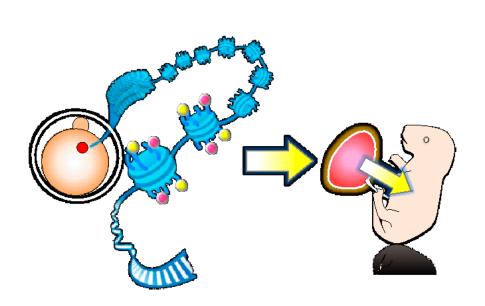
#### 1 胎盤を介した肥満体質の遺伝機構の解明

井上 梓

【目的】近年、親の肥満が子供の代謝疾患リスクを上昇させるという肥満体質の遺伝性が注目を集めている。しかし大規模なゲノム解析の結果、ゲノム変異の寄与は5~30%程度と見積もられており、ゲノム配列に非依存的な遺伝機構の存在が示唆される。生育環境などの交絡因子を排除できる動物モデルを用いた研究により、肥満体質の少なくとも一部は、卵のおそらくエピゲノムにより仲介されることが示唆されているが、その分子機構は全くわかっていない。そこで本研究では、肥満体質の母子遺伝に、卵から胎盤に伝達されるエピゲノムが関与すると仮説を立て、この検証に向けた知的基盤の構築を進めた。

【方法】我々は以前に、卵のエピゲノム修飾の一つであるヒストン H3 リジン 27 トリメチル化 (H3K27me3) が、次世代の胚に伝達され、胎盤において片アレル性遺伝子発現を制御することを明らかにした。そして、H3K27me3 の母子伝達を阻害したマウスモデル (H3K27me3 の修飾酵素である Eed の欠損卵と野生型精子を受精させて生じる Eed 母性欠損体:以下、LOI (loss-of-imprinting) 変異体と略す)において、胎盤特異的インプリンティングの破綻と胎盤の過形成が起こることを見出した。さらに、LOI 変異体は出生後に過体重を示すことから、母体環境などにより生じた卵のエピゲノム変異が、胎盤を介して次世代の代謝形質に影響を与えるという、肥満体質の母子遺伝機構を説明しうる新たな仮説を着想した (図)。そこで、本仮説の検証に向けた取り組みの一つとして、胎盤過形成と出生後過体重の因果関係を明らかにする実験を計画した。すなわち、LOI 変異体の胎盤過形成を治すことで、出生後過体重が治るかどうか、という点の検証である。具体的には、LOI 変異体の胎盤では 6 個の胎盤特異的インプリンティング遺伝子が両アレルから発現 (2 倍量発現) しているが、この 6 個各々の遺伝子をヘテロ欠損させることで強制的に片アレル性発現 (1 倍量発現) を回復させ、LOI 変異体の胎盤を治す。

【結果】CRISPR 等による遺伝子改変法により、6個の胎盤特異的インプリンティング遺伝子である Gab1、Jade1、Sfimbt2、Slc38a4、Smoc1、Xist それぞれのヘテロ欠損マウスを得た。このヘテロ欠損体を LOI 変異体と交配させることで、胎盤過形成が回復するインプリンティング遺伝子を同定する計画であり、実験を進めている。この過程で我々は、X 染色体の不活性化に必須な Xist のヘテロ欠損により、LOI 変異体の胚性部分致死が大きく回復することを見出した。このことは、Xist の片アレル性発現制御が、発生自体における経世代 H3K27me3 の主要な役割であることを意味する。そこで、LOI 変異体の胚性部分致死を回避して胎盤回復実験を遂行するために、Eed と Xist の母性二重欠損マウスを作製した。



卵のエピゲノムが胎盤を介して次世代形質を制御する

# 2 免疫染色を用いた生物オリジン探索研究

上村 大輔

【目的】海洋天然物化学の分野は近年非常に発展し、多くの天然物がカイメン類から単離・構造決定されてきた。例えばクロイソカイメン Halichondria okadai からはオカダ酸が単離されている。またクロイソカイメンからはオカダ酸以外にもオカダ酸誘導体である、ディノフィシストキシン、グリコオカダ酸などが単離されている。私達もクロイソカイメンよりハリコンドリン B を単離・構造決定している。この構造をもとに新規抗がん剤ハラヴェン®が開発され、すでにアメリカ、日本等で上市され、カイメン由来天然物の医薬リードとしての価値が強く認識されている。それ以外にも、ハリクロリンやハリクローム A などを単離・構造決定している。近年こうした天然物はカイメンに住む共生微生物が産生していることが報告されている。しかしこうした微生物がなぜこのような天然物を生産するのかは依然不明である。というのも環境中の細菌の大部分は難培養性であるためである。このような背景より私達は天然物そのものに注目した新しいアプローチを導入することにした。生物種や生合成遺伝子等の情報がまったくない状態では、天然物の構造こそが最大の手がかりであるからである。研究対象としては前述のように様々な有用医薬リードが報告されてきたクロイソカイメンを用いた。探索対象は先ずオカダ酸とした。

【方法】採取したクロイソカイメンはオートクレーブで滅菌した海水中で破砕し、石や貝類等はデカンテーションで除去した。クロイソカイメン破砕液は固定し、抗オカダ酸抗体で免疫染色した。二次抗体は Dylight 488 と Dylight 650 を用いた。免疫染色したサンプルを用いてフローサイトメトリーで解析を行った。セルソーターで回収したサンプルを試料として、蛍光顕微鏡で観察を行った。さらに、シングルセルの条件で PCR チューブに回収した。また、マニュピレーターを用いた回収も行った。回収した微生物は定法に基づきゲノムを抽出し、WGA キットでゲノムの増幅を行った。抽出したゲノムを鋳型に PCR を行い、回収した微生物の同定を行った。また、固定操作を行わずに生きたまま免疫染色も行った。染色後、セルソーターで回収し培養を試みた。真菌 A を培養し、抗オカダ酸抗体で免疫染色、フローサイトメトリーで解析した。また、真菌 A の培養抽出物に対し逆相 TLC プレートを用いてクロマトグラフィーを行った。真菌 A 培養抽出物を展開した TLC プレートを抗オカダ酸抗体で免疫染色した。また、増幅したゲノムを次世代シーケンサーで解析し、PKS 遺伝子を中心にゲノムマイニングを行った。

【結果】抗オカダ酸抗体を用いてカイメン破砕液を免疫染色し、蛍光を指標に染色された微生物を回収したところ、複数の微生物が取得された。解析の結果、一つは真菌であり、もう一つは複数の細菌から構成されるバイオマットであった。そこで、固定を行わず同様に免疫染色を行い、回収した微生物の培養を試みた。その結果、真菌の培養に成功した。培養した真菌を抗オカダ酸抗体で免疫染色したところ、染色を確認した。培養抽出物をクロマトグラフィーで分離し、プレートごと免疫染色したところ、蛍光を示すバンドを確認した。また、ゲノムマイニングの結果、真菌由来のLovastain 生合成遺伝子を含む複数の遺伝子クラスターを確認した。さらに、細菌に関しても多数の酸化還元酵素をクラスター内に含む放線菌由来のPKS遺伝子クラスターを確認した。

#### Structures of okadaic acid and halichondrin B

# 3 新しいがん光治療薬剤と治療効果モニタリング法の開発

小川 美香子

【目的】本研究では、我々がこれまでに見出した近赤外光によりがん細胞のみを特異的に殺傷する新たな手法である 光免疫療法 Photo-immuno therapy(PIT)について、汎用性の向上を目指した新規薬剤開発と治療効果の モニタリング手法の開発を行った。PIT では、がん細胞表面に結合する抗体とフタロシアニン誘導体 IR700 からなる 光反応性薬剤を投与後に近赤外光を照射し、がん細胞のみ特異的に殺傷する。本研究では、汎用性の向上を目指し インテグリン  $\alpha$  v  $\beta$   $\beta$   $\delta$  を標的化した薬剤開発を行った。また、光音響イメージングを用いた治療効果モニタリング手法 の開発を行った。

【方法】インテグリン $\alpha$ v $\beta$ 3 を標的とした薬剤 RGD $_2$ -IR700 を合成した。これを用い、RGD $_2$ -IR700 による PIT の効果を培養細胞を用いて検討した。さらに、担がんマウスを用いて体内動態と治療効果を検討した。また、抗体-IR700 複合体を担がんマウスに投与し光音響イメージングを行った。

【結果】培養細胞を用いた検討では、作製した薬剤 RGD2-IR700 はインテグリンανβ3特異的に結合し、近赤外光の照射により、特異的かつ迅速な細胞の収縮を引き起こした。これは細胞の膨張を伴う既存の抗体 PIT と異なる現象であった。担がんマウスモデルを用いた体内動態検討では、投与後早い段階で腫瘍への集積と腫瘍対バックグラウンド比(TBR)が最大となった。治療効果検討では、抗体 PIT の場合と同様に、近赤外光照射後に腫瘍における IR700 の蛍光強度が大きく低下したが、その後、腫瘍の増殖は抑制されず、有意な治療効果は認められなかった。この知見は、RGD2-IR700 を用いた PIT が、担がんマウスモデルにおいても既存の抗体 PIT と異なるメカニズムでがん細胞に作用することを示唆する。また、光照射前後、脱血後、腫瘍摘出後の各タイミングで光音響イメージングを行ったが、照射側と非照射側の腫瘍において蛍光イメージングで観察されたような差は認められなかった。IR700 に特徴的な近赤外光領域のシャープな吸収は 650 nm 付近から始まるため、より短波長のシグナルを得ることができる光音響イメージング装置を用いれば、ヘモグロビンのシグナルと分離して解析することができる可能性が高い。

# NIR-light RGD Time after irradiation Pre irradiation Discretely a minus of the property of

intezrin ανβαnegativ

インテグリン $\alpha$ v $\beta$ 3 を標的とした薬剤を用いた PIT

#### 4 超百寿者エピゲノム解析による健康長寿規定要因の解明

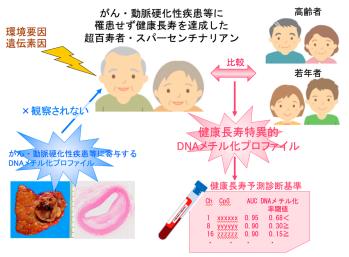
金井 弥栄

【目的】健康長寿は古来人類の願いであり、顕著な高齢化社会を迎える我が国では、個々人が疾病を避け健康長寿を達成できるように、健康長寿を規定する要因の解明が望まれる。本研究では、若年者・高齢者・超百寿者(105歳以上)ならびにスーパーセンチナリアン(110歳以上)の血液検体のゲノム網羅的DNAメチル化解析結果を、生活習慣等の問診情報やゲノム情報と照合することで、生活習慣等環境要因と遺伝素因が誘導するDNAメチル化プロファイルが、健康長寿を規定する機構を解明し、予防・先制医療の基盤となる知見を得ることを目的とした。

【方法】「慶應義塾大学医学部百寿総合研究センター」が収集し、全ゲノム解析が終了している血液検体を、「いわて東北メディカルメガバンク機構」の支援を受けて、次世代シークエンサを用いた DNA メチル化キャプチャ法によるゲノム網羅的 DNA メチル化解析(SureSelect XT Human Methyl-Seq [Illumina] によるバイサルファイトシークエンシング [84 Mb、370 万 CpG 対象])に供した。本報告書作成時点で、一部検体においてシークエンシングを完了し、一部検体においてはライブラリ作製まで終了した。比較の対象として、「いわて東北メディカルメガバンク機構」が実施した、住民コホートの若年者( $40\sim50$  歳程度)・高齢者( $80\sim90$  歳程度)の血液検体におけるエピゲノム解析結果の提供を受けることになった。

【結果】当研究室で蓄積してきた 2,000 検体程度の諸臓器がん組織・がん症例手術検体の非がん組織(既に発がん要因の影響を受け前がん段階にある可能性がある)・当該臓器がんを有さない症例の手術検体より得られた正常組織における DNA メチル化解析結果を再検討した。超百寿者・スーパーセンチナリアンが発がんに対する耐性を獲得しているか知るために、重点的に確認すべき CpG 部位として、肺・胃・腎・乳腺・肝等の諸臓器に共通して、前がん段階から DNA メチル化異常が起こり、その異常ががん組織そのものに継承される 489 CpG 部位を同定した。同様に、糖尿病・動脈硬化性疾患に対する耐性を獲得しているか知るために重点的に解析すべき CpG 部位の候補を、共同研究機関とともに絞り込んだ。研究体制整備に時間を要し、研究期間内に DNA メチル化キャプチャ法によるゲノム網羅的 DNA メチル化解析を全検体で完了することができなかったが、解析は当初計画の手順で進行した。超百寿者・スーパーセンチナリアン血液検体のエピゲノムデータを取得次第、対照となる若年者・高齢者の血液検体と比較し、DNA メチル化率が異なる CpG 部位を抽出して、健康長寿特異的 DNA メチル化プロファイルを同定できると見込まれた。がん等の疾患促進的 DNA メチル化異常が、超百寿者・スーパーセンチナリアンの血液検体には認められないことが証明できると期待された。健康長寿特異的 DNA メチル化プロファイルを特徴付けるマーカーCpG 部位を絞り込めば、近未来の予防・先制医療戦略につながる「健康長寿予測診断基準」が策定できると期待された。

#### 本研究全体の概念図



遺伝素因も加味して健康長寿が期待できるか判定し、 生活習慣改善等をはかる予防・先制医療へ

# 5 運動筋ニッチが司る運動免疫ネットワーク制御の解明

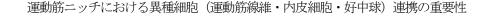
神﨑 展

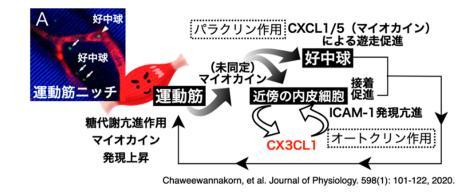
【目的】本研究課題では、我々が最近に見出した運動筋ニッチ(exercise-governed favorable immune-metabolic niche) (Tsuchiya, M. et al. Cell Rep.2018) と、その現場における動員好中球などの免疫系細胞種、血管内皮細胞、そして運動筋線維からなる異種細胞間の機能連携に着目し、「運動筋ニッチがつかさどる運動免疫ネットワーク制御」の重要性を明らかにすることを目的とした。

【方法】軽微な筋運動を負荷できるマウス咬筋咀嚼運動(Gnawing)モデルを用い、一定期間の運動負荷の後に咬筋を採取して各種解析および 2 光子顕微鏡解析へと供した。筋糖代謝亢進の指標としてのインスリン反応性糖輸送担体(GLUT4)を観察するためGLUT4・EGFP・tg マウスを用い、量子ドット(QD)標識 Gr-1 抗体を予め投与して in vivo で好中球を免疫染色することで、運動筋ニッチにおける GLUT4 膜移行(糖代謝亢進)と好中球動員(免疫系賦活化)の連関状況を可視化解析した。また、マウス筋組織内における異細胞種間の機能連携を培養系において再構成し、マウス筋細胞株(C2C12)を用いた in vitro exercise モデルおよび血管内皮細胞培養系を活用した一連の実験を遂行した。

【結果】運動筋内における CX3CL1 の生理的役割を明らかにするために、CX3CL1 受容体 (CX3CR1) のアンタゴニストである AZD8797 投与による影響 (咬筋活動量・好中球動員量・筋糖代謝能) を Gnawing モデルにより調べた。その結果、(1) AZD8797 投与は、運動依存性の好中球動員を阻害し、咬筋活動量も減弱することを見出した。また、(2) 咬筋運動により、IL-6 や CXCL1、CX3CL1 および ICAM-1 の mRNA 発現が筋組織内で増加するが、AZD8797 投与は、運動依存性の IL-6、CXCL1 および ICAM-1 の mRNA 発現亢進を抑制することを見出した。一方、CX3CL1 発現亢進は AZD により抑制されず、他のマイオカイン類の調節機構と異なっていた。(3) AZD8797 投与により運動依存性の筋糖取込および GLUT4 膜移行が有意に抑制された。(4) 免疫組織染色解析を行ったところ CX3CL1 と ICAM-1 は主に血管内皮細胞にて強い免疫染色性が認められ、筋線維自体では確認されなかった。(5) in vitro exercise モデルを用いた実験を行ったところ、筋細胞自体の CX3CL1 発現亢進は認められなかった。(6) 培養血管内皮細胞における CX3CL1 の mRNA 発現量は、上述の in vitro exercise モデルで得られた収縮筋細胞の条件培地により上昇した。

以上の結果から、運動骨格筋内の運動筋ニッチにおける異種細胞種間の機能連携の重要性を明らかにした。特に筋運動ニッチ内の収縮筋線維近傍に存在する血管内皮細胞が分泌するCX3CL1は、運動依存性の好中球動員、さらには筋GLUT4膜移行と糖取込亢進と、マイオカイン類(IL-6やCXCL1)の発現亢進に不可欠であり、この運動筋ニッチ内での機能連携性の不全は、筋運動能力自体の低下を惹起することを明らかにした。本研究課題では比較的急性の効果について研究を行ったが、中長期的な筋適応性や、さらには加齢に伴う「運動筋ニッチ」の変容は筋可塑性の作動原理ともなり、そのシステム不全は筋機能、ひいては身体運動機能の弱体化にも関与する可能性が非常に高い。本研究成果に基づく上記の新視点からの包括的な筋運動研究は、超高齢化社会にある現代社会の吃緊の課題であると考えられる。





# 6 アミド結合形成の触媒化による医薬品合成の刷新

熊谷 直哉

【目的】アミド結合はタンパク質やナイロン等の生体・合成高分子の主鎖を形成するほか、多くの農薬・医薬品に含まれる重要な構成要素である。アミド形成反応は特に産業界における需要が高く、大規模合成反応に環境調和性を求める機運が高まりつつある昨今、カルボン酸とアミンを基質とした触媒的な直接アミド結合形成反応が廃棄物を副生しない合成法として注目を集めてきた。最近我々は、独自のコンセプトに基づいて設計した  $B_3NO_2$ 型〜テロ 6 員環多核ホウ素化合物 DATB(1,3-dioxa-5-aza-2,4,6-triborinane) 1a が、直接アミド化反応の高活性な触媒として機能することだけでなく、広範な基質適用範囲を有していることを見出した(下図)。我々は、本 DATB 触媒 1a を基盤として、詳細な反応機構解析による本アミド形成触媒反応の本質的理解と、その知見に基づく実践的なアミド形成触媒方法論の確立を目指し、研究を開始した。

【方法】酢酸とメチルアミンのアミド形成反応をモデル反応として、DFT 計算によりカルボン酸活性化に関する遷移 状態構造の探索を行い、反応機構の包括的理解を進めることとした。得られる知見をもとに触媒の再設計を施し、 実践的な大規模合成に耐えうる安価かつ活性の高いアミド結合形成触媒の合成法を再開発することとした。触媒性能は、 これまで困難とされてきた立体的に嵩高い基質や種々の反応性官能基を有するものを戦略的に選定することで、実際の 合成ニーズに即応できる触媒としての確立を目指すこととした。

#### DATB 触媒 1a による直接的アミド形成反応

bulky & functionalized substrates 
$$\alpha$$
-amino acids DATB 1a O.5-5 mol% PNH NS4A, toluene rt to reflux  $R^1$  OH  $R^2$  OH  $R^2$  OH  $R^2$  OH  $R^3$  OH

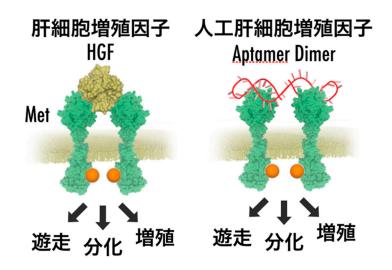
#### 7 医療応用に向けた人工肝細胞増殖因子の創製

山東 信介

【目的】体を構成する細胞は、外界からの刺激に応答してその細胞機能を変化させる。その主要な役割をはたすのが、細胞膜上に発現する細胞膜タンパク質とそれに結合するリガンド分子である。様々なリガンドの中でも、本研究では細胞増殖因子、特に肝細胞増殖因子に着目して研究を進めた。肝細胞増殖因子(Hepatocyte Growth Factor: HGF)は、細胞膜受容体 Met に結合して二量体化を引き起こす。その結果、細胞内部ドメインがリン酸化され、増殖や遊走、分化といった特徴的な細胞機能が誘起される。組換え HGF は、肝細胞に対する作用から肝炎や肝硬変などの肝疾患や筋萎縮性側索硬化症治療への応用が検討されている。一方で、組換えタンパク質作製にかかる製造コスト、活性クオリティーコントロールや熱安定性の低さなど、実応用に向けて克服すべき課題もある。我々は、この問題点を克服すべく、化学合成可能な人工 HGF の開発に取り組んできた。核酸アプタマーを構成要素とする核酸化学型人工 HGF を設計し、この人工 HGF が細胞上に発現する Met 受容体の活性化を引き起こすことを示している。本研究では、開発した人工 HGF の医療応用に向け、生体条件における人工 HGF の安定性評価を行うとともに、動物実験を実施し、肝疾患治療への応用可能性を検討する。

【方法と結果】本研究では、人工 HGF の医療応用評価に向け、生体条件下における安定性評価を実施するとともに、体内動態評価、及び肝炎モデルに対する治療効果評価を進めた。生体条件における安定化は、人工 HGF の血清中の安定化をポリアクリルアミド電気泳動により評価した。その結果、興味深いことに、部分人工 HGF は血清中で速やかに分解されたのに対し、完全長人工 HGF は高い血清安定性を示すことを見出した。また、蛍光標識した人工 HGF を用い、マウス尾静脈から投与した際の体内動態評価を行った。その結果、人工 HGF が肝臓に集積し、さらに肝臓部位における Met リン酸化を引き起こすことを明らかにした。最後に、肝炎モデルマウスを用い、人工 HGF の肝炎抑制能を確認した。その結果、人工 HGF を投与することにより、肝炎マーカーの抑制が確認された。Preliminary な段階であるが、本研究により人工 HGF が生体応用に向けて有望な機能を有していることが示された。

肝細胞増殖因子と人工肝細胞増殖因子の概念図



# 8 創薬化学を志向したロバストな金属触媒反応の開発

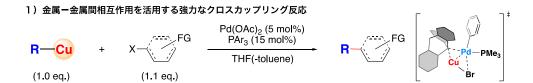
滝田 良

【目的】有機金属化学の発展は、有機化学分野において大きな貢献を果たし、高度な分子変換・精密有機合成を可能にしてきた。しかしながら、創薬化学において満足はなく、特に有用官能基の迅速・効率的・選択的導入法の開拓は一層不可欠である。本研究では、特に元素の特性を活用することで、有機金属試薬が活躍する有機反応における新たな反応性・選択性の実現を目指した。具体的には、1. 金属一金属間相互作用を活用する強力なクロスカップリング反応の開発、2. 芳香族化合物のロバストな銅触媒官能基導入法、3. アミド還元反応の選択性、などについて取り組んだ。

【方法】1. 有機銅試薬の特性を活用することで様々な嵩高い炭素骨格に適用可能な強力なクロスカップリング反応を開発し、その高い反応性の起源に実験と理論計算の両面から検討を行った。2. 水を酸素源とする芳香族化合物水酸基導入反応を検討した。銅触媒の反応性向上のため配位子や界面活性剤などの添加効果を多角的に検討した。見出したスクロースの効果について特に理論計算を用いて、その役割を検証した。3. DIBAL 試薬を用いる N,Nジアルキルアミドの還元反応は対応するアミンを選択的に与えるが、その選択性の起源について DFT 計算を用いて検討した。

【結果】1. 反応最適化の結果、パラジウム触媒存在下、有機銅試薬を用いることで様々な嵩高い炭素骨格において 炭素-炭素結合形成反応が進行することを見出した。特にクロスカップリング反応の前例のないトリプチセン骨格など が適用可能である。また、ほぼ同様の条件で sp<sup>2</sup>-および sp<sup>3</sup>-炭素を有する様々な嵩高い基質に適用可能な クロスカップリング反応であることを実証した。実験および理論計算による検証から、銅の特性を活用し、トランス メタル化段階における Pd-Cu の金属ー金属間相互作用を活用するコンパクトな遷移状態にて進行することを明らかに した。2. 銅触媒の反応性の低さと基質の溶解性の低さが課題であったため、配位子や界面活性剤などの添加効果を 多角的に検討した。その結果、スクロースを添加した際に大きな加速効果が見られ、目的のフェノール誘導体が高収率 にて得られることを見出した。本反応系は種々の(ヘテロ)芳香族化合物に適用可能であり、空気中でも反応が行える。 またグラムスケールでの反応も問題なく進行するなど、堅牢な反応である。特にスクロースの役割を明らかにすべく、 反応機構の解析に取り組んだ。理論計算より、スクロースの部分構造が配位した銅錯体は酸化的付加段階を促進する ことが示唆されており、配位子として働き、銅触媒の反応性を向上させていることが明らかとなった。また基質の 溶解性の向上にも寄与していることが示され、銅触媒反応で用いられることがなかったスクロースの役割が明らかとな った。3. DIBAL 試薬による N.N・ジアルキルアミドの還元反応について DFT 計算を行った。その結果、二量体構造 を有する試薬の 2 核アルミニウム中心が効率的に炭素-酸素結合を活性化することにより、その切断が速やかに 進行することが明らかとなった。試薬の二量体構造は重要であり、単核のモデルでは上述の炭素ー酸素結合の切断は 全く進行しない。すなわち、DIBAL 試薬による還元反応において、二量体構造と高い Lewis 酸性を有する アルミニウム元素の特性がその反応性・選択性を制御していることを明らかにした。

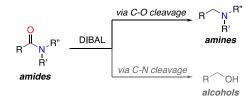
#### 創薬を志向したロバストな反応



#### 2) 芳香族化合物のロバストな銅触媒官能基導入法

# $\begin{array}{c|c} & Cu_2O \ (1 \ mol\%) \\ & Sucrose \ (0.5 \ eq) \\ \hline & K_2CO_3 \ (3 \ eq) \\ & H_2O \ (0.1 \ M) \\ & 140 \ ^{\circ}C \ (oil \ bath) \end{array}$

# 3) DIBALによるアミドの還元反応の選択性



# 9 病原菌の特異的代謝経路をターゲットにした抗生剤開発

大利 徹

【目的】種々の微生物のゲノムデータベースを用い詳細な比較解析を行うと、既知の生合成経路の遺伝子群を見出せない場合がある。それらが生育に必須な経路の遺伝子であれば、当該微生物は新規の生合成経路を利用している可能性が高い。実際、筆者はゲノムデータベースの精査と生化学実験により、メナキノンとペプチドグリカンの生合成に関与する新規経路(酵素)を見出した。前者はピロリ菌が、後者はイネ白葉枯病菌が利用する。新規経路の阻害剤は、これら病原菌の特異的抗生剤・農薬になると考えられることから、放線菌と糸状菌の培養液に目的化合物を探索した。【方法】メナキノン(MK)新規経路の阻害剤の探索は以下のように行った。当研究室では病原菌であるピロリ菌を扱うことができないため、スクリーニングには互いに近縁な2種の Bacillus 属細菌を用いた。既知 MK 生合成経路保有株である Bacillus subtilis および新規経路保有株である Bacillus halodurans を培養液サンプルの存在下でそれぞれ培養し、B. halodurans の生育のみを阻害するサンプルを探索した。

ペプチドグリカン新規生合成経路阻害剤の探索は、既知経路保有株として *Streptomyces lividans* を、新規経路保有株として *Micromonospora* sp. を被検菌に用いて生育阻止円検定を行い、後者にのみ生育阻害を示すサンプルを探索した。最終的には新規経路の生合成酵素を用いた *in vitro* アッセイで阻害を確認した。

【結果】MK 新規経路阻害剤の探索は、放線菌と糸状菌の培養液 5,200 サンプルに対し行った結果、18 のヒットサンプルを得た。しかし、何れも既知の脂肪酸類であることが判明し、これらサンプルからの活性本体の単離は中止した。

ペプチドグリカン新規生合成経路阻害剤の探索は、放線菌培養物 3,280 サンプルを用いて行い候補サンプル 1 つを得た。候補サンプル生産菌を大量培養後、上清を酢酸エチルで抽出し HPLC で分析した結果、1 つの大きなピークが検出された。本ピークを分取しペーパーディスクアッセイを行った結果、本ピークに活性本体が含まれていることがわかった。活性本体を精製後、精密質量分析を行った結果、m/z=1255.6373 を得た。活性化合物は結晶性が良かったことから、結晶構造解析を行った結果、actinomycin D であることが明らかとなった。Actinomycin D が実際に新規経路を阻害するか組換え酵素を用いて  $in\ vitro$  で調べた結果、 $in\ vitro$  で調べた結果を開かれた。 $in\ vitro$  で調べた結果、 $in\ vitro$  で調べた。 $in\ vitro$  で調べたがままない。 $in\ vitro$  で調べたままない。 $in\ vitro$  で調べた結果、 $in\ vitro$  で調べた。 $in\ vitro$  で調べた。 $in\ vitro$  で調べた。 $in\ vitro$  で調べた。 $in\ vitro$  で調べたが明らかかかかった。 $in\ vitro$  で調べた。 $in\ vitro$  で調べたままない。 $in\ vitro$  で調べた。 $in\ vitro$  で調がた。 $in\ vitro$  で調がた。

# Actinomycin D の構造

【目的】芸能人や元スポーツ選手、あるいは社会的地位のある政治家や医師が覚醒剤や大麻を使用する薬物事犯が頻繁に報道され、薬物乱用に対する国民からの注目度は非常に高く、啓蒙活動が活発になされながらも、覚醒剤・大麻の乱用問題は引き続き残っている(図)。乱用薬物依存を疾病として捕らえ、予防・治療法の確立を目指すことが、我々、薬学研究者の責務となることが近い将来に予想される。今までにも、乱用者の多くで観察される遺伝子変異について報告されているが、それらの経過を予防に活用するには至っていない。特定のがんの治療と同様に乱用薬物依存になった人が特定遺伝子に変異があることが明確になれば、薬物乱用予防に対して新たな啓蒙活動につながる。その因果関係を明確にすることができれば、早期より薬物乱用防止への徹底した教育を施すことが可能となる。我々は、覚醒剤の1つであるメタンフェタミンをマウスに投与した時に発現量が増加する分子である SHATI/NAT8L に着目し、そのプロモーター部位での遺伝子修飾の変化を検討し、薬物乱用に陥る可能性の高いヒトを検出する方法を確立し、科学的で確実な薬物乱用治療・防止政策につなげたいと考えている。

【方法】1. 覚醒剤乱用者の遺伝子については、東京都医学総合研究所が現有している覚醒剤乱用患者の遺伝子を使用した(承認番号 17-43)。2. 遺伝子修飾については、SHATINAT8Lのプロモーター部位でのメチル化の検討を行った。バイサルファイト処理を行った。PCR プライマーは reverse 側にビオチン化プライマーを使用した。3. PyroMark を用いて、パイロシークエンス法にて実施した。

【結果】覚醒剤使用者 193 名(平均年齢 37.4±0.88 歳)および健常者 60 名(同 50.55±2.49 歳)の血液から抽出した DNA を使用した。翻訳開始点から下流へ 1,480 番から 1,714 番目の CpG サイトのメチル化を測定した。その結果、-1700、-1532、-1509、-1492、-1482、-1480 の DNA メチル化が増加していることが分かった。これらの結果から、覚醒剤使用者の遺伝子では、SHATI/NAT8L の発現が減少していることが示唆される。覚醒剤乱用との関連が深いと考えられている Shati/Nat8l の生理機能の良質な抗体を得ることができず、SHATI/NAT8L の発現量を直接的に測定できない現状では、本遺伝子修飾を指標として、乱用者や乱用可能性の高い患者を検出するための方法に大きく前進したと考えられる。

#### DNA のメチル化

5-hydroxymethylcytosine (5hmC)

# 11 漢方薬によるオートファジー抑止を通じた薬効の研究

野田 健司

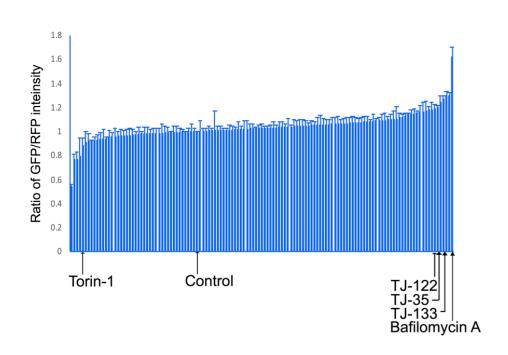
【目的】オートファジーは真核生物における細胞内の自己分解機構である。その機構は真核生物に広く保存されており、ヒトやマウスをはじめとする哺乳類でも、オートファジーの研究が近年盛んに行われ、その結果オートファジーは様々な疾病や生理現象に深く関わることが明らかにされてきた。このような観点から、オートファジー活性を薬剤などにより人為的に制御することが様々な企業や研究所などにより目指されているが、まだ理想的な薬剤の登場には至っていない。漢方薬は中医学を起源とし、日本の文化などに適応しながら受容されてきた生薬の組み合わせの体系である。その薬効をもとに古来より伝達されてきたが、その作用機序に対する理解は未だ十分とは言えない。ツムラより販売されている医療用漢方 145 種類のうち、その薬効がオートファジー活性の調節を介在しているものがある可能性を検討するため、本研究を開始した。

【方法】オートファジー活性を定量する tfLC3 法を用いて、Hela 細胞を全 145 種の漢方処方で処理をした。そのなかで著明なオートファジー抑制活性を示したものに注目して、その作用機序を探求した。様々なオートファジー実行分子への影響を調べた。オートファジー制御機構であるmTORC1 の活性制御への影響を解析した。基質の一つ TFEB への影響の機構として、細胞内カルシウム動態およびカルシニューリンの影響を解析した。

【結果】スクリーニングの結果、TJ-35 四逆散がオートファジー抑制活性を示すことが明らかとなった。TJ-35 はオートファゴソーム形成を抑制した。mTORC1 の基質のうち、特に TFEB の脱リン酸化を抑制した。TFEB はカルシニューリンにより脱リン酸化された。飢餓環境下に小胞体からカルシウムが流出することを見出し、TJ-35 はその流出を阻害することで、TFEB の脱リン酸化を阻害し、オートファジーを阻害することが判明した。

Ikari, S., S.-L. Lu, F. Hao, K. Imai, Y. Araki, Y.-H. Yamamoto, C.-Y. Tsai, Y. Nishiyama, N. Shitan, T. Yoshimori, T. Otomo, and T. Noda. 2020. Starvation-induced autophagy via calcium-dependent TFEB dephosphorylation is suppressed by Shigyakusan. *PLoS ONE*. 15:e0230156–22. doi:10.1371/journal.pone.0230156.

# 全漢方処方のオートファジー活性への影響



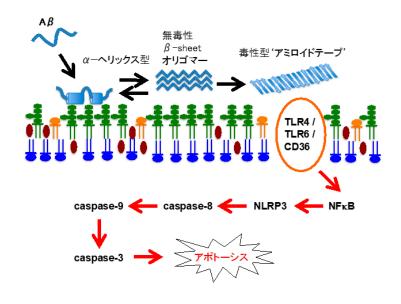
【目的】アルツハイマー病(AD)は老年性認知症の大部分を占める神経変性疾患であり、ADの予防・治療法の開発は 喫緊の課題である。ADの発症機序として最も有力なのは「アミロイド $\beta$ ペプチド(A $\beta$ )が, $\beta$ シート構造に富んだ 凝集体を形成し神経細胞に沈着して神経毒性を示す」という $\beta$ アミロイドカスケード仮説である。しかし、本来可溶性 である A $\beta$ が、老化に伴い不溶化・沈着するメカニズムは不明である。我々は、神経細胞膜を介したメカニズムに注目 し、GM1 クラスターに結合した A $\beta$ が、 $\alpha$ ヘリックスから $\beta$ シートへと構造変化し、最終的に毒性を有する アミロイド線維を形成する凝集メカニズムの詳細を解明してきた。本研究では、膜中線維の構造と膜中線維によって 誘起されるアポトーシスの分子メカニズムを解明することによって、膜を介した毒性型 A $\beta$ アミロイドの形成・毒性 発現機構の全容を明らかにすることを目的とした。

【方法】膜中線維の構造は、同位体標識 FTIR、AFM、TEM、クロスリンク、固体 NMR にて推定した。毒性発現機構は、SH-SY5Y 細胞 (caspase-8、caspase-9 ノックダウン細胞を含む) を用い、各種 caspase の活性化、NF  $\kappa$  B の細胞内局在観察により検討した。

【結果】同位体標識線維と非標識線維の FTIR 差スペクトルから、膜中線維はほぼ全長に渡って逆平行 $\beta$ シート構造をとっていると考えられた。このことは TEM 観察の結果とも符合した。AFM 測定から、膜中線維の高さ  $(0.6\pm0.1\,\mathrm{nm})$  は著しく低かった。G9 と A30 をシステインに置換した 2 種の A $\beta$ 40 を用いてクロスリンク実験を行ったところ、G9 C·A $\beta$ ホモダイマー、A30 C·A $\beta$ ホモダイマーに加えて、両者のヘテロダイマーが検出されたことから、膜中線維は1層の $\beta$ シート構造からなるテープ状であり、in-register 平行 $\beta$ シート構造の途中で $\beta$ ストランドが反転し、2 残基ずれた逆平行 $\beta$ シート構造を形成していると推定された。固体 NMR の結果も、この構造を支持した。

Caspase-8 や caspase-9 の阻害剤が  $A\beta$  42 投与による caspase-3 活性化を抑制したことから、アポトーシスに これらのカスパーゼの関与が示唆された。 ノックダウン細胞を用いた実験から、caspase-9 は caspase-8 の下流で 活性化していることが明らかになった。抗 TLR4 抗体、抗 TLR6 抗体、NLRP3 阻害剤を投与したところ、 $A\beta$  投与による caspase-3 の活性化は顕著に抑制されたことから、TLR4-TLR6-CD36 複合体、NLRP3 インフラマソームを 介するシグナル経路がいずれも  $A\beta$  投与によるアポトーシスに関与していることが示唆された。また、 $A\beta$  が線維を 形成するのと同時に NF  $\kappa$  B が核移行するのを確認した。以上の結果から、膜中線維の毒性発現機構として、 TLR4-TLR6-CD36 複合体の活性化  $\rightarrow$  NF  $\kappa$  B の核移行  $\rightarrow$  NLRP3 の活性化  $\rightarrow$  caspase-8 の活性化  $\rightarrow$  caspase-9 の 活性化  $\rightarrow$  caspase-3 の活性化  $\rightarrow$  アポトーシスがメインルートであると考えられた。

膜を介した毒性型Αβアミロイドの形成・毒性発現機構



# 13 海洋生物からのパーキンソン病治療化合物の探索

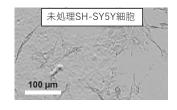
松永 茂樹

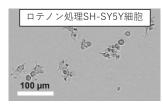
【目的】パーキンソン病を含む神経変性疾患は、罹患者の生活の質を著しく低下させるが有効な治療法が開発されていない。パーキンソン病は、環境中の毒物への暴露がその原因の一部として疑われており、薬物常用者における薬物中の副成分である MPTP の摂取や農薬のロテノンやパラコートに対する暴露が急性パーキンソン病を誘導する。これらの毒物を用いたパーキンソン病モデルに対する神経細胞保護作用を指標として、パーキンソン病治療薬探索のための試験系を作製できる。また、カイメン等の海産無脊椎動物に含まれる天然物の医薬資源としての重要性が再認識されている。このような背景に基づき、パーキンソン病を標的として、海産無脊椎動物を対象に探索研究を行うことを目的とする。

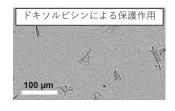
【方法】採取が困難であることから未開拓な化合物資源といえる、深海底に生息するカイメンを探索素材とした。 ヒト神経芽細胞腫由来 SH-SY5Y 細胞に対してロテノンが示す毒性から培養細胞を保護する作用を指標として、活性 物質の探索を行った。カイメンの抽出物の水溶性画分と脂溶性画分を試験に供した。細胞毒性のため細胞保護活性が 検出できなかった場合は、予備分画物を行った。スクリーニングにおいて細胞保護作用を示した試料を大量に抽出し、 分画の各段階で SH-SY5Y 細胞に対する細胞保護作用を調べつつ活性成分の精製を行った。

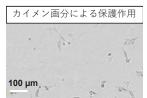
【結果】SH-SY5Y 細胞を用いて、MPTP とロテノンが示す毒性を比較したところ、ロテノンの方が再現性よく顕著な毒性を示したため、本研究ではロテノンを用いることとした。ドキソルビシン処理によりロテノンが示す毒性から細胞が保護されることを確認後、スクリーニングを実施した。284種のカイメンについて調べた結果、41種のカイメンの水溶性あるいは脂溶性画分が細胞保護作用を示した。これらの活性の再現性を調べるため、再試験に供すると、活性を示したものは6種にとどまった。そこで、これら6種の試料から活性成分の探索を進めた。屋久新曽根産カイメン16-008と大島新曽根産カイメン17-017の抽出物は、溶媒分画物後のODSフラッシュクロマトグラフィーで、いずれの画分にも生物活性が検出されなかった。大島新曽根産カイメン18-333は抽出物の溶媒分画物後に生物活性が消失した。大島新曽根産カイメン18-333は抽出物の溶媒分画物後に生物活性が消失した。大島新曽根産カイメン18-333は抽出物の溶媒分画物後に生物活性が消失した。大島新曽根産カイメン17-114では、溶媒分画物後のODSフラッシュクロマトグラフィーで活性画分が得られ、これをさらにHPLCで分画して活性画分を得た。その画分のLCMSデータに基づき、類縁化合物を探索するとともに活性物質の精製を進めた。生物活性を示す画分は得られたが、構造決定を行うために十分な量の化合物を得ることができなかった。サンゴ曽根産カイメン08-679では溶媒分画後の、水画分、1-ブタノール画分、および n-ヘキサン画分に生物活性が認められた。水画分をODSフラッシュクロマトグラフィーにより分画したところ、水および75%メタノール溶出画分に活性が認められ、この75%メタノール画分を用いて活性成分の精製を行った。

#### SH-SY5Y 神経芽細胞腫細胞を用いたパーキンソン病モデル









# 14 初期フレイルのバイオマーカー探索

三浦 ゆり

【目的】フレイルは、サルコペニアとともに高齢者の QOL を低下させる大きな原因となっている。運動機能の低下を初期のうちに発見し速やかに介入を行うことは、高齢者が健康な生活をおくるための大きな目標であり、このため高い精度で判定できる診断マーカーの策定が求められている。ところがこれまで、プロテオミクスによる疾患バイオマーカー探索研究は、別人である「患者」と「健常者」を比較していたため個人差によるばらつきが大きく、疾患に起因する変化を見つけることが難しかった。そこで本研究では長期縦断コホートとプロテオミクス(タンパク質の網羅的解析)及びグライコミクス(糖鎖の網羅的解析)を組み合わせて、個人ごとに「健常時」と「運動機能低下時」の比較を行い、フレイルを初期の段階で発見する診断指標を開発することを目的とする。

【方法】解析対象者は、長期縦断コホート SONIC (Septuagenarians、Octogenarians、Nonagenarians Investigation with Centenarians) の参加者から抽出した。SONIC は、3 年ごと、20 年間の予定で行われる 大規模長期縦断研究である。今回は、初回調査時(1 wave)の年齢が70歳(1,000名)を対象とし、運動機能 調査のデータをもとに、3 年後(2 wave)及び 6 年後(3 wave)の追跡調査において、継続的に一定以上、 握力が低下したグループを「低下群」、握力が維持された群を「安定群」として抽出した。解析対象者の1wave と 3 wave の血漿について、蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動法 (2D-DIGE)を用いて プロテオーム解析を行った。得られた二次元電気泳動画像を解析し、同一対象者ごとに 1 wave と 3 wave の画像 を比較し、スポットの発現量(相対蛍光強度)が 1 wave に比べて 1.5 倍以上変化し、かつ分散分析により 有意な変化 (p<0.05) を示したスポットを、発現の変動したスポットとして抽出し、タンパク質の同定を行った。 【結果】SONIC 調査に 3 回連続して参加した 70 代、488 人の中から、握力低下群として 23 人(男性 9 人、 女性 14 人)、安定群として 23 人(男性 9 人、女性 14 人)を抽出した。2D-DIGE を行った結果、低下群におい て握力低下前(1 wave)に比べて低下後 (3 wave)に発現が増加したスポットが 11、低下したスポットが 24 あった。これらをバイオマーカー候補スポットとした。これらのスポットのタンパク質を同定したところ、 プロテアーゼインヒビターなどが増加し、ヘモグロビン結合タンパク質などが減少することが明らかになった。 しかし、同じタンパク質と同定されるスポットのうち、特定のスポットだけがバイオマーカー候補となっている 場合もあり、翻訳後修飾、即ち糖鎖修飾を含めて解析する必要性が示唆された。

バイオマーカー探索研究において長期縦断コホートを用いる利点

#### (a) これまでのバイオマーカー探索



# (b) 長期縦断コホート



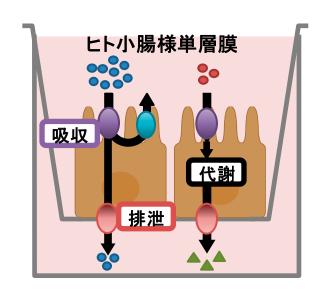
#### 15 創薬応用のためのiPS細胞由来小腸上皮細胞の開発

水口 裕之

【目的】小腸上皮細胞は、様々な薬物代謝酵素や薬物トランスポーターを発現しているため、経口投与された薬物の吸収・排泄や代謝において重要な役割を担う。創薬研究において、医薬品候補化合物の小腸での吸収を評価するための in vitro 評価系としては、ラット等の小動物由来小腸組織を用いた反転腸管法やヒト大腸癌細胞株である Caco-2 細胞を用いた系が汎用されているが、種差や"代謝"を評価できないという問題がある。ヒトiPS 細胞から分化誘導した小腸上皮細胞は、これらの問題点の解決が可能であり、薬物の"吸収・排泄と代謝"を同時に評価可能になると期待される。そこで本研究では、ヒトiPS 細胞から小腸上皮細胞へのより安定な高効率分化誘導法の開発を行った。まずは、ヒトiPS 細胞から小腸上皮細胞への分化過程の細胞に、適切な分化関連遺伝子を遺伝子導入能に優れたアデノウイルス(Ad)ベクターを用いて一過性に導入することで、小腸上皮細胞への分化効率を飛躍的に高めることを試みた。また、安定製造に重点を置きながら、化合物をスクリーニングすることで分化誘導法の改良にも取り組んだ。一方、我々が開発済みの高効率ゲノム編集技術を駆使して、消化管吸収・代謝に重要な薬物代謝酵素(CYP3A4)遺伝子をノックアウトしたヒトiPS 細胞由来小腸上皮細胞を作製し、当該分子の薬物代謝・毒性への影響を分子レベルで検討した。

【方法】ヒト iPS 細胞から分化誘導した中内胚葉系細胞に FOXA2 発現 Ad ベクターを、腸管前駆細胞に計 6 種類の候補転写因子を発現する Ad ベクターを作用させた。ヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞の機能を向上できる化合物の探索においては、計 10 種類の候補化合物を分化誘導の day17 から 10 日間作用させて小腸上皮細胞へと分化誘導を行った。 CYP3A4 遺伝子のノックアウトはバルプロ酸と RAD51 を用いた独自開発のゲノム編集法 (Crispr-Cas9 系を利用) を用いて行った。

【結果】ヒトiPS 細胞内胚葉細胞に FOXA2遺伝子を、ヒトiPS 細胞腸管前駆細胞に CDX2遺伝子を導入することで、小腸上皮細胞分化が飛躍的に向上し、villin や薬物代謝酵素活性をはじめとする各種小腸上皮細胞機能が向上することが明らかになった。また、化合物 X を分化誘導後期に作用させることで、ヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞における薬物代謝活性が向上することを見いだした。 CYP3A4 ノックアウト (CYP3A4-KO) iPS 細胞由来小腸上皮細胞では、CYP3A4 を介した医薬品の毒性を評価できることを実証した。以上、ヒト iPS 細胞由来小腸上皮細胞の分化誘導技術の更なる改良に成功し、in vitro 評価系としての有用性を実証した。



小腸上皮細胞機能を有した in vitro 吸収・排泄・代謝評価系

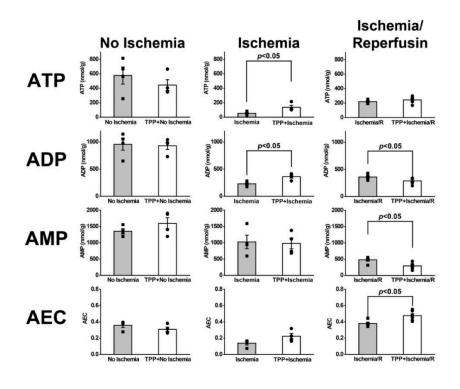
南沢

【目的】ビタミン B1 (VB1) は糖代謝をはじめエネルギー産生に関わる重要な補酵素である。近年、食生活の変化、アルコール依存症や高齢者の増加によって、潜在的な VB1 欠乏状態が進行しているといわれる。心臓はエネルギー需要が大きいため、VB1 欠乏状態時に虚血ストレスに晒された場合、組織代謝が障害され、より重症化することが予測される。心臓におけるエネルギー産生の主要な場となるミトコンドリアは常に分裂・融合を繰り返し、形態変化をさせつつ、生理機能を維持している。従って、VB1 が心筋ミトコンドリア動態に如何に作用するかを知ることは重要である。 VB1 が心筋に対して保護的に働くという実験や臨床研究が報告されているが、網羅的代謝解析(メタボロミクス)を行い、ミトコンドリア動態から VB1 の心筋への効果を検討した報告はない。そこで本研究では、VB1 はミトコンドリア動態や心筋での代謝状態を変化させ、虚血ストレスによる組織傷害に保護的に働くという仮説をたて、その分子機序を動物実験によって検証することを目的とした。

【方法】1. VB1 が虚血再灌流後の心機能、心筋代謝、ミトコンドリア微細構造に及ぼす効果について、ランゲンドルフ灌流装置を用いて、ラット摘出心において検証した。2. 生後 6 週齢のラットに VB1 欠乏食を与えて、VB1 欠乏が心機能、心筋代謝、ミトコンドリア微細構造に及ぼす効果について検証した。

【結果】1. VB1 の事前投与によって、虚血再灌流後の左室機能が有意に改善をした。メタボロミクスの結果、VB1 は虚血後の心筋 ATP 含有量の減少を抑制し、虚血再灌流後のエネルギー状態を改善させることが判明した。この効果は、電子顕微鏡によるミトコンドリアの大きさが保たれることやミトコンドリア分裂促進因子である Drp1 タンパク質のリン酸化が抑制されることと関係する可能性が示唆された。2. VB1 欠乏食によってラットの有意な体重減少や突然死が認められた。VB1 欠乏食群では ANP 上昇など心機能の低下が示唆された。さらにメタボロミクス解析及び電子顕微鏡によるミトコンドリア形態の検討が必要とされた。

VB1 (TPP) が虚血再灌流後の心筋 ATP 含有量など高エネルギー産生物質量に及ぼす影響



# 17 運動関連シナプス機能に対する神経栄養因子の作用

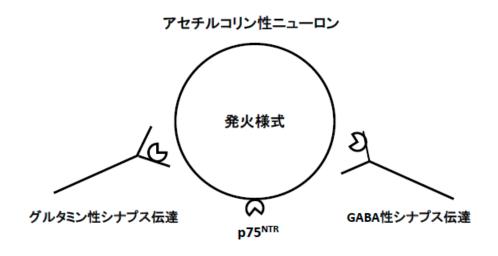
籾山 俊彦

【目的】神経栄養因子のいくつかが共通して結合する受容体である p75 neurotrophin receptor 受容体(以下 p75<sup>NTR</sup>)は、中枢神経系において、前脳部のアセチルコリン性ニューロンに特異的に発現している。筆者は p75<sup>NTR</sup> を同定のためのマーカーとして利用して、同受容体を発現するアセチルコリン性ニューロンへのシナプス伝達制御機構の解析を行ってきた。しかしながら、p75<sup>NTR</sup>活性化によって、シナプス伝達およびニューロン活動がどのように修飾されるのかに関しては不明であった。本研究課題では、最近開発された p75<sup>NTR</sup> に特異的なリガンドを薬理学的ツールとして利用して、同受容体活性化による線条体アセチルコリン性ニューロンへのシナプス伝達およびニューロンの発火に対する修飾作用を電気生理学的に検討した(図)。

【方法】生後2~4週齢のマウスを断頭して脳を取り出し、マイクロスライサーを用いて厚さ300ミクロンのスライス標本を作製した。正立型顕微鏡下にスライス標本線条体内のアセチルコリン性ニューロンからパッチクランプ用増幅器を用いてホールセル記録を行った。シナプス電流および活動電位発生に対する、p75NTR 特異的リガンドの作用を検討した。

【結果】p75<sup>NTR</sup> リガンドにより、アセチルコリン性ニューロンへの興奮性シナプス伝達が抑制され、一方で、抑制性シナプス伝達は増強した。そして、膜電位および活動電位発生に対しては、脱分極作用および発火増大作用を示した。運動制御機能制御、およびその病的状態として、パーキンソン病等の発症機構における神経栄養因子およびその受容体の関与が示唆され、新たな治療法開発にもつながることが期待される。

線条体アセチルコリン性ニューロンへの興奮性(グルタミン酸性)、抑制性(GABA 性)シナプス入力、神経栄養因子受容体( $p75^{NTR}$ )を示す模式図



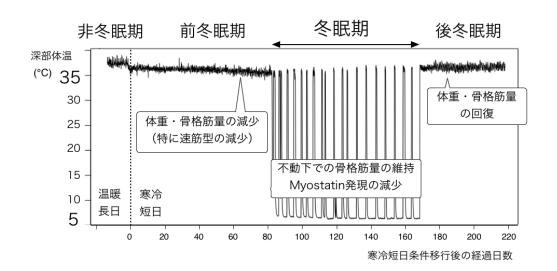
# 18 冬眠動物が示す筋萎縮耐性能の解析

山口 良文

【目的】哺乳類の冬眠は、全身性の積極的な代謝抑制により低温・乾燥・飢餓といった極限環境下での長期生存を可能とする生存戦略である。ヒトやマウスなど多くの哺乳類は長時間の低体温下では臓器機能を保持できず死に至るため冬眠できないが、一部の哺乳類は10℃以下まで体温を下げ長期間の冬眠を行う冬眠動物である。この冬眠を可能とする「冬眠耐性」には、低体温とそこからの復温にともなう臓器障害を防ぐ機構(低体温・冷虚血復温障害耐性)に加え、貯蔵白色脂肪組織の効率的な燃焼機構(健康肥満)、長期間の冬期を飢餓・不動状態で過ごすにも関わらず骨格筋が萎縮しない筋萎縮耐性機構(寝たきり耐性)、等が含まれる。本研究では、実験室での冬眠誘導が可能な哺乳類シリアンハムスターを用いて、冬眠動物が示す筋萎縮耐性機構の分子機構に迫ることを目的とした。

【方法】寒冷短日条件での長期飼育によりシリアンハムスターに冬眠を誘導した。このとき、骨格筋がどのような状態にあるのか、全身の骨格筋のうち広背筋と脚部の筋肉において、筋線維タイプマーカーである Myosin 重鎖の発現を定量 PCR と免疫染色により検討した。また、筋萎縮誘導時に発現が上昇することが知られる骨格筋量の負の制御因子である Myostatin の発現も定量 PCR により検討した。

【結果】冬眠期のシリアンハムスターの骨格筋では、非冬眠期に比べ骨格筋量の減少が認められた。しかし、冬眠期の間はその量は一定であった。骨格筋の変化を詳細に検討したところ、筋の部位特異的に、速筋型筋線維 Type I a および Type II b のマーカーである Myh2 と Myh4 の発現減少が認められた。また、全身の骨格筋で、Myostatin の発現が 冬眠期に顕著に低下していた。さらに、この Myostatin の発現低下は不冬眠個体では見られず、Myostatin は冬眠の発動と連関した発現を示すことが明らかになった。こうした骨格筋の性質変化が、不動状態の筋萎縮耐性機構に寄与する可能性がある。



シリアンハムスターの冬眠生活環における骨格筋の変化

【目的】当研究室では低環境負荷型の生体内酸化反応を模倣した反応触媒開発に取り組んでおり、これまでに補酵素フラビン誘導体とアルカロイド2量体を組み合わせたイオン対触媒により、立体選択的バイヤービリガー(BV)反応を開発している。助成期間内では、この反応に関し高い立体選択性を示す基質および触媒の原理的裏付けを同定すること、より具体的には、1. 基質構造一立体選択性相関、および2. 反応機構の解析に向けた速度論解析を行い、これらにより反応機構の仮説をたてることを目的とした。最終的には立体選択性を決定づける反応遷移状態の仮説を立てることを目指している。

【方法および結果】1. 上記の BV 反応において高い立体選択性を示した化合物 3-フェニルシクロブタノンを基準と して、そのフェニル基の置換基効果およびプロキラル中心となる 3 位について、基質特異性を調べることとした。 まず基準化合物の類縁体を合成し、基準となる反応条件下での立体選択性の相違を比較検討する。基質の選定に あたっては、触媒の基質認識にフェニル基の π·スタッキング、触媒·基質間の水素結合などが関与していることが示唆 されていたため、立体反発、水素結合形成の可否、そして電子効果の違いなどの比較対象が得られるように工夫した。 また、4級不斉中心炭素の有機合成上の有用性を鑑み、基準化合物の3位にメチル基を導入した基質についても検討 した (下図 A)。まずオルト位置換の基質は、その電子効果や水素結合能によらず基準化合物よりも高い選択性を 示した。これはその効果が主に立体反発に起因することを示唆する。一方、パラ位に電子吸引基をつけた場合も同様 な立体選択性の向上が見られたことから、電子効果もある程度は関与するとみられた。また、本反応では3位が4級の 基質の選択性が低下したが、選択性の改善を期待してフェニル基のオルト位を臭素置換した基質を検討したところ、 興味深いことに逆の選択性が得られた。2. 反応の律速段階における電子効果を同定するため、基準物質フェニル基の パラ位に様々な置換基を導入した化合物を合成し、それぞれの速度定数を求め Hammett 則に適用した (下図 B)。 また、シクロブタノンの $\alpha$ -位を重水素交換させた基質を合成し、その同位体効果を解析した(下図 C)。これまでの 結果から、 $\mathbf{Hammett}$  式の  $\rho$  値が正であること、および  $\mathbf{2}$  次的同位体効果がほぼ見られないことから、本反応律速が 通常のBV 反応と異なり、酸化剤の付加段階であることが示唆された。これらの結果の包括的な説明は今後の計算化学 を用いた反応遷移状態の解析を要する。今後は得られた情報を基に、本反応の基質汎用性および立体選択性の向上、 さらに位置選択性の制御などを目指す。

立体選択的 BV 反応(A)基質-立体選択性相関(B)速度論解析結果(C)同位体効果

# 20 ヒト胎盤細胞への運命決定機構の解明

有馬 隆博

【目的】桑実胚期に受精後最初の分化が起こり、内部細胞塊(ICM)と栄養外胚葉(TE)からなる胚盤胞が形成される。ICM からは多能性幹細胞である胎児性幹細胞(ES 細胞)が、TE からは胎盤への分化能を持つ胎盤トロフォブラスト幹細胞(TS 細胞)が樹立される。マウスの ES、TS 細胞の未分化維持と細胞運命決定には、それぞれ OCT3/4 と CDX2 が必須である事が知られているが、将来胎盤となるヒト胚体外細胞系譜への細胞運命決定機構は、ほとんど明らかではない。本研究では、ヒト線維芽細胞、人工多能性幹(iPS)細胞に複数の転写因子を導入し、人工 TS 細胞(iTS)を作製し、ヒト胚体外細胞への運命がどのような仕組みで決定されているのかを明らかにすることを目的とした。

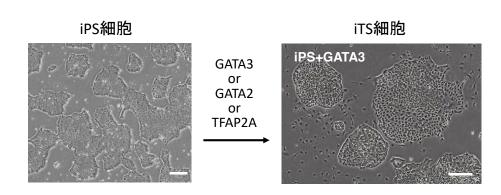
【方法】1. ヒトトロフォブラスト細胞への分化を誘導する因子の探索:ヒトiTS 細胞の誘導に必要な因子の探索は、文献情報や遺伝子の発現データなどをもとに、20 種類の候補因子に絞り込んだ。2. 体細胞への遺伝子導入:サイレンシングが起こりにくい EF1  $\alpha$ プロモーターをもつ pLVSIN-EF1  $\alpha$ ベクターを用い 20 種類のウイルス液を作製し、ヒト皮膚線維芽細胞(NHDF)とヒトiPS 細胞(理研、BRC より譲渡)に遺伝子導入を行い、TS 細胞の培養条件で継代を繰り返した。

# 【結果】1. ヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF) への遺伝子導入

- 1) 導入遺伝子の発現解析: リアルタイム PCR を用いて 20 種類の導入遺伝子の発現解析を行った。15 因子については、概ね TS 細胞と同等かそれ以上のレベルまで発現量が上昇していた。また、導入遺伝子の発現量は培養を経ても維持されていることを確認した。Day17 の細胞では、GATA3 の発現をタンパク質レベルで確認した。
- 2) 細胞培養と形態観察: TS 細胞は上皮系の細胞で、細胞同士が密に接着し、明瞭なコロニーを形成する。20 因子を 導入した NHDF を TS 細胞の培養条件で継代を続けたところ、Day11 には NHDF に比べて明らかに小型の TS 様細胞が出現した。この細胞は増殖能が強く、大きなコロニーを形成した。
- 3) 栄養膜細胞マーカーの発現解析:栄養膜細胞に特異的に発現する未分化マーカー(TP63、GATA3、TEAD4) と分化マーカーヒト絨毛性ゴナドトロピン(CGB)の発現を確認した。
- 2. ヒトiTS 細胞への遺伝子導入

GATA3、GATA2、TFAP2AのレンチウイルスをヒトiPS 細胞に1遺伝子ずつ導入し、TS 細胞培養条件下で継代培養した。その結果、いずれの遺伝子を導入した細胞も、20 継代以上未分化状態を維持する TS 様細胞を樹立することができた。また、これらの細胞の遺伝子発現パターンは、正常ヒト TS 細胞の遺伝子発現パターンに極めて類似した結果であった。

#### ヒトiPS 由来TS 様細胞



#### 21 グルココルチコイドによる免疫活性化機能の解明

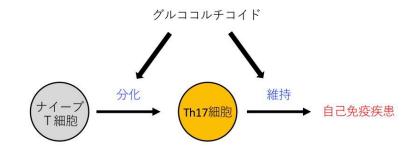
生田 宏一

【目的】グルココルチコイド(糖質コルチコイド)は副腎皮質ホルモンの一つであり、グルココルチコイド受容体(GR)を介して広汎な生体防御機能を発揮する重要なステロイドホルモンである。グルココルチコイドの血中濃度は、ヒトでは昼に高く夜に低い概日変動をする(マウスでは逆転)。免疫系との関係では、グルココルチコイドの抗炎症効果や免疫抑制効果などの薬理作用が注目され広く治療に用いられているが、その生理的な機能についてはほとんど不明であった。我々は、グルココルチコイド濃度の日内変動がインターロイキン7受容体(IL-7R)とケモカイン受容体CXCR4の発現を誘導することで、T細胞のリンパ器官への再配置と免疫応答能を高めることを明らかにした。本研究では、グルココルチコイドが炎症誘導性のTh17細胞の働きを高め、感染免疫応答や自己免疫疾患の発症を促進することを明らかにする。本研究により、強い抗炎症効果で知られるグルココルチコイドが、生理的な濃度では逆に炎症性免疫応答を高め免疫疾患を誘導するという新たな概念を確立する。

【方法】本研究では、まず、T 細胞特異的 GR 欠損マウスのナイーブ T 細胞を培養して、Th17 細胞への分化誘導が障害されるかを解析した。次に、T 細胞ならびに Th17 細胞特異的 GR 欠損マウスの腸管粘膜固有層の Th17 細胞が減少しているかを、フローサイトメトリーにて解析した。さらに、T 細胞特異的 GR 欠損マウスにミエリン塩基性タンパク質ペプチドを免疫して実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)を誘導し、その神経症状が軽減するかどうかを解析した。

【結果】まず、T細胞特異的 GR 欠損 (CD4-Cre x GR-flox) マウスのナイーブ T 細胞を IL-1β、IL-23、IL-6 存在下で Th17 細胞に分化誘導した。その結果、IL-17A を発現する Th17 細胞の割合が野生型 T 細胞に比べて激減した。次に、T 細胞ならびに Th17 細胞特異的 GR 欠損マウスの腸管粘膜固有層の Th17 細胞を調べたところ、野生型マウスと比べて 30~40%減少していた。以上の結果から、グルココルチコイドはナイーブ T 細胞からの Th17 細胞の分化と維持を促進する働きを持つことが示された。さらに、T 細胞特異的 GR 欠損マウスにミエリン塩基性タンパク質ペプチドを免疫して実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を誘導したところ、野生型マウスと比べて神経症状が劇的に軽減した。また、脊髄に浸潤しているリンパ球を解析すると、IL-17A を発現する Th17 細胞の割合が野生型マウスと比較して 40%減少していた。以上の結果から、グルココルチコイドは Th17 細胞の分化と維持を促進することで、自己免疫疾患の発症を高める働きを持つことが明らかになった。本研究により、強い抗炎症効果で知られるグルココルチコイドが、生理的な濃度では逆に炎症性免疫応答を高め免疫疾患を誘導するという新たな概念が確立された。

グルココルチコイドによる Th17 細胞誘導を介した自己免疫応答の亢進機構



# 22 癌細胞の運動に関わるブレブ形成制御機構の解明

池ノ内 順一

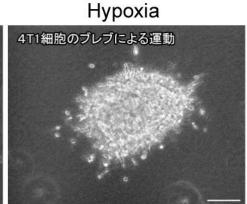
【目的】癌細胞が遊走性を獲得する機序として、上皮間葉転換現象(Epithelial mesenchymal transition: EMT)以外にも、ブレブと呼ばれる特徴的な細胞膜構造を形成しながら運動するアメーバ運動(Amoeboid Movement)が挙げられる。ブレブを用いた細胞運動は、細胞性粘菌や単細胞アメーバの運動において観察されていたが、脊椎動物ではゼブラフィッシュの始原生殖細胞がブレブを用いて運動することが記載されて以降、様々なヒトの癌細胞がブレブを形成して運動することが報告されるようになった。ブレブは、細胞膜と細胞骨格が脱離することによって生じる細胞膜の突出構造である。ブレブの分子機構や、細胞膜と細胞骨格の相互作用がどのような分子群によって制御されているかについては明らかになっていない。我々は、ヒト大腸癌由来 DLD1 細胞を I 型コラーゲンの上に播種すると顕著にブレブを形成し運動性を獲得することを見出した。本研究課題において、この実験系を用いてブレブの形成・退縮に関わる新規分子の探索、我々がこれまでに見出したブレブの形成機構に関する知見に基づく数理モデルの構築や、癌細胞が低酸素応答に伴ってブレブによる運動能を獲得する分子メカニズムの解明を試みた。

【方法】本研究では、いくつかアプローチによってブレブの分子機構の解明を行った。一つには、DLD1 細胞に GFP タグを付けた遺伝子のライブラリーを発現させて、1 クローンずつライブイメージングで観察することで、ブレブ の形成・退縮に伴い興味深い動態を示す分子の探索を行った。二つ目には、我々がこれまでに見出したブレブの形成 メカニズムに基づいて、ブレブの動態を記述する数理モデルを構築し、その実験的検証を行った。三つ目には、低酸素 応答に伴ってブレブによる遊走能を獲得するマウス肺癌由来の 4T1 細胞を用いて、ブレブの形成を抑制する化合物の 探索を行った。

【結果】DLD1 細胞に GFP タグの遺伝子ライブラリーを発現し、ブレブの形成・退縮過程における挙動を観察したところ、拡大中のブレブの細胞質にのみ濃縮する分子を同定した。このタンパク質は拡大中の細胞質に濃縮し、退縮時には細胞質の濃度が減少に転じる。細胞質は均質な溶液であるというこれまでの定説と異なり、拡大中のブレブは他の細胞質領域とタンパク質の組成が異なることが示唆された。また、ブレブを形成した細胞において、細胞質の流動性を調べたところ、急速に細胞膜が変形し拡大する拡大期のブレブの細胞質では他の細胞質領域に比べて流動性が上昇していることが明らかになった。このことは、ブレブの拡大時に、細胞質の流動性を上昇させる制御機構が存在することを示唆している。また、これまでに我々の明らかにしたブレブの分子機構に着目した数理モデルの構築を行い、低分子量 G タンパク質の Rnd3 と RhoA 間の Double negative feedback loop がブレブの形成・退縮の中心的なメカニズムであることを検証した。最後に、低酸素環境下でブレブを形成して浸潤性を獲得する肺癌由来細胞 4T1 細胞を用いて、化合物ライブラリースクリーニングを実施し、ブレブによる運動を抑制する化合物を複数同定した。

低酸素環境下における癌細胞のアメーバ運動

4T1細胞の集団細胞運動



#### 23 長寿命プラズマ細胞の分離と分子マーカーの同定

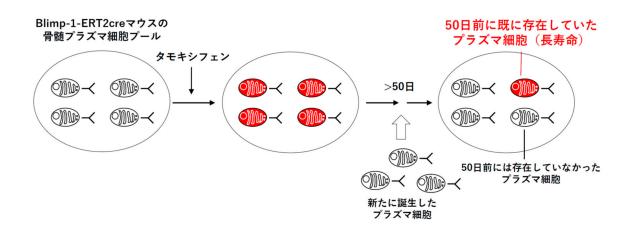
伊勢 渉

【目的】ウイルスや細菌の排除に必要不可欠な抗体分子は B 細胞から分化したプラズマ細胞によって産生される。 抗体の半減期は数日から 20 日程度であるが、感染・ワクチン接種後に抗体産生応答は時に数十年に渡って持続する。 これはプラズマ細胞の一部が骨髄で長期に渡って生存し続けるからだと考えられている。実際にヒトで 50 年前に感染 したと考えられる麻疹に対する抗体を作り続けるプラズマ細胞の存在が報告されている。このような長寿命プラズマ 細胞の特性を明らかにすることは、効率の良いワクチン開発のために非常に重要である。しかし、長寿命プラズマ細胞 を識別可能な分子マーカーが存在しないために研究が進展していないのが現状である。そこで本研究では 長寿命プラズマ細胞の同定・分離を可能とする新規実験系を開発し、長寿命プラズマ細胞の特性を明らかにすることを 目的とした。

【方法】プラズマ細胞特異的転写因子である *Blimp-1* 遺伝子座に *ERT2cre* をノックインした Blimp-1-ERT2cre マウスを作製し、これを Rosa-stop-tdTomato (Ai14) マウスと交配した (以下、Blimp-1-ERT2cre x Ai14 マウスと呼ぶ)。このマウスにタモキシフェンを投与することで、マウス体内に存在する全てのプラズマ細胞を誘導性に赤色蛍光 tdTomato でラベルした。その後タモキシフェンの投与を中止し、経時的に骨髄に存在する tdTomato 陽性プラズマ細胞の細胞表面分子の発現パターンなどを解析した。また長期生存を果たしたプラズマ細胞を分離し、RNA シークエンス解析を行った。

【結果】タモキシフェンの投与を中止して 7 日目には骨髄内に tdTomato 陰性プラズマ細胞が観察されたことから、新たに産生されたプラズマ細胞の骨髄への流入が起きていることが示唆された。一方骨髄プラズマ細胞中の tdTomato 陽性細胞の割合は時間とともに減少し、56 日後には約 30%であった。56 日以降でその割合はほぼ一定であったことから、56 日後に存在する tdTomato 陽性細胞は長寿命プラズマ細胞であると考えられた。この長寿命プラズマ細胞はほぼ全てが B220negaMHC クラス II nega であった。またタモキシフェン投与直後、28 日後、56 日後に生存している tdTomato 陽性プラズマ細胞を分離し、RNA シークエンス解析を行った。その結果、長寿命プラズマ細胞では増殖や細胞周期に関わる遺伝子群の発現が低下していることが判明した。

#### 長寿プラズマ細胞の蛍光ラベル



#### 24 異なる時間スケールのリズムを統合する神経機構の解明

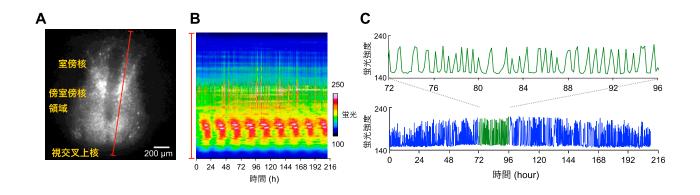
榎木 亮介

【目的】哺乳類の概日リズムの中枢は、脳深部の視床下部にある視交叉上核に存在する。視交叉上核は網膜を介して 光情報を受けて固有の周期を 24 時間に調節して、全身の細胞や臓器に統一のとれたリズム情報を伝達している。近年 の研究により、概日リズムを生み出す分子や細胞レベルでのメカニズムが次第に明らかとなってきている。一方で、 哺乳類の生体内では、レムーノンレム睡眠サイクルやホルモン分泌など、様々な生理機能に数十分~数時間の短い周期 のウルトラディアンリズムが観察される。視交叉上核を切除した動物では、行動や食事リズムなどにウルトラディアン リズムのみが観察されることから、概日リズム中枢とは別の領域にウルトラディアンリズムを生み出す領域があると 推察されていた。しかしこれまでウルトラディアンリズムを長期的・高精細に計測するよい方法がなく、ウルトラ ディアンリズムを生成する脳の領域がどこにあるのかは長く不明だった。特に概日リズムとウルトラディアンリズムと いう 2 つの異なる時間スケールのリズムがどのように脳内で統合されているかは全く不明であった

【方法】これまで私は、概日リズム観察のための長期間の光イメージング計測法を確立し、視交叉上核の神経細胞ネットワークの働きを観察してきた。本研究では、視交叉上核とその周辺領域を含む組織を長期間培養し、緑色蛍光タンパク質からなるカルシウムイオンセンサーを多数の神経細胞に発現させ、概日リズム中枢を含む複数の脳領域の神経細胞から神経細胞の活動を数日間測定した。

【結果】視交叉上核の主な神経投射先である室傍核と傍室傍核領域の多数の神経細胞において、30分~4時間周期で同期する細胞内カルシウムのウルトラディアンリズムを発見した。このリズムは室傍核と傍室傍核領域のみを単離した組織でも観察され、視交叉上核のみでは観察されないことから、室傍核と傍室傍核領域がウルトラディアンリズムの発生源であることが分かった。さらに、毎秒30フレームの高速カルシウム計測により、神経細胞ネットワークのミリ秒スケールの早い神経細胞の同期活動がウルトラディアンリズムを生み出すことが分かった。また薬理実験により、興奮性と抑制性の神経伝達物質であるグルタミン酸とGABAの協調によりウルトラディアンリズムが制御されること、またその発生頻度は概日リズムにより制御されることが分かった。

# 室傍核-傍室傍核領域のウルトラディアンカルシウムリズム



#### 25 ミクログリア活性化エンハンサー変容による脳機能低下

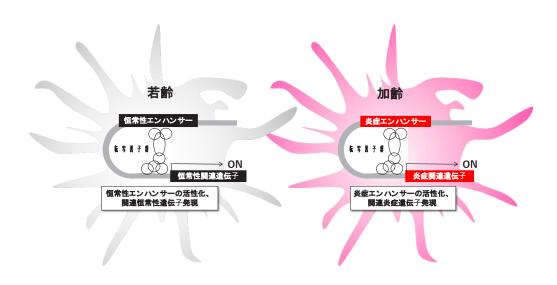
樗木 俊聡

【目的】ミクログリアは脳のマクロファージであり、長寿命で自己複製能に優れ、生涯にわたって細胞数を保っている。 若齢期健常脳において、ミクログリアは脳の恒常性維持に貢献しているが、加齢に伴い炎症形質に変化して脳機能低下の一因となる。 しかしながら、加齢に伴うミクログリアの当該機能変容の分子基盤は不明である。 本研究では、遺伝子発現の定量性に優れる Cap Analysis of Gene Expression(CAGE)法及びエンハンサーの活性化を高塩基解像度で計測可能な native elongating transcript-CAGE(NET-CAGE)法を用いて、ライフステージの進行に伴うミクログリアの転写制御変容機構を明らかにすることを目的とした。

【方法】1週齢、8週齢、1才齢の野生型マウスミクログリアからトータルRNA及び新生RNAを抽出、CAGE法により遺伝子発現を、NET-CAGE法によりエンハンサー解析を行った。各週齢ミクログリア間で変動のあった遺伝子群を用いて、GOTERM\_BPカテゴリーを指標にGene Ontology (GO)解析を行った。

【結果】CAGE 法により、8 週齢から 1 歳齢にかけて変動する遺伝子群が検出された。これらの遺伝子群を用いて GO 解析を行ったところ、489 個の遺伝子発現量が 1/2 以下に低下し、その中には細胞周期・分化・増殖に関連する ものが多く含まれていた。対照的に、717 個の遺伝子発現量が 2 倍以上に増加しており、多くはインターフェロン誘導 遺伝子であった。これら遺伝子群はミクログリアの機能変容に関わることが推測された。さらに NET CAGE 法により 活性化エンハンサー解析を行った結果、ライフステージの進行に伴いミクログリアにおいて特徴的に活性化または 抑制されるエンハンサー領域が存在することが判明した。今後、Hi-C 法による標的遺伝子解析や当該エンハンサー 欠損マウスの作製・解析を行うことにより、ミクログリアの加齢に伴う詳細な転写制御変容機構の解明が期待できる。

ライフステージ進行に伴うミクログリア活性化エンハンサー変容



# 26 Toll様受容体のシグナル伝達の構造基盤解明

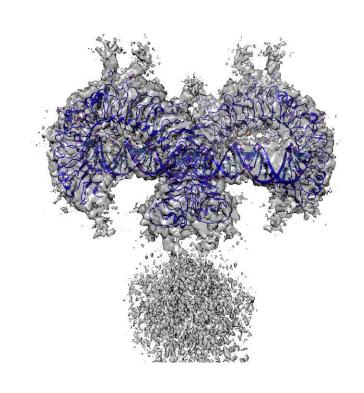
大戸 梅治

【目的】自然免疫は微生物の感染に対する生体の初期防御反応である。微生物の構成成分はToll-like receptors (TLRs) などの病原体センサーによって認識され様々な自然免疫応答を引き起こす。TLR は、様々な疾患に関わり、それらの治療薬のターゲットとされている。ゆえに、そのリガンド認識・活性化・シグナル伝達機構を正しく理解することが必要である。本研究課題では、全長のTLR 受容体を用いて細胞外ドメインと細胞内ドメインの協働性を構造生物学的に明らかにし、真の意味でのリガンド認識とシグナル伝達機構を明らかにすることを目的とした。具体的には、脂質二重膜上でのTLR 全長のリガンド結合に伴う二量体化、2分子の膜貫通領域間の間および特定のリン脂質との間の相互作用、細胞内のTIR ドメイン間および下流にシグナルを伝達するアダプター分子との間の相互作用を構造生物学的な観点から明らかにすることを目的とした。

【方法】本研究では、脂質二重膜環境を人工的に再現した ND に TLR 全長を再構成した試料を調製し、クライオ電子 顕微鏡による単粒子解析を行うことを目指した。精製した hTLR3 全長試料を ND へ再構成する条件の検討を行い、 再構成後の試料は、SDS-PAGE、ゲルろ過クロマトグラフィー、および電子顕微鏡により評価した。またクライオ電子 顕微鏡で収集したデータを用いて単粒子解析を行った。

【結果】本研究により単量体および二量体 hTLR3 全長を ND に再構成する方法が確立された。これまでに TLR 全長の構造解析例はなかったが、種々の条件検討の結果、二量体 hTLR3 全長を脂質二重膜上に再構成した試料のクライオ電子顕微鏡による構造解析に成功した。細胞外ドメインの二量体構造は明瞭に密度が確認された。一方で、TLR の膜貫通領域を含むナノディスクの部分については密度が非常に弱かった。また、TLR の細胞内の TIR ドメインについては全く密度が確認できなかった。細胞外ドメインの二量体構造および dsRNA の認識の様子は既報の結晶構造とよく一致していた。

