

1 生死の天秤シグナルを制御する天然基盤小分子の創成

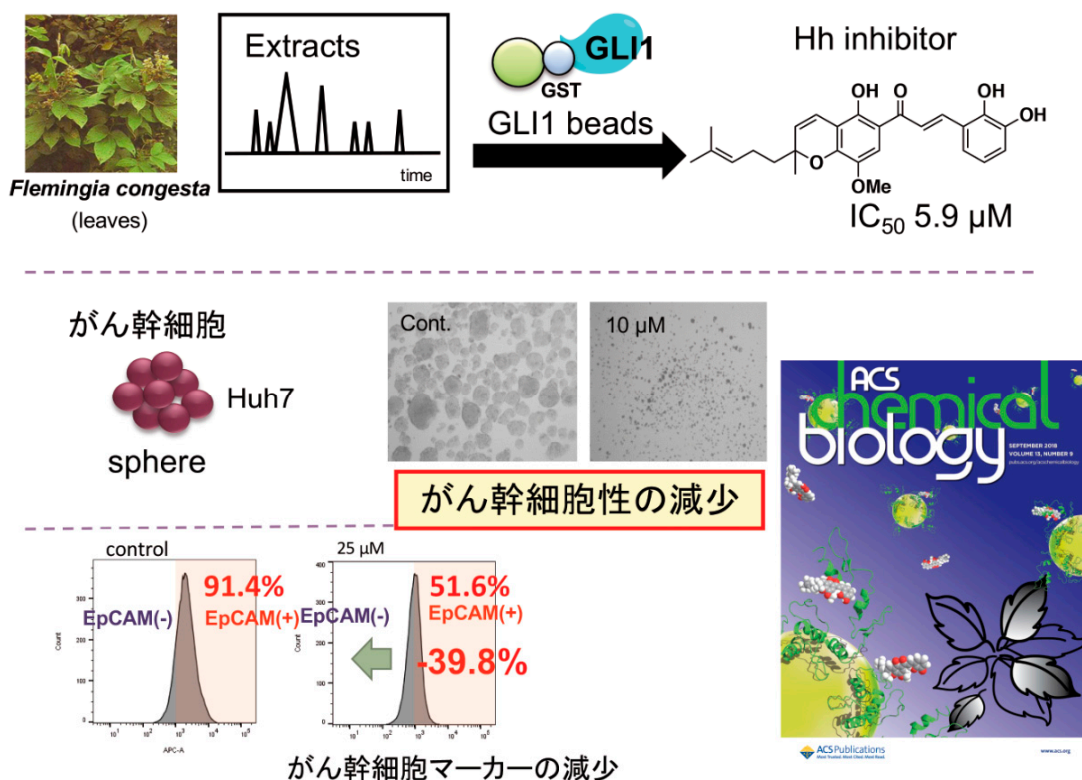
荒井 緑

【目的】 生体の健常状態か疾病状態かは、生命の鍵となるシグナル伝達が正常か異常かに作用される場合が多々ある。たとえば発生・分化で重要なシグナルがコンポーネントの変異等によりひとたび異常亢進するとがんにつながる。本研究では生死のバランスを保っている重要シグナル（ヘッジホッグ（Hh）シグナル、Notch-Hes シグナル、ウィント（Wnt）シグナル等、以下、生死の天秤シグナルと呼ぶ）を標的とし、その効果的モジュレーターを研究室独自の植物、放線菌エキストラライブラリーおよび千葉化合物ライブラリーから見いだすことを目的とする。手法としては、我々が近年構築し提唱してきた「タンパク質ビーズ」を用いる「標的タンパク質指向型単離法」および独自に構築した細胞レポーターアッセイを用いる。得られた化合物の細胞に及ぼす影響を精査し、新規な医薬リード候補を創出することを目的とする。

【方法】 「標的タンパク質指向型単離法」は、「タンパク質ビーズ」を用いて天然素材のエキス（天然物の混合物）から標的タンパク質に結合する化合物を迅速に見いだす方法である。今回、我々は、生死の天秤シグナルの一つであるヘッジホッグ（Hh）シグナルの阻害剤を見いだすことを目的とし、その転写因子である glioma-associated oncogene (GLI1) を担持した GLI1 ビーズを用いて、GLI1 を直接的に阻害する天然物を探索した。

【結果】 GLI1 ビーズを用いる「標的タンパク質指向型単離法」を構築し、天然物エキスをスクリーニングしたところ、バングラデシュ植物 *Flemingia congesta* のエキスがヒットした。本エキスより、GLI1 に結合し、Hh シグナルを阻害するカルコン型天然物 5 種の単離に成功した。そのうち化合物 **2** は、Hh シグナルが異常亢進している種々がん細胞に対し、細胞毒性を示した。また化合物 **2** は GLI1 と DNA の複合体形成を阻害した。さらに化合物 **2** は、Hh シグナル関連タンパク質である B cell-specific Moloney murine leukemia virus insertion region 1 (BMI1) のタンパク質量を減少させ、肝がん細胞（Huh 7）の「がん幹細胞性」を著しく減少させた。このように今回、GLI1 ビーズを用いる「標的タンパク質指向型単離法」により、「がん幹細胞性」を減少させる Hh 阻害剤を見いだすことに成功した。

標的タンパク質指向型天然物単離によるヘッジホッグシグナル阻害剤の探索



2 選択的オートファジーの自在制御による疾患抑制

有本 博一

【目的】これまでの低分子量医薬品は、酵素や受容体を主な標的分子としてきた。これらは基質となる化合物と結合する狭い領域を有しているため、低分子で「ふた」をすると「阻害薬」などが創製できる。このアプローチの課題はヒトプロテオームのうち酵素機能を持つものが2割程度に過ぎないことである。足場タンパク質などとして働く大半のタンパク質は、低分子創薬の対象から外れている。

阻害作用に大きく依存した従来型低分子医薬の欠点を克服するアイデアとして、標的タンパク質を選択分解する手法がある。本研究では、選択的オートファジーを利用して標的を分解する新手法 AUTAC の確立に取り組んだ。

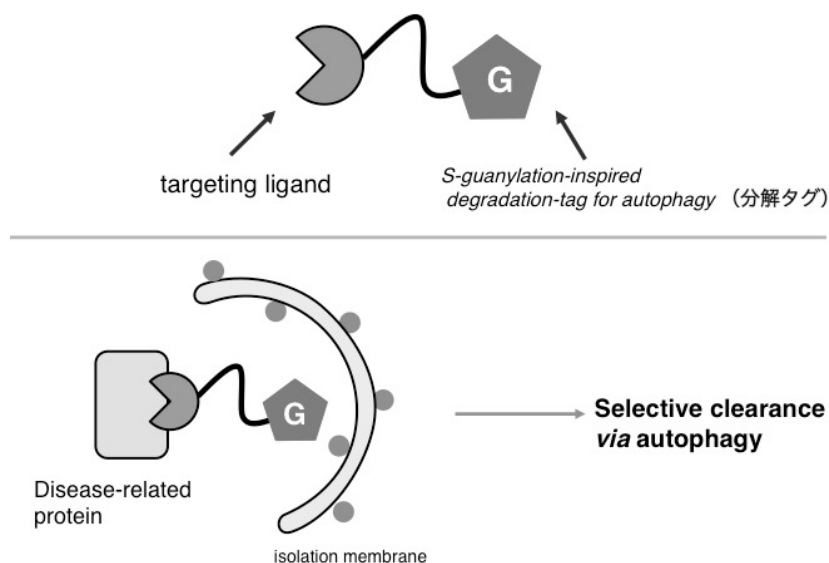
【方法】S-グアニル化は、A 群レンサ球菌の選択的オートファジーにおいて分解対象を示すタグとして働くことが示唆されている（伊藤、斎藤ら Mol Cell 2013）。そこで、S-グアニル化構造を元にして設計した分解タグと、疾患標的分子に結合する標的化リガンドをリンカーで結合して各種のキメラ分子（AUTAC）を合成した。助成期間においては、主に機能不全ミトコンドリアの分解を行う AUTAC に重点を置いて検討した。ミトコンドリアの分解は、生細胞イメージング、およびミトコンドリア局在タンパク質（Tom20、Hsp60、UQCRC1 など）のレベル変化を免疫ブロット法で評価した。

【結果】ミトコンドリア外膜に分解タグを導入するため、ミトコンドリア局在タンパク質と EGFP-ハロタグとの融合タンパク質（mito-HT）を HeLa 細胞に一過性発現させた。分解タグを含むハロタグリガンドを投与すると、ミトコンドリア周囲にユビキチン鎖の集積が観測された。しかしながら、健常な HeLa 細胞では、このときミトコンドリアタンパク質レベルは減少しなかった。一方、OPA1 遺伝子の RNAi や CCCP 処理によってミトコンドリアが断片化する条件に置くとミトコンドリアタンパク質の顕著な減少が確認された。続いて、ハロタグ法を用いずにミトコンドリア外膜に直接分解タグを送達できる AUTAC4 を開発し、同様なミトコンドリア分解の結果を得た。

21 番染色体のトリソミーであるダウン症由来繊維芽細胞では、ミトコンドリア機能が低下していることが報告されている（A. Izzo ら Hum Mol Genet 2017）。

ダウン症由来 Detroit532 細胞にハロタグ法もしくは AUTAC4 を用いて分解タグを導入したところ、断片化したミトコンドリアの排除が進み、ミトコンドリア長、ネットワーク数、ATP 産生量が改善した。

Autophagy-targeting chimera (AUTAC)



3 多官能光学活性有機ホウ素化合物の創薬志向新合成法

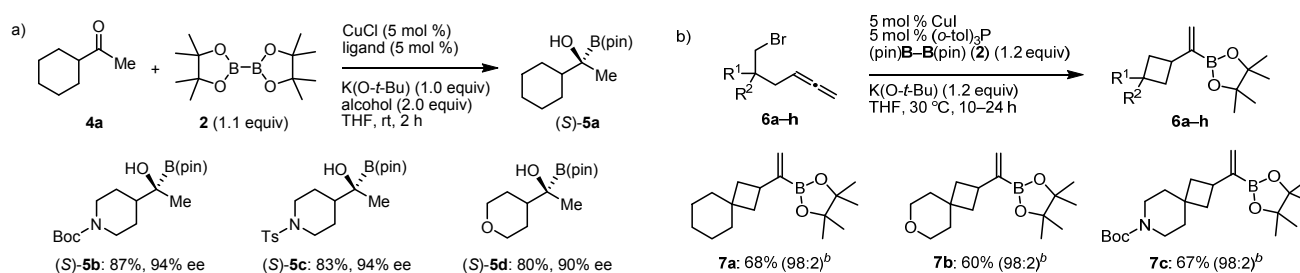
伊藤 肇

【目的】本報告者らは、2000年に銅(I)錯体を触媒とするジボロンによるホウ素化反応を世界に先駆けて報告したのち、これを光学活性アリルホウ素化合物の立体選択的合成、光学活性有機ホウ素化合物のエナンチオ選択的合成の開発へと発展させた。銅(I)触媒を用いるホウ素化法は、高い立体選択性、エナンチオ選択性をもち、かつ官能基許容性に優れているため、旧来の有機ホウ素化合物の合成法が持つ欠点を大幅に改善できる点が特長であり、現在では報告者をはじめ世界中で多くの研究者がこの手法をベースにした有機ホウ素化合物の合成方法の研究を行っている。本研究は、報告者らが最近見つけ出した新しい知見をもとに、以下の2つの方向性で、新しい光学活性ホウ素化合物の新規合成方法を開発する。「1. 三級不斉をもつ直鎖型光学活性 α -ヘテロアルキルホウ素化合物の不斉合成法確立 2. 芳香族化合物の不斉脱芳香族ホウ素化によるヘテロ環状光学活性有機ホウ素化合物の合成」である。これまでの知見を活用して、より幅広い芳香族化合物の脱芳香族ホウ素化を達成し、これまでに合成が不可能であった、3. 光学活性有機ホウ素化合物の合成方法を確立する。

【方法】1. 光学活性銅(I)触媒による脂肪族ケトンのエナンチオ選択的ホウ素化について、銅(I)/キラル*N*-複素環カルベン錯体触媒の存在下、反応最適化を行った。2. 銅(I)触媒によるインドール類の脱芳香族アルキルホウ素化について、indole-2-carboxylateの銅(I)触媒位置選択的及びジアステロ選択的反応の最適化を行った。3. 銅(I)触媒存在下、ハロゲン化アルキル部分を有する末端アレンの最初の銅(I)触媒分子内アルキルボレート化を検討した。

【結果】1. 反応最適化の結果、CuCl および *trans*-1-amino-2-indanol (*S,S*)-**L1** NHC 塩の存在下、(5 mol %)、KOtBu (1.0 equiv)、と MeOH (2.0 equiv) をプロトン源として、1-cyclohexylethan-1-one が THF 中でジボロンと反応し、目的とする光学活性化化合物を高収率、高選択性で与えることを見出した (下図 a、96% yield, 92% ee)。2. 最適化実験の結果、Boc で保護された methyl indole-2-carboxylate、bis(pinacolato)diboron 及びアルキル求電子剤として MeOTs を、塩基として K(O-*t*-Bu) の存在下、10 mol% の CuCl と NHC 配位子である IC_y を触媒として、THF 中、30°C で反応を行ったところ、目的のカルボニル化合物を高収率、高選択性で得た (60%、dr = 90 : 10)。3. ハロゲン化アルキル部分を有する末端アレンの最初の銅(I)触媒分子内アルキルボレート化を検討した。配位子として (σ -tol)₃P を用いた場合、反応は IA を経るパスが優先して起こり、四員環生成物のみが選択的に得られた (下図 b)。

光学活性銅(I)触媒による脂肪族ケトンのエナンチオ選択的ホウ素化および
ハロゲン基をもつアレン化合物の銅(I)触媒による環化ホウ素化反応

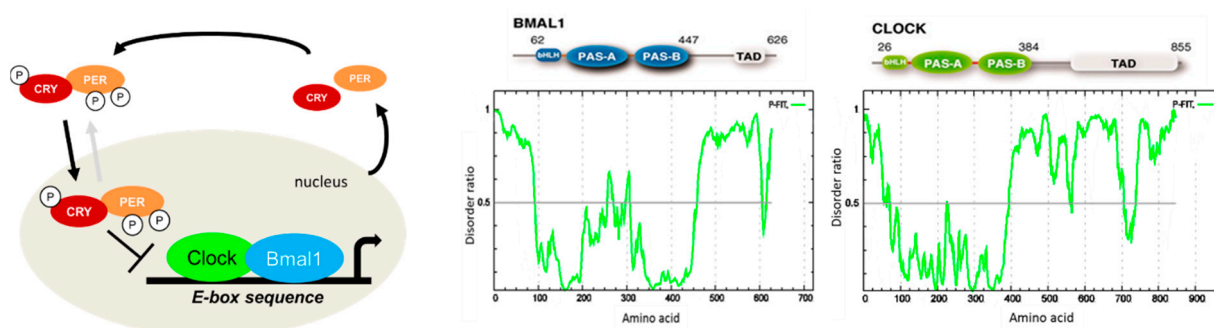


【目的】天然変性たんぱく質 (intrinsically disordered proteins: IDPs) は、細胞内の信号伝達系の調節や過渡的な反応場を形成する液-液相分離構造の構築において中心的な役割を担っており、詳細な機能の解明が求められている。しかし構造情報が乏しく実験的な評価系が未だ確立されていない IDPs の化学生物学的な研究はほとんど行われていない。概日時計転写因子 Bmal1 および Clock は全長の 30%以上が非構造領域を持つ IDPs として知られており、ヘテロ 2 量体を形成し E-box 配列 DNA に結合し概日リズム遺伝子産物 CRY、PER の発現を誘導するたんぱく質である。Bmal1/Clock のヘテロ 2 量体形成を調節する化合物は概日時計機構解明の分子プローブあるいは不眠症等の創薬に向けたリードとして有用と考えられる。本研究では、Bmal1 および Clock の IDP モデルたんぱく質を設計し、両者のヘテロ 2 量体形成を分光学的手法により簡便に検出可能とする、*in vitro* たんぱく質間相互作用 (PPI) 評価系の構築を目指した。さらにこの検出系を基盤とする HTS ライブラリスクリーニングを実施し、Bmal1/Clock 相互作用阻害剤を見出すことを目的とした。

【方法】シミュレーションに基づき Bmal1/Clock の PPIs には直接関与しないと予想した転写活性化領域 (TAD) を両者から除去し、それぞれの N 末端にチオレドキシンおよび His タグを付与した遺伝子組み換え型モデルたんぱく質を設計した。大腸菌を各々のプラスミドで形質転換し、発現誘導、超音波破碎、沈殿の取得、尿素変性、Ni-NTA カラム精製、及び透析による再構成を経て精製した。得られたたんぱく質のヘテロ 2 量体形成は、5'-FAM 修飾 E-Box 配列含有 オリゴ DNA 断片への 2 量体依存的な結合に基づく蛍光偏光強度変化を指標として評価した。この *in vitro* 評価系を用いて約 1,800 個の芳香族系化合物ライブラリのスクリーニングを実施し、蛍光偏光強度の増加を有意に阻害する化合物を探索した。得られたヒット化合物について濃度依存的な阻害活性および選択性を評価した。

【結果】種々の実験条件の最適化を経て遺伝子組み換え型 Bmal1 及び Clock モデルたんぱく質の発現・精製を達成した。蛍光偏光滴定実験の結果、Bmal1/Clock 両者のヘテロ二量体と E-box オリゴ dsDNA が 1 : 1 複合体を形成し、その際の解離定数は文献値と一致することを確認した。この *in vitro* 評価系に基づいた 96 well フォーマット HTS スクリーニングを 1,780 個の芳香環化合物ライブラリに対して実施し、4 種類の基本骨格を有する化合物群に分類される 27 個のヒット化合物を見出した。そのうち化合物 1 について精査した結果、濃度応答的な阻害活性を示すことを明らかにし、また zinc finger の GC Box 結合試験を用いた評価によりその活性は Bmal1/Clock 選択的であることが示唆された。以上より本研究では概日時計転写因子の IDP モデルたんぱく質を用いた分光学的 *in vitro* PPI 評価系を確立し、Bmal1/Clock PPI に選択的な阻害活性を示す低分子化合物を見出すことに成功した。

天然変性たんぱく質概日時計機構転写因子 Bmal1 および Clock



5 運動が骨格筋の恒常性を維持する分子基盤の解明

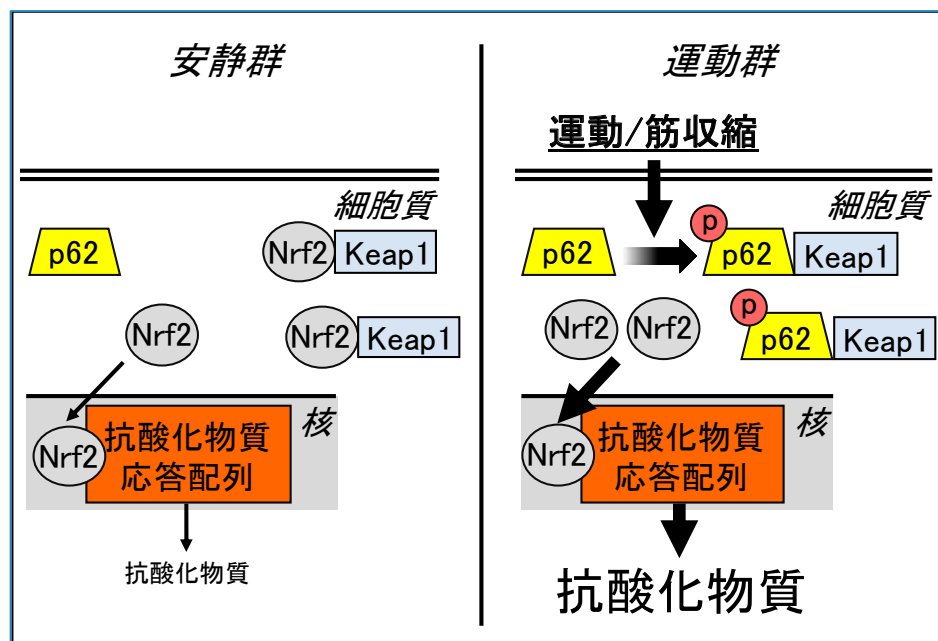
奥津 光晴

【目的】癌や糖尿病などの慢性疾患や加齢は、筋量の減少（筋萎縮）を引き起こす。筋萎縮は、疾患治療の障害やロコモティブ症候群を発症することから、筋萎縮の発症と予防の分子メカニズムを解明し、正常な骨格筋量を維持することは重要な課題である。疾患や加齢による筋萎縮は酸化ストレスの増大が要因であることから、抗酸化物質を増加することで筋萎縮の抑制が期待できる。運動は筋萎縮を抑制するが、これは筋収縮による抗酸化物質の増加が一因である。しかしながら、この分子メカニズムは未だ不明な点が多い。本研究では、運動が骨格筋の抗酸化物質の産生を増加する分子メカニズムの解明を目的とした。

【方法】本研究では野生型マウスと筋特異的に *p62* を欠損したマウス（*p62mKO*）を使用した。野生型マウスの検討では、C57BL/6 マウスに4週間の自発走行運動を実施させた後に骨格筋を採取し、抗酸化物質の産生に重要な *Nrf2* の発現、*Nrf2* の核内移行、抗酸化物質応答配列への結合と *Nrf2* の核内移行を制御する *p62* の発現とリン酸化を評価した。*Nrf2*、*p62*、リン酸化 *p62* と抗酸化物質はウェスタンブロット、*Nrf2* の核内移行は骨格筋から抽出した核分画をウェスタンブロット、抗酸化物質応答配列への結合は TransAM キットを使用した。一方、*p62mKO* マウスの検討では、*p62mKO* マウスを *cre-loxp* システムを用いて作成し、4週間の自発走行運動を実施させた後に骨格筋を採取して抗酸化物質の変動を同腹子の野生型マウスと比較した。

【結果】C57BL/6 マウスに自発走行運動を実施させると、抗酸化物質の増加、*Nrf2* の増加、*Nrf2* の核内移行の促進と *Nrf2* の抗酸化物質応答配列への結合の増加が観察された。*p62* の増加と *p62* のリン酸化は運動により促進したが、この変動は遅筋では観察されるが速筋では観察されなかった。また *p62mKO* マウスを作成し解析すると、*Nrf2* 欠損マウスで顕著に低下する抗酸化物質である NAD(P)H-quinone oxidoreductase 1 (NQO1) が *p62mKO* マウスでも同様に低下した。さらに *p62mKO* マウスに自発走行運動を実施させると、野生型マウスの遅筋で増加する CuZnSOD や EcSOD は、*p62mKO* マウスでは増加が抑制された。以上の結果をまとめると、運動が遅筋の抗酸化物質を増加するメカニズムは、*p62* のリン酸化による *Nrf2* の核内移行の促進が関与することを示唆している。

運動が骨格筋の抗酸化物質を増加する分子経路

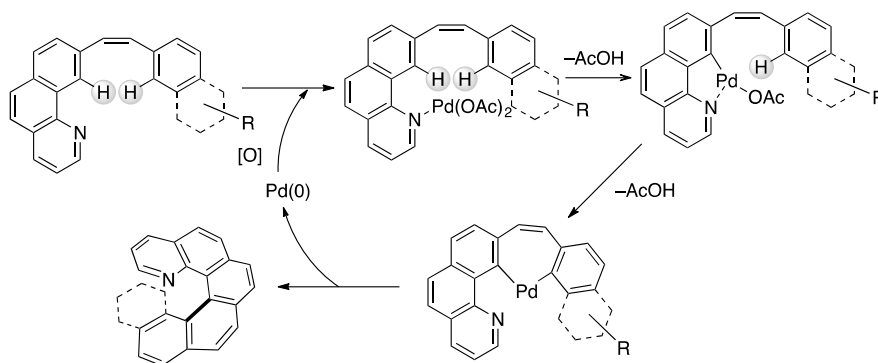


【目的】 医農薬および機能性材料分野における光学活性有機化合物の高い需要を背景に、「キラルテクノロジー」が注目されており、近年では不斉有機分子触媒がこの技術を支える大きな新潮流となっている。しかし、遷移金属触媒を用いる従来の不斉触媒と比較した場合、これまでに報告されている不斉有機分子触媒の種類はまだまだ限られているのが現状である。従って、新たな不斉プラットフォームを活用した不斉有機触媒の開拓がこの領域のさらなる進展に必要不可欠である。本研究では、「らせん不斉を有するアザヘリセン」を不斉プラットフォームとする有機触媒の迅速合成を行う。これらのらせん状の不斉を有するアザヘリセンは、不斉反応を行うにあたり、効果的な不斉場を提供できる分子骨格を有しているが、未だに煩雑な工程を経て合成されていたため有機分子触媒への応用研究は軸不斉ビアリールのそれに比べて大いに立ち後れた状態にあった。そこで、本研究課題ではまず様々なアザヘリセンの迅速合成法を開発し、さらにそのアザヘリセンを活用して最終的には触媒や配位子として利用可能な分子の創製を行う。特に、分子変換の特性を活かし、 π 拡張アザヘリセンの創製と不斉配位子としての応用の可能性について明らかにすることを目的としている。

【方法】 基質の予備的な活性化を必要としない C-H 結合の直接的な変換反応は、最も効率のよい方法として活発に研究が行われている。本研究課題のアザヘリセンを迅速に合成するにあたり、Sanford らによって報告された酢酸パラジウム(II)触媒を用いたベンゾ [h] キノリンとアレーン類との脱水素型カップリング反応に着目した。この反応ではベンゾ [h] キノリンの窒素原子が配向基として働き、ベンゾ [h] キノリンの 10 位のにアリール基が導入される。そこで、この反応をベンゾキノリンとアリール基とを互いに (Z)-オレフィンで架橋した (Z)-スチルベン型化合物における分子内反応へと適用することにより、アザヘリセン類の迅速な合成法になると考えた。具体的には、ベンゾキノリンを配向基とした Pd 触媒による C-H 結合の切断と、続く近傍の C-H 結合の切断を分子内で行なうことで、アザヘリセン類を簡便に合成できると考え、検討を行った (スキーム 1)。

【結果】 Pd 触媒を用いた分子内脱水素型 C-H カップリング反応において、最適化された反応条件を用いることにより、電子供与性、あるいは電子求引性の置換基の有無に関わらず、脱水素型カップリング反応が進行し、対応する置換ヘリセン類を 87~94% の高い収率で得ることに成功した。さらに、より高次なヘリセンであるアザ [6] ヘリセンについても、基質を調製することにより 90% の高い収率で合成することに成功した。また得られたアザヘリセンの窒素原子を酸化したアザヘリセン N-オキシドとすることにより、ルイス塩基触媒へと変換することもできた。また、より π 拡張された分子で 2 回の脱水素型カップリング反応を行うことにより、S 字型ジアザヘリセンを 90% という非常に高い収率で得ることに成功した。この S 字型ジアザヘリセンは、2 つのヘリセン部位が同じ側を向いた DL 体が選択的に得られており、キラルカラムによって光学分割することも可能である。さらに、2 つ窒素原子がヘリセン内部に位置しているため、不斉触媒反応の配位子として活用することも期待される。

スキーム 1 分子内脱水素型 C-H カップリング反応を活用したアザヘリセン類の合成法



7 舌診所見の定量化のためのセンサーシステム開発

川鍋 伊晃

【目的】漢方医学の診察において舌診は重要な要素であるが、舌の色と形などの性状は主に肉眼で判断されており主観の影響が大きく、また、判断の基準となるようなツールもなかったため、科学的な議論や研究を行う上で課題があった。舌診に関する情報を信頼性のある形で客観化できれば、1800年以上の歴史を持つ伝統医学の経験知・暗黙知の形式知化が可能となり、臨床エビデンスの構築のみならずセルフヘルスケアや予防医学への応用も期待できる。ストレスやうつ、超高齢化社会などが社会的に問題となる中で、西洋医学とは異なる新たな評価軸により健康度が確認できることは、病気になる前の「未病」の段階でのアプローチなどに繋がるなど、社会的にも有益であると考えられる。そこで、舌診情報の定量化を可能とし、健康サポートに寄与するシステムの構築を目指す。

【方法】舌の色や形に関する情報をデジタル舌画像とともに集積し、それらの定量化に必要な要素について、現在までの研究を基にさらなる検討を加える。また、開発中のセンサーシステムプロトタイプをベースに、ハードウェアならびにソフトウェアの改良を行う。その上で、実証実験による検証や研究成果の論文投稿、研究内容の紹介なども行う。

1. ハードウェア

開発中のプロトタイプをベースに、光源環境を維持したまま、排気機構の造設および表面の抗菌加工などの改良を行う。実証実験用に2台複製し、ノートパソコン以外にタブレット端末を用いたユーザビリティの検証も行う。舌色校正用の専用カラーチャートに関して、色再現性の向上のため印刷媒体を変更など、精度向上に向けた検証を進める。

2. ソフトウェア

開発中の舌画像解析アルゴリズムの課題克服に向けた作業を進める。具体的には、舌領域を抽出するクリッピングと舌体部の裂溝（皺裂）や舌辺縁部の凹凸（歯痕）の検出アルゴリズムの改良を進め、ハードウェアに実装する。また、スマートフォンやクラウド連携についても検討を進める。

3. 実証実験

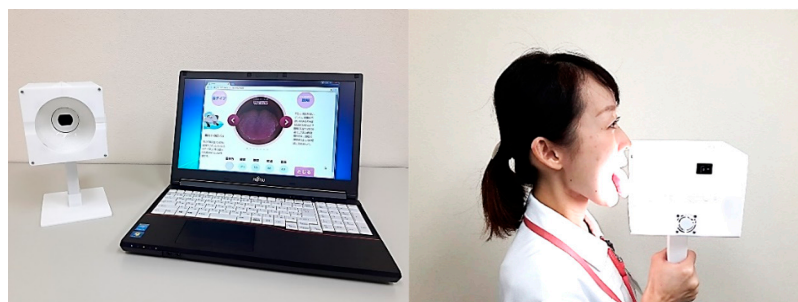
上記システムの改良を経た後、新たなヘルスケアシステムの構築・社会実装を目標に実証実験の場を設け、一般の方に対する認知拡大を図ると共にユーザビリティの検証を行う。

4. 論文投稿

現在まで集積した臨床データに関して、舌色と臨床情報との相関を検討した結果を論文として国際誌へ投稿する。また、本研究活動に関する内容を広く発信するため研究内容の紹介に努める。

【結果】上記ハードウェアおよびソフトウェアの改良の結果、下図に示すセンサーシステムプロトタイプを完成させた。ハードウェアの構造改良により光源環境性能を維持しつつ衛生面が改善され、また、ソフトウェアの改良により従来の課題であった複数の画像処理エラーを大幅に改良できた。実証実験では500名以上の一般人にプロトタイプを体験いただき、長時間かつ複数回の連続撮影などの実用に耐えうることが確認でき、ユーザビリティの検証から改良すべき課題も見出せ、広く認知を図ることができた。また、本研究の成果をまとめた論文が国際誌にアクセプトされ、活動内容についても科学紹介雑誌に記事が掲載された。

舌診センサーシステムプロトタイプ



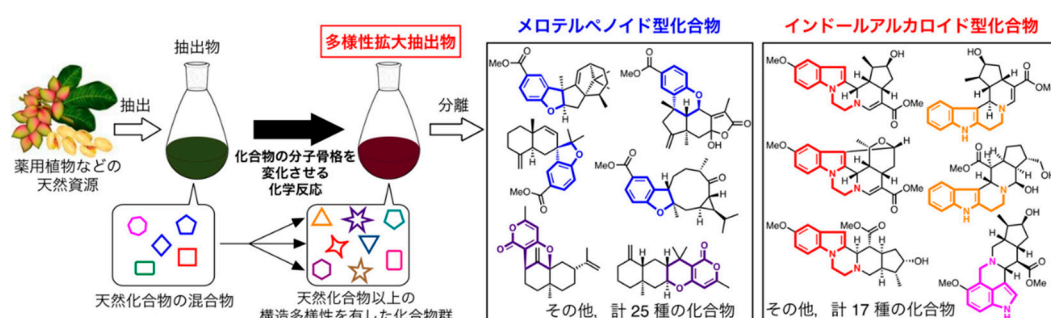
【目的】天然物化学は、新規な母核構造を有し、特異な生物活性を示す多種多様な天然由来化合物を、生命科学・創薬科学など様々な分野に対して提供するという重要な役割を担っている。このような有用性をもたらしている要因としてはいくつか挙げられるが、最も大きい要因は、化合物の高度な構造多様性であると考えられている。しかし、天然由来化合物の探索は古くから行われており、多様な新規骨格を含む化合物の発見は困難になりつつあるのが現状である。したがって、今後も創薬等に重要な役割を果たしていくためには、多様な構造を有した天然化合物または天然化合物類縁体を継続的に得る手法を開発しなければならない。本研究は、我々が独自に開発した手法である「多様性拡大抽出物」を活用することで、高度な構造多様性と生物活性を示す可能性の高い化学構造とを併せ持つ創薬を指向した天然化合物類縁体ライブラリーの構築を目的とする。

【方法】本研究の基盤となる技術である「多様性拡大抽出物」は、従来の天然由来化合物の探索研究に多様性指向型合成の考え方を組み合わせたものである。すなわち、天然資源の抽出物に対して直接、化合物の分子骨格を変化させるような反応をおこなうことで、それに含まれる化合物の構造多様性が一層高められた多様性拡大抽出物が得られる。これをカラムクロマトグラフィ等によって各化合物を分離・精製することで、構造多様性の高い化合物ライブラリーを取得することができる、といった手法である。実際に創薬等に役立つような化合物ライブラリーとするためには、単に分子骨格が新しいというだけでは不十分であることから、本研究では、これまでに知られている生物活性天然化合物や医薬品の構造を参考にし、メロテルペノイド型化合物およびモノテルペンインドールアルカロイド型化合物ライブラリーの構築を行った。

【結果】ガジュツ、ハマスゲ、オケラなどのセスキテルペン類を多く含む薬用植物を原料として、これらの抽出物に対して DIBAL を作用させて、含まれる化合物中のケトンを第二級アルコールへと還元した。つづいて光延反応によって σ ヨードフェノール誘導体あるいはヒドロキシヨードピロン誘導体とエーテル結合させ、さらに溝呂木・Heck 反応をおこなうことで環状エーテル構造を形成し多様性拡大抽出物とした。これを分離することで、非天然型骨格を有するメロテルペノイド類縁体 25 種を得た。得られたメロテルペノイド型化合物群について広範な生物活性スクリーニングを行った結果、骨粗鬆症などの治療薬のシーズとなり得る破骨細胞分化抑制作用を有する化合物を見出した。一方、イリドイド配糖体を多く含む薬用植物であるサンシュユおよびクチナシのメタノール抽出物を脱グルコシド化し、さらにビスマストリフラートを触媒として芳香族非天然アミンをそれぞれ作用させることで、Pictet-Spengler 型に縮合した化合物群を含む多様性拡大抽出物を得た。これらを分離することで非天然型インドールアルカロイド型化合物 17 種を得た。得られた化合物はいずれも、これまで天然化合物としても合成化合物としても報告例の無い 6 種の新規五環式あるいは多環式骨格を含んでいた。

以上のように、多様性拡大抽出物を用いることで、薬用植物などの容易に入手可能な天然資源から、新規骨格を有する多くの天然化合物類縁体を得ることができた。引き続き、創薬研究に十分利用できる構造多様性の高い化合物ライブラリーの構築を進めていきたい。

多様性拡大抽出物より得られたメロテルペノイド型化合物およびインドールアルカロイド型化合物



9 疲労による健康障害の分子機構に基づく予防法の開発

近藤 一博

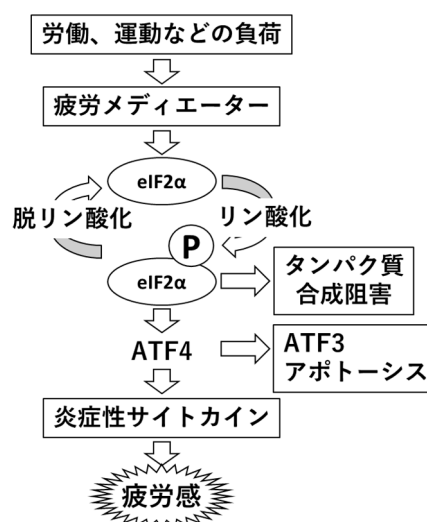
【目的】疲労は労働力の低下を招くだけでなく、うつ病などの重篤な疾患の原因にもなるため、現代社会の大きな問題となっている。疲労という現象は、心身の消耗を脳に疲労感として認識させる生体アラームである。疲労感の発生に炎症性サイトカインが関係することは知られていたが、どのように炎症性サイトカインが誘導されるかなど、疲労のメカニズムはながらく不明であった。我々はウイルス学的研究から、疲労と真核生物翻訳開始因子 2α (eIF2 α) のリン酸化が関係することを見いだしていた。本研究では、この成果を利用して、疲労現象における心身の消耗、すなわち脳や心臓などの臓器や組織の機能低下や、疲労感の発生機構を解明することで、疲労回復や疲労による疾患の予防に寄与する研究基盤を得ることを目的とした。

【方法】労働や運動によって生じる生理的疲労を再現するマウスモデルを作製し、各種臓器における疲労に関わるシグナル伝達機構を検討した。シグナル伝達機構の候補の探索は、eIF2 α のリン酸化や炎症性サイトカインの誘導に関係する因子を中心に、各種の臓器における mRNA 発現を Real-time PCR 法で定量することによって行った。候補となったシグナル伝達機構に関する阻害剤を利用することで、疲労による臓器・組織の消耗や、疲労感の発生に関する分子機構を確定した。

【結果】生理的疲労を生じる負荷によって、脳、心臓、肝臓、腎臓、筋肉といった各種の臓器や組織において、eIF2 α のリン酸化が共通に観察された。このことは、疲労に関係する臓器の消耗や機能低下に eIF2 α のリン酸化が広く関係することを示すものと考えられる。一方、eIF2 α のリン酸化によって誘導される炎症性サイトカインに関しては、肝臓におけるインターロイキン 1β (IL-1 β) の産生が他の臓器に比して圧倒的に多かった。このことは、疲労感の発生には、肝臓における eIF2 α のリン酸化が主要な働きをしていることを示唆する。

疲労を軽減する方法を開発するために、労働や運動の負荷と eIF2 α のリン酸化を結びつける疲労メディエーターの同定と抑制法の検討を行った。この結果、酸化ストレスを抑制すると、肝臓における eIF2 α リン酸化や IL-1 β 産生が抑制されることが分かった。興味深いことに、酸化ストレス抑制剤は、脳、心臓、腎臓、筋肉といった臓器・組織における eIF2 α リン酸化は抑制しなかった。このことは、酸化ストレスの抑制は、生体アラームである疲労感だけを抑制してしまい、疲労現象にともなう心身の消耗を見過ごすことになる可能性があることを示している。実際、抗酸化作用のあるエナジードリンクやカフェインの過剰摂取による健康障害が、最近大きな問題となっている。本研究の結果は、抗疲労物質の開発や使用に関する問題点を浮き彫りにするものであり、疲労の予防・回復法の開発の重要な研究基盤となると考えられる。

疲労と疲労回復の分子機構

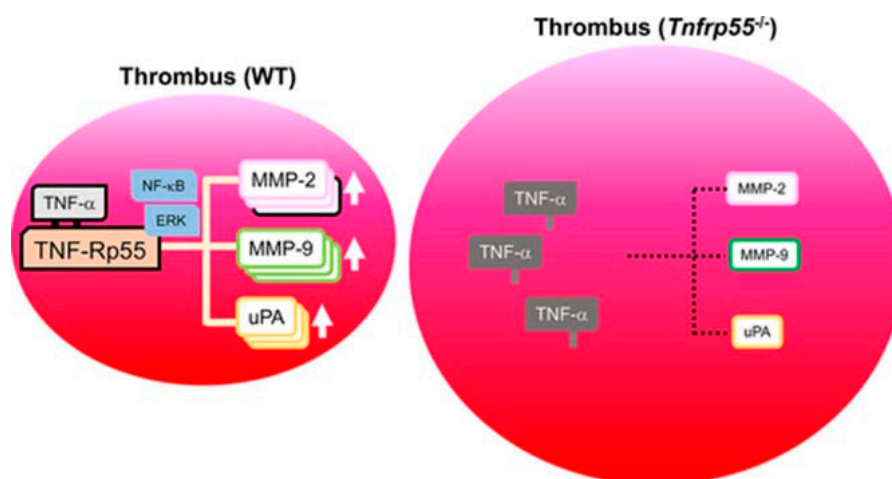


【目的】突然死とは、発症後 24 時間以内の自然死（内因死）と定義され、我が国における突然死の発生頻度は、全自然死の 14～17% にのぼる。突然死は、いつでもどこでも発生し、また死亡したという事実でしか把握できず、その殆どが法医学解剖により死因が究明される。肺動脈血栓塞栓症は、従来、欧米で多い疾患とされていたが、我が国においても食生活の変化に伴い増加傾向にあり、さらにエコノミークラス症候群や地震被災地で長期車内生活が要因となった肺動脈血栓塞栓症の死亡例が報告されたことから注目されるようになった。肺動脈血栓塞栓症の塞栓子の 90% 以上は、下肢および骨盤内の深部静脈血栓に由来するものである。深部静脈血栓形成・融解機序は、血栓内への炎症細胞浸潤と血管内皮細胞のサイトカインを通じたクロストークが重要とされている。そこで、炎症性サイトカインの一つ、腫瘍壊死因子（Tumor necrosis factor- α 、TNF- α ）が深部静脈血栓形成・融解にどのように関与しているのかの分子メカニズムを解析する。

【方法】TNF- α のレセプターである I 型 TNF レセプター（TNFRp55）遺伝子欠損マウス（*TNFRp55*KO）マウスと野生型マウス（WT）マウスを用いて、全身麻酔下で開腹し、実体顕微鏡観察下にて下大静脈（IVC）を結紮し、静脈血栓を作成する。その後、血栓を採取し、重量及び長さを測定し、さらに免疫組織化学的解析および分子生物学的解析を行う。

【結果】血栓重量は WT マウスより *TNFRp55* KO マウスで大きく、IVC の血流量は WT マウスでより短期間で回復した。しかしながら、血栓内の好中球およびマクロファージ数は両者で変化は認められなかった。一方、血栓融解の促進因子であるマトリックスメタロプロテアーゼ 2（matrix metalloproteinase 2、MMP-2）、MMP-9 およびウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター（urokinase-type plasminogen activator、PLAU）の遺伝子発現は、*TNFRp55* KO マウスにおいて WT マウスよりも有意に減弱していた。以上の *TNFRp55* 遺伝子欠損では、血栓中における MMP-2、MMP-9 および PLAU 発現を抑制することによって血栓融解を阻害すると考えられ、TNF- α ・TNFRp55 が、深部静脈血栓治療の有用な分子標的となり得ることが示唆された。

血栓形成における TNF- α ・TNFRp55 の役割



【目的】自然免疫は病原微生物感染に対する重要な生体防御のシステムである。病原微生物に対しいち早くその侵入を察知し、炎症反応を引き起こす。微生物表面にはPAMP (Pathogen-associated molecular pattern) と名付けられた微生物に特徴的な構造の繰り返し (分子パターン) が存在し、それを宿主のセンサーが認識する。自然免疫における代表的な病原体センサーとして膜結合型の Toll 様受容体 (TLR : Toll-like receptor) が知られている。TLR は抗ウイルス薬、免疫賦活剤、アジュバント、自己免疫疾患治療薬など様々な疾患・症状の創薬ターゲットである。本研究ではTLRの活性制御機構の解明を目的として以下の2つの課題に取り組む。

1. 一本鎖核酸を認識する TLR8 に働くアンタゴニストの作用機序の解明

TLR8の活性化を抑制するアンタゴニストは自己免疫疾患治療薬 (全身性エリテマトーデスなど) として期待されているものの、まだ上市されたものはない。本研究では TLR8 に対するアンタゴニストの阻害活性作用機序を構造科学的な見地から直接的に証明し、物理化学的な測定手法を用いて結合定数を求めるなど定量的に評価する。

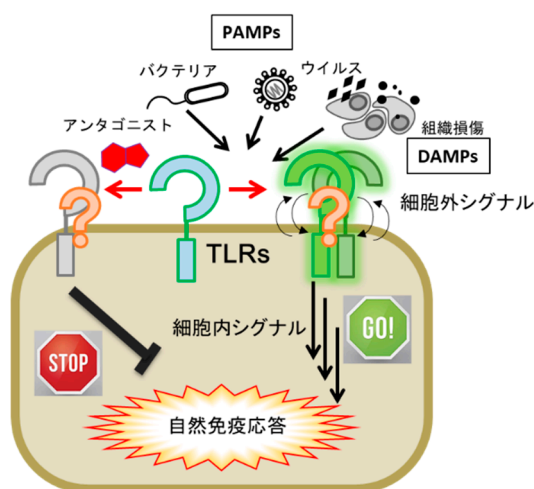
2. 全体構造を通した TLR の活性制御機構の解明

これまでの TLR の構造情報は細胞外ドメインあるいは細胞内ドメインに限られており、全体構造を通した構造解析は成功していない。本研究では全長 TLR の極低温電子顕微鏡による単粒子解析構造解析を目指す。

【方法】1. TLR8 の細胞外ドメインとアンタゴニストとの複合体の結晶化、物理化学的測定 : TLR8 に対するアンタゴニストと純化した TLR8 の細胞外ドメインタンパク質を用いてアンタゴニストとの結合定数を等温滴定カロリーメトリー (ITC) 法により求めた。さらにはタンパク質-アンタゴニストとの結晶化を行い X 線結晶構造解析により阻害活性機構を原子レベルで解明することに成功した。2. TLR 全長のサンプル調製、構造決定 : 比較的良好な性状を示した TLR3 を対象に、種々の界面活性剤を試し可溶性が高くかつ、リガンドへの応答性を指標に最も適した界面活性剤を選択した。さらにナノディスクに組み込み、電子顕微鏡による観察を行った。

【結果】TLR8 と阻害剤との複合体の X 線結晶構造解析により、阻害剤による TLR8 の応答阻害機構を明らかにした。今回解析した阻害剤は、TLR8 のリガンド非結合型の二量体構造で形成されたポケットに結合して構造を安定化し、アンタゴニストによる活性型二量体への再構成を防いで阻害効果を発揮することが判明した。全長の構造解析では比較的良好な性状を示した TLR3 を選択した。全長 TLR3 を含むナノディスクを形成させ負染色した後電子顕微鏡観察を行い、ナノディスクに取り込まれた TLR3 を確認した。

TLR シグナリング



【目的】タンパク質の細胞内局在を人為的に制御する技術は、細胞機能の作用機序解明や人工操作のための強力なツールとなる。これまでに、タンパク質の局在を化合物で制御する幾つかのケミカルツールが開発されてきた。しかし、既存の手法はいずれも、標的タンパク質を改変したものを細胞内に過剰発現させ、その外来発現タンパク質の局在を化合物で動かすものであった。そこで本研究では、細胞内の任意の内在性タンパク質の局在を化合物で制御可能な新しい基盤技術の開発に取り組んだ。

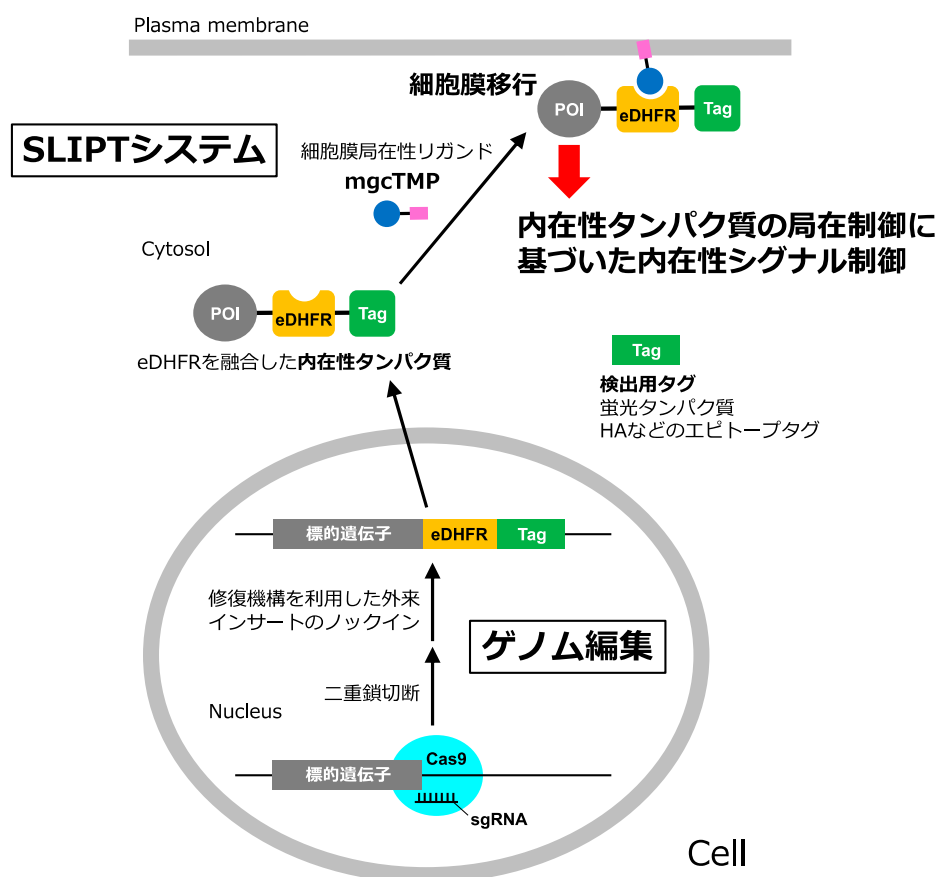
【方法】内在性タンパク質の局在を制御するための基本戦略として、我々が独自に開発した「局在性リガンドによるタンパク質局在移行 (SLIPT) システム」と「ゲノム編集」を融合するというアプローチを考えた (下図)。すなわち、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集技術を利用することで、標的とする内在性タンパク質に eDHFR タグをノックインする。そして、eDHFR に対する局在性リガンドを用いることで、eDHFR でタグ付けされた内在性タンパク質の細胞膜移行を誘導する。このような技術は、さまざまな内在性シグナル分子の局在を制御する汎用的な基盤技術になるものと期待される。

【結果】内在性シグナル分子の局在制御技術の開発を目指し、本研究では、以下の要素技術を確立することに成功した。

1. 細胞膜インナーリーフレットへの安定な局在移行を実現する新しい局在性リガンドの開発。
2. 標的タンパク質のさまざまな部位に融合でき、汎用的な細胞膜移行を実現する改変型 eDHFR タグの創製。
3. 標的内在性タンパク質の C 末端に eDHFR タグをノックインするゲノム編集法の確立。

今後は、本研究で得られた要素技術を統合することで、内在性シグナル分子の局在を制御する基盤技術を確立し、内在性のシグナル分子やシグナル経路の人為的操作に立脚した新しい生命研究アプローチを切り拓くことを目指す。

SLIPT とゲノム編集の融合による内在性シグナル分子の局在制御



13 嗜銀顆粒症の臨床病理学的意義に関する研究

西田 尚樹

【目的】嗜銀顆粒症 (argyrophilic grain disease、以下 AGD) は、1987 年 Braak らによって最初に報告され、リン酸化 tau および Gallyas-Braak 染色を始めとする嗜銀染色に陽性となるコンマ型や紡錘型のニューロピル内封入体を有する。AGD は、高齢者認知症や気分障害を来し得る独立した疾患概念と考えられる一方で、多くの神経変性疾患との合併があることや、生前無症候と考えられる剖検例に偶発的に発見されることが報告されており、その臨床病理学的に意義に関しては、未だ定見を見ない。法医解剖は生前に明確な疾病を指摘されていない症例を多数含むことから、未発症または疾患早期の神経病理像を探索するのに有用と考えられるが、世界的に検索対象となることは非常に少ない。今回、多数の連続司法解剖例から嗜銀顆粒症を有する症例を抽出し、病変出現頻度、生前の状況、他の神経変性疾患病変の合併頻度を示し、さらに死因との関連、特に自殺との関連の有無につき検証を試みた。

【方法】富山大学大学院医学薬学研究部法医学講座にて、2009 年 7 月から 2018 年末までに法医解剖された事例のうち、神経病理学的検索が可能であった 1,347 例 (男性 823 例、女性 524 例、0 才から 101 才、平均年齢 62.4 ± 11.9 才) を検索対象とした。脳内各所から組織標本を作製し、Gallyas-Braak 染色、免疫染色を施行して、AGD に合致する症例を抽出した。他の神経変性疾患についても、汎用されている病理診断基準を用いて評価した。

【結果】1,347 例中、264 例 (19.6%、男性 129 例、女性 135 例、46~100 才、平均年齢 80.1 ± 9.3 才) が AGD を有していた。男女別の検索総数における比率は男性が 15.7%、女性が 25.8%であり、女性は男性より有意に有病率が高かった ($p < 0.001$)。加齢につれて出現率が上昇しており、60 才以上の有病率は 25.0%、80 才以上が 40.7%であった。生前、認知症と病院で診断されていたのは 68 例、病院では診断されていないが、家族が認知症と考えていたのが 21 例、精神科の病歴を有している症例が 37 例であった。AGD 例では 87 例 (33.0%) であった。女性 (62 例) では男性 (25 例) に比して有意に自殺者数が多かった ($p < 0.005$)。AGD の stage は stage 1 が 41 人、2 が 105 人、3 が 118 人であった。NIA-AA criteria によるアルツハイマー病変の評価では、not : 92 例、low : 64 例、intermediate : 71 例、high : 37 例であった。Lewy 病理の合併を 51 例 (19.3%)、PSP36 例 (13.6%)、CBD、TDP-43 proteinopathy が各 2 例で (0.8%) 認められた。以上の結果は、本邦における AGD の有病率の近似値、臨床病理学的背景の一部を明らかにしたと考えられる。

AGD の年齢別 stage 分布、合併病理

	AGD stage			NIA-AA				Lewy	PSP	CBD	TDP-43
	1	2	3	not	low	intermediate	high				
40-49 才	1	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0
50-59 才	0	0	5	4	1	0	0	1	0	0	0
60-69 才	7	10	9	16	7	3	0	3	1	0	1
70-79 才	10	36	29	24	19	24	8	11	11	1	1
80-89 才	18	49	60	37	32	34	24	30	20	1	0
90 以上	5	10	14	9	5	10	5	6	4	0	0
計	41	105	118	92	64	71	37	51	36	2	2

14 高体温誘発性換気亢進反応のメカニズム解明

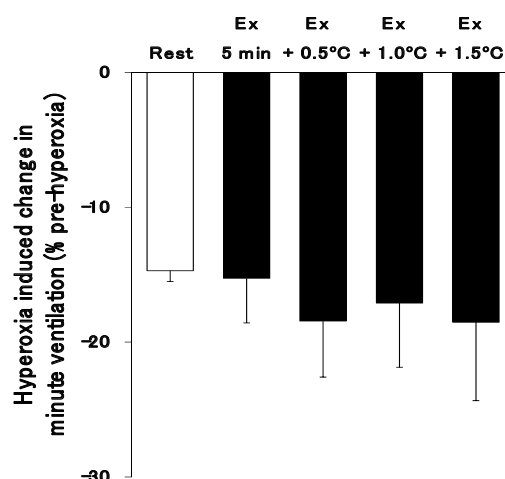
西保 岳

【目的】暑熱下で運動を行うと深部体温が上昇し、換気量 (VE) が増加する。この高体温誘発性換気亢進によって体内の二酸化炭素 (CO_2) が過剰に排出され、動脈血 CO_2 分圧の低下が生じることで脳血管が収縮し、脳血流量が低下する。さらに、この脳血流量低下により脳温の上昇や中枢性疲労が生じ、運動パフォーマンスの低下や熱中症につながる可能性が示唆されている。しかし、暑熱下運動時における高体温誘発性換気亢進のメカニズムは明らかでない。換気調節に寄与する要因として末梢化学受容器がある。In vitro の先行研究において、末梢化学受容器は温度上昇によってその活動が大きくなることが示されている。従って、体温が上昇したヒトにおいても末梢化学受容器の活動が大きくなる可能性が考えられ、それが高体温誘発性換気亢進反応を起こすメカニズムの 1 つかもしれない。Fujii ら (2008) は、安静加温時の換気亢進反応に末梢化学受容器はほとんど関与しないことを報告しているが、安静時と運動時で体温上昇時の換気反応の特性が大きく異なることから、暑熱下運動時の高体温誘発性換気亢進反応に末梢化学受容器が関与しているかを直接検討する必要がある。本研究では、暑熱下一定負荷運動時における高体温誘発性換気亢進反応に末梢化学受容器が及ぼす影響について検討した。

【方法】被験者は 11 名の健康男性とし、室温 25°C 、相対湿度 50% の暑熱下において、55% 最大酸素摂取量強度の一定負荷自転車運動を行った。安静時、運動開始 5 分目 (運動時ベースライン) および運動時ベースラインよりも食道温 (Tes) が 0.5 、 1.0 、 1.5°C 上昇した時に、末梢化学受容器の活動を抑制するための高酸素吸入を 30 秒間行った。測定項目は、Tes、皮膚温、呼吸代謝パラメーター [VE、呼気終末 CO_2 分圧 (PETCO₂)]、中大脳動脈平均血流速度 (MCAVmean) などであった。

【結果】運動時に Tes の上昇に伴い VE が増加し、高体温誘発性換気亢進反応が生じたことを示唆する。運動時に高酸素吸入し、末梢化学受容器の活動を抑制すると、いずれの深部体温レベル (運動時ベースライン、ベースラインから Tes + 0.5 、+ 1.0 、+ 1.5°C) においても、VE が一時的に低下し、VE の低下の程度は、深部体温のレベルに関わらず 15% 程度であった。体温上昇に伴う換気亢進反応に末梢化学受容器が大きく関与しているのであれば、深部体温が上昇するに従い、高酸素吸入による換気量低下の程度は大きくなるはずであるが、そのような結果は得られなかった。従って、運動時の体温上昇に伴う換気亢進反応に、末梢化学受容器はほとんど関与しないことが示唆される。また、高酸素吸入を行うことにより、PETCO₂ および MCAVmean が一時的に上昇した。高酸素吸入による PETCO₂ の上昇は、深部体温のレベルに関わらず同程度にあったのにもかかわらず、脳血流量の上昇は、運動時ベースラインでは見られず、体温が上昇した場合にのみ見られた。この結果は、運動時における脳血流量の CO_2 の感受性は、体温上昇時により大きくなるという可能性を示唆する。

安静時及び運動時におけるベースラインと運動中食道温が 0.5 、 1.0 、 1.5°C 上昇した場合に高酸素を吸入した時の換気量の相対値変化



15 がん免疫療法における補剤の活用に関する研究

早川 芳弘

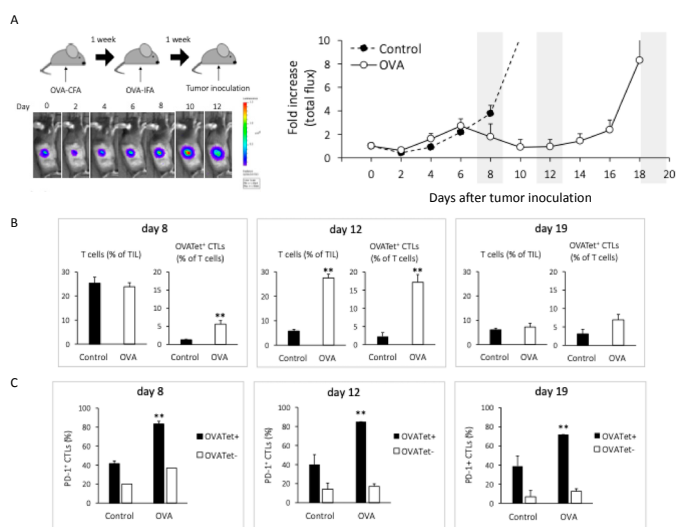
【目的】現在、臨床での免疫チェックポイント阻害剤の成功によってがん免疫療法に多くの注目が集まっているが、十分な薬効を得られずに未だその利益を受けられないがん患者がいることも事実であり、このようながん免疫療法への responder/non-responder の判別やバイオマーカー探索が大きな課題である。また、最近の研究成果からがん細胞はがん抗原の発現低下やがん抗原特異的 T 細胞疲弊の誘導によって免疫監視から逃避すること、化学療法や分子標的治療と同様にがん免疫療法に対する治療抵抗性を獲得することなど課題が明らかになりつつある。一方、このようながん細胞の免疫逃避メカニズムやがん免疫療法に対する抵抗性の獲得メカニズムは明らかでない。

本研究課題では、これらががん免疫療法に応答性を示さない患者背景には「がん虚」、つまりがん患者特有の身体症候が大きく関わると考え、有効ながん免疫治療のためには「がん虚」の理解によるがん細胞の免疫抵抗性獲得メカニズムの解除を目指した研究を行なった。また、がん細胞の免疫抵抗性獲得機構とがん微小環境における免疫機能の補助による抗腫瘍免疫応答の効果的な誘導法について理解することで、さらに漢方薬、特に補剤の有用性について探索を行なった。

【方法】B6 マウス由来 B16 メラノーマ細胞に ovalbumin (OVA) を強制発現させた B16OVA 細胞のルシフェラーゼ安定発現細胞株 (B16OVA-Luc2) を取得して樹立した。OVA に対する抗原特異的免疫応答を OVA 抗原と complete Freund's adjuvant で誘導した C57BL/6J マウスに B16OVA-Luc2 細胞を移植し生物発光イメージングを用いてがん細胞の増殖をモニタリングした。腫瘍浸潤リンパ球の解析はフローサイトメトリーにより行った。

【結果】がん細胞増殖をルシフェラーゼ発光活性の *in vivo* イメージングにより測定することで、これまで肉眼的には評価不可能であった移植後のがん細胞増殖期 (～7 日目)、その後の排除期 (8 日後)、平衡期 (12 日後)、続く逃避期 (19 日後) が検出可能であることを示した。この結果に基づく抗原特異的 T 細胞応答の経時解析の結果から、がん細胞の免疫逃避にはすでに指摘されている機能的な T 細胞疲弊ではなく、がん抗原特異的 T 細胞受容体の多様性の拡大によってがん細胞が T 細胞による免疫監視を逃避している可能性が示唆された。またがん細胞の免疫逃避期では CD8⁺T 細胞でエフェクター T 細胞からメモリー細胞へと分化誘導させるために重要であることが示唆されている Eomes の発現減少が認められた。十全大補湯投与群は対照群と比較して、B16OVA-Luc2 の増殖を顕著に抑制したが、一方で腫瘍浸潤 T 細胞の CD4/CD8 T 細胞浸潤の割合、ならびに OVA 特異的 T 細胞浸潤の割合に大きな変化は認められなかった。これらの結果は少なくとも十全大補湯の投与による B16OVA-Luc2 に対する抗腫瘍効果は、がん抗原特異的な T 細胞の増加やヘルパー T 細胞の増加といった T 細胞性免疫応答を直接的に増強する機序ではなく、その他の制御性メカニズムを介した機序であることを示唆すると考えられる。

腫瘍内浸潤がん抗原特異的 T 細胞の経時的解析



【目的】複数の不斉炭素有し、合成が困難な化合物が医薬品候補化合物に取り上げられるようになり、医薬品合成における有機合成化学の役割は年々増大している。天然物が強力な生物活性を有する場合、天然物あるいはその誘導体が新規な医薬品として開発される可能性があり、生物活性天然有機化合物の全合成研究は現在でも重要な研究テーマである。このような化合物の合成に際して、天然物に頻繁に見られる基本部位の効率的、かつ立体選択的な不斉触媒反応の開発は重要である。1,3-ジメチル部位は多くの生物活性天然物に見られる部位であり、今回、有機触媒を用いた 1,3-ジメチル部位の *syn*, *anti* 体の立体選択的な不斉合成法の開発を行った。

一方、amphidinolide 類は北大の小林淳一のグループが単離、構造決定を行ったマクロリドの一群である。沖縄産のアンフィスコロプス (*Amphiscolps* sp.) という渦鞭毛藻が生産する化合物であり、amphidinolide N はマウス白血病細胞 L1210、ヒト上皮癌細胞 KB に対して amphidinolide 類の中で最強の細胞毒性を示す ($IC_{50}=0.00005$, $0.00006 \mu\text{g/mL}$) が、渦鞭毛藻が超微量しか生産せず、しかも現在は生産なくなり、ほとんどこの世の中に存在しない。13 の不斉点を有する 26 員環のマクロリドであり、不安定と考えられるエポキシエキソメチレン部位を有し、化学合成は非常に困難である。今回、その全合成を目的として、C17-C29 部位の大量合成可能な立体選択的合成法の開発を行った。

【方法・結果】

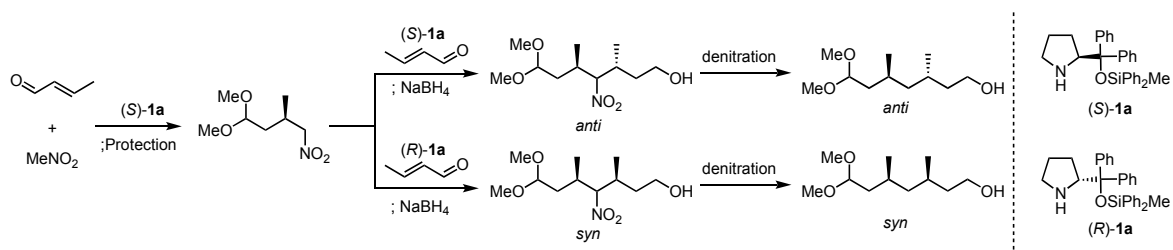
1. 1,3-ジメチル部位の合成

我々が開発した diphenylprolinol silyl ether という触媒 (林-Jorgensen 触媒) は、 α 、 β -不飽和アルデヒドとニトロアルカンとの不斉マイケル反応に有効である。用いる触媒の絶対立体配置を変え、連続的にこのマイケル反応を利用することにより *syn* 体、*anti* 体を自在に作り分けられることを見出した。すなわち、クロトンアルデヒドにニトロメタンを触媒 (*S*)-**1a** を連続的に用いると *anti* 体が、逆の絶対立体配置の触媒を用いると *syn* 体がいずれも高い不斉収率で得られる。またこの手法を鍵反応として、 β -(1,3)-D-glucan の生合成の阻害剤である pneumocandin B₀ の側鎖の立体選択的合成に成功した。

2. amphidinolide N の C17-C29 部位の立体選択的合成

trimethylsilylacetylene と (*E*)-1-iodohexene との菌頭カップリング反応を行い、得られた化合物のアルケン部位を有機触媒を用いる Shi 不斉エポキシ化反応により対応するエポキシアルキンに高い不斉収率で導いた。その後エポキシ部位の酸による開環反応によりトランスジオールとし、ジオール部位をアセタールで保護した。その後、シリル基の脱保護を行い、アルキンとした。一方、Krische 不斉アリル化反応により得られた、高い光学純度を有するヒドロキシアルケンのアルコールをシリル基で保護した後、アルケン部位を酸化的に切断して β -シロキシアルデヒドとした。先に合成したアルキンと β -シロキシアルデヒドのカップリング反応を行い、得られたアルコールの一方を選択的に酸化して β -ヒドロキシケトンに導いた。 β -ヒドロキシケトンのアンチ選択的還元により 1,3-ジオールとしたのち、DDQ を用いる酸化的フラン環構築反応を鍵反応として、2 置換フラン部位を立体選択的に構築した。保護基の脱保護により、4 つの不斉点を有する amphidinolide N の C17-C29 部位を立体選択的に、また高い不斉収率で合成することに成功した。本反応は大量合成に向けた合成法である。

立体選択的 1,3-ジメチルユニットの不斉合成



17 運動と食事が動脈血管内皮機能に及ぼす交互作用の解明

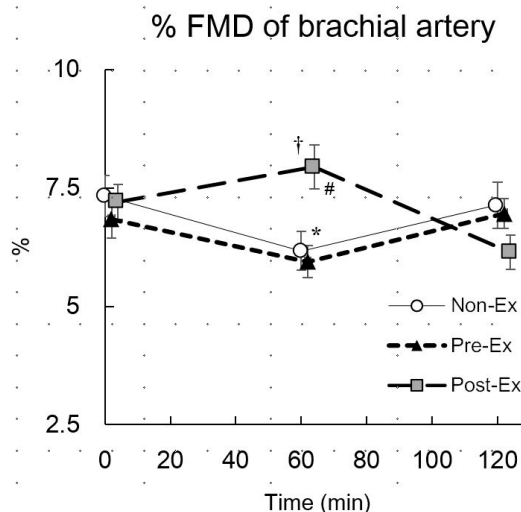
福場 良之

【目的】血管内皮機能をいかに正常、あるいはよりよい状態に保つか、動脈硬化を基礎とした心血管性疾患の発症や進展を抑える上では重要である。運動には急性で血管内皮機能への恩恵的効果があることが知られ、それが運動トレーニングによる抗動脈硬化作用の基礎となる。運動による血管内皮機能改善の急性な機序において、伝導血管を流れる血流が血管内皮細胞へ及ぼす力学的刺激、シェアストレスが重要な役割を果たすと考えられている。具体的には、伝導血管内を末梢へ流れる血流、順向性の血流の増大が引き起こす順向シェアストレスが、血管内皮細胞の機能改善を惹起する刺激となる。一方、運動の正の効果に対して、食事は負の影響、血管内皮の一過性な機能低下を引き起こすことが知られている。運動と食事の組み合わせ、順序が、血管内皮機能へどのような影響を及ぼすのかについては、未だ十分に解明されていない。そこで本研究では、高糖質食摂取後の一過性の血管内皮の機能低下に対して、運動がどのような効果を与えるかを明らかにすることを目的とした。

【方法】健康な若年成人 23 名が、以下の 3 つのプロトコールにランダムな順序で参加した。対照 (non-Ex) 条件として、グルコース 75 g を含有した飲料 (500 g) を摂取し、その後 120 分の安静を保った。運動条件は、脚自転車エルゴメータによる高強度間欠的運動を 30 分間行った。食事との順序は、non-Ex 条件と同様な高糖飲料摂取の 60~30 分前に運動する Pre-Ex 条件、あるいは摂取 15~45 分後に運動する Post-Ex 条件の 2 つとした。上腕動脈の血管内皮機能は、糖質飲料摂取の直前、ならびに摂取後 60 分目、120 分目に、血流依存性血管拡張反応 (FMD) という確立した手法を用いて測定し、%FMD を算出した。プロトコール中、超音波ドップラー法により上腕動脈の血流速度と血管径を定期的に測定して、シェアストレスの指標である shear rate (SR) の様相を評価した。また、FMD 測定と同じタイミングで血中のグルコース濃度とインスリン濃度を測定した。なお、血中の活性酸素種については現在、分析中である。

【結果】糖質飲料摂取 (non-Ex 条件) によって、その後 60 分目に %FMD の有意な低下が認められた。食前の運動 (Pre-Ex 条件) での %FMD は、non-Ex 条件とほぼ同様な時間推移を示した。一方、食後の運動 (Post-Ex 条件) では、摂取後 60 分目において、%FMD は他の 2 条件よりも有意に高い値を示した。いいかえると、食事誘発性の血管内皮機能の一過性の低下は、食後運動によって抑制されていた。このような抑制効果を生じさせた機序のひとつとして、順向 SR の増大が関連していた。また、%FMD と血中グルコースの経時変化の間には有意な負の関連性が認められたので、おそらく高血糖による活性酸素種の増加や血管拡張物質 NO 産生の抑制なども関与していたものと推察された。食後の高強度間欠的運動は、食事誘発性の血管内皮機能の低下を抑制する方向に作用し、この作用は血糖の上昇抑制および順向シェアストレスの増加によることが示唆された。

食事誘発性の血管内皮機能低下を食後実施運動は抑制する



18 身体運動による健康効果にマイオカインが果たす役割

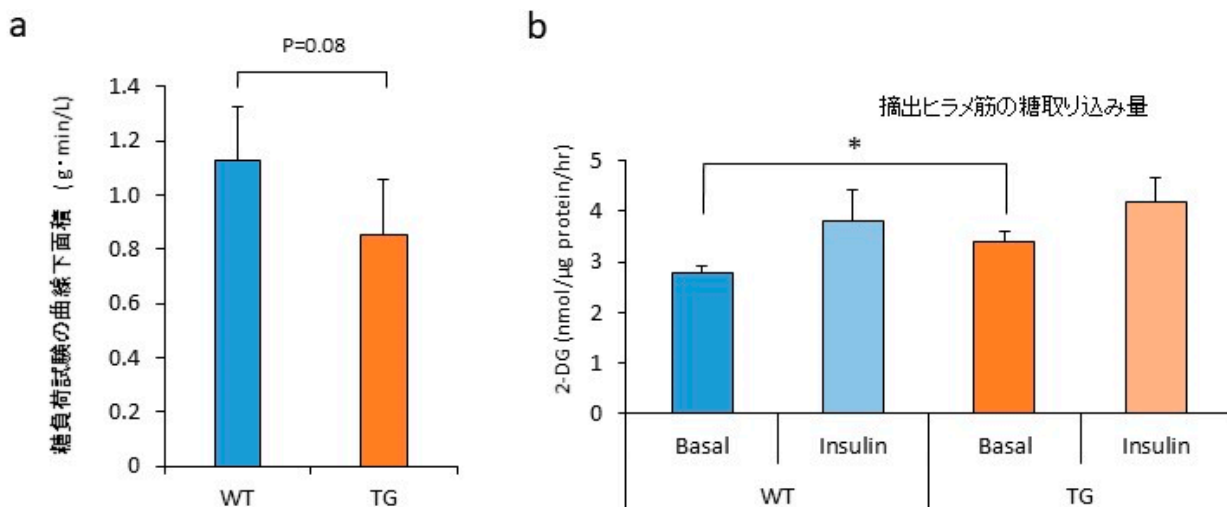
藤井 宣晴

【目的】骨格筋は種々の生理活性物質（総称してマイオカイン）を分泌していることが明らかになってきた。我々は、「運動がもたらす様々な健康効果は、骨格筋から分泌されたマイオカインが全身に届けられることによって生じる」という仮説を有している。本研究は、我々がこれまでに発見した新規マイオカインの発現量を骨格筋のみで変化させた遺伝子組み換えマウスを解析することで、運動によってもたらされる様々な健康効果には、マイオカインを介した骨格筋—諸臓器間のコミュニケーションが必要かどうかを検証することを最終目的としている。本報告書では、検証を試みた複数のマイオカインのうち、最も解析の進んだペルオキシレドキシン-6 の骨格筋特異的過剰発現マウスについて報告する。

【方法】過剰発現用の DNA コンストラクトは、ヒト骨格筋 α -actin プロモーターと、その制御を受けるヒト・ペルオキシレドキシン-6 遺伝子で作製した。完成した DNA コンストラクトを C57BL/6N マウス受精卵の前核に注入し、仮親の子宮に移植してキメラマウスを得た。一部のキメラマウスは、生殖系列細胞に TG コンストラクトが挿入されたゲノム DNA が認められたため、野生型マウスと交配させることで、全細胞に組換えゲノムを持つ仔マウスを得た。一晩絶食させたマウスの尾部先端を約 2 mm 切り、血糖値測定器を用いて空腹時血糖値を測定した。100 mg/mL グルコース溶液を腹腔内投与 (10 μ L/g Body Weight) し、15、30、60、90、および 120 分後の血糖値を測定した。これらの値を、経過時間および血糖値を軸とするグラフ上にプロットし、空腹時血糖値のベースラインと血糖値推移に囲まれた面積（上昇曲線下面積：iAUC）を算出した。また摘出したヒラメ筋を用いて、糖取り込み量を測定した。

【結果】骨格筋特異的にペルオキシレドキシン-6 を過剰発現させたマウス（TG マウス）の骨格筋では、野生型マウス（WT マウス）と比較して約 10~40 倍のペルオキシレドキシン-6 が発現していた。また、ウェスタンブロッティングで定量した血中のペルオキシレドキシン-6 含有量は、TG マウスでは WT マウスと比較して約 2 倍に増加しており、実際に生体内で骨格筋からペルオキシレドキシン-6 が分泌されていることが示された。TG マウスに対して耐糖能試験を行ったところ、WT マウスと比較して亢進傾向が認められた ($p < 0.08$)。そこで遅筋を代表するヒラメ筋を摘出して糖取り込み量を測定したところ、TG マウスではインスリン非刺激時の糖取り込み量が増加していた ($p < 0.05$)。ヒラメ筋でグルコース・トランスポーター1 のタンパク質発現量の増加も認められた。

野生型マウス（WT）と骨格筋特異的ペルオキシレドキシン-6 過剰発現マウス間で
糖耐能試験（a）と摘出骨格筋の糖取り込み量（b）を比較



【目的】大腸がんや肝がんでは、高頻度に Wnt シグナルの活性化が発がん重要な役割を演じている。Wnt シグナルを阻害する薬剤は有望な抗がん剤になるとのプルーフ・オブ・コンセプトが得られているが、これまでに上市に至った化合物はない。我々は Wnt シグナルを阻害する化合物を探索するための新規レポーターアッセイを開発し、試験的なスクリーニングを行ったところ、ヒット化合物として Brefeldin A (BFA) が得られた。そこで本研究では、BFA の Wnt シグナルへの影響を確認するとともに、その機序を明らかにすることを目的としている。また新たな化合物ライブラリーをスクリーニングし、新規抗がん剤開発へと繋げることを目的としている。

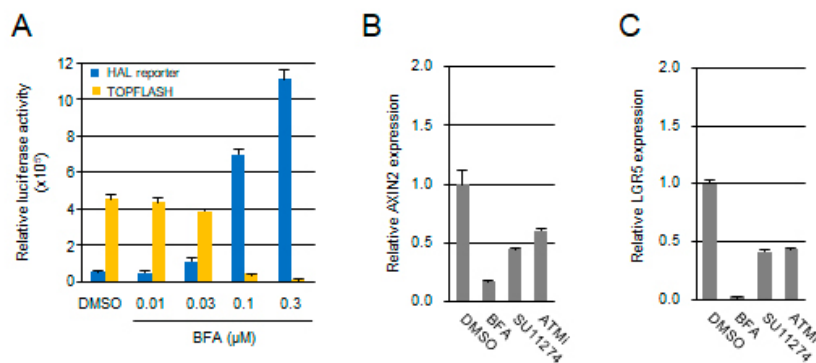
【方法】1. Wnt 活性に応じて変動する 2 種類のレポータープラスミド TOP-Flash reporter plasmid (TOPFLASH-Rluc) および histidine ammonia-lyase (HAL) reporter plasmid (pHALx8-minFluc) を作製し、Dual Luciferase Assay を行った。2. HepG2 細胞に化合物を投与後 24 時間にタンパク質を抽出し、ウェスタンブロットにて Wnt シグナル関連分子の発現を解析した。3. 化合物投与後 48 時間に RNA を抽出し、マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析と、発現変動遺伝子群によるパスウェイ解析を実施した。

【結果】レポーターアッセイの結果、BFA は TOP-Flash のレポーター活性を抑制するとともに *AXIN2*, *LGR5* の発現を低下させた。加えて BFA は HepG2 細胞において野生型および変異型 β -catenin タンパク質の量を減少させた。これらの結果から、BFA は β -catenin タンパク質の低下を介して Wnt シグナルを抑制することが示唆された。

マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析の結果、BFA は Golgi 機能関連分子に加え、Wnt パスウェイにも有意な変動をもたらした。Golgi 阻害剤の中で GBF1 阻害作用がある BFA と GCA は β -catenin タンパク質を減少させたが、GBF1 阻害作用がない Exo1 は低下させなかった。

更に 2 万化合物のスクリーニングを実施し、新たに Wnt シグナル阻害化合物候補 139 種類を同定した。

BFA による TOP-Flash レポーター活性低下と下流遺伝子の発現抑制

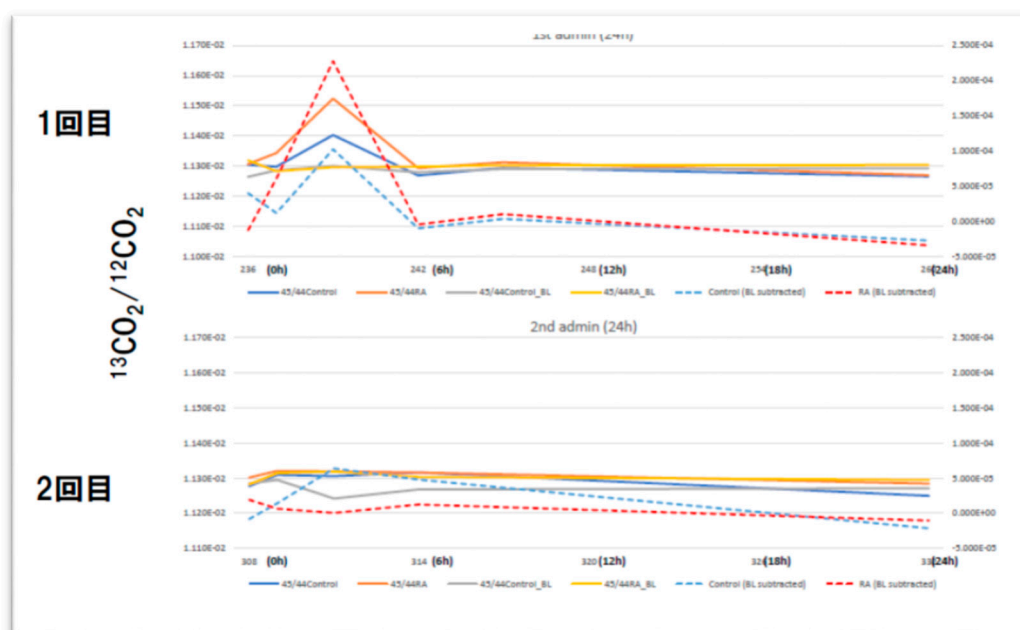


【目的】ビタミンA (VA) 欠乏症は、貧困、戦争といった社会情勢とも密接に関与しており、未だに、アフリカや南・東南アジアではVA 欠乏症が蔓延している。VA 欠乏・不足の診断は、夜盲症、眼球乾燥症といった臨床症状と、血中VA であるレチノール (ROH) の測定で行われる。しかし、生体では肝臓のVA 貯蔵細胞である星細胞 (伊東細胞) に通常は80~90%のVA がエステル型VA として蓄えられており、そのリザーブされたVA が欠乏してはじめて血中ROH レベルが低下する。このため、従来の血中VA 測定方法では、VA 欠乏を末期状態でしか診断できない。本研究では、肝臓におけるVA 貯蔵状態を評価することで、生体のVA の栄養状態 (過剰・正常・不足・欠乏) を診断するための ^{13}C -VA 呼気試験を新規に開発する。

【方法】初めに、VA の13位の炭素を ^{13}C にラベルした ^{13}C -retinyl acetate (^{13}C -Race) を合成した。ヒト肝癌細胞FLC-4を、5 mL容量のラジアルフロー型バイオリアクター (RFB) に播種し、バイオ人工肝臓を作製した。RFBのバイオ人工肝臓部と培養液がガス交換を行うリザーバー部を150 mLの培養液が閉鎖系で還流された。リザーバーには5% CO_2 ・95%Airが注入され、液面でガス交換の上、注入と同量が排出路から排出された。細胞が増殖し、安定したところで、 ^{13}C -Race濃度が100 μM に調整した培養液にリザーバー内の培養液を交換し、還流を開始し、継続的に排気 (呼気) を呼気バックで採取した。24時間還流後、再度 ^{13}C -Race濃度が100 μM の培養液に交換し、培養をさらに24時間継続し、排気を採取した。 $^{13}\text{CO}_2$ の測定は、呼気ガス用質量分析装置で行った。

【結果】FLC-4細胞を培養したバイオ人工肝臓に100 μM の ^{13}C -Raceを含有する培養液を還流した (図)。100 μM の ^{13}C -Raceを添加すると1回目の還流では、 $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ 比値は3時間をピークに上昇し、その後、低下する。2回目の添加では3時間の上昇は観察されなかった。一方、 ^{13}C -Race未添加条件でも、1回目、2回目ともわずかに $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ 比値は上昇した。従って、VA 欠乏状態のバイオ人工肝臓に ^{13}C -Raceを投与することで、最終産物の $^{13}\text{CO}_2$ が生成し、その検知によってVA 欠乏が診断できる可能性が示唆された。

^{13}C -retinyl acetate 還流実験における $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ 比の動態



21 遺伝子型により個別化された認知機能障害予防法の検討

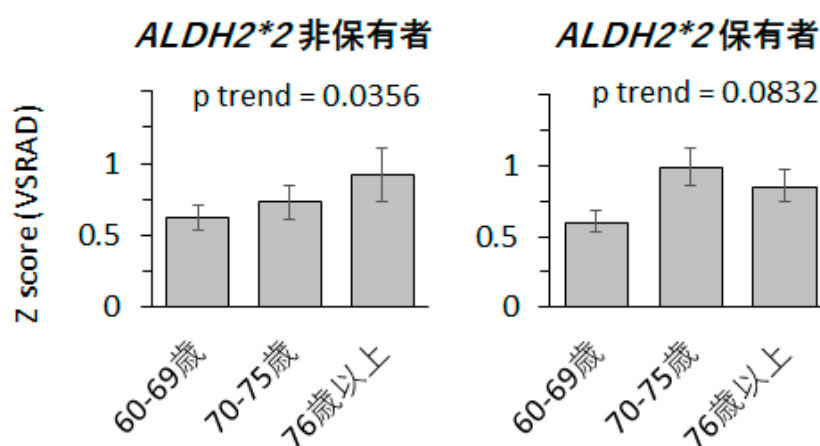
松本 明子

【目的】日本人の約半数が保有する *Aldehyde dehydrogenase 2* (*ALDH2*) 遺伝子多型を考慮し、個別化された認知機能障害予防法の提案を試みる。アルツハイマー病リスクは変異型 *ALDH2* 遺伝子により上昇することが報告されている一方、ラクナ梗塞や脳卒中リスクなどは変異型 *ALDH2* 遺伝子により低下することが報告されている。*ALDH2* 不全個体においては4ヒドロキシノネナールの代謝が遅く神経毒性が発現しやすいことが考えられ、一方で、エネルギー代謝系の活性化や、アセトアルデヒドの血管拡張作用などで血管障害の基礎疾患のリスク低下が考えられる。疾病予防において、重視する対策は性別や年齢、体質などによって個別化されるのが理想である。本検討では *ALDH2* 多型ごとの認知機能障害リスクを明らかにし、生活習慣との関連を検討することで、体質ごとに個別化された認知機能障害予防について提案することを目指している。

【方法】健診もしくはドック受診者を対象として、年齢、性別、生活歴、病歴、身体所見、自覚的精神活動、認知機能検査、頭部MRI、血液検査、*ALDH2* 遺伝子型検査等を行った。

【結果】2019年2月1日現在利用可能なデータベースを解析した結果、*ALDH2**2保有者で年齢が高く、飲酒量が少なく、自覚的不眠が少なかった。中等度以上の自覚的不眠に対する *ALDH2**2保有の性年齢補正オッズ比は0.265 (95%信頼区間0.088~0.796) であった。さらに、*ALDH2**2保有は低いBMIや腹囲、高い身体的活動、低い抑うつ、低いMoCA-Jスコア（認知機能スコア）、高いZスコア（海馬委縮度）と関連する傾向にあった。このように、*ALDH2**2保有者では、認知機能の低下がみられる一方で不眠が少なく、精神活動が比較的良好で、身体活動が多い等の傾向があり、心理的、身体的健康度が高い傾向が見られた。このような傾向はモデル動物や *ALDH2* 阻害薬投与実験、疫学検討の結果と合致する。さらに、性年齢調整一般線形回帰モデルによる検討で、*ALDH2**2保有者では海馬の委縮度における年齢による影響が弱いことが示され、年齢以外の生活習慣がより強く影響する可能性が示された。今後は対象者数を増やし、認知機能／脳血管障害と生活習慣との関連を *ALDH2* 多型別に検討するなどして、それぞれの体質に応じた効果的な認知症予防の提案につなげる必要がある。

ALDH2 多型別 Z スコアの調整平均値

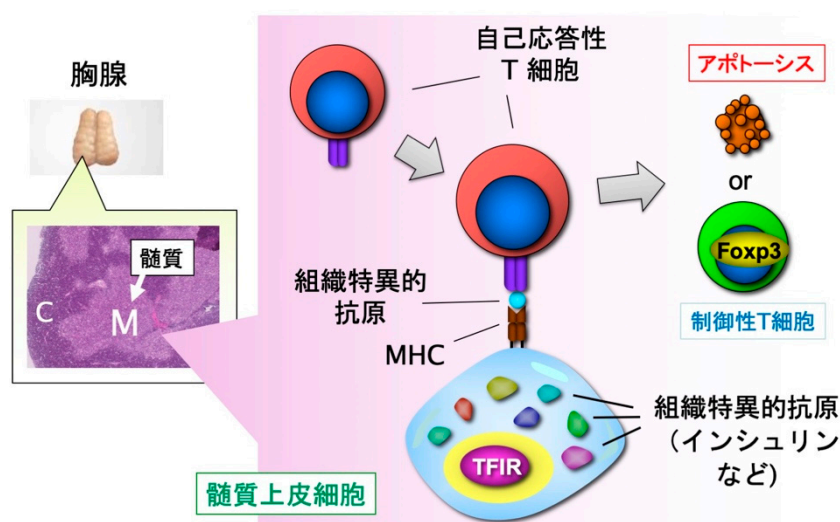


【目的】自己免疫疾患の治療や予防法の開発には、自己免疫疾患の発症を抑制している機構を理解することが重要となる。本課題は、自己免疫疾患の発症を防止する“胸腺上皮細胞”に着目し、その機能を制御する分子機構の解明を目的とする。免疫応答に重要な T リンパ球 (T 細胞) が胸腺で分化する際、自己組織に応答する T 細胞 (自己応答性 T 細胞) が一定の頻度で生じる。健全な状態では、これら自己応答性 T 細胞は、胸腺の髄質上皮細胞により除去され、自己免疫疾患の発症は抑制される。髄質上皮細胞は、(インシュリンなど) 特定の臓器・組織にだけ発現するタンパク質 (組織特異的抗原) を多種類にわたり異所的に発現する特殊な性質を持ち、それらを提示することで自己応答性 T 細胞を除去する。本課題では、組織特異的抗原の発現を制御する新たな転写因子の同定を目指し、髄質上皮細胞の分化に伴い発現誘導される転写因子 (未発表のため転写因子 Transcription factor induced by RANKL : TFIR と略) の機能解明を目指した。

【方法】胸腺上皮細胞で特異的に TFIR 遺伝子を欠損するマウスを作製した。それらのマウスの胸腺細胞の発生を、フローサイトメーターなどで解析した。さらに胸腺上皮細胞を分取し、遺伝子発現を次世代シーケンサーを用いた RNA-seq 法で解析した。一方、当該マウスから様々な臓器 (肝臓、脾臓、腎臓、肺など) を採取し、組織学的解析により炎症性細胞浸潤の有無を検証した。また当該マウスの血清中に存在する自己抗体を、免疫組織学的に検討した。

【結果】胸腺上皮特異的 TFIR 欠損マウスでは、T 細胞や制御性 T 細胞は正常に発生したが、制御性 T 細胞の前駆細胞は有意に減少した。また胸腺上皮細胞の中で、CD80 の発現が低い髄質上皮細胞が減少した。また胸腺髄質上皮細胞で発現する組織特異的抗原遺伝子を検討したところ、多くの組織特異的抗原の発現が減少していた。それらは、Aire や Fezf2 などこれまでに組織特異的遺伝子の発現を制御することが報告されている転写因子では、制御されない組織特異的遺伝子であった。また肝臓、肺、腎臓、顎下腺などに炎症性細胞浸潤が検出され、同時にこれらの臓器由来の抗原に対する抗体が、血清中で増加していた。

胸腺髄質上皮細胞による自己免疫抑制



23 ヒト二本鎖DNA切断修復機構とゲノム安定性維持

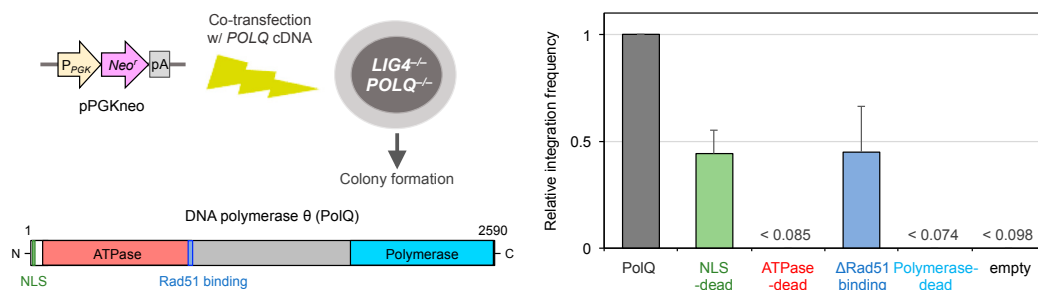
足立 典隆

【目的】細胞のゲノム DNA は、さまざまな内的・外的要因により絶えず損傷を受けている。最も危険な DNA 損傷である二本鎖 DNA 切断は非相同末端連結 (NHEJ) または相同組換えによって速やかに修復されるが、これら 2 つの主要経路とは異なる修復機構も存在する。しかし、こうした経路の意義や分子機構の多くは未解明である。我々は最近、マイナーな修復機構の一つ alternative end-joining に PolQ タンパク質が必須であることを遺伝学的に明らかにした。また、PolQ と Lig4 (NHEJ の必須因子) を同時に欠損した細胞では Alu 配列間での組換えが顕著になることを見いだした。本研究では、ヒト細胞のゲノム安定性維持における二本鎖切断修復の役割と意義を明らかにすることを目的として、PolQ の機能ドメインの解析を進めるとともに、Alu-Alu 組換えの特徴と制御機構に関する先駆的研究を行った。

【方法】1. 各ドメインに変異を入れた発現ベクターを構築し、ヒト *LIG4/POLQ* 二重破壊株に pPGKneo と共導入した。細胞を G418 含有アガロース培地中で 3 週間培養した後、生存コロニー数を指標にランダム挿入頻度 (ベクターが染色体中に組み込まれる頻度) を算出した。2. *LIG4/POLQ* 二重破壊株の *HPRT* 遺伝子座の第 3 エクソン中に CRISPR/Cas9 により二本鎖切断を誘発した後、PCR 解析とシーケンス解析により組換え体の同定と各クローンにおける Alu-Alu 組換えの特徴の解析を行った。Rad51 と Rad52 の関与については阻害剤を用いて、Msh2 の関与についてはゲノム上の変異を修正 (cDNA をノックイン) した細胞を構築して実験を行った。

【結果】PolQ の Polymerase 活性だけでなく ATPase 活性も alt-EJ において必須の機能を果たすことが明らかとなった。一方、Rad51 結合ドメインは PolQ の機能に必須ではなかった。NLS 配列中に変異を入れると PolQ は細胞質に局在したが、その機能に大きな影響はみられなかった。上で述べた通り、PolQ と Lig4 を同時に欠損した細胞では Alu-Alu 組換えでしか修復 (すなわち切断末端の再連結) が行われない。*LIG4/POLQ* 二重破壊株の *HPRT* 遺伝子座における Alu-Alu 組換えの特徴を調べたところ、二本鎖切断誘発部位の近傍に存在する Alu 配列が組換えの基質として利用されやすいこと、また相同性の高い Alu 配列同士で組み換わる頻度が高いことが判明した。阻害剤等を用いた実験から、こうした Alu-Alu 組換えは Rad52 依存性の一本鎖 DNA アニールリング (SSA) によって引き起こされることが強く示唆された。また、PolQ や Lig4 に加え、Msh2 によっても SSA を介した Alu-Alu 組換え反応が強く抑制されていることが明らかとなった。異なる Alu 配列の間で起こる一本鎖 DNA のアニールリングが Msh2 タンパク質によって阻害されていることが推測される。Alu-Alu 組換えはがんや遺伝病の直接的原因となる危険な組換えであり、その制御機構の解明は反復配列に富んだゲノムが安定に維持される仕組みを理解するうえで重要な課題である。

Alternative end-joining の主役 PolQ の機能ドメインと Alu-Alu 組換えに関する研究

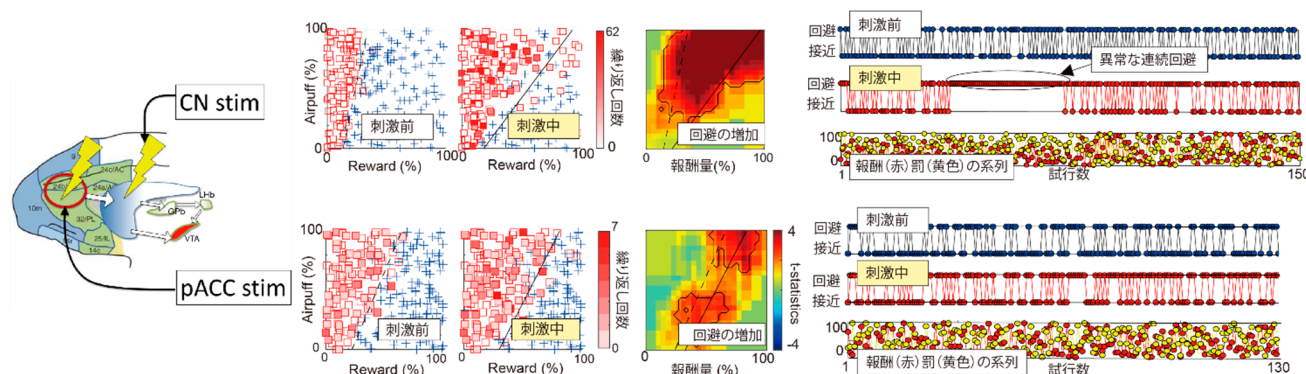


【目的】不安障害やうつ病などの気分障害、あるいは依存症に、ドーパミン細胞を中心とした神経回路（DA 回路）の障害が関わると考えられている。解剖学的にみると、そのなかでも線条体のストリオソームや側坐核（NAc）が DA 細胞に直接投射する最も重要な皮質下構造である。しかしながら、これらの構造が DA 細胞をどのように制御しているかは、まだ十分に解明されていない。そこで本研究では、ヒトと相同な脳構造を持つマカクザルを対象に、遺伝子改変技術を用い、線条体や側坐核の活動変化が意思決定に及ぼす影響を調べる。

【方法】認知的な価値判断を、運動関連活動と分離して正確に報告できるマカクザルの特長を生かして、次の葛藤課題を訓練する。報酬と罰が様々な割合で組み合わせて提示し、受け入れるか、拒否するかを意思決定課題を行わせる。我々のこれまでの研究から、報酬と罰がバランスする条件では、意思決定は不安などの情動要因に影響を受けやすく、数理モデルを用いると、不安のレベルを定量的に評価できることが分かっている。そこで、線条体や側坐核の活動操作が、悲観的な価値判断にどのような影響を与えるかを調べる。当該年度は、線条体の尾状核を微小電気刺激で操作した研究結果をまとめて発表した。

【結果】本研究では、意思決定のパターンのベースラインを刺激前の試行で記録したのち、尾状核の刺激を続ける刺激中ブロックでベースラインから意思決定のパターンがどのように変化するかを調べた。すると、尾状核の局所部位の 12% は「ポジティブ」な神経回路で、刺激により接近選択が増え、積極的にコスト（この場合は罰）を受け入れる選択が増加した。逆に 22% の部位では、「ネガティブ」な回路で、刺激により回避選択が増え、悲観的な価値判断が増加した。数理モデルによりこの引き起こされた選択のパターンを解析すると、「ネガティブ」回路の刺激では、罰に対する過大評価が引き起こされていることが明らかになった。この罰に対する過大評価は刺激を停止しても元に戻ることがなく、悲観的な状態が持続することが明らかになった。さらに、刺激中の意思決定パターンをより詳しく調べたところ、回避選択の異常な繰り返しが統計的に有意に増加していることが明らかになった。このことは、刺激が価値判断の変化だけではなく、意思決定の固執も引き起こしていることを意味する。最後に、この意思決定の固執が尾状核刺激に特徴的な現象であるかどうかを調べるために、これまでの前帯状回皮質刺激のデータと比較した。すると、こうした意思決定の固執は尾状核刺激のみで見られることがわかった。以上のことから、前帯状回皮質と尾状核は結合関係は持つものの、刺激によって引き起こされる現象には違いがあることがわかった。

前帯状回皮質膝前部の微小刺激は悲観的な意思決定を誘導し、尾状核の刺激は悲観的な意思決定を異常に連続させた。



25 アセチル化ヒストンの動的変化とがん抑制シグナル制御

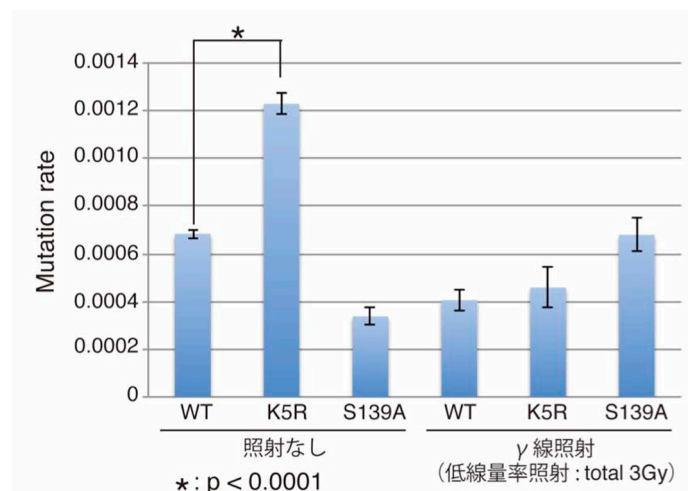
井倉 毅

【目的】真核生物の DNA は、ヒストンタンパク質とクロマチン構造を形成している。我々は、DNA 損傷応答に関与する TIP60 ヒストンアセチル化酵素が、ヒストン H2A のバリエーション H2AX をアセチル化し、クロマチンからの放出を促すことにより損傷領域のクロマチンを open に維持することを見出した。これまでヒストンは、DNA 修復因子などの DNA へのアクセスを阻害する、バリアータンパク質として認識されていたが、我々は、H2AX のクロマチンからの放出という一見、シグナル因子のような振る舞いが、active player として積極的に DNA 損傷応答反応に関与していることをこれまで明らかにしてきた。我々は、NIH3T3 細胞を用いたコロニーフォーメーションアッセイでコロニー形成能が、TIP60 をノックダウンすると高まることを明らかにしており、これらの結果は、クロマチンの動的変化を促す TIP60 による H2AX のアセチル化が、DNA 損傷応答シグナルを制御していると同時に、がん抑制シグナルとしても働いている可能性を示唆している。本研究の目的は、損傷領域のクロマチンの動的変化を制御する TIP60 による H2AX のアセチル化シグナルが、癌抑制シグナルとなる可能性を検討する。

【方法】TIP60 による H2AX のアセチル化とリン酸化酵素 ATM との関係とがん抑制シグナルとしての H2AX のアセチル化の役割について以下の方法で検討する。

1. TIP60 による H2AX のアセチル化の損傷部位への ATM の集積に対する影響をクロマチン免疫沈降法を用いて検討
2. NIH3T3 細胞における H2AX のアセチル化、リン酸化、および p53 のコロニー形成能比較実験
3. H2AX のアセチル化とリン酸化を細胞内で阻害した時の *HPRT* (ヒポキサンチン・グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ) 遺伝子の変異原性解析
4. フローサイトメトリーを用いた H2AX アセチル化の DNA 損傷後のチェックポイント活性化への影響

【結果】TIP60 による H2AX のアセチル化を細胞内で阻害すると、H2AX のリン酸化を阻害した時よりもコロニー形成能が増大すること、また G1/S のチェックポイント活性化が阻害されることが明らかになった。さらに TIP60 の基質として知られているがん抑制因子 p53 にも着目し、H2AX と p53 が同一の経路でコロニー形成に作用しているのかについて検討し H2AX と p53 は、同一の経路で作用していることが示唆された。*HPRT* 遺伝子の変異原性解析の結果においても TIP60 による H2AX のアセチル化を細胞内で阻害すると *HPRT* 遺伝子の変異率が増大することが示されたが、低線量率放射線を与えた場合では、H2AX のリン酸化を阻害した時の方が、*HPRT* 遺伝子の変異率がやや増大する傾向となった。H2AX のアセチル化と ATM のリン酸化との関係については、H2AX のアセチル化を阻害するとリン酸化 ATM の DNA 損傷領域への集積が過剰になり、H2AX のアセチル化と ATM のリン酸化カスケードは、互いに補完的であることが示された。以上より、H2AX のアセチル化が、がん抑制シグナルとして働く可能性があることが示唆された。

