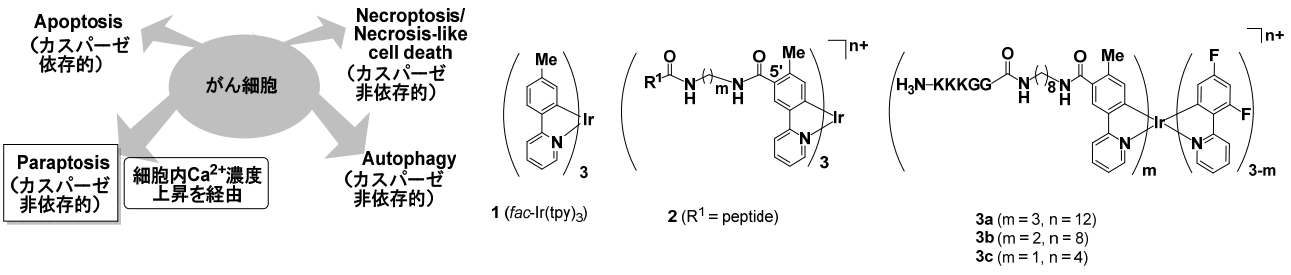
1　プログラム細胞死paraptosisの解明と抗がん剤の開発	青木　伸

【目的】プログラムされた細胞死（Programmed Cell Death：PCD）は、固体の生命維持のために遺伝子によって制御された細胞死であり、発生時の形態形成や恒常性維持、がん、自己免疫疾患、ウイルス感染症等と密接に関わっている。従来、細胞死は「PCD としてのカスパーゼ依存性 apoptosis」と「受動的な死＝necrosis」に分類されていたが、最近 necroptosis、autophagic cell death、paraptosis など多様な PCD 様式が明らかになり（下図）、それらを利用するがん治療の可能性が指摘されている。例えば、アポトーシス耐性を獲得したがん細胞の細胞死を誘導するためには、異なる PCD を誘起する薬剤が必要不可欠であると考えられる。paraptosis は近年発見された PCD の一つであり、ルテニウムおよびイリジウム（Ir）などの金属錯体や天然由来の化合物も、細胞内 Ca^{2+}濃度上昇や小胞体とミトコンドリアの液胞化を伴う paraptosis を誘導することが報告されている。筆者らは、Ir 錯体の代表的な例である Ir（tpy）$_3$（**1**）tpy（=2-（4'-tolyl）pyridine）にペプチドを導入した Ir complex-peptide hybrids（IPHs）（下図の **2**、**3**）が Jurkat 細胞の paraptosis を誘導することを発見した。本研究では、IPHs や、paraptosis を誘導する天然物（celastrol、hesperidine）が共通のシグナル伝達分子を活性化すると仮定して、ターゲット分子の探索と同定を行い、paraptosis の分子機構を明らかにすることを目的とした。

【方法】1. IPHs による Jurkat 細胞の paraptosis 誘導と細胞形態変化、細胞内器官への影響、celastrol との比較。2. 細胞内器官内のカルシウムイオン濃度変化の測定。3. IPHs によって誘導される paraptosis の機構解析と autophagy との関連。

【結果】本研究の結果から、IPHs と celastrol が異なる細胞内シグナル伝達経路を活性化して Jurkat 細胞の paraptosis を誘導することが強く示唆された。そして、i）IPHs は数時間単位で paraptosis を誘導するが、celastrol は約一日必要とすること、ii）死細胞の透過型電子顕微鏡（tunneling electron microscopy：TEM）画像から、paraptosis の特徴的な現象であると報告されている細胞内器官の液胞化が誘導させること、iii）IPHs はカルモジュリンまたはカルモジュリンの Ca^{2+}錯体に結合すること、iv）IPHs は最初に細胞膜へ移行し、その後ミトコンドリアへ移行すること、v）IPHs はリソソームと小胞体の液胞化を誘導するが、celastrol はリソソームの液胞化を誘導すること、vi）IPHs は小胞体からミトコンドリアへの Ca^{2+}輸送を促進し、ミトコンドリア膜電位を低下させること、それに対して celastrol は細胞質内の Ca^{2+}濃度を上昇させるが、ミトコンドリア内の Ca^{2+}濃度とミトコンドリア膜電位には影響しないこと、vii）IPHs は、前記の vi と前後して小胞体ストレスを誘導することが明らかになった。また、IPHs による paraptosis 誘導は autophagy 様現象を伴うが、autophagy は paraptosis に付随して起きた現象であることが示唆された。同時に、Ir 錯体部分を有機分子に置き換えた分子の合成にも成功しており、IPHs と同様のメカニズムで、IPHs よりも強い抗がん活性を有することが示唆されている。今後は、カルモジュリンとの相互作用や、ミトコンドリアと小胞体の接合および膜融合に関与する分子などに着目して詳細な解析を行い、新たな抗がん剤の開発へ展開する予定である。