二量体 TLR3 全長-dsRNA-ND のクライオ電子顕微鏡による三次元密度マップ



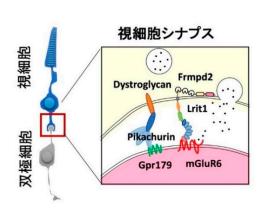
#### 27 網膜のON・OFF回路形成と視覚情報処理機構の解析

その表現型を観察した。

大森 義裕

【目的】網膜の細胞種は、大きく 5 種類のニューロン (視細胞、双極細胞、神経節細胞、水平細胞、アマクリン細胞) と 1 種類のグリア細胞から成る。2 次ニューロンである双極細胞には、明るくなるとより活動する ON 型双極細胞と 暗くなるとより活動するOFF型双極細胞が存在し、3次ニューロンである神経節細胞もON型とOFF型に分かれる。 視覚においては ON・OFF 経路による並列情報処理がショウジョウバエからヒトに至るまで行われることが特徴であ る。しかしながら、視細胞が受けた「明暗コントラスト」「輪郭」「動き」「色」といった情報が、どのように ON 経路 と OFF 経路に振り分けられ、情報処理されるかはほとんど不明であり、特異的シナプスの形成と維持のメカニズムの 理解は非常に重要であるが、その分子機構はいまだによく分かっていない。これまでに、筋ジストロフィーの原因分子 の一つである膜蛋白質ジストログリカンと視細胞シナプスに局在する分泌蛋白質ピカチュリンが直接相互作用し、 視細胞-双極細胞の特異的シナプス形成を制御することを明らかにした。また、視細胞シナプスに局在するシナプス 形成因子である Lrit1 と足場蛋白質 Frmpd2 や双極細胞プレシナプスに局在するグルタミン酸レセプターmGluR6 と 相互作用することにより、Lrit1-Frmpd2-mGluR6 複合体を形成し、今まで不明であった錐体視細胞の ON 経路に おけるシナプス形成を制御していることを報告している。しかし、これらのシナプス形成因子がどのようなメカニズム で機能しているのかその全体像は明らかとなっていない。一方で、これらの ON・OFF 回路形成には数種類の視細胞に 対して、10 数種類の双極細胞が接続することが知られているが、これらの細胞の分化過程やシナプス制御因子の 細胞種特異的な遺伝子発現機構は明らかとなっていない。網膜視細胞分化においてホメオボックス転写因子である Otx2 と Crx が重要な役割を担っていることが明らかとなりつつあるが、いずれも視細胞や双極細胞、それらの前駆 細胞に発現し相互にホモロジーが高く構造的に類似しているが、発現時期や細胞種による発現量の差があり、視細胞と 双極細胞の分化や成熟にどのように機能しているか明らかではない。これらの ON・OFF 回路の形成における シナプスの形成因子とこれらの細胞の分化や発現制御を行う転写因子について in vivo モデルを使った研究を行った。 【方法】ピカチュリン欠損マウスの網膜における、Gpr179 の局在を解析することを試みた。1 ヵ月齢の野生型マウス とピカチュリン欠損マウスから、作製した凍結切片を用いて Gpr179/Rgs11 の蛍光免疫染色を行いコンフォーカル 顕微鏡による観察を行った。また、Otx2と Crxの遺伝子を置き換えたマウス(Otx2 KI、Crx KI マウス)を作製し、

【結果】野生型マウスでは視細胞のシナプスに、Gpr179 と Rgs11 の局在が見られたが、ピカチュリン欠損マウスではこれらの局在が消失していることが観察された。このことから、Gpr179 と Rgs11 の局在はシナプスマトリクス蛋白質であるピカチュリンの存在に依存していることが明らかとなった。一方、Otx2 遺伝子座を Crx と置き換えた Crx KIマウスの網膜では、正常な視細胞前駆細胞が生産されず異常な前駆細胞は細胞死を起こした。Crx 遺伝子座を Otx2 と置き換えた Otx2 KI マウスでは正常な視細胞が形成されず異常な視細胞が形成された。Otx2 と Crx は互いに機能を代替することができず、大きく機能が異なっていることが明らかとなった。



網膜 ON・OFF 回路形成を制御するシナプス形成因子

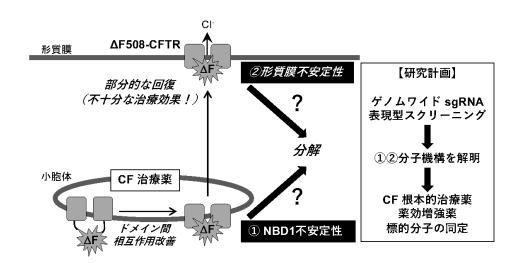
#### 28 CFTR modulator の薬効増強薬標的分子の同定

沖米田 司

【目的】嚢胞性線維症(Cystic Fibrosis: CF、平均寿命 40 歳)は致死性の劣性遺伝病であり、塩素イオンチャネル CFTR 遺伝子変異(半数以上は $\Delta$ F508 ホモ変異)により発症する単一遺伝病である。患者の寿命中央値は約 40 歳で、未だ根本治療法は確立されていない。近年上市された CF 治療剤(CFTR modulator)の有効性は低く、その薬効を増強するためには、 $\Delta$ F508-CFTR の形質膜発現量を十分に改善する必要がある。これまでの我々の研究から、CF 治療剤の薬効を増強するためには、①  $\Delta$ F508-NBD1 不安定性と②  $\Delta$ F508-CFTR 形質膜不安定性を改善する必要がある(図)。本研究では、我々が独自に開発した形質膜 CFTR 簡便標識法と、比較的安価に入手可能となったプール型ゲノムワイド sgRNA ライブラリーを利用することで、CF 治療剤の薬効抑制に関わる分子の全貌解明を行った(図)。

【方法および結果】 sgRNA 表現型スクリーニングを行うために、  $\Delta$  F508-CFTR-3HA 及び Cas9 安定発現 気道上皮細胞(CFBE-tet  $i\Delta$  F508 CFTR-3HA/Cas9)を樹立した。樹立した細胞における CF 治療剤の有効性を評価した結果、本細胞においても部分的な CF 治療剤の有効性を定量できた。 CF 治療剤の薬効を増強する治療標的分子を同定するために、sgRNA 表現型スクリーニングを行った。本細胞に、ゲノムワイド sgRNA ライブラリー発現レンチウイルスを感染後、薬剤選抜し、sgRNA-mCherry 安定発現細胞を樹立した。樹立した細胞に CF 治療剤を  $37^{\circ}$ Cで 2 日間処理後、細胞表面の  $\Delta$  F508-CFTR を蛍光標識し、フローサイトメトリーにより解析した。パイロットテストとして、全ゲノムの 10%をカバーする sgRNA ライブラリー発現細胞を用いた。その結果、CF 治療剤処理で  $\Delta$  F508-CFTR の形質膜発現が増加し、約6%の細胞で劇的な増加が観察された。しかしながら、sgRNA 発現細胞において、CF 治療剤の有効性は低下し、今回テストした遺伝子集団においては、CF 治療剤の有効性を増強するものは得ることができなかった。

#### 本研究の目的



# 29 一次線毛ダイナミクスによる細胞増殖制御機構の解明

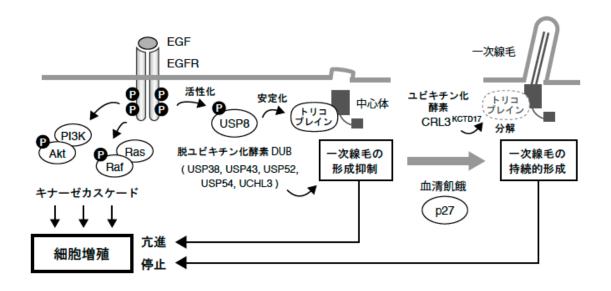
笠原 広介

【目的】近年、癌治療において EGFR などの受容体型チロシンキナーゼや、その下流に位置するキナーゼカスケードを分子標的とした薬剤が臨床導入され、高い有効性と比較的軽微な副作用から大きな期待が寄せられている。一方、これらの分子標的薬には変異型 RAS 遺伝子を発現する癌に効果が見込めないことや、耐性獲得による再発などの問題も残されている。このような難治性癌に対する治療方法を創出するため、細胞の増殖制御機構を従来とは異なる観点から解析し、新しい分子標的を見つけ出すことが喫緊の課題である。これまでの研究で我々は、従来のキナーゼカスケードによる細胞増殖(図:左側)に加えて、一次線毛と呼ばれる細胞小器官の形成が細胞増殖を制御することを発見し、一次線毛の制御に関与する種々の因子およびシグナル伝達機構を明らかにしてきた(図:右側)。本研究では、これらの研究をさらに進展させ、一次線毛の形成を制御するメカニズムの詳細について解明を進め、これらが癌細胞増殖抑制を誘導する分子標的となるか検証することを目的とする。我々は最近、cyclin/CDK の阻害因子であるp27kip1 が一次線毛の新規制御因子である可能性を示唆するデータを得たため、本研究で検証する。

【方法】CRISPR/Cas9 テクノロジーにより、p27kip1 (*CDKN1B* 遺伝子)をノックアウトした hTERT-RPE1 細胞 (不死化ヒト網膜色素上皮細胞株)を作製し、一次線毛の形成について、免疫細胞染色および電子顕微鏡で解析した。一次線毛の形成に必要な領域を決定するため、種々の p27kip1 変異体を作製し、p27kip1 ノックアウト細胞に発現させて一次線毛の形成能の回復の有無を検証した。一次線毛の制御領域に結合するタンパク質を共免疫沈降法/質量分析で探索した。

【結果】p27kip1 ノックアウト細胞は、一次線毛の形成が著しく阻害されていることが明らかとなった。電子顕微鏡解析の結果、一次線毛の形成初期であるシリア小胞が中心小体(基底小体)に輸送される過程が阻害されていることも判明した。この細胞に、p27kip1 の各種変異体を発現させたところ、少なくとも 86~140 aa 領域を含む p27kip1 変異体に、一次線毛の形成を誘導する能力があることが判明した。p27kip1 の86~140 aa 領域に結合する分子としてHsc70 を同定し、Hsc70 のノックダウンも一次線毛の形成を抑制することが分かった。

# 一次線毛の形成動態を制御する分子メカニズムと細胞増殖



# 30 腸内細菌利用糖による食物アレルギー制御機構の解明

金 倫基

【目的】食物アレルギーは、食物によって引き起こされる抗原特異的な免疫学的機序を介して生体にとって 不利益な 症状が惹起される現象をいう。近年、食物アレルギーの制御因子の一つとして腸内細菌叢が注目されている。特に、一部の腸内細菌によってのみ利用される食物繊維などの腸内到達糖 (Microbiota-accessible carbohydrates、MACs) が、食物アレルギーの症状を軽減させる作用を持つことが複数の動物実験から明らかになっている。しかし、腸内細菌 によるアレルギー抑制作用の全容については不明な点が多い。そこで本研究は MACs をツールとして、食物 アレルギー抑制作用を持つ腸内細菌を同定するとともに、そのメカニズムを解明することを目的とした(下図参照)。

【方法】まず、食物抗原で感作することにより全身性アナフィラキシーまたは下痢を誘導するマウスモデルにおいて、腸内糖が病態改善効果を示すのかを観察した。次に、腸内細菌叢を 16S rDNA シークエンスにより解析し、腸内糖の投与で増加する細菌を同定した。さらに、腸内糖により増加する腸内細菌の中で共通して増えている細菌に着目し、この腸内細菌を無菌マウスに移植することにより、アレルギー症状が改善するかを検証した。

【結果】まず、腸内糖 A、B、C 投与マウスにおいて、食物抗原感作後の全身性アナフィラキシー誘導後の体温低下が対照マウスと比較して軽減されることを見出した。次に、腸内糖 A、B、C の投与による、腸内細菌叢の変化を解析した。その結果、いずれの腸内糖の投与によっても、腸内の Bacteria X が増加していることが観察された。そこで、腸内糖で増加した Bacteria X が全身性アナフィラキシーの抑制に関与するのかを検証するため、MACs 投与マウスの糞便より Bacteria X の単離を行った。単離した Bacteria X を無菌マウスに定着させ、全身性アナフィラキシー誘導後の体温低下を無菌マウスと比較した。その結果、無菌マウスと比較して、Bacteria X 定着マウスでは全身性アナフィラキシー誘導後の体温低下が有意に軽減された。以上の結果から、MACs で増加した Bacteria X がアレルギー抑制作用を持つことが明らかとなった。

#### 本研究の目的



多糖類

食物繊維

腸内細菌・代謝物↑



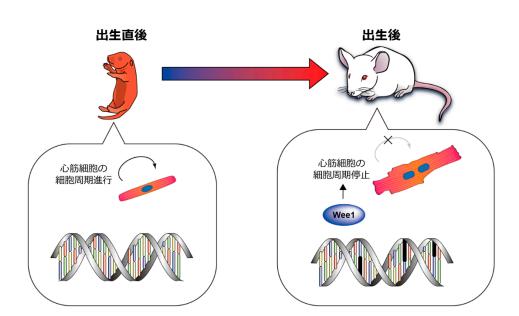
#### 31 DNA損傷応答による心筋細胞の細胞周期制御

木村 航

【目的】哺乳類の成体の心臓は損傷を受けた心筋を再生する能力を持たない。近年、胎仔期および新生仔期のマウスに心臓再生能があり、しかしそれは生後一週間以内に失われることが報告された。哺乳類の心筋細胞は、出生後に嫌気的解糖系からミトコンドリア好気呼吸へとエネルギー代謝が大きく転換する。この代謝の切り替わりは生後一週間以内に起こり、かつ前述のように ROS の産生および DNA 酸化損傷を含む酸化ストレスの蓄積を伴っている。我々はミトコンドリア由来の ROS を除去することで心筋細胞が増殖可能である時期、および心筋が再生能を維持している時期が出生後に延長することを見出した。これらの知見から、我々は DNA 損傷応答経路の心筋細胞の細胞周期制御機構を明らかにすることを目的として本研究を行った。

【方法】新生児及び成体マウスを用いて、DNA 損傷応答経路活性化の検出と阻害を、それぞれウェスタンブロット・免疫組織染色、および低分子阻害剤のインジェクションにより行った。さらに心筋細胞の細胞周期について、免疫組織染色を用いて解析した。

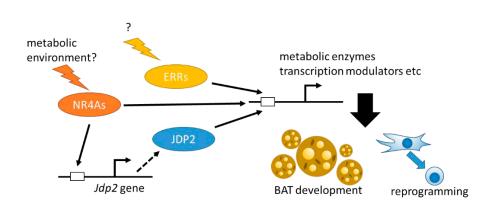
【結果】生化学的解析により、マウス生後心筋において出生後一週間以内にROS 産生が増加していた。それに伴い、心筋細胞において核 DNA 酸化損傷および DNA 損傷応答が同期間中に増加していた。これらの結果は、マウス新生児心臓でのミトコンドリア好気呼吸の増加に伴うROS の蓄積が DNA 酸化損傷および DNA 損傷応答を活性化していることを示唆するものであった。続いて、マウス新生児で DNA 損傷応答のエフェクターキナーゼである Weel タンパク量を検討したところ、P1 から P7 にかけて心筋内で増加していた。また Weel 阻害剤である MK-1775 を P0 から二週間皮下投与したところ、心筋細胞の細胞分裂の増加が観察された。以上の結果は、生後の心筋細胞において好気呼吸の増加に伴うROS レベルの上昇が DNA 損傷応答経路を介して細胞周期停止を誘導するという仮説を強く支持するものであった。続いて、ミトコンドリア代謝を抑制することによって成体の心筋細胞の細胞周期を制御できるかどうかを検討するため、成体マウスを 2 週間の間 7%酸素濃度下に置いた。するとミトコンドリアにおけるクレブス回路および脂肪酸  $\beta$  酸化に関わる酵素群の減少が見られた。さらに、低酸素状態の心臓において、コントロールの心臓と比較して ROS レベルの低下と、DNA 酸化損傷および DNA 損傷応答経路の両者が抑制されていること、そして心筋細胞の細胞増殖が増加していることを見出した。低酸素暴露による心筋細胞増殖の増加は、酸化 DNA 損傷の減少が直接の原因であることが強く示唆された。



DNA 損傷応答経路による出生後の心筋細胞の細胞周期停止

【目的】本研究は免疫応答、がん、脂肪組織分化成熟、細胞初期化等に関与する栄養代謝変化と遺伝子発現変化を統一的見地から横断的に解析し、それらに共通する栄養代謝変化によって生じる情報伝達の分子機構と生理的意義を明らかにすることを目的とした研究である。免疫系における分化、応答と代謝の変化を研究するimmunometabolism、好気的条件下にもかかわらず解糖系が優位に働く Warburg 効果を始めとした cancer metabolism 研究等を横断的に見ることで、異なる細胞・組織における異なる現象であるにもかかわらず、代謝変化とそれに呼応するように発現変化する遺伝子の組合せ一これを「代謝コード」と呼称する一が共通して存在する可能性が暗示される。本研究ではこの「代謝コード」を解読する装置として核内レセプタに注目し分子機構を明らかにしながら、「コード」の異なる細胞・組織における役割を横断的に「解読」することを目指した。

【方法および結果】褐色脂肪細胞 (BAT) は脂質を貯蔵するのみならず代謝することで余剰脂質を減少させるとともに 熱を発生させる組織である。 胎生 18 日齢、生後 4 日齢、10 日齢、4 週齢、8 週齢の野生型マウスから BAT を回収し、 経時的トランスクリプトームデータを取得した。また、同時にメタボロームデータを取得した。主成分分析により、 遺伝子発現、代謝物の量ともに胎生 18 日齢から生後 4 日齢の間と 10 日齢から 4 週齢の間に大きな変化があることが 示唆された。階層的クラスタリングにより遺伝子発現のパターンに基づいた遺伝子クラスターを同定し、得られた クラスター内の遺伝子プロモーター配列に存在する転写因子結合モチーフを検索し有意に多いものを抽出したところ、 胎生 18 日齢から生後 4 日齢の間に発現が上昇する遺伝子クラスターを制御する転写因子の候補として JDP2 が同定 された。そこで JDP2 遺伝子欠損マウスの BAT 重量を計測したところ、野生型よりも有意に BAT 重量が小さく、 JDP2 が BAT の発生・機能に関与していることが示唆された。しかしながら BAT マーカー遺伝子の発現は野生型と JDP2 欠損組織において差は見られなかった。JDP2 は脂肪細胞の分化を制御しているという報告もあるが、 本研究では胎生18日齢から生後4日齢の間において遺伝子の変化を促しているが成熟後は機能に影響しない可能性が 示唆された。胎生 18 日齢から生後 4 日齢の間に発現が上昇する遺伝子クラスターに含まれる核内レセプタ NR4A1、2、3 (NR4As) の認識配列は JDP2 プロモーターに見られ、NR4As が JDP2 を制御している可能性が暗示 された。BAT の機能を制御していると言われる核内レセプタ ERR yや JDP2 はいずれも細胞の初期化に関与している という報告があることから、NR4As の細胞初期化への関与を調べるために阻害剤 camptothesin を用い、細胞の 初期化に及ぼす影響を評価したところ、初期化が阻害され、幹細胞マーカー遺伝子の発現も減少していた。この結果は NR4As が細胞初期化を制御する因子であることを示唆する。本研究により代謝システム、初期化、免疫系に共通する、 NR4As、JDP2、ERRs を含む転写因子ネットワークの一端を明らかにした(図)。今後は核内レセプタの認識する 環境変化、その生体内での役割を解析することで、「代謝コード」を解読する装置として核内レセプタとその制御の 分子機構が明らかになると期待される。



NR4As-JDP2-ERRs 転写因子ネットワークによる生命現象の制御

# 33 新規発光イメージングを用いた腫瘍内微小環境の解析

近藤 科江

【目的】低酸素誘導因子(HIF)は、生体の低酸素応答を司る転写因子で、発生や分化にも重要な役割を担う必須の因子である。一方で、腫瘍においては、不死化、未分化の維持、血管新生、代謝シフト、増殖因子の自己分泌、慢性炎症、転移・浸潤、免疫抑制、治療抵抗性などに関与する多くの因子が HIF によって誘導され、予後不良に深く関係している。がん細胞における HIF 活性が、がんの増殖や悪性化過程で重要な役割を担っていることは、多くの研究により明らかにされているが、間質細胞における役割は明確ではない。腫瘍内には、血管・リンパ管を形成する内皮細胞や周皮細胞、線維芽細胞、および免疫細胞などの多種多様な間質細胞が存在している。特に、免疫系の細胞では、本来は腫瘍を攻撃し消滅させるべき免疫機能が抑制され、逆に腫瘍増殖や悪性化を手助けしていることが明らかにされてきている。これらの間質細胞とがん細胞との相互作用が悪性化に大きく寄与しており、免疫抑制環境の構築にも深く関わっていることが示唆されているものの、腫瘍形成過程のどの段階で、どのような相互作用が起こり、その過程で HIF 活性がどのように関与しているのかは明確ではない。本研究により、がん細胞と間質細胞との相互作用や腫瘍免疫抑制ネットワークの構築機構を分子レベルで解明することで、新たな治療標的の同定や既存の免疫療法抑制因子の同定などにより、新規がん治療法や早期診断法の開発に繋がる成果を得ることを目的とする。

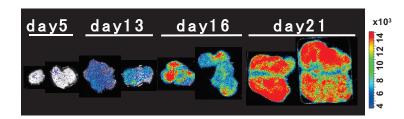
【方法】発光・蛍光レポーター遺伝子を作製し、Tg マウスを作製した。5 ラインを用いて移植腫瘍モデルで HIF 活性を有する間質細胞の腫瘍内侵入を、非侵襲的に生体レベルで観察することに成功し、期待通りの成果が得られた。しかし、蛍光レポーターが十分に機能せず、細胞レベルの解析に至らなかったため、再度 Tg マウスのライン選定を行っている。その間にも、間質細胞の悪性化への影響を探るべく、既存の Tg マウスで HIF 活性を有する間質細胞の時間空間的な経時的解析を発光 ex vivo で継続するとともに、腫瘍内に浸潤する間質細胞を免疫化学染色法にて解析した。

【結果】超高感度発光レポーターの経時的空間的解析により、HIF 活性をもった間質細胞の腫瘍内への侵入は、血管新生以前の極めて早い時期から始まっており、血管新生が不十分な腫瘍形成初期には特定の細胞がクラスターを形成し、腫瘍成長とともに全体に広がっていることが分かった。また、GFP-Tgを用いた解析から、血管新生が始まる前の腫瘍に浸潤する間質細胞は、特定の細胞であり、その間質細胞により腫瘍増殖が大きく影響されることが分かった。同定された間質細胞は、移植部位特異的であることから、今後、培養系でこの間質細胞と腫瘍細胞との相互作用を解析し、この間質細胞特異的な相互作用関連因子を特定・解析することで、治療標的や腫瘍マーカーへ開発に繋がることが期待される。

腫瘍に侵入する間質細胞の解析

HIF活性可視化Tgマウス 皮下腫瘍(レポーター無し)





#### 34 胎生期樹状細胞における分化制御機構と疾患制御機構

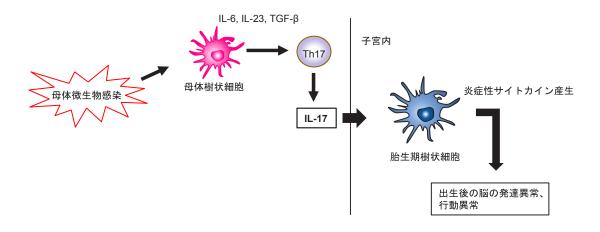
齋藤 史路

【目的】妊娠中の母体内の胎児は母体由来のアロ抗原や病原性微生物といった様々な免疫刺激に暴露される危険性がある。実際に母体の感染や炎症が胎児の脳の発達や自閉症の発症に影響を及ぼすことが報告されている。しかし、胎生期における病原性微生物を認識する免疫反応、特に樹状細胞については未だよくわかっていない。成人期における樹状細胞の分化や活性化機構、免疫応答誘導機構については非常によく研究されているが、胎生期における樹状細胞の活性化機構や免疫応答誘導機構についてはあまり解明されていない。そこで本研究では、胎生期樹状細胞について、その前駆細胞の分化制御機構、及び胎生期樹状細胞の機能、炎症における役割について解明することを目的とした。

【方法】マウス胎生期肝臓から樹状細胞の前駆細胞、樹状細胞を同定し、成体期樹状細胞と比べてどの程度の機能を有するのかを調べるために、樹状細胞について混合リンパ球反応を行った。また、TLR リガンド刺激によるサイトカインの産生量について定量 PCR やサイトカイン多項目同時解析をフローサイトメーターにて行った。

【結果】混合リンパ球反応の結果より、胎生期樹状細胞は成体期と同等の抗原提示能を有することを示した。また、TLR リガンド刺激によって炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$ や IL-6 が成体期樹状細胞よりも多く産生されていることが明らかとなった。

母体感染時における胎児脳の発達、行動異常に胎生期樹状細胞が関与か?



# 35 ヒストン脱メチル化制御による骨形成促進機構の解明

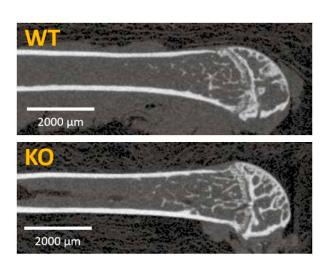
酒井 寿郎

【目的】現代社会では肥満を背景にした糖脂質代謝異常、動脈硬化などの生活習慣病患者が増加し、また超高齢化社会を迎え骨粗鬆症やサルコペニアの対策も重要な課題となっている。生活習慣病の発症進展には遺伝因子とともに環境因子の関与が重要である。我々はこれまで、エピゲノム制御の観点から生活習慣病に関する研究を推進し、最近では褐色脂肪や白色脂肪細胞において、環境因子に対する反応が急性期【応答】と慢性期【適応】で異なる遺伝子発現制御を経ることを示し、エピゲノム制御により生活習慣病発症に至る詳細な分子基盤を報告した。脂肪組織と骨は同じ間葉系幹細胞に由来する。そこで本研究では、我々のこうした研究背景を活かして、骨形成に関与するエピゲノム機構を解明し、骨粗鬆症の新規治療薬標的を提示することを目的とした。

【方法】我々はある種のヒストン脱メチル化酵素に着目し、そのノックアウトマウスを用いて、骨形成への寄与を調べることとした。12 週齢の野生型マウスおよびノックアウトマウスから大腿骨をサンプリングし、その大腿骨遠位の骨量をマイクロ CT を用いて測定した。生後 3~4 日目の時点で、野生型マウスおよびノックアウトマウスから頭蓋骨をサンプリングし、コラゲナーゼ・トリプシンを用いた酵素処理によって初代骨芽細胞を単離・培養した。骨芽細胞分化誘導をかけ、アルカリホスファターゼ活性を測定した。また、石灰化をアリザリンレッド S 染色で評価した。12 週齢の野生型マウスおよびノックアウトマウスから大腿骨および脛骨をサンプリングし、骨髄細胞を培養した。M-CSF および RANKL を用いて破骨細胞分化を刺激し、RANKL 添加開始 3 日後に細胞を固定し、TRAP 染色を行い、破骨細胞数を計測した。

【結果】野生型マウスと比較して、ノックアウトマウスでは骨量が増加しており、その骨形成と骨吸収を検証すると、 骨吸収に関しては両群で差がなく、骨形成に関してはノックアウトマウスで亢進していた。このことから、ヒストン 脱メチル化酵素の欠損によって骨形成が促進され、個体レベルでの骨量増加につながっていると推測された。

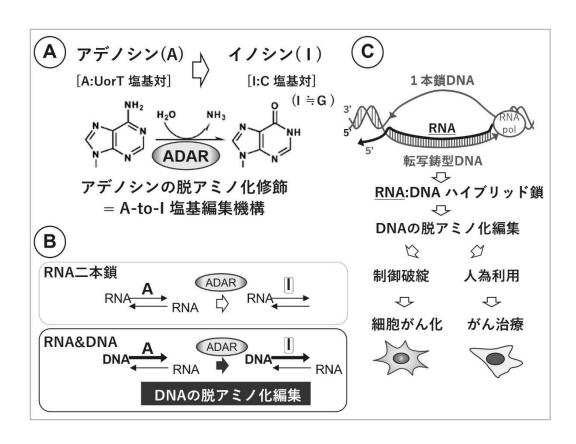
骨量の評価



【目的】「生命のセントラルドグマ」である DNA から適宜必要な遺伝子を RNA へと転写し、機能発現体であるタンパク質を産生する遺伝子発現の流れにおいては、各段階において多彩な発現調節機構が働くことにより、適切な遺伝子発現が維持される。この調節機構の1つに、遺伝子情報そのものである DNA と RNA の [A、G、C、T (U)] 4種の塩基の化学構造を修飾する機構が備わっている。我々は、これまで二本鎖 RNA のみを基質とすると考えられていたアデノシンを脱アミノ化してイノシンへと修飾 (A-to-I 脱アミノ化編集、図 A) する酵素である ADAR (Adenosine Deaminase Acting on double-stranded RNA) が、RNA: DNA ハイブリッド鎖をも基質として RNA のみならず DNA のアデノシンをも脱アミノ化編集することを発見した(図 B)。これは哺乳動物細胞内在性として初の RNA がガイドするゲノム配列編集機構と考えられる。本研究では、この仮説の検証による哺乳動物細胞内在機構として初の、RNA がガイドするゲノム配列編集機構となる、DNA: RNA ハイブリッド鎖を基質とした DNA のアデニン塩基脱アミノ化編集の分子機構と生物学的意義の解明と、遺伝子工学への応用利用、検出技術の開発を目的として実施した(図 C)。

【方法と結果】本研究では、まずADAR 発現抑制時の細胞動態の解析を行い、ADAR の発現抑制がDNA 損傷・細胞周期停止・細胞死を誘導することを見出し、ADAR が DNA 損傷抑制/修復促進に関与することを明らかにした。 さらに ADAR 発現抑制及び ADAR 遺伝子再導入による RNA: DNA ハイブリッド鎖量の変動解析により、ADAR 発現抑制時に 3 倍以上増加することの再現性を確認した。続いて、本機構を利用して人工ガイド RNA の導入によるゲノム DNA 脱アミノ化編集によるゲノム編集法開発に取り組み、厳密に A-to-I DNA 編集部位を規定可能な設計規則を見出した。最後に、既存手法では難しい、超微量細胞内 DNA 鎖におけるイノシン部位の同定を目指し、核酸鎖内のイノシン部位に対する特異的標識法の開発に成功した。以上、機構の解明・利用技術の開発・同定技術の開発により、さらに新たな意義の解明が期待できる。

#### 哺乳類内在性 RNA 依存的 DNA 鎖 A-to-I 脱アミノ化機構



#### 37 芽球形質細胞様樹状細胞腫瘍の統合的標的治療法の開発

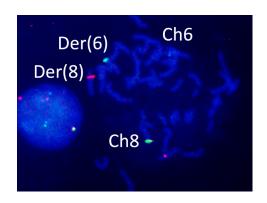
指田 吾郎

【目的】 芽球形質細胞様樹状細胞腫瘍・Blastic plasmactyoid dendritic cell neoplasm(BPDCN)は、急性骨髄性白血病に分類される希少がんであり、ウイルス感染防御に重要な plasmacytoid dendritic cells(pDCs)の前駆細胞から発生すると推測されているが、がん幹細胞を含めた病態基盤は未だ明らかでなく、新しい標的治療が求められている。次世代シーケンサーの進歩によって、BPDCN においても多くの遺伝子変異・エピゲノム異常が報告されているが、こうした異常の BPDCN 発症過程での機能的役割や、その病態基盤や BPDCN に特異的なバイオマーカーも未だ同定されていない。こうした課題を克服するために、我々は BPDCN 特異的な染色体転座 t(6;8)(p21;q24)からアイデアを得て、転座によって活性化された MYC(8q24)と RUNX2(6p21)による BPDCN 発症機構解明に着手した。t(6;8)(p21;q24)によって生じた RUNX2 スーパーエンハンサーの交換による MYC と RUNX2 発現制御破綻の分子基盤の一端を明らかにした。さらに、RPDCN 患者で高率に変異しているがん抑制遺伝子 RUNX2 を欠損させたマウスを用いて、RUNX2 スーパーエンハンサーに依存した RUNX2 高発現 RUNX2 を見せれるアウスを用いて、RUNX2 スーパーエンハンサーに依存した RUNX2 に対する新規標的治療の検証を実施した。

【方法】BPDCN 発症機構に関して、BPDCN 特異的な染色体転座による RUNX2 スーパーエンハンサーの交換による MYC と RUNX2 活性化とがん細胞増殖の分子メカニズムを、ゲノム・エピゲノム解析と細胞機能解析を実施した。実際、MYC と RUNX2 をノックダウンすると BPDCN 細胞の増殖活性は著しく抑制された。さらに、BPDCN 患者で高率に認められる p53 と TET2 の機能喪失型変異と、RUNX2 スーパーエンハンサーによる MYC 高発現の協調による発症機構を解明する過程において、世界で初めて BPDCN マウスモデルの作製に成功した。この pDCs-specific MYC-RUNX2 expressing Tet2/p53 double KO マウスによって、初めて生体レベルにおける BPDCN の病態基盤を詳細に検証することが可能になった。本研究では、未だ実験的に証明されていない BPDCN の発生起源・がん幹細胞を、純化した各細胞系列の前駆細胞をレシピエントマウスに移植して解析した(研究計画 1)。次に、BPDCN に対する新規治療開発のために、同定したがん幹細胞特異的スーパーエンハンサー機能を化学的に阻害する検証を in vitro および in vivo にて実施し、ゲノム編集技術によって遺伝学的に欠損させることでも検証した(研究計画 2)。続けて、BPDCN マウスを用いて、pDCs 関連転写因子 RUNX2 と、その標的因子・経路の阻害を目指した。転写因子の DNA 結合を特異的に阻害できる技術を用いて、RUNX2 標的遺伝子の発現を包括的な抑制を試みた。以上、がん生存に不可欠な細胞系列転写因子・RUNX2 を阻害する統合的ながん標的治療開発のための検証を実施した(研究計画 3)。

【結果】本研究課題によって、希少な難治性がんである BPDCN に対して、世界初のマウスモデルを活用することで、その病態基盤を解明した。また、がん幹細胞特異的スーパーエンハンサーと細胞系列特異的転写因子の機能阻害による新しいがん治療法のための重要な基礎的知見が得られた。

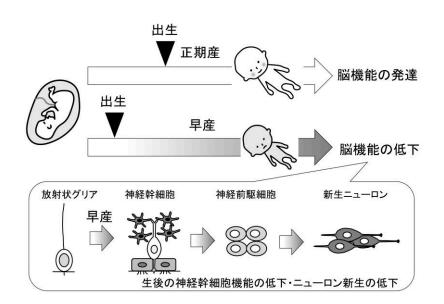
BPDCN 細胞 FISH 解析



【目的】早産児では、脳に明らかな傷害がないにもかかわらず、運動・認知機能の発達が障害されるケースが知られている。出生時期が早まることにより、脳発達に悪影響を及ぼしている可能性が示唆されているが、その病態や詳細なメカニズムについては十分に研究されていない。最近の研究で、生後の脳における脳発達や可塑性を調節するメカニズムとして、生後脳のニューロン新生が注目されている。哺乳類の側脳室外側壁に位置する脳室下帯では、生後も神経幹細胞が維持されており、新しいニューロン(新生ニューロン)を産生している。新生ニューロンは脳内の目的地まで移動して成熟し、神経回路に組み込まれることで、正常脳発達および脳機能維持のみならず、脳傷害後の神経再生や機能回復に貢献することが明らかになってきた。生後にニューロンを産生する脳室下帯の微小環境(神経幹細胞ニッチ)は、出生と共に形成されることが明らかになっている。このことから、早産が神経幹細胞ニッチの形成および維持に悪影響を及ぼす可能性があるが、その詳細は不明である。そこで本研究では、早産によるニューロン新生低下のメカニズムを解明し、予防・治療開発に貢献することを目的とする。

【方法】早産モデルマウスにおける脳室下帯のニューロン新生について、免疫組織化学染色法を用いて評価した。新生ニューロンの微細形態について、連続ブロック表面走査型電子顕微鏡を用いた連続切片撮像および 3 次元立体再構築により解析を行った。また、新生ニューロンにおける一次繊毛の動態は、Arl13b::Venus を導入した新生ニューロンのタイムラプスイメージングにより評価した。さらに、霊長類における生後のニューロン移動の解析には、コモンマーモセットを用いた。

【結果】早産が生後のニューロン新生に与える影響を調べるために、1日早産モデルマウスの脳を解析した結果、脳室下帯における神経幹細胞の機能が低下したことから、生後のニューロン新生が早産に影響されることが示唆された。神経幹細胞から産生された新生ニューロンの微細形態を3次元的に解析した結果、新生ニューロンには一次繊毛が存在すること、その存在は霊長類でも保存されていることが明らかになった。さらに、生後の霊長類脳における新生ニューロンの移動を理解するために、生後コモンマーモセットの脳を解析した結果、脳室下帯から嗅球および大脳皮質へ移動する新生ニューロンが観察され、マウスおよびヒトの両方と共通した特徴を示すことが明らかになった。研究の成果は、早産による神経幹細胞機能の低下メカニズムを解明し、内在性の神経再生能力を利用した早産児の新規治療法開発へと応用するための基盤となるものである。



早産による神経幹細胞機能の低下

#### 39 脳神経系の形成機構の解明

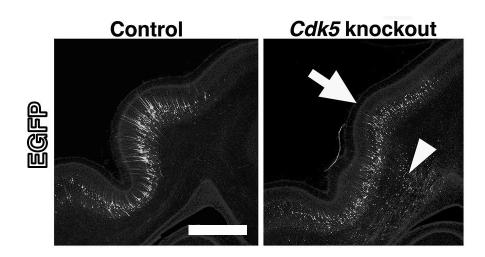
新明 洋平

【目的】ヒトなどの高等哺乳動物では大脳皮質は特に発達しており、発達期にその組織構築がダイナミックに変化しシワ(脳回)を形成する。進化における脳回の獲得は高次脳機能の発達の基盤であり、脳回異常疾患では著しい脳機能障害を呈することから、脳回の形成メカニズムおよび疾患病態の解明は神経科学の重要研究課題である。実際、脳回形成が障害され平滑な脳表面を示す疾患であるヒト滑脳症では、乳児期早期より難治性てんかんと重度の精神発達遅滞を伴う。このように、脳回形成とその異常により生じる脳機能障害に関する研究は、基礎神経科学のみならず臨床脳医学へも波及効果が大きい研究課題である。しかし分子遺伝学的研究に用いられるマウスの脳には脳回は存在せずに、マウスを用いた解析が困難であるために脳回形成に関する研究は遅れている。イタチ科に属するフェレットは、脳回や眼優位性カラムなど高等哺乳動物に特徴的な発達した脳神経構築を持つことから形態学的および生理学的研究に多く用いられてきたが、分子遺伝学的研究は解析手法が確立されておらず遅れていた。我々は、フェレットでの分子遺伝学的解析を可能とするために、子宮内電気穿孔法を応用しフェレット大脳皮質への遺伝子導入法を確立している。次の大きな課題は、loss-of-function実験を行うための遺伝子ノックアウト技術の開発である。ZFN や TALEN に続く第三世代のゲノム編集ツールとして、近年、CRISPR/Cas9 システムが大きな注目を集めている。

【方法】本研究では、子宮内電気穿孔法と CRISPR/Cas9 システムとを組み合わせることにより、大脳皮質において 効果的な遺伝子ノックアウト法の確立を目指した。ヒト滑脳症の原因遺伝子として知られている *Cdk5* 遺伝子の ノックアウトを行った。

【結果】 Cdk5 に対する CRISPR/Cas9 プラスミド (pX330-Cdk5) を導入した結果、EGFP 陽性細胞の約半数で、Cdk5 の機能が喪失し放射状移動が障害されていた。次に、フェレット脳回形成において Cdk5 が重要であるかを調べるために、pX330-Cdk5 を導入した個体の組織学的解析を行った。その結果、pX330-Cdk5 を導入した個体では脳回の低形成が観察された。これらの結果から、Cdk5 が脳回形成に必須であることが明らかとなった。

Cdk5 ノックアウトによる脳回形成異常

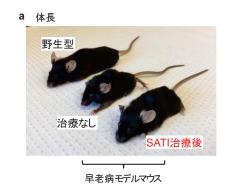


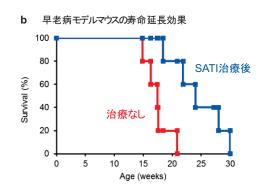
【目的】先天的な遺伝子変異により発症する遺伝病として 6,000 以上の疾患名がすでに報告されており、10,000 以上 の遺伝性疾患が存在すると推測されている。一方で、そのほとんどが根治する可能性がなく有効な治療法が存在しない 難治性遺伝病である。近年、ゲノムの標的配列のみを特異的に切断・改変するタンパク質『人工 DNA 切断酵素』が 開発され、標的遺伝子の破壊(遺伝子ノックアウト)や、外からの遺伝子挿入(遺伝子ノックインや遺伝子修復)など、 様々な細胞種・生物種で自由自在にゲノム配列をデザイン・改変する『ゲノム編集』技術が開発されてきた。特に 近年では、CRISPR/Cas9 の開発によってゲノム DNA の任意の部位に切断を容易に加えることが可能となったが、 切断部位への遺伝子ノックインや遺伝子置換には、細胞が有する DNA 修復機構の一種である『相同組換え修復』が 用いられてきた。しかし、相同組換え修復によるゲノム編集には高い細胞分裂活性が必要であるため、生理的に細胞 分裂を行っていないほとんどの生体内の細胞への応用は非常に困難であった。このような背景の中、筆者は非分裂細胞 でも活性のある「非相同末端結合」経路を利用した標的遺伝子の改変手法を独自に開発し、生体内、特に非分裂細胞で ある神経、筋肉、網膜における標的ゲノム配列を自由に改変する世界初の技術を開発し、HITI (Homology-Independent Targeted Integration) と名付け、実際に遺伝性疾患である網膜色素変性症のモデルラットに対して視覚機能障害の 治療効果が得られた(Suzuki et al, Nature 2016)。しかしながら、既存の HITI 法では、任意の配列をゲノム標的部位 に挿入することはできても、原因変異を取り除くことは出来ないという大きな問題点があり、治療可能な標的は遺伝子 の一部が欠落している欠失変異のみであった。本研究では、自ら開発した HITI 技術を更に発展させることで、従来の 遺伝子治療法の治療対象とならない『Gain of function (優性遺伝子変異)』を治療可能とする新規ゲノム編集技術の 確立を目指す。

【方法】優性変異を持つエクソンの前のイントロンに以降のエクソンとイントロンと 3' UTR を結合した『mini-gene』を HITI 法により挿入する『イントロンノックイン法』を考案し、優性変異の治療を試みた。具対的な実験系として、生体内での DNA 導入に優れているアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターに遺伝子治療用『mini-gene』を持たせ、これを *Lmna* 遺伝子座に優性変異を持ち病的に老化が促進する早老症(プロジェリア症候群)マウスに静脈注射し、優性点突然変異の遺伝子修復による治療効果を検討した。

【結果】本研究過程で、新規の遺伝子改変機構(oaHDR: one-armed Homology-directed repair)を発見し、これらの 方法を組み合わせた新規のゲノム編集法「SATI: intercellular linearized Single homology Arm donor mediated intron-Targeting Integration」の開発に成功した。さらに本技術を用いることで、プロジェリア症候群モデルマウスに対し、複数の組織や臓器で同時にゲノム編集を行い、全身性のゲノム編集治療に成功した(Suzuki et al, Cell Res 2019)。今後本技術がさらに改良されることで、成人の神経・心臓・筋肉・網膜など様々な組織または全身に異常を持つ数多くの難治性遺伝病に対し、その原因となる異常遺伝子を病変部位で直接修復する医療への応用へ繋がることを期待している。

優性変異を持つプロジェリア症候群モデルマウスのゲノム編集治療





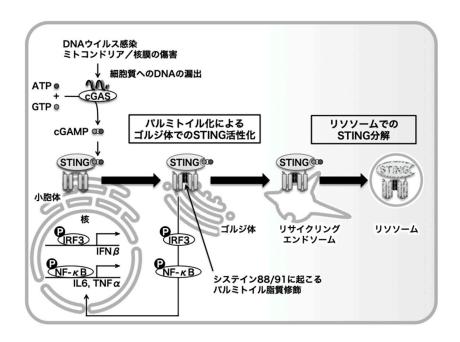
# 41 cGAS/STING自然免疫シグナル経路の収束分子機構

田口 友彦

【目的】自然免疫は先天的に備わっている異物に対する応答機構であり、感染初期の生体防御において重要な役割を果たしている。近年、この自然免疫応答の研究において、DNA ウイルス感染時に細胞質に露出した DNA を異物として感知するセンサータンパク質 cGAS、及びアダプタータンパク質 STING が同定され、cGAS-STING 経路のウイルス感染応答における重要性が明らかとなった。さらに最近では、ウイルス感染時だけでなく、老化や腫瘍免疫においても、細胞質にゲノム・ミトコンドリア DNA が漏出することで cGAS-STING 経路が活性化し、炎症応答や I型インターフェロン応答を引き起こしていることが示され、注目を浴びている。STING の活性化/不活性化の分子機構を明らかにすることは、人類の健康を増進していく上で重要な課題であると考えられる。本研究では、cGAS-STING 経路の不活性化プロセスに着目し、その分子機構を細胞生物学的なアプローチで解明することを目的とする。

【方法】小胞体に局在する STING は、細胞質 DNA 刺激によって小胞体を脱出し、ゴルジ体で下流の自然免疫シグナルを活性化することが知られている。本研究では、ゴルジ体で活性化した STING がその後どのような運命を辿るのか、ライブセルイメージングによって観察を行い、cGAS-STING 経路の不活性化に必要なプロセスの素過程を明らかにした。観察には、多色の超高解像度蛍光ライブイメージングシステム (Zeiss 880 AiryScan) を用いた。その結果、STING がリソソームで分解されて cGAS-STING 経路の不活性化が起きることが明らかになった。この分解のプロセスを制御する遺伝子について、さらにセルソーターを用いたアッセイシステムを構築して同定を行った。【結果】超解像度ライブセルイメージングにより STINGの輸送過程を観察したところ、DNA刺激後3時間後にSTINGを含むエンドソーム小胞がリソソームに包み込まれて最終的に分解されていく瞬間を多数捉えることができた。すなわち、STING は小胞体→ゴルジ体→エンドソーム→リソソームという新規細胞内物質輸送経路によりリソソームで運搬され分解を受けることが明らかになった。リソソーム機能阻害剤の添加によって、cGAS-STING の下流シグナルが持続することから、このリソソームでの分解過程が cGAS-STING 経路の収束に必要であることが示唆された。さらに、リソソーム分解のプロセスを制御する遺伝子についてセルソーターを用いたアッセイシステムを構築して検討を行ったところ、種々の神経変性疾患の原因となる遺伝子が同定された。

cGAS-STING 自然免疫シグナルは細胞内物流によりその活性化・不活性化が制御されている



#### 42 短期睡眠時脳活動の記憶固定化メカニズムに関する研究

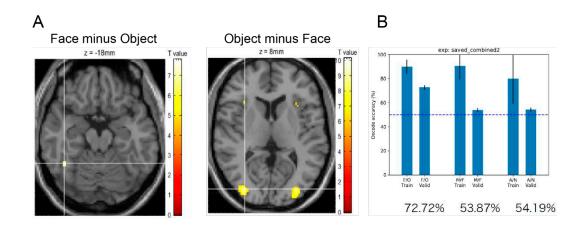
竹田 真己

【目的】睡眠時の脳活動が知覚情報の長期記憶固定化に重要であることが指摘されているが、その神経基盤は未だ不明な点が多い。本研究では、睡眠時および記憶学習中における全脳活動の高時空間分解能計測を高磁場 MRI と脳波計の同時計測により実現し、また経頭蓋電流刺激法による睡眠時神経活動の人為的操作を組み合わせることにより、睡眠の記憶固定化に対する因果的役割を明らかにする。この目的を達成するために、本年度は、以下の2つの実験を遂行した。1つ目の実験では、視覚性記憶の脳活動デコーディングを評価するために、視覚分類課題中の脳活動から視覚刺激をデコードできるか検証した。2つ目の実験では、短期睡眠後の覚醒度(睡眠慣性)を暗算課題によって検証した。

【方法】視覚情報デューディング実験では、実験参加者 38 名に視覚分類課題を行ってもらい、課題遂行中の脳活動を fMRI(機能的磁気共鳴画像法)と EEG(脳波計)により同時計測した。視覚分類課題は、提示された視覚刺激が男性 か女性か自然物か人工物かをボタン押しにより判断させる課題である。得られた脳活動データは前処理を行った後に、univariate analysis を行った。また、提示された視覚刺激を同時計測データからデュードする深層ニューラルネット ワークを構築し、デューディングパフォーマンスを評価した。睡眠慣性実験では、実験参加者 10 名を対象として 睡眠中の睡眠ステージの評価を行い、起床直前の睡眠ステージと起床直後の暗算成績の関係を検証した。コントロール として就寝前の暗算成績を用いた。

【結果】視覚情報デコーディング実験における fMRI univariate analysis の結果、Face 刺激と Object 刺激によって、 先行研究によって示された Face、Object 処理脳領域の賦活を認めた。 EEG データの univariate analysis は現在 進行中である。 fMRI+EEG 同時計測データによるデコーディングパフォーマンスを見ると、カテゴリ間分類、 カテゴリ内分類ともに Training は 80%以上程度行えている一方、Validation は Training ほどのパフォーマンスが 見られず、過学習が認められた。カテゴリ間とカテゴリ内分類の Validation パフォーマンスを比較すると、カテゴリ間 分類の方のパフォーマンスの方が高い結果となった。 今後、深層ニューラルネットワーク構成の調整が必要だと 考えられる。 睡眠慣性実験は、実験参加者数が少ないために、起床直前の睡眠ステージと暗算成績の変化の間に明瞭な 関係は見られなかった。 今後実験参加者を増加させてさらに検証する必要がある。

# fMRI 賦活領域とデコーディング成績の結果



#### 43 キネシンモーターのかかわる代謝疾患の分子機構の解析

田中 庸介

【目的】糖尿病は生活習慣病のうち最大のものであり、わが国における患者とその予備軍の数は 1,000 万人を超えている。病態の核心を担う膵 $\beta$  細胞からのインスリン分泌不全の機序には不明な点が多く、その根本的な治療法は開発途上にある。また非アルコール性肝疾患においては、健康診断を受ける成人の  $2\sim3$  割が NAFLD、そのうち約  $1\sim2$  割が NASH、さらにそのうち  $5\sim20\%$ が  $5\sim10$  年で肝硬変に至るが、NASH/NAFLD の病態生理ならびに治療法は未だほぼ不明である。本研究では、細胞内物質輸送に携わるキネシン分子モーター欠失マウスがこれら代謝疾患の表現型を示す予備的成果から、これらのマウスならびにその初代培養細胞・ノックダウン細胞を実験系として、細胞内物質輸送の新たな観点から疾患病態生理の解明・新規治療法の開発をめざすことを目的とした。

【方法・結果】以下の2つの相互に関連するテーマに沿い研究を行った。

# 1. キネシン分子モーターの膵β細胞刺激・分泌連関における新しい役割の解明

キネシン分子モーターのノックアウトマウスはインスリン分泌不全による耐糖能異常を呈しており、膵島還流試験等により特に第二相のインスリン分泌に障害を生じていることが明らかとなった。また $\beta$  細胞の刺激一分泌連関を詳細に解析したところ、グルコース刺激時の電気生理学的あるいは細胞内カルシウムの反応性が顕著に低下していた。そこで、ノックアウトマウス $\beta$  細胞およびノックダウン MIN6 細胞について、免疫沈降法等の生化学的手法、近接ライゲーションアッセイ法、超高解像顕微鏡等の形態学的手法を用いて解析し、カルシウムチャネルタンパク質群がタンパク質分解経路の亢進によって不安定化していることを示す結果を得た。これらの成果は、キネシン分子モーターのインスリン分泌制御における新たな役割を示唆し、2 型糖尿病の病態解明・治療戦略創出への新しいアプローチを拓くものである。

#### 2. キネシン分子モーターの肝細胞脂質代謝における新しい役割の解明

キネシン分子モーターのノックアウトマウス肝は進行性の脂肪肝・肝線維症の知見を生じ、ヒト遺伝性 NASH 家系においてもキネシン遺伝子変異が同定された。またヒト HepG2 細胞においてキネシン遺伝子のノックダウンを行うと、脂肪滴の顕著な貯留が生じた。表現型レスキュー実験により、キネシン中間ドメインがこの脂肪滴貯留に必要十分であるとの知見を得た。次にこの中間ドメインの遺伝子断片を用いて、BioID 法により結合タンパク質を精製し質量分析法により解析したところ、カルボキシル基転移酵素群が新規キネシン結合タンパク質として同定され、さらにノックアウト肝において酵素活性の異常な上昇を示唆するデータを得た。ヒト線維芽細胞をレトロウイルスベクターにより肝iHep 細胞に分化させたところ、患者変異群では確かに脂肪滴貯留が亢進しており、これに対してキネシン中間ドメインを強制発現することで表現型の改善が可能になった。これらの成果は、キネシン分子モーターの肝細胞脂質代謝における新たな役割を示唆し、NASH/NAFLD の病態解明・治療戦略創出への新しいアプローチを拓くものである。

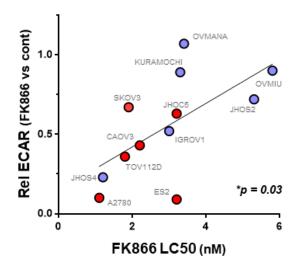
キネシン分子モーターを通した代謝疾患への新しいアプローチ

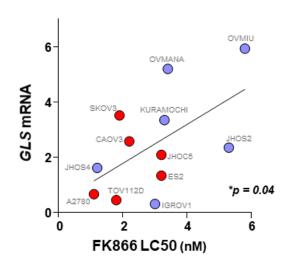
【目的】がん代謝は、近年、新規治療標的としての開発が期待され、多くの研究がなされてきたが、臨床応用までに越えなければならないハードルは多い。その一つが代謝ネットワークの恒常性であり、少々の干渉では、代償経路の活性化やフィードバック等を介した緩衝作用によって、うまく回避されてしまうことが多い。そのような代謝ネットワークロバスト性が垣間見られる現象として、例えば、NAD合成に対する応答が挙げられる。本課題では、NAD合成阻害、とくに NAD サルベージ経路の遮断に対し感受性を異にする腫瘍細胞群同士を比較することにより、がんにおける代謝ネットワークロバスト性分子基盤の一端を明らかにすることを目的として、研究を行った。

【方法】ヒトがん細胞株パネルを 2 種類の NAD 合成阻害剤にて処理し、リアルタイム細胞増殖アッセイ、コロニー 形成試験、細胞外フラックス解析による代謝解析等を行った。NAD 合成阻害剤としては、サルベージ経路の律速酵素 NAMPT に対する阻害剤を使用した。また、代謝物の定量、網羅的な遺伝子発現解析も行った。

【結果】リアルタイム細胞増殖アッセイにより、コロニー形成試験条件の最適化を行った。その結果を踏まえ、ヒトがん細胞株パネルの NAMPT 阻害剤に対する感受性を、コロニー形成試験によって精査した。同様に、PARP 阻害に対する感受性についても調べた。PARP は、NAD を基質として用いタンパク質をポリ ADP リボシル化する酵素であり、この分子群に対する阻害剤は、既に臨床にて治療に用いられている。ほとんどの細胞において、PARP 活性は、NAMPT 阻害によって著しく低下することから、NAD サルベージへの依存が顕著であることが分かった。コロニー形成試験の結果、NAD 合成阻害や PARP 阻害に対する感受性は、細胞株毎に大きな差異があることが分かった。意外にも、NAD 合成阻害と PARP 阻害に対する感受性は、細胞株毎に大きな差異があることが分かった。意外にも、NAD 合成阻害と PARP 阻害に対する感受性はまったく相関しないことが分かった。従って、NAD 合成阻害がもたらす増殖抑制作用は、特に感受性が高い細胞株の群においては、PARP 活性低下以外の作用ルートも含むことが強く示唆された。NAD を基質に合成される NADPH レベルも検討したが、NAD サルベージ阻害への感受性に一致するような結果は得られなかった。細胞外フラックス解析等を用いたその後の詳細な検討により、NAD 合成阻害に対して感受性の低い細胞株は、1. サルベージ経路を介する NAD 合成に非依存的な乳酸産生能を有していること、2. グルタミン代謝に関わる酵素、GLS を高発現する傾向があること、が明らかになった。GLS の高発現が、NADサルベージに依存しない乳酸産生の直接の原因か否かは明らかになっておらず、今後、さらなる検討が必要と考えられた。また、いくつかの検討項目において、BRCA 遺伝子変異の有無が、NAD 合成阻害への感受性や乳酸産生の NADサルベージ依存性などの点において、弱いながらも相関する傾向、あるいは統計的に有意な差異が認められた。

NAD サルベージ経路阻害に対する感受性は、同経路に依存しない乳酸産生・GLS 遺伝子発現レベルと逆相関する





#### 45 マイクロRNA発現コントロールの分子構造基盤

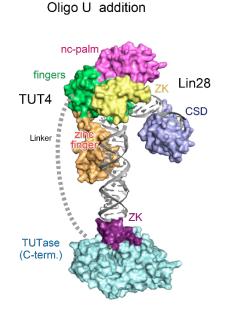
富田 耕造

【目的】マイクロRNA は相補的な mRNA を抑制して幅広い生命現象を制御している。マイクロRNA 自身の発現もまた様々なメカニズムによりコントロールされており、その異常はガンなど各種疾患や発生異常の原因となる。let-7 は線虫からヒトまで広く保存されたマイクロRNAのファミリーであり、特に増殖を促進する遺伝子を標的として様々な生命機能を制御している。すなわち、分化した体細胞では let-7 が過剰な増殖を抑える一方で、幹細胞や一部のガン細胞では let-7 の発現が抑制され細胞増殖が亢進している。let-7 の抑制には RNA 結合タンパク質 Lin28 の前駆体let-7 (pre-let-7) への結合と、続くヌクレオチド転移酵素 TUT4 によるウリジル化が重要な役割を果たしている。TUT4 は Lin28 依存的に pre-let-7 と安定な複合体を形成し、複数のウリジン塩基を pre-let-7 の 3' 未端に付加してlet-7 の発現を抑制する。一部のガン細胞においては TUT4 と Lin28 による let-7 の発現抑制が増殖能に寄与しており、この経路が抗ガン剤の標的となることが期待されるが、複合体形成の構造基盤は明らかになっていない。本研究はTUT4 による Lin28 依存的な pre-let-7 オリゴウリジル化の分子構造基盤の解明を目的とする。

【方法】ヒト TUT4 の Lin28 結合モジュール(Lin28 Interacting Module、LIM)の X 線結晶構造解析を行った。 TUT4\_LIM は TUT4 の N 末端側領域に相当し、zinc finger、nc-palm、fingers ドメインからなる。大腸菌で発現させた組換えタンパク質を精製・結晶化し、大型放射光施設 Photon Factory(つくば)で X 線回折データを取得して立体構造を決定した。構造情報から複合体形成のメカニズムについてモデルをたて、各種変異体タンパク質や放射性同位体を用いた *in vitro* での生化学実験によって検証した。

【結果】 X 線結晶構造解析により、ヒト TUT4 の Lin28 結合モジュールの立体構造を決定した。また生化学実験とあわせて、TUT4\_LIM の zinc finger が pre-let-7 の dsRNA 部分と結合することや、zinc finger から nc-palm、fingers ドメインにわたって保存された塩基性表面で Lin28: pre-let-7 と相互作用することなどを示した。これらの相互作用が Lin28: pre-let-7: TUT4 の三者複合体を安定化させることで、TUT4 の C 末端側の触媒ドメインによるオリゴウリジル化が促進されることを明らかにした。

TUT4による Lin28 依存的な pre-let-7 オリゴウリジル化のモデル



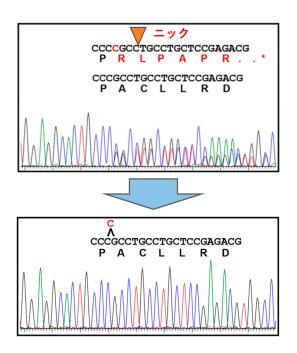
45

【目的】相同組換えは、細胞分裂過程において発生する DNA2 本鎖切断の修復機構である。ホモロジーが高い DNA 配列を修復鋳型として、その配列を読み取りながら DNA 合成し、DNA 損傷を修復する。体細胞分裂時にも減数分裂時にも機能する。体細胞では姉妹染色分体を鋳型として修復される。生殖細胞の減数分裂では、相同染色体間で組換えが起こる。体細胞でも、相同染色体を相同組換えの修復鋳型として用いることは可能である。しかし、その頻度は非常に低い。また、体細胞で相同染色体間相同組換えが起きた場合、ヘテロ接合性の喪失が起こるため、その頻度が低いことはゲノム恒常性維持の観点では合理的である。実際にゲノムに DNA2 本鎖切断を発生させ、相同染色体間組換え頻度を解析したところ、非相同末端結合 DNA 修復によるヌクレオチド欠失が多発し、相同染色体間相同組換えはほとんど起こらなかった。我々は、これまでの研究において、ゲノムに発生させたニックは、ホモロジー配列を持つプラスミドとの間で相同組換えを起こし、修復されることを示していた。これは、細胞内に多コピーのプラスミドが存在することが原因だと考えられた。一方、相同染色体は細胞内に 1 ペアしか存在しないが、頻度が低いながらもニックの修復において相同染色体を鋳型として修復される場合があると予想される。そこで、ニックにより相同染色体組換えが起こることを検証するための研究を行った。

【方法】チミジンキナーゼ遺伝子 (*TKI* 遺伝子) の Exon 4 に 1 ヌクレオチド挿入変異を持つリンパ芽球 TK6 細胞において、Cas9 を用いて Exon 5 に変異を発生させ、複合ヘテロ接合体変異とした細胞を作製した。この細胞では TK 活性が失われており、DNA 合成においてチミジンを利用したサルベージ経路が機能しない。 *TKI* 遺伝子の変異 部位が野生型に上書きされることにより、TK 活性は回復し、HAT 培地中で細胞増殖が可能となる。この仕組みを利用し、コロニー形成能により、相同染色体間相同組換え効率を測定した。

【結果】Cas9 D10A ニッカーゼを用いてニックを発生させることにより、相同染色体間組換えを 5%程度の細胞で発生させることに成功した。野生型 Cas9 をもちいた手法では TK 活性回復に目的外のヌクレオチド欠失が 96.3%検出されたのに対し、ニックでは 0.0%であった。また、DNA 修復に関与する既知遺伝子 NIHA (仮称) のノックアウトにより、組換え頻度は大きく低下した。これにより、ニックによる相同染色体間組換えの分子機構の一端が明らかとなった。

相同染色体間相同組換えによる TK1 遺伝子のニック修復



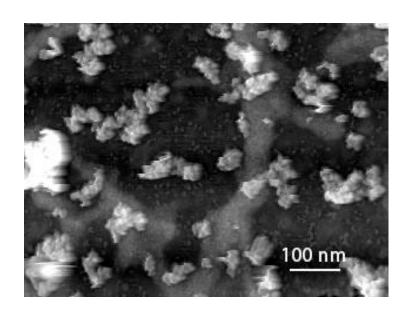
#### 47 AFMによる細胞膜上ウイルス動態の直接観察法の確立

成田 哲博

【目的】ウイルスの細胞内への侵入、細胞からの放出は言うまでもなくあらゆるウイルス感染症のキーになる現象である。この現象は、長年、光学顕微鏡や電子顕微鏡で観察されてきた。しかしながら、光学顕微鏡では分解能が足りず、いつウイルスが細胞膜を越えたか及びそのときの細胞膜の形態変化を観察できない、また電子顕微鏡では細胞を生きた状態で観察できないという欠点がある。一方で表面だけを高分解能で観察する原子間力顕微鏡(以下 AFM)は、細胞表面におけるウイルスの挙動を追うのに最も適した手段である。本研究では、私達がいままで開発してきた試料作製技術と AFM を組み合わせ、ウイルスの侵入、放出を、AFM を用いて観察するための技術を確立することを目標とする。

【方法】 蛍光標識したインフルエンザウイルスが細胞に取り込まれる様子を、AFM と共焦点顕微鏡の同位置、同時観察した。また、インフルエンザの細胞からの放出の様子を、細胞表面のリアルタイム観察で可視化した。同時に、ウイルスを放出している状態の細胞膜内側の構造をアンルーフィング法と AFM – 蛍光相関顕微鏡で観察した。

【結果】ウイルスが細胞表面から現れた突起に飲み込まれる形で取り込まれる様子、まずくぼみができてそこからウイルスが放出される様子をリアルタイムで観察できた。また、ウイルスを放出している状態の細胞膜内側にはウイルスのコンポーネントである vRNP を含む大きな複合体構造が多く観察された。



ウイルス放出時の細胞膜内側構造

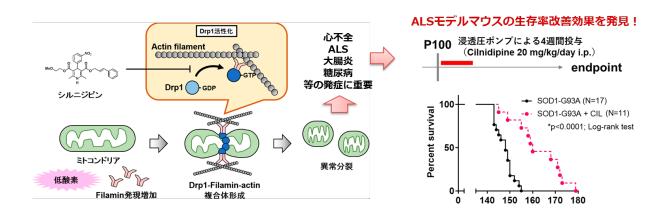
【目的】我々はこれまでに、虚血や高血糖などの負荷によって生じる病態特異的なタンパク質間相互作用(ミトコンドリア分裂促進 G タンパク質 Drp1ーアクチン結合タンパク質 (filamin) がミトコンドリアの過剰分裂を誘導し、心筋早期老化を誘導することを報告した。本研究では、病態特異的に Drp1-filamin 複合体が形成されるメカニズムの解明すること、およびミトコンドリア機能異常を伴う難治性疾患である筋萎縮性側索硬化症における Drp1-filamin 複合体形成阻害剤 (既承認薬シルニジピン) の効果を検証し、その治療標的としての有効性を実証することを目的とした。

【方法】6 週令の C57BL/6J 雄マウスに低用量の有機水銀 (MeHg) を暴露させた後、横行大動脈を結紮することで 圧負荷モデルを作製し、圧負荷誘発性心不全の重症度を評価した。また、MeHg 曝露による心筋ストレス抵抗性減弱に Drp1-filamin 複合体形成が関与するかどうか、薬理学的手法を用いて検証した。治療標的としての Drp1-filamin 複合体形成の有効性を示すため、ストレプトゾトシン (200 mg/kg、i.p.) 誘発性 I 型糖尿病、3%デキストラン 硫酸ナトリウム (DSS) 誘発性炎症性腸疾患 (IBD)、筋萎縮性側索硬化症モデル (SOD1 (G93A) 変異) マウスに シルニジピンを投与し、その効果を調べた。

【結果】低用量MeHgを1週間曝露させたマウスに圧負荷(TAC)を施したところ、圧負荷後の急性心不全による 突然死が増悪した。生き残ったマウスにおいても、心肥大の増悪が認められた。MeHg曝露マウスの心臓では ミトコンドリアが著しく分裂しており、メカニカルストレスに対して脆弱になることが細胞レベルでも示された。 MeHg曝露によるミトコンドリア過剰分裂はDrp1またはFilaminのノックダウンや複合体形成阻害薬シルニジピン 処置によって顕著に抑制された。さらに詳細な解析を行った結果、Drp1タンパク質のCys624-SH基がポリ硫黄鎖を 形成することでDrp1活性が負に制御されており、ここがMeHgによって脱イオウ化されることでfilaminとの相互作用 が促進し、結果的にミトコンドリア過剰分裂が誘発されることが明らかとなった。

マウスにストレプトゾトシンを投与すると、2週間で血糖値は最大値に達した。血糖値が最大レベルで安定してからシルニジピンを投与したところ、糖尿病治療薬のように急な作用ではなく、ゆっくりと2~3週間かけて血糖値が低下し、正常レベルまで回復することが明らかとなった。ALSモデルマウスは生後100日目から歩行障害を伴う病態を発症し、150日以降突然死を起こす。臨床適用量のシルニジピンをこのマウスに投与したところ、生存期間が3週間延長することが明らかとなった(図)。また、シルニジピン投与は、3%DSS投与マウスの大腸組織におけるインターロイキンやケモカイン類の産生を顕著に抑制し、生存期間も有意に延長させることが明らかとなった。以上より、シルニジピンはミトコンドリア機能異常を伴う疾患(ALSやIBD、I型糖尿病)の重症化を有意に抑制することがマウスで実証された。

既承認薬シルニジピンによる病態特異的タンパク質間(Drp1-filamin)相互作用の抑制を介した ミトコンドリア品質維持と ALS 重症化の抑制



#### 49 精神・神経疾患と骨粗鬆症の連関

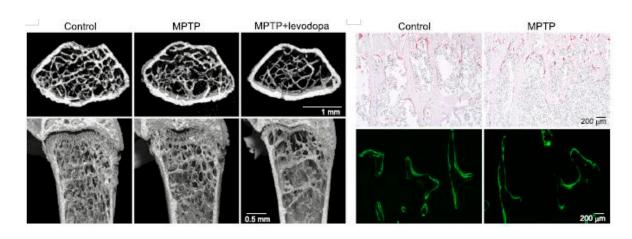
根岸 貴子

【目的】本研究はパーキンソン病に伴う骨粗鬆症の病因解明を目的とした。パーキンソン病は脳線条体のドパミン神経が変性し、運動機能の低下を主症状とする疾患である。無動、静止時振戦、筋固縮、姿勢反射障害という特徴的な症状を示し、パーキンソン病に付随する骨粗鬆症は廃用性骨粗鬆症として捉えられがちであった。しかし、その連関や詳細な病因に関する研究は少ない。本研究ではパーキンソン病に使用される治療薬の骨代謝に対する影響と、パーキンソン病モデルマウスを用いた骨代謝の制御を明らかにすることを目的とした。

【方法】パーキンソン病モデルマウスは、脳線条体ドパミン神経の細胞死を誘導する神経毒 MPTP (1-メチル-4-フェニル-1,2,3,6,-テトラヒドロピリジン) (20 mg/kg) をマウスの腹腔内に、 $2 \text{ 時間おきに 4 回投与して 作製した。また、パーキンソン病治療薬の骨代謝に及ぼす影響を検討するため、Levodopa(<math>100 \text{ mg/kg}$ )、Pramipexole(2 mg/kg)、Ropinirol(10 mg/kg)、Bromocriptine(4 mg/kg)を腹腔内投与した。このマウスの自発行動の異常は Open field test にて評価した。骨代謝についてはマイクロCTによる骨構造解析と骨組織切片を用いた組織学的解析を行った。

【結果】実臨床において使用されているパーキンソン病治療薬である Levodopa、Pramipexole、Ropinirol、Bromocriptine をマウスに投与し、骨組織を解析した結果、Levodopa は骨量を低下させることが明らかとなった。 Levodopa は骨髄由来間葉系細胞からの骨芽細胞への分化と石灰化能を顕著に低下させた。末梢での Levodopa 代謝 産物であるホモシステインが骨代謝に影響する可能性が示唆されていたが、確かに、血清中のホモシステインレベルが Levodopa 投与マウスで上昇していた。また、神経毒 MPTP を投与したパーキンソン病モデルマウスは、自発行動に 異常を呈さなかったが、破骨細胞数が増加し、骨表面あたりの骨吸収面が増加し、同時に骨形成率が低下して骨量が減少することが明らかとなった。MPTP 投与マウスの骨髄細胞を RANKL 存在下で培養すると、過剰な破骨細胞を 形成した。また、骨芽細胞培養条件下で培養すると、対照マウス由来の骨髄細胞に比べて骨芽細胞への分化と骨基質形成能が低下することが判明した。パーキンソン病患者でも血中プロラクチンレベルが亢進することが示されていた。ドパミン神経が変性したマウスでも、MPTP 投与 3 目目から 7 目目にかけて血清中のプロラクチン濃度が亢進することが確認された。MPTP 投与マウスでは、ドパミン神経が変性した結果、末梢のプロラクチン濃度が亢進し、骨芽細胞分化とその石灰化能を抑制するために、骨形成が低下して骨量低下を引き起こしたことを示唆していた。本研究は、パーキンソン病に付随する骨粗鬆症は、パーキンソン病の運動障害による廃用だけが原因ではなく、治療薬である Levodopa や、血中プロラクチン濃度の上昇が原因となりうることを提唱した。

#### MPTP 投与マウスは破骨細胞分化の亢進により骨量が低下する



#### 50 HSF1複合体によるエピジェネティックな遺伝子発現制御

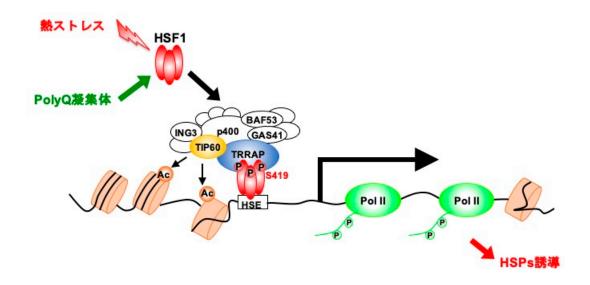
藤本 充章

【目的】細胞が高温に曝されると一群の熱ショックタンパク質(HSP)が合成される。この応答は熱ショック応答と呼ばれ、主に熱ショック転写因子(HSF)によって制御される。熱ショック応答は、ストレスから自身を守るための基本的な生体防御機構である。HSFによる HSP70遺伝子の転写制御機構はショウジョウバエで良く研究されている。ショウジョウバエではショック後、すみやかに HSP70遺伝子のヌクレオソームの除去と転写誘導が起こる。しかしながら、高等動物の HSF1 結合タンパク質であるエピジェネティック関連因子が熱ショック蛋白質群の遺伝子発現をどのように制御するかは不明である。本研究の目的は、クロマチン修飾などの分子メカニズムをクロマチン免疫沈降法などの分子生物学的手法を用いて HSF1 に結合するエピジェネティック関連因子を同定し、さらにその複合体によるHSP 群の転写制御がタンパク質ホメオスタシスへの関与、タンパク質凝集病に対する治療のターゲットになる可能性を明らかにすることである。

【方法】我々は、ゲノム DNA に結合した HSF1 複合体を網羅的に同定するために ChIP-mass 解析を行った。 同定した HSF1 結合タンパク質の TRRAP との相互作用、さらに HSF1・TRRAP 複合体形成に必須な HSF1 領域を免疫沈降法で同定した。また、この複合体が HSP70 誘導に必要であることをリアルタイム PCR 法で、さらに HSP70 プロモーター領域へのリクルート、そしてクロマチン弛緩への関与を ChIP アッセイで明らかにした。 HeLa 細胞で HSF1・TRRAP 複合体がプロテアスタシス容量の調節への関与を明らかにするため、HeLa 細胞に PolyQ81・GFP を高発現させ、HSF1・TRRAP 複合体が PolyQ81・GFP 凝集体形成に及ぼす影響を調べた。

【結果】ChIP-mass 解析から、新たにヒストン修飾に関与する TRRAP、TRIM24 や TRIM33 を同定し、熱ストレスで TRRAP が HSP70 誘導を促進するために必要であることを見出した。HSF1-TRRAP 複合体の形成は熱ストレス条件下で増加し、この複合体の相互作用は熱ストレスで起こる HSF1-S419 のリン酸化に依存していた。TRRAP は HSP70 プロモーター領域に熱ストレスによりリクルートされ、HSF1-TRRAP 複合体がプロモーター領域のヒストン H3 と H4 のアセチル化の亢進に必要であった。HSF1-TRRAP 複合体は、少なくとも p400/TIP60 複合体 HSP70 プロモーターにリクルートすることでクロマチン弛緩および HSF1 結合の促進に働いていた。さらに、HSF1-TRRAP 複合体は PolyQ81-GFP 凝集体形成を抑制することが分かった。以上のことから、HSF1-TRRAP 複合体がプロテアスタシス容量の調節に関与することが明らかになった。

#### HSF1-TRRAP 複合体によるプロテオスタシス容量の調節



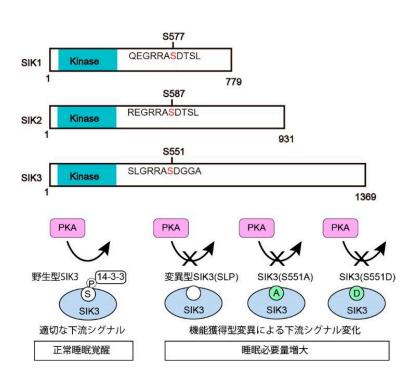
# 51 睡眠覚醒制御の細胞内シグナル伝達系の解明

船戸 弘正

【目的】睡眠の恒常性維持や睡眠覚醒状態を切り替える分子機構は明らかではない。研究代表者らはマウスを用いた睡眠のフォワードジェネティクス研究によって、睡眠の恒常性維持や睡眠量を決定に深く関与する分子としてリン酸化酵素 SIK3 を同定した。SIK3 は SIK (salt-inducible kinase) ファミリーを構成する。しかし、SIK3 に代表される SIKファミリーがどのような機構によって個体の睡眠量を増加させているのかは不明である。インフレームの点突然変異によってスプライス異常が生じ、途中を欠失した変異型 SIK3 蛋白が産生される。SIK ファミリーは C 末側の構造には多様性があるものの、N 末にあるキナーゼドメインと、中間部にあるプロテインキナーゼ A (PKA) リン酸化部位はよく保存されている。変異型 SIK3 蛋白は PKA リン酸化部位を欠失することから、PKA-SIK が睡眠覚醒制御の細胞内シグナルを構成していることが推測される。本研究では、マウス個体および細胞を用いて SIK ファミリー蛋白質が睡眠覚醒を制御する分子機構の理解を深めることを目的とした。

【方法】Cre を発現するアデノ随伴ウイルスを作製し、脳定位固定装置およびキャピラリーを用いて脳内局所にウイルスを投与した。FLAG タグを付加した SIK を発現するアデノ随伴ウイルスベクターも調整した。睡眠覚醒は脳波筋電図に基づいて検討した。HEK293 細胞を用いて Cre を発現するアデノ随伴ウイルスを作製した。FLAG タグを付加した SIK1、SIK2、SIK3 および SIK1(S577A)、SIK2(S587A)、SIK3(S551A)を pcDNA3 に組み込んだ発現ベクターを、FuGENE を用いて HEK293 にトランスフェクトした。ホモジネートから FLAG 抗体を結合させたビーズを用いて免疫沈降を行った。

【結果】SIK3 S551 に相当するアミノ酸は、SIK1 S577 および SIK2 S587 である。このセリン残基をアラニン置換した SIK1 (S577A)、SIK2 (S587A)、SIK3 (S551A) 蛋白はいずれも PKA リン酸化認識抗体の反応性が大きく低下し共沈する 14-3-3 の量が大きく減少した。AAV ベクターを視床下部に局所投与することにより部位特異的に変異型 SIK3 を発現させ、脳波筋電図に基づき睡眠覚醒行動を検討した。コントロールベクターを投与したマウスも未処理のマウスに比べるとわずかにノンレム睡眠量が増加する傾向が見られた。AAV ベクターは視床下部の各部位に局所投与した。ノンレム睡眠量が増加する部位を見出し詳細な検討を進めている。



SIK ファミリーによる睡眠制御シグナル

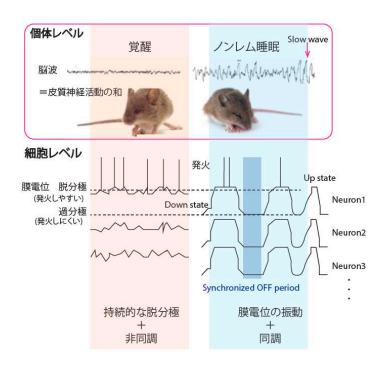
本城 咲季子

【目的】睡眠は神経系を持つ生物種に普遍的に観察される生命現象であり、正常な認知機能および個体の恒常性維持に必須の役割を果たしている。本研究は、ほ乳類の睡眠のうち 80%を占めるノンレム睡眠に着目し、ノンレム睡眠特異的脳波・徐波(Slow wave)の神経基盤の解明を目的とする。

【方法】脳波は多数の大脳皮質神経細胞の活動の和を検出していると考えられている。そこで、脳波測定に加え、徐派の神経基盤を解析するために、高い空間解像度で単一神経細胞活動を検出することが出来る微小電極を用いて神経活動 記録を行った。大脳皮質の複数領野、および大脳皮質と相互に投射しあっている視床を記録部位とした。また、自発活動の計測に加え、視床マトリックス細胞、皮質抑制性神経の役割を検討するため、光遺伝学による刺激実験 および細胞腫特異的除去実験を行った。

【結果】自由行動下マウスにおいて自発的な睡眠覚醒サイクル(24 時間)および 6 時間の断眠実験とその後の回復期(18 時間)を通じた局所電位と神経発火計測を行った。大脳皮質・視覚野、体性感覚野、運動野、前頭前野、および視床の腹側内側核と後内側腹側核を対象領域とした。これまでの報告通り、断眠によって睡眠圧が高まると、頭蓋脳波の周波数成分のうち、徐派に相当する 0.5~4 Hz の周波数成分の上昇が観察された。そこで、各大脳皮質領域の局所電位を用いて局所的な徐派の解析を行ったところ、すべての皮質領域において、徐派の起きる頻度、徐派の振幅の大きさ、および徐派の傾き、すべてが断眠によって上昇することが明らかとなった。興味深いことに、自発的な徐派の頻度や断眠に対する反応性について、大脳皮質領域間で違いが観察された。徐派の発生機構、および断眠によって増強が起きるメカニズムを解析するため、我々は視床マトリックス細胞の光遺伝学刺激を行った。その結果、マトリックス細胞の発火によって大脳皮質で徐派様反応が誘導されることが明らかとなった。さらに大脳皮質において、抑制性神経細胞の除去実験を行ったところ、徐派成分の減少が観察された。

#### 覚醒時脳波とノンレム睡眠時脳波



#### 53 脳組織内の新規合成タンパク質のイメージング

三國 貴康

【目的】細胞は、細胞外からの刺激に応じて特定のタンパク質を新規に合成し、刺激に応じた細胞内プロセスを時空間的に正確に実現する。脳においては、タンパク質の新規合成は、神経回路の形成やリモデリングなど様々な過程に不可欠であることが知られている。ゆえに、新規合成タンパク質を選択的に観察しその機能を操作する方法は、様々な脳内過程における細胞内プロセスをタンパク質レベルで理解するために必須である。しかしながら、これまで新規合成タンパク質を選択的に観察しその機能を操作する良い方法は存在していない。

三國はこれまでに、脳組織内の 1 細胞で正確なゲノム編集を行い、内在性タンパク質の局在や動態を迅速にかつ高解像度で観察する方法「SLENDR 法」を開発した(Mikuni et al.、Cell 2016)。また、SLENDR 法を発展させて、あらゆる時期の脳の任意の細胞種、脳部位あるいは脳全体で内在性タンパク質の局在や動態を観察できる「vSLENDR 法」を開発した(Nishiyama\* and Mikuni\* et al.、Neuron 2017)。本研究では、SLENDR およびvSLENDR 法をベースにして、脳組織中で内在性の新規合成タンパク質をハイスループットに可視化する技術の確立を目的とした。