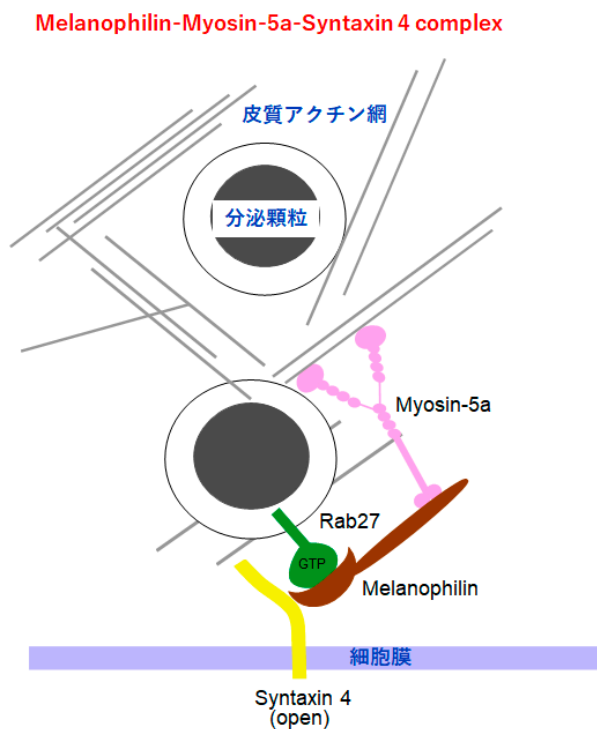
H2AX のアセチル化とリン酸化を細胞内で阻害した時の *HPRT* 遺伝子の変異原性解析の結果

【目的】単量体 GTPase Rab27 とその GTP 結合型に結合するエフェクター分子は、刺激に応じて生理活性物質を放出する調節性分泌経路において、分泌小胞膜の細胞内輸送を制御している。Rab27 エフェクターの 1 つ Melanophilin は、アクチン線維上で働くモーター・タンパク質 Myosin-Va と結合活性を持つことから、細胞辺縁部皮質アクチン網内における分泌小胞の捕捉または輸送に関わる可能性があるが、その役割は解明されていない。本研究では、膵β細胞におけるインスリン分泌過程を対象にして、その機能と作用機構を解明する。

【方法】Melanophilin をコードする遺伝子の自然変異を有する *leaden* マウスと野生型マウスの膵島および単離β細胞を用いて、インスリン分泌能を比較解析する。通常の生理学的、形態学的、生化学的解析に加え、全反射顕微鏡を用いて、蛍光標識したインスリン顆粒の開口放出を生きた細胞でリアルタイムに観測する。また、Melanophilin 分子と相互作用するタンパク質を同定し、その結合能を欠失させた変異体を *leaden* マウス膵β細胞に導入し、インスリン分泌能が回復するかどうかを調べ、Melanophilin 作用の分子機序を解明する。

【結果】*leaden* マウスでは、耐糖能が低下し、単離膵島におけるグルコース依存性インスリン分泌能が減弱していた。Melanophilin は、膵β細胞に発現し、インスリン顆粒膜に局在していた。インスリン顆粒の開口放出を全反射顕微鏡で直接観察すると、*leaden* マウス膵β細胞では、刺激前に細胞膜近傍に局在していなかった顆粒からの開口放出頻度が、野生型膵β細胞に比べて、特異的に減弱していた。膵β細胞内で、Melanophilin は、Rab27a, Myosin-Va, Syntaxin-4 に結合しており、そのいずれかの結合を失わせた Melanophilin 変異体は、野生型と異なり、*leaden* マウス膵β細胞におけるインスリン分泌能低下を回復させなかった。以上のことから、Melanophilin がこれら分子との複合体形成を介して、分泌顆粒が安定的な細胞膜ドッキングを介さずに膜融合を起こす機構を仲介している可能性が示唆された。

Rab27 エフェクター Melanophilin による分泌顆粒開口放出機構



27 小胞体品質管理を支えるPDIと分子シャペロンの連携

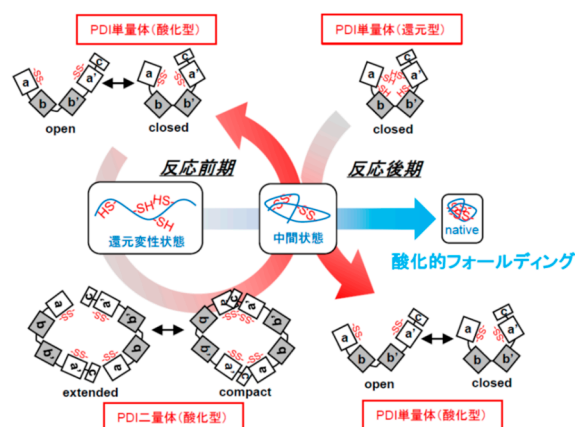
稲葉 謙次

【目的】細胞は、新規に合成されたタンパク質の品質を管理するため厳正かつ巧妙なシステムを備えている。タンパク質品質管理システムの破綻は、細胞に種々のストレスを引き起こすにとどまらず、個体レベルにおいてアルツハイマー病、パーキンソン病などの神経変性疾患や糖尿病を引き起こすことが報告されており、同システムの作用機序を理解することは細胞生物学的にも医学的にも極めて重要である。中でも、二つのシステインが二電子酸化を受けることにより形成されるジスルフィド結合はタンパク質の立体構造形成において重要な役割をもち、細胞におけるタンパク質の恒常性維持とも密接に関わる。細胞内で合成される全タンパク質の約 30%はジスルフィド結合を有しており、その中には我々の健康維持に不可欠かつ創薬のターゲットとなる細胞表面受容体、免疫グロブリン、インスリン、血液凝固因子などが知られる。実際、細胞内にはジスルフィド結合形成反応を促進するための複雑かつ巧妙な触媒システムが存在しており、このシステムを中心的に司るのは 20 種類以上も存在する PDI ファミリータンパク質である。PDI ファミリーの生理的機能の重要性が明らかになる一方、これら酵素が基質にどう働きかけるのか、その作用機序は依然未解明であった。そこで本研究では、高速原子間力顕微鏡を用いた一分子観測や種々の生化学・生物物理学的解析により、PDI が基質の酸化的フォールディングを触媒する分子機構の解明を目指した。

【方法】ヒト由来 PDI を大腸菌により発現し、種々のクロマトグラフィーを用いて精製した。精製した PDI について、酸化処理、還元処理を施し、マイカ基板上に固定化し、高速原子間力顕微鏡による一分子観測を行った。さらに、PDI を固定化した基板上に還元変性させた BPTI および RNase A を基質として加え、基質に働きかける PDI 分子の高速原子間力顕微鏡による一分子観測を行った。

【結果】酸化型および還元型の PDI について高速原子間力顕微鏡を用いて一分子観察することにより、PDI が酸化還元状態依存的に 4 つのドメインで構成される U 字構造の開閉を制御し、この動的構造の制御が還元変性基質の効率的な酸化的フォールディングの触媒に重要な役割をもつことを明らかにした。さらに、BPTI、RNase A、Plasminogen といった形や大きさ、ジスルフィド結合の数が異なる様々な基質を添加することにより、PDI が二量体化することを発見した。興味深いことに、還元変性基質は PDI 二量体の中央に形成される空洞に取り込まれ、そこで迅速なジスルフィド結合の導入と立体構造形成を受けることを明らかにした。この現象は、大きさやジスルフィド結合の数が異なる複数種類の基質に対しても同様に観察された。また、アンフォールド基質依存的に形成された PDI 二量体は、基質のフォールディング状態やフォールディング速度に応じて形状や寿命を変えることを突き止めた。このように、二量体を形成することで生じる中央の空洞中にアンフォールド基質を捕獲し、効率的な酸化的フォールディングを促すという PDI の全く新しい触媒機構を提唱した (図参照)。

PDI による新たな酸化的フォールディングの触媒機構

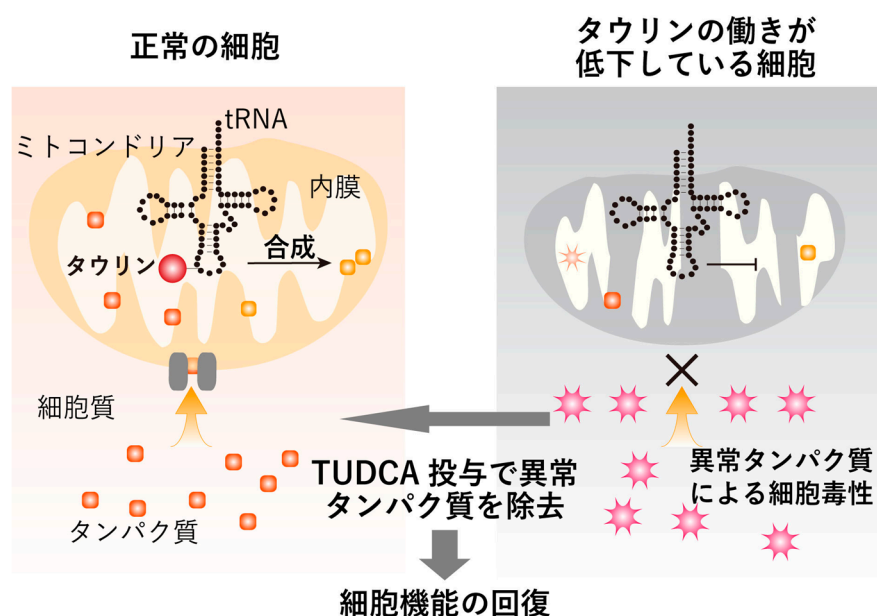


【目的】近年、RNA を構成するヌクレオシドに多種多様な化学修飾が見出され、これら修飾ヌクレオシドが RNA の構造や局在を制御することで、遺伝子発現やタンパク質翻訳を精密に制御することが明らかになってきた。ミトコンドリアには、ミトコンドリア DNA から転写されるトランスファーRNA(mt-tRNA)が存在し、多くの化学修飾が mt-tRNA の塩基上に存在するが、ミトコンドリア機能への関与が不明である。本研究は、mt-tRNA に存在するタウリン修飾に着目し、タウリン修飾の分子機能の解明を本研究の目的とした。

【方法】mt-tRNA タウリン修飾を行う酵素である *Mto1* の全身型ノックアウトマウスと心臓特異的にノックアウトマウスを作製し、ミトコンドリアにおけるタンパク質翻訳とミトコンドリア呼吸活性を中心に、ミトコンドリアにおける代謝変化を解析した。さらに、RNAseq によりミトコンドリア機能障害によるトランスクリプトーム解析を行なった。

【結果】全身型 *Mto1* 欠損マウスの胚は、著しい成長の遅れにより胎生 8 日目よりも早い時期に発生が停止していた。また、心臓特異的欠損マウスも出生直後に死亡した。*Mto1* 欠損マウス由来の培養細胞を解析したところ、mt-tRNA 中のタウリン修飾が消失し、ミトコンドリアでのタンパク質翻訳が著しく低下した。これにより、*Mto1* 欠損細胞では、ミトコンドリア呼吸鎖複合体の形成が障害され、電子伝達系の活性が顕著に低下した。また、電子顕微鏡を用いてミトコンドリアを観察したところ、*Mto1* 欠損細胞においてミトコンドリアの膜構造が崩壊していることが分かった。さらに、ミトコンドリアの膜構造の崩壊により、ミトコンドリアの外で産生されミトコンドリアに輸送される様々なタンパク質が行き場を失っていた。そのため、これらのタンパク質の構造が壊れ、凝集体として細胞質に蓄積し、著しい小胞体ストレスを惹起していた。タンパク質凝集体の蓄積を抑制するため、Chemical Chaperon である TUDCA を *Mto1* 欠損細胞に投与したところ、TUDCA が凝集体の蓄積を解消し、細胞機能を改善した。

ミトコンドリア tRNA タウリン修飾による細胞機能制御

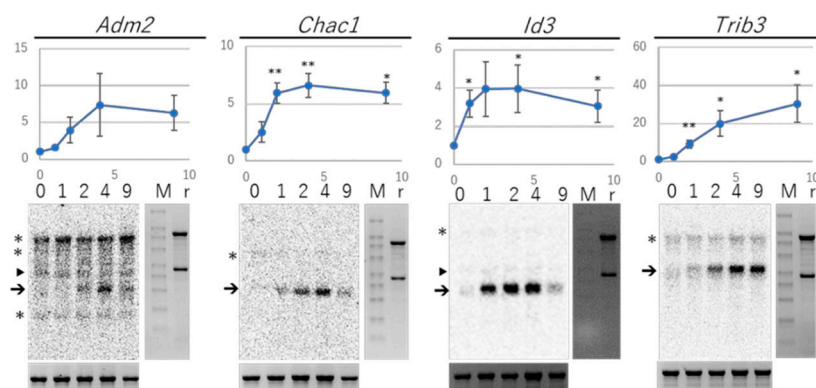


【目的】ヒトゲノムの98.5%は、タンパク質をコードしない領域である。この領域はこれまで大半が機能を持たない「ジャンク」と捉えられてきた。しかし、ENCODE プロジェクトの成果などから、多数の生物種でこの非コード領域から莫大な種数の「長鎖非コードRNA (lncRNA : long non-codingRNA)」が合成されていることがわかった。種々の細胞シグナルに応じて、lncRNA がエピゲノムや遺伝子発現制御に関わることが示されつつあるが、その役割は依然として不明な点が多い。我々は、分裂酵母においてグルコース飢餓時に発現誘導される *fbp1*⁺ 遺伝子領域において、グルコース豊富時にはアンチセンス鎖 lncRNA (asRNA) が合成されていること、またグルコース飢餓にตอบสนองして早期に5' 上流域からセンス鎖 lncRNA がカスケード的に合成され、これと共役してクロマチン構造の段階的な再編成が生じ、最終的に大規模な mRNA の転写が起こることを示した (Hirota et al., *Nature* 2008)。この lncRNA は mlonRNA (metabolic stress-induced long ncRNA) と命名された。本研究では、同様の機構の普遍性を動物細胞で検証するため、膵β細胞における mlonRNA 様の lncRNA の探索と発現制御機能の解析を行った。

【方法】マウス膵β細胞株 MIN6 を、0~4 mM グルコースを含む DMEM で培養し、0、1、2、4、9 時間後に細胞を回収して全 RNA を回収した。この RNA を用いて、次世代シーケンサーを用いた RNA-seq により遺伝子発現を網羅的に解析した。次に、RNA-seq の時系列データを用いて、グルコース飢餓によって発現誘導を受ける遺伝子群を抽出した。さらに上流域に長鎖非コード RNA の発現が認められる染色体領域を、情報科学的手法により探索した。これらの遺伝子座については、qPCR、5'-RACE、ノザンハイブリダイゼーションでさらに定量的な解析を行った。

【結果および考察】RNA-seq データの解析から、マウス膵β細胞由来の MIN6 細胞をグルコース飢餓に暴露すると、数時間のうちに炎症応答やアポトーシス、小胞体ストレスに関係する転写因子など (*Trib3*, *Atf5*, *Atf4*, *Chac1* など) の発現が誘導されることが明らかになった。これらのうち、少なくとも8種の遺伝子に関しては、ノザンブロッティングを行い、連続的な長鎖 RNA の存在を確認した。また、5'RACE によって転写開始点の決定を行い、プロモーター領域からの転写開始を確認した。*Trib3* 転写物に関しては、上流域で RNAi を実施したところ、全領域の転写物の発現量の低下が生じることが明らかになった。これらの転写物には分裂酵母で見出された mlonRNA 様 lncRNA 候補が存在するものと思われる。グルコース飢餓に応じて発現誘導される一群の遺伝子の upstream に、mlonRNA 様の転写物が共通に見出された。これらの遺伝子群を遺伝子オントロジー解析すると、細胞死、炎症応答、小胞体ストレスなどの経路が高い関連性を示した。2型糖尿病の初期段階では、食後高血糖など部分的な血糖値の調節の不全が見られる。膵臓β細胞に対して、血糖値の激しい変動が炎症応答やアポトーシスなどの細胞疲弊を引き起こす可能性があることを、遺伝子レベルで示したことになる。その際に、代謝ストレス応答性の lncRNA が遺伝子発現制御に関わっている可能性があり、β細胞疲弊のメカニズム解明や、2型糖尿病の進行との関係性について将来的な解析が必要になると思われる。

mlonRNA 様転写物 (*印) が確認できた遺伝子群の一部

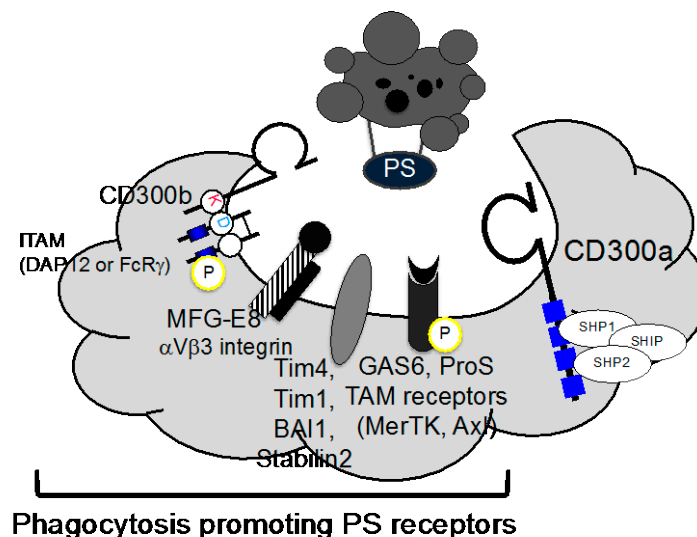


【目的】アポトーシス細胞の貪食は貪食細胞に発現するホスファチジルセリン(Phosphatidylserine, PS) 受容体が担っているが、その制御機構については十分に解明されていない。我々は、マクロファージなどの骨髄球系細胞に発現する抑制性免疫受容体である CD300a を同定し、CD300a が新しい PS 受容体であることを明らかにしてきたが、最近、マクロファージ上に発現する CD300a がアポトーシス細胞上の PS と結合して、貪食を抑制するというこれまで知られていなかった現象を見いだした。本研究では、CD300a による死細胞の貪食抑制のメカニズムと、その病理学的意義を明らかにすることを目的とした。

【方法】CD300a 遺伝子欠損マウス、およびコントロールマウスからの腹腔マクロファージを用いて、pH 感受性の蛍光でラベルした死細胞を貪食させ、その割合をフローサイトメトリー法にて解析した。さらに、マウスモデルとして、腎虚血再灌流モデルを作製し、マクロファージ上で CD300a が欠損しているコンディショナルノックアウトマウス(*Cd300a*^{f1/f1} *Lyz2-Cre* マウス)およびコントロールマウスを用いた腎機能、腎組織病理学的解析を行なった。

【結果】CD300a による死細胞に対する貪食抑制は、マクロファージ上の貪食を促進する活性化 PS 受容体を標的としていることを明らかにした。また、CD300a が死細胞の貪食を抑制していることによる病理学的意義を明らかにするために、死細胞が短時間に多く出現する急性虚血性疾患のマウスモデルとして、マウス腎虚血再灌流モデルを作製した。マクロファージ上の CD300a 遺伝子を欠損させたコンディショナルノックアウトマウスでは、コントロールマウスと比較して腎機能が保たれ、腎組織における腎障害の程度が軽度であった。これらのことから、CD300a は貪食を制御する新たな PS 受容体であり、死細胞の貪食を制御することで虚血性疾患の新たな治療法が提起できる可能性が生じた。

CD300a によるマクロファージ上の貪食抑制

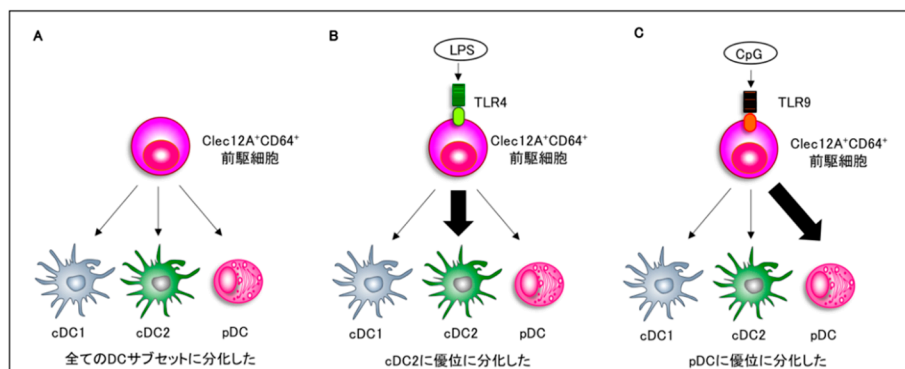


【目的】樹状細胞、単球及びマクロファージは単核貪食細胞に属し、病原性微生物に対する免疫応答や不純物や死細胞を除去することで生体の恒常性維持に寄与する。近年、細胞表面マーカーの充実、セルソーターの技術進歩によって、マウス単核貪食細胞前駆細胞が発見され、同細胞群の分化経路や分化系譜決定転写因子なども明らかになり、分化制御機構が解明されつつある。我々の研究グループもマウス樹状細胞分化に必須サイトカイン受容体の発現を指標に、樹状細胞サブセットのみに分化する前駆細胞を世界に先駆けて発見し、同細胞の分化経路を明らかにした。一方で、ヒト単核貪食細胞の分化研究は、倫理的な問題からサンプル入手が困難な点、あるいは実験系が十分に確率されていない点などから研究が遅れていた。こうした中、我々の研究グループは前駆細胞を発見するために細胞表面マーカーCLEC12AとCD64を見出し、臍帯血及び骨髓からヒト単球のみに分化する単球前駆細胞を同定した。また、他のグループから樹状細胞前駆細胞及びマクロファージ/樹状細胞前駆細胞を同定したという報告があったが、我々が該当細胞の分化能を検討したところ、他系列細胞への分化能を有していたり、あるいは全ての樹状細胞サブセットへの分化能を有していなかったりすることを確認している。つまりヒト樹状細胞前駆細胞は未同定である。そこで本研究では真のヒト樹状細胞前駆細胞を同定することを目的とする。また、病原性微生物感染時には、感染が引き金になり、造血幹細胞から分化の方向性が変更することが報告されている。そこで、本研究ではヒト単核貪食細胞前駆細胞においても感染シグナルに反応し、分化の方向性の偏りが誘導されるかどうか検討する。

【方法】1. 臍帯血から $\text{Lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^+ \text{CD45RA}^+ \text{CD123}^+ \text{CLEC12A}^+ \text{CD64}^-$ 分画を純化し、Flt3L、SCF及びTPO存在下で培養し、樹状細胞への分化能を他の分画と比較検討する。2. 同分画を純化し、免疫不全マウス(NOGマウス)に移植し、ヒト *Flt3L*、*SCF*あるいは*TPO*遺伝子を組み込んだ発現ベクターを微静脈から急速に注入して同サイトカイン群を発現させ、*in vivo*における分化能力を検討する。3. $\text{Lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^+ \text{CD45RA}^+ \text{CD123}^+ \text{CLEC12A}^+ \text{CD64}^-$ 分画からRNAを抽出してcDNAを合成し、*TLR*遺伝子発現を検討する。4. $\text{Lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^+ \text{CD45RA}^+ \text{CD123}^+ \text{CLEC12A}^+ \text{CD64}^-$ 分画をTLRリガンドにて刺激後どのような細胞に分化するかどうか検討する。

【結果】1. $\text{Lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^+ \text{CD45RA}^+ \text{CD123}^+ \text{CLEC12A}^+ \text{CD64}^-$ 分画をFlt3L、SCF及びTPO存在下で培養しフローサイトメーターにて解析したところpDC、CD141⁺cDC1及びCD1c⁺cDC2と全てのヒトDCサブセットへと分化した。また、DCサブセットへの分化能力は他の分画と比較してもっとも優れていた(図A)。2. $\text{Lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^+ \text{CD45RA}^+ \text{CD123}^+ \text{CLEC12A}^+ \text{CD64}^-$ 分画(以下CLEC12A⁺CD64⁻分画)をNOGマウスに移植後、ハイドロダイナミック法にてFlt3L、SCF及びTPOを過剰発現させたところ、*in vitro*の実験と同様に全てのDCサブセットへと分化した。3. CLEC12A⁺CD64⁻分画はTLR4とTLR9を発現していた。そこで、同前駆細胞をLPSあるいはCpGにて2時間刺激後、その後の分化能を検討したところ、LPS刺激後はcDC2にCpG刺激後はpDCへと優位に分化した(図B、C)。

定常状態と感染状態におけるヒト樹状細胞サブセットの分化モデル

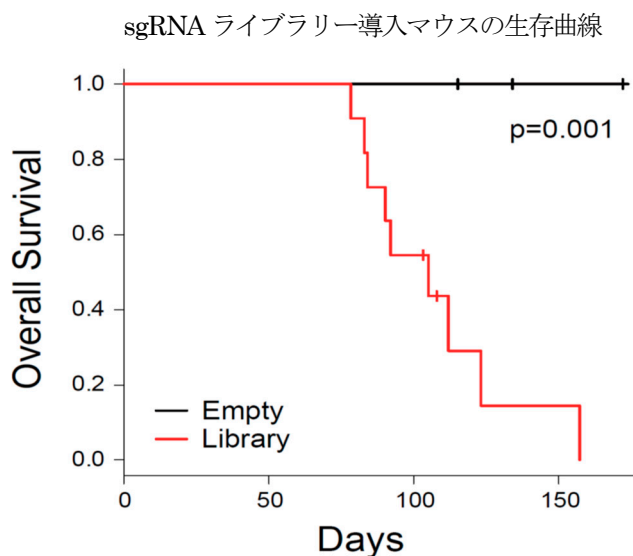


【目的】近年、次世代シーケンス技術の発達により、数多くの悪性腫瘍の遺伝子異常の全体像が解明され、遺伝子変異・コピー数異常・融合遺伝子などの多数の新規異常が同定されてきた。しかし、このように同定された新規異常の生物学的な役割や機能の検証は従来の方法では非常に時間を要するため、その多くについては未だ不明なままである。成人 T 細胞白血病リンパ腫 (adult T-cell leukemia/lymphoma : ATL) は HTLV-1 ウイルス感染を原因とする造血器腫瘍である。我々は世界に先駆けて 400 例を超える ATL 患者で包括的な遺伝子解析を行い、ATL における遺伝子異常の全体像を明らかにしてきた。その結果、50 個の遺伝子変異、26 個のコピー数増加領域、50 個のコピー数減少領域が有意に認められることが明らかとなった。しかし、これらの変異を認める遺伝子やコピー数異常領域に含まれる遺伝子の造血器腫瘍発症における機能的な役割はほとんど明らかとなっていない。本研究では近年発展を続けているゲノム編集技術を用いて、これまでに見出した遺伝子異常の機能的役割を *in vivo* でハイスループットに検証することを目的とした。

【方法】我々が ATL を中心にリンパ腫症例で新規に同定した遺伝子異常のうち造血器腫瘍における機能が不明で、かつ異常が機能喪失を引き起こすと予想される 80 遺伝子について、12 個ずつの sgRNA を含んだ sgRNA ライブラリーを作製した。このライブラリーをレンチウイルスにより、Cas9 を発現するマウスから純化した造血幹前駆細胞分画に導入し、同系マウスに移植を行うことで、造血細胞のみに遺伝子異常を導入する系を確立した。造血器腫瘍が発症した際には、表面マーカーや病理組織などを調べることで表現型を明らかにするとともに、ゲノム DNA を用いて sgRNA 配列領域を増幅しシーケンスすることで、発症した造血器腫瘍で濃縮されている sgRNA の同定を行った。

【結果】まず作製した sgRNA ライブラリーベクターの sgRNA 配列部位を PCR 増幅し、次世代シーケンサーを用いて解析を行い、各 sgRNA が偏りなく含まれていることを確認した。この sgRNA ライブラリーをレンチウイルスにより Cas9 を恒常的に発現しているマウスから純化した造血幹前駆細胞分画に導入し、致死量の放射線量を照射した同系マウスに骨髓移植を行った。すると下図に示す通り、骨髓移植後 3 カ月後頃より sgRNA ライブラリーを導入したマウスの死亡が確認され、一方で空ベクターを導入したマウスでは死亡は認められなかったことから、sgRNA ライブラリー由来の遺伝子異常が何らかの疾患を引き起こしているものと考えられ、実際に衰弱したマウスの形態学的、免疫学的解析を行ったところ、白血病やリンパ腫など、さまざまな種類の造血器腫瘍を発症していることが明らかとなった。

さらに、造血器腫瘍を発症したマウスの腫瘍細胞から採取したゲノム DNA を用いて、sgRNA 配列領域のシーケンスを行ったところ、腫瘍細胞で濃縮されている sgRNA を同定することが可能であった。これらの結果により、本手法が造血器腫瘍の発症に重要な遺伝子異常を *in vivo* でハイスループットに解析するための強力なツールであることが示され、現在さらに詳細な解析を進めている。

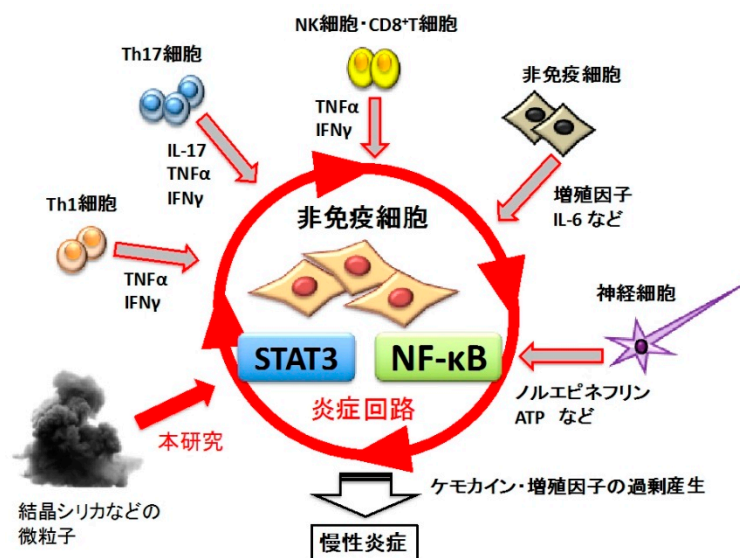


【目的】大気汚染が深刻化する現代社会において、PM2.5 や結晶性シリカなどの外来微粒子による健康被害は重要な課題である。本提案では、これら微粒子による影響が大きい呼吸器を研究対象として、炎症回路およびゲートウェイ反射という独自の視点から疾患モデルを利用した研究を行い、微粒子による呼吸器炎症・発がん機構を解明することを目的とする。

【方法】炎症回路の活性化が増強している F759 マウスに結晶性シリカを暴露し、呼吸器炎症を誘導する。現在はシリカ懸濁液を点鼻しているが、鼻部エアロゾル暴露装置を研究室で導入し、導入後はシリカ懸濁液をエアロゾル化してより暴露条件をヒトの状況と類似させて実験を行う。さらに、タバコに含まれる有毒物質である NNK を結晶性シリカと同時に暴露させることによって発がんに対する促進効果を検討する。また、体内に取り込まれた微粒子がどのように分布し、また除去されていくのか、蛍光標識微粒子をマウスに暴露し、その蛍光シグナルを追跡することによって明らかにする。

【結果】ヒト気管支上皮細胞に結晶シリカを添加することによって炎症応答（IL-6 の発現）が誘導された。マウスにおいて、結晶シリカの点鼻もしくはエアロゾル暴露によって肺に炎症を誘導することができた。炎症応答が遷延化している F759 マウスを用い、タバコ有毒物質 NNK とともに結晶シリカをエアロゾル暴露しているが、炎症像は認められるものの、現時点で腫瘍形成には至っておらず、腫瘍化にはより長期の時間経過や遺伝子変異などの因子が必要と考えられる。本研究は、第 37 回札幌国際がんシンポジウムにおいて発表した。

本研究の仮説：外来微粒子による炎症回路の活性化

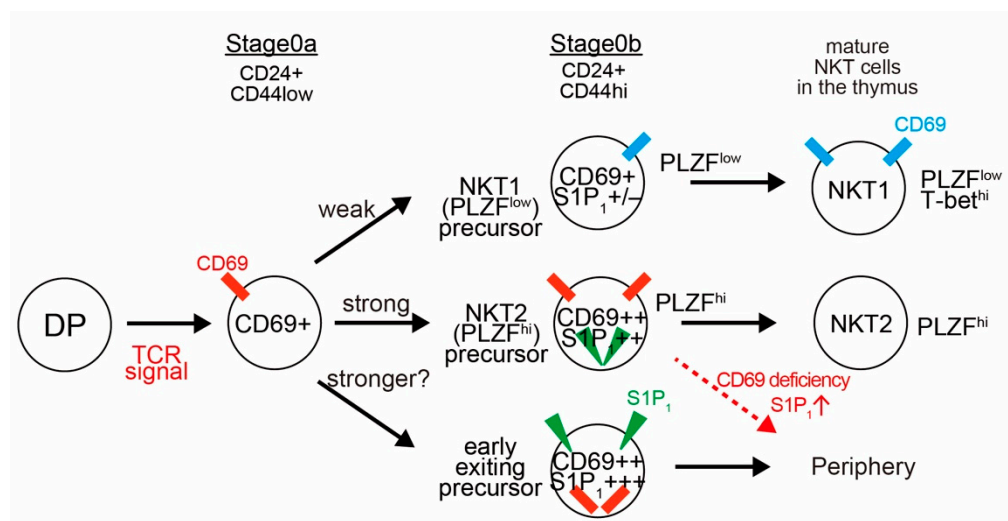


【目的】 Natural Killer T (NKT) 細胞は、CD1d 分子上に提示された「糖脂質」を認識する多様性の乏しいインバリアント T 細胞抗原受容体 (TCR) ($V\alpha 14J\alpha 18/V\beta 8,7,2$) を有する細胞集団である。抗原認識により迅速にサイトカイン産生などの様々なエフェクター機能を発揮することで、感染症や腫瘍形成に対して防御的に働く一方で、自己免疫疾患やアレルギー・生活習慣病などの免疫関連疾患に対しては、対象疾患により防御的な反応もしくは有害な反応を示すことが知られている。最近の研究により、NKT 細胞は、 $IFN\gamma$ を産生する NKT1 細胞、 $IL-4$ を産生する NKT2 細胞、 $IL-17$ を産生する NKT17 細胞の 3 つの異なるサブセットが存在することが明らかとなった。そして興味深いことに、これらのエフェクター機能を有する各 NKT 細胞サブセット (*i.e.* NKT1, NKT2, NKT17 細胞) への分化運命決定は、胸腺内での分化過程で起こることがわかった。しかし、その分化のメカニズムの詳細は良くわかっていない。

【方法】 CD69 分子は、胸腺内の分化の過程にある細胞に発現することが知られている。そこで胸腺内における各 NKT 細胞サブセットへの分化運命決定に、CD69 分子が関わっているかを調べる目的で、*CD69* 欠損マウスを用いて解析を行った。また CD69 は $S1P_1$ の発現を抑制し、胸腺細胞の胸腺外への移出を防ぐ働きをする。そこで、 $S1P_1$ アゴニストである FTY720 を *CD69* 欠損マウスに投与し、 $S1P_1$ の発現を抑制することによる NKT 細胞サブセット分化への影響について解析した。

【結果】 *CD69* 欠損マウスでは、胸腺内 NKT2 細胞の分化が顕著に低下することがわかった。一方で、NKT1 細胞の分化、NKT17 細胞の分化に違いは見られなかった。また *CD69* 欠損による NKT2 細胞の分化低下は、 $CD24^+NKT2$ 前駆細胞が $S1P_1$ を発現することにより、早期に胸腺外に排出されてしまうことが原因であることが判明した。つまり、 $CD24^+NKT2$ 前駆細胞は、CD69 を発現することで $S1P_1$ の発現を抑制し胸腺内に留まることが、NKT2 細胞の分化完遂に重要であると考えられる。さらに、NKT2 細胞は胸腺内に強い TCR シグナルを受け取っていることが判明した。すなわち、強い TCR シグナルを受けた細胞は、CD69 を高発現する NKT2 前駆細胞へと分化し、 $PLZF^{hi}$ の NKT2 細胞へと分化する。一方、弱い TCR シグナルを受けた細胞は、CD69 非依存的に NKT1 細胞へと分化を遂げることが示唆された。この結果は、NKT 細胞の各サブセットへの運命決定は、正の選択を受ける際の TCR のシグナルの強弱、もしくは長短によってなされ、従来考えられていたよりも早い段階で、運命決定がされることを示唆するものである。また、CD69 が、成熟分化過程にある細胞の胸腺内での滞在時間を制御することで、その分化成熟に寄与することを初めて示したものであり、科学的な意義は大きいと考える。

NKT 細胞の胸腺内分化運命決定機構

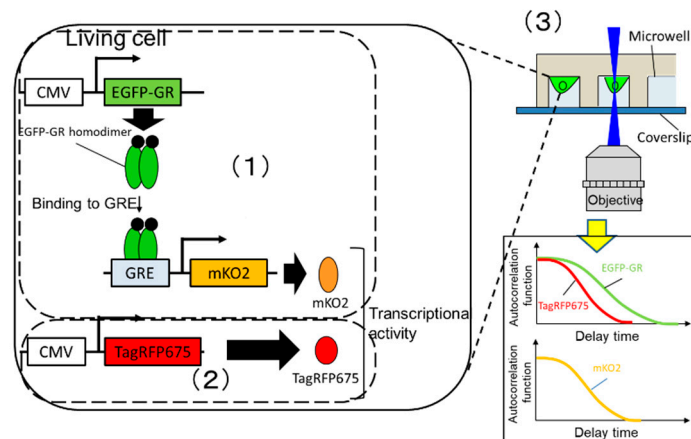


【目的】 グルココルチコイドレセプター (Glucocorticoid Receptor : GR) は、核内受容体のひとつであり、糖代謝や、免疫制御、抗炎症作用などに広く関与していることが知られ、これまでに多くの研究がなされている。しかし一方では、その立体構造や、機能については、まだ不明点が多い。我々は、これまで生細胞内での GR の定量的な機能解析を目指してきた。本研究ではその解明のため、GR の 2 量体化量と、GR の直接的機能としての転写活性量とを同一単 1 細胞由来溶解液で検出・解析を行い、その関連を明らかにすることを目的とした。

【方法】 我々の開発したマイクロウェル・蛍光相関分光測定システムに、新たに 1 細胞由来の転写活性測定系の拡張を行った。そのため、まず 3 色蛍光相関分光法を用いたダイマー生成量と生細胞内転写活性同時測定システムの開発を行った。次に CMV プロモーター下流に EGFP-GR (緑色) を組み込んだプラスミド、GR 応答性のプロモーター配列の下流に蛍光タンパク質である mKO2 (橙色) を組み込み GR の結合によって mKO2 の発現が誘導されるプラスミドを構築した。EGFP-GR 及び内部コントロールである TagRFP675 (赤色) と一緒に U2OS 細胞に導入し、3 色 FCS 測定条件を確立し、マイクロウェルシステム中にて、1 細胞内に発現した EGFP-GR の濃度と転写活性をそれぞれ定量した。

【結果】 3 色の蛍光分子の FCS 測定により GR の発現量と 2 量体の割合、並びに転写活性量の関係が明らかになった。野生型 EGFP-GR/WT 及び 2 量体欠損変異体 EGFP-GR/A458T においてホモ 2 量体の濃度が増加するにつれて転写活性も増加する事が観察された。また、直線フィッティングから同濃度のホモ 2 量体が存在する場合、EGFP-GR/WT は EGFP-GR/A458T より高い転写活性を示した。EGFP-GR/WT と EGFP-GR/A458T の DNA 結合における解離定数 (K_d) を算出し、EGFP-GR/WT が EGFP-GR/A458T よりも強く DNA と結合する事を明らかにした。これからのことは、DNA と GR の結合の強さが転写活性の制御を行っていることを明らかにした。

単 1 細胞 3 色蛍光相関分光測定方を利用したタンパク質発現量解析

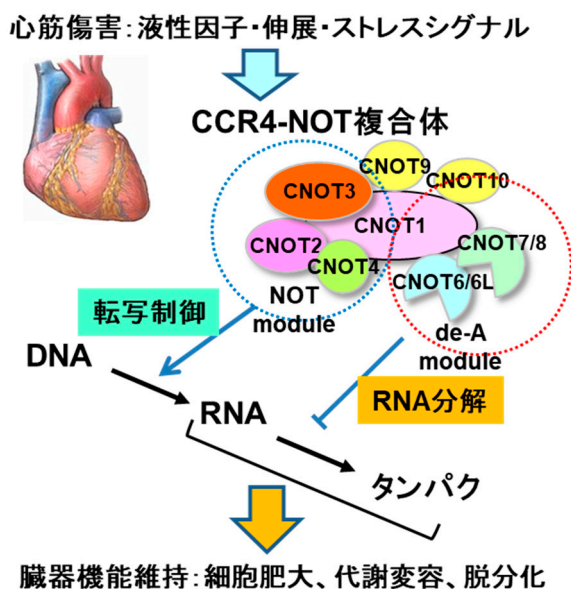


【目的】循環器疾患は先進国における死因のトップにあり疾患発症のメカニズムの解明が急務の課題である。心不全のシグナル伝達における転写、エピゲノムなど mRNA 合成の制御機構について多くの知見が蓄積されてきた一方で、mRNA 分解など代謝制御の解析は未だ十分とはいえない。私達は、これまでに CCR4-NOT 複合体を新規の心機能調節因子として単離し (Neely et al, 2010)、さらに Cnot3 の標的 mRNA として Atg7 を見出し、Cnot3 が Atg7 mRNA の poly(A)鎖分解、翻訳抑制を介して p53 誘導性の心筋細胞死を阻止することを明らかにした (Yamaguchi et al, 2018)。本研究では CCR4-NOT 複合体を介したグローバルな RNA 制御の分子メカニズムを明らかにすること、ならびにマウス心不全モデルにおける CCR4-NOT の deadenylase 因子の生理機能を明らかにすることを目的とした。

【方法】薬剤誘導性に CCR4-NOT を欠損させる細胞モデルで各種シーケンス解析により、mRNA 発現量、Cnot1 結合強度、転写効率、poly(A)鎖長の変化を包括的に解析した。また、マウス心不全モデルにおける deadenylase 因子の機能、役割について遺伝子欠損マウスを用いて解析を行った。

【結果】CCR4-NOT 複合体内の NOT module と deadenylase module では機能の異なる遺伝子の発現調節に寄与することが分かった。遺伝子毎の poly(A)鎖長の解析から、mRNA 分解のみならず転写に対しても CCR4-NOT が寄与することが分かったことから、CCR4-NOT が遺伝子発現の buffering 作用をもたらすことが考えられた。また、deadenylase 因子が心不全の代償期に心機能維持に重要であることが分かった。さらに、deadenylase 因子の標的 mRNA の 1 つが心不全における線維化の防御に重要であることを解明した。今後、さらに心不全組織における細胞内の制御機構ならびに細胞間の相互作用を介したメカニズムを解明していく予定である。

RNA poly(A)制御因子 CCR4-NOT による転写、翻訳、mRNA 分解の制御



37 機能ゲノム部位の「世代間エピゲノム継承機構」の解析

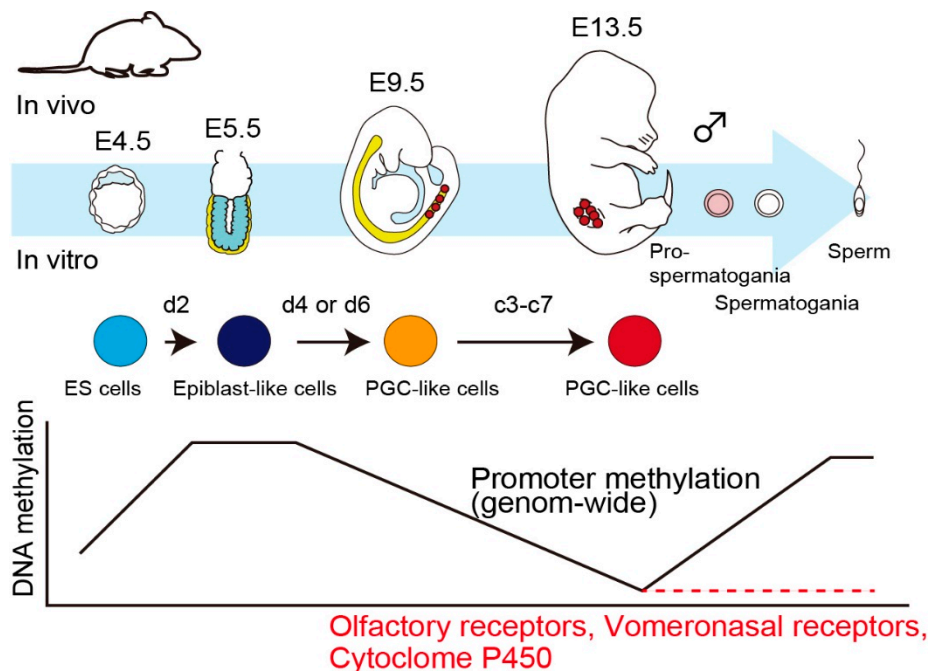
栗本 一基

【目的】ゲノム情報は親から子へと伝達され生命の連続性を担保するが、哺乳類ではDNAのメチル化など後成的に付与された情報(エピゲノム)はほとんど遺伝しない。これは、配偶子の起源である始原生殖細胞(primordial germ cell: PGC)におけるエピゲノムの消去と、その後の再構築からなる初期化機構による(エピゲノムリプログラミング)。PGCにおけるDNAメチル化消去は、メチル化維持に必須の遺伝子 *Uhrf1* の発現抑制による受動的な機構によると考えられる。本研究の目的は、PGCの体外再構成および増殖システムを用いて、遺伝子プロモーターを含む機能ゲノム部位の世代間継承メカニズムを解明することである。

【方法】マウスにおいては、PGC形成過程でゲノムDNAのメチル化が消去された後、雄では前精原細胞の分化にともなってゲノムワイドに再度メチル化を受ける。この再メチル化過程でのメチル化されにくく、低メチル化状態を維持するゲノム部位は、リプログラミング過程が異常であった場合に最も影響を受けやすいゲノム部位であると予想される。本研究ではまず、体外培養系および胚体内のPGC、前精原細胞におけるゲノムワイドなDNAメチル化および遺伝子発現データを解析し、PGC形成過程で脱メチル化されるが、前精原細胞では再メチル化されず低メチル化状態を維持するプロモーターを同定した。

【結果】上記の条件に合致するプロモーター(PGCで脱メチル化され前精原細胞で低メチル化状態を維持するプロモーター)は1,081個同定され、嗅覚受容体、鋤鼻受容体、シトクロームP450構成因子など、重要な機能カテゴリーに属する遺伝子が有意に濃縮していた。これらの遺伝子はPGC発生過程では全く発現しておらず、プロモーターの低メチル化は次世代における発現のために準備されたものである可能性があり興味深い。また、初期胚において *Uhrf1* タンパク質の分解に関わることが知られている *Pramel7* は、意外なことにPGCにおいて全く発現が検出されなかった。その一方で、PRAMEファミリーに属する別の遺伝子 *Pramel1* の発現はPGC発生過程で上昇しており、PGCにおける *Uhrf1* の転写後制御に関与する可能性があり、その機能検証は興味深い。

雄性生殖細胞への分化において低DNAメチル化状態を維持するプロモーター群の同定



38 ウイルス感染における液性免疫記憶形成機序

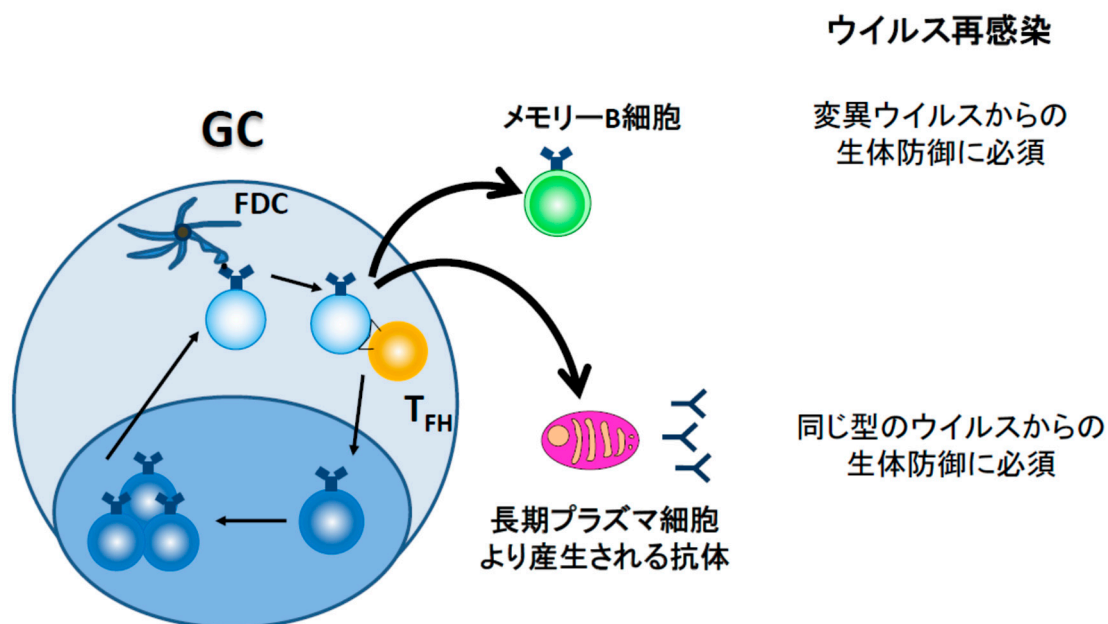
黒崎 知博

【目的】インフルエンザ感染に対する液性免疫記憶を支える細胞として、常に抗体を産生し続ける長期プラズマ細胞と、ウイルス刺激により活性化されるメモリーB細胞と2種類の細胞集団が存在する。しかしながら、インフルエンザ再感染時、この2種類の細胞群のユニークな機能、及び生成機序は明らかにされてきていなかった。従って、本研究では、この課題にチャレンジした。

【方法】H1N1型のインフルエンザ株（Narita株）を先ず、マウスに一次感染し、免疫記憶を形成さす。その後、同じ株であるNarita株を感染さす系と、H1N1型ではあるが変異株であるPR8株を感染さす系を用いて、2種類の細胞群のインフルエンザウイルス再感染時における機能検定をおこなった。

【結果】長期プラズマ細胞により産生される抗体（Antibody：Ab）は、同じ株のインフルエンザ感染に必須の役割をしていた。一方、この抗体は、変異インフルエンザPR8感染には、全く効果がなく、一次感染時に形成されたメモリーB細胞が必須であった。この機能的メモリーB細胞の抗体は、胚中心（GC）を経て変異を受け、親和性が高くなると同時に、他の型のインフルエンザウイルス（例えば、鳥インフルエンザウイルスであるH5N1型）に対する反応性も獲得していた。

メモリーB細胞と長期プラズマ細胞の機能相違



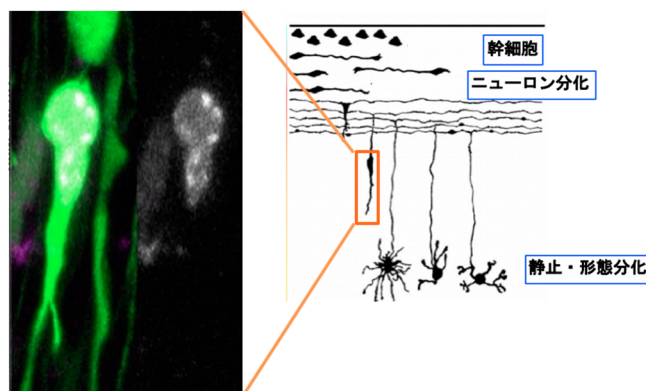
【目的】発生過程の哺乳類脳は、神経幹細胞から誕生したニューロンとグリアが組織内を大規模に遊走することにより、多数の細胞が秩序正しく重層した皮質構造を形成する。我々はこれまでに、発生中の小脳脳皮質を遊走する顆粒細胞を高解像ライブ観察し、核が著しく変形して狭い組織空間をすり抜けるように前進することを見出した。また皮質形成期のニューロン核で DNA 損傷の標識分子の発現が見られた。これらの結果から、正常発生においてニューロン核は組織間隙を移動するために高い柔軟性を維持しており、その代償として移動に伴う機械的ストレスにより不可避の DNA 損傷を受けることが示唆された。本研究ではこの仮説を検証するべく、小脳皮質形成における顆粒細胞の遊走をモデルに、核の物性と運動能を制御する核ラミナ分子の発現機構を解析し、さらに機械的ストレスによるニューロン核損傷の実態と修復機構を明らかにすることを目標とした。

【方法】＜細胞の弾性測定＞ マウスの小脳を取り出し、トリプシン処理を施して細胞を分散させ、パーコール密度勾配遠心を行い小脳顆粒細胞を回収した。培地に懸濁後、ガラス培養皿に播種して原子間力顕微鏡による弾性率計測を行った。＜マウス小脳への遺伝子導入と免疫蛍光観察＞ 出生 8 日齢のマウスを氷上麻酔した後、pCAG-LMNA-EGFP を小脳溝に注入し、パルス電流発生装置 CUY21 (Nepagene) を用いて電気穿孔法で遺伝子導入を行った。脳は 4%パラホルムアルデヒドで灌流固定し、ビブラトームで 100 μm 厚の小脳矢状切片を作製して免疫蛍光染色を施し、共焦点顕微鏡 (FV1000) で観察した。＜Transwell 遊走アッセイ＞ 分散した顆粒細胞を多孔性ポリカーボネート膜 (MilliCell) 上に培養し、5 時間後に固定して免疫蛍光染色し、DNA 損傷の有無を観察した。

【結果】1. 核ラミナ分子が核の物性と移動を制御する機構：皮質発生期の小脳顆粒細胞は特に遊走期に柔らかく、核の弾性を制御するとされる核ラミナ分子ラミン A の発現が殆どないことが確かめられた。遊走前の小脳顆粒細胞にラミン A を強制発現させると細胞遊走が有意に抑制されることから、ラミン A の発現抑制が顆粒細胞遊走能の制御に必要であることが示唆された。2. 機械的ストレスによる核損傷の実態と修復機構：遊走に伴う機械的ストレスが核損傷を誘発する可能性を検証するため、組織間隙を模した数 μm の隘路を含む基質上で顆粒細胞を培養し、DNA 損傷マーカーの発現を調べたところ、隘路通過後に一過的に上昇することが確かめられた。すなわちニューロンは移動に伴う機械的ストレスにより核損傷を受けることが明らかになった。

ニューロン遊走に伴う核への機械的ストレス

ニューロン遊走のライブイメージ

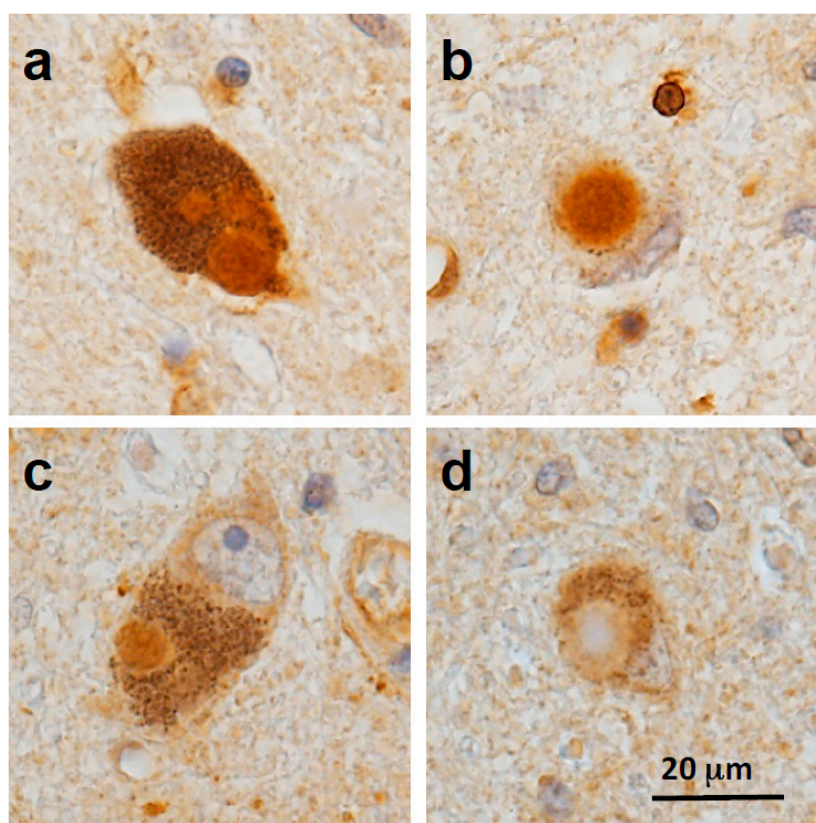


【目的】我々は、1986 年以来、L-ドーパ（ドーパ）神経伝達物質仮説を提起してきた。2014 年、その受容体候補分子として G タンパク質連関型受容体（GPCR）の一つ GPR143（OA1）を同定した。ドーパは、パーキンソン病（PD）におけるもっとも有効な治療薬である。本研究計画は、GPR143 の PD における病態への関与の有無について解析することを目的とする。

【方法】抗ヒト GPR143 ポリクローナル抗体を作製し、その特異性をウェスタンブロッティング、および免疫細胞化学染色、抗原ペプチドによる吸収実験により確認する。倫理委員会における承認を得た上で、PD 剖検脳組織において、抗ヒト GPR143 抗体ならびに抗リン酸化 Ser129 α -シヌクレイン抗体を用いて免疫組織化学的解析を行う。陽性シグナルの可視化はジアミノベンチジン、ないし蛍光 2 次抗体により行った。

【結果】今回新たに作製した抗ヒト GPR143 ポリクローナル抗体を用いた免疫組織化学的解析により、GPR143 陽性シグナルがヒト剖検脳における中脳領域において存在することを確認した。PD 剖検脳組織においては、GPR143 陽性シグナルが、PD に特徴的な病理組織像であるレビー小体に局在することを見出した。

GPR143 はレビー小体に局在する



【目的】 Piwi はショウジョウバエ生殖細胞の維持継承に必須な蛋白質であり、piRNA と呼ばれる小分子 RNA と複合体を形成しレトロトランスポゾンの発現を転写レベルで抑制する。しかし、レトロトランスポゾンの脱抑制がなぜ生殖機能不全を引き起こすかは不明である。近年、我々は Piwi がレトロトランスポゾンのみならず周囲領域のクロマチン状態やレトロトランスポゾンがイントロン内に挿入された遺伝子の発現も抑制することを発見した (Mol. Cell 2016)。すなわち、Piwi-piRNA 複合体は蛋白質コード遺伝子の発現も抑制し得ると言える。そこで本研究は、Piwi の消失による生殖機能不全はレトロトランスポゾンというよりも蛋白質コード遺伝子の発現異常によって引き起こされるという仮説をたて、これを検証することとした。近年、レトロトランスポゾンのゲノム内配置が蛋白質コード遺伝子の発現を制御する「足場」となることが報告されており、本研究が新たな生殖細胞形成機構の解明とその関連因子の同定につながることを期待される。

【方法】 本研究は Piwi-piRNA 複合体がレトロトランスポゾンのみならず、タンパク質コード領域のエピゲノムを変化させ、これが生殖幹細胞の維持異常という表現型に直結しているという仮説をたてており、以下の 2 つのアプローチをとる。

1. Piwi-piRNA 複合体が制御する標的タンパク質遺伝子の同定

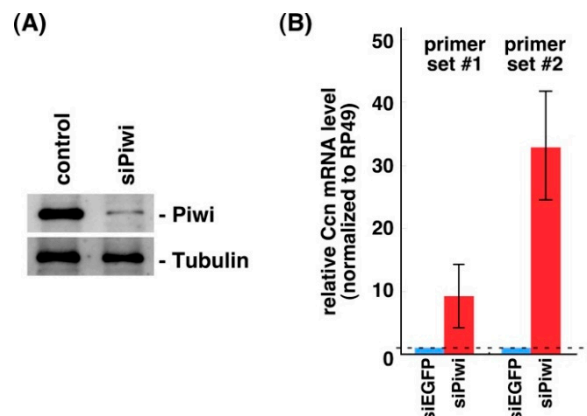
2. レトロトランスポゾンの抑制機構解明からのアプローチ

1. の解析では個々の標的遺伝子候補から実際に Piwi-piRNA 複合体によって制御される遺伝子を絞り込む。一方、2. の解析では、新たなレトロトランスポゾン抑制因子を同定し、その中でレトロトランスポゾンのみを制御する蛋白質がないか探索する。もしそのような蛋白質が得られれば、実際に蛋白質コード遺伝子の制御と生殖細胞形成の直接的接点の証明になると考える。

【結果】 1. 細胞外マトリックス結合蛋白質と予測される *ccn* 遺伝子が Piwi ノックダウン細胞で発現上昇することを見出した。2. 新規クロマチン制御因子として CG14438 遺伝子を見出した。CG14438 をノックダウンするとトランスポゾンの発現が上昇したが、piRNA 量に変動は認められなかった。CG14438 ノックダウン細胞では、転写レベルでレトロトランスポゾンの発現が減少していることを ChIP 解析で明らかにした。しかし、mRNA-seq 解析を行った結果、CG14438 はトランスポゾンのみならず、*ccn* も制御していたことから、当初目的としていたレトロトランスポゾン制御に特異的な因子ではないと結論づけた。

Ccn は細胞間相互作用に働く因子であり、生殖幹細胞とニッチの相互作用に機能する可能性が示唆されている。したがって、*ccn* 遺伝子を有力な Piwi の下流で働く蛋白質コード遺伝子の一つとして位置付け、その制御が実際に生殖細胞形成に必須であるかどうかを今後検討したい。

Piwi ノックダウン細胞における *ccn* 遺伝子の脱抑制

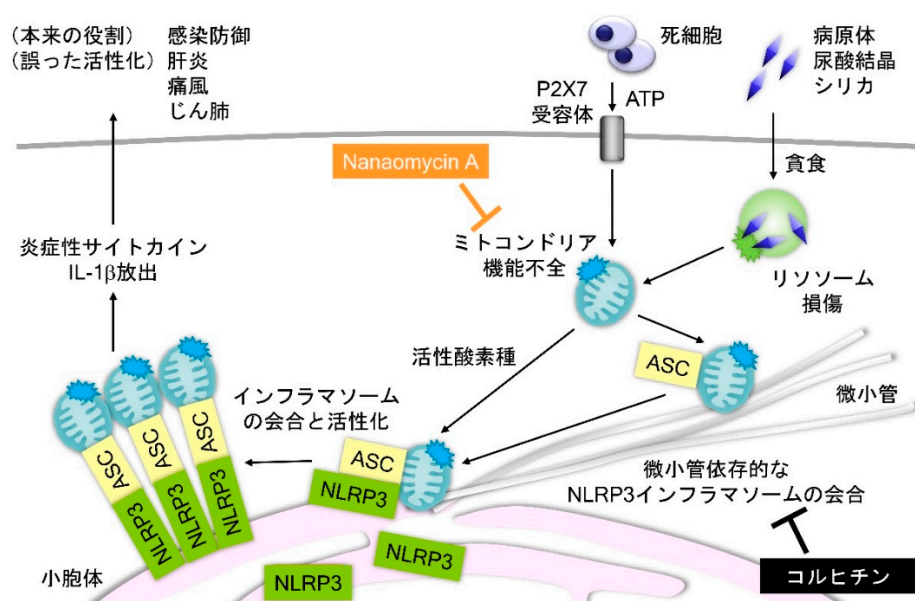


【目的】病原体成分をパターン認識受容体により感知した自然免疫機構は、適切なレベルのサイトカインやインターフェロンを産生することにより、生体を防御する。一方で、病原体が制御できる範囲を超えて増殖した際に、過剰な病原体成分に晒された自然免疫機構は、サイトカインストームなどの過度の炎症を惹起して組織障害を引き起こす。さらに、過度に摂取した栄養成分の代謝物や死細胞から放出された刺激性成分などに反応した自然免疫機構は、生活習慣病や急性組織障害などの発症要因となる。NLRP3 インフラマソームは、このような正負の両面性を有する代表的な自然免疫機構であり、様々な疾患の発症に深く関わっている。本研究では、NLRP3 インフラマソームの活性化を促進することが知られている活性酸素種に着目し、制御機序の解明と制御化合物の同定に取り組んだ。

【方法】本研究には、生後 6~9 週齢の C57BL/6 マウスを用いた。骨髓由来マクロファージは、C57BL/6 マウスの後肢から造血幹細胞を単離した後、Macrophage colony stimulating factor を加えた RPMI 培地で培養を行うことにより分化誘導した。腹腔マクロファージは、チオグリコレートを投与した C57BL/6 マウスから単離した。Interleukin (IL)-1 β は、ELISA により測定した。好中球の数は、フローサイトメーターにより CD11b(+)Ly6g(+)細胞を検出して測定した。ミトコンドリア由来の活性酸素種のレベルは、フローサイトメーターにより MitoSOX を検出して測定した。アセトアミノフェン誘導性肝炎や尿酸結晶/シリカ粒子誘導性腹膜炎などのマウス実験は、過去の論文を参考に行った。

【結果】NLRP3 インフラマソームをより特異的に、より強力に抑制する化合物を求めて、スクリーニングを行った。最終的に、グラム陽性細菌であるストレプトマイセス属が産生する抗生物質として知られている Nanaomycin A およびその類似体を、NLRP3 インフラマソームを阻害する化合物として同定した。そこで、Nanaomycin A の作用機序解明と有用性検証を行い、以下 1~3 の成果を得た。1. Nanaomycin A は、ATP や尿酸結晶で刺激したマクロファージにおいて、活性酸素種の産生を抑制し、NLRP3 インフラマソームを介した IL-1 β の放出を阻害する。2. Nanaomycin A は、ATP による NLRP3 インフラマソームの活性化が引き起こすアセトアミノフェン誘導性肝炎マウスモデルにおいて保護的に働く。3. Nanaomycin A は、尿酸結晶などの腹腔内投与が引き起こす痛風マウスモデルにおいて、治療効果を示さない。

NLRP3 インフラマソームの活性化と化合物による抑制



43 乳がんに関わる核内長鎖ノンコーディングRNAの解析

斉藤 典子

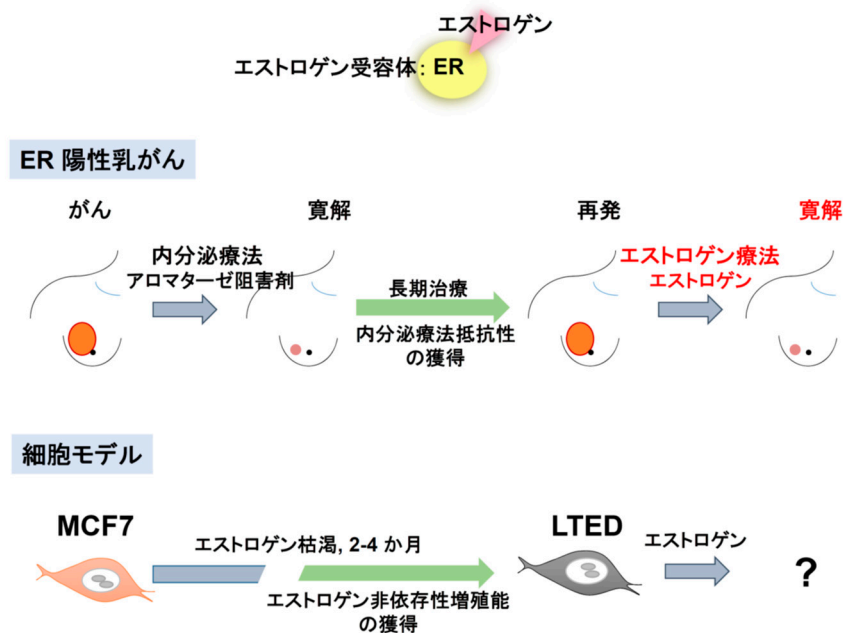
【目的】乳がんのおよそ 70%を占めるエストロゲン受容体 (ER) 陽性型乳がんは、女性ホルモンのエストロゲン存在下で増殖するため、エストロゲンを阻害する内分泌療法が有効である。しかし、治療中にがん細胞は治療抵抗性を獲得し、その結果、高い頻度で再発することが問題である (下図)。一見矛盾するが、再発乳がん患者に高濃度のエストロゲンを投与することにより、寛解することが古く (1950 年代) よりみとめられており、「エストロゲン療法」とよばれてきた (下図)。しかし機序は明らかでなく、その解明が必要である。

ヒト乳がん培養細胞株である MCF7 細胞をエストロゲン枯渇下で培養して生き残る LTED 細胞は、この内分泌療法抵抗性再発乳がんのモデル細胞である (下図)。研究代表者の斉藤は、LTED 細胞で、タンパク質に翻訳されないノンコーディング RNA (non-coding RNA) 群が過剰発現することを見出し、これらを「エレノア」と命名した。エレノアは、細胞核内で RNA クラウドとよばれる構造体を形成し、ER をコードする *ESR1* 遺伝子座を活性化する。エストロゲン枯渇下でのがん細胞の増殖に必須なノンコーディング RNA である。本研究では、再発乳がんに対する治療候補であるエストロゲン療法に、エレノアがいかに関わるかを分子レベルで理解することを目的とした。それにより、ノンコーディング RNA が担う、新たなエピジェネティクスの制御機序を明らかにすることが期待される。

【方法】LTED 細胞をエストロゲンおよびエストロゲン類似化合物で処理し、その後、エレノアクラウド形成、*ESR1* 遺伝子の発現、細胞増殖への影響を調べるために、FISH、qRT-PCR、FACS 解析などを行った。

【結果】エストロゲンとレスベラトロールは LTED 細胞において、エレノアクラウド形成、*ESR1* 遺伝子の発現、細胞増殖を抑制すること、さらに、アポトーシスを誘導することを明らかにした。これらの結果は、エストロゲン療法を細胞培養下で再現可能としたこと、それにより、治療の分子機序の解明が可能となったこと、エレノアが本療法の標的である可能性が示された。さらに、治療抵抗性となって再発した乳がん細胞には、適確な“トリガー” (エストロゲン) を加えることで効率的にアポトーシスを誘導できるという、乳がんの脆弱性を新たに示した。細胞核内ノンコーディング RNA が、がんの治療選択の指標と治療の標的となる可能性を示した。

ER 陽性乳がんの内分泌療法抵抗性獲得とエストロゲン療法

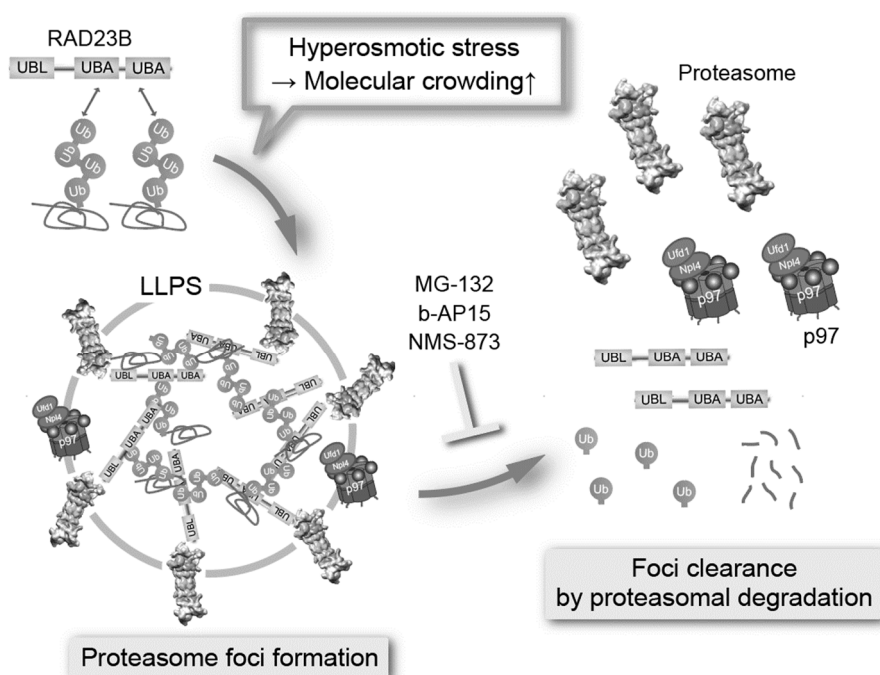


【目的】プロテアソームはユビキチン化されたタンパク質を選択的に分解することで、様々な細胞機能の制御に必須の役割を果たしている。従来、プロテアソーム基質はユビキチン化されれば一義的に分解されると考えられてきたが、最近ではプロテアソームと相互作用する様々なアクセサリータンパク質が同定され、基質タンパク質の運搬・認識・分解の各ステップを厳密に調節していることが明らかになってきた。本研究は、我々が見出したプロテアソーム核内 foci を材料に、アクセサリー分子の機能連携と階層性を明らかにすることを目的とする。

【方法】プロテアソームの生細胞イメージング解析のため、プロテアソームサブユニット遺伝子に蛍光タンパク質をノックインしたプロテアソーム可視化ヒト培養細胞を作製した。次いで、様々なストレス存在下でプロテアソームの局在変化を解析するとともに、プロテアソームと相互作用するアクセサリー分子を質量分析により解析した。同定されたアクセサリー分子の siRNA のノックダウンまたは遺伝子破壊、あるいは特異的阻害剤を用いてプロテアソーム依存的タンパク質分解に与える影響を解析した。

【結果】生細胞イメージングに適したプロテアソーム可視化細胞の作出に成功した。さまざまなストレス下でプロテアソーム局在変化を解析したところ、高浸透圧ストレス刺激によりプロテアソームがユビキチン化基質とともに核質で foci を形成することを見出した。この foci は一過的な構造体であり数時間後には消失するが、プロテアソーム阻害剤処理により安定化したため、核内のタンパク質分解の場を可視化していることが示唆された。質量分析解析の結果、このプロテアソーム foci に局在化するアクセサリー分子としてユビキチン選択的シャペロン p97、シャトル分子 RAD23B、ユビキチンリガーゼ UBE3A を同定した。RAD23B と UBE3A はプロテアソーム foci の形成に、p97 はプロテアソーム foci のクリアランスに寄与することがわかった。興味深いことにプロテアソーム foci は液滴様の性質をもち、まず RAD23B がユビキチン鎖と液-液相分離することで液滴を形成し、プロテアソームを集積させることがわかった。本研究により、核内のタンパク質品質管理経路とアクセサリー分子による分解ネットワークの存在が明らかとなった。

プロテアソーム foci は核内タンパク質品質管理の場である

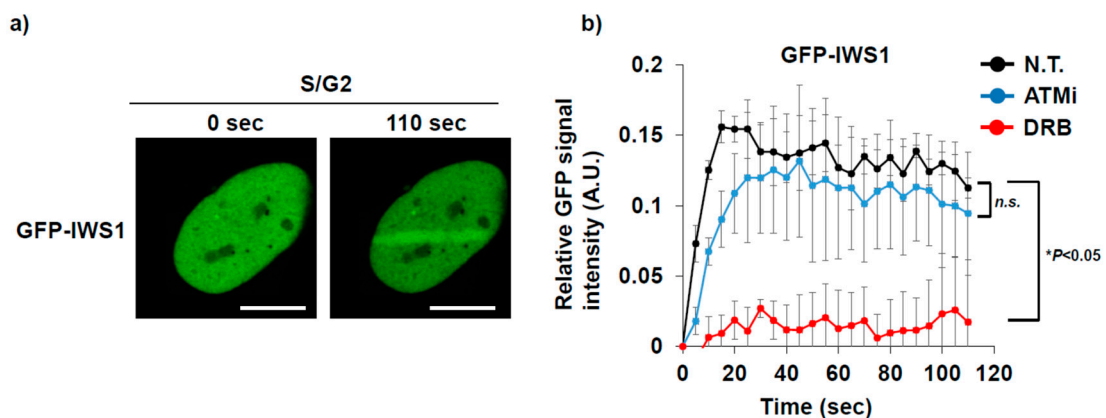


【目的】放射線照射が誘発する DNA 二本鎖切断 (DSB : DNA double strand break) は non-homologous end joining (NHEJ) 又は homologous recombination (HR) のいずれかにより修復される。近年の我々の研究により、S/G2 期細胞であっても放射線誘発 DSB 修復の第一選択は NHEJ であり、DSB の約 70% は NHEJ により修復されることが明らかになってきた (Shibata, EMBO J, 2011)。一方で約 30% の DSB に対しては、NHEJ が停滞又は遅延した場合に CtIP/MRE11 依存的に修復経路が NHEJ から HR への移行することを報告している (Shibata, Mol Cell, 2014)。さらに我々は、放射線照射直後は全ての DSB 末端付近で Ku80 及び 53BP1 が結合し、DSB 修復を NHEJ に向かわせる NHEJ 環境 (pro-NHEJ environment) を形成していることを見出している (Isono and Shibata*, Cell Rep, 2017 *責任著者; Barton and Shihabta*, Mol Cell, 2017 *共責任著者)。ゲノム上で変異を残すべきではない場所に DSB が生じた場合、細胞は HR を優先すると考えられ、実際に転写活性遺伝子領域に生じた DSB は HR により修復される (Aymard, NSMB, 2014; Pfister, Cell Rep, 2014)。本研究では転写活性領域で起こる HR に着目し、転写と共役する新規 HR 因子の同定を目指した。

【方法】ヒト正常細胞である RPE 細胞 (網膜色素上皮細胞) または U2OS 細胞を用いて、DNA 損傷応答の解析を行った。DSB のマーカーである γH2AX foci を指標とすることで DSB 修復能を計測した。また HR 時に生じる DSB end resection については、RPA foci を指標として解析を行った。また、DSB 部位における DNA 修復タンパク質の集積をリアルタイムで計測するために、東京大学・安原崇哲助教との共同研究により、二光子顕微鏡でのリアルタイムライブイメージングを行った。HR 頻度の計測には、U2OS DR-GFP アッセイ系を用いた。

【結果】転写因子として知られる遺伝子群の中で、HR に関わる新規因子を同定するため、siRNA スクリーニングを行った結果、我々は IWS1 が HR の開始に必要なことを見出している (未発表)。そこで、これらの因子が DSB 部位に集積するかどうかを、東京大学・安原崇哲助教との共同研究により、二光子顕微鏡を用いたライブイメージング解析を行った。HR は S/G2 において引き起こされるため、本実験では mCherry-Geminin を発現する U2OS 細胞に、GFP-IWS1 を一過性に発現させ、Hoechst 33342 を増感剤として用いた上で、730 nm (365 nm 励起) の照射を行った。その結果、DSB 部位への IWS1 の集積が確認された。またこの集積は転写阻害剤の添加により低下したことから、転写依存的に IWS1 が DSB 部位へ集積することが示唆された。また HR 頻度を測定する DR-GFP アッセイを行った結果、IWS1 ノックダウン細胞では HR 効率の顕著な低下が認められた。以上の結果から、IWS1 は HR を導く新規因子であることが示唆された。

転写に関わる新規 HR 候補因子の DSB 部位への集積解析

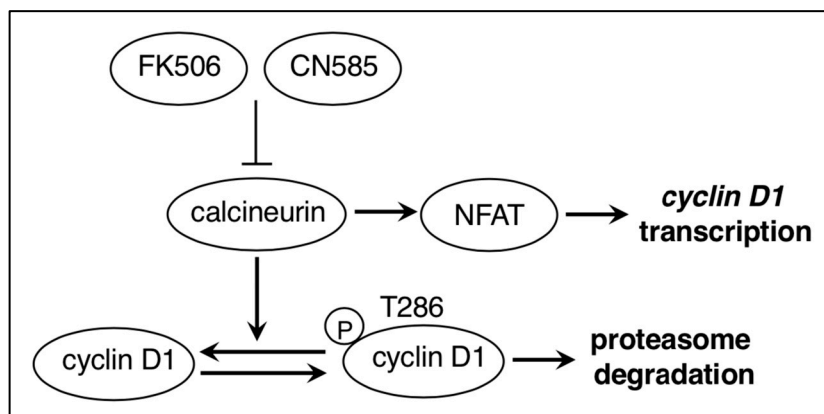


【目的】サイクリン D1 は CDK4、6 と結合して主に G1/S 期の細胞周期進行を制御する。予後不良な乳癌のサブタイプとして知られているトリプルネガティブ乳癌を含む多くのがんでは、サイクリン D1 が過剰発現していることが知られている。サイクリン D1 の発現制御、特にタンパク質分解制御にはサイクリン D1 の Thr286 のリン酸化がプロテアソームによるタンパク質分解を誘導する。本研究ではサイクリン D1 の発現制御に関わる新たな分子としてカルシニューリンを同定した。その分子機構の解明はトリプルネガティブ乳癌治療における新たなターゲットの発見につながる可能性がある。

【方法】トリプルネガティブ乳癌細胞株である Hs578T をカルシニューリン阻害薬である FK506、CN585 で処理し、FACS を用いた細胞周期解析、ウェスタンブロッティングおよび real time PCR を用いた細胞周期関連タンパク質の発現解析を行った。FK506 存在下でプロテアソーム阻害剤 MG132 を用いて、サイクリン D1 分解における FK506 の影響を解析した。リコンビナントカルシニューリン、精製した Flag-サイクリン D1 を用いて、サイクリン D1 分解制御に重要である Thr286 の脱リン酸化作用を *in vitro* で検証した。またレンチウイルスの系を用いた shRNA により、カルシニューリンをノックダウンすることにより、サイクリン D1 への発現への影響を検証した。

【結果】Hs578T を FK506、CN585 で処理すると G1/S 期の進行が遅延することが分かった。G1/S 期の進行に必要なサイクリン D1 の発現が顕著に低下し、サイクリン D1 を過剰発現すると部分的に G1/S 期の進行遅延が抑制された。またサイクリン D1 の発現減少はタンパク質分解が亢進することにより引き起こされていることが分かった。*in vitro* の脱リン酸化アッセイにより、カルシニューリンがサイクリン D1 の Thr286 を脱リン酸化することを見出した。さらにカルシニューリンをノックダウンすると、サイクリン D1 の発現量は減少した。以上のことから、カルシニューリンはサイクリン D1 の Thr286 を脱リン酸化することにより、サイクリン D1 の発現を制御していることを明らかとした。

カルシニューリンによる Thr286 脱リン酸化を介したサイクリン D1 の分解制御



47 統合オミクスを用いたアトピー性皮膚炎の分子基盤解明

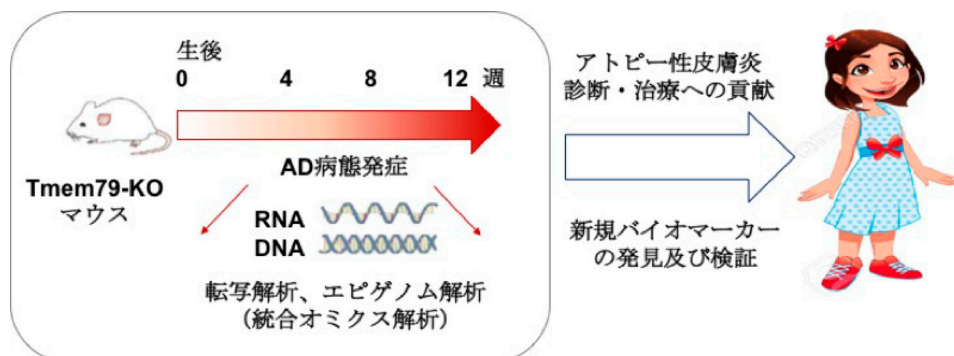
シャリフ ジャファル

【目的】皮膚疾患の代表的な例であるアトピー性皮膚炎 (atopic dermatitis : AD) は、皮膚の痒みや炎症を誘導し、患者にとって身体的な負担を与えるだけでなく、大きな精神的なストレスの要因ともなる。2014 年の統計によると、日本では、AD 患者数は既に 45 万人を超えており、この数は 30 年前と比べて約 2 倍に増えている。このように AD 患者数が年々増え続けることを防ぐには、AD の効果的な診断・治療の開発が急務である。しかし、典型的な多因子疾患である AD の分子病態は未だ解明されていない。これまでの研究から、AD の背景に遺伝的な要因と環境要因 (乾燥、ストレスなど) の両方の存在が明らかになっている。すなわち、AD の診断・治療を開発するには、まず、その背景にある分子メカニズムを解明しなければならない。本研究は、AD の分子を基盤解明することにより、新たな診断・治療法の開発を目的としている。

【方法】本研究では、AD に似た症状を誘発する Tmem79-KO マウスを用い、AD 発症の背景にある分子メカニズムを解析した。具体的に、control 及び Tmem79-KO マウス (♂、n=5) を用い、炎症が顕著に見られる顎下部位の皮膚を採取した。Tmem79-KO の皮膚では、どのような遺伝子発現の変化が起きているのか、その点を明らかにするため、RNA-seq による網羅的な遺伝子発現解析を行なった。本研究では、さらに、AD に関与する新たな分子マーカーの探索を行なった。異時性多発胃がんの発生予測に使われている DNA メチル化による分子診断法を参考にし、control 及び Tmem79-KO マウスの顎下部位の皮膚からゲノム DNA を精製し、RRBS (reduced representation bisulfite sequencing) 法による DNA メチル化解析を行なった。

【結果】網羅的な転写解析 (RNA-seq、♂、n=5) により、Tmem79-KO マウスでは、control 群と比べて代謝関連遺伝子や転写関連遺伝子の発現が顕著に変化することを示した。さらに、Tmem79-KO では、Jarid2 や Cdk8 などのエピゲノム制御に関わる遺伝子の発現が低下することを発見した。Jarid2 と Cdk8 のどちらも、ポリコム複合体の構成因子である。ポリコム複合体は、H3K27me3 修飾を媒介することにより、プロモーター部位に CpG アイランド (CGI) を持つ遺伝子の発現を抑制する。Jarid2 などの発現の低下は、ポリコム複合体の機能 (H3K27me3 媒介の) 低下につながる可能性がある。今後、control 及び Tmem79-KO マウスを用い、CGI における H3K27me3 のレベルを解析したい。ここで、CGI のエピジェネティック制御に、H3K27me3 の他に、DNA メチル化という別の経路も寄与することを述べておきたい。本研究では、RRBS (reduced representation bisulfite sequencing) 実験を行い、CGI における DNA メチル化を網羅的に解析した (♂、n=5)。Tmem79-KO では、いくつかの CGI では DNA メチル化が顕著に変化していることを示した。これらの DNA メチル化変化は、AD の新たな分子マーカーとして利用できる可能性がある。

研究目的及び研究方法



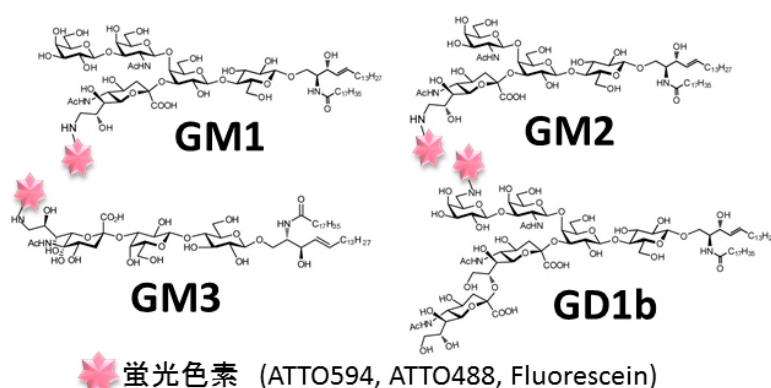
【目的】 シアル酸を含むスフィンゴ糖脂質であるガングリオシドは、ラフト中で最も重要な分子種の一つであり、特異的機能や多くの疾患に関与するとされてきた。しかし、天然のガングリオシドと同様に挙動する蛍光プローブが存在していなかったために、生細胞の形質膜上のラフト内での挙動など、その動態は全く明らかになっていなかった。この問題を解決するために、我々は、岐阜大学の安藤教授との共同研究で、天然のガングリオシドと同様に振舞う 8 種のガングリオシド蛍光プローブの合成に成功した。本研究では、高精度 1 分子観察法を用いて、生細胞膜上でのガングリオシド動態を解明することを目的とした。

【方法】 生細胞膜や人工リン脂質膜にガングリオシド蛍光プローブを再構成し、それらの 1 分子観察を 37°C で行い、ホモダイマー、オリゴマー寿命、EGF 受容体との共局在期間の測定を行った。また、1 分子 FRET 観察によって、ホモダイマー、ヘテロダイマー寿命の測定を行った。

【結果】 8 種のガングリオシドプローブ (GM1、GM2、GM3、GalNAcGD1a、GD1b、GD3、GT1b、GQ1b、蛍光色素は ATTO594) を、それらのガングリオシドが発現していない細胞膜上で 1 分子観察した結果、いずれのプローブも短寿命 (~200 ミリ秒) のホモダイマーを形成していることが分かった。また、このホモダイマー形成はラフト脂質相互作用によって安定化されていることが明らかとなった。さらにガングリオシドプローブは、人工リン脂質平面膜上でも、細胞膜上と同程度の寿命のホモダイマーを形成していた。従って、ガングリオシド自体の相互作用でホモダイマーが形成されていることが示唆された。ガングリオシドの様々な糖鎖のアナログ体を合成し、1 分子観察した結果、ホモダイマーの安定化に重要な官能基を特定することができた。また、1 分子 FRET 観察の結果、一般にはホモダイマーの方がヘテロダイマーよりも安定だが、ガングリオシドの組み合わせによっては、ヘテロダイマーもホモダイマーと同程度安定に存在しうることも明らかとなった。

ガングリオシドは、様々な受容体の活性制御に関わっていることがよく知られている。しかし、生細胞膜上でのその詳細な機構は明らかではない。そこで我々は、1 分子観察法により、ガングリオシドによる EGF 受容体の活性制御機構を解明しようと試みた。結果、EGF 受容体の N 型糖鎖の一部とガングリオシド GM3 との相互作用が、EGF 受容体のダイマー形成と活性化を抑制することが明らかとなった。

開発したガングリオシド蛍光プローブ



49 慢性炎症からの発がんに関与する長鎖non-coding RNAの解析

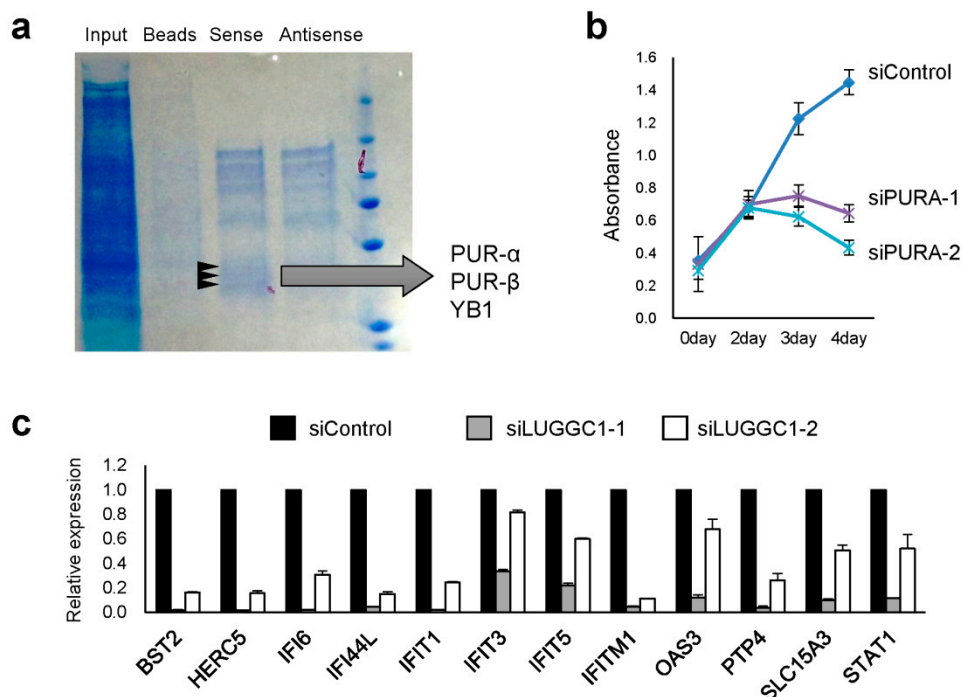
鈴木 拓

【目的】近年、長鎖非コードRNA (lncRNA) と疾患とのつながりが注目されている。我々は、胃癌関連 lncRNA を解析することで炎症からの発がんメカニズムを解明し、診断・治療法の開発につなげることを目指している。これまで我々は、健常者と胃癌患者の胃粘膜のエピゲノム解析から、胃癌背景粘膜で転写活性化する lncRNA として LUGGC1 (LncRNA Upregulated in Gastritis and Gastric Cancer 1) を同定し、LUGGC1 ががん遺伝子的に機能することを見いだした。本研究では、LUGGC1 の相互作用因子および下流標的を明らかにすることで発がんメカニズムを解明し、診断・治療法の開発につなげることを目的とした。

【方法】胃癌細胞において LUGGC1 と相互作用するタンパクを同定するため、RNA プルダウンおよび質量分析を行った。LUGGC1 の下流標的を同定するため、胃癌細胞において LUGGC1 のノックダウンが遺伝子発現プロファイルに与える影響をマイクロアレイ解析し、定量 RT-PCR で結果を検証した。さらに胃癌以外の他がん種における LUGGC1 の発現および増殖に与える影響を解析した。

【結果】RNA プルダウンと質量分析から、LUGGC1 と相互作用するタンパクとして PUR- α (purine-rich element binding protein A)、PUR- β (purine-rich element binding protein B)、YB1 (Y box binding protein 1) を同定した。これらはいずれも DNA/RNA 結合タンパクとして知られており、かつ PUR- α 、YB1 のノックダウンは胃癌細胞の増殖を抑制した。また遺伝子発現プロファイルの解析から、LUGGC1 が免疫応答遺伝子の発現を誘導することが示された。さらに我々は、LUGGC1 が乳がん、肝がん、大腸がんなど様々ながん種においても高発現していること、そして LUGGC1 ノックダウンが乳がん・肝がん細胞の増殖を抑制することを明らかにした。以上の結果から、LUGGC1 が PUR- α 、YB1 などと相互作用することで機能すること、LUGGC1 が免疫応答に関与しうること、そして胃癌をはじめ様々ながん種において治療標的となりうることが示された。

LUGGC1 と相互作用するタンパクおよび下流標的の同定

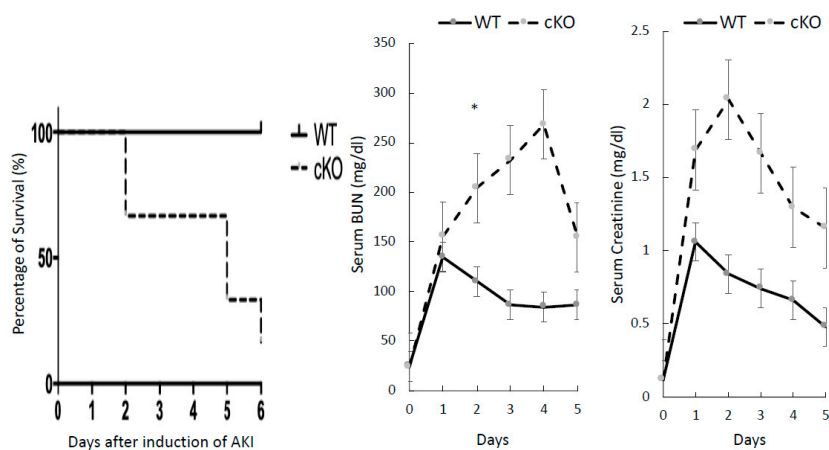


【目的】 Large Maf 転写因子は、日本で発見された「がん遺伝子」の細胞性ホモログで、b-ZIP 型転写因子群ファミリーに属し、Maf 認識配列 (MARE) に結合する転写因子である。マウスおよびヒトでは、MafA、MafB、c-Maf、Nrl の4種類存在することが明らかにされている。その中で、MafB および c-Maf は、血球系ではマクロファージ系細胞に多く発現していることが報告されていたが、その機能の詳細は明らかにされていなかった。マクロファージは自然免疫系の中心的な細胞であり、様々な免疫応答に重要であるが、成体で蓄積する老廃物や死細胞の除去にも働き、プロフェッショナルな貪食細胞として成体の恒常性を維持している。本研究では、MafB および c-Maf の欠損マウスおよびマクロファージ特異的な欠損マウスを用いて、各組織に存在するマクロファージのプロフェッショナル貪食細胞としての機能を包括的に解明することとした。

【方法】 MafB および c-Maf のマクロファージでの機能を明らかにする目的で、MafB および c-Maf を誘導的に全身で欠損できるマウス (MafB cKO : CAG-CreERTM、c-Maf cKO : CAG-CreERTM) を作製して、成体マウスで MafB または c-Maf を欠損させ、その全身の表現型およびマクロファージの表現型を解析するとともに、マクロファージ特異的に欠損するマウス (MafB cKO : LyM-Cre、c-Maf cKO : LyM-Cre) を作製して、急性虚血性腎不全における病態を解析した。

【結果】 c-Maf を成体マウスで欠損させたところ、腎性尿糖を発症することを見出した。詳細な解析から c-Maf が腎臓の近位尿細管での SGLT2 の発現を制御していることが明らかとなった。MafB や c-Maf の欠損はマクロファージの数には影響を与えないことが明らかとなった。急性虚血性腎不全モデルでは、マクロファージでの MafB の欠損 (cKO) により、野生型のマウス (WT) と比較して生存率が著しく低下することが明らかとなり、急性虚血性腎不全からの回復にマクロファージでの MafB の発現が重要であることが示唆された。

急性虚血性腎不全におけるマクロファージ特異的 MafB 欠損の影響



図a. 急性虚血性腎不全後の生存率

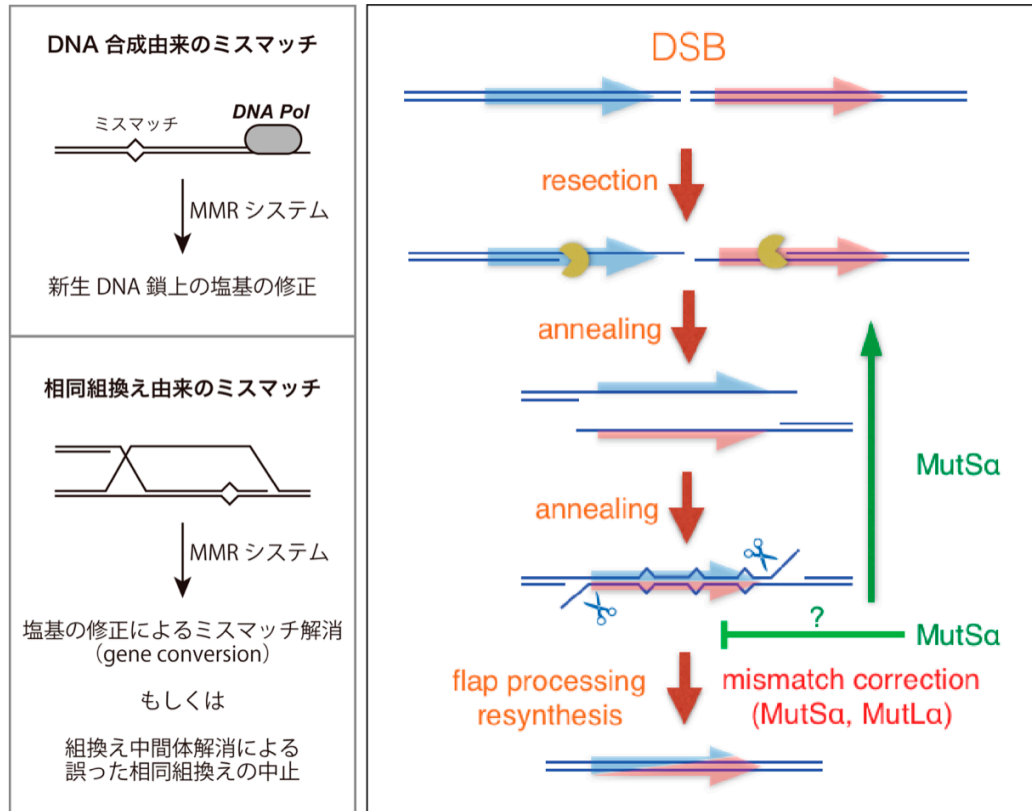
図b. 急性虚血性腎不全後の腎機能指標

【目的】染色体上では、さまざまな原因により塩基ミスマッチが生じる。DNA 複製の誤りによって生じるミスマッチは、新生 DNA 鎖上の塩基を修正して解消される。一方、類似するが同一ではない配列間での組換えによってもミスマッチが生じるが、座位が異なる類似配列間での相同組換えは、転座や欠失、染色体再編の原因となる。このような類似配列間の相同組換えは、ミスマッチ認識センサーである MutS 複合体に依存した経路（ミスマッチ修復経路/MMR 経路）によって阻止されることが知られる。MMR 遺伝子の変異やサイレンシングは発がんの原因としてよく知られ、MMR 経路によるゲノム品質管理はヒトの健康と医療にも密接に関係している。本研究では類似配列間の組換えを MMR 経路が抑制する分子メカニズムの解明を目指した。

【方法】ツメガエル卵核質抽出液（NPE）は DNA 合成やミスマッチ修復、相同性依存的修復などさまざまな反応を試験管内で再現可能なモデル系である。本研究では、NPE 中で相同性依存的修復のひとつである一本鎖アニーリングを再現し、類似配列間の一本鎖アニーリング制御に対する MMR 因子の寄与を調べた。

【結果】類似配列間一本鎖アニーリングを試験管内再現することに成功した。一本鎖アニーリング反応は、リピート間の相同性が低下すると著しく減少し、この減少は MutS α ミスマッチ認識複合体に依存していた。類似配列間一本鎖アニーリングの中間体では反応の著しい遅延が見られ、反応中間体と考えられる DNA 分子種が蓄積していた。これらの結果から、MutS α は一本鎖アニーリング反応と拮抗して不正確なアニーリングを阻害しているものと考えられた。

ミスマッチ修復システムによる類似配列間一本鎖アニーリング反応の制御モデル

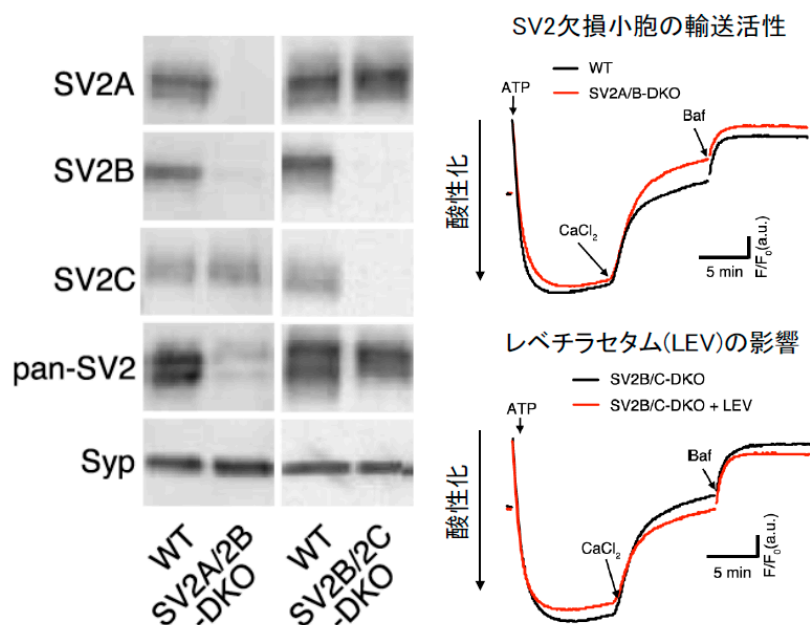


【目的】てんかんは異常な神経活動のために意識障害や痙攣などのてんかん発作を繰り返す神経疾患で、発症率は全人口の1%を占めると言われている。抗てんかん薬として近年脚光を浴びているレベチラセタム（別名イーケプラ）は、神経終末のシナプス小胞膜に存在するSV2Aという輸送体様の膜タンパク質に結合し作用する。一方、SV2Aは1980年代後半に同定されたにも関わらず、その分子機能と脳機能における役割は明らかになっていないことから、レベチラセタムの作用機序は不明な点が多いまま臨床現場で使用されている。本研究では、従来SV2Aの機能として提唱されてきた「 Ca^{2+} 輸送仮説」と「ガラクトース輸送体仮説」の双方を、SV2遺伝子改変マウスを用いて検証し、抗てんかん薬標的分子であるSV2Aの分子機能解明を目的とした。

【方法】SV2がシナプス小胞上の Ca^{2+} 輸送体である可能性を検証するために、げっ歯類脳から精製したシナプス小胞膜画分を用いて、小胞内酸性化測定による $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 交換輸送活性の性状解析法と $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 同位体を用いた輸送活性測定法を確立した。次に、CRISPR/Cas9法を用いてSV2Aとそのイソ型の遺伝子欠損マウスを作製し、それらの遺伝子改変マウス脳から精製したシナプス小胞膜画分を用いて、SV2欠損やレベチラセタムによるSV2A阻害がシナプス小胞の Ca^{2+} 輸送活性に与える影響を調べた。

【結果】ラット脳から精製したシナプス小胞膜画分を用いて、 Ca^{2+} がシナプス小胞の酸性化に与える影響を精査した所、高親和性（ $K_m \sim 400 \text{ nM}$ ）の $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 交換輸送体活性を認めた。次に、SV2A/SV2B-ダブル欠損マウスの脳（総SV2発現が微量なマウス）で同様の測定を行なった所、野生型脳と同程度の $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 交換輸送活性が検出された。また、SV2B/SV2C-ダブル欠損マウスの脳（脳内にSV2Aのみ発現する脳）由来のシナプス小胞における $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 交換輸送活性は、レベチラセタムで阻害されなかった。 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 同位体を用いた輸送活性測定法においても、SV2欠損と Ca^{2+} 輸送活性の連関は認められず、今回行なった薬理学的な実験等の結果を総合的に判断すると、シナプス小胞膜上の Ca^{2+} 輸送体は、主に形質膜型 Ca^{2+} -ATPase（PMCA）が寄与していることが示唆された。