様々なプログラム細胞死（PCD）のタイプと paraptosis を誘導するイリジウム錯体ーペプチドハイブリッド



2　運動応答性マイクロRNAによる老化の調節	秋本　崇之

【目的】すでに超高齢社会を迎えた我が国を含め、先進諸国において人口の高齢化が進んでおり、高齢者の健康問題のみならず介護・医療費の増加による経済的負担の増加、生産年齢人口の低下等が大きな社会課題となっており、これらに対応することが世界的にも喫緊の課題となっている。我々はこれまでに、身体運動によって発現の変化するマイクロRNA（miRNA）を複数同定し、これらのうちいくつかの遺伝子改変マウスを作製してきた。本研究では、我々の研究室で作製したあるマイクロ RNA の遺伝子改変マウス（以下 KO マウス）において偶然見出された「老化加速」表現型を解析し、そのメカニズムを検討するための予備的検討を行った。

【方法】マウスの一般的な表現型を明らかにするために、出生率、体重変化、平均寿命、摂餌量、運動量、心拍数、血圧を継続的に測定し、これらを KO マウスと対照群マウス（以下 WT マウス）間で比較した。さらにこれらのマウスの老化度を評価するために 16、32、52 週齢時に Frailty index の測定を行った。

【結果】KO マウスは WT と同様な出生率で生まれてきたが、12 週齢以降ですでに脱毛や体毛の白色化、Kyphosis（脊柱後弯）を認めた（図）。KO マウスの平均寿命は、雄性 31.16±3.55 週と雌性 34.89±5.37 週であり、WT の雄性（130.17±7.52 週）と雌性（124±8.87 週）に比べて極端に短かった。またこれらのマウスは筋力の低下と顕著な Frailty index の増加を示し、KO マウスでは著しく老化が加速されていることが分かった。さらに、KO マウスでは WT より体重が小さく、活動量の減少、そして心拍数及び血圧の低下が認められた。今後これらのマウスの老化加速の表現型を誘導する分子メカニズムについて検討する予定である。

miRNA 欠損マウスに認められる老化加速表現型

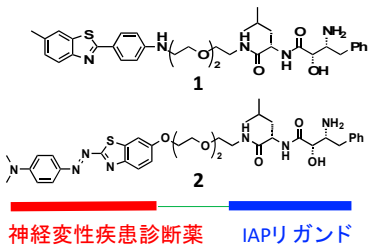
3　ケミカルノックダウンを利用した神経変性疾患治療薬	石川　稔

【目的】神経変性疾患は、異常凝集した疾患原因タンパク質が脳内に蓄積して、神経細胞が障害を受けることにより発症すると考えられている。一方、標的タンパク質分解薬 PROTAC（proteolysis targeting chimera）は、ユビキチンリガーゼリガンドと標的タンパク質リガンドを、リンカーを介して連結した分子である。PROTAC は、ユビキチンリガーゼと標的タンパク質を物理的に近接させることにより、標的タンパク質をユビキチン化し、プロテアソームで分解させる。我々は、PROTAC の低分子化に成功したノウハウを活用し、異常凝集したタンパク質に特異的に結合する神経変性疾患診断薬と IAP リガンドを連結した低分子が、神経変性疾患の一種であるハンチントン病の原因タンパク質およびその可溶性凝集体量を減少させることを見出した。しかしながらこの化合物の、神経細胞に対する保護作用や動物モデルによる有効性評価には至っていない。そこで本研究では、この低分子の活性増強、薬物動態改善を指向した構造展開を実施し、動物モデルで有効性を示す化合物の創製を目指す。

【方法】異常凝集したタンパク質に特異的に結合する神経変性疾患診断薬と、ユビキチンリガーゼリガンドや疎水性タグをそれぞれ連結した分子を合成した。神経変性タンパク質が発現している細胞に上記合成化合物を処理し、ウェスタンブロット法などにより標的タンパク質の存在量を、蛍光顕微鏡により可溶性凝集体量を評価した。更に、プロテアソーム依存的に標的タンパク質が減少していることを、プロテアソーム阻害薬の併用処理実験により確認した。

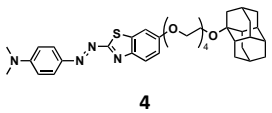
【結果】神経変性疾患診断薬とユビキチンリガーゼリガンドを連結した低分子 PROTAC1、2 が、ハンチントン病原因タンパク質の他に、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症の原因タンパク質である変異 atrophin-1 や、脊髄小脳失調症の原因タンパク質である変異 ataxin-7、変異 ataxin-3 も分解誘導できることが明らかになった。経口薬・中枢薬にとって重要な物理化学的性質として、分子量や、水素結合の受容体数・供与体数が知られている。このことから、PROTAC1、2 の分子量を削減、また水素結合の受容体数・供与体数を削減することで、薬物動態改善や、それに伴う分解活性向上を期待した。そして、アダマンチル基などの疎水性タグと標的タンパク質リガンドを連結させた分子が、変性タンパク質の構造的特徴である疎水性部分構造を標的タンパク質表面に担持することにより、標的タンパク質を品質管理機構に認識・分解させる疎水性タグ法に着目した。そして、PROTAC2 の IAP リガンドを、アダマンチル基などの疎水性タグに変換した連結低分子 3、4 などを合成した。疎水性タグ連結低分子 3 が生細胞において、ハンチントン病原因タンパク質の存在量を減少させ、可溶性凝集体量も減少させることが明らかになった。更に、最も強い活性を有する疎水性タグ連結低分子 4 は、血液脳関門を透過する標準化合物よりも、血液脳関門の透過性が高い可能性が、IAM カラムを用いた *in vitro* 予備実験により示唆された。