【方法】ある時間枠に新規合成された特定のタンパク質をイメージングするために、三國が開発したゲノム編集による内在性タンパク質の可視化技術(SLENDR およびvSLENDR 法)と、化学タグによるパルスチェイス法を組み合わせた。化学タグは、低分子リガンドが特異的かつ不可逆的に結合する「受け皿タンパク質」であり、低分子リガンドとして波長の異なる様々な蛍光リガンドを使用できる。この化学タグの性質を利用して、脳組織において、SLENDR/vSLENDR 法により化学タグを付加した特定の内在性タンパク質に対し、まずある色の蛍光リガンドで染色した。その後、任意の時間が経った後、異なった色の蛍光リガンドで染色することで、新規合成されたタンパク質を特異的に染色した(パルスチェイス法)。染色した新規合成タンパク質を、共焦点あるいは二光子顕微鏡で観察した。

【結果】上記の方法により特定の新規合成タンパク質をイメージングできるかどうかを確認するために、脳でシナプス可塑性に重要とされる CaMKII αタンパク質に着目した。子宮内電気穿孔法あるいはアデノ随伴ウイルスベクターでゲノム編集に必要なコンポーネントをマウスの大脳皮質あるいは海馬の錐体細胞に導入し、相同組換え修復によるゲノム編集でCaMKII αの遺伝子座に化学タグをエンコードする配列を正確に挿入することに成功した。そのうえで、2色の化学タグリガンドを用いて、上記のパルスチェイス法を用いて、2時間内に新規合成された CaMKII αタンパク質を選択的に可視化することに成功した。本研究で開発した方法により、脳組織での新規合成タンパク質の動態を高い時空間分解能で迅速に調べられるので、様々な脳内過程の分子メカニズムの理解が飛躍的に進む。

あるタンパク質の 新規合成成分 脳組織内の神経細胞

脳組織内1細胞での新規合成タンパク質のイメージング

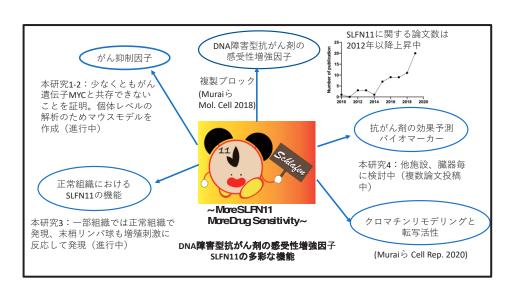
#### 54 複製ストレス制御によるがん抑制機構の解明

村井 純子

【目的】SLFN11(Schlafen 11)は、DNA 障害型抗がん剤の効果を高め、DNA 複製の異常(複製ストレス)に さらされる細胞を選択的に排除する機能があることが最近解ってきた。複製ストレスは、がん遺伝子の活性化や DNA 障害型抗がん剤など様々な原因によって引き起こされ、遺伝子変異やがん化の促進、がんの薬剤耐性獲得の要因となる。 よって、複製ストレスにさらされる細胞を排除できれば、がんの発症、進展、再発の抑制が期待できる。本研究の目的は、1. SLFN11にがん抑制遺伝子としての機能があるかを検討すること、2. 個体レベルの SLFN11機能解析のためにマウスモデルを構築すること、3. 正常ヒト組織における SLFN11の機能を検討すること、4. さらには実臨床において、SLFN11の抗がん剤効果予測バイオマーカーとしての有用性を検討することである。これらを明らかにすることで、SLFN11を軸としたがん治療戦略を打ち立てることが可能となる。

【方法】1. 複製ストレスを惹起することが知られているがん遺伝子 MYC の過剰発現がドライバーとなって発症する バーキットリンパ腫 (BL) 由来の細胞株について、SLFN11 と MYC の共発現が細胞生存に及ぼす影響を検討した。 2. マウス細胞においてヒト SLFN11 が機能するかを細胞レベルで検討した。 3. 広島大学医学部病理学と共同研究で、ヒト非腫瘍部における SLFN11 発現頻度を 17 臓器について、免疫組織染色法にて検討した。また正常ヒト末梢血単核 細胞をもちいて、正常 T リンパ球における SLFN11 の発現レベルと発現制御について検討した。 4. 複数施設との 共同研究で、SLFN11 の発現レベルと DNA 障害型抗がん剤を含む抗がん治療成績との相関関係を検討した。

【結果】1. MYC 高発現 SLFN11 低発現の BL 細胞株 Sultan、Ramos において、薬剤による SLFN11 発現誘導により細胞死が起こった。逆に MYC 低発現 SLFN11 高発現の BL 細胞株 Tree92 に MYC の発現を誘導すると細胞死が起こった。どちらの場合も SLFN11 をノックアウトした株では細胞死が起こらなかったことから、BL 細胞株では SLFN11 と MYC が共発現できない、つまりがん遺伝子 MYC の過剰発現細胞を SLFN11 は選択的に排除できると 考えられた。2. マウス由来リンパ球細胞 A20 を用いて、tetracycline 誘導性にヒト SLFN11 を高発現する細胞株を 作製したが、これらの株は DNA 障害型抗がん剤に高感受性とならなかった。少なくともこの細胞株では、ヒト SLFN11 が機能しないと結論づけた。3. ヒト非腫瘍部における SLFN11 の発現は、乳腺、大腸、膵臓ではほぼゼロであった一方、肺、子宮頸部、食道では発現していた。またヒト抹消 T リンパ球は非増殖刺激下では、SLFN11 の発現を認めなかったが、IL2 刺激により発現が上昇した。マクロファージは非増殖刺激下でも SLFN11 を高発現していた。このことより、正常細胞においても SLFN11 が機能している可能性が示唆された。4. 複数のがん種において、SLFN11 の発現レベルと DNA 障害型抗がん剤を含む治療を受けた時の生命予後に有意な相関を認めた。SLFN11 が抗がん剤治療の効果予測バイオマーカーまたは、治療薬決定のバイオマーカーとして有用であるエビデンスが得られた。



SLFN11 研究の現在とこれから

#### 55 マクロファージの機能分化を司るTRPM2チャネロソーム

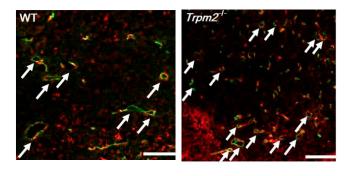
森 泰生

【目的】マクロファージ( $M\phi$ )は多彩な生理的役割を担うために、異なる機能的特徴を備えた複数種類の  $M\phi$ に分極することが知られているが、その機構は未解明である。また、 $M\phi$ の分類は様々な基準によりなされ、特定の種類の  $M\phi$ の生物学的意義の解明には、分類基準の分子的基盤の確立が枢要である。一方、transient receptor potential (TRP) タンパク質ファミリーは、環境や細胞内状態の変化を感知し活性化開口する  $Ca^2$ +透過型陽イオンチャネル群を形成する。特に、TRPM2 と TRPM7 は正統的な機能である陽イオン透過から独立した酵素活性ドメインを有する「Chan-zyme」である。我々は、redox センサー或いは体温付近の温度センサーとして働く TRPM2 チャネルに注目し、TRPM2 が酸化ストレスや温度上昇という生体内外の環境因子により活性化し、炎症応答を促進することを明らかにしてきた。本研究では、炎症性細胞応答を調節するシグナル分子の複合体「TRPM2 チャネロソーム」の解明を目的に、STAT3-TRPM2 相互作用を中心にしたチャネロソームによる  $M\phi$ の機能分極の分子基盤と炎症応答等の調節機構を探究した。

【方法】TRPM2 チャネロソームが司る  $M \phi O M1/M2$  型機能分化の解明を目指し、4 項目の実験を遂行した。第一に、STAT3 と TRPM2 を中心にしたチャネロソーム内タンパク質間相互作用を解析した。第二に、TRPM2 チャネロソームの STAT3 等の構成タンパク質が TRPM2 チャネル活性に及ぼす影響、タンパク質の修飾反応を介した TRPM2 チャネロソーム分解と活性減弱の機序を、質量分析、蛍光タンパク質融合化した TRPM2、STAT3 等の顕微 観察、各種阻害剤を組み合わせ解析した。第三に、TRPM2 チャネロソームによるシグナル経路、M1 及び M2 型関連遺伝子の転写の調節の解析を解析した。第四に、個体レベルで TRPM2 チャネロソームが M1 及び M2 への  $M \phi$  分化をどう調節するか、TRPM2 KO マウスを用いて担癌モデルにおける TAM  $M \phi$  のがん転移能の亢進に着目して解析を進めた。

【結果】STAT3 と TRPM2 との会合は、活性酸素種  $H_2O_2$ により惹起される TRPM2 を介した  $Ca^{2+}$ 流入と JAK キナーゼによる TRPM2 と STAT3 のリン酸化により増強されることを見出した。また、組換え発現系と  $M_{\phi}$ 内在発現系において、STAT3  $\alpha$  と TRPM2 との間の会合が両タンパク質のレベルをプロテアソームやリソソーム を介さず減少させ、 $H_2O_2$ 及び ADP ribose により惹起される TRPM2 活性を減弱させることを確認した。本分解 機序は  $H_2O_2$ により惹起される TRPM2 を介した  $Ca^{2+}$ 流入が劇的に進行させ、STAT3  $\alpha$  の核移行を阻害することも分かった。さらに、TRPM2KO マウスにマウスメラノーマ細胞を用いた担癌を施し、担癌組織内の血管の新生・発達を観察したところ、野生型マウスより多数の新生血管が見られるが、それらはペリサイトが接着しない未成熟状態に留まることが観察された。また、血管成長因子(VEGF)の Tumor associated  $M_{\phi}$ (TAM)からの産生は TRPM2KO マウスにおいて有意に高く(つまり高い  $M_2$  性を示す)、これは過剰な VEGF が血管の分化を阻害する知見と一致していた。このように、TRPM2 発現が優位になると、 $Ca^{2+}$ 流入を介して  $M_1$  性を亢進しながら STAT3 レベルの減弱により  $M_2$  性を抑制する一方、STAT3 発現が優位になると  $M_2$  性を亢進しながら TRPM2 の発現( $Ca^{2+}$ 流入)の減弱(や欠損)により  $M_1$  性を抑制するという、我々が発想提起した  $M_{\phi}$ の機能分化( $M_1$  vs  $M_2$ )に関する分子機構を支持する結果が得られた。

TRPM2 KO マウスにおける担癌組織内メラノーマ細胞の血管発達は未成熟に留まる



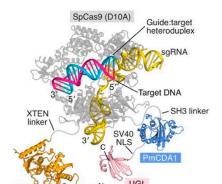
#### 56 多重塩基編集技術の開発

谷内江 望

【目的】CRISPR-Cas9 システムでは、ガイド RNA (gRNA: guide RNA) によって Cas9 が gRNA と相補的であり 3'側に PAM 配列を持つターゲット標的 DNA 領域にリクルートされ、二本鎖 DNA 切断 (DSB: double-stranded DNA break) を引き起こす。この性質がこれまでに、DSB後のDNA修復エラーに依存した遺伝子破壊や、DSB誘導性の 相同的組換え(HR: homologous recombination)を利用したドナーDNAの染色体へのノックインなどのゲノム編集 を可能にしてきた。さらに、DSB 誘導性の HR によってゲノム配列の特定の一塩基を置換あるいは修正するゲノム 治療技術も提案されてきた。しかしながら、この DSB を介した塩基編集戦略は、細胞毒性や染色体切断による染色体 の欠失や転座を引き起こすことが示されている他、HR自体の効率が低いなどの問題が知られていた。このような中で、 塩基編集ツールと呼ばれる技術も開発されてきた。塩基編集ツールでは、ヌクレオシド脱アミノ化酵素をヌクレアーゼ 欠損型またはニカーゼ型の Cas9 (dCas9 または nCas9) と gRNA の複合体に融合させることによって、染色体の ターゲット配列に脱アミノ化を介した直接的な塩基置換を誘導することができる。塩基編集ツールではこれまで大きく  $C \rightarrow T$  塩基編集ツールと  $A \rightarrow G$  塩基編集ツールが開発されてきた。 $C \rightarrow T$  塩基編集ツールは変異型 Cas9 がシチジン(C) 脱アミノ化酵素を有し gRNA ターゲット配列の C を T に変換する。 $A\rightarrow G$  塩基編集ツールは変異型 Cas9 が アデノシン(A)脱アミノ化酵素を有し gRNA ターゲット配列の A を G に変換する。これらの塩基編集ツールは、 染色体を切断しないために、染色体の欠失や転座、あるいは切断による細胞毒性を最小限に抑えたままに狙った染色体 配列を編集することができ、「ゲノムの変異を治療する」という分野において期待が高い。また、これだけでなく、 人工的な変異の導入による遺伝子の機能解析、人工タンパク質進化実験、ゲノム編集と DNA バーコードを利用した 高解像度細胞系譜トレーシング、などの分野においてその応用が期待される。しかしながら、現在の塩基編集ツールは、  $C \cdot G \rightarrow T \cdot A$  または  $A \cdot T \rightarrow G \cdot C$  置換のいずれかしか実現することができず、これらが生み出すことのできる塩基編集 のパターンは限られていた。

【方法】変異型 Cas9 にシチジン脱アミノ化酵素とアデノシン脱アミノ化酵素の両方を融合したいくつかの多重塩基編集ツールを構築し、これらに対応する単一塩基編集ツールと単一塩基編集ツールの混合とともにヒト培養細胞 HEK293Ta を用いたゲノム編集評価実験を行った。ゲノム編集後、ゲノム中のターゲット領域を超並列 DNA シークエンシングによって解析してその活性を解析した。また、エキソームシークエンシングやトランスクリプトーム 解析によるオフターゲット評価を行った。さらに、超並列 DNA シークエンシングデータの学習によって様々な塩基 編集ツールの編集パターンを予測できる機械学習モデルを樹立した。

【結果】多重塩基編集ツールのうち Target ACEmax が高い C→T および A→G 塩基編集活性を持ち、汎用的にゲノム 領域を編集できることを示した。 さらにこれが既存の単一塩基編集ツールの RNA および DNA オフターゲット効果を 越えずに正確に異種塩基同時編集を引き起こせることが、ゲノムのタンパク質コード領域に対して人工的に大きな 多様性を生み出せることを示した。



Bipartite NLS

Target-ACEmax の構造

#### 57 2型慢性アレルギー性炎症におけるRabの役割解明と制御

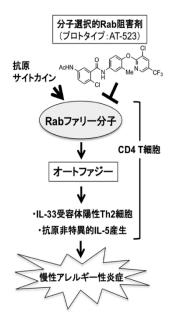
山下 政克

【目的】Rab ファミリー分子による 2 型慢性アレルギー性炎症病態制御機構を、特に CD4 T 細胞におけるオートファジーに着目して解明する。さらに、我々が新規に合成した Rab 結合化合物 SH-2251/AT-523 をプロトタイプとしてサブタイプ選択的な Rab 結合低分子化合物を創製することで、Rab 機能の調節を介した慢性アレルギー性炎症根治療のための新たな治療戦略と新規創薬シーズの提示を目指す。

【方法】AT-523 誘導体をアフィニティー樹脂に固定したカラムを用いて、結合タンパク質を分離し、質量分析でタンパク質を同定した。質量分析によって同定された、Rab ファミリー分子とAT-523 誘導体の結合を Biacore により確認した。Invitro 培養系で、SH-2251/AT-523 の結合が確認された Rab1A、Rab1B、Rab5C、Rab8A、Rab10、Rab11B および Rab35 をレトロウイルスベクターで活性化 CD4 T 細胞に導入し、IL-4、IL-5、IL-13 産生細胞分化を指標に Th2 細胞分化における Rab ファミリー分子の役割を検討した。また、Th2 細胞分化におけるオートファジーの役割を解析するため、クラス PI3 キナーゼの抑制を介してオートファジーを阻害する 3-methyladenine(3-MA)を添加し、Invitro Th2 細胞分化に与える影響を検討した。加えて、病原性 Th2 細胞のマーカーである IL-33 受容体  $\alpha$  鎖 (IL-33R $\alpha$ ) の IL-7/IL-33 依存的な発現誘導に対する、3-MA の作用についても Invitro で解析した。さらに、3-MA が Th1、Th17 細胞分化、Foxp3 陽性 iTreg 細胞分化に及ぼす影響についても、Invitro 分化系を用いて解析した。

【結果】検討した Rab ファミリー分子の中で、Rab8A および Rab35 の導入により、IL-5 産生 Th2 細胞、IL-13 産生 Th2 細胞分化の低下が認められた。一方、IL-4 産生 Th2 細胞への分化は、Rab8A および Rab35 の導入では影響を受けなかった。また、3-MA の添加によっても IL-5 産生 Th2 細胞、IL-13 産生 Th2 細胞への分化が顕著に低下したが、IL-4 産生 Th2 細胞分化への影響はほとんど認められなかった。さらに、IL-7/IL-33 依存的な IL-33R  $\alpha$  の誘導も 3-MA によって低下した。IL-7/IL-33 依存的 IL-33R  $\alpha$  発現の低下は、別のオートファジー阻害薬である Bafilomycin A1 によっても認められた。3-MA は、Th17 細胞分化も抑制したが、Th1 細胞分化、Foxp3 陽性 iTreg 細胞分化は抑制しなかった。Rab8A および Rab35 は、オートファジーの制御に関わっていることが報告されている分子であるが、活性化 T 細胞のオートファジーにおける役割は不明である。今後は、Rab8A および Rab35 の CD4 T 細胞オートファジーにおける役割を明らかにしたいと考えている。

Rab ファミリー分子によるオートファジーを介した慢性アレルギー性炎症の制御(仮説)



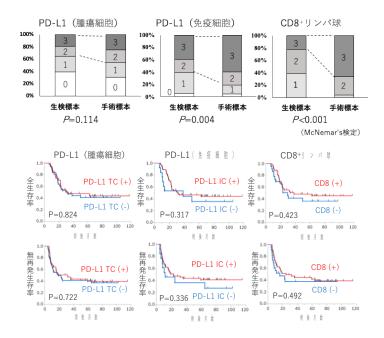
掛地 吉弘

【目的】消化器癌の治療成績の向上のためには、手術による完全切除と術後再発の抑制が重要である。このため、術前補助療法が重要な役割を果たす。進行食道癌では、5-FU+CDDP (FP)療法を標準治療して術前化学療法 (neoadjuvant chemotherapy:NAC) (FP-NAC)、進行直腸癌では、術前化学放射線療法 (neoadjuvant chemoradiotherapy:NACRT) が広く行われている。この術前療法での低酸素下での腫瘍や免疫細胞の微小環境に及ぼす変化を明確にし、メカニズムを把握することで、免疫チェックポイント阻害剤の併用治療への可能性と効果的な治療選択の手法を明らかにし、治療成績の向上を目指す研究である。

【方法】進行食道癌 FP-NAC 症例や局所進行直腸癌 NACRT 症例に対して、腫瘍免疫微小環境の評価を行った。評価項目はPD-L1 発現(腫瘍細胞および免疫細胞)、CD8 などで、治療前生検標本および手術標本で免疫染色を行い、スコア化して比較した。さらに、術後標本により予後との関連を評価した。さらに、マウス大腸癌放射線照射モデルで、腫瘍内 CD8+T 細胞を中心に解析し、その動態を検討した。

【結果】食道癌 FP-NAC 後手術症例では、PD-L1<sup>+</sup>免疫細胞と CD8<sup>+</sup>リンパ球の陽性率は有意に上昇していた。FP-NAC は食道癌腫瘍免疫微小環境において、PD-L1<sup>+</sup>免疫細胞および CD8<sup>+</sup>リンパ球を誘導する可能性が示唆された。予後については、いずれの因子においても発現は、生存率との相関を認めなかった。一方、直腸癌 NACRT 後手術症例を検討した。PD-L1<sup>+</sup>免疫細胞および CD8<sup>+</sup>で術後に有意に増加を示した。NACRT 群手術標本の各因子の免疫染色スコアと予後では、全生存率においては、いずれも有意な差を認めなかったものの、無再発生存率においては、PD-L1<sup>+</sup>免疫細胞陽性群、CD8<sup>+</sup>陽性群が有意に良好であった。多変量解析では CD8<sup>+</sup>の低浸潤が無再発生存の独立した予後不良因子であった。次に、腫瘍内 CD8<sup>+</sup>T 細胞の動態の解析を目的として、CT26 大腸癌細胞株を皮下接種したマウスで放射線照射モデルを作製した。放射治療後の腫瘍内 CD8<sup>+</sup>T 細胞は、放射線照射後 11 日に著明に増加した。表現型 PD-1<sup>+</sup> Tim-3<sup>+</sup>であり、腫瘍反応性 T 細胞が著明に増加していると考えられた。術前治療により食道癌、直腸癌では、腫瘍内 CD8<sup>+</sup>T 細胞が増加することが示された。マウス放射線治療モデルでは、腫瘍反応性 CD8<sup>+</sup>T 細胞が増加することが示された。この変化と低酸素応答のメカニズムの検討を進め、術前治療を行う手術成績の向上の一助としたい。

#### 食道癌 NAC-FP による腫瘍免疫微小環境の変化と予後との相関



#### 59 NASH肝再生機能不全の解明と統合的治療の開発

島田 光生

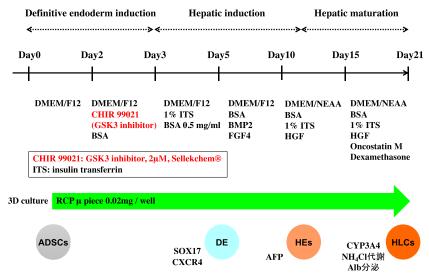
【目的】近年、メタボリック症候群(肥満や 2 型糖尿病、高脂血症など)の増加や、化学療法に伴う非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)は 1. 悪性腫瘍に対する肝切除後再生不全、2. マージナルグラフトとしての生体部分肝移植後グラフト不全を惹起することが肝蔵外科分野において問題となっており、NASH 肝再生不全の機序解明・治療戦略の確立が急務である。これまで我々は肝再生制御因子の研究を行ってきたが、絶対的再生肝細胞不足の克服に対する新たな細胞資源として脂肪由来幹細胞: adipose tissue-derived mesenchymal stem cell(ADSC)を用いた細胞移植治療研究に移行している。本研究では NASH における再生不全制御を目指した統合的治療開発のため、NASH 肝癌モデル・NASH 肝再生不全モデルの作製と 3D 培養システムを用いた肝細胞保護効果・ADSC による細胞移植治療の可能性について検討した。

【方法】1. NASH 肝発癌モデルの作製と NASH・腸管マイクロバイオーム制御に関する検討: TSOD マウス (Tsumura-Suzuki Obese Diabetic Mice: 肥満と 2 型糖尿病を持つ近交系マウス)を用いて、Compound X 投与による NASH 進展・肝発癌抑制効果、腸内マイクロバイオームについて解析した。2. NASH 肝再生障害に関する検討: NC57BL/B6 マウスを、1) Control 群(通常食)、2) NAFL 群(高脂肪食・10 週投与)、3) NASH 群(高脂肪高コレステロール+コール酸食・16 週投与)の 3 群に分け、肝切除術後肝再生比率について解析した。3. 3D 培養システムによる単離肝細胞保護・ADSC の肝細胞様細胞(HLC)分化に関する研究: 3D 培養システムによる雄性 8 週齢 C57BL/6J マウス単離肝細胞生存率・機能を解析し、肝細胞保護効果を確認するとともに、徳島大学 HLC 分化プロトコール下に 3D 培養システムを用いて ADSC の肝細胞様細胞(HLC)への分化能を検討した(図)。

【結果】1. 週齢 24 週で NASH、48 週で肝発癌が確認されたが、Compound X 投与により、NASH 進展抑制、肝発癌抑制効果が得られた。さらに腸管マイクロバイオーム解析により短鎖脂肪酸産生菌の増加、炎症・発癌誘導菌の減少が確認できた。2. 肝切除術後 NASH 群・NAFLD 群において ALT は高値を維持し、NASH 群では術後肝再生を全く認めず、生存率は 20%(1/5)であった。3. 3D 培養システムは 2D 培養より単離肝細胞の生存率を向上し、アルブミン産生能も維持した。また 3D 培養システムにより HLC 分化誘導における各種遺伝子マーカー発現や、CYP3A4 活性、アンモニア代謝能も 2D 培養と比較して亢進しており、ADSC の HLCへの分化能の向上が確認できた。

# 7.17

徳島大学 HLC 分化プロトコール



#### 60 造血幹細胞移植におけるKIRアリル多型の機能解析

進藤 岳郎

【目的】同種造血幹細胞移植の成功と患者の QOL 維持には、ドナーリンパ球によるレシピエントの組織傷害 (Graft-versus-Host Disease: GVHD) と抗腫瘍免疫 (Graft-versus-Tumor Effects: GVT 効果) の適正化が求められる。両者にはドナー由来 T 細胞に加えて NK 細胞が関与するが、NK 細胞の機能発現には不明な点が多い (下図)。

Killer immunoglobulin-like receptor(KIR)は NK 細胞が発現する受容体蛋白質で、標的細胞上の特定の human leukocyte antigen(HLA)と会合することで NK 細胞に活性化ないし抑制性シグナルを伝える。KIR と HLA の両者 とも多くのサブタイプがあり、それぞれが豊富な多型性を持つ。そして両者の会合親和性および伝達されるシグナル強度は両多型の組み合わせで決定される。よって KIR と HLA 多型に注目してドナー選定法を最適化すれば、GVHDと GVT 効果の調節により移植成績を向上できる可能性がある。しかし既報では KIR の意義は一定せず、移植免疫における KIR、特に近年明らかとなった KIR アリルの意義はなお不明である。今回同多型のタイピングで GVHDの低減と GVT 効果の最大化を可能にする治療戦略の確立を目指した。

【方法】1. 難治性の慢性骨髄性白血病症例(Chronic Myeloid Leukemia: CML)に同種造血幹細胞移植を行った症例で、KIR3DL1 陽性 NK 細胞の多寡と NK 細胞活性、CML の病勢との相関性解析を行った。2. 複数の HLA アリルを導入した CML 細胞株とヒト NK 細胞の共培養系で KIR アリルの機能解析を行った。3. 多数の移植症例での臨床研究により、GVHD 発症の予測に有用なバイオマーカーの検索を行った。4. 免疫不全マウスにヒトリンパ球を輸注して作製した異種移植 GVHD モデルで、免疫再構築の評価を行った。5. 本邦で集積された同種移植症例の保存検体を用いた KIR アリルタイピングの臨床研究の準備を進めた。

【結果】1. KIR3DL1 陽性 NK 細胞が生着したことに伴って NK 細胞活性が低下し、CML の再発に至った。 すなわち KIR3DL1 陽性細胞の増加が NK 細胞による抗腫瘍免疫の弱体化を来す可能性が示唆された。2. 異なる KIR アリルと HLA との会合で NK 細胞活性が調節される可能性が示唆された。3. 移植患者の CD4T 細胞内 ERK1/2 のリン酸化がヒト急性 GVHD のバイオマーカーとなる可能性が示唆された。4. GVHD マウスでは T 細胞の多様性が失われるが、MEK 阻害剤の投与でその多様性が保持された。5. 上記研究につき、日本造血細胞移植データセンターおよび本学の倫理承認を得た。

造血幹細胞移植における免疫動態: GVHD と GVT 効果

# ドナーリンパ球が正常細胞を攻撃すると……、 移植片対宿主病(GVHD)→有害!



GVHDの抑制とGVT効果の温存は造血幹細胞移植の最重要課題。

KIRアリル多型に注目してNK細胞免疫の最適化を試みる。

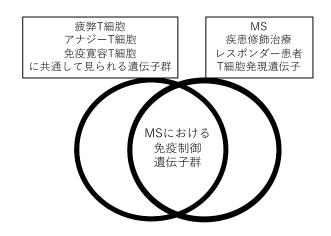
# 61 神経免疫疾患におけるCysltrl の免疫寛容機構の解明

千原 典夫

【目的】過剰な免疫応答は自己免疫疾患を招き、過度の免疫抑制は腫瘍の出現を生む。免疫機能の恒常性を維持するためにはその両者の特徴の理解が肝要である。代表的な自己免疫性神経疾患である多発性硬化症(Multiple Sclerosis:MS)では免疫寛容機構の破綻が炎症の継続と神経障害の蓄積を来す。MS はインターフェロンβ、フマル酸ジメチル、フィンゴリモドなどの疾患修飾治療薬の登場によって一部に良好な経過をとる例が認められるが、治療に反応の悪い群では、慢性進行性の経過をとる。一方で、持続的な自己免疫反応の原因の一つとして、T 細胞上に発現する共抑制性受容体の機能異常が指摘されている。そこで、疾患修飾治療によって良好な経過をとる MS 患者から得られた T 細胞亜分画の発現遺伝子の中から最近筆者らが同定した免疫寛容の核となる遺伝子モジュールに含まれる遺伝子群を MS における免疫制御遺伝子群と抽出し、その表面受容体遺伝子の免疫制御機能や転写制御機構について解析を行なっている(下図)。本研究では Cysteinyl Leukotriene Receptor 1(Cysltr1)に注目し MS におけるその機能について解明することを目的とした。

【方法】本研究では以下の方法を用いて、MS における T 細胞上に発現する Cysltr1 を含む表面受容体についてその免 疫制御機能の解析を行った。 $1.\,\,{
m MS}$  治療薬であるインターフェロン eta 治療レスポンダー患者末梢血中の  ${
m CD4^+~T}$  細胞 について代表的な共抑制性受容体 Programmed cell death 1 (PD-1) と共発現する遺伝子群を抽出するために PD-1 陽 性  $CD4^+$  T 細胞と PD-1 陰性  $CD4^+$  T 細胞の両者についてセルソーターを用いて抽出し、それらに発現する遺伝子を RNA-sequence 法を用いて網羅的に解析し、両者の発現変動遺伝子について抽出した。2. CD4+T 細胞の亜分画の解 析を行うため C57BL/6 マウスの脾臓及びリンパ節由来のナイーブ T 細胞に対して各種分化刺激を行い、Cvsltr1 の発 現を解析した。3. MS の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を用いた Cysltr1 の機能解析を行った。 【結果】1. Cysltr1 は寛解期の MS 患者において PD-1 陰性 CD4 $^+$  T 細胞と共発現した。インターフェロンレスポン ダー患者末梢血から分離した PD-1 陽性 CD4 $^+$  T 細胞と PD-1 陰性 CD4 $^+$  T 細胞について両者間で 12,610 個の発現変 動遺伝子を抽出した。抑制性遺伝子モジュール [1] に含まれる Cysltr1 は MS 患者 CD4T 細胞において有意差を持 って PD-1 陰性細胞に発現が認められた。2. Cysltr1 は Th1 細胞や Th17 細胞に発現が認められた。 Th1、Th2、Th17、 Th17p、Tr1、iTreg 細胞の分化誘導を行った。Cysltr1 は主に Th1 と Th17、Th17p 細胞で発現が認められ、Tr1 や Treg 細胞ではほとんど発現が認められなかった。3. Cysltr1 KO マウスは EAE を早期発症した。Cysltr1 がエフェク ターT 細胞に発現することからその過剰活性化に対する制御機能を担っているかについて野生型マウスと Cysltr1 KO マウスに髄鞘抗原(Myelin oligodendrocyte glycoprotein: MOG)を免疫して誘導した EAE では野生型と比して *Cysltr1* KO マウスでより早期の発症が認められた (unpublished data)。

MS における免疫制御遺伝子の検出



#### 62 造血器腫瘍におけるゲノム異常と微小環境との相互作用

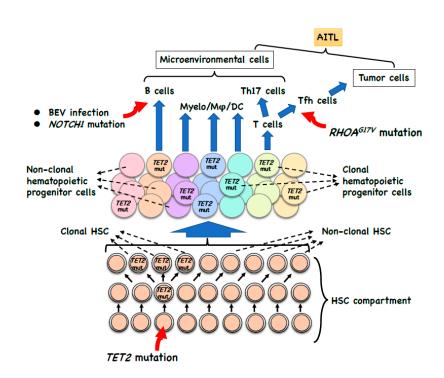
千葉 滋

【目的】造血器腫瘍で同定される遺伝子変異と同様の体細胞性遺伝子変異が、高齢者の正常血液細胞において高頻度に同定される(クローン性造血:clonal hematopoiesis、CH)。CH 細胞は造血器腫瘍をもつ患者の一部でも同定され、こうした患者の造血器腫瘍は CH 細胞を供給する造血幹細胞に由来する。CH 細胞で 2 番目に高頻度に同定される TET2は DNA メチル化修飾酵素をコードし、骨髄系腫瘍でもリンパ系腫瘍でも高頻度に同定される。血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫(AITL)は、TET2変異が約80%の患者で同定される。また、TET2変異をもつAITLの60~90%で RHOAGITV が同定される。本研究では、造血幹細胞における TET2 変異と、T 細胞における RHOAGITV 変異を 模倣するマウスを作製することで、AITL における腫瘍微小環境の変化と発症メカニズムとの関連を解明することを目的とした。

【方法】造血幹細胞で Tet2がノックアウトされ、T 細胞で  $RHOA^{G17V}$ を発現する  $Tet2^{nullnull} \cdot Mx$ - $Cre^{\cdot}$  CD2- $RHOA^{G17V}$  マウス (Tet2RHOA マウス) を作製した。 Tet2RHOA マウスの腫大リンパ節由来の細胞を解析し、またこの細胞を放射線照射したヌードマウスの腹腔内に移植して腫瘍形成過程と腫瘍の性状を詳細に解析した。

【結果】Tet2RHOA マウスは脾腫やリンパ節腫大を示し死亡した。脾臓や腫大リンパ節は濾胞が消失して多彩な細胞が充満し、また血管増生を伴うなど、AITL に類似した組織像を示した。AITL の腫瘍細胞は濾胞性ヘルパーT (Tfh) 細胞の形質をもつことが明らかにされているが、本マウスの脾臓や腫大リンパ節でも CD4+PD1+など Tfh 細胞の形質をもつ細胞が増加していた。一方、多数の B 細胞や骨髄系炎症細胞も混在しており、この点でもヒト AITL に類似していた。以上から Tet2RHOA マウスは AITL モデルと考えられた。腫瘍組織由来細胞をヌードマウスに腹腔内投与すると 2 週間で約半数のレシピエントが脾腫とリンパ節腫大をきたして死亡した。腫大脾臓では Tfh 様細胞が増加しておりその大部分はドナー由来であった。その他に多種類の炎症細胞で構成されており、これらにはドナー由来とレシピエント由来細胞が混在していた。AITL 発症には TET2 変異をもつ微小環境細胞が重要な役割を果たすことが示唆された。

# AITL の分子病態と微小環境細胞



#### 63 肝プロスタシンによる糖脂質代謝機構の解明と医学応用

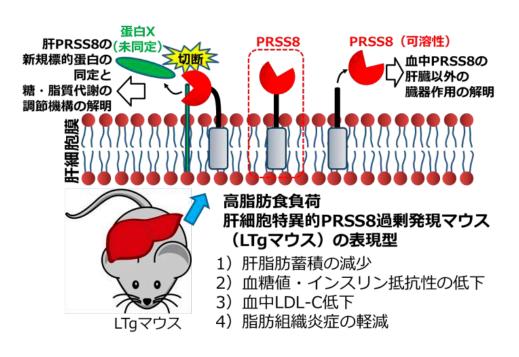
土屋 恭一郎

【目的】プロスタシン(prostasin: PRSS8)は分子量 40 kDa の細胞膜に局在するセリンプロテアーゼであり、膜蛋白の切断を介した機能調節を担う。本研究では、肝細胞特異的 PRSS8 過剰発現マウス(LTg マウス)およびテトラサイクリン発現誘導性 PRSS8 過剰発現 HepG2 細胞株(ヒト肝癌由来細胞株)を用いて肝 PRSS8 の基質の網羅的解析を行い、新規基質蛋白を同定する。加えて、新規に同定した基質蛋白やその下流分子・メカニズムについて in vitro、in vivo における検討で明らかにし、肝臓における新たな糖・脂質代謝調節機構の解明を目指す。

【方法】高脂肪食給餌野生型及び LTg マウスの体重、摂餌量、随時血糖値を経時的に測定し、糖、インスリンおよび ピルビン酸負荷試験を施行した。高脂肪食給餌 8 週目の絶食後に血液、肝臓、白色・褐色脂肪組織、骨格筋を採取した。 また、テトラサイクリン発現誘導性 PRSS8 過剰発現 HepG2 細胞株を樹立した。

【結果】LTg マウスにおいて高脂肪食負荷にて体重非依存的にインスリン抵抗性が軽減し、血清 LDL-コレステロール値及び肝中性脂肪蓄積が減少していた。また、LTg マウスの肝臓では脂肪酸トランスポーターCD36 の蛋白発現が減少しており、HepG2 細胞株に PRSS8 を過剰発現させることにより CD36 の蛋白発現が同様に減少した。加えて、LTg マウスの血清において可溶性 PRSS8 濃度が増加していた。今後、LTg マウス由来初代培養肝細胞の培養上清と細胞をショットガン解析に供するとともに、テトラサイクリン発現誘導性 PRSS8 過剰発現 HepG2 細胞株を用いたSILAC (Stable Isotope Labeling using Amino Acids in Cell Culture) 法による定量比較により蛋白レベルでの網羅的解析を推進する。また、可溶性 PRSS8 を大量精製し、外因的投与による糖・脂質代謝への影響を検討する。

肝細胞特異的プロスタシン (PRSS8) 新過剰発現マウス (LTg マウス) をモデルとした 肝 PRSS8 を起点とした新たな糖・脂質代謝の調節機構の解明



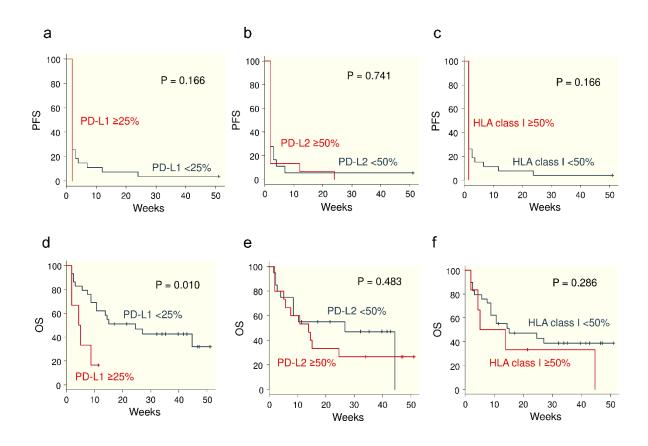
土屋 弘行

【目的】がんの治療において、免疫療法が標準的治療となりつつあるが、免疫療法の効果がみられる症例は一部に限られる。本研究では、樹状細胞を用いた免疫療法を受けた肉腫患者における PD-L1、PD-L2、HLA class I の発現と、免疫療法の効果の相関を検討した。

【方法】当院で樹状細胞療法を受けた肉腫患者 35 例(男性 18 例、女性 17 例、平均年齢 37.7 歳)を対象とした。対象患者は、骨腫瘍 16 例(骨肉腫 13 例、軟骨肉腫 3 例)、軟部腫瘍 19 例(明細胞肉腫 4 例、MFH/UPS 4 例、平滑筋肉腫 3 例、滑膜肉腫 2 例、ユーイング肉腫 1 例、ASPS 1 例、血管肉腫 1 例、骨外性軟骨肉腫 1 例、MPNST 1 例、上衣腫 1 例)であり、12 例で再発病変、31 例で転移性病変を認めた。これらの症例について、免疫療法前に採取した腫瘍組織における PD・L1、PD・L2、HLA class I の発現を調査し、これらの分子発現と免疫療法後の免疫反応(IFN・γ、 IL・12)、治療効果、生存期間の相関を評価した。

【結果】PD-L2 (+) 群は PD-L2 (-) 群に比べて IFN- $\gamma$ 、IL-12 の変化が少ない傾向がみられた。PD-L1 の発現と病勢コントロール率(CR+PR+SD)では、PD-L1 (+) 群 0%、PD-L1 (-) 群 22%であった。PD-L2 の発現と病勢コントロール率(CR+PR+SD)では、PD-L2 (+) 群 13%、PD-L2 (-) 群 22%であった。また、PD-L1 (+) 群は PD-L1 (-) 群に比べて全生存率が有意に低いことが示された。一方、HLA class I の発現と免疫療法後の免疫反応、治療効果の相関は認めなかった。本研究の結果から、PD-L1、PD-L2 の発現は樹状細胞療法の効果予測におけるバイオマーカーの候補となることが示された。また、免疫チェックポイント阻害薬の併用が樹状細胞療法の効果を増強させる可能性が示唆された。





#### 65 スキルス胃癌におけるS1P分子機構の解明と臨床的意義

永橋 昌幸

【目的】スキルス胃癌はびまん性浸潤を呈し、腹膜播種を伴うことが多く、極めて予後不良である。次世代シークエンサー解析により、スキルス胃癌は Genomically Stable (GS、ゲノム安定型) サブタイプに分類され、ドライバー遺伝子変異に乏しく、その病態は未だ不明な点が多い。 興味深いことに、 GS 胃癌ではスフィンゴシン・1・リン酸 (S1P) 情報伝達経路が亢進していることを示唆するデータが米国 The Cancer Genome Atlas によって報告された (Nature 2014)。 S1P は、脂質でありながらタンパク質と同様に細胞表面の受容体に作用することで情報伝達物質として働き、癌の発生や転移に寄与する脂質メディエーターであり、我々はこれまでに S1P の癌における役割について研究を行ってきた。我々は、「脂質メディエーターであるスフィンゴシン・1・リン酸 (S1P) の分子機構が GS スキルス胃癌の発癌機序や病態に重要な役割を担っている」と仮説を立て、本研究を企画した。本研究の目的はこの仮説を検証し、新たな治療法開発へ向けた研究基盤を確立することである。

【方法】2009 年から 2015 年までに自施設で手術を施行された胃癌症例 130 例を対象とし、手術切除標本のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 腫瘍組織を用いて遺伝子解析を行った。EBV-DNA 解析、MSI 解析に加え、435 の癌関連遺伝子の解析データを基に、TCGA により提唱された 4 つの分子サブタイプに分類した。リン酸化 SphK1 抗体を用いて免疫染色を行った。臨床病理学的特徴と pSphK1 の発現強度の関連について検討を行った。

【結果】EBV サブタイプは 4 例 (3%)、MSI サブタイプは 13 例 (10%)、CIN サブタイプは 72 例 (55%)、GS サブタイプは 41 例 (32%) であった。免疫染色の結果、89 例が pSphK1 high、41 例が pSphK1 low であった。臨床病理学的因子と pSphK1 を比較検討した結果、Lauren 分類 (P=0.038)、HER2 (P=0.014)、分子サブタイプ (P=0.048)、pN (P=0.022) で有意差を認めた。 CDH1 と RHOA 遺伝子変異は GS サブタイプに特徴的な遺伝子変異として報告されているが、これらの 2 つの遺伝子変異と pSphK1 の発現強度に関連がないか解析を行ったところ、いずれも遺伝子変異がある症例において pSphK1 の陽性率が高かった (P=0.049、0.027)。

胃癌 130 例におけるリン酸化スフィンゴシンキナーゼ 1 型 (pSphK1) の発現と臨床病理学的特徴

		SphK1			
		全例 (N = 130)	High (N = 89)	Low (N = 41)	P
Lauren分類, N (%)	Intestinal	74 (57)	44 (49)	30 (73)	0.038
	Diffuse	35 (27)	30 (34)	5 (12)	
	Mixed	9 (7)	7 (8)	2 (5)	
	Indeterminate	12 (9)	8 (9)	4 (10)	
HER2, N (%)	Positive	19 (15)	8 (9)	11 (27)	0.014
	Negative	111 (85)	81 (91)	30 (73)	
分子サブタイプ, N (%)	EBV	4 (3)	2 (2)	2 (5)	0.048
	MSI	13 (10)	11 (12)	2 (5)	
	CIN	72 (55)	43 (48)	29 (71)	
	GS	41 (32)	33 (37)	8 (20)	
pN (規約14版), N (%)	pNO	37 (28)	27 (30)	10 (24)	0.022
	pN1	27 (21)	9 (17)	17 (29)	
	pN2	19 (15)	15 (10)	10 (24)	
	pN3	47 (36)	38 (43)	9 (22)	

#### 66 褐色脂肪細胞が糖代謝・肥満に及ぼす役割の解明

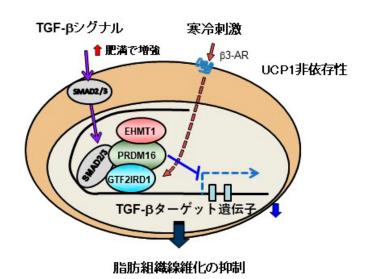
長谷川 豊

【目的】褐色/ベージュ脂肪細胞は、脱共役蛋白 UCP1 を強く発現し、熱産生機構を備えている脂肪細胞である。 この褐色/ベージュ脂肪細胞の分化・機能維持にとりわけ重要な役割を果たしている転写因子として PRDM16 が 知られている。この転写因子の制御機構の詳細を解明し、肥満症や糖代謝の病態を解明することを目的とする。

【方法】PRDM16 による線維化が抑制される機序を解明する目的で、PRDM16 と転写複合体を形成している蛋白の同定を試みた。この転写因子が制御している遺伝子発現プログラムの詳細を解明した。

【結果】脂肪組織にて転写因子 PRDM16 を過剰発現させたマウス (Prdm16 Tg マウス) の皮下脂肪組織では、正常コントロールマウスと較べて、ベージュ脂肪細胞が誘導され、全身の糖代謝が改善する。また、熱産生に関わる脱共役蛋白 UCP1 を欠損したマウス (Ucp1 マウス) と Prdm16 Tg マウスとの掛け合わせで誕生した Ucp1 メ Prdm16 Tg マウスにおいてもコントロール Ucp1 マウスと比べて、同様に全身の糖代謝が改善する。以上から、UCP1 (熱産生) には依存しない機序で、PRDM16 により誘導されたベージュ脂肪細胞による糖代謝を改善させる機序が存在することが示唆された。さらに、これら 4 つの異なる遺伝子マウス群間の皮下脂肪組織で、組織学的解析、RNAシークエンス解析を行うと、ベージュ脂肪細胞が誘導される Prdm16 Tg マウス群 (Prdm16 Tg マウス群と Ucp1 メ Prdm16 Tg マウス群)で、熱産生には関係なく、線維化が抑制されることを見出した。以上から、糖代謝を改善させる機能がある転写因子 PRDM16 には、UCP1 非依存性に線維化を抑制させる機序が存在することが判明した。次に、PRDM16 による線維化が抑制される機序を解明する目的で、PRDM16 と転写複合体を形成している蛋白の同定を試みた結果、褐色脂肪細胞での発現が特異的に高い転写因子 GTF2IRD1 を同定できた。この GTF2IRD1 は脂肪組織における線維化に関わる広範な遺伝子プログラムを制御し、TGF-βシグナルを強力に抑制していた。また、脂肪組織にGTF2IRD1 を過剰発現させたマウスでは、肥満の進展に伴い脂肪組織で生じる細胞外マトリックスのリモデリングや線維化現象が抑制され、肥満や全身の糖代謝の増悪が抑制された。これらは、熱産生に関わる UCP1に依存しない新たな機序によるものであった(下図)。

転写因子 GTF2IRD1 による脂肪組織の繊維化の抑制および糖代謝改善機構



馬場 祥史

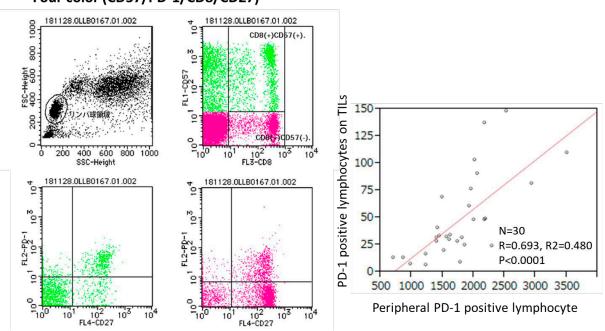
【目的】細胞障害性 T 細胞における PD-1 発現が免疫チェックポイント阻害剤の治療効果に影響を与えることが考えられる。末梢血リンパ球が腫瘍浸潤リンパ球を反映するということが報告されているが、消化器癌症例においてその関係性を検証した研究は皆無である。現状では、PD-L1/PD-1 発現を検証するには侵襲的な処置(切除検体や生検サンプルなど)が必要であり、また、その検体が治療時の患者の状態を正確に反映しているかどうかは不透明なままである。よって、簡便かつ正確に患者の血中及び末梢血リンパ球における PD-1/PD-L1 発現の状態を把握することは喫緊の課題と言える。本研究は、末梢血リンパ球の PD-1 発現は腫瘍局所細胞障害性 T 細胞の PD-1 発現と一致し、簡便に測定可能な革新的バイオマーカーになりうるという我々の仮説を検証するものであり、上部消化管癌患者の臨床検体を用いて下記事項を明らかにすることを目的とする。

【方法】抗 PD-1 抗体 (Cell Signaling Technology) を用いて消化器癌切除検体における PD-1 の免疫組織化学染色を行った。また、食道 60 例、胃 16 例、大腸 33 例、肝 13 例、膵 6 例の患者の術前末梢血中の PD-1 陽性リンパ球を評価した。末梢血リンパ球における PD-1 発現は、FITC 標識抗ヒト CD57 マウス抗体、APC 標識抗ヒト CD27 マウス抗体、PE 標識抗ヒト PD-1 マウス抗体、PerCP 標識抗ヒト CD8 マウス抗体を用いた fluorescence activated cell sorter (FACS) により評価した。

【結果】血中及び腫瘍浸潤リンパ球の PD-1 発現両方を検討可能であった食道 30 例において、血中及び腫瘍浸潤リンパ球の PD-1 発現の関係を検討した。切除検体における腫瘍浸潤リンパ球数と血中 PD-1 陽性リンパ球数は有意に相関していた (P<0.0001、R=0.693)。現在、PD-1 発現を検証するには侵襲的な処置 (切除検体や生検サンプルなど)が必要であり、また、その検体が治療時の患者の状態を正確に反映しているかどうかは不透明なままである。今回の結果により、血中リンパ球における PD-1 発現が腫瘍浸潤リンパ球における PD-1 発現の状態を反映することが示唆された。この点において、本研究はかなりの臨床的意義を有すると考えられる。

PD-1 発現評価のためのフローサイトメトリー及び血中及び腫瘍浸潤リンパ球における PD-1 発現の関係

# Four color (CD57/PD-1/CD8/CD27)



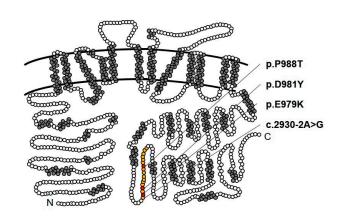
松永 達雄

【目的】本研究の目的は、私たちが同定した新規難聴原因候補 SLC12A2 変異による難聴発症の分子機序を動物モデル・細胞モデルを用いて詳細に解析することである。聴覚は内耳蝸牛による音刺激の感知と脳への神経伝達によって行なわれ、関連する遺伝子の突然変異は遺伝性難聴を引き起こす。500~1,000 人の新生児に一人は聴力に問題があるとされ、そのうち半数以上の原因が遺伝子変異である。難聴遺伝子検査は本邦で保険収載されているが原因判明率は 3~4 割にとどまる。私たちはこの診断効率を高めるため、新規難聴遺伝子同定を目的とし、全遺伝子(エクソーム)解析その他の解析も含め、新規難聴遺伝子候補 Slc12a2 を 4 家系で同定し、発表してきた(Mutai et al., 2020 PlosGenet)。本遺伝子はNa+、K+、2Cl-共輸送体として、蝸牛内リンパ液組成の恒常性維持に必須であることが知られる。4 変異はいずれも特定のエクソン領域に集中し(図)、その一つはエクソンをスキップした転写産物を発現させる変異であった。興味深いことにこのエクソンスキップ型転写産物は脳では内在性に発現するが蝸牛では強く抑制されている。また各変異を導入した変異体のイオン輸送能は有意に低下していた。本研究ではモデルマウスの聴力等の表現型解析を実施した。また、遺伝子の組織特異的スプライシング調節機構の解析実験を立案し、実験系の確立に成功したので報告する。

【方法】第一に、CRSPR-Cas9 ゲノム編集技術を用いて作出した *Slc12a2* 変異導入マウスより 2 系統を選択し、 聴力等の表現型を解析した。第二に、エクソン 21 組織特異的スプライシングのメカニズムの検証とエクソン 21 スキップ阻害剤の薬剤スクリーニングに有用な、ルシフェラーゼレポーターを用いたスプライシング活性アッセイ系を 構築し、細胞培養系によりその有用性を検討した。

【結果】第一に、A:エクソン 21 のスキップを引き起こすと考えられる、難聴患者と等価と予想される変異を持つマウス、および B:エクソン 21 のスキップまたは遺伝子機能消失をもたらすと考えられる、エクソン 21 中フレームシフト変異を持つマウスの計2系統を選択した。Aマウス系統は繁殖効率が非常に低く、現在解析を続行中である。Bマウスは変異ホモマウスで聴性脳幹反応の閾値の著しい上昇がみられ、また前庭機能障害に特徴的な行動異常が観察された。この表現型は従来報告されていた Slc12a2 欠損マウスの報告とほぼ同等であった。第二に、レポーター遺伝子ルシフェラーゼ中に人工的に Slc12a2 のイントロン 20 全長約 2.5 kb を挿入した発現ベクターの構築に成功した。これが実際にスプライシングにより、正常ルシフェラーゼと同等な活性をもつルシフェラーゼが発現すること、難聴患者で同定された変異を持つイントロン 20 存在下ではルシフェラーゼ活性が 100 分の 1 以下に低下することを確認した。本遺伝子の組織特異的スプライシングのメカニズムを解析するための有用なツールが開発されたのみならず、当該変異を原因とする難聴の治療薬候補のハイスループット・スクリーニングアッセイ系構築への重要な進展が達成された。

SLC12A2 タンパク質模式図と病的変異のエクソン 21 への集積



# 69 オルガノイドモデルを用いた肉腫肺転移メカニズム解明

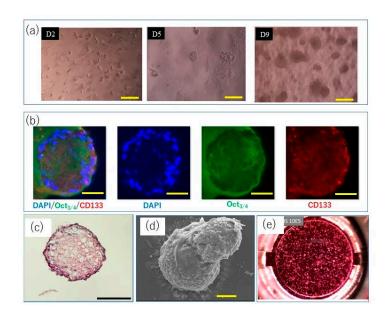
松峯 昭彦

【目的】肉腫は、骨や軟部組織などの中胚葉由来の組織から発生する悪性腫瘍である。抗がん剤治療の導入により生命予後は改善したが、40%の症例は多発肺転移を来し、これらの症例に対する有効な治療薬の研究開発が進んでいない。肉腫は希少疾患であり、多数の臨床サンプルを用いた解析が困難であるが大きな問題であるが、単層培養では再現できない肉腫細胞を取り巻く微小環境の解析が、肉腫進展・転移の解明には必要である。近年、「自己複製能」と「多分化能」「薬剤抵抗性」などの性質を有する"がん幹細胞"の存在が明らかとなっている。肉腫においてもいくつかの報告はあるが、科学的根拠に根ざした報告は少ない。肉腫の発生・進展、転移のメカニズムを解明し、治療薬を開発するためには肉腫幹細胞の分離・同定が必要である。一方、多能性幹細胞や生検サンプルからの細胞を利用したオルガノイド研究が盛んになってきた。オルガノイドモデルは、細胞を3次元培養することにより得られる人為的に創出された組織体であり、解剖学的・機能的に生体に近い特徴を示す。2次元単層培養の肉腫細胞株が、多様性に富む真の肉腫の姿をmimic していないことから、肉腫治療薬の開発のためには、肉腫の微小環境を再現した3次元肉腫オルガノイドモデルの確立が必要である。骨肉腫幹細胞から誘導した骨肉腫オルガノイドを用いて、骨肉腫の進展・肺転移成立のメカニズムを明らかにするとともに、治療薬の開発を行うことがこの研究の目的である。

【方法】生検の際に採取したヒト肉腫細胞とマウス骨肉腫細胞株を用いて、スフェロイド形成能を指標に幹細胞と考えられる細胞集団の同定を行い、同定した細胞集団における *Oct3/4、CD133、Nanog* など幹細胞マーカー遺伝子の発現の確認を real-time PCR および免疫染色で行った。そして、スフェロイドの形態の確認を行ったうえで、同定した骨肉腫幹細胞の骨分化刺激因子(IGF-2、BMP、FGF)での分化能を確認した。さらに骨肉腫幹細胞のマウスでの造腫瘍性を確認した。

【結果】マウス肉腫細胞株 LM8 から骨肉腫幹細胞と考えられる細胞集団を分離した。この細胞集団の遺伝子発現解析を行ったところ、Oct3/4、CD133、Nanog など幹細胞マーカー遺伝子が強く発現することが確認できた。また、ニッチ刺激因子(IGF・2、BMP、FGF)で刺激したところ、骨形成を伴いつつ骨肉腫様に分化することが明らかとなった。さらに、この骨肉腫幹細胞 100 細胞をマウス背部皮下に移植したところ、少ない細胞数にもかかわらず、腫瘤を形成することがわかった。以上のことから我々は、骨肉腫幹細胞を同定できたと考えている。骨肉腫幹細胞から誘導した骨肉腫 Organoid を用いて、骨肉腫の進展・肺転移成立のメカニズムを明らかにするとともに、治療薬の開発につなげたいと考えている。

#### マウス骨肉腫細胞株 LM8 の肉腫幹細胞の Characterization



# 70 骨粗鬆症性軟骨下脆弱性骨折の病態解析と予防法の構築

山本 卓明

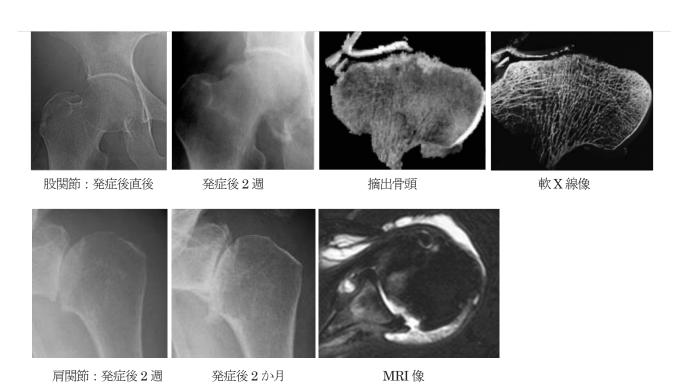
【目的】我が国は高齢化の進行に伴い、骨粗鬆症の患者数も増加の一途を辿り、既に 1,100 万人を超えている。この骨粗鬆症により招来される骨折は、脊椎椎体、大腿骨、前腕骨がよく知られている。しかし、これらの骨折に加え、関節内の軟骨下にも脆弱性骨折が発生し、さらにその一部は予後不良で関節破壊を来すことがわかってきた。そこで、本研究は、関節内に発生する軟骨下脆弱性骨折(subchondral insufficiency fracture: SIF)のうち、特に股関節、肩関節内に発生した症例を中心にその病態と予後規定因子を多角的に解析することである。

【方法】股関節については、人工股関節置換術を施行され、病理組織学的にSIFと診断された症例のうち、発症直後と手術直前の経時的レントゲン変化の検討が可能であった 13 大腿骨頭を対象とした。内訳は、男性 2 例、女性 11 例、年齢は 59~78 歳(平均年齢 68 歳)であった。肩関節については、当科において SIFと診断され、急速な関節破壊を呈した 2 症例について臨床像、画像所見、病理像を検討した。病理組織学的には、摘出骨頭標本はホルマリン固定・脱灰の後、H.E 染色を行った。SIF の病理診断は、骨折線とその周囲に仮骨・肉芽組織が認められるものとした。

【結果】股関節では、13 例全例において発症後 6 カ月以内に骨頭外側を中心に圧潰変形を来していた。発症から手術までの期間は、 $1\sim9$  ヵ月(平均 5.6 ヵ月)であった(下図)。関節裂隙は  $0.4\sim2.0$  mm/month(平均 0.7 mm/month)の速さで急速に狭小化していた。病理組織学的には、骨折像に加え、骨軟骨破壊産物を含む肉芽腫性病変を全例に認め、さらに関節軟骨の破砕片も骨髄内に認められた。関節軟骨は荷重部を中心に非薄化していたが、それ以外の部位では保たれており chondrolysis の所見は認めなかった。また、crystal deposition の所見も認めなかった。

肩関節においては、二例の急速破壊例の SIF が見出された。肩関節における SIF は股関節と同様、骨粗鬆症を有する高齢女性にみられた。初診時 X 線検査で crescent sign を認める例や骨頭形態は保たれているが軽度下方転位を認めた。また、初診時には異常なく経過中に骨頭圧潰が生じ、急速な関節裂隙の狭小化を伴いながら骨頭とともに関節窩にも破壊が生じており、わずか 2 ヵ月間で関節破壊が急速に進行していた(下図)。

#### 股関節、肩関節における急速な関節破壊を来した症例



#### 71 遺伝子改変霊長類を用いた老化促進病態の解明と応用

横手 幸太郎

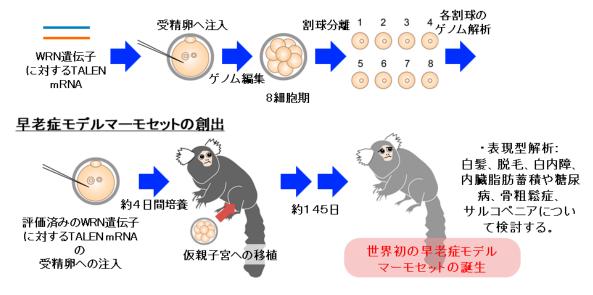
【目的】ヒトには、遺伝的早老症と呼ばれる疾患群があり、白髪・脱毛や白内障、皮膚の萎縮など、各種の老化症候が 暦年齢に比べて早発し促進されることが知られている。中でも常染色体劣性遺伝の Werner 症候群(以下、WS と略) は、成人期に老化が促進される accelerated aging syndrome の代表であり、糖尿病や動脈硬化、骨髄異形成症候群な ど、一般集団でも加齢とともに好発する疾病を早期から高頻度に合併する。したがって、WS の病態解明は、この難病 に革新的治療法をもたらすのみならず、ヒト老化機序全般の理解や介入手法開発に大きな手掛かりを与えると期待され ている。本疾患は、RecQ型 DNA ヘリケース WRN の遺伝子変異を原因とすることが示されているものの、そのノッ クアウト(KO)マウスは何ら早老形質を示さないため、齧歯類をはじめ病態解明研究に用いることのできる動物モデ ルが存在しない。ところが、近年のゲノム編集技術を用い、非ヒト霊長類マーモセットの遺伝子を改変して KO モデル を作製することが日本国内で可能となった。そこで我々は、WRN遺伝子を欠損した老化促進マーモセットモデルを世 界に先駆けて開発、その形質と分子病態を解明することを研究の目的とした。

【方法】ヒト/マーモセット共通配列を標的とした WRN TALEN を設計し、その活性を *in vitro* および *in vivo* で検証、マーモセット受精卵への TALEN mRNA 注入と割球におけるゲノム解析を行うとともに、移植へ向けたゲノム編集受精卵の作製と仮親マーモセットの準備を行った。

【結果】マーモセット WRN遺伝子のノックアウトを目的として、Exon 2、3 を標的とした TALEN をそれぞれ2 セットずつ設計した。構築した WRN TALENs を HEK293T 細胞にトランスフェクションし、48 時間後に回収して遺伝子の変異解析を行ったところ、2 種類の TALEN Ex2A および Ex3A が高活性を示すことが分かった。続いて、TALEN mRNA をマーモセットの受精卵へ注入し、8 細胞期において割球を分離、Surveyor アッセイと sequence 解析でゲノム解析を実施した結果、Ex2A に WRN遺伝子の編集が確認された。すなわち、WRNExon2 に対する TALEN を用いることで、高効率・低毒性のゲノム編集ツールの開発を完了できたと考えられる。2020 年 4 月現在、新型コロナウイルス感染症の影響により研究遂行に制約があるものの、実験動物中央研究所との連携を通じて、移植用ゲノム編集受精卵の作製と移植対象となる仮親マーモセットの準備を進めている。研究再開の暁には、仮親子宮への受精卵移植を実施し、個体を得て、その表現型解析を実施する計画である。

WRN遺伝子ノックアウトマーモセットの作製と解析を通じた老化病態の解明

# ゲノム編集ツールの開発とその評価



#### 72 超高感度X線検出で実現する低被ばく高先鋭なX線CT

有元 誠

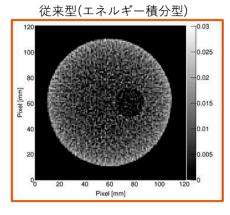
【目的】 X 線コンピュータ断層撮影 (X 線 CT) は、人体にメスをいれることなく、人体内部の 3 次元構造を可視化できる現代医療の根幹を支える技術である。その多大なメリットの一方で、1 回あたりの CT 撮影による患者の被ばく線量は~10 mSv (年間の自然放射線量の 5 倍以上) におよび、患者への負担が大きい。その高線量の理由として、X 線 CT の基礎となる X 線センサーに半導体検出器であるフォトダイオードが用いられていることが挙げられる。フォトダイオードは、センサー固有のノイズが高いことに加え、信号の増幅機能を持っていないため、X 線信号を有意に検出するために大量の X 線照射が必要となる。加えて X 線信号を積算して取得しているため、個々の X 線エネルギー情報が失われ、CT 画像が不鮮明になる問題があった。そこで上記の課題を解決するために本研究では従来 CT 装置で用いられていたフォトダイオードに代わり、高い信号増幅率 (~106) を持つ次世代半導体素子マルチピクセルフォトンカウンター (MPPC) を採用する。これにより、非常に高い感度で個々の X 線を検出し、劇的な低被ばく化と画像の先鋭化を両立した次世代 X 線 CT の基礎となる科学計測技術を構築することを目的とする。特に本研究では、独自に開発した X 線 CT アレーを用いて、低被ばく化の効果を定量化および画像先鋭化による物質弁別を検証する。さらに小動物イメージングを目指した、大面積をカバーする新たな X 線 CT システムの構築を行う。

【方法】MPPC アレーと高速シンチレータアレー(YGAG)を組み合わせ、これを X 線 CT アレーとした。またこのアレーには、X 線発生装置から非常に高いカウントレートで X 線光子(>10 MHz/mm²)が入射するため、高速での信号処理が必須となる。そこで、この X 線信号の高速処理を実現する大規模集積回路を新たに開発した。これらを組み合わせて本研究で提唱する光子計数型 CT 装置を実現し、様々なターゲットの CT イメージを取得した。【結果】低被ばく化の実現性という観点で、軟部組織を模した水とアルコールをターゲットとして、従来 CT 装置を模擬した電流積分型イメージと、光子計数モードでのイメージを取得した(図)。そのイメージを定量的に比較したところ、~100 倍の低被ばく化を達成できることを見出した。さらにこの高感度化したシステムを用いて、人体に投与される薬剤としてよく用いられる造影剤(ヨードやガドリニウム)のイメージングを実施し、従来 CT システムでは不可能だった濃度推定を実現する結果を得た。また我々の初期の試作装置では、取得できるエネルギー情報に誤差が生じるなど様々な課題があった。そこで、この課題を克服した機能を有し、かつ小動物実験でも応用可能な大面積のイメージ領域をカバーできる CT 装置の開発を行い、さらに高い精度での造影剤の濃度推定を行うことに成功した。

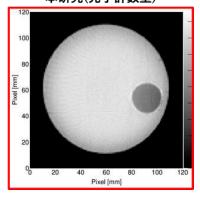
軟部組織を模した水とアルコールのターゲット(左)、 従来型 CT(中)と本研究方式(右)で得られた CT 画像の比較

ターゲット: 水とアルコール





本研究(光子計数型)



# 73 Collagen嵌合現象を応用したLaser組織接合機開発-研究

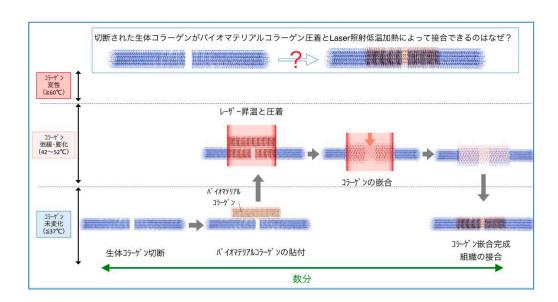
池田 哲夫

【目的】1. 組織コラーゲン嵌合のための至適温度と照射範囲を色の変化で感知するカラーレギュレート方式 Laser 照射装置を開発する。2. ex vivo で実証した生体コラーゲン分子の嵌合現象(interdigitation)を応用した動脈接合技術を、in vivo(大動物実験)で検証し臨床応用へ繋げる。

【方法】全身麻酔科にビーグル犬の両側大腿動脈を露出させ、横軸方向に 1/3 周の全層切開を加えた。両側大腿動脈の内、片側を 7-0 prolene にて縫合閉鎖、他側をバイオマテリアルコラーゲンを添付しテフロンフィルムで周囲を覆い圧着した。照射する切開部の温度を放射温度計で同時計測し、3 秒間  $42\sim52^{\circ}$ Cが出来るようにコンピュータ制御された波長  $1,940\,\mathrm{nm}$  のファイバーレーザーをコラーゲン被覆された切断部に照射した。止血を確認し閉創した。予備実験の 2 頭のみ、翌日大腿動脈の開存の有無などを確認し両側の接合部を病理標本として摘出し、本実験の 5 頭は 14 日後に同様に確認し摘出した。

【結果】7 頭全例でコラーゲン嵌合閉鎖および縫合閉鎖に成功した。予備実験の2 頭は翌日まで本実験の5 頭は術後14 日目まで出血などの併発症を認めず、動脈の開存をドプラー血流計で確認した後に、標本として吻合部を摘出した。

Laser 照射低温加熱によるバイオマテリアルコラーゲンをブリッジとした生体コラーゲン接合技術の原理



梅村 将就

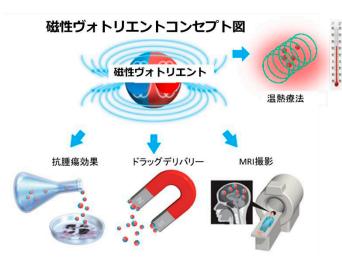
【目的】我々は先行研究により確立した「医薬品の薬効成分の磁性化技術」により、市販医薬品であるヴォトリエントの磁性化に成功した(以後、磁性ヴォトリエントと呼ぶ)。先行実験において磁性ヴォトリエントに磁性があること、悪性軟部腫瘍の培養細胞(HS-SY-Ⅱ)に対して、強い抗腫瘍効果を示すことはすでに確認済である。そこで、ヴォトリエントが磁性化する前と同じ薬効や性質を持っているかの確認を行う。また、骨肉腫動物モデルを用いて、磁石付ジャケット(磁気サポーター)を使用して磁石によるドラッグデリバリーを行うことで腫瘍部での磁性ヴォトリエントの集積を高め、より高い治療効果が得られることを確認する。

【方法】1. ヴォトリエントが磁性化されたことから、交流磁場を印加することで薬剤自体が熱を発するかについて検討した(IH クッキングヒーターの原理)。2. ヴォトリエントは Extracellular Signal-regulated Kinase(ERK)のリン酸化を抑制するという報告があるため、磁性ヴォトリエントも磁性化された後も市販のヴォトリエントと同じ性質を保持できているかをウエスタンブロッティングで確認した。3. 磁性ヴォトリエントを MRI で撮影し、画像による視覚化が可能かどうかを確認した。4. 骨肉腫動物モデルを用いて、磁石付ジャケット(磁気サポーター)を使用することで、磁場により薬剤を集積させ、実際に腫瘍内の磁性ヴォトリエントの薬剤濃度を高めることができ、より高い治療効果が得られるかを確認した。

【結果】1. 交流磁場印加前は薬剤の温度は23.3℃だったのが、交流磁場を印加することで、IH クッキングヒーターの原理で、磁性ヴォトリエント自体が発熱することで交流磁場印加20分後には38.2℃まで上昇した。その後、60分間観察したが、温度は38.2℃からプラトーを示し、変化は認めなかった。2. 磁性ヴォトリエントは市販のヴォトリエントと同様に、ERKのリン酸化を抑制した。3. 磁性ヴォトリエントはMRIの撮像により、T2強調画像で濃度依存的に低信号を示した。4. 悪性軟部腫瘍内の磁性ヴォトリエントの集積有無の評価は、磁性ヴォトリエントの磁性が弱いのか、磁石付きのジャケットでの集積が弱いのかは不明だが、コントロールと比較し、より集積している結果は得られなかった。

磁性ヴォトリエントコンセプト図





# 75 分子機能を集積したDNAデバイスによる細胞機能の制御

遠藤 政幸

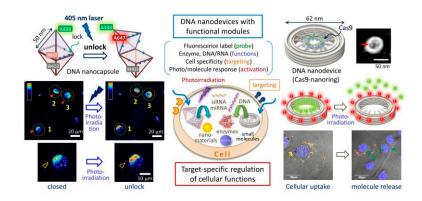
【目的】細胞選択的な分子デリバリーシステムと遺伝子発現など細胞機能の制御は、癌治療・診断などの医療応用につながる重要な技術であり、薬物のデリバリーや細胞に対する機能制御の基礎研究がなされてきている。本研究では、DNAから設計・作製したナノスケールの構造体「DNAオリガミ」を用いて、目的に応じた機能を集積したDNAナノデバイスを開発し、細胞機能の制御から細胞標的型の分子デリバリーと生体への応用まで視野に入れた新たな汎用性のある技術を創出する。DNAによって開閉可能なカプセル状あるいはリング状の3次元ナノ構造体を設計・作製し、細胞機能の制御に関連する生体分子や細胞選択的な標的結合分子を機能モジュールとして構造体に集積し、細胞侵入後に外部からの操作や内在性の分子に応答して自律的に起動する「分子機能を集積したDNAデバイス」を構築する。

【方法】DNA オリガミ構造体の設計と構築技術を利用し、光応答性を持つ八面体 DNA オリガミナノ構造体 (ナノカプセル) 及びリング状の 3 次元構造体 (ナノリング) を設計した。40 nm 程度の内部空間を持つナノカプセルは、2 つの四角錐構造から作製し、光開裂する DNA 鎖を導入することで光照射により開口できるように設計した。また、ナノリングには Cas9、光開裂性 DNA 鎖、蛍光ラベルを自己集合によって集積した。これらのナノデバイスの機能を確認後、細胞に導入し、細胞内での構造体の光照射による開口操作や機能発現を行い共焦点顕微鏡による観察を行った。

【結果】1. 光応答性 DNA ナノカプセルの細胞への導入と細胞選択的な開口操作: 光照射によるナノカプセル構造体の開口は蛍光検出及び AFM 観察により確認した。作製したナノカプセルは正常ヒト表皮角化細胞(NHEK)へ導入し、光照射による細胞内での開口操作を行った(図左)。光応答性ナノカプセルを培地に加え、細胞内に取り込まれることを確認した。さらに、細胞導入後、個々の細胞へのレーザー照射(405 nm)を行い、細胞内での選択的なDNA ナノカプセルの開口を共焦点顕微鏡により観察した。この結果、光照射後にナノカプセルの開口に由来する蛍光強度(Alexa647)の増加が見られた(図左下)。このように、光応答性ナノカプセルの細胞導入と光照射によるカプセルの選択的な開口を細胞内で操作でき、1 細胞レベルでも操作することに成功した。2. 光応答性 DNA ナノリングの機能化と細胞への導入:機能性ナノデバイスは、自己集合させた DNA ナノリング内側に光開裂する相補鎖 DNA を導入し、それに相補的な RNA 鎖を持つ Cas9 を結合し作製した(図右上と AFM 画像)。精製後、Cas9 を導入したナノデバイスからは光照射による Cas9 の放出が観察され、それに伴う基質 DNA 鎖の配列選択的な切断が確認された。次に、蛍光ラベルしたナノデバイスの細胞への導入を行った。ナノリングの外側に蛍光ラベル(Alexa647)した相補鎖 DNA、内側に光切断可能な DNA 鎖と蛍光色素(Alexa488)を導入したナノデバイスを作製し MCF-7 細胞へ導入した。UV 光照射により細胞内でのナノデバイスからの分子の放出が確認された(図右下)。

これからの結果から、DNA の自己集合のみを用いて、分子機能を集積化した DNA ナノデバイスを作製し、その機能をモジュール的に入れ替える新たな分子技術を開発した。蛍光ラベルやリガンドなどの機能性分子、細胞機能の制御に必要な酵素、光切断に必要な DNA 鎖などをモジュールとして導入可能であり、光照射による分子の放出や活性化など作製した DNA ナノデバイスの機能を発現できる系の構築に成功した。

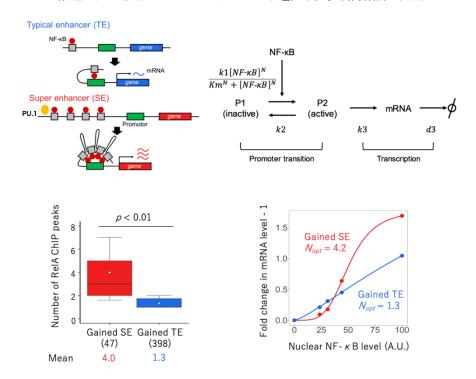
ナノカプセル(左)とナノリング(右)構造体を機能化したナノデバイスによる 分子デリバリーシステムと細胞内での操作



【目的】本研究では、細胞核内のクロマチン状態の変化と、それに連動して起こる細胞の不可逆な遷移過程をデータ 駆動的に捕捉することにより、細胞個性獲得のための分子制御機構を明らかにすることを目指す。クロマチン状態、 転写因子結合、エンハンサー活性、遺伝子発現の定量的関係を明らかにし、数理モデル化することにより、さまざまな 疾患解明に応用可能な数理情報基盤を構築する。

【方法】免疫 B 細胞の分化における NF  $\kappa B$  の転写制御を対象とし、エンハンサーと呼ばれる遺伝子の制御領域と その標的遺伝子発現との関係に注目した情報統合解析を行った。マウス脾臓から B 細胞を単離し、anti-IgM 刺激有無 の条件下で、細胞試料を作製した。Super enhancer (SE) と Typical enhancer (TE) というタイプの異なる エンハンサーの同定を目的とした H3K27ac 免疫沈降シーケンス (acetylated histone H3 lysine 27 ChIP-seq)、 NF-κB (RelA) の DNA 結合領域を同定するための RelA ChIP-seq、クロマチン開口領域を同定するための ATAC-seq (an assay for transposase-accessible chromatin through sequencing) を行った。さらに、エンハンサーの 標的遺伝子の発現量を求めるために、一細胞 RNA シーケンス (RamDA-seq) を行った。これらの次世代シーケンス データをもとに、統合情報解析を行った。抗原刺激前後での SE および TE における各シグナルの定量的比較、 クロマチン開口領域のモチーフ解析による SE と TE に特徴的な結合転写因子の予測を行った。最終的に、 エンハンサーのクロマチン開口領域における NF-κB 結合数と各遺伝子発現量の関係を数理モデルを用いて解析した。 【結果】H3K27ac データにより、SE および TE を同定し、この情報統合解析を行ったところ、SE において、 クロマチン開口、NF-  $\kappa$  B 結合が連動して起こり、遺伝子発現を高く、また閾値様に誘導することが明らかになった。 さらに、このデータを定量的に解析することにより、 ${f SE}$  と  ${f TE}$  の違いは、 ${f DNA}$  の長さとそれに伴う  ${f NF}$   $\kappa\, {f B}$  結合数 の増加にあることがわかった。詳細な解析により、DNA の長さは遺伝子の倍数変化に影響し、NF $\kappa$ B の結合数は、 閾値変化に重要であることがわかった。また、モチーフ解析の結果から、この閾値応答には、パイオニア因子 PU.1 と NF- κ B の共在が重要であることがわかった。SE により発現誘導される遺伝子のひとつに免疫細胞分化に重要な 転写因子 IRF4 が見出されたことから、SE を介した転写因子の発現の時間発展が、細胞の不可逆的遷移に関与する ことが示唆された。

# 数理モデルを用いたエンハンサーによる遺伝子発現制御機構の同定



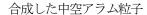
# 77 バイオと微粒子合成技術の融合によるアジュバント開発

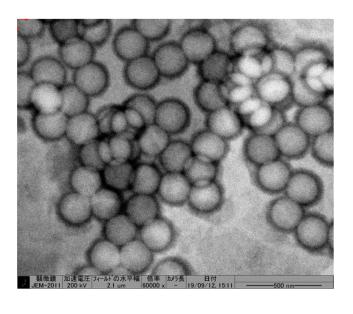
タンパク質を用いてタグの効果を確認したい。

黒田 章夫

【目的】アジュバントとは、免疫反応を促進する物質である。アルミニウム塩の無機粒子(アラム)からなるアラムアジュバントは約 100 年前に開発され、多くの命を救ってきた。最近では感染症の枠を超え、ガンなどの治療に広がってきている。しかし、アラムアジュバントの欠点は、1. 抗原によってはアラム粒子に結合せず、免疫細胞に届ける前に抗原が分解される場合があること、2. 溶け出したアルミニウムの毒性の負の側面が存在することである。効率的で安全なアジュバント技術は今後の免疫療法の「鍵」とされている。本研究では、その欠点を克服するために、1. 「アラム粒子に結合するペプチド」によって任意の抗原をアラム粒子に結合させる技術(アラムタグ法)を開発すること、2. 「微粒子のナノ構造化技術」によって中空構造を持つアラム粒子を合成し、アルミニウムの含量を低下させてその毒性を低減することである。これまでになかった無機とバイオの融合により、アラムアジュバントの効率性と安全性を高め、人類の健康に資することを目的とする。