SV2欠損およびSV2A標的薬レベチラセタムのシナプス小胞膜 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 交換輸送活性への影響

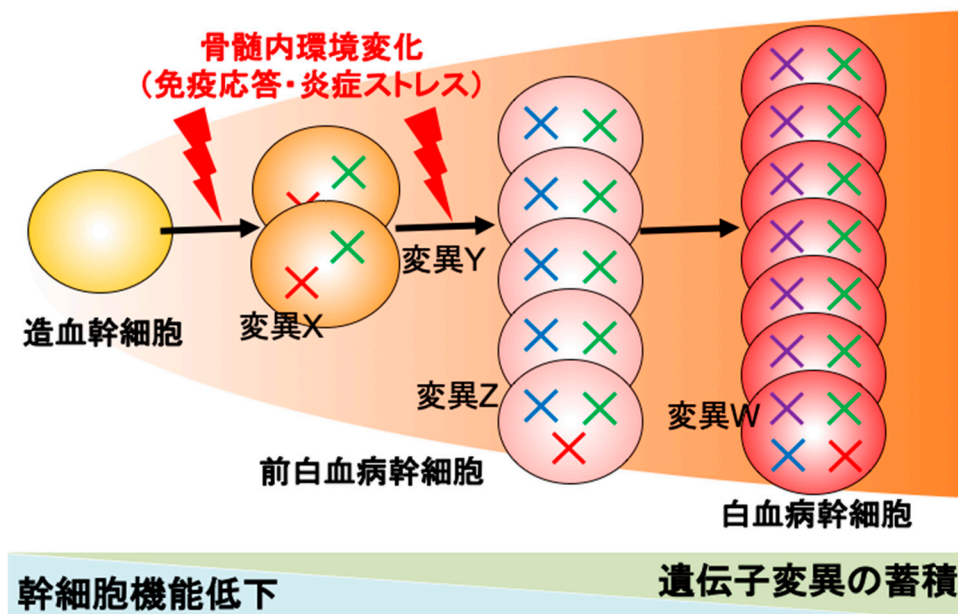


【目的】近年のシーケンシング技術の進歩に伴い、段階的な遺伝子変異の蓄積が癌化の引き金となることが実証された。また、数理モデルによる疫学データ解析から、各臓器の癌化リスクは組織幹細胞の細胞分裂歴と強く関連することが示され、幹細胞から癌化に至るプロセスは内在性因子と環境因子の影響を受けることが示唆された。しかしながら、幹細胞の機能変容から癌化に至るプロセスにおける細胞自律的または環境依存的因子の相対的役割や分子基盤については生物学的な検討が必要である。造血システムでは、白血病の前段階として白血病化する前の造血幹細胞、いわゆる前白血病幹細胞が遺伝子変異を蓄積しながらクローン化するクローン造血が知られている。本研究では、前白血病幹細胞のクローン出現や進化には炎症反応（炎症ストレス）が深く関与しているという仮説のもと、造血クローナル化に対する炎症ストレスの役割を解析するために実験系の確立とモデルマウスの作製を行なった。

【方法】造血幹細胞クローンの数とサイズを追跡するため、バーコードDNA配列をランダムにゲノムに挿入するトランスポゾンを採用し、これまでレトロウイルスの検出に使われていた方法を改変してバーコードDNA配列の検出を行なった。また、バーコードDNA配列を条件的にゲノムに挿入するマウスの作製を行なった。

【結果】バーコードDNA配列の挿入箇所を同定することにより数百の細胞クローンを検出できる感度の高い方法論を確立し、同じバーコードDNA配列を持ったマウスを作製した。

炎症に起因したクローナル造血の出現と進展メカニズム（仮説）

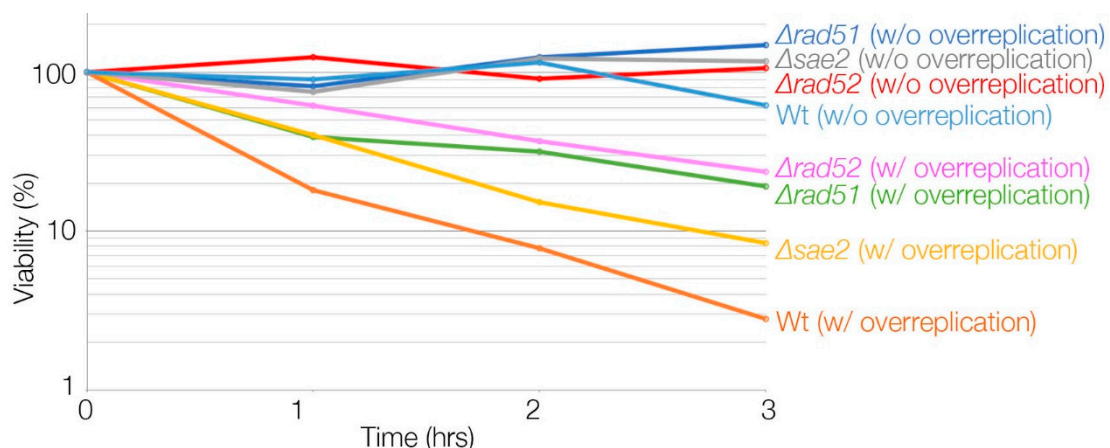


【目的】細胞が増殖するとき、各細胞分裂周期においてそのゲノム DNA は正確に複製・分配され、世代を超えて安定に維持されなくてはならない。しかし逆に、重複・転座といった染色体 DNA の大幅な変化は、進化の原動力となることも示唆されている。したがって、生物は世代を超えて染色体を安定に維持していくことを保証する機構を備えると同時に、超長期的には、染色体改編のポテンシャルも併せ持つと考えられる。我々はこれまでに、ゲノムの安定維持のために細胞が備える、一回の細胞周期につき染色体 DNA 複製起を一度だけに限定する巧妙な制御機構（Once per Cell Cycle 制御：OCC 制御）の解明を行い、その制御の破綻がゲノムの不安定化を誘導することを示してきた。通常は複製開始が起こらない G1 期において人工的な OCC 制御からのエスケープを誘導すると、強い細胞毒性を示し、多くの細胞は死に至るが、低い割合でサバイバーが現れる。このサバイバーは高頻度に染色体の異数性や染色体転座等の Gross Chromosome Rearrangements (GCR) を伴うゲノム不安定化を示す。一方、がん細胞においてはゲノムの不安定化はその大きな特徴である他、しばしば複製開始因子の発現亢進が観察されることも知られている。これらの事実は、複製因子の高発現が OCC 制御からのエスケープを誘導しゲノムを不安定化させ、細胞がん化に関与する可能性を示唆している。そこで、OCC 制御の破綻に細胞がどう反応し、ゲノム不安定化が如何に生起するのかを、まずモデル細胞である酵母を用いて理解することを目指した。

【方法】OCC 制御の破綻による過剰複製は DNA2 本鎖切断等の DNA 損傷につながり、DNA ダメージ応答経路が活性化される。そこで、DDR の中核をなす種々の因子をそれぞれ欠損させた細胞株において、OCC 制御破綻を誘導し、その後の細胞生存率の測定・サバイバークローンのゲノム編成に与える影響を定量的に測定した。

【結果】DNA2 本鎖切断が生じた際には、細胞はそれを検知して DNA ダメージ応答 (DNA damage response : DDR) 経路を活性化し、修復反応を行う。この経路に関わる種々の因子（検知・シグナル伝達・修復）の変異を用いて OCC 制御の破綻による過剰複製を誘導することで、各修復因子・経路が OCC 制御の破綻で生じる DDR において果たす役割の解析を行った。その結果、驚くべきことに、DDR 経路のいずれの因子の欠損も過剰複製誘導後の細胞生存率に大きな影響を与えなかった。また、欠損させた因子によってはその欠損がある方がむしろ生存率が高くなるというさらなる驚きの結果を得た。これらの結果はこれまでに知られている DDR 経路が、過剰複製に対しては無力であることを示している他、こと細胞生存率に限って言えば、その経路を使ったダメージの修復を試みない方がむしろよいことを示す。これらの結果はさらに、DNA 過剰複製という制御異常が、細胞周期においてなぜ確実に抑止されなくてはならないのかを逆説的に示すものであり、DDR 経路が果たす役割についても新たな概念の提出につながるものである。

DDR 経路は過剰複製で生じるダメージに対し有効に機能できない

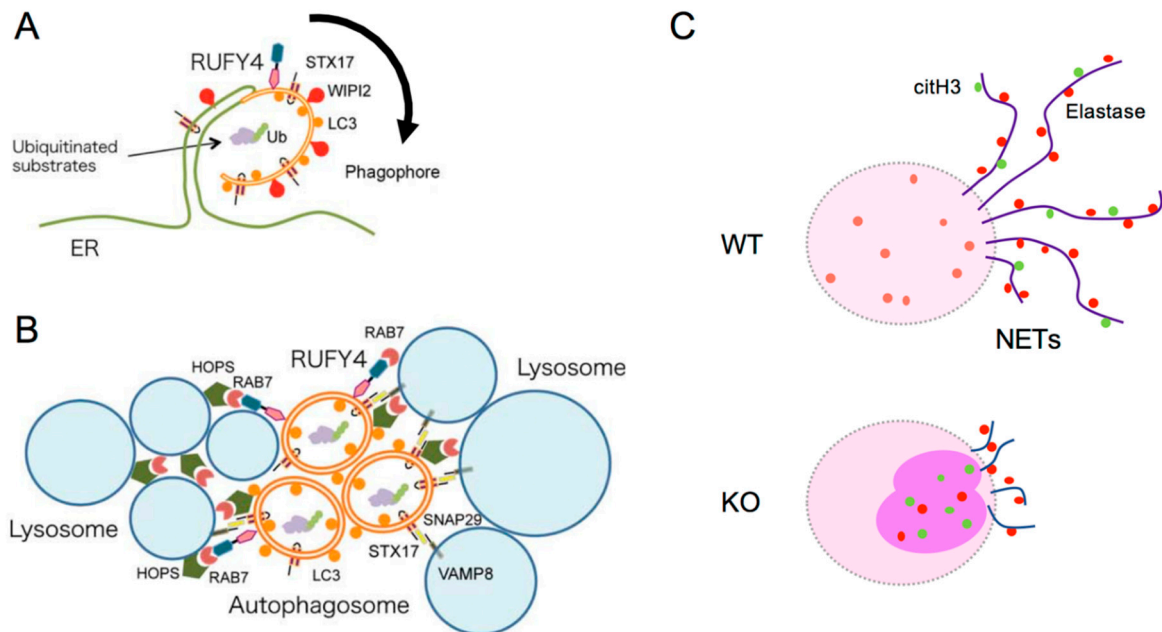


【目的】マウス骨髄細胞から GM-CSF により樹状細胞を誘導する際、液性免疫応答に不可欠なサイトカイン IL-4 の存在下で分化させるとオートファジー活性が亢進し、MHC クラス II 分子への内在性抗原の提示、および細胞内寄生細菌に対するゼノファジーが促進される。このオートファジーの亢進には IL-4 によって発現が誘導される *Rufy4* が寄与している (*J Cell Biol.* 2015)。*Rufy4* は隔離膜の伸長促進 (図 A) やリソソームのトラフィック制御 (図 B) によりオートファジーを亢進させていると考えられる。一方 *Rufy4* は好中球において恒常的に発現しているが、好中球における機能は明らかになっていない。本研究では好中球においてオートファジーの分子機構の関与が指摘されている細胞死 NETosis に注目し、その分子機構と好中球における *Rufy4* の生理学的機能の解明を目的として、研究をおこなった。

【方法】野生型および *Rufy4* 欠損マウスにカゼインを腹腔内投与し、腹腔洗浄液から Percoll を用いた密度勾配遠心にて好中球を単離した。この初代培養好中球を PMA もしくはカルシウムイオノフォア A23187 で刺激することで NETosis を誘導し、NETs の形成を蛍光顕微鏡で観察した。また NETosis を誘導した好中球を S7 スクレアーゼ処理し、上清に遊離したエラスターゼの活性を測定することで、放出された NETs の定量をおこなった。

【結果】PMA により刺激された野生型好中球ではクロマチン DNA を大きく放出する典型的な NETosis が認められたのに対し、*Rufy4* 欠損マウス由来の好中球では細胞死は誘導されるものの、形成される NETs は顕著に縮小していた (図 C)。一方、A23187 で誘導した NETosis では明確な差は認められなかった。これと一致して、S7 スクレアーゼ処理依存的に検出されたエラスターゼ活性は、*Rufy4* 欠損マウス由来の好中球において低かった。以上の結果は *Rufy4* の欠損下では NETosis の進行や NETs の形成に異常が生じていることを示唆している。*Rufy4* を介した NETosis の分子機構、および *Rufy4* 欠損による NETosis 不全が *in vivo* における生体防御機構、さらには NETosis により惹起される炎症応答に与える影響について検討を進めている。

Rufy4 によるオートファジー亢進と NETosis への寄与

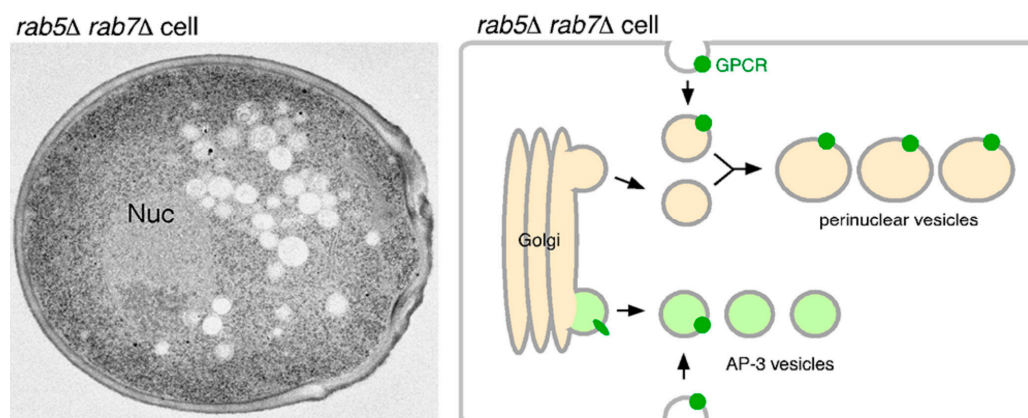


【目的】Gタンパク質共役型受容体（GPCR）は真核生物に幅広く発現しており、血圧の調節、味覚、嗅覚など様々な生体現象に関わるほか、細胞の増殖、遊走などにも必要とされている。GPCRは創薬の重要な標的分子であり、現在まで開発された医薬品の中で約40%はGPCRに作用する薬剤である。また、幾つかのGPCRはがん細胞に過剰発現し、細胞の癌化にも関わっていることが報告されている。これらのことから、GPCRシグナルの活性制御機構を明らかにすることは、臨床応用の面からも重要な研究課題である。GPCRはリガンドの結合により活性化し、シグナルを伝えると、クラスリン小胞によりエンドサイトーシスされ、エンドソームを経て、リソソームで分解される。GPCRのエンドサイトーシスによる取り込みは、GPCRシグナルの不活性化のための主たる制御機構であるが、活性化したGPCRのクラスリン小胞への取込み機構、およびエンドサイトーシス後の輸送および分解機構については不明な点が多い。本研究はGPCRのエンドサイトーシスによる分解の諸過程を制御する分子機構を解明することを目的とする。

【方法】GPCRのエンドサイトーシスの初期過程ではたらく4種類のタンパク質を蛍光標識し、変異体におけるクラスリン小胞の動態を解析し、GPCRのエンドサイトーシスによる取り込みに必要な遺伝子を解析した。また、*Rab5*、*Rab7* 遺伝子欠損変異体について、蛍光顕微鏡および電子顕微鏡によりリソソームの形態およびGPCRの輸送への影響について詳細に解析した。

【結果】GPCRのエンドサイトーシスによる取り込み過程に関わる遺伝子を解析するため、初期過程ではたらく4種類のタンパク質をGFPで標識し、エンドサイトーシス変異体における動態を解析した。この結果、*clc1*、*end3*、*las17*、*sla2*変異体の4つの変異体で顕著な異常が見られることを発見した。特に興味深いことに、*clc1*変異体ではクラスリン小胞の形成が損なわれていると共に、アクチン骨格にも重篤な異常を示すが、GPCRのリクルート自体は起こっていることが分かった。また、エンドソーム-リソソーム間の輸送に関わる*Rab5*、*Rab7*について解析した。この結果、酵母*Rab5* (*ScRab5*) および*Rab7* (*ScRab7*) 欠損変異体におけるGPCRの輸送への影響を調べたところ、*ScRab5*欠損細胞ではAP-3経路依存的にリソソームで分解されるのに対して、*ScRab7*欠損細胞では断片化したリソソームへのGPCRの輸送が見られた。興味深いことに、*ScRab5*、*ScRab7*の二重変異体ではリソソーム自体の形成が見られなくなり、GPCRの輸送も完全に抑制された。

酵母 *Rab5*、*Rab7*二重変異体におけるリソソーム形成およびGPCR輸送に与える影響

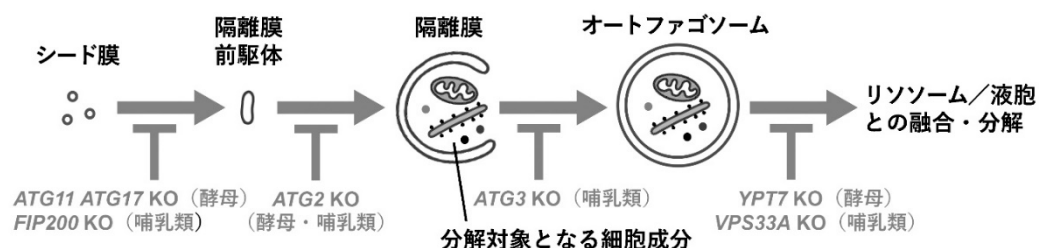


【目的】オートファジーは、酵母からヒトに至るまで真核生物に共通して備わる細胞内の主要な分解機構である。オートファジーによる分解の対象は、オートファゴソームと呼ばれる二重膜胞内に隔離され、哺乳類においてはリソソーム、植物や酵母においては液胞に輸送され、分解される。オートファゴソームは、必要に応じて、非常にユニークかつダイナミックなプロセスを経て、全く新規に形成される（図）。オートファゴソームの形成機構に関しては、大隅良典博士らが同定した Atg タンパク質の解析や、小胞体等のオルガネラの関与を中心に研究が進められてきたが、「オートファゴソームが細胞内の何を膜の供給源とし、どのような機構で形成されるのか」という極めて基本的な問題が明らかとなっていない。また、これまで、人工膜小胞を用いて Atg タンパク質の機能解析が進められてきたが、正しい理解のためには実際に Atg タンパク質が機能する膜の脂質組成を知ることが重要である。本研究では、こうした問題の解明に向けてオートファゴソーム膜やその前駆体膜の脂質組成を決定することを目的とした。また同時に、膜の供給源および供給機構を解明するための細胞生物学的解析および生化学的解析もおこなうこととした。

【方法】オートファゴソームは、Atg9 を含むゴルジ体由来の小胞が“シード”となり、これが他の 10 数種の Atg タンパク質の働きにより“隔離膜前駆体”へ変換され、いずれかのオルガネラから膜の供給を受けて隔離膜が伸張し、形成される（図 1）。特定の遺伝子の欠損細胞をアミノ酸飢餓やラパマイシン処理などのオートファジー誘導条件に置くことで、各オートファゴソーム関連膜を蓄積させ（図）、細胞分画およびこれらの膜に局在するタンパク質を標的とした免疫単離により、各膜標品を調整し、質量分析により脂質組成を決定する。さらに、同条件の細胞から、膜供給源として有力な小胞体などのオルガネラを上記と同様の生化学的手法により単離し、脂質組成を決定する。これらの脂質組成とオートファゴソーム関連膜の脂質組成を比較解析することで、膜の供給源となっているオルガネラを特定する。また、膜供給に関わると考えられる Atg タンパク質に着目し、その分子機能を解析することで膜供給機構の解明を目指す。

【結果】本研究期間の 1 年間で、シード小胞（Atg9 小胞）および隔離膜前駆体の単離法を確立し、これらの質量分析による脂質組成解析のための準備が整えることができた。また、単離した Atg9 小胞のプロテオーム解析の結果をもとに、Atg9 小胞の純度を向上するための新たな情報を得た。一方で、COP II 小胞がオートファゴソーム形成における膜供給源であることを明らかにし、脂質組成解析の対象に COP II 小胞も加えるべきであることを示した。加えて、機能未知であった Atg2 タンパク質に隔離膜前駆体を小胞体に繫留する機能があることを示し、さらに Atg2 には膜から脂質分子を引き抜き他の膜へと輸送する活性があることも明らかにした。このような Atg2 の機能の発見は、オートファゴソーム形成における膜伸張機構の解明の鍵となると期待され、試験管内で Atg2 の機能をさらに解析するためには、オートファジー誘導条件での小胞体および隔離膜前駆体の脂質組成を決定することが重要であることが示唆された。

オートファジーの模式図

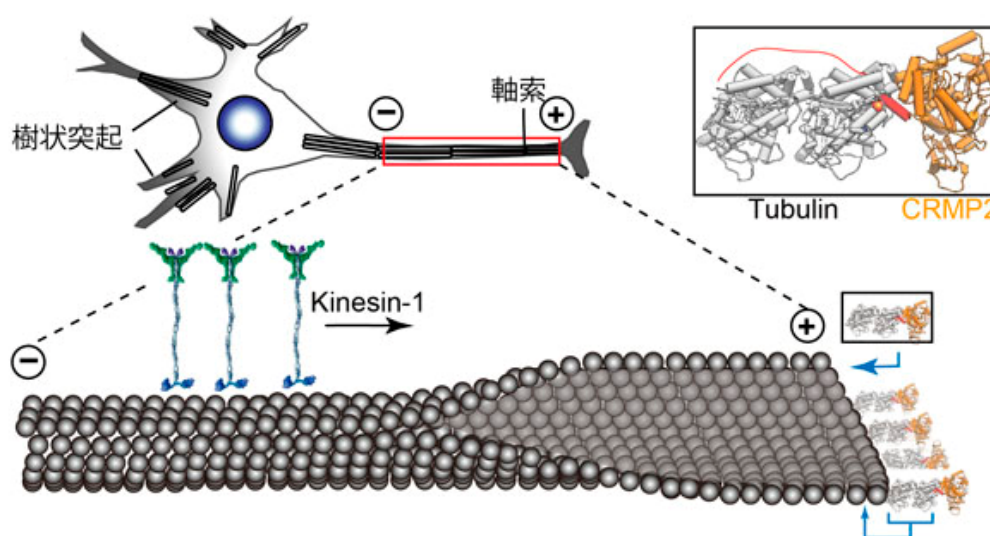


【目的】微小管結合蛋白質 Collapsin Response Mediator Protein 2 (CRMP2) は、微小管への作用を介して、神経細胞の軸索突起の形成および伸長（軸索誘導）に関わることが報告されている。一方で CRMP2 はセマフォリンシグナル経路の下流因子であり、この経路により CRMP2 の C 末端ドメイン（テイルドメイン）がリン酸化を受けると、成長円錐が崩壊して軸索が退縮する（軸索反発）。つまり、CRMP2 は軸索の誘導因子であり、またリン酸化後の CRMP2 は軸索の反発因子として作用すると考えられている。そこで本研究では、CRMP2 がどのように神経細胞の軸索形成に関わり、またそのリン酸化により何故軸索が退縮するのか、神経細胞の分化、極性形成における根本的な生命原理を解明することを目的とする。そのために、CRMP2 の直接の相互作用部位である微小管に対する CRMP2 の作用を生化学的および細胞生物学的手法を用いて解明し、さらにその結果をもとに、原子レベルから細胞レベルまでのさまざまな構造解析手法を駆使し、その構造基盤を明らかにする。

【方法】*in vitro*、細胞内（COS7 細胞、培養神経細胞）、線虫個体内において、CRMP2 が微小管の重合、脱重合にどのような影響を及ぼすのかについて観察するとともに、その機能ドメインを調べた。またリン酸化 CRMP2 による変化も同様に観察した。続いて、CRMP2 の機能ドメインを用いた構造解析に移行した。野生型および擬似リン酸化型の CRMP2 を用い、X 線結晶解析を用いた原子レベルの構造解析、X 線小角散乱を用いた分子レベルの溶液構造解析、そして蛍光顕微鏡やクライオ電子顕微鏡を併用した超分子複合体～細胞レベルの構造解析を併用した。

【結果】CRMP2 による軸索誘導・反発の詳細な分子機構が明らかとなってきた。CRMP2 は神経細胞の発生段階において、将来の軸索突起の先端に局在する。ここで CRMP2 は tubulin と一時的な 1 : 1 複合体を形成することにより、tubulin を効率よく微小管に取り込ませ、軸索特有の「軸索型微小管」（GTP 型微小管）の重合を促す。この結果、軸索型微小管を豊富に有する突起を効率的に伸長させることで軸索伸長を誘導し、神経細胞極性形成に大きく寄与する。微小管モーターキネシンは、CRMP2 が誘導した「軸索型微小管」を道標として軸索突起に侵入し、選択的な物質輸送を行う。これらの CRMP2 の微小管への効果は CRMP2-tubulin 複合体の形成により生じるため、CRMP2 の tubulin 結合面にアミノ酸点変異を導入すると、CRMP2 の機能は全てキャンセルされた。また、CRMP2 が C 末端部にリン酸化を受けると、CRMP2 と tubulin との静電的反発により複合体形成が阻害され、軸索型微小管の誘導効果が消失するのみならず微小管が不安定化され、軸索誘導から反発へとシグナルが切り替わる。

CRMP2 の軸索誘導モデル

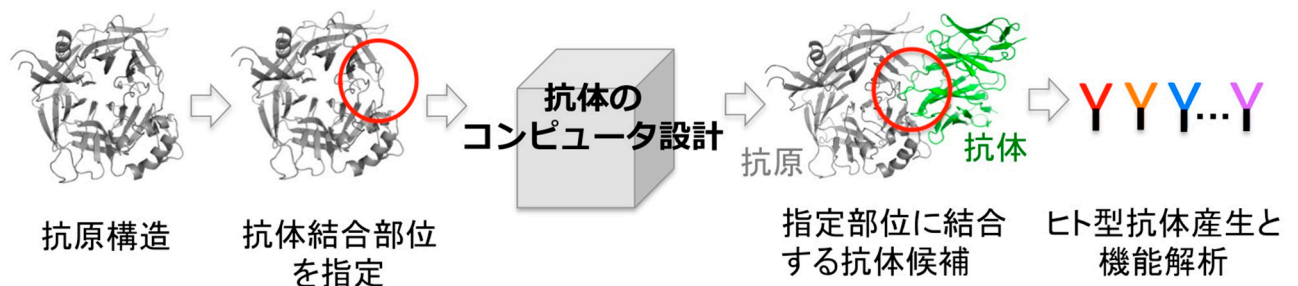


【目的】本研究では新規抗体作製法として、ウイルス学・構造生物学・コンピュータ計算科学的手法を組み合わせ、抗原の立体構造情報に基づき、ウイルス抗原上の標的部位へ自由自在に抗体をコンピュータ上で理論的に設計し、人工創成することを目的とした。

【方法】抗体の人工設計の標的構造として、我々が自ら構造決定を行った麻疹ウイルス受容体結合蛋白質を用いた。受容体結合蛋白質の機能部位である受容体結合部位を標的として、抗体の人工設計をスーパーコンピュータ上で行い、抗原と抗体の相互作用を結合エネルギーの安定性により評価した。評価スクリーニングで上位に順位付けられた候補配列を実際に人工遺伝子として合成し、HKE293 細胞に導入することで、培養上清中に人工設計抗体を発現させた。この抗体を用いて、EGFP 組み換え麻疹ウイルスによる培養細胞への感染を阻害できるかどうかを評価した。

【結果】人工合成した新規設計抗体は、全体の 3 分の 1 程度の候補において、実際に培養上清中に蛋白質として発現させることに成功した。これらの候補中に、実際に麻疹ウイルス感染を阻害する中和能を持つ抗体が存在することが期待されたが、中和能を発揮する抗体は確認されなかった。しかし、一部の抗体は実際にウイルス抗原への結合が確認できたことから、設計システムをさらに改良することで、有用な抗体作製手段と成り得ることを示した。

抗体のコンピュータ設計の手順

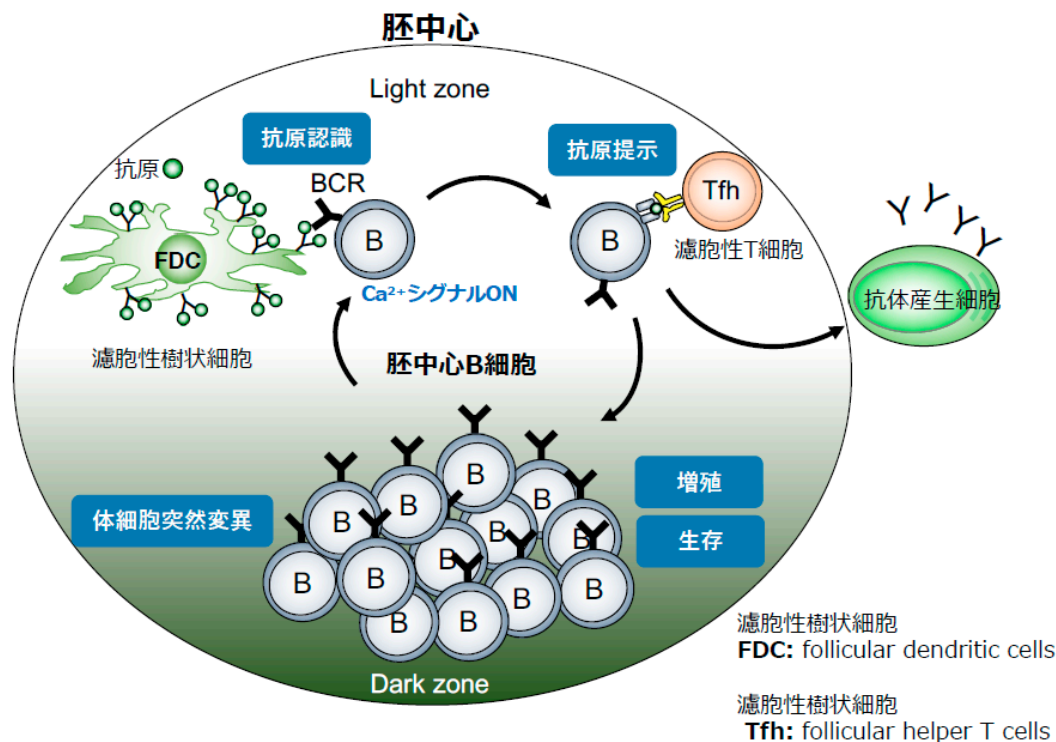


【目的】我々は常に細菌やウイルスなどの病原体の脅威に晒されているが、B細胞が分泌する抗体により、多くの感染症から身を守られている。よって、どのようにして品質の良い抗体が産生されるのかという問いは感染防御の観点からみて極めて重要である。この課題にアドレスするためには、抗原に対して親和性の高いB細胞レセプター（BCR）を発現する胚中心B細胞の活性化・維持のメカニズムの解明が必要不可欠である。しかし、濾胞性樹状細胞上でのB細胞の抗原認識がどういう役割を果たしているのかは未解決課題として残されている。抗原認識したB細胞の主要な反応として細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が知られているが、胚中心B細胞におけるカルシウムシグナルの重要性は未だ不明である。そこで、本研究ではカルシウムシグナルを基軸に「高親和性BCRを発現する胚中心B細胞の抗原認識の重要性」を解明し、胚中心B細胞の活性化・維持の仕組みを理解することを目的とした。

【方法】小胞体カルシウムセンサーSTIM1/STIM2がBCR依存的なカルシウム流入に必須であることを報告していることから、胚中心B細胞特異的なSTIM1/STIM2欠損マウスやNP反応性B細胞のみをもつノックインマウスを利用し、NP-CGG免疫で誘導される胚中心B細胞の産生を検討した。また、高親和性BCRによる細胞内カルシウム上昇はカルシウム指示薬Indo1を用いて検出した。

【結果】STIM1/2欠損B細胞では胚中心B細胞が著減することが判明した。さらに、BCRの親和性とカルシウムシグナル強度に相関がみられ、高親和性BCR誘導カルシウム動員にはSTIM1/STIM2が重要であることが確認された。さらに、競合移入実験により、STIM1/STIM2が欠損すると高親和性BCRを有する胚中心B細胞の産生に障害がでることが明らかになった。

胚中心B細胞におけるBCR依存的なカルシウムシグナルの役割は？



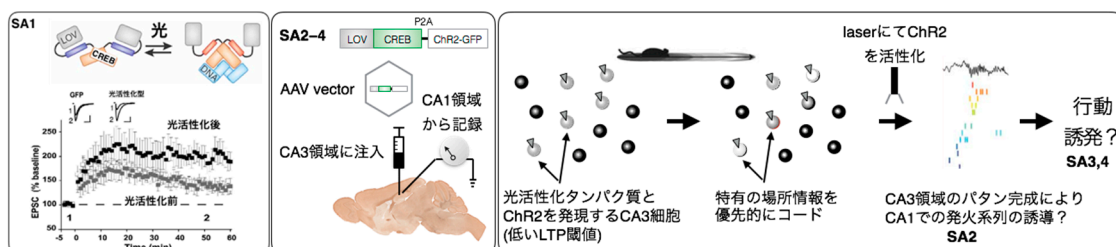
【目的】動物はある行動をしようとする意思を決定する前に、意識下あるいは意識上にシミュレーションを行うことで脳内モデルを形成し、そのうち最適なものを選択していると考えられる。しかし、それに関わる神経回路は明らかではない。本研究では特に海馬に着目して研究を進める。海馬では動物の場所に応答する場所細胞がある事が知られているが、最近、場所細胞が行動前、これからの行動を予想するように順番に発火する事が見出された。特に、動物に走った経験がない新たな経路を予想させても、これまで経験した発火を組み合わせ、新しい発火順列を形成することができることから、単にこれは既に走った経験がある経路の場所細胞が再活性化されているのではなく、行動の意思決定に伴い、新たな脳内モデルが形成されていると想定される。

しかしこの「行動予想発火順列」の生理的意義は明らかではない。特に重要な事に、それが行動を計画し、かつ引き起こすのに必要十分であるかは明らかではない。この解明にあたり難しい点は、行動予想発火順列は時間的に制御されたものであり、単に光遺伝学的に活性化させただけでは誘導できない点である。そのため、いくつかの技術的な工夫が必要である。そこで本研究では、まず LTP の閾値を調節するシグナル経路である CaMKIV 及び CREB の活性を、光感受性タンパク質である LOV2 ドメインを用いることで光にて制御できるようにする。これを用いると場所体験時に光を照射する事により、特定の細胞に選択的に場所をコードさせる事ができる。さらに ChR2 と共発現する事により、場所をコードさせた細胞を任意の時に再活性化する事が可能となる。

【方法】本研究では、まず、光活性化 CREB ならびに CaMKIV 作製し、それを用い、特定の神経細胞に記憶をエンコードさせることを目的とした。この目的のため、両者が核タンパク質であることを利用し、光活性化核移行シグナル (paNLS) を作製することを試みた。この目的のためには燕麦由来の向光性に関与する蛋白質ドメインである、LOV2 ドメインを用いた。LOV2 ドメインは光照射により、構造が変化し、他のタンパク質の活性を調節できる。そこで、mCherry と核輸出シグナル-LOV2 ドメイン-核移行シグナルとを融合し、細胞に発現し光照射する構築をスクリーニングした。出来た paNLS にさらに CREB を融合し、光活性化により核に移行することを確認した。最終的に、CRE 下流で luciferase 発現する構築と共発現し、luciferase を western blotting にて検出した。

【結果】作製した paNLS は核へ移行することが観察された。このことから、光活性化核移行シグナルの作製に成功したと考えられた。しかし CREB と融合し、CRE 下流で luciferase 発現させたところ、光照射していない場合も発現が見られ、mCherry のシグナルでは検出されなかったが、その程度の発現でも CREB の活性が leak していることが疑われた。現在、CaMKIV を同様なアプローチで作製している他、優勢抑制体の CREB ならびに CaMKIV を作製し、記憶固定化の実験に利用できないかを試行していく。

実験計画の概念図

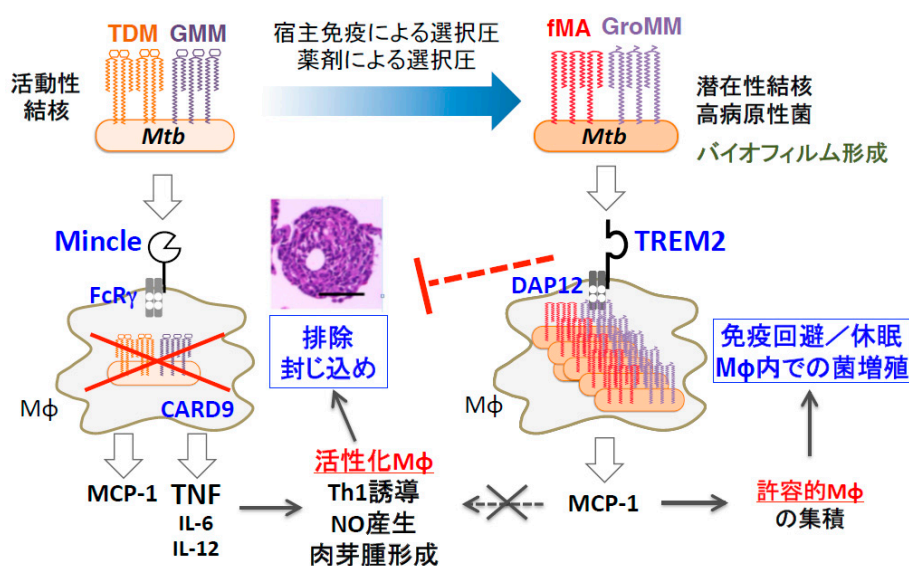


【目的】結核菌細胞壁の主成分であるミコール酸 (Mycolate : MA) は、細胞壁骨格を形成するとともに様々な遊離形態で細胞壁表層に発現する。その構成は菌の生活環や外部環境に依存して大きく変容し、宿主免疫系の応答に影響を及ぼす。活動性結核菌は、肉芽腫形成などの免疫賦活能を有する MA 含有糖脂質 (TDM や GMM) を表層に発現する。一方、休眠結核菌では糖脂質の発現が減少し、非糖化 MA 脂質である遊離ミコール酸 (free MA : fMA) や GroMM の発現が優位となる。fMA はバイオフィーム成分となって薬剤耐性に寄与し、ある種の高病原性株では弱毒株の 10 倍以上産生され、マクロファージ (Mφ) の活性化を抑制する。GroMM は Th1 に拮抗する 2 型の免疫応答を誘導する。これまで、FcRγ 会合型の C 型レクチン受容体 Mincle が TDM を認識し、結核菌防御的な免疫応答を惹起することが知られていたが、TDM 以外の MA 脂質の受容体は不明であった。我々は結核菌を認識する新規宿主受容体を探索した結果、DAP12 会合型の ITAM 共役受容体 TREM2 が MA 含有脂質を認識することを見出した。そこで、本研究では TREM2 の機能解析を試みた。

【方法】1. Mincle^{-/-}、TREM2^{-/-}、DAP12^{-/-}、FcRγ^{-/-}、CARD9^{-/-}マウスから腹腔 Mφ または骨髓由来 Mφ を調製し、各種ミコール酸含有脂質に対する応答を野生型マウス由来のそれと比較した。2. Mincle あるいは TREM2 のリガンドとなるミコール酸含有脂質を野生型および TREM2^{-/-}マウス腹腔内に接種した際に誘導される Mφ の表現型および腹腔滲出液中の MCP-1 および TNF の産生量を比較した。3. TREM2^{-/-}マウスに BCG を腹腔内感染させ、臓器内菌数や炎症メディエーターの産生を野生型マウスと比較した。

【結果】以上の実験の結果次のことが明らかになった。糖が付加した MA 糖脂質 (TDM、GMM) は Mincle によって認識され、糖付加のない MA 脂質 (GroMM、fMA) は TREM2 によって認識される。Mincle を介した刺激は、炎症性サイトカインを産生する iNOS 陽性の殺菌的 Mφ を誘導する。一方、TREM2 を介した刺激は iNOS 陰性の許容的 Mφ を誘導する。TREM2/DAP12 シグナルは、Mincle-FcRγ-CARD9 シグナルを介した Mφ 活性化および肉芽腫形成などの防御的免疫応答を抑制する。TREM2 欠損マウスは、感染初期の BCG 菌の排除が促進される。

TREM2 を介した MA 脂質応答による結核菌の免疫回避仮説



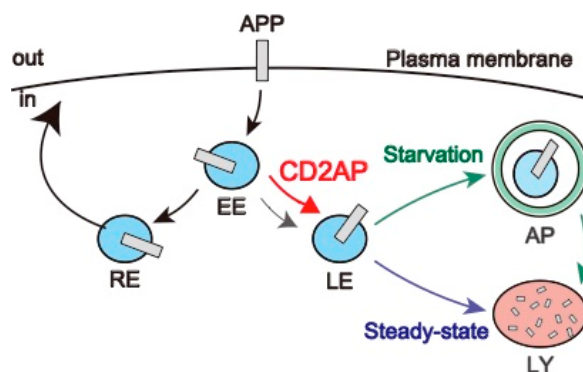
【目的】アルツハイマー病 (AD) や前頭側頭葉型認知症 (FTD) など神経変性疾患の多くは加齢依存的である。高齢化が進み、患者数は増加の一途を辿っており、病因の解明が急務である。家族性 (遺伝性) の研究から原因遺伝子が同定されている疾患も多い。AD ではアミロイド β ($A\beta$) がアミロイド前駆体タンパク質 (APP) から β セクレターゼ (BACE1) と γ セクレターゼ (PSEN1/2) によって切り出されるのが発端となる。しかし、認知症になる仕組みは解明されていない。AD の原因因子、APP、BACE1、PSEN1/2 は全て膜タンパク質で、エンドソームによって細胞膜と細胞内を行来している。以前は $A\beta$ の切り出し機構が注目され、エンドソーム輸送関連の研究は少なかった。ところが、最近認知症患者のゲノムワイドな遺伝子解析が行われ、エンドソーム輸送制御因子が一群の危険因子として同定されたことから、認知症発症におけるエンドソーム輸送の重要性が認識されるようになった。

最近の認知症研究では原因タンパク質の伝搬、即ち、変性・凝集した病原タンパク質が神経細胞から神経細胞へと伝搬し、脳全体へと病態を広げるという説が注目されている。まだ様々な仮説が乱立しているが、神経細胞間の移動にはエンドソームの関与が示唆されており、エンドソーム輸送は疾患の発端ばかりではなく、病態進行にも関わると考えられる。我々は、ここ 10 年ほど神経細胞におけるエンドサイトーシスやエンドソーム輸送の生理的な役割について研究を続けてきた。その過程で、神経細胞でエンドソーム輸送を制御する新たな因子を 4 つ (CD2AP/CIN85、LMTK1、GRAB、CHMP2B) ほど見つけた。非常に興味あることに、それらのうち 3 つは AD や FTD の原因または危険因子であった。そこで、ここ数年は視点を神経変性疾患へとシフトさせて研究を続けている。神経細胞は軸索と樹状突起という長い神経突起を介し、神経回路を形成し、記憶、学習、認知など高度な脳機能を果たしている。軸索先端で使われるタンパク質は神経細胞体で合成され、エンドソーム輸送によって末端まで運ばれていく。これは神経細胞にとって非常に大きな負担であり、加齢に伴いその破綻が生じても不思議ではない。本研究では、我々の見つけたエンドソーム輸送制御因子 2 つ (CD2AP と LMTK1) の役割と神経変性疾患との関連について調べた。

【方法】主に株化培養細胞、マウス初代神経細胞に CD2AP または LMTK1 を AD 関連因子である APP や BACE1 などと共発現させ、その細胞内局在や輸送、およびその役割について調べた。

【結果】APP はリサイクリングエンドソーム輸送 (図の RE) により細胞膜と細胞内の膜小器官を行き来する。APP のタンパク質量は後期エンドソーム (図の LE) を経由してリソソーム (図の LY) で分解されることで調節されている。CD2AP は初期エンドソーム (図の EE) から後期エンドソームへ (LE) の輸送を促進し、APP の分解を促進することが明らかとなった (図参照)。CD2AP 活性の低下は APP のエンドソーム滞在時間を長くして、 $A\beta$ 生成の可能性を高めると考えられる。LMTK1 をノックアウトやノックダウンするとシナプス形成が促進された。また、BACE1 の局在に異常が見られることが判明した。LMTK1 の機能異常が変性疾患と関連する可能性が示唆された。

CD2AP による APP の細胞内輸送制御機構

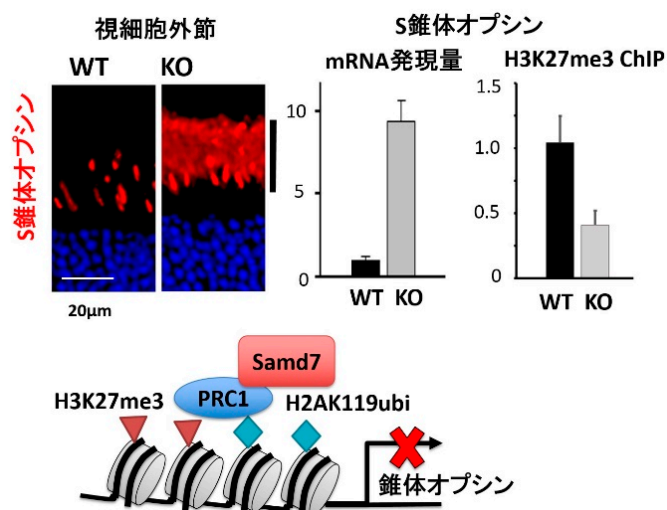


【目的】哺乳類の神経細胞の発生や分化におけるヒストン修飾の生理的意義やその制御メカニズムはまだ未解明な点が多い。網膜の発生・成熟段階や変性網膜ではヒストン修飾がダイナミックに変化することが知られており、遺伝子の異常のみならずエピジェネティックな制御もこれらの疾患の発症に大きな影響を与えていると考えられている。しかし、網膜の分化や成熟におけるエピジェネティック制御の明確な生理的意義や機能メカニズムについてはほとんど明らかになっていない。我々は網膜視細胞におけるエピジェネティック制御を行う因子の同定とその機能メカニズムの解析を行い、網膜視細胞の発生と機能におけるエピジェネティック機構の生理的意義を明らかにすることを本研究の目的とした。

【方法】我々は、網膜視細胞の発生に重要なエピジェネティック因子を探索するスクリーニングを行った。このスクリーニングからヒストン K27 メチル化を制御するポリコームグループ PRC1 の構成因子 Phc2 の SAM ドメインと高いホモロジーを持つ機能未知タンパク質 Samd7 と Samd11 を見出した。Samd7 と Samd11 それぞれのノックアウト (KO) マウスを作製し、網膜における表現型の機能解析を行った。Samd7 と Samd11 の発現解析とともに、Samd7 の抗体を作製した。さらに KO マウスを用いて、網膜組織の免疫染色、網膜電図 (ERG)、遺伝子発現のマイクロアレイ解析、蛋白質相互作用解析、ChIP 解析などを実施した。

【結果】Samd7 と Samd11 はともに網膜視細胞特異的な発現パターンを示した。我々は、Samd7 の欠損マウスを作製し、Samd7 欠損マウスでは青色錐体 (S 錐体) オプシンが野生型に比べて 10 倍程度に過剰発現することや約 160 個の非桿体遺伝子が桿体視細胞に高発現をすることを見出した。我々は Samd7 によるエピジェネティックな発現制御機構を解析するために、クロマチン免疫沈降 (ChIP) アッセイを行ったところ S 錐体オプシンをはじめとした錐体遺伝子のプロモーター領域で H3K27me3 や H2AK119Ubi のヒストン修飾が大きく減少していることを見出した (図)。また、これらのヒストン修飾を制御するポリコーム複合体 1 (PRC1) が Samd7 と細胞核内で共局在することが明らかとなった。これらの結果から、Samd7 は桿体視細胞において不必要な錐体遺伝子を PRC1 とともに抑制しており、Samd7 欠損マウスでは脱抑制により種々の錐体遺伝子が桿体視細胞で異常に高発現していることが明らかとなり、Samd7 が PRC1 複合体の細胞種特異的サブユニットとして桿体視細胞におけるヒストン修飾を制御し、オプシンなどの錐体視細胞特異的遺伝子の発現抑制を行っていることを発見した。さらに、Samd11KO マウスおよび Samd7/11 のダブル KO マウスを作製し、これらのマウスの表現型解析を通じて、網膜視細胞の発生におけるエピジェネティック機構の機能的意義を明らかにする。

ヒストン修飾を通じた網膜視細胞のアイデンティティ制御

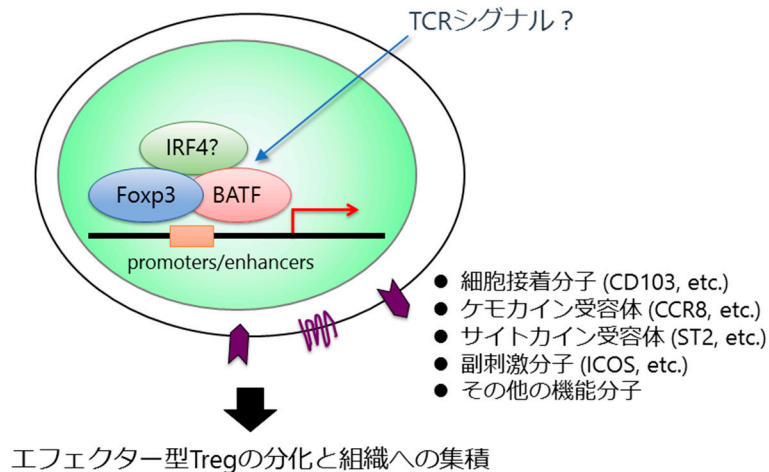


【目的】制御性T細胞（regulatory T cells : Treg）は免疫応答を抑制的に制御することで自己免疫寛容と免疫恒常性の維持に必須の役割を担っている。我々は、転写因子 Foxp3 が Treg 分化と機能を司るマスター転写因子として機能すること、転写因子 BATF が機能的に活性化した CD44^{high} CCR7^{low} エフェクター型 Treg への分化と非リンパ組織への集積に重要な役割を担うことを明らかにしてきた。本研究では、BATF による Treg 制御メカニズムの解明を目指した。

【方法】Treg における BATF の機能解析を行うために Treg 特異的 *BATF* 欠損マウスを作出し、病理組織学的解析、様々な組織から単離した CD4⁺T 細胞サブセットの flow cytometry 解析、RNA-seq 法による遺伝子発現解析を行った。ゲノム上の BATF および Foxp3 結合領域は ChIP-seq 解析により同定した。Foxp3 と BATF の機能的協調を調べるために、*Batf* と *Foxp3* の二重変異マウスから単離した Treg にレトロウイルスベクターを用いて BATF、Foxp3 それぞれ単独または両者を遺伝子導入した。そして、遺伝子導入した細胞を放射線照射した Ly5.1 コンジェニックマウスに移入し、各組織への集積と表現型を flow cytometry により解析した。

【結果】Treg 特異的 *BATF* 欠損マウスは様々な臓器に激しい炎症を呈し、組織中 CD4⁺T 細胞におけるエフェクター型 Treg の割合が著しく減少したことから、BATF はエフェクター型 Treg の分化と組織集積、Treg の炎症抑制機能に必須であることがわかった。BATF は Foxp3 と機能的に協調することで、エフェクター型 Treg 選択的に高発現する遺伝子の発現を正に制御し、エフェクター型 Treg 分化と組織集積を促進することが明らかになった。

BATF は Foxp3 と機能的に協調してエフェクター型 Treg の分化と組織への集積を制御する

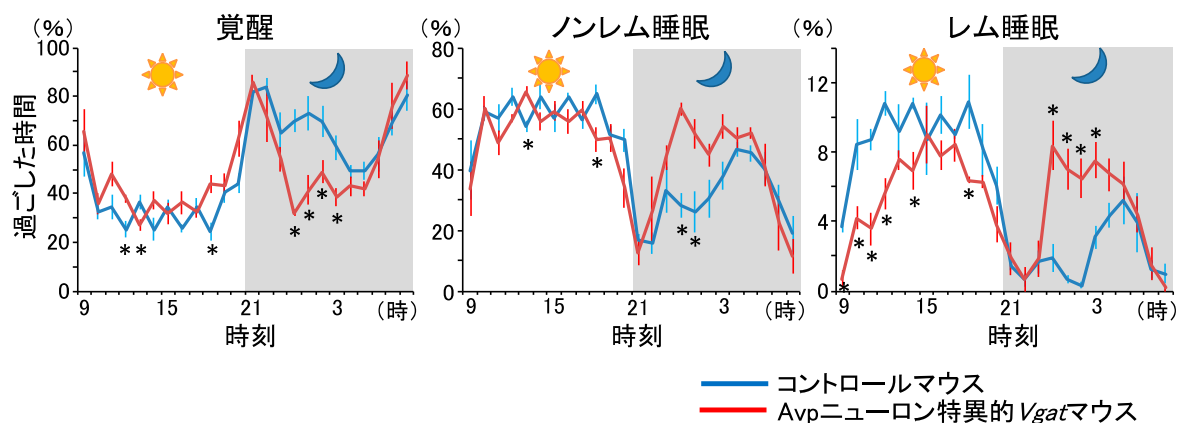


【目的】睡眠を調節する主要な要素として、恒常性（長く起きた後には長く眠る）に加えて、概日リズム（サーカディアンリズム）が挙げられる。哺乳類においては、視床下部の視交叉上核が体内時計（中枢概日時計）として機能し、全身に時刻の情報を送る。しかしながら、中枢概日時計からどのような神経メカニズムで睡眠が調節されるのか、その具体的な神経経路は明らかになっていない。本研究では、中枢概日時計による睡眠覚醒制御の神経メカニズムを理解することを目的とした。

【方法】視交叉上核の中枢概日時計神経ネットワーク機能に異常が生じるバソプレシン（AVP）産生ニューロン特異的小胞 GABA トランスポーター（*VGAT*）欠損マウスの睡眠覚醒を測定した。また、光遺伝学・化学遺伝学的手法を用いて視交叉上核ニューロンをニューロンタイプ特異的に刺激し、睡眠覚醒への効果を検討した。

【結果】AVP ニューロン特異的 *Vgat* 欠損マウスでは、夜間の覚醒量が減少し、ノンレム睡眠、レム睡眠量が増加した（下図）。また視交叉上核の AVP ニューロンを光遺伝学により特定の条件で刺激すると、睡眠中のマウスが速やかに覚醒し、しばらくの間覚醒が維持された。現在詳細なメカニズムを解析中である。これらの知見は、中枢概日時計と睡眠覚醒制御中枢を結ぶミッシングリンクを解明する大きな手がかりになると考えている。

AVP ニューロン特異的 *Vgat* 欠損マウスの睡眠覚醒リズム

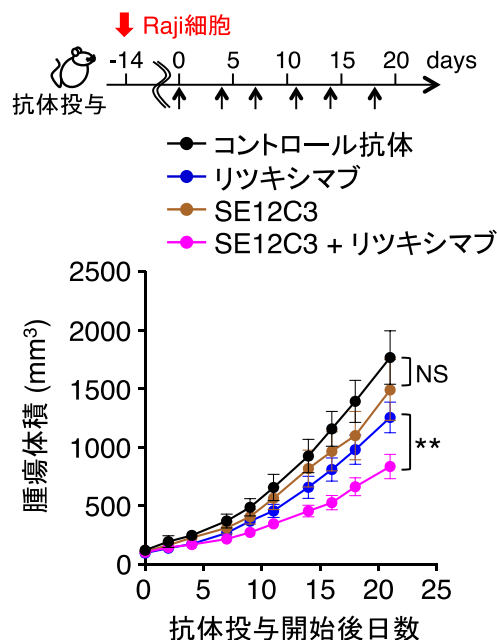


【目的】最近、研究代表者は、マウス及びヒトがん由来株化細胞を移植したマウスを用いた解析から、マクロファージなどの食食細胞とがん細胞の間で形成される細胞間シグナルCD47-SIRP α 系を阻害する抗マウスSIRP α 抗体が、単独、もしくは既存の分子標的薬との併用により強力な抗腫瘍効果を発揮することを見出していた。しかしながら、マウスとヒトSIRP α のいずれにも反応性を示す抗SIRP α 抗体はこれまで存在せず、臨床応用を目指す上で重要な抗ヒトSIRP α 抗体の抗腫瘍剤としての有効性の確立、また、その作用機序の解明について、とりわけ、動物モデルを用いた解析がなされていなかった。そこで研究代表者らは、ヒトSIRP α を発現する免疫不全マウス(hSIRP α -Tgマウス)を用いることで、抗ヒトSIRP α 抗体の抗腫瘍剤としての有効性とその作用機序について解析を試みた。

【方法】本研究では、抗体医薬により標識されたがん細胞に対するhSIRP α -Tgマウス骨髄由来マクロファージによる食食作用をCD47-SIRP α 結合の阻害活性を持つ抗ヒトSIRP α 抗体が促進するかについて検討した。また、ヒトB細胞リンパ腫由来株化細胞Rajiを皮下移植したhSIRP α -Tgマウスを用い、抗体医薬リツキシマブによるRaji腫瘍に対する抗腫瘍効果を*in vivo*において抗ヒトSIRP α 抗体が増強するかについて検討した。さらに、クロドロン酸内包リポソームをRaji細胞皮下移植後のhSIRP α -Tgマウスに投与し、マウス個体内からマクロファージを枯渇化させた際、リツキシマブによる抗腫瘍効果を抗ヒトSIRP α 抗体が増強し得るかについて検討した。

【結果】CD47-SIRP α 結合を阻害する抗ヒトSIRP α 抗体が、がん抗原を認識し抗体依存性細胞食食(ADCP)の誘導能を持つ抗体医薬によるがん細胞のマクロファージによる食食作用をhSIRP α -Tgマウス骨髄由来マクロファージを用いることで増強することが明らかとなった。また、Raji細胞を皮下移植したhSIRP α -Tgマウスを用いた解析から、抗ヒトSIRP α 抗体がリツキシマブによる抗腫瘍効果を増強することが確認された。さらに、この*in vivo*における抗腫瘍効果には少なくともマクロファージが関与することが明らかとなった。従って、腫瘍モデル動物において、抗ヒトSIRP α 抗体がADCPの誘導能を持つ抗体医薬の抗腫瘍効果を増強する薬剤として有効性を示す可能性が高く、今後、ヒトSIRP α に作用する様々な薬剤の抗腫瘍剤としての薬効評価や作用機序の解明にhSIRP α -Tgマウスが有用であると考えられた。

hSIRP α -Tgマウスにおける抗ヒトSIRP α 抗体(SE12C3)によるリツキシマブ依存的な抗腫瘍効果の増強



【目的】細胞死は従来「プログラムされた自然死」apoptosis と「破壊的な死」necrosis に分類されてきた。近年、細胞死の分子メカニズムの解明が進むことにより、プログラム細胞死には様々なタイプが存在することが明らかになりつつある。中でも pyroptosis は分子複合体インフラマソームの形成により生じる活性型 caspase-1 により誘導され、マクロファージからの IL-1 の分泌による炎症反応を伴うユニークな細胞死である。

本研究では NLRP3 インフラマソームに着目しマクロファージのプログラム細胞死の制御機序の解明を目指した。アクチン結合因子 gelsolin が NLRP3 の結合因子であることを見出し、本研究では gelsolin を軸とした解析を進めた。

【方法】マウス骨髄細胞よりマクロファージを分化誘導し、LPS で刺激した後に免疫沈降法と proximity ligation assay にて NLRP3 と gelsolin の結合を確認した。CRISPR / Cas9 によりマウスマクロファージ株 J774.1 細胞より *gelsolin* 遺伝子 (*Gsn*) のノックアウト細胞クローンを樹立した。LPS と nigericin の刺激によりこの細胞クローンの NLRP3 インフラマソームを活性化させた後に、apoptosis、インフラマソーム活性による caspase-1 の活性化さらに LDH による細胞死を評価した。

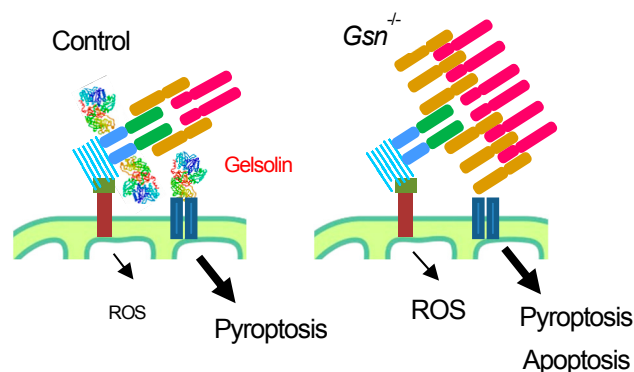
ミトコンドリアは NLRP3 インフラマソーム形成と共に apoptosis 起動の場である。そこでインフラマソーム活性時に gelsolin がミトコンドリアに結合するか否か、加えて *Gsn* 欠損により NLRP3 のミトコンドリアへの結合性が変化するか否かを共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

ミトコンドリア由来活性酸素種 (ROS) はプログラム細胞死の誘導因子として知られている。そこで *Gsn* 欠損が NLRP3 インフラマソーム誘導時の ROS 産生に影響を与えるか否か、MitoSOX で細胞をラベルしフローサイトメーターで ROS 産生を評価した。

【結果】マクロファージでは LPS 刺激により NLRP3 の発現が誘導されることが知られている。免疫沈降法と proximity ligation assay いずれにおいても NLRP3 と gelsolin の結合が認められた。即ち、インフラマソーム形成前には NLRP3 は gelsolin と結合して存在することが明らかとなった。

また *Gsn* 欠損 J774.1 細胞では LPS / nigericin 刺激に対してより強い caspase-1 と caspase-3 の活性化、IL-1 の産生、更にはより多くの細胞死と ROS 産生が見出されたことから、gelsolin は pyroptosis と apoptosis の 2 種類のプログラム細胞死を制御していることが見出された。NLRP3 インフラマソーム活性化刺激は gelsolin のミトコンドリアへの結合を誘導し、*Gsn* 欠損により NLRP3 のミトコンドリアへの結合がより強く観察されたことから、インフラマソーム形成時において gelsolin はミトコンドリアに結合することにより、NLRP3 インフラマソーム形成 (pyroptosis 誘導と IL-1 産生) と apoptosis 誘導を共制御していることが示唆された。

Gelsolin は NLRP3 インフラマソーム形成と apoptosis 誘導を共制御する



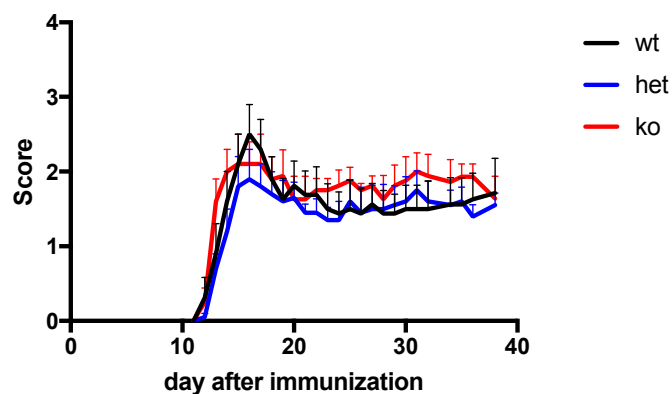
【目的】 High-mobility group box 1 (HMGB1) は主に有核細胞の核内に発現しているタンパクであるが、炎症性刺激時、または細胞死に際して核内から細胞外に放出され、それが炎症応答を誘導し、敗血症や免疫疾患等の病態を増悪することが知られている。このように細胞外に放出された HMGB1 の機能について関心が持たれているが、細胞内の HMGB1 の機能については未だ不明な点が多い。HMGB1 遺伝子欠損マウス上記に加え、我々は最近、HMGB1 が神経発生に重要であるという知見を得た。HMGB1 の炎症・神経疾患との役割について HMGB1 コンディショナルノックアウトマウスを用いて解明する。

【方法】 これまでの報告から、High-mobility group box 1 (HMGB1) を全身性に欠損させたコンベンショナルノックアウトマウスは生後すぐに、低血糖の症状を呈して致死となることが知られている。そこで我々は炎症性疾患・神経発生における HMGB1 の役割について解析すべく、HMGB1 のコンディショナルノックアウトマウスを作製し、種々の臓器・細胞で HMGB1 を欠損したマウスを作製した。作製したマウスにおいて、炎症性疾患のマウスモデルを適用し、HMGB1 の役割について解析を行った。

【結果】 これまで作製した HMGB1 コンディショナルノックアウトマウスについて、肝臓、脾臓、ミエロイド系細胞やリンパ球系細胞などで HMGB1 を欠損させても、致死となるようなマウスはおらず、正常に発育することが分かった。また、タモキシフェンの投与依存的に全身性に HMGB1 を欠損させたマウスを作製し、半年の経過後に観察を行っても、特段の異常は見られなかった。一方で、*Hmgb1* flox マウスを *Nestin1-Cre* マウスと交配させたところ、得られる産子に顕著な減弱が見られた。HMGB1 は神経系細胞など、*Nestin1* を発現する細胞集団において、マウス発生初期に大事な役割を果たしている可能性があることが判明した。

少ないながらも得られた、*Hmgb1*^{flox/flox} *Nestin1-Cre*⁺マウスについて、血糖値などを測定したが、特段の異常は見られなかった。しかしながら、これらのマウス個体は発育の遅滞と体重の減少が見られた。またこのように得られたマウスを用いて、ヒトの多発性硬化症のマウスモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (Experimental autoimmune encephalomyelitis : EAE) を誘導し検討を行ったところ、興味深いことに、野生型マウスと比較し、HMGB1 欠損マウスにおいて病態スコアに差異を認めなかった(図)。したがって、*Nestin* 陽性細胞において発現している HMGB1 は、炎症性疾患の一つと考えられる EAE の病態には大きく関与せず、マウスの発達や成熟に重要であることが明らかとなった。

神経系細胞 (*Nestin1* 陽性) において HMGB1 を欠損させたマウスにおける EAE の病態スコア



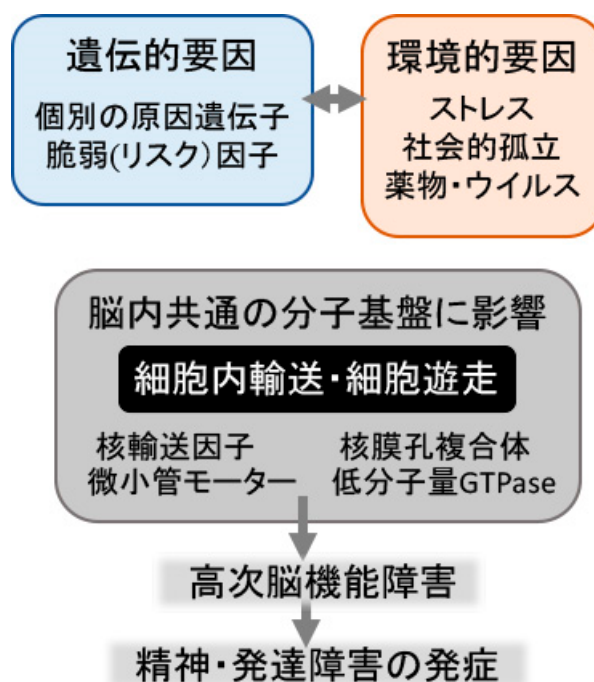
【目的】精神・発達障害に共通する社会性行動の脳基盤を探索することは、病態解明に向けての有力な指針となり得る。私たちは、神経細胞内にその分子基盤があるのではないかと考えた（図参照）。近年、統合失調症、ASD、ADHD等の複数の精神・発達障害に核移行因子が関与していることが相次いで報告されている。しかしながら、当該障害における核移行因子の関与は、記憶、学習、情動など高次脳機能に関わる個々の情報を核内に伝達する従来の核移行活性だけでは、その機能的役割を説明することはできない。核移行因子の神経細胞内における新たな機能的役割を明らかにすることは、当該疾患の発症に至る分子メカニズムを解明する為に重要である。

本研究課題は、脳内での発現量をもっとも高く、統合失調症の発症との関連が示唆されている核輸送因子 *KPNA1* に着目し、細胞内輸送および神経遊走活性を指標した神経細胞内における新たな機能的役割を明らかにすることを目的とする。さらに、精神・発達障害に共通する分子基盤を標的とした創薬探索を行い、汎用性の高い診断法、根本的治療法の確立を目指す。

【方法】*KPNA1* 遺伝子欠損マウス由来の脳部位（前頭前皮質および側坐核）から抽出、精製した RNA を用いた DNA マイクロアレイにより、遺伝子発現変動を野生型マウス由来のものと網羅的に比較した。また、薬物ストレスとして、NMDA 型グルタミン酸受容体遮断薬のひとつであるフェンシクリジン (PCP) を皮下投与し、その影響を調べた。

【結果】今回、前述の各試料の DNA マイクロアレイによる遺伝子発現レベルを網羅的に測定した。各群の散布図をもとに主成分分析を行ったところ、前頭前皮質および側坐核共に、*KPNA1* 欠損と野生型間で顕著な差異はみられなかった。但し、PCP 投与の有無による差異は、両マウス群の前頭前皮質および側坐核で共に顕著にみられた。さらに興味深いことに、側坐核においては、PCP 投与群においてのみ、*KPNA1* 欠損と野生型間での差異が顕著にみられた。次に、*KPNA1* 欠損の側坐核において、微小管モーターの細胞質ダイニンの構成因子の遺伝子発現レベルが顕著に低下していた。また、PCP による薬物ストレス負荷の影響を調べたところ、*KPNA1* 欠損マウスにおいて、細胞質ダイニン構成遺伝子のさらなる発現低下がみられた。

高次脳機能障害の分子基盤



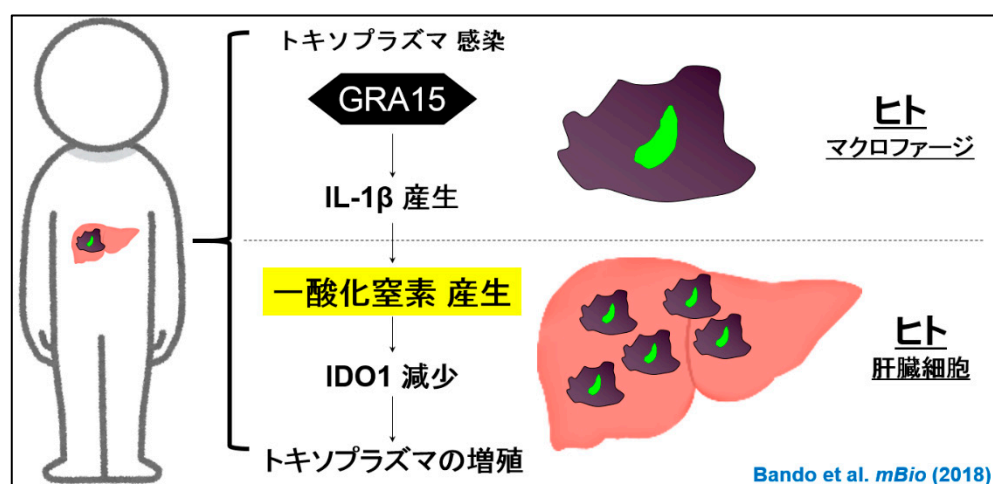
【目的】 インターフェロン (IFN) 誘導性 GTPase は、小型魚類から哺乳動物まで広く保存されており、IFN 刺激によって様々な細胞で強く誘導される分子群である。IFN 誘導性 GTPase は主に、細胞内に寄生する様々な病原体が形成する病原体含有小胞に蓄積し、それを破壊する機能を有し、トキソプラズマなどの寄生虫やサルモネラなどの細菌に対する宿主免疫応答に重要である。トキソプラズマは細胞に感染して、病原体含有小胞の中でだけ増殖ができる寄生虫である。これまでに宿主の細胞に感染した際に様々な分子を放出することが知られており、それら分子がどのように病原性発症にかかわってくるのかなど、その寄生虫学の研究がされている。その中の一つである GRA15 も宿主細胞内に放出され、宿主免疫系を活性化することが知られ、IL-1 β の産生に関与することが報告されていた。しかし、マウスを使った寄生虫免疫学による研究の結果、*GRA15* を欠損したトキソプラズマの方が野生型原虫よりも病原性が増す（つまり、*GRA15* が無い方がトキソプラズマには有利である）ことが報告され、トキソプラズマが *GRA15* を持つ寄生虫学上の意義は長い間不明であった。

そこで我々はトキソプラズマの *GRA15* のインフラマソーム活性化と IFN 誘導性の抗トキソプラズマ応答の関係性を調べることを目的とした。

【方法】 ヒトマクロファージにトキソプラズマを感染させ、ヒト肝臓細胞と共培養をし、インターフェロン依存的な宿主免疫応答を検討した。

【結果】 トキソプラズマに感染したヒトマクロファージは *GRA15* の有無によって、NLRP3 インフラマソームの活性化による IL-1 β の産生が制御され、さらにヒト肝臓細胞を刺激し一酸化窒素を産生することによって、IFN 依存的な宿主免疫応答を抑制していた。このことによって、NLRP3 インフラマソームによるインターフェロン宿主免疫の負の制御機構が明らかとなった。

NLRP3 インフラマソームの活性化によって、インターフェロン依存的宿主免疫応答が制御される

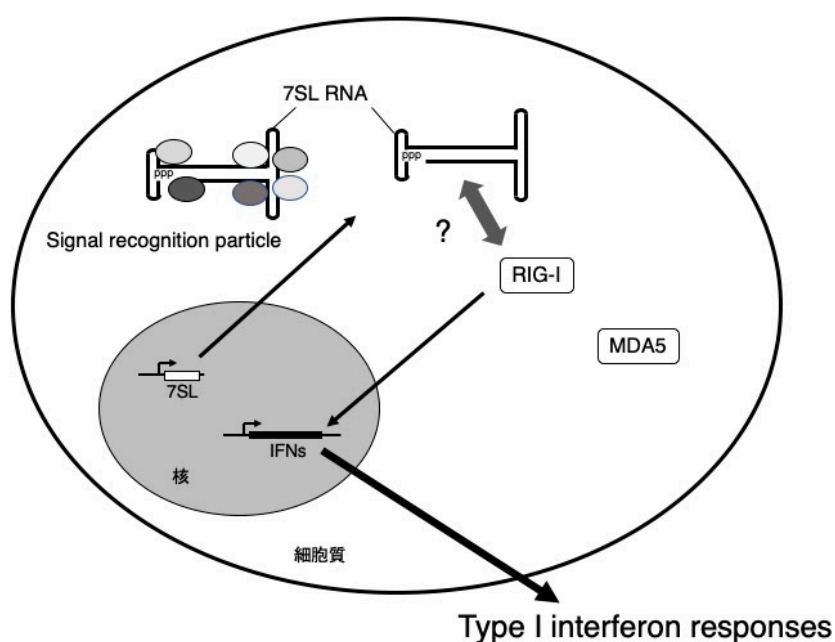


【目的】抗ウイルス自然免疫誘導に必須な役割を担う感染センサーである retinoic acid inducible gene (RIG)-I-like receptor (RLR) は、RNA 結合タンパク質 (RNA-binding protein : RBP) であり、ウイルス感染によって細胞質に出現するウイルスに特徴的な非自己 RNA 構造を認識することで活性化される。最近の解析から、RLR がストレス顆粒 (stress granule : SG) と呼ばれる自己 mRNA の機能制御に関わる凝集体に集積して機能していることや、内在性 mRNA を介した遺伝子発現調節に関与する RNA サイレンシングの制御に RLR が関与することなどが明らかになってきた。本研究では、非自己 RNA を認識する RLR が、どのような内在性 RNA と相互作用し得るのかを解析し、それによって抗ウイルス自然免疫応答が誘導されるのかどうかを検討することとした。

【方法】本解析では RLR のうち RIG-I に注目した解析を実施した。初めに、RIG-I の基質である 5'三リン酸構造を持つ内在性 RNA を [α - 32 P] GTP 存在下での 5'キャッピング反応により検出した。次に、得られた RNA が RIG-I と会合し得るかどうかを、細胞に RIG-I を発現させた後に精製し、そこに結合している RNA を RT-pPCR により検出することによって検討した。さらに、RIG-I と結合することが検出された内在性 RNA が RIG-I を介した抗ウイルス自然免疫シグナルを誘導し得るかどうかを、培養細胞を用いたレポーターアッセイにより解析した。

【結果】5'キャッピング反応により、RNA polymerase IIIにより転写される 7SL RNA や 5S rRNA など複数の内在性 RNA が検出された。また RIG-I との結合実験から、これらの RNA が実際に細胞内で RIG-I と結合し得る可能性が示唆された。これらの RNA を合成し IFN 誘導シグナル能を検討したところ、7SL RNA の細胞内への導入によってレポーター遺伝子の活性上昇が検出されたことから、7SL RNA が RIG-I による認識を介して、細胞内へシグナルを伝達することが可能であることが示唆された。しかし、7SL RNA は通常 Signal recognition particle として RNA-タンパク質複合体として翻訳制御に必須であることから、生理的にどのような局面でこのような内在性 RNA による抗ウイルスシグナルの活性化が起き得るのかの理解に対しては、今後の解析が必要であると考えられた。

RIG-I による内在性 RNA の認識とシグナル活性化

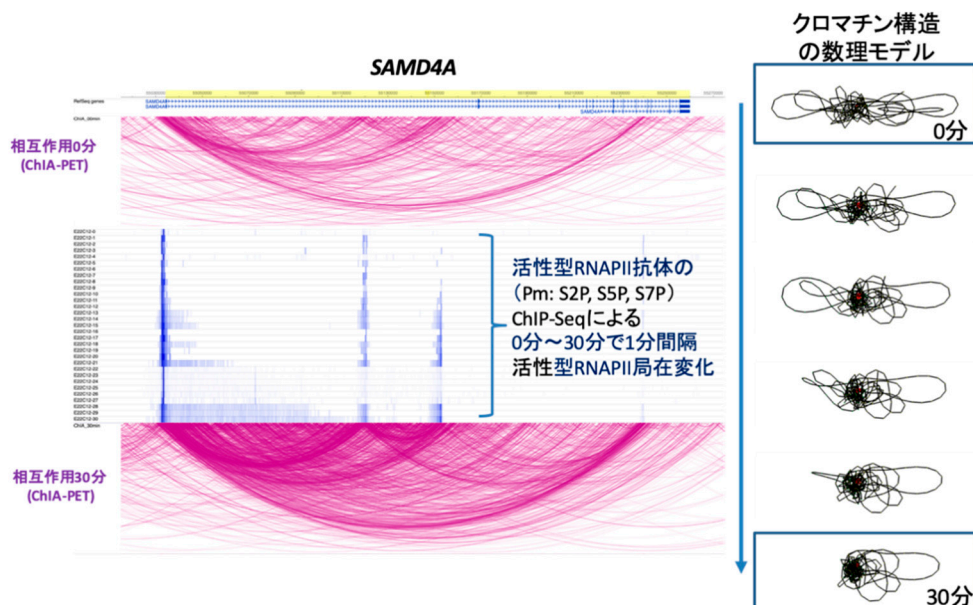


【目的】血管内皮細胞への炎症刺激により、RNAポリメラーゼ II (Pol II) を抑制される遺伝子から誘導される遺伝子へ再配分する転写複合体仮説を検証する。そのため、本研究では、1. Pol IIのChIP-Seqを1分間隔で実施し、近接する遺伝子間でのPol IIの動員を比較し、2. captureHi-C法により経時的クロマチン構造との一貫性を確認し、3. enChIP法によりこの転写複合体の蛋白成分を同定する。

【方法】1. TNF α 刺激後1分間隔でPol II抗体によるChIP-Seqのための検体調製：1分時間解像度で転写を再現性良く観察するため、ChIP 検体調整自動化装置を開発し、ChIP-Seqに適した各種活性型 Pol II 抗体を樹立する。2. captureHi-C による時系列相互作用解析：全 3C 産物に対して、エンハンサーやプロモーター等観察すべき相互作用領域に設計された修飾 RNA プローブをハイブリさせることによって検体を濃縮し、十分な経時変化のデータを取得することを目指した。3. enChIP 法による転写複合体精製：enChIP 法を用いて転写複合体を精製・濃縮する。蛋白成分は、ショットガンプロテオミクスによって同定する。

【結果】1. TNF α 刺激後1分間隔でPol II抗体によるChIP-Seqのための検体調製：TNF α 刺激によって誘導されるSAMD4A 遺伝子領域に於いて刺激後10分頃からPol IIの波が出現した。また、刺激23分から27分の間CTDの3カ所がリン酸化されている活性型 Pol II の結合シグナルが一旦消失し、その後28分から再度出現した。2. captureHi-C による時系列相互作用解析：新たなシーケンス方法 (Nova-Seq) の普及により大量のシーケンスを効率的に実施し、capture を行わずとも当初目指したデータを取得することが可能となった。3. enChIP 法による転写複合体精製：SAMD4A 上第一イントロンにあるエンハンサー領域に設計したガイド RNA 領域から精製された DNA の配列を決定したところ、ケモカイン、接着因子など TNF α に応答して発現量が変動する遺伝子領域の配列が検出された。本報告書作成段階ではこの蛋白成分の同定を行っている。

1分間隔 ChIP-Seq と 30分間隔 ChIA-PET を統合して時間解像度1分でクロマチン構造の変化を推定する数理モデル



【目的】我々は、体細胞復帰変異によるモザイク (RSM) を高率に生じる細胞モデル、マウスモデルの作製のために必要な情報を集積するため、実際の患者において起こっている体細胞復帰変異を来すメカニズムを、ゲノムレベルで詳細に解析する必要があると考えた。本研究では、RSM を生じる機序の解明を目的として、RSM を生じていると考えられる症例を収集し、それらの症例において、体細胞復帰変異による健常部皮膚の表皮細胞を対象として、詳細なゲノム解析を行った。

【方法】まず、解析対象となる体細胞復帰変異を有する魚鱗癬症例を収集した。本研究では、これまでに文献上、体細胞復帰変異による健常皮膚斑を有することが報告されている ichthyosis with confetti (IWC) 症例についても検索した。患者末梢血中の細胞からゲノム DNA を抽出し、ケラチン遺伝子、*KRT1*、*KRT10* の全コード領域とエクソン・イントロン境界領域を、PCR にて増幅し、サンガー法にてシークエンシングを行なった。また、健常皮膚部での表皮細胞のゲノム DNA の解析も行った。健常皮膚部から皮膚生検を施行し、生検皮膚検体を EDTA 溶液に浸漬することで、表皮と真皮以下とに分け、表皮のみからゲノム DNA を抽出した。表皮から抽出したゲノム DNA を用いて、病因ケラチン遺伝子変異が RSM により消失していることを確認するために、*KRT1* について、サンガー法によるダイレクト・シークエンシングを施行した。さらに、RSM の生じた機序が体細胞での遺伝子組み替えであるか、否かを明らかにするため、*KRT1* の近傍における loss-of-heterozygosity (LOH) の存在を、CytoScan HD (Affymetrix) を用いた SNP array 検索にて解析した。さらに、健常部皮膚表皮細胞での体細胞遺伝子組み替えの範囲を厳密に特定するために、*KRT1* の近傍について、次世代シーケンサーを用いて、全ゲノム・シークエンシングを施行した。

【結果】体細胞復帰変異による健常皮膚斑を有する表皮融解性魚鱗癬、3 症例を集積した。各症例ともに、出生時から広汎に皮膚の潮紅と鱗屑を認め、水疱形成も認められた。症例によって、10 歳代から 30 歳代くらいから複数の健常に見える皮膚が生じて来ていたとのことであった。表皮融解性魚鱗癬の病因としては、*KRT1* に、ヘテロの挿入変異、c.1758_1759insT (p.Tyr587-Leufs*67)、*KRT1* の intron1 から intron5 に至る比較的大きな欠失変異 (197 番目のアミノ酸から 375 番目のアミノ酸までの欠失)、ミスセンス変異、c.563A>G (p.Asn188Ser) を認めた。全例で健常部皮膚の表皮細胞では、体細胞復帰変異により病因遺伝子変異は失われていた。SNP array 検索、*KRT1* の近傍の全ゲノム解析の結果、2 症例では *KRT1* の近傍における LOH を認め、RSM を生じた機序は体細胞遺伝子組み換えと考えられた。残りの 1 例では、LOH は見られず、病因変異部の点変異による RSM と考えられた。

体細胞復帰変異によるモザイク症例 (50 歳、男性) の臨床像



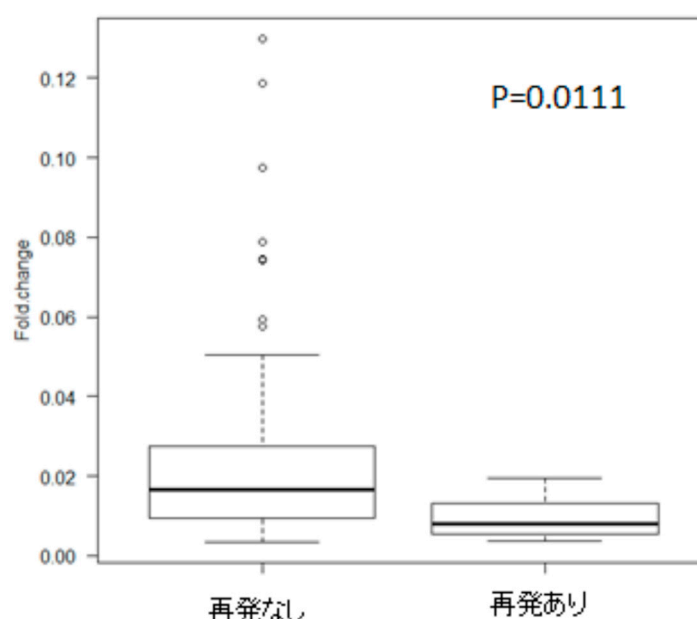
【目的】固形癌の多くは発育の過程で遺伝子の動的変化をもたらす形質を獲得する。この形質変化が、腫瘍内の細胞間における遺伝子不均一性を生み出し、同一腫瘍内に多様な性質をもつサブクローンの発育を促す（腫瘍内不均一性）。また、*EGFR* 遺伝子変異を有する肺癌は日本人に発生する肺腺癌の約半数におよぶ。*EGFR* 変異肺癌は発癌初期では低悪性であるが、癌の進化的発育過程において高悪性の性質に変化することが示唆される。

今回の研究では、ドライバー遺伝子変異を有する肺癌の代表格である *EGFR* 遺伝子変異肺腺癌における腫瘍内不均一性の機序解明として、1. *EGFR* 変異肺癌における腫瘍内不均一性に関与する因子の探索と解析、2. *EGFR* 変異肺癌における進化的発育に関与する因子の探索と解析、の両面から研究を進めた。

【方法】1. *EGFR* 変異陽性肺癌の腫瘍内不均一性の解析：*EGFR* L858R 蛋白の不均一発現部において、*EGFR* 遺伝子コピー数変化と同様の変化を示した *MDM2* 遺伝子に着目し、*EGFR* 変異陽性肺癌における *MDM2* 遺伝子発現の意義に関する検討を行った。2. *EGFR* 変異肺癌における進化的発育に関与する因子の検討：術前 CT 画像における *EGFR* 変異陽性肺癌の進化的発育を示唆する所見から、肺癌を発育段階別に分け、*EGFR* 遺伝子変異別に発育の特徴を調べた。同症例の *EGFR* 遺伝子変異方および臨床病理学的因子、予後との関係を検討した。

【結果】1. 再発を認めた肺癌と再発を認めていない肺癌の両群で *MDM2* 遺伝子発現を比較したところ、再発ありの肺癌において有意に *MDM2* 遺伝子発現が低値であった（図）。*MDM2* 低発現群と高発現群に分けて検討したところ、*MDM2* 低発現群で進行癌が多く、*MDM2* 低発現群で有意に無再発生存における予後が不良であった。CT 所見による各グループの特徴的な症例を合計 20 例選択し、次世代シーケンスパネルを用いて、進化的発育に関連する遺伝子変化を検討している。2. Ex21L858R 陽性肺癌は Ex19del 陽性肺癌より GGO を有する腫瘍の割合が多く、無再発生存が良好であった。肺癌手術症例において、*EGFR* exon 21 変異型腺癌は exon19 変異型および野生型腺癌に比べ GGO を有するものが多く、早期に切除される割合が高いことが示唆された。今後は、次世代シーケンスパネルにより、肺腺癌の進化的発育に関係する因子を検討する予定である。

肺癌再発の有無と *MDM2*mRNA 発現量との関係



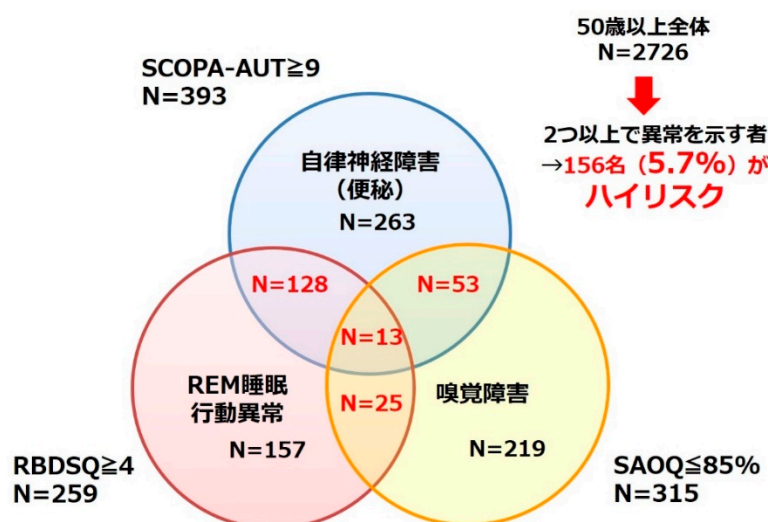
【目的】パーキンソン病 (PD) およびレビー小体型認知症 (DLB) は、いずれも α -シヌクレインの神経細胞内沈着を病理学的特徴としており、あわせてレビー小体病と呼ばれている。レビー小体病では神経症状の発症前から便秘や排尿障害などの自律神経障害、レム睡眠行動障害、嗅覚障害、うつ、日中の眠気などの prodromal 症状を高率に呈することが知られており、他の神経変性疾患と同様、自覚症状の発症前から分子病態が進行していると考えられている。神経変性を抑制するためには発症前のより早期の段階での治療介入が必要であるが、prodromal 症状の発現から神経症状の出現までの詳細な経過は十分明らかになっておらず、早期診断法や治療法のターゲットとなるバイオマーカーの同定が急務となっている。そこで我々は、prodromal 症状に関する質問紙を用いて健常者からレビー小体病発症のハイリスク者を抽出し、将来的に予防的治療法開発へと繋げることを目的として本研究を計画した。

【方法】高山久美愛厚生病院およびだいでうクリニックの健康診断 (人間ドック) 受診者に質問紙を用いてレビー小体病の prodromal 症状に関する調査を行い、50 歳以上で複数の非運動症状を有する者 (ハイリスク者) を抽出し、その特徴を解析した。また並行して、レビー小体病患者の過去の健康診断データを解析して、疾患の発症や進行リスク因子および阻害因子を探索した。

【結果】人間ドック受診者 12,378 名に対してレビー小体病の prodromal 症状に関するアンケートを配布し、4,953 名 (男性 2,641 名、女性 2,312 名) から回答を得た。年齢は 51.33 ± 10.46 歳 (20~87 歳) で、PASE (身体活動量) は 133.26 ± 82.46 、SCOPA-AUT (自律神経障害) は 4.96 ± 4.16 、SAOQ (嗅覚障害) は $96.53 \pm 10.55\%$ 、RBDSQ (レム睡眠行動障害) は 2.12 ± 2.07 、BDI-II (うつ) は 7.00 ± 6.62 、ESS (日中の眠気) は 7.96 ± 4.42 であった。50 歳以上かつ SCOPA-AUT、SAOQ、RBDSQ のうち 2 つ以上で 90 パーセントイル以上の異常を示す者 155 名を見出し、レビー小体病のハイリスク群と定義した。ハイリスク群の年齢は 61.43 ± 7.07 歳で、PASE は 123.10 ± 79.54 、SCOPA-AUT は 12.51 ± 5.19 、SAOQ は $82.37 \pm 19.79\%$ 、RBDSQ は 4.98 ± 2.74 、BDI-II は 11.97 ± 8.32 、ESS は 9.59 ± 4.96 であり、全ての非運動症状のスコアが異常値を示していた。これらの数値は同時に収集したレビー小体病患者のデータとほぼ同等であり、高齢で複数の非運動症状を有する健診受診者がレビー小体病のハイリスク者であることが示唆された。

一方、パーキンソン病患者 (男性 23 名、女性 21 名) の過去の健康診断結果を後方視的に解析したところ、発症前から Hb や LDL-c の低下がみられた。この結果は、上記の男性ハイリスク者とも共通しており、レビー小体病の preclinical 期に鉄や脂質の代謝異常が存在することが示唆された。

健診受診者における prodromal 症状の頻度



77 糖尿病網膜症における糖鎖の病態形成への関与

神田 敦宏

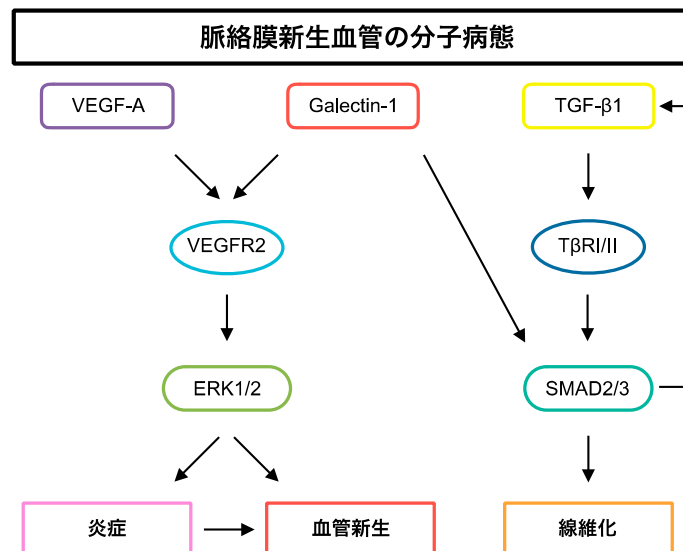
【目的】糖尿病網膜症や加齢黄斑変性は、主要な中途失明原因の網脈絡膜疾患であり、生活習慣病や加齢による慢性炎症性疾患と位置づけられる。しかしながら、いまだ根本的な治療法の開発・疾患発症機序の解明には至っていない。我々は、これまでに糖尿病網膜症患者と非糖尿病患者の硝子体中 N 型糖鎖量を比較し、糖尿病網膜症患者において有意に増加していることを明らかにし、さらに糖鎖結合タンパク質ガレクチン-1 が血管内皮増殖因子 (VEGF) とは独立して増殖糖尿病網膜症眼内における血管新生を促進していることを明らかにした。ガレクチン-1 および糖鎖は、腫瘍転移やアポトーシスなど様々な病理的機能を持っていることから、他の網脈絡膜疾患の病態形成 (血管新生・炎症など) にも関与している可能性は大きい。また、ガレクチン-1 の網膜における生理的な機能に関しては多くが不明である。そこで本研究では、網脈絡膜疾患における病態形成 (血管新生、炎症、線維化など) でのガレクチン-1 および糖鎖の関与の解明を行う。

【方法】ガレクチン-1 欠損 (*Lgals1*-KO) およびガレクチン-1 過剰発現 (*Lgals1*-Tg) マウスを用いて、レーザーを眼底に照射して脈絡膜新生血管ならびに網膜下線維化モデルを作製した。そして、リアルタイム PCR、イムノブロット、免疫組織染色法などを用いて、種々の炎症性サイトカインや線維化関連分子の発現・局在を解析した。さらに *LGALS1* siRNA 遺伝子導入をした培養ヒト網膜色素上皮細胞を用いて、上皮間葉移行マーカーの発現変化を解析した。

また、2 型糖尿病による増殖糖尿病網膜症患者 20 例、糖尿病の既往がない特発性黄斑上膜および黄斑円孔患者 20 例から手術前に採取した血漿中における種々の血漿中タンパク質濃度をマルチプレックス解析システムと酵素免疫測定法を用いて測定した。

【結果】ガレクチン-1 は、網膜色素上皮および脈絡膜における血管新生および線維化の両方で病態形成に関わる重要な促進因子として機能していることが示唆された。

ガレクチン-1 の脈絡膜新生血管と網膜下線維化への病態形成関与



【目的】心臓エネルギー代謝の調節メカニズムの解析は心不全の病態解明と新規治療法の開発にとって有効なアプローチである。心臓は、血行動態上の負荷に対して、心筋細胞肥大や間質線維化などの構造的なリモデリングとともに、エネルギー基質の変換を特徴とする代謝リモデリングを起こす。そして、心臓エネルギー基質は脂肪酸から糖へ、さらには、ケトン体へとシフトする。しかし、こうしたエネルギー基質変換の分子メカニズムや病態生理的意義は未解明である。本研究では、ケトン体による代謝リモデリングの調節メカニズムと病態生理的意義を解明することで、心不全の新たな予防法と治療法の開発に繋げることを目的とする。

【方法】1. ケトン体による FGF21 発現誘導の有無

ラット培養心筋細胞に β ヒドロキシ酪酸 (β OHB) を 0~5 mM の種々の濃度で添加し、心筋および培養上清中の FGF21 の発現をそれぞれウエスタンブロットおよび ELISA にて解析した。

2. ケトン体による AMPK、Sirt1、PGC1 α 、および PPAR α の活性化の有無

β OHB を培養心筋細胞に添加し、ミトコンドリア産生やミトコンドリア機能の制御に重要な AMPK、Sirt1、PGC1 α および PPAR α の発現をウエスタンブロットにて解析した。AMPK に関しては Thr172 のリン酸化の有無を検討した。また、AMPK α 1 siRNA をトランスフェクトし、 β OHB による FGF21 の発現誘導が起こるか否かを解析した。

3. ケトン体が FGF21 プロモーター活性に及ぼす影響

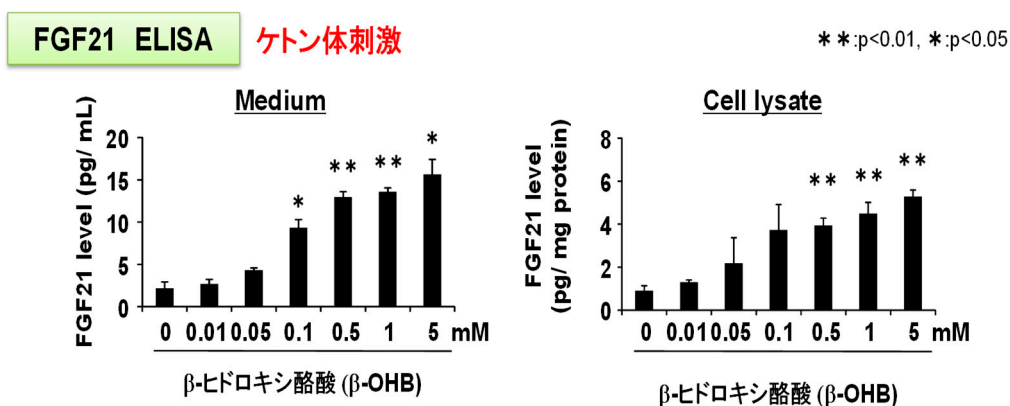
マウス FGF21 遺伝子のプロモーター領域 1.5 kb を含むルシフェラーゼベクターをトランスフェクトしたラット培養心筋細胞を 1 mM の β OHB に 24 時間暴露し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

4. 心不全患者における血清 β OHB と FGF21 濃度との関連

急性心不全にて入院した心不全患者 140 名において、退院時の β OHB、FGF21、NT-proBNP および遊離脂肪酸 (FFA) の濃度を調べ、相互の相関関係を解析した。

【結果】 β OHB は心筋細胞で用量依存的に FGF21 の発現、ミトコンドリア産生およびミトコンドリア機能の調節に重要なシグナル分子であるリン酸化 AMPK、PGC1 α Sirt1、および PPAR α の発現を誘導した。また、 β OHB による FGF21 の誘導は転写レベルで制御されていた。さらに、心不全患者で血清 β OHB と FGF21 との濃度には有意な相関が認められた。ケトン体は心筋のエネルギー基質として利用されるだけでなく、AMPK の活性化を介してミトコンドリア機能維持を促進するシグナル分子として機能する可能性が示唆された。

培養心筋細胞においてケトン体は FGF21 の発現を誘導する



【目的】慢性心不全の病態形成においては、病的ストレスにより惹起される心筋の形態学的、機能的な変化である心筋リモデリングが重要な役割を果たす。こうした病的な心筋リモデリング過程での心筋遺伝子発現変化の中で、特によく知られている現象が、胎児期の心室に認められるが、生後心臓の成熟と共に低下する一連の遺伝子発現プログラムが再誘導される、心筋胎児型遺伝子再活性化である。このような心筋胎児型遺伝子群の再活性化は、心不全の病態進行と関連するのみならず、心不全の進行そのものにも関与すると考えられている。したがって、心不全に至る過程における心筋胎児型遺伝子再活性化をはじめとする心筋遺伝子発現変化の分子メカニズムを明らかにすることが、慢性心不全の発症・進展に深く関わる分子機序の解明、さらには心不全に対する新規予防法、治療法確立のための標的分子の同定に繋がりうる。しかしいまだ最終分化した心筋細胞における遺伝子発現制御経路、特にその病的プロセスに関わる転写・エピゲノム制御因子の役割は明らかで無い点が多い。そこで本研究では、現在までに心不全発症・進展に関わる意義を我々が明らかにしてきたNRSF転写抑制複合体に関して、同複合体を構成するエピゲノム制御因子の役割に注目し、最近得た未発表の知見や新規モデル動物を解析することにより、心筋機能の維持と破綻における転写・エピゲノム制御因子の役割の詳細な解明とそれに基づく新規心不全治療標的の同定をめざす。

【方法】NRSF転写抑制複合体を形成するエピゲノム因子である、*HDAC1/2*、*G9a*、*LSD1*それぞれの心筋特異的コンディショナルノックアウトを作製し、その心臓における表現形質と分子機序を解析した。

【結果】1. *HDAC1/2*心筋特異的コンディショナルノックアウトマウス (*HDAC1/2* dcKO) の解析

HDAC1/2 flox マウスと心筋特異的タモキシフェン誘導性 CRE マウスを交配し、成体マウス心筋において心筋特異的に *HDAC1/2* dcKO を誘導し、その表現型を解析した。タモキシフェン投与後、一部の心筋胎児型遺伝子の発現誘導が観察され、投与 8 週後に *HDAC1/2* dcKO メスでは対照マウスに比べて顕著な左室収縮力の低下が認められた (下図)。*HDAC1/2* dcKO メスの心筋組織では対照マウスに比べて明らかな線維化の亢進を認め、1 年以内に約半数が死亡した。またマイクロアレイ解析にて、*HDAC1/2* dcKO メスの心室筋では心筋胎児型遺伝子および心房特異的遺伝子の発現亢進が認められ、その少なくとも一部は NRSF 転写抑制複合体により制御される遺伝子であることが確認された。本結果により NRSF-*HDAC1/2* 複合体の心筋恒常性維持における重要性が確認された。

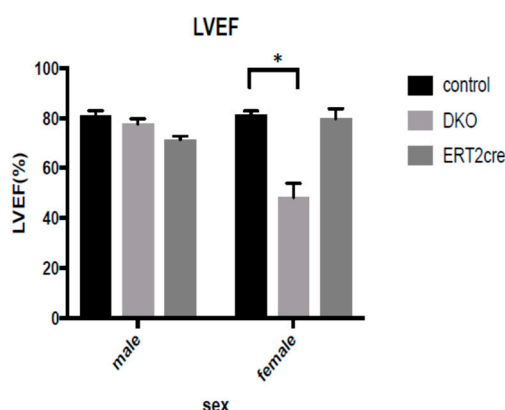
2. *G9a*心筋特異的コンディショナルノックアウトマウス (*G9a* cKO) の解析

G9a cKO を作製しその心機能を解析した。*G9a* cKO は心機能に明らかな差を対照マウスと比較して認めなかったが、心筋において一部胎児型遺伝子の発現誘導が起きていることを確認した。現在、本マウス心臓に種々のストレスをかけその反応を解析している。

3. *LSD1*心筋特異的コンディショナルノックアウトマウス (*LSD1* cKO) の作製

LSD1 flox マウスと心筋特異的タモキシフェン誘導性 CRE マウスの交配を行い、心筋特異的誘導性 *LSD1* ノックアウトマウスの作製、解析を開始し、現在継続中である。