【方法】0.2 μ m のポリスチレン粒子をテンプレートとして水酸化アルミニウムを粒子表面で析出させた。その後ポリスチレンをトルエンで除去することで中空の水酸化アルミニウム粒子を作製した。また、ヒト単球白血病細胞株 THP-1 の細胞破砕液とアラム粒子を混合して、結合するタンパク質の同定を行った。さらに結合するタンパク質をフラグメント化し、結合部位を同定した。アラム粒子に結合するアラムタグと B 群連鎖球菌のタイプⅢの莢膜多糖体の保護エピトープの構造を模倣するペプチドの融合したペプチドを作製し、マウス (BALB/c、各 5 個体) に免疫した。 【結果】塩化アルミニウム水溶液にポリスチレン粒子を分散させ、ローテーターで混合しながら徐々にアンモニア水を添加することで、ポリスチレン粒子テンプレートの周囲に水酸化アルミニウムが合成された。トルエンでポリスチレン粒子を取り除いた結果、内径 200 nm の中空の水酸化アルミニウム粒子が合成できた。ヒト単球白血病細胞株 THP-1 の細胞破砕液から、アラム粒子に結合するタンパク質のスクリーニングを行った。その結果、Myosin-9,10、actin、Histone H2B の 4 つのアラム粒子結合お少パク質を同定することができた。次に、最も分子量の小さい Histone H2B タンパク質を用いてアラム粒子結合部位の同定を行った。その結果、KKAVTKAQKKDGKKRK の中にアラム粒子と強く結合する配列が存在すると考えられ、これをアラムタグとした。アラムタグを融合した抗体ペプチド (S9p-AlumTag) とアラム粒子を混合し、マウスに免疫して、抗 S9p 抗体 (IgG) の産生量を評価した。比較として、抗原ペプチド (S9p) のみとアラム粒子の混合体を用いることで、アラムタグの効果を検討した。しかしながら、抗 S9p 抗体の産生は認められず、現状ではアラムタグの効果が確認できていない。今後、抗原の分子量を大きくした





# 78 近赤外蛍光色素導入ベタイン型ポリマープローブの創製

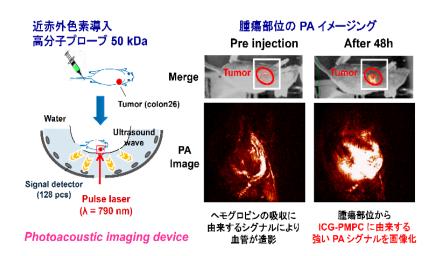
近藤 輝幸

【目的】新しい生体イメージング法として、光イメージング法と超音波イメージング法とを融合した新しい "光音響イメージング法" (Photoacoustic Imaging: PAI) が、臨床現場から期待されている。光音響現象は、1880 年に Bell が通信手段の応用研究の中で発見した現象であり、その原理は、励起光を照射した光吸収体が熱膨張する際に 発生する光音響波(粗密波)を超音波として観測する技術である。近年のレーザー光源の小型化と超音波検出素子の高性能化により、生体への応用が現実味を帯びている(Nature 2010 Feb 17;463(7283):977-80)。

多くの腫瘍において、著しい速度で増大する新生血管を PAI で 3D 画像化できれば、乳癌、甲状腺癌、前立腺癌等の比較的体表に近い癌の早期診断が可能になると考えられた。しかしながら、腫瘍内の新生血管は極めて細く、PAI に必要なヘモグロビン量が圧倒的に不足していることが分かってきた。従って、PET や MRI と同様、PAI に適した新しい分子プローブの創製が急務である。本研究では、我々のこれまでの研究成果に基づき(J. Am. Chem. Soc. 2015 Jan 21:137(2):799-806)、PAI に有効な新しい「近赤外蛍光色素導入ベタイン型ポリマープローブ」を開発する独創的、学術的、および臨床的意義の高い研究を行った。

【方法】2-methacryloyloxyethylphosphorylcholine (MPC) の原子移動ラジカル重合 (ATRP) により、末端に アミノ基を有する H<sub>2</sub>N-PMPC を合成した。臨床応用されているインドシアニングリーン (ICG)、およびシアニン 骨格を有し、親水性に優れた近赤外蛍光色素(Cy7、IRDye®800RS、IRDye®800CW)のスクシンイミジル誘導体と H<sub>2</sub>N-PMPC との縮合反応により、4種類の新しい近赤外蛍光色素導入ベタイン型ポリマープローブ (ICG-PMPC) Cv7-PMPC、800RS-PMPC、800CW-PMPC)を合成した。新規ポリマープローブの粒径と表面電位は、動的 光散乱法 (DLS) により測定するとともに、透過型電子顕微鏡 (TEM) 画像と比較した。また、水晶発振子マイクロ バランス (QCM) 法により、4 種類の NIR-PMPC と BSA との相互作用について評価した。 さらに、マウス由来の 大腸癌細胞 (colon26) を右肩皮下に移植した表層担癌モデルマウスに、4 種類の NIR-PMPC をそれぞれ尾静脈投与 (20 nmol/mouse) し、48 時間後まで経時的に in vivo 蛍光/光音響イメージングを行い、体内動態を明らかにした。 【結果】本研究では、腫瘍の in vivo 光音響イメージングに有効な概念的に新しい近赤外蛍光色素導入ベタイン型 ポリマープローブ (NIR-PMPC) の開発に成功した。PMPC の末端に導入した近赤外蛍光色素の疎水性/親水性が、 NIR-PMPC プローブの粒径、生体適合性、および腫瘍集積性に顕著な影響を与えることを見出した。合成した4種類 の NIR-PMPC の内、特に、800RS-PMPC を、微小癌を担癌したモデルマウスに尾静脈投与し、in vivo PAI を 行った結果、800RS-PMPC プローブが微小癌に高集積した明瞭な PAI 画像が得られた (下図)。以上の結果から、 本研究では、近赤外蛍光色素導入ベタイン型ポリマープローブ (NIR-PMPC) を用いる光音響イメージング法が、 生体深部の微小癌の早期診断に極めて有効であることを明らかにした。

800RS-PMPC プローブを用いた担癌マウスの腫瘍部位選択的 PAI 画像



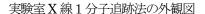
## 79 X線1分子動画からの蛋白質凝集疾患早期診断技術開発

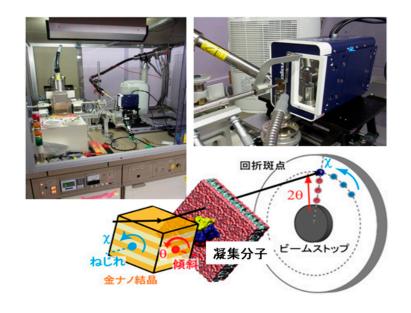
佐々木 裕次

【目的】疾病で注目されている多くの天然変性タンパク質分子(Intrinsically Disordered Protein: IDP)を対象にできる実験室レベルの X 線 1 分子計測を実現し、より臨床的高感度 1 分子評価装置に近づけることのできる 1 分子評価技術の確立を目指した。そして、時分割性ピコメートル微小構造変化検出できる X線 1 分子評価装置を実験室 X線光源によって高精度のデータがとれることを実現した。

【方法】計測原理であるX線 1 分子追跡法 Diffracted X-ray Tracking: DXT は、今までは、大型放射光施設が必要であったが、実験室光源を用いて分子内部運動を検出できるように改良した。回折 X 線の明滅現象を発見・利用することで、実験室光源を用いて高感度に分子動態検出を行った。また、得られたビックデータを効率的に処理できるシステムも確立させることができた。

【結果】タウタンパク質分子の動態 1 次元ヒストグラムやボックスプロットの結果から、天然状態 WT よりも 疑似リン酸化した Thr205 と Thr231 の両方を変異導入した分子の硬化が一番激しかった。これは放射光施設を使った 実験結果と矛盾しない結果であった。今回表記したデータは 100 ミリ秒の時分割計測の結果だけであるが、他の時間軸 のデータも測定した。その結果、今回明確化した 100 ミリ秒の動態変化の差異は、500 ミリ秒や 1 秒時分割では 確認出来なかったことより、かなり時間依存性がある動態変化であることが明確化された。





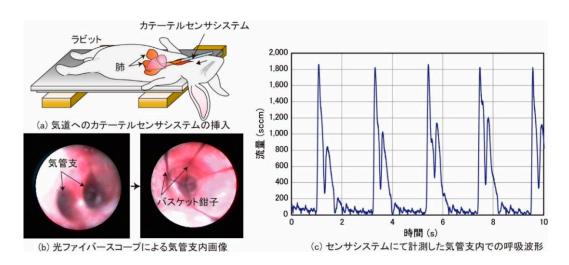
式田 光宏

【目的】現在、COPD(慢性閉塞性肺疾患)が急激な増加傾向にあり、"取り残された生活習慣病"と言われている。一般に、慢性呼吸器疾患に対しては、スパイロメトリー、胸部単純 X 線、X 線 CT などの検査方法が用いられるが、いずれも末梢気道における呼吸量を直接的かつ定量的に明らかにすることは難しい。すなわち、現在、病変部位となる末梢気道での十分な工学的計測手法は確立しておらず、末梢気道は別名「サイレントゾーン」と呼ばれ、現代医学でも未解明の領域とされている。一方、生体内という限られた空間内にて、かつ低侵襲で生体情報を計測することを目的して、機械・電気システムの微小化が可能な MEMS(Micro Electro Mechanical Systems)技術の医療への応用展開が 90 年代前半から着目されている。以上のような社会的背景から、本研究では生体内での極限計測を可能とする最先端の MEMS 技術を呼吸計測へと展開し、肺内部、すなわち病変部近傍での呼吸を定量的に計測評価できる「肺内部での局所的な総合的呼吸計測システム技術」の実現を目的とした。

【方法】医療用バスケット鉗子とチューブ状呼吸計測用流量センサとをタンデム実装し、バスケットの開閉を利用してセンサを気道内に位置決め固定し、気管支での呼吸計測を可能とするカテーテルセンサシステムを開発した。MEMS技術を駆使することで、厚さ数 $\mu$  m のパリレンフィルム上に熱線流速計として機能する金属製細線ヒータを形成し、これをフィルム転写技術にてチューブ外壁面に実装した。その後、フィルム周辺部と電気的配線部を熱収縮チューブで固定しチューブ状呼吸計測用流量センサを作製した。なお、時々刻々流れの向きと流量が変化する呼吸計測に対応すべく、熱線流速計周辺部に熱絶縁構造を設け、熱式センサの応答性を向上させた。

【結果】バスケット鉗子一体型呼吸用流量センサの動作特性を評価し校正曲線( $V^2 = 0.488 + 0.175 \ u^{081}$ )を求めた。ただし、Vはヒータ駆動電圧、uは管内平均流速である。なお、管内流量については上記校正曲線の式に管内断面積を乗ずることで求めた。また、ステップ状の流れに対する応答波形からセンサの応答が  $60 \ ms$  であることを確認した。一般的にヒトの呼吸周期が  $3.3 \ s$ 、実験動物(ラビットの場合)のそれは  $1.0 \sim 2.0 \ s$  であることから、これらの呼吸計測に対して本呼吸計測用センサが十分な時間的追従性を有していると判断した。そしてバスケット鉗子一体型呼吸用流量センサと細径光ファイバースコープとを一つのチューブ内にタンデム実装したカテーテルセンサシステムを構築しそれをラビットに適用した。具体的には、光ファイバースコープで得られた画像をもとにファイバースコープとチューブを肺内部の気道内へ挿入した後、気道が気管支に分岐する手間でバスケット鉗子一体型呼吸計測用流量センサをチューブから気道内へと取り出した。そしてバスケット鉗子を拡張しバスケット鉗子一体型呼吸用流量センサを気道内に固定し気道内でのその場呼吸を計測し、ラビットの生理値と同程度の呼吸周期  $1.08 \ s$  を得ることができた。また上記カテーテルセンサシステム開発と並行して、それの次なるステップ技術として、フレキシブル基板上での呼吸用流量センサと信号処理回路との一体化、ステントー体型呼吸用流量センサの二つの要素技術も併せて開発した。

#### カテーテルセンサシステムによるラビットの気道内におけるその場画像および流量計測



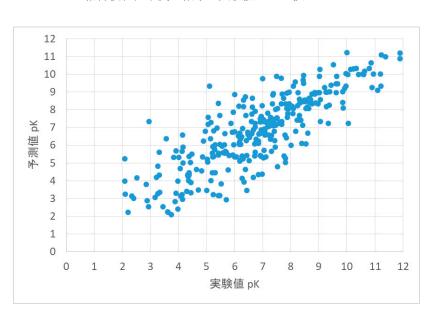
# 81 深層学習を用いたタンパク質-リガンド結合親和性予測

清水 謙多郎

【目的】タンパク質とリガンド(低分子化合物)の結合親和性(affinity)の解析は、薬剤および有用酵素の設計において、基盤となる重要な技術である。結合親和性をもとに、特定のタンパク質に結合するリガンドの探索、あるいは、特定のリガンドに結合するタンパク質の探索が行われるが、こうしたスクリーニングを広範に行うには、生化学実験や構造解析は多くの時間と労力を必要とするため、生命情報工学による予測が期待されている。本研究では、タンパク質とリガンドが結合する可能性のある部位の3次元(3D)構造から、深層学習によって、それらの結合親和性を高精度で予測(回帰)するシステムを開発する。実験によって得られた結合構造を学習させ、ドッキング予測などで得られた候補構造に対して予測を行う。予測には、結合構造あるいは候補構造の周辺の3D空間をグリッドに区切り、グリッド内の原子の属性(原子種など)を入力とする。このような予測には高度な深層学習が不可欠であり、本研究では、画像認識の分野で実績のある convolutional neural network (CNN)を3D空間に適用できるよう拡張した手法3D-CNNを開発する。

【方法】1. 学習データセットの取得:学習に用いるデータは、タンパク質ーリガンドの結合構造と実験によって計測された親和性の値を収集した PDBbind データベース(http://www.pdbbind.org.cm/)から取得した。性能評価は、PDBbind のデータのうち、信頼度の高いものを選択して行った。2. 入力データを処理するプログラムの開発:タンパク質ーリガンドの結合構造を深層学習に入力するため、タンパク質ーリガンド結合部位の空間を3次元ボクセルに分割し、各ボクセルに位置するタンパク質、リガンドそれぞれの構成原子に対し、原子種とその構造的、化学的環境に応じて原子のタイプを定義し、チャネルに割り当てた。3. 深層学習による予測プログラムの開発:タンパク質ーリガンド結合部位の周辺を直接学習させるため、3D-CNNを開発し、タンパク質の特性と合わせて結合親和性を学習するシステムを構築した。また、構造と合わせて、PSI-BLASTを用いて類縁タンパク質のマルチプルアラインメントを構築し、プロファイルを作成した。プロファイルはネットワークの最後のステージに入力することで、進化情報を加味した予測を行った。4. テスト予測とパラメータの調整: PDBbind から選択した学習データセットを対象にテスト予測を行い、3D-CNNの畳み込み層およびプーリング層の構成、フィルターの設計、その他各種パラメータの最適化を行った。

【結果】PDBbind のデータに対して予測した親和性と実験によって得られた親和性(どちらも pK 値)の関係を示したものである。相関係数は 0.782 であり、3D 構造と従来の配列ファイルのみを用いた比較的簡易な方法で高い予測性能が得られていることがわかる。



結合親和性予測の結果と実験値との比較

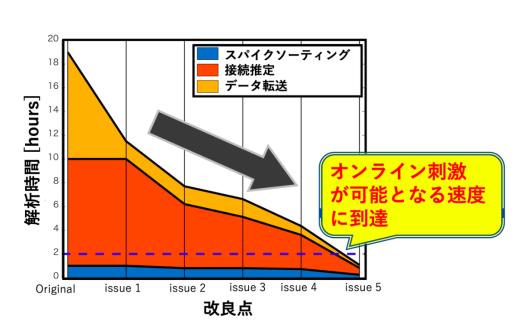
#### 82 多神経細胞間での情報流ネットワークの制御

下野 昌宣

【目的】脳は、極めて非均一に分布した細胞群により構成されている。そのため、一つ一つの細胞のシステム全体への寄与度は極めて異なっている。この様な系を刺激するならば、とりわけ影響力の持つ細胞を選んで刺激することで、刺激の効率を高めることが出来ると期待される。そこで、本研究では、脳ー神経系の不均一に分布している超多数細胞(~1,000 個)から計測した高次元時系列から、有望な刺激対象を個々の細胞の"影響度"に基づいて絞り込み、"影響度"の高い細胞群(数個)をターゲットとした刺激や組み合わせの効果を定量評価し、刺激対象自体の最適化を図ろうとしている。刺激対象となる細胞群を選ぶためには、選ぶための事前データを計測し、解析を終わらせた上で、刺激実験を行わなくてはならない。しかし、時間が経つと組織の状態が変わる可能性もあるため、状態把握のための解析後は、出来るだけ早めの刺激が望まれる。そこで、解析時間の短縮が肝要であった。

【方法】解析時間の短縮が乗り越えようとしていたハードルである。本研究では、マウスから摘出した脳スライスから MEA(多電極アレイ)装置を使用してニューロンスパイクを電気計測した。そのデータの解析方法は主に 3 つのステップから構成される。1. 多電極の計測点ごとでの時系列を、細胞ごとの時系列に変換するスパイクソーティングし、2. 細胞の時系列から細胞間の因果的な相互作用ネットワークの接続推定し、3. 推定した相互作用ネットワークのトポロジーを定量化することでの影響力の高い細胞を抽出する、という3 ステップである。step1、2 は、元々の環境では数時間から半日以上かかる処理であり、step3 でかかる時間は数分であった。step3 の処理は、他のステップと比べると計算時間は現在のところ問題にならなかった。その解析以外に、計測装置から解析サーバーへのデータ転送の時間が必要であったため、step1、step2 の解析時間とデータ転送の時間の短縮が焦点であった。

【結果】解析速度向上の模索:サイエンスとして未知の知見を、今も探求中であるが、本報告書では解析速度向上の現状を報告する。図は、元々かかっていた時間に対する課題一つ一つを解決するごとに、スパイクソーティング(Spike Sorting)、結合推定(Connectivity inference)、データ転送時間(Transmission)のそれぞれが、どの程度に短縮されたかを記している。現時点までの地道な積み重ねにより、目標としたところまでの解析の高速化に成功した。今後、この基盤技術を活かした、ダイナミックなネットワーク制御を通じて、新たな生命現象の発見に向けた研究を進めてゆく。



五段階での課題解決による解析時間の短縮状況

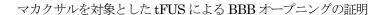
# 83 経頭蓋集束超音波による非侵襲的な脳深部刺激法の確立

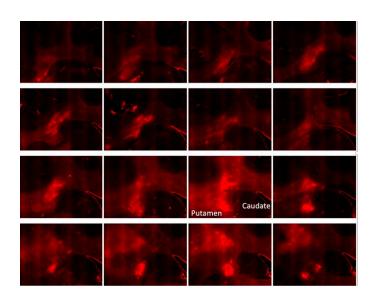
関 和彦

【目的】生体への超音波刺激が神経組織の活動を変化させることは古くから知られている。しかしながら、超音波を 頭蓋骨経由で行う tFUS についての試みは新しく、先行研究は少ない。例えば、齧歯類(ラットなど)を対象とした 超音波による脳刺激の試みは世界数箇所で行われているが、再現性のある結果は出ていない。超音波を集束させる tFUS の技術は、頭蓋の小さい齧歯類では困難なことが一因である。また、頭蓋の大きいヒトやマカクサルにおける tFUS 研究も始まっているが、超音波の集束技術が確立していないため、刺激効果は小さく、再現性も低い。近年、サルを モデルにしてヒトを対象とした tFUS 技術を確立する試みが、中国において始まっているが、日本では少ない。国外で 開発された MRI 一体型の tFUS 装置は超音波の集束が可能であり、同等な装置は日本にも数台導入されているが、その主目的は脳組織の熱凝固治療であり、ニューロモジュレーション目的の利用は基礎研究レベルでさえ行われていない。またその導入には高いコストがかかり、気軽に導入することができないのが現状である。そこで本研究では 比較的簡便に用いることができる tFUS 装置を開発し、その効果を動物実験により検証する方法論を確立することを目的とする。

【方法】麻酔下のサルを専用のチェアに座らせ、チェアに安定的にtFUS刺激装置を取り付け、その際、脳内標的焦点までの距離を調節できるよう、頭部上にウォータープールを作り、プール上に刺激装置を固定できるようにした。次に、サルを CT 装置 (既存) に移動し、上腕静脈から CT 造影剤とマイクロバブルを投与し、同時に超音波刺激を行いながら、脳軟部組織の CT 撮像を行った。そして、CT によって脳内に造影剤の滞在が観察されるまで、超音波刺激方法やマイクロバブルの注入法・スピードなどの改善を行った。さらにこの方法によって、エバンスブルーを標的部位に導入することを行った。標的領域に造影剤が再現性高く認められるまで、刺激パラメタを調節した。一方、ラットに同様な実験を行い、tFUS による脳活動誘発を試みた。

【結果】従来開発してきた tFUS 制御システムをサル用にアレンジして、各種シミュレーションによってその機能確認を行ったのち、実際のトランスデューサを開発し、それらが充分な集束精度、焦点強度、頭蓋骨透過補正特性を持つことを確認した。その後、サル CTMRI 画像の合成マップによる評価系の確立、アンギオグラフィーによる血管造影技術を麻酔下のサルを対象に確立した。また齧歯類を対象に、tFUS 照射パラメタとマイクロバブル投与量などの最適化を行い、tFUS によって脳活動が誘発できることを、四肢の動きを確認することによって証明した。





#### 84 エクソソーム動態解析に基づくデリバリーシステム開発

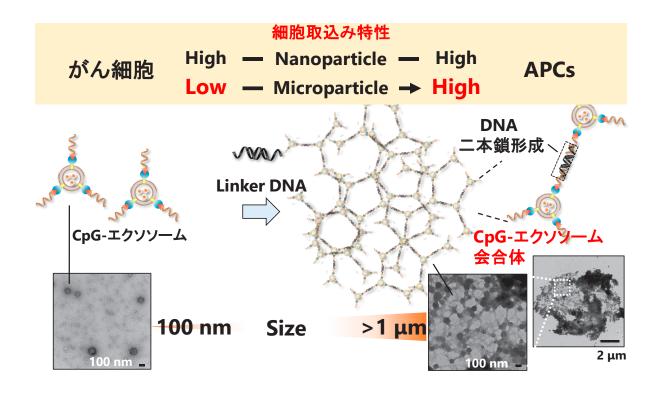
髙倉 喜信

【目的】エクソソームは核酸やタンパク質を内包する粒子径 100 nm 程度の脂質膜小胞であり、内包物を遠隔の細胞に送達する内因性輸送担体であることから、近年エクソソームを利用した治療薬、あるいはドラッグキャリアとしての利用が期待されている。その実現に向けて解決すべき重要な課題の一つとしてエクソソームの体内動態特性の把握とその制御に基づく疾患治療法の開発が挙げられる。研究代表者はこれまでにエクソソームがマクロファージをはじめとした抗原提示細胞(APC)に取り込まれやすいという性質に着目し、癌抗原を内包する癌細胞由来エクソソームを利用した癌ワクチン療法の開発に取り組み、エクソソームに免疫賦活剤である CpG DNA を搭載した CpG エクソソームが抗腫瘍免疫誘導に有用であることを見出した。一方でその過程において、腫瘍組織に局所投与後のエクソソームの動態を解析したところ、標的である APC 以外への取込みが明らかとなった。抗原特異的免疫反応を誘導するためには、APC への送達が重要である。ナノ粒子はサイズ増大に伴い、APC に取り込まれやすくなる一方で、他細胞には取り込まれにくくなる。そこで、エクソソームが APC へと細胞選択的に送達されるよう、サイズ増大を目的としてCpG エクソソームを DNA の相補鎖形成能で連結した CpG エクソソーム会合体を調製し、会合体化による抗腫瘍免疫誘導の増強について評価した。

【方法】エクソソーム会合体の形成は透過型電子顕微鏡観察により確認した。培養細胞系にて、APC ならびに非APC による取込みを、FACS 法により確認した。担癌モデルマウスを用いて、エクソソームならびにエクソソーム会合体 投与後の抗腫瘍免疫誘導ならびに抗腫瘍効果を評価した。

【結果】平均粒子径  $1\sim10\,\mu\,\mathrm{m}$  程度のエクソソーム会合体の形成を確認した。エクソソーム会合体はエクソソームと 比べて APC への取り込みが 2 倍程度増大した一方で、癌細胞への取り込みは半分程度に減少した。担癌モデルマウス を用いた治療実験では、エクソソーム会合体はエクソソームに比較して有意に腫瘍の成長を遅延させた。

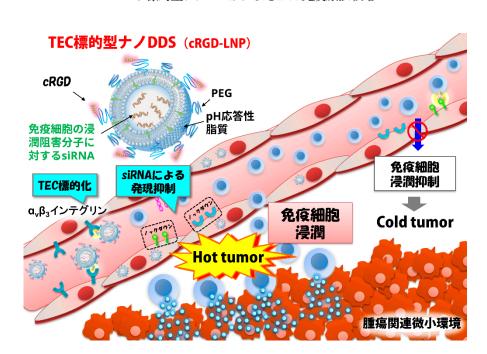
DNA 会合体形成による細胞取り込み特性の制御のイメージ図



中村 孝司

【目的】免疫チェックポイント阻害剤である programmed cell death 1 (PD-1) 抗体が有効な患者は全体の  $20\sim30\%$ であり、残りの患者に対する有効性を向上させることが焦点となっている。この治療効果の違いには、腫瘍関連微小 環境の免疫ステータスの違いが大きく関連している。免疫細胞が腫瘍内に浸潤しているがブレーキがかかっている 腫瘍(hot tumor)と免疫細胞の活性化が起こっていないあるいは免疫細胞が腫瘍内に浸潤できない腫瘍(cold tumor) の 2 つに大別され、PD-1 抗体などは hot tumor に対して有効性を示す。70~80%の PD-1 抗体療法抵抗性の患者の がんの多くは cold tumor であり、cold tumor から hot tumor へ改善することが重要である。非常に複雑な機構により cold tumor が形成されているが、その機構の 1 つに腫瘍血管内皮細胞(TEC:tumor endothelial cell) による 免疫細胞の腫瘍組織への浸潤抑制がある。TEC 表面には、免疫細胞の腫瘍組織への浸潤を阻害する分子が発現して いることが知られている。一方で、TEC はがん免疫応答の活性化に関与しているという報告もある。それ故、TEC の 機能を制御することで cold tumor を hot tumor に変えるだけではなく、がん免疫応答のさらなる増強も期待できる。 本研究では、ナノバイオテクノロジーを駆使したキャリア型 Drug Delivery System (ナノ DDS) を基盤技術とし、 TEC 標的化能と先述した負の機能の阻害と正の機能の促進を同時に実現するナノ DDS を創製することを目的とした。 【方法】TEC 株を用いたナノ DDS の取り込み評価をフローサイトメトリーにより行った。続いて、TEC に発現する 免疫細胞の浸潤抑制分子の発現が認められる cold tumor モデルの選定を行った。さらに、TEC 株および担がんマウス を用いた標的遺伝子のノックダウン評価に基づいたナノ DDS の最適化を行った。最適化したナノ DDS を担がん マウスへと投与し、抗腫瘍活性を評価した。

【結果】PD-1 抗体投与による抗腫瘍活性評価と腫瘍組織の遺伝子発現解析の結果、腫瘍モデルとして、マウス直腸がん細胞 CT26 を移植したマウスを選択した。TEC 標的化ナノ DDS として、cyclic RGD(cRGD)ペプチドを修飾した脂質ナノ粒子(lipid nanoparticle: LNP)を構築し、TEC 株に対する取り込みを評価した結果、cRGD ペプチド修飾 LNP(cRGD-LNP)は未修飾の LNP と比較して、飛躍的に細胞への取り込みが増加した。続いて、cRGD-LNPの最適化を行うことで、TEC における標的遺伝子を効率的にノックダウンすることに成功した。さらに、CT26 担がんマウスに対して最適化 cRGD-LNP を投与した結果、コントロール群と比較して高い抗腫瘍活性を示した。以上のことから、TEC の機能を遺伝子レベルで制御可能なナノ DDS の構築に成功した。



TEC 標的型ナノ DDS によるがん免疫療法戦略

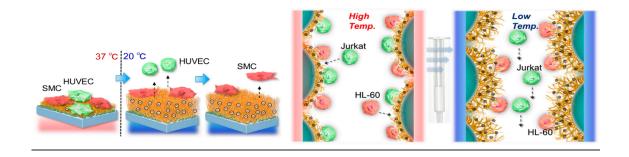
長瀬 健一

【目的】近年、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の開発により、治療に用いる細胞を人為的に作製することが可能となり、細胞を用いた再生医療が加速的に発展しつつある。治療に用いる細胞を調製・作製する際には、細胞分離、分化誘導、細胞組織作製といった細胞操作が必要である。特に、細胞の活性や性質を失わずに細胞を精製する細胞分離法が必要とされている。そこで本研究では、温度応答性高分子であるポリ (N-イソプロピルアクリルアミド) (PNIPAAm) を用いた機能性界面による革新的な細胞分離法を開発した。

【方法】ガラス基板に原子移動ラジカル重合(ATRP)の開始剤を修飾し、その後、NIPAAm、tert-ブチルアクリレート(tBA)、tert-ブチルアクリルアミド(tBAAm)を 2-プロパノールに溶解させ、ATRP により P(NIPAAm-cotBA-cotBAAm)修飾ガラス基板を作製した。その後、tert ブチル基を脱保護し、 P(NIPAAm-cotBA-cotBAAm)修飾ガラス基板とした。作製したガラス基板にヒト血管内皮細胞(HUVEC)、ヒト大動脈平滑筋細胞(SMC)を播種し、37℃での接着挙動、20℃での脱着挙動を観察した。アミノプロピルシリカビーズ(粒子径  $75\sim150\,\mu$  m)に分級し、重合開始剤の V-501 を固定化した。エタノールに NIPAAm、正荷電を有する N,N-ジメチルアクリルアミド(DMAPAAm)、疎水性の n-ブチルメタクリレート(BMA)、N,N-メチレンビスアクリルアミド(BIS)を溶解させ、V-501 固定化シリカビーズを加え、70℃で 5 時間反応させて、 P(NIPAAm-cotDMAPAAm)。修飾シリカビーズを作製した。シリカビーズを固相抽出カラム( $0.7\times5.6\,cm$ )に充填した。作製したカラムを用いて、HL-tau0、tau1 Jurkat の溶出挙動を tau3 tau2 tau3 tau4 tau6 tau6 tau7 tau8 tau9 tau

【結果】P(NIPAAm-crAc-crtBAAm)修飾ガラス基板に HUVEC、SMC を播種し、37℃での細胞の接着、20℃での細胞の脱着を観察した。比較対称として、負電荷を含まない PNIPAAm 修飾ガラス基板を用いて同様の検討を行なった。アニオン性の P(NIPAAm-crAc-crtBAAm)修飾ガラス基板は、PNIPAAm 修飾基板と比較して、SMC の接着の向上と HUVEC の迅速な脱着が確認できた。この結果を基に HUVEC と SMC の混合懸濁液を播種したところ、37℃で HUVEC、SMC の両細胞が接着し、温度を 20℃に変化させると、HUVEC が迅速に脱着し、その後、SMC が徐々に脱着することがわかった。これらの結果より、アニオン性の温度応答性高分子を用いることで、HUVEC、SMC の接着挙動、脱着挙動の違いを大きくし、細胞分離に応用できる可能性が示された。37℃でカラムにHL-60、Jurkat を負荷したところ、HL-60、Jurkat ともに溶出してこなかった。一方、4℃での溶出では、HL-60 は溶出してこないが、Jurkat は溶出することがわかった。この原因を調べるため、HL-60、Jurkat の細胞表面のゼータ電位を測定したところ、HL-60 の方が Jurkat よりも負に帯電していることがわかった。これにより、HL-60、Jurkat の溶出挙動の違いは細胞膜表面の静電的性質の違いに起因すると示唆された。そこで、HL-60 と Jurkat の混合懸濁液をカラムに負荷したところ、温度 4℃で回収した細胞は Jurkat を多く含むことがわかった。これにより、作製したカラムに温度変化を与えることで、細胞表面の電荷の違いにより細胞を分離できることがわかった。

# 機能性界面を用いた温度制御型細胞分離システム



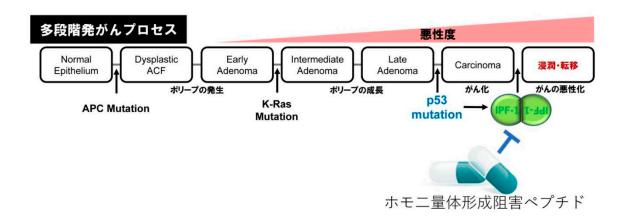
#### 87 がんの悪性進展促進因子に対するペプチド創薬

原田 浩

【目的】がんが発生する初期過程で、がん遺伝子やがん抑制遺伝子に段階的に変異が蓄積する"多段階発がんモデル"が提唱されている。その最終段階で、代表的ながん抑制遺伝子 p53 に機能欠失型変異が導入される例が多いことが知られているが、それをきっかけにがん細胞の浸潤能が誘導される機序は解明されていない。予備的な研究を通じて我々は、p53 の機能低下を引き金にがん細胞の浸潤能を亢進する新規遺伝子を同定し、浸潤促進因子 1 (Invasion-Promoting Factor 1: IPF-1) と命名、IPF-1 がホモニ量体として機能することを見出した。そして、IPF-1 のホモニ量体形成を阻害することによって、p53 変異型がん細胞の浸潤と増殖を抑制できることを発見した。また、ヒト腫瘍の臨床検体を用いた解析で、IPF-1 の腫瘍内発現レベルががん患者の生命予後不良と相関することを明らかにし、IPF-1 を治療標的とする意義を確認しつつある。これら本研究に先立って得ていた知見に基づき、我々はIPF-1 のホモニ量体形成を阻害するペプチドを創出することを目指して、本研究の実施に着手した。

【方法と結果】我々が見出した IPF-1 の立体構造をホモロジーモデリング法などで in silico 解析し、IPF-1 のホモニ量体形成を担う領域を予想した。その解析結果を検証する分子生物学的研究を実施し、IPF-1 のホモニ量体形成に必要な2か所のコアドメインを同定した。このドメインの立体構造を計算科学的に予測し、ホモニ量体形成を阻害する活性を持つポリペプチドをデザインした。このポリペプチドを発現するベクターを構築し、分子細胞生物学的研究でその活性を評価した。具体的には、IPF-1 のホモニ量体形成効率をルシフェラーゼ発光として定量できる実験系によって、当該ポリペプチドが IPF-1 のホモニ量体形成を阻害する活性を持つことを確認した。また、IPF-1 のホモニ量体形成量を定量できる共免疫沈降実験によって、当該ポリペプチドのホモニ量体形成阻害活性を再確認することが出来た。さらに、当該ポリペプチドで処理したがん細胞の中では、細胞の浸潤能を左右するマトリックスメタロプロテアーゼの発現誘導がかからなくなることを確認した。実際に、ボイデンチャンバーを用いた in vitro 浸潤アッセイによって、当該ポリペプチドが、p53変異型がん細胞の浸潤能を抑制する活性を持つことが確認された。

p53変異型腫瘍の浸潤を亢進する新規遺伝子 IPF-1 に対するペプチド製剤の開発に関する概念図



# 88 AIによる脳波を用いた電気けいれん療法の効果予測

平野 仁一

【目的】全世界で約3億5,000万人がうつ病に苦しんでおり、うつ病は生活の質にも大きな影響を与える疾患である。 ECT(Electroconvulsive therapy)の安全性と有効性は確立しており薬物療法が奏功しない治療抵抗性うつ病はECTの適応とされる。近年機械学習を用いてECTの効果予測を行う研究が報告されているが、いずれも限定されたサンプル数、モデルの汎用性の低さといった限界が存在し現実的なモデルとは言い難い。このため今回汎用性の高い保険採用脳波データを機械学習にかけることにより、実臨床でも高い有用性を有する電気けいれん療法の治療効果予測モデルを作成する本研究を立案した。

【方法】慶應義塾大学医学部精神・神経科にて 2012 年以降に電気けいれん療法を受療した症例を後方視的に登録し、1. 診断と統計に関するマニュアルにて大うつ病性障害うつ病相の診断基準を満たす、2. CT 施行 2 週間前に通常臨床にて施行された安静閉眼時脳波検査(日本光電社製デジタル脳波計、基準電位:両側耳朶、Sampling rate: 500 Hz、19 ch)を受療している、3. 脳波検査受療後に ECT を受療の3点を満たす症例を組み入れた。登録症例から、年齢、性別、重症度等の臨床情報を抽出し、治療反応性の指標としてモントゴメリーアスベルグうつ病評価尺度あるいはハミルトンうつ病評価尺度、Clinical Global Impressions Scale の得点で ECT に対する治療反応(寛解の有無)を評価した。得られた脳波に対して、独立成分分析を用いた前処理を行い筋電や体動等のノイズ除去を行った。その後各チャンネルの周波数帯域ごとのパワースペクトル密度ならびに脳波の空間分布特性を定量化する microstate analysis の指標を算出した。臨床データならびに上記脳波解析にて得られた特徴量をもとに Light GBM を用いて、2クラスのパターン識別器(寛解ならびに非寛解)を作成した。交差検証法としては10 fold cross validation を用いた。【結果】212 名のデータが後方視的に集められた。その中から組み入れ基準を満たす 93 例が最終的な機械学習モデル作成に用いられ Light GBM を用いてモデル作成を行なった。結果、予測精度 77.4%(感度 87.5%、特異度 77.4%)のモデルが作成された(下図)。

予測モデルの結果

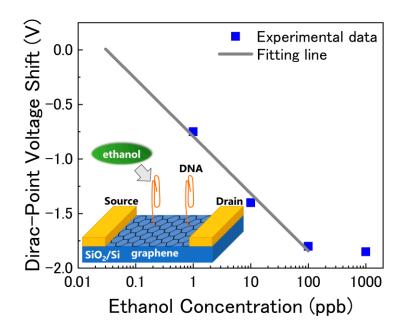
		予測	
		寛解	非寛解
結果	寛解	49	7
	非寛解	14	23

【目的】疾病早期発見を実現するためには、小型デバイスを用いた parts per billion (ppb) レベルでの呼気ガス分子の検出が必要であると考えられる。グラフェンは、炭素原子からなる蜂の巣格子状に配列した六角形格子構造をしており、キャリアの移動度が極めて高いことでも知られている。したがって、これらの特徴を活かすことによって、従来の半導体式ガスセンサよりもさらに高感度なガスセンサを作製することができると期待される。本研究では、高感度呼気ガスセンサの開発に向けて、1 本鎖 DNA 修飾グラフェン電界効果トランジスタを作製し、ターゲット気体導入前後での伝達特性をそれぞれ測定することでガス分子を電気的に検出することを目的とした。

【方法】単層グラフェンは熱化学気相成長法を用いて銅箔上に合成し、その単層グラフェンを  $SiO_2$  基板上に転写した後、ソース、ドレイン電極を形成することによって、グラフェン電界効果トランジスタを作製した。そのグラフェン上にある塩基配列を有する 1 本鎖 DNA を塗布することによって修飾した。作製したデバイスをプローブ装置に設置し、ppb オーダーのエタノールガスを装置に導入することによって、デバイスの電気特性の変化を計測した。

【結果】エタノールガスを導入する前後でその伝達特性を測定した。その結果、1本鎖 DNA 修飾グラフェン電界効果トランジスタを用いることによって、エタノールガスを ppb オーダーで検出することに成功した。さらに、2 種類の異なる塩基配列をもった DNA を用いて測定を行い、塩基配列の違いに応じて伝達特性のシフト方向の違いが観測された。これは、エタノール分子導入による DNA の構造変化の仕方によってグラフェンに与える影響が異なるためであると考えられる。以上より、測定するガスの種類に対して、DNA の塩基配列を適切に選択することによって、様々な種類のガスを低濃度で測ることが可能であると期待される。したがって、1本鎖 DNA 修飾グラフェン電界効果トランジスタは、疾病早期発見に向けた呼気ガス分子の電気的高感度検出に対して有効であると考えられる。

#### 1本鎖 DNA 修飾グラフェン電界効果トランジスタを用いたエタノール分子の高感度検出



## 90 ペプチド脂質の自己組織化による新規抗ガン活性の創出

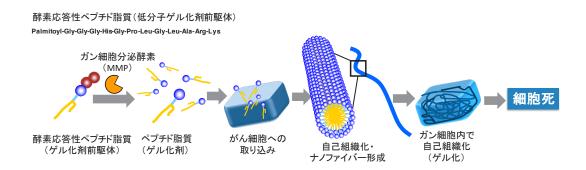
丸山 達生

【目的】本研究では、精密に分子設計したペプチド脂質分子がガン細胞に選択的に取り込まれ、細胞内でファイバー状の自己組織体を形成し(細胞質をゲル化)、この自己組織体が顕著な抗ガン活性を発揮するという全く新しい抗ガン活性システムの実証を目指した。従来の生理活性・薬理活性物質は、化合物の分子が単体で薬理活性を示していた。本研究では、単一分子では特段の薬理活性を示さないが、ガン細胞の中でペプチド脂質分子が集合化し、物理的に大きな組織体( $\mu$  m スケール)をつくることで初めて抗ガン活性を示すという新しい薬理活性コンセプトを目指した(図 1)。

【方法】分子構造の異なるペプチド脂質各種をペプチド固相合成により合成した。合成したペプチド脂質の自己組織化能は緩衝液のゲル化により検証した。ペプチド脂質の細胞毒性は、MTT アッセイにより数種のガン細胞と正常細胞を用いて評価した。細胞内でのペプチド脂質の局在化は共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

【結果】本研究では、ペプチド脂質の自己組織化(ゲル化)を封印した分子設計を行い、特定の刺激に応じて その封印を解き、自己組織化(ゲル化)が進行するように分子をデザインした。特定の刺激として、「ガン細胞が過剰 に分泌する酵素 MMP-7」と「一部のガン細胞内低 pH 環境」を選択し、これに応答して自己組織化し、ガン細胞内で ゲルを形成し死滅させることを狙った。MMP-7 に応答してゲル化するペプチド脂質を作製したところ、MMP-7 を 多く分泌しているガン細胞に対してより強い毒性を示し、ガン細胞選択的に死滅させることに成功した。ガン細胞への 取り込み挙動も観察され、またガン細胞内でペプチド脂質が自己組織体を形成し、細胞質の流動性が顕著に低下して いることも強く示唆された。このことから、細胞内での合成分子の自己組織化制御に成功し、またこれを利用して ガン細胞選択的に殺傷可能であることが明らかになった。また本研究では、一部のガン細胞の細胞内 pH が正常細胞の それよりわずかに低いことに着目し、このわずかに低いpH に応答して自己組織化 (ゲル化) するペプチド脂質の開発 を行った。その結果 pH 7 以上ではゲル化せず、pH 7 以下でゲル化するペプチド脂質の開発に成功した。 このペプチド脂質を、細胞内 pH のわずか異なる 4 種の培養細胞に添加したところ、細胞内 pH が低い細胞 (HEK293、HeLa 細胞) に対してこのペプチド脂質が選択的な細胞毒性を示すことが判明した。このペプチド脂質の 細胞取り込み挙動も確認されており、細胞内にてペプチド脂質の自己組織化体が形成し、これが細胞機能に重大な損傷 を与えていることが示唆された。以上の検討より、特定の疾患細胞の刺激に応答して自己組織化するペプチド脂質を 適切に設計することで、疾患細胞選択的な毒性(ここではガン細胞選択的抗ガン活性)を発現させることに成功した。 本研究で提案する抗ガン活性は従来と全く異なる作用機序であることから、新たな薬理機構の提案につながると 期待される。

本研究で提案する "ペプチド脂質分子の自己組織化による選択的抗ガン活性"



# 91 インプランタブル光デバイスを利用したがんの免疫療法

守本 祐司

【目的】光増感剤が集積されたがん組織に光を照射して細胞死を誘導する光線力学療法(PDT)という保険承認されているがん治療法がある。最近、照射強度を極微弱にする(×1/1,000)一方で、照射時間をはるかに長く(×1,000)したメトロノミック PDT(mPDT)の概念が提唱され、著者らは、無線給電方式インプランタブル LED デバイスを開発し、mPDT の光源として用いて、高い抗がん効果を発揮することを成功した。実臨床への応用を念頭におくと、光増感剤は医療行為である経静脈投与を必要とせず、患者自身で服用できる内服タイプの薬剤を用いるのが望ましい。そこで本研究では、内服することにより体内で光増感剤(プロトポルフィリン IX(PPIX))に変換される5-アミノレブリン酸(ALA)を用いて、著者らの確立したシステムによる mPDT を行い、がん治療における有効性を検証した。

【方法】1. 皮内腫瘍モデルマウスに ALA 水溶液を経口投与して、腫瘍組織内 PPIX 濃度の時間推移を蛍光 イメージングにより計測した。2. 皮内腫瘍モデルマウスの腫瘍部位の皮下に無線給電式インプランタブル LED デバイスを埋め込んだ。その後実験動物を 4 群に分けて、mPDT による抗腫瘍効果を調べた。3. インプランタブル デバイスの発光に伴う熱産生が、温熱作用として腫瘍増殖抑制に働く可能性を否定することを目的に、発光時の皮膚温を計測した。

【結果】ALA 水溶液の経口投与でマウス腫瘍内の PPIX 濃度が上昇し、少なくともその状態が投与後 10 時間は 持続することがわかった。この結果をもとに、無線給電式インプランタブル LED デバイスを皮内腫瘍モデルに 埋め込みメトロノミック PDT を行ったところ、腫瘍増殖を抑制できることがわかった (図)。さらにこの抗腫瘍効果は 温熱作用ではなく、光化学的作用に起因することが示唆された。







# 92 隕石学的手法による尿路結石の形成機序解明とその予防

安井 孝周

【目的】尿路結石は、90%以上の無機成分と数%の有機成分で構成されている。その形成過程は、結晶核形成、成長、 凝集、石灰化を辿ると考えられてきたが、その詳細な機序は未だ解明されていない。本研究の目的は、尿路結石の成長 機序を解明するために、隕石学・鉱物学の技術を応用した尿路結石内の無機成分と有機成分の二次元マッピング法を 開発し、さらにこの分析技術によって無機成分と有機成分の分布・構造の関係性を見出すことである。

【方法】10 サンプルのシュウ酸カルシウム結石から、平面研磨によって構造観察や成分分析が可能な厚さ  $20\,\mu$  m の 薄片を作製し、以下の研究を行った。研究 1: 偏光顕微鏡を用いた尿路結石の結晶構造を観察した。研究 2: フーリエ変換赤外分光分析(FT·IR)を用いた無機成分の分布構造解析を行った。研究 3: 蛍光免疫染色を用いた有機成分(osteopontin(OPN)、Renal prothrombin fragment 1(RPTF·1)、calgranulin A(Cal·A)の分布構造解析を行った。

【結果】まず代表的なサンプル 1 を評価した(図)。研究 1: 偏光顕微鏡観察の光学的特徴から、結石中心部では、層状構造を呈した結晶領域(A)、直径  $50\,\mu$  m の結晶で構成された領域(B)、辺縁部では、直径  $10\,\mu$  m 以下の結晶で構成された領域(C)に分類できた。研究 2: 研究 1 の領域(A)、(B)では、シュウ酸カルシウム一水和物(COM)99%に対して、領域(C)では、二水和物(COD)40%を含んでいた。研究 3: 領域(A)では、OPN、RPTF-1 のみが層状かつ数  $\mu$  m 均一の間隔で分布していた。領域(B)(C)では OPN、RPTF-1 は結晶内に分布するものの、Cal-A は結晶粒界に分布していた。

さらに我々は 10 サンプルの追加分析から、尿路結石を構成する COM、COD 結晶の種類、およびそれぞれの結晶 サイズ・構造の類似性から 4 つの Type に分類した。結石中心部では、数 $\mu$ m 大の COM 結晶から成る顆粒状領域 (Type1) と、数 $+\mu$ m 大の COM 結晶 から成るモザイク状領域 (Type2) を確認した。辺縁部では、数tm 大の tm tm 大の tm 大の

【結論】今回我々は、隕石学・鉱物学で用いられた技術を応用することで、尿路結石の無機成分・有機成分の二次元マッピング法を開発した。この手法により COM、COD の無機成分における OPN、RPTF-1、そして Cal-A の局在を初めて可視化することに成功した。また複数のサンプル分析結果から、尿路結石を構成する COM、COD 結晶の種類・サイズ・構造には類似性があり、その分類別の結晶においての 3 つの有機成分の分布に違いがあることがわかった。有機成分の局在の違いから、無機成分に対する相互作用が異なることが考えられた。

# 

薄切切片を用いた有機成分マッピング

# 93 人工知能を使用した食道癌の拾い上げ診断の検討

由雄 敏之

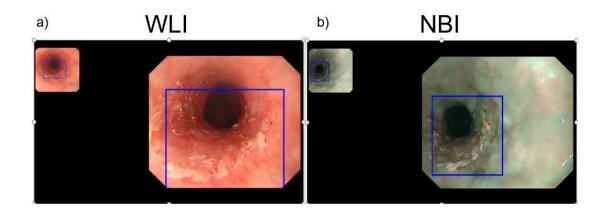
【目的】食道癌は進行癌で診断されると予後不良であり、早期発見は重要である。近年の内視鏡検診の増加によりその改善が期待されるが、表在癌は分かりにくい病変も多いこと、頻度が高くないことから盲点となりえる。我々は Deep learning を用いた人工知能(AI)診断補助システムが内視鏡静止画において食道癌を高率に非常に速く検出すると報告した。また下咽頭癌も同様に検出し、食道癌の深達度診断能も良好であった。今回は内視鏡動画における AI の診断能を検証した。

【方法】2014 年から 2017 年に当院組織学的に食道癌と診断された 397 病変の内視鏡画像 8,428 枚を教育用画像として Deep learning を介した CNN の構築を行った。次に、AI の診断能を評価するため、食道表在癌 20 症例 22 病変と非癌症例のコントロール 20 症例をそれぞれ白色光と NBI の両方で撮影し、40 症例 80 本の検証用動画を作成した。動画は頸部食道から食道胃接合部まで 2 cm/sec の速度で挿入して撮影した。それぞれの動画を AI と 15 人の内視鏡医(専門医 7 人、非専門医 8 人)が診断した。AI は癌を四角枠に囲んで示し、癌と診断した部位は左側に画像を示した(下図)。

【結果】AI は白色光で75%(15/20)、NBI で55%(11/20)の症例で食道癌を診断し、いずれかにて85%(17/20)を診断した。一方で、内視鏡医は白色光で中央値25%(15~30%)、NBI で中央値35%(15~60%)の症例を診断し、いずれかにて45%(25~60%)を診断した。偽陽性の原因の41%は食道管腔の影、18%は食道胃接合部であり、その他は炎症32%、内視鏡切除後瘢痕9%であった。また偽陰性の原因は背景粘膜の炎症により不明瞭な病変が42%、視認しにくい前壁病変が33%、白色光で不明瞭な病変17%、5 mm以下の病変が8%であったこのシステムの実用性を考えると、内視鏡医は食道胃接合部や食道内腔の影を癌とは診断しないこと、従来の生検の陽性的中率も高くないことから容認できると考えた。診断出来なかった癌はすべて1 cm未満の微小病変であった。

【結論】AI は静止画と同様に、動画においても高率に食道表在癌を検出することができた。内視鏡検査時にリアルタイムで食道癌の検出をする、AI 診断補助システムは実現しうる。

## AI 診断補助システムによる食道癌診断



#### 94 微小管形成中心の分子基盤の統合的解析と抗がん剤創薬

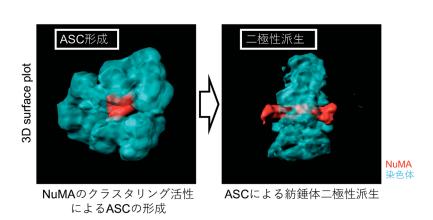
北川 大樹

【目的】細胞は分裂時に複製した染色体を正確に娘細胞に分配する必要があり、そのためには二極性の紡錘体形成が必須になる。哺乳類の体細胞分裂では、二つの中心体が極として機能することで二極性の紡錘体が形成される。その一方で、中心体を持たない卵母細胞の減数分裂では非中心体性のメカニズムが働くことで二極紡錘体形成が為される。以上のように中心体依存的・非依存的な両経路が紡錘体形成に重要であることは知られていたが、特にヒトの体細胞分裂において、どのような非中心体性メカニズムが紡錘体の二極性派生に関わるかは明らかになっていなかった。そこで、本研究では、中心体に非依存的な紡錘体形成機構を明らかにし、中心体性と非中心体性両方の微小管形成中心の構築機構を統合的に解析することで、新規抗がん作用点の同定を行うことを目的とした。

【方法】本研究では中心体の倍化に重要なキナーゼである PLK4 を阻害することで、ヒト培養細胞において 非中心体性の紡錘体を誘導し、二極紡錘体形成プロセスを解析した。中心小体非依存的な微小管形成中心の構成因子を siRNA を用いたスクリーニングにより同定し、介在する複合体形成や、微小管重合活性を有する構造体としての機能 解析を行った。

【結果】中心体除去時には染色体付近に紡錘体極因子 NuMA が重合して微小管を放射上に配向し、その後、微小管の 逆並行スライドを担う分裂期キネシン Eg5 の働きにより紡錘体の二極性が派生し、染色体の整列と分配が起こること が明らかとなった。さらに NuMA の除去は、中心体を持たない細胞のみならず中心体を持つ細胞においても紡錘体の 二極性派生に寄与することを見出した。以上より、ヒトの体細胞は NuMA に依存した非中心体性システムと中心体に 依存したシステムの協調により紡錘体の二極性を派生させることが示唆された。

## ヒトがん細胞における非中心体性紡錘体形成のモデル



## 95 小胞体出芽部位の形成と分泌制御メカニズムの解明

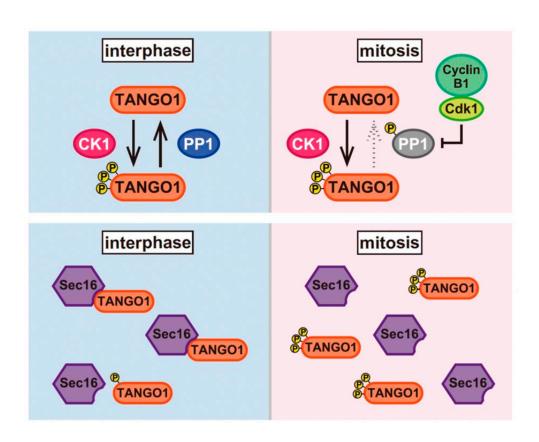
齋藤 康太

【目的】小胞体で合成された蛋白質は被覆に包まれた小胞(COPII 小胞)に詰め込まれ、ゴルジ体を経由し細胞内の様々な小器官あるいは細胞外へ輸送される。この小胞輸送の基本原理は、出芽酵母において分泌変異体が網羅的に単離され、その機能が解析されるに伴い飛躍的に明らかになった(Randy Schekman 博士、2013年ノーベル医学生理学賞)。一方で高等真核生物の分泌機構については、その複雑性を反映し、以下の点が未だ明らかとなっていない。COPII 小胞が出芽する小胞体上のドメインである小胞体出芽部位、すなわち「ER exit site」は、哺乳細胞 1 細胞あたり数百個存在するが、細胞周期や栄養状態などによって、その数や大きさ、局在が変化することが知られている。しかし、ER exit site の局在規定機構およびバイオジェネシスの分子機構はほとんど明らかになっていない。本研究は、特に細胞分裂期に着目し、ER exit site の崩壊と再形成機構を明らかにすることを目的とした。

【方法】培養細胞を用いて細胞生物学的手法および生化学的手法によって解析を行った。

【結果】本研究により、TANGO1 は常時 CK1 によってリン酸化されており、リン酸化された TANGO1 は Sec16 との結合活性を低下させることにより、ER exit site の崩壊を促すことが明らかとなった。一方で、脱リン酸化酵素である PP1 は間期に比べて分裂期にその活性が低下することが知られている。間期の細胞においては、CK1 によってリン酸化された TANGO1 は PP1 による脱リン酸化と平衡状態にあり、結果 TANGO1 と Sec16 との結合は安定的に保たれている。一方で、分裂期の細胞においては PP1 の活性が低下することで、相対的に CK1 による TANGO1 のリン酸化が亢進し、その結果 ER exit site の崩壊が促される可能性が明らかになった。本研究によって、細胞分裂期にER exit site が崩壊するメカニズムが初めて分子レベルで明らかになった。

細胞分裂期における ER exit site の形成と崩壊の分子メカニズム



# 96 幹細胞治療最適化に向けたニコチン受容体シグナル制御

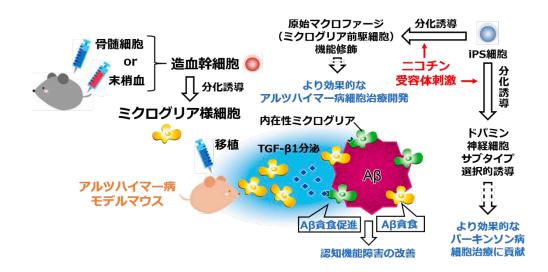
高田 和幸

【目的】加齢を最大の危険因子とするアルツハイマー病(AD)は、超少子高齢化が進む日本において、一刻も早い根本的治療法の開発が必要である。脳の組織マクロファージとして脳免疫の第一線を担うミクログリアは、胎児期の一次造血で発生する原始マクロファージを前駆細胞とし、脳に生着後は自己増殖によりポピュレーションを維持するとされている。このことは、ミクログリアの加齢に伴う機能変化が AD の発症や病態悪化に密接に関与しており、ミクログリアの再生が AD 治療に貢献できる可能性を示唆している。一方、ヒト人工多能性幹(iPS)細胞から分化誘導したドパミン神経細胞の移植によるパーキンソン病(PD)の臨床試験が開始されたが、今後は移植細胞の最適化による、より効率的な治療法の開発が進むことが予想される。脳ニコチン性アセチルコリン受容体(ニコチン受容体)は、神経細胞のみならずミクログリアにも発現しており、これら細胞の機能制御に重要であるが、ミクログリアやドパミン神経細胞の発生・分化における役割は解明されていない。本研究では、骨髄細胞や低侵襲性に採取可能な末梢血造血幹細胞からミクログリア様細胞を作製し、その脳内移植が内在性ミクログリアの機能を補填してAD治療に貢献できるか否かを評価し、さらに、幹細胞からミクログリアの前駆細胞である原始マクロファージやドパミン神経細胞への分化・成熟におけるニコチン受容体の関与を解析した。

【方法】マウスの骨髄細胞または末梢血中の造血幹細胞を採取し、ミクログリア様細胞に分化誘導した。ミクログリア様細胞の AD 発症原因物質アミロイド $\beta$  (A $\beta$ ) の貪食機能を解析し、AD モデルマウスの脳内に移植して、脳内 A $\beta$ 量と認知機能への作用を解析した。また、人工多能性幹 (iPS) 細胞を原始マクロファージやドパミン神経細胞へと 分化誘導し、それぞれの分化過程における各種ニコチン受容体サブユニットの mRNA 発現とニコチン刺激が及ぼす 各種分化マーカー遺伝子やタンパク質の発現への作用を解析した。

【結果】末梢血造血幹細胞由来のミクログリア様細胞は  $A\beta$  貪食機能を有しており、AD モデルマウス脳内において  $A\beta$  除去に働き、さらに認知機能を改善した。また、骨髄由来ミクログリア様細胞は transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) の分泌を介して、内在性ミクログリアの  $A\beta$  貪食機能も促進することが分かった。一方、iPS 細胞から原始 マクロファージやドパミン神経細胞の分化過程において、種々のニコチン受容体サブユニット mRNA の発現変動が 認められた。分化ステージに合わせたニコチン処置により原始マクロファージの機能性タンパク質 (CX3CR1) の発現 や、ドパミン神経細胞 DA2 サブタイプのマーカーである LMO3 の発現が促進された。以上より、骨髄細胞/末梢血 造血幹細胞由来ミクログリア様細胞が AD 治療に貢献できること、さらには、AD や PD 治療に用いる幹細胞由来の 治療細胞の作製時にニコチン受容体シグナルを制御することで、より効果的な治療細胞を作製できる可能性が 示唆された。

幹細胞由来ミクログリア様細胞のアルツハイマー病治療細胞としての機能とニコチン受容体刺激の可能性



# 97 プロトンチャネルによるpHホメオスタシスの分子基盤

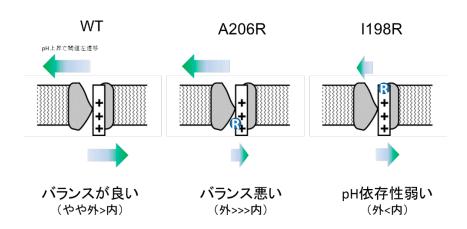
藤原 祐一郎

【目的】好中球やマクロファージなどの貪食細胞に発現する電位依存性  $H^+$ チャネル (Hv チャネル) は、病原菌を退治する際の活性酸素の産生を担うイオンチャネルとして知られている。 $H^+$ を透す Hv チャネルは細胞内外の相対的 pH 勾配 ( $\Delta pH$ ) を感知し、微小環境での pH 変化を鋭敏に捉え自身の活性を制御する、活性酸素産生におけるフィードバック制御ならびに細胞の pH ホメオスタシスの役割を果たす。本研究は、Hv チャネルの未解明の pH センシング機構、特に  $\Delta pH$  を感知する機構を明らかにする目的で行った。

【方法】培養細胞に発現させた野生型および変異体 Hv チャネルに対して、パッチクランプ法を用いて種々の細胞内外の pH 条件のもと、H<sup>+</sup>電流の発生する膜電位閾値の解析を行った。ツメガエル卵母細胞に発現させた野生型および変異体 Hv チャネルに対して、二本刺し膜電位固定法を用いて種々の細胞外 pH 条件のもと、マクロ電流 (H<sup>+</sup>電流+ゲート電流) の発生閾値電位の解析を行った。

【結果】野生型 Hv チャネルでは、細胞内 pH の変化に対しても、細胞外 pH の変化に対しても同程度に、 $H^+$ 電流の発生閾値が約  $40\,mV/pH$  シフトした。A206R 変異体では、細胞内 pH の変化に対する閾値のシフトが著しく減弱した。 I198R 変異体では、細胞内/外 pH の変化、両方ともに対する閾値のシフト割合が減弱した。 pH 変化は  $H^+$ 電流の発生する膜電位閾値を変化させるばかりではなく、ゲート電流の発生閾値も変化させた。 このことは、pH は膜電位センシングに影響を与えることを示唆する。以上の実験から、Hv チャネルは細胞内外の相対的 $\Delta pH$  に依存して閾値がシフトするというこれまでの概念よりも、細胞内そして細胞外の絶対的 pH に独立して依存する機構を有すると考えるほうが妥当である。Hv チャネルは細胞内外に同程度の能力の pH センサーを有していることが考えられ、細胞内外環境の pH 変化を鋭敏に感知する機構が備わっていることが示唆された。

#### 細胞内/外のpH 感知機構のモデル



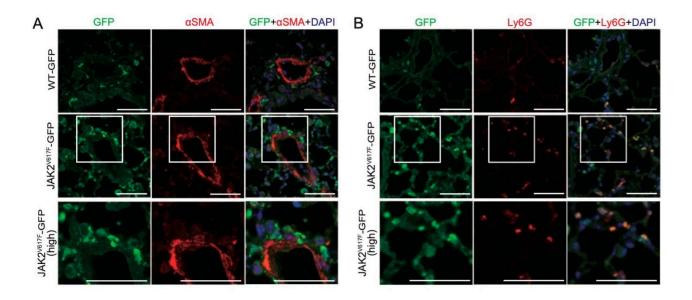
## 98 巨核球ニッチと髄外造血~骨髄増殖性腫瘍変異の役割

池田 和彦

【目的】骨髄増殖性腫瘍(MPN)は骨髄系細胞の増殖、髄外造血、動静脈の血管性合併症、急性白血病への進展などを呈する疾患群であり、本態は JAK2 V617F などのドライバー変異による細胞増殖である。未確定の潜在能をもつクローン性造血(CHIP)は、MPN などの骨髄系腫瘍と共通した遺伝子変異が存在するものの、血液疾患を発症していない状態である。MPN と CHIP はともに急性白血病などへの進展や血管性の合併症を呈する。ここでは MPN 変異を有するクローン性造血において、造血幹細胞が髄外造血と血管性の合併症を促進する巨核球ニッチ-髄外造血による病態を想定し、JAK2 V617F+造血細胞の動態と血管性病変への関与について検討を行った。

【方法】JAK2 V617F+造血細胞の髄外組織への浸潤様態、マウスの臓器におよぼす影響を肺において検討した。さらに、造血巣から組織において、分化成熟の過程における JAK2 V617F+造血細胞の分子遺伝学的変化を解析した。 【結果】JAK2 V617F トランスジェニックマウスおよびこれをドナーとした骨髄移植実験において、JAK2 V617F+造血細胞が肺の血管周囲に多数認められ、肺動脈中膜の肥厚を伴い、低酸素状態への曝露により肺高血圧症を呈した。 それらの造血細胞は造血に関わる未分化な分画ではなく、好中球が主体であり、肺動脈の中膜は JAK2 V617Fーの 非造血細胞に由来していた。造血幹細胞から肺の好中球に至る各成熟段階において遺伝子発現を解析し、成熟に従って 発現が増強する分子が見出され、その阻害実験により肺高血圧症の新規治療標的として有望である可能性が示唆された。 JAK2 V617F+好中球は、肺動脈中膜のリモデリングに重要な役割を果たすものと考えられる。

骨髄移植レシピエントの JAK2V617F<sup>+</sup>ドナー由来好中球と JAK2V617F<sup>-</sup>レシピエント由来肺動脈中膜



# 99 炎症と再生を協調して制御する分子メカニズムの解明

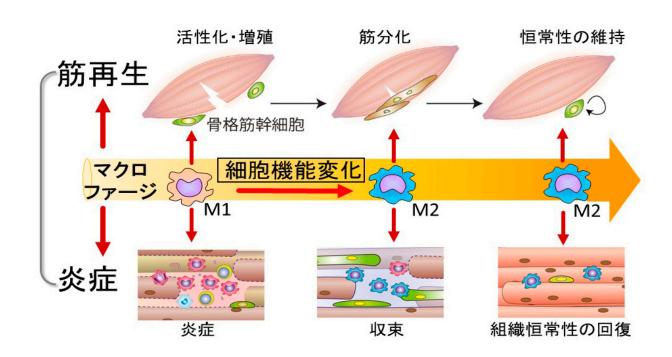
大石 由美子

【目的】サルコペニアは「加齢に伴う筋量の低下」と定義され、高齢者が生活の質を損なう主因となる。従ってサルコペニアの病態の解明と治療・予防法の開発は、高齢化を迎えた我が国における喫緊の課題である。外傷後に生じる2次性サルコペニアは、損傷と再生のインバランスを背景として発症する。筋肉が損傷を受けると、筋幹細胞を主体とした筋再生と炎症、組織修復とが同時に起こり、これら3つの機序が時空間的に連携し、協調して制御されることが筋恒常性の回復に必須である。本研究では、マクロファージが、筋衛星細胞や線維芽細胞と1細胞レベルで相互作用することによって、骨格筋の傷害によって生じた炎症と再生を協調し制御する分子機構を解明することを目的として実施した。

【方法】C57BL/6 マウス(雄、8 週齢)の前脛骨筋(tibialis anterior)に、ヘビ毒の成分であるカルジオトキシンを 投与し、傷害を与えた。損傷前後の骨格筋を採取し、間質細胞を単離してフローサイトメトリー(FACS)で解析 した後、シングルセルトランスクリプトーム解析を行った。

【結果】損傷前には、筋間質に存在するマクロファージの多くが Ly6C low/negative、F4/80 陽性の集団として同定された。ところが、損傷 3 日目には、従来報告されている Ly6C の発現レベルによる指標では説明できない、未知のマクロファージサブタイプが複数存在することが明らかとなった。これまでの研究から、マクロファージの遊走には、Ccl2 サイトカインを通したシグナルが重要であることが知られている。そこで、損傷後の筋間質に存在するマクロファージが、Ccl2 のレセプターである Ccr2 を発現するかどうかを解析したところ、予想に反し、Ccr2 を発現するのは Ly6Chigh の炎症性単球を主体とした集団に限局され、損傷部位に集積するマクロファージの多くは Ccr2 を発現していなかった。Ccr2 を発現しない細胞集団には、Ki67 など細胞増殖の指標となる遺伝子群の発現が高い細胞集団も存在した。

#### マクロファージは傷害によって生じた炎症と再生を主導する



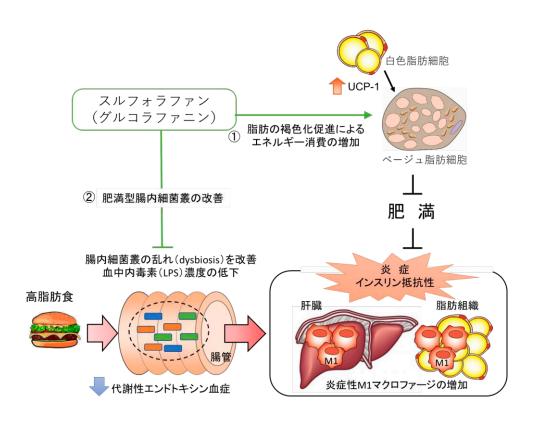
太田 嗣人

【目的】世界的に肥満人口は増加し、過体重や肥満の是正は、2型糖尿病や非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)等の予防・抑止の観点から重要視される。しかし、既存の抗肥満薬は、食欲抑制や脂肪吸収阻害等、エネルギー摂取を減少させる作用が主であり、抑うつや下痢等の副作用を伴う等、問題点は少なくない。現在、エネルギー消費を増大させ、肥満や NAFLD を抑制する安全性の高い薬剤や生理活性物質が求められている。我々は最近、酸化ストレス応答転写因子 Nrf2 を活性化するスルフォラファンの安定前駆体であるグルコラファニン(GR)が、高脂肪食肥満モデルの食餌摂取量を変化させずに、体重増加を減少させ、2型糖尿病と脂肪肝の発症を予防することを報告した。一方、Nrf2 遺伝子を欠損したマウスでは、GR による抗肥満・抗糖尿病効果、エネルギー消費の増大、および熱産生を担う脱共役タンパク質 Ucp1 発現の誘導がほぼ完全に消失していることを見出した。本研究では、1. Nrf2 活性化を介した GR の肥満症に対する治療効果とその分子メカニズム、2. GR の腸内環境への作用を介した NASH の改善効果を明らかにすることを目的とする。

【方法】雄性 7 週齢 C57BL/6J マウスに高脂肪食(HF)または通常食(NC)を 11 週間投与して、HF 群において 肥満を誘導した。HF を継続する群と HF+GR に変更する群とし、肥満に対する GR の治療効果を 4 週間検討した。 また、脂肪肝の進行型である NASH に対する GR の効果を明らかにするために、食餌性 NASH モデルである 高コレステロール高脂肪食に GR を配合し検討を行った。

【結果】肥満モデルにおける検討では、GR が 2 型糖尿病と脂肪肝を合併した進行した肥満モデルにおいて、体重を軽度に減少させ、インスリン抵抗性、耐糖能を改善し、脂肪肝を減弱させる治療効果がみられた。また、肝臓のマクロファージを抗炎症性の M2 優位に増加させ、肝臓への抗炎症作用が認められた。一方、NASH モデルにおいて肝臓の脂肪化、炎症、また、軽度の肝線維化が認められ、早期の NASH 病理像を呈していた。しかしながら、GR 投与群では、脂肪化、炎症、線維化に対する有意な影響は見られず、NASH に対する組織学的改善は乏しかった。

## スルフォラファンの肥満、脂肪肝に対する作用



## 101 ウィルス癌由来エクソソームの新機能

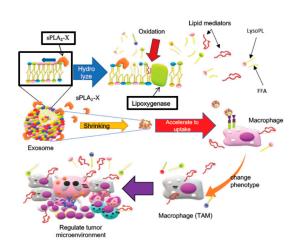
幸谷愛

【目的】我々は、Epstein-Barr ウィルス(EBV)感染による B 細胞性悪性リンパ腫の発症に関連して、EBV 由来 小分子 RNA が細胞外小胞エクソソームを介してマクロファージ特異的に取り込まれることがリンパ腫悪性化の鍵と なることを明らかにした。しかし、この内容物の輸送だけで腫瘍悪性化機構の全てを説明しきれないという課題が 残ったことから、エクソソーム膜を構成するリン脂質(PL)に着目し解析を行ったところ、腫瘍由来エクソソームの 独特な膜 PL 組成が明らかとなった。この知見から、「エクソソーム膜状の PL が脂質メディエーターの供給源になる のではないか」という仮説を考えた。脂質メディエーターにはプロスタグランジン等強力な生理活性を持つ物質が多い ため、我々はその産生に関与するリン脂質分解酵素、分泌性ホスホリパーゼ A2( $\mathrm{sPLA}_2$ )に着目し、エクソソームと の反応性を検証した。その結果、エクソソームが  $\mathrm{sPLA}_2$ の基質となることが明らかとなり、その新たな機能の存在が 示唆された。そこで本研究では、癌におけるエクソソーム膜の PL の生物学的意義のさらなる解明に迫ることを 目的とした。

【方法】 $sPLA_2$ 処理を行ったエクソソームを用いて以下の実験を行った。1. クライオ電顕による観察:東京大学の共用設備を利用し  $sPLA_2$ 処理後エクソソームの観察を行った。2. 取り込み速度変化の観察: THP-1 細胞株に標識エクソソームを添加し取り込みの様子を FACS と共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。3.  $sPLA_2$ 処理中にエクソソーム上で産生されるメディエーターの同定:質量分析にて酸化脂肪酸の検出を酵素処理前後で行い比較した。4. エクソソームから遊離したメディエーターの検出:  $sPLA_2$ 処理後に限外濾過フィルターを用いてエクソソームと $sPLA_2$ により遊離したものとに分画し質量分析にてそれぞれに含まれる脂質を検出した。5. GPCR の活性化: AP-TGF  $\alpha$  を THP-1、Jurkat 細胞に発現させ、エクソソームを添加後、その活性の変化をアルカリホスファターゼ活性値として検出した。6.  $In\ vivo\$ でのフェノタイプ検出: 健常マウスに複数回エクソソームを投与し、更に炎症を誘発させたときの変化を ELISA や組織学的手法にて解析した。

【結果】1. クライオ電顕による観察:粒子径の縮小だけでなく膜構造の変化や連銭形成などエクソソームの様々な形態変化が観察された。2. 取り込み速度変化の観察: $\mathrm{sPLA}_2$ 処理エクソソームにて取り込み速度の劇的な亢進が観測された。3.  $\mathrm{sPLA}_2$ 処理中にエクソソーム上で産生されるメディエーターの同定:強力な免疫抑制性メディエーターであるレゾルビン $\mathrm{D}_2$ ( $\mathrm{RvD}_2$ )が  $\mathrm{On}$  site で合成されている可能性が示唆され、さらにこれが取り込み促進に寄与するという側面も明らかとなった。4. エクソソームから遊離したメディエーターの検出: $\mathrm{sPLA}_2$ 処理を行うと多くの脂肪酸やリゾリン脂質、脂質メディエーターが細胞外環境に遊離することが明らかとなった。5.  $\mathrm{GPCR}$  の活性化: $\mathrm{sPLA}_2$  処理エクソソームが細胞膜上の  $\mathrm{GPCR}$  を著しく活性化させることが明らかとなった。6.  $\mathrm{In}$   $\mathrm{vivo}$  でのフェノタイプ検出: $\mathrm{sPLA}_2$  エクソソームが免疫抑制型フェノタイプを劇的に誘導することが明らかとなった。

EBV 関連癌におけるエクソソームの新機能



# 102 IgG4関連疾患の自己抗原同定による病態解明と臨床応用

児玉 裕三

【目的】IgG4 関連疾患は、血清 IgG4 高値を特徴とし、全身臓器の腫大と線維化を同時性・異時性にきたす新しい疾患概念である。2001 年に我が国において自己免疫性膵炎の血清 IgG4 高値が発見されたことを契機に、各臓器病変が一連の全身性疾患であることが明らかとなってきた。一方、高 IgG/IgG4 値やステロイドへの反応性より、IgG4 関連疾患には自己免疫の関与が疑われてきたが、その原因は不明であり、2014 年に我が国の指定難病に指定された。我々はこれまでに、自己免疫性膵炎の患者血清より IgG を抽出しマウスへ投与するという極めて独創的な手法を用い、IgG4 関連疾患の膵病変である自己免疫性膵炎に自己抗体が存在することを証明した。また、膵臓組織の構成タンパク質のスクリーニングの結果、自己免疫性膵炎患者が持つ自己抗体の標的自己抗原がラミニン 511 であることを同定し報告した。本研究では、我々による自己免疫性膵炎の病原性自己抗原・自己抗体の発見を基に、IgG4 関連疾患のさらなる自己抗原・自己抗体の同定、および同疾患の病態を解明することを目指し以下の検討を行なった。

【方法】1. 自己免疫性膵炎の新規自己抗原・自己抗体の同定:我々は、自己免疫性膵炎の自己抗体が、膵臓上皮細胞を裏打ちする基底膜の構成タンパク質を標的としている可能性を考えてきた。本研究ではラミニン 511 以外の自己抗原について引き続きスクリーニングを行った。2. IgG4 関連疾患の病態解明:我々が発見した自己抗体による IgG4 関連疾患の診断能を評価すると共に、その臨床像との関連についての検討を行い、病態解明と臨床応用への可能性について検討した。

【結果】1. 自己免疫性膵炎の新規自己抗原・自己抗体の同定:IgG4 関連疾患の膵病変である自己免疫性膵炎の患者血清を用い、ラミニン 511 のサブファミリータンパク質、あるいは機能的に関連するタンパク質についてELISA 法を用いて検討を行った。その結果、新規自己抗原候補 X、および抗 X 自己抗体を同定した。2. IgG4 関連疾患の病態解明:まず、自己免疫性膵炎における抗ラミニン 511 抗体、および抗 X 自己抗体の診断能について評価を行った。その結果、診断基準を満たす自己免疫性膵炎患者 60 例のうち、抗ラミニン自己抗体陽性例を 32 例、抗 X 自己抗体陽性例を 5 例に認めた。一方、コントロール 112 例にはこれらの自己抗体陽性例は認められなかった。興味深いことに、抗ラミニン自己抗体陽性例には悪性腫瘍の合併を 1 例も認めなかったが、抗 1 自己抗体陽性の 1 5 例のうち 1 例のりち 1 のりち 1 のりも 1 のりも 1 のりも 1 のり 1 のり

自己免疫性膵炎における新規自己抗体の有無と悪性腫瘍合併との関連

抗ラミニン511 自己抗体	+	-	-
抗X 自己抗体	-	-	+
症例数	32	23	5
悪性腫瘍の合併	0 (0%)	6 (29%)	3 (60%)

## 103 エクソソームmiRNAが膵β細胞増殖に及ぼす影響の解明

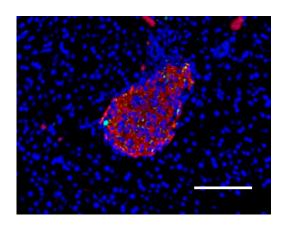
山田 哲也

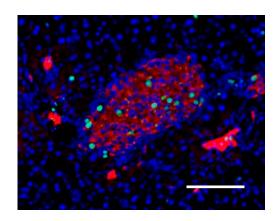
【目的】糖尿病における膵 $\beta$ 細胞の機能や増殖に及ぼす細胞/臓器連関の分子メカニズムは、ホルモンやアディポカインなどの液性因子や神経ネットワークを中心に様々な研究がなされているが、未だ不明な点が多い。例えば肥満によって肝臓にインスリン抵抗性が生じると膵 $\beta$ 細胞の増殖が促進されることや、脂肪組織特異的に IR(Insulin receptor)を後天的にノックアウトしたマウスで、膵臓の $\beta$ 細胞の増殖が見られたことが報告されているが、その分子メカニズムはほとんど明らかになっていない。これらは膵 $\beta$ 細胞の増殖促進メカニズムとして、細胞/臓器連関が重要な役割を果たしていることを示唆する。近年、様々な細胞から分泌されたエクソソームが生体内を循環し、他の細胞/臓器にエクソソーム miRNA を受け渡すことで、エクソソームが細胞/臓器連関の担い手として働くことが示された。これらの知見から、我々は生体内を循環するエクソソーム miRNA が膵 $\beta$ 細胞増殖に与える影響を検討することとした。肥満や脂肪組織特異的に IRをノックアウトしたマウスの血清中エクソソーム miRNA を網羅的に解析し、これらの環境で変化した miRNA を個別に検討し、膵 $\beta$ 細胞の増殖を促すエクソソーム miRNA の候補を探索する。本研究の成果は糖尿病の新たな治療法開発につながる可能性も想定され、大変意義深いと考えられる。

【方法】1. タモキシフェン誘導性脂肪組織特異的 IR ノックアウトマウスを作製した。2. IR ノックアウトマウスにおいて、耐糖能を評価した。3. 脂肪組織特異的 IR ノックアウトマウスの膵 $\beta$  細胞の Ki67 陽性率を測定した。4. 脂肪組織特異的 IR ノックアウトマウスの血清中エクソソーム miRNA を抽出し、次世代シークエンサー解析を行った。5. 高脂肪食負荷マウスと通常食マウスの血清中エクソソーム miRNA を抽出し、通常食に比して高脂肪食負荷により増えるエクソソーム miRNA の網羅的解析を次世代シークエンサーで行った。

【結果】タモキシフェン誘導性に IR をノックアウトするマウスモデルを作製した。 IR ノックアウトマウスにおいて、 膵  $\beta$  細胞の Ki67 陽性細胞数が増加し、 膵  $\beta$  細胞の増殖促進が確認できた。 これらのマウスの血清中エクソソーム miRNA を抽出し、コントロールに比して増加しているエクソソーム miRNA を探索する予定である。 さらに高脂肪食 負荷によって増える miRNA を 54 個抽出した。 これらから、インスリン作用の減弱した脂肪細胞に由来する エクソソーム miRNA を絞り込み、 膵  $\beta$  細胞の増殖に関係しうる miRNA を同定する予定である。

IR ノックアウトマウスにおいて、 $膵 \beta$  細胞の Ki7 陽性率の上昇がみられた





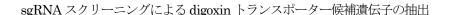
# 104 脳内薬物デリバリーを促進するトランスポーターの探索

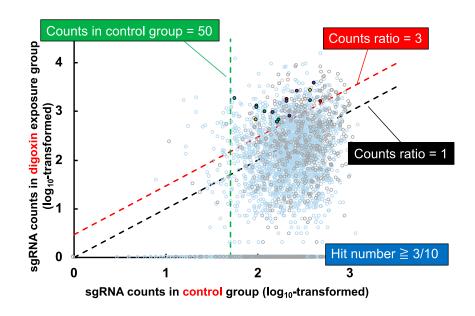
荒川 大

【目的】血液脳関門(BBB)の克服は、中枢神経系疾患に対する創薬の最大の課題である。BBBには薬物を積極的に 取り込むトランスポーターの存在が多く報告されており、その利用により効率的な薬物の脳内デリバリーが期待される が、関与するトランスポーター分子の実体は同定されていない。これは、従来の対象薬物の特徴からトランスポーター を推定する限定的手法では、分子の同定は困難であることを意味する。そこで本研究では、独自に構築した sgRNA ライブラリーを用い、取り込みに働くタンパク質全てを対象としてスクリーニングすることで、BBB 取り込み トランスポーターを同定することを目的に研究を行った。

【方法】脳毛細血管内皮細胞の特性を強く有する hCMEC/D3 細胞を用い、hCMEC/D3 へのトランスポーター介在 輸送を調べた。コラーゲンコートを施した 96-well plate に hCMEC/D3 細胞を播種し、37℃および 4℃における 薬物取り込みを行った。また、別のプレートに播種した hCMEC/D3 細胞を用い、薬物の曝露 72 時間後に WST-8 アッセイにより細胞毒性を評価した。sgRNA ライブラリーを用いたスクリーニングを行うため、レンチウイルスに組 み込まれた sgRNA ライブラリーを hCMEC/D3 細胞に感染させた。その後、8種の薬物(crizotinib、cyclosporine A、digoxin、imatinib、loperamide、mitoxantrone、paclitaxel 及び vincristine)をそれぞれ曝露し、一定時間後に ゲノム DNA を回収した。次世代シークエンサーでゲノム DNA に含まれる sgRNA の配列を読み込み、BBB 取り込みトランスポーター候補遺伝子を抽出した。

【結果】低分子及び中分子化合物の取り込みにトランスポーターが関与する可能性を調べるため、hCMEC/D3 細胞への 21 種の化合物の取り込みを調べた。その結果、低分子化合物の中でも比較的分子量が大きい化合物 16 種の取り込みに温度依存性が観察された。また、そのうち 8 種の薬物(crizotinib、cyclosporine A、digoxin、imatinib、loperamide、mitoxantrone、paclitaxel 及び vincristine)は hCMEC/D3 細胞に対して細胞毒性を示し、sgRNAスクリーニングに適用できることが示された。sgRNAライブラリーを hCMEC/D3 細胞に感染させ、これら薬物を用いたスクリーニング試験を行った。その結果、digoxinの排出に働く MDR1 が抽出され、本法の妥当性が示された。また、薬物の取り込み活性が期待できる solute carrier family および major facilitative superfamily として、14種の遺伝子が抽出された。現在見出された遺伝子のクローニングを行い、発現系を用いて基質認識性試験を実施している。





【目的】イトヒメハギの根を乾燥させた生薬であるオンジは、古来より精神を安定させる作用を有するものとして、漢方薬の構成生薬に使用されてきた。最近では、もの忘れ改善作用を期待した一般用医薬品としてオンジの抽出エキスが販売されるなど、オンジは中枢神経系の機能異常を改善する生薬として知られている。我々はこれまでに動物を用いた検討から、オンジ抽出エキスが抗うつ様作用を有すること、側坐核や海馬においてグリア細胞株由来神経栄養因子(GDNF)の発現を誘導すること、神経細胞の樹状突起スパインの成熟を促進することを示してきた。GDNFは、うつ病患者の血清中において有意に減少していることや、抗うつ薬により発現が誘導されることから、オンジ抽出エキスの抗うつ様作用に GDNF の発現誘導が大きく寄与するものと想定される。そこで本研究では、オンジ抽出エキスに含まれる GDNF 発現誘導活性を有する化合物を同定するために、GDNF 産生細胞であるラット脳由来アストロサイトを用いて、GDNF mRNA 発現量の変化を指標に成分の分画を行った。

【方法】3日齢のWistarratの大脳皮質から振盪法により単離したアストロサイトを実験に用いた。評価化合物を添加した6時間後に定量的RTPCR法により、GDNFのmRNA発現量を解析した。

【結果】GDNFのmRNA 発現量の変化を指標に、オンジ抽出エキスから GDNF 発現誘導活性を有する化合物の探索を行った。その結果、強力な GDNF mRNA 発現誘導活性を有する化合物として polygalasaponin XXX II (PS32) を 得た。PS32 にはフェニルプロパノイド部分の立体構造の違いにより E 体 (EPS32) と Z 体 (Z-PS32) の二つの立体異性体が存在するが、Z-PS32 と比べて E-PS32 でより強い GDNF mRNA 発現誘導活性が見られた。EPS32 を アルカリ加水分解し、フェニルプロパノイド部分を除いた desacyl PS32 とフェニルプロパノイド部分である (E)-4-methoxycinnamic acid (E-methoxy CA) に分離したところ、E-methoxy CA は E-PS32 よりは弱いものの GDNF mRNA 発現誘導活性が見られたのに対し、desacyl PS32 は GDNF mRNA 発現誘導活性を示さなかった。また、E-PS32 の GDNF mRNA 発現誘導活性は、E-NF-E-R 阻害剤により減弱した。以上の結果から、生薬のオンジは、含有成分 E-PS32 のフェニルプロパノイドを含む部分構造により、E-NF-E-R の活性化を介して GDNF 発現誘導活性を示す可能性が示された。

# (E/Z)-polygalasaponin XXX II の構造

# 106 自然リンパ球を制御するリガンドの探索と合成研究

井貫 晋輔

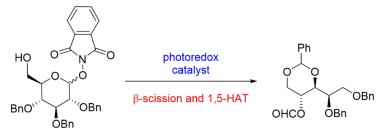
【目的】自然リンパ球は、自然免疫と獲得免疫の橋渡しを行い、免疫の初期応答において重要な役割を担う免疫細胞である。抗原認識受容体の有無で二つのグループに分類され、抗原認識受容体を有するグループとしては、mucosal-associated invariant T(MAIT)細胞などが知られている。MAIT 細胞は、T細胞受容体を介して、抗原提示細胞上の MR1 タンパク質とリガンドの複合体を認識して活性化され、サイトカイン誘導を介して、細菌感染からの生体防御など様々な免疫応答を示すとされている。しかしながら、リガンドとなる化合物が不明であったため、その機能解析や分子レベルでの理解が遅れていた。最近、微生物によるビタミン B2 合成の代謝産物である5-(2-oxopropylideneamino)-6-D-ribitylaminouracil(5-OP-RU)などが MR1 タンパク質と結合し、MAIT 細胞を活性化することが報告された。我々は、MAIT 細胞活性化に関わる MR1 や MAIT-TCR のリガンド認識機構の詳細を解明するために、MAIT 細胞の活性化に大きく寄与するとされる 5-OP-RU のポリオール部位の構造展開を計画した。特に本研究では、穏和な条件下、可視光エネルギーを電子移動に基づいた分子変換反応に利用可能である光酸化還元触媒反応を鍵としたポリオール構造の合成法の開発を検討した。

【方法】本研究では、光酸化還元触媒反応を用いて N-ヒドロキシフタルイミドを有する単糖誘導体からアルコキラジカルの発生に続く  $\beta$ 位の C-C 結合開裂によってポリオール構造を合成することを計画した。

【結果】様々な反応条件、基質を用いた検討を行った結果、1 位に N-ヒドロキシフタルイミド、6 位に無保護のヒドロキシ基を有するグルコース誘導体を用いて反応を行うと、望みの $\beta$ 開裂反応に続いて 1,5-hydrogen atom transfer (1,5-HAT) が進行して、ベンジリデンアセタールを有するポリオール誘導体を得ることができた。本手法を様々な単糖誘導体に適応すれば、多種多様なポリオール構造の合成が可能となる。現在、本反応を活用して、5-OP-RUのポリオール部位の構造展開を検討している。

#### 5-OP-RU の構造と光酸化還元触媒を用いたポリオール誘導体の合成

5-OP-RU: MAIT細胞活性化リガンド



光酸化還元触媒を用いたβ開裂と1,5-HAT反応によるポリオール誘導体の合成

# 107 高選択的ラジカル付加による含硫黄アルカロイドの創出

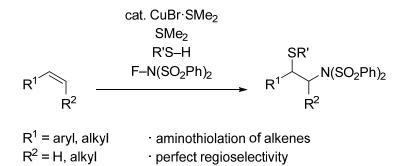
岩﨑 真之

【目的】含硫黄アルカロイドは、強力な生物活性を有することから、有機化学のみならず、医学・薬学・生物学など様々な分野で注目を集めている。よって、その効率的な合成法の開発は、有機化学において重要な課題の一つである。一方、炭素一炭素不飽和結合のビシナル二官能基化反応は、有機不飽和分子に二種類の官能基を一挙に組み込むことができるため、理想的な物質変換法であると言える。よって、アルケンのアミノチオ化反応は、含硫黄アルカロイドの直截的な合成法となるが、未だにその詳細な研究はなされていない。本研究では、重要な生物活性物質である含硫黄アルカロイドを迅速に提供することを目的に、遷移金属触媒を利用したアルケンの位置選択的なアミノチオ化反応の開発に取り組んだ。

【方法】遷移金属触媒を用いることで、位置選択的なアルケンのアミノチオ化反応を開発し、生物活性物質として有用な含硫黄アルカロイドの合成法を確立した。また、得られた付加体の変換反応を行うことで、本手法の有用性を明らかにした。その後、更なる有用なアルカロイドの創出を目的に、関連するアルケンのビシナル二官能基化反応に取り組んだ。

【結果】基質としてスチレンを選び、硫黄化剤としてp-トルエンチオールを、窒素化剤としてN-フルオロベンゼンスルホンイミド(NFSI)を用いて、アルケンのアミノチオ化反応について検討を行った。種々の反応条件について精査した結果、臭化銅( $\mathbf{I}$ )のジメチルスルフィド錯体の存在下、ジメチルスルフィドを添加することで、目的のアミノチオ化反応は完全な位置選択性をもって進行し、望みのアミノチオ化体を単一の生成物として良好な収率で得た。生成物の構造は $\mathbf{X}$ 線結晶構造解析により明らかにした。また、反応の一般性について検討を行った結果、本反応は高い基質一般性を有しており、さまざまなアミノチオ化体を収率よく得た。さらに、得られたアミノチオ化体は、更なる変換反応を行うことで、多様な含硫黄アルカロイドに誘導できることも明らかにした。

#### 高選択的なラジカル付加による含硫黄アルカロイドの創出



promoted by copper catalyst and SMe<sub>2</sub>
radical pathway

R' = aryl, alkyl

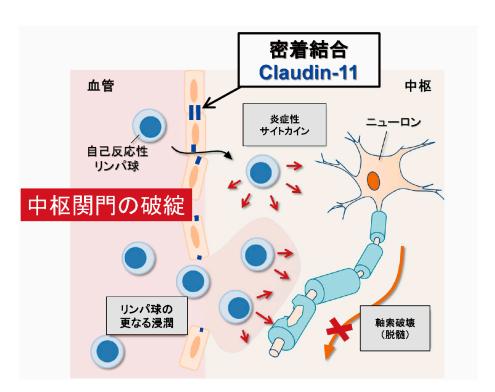
## 108 多発性硬化症における中枢関門崩壊の分子機構の解明

内田 康雄

【目的】本研究では、「中枢関門における役割がわかっていない Claudin-11 分子が、中枢関門の密着結合形成に重要な役者であり、多発性硬化症における中枢関門のバリア一機能破綻の原因分子である」という仮説を証明することを目的とした。

【方法】改良型 SWATH (sequential window acquisition of all theoretical fragment ion spectra) 法によって中枢 関門に発現する密着結合分子 claudin サブタイプを探索し、QTAP (Quantitative Targeted Absolute Proteomics) 法によって claudin サブタイプの絶対発現量を計測した。市販されている目的分子の特異抗体を用いて、定法に従い、免疫組織学的染色解析およびウェスタンブロット解析を行った。中枢の内皮系バリアーのモデルとしてヒト脳毛細血管 内皮細胞株 (hCMEC/D3 細胞) を、中枢の上皮系バリアーのモデルとして脈絡叢上皮細胞株 (TR-CSFB 細胞) を用いて、claudin サブタイプの密着結合形成への寄与を計測した。

【結果】ラットから単離した脳毛細血管において、全 claudin family の中で claudin-5 と claudin-11 のみのタンパク質発現が検出された。Claudin-11 のタンパク質絶対発現量は、ラット及びヒト脳毛細血管において、claudin-5 (従来から知られている血液脳関門の主要密着結合分子)と比較してそれぞれ1.0 倍及び2.8 倍多く、定量的な観点から (特にヒトで) claudin-11 の重要性が示唆された。免疫組織学的解析によって、脳毛細血管内皮細胞だけでなく他の中枢関門を構成する脊髄毛細血管内皮細胞、脈絡叢上皮細胞およびクモ膜にも発現することが示された。Claudin-11 発現の特異的ノックダウンによって、細胞膜非透過性物質である FITC-dextran の細胞間透過性が上昇し、claudin-11 が中枢の内皮系バリアー及び上皮系バリアーの両方の密着結合形成に寄与していることが示された。In vivo のヒトの血液脳関門における claudin-11 の寄与率は claudin-5 とほぼ同程度であると推定された。多発性硬化症の患者では脳毛細血管および脊髄毛細血管、多発性硬化症モデルマウスではそれらに加えてクモ膜において、claudin-11 の発現低下が示された。結論として、claudin-11 は複数の中枢関門の密着結合形成に重要な分子であり、その発現低下が多発性硬化症におけるそれら中枢関門の破綻の原因の一つであることが本研究によってはじめて明らかとなった。



多発性硬化症の中枢関門崩壊における Claudin-11 の関与

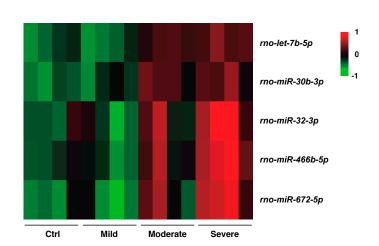
## 109 遺伝子発現プロファイルによる新規凍死診断法の開発

梅原 敬弘

【目的】凍死の診断は、寒冷暴露されたことで生じる左右心臓血の色調差や胃十二指腸粘膜下出血、紅色調死斑などの所見を組み合わせることで行われるが、他の死因においてもこれらの所見は認められることがあるため、凍死特異的な所見とはいえず、確定診断を行うことは難しい。ところで、法医学検査に用いられる検体は、死後経過時間を伴うため新鮮でないことが多く、そのような検体を用いた検査は、必ずしも死亡時の状態を反映しているとは限らない。従って、より死後変化に耐えうる分子診断マーカーの探索が必要となる。近年、死後変化に耐えうる分子としてmicroRNA (miRNA) の存在が注目されてきた。そこで本研究は、寒冷環境下での恒常性維持に関与する褐色脂肪組織 (BAT) における網羅的 miRNA・mRNA 発現検討を行い、死因究明が困難な病態の一つである凍死の診断に有用な分子診断マーカーを同定することで、死後変化に耐えうる新しい凍死の分子病理学的診断法を確立する。

【方法】コントロール群 (Ctrl)、軽度低体温群 (Mild)、中等度低体温群 (Moderate)、重度低体温群 (Severe) の動物モデルを作製した。軽度・中等度・重度低体温群は、直腸温がそれぞれ 30℃・22℃・12℃になった時点で 安楽死させ、直ちに BAT を摘出し、Total RNA を抽出した。コントロール群の直腸温は約 37℃であった。 マイクロアレイ及び次世代シークエンス (NGS) を用いて、網羅的 miRNA 及び mRNA 発現解析を行った。 詳細な発現検討は、quantitative real-time PCR (qRT-PCR) を用いて行った。

【結果】マイクロアレイ解析において 5 つの miRNA が、コントロール群と比較して重度低体温群で 1.5 倍以上の発現増加を示した。qRT-PCR において、rno-let-7b-5p の発現が体温低下とともに増加し、コントロール群と比較して中等度及び重度低体温群で有意な増加を示した。NGS 解析において、469 の mRNA がコントロール、軽度、中等度低体温群と比較して重度低体温群で 1.5 倍以上の発現増加を示した。さらに、qRT-PCR において、Pmaip1 及び  $Pgc1\alpha$  の発現が、重度低体温群のみで有意な増加を示した。本研究で同定された miRNA 及び mRNA は、凍死診断を補完する新規分子診断マーカーになりうる可能性が示唆された。



体温低下に伴い発現増加した5つの miRNA

江上 寛通

【目的】生物活性物質の適切な位置へフッ素を導入することにより、代謝安定性、脂溶性や体内動態を改善し、生物活性を向上させることができるため、フッ素を有機分子に導入することは、生命科学研究において重要な戦略のひとつとなっている。しかし、フッ素を含む天然有機化合物はほとんどなく、含フッ素有機化合物を供給するには、化学合成が必須となる。生体内がキラルな環境下にあることから、光学異性体は生体内で異なる作用を示すため、立体化学を識別する重要性は明らかである。以上を考慮すると、フッ素導入における不斉制御を実現する分子変換反応は重要な研究課題である。一方で、ステップエコノミーおよびアトムエコノミーの観点から近年 C・H 官能基化が注目され、フッ素化においても Mn ポルフィリン錯体やケトン触媒を用いた触媒的 C・H フッ素化反応の開発が活発に行われているものの、その不斉制御は未開拓である。そこで本研究では立体選択的な C・H フッ素化反応の開発を目指した。

【方法と結果】我々が最近開発した相間移動触媒を用いることで系内にキラルなフッ素化剤を調製し、このものと別途水素原子引き抜き(HAT)触媒により調製した炭素ラジカルとを反応させることで、 $C\cdot H$  フッ素化における立体制御が可能になるものと期待した。そこで  $C\cdot H$  フッ素化を促進する HAT 触媒を見出すため、アニオン性相間移動触媒と相互作用できるアミド基質を用いて種々検討した(式 1)。特に光照射下における  $C\cdot H$  フッ素化反応に適応されているケトン触媒を中心に検討したが、相間移動触媒が使用できる非極性溶媒中では HAT 自体が困難であることが明らかとなった。今後は遷移金属触媒との組み合わせによる  $C\cdot H$  フッ素化も検討する予定である。一方で  $C\cdot H$  フッ素化における不斉誘起は、炭素ラジカルとフッ素化剤との反応による  $C\cdot F$  結合形成段階で起こる。そのため、相間移動触媒により調製されるキラルなフッ素化剤が炭素ラジカルとの反応において、立体制御可能か確認した。すなわち、 $Et_3B$  と酸素により発生させたエチルラジカルをアルケン基質に付加させることでベンジルラジカルを調製し、このものを相間移動触媒条件に付した。その結果、中程度ながら不斉誘起を確認することができた。この知見はラジカル中間体を経る反応においても不斉フッ素化反応が可能であることを示す重要な知見であり、今後のさらなる展開が期待される。

## 相間移動触媒による不斉フッ素化

Ph HAT catalysts Selectfluor benzene, CFL Ph HAT catalysts Selectfluor benzene, CFL Ph HAT catalysts Selectfluor hot detected 
$$(1)$$
  $(2)$   $(2)$   $(3)$   $(3)$   $(3)$   $(4)$   $(4)$   $(4)$   $(4)$   $(4)$   $(5)$   $(5)$   $(5)$   $(6)$   $(7)$   $(7)$   $(8)$   $(8)$   $(8)$   $(9)$   $(1)$   $(1)$   $(1)$   $(1)$   $(2)$   $(2)$   $(2)$   $(3)$   $(3)$   $(4)$   $(4)$   $(4)$   $(4)$   $(4)$   $(5)$   $(5)$   $(5)$   $(6)$   $(6)$   $(7)$   $(7)$   $(8)$   $(8)$   $(8)$   $(9)$   $(1)$   $(1)$   $(1)$   $(1)$   $(2)$   $(2)$   $(2)$   $(3)$   $(3)$   $(4)$ 

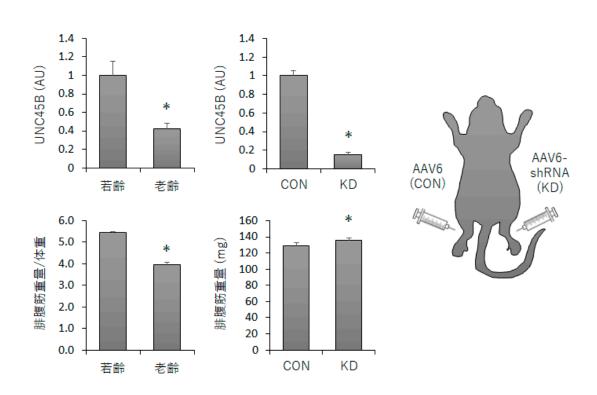
小笠原 理紀

【目的】 骨格筋は、日常生活動作などの運動器としての役割のみならず、代謝臓器としても重要な役割を果たすことから、その量・機能の低下は我々の健康に深刻な影響を及ぼす。 骨格筋量・機能は疾患の有無に関わらず加齢により低下するため、そのメカニズムの解明と予防・改善方法の開発が喫緊の課題となっている。 収縮タンパク質ミオシンの分子シャペロンである UNC45B は加齢によって低下することから、この変化が加齢性筋萎縮の一要因である可能性が考えられた。 本研究では、 骨格筋量の調節における UNC45B の役割を明らかにすることを目的とした。

【方法】3 か月齢(若齢)と 24 か月齢(老齢)の雄性 C57BL/6J マウスを対象とした。UNC45B を過剰発現させる際には UNC45B の発現 AAV6 ベクターを、ノックダウンさせる際には  $\sinh$ RNA 発現 AAV6 ベクターをそれぞれ片側の下腿三頭筋に導入した。反対側の下腿三頭筋にはコントロール AAV6 ベクターを導入した。AAV6 ベクター導入 2 週間後に下腿三頭筋を採取した。

【結果】 *UNC45B* のノックダウンによって遅筋線維優位なヒラメ筋重量は変化しなかったが、速筋線維優位な 腓腹筋重量が増加した。 *UNC45B* の過剰発現ではヒラメ筋重量、腓腹筋重量ともに変化しなかった。 *UNC45B* の過剰発現では結合パートナーである HSP70 と HSP90 の発現量に顕著な変化は観察されなかったが、ノックダウンに よって腓腹筋において両タンパク質の顕著な増加が観察された。 オートファジー基質である p62 やオートファゴソームマーカーである LC3 の発現量は、 *UNC45B*のノックダウンや過剰発現によって変化しなかった。

# UNC45B と骨格筋量:加齢とノックダウンの影響

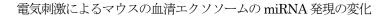


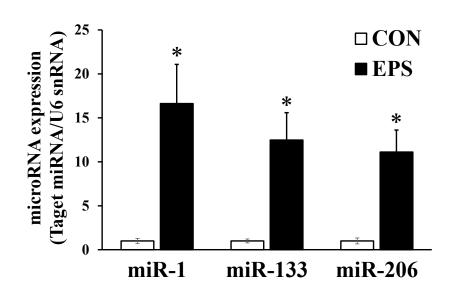
川西 範明

【目的】運動は骨格筋の代謝機能を向上させることで、代謝性疾患の予防あるいは改善の効果を有するが、この現象の調節機能の全容は明らかにされていない。細胞から分泌されるエクソソームには多種多様なタンパク質、遺伝子の発現を調節する作用を有するマイクロ RNA (miRNA) などが含まれている。細胞から分泌されたエクソソームは分泌臓器内で作用するのみならず、血液により運搬されて標的組織に作用することが知られている。持久的な運動は血液中のエクソソームに含まれる miRNA の発現プロファイルを変化させることが明らかになっていることから、エクソソームは骨格筋の糖代謝機能の調節など様々な運動適応現象に重要な役割を担うことが想定されるが、骨格筋由来のエクソソームの変動については不明瞭な点が数多く残されている。本研究では筋収縮により変動する骨格筋由来のエクソソームの miRNA の探索と、変動するエクソソームが骨格筋の遺伝子発現を制御するのか否かを検討した。

【方法】マウスの腓腹筋に経皮電気刺激を負荷して筋収縮を行わせた。電気刺激の 90 分後にマウスから血液を採取して、血清中のエクソソームを回収した。血清中エクソソームの数は Acetyl-CoA Acetylcholinesterase (AChE) の活性を酵素反応による比色定量法により測定した。また、血清中エクソソームから RNA を抽出した後に real-time PCR 法により microRNA の発現量を定量した。また、マウス骨格筋細胞株 C2C12 細胞にマウスの血清エクソソームを添加して、mRNA の発現量を real-time PCR 法により定量した。

【結果】マウスの骨格筋への経皮電気刺激は血清エクソソームの数は変化させなかった。興味深いことに、マウスの骨格筋への経皮電気刺激は血清エクソソームの miRNA (miR-1、miR-133、miR-206) の発現を増加させた。電気刺激を負荷したマウスの血清エクソソームの添加は C2C12 細胞の IL-6 の mRNA 発現を増加させた。



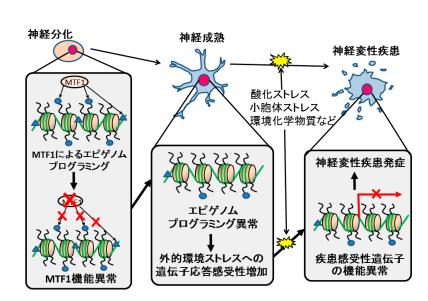


栗田 尚佳

【目的】神経変性疾患は、特定の神経細胞が変性、脱落することで起こる難治性の疾患である。また、神経変性疾患において、患者の大多数は家族的な遺伝歴を持たない孤発性である。これまでに、亜鉛、銅などの重金属と神経変性疾患との関わりが示唆されている。孤発性神経変性疾患発症の原因は、未だ解明されていないが、生活習慣、環境、化学物質の曝露などの外的な要因が考えられる。したがって、何らかの環境要因が引き起こす、脳神経における金属代謝異常が、孤発性の神経変性疾患発症に関わっている可能性が示唆される。近年、胎生期の環境要因が生後の疾患発症のリスクとなる「疾患胎児起源説: Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) 説」が提唱され、注目されている。DOHaDによる次世代影響は、胎生期に受ける環境要因によるエピゲノムプログラミング攪乱によって引き起こされると考えられている。神経変性疾患でも、DOHaDを基盤とした胎児発生期の環境を起源とする疾患発症の可能性が考えられる。以上より、胎生期における金属代謝関連遺伝子のエピゲノム変化の異常が、成人後の孤発性の神経変性疾患発症のリスクとなると考えられる。また、金属応答転写因子 (MTF1) は、亜鉛、銅などの必須微量金属による刺激により活性化され、生体内金属恒常性維持に働いている。また、MTF1 は正常な個体発生に必要不可欠と考えられており、以上から MTF1 による金属代謝関連遺伝子の胎生期エピゲノムプログラミング異常が、後天的な疾患発症のリスクとなることが予想される。本研究では、胎生期における金属応答転写因子 MTF1に注目し、神経分化への影響ならびに MTF1 の神経分化におけるエピゲノムプログラミングの役割を解明し、金属代謝異常を基にした神経変性疾患と DOHaD 仮説との関連を明らかにする。

【方法】神経分化における MTF1 の役割を解明するために、ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y を用い、レチノイン酸  $10\,\mu\,\mathrm{M}$ 、2% FBS を含む DMEM 培地中で 3 目間分化誘導した。分化後の神経突起伸長を蛍光免疫染色、ならびに MTF1 発現量をウエスタンブロットで解析した。また MTF1 を  $\mathrm{siRNA}$  でノックダウンし、同様に神経分化させ、神経突起伸長を評価した。また、金属代謝異常として亜鉛に注目し、金属キレート樹脂を用いて FBS から亜鉛を除去し、亜鉛除去培地を作製した。その培地中で SH-SY5Y を神経分化させ、神経突起伸長ならびに MTF1 発現量を評価した。

【結果】神経分化後の MTF1 発現量は未分化時と比較して減少した。また、MTF1 をノックダウンした場合、神経 突起伸長が抑制された。亜鉛除去培地を用いて、低亜鉛条件下で神経分化誘導した結果、低亜鉛により神経突起伸長の減少、ならびに MTF1 発現量も減少した。以上より、MTF1 は神経分化に関与していること、また低亜鉛条件下の神経突起伸長抑制には MTF1 が関与している可能性が示唆された。



MTF1 による神経発達期エピゲノムプログラミング異常を基盤とした神経変性疾患発症仮説

## 114 感覚機能に特異的に関連する皮質間ネットワークの解明

小島 翔

【目的】一定時間の機械的触覚刺激による介入は、刺激部位の感覚機能を向上させることが報告されている。この感覚機能の向上に伴い、感覚機能を司る一次体性感覚野の興奮性が変化することが示されている。触覚刺激直後の皮質活動は、一次体性感覚野で認められることが示されているが、刺激面内を刺激が移動する触覚刺激条件では、一次体性感覚野だけでなく、運動を司る一次運動野や高次の情報処理に関与する後頭頂葉なども活動することが示されている。よって、刺激直後の皮質活動が異なるのであれば、一定時間の触覚刺激介入の効果が刺激パターンによって異なる可能性が考えられる。そこで、本研究は感覚機能に特異的に関連する皮質間ネットワークを明らかにすることを目標に、機械的触覚刺激介入の刺激パターンによって皮質活動が変化するか否か明らかにすることとした。

【方法】対象は健常成人 21 名であった。機械的触覚刺激には、点字様刺激ピン 24 本を用い、刺激部位は右示指の指腹とした。刺激介入条件は、1. 合計 24 本の刺激ピンが同時に突出し刺激する条件(同時刺激条件)、2. 突出する縦 6 本の刺激ピン列が左から右に順序良く移動する条件(移動刺激条件)の 2 条件とした。各刺激介入は、20 Hz の刺激頻度で 1 秒間の刺激の後 5 秒間の休息を挟むパラダイムで 20 分間実施した。評価項目は、脳磁図を用いて触覚刺激後の皮質活動(体性感覚誘発磁界振幅値)および安静時の皮質活動周波数(15 名)と経頭蓋磁気刺激後の脳波による誘発振幅値(6 名)とし、介入前後で計測した。

【結果】同時刺激条件では、介入前に比べ介入後で体性感覚誘発磁界の振幅値が有意に大きな値を示した。一方、移動刺激条件では、介入前に比べ介入後で体性感覚誘発磁界の振幅値が有意に小さな値を示した。また、同時刺激条件での体性感覚誘発磁界の変化は介入前の誘発磁界の大きさと負の相関を示した。一方、移動刺激条件での体性感覚誘発磁界の変化は、皮質活動周波数の電流密度(beta 帯域)の変化と負の相関を示した。経頭蓋磁気刺激後の脳波計測では各介入前後で有意な変化は認められなかった。これまでの結果より、一定時間の機械的触覚刺激介入は、異なるメカニズムで感覚機能に関連する皮質領域に影響を及ぼす可能性が示唆された。

## 本研究の概略

#### 【介入方法:20分間】 【結果:脳磁図】 a. 刺激イメージ b. 同時刺激介入 a. 同時刺激介入 b. 移動刺激介入 (nAm) (nAm) 皮質活動 c. 移動刺激介入 皮質活動 10 = 0.047= 0.04915 【介入前後皮質活動計測方法】 a. 脳磁図 b. 経頭蓋磁気刺激後脳波 触覚刺激介入によって皮質活動が変化し、 その変化は触覚刺激介入のパターンによって異なる。

## 【結論】

一定時間の触覚刺激介入は感覚機能に関連する皮質部位の活動に 影響を与える可能性が示唆された

## 115 Aβ凝集阻害を指向したペプチドミメティックの開発

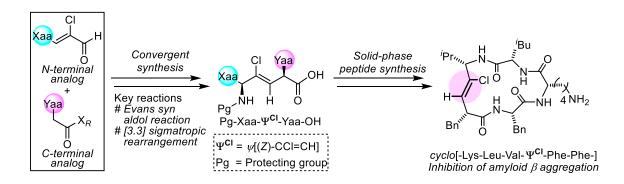
小早川 拓也

【目的】記憶や思考能力障害の症状を引き起こすアルツハイマー病(AD)は日常生活の単純な作業能力を損失する可能性のある疾患であり、治療薬の創出は急務である。アルツハイマー病の発症はアミロイド $\beta$ ペプチド( $A\beta$ )の凝集に伴う神経毒性によるものが有力視されており、凝集阻害可能なペプチド性リード化合物も報告されている。しかし、現在までにペプチドを起源とした機能性分子の創製には至っていない。本研究ではペプチドの構造解析、機能維持および向上を指向したペプチドミメティック(クロロアルケン型ジペプチドイソスター:CADI)をケミカルツールとするための CADI の新規合成戦略の開発および、新規のペプチドミメティックを基盤とした  $A\beta$ の凝集阻害の向上を目指した。

【方法】ペプチドミメティック、特に CADI を "収束的"に合成戦略を立案した。すなわち、N 末端と C 末端 アミノ酸に相当するアナログを別々に調製し、コンジュゲートさせる方法である。具体的には Evans syn aldol 反応で N 末端と C 末端アミノ酸に相当するアナログをコンジュゲートさせた後に、[3.3]・シグマトロピー転位 (市川アリルシアナート転位) を経ることで、目的とする CADI が合成できるものとした。また、本戦略で得られた ペプチドミメティックをペプチド固相合成と組み合わせることで、阻害能が期待される環状ペプチドミメティックの 合成を行った。

【結果】Evans syn aldol 反応と市川アリルシアナート転位を鍵反応とすることで、目的とする CADI を短工程にて合成することに成功した。また、本合成戦略を活用して、環状ペプチドミメティック( $cyclo[-Lys-Leu-Val-\phi[($ **2** $)-CCl=CH]-Phe-Phe-])の合成を達成した。得られた本環状ペプチドミメティックは <math>A\beta$  凝集阻害活性が大幅に向上することが確認された。

## CADI の収束的合成と A β 凝集阻害剤への応用



## 116 受容体タンパク質の機能制御を行う光酸素化分子の創出

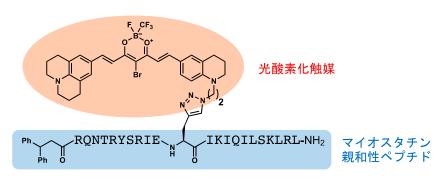
谷口 敦彦

【目的】トランスフォーミング増殖因子 $\beta$ (transforming growth factor -  $\beta$ : TGF- $\beta$ )スーパーファミリーに属するタンパク質であるマイオスタチンは、II型アクチビン受容体に結合して、細胞内へシグナル伝達することで、筋肉量を負に制御している。よって、この受容体シグナルを抑制することは筋肉量の増大につながり、筋ジストロフィー、カヘキシア、サルコペニア、廃用性筋萎縮等の筋萎縮性疾患の治療戦略として注目されている。したがって、本受容体シグナルを制御できるツールは有意義であると考えられる。我々は、マイオスタチン前駆体タンパク質の N 末端にあるプロドメイン部分が、マイオスタチンと相互作用していることに着目し、マウス由来プロドメイン配列よりマイオスタチンに親和性を有する 23 残基のペプチド 1 を見出している。ペプチド 1 はマイオスタチンに対して弱い阻害作用を示し、マイオスタチンと可逆的に結合していると考えられた。そこで、このマイオスタチン親和性ペプチド 1 を利用して、マイオスタチンの光酸素化を基盤とした、光照射に応答して受容体シグナルを制御する手法の開発を目指した。

【方法】まず、マイオスタチン親和性ペプチド 1 に光酸素化触媒 2 を担持したコンジュゲート 3 を合成した。 次に、コンジュゲート 3 にマイオスタチン共存下で光を照射し、マイオスタチンの光酸素化反応を MALDI-TOFMS にて追跡した。さらに、本光酸素化が与えるマイオスタチン活性への影響を、HEK293 細胞を用いた *in vitro* ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて評価した。

【結果】合成した光酸素化触媒ーペプチドコンジュゲート 3 のみ又は光照射のみの処理では、マイオスタチンの酸素化は認められなかったのに対して、コンジュゲート 3 と光照射で処理した場合は、マイオスタチンが効率的に光酸素化された。さらに、コンジュゲート 3 をマイオスタチンに添加した際は、マイオスタチン活性による受容体シグナルが誘導された一方、そこに光照射を行うことで、本受容体シグナルは誘導されなかった。これは、光照射によって受容体シグナルを制御できる可能性を示唆する。

## マイオスタチン親和性ペプチドと光酸素化触媒からなるコンジュゲート 3



コンジュゲート3

## 117 分子対称性を利用した縮環式アルカロイドの不斉合成

原田 慎吾

【目的】窒素架橋構造を含む複雑縮環分子は、有用な生物活性を示す化合物群である。しかし本分子群を効率的かつ網羅的に合成する方法が確立されておらず、その開発が急務となっている。今回、我々は標的分子構造に潜在する対称性に着目した新しい合成アプローチを立案した。独自に開発したアミド挿入反応による対称アザビシクロ環の構築と、その非対称化法を駆使して、本化合物群の効率的かつ分岐的な合成を行う。さらに本法を利用した生物活性化合物および類縁体の不斉全合成を目指して研究を行った。

【方法】1. アミド挿入反応: Rh<sub>2</sub>(NHCO/Bu)<sub>4</sub> 触媒(0.4 mol%)をジクロロメタン溶媒に溶解させた溶液に対して、ジアゾ基を有する第3級アミド誘導体のジクロロメタン溶液を滴下し、室温下で20分反応させた。その後反応溶液を-78 ℃に冷却して Diisobutylaluminium hydride(DIBALH)のヘキサン溶液を加えて、1 時間反応させた。ロッシェル塩を含む水溶液を加え、酢酸エチルで抽出後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、窒素渡環化合物を合成した。2. エナンチオ選択的非対称化反応: Brønsted 酸触媒と対称アミノジオール基質を溶解したトルエン溶液に対し、イソ酪酸無水物を加え80℃で2日間反応させた。反応溶液に水を加え、酢酸エチルで抽出後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、対応するモノエステルを得た。光学純度はキラル HPLC 測定により決定した。

【結果】我々は、独自開発したアミド結合に対するカルベン挿入反応とキラル Brønsted 酸触媒によるエナンチオ選択的アシル化反応を鍵工程とする生物活性物質の合成を検討した。これらの鍵工程に関して、網羅的な検討により、高立体選択的に進行する条件を見出した。得られたキラルイソキヌクリジン誘導体から抗悪性腫瘍薬ビンブラスチンの合成前駆体である Catharanthine への変換を検討した。Albright-Goldman 酸化を行うことでケトンへと酸化し、トリフリル化に続く還元によりアルケンへと変換した。その後、エステルを加水分解して、ノシル基を脱保護、インドール部位を導入した。分子内七員環形成反応は、化学量論量のパラジウム試薬を用いることでほぼ定量的に進行し、カタランチンの合成中間体を得ることに成功した。また本合成戦略に立脚した他のアルカロイドの合成検討も並行して行い、Vellosimine の既知中間体の合成を行い、合成化学的な有用性を実証した。本戦略においては合成経路終盤にインドール部位を導入するため、インドール上に様々な置換基を有する類縁体が取得可能となり、ダイバージェントな合成法としての応用が期待される。以上の通り、分子構造が潜在的に内包する対称性を活用した合成戦略を開発した。

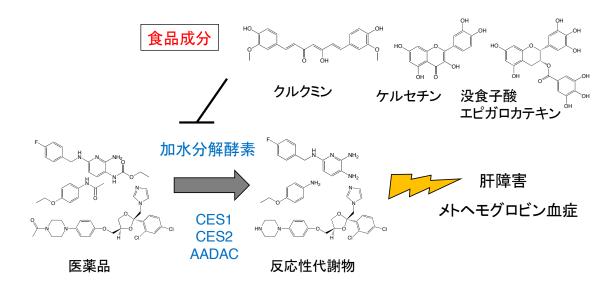
# 抗悪性腫瘍薬前駆体 Catharanthine の合成中間体の不斉合成

【目的】医薬品による副作用・毒性発症には肝臓に発現する薬物代謝酵素により生成される反応性代謝物に起因する例が多く、主な薬物代謝酵素であるシトクロム P450 に関する研究に精力が注がれてきた。近年、シトクロム P450 以外の酵素も副作用発現に関与する例が散見され、その阻害特性などの機能解明が課題となっている。シトクロム P450 以外の酵素の中でも加水分解酵素が医薬品の副作用および毒性発症に関与する例が多いことを明らかにしてきた。本研究では、毒性発現の原因となる加水分解酵素を特異的に阻害する化合物を食品成分から見出し、食薬相互作用を利用して、より安全で効果的な薬物治療が可能となるか明らかにすることを目的とした。

【方法】薬物の加水分解反応を触媒することでよく知られるカルボキシルエステラーゼ 1 (CES1)、CES2 およびアリルアセタミドデアセチラーゼ (AADAC) が高く発現する薬物代謝の主要臓器、ヒト肝臓のミクロソーム画分におけるフェノフィブラート (CES1 基質)、プロカイン (CES2 基質) およびフェナセチン (AADAC 基質) の加水分解酵素活性に対する 35 種類の食品成分の阻害効果を評価した。強い阻害効果を示した食品成分について、B57BL/6Jマウスを用いた *in vivo* 試験および加水分解酵素を発現させた細胞を用いた *in vitro* 試験において、薬物により認められる毒性が抑制されるかどうか解析した。

【結果】ヒト肝臓ミクロソームを用いて 3 種類の加水分解酵素の酵素活性に対する 35 種類の食品成分の阻害効果を解析したところ、クルクミンとケルセチンが全ての加水分解酵素を強力に、エピカテキンや没食子酸エピガロカテキン(EGCg)が AADAC を特異的かつ強力に阻害することを見出した。加水分解酵素の中でも AADAC が特に医薬品毒性の発現に関与する事例が多いため、AADAC に対する EGCg の阻害効果についてマウスを用いて in vivo で評価することを試みたが、マウス肝臓ミクロソームにおける Aadac 酵素活性は EGCg により阻害されなかった。食品成分による加水分解酵素への阻害効果には種差が認められる可能性が大きいと考え、食品成分の医薬品毒性に対する抑制効果の検討は細胞を用いた in vitro において行った。CES2 を発現させた細胞において解熱鎮痛薬フルピルチンが、AADAC を発現させた細胞において真菌症治療薬ケトコナゾールが細胞毒性を示したが、前者ではケルセチンにより、後者では EGCg により毒性の抑制効果が認められた。さらに、解熱鎮痛薬フェナセチンが AADAC により加水分解されることで認められるメトヘモグロビンの生成は EGCg の存在下において抑制された。このように、食品成分の中に加水分解酵素を強力に阻害し、毒性発現を抑制するものが見出された。このように本研究において、食薬相互作用を利用して、医薬品の副作用発症率を減少できる可能性が示された。

## 医薬品毒性に関与する加水分解酵素を阻害する食品成分の探索

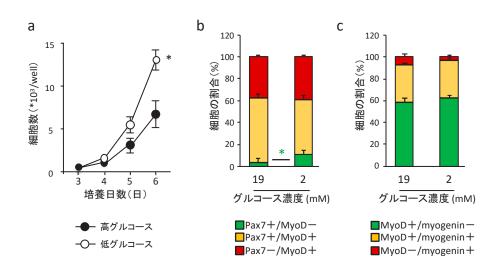


【目的】骨格筋は損傷しても速やかに修復することのできる再生能力に富んだ組織である。筋再生の主役は骨格筋の体性幹細胞であるサテライト細胞である。サテライト細胞である。サテライト細胞である。サテライト細胞である。サテライト細胞の機能は筋再生のみならず、筋量の維持に重要であることから、その機能調節機序の理解が求められている。我々はこれまで、マウスの骨格筋から採取したサテライト細胞を培養し、その増殖能力を評価できるアッセイ系を構築してきた。その過程で、サテライト細胞はグルコース濃度の高い環境におかれると増殖能力が低下することを発見した。細胞増殖にはエネルギーが必要なため、ほとんどの細胞の場合、グルコースは増殖を促進させるように働き、枯渇すれば細胞は死滅してしまう。しかしサテライト細胞の場合は逆で、グルコースが多いほど増殖が抑制され、グルコースが少ないほど増殖が活発になる。以上の知見から、血糖値の高い疾患である糖尿病で骨格筋が萎縮するのは、高血糖によってサテライト細胞の増殖能力が低下するためであるという仮説が立てられたが、その機序は明らかにされていない。本研究の目的は、高濃度のグルコースがサテライト細胞の増殖力を抑制する分子機序を解明することである。

【方法】マウスの骨格筋(長指伸筋)から筋線維を単離し、酵素処理によってサテライト細胞を播種した。高グルコース培地(最終濃度 19 mM)と低グルコース培地(最終濃度 2 mM)をそれぞれ調製し、グルコース濃度の異なる条件で培養した。培養 3、4、5、6 日目に細胞を 4%PFA で固定し、筋分化のステージを同定するためにそれぞれの段階のマーカー・タンパク質の免疫染色を行った。また、エネルギー・センサーである AMP キナーゼ (AMPK) の関与を検証するために、AMPK 活性化薬である AICAR を添加し、AMPK のリン酸化と細胞増殖を評価した。さらに、グルコースがサテライト細胞の増殖および自己複製に及ぼす影響の分子機序を明らかにするために、培養 6 日目の細胞から RNA を回収し、RNA シーケンス解析を行った。

【結果】低グルコースで培養すると 6 日目の時点で高グルコース条件より細胞数が有意に増加し、高濃度のグルコースは細胞の増殖を抑制することが示された。また、Pax7 と MyoD を共染色した結果、Pax7 陽性かつ MyoD 陰性の細胞集団の割合が、高グルコースより低グルコース条件で有意に増加した。AICAR を  $200 \, \mu$  M の濃度で高グルコース培地に添加し 6 日間培養したところ、AMPK のリン酸化の上昇が認められた。しかしながら、低グルコースで培養した細胞では AMPK のリン酸化の上昇が確認されなかった。また、同条件のサンプルを用い、培養 6 日目の細胞数を計測した結果、通常培養と AICAR 添加培養で細胞数に差は認められなかった。すなわち、低グルコース培養で生じるサテライト細胞の増殖亢進は、AMPK を薬理的に活性化しても再現されることはなかった。培養 6 日目の細胞で RNAシーケンス解析を行った結果、グルコース濃度で発現量が 2 倍以上変化する遺伝子を 1.207 個同定した。

グルコース濃度によるサテライト細胞の増殖と運命決定の変化

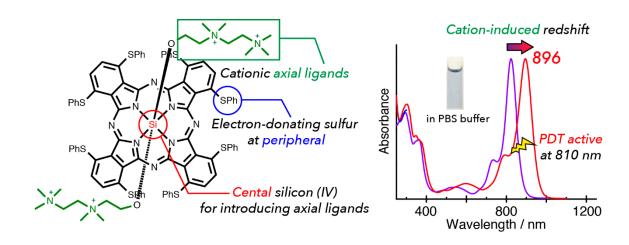


【目的】可視~近赤外光を強く吸収するフタロシアニンを基に、「生体系へ適用可能な親水性」「『生体の窓』と呼ばれる近赤外光の選択的吸収」を同時に達成するための分子デザインとして、「元素特性の相乗効果を利用したフタロシアニンケイ素錯体」を新たに提案し、合成法の開発および光線力学療法への応用を行う。光線力学療法 (PDT) は光感受性を示す色素をがんなどの病理組織に集積させ、レーザー光を照射することで病理組織のみを選択的に駆除する手法であり、既に国内でも加齢黄斑変性症に対する治療などにおいて認可された手法である。照射された光を色素(光増感剤)が吸収し、近傍で細胞毒性のある一重項酸素を発生させ、これが病理組織を駆除するとされる。よって、空間選択性に優れており、患者への負担も少ないことが利点として挙げられ、薬学・医学の分野で注目を集めている。一方で従来用いられている光増感剤が利用できる波長は 600 nm 程度が限界であり、生体深部に対する透過性に問題があった。一方、フタロシアニン類は可視~近赤外光を強く吸収し、光物理特性の制御も容易であるため、光増感剤としての応用研究も行われていたが、「生体の窓」と呼ばれる領域である 800 nm を超える光を活用した材料は知られていなかった。以上の背景から、生体応用を指向したフタロシアニン近赤外材料の開発が PDT における新たな展開に貢献できると考え、検討を行った。

【方法】フタロシアニンケイ素錯体は中心ケイ素上に様々な官能基を導入できることが知られている。例えば、カチオン性イオン官能基を導入すれば親水性が向上するため、生体材料への適用に有利となることが知られている。以前の知見から、フタロシアニン周辺部に硫黄置換基を導入し、中心に電子不足のリン原子を導入することが近赤外光の活用において重要であることがわかっていた。カチオン性イオンは電子不足と捉えることもできるため、先の結果を踏まえて周辺に硫黄置換基を導入し、ケイ素上にカチオン性イオン官能基を導入したフタロシアニンは生体適用可能な親水性と近赤外光の選択的吸収の両方を実現できるのではないかと仮説を立て、検討を行った。

【結果】既存のフタロシアニン合成法に則ることで、目的のケイ素錯体を良好な収率で得ることができた。親水性溶媒に対する溶解性を評価したところ、イオン官能基の導入により溶解性が向上していることを確認できた。また、親水性溶媒中においてしばしば問題となる色素の会合も観測されなかった。これらの化合物の溶液中における吸収スペクトルを測定したところ、Q 帯と呼ばれる強い吸収帯を 800 nm を超える近赤外領域に観測した。また、興味深いことに、イオン官能基の導入による Q 帯のさらなる長波長化が観測された。電気化学測定および理論計算による解析から、この効果が周辺の硫黄置換基との相乗効果によるものと明らかにした。開発したフタロシアニンを用いて、HEK293T 細胞に対する光毒性を評価した。照射光として 810 nm の近赤外光を用いたところ、明確な光毒性を観測することができ、本材料が近赤外光を用いた PDT へ適用できる可能性を示すことができた。

周辺置換基とケイ素上軸配位子効果に基づく近赤外光吸収フタロシアニンの設計



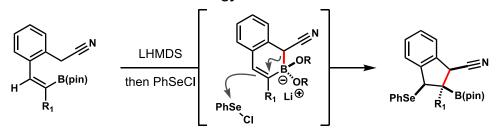
【目的】有機ホウ素化合物は現代の有機化学において欠かすことのできない一群である。特に、立体中心を持つアルキルボロン酸誘導体においては炭素―ホウ素結合が様々な炭素―炭素および炭素―ヘテロ元素結合へと立体特異的に変換可能であり、様々な化合物へと誘導可能な中間体として、また抗がん剤ボルテゾミブのようにホウ素化合物そのものが生体高分子と特異的に相互作用するホウ素医薬品として幅広く活用されている。本研究では、このような機能の期待できる、複雑な構造を持つ多官能性ボロン酸の効率的な合成法の確立を目指し、アルケニルホウ素アート錯体の1,2-メタレート転位を活用する反応プロセスの開発を行った。

【方法】本研究では、アルケニルボロン酸アート錯体の 1,2-メタレート転位をシクロアルキルボロン酸のような環状構造を持つホウ素化合物合成に展開するため、1. ボラサイクルを活用する環縮小型メタレート転位によるシクロアルキルボロン酸の構築、および 2. シクロプロペニルボロン酸エステルの歪み開放型メタレート転位によるシクロプロピルボロン酸群の立体選択的合成、の二つのアプローチを検討した。

【結果】環縮小型のメタレート転位を進行させるため、分子内にシアノ基を持つビニルボロン酸エステルを基質として設計した。塩基性条件下で発生させたシアノカルバニオンを求核剤としてボラサイクル(環状ホウ素)を形成し、そこに求電子剤を加えることで反応を試みた。反応の立体制御を期待し、基質の持つアルコキシドをホウ素の配向基として用いるアプローチを検討したが、想定した中間体の発生が困難であり、残念ながら目的の転位体を得ることができなかった。一方で、水酸基を持たない基質においては、セレン化剤を求電子剤とすることで環縮小型メタレート転位を進行させることが可能であり、三連続立体中心を持つインダン骨格のボロン酸エステルをジアステレオ選択的に合成することができた。また、前例のないシクロプロペニルボロン酸エステルアート錯体のメタレート転位反応の開発に取り組んだ。シクロプロペニルリチウムとボロン酸エステルとの反応により調製したアート錯体に対し、求電子剤を作用させることで転位を引き起こし、多置換シクロプロピルボロン酸へと導いた。ハロゲン化剤との反応では転位は進行せず、ビニルハライドが選択的に得られる一方、セレン化剤を求電子剤とすることで望みのメタレート転位が進行し、cis-β-セレノシクロプロピルボロン酸エステルが高立体選択的に合成できることを見出した。

# 本研究の概要

# New Methodology: 環縮小型メタレート転位



New Reactivity: シクロプロペニルボロン酸エステルを利用する歪み開放型カップリング



# 122 松果体メラトニンによる網膜の光感受性抑制機構の解明

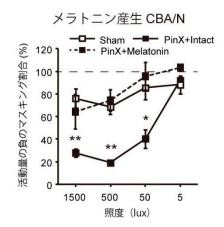
池上 啓介

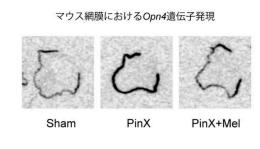
【目的】生物の多くの生理現象は約24時間周期の概日リズムを持っている。哺乳類では環境光は眼球の網膜で受容され、脳視床下部の体内時計中枢である視交叉上核に伝達され、時計をリセットさせる。松果体のメラトニンもこの経路で合成分泌を制御され、ヒトでは睡眠ホルモンとして働く。日本人の10人に4人が何らかの不眠や睡眠障害を抱えていると言われ、睡眠障害のうち、非24時間睡眠覚醒症候群は、通入眠と覚醒の時刻が毎日1~2時間ずつ遅れ、睡眠覚醒リズムが24時間よりも長い周期を示す。原因として光感受性の低下が挙げられているが、その因果関係やメカニズムもわかっていない。我々のこれまでの研究で松果体を除去により光感受性が増加することが判明し、松果体メラトニンが光同調における光感受性に関与しているのではないかと考えられた。そこで、本研究では松果体メラトニンによる光感受性制御機構の解明を目的とした。

【方法】4~5 週齢雄のメラトニン産生 CBA/N マウスおよびメラトニン欠損 C57BL/6 マウスの松果体を除去 (PinX) 後、16 時間明期 8 時間暗期の明暗環境下で、暗期に 1 時間光照射し、活動量の抑制(マスキング)効果を解析した。メラトニン投与によるマスキングの抑制効果を検証した。メラトニンが作用する部位を検証するため、網膜変性 rd/rdCBA/J マウスを用いてマスキング効果を解析した。次に青色と緑色の LED を用いて PinX マウスによるマスキング効果を検証し、網膜内層の青色吸収する光受容体 Opn4 の関与を確認した。さらに PinX およびメラトニン投与による Opn4 発現への影響を *in situ* hybridization 法およにウェスタンブロット法により検証した。最後に夜間薄明環境下(12 時間明期 400 lux、12 時間暗期 5 lux:12L12dL)で非 24 時間型睡眠障害様行動を示すマウスにおいて、メラトニン受容体アンタゴニストの慢性投与による改善効果を検証した。

【結果】CBA/N マウスにおいて、PinX によって増幅されていたマスキング効果は、メラトニン投与により低下した。C57BL/6 マウスでは PinX による影響はなく、メラトニンに光感受性が抑制されることが示唆された。網膜変性マウスでも PinX によってマスキング効果が増幅し、メラトニン投与により回復した。さらに青色光にのみ PinX によるマスキング効果増幅を示した。これらの発見は、メラトニンが網膜内層の MT1 に作用して Opn4 発現細胞の光感受性を抑制している可能性を示唆している。そこで、網膜 Opn4 発現を解析したところ、PinX により発現量が増加しメラトニンにより抑制された。タンパク質レベルでも同様の結果であったことから、メラトニンが Opn4 の発現量を抑制することを示唆した。しかし、MT1 アンタゴニスト慢性投与では非 24 時間睡眠覚醒症候群様行動を回復させる効果が得られず、今後濃度検討や遺伝子改変によるさらなる検討が必要である。

松果体除去とメラトニン投与によるマスキング効果と網膜の Opn4 発現への影響



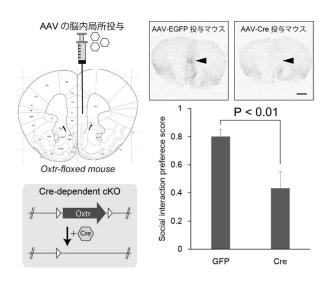


犬束 歩

【目的】近年、社会における競争的傾向が高まっている。その際、競争に敗北した人達が精神的健康をいかに保つかということは、個人にとっても社会全体にとっても重要な課題である。マウスやラットといった齧歯類においても、社会的敗北は社会的忌避行動や報酬への嗜好性減弱、不安様行動の亢進といった、うつ病に類似した現象をもたらす。しかし、その神経機構は良く分かっていない。社会的敗北ストレスによって誘導される社会的忌避行動には、前頭前皮質が関与する。また、前頭前皮質にはオキシトシン受容体が発現しており、社会的敗北ストレスによるオキシトシン産生ニューロンの活性化は不安解消を介して社会的忌避行動を緩和しているという仮説が立てられる。本研究では前頭前皮質のオキシトシン受容体発現ニューロンの投射経路選択的な活動操作・活動記録を達成し、社会的敗北ストレスによって引き起こされる社会的接触を求める意欲の変化における役割を明らかにすることを目的とした。【方法】前頭前皮質のオキシトシン受容体を特異的にノックアウトするため、オキシトシン受容体(Oxtr)のトランスジェニックマウスに対するアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの脳内局所投与を行った。具体的には、オキシトシン受容体が Cre 依存的に脱落する Oxtr-floxed マウスの前頭前皮質に、AAV-CMV-EGFP-2A-Cre あるいは対照群としてAAV-CMV-EGFP を、脳定位固定装置を用いて局所投与した。AAV 投与の 4 週後から高架式十字迷路、社会的忌避行動試験、尾懸垂試験、強制水泳試験を行った。その後、10 日間の ICR マウスによる社会的敗北を与えてから、一連の行動実験を繰り返し行った。最後に、ウイルス投与したマウスの脳切片に対して1251で放射性標識した OVTAを用いたオートラジオグラフィーを行い、オキシトシン受容体の脳内における発現を確認した。

【結果】オートラジオグラフィーでは、前頭前皮質に対照群で見られるオキシトシン受容体の発現が、テスト群では大幅に欠損していることが確認された。対照群において、社会的敗北ストレスの前後で高架式十字迷路では open arm の滞在時間低下、尾懸垂試験、強制水泳試験では無動時間の増加が確認され、社会的忌避行動試験では他個体への社会的接触の時間が有意に低下していた。テスト群と対照群との間では社会的敗北を与える前の行動試験では有意差が見られるものはなかった。一方、社会的敗北ストレスを与えた後の行動試験では、高架式十字迷路、尾懸垂試験、強制水泳試験では有意差が無かったものの、社会的忌避行動試験では他個体への社会的接触がテスト群において優位に低かった。こうした実験結果は、前頭前皮質のオキシトシン受容体が社会的敗北ストレスによる社会的忌避行動を緩和するような働きを果たしていることを示唆している。

前頭前皮質オキシトシン受容体の欠失による社会的忌避行動への影響

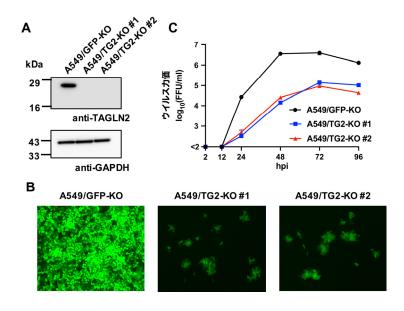


【目的】アレナウイルス科にはヒトに致死的なウイルス性出血熱を引き起こす病原体が複数存在し、それぞれの流行地域で公衆衛生上の重要な問題となっている。特にラッサ熱を引き起こすラッサウイルスは最も人類への影響が大きく、西アフリカで毎年数十万人の患者とおよそ 5 千人の死者を出している。重要なヒトの感染症でありながら確立された治療法や予防法のないラッサ熱は Blueprint Priority Diseases (WHO) に指定されており、その対策は世界的な課題である。我々は先行研究において、ラッサウイルスの治療標的となり得る宿主細胞因子を同定するため、ラッサウイルスと近縁のリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV) ヌクレオプロテイン (NP) のインタラクトーム解析を行った。この研究では NP と特異的に結合する 171 個の宿主因子を同定し、その中の ATP1A1 (Na+/K+ATPase) が LCMV だけでなく、ラッサウイルスやアルゼンチン出血熱を引き起こすフニンウイルスの増殖にも利用されている因子であることが明らかとなった。本研究では、先の研究で同定された NP 結合宿主タンパク質のうち、ATP1A1 以外の分子の、LCMV 増殖における役割を解析した。

【方法】先行研究で同定したNP結合タンパク質のうち、LCMV増殖に寄与する候補宿主因子としてCCT2、TAGLN2、RBM14 に着目し、それぞれの遺伝子ノックアウト(KO)細胞を作出した。 それら KO 細胞にレポーター遺伝子 ZsGreen(ZsG)を発現する組換え LCMV(rLCMV-ZsG)を感染させ、培養上清中のウイルス力価を測定した。 次に、候補宿主因子の LCMV 増殖における役割を明らかにするため、KO 細胞で rLCMV-ZsG を連続継代し、増殖が抑制されない変異株の出現をモニターした。 得られた変異株のゲノム配列を解析し、変異を同定した。 該当の変異をあらかじめ導入した rLCMV をリバースジェネティクス系により作製し、KO 細胞での増殖効率を解析した。

【結果】 TAGLN2 に関しては KO 効率の良い細胞を作出することができたが、CCT2 及び RBM14 に関しては KO の 効率が不十分であったため、TAGLN2 に関してさらなる解析を進めた。 TAGLN2KO A549 (A549/TG2-KO) 細胞では、rLCMV-ZsG の増殖が著しく減弱していた(図 A $\sim$ C)。rLCMV-ZsG を A549/TG2-KO で連続継代したところ、3 ないし 4 継代目には増殖がコントロール細胞と同程度まで回復し、変異株の出現が疑われた。そこで、感染細胞中からトータル RNA を抽出し、ウイルス遺伝子のうち、NP、糖タンパク質前駆体 (GPC)、マトリックスタンパク質 (Z)遺伝子の配列を解析した。その結果、GPC 遺伝子に一つのアミノ酸変異(F129I)を同定した。GPC (F129I) 変異をあらかじめ持つ rLCMV-ZsG [rLCMV-ZsG (GPC/F129I)]を作製し、A549/TG2-KO に感染させたところ、ウイルス力価はコントロール細胞に感染させた場合と同程度であった。

TAGLN2 ノックアウト細胞ではrLCMV-ZsG 増殖が抑制される

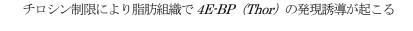


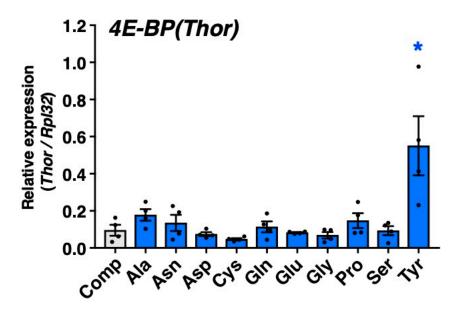
小幡 史明

【目的】疫学的な研究から、発生・発達期の栄養環境が、成人の健康寿命に強く影響することが示唆されてきた。このような栄養プログラミングは、2型糖尿病や心疾患などの生活習慣病の発症に強く関わる現象であり、動物実験によっても同様の現象が再現されている。しかしながら、発生期のどの栄養分子が、どのように長期的な生理応答を誘導するかについては、ほとんど不明である。興味深いことに、発生期の食餌中チロシン量を特異的に制限すると、代謝状態が再構成され、生殖能や酸化ストレス耐性が向上することが明らかになってきた。本研究の目的は、発生期のチロシン制限が個体に与える影響を解析し、その分子機構を解明することである。

【方法】40 種類の栄養素の混合物である合成培地を利用して、ショウジョウバエの成虫および幼虫の食餌から チロシンを制限した。チロシン制限下での発生スピード、個体の成長、アミノ酸プロファイルを含むメタボローム解析、 腸組織、脂肪組織におけるトランスクリプトミクス解析を行い、チロシン制限によって個体に起こる変化を解明した。 また、チロシン制限下におけるドーパミンの減少が、成体の生理状態を変化させる可能性を考慮して、ドーパミンの 摂食、ドーパミン合成の遺伝学的操作を行った。また発生期チロシン制限による成体の記憶・学習能を調べた。

【結果】本研究により、チロシン制限を行った幼虫においては、チロシン量が半分に低下した。このようなアミノ酸制限下での当該アミノ酸の減少は、必須アミノ酸ではいずれにも顕著に見られるが、非必須アミノ酸では、チロシン、アスパラギン、セリンのみで観察された。チロシン欠乏培地における生育は、野生型においては、比較的弱い発生スピードの遅延が認められる一方、チロシン合成酵素(PAH)のノックダウンにより発生が完全に停止する。従って、チロシンは体内生合成により産生される非必須アミノ酸にも関わらず、その体内量を保つためには食餌中からの摂取が必要であることが分かった。チロシン欠乏状態においては、腸組織ではほとんど遺伝子発現に差異がないが、脂肪組織においては飢餓応答に関わる経路の特徴的な活性化が見られた。4E-BPの発現上昇に見られるこの飢餓応答は、非必須アミノ酸の中でもチロシン制限によってのみ誘導された。従って、このようなチロシン欠乏に起因した幼虫期の変化が成体の生理状態を規定する可能性が考えられた。一方、チロシン制限によってドーパミンの低下が認められたことから、発生期のドーパミンの低下による脳機能への影響が予想されたが、チロシン制限を経験した個体についても記憶学習のスコアには変化がなかった。また、ドーパミン量を増減した個体において、若干の生理状態の変化が認められたが、発生期チロシンとの関連性は大きく認められなかった。





## 126 腫瘍組織の形態形成機構およびその意義の解明

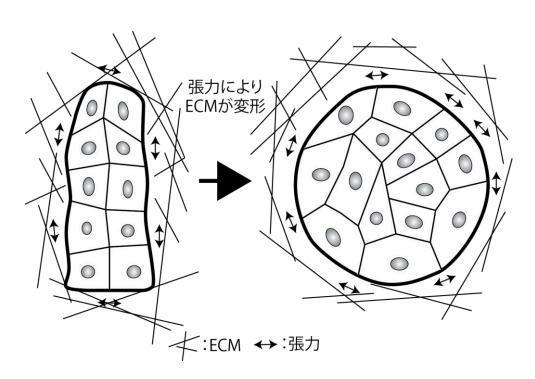
加藤 琢哉

【目的】腫瘍組織の形態学的特徴は病理医によるがんの診断において重要な意味を持つ。この形態学的特徴はがん細胞が過去にどのように浸潤・増殖したかを反映しており、このことが個々のがんの形態が悪性度と関連づけられる要因の一つと考えられる。これまでに移動するがん細胞集団は鎖状、出芽様など複数の異なる形態を取りうることが明らかにされてきた。しかしながら、それらの研究では浸潤の有無あるいは多寡について論じており、浸潤部の形態的な変化についてはほとんど考察されていない。そのため、腫瘍形態形成の決定因子及び分子メカニズムについては未解明のままである。また、それらの浸潤形態ががんの進展においてどの様な意義を持つのかは明らかにされていない。我々の予備的な研究により、CRISPR-Cas9技術あるいは遺伝子過剰発現系によって細胞間接着あるいは ECM 分解能を操作した細胞株が、それぞれ異なる浸潤形態を示すことを見出している。本研究ではこれらの細胞株を用いてがん組織形態形成の詳細な分子機構を解明するとともに、異なる浸潤形態ががんの増殖や転移にどのような影響を与えているかを検討することを目的とする。

【方法】三次元浸潤実験系においてアクトミオシン制御に重要な ROCK の阻害剤処理および ROCK 活性化型変異体 発現により活性化させることで浸潤部の形態にどのような影響を与えるのか、共焦点顕微鏡によって得た画像を解析した。また、これらの細胞の増殖がどのように影響を受けるかを三次元培養法にて解析した。

【結果】三次元浸潤実験の結果から、細胞集団におけるアクトミオシン活性の局在を撹乱することで浸潤部の肥厚化や、ECM 内での癌細胞の増殖が抑制されることが明らかとなった。また、ヌードマウスを用いた実験から、in vitroで浸潤部を肥厚化できる細胞は in vivoで効率よく増殖し、かつ高頻度に転移することが明らかとなった。今回の結果は、細胞集団の外縁部に局在するアクトミオシン活性が、集団外縁部に張力を発生させることで周囲の ECM を押しのける力が作用し、浸潤部位の肥厚化や ECM 内での高効率な増殖に繋がることを示唆している。

### 細胞間張力による増殖スペースの確保



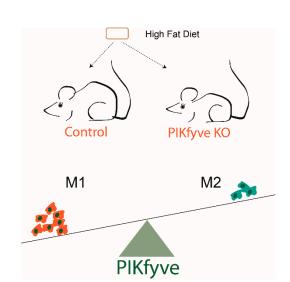
## 127 肥満炎症抑制を目指したマクロファージの脂質代謝制御

川﨑 拓実

【目的】生体が障害やストレスを受けるたり、病原体に侵入されることにより、自然免疫系の応答が誘導され、サイトカインの産生に伴って生体防御のための炎症応答が誘導される。このような炎症応答が、原因が除去されても何らかの理由により収束せず持続的に慢性化することを慢性炎症と呼んでいる。慢性炎症は多様な疾患に伴っており、ぜんそくやアトピー性皮膚炎などのアレルギー性疾患、関節リウマチなどの自己免疫性疾患の要因として挙げられており、さらに近年では肥満も慢性炎症の関わる代表的な疾患として知られている。これまでの我々の研究において、マクロファージのイノシトールリン脂質代謝と炎症に着目して研究をしてきたことから、本研究では肥満炎症抑制を目指したマクロファージの脂質代謝制御を目的とした研究を行った。

【方法】イノシトールリン脂質のリン酸化酵素である PIKfyve は、イノシトールリン脂質のイノシトール環の 5 位の部位をリン酸化することでホスファチジルイノシトール 5 リン酸やホスファチジルイノシトール 3、5 リン酸を産生する。一方、高脂肪食投与による脂肪組織内のマクロファージの炎症が肥満の増悪化に関与することが多数報告されている。そこで、野生型及びマクロファージ特異的 PIKfyve 欠損マウスに、高脂肪食を付加することにより肥満を誘導し、組織内に浸潤する免疫細胞を調べることにより、マクロファージの PIKfyve による肥満抑制の詳細な分子メカニズムや作用機序を明らかにした。

【結果】野生型マウス及びマクロファージ特異的 PIKfyve 欠損マウスに通常食もしくは高脂肪食投与後の体重の計時変化を計測した。その結果、通常食投与ではでは野生型マウスと PIKfyve 欠損マウスの体重は加齢とともに増加するものの、体重差は見られなかった。一方、高脂肪食投与により、野生型マウスは通常食を与えたものよりも優位に体重が増加したが、PIKfyve 欠損マウスは体重の増加が抑制されていた。腹腔内の脂肪組織の重量も、野生型マウスは高脂肪食投与後により増加した一方で、高脂肪食投与による PIKfyve 欠損マウスの脂肪の蓄積は抑えられていた。腹腔内の脂肪組織に浸潤したマクロファージがどのように PIKfyve により制御を受け、また、マクロファージが慢性炎症をどのように制御をしているかを明らかにするため、脂肪組織内の免疫細胞を解析した。その結果、野生型マウスと PIKfyve 欠損マウス間での脂肪組織内に浸潤した T 細胞、NK 細胞、好中球、好酸球、樹状細胞及びマクロファージの割合には変化がなかったが、炎症性マクロファージである M1 マクロファージの割合が野生型マウスに比べ PIKfyve 欠損マウスでは減少していることが明らかとなった。以上の結果から、PIKfyve 欠損マウスでの肥満は、脂肪組織内に浸潤した M1 マクロファージを制御することにより、抑制された可能性が示唆された。



PIKfyve のマクロファージ分化制御による肥満炎症制御

## 128 グルタミン合成酵素を起点としたてんかんの発症機序

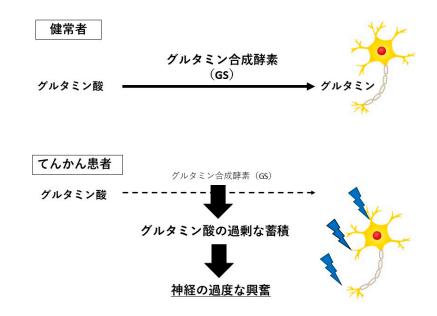
岸川 咲吏

【目的】アストロサイトは脳細胞で唯一グルタミン合成酵素(Glutamine synthetase: GS)を発現し、GS を介して神経伝達物質ではあるが神経毒性をもつグルタミン酸を無害なグルタミンに変換する機能を有している。しかし、何らかの原因でGS の発現が減少すると、細胞間隙にグルタミン酸が過剰に蓄積する。てんかん患者ではグルタミン酸が過剰に蓄積したため神経細胞の過度な興奮が起きていると考えられている。近年、脳細胞以外の細胞でGS の発現が減少する原因として、オートファジーの亢進が報告された。しかし、アストロサイトのGS の発現を制御する分解系の有無については報告がない。我々は準備実験においてプロテアソーム阻害剤であり、オートファジーを誘導する作用をもつ MG132 を培養アストロサイトに添加したところ時間依存的に GS の発現が減少するという結果を得た。そこで、本研究課題ではオートファジーの活性化が GS の発現やアストロサイトの機能に与える影響、そしてアストロサイトの GS の分解経路について明らかにする。

【方法】本研究では、オートファジーの活性化がアストロサイトの GS の発現や機能に与える影響と GS の分解経路を調べるために、胎生ラットの大脳皮質由来の培養アストロサイトを用いて以下の検討を行った。1. MG132 を培養アストロサイトに経時的に添加し、GS とオートファジーマーカーである LC3 の発現変化についてウエスタンブロット法を用いて解析を行った。2. 培養アストロサイトに MG132 とオートファジー阻害剤を添加し、MG132 による GS の発現低下からの回復の程度について調べた。3. 2. の実験におけるアストロサイトの細胞形態の変化について観察した。

【結果】本研究の結果、1. MG132 を添加したことでオートファジー活性化の指標である LC3-2/LC3-1 は有意に増加した。しかし、2. MG132 添加による GS の発現減少を回復するためにオートファジー阻害剤を添加しても、GS の発現低下は回復しなかった。さらに、3. MG132 を添加したアストロサイトでは細胞萎縮や細胞死などが観察された。形態回復を目的に MG132 にオートファジー阻害剤を添加しても、細胞は縮小したままであった。

## GS の発現減少によるてんかんの発症



## 129 記憶情報の脳内伝達とその破綻のメカニズム

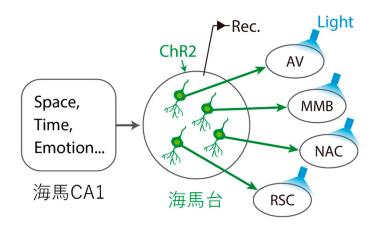
北西 卓磨

【目的】海馬は記憶にまつわる様々な情報を処理する脳領域だが、この多様な情報が、下流の複数の脳領域へと どのように分配されて使われるかは不明である。海馬の情報は、海馬台という出力領域を介して4箇所以上の脳領域へ と送られる。海馬台の個々の神経細胞は、これらの投射先領域のうち一部のみに投射することから、投射先ごとに 異なる情報が伝達されることが示唆される。しかし、海馬台における情報の分配の実態はこれまでまったく分かって いなかった。そこで本研究は、行動中の動物における大規模な神経活動計測と光遺伝学とを組み合わせて用いることで、 海馬台から下流の複数の脳領域へとどのように情報が分配されるかを調べた。

【方法】自由行動中のラット脳における大規模細胞外計測において、活動を計測している神経細胞の投射先を同定する 手法を新たに確立した。この手法により、海馬台の数十個の神経細胞の活動を一斉に計測しつつ、さらに、これらの 神経細胞の投射先領域を知ることが可能になった。具体的には、ラットの海馬台に、青色光で神経細胞を活性化する チャネルロドプシン 2 と、256 点からなる多点電極とを導入し、さらに、海馬体の 4 箇所の投射先領域にはそれぞれ 光ファイバを挿入した。光ファイバを介した投射先領域への光照射により、軸索終末から細胞体へと伝搬する逆行性の 活動電位を生じることを指標として、個々の海馬台神経細胞の投射先領域を同定した。

【結果】上記の計測系により、ラットに複数の行動課題(空間探索課題や作業記憶課題など)を行わせた際の神経活動データを収集し、オフラインのデータ解析に供した。個々の神経細胞が持つ各種の情報(場所情報・作業記憶情報・移動速度の情報など)を定量するとともに、海馬台で観察される各種の局所電位 シータ波・リップル波などに対する発火リズム、また、各種の行動状態(課題遂行時・安静時・レム睡眠時・ノンレム睡眠時)における発火パターンを精査した。その結果、海馬台は、様々な種類の情報をノイズ耐性のある頑強な活動パターンで表現し、さらに、これらの情報を投射先の脳領域に応じて選択的に分配することが分かった。こうした結果から、海馬台は、海馬のもつ多様な情報を、頑健かつ投射先選択的に伝達するために重要な役割を果たすことが分かった。

投射先を同定した大規模活動計測による記憶情報の脳内伝達の解明



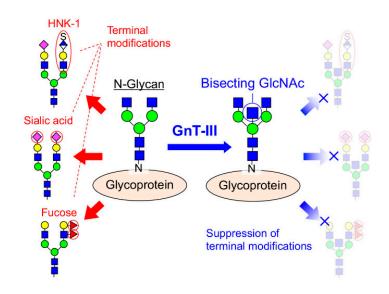
木塚 康彦

【目的】本研究では、「神経系の糖鎖」に着目し、その発現制御機構と作動原理の解明を目的とする。特に、我々の研究によりアルツハイマー病発症を促進させることが見出された「バイセクト糖鎖」に焦点を絞り、いまだ不明であるバイセクト糖鎖の発現制御メカニズムと作動原理を明らかにする。具体的には、本糖鎖がどのように限られたタンパク質に発現するのか、そしてその発現が疾患でどのように破綻するのか、また本糖鎖が物理的にどう働いているのか、という未解決の基本的な問に対する答えを探す。これにより、アルツハイマー病の病態形成メカニズムの解明や新規治療薬の開発へ貢献し、基礎科学・医学の発展に資する基礎研究を目指す。

【方法】バイセクト糖鎖合成酵素 GnT·Ⅲや神経系の糖鎖制御因子であるアルギニンメチル化酵素 PRMT1 の遺伝子 欠損マウスの脳を対象とし、グライコミクス解析、糖転移酵素の活性測定、遺伝子発現解析、プロテオミクス解析等を 行った。

【結果】バイセクト糖鎖の生理機能を明らかにするため、GnT·Ⅲ欠損マウスの脳のグライコミクス解析を行ったところ、ルイス型フコース、シアル酸、HNK-1 抗原など、N 型糖鎖の末端構造がおしなべて増加していることがわかった。このメカニズムを詳細に解析した結果、これらの糖鎖末端構造を合成する酵素は、バイセクト型の糖鎖構造に対して親和性が低く、非バイセクト型の糖鎖に比べて低い活性しか示さないことがわかった。このメカニズムを調べるために MD 計算を行ったところ、N 型糖鎖がバイセクト型になると、糖鎖全体のコンフォメーションが変化して、修飾酵素との相互作用が失われて親和性が低下することが推定された。このことから、バイセクト糖鎖はN 型糖鎖の末端修飾全体の生合成を抑制する働きがあると考えられる(下図)。また、生理的な条件の脳でバイセクト糖鎖が付加されているタンパク質を同定するため、野生型と GnT・Ⅲ欠損マウスの糖タンパク質をトリプシンで消化し、バイセクト糖鎖を認識する E4・PHA レクチンで濃縮した糖ペプチドをプロテオミクス解析した。その結果、バイセクト糖鎖が付加されている 32 の N 型糖鎖付加部位を同定した。それらの N 型糖鎖付加部位周辺には特徴的なモチーフは見出されなかったことから、GnT・Ⅲは立体構造や局在制御など、異なるメカニズムで基質タンパク質を選別していると考えられた。さらに、神経の糖鎖の発現を小脳特異的に抑制する因子として、アルギニンメチル化酵素 PRMT1 を新規に同定した。これまでアルギニンのメチル化と糖鎖修飾の関連性は報告がないことから、小脳における新たな糖鎖発現制御機構の存在が示唆された。