タモキシフェン投与 8 週後の *HDAC1/2* dcKO の左室収縮能



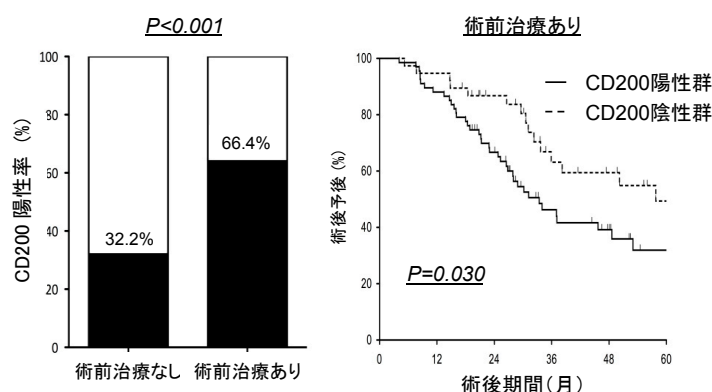
【目的】新規化学療法等の癌治療の進歩により、消化器癌においても予後の向上が認められるが、今なお切除不能例や進行例がみられ、それらの予後は不良である。特に、膵癌に代表される難治性消化器癌は、根治術後であっても転移および再発の頻度が高く、再発後の治療は困難である。したがって、さらなる予後向上のためには、新たな観点からの癌治療法開発が必須である。本研究では、これまで独自に蓄積してきた一連の研究成果と、最新の免疫・癌研究の報告を融合・発展させ、特に膵癌における CD200 発現および大腸癌肝転移における HVEM 発現について検討を行った。

【方法】1. 20 例の膵癌切除症例を用いて、腫瘍細胞の CD200 発現を免疫組織染色にて臨床的意義を検討した。また、腫瘍内浸潤 T 細胞 (TIL) についても同様に免疫組織染色にて検討した。さらに、ヒト膵癌株 PANC-1 および Capan-2 を用いて、CD200 の他に、CD44、CD24、EpCAM の発現について、各細胞株に 10 Gy の放射線照射を行い、照射前後に細胞表面マーカーを検討して、膵癌幹細胞との関連を検討した。大腸癌肝転移に肝切除を行った 104 例を対象とした。ヒト HVEM 特異抗体にて免疫染色を行った。HVEM 高発現群と低発現群に分類し臨床病理学的因子、予後との関連を検討した。また TIL についても同様に検討し、臨床的意義を検討した。

【結果】1. 膵癌における CD200 発現は、手術先行例 (術前治療非施行例) では予後との明らかな関連は認めなかった。一方、術前化学放射線治療施行例では非施行例に比して、有意に CD200 発現が高く、また CD200 発現陽性群の予後は陰性群に比して有意に不良であった ($P=0.030$) (図)。また多変量解析の結果、CD200 発現は独立予後不良因子であることが明らかとなった ($HR\ 2.51$; $95\% CI\ 1.35\sim4.66$; $P=0.004$)。また、CD4、CD8、CD45RO 陽性 TIL は、CD200 陽性群で、陰性群に比して、いずれも有意に少なかった。さらに *in vitro* での検討の結果、ヒト膵癌株の放射線照射によって、CD200 発現が誘導され、さらには CD44/CD24/ESA 等との関連も認められた。以上より、最難治癌といわれる膵癌において、CD200 は宿主免疫回避機構に影響し、さらには放射線治療等による治療抵抗性に関わっていることが示唆された。したがって、新たな膵癌治療におけるバイオマーカーとなるとともに、治療標的分子としても有用である可能性が示された。

2. 大腸癌肝転移において、HVEM 高発現群 49 例 (47.5%)、低発現群 55 例 (52.5%) の 2 群に分類して以下の検討を行った。背景因子として、両群間に年齢、性別、同時性転移、異時性転移、化学療法の有無、腫瘍径、T 因子、N 因子において両群間に差は認められなかった。予後との関連は、無再発生存期間は高発現群で低い傾向 ($P=0.106$) であり、全生存期間では高発現群で有意に予後不良であった ($P=0.002$)。また多変量解析では、年齢、腫瘍個数とならんで、HVEM 発現は独立予後不良因子であった ($HR=3.35$, $P=0.006$)。また、TIL との相関では、CD8 および CD45RO 陽性細胞数は、HVEM 高発現群で有意に少なかった。これらのことから、HVEM が大腸癌肝転移後の再発、生存に有意に関連していることが示唆された。さらに腫瘍免疫を介した機序が少なくとも関連している可能性が示された。したがって、HVEM が大腸癌肝転移症例における新たなバイオマーカーとなるばかりでなく、新たな治療標的因子となり得る可能性が示唆された。

膵癌における CD200 発現の臨床的意義

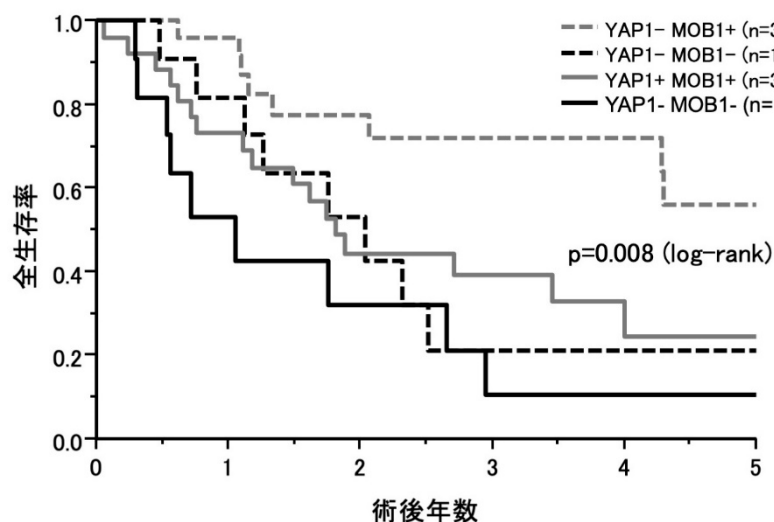


【目的】肝内胆管癌は早期に転移を来すことから診断・治療が困難な難治性悪性腫瘍である。Hippo シグナル伝達系は細胞増殖、アポトーシスのみならず細胞分化にも重要な役割を果たすことから、癌の発生・進展における役割が注目を浴びている。Hippo シグナルのノックアウトマウスでは腫瘍形成型肝内胆管癌が多く発生するという知見を得られているため、肝内胆管癌における Hippo 経路異常の解析は、新たなバイオマーカーや新規分指標的治療の確立につながると思え本研究を計画した。本研究の目的は肝内胆管癌における Hippo シグナル伝達分子の発現異常を検討し、その機能を解析することにより、Hippo 経路分子の胆管発癌への関わりや、疾患予後との関連を解明し、新たな肝内胆管癌治療の発展へつなげることである。

【方法】88 例の肝内胆管癌切除症例の切除病理標本、臨床病理学的所見、治療内容、治療反応性・予後の情報を集積した。Hippo シグナル分子の重要経路である YAP1、MOB1、TGF β 2、SMAD2 にて免疫組織学的染色を行った。さらに肝内胆管癌切除 10 症例の切除標本より、各症例癌部 3~9 ケ所、非癌部 1 ケ所、合計 74 検体より腫瘍組織を三次元的に採取した。全エクソンのシーケンシングを行い、塩基変化（遺伝子変異、コピー数変化）を同定した。

【結果】YAP1 の核内異常発現は 28 例 (31.8%) に認められ、MOB1 の発現低下が 42 例 (47.7%) にみられた。YAP1 強発現群は低発現群と比較して有意に術後生存率が低く、MOB1 低発現群は高発現群と比較して有意に術後生存率が低かった。YAP1 発現高・低と MOB1 発現高・低によって 4 群に分けてサブグループ解析を行ったところ、YAP1 低発現かつ MOB1 高発現群は他の 3 群と比較して有意に術後生存率が高いことが示され、YAP1 強発現や MOB1 低発現があれば予後は不良であり、Hippo シグナル構成分子の異常が一つでもあれば重要な予後因子となることが示された。また YAP1 の核内高発現は有意に TGF β 経路の核内転写因子である SMAD2 と核内発現が相関しており、両者の相互的な働きが示唆された。肝内胆管癌の multiregional sampling によるエクソームシーケンスによって症例内や症例間での遺伝的不均一性・多様性が見られることがわかった。

肝内胆管癌における YAP1 と MOB1 の発現と予後の関連

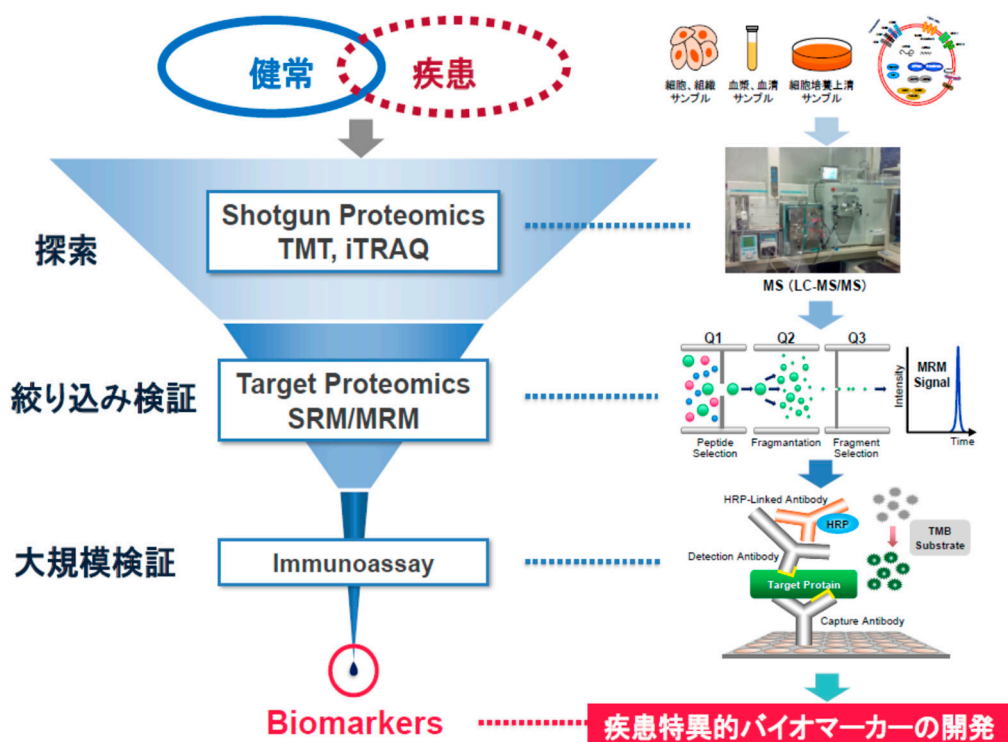


【目的】閉塞性肺疾患 (BA、COPD) のエクソソームの網羅的解析から、病態解明や個別化医療に役立つ新規 Biomarker (BM) を探索すること。

【方法】最新定量プロテオミクスによる多くの BM 候補から、ターゲットプロテオミクス (MRM/SRM) により選択的かつ効率的に大量 BM 候補から「真の BM」を絞り込む。ヘテロなヒト疾患のアプローチのために、マウスモデルから BM を絞り込みヒトへの応用を試みると同時に、ノンラベル・定量プロテオミクスにより、直接ヒト検体から新規 BM の探索に挑戦する。

【結果】肺気腫モデルと喘息モデルの血清から単離したエクソソームについて、ノンラベル・定量プロテオミクスを行った。同定された蛋白は、従来血清から検出されない膜蛋白など数百種類に及んだ。さらに、COPD と喘息モデルにおいて、疾患特異的・両疾患共有の蛋白だけでなく、病勢との相関を認める BM 候補も見出した。さらに、絞り込まれた BM 候補蛋白について、COPD 患者と喘息患者にて検証することができた。エクソソームの最新プロテオミクスにより COPD・喘息の新規バイオマーカーを見出した。

炎症性呼吸器疾患におけるバイオマーカー探索のための新規ストラテジー



83 網羅的epigenetic解析による小児肝芽腫治療抵抗性の解明

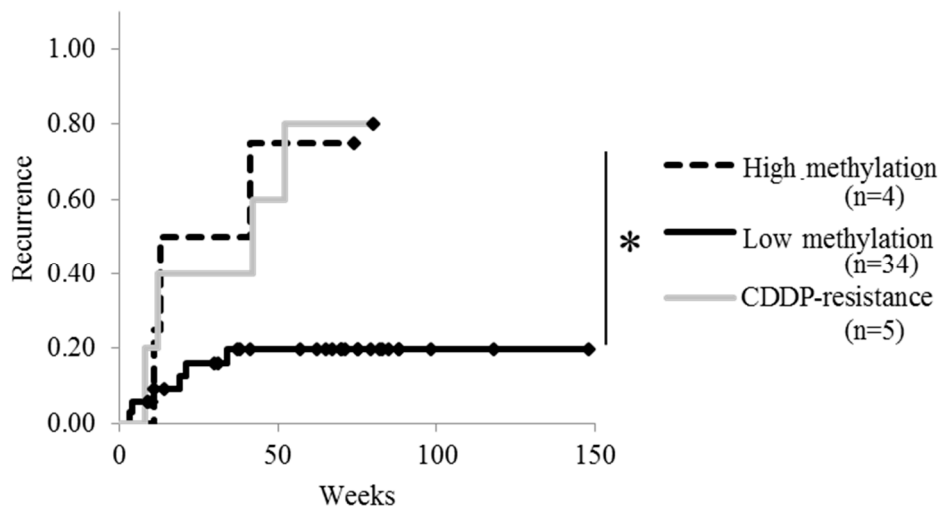
武富 紹信

【目的】多くの肝芽腫患者はシスプラチン（CDDP）を1stラインとした術前・術後化学療法を施行される。約20%の患者で術前化学療法に抵抗性を持ち、予後は不良となる。しかし、中には術前化学療法に感受性があっても術後化学療法中に早期再発がみられる患者もいる。我々は、それらの症例において術前化学療法後にも少数の化学療法抵抗性細胞が残存していると考えた。最近の研究では、DNA高メチル化と肝芽腫の進展が報告されている。本研究では、DNA高メチル化がCDDP抵抗性に関与するか、また、術後化学療法にCDDPを行う指標となり得るかを検討した。

【方法】43症例の肝芽腫切除検体よりDNAを抽出した。そのうち、CDDP感受性の6例および抵抗性の5例を含む11例に対しゲノムワイドメチル化アレイ解析を施行した。我々はまた、肝芽腫細胞株であるHuH6を用いてCDDP耐性株を作製後、HuH6野生株と耐性株を用いてcDNAマイクロアレイ解析を施行した。これらのアレイデータより統計学的にCDDP耐性と最も関連のある遺伝子を抽出した。バイサルファイトパイロシーケンシング法を用いて、術前化学療法に抵抗性のあった38症例に対し、抽出した遺伝子のメチル化率を計測した。メチル化率と臨床データの比較を行った。

【結果】*CSF3R*がCDDP耐性に最も関連する遺伝子であった。バイサルファイトパイロシーケンシング法でも、*CSF3R*はCDDP抵抗性群で有意に高メチル化していた。術前化学療法感受性の38症例でも、*CSF3R*高メチル化群は低メチル化群と比較し有意に早期再発を認めた。また、高メチル化群の再発曲線は、術前化学療法抵抗性群と相似していた。

術後再発曲線

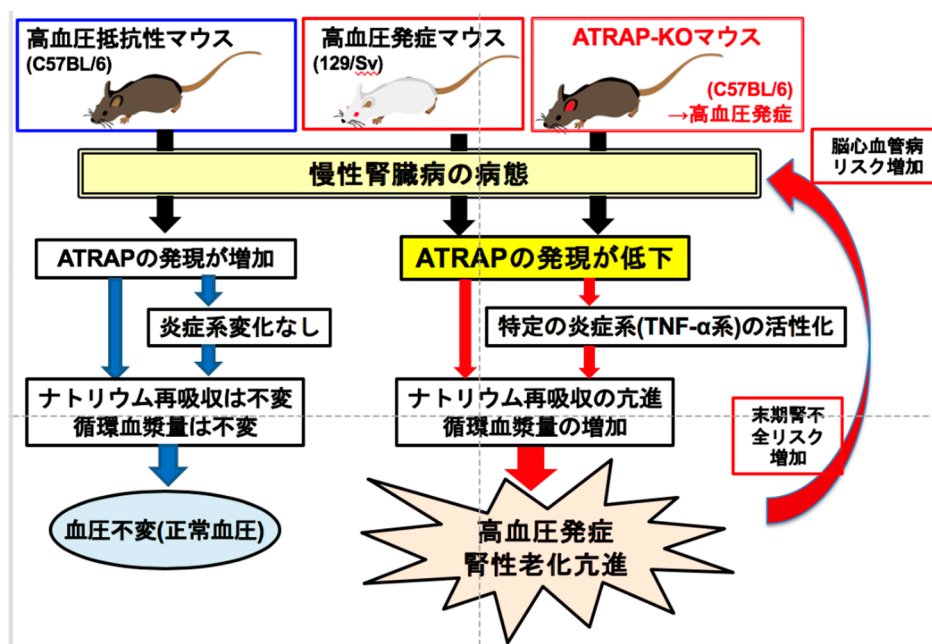


【目的】 特異的 AT1 受容体結合蛋白質として世界で初めて単離同定に成功した AT1 receptor-associated protein (ATRAP) は、心血管細胞や脂肪細胞において病的刺激による AT1 受容体情報伝達系の過剰活性化を選択的に抑制する機能があり、慢性的病的刺激下マウスでは組織での ATRAP 発現の変化は血圧を含むベースラインの心血管腎臓機能に影響を及ぼすことなく各種臓器障害の程度に影響するという仮説を立てている。腎臓において ATRAP は腎尿細管に沿って豊富に分布していることから、本研究では遺伝子工学的手法により作製に成功した ATRAP 遺伝子特異的欠損マウス [ATRAP ノックアウト (ATRAPKO) マウス] において、慢性腎臓病 (CKD) の病態が血圧制御や腎ナトリウム代謝に及ぼす影響を検討した。

【方法】 以下の 1～3 の検討を行った。1. マウス系統 (C57BL/6、129/Sv) に依存した、CKD 病態 (5/6 腎摘、RK: Remnant kidney model) における高血圧発症の有無と腎 ATRAP 発現との関連性検討。2. CKD 病態での高血圧抵抗性 C57BL/6 系統における組織 ATRAP 発現低下が CKD 病態での高血圧発症に与える影響と機序検討 [C57BL/6 系統全身性 ATRAP ノックアウトマウス (ATRAPKO) を用いた検討]。3. C57BL/6 系統全身性 ATRAP ノックアウトマウス (ATRAPKO) での CKD 病態における高血圧発症における炎症系の関与についての検討。

【結果】 本研究での研究成果として、CKD 病態においては、正常では豊富に存在する腎尿細管 ATRAP が低下することで、AT1 受容体・TNF- α ・ENaC を介した経路の過剰活性化が起こり、循環血漿量の増加を介した CKD 合併高血圧を引き起こされ、腎性老化が進行することが明らかになった。すなわち、CKD 病態における、循環血漿量の増加は、腎機能 (GFR) 低下の程度に依存しているというよりも、むしろ、腎 ATRAP 発現の減少を起源とする尿細管での Na⁺再吸収亢進がその本質であり、CKD における腎障害進展と腎機能低下にともなう腎性老化の進行には腎組織における ATRAP 低下が重要である可能性が示された。

ATRAP は慢性腎臓病悪化の主役である高血圧発症の鍵分子である可能性
～ATRAP 減少による CKD 合併高血圧のメカニズム～



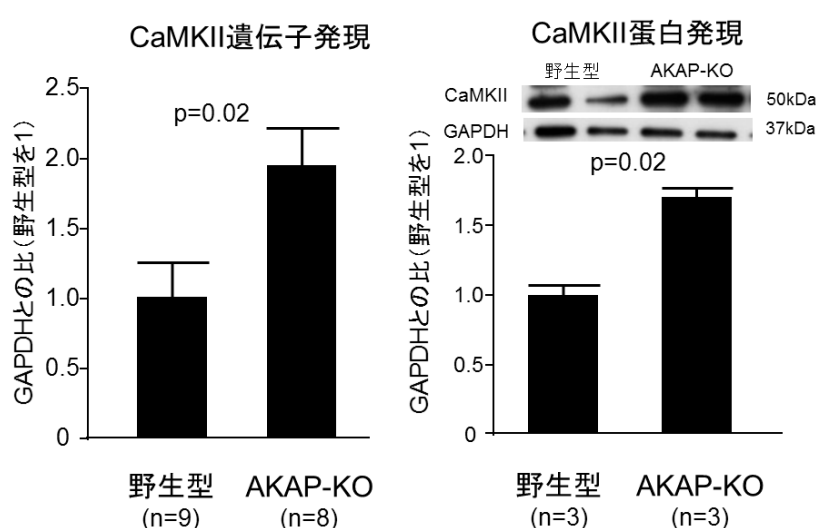
【目的】冠攣縮性狭心症は冠動脈平滑筋の収縮刺激に対する過剰反応を特徴とする。その機序は細胞内カルシウムイオン濃度上昇の亢進であり、その視点からこれまで多くの研究が行われてきた。一方、最近我々は細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を伴わない冠攣縮の動物モデルを見出した。本研究では、冠攣縮におけるカルシウム感受性亢進の関与を検討し、さらにカルシウム感受性亢進を抑制するとされるカルベジロールの冠攣縮抑制効果を評価した。

【方法】A キナーゼアンカータンパク (A-kinase anchoring proteins, AKAP) 79/150 ノックアウト (*AKAP-KO*) マウスにエルゴノビンを投与し、冠攣縮誘発の有無を検討した。続いて、野生型マウスと *AKAP-KO* マウスの血管平滑筋細胞を培養し、アセチルコリン刺激による細胞内カルシウム濃度上昇を Fura-2 により測定した。さらにカルシウム感受性関連物質であるカルモジュリンキナーゼ II (CaMK II) の遺伝子発現ならびに蛋白発現を検討した。*AKAP-KO* マウスにカルベジロールを投与し、冠攣縮抑制効果を検討した。冠攣縮性狭心症患者より得られたゲノム DNA を使用し、*AKAP5* (マウスの *AKAP79/150* に相当) の遺伝子変異を検討した。

【結果】*AKAP-KO* マウスにエルゴノビンを投与したところ、体表面心電図にて ST 上昇が観察され、冠攣縮が誘発された。*AKAP-KO* マウス由来の血管平滑筋細胞では、アセチルコリン刺激による細胞内カルシウム濃度の上昇は、野生型マウスと同等であった。*AKAP-KO* マウスの血管平滑筋細胞における CaMK II の遺伝子ならびに蛋白発現は、野生型マウスと比較していずれも有意に増加していた。カルベジロールを *AKAP-KO* マウスに投与し冠攣縮を誘発したところ、冠攣縮が抑制された。一方、 β 遮断薬であるプロプラノロールを *AKAP-KO* マウスに投与しても、冠攣縮は抑制されなかった。*AKAP5* の遺伝子解析では、冠攣縮性狭心症患者 62 名中 7 名に、コントロール群 64 名 5 名に 203 番目のアミノ酸置換を伴うヘテロ遺伝子変異 (イソロイシン→スレオニン) を認め、さらにコントロール群 1 名では、同部位のホモ遺伝子変異を認めた (2 群間に有意差なし)。

以上から、*AKAP-KO* マウスでは過剰な CaMK II の発現によってカルシウム感受性が亢進し、結果として冠攣縮が引き起こされるという新たな機序が示唆された。また、カルベジロールの冠攣縮に対する抑制効果は、新たな治療法の開発に寄与する可能性が考えられた。

AKAP-KO マウス由来の血管平滑筋細胞における CaMK II 発現



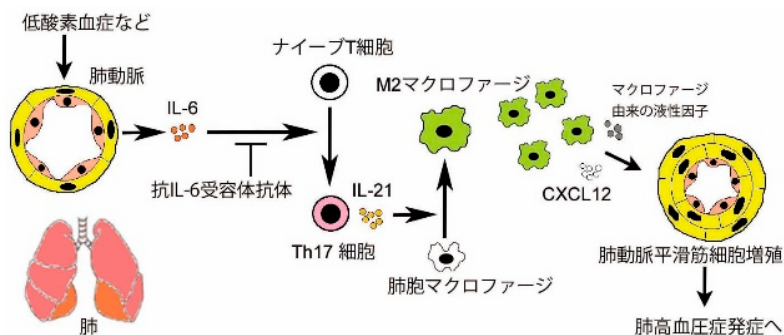
【目的】肺動脈性肺高血圧症（PAH）は肺動脈末梢の小動脈（細小動脈）レベルで特異的に内膜・中膜の肥厚・閉塞を来して、肺動脈圧の上昇から右心不全に至る厚労省指定難病である。近年、PAH の治療には肺動脈平滑筋細胞の収縮・弛緩の不均衡を標的とした肺血管拡張薬による治療が導入されて、予後は改善して来ているが、膠原病性 PAH の予後は依然として不良であり、未だ unmet medical needs が存在する。

PAH 発症には遺伝的背景に加えて、「炎症」などの環境因子による刺激が必要とされる。炎症性サイトカインの interleukin (IL) -6 は PAH 病態形成の鍵を握るサイトカインとして多くの報告がなされていたが、下流の標的シグナルなど詳細は不明であった。我々は低酸素曝露性肺高血圧症（Hypoxia-induced PH : HPH）マウスの系で、IL-6 が肺細小動脈の内皮細胞、平滑筋細胞で強く産生されること、そして HPH マウスに抗 IL-6 受容体抗体を投与するとコントロールに比べて HPH 病態が抑制されることを見出した。更に HPH マウス肺では IL-6 依存性に IL-21 が分泌誘導されて、肺泡マクロファージの M2 マクロファージ極性化を介して肺動脈平滑筋細胞の増殖が促進されることを報告した（下図、PNAS. 2015 ; 112 : E2677~2686）。HPH マウスは中等症 PAH モデルで肺動脈の中膜肥厚のみが誘導され、重症 PAH 患者に観察される亜閉塞性病変を来さない。重症 PAH の病理像の形成や重症 PAH 血行動態への進展が IL-6 や IL-21 シグナルの抑制で防げるかは不明である。そこで、本研究の目的は PAH 重症化での炎症性サイトカインの役割を解明することである。

【方法】ヒトの重症 PAH 患者では、病理学的に中膜肥厚だけでなく、内膜増殖病変・叢状病変のような亜閉塞性／閉塞性の病理像が見られる。ヒト重症 PAH に酷似する病理像と病態を呈するモデル動物として、Sugen5416/Hypoxia/Normoxia (Su/Hx/Nor) ラットがある。本研究は、CRISPR/Cas9 システムを用いて IL-6KO、IL-21RKO ラットを作製して、Su/Hx/Nor モデルで野生型 (WT) と KO ラットの PAH 表現型を血行動態的、組織学的に比較・検討することで、重症 PAH に対してこれらのサイトカイン阻害による治療の可能性を検討した。

【結果】CRISPR/Cas9 システムを用いて IL-6KO ラットと IL-21RKO ラットを作製した。IL-6KO については、LPS 腹腔内投与後の IL-6 発現誘導の有無を ELISA にて確認した。また、IL-21RKO については肺組織での蛋白質発現の欠損をウェスタンブロットにて確認することで、遺伝子欠損を確認した。まず、野生型ラットで Su/Hx/Nor モデルを作製したところ、血行動態的には既報の通り、右室収縮期圧（Right Ventricular Systolic Pressure : RVSP）が 100 mmHg を超えるレベルに上昇して重症 PAH 病態を呈して、組織学的には新生内膜病変や叢状病変を遠位肺小動脈レベル、細小動脈レベルにおいて認めた。そこで IL-6KO ラット、IL-21RKO ラットで Su/Hx/Nor モデルを作製すると、野生型に比して血行動態で RVSP の著明な低下、右室／左室＋心室中隔重量比の有意な改善、そして肺の血管リモデリングの著明な改善が観察された。以上より、IL-6/IL-21 シグナルは PAH 病態の重症化で重要な役割を担う可能性が示唆された。

PAH 病態形成における炎症性サイトカイン（IL-6/IL-21）シグナルの役割

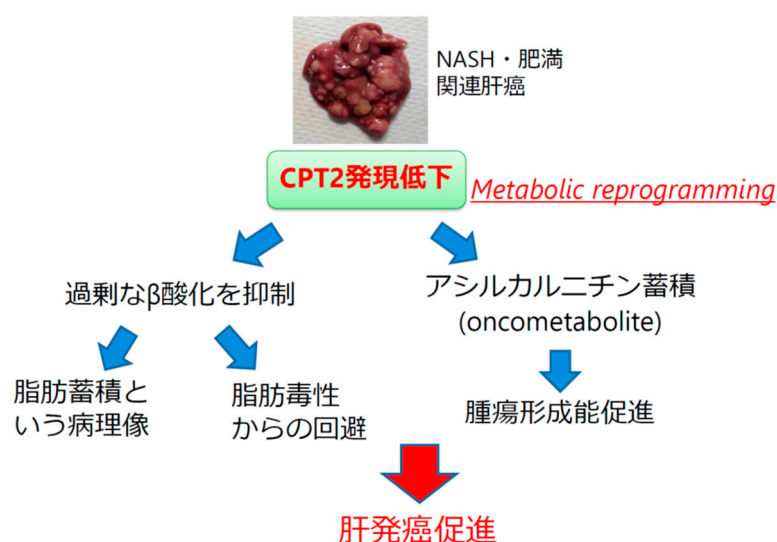


【目的】最近癌細胞は周囲の環境に適応しかつ自身の成長に有利な状況を作り出すため、正常細胞とは異なった固有の代謝変化、いわゆる“metabolic reprogramming”が生じていることが明らかとなり、新たな治療標的として注目されている。そこで本研究では、非アルコール性脂肪肝炎（NASH）・肥満関連肝臓に特異的に生じている脂質代謝プログラミングに着目し、その病態における意義を明らかにする。

【方法】肝化学発癌剤 Diethylnitrosamine（DEN）投与後に通常食および高脂肪食を与えたマウスから、それぞれ非癌部・癌部組織を採取し、メタボローム解析を行った。さらに細胞株を用いてその病態における意義を明らかにするとともに、ヒト検体を用いた検証を行った。

【結果】メタボローム解析の結果、肥満関連肝臓では脂肪酸 β 酸化の中間代謝産物アシルカルニチンが著明に蓄積しており、それはアシルカルニチンをアシルCoAに分解し β 酸化を誘導する酵素 carnitine palmitoyltransferase (CPT) 2 の発現が低下していることが原因であることを突き止めた。マウス DEN 由来肝臓細胞株 Dih10 を用いて CPT2 をノックダウンすると飽和脂肪酸による細胞死が減弱したことから、肥満関連肝臓では CPT2 発現低下によって β 酸化を介した脂肪毒性から回避している可能性が考えられた。さらに Dih10 に肥満関連肝臓で顕著に蓄積していたアシルカルニチンである AC18:1 を添加すると、STAT3 活性化を介して sphere 形成能が亢進したことから、アシルカルニチン蓄積は CPT2 低下の surrogate marker だけでなく、直接的に発癌を促進する作用を持つことが示唆された。よって CPT2 の発現を回復させるような薬剤が、肝臓に対する治療薬として有望である可能性が示唆された。さらにアシルカルニチンは HCC を有する NAFLD 患者の血中において有意に上昇しており、AC18:1 にも同様の傾向がみられたことから、血清アシルカルニチンのバイオマーカーとしての有用性や病態への関与について、さらに検討する価値があると考えられた。

NASH・肥満関連肝臓に起きている metabolic reprogramming

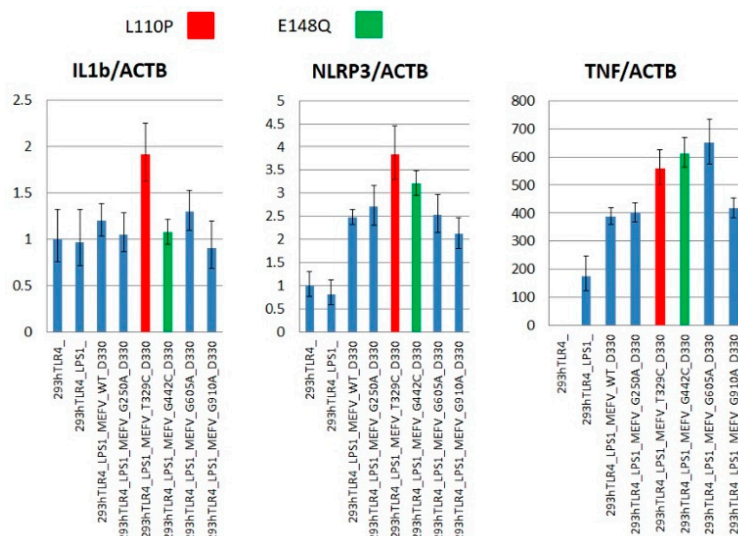


【目的】炎症性腸疾患（以下、inflammatory bowel disease : IBD）患者数の増加は著しく、個々の患者の病態を基盤とした治療開発が必要である。現在まで、家族性地中海熱（*FMF*）遺伝子変異とIBDとの関連並びに病態解明に関する研究はほとんど行われていない。今回の研究目的は、IBD患者群においていままでとは全く異なった機序が関与する*FMF*関連腸炎（*IL-1 β* 関連腸炎）の診断法の確立並びに機序解明を行うことである。

【方法】1. *IBDU* 患者における *MEFV* 遺伝子解析：血液検体を採取し、DNA を抽出する。抽出された DNA を用いてピリン蛋白をコードする *MEFV* 遺伝子解析を行った（札幌医科大学医の倫理委員会承認番号 G718）。2. *FMF* 遺伝子関連腸炎に関する臨床像（内視鏡所見を含む）の検討（UMIN 登録 ID 000022289）：（1）*MEFV* 遺伝子変異陽性 *IBDU* 患者群に対して、患者情報ファイルを作成した。（2）*MEFV* 遺伝子関連腸炎の臨床像（内視鏡所見含む）を明らかにし、遺伝子解析データと組み合わせた検討を行った。3. *MEFV* 遺伝子変異各種細胞株の作製ならびにサイトカイン産生能の評価：*MEFV* 遺伝子変異プラスミド作製を行い 293T 細胞に遺伝子導入した。これらの細胞を TLR ligands で刺激し、NLRP3 の発現ならびに活性化について検討した。

【結果】1. コルヒチン反応性 *FMF* 関連腸炎 50 症例の患者群の検討結果：1) *MEFV* 遺伝子変異部位について：日本人 *FMF* 腸炎症例の 70% 以上が Exon2 部位での変異を有した。2) *FMF* 遺伝子関連腸炎の臨床的特徴所見：非定型例あるいは基準を満たさない症例が全体の 3 分の 2 を占めることが判明した。3) 消化管病変の内視鏡的特徴所見では、（1）直腸に病変を伴わない大腸の連続性病変。（2）潰瘍性大腸炎様の粘膜所見（68%）。（3）狭窄例も存在することが明らかとなった。2. 発症機序解明に向けての研究成果：*FMF* は、変異ピリン蛋白の Caspase-1 制御機能消失により発症する常染色体劣性遺伝疾患（Loss-of-function）とされてきた。しかしながら、heterozygous 変異での発症が多いこと、ピリン欠損マウスでは全身炎症の誘導が認められないことから、loss of function で本疾患発症機序は説明できない。Pyrin の N 端に存在する pyrin domain は Caspase-1 により、330 番目のアスパラギン酸で切断されることが判明した。我々は Exon2 の変異 pyrin domain を作製、293T 細胞に導入した。その結果として、日本人で変異の頻度が高い E148Q L110P のアミノ酸置換を生じるプラスミドが導入された細胞では、*IL-1 β* 、*TNF- α* の発現増強が確認された。さらに、*MEFV* 変異部位の違いにより、各 Toll like receptor ligand 刺激に対する反応性が異なることが明らかとなった。これらの研究結果から、患者の腸内細菌叢変化が *FMF* 関連腸炎発症に関与しているものと考えられた。

Exon2 部位におけるアミノ酸変異を伴う pyrin domain がサイトカイン産生に与える影響

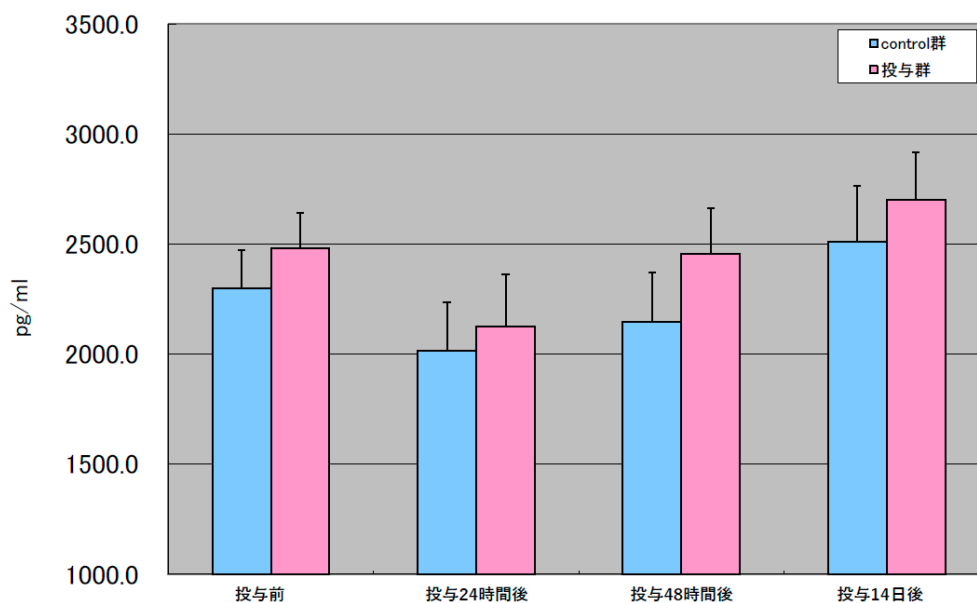


【目的】動脈硬化性疾患や心不全の発症・進展には活性化 Th1 細胞と炎症性サイトカインにより促進される心血管炎症が重要な役割を果たしている。

【方法】IL-27・WSX-1 の動脈硬化抑制作用の検討として、LDL 受容体欠損マウスと LDL 受容体・WSX-1 二重欠損マウスにおける動脈硬化巣の面積と組織性状、培養腹腔内マクロファージのサイトカイン発現と蛍光ラベル LDL 取り込み能、アンジオテンシン II 投与による大動脈瘤の発生頻度を比較検討した。IL-27・WSX-1 の心不全抑制作用の検討として、野生型マウスと WSX-1 欠損マウスにイソプロテレノール投与、アンジオテンシン投与を行い、心肥大、心臓組織における組織繊維化、炎症細胞浸潤、アポトーシス、胎児型遺伝子発現を検討した。ラット新生仔培養心筋細胞を用いてリコンビナント IL-27 のイソプロテレノール刺激あるいはアンジオテンシン刺激により誘導される心筋細胞肥大・胎児型遺伝子発現に対する抑制作用を *in vitro* において検討した。IL-27 の心血管不全マーカーとしての可能性を検討するため、ELISA 法により血中 IL-27 値を発症早期アトルバスタチン投与前、投与 24、48 時間後、14 日後の測定し、対照群と比較検討した。

【結果】動脈硬化巣の面積、マクロファージの血管壁への浸潤、マクロファージの活性化、大動脈瘤の発生頻度は、LDL 受容体欠損マウスに比して WSX-1 欠損マウスにおいて増加したことから、WSX-1 欠損は血管炎症を促進することで動脈硬化を促進すると考えられ、IL-27・WSX-1 の動脈硬化抑制作用が示唆された。また、心肥大、心筋線維化、炎症細胞の心筋組織内浸潤、心筋組織の胎児型遺伝子発現は WSX-1 欠損により増加し、リコンビナント IL-27 は培養心筋細胞における肥大シグナルによる心筋細胞サイズの増加を抑制したことから、IL-27・WSX-1 の心肥大抑制作用が示唆され、IL-27・WSX-1 は心血管不全に対して抑制的に作用する可能性が示唆された。さらに、急性心筋梗塞患者における血中 IL-27 値は急性期から慢性期にかけて増加し、抗炎症作用を有するアトルバスタチンによりこの変化が増強することが示唆されたことから、血中 IL-27 値は心血管炎症マーカーとなりうる可能性が示唆された。

急性心筋梗塞患者に対して発症早期にアトルバスタチンを投与した際の血中 IL-27 値の推移

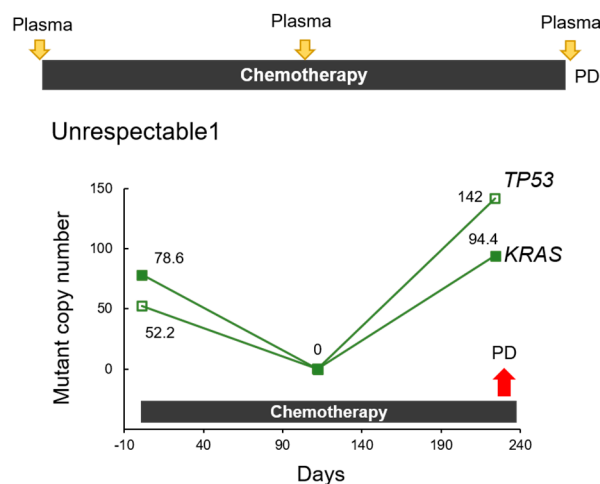


【目的】難治癌である膵癌患者の生存期間延長に向けた研究成果が徐々に明らかになってきた一方、化学療法に対して十分な治療効果が認められない膵癌や、外科的切除後補助化学療法を施行しても再発・転移が生じる膵癌症例も多い。すなわち、膵癌に対する化学療法の感受性と耐性メカニズムの解明に関与する分子マーカーの開発が急務である。膵癌は腫瘍不均一性をもつため、生検組織の遺伝子異常解析では薬剤に対する感受性を評価することはできず、また治療に対する反応性・耐性を評価するためには、治療中繰り返し遺伝子解析を行う必要があり、高侵襲な組織生検を繰り返すことは不可能である。近年、原発巣の腫瘍から血中に循環する腫瘍細胞の DNA (circulating cell-free tumor DNA : ctDNA) を用いた非侵襲的な遺伝子解析が注目され、癌の診断・治療予測への応用が期待されている。とくに、Cancer Personalized Profiling by deep Sequencing (CAPP-Seq) は、197 種類の遺伝子の癌特異的に変異を認める領域を同時にシーケンスし、ctDNA の変異を高効率に検出できる超高感度な ctDNA 定量法として開発された。本研究では、CAPP-Seq を用いて、膵癌患者の ctDNA 変異解析を行い、治療効果予測可能となる変異の同定を行う。さらに、切除不能膵癌患者の化学療法である gemcitabine (GEM)・nab-paclitaxel (nab-PTX) 併用療法を受ける膵癌症例の ctDNA 変異解析をモニタリングし、治療効果予測ならびに耐性予測に関与する変異の同定を行うことを目的とする。

【方法】切除可能膵癌症例は術前に採血を行い、BR 膵癌は術前治療 (GEM・nab-PTX 併用療法) 前と術前治療後の 2 回に、切除不能膵癌は化学療法 (GEM・nab-PTX 併用療法) 開始前と化学療法開始後 3 ヶ月目、progression disease (PD) になった時点の 3 回で血液を採取する。膵癌患者の血液サンプルから分離した血漿を用いて cell-free DNA を抽出し、CAPP-Seq の遺伝子変異解析に用いる。膵癌患者の cell-free DNA に adaptor を ligation し、PCR にて増幅し、ctDNA Surveillance Panel (197 遺伝子) を用いて、標的領域を hybridization し、DNA 断片を回収する。回収した DNA 断片の配列を NextSeq sequencer でシーケンスし、ctDNA の変異頻度を定量化する。

【結果】膵癌患者症例 13 例に対して、治療前の血液を採取し、CAPP-Seq を用いて、ctDNA 変異解析を施行した。全ての症例において ctDNA 変異を認め、計 42 種類の標的領域に変異を同定した。13 例中 4 例 (30.8%) の ctDNA において *KRAS* mutation、*TP53* mutation を認めた。切除不能膵癌症例 (UR1) に対して、GEM・nab-PTX の化学療法を施行し、治療前、治療開始後 3 ヶ月、PD になった時点の 3 ポイントで ctDNA 変異をモニタリングした結果、*KRAS* mutation は、治療前 78.6 copy 認めたが、化学療法開始後 3 ヶ月目では検出不能となり、PD になった時点では 94.4 copy に増量した。また *TP53* mutation においても、治療前 52.2 copy 認めたが、化学療法開始後 3 ヶ月目では検出不能となり、PD になった時点では 142 copy に増量した (図)。この結果から、CAPP-Seq による ctDNA 変異をモニタリングすることで、治療の効果判定が可能であることが示唆された。

切除不能膵癌患者の ctDNA 変異解析のモニタリング



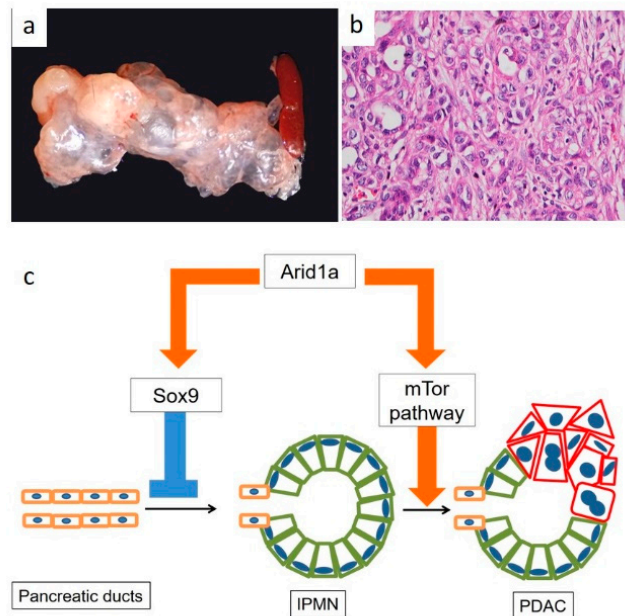
【目的】 ヒト膵癌においては SWI/SNF 複合体の中で *ARID1A* に最も高頻度に不活化変異（約 7%）が認められることから、*Arid1a* が癌抑制的に働く可能性が示唆されていたが、膵発癌における *Arid1a* の詳細な機能的役割はこれまで不明であった。本研究は、SWI/SNF 複合体の DNA 結合能を持つサブユニットである *Arid1A* に焦点を当てて、膵発癌における *Arid1A* の機能的役割を明らかにすることを目的とした。

【方法】 膵特異的に *Kras^{G12D}* を発現させ、*Arid1A* を K.O. したマウス (*Ptf1a^{Cre/+}; Kras^{LSL-G12D}; Arid1A^{flax/flax}*) を作製、解析した。ヒト膵癌、膵管内乳頭状粘液性腫瘍 (IPMN) の病理組織標本を用いて免疫染色解析を行った。

【結果】 *Arid1a* がマウス膵において膵管細胞の分化を維持し、IPMN ならびに IPMN 由来膵癌の発生を抑制していることが明らかになった。*Arid1a* の欠失によって、膵管細胞が脱分化して可塑性を獲得し、IPMN および IPMN 由来膵癌が生じることをマウスの個体レベルで初めて明らかにした。さらに、分子メカニズムとして、膵管細胞の脱分化には *Sox9* の発現低下が、IPMN からの膵発癌には mTOR pathway が、それぞれ寄与していることを明らかにした。さらに、本研究により導き出された IPMN・IPMN 由来膵癌の新規マウスモデルを用いて、IPMN の起源細胞が膵管細胞であること、および IPMN からの膵がん発生のメカニズムを明らかにした。

本研究は、膵発癌におけるクロマチン制御因子 *Arid1a* の役割を明らかにしたのみならず、本研究の IPMN および IPMN 由来膵癌の新規遺伝子改変マウスモデルは、今後の IPMN および IPMN 由来膵癌の研究における有力なツールになり得ると考えられる。

Arid1a は膵管内乳頭状粘液性腫瘍 (IPMN) および IPMN 由来膵癌の形成を抑制する

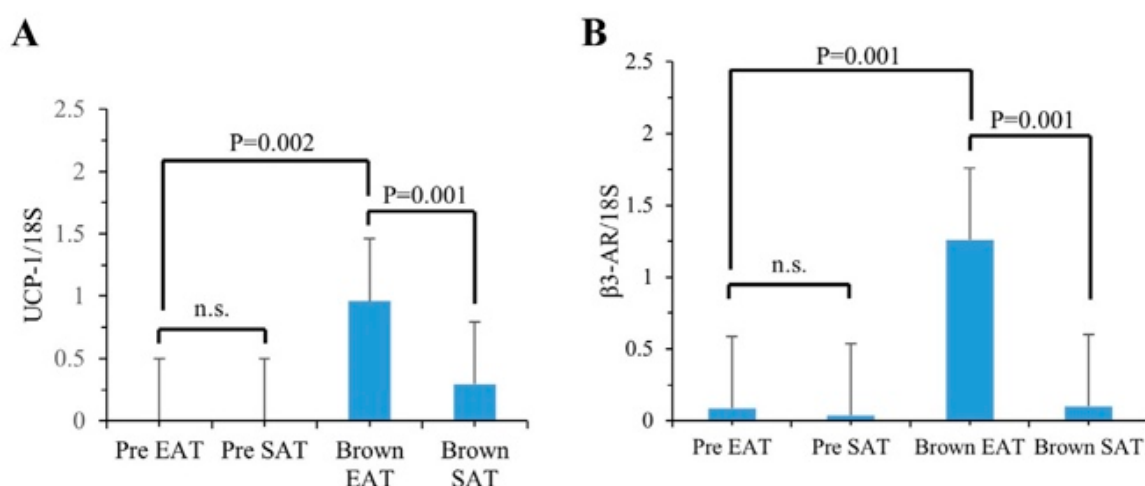


【目的】先端画像技術によりヒト脂肪には、エネルギーを蓄え糖尿病の原因となる白色脂肪とともに、エネルギーを熱に変えて消費活性の増大する褐色脂肪（ベージュ脂肪）の存在することが明らかになった。著者らは、平滑筋細胞のフェノタイプである血管内膜の増殖遊走細胞から同定した脱分化遺伝子 *LR11* のノックアウトマウスを作製したところ、過剰に脂肪摂取しても白色脂肪がブラウニングし安静時エネルギー消費量を増大させることで肥満や糖尿病が抑止されること、この状態を血中の可溶性 *LR11* 濃度が反映する事実遭遇した。本研究は、可溶性 *LR11* による脂肪ブラウニング調節機構を明らかにし、糖尿病抑止のための細胞エネルギー消費をあらわす血中マーカーの検査概念を確立することを目的とした。

【方法】可溶性レセプター *LR11* 遺伝子発現は培養樹立 3T3-L1 細胞を、ベージュ脂肪細胞の特性解析にはヒト心臓周囲脂肪と皮下脂肪、およびそれらから培養された初代脂肪細胞を使用した。遺伝子発現は Real-time RT-PCR 法により測定した。メタボローム解析を行うためのマウス脂肪細胞は初代マウス培養脂肪細胞に SV40 large T antigen を導入し不死化処理を行った。活性化脂肪診断への検査研究データベース登録にこれまでに登録されたデータから対象背景を中間集計した。

【結果】培養白色脂肪細胞における可溶性レセプター *LR11* 遺伝子発現は前脂肪細胞の増殖とともに増大し分化誘導すると低下した。ヒトベージュ脂肪細胞として知られる心臓周囲脂肪の熱産生に関連する遺伝子発現は皮下脂肪に比べては高値だった。培養ヒト初代前脂肪細胞ではブラウニング分化とともに増加し、心臓周囲脂肪由来細胞は皮下脂肪由来細胞に比べて高値だった。 *LR11* ノックアウトマウス脂肪から前脂肪細胞を調整し均一化し複数のクローン株を樹立しメタボローム解析を行う 3 次元培養条件を設定した。これまでに登録が終了した糖尿病患者の中間解析では血中可溶性 *LR11* は高値だった。以上より、 *LR11* 遺伝子は前脂肪細胞から白色脂肪細胞へと分化誘導し、発現することでベージュ脂肪細胞への分化を抑制している可能性がある。ヒトにおいても熱産生遺伝子発現機能を有するベージュ脂肪が確認され、血中可溶性 *LR11* 濃度は病的脂肪が存在する可能性のある糖尿病患者で高値だったことから、血中可溶性 *LR11* はヒト脂肪のブラウニング特性の調節に関わりその病態を反映する可能性があることが明らかになった。

ヒト培養初代前脂肪細胞およびブラウニング分化後の熱産生遺伝子の発現



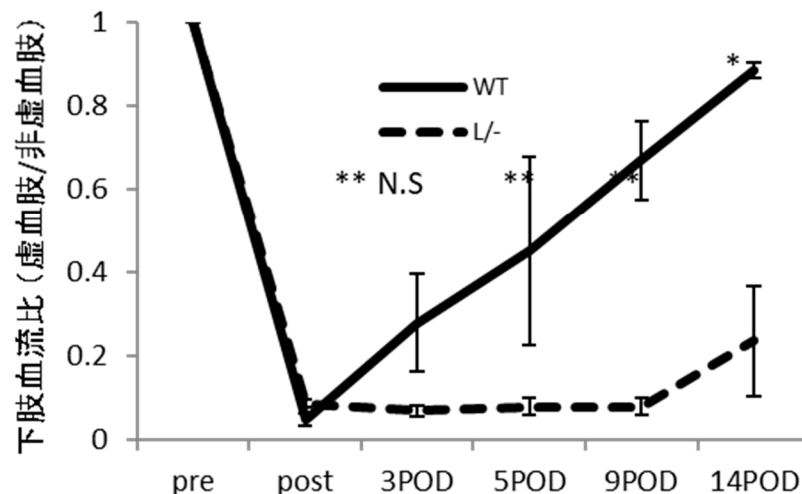
【背景】BubR1 (budding uninhibited by benzimidazole-related 1) は有糸分裂における染色体の分離不全と異数体形成を防ぐ紡錘体形成チェックポイント機構において重要な役割を担う分子の一つである。BubR1 の発現が通常より10%まで低下したマウスは、早期より老化の表現型を示すことが明らかにされているが、血管疾患や血管新生においてBubR1 が果たす役割は、これまで明らかにされていない。血管新生におけるBubR1 の影響を評価する目的で、我々は15%程度までBubR1 の発現を低下させた、外観上は異常を示さないマウス (*BubR1^{L/-}*) を作製し、検討を行った。

【方法】血管新生におけるBubR1 の役割を明らかにするために、我々は週齢を揃えた *BubR1^{L/-}* および野生型 (*BubR1^{+/+}*) マウスを用いて、虚血肢モデルを作製し、実験に使用した。血管新生におけるBubR1 の病理学的影響を評価する目的で、我々は虚血肢を誘導するための手術前後での血流を評価し、典型的な血管新生因子の発現を *in vivo* において評価した。

【結果】*BubR1^{+/+}* マウスにおいては、虚血導入後の下肢の血流は徐々に回復し、手術14日後には約80%まで回復を認めた。一方で、*BubR1^{L/-}* マウスにおいては、約30%までの回復にとどまった ($p < 0.01$, 下図)。手術14日後の *BubR1^{L/-}* マウスの大腿、下腿筋においては、組織学的に再生筋繊維、肉芽組織、炎症細胞の浸潤が、*BubR1^{+/+}* マウスのそれに比べ、著明であった。*BubR1^{+/+}* マウスは、虚血導入後14日間で下肢の脱落は認めなかったが、*BubR1^{L/-}* マウスにおいては、約70%で下肢の脱落を認めた ($p < 0.05$)。 *BubR1^{L/-}* マウスにおける、虚血肢側の下腿筋内の血管内皮増殖因子 (VEGF; vascular endothelial growth factor) 蛋白の発現は、*BubR1^{+/+}* マウスに比べ、有意に低下していた ($p < 0.05$)。

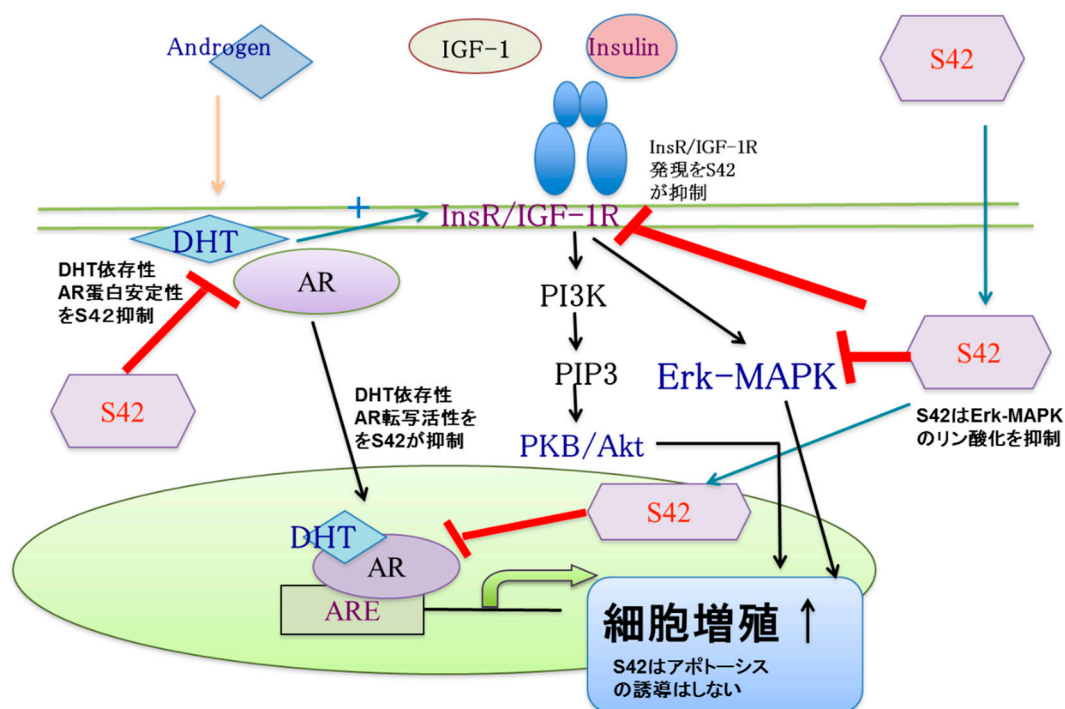
【考察】BubR1 の発現低下は、虚血誘導後の下肢において、血管新生を減弱させ、下肢の脱落をもたらした。BubR1 は重要な血管新生因子であり、虚血肢の治療において有用なものとなる可能性が示唆された。

BubR1^{+/+} マウス群 (実線)、*BubR1^{L/-}* マウス群 (破線) の虚血肢における下肢血流比の経時的変化



【目的】我々自身が同定した新規 SARMS42 の抗前立腺癌作用と筋管細胞への作用に関する研究を行った。S42 は去勢感受性（アンドロゲン感受性）のヒト前立腺癌細胞株である LNCaP 細胞と 22RV1 細胞の増殖を抑制した。機序として、AR の DHT 依存性の転写活性の抑制のほか、AR の蛋白発現量を抑制することを明らかにした。前立腺癌は IGF-1 やインスリンシグナルによってその増殖が促進されるが、S42 は そのシグナルの入り口である IGF-1 受容体 (IGF-1R) やインスリン受容体 β (IR β) の蛋白発現を抑制することも判明した。さらに S42 は前立腺癌の増殖シグナルとして重要な Erk-MAPK のリン酸化を抑制した。一方、S42 にはアポトーシス誘導効果は認めなかった。CAG-LucLNCaP 細胞をヌードマウスに播種し S42 を投与すると、腫瘍形成抑制効果が観察された。S42 は前立腺癌細胞増殖抑制とアンチメタボ効果を有する化合物である可能性が示唆された。S42 は培養筋管細胞 (C2C12) の筋萎縮関連遺伝子の Atrogin1 と MuRF1 の有意な発現低下をもたらし、骨格筋のタンパク合成促進に重要である P70S6K のリン酸化レベルを亢進させた。S42 は筋の蛋白異化に抑制的に、蛋白合成に促進的に作用する可能性が示唆された。S42 は IGF-1-Akt 経路や ERK 経路とは独立して、mTORC1-p70S6K 経路を活性化することで蛋白同化作用を発揮すると考えられた。S42 は高齢化社会に向けて、サルコペニア治療薬となる可能性が示唆された。

S42 は種々の機序を介して前立腺癌細胞増殖を抑制する



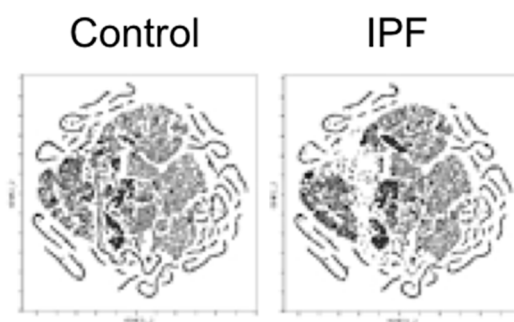
【目的】わが国の肺癌症例における間質性肺炎の合併率は約4~15%と報告されており、術後5年生存率はIA期で59%と、間質性肺炎非合併肺癌IA期の86.8%と比べて著しく不良である。間質性肺炎の進行による予後への影響や二次癌発生の影響などの他、初回手術後の急性増悪や、再発時の治療制限などが予後不良の原因と考えられている。また上皮間葉転換機構による形質を多く有し、浸潤・転移能が高いことも一因と考えられている。

近年、ピルフェニドンなど肺の線維化や炎症を抑制して急性増悪の頻度を減少させ、特発性肺線維症 (Idiopathic pulmonary fibrosis : IPF) の進行を遅らせる薬剤が開発されたが、IPF 合併肺癌の治療における急性増悪の予防や長期予後の改善効果は定かではない。我々は第Ⅱ相試験 (WJOG6711L) で外科治療の対象となる IPF 合併肺癌患者に対する周術期ピルフェニドン療法に関して安全性および効果を報告した。本研究ではその術後急性増悪抑制効果と2年無再発生存を IPF 無増悪期間の対照群との比較により第Ⅲ相試験として検討することを主な目的としている。併せて、両群の切除検体を用いた次世代シーケンサによる mRNA シーケンスや CyTOF により、IPF における肺がん過程における特異的なシグナルや、ピルフェニドンによる抗線維化や抗 EMT シグナルの変化の検出を試み、新たな治療標的の探索を行う。

【方法】1. IPF 合併非小細胞肺癌に対する周術期ピルフェニドン療法の術後急性増悪に関する第Ⅲ相試験 (NEJ034 試験) : IPF を合併する臨床第Ⅰ~Ⅱ期非小細胞肺癌の20歳以上の患者を対象とし、登録後にピルフェニドン投与群または対照群にランダム化割り付けを行い手術を行った。主要評価項目として術後無増悪期間、副次的評価項目として術後1か月以内の IPF 増悪割合、安全性、術後3年間の生存割合、肺癌無再発生存割合、IPF の無増悪生存割合とした。目標登録件数は230件 (約5年間の症例集積期間) とし、その後の Secondary endpoint までの3年の観察期間をおいた。2. IPF 肺における肺がん機序および抗線維化薬によるシグナル修飾の解析 : これまで手術を行った患者の肺の検体を単細胞へと調整し、抽出した RNA を用い、次世代シーケンサによる mRNA シーケンスを行った。解析結果の比較より、線維化および抗線維化に関する因子を抽出し、線維化に直接関わるシグナル伝達経路を特定した。また30種程度の金属標識された抗体を用いてラベリングし、どの細胞で線維化の変化が起きているか、そしてどの細胞が抗線維化の働きをしているのかを CyTOF にて解析した。

【結果】1. 臨床試験は NEJ034 として2017年10月より全国で開始され、2019年4月時点で64例が登録され、試験は継続中である。この間、ブーストアップ会議を年1~2回開催し、参加施設間の情報共有および IPF に関する治療に関する討議を行ってきた。2. これまでに6症例を蓄積し、次世代シーケンサによる解析を進めてきた。単細胞に分離を行い、表面マーカーでソーティングすることで細胞特異的な RNA 発現解析を行うことができた。また、CyTOF による肺由来上皮細胞のサブセット解析は、30種類の金属マーカーを用いて今後解析を進める予定である (図)。

肺胞上皮細胞のサブセット解析



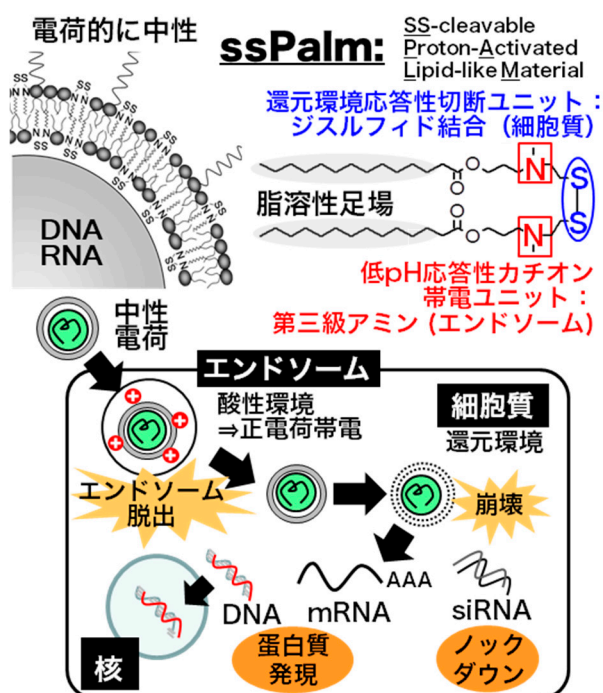
【目的】特定の遺伝子を標的細胞に移入する遺伝子治療や、特定の遺伝子の発現を抑制する核酸治療（アンチセンス核酸や short interference RNA : siRNA など）は、個別化医療や癌免疫治療を実現するための有力な技術になると期待される。遺伝子や核酸を『くすり』として実用化するためには、標的となる疾患臓器に届くだけでなく、細胞内の特定の細胞内小器官まで分子を送達するためのナノサイズに制御された『ドラッグ・デリバリー・システム (DDS)』の開発が不可欠である。本研究では、我々が独自に開発したナノ材料である細胞内環境応答性脂質様物質 (SS-cleavable and pH-Activated and Lipid-like Materials : ssPalm) を進化させ、下記の3つの基盤技術の開発を目指した。

1. 癌抗原特異的な細胞傷害性 T 細胞を活性化する DNA/RNA ワクチン・アジュバント開発
2. 個別化医療を実現する免疫を活性化しにくい *in vivo* 核酸導入技術の開発
3. 安価な抗炎症薬の送達により抑制的な腫瘍内免疫環境を『リセット』する癌治療戦略の確立

【方法】ssPalm は、2本の脂溶性足場を有する脂質様材料であるが、その親水性基には、エンドソーム内の酸性環境に反応してプロトン化を受けて正に帯電しうる第三級アミン構造と、細胞質内の還元環境に反応して切断されるジスルフィド結合を有する。本研究では、これらのユニットのうち、脂溶性足場に改良を加えながら、免疫を活性化する粒子と抗炎症性の粒子の開発を進めた。また、親水性基と親油基の間のリンカーについても改良した。

【結果】ビタミンEを足場とした ssPalmE 粒子において、核酸と組み合わせた際に高い免疫活性化が認められた。本粒子に抗原をコードした DNA や mRNA を搭載することにより、抗原特異的な細胞傷害性 T 細胞の活性化が認められた。一方、潰瘍性大腸炎モデルを用いた検討により、オレイン酸を足場とした ssPalmO において、抗炎症性の効果が認められた。そこで、蛋白の補充あるいは、特定の遺伝子をノックダウンするための静脈内投与型 mRNA/siRNA キャリアを開発すべく、ssPalmO の分子改良をおこなった。細胞内の還元環境に反応して酸性されるチオール基が反応しうるリンカーを ssPalmO 分子内に組み込んだ結果、さらに ssPalm 分子の自己分解性が向上し、肝臓における mRNA および siRNA の導入効率が劇的に改善した。さらに、ssPalm の低分子キャリアとしての有用性を検証すべく、抗炎症薬を搭載した ssPalm 粒子を開発した。本粒子を静脈内投与した場合、抗腫瘍効果が認められた。

細胞内環境応答性脂質様材料 (ssPalm) の構造と概念



97 極性転換型不斉Csp³-Csp²クロスカップリング反応の開発

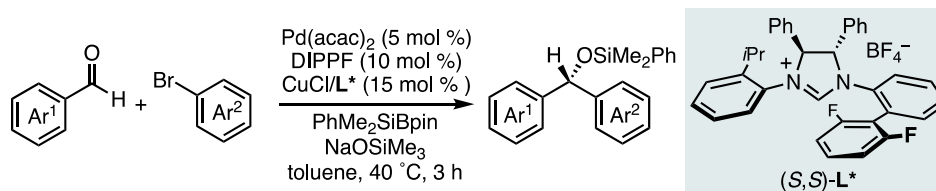
大宮 寛久

【目的】キラル α -アルコキシアルキルアニオンは、不斉合成反応における魅力的なsp³炭素求核剤の一つであり、医薬品や生理活性天然物に見られるキラルアルコール骨格を構築できる。従来のキラル α -アルコキシアルキルアニオンは、有機リチウム、有機亜鉛、有機ホウ素、有機ケイ素などの化学量論量の有機金属反応剤として事前調整する必要があった。今回、我々は、アルデヒドからキラル α -アルコキシアルキルアニオンを触媒的に形成させ、これを利用した不斉クロスカップリング反応の開発に成功した。

【方法】アルデヒドへのケイ素の不斉付加、続く 1,2-Brook 転位を経て“キラル α -アルコキシアルキル銅種”を触媒的に形成させ、これをパラジウム触媒存在下でハロゲン化アリールと反応させる手法を用いた。

【結果】キラル銅/*N*-ヘテロ環カルベン錯体触媒とパラジウム/ビスホスフィン錯体触媒を協働的に用いることにより、芳香族アルデヒド、ハロゲン化アリール、シリルボランの三成分不斉クロスカップリングが進行し、キラルなジアリールメチルシリルエーテルを与えた。

不斉クロスカップリング



【目的】二重鎖 DNA を配列特異的な三重鎖核酸形成により認識できる一本鎖のオリゴ核酸（アンチジーン核酸）はゲノム DNA を標的とする創薬材料への適用が期待できる。しかし、形成される三重鎖核酸の安定性は低く、三重鎖形成可能な二重鎖 DNA 配列は限定されるため、アンチジーン核酸の実用に向けた研究はあまり行われていない。

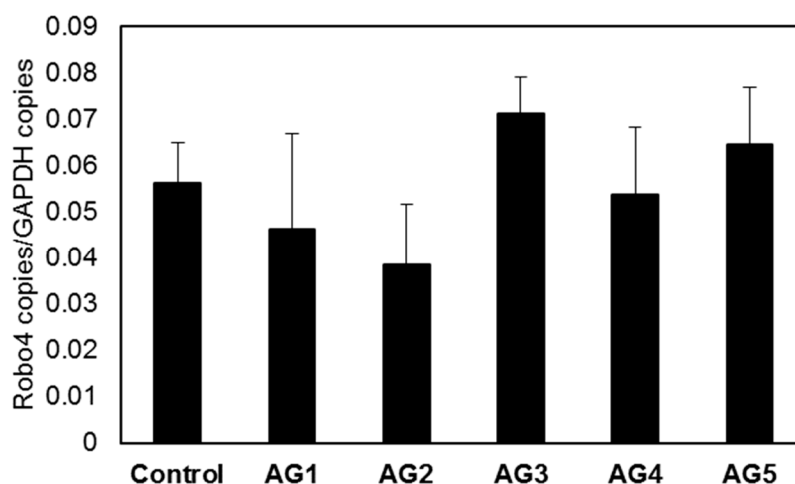
しかし、アンチジーン核酸は遺伝子本体を標的とするため、1. 既存の核酸医薬と比べて量論的に効率が良い、2. 工夫次第で遺伝子の発現促進が可能、3. 変異誘発等によるゲノムレベルでの遺伝子異常の修復（遺伝性疾患の完治）への応用なども期待できる。

私たちはこれまで“三重鎖の安定性”と“標的配列の制限”を克服できるアンチジーン核酸材料の開発を手掛け、様々な化学修飾核酸を見出してきた。しかし、これまで材料開発に注力し、その実用展開は全く行っていなかった。このような背景下、私たちが開発した材料等をアンチジーン核酸の実用に向けたアプリケーションへと展開すべく、共同研究者とともに Robo4 アンチジーン核酸の創製を目指した。

【方法】Robo4 の発現は *Robo4* 遺伝子の転写開始点付近に転写因子（SP1 や GABP など）が結合することが鍵となるため、転写因子結合部位や転写開始点をターゲットとしたアンチジーン核酸を設計した。その際、標的部位だけでなく標的の二重鎖 DNA との結合親和性を向上させるための化学修飾の導入も検討した。そのアンチジーン効果は、Robo4 発現細胞である HUVEC を用いて、リアルタイム RT-PCR による Robo4 mRNA 発現量測定（ハウスキーピング遺伝子 *GAPDH* の mRNA 量で補正）により評価した。

【結果】Methylene-EoDNA 修飾が二重鎖 DNA と形成した三重鎖核酸を大きく安定化できることを融解温度測定により明らかにし、その安定化能は LNA（高い三重鎖核酸安定化能を持つ核酸材料）と同程度であった。次に、LNA や methylene-EoDNA 修飾されたアンチジーン核酸を用いて、Robo4 mRNA 発現量の抑制能を指標にアンチジーン効果を調べた。使用するアンチジーン核酸の濃度やリン酸ジエステル結合部のホスホロチオエート修飾など種々検討した。結果の一部を下図に示す。最終的には、400 nM の濃度において、Robo4 mRNA の発現量（補正後）を 60% 減少させるアンチジーン核酸を見出すことに成功した。

HUVEC 細胞におけるアンチジーン核酸による Robo4 mRNA 発現抑制能



【目的】植物酸化ステロイドは、多様な構造・生物活性を持つが、その詳細な機能は未解明のものが多い。我々はこれまでに、最も酸化度の高い植物酸化セコステロイドの1つである physalin 類に着目した研究を展開してきた。部分構造の合成とその NF- κ B 活性化阻害機構研究の結果、physalin 類の右側 (DEFGH 環部) が中程度の NF- κ B 活性化阻害活性を示し、さらにその作用機序も天然物と同様であることを見出している。右側構造の異なる withanolide 類も NF- κ B 活性化阻害を示すが、その作用機序は異なることから、physalin 類の DEFGH 環部が NF- κ B 活性化阻害の作用機序決定に寄与していることが示唆された。これらの知見を活かし、本研究では DEFGH 環部の誘導体を合成し、NF- κ B 活性化阻害能の向上を目指した。

また physalin 類は、酸化度の低いステロイド誘導体から生合成されていると考えられる。植物ステロイドの生合成スキームを倣い、他のステロイド化合物の右側構造を改変することによって、新たな分子群を創製することにも挑んだ。

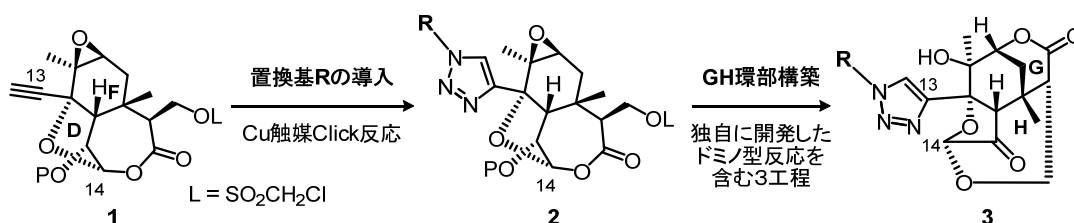
【方法】これまでの知見から、DEFGH 環部に疎水性置換基を導入することで、阻害活性の向上が期待された。そこで 1 のアルキン部に種々の官能基を Click-Chemistry によって導入後、DFGH 環構造を構築して各種誘導体 3 を合成した。また、合成した化合物の NF- κ B 活性化阻害能を、培養細胞を用いて評価した。

ステロイド化合物を基盤とした分子創製研究では、コレステロールを原料として誘導体合成を検討した。

【結果】化合物 1 を 21 工程で合成し、クリック反応を利用して 2 を合成した。得た 2 の環構造を組み換え、3 工程で 3 に導いた。合成した 3 種の NF- κ B 活性化阻害能を評価したところ、以前合成した DEFGH 環化合物と比べ、阻害活性が低下することがわかった。このことから、本生物活性には E 環部が重要であることが示唆された。

各種コレステロール誘導体の合成を種々検討し、これまでに 4 種の化合物を合成することに成功した。なお、本成果に関しては、都合により本報告書では詳細な内容は記載しない。

Physalin 類の DFGH 環部を基盤とする新規生物活性分子創製

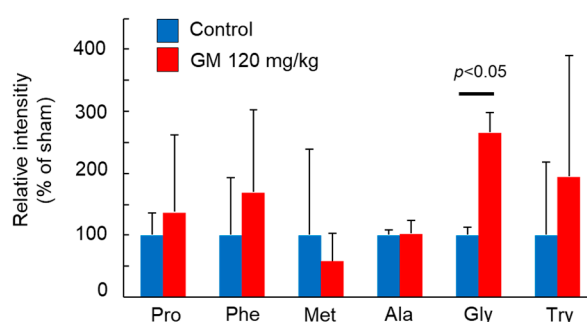


【目的】薬物の使用により副作用が発現すると、治療の継続が困難になったり、後遺症が残ったり、死に至るケースがある。そのため医療従事者は、副作用の発現を最小限に抑えるため、患者状態、臨床検査値等をモニタリングし、副作用の早期発見に努める必要がある。しかし既存の臨床検査値では、組織障害が発現してから指標の数値が変動するまで、タイムラグがあり、副作用の早期発見に繋がらないケースがある。近年、疾患と蛋白質断片（ペプチド）の発現や濃度変動、または、アミノ酸の濃度変動との関係が検討され、疾患の biomarker として、ペプチドやアミノ酸が注目されている。これらのペプチドは、様々な疾患で特徴的に増減することから、疾患の有無や進行度の判断、治療効果の判定における biomarker として期待されている。しかし、薬物による副作用の判定に、ペプチドやアミノ酸を biomarker として検討されている研究はない。そこで、薬物の副作用の早期発見を目指して、既存の指標よりも迅速かつ正確な biomarker（ペプチド、アミノ酸）を探索することを目的として研究を実施する。薬物は、臨床での使用頻度、ならびに、副作用の発現頻度が高いアゾール系抗真菌薬による肝障害、アミノグリコシド系抗菌薬による腎障害、ダプトマイシンによる横紋筋融解症、ニューキノロン系抗菌薬による血糖異常をターゲットにペプチドの発現、濃度変動、アミノ酸の濃度変動を調査する。さらに、薬物の投与前のペプチドやアミノ酸濃度と副作用発現の関係を検討し、副作用発現のリスクファクターとなるペプチドやアミノ酸を同定する。また、薬物の副作用発現に関わるペプチドから蛋白質を同定し、副作用の発現機序ならびに副作用の発現を予防できる薬物の開発に繋がりたいと考えている。

【方法】アミノ酸の測定は、蛍光誘導体化試薬である DBD-PyNCS を用いた検出方法を用いた。アミノ酸を DBD-PyNCS により誘導体化し、液体クロマトグラフ質量分析法（LC-MS）による各アミノ酸の検出を行った。動物実験モデルとしては急性腎障害モデルラットを用いた。ラットに、アミノグリコシド系抗菌薬であるゲンタマイシンを 120 mg/kg で腹腔内投与し、急性腎障害モデルラットを作製した。モデル作製の指標には既存の臨床検査値として血清クレアチニン（sCr）、血中尿素窒素（BUN）を用いた。薬物投与後、経時的に採血を行い、各種アミノ酸を LC-MS により測定した。既存の臨床検査値と各種アミノ酸の相関関係を確認し、biomarker の候補を探索するとともに既存の腎障害マーカーよりも早期から診断可能な biomarker について検討した。

【結果】LC-MS を用いたアミノ酸の同時検出方法について検討した結果、高感度に検出が可能なアミノ酸はプロリン、メチオニン、フェニルアラニン、アラニン、グリシン、チロシンの 6 種類であった。次に薬剤性の副作用モデルとして、ゲンタマイシン誘発急性腎障害モデルラットを作製し、既存の腎障害マーカーである sCr、BUN との比較検討を行った。ラットにゲンタマイシンを 120 mg/kg で連日腹腔内投与した結果、sCr、BUN は投与 5 日目まではコントロール群と比較して差はみられないものの、8 日目において有意に上昇した。投与 8 日目において、既存の腎障害マーカーの上昇がみられたため、ゲンタマイシン投与 8 日目における血中アミノ酸濃度変動について検討した結果、グリシンについては control 群と比較して有意に上昇していることが確認された。そこで、これら既存の腎障害マーカーによる腎障害が認められない、ゲンタマイシン投与 3 日目以前における血中アミノ酸濃度変動について検討した結果、これらアミノ酸の変動は認められなかった。今後、さらに検出条件を検討し、他のアミノ酸変動について解析を行うとともに、ペプチドや他のアミノ酸関連代謝物の変動についても解析を進める予定である。

ゲンタマイシン誘発腎障害モデルラットにおけるアミノ酸変動



【目的】カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス (KSHV) はカポジ肉腫の発症に関与するウイルスである。カポジ肉腫は後天性免疫不全 (AIDS) に合併する AIDS 型が最も高頻度である。しかし、免疫能に異常がない者に発症する古典型の存在も古くから知られている。古典型カポジ肉腫は地中海沿岸地域や、中国の新疆ウイグル自治区などの特定の地域に好発することが知られている。沖縄県の宮古島地域にも古典型カポジ肉腫が多発することが知られており、本土日本と比較すると発症頻度は 1,000 倍以上であることが報告された。

カポジ肉腫患者と健常者との間には高い発症率を説明できるだけの遺伝学的な相違は見られなかった。一方、宮古島の KSHV には、他の地域の KSHV には見られないアミノ酸変異を伴う遺伝子変異が複数あることが報告された。これらのことから、宮古島の KSHV は他の地域のウイルスに比べて造腫瘍性が高いという仮説をたてた。臨床検体からの感染性 KSHV の回収は困難であることが知られている。しかし、Epstein-Barr ウイルスを細菌人工染色体 (BAC) にクローニングする技術が開発され、臨床検体からのウイルス回収が比較的容易に行えるようになった。本研究では、

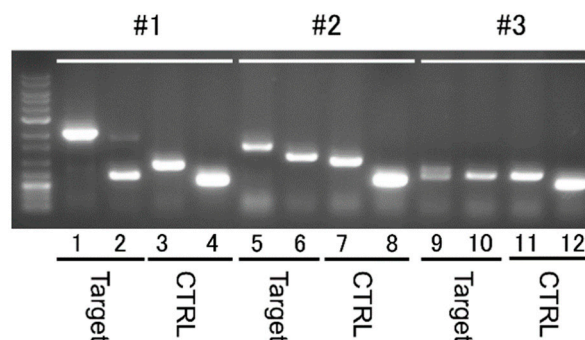
1. EBV で樹立されたウイルスゲノムクローニング技術を KSHV に転用するための技術的基盤を確立すること、
2. 患者由来の臨床検体から KSHV を BAC プラスミドにクローニングし、遺伝子組み換えウイルスを作製することで宮古島のウイルスの造腫瘍性について評価することを目的とする。

【方法】

1. KSHV ゲノムを一箇所だけ切断する CRISPR/Cas9 プラスミド、切断部位周辺の配列を Homology arm として組み込んだウイルスゲノムクローニング用の BAC プラスミドを作製した。
2. KSHV クローニング技術基盤の確立を目指し、KSHV 陽性培養細胞株 BCBL-1 へ上記 2 種類のプラスミドを導入した。
3. プラスミド導入細胞を選択するため、ハイグロマイシン存在下で培養した。
4. ハイグロマイシン耐性細胞から DNA を回収し、KSHV がクローニングされた BAC (KSHV BAC) の存在を PCR で確認した。
5. ハイグロマイシン耐性細胞から回収した DNA 中の KSHV BAC をサブクローニングするため、大腸菌を形質転換し、寒天培地に塗布した。

【結果】BAC プラスミドの挿入がウイルスの増殖に抑制的な影響を与える可能性を考え、3 種類のプラスミドセットを作製した (#1~#3)。それぞれのプラスミドセットを BCBL-1 細胞に導入し、ハイグロマイシンで選択培養したところ、いずれのプラスミドセットを導入した場合にもハイグロマイシン耐性の細胞凝集塊が認められた。それらの細胞凝集塊から抽出した DNA 中には KSHV BAC が含まれることを PCR で確認することができた (下図 lane 1 と 2, lane 5 と 6, lane 9 と 10)。現在、KSHV BAC を大腸菌にサブクローニングするための条件検討を進めている。

選択培養した BCBL-1 細胞には KSHV BAC の DNA が含まれる

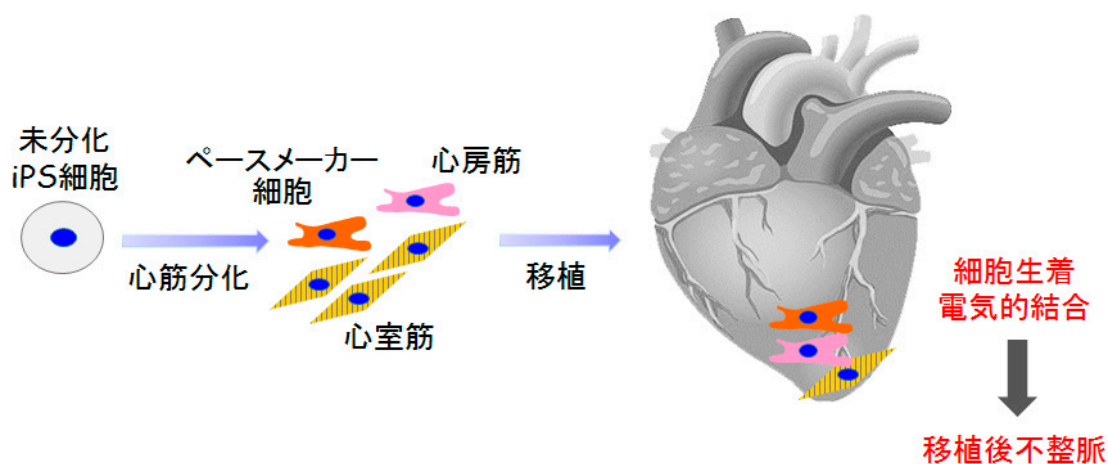


【目的】心不全は罹患率、死亡率ともに高く、新たな治療法の開発が望まれている。近年、心不全に対する新しい治療法として、多能性幹細胞（ES 細胞および iPS 細胞）を用いた心筋再生医療の実用化が期待されている。ヒト多能性幹細胞由来心筋細胞は種々の動物心筋梗塞モデルにおいて、移植後生着し、心機能を改善することが示されている。しかし、これまでの移植試験は、ヒト由来細胞を動物モデルに移植する異種移植における検討のみであったため、移植試験結果が正しく評価されていない可能性があった。私たちは、霊長類（ヒトおよびカニクイザル）iPS 細胞を樹立し、これらの細胞から分化させた心筋細胞を動物モデルに異種／同種移植することにより、移植後不整脈という新たな知見を得てきている。本研究では、霊長類 iPS 細胞を用いて、移植後不整脈のメカニズムを解明し、不整脈発生を抑制する新たな手法を見出すことを目指した。

【方法】移植後不整脈の基質となる、ペースメーカー細胞が霊長類 iPS 細胞由来心筋細胞に含まれているか、パッチクランプ法及び免疫組織染色で評価した。また、一過性不整脈のメカニズム解明として、免疫不全ラットにヒト iPS 細胞由来心筋細胞（心室筋およびペースメーカー細胞）を移植し、移植後時間経過においてグラフト心筋細胞の組成に変化があるか組織学的に評価した。さらにヒト iPS 細胞からペースメーカー細胞を含まない心室筋細胞を作製し移植することにより移植後不整脈が抑制できるか検討する移植試験に着手した。

【結果】ヒトおよびカニクイザル iPS 細胞由来心筋細胞には約 10%の割合でペースメーカー様細胞が含まれていることが分かり、この細胞は心室筋細胞よりも早い自己拍動 rate を有していることが明らかとなった。ペースメーカー細胞を含む心筋細胞を移植すると、短期的にはペースメーカー細胞は生着するが、長期的には生着しないことが明らかとなった。さらに、ヒト iPS 細胞由来心室筋細胞はカニクイザル心筋梗塞モデルにおいて、適切な免疫抑制プロトコールによって、拒絶反応影響を受けずに生着することが明らかとなった。

iPS 細胞由来心筋細胞移植後の心室性不整脈の発生



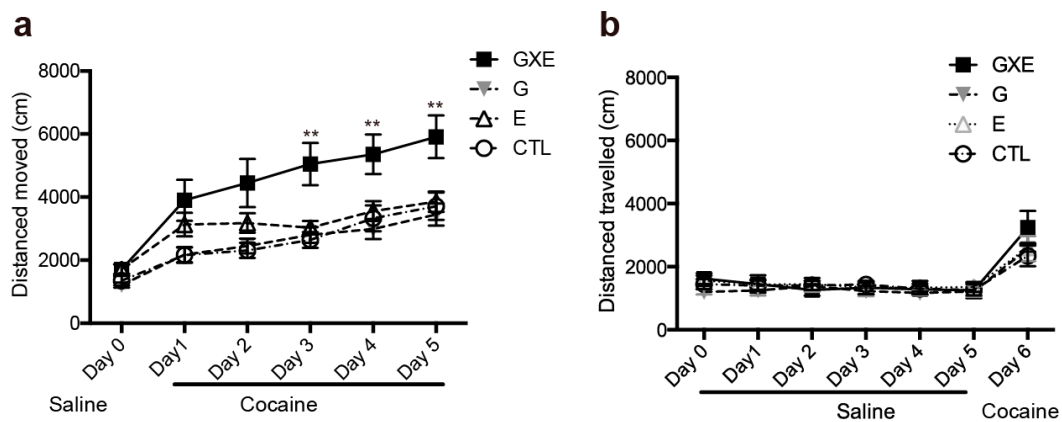
【目的】精神疾患は遺伝要因と環境要因の組み合わせによって発症する複合疾患である。研究代表者が開発したスコットランドの精神疾患多発家系で見つかった変異型 DISC1 遺伝子を前脳神経細胞に導入したトランスジェニックマウスは遺伝要因のみでは表現型に乏しいが、周産期あるいは思春期に環境要因を導入することで成年期において行動異常を呈する。そこで本マウスモデルを用いて、遺伝-環境相互作用による精神疾患発症の分子機構を明らかにすることを目的とした。

【方法】変異型 DISC1 トランスジェニックマウスを集団飼育する群 (G) と思春期 (生後 5~8 週齢) に孤立飼育する群 (GXE) に分け、8 週齢以降に実験を行った。比較対照群として、同胞野生型マウスを集団飼育する群 (CTL) と思春期に孤立飼育する群 (E) に分け、同様に 8 週齢以降に実験を行った。本研究は大阪大学蛋白質研究所動物実験委員会により承認されており、動物実験に関する倫理指針に従って行った。コカイン投与後の行動量測定と、コカインによる条件付け場所嗜好試験によって薬物依存行動を観察した。

それぞれのマウスの脳スライスから、側坐核、大脳皮質前頭前野、腹側被蓋野を取り出し、PDE4 の mRNA 発現量、蛋白量の測定、酵素活性の測定を行った。脳スライスに SKF81297 あるいはロリプラムを処置し、DARPP32 と GluA1 の PKA リン酸化を、それぞれのリン酸化抗体を用いて調べた。

【結果】DISC1 遺伝子変異と思春期での社会的孤立という遺伝-環境相互作用が、薬物依存行動を増悪させることを示し、その分子機構として、側坐核特異的な PDE4 の酵素活性上昇によるものであることを示した。

コカインによる行動感作における遺伝-環境相互作用



【目的】近年、高齢化を背景に痛みを有する患者数が著しく増加している（本邦では約2,300万人の慢性疼痛患者が存在）。慢性疼痛は生活の質を低下させ、労働・学習意欲が減退するため、国家的損失に係わる問題であるが、オピオイドやNSAIDsなど既存の鎮痛薬が奏功しない。それ故、慢性疼痛発症に関わるメカニズムを明らかにするとともに、新たな作用機序を有する鎮痛薬の創製が必要不可欠である。

脳・脊髄におけるミクログリアやアストロサイトといったグリア細胞の活性化に伴う炎症反応は、慢性疼痛を惹起する重要な機構の一つである。本研究で着目したREV-ERBは炎症反応の制御に関わる核内受容体であり、REV-ERB作用薬がREV-ERBに結合することで複合体を形成し、これがさらに特定遺伝子のプロモーター領域に結合することで、サイトカインやケモカインなどの炎症性物質の遺伝子発現を転写レベルで抑制することが知られている（図）。

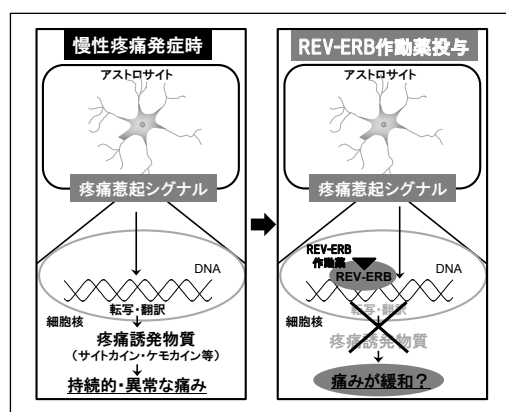
一方で、慢性疼痛に対するREV-ERBの役割・機能に関しては全く研究がなされていない。そこで、我々は培養脊髄アストロサイト及び慢性疼痛モデルマウスを用いて、新規鎮痛薬標的としてのREV-ERBの可能性を検討した。

【方法】Wistar系ラット新生仔（生後1日）脊髄より培養アストロサイトを調製した。雄性ddy系マウス（5週齢）を用いて慢性疼痛モデルを作製した。これらの機械的刺激に対する逃避閾値をvon Frey filamentsにより測定することで疼痛反応を評価した。脊髄アストロサイトの活性化は、glial fibrillary acidic protein（GFAP）の発現量を免疫組織化学法により測定することで評価した。疼痛誘発物質のmRNA発現量はreal-time PCR法、タンパク発現量はELISA法にてそれぞれ測定した。REV-ERBのknockdownはRNA干渉法により行った。

【結果】培養脊髄アストロサイトにlipopolysaccharide（LPS）を処置することによる疼痛誘発物質interleukin-1 β （IL-1 β ）、interleukin-6（IL-6）及びマトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）-9発現の増大反応は、REV-ERB作用薬SR9009を前処置することにより有意に抑制された。疼痛誘発物質の発現増大に対するSR9009の抑制効果へのREV-ERBの関与を明らかにする目的でRNA干渉法を用いて検討を行ったところ、REV-ERBのknockdownによりSR9009の抑制効果は有意に低下した。

マウス脊髄くも膜下腔内にLPSを投与すると、機械的刺激に対する逃避閾値の低下が認められた。SR9009を脊髄くも膜下腔内に前処置することによりLPSによる機械的刺激に対する逃避閾値の低下は有意に抑制された。LPSモデルにおいて、脊髄後角でのIL-1 β mRNA及びIL-6 mRNA発現の有意な増大が認められたが、MMP-9 mRNA発現に変化は認められなかった。さらにLPSモデルの脊髄後角におけるIL-1 β mRNA及びIL-6 mRNA発現の増大反応は、SR9009を前処置することにより有意に抑制された。またLPSモデルにおいて、脊髄後角でのGFAP発現の増大が認められたが、この反応はSR9009を前処置することにより有意に抑制された。加えて、炎症性疼痛モデルならびに神経障害性疼痛モデルの機械的刺激に対する逃避閾値の低下に対するSR9009の効果を検討したところ、いずれの疼痛モデルに対してもSR9009を脊髄くも膜下腔内に投与することにより有意な抑制効果が認められた。

REV-ERB作用薬による鎮痛作用メカニズム



【目的】劇症型心筋炎は、心原性ショックを主体とした若年者に発症する致死的な疾患である。故に、その治療法の確立は世界的な課題である。心筋炎の発症機序はウイルス感染と引き続く自己免疫応答が考えられてきた。本研究では、ヒト劇症型心筋炎の臨床経過をよく反映した実験的自己免疫性心筋炎モデルを作製し、それを用いて新たな治療標的分子を明らかにすることを目的とした。

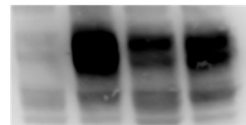
【方法】完全フロントアジュバンドと共に心筋ミオシンペプチドを 6 週齢オス Balb/c マウスに皮下注射し、経時的に心筋標本の免疫組織学的検討と共にウエスタンブロット法にて分子シグナルを検討した。

【結果】心筋ミオシン免疫後 21 日目より心筋組織において細胞浸潤を認め、その後も持続した。肉眼的に、免疫 21 日目に炎症浮腫による心室腔の狭小化が認められ、一方 42 日目より心拡大が出現した。心筋炎の発症と最も関連したウイルスの一つであるコクサッキーアデノウイルスに対する受容体 (CXADR) のタンパク発現は、健常心臓組織において認められなかったが、免疫 21 日目より出現しその後も持続した。免疫染色にてその局在は心筋細胞と血管内皮に認められた。以上の結果は、劇症型心筋炎の進展と CXADR の関連性及びその治療的役割を明らかにする根拠となる。

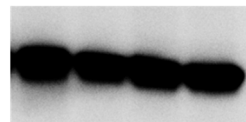
心筋ミオシン免疫後の心臓コクサッキーアデノウイルス受容体 (CXADR) 発現

ミオシン免疫後(日) 14 21 35 42

CXADR



GAPDH

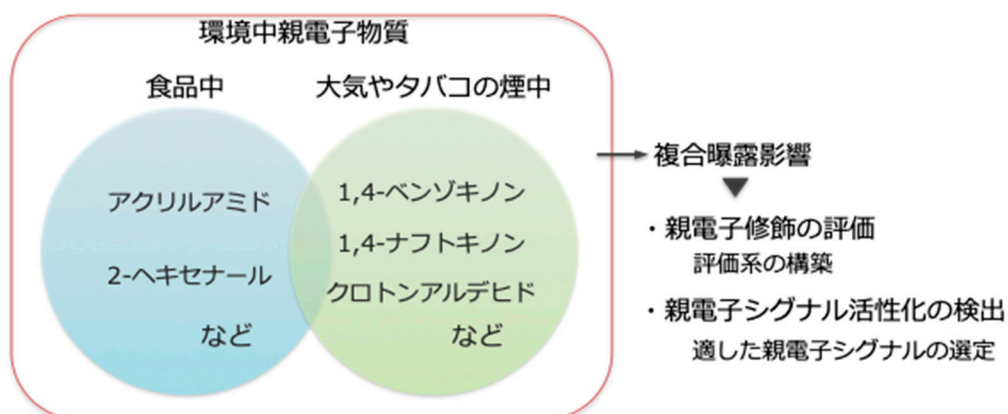


【目的】親電子物質は、タンパク質への共有結合を介して被修飾タンパク質の機能変化を引き起こし、それに伴う様々な生体応答を引き起こし得る物質である。我々は、日常生活から大気や食品中から様々な環境中親電子物質に複合的に曝露されている。しかしながら、親電子物質の複合的な曝露を考慮した研究は皆無であり、その評価方法も環境中親電子物質の複合的な曝露による細胞応答および曝露程度を推定可能な被修飾タンパク質の検出系を構築することを目的とした。

【方法】細胞はHepG2細胞、マウス由来初代肝細胞もしくはA431細胞を用いた。各親電子物質曝露による細胞毒性はMTT法にて検討した。親電子シグナルとして、Keap1/Nrf2経路、PTP1B/EGFRシグナルおよびPTEN/Aktシグナルに着目し、Nrf2、EGFRおよびAktの活性化はウエスタンブロット法で行った。チオール基に対する親電子修飾の評価はビオチンマレイミド試薬を用いたELISA (BPM-ELISA) で、アミノ基への親電子修飾はBPM-ELISAを応用し、本研究で構築したビオチンOSu試薬を用いたELISA (BAS-ELISA) で検出した。

【結果】HepG2細胞にキノン類である1, 2-ナフトキノン (1,2-NQ)、1,4-NQもしくは1, 4-ベンゾキノン (1,4-BQ)、および2-アルケナール類であるクロトンアルデヒド (CrA) もしくは2-ヘキセナールをそれぞれ曝露して得られたLD₅₀値 (それぞれ56.3、41.3、533.4、389.4、もしくは463.6 μ M) を基に複合曝露サンプルを調整して曝露したところ、本サンプルのLC₅₀値は120 μ Mであり、各LC₅₀の1/10濃度に値する濃度だった。初代肝細胞においても1,4-NQ、1,4-BQ、CrAもしくはアクリルアミドの複合曝露では、各LC₅₀の1/5濃度に値する濃度であったにもかかわらず、その生存率は44%であった。これらの結果から、単独曝露では毒性が見られない濃度であっても、複合曝露では毒性が見られたことから、複合曝露によってリスクは高くなると示唆された。環境中親電子物質の曝露を評価する上で適している親電子シグナルを選定するために、EGFRが高発現している細胞であるA431細胞を1,2-NQ、1,4-NQ、1,4-BQもしくはCrAに曝露して検討した。その結果、使用した濃度域においていずれの親電子物質においても、より低濃度でNrf2が活性化したことから、Nrf2の活性化が細胞への親電子物質曝露評価に適していることが示唆された。また、本研究で改良したBPM-ELISAはキノン類だけではなく、種々の親電子物質に応用可能であることが示された。BAS-ELISAと組み合わせることで、様々なサンプル中からタンパク質のアミノ基およびチオール基を修飾するような化学物質の存在を明らかにすること、およびタンパク質への修飾の程度を評価することが可能であると示唆された。

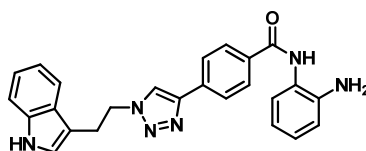
環境中親電子物質複合曝露影響評価を目的とした本研究の概略図



【目的】阻害薬－酵素複合体の解離反応には、熱力学的側面と速度論的側面がある。創薬化学研究では、通常、熱力学的指標となる阻害定数もしくは50%阻害濃度 (IC_{50}) といった熱力学的パラメータによって阻害薬の評価を行う。しかし、これらの値は評価系の影響を受けやすく、様々な因子が存在する細胞系ならびに *in vivo* 系では、*in vitro* 評価によって算出された熱力学的パラメータ値を反映する薬理作用を示さないことが多々見受けられる。その一方で、熱力学的指標だけでなく、酵素阻害速度論に基づいた指標(速度論的パラメータ)を用いることが重要性であるとの報告もある。特に、阻害薬－酵素複合体における解離速度定数は、系の影響を受けにくく、細胞系や *in vivo* 系においても阻害薬－酵素相互作用の強さを反映する値として阻害薬評価に利用すべきであると提唱されている。以上の背景から、我々は、熱力学的指標のみならず、速度論的指標にも着目し、酵素阻害薬の創製研究を行うことが重要だと考えた。そこで、本研究では、酵素阻害速度論に基づいて、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害薬の創製研究を行った。

【方法および結果】速度論的パラメータが優れた値を示す HDAC 選択阻害薬を見出すために、クリックケミストリーを利用した HDAC 阻害薬用フォーカストライブラリーを構築した。その後、蛍光基質による HDAC1 阻害活性評価系にてスクリーニングを行い、ヒット化合物 **1** を得た。化合物 **1** を別途合成・単離精製し、詳細な酵素阻害速度解析を行ったところ、化合物 **1** の解離速度定数 (k_{off}) は非常に小さく、また、レジデンスタイム τ が非常に大きかった。これらの速度論的パラメータは、既知の HDAC 阻害薬である vorinostat や entinostat に比べて優れていた。以上のように、我々は、優れた速度論的パラメータをもつ HDAC 阻害薬を見出すことに成功した。

見出した速度論的 HDAC 阻害薬とその阻害定数 (K_i)、
解離速度定数 (k_{off}) およびレジデンスタイム (τ)



1

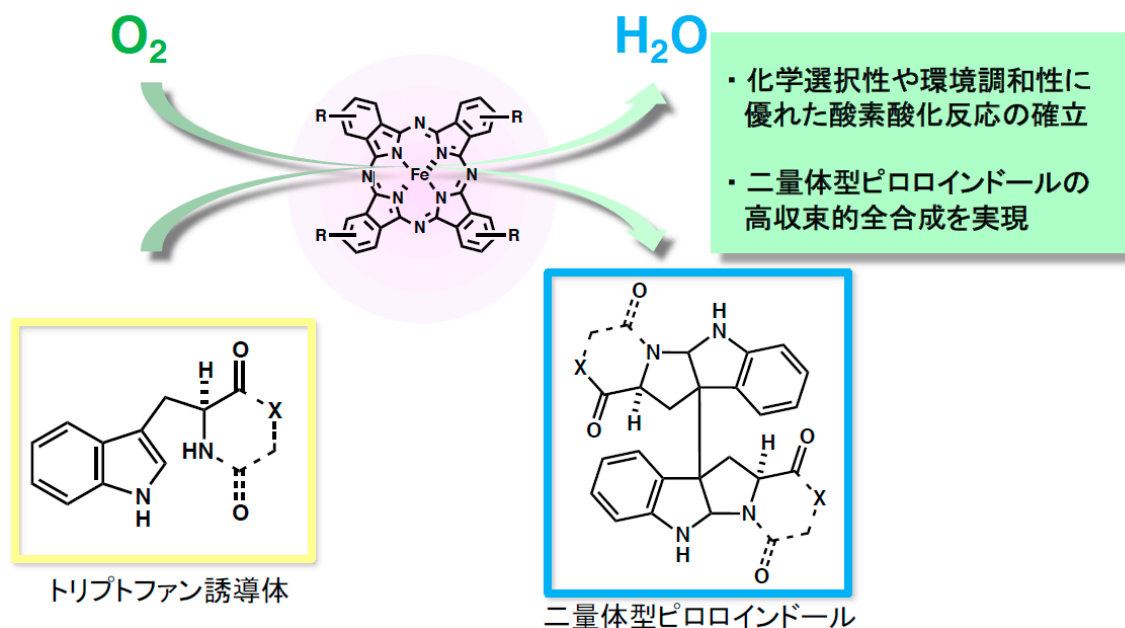
1	
K_i (nM)	0.453
k_{off} (min^{-1})	0.0011
τ (min)	909