バイセクト糖鎖はN型糖鎖の末端構造の修飾を抑制する生理機能を持つ



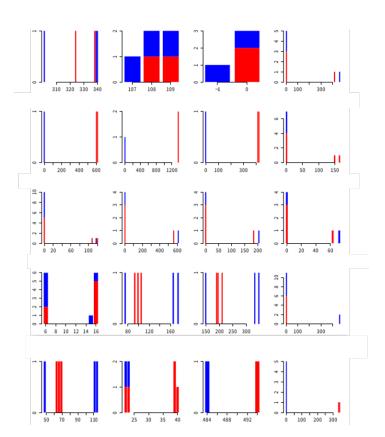
久米 広大

【目的】筋萎縮性側索硬化症(Amyotrophic lateral sclerosis: ALS)は、運動神経の変性を特徴とする神経変性疾患であり、その病態の多くは不明であり、根本的な治療法は無い。約10%のALS患者が家族性とされ、原因遺伝子および感受性遺伝子が20以上報告されている。しかし、本邦の家族性ALSの半数近くは原因遺伝子が同定されず、未同定の原因遺伝子が多く存在すると考えられる。本研究は、同一地域に由来するALS2家系を対象としてALSの新規原因遺伝子を同定することを目的とする。

【方法】対象はALS の 2 家系(家系 1: ALS 5 名、健常者 2 名、家系 2: ALS 2 名、健常者 3 名)。まずはじめに、マイクロアレイを用いて高密度 SNP タイピングを行い、連鎖解析、ハプロタイプ解析を行った。次に、エクソーム解析を Illumina platform で行い、全ゲノム解析を Nanopore platform を用いて行った。マッピングには、Illumina platform のデータには BWA を、Nanopore platform には LAST を用いた。バリアントの検出には、一塩基置換や小さい挿入欠失の検出には GATK、リピート延長の検出には tandem-genotypes、構造多型の検出には dnarrange を用いた。全エクソーム解析および全ゲノム解析により同定したバリアントを連鎖解析およびハプロタイプ解析で同定した候補領域を用いて抽出した。

【結果】エクソーム解析では、原因となり得るバリアントを同定することができなかった。Nanopore platform による全ゲノム解析で候補となるリピート延長を同定した(図)。ただし、原因遺伝子を 1 個に絞りこむことはできず、現在、家系内分離解析およびALS 検体でのスクリーニングを行っている。





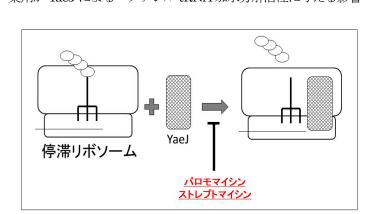
## 132 翻訳停滞解消を阻害する薬剤の探索と作用機序の解明

栗田 大輔

【目的】細胞内では様々な理由により翻訳が停滞する。翻訳の停滞したリボソームの蓄積は細胞に致死的な影響を与えることから、停滞状態を解消する「リボソームレスキューシステム」が必ず存在している。バクテリアではtmRNAによるトランス・トランスレーションがその役割を果たしている。長い間、トランス・トランスレーションは唯一知られているリボソームレスキューシステムであったが、近年の遺伝学・構造生物学の研究から新たな翻訳停滞解消因子 YaeJ が明らかになった。本研究では、ペプチジル tRNA の加水分解活性を指標にして、YaeJ がリボソームに結合した瞬間の状態を得られる薬剤の探索を行う。本研究では、我々が培った独自の in vitro 翻訳系を化合物探索のスクリーニングに利用することで、これまでにない翻訳停滞解消システムの阻害剤を探索すると共に、得られたYaeJ/リボソーム反応中間体に対して高分解能構造解析への道筋をつけることを目的とする。

【方法】YaeJ は、リボソームの A サイトに作用する。このことを念頭に、30S サブユニットのデコーディング領域の近傍に結合する抗生物質を用いてペプチジル tRNA 加水分解反応の阻害を指標にして bench-top assay を行った。まず 70S リボソーム、mRNA、Wacetyl[14C]Phe+tRNA を用いて翻訳停滞リボソームを in vitro で形成させた。YaeJ を加えることによってリボソーム画分に含まれる Wacetyl[14C]Phe+tRNA の放射活性を液体シンチレーションカウンターを用いて測定し、ペプチジル tRNA 加水分解活性を評価した。YaeJ と停滞リボソームの解離会合の段階を評価するために、1 分子蛍光分析システムを用いてアフィニティ解析を行った。まず YaeJ に対して蛍光試薬で標識を行った。次に蛍光標識した YaeJ、様々な濃度の翻訳停滞リボソームを用いて複合体を形成させた。複合体の評価は蛍光偏光解消法によって行った。さらに YaeJ に影響を与える化合物を検討するために、マイクロプレートリーダーを使用した表現型解析を行った。この解析は 96 穴プレート上で大腸菌野生株および YaeJ 欠損株を様々な条件で培養して成長曲線を得ることで、各種化合物に対する耐性を評価するものである。これによって YaeJ の生理的役割、すなわち YaeJ が必要とされる条件を明らかにした。

【結果】リボソームのデコーディング領域に作用する抗生物質パロモマイシンおよびストレプトマイシンが YaeJ によるペプチジル tRNA 加水分解活性に与える影響を検証したところ、パロモマイシンは終濃度  $50\,\mu$  M で反応を阻害したのに対して、ストレプトマイシンは  $5\,\mu$  M で十分に阻害活性を示した。どちらもリボソーム上のデコーディング領域に結合するが、その阻害メカニズムが異なっている。これらの抗生物質が YaeJ のリボソームへの結合を阻害するのか、または結合後のステップに影響を与えるのかを明らかにするために、1 分子蛍光分析によるアフィニティ解析の実験系を立ち上げた。まず、抗生物質非存在下で蛍光標識した YaeJ を用いて蛍光変更解消法を行ったところ、解離定数は 27.34 nM であった。今後、抗生物質を加えて同様の実験を行う必要がある。また、YaeJ 欠損株の表現型解析を行ったところ、一部の化合物について YaeJ 欠損株の増殖速度を低下させることを確認した。



薬剤が YaeJ によるペプチジル tRNA 加水分解活性に与える影響

## 133 HSV感染モデルを用いた脳炎発症機構の解明

小栁 直人

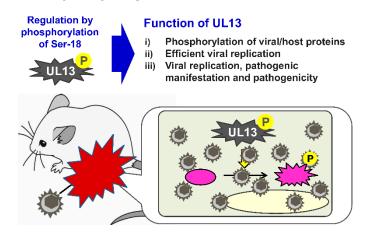
【目的】単純ヘルペスウイルス(herpes simplex virus: HSV)はヒトに口唇ヘルペス、性器ヘルペス、皮膚疾患、眼疾患、脳炎、新生児ヘルペスなど多様な病態を引き起こす。世界市場における HSV 感染症の医療費は、年間数千億円と試算されており、医学的に非常に重要なウイルスである。これらの病態の中で、単純ヘルペス脳炎(herpes simplex encephalitis: HSE)は抗ヘルペス薬が開発された現在でも半数の患者は予後不良であることから新規治療法や早期診断法・予防法の開発が臨床上の急務である。筆者はこれまでに HSE に関与する HSV 因子として UL13 を同定した。 UL13 は単純ヘルペスウイルス 1 型および 2 型(HSV-1 and HSV-2)がコードするプロテインキナーゼ(PK)の一つである。これまでに HSV-1 UL13 欠損株や UL13PK 活性消失株を用いた解析により、UL13 は細胞種依存的にウイルス増殖に寄与することやマウスへの病原性発現に寄与することが報告されている。しかし、HSV 感染細胞において UL13 の機能がいかにして制御されているかは不明であった。そこで、本研究では、タンパク質の機能制御を司る翻訳後修飾の一つであるリン酸化に着目し、HSV 感染における UL13 リン酸化の生物学的意義の解明を試み、HSE 発症制御機構を明らかにすることを目的とした。

【方法】1. HSV-2 感染細胞における UL13 のリン酸化部位を同定するために、高感度質量分析計を用いたリン酸化プロテオーム解析を実施した。2. 同定した UL13 リン酸化部位の一つである Ser-18 を Ala に置換したリン酸化消失変異株 (UL13-S18A) を作製し、U2OS 細胞におけるウイルス増殖性および細胞間伝播への影響を解析した。3. リン酸化消失変異株 (UL13-S18A) 感染 U2OS 細胞において、UL13 によってリン酸化されることが知られている翻訳伸長因子 EF-1  $\delta$  の Ser-133 リン酸化状態を評価した。4. リン酸化消失変異株 (UL13-S18A) をマウスに経膣接種し、マウスの致死率、病態スコア、ウイルス量を評価した。5. リン酸化消失変異株 (UL13-S18A) で認められた表現系が、Ser-18 を Asp に置換した恒常的リン酸化模倣株 (UL13-S18D) において、野生体の表現系に回復するか評価した。

【結果】1. リン酸化プロテオーム解析の結果、6 ヶ所の UL13 リン酸化部位を同定した。2. リン酸化消失変異株 (UL13·S18A) では、U2OS 細胞において、ウイルス増殖および細胞間伝播が UL13 欠損株および UL13PK 活性消失株と同程度まで低下した。3. リン酸化消失変異株 (UL13·S18A) 感染 U2OS 細胞では野生体感染 U2OS 細胞に比べて、EF-1 δ Ser-133 のリン酸化が低下した。4. リン酸化消失変異株 (UL13·S18A) では、経膣接種後のマウスの致死率、病態スコア、ウイルス量が低下した。5. 恒常的リン酸化模倣株 (UL13·S18D) ではリン酸化消失変異株 (UL13·S18A) で認められた表現系が野生体の表現系へと回復した。以上の結果から、UL13 Ser-18 のリン酸化は UL13 の機能を制御することでウイルス増殖や病原性発現に寄与することが示唆された。

HSV-2 UL13 Ser-18 のリン酸は UL13 の機能を制御し、効率的なウイルス増殖・病原性発現に寄与する

# Biological significance of UL13 and phosphorylation of UL13 Ser-18



## 134 運動の抗うつ機序に着眼したうつ病の新たな治療薬開発

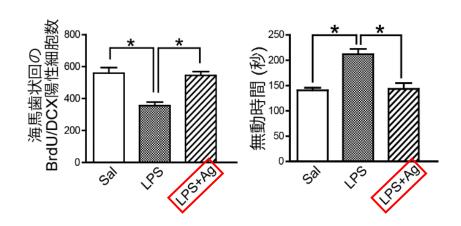
近藤 誠

【目的】現在、うつ病治療にはSSRIを主とする抗うつ薬が用いられているが、既存薬抵抗性のうつ病患者は大変多く、新たな治療薬の開発が望まれている。近年我々は、運動による抗うつ効果にセロトニン3型 (5·HT3) 受容体が必須であること、さらに、5·HT3 受容体アゴニストを投与すると海馬で IGF1 分泌が促されて神経新生が増加し、既存の抗うつ薬 SSRI と異なる機序で抗うつ効果が得られることを見出し、5·HT3 受容体を介する新たな抗うつ機序を明らかにした。本研究では、うつ病モデルマウスを用いて、5·HT3 受容体アゴニストの海馬神経新生促進効果、抗うつ効果について検討した。

【方法】野生型マウスに Lipopolysaccharide (LPS) を投与し、うつ病モデルマウスを作製した。LPS 誘発うつ病 モデルマウスに対して 5-HT3 受容体アゴニストを投与し、うつ行動および海馬神経新生に与える影響を検討した。 うつ行動の解析は、うつ行動テストにより評価した。海馬神経新生の解析は、BrdU 標識法を用いて形態学的に 検討した。

【結果】LPS 誘発うつ病モデルマウスでは海馬神経新生が減少し、うつ状態を示した。LPS 誘発うつ病モデルマウス に 5-HT3 受容体アゴニストを投与すると、海馬神経新生は増加し、うつ状態は改善した。本研究により、うつ病モデル動物において、5-HT3 受容体アゴニストの抗うつ効果が明らかとなった。

5-HT3 受容体アゴニストは海馬神経新生を増やし、うつ状態を改善する



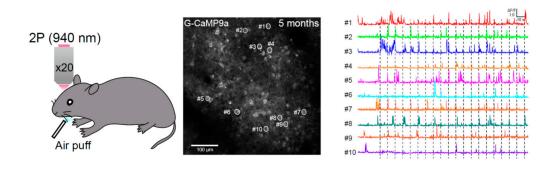
# 135 多色神経活動イメージングによる記憶メカニズムの解析

坂本 雅行

【目的】高次脳機能解明のためのアプローチとして、2 光子励起顕微鏡を用いた遺伝子にコードされたカルシウムセンサー (Genetically Encoded Calcium Indicator、GECI) による生体 (*in vivo*) 活動イメージングが急速な発展を遂げている。ところが、従来のカルシウムイメージング法では、主として興奮性ニューロンあるいは抑制性ニューロンの単色活動イメージングしかなされていなかった。また、記憶を制御する神経回路機構を解明するためには、長期間にわたって活動イメージングが可能な技術を確立する必要があった。本研究では、G-CaMP9a ノックインマウスが記憶メカニズムを解析する際に必要である長期的なイメージングに適用可能であるか、その評価を行った。次に、赤色カルシウムセンサーを一緒に用いることで 2 色 (緑と赤) の同時カルシウムイメージングを行うための方法の確立を行った。

【方法、結果】本研究では、高速かつ高感度な緑色カルシウムセンサーG-CaMP9a を Rosa26 遺伝子座にノックインした遺伝子改変マウス(R26-pCAG-FSF-GCaMP9a)が、長期的なイメージングに適用可能であるか評価を行った。その結果、G-CaMP9a ノックインマウスは、5 ヶ月齢でもニューロンの自発発火ならびに感覚刺激(ヒゲ刺激)に対する神経活動をモニター可能であった。カルシウムセンサーの蛍光輝度、自発発火における蛍光変化の大きさ、蛍光減衰の時定数に 1~5 月齢で有意な差は見られなかったこと、さらに、2 光子レーザーで 30 分間励起を続けても、G-CaMP9a の蛍光の褪色は見られなかったことから、G-CaMP9a ノックインマウスは長期イメージングにも有用であることが分かった。次に、赤色カルシウムセンサーを一緒に用いることで2色(緑と赤)の同時カルシウムイメージングを行なうための方法の確立を行った。抑制性ニューロン選択的に G-CaMP9a を発現させたトランスジェニックマウス (Dlx5/6-Flpe;G-CaMP-9a) に AAV を用いて赤色カルシウムセンサー (XCaMP-R) を興奮性ニューロンに発現させることで、興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの同時イメージングに成功した。

## G-CaMP9a ノックインマウスを用いた in vivo カルシウムイメージング



## 136 遺伝子導入細胞を用いた感染性ウイルスサルベージ戦略

佐々木 道仁

【目的】A 群ロタウイルス(ロタウイルス)は、ヒトを含む動物に重篤な下痢症を惹起する。ロタウイルスは、ウイルス粒子を構成する外殻スパイクタンパク VP4 が外来性のプロテアーゼにより VP5\*と VP8\*に開裂することにより感染性を獲得する。本研究では、インフルエンザウイルスやコロナウイルスの糖タンパクを開裂、活性化することにより、ウイルス感染を促進することが報告されている宿主の膜貫通型セリンプロテアーゼ(TTSP: Type II transmembrane serine protease)に着目し、ロタウイルスの感染を促進する膜貫通型セリンプロテアーゼを探索した。また、同定した膜貫通型セリンプロテアーゼを恒常発現させた細胞を用いてロタウイルスの高効率分離手法の確立を試みた。

【方法】膜貫通型セリンプロテアーゼ遺伝子(TMPRSS2、TMPRSS11D、TMPRSS11E または TMPRSS13)をサル腎由来 MA104 細胞へ導入し、恒常発現細胞を作製した。各細胞へサルロタウイルスを接種し、ウイルス感染および産生される子孫ウイルス量を解析した。次に、TMPRSS2 と TMPRSS11D を共導入し、ヒトロタウイルス、ウシロタウイルスに高い感受性を有する細胞 MA104-T2T11D を作製した。さらに、作製した MA104-T2T11D 細胞へ野外にて採集したげっ歯類糞便の懸濁液を接種し、ロタウイルスの分離を試みた。

【結果】TMPRSS2 および TMPRSS11D がロタウイルスのトリプシン非依存的感染を誘導する宿主のプロテアーゼであることが判明した。また、TMPRSS2 と TMPRSS11D を共発現させた MA104-T2T11D 細胞と回転培養を組み合わせることにより、ロタウイルスの増殖が強力に促進された。本法を用いたウイルス分離を行い、実際に野生のげっ歯類動物糞便からロタウイルスの分離に成功したことから、本研究で作製した MA104-T2T11D 細胞は、ロタウイルスの分離に有用であることが示された。

予想される細胞膜上の膜貫通型セリンプロテアーゼによるロタウイルス粒子活性化機構

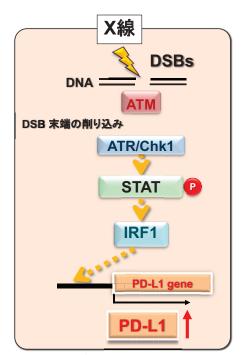
# 未成熟ロタウイルス粒子 細胞膜上のTMPRSS2または TMPRSS11Dによる ロタウイルス活性化 TMPRSS2 または TMPRSS11D発現細胞

佐藤 浩央

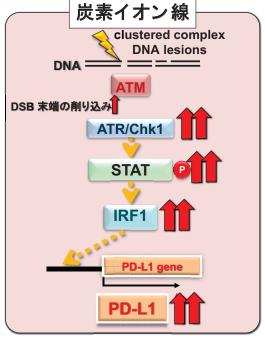
【目的】免疫チェックポイント阻害剤である抗 PD-1/PD-L1 抗体治療は、新たながん治療の柱として世界的に大きな注目を集めている。しかし抗 PD-1/PD-L1 抗体単独では、高い有効性が得られるのは一部の患者に限られることも明らかになってきた。そのため、放射線治療や化学療法といった従来のがん治療との併用による効果の増感が期待される。さらに複数の臨床試験から、抗 PD-1/PD-L1 抗体は、PD-L1 発現率が高い腫瘍に対し特に有効であることが報告されている。これまでの研究から、放射線治療が腫瘍細胞の PD-L1 発現を誘導することが明らかにされてきた。一方で、その詳細な分子機構の解明は不十分であった。我々はこれまでに、放射線(X 線)照射を受けたがん細胞における DNA 二本鎖切断(double-strand break: DSB)後の DNA 修復シグナル応答に着目し、DNA 損傷依存的な PD-L1 発現制御機構を報告した。そこで本研究では、X 線に加え、重粒子線照射による DNA 損傷応答に着目し、重粒子線照射後に誘発されるがん細胞膜表面上の PD-L1 発現調節機構の解明を目指した。

【方法】ヒト腫瘍細胞株である U2OS、MCF-7、HCT116 を用いて、炭素イオン線照射後の PD-L1 発現を解析した。 炭素イオン線照射は、群馬大学重粒子線医学研究センターにて行った。 PD-L1 発現における DNA 損傷シグナル (ATR、Chk1) の関与に着目し、それぞれの阻害剤を、炭素イオン線および X 線照射の 30 分前に投与した。 PD-L1 発現レベルは Western blot、Flow cytometry、リアルタイム PCR にて解析した。

【結果】本研究の結果から、炭素イオン線照射後に PD-L1 発現が誘導されることが明らかになった。またこの PD-L1 発現は、X線と同様、ATR/Chk1 といった DNA 損傷シグナルと、その下流での STAT-IRF1 経路を介して制御されることを解明した。炭素イオン線照射では X 線よりも複雑な DNA 損傷が誘導されるため、同経路は強く活性化され、それによって、X線よりも高度に PD-L1 発現が誘導されると考えられた。



炭素イオン線照射後のPD-L1 発現制御経路モデル



H Sato, et al. Nat commun. 2017

## 138 ピロリ菌の毒性タンパク質VacAの解析と阻害剤探索

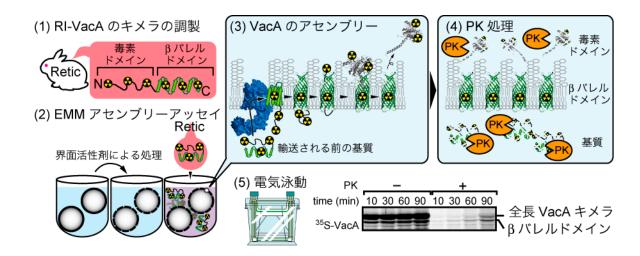
塩田 拓也

【目的】ヘリコバクター・ピロリ(Helicobacter pylori)は、グラム陰性菌に属する消化性潰瘍や胃癌の原因菌であり、その保菌者は全人類の約半数にのぼると推定されている。H.pyloriの重要な病原因子に空胞化毒素タンパク質 VacA がある。VacA が毒素としての機能を発揮するためには、VacA が細胞外へと分泌されなければならない。VacA の分泌プロセスのひとつに、VacA の C 末端側に存在するB バレルドメインの外膜への組込みがある。グラム陰性菌では、B バレルドメインの膜組込みは、外膜に存在する分子装置、BAM 複合体を介して行われる。しかし、H.pylori は生化学実験が行いにくいため、VacA のB バレルドメインの膜組込みにおける分子機構については不明な点が多い。そこで、本研究では、生化学実験が行いやすく、類似のBAM 複合体を持つグラム陰性菌、E.coli を用いた生化学実験により、VacA の外膜組込みの解析および阻害剤探索を行った。

【方法】VacA の膜組込みを生化学的に解析するため、我々が開発した $\beta$ バレルドメイン膜組込み *in vitro* 再構築実験系「EMM アセンブリーアッセイ」を VacA 解析のために最適化の検討を行った。EMM アセンブリーアッセイは、 *E.coli* から簡便な方法で単離した膜画分(*E.coli* Microsomal Membrane : EMM)に、 $\beta$ バレルドメインをもつタンパク質を加えてインキュベートすることで、 $\beta$ バレルドメインの膜組込みを高い時間分解能で定量的に解析できる方法である。VacA の $\beta$ バレルドメインに加え、EMM に存在する *E.coli* の BAM 複合体に認識されやすくするために、一部を *E.coli* の $\beta$ バレルドメインに変更したキメラ変異体も同時に作製した。BAM 複合体のサブユニット欠損変異体から単離した EMM を用いて、BAM 複合体のどのサブユニットが VacA の輸送に必要かを検討した。また、ペプチドライブラリーを EMM アセンブリーアッセイに添加し、阻害ペプチドスクリーニングを行った。

【結果】 VacA の $\beta$ バレルドメインの配列をそのまま用いた場合、EMM への膜組込みは確認できなかった。そこで、VacA の $\beta$ バレルドメインの最後の $\beta$ ストランドを、*E.coli* で最も発現量の多い $\beta$ バレル型膜タンパク質のひとつである OmpC の最後の $\beta$ ストランドに置換したキメラタンパク質を作製したところ、EMM への膜組込み、毒素ドメインの切断による分子量の減少が見られた。キメラタンパク質を用いた EMM アセンブリーアッセイにより、VacA の膜組込みに必要な BAM 複合体のサブユニットを決定した。さらにペプチドライブラリーを添加したスクリーニングにより VacA の毒素放出阻害ペプチドの単離に成功した。

## VacA の膜組込みと EMM アセンブリーアッセイ



## 139 1型糖尿病制御に向けた新たな治療法の開発

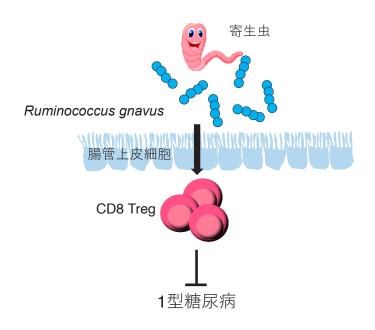
下川 周子

【目的】腸管寄生蠕虫は、宿主内での防御機構を回避し、長期間生存するために宿主の免疫を変調させる術を備えてきた。この特性は、過剰な免疫応答を抑制することで宿主にも恩恵を与えてきたとされる。近年、先進国においては衛生環境の向上により腸管寄生蠕虫の感染率は激減し、相反するようにアレルギー、自己免疫疾患などの炎症性疾患が増加してきた。これは衛生仮説と呼ばれ、炎症性疾患が増加した原因を感染症への暴露が減少したためだとする説は、疫学的にも証明されている。我々も、衛生仮説を科学的に証明するかのように寄生虫感染マウスでは1型糖尿病の発症を抑制すること、そのメカニズムとして寄生虫感染で誘導される CD8 陽性の制御性細胞 (CD8Treg) が重要であることを既に見出している。そこで、本研究では、CD8Treg が寄生虫によってどのように誘導されるかを解明することを目的とする。

【方法】寄生虫感染マウス、非感染マウスの糞便を回収し、次世代シーケンサーを用いて菌叢解析を行った。 また、CD8Treg の増減と腸内細菌の増減をヒートマップ解析し、CD8Treg に関わる腸内細菌を特定した。特定した 菌は単離し、寄生虫非感染マウスに経口摂取させることで CD8Treg の誘導を試みた。

【結果】寄生虫感染マウスと、非感染マウスでは、腸内細菌叢が明らかに違い、中でも Ruminococcus 属に分類される 腸内細菌が大きく変化していることを見出した。さらに詳細な解析により Ruminococcus 属の中でどの細菌が増加しているかを調べたところ、R.gnavus が寄生虫感染特異的に増加していることを見出した。そこで、非感染マウスに R.gnavus を経口的に投与すると、寄生虫が感染していなくても CD8Treg を誘導できた。このことから、CD8Treg の 誘導には R.gnavus が重要であることが明らかになった。今後、CD8Treg を移入することで治療的に、さらには 腸内細菌を人為的に操作することで1型糖尿病を予防できる可能性が示された。

寄生虫による腸内細菌依存的な1型糖尿病抑制メカニズム



## 140 経胎盤移植系を用いた血液キメラマウスの作製

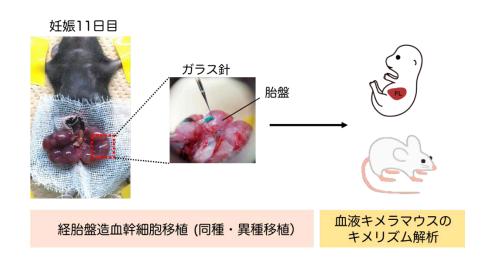
全 孝静

【目的】ヒトの造血システムをマウスの体内で再現する造血免疫系ヒト化マウスは、私たちヒトの血液系を理解し、新たな医薬品の創出や疾患の克服にもつながる重要なモデルとして期待される。現在まで、免疫不全マウスにヒトの造血幹細胞を移植する方法で、ヒト化マウスの開発が行われてきた。しかし、免疫不全マウスを用いることや骨髄微小環境の破壊による生着不全の問題などが残っている。本研究では、マウスへのリスクを最小限にし、より有効で安全な造血幹細胞移植法の開発を目指した。またレシピエントとして、造血幹細胞を完全に欠損する遺伝子改変マウスの胎仔を用いることで既存の問題を克服した、血液キメラマウスを作製することを目的とし研究を行った。

【方法】造血幹細胞を欠損する胎仔をもつ母親マウス(妊娠 10~11 日目: BDF1 系統)の全身麻酔を行い、子宮を体外に露出させた。胎仔胎盤側を標的にドナー細胞(マウス造血幹細胞: B6 系統、ラット造血幹細胞、ヒト臍帯血由来造血幹細胞)を穿刺注入することで移植した。移植後、子宮を体内に戻し、皮膚を縫合し回復させた(経胎盤移植)。移植から一週間後の胎仔を帝王切開により取り出し、胎仔肝臓を用いてフローサイトメトリー解析およびコロニー形成アッセイを行い、レシピエント体内におけるドナー由来の細胞を確認した。

【結果】マウスおよびラット造血幹細胞移植の結果、生後1日目において、レシピエント肝臓の95%以上の血球細胞がドナー由来であり、リンパ球生や顆粒球系、単球系の多種類の血球系列に分化しているなど良好な生着が認められた。ヒト造血幹細胞を移植した結果では、マウスやラット細胞に比べ生着率が低かったものの、レシピエント胎仔肝臓においてヒト CD45 陽性血球細胞(特に CD19 陽性ヒト B 細胞)が確認された。以上の結果より、造血幹細胞を形成できないマウスの胎仔期に造血幹細胞移植を行うことは、有効な異種動物移植のモデルになり得ることが示唆された。

## 胎仔期造血幹細胞移植による血液キメラマウスの作製



## 141 新規のエストロゲン受容体活性化機構とがんの細胞制御

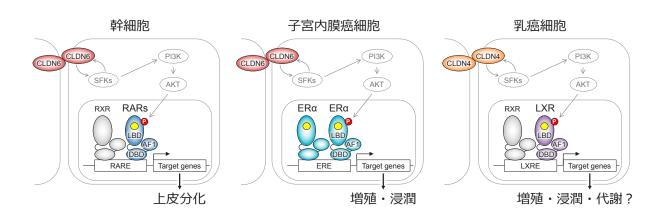
杉本 幸太郎

【目的】シグナル伝達の起点として液性因子、細胞間接着、および細胞基質間接着があり、そのうち液性因子によるものは比較的よく解明されている一方で、細胞間接着による遺伝子発現調節機構は多くが未解明である。私は以前、細胞間接着分子クローディン-6 (CLDN6) が幹細胞の上皮分化トリガーとして機能することを報告した。本研究ではその系を用いて CLDN6 を起点とするシグナル伝達経路の全容および同経路によるがんの細胞制御機構を解明すべく研究を進めた。

【方法】まずマウス F9 幹細胞を用いて、CLDN6 による上皮分化誘導機構についてシグナル伝達に着目しながら分子生物学的に解析した。続いて子宮体がん切除検体および子宮体がん細胞株を用いて、同シグナル経路による細胞制御機構を解析した。最後に乳がん切除検体および乳がん細胞株を用いて、同様に検討した。

【結果】CLDN6 は Src ファミリーキナーゼ(SFK)/PI3K/AKT 経路を介してレチノイン酸受容体 $\gamma$ (RAR $\gamma$ )をセリンリン酸化した。さらに CLDN6 は同様の経路でエストロゲン受容体 $\alpha$ (ER $\alpha$ )もセリンリン酸化し、これが子宮体がんの悪性形質を増強することが解った。また乳がんでは CLDN4 が同様に肝 X 受容体 $\beta$ (LXR $\beta$ )を活性化し、がんの進展に寄与することが示唆された。この CLDN-核内受容体経路は他の器官や病態にも関与する可能性が考えられ、様々な疾患に対する治療標的としての可能性も期待される。

## CLDN-核内受容体経路による細胞制御



# 142 個体間の距離を制御する生体メカニズムの解明

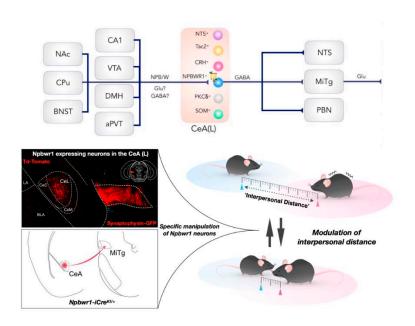
征矢 晋吾

【目的】他者とコミュニケーションを取る上で個体間の距離を縮めていくことは社会性を構築する上で必須である。しかし、社会行動に関わる神経メカニズムについてはこれまでに報告されているが、社会行動に至るまでの個体間距離の調節機序については全く明らかになっていない。他者の情報を得るためには個体間距離を縮める必要があるが、他者との社会的接触は恐怖や不安などの情動応答を引き起こす。したがって、個体間距離の調節メカニズムは情動制御のメカニズムが関与している可能性が示唆されるが、その分子・神経基盤については未だ明らかではない。本研究では、新規のニューロペプチドである NPB/NPW の受容体である Npbwr1 に焦点を当て、情動応答や社会行動への関与が示唆される Npbwr1 を豊富に発現する扁桃体中心核(CeA)のニューロンを解析することで Npbwr1 が個体間距離の制御に果たす役割について検討する。

【方法】Npbwr1が発現するニューロン (Npbwr1ニューロン) に Cre 組み換え酵素が特異的に発現する Npbwr1iCre マウスを用いて、Cre 依存的にシナプトフィジンを発現するアデノ随伴ウイルス (AAV) や狂犬病ウイルス (SADAG) 等を用いて、Npbwr1ニューロンの投射領域および Npbwr1ニューロンに入力するニューロン群を解析した。また、Npbwr1iCre マウスの CeA に Cre 依存的に発現する人工受容体である hM3Dq (興奮性) または hM4Di (抑制性) を組み込んだ AAV を投与し、腹腔に人工リガンドである Clozapine-N-Oxide (CNO) を投与することで Npbwr1ニューロンの薬理遺伝学的操作を行った。さらに、光遺伝学を用いて CeA から MiTg に投射する Npbwr1ニューロン特異的にチャネルロドプシン 2 を発現させ、473 nm のレーザー照射により軸索末端を人為的に興奮させ、社会行動における影響を観察した。

【結果】本研究によって、CeAに局在するNpbwr1ニューロンを中心とした入出力機構を同定した。具体的には、CeAのNpbwr1ニューロンはNAc、CPu、BNST、CA1、VTA、DMH、aPVT等の領域から直接入力を受けており、同定した出力先(NTS、MiTg、PBN)の中でも主にMiTgに顕著な投射線維が観察された。さらに、薬理遺伝学および光遺伝学を用いることで、CeAのNpbwr1ニューロンが社会行動を調節することが明らかになり、CeAから脳幹のMiTgへのNpbwr1ニューロンの投射がその神経メカニズムの一つであることが示唆された。

# 本研究で明らかにした個体間の距離を制御する神経回路



## 143 髄膜炎による異常な神経回路形成のメカニズム

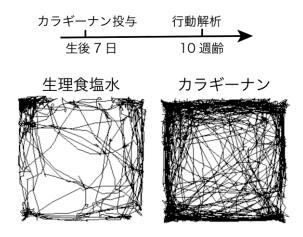
田辺 章悟

【目的】髄膜炎は脳や脊髄を覆う髄膜に炎症を起こす疾患の総称である。新生児期に髄膜炎を発症すると、知的障害、てんかん、運動麻痺など重篤な後遺症を残すことがある。しかし、幼年期の髄膜炎が永続的な脳発達障害を引き起こす詳細な分子基盤は解明されていない。近年の遺伝子多型の解析により、脳発達障害の発症には免疫関連分子が関係していることが明らかになってきた。脳内免疫システムは様々な形で脳内の神経回路形成を制御するが、脳発達障害への関与はほとんど解明されていない。本研究では、幼年期の髄膜炎が神経回路の形成を障害するメカニズムの解明を目的に研究を行った。

【方法】生後 7 日の C57BL/6J マウスに対して、カラギーナンを大槽に投与して髄膜炎を誘導した。24 時間後、フローサイトメトリーにより免疫系細胞の動態解析を行い、脳内に浸潤する免疫系細胞数を計測した。幼年期に髄膜炎を誘導したマウスを成体まで成長させ、明暗選択箱、オープンフィールド、高架式十字迷路、プレパルス抑制の行動学的解析を行った。さらに、異常行動に関係する脳領域を特定するため、神経活動を検出する c-fos 抗体を用いて免疫組織化学法による組織学的な解析を行った。

【結果】髄膜炎を誘導した 24 時間後に免疫系細胞の動態解析を行ったところ、いずれの免疫系細胞の数も大きく増加しており、カラギーナンの投与により髄膜炎が誘導されることが確認できた。幼年期に髄膜炎を誘導したマウスを成体まで成長させ、行動学的解析を行ったところ、多動行動や注意力の低下が観察された。さらに、異常行動に関係する脳領域を特定するために神経活動が変化している脳領域を探索したところ、孤束核で過剰な神経の活性化が認められた。これらの結果から、幼年期の髄膜炎により孤束核に投射する神経の接続性が変化して、行動異常を引き起こしている可能性が示唆される。今後、幼年期の髄膜炎で異常な神経回路の形成に寄与する免疫系細胞の特定やその分子機序の解明、更には孤束核と接続性が変化している脳領域を明らかにしていく必要がある。

幼年期の髄膜炎は成体での多動行動を発症させる



## 144 細胞内構造の生体力学

谷本 博一

【目的】生体力学は形態学の一分野として長い歴史をもち、分子、細胞、組織の各スケールにおける機械的力の直接測定に基づいて、各々の階層における生命動態の力学的理解を構築してきた。一方で、分子と細胞の間の階層、1 ナノメートルから 100 マイクロメートルまで長さにして 100,000 倍にもわたるメゾスコピックな階層における直接力学測定技術は未だ全く確立されていない。この準細胞スケールは、細胞骨格の高次構造形成、染色体の分配を始めとする、細胞生物学における主要な研究対象である。準細胞スケールの生体力学測定技術を確立することで、様々な細胞生物学的課題の力学的側面を解き明かして、分子からマクロスケールまでの生命動態を連続的に理解することが可能となると考える。

【方法】本研究は、研究代表者がこれまでに構築した細胞内磁気ピンセット技術(Tanimoto et al., Nature Physics 2018) を発展させることで、生細胞内における機械的力の時空間動態をピコニュートンオーダーで精密に測定するための基盤技術を開発した(下図)。

【結果】本研究で得られた成果は以下の 3 つである。1. 出力をリアルタイム制御した電磁石を用いた細胞内磁気ピンセットを構築し、受精卵細胞および培養細胞内で磁気プローブ粒子を力学制御できることを検証した。2. 受精卵細胞内の微小管星状体構造の精密力学測定のために、星状体に磁気プローブ粒子を細胞内で結合させる方法を比較検討した。3. 細胞内磁気ピンセットと標的構造の可視化および分子生物学的摂動実験を組み合わせるために、動物培養細胞を用いた実験系の構築を進めた。微小管およびアクチン骨格を可視化した動物培養細胞に直径1ミクロン程度の磁気プローブ粒子を導入するマイクロインジェクションプロトコルを確立した。

## 本研究の概要

# これまでの研究成果

# 生体高次構造の細胞内力学操作

(Tanimoto et al., Nature Physics 2018; J. Cell Biol. 2016)



本申請研究

単一分子スケールの時空間解像度を持つ細胞内力学操作技術



# 1.細胞内の秩序構造をつかさどる力学

微小管星状体の非平衡動力学 初期発生過程における分裂パターンの正確性



# 2. 生体の階層をまたぐ機械的力の伝播

アクチン骨格上での機械的力の生成と伝播 生命動態を駆動する接着応力の細胞内起源

# 145 誘導性がんモデルサルの作製と免疫細胞療法への応用

富松 航佑

【目的】がんの発生は多段階的であり、そのプロセスに関わる遺伝子変異は動物種によって異なることが明らかになっている。これまでのがん研究においては、主にマウス等のげっ歯類が実験動物として用いられて来た。しかしながらマウスでは、単一のがん遺伝子の変異と、がん抑制遺伝子の欠失によってがんが誘発できるのに対して、ヒトの腫瘍形成には少なくとも 4 つの遺伝子の変異が必要である。またがん遺伝子が活性化したヒトの細胞は、細胞老化により細胞周期が永続的に停止させられるが、げっ歯類では細胞周期停止から逸脱してがん化しやすい。さらにマウスのがんで治療効果があった薬剤が、ヒトでは効果がないなど、マウスで得られた知見がヒトには外挿できない例が多く知られている。そのため非ヒト霊長類を用いたがん研究の推進が研究面・治療面ともに必要不可欠であるが、がん遺伝子を恒常的に発現する動物では個体の発生異常の回避が難しく、安定的に供給可能な非ヒト霊長類のがんモデル動物は未だほとんど例がない。そこで本研究では、薬剤添加により誘導的にがん遺伝子を発現させることで、任意にがん発症を可能にするモデルサルを作出し、治療応用へ結びつけることを目的とした。

【方法】ヒトの腫瘍形成に必要な 4 つの遺伝子(p53CT、CDK4、KRAS<sup>G12V</sup>、TERT)をカニクイザルから単離し、ドキシサイクリン (Dox) で任意に発現誘導可能な形で 2 つのレンチウイルスベクターに挿入した。これらのベクターを保持するレンチウイルスを作製し、培養細胞でベクターの動作確認を行った。これらのレンチウイルスをカニクイザルの卵に感染後、顕微授精でトランスジェニック (Tg) 胚を作製した。産まれた仔サルについては、現段階で解析可能な胎盤を用いて蛍光観察とジェノタイピングを行った。

【結果】4つの遺伝子を誘導的に発現する2種類のベクターをレンチウイルスでカニクイザル由来の培養細胞に導入しDox を添加すると、培養細胞が足場非依存的な増殖能を獲得した。またこれらのレンチウイルスを感染させたカニクイザル胚はGFPと Kusabira Orange (KO) の蛍光を呈するため、蛍光陽性胚を選定して仮親へ移植した。産まれた仔サルの胎盤を蛍光観察した結果、GFPとKOの2色の蛍光が確認され、さらにジェノタイピングによって4種類のトランスジーンが導入されていることを確認した。

# Placenta N P WT 1 2 TERT P53CT GFP CODK4 KRAS TERT CAGAI INGEP NLS TERT CAGAI INGEP NLS

薬剤誘導性がん遺伝子発現システムを持つ Tg カニクイザル

【目的】マクロファージや樹状細胞などに発現している ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activating motif) 共役型受容体のシグナル伝達に必須の役割を担う CARD9 欠損マウスは、結核菌感染において、生存率の低下や菌の排除遅延など、抵抗性の著しい減弱が報告されている。ところが、CARD9 欠損マウスにおいても、感染後の抗原特異的 T 細胞応答は野生型マウスと同等に誘導されることから、CARD9 は特に感染初期の宿主防御に重要な分子と推察されているが、CARD9 を介した初期感染制御機構についてはよく解っていない。そこで、本研究では、結核ワクチン株である  $Mycobacterium\ bovis\ BCG$  ( $M.\ bovis\ BCG$ ) を用いたマウス感染実験を行い、抗酸菌感染初期における CARD9 の役割解明を試みた。

【方法】M. bovis BCG Tokyo 株  $0.5\sim1.0\times10^7$  CFU を、野生型(C57BL/6)および CARD9欠損マウスの腹腔内に摂取し、感染 7 日後のマウスを解析した。

【結果】M. bovis BCG を用いたマウス腹腔内感染においては、感染局所への Ly6C 陽性の炎症性単球の浸潤に CARD9 は重要な役割を担っていることが明らかとなった。 CARD9 欠損マウスでは、これら炎症性単球の感染局所への浸潤減少に加え、抗結核応答に特に重要と考えられている IFN  $\gamma$  産生も低下しており、腹腔内菌数も上昇していた。

# 単球由来 炎症性細胞 血中 9) (9) (9) (9) 単球浸潤 Mycobacteria 炎症性サイトカイン (9) ケモカイン産生 (MCP-1を含む) (9) (3) マクロファ 樹状細胞

M. bovis BCG 感染初期に誘導される宿主防御応答の概略

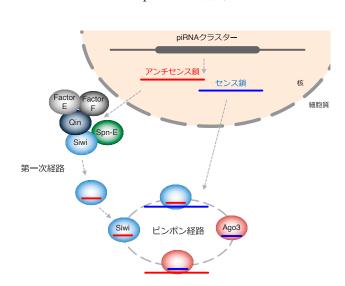
# 147 カイコpiRNA生合成経路因子Qin及びSpn-Eの機能解析

西田 知訓

【目的】piRNA (PIWI-interacting RNA) は、生殖細胞特異的に発現し、PIWI タンパク質と piRISC (piRNA-induced silencing complex) を形成し、トランスポゾン mRNA の発現を抑制する。piRNA は、始めに第一次生成経路で生成され、ピンポン経路で増幅される。piRNA の前駆体は、piRNA クラスターと呼ばれるゲノム領域から転写される。これまでに piRNA 生成経路に関与する因子は多数同定されてきた。しかし、これら因子の piRNA 生成経路における詳細な分子機能については未だよく判っていない。私は、カイコ卵巣生殖細胞由来である培養細胞 BmN4 を実験材料として用い、piRNA 生成経路の解明を試みた。カイコでは、2 種類の PIWI タンパク質(Siwi と Ago3)が piRNA と結合し、piRNA 生成経路も保存されている。これまでの解析から、Spn-E が第一次生成経路に関与し、Siwi と Qin とともに複合体を形成することを示した。さらに、Spn-E と Qin は第一次生成経路で異なる piRNA の生成を制御していることが示唆された。しかし、Spn-E と Qin は同じ複合体を形成するにも関わらず、異なる piRNA の生成で機能する仕組みは判らなかった。そこで、Spn-E と Qin による異なる piRNA を生成する仕組みを明らかにすることを目的とした。

【方法】piRNA の前駆体と結合すると考えられる Spn-E および Qin に対する抗体を用いた iCLIP 法により、piRNA 前駆体の種類の同定を試みた。また、Qin のノックダウンにより、piRNA 前駆体が蓄積することが示唆された。この piRNA 前駆体を同定することにより、piRNA 前駆体の塩基長及び特徴を明らかにできると考えられた。さらに、Spn-E 抗体及び Qin 抗体を用いた免疫沈降法により精製し、ショットガン分析によって網羅的に同定した。Spn-E 及び Qin と結合する新規因子は piRNA 生合成経路に関わるのかを明らかにするため、それら因子を RNAi でノック ダウンした BmN4 細胞を用いて piRNA 量やトランスポゾンの発現量をノザン解析及び qRT-PCR 法により網羅的にスクリーニングを試みた。

【結果】それぞれの抗体を用いて免疫沈降を行い、ショットガン解析を試みた。その結果、それぞれ約 300 因子が得られた。二段階のスクリーニングを行い、RNA 結合能または核酸結合能を持つ因子を更に 11 (Qin 結合因子) と 15 (Spn-E 結合因子) 個選別した。これらの因子に対するノックダウンを行い、ノーザンブロット法を用いて piRNA の生成量を確認した。その結果、2 因子について、piRNA の量の劇的な減少が見られた。2019 年に Kawamoto らが報告した論文により、詳細にカイコゲノムが読まれ、データベースが整備された。そこで、私は、Siwi に結合する piRNA を新しいゲノム配列にマップすることで、piRNA クラスターの同定を試みた。その結果、2 つの染色体の一部の領域で、piRNA が多数マップされることが判った。おそらく、これらの領域から piRNA 前駆体が転写されていると考えられた。Spn-E および Qin 抗体を用いた iCLIP 法で得られた結果は解析中である。



カイコ piRNA 生合成経路

# 148 精巣上体炎における精子のin vivoイメージング

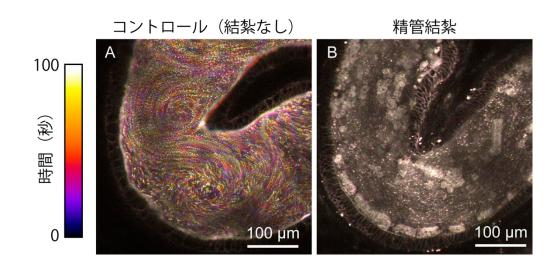
平島 剛志

【目的】精巣上体は、未熟な精子が受精能を獲得する生殖器官である。精巣から運ばれる精子は、精巣上体内部に位置する上皮管腔(精巣上体細管)中を輸送され、精巣上体尾部に到達するまでに、上皮から分泌される様々な化学因子に暴露されることで受精能を獲得する。精巣上体の炎症は、男性不妊の原因のひとつと考えられている。精巣上体炎は、微生物などが尿道から精管を上行し精巣上体に到達することで引き起こされるものや、軽度の精管捻転に起因するものがある。いずれの場合においても、精巣上体炎は受精能獲得過程における精子に影響を与えると考えられているが、これまでに精巣上体細管中の精子の振る舞いに関する観察報告はなく、精巣上体炎が精子の運動に与える影響は未解明である。

【方法】はじめに、蛍光レポーターマウスの作出を行った。精子及び精巣上体細管を標識する蛍光レポーターマウス (Pax2-Lyn-Venus)を作出した。次に、二光子顕微鏡によるマウス精巣上体の *in vivo* イメージング法を確立した。麻酔の程度や体温保持、また、体動による撮像ブレを防ぐために両脚を粘着テープで固定するなどの工夫により、倒立顕微鏡下で数時間の安定したライブイメージング技術を確立することができた。精巣上体炎の誘導法については、1. グラム陰性菌細胞壁外膜の構成成分である lipopolysaccharide (LPS) の投与、2. 精巣上体体部もしくは精管の結紮の2種類の方法を検討した。検討の結果、2. の精巣上体体部もしくは精管の結紮を本研究では用いることとした。全ての実験には、12 週齢から24 週齢までのオスマウスを使用した。

【結果】精巣上体体部を結紮した個体については、コントロールと比べてわずかに精子の運動速度(精子集団の流速)が増加したものの顕著な違いは認められなかった。一方で、精管結紮した個体については、精巣上体細管および精子運動に関しコントロールと比べて顕著な差が認められた。精巣上体細管については、結紮による管の太さへの影響は認められないものの、精巣上体細管を構成する上皮細胞のアピカルーベーサル軸に直交する断面を観察したところ、細胞の大きさが著しく減少していることが明らかとなった。また、精巣上体細管内腔の精子運動への影響については、コントロール群では精子集団が管腔部に精子が多数存在し渦を巻くように運動していたが、結紮群では精子の数は少なく運動は認められなかった(下図)。また、管腔内の上皮に接した領域で脱落した細胞が認められた。これらの結果から、精管結紮によって、精巣上体細管中に存在する精子数は減少し精子運動は著しく抑制されることが明らかとなった。

精管結紮による精巣上体細管及び管内の精子運動への影響



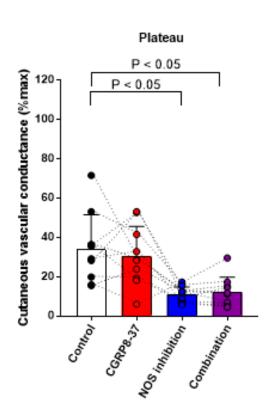
藤井 直人

【目的】地球温暖化が進行している中、2020年には夏季オリンピックが東京で行われたり、夏季であっても屋外で学校体育や労働活動を余儀なくされる場面が多々ある。従って、熱中症の発生件数は年々増加することが予想され、効果的な熱中症予防法を打ち出すことは、安全確保の観点から極めて重要である。熱中症の予防を考えるうえで、熱 放散反応 (皮膚血管拡張および発汗反応)を理解することは必要不可欠であるが、この末梢メカニズムに関しては、未だ不明な点が数多く残されている。本研究では、熱放散反応の1つである皮膚血管拡張反応にカルシトニン遺伝子関連ペプチド (calcitonin・gene・related peptide: CGRP) が関与するかを明らかにするために実験を行った。また、一酸化窒素合成酵素 (Nitric oxide synthase: NOS) の役割も同時に検討した。

【方法】被験者は 10 名の健康な若年成人であった(女性 3 名)。前腕部真皮に挿入した 4 本のマイクロダイアリシスのチューブを介して、それぞれ以下の溶液を連続的に投与した: 1. リンゲル液 (コントロール)、2.  $160 \, \mu \, \mathrm{M}$  CGRP8-37 (CGRP 受容体ブロッカー)、3. 20 mM L-NAME (NOS 阻害薬)、4. CGRP8-37 と L-NAME の組み合わせ (Combination)。マイクロダイアリシス処置部には、レーザードップラー血流計と局所加温装置を取り付けた。ベースラインの測定後、局所温度を 39℃に設定し、皮膚血流量を増加させた。その後、42℃に温度を上昇させることで、さらに皮膚血流量を増加させた。皮膚血流量は平均血圧で除し、皮膚血管コンダクタンスを得た(皮膚血管の拡張度合いの指標)。

【結果】39℃の局所加温によって皮膚血管コンダクタンスは上昇した。この反応は初期のピーク(Initial peak)、最下点(Nadir)、持続的な定常状態(Plateau)の3 相性を示した。3 相全てにおいて、皮膚血管コンダクタンスはコントロールと CGRP8-37 処置部で差はなかった。一方で、皮膚血管コンダクタンスは L-NAME によりコントロールと比べて低くなった。以上から、熱ストレス負荷時の皮膚血管拡張反応に、CGRPは関与しないものの、NOSは関与することが示唆された。

39℃局所加温時の皮膚血管拡張反応 (cutaneous vascular conductance は皮膚血流量の指標)



# 150 SPOPでユビキチン化される真の基質タンパク質の同定

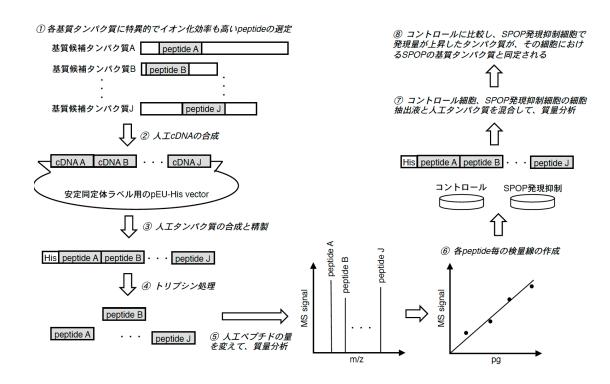
前川 大志

【目的】SPOP(speckle-type POZ protein)は、Cullin-3(CUL3)型ユビキチン(Ub)-E3 複合体の基質認識受容体であり、標的基質タンパク質と結合し、基質タンパク質を Ub 化することで、基質タンパク質を分解に導く。前立腺癌患者の約 15%において SPOP の基質結合ドメインに点変異が存在し、アンドロゲン受容体等の基質タンパク質との結合能を失い、oncogenic な基質タンパク質が蓄積することで前立腺癌が発症するとされている。我々は最近、前立腺癌だけでなく、乳癌、髄芽腫、横紋筋肉腫の発癌にも SPOP の機能不全が関与することを見出したが、前立腺癌を含めた各癌種の発癌過程に寄与する SPOP の標的基質タンパク質の全貌は不明な点が多く残されている。そこで本研究では、SPOP の既知基質タンパク質及び、我々が独自に見出してきた SPOP 基質候補タンパク質に Q-conCAT 一斉絶対定量系システムを構築、適用することで、各種癌細胞における SPOP の真の基質タンパク質を細胞毎に同定することを目的として、実験を実施した。

【方法】SPOP の既知基質タンパク質を含む 130 分子の SPOP 既知基質/基質候補タンパク質に関して、各タンパク質に特異的で、実際にイオン化し得る proteotypic peptide (PTP) の選択を試みた。次に、選択できた PTP に関して、約 30 ペプチドをタンデムに繋いだ人工タンパク質をコードする人工遺伝子を Q-conCAT 内部標準ペプチド His-TIPS タグを N 末端に付加し、pEU ベクターに組み込んだ(合計 7 種類)。コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて、安定同位体ラベルした 7 個の当該人工タンパク質を合成し、His 精製を実施し、質量分析により当該人工タンパク質の量と各ペプチドのシグナル強度の検量線を作成し、SPOP 基質候補タンパク質毎の一斉定量法(Q-conCAT 定量システム)を確立した。本定量系を用いて、SPOP を人為的に制御した各種癌細胞の細胞抽出液中の基質タンパク質の定量を試みた。

【結果】PTP を選択できた 118 分子の SPOP 既知基質/基質候補タンパク質由来の PTP をコードする人工タンパク質 7 種類の合成と精製は良好で、この 118 分子の SPOP 既知基質/基質候補タンパク質に関して、Q-conCAT 定量システムの構築に成功した。一方で、SPOP を人為的に制御した各種癌細胞の細胞抽出液中の基質タンパク質の定量に関しては、定量サンプルの調整方法に検討が必要であることが分かった。

# Q-conCAT システムを用いた SPOP の基質タンパク質の絶対定量法



# 151 生命の連続性を担う生殖細胞エピゲノム形成機構の解明

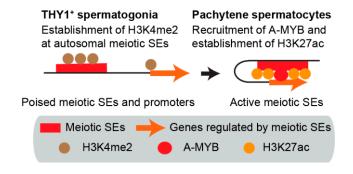
前澤 創

【目的】精子形成期において、生殖細胞が分化し減数分裂期へ移行する際には、数千もの遺伝子発現が変化し、体細胞型の遺伝子発現プロファイルから生殖細胞特有の遺伝子発現プロファイルへと切り替わる。これまでに、生殖細胞特異的なエピゲノム変化及びクロマチン構造変化によって遺伝子発現プロファイルの変化がもたらされることが示されている。興味深いことに、クロマチンの開閉状態は、減数分裂期の前後においてプロモーター領域よりも遺伝子間領域で大きく変化していた。そのため、エンハンサーの活性化状態が生殖細胞特異的な遺伝子発現プロファイルの制御に機能していることが示唆されたが、詳細な分子機構は不明であった。本研究では、マウス精子形成期における活性化エンハンサーの同定、及びその分子機構の解明を目的とした。

【方法】マウス精巣から精子形成期の代表的な分化段階の生殖細胞を単離した。単離した細胞を用いて、活性化エンハンサーの指標であるヒストン修飾 H3K27ac のゲノムワイドな分布を ChIP-seq 法により明らかにした。さらに ROSE(Rank Ordering of Super-Enhancers)アルゴリズムを用いて生殖細胞特異的なスーパーエンハンサーを同定した。

【結果】マウス精子形成期におけるエンハンサー活性化状態を明らかにするために、精巣から生殖細胞を単離し、活性 化エンハンサーの指標であるヒストン修飾 H3K27ac のゲノムワイドな分布を ChIP-seq 法により解析した。活性化 エンハンサーの分布は、分化型精原細胞から精母細胞への分化の過程で大きく変化していた。また、一部の活性化 エンハンサーが局所的にクラスターを形成していることを見出し、ROSE アルゴリズムにより各分化段階でスーパー エンハンサーを同定した。特に、減数分裂期移行後に多くのスーパーエンハンサー (meiotic SEs) が形成されており、 その近傍には、精子形成に必須の遺伝子が存在していた。減数分裂期以降の特異的なエンハンサー領域に含まれる転写 因子結合モチーフの探索の結果、生殖細胞特異的な転写因子である A-MYB 結合モチーフが同定された。マウス精巣に おける A-MYB のクロマチン結合領域を解析したところ、meiotic SEs 領域内に存在していることが明らかになった。 A-MYB の集積が meiotic SEs の形成に必要であるかを検討するために、A-myb 機能欠失マウスの精母細胞における H3K27ac の分布を解析したところ、meiotic SEs で H3K27ac の集積が減少していることが示された。これらの結果 から、A-MYBが meiotic SEsの形成に機能することが示唆された。meiotic SEsの形成機構を明らかにするために、 未分化精原細胞における meiotic SEs 領域のエピジェネティックな状態を解析したところ、H3K4me2 が集積している ことが示された。meiotic SEs 領域における H3K4me2 の集積は、減数分裂期移行の精母細胞や精細胞では減少してい た。また、meiotic SEs 領域以外に形成される活性化エンハンサー領域では H3K4me2 の集積はみられなかった。 以上から、meiotic SEs は、未分化精原細胞において H3K4me2 の集積を伴う準備状態にあることが示唆された。 本研究から、次の 1~3 に示される、meiotic SEs の標的となる精子形成関連遺伝子群の発現制御機構が明らかに なった。 1.未分化精原細胞において meiotic SEs 領域及びプロモーター領域に H3K4me2 が集積した準備状態が形成 される。2. 減数精子形成期へ移行後に A-MYB などの転写因子が集積する。3. H3K27ac が集積した活性化状態へ 変化し、標的遺伝子の発現が誘導される。

マウス精子形成期におけるスーパーエンハンサー (meiotic SEs) の形成機構



# 152 ドーパに関する新規受容体探索および構造活性相関解析

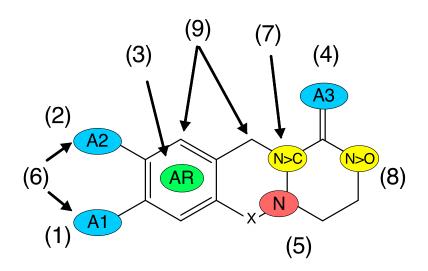
増川 太輝

【目的】我々は、L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA、ドーパ) 神経伝達物質仮説を提起してきた。2014年に、ドーパ受容体候補分子として GPR143 が同定された。しかし、GPR143 がドーパ応答を媒介する唯一の受容体であるかどうか、さらには、ドーパリガンドの存在は不明である。本研究では、ドーパに関する構造活性相関を求め、生体内において安定なドーパリガンドを得ることを目的とする。

【方法】麻酔下ラットの下位脳幹孤束核(NTS)にドーパ(30~100 ng)およびドーパ類似化合物(30~100 ng)を 微量注入した際の降圧応答の有無を測定した。降圧応答陽性化合物と陰性化合物の構造的特徴を比較し、活性に必要な 特徴を予測した。また、予測した特徴を用いてベイズ解析を行い、それぞれの化合物が活性を持つ確率を求めた。

【結果】試験した化合物のうち、12 種類の化合物が降圧応答を示し、18 種類は未応答だった。これらの化合物を比較することにより、活性を持つ化合物には、9 つの特徴が必要であることを見出した。さらに、この9 つの特徴はベイズ解析によって算出された確率と一致した。

ドーパ様活性を示すための構造活性相関の特徴



# 153 放出前シナプス小胞ナノスケール動態の計測法の開発

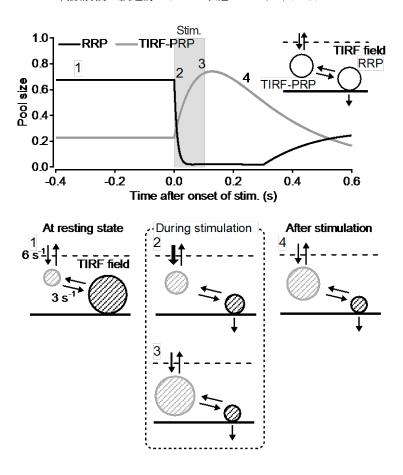
三木 崇史

【目的】高次脳機能を支えるシナプスは時に数 kHz もの頻度で活動する。このような高頻度での神経伝達を行うために、シナプス前終末ではシナプス小胞がシナプス前膜にある放出部位で活動依存的に次々と膜融合される。しかし、どのように小胞が放出部位に動員され高頻度な伝達物質放出に寄与するのか、そのメカニズムは未だ不明な点が多い。本研究ではこの高頻度神経伝達メカニズムの解明を目的として、運動時などの体の動きを高頻度で小脳へ伝える小脳 苔状線維シナプス前終末を標本とし、神経活動中の放出部位近傍のシナプス小胞動態を観測した。

【方法】小脳苔状線維シナプス前終末を急性単離し、ガラスに貼り付け蛍光色素でラベルしたシナプス小胞の動態を全反射照明蛍光顕微鏡(TIRF 顕微鏡)で観察した。同時に単離シナプス前終末をパッチクランプし、前終末に刺激を与えるとともに伝達物質放出をシナプス小胞膜融合による膜容量変化として定量した。薬理実験などを行い、小胞動態と神経伝達の関連性について研究を行った。

【結果】TIRF 顕微鏡下で単離シナプス前終末に電気生理にて脱分極刺激を行った際、神経伝達物質放出とほぼ同期したシナプス小胞の放出部位への速い動員が観察された。この速い小胞動員は小胞の放出に依存し、また細胞骨格であるアクチンの活性に依存することが薬理学的実験により示唆された。モデルシミュレーションの結果から、高速動員された小胞は、刺激時に放出された小胞の膜近傍のスペースを瞬時に埋め、数百 ms かけて放出可能な小胞となり持続的な神経伝達を担うことが示唆された。

# 刺激前後の膜近傍シナプス小胞プールダイナミクス



# 154 トランスポーター創薬を指向した化学伝達の制御

宮地 孝明

【目的】神経障害性疼痛と炎症性疼痛の発症にはグルタミン酸とプリン作動性化学伝達が関与する。小胞型グルタミン酸トランスポーター(VGLUT)と小胞型ヌクレオチドトランスポーター(VNUT)は、それぞれの伝達物質の小胞内充填と放出を司り、化学伝達に必須である。これらトランスポーターは慢性疼痛の良い創薬標的になると期待されるが、小胞型神経伝達物質トランスポーターの良い輸送活性測定法がなかったため、特異的かつ安全な創薬シーズはほとんど見つかっていなかった。そこで我々は、独自のトランスポーターの研究基盤を活かして、これら小胞型神経伝達物質トランスポーターの特異的阻害剤を同定し、ケミカルバイオロジーによる化学伝達の制御システムを構築することを本研究の目的とした。

【方法】VNUT と VGLUT を大腸菌あるいは昆虫細胞に大量発現させ、膜画分を界面活性剤で可溶化、アフィニティー精製し、これを人工膜小胞(リポソーム)に再構成した。再構成リポソームを用いて、バリノマイシン誘導による膜電位依存的な ATP あるいはグルタミン酸輸送活性を測定し、有効な阻害剤を探索した。神経細胞からの脱分極刺激による伝達物質の開口放出を定量し、細胞レベルでの阻害剤の効果を検証した。神経障害性疼痛と炎症性疼痛モデルマウスに阻害剤を静脈投与し、von Frey 試験により機械痛覚過敏を評価した。

【結果】精製・再構成法により小胞型神経伝達物質トランスポーターの阻害剤を探索した結果、nM レベルという極めて低濃度で VNUT の ATP 輸送を阻害する化合物を複数同定することができた。この VNUT 阻害効果は塩素イオン依存的かつ可逆的であった。また、グルタミン酸輸送活性を ON と OFF できる新しい制御因子の同定に成功した。同定した VNUT 阻害剤は、神経細胞からのグルタミン酸や GABA 等の伝達物質の開口放出に影響することなく、ATP の開口放出を選択的に阻害した。 VNUT 阻害剤は神経障害性疼痛と炎症性疼痛に既存の鎮痛薬より有効かつ副作用なく鎮痛効果を発揮し、正常なマウスの知覚には影響しなかった。 VNUT ノックアウトマウスにはこの VNUT 阻害剤は無効であったことから、in vivo でも VNUT を標的として鎮痛効果を発揮したと結論した。以上より、トランスポーターを標的とした化学伝達の新しい制御システムを構築することができた。本研究成果はトランスポーター標的型の新しい鎮痛薬の開発に繋がると期待される。

# 

小胞型神経伝達物質トランスポーターの役割

# 155 細胞内膜リン脂質によるYAPの活性化機構の解明

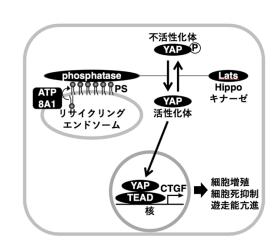
向井 康治朗

【目的】悪性新生物(癌)は日本人の死亡原因の30%以上を占めることから分かる通り、癌の治療法を開発することは非常に重要な課題である。Hippo-YAP経路は器官の大きさを規定するシグナルとして同定された経路であるが、癌においては転写共役因子YAPの恒常的な活性化が過剰な細胞増殖、細胞死の抑制、浸潤能の亢進を誘導し、癌の悪性化の一因となる。

我々はこれまでに、YAP の活性化がリサイクリングエンドソームに局在する酸性リン脂質ホスファチジルセリンによって制御されることを明らかにしてきた(T. Matsudaira and K. Mukai et al., *Nat Commun*, 2017)。さらに最近、YAP 依存的に増殖する癌細胞の一つである MDA-MB-231 細胞においては、リサイクリングエンドソーム膜の細胞質側のホスファチジルセリン量を制御するタンパク質 ATP8A1 を発現抑制すると、YAP のリン酸化体が増加し、細胞増殖が著しく減弱するという予備的結果を得たが、その分子機構に関しては未解明のままである。そこで本研究では、乳癌細胞においてリサイクリングエンドソーム膜の細胞質側のホスファチジルセリンが Hippo-YAP 経路を制御する分子機構を明らかにすることで、癌細胞に対する新規創薬標的の提案を目指す。

【方法】上述の通り ATP8A1 を発現抑制すると YAP のリン酸化体が増加したので、本研究ではホスファチジルセリン 近傍タンパク質として同定された 11 個のセリンホスファターゼファミリー分子に着目した。この 11 遺伝子に関して、The Cancer Genome Atlas にて乳がん患者における発現量と予後の相関解析を行ったところ、PPP1R12A と PP1B においてのみ、高発現の乳がん患者群で予後が悪いという結果が得られた。PPP1R12A と PP1B が含まれる PP1 ファミリーのホスファターゼは、触媒サブユニットと調節サブユニットが複数のモチーフを介して結合し、ヘテロニ量体を形成している。触媒サブユニットには PP1A、PP1B、PP1C の 3 種類のみが存在する一方で、調節サブユニットは 100 種類以上存在し、触媒サブユニットの基質特異性を高めていることが知られている。そこで本研究では、PPP1R12A ーPP1B 複合体が YAP の脱リン酸化に寄与するかを、PPP1R12A を MDA・MB・231 細胞で発現抑制し、YAP のリン酸化状態と細胞増殖を評価することで検証した。また、細胞内オルガネラ分布が観察しやすい COS・1 細胞を用いて PPP1R12A と PP1B の細胞内局在も検証した。

【結果】MDA-MB-231 細胞で PPP1R12A を発現抑制したところ、細胞増殖が抑制され、YAP のリン酸化体が蓄積した。さらに、PPP1R12A 及び PP1B はすでに報告のある核や細胞質に加え、リサイクリングエンドソームに局在した。また、酸性リン脂質との相互作用に必要な C 末端側を欠損した PPP1R12A(1 $\sim$ 667)はリサイクリングエンドソーム局在を失っていることを見出した。



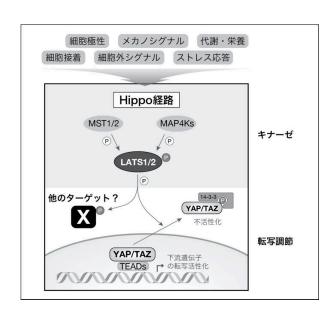
細部内膜リン脂質による YAP の活性化機構

諸石 寿朗

【目的】Hippo 経路は臓器の発生や大きさの制御、幹細胞や組織再生、また、がんの生物学に重要な役割を担うシグナル伝達経路として近年盛んに研究が行われている。この経路では、種々の刺激に応じて上流のキナーゼ分子群が活性化し、下流の転写調節分子群を制御することによって、様々な生理機能をもたらすと考えられている(図)。Hippo 経路の中心的なキナーゼである LATS キナーゼの標的分子としてよく知られているのは転写コアクチベーターである YAP/TAZ であるが、ノックアウトマウスを用いた解析などから LATS キナーゼは細胞分裂・中心体複製などの細胞周期進行、細胞分化・老化、オートファジーなど様々な場面で働いていると考えられており、これらの機能がすべて YAP/TAZ のリン酸化による制御で説明できるとは考え難い。また、我々は最近の研究で、がん細胞内の Hippoシグナルが宿主のがんに対する免疫応答を抑制していることを発見した[Cell 167: 1525-39 (2016)]が、この機構においては YAP/TAZ の関与は部分的であり、LATS キナーゼの未知の標的によってがん免疫の制御がもたらされている可能性が示唆された。そこで、本研究においては、LATS キナーゼの生理的な基質をリン酸化プロテオミクス解析で網羅的に同定し、LATS キナーゼの下流で Hippo 経路のエフェクターとして働く分子を明らかにすることを目指す。

【方法】Hippo 経路の中心キナーゼである LATS1 および LATS2 を欠損した細胞を CRISPR 法により作出した。この LATS1/2 欠損細胞と野生型の細胞における全タンパク質のリン酸化状態の変化を、SILAC リン酸化プロテオミクス法で網羅的に比較し、そのリン酸化部位が LATS キナーゼのリン酸化コンセンサス配列に合致するかを調べることで、LATS キナーゼの基質を探索した。その結果得られた LATS キナーゼの基質候補分子に関してインフォマティクス解析を行い、個別に研究を進める候補分子を絞り込んだ。この基質候補に対して in vitro でのリン酸化反応を用いた確認実験やリン酸化変異体(リン酸化部位のアラニン置換やアスパラギン置換)等を用いた機能解析実験によって、LATS によるリン酸化がもつ生物学的意義を検証した。

【結果】リン酸化プロテオミクス解析の結果、数万個のペプチドが同定され、上述の基準でLATSキナーゼの基質候補分子を絞り込み、既知のリン酸化部位を含む数十個の基質を同定した。これらの分子をジーンオントロジー解析に用いたところ、LATSキナーゼの基質の多くは細胞内小胞輸送に関わることが分かった。そこで、これらのうち特定のタンパク質に焦点を絞りリン酸化変異体等を用いた機能解析実験を進めたところ、LATSキナーゼによるリン酸化によって分子の細胞内局在や機能が変化することが明らかとなった。すなわち、Hippo 経路はこの新規基質分子のリン酸化を制御することで細胞内小胞輸送を調節し、様々な細胞機能を発揮する可能性が示唆された。



Hippo シグナルの概略と本研究のねらい

# 157 エンハンサーが制御するNKT細胞への分化運命決定機構

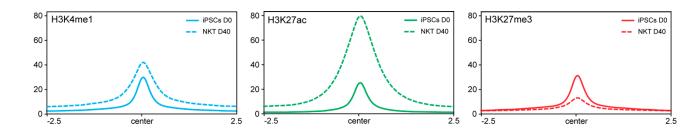
藥師寺 那由他

【目的】リンパ球の一つである NKT 細胞は、他の免疫細胞を活性化することで高い抗腫瘍効果をもたらす。がん免疫治療法への利用が期待されるが、ヒト末梢血中には 0.01~0.1%しか存在せず、試験管内で治療に必要な細胞数まで増殖させることは困難である。我々の研究室では、ヒト NKT 細胞由来 iPS 細胞を再度 NKT 細胞へと分化させることでこの問題に取り組んできている。しかしながら、現行の分化誘導法は計 40 日間にわたり、最終的に Va24、Vb11、CD3、CD45 全てを強く発現している NKT 細胞の割合は全体の約 20~30%と誘導効率にばらつきがあるのが現状である。がん免疫治療法の実施に向けて、十分な細胞量を安定かつ迅速に供給するためには、工程期間の短縮と誘導効率の改善が大きな課題である。そこで分化誘導期間の短縮と高い誘導効率を兼ね備えた次世代の分化誘導法の開発に向け、本研究では現行の分化誘導法を用いて、NKT 細胞への分化運命を規定するような発現制御領域(エンハンサー)を同定し、その制御機構を明らかにすることを目指した。

【方法】ヒトNKT 細胞由来 iPS 細胞から NKT 細胞への分化誘導過程における遺伝子発現状態の遷移を明らかにするため、分化誘導前の iPS 細胞と分化誘導後 40 日目の NKT 細胞を用いて、RNA-seq を行った。次に、それらの遺伝子群の発現を制御するエンハンサー候補を調べるために、iPS および分化誘導後 40 日目の NKT 細胞を用いて、エンハンサー領域の指標となるヒストンアセチル化酵素 P300 およびヒストン修飾状態を認識する抗体を用いて、CUT&Tag 法によるクロマチンプロファイリングを行った。

【結果】ヒト NKT 細胞由来 iPS 細胞と分化誘導後 40 日目の NKT 細胞を用いて遺伝子発現比較を行った結果、NKT 細胞では予想通り免疫細胞を特徴づけるような遺伝子群の発現が上昇していることがわかった。これらの遺伝子の TSS 領域周辺におけるヒストン修飾状態をみたところ、NKT 細胞では転写の活性化およびエンハンサー活性の指標となる H3K4me1 と H3K27ac のシグナルが高くなっており、反対に転写の抑制に作用する H3K27me3 のシグナルは低くなっていた。また、エンハンサー領域の指標となる P300 のプロファイリングを行ったところ、およそ 6,800 ヶ所において強い結合がみられた。分化誘導の NKT 細胞において、P300 結合領域における H3K4me1、H3K27ac および H3K27me3 のシグナルを調べたところ、分化誘導後の NKT 細胞では転写活性に作用する H3K4me1 と HeK27ac の 濃縮状態が iPS 細胞のものよりも上昇していることが明らかとなった。

P300 結合領域周辺 5kb 内でのヒストン修飾の濃縮状態から明らかとなった iPS 細胞と NKT 細胞におけるエンハンサーの活性の違い



# 158 ALS関連タンパク質凝集体によるRNA動態制御異常の解明

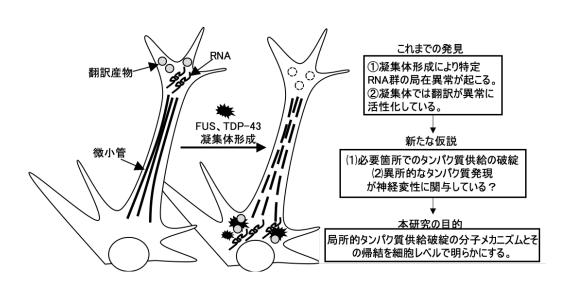
安田 恭大

【目的】筋萎縮性側索硬化症(ALS)や前頭側頭葉変性症などの複数の神経変性疾患で、複数のRNA 結合タンパク質の細胞質での凝集が病理的所見として報告されている。これは疾患発症に深く関わることが示唆されているが、その機構については未解明な部分が多い。我々はこれまでに、そのような凝集タンパク質に注目して研究を行ってきた。そして、異なる RNA 結合タンパク質を中核とする凝集体が、共通して特定の RNA の細胞内局在を撹乱すること、また凝集体形成により異所的な翻訳活性化が起こることを見出している。これらの事実は、凝集体形成による RNA 動態の変容が神経変性疾患の病態形成の要因となることを示唆している。本研究はこれを発展させ、ALS 関連凝集体の一つである FUS タンパク質凝集体を対象とし、その形成下で RNA 動態を変化させる因子の探索とその機能解析を通して、RNA 動態変化メカニズムの解明を目指した。将来的な目標は、凝集体形成による神経変性疾患発症機構の理解である。

【方法】本研究ではまず光反応性 Halo タグ基質を用いて、野生型と変異により凝集体形成が促進された FUS タンパク質で、相互作用が変化する因子の探索を行った。この基質は光刺激により近傍分子に化学架橋を施すものであり、これと質量分析を組み合わせることで、標的分子とその近傍分子の相互作用探索が可能となる。次に、上記実験で相互作用変化の見られたタンパク質の一つである VCP タンパク質を対象とした解析を行った。具体的には、FUS 凝集体の性質と VCP 発現レベルの関係性の解析や、局在 RNA のライブイメージング、および細胞内の翻訳活性の可視化を用いた RNA 動態の解析を行った。上記実験は、これまでに我々が、当該分野の研究で使用しており、かつ神経細胞と類似した RNA 局在を示す NIH/3T3 細胞を用いて遂行した。

【結果】光反応性 Halo タグ基質と質量分析を用いた解析の結果、FUS タンパク質変異の有無に際して FUS との相互作用が変化するいくつかのタンパク質の同定に成功した。その一つであり、ALS 原因遺伝子としても報告されている VCP タンパク質は、ALS 関連変異により凝集体形成する FUS タンパク質とは相互作用が減少していた。そして興味深いことに、VCP の過剰発現により、FUS 凝集体形成によって引き起こされる異所的な翻訳活性化や RNA 局在の異常が緩和されることを示唆する結果が得られた。このことは、VCP は本来、上記のような RNA 動態に何らかの形で関わる制御機構(の一部)であり、FUS 変異による相互作用の減少がその制御を逸脱する一因になっている可能性を示唆している。また、VCP はプロテアソーム経路での活性が報告されているが、上記の結果はプロテアソーム経路とは別に、VCP が根本に持つ ATP 分解酵素としての側面が非常に重要であることも明らかとなった。これまでVCP は、プロテアソーム経路に着目して、ALS との関わりが議論されてきた。本研究結果はそれら先行研究とはまた別の、新たな病態形成経路の解明につながる結果である。

### 本研究の経緯と目的の概略図



# 159 音受容チャネルの細胞内領域の核移行現象と難聴病態

山口 聡一郎

【目的】Transmembrane channel like protein 1(膜貫通チャネル様タンパク質 1、TMC1)は内耳蝸牛の有毛細胞において、音の振動により開く Mechano Electrical transducer(機械電気変換、MET)チャネルのポアを構成するタンパク質であり、その変異は難聴を引き起こすことが報告されている。我々はマウスの TMC1 (mTMC1)を HEK293 細胞に強制発現させると、一部の細胞において、その細胞内 N 端領域が核に集積するという現象を見出した。これは TMC1 の細胞内 N 端領域が何らかの機序で切断され、核内に輸送され、核内で何らかの作用を示す可能性を示唆する。そこで、本研究では、細胞内 N 端領域が切断される部位を明らかにし、その断片を強制発現させて HEK293 細胞において、トランスクリプトーム (mRNA の発現) に変化が生じるかを調べる。それにより、TMC1 の切断と核移行現象が難聴病態の発生に関わる可能性があるか否かを明らかにすることが本研究の目的である。

【方法】野生型や作製した変異体の mTMC1 を HEK293 細胞に強制発現させ、その N 端に対する抗体を用いて、免疫染色あるいは Western blot により、細胞内における局在や N 端断片の大きさや出現を検出した。アミノ酸の置換や欠損をさせた変異体は site-directed mutagenesis により作製した。mTMC1 の細胞内 N 端領域による転写調節の可能性を検討するため、mTMC1 の細胞内 N 端領域を発現した HEK293 細胞をセルソーターで分取し、次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析を行った。

【結果】まず、mTMC1 には mTmclex1 と mTmclex2 の二種類のスプライスバリアントがあるが、mTMC1 の タンパク質は mTmclex1 から生じることを明らかにした。よって、以下の実験では mTmclex1 を用いた。 Western blot の解析の結果、HEK293 細胞に強制発現させた mTMC1 から、少なくとも二種類の細胞内 N 端領域の 断片が生じていることが明らかとなった。アミノ酸を変異させる実験により、それぞれの断片の切断が起こるために 必要なアミノ酸配列あるいはアミノ酸残基を明らかにした。mTMC1 の細胞内 N 端領域のみを強制発現させたところ、発現させたほぼ全ての細胞で核に細胞内 N 端領域が核内に集積していた。細胞内 N 端領域には核移行シグナルとなる アミノ酸配列があり、それを変異させた細胞内 N 端領域は核へは集積せず、細胞全体に分布した。細胞内 N 端領域を強制発現させた HEK293 細胞ではいくつかの遺伝子の発現量に変化が見られた。変化した遺伝子が有毛細胞の機能に どのように影響するのかはさらなる研究が必要である。以上、本研究により、mTMC1 の細胞内 N 端領域が転写調節を行う可能性が示唆された。

mTMC1(ex1) HEK293 細胞 細胞質基質 様移行シグナル KR:KR:TR

強制発現させた mTMC1 の切断と核移行と転写調節機能

# 160 血管壁のメカニカルストレス応答機構の解明

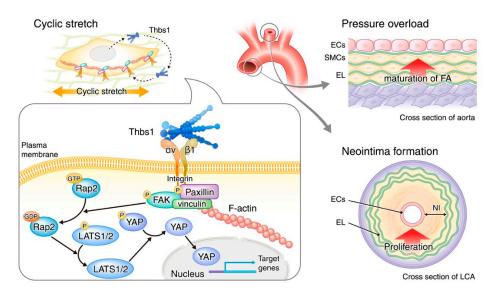
山城 義人

【目的】血管壁は絶えずメカニカルストレス(血圧や血流による血行力学的応力)に晒されており、その制御機構の破綻が血管病態の根本原因ではないかと注目されている。細胞が外力を感知し、応答する仕組み(メカニカルストレス応答)とそのシグナル伝達(メカノトランスダクション)は、細胞外マトリクスと細胞接着斑、または細胞表面受容体を介して細胞内に伝搬されるが、その制御メカニズムの詳細は明らかになっていない。そこで本研究では、血管のメカノトランスダクション機構における細胞外マトリクスの役割と、血管病態発症の分子メカニズムを明らかにすることを目的として遂行した。