【目的】トリプトファンを由来とするピロロインドールアルカロイドは、アミノ酸に由来する多様な類縁体が存在し、また強力かつ広範な生物活性を有しているため、有機化学者のみならず薬理学者などからも注目を集めている化合物群である。本化合物群の中でも、ピロロインドール骨格が二量化した構造をもつ化合物は、天然物では珍しいヒストンメチル基転位酵素を有するなど、エピゲノム創薬の観点からも注目を浴びている。このような背景のもと、本研究では、独自に開発した高活性酸素酸化触媒の精密制御を基盤とし、二量体型ピロロインドールの高収束的合成の実現を目指す。さらに、本化合物群の化合物ライブラリーを用いたエピゲノム制御による新規抗がん剤の開発を行う。

【方法】二量体型化合物の創薬を指向した高効率かつ誘導体合成に適した合成法を確立するためには、いかに単量体を合成終盤でカップリングするか、合成の収束性が重要である。しかし、合成終盤での単量体のカップリングは、基質がより複雑になるため、化学選択性や立体障害などの課題を有する。このような背景のもと、本研究では、生体酸化触媒シトクロム P450 の持つ高い選択性に着目し、生体触媒を模倣した触媒開発を通じ、合成終盤でのカップリングを可能とする高い化学選択性を持つ新たな酸素酸化プロセスを確立する。生体触媒を模倣した酸化触媒の開発にあたり、ポルフィリン錯体ではなく、合成・誘導体化が簡便であり、高い安定性と多機能性を有するフタロシアニンを中心に検討し、高活性酸素酸化触媒の開発を行う。

【結果】生体触媒を模倣した様々な鉄触媒を検討した結果、P450 と同様の三価の高スピン状態の鉄を有するオクタカルボキシ鉄フタロシアニン錯体のみが、酸素雰囲気下、水溶媒中でトリプトファン誘導体の二量化体を与えることがわかった。本法論をアミノ酸由来の様々な活性官能基を有するジペプチドに適用した結果、他の官能基を損ねることなくインドールの酸素酸化が化学選択的に進行し、目的の二量化体を与えた。さらに、ジケトピペラジン骨格を有するインドールに最適条件を適用した結果、様々な天然アルカロイドの高収束的全合成に成功した。なお、本反応は、酸素をバルク酸化剤とするインドールの世界初の触媒的二量化反応であり、従来法にない高い官能基共存性や広範な基質一般性、優れた環境調和性を有する点が特徴である。本方法論の確立は、医薬品探索における有用な合成ツールを提供するのみならず、二量体型ピロロインドールアルカロイドの化合物ライブラリーの拡充による創薬研究への貢献が見込まれる。

鉄フタロシアニン触媒を用いたトリプトファン誘導体の酸素酸化による
二量体型ピロロインドールアルカロイドの収束的合成

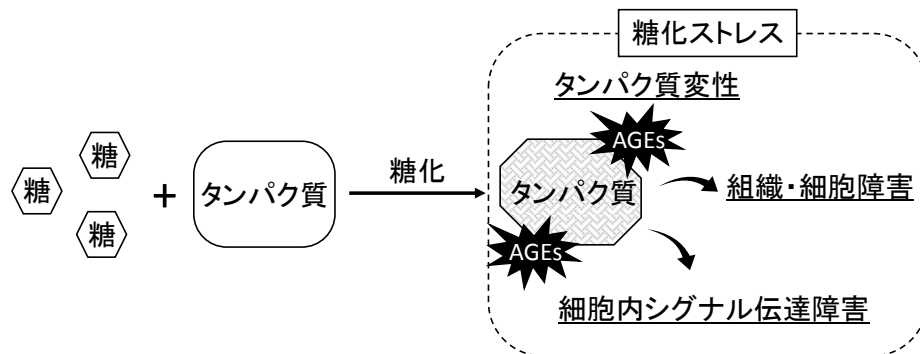


【目的】糖化反応に起因する組織、細胞障害やタンパク質変性、細胞内シグナル伝達障害などの生体ストレスは糖化ストレスと呼ばれ、生活習慣病や加齢性疾患の病態形成に関与している。糖化反応の最終生成物である終末糖化産物 (advanced glycation end products : AGEs) の体内への蓄積は高齢者の筋量や筋力、歩行速度の低下と相関することが報告されており、糖化ストレスはサルコペニアの誘発因子であると考えられている。運動トレーニングは骨格筋機能維持に有益であるが、これまでに運動トレーニングが糖化ストレスの除去・緩和に有効であるかについては明確になっていない。そこで本研究では、自発的な運動トレーニングが骨格筋の AGEs 蓄積量や AGEs 受容体発現量、AGEs 分解酵素活性に与える効果を検討し、運動トレーニングが骨格筋の糖化ストレスの軽減に有効であるのかについて明らかにすることを目的とした。

【方法】5 週齢雄性 C57BL/6NCr マウスを、ランダムに 1) コントロール群、2) 自発運動群、3) 糖化ストレス負荷群、4) 糖化ストレス負荷+自発運動群の 4 群に分類し、4 週間飼育した。糖化ストレス負荷群には糖化産物の一種である methylglyoxal (MGO、0.1 % w/w) を添加した飲料水を自由摂取させた。自発運動群には、飼育ケージ内に回転ケージを設置し自発運動を行わせた。

【結果】非運動群では糖化ストレス負荷によるヒラメ筋の AGEs 蓄積状態は変化しなかったものの、運動群では糖化ストレス負荷状態において AGEs 量が有意に減少した。糖化ストレス負荷により、AGEs 生成に関わる AGEs 受容体 receptor for AGEs 発現が増加したが、運動群ではその増加が抑えられた。AGEs 除去や分解に関わる AGEs 受容体 oligosaccharyltransferase-48 に関しては、MGO 負荷により減少し、運動により増加した。以上の結果は、運動トレーニングが骨格筋の AGEs 受容体発現変化をもたらし、AGEs の生成抑制や分解能の向上に有効であることを示唆している。

糖化ストレスの生成機序

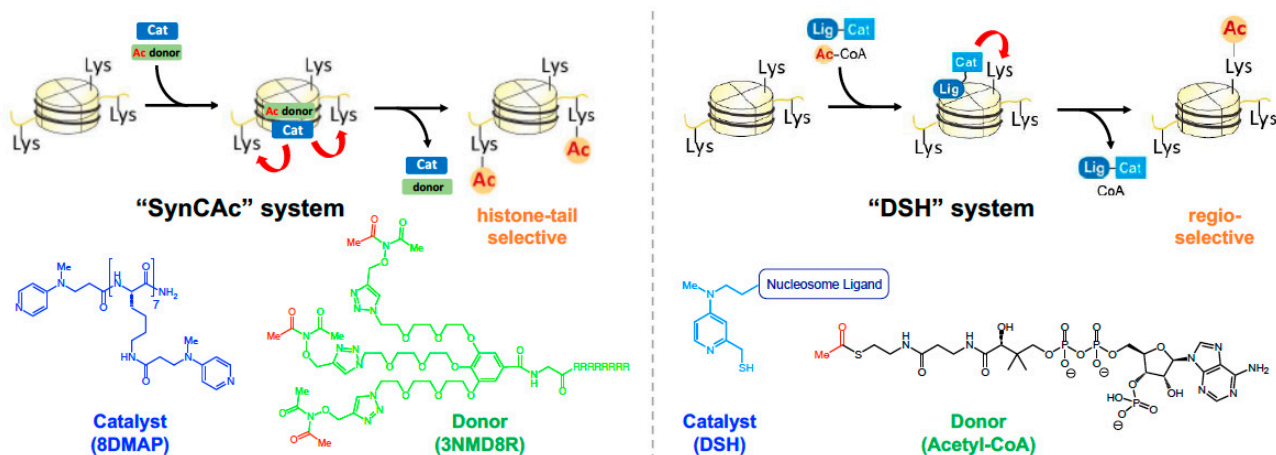


【目的】クロマチンを構成する主要なタンパク質であるヒストンは、様々な翻訳後修飾を受けることにより多彩な遺伝子発現パターンを生み出す。特に、約 50 年前にヒストン翻訳後修飾としてメチル化とともに発見されたアセチル化は、最もよく研究されてきた修飾の一つであり、ヒストンアセチル化酵素 (HAT) がアセチル CoA からヒストンのリジン残基へとアセチル基を転移させることにより進行する。細胞内でのヒストンアセチル化プロファイルは、HAT とヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) のバランスで規定されている。HAT の不活性化によるヒストンアセチル化の減少はがんをはじめとした様々な疾患との関与が示唆されていることから、創薬の標的としても注目されている。近年の質量分析技術の発展により、ヒストンのリジン残基は、アセチル化だけではなくブチリル化、クロトニル化、マロニル化等の様々な種類のアシル化修飾を受けていることが明らかになっている。これら新しいヒストンアシル化の機能や酵素による制御機構はほとんど不明であり、現在のエピジェネティクス研究分野における中心的な問題の一つである。最近、精子の形成過程や、ダイエットや糖尿病に起因する代謝異常時の遺伝子発現制御にヒストンのブチリル化やクロトニル化、または 3-ヒドロキシブチリル化が関与することが示され、個体は発生・分化時やストレス応答時に様々なヒストンアシル化修飾を使い分けることで精密なクロマチン制御を行っていることが示唆されている。著者らは、ヒストンを選択的にアセチル化する二種類の人工触媒系 (触媒+アセチルドナー) の開発に世界で初めて成功している。一つは、ヌクレオソームの DNA に結合し、ヒストンテール領域の複数のリジン残基を広範囲にアセチル化する人工触媒であり (“SynCAc” system)、もう一つは、ヌクレオソームの中の特定の領域に結合し、リジン残基を位置選択的にアセチル化する人工触媒である (“DSH” system)。これらの人工触媒系はドナーを変えることにより、アセチル化だけではなく他の様々なアシル化をヒストンのリジン残基に導入できるという特徴をもつ。本研究計画では、これらの独自の人工触媒系を用いたケミカルバイオロジー的手法を主軸とし、ヒストンアシル化修飾の機能や酵素による制御機構の理解を深めることを目的とした。

【方法】著者らは、人工触媒系を用いて調製したアシル化ヌクレオソームをヒトのサーチュインと反応させた後、LC-MS/MS 解析により各残基の脱アシル化率を定量化する系を立ち上げた。この系を用いてヒトサーチュインの残基およびアシル基選択性の網羅的解析を行った。

【結果】ヒト Sirt1~7 のリジン残基およびアシル基選択性についての網羅的知見を得ることに成功した。特にがん化との関連がよく知られている Sirt7 は、自身のカルボキシ末端に存在する塩基性アミノ酸に富んだ領域を介してヌクレオソームに直接結合し、これまで主な標的と考えられていたヒストン H3 の 18 番目のリジン残基よりも、36 番目のリジン残基を効率的に脱アセチル化及び脱ブチリル化することを見出した。

ヒストンを選択的にアセチル化する人工触媒系

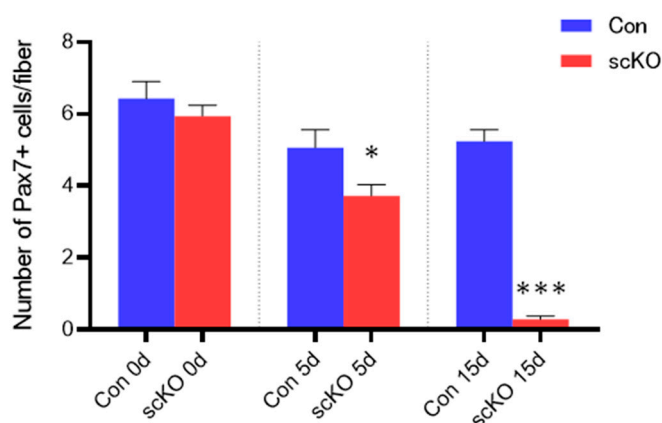


【目的】サルコペニア（加齢に伴う筋萎縮）に伴う運動機能低下が多くの要介護者を生み、社会問題化が加速することは必至である。これにより、高齢化に伴う筋萎縮予防は喫緊の課題であり、筋萎縮の分子機構の解明が求められている。生体内の主要なタンパク分解系としては、ユビキチン-プロテアソーム系が挙げられ、筋萎縮においても分解系の関わりは多く報告されている。最近、筆者らは、プロテアソーム機能に必須であると考えられる *Rpt3* 遺伝子欠損マウスの解析により、主のタンパク分解系であるプロテアソーム機構は、筋量の維持に必須であることを明らかにした。また、骨格筋幹細胞においては、高齢マウス由来の筋幹細胞では、プロテアソームコンポーネントの遺伝子発現が減少しており、幹細胞においても老化による機能低下が示唆された。そこで、本研究では、骨格筋幹細胞におけるプロテアソームの役割について骨格筋幹細胞特異的プロテアソーム機能不全マウスを用いて明らかにすることを目的とした。

【方法】骨格筋幹細胞特異的プロテアソーム機能不全マウスは、*Rpt3* floxed マウスと *Pax7*^{CreERT2/+}マウスとの交配により作出した。

【結果】プロテアソームを構成する *Rpt3* 遺伝子の欠損をサテライト細胞でのみ誘導できるマウスを作出した。この *Rpt3* を欠損したマウスではプロテアソームによるタンパク分解が抑制され、*Rpt3* 欠損を誘導してから約 2 週間で筋幹細胞プールが減少し、筋再生不良を呈した。さらに、培養細胞を用いて解析した結果、*Rpt3* の欠損により筋幹細胞の増殖および筋分化が抑制され、細胞死が誘導されることが明らかになった。また、この増殖抑制や細胞死の際に、細胞増殖などに関わることが報告されている p53 タンパク質の過剰な活性化が起こっていることを見出した。そこで、p53 遺伝子を人為的に抑制すると、筋幹細胞の増殖抑制が軽減されたことから、プロテアソームによる分解系の抑制により引き起こされる筋幹細胞の機能不全に p53 が関与していることを突き止めた。これまでに、タンパク分解系の不全や p53 は老化との関連も指摘されており、本研究の知見は骨格筋幹細胞とタンパク分解系、さらには老化をつなぐ研究の端緒になり、更なる解析が必要である。

骨格筋幹細胞特異的プロテアソーム機能不全では、筋幹細胞プールが減少する

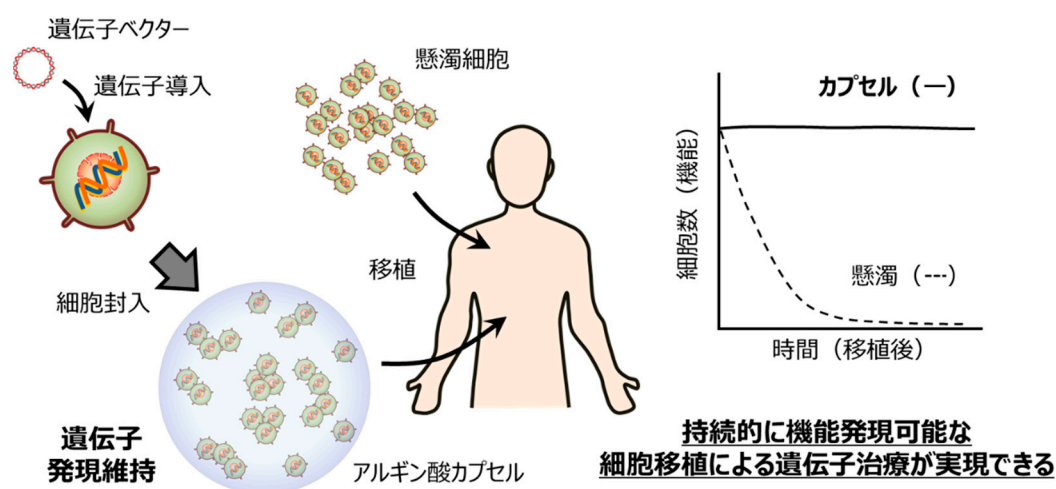


【目的】体内に直接遺伝子を導入する *in vivo* 遺伝子治療法は、遺伝子発現期間の制御が困難であることや、生体に対して遺伝子を直接導入することによる過剰な免疫応答の危険性など、臨床応用には未だ多くの課題が残されている。こうした *in vivo* 遺伝子治療法における問題点を解決する方法として、生理活性物質をコードする遺伝子を導入した細胞を生体に移植する治療法が注目されている。この細胞移植による遺伝子治療法は、患者の体内に遺伝子を直接導入する必要がなく、細胞を一度移植するだけで持続的に生理活性物質を放出できることから、細胞を生理活性物質の放出プラットフォームとした効率的な疾患治療が可能である。しかしながら、移植した細胞の大半は移植直後に死滅することから、実際にはその治療効果は一時的であり、それぞれのタンパク質を投与するよりもわずかに長い期間作用する程度に過ぎないことが問題とされる。そこで本研究では、細胞における安定な遺伝子発現とアルギン酸カプセルの利用により、生体に移植した細胞が持続的に遺伝子機能を発現可能な細胞介在型遺伝子治療システムの開発を試みた。

【方法】マウス間葉系幹細胞株 C3H10T1/2 細胞に対して、NanoLuc luciferase (Nluc) 遺伝子をコードする pEBMulti-Nluc プラスミドをリポフェクション法により導入し、C3H10T1/2/Nluc 細胞を樹立した。次に、1%アルギン酸ナトリウム溶液に懸濁した C3H10T1/2/Nluc 細胞を 10%塩化カルシウム溶液に添加することで、C3H10T1/2/Nluc 細胞封入アルギン酸カプセルを作製した。カプセル内への細胞封入の確認を目的に、C3H10T1/2 細胞を赤色蛍光色素 DiI で染色し、凍結切片を作製後、顕微鏡を用いて観察した。さらに、カプセル内へ封入する細胞数の最適化を目的に、様々な細胞数の C3H10T1/2/Nluc 細胞をアルギン酸カプセルに封入し、培養上清中のルシフェラーゼ活性を経時的に測定した。最後に、移植細胞の生存期間の評価を目的に、C3H10T1/2/Nluc 細胞封入アルギン酸カプセルまたは懸濁 C3H10T1/2/Nluc 細胞を C3H/He マウスの腹腔内に投与し、経時的に血中のルシフェラーゼ活性を測定した。

【結果】凍結切片画像の観察から、DiI 標識 C3H10T1/2 細胞はアルギン酸カプセル内に安定に封入されていることが示された。次に、C3H10T1/2/Nluc 細胞を $10^2 \sim 10^5$ cells/capsule でアルギン酸カプセルに封入した結果、 $10^3 \sim 10^4$ cells/capsule において一定のルシフェラーゼ活性を示すことが明らかになった。懸濁 C3H10T1/2/Nluc 細胞を移植したマウスの血中ルシフェラーゼ活性は時間とともに減少した。これに対し、C3H10T1/2/Nluc 細胞封入アルギン酸カプセルを移植後の血中ルシフェラーゼ活性は 12 日間ほぼ一定であった。以上のことから、細胞における安定な遺伝子発現とアルギン酸カプセルの利用により、持続的に遺伝子機能を発現可能な細胞介在型遺伝子治療を実現できることが示された。

細胞における安定な遺伝子発現とカプセル封入による持続的に機能発現可能な細胞介在型遺伝子治療

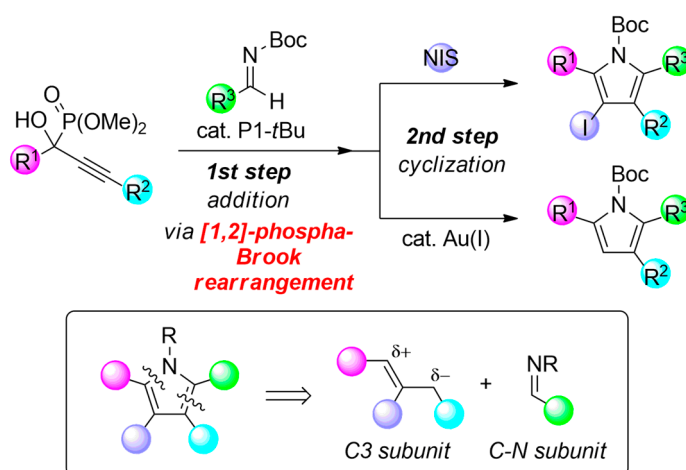


【目的】ピロールは生物活性天然物や合成医薬品に含まれる重要な含窒素複素芳香族化合物である。高度に官能基化された多置換ピロールの簡便かつ高効率な合成法の開発は、新たな医薬品の創製に直接的につながるため、有機合成化学における重要な課題の一つとなっている。多置換ピロール合成の強力な方法論の一つとして[3+2]環化付加がある。この方法論では、二つのサブユニットから収束的にピロール環を構築するため、それぞれのサブユニットの置換基の選択に応じて多様な置換基をもつ多置換ピロールの迅速合成が可能となる。よって、類縁体合成の観点から非常に魅力的な方法論である。しかしながら、この方法論に基づく従来の反応では、ピロール環上に導入可能な置換基の多様性や置換基導入における位置選択性に多くの課題があった。そこで本研究では『多置換ピロールの革新的迅速合成法の確立』を目的として、ピロール環上への多様な置換基の位置選択的な導入を可能にする新たな形式的[3+2]環化付加反応の開発を目指した。

【方法】これまでに取り組んできた[1,2]-ホスファ-ブルック転位を用いた極性転換型炭素アニオン発生法ならびにそれを利用した触媒的付加反応の開発研究で得られた知見を活かし、二段階の反応からなる形式的[3+2]環化付加による多置換ピロール合成法を設計した。すなわち、ブレンステッド塩基触媒による[1,2]-ホスファ-ブルック転位を利用した α -オキシプロパルギルアニオンのイミンへの付加反応と、これにより得られるホモアレニルアミンのリン酸の脱離を伴う分子内環化反応により、多様な多置換ピロールの合成が可能になると考えた。

【結果】設計した二段階の反応について、それぞれ反応条件の検討を行った。一段階目の反応については、ブレンステッド塩基触媒としてホスファゼン塩基 **P1-*t*Bu** を用いることで目的とする α -オキシプロパルギルアニオンの発生とイミンへの付加が良好な収率で進行することを見いだした。また、二段階目の反応については、一段階目の付加で得られたホモアレニルアミンに対し、カチオン性金触媒あるいは種々の求電子のハロゲン化剤を作用させることで、想定したリン酸の脱離を伴う分子内環化反応が進行し、対応する多置換ピロールが得られた。本手法には様々な置換基を有する基質を適用することができる。よって、ピロール環上に多様な置換基が位置選択的に導入された多置換ピロールを簡便に合成することが可能となった。

形式的[3+2]環化付加による多置換ピロール合成法

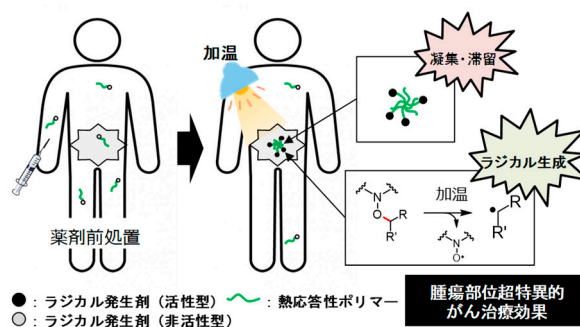


【目的】近年、ラジカルによる抗がん作用を期待したがん治療薬の開発が高い注目を集めている。ラジカルはその反応性が高く、活性酸素種の産生や直接的な DNA アルキル化作用により抗がん作用を有するが、高反応性ゆえに短寿命でもあることから、ヒトへの直接投与は不可能である。正常組織への副作用についても懸念されることから、厳密な生体内挙動の制御が求められるがゆえに、基礎研究においても高い治療効果を示した例はほとんどない。ここで研究代表者は、下図のように、①がん組織選択的にラジカル発生剤（非活性型）を送達した後に、②がん組織特異的に治療用活性型ラジカルを自在に発生させることができれば、がん部位超特異的な細胞障害による高いがん治療効果が期待できるのではないかと考え、多段階活性制御機構に基づいて、ラジカル剤をがん部位特異的に集積・活性化させる革新的 DDS 製剤の開発を計画した。

【方法】ラジカル発生剤をがん特異的に集積させる手段（段階①）として熱応答凝集性ポリマーの利用を考えた。すなわち、体内から比較的速やかにクリアランスされ、かつ、熱に応答して凝集する特長を有する生体適合性水溶性ポリマー（ポリオキサザリン：POZ）を基盤とし、トリガー（熱）を利用して薬剤をがん特異的に凝集・滞留させる手法を考案した。まず、体温以上かつ温熱療法適用温度以下（36～42℃）に下限臨界溶液温度をもつ POZ 誘導体を合成した。Colon26 担がんマウスを作製し、がん部位は、薬剤投与 15 分前から温水（42℃）に浸漬して加温することで、がん組織内温度が 40℃以上になるようにし、薬剤投与後も加温を継続した。次に、この POZ 誘導体の In-111 標識体を合成して担がんマウスへ投与し、加温されたがん部位における放射能集積について評価した。また、蛍光標識 POZ 誘導体を担がんマウスに投与し、インビボ共焦点蛍光顕微鏡を用いて、がん組織内における分布を評価した。一方、ラジカル発生剤としては、熱処理により初めてラジカルを生じるアルコキシアミン誘導体を新規に合成した。アルコキシアミンの炭素-酸素結合の開裂速度は、加温条件下、開裂反応により生成するニトロキシドのラジカル量を電子スピン共鳴装置を用いて定量した。

【結果】本研究で合成した POZ 誘導体は、約 38℃の下限臨界溶液温度を示した。そこで、In-111 標識 POZ 誘導体（約 20 kDa）について生体内放射能分布（投与 1 時間後）を評価した結果、加温によりがん集積性が約 1.8 倍向上した。また、がん組織内における POZ の局在についてインビボ共焦点蛍光顕微鏡を用いて評価した結果、非加温条件においては大部分の POZ が血管内に滞留していた一方で、加温条件においては、血管近傍あるいは血管内に多数の蛍光スポットが認められた。これらの結果より、POZ が熱に応答してがん部位で凝集・滞留するキャリアとなる可能性を示した。一方、ニトロキシド側に立体的に嵩高いアダマンチル基を導入したアルコキシアミン誘導体を合成することに成功し、その開裂速度は、従来開発されたアルコキシアミン誘導体と比較して約 3 倍改善された。今後、アルコキシアミン誘導体の改良を継続するとともに、最適な化合物を POZ へ結合させることにより、熱に応答した POZ の腫瘍集積性 ①とその場所での特異的なラジカル発生 ②を同時に誘起できる、多段階活性制御に基づくがん特異的ラジカル療法用薬剤を創製する。

熱応答性ラジカル発生剤と POZ との結合体を用いるがん特異的ラジカル療法



【目的】 マイオスタチンは TGF- β スーパーファミリーに属し、筋量を負に制御しているタンパク性局所因子であることから、筋萎縮性疾患治療の標的分子として注目されている。我々は、種を越えて共通の内因性マイオスタチン阻害分子として知られるマイオスタチンプロドメインタンパク質の作用機構に着目し、「マウス」由来プロドメイン配列からマイオスタチンを効果的に阻害する比較的小さなペプチド **1** (23 残基) の創製に世界で初めて成功している。しかし、ペプチド **1** に相当する「ヒト」由来配列を用いた 23 残基ペプチドでは阻害活性が顕著に弱いことから、阻害ペプチドの作用機構は、由来するプロドメインタンパク質の相互作用メカニズムとは異なることが示唆された。一方で、構造活性相関研究により高い阻害活性を示すペプチド **2** の創製にも至っている。そこで、本研究では、マイオスタチンとその阻害ペプチドとの共結晶を作製し、X 線結晶構造解析によってマウス由来ペプチドの詳細な結合様式および高い阻害活性に寄与する分子機構を解明することを目的に検討を行った。

【方法】 ペプチドは全て Fmoc 固相合成法により合成した。結晶化に用いるマイオスタチンタンパク質を獲得するために、大腸菌発現系および培養細胞を用いた発現系を種々検討した。最終的には、マイオスタチン前駆体 (25~376) の N 末端に His6 タグを導入した組換えタンパク質を安定発現する HEK293 細胞株を構築し、三段階の精製を経て成熟マイオスタチンを大量調製した。精製したマイオスタチンを大規模自動結晶化システムに附することで、700 種を超える結晶化溶媒の中から、ペプチド **1** 存在下で結晶が生成する条件を探索した。見出した結晶化条件を精査し最適化することで、構造解析に適用可能な結晶を獲得し、X 線結晶構造解析を実施した。

【結果】 本研究では、まず結晶化に用いるマイオスタチンタンパク質の大量調製法の検討を行った。はじめに、組換え成熟マイオスタチンを安定発現する HEK293 細胞を構築したが、発現量が少なく、さらにはオリゴマー形成が顕著にみられた。そこで、生来の産生機構を利用し、組換え前駆体タンパク質として発現させることで、純度の高いマイオスタチンタンパク質を獲得する大量調製法を確立することに成功した。次に、大規模自動結晶化システムを利用し、ペプチド **1** 存在下で結晶化が可能な溶媒条件として、2-メチル-2,4-ペンタンジオール (MPD) を添加剤として用いる重要性を見出すことができ、更なる最適化によって最終的に三種の結晶化条件に絞り込んだ。得られた結晶 165 種中 69 種の X 線回折データを取得したが、いずれもペプチドとの共結晶ではないことが判明した。今後は、ソーキングなどの手法によりペプチドとの共結晶獲得を検討したい。

「マウス」由来マイオスタチン阻害ペプチド **1** と高活性誘導体 **2** および「ヒト」由来ペプチドの配列

ヒト由来ペプチド (21-43位, 23aa)

WRQNT**KS**SRIEAIKIQILSKLRL-amide $IC_{50} > 10 \mu M$

↑ マウス配列と2残基のみ異なる

マウス由来ペプチド **1** (21-43位, 23aa)

WRQNTR**Y**SRIEAIKIQILSKLRL-amide $IC_{50} = 3.52 \mu M$

↑ げっ歯類に特徴的(合成ペプチドにおける阻害活性発現に重要)

高活性化ペプチド **2**

XRQNTRYSRIEWIKIQI**I**SKLRL-amide $IC_{50} = 0.32 \mu M$

(X = 2-naphthyloxyacetyl)

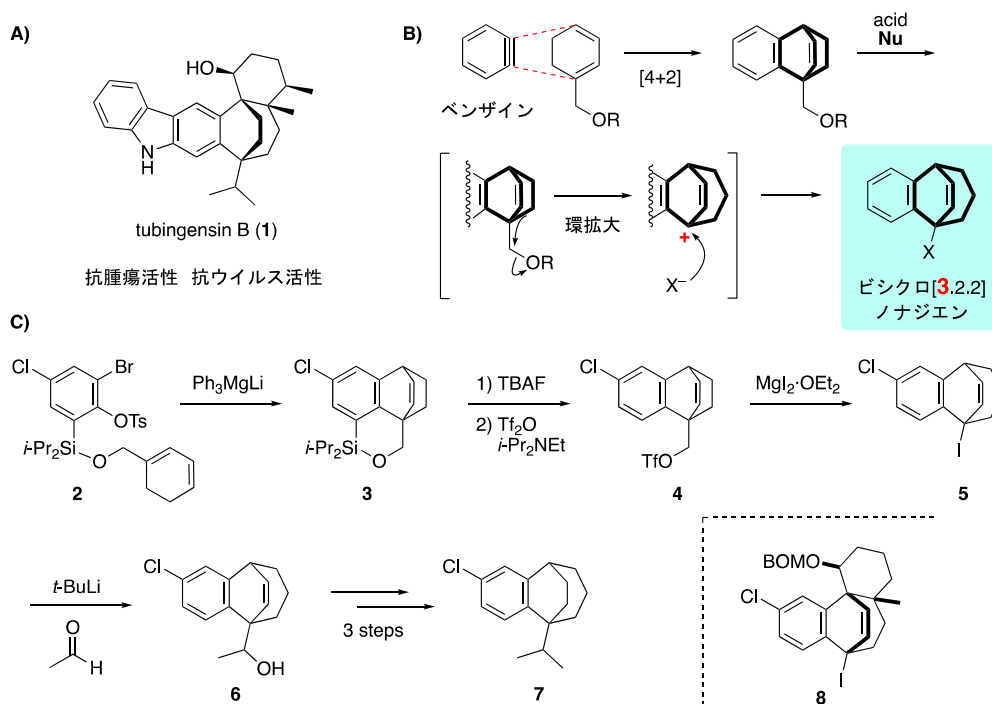
【目的】天然由来の有機化合物には、異なる生合成経路から生じた2つのユニットが複合化することによって複雑な三次元構造が形成され、独特な生物活性や機能を発現するものが数多く存在する。しかし、このように sp^3 炭素が多く、トポロジー的にも複雑な化合物を合成することは、必ずしも容易ではない。

こうした背景のもと、本研究では、テルペノイドとカルバゾールの複合構造を有する抗腫瘍性・抗ウイルス性アルカロイド、ツビンゲンシン B (1) を標的化合物とした効率的な合成経路の開拓、および構造活性相関研究に基づく有用物質の創製、を目指すことにした (下図 A)。この 1 の構造に着目すると、カルバゾールとテルペン由来炭素環とが2カ所で結合することによって、ベンゾビスクロ [3.2.2] ノネン骨格を含む複雑な6環性構造が形成されている。これまで様々な環構築法が報告されているが、この特異なビスクロ骨格の構築に対する実用的な方法は限られている。そこで、1 の独特な3次元構造と生物活性との関連を明らかにすべく、構造活性相関研究を指向した合成研究を行うことにした。

【方法】本研究では、高度に官能基化された特異なビスクロ [3.2.2] ノネン骨格の構築法の開発が鍵となる。これに対し、ベンザインの付加環化と環拡大とを活用した新しいビスクロ [3.2.2] ノナジエン骨格の構築法を立案した (下図 B)。すなわち、まず、ベンザインとジェンとの [4+2] 付加環化反応によってベンゾビスクロ [2.2.2] オクテン骨格を構築し、続いて環拡大反応によってベンゾビスクロ [3.2.2] ノネン骨格を構築する。

【結果】まず、ジェン部位が Si-O 結合を介して繋がったベンザイン前駆体 2 を合成した後、 Ph_3MgLi を作用させたところ、発生したベンザインとジェン部位との間で分子内 Diels-Alder 反応が速やかに進行し、環化付加体 3 が得られた (下図 C)。続いてこの 3 をトリフラート 4 へと変換した後、 $MgI_2 \cdot OEt_2$ を作用させたところ、アルキル架橋基選択的な転位反応に続いて橋頭位のヨウ素化が進行し、ヨージド 5 が得られた。さらに、この 5 から発生させたリチオ体をアセトアルデヒドに付加させた後、3工程の変換により三環性化合物 7 へと導くことができた。現在、より実際の合成に近いモデルであるヨージド 8 まで合成しており、その後の変換に取り組んでいる。

抗腫瘍・抗ウイルス性物質ツビンゲンシン B の合成研究



【目的】現在、肥満対策から、摂取カロリーを抑えるために、人工甘味料の使用が拡大している。しかし、近年の動物およびヒトの研究から、人工甘味料は代謝に影響を与え、食欲を促進し、総摂取カロリーを増加させる可能性が明らかになった。

砂糖を経口摂取する際の甘み刺激は、生得的な報酬刺激である。経口摂取後、砂糖は消化管内膜上の受容体で検出され、このシグナルは中枢神経系へ伝達される。このような、神経伝達系を脳腸相関という（図）。脳腸相関を介した消化管からの砂糖の刺激はカロリー摂取という報酬刺激である。口腔からの砂糖の甘み刺激と、脳腸相関を介した消化管からの砂糖の刺激は、中枢神経内で影響し合う。その結果、砂糖の甘み刺激は、カロリー摂取という報酬の予測刺激となる。このことから、砂糖の甘み刺激は報酬刺激であるとともに、報酬予測刺激でもあるといえる。このような報酬刺激や報酬予測刺激は、食欲や摂食行動の制御において、非常に重要な役割を果たしている。

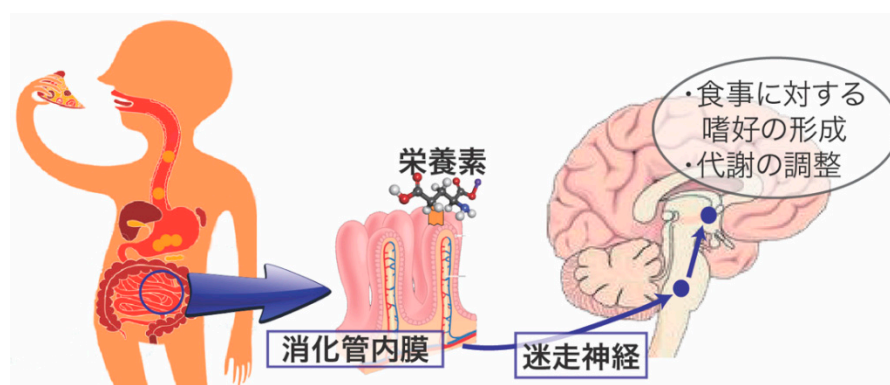
人工甘味料には、甘みがあってもカロリーがほとんどないため、人工甘味料の甘みは報酬予測刺激として適切に機能せず、食欲を増加させる可能性がある。ハエやマウスの実験では、人工甘味料の摂取により、視床下部において食欲促進ペプチドが増加し、摂食量が有意に増加した。また、この影響は、人工甘味料に、その甘さに相当するカロリーを加えると、有意に低下した。加えて、近年のヒトの脳機能画像研究では、人工甘味料と砂糖などの天然の糖による味覚刺激に対する脳活動が異なることが明らかになった。これらの研究は、人工甘味料の甘み刺激や脳腸相関を介した刺激に対する中枢神経の反応が、天然の糖に対する反応と異なることを示唆している。しかし、ヒトにおいて、脳腸相関を介した人工甘味料の刺激に対する中枢神経の反応はわかっていない。また、疫学研究においても、人工甘味料の使用が、体重増加や肥満に対してどのように影響しているのか、明らかになっていない。

そこで本研究では、砂糖を直接消化管内へ供給し、脳腸相関による脳活動を fMRI によって計測する。この結果から、脳腸相関を介した甘み刺激に対する脳活動が、どのように中枢神経系内で処理され、食欲や摂食行動に関する神経回路に影響しているのか検討する。この結果から、天然の糖の摂取に対する脳活動の指標を確立し、今後、人工甘味料に対する脳活動を検証する際にもちい、人工甘味料がどのように摂食制御の神経回路に影響しているのか解析できるようにする。

【方法】健康成人 5 名に対し、経鼻胃管を介してグルコース溶液（1M）もしくは生理食塩水をそれぞれ 200 ml 供給し、その後、fMRI によってそれぞれの溶液に対する脳活動を計測した。

【結果】甘み溶液に対する有意な脳活動を insular cortex と thalamus にみとめた。これらの脳活動領域は、エネルギー過多か不足かといった体内の栄養状態を計測しているといわれている。対照溶液に対する有意な脳活動は確認できなかった。今回の結果により、動物実験が示したように、ヒトにおいても脳腸相関を介した消化管からのシグナルは、体内の栄養状態を反映しているとともに、食物に対する嗜好性の形成にも関わっている可能性が示唆された。

脳腸相関を介した神経伝達システム



【目的】糖類やアミノ酸、有機酸等の内因性代謝物（メタボライト）の網羅的解析手法であるメタボローム解析は、疾患のバイオマーカー探索等、生命科学分野において広く応用されている。しかし、解剖によるサンプリングは必然的に「死」を伴うことから、メタボローム・プロファイルに影響を与える事が問題となっている。また、メタボロームは動的に変化しているため、解剖による定点観測で捉えたプロファイルが、どの程度、病態と真に相関しているのかは定かではない。さらに、前処理操作中に化学的な分解等が生じ、結果に「バイアス」が生じる可能性も示唆されている。

一方、近年、脳疾患や認知症へのメタボローム解析の応用は著しく、特定のメタボライトをバイオマーカーとした病態レベルや病態進行程度の予測が模索されている。しかし、アルツハイマー病において、有効な「病態進行の予測法」が確立されていないのが現状である。

そこで、本研究では、新規イオン化法である探針エレクトロスプレーイオン化法／タンデム質量分析（PESI/MS/MS）を用いて、マウス脳内のリアルタイム・メタボローム解析法の構築を試みる。さらに、アルツハイマー病モデルマウスのメタボローム・プロファイルをリアルタイムで観測し、病態進展が予測可能な新たなバイオマーカーを探索する事を目的とする。

【方法】PESIでは、イオン化促進のため有機溶媒の供給が必要となるが、有機溶媒交換の有無におけるイオン化の影響について検討するため、解剖により採取した臓器を用いて30分間分析を行い、メタボライトの検出強度を比較した。また、本手法を生きたマウスの脳に適用することを試みた。麻酔下のマウスの脳を露出させ、有機溶媒供給用の特殊サンプルカップを固定した後、PESI用ステージに固定した。ヘパリンを添加した50%エタノール溶液を特殊サンプルカップに添加し、PESI/MS/MSにてリアルタイム・メタボローム解析を行った。対象化合物は、エネルギー代謝関連物質を中心とした。さらに、構築したメタボローム解析法を用いて、アルツハイマー病モデルマウスへの適用を試みた。

【結果】解剖により採取した臓器を用いて30分間の分析を行ったところ、有機溶媒を交換しない場合は、メタボライトの検出強度に大きな変動が認められたのに対し、有機溶媒の交換を行った場合では、30分間で大きな変動は認められなかった。従って、有機溶媒を交換することで、長時間でも安定的に分析を行うことが可能であると考えられた。また、本手法を用いることで、生きているマウスの脳内リアルタイム・メタボローム解析を最大で3時間行うことに成功した。さらに、各メタボライトの微細な変動を捕捉することも可能であり、生きているマウスの脳内メタボロームのリアルタイムな変動を観察することが可能であることが示された。そこで、現在、本手法をアルツハイマー病モデルマウスに適用し、各月齢におけるメタボロームをモニタリングすることで、病態進展が予測可能な新たなバイオマーカーの探索を行っている。

脳内メタボロームのリアルタイム分析のフローとシステム概略図



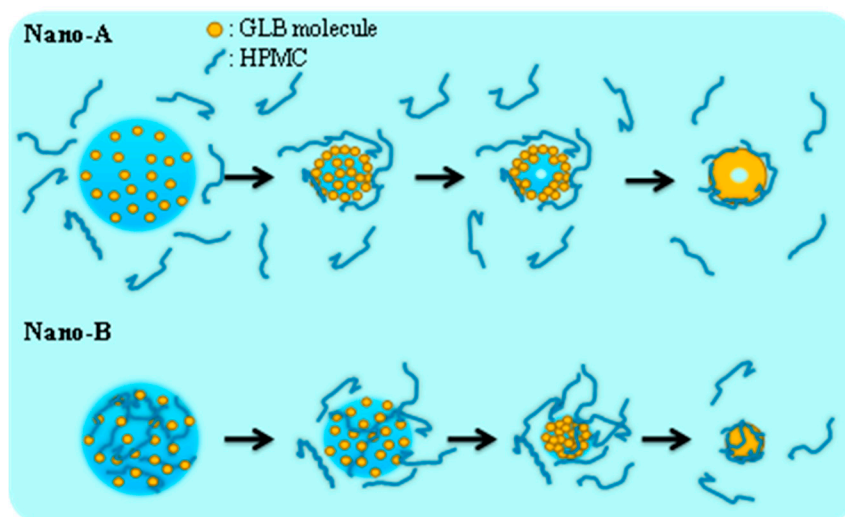
【目的】薬物非晶質ナノ粒子は比表面積の増大及び非晶質化による熱力学的なエネルギーの増大により、従来の製剤と比較して優れた薬物溶解性改善能を示す。本研究では、難水溶性薬物 glibenclamide (GLB) 及び添加剤 hypromellose (HPMC) を用いて調製した非晶質ナノ粒子の形態及び分子状態の評価を行った。

【方法】Antisolvent 法により 2 種の方法で GLB 非晶質ナノ粒子を調製した。調製法 A では、GLB を溶解させた DMSO 溶液を HPMC 水溶液に対して注入し、nano-A 懸濁液を得た。調製法 B では GLB 及び HPMC を共に溶解させた DMSO 溶液を蒸留水に対し注入し、nano-B 懸濁液を得た。

【結果】Cryo-TEM 測定による形態観察の結果、nano-A 及び nano-B ではそれぞれ球形の中実粒子と非球形の中実粒子が観察された。Nano-A 及び nano-B を超遠心処理して得られた沈殿の凍結乾燥試料について固体¹³C NMR 測定を行った結果、GLB は非晶質状態であると認められた。溶液¹H NMR ピーク面積から算出した GLB/HPMC の組成比は、nano-A 及び nano-B でそれぞれ 90 : 10 (w/w) 及び 86 : 14 (w/w) であった。DSC 測定及び保存安定性試験を行った結果、nano-A と比較し nano-B においてより強い GLB 結晶化抑制が認められ、これは nano-B 中の HPMC と GLB の混和性が高いためと推察された。

Nano-A の形成過程では、DMSO の水への拡散速度が薬物分子の液滴内部への拡散より速いため、先に粒子外側界面で固化が起こる。その後、DMSO の拡散と同時に水が浸入するため、中空粒子が形成された。また、界面近傍において水溶液中の HPMC が GLB ナノ粒子形成時に取り込まれ、粒子表面近傍に HPMC を含有した GLB ナノ粒子が形成されたと考察した。一方、nano-B の形成過程では、DMSO 中に HPMC が存在するため DMSO の水への拡散が遅くなり、薬物が粒子内部へ拡散する。その結果、粒子径の小さい非球形の中実粒子が形成された。また、DMSO 中に GLB と HPMC が共に溶解しているため、nano-A と比較して粒子全体に HPMC が分布した混和性の高いナノ粒子が形成されたと推察した。

安定化剤の添加様式が異なる antisolvent 法による GLB 非晶質ナノ粒子形成の模式図



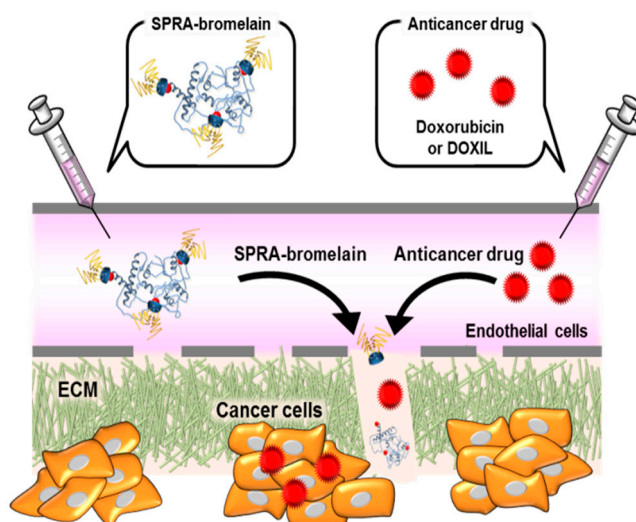
【目的】膵臓癌は、様々な癌種の中で生存率や薬物の治療貢献度が最も低い難治癌である。この理由の一つに、癌細胞周辺に密に存在する間質によって、抗癌剤が癌組織に拡散できないことが挙げられる。一方、タンパク質分解酵素であるブロメラインやヒアルロン酸分解酵素であるヒアルロニダーゼは、癌組織中の間質を分解可能なことが知られている。しかし、これら間質分解酵素は、静脈内投与後速やかに排泄されるため、癌組織まで到達することが困難である。ここで、タンパク質に共有結合を介してポリエチレングリコール (PEG) を化学修飾すると、血中滞留性が著しく改善されるものの、タンパク質本来の活性が劇的に低下するという致命的な欠点を有する。これに対して、最近我々は、 β -シクロデキストリン (β -CyD) とアダマンタン (Ad) の可逆的な相互作用を介してタンパク質を PEG 化すると、活性を損なうことなく血中滞留性が増大することを明らかにし、self-assembly PEGylation retaining activity (SPRA) 技術と命名した。そこで本研究では、SPRA 技術を駆使して、血中滞留性や癌集積性に優れた活性保持型 PEG 化ブロメライン (SPRA-ブロメライン) および SPRA-ヒアルロニダーゼを構築し、膵臓癌への高効率な抗癌剤デリバリーシステムとしての有用性を評価した。以下には、紙面の都合上、SPRA-ブロメラインの結果のみを紹介する。

【方法】 β -CyD に分子量 20 kD の PEG 鎖を複数本修飾した PEG- β -CyD を調製した。また、ブロメラインに Ad を結合させた Ad-ブロメラインを合成し、PEG- β -CyD と水中で混合することにより、SPRA-ブロメラインを調製した。SPRA-ブロメラインの形成の確認は、等温滴定型熱量測定ならびに動的光散乱法による粒子径測定により行った。*In vitro* 間質分解能は、ゼラチンゲルに対するゲル分解能を指標に評価した。さらに、*in vivo* 抗腫瘍活性を評価するため、ヒト膵臓癌細胞由来の株化細胞である MIA PaCa-2 細胞を用いて膵臓癌モデルマウスを作製し、SPRA-ブロメラインとドキソルビシンの静脈内併用投与後の腫瘍サイズを測定した。

【結果】PEG- β -CyD は、Ad-ブロメラインと安定な超分子複合体 (SPRA-ブロメライン) を形成した ($K_c > 10^4 \text{ M}^{-1}$)。また、それらの粒子径は約 150 nm 程度で、enhanced permeability and retention effect (EPR 効果) により腫瘍に集積しやすい粒子径であることが示唆された。共有結合により PEG 鎖を導入した PEG-ブロメラインは、間質分解能を有していなかったのに対して、SPRA-ブロメラインは、ブロメライン単独と比較して同等以上の活性を保持した。ヒト膵臓癌モデルマウスに、SPRA-ブロメラインを静脈内投与し、さらに FITC-デキストラン (2 MD) を静脈内投与すると、腫瘍内に FITC-デキストラン由来の蛍光が観察された。また、SPRA-ブロメラインの静脈内投与は、ドキソルビシンの抗腫瘍活性を増強する傾向を示した。

以上のことから、SPRA-ブロメラインは、抗癌剤を膵臓癌へ高効率にデリバリーする際に有用であることが示唆された。

SPRA-ブロメラインによる抗癌剤の抗腫瘍効果増強機構

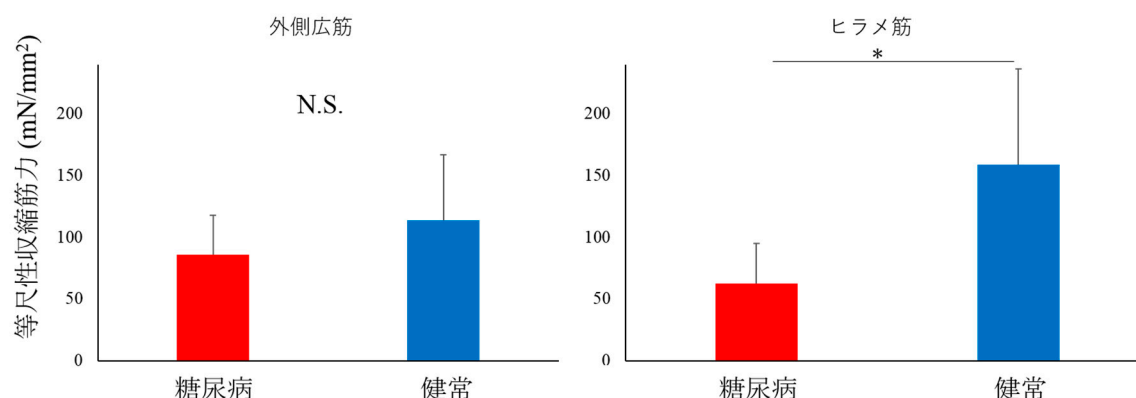


【目的】糖尿病が代謝に与える影響は広く検証されているが、筋の収縮機能に与える影響はあまり検証されていない。筋の収縮機能が低下すると、運動不足によりさらなる糖尿病の悪化に繋がる可能性がある。そこで本研究では、糖尿病によって筋の収縮機能がどのように変化するかを、単一の筋細胞を摘出して検証した。

【方法】本研究では、糖尿病モデルとしてZDFラットを対象とした。ZDF（糖尿病条件）、およびコントロール（健常条件）から、速筋で構成される外側広筋、および遅筋で構成されるヒラメ筋を摘出した。これらの筋サンプルから、化学的、物理的处理によって単一の筋細胞を抽出し、筋細胞を浸した水溶液内にカルシウムイオンを加えることで筋収縮を誘発した。主要な測定項目は、筋細胞の断面積と最大等尺性収縮筋力から算出した単位断面積あたりの力、およびカルシウムイオン濃度を徐々に増大させていった時の等尺性筋力から求められるカルシウムイオン感受性とした。

【結果】本研究の結果、速筋である外側広筋においては、糖尿病条件、健常条件間において単位断面積あたりの力に差は認められなかったが、遅筋であるヒラメ筋においては、糖尿病条件は健常条件よりも単位断面積あたりの筋力が小さかった。一方でカルシウムイオン感受性は、いずれの筋においても条件間で差はみられなかった。上記の結果は、糖尿病によって筋細胞内に蓄積した脂肪によるクロスブリッジサイクルの障害が原因として考えられ、この影響は筋線維タイプによって異なることが示唆された。

外側広筋（速筋）およびヒラメ筋（遅筋）における、糖尿病ラットと健常ラットの単位断面積あたりの筋力

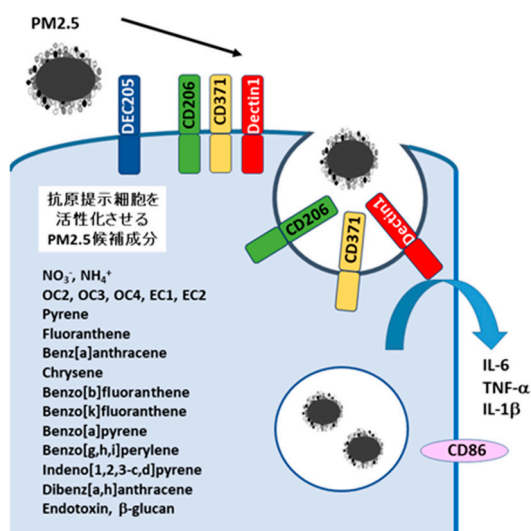


【目的】PM_{2.5}は、元素状炭素等の粒子や炭化水素や金属、イオン等の多くの化学物質から構成され、その健康影響は呼吸器系や免疫系に出現しやすい。中でも、気管支喘息等のアレルギー疾患の増加・悪化は、その代表的存在である。しかしながら、PM_{2.5}の多様性から、内在する作用メカニズムや、PM_{2.5}のいかなる成分が、呼吸器・免疫系に影響を及ぼすのか、については、十分に明らかにされていない。我々は、PM_{2.5}抽出物が、抗原提示細胞を活性化し、アレルギー疾患の増加・悪化に重要な役割を担っていることを見出している。しかしながら、このPM_{2.5}抽出物を利用した影響評価は、抽出操作によって一部消失後の成分の曝露影響評価のみにとどまり、かつサンプルの抽出効率の違いによる不確実要因も存在した。そこで、本研究では、抽出操作が不要な手法を用いてPM_{2.5}を回収し、実環境を反映するPM_{2.5}そのもの（粒子全体）が、抗原提示細胞に及ぼす影響を検討した。さらに、PM_{2.5}成分分析を行い、実環境中のPM_{2.5}そのものによるアレルギー悪化機構の解明と疾患悪化成分の同定を目指した。

【方法】PM_{2.5}を採取し、その成分の影響を調べるため、粒子を360℃、30分加熱することによって、PM_{2.5}成分を失活させた（H-PM_{2.5}）。PM_{2.5}とH-PM_{2.5}を抗原提示細胞に24時間曝露し、細胞活性を、Water soluble tetrazolium-1（WST-1）を用いた比色法により、細胞表面分子の発現に関する解析をフローサイトメトリーにより、炎症性サイトカインの産生量をEnzyme linked immuno sorbent assayにより、解析した。粒子中の化学的成分として、イオンをイオンクロマトグラフィー法により、炭素成分をサーマルオプテカル・リフレクタンス法により、多環芳香族炭化水素を高速液体クロマトグラフ法により、無機元素成分を誘導結合プラズマ質量分析法により測定した。また、生物成分として細菌、真菌成分であるエンドトキシンおよびβ-グルカンを用いた比色法により測定した。

【結果】非加熱PM_{2.5}は、DEC205、CD206、CD371、Dectin1、CD86等の細胞表面分子の刺激やTNF-α、IL-6、IL-1β等の炎症性サイトカインの産生により、抗原提示細胞を活性化したが、H-PM_{2.5}は、それらの影響を抑制した。非加熱PM_{2.5}とH-PM_{2.5}の化学的および生物的成分を測定したところ、NO₃⁻、NH₄⁺、OC2、OC3、OC4、EC1、EC2、Pyrene、Fluoranthene、Benz[a]anthracene、Chrysene、Benzo[b]fluoranthene、Benzo[k]fluoranthene、Benzo[a]pyrene、Benzo[g,h,i]perylene、Indeno[1,2,3-c,d]pyrene、Dibenz[a,h]anthracene、Endotoxin、β-glucanが加熱によって減少していた。これらの熱易変性成分が、抗原提示細胞を活性化させ、アレルギー疾患の悪化に寄与する可能性が考えられた。

実環境中PM_{2.5}による抗原提示細胞の活性化機構とその影響候補成分

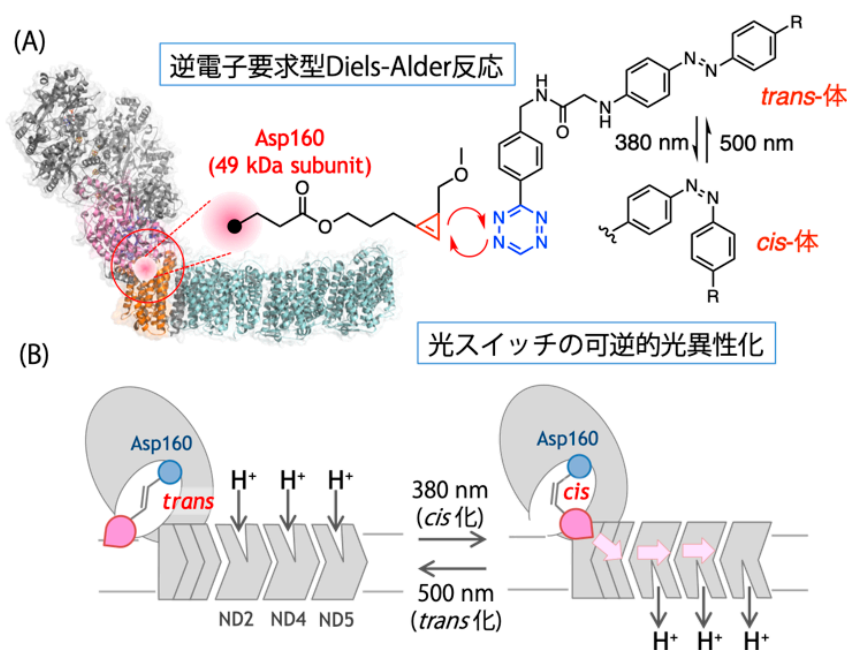


【目的】ミトコンドリア NADH-ユビキノン酸化還元酵素（呼吸鎖複合体-I）は、呼吸基質の酸化還元を駆動力とするプロトンポンプであり、エネルギー代謝（ATP 合成）に必須のプロトン電気化学的ポテンシャルを形成する。本研究では、ウシ心筋ミトコンドリアを生物材料として、光スイッチ分子を複合体-I のキノン結合ポケットに導入し、光照射によってプロトン輸送活性を誘導し、複合体-I を“酸化還元駆動型”から“光駆動型”のプロトンポンプに機能変換することを目指した。複合体-I を光駆動型プロトンポンプに機能変換することができれば、本酵素の作動メカニズムの解明に向けた全く新しい方法論を提示できるだけでなく、ミトコンドリアや細胞レベルのエネルギー代謝を光で制御することが可能な新技術の開発に繋がり、生化学分野におけるその意義と将来的な波及効果は極めて大きい。

【方法】複合体-I のプロトン輸送のメカニズムについては、『キノンの還元反応によってキノン結合ポケット内に構造変化が生じ、これが駆動力となって膜ドメインに伝搬してプロトンが輸送される』と考えられており（下図 B）、キノン結合ポケット最深部に位置する 49 kDa サブユニットの Asp160（49 kDa・Asp160）の動きが、膜ドメインでのプロトン輸送のトリガーとなる構造変化に重要な寄与をしている。我々は、複合体-I 阻害剤をモチーフとした合成リガンド分子を活用して、49 kDa・Asp160 にピンポイントでアゾベンゼンのような光スイッチ分子を導入することで、キノン結合ポケットの構造変化を光照射で可逆的に発生させ、プロトン輸送活性を誘導することを目指した。

【結果】“トシル化学法”と呼ばれるタンパク質化学修飾法を利用して、キノン結合ポケットを構成する 49 kDa・Asp160 に対してピンポイントでシクロプロペン化し、これを足場としてテトラジンを有する 2 次タグ分子を導入する方法論を確立した。現在、図に示した光スイッチ部分の合成を行なっている段階であり、残念ながら、研究期間内に合成を完了させられなかったが、1 日も早く光スイッチによる複合体-I の光制御を実現したい。

複合体-I の化学修飾 (A) と光操作 (B) の模式図



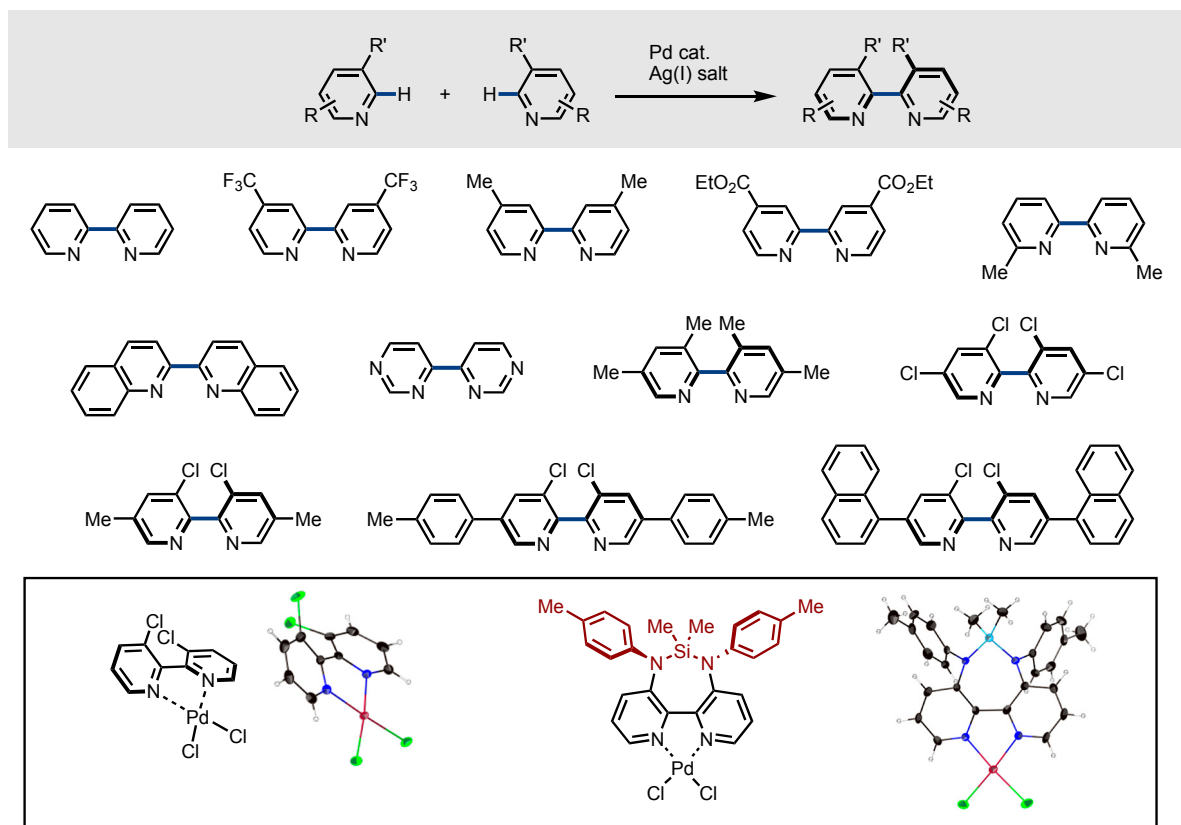
【目的】アミノ基を有する芳香環は様々な生物活性を持ち、医学や薬学の分野において重要な役割を果たしている。実際、2012年に処方された薬のトップ100のおよそ10%が芳香族アミン部位を有している。その重要性からアミノ基の導入法（アミノ化反応）は数多く研究されている。これまで汎用されてきた有機ハロゲン化物とアミンのクロスカップリングにかわる次世代アミノ化反応として、炭素-水素（C-H）結合のアミノ化反応に近年注目が集まっている。これまで銅塩とビピリジン配位子を用いるアミノ化反応を報告しているが、適用範囲に制限があった。本研究では、第二世代のアミノ化として、より一般性と適用性の高い反応の開発を目指して研究を行った。

【方法と結果】本研究では触媒配位子として有用なビピリジンに着目して、その新規合成法の開発を行った。特に重点的に行ったパラジウム触媒を用いるビピリジン合成について述べる。

ビピリジン配位子の新規合成法の開発

新しいビピリジン配位子の開発を目指して、その合成法の検討を行った。具体的にはピリジンの酸化的二量化反応の検討である。パラジウムを触媒として、銀(I)塩酸化剤存在下、ピリジンに対して反応を行うと種々のビピリジンが良好な収率で得られた。最適条件を用いて、適用範囲について検討を行ったところ、トリフルオロメチル基のような電子求引基やメチル基のような電子供与基を有する基質も問題なく反応した。さらにエステルを有する基質もそれを損なうことなく反応が進行した。同様の反応条件を用いることによって、低収率ではあるが、2位にメチル基を有する基質も二量化し、対応するビピリジンになった。その他、ピキノリンやビピリミジンなども合成可能である。興味深いことに、3位に置換基をもつ萘高いピリジンも反応し、従来合成が困難であった様々なビピリジンを一工程で合成することが可能になった。得られたビピリジンは配位子として働き、金属に配位する。例えば、合成したビピリジンが配位した塩化パラジウムを単離し、その構造をX線結晶構造解析にて明らかにした。

芳香族イミド化配位子の新規合成法

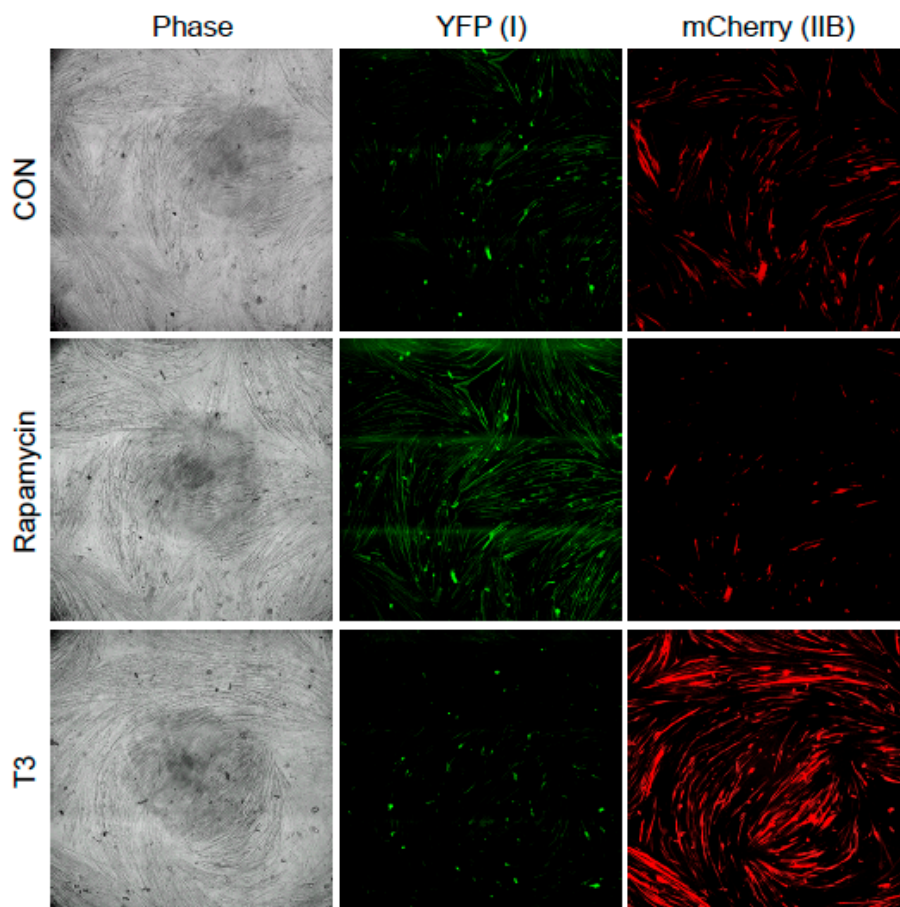


【目的】骨格筋は肥大・萎縮をする可塑性を有すると共に、筋線維タイプ（遅筋・速筋）および代謝変換（酸化系・解糖系）能を有し、それらは関連する可能性が考えられる。ところが筋線維タイプ変換の詳細なメカニズムは未解明な部分が多く、さらに筋線維タイプと骨格筋の可塑性との関連についても全く不明であった。本研究では、全ての筋線維タイプを蛍光蛋白で識別することができる MusColor マウス由来筋細胞を用いて、筋線維タイプ変換を引き起こす生体内物質・薬剤等を網羅的に探索・同定する事を目的とした。また同定した因子がどのように筋代謝変換を誘導するかを明らかにし、さらに同定した因子を用いて加齢や不活動による筋萎縮を抑制できるか否かを検討した。

【方法】MusColor マウス由来筋管細胞に対し生体内因子或いは薬剤を添加し、その後 MyHC-I-YFP（遅筋線維）、II B-mCherry（速筋線維）の発現を蛍光顕微鏡下で測定した。YFP 或は mCherry を誘導する物質の網羅的スクリーニングを行い、筋線維タイプ変化を誘導する因子・薬剤を探索した。また筋線維タイプ変換が代謝機能を伴う変換か否かを *in vitro* で検討する為、候補因子で処理した筋管を、細胞外フラックスアナライザーXFp を用いてミトコンドリア活性、或は解糖能を検討した。さらに筋線維タイプ変換誘導因子を加齢マウスに投与した。

【結果】*In vitro* で遅筋線維、或は速筋線維を誘導する因子を複数同定した。筋線維タイプ変換誘導因子は筋代謝も変化させる事が明らかと成った。さらに遅筋化が進行する老齢マウスに対して速筋誘導因子を投与した結果、筋萎縮の予防・運動機能および筋代謝機能改善を認め、速筋誘導因子は加齢性筋萎縮を予防・改善効果がある可能性が示唆された。

速筋誘導因子 T3 および遅筋誘導因子 Rapamycin による筋線維タイプ変化

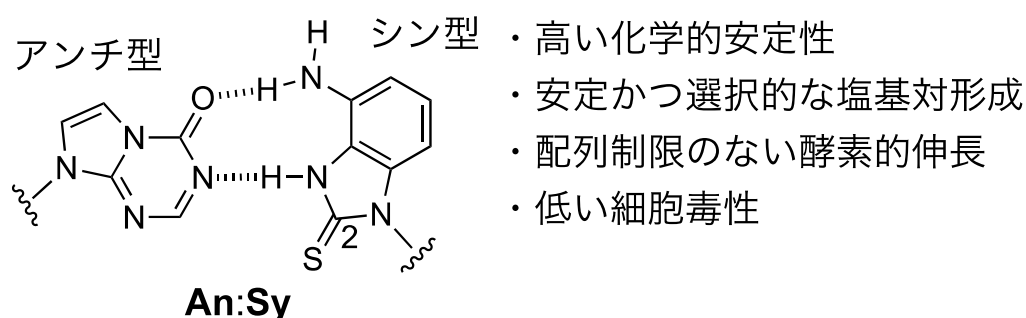


【目的】天然の A : T 及び G : C 核酸塩基対は選択的かつ強固に形成されることから、遺伝情報の保存と伝達に大きな役割を果たしている。もしこれらに加えて第 3 の塩基対を DNA 中に導入することができれば、合成生物学や核酸医薬品の素材としても非常に有用である。しかし、既存の非天然塩基対には化学的安定性や酵素認識能、安全性に問題点が存在し、実用化へのハードルは未だ高いのが現状である。本研究では核酸塩基のアンチ・シン配向性に着目した新規非天然塩基対 **An : Sy** の開発研究を行った (図)。

【方法】**An** および **Sy** を塩基部にもつアミダイトブロックを化学合成し、DNA 合成機によるオリゴヌクレオチドへの導入を計画した。また、**An : Sy** 塩基対の安定性については、二重鎖 DNA の融解温度 (T_m 値) 測定によって評価することとした。また、得られた結果を基に量子化学計算を実施し、化合物設計へフィードバックすることで構造の最適化を行うこととした。

【結果】当初予定していた合成スキームから若干の変更はあったものの、計画通り **An** および **Sy** アミダイトの合成を完了し、DNA 自動合成機を用いてオリゴヌクレオチド中に導入することに成功した。続いて、融解温度 (T_m 値) 測定により **An : Sy** 塩基対の安定性を評価した結果、**An : Sy** 塩基対は一定の安定性を示すものの、天然の A : T 塩基対と比較すると熱的に不安定であることが明らかとなった。また、その選択性にも一部不十分な点が見られた。これらの原因を考察するべく量子化学計算を実施したところ、**Sy** 塩基の異性化の関与が示唆された。現在、これらの欠点を解決できる誘導体の合成を行なっている。

本研究で設計した非天然塩基対 **An : Sy** の構造と期待される特性



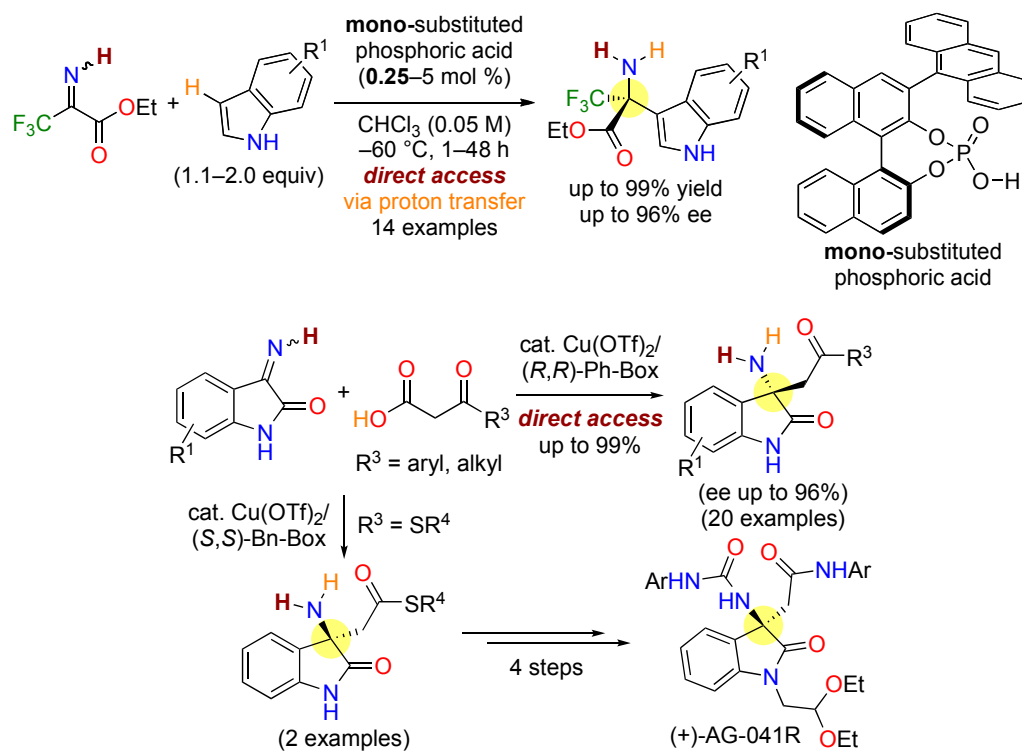
【目的】医薬品や生物活性物質合成に多用される非天然アミノ酸類の新規合成手法の開発は、より高活性な誘導体を合成可能とすることから、医薬化学上重要な研究テーマの1つである。しかし、従来の合成法では、目的物を得るために不要な副生成物を大量に生じる手法が利用されており、環境調和性や合成効率に改善の余地を残していた。

そこで本研究では、医薬品合成において重要な非天然アミノ酸類を効率的に合成可能とする新たな手法の開発を目指した。特に、生物活性向上において重要なトリフルオロメチル基や不斉四置換炭素を有する α -および β -非天然アミノ酸類を合成目標とし、その難易度の高さからこれまで利用されてこなかった無保護のケチミンを用いる新しい触媒的不斉炭素-炭素結合形成反応の創出によりそれらの実現を目指した。

【方法】本研究を実施するにあたり、無保護のケチミンを求電子剤として立体選択的な反応に利用した例は非常に限られており、未開拓の状態であった。そこで、無保護のケチミンを求電子剤とする反応について、種々の求核剤を用いてそれぞれの反応に適切な触媒の探索を行った。反応条件の最適化後、基質一般性の検討および生物活性物質の短工程合成への応用を行った。

【結果】種々条件検討の結果、 α -および β -四置換非天然無保護アミノ酸類それぞれについて、新規直接合成法を見出した。まず、 α -四置換非天然無保護アミノ酸類合成については3位モノ置換の新規 BINOL リン酸触媒存在下で直接的触媒的不斉 Friedel-Crafts 型反応が円滑に進行した。また、 β -四置換非天然無保護アミノ酸類合成については、直接的触媒的不斉脱炭酸 Mannich 型反応がキラル銅触媒存在下で円滑に進行した。いずれの反応についても、種々の基質について目的の生成物を高い収率およびエナンチオ選択性で与え、生物活性物質の短工程合成への応用にも成功した。以上の研究結果は、無保護のケチミンを活用した今後の類似の反応開発において、有用な研究の指針となりうる重要な成果である。

α -および β -四置換非天然アミノ酸類の環境調和型新規合成手法

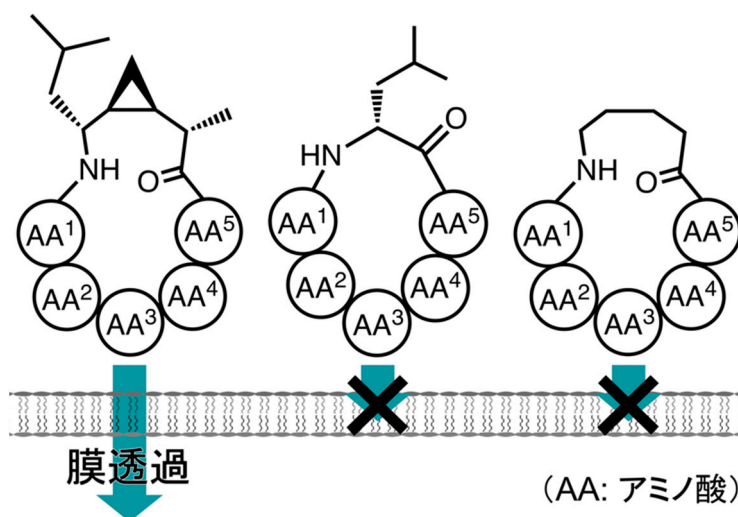


【目的】タンパク質間相互作用は、生体の恒常性維持において重要な様々な役割を担う。この相互作用を制御できる分子は、生物医学研究のツールや新たな医薬シーズとなりうる。実際に、特定のタンパク質間相互作用を阻害するバイオ医薬（例：抗体）が臨床応用され、その治療効果は高い。しかし、高い生産コスト、高分子量（>10,000）による免疫毒性、また、標的が細胞膜表面に限定的といった課題もある。これらバイオ医薬を補完しうる、より低コストで細胞内のタンパク質間相互作用も標的可能な合成小～中分子が求められている。タンパク質間相互作用の制御分子として、相互作用面の hot-spot を形成するアミノ酸残基や配列を模倣し、多点間分子認識を可能とする機能性オリゴペプチド（およびその等価体）は有効であると考えられる。そこで本研究では、細胞内タンパク質間相互作用を標的可能な機能性オリゴペプチドの創出を目指した。

【方法】シクロプロパンの構造特性によって立体化学依存的にその配座が厳密に制御される光学活性シクロプロパン δ -アミノ酸が、ペプチド分子全体の配座制御素子として利用できると考えた。特定の立体化学を有したこのアミノ酸誘導体を導入した環状ペプチドやオリゴペプチドを設計・合成し、その三次元構造を NMR や X 線回折を用いて解析した。また、合成した各種環状ペプチドの膜透過性を評価した。

【結果】まず、光学活性なシクロプロパン δ -アミノ酸モノマーを立体選択的に合成する経路を確立した。合成した δ -アミノ酸モノマーを導入した各種環状ペプチドや、オリゴ化した分子の合成に成功した。合成した環状ペプチドの膜透過性を評価した結果、アミノ酸配列ではなく、導入した δ -アミノ酸の立体化学に依存して膜透過性が大きく変化することが分かった。特に、*cis*-folded 構造に配座が制御された δ -アミノ酸を含む環状ペプチドの膜透過性が、親ペプチドと比較して飛躍的に向上した。また、オリゴマー化した分子の三次元構造を NMR など解析した結果、分子設計で期待した通り、ヘリックス構造をとっていることが分かった。

シクロプロパン導入による環状ペプチドの膜透過性の向上

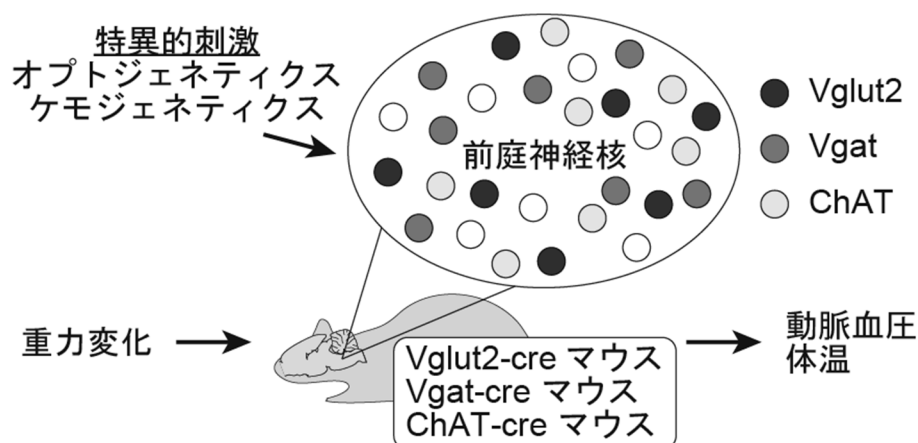


【目的】前庭系は特殊感覚のひとつである平衡感覚に必要なシステムである。末梢から中枢に送られた情報に応じて、眼球運動（前庭－動眼反射）や骨格筋運動（前庭－脊髄反射）の制御量が決まり、適切な姿勢維持や歩行移動を行うことができる。我々はこれまで、これらの反射に加え、前庭系が自律神経応答のひとつである動脈血圧調節に重要な役割を担っていることを報告してきた（前庭－動脈血圧反射）。また、重力環境の変化によって前庭－動脈血圧反射のゲインが低下することがわかってきた。しかしながら、この可塑のメカニズムは不明である。本研究では、橋・延髄領域の前庭神経核を対象に、自律神経応答（体温調節）に重要なニューロン群の同定とその可塑のメカニズムを明らかにすることを目的とする。

【方法】末梢前庭器からの情報は、前庭神経を介して橋・延髄領域の前庭神経核に投射される。前庭神経核には、少なくともグルタミン酸作動性ニューロン、GABA 作動性ニューロンとコリン作動性ニューロンが存在する。これらのニューロンが姿勢制御や自律神経応答に関与しているかどうかを調べるために、Vglut2-cre マウス、Vgat-cre マウスとChAT-cre マウスを用い、ウイルスベクターにて片側前庭神経核のグルタミン酸作動性ニューロン、GABA 作動性ニューロンとコリン作動性ニューロンに光受容体（ChR2）および化学受容体（hM3Dq）を発現させた。光もしくは化学刺激時の姿勢はハイスピードカメラにより、自律神経応答は深部体温測定により定量的評価を行った。

【結果】光刺激を行うと、Vglut2-cre マウスは刺激同側に、Vgat-cre マウスは反対側に身体が傾斜した。一方、ChAT-cre マウスでは光刺激の影響がみられなかった。このことから、前庭神経核のグルタミン酸作動性ニューロンと GABA 作動性ニューロンが姿勢制御に関与していることがわかった。また、Clozapine-N-Oxide (CNO) による化学刺激により、Vglut2-cre マウスでは体温の低下がみられた。一方、Vgat-cre マウスでは体温の変化がみられなかった。また、サーモグラフィーによる撮影では、グルタミン酸作動性ニューロンの興奮により褐色脂肪細胞相当部の温度が低下した。さらに、ウイルスベクターにて前庭神経核のグルタミン酸作動性ニューロンを特異的に除去し過重力刺激を与えると、体温低下が有意に抑えられた。これらの結果から、過重力曝露による体温の低下には前庭神経核のグルタミン酸作動性ニューロンが関与していることがわかった。

前庭系可塑に関わるニューロンの探索



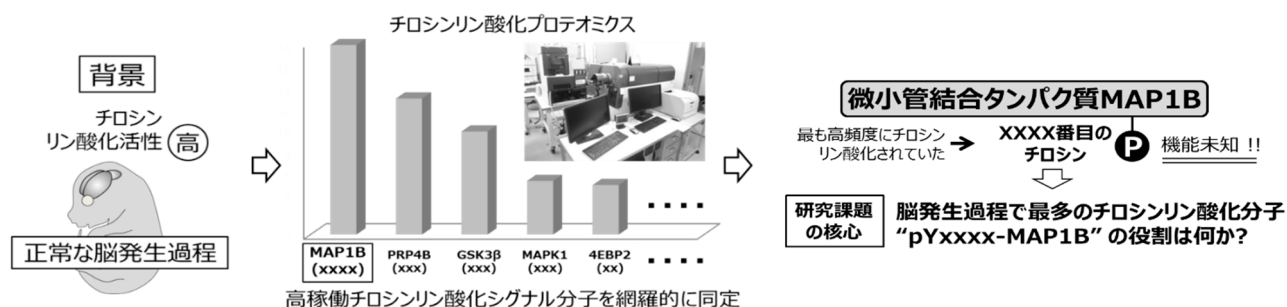
【目的】我々は準備実験でマウス脳の発生過程におけるリン酸化プロテオミクスを行い、微小管タンパク質 (MAPs) の MAP1B の 4 箇所 (Yxxxx) のチロシンが高頻度にリン酸化されていることを確認した。中でもリン酸化された Yxxxx は胎仔全脳のリン酸化チロシンの中で最も存在量が多く、胎生期 15 日目でピークを迎えていたことから、pYxxxx-MAP1B は脳の発生過程で重要な存在である可能性が高い。チロシンのリン酸化は細胞の発生・増殖・分化といった生命活動の厳密な制御に関わるが、タンパク質配列やリン酸化部位データベースの UniProt、Phospho SitePlus に pYxxxx の機能報告は一切無い。そこで本研究課題では、Yxxxx を中心に pY-MAP1B の神経発生における役割を調べる。

【方法】本研究では、発生過程の脳で発見した pYxxxx-MAP1B の細胞内における役割を *in vitro* で調べるため、マウス大脳皮質由来の初代培養神経細胞を用いて、下記の検討を行った。

1. pYxxxx-MAP1B に特異的な抗体を外注で作製し、細胞内分布とその経時的な変化を確認した。2. 上記特異抗体とチロシン化チューブリン、アセチル化チューブリン、F-アクチンに対する抗体を用いてこれらの細胞内分布を確認した。また、微小管先端マーカー EB3 (N 末 GFP タグ付) を過剰発現させて、神経成長円錐のフィロポディアにおける pYxxxx-MAP1B とチロシン化チューブリン、GFP-EB3 の分布を確認し、定量解析を行った。3. pYxxxx-MAP1B の細胞内機能を調べるために、リン酸化部位の野生型、擬似非リン酸化 (Tyr→Phe)、擬似リン酸化 (Tyr→Glu) を初代培養神経細胞に過剰発現させ、成長円錐の形態解析を行った。

【結果】上記の検討 1~3 を行った結果、1. pYxxxx-MAP1B は神経細胞の軸索先端に形成される成長円錐のフィロポディアに濃縮され、日数を経るごとに強く濃縮された。2. pYxxxx-MAP1B は成長円錐内において、フィロポディアに強く染まり、微小管よりもアクチン繊維との共局在を示した。3. リン酸化変異体の過剰発現は成長円錐の形態形成に影響を与え、非リン酸化変異体の過剰発現は、一般的な扇形の成長円錐を減少させ、そのサイズも小さくなった。対照的に、擬似リン酸化の過剰発現は成長円錐のサイズを増大させるが、フィロポディアが長く、ラメリポディアが多い成長円錐が多い、異常な構造を持つ成長円錐が出現した。

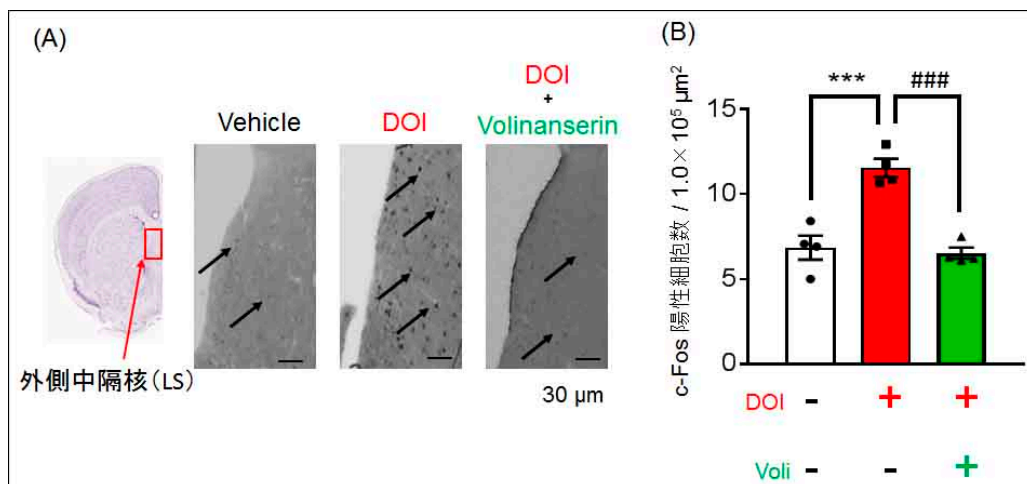
MAP1B は脳発生過程で最も高頻度にチロシンリン酸化される



【目的】うつ病患者の 20～30%は治療抵抗性（難治性）とされている。解離性麻酔薬ケタミンが難治性うつ病に対して即効性と持続性を兼ね備えた抗うつ作用を示すことが報告され、米国では既に臨床で使われ始めている。しかし、ケタミンには精神病様症状を引き起こすなどの副作用が問題視されており、ケタミンの使用は制限されている。最近、幻覚薬として古くから用いられているセロトニン 5-HT_{2A}受容体刺激薬の **psilocybin** にも難治性うつ病に対して即効性と持続性を兼ね備えた抗うつ作用を示すことが報告された。しかし、セロトニン 5-HT_{2A}受容体刺激による抗うつ作用発現の分子機構は分かっていない。そこで、本研究ではセロトニン 5-HT_{2A}刺激による抗うつ作用発現のメカニズムを解明することを目的とした。

【方法】6～8 週齢の雄性 C57BL/6 マウスを用いて、うつ様・不安様行動を調べるために行動薬理的解析を行った。うつ病モデルマウス作製のためにコルチコステロン長期曝露を行った。神経活性マーカー **c-Fos** 発現を調べるために、免疫組織化学染色を行った。セロトニン 5-HT_{2A}受容体刺激薬として DOI を、セロトニン 5-HT_{2A}受容体遮断薬として **volinanserin** を用いた。

【結果】マウスに DOI を腹腔内投与し、24 時間後にうつ様行動を調べるために強制水泳試験を行ったところ無動時間の短縮が認められた。その作用は **volinanserin** の前処置により抑制された。次にセロトニン 5-HT_{2A}受容体刺激を介する抗うつ作用に関わる脳部位を明らかにするために、神経活性のマーカーである **c-Fos** タンパクの発現を観察したところ、ストレス感受性などに関わる外側中隔核の **c-Fos** 発現増加が認められたが、その変化は **volinanserin** の前処置により消失した。さらにコルチコステロン慢性曝露によるうつ病モデルマウスで認められる強制水泳試験における無動時間の延長は、DOI の急性処置によりコントロールレベルにまで短縮した。以上から、セロトニン 5-HT_{2A}受容体刺激による抗うつ作用は、外側中隔核の神経活性化を介して発現している可能性がある。

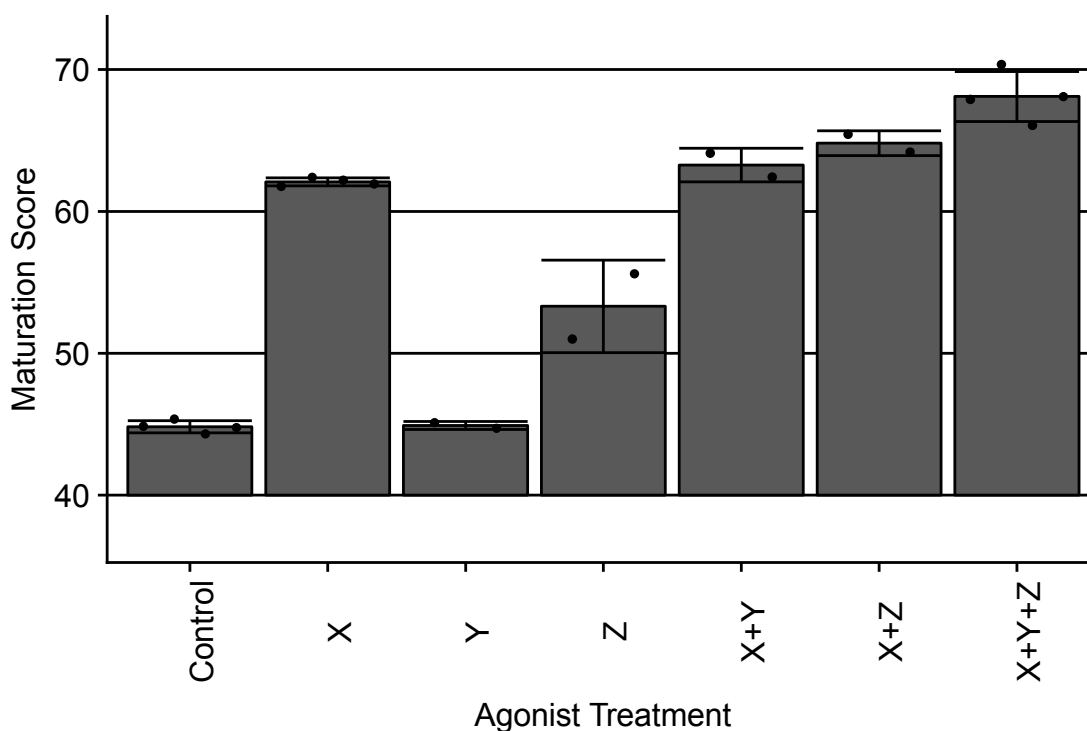
DOI 処置後、強制水泳ストレスによる外側中隔核の **c-Fos** 発現

【目的】この10年ほどで胚性幹（ES）細胞や人工多能性幹（iPS）細胞などの多能性幹細胞（PSCs）から心筋細胞を効率よく誘導する手法が開発され、患者由来のヒト iPS 細胞を用いた心臓疾患研究が現実のものとなりつつある。しかしながら、このような PSCs から試験管内で作製される心筋細胞（PSC-CMs）は未成熟であり、胎生期相当より試験管内では成熟しないことが明らかになってきた（Uosaki, Cell Rep, 2015）。そのため、成人になってから発症する心臓疾患の試験管内での疾患研究は未だ困難であると言える。我々は PSC-CMs を新生仔の心臓内に移植することで、成体相当まで成熟可能であることを示した（Cho, Cell Rep, 2017）。この結果から、PSC-CMs の内在的な転写プログラムが破綻しているのではなく、心臓組織にある細胞外微小環境やホルモンなどの液性因子といった外因性のシグナルの欠如が試験管内で PSC-CMs が成熟しない原因であると考えられた。そこで、本研究では新しい心筋細胞成熟レポーターと定量的成熟度評価系を用いて外因性シグナル、特に核内受容体アゴニストおよび細胞外マトリックスについて PSC-CMs に対する成熟促進効果について評価を行った。

【方法】我々はこれまでの研究で、アゴニスト既知の核内受容体 20 種類が心筋細胞成熟過程で活性化している可能性を見出した。また、心筋細胞が成熟する時期特異的に発現する細胞外マトリックスを同定した。そこで本研究では、これら核内受容体アゴニストおよび細胞外マトリックスが実際に心筋細胞の成熟を促進するかを検証した。検証には、トランスクリプトームにより心筋細胞の成熟度を定量的に評価する手法を用いた。

【結果】核内受容体アゴニスト X、Y、Z（知財上の観点からアゴニスト名は未公表）の組み合わせにより心筋細胞の成熟を促進することを見出した。一方、細胞外マトリックスではレポーター発現の増加や細胞形態の変化は認められたものの、トランスクリプトームとして評価できる成熟は見られなかった。

核内受容体アゴニスト処理による心筋細胞の成熟

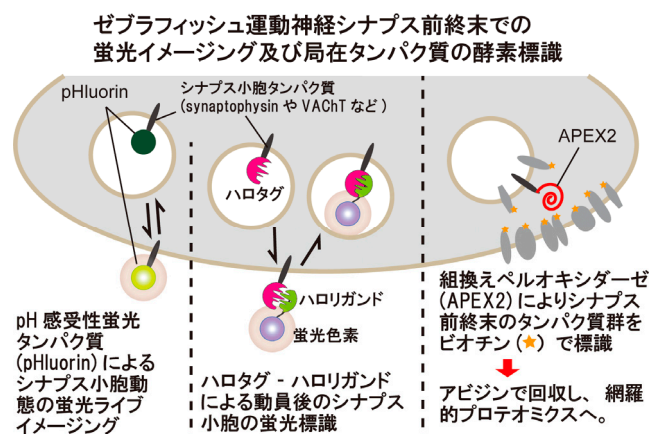


【目的】シナプス伝達には、通常の活動電位依存的な誘発性伝達とは別に、自発性伝達と呼ばれ、神経細胞の発火とは無関係に生じる応答も存在する。近年、自発性伝達が神経回路の形成や維持に重要な役割を果たしていることが分かっているが、その独自の分子機構にはいまだ不明な点が多い。本研究では、神経筋接合部において自発性伝達を選択的に欠損する完全麻痺ゼブラフィッシュをモデルとして、自発性伝達を特異的に制御する分子実体を同定することを目指す。そのために、ゼブラフィッシュの運動神経終末からの伝達物質放出を直接かつ簡便に計測する手法を確立することを第一に行う。さらに、完全麻痺を示す変異体ゼブラフィッシュを解析対象として、自発性シナプス伝達の欠損に関わる分子群の同定を目指す。そのために本研究課題では、酵素反応によるタンパク質標識技術を利用して、プレシナプスに局限した網羅的プロテオーム解析を目指し、必要となるトランスジェニック (Tg) ゼブラフィッシュを作製する。

【方法】1. 蛍光イメージングによるシナプス伝達の評価系の確立：神経筋接合部の小胞動態を解析する実験系として、蛍光イメージングによって直接的にシナプス小胞の開口放出を可視化する系を確立する。そのために pH に感受性をもつ蛍光タンパク質 (pHluorin) とハロタグと呼ばれるタンパク質をシナプス小胞分子に融合することで、それぞれシナプス小胞内部に局在化するようにした Tg 動物を作製する。pHluorin は小胞動態のライブ観察を可能にし、ハロタグはスナップショットながら高感度の観察を可能にする (下図)。2. 神経筋接合部でプロテオミクスを行うための Tg フィッシュの作製：最近、特定のタンパク質に組換えペルオキシダーゼ (APEX2 など) を融合して発現させ、酵素と基質の反応を利用して、そのタンパク質のごく近傍にある他のタンパク質を選択的に標識する技術が細胞内で実用化された。これにより、あるタンパク質と相互作用するタンパク質群や、特定のオルガネラに存在するタンパク質群に的を絞ってプロテオミクスが可能となっている。本研究では運動ニューロンのシナプス終末に局在する小胞型アセチルコリン輸送体 (VAcHT) などを選択的に APEX2 との融合タンパク質を発現するような Tg フィッシュを作製する (下図)。

【結果】シナプス小胞の動態をイメージングする分子プローブとして、小胞型 GABA 輸送体 (VGAT) の C 末端に pHluorin とハロタグをタンデムに融合したタンパク質が有用であることを確認し、このタンパク質とレポーター蛍光タンパク質を運動ニューロン特異的に発現する Tg フィッシュの作製に成功した。この Tg フィッシュの pHluorin の蛍光ライブイメージングを行うことで、ゼブラフィッシュ神経筋接合部でのエンドサイトーシスのキネティクスを初めて解析することに成功した。またハロリガンド化した蛍光色素によるシナプス小胞のラベリング実験を行うことで、自発的放出に動員されるシナプス小胞は脱分極刺激によって放出される全シナプス小胞の 10~15%に限られていることが明らかになった。

また、APEX2 を VAcHT の C 末端に融合したタンパク質を運動ニューロン特異的に発現する Tg フィッシュの作製にも成功した。この Tg フィッシュにおいて、APEX2 の酵素活性を利用して近傍タンパク質のビオチン化を行い、蛍光標識したストレプトアビジンによって検出したところ、神経筋接合部が特異的にラベルされることが確認できた。

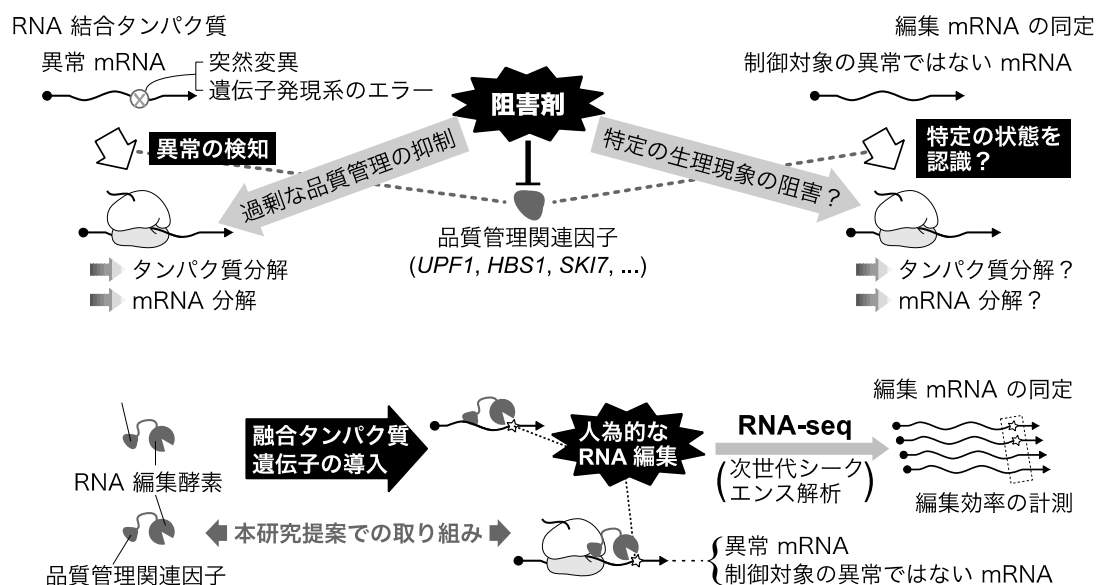


【目的】ヒトの遺伝的疾患の約3割は終止コドンに関連した変異に起因する。このような遺伝的疾患は症例が少なく治療の研究も進展しにくいなか、終止コドンの認識機構や品質管理機構を創薬のターゲットにすることによって、多数の遺伝的疾患を包括的に治療しようとする研究が模索されている。一方で、mRNA 品質管理機構に関連した因子は異常な mRNA の検出、分解とは異なった細胞の生理機能に対しても一定の役割を果たしていると考えられている。しかし、品質管理機構の異常ではない mRNA への作用は未だ十分に解明されておらず、遺伝的疾患を治療するための品質管理機構の阻害がどのような副作用をどの程度引き起こし得るのか評価することも難しい。本研究課題では、異常ではない mRNA に対し mRNA 品質管理機構の役割を明らかにすることを目指して、mRNA の品質管理機構に関わるタンパク質因子がどの（正常な）mRNA に作用しているのか同定することを目的とする。

【方法】間接的にかつ過的な mRNA-タンパク質因子間の相互作用を効率よくかつ網羅的に検出することを目指して、デアミナーゼによりアデニンがイノシンに、シトシンがウラシルに変換される mRNA 塩基配列の編集機構を応用した新規解析方法の開発に取り組んだ。具体的には、mRNA に結合するタンパク質をデアミナーゼと融合させて出芽酵母細胞に導入した後、細胞から全 RNA を抽出した。次世代シーケンサーを用いたアンプリコン解析によって、cDNA 中の RNA 編集による塩基置換を検出した。

【結果】本研究では、新規方法の第一段階として、細胞内の mRNA-タンパク質間の直接的な相互作用を RNA 編集と次世代シーケンサーを用いた配列解析により解析する方法の開発に成功した。本法により、mRNA あたり約 10% の塩基置換を検出できた。また、本法ではアデニン残基の次のシトシン残基が効率よく RNA 編集されることが判明した。

本研究の目的と方法の概要

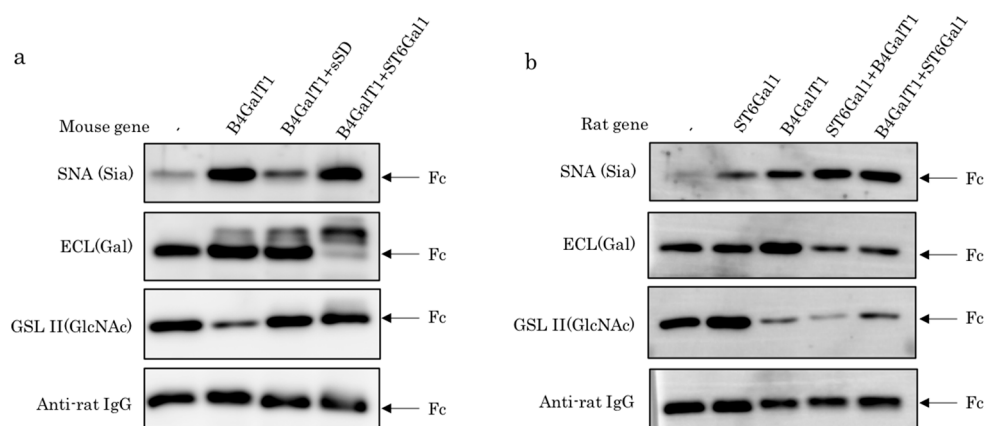


【目的】抗体は特異的な抗原と結合し、さまざまな免疫応答反応を発現するが、このような抗体の機能を利用し、近年、抗体治療が盛んに行われている。一方、IgG は Fc 領域に N 型糖鎖結合部位を一箇所持ち、多様な糖鎖構造が形成される。その中でも末端シアル酸が抗体機能を調節することがわかってきた。我々は、関節リウマチ (RA) において、シアル酸が欠損した抗原特異的抗体は細胞傷害能や炎症誘導能の亢進により癌細胞などへのより効果的な抑制作用が誘導され、逆にシアル酸が付加した抗体では、自己免疫疾患における抗炎症反応を誘導されることを示唆する結果を報告した。しかし、現在、抗体治療に用いられている抗体は糖鎖構造を厳密に制御できていない。そこで、本研究では抗原特異的 IgG 上の糖鎖 (主にシアル酸) 構造を正確にリモデリングする技術を開発し、さらに、この技術を使って、RA の自己抗体あるいは癌抗原に対する抗体の抗体薬としての効果を検討する。

【方法】マウス、ラットまたはヒト *ST6GalI* 遺伝子、*B4GalT1* 遺伝子の発現ベクター、さらには、*sialidase* 遺伝子発現ベクターを作製し、マウスハイブリドーマ、ラットハイブリドーマまたはヒトミエローマ細胞にレトロウイルスを用いて遺伝子導入した。それぞれの遺伝子の発現を、*GFP* 遺伝子と *Ds-Red* 遺伝子の蛍光強度で確認し、高発現細胞をセルソーターにて sorting し、蛍光遺伝子発現細胞数が 95%以上の細胞を得た。これらの細胞から精製した IgG の糖鎖構造を lectin blot にて検討した。

【結果】ラットハイブリドーマ細胞へ遺伝子導入して得られた IgG では、部分的にはシアル酸まで伸長できるが、GlcNAc または Gal までしか伸長していない糖鎖構造の IgG が多く生成された。また、ヒトミエローマ細胞へ遺伝子導入して得られた IgG では、GlcNAc または Gal までしか伸長していない糖鎖構造の IgG が、より顕著に生成された。それぞれの species に合わせて、rat または human *ST6GalI* 遺伝子と rat または human *B4GalT1* 遺伝子を導入し、導入細胞から産生される IgG の糖鎖構造を検討した。その結果、ラット由来 IgG において、mouse 遺伝子を導入した IgG と比べ、rat 遺伝子を導入した方がシアル酸までの伸長が見られた。また、ヒト由来 IgG においても mouse 遺伝子を導入した IgG と比べ、human 遺伝子を導入した方がシアル酸までの伸長が見られた。しかし、ヒト由来 IgG においては、未だ Gal や GlcNAc が末端にある IgG が多く存在し、完全なシアル酸の伸長が認められなかった。また、*sialidase* 遺伝子を導入すると、*B4GalT1* 遺伝子のみ導入した細胞が産生した IgG に比べ、シアル酸の除去が認められたが、遺伝子を全く導入していないコントロール細胞から産生された IgG と同程度のシアル酸が付加していることがわかった。

ラットハイブリドーマ細胞が産生する IgG 上の糖鎖構造

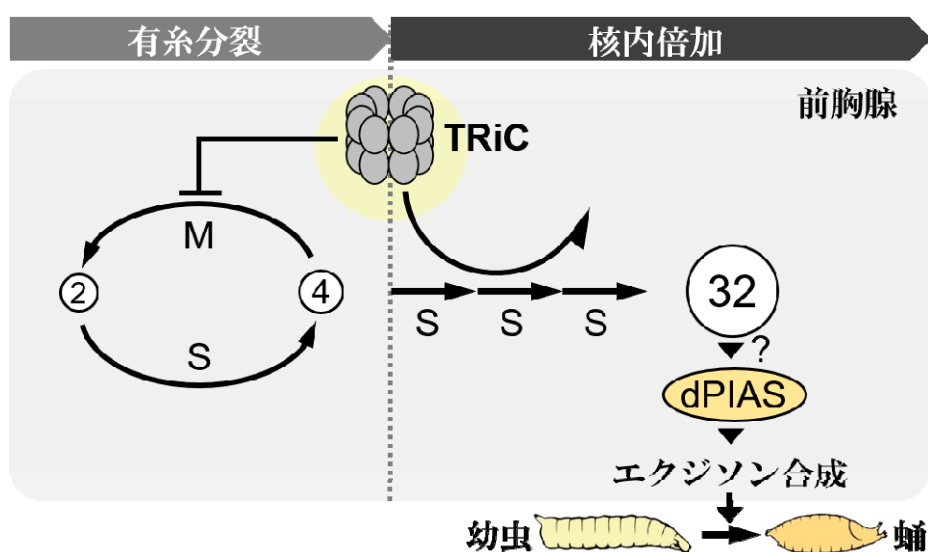


【目的】多細胞生物の身体がつくり上げられる過程において、一部の細胞は有糸分裂による増殖を停止し、核内倍加と呼ばれる細胞周期を開始し成長・肥大する。核内倍加は分裂期を伴わずゲノム DNA コピー数と細胞サイズを増加させる細胞周期であるが、有糸分裂から核内倍加への切り替えがどのような分子機構で達成されているのかは解明されておらず、核内倍加が進行することによって惹起される下流シグナル伝達経路も同定されていない。そこで本研究では、ショウジョウバエ内分泌組織である前胸腺を対象に、これらの疑問点に迫るべく遺伝学的解析を行った。前胸腺における核内倍加の進行はエクジソンと呼ばれるステロイドホルモンの産生に必須であり、前胸腺から分泌されたエクジソンは幼虫から蛹への変態を誘発する。前胸腺において、「有糸分裂化から核内倍加への切り替え」または「核内倍加の下流経路」を制御する因子を阻害した場合、その個体はエクジソン産生が活性化しないことが原因で幼虫期において致死となり、それぞれの前胸腺は「細胞数の増加」および「正常な DNA 量」を示すはずである。本研究ではこの判断基準をもとに前胸腺選択的な RNAi スクリーニングを行うとともに、選抜した因子の機能解析を行った。

【方法】前胸腺選択的に任意の遺伝子をノックダウンするために Gal4/UAS システムを用いた。前胸腺細胞の観察には免疫染色法を用い、遺伝子発現量を測定するために定量 RT-PCR を行った。

【結果】701 遺伝子を対象とした RNAi スクリーニングにおいて、コントロール個体の前胸腺と比較して有意に前胸腺の DNA 量が低下しない 74 遺伝子が選抜された。この遺伝子群のうち、*dPIAS* (*Drosophila Protein Inhibitor of Activated STAT*) に着目し機能解析を行い、*dPIAS* ノックダウン個体はエクジソン合成酵素の一つである *neverland* (*nvd*) の発現が低下することにより幼虫で発生を停止することを見出した。この結果は、*dPIAS* は *nvd* の発現制御を介してエクジソン産生を制御することを示している。さらに、RNAi スクリーニングではノックダウンにより前胸腺細胞数が増加する 44 遺伝子が見出され、この遺伝子群に TRiC (TCP-1 Ring Complex) と呼ばれるタンパク質複合体のサブユニットが有意にエンリッチしていたことから、TRiC が核内倍加の開始を制御する可能性を検証した。その結果、TRiC を阻害した前胸腺では細胞数が有意に増加し、有糸分裂を駆動する因子・サイクリンの抑制因子である *Fzr* の核内局在が低下していたことから、TRiC は *Fzr* の制御を介して有糸分裂から核内倍加への切り替えを促進することが示唆された。以上、本研究ではショウジョウバエ内分泌組織である前胸腺を活用し、核内倍加の開始および下流経路を司る分子機構を明らかにする基盤を構築した。

核内倍加の開始制御機構および下流シグナル伝達経路のモデル



【目的】妊娠高血圧症候群（hypertensive disorders of pregnancy : HDP）は、妊娠 20 週以降の高血圧を主徴とする疾患であり、発症頻度は全妊婦の約 10%にもおよぶ。HDP の病因としては、胎盤を構成する栄養膜細胞の分化・機能異常が有力視されているが、詳細なメカニズムは不明である。我々は最近、妊娠初期のヒト胎盤より栄養膜幹細胞（TS 細胞）を樹立することに成功した。ヒト TS 細胞は、胎盤を構成するあらゆる栄養膜細胞へと分化する能力を持つため、ヒト胎盤研究のための優れたモデルとなる。本研究では、この技術を発展させ、HDP のモデル細胞を作製することにより、その発症機構に迫ることを目的とした。

【方法および結果】

1. 妊娠初期の栄養膜細胞において特異的に発現する転写因子の同定

我々が確立した TS 細胞の培養技術を用い、妊娠末期の栄養膜細胞より TS 細胞の樹立を試みたが、細胞株は得られなかった。妊娠末期の栄養膜細胞から TS 細胞が得られない原因を探るため、妊娠初期と末期の栄養膜細胞の RNA-seq 解析を行った。その結果、妊娠末期と比べ、妊娠初期の栄養膜細胞において 10 倍以上高い発現を示す転写因子を 5 遺伝子同定した（*BRDT*, *DPPA4*, *SALL4*, *SOHLH2*, *ZFP42*）。さらに、ヒト iPS 細胞の誘導に用いられる *LIN28A* が、妊娠初期の栄養膜細胞において特異的に発現していることを見出した。

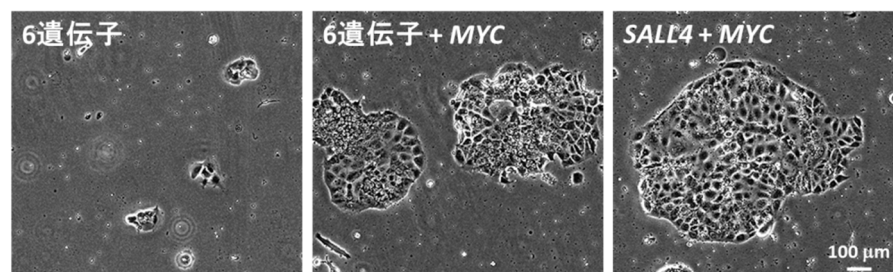
2. 妊娠末期の栄養膜細胞を用いた TS 細胞の樹立

RNA-seq 解析によって同定した 6 遺伝子をレンチウイルスベクターに組み込み、妊娠末期の栄養膜細胞に導入することで TS 細胞の誘導を試みたが、細胞株は得られなかった。そこで、iPS 細胞の誘導効率を高めることが知られている *MYC* を加えて再度実験を行ったところ、TS 細胞を誘導することに成功した。さまざまな遺伝子の組み合わせで実験を繰り返し、妊娠末期の栄養膜細胞から TS 細胞を誘導するためには、*SALL4* と *MYC* が必要であることを突き止めた（図）。この手法を用い、HDP 胎盤 3 例、正常胎盤 7 例より TS 細胞を樹立することに成功した。

3. TS 細胞を用いたオルガノイドの作製

HDP の病態を詳しく解析するためには、試験管内でヒト胎盤様構造を再現する必要がある。そのため、正常 TS 細胞を用いたオルガノイドの作製を試みた。まず、TS 細胞をマトリゲルに包埋し、通常の TS 細胞用の培地を用いて培養を行ったが、大部分の細胞が合胞体性栄養膜細胞へと分化してしまい、オルガノイドは得られなかった。そこで、培地に含まれる増殖因子や小分子化合物の組み合わせを変えて検討を重ねたところ、未分化細胞と合胞体性栄養膜細胞からなるオルガノイドを作製することに成功した。

妊娠末期の栄養膜細胞より樹立した TS 細胞



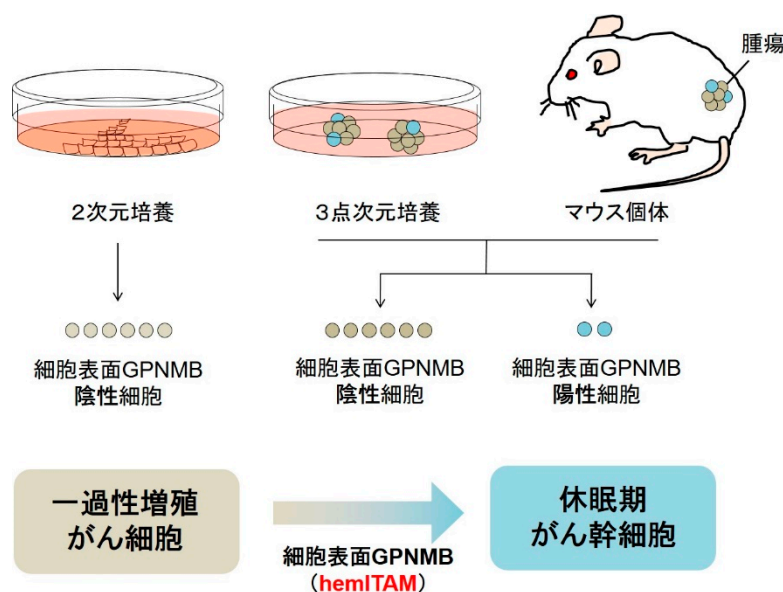
【目的】がんの根絶が難しい原因の1つとして、がん幹細胞の存在が挙げられる。がん幹細胞は、それ自体の数は少なく増殖速度も遅いが、抗がん剤や放射線などの治療に対して抵抗性が高く、転移や治療後の再発の原因になると考えられている。そのためがん幹細胞に特異的な因子を解明し、それを標的としたがんの根本的な治療法の開発が求められている。

本研究課題で着目する Glycoprotein NMB (GPNMB) は、上皮間葉転換 (EMT) を誘導し、乳がんの発生・進展に寄与することを見出している。EMT は、がん細胞の浸潤転移に加え、がん幹細胞様特性の誘導にも関与すると報告されている。よって、EMT 誘導に関与する GPNMB とがん幹細胞性誘導との関連について検討することで、がん幹細胞についての理解を深め、がん幹細胞を特異的に標的とする治療法の開発につなげることができないのではないかと考えた。

【方法】がん幹細胞を濃縮する方法として、3次元スフェア培養法を用い、通常の2次元単層培養法で培養した細胞、それぞれから RNA を抽出し、cDNA に逆転写後、がん幹細胞マーカー遺伝子 (*SOX2*, *NANOG*, *OCT4*, *CD44*)、EMT 関連転写因子 (*SNAIL*, *SLUG*, *ZEB1*) および *GPNMB* の mRNA 発現を定量的 RT-PCR 法にて検討した。また、3次元スフェア培養またはマウス個体に移植し形成された腫瘍より、細胞表面 GPNMB 陽性/陰性細胞を FACS にて分取し、遺伝子発現およびスフェアまたは腫瘍の形成能を検討した。さらに GPNMB による腫瘍形成能に重要である細胞内チロシン残基が、がん幹細胞様性質の誘導にも関与しているのかについて、変異体を用いて検討した。

【結果】乳がん細胞を3次元スフェア培養またはマウス個体で形成された腫瘍でのみ、GPNMB が細胞表面に出現してくることを見出した。そこで細胞表面 GPNMB 陽性細胞を分取し、その性質を調べると、幹細胞マーカーおよび EMT 関連転写因子の遺伝子発現量が高い一方、増殖マーカー遺伝子の発現が低いことが明らかになった。さらに細胞表面 GPNMB 陽性細胞は、細胞表面 GPNMB 陰性細胞に比べ、スフェアおよび腫瘍形成能が高いという結果を得ることができた。つまり、GPNMB は休眠期にあるがん幹細胞様細胞でのみ細胞表面に出現してくると思われた。また幹細胞様性質の獲得には、GPNMB による腫瘍形成能および EMT 誘導に重要な細胞内領域に存在するチロシン残基が重要であることも明らかとなった。

3次元培養スフェアと腫瘍における細胞表面 GPNMB 陽性細胞とがん幹細胞様特性の誘導

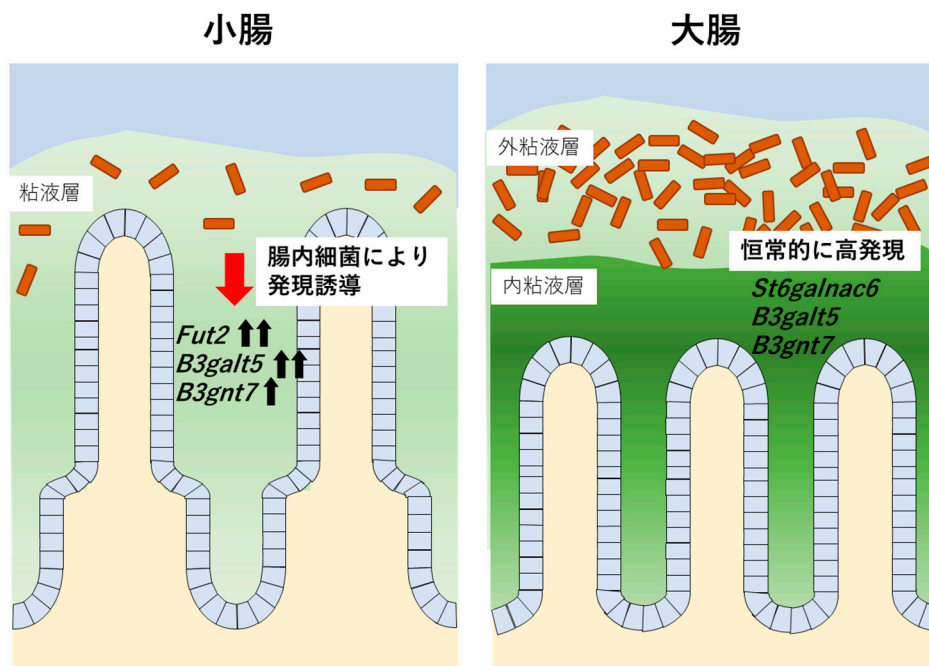


【目的】消化管においては、ムチンで構成される粘液層を中心とした粘膜バリアが消化管粘膜を覆い、体外から侵入する微生物や常在する腸内微生物叢の腸管組織への侵入を防止している。そのような粘液層を構成するムチンならびに、近年我々がバリア分子として同定した *Lygd8* の機能には、蛋白に付加される糖鎖が重要である。小腸上皮細胞における蛋白の糖鎖修飾については、フコースに代表される一部の糖鎖の修飾が腸内細菌によって誘導されることが明らかとなっているが、どのような糖鎖がどのような腸内細菌で誘導されるのか？小腸と大腸ではそのメカニズムが異なるのか？など、腸管上皮細胞における糖鎖修飾機構のメカニズムはほとんど明らかとなっていない。そのため、本研究では腸内細菌によって腸管上皮細胞で誘導される糖転移酵素の発現を解析した。

【方法】SPF マウスと無菌 (GF) マウスのそれぞれ雄、雌から小腸上皮細胞、大腸上皮細胞を単離し、それぞれの上皮細胞集団から RNA を抽出した後、次世代シーケンサーを用いた RNA-sequencing (RNA-seq) により、それぞれの上皮細胞集団における遺伝子発現を網羅的に解析した。

【結果】RNA-seq 解析により、全サンプルにおいて発現レベルを示す FPKM 値が 0.1 以上の糖転移酵素をコードする 134 の遺伝子を対象に、SPF マウスと GF マウスでの発現レベルの違いを解析した。その結果、大腸上皮においては、雄、雌共に 2 倍以上の発現変化がある糖転移酵素遺伝子は認められなかったが、小腸上皮においては、これまで腸管上皮細胞による発現誘導されることが報告されている *Fut2* 以外に、*B3galt5*、*B3gnt7*、*B3gnt5* などの計 11 つの遺伝子が、雄、雌の平均値で、SPF マウスで発現が 2 倍以上高く、小腸上皮においてはそれらの遺伝子が腸内細菌によって誘導されることが示唆された。また SPF マウスの小腸と大腸での各糖転移酵素の発現レベルを比較すると、*St6galnac6*、*St6gal1*、*B3galt5*、*B3gnt7* などの遺伝子が小腸において恒常的に高発現していることが明らかとなった。今後それらの糖転移酵素遺伝子が小腸ではどのようなメカニズムで腸内細菌により発現誘導されるのか、さらには遺伝子欠損マウスを用いて、それらの糖転移酵素によって付加される糖鎖が腸管内でどのような機能を持つのかについて解析を進めていく。

腸管上皮細胞における糖転移酵素遺伝子の発現

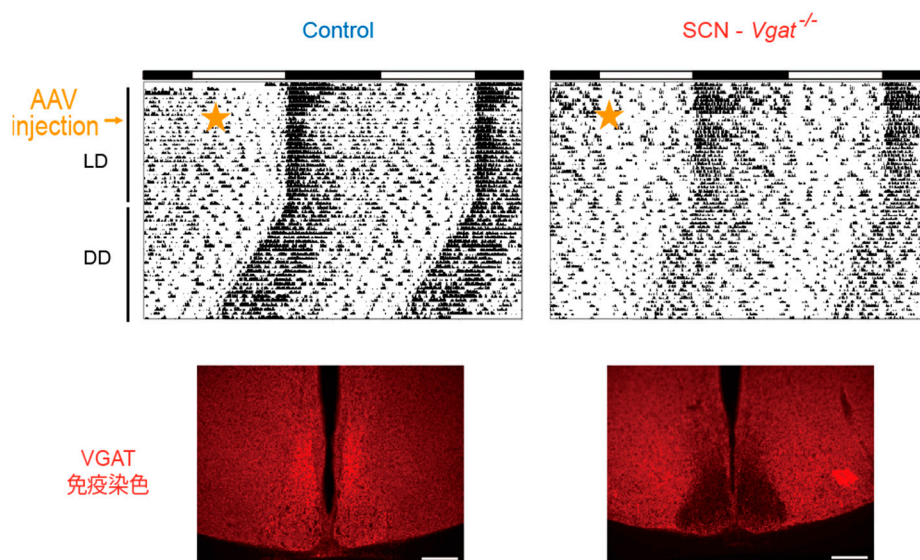


【目的】睡眠・覚醒は約 24 時間ごとに繰り返される。この 24 時間周期のリズムを「概日リズム」と呼び、脳内視床下部の「視交叉上核」が概日時計の中核として生体機能の時間的統合を行う。また、概日リズムは“時計遺伝子”の発現を皮切りにその調節機構が明らかにされてきている一方で、神経回路レベルの調節機構の解明はほとんど進展がなく未だ仮説の域を出ない。本研究では、光操作と併用可能な発光イメージング技術を導入し、哺乳類の概日時計による睡眠覚醒調節メカニズムを神経回路レベルで明らかにする事を目的とする。

【方法、結果】視交叉上核はほぼすべて抑制性神経であることから、視交叉上核特異的な *Vgat* 欠損を試みた。*Vgat^{flax/flax}* マウスに AAV を用いて、視交叉上核特異的に Cre を発現させた。動物の自発行動を計測する為に、赤外線センサーを飼育ボックスの上部に設置し、1 分ごとの自発行動量を連続的に計測した。視交叉上核特異的な *Vgat* 欠損マウスは、暗期における行動量の低下、および活動開始時間のばらつきの増加がみられたが、フリーラン周期そのものには影響を与えなかった。これらの結果は、視交叉上核における GABA は概日時計の周期には影響を及ぼさないが、出力経路に影響を及ぼすことを示唆する。

次に視交叉上核からの出力領域を同定するため、*Gad67-Cre* マウスを用い視交叉上核特異的に GFP を発現させ、軸索終末を確認した。その結果複数の脳領域に視交叉上核の軸索が確認された。その中で最も密に軸索が確認された室傍核に着目した。視床下部室傍核神経は様々な神経ペプチドを発現する神経細胞である事が知られている。その中でコルチコトロピン放出因子 (CRF) 神経はストレス応答に関わることから、睡眠覚醒の調節に関わるのではないかと考えた。そこで、*CRF-Cre* マウスを導入し、Cre 依存的に *ChR2* を発現させる事が可能な AAV (AAV-CMV-flex-*ChR2*-EYFP) を室傍核 CRF 神経に発現させた。その後、光ファイバーを室傍核直上に挿入し、さらに脳波・筋電図を計測するための電極およびワイヤーを装着した。その結果、室傍核 CRF 神経の光操作により覚醒が誘導された。今後は視交叉上核から睡眠覚醒を調節する神経回路の全貌を明らかにする。

視交叉上核における GABA は概日リズムの出力に関与する



【目的】咀嚼運動は、栄養を摂取するために必須の生体機能である。咀嚼機能が障害されると、発育障害や誤嚥性肺炎、さらには認知機能の低下が起こりうる。一方、咀嚼運動の亢進は記憶／集中／覚醒といった脳機能を向上させることが知られている。このような背景から、近年、口腔の健康に対する関心が高まっている。

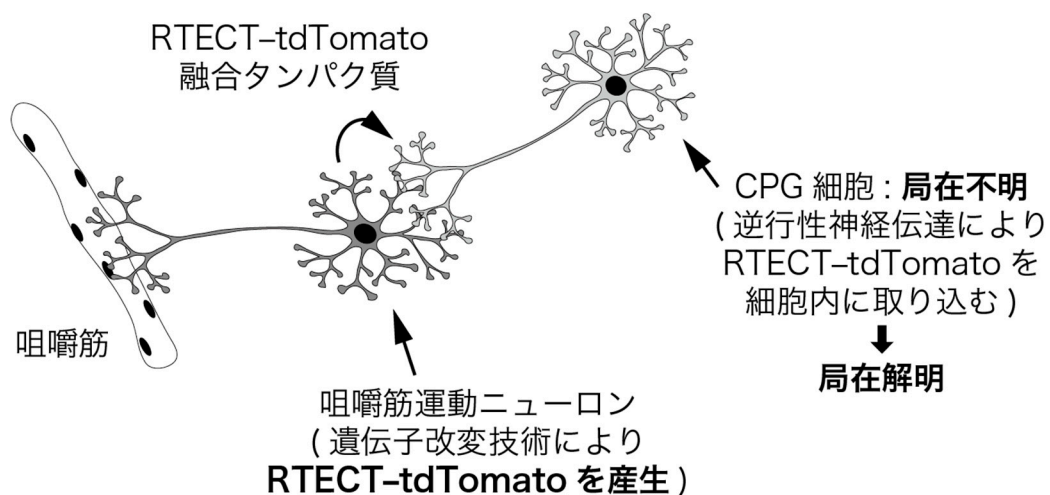
咀嚼に際しては、咀嚼筋をはじめ多くの筋が協調し、顎がスムーズかつリズムカルに動く。そのためには、上位脳や末梢臓器からの情報がセントラルパターンジェネレーター（CPG）により統合される必要がある。CPGの実体は不明であり、現状では概念的な存在でしかない。本研究では、既存の方法とは全く異なる CPG 探索法の確立を目的とした。

【方法】脳幹への侵襲の無い CPG 探索法として、逆行性神経伝達を利用した特異性の高い神経細胞の標識方法を考案した。シナプスを逆行性に伝達され、上位ニューロンに取り込まれる因子、retrogradely-transmitted and endocytosed CPG tracer (RTECT、仮称) と蛍光分子 tdTomato の融合タンパク質を咀嚼筋運動ニューロンで発現するマウスを作出することで、咀嚼筋運動ニューロンの上位ニューロンが標識できると考えた。

マウスの咀嚼筋運動ニューロンが存在する三叉神経運動核が位置する脳幹部の免疫組織学的解析により、RTECT の組織内での発現を評価した。RTECT と tdTomato の融合タンパク質 RTECT-tdTomato をレトロウイルスベクターにサブクローニングした。ウイルス感染細胞が産生する RTECT-tdTomato 分子の細胞外への分泌を tdTomato の蛍光を指標に評価した。RTECT-tdTomato を発現するノックイン細胞を作製するために、ベクターの設計と構築を行った。

【結果】免疫組織染色法により、三叉神経運動核における RTECT およびその受容体 RTECTR の発現が確認された。RTECT と tdTomato の融合タンパク質 RTECT-tdTomato を作製するために、マウスの *Rtect* 遺伝子及び tdTomato 遺伝子をクローニングした。*Rtect* と tdTomato の間にリンカー配列を挿入し、レトロウイルスベクターにサブクローニングした。ウイルス感染細胞には tdTomato の蛍光が認められ、融合タンパク質の tdTomato 部分が正常にフォールディングされていることが示唆された。ウイルス感染細胞の培養上清からも tdTomato の蛍光が検出され、RTECT-tdTomato の細胞外への分泌が示唆された。Cre 依存的に内因性の RTECT の代わりに RTECT-tdTomato を発現するノックイン細胞を作製するために、マウスゲノムを切断する gRNA および Cas9 タンパク質の発現ベクターの構築、そしてノックインアレルのサブクローニングを行った。

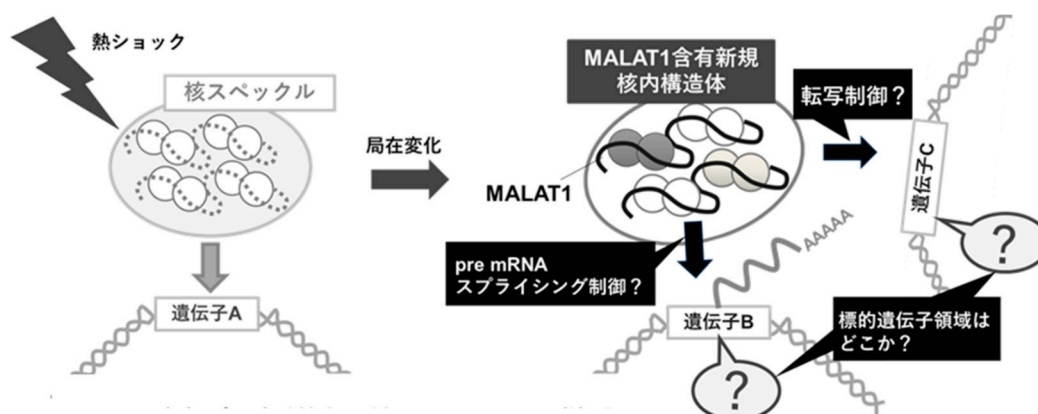
逆行性神経伝達を利用した CPG 細胞の同定



【目的】熱ストレスへ正常に応答することは生物の生存において重要であり、熱ストレスへの応答異常は神経変性疾患やがんなど様々な疾患の原因の一端となっている。我々はストレス応答を担う新たな因子として、長鎖非コード RNA に着目した解析を行ってきた。その過程で、以下の新規事象を発見した。すなわち、通常は核スペckルという核内構造体に局在する MALAT1 長鎖非コード RNA が、熱ストレスに応答して核スペckルから離脱し新規核内構造体（MALAT1 含有新規核内構造体と命名）を形成することを見出した。この新規構造体を介した新規の熱ストレス応答機構の存在が期待される。そこで本研究では MALAT1 含有新規核内構造体を介した遺伝子発現の制御機構を解明し、熱ストレス応答におけるこの構造体の生理的意義を明らかにすることを目的とする。最終的には長鎖非コード RNA を含有する新規核内構造体を基盤とした、新しい熱ストレス応答機構の提唱を目指す。

【方法・結果】任意の RNA と相互作用する因子（RNA 結合タンパク質やゲノム DNA）の画期的な解析手法である ChIRP 法を用いて、MALAT1 含有核内構造体の構成因子の候補タンパク質ならびに MALAT1 含有核内構造体と相互作用するゲノム DNA 領域の同定を試みた。質量分析による解析の結果、MALAT1 含有核内構造体の構成因子の候補タンパク質として 73 種の RNA 結合タンパク質が同定された。さらに、得られた MALAT1 含有新規核内構造体の構成タンパク質候補が、熱ストレス時の MALAT1 の局在変化に寄与しているか否かの検証実験を行った。候補タンパク質に対する siRNA を細胞にトランスフェクションし、熱ストレス（42℃×1 時間）を与えた細胞における MALAT1 の局在を RNA-FISH 法により観察した。その結果、特定のタンパク質候補をノックダウンすると熱ストレス条件下での MALAT1 の局在変化が観察されなかった。このことから、MALAT1 が特定の RNA 結合タンパク質との相互作用を介して熱ストレスに応じた局在変化を引き起こしている可能性が考えられる。また、MALAT1 含有核内構造体と相互作用するゲノム DNA 領域の解析の結果、熱ストレス細胞で MALAT1 特異的に結合するゲノム DNA 領域が同定された。この結果より、熱ストレスに応答して MALAT1 が局在変化するのに伴い、ストレス非負荷時とは異なるゲノム DNA 領域を標的とすることが示唆された。

本研究で明らかにしたい課題

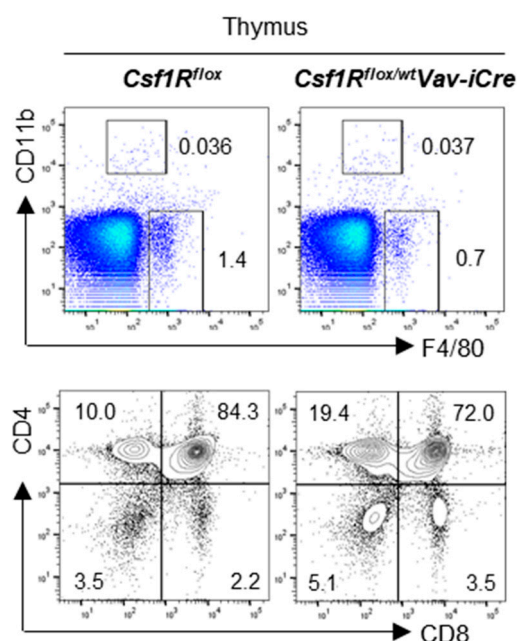


【目的】胸腺はT細胞の成熟と自己・非自己の認識を司る免疫の中心である。胸腺は思春期を境に退縮し、これが免疫老化の一因になっていることが知られている。組織常在性マクロファージは各臓器の恒常性維持に寄与していることが知られているが、胸腺のマクロファージの機能は不明な点が多く残されている。本研究では、胸腺の退縮における組織常在性マクロファージの役割について明らかにすることを目的とする。

【方法】マクロファージの分化に重要な M-CSF 受容体を造血細胞特異的に欠損させたマウス (*Csf1r^{fllox/+} Vav-Cre*) を作製し、胸腺マクロファージの数に影響するか検討した。また、このマウスを老齢期まで維持し、胸腺細胞の数を計測するとともに、胸腺細胞をフローサイトメトリーにより解析した。また、胸腺マクロファージのソースを検討するため、骨髄の造血幹細胞や胎児の肝臓由来マクロファージで同様に M-CSF 受容体を欠損する (*Csf1r^{fllox/+} Flt3-Cre*) マウスを作製し、同様に解析を行った。また、クロドロン酸リポソームを用いた胸腺のマクロファージ除去が胸腺の退縮に影響を与えるのか、フローサイトメトリーにより解析した。

【結果】*Csf1r^{fllox/flox} Vav-Cre* マウスを作製するため、*Csf1r^{fllox/+} Vav-Cre* マウスと *Csf1r^{fllox/+}* マウスを交配したところ、興味深いことに、*Csf1r^{fllox/flox} Vav-Cre* マウスは誕生しなかった。そこで、*Csf1r^{fllox/+} Vav-Cre* マウスを老齢期まで維持し胸腺細胞の割合を調べたところ、 $F4/80^+CD11^-$ の胸腺マクロファージが減少しており、胸腺細胞の総数が増加していた。T細胞群においても、 $CD4^+CD8^+$ の未熟な T 細胞が減少し、 $CD4^+$ T 細胞や $CD8^+$ T 細胞の画分が増加していた。これに対して、若齢のマウスではこれらの知見は確認されなかった。また、*Csf1r^{fllox/flox} Flt3-Cre* マウスは正常に誕生し、胸腺細胞にも変化は見られなかった。クロドロン酸リポソームを投与すると胸腺のマクロファージも一時的に減少することが確認できたため、クロドロン酸リポソームを投与した野生型マウスにおいて同様に胸腺細胞の解析を行ったが、コントロールリポソーム投与群と比較して有意な差は確認されなかった。

Csf1r^{fllox/+} Vav-Cre マウスにおける胸腺マクロファージの減少と成熟 T 細胞の増加

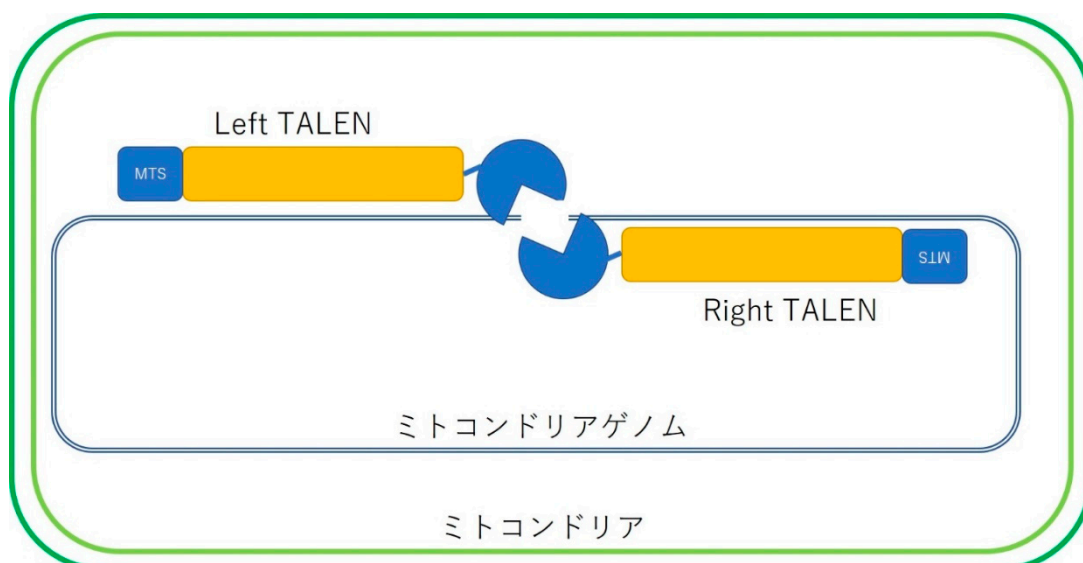


【目的】ミトコンドリア病は最も頻度の高い先天代謝疾患として知られ、厚労省の定める指定難病となっている。本研究では、ミトコンドリア病のゲノム解析から同定されたミトコンドリア遺伝子変異の有害性検証するため、ミトコンドリアゲノムを対象としたゲノム編集ツール mitoTALEN の技術構築を目的とする。

【方法】従来の TALEN (Transcription activator-like effector nuclease) にミトコンドリア局在シグナルを付加したベクターを構築し、ミトコンドリア局在型の mitoTALEN を作製した。さらに Left TALEN と Right TALEN の細胞内導入が確認できるように、EGFP と mCherry の蛍光マーカーをそれぞれに導入した。先行研究で同定したミトコンドリア遺伝子変異をターゲットとする mitoTALEN を構築した。株化細胞 HEK293 あるいはミトコンドリア遺伝子変異を有する患者線維芽細胞に対して、リポフェクションにより mitoTALEN を導入した。

【結果】まず mitoTALEN を処理した HEK293 細胞で、ミトコンドリアを分画し、mitoTALEN の細胞内局在を確認した。TALEN の十分なミトコンドリア局在を確認することができた。また、免疫染色でも mitoTALEN のミトコンドリア局在を確認することができた。mitoTALEN を処理した HEK293 細胞では十分な蛍光タンパク質の発現を確認することができたが、患者線維芽細胞での導入効率は高くなかった。そこで、セルソーターを用いて、EGFP と mCherry のダブルポジティブ細胞を選択した。この細胞でのミトコンドリア変異率の変動を定量し、7%程度の変異減少を観察した。

mitoTALEN によるミトコンドリアゲノム編集

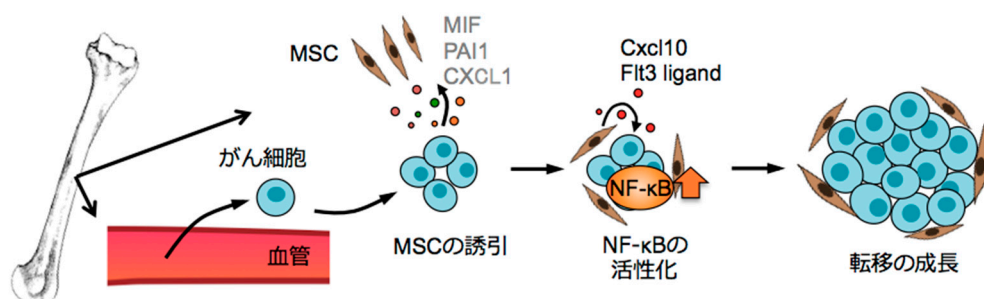


【目的】骨転移は前立腺がん、乳がんなどで頻発し、患者の生活の質を著しく悪化させる。多くの場合、原発巣が見つかった段階で骨転移のリスクが高いにも関わらず、有効な予防法や治療法は開発されていない。診断で検出される以前の転移早期過程における、がん細胞の生存や微小コロニーの形成・成長に関わる分子機構がほとんど解明されていないことが、治療法開発を困難にしている。現在、数少ない報告から、骨転移早期過程を制御する分子機構解明の手掛かりとして、造血幹細胞の機能を制御する骨髄由来細胞群が形成する特徴的な骨髄微小環境（骨髄ニッチ）とがん細胞の相互作用が注目されている。そこで、我々は、骨転移微小コロニーの効率的な組織学的解析を可能にする血行性骨転移マウスの構築手法とマウス骨髄に播種されたがん細胞の増殖や転写因子活性を非侵襲的かつ高感度・定量的にモニタリングできる生物発光イメージングシステムを組み合わせた新規モデルマウスを確立した。このモデルマウスを解析した結果、がん細胞の増殖に重要な役割を果たす転写因子 nuclear factor- κ B (NF- κ B) が前立腺がんの骨転移微小コロニーの成長に先立って活性化すること、骨転移微小コロニー周辺には、間葉系幹細胞 (MSC) が蓄積していること、MSC が分泌する因子によってがん細胞の NF- κ B が活性化されることなどが明らかになった。本研究では、MSC が形成する骨髄ニッチと前立腺がん細胞の相互作用を分子レベルで明らかにし、治療標的分子を見出すことで、骨転移の発症・進行を阻止する新たな治療戦略の開発を目指した。

【方法】ヒト前立腺がん細胞がマウス骨髄内での MSC を誘引し、骨髄ニッチが形成される可能性について検討した。マウス骨髄から単離した MSC を蛍光色素標識し、トランスウェルを用いた誘引アッセイを実施した。また、MSC を誘引する PC-3 由来の分泌因子を明らかにするために、PC-3 の培養上清をサイトカインアレイによって解析した。サイトカインアレイ解析によって明らかになった候補分子の精製タンパク質を用いて MSC の誘引効果を解析した。また、PC-3 の NF- κ B を活性化する MSC の分泌因子を同定するために、MSC の培養上清をサイトカインアレイによって解析した。サイトカインアレイ解析によって絞り込まれた候補分子の精製タンパク質を NF- κ B 応答性発光レポーターを導入した PC-3 細胞に添加し、NF- κ B の活性化レベルを解析した。

【結果】MSC を誘引するがん細胞由来の分泌因子として、macrophage migration inhibitory factor (MIF)、plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)、C-X-C motif ligand 1 (CXCL1) などを候補分子として選出した。しかし、これらの精製タンパク質を使って、MSC への誘引効果を調べたところ、個々の因子の誘引効果は非常に限定的であったことから、複数の因子が協調して MSC に作用している可能性が示唆された。PC-3 の NF- κ B を活性化する MSC 由来の因子に関しては、C-X-C motif ligand 10 (Cxcl10)、C-C motif chemokine 5 (Ccl5)、Fms-related tyrosine kinase 3 ligand (Flt3 ligand) などを候補分子として選出して、がん細胞の NF- κ B を活性化するか調べた。そして、候補分子の中で、CXCL10 と Flt3 ligand が NF- κ B を活性化することが明らかになった。これらの結果より、骨髄に転移した前立腺がん細胞は、複数の分泌因子によって MSC を誘引し、MSC ニッチの形成を促す。そして、MSC から分泌される Cxcl10 と Flt3 ligand によってがん細胞の NF- κ B が活性化され、骨髄で増殖、骨転移の発症に至る可能性が示唆された (図)。

骨転移早期過程における MSC ニッチとがん細胞の分子的相互作用

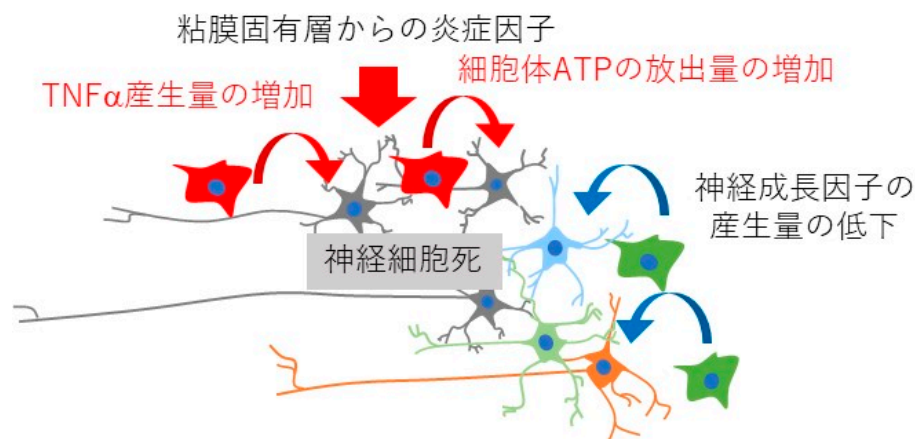


【目的】炎症性腸疾患は腸管粘膜を主体とした炎症という特性ゆえに、上皮や粘膜内の免疫細胞の機能解析が主に行われてきた。一方で腸管蠕動運動を司る神経叢が存在する筋層においても炎症が及ぶことが知られているが、筋層における炎症・抗炎症反応の多くは不明である。蠕動運動等の障害による腸管内容物の滞留は腸内細菌の構成にも影響を及ぼすことから、筋層を始めとした腸管の微小環境の解析は重要なテーマである。本研究では、炎症時に筋層に集積する免疫細胞の同定並びに機能的解析を行うことで、腸管微小環境における炎症機構の解明を目指す。

【方法】正常並びに腸炎マウスを用いて、大腸の粘膜固有層と筋層などの腸管微小環境に集積する免疫細胞について、免疫染色法とフローサイトメトリー法によってプロファイリングを行った。さらに、機能的解析については、各種炎症性サイトカイン等の炎症物質の発現量についての遺伝子解析並びに細胞単離後に網羅的遺伝子解析を行った。

【結果】粘膜固有層に比較して、筋層では $CD11b^+F480^+$ のマクロファージをはじめとするミエロイド系の細胞が主な構成細胞であることが示された。正常時には、筋層マクロファージは神経成長因子を産生しており、神経保護に寄与するという既報に沿った結果が得られた。しかしながら、炎症時では神経成長因子の産生が低下し、 $TNF\alpha$ の産生が起こることが示された。加えて、神経障害因子として作用する細胞外のアデノシン 3 リン酸 (ATP) の放出源になっている可能性が示唆される ATP 放出チャネルの発現量が増加していた。以上のことから、筋層の主たる構成であるミエロイド系の細胞群は、神経保護から炎症増悪へと機能が変化しており、重症化に寄与している可能性が示された。つまり、腸炎発症時の筋層のミエロイド系細胞の機能的変化を制御することが、腸炎の増悪化を防ぐ方策の一つになると考えられ、現在その詳細について解析を進めている。

筋層ミエロイド系細胞による炎症増幅機構

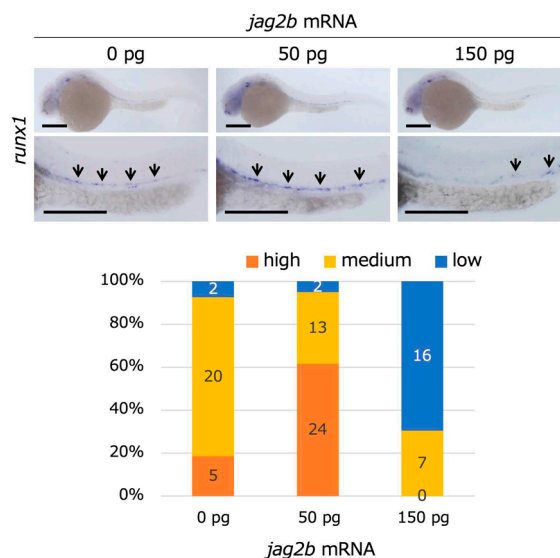


【目的】造血幹細胞は全ての種類の血液細胞を生産に亘って供給し続けられるという特殊な能力から、骨髄移植という形で白血病などの難治性血液疾患に対する治療に応用されている。人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) から造血幹細胞へ分化誘導するには、胚発生期における造血幹細胞の発生過程を生体外で忠実に再現する必要がある。そのため造血幹細胞が生体内でどのように制御されて発生するのかを分子レベル・細胞レベルで詳細に解明することが求められている。脊椎動物の発生過程において造血幹細胞は血管芽細胞と呼ばれる血液・血管系の共通前駆細胞から発生することが知られており、その発生過程には Notch シグナルが重要な役割を果たしていることが知られている。そこで本研究では、発生生物学の分野で有用な実験モデルとして知られるゼブラフィッシュを用いて、Notch リガンドである Jagged 2b (Jag2b) が造血幹細胞の発生過程でどのような役割を果たすのか、および Jag2b の強制発現によって造血幹細胞を増幅させることができるのかについての検討を行った。

【方法】ゼブラフィッシュにおける Jag2b の機能を抑制するために、Morpholino oligo (MO) を一細胞期の受精卵へ注入した。また、遺伝子の強制発現を行うために、生体外で合成した mRNA を MO と同様の方法で受精卵へ注入した。注入した胚において遺伝子の発現を調べるために、Whole-mount in situ hybridization (WISH) および免疫組織化学染色を行った。

【結果】ゼブラフィッシュ胚において *jag2b* は体節において発現していたが、血管芽細胞へ直接シグナルを伝達している可能性は低く、Jag2b は何か別のシグナル伝達分子を介して造血幹細胞の発生を制御しているものと考えられた。野生型胚と *jag2b* MO 胚で造血幹細胞の制御に関わる分子の発現を比較した結果、Jag2b は体節において *wnt16* の発現制御に関わっている可能性が示唆された。しかしながら、Jag2b によって誘導される Notch の活性化細胞と *wnt16* の発現細胞は互いに隣接するように分布しており、重複しなかったことから、Jag2b による *wnt16* の発現制御の間にも別のシグナル伝達分子が存在すると考えられた。詳細な解析の結果、Ephrin A-L1 が Jag2b から *wnt16* へのシグナル伝達の橋渡しを行なっていることを見出すことに成功した。一方、*jag2b* mRNA をゼブラフィッシュ胚へ注入し、強制発現を行ったところ、50 pg の mRNA を注入した胚では、造血幹細胞のマーカー遺伝子である *runx1* の発現が増加したのに対し、150 pg の mRNA を注入した胚では逆に *runx1* の発現が減少した。これらのことから、Jag2b の適度な過剰発現では造血幹細胞の増幅が見込めるものの、過剰になりすぎると逆に造血幹細胞への分化を抑制してしまうことが明らかになった。

jag2b の強制発現による造血幹細胞数の変化



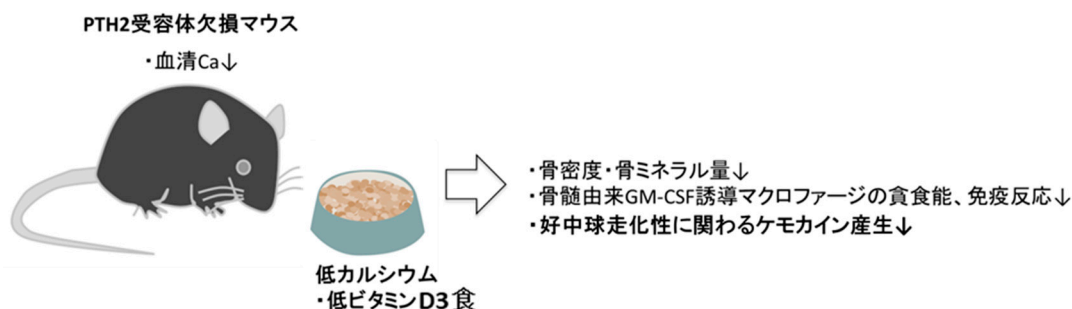
【目的】体内のカルシウムイオンは主に副甲状腺ホルモン（PTH）、ビタミンD、カルシトニンによって調節されている。PTH の受容体として PTH1 受容体および PTH2 受容体が知られているが、PTH2 受容体については過去にあまり研究がされていない。カルシウムシグナルは免疫細胞の分化や炎症反応に重要な役割を持つことが知られており、今回私たちは PTH2 受容体欠損マウス（*Pth2r*^{-/-}）とその同腹仔の野生型マウス（*Pth2r*^{+/+}）を用いてその評価を行う。

【方法】成熟した雌 *Pth2r*^{+/+} および *Pth2r*^{-/-} 脾臓から得られた免疫細胞分画を FACS で解析した。また骨髄細胞から M-CSF もしくは GM-CSF でマクロファージを誘導し、その食食能を phagocytosis assay で測定した。さらに TLR リガンドや inflammasome リガンドで刺激し炎症性サイトカインやインターフェロン関連遺伝子群を qRT-PCR にて定量した。最後に低カルシウム状態の体から得た免疫細胞の活性能をみるため *Pth2r*^{-/-} に低カルシウム食、低ビタミンD食を3週間ずつ負荷し、その大腿骨の骨密度・ミネラル成分の測定と骨髄由来マクロファージを TLR4 リガンドの LPS および IFI16 リガンドの HSV60 で刺激しマイクロアレイ解析を行った。

【結果】FACS では非感染の *Pth2r*^{-/-} 脾臓で CD4⁺T^{bet}⁺ の Th1 リンパ球が減少している傾向があったものの他の免疫細胞分画に大きな変化は見られなかった。マウス的大腿骨から得た骨髄細胞に M-CSF もしくは GM-CSF を添加してマクロファージを誘導し phagocytosis assay を行ったところ GM-CSF 誘導マクロファージ（GMM）で40時間後の食食能の低下がみられた。*Pth2r*^{+/+} GMM と *Pth2r*^{-/-} GMM を複数の TLR リガンドで刺激して3時間後に炎症マーカーである *Nos2* の発現を比較してみると *Pth2r*^{-/-} GMM では TLR4 リガンド（LPS）で刺激した際に発現が低下していた。次に3時間 LPS で刺激した後に複数の inflammasome リガンドを投与し合計24時間後に遺伝子の発現を確認すると IFI16 リガンド（HSV60）で刺激した際に *Ifnb1* の発現が低下した。最後に *Pth2r*^{+/+} と *Pth2r*^{-/-} に低カルシウム食と低ビタミンD食を3週間ずつ負荷した後に大腿骨を解析すると *Pth2r*^{-/-} では骨密度と骨塩量が有意に低いことがわかった。同様の低カルシウム・低ビタミンD食を負荷した *Pth2r*^{+/+} と *Pth2r*^{-/-} 由来 GMM に TLR4 もしくは IFI16 リガンドを投与してマイクロアレイで網羅的に遺伝子変動を解析し2群間（*Pth2r*^{+/+} vs *Pth2r*^{-/-}）で比較したところ、通常食より低カルシウム・低ビタミンD食を負荷した方が *Pth2r*^{-/-} GMM で有意に発現が低い遺伝子（Z-score ≤ -2.0, ratio ≤ 0.66）が増加した。さらにそれらの *Pth2r*^{-/-} GMM で低発現であった遺伝子の GO 解析を行うと、免疫反応（immune response）、走化性（chemotaxis）、炎症反応（inflammatory response）などに関連する遺伝子群が大きく変動しており、特に好中球走化性に関わるケモカイン遺伝子の発現が多く減弱していることがわかった。最後に単純ヘルペスウイルス1型を B6 系統の *Pth2r*^{+/+} および *Pth2r*^{-/-} の皮下に感染させると皮膚症状は出ないものの *Pth2r*^{-/-} 脾臓では Ly6G⁺ の好中球が減少している傾向があった。

これらの結果を総合すると PTH2 受容体シグナルは体内カルシウムの恒常性に影響を及ぼし自然免疫細胞が引き起こす免疫反応や走化性に関与することが予測された。

PTH2 受容体欠損マウス骨髄由来 GM-CSF 誘導マクロファージは食食能や免疫反応が低下しており
低カルシウム・低ビタミンD3食の負荷はさらにその傾向に拍車をかける

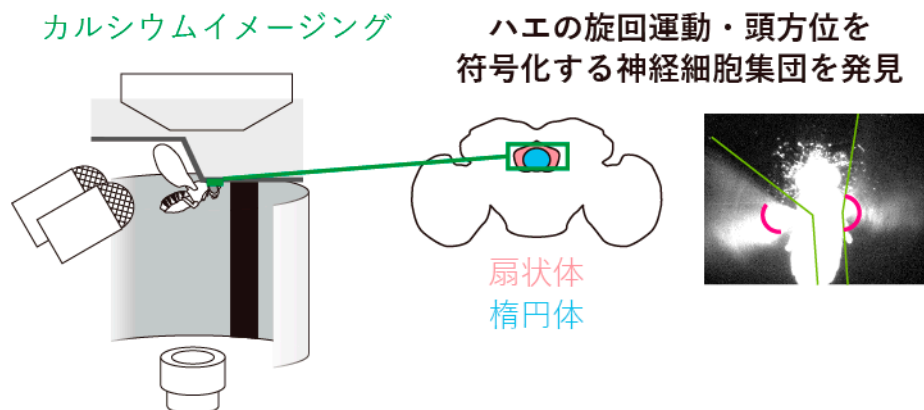


【目的】昆虫を含む多くの動物は、自分が今どの方向を向いているかを知覚することで、環境を効率的に移動する。神経生理学的研究により、動物が特定の方向を向いている際に活動する頭方位細胞が発見されたが、脳内に散在する頭方位細胞がどのようなネットワークを形成し、動作しているかは不明である。本研究では、細胞種特異的な神経ネットワークの解析が容易なキイロショウジョウバエに着目し、著者がこれまでに構築したバーチャルリアリティ技術と生理学的計測を組み合わせた実験系を用いることで、方向感覚を担う脳神経回路の機能と構造を明らかにすることを目的とした。

【方法】遺伝学的手法を用いて、特定の神経細胞集団にカルシウム指示タンパク質を発現させた。2光子カルシウムイメージング法を用いて、仮想空間を飛行中のハエから神経活動を記録した。

【結果】過去に発見された頭方位細胞ネットワークの下流に、もう一つ別の頭方位細胞ネットワークが存在すること発見した。これら2つのネットワークは同期して活動し、ともにハエの旋回運動および頭方位を符号化していたが、下流のネットワークのみが視覚環境依存的に旋回運動符号を変化させた。以上の結果により、ショウジョウバエの空間知覚を担う神経回路機構の一端が解明された。

飛行するショウジョウバエの神経活動を記録し、方向感覚に関わる神経回路を解析

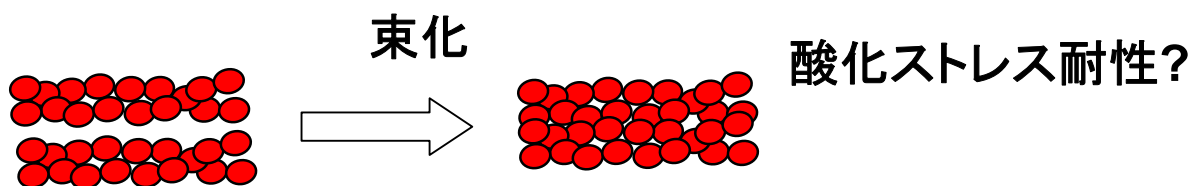


【目的】 今日、我が国は人口の超高齢化が進んでおり、高齢者が QOL を損なうことなく健康で快適な生活を維持する技術が求められている。多くの高齢者が悩まされる疾患の代表例として、ガン・血管障害・心臓疾患などがある。これらの疾患の主な原因の一つとして、加齢に伴い活性酸素 (Reactive oxygen species : ROS) が過剰に細胞内で産生され細胞老化が引き起こされた結果発症するという機構が提唱されている。最近の研究から高いレベルの ROS は細胞骨格であるアクチンを不安定化し細胞老化に関与する事が報告されている。ROS が豊富に存在する細胞内環境下ではモノオキシゲナーゼ MICAL がアクチンのメチオニン残基とシステイン残基を酸化し、その残基を標的としてアクチン切断因子 Cofilin が攻撃する事でアクチンフィラメントが不安定化する事が報告されている。本研究では、最近同定した新規分子 *Dpcd* の解析を通して、細胞が酸化ストレスからアクチンを保護し細胞老化を防ぐ仕組みを明らかにする事を目指した。

【方法】 1. 人工的に誘導した酸化ストレスに対する耐性の評価：野生型マウスと *Dpcd* 遺伝子ノックアウトマウスそれぞれの気管を単離した後、人工的に酸化ストレスを誘導した。細胞内、特に *Dpcd* が発現する繊毛細胞内におけるアクチンフィラメントの量と分布に注目して酸化ストレスの影響評価を行った。2. マウス生体内における *Dpcd* 蛋白の結合因子の探索： *Dpcd* が酸化ストレスからアクチンフィラメントを保護するしくみを明らかにするためにマウス組織を用いて結合因子の探索を行った。3. 食事を通じた抗酸化物質の投与と繊毛病の症状への影響：繊毛病と酸化ストレスの個体レベルでのつながりを明らかにするため、抗酸化物質を含むエサの摂取に対する影響を野生型マウスと *Dpcd* 遺伝子ノックアウトマウスで比較・検証を行った。

【結果】 1. 人工的に誘導した酸化ストレスに対する耐性の評価：野生型マウスに比べて *Dpcd* 遺伝子ノックアウトマウスの気管繊毛細胞では酸化ストレスによりアクチンフィラメントの量が減少する事が観察された。2. マウス生体内における *Dpcd* 蛋白の結合因子の探索： RuvBL2 など分子シャペロンが *Dpcd* と相互作用する因子として同定されたが、還元酵素のような抗酸化機能に直接的に結びつく因子は見つからなかった。3. 食事を通じた抗酸化物質の投与と繊毛病の症状への影響：繊毛病と酸化ストレスの個体レベルでのつながりを明らかにするため、抗酸化物質を含むエサの摂取に対する影響を野生型マウスと *Dpcd* 遺伝子ノックアウトマウスで比較・検証を行った。

アクチンフィラメントの束化とストレス耐性

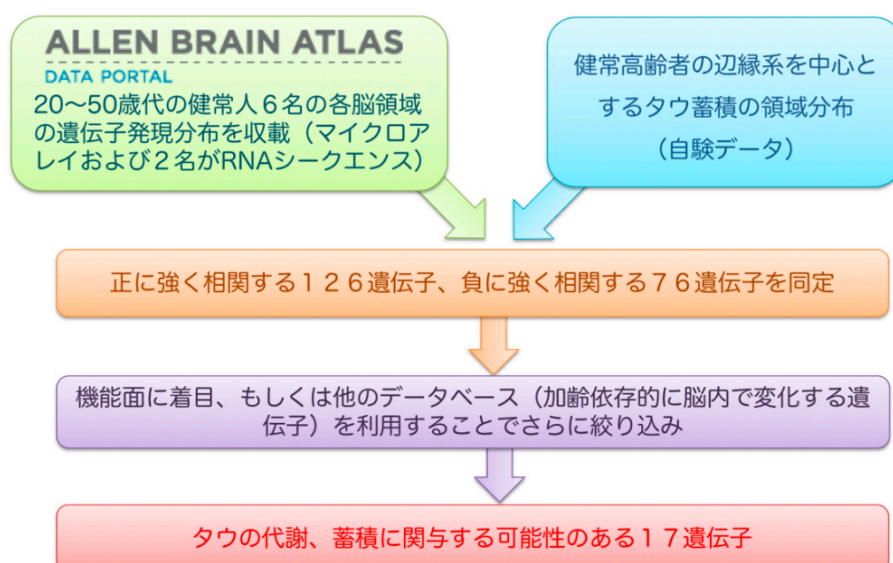


【目的】認知症の社会的対策は急務である。アルツハイマー病（AD）は認知症の半数以上を占めるが、その原因は十分には分かっていない。疾患の原因とされているアミロイド β （A β ）とタウは、加齢に伴いそれぞれ独立して脳内に蓄積する。特にA β （老人斑）が蓄積した場合を老人斑優位型（Pathological Aging : PA）、タウ（神経原線維変化）が蓄積した場合を原発性加齢性タウオパシー（Primary age-related tauopathy : PART）と称す。それぞれの機序を捉えることが、ADのみならず高齢者の認知機能障害を理解する上で重要であり、病態、病因に根ざした創薬開発が可能となる。我々は、タウとA β の蓄積の各々の領域特異性に着目し、剖検脳を用いて、脳内のA β と、A β の代謝もしくは神経変性に関係する分子の領域分布を比較し、A β 蓄積がもたらす結果のみならず、A β 蓄積の原因を理解する上で重要な手がかりを検討してきた。我々はこれまで主にA β に着目してきたが、本研究では、さらにタウに着目、研究する。

【方法】タウ解析のために、新たに PART の剖検脳も解析対象にするとともに、タウの蓄積が病態初期から認められる、もしくは病態後期まで認められにくいとされる領域を新たに追加する。A β とタウおよびタウの代謝に関与すると考えられる分子、シナプスや炎症などの神経変性に関係する分子の発現量を、ELISA 測定系を中心に定量し、発現量の病態間の比較のみならず、各分子の領域分布を比較することでタウの蓄積が神経変性にどう影響を与えるかとともに、何故タウが蓄積するのか、分子的な理解の手がかりを得ることを目的とする。また公共データベースの解析や我々の網羅的遺伝子発現解析などのオミクス解析により、タウの蓄積と時間的、空間的に相関する新規分子の同定も進める。

【結果】本研究での結果を簡潔に記載する。本研究を行うために、1. タウやタウの代謝に関与する分子の ELISA の開発、導入、2. 剖検脳の入手、3. 公共データベースの活用による、タウの領域分布と相関する分子の同定、4. 同定した分子の蛋白質レベルでの検証、をすすめた。1. については、様々なエピトープの抗体を組み合わせ、AD 患者脳で反応性が高く神経病理ステージともよく相関する ELISA を構築することができた。またタウの代謝に関与することが想定される複数の候補分子の ELISA を、その妥当性を確認しつつ導入できた。2. 剖検脳の入手は、領域数が多いため、当初の計画通りではないが、10 例以上入手できた。3. 公共データベースの遺伝子網羅発現データと我々のデータを比較することで、タウの代謝、蓄積に関与しうる遺伝子群を同定した。4. 3 で同定した遺伝子をさらにタンパク質レベルで検証した。中でも遺伝子 Y については、AD 患者脳内で増加することが確認された。以上、タウの蓄積機序を解析するのに必要な新規知見をいくつか得た。この成果を学術誌などで宣伝しつつ、さらなる病態解明を目指したい。

公共データベースを利用したタウの蓄積に関与する可能性がある遺伝子の絞り込み

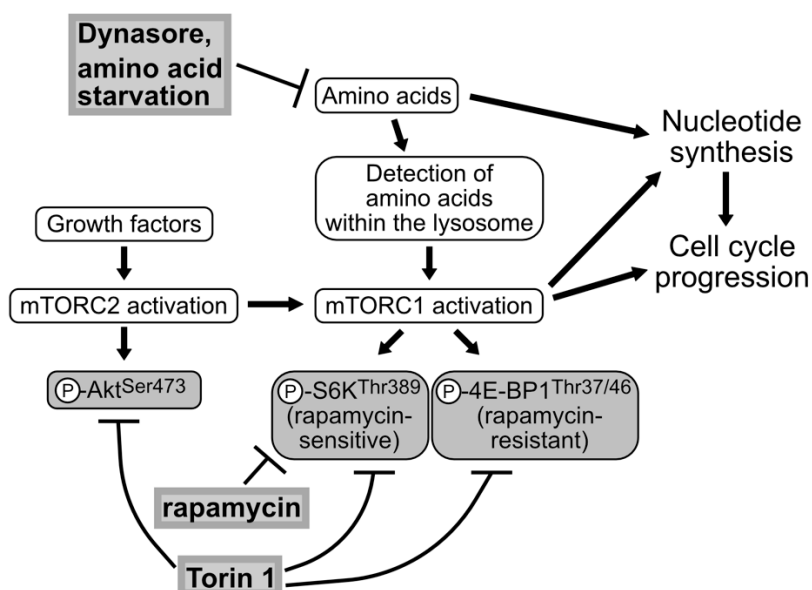


【目的】 mTORC1 は、アミノ酸-タンパク質代謝を担う主要なシグナル複合体である。mTORC1 は細胞外のアミノ酸によって活性化されることが知られていたが、近年、アミノ酸による mTORC1 活性化のメカニズム解明が急速に進み、細胞外のアミノ酸がリソソームの内腔に到達した後に mTORC1 を活性化することが判明した。しかし、細胞外のアミノ酸がどのようにしてリソソーム内腔に到達するのかは不明瞭な点が多かった。我々は最近の報告において「ダイナミン依存性エンドサイトーシスによりアミノ酸が細胞内に取り込まれ、mTORC1 を活性化する」というメカニズムを明らかにした。この発見により、エンドサイトーシス阻害剤が mTORC1 阻害剤として機能する可能性が示された。本研究においては「過栄養を原因とする疾患の治療・予防に向けたエンドサイトーシス制御」という新しいアプローチの実現に向けて、細胞レベルでの栄養取り込み阻害剤としてのエンドサイトーシス阻害剤が、細胞に及ぼす影響を明らかにすることを目的とする。

【方法】 HEK293T 細胞を用いて実験を行った。ダイナミン依存性エンドサイトーシス阻害剤であるダイナソア、mTORC1 阻害剤であるラパマイシン、mTORC1/2 阻害剤である Torin 1、アミノ酸飢餓を引き起こすアミノ酸不含培地で細胞を処理し、ウェスタンブロット法により各種の mTORC1/2 ターゲットリン酸化サイトを検証した。また、細胞数の測定、WST アッセイによる細胞代謝活性の測定、フローサイトメトリーによる細胞周期プロファイルの検証を行った。

【結果】 比較的弱い mTORC1 阻害剤であるラパマイシンは、ラパマイシン感受性リン酸化サイトである S6K (Thr389) の脱リン酸化を誘導し、代謝抑制効果を示した。一方、ダイナソア、Torin 1、アミノ酸飢餓は、S6K (Thr389) だけでなく、ラパマイシン非感受性リン酸化サイトの 4E-BP1 (Thr37/46) も脱リン酸化したことから、強力な mTORC1 抑制作用を有することが示された。さらに、ダイナソア、Torin 1、アミノ酸飢餓により、細胞代謝の抑制だけでなく、細胞増殖の抑制が認められた。フローサイトメトリーを用いて細胞周期をより詳細に解析した結果、これらの薬剤・飢餓による細胞増殖抑制は S 期における停滞が原因であることが推測された。

mTORC1 を介した各種阻害剤の細胞増殖への影響

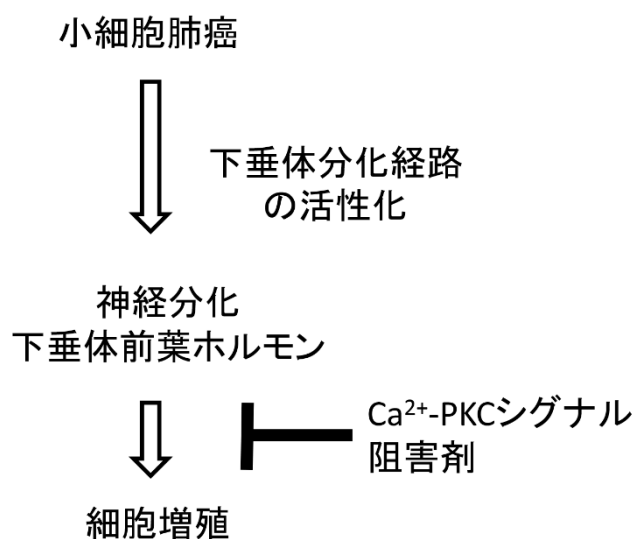


【目的】小細胞肺癌は肺癌の中で最も悪性であり、化学療法や放射線療法といった古典的な治療法以外に有効な治療法はない。5年生存率は約20%であり、新たな治療法の開発が必要である。我々は、小細胞肺癌の一群が下垂体前葉の発生初期を制御する転写因子を高発現し、90%以上の5年生存率を示すことを発見した。本研究では、この独自の知見をもとに小細胞肺癌の分化や脱分化を誘導することで、治療感受性を増強できるかを調べた。

【方法】口腔外胚葉の発現パターンを示す小細胞肺癌株 SBC3、SBC5 を用いて、脱脂 FCS を含む培地で培養し、脱分化を誘導した。神経分化誘導には低接着プレートを用いた3次元培養を行った。神経分化誘導後の小細胞肺癌株を用いた化合物スクリーニングでは分子プロファイリング支援活動の支援を受けて入手した標準阻害剤キット 1~4 (kit1 ver3.2, kit2 ver2.3, kit3 ver1.6, kit4 ver2.3) とシグマ社より購入したエピジェネティクス関連化合物ライブラリー (80 種) の計 445 化合物を用いた。

【結果】SBC3 および SBC5 細胞では3次元培養により、下垂体分化経路の活性化が起こり、神経分化が誘導されることが明らかになった。また、神経分化後の SBC3 細胞では Ca^{2+} -PKC シグナル、CAMKII、Ca ionophore などの阻害剤が選ばれ、神経分化に伴い、神経のシナプスやスパイン形成に重要な因子の阻害剤が細胞増殖を抑制することが示唆された。

Ca^{2+} -PKC シグナル阻害剤は神経分化誘導した小細胞肺癌の細胞増殖を抑制する

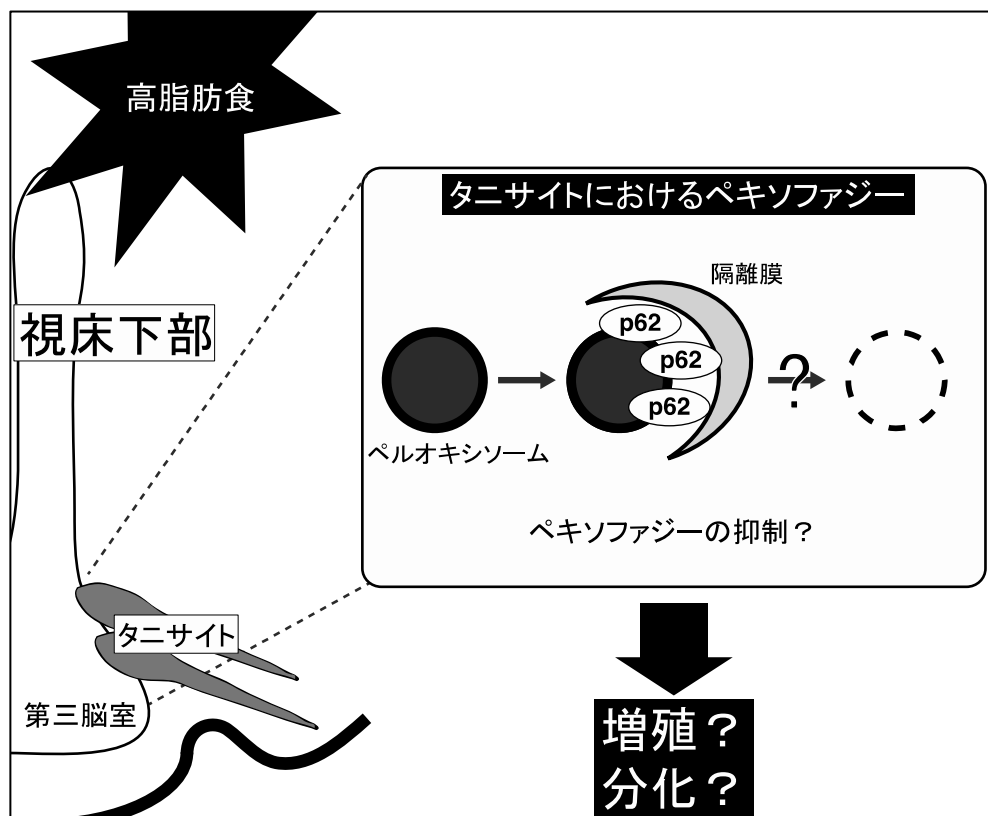


【目的】視床下部は個体代謝調節の中樞であるが、細胞内代謝の場であるオルガネラの視床下部における機能については未知な部分が多く残されている。本研究は、細胞内代謝の中心的オルガネラの一つであるペルオキシソームに着目し、視床下部機能低下に果たすペルオキシソームダイナミクスの役割と作用機構を解明することを目的とした。

【方法】1. 高脂肪食摂餌マウスの視床下部を免疫蛍光法、ウェスタンブロッティング法により解析した。2. 初代培養タニサイトをパルミチン酸添加培地で培養し、免疫蛍光法、ウェスタンブロッティング法により解析した。

【結果】高脂肪食摂餌マウス視床下部や、パルミチン酸添加培地で培養のタニサイトにおいて、ペキソファジーマーカーである p62 の蓄積とペルオキシソームとの共局在が観察された。

高脂肪食摂餌下の視床下部タニサイトにおけるペキソファジー

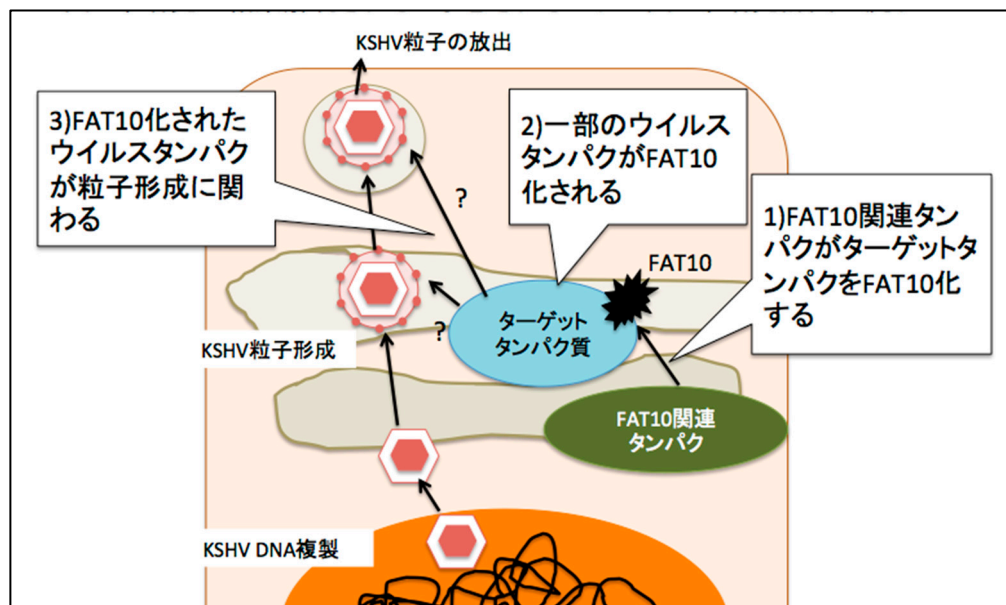


【目的】カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス（KSHV）の溶解感染機構は未だ解明されていない部分が大きく、KSHV に有効な治療薬のターゲットは未だに提示されていないのが現状である。ヘルペスウイルスは宿主因子なしには溶解感染を行うことができず、溶解感染の際に様々な宿主因子をハイジャックして自身の DNA 複製やウイルス粒子形成に役立っていることが知られている。しかし、KSHV では溶解感染に関わる宿主因子はほぼ知られておらず、KSHV 溶解感染機構の解明のためには KSHV の溶解感染に中心的役割を果たす宿主因子を発見することが急務である。これまでの研究で、プロテオーム解析を用いた結果、KSHV 溶解感染ではユビキチン様タンパクである FAT10 関連タンパク群の発現が上昇していることが明らかとなった。そこで本研究では、FAT10 関連タンパクの KSHV 溶解感染での機能解析を目的として研究を行った。

【方法】網羅的プロテオーム解析の結果、FAT10 関連タンパク群の発現が顕著に上昇していることがわかったため、ウエスタンブロット法を用いて確認を行った。また FAT10 についてもウエスタンブロット法および RT-定量的 PCR 法にて確認した。CRISPR/Cas9 を用いて FAT10 関連タンパクをノックアウトし KSHV の溶解感染に与える影響を解析した。また、超解像度顕微鏡を用いて FAT10 および関連タンパクの局在を確認した。さらに、免疫沈降-マス解析を用いて FAT10 化されるウイルスタンパクの探索を行った。

【結果】網羅的プロテオーム解析の結果、FAT10 関連タンパク群の発現が顕著に上昇していることがわかったため、ウエスタンブロット法を用いて確認を行ったところ、やはり発現が顕著に上昇していた。また FAT10 についてウエスタンブロット法および RT-定量的 PCR 法にて確認したところ、やはり KSHV 溶解感染において発現が顕著に上昇していたことが確認された。さらに CRISPR/Cas9 を用いて FAT10 関連タンパクをノックアウトしたところ、KSHV の粒子産生が顕著に低下した。これらの結果より、FAT10 系は KSHV の粒子形成に関わることが予測され、免疫沈降-マス解析を用いて FAT10 化されるウイルスタンパクの探索を行ったところ、やはりいくつかの KSHV 粒子形成に関わると思われるタンパクが FAT10 化される可能性が示唆された。

本研究から得られた FAT10 の関わる KSHV 溶解感染についてのモデル図

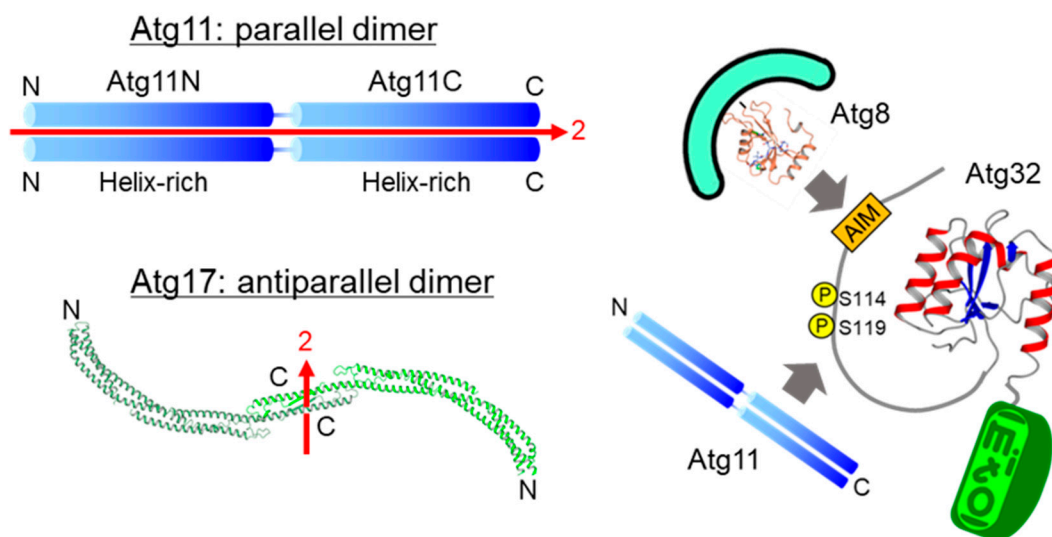


【目的】オートファジーは真核生物に保存された細胞内分解システムであり、飢餓などに応じて細胞質成分を非選択的に分解して、細胞内成分の再構成に関与している。一方で、細胞の恒常性維持のために、ミトコンドリアなどの損傷したオルガネラや細胞に侵入してきた細菌などを選択的に認識して分解することにもオートファジーは関与している。後者は特に選択的オートファジーと呼ばれ、がんや神経変性疾患、感染症などの疾患に関与しているものの、その基本的なメカニズムに関する知見は乏しい。本研究では、すべての選択的オートファジー経路に関わる Atg11 と、ミトコンドリア外膜上に発現しオートファジーによる選択的ミトコンドリア分解（マイトファジー）に関わる Atg32 に着目した。これらの分子構造や相互作用様式を明らかにすることで、選択的オートファジーの分子機構をタンパク質レベルで明らかにすることを目指した。

【方法】Atg11 および Atg32、両者に結合するとされる Atg8 を昆虫細胞発現系または大腸菌発現系を用いて調製した。動的光散乱法、CD スペクトル、超遠心分析などにより各種試料の物理化学的性質を確認した。Atg32 の細胞質領域 C 末端側については、X 線結晶構造解析により構造を決定した。生化学的な手法と併せて、巨大脂質膜リポソームを用いた脂質膜上でのタンパク質間相互作用の解析を行った。

【結果】種々の方法による性状解析から、巨大タンパク質 Atg11 は細長い分子であり、かつ平行な二量体を形成していることが示唆された。結晶構造解析により、Atg32 の細胞質領域 C 末端側は低分子量 GTPase に類似した立体構造を有することが明らかとなった。タンパク質間相互作用解析により、Atg32 は Atg11 と Atg8 両者に結合するが、Atg11 と Atg8 の間に直接的な相互作用はないことが明らかとなった。

マイトファジーに関わるタンパク質間の相互作用

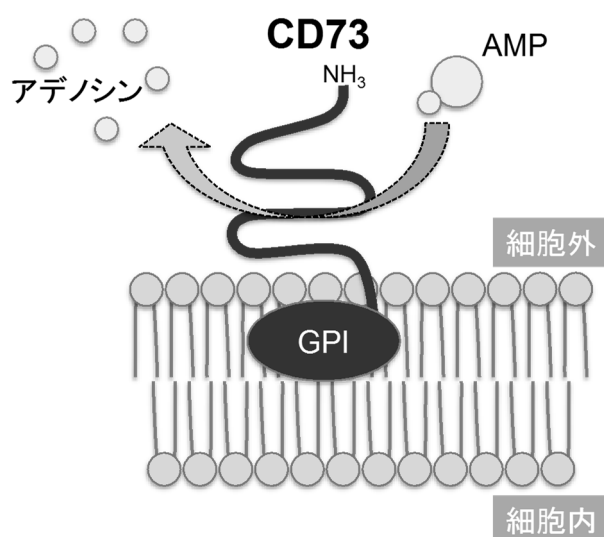


【目的】現在、間葉系幹細胞（MSC）を用いた再生治療や免疫調節治療が行われている。しかし現状の MSC 採取法では混入細胞のリスクを排除しきれず、治療効果は一定ではない。我々は抗 CD73 抗体を用いて純度の高い MSC を分離する方法を開発し、モデル動物で移植効果を確認した。本研究ではヒト組織から新鮮純化法により MSC を分離し、組織再性能や免疫抑制能を評価することを目的とする。

【方法】本研究は東京医科歯科大学附属病院の産婦人科、泌尿器外科より患者検体の提供を受けて臍帯、胎盤、皮下脂肪、内臓脂肪よりヒト MSC を分離する。検体入手については既に本学研究倫理委員会の承諾を得ており (G2017-005)、手術切除後に通常廃棄される組織を解析する。入手後の組織からフローサイトメーターを用いて細胞を新鮮純化し、*in vitro* での品質評価および疾患モデル動物への移植による *in vivo* での機能評価を行う。

【結果】ヒト皮下脂肪、内臓脂肪、絨毛、絨毛膜、羊膜、臍帯の組織より CD73 陽性細胞を分離し、細胞表面抗原解析を行った。皮下脂肪由来 CD73 陽性細胞は MSC 様の特性を示しており、内臓脂肪や胎盤組織と比較して高い増殖能が認められた。さらに、間質性肺炎モデルマウスへの経鼻投与によって、CD73 陽性細胞投与群への有効性が認められた。

細胞表面タンパク質である CD73 (ecto-5'-nucleotidase)

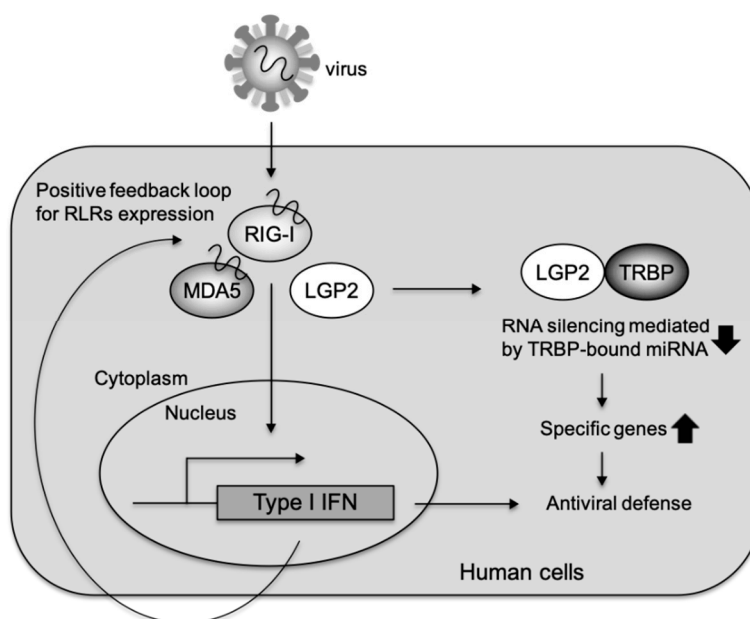


【目的】細菌やウイルスが感染すると、生体は免疫応答という生体防御機構を引き起こす。免疫応答には、自然免疫応答と獲得免疫応答があるが、自然免疫応答は免疫応答の初動で重要な役割を果たす即時対応型のシステムであり、サイトカインの誘導を伴う。哺乳類細胞にウイルスが感染すると、細胞外では Toll like receptors (TLRs)、細胞内では Retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) like receptors (RLRs) といったウイルスセンサータンパク質がウイルス特有の構成成分を認識し、I 型インターフェロン (IFN) を誘導する。RLRs として RIG-I、Melanoma differentiation-associated protein 5 (MDA5)、Laboratory of genetics and physiology 2 (LGP2) が知られるが、RIG-I と MDA5 はそれぞれ異なる特徴を持つウイルス性 RNA を認識し IFN を誘導するのに対し、LGP2 はこれまでその機能が明確ではなかった。我々はこれまでの研究により、LGP2 が、RNA サイレンシングの主要因子である TAR-RNA binding protein (TRBP) と相互作用することを見出した。本研究では、LGP2 と TRBP の相互作用を介した、自然免疫応答と RNA サイレンシングのクロストーク機構の分子メカニズムの解明を目指した。

【方法】まずヒト培養細胞を用いた免疫沈降法により、LGP2 と TRBP の細胞内における相互作用を同定した。次にゲノム編集ツールである CRISPR/Cas9 システムにより、ヒト LGP2^{-/-}細胞と TRBP^{-/-}細胞を樹立し、それらを用いて RNA サイレンシング活性を測定した。さらにノザンブロットまたは定量 RT-PCR により成熟 miRNA 量を定量した。最後に、RNA シークエンス解析により、TRBP が結合しやすい miRNA の同定とその二次構造的特徴の同定、マイクロアレイ解析によるそれらの標的遺伝子群の発現変動を定量的に解析した。

【結果】これまでウイルスセンサーであるとされながらも機能が不明であった LGP2 が、RNA サイレンシングの主要因子である TRBP との相互作用を介して、microRNA (miRNA) による遺伝子発現ネットワークを制御することを見出した。IFN により発現量が増加した LGP2 は TRBP との相互作用を介して、TRBP が結合する特定の miRNA の成熟化を抑制し、その標的遺伝子群を発現上昇させた。LGP2 と TRBP の相互作用を介した特定の miRNA とその遺伝子群の発現制御は、ウイルス感染細胞において生体防御機構として機能していると考えられる。

LGP2 による RNA サイレンシングを介した遺伝子発現制御

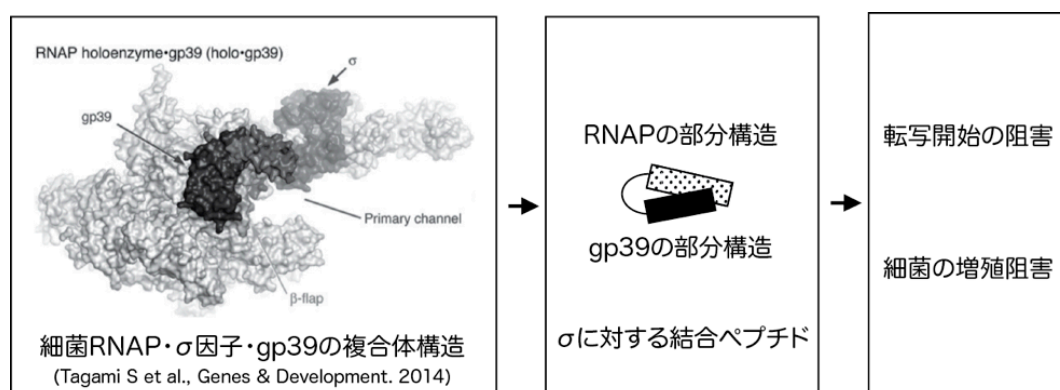


【目的】細菌感染は依然として人類の健康にとって重大なリスクであるが、近年抗生物質の開発ペースは低下しており、迅速に抗生物質を開発する新たな手法の確立が望まれる。現在までに開発されてきた抗生物質のほとんどは低分子化合物であるが、低分子化合物の改良を化学的手法によって行おうとすれば、そのハイスループット性には限界がある。そこで、本研究では分子生物学的な手法によってハイスループットに改変可能なペプチドを用いることによって、新規抗生物質の獲得を試みる。ペプチドはリボソームによる翻訳系を用いることにより非常に大きなライブラリーの作製が可能であり、新たな医薬品開発のシードとして注目されている。しかし、実際にはランダムな配列を持つペプチドライブラリーを用いると機能を持つペプチドの割合が低く、機能性ペプチドのセレクションにはしばしば困難を伴う。そこで本研究では、細胞内で働くタンパク質の部分構造を元にペプチドライブラリーを作製することで、効率の良い抗菌ペプチド開発に挑んだ。

【方法】細菌の転写機構はリファンピシンなどの代表的な抗生物質の標的である。そこで本研究では、細菌の転写阻害タンパク質 gp39 の作用機構を模倣することで、効率的な抗菌ペプチド開発を目指した。そのため、gp39 の部分構造を元にしたペプチドライブラリーを mRNA ディスプレイ法を用いて作製し、細菌の転写開始因子 (σ 因子) に強固に結合するペプチドのスクリーニングを行った。

【結果】gp39 の部分構造を元にしたペプチドライブラリーから σ 因子に結合するペプチド (K_D 20 nM 程度) を効率よくスクリーニングすることができた。今後スクリーニングされたペプチドによる細菌の転写・増殖阻害実験を行っていく予定である。

細菌の転写阻害因子を模倣した抗菌ペプチドの開発

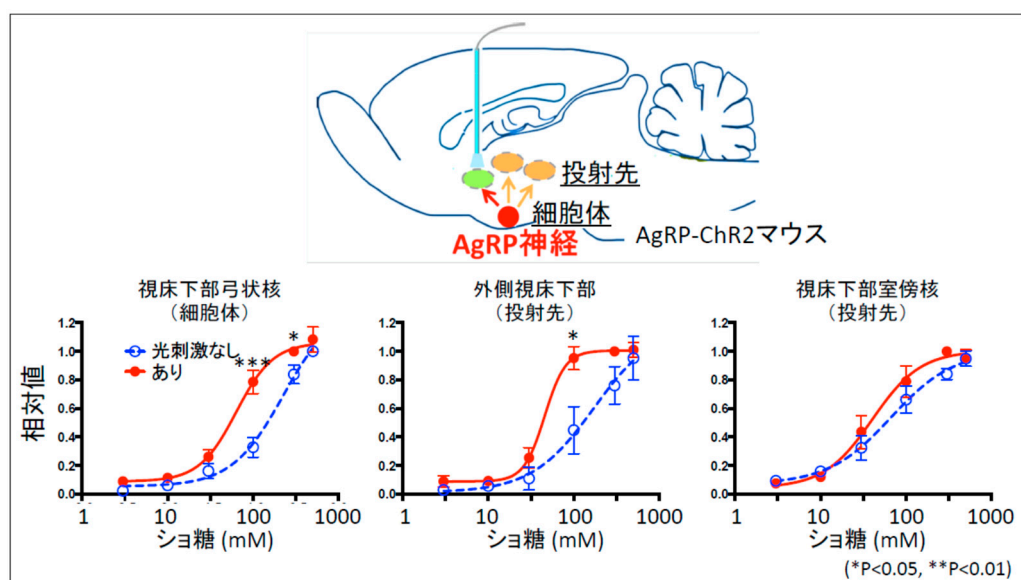


【目的】食物は栄養と感覚（味覚・嗅覚など）の両方の性質を併せ持つ。しかし、これらを統合してはじめて成立する課題—栄養・生理状態の変化によって味覚や食の嗜好性が変動する原因—は未だ不明な点が多い。この課題を解決するため、本研究では空腹になると甘味に敏感になるというショウジョウバエからヒトにいたるまで観察される現象に注目した。脳内で摂食調節を司る視床下部の活動を光遺伝学などの分子ツールにより制御し、いわば脳内に人工的に空腹や満腹を再現することで、中枢神経系がどのような神経ネットワークを利用して栄養状態依存的に味覚を調節するのか解明を試みた。

【方法】視床下部に存在し様々な部位とネットワークを構築して、摂食を誘導するアグーチ関連ペプチド産生神経（AgRP 神経）は空腹時に脳内で最初に活動する神経である。そこで、この神経の活動を光遺伝学により操作するため、光応答性のイオンチャネルであるチャネルロドプシン 2（ChR2）をコードする組換えアデノ随伴ウイルスを AgRP 神経特異的に Cre を発現する遺伝子改変マウスに導入した。このマウス（図中、AgRP-ChR2 マウス）の AgRP 神経を光刺激により活性化した場合に味覚嗜好性がどのように変化するかを brief access taste test（味溶液を 10 秒間に舐める回数を計測し、味覚嗜好性を評価する方法）により測定した。また、AgRP 神経の複数ある投射先のうち、どの部位が味覚の調節に関わるのかを AgRP 神経の軸索末端にある ChR2 を光刺激することで検証した。

【結果】まず、1 絶食したマウスの味覚嗜好性を評価したところ、甘味など好ましい味に対する嗜好性が高まるのに対し、苦味など忌避性の味に対する嗜好性が低下することが判明した。そこで、通常状態のマウスにおいて AgRP 神経を光刺激により人工的に活性化させた場合の嗜好性を評価したところ、興味深いことに、生理的な空腹状態と同様の嗜好性の変化が観察された。そこで、AgRP 神経の投射先を 1 ヶ所ずつ光刺激したところ、特に外側視床下部に投射する AgRP 神経が味覚の調節を担うことが明らかになった。また、詳細な解析を行ったところ、外側視床下部にある興奮性神経の活動レベルによって味覚嗜好性が調節されることがわかった。

光遺伝学を用いた視床下部を起点とした味覚調節神経回路の探索



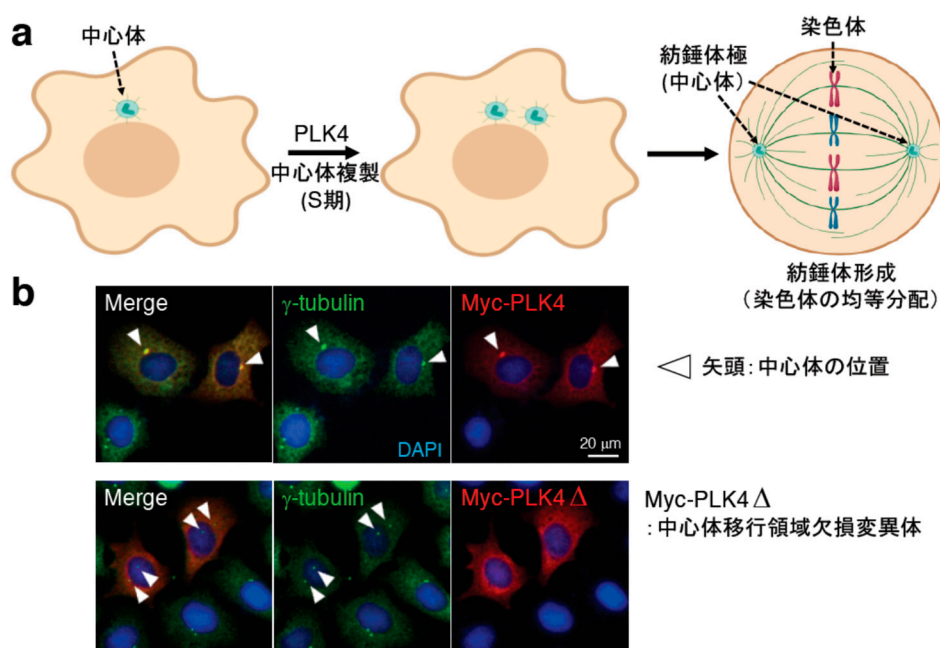
【目的】細胞内小器官の1つである中心体は、細胞分裂期に双極性の紡錘体極として機能することにより染色体の均等分配に本質的な役割を担う [1~3]。中心体数の異常は染色体の不均等分配を惹起するため癌の悪性度を高める要因となることが知られている。実際に多くの癌細胞ではDNA損傷などのストレス刺激によって容易に中心体の過剰複製が誘導されており、中心体数の異常が臨床的予後と相関することも報告されている。このため正常細胞では Polo-like kinase 4 を介した中心体複製が細胞周期を通して1度だけ起こる様に厳密に制御されており、その結果中心体数はG1期に1つ、S期に複製されて2つになる様に保持されている [4, 5]。仮に正常細胞が様々なストレス環境下に曝された場合でも中心体複製を停止させることにより中心体数は保持されるが、その分子制御機構は不明であった。

近年我々はストレス応答 MAPK と p53 経路が協調的に PLK4 を介した中心体複製を制御することにより、中心体数と染色体安定性を保持することを見出した [6]。また我々は中心体複製の開始において PLK4 の中心体局在とキナーゼ活性が必要であることも明らかにしてきた。更に世界的にも PLK4 を介した中心体複製開始機構に関して盛んに研究が行われているが、PLK4 が中心体輸送される分子機構に関しては未だ不明な点が多く残されている。そこで我々は PLK4 の中心体移行機構の解明を目指した研究と、これを利用した抗癌剤の開発を行った。

【方法】PLK4 の中心体輸送に関わる蛋白質を同定することで PLK4 の中心体移行機構を明らかにする。そこで PLK4 分子と特異的に結合する分子を質量分析により網羅的に同定する。得られた PLK4 結合分子を siRNA によって遺伝子欠損させた場合に PLK4 の中心体輸送が阻害されるか検証を行って、PLK4 の中心体移行に関わる分子を特定する。更にこれら中心体輸送制御分子と PLK4 との結合様式等を調べることで、PLK4 の中心体輸送に関わる分子制御機構を明らかにする。