【方法】始めに、ラット血管平滑筋細胞を用いて周期的伸展刺激(20% strain、1.0 Hz、20 時間)において分泌されるタンパク質を網羅的に解析し、Thbs1 を含む 85 種類のタンパク質を同定した。大動脈瘤病変で過剰に発現している先行研究の結果から Thbs1 の役割に注目し、分泌された Thbs1 が細胞膜上の Integrin αvβ1 に結合し、接着斑の活性化やアクチンフィラメントの配向といった伸展刺激応答を制御することを見出した。免疫染色、原子間力顕微鏡を用いた測定から、Thbs1 欠損細胞では伸展刺激応答における接着斑の活性化が誘導されず、細胞骨格を形成するアクチンフィラメントの配向が崩れ、細胞張力が減少していることを明らかにした。Thbs1 が誘導する細胞内のシグナル伝達経路を特定するために、遺伝子発現解析(RNA-seq)を行った。器官のサイズや細胞増殖に関わる転写調節因子 Yes-associated protein(YAP)の標的遺伝子の発現が、Thbs1 欠損細胞では伸展刺激後も抑制されること、伸展刺激による YAP の核内移行(活性化)には Thbs1 が必須であることを見出した。また、YAP の核内移行は、Thbs1の Integrin αv81 への結合と、低分子量 G タンパク質 Rap2 の不活性化を伴って、Hippo 経路依存的に制御されていることが示唆された。さらに、Thbs1 欠損マウスは、横行大動脈縮窄術(TAC)による圧負荷により、血管の破裂・乖離を引き起こすこと、Thbs1 / Integrin / YAP のシグナル伝達経路が、血管狭窄時の新生内膜細胞の増殖を制御することを明らかにした。

【結果】これらの結果から、細胞のメカニカルストレス応答の中心を担う転写調節因子 YAP の活性化を、細胞外マトリクス Thbs1 が制御することを明らかにした。さらに、Thbs1 が制御する YAP 活性化のシグナル伝達経路は、血管壁の圧負荷応答や、狭窄に伴う新生内膜形成時の血管リモデリングに重要な働きを示すことを明らかにした。

# 伸展刺激応答における Thrombospondin-1 を介した YAP の活性化(核内移行)制御の概略



# 161 オルガノイドを用いた脂肪肝炎の多細胞連携基盤の解明

米山 鷹介

【目的】近年、生活習慣病や糖尿病を背景として急増している非アルコール性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis: NASH)は、単純な脂肪肝から発展して、炎症や線維化を伴う進行性の慢性疾患である。NASH は高頻度で肝硬変や肝がんを発症するため、治療介入が必須であるものの、現在までに有効性の高い治療法が存在しないことが問題となっている。NASH に関する従来の研究は、主にモデル動物を用いて行われてきたが、ヒトの病態を十分に再現できないために、病態メカニズムの理解や薬剤開発には至っておらず、炎症や線維化などの複雑な病態を再現できるヒト肝臓モデルの開発は喫緊の課題となっている。NASH の病態は、肝細胞の脂肪蓄積、クッパー細胞が起点となって惹起される炎症反応、肝星細胞による細胞外基質の産生、といった複数種類の細胞の応答が連鎖して形成される。したがって、このようなヘテロな細胞間相互作用の観点から、NASH 発症機構をヒトレベルで理解することは、治療開発を前進させる上で極めて重要と考えられる。そこで本研究では、1. ヒト iPS 細胞から、NASH 病態に特徴的な脂肪蓄積、炎症、線維化を誘導できる多細胞系肝臓オルガノイドを創出するための培養システムを開発するとともに、2. ヒト肝臓オルガノイドを用いて、NASH の病態進展の起点となる細胞間相互作用の破綻をシグナル分子レベルで明らかにすることを目的とした。

【方法】ヒト iPS 細胞から、胚体内胚葉細胞、後方前腸を経て、非実質細胞群を含む多細胞系の肝臓オルガノイドを誘導した。構築したオルガノイドの構成細胞種を、免疫染色法および遺伝子発現解析によって評価した。脂肪蓄積を起点とした炎症・線維化を誘導するために、肝臓オルガノイドを遊離脂肪酸で処理し、シングルセルトランスクリプトームを含む遺伝子発現解析と免疫組織学的解析により、炎症マーカーおよび線維化マーカーの発現を評価した。【結果】炎症や線維化を再現可能な肝臓オルガノイドを創出するために、ヒト iPS 細胞から、肝細胞に加えて、クッパー細胞や肝星細胞などの複数種類の細胞を同時に分化させる手法をとった。すなわち、前腸内胚葉の形成や、マクロファージ・肝星細胞の分化に重要とされるレチノイン酸シグナルに着目し、オルガノイドの形成初期にレチノイン酸を一過的に導入することで、複数系譜の細胞を同時に創出する手法を確立した。この肝臓オルガノイドに遊離脂肪酸を長期間暴露すると、肝細胞内への脂肪蓄積に引き続き、炎症性サイトカインの発現が上昇するとともに、線維化を示す病理的変化が起こることを見出した。この NASH に類似した表現型が引き起こされる多細胞連携基盤を明らかにするために、オルガノイドに発現する分泌因子をスクリーニングした結果、成長因子 X が抗線維化活性を有すること、また遊離脂肪酸処理によってその発現が顕著に抑制されることが明らかとなった。以上の結果から、本手法によるヒト肝臓オルガノイドをモデルとして、成長因子 X シグナルの異常が炎症・線維化の起点となっている可能性が示唆されるとともに、本成果は NASH 治療に対して臨床病態への外挿性に優れた創薬ツールを提供でき、治療法の開発に今後大きく貢献すると考えられる。

NASH における多細胞連携基盤に対する、ヒトiPS 細胞由来肝臓オルガノイドを用いたアプローチ



# 162 血管内皮機能に着目した歯周病による血管疾患への影響

青山 典生

【目的】近年、歯周病が循環器疾患のリスクとなる可能性が指摘されているが、関連メカニズムについてはほとんど明らかになっていない。歯周病が循環器系へ影響する機序の解明が急務である。我々はこれまで動物モデルを用いた基礎研究から、特定の歯周病菌による感染がさまざまな循環器疾患を悪化させることを明らかにしてきた。また、臨床研究により、高血圧や糖尿病を有する循環器疾患患者では歯周病菌のより強い感染を認めることを示してきた。以上のことから、歯周病による細菌感染が、持続性の全身の炎症を誘導し、酸化ストレスの亢進により血管内皮細胞に影響する可能性があると考えた。本研究の目的は、全身炎症と血管内皮機能に着目し、循環器疾患患者での歯周病の状態を評価することである。

【方法】末梢血管疾患患者での歯周病の状態および全身の炎症マーカーの測定を行った。末梢血管疾患を有する者および末梢血管疾患を有さない対照群の者を被験者とした。測定項目として、既往歴の聴取、血中の炎症因子、臨床的な歯周病指標、口腔清掃状態の評価、歯周病菌に対する抗体価の測定、歯周病菌遺伝子の定量を行った。

続いて、血管内皮機能と歯周病の状態との関連の評価を実施した。被験者として、内科医院に通院している患者を対象として、血管内皮機能検査を行った。医科検査結果は診療録より採取し、冠動脈疾患の家族歴の聴取、喫煙、血圧、糖尿病、脂質異常症、慢性腎臓病、肥満、身体活動量について調査するとともに、血中マーカーの測定を行った。 歯周病検査として、口腔清掃状態など臨床的な歯周病指標の測定を行った。

【結果】末梢動脈疾患を有する患者では、対照群の被験者と比較して、統計学的有意に喪失歯数が多いことが明らかになった。末梢動脈疾患患者では血液中の炎症関連因子の値が上昇していることが認められた。血管内皮機能が低下している被験者群では欠損歯数が多く、歯の動揺の増加を認めた。多変量解析により年齢とヘモグロビン Alc の影響を補正した上でも、血管内皮機能の低下と歯の動揺との相関が認められた。

歯周病が循環器疾患に影響する機序の概念図



# 163 希少がん骨軟部腫瘍のCAGE法を用いた新規治療法開発

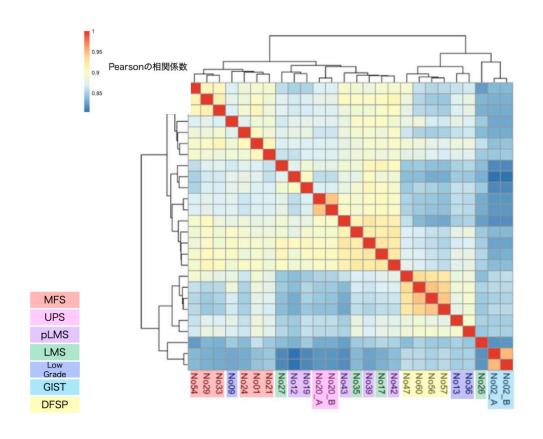
赤池 慶祐

【目的】骨軟部肉腫の治療成績は依然極めて不良であり、「希少がん」であるが故に限られたデータ量や、それに伴う消極的取組みが影響し新規治療の開発が滞っている現状がある。軟部肉腫の研究は組織型特異的遺伝子変異(特に融合遺伝子:ユーイング肉腫\_EWS/FLI1、滑膜肉腫\_SS18/SYT、横紋筋肉腫\_PAX3-FOXO1 など)が発見され、各組織診断に有用なマーカーとなっている。しかしながら、未だ約 60%の骨軟部腫瘍には組織特異的遺伝子変化は不明である(complex karyotype sarcomas)。特に組織型頻度の高い紡錘型肉腫(spindle cell sarcoma)において未解明であり、UPS(Undifferentiated pleomorphic sarcoma:以前はMFH)と称される分化方向性が不明なものも多く含まれ、現在までに発生・発がんの因子も不明であり、診断はもとより治療法開発にも難渋しその解明が求められている。

【方法】近年開発された新規テクノロージーとして、各遺伝子に複数存在する転写開始点・プロモータ・それに伴うエンハンサの発現の網羅的精密解析を可能とした CAGE (Cap Analysis of Gene Expression 法) が理化学研究所で独自に開発されている。しかしながら現在までに、骨軟部肉腫において CAGE 法による解析は行われていないため、本研究では骨軟部肉腫に対して CAGE 解析を進めプロファイルイングを獲得した。

【結果】軟部肉腫手術検体 24 例に対して CAGE 解析を行い 99,602 個の転写開始点・プロモータ・それに伴うエンハンサの発現のプロファイルイングを獲得した。また骨肉腫抗がん剤耐性株に対して同様に CAGE 解析を行い 99,602 個の転写開始点・プロモータ・それに伴うエンハンサの発現のプロファイルイングを獲得した。そのプロファイリングは現在解析中であり、その機能解析や検証実験は骨軟部肉腫の悪性度解明や新規治療法開発に繋がると考えている。

# 軟部肉腫組織型相関図



# 164 脳と心臓双方の視点から捉える統合失調症の病態

有岡 祐子

【目的】統合失調症患者数は日本だけでも約 80 万人で、そのうち約 19 万人が入院を余儀なくされている。病態に基づく根本的治療法の開発が望まれているが、統合失調症の病態は未だ不明である。統合失調症は、精神症状の基盤となる脳病態に加えて心臓にも病態があると予想され、脳と心臓の両者の病態を解明することが、効果に優れ副作用の少ない治療薬開発を進める上でも不可欠と考える。

そこで本研究では、iPS 細胞を用いて、1. 統合失調症の脳と心臓の病態を反映した疾患ヒトモデルを作製し、2. 脳と心臓双方の視点から統合失調症の病態解明・創薬への応用、を目的とする。特に統合失調症の発症リスクであり、心疾患ももたらす染色体 22q11.2 欠失症候群 (22q11.2DS) 患者由来 iPS 細胞を用いる。

【方法】健常者 iPS 細胞および 22q11.2DS 患者 iPS 細胞から神経細胞 (ドパミン神経細胞と大脳皮質神経細胞) および心筋細胞を分化誘導した。それぞれを統合失調症脳モデル、統合失調症心臓モデルとし、健常者細胞と比較して分子・表現型系解析を行った。また、神経細胞と心筋細胞について、抗精神病薬に対する反応性を比較した。

【結果】半定量プロテオーム解析の結果、22q11.2DS 神経細胞では小胞体ストレス関連パスウェイの異常が認められ、実際、小胞体ストレスに対する耐性が低下していた。また、22q11.DS 心筋細胞では分化初期段階における顕著な細胞死が認められた。さらに、22q11.DS 患者細胞(神経細胞と心筋細胞)は健常者細胞(神経細胞と心筋細胞)よりも抗精神病薬のひとつであるクロザピンに対する細胞生存率が低値であった。以上は、22q11.2DS 患者細胞では、脳と心臓双方において、細胞死に対する顕著な脆弱性が存在していることを示唆する。本成果は、脳と心臓、という新たなアプローチによる統合失調症の病態解明、および創薬へ寄与することが期待される。

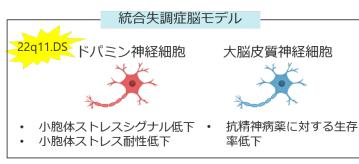
### 研究概要

# ヒトiPS細胞の利用による 脳および心臓に着目した統合失調症の病態解明

染色体22q11.2欠失症候群(22q11.2DS)

「統合失調症発症:脳病態」と「先天性心疾患:心臓病態」のリスクを併せもつ

22q11.2DS患者iPS細胞から誘導された神経細胞・心筋細胞は 統合失調症の「脳」と「心臓」の病態を反映する最適モデル



22q11.DS 心筋細胞・ 心筋分化初期に顕著な細胞死・ 抗精神病薬に対する生存率低下

統合失調症心臓モデル

細胞死への脆弱性を加味した創薬の必要性を示唆

# 165 IVIMイメージング法による腫瘍診断法の新たな展開

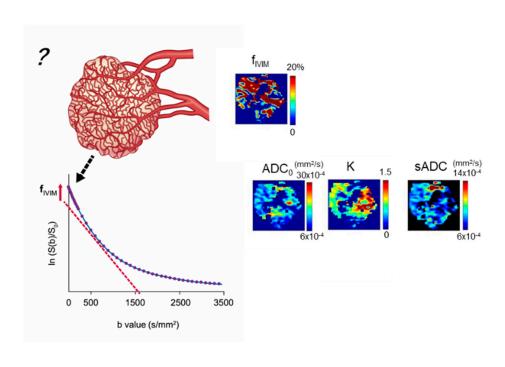
飯間 麻美

【目的】造影剤を使用しない非侵襲的な拡散強調 MRI は、生体内の水分子のブラウン運動による拡散現象を介した 組織微細構造の検出が可能なイメージング手法である。拡散強調 MRI から、日常臨床で使用されているかけの 拡散係数 (ADC: Apparent Diffusion Coefficient) のみならず、組織の拡散と灌流の両方を評価可能な (IVIM: Intra-Voxel Incoherent Motion) や非ガウス拡散 (Kurtosis) など、新たな定量値を算出することが可能で ある。特に IVIM は、ランダムに配列した毛細血管の中の血液の流れが拡散現象に模倣することに起因し、最近は 造影剤を用いずに腫瘍の血流を評価できる可能性がとみに注目されている。しかしながら、十分に IVIM 評価可能な 撮影時間を臨床で確保するのは困難であり、未だ研究の範囲内としてとどまっている。そこで本研究では、正確に 腫瘍内の灌流情報を反映可能な IVIM のイメージング法の開発を目的とする。

【方法】ヒトがん細胞を用いた異種移植モデルによる腫瘍マウスを作製し、動物用 7TMRI 撮影を実施した。マウス撮影を *in vivo、ex vivo* 両面で行いそれぞれから得られる信号強度を基に解析することにより IVIM 値の変化を評価し、腫瘍の灌流成分を正確に反映可能な IVIM 値及びフィッティングのモデルにつき模索した。

【結果】乳腺腫瘍と肝腫瘍の異種移植モデルによる腫瘍マウスを作製し、動物用 7TMRI を用いて拡散強調像の撮影を in vivo、ex vivo で行った。複数の IVIM フィッティング法にて解析し、還流成分を正確に反映可能な IVIM 値を 模索した。IVIM のうち fivim 値は ex vivo においてより低値を示す傾向にあり、生体内の灌流成分を反映していると 示唆された。IVIM の D\*値に関しては正確な算出が困難な症例もあったが、一部で低下する傾向にあった。 ただ ADC 値も低下する傾向にあり、ex vivo では灌流成分と拡散成分両方の低下が示唆された。腫瘍の種類により 拡散強調による信号変化、及び定量値算出の安定性も異なる傾向にあり、適切な腫瘍モデルの選択も IVIM 定量値算出 に有効であると考えられた。





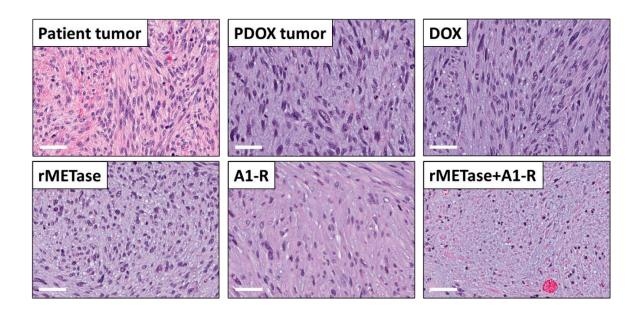
五十嵐 健太郎

【目的】原発性悪性骨軟部腫瘍は発生頻度が低く、100 種類以上が存在しており、それぞれ全く異なる性質を持つ希少がんの集合である。市場規模の小ささから新規薬剤開発のハードルが高く、それぞれの病理型に細分化すると発生頻度が極端に少ないため新規薬剤の標準治療が定まっていない。我々はカリフォルニア大学サンディエゴ校との共同研究において、Patient derived orthotopic xenograft(患者由来組織の同所性異種移植、以下 PDOX)を用いた腫瘍モデルを確立した。本研究では PDOX モデルマウスを用い、発生頻度の低い悪性骨軟部腫瘍領域における1. 個別化医療の追求、2. 新規治療の開発を目指した。

【方法】PDOX モデル作製:骨軟部肉腫患者の手術に際し切除した腫瘍の一部をヌードマウスの患者発生部位と同所へ移植(骨腫瘍は脛骨 or 大腿骨、四肢発生軟部腫瘍は大腿二頭筋、後腹膜発生の軟部腫瘍は後腹膜腔に移植)。作製した PDOX モデルに対し臨床上使用可能な各種薬剤を投与し治療を行い、最も効果の高い薬剤を見出した。我々が骨軟部肉腫に対する新規治療として開発した「腫瘍特異性の高いバクテリア」、「骨親和性の高い新規プラチナ製剤」、「腫瘍のメチオニン代謝をブロックするメチオニン阻害剤」の有用性についても PDOX モデルを用いて検証し臨床応用の可能性につき評価した。

【結果】横紋筋肉腫、骨肉腫、脱分化型脂肪肉腫 PDOX モデルを樹立した。骨肉腫、脱分化型脂肪肉腫は臨床上第一選択薬に対し治療抵抗性であったが PDOX モデルにおいても抵抗性であり、薬剤抵抗性が PDOX モデルに再現できていることを明らかとした。脱分化型脂肪肉腫に対し薬剤感受性試験を行い、PDOX モデルにおいて腫瘍縮小効果を示す薬剤を明らかとしたが、患者病勢の進行が早く実臨床における治療選択の指標とすることはできなかった。「骨親和性の高い新規プラチナ製剤」は骨肉腫 PDOX に対しシスプラチンを上回る抗腫瘍効果を示した。「腫瘍特異性の高いバクテリア」、「腫瘍のメチオニン代謝をブロックするメチオニン阻害剤」はいずれも脱分化型脂肪肉腫 PDOX モデルに対しドキソルビシンを上回る抗腫瘍効果を示した。本研究において PDOX モデルは、1. 悪性骨軟部腫瘍の個別化医療にむけた取り組み、2. 新規治療の悪性骨軟部腫瘍への応用として有用である可能性を示した。

ドキソルビシン抵抗性後腹膜脱分化型脂肪肉腫に対する rMETase と腫瘍特異的バクテリアの併用療法



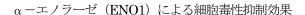
# 167 脳アミロイド血管症の進行抑制因子SRPX1の機能解析

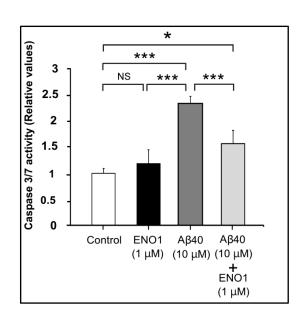
井上 泰輝

【目的】脳アミロイドアンギオパチー(CAA)は、アルツハイマー病(AD)患者の 90%に随伴し、 $A\beta$  が脳血管に 沈着、脆弱化し脳出血を発症する。高齢化社会が社会問題となる中、CAA 患者が増加する一方で、CAA の 予防や治療法は未確立であり、その開発は急務である。CAA や AD は病原タンパク質である  $A\beta$  が脳に沈着する アミロイドーシスという疾患概念に含まれる。アミロイドーシスは、難溶性のタンパク質であるアミロイド線維が 全身諸臓器の細胞外に沈着し、様々な機能障害を起こす疾患群の総称であり AD と CAA を総じて脳アミロイドーシス と呼ぶ。近年、アミロイドーシスの研究領域では、病原タンパク質と共存するタンパク質が分子基盤の解明と治療薬 開発の鍵として認識されるようになった。しかし、CAA の共存タンパク質の研究は、これまで日本、および諸外国を 含め報告がなかった。我々はこの問題を解明すべく、世界に先駆けて CAA における共存タンパク質を同定した。 この中から我々はSRPX1に着目し、そのアポトーシス誘導効果がCAA病態の中核を成す可能性をin vitroで示した。 本研究では、この効果を生体内で検証すべく CAA モデルマウスである APP23 マウスと SRPX1 ノックアウトマウス を交配させ、アポトーシス抑制を介しCAAが改善するか否かを検討する研究スキームを描いていた。しかし、SRPX1 のコンディショナルノックアウトマウスの作製に当初の予想以上の時間を要することが判明したこと、SRPX1をCAA のバイオマーカーとして想定していたが、ELISA 法において検出感度以下となったことから、新たに $\alpha$ -エノラーゼ に着目した研究を展開した。 α - エノラーゼは、我々の先行研究においても同定されており、解糖系酵素として広く 研究されているが、近年、熱ショックタンパク質や低酸素ストレスタンパク質としての多面的機能が指摘されつつある。 α-エノラーゼが解糖系酵素以外の機能を有している可能性を想定し、その機能解明を目指した研究を行った。

【方法】チオフラビン T はアミロイド線維の $\beta$ シート構造を認識するが、この吸光度を測定することによって、その上昇が  $A\beta$ の線維形成を示す。そこで、 $A\beta$ に $\alpha$ -エノラーゼを添加した際のチオフラビン T の吸光度を測定し線維形成阻害効果について検証を行った。また、脳平滑筋培養細胞を用いて、 $\alpha$ -エノラーゼの  $A\beta$ 細胞毒性軽減効果をカスパーゼ 3/7 の活性を指標に評価した。

【結果】  $\alpha$  -エノラーゼが  $\mathbf{A}\beta$  線維形成を抑制し、 $\mathbf{A}\beta$  の細胞毒性を抑制した。さらに、 $\alpha$  -エノラーゼを  $\mathbf{CAA}$  モデルマウスの脳内へ投与し、病態改善効果を立証した。





# 168 器官再生に向けた線維芽細胞増殖因子の機能理解と応用

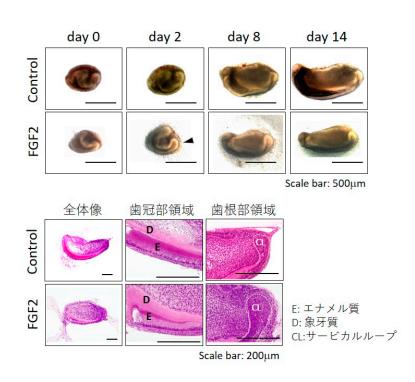
大島 正充

【目的】ほぼ全ての器官は、胎児期の器官発生メカニズムによって誘導され、線維芽細胞増殖因子群(FGFs)などの遺伝子群による分子基盤が働いている。近年、機能不全に陥った器官を置換する器官再生医療が期待されているものの、再生器官は器官サイズや形態を十分に再現できていないことが課題とされてきた。本課題では、胚発生や器官発生において重要な役割を果たす FGF2 が、歯胚発生に及ぼす影響を器官発生の観点から解析することにより、器官サイズ/形態形成の制御メカニズムの理解と応用を目的とした。

【方法】1. FGF2 による切歯歯胚発生への影響: C57BL/6J マウスから胎齢 14.5 日目の下顎切歯歯胚を摘出し、器官培養を行った。FGF2 添加群には Recombinant human FGF2、100 ng/mL を培地中に継続的に添加し、一方でControl 群には FGF2 非添加とし、切歯歯胚発生の観察と組織学的解析を行った。2. FGF2 濃度依存的な切歯歯胚の伸長抑制: 培地中に 20 ng/mL、100 ng/mL、500 ng/mL の rhFGF2 を継続的に添加し、8 日間の切歯歯胚の器官培養中の経時的な歯胚伸長率を算出した。3. FGF2 による歯胚発生関連遺伝子の発現変動: FGF2 非添加および添加(100 ng/mL)条件下における歯胚発生関連遺伝子の変動をリアルタイム PCR にて解析した。

【結果】1. FGF2 による切歯歯胚発生への影響:器官培養 14 日目には Control 群と比較して、FGF2 添加群の切歯歯胚の伸長が抑制され、エナメル質の減形成と象牙質形成の亢進、サービカルループ領域の肥大化が認められた。2. FGF2 濃度依存的な切歯歯胚の伸長抑制:高濃度の FGF2 添加群では、サービカルループ領域の肥大化が確認され、培養期間に伴って FGF2 濃度依存的に切歯歯胚の伸長が抑制された。3. FGF2 による歯胚発生関連遺伝子の発現変動:FGF2 添加群では、歯胚上皮における未分化マーカー遺伝子の発現上昇、および分化マーカー遺伝子の発現低下が認められた。一方、歯胚間葉においては未分化/分化マーカー遺伝子ともに発現上昇が認められた。

# FGF2 による切歯歯胚発生への影響



# 169 遺伝子改変による長期生存能を持つ抗腫瘍T細胞の開発

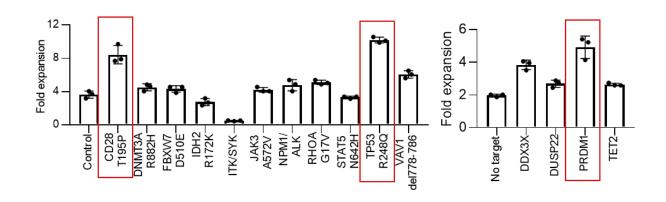
籠谷 勇紀

【目的】腫瘍抗原を特異的に認識する T 細胞を体外で準備し、患者に輸注することで腫瘍細胞を攻撃させる養子免疫療法は、CD19 に対するキメラ抗原受容体(chimeric antigen receptor: CAR)導入 T 細胞(CAR-T 細胞)療法が B 細胞性腫瘍に著効したことから注目されているが、固形腫瘍に対する CAR-T 細胞療法では十分な臨床効果が得られていないのが現状である。これまでの臨床試験データの解析から、輸注した抗腫瘍 T 細胞が体内で長期間生存することが持続的な治療効果と深く関わることがわかっている。本研究では、T 細胞性リンパ腫関連遺伝子に着目して、これらの変異遺伝子を抗腫瘍 T 細胞に導入することにより、優れた長期生存能、抗腫瘍効果を誘導することを目的とした。

【方法】T 細胞性リンパ腫で見られる遺伝子変異はレトロウイルスプラスミドに組み込み、ヒト T 細胞に導入した。またリンパ腫で欠失・機能喪失などが見られる遺伝子は、CRISPR/Cas9 によるノックアウトを電気穿孔法により行った。ヒト T 細胞のソースは、健常人由来の末梢血単核球を用いた。CD19 に対する CAR遺伝子として、クローン FMC63 由来の単鎖可変領域フラグメントに CD28、CD3z の細胞内ドメインを連結した第二世代 CAR を使用した。 In vivo における T 細胞の生存能評価は、NSG マウスにヒト T 細胞を輸注することにより行った。遺伝子発現プロファイルは RNA シークエンスにより解析した。

【結果】T 細胞性リンパ腫で見られる変異遺伝子・欠失遺伝子をヒト末梢血 T 細胞に個別に導入して、*in vitro* における長期培養下における生存能への影響を評価したところ、変異遺伝子では CD28 T195P、TP53 R248Q、欠失遺伝子については PRDM1 が T 細胞の長期生存能を高める有望な標的遺伝子として同定された。特に PRDM1をノックアウトした T 細胞では、長期生存能の指標となるメモリー形質が有意に維持されていた。 PRDM1 ノックアウト T 細胞の性質についてさらに解析を進めた。同遺伝子をノックアウトした CAR-T 細胞を NSG マウスに輸注したところ、コントロール T 細胞と比較して *in vivo* において生存能が優れていることを確認できた。また PRDM1 ノックアウト T 細胞は移植マウスに xenogeneic GVHD による体重減少を引き起こし、*in vitro* の解析で未分化なメモリー分画を維持していたことと合致する結果であった。次に、PRDM1 のノックアウトにより起こる遺伝子発現プロファイル変化を、RNA シークエンスにより網羅的に解析した。未分化な T 細胞で発現が亢進している既知の遺伝子群 (例えば表面抗原 CCR7、ILTR、転写因子 TCF7、LEF1、BACH2 など)を用いて gene set enrichment analysis (GSEA)を行ったところ、表面抗原解析結果と合致して、PRDM1 ノックアウト T 細胞で有意な発現上昇が見られた。これらのことから PRDM1 ノックアウトはゲノムワイドに T 細胞の遺伝子発現変化を起こすことで、T 細胞の機能変容を誘導できることがわかり、抗腫瘍 T 細胞における修飾標的として有望であると考えられた。

寄生虫による腸内細菌依存的な1型糖尿病抑制メカニズム



# 170 生体内機器を駆動させるワイヤレス給電システムの開発

木村 光一

【目的】本研究の目的は、「サンドイッチング送電方式を用いた生体内インプラント機器を駆動させるワイヤレス給電システムの開発」である。これまでに我々が開発したサンドイッチング送電方式を応用し、手術に利用されている電気メスなどの標準出力をジェネレータとして、100 mW 程度の電力を受電することができる回路を開発する。受信した電力を用いて圧力センサ及び温度センサの駆動電力、及び無線データ転送用電力とする。得られた生体方法のデータは2.4 GHz 帯無線通信規格である Bluetooth 回路(送信出力 30 mW)により人体外部へ転送する。生体外に情報が取り出せれば、既存の技術を用いて、データの復調、及びストレージを行う。

【方法】1. 体内に留置されたバイタルセンサに電源を供給する技術の確立: 低周波治療機器の両極のパッドによるサンドイッチ給電から受信されるエネルギーは交流で微弱であるため、デバイスを駆動させるために昇圧・整流が必要であり直列共振回路を導入した。直流出力部に電気二重層型スーパーキャパシタを接続し、圧力センサ及び温度センサの駆動電力、および無線データ転送用の電力として 100 mW を蓄えた。高周波治療機器等の標準出力を受電し、圧力センサ及び温度センサの駆動電力、および無線データ転送用のとして、電圧 3.3 V、100 mW の受電を実現した。2. 体内におけるバイタルデータを外部へワイヤレスで送信する技術の確立: 2.4 GHz 帯無線通信規格である Bluetooth 回路(送信出力 30 mW)により人体外部のデータ転送を行った。3. センサ及び給電・通信用アンテナを一体化設計する技術の確立: 上記で実現した、電源、センサ、及び給電・通信用アンテナを一体化設計した。また、得られたセンサプラットホームを用いて動物実験により実証実験を行った。

【結果】トリの体内に留置した LED が体外からのサンドイッチング送電方式による出力に比例して、発光することを確認した。

# 直列共振回路を用いてトリの体内に留置した LED の発光出力増強



# 171 クローン造血制御を介した新規白血病予防法の創成

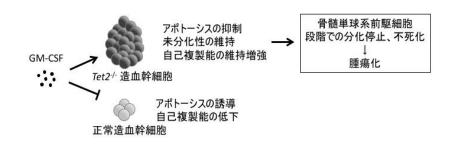
國本 博義

【目的】2009 年に AML を始めとする広範な血液腫瘍において機能喪失型の TET2 変異が初めて同定され、その後 高齢者に多く白血病へ進展しやすいクローン造血においても高率に TET2 変異が同定された。これまでの我々の研究 から、TET2 の機能喪失は造血幹細胞または前駆細胞を増殖させて前白血病状態であるクローン造血を直接的に引き 起こすことが明らかとなったが、その詳細な分子メカニズムは依然として不明である。最近の研究により、Tet2 欠失 骨髄マクロファージは炎症性サイトカインである  $IL\cdot1$   $\beta$  を産生して炎症を惹起することが明らかとなった。そこで、まずは Tet2 欠失造血幹細胞の幹細胞機能に対する  $IL\cdot1$   $\beta$  シグナルの影響を解析し正常造血幹細胞の挙動との違いを 明らかにすることを目的に研究を行った。また血球系列特異的 Tet2 欠失マウスもヒトと同様に単球系細胞の増加を 伴う慢性骨髄単球性白血病様の病態を呈することから、TET2 の機能喪失は骨髄単球系列へ分化を誘導すると考えられる。そこで顆粒球コロニー刺激因子(Granulocyte colony stimulating factor:GCSF)、マクロファージコロニー刺激因子 (Granulocyte macrophage colony stimulating factor:GCSF) などの骨髄単球系サイトカインに対する Tet2 欠失 細胞の挙動を明らかにすることを目的に研究を行った。

【方法】IL-1 $\beta$ を含む炎症性サイトカインあるいは骨髄単球系サイトカインの Tet2 欠失造血幹細胞機能に与える影響を明らかにするため、まず炎症性サイトカイン(IL-1 $\beta$ 、IL-6、IFN $\gamma$ )あるいは骨髄単球系サイトカイン(G-CSF、M-CSF、GM-CSF)存在下で野生型または Tet2 欠失骨髄細胞をメチルセルロース軟寒天培地で継代培養し、各継代で形成されたコロニー数及び継代培養可能回数を比較した。骨髄単球系サイトカインのうちGM-CSF については、GM-CSF 刺激による Tet2 欠失造血幹細胞の骨髄単球系列への分化、アポトーシス、細胞周期に与える影響を明らかにするため、GM-CSF 存在下で培養後の野生型または Tet2 欠失骨髄細胞を用いて、フローサイトメトリーによる細胞表面形質解析、Annexin V DAPI 染色によるアポトーシス解析、および Ki67 DAPI 染色による細胞周期解析を行った。さらに、野生型または Tet2 欠失骨髄球系前駆細胞の細胞表面における GM-CSF 受容体  $\alpha$  鎖の発現を比較するため、抗 GM-CSFR  $\alpha$  抗体を用いてフローサイトメトリー解析を行った。

【結果】賦形剤または IL-1 $\beta$ を 25 ng/mL の濃度で添加してメチルセルロース軟寒天培地上で造血幹細胞を含む野生型または Tet2欠失マウス骨髄細胞を連続継代培養したところ、賦形剤添加群に比べて IL-1 $\beta$ 添加群で Tet2欠失細胞の継代培養能の増強はみられなかった。一方、GM-CSF(10 ng/mL)を添加した場合では、サイトカイン非存在下に比べて野生型細胞はコロニー形成能が減弱するのに対し、Tet2欠失細胞はコロニー形成能・継代培養能が継代培養を重ねるごとに増強することが確認された。GM-CSF 存在下で野生型または Tet2欠失骨髄細胞を培養すると、野生型では賦形剤添加群に比べて GM-CSF 添加群で CD11b 陽性単球細胞数の増加を認めたのに対して、Tet2欠失細胞では GM-CSF を添加しても CD11b 陽性単球の増加はみられなかった。また野生型では賦形剤添加群に比べて GM-CSF 添加群で GM-CSF 添加群で GM-CSF 添加群で GM-CSF を添加しても GM-CSF を添加したのに対して、GM-CSF 添加群で GM-CSF を添加しても GM-CSF を添加したのに対して、GM-CSF を添加しても GM-CSF を添加してもこれらの細胞の増加はみられなかった。

GM-CSF を介した Tet2変異陽性クローン造血・白血病の発症モデル



# 172 DNA複製ストレスを利用したがん合成致死誘導治療法確立

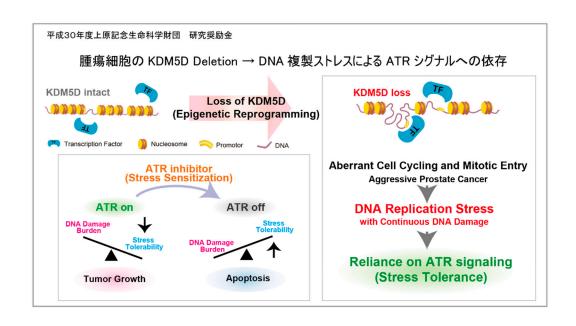
小村 和正

【目的】がんは、正常細胞が様々な細胞ストレスにより起こる遺伝子変異を蓄積することにより発生する。それらの一部は Driver Mutation として働き、腫瘍細胞へと変化していくが、核内で起こっているこの変異を修復できずに核酸が正常からかけ離れた状態となっていく状態をゲノム不安定性 Genomic Instability と呼んでいる。我々は現在までにエピジェネティックファクターである KDM5D の機能異常により、細胞のトランスクリプトーム変遷がおこり、DNAの複製に負荷がかかることから(複製ストレス)、この修復機構が完全に働かず、がん細胞のゲノム不安定性を引き起こし、より悪性度の高い腫瘍へと変化していくことを報告している(Komura et al. PNAS 2016)。本研究では、この分子生物学的な特徴の解明と、臨床への応用の可能性を明らかにすることを目的とした。

【方法】男性特異的臓器である前立腺がんでの、Y 染色体上にコードされるヒストン脱メチル化酵素である KDM5D は、病期進行に伴い mRNA レベルでの発現が低下、また KDM5D 低発現レベル群では明らかに予後が不良であることから、実臨床の前立腺がん FFPE 検体を用いて、Fluorescent in Situ Hybridization (FISH) による KDM5D locus の deletion を検出できる実験系を樹立した。また KDM5D deletion による DNA 複製ストレス発生に寄与する因子の解析のための in vitro、in vivo 実験系を構築した。

【結果】前立腺がん全摘標本で施行した FISH 検体のうち、11%(8/75)において *KDM5D* 欠失が確認され、さらにそのうちのほとんど全例(7/8)で優位グリソンスコアが 5 の悪性度の高い腫瘍であった。このことから、*KDM5D* 欠失は、前立腺がんの極めて悪性度が高いサブタイプのジェネティックな特徴の一つである可能性が考えられた。 *KDM5D* 欠失細胞では、細胞内で発生している複製ストレスによる DNA ダメージ修復時間の猶予を担保するために ATR シグナルへの依存がおこっており、genomic instability を伴いながら生存増殖していることを明らかにした。このことから、ATR 阻害薬により、DNA 複製ストレスへの耐性を打ち消すことで腫瘍合成致死を誘導できる可能性を考え、*in vivo* にてその効果を検討したところ、*KDM5D* の欠失している細胞に特異的な腫瘍増殖の抑制効果が認められていた。本研究成果は、*KDM5D* 欠失の検出が、ATR 阻害薬の治療効果予測のバイオマーカーである可能性を示したものであり、これをもとに Precision Medicine への応用を目指し、ゲノム医療で加療選択され得る治療オプションの一つとなる可能性をもつ研究成果であると考えている。

腫瘍細胞の KDM5D Deletion → DNA 複製ストレスによる ATR シグナルへの依存



# 173 骨、関節破壊を引き起こす炎症の慢性化機構の解明

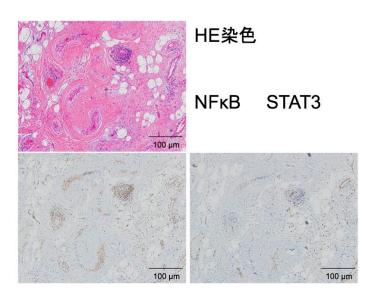
清水 智弘

【目的】関節リウマチのような全身性の免疫異常炎症が慢性化することや局所の感染が制御できず炎症が慢性化することに対する病態の理解や治療法はある程度確立されてきている。一方で、炎症が慢性化および重症化することによって、軟骨の変性進行や広範囲に関節破壊が引き起こされることがあるが、病態のメカニズムが不明であるため予防法及び治療法がないために人工関節などの侵襲の大きい手術療法以外治療選択肢がないというのが現状である。大腿骨頭軟骨下脆弱性骨折(SIF)は、特発性大腿骨頭壊死症と鑑別な必要な骨脆弱性を背景とした骨折の一つである。軟骨下骨の骨折後、関節軟骨の変性の進行する症例と急速破壊型股関節症(RDC)に移行する症例が存在するが、予後不良因子や関節内の分子生物学的な要因は明らかではない。本研究では、SIFに焦点をあて、予後不良因子の解明とRDCに移行した症例の滑膜の免疫染色を行い、骨、関節破壊を引き起こす炎症の慢性化機構の解明をすることを目的とした。

【方法】 2010 年から 2018 年において、MRI で大腿骨頭に band pattern を呈した 238名 353 股のうち、SIF と診断した 41名 44 股を対象として、臨床情報、骨密度、骨代謝マーカー、縦断的な X 線学的な関節裂隙の狭小化、MRI における Band 長、信号変化の部位を調査した。関節裂隙の継時的な変化と MRI 画像評価、骨代謝マーカーの関連、人工股関節(THA)をエンドポイントとして、予後不良因子を探索した。RDC に移行した症例で著しく、機能障害を来した症例には人工股関節全置換術(THA)を行った症例に対して、滑膜をホルマリン固定後、パラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色(HE 染色)と nuclear factor-kappa B(NF- $\kappa$  B)及び signal transducer and activator of transcription 3(STAT-3)の免疫染色を行った。

【結果】最終経過観察時の関節裂隙幅は初診時と比較して有意に減少していた(P<0.001)。年齢、性別、骨粗鬆症治療の有無、初期の関節裂隙幅を調整した多変量解析を行ったところ、関節裂隙の狭小化と関連した因子として、MRIの band 長と骨代謝マーカーが有意な因子であった。骨密度は関節裂隙の狭小化とは関連しなかった。SIF診断後に関節の変性変化を来す症例がある一方で、急速破壊型股関節症に移行する症例が存在した。滑膜を組織学的に検討すると、リンパ球の浸潤などの炎症所見を呈しており、NF-kBとSTAT-3が同部位に発現していた。それゆえ、骨折後に関節リウマチ等同様の病態である炎症の増幅回路が誘導されている可能性が示唆された。

# RDC 滑膜の組織所見



### 癌細胞特異的RNA干渉によるLysosome酵素制御法の開発 174

白井 祥睦

【目的】膵臓癌の特徴は乏血性の腫瘤であり血管新生に乏しいことである。癌細胞はその増殖を維持するために、 アミノ酸、糖質、脂肪酸などをより多く必要とするが、膵臓癌では低酸素、低栄養環境においても生育できるよう細胞 内の自食機構であるオートファジーが亢進することで供給されている。近年オートファジーの阻害が癌細胞の発育を 抑制し、癌細胞のオートファジーを標的とした治療法の検討がなされているが、オートファジー全体を阻害することは 正常細胞へ及ぼす影響が大きく、臨床応用へは新たな観点が必要である。そこで本研究では膵臓癌で亢進した オートファジーの役割と分解の中心を担うライソソームの機能に着目し、癌細胞特異的にライソソーム酵素遺伝子に RNA 干渉を行う方法の開発を行う。

【方法】ヒト膵臓癌細胞株に対し、siRNA 法を用いて GAA 遺伝子をノックダウンし、ウエスタンブロッティングにて アポトーシスシグナルが誘導されることを評価した。癌細胞特異的なウイルスベクターの開発のため、shRNA を 搭載したアデノウイルスベクターを作製し in vivo においても同様に抗腫瘍効果を誘導できることを確認した。 EF1 αプロモーター下流に shGAA を搭載した第一世代アデノウイルスベクターを作製し GAA タンパク発現抑制効果 の評価を行った。

【結果】GAA遺伝子発現抑制により、アポトーシスシグナルが誘導されることが確認された。さらに、siRNA の併用 により塩酸ゲムシタビンによって誘導されたアポトーシスシグナルタンパク発現が増強していることを確認した。 マウス異種同所性皮下担癌モデルを作製し、AdU6shGAA ベクターを腫瘍に局注することで、腫瘍の発育抑制効果を 認めた。また、第一世代ベクターを作製しGAAタンパク発現抑制効果を確認した。

# Lysosome Lysosome 酵素 抗癌剤ストレス オートファゴソーム形成 恒常性維持 常高分子を分解・再利用 抗癌剤耐性 異常な生体高分子 細胞質 増加した酵素の Lysosome不全を誘導

抗癌剤ストレスに対する抵抗性を減弱

選択的阻害

Lysosome 酵素制御による抗癌剤耐性改善の治療戦略

# 175 早期肺癌治療へのliquid biopsyの応用

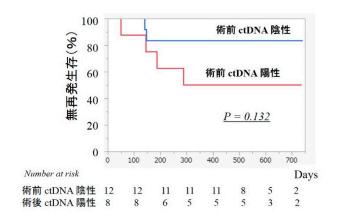
須田 健一

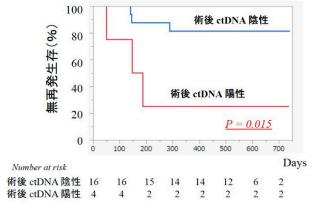
【目的】がん患者の血漿中には腫瘍由来の可溶性 DNA(ctDNA)が含まれており、ctDNA を用いた分子診断(liquid biopsy)は、比較的低侵襲ながん遺伝子検査法として注目されている。進行・再発肺がんでは、ctDNA を用いた liquid biopsy は、治療効果の予測(バイオマーカー)や治療効果の早期判定、薬剤耐性出現の予測などに有用であることが数多く報告されている。一方、外科切除の対象となるような早期肺がんにおいては、ctDNA の総量が比較的少ないことより、ctDNA の検出感度が飛躍的に向上した近年、ようやく解析が可能となった。今回我々は、外科切除を予定している早期肺がん患者において、術前・術後に liquid biopsy を用いて ctDNA を検出することで、術後再発リスクの高い患者を同定することが可能であると仮定して本研究をおこなった。

【方法】当科にて根治的切除をおこなった臨床病期  $IIA \sim IIIA$  期肺がん患者計 20 名について、検討をおこなった。 切除検体(がん部)、術前血漿サンプル(術前 2 日前~手術当日)、および術後血漿サンプル(手術後 3~12 日目)を採取・保存した。 切除検体(がん部)の遺伝子異常は Ion AmpliSeqIM Comprehensive Cancer Panel(CCP パネル)を用いて解析し、血漿サンプルの遺伝子異常は Ion Cancer personalized profiling by deep sequencing(CAPP-Seq)法を用いて解析した。

【結果】術前の liquid biopsy では 8 名(40%)に ctDNA が検出され、術後(3~12 日)の liquid biopsy では 4 名(20%)に ctDNA が検出された。術後の ctDNA 陽性患者 4 名のうち 3 名は術前の ctDNA も陽性であったが、残りの 1 名は術後に ctDNA が陽性化した。切除検体(がん部)で検出された遺伝子異常の多くが、liquid biopsy でも検出された。術前の ctDNA 陽性は腫瘍径(5.0 cm 以上)と関連しており(p=0.018)、術後の ctDNA 陽性は組織学的分化度(grade 3)と関連していた(p=0.032)。術後に ctDNA が検出された患者では無再発生存期間が有意に短く(下図右、p=0.015)、術前の ctDNA 陽性(下図左、p=0.132)や術後の CEA 高値(p=0.533)よりも有用な術後再発予測因子であると考えられた。

# 術前または術後 ctDNA 陽性と無再発生存の関連





# 176 膵癌タイプ分類を可能とするTEPの臨床応用

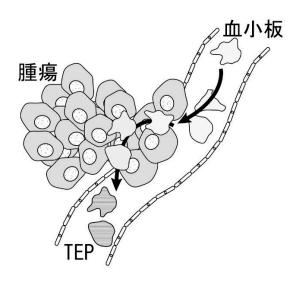
園原 史訓

【目的】膵癌は早期発見が困難で局所進行した状態や遠隔転移を伴う状態で診断されることが多い。さらに外科的根治術単独での長期治療成績は満足できるものではなく、術後の再発・転移も高率である。したがって、膵癌の治療成績向上には、化学療法・放射線療法・手術治療等を組み合わせた集学的治療が不可欠である。当教室ではこれまでに上皮間葉転換(EMT)が膵癌の浸潤・転移メカニズムにおいて重要な鍵となることを報告してきた。また、過去の豊富な臨床経験から、膵癌は「局所進展タイプ」と「遠隔転移タイプ」に二分されると考え、各々のタイプに応じた治療が求められることから、EMTを膵癌のタイプ別分類に利用することを着想した。膵癌は手術以外の組織採取が必ずしも容易ではなく、体液を用いたより侵襲の少ない検査が切望されている。近年、癌細胞との相互作用を有し、EMTにも関連するとされる血小板(tumoreducated platelets: TEP)が脚光を浴びており、本研究ではTEPに含まれる核酸分子の網羅的解析を行い、膵癌のタイプ別分類に有用なTEP関連バイオマーカーを開発し、難治性膵癌に対する個別化集学的治療に貢献することを目的としている。

【方法】膵疾患に対して手術を中心とした集学的治療の予定となった患者から術前採血検体を収集し、血小板を採取した。1. 遠心処理を行い、全血から血小板以外の血球を除去し、血小板ペレットとして保存可能な状態で処理した。2. テストサンプルにより、血小板に含まれる mRNA の網羅的解析を mRNA-seq により行った。

【結果】血小板中のRNA を網羅的に解析するため、high-throughput RNA sequencing を行った。まず、集学的治療を受ける予定である膵癌患者から採取した血液検体より、遠心処理で血小板ペレットを抽出し、そこから total RNA を抽出した。まずテストサンプルとして 4 例の血小板由来 total RNA を用い、Agilent 2100 バイオアナライザを用いた quality check を行った。quality check の結果を基に、Nugen kit によるライブラリ調製を行い、quality check を行った 4 例のテストサンプルに対して DNBseq を用いた網羅的 mRNA-seq を行った。得られたシーケンス情報はフィルタリング処理され、アダプター配列、コンタミネーションおよび低品質の配列情報は除外された。データフィルタリングの後のシーケンス配列統計学的情報から、血小板から充分な mRNA-seq 情報 (6G リード数以上) が得られることが確認され、さらに症例を拡張し、膵癌 14 例、IPMN 5 例、NET 3 例、胆管癌 3 例、SPN1 例および、疾患のない healthy volunteer 4 例の合計 30 例について上記同様の手法で血小板中 mRNA-seq 解析を実施した。

Tumor-educated platelets: TEP の概念図



# 177 Preconditioned ASCエクソソームの機能解明

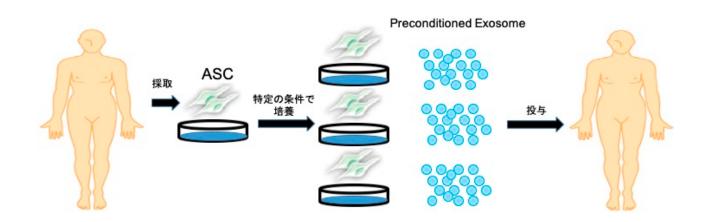
田代 絢亮

【目的】脂肪由来間葉系幹細胞(ASC)が、細胞治療による再生医療の供給源として注目を集めているが、その作用の一端を担うものとしてエクソソームが注目されている。エクソソームとは直径 40~200 nm ほどの細胞が放出する細胞外小胞体であり、細胞が持つ働きの媒介を担うことが知られている。このような間葉系幹細胞のエクソソームが治療効果を持つことが近年分かってきており、多くの研究が行われている。安全性の点では、ASC は体外で長期培養した際に染色体異常などのゲノム異常が生じうる可能性があるが、ASC エクソソームは、cell-free であり、その心配は少ない。さらに、細胞を移植することに比べエクソソームのみを単離して使用することで、治療効果の調節が簡単になり、移植した細胞の壊死や予期せぬ細胞への分化の懸念を除けるといった利点がある。ASC を様々な条件下で培養する(Preconditioned ASC)ことで、ASC が分泌するエクソソーム(Preconditioned ASC Exosome)の性質が変わってくることが明らかになってきた。例えば、低酸素下で培養した ASC の分泌するエクソソームが血管新生を亢進させることが分かってきている。今回、我々は、ASC をいくつかの低分子化合物下で培養し、その性質変化を見るとともに、特定の化合物下で精製されたエクソソームの持つ性質を調べた。

【方法】ASC の培養にあたり、4 種の低分子化合物(W、X、Y、Z)を混合して、培養を行った。それぞれの低分子化合物の有無から、 $2\times2\times2\times2=16$  通りの培養を行い、ASC の培養に与える影響を形態の変化、老化度、増殖率から解析を行った。その中から増殖率を低下させる低分子化合物を除外し、残った低分子化合物で培養された ASC の持つ機能を調べるため、それらからエクソソームを精製した。精製されたエクソソームのリンパ管内皮細胞に対する機能解析のため、Proliferation assay を行った。最もリンパ管新生作用を持つエクソソーム中に含まれる miRNA を解析するため、miRNA PCR array を行った。

【結果】ASC の形態変化、老化度、および増殖率から、W、X、WX、XY、WXY の 6 つに絞り、解析を行った。各々の条件下で精製されたエクソソームをリンパ管内皮細胞に添加し、解析を行った。Proliferation assay にて最もリンパ管新生の亢進を見せたのは、低分子化合物 X から精製されたエクソソームであった。そこでこの X から精製されたエクソソームと通常の ASC エクソソームを miRNA PCR array にて解析したところ、X から精製されたエクソソームには miR-AAA、miR-BBB、miR-CCC、miR-DDD、miR-EEE が多く含まれていることが分かり、また文献的考察より、これらの miRNA がリンパ管新生を誘導する因子と考えられた。

ASCエクソソームを用いた治療法の概要



# 178 大腸癌におけるDOCK1の発現と臨床学的意義の検討

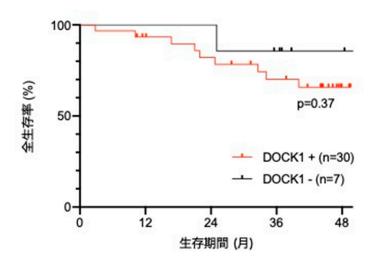
田尻 裕匡

【目的】がん遺伝子RASはヒトのがんで最も多く変異が見つかっており、大腸癌をはじめとする多くのがんでRASに変異が認められている。Rasは、細胞外のシグナルを細胞内に伝える分子スイッチとして働く。正常なRasは、細胞外の刺激を受けた場合にのみ活性型となり、増殖や分化、生存、細胞運動といった細胞活動を支える。一方で、変異によってがん化したRasは、常にスイッチが入ったままの状態になるため、増殖や生存、細胞運動が異常に亢進して、がん化をもたらすことが知られている。変異型Rasは、栄養源となる細胞外タンパク質の取り込みを促進し、細胞増殖に必要なグルタミンの供給源としている。この細胞外からのタンパク質を取り込む現象は、マクロピノサイトーシスと呼ばれ、Racの作用によることが知られている。このRac活性化はDOCK1に制御されており、最近の研究で変異Rasの下流でDOCK1が、がん細胞の生存、浸潤に重要な役割を果たしていることが報告されている。本研究では臨床検体を用いて大腸癌におけるDOCK1の発現を確認し、さらに臨床学的意義を明らかにすることが目的である。

【方法】2016 年 1 月 1 日から 2016 年 12 月 31 日までに別府医療センターで大腸癌の治療を受けた 61 名の患者を対象とし、免疫染色を行った。DOCK1 の発現の有無を調べ、臨床学的因子について検討を行った。

【結果】標本が使用可能であった 37 例の検討を行った。37 例のうち、30 例 (81.1%) で DOCK 1 の発現が認められた。DOCK 1 発現群 30 例 (81.1%) と非発現群 7 例 (18.9%) の 2 群に分類して以下の検討を行った。背景因子として、年齢、性別、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、全生存率は DOCK 1 発現群で低い傾向 (P=0.37) であった。DOCK 1 が大腸癌における新たなバイオマーカーや、新たな治療標的因子となり得る可能性が示唆された。

# 大腸癌における DOCK1 発現と予後の関連



# 179 関節リウマチ病態におけるSemaphorin3Gの役割の解明

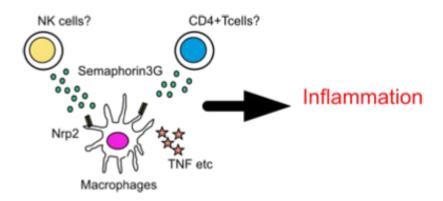
田中繁

【目的】関節リウマチ(RA)は破壊性の慢性関節炎である。近年、生物学的製剤の登場によりその関節予後は改善したが、依然として寛解に至らない例がある。本研究は新規治療ターゲットを探索する目的で、メトトレキサート治療前後の RA 患者から CD4 陽性 T 細胞を採取し、その遺伝子発現の変化を検討したところ、Semaphorin3G の発現が有意に変動した。そこで RA 病態における Semaphorin3G の役割を解明することを目的とした。

【方法】1. 関節炎病態における Semaphorin3G 産生細胞と応答細胞を同定するため、コラーゲン誘導性関節炎モデルを用いて解析した。2. 関節炎病態における Semaphorin3G の役割を解明するため、Semaphorin3G 欠損マウスを用いてコラーゲン誘導性関節炎を解析した。3. マクロファージにおける Semaphorin3G -Nrp2 シグナルで誘導される遺伝子を解析した。

【結果】 1. コラーゲン誘導性関節炎を惹起したマウスの関節において Semaphorin3G は CD2 陽性 CD11b 陽性の 小型の細胞により産生されていた。また、Semaphorin3G の受容体である Nrp2 は主に F4/80 陽性のマクロファージ に発現していた。2. Semaphorin3G 欠損マウスはコラーゲン誘導性関節炎に抵抗性であった。3. Bone marrow derived macrophage を IFN  $\gamma$  で刺激すると Nrp2 の発現が強く誘導された。LPS で刺激した Bone marrow derived macrophage にリコンビナント Semaphorin3G を添加したところ、TNF  $\alpha$  の産生が亢進した。

Semaphorin3G はマクロファージを活性化し、関節炎病態を悪化させる



# 180 RNAプロファイリングによる認知症の発症機序解明

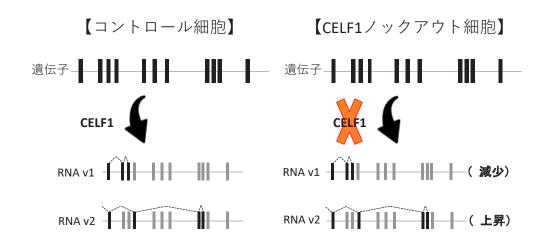
永田 健一

【目的】アルツハイマー病は高齢期発症の認知症の過半数を占める神経変性疾患であり、患者数の増加が深刻な問題となっている。疾患発症機序に関する理解は未だ限定的であり、根本原因を取り除くような治療薬は存在しない。 ごく一部の遺伝性の患者では、原因遺伝子上の遺伝子変異が発症の引き金になる。また、孤発性患者においても、 Genome-wide association study (GWAS) や次世代シークエンサーを用いて疾患発症の遺伝的素因について網羅的に探索することが可能になっており、これまでに孤発性アルツハイマー病の発症に関わる数十のリスク因子が同定されている。 ただし、多くのリスク因子で機能的側面の知見は十分に集まっておらず、なぜアルツハイマー病発症のリスクとなるのかは不明瞭なままである。本研究ではアルツハイマー病の発症機序について新たな知見を得ることを目的とし、 リスク因子である RNA 結合タンパク CELF1 についてゲノム編集技術や革新的なシークエンス技術を駆使して機能解析を行った。

【方法】まず、ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 を用いて *CELF1* ノックアウト細胞を樹立した。次に、未編集のコントロール細胞、ノックアウト細胞のそれぞれから RNA を抽出し、次世代シークエンサーを用いて RNA-seq を行った。網羅的探索の結果や過去の知見を踏まえて CELF1 の標的候補を絞り、さらに第三世代シークエンサーを用いて各転写産物の全長を定量的に評価した。

【結果】CELF1 の翻訳開始地点の周辺を狙って、CRISPR/Cas9 の発現プラスミドを細胞に導入した。ゲノム編集の 効率を確認し、編集効率が高く、タンパク質の読み枠がずれる標的配列のみを以降の解析に使用した。プラスミド 導入後、96 well プレートに 1 細胞ずつ入るように播き直し、細胞の増殖を待って DNA の編集結果をシークエンスで 評価した。また、CELF1 抗体を使った western blotting で CELF タンパクが出ていないことを確認した。 RNA-seq による解析で転写産物のスプライシングの異常を網羅的に探索し、HeLa 細胞および HEK 細胞のどちらの 細胞株でも変化している遺伝子を CELF1 の標的候補とした。標的候補のリストの中で、KLC1 遺伝子については アルツハイマー病との関連が指摘されていたため、さらに第三世代シークエンサーを用いた全長の定量的解析を行った。 CELF1 ノックアウト細胞では KLC1 転写産物が質的・量的に変化していることが明らかとなった。

アルツハイマー病のリスク因子 CELF1 の機能解析



# 181 小児潰瘍性大腸炎診療における尿中PGE-MUMの有用性

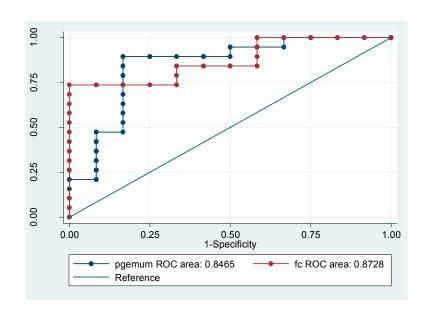
萩原 真一郎

【目的】潰瘍性大腸炎(以下 UC)の最終治療目標は、内視鏡的に炎症所見が認められない状態、いわゆる「粘膜治癒」を達成することである。粘膜治癒を確認するには大腸内視鏡による大腸粘膜の観察が必要であるが、小児患者にとっては大腸内視鏡は負担である。内視鏡にとって替わるバイオマーカーとして、便中カルプロテクチン(便 Cal)が UC の粘膜病勢を反映することが明らかとなったが、便 Cal の測定には採便が必要である。思春期前後の患児は、採便に対して心理的に抵抗感をもつことがあり、タイミングよく排便ができないことも多いため臨床現場では便 Cal の検査をすることができないことがある。以前我々は、尿で測定可能な尿中プロスタグランジン E 主要代謝産物(以下 PGE-MUM)が小児潰瘍性大腸炎の大腸粘膜炎症を反映することを報告した。本研究の目的は、小児 UC における PGE-MUM が、便 Cal と比較して大腸粘膜の状態を鋭敏に反映しているかどうかを多施設共同研究によって明らかにすることである。

【方法】本研究参加施設(19 施設)で、UC と既に診断がついている 6 歳から 16 歳以下の患者のうち、日常診療において担当医が大腸内視鏡が必要と判断された患者のエントリーを行った。同意が得られた後、内視鏡検査の 4 週間前に尿検体(午前中に採取された尿)・便検体を採取した。尿検体より PGE-MUM(化学発光酵素免疫測定法)を、便検体から便 Cal (酵素免疫測定法) を測定し、小児 UC 患者の内視鏡活動性 (Mayo) を、PGE-MUM と便 Cal が反映しているかどうか比較検討を行った。

【結果】8 施設から 34 例が登録された。患者背景は、平均年齢 12.7 歳、男児 10 例、女児 24 例、病型は全結腸型が 28 例、広範囲型が 2 例、左側結腸型が 3 例、直腸炎型が 1 例であった。臨床的寛解 (PUCAI<10) は、14 例、軽症 (PUCAI $\geq$ 10、<35) は 6 例、中等症以上 (PUCAI $\geq$ 35) が 14 例であった。PGE-MUM 値と便 Cal 値は 有意に正の相関を示した ( $\rho$ =0.60、 $\rho$ <0.001)。PUCAI<10 (臨床的寛解)と PUCAI $\geq$ 10 (軽症以上)で分けた時、PGE-MUM 値と便 Cal 値はそれぞれ、有意差をもって PUCAI $\geq$ 10 の群で高かった。Mayo $\leq$ 1 (粘膜治癒群)と Mayo $\geq$ 2 (粘膜炎症群)で分けた時、PGE-MUM 値と便 Cal 値はそれぞれ、有意差をもって Mayo $\geq$ 2 の群で高かった。粘膜炎症群における PGE-MUM と便 Cal の Area Under Curve (AUC) は、それぞれ 0.84、0.87 で、診断能に統計学的有意差は認めなかった (P=0.76)。PGE-MUM のカットオフ値を 23.1  $\mu$  g/g・Cr とすると、粘膜炎症群の診断能は、感度 90%、特異度 83%であった。





# 182 RNA編集酵素ADARによる腫瘍の遺伝子不安定性惹起機序

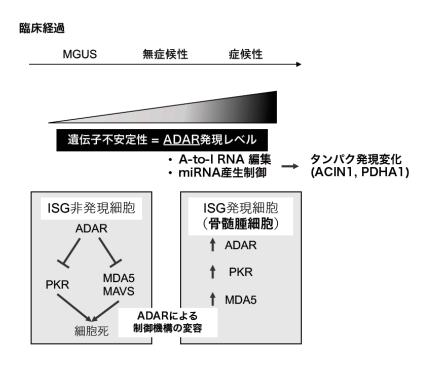
原田 武志

【目的】多発性骨髄腫(multiple myeloma: MM)は、骨髄内で前癌状態の意義不明の単クローン性免疫グロブリン血症(monoclonal gammopathy of undetermined significance: MGUS)から無症候性、症候性骨髄腫、次いで形質細胞白血病へと遺伝子発現異常を積み重ね治療抵抗性を獲得しつつ進展する難治性造血器悪性腫瘍である。 MM において、遺伝子発現の不安定性は MM 細胞が持つ細胞遺伝学的因子や腫瘍微小環境、抗がん薬による外的ストレスなどにより惹起されると考えられるが、その遺伝子不安定性が惹起される分子機序は未だ不明である。 MM はその進展や治療抵抗性の獲得とともに、1 番染色体の増幅(1q gain)が高頻度に出現する。 RNA 編集酵素 adenosine deaminases acting on RNA(ADAR)は染色体 1q21.3 座に存在し、遺伝子発現を大きく変化させる原因因子と考えられる。 MM の進展機序および遺伝子不安定性を惹起する分子機序を解明するために、本研究では、MM における ADAR の治療標的としての意義を明らかにすることを目的とした。

【方法】ヒト MM 細胞株、MM 患者検体および健常人由来の末梢血単核細胞を用いて、免疫組織化学およびウエスタンブロット法により ADAR のタンパク発現解析を行った。MM 細胞株 RPMI 8226 や JJN3 において、shRNA による ADAR 遺伝子発現抑制を行い、アポトーシスの誘導や ADAR 関連経路の変化をフローサイトメトリーおよびウエスタンブロット法で解析した。また、ADAR 発現抑制 JJN3 を使用して、LC-MS/MS 解析により ADAR が制御するタンパクの同定を試みた。

【結果】ヒト MM 細胞では、ADAR が高発現しており、ADAR の発現抑制は MM 細胞にアポトーシスを誘導させ、治療標的因子になり得ることが明らかとなった。抗 MM 薬の中でも、細胞傷害活性の高い HDAC 阻害薬やプロテアソーム阻害薬は、ADAR の発現抑制を来すとともに、DNA 損傷マーカー  $\gamma$ -H2A.X の増加と逆相関するように MDA5 や PKR の発現低下を認めた。また、MM 細胞において ADAR の発現抑制は、アポトーシス制御に関わる ACIN1 やメタボリズムに関わる PDHA1 などの発現変化をきたし、ADAR が制御する候補分子として抽出できた。

#### ADAR-miRNA/mRNA-タンパク発現制御機構による MM の進展

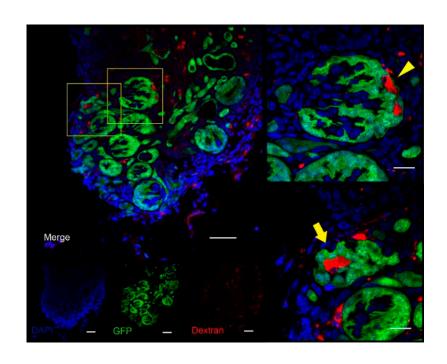


山中 修一郎

【目的】我々は新たな腎代替療法の開発のため、自己の細胞から生体内で機能し得る腎臓の再生を研究している。 腎臓の幹細胞を異種胎仔の腎臓発生領域に移植し、腎臓発生に必須である複雑かつ精密な発生プログラムをそのまま 借り受けることで、新たに腎を構築させるという戦略である。薬剤誘導性にネフロン前駆細胞のみが除去可能な遺伝子 改変マウスを作製し、ネフロン前駆細胞の除去と同時に外来性のネフロン前駆細胞を移植することで、遺伝子改変 マウスの腎発生領域内部で前駆細胞の置換をおこさせ、移植細胞由来のネフロンを再生する現象を 2017 年に報告した (前駆細胞置換法)。しかし報告時には異種間での *in vivo* 腎再生までは示せておらず、再生ネフロンが生体内で生理的 機能を持つかは不明であった。そこで本研究ではラットの体内でマウスの腎臓を足場にラットのネフロン再生を試み、ラットーマウスの異種間における *in vivo* での生理機能を持った腎臓再生の検討を行った。

【方法】Six2-GFP-Cre マウス(Six2 マウス)及び C57BL/6-Gt(ROSA)26Sor[tm1(HBEGF)Awai]/J マウス(iDTR マウス)を交配させ、その胎仔(Six2-iDTR マウス)の胎生期腎臓の皮下膜下に抽出したラットの腎前駆細胞と自殺誘導因子となるジフテリアトキシンを混合し移植した。細胞移植された"膀胱付き腎臓(再生用腎芽)"をホストの成獣ラット大動脈近傍へ移植した。ホストの成獣ラットへ移植時に免疫抑制を使用した(タクロリムス 2 mg/kg 皮下注とメチルプレドニゾロン 5 mg/kg 腹腔内注、移植前日から評価日まで連日投与)。移植後 2 週間で、一般染色、免疫染色、電子顕微鏡観察で腎の形態学的評価を行った。再生腎からの産生尿を蛍光デキストラン投与による膀胱内残存を観察することで評価を行った。

【結果】免疫抑制剤使用下の成獣ラットから回収した移植 3 週間後の再生用腎芽を解析したところ、ラット前駆細胞 由来の GFP を発現する糸球体構造を認め、Nephrin を発現する上皮細胞の内側に CD31 陽性の血管内皮細胞が裏打ちされていた。電子顕微鏡観察では糸球体係蹄内に赤血球を認め、糸球体に血流があることが示唆された。また、蛍光標識デキストランをホスト成獣ラットに尾静脈投与したところ、再生糸球体のボウマン腔内と Megalin を発現する近医尿管管腔に蛍光標識デキストランを認めた。ホストの血流を濾過し尿細管腔まで原尿が通過していることが示された。ラットの Native 腎前駆細胞から、前駆細胞置換法を用いたラットーマウス異種間における濾過能を持った in vivo での腎臓再生を示した。



再生ネフロンの濾過能評価

## 184 糖尿病性腎症における糸球体上皮細胞FERMT2の役割

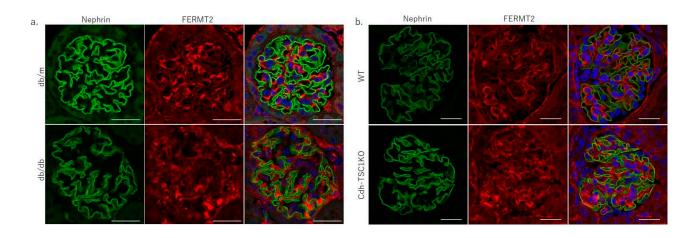
山原 真子

【目的】糖尿病性腎症(腎症)は、蛋白尿を呈し、末期腎不全へと至る進行性の病態で、その患者数は増加しており、腎症発症機構の解明ならびに新規治療標的薬の開発は喫緊の課題である。蛋白尿の主な原因は糸球体上皮細胞の障害である。糸球体上皮細胞は分裂能を有さない高度に分化した細胞であり、一度障害され脱落すると再生できない。糸球体上皮細胞は、糸球体ろ過バリアを形成しているが、糸球体上皮細胞の障害や脱落によりこの機構が破綻すると蛋白尿の出現に繋がる。これまで、糸球体上皮細胞に対する障害機構の検討が行われてきたが、糸球体上皮細胞の基底膜からの脱落機構についての検討は少ない。我々は、マウス糸球体上皮細胞に多く発現する細胞接着因子 FERMT2 (Fermitin family homolog 2) を同定した。FERMT2 は細胞接着斑に存在する蛋白で、FERMT2 の欠損により糸球体上皮細胞の細胞骨格異常をきたし易脱落性を示すこと、ゼブラフィッシュモデルにおいて FERMT2 欠損が糸球体濾過機構の破綻を惹起することを明らかにした。しかしながら、糖尿病の病態における FERMT2 の役割は不明である。そこで、腎症における糸球体上皮細胞の基底膜からの脱落に FERMT2 の変化が関与しているとの仮説をたて、糖尿病状態における糸球体での FERMT2 の発現および局在異常、機能異常について検証を行うこととした。

【方法】糖尿病モデルマウスおよび糸球体上皮細胞・血管内皮細胞障害モデルマウスを用いて、糸球体における FERMT2 の発現量および発現局在について検討した。さらに、培養糸球体上皮細胞を用いて、糖尿病疑似刺激を行い FERMT2 の発現量や発現局在の評価を行った。また糖尿病モデルマウスより単離した糸球体上皮細胞を用いて、同様に FERMT2 の発現や局在、接着斑機能についての検討を行った。

【結果】ストレプトゾトシン誘発 1 型糖尿病モデルの糸球体においては、FERMT2 の発現増加の傾向を認めた。 2 型糖尿病モデルマウスである db/db マウスおよび高脂肪食負荷 2 型糖尿病モデルマウスの糸球体では、糸球体におけるネフリンの発現低下とともに基底膜に沿って存在する FERMT2 の細胞内局在異常を認めた。近年、栄養感知シグナル mTORC1 の腎臓での過剰亢進が腎症の発症・進展に関与していると言われており、この関与についての検討を行った。その結果、糸球体上皮細胞特異的 mTORC1 過剰亢進マウスおよび血管内皮細胞特異的 mTORC1 過剰亢進マウスにおいても FERMT2 の細胞内局在異常を認めた。このことは、糖尿病状態での過剰な mTORC1 シグナルが、接着斑蛋白の機能にも影響を及ぼす可能性、そして糸球体血管内皮細胞の障害が糸球体上皮細胞の FERMT2 同在異常を介して、基底膜への接着機能障害を惹起しうる可能性を示唆している。細胞実験においては FERMT2 の局在異常や機能異常を惹起する因子を特定するには至らなかったが、腎症の発症・進展に FERMT2 の局在異常や機能異常が関与する可能性が示唆された。

#### 糖尿病モデルマウスおよび血管内皮障害モデルマウスの糸球体における FERMT2 の発現局在



# 185 転写制御による上皮一間葉相互作用誘導法の開発と応用

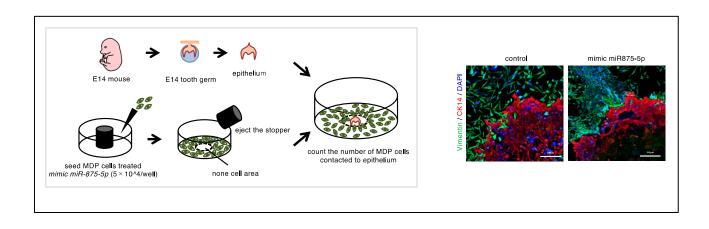
吉崎 恵悟

【目的】上皮-間葉相互作用は、肺、腎臓、毛、唾液腺および歯といった様々な器官の発生に重要であり、これらの器官は上皮の肥厚および間葉細胞の凝集という共通のイベントを経て、様々なシグナル経路により発生制御が行われている。本研究では、上皮ー間葉相互作用を通じて形成される器官のうち、歯に特異的な遺伝子について網羅的にスクリーニングを行い、上皮ー間葉相互作用に重要な遺伝子の機能解明することを目的として研究を開始した。

【方法】歯に特異的に発現する遺伝子をスクリーニングするため、CAGE (Cap Analysis of Gene Expression) 解析を行った。さらに、*in situ* hy bridization 法を用いて、スクリーニングした遺伝子の歯における発現パターンを確認した。 同遺伝子を制御している転写因子を同定するため、データベースを用いたスクリーニングを行い、同転写因子が結合する部位を Luciferase assay を用いて確認した。また、上皮ー間葉相互作用に与える影響を確認するため、下図に示す細胞凝集実験を行った。

【結果】トランスクリプトーム解析を用いて網羅的遺伝子解析を行い、歯に特異的と考えられる microRNA 875 (miR875) を同定した。miR875 の転写開始点に結合しうる転写因子をデータベース上にて予測し、ホメオボックス 転写因子である Prrx1/2 が結合している可能性を発見した。さらに、miR875 は歯の発生初期において間葉細胞に強く 発現していた。そこで、上皮一間葉相互作用に与える影響を確認するため、歯の間葉細胞株に miR875 を遺伝子導入し、マウス胎仔歯胚より摘出した歯の上皮細胞を共培養することで、間葉細胞の動態を確認したところ、miR875 遺伝子導入群において、間葉細胞の上皮細胞への細胞凝集を認めた(図)。以上の結果から、歯の発生初期に特異的に 発現する miRT875 が、上皮一間葉相互作用において、重要な役割を果たしている可能性が考えられ、将来の歯の再生技術に応用できる可能性が示唆された。

#### 上皮ー間葉相互作用における細胞凝集能の検討



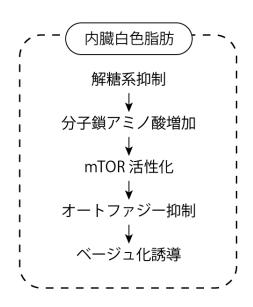
吉田 陽子

【目的】肥満や糖尿病により健康寿命の短縮や全死亡率が上昇するため、これらの病態を解明することは極めて重要である。褐色脂肪組織は全身の代謝を制御する可能性を秘めた臓器である。肥満や加齢に伴い褐色脂肪が機能不全に陥るが、機能不全に陥った褐色脂肪ではミトコンドリア不全が生じ、細胞代謝がミトコンドリア呼吸から解糖系にシフトしていると考えられる。ベージュ細胞は白色脂肪組織から誘導される細胞であるが、ミトコンドリアに富み高いエネルギー消費能をもつことから、肥満や糖尿病などの代謝性疾患においてベージュ細胞を効果的に誘導することで、これらの疾患に対する新たな治療法となる可能性を大いに秘めた細胞である。我々の予備的検討により、解糖系を抑制すると内臓脂肪において白色脂肪のベージュ化が誘導されることがわかった。そこで本研究では、1. 解糖系の制御により内臓脂肪組織でベージュ細胞が誘導される機序を解明すること、2. 細胞自律的なベージュ化の分子機序を明らかにし、糖尿病や心不全などの代謝リモデリングが生じる病態において、ベージュ細胞の誘導による新規治療法を確立すること、を目的とした。

【方法】解糖系酵素のひとつである Phosphoglycerate mutase 1 (Pgam1) を Cre-LoxP システムを用いて脂肪組織 特異的あるいは褐色脂肪特異的に欠損したマウスを作製し熱産生能やエネルギー消費能、耐糖能などの表現系を解析した。それらのマウスの主要代謝臓器を用いてオミクス解析を行い、脂肪組織での解糖系阻害が内臓脂肪組織のベージュ化を誘導する分子機序を検証した。

【結果】脂肪組織特異的解糖系阻害マウスでは褐色脂肪の白色化と機能不全が生じ、全身のエネルギー消費量が低下した。本マウスでは褐色脂肪が機能不全に陥る一方で、白色内臓脂肪組織が著しく褐色化(ベージュ化)し、全身の熱産生能が維持された。本マウスの主要代謝臓器を用いて、マイクロアレイ解析およびメタボローム解析を行ったところ、ノックアウトマウスの白色内臓脂肪において分枝鎖アミノ酸が増加しており、さらにオートファジーが抑制されていることがわかった。さらに、ノックアウトマウスの内臓脂肪では mTOR 活性化が生じており、これによってオートファジーが抑制され、白色内臓脂肪のベージュ化が誘導されていると考えられた。本研究により脂肪組織における代謝リモデリングの新たな側面が明らかになるとともに、代謝性疾患に対する新たな治療アプローチにつながるものと考えられた。