【結果】今回我々は PLK4 の系統的欠損変異体を作製してその中心体移行性を検証することにより、PLK4 の中心体移行領域を特定した。また我々はこの PLK4 分子内の中心体移行領域に特異的に結合する分子を質量分析によって探索した結果、複数の候補分子を同定することに成功した。更にこれらの分子を介した PLK4 の中心体移行機構の解明にも成功した。また中心体を標的とする新たな抗癌剤のリード化合物を得ることに成功した。

染色体の均等分配を担う中心体は、PLK4 を介した複製により中心体数が厳密に制御される



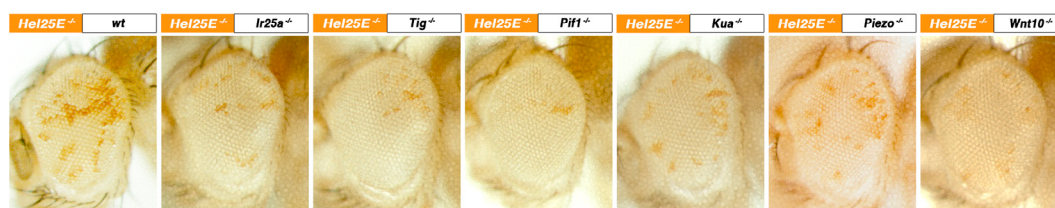
【目的】細胞社会の適者選択システムとして機能する細胞競合は、多様な生命現象に関わることが示されつつあるが、その共通原理と生理的意義はいまだ不明である。本研究では、ショウジョウバエ遺伝学を駆使し、細胞競合を引き起こす遺伝子変異を網羅的に同定してその共通項を探索・解析するとともに、細胞競合の特異的マーカー分子を同定し、生体内における細胞競合の生理的意義を解明することを目的とした。

【方法】細胞競合を引き起こしうる突然変異や遺伝子群を網羅的に同定して、その共通原理を解明するための大規模な遺伝学的スクリーニングを行い、原因遺伝子の同定を行った。さらに得られた細胞競合の共通トリガー変異を用いて、モディファイヤー・スクリーニングを実施し、細胞競合を制御する共通分子を単離・同定した。スクリーニングには EMS による突然変異導入系統および CRISPR-Cas9 誘導性遺伝子欠失変異系統を用いた。

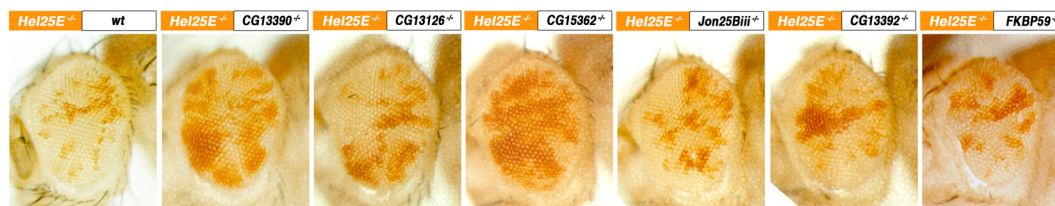
【結果】EMS 変異系統を用いたスクリーニングにより、細胞競合を誘発する突然変異として RNA ヘリカーゼをコードする *Hel25E* 遺伝子に突然変異をもつ系統が単離された。*Hel25E* 変異が引き起こす細胞競合の制御に関わる遺伝子群を単離するためモディファイヤー・スクリーニングを実施したところ、*Hel25E* 変異細胞クローンの排除を抑制（サプレッサー）あるいは促進（エンハンサー）する変異系統をそれぞれ 37 系統および 42 系統単離することに成功した。

Hel25E 変異による細胞競合を制御する遺伝子群の例

Hel25E 変異による細胞競合を促進する系統



Hel25E 変異による細胞競合を抑制する系統

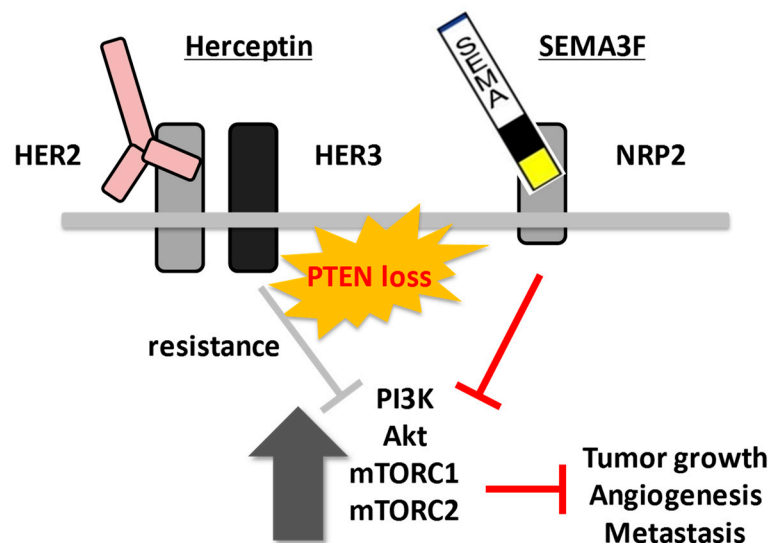


【目的】HER2 分子標的薬ハーセプチンは乳癌患者の生存率改善に大きく貢献している一方、一部の患者に対する元々の耐性や獲得耐性が大きな課題となっている。耐性機序には PI3K/AktK/mTOR 経路の活性化が関与しており、ハーセプチン処置に加えて、この経路の遮断が効果的な治療に重要であることが分かってきた。私の研究グループでは、抗腫瘍・抗血管新生効果を有する軸索誘導因子セマフォリン 3F (SEMA3F) の細胞内シグナル解析から、SEMA3F が様々な細胞の PI3K/AktK/mTOR 経路を抑制することを明らかにしてきた。本研究では、SEMA3F が新たな乳癌治療分子になるかどうか検証するため、SEMA3F が乳癌細胞に与える影響、およびマウスを用いた乳癌細胞移植モデルによって評価を行った。本研究成果を基に、SEMA3F の効果を利用した乳癌治療の臨床応用を目指すため、*in vivo* 環境下で、より安定な『セマフォリンペプチド』の開発を目指し、より効果的・安全な新規乳癌治療薬開発を目指す。

【方法】移植実験には、SEMA3F 安定発現株 4T1 細胞（同種移植）、あるいは MDA-MB-231 細胞（異種移植）をそれぞれマウス乳腺に移植して検討を行った。これらの細胞にはルシフェラーゼ遺伝子が導入されているため、発光イメージングを用いて他臓器への転移をモニターした。移植 24 日後に、腫瘍を摘出し免疫染色によって増殖マーカー Ki67、血管内皮マーカー CD31 で観察を行い、SEMA3F による効果を評価した。

【結果】SEMA3F 過剰発現 4T1 細胞 (SEMA3F-4T1) を移植した群では、コントロール 4T1 細胞を移植した群に比べて、腫瘍サイズが有意に低下していることが明らかとなった。移植 24 日後には、コントロール 4T1 群では肺、肝臓への転移が確認されたが、SEMA3F 群では転移が抑制されていた。腫瘍組織の免疫染色では、SEMA3F 群において Ki67 および CD31 陽性細胞が低下していたことから腫瘍増殖能、血管新生が抑制されていることが分かった。また、腫瘍における細胞内シグナルを解析すると Akt-mTOR シグナルが SEMA3F によって抑制されていた。一方で MDA-MB-231 細胞を用いた異種移植モデルではコントロール群と SEMA3F 過剰発現群において原発部位の腫瘍サイズに変化はなかったが、肺への転移が SEMA3F 群において抑制されていることが明らかとなった。以上のデータから、SEMA3F が乳癌の増殖、血管新生、転移を阻害する新たな治療標的となりうることが示された。

セマフォリン 3F による乳癌転移抑制メカニズム

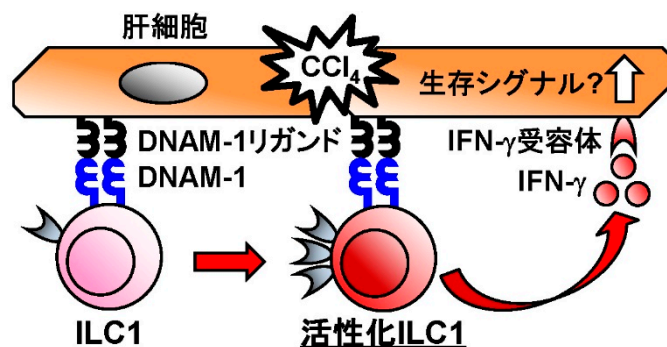


【目的】急性肝障害は致死率の高い疾患である。急性肝障害の発症と増悪には免疫応答が関与する事が知られている。しかしその分子機序、特に免疫受容体の関与については完全には解明されていない。近年、新しい免疫細胞として自然リンパ球 (ILC) が同定された。グループ1 ILC (ILC1) は肝臓にのみ多く存在し高いインターフェロン γ (IFN- γ) 産生能を持つナチュラルキラー (NK) 細胞様の細胞である。しかし肝臓 ILC1 の生理的・病理的な役割は明らかになっていない。著者らは肝臓 ILC1 がNK 細胞に発現する活性化受容体 DNAM-1 (CD226) を高発現する事を見出した。本研究では四塩化炭素 (CCl₄) 誘導急性肝障害モデルにて、肝臓 ILC1 が発現する DNAM-1 の役割を解明する事を目的とする。

【方法】野生型 (WT) 及び *DNAM-1* 欠損 (*Cd226*^{-/-}) マウスに対して CCl₄ を投与し、血漿 ALT 値にて急性肝障害の重症度を比較する。更に、*Rag-1* 欠損 (*Rag1*^{-/-}) マウスと *Rag-1*・*DNAM-1* 両欠損 (*Rag1*^{-/-}*Cd226*^{-/-}) マウスに於ける CCl₄ 誘導急性肝障害を比較する。

1. NK 細胞を優先的に除去する抗 asialo GM1 抗体を投与された WT マウスと、ILC1 と NK 細胞の両方を除去する抗 NK1.1 抗体 (PK136) を投与された WT マウスに対し CCl₄ を投与する。両群の急性肝障害の重症度を比較し、ILC1 が急性肝障害に寄与する免疫細胞か否かを決定する。
2. WT 及び *Cd226*^{-/-} マウスに CCl₄ を投与し、肝臓 ILC1 の存在率・細胞数・詳細な表現型 (活性化マーカー等)・IFN- γ 産生をフローサイトメトリーで評価する。
3. *In vitro* にて肝臓 ILC1 の DNAM-1 を架橋刺激し、IFN- γ の産生を評価する。
4. WT マウスに対し IFN- γ 中和抗体を投与後に CCl₄ を投与し、急性肝障害の重症度を比較する。

【結果】WT 及び *Cd226*^{-/-} マウスに対し CCl₄ を投与した結果、*Cd226*^{-/-} マウスに於いて CCl₄ 誘導急性肝障害が増悪した。この肝障害の差は適応免疫細胞が存在しない *Rag1*^{-/-} マウスと *Rag1*^{-/-}*Cd226*^{-/-} マウスの間でも確認された。また、NK 細胞を優先的に除去したマウスでは急性肝障害の増悪が見られなかったのに対し、ILC1 と NK 細胞の両方を除去したマウスでは急性肝障害が増悪した。更に、CCl₄ 投与後に WT 及び *Cd226*^{-/-} マウスに於ける肝臓 ILC1 の活性化と IFN- γ 産生を評価した所、*Cd226*^{-/-} 肝臓 ILC1 の活性化及び IFN- γ 産生が著しく障害されている事が明らかになった。一方、肝臓 ILC1 を単離し *in vitro* に於いて DNAM-1 を架橋刺激した所、IFN- γ の産生が亢進した。以上の結果から、活性化した肝臓 ILC1 が産生する IFN- γ が急性肝障害を軽快させる事が示唆された為、WT マウスに対し IFN- γ 中和抗体を投与後に CCl₄ を投与した所、急性肝障害が増悪した。また、肝細胞は IFN- γ 受容体を発現し、更に CCl₄ 投与後に DNAM-1 リガンドである CD155 の発現を著しく上昇させる事が確認された。従って、肝臓 ILC1 が発現する DNAM-1 は、肝臓 ILC1 活性化及び IFN- γ 産生を亢進し、急性肝障害の軽快に寄与する事が強く示唆された。

DNAM-1 による肝臓 ILC の活性化と IFN- γ 産生の亢進

【目的】本邦での死亡数第2位のがんである大腸癌の発症・進展には、癌組織周辺の微小環境が重要な役割を果たしていると考えられているが、その機構については依然不明である。我々は、大腸癌増悪に働くサイトカイン IL-11 が癌細胞周囲に存在する間質細胞で特異的に産生されていることを予備的な解析から見出している。本研究では、大腸癌における新たな治療標的の同定を目指して、いまだ不明な癌関連間質細胞の腫瘍形成における役割を明らかにするために、IL-11 を産生する癌関連間質細胞の特性ならびに機能を解明することを目的とする。

【方法】我々が新たに樹立した IL-11 レポーターマウスを用いて、大腸癌形成時における IL-11 産生をイメージングし、腫瘍形成に関わる細胞の特性を明らかにする。具体的に、レポーターマウスを用いて、炎症誘発性大腸癌モデルマウスならびに散発性大腸癌モデルマウスを作出した。さらに、マウスより得られた知見がヒトでも見られるかを明らかにするために、ヒト大腸癌検体（大腸腺腫、早期癌、進行癌）を用いて解析を行った。

また、腫瘍形成に関わる IL-11 がどのように産生誘導されているかを阻害剤スクリーニングにより明らかにする。具体的に、大腸癌モデルマウスを用いて、腫瘍部で産生が亢進している分子、および活性化しているシグナル伝達経路に対する阻害剤を処理し、その発現への寄与を検討した。

【結果】大腸癌モデルマウスを作製し、*in vivo* で IL-11 産生細胞の同定を試みた。その結果、IL-11 の産生 EGFP 細胞が腫瘍形成に伴って、腫瘍間質領域に出現することを確認し、フローサイトメトリー及び免疫組織学的解析から産生細胞を各種分化マーカーや特異的細胞表面タンパク質から特徴付けることができた。また実際に、これらのマーカー発現が、ヒト病理所見と一致するかを、ヒト大腸癌検体（大腸腺腫、早期癌、進行癌）をもちいて免疫組織学的解析を行った。その結果、腫瘍間質領域で IL-11 の発現が確認され、マウスモデルの結果と関連した細胞分化マーカーの発現が見られる事が分かった。どのようにして IL-11 の産生が誘導されているかを明らかにするために、IL-11 の発現を抑制できる阻害剤の探索を行った結果、ある酵素阻害剤を用いた場合に、IL-11 の発現が腫瘍部で減少することが示された。また、この阻害処理群においては、腫瘍細胞の細胞増殖、ならびに細胞死の亢進が認められた。すなわち、この活性化経路を介して、腫瘍形成が促進されることが示唆された。

研究計画

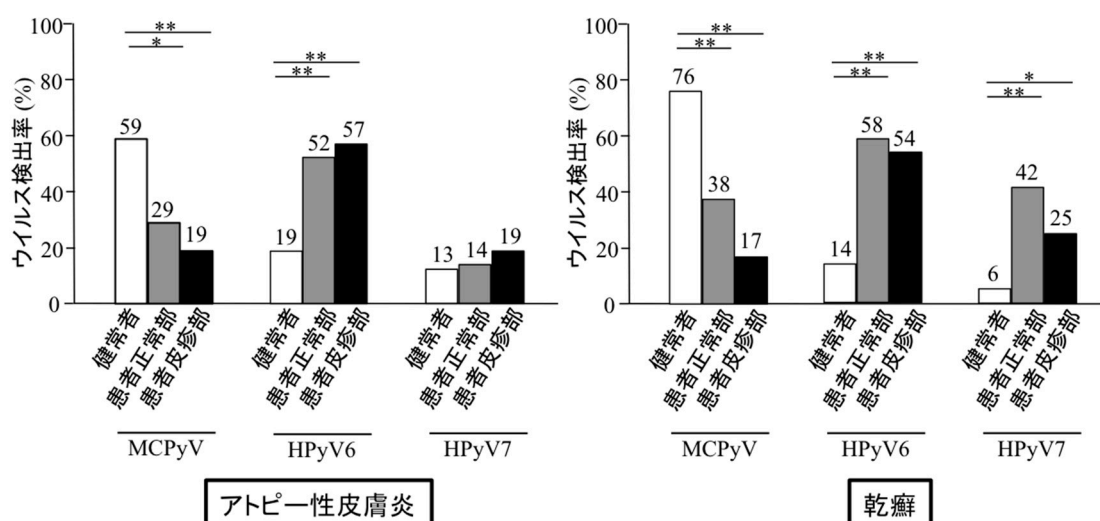


【目的】人体の外部環境に接するあらゆる部位には様々な微生物が生息している。この微生物叢の変動が健康や疾患に深く関与していることが示唆され、注目を集めている。しかし、これまでの微生物叢の研究は細菌叢に主眼が置かれ、微生物叢を構成するウイルス種と疾患との関連性については明らかにされていない。本研究では、皮膚に生息する主なウイルスであるポリオーマウイルスに焦点をあて、炎症性皮膚疾患との関連性を明らかにすることを目的とし、感染実態の調査を行った。

【方法】炎症性皮膚疾患患者の病変部（皮疹部）と非病変部（正常部）の皮膚を清潔綿棒で擦過し、皮膚スワブを採取した。DNA を抽出し、定量リアルタイム PCR 法により皮膚指向性ポリオーマウイルスであるメルケル細胞ポリオーマウイルス（MCPyV）・ヒトポリオーマウイルス 6（HPyV6）、ヒトポリオーマウイルス 7（HPyV7）のウイルスゲノムの検出および定量を行うことで皮膚上での感染状況を調べた。ウイルスが検出された例では、ウイルスゲノム配列を同定し、変異解析および系統解析を行った。さらに、同例において皮膚常在細菌である黄色ブドウ球菌の存在量を定量リアルタイム PCR 法によって検出した。これら皮膚疾患症例での感染実態と健常者の健常皮膚での感染状況を比較した。

【結果】本研究の結果、乾癬患者では HPyV6、HPyV7 の検出率およびウイルス量が健常者の健常皮膚に比べて有意に高く、一方で MCPyV の検出率とウイルス量は共に低いことが示された。また、アトピー性皮膚炎患者でも MCPyV と HPyV6 において同様の変動が有意に認められた。これらのウイルスの変動は病変部位だけではなく、ほとんどの患者の非病変部位でも観察され、患者全身でのウイルス感染状況の変動が示唆された。また、得られたウイルスゲノム配列を調べたところ、ウイルス株は全てアジア／日本の遺伝子型であった。本研究から、疾患により皮膚常在ウイルス量の変動に差があることが明らかとなり、その変化とウイルス遺伝子型により皮膚疾患の発症や病態変化を推定できる可能性が示唆された。

炎症性皮膚疾患患者と健常者における皮膚スワブからのウイルス検出率

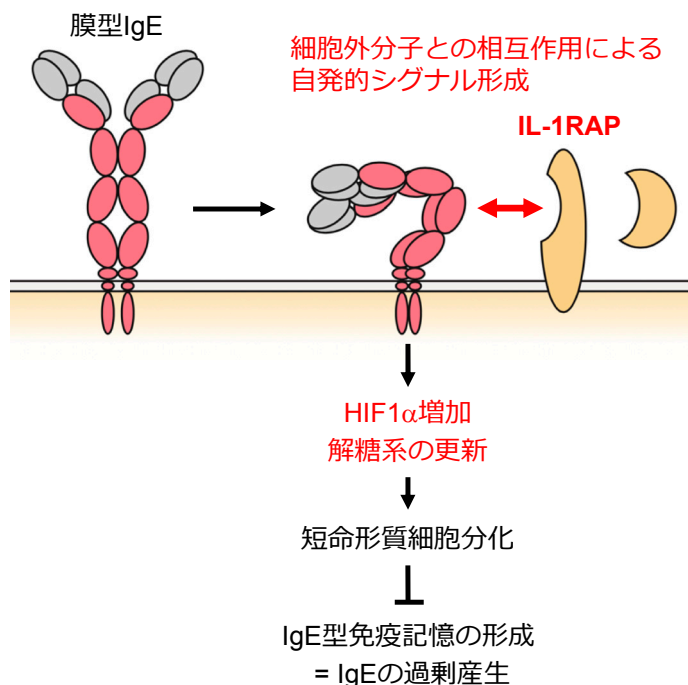


【目的】IgE 抗体は、アトピー性皮膚炎や気管支喘息をはじめとしたアレルギー疾患の発症や増悪因子としてよく知られている。IgE 抗体は健常人の血清中にごく微量しか存在せず、寄生虫感染等により一過性に産生されるが IgE⁺ のメモリーB 細胞や長期生存する抗体産生細胞 (IgE 型免疫記憶) が形成されない。その理由は、IgE⁺ B 細胞が発現する膜型 IgE が細胞上への発現のみで自発的にシグナルを発し、短命の形質細胞への分化を誘導して IgE 型免疫記憶の形成を抑制するためである。したがって、IgE 高値を示すアレルギー疾患では、膜型 IgE の自発的シグナルの形成や伝達に異常が起こり、それが IgE 型免疫記憶の異常形成をもたらしている可能性が予想される。しかしながら、膜型 IgE の自発的シグナルによる免疫記憶形成の抑制メカニズムおよび膜型 IgE が自発的シグナルを形成するメカニズムには依然として不明な点が多く、本研究ではそれらの解明を目的とした。

【方法】CD40 リガンドと BAFF を発現するフィーダー細胞を用いる独自の培養系である induced germinal center B 細胞培養系と、目的のクラスの免疫グロブリン重鎖 (IgH) のみを培養 B 細胞に発現させることが可能な IgH 置換系を用いて、活性化 B 細胞に膜型 IgE を発現させて細胞の特性変化を解析した。さらに、膜型 IgE の細胞外領域に会合する分子を IgH の部分置換体を用いた免疫沈降法により同定した。

【結果】膜型 IgE の発現は転写因子 HIF1 α の発現を恒常的に誘導すること、解糖系を活性化して形質細胞分化を促進することが明らかとなった。さらに、膜型 IgE の細胞外領域には IL-1 受容体の構成分子である IL-1RAP が恒常的に会合することで B 細胞受容体シグナル伝達経路を活性化することが判明した。

膜型 IgE による B 細胞記憶の制御メカニズム

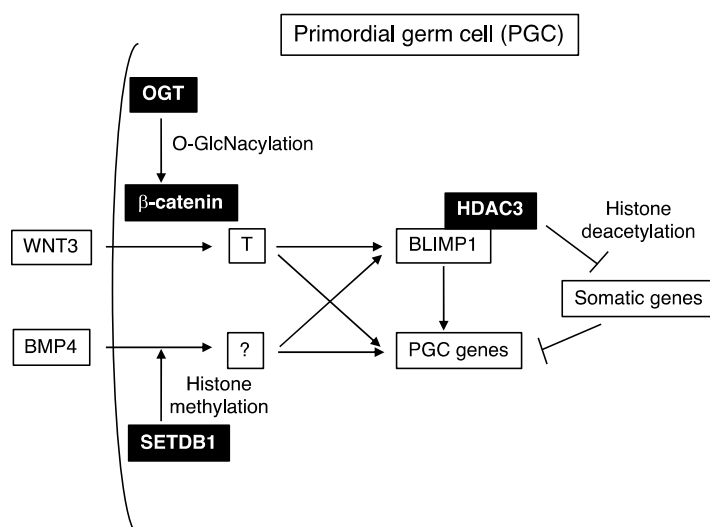


【目的】本研究では、哺乳類の生殖細胞系列の発生・分化における代謝調節の攪乱が始原生殖細胞の形成やエピゲノム制御を介した遺伝子発現に与える影響を解明することを目的として進めた。我々は、マウスの多能性幹細胞から始原生殖細胞 (PGC) への分化過程において、解糖系から酸化的リン酸化への主要エネルギー代謝の変換が起こることを明らかにした。しかし、代謝調節の異常がどのような経路を介して生殖細胞の分化や機能に影響を与えるか、は全く分かっていなかった。そこで本研究では、生殖細胞分化に必須な代謝・エピゲノム関連因子を同定し、その薬剤による阻害や遺伝子操作により生殖細胞の分化や機能に現れる異常を検証する。また、代謝・エピゲノム関連因子が生殖細胞分化に寄与する分子メカニズムを解明する。

【方法】生殖細胞の形成、分化の過程で代謝状態を調節する因子として転写因子やエピゲノム関連因子が挙げられる。本研究では、特に代謝調節とエピゲノム制御に焦点を当て、これらの制御と生殖細胞分化の関連性について研究を進めた。当研究室で行われたスクリーニングにより、始原生殖細胞の形成に関わるエピゲノム因子として、ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC3 とヒストンメチル化酵素 SETDB1 が特定された。本研究ではこれらに加え、培地組成を様々に変えて始原生殖細胞の分化誘導を行うことにより、生殖細胞分化に寄与する新規の代謝関連因子の同定を進めた。これらの遺伝子のノックダウンや薬剤による阻害が始原生殖細胞の形成を抑制する分子メカニズムを、定量 PCR を用いた遺伝子発現解析や免疫染色によるタンパク質の局在解析により検証した。

【結果】*Hdac3* と *Setdb1* の遺伝子ノックダウンは、培養下での多能性幹細胞からの始原生殖細胞形成を顕著に阻害した。また、その制御機構を検証したところ、HDAC3 は転写因子 BLIMP1 と協調してヒストン H3/H4 の脱アセチル化を介した体細胞遺伝子の発現抑制を行い、SETDB1 はヒストン H3K9 のトリメチル化を介して BMP4 シグナルの阻害因子の発現を抑制しており、それぞれ異なる経路によって生殖細胞遺伝子の発現上昇に寄与していることが明らかになった。また、*Hdac3* や *Setdb1* のノックアウトマウスの解析から、これらの因子が個体内でも生殖細胞の形成に寄与していることを明らかにした。さらに、始原生殖細胞の形成に関わる新規の代謝経路として、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) の合成を担うヘキソサミン経路を同定した。始原生殖細胞の形成に重要な役割を果たす WNT シグナル経路の主要制御因子である beta-catenin が O-GlcNAc 転移酵素 (OGT) を介した O-GlcNAc 化を受けることにより核局在を増加させることを見出しており、タンパク質の O-GlcNAc 化が生殖細胞の分化に関与する可能性を示した。

始原生殖細胞形成を制御する分子ネットワークと新規エピゲノム・代謝関連因子 (白抜き)



【目的】がんは国民死亡原因の第1位であり、このがん死亡率を低下させると共にがん患者のQOLの維持に主眼を置いた包括的治療戦略を構築することは極めて重要であり、今なお試行錯誤の最中にある。従来の治療技術では成し得なかった”Total tumor cell killing”を達成し得る治療法として免疫の利用が検討され始めて40年近くなる近年、免疫チェックポイント阻害剤の登場により、がんに対する免疫の積極的利用に注目が集まるようになった。

しかし依然としてHLAや特定の抗原に依存するモダリティの開発に留まっており、T細胞に依らないモダリティの開発が囑望されていることから、NK細胞に着目してその実用化研究開発を行うことを目的とした。

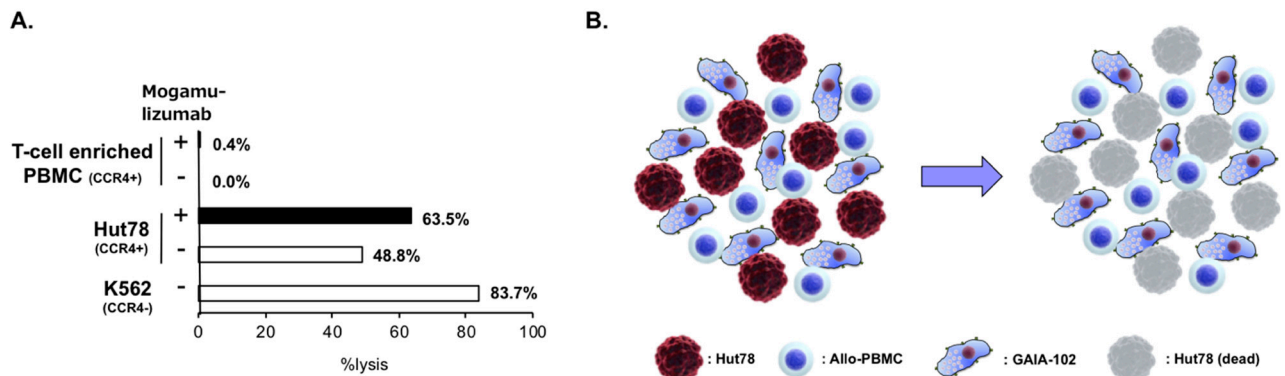
【方法】我々が開発してきたNK細胞プラットフォーム技術GAIA-102：WO2014188680A1 (JP5511039/JP5989016)、WO2012176796A1 (JP5572863/US9404083/CN ZL201280031188.5、JP-2016176379、JP-2016188166、JP-2017095288)、他を総動員し、NK細胞が傷害活性を発揮する際のキーとなる因子の探索を行った。ヒト検体の使用については九州大学医系地区部局臨床研究倫理審査委員会により承認を得ており（体外培養NK細胞を用いた再生医療等製品の開発のための予備試験、許可番号：29-218、許可期間：平成29年8月9日～平成34年3月31日）、GAIA-102の作製はAdoptCell®-NK Kit (Kohjin Bio)のプロトコールに準じて行った。

【結果】NK細胞の抗腫瘍活性の測定に標準的に用いられるK562の他、種々の組織に由来する腫瘍細胞に対する傷害活性の測定を行った結果、HLA nullかつNKG2D ligand陰性であるため一般にNK-resistantとして知られるRajiを含め、K562/IMR32/HCT116/SKOV3/MCF7/Hut78に対してE:T=1:1、2時間の共培養による傷害活性はPrimary NK細胞のそれを大きく上回ることが確認された。予想に反し、接着系の細胞に対してはSpheroidを形成した際により高い傷害活性を示すことが明らかになり、臨床応用の際には固形腫瘍に高い奏功が期待される結果となった。また急性単球性白血病細胞であるTHP-1はSpheroidを形成しないが、驚くべきことに液性因子X（炎症性サイトカインの一つ）を添加するだけでその感受性が大幅に向上することが明らかになった。

またGAIA-102をエフェクターとした場合、MogamulizumabはCCR4陽性であるHut78に対してADCC活性を示した一方、CCR4陽性の正常細胞（末梢血中CD4陽性T細胞の一部）に対する傷害活性は観察されなかった。つまり、多くの抗体医薬品が抱える有害事象の一つ、“On-target Off-tumor 効果”の原因細胞がNK細胞（GAIA-102のような体外で活性化培養を経た細胞であっても）ではないことが確かめられた。

本研究の成果はNK細胞を再生医療等製品として開発する際に貴重な情報を与えると共に、NK細胞による腫瘍細胞識別機構解明の糸口を発見した有意義なものであった。

GAIA-102によるADCC活性と腫瘍細胞特異的傷害活性

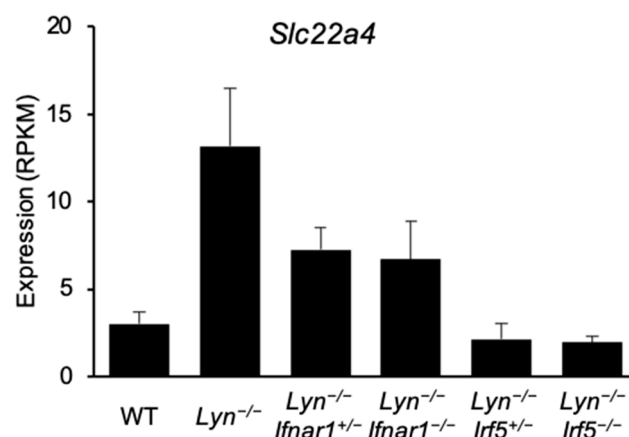


【目的】 Interferon regulatory factor-5 (IRF5) は樹状細胞 (dendritic cell : DC) などの自然免疫細胞で働く転写因子であり、自然免疫応答において重要な役割を果たすが、全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus : SLE) などの自己免疫疾患の病態発症とも密接に関連する。著者らはこれまで、IRF5 の過剰な活性化は DC による I 型インターフェロン (interferon : IFN) などのサイトカイン産生を亢進させ SLE 様病態を引き起こすこと、そして IRF5 が SLE の有力な治療標的となる可能性を示した。一方で、I 型 IFN をはじめとするサイトカイン以外の IRF5 の標的遺伝子とその SLE における役割や、IRF5 が転写を活性化する詳細な分子機構についての解析は遅れている。そこで本研究では、ヒトおよびマウスの DC における IRF5 による新たな遺伝子発現制御機構を見出し、その SLE の病態形成への関与を解明することを目的とする。

【方法】 自然免疫刺激を行った DC を用いて網羅的解析 (マイクロアレイ、RNA-seq ならびに ChIP-seq) を行い、IRF5 による新規遺伝子発現制御機構の同定を試みた。また、それが SLE 病態形成において重要であるかを SLE モデルマウスあるいは SLE 患者パブリックデータの解析により検討した。

【結果】 マウス骨髄由来樹状細胞 (bone marrow-derived DC : BMDC) における遺伝子発現プロファイルを解析した結果、Toll 様受容体 (Toll-like receptor : TLR) 刺激した BMDC では ion transport 関連遺伝子群の発現が IRF5 依存的に変動することが判明した。SLE モデルマウスの一つである *Lyn* 欠損マウスの末梢血細胞における遺伝子発現プロファイルを解析した結果、野生型マウスと比較して *Lyn* 欠損マウスで発現が亢進しており、かつそれが I 型 IFN 受容体欠損よりも *IRF5* 欠損によって有意に減弱するものとして ion transport 関連遺伝子群が抽出された。Ion transport 遺伝子のひとつである *Slc22a4* の発現制御について、IRF5 が DC において関与するかどうかをヒト形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid DC : pDC) 株を用いて検討した結果、意外なことにこれらの遺伝子のプロモーター領域に TLR 刺激依存的な IRF5 の結合は生じなかった。以上の結果から、IRF5 は DC における TLR 刺激依存的な ion transport 関連遺伝子群の発現制御に関与しているが、SLE モデルマウスにおいて IRF5 依存的に変動する ion transport 遺伝子 *Slc22a4* の場合は TLR 刺激依存的ではない経路によりその発現制御に関与することが示唆された。*Slc22a4* は炎症部位において多く発現することが知られており、SLE モデルマウスでは IRF5 依存的な炎症性サイトカイン産生を介して間接的にその発現が変動した可能性が考えられる。

Ion transport 関連遺伝子のひとつ *Slc22a4* のマウス末梢血における発現

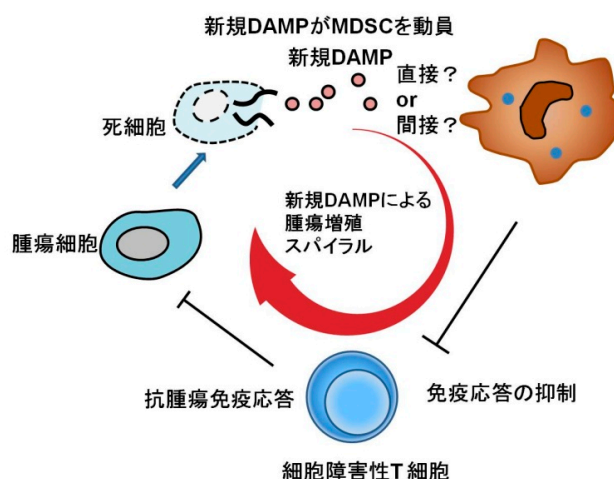


【目的】 Damage-associated molecular patterns (以下 DAMPs) は細胞死に際して放出される自己由来分子であり、種々の炎症性免疫応答を惹起して自己免疫疾患やがんなどの、炎症反応の関与する種々の病態に深く関与している。本研究では、代表的な細胞死であるネクロシス細胞より放出される分子に対し、生物学的・生化学的スクリーニングを行い、炎症病態に関わる新規 DAMPs の同定を行う。またこの新規 DAMPs が炎症応答を惹起するメカニズム、およびマウス病態モデルにおける役割を検討し、DAMPs をターゲットとした治療基盤の創出を目指す。

【方法】 新規 DAMPs の同定は、マウス大腸癌細胞株である SL4 細胞に凍結融解法によるネクロシスを惹起し、その上清を用いた。この上清はマウス腹腔マクロファージに対して TNF- α mRNA 誘導を行うという結果がすでに得られている。そこでこの TNF- α mRNA 誘導を指標として、この上清を、陰イオン交換カラム、陽イオン交換カラムおよびゲル濾過クロマトグラフィーにて精製した。精製後の TNF- α 誘導を持つ分画に対し質量分析を行った。得られた新規 DAMPs 候補分子を、SL4 細胞において CRISPR/Cas9 システムを用いてそれぞれ欠損させた後、ネクロシス細胞上清を作製し、TNF- α 誘導能を検討した。また、候補分子の遺伝子組み換え体を用いてマウス腹腔マクロファージに対する遺伝子誘導能の検討を行った。さらに候補分子を欠損する SL4 細胞をマウスに皮下移植し、移植後 4 日後より開始し、3 日毎に腫瘍径を計測した。また皮下移植後 19 日後に腫瘍内の免疫細胞をフローサイトメトリー法で解析した。

【結果】 スクリーニングの結果、新規 DAMPs は陰イオン交換カラムに結合し、陽イオン交換カラムに結合しないことが判明した。従ってネクロシス細胞上清に対し、陰イオン交換カラム結合分画かつ陽イオン交換カラム非結合分画を分取し、これに対してゲル濾過クロマトグラフィーを行ったところ、約 15~40 kDa の分子を含む分画に TNF- α mRNA の誘導能が存在するという結果が得られた。この分画に対し質量分析を行ったところ、10 個程度の候補分子が得られた。これらの分子のうち、ある分子（以降新規 DAMPs とする）を欠損した SL4 細胞のネクロシス細胞上清は、TNF- α mRNA 誘導能が減弱しており新規 DAMPs である可能性が高いと考えられた。さらにこの新規 DAMPs の遺伝子組み換え体を腹腔マクロファージに添加すると、TNF- α mRNA 誘導が濃度依存的に認められ、かつ TLR2 遺伝子欠損マウス由来の腹腔マクロファージでは TNF- α 誘導が消失した。この新規 DAMPs を欠損した SL4 細胞では野生型 SL4 細胞と比較して皮下における増殖が顕著に遅延し、腫瘍内の骨髄由来免疫抑制細胞 (Myeloid derived suppressor cells : MDSC) が減弱していた。MDSC は抗腫瘍免疫応答を強力に抑制し、がんの増殖を促進する細胞であり、一連の結果は、がん死細胞よりこの新規 DAMPs が放出され、MDSCs を腫瘍内部に動員してがんの増殖を促進する、腫瘍増殖スパイラルを形成していると考えられた (図)。

新規 DAMP による腫瘍増殖スパイラル



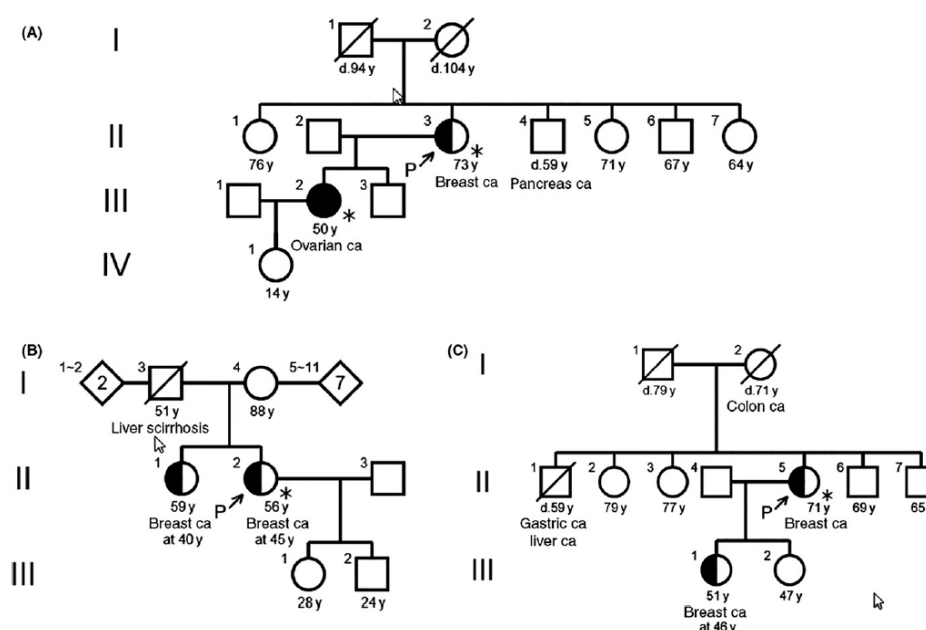
【目的】癌発症に関わる遺伝子群の生殖細胞系列変異を次世代シーケンス解析により明らかにし、そのゲノム情報を遺伝性腫瘍の診断・治療につなげる。特に、機能的意義が不明な日本人特有のバリエーション (Variants of Uncertain Significance、以下 VUS) の意義づけを行う。また、遺伝的素因、家族歴、他の癌発症リスクとの関わりを分析し、ゲノム情報と臨床情報のデータベース構築を行い、より緻密な診断を行う体制を構築する。

【方法】遺伝子カウンセリングを受け、ゲノム解析に対し同意を得た乳癌、卵巣癌患者および遺伝性腫瘍が疑われる患者の末梢血液を採取した。また、比較対象の解析をするため、当センターで保管する血液バイオバンクサンプルの中から、90 歳以上で癌を発症していない健康人の血液も解析した。血液から DNA 抽出し、生殖細胞系列変異を決定するため、遺伝子パネルを用いて次世代シーケンス解析した。遺伝子パネルとしては、*BRCA1/2* の変異とコピー数を同時に検出するパネルの検証を行った。

シーケンスで得られたゲノム情報を、標準ゲノム配列 (hg19) と比較し、生殖細胞変異の有無を決定した。病的変異については、タンパク質の構造に影響するナンセンス変異、フレームシフト変異、スプライス変異をフィルタリングで同定した。90 歳以上の癌未発症者で同定された変異は、病的な可能性が低いと判断した。さらに、稀なバリエーション (主にミスセンス変異) は、6 万人のデータベース (ExAC)、東北メディカルメガバンクの日本人データベース (iJGVD) を元にした変異の頻度情報、タンパク質構造異常のバインインフォマティクス解析 (CADD)、臨床情報との関連 (ClinVar)、文献情報等を考慮し、病的な意義を総合的に検証した。家族歴の有無、病歴、治療歴は電子カルテ情報から抽出した。

【結果】次世代シーケンス解析から、*BRCA1/2* 遺伝子の生殖細胞系列の変異とコピー数欠失を同時に測定する解析系を構築した (Hirotsu et al. *Oncotarget* 2017)。また、ミスセンス変異など日本人集団に頻度の低い機能意義不明な多型について、バイオインフォマティクス解析を実施し、CADD スコアによる病原性の評価を行った (Nakagomi and Hirotsu et al. *Cancer Science* 2018)。得られた結果の変異情報、家族歴、病歴等のデータ蓄積を行い、データベース構築を行った。

BRCA1/2 遺伝子変異陽性者発端者と親族の保有に関する家族歴

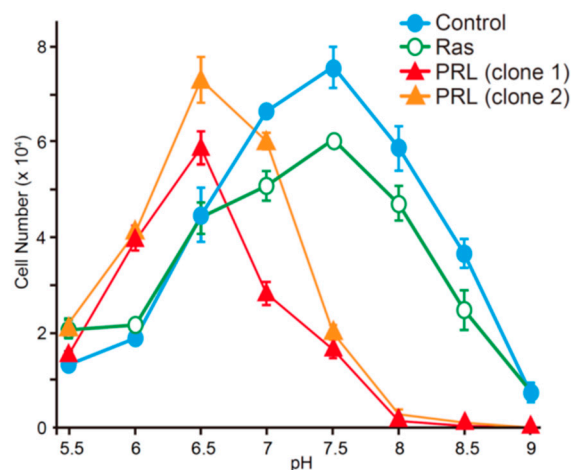


【目的】大腸がんの転移巣で特異的に高発現し、がんの悪性化に重要な働きをする PRL を上皮細胞で高発現させたところ、培地 pH に対する応答性が元の細胞と比べ大きく異なっていた。培地の pH を 7.5 に固定すると増殖がほぼ停止し、通常は増殖等に大きく影響しない pH 8.0 の弱アルカリ条件では細胞が死滅していた。その一方、培地の pH を悪性化したがん組織で見られる pH 6.5 の弱酸性状態に固定すると、細胞は旺盛に増殖することが分かった。つまり、PRL の高発現は周囲環境を酸性化させると共に、自らその pH 環境に適応して増殖しやすくなっている可能性が示唆された。PRL によるがん悪性化と密接に関わっていると想定され、本研究ではこの PRL 高発現応答性の酸性環境適応の分子機構解明を目指した研究を行った。

【方法】CRISPR/Cas9 法を用いたゲノムワイドなスクリーニングを行った。レンチウイルスを用いて sgRNA のプールを PRL 高発現細胞に導入したのち、PRL 高発現細胞のみが死滅する弱アルカリ条件で培養し、生き残った細胞のプールを得た。この集団より DNA を回収し、次世代シーケンサーを用いてどの遺伝子を標的とする sgRNA 配列が濃縮されているのか明らかにし、その後検証実験を行った。

【結果】次世代シーケンサーでの解析およびノックダウンによる検証の結果、*MYH9*、*GRIK5*、*SLC39A3* の 3 遺伝子のノックダウンにより PRL 依存的な pH 応答性の変化が消失した。このうち *MYH9* をコードする non muscle myosin IIA の機能としてリソソーム由来の小胞が細胞膜と融合してその内容物を放出する「lysosome exocytosis」と呼ばれる現象への関与が報告されていた。Lysosome exocytosis に伴って内腔の高濃度 H^+ を細胞外に排出したり、細胞膜の酸抵抗性を高めることで酸性環境への適応に寄与している可能性が考えられ、実際 PRL 高発現細胞ではリソソーム内腔に局在する酵素 β -hexosaminidase が細胞外に盛んに分泌されていた。また *MYH9* のノックアウトによって β -hexosaminidase の放出と pH 応答性の変化の双方が消失しており、併せて PRL による pH 応答性の変化に non muscle myosin IIA と lysosome exocytosis が重要であると判明した。

PRL 高発現による環境 pH 応答性の変化

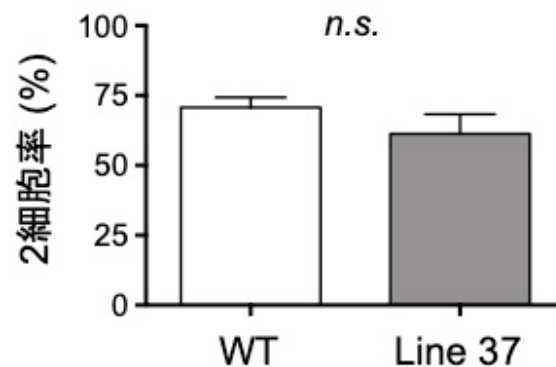


【目的】 Peroxiredoxin (Prx) ファミリーのPrx4には、全身に発現するタイプのPrx4 (=Prx4 ubiquitous : Prx4u) と精巢型Prx4 (=Prx4 testis : Prx4t) が存在する。Prx4uは小胞体でthiol oxidaseとして働き、ER oxidoreductin 1 (Ero1) やProtein disulfide isomerase (PDI) と協調してタンパク質の酸化的折畳みに関与することが近年明らかとなった。一方で、Prx4tは性成熟に伴って精巢に得意的に発現するものの、その分子機構の詳細や生理的役割については明らかでない。そこで、本研究では、*Prx4t* 欠損マウスを樹立し、Prx4tの精子形成過程における役割を解明することを目的とし検討を行った。

【方法】 CRISPR/Cas9 システムにより、*Prx4t* 遺伝子のノックアウトマウスを樹立した。マウス精巢上体尾部より採取した精子数を測定した。また、同様に、体重当たりの精巢重量を測定した。また、*in vitro*における受精実験により、精子の受精能を評価した。さらに、また、*Prx4t* 欠損雄マウスと野生型の雌マウスを交配させることで得られた産仔数を測定し、生殖能力を比較検討した。

【結果】 野生型および *Prx4t* 欠損マウス間での精子数や精巢重量の差は認められなかった。体外受精 (IVF) の結果から、*Prx4t* 欠損マウスの精子はほぼ正常に機能することが示された。また、個体レベルでも *Prx4t* 欠損雄マウスの生殖能力の異常を認めなかった。これらの結果から、予想に反して、精巢でしか発現しない *Prx4t* 遺伝子の欠損による妊孕性への影響は少ないことが明らかとなった。

Prx4t 欠損による体外受精への影響
(Line 37 は *Prx4t* 欠損マウスを示す)

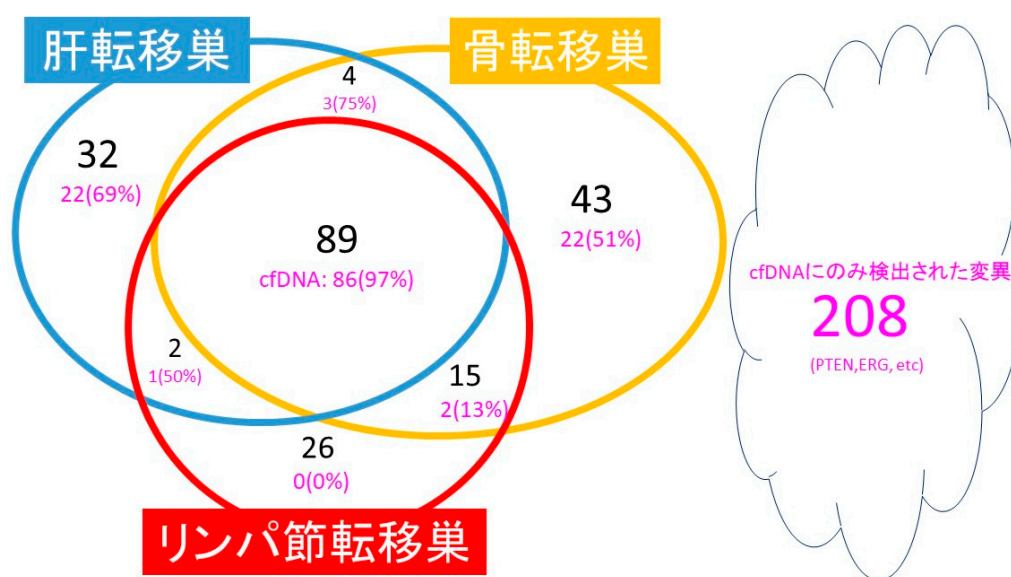


【目的】がん症例の病理解剖の際に採取、保存した屍体血中の遊離 DNA (cfDNA) をシーケンスし、全身の癌巢の genotype との比較検討を行うことで、血中 cfDNA がいかに全身のがんの不均一性を反映しているかについて明らかにする。

【方法】多発転移によって死に至った前立腺癌の病理解剖症例を対象に、凍結保存した 3 個の転移巣、屍体血中 cfDNA の全エクソンシーケンスを行った。転移巣において検出された変異、屍体血中 cfDNA において検出された変異を比較した。そして、屍体血中 cfDNA のみで検出された変異の由来を探究すべく、ホルマリン固定パラフィン包埋された多数の癌巢を対象にサンガーシーケンスを施行した。

【結果】全エクソンシーケンスを施行した 3 個の転移巣に共通した変異のほぼ全てが屍体血中 cfDNA のシーケンスによって検出された。個々の転移巣に固有の変異も多数存在したが、これらの一部は cfDNA 中に存在していた。なお、cfDNA においてのみ検出された変異の一つである *PTEN* に関して、ホルマリン固定された全身の癌巢を対象に変異の有無を確認したところ、検索した 14 個のリンパ節転移巣のうちの 1 個、15 個の肝転移巣のうちの 1 個、そして 2 個の肺転移巣のうちの片方において変異が検出された。

転移巣及び屍体血中 cfDNA の全エクソンシーケンスの結果

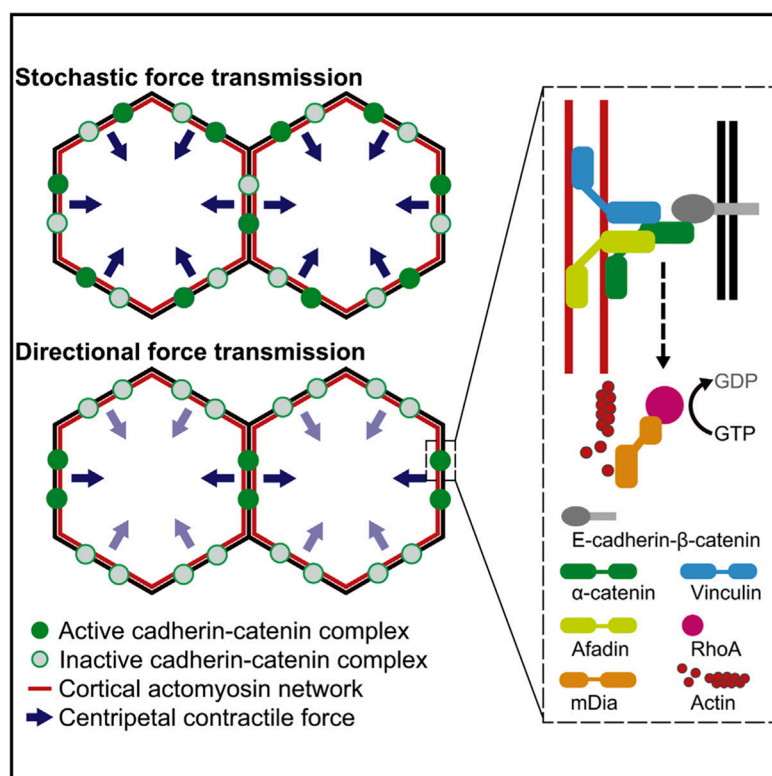


【目的】上皮細胞や血管内皮細胞などから形成される接着性組織では、細胞間で絶えず張力が発揮されており、組織内の個々の細胞には変化する力に適切に応答する能力が求められる。近年の研究から、がん細胞が集団を維持したまま効率良く運動する背景には、細胞接着装置を介して、細胞同士が引っ張り合い、細胞接着部位にかかる力に応じて柔軟に細胞内部の構造を協調的に変化させる能力が重要であることが明らかになった。しかしながら、細胞集団の協調性を裏付ける分子メカニズムの理解は不十分である。本研究では、細胞接着装置の構成分子である α -カテニンの張力依存的な構造変化に着目し、集団細胞運動における役割を実験観察と数理モデリングを通して調べた。

【方法】 α -カテニンの張力依存的な構造変化の役割を調べるために、構造解析の結果に基づいて、常に張力を受けた状態の構造を維持する α -カテニン変異体を設計し、これを安定的に発現する細胞株を樹立した。この細胞株を用いイメージング解析や生化学シグナルの解析を行なった。

【結果】本研究により、 α -カテニン張力依存的な構造変化が、RhoAの活性を亢進することによりアクチン細胞骨格の重合化を局所に限定することで、細胞間接着における収縮力を調節し、効率的な集団細胞運動に寄与することを明らかにした。また、数理モデリングを通して、偏りのある α -カテニンの張力依存的な構造変化が、不均衡な張力分布をもたらし、上皮細胞単層の協調的な遊走を可能にすることを実証した。

集団細胞運動における上皮細胞接着の可塑性は細胞間張力により制御されている



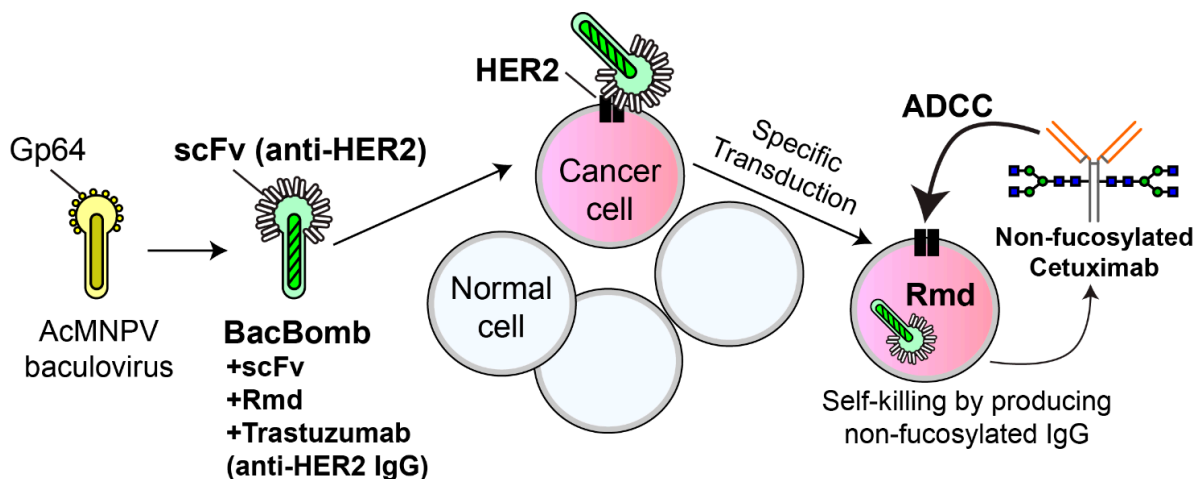
【目的】抗体医薬は病原体やがんマーカー分子に対する組換え体モノクローナル抗体であり、特にがんに対する有効な、副作用の少ない医薬品である。一方で抗体医薬は高額な薬価が問題であり、将来的な抗体医療システムを安定的に維持できるかどうかが不安視されている。

そこで本研究ではこの問題を解決すべく、精製したモノクローナル抗体を抗体医薬として用いるのではなく、患者のがん細胞特異的に自らを認識する抗体医薬をがん細胞自身に産生させ、さらには抗体医薬の糖鎖構造の改変も同時に行い、効率的な ADCC を誘導してがん細胞を死滅させる、新しい抗体医療法を提案し、その確立を目指した。

【方法】目標とするがん細胞を特異的に認識し、外来遺伝子を導入するデリバリーシステムの構築の第一歩として、HER2 発現細胞を特異的に認識することのできる組換え体バキュロウイルスを作製することとした。HER2 を特異的に認識することが明らかにされている 4D5 scFv、また scFv の代替として HER2 を特異的に認識する分子として DAPin 9_5_G を採用し、これらをバキュロウイルス Gp64 分子の膜貫通領域周辺部とキメラ構造をとることによりウイルス表面に提示することとした。

【結果】コドン最適化を行った 4D5 scFv、DAPin 9_5_G の DNA 断片それぞれを Opie2 プロモーター下流へ接続し、目的とするバキュロウイルストランスファーベクターを単離した。このベクターにはがん細胞へ外来遺伝子を導入可能であることを確認するためのマーカーとして、CMV プロモーター下流に接続した蛍光タンパク質 mNeonGreen の配列を有している。これらの配列をバキュロウイルスゲノムへ相同組み換えにより導入し、それぞれのタンパク質を表面に提示したウイルス候補を作製した。

バキュロウイルスを改変した BacBomb システムの概要



【目的】生後発達期において、大脳皮質感覚野第4層の神経回路は、感覚器からの入力によって成熟する。第4層神経回路の成熟は正確な感覚入力処理の基盤であるため、そのメカニズム解明は医学・生物学における最も重要な課題の1つである。これまでの研究で、私はマウス体性感覚野をモデルとして用い、生体新生仔における2光子顕微鏡観察法を開発することで、第4層回路成熟の分子メカニズムの一端を解明した。一連の研究により、第4層細胞樹状突起は正しい感覚入力を伝える軸索を探索していること、および神経回路形成・記憶等に関与するNMDA受容体が樹状突起ダイナミクスを制御することで樹状突起分枝パターンが形成されることが示された。

しかし、生体において樹状突起ダイナミクスを制御する細胞内分子シグナリングは、NMDA受容体の他に関わる分子が不明なため、明らかでなかった。これを解決するため、近年我々は生体の大脳皮質内で個々の細胞を標識し、同時に任意の遺伝子を抑制するシステムを開発した。本研究の目的は、本システムを用いたスクリーニングにより、樹状突起ダイナミクスに関わる未知の分子を同定する事であった。また同定される分子とNMDA受容体の関連を調べ、NMDA受容体がどのような分子シグナリングにより樹状突起ダイナミクスを制御するかを解明することであった。

【方法】本研究は、生体遺伝子導入法（子宮内電気穿孔法）・組織学的手法・新生仔脳2光子顕微鏡イメージング法等を組み合わせを行った。

【結果】

1. 大脳皮質第4層神経回路形成に関わる分子のスクリーニング

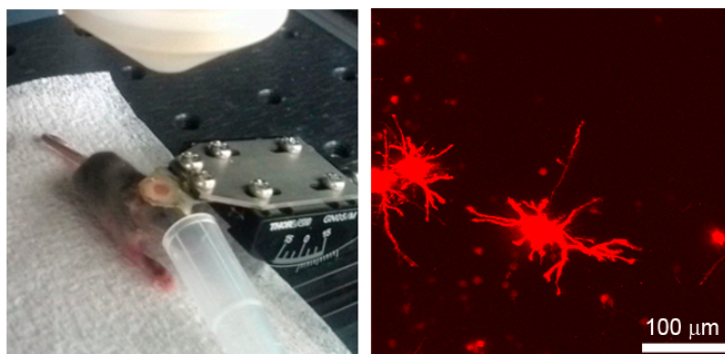
NMDA受容体関連分子群を標的とした遺伝子抑制ベクターを作成し、固定組織切片において、遺伝子抑制による樹上突起形態変化の有無を確認した。ある分子を阻害した細胞において、樹状突起の枝分かれが変化することを見出した。

2. 第4層神経細胞の生体2光子イメージング

当初の研究計画では、同定された分子を阻害した第4層細胞を生体2光子イメージングし、樹状突起ダイナミクスの変化を調べる予定であった。しかし本研究期間に、熊本大学国際先端医学研究機構で研究室をスタートすることになった。移動に伴い、研究で使用する予定であった2光子顕微鏡と遺伝子組換え動物を移動する必要性が生じた。そのため、研究期間内に同定された分子を阻害した細胞をイメージングすることはできなかった。

現在までに、顕微鏡と組換え動物の移動を終え、新しい環境での2光子イメージングの立ち上げに成功し、移動に伴う研究の遅れは最低限に抑えることができた。今後スクリーニングで同定された分子を阻害した細胞をイメージングする予定である。なお、移動の期間中にはイメージング法についてまとめた論文を発表した。

新生仔大脳皮質2光子イメージングによる樹状突起ダイナミクスに関わる分子のスクリーニング



【目的】げっ歯類を用いた恐怖記憶の形成と消去は、ヒトにおける外傷後ストレス障害の発症と治療の動物モデルとして広く研究されている。恐怖記憶には扁桃体が深く関わることが知られているほか、近年の研究により海馬や前頭前野の関与も明らかとされ、複数の脳領域が協調してミリ秒レベルでの活動パターンを制御することにより神経ネットワークを変化させることで記憶が固定化されている可能性が示唆されている。しかし、いつ、どこで、どのような神経活動が見られ、どのような脳領域間および神経細胞間の相互作用が恐怖記憶の形成や消去に必要なのかは不明である。

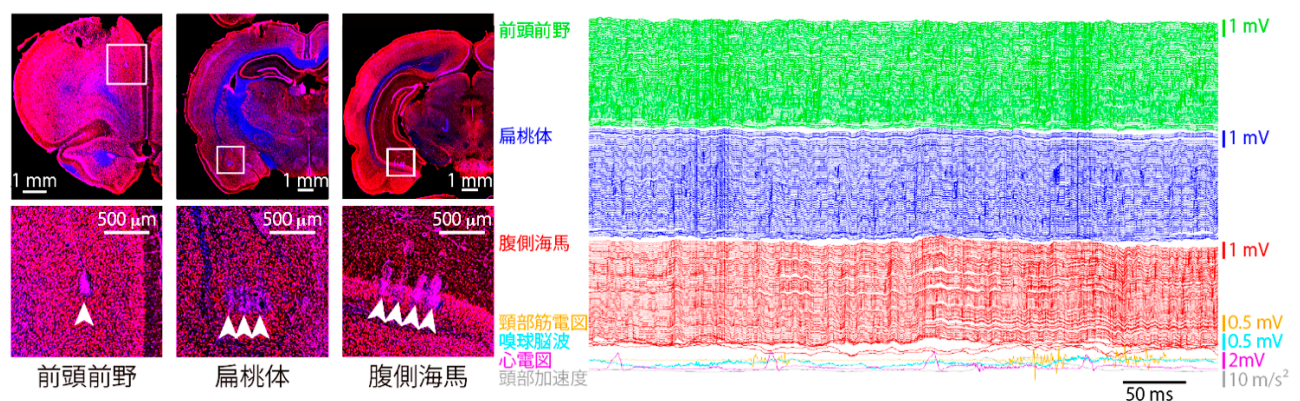
この点を明らかにするためには、恐怖記憶に関わる複数の脳領域から多数の神経細胞の活動を同時に、ミリ秒レベルの時間分解能で、記憶の形成前から消去後まで連続して記録することが必要である。そこで本研究ではまず、恐怖記憶の形成前から消去後まで連続して、扁桃体、前頭前野、腹側海馬の3領域から多数の神経細胞の活動を記録する手法の開発を目的とした。さらに、恐怖記憶の形成や消去に伴うこれらの領域の神経細胞の活動変化の解明を目指した。

【方法】3つのシリコン製多点微小電極を同時に用いることにより、自由に行動しているラットの扁桃体、前頭前野、腹側海馬の3領域から高い時間分解能をもって多数の神経細胞の活動を記録した。さらに、眼瞼内に留置した電極からの電流パルス提示によって恐怖条件付け学習を行うことにより電氣的ノイズを低減し、恐怖記憶の形成前から消去後までの神経活動を連続して記録した。同時に動物の行動や心拍、嗅球の活動を記録し、これらをもとにラットが恐怖を感じすくみ反応を呈しているタイミングを検出した。これらのデータを用い、情報理論を応用することによりすくみ反応の有無について各細胞の1つのスパイクがもつ情報量を計算し、その相関や変化を異なる脳領域間で比較を行った。

【結果】複数のシリコン製多点微小電極を用いた超大規模電気生理学と眼瞼内電極による低ノイズ電気刺激法を組み合わせるにより、複数の脳領域の多数の神経細胞の活動を恐怖記憶の形成前から消去後まで連続して高い時間分解能で記録する手法を確立することができた。

さらに、すくみ反応の有無に対する各細胞の1つのスパイクあたりの情報量を記憶プロセスの異なるタイミングで比較したところ、領域を問わず全体として情報量は正の相関を示す傾向が認められた。一方で個々のスパイクがもつ情報量の変化については領域ごとに異なるパターンが見られた。この結果は、1つの記憶が複数の脳領域において異なる形でコードされている可能性を示唆している。

超大規模電気生理学による前頭前野・扁桃体・腹側海馬からの同時記録

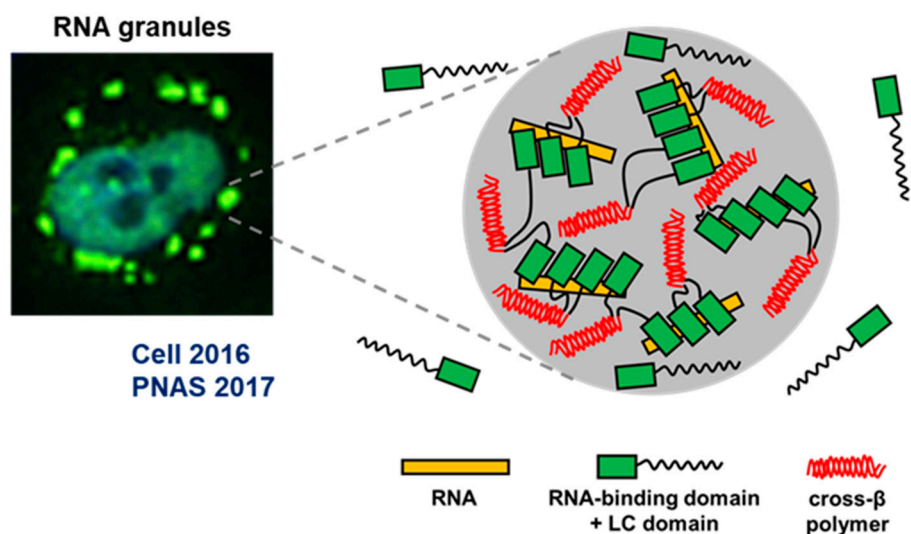


【目的】神経難病の代表疾患である筋萎縮性側索硬化症（ALS）および前頭側頭型認知症（FTD）は、その原因遺伝子が多岐に渡ることから、分子生物学的な病態解明が遅れていた。しかしながら、近年、ALS/FTD に共通した病態を有する遺伝子異常として、*C9orf72* 遺伝子のイントロンにおける異常な繰返し配列（GGGGCC）が報告された [Neuron 2011]。この *C9orf72* 遺伝子異常は、ALS/FTD 発症の最も頻度の高い原因である。また、本遺伝子異常を伴う患者由来細胞では、スタートコドン（ATG）に依存しない翻訳によって、病的なポリペプチドを産生することが明らかになった [Science 2013]。これまでの研究から、*C9orf72* 遺伝子の異常な繰返し配列から産生される PR（プロリン・アルギニン）ポリペプチドが病態発症の本態であること [Science 2014]、PR ポリペプチドが cross- β ポリマーを形成する LC ドメインタンパク質に結合することによって起因すること [Cell 2016]、PR ポリペプチドが核膜孔の FG ドメイン（LC ドメイン）と結合することで、核・細胞質間の物質輸送を阻害していること [PNAS 2017] が明らかになってきた。本研究では、ヒト脳組織における影響を明らかにすることを目的とした。

【方法】ヒト ES 細胞から作製する脳オーガノイドにさらに改良を加え、ヒト脳組織レベルでの PR ポリペプチドの影響を調べた。

【結果】ヒト脳オーガノイドの成熟度の向上に成功した。また、PR ペプチドを発現する病態モデルの確立にも成功した。

PR ポリペプチドによる機能阻害の標的となる RNA 顆粒の形成機構



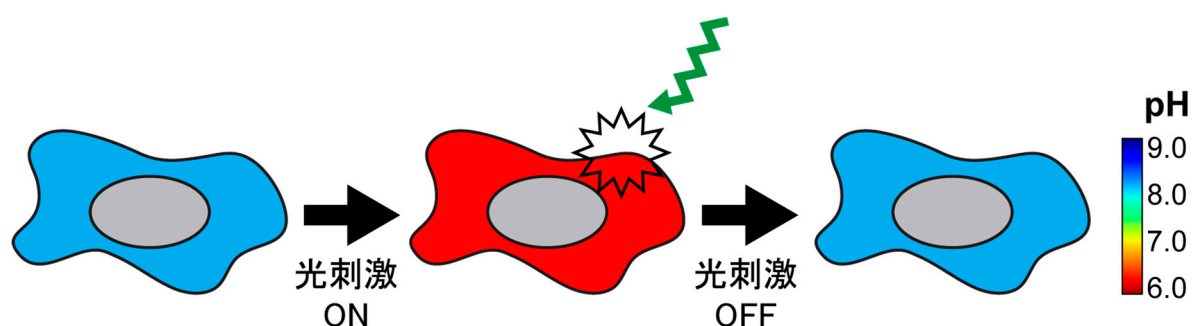
【目的】抗がん剤の多くはがん細胞において特徴的なシグナル経路に働く分子標的型のものである。しかし、標的となるシグナル経路は正常な生命活動にも必須な場合が多い。そこで、分子標的型ではないが、がん特異的な特徴を捉えた、より汎用的ながん治療法が望まれている。本研究課題では、ほとんどのがん細胞が正常細胞よりも高い細胞質 pH を保持していることに注目した。我々はこれまでに高感度な pH イメージング手法を開発するなど、細胞内 pH の定量計測を広く実施しており、細胞内 pH が実際に細胞機能へどのように働いているかを明らかにしてきた。そこで本研究課題では、高感度 pH イメージングとオプトジェネティクス技術の応用によってがん細胞の細胞質 pH を光操作し、細胞質 pH と細胞機能の関係を明確にするための新規光操作技術の確立を目的とした。

【方法】本研究では、生細胞の細胞質 pH を定量的に光操作する手法の開発を進めた。我々はこれまでに独自で開発・改良を行なった pH プローブを用いた高感度 pH イメージング計測手法を確立しており、1 細胞局所の pH 変化や pH を指標とした 1 細胞レベルでの分化のモニター等を可能としている。これまでに開発したプローブの高感度化および計測手法の改良により、生細胞内 pH 測定の定量性を向上させる。遺伝子操作が容易な大腸菌や細胞性粘菌を用いることで、プローブの性能や計測技術の効率的な改良を進める。

また、バクテリオロドプシンの一種であるプロテオロドプシンは光刺激により H^+ を特異的に細胞外へと排出するため、細胞内 pH を任意に上昇させることができる。また、チャネルロドプシン 2 は光刺激により H^+ を細胞内に取り込むため、細胞内 pH を低下させることが可能である。以上のように、プロテオロドプシンとチャネルロドプシン発現株をそれぞれ使い分けることにより、細胞内 pH の上昇および低下の光刺激制御を行うことができる。光刺激によって変化する細胞内 pH を高感度イメージングによって定量することにより、細胞内 pH を任意の値へと光操作することができ、細胞機能と細胞内 pH の関係を正確に理解することが可能となる。

【結果】本研究によって、チャネルロドプシン 2 を用いることで細胞内 pH を任意に低下させ、その pH 変化量を定量的に計測することが可能となった。本技術はがん細胞研究だけにとどまらず、さまざまな生命科学研究への応用が可能な技術である。一方、プロテオロドプシンを用いた細胞内 pH を上昇させる手法は確立できておらず、光操作ツールタンパク質のさらなる検討、および異なる細胞系での計測が必要である。

細胞質 pH の定量的な光操作手法

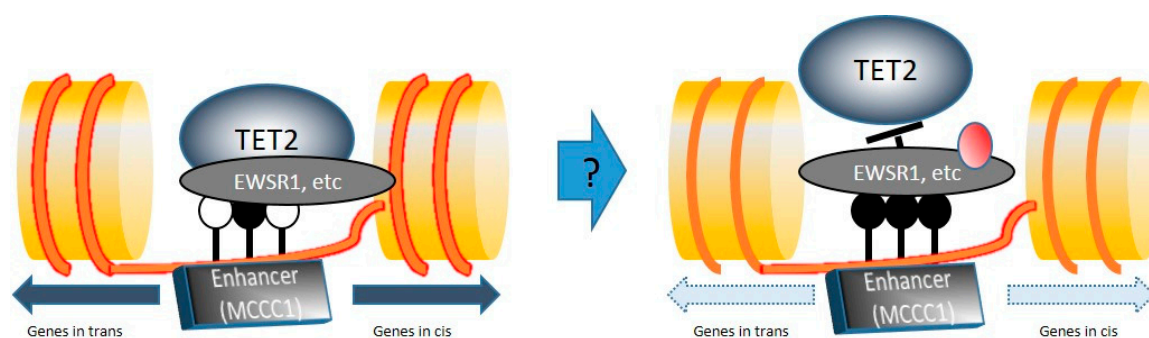


【目的】DNA メチル化は、近傍遺伝子発現の低下と関連し、生物学的に重要な機構である。DNA 脱メチル化を担う酵素として TET ファミリーが同定されたが、このうち TET2 がどのようにエンハンサー領域特異的に DNA メチル化の恒常性を維持しているかは不明である。そこで、TET2 をリクルートする因子による領域特異性の存在という仮説を立て、TET2 の影響が顕著であるエンハンサー領域特異的 TET2 結合因子の同定を突破口として DNA 脱メチル化の制御メカニズムを解明し、変異による腫瘍化メカニズムおよび真の TET2 の生物学的重要性を解明することを目的とした。

【方法】K562 への TET2 の発現導入にて TET2 結合因子群を得た。TET2 結合因子を含む沈降物を nanoLC-MS/MS 解析に供した。同定された *EWSR1*、*PAPBC1*、*PFPR36*、*ILF3* 遺伝子を K562 に発現導入した。発現導入後クロマチン免疫沈降を行い、2 つの *tet2*-DMCs 領域に対するエンリッチメントを解析した。*EWSR1* 遺伝子発現干渉を K562 用いて行い、細胞増殖能を検討した。

【結果】K562 への TET2 過剰発現により、約 200 KDa の TET2 タンパクが検出された。可溶性タンパク質液に対し、抗 FLAG 抗体にて免疫沈降を行い nanoLC-MS/MS 解析に供したところ、*EWSR1*、*PAPBC1*、*PFPR36*、*ILF3* タンパクなどが同定された。これら候補タンパクに対するクロマチン免疫沈降を行い、*tet2*-DMCs 領域への結合を検討したところ、*EWSR1* を過剰発現させた場合に、MTSS1 近傍の *tet2*-DMCs 領域における *EWSR1* のエンリッチメントが認められ、*EWSR1* がこの領域に存在することが示唆された。一方、MCCC1 領域における *EWSR1* 結合や *GAPDH* を用いたプロモーターへの *EWSR1* の結合は認められなかった。またその他の候補タンパクを過剰発現させた場合には、MTSS1、MCCC1 領域への結合が認められなかった。*EWSR1* の発現を siRNA により発現抑制を誘導したところ、本細胞の細胞増殖の増加に顕著な変化は認められなかった。

TET2 のエンハンサーにおける特異的 DNA 脱メチル化メカニズム

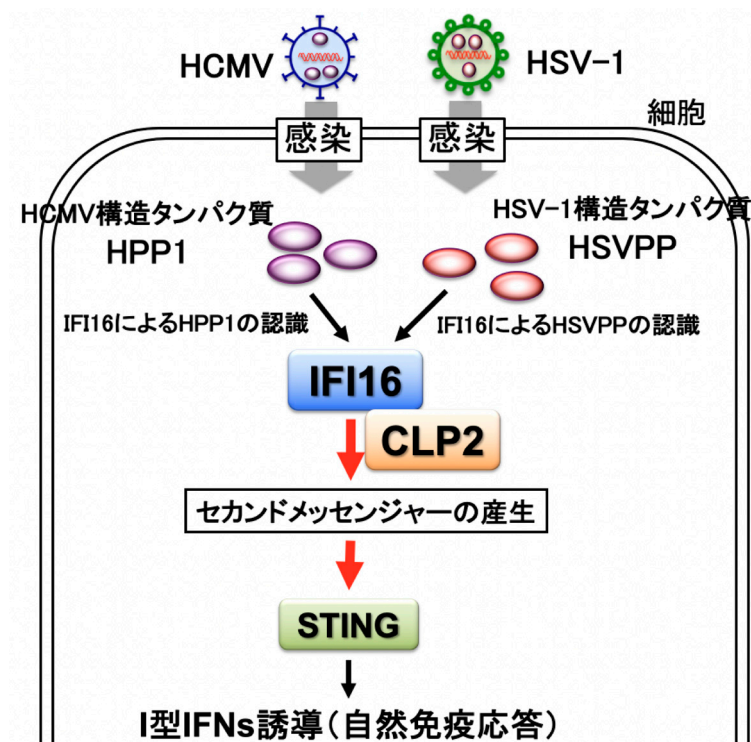


【目的】ヒトサイトメガロウイルス（HCMV）は、健常人に広く潜伏感染しながら、とくに免疫不全の患者で致死的な感染症を引き起こすヘルペスウイルス科に属する DNA ウイルスであり、実際に重篤な肺炎や網膜炎、肝炎などの原因となる、臨床的に注意すべき日和見病原体として知られているが、その自然免疫認識機構についてはまだ十分に明らかにされていない。そのような背景の中、我々は HCMV 感染時に、cGAS が核酸（HCMV ゲノム DNA）を認識する一方、IFI16 のターゲットは核酸ではなく、HCMV 粒子中に存在する構造タンパク質 HPP1（HCMV particle containing protein 1）であることが示唆される結果を得た。そこで本研究では、IFI16 による HPP1 認識経路に関わる分子機構を検討した。

【方法】IFI16 の STING へのシグナル伝達機構は、cGAS 経路と類似した機構ではないかと仮説を立て、cGAS が属する Mab21 ファミリーの中から、ヒト肺胎児線維芽細胞（human embryonic lung fibroblasts : HELF）で発現が高い因子を定量的 RT-PCR 法で測定し、その候補因子を探索した。さらに、siRNA を用いて、その候補因子をノックダウンさせ、HPP1 認識経路による IFN- β 誘導への影響を検討した。また、その他のウイルスタンパク質 HSVPP 認識による自然免疫活性化においても同様に検討した。また、HPP1 を過剰発現させた HELF から低分子化合物が産生されるかを Digitonin 処理による透過処理などを行う実験系を構築し、検討を行った。

【結果】IFI16 による HPP1 認識経路に関与するタンパク質 CLP2 を同定した。さらに、この CLP2 は HSV-1 構造タンパク質 HSVPP による IFI16 経路においても重要であり、外来タンパク質を認識するシグナル経路に関与する、ユニバーサルな因子であることが示された。また、CLP2 は、その IFI16 と STING を結ぶ低分子化合物（セカンドメッセンジャー）を産生し、抗ウイルス応答を誘導することが示唆された。

ウイルス由来タンパク質認識を認識する IFI16 経路の自然免疫シグナル伝達機構

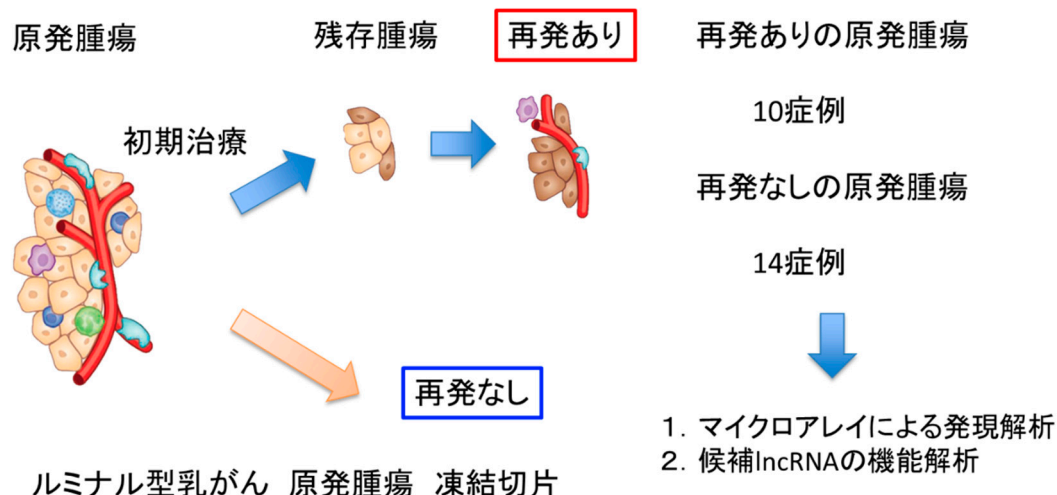


【目的】乳がんは早期発見をすることによって、五年生存率が90%を越えるため、予後の良いがんではあるものの、治療後の再発や遠隔転移は大きな問題である。近年、タンパク質をコードしないRNA、つまり non-coding RNA が細胞中に多数発現しており、様々な生命現象に関与していることが明らかになってきている。これまでに、発がんや腫瘍の抑制に関与するマイクロRNA (miRNA) や long-non-coding RNA (lncRNA) が報告されてきた。そこで、我々はがんの再発に関わる lncRNA が存在すると仮定し、それらの探索および機能解析を目的として研究を開始した。

【方法】乳がんの再発に寄与する lncRNA を同定するために、再発群と非再発群のルミナル型の原発腫瘍の臨床検体を用いて遺伝子発現マイクロアレイ解析を実施した。臨床検体および乳がん細胞株で発現の確認が取れた lncRNA を乳がんの再発に関わる lncRNA とし、その発現制御、ならびに強制発現による機能解析を実施した。

【結果】再発群と非再発群の原発腫瘍の比較において 52 種類の lncRNA が有意に発現変化していた。定量的 PCR により LINC00922、NR2F1-AS1 と SOX9-AS1 の 3 つの lncRNA を候補因子として選択した。乳がん細胞株を用いた発現制御解析から候補 lncRNA とエストロゲン受容体やプロゲステロン受容体の発現が逆相関していることが明らかになった。臨床検体解析からも NR2F1-AS1 がエストロゲン受容体と弱い逆相関があり、また NR2F1-AS1 はプロゲステロン受容体の発現と弱い逆相関が認められた。次に乳がん細胞株においてエストロゲン受容体とプロゲステロン受容体に対する siRNA とエストロゲン受容体の阻害剤タモキシフェン添加による NR2F1-AS1 の発現量の変化を定量的 PCR で検証したところ、その発現が上昇していることが確認された。抑制効果が NR2F1-AS1 のプロモーター領域へのホルモン受容体の直接の結合によるものかをクロマチン免疫沈降法で検証した結果からも、NR2F1-AS1 はルミナル型の乳がん細胞においてエストロゲン受容体とプロゲステロン受容体によって発現が抑制的に制御されていることが結論付けられた。これらの研究成果より同定された lncRNA が乳がんの再発した原発腫瘍で発現が亢進していることから予後予測をするうえでのバイオマーカーとして使用可能であること、NR2F1-AS1 はエストロゲン受容体やプロゲステロン受容体によってその発現が抑制され、発現が通常ルミナル型の乳がんにおいては発現が低いこと、さらに高発現させることでがん幹細胞性を誘導することから薬剤耐性や転移能の獲得などの悪性度と関連していたことが示された。さらに、NR2F1-AS1 を強制発現することで細胞の増殖が止まり、幹細胞のマーカーとなる遺伝子の発現や細胞の休眠に関わる遺伝子の発現ならびに遺伝子経路が活性化していることを確認した。つまり、これらの結果から、NR2F1-AS1 ががん細胞の休眠に関与し、その後の再発にも関与していることが実験的に示唆された。

乳がん細胞の抗がん剤耐性、転移、再発に関する Long-non-coding RNA の探索

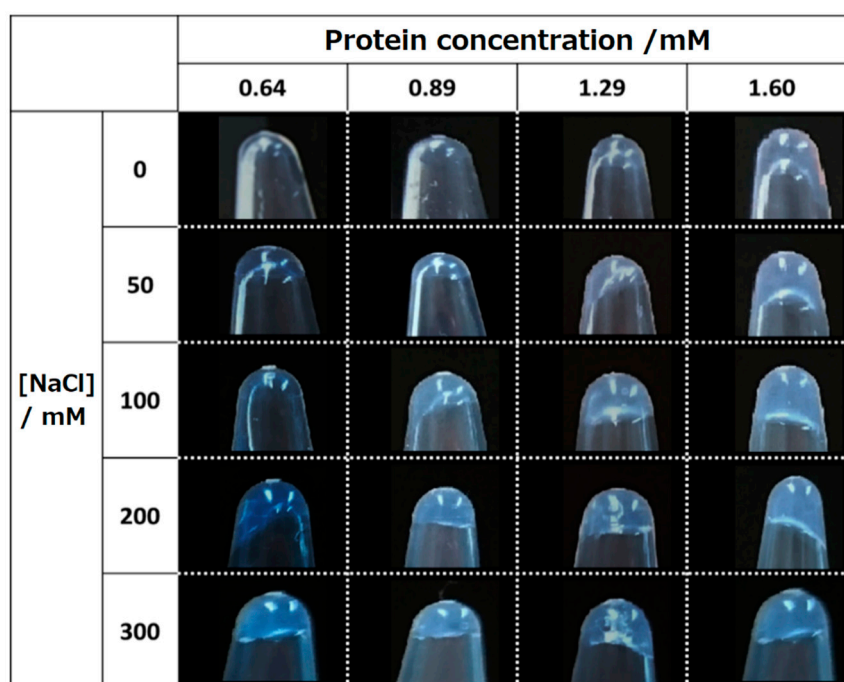


【目的】細胞は外部からのストレス刺激に応答して、組織化した構造体であるストレス顆粒を一過的に形成する。ストレス顆粒は、mRNA の翻訳を一時的に停止することでストレス環境下での細胞の生存を図る。その一方で、ストレス顆粒が細胞内で過剰に蓄積すると、不溶性の異常凝集体へと相転移して、神経変性を誘導する。重篤な神経変性疾患の予防法や有効な治療法を確立するためには、異常凝集体の形成を制御する原理を理解する必要がある。ストレス顆粒を構成する RNA 結合蛋白質の天然変性領域（プリオン様ドメイン、PrLD）は、凝集しやすいアミノ酸組成で構成されることからストレス顆粒や不溶性凝集体の形成において重要な役割を果たすと考えられる。遺伝性の疾患では、PrLD のアミノ酸変異が同定されている。本研究では、PrLD の自己重合における蛋白質変異の影響を分子レベルで明らかにすることを目指した。

【方法】RNA 結合蛋白質 T-cell intracellular antigen 1 (TIA-1) が構造転移する条件を体系的に検証して相図を作成し、得られた相図に基づいて、NMR 解析を遂行した。

【結果】蛋白質濃度および塩濃度の上昇に伴い、TIA-1 は溶液状態からハイドロゲルへと相転移した。TIA-1 ハイドロゲルの NMR 測定において、運動性の高い領域および低い領域の NMR 信号をそれぞれ取得することができた。

TIA-1 RRM3-PrLD ハイドロゲル形成の観察

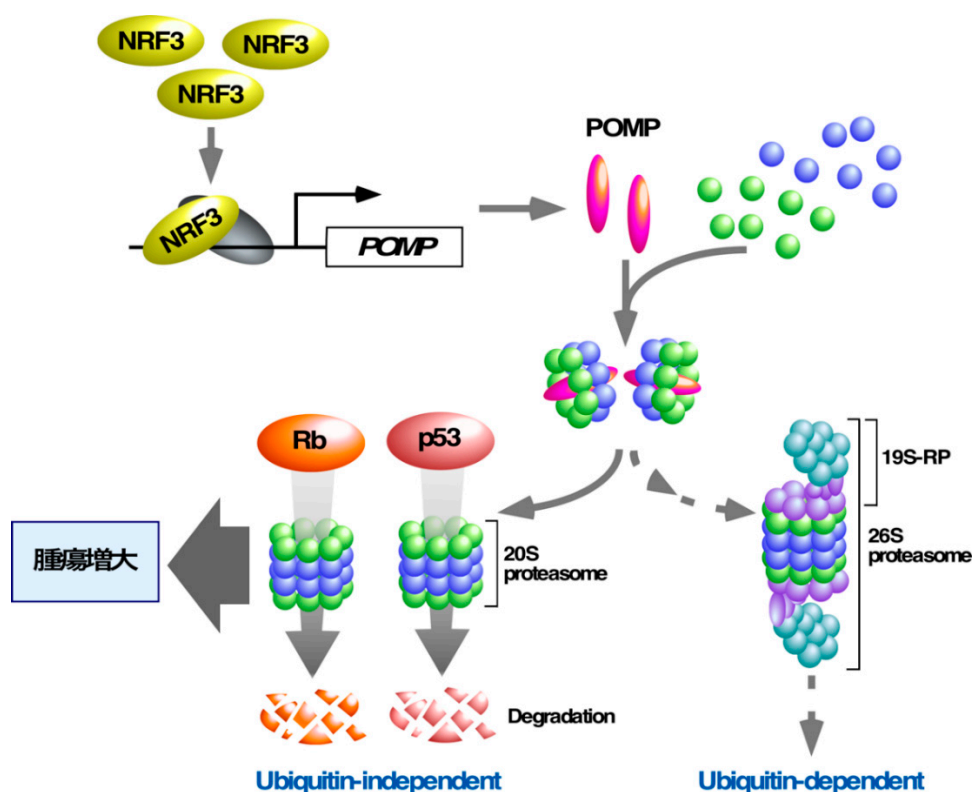


【目的】プロテアソームは、細胞内で不要あるいは過剰になったタンパク質を分解しているため、その機能低下は神経変性疾患など様々な疾患の要因になる。その一方で、がん組織ではプロテアソーム活性の亢進が見られるため、プロテアソーム阻害剤が抗がん剤として臨床使用されている。このことは、本来は生体の恒常性維持に寄与しているプロテアソームが、がん細胞の生存や増殖にも必要であることを示唆している。しかしながら、がん細胞におけるプロテアソーム活性亢進メカニズムは不明であった。我々はこれまでに、転写因子 NRF3 (NFE2L3) を過剰発現するヒト肺がん細胞 H1299 を樹立しマウス移植した結果、コントロールとして用いた GFP 過剰発現細胞に比べ、NRF3 発現により腫瘍が増大することを明らかにしていた。また、NRF3 過剰発現細胞ではユビキチン認識ユニットをもたないプロテアソーム (20S プロテアソーム) の会合が促進している可能性を見出していた。そこで本研究では、NRF3 による 20S プロテアソーム会合促進機構の解明とがん増悪との関連について調べた。

【方法】樹立済み NRF3 過剰発現およびコントロール細胞を用いて、1. リアルタイム qPCR 解析、2. クロマチン免疫沈降 (ChIP) -qPCR 解析、3. CRISPR/Cas9 を用いた *POMPARE* 変異細胞株の樹立、4. 20S プロテアソーム活性測定、5. マウス移植解析、6. ユビキチン活性化酵素阻害剤 TAK-243 を用いた発現解析を行った。

【結果】樹立済み NRF3 過剰発現およびコントロール細胞を用いて、遺伝子発現解析の結果、NRF3 は 20S プロテアソーム会合因子である *POMP* を直接転写することを明らかにした。また CRISPR/Cas9 解析によって、この NRF3-*POMP* 経路が 20S プロテアソーム活性促進だけでなく腫瘍増大にも寄与していることも実証した。さらにユビキチン活性化酵素阻害剤 TAK-243 を用いたウェスタンブロット解析の結果、がん抑制因子である p53 と Retinoblastoma (Rb) タンパク質がユビキチン非依存的に分解されることを見出した。

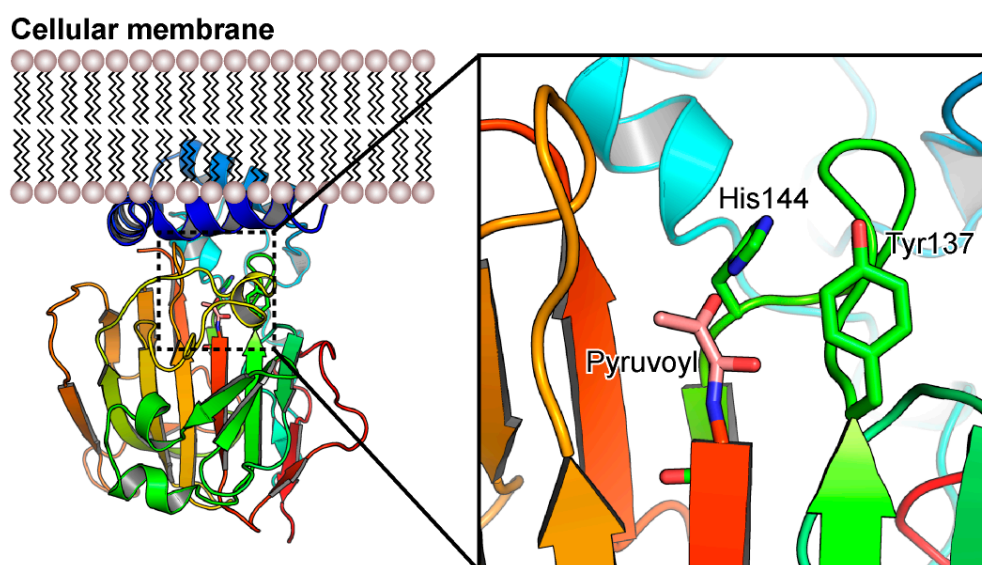
NRF3-POMP-20S プロテアソーム会合促進による腫瘍増大メカニズム



【目的】細胞やオルガネラが正常に機能するには生体膜を構成するリン脂質組成が正しく保たれていることが重要である。例えば大腸菌の細胞膜は約 70%がホスファチジルエタノールアミン (PE) から構成されており、ホスファチジルセリン (PS) から PE の生合成を担う PS 脱炭酸酵素をコードする *psd* 遺伝子は大腸菌の生育に必須であることが知られている。PS 脱炭酸酵素は細菌からヒトに至るまで広く保存されており、新規抗菌薬の開発やリン脂質代謝異常による疾患の治療のための標的分子として適していると考えられるが、PS 脱炭酸酵素による基質認識メカニズム等、PE 生合成の詳細な分子機構は明らかになっていない。そこで本研究では、大腸菌由来 PS 脱炭酸酵素 (EcPsd) に着目し、EcPsd の X 線結晶構造解析および立体構造に基づいた機能解析を行った。

【方法および結果】EcPsd を大腸菌の系を用いて調製し、良質な結晶を得ることに成功した。SPRING-8 で回折データを収集し、セレンメチオニン置換体結晶を用いた単波長異常分散法により位相決定を行い、最終的に 2.6 Å 分解能で構造を決定した。EcPsd はフォールドの片側に正電荷が優勢なくぼみを形成しており、その周囲は疎水性アミノ酸残基が多く存在していた。活性中心を形成すると考えられる EcPsd の α サブユニットの N 末端に存在するピルボイル基はくぼみの底部に位置していたことから、負電荷を持つ PS 頭部はくぼみに入り反応が起こることが示唆された。構造に基づいた変異解析により、N 末端ヘリックス領域は細胞膜への結合に関与し、活性中心付近の Tyr137 および His144 は PS 脱炭酸反応の酵素活性に重要であることが示された。

EcPsd の細胞膜結合モデルと活性部位の拡大図

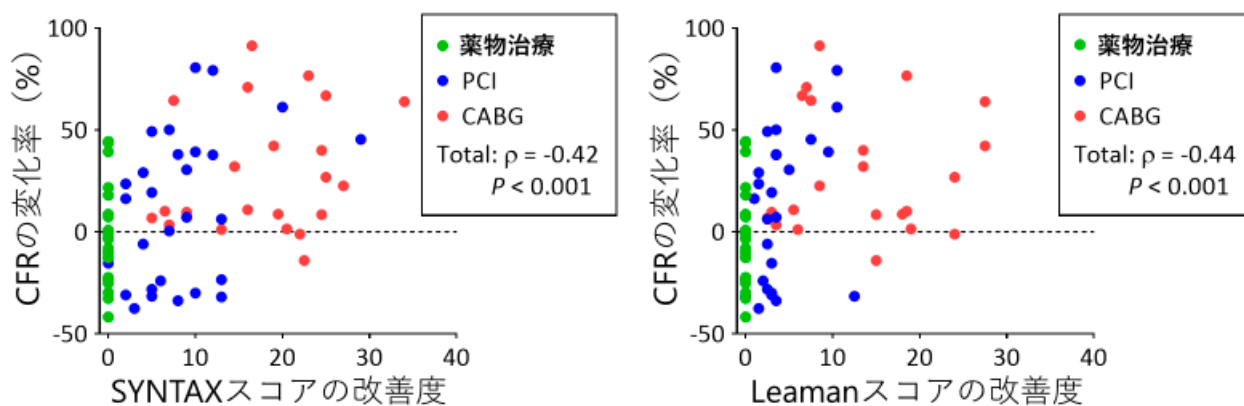


【目的】冠血流予備能 (CFR) は、ポジトロン断層撮像法 (PET) から求まる安静時の心筋血流量と、血管拡張薬などを用いた負荷時の心筋血流量の比である。CFR の低下は冠微小循環障害や機能的虚血を反映するだけでなく、冠動脈疾患の独立した予後予測因子である。しかし、冠動脈狭窄に対する冠血行再建が心筋全体の CFR をどの程度改善させるかは明らかでない。本研究では冠血行再建が心筋全体の CFR に及ぼす効果について検証した。

【方法】北海道内の 4 施設で、冠動脈疾患と診断された患者 82 名を登録した。全ての患者でガイドラインに沿った適切な薬物治療を行い、機能的虚血の程度に応じて各施設で冠動脈インターベンション (PCI) もしくは冠動脈バイパス術 (CABG) を実施した。登録時に心筋血流定量のゴールドスタンダードである¹⁵O 標識水 PET を用いて安静時と負荷時の心筋血流量と CFR を計測し、さらにその 6 か月後に PET で再評価した。冠動脈病変の解剖学的重症度や冠血行再建による改善度は、SYNTAX スコアと Leaman スコアの両方を用いて評価した。

【結果】82 名中 75 名 (薬物治療単独群 25 名、PCI 群 28 名、CABG 群 22 名) で 2 回目の PET を行い、解析対象とした。治療前の CFR は SYNTAX スコアおよび Leaman スコアと負に相関した。治療後の CFR は CABG 群でのみ有意に増加した。治療前の CFR が 2 未満と低下した研究参加者 41 名で検討すると、CFR の増加は CABG 群だけでなく、PCI 群でも認められた。治療前後の CFR の変化率は、冠血行再建による SYNTAX スコアの改善度もしくは Leaman スコアの改善度とそれぞれ有意に相関した (図)。臨床背景などを調整した多変量解析においても、CFR の変化率は冠血行再建による各スコアの改善度と有意に関連した。

CFR の変化率と SYNTAX スコアの改善度および Leaman スコアの改善度との関係



【目的】脊椎動物を基本とする生体はリン酸カルシウムを貯蔵させる骨形成により強固な骨格を形成し多彩な運動や防御を可能にする一方、他の組織では石灰化が生じないような制御が働いている。しかし、老化や動脈硬化、高血圧、糖尿病、慢性腎不全、透析などに伴い病的な血管石灰化が認められるようになり、血管の梗塞により重篤な合併症に関連する。カルシウム・リンの血中濃度は骨—腎臓—腸管というネットワークにより恒常性が保たれており、各臓器の間をホルモンが調節している。骨では骨吸収により、腎臓では再吸収と排泄により、腸管では吸収によりカルシウム・リン濃度を調節している。近年の研究より Fibroblast growth factor 23 (FGF23)・Klotho はリン利尿ホルモンとその受容体として同定され、生体内におけるリンの恒常性維持に必須であることが報告された。そして *Klotho* 欠損マウスはリンの排泄障害を生じ、高リン血症由来の早老症や血管の石灰化という病態を呈するが、その詳細な分子機序は解明されていない。Indian hedgehog (Ihh) は生理的な骨軟骨形成において必須的役割を果たしている一方で、血管の形成や石灰化などの病態への関与や機能的役割は未だ解明されていない。そこで本研究では、まず Ihh を血管局所因子として仮説を立て血管平滑筋細胞特異的に遺伝子発現を欠損させたマウスを作製し表現型を検索することで、Ihh シグナルの血管形成や血管構造の維持への役割の有無を検討することを目的とした。さらに高リン血症に伴う血管石灰化については局所的因子の関与や相互作用については不明であったため、*Klotho* 欠損マウスの解析を進めることでこの病態における Ihh シグナルの関与や影響を検討することを目的とした。

【方法】過剰麻酔にて α -Klotho マウスを Sacrifice し、採血を行い、大動脈、心臓、両側の腎臓および肺組織を摘出し、各々を用途に応じて凍結保存もしくは 70%エタノールで固定した。大動脈は腎動脈分岐部より同定し、中枢側に剥離をすすめ大動脈弓基部で切離し、摘出した。

【結果】個体の尾の一部を採取し cDNA を精製し Genotyping PCR を実施した結果、WT および KO のバンドが検出されこれにより遺伝子型の解析方法の確立を行った。8 週齢における各個体の全長および体重の測定を行い、 α -Klotho homo 変異体は発育障害を生じていることが見出された。臓器の評価として、大動脈と心臓を含む心血管系と腎臓に着目して microCT による評価を行った。その結果、 α -Klotho homo 変異体において大動脈（弓部）および腎臓にて著明な石灰化の蓄積が観察された。交配における fertility が低かったため当初からの研究実施進捗は遅れているが、今後も継続して高リン血症に由来する血管石灰化における Ihh シグナルの関与および役割について研究することを考えている。

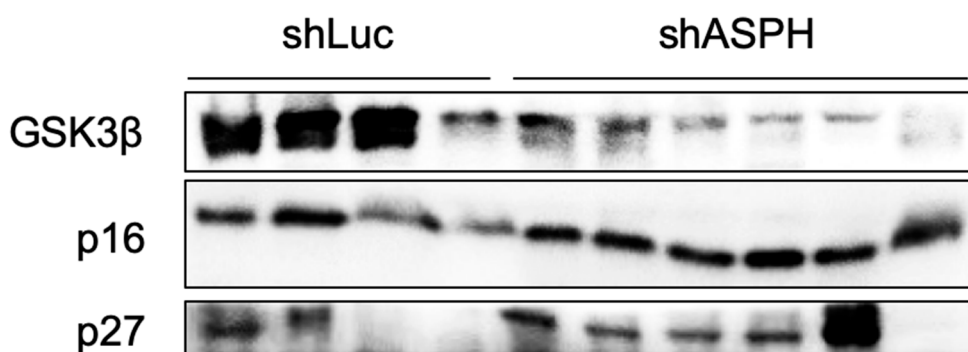


【目的】胆道癌の治療成績は未だ十分ではなく、根治切除以外に有効性の確認された治療はほとんどない。胆道癌の進展および悪性化に関わる分子機構の解明および新たな治療標的の探索を目的として、我々は Glycogen synthase kinase 3 (以下、GSK3) に注目した。本研究では胆道癌における GSK3 の機能解析および GSK3 の阻害を介した治療の有効性について検討した。