本研究の概要



新井 康之

【目的】白血病やリンパ腫などの難治性造血器腫瘍に対して、同種造血幹細胞移植は根治治療となる。移植後には様々な合併症を伴うが、中でも、腸管急性移植片対宿主病(GVHD)は、ドナー免疫細胞が、患者腸管粘膜細胞を攻撃する病態で、予後不良因子として知られる。その病因として、一般的な炎症性腸疾患と同様に、「腸管細菌叢の変化(dysbiosis)」が関連している可能性がある。同種移植に際しては、前処置に用いる化学療法や抗生剤によって、短期間のうちに腸管細菌叢の様態が劇的に変化し、dysbiosis が起こることが予想されるが、包括的な研究はされていない。

そこで、我々は、移植後患者の糞便に対して、次世代シーケンスを用いた腸内細菌叢の同定を行うとともに、マススペクトグラムを用いた代謝産物の解析を行う。得られた結果は、前処置や抗生剤使用、腸管 GVHD との関連を解明する。それにより、特徴的な dysbiosis や代謝産物パターンを、腸管 GVHD の早期予測マーカーとして確立し、予後改善のために最適化された同種移植レジメンを提案することが、本研究の目的である。

【方法】1. 造血器腫瘍に対する骨髄移植後の腸内細菌叢の採取と同定、2. AI を用いた機械学習による腸内細菌叢の分類と、移植後臨床データベースとの融合と解析、3. マウス実験モデルでの同様の検討と生菌製剤を用いた予防実験、およびそれを踏まえたヒト臨床試験の準備、に分けて、ステップ毎に研究を行った。

【結果】我々は2018年度後半から検体採取を開始した。検体に関しては、これまでに約10患者(合計70検体)の解析を行っている。次世代シーケンスを用いた細菌叢同定を行い、属名まで同定できることを確認した(下図)。また、脂質メタボロームに関しても同様に同定できることが分かった。結果からは、移植前処置によって、腸内細菌叢Dysbiosisや脂質メタボロームの乱れが起こっていることが、実際に確認できた。これをもとに、計画通り研究を進め、2年後を目処に新たな創薬に繋げたい。

# Unclassified:Other k Archaea;p Euryarchaeota k Bacteria;Other I k Bacteria;p Actinobacteria k Bacteria;p Bacteroidetes k Bacteria;p Cyanobacteria k Bacteria;p Deferribacteres k Bacteria;p Firmicutes k Bacteria;p\_Fusobacteria k Bacteria; p Proteobacteria k Bacteria;p Synergistetes k Bacteria;p TM7 k Bacteria;p Tenericutes k Bacteria;p Verrucomicrobia k Bacteria;p WPS-2 k Bacteria;p [Thermi]

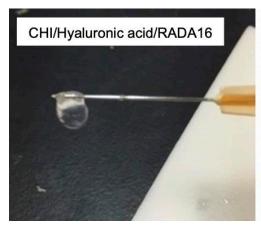
同定された腸管細菌叢の分類

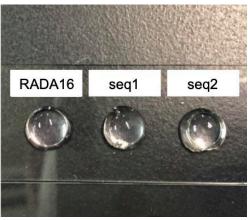
【目的】再生医療の実現のためには幹細胞を高効率かつ特異的に特定の組織に分化誘導する技術が不可欠であり、細胞足場材料による分化制御法が注目を集めている。細胞足場材料が幹細胞の分化特性に影響を与える主な因子として、1. 弾性率、2. 細胞周囲微小環境、3. 担持生理活性分子、が挙げられる。しかし弾性率と細胞周囲環境は相関しており、単一成分からなるゲルではそれぞれを最適化することは困難であった。本研究では、弾性率と細胞周辺環境をそれぞれ制御可能な相互侵入高分子網目ゲルシステムを用い、種々のゲルを作製して間葉系幹細胞の分化に与える影響を明らかにすることで、分化を制御可能な足場材料の開発を目的とした。具体的には、1. 弾性率を調節可能で生分解性を有するグリコサミノグリカン/キトサンを力学ネットワークとしたゲルの作製、2. 多様な自己会合性ペプチドからなるゲルを作製と間葉系幹細胞の分化に与える影響の解明、を行った。

【方法】コンドロイチン硫酸 C およびヒアルロン酸の過ヨウ素酸酸化によりグリコサミノグリカンジアルデヒドを 得た。自己会合性ペプチドとしてはすでに自己会合性を示すことが報告されている seq1 ペプチドおよび seq2 ペプチドを用いた。ゲルは、キトサン溶液へ NHS 化ポリエチレングリコールまたはグリコサミノグリカンジアルデヒド溶液、自己会合性ペプチド溶液を順に加え、混合することで作製した。ゲル内でヒト骨髄由来間葉系 幹細胞の骨分化および軟骨分化を誘導し、各種マーカー遺伝子の発現より分化特性を評価した。

【結果】グリコサミノグリカンジアルデヒド、キトサン、RADA16 ペプチドより透明のハイドロゲルが形成され、力学強度をもたらす化学架橋ネットワークとしてキトサン/グリコサミノグリカンネットワークも利用可能であることが示された。過ヨウ素酸量により酸化率が制御可能であることも確認し、弾性率を制御可能なゲルの構築に道筋と立てた。一方、seq1 ペプチドおよび seq2 ペプチドを用いた場合も RADA16 と同様のゲル化挙動がみられた。次に、自己会合性ペプチドがヒト骨髄由来間葉系幹細胞の分化挙動に与える影響を調べた。軟骨分化において、seq2を用いたゲルでは RADA16 を用いたゲルと比較して関節軟骨を構成する硝子軟骨のマーカー遺伝子 *COL2A1* の発現が30 倍ほど高く、軟骨再生において有用なゲルとなる可能性が示唆された。以上より、相互侵入高分子網目ゲルを構成する自己会合性ペプチドの種類により間葉系幹細胞の軟骨分化挙動が大きく変化することが明らかになった。間葉系幹細胞の分化を制御可能な本ゲルシステムを利用することで、MSC を用いた各種組織への分化誘導技術の確立が期待される。

本研究において作製したゲルの巨視像





# 189 遺伝子発現を非侵襲可視化する人工生物発光技術の開発

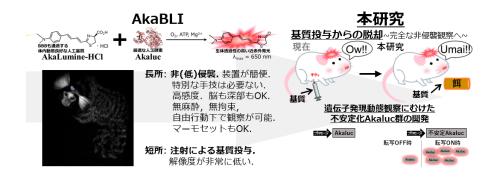
岩野 智

【目的】発光生物の発光メカニズムに基づく、生物発光反応を利用したイメージング技術は生命科学分野でよく利用される。生物発光反応は、発光基質ルシフェリンが酵素ルシフェラーゼの触媒作用によって進行し、発光を生成する。これを利用する in vivo 生物発光イメージングは動物個体の非侵襲的な観察が可能である。我々は 2018 年に in vivo 生物発光イメージングの検出感度を飛躍的に向上させる技術 AkaBLI を開発した。AkaBLI は生体透過性の高い近赤外光を発する人工基質 AkaLumine とそれに最適化した人工酵素 Akaluc から構成される。AkaBLI システムと神経活動依存的に駆動するプロモーターでfos を組み合わせ、Akaluc を発光レポーターとして利用することで、マウス海馬のわずか数十個の神経細胞が環境変化に応じて活性化した記録を同一個体で追跡することにも成功した。AkaBLI は深部組織の極小数細胞の遺伝子発現を非侵襲に定量可視化できる唯一無二の発光レポーターシステムであるが、いくつかの課題が明らかとなってきた。本研究では AkaLumine の優れた体内動態を活かし、AkaLumine 含有餌の経口投与による基質投与に伴う侵襲性からの脱却と、プロモーター活性を正確に反映する不安定化 Akaluc の開発を目的とした。

【方法】AkaLumine 含有餌の作製と不安定化 Akaluc の開発を行った。AkaLumine 含有餌の作製にあたっては、室温においても長期間安定である AkaLumine 誘導体を利用した。マウス用の飼料 CRF-1 粉末に AkaLumine 誘導体の粉末を混合し、固形化した。Akaluc を脳線条体に発現するマウスに作製した AkaLumine 誘導体含有餌を与え、その発光強度から、含有餌の性能評価を行った。並行して、不安定化の開発を行った。Akaluc の細胞内半減期は <8 時間であることがわかっている。鋭敏に遺伝子発現の様子を捉えるため、Akaluc に対し種々の分解シグナルを付与し、細胞内半減期を短くした不安定化 Akaluc を作製した。作製した不安定化 Akaluc の性能評価のため、培養細胞レベルでの細胞内半減期を調べた。次に、この不安定化 Akaluc を神経活動依存的プロモーター下流に導入し、マウスの大脳皮質の一次視覚野へ発現、光刺激に応答し不安定化 Akaluc を発現するマウスを作製し、不安定化 Akaluc の性能評価を動物個体で行った。

【結果】AkaLumine 誘導体含有餌の自由摂取によりマウス脳深部からの発光シグナルを確認することが出来た。発光基質粉末が経口投与によって脳深部へと到達することは驚くべき点ではあるが、しかし、発光シグナルのばらつきは大きく、AkaLumine 誘導体含有餌による持続的な安定な発光シグナルを実現には至らなかった。更に高濃度でAkaLumine 誘導体を混合した餌も試みたが、マウスが摂取しなかった。この結果を受け、餌の成形方法や、甘味料を混ぜるなど、餌の作製方法、及び、経口投与を志向した AkaLumine 誘導体の検討を進めている。不安定化 Akaluc の開発は、Akaluc と PEST 配列の融合により行った。 Akaluc-PEST は細胞内半減期が < 1 時間となった。 Akaluc-PEST を導入したマウスを利用した実験で、プロモーター活性に伴って、発光強度が増強する様子を観察することが出来た。一方で、PEST 配列付与による発光強度の減弱(Akaluc の分解)は遅く、刺激後 48 時間経ても発光強度は保たれていた。この結果を受け、PEST 配列よりも更に分解力の高いとされる不安定化配列を融合した不安定化 Akaluc (細胞内半減期 < 3 分)を作製し、動物個体での実証実験を進めているところである。

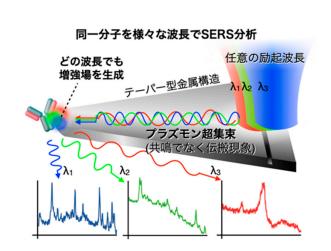
AkaBLIによる非侵襲な遺伝子発現動態の可視化



【目的】生体分子の化学結合状態を 1 分子レベルで分析・理解することは、生命科学において基礎的かつ重要なトピックである。1分子化学結合分析には、金属ナノ構造上での局在プラズモン共鳴現象で生成する増強電場が有効である (SERS 分析法)。分子 1 つからでも分子結合に由来するラマン散乱光を検出できるため、生命科学のみならず様々な分野で用いられてきた。しかしながら、文字通り特定波長でのみ起こる現象であるため、動作波長が限られるという課題を抱えていた。様々な波長で同一分子を 1 分子 SERS 分析できれば、化学結合を網羅的に検出することができるようになる。本研究では、共鳴フリーなプラズモン超集束という現象を用いることによって、革新的な波長の自由度を持つ新規 1 分子 SERS 分析法を創出することを目的とした。プラズモン超集束は、テーパー型金属構造上を伝播するプラズモンによって先端に増強電場を生成する現象である。プラズモンの共鳴ではなく伝播に立脚した共鳴フリーな現象であるため、極めて広帯域に動作すると考えた。本技術を用いれば、生体分子を 1 分子レベルで波長スクリーニングして網羅的に化学結合分析できるため、分子内の結合状態を極めて詳細に解明できるようになる。

【方法】まずは、電磁場シミュレーションを用いて、共鳴フリーSERS 分析法に最適なテーパー型金属構造を模索した。 金属の種類やテーパー構造の角度、膜厚など網羅的に計算した。また、実際に電子ビームリソグラフィでテーパー構造を作製し、実験的にも所望の特性が得られていることを確認した。テーパー構造の最適化の後、高波長自由度 SERS 分析装置の開発に取り組んだ。442 nm~785 nm にわたる様々な波長を同時入射、同時検出できる系を構築した。 テーパー構造先端からのみのラマン散乱光を検出するため、共焦点系も導入した。また、開発途中で、構造的なドリフトによって、安定的に計測が行えない事案も見出したため、高安定化ステージなどを導入し、装置の安定化も図った。ある程度装置が完成した後、実際に色素分子を用いて高波長自由度 SERS 分析装置の特性を評価した。様々な波長で同一分子を計測するだけでなく、その計測感度や速度、安定性なども評価した。

【結果】電磁場シミュレーションより、532 nm、633 nm、785 nm などの比較的長波長な可視光では、テーパー構造の材料として銀を用いた方が良いことを見出した。一方で、442 nm など短波長も同時に用いる場合はアルミニウムが適していた。実験的にも、同様の結果を得ることができた。次に、上記に示した通り、442 nm、488 nm、532 nm、633 nm、785 nm の波長を同時に照射できる高波長自由度 SERS 分析装置の構築に成功した。有機分子4-aminothiophenolを試料として、実際に同一分子を多波長で SERS 分析することに成功した。また、波長に応じて異なるラマンスペクトルが得られており、より詳細な分析が可能であることを示すこともできた。計測感度や速度など、まだまだ改善の余地はあるが、高波長自由度 SERS 分析技術を実現することができた。



共鳴フリーなプラズモン超集束と高波長自由度 SERS 分析法

岡本 和紘

【目的】低分子医薬において環構造は生物活性を決定づける重要な部位であるが、頻出する環構造 100 種類のうち実に 61 種類は窒素原子を含む複素環である。よって分子の環構造に窒素原子を効率的かつ自在に導入する新手法の開発は重要な課題である。含窒素複素環の中でも四員環のβラクタムはその環歪みに由来する顕著な抗生物活性を特徴として、古くから抗生物質として盛んに利用されてきた。近年医療現場において脅威が増大している薬剤耐性菌への対応を考えると、新規活性物質の合成探索は健康増進や疾病予防の観点から見て、今もなお喫緊の課題であると言える。既存の合成法に依拠した探索だけでは、比較的合成法が限られた環歪みを有する新規候補分子を効率的に合成することは難しいため、これらの化合物群を効率的に合成する新手法の開発が特に望まれる。本研究代表者は全く新しい有機窒素前駆体として五員環イソオキサゾール誘導体が適用可能であることを見出し、種々の遷移金属触媒系と組み合わせることにより様々な含窒素複小員環骨格の選択的な合成法を達成してきた。環構造を有する含窒素活性種前駆体を用いた研究は代表者らの研究を契機として盛んに行われるようになり、現在ではこれを含むオキシム誘導体の N-O 結合活性化を経る触媒的分子変換は複素環合成における一大潮流となっている。そこで本研究では化学生物学分野において必須技術となりつつある生体イメージングへの展開を視野に、遷移金属触媒を用いる生物活性候補分子となりうる含窒素小員環の構築手法の開発に焦点を当てて研究を行った。

【方法および結果】本研究では以上の経緯を踏まえ、遷移金属触媒を用いる多様な複素環の選択的合成手法を発展させることにより、含窒素環状骨格、とりわけ高い抗生物活性を有する含窒素小員環の効率的な不斉合成法の開発を目標として研究に取り組んだ。本触媒系では効率的な不斉転写により原料に含まれる不斉炭素の立体情報はほぼ完璧に生成物へと転写された。この知見を生かし、キラルなホスフィン配位子を用いる触媒的非対称化法によりアジリジン及びアザニ環式シクロプロパンを高いエナンチオ選択性で得ることに成功した。本研究成果により新しい置換様式を含む様々な含窒素小員環の不斉合成法を確立したので、これをもとに現在、共同研究者とのさらなる連携により、生物活性分子に対する NMR あるいは蛍光プローブの導入による生体イメージングへの展開を計画している。

# 新規含窒素前駆体を用いた含窒素小員環分子の触媒的不斉合成

#### 近赤外光駆動型ナノマシンによる転移がんの診断と治療 192

上村 真生

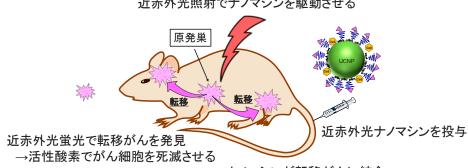
【目的】がん細胞の転移は、がんの症状悪化の大きな原因であり、迅速かつ精確な発見と治療が可能な技術の開発が 求められている。そこで本研究は、生体透過性が極めて高い波長 1,000 nm を超える近赤外蛍光を発すると同時に、 がん組織を破壊する機能を併せ持つ「近赤外光駆動型ナノマシン」を新規に作製し、体内深部の転移がんの発見と治療 を実現する革新的技術を創出することを目的とした。

【方法】希土類含有セラミックスナノ粒子の代表的な合成方法である熱分解法を用いて、オレイン酸(OA)が ナノ粒子表面に配位した希土類含有 NaYF4 (OA-NaYF4) ナノ粒子を合成した。このナノ粒子の表面に、リガンド 置換によって生体適合性高分子であるポリエチレングリコール (PEG) の片末端にポリアクリル酸 (PAAc) の ブロック構造を有するポリマー (PEG-b - PAAc) と光増感剤 (Ce6) を修飾することで PEG/Ce6 修飾 NaYF4 ナノ粒子を作製した。つぎにこの PEG/Ce6-NaYF4 NPs を、マウス大腸がん由来 C-26 細胞上に播種し、細胞内に ナノ粒子を導入した (NPs-C26 細胞)。細胞内への粒子導入は、NPs-C26 細胞を近赤外蛍光顕微鏡により観察する ことで評価した。さらに、がん細胞にナノ粒子を播種し、NIR 照射を行うことで、がん光治療の効果の評価を行った。 【結果】PEG/Ce6-NaYF4 NPs を導入した C-26 細胞を NIR 蛍光顕微鏡により観察したところ、強い NIR 蛍光を 観察できたことから、PEG/Ce6-NaYF4 NPs を C-26 細胞に導入できていることが示唆された。また細胞毒性試験の 結果より、ナノ粒子の添加によって、細胞生存率が変化することはなく、ナノ粒子自体は細胞にダメージを与える ことがない安定な複合体を形成していることが明らかになった。さらに、細胞の生死評価を Live/Dead 染色により 行った結果、ナノ粒子を添加していない細胞とナノ粒子を添加した細胞のいずれも、C-26 細胞はほとんど死滅する ことなく生存していることが明らかになった。この結果からも、本研究で作製したナノ粒子は、細胞の増殖や生存に ほとんど影響を与えない安全性を有していることが明らかになった。さらに、PEG/Ce6-NaYF4 NPs をがん細胞に 播種し、NIR 光を照射した結果、がん細胞の増殖を抑制できることも明らかになった。これらの結果から、本研究で 作製したナノ粒子は、転移がんの診断と治療のための「近赤外光駆動型ナノマシン」として、次世代のがん医療への 応用が期待される。

# 本研究の概要

# 1000nmを超える近赤外光による 転移がんの<u>追跡</u>と<u>治療</u>

近赤外光照射でナノマシンを駆動させる



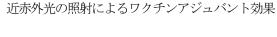
ナノマシンが転移がんに結合

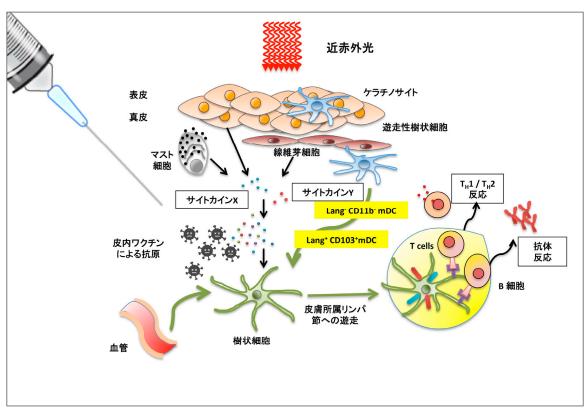
樹状細胞の遊走促進作用が重要な役割を持つことが明らかになった。

君塚 善文

【目的】現在のワクチン製剤は安全性の追求からその抗原が選択的になる一方で、免疫原性が低下し有効性が減少している。そこで免疫反応を惹起するために金属や生体化合物由来の免疫賦活化剤(アジュバント)が添加されるが、アジュバント自体に種々の副作用が知られ、より安全で効果的な技術が求められている。これまで、我々は安全な条件の近赤外光の皮膚への照射がその直後に接種されたワクチンの効果を増強することを明らかにしてきた。そこで本研究では、光受容細胞に注目し、生体が近赤外光を免疫反応につなげていく分子機構を明らかにすることを目的とする。

【方法】光源として連続波 1,064 nm の近赤外光を用いた。マウス皮膚を構成する細胞の培養系に近赤外光を照射し、活性酸素検出薬を用いて細胞内活性酸素種 (ROS) 産生を定量化した。近赤外光照射後のマウス表皮を採取し自然免疫に関与する諸遺伝子の変化を定量的に評価した。除毛後の皮膚に FITC 溶液を塗布し皮内の細胞を標識した後に近赤外光を照射し、皮膚所属リンパ節を採取し、照射が樹状細胞の遊走へどのように影響を与えるかをフローサイトメトリにて評価した。インフルエンザワクチンマウスモデルにて抗インフルエンザ特異抗体の定量を ELISA で行った。【結果】マスト細胞の培養系では近赤外光照射によって ROS 産生の増加が観察された。N・アセチルシステインの前投与やマスト細胞欠損マウスを用いることで近赤外光によるインフルエンザワクチンモデルのアジュバント効果は減弱し、マスト細胞欠損マウスの皮膚にマスト細胞を再構成することでアジュバント効果も復元されたことから、マスト細胞が近赤外光の受容体細胞として重要な働きをしていることが分かった。光照射後の皮内では CCL20 や CCL2 など樹状細胞の活性化、遊走促進に関与する遺伝子の増加が認められ、皮膚所属リンパ節への遊走が促進されていることも明らかになった。以上のことから、近赤外光によるアジュバント効果には皮膚マスト細胞から始まる





# 194 核酸医薬の肺選択的送達技術と肺線維症の治療法の開発

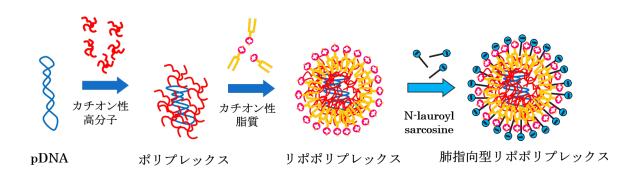
黒崎 友亮

【目的】肺線維症は予後不良の疾患であり、有効性が明らかに証明された治療法が少ない。近年開発が進む核酸医薬は既存の薬剤とは大きく異なった機序で効果を示す化合物であり、肺線維症についても高い有用性が期待されている。 一方で、核酸医薬を単独で生体内へ投与しても細胞内へ取り込まれず、酵素分解や腎排泄によって速やかに生体内から消失し、十分な効果が得られない。本研究では、肺線維症治療への応用を目的として肺に効率的に核酸医薬を送達することができる肺指向型リポポリプレックスの開発を行った。

【方法】肺指向型リポポリプレックスは pDNA にカチオン性高分子とカチオン性脂質、アニオン性脂質である N-lauroylsarcosine(LS)を添加することで調製した。カチオン性高分子には polyethylenimine(PEI)や poly-L-lysine(PLL)、poly-L-arginine(PLA)、dendrigraft-poly-L-lysine(DGL)を、カチオン性脂質には 1,2-dioleyloxy-3-trimethylammonium propane (DOTMA)、1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP)、  $3\beta$ -[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbamoyl] cholesterol(DC-Chol)を用いた。調製した肺指向型リポポリプレックスの粒子径や表面電荷を測定し、ヒト肺癌細胞株である A549 細胞を用いて細胞内取り込みメカニズムを評価した。また、実験動物に肺指向型リポポリプレックスを静脈内投与し、肺における遺伝子導入効果を測定した。

【結果】調製された肺指向型リポポリプレックスは、粒子径が約 180~200 nm のカチオン性の微粒子であった。 培養細胞における肺指向型リポポリプレックスの取り込みメカニズムを評価したところ、肺指向型リポポリプレックス が細胞内へエンドサイトーシスによって取り込まれていることが示唆された。次に、肺指向型リポポリプレックスの 構成成分のうち、カチオン性高分子とカチオン性脂質の最適化を行った。その結果、pDNA と DGL、DOTMA、LS を 用いた肺指向型リポポリプレックスが最適であると判断した。

#### 肺指向型リポポリプレックスの調製



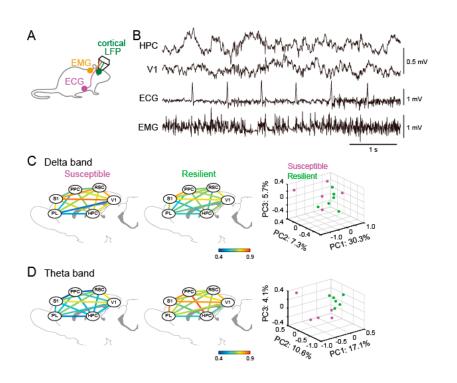
佐々木 拓哉

【目的】動物は強いストレスを受けると、脳や末梢臓器の機能不調が生じる。本研究では、分子や細胞レベルの知見と、個体レベルの知見を繋ぐような各臓器の生理学変化に着目した。また、ストレス応答においては、個体に同じようなストレスが与えられても、強い反応を示す個体(ストレス感受性群)と、ほとんど反応を示さない個体(ストレス耐性群)に分類される。こうしたストレス応答の個体差は、脳の情報処理(情動反応やストレス記憶など)の個体差に起因すると考えられる。本研究では、ラットを用いて、社会的敗北ストレス負荷によって全身の臓器に生じる生理学的な変化を定量し、その個体差を多数の脳波パターンから説明できるか調べた。近年、ビックデータ解析の必要性が高まる中、複数の要素を含む同時記録データに対して、機械学習や多変量解析を適用した前例がほとんどないストレス研究である。

【方法】ラットにおいて、大脳新皮質の6つの脳領域(PL(前頭前皮質)、S1(第一次体性感覚皮質)、HPC(海馬)、PPC (頭頂皮質)、RSC(脳梁膨大後部皮質)、V1(第一次視覚皮質))に脳波測定用電極を刺入し、さらに、ECG(心電図)、EMG(筋電図)、呼吸リズムを同時に測定した。

【結果】ラットに社会的敗北ストレスを負荷するために、対象ラットと攻撃用ラットを同じテスト箱に入れ、10 分間の社会的敗北ストレスを与えた。ストレス負荷後にストレス負荷前よりも不整脈の発生頻度が上昇した7匹のラットをストレス感受性群、変化しなかった12匹のラットをストレス耐性群と分類した。こうしたストレス誘発性の心拍動変化が、大脳皮質脳波と関連するか調べるために、ストレス負荷前の各脳領域の脳波パワー(デルタ帯(1~4 Hz)、シータ帯(6~10 Hz)、ガンマ帯(40~100 Hz))の相関を算出した。描いた相関マップについて、ストレス感受性群と抵抗性群の差を比較したところ、デルタ帯とシータ帯の脳波パワーにおいて有意な差が検出された。これらの結果は、ストレス負荷前に、デルタ帯の相関が低く、シータ帯の相関が強いラットほど、ストレスに対して抵抗性を示すことを証明している。さらに、同様のデータセットに主成分分析と、判別分析であるサポートベクターマシーンを連鎖的に適用し、二つの動物群が脳波パターンから分類可能であることを確認した。本研究は、ストレス経験に関連する脳情報処理と、末梢臓器反応の同調変化の関連の一端を明らかにした一例であり、今後、多くの精神疾患研究において、同様の研究パラダイムを適用することが可能である。

ラット大脳皮質脳波の大規模データに基づいたストレス感受性の予測

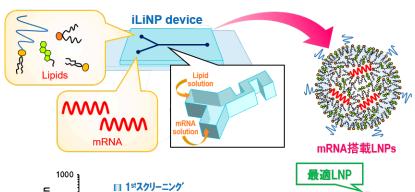


佐藤 悠介

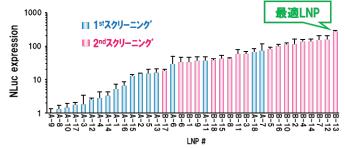
【目的】ゲノム編集技術は目的のゲノム領域の塩基配列を任意に改変可能な手法である。第 3 世代のゲノム編集技術である CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeat) -Cas (CRISPR-associated) システムは高効率なゲノム編集を誘導しかつ簡便なデザインが可能であり、医療への応用が非常に期待されている。CRISPR-Casシステムは Cas タンパク質と guide RNA (gRNA) から成り、これらの因子を効率的に標的細胞へ送達可能な技術の開発が医療応用において重要である。これらの因子を RNA として送達する手法は DNA と比較してゲノムへの挿入リスクおよび off-target 効果の低減が期待される。本研究では脂質ナノ粒子(lipid nanoparticles: LNP)による肝臓への mRNA 送達によるゲノム編集を目指し、製剤設計の最適化を目的とした。

【方法】LNPの構成因子として独自のpH 感受性カチオン性脂質(CL)、中性リン脂質(PL)、コレステロール(chol)、PEG 化脂質(PEG) および nanoluciferase (Nluc) をコードした mRNA を用い、脂質の種類・含量および mRNA/lipid 比に関して実験計画法を 2 段階行うことで最適化を試みた。LNP は 2 液の急速混合を実現するマイクロ流体デバイス(iLiNP)を用いて合成し、LNPの粒子径、多分散度指数(PdI)、マウスに静脈内投与してから 24 時間後の肝臓および脾臓における遺伝子発現量(Nluc 発光量)を測定し、各測定結果を多元分散分析により解析した。得られた最適 LNP と実用化製剤(MC3-LNP)との遺伝子発現活性を Nluc 発現定量および CLSM により比較した。また、ヒトエリスロポエチン(hEPO)をコードした mRNAを搭載した最適 LNPをマウスに静脈内投与した際の hEPO 発現を ELISA 法により定量した。また、毒性の指標として血液学的パラメーター(ALT、AST、LDH、BUN、CRE)の測定を行った。

【結果】多元分散分析により、肝臓における遺伝子発現効率に重要な脂質の種類およびそれらの組成比率の最適値を同定した。また、肝臓における遺伝子発現効率および遺伝子発現の肝臓選択性に重要な因子として粒子径、PdIおよび PL/PEG 比を新たに同定した。これらの解析結果から最適 LNP を同定した。最適 LNP は主に肝実質細胞における遺伝子発現を誘導し、その発現量は MC3-LNP よりも約 2.5 倍高かった。最適 LNP は factor IX (FIX) 補充による血友病治療効果を示した競合技術よりも高い hEPO 発現量を誘導した。また、いずれの血液学的パラメーターの変動も認めず、最適 LNP の安全性が示された。



mRNA 搭載 LNP の製造と実験計画法による製剤最適化



#### 197 新眼科診療機器 スマートアイカメラの臨床実用化

清水 映輔

【目的】失明および視機能障害は、患者の視覚の質や日常生活動作だけでなく、大きな障害調整生命年や経済的 損失をもたらす。失明の原因の 51%は白内障であり、手術で治癒が可能な白内障は、医療機器不足と医師不足に より、2020年現在においても解決されない世界的問題である。この問題は国連が定義する「持続可能な開発 目標」の 3 番目にユニバーサル・ヘルス・カバレッジの内容と合致し、早急な課題解決が求められており、 全世界で 720 兆円の損失を生んでいると推定される。この問題を解決するために、我々は、眼科診療を場所は どこでも誰でも行うことを可能としたスマートフォンアタッチメント型医療機器 smart eye camera (SEC) を 開発した。本研究においては、SEC の白内障診断に対する有用性を既存の細隙灯顕微鏡と言う眼科診療機器と 比較し、SECが既存の細隙灯顕微鏡の代替となる可能性を検討した。

【方法】本研究は、前向きに2019年7月から9月の間に、64人128眼の白内障症例を対象に行われた。既存の 細隙灯顕微鏡と、SEC で試験者の水晶体を撮影し、白内障の WHO 分類を用いて、それぞれ眼科専門医が重症度 評価を行った。また、既存の細隙灯顕微鏡は評価者と別の眼科専門医が撮影を行い、SECは視能訓練士が撮影を 行った。白内障重症度分類の相関や、聞き手の評価結果の一致率などの解析が行われた。

【結果】眼科専門医によって診断された、白内障重症度は細隙灯顕微鏡および SEC との間に有意な高い正の 相関を認めた(r=0.871 [95%CI: 0.821 to 0.907、P<0.001] )。SEC による既存の細隙灯顕微鏡に対する 診断精度は有意に高いことが認められた(weighted κ=0.807 [95%CI:0.798 to 0.816、P<0.001])。 これらの結果により、SEC は既存の細隙灯顕微鏡と比較し、白内障の診断及び重症度評価において、高い診断 精度が認められ、場所を選ばず白内障診断が行えるとともに、今後遠隔診療や人工知能を用いた、新しい 白内障診断方法の開発につながる可能性が示唆された。なお、当該研究は、以下の通り報告した。

Yazu H, Shimizu E, Okuyama S, et al. Evaluation of Nuclear Cataract with Smartphone-Attachable Slit-Lamp Device. Diagnostics (Basel). 2020;10(8):E576. Published 2020 Aug 9. doi:10.3390/diagnostics10080576

SEC と既存機器の図



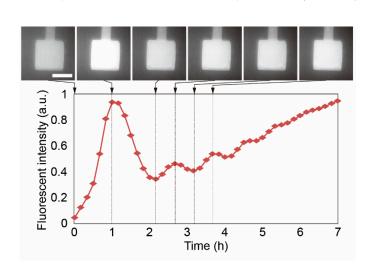




【目的】近年の再構成系での人工遺伝子回路関連の研究の進展によって、再構成系を用いて人工遺伝子回路により振動 現象を創り出すことが可能となりつつある。例えば、Niederholtmeyer らはマイクロ流体デバイスを用いることにより、無細胞タンパク質発現系を封入したマイクロチャンバに溶液交換機能を付加し、DNA 濃度を一定に保ちつつ、合成 されたタンパク質を一定の割合で拡散により除去するシステムを構築した。これにより人工遺伝子回路を用いてマイクロチャンバ内での遺伝子発現を振動させることに成功した。また、Karzbrun らは、マイクロ流体デバイス中のマイクロチャンバ内に DNA を固定する技術を開発し、さらに前出の研究と類似した溶液交換機能を付加することにより、DNA がマイクロチャンバ内にとどまり続け、合成されたタンパク質を一定の割合で拡散により除去するシステムを構築した。これにより前出の研究と同様にマイクロチャンバ内での遺伝子発現を振動させることに成功した。しかし、これらの振動系は、いずれも合成されたタンパク質を拡散によりマイクロチャンバ外部に排出することで成り立っており、実際に細胞内で起こっているタンパク質の分解によるタンパク質濃度の低減を反映していない。今後、振動する人工遺伝子回路を用いて細胞内での現象や人工細胞内の反応を制御するためには、実際に細胞内での現象を反映して「タンパク質の分解による振動回路の構築とその理解」が必要であると考えられる。そこで本研究では、タンパク質の分解機能を付加した再構成系を作製し、タンパク質分解による振動回路の構築を目的とする。

【方法】タンパク質分解酵素(ClpX)を発現した大腸菌から細胞抽出液を作製した。この細胞抽出液を用いて無細胞タンパク質合成・分解系を作製することにより、タンパク質の合成と分解を同時に可能な再構成系を構築した。また、大腸菌の細胞内で遺伝子発現が振動することが示されている人工遺伝子回路を参考に、再構成系で振動する人工遺伝子回路の設計と、それを実現するプラスミドの作製を行った。人工遺伝子回路を構成するプラスミドDNAをマイクロ流体デバイス中のマイクロチャンバ内に固定化し、マイクロチャンバ内に無細胞タンパク質合成・分解系を供給することにより、長時間に渡って再構成系を動作させ、その挙動を観察することが可能となった。

【結果】マイクロ流体デバイス中のマイクロチャンバ内に遺伝子発現が経時的に振動する人工遺伝子回路を構成するプラスミド DNA を固定化し、その遺伝子回路の挙動を蛍光顕微鏡により観察した。この人工遺伝子回路は、振動回路を構成する部分と、レポーター回路を構成する部分から成り、レポーター回路によって遺伝子回路の挙動を GFP 由来の蛍光強度から推測することができる。実際にマイクロチャンバ内の蛍光強度の経時変化を計測したところ、経時的な振動現象を示す結果となった。



振動する人工遺伝子回路を封入したマイクロチャンバ内の蛍光強度の経時変化

### 199 オルガノイドアレイ構築用の超並列細胞プリンタの開発

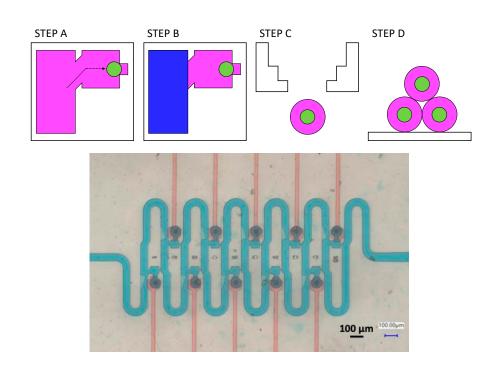
永井 萌土

【目的】健康長寿社会に向けて、慢性疾患の解明と治療が望まれる。ヒトによる疾患の解明と薬効試験は困難さがあるため、 $in\ vitro$  にて疾患を模擬した組織・臓器モデルが代替手段となる。例えば細胞スフェロイドにより腫瘍研究、抗がん剤探索がなされる。ただし生体外でのスフェロイドは、細胞種も限定的で単一細胞間の相互作用の再現が欠けていることから、 $in\ vivo$ での現象の再現性には懐疑的な見方がある。そこで本研究の最終目的は、直径約  $10\ \mu$  m の  $10^4$  の単一細胞を対象にして、超並列かつ $\mu$  m の精度で空間的に再配置し、オルガノイド( $in\ vitro$  での 3 次元臓器)アレイの構築につながる超並列細胞プリンタを開発することである。本研究では、細胞配置のスループットを異なる次元に増大させるために、単一ノズルの計測制御を取り除く。つまり流体力学的な自動配置をベースにし、ノズルアレイへの流体抵抗を低くして、単一細胞を配置する。加えて光硬化性樹脂での細胞の被覆、ノズルからの外部への吐出も実現する。

【方法】超並列細胞プリンタの主要素は、細胞吐出を行うノズルアレイである。特にエポキシ系フォトレジスト SU-8 とシリコーンゴムである PDMS を組み合わせ、単一細胞への光硬化性樹脂の被覆機能を統合したノズルアレイの作製を行った。ここでは空圧流路も組み込むことで、細胞の捕獲と吐出を切り替えられるバルブも設けた。この作製したノズルアレイを利用して、単一の細胞や粒子の捕獲、被覆、吐出特性を評価した。

【結果】細胞用流路、PDMS 可変膜、空圧用流路を組み合わせた多層構造を達成した。開口部と捕獲部を隣接して設計することで、被覆された単一細胞の輸送距離を約  $20~\mathrm{mm}$  から約  $110~\mathrm{\mu\,m}$  へと大幅に短縮した。PDMS 可変膜と空圧用流路により  $0.25~\mathrm{s}$  以下での PDMS 可変膜の開閉を実現した。HeLa 細胞と同等の大きさのトレーサ粒子を導入し、単一粒子の捕獲を達成した。被覆時の非活性流体として Mineral Oil に  $1~\mathrm{v/v}$ % Span80 で混合した溶液を導入し、単一粒子の被覆を達成した。吐出の際は液滴が粒子より先行し、続いて単一粒子が吐出された。HeLa 細胞を導入すると、その集団の一部がノズルアレイのチャンバに引き込まれ、捕獲された。ただし、すべての細胞が捕獲されたわけではないため、その理由を検証した。バイパス流路を通過する HeLa 細胞に比べ、チャンバに流入する粒子の方がサイズが大きいことから、十分な割合の細胞が捕獲されないことを見出した。

単一細胞プリンティングの原理図と作製した単一細胞吐出用ノズルアレイの顕微鏡像



# 200 脳血管へ接着し脳実質へ浸潤する白血球模倣ナノDDS

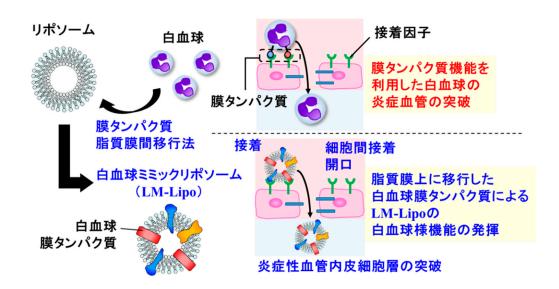
福田 達也

【目的】我々はこれまでに、脳梗塞部位にて生じる血液脳関門(BBB)の透過性亢進を利用することで、ナノサイズのリポソームを用いた脳実質への受動的な薬物送達が、脳梗塞からの血流再開後に生じる二次的な障害、脳虚血/再灌流障害の治療に有効であることを報告してきた。しかしリポソームの、BBB に生じた血管間隙突破と脳実質への移行には時間的制限が存在し、患部への薬物送達効率を向上させるためには、脳梗塞部位のBBBを能動的に突破可能な技術が求められる。ところが血液中を循環する白血球は、リポソームが脳実質へ移行できない条件下においても、膜タンパク質機能を利用して炎症性のBBB へ接着し透過することができる。そこで本研究では、リポソーム膜へ白血球膜タンパク質を搭載することで、白血球のように炎症血管、さらには脳梗塞部位のBBBを能動的に突破可能な白血球ミミックリポソーム(Leukocyte-mimetic liposome: LM-Lipo)を構築することを目的とした。

【方法】リポソームへの白血球膜タンパク質の再構成法として、リポソームと細胞膜が一過的に部分融合した際に生じる脂質膜間移行法を用いた。白血球モデル細胞として好中球様に分化させた前骨髄性白血病細胞 HL-60 を用い、リポソームへの膜タンパク質の移行をウエスタンブロッティングにて確認した。また、腫瘍壊死因子(TNF- $\alpha$ )で炎症処理したヒト臍帯静脈血管内皮細胞 HUVEC を用い、LM-Lipo の炎症血管内皮細胞に対する親和性を評価するとともに、トランズウェル上に形成した細胞層に対する透過性をそれぞれ評価した。また、LM-Lipo で処理した際のHUVEC 細胞骨格、および細胞間接着タンパク質に対する影響を、免疫蛍光染色および共焦点顕微鏡観察にて評価した。

【結果】リポソームと好中球様分化 HL-60 細胞を混合することにより、炎症血管に高発現する接着因子 ICAM-1 への結合性を有する白血球膜タンパク質 CD11a、CD11b のリポソーム膜への移行が確認された。また、TNF- $\alpha$ 処理により ICAM-1 発現を誘導した HUVEC へ LM-Lipo を添加したところ、通常のリポソームと比較して有意に高い親和性を示した。さらに、トランズウェル上に形成した炎症血管内皮層に対して蛍光標識 LM-Lipo を添加したところ、対照群と比較して高い透過性を示した。メカニズム解析の結果、LM-Lipo により HUVEC のアクチン骨格の変化と、細胞間接着タンパク質である VE カドヘリンの有意な発現減少が認められた。以上より、リポソーム膜上の白血球膜タンパク質の機能により細胞間接着が変化し、それにより LM-Lipo が炎症血管内皮細胞層を突破したことが示唆された。

白血球ミミックリポソームによる白血球機能の模倣と炎症血管内皮細胞層の突破



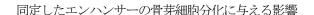
# 201 ゲノム編集と一細胞解析を用いた転写ネットワーク解析

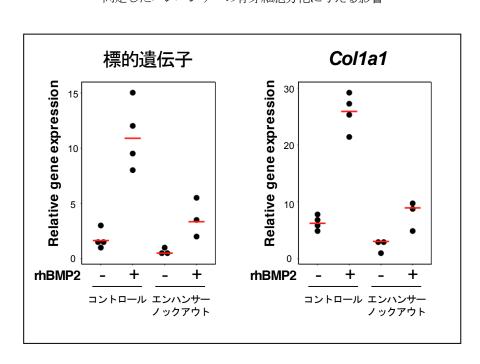
北條 宏徳

【目的】個体発生や細胞の運命決定において、マスター転写因子群が中心的な役割を果たす。これらの蛋白質は、エンハンサー領域と呼ばれるゲノム上の特定の転写制御領域に結合することで、標的遺伝子の発現を制御し生物学的機能を発揮する。次世代シーケンサーを用いたクロマチン免疫沈降―シークエンス(ChIP-seq)法の発展により、マスター転写因子群の結合部位がゲノムスケールで明らかになってきた。しかしながら、機能的に重要なエンハンサー領域を明らかにする手法はほとんど開発されておらず、その機能解析は未だ困難を極めている。そこで本研究では、CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集技術と一細胞 RNA-seq 解析技術を融合することで、転写制御領域の機能を一細胞単位で解析する新しい研究手法の確立を目指した。

【方法】骨発生エンハンサー候補選定のため、骨形成を担う骨芽細胞において、マスター転写因子群のゲノム結合部位データ、エピゲノムデータ、転写産物データおよび脊椎動物ゲノム配列保存情報を用いた。各エンハンサー候補領域を標的とするガイド RNA ウイルスライブラリーの作製のため、CROPseq ベクターを用いた。10x Genomics 社のChromium システムを用いて一細胞 RNA-seq 解析を行った。

【結果】エンハンサースクリーニングのため、エンハンサー候補領域群を標的とするガイドRNAを有するCROPseqベクター由来ウイルスライブラリーを作製した。本ライブラリーを、Cas9 恒常骨芽細胞株に感染させた後、骨誘導シグナル因子の rhBMP2 を一週間曝露し骨芽細胞の分化を誘導した。その後、酵素処理により細胞を単離し、一細胞ごとに 10x Genomics 社の Chromium システムによる一細胞バーコード (Droplet バーコード) 付与を行った。本サンプルで一細胞 RNA-seq 解析を行うことで、各細胞における Genotype (エンハンサー欠損部位) と、Phenotype (遺伝子発現プロファイル)を対応付けた。これにより、どのエンハンサー候補群が、骨芽細胞の分化に寄与するか絞り込み、有望なエンハンサー候補が同定した。さらに、選別された有望エンハンサー候補領域に対して、CRISPR/Cas9システムを用いたエンハンサー欠損骨芽細胞株を作製し、骨芽細胞分化における候補エンハンサーの寄与を検討した。その結果、エンハンサー領域のノックアウトにより標的遺伝子および骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現が減少することが確認された。以上より、骨格発生における転写制御ネットワークの一端が明らかになった。





# 202 中腎管ファイバーを用いた尿管芽オルガノイドの作製

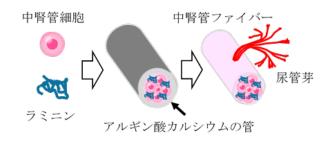
前 伸一

【目的】先天性腎尿路異常(Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract:CAKUT)は、腎尿路におけるさまざまな形態形成異常、奇形、機能異常を伴う病態である。胎生組織である中腎管から派生する尿管芽の形成が障害を受けることによって CAKUT が引き起こされる。腎不全の進行に伴い、保存期腎不全管理、透析療法などの対症療法や腎移植が実施されているが、根治的な治療法は確立されていないのが現状である。したがって、CAKUT に対する予防および治療方法の確立や医薬品の開発が切望されており、そのためには新規病態モデルの開発に応用可能なヒト中腎管および尿管芽組織を確保することが急務である。ヒトのすべての体細胞に分化可能な iPS 細胞(人工多能性幹細胞)は、中腎管および尿管芽組織を作製するための有効な手段になりうる。国内外のグループに先駆け、我々はヒト iPS 細胞から中腎管細胞を平面培養によって高効率に分化誘導し、中腎管細胞から成る単層連続上皮組織を誘導することで、生体内と同様に極性を有し、幾度も分岐する尿管芽オルガノイドを作製することにも成功している。しかしこの方法では、自己組織化を促すことで中腎管組織を誘導しているため、尿管芽オルガノイドの大きさや形を調節することが可能となっていない。腎尿路における形態形成の異常や奇形のような変化が生じることを定量的に評価可能なモデルを構築するためには、大きさや形の違いを極力無くした均一なオルガノイドを作製することが必要である。そこで本研究では、中腎管細胞の増殖を促す細胞外基質を探索し、その細胞外基質との混合溶液を微小な管に流し、固定化することによって中腎管ファイバーの作製を試みる。そして、作製する中腎管ファイバーから規則的に尿管芽を発芽させる培養方法の開発を目指す。

【方法】中腎管ファイバーを作製するためには、iPS 細胞から高効率に中腎管細胞を分化誘導することで必要な細胞数を確保することが不可欠である。そこで、iPS 細胞からの分化誘導の最初のステップである原始線条への分化誘導効率を向上させる方法の開発を試みた。次に、中腎管細胞の分化や増殖を促す細胞外基質の探索を行い、尿管芽オルガノイドを作製可能な細胞外基質を検証した。そして、中腎管細胞を多糖類の一種であるアルギン酸カルシウムの微小な管に充填することで中腎管ファイバーの作製を行い、尿管芽誘導因子を含む培地を用いて培養することで尿管芽が形成されるか否かを検証した。

【結果】iPS 細胞から中腎管細胞を効率良く分化誘導するためには、最初のステップである原始線条を高効率で作製することが重要であると考えた。そこで細胞骨格に着目することで、ROCK 阻害剤である Y27632 を用いる方法を確立した。次に、中腎管細胞の分化や増殖を促す細胞外基質を探索し、マウス腫瘍由来の基底膜成分を含む Geltrex が効果的であることを見出した。さらに、マトリゲルを用いることでのみ中腎管細胞塊から尿管芽オルガノイドを作製することができ、マトリゲルの主成分であるラミニンタンパク質では尿管芽オルガノイドを誘導できないことが分かった。そして、中腎管細胞塊とマトリゲルをアルギン酸カルシウムの微小な管に充填して培養したところ、一部に尿管芽の形成を認めた。しかし、細胞塊に含まれる中腎管以外の細胞の増殖も促され、ファイバーの大半はそれらの細胞が占めることが分かった。これらの結果から、今後はフローサイトメーターなどを用いることで単離した中腎管細胞のみから成るファイバーの作製方法の確立を試みる。そして、共培養などにより尿管芽の形成を制御する方法の開発を目指す。

#### 中腎管ファイバー作製の模式図



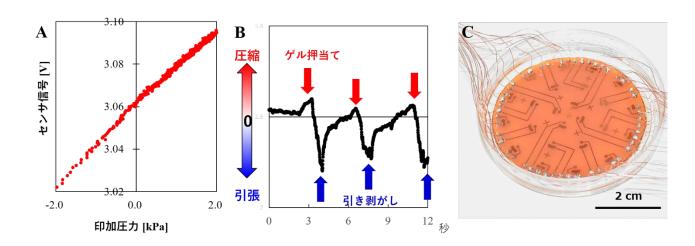
森脇 健司

【目的】細胞の機能を評価するうえで、その接着力や牽引力は重要な指標のひとつとなる。細胞の力の計測には、原子間力顕微鏡や蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)、マイクロピラープレートなどが利用されているが、3次元的な力の向きと大きさを把握するのは難しい。一方、我々は感圧層の電気抵抗変化を利用したフィルム型力覚センサの開発を行っている。電極の配置を工夫することで感圧部表面に作用する3次元的な力を検出できる。これまでに本センサ技術を細胞と培養皿表面間に作用する接着力分布のモニタリングに応用するため、電極と感圧層を導電ペーストで接着することで引張力を計測可能とし、細胞接着力のような微弱な引張力も検出できる可能性を示した。本研究では、密着方法の改良を行った後に多点センサを作製し、粘着ゲルの引き剥がしによって接着力分布のモニタリングを行った。

【方法】フォトリソグラフィとウェットエッチングによってパタニングした 2 枚の銅ポリイミド積層フィルムで 導電ゴムを挟むことで、圧力センサシートを作製した。感圧部の周辺に接着剤を塗布し、接合時に圧縮力をかけること で、電極と感圧層を密着させた。測定部に圧力が作用すると導電ゴムが変形し電気抵抗値が変化するが、電子回路に より抵抗変化を電圧信号変化へと変換し、センサインターフェイスにより記録した。引張・圧縮試験機を用いて フィルム型センサに圧力を印加した際の電圧信号の変化を調べた。また、センサ上で粘着性ゲルの押当てと引き剥がし 動作を繰り返し、センサ信号の変化を捉えた。細胞評価に向けて、透明素材によってセンサを作製した。また、多点 2 軸力センサシートを細胞培養皿に貼り付けた。

【結果】センサの電極と感圧層をあらかじめ密着させておくことにより、引張力が検出できた。1kPa以下の力も検出でき、細胞と培養皿間に作用する微弱な接着力の評価が可能だと考えられた。また、粘着性ゲルの押し当てと引き剥がしに合わせて圧縮力と引張力が検出された。10 Hz 以上のサンプリングが可能であることが確認できた。多点化も可能で、センサシートを押した位置と力や粘着ゲルを引き剥がした際の剥離点やその引張力の大きさを評価できた。酸化インジウムスズ (ITO) を成膜しフォトリソグラフィによりパタニングしたところ、透明電極が作製できた。感圧層にはポリチオフェン系導電性高分子を用いることで、ほぼ透明なセンサ構造を作製することができた。また、細胞培養ディッシュに貼り付けるセンサシートを作製した。培養平面に対する垂直方向と半径方向の2軸の力が検出でき、細胞とディッシュ間に作用する接着力や細胞同士の凝集力の把握に有用だと考えられる。

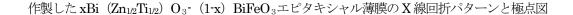
# センサ特性と細胞培養皿への貼り付け

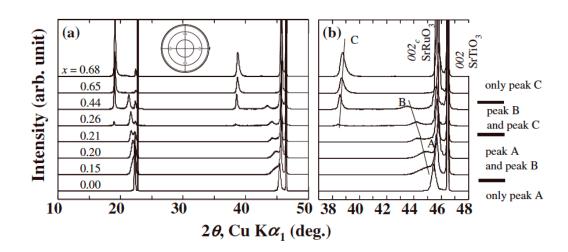


安井 伸太郎

【方法】Bi( $Zn_{1/2}Ti_{1/2}$ ) $O_3$ -BiFe $O_3$ エピタキシャル薄膜の作製には、ターゲットを必要とせず、広い組成範囲で高品質のエピタキシャル膜が作製可能な化学気相析出(Chemical Vapor Deposition: CVD)法を用いた。基板には、種々の結晶方位が入手可能な  $SrTiO_3$ 単結晶を用いた。圧電性の評価を行う場合ために、圧電体膜を作製する前に下部電極として導電性酸化物の  $SrRuO_3$ エピタキシャル膜を作製した。作製したサンプルの結晶構造は X 線回折(XRD)を用いて評価した。構成されるサンプルの組成は蛍光 X 線分析(XRD)にて測定した。作製したサンプルの上部にXRD100 XRD2 にで調金を電子線蒸着法にて作製した。XRD3 にであることで誘電率を、圧電応答顕微鏡(XRD3 によって歪曲線を測定することで XRD3 で求めた。

【結果】この材料でも菱面体晶と正方晶の組成相境界に2相共存領域が存在していることが分かった。この薄膜の電気特性を調査した結果、2相共存領域において誘電率が最大値を示すことが分かった。誘電率の組成依存と圧電性のそれは、経験的に一致することを考えると、この組成で局所的に圧電性が大きくなることを示唆する結果であるといえる。ここで注目すべき点は、誘電率の値が最大でも100程度であり、鉛系圧電体のPZTと比べて一桁ほど小さい値である。更に圧電性を調査した結果、d33は約80 pm/Vであった。鉛系圧電体のPZTと比べて1/2~1/3程度の値であった。ここで超音波の性能に重要な圧電 g 定数 (d 定数/誘電率)を考える。PZTと比較して本研究で開発した材料は3~5倍大きなことが分かる。この結果は空間分解能の高性能化が十分に期待できる値であると考える。さらにキュリー温度は少なくとも800℃以上であることが示唆されたことから、この材料は巨大圧電性、高キュリー温度そして高絶縁性が期待される結果であることが分かった。デバイス展開することで超高分解能エコーの作製が期待できる結果であった。





### 205 人工知能による臨床エビデンスの統合と体系化

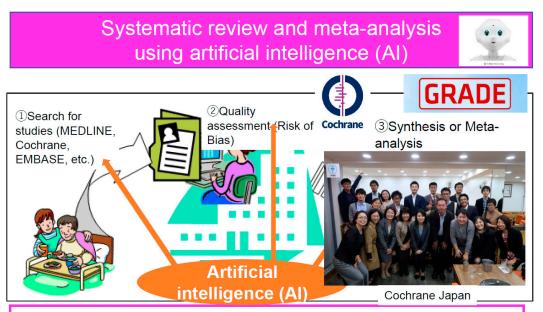
山田 朋英

【目的】本研究の目的は以下の4つである。1. 重要な臨床議案に関し質の高いネットワークメタアナリシスを行い、臨床ガイドライン構築に貢献する。2. システマティックレビューの自動化を実現させる。3. 人工知能による臨床エビデンスの統合と体系化を行う。世界のビッグデータを、人工知能やテキストマイニングの技術を用い解析する。これはプレシジョンメディシンの実現に寄与する。4. AI を用い、現場の医療者の作業の省力化や効率化、日本の医療システムの維持と改善を目指す。

【方法】人工知能(RobotAnalyst)は、英国マンチェスター大学コンピューターサイエンス学科、英国国立テキストマイニングセンター(NaCTeM)で開発されたニューラルネットワークを介した人工知能である。RobotAnalyst は、文章を読んだ人が重要だと判断する暗黙の基準を学習(ディープラーニング)し、多数の文書からその基準に沿ったものを抽出できる人工知能(AI)である(http://www.nactem.ac.uk/robotanalyst/)。RobotAnalyst は、教師データを学習する際に、教師データに含まれる単語ごとに教師データとの関連性と単語同士のつながりに関して伝達情報量を通して数値化し、ニューラルネットワークを介し、特徴量として利用している。教師データを学習した後、新たに評価用に投入されたデータにも同様の処理がなされ、教師データによって付与された特徴量により、それぞれの文章はスコア化され、そのスコア(=正解である予測確率)を基に教師データとの関連性を評価した。

【結果】煩雑な作業を、専門家の暗黙知を学んだ人工知能が代行することで、人間はより創造的で生産的な仕事に 従事することが可能となった。

### 人工知能による臨床エビデンスの統合と体系化



Employing AI techniques to perform systematic reviews can provide "high-speed, real-time", accurate, high-quality useful clinical evidence with little bias.

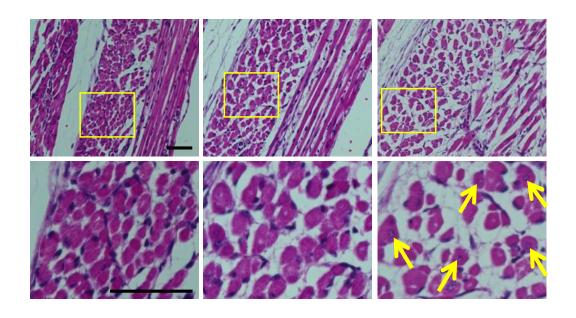
石野 史敏

【目的】鏡-緒方症候群は染色体 14 番父親性 2 倍体によって引き起こされるゲノムインプリンティング疾患であり、 難病指定を受けている疾患である。呼吸不全による新生児致死、腹直筋乖離、胎盤の過形成生後成長遅延など重篤な 症状を呈するが、胎盤の異常以外の主病態である筋肉関連異常の原因は長い間不明であった。我々はその主原因が PEG11/RTL1 の過剰発現であると考え、本研究ではマウスモデルにおける Peg11/Rtl1 の筋肉での発現と過剰発現に よる異常を明らかにし、アンチセンス RNA に含まれる miRNA で過剰発現を抑制する遺伝子治療開発を試みる。

【方法】ヒト染色体 14 番の相同染色体であるマウス 12 番染色体の父親性 2 倍体、母親性 2 倍体でもヒト同様の症状が見られる。そこで、原因インプリンティング領域に含まれる Peg11/Rtl1 とそのアンチセンス RNA をコードする antiPeg11/antiRtl1 領域を欠失した J ックアウトマウスを作製した。この欠失を父親由来で伝達したマウスは Peg11/Rtl1 を標的とする 6 個の miRNA が含まれることから、このマウスでは miRNA 欠失により Peg11/Rtl1 mRNA の過剰発現が誘導される。まず、野生型のマウスを用いて個体発生の各ステージでの Peg11/Rtl1 の発現時期と部位の詳細を明らかにし、筋肉での発現の有無を明らかにする。次に筋肉での発現が見られる発生ステージにおいて、Peg11/Rtl1 の欠失と過剰発現による筋肉の異常を明らかにする。最終的に、antiPeg11/antiRtl1 に含まれる miRNA または antiPeg11/antiRtl1 自身を導入が、実際に胎児期において Peg11/Rtl1 の抑制に機能するかを確認する。

【結果】マウスにおいて胎児期および新生児期特異的に Peg11/Rtl1 が骨格筋で発現することを確認した。これらには 肋間筋、腹筋、横隔膜など新生児の呼吸に重要な筋肉が含まれることから、これらが鏡-緒方症候群の新生児における 呼吸不全の原因になる可能性が高いことを突き止めた。また、新生児期のこれらの筋肉を調べると、固定化処理をした 標本において筋繊維が筋細胞膜から剥離し、著しく収縮することを発見した(右図)。また、筋細胞において細胞核が 中央部に位置する未成熟タイプが多いことを発見した(右下図の矢印)。これらのことから、Peg11/Rtl1 の過剰発現が、実際に呼吸関連の骨格筋の構造的異常を引き起こしていることが明らかになった。 さらに胎児期に antiPeg11/antiRtl1 に含まれる複数の miRNA を投与することにより、これらの筋肉に影響が出ることを確認した。 投与量と投与時期を詳細に詰めることにより、この方法は鏡-緒方症候群の遺伝子治療となりうると考えている。

Peg11/Rtl1の欠失(左)および過剰発現(右)は骨格筋の異常を引き起こす

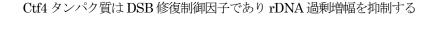


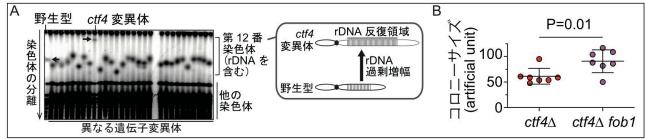
佐々木 真理子

【目的】DNA 複製では、全 DNA 配列を正確にコピーする必要がある。しかし、DNA 上には様々な障害が存在する ため複製装置の進行は頻繁に阻害され、最も危険な DNA 損傷である DNA 二本鎖切断(DNA double-strand break: DSB) が生じる。DSB は誤って直されるとゲノム再編成を誘導しゲノムを不安定化し、がんや多くのゲノム疾患を 引き起こす。細胞周期の中で S 期は、複製阻害によって DSB が最も頻繁にできやすい時期である。しかしこれまで 複製阻害時の DSB を高頻度で検出できる領域が見つかっていなかったため、その修復過程を DNA レベルで解析する ことが難しく複製阻害時の DSB 修復機構は不明であった。リボソーム RNA 遺伝子 (rDNA) は真核生物で保存 された反復配列であり、出芽酵母のrDNAは約150個のrDNA配列からなる巨大なクラスターを形成している。rDNA 配列は、リボソーム RNA 転写ユニットの他に複製開始点と複製阻害点が存在する。そして複製開始点から開始した 複製は、複製阻害点に結合している Fob1 タンパク質によって進行阻害を受け、その結果 DSB が生じる。DSB の 修復過程で 異常が起こると rDNA コピー数変動が起こりやすく rDNA 領域が不安定になると考えられているが、 DSB 修復機構は不明であった。研究代表者は先行研究において、rDNA 領域で生じる DSB をサザンブロッティングに よって 検出しその修復過程を DNA レベルで解析する実験系を立ち上げた。そして DSB 修復に必要な因子を調べた ところ、複製阻害時の DSB 修復には S 期以外の DSB 修復に必要な非相同末端結合や相同組換え因子は必要ではなか ったことから、この DSB は新規の経路によって修復されることを明らかにした。そこで本研究課題では、この新規 DSB 修復機構を明らかにすることにより、複製阻害時の DSB からゲノム恒常性を維持する機構を明らかにすることを目指 した。出芽酵母の rDNA 領域で生じる DSB の修復因子が欠損した細胞は、Fob1 発現時には DSB が生じその修復が できないため増殖阻害を示すが、Fob1 が発現しない条件では野生型と同様の増殖能を示すと予想される。そこで当初 の研究実施計画では、この表現型を示す遺伝子欠損株を網羅的に探索することによって DSB 修復因子を同定する スクリーニングを行う予定であった。しかし、その前に DSB 修復因子欠損株において予想される増殖パターンが観察 されることを確認することにした。

【方法】研究代表者は先行研究において、複製装置の構成因子である Ctf4 タンパク質は DSB の修復過程で作用し、 DSB 修復時に rDNA 過剰増幅が起こることを防ぐ因子であることを明らかにした。そこで、ctf4遺伝子欠損株と ctf4 fob1 二重変異株の増殖能を比較した。そのため、CTF4遺伝子と FOB1 遺伝子の変異をヘテロに持つ二倍体を構築し 四分子解析を行うことによって、ctf4遺伝子欠損株と ctf4 fob1 二重変異株を単離しそのコロニーサイズを比較した。

【結果】すると ctf4/2変異株は、野生型に比べて増殖阻害を示した。そしてこの増殖阻害は、ctf4/2 fob1 二重変異株においては抑制されていた。よって、DSB 修復に関与する Ctf4 タンパク質が欠損した細胞は FOB1 遺伝子の発現によって増殖阻害が誘導されることが明らかとなった。よって今後の研究においては、FOB1遺伝子の発現によって増殖阻害が引き起こされる遺伝子欠損株を網羅的に探索するスクリーニングを行う予定である。





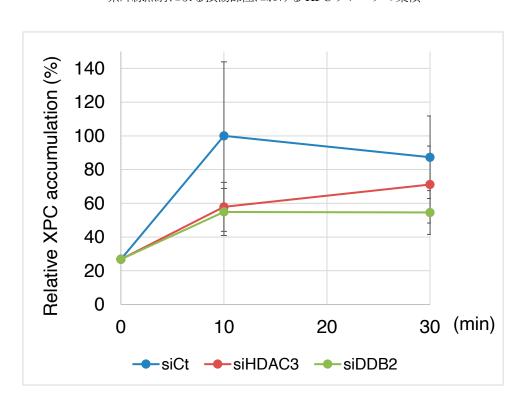
# 208 ヒストン脱アセチル化からNERへのアプローチ

丹伊田 浩行

【目的】生物にとり遺伝情報を担う DNA の安定性を維持することは最も重要なことである。この任務を達成するために生物は様々な DNA 損傷に対応する修復機構を発達させてきた。ヌクレオチド除去修復(NER)は最も多彩な DNA 損傷に働く修復機構である。最近の研究から NER が細胞内で効率よく働くために細胞内のクロマチン構造変換が重要であることが明らかになってきた。本研究においてクロマチンの構造に影響を与えるヒストン脱アセチル化と NER の 関係を明らかにすることを目的とした。

【方法】ヒト細胞株 U2OS 細胞および HeLa 細胞を用いヒストン脱アセチル化酵素 3 (HDAC3) が担う NER への 影響を調べた。方法として局所紫外線照射 (Local UV irradiation) した細胞内の修復タンパクを免疫染色すること により定量した。また UV に対する感受性をコロニーアッセイ法により検討した。

【結果】UV 照射によりクロマチンでヒストン H3 リジン 14 (H3K14) が脱アセチル化されることがわかった。この脱アセチル化は主としてHDAC3が担うことを明らかにした。HDAC3のシクロブタン型ピリミジン二量体(CPD)除去に関する影響を調べると NER の遂行に必要とされることが明らかにされた。HDAC3 が必要とされる NER 経路を調べると DNA 損傷の認識に必要な Xeroderma pigmentosum, complementation group C (XPC) タンパクの損傷部位への集積に関与することが示された。このため HDAC3 が欠損すると XPC の集積が阻害され NER の欠陥と紫外線感受性が出現するものと推測された。



紫外線照射による損傷部位における XPC タンパクの集積

# 209 発がんを含めた炎症性腸疾患病態におけるplasmin

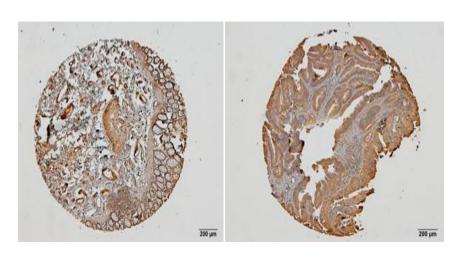
Heissig Beate

【目的】炎症性腸疾患(IBD)は潰瘍性大腸炎やクローン病等によって構成される慢性炎症性疾患である。 近年、慢性炎症は発癌要因の一つと考えられており、IBDは、結腸直腸癌(CRC)の前癌病変と捉えられている。

【方法】本研究では、アゾキシメタン/デキストラン硫酸ナトリウム誘発・発癌モデルとヒト検体を使用し、IBD・慢性炎症を基礎とした発癌における線溶系因子の役割を精査・検討した。

【結果】CRC の疾患モデルとヒト検体の病変組織中で、有意に高い組織型プラスミノーゲンアクチベーター(tPA)の発現が検出された。さらに CRC の疾患モデルにおける線溶系因子 tPA およびプラスミンの前駆体であるプラスミノーゲンの遺伝子欠損、またはプラスミンの薬剤による活性阻害は、発癌、及び癌増殖の進行を抑制することが判明した。私共のデータは、プラスミンに対する分子標的療法、プラスミンの活性阻害が、IBD の発癌予防に有用である可能性を示唆するものと考えている。

ヒト結腸癌の組織アレイとヒト腫瘍(右)及び非腫瘍部(左)組織の tPA による免疫染色切片



# 210 局所進行非小細胞肺癌に対する集学的治療の忍容性試験

井上 匡美

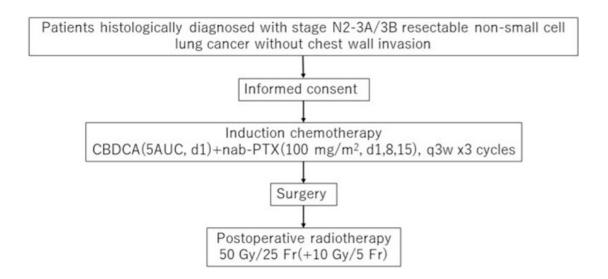
【目的】肺癌はがん死亡原因の第一位で、厚生労働省による2015年罹患数は133,500人、死亡数は77,000人と予測され、社会の高齢化に伴い増加の一途をたどっている。その中で、早期非小細胞肺癌は外科的根治術により治癒することが期待できるが、リンパ節転移を伴ったいわゆる局所進行非小細胞肺癌は難治性であり外科手術と化学療法、さらには放射線照射などを組み合わせた集学的治療を要するが、その治療成績は満足できるものではない。そこで本試験では、集学的治療による忍容性を評価し、局所進行非小細胞肺癌の治療方法を確立する。

【方法】術前に縦隔リンパ節転移(N2)が証明された N2·3A/3B 期非小細胞肺癌で完全切除が可能と判断された症例を登録し、術前化学療法としてカルボプラチン(CBDCA)+ナブパクリタキセル(nab-PTX)を 3 コース投与した後、Response Evaluation Criteria in Solid Tumors(RECIST)基準にて PD でない症例に対して肺葉切除以上の肺癌根治術を施行し、さらに術後放射線照射 50 Gy を行う集学的治療の忍容性を明らかにすることを目的として本研究を計画した。主要評価項目は治療完遂割合とし、副次評価項目として術前化学療法奏効割合、治療関連有害事象、術後 2 年無増悪生存割合を解析した。倫理的な観点から全参加施設からの登録 25 例中 5 例で安全性評価を確認することとした。

【結果】 2020 年 1 月末現在、症例登録は 1 例であり、統計的解析による結果を得られていないが、2022 年までとした症例登録期間中に症例登録を進めていく。なお、本試験については UMIN000025010 and jRCT1051180028 として登録された。 2019 年 7 月には以下のように雑誌 Medicine にプロトコール論文が掲載された。

Treatment rationale and design of the induction chemotherapy and adjuvant thoracic radiation in resectable N2-3A/3B non-small cell lung cancer (ICAT) study. Tsunezuka H, Inoue. M.Medicine (Baltimore) . 2019 Jul;98 (27): e16298. doi: 10.1097/MD.0000000000016298.

### プロトコール治療

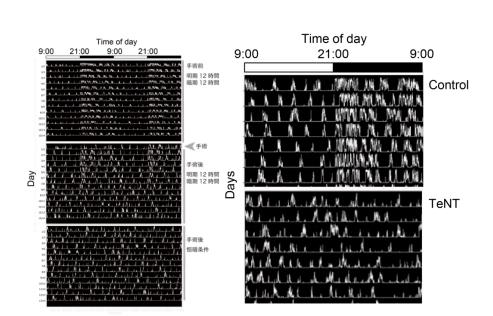


平野 有沙

【目的】睡眠は生物に不可欠な本能行動の一つである。睡眠は量的に充分であるだけではなく睡眠・覚醒のタイミングも重要なファクターである。特に24時間型社会と呼ばれる現代社会では、概日リズム睡眠障害が社会的な問題であり、癌、メタボリックシンドロームや鬱病などの重篤な病気と深く連関する。位相決定に重要な役割を果たす概日時計の中枢は視床下部の視交叉上核(SCN)に存在しており、個々の SCN 神経はそれぞれ細胞内に分子時計を内在する。個体においては SCN から他の脳領域に時刻情報を出力することで、睡眠リズムをはじめ様々な生理リズムが生み出されると考えられるが、SCN から行動に至る神経ネットワークの理解はほとんど進んでいない。本研究では、概日時計の中枢である視交叉上核(SCN)を出発点として神経投射される細胞群の同定とその神経回路が生理リズムの基本である睡眠覚醒サイクル制御において果たす役割の解明を目指した。特に、SCN の中でも第三の神経群を形成しながらその機能がわかっていないガストリン放出ペプチド(GRP)産生神経に注目し、GRP 神経の投射地図を作製するとともに概日リズム制御における生理的意義を明らかにした。

【方法】 Grp 遺伝子プロモーターに駆動される Cre リコンビナーゼを発現する Cre ドライバーマウスとアデノ随伴 ウイルス (AAV) を用いて GRP 神経特異的な遺伝子操作を行った。GRP 神経を特異的に蛍光タンパク質でラベルし、その投射先マッピングを行った。さらに、GRP 神経特異的に破傷風毒素(テタヌス毒素, TeNT)を発現させて、神経小胞を機能阻害したときの行動リズムへの影響を解析した。その際に SCN の時計遺伝子発現リズムを調べるために PER2:LUC マウスにおける発光モニターを行った。さらに、赤色ルシフェラーゼである AkaLuc を用いて自由行動下のマウスにおける脳深部の発光を観察することで、in vivo で神経活動を測定する実験系を立ち上げた。

【結果】 Grp-iCre ノックインマウスの SCN に ChR2-EYFP またはシナプトファイジン・GFP を発現する AAV を 投与することにより、神経細胞の軸索を蛍光ラベルした。その結果、SCN の GRP 神経は視床下部の視索前野 (POA)、 視床室傍核 (PVT)、室傍核下部領域 (SPVZ)、視床下部室傍 (PVH)、核視床下部背内側核 (DMH) に密な投射を している一方、視床下部腹内側核 (VMH) には投射しないことが判明した。さらに、TeNT を発現させたマウスに おいては行動リズムが大きく減弱することが明らかになった (図)。 さらにそのときの SCN の PER2::LUC の発現 リズムも大きく減弱していた。神経活動のイメージングに関しては、SCN のような脳深部でも完全な非侵襲系で ルシフェラーゼの発光を検出することが可能であった。今後、基質の連続投与の条件を確定させて GRP 神経における 神経活動リズムを観察する予定である。



TeNT を用いて GRP 神経を抑制したときのマウス行動リズム

# 212 心血管病における脂質ラジカルを標的とした治療の確立

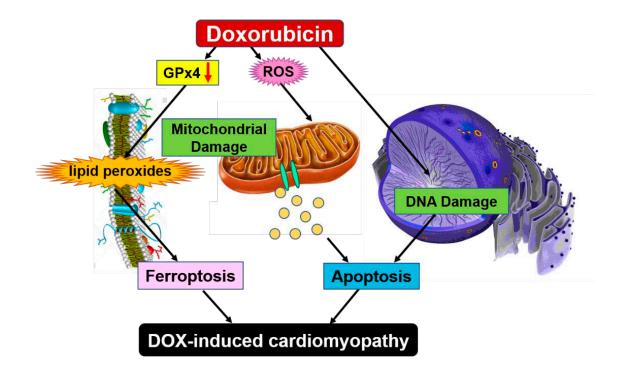
池田 昌隆

【目的】心血管病は本邦における死因の約 3 割を占める疾患群であり、さらなる病態解明とその治療法の確立が望まれる。以前より脂質化酸化物は心血管病の進展において重要な役割を果たしていることが報告されてきたが、依然として過酸化脂質が病態進展に寄与する分子機序は明らかではない。本研究では、近年新規に提唱された過剰な過酸化脂質に基づく制御性細胞死であるフェロトーシス(ferroptosis)とその主たる制御分子であるglutathione peroxidase 4(GPx4)に着目し、心血管病の中でも特に過酸化脂質が病態に深く関与していることが示唆されているドキソルビシン心筋症でのこれらの役割についての解析を行った。

【方法】C57BL/6J マウスおよび GPx4 過剰発現マウスにドキソルビシン心筋症モデルを作製し、心機能および 生化学的な解析を行った。また新生仔ラットから得た単離培養心筋細胞にドキソルビシン刺激を加え、フェロトーシス 阻害剤である ferrostatin-1 (Fer-1) およびアポトーシスの阻害剤である zVAD-FMK を用いて、ドキソルビシンに よって誘導される細胞死の詳細な解析を行った。

【結果】ドキソルビシン心筋症モデルの心筋組織においては、心収縮能の低下や心筋細胞死といった心筋傷害とともに GPx4 が有意に減少しており、過酸化脂質が増加していることが確認された。一方で、GPx4 の過剰発現マウスでは これらの心筋傷害が改善された。単離心筋細胞を用いた検討では、ドキソルビシンによる刺激により GPx4 の減少と ともに 6 割程度の細胞死が誘導された。脂質親和性抗酸化剤の一種であり、フェロトーシス阻害剤とされる Fer-1 の 添加により、3 割程度の細胞死が抑制され、またアポトーシスの阻害剤である zVAD-FMK の添加により、3 割程度の細胞死が抑制された。 さらに Fer-1 と zVAD-FMK 両者の添加によりドキソルビシンによる細胞死がほぼ完全に抑制されることが示された。以上の結果より、ドキソルビシン心筋症における細胞死においてはアポトーシスとともに GPx4 の減少に伴うフェロトーシスが病態進展に重要な役割を果たしていることが示唆された。

ドキソルビシンに伴う GPx4 の減少とそれに伴うフェロトーシスは アポトーシスとともにドキソルビシン心筋症の病態進展に寄与する



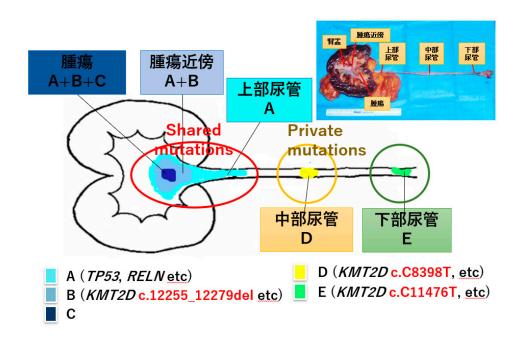
# 213 尿路上皮癌における多中心性多発のメカニズムの解明

佐藤 悠祐

【目的】腎盂尿管癌や膀胱癌は、病理組織学的にその大半を尿路上皮癌が占める。本研究では、尿路上皮癌の最大の特徴の 1 つである多中心性多発に着目し、網羅的なゲノム解析を行うことによってその分子メカニズムの解明を試みた。

【方法】腎盂尿管癌に対し手術を施行した5症例について、腫瘍ならびに非腫瘍部粘膜からDNAを抽出し、大量並列シークエンサーを用いて網羅的に遺伝子変異の検出を行った。

【結果】1 症例の結果を以下の図に示す。解析の結果、腫瘍からは TP53 遺伝子、KMT2D 遺伝子、ATRX遺伝子など、ドライバー変異と考えられる遺伝子変異のほか、パッセンジャー変異も含め 126 個の体細胞性変異を検出した。一方、非腫瘍部粘膜のうち腫瘍近傍および上部尿管粘膜では、それぞれ 63 個、44 個の体細胞性変異が見られ、TP53 遺伝子変異や KMT2D 遺伝子変異をはじめとして、その大部分は腫瘍部で見られた変異と同一のものであった。このことは、非腫瘍部の粘膜に、病理組織学的に検出が困難な腫瘍細胞の播種が既に生じていることを示唆していると考えられた。さらに、中部尿管ならびに下部尿管の粘膜からは、それぞれ 4 個、19 個の体細胞性変異を検出した。興味深いことに、それぞれの検体に KMT2D 遺伝子の変異を検出したが、いずれも腫瘍検体から検出されたものとは異なる変異であった(腫瘍:Q4085fs、中部尿管:Q2800X、下部尿管:L3566P、Q3826X)。したがって、中部尿管や下部尿管の粘膜では、腫瘍部分とは独立して KMT2D 遺伝子の変異が生じており、癌の多中心性多発の要因の 1 つである field cancerization が尿路上皮においても生じていることを示唆するものと考えられた。



癌の播種と field cancerization の双方が示唆された腎盂癌の 1 例