【方法】以下の研究課題 1、2 に従い研究を進めた。1. 胆道癌細胞株に対する GSK3 の阻害を介した *in vitro* の実験：ヒト胆道癌細胞株として H1、SSP25、RBE の 3 系統を用いた。small hairpin RNA (以下、shRNA) を用いて ASPH の発現を抑制することで GSK3 の機能を阻害し、*in vitro* で解析を行った。細胞増殖能の評価は、MTT を用いた Proliferation assay にて行い、Cellular senescence の評価は、Senescence-associated β -galactosidase 染色、ウェスタンブロットによるタンパク発現解析にて行った。2. *in vivo* 肝内腫瘍増殖モデルにおける GSK3 阻害の評価：ラット由来の胆道癌細胞株 (BDeneu-CL24) を用いて、ラット肝内腫瘍モデルを作製した。GSK3 の機能阻害は shRNA を用いた ASPH の発現抑制にて行い、得られた腫瘍を用いてウェスタンブロットによるタンパク発現の解析を行った。

【結果】1. ヒト胆道癌細胞における shASPH の導入株では、shLuc コントロールに比して ASPH のタンパク発現が低下しており、有意に増殖能の低下が認められ、また Senescence-associated β -galactosidase 染色では青色に染色される β -galactosidase 陽性細胞が多く観察された。タンパク発現解析では、ASPH の発現抑制下において細胞増殖能の変化と同様に cyclin D1 の発現低下を認めた。2. shASPH を導入した BDeneu-CL24 由来の肝内腫瘍は、shLuc コントロールを導入した細胞由来の腫瘍に比して小さく、得られた腫瘍を用いたタンパクの発現解析では、ASPH の発現を抑制した shASPH 導入株由来の腫瘍の方がコントロールに比し GSK3 の発現がより低下し、また p16 および p27 の発現がより上昇していた。以上の結果より、胆道癌における GSK3 の阻害が cellular senescence を引き起こす可能性が示唆された。

胆道癌細胞株肝内腫瘍モデルにおける GSK3、16、p27 のタンパク発現の関係

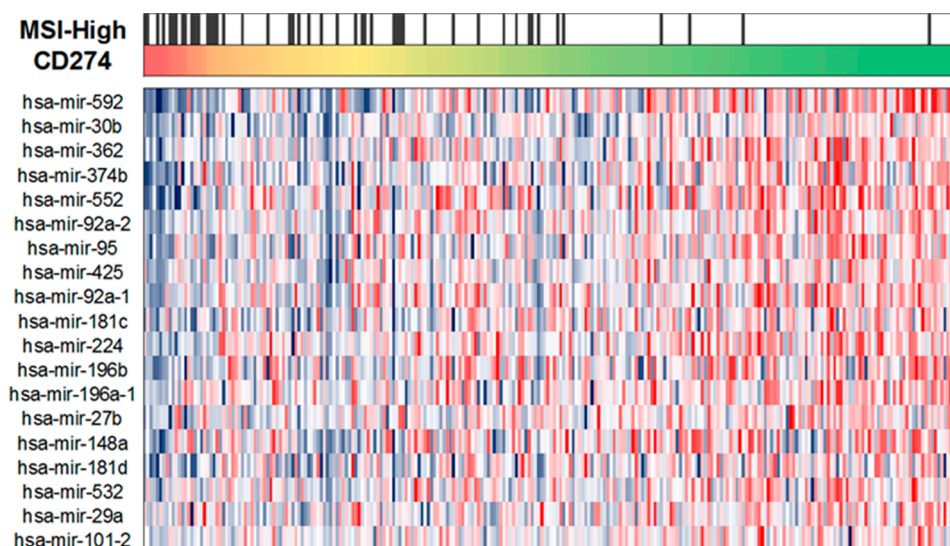


【目的】大腸癌の約15%はミスマッチ修復機構欠損（dMMR）・マイクロサテライト不安定性（MSI-H）を示し、高い免疫原性と免疫細胞浸潤を伴うが、癌細胞表面のPD-L1、免疫細胞上のPD-1などの免疫チェックポイント分子高発現により、T細胞応答は抑制されている。dMMR/MSI-H大腸癌に対しては、PD-1/PDL1を標的とした免疫療法が高い奏効率を示す。癌細胞PD-L1の詳細な発現制御機構は十分に解明されていない。本研究は、dMMR/MSI-H大腸癌における免疫抑制的微小環境下で、PD-L1発現制御に関連するマイクロRNAを同定し検証することを目的とする。

【方法】TCGAから得た260例のRNAシーケンスによる網羅的マイクロRNA発現データ、および複数のマイクロRNA標的予測アルゴリズムを組み合わせることで、PD-L1を標的とするマイクロRNAを抽出する。候補マイクロRNA、miR-148a-3pをHCT116およびSW837の2つの細胞株に過剰発現させ、細胞機能とともにmiR-148a-3p過剰発現に伴うPD-L1発現変化をqRT-PCR、ウェスタンブロット、フローサイトメトリーで評価する。癌細胞とT細胞の共培養モデルを用いて、miR-148a-3p過剰発現によるT細胞アポトーシスを評価する。

【結果】網羅的解析を用いて、PD-L1発現と逆相関し、かつdMMR/MSI-H大腸癌で発現低下しているマイクロRNA候補のなかから、PD-L1 mRNAの3' UTRを標的とし得るマイクロRNAとしてmiR-148a-3pを同定した。大腸癌細胞株にmiR-148a-3pを過剰発現させることで、細胞増殖能やコロニー形成能の低下やアポトーシスの増加を認め、miR-148a-3pの癌抑制的機能が確認された。HCT116およびSW837の2つの細胞株において、miR-148a-3p過剰発現により、mRNA・タンパク・細胞表面レベルでそれぞれPD-L1発現が抑制されることを確認した。さらにmiR-148a-3p過剰発現は、IFN- γ 投与下に誘導された癌細胞表面PD-L1発現をより強力に抑制した。大腸癌細胞株とT細胞の共培養モデルを用いることで、癌細胞におけるmiR-148a-3p過剰発現がT細胞に対する細胞障害性を低下させることを見出した。

dMMR/MSI-H大腸癌において、PD-L1を制御する候補マイクロRNAの抽出

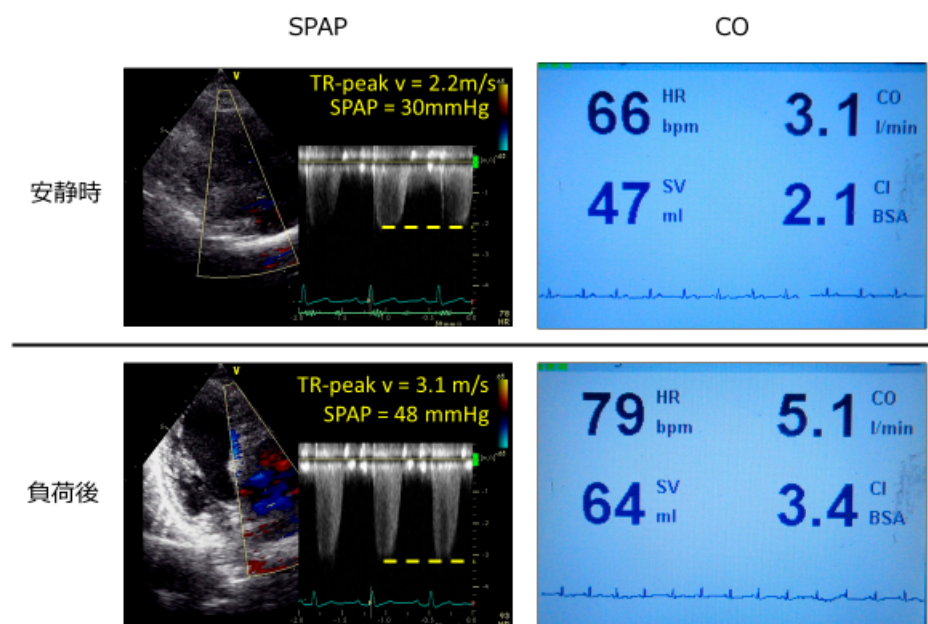


【目的】肺高血圧症（pulmonary hypertension、PH）は様々な原因により肺動脈圧が上昇する病態であり、特に全身性強皮症（systemic sclerosis、SSc）はPH発症の高リスク群である。SScにおいてPHは主な死因の1つであり、早期発見・早期治療による予後改善効果が期待される。SSc患者に対するPH検査のうち、非侵襲的な検査法として心エコー図検査が広く用いられている。一方で安静時の心エコー図検査だけでは早期の病態をとらえることに限界があるため、運動負荷心エコー図検査により、潜在性肺高血圧症を検出する試みがなされてきた。本研究の目的は潜在性肺高血圧症の頻度の調査をSSc患者に対して行い、さらに同意の得られた患者において肺血管拡張薬による治療を行うことで、将来の顕性肺高血圧症への進展を抑制することが可能かどうか検討することである。

【方法】2013年1月から2017年12月の期間に、徳島大学病院超音波センターで6分間歩行負荷心エコー図検査を施行したSSc患者を対象とした。左心不全、慢性閉塞性肺疾患、先天性心疾患、肥大型心筋症、心房細動・ペースメーカ調律、三尖弁逆流（tricuspid regurgitation、TR）が消失、安静時にPHの基準を満たす症例を除外した。

【結果】2019年3月末までに243例を登録した。全症例の内訳は年齢 58 ± 13 歳、性別は女性が90%であった。潜在性肺高血圧症の基準を満たした症例は57例であり、全体の23%であった。以下に潜在性肺高血圧の基準を満たした症例の代表例を提示する。現在、6分間歩行負荷心エコー図検査を受けた患者を登録し、前方視的に予後調査を行っている。また、治療介入した症例もあるため、治療介入の有無により予後に差が出るかも検討をする予定である。今後も症例登録を進め、潜在性肺高血圧症に対する肺血管拡張薬の治療効果について、検討する予定である。

潜在性肺高血圧症 代表例



193 オルガノイドによる少数転移乳癌分子メカニズムの解明

工藤 麗

【目的】少数転移乳癌（Oligometastatic Breast Cancer : OMBC）とは、転移臓器数や大きさ、個数が限られた転移乳癌のことである。これまでは、転移の大きさや個数が少ない OMBC に対しても、転移乳癌として薬物療法を中心に緩和的治療が行われてきた。しかし近年、転移の少ない症例では、十分な薬物療法の上で切除や放射線治療などの局所治療を加えることにより予後が改善されとの報告がなされるようになった。我々の施設では以前から OMBC に対して積極的な集学的治療を行っており、2012 年に後方視的な解析を報告している。1980～2010 年の OMBC75 例では 20 年生存率が 34%であり、転移乳癌の長期生存 3～4%と比較すると、極めて高いものであった。しかし、OMBC の分子生物学的特徴についての研究はほとんど報告はない。そこで本研究では、前向きの特ランスレーショナルリサーチとして、OMBC の分子生物学的特徴を明らかにする。

【方法】乳癌の原発巣および転移巣から針生検にて組織を採取した。組織をメス、酵素により処理しマトリゲル中で培養しオルガノイドの作製を行なった。同様に処理した組織を、Swiss J2 3T3 細胞と共培養し、Conditionally reprogrammed (CR) 細胞を作製した。CR 細胞を用いて、マイクロアレイ解析・乳癌での変異が高頻度である 93 遺伝子の DNA ターゲットシーケンスを行なった。OMBC から作製した CR 細胞を用いて、Anti-cancer compound library を添加し、薬剤スクリーニングアッセイを行なった。

【結果】乳癌原発巣 4 例から CR 細胞は 3 例作製できたのに対して、オルガノイドは 1 例も作製することができなかった。そのため、以降の実験系は CR 細胞を用いて行うこととした。原発巣に比較し CR 細胞で発現上昇した遺伝子 162 遺伝子と、発現低下した遺伝子 271 遺伝子を対象として KEGG パスウェイ解析を行なったところ、細胞接着に関与する因子が変動していた。原発巣では 119 遺伝子に変異が、転移巣では 118 遺伝子に変異が同定され、そのオーバーラップは 96%であった。OMBC の薬剤スクリーニングアッセイでは 66 の薬剤が感受性ありとされ、そのターゲットとなる分子が同定された。

表：OMBC の転移巣において感受性のある薬剤のターゲット分子

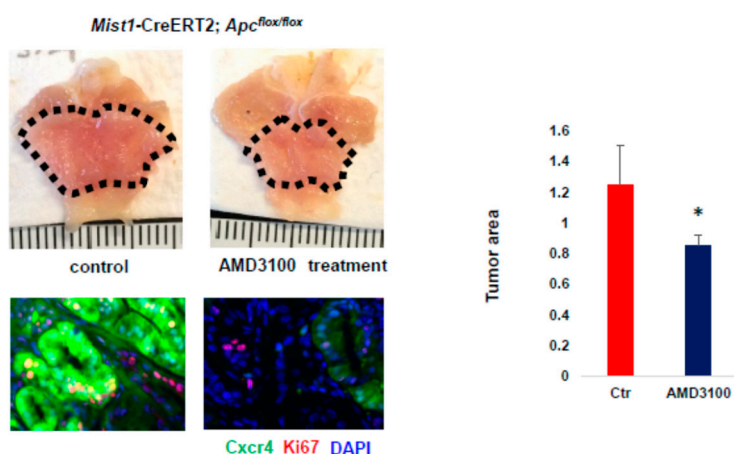
EGFR	PI3K
ER/PR receptor	PLK
FGFR	VEGFR
mTOR	Aurora kinase
PDGFR	Bcr-Abl
Topoisomerase	

【目的】我々は胃がんの幹細胞として Mist1 陽性細胞を同定し、治療標的となることを Cancer Cell 誌 (2016) に報告した。その後の検討で、Mist1 を標的とする抗がん剤治療は効果を示すが、別の胃前庭部のがん幹細胞マーカー CCK2R (GUT 2015) が代償的に増加することを発見した。これらのことから、代償的増殖幹細胞やがん微小環境を含めた複数の経路を同時に標的とする新規抗がん療法の有用性が期待できると考えた。この仮説を検証することが本研究の目的である。

【方法】1. Mist1 が、胃がんの幹細胞であることを示す。2. Mist1 陽性細胞が CCK2R を含む他の胃がん幹細胞マーカー陽性細胞と異なることを示す。3. Mist1 陽性細胞と CXCR4 陽性細胞のオーバーラップを示す。4. CXCR4 /CXCL12 シグナル阻害の抗がん作用を示す。5. Mist1 陽性がん幹細胞標的治療による代償的 CCK2R 増加を示す。同時に、Mist1 を標的とする治療時に代償的にがん細胞生存に働く経路、分子、タンパクの網羅的検索のためにマイクロアレイ、プロテオミクス解析を行う。特に、神経・血管・免疫細胞といったがん微小環境から誘導されるサイトカインに着目。6. Mist1 陽性細胞と CCK2R 陽性細胞を同時に標的とする抗がん療法の効果：胃がんマウスモデルに対する AMD3100 と CCK2R 抗体の併用療法を検討。さらに、5 の網羅的解析によって有効と考えられる代償的経路を標的として含めた併用療法を行う。同様の手法を、大腸がんモデルマウス、膵臓がんモデルマウス、肺がんモデルマウスに応用する。

【結果】進行がんに対する抗がん剤治療は精力的に研究されている。抗がん剤治療が開始初期には効果的であっても、治療経過とともに耐性を生じるケースが多く、最も進んだ Stage の胃がん、大腸がんの予後は抗がん剤治療を行っても 1 年程度に留まることが問題である (2016 Nature Rev Clin Oncology)。我々は胃がんの幹細胞 (Mist1 陽性細胞) を同定、Mist1 を標的とする抗がん剤治療を行った。同治療は別の幹細胞マーカー CCK2R 陽性細胞の代償的増加を惹起した。このことから、Mist1 陽性細胞と CCK2R 陽性細胞を同時に標的とする新規の治療が効果的な可能性が高いと考えるに至った。予備的検討では下記の結果を得ている。Cxcr4 と Mist1 はオーバーラップし、double positive の細胞は *in vitro* で高い colony formation ability を示す一方 Cxcr4 と CCK2R はオーバーラップなしであった。CXCR4 阻害薬 AMD3100 は抗胃がん作用を示した。また、Tie2-Cre/Cxcl12^{flx/flx} マウスの胃がんモデルは Cxcl12 シグナルの低下に伴い、幹細胞マーカー Mist1 の低下、別の幹細胞マーカー CCK2R の代償的増加を示した。

Mist1 陽性細胞と CCK2R 陽性細胞を同時に標的とする新規の治療の検討

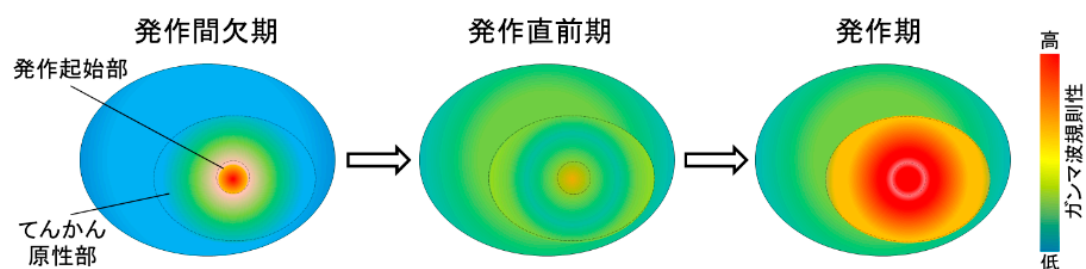


【目的】 焦点性てんかんの脳波におけるガンマ波（30～70 Hz）は、発作起始部と周辺のでんかん原性部を結ぶ介在ニューロン間ネットワークの同期化に関連していることが示されている。その同期化が、発作起始部とてんかん原性部においてなんらかのタイミングでガンマ波規則性の増加をもたらすのではないかと仮説を立てた。本研究は、デジタル脳波において波形規則性を定量化できる Multiscale entropy 法を用いて、焦点性てんかんにおけるガンマ波規則性をエントロピー値として算出し、その時間空間的ダイナミクスを評価することを目的とした。

【方法】 術後転帰が良好であった限局性皮質異形成症の 13 人の患者の合計 1,164 電極で記録された頭蓋内脳波データを後方視的に分析した。発作間欠期、発作直前期、および発作期の 20 秒間において、個々の電極でガンマ波（28.6～60.7 Hz）のエントロピー値（エントロピー値が小さいほど、ガンマ波規則性が高い）を計算した。また、発作起始部およびてんかん原性部（実際に切除された部）において、エントロピー値を Z 値（Z 値が小さいほど、ガンマ波規則性が高い）で標準化してヒストグラムを作成した。

【結果】 発作間欠期では発作起始部においてエントロピー値が最も低下し、発作直前期では発作起始部においてエントロピー値がやや増加し、発作期ではてんかん原性部においてエントロピー値は特異的に低下した。Multiscale entropy 法を用いたガンマ波規則性の時間空間的解析により、焦点性てんかん発作発生のメカニズムが示されたと同時に、発作間欠期の最小エントロピー値（最も高いガンマ波規則性）は発作起始部のマーカーとして、発作時の低いエントロピー値（高いガンマ波規則性）はてんかん原性部のマーカーとして発展する可能性が示された。

焦点性てんかん発作発生におけるガンマ波規則性の時間空間的ダイナミクス



196 自己炎症性角化症の病態解明と新規治療法の開発

武市 拓也

【目的】最近我々は、CARD14 異常症を始めとした自己炎症性疾患の一部は、皮膚を炎症の主体とし、時として全身炎症を来す、自己炎症性角化症 (autoinflammatory keratinization diseases : AiKD) である、という新しい疾患概念を提唱した。しかしながら、AiKD が比較的稀な疾患であること、多彩な遺伝子変異がその病因であり、類似の臨床像を呈する症例でも原因遺伝子が異なること等、病因の完全な解明への道には、いくつもの障害が残されている。本研究では AiKD の包括的病態解明を目指し、新規治療法開発に直結する基礎的データを得ることを目的とする。

【方法】1. 病因遺伝子が明らかにされていない汎発性膿疱性乾癬 (generalized pustular psoriasis : GPP) / 毛孔性紅色粗糠疹 (pityriasis rubra pilaris : PRP) 症例の DNA を用いて、全エクソームシーケンセス法を行った。2. AiKD の病態を明らかにするために、GPP/PRP 症例の皮膚から抽出した RNA を用いて RNA シーケンセス法を行った。3. 患者の表現型を、既報告の症例と比較して、その相違点を包括的に分析した。4. 集積された AiKD 患者を、遺伝子型に基づいて分類し、既存の炎症性角化症の治療薬について、その薬効を検討した。5. AiKD モデルマウスの作製を開始した。

【結果】10 家系の GPP/PRP 症例において、全エクソームシーケンセス法を施行し、既報告の遺伝子変異を複数同定した。その中で、IgG4 陽性形質細胞の関連が示唆されたアロポー稽留性肢端皮膚炎の症例を報告した。また、文献的考察により、皮膚の良性腫瘍にも分類される角化性病変である汗孔角化症が、自己炎症性角化症に含まれることを世界で初めて報告し、自己炎症性角化症の疾患概念を拡大することができた。

現在想定されている汗孔角化症の病態機序

Table 1. Current hypothesized pathogenesis of porokeratosis in autoinflammatory keratinization diseases

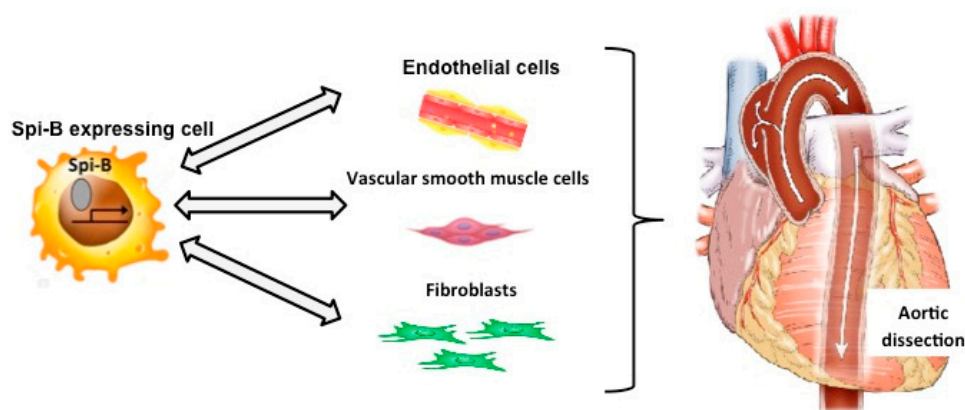
Disease	Genetic causative factor (frequency)	Hypothesized pathogenic inflammatory mechanisms and pathways
Porokeratosis	<i>MVK</i> mutations (prevalent)	5-Phosphomevalonate ↓
	<i>PMVK</i> mutations (rare)	→ 5-Pyrophosphomevalonate ↓
	<i>MVD</i> mutations (prevalent)	→ Geranylgeranyl pyrophosphate ↓
	<i>FDPS</i> mutations (rare)	→ Small GTPase ↓ → interleukin-1β ↑?

【目的】大動脈解離は「突然死」の原因として最重要疾患である。大動脈解離の機序は、大動脈中膜の変性により、剪断応力に対し大動脈が脆弱な状態となるため、一過性の血圧上昇により大動脈中膜の解離が生じ発症すると考えられている。しかし、大動脈解離の前段階である中膜変性の機序は、未だ十分に解明されていない。すなわち、大動脈解離の分子病態機構が未解明であるため、予防法は確立しておらず、大動脈解離を発症して初めて治療が行われているのが現状である。この状況を打開するには、大動脈解離の分子病態機構を解明し、新規分子標的治療法の確立が必要である。本研究の目的は、大動脈解離における中膜変性の分子病態機構を明らかにすることである。そして、解明した大動脈解離の分子病態機構を基に、最終目標である大動脈解離に対する原因治療となる新規分子標的治療法の開発への礎とする。

【方法】8週齢オスの *Spi-B* 遺伝子欠損 (*Spi-BKO*) マウスと野生型 (WT) マウス (Balb/c) を用いて、アンジオテンシン 2 による高血圧負荷実験を行い、大動脈解離の発症率の比較や組織学的な検討を行った。さらに大動脈組織から抽出した mRNA や蛋白質を用いて、大動脈の構成要素である弾性繊維の関連遺伝子や蛋白の発現について検討を行った。

【結果】高血圧負荷を行うと、WT マウスと比較し、*Spi-BKO* マウス大動脈の構成組織である弾性繊維が減少・断裂することが分かった。この結果より、*Spi-B* が大動脈解離発症に対し、保護的分子病態機構を有することが示唆された。さらに弾性繊維が脆弱化する原因は、弾性繊維維持に寄与している lysyl oxidase の遺伝子・蛋白発現に *Spi-B* が関与していることが確認された。

大動脈解離発症に対する Spi-B の保護的分子病態機構

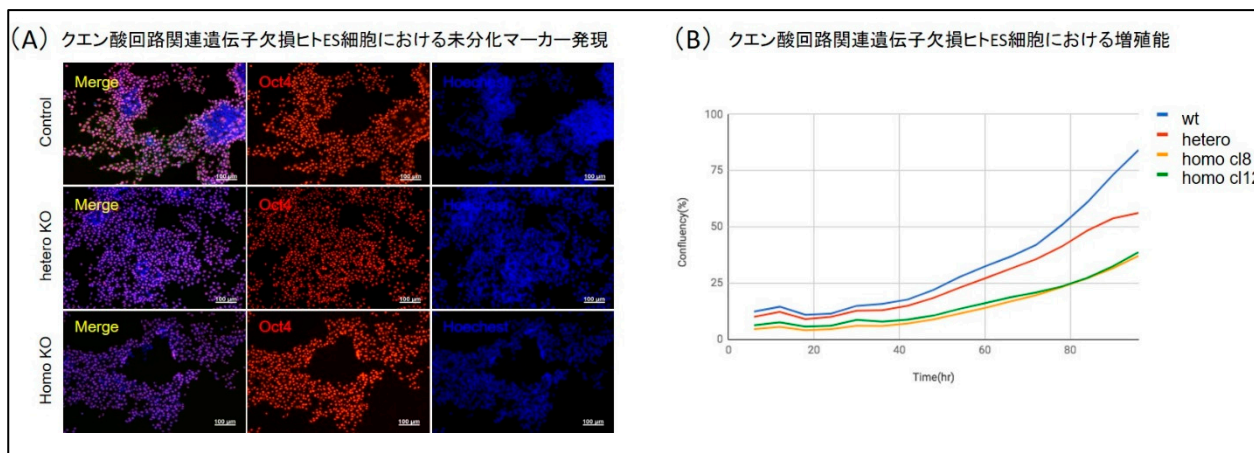


【目的】 ヒト多能性幹細胞は心筋細胞を含むあらゆる細胞へ分化することができるため、再生医療のみにならず創薬スクリーニングへの応用も期待されている。再生医療や創薬スクリーニングに利用するための細胞を効率よく作製するには、ヒト多能性幹細胞および分化誘導過程における細胞の代謝を理解することが極めて重要である。我々の報告により、分化細胞だけでなくヒト多能性幹細胞においてもクエン酸回路を利用していることが明らかとなった。そこで、本研究ではヒト多能性幹細胞におけるクエン酸回路の役割を解析すると同時に、心筋細胞への分化誘導および心筋細胞の成熟化におけるクエン酸回路の役割を明らかにし、最終的に心筋分化能の高いヒト多能性幹細胞の選別や成熟心筋細胞の作製に応用することを目的としている。

【方法】 1. ヒト多能性幹細胞におけるクエン酸回路の代謝酵素を CRISPR/Cas9 システムによりノックアウトした細胞株を作製する。2. クエン酸回路関連遺伝子欠損ヒト多能性幹細胞における未分化性および増殖能の評価を行う。3. クエン酸回路関連遺伝子欠損ヒト多能性幹細胞における心筋分化能の評価を行う。

【結果】 ヒト多能性幹細胞におけるクエン酸回路の代謝酵素を CRISPR/Cas9 システムによりノックアウトした細胞株を作製した。クエン酸回路関連遺伝子欠損ヒト ES 細胞において、未分化マーカー発現は維持されていたが、増殖能はコントロール（クエン酸回路関連遺伝子発現株）に比べて低下傾向であった。また心筋細胞への分化誘導を行ったところ、心筋細胞への分化が可能であった。分化誘導効率に関しては大きな差を認めなかったものの、作製された心筋細胞における形態異常が認められた。

クエン酸回路関連遺伝子欠損ヒト ES 細胞における未分化マーカー発現と増殖能

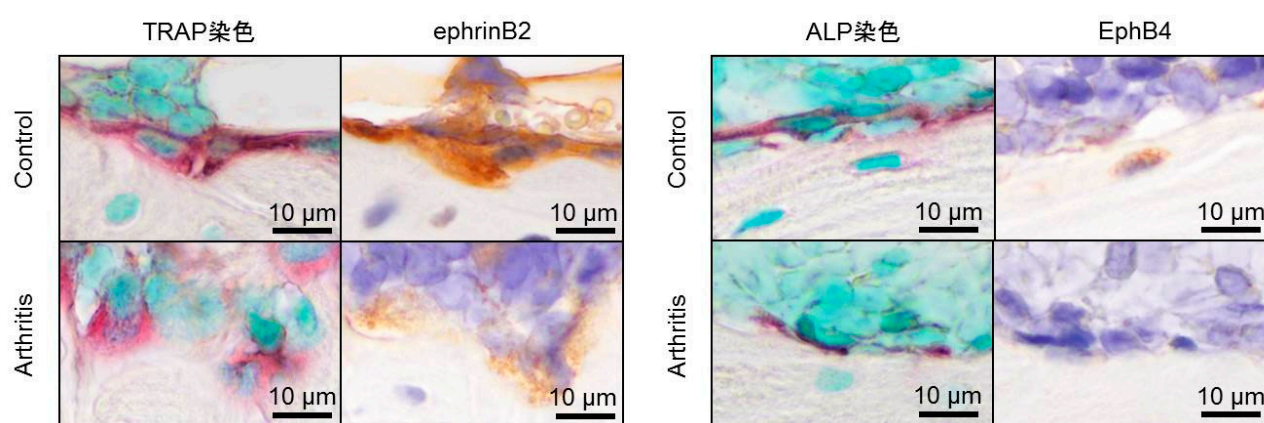


【目的】関節リウマチは関節滑膜における滑膜炎が主な病態であるが、その炎症が近傍の骨組織へ波及し、破骨細胞活性化による骨吸収の亢進および骨芽細胞分化・骨形成の抑制が惹起され、骨・軟骨破壊や二次性骨粗鬆症が進行する。骨リモデリングでは破骨細胞／骨芽細胞間のカップリング因子を介し、骨吸収と骨形成の均衡が保たれるが、上述の通り関節リウマチにおいてはこのバランスが崩れていることは明らかである。しかし関節炎における炎症性サイトカインが破骨細胞／骨芽細胞カップリング因子に与える影響に関しては、未だ明かにされていない。本研究では、関節リウマチにおける主たる炎症性サイトカインである $\text{TNF}\alpha$ によって、破骨細胞／骨芽細胞 ephrinB2／EphB4 カップリング因子発現変化とそれに伴う骨代謝への影響を明らかにすることを目的とした。

【方法】自然発症関節炎マウスにラミナリン 30 mg を腹腔内投与した群を関節炎群として、骨組織の検討を行った。脛骨における TRAP 陽性細胞での ephrinB2 発現および ALP 陽性細胞での EphB4 発現を免疫組織化学法にて解析した。マウス長管骨より遊離した骨芽細胞およびマウス単核球より作製した破骨細胞様細胞、その両者の共培養において、 $\text{TNF}\alpha$ を添加した。それらのサンプルを用いて、破骨細胞様細胞における ephrinB2、NFATc1、CathepsinK、骨芽細胞における EphB4、ALP 発現をウエスタンブロッティング法によって解析した。

【結果】関節炎マウス骨組織において、コントロール群と比較して、破骨細胞の指標となる TRAP 陽性細胞で ephrinB2 発現は低下し、骨芽細胞の指標となる ALP 陽性細胞では EphB4 発現の低下が認められた。*In vitro* において、WT マウス単球由来の破骨細胞様細胞に $\text{TNF}\alpha$ 添加すると、NFATc1 発現が軽度上昇したのに対し、ephrinB2 発現は低下した。骨芽細胞の初代培養においても、 $\text{TNF}\alpha$ 添加すると、ALP 発現とともに EphB4 発現も低下した。破骨細胞／骨芽細胞共培養でも同様の結果であった。以上より関節リウマチでは炎症性サイトカインによる破骨細胞の活性化と骨芽細胞分化抑制が起こることに加え、破骨細胞／骨芽細胞カップリングの低下により骨破壊や傍関節性骨粗鬆症が促進される可能性が示唆された。

関節炎マウスにおける破骨細胞／骨芽細胞カップリング因子 EphrinB2／EphB4 発現



200 三次元的病理組織所見に基づく新規生検法の確立

野島 聡

【目的】病理組織診断は、腫瘍性疾患の悪性度・分化度・転移の程度や、炎症性疾患/自己免疫性疾患の炎症・線維化の程度といった所見を組織形態学的に診断する医行為のことで、医療における最終診断と位置付けられている重要な診断技術である。病理組織診断は、固定後薄切した組織標本を HE 染色で染色し作製したスライドガラスを光学顕微鏡で観察することにより行われるが、その標本作製・染色方法の根幹については、19 世紀に HE 染色が開発されて以来大きな改変が加えられておらず、新たな技術の導入が望まれている。

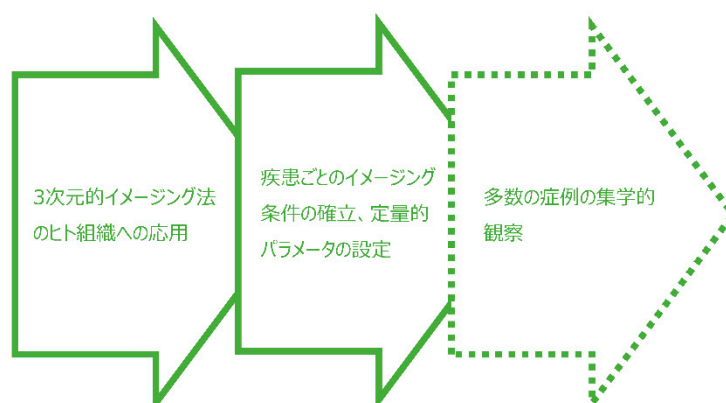
一方で、近年、基礎生命科学分野において蛍光顕微鏡を利用した最先端イメージング技術が目覚ましい発展を遂げている。特に、生体組織を透明化し、三次元的に観察する技術について次々と新しい試薬、光学的機器が開発されてきており、その代表である独立行政法人理化学研究所を中心に開発された生体透明化試薬および三次元イメージング技術である CUBIC は、マウス成体の臓器を透明化し 1 細胞解像度で観察する画期的な新技術であり、世界的にも大きな注目を集めている (Susaki EA, Ueda HR, et al. Cell. 2014 Apr; Tainaka K, Ueda HR, et al. Cell. 2014 Nov)。本技術により、“マウスの臓器・全身丸ごと”を透明化することがはじめて可能となり、透明化した臓器や個体サンプルを共焦点蛍光顕微鏡やライトシート蛍光顕微鏡で観察することにより、体内の解剖学的構造や遺伝子発現などの様子を、1 細胞解像度の三次元イメージとして取得することが可能となっている。

我々の研究プロジェクトは、基礎生命科学分野における最先端三次元イメージング技術である CUBIC をヒト病理組織診断に応用せんとする試みで、最先端イメージング技術と古典的病理形態学の融合を目指すものである。本研究では、主に特発性心筋症由来の心筋生検検体、大脳発生の神経膠腫組織検体の三次元的イメージング手法の開発に焦点をあて、これらの手法の標準化、新たな三次元的診断基準の開発を目指した。

【方法】心筋生検検体における心筋細胞の形態・走行、および大脳発生の神経膠腫組織検体における血管構造を三次元的にイメージングする手法について、CUBIC 試薬の種類や処理時間、蛍光プローブの種類や濃度といった様々な条件の検討、最適化を行った。

【結果】透明化試薬や蛍光プローブの条件設定を行うことにより、心筋細胞の走行や形態、大脳組織およびその腫瘍組織内における血管の走行や形態について、明瞭にイメージングを行う手法の開発に成功した。

三次元的病理組織診断法の確立にむけた各段階

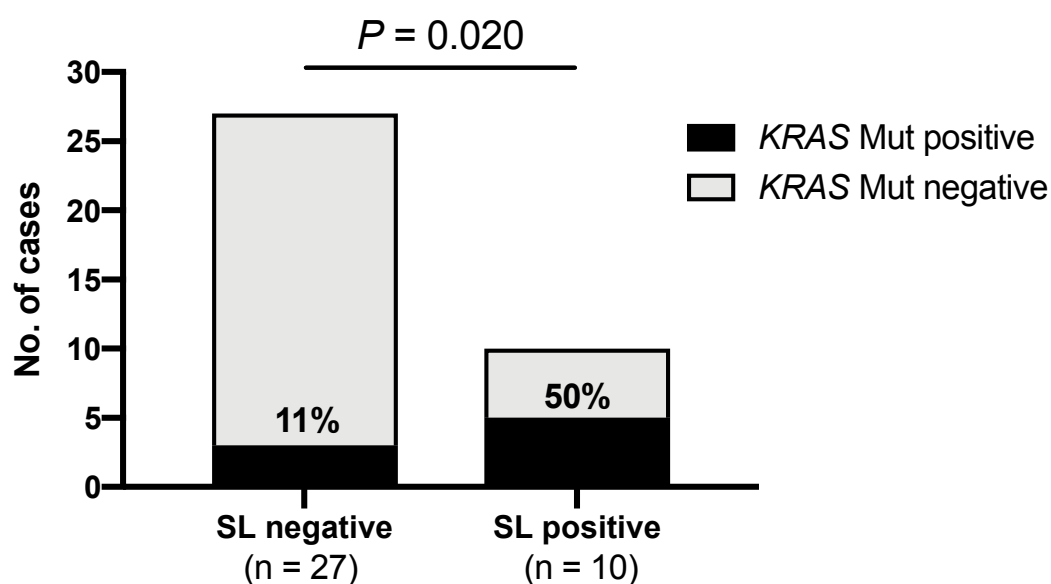


【目的】膵癌は依然として難治であり、治療成績向上のための基礎的、臨床的研究の重要性・緊急性は極めて高い。膵癌において長期生存を得るための唯一の治療法は根治切除であるが、早期発見が困難であり、多くの症例では診断の時点で既に遠隔転移を伴っているため切除不能とされる。また、切除しえたとしても高率に再発を来すことから、今後さらなる治療成績向上のためには手術治療と非手術治療（放射線治療や全身化学療法）を組み合わせた集学的治療法の改良が求められる。当教室は切除企図膵癌に対する集学的治療の改良にいち早く取り組み、症例毎に至適な治療方針を決定するためには正確な病期診断が前提であるとの考えから、審査腹腔鏡検査による微小転移の検索を積極的に行っている。本研究の目的は、特に画像診断では検出困難な微小転移診断における血液バイオマーカーの有用性を明らかにすることである。

【方法】2017年11月から2018年4月までの間に東北大学病院総合外科で審査腹腔鏡検査を行った通常型膵癌37例を対象とした。審査腹腔鏡検査と同時期に末梢血より全血を採取後、可及的速やかに遠心分離し、血漿成分から cell-free DNA (cfDNA) を抽出した。得られた cfDNA とデジタル PCR を用いて *KRAS* 遺伝子のコドン 12/13 の点突然変異を有するアレル頻度を定量した。対象症例の臨床情報（画像診断、腫瘍マーカー、審査腹腔鏡検査所見）を診療記録から抽出し、*KRAS* 変異アレル頻度との関連性を検証した。

【結果】審査腹腔鏡検査の結果、10例に陽性所見を認めた。内訳は腹腔洗浄細胞診陽性が全10例で、うち1例が肝転移と診断され、2例が腹膜転移と診断された。cfDNA 中の *KRAS* 変異アレルは全37例中8例から検出され、切除不能局所進行膵癌症例の半数、切除可能膵癌症例の約2割で *KRAS* 変異アレルが検出された。審査腹腔鏡検査陽性であった10例中5例（50%）から *KRAS* 変異アレルが検出され、検査陰性例（3/27、11%）と比較すると有意に高頻度であった（ $P=0.020$ ）。切除可能膵癌症例の cfDNA 中の *KRAS* 変異陽性4例のアレル頻度はそれぞれ2.1%、1.0%、0.5%、0.4%であり、4例中2例は腹腔洗浄細胞診が陽性で、また1例は血液中の腫瘍マーカーである DUPAN-2 が16,000 IU/mL と異常高値を示していた。

審査腹腔鏡検査所見と血中 cell-free DNA の *KRAS* 変異アレル検出頻度



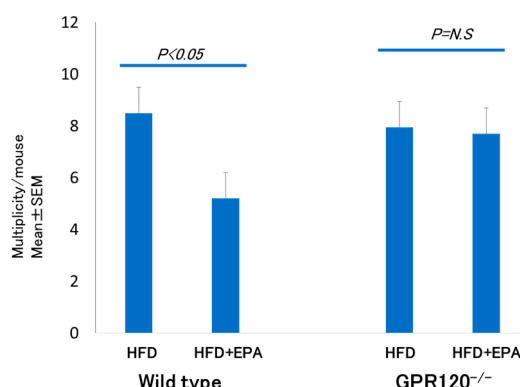
【目的】大腸癌は定期健診や内視鏡検査の普及により早期発見の機会も増えているが罹患率／死亡率ともに依然として高く、対策が必要である。大腸癌や前がん病変の早期発見/早期治療は死亡率を抑制することは既に論をまたないが、治療した患者さんはまた新規病変が出現する高リスク群であり、根本的な対策すなわち疾病／罹患予防への期待が高まっている。

すでに循環器、神経内科領域では疾病予防の取り組みとして生活習慣の変容のほか、心筋梗塞、脳梗塞のハイリスク群にはアスピリンなどの薬剤を用いて積極的に予防を行なっているが今後、癌診療においても薬剤を用いた予防策を講ずることが求められている。現在欧米を中心に、経口薬を内服することで癌を積極的に予防しようとする試みが行われており、化学予防と呼ばれている。大腸癌の危険因子として肥満・糖尿病・高脂血症などの生活習慣病因子が考えられており、これらは化学予防のターゲットとして注目される。脂質異常症、閉塞性動脈硬化症において既に実地臨床で使用されている EPA や DHA などの ω 3系多価不飽和脂肪酸 (ω 3PUFA) は、近年、家族性腺腫症患者の大腸腺腫を減少・縮小させたという報告やマウス大腸腫瘍モデルにおいても腫瘍を抑制したという報告があり、大腸腫瘍の化学予防薬としての可能性を有しているといえる。 ω 3PUFA の化学予防作用機序としては、既に存在する大腸腫瘍に対しては COX-2 の抑制作用が主経路と考えられているが、正常大腸上皮での COX-2 の発現は低く、腫瘍の発生予防機序としては別の経路が関与している可能性が高い。近年 ω 3PUFA の受容体として G 蛋白共役受容体 120 (GPR120) が発見され特に糖尿病領域において注目されている。それによると、 ω 3PUFA は GPR120 を介して抗炎症効果を示し、抗炎症作用や細胞増殖抑制作用を示すことが実証されている。しかし消化器領域においてはまだ GPR120 に注目した ω 3PUFA の抗腫瘍効果を検討した報告はない。しかし腸管には GPR120 が豊富に発現しており、糖尿病領域で報告されたように ω 3PUFA が GPR120 を介して活性化している JNK や $\text{NF-}\kappa\text{B}$ を抑制するという機序で EPA が大腸腫瘍の初期段階で抗腫瘍効果を発揮していると推測している。今回我々は ω 3PUFA による大腸腫瘍予防における GPR120 の役割について、GPR120 欠損マウスおよび野生型マウスを用いて解析を行う。

【方法】野生型マウスと GPR120 欠損マウスに大腸発癌物質であるアゾキシメタン (AOM) を投与して大腸前がん病変である ACF、さらに長期投与で大腸ポリープを誘導する。そこに ω 3PUFA である EPA を投与し、抗腫瘍作用、GPR120 経路の役割や、 ω 3PUFA による大腸腫瘍予防の機序を、免疫組織学的、生化学的に解析する

【結果】高脂肪食 (HFD) 投与により WT、GPR120 欠損マウスともに普通食 (ND) 投与のモデルと比較して ACF (図 1)、大腸ポリープの誘導が亢進された (図 2)。EPA を投与すると、WT では ND、HFD ともに ACF、大腸ポリープの発生が有意に抑制されたが、GPR120 欠損マウスでは ACF の抑制効果は認めなかった。ウエスタンブロットで蛋白発現を確認すると、GPR120 経路の顆粒である TAK1、JNK のリン酸化が EPA 投与で抑制されており、GPR120 経路を介して EPA が抗腫瘍作用を示したことが示唆された。

野生型と GPR120 欠損マウスの ACF 数の比較



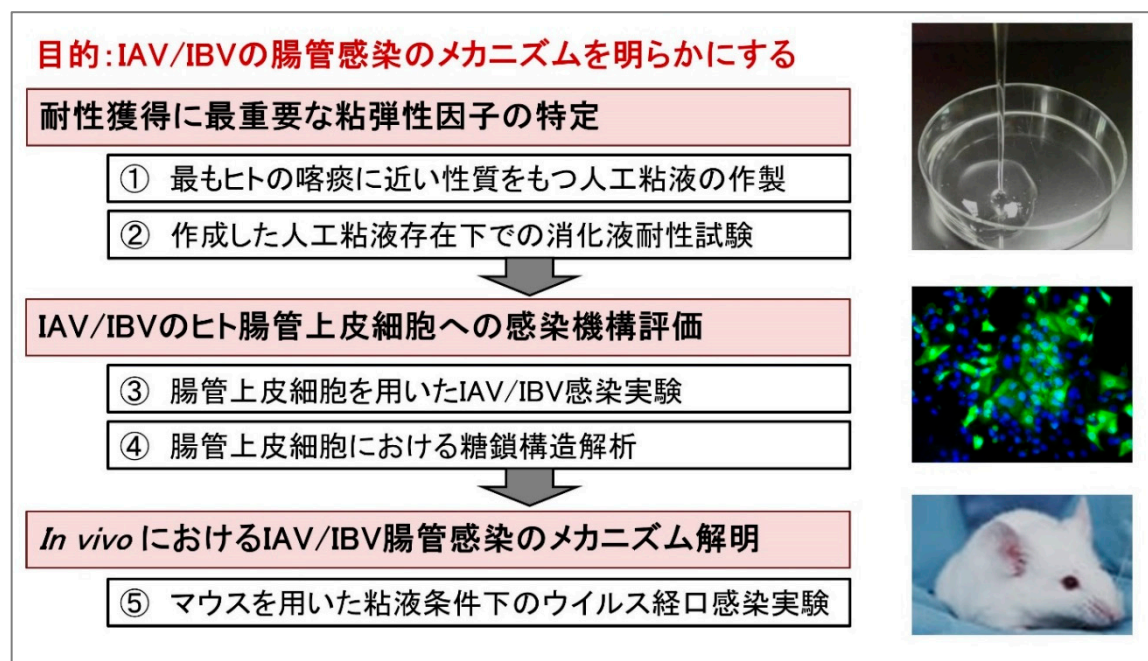
【目的】一般に季節性ヒトインフルエンザA型・B型ウイルス（IAV/IBV）は上気道感染を起こし、上気道症状、発熱、倦怠感などの症状を引き起こす。一方で IAV/IBV の症例の中には、腹痛・嘔吐・下痢といった腹部症状を認める症例が散見される。その病態を考えるにあたって、感染部位は上気道に限定されるものではなく、消化管などの他臓器にも広がっているのではないかと考えられる。本研究では、『IAV/IBV の腸管感染を証明すること』、『IAV/IBV が腸管内の環境で不活化されずに感染力を有したまま小腸・大腸に到達し、腸管上皮に感染を起こすメカニズムを解明すること』を目的とした。

【方法】IAV/IBV と診断された全 22 症例に対して糞便、喀痰を採取し RNA の検出・定量を行い、前向き観察研究を行った。また上気道で感染、増殖したウイルスを含んだ痰や鼻汁を嚥下し腸管感染を起こすモデルを考案した。粘液と IAV/IBV を混和した上で、人工消化液によってウイルスや RNA が不活化・分解されないか評価を行い、さらにヒト結腸癌由来細胞とヒト小腸、大腸初代培養細胞を用いて IAV/IBV 感染実験を行った。またマウスを用いて IAV/IBV を経口投与し腸管感染が起こるか評価を行っている。

【結果】IAV/IBV 感染者 22 例の糞便よりウイルス RNA が検出されたのは 8 例（36.4%）であった。糞便 IAV 陽性群は 5 例（71.4%）に下痢を認め、陰性群に比して有意に下痢が出現した。また長期解析例では痰検体のウイルス RNA が消失後も長期にわたり、便検体からは 1.0×10^5 copies/g 程度の RNA を検出し続けた。また腸炎発症例は S 状結腸粘膜に線状発赤と軽度びらんを認め、PCR・免疫組織化学染色にて同部位よりウイルス RNA・抗原が検出された。

基礎研究では、胃酸暴露環境下において粘液中の pH 低下速度は極端に遅くなる事が明らかになった。また粘液中の IAV/IBV は胃酸や胆汁酸と暴露後も感染力を維持して生存し、粘液粘度と生存率には正の相関が認められた。ヒト結腸癌由来細胞とヒト小腸・大腸初代細胞での感染実験では IAV/IBV 感染細胞を多数認め、同細胞の糖鎖解析では SAα2,6、SAα2,3 両方のシアル酸レセプター発現が認められた。

本研究課題の目的と概要

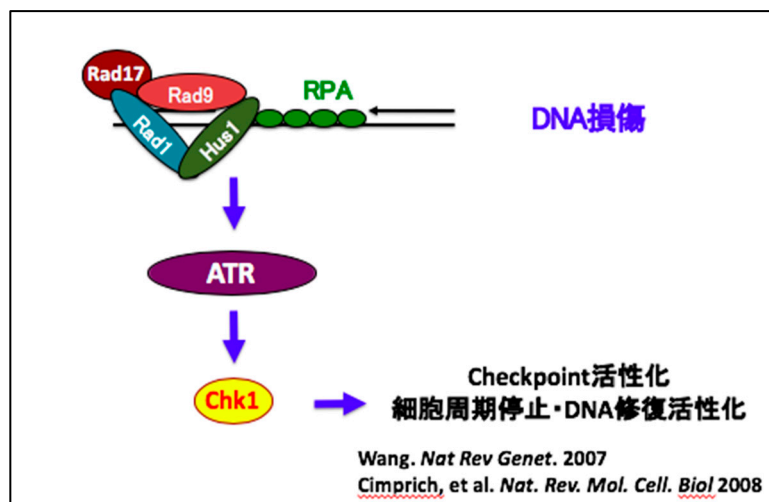


【目的】5-フルオロウラシル (5-FU) は、長年にわたり固形癌、特に消化器癌の治療において抗がん剤の第一選択として重要な位置を占めてきた。5-FUは Ataxiatelangiectasia-mutated and Rad3-related kinase (ATR) を介して、DNA 損傷応答において細胞周期チェックポイントと DNA 修復における主要な仲介役を果たす Chk1 を活性化することが報告されている。ATR は、主に replication protein A (RPA) におおわれた 1 本鎖 DNA において、ATR interacting protein (ATRIP) を介した安定な結合を通じて活性化される。Rad9 と Rad17 は、一本鎖 DNA を覆っている RPA による ATR と Chk1 の活性化の重要因子である。5-FU 感受性における Chk1 の役割については、ヒト細胞株 HeLa で siRNA を用いて Chk1 を阻害すると 5-FU による S 期チェックポイントが機能せず、DNA 合成がそのまま継続することで DNA 二重鎖切断の蓄積につながり、その結果 5-FU による細胞殺傷効果を亢進することが観察されている。本研究の目的は、ATR-Chk1 シグナル経路をターゲットとした癌細胞特異的な治療の開発とそのための 5-FU 系抗癌剤の効果を高める癌細胞特異的な経路を解明することである。

【方法】1. ニワトリ B 細胞株 DT40 野生型を 5-FU 刺激し、その細胞内応答ウェスタンブロッティング、コロニーサバイバルアッセイ、 γ H2AX 蛍光免疫染色で評価する。2. Chk1 キナーゼ阻害薬である UCN-01 投与下での 5-FU 感受性、細胞応答を同様に評価する。3. ニワトリ B 細胞株 DT40 野生型に加えて *Rad9* 欠損細胞株、*Rad17* 欠損細胞株を 5-FU 刺激し、その感受性、細胞応答について上記と同様の評価を行う。

【結果】ATR-Chk1 経路を阻害することで 5-FU 感受性の増強を認めた。また、Rad9/Rad17 非依存的な Chk1 キナーゼ活性経路が存在し、それが 5-FU 感受性を規定する可能性が示唆された。

DNA 損傷と ATR-Chk1 経路の活性化

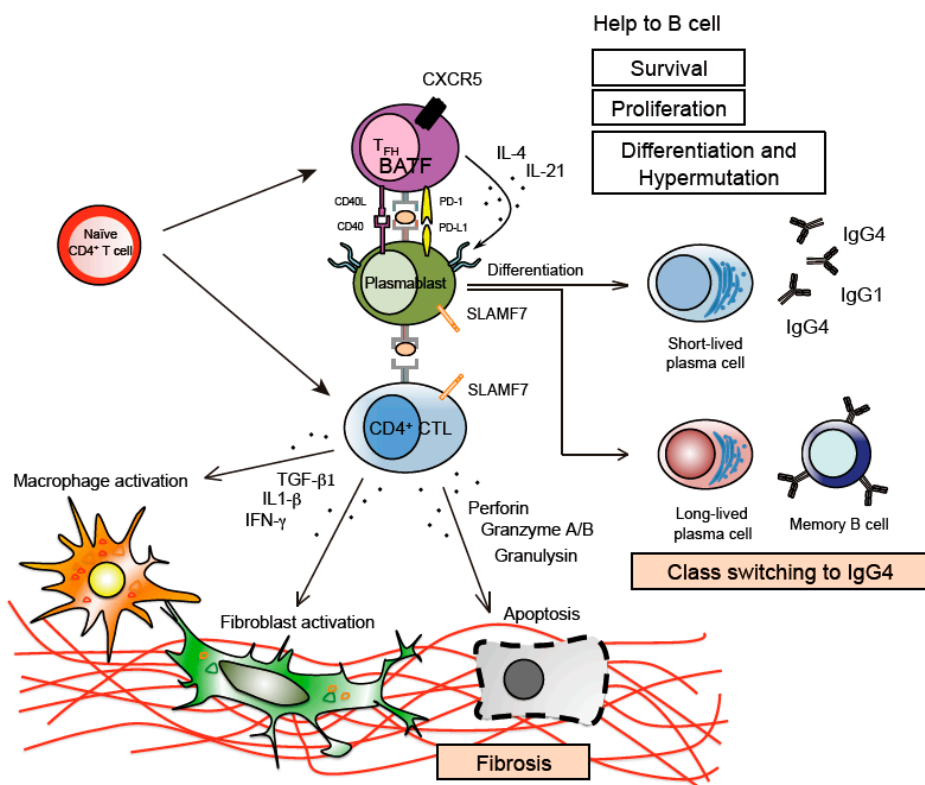


【目的】本邦から提唱された IgG4 関連疾患 (IgG4-related disease : IgG4-RD) は、高 IgG4 血症と罹患臓器への IgG4 陽性形質細胞の著名な浸潤、特徴的な花筵用線維化ならびに閉塞性静脈炎を呈する慢性炎症性疾患である。現在その治療にはステロイドが第一選択薬で有効である反面、ステロイド維持療法において累積ステロイド投与量の増加に伴う副作用のリスクや活動性の高い症例では再発率は極めて高いなど問題となっている。そのため病因究明と新規治療法の確立が求められている。これまで我々は、IgG4 関連疾患の罹患臓器における $CD4^{+}$ cytotoxicT ($CD4^{+}$ CTL) 細胞による慢性炎症性線維化について報告してきた。さらに特異的に IgG4 ヘクラススイッチしている疾患であり、この免疫学的特異性を標的にする分子標的薬が新規治療として有効ではないかと大いに期待できる。

濾胞性ヘルパーT (Tfh) 細胞は主に Interleukin-21 (IL-21) を産生し、胚中心の形成やB細胞の成熟と活性化、抗体産生細胞への分化制御などの役割を担う $CD4^{+}$ T 細胞である。IgG4 関連疾患の罹患臓器では拡大した胚中心が過形成されており、また血中にはオリゴクローナルに増殖した $IgG4^{+}$ Plasmablast が多数認められる。さらに特定の免疫グロブリンが上昇するクラススイッチング病変であることを考えると、Tfh 細胞が病態形成に大きく関与している可能性が想定される。しかしながら、サイトカイン産生による機能的に区別された Tfh 細胞と各免疫グロブリンのクラススイッチに関する報告はなかった。

【方法と結果】そこで本研究では、クラススイッチに関与するサイトカインである IL-4 に着目した。クラススイッチが実際に起こっているヒトリンパ組織を用いて IL-4 産生 Tfh 細胞を IL-4 Capture アッセイにてソーティングし、その遺伝子発現を解析した。その結果、IL-4 産生 Tfh 細胞は non-IL-4Tfh 細胞とは異なる遺伝子群を発現しており、B 細胞との相互作用に関連した遺伝子や特徴的な遺伝子 (*BATF*, *ICOS*, *CD40L*, *IL-21R*, *PD1*, *CD200*) が特に上昇していた。この $IL-4^{+}$ Tfh 細胞は IgG4 関連疾患患者の胚中心形成部位とその周囲で増加しており、*in vivo* で血清 IgG4 値と正の相関を認めた。

IgG4 関連疾患の病態形成におけるモデル

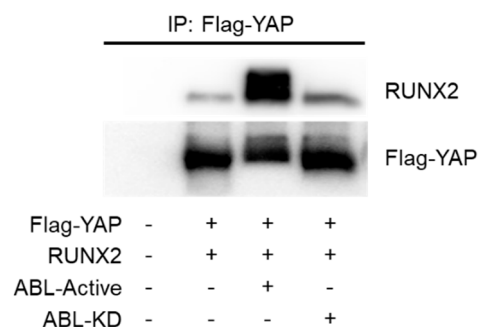


【目的】健康で豊かな長寿社会を実現させる為には、骨粗鬆症の予防、改善が急務である。50 歳以上の日本人女性の 3 割が骨折や寝たきりの原因となる骨粗鬆症を発症する為、骨形成、骨吸収を担う骨芽細胞及び破骨細胞を制御する機序の解明は骨粗鬆症の克服に必須の研究テーマであるが、未だその詳細は不明である。我々はチロシンキナーゼ ABL が骨芽細胞内で YAP (yes-associated protein) に結合することを見出した。YAP は Hippo 経路の下流で細胞増殖を促進する transcription co-activator であり、細胞同士が接触すると Hippo 経路が活性化して YAP が抑制され、細胞増殖能が低下する。ところが、近年 YAP が骨芽細胞分化を促進し、脂肪細胞分化を抑制することが報告され、YAP は骨芽細胞や脂肪細胞の起源となる間葉系幹細胞の運命決定因子であることが明らかとなった。我々は、ABL が YAP との相互作用を介してこの働きを制御しているのではないかと考えた。本研究では、細胞増殖に関与する転写共役因子 YAP に着目し、ABL が YAP を介して骨芽細胞分化を促進する機序を明らかにした。

【方法】1. RUNX2/YAP/ABL の関係について：293T 細胞を使用した強制発現モデルを用いて、RUNX2/YAP の結合における ABL の役割を明らかにする。2. RUNX2 の骨芽細胞における転写活性の検討：RUNX2 は転写因子であり、ターゲット遺伝子のオステオカルシンのプロモーター領域に結合し、遺伝子発現促進を介して、骨芽細胞分化及び石灰化を増強させる。RUNX2 の転写活性における YAP、ABP の役割を検討するため、ルシフェラーゼベクターを用いて、プロモーターアッセイを行う。3. RUNX2 の転写活性におけるチロシンリン酸化の意義：ABL による YAP と RUNX2 の結合制御メカニズム解明の為、活性型 ABL、RUNX2 を共発現させた細胞を用いて、RUNX2 のチロシンリン酸化部位を詳細に検討する。

【結果】ABL は骨芽細胞必須転写因子 RUNX2 と YAP との結合を促進し、RUNX2 の転写活性を高め、骨芽細胞分化を促進する可能性が示された。この作用は ABL キナーゼ活性依存的であった。また ABL は YAP、RUNX2 に結合し、ABL が RUNX2 と YAP の結合を仲介する蛋白である可能性が示された。また本研究で我々は、活性型 ABL が YAP の細胞内発現量を増加させる可能性があることに気がついた。これは posttranscriptional modification であった。更にその機序として、ABL が YAP のセリン残基の脱リン酸化を促進していることを見出した。

RUNX2 と YAP の結合は活性型 ABL によりコントロールされる

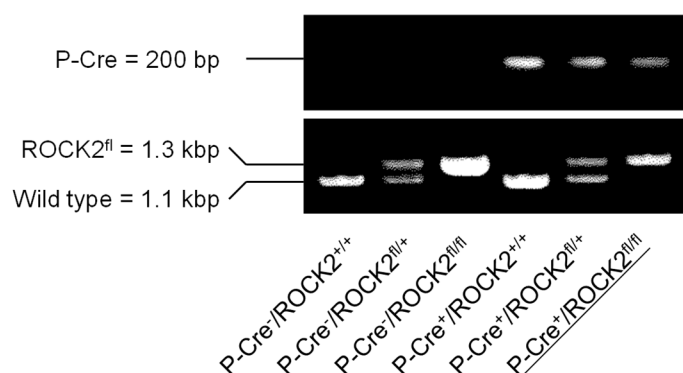


【目的】糖尿病腎症の病態解明は、腎不全への進展を阻止する新たな治療戦略の構築につながり、学究的な側面のみならず、透析医療を取り巻く経済的側面からも喫緊の課題となっている。細胞の形態や伸縮性の調整を担う Rho-kinase (ROCK) には ROCK1、ROCK2 という二種類のアイソフォームが存在する。ROCK は糖尿病腎症の発症進展に関与することが報告されているが、ROCK1 に比較して ROCK2 の意義は不明な点が多い。本研究では、腎組織 ROCK2 の糖尿病腎症における役割を明らかにする。

【方法】本研究では、分子生物学的手法を用いて腎糸球体上皮細胞における ROCK2 のアイソフォーム特異的な役割を明らかにする。ROCK2 は全身に発現し多くの作用を担っているため、腎組織での役割を解明するには臓器特異的遺伝子改変動物の入手が不可欠であり、その作製から研究を開始した。

【結果】我々が独自に樹立した ROCK2 flox マウスと、糸球体上皮細胞特異的に Cre recombinase を発現する Podocin-Cre マウス (P-Cre) を交配し、糸球体上皮細胞特異的 ROCK2 欠損マウス (P-Cre⁺/ROCK2^{fl/fl}) を新たに作出した (図)。今後、P-Cre⁺/ROCK2^{fl/fl} を用いて糖尿病腎症モデルを作製し、糸球体上皮細胞の尿中への挙動を観察する。さらに、腎組織から糸球体上皮細胞を分取し、ROCK2 のアイソフォーム特異的な機能解析を実施する。これを通して腎症の未だ解明されていない病態が明らかになり、ROCK2 阻害薬の腎症への適応拡大に向けた基盤的知見を得ることができる。

糸球体上皮細胞特異的 ROCK2 欠損マウスの genotyping

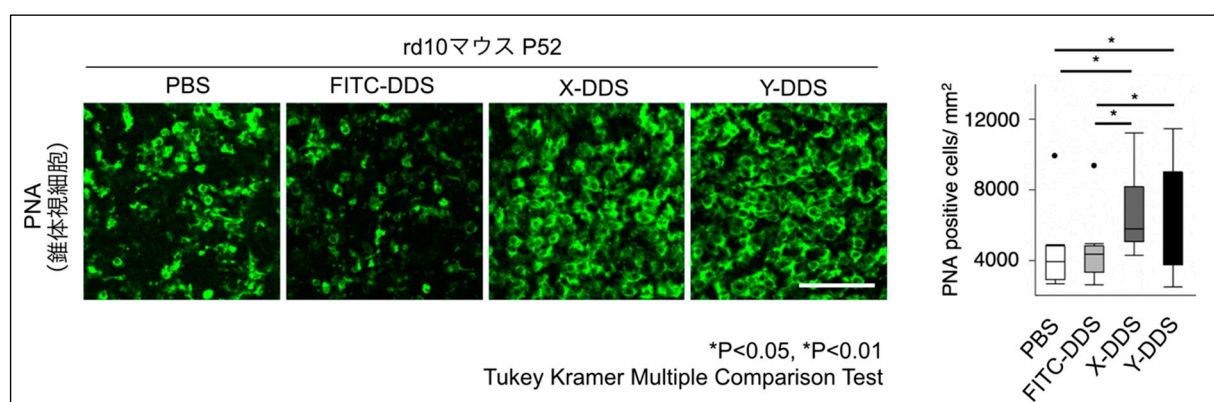


【目的】細胞死の研究はアポトーシスの分子メカニズムを中心に進められてきたが、ネクロシスやオートファジーの責任分子が同定されるにつれ、非アポトーシス型細胞死の疾患への関与が注目されるようになってきている。網膜変性疾患の細胞死も長らくアポトーシスによって起こると考えられてきたが、以前の我々の研究から、網膜変性の病態にはアポトーシスのみならずネクロシスの関与もあること、ネクロシス誘導に重要な分子である Receptor interacting protein 1 kinase (RIP1K) -RIP3K 経路が、網膜変性の神経細胞死とそれに付随する炎症応答に大きく関わっていることが明らかとなった。本研究では、RIPK 阻害薬やネクロシス/炎症を標的とした薬剤を、新規のドラッグデリバリーシステム (DDS) で修飾し、網膜変性を効果的かつ安全に抑制しうる新規治療薬を開発する。

【方法】1. 新規 DDS の細胞・組織移行性の確認。FITC を封入した DDS (FITC-DDS) をマウスの静脈内または眼内に投与し、細胞や網膜への移行性をフローサイトメトリーで検討した。2. 網膜変性モデルにおける RIPK 活性局在の同定。*Rip3k^{fl/fl}*マウスを導入し、視細胞 (*Rip3k^{fl/fl}; Nr1^{Cre}*)、マイクログリア (*Rip3k^{fl/fl}; Cx3cr1^{Cre-ERT}*)、アストログリア (*Rip3k^{fl/fl}; GFAP^{Cre}*) 特異的に RIPK 活性を阻害し、網膜変性モデル動物の表現型の変化を観察した。3. 薬剤封入 DDS の網膜変性抑制効果。RIPK 阻害薬である Necrostatin-1 を封入した Nec-1-DDS、抗炎症・細胞死抑制作用のある薬剤 X または Y を封入した X-DDS、Y-DDS を作製した。実験 1、2 で明らかとした DDS の細胞・組織移行性と、網膜変性における RIPK の活性局在を元に、網膜変性モデルに対する治療実験を行った。

【結果】1. FITC-DDS を静脈内に投与すると、単球の中でも特に *Ly6c^{high}* 炎症性単球に、効率良く FITC が導入されることが分かった。また網膜変性モデルマウス (rd10 マウス) に FITC-DDS を静脈内投与すると、網膜内のマクロファージに FITC が導入されることを確認した。FITC-DDS の眼内投与による網膜移行性については、現在検討中である。2. *Rip3k^{fl/fl}*マウスを凍結胚から個体化し、施設に導入した。今後 *Nr1^{Cre}* マウス、*Cx3cr1^{Cre-ERT}* マウス、*GFAP^{Cre}* マウスと交配し、網膜変性モデルでの表現型解析を進めていく予定である。3. DDS の素材や大きさなどを調整して、Nec-1 の薬剤含有率や均質性の高い DDS 作製条件を調整している。先に作製が完了した X-DDS、Y-DDS を rd10 マウスの静脈内に投与し、コントロールと比較して視細胞死ならびに網膜炎症が有意に抑制されることを明らかにした。薬剤 X、Y の経口投与では、副作用を生じる高濃度で投与しなければ治療効果が得られなかったため、DDS により低容量で高い有効性を達成することができた。今後 Nec-1-DDS の治療効果ならびに他の網膜変性モデルでの治療効果を検討する予定である。

新規 DDS 製剤の網膜変性抑制効果

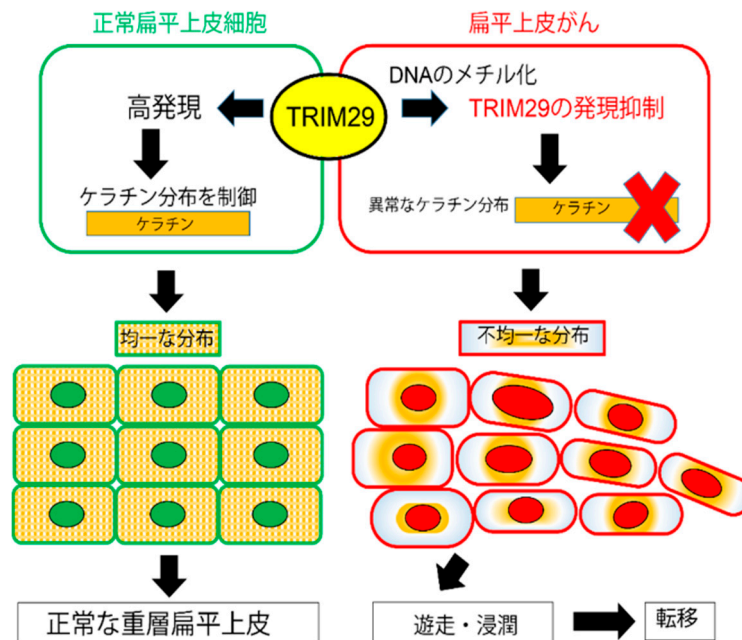


【目的】 TRIM ファミリー分子の一つ TRIM29 は種々の癌との関連が示唆されていたが、重層扁平上皮での機能は不明であった。本研究では、皮膚および口腔粘膜における TRIM29 の機能を解析した。

【方法】 1. Public database を用いて、扁平上皮において高発現する TRIM ファミリー分子を検討した。2. TRIM29 分子の発現を、正常表皮・有棘細胞癌・良性表皮由来腫瘍（脂漏性角化症・尋常性疣贅）・正常舌上皮・舌癌などで検討した。また RNA レベルでの検討、DNA メチル化解析を実施した。3. shRNA による TRIM29 ノックダウン扁平上皮細胞株を樹立し、その増殖能・遊走能・転移能などを検討した。4. 免疫沈降法と質量分析によって、TRIM29 結合分子を網羅的に探索した。5. TRIM29 の細胞内分布、結合分子との局在の検討を行った。

【結果】 Public database の解析の結果、重層扁平上皮において TRIM29 分子が高発現であることが判明した。皮膚および口腔粘膜の臨床検体を解析した結果、正常扁平上皮（表皮、口腔粘膜上皮）では TRIM29 の高発現が認められたが、癌部（有棘細胞癌、舌癌）では、DNA のメチル化によって TRIM29 発現が抑制されていた。培養細胞にて TRIM29 発現を抑制すると、扁平上皮細胞の遊走・浸潤・転移が促進され、逆に TRIM29 を過剰に発現させると細胞の遊走、浸潤は低下した。TRIM29 の結合分子を探索するために、免疫沈降法と質量分析を行ったところ、TRIM29 は細胞骨格分子ケラチンと結合していた。培養細胞において TRIM29 の発現を抑制すると、細胞内ケラチン分布が核周囲に変化し、臨床検体においても TRIM29 低発現腫瘍検体ではケラチンの分布異常を認めた。以上より、TRIM29 は扁平上皮において、ケラチンと結合することにより細胞遊走を調整しており、扁平上皮癌では TRIM29 の発現量が低下し、浸潤能・転移能を獲得していると考えられた。

扁平上皮細胞における TRIM29 のモデル



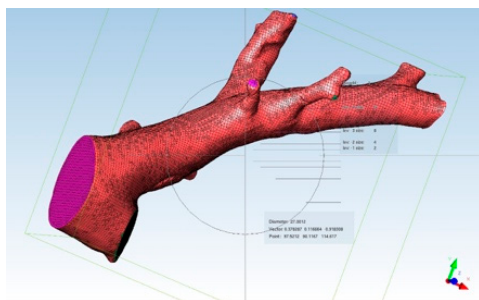
【目的】呼吸器外科手術において胸腔陽圧を用いることが多くなっているが、胸腔陽圧下に十分な肺虚脱が得られないことを時々経験する。この原因として末梢気管支壁が菲薄化し胸腔内圧と気道内圧の圧較差に気管支壁が支えきれず気道が閉塞してしまうことが考えられ、比較的中枢に近い気管支でも閉塞する症例があることを既に確認している。気道閉塞を規定している因子を明らかにするため、バイオメカニクスの技術を利用し解析のための気管支理論モデルの作製を試みた。臨床事例の分析とブタ肺を用いた試験計測によって気管支の理論力学モデルを構築して、気管支壁の強度特性に問題がある場合にも速やかな虚脱を得る方法をシミュレーションによって検討したいと考えた。

【方法】虚脱したブタ肺検体の気管支に空気陽圧を与えた状態でマイクロフォーカス X-CT 撮影を行い、虚脱及び既知の陽圧下での気管支内径、気管壁厚み計測を実施した。更に、撮影後にブタ肺を解剖して、気管支要素の弾性係数などの力学特性を計測した。本研究では、これらの結果を用いて、理論解析及び数値解析の知見を加えて、臨床に適用できる気管支理論力学モデル構築の研究を行う。力学モデルの構築に必要な解析と試験・検査を実施した。

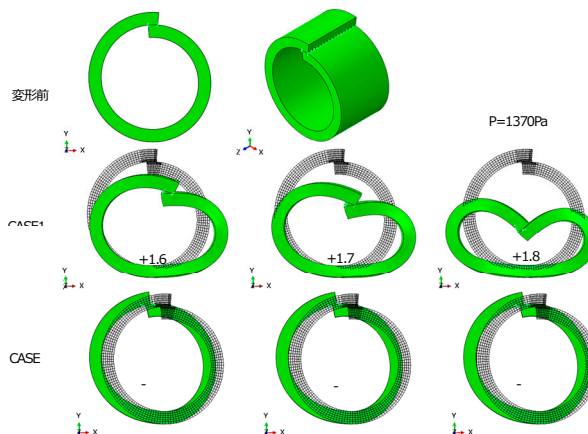
【結果】1. ブタ肺の力学特性の計測結果より力学シミュレーション用の気管支の力学理論モデル構築に必要なデータを得た。2. ブタ肺を用いた計測試験によって、気管及び気管支の力学特性データを取得できた。3. X 線 CT 計測結果により、虚脱状態で気管支は周囲組織から圧縮応力を受けていることが推定され、計測結果を用いて、Pre-stress 力学モデルを作成した。4. X 線 CT 計測結果を用いて流体力学及び構造力学解析用モデルを作成し、この解析モデルが現実の気管支閉塞を再現しうることを確認した。

解析モデルと解析結果 (a) 流体解析モデル (b) 構造解析モデル

(a)



(b)

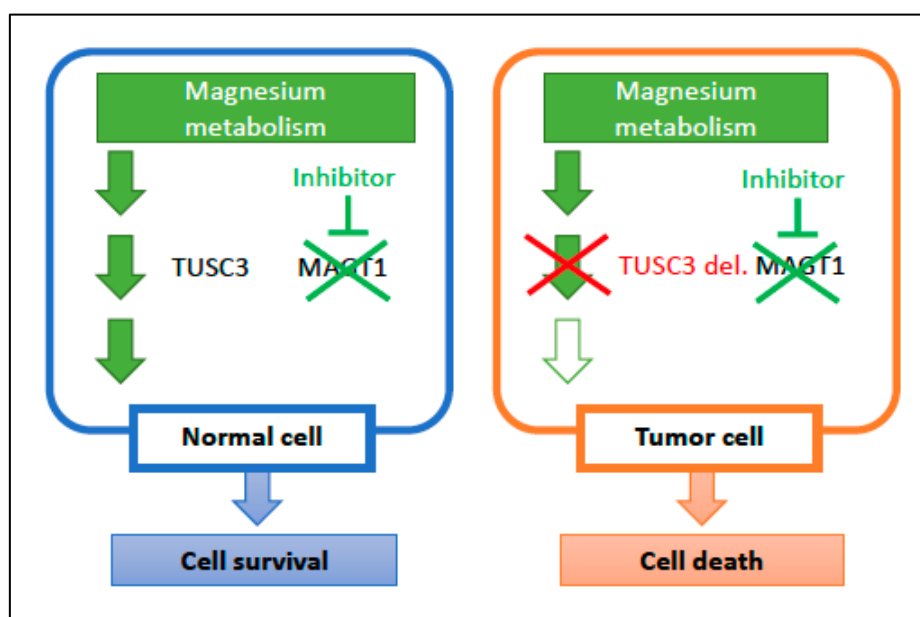


【目的】卵巣癌の予後改善を目指した分子生物学的特徴に基づいた治療戦略の開発は急務であるが、卵巣癌のうち最も頻度の高い組織型である高異型度漿液性卵巣癌は、コピー数異常によって特徴付けられる。そこで「卵巣癌における著明なコピー数異常」と「癌の脆弱性」に注目し、ホモ接合性欠失を伴う卵巣癌に対するパラログ遺伝子の抑制により、新規の卵巣癌特異的治療法を開発し、卵巣癌の予後改善につなげることを目的とした。

【方法】The Cancer Genome Atlasに登録されている高異型度漿液性卵巣癌のゲノム・トランスクリプトームデータを用いて、ホモ接合性に欠失している遺伝子を標的とした。卵巣癌細胞株を用いた標的遺伝子のパラログ遺伝子に対する発現抑制実験により、標的遺伝子欠失細胞株でのみ細胞増殖が抑制されるか検討した。

【結果】高異型度漿液性卵巣癌 562 症例のゲノム・トランスクリプトーム解析により、候補標的遺伝子として 73 個を抽出した。そのうち、マグネシウム代謝に関連のある *TUSC3* 遺伝子に注目し、そのパラログ遺伝子である *MAGT1* 遺伝子の発現抑制実験を実施し、*TUSC3* 野生型細胞株では細胞増殖に変化を認めず、*TUSC3* 欠失細胞株で著明な細胞増殖抑制効果を認めた。

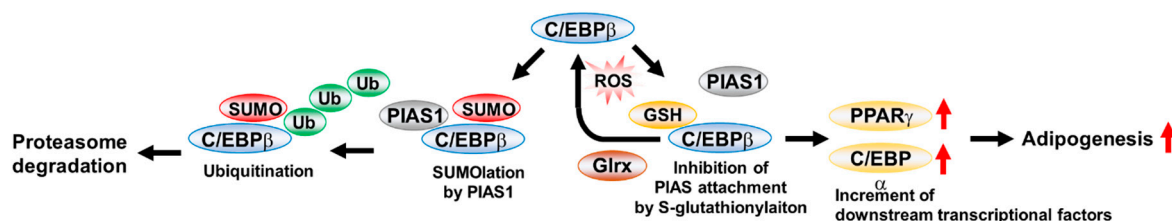
マグネシウム代謝に注目した卵巣癌の脆弱性



【目的】肥満になると脂肪組織中で活性酸素が増加する。さらに活性酸素は脂肪細胞の分化に関わっており、活性酸素による細胞内シグナル伝達が脂肪細胞の分化を促進することが予想される。しかしながらその分子メカニズムは十分には解明されていない。蛋白質 S-グルタチオン化は比較的安定で可逆的な酸化修飾で活性酸素によるシグナル伝達を媒介するが、既報の S-グルタチオン化される蛋白では肥満や脂肪細胞の分化に関わるものは報告されていない。未知の S-グルタチオン化蛋白の関与が考えられるため、これを探索しその機能を解明する。

【方法】脂肪細胞に分化する 3T3-L1 細胞において CRISPR/Cas9 システムを用いて脱グルタチオン化酵素であるグルタレドキシン (*Glx*) をノックアウトした。 *Glx* KO 3T3-L1 細胞を用いて S-グルタチオン化が脂肪合成およびその細胞内シグナリングに与える影響を検討した。

【結果】3T3-L1 細胞において *Glx* をノックアウトするとコントロール細胞に比べ脂肪細胞分化誘導後に S-グルタチオン化が増加することが分かった。脂肪細胞分化誘導は活性酸素を増加させるが、活性酸素はコントロール細胞と *Glx* KO 3T3-L1 細胞間で差はなかった。脂肪合成分化誘導後の脂肪含有量は *Glx* KO 3T3-L1 細胞で優位に増加した。この効果は還元剤である Tempol 投与でなくなることを確認できた。 *Glx* KO 3T3-L1 細胞では PPAR γ 、C/EBP α 、C/EBP β の発現の増加が認められ、特に、C/EBP β については蛋白レベルで発現が制御されていることが示唆された。また C/EBP β は S-グルタチオン化される蛋白であることが分かった。C/EBP β は SUMO 化後にユビキチン化を受けプロテアソームで分解される蛋白であるが、S-グルタチオン化されることにより SUMO E3 Ligase である PIAS1 の結合が低下することが分かった。

C/EBP β の S-グルタチオン化による安定化と脂肪合成

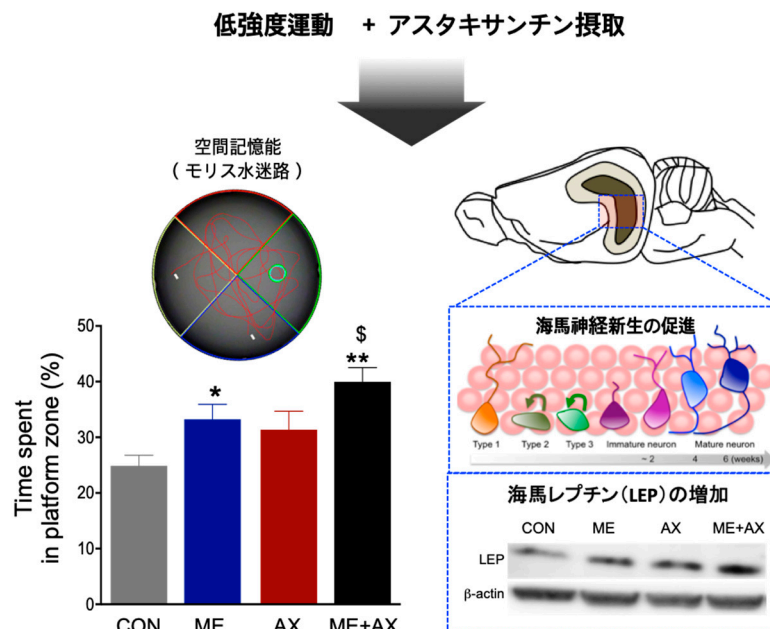
ROS: 活性酸素、GSH: グルタチオン、Ub: ユビキチン

【目的】本研究は、これまで見出された低強度運動（ME）がもつ海馬機能を高める効果が、高い抗酸化作用を持つアスタキサンチン（AX）摂取で更に相乗的に増強され、その際の分子基盤として脳由来レプチン（LEP）の関与を明らかにするとともに、その増強効果がアルツハイマー病（AD）により生じる認知機能の低下に及ぼす影響を明らかにすることを目的とする。

【方法】C57BL/6J 系雄性マウス（WT）、*LEP* 欠損遺伝性肥満マウス（*ob/ob*）、*APP^{NL-GF}* 系雄性 AD マウスを用いた。低強度運動は、予め動物で決定しておいた換気性作業閾値（VT）を基準としてそれ以下の走速度で運動を課した。AX 摂取の濃度は海馬神経新生を促進する 0.5%濃度を用いた。最終週にモリス水迷路を用い、空間学習・記憶能を評価した。免疫組織化学染色法により海馬歯状回の増殖細胞数と新生成熟細胞数を評価した。レスキュー実験として、浸透圧ポンプシステムを用いて *ob/ob* マウスの脳室に LEP を投与した。

【結果】WT マウスにおける 4 週間の ME と AX の併用介入は、相乗的に海馬特異的な空間記憶能および神経新生を高めた。この相乗効果を生み出す分子機構として網羅的な遺伝子発現解析（DNA マイクロアレイ）及び RT-PCR や Western blotting の結果から脳内 LEP タンパク質を同定、その関与を調べたところ、海馬由来 LEP タンパク質の発現が上記の神経新生及び認知機能増進効果と同様に変化し、相乗効果を生む併用条件で最も増加すること、更にその効果は LEP を欠損する *ob/ob* マウスでは消失するが、4 週間の脳内 LEP 投与で回復することが判明した。最後に、AD の発症機序及び症状がよりヒトに近い新型モデルマウスである *APP^{NL-GF}* マウスにおいて、AX 摂取の効果を検討したところ、AD で低下した空間学習機能を改善することが初めて明らかになった。これを踏まえ運動と AX の併用効果の一部を報告する。

低強度運動とアスタキサンチン摂取による海馬機能の向上効果

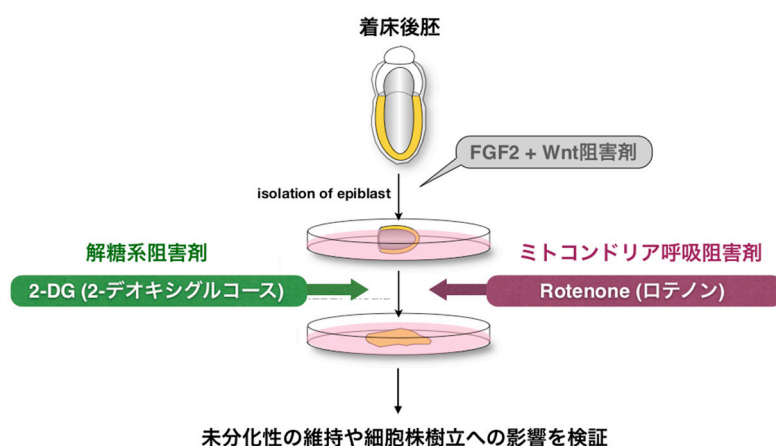


【目的】 万能細胞と呼ばれる多能性幹細胞は、一般的に二つに大別される。マウスの着床前胚から樹立される ES 細胞や最終分化した体細胞から樹立される iPS 細胞などはナイーブ型と呼ばれ、マウスの着床後胚から樹立されるエピブラスト幹細胞などはプライム型と呼ばれる。このナイーブ型とプライム型はそれぞれ異なる細胞特性を持つ。その代表的な例としてキメラ形成能や X 染色体の不活性化が挙げられる。これらの性質の違いに加え、もう 1 つ大きな違いとしてエネルギー代謝がある。通常、細胞はエネルギー代謝として解糖系とミトコンドリア呼吸を利用しているが、多能性幹細胞において、ナイーブ型では解糖系とミトコンドリア呼吸の両方に依存し「二元性」を実現しているのに対し、プライム型では主に解糖系に依存していることが知られている。近年、多能性幹細胞の未分化性の維持機構におけるエネルギー代謝の関連性が明らかになりつつある。そこで今回はプライム型多能性幹細胞におけるこの偏ったエネルギー代謝が、多能性幹細胞化する過程での未分化性にどのように影響しているのかを調べることにした。

【方法】 近年、我々が樹立に成功した新規多能性幹細胞（領域選択型エピブラスト幹細胞：rsEpiSC 細胞）は、着床後のマウス胚の未分化細胞集団であるエピブラストを Wnt シグナル抑制剤（IWR1）と FGF2 の添加条件下で培養することで、エピブラスト細胞は無限増殖能を獲得し多能性幹細胞株として樹立される。またこの細胞は、ナイーブ型であるマウス ES 細胞/iPS 細胞とは異なり「解糖系」にそのエネルギー代謝経路を大きく依存しており、癌細胞と同様のワールブルグ効果（好気性解糖）を示すことが分かっている（Okamura et al., *Nature*, 2015）。我々は多能性幹細胞におけるエネルギー代謝の役割を解析すべく、rsEpiSC 細胞または同細胞の樹立過程におけるエピブラストを材料とし、解糖系ならびにミトコンドリア呼吸の阻害効果を検証した。本実験に際し我々は、細胞・組織培養下において以下の化合物添加を実施した。ミトコンドリア呼吸の阻害剤として呼吸鎖複合体 I 内の電子の移動を妨げる Rotenone（ロテノン）を用い、一方で解糖系の阻害剤として解糖系による代謝を受けないグルコース分子である 2-DG（2-デオキシ-D-グルコース）を用い、エネルギー代謝阻害によるエピブラスト細胞の未分化性への影響を検証した。

【結果】 エネルギー代謝の調整は細胞の生死や増殖などの基本的な生理活性のみならず、細胞特性や分化多能性の維持機構に大きく影響を与えることが明らかとなった。近年、代謝物そのものが「情報」としての意味をもつことが分かっている。「情報物質としての栄養」という観点の中で、近年特に注目されているのがクエン酸回路（TCA 回路）の中間代謝産物や補酵素である。これらの中には、ヒストンのアセチル化やメチル化修飾に関わる分子が多く含まれ、エネルギー代謝とエピゲノム情報・遺伝子発現調節の密接な関係が明らかになりつつある。我々の結果は、エネルギー代謝が単純な「活動エネルギーの源」としての役割のみならず、ときにその中間代謝産物量をコントロールすることで、細胞特性や発生・分化にも影響を与えうる可能性を示すものである。

エピブラスト細胞に対する選択的エネルギー代謝阻害



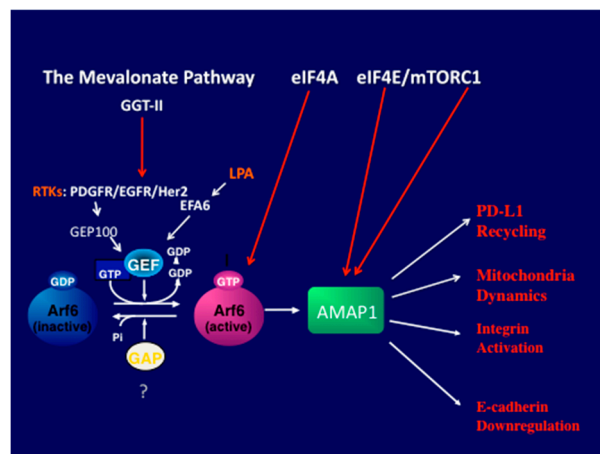
【目的】免疫チェックポイント阻害剤を用いた癌免疫療法が注目されている。これまで癌細胞における PD-L1 発現誘導に関しては相当な研究がある。一方、チェックポイント作動には、癌細胞、免疫細胞間の『免疫シナプス』形成が必要である。機能的シナプスは初期衝突部に存在する PD-1/PD-L1 間の結合だけで形成されるのではなく、接触部への PD-1/PD-L1 集積、形質膜や細胞骨格などの構造的リモデリングが必要である。免疫シナプス形成やその際の PD-1 動態に関してはある程度研究が進んでいるが、癌細胞における PD-L1 動態やその制御機構に関しては十分には解明されていない。また、免疫チェックポイント阻害剤の多くは、PD-1 や PD-L1 などに対する抗体であるが、このような抗体治療法の障害として細胞表面蛋白質に結合した抗体が、エンドサイトーシスされ分解されてしまうことも知られている。このような幾つかの観点から、癌細胞における PD-L1 動態制御の理解は、その発現制御と共に今後の癌免疫学発展における重要課題である。

私達はこれまでに癌の浸潤転移・治療抵抗性を駆動する低分子量 G 蛋白質 ARF6 とその下流シグナル因子 AMAP1 を軸とするシグナル経路を見出し、詳しく研究してきた。本経路はチロシンキナーゼ型増殖因子受容体や三両体 G 蛋白質受容体によって活性化され、癌細胞に対する増殖因子やリゾフスファチジン酸などの様々な刺激と悪性度進展とをつなぐものである。ARF6 や AMAP1 を始めとする本経路構成因子群は、乳癌、腎癌（腎明細胞癌）、膵癌（膵管癌）、肺癌（肺腺癌、小細胞肺癌）、頭頸部癌、悪性黒色腫に認められ、それらの異常な高発現は患者悪性予後と高い統計的有意差を示す。本 ARF6 経路が浸潤転移や放射線・薬剤抵抗性を促進することは既に報告したが、最近、PD-L1 ダイナミックスも制御することを見出した。本研究はその分子詳細の解明を行い、ARF6 経路が駆動する癌免疫回避の分子実態を明らかにすることを目的とする。

【方法】ARF6 経路による PD-L1 ダイナミックス制御の分子の詳細を解析した。その為、まず ARF6、AMAP1 が癌細胞に異常高発現し活性化されることの分子機構を解析し、同定された因子群が PD-L1 ダイナミックスや免疫回避に関連するかを調べた。ヒト膵管癌細胞、マウス膵管癌モデル細胞、および、マウス個体実験を併用し、多角的多面的に解析した。

【結果】膵癌ドライバー変異である KRAS 癌遺伝子産物が ARF6 と AMAP1 の蛋白質異常発現の原因であり、一方、同じくドライバー変異である TP53 癌遺伝子産物が ARF6 の活性化促進因子であった。その際、蛋白質異常発現は mRNA 翻訳因子 eIF4A/4E の活性促進を介するものであり、ARF6 は膵癌危険因子として知られている血小板由来増殖因子（PDGF）の受容体によって活性化され、活性化にはメバロン酸経路、特に、geranylgeranyl transferase- II（GGT-II）が必須であった。これらはいずれも PD-L1 動態制御に関与した。動物実験も行い、本 ARF6-AMAP1 経路は癌免疫回避の根幹経路であることを明らかにした。

癌細胞に発現する PD-L1 の動態制御とその阻害における分子標的群



216 タイプ別胃癌の発癌・進展における分子機序の解明

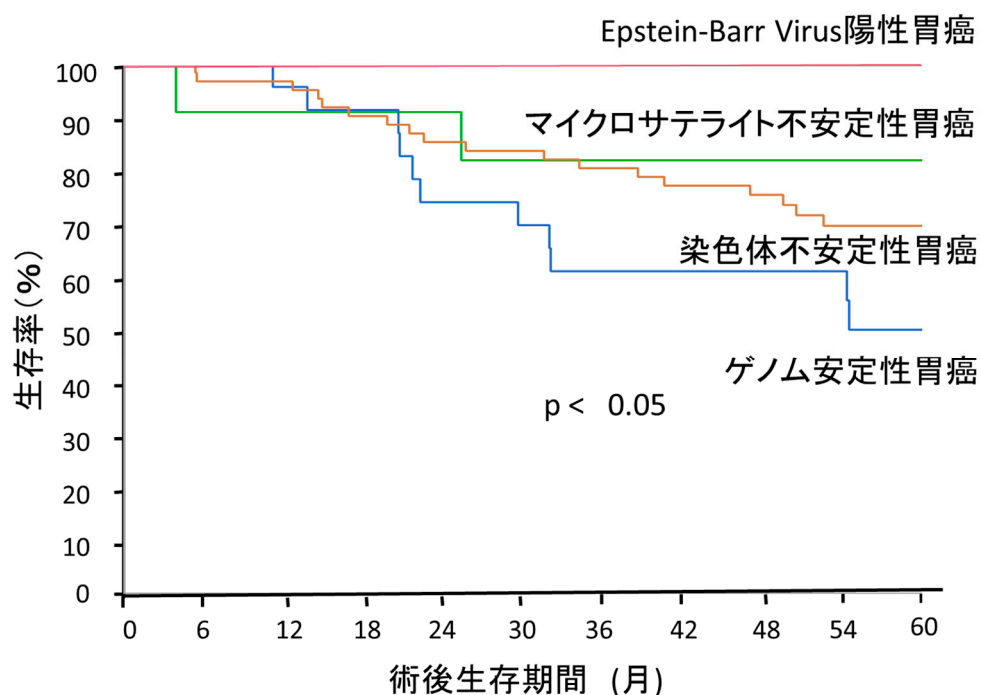
山本 学

【目的】分子学的発生機序に基づく胃癌のタイプは4つに分類されることが最近わかってきた。本研究は、胃癌の発癌タイプ別の各遺伝子群とその特性および予後を検討することで、今後胃癌のタイプ別治療への発展に役立てることを目的とした。

【方法】103例の胃癌の臨床組織を用いて、Epstein-Barr Virus 陽性胃癌、マイクロサテライト不安定性胃癌、ゲノム安定性胃癌、染色体不安定性胃癌を分類した。4つのタイプに分類したのち、各種タイプ別の特性と予後を検討した。

【結果】病理学的および免疫組織学的手法を用いて4つのタイプ別に分類可能であった。Epstein-Barr Virus 陽性胃癌は、103例中9例(8.7%)、マイクロサテライト不安定性胃癌は103例中11例(10.7%)、ゲノム安定性胃癌は、103例中23例(22.3%)であった。それ以外の60例(58.3%)を染色体不安定性胃癌とした。マイクロサテライト不安定性胃癌は、高齢者に多く、ゲノム安定性胃癌は女性、Epstein-Barr Virus 陽性および染色体不安定性胃癌は男性に多く認められた。さらに、染色体不安定性胃癌では、65.0%がp53蛋白異常であった。各タイプ別の予後は Epstein-Barr Virus 陽性胃癌>マイクロサテライト不安定性胃癌>染色体不安定性胃癌>ゲノム安定性胃癌の順であった。

タイプ別胃癌の予後

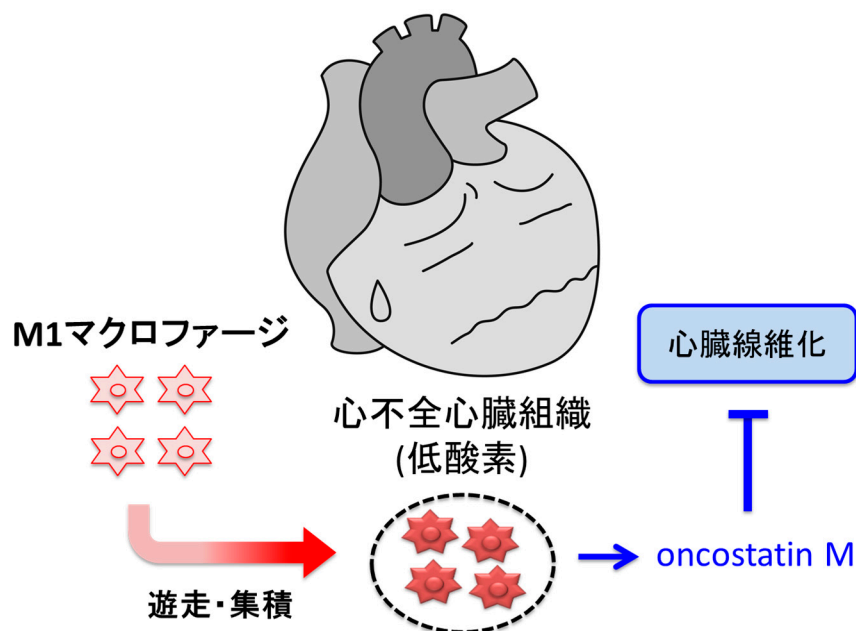


【目的】高齢化に伴い本邦の心不全患者は爆発的に増加しており、「心不全パンデミック」と呼ばれ社会的問題となっている。心不全には、左室収縮能が低下した収縮障害性心不全のみならず、収縮能の保たれた拡張障害性の心不全も高率に存在することが知られている。しかし現在の心不全診療において、拡張障害の心不全患者の予後を改善する有効な治療法は未だに確立されていない。本研究は、拡張障害の病態基盤である心臓線維化のメカニズムを詳細に解明し、拡張障害性心不全に対する新規治療法開発の基盤的知見を得ることを目的とした研究である。

【方法】我々は、実験的心不全マウスモデルとして横行行大動脈圧負荷モデル (Transverse Aortic Constriction in mice: TAC) を採用し、これを用いて心筋組織に集積するマクロファージの役割に着目し解析を進めることとした。分子細胞学的手法を用いてマクロファージの *in vitro* 解析をおこない、線維化制御因子として同定したマクロファージ由来分泌物質について、さらにマウスおよびヒト検体を用いて *in vivo* 解析を実施した。

【結果】上記解析により我々は、TAC 後の心不全状態の心臓組織では炎症惹起性の M1 マクロファージが低酸素誘導型転写因子 HIF-1 α を介して心臓組織に遊走、集積し、oncostatin M を分泌して心臓線維化を抑制的に制御していることを明らかにした。マクロファージを介した炎症プロセス、低酸素シグナルという独自の観点から心臓線維芽細胞の活性化制御メカニズムを解明した本研究の成果は、拡張障害性の心不全に対する新規治療法開発のための基盤的知見であり、これまで治療介入が困難であった心臓拡張不全患者の予後改善に大きく貢献するものである。

マクロファージ由来の分泌タンパク質 oncostatin M による心臓線維化抑制制御

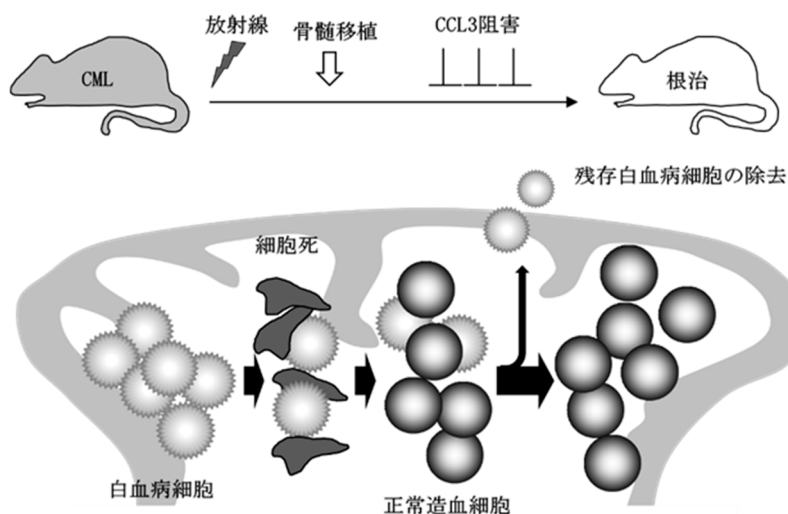


【目的】慢性骨髄性白血病（CML）は、原因遺伝子 BCR-ABL を発現することで、悪性転換した白血病幹細胞（LIC）を病態の起源としている。CML マウス実験モデルを用いた解析から、骨髄内において、LIC から分化、増殖した好塩基球様の白血病細胞から恒常的に産生される炎症性ケモカイン CCL3 が、LIC の維持・増殖、さらには CML の発症に重要であることを明らかにしてきた。本研究では、CCL3 を新たな分子標的とした治療法の確立を目的として、既存の CML 治療法である骨髄移植療法との併用効果の検討に着手した（図）。

【方法】骨髄移植の最適条件を決定するための予備的実験として、CML マウスに対して異なる強度で放射線照射した後、野生型マウス由来の骨髄細胞を移植し、治療後に残存した白血病細胞の経時的な変動を観察した。

【結果】最適条件で治療を行った際に、いったんはドナー由来の正常血球が再構築され、長期にわたり CML の再発が予防されたにもかかわらず、その後ほとんどのマウスが重度の貧血により死亡した。詳細な病理学的解析から、ドナー由来の細胞から骨髄異形成症候群（MDS）に類似した病態が発症していることを明らかにした。臨床的に骨髄移植後にドナー由来の細胞が、MDS を含む様々な白血病を新たに発症するドナー細胞由来白血病（DCL）が問題となっており、原因の解明が求められている。発症過程の類似性から、本病態の DCL 実験モデルとしての妥当性の確立、病態生理の解明が期待される。

CML に対する骨髄移植と CCL3 阻害の併用療法



【目的】キメラ抗原受容体 (CAR : chimeric antigen receptor) に代表されるがん特異的 T 細胞免疫療法の開発研究が盛んに進められている。このような一本鎖抗体 (scFv) をベースとした T 細胞免疫療法の確立によって、T 細胞受容体 (TCR : T-cell receptor) が抱える様々な課題を克服できる可能性が示された。本研究課題では、改変抗体 T 細胞療法を推進するために、様々ながん抗原特異的 scFv を、T 細胞活性化を指標として網羅的かつ効率よくスクリーニングする手法を確立する。そして T 細胞免疫療法に最適な scFv レパトアを作製して臨床応用に繋げる。

【方法】HLA-A*02:01/NY-ESO-1₁₅₇₋₁₆₅ (A2/NY-ESO-1₁₅₇) を特異的に認識する抗体 (3M4E5-scFv) をモデルとする。3M4E5-scFv の可変領域配列の片方を、ヒト免疫グロブリン由来可変領域ライブラリーと組み合わせ、A2/NY-ESO-1₁₅₇ 特異的 scFv ライブラリーを構築する。この scFv ライブラリーを CAR に組み込んで CAR ライブラリーを作製し、T 細胞応答性をリードアウトした完全ヒト型 scFv スクリーニングと scFv 機能解析とを行った。

【結果】本手法を用いて、我々は新規 A2/NY-ESO-1₁₅₇ 特異的 scFv レパトアの同定に成功した。A2/NY-ESO-1₁₅₇ 特異的重鎖可変領域を固定して、異なる軽鎖可変領域をもつ CAR 発現細胞株を樹立したところ、A2/NY-ESO-1₁₅₇ に対してそれぞれ異なる標的親和性と交差反応性を示すことが明らかとなった。

T 細胞活性化を指標としたがん特異的 scFv スクリーニング法