ハンチントン病原因タンパク質分解 PROTAC を起点とした研究成果



ハンチントン病原因タンパク質
を分解するPROTAC

歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症原因タンパク質、
脊髄小脳失調症の原因タンパク質も分解



in vitro予備試験で
血液脳関門を透過

ハンチントン病原因タンパク質
を分解する疎水性タグ連結分子

4　新たに発見した脳因子による肥満誘導機構の解明	浮穴　和義

【目的】飽食やストレス社会である現代において、食生活の乱れ及びライフスタイルの欧米化に伴う「肥満」や無理なダイエットから生じる健康被害が老若男女問わず問題となっている。中でも肥満対策は、高脂血症、高血圧症、糖尿病の疾病予防や治療に繋がることは明白であり、QOL の向上や健康長寿の延伸のためにも肥満の予防・対策・解決は必要不可欠である。肥満は過食や偏食、エネルギー収支バランスの破綻により生じることから、特に脳内視床下部に存在する中枢性摂食調節因子の探索と機能解析が精力的に進められている。我々は、脳内視床下部に存在する未知の摂食調節因子の探索の結果、80 アミノ酸残基からなる分泌性の小タンパク質をコードする新規の遺伝子を最近発見した。この小タンパク質を C 末端部分の配列の特徴から Neurosecretory Protein GL（NPGL）と命名した。ラットにおける NPGL の脳室内投与や前駆体遺伝子（*Npgl* ）の過剰発現の解析から、白色脂肪組織（WAT）での *de novo* 脂肪合成亢進による脂肪蓄積が生じることを見出している。本研究では、肥満を誘導しやすい系統のマウスを用いることで NPGL が早期に肥満を惹起すると予想し、その肥満誘導機構の解明を行うことを目的とした。

【方法】肥満を誘導しやすい C57BL/6J マウスを用いて、アデノ随伴ウイルス（AAV）を用いた前駆体遺伝子 *Npgl* 過剰発現実験を行った。脳手術により、NPGL 産生細胞が局在するマウスの弓状核後外側部に *Npgl* を過剰発現する AAV ベクターを局所注入した。脳手術後のマウスを普通食給餌群あるいは高カロリー食給餌群の 2 群に分け、9 週間飼育した。飼育中は摂食量と体重を毎週測定した。さらに、各組織重量の測定や形態学的解析、脂質代謝関連遺伝子の mRNA 発現解析、呼吸代謝・活動量解析を行った。

【結果】9 週間の *Npgl* 過剰発現を行った結果、普通食・高カロリー食両給餌条件において摂食量および体重が顕著に増加した。また、白色脂肪組織重量が顕著に増加した。さらに臓器重量を測定したところ、*Npgl* 過剰発現により肝臓重量が有意に増加した。Oil Red O 染色により肝臓の中性脂肪を染色した結果、*Npgl* 過剰発マウスでは顕著な脂肪蓄積が認められた。また、WAT において脂質代謝関連因子の mRNA 発現量が有意に増加した。最後に、NPGL がエネルギー消費に及ぼす影響を評価するために、呼吸代謝および自発活動量の測定を行った。その結果、*Npgl* 過剰発現マウスにおいて自発活動量に変化はみられなかったが、マウスの活動期である暗期のエネルギー消費量が有意に減少した。以上の解析から、NPGL は下図のような機構により、肥満を誘導することが示唆された。

新規脳因子 NPGL による肥満誘導機構

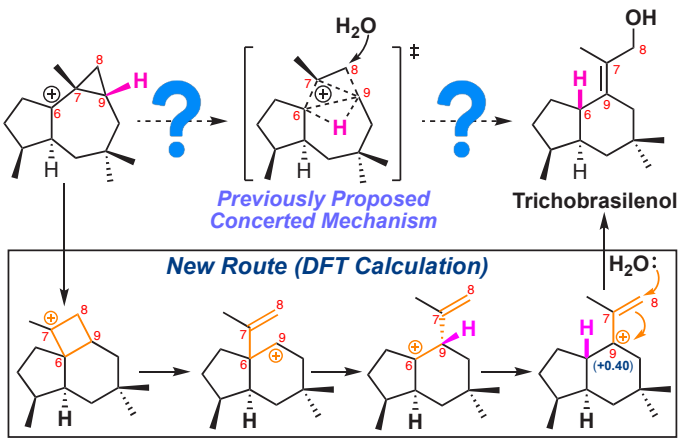
5　天然物生合成経路の理論解析と創薬化学研究への応用	内山　真伸

【目的】「天然物」は、微生物や動植物の持つ生合成のダイナミズムが作り出す多彩な化学構造と機能を持つ有機分子群である。多種多様な天然物の骨格は、(生合成) 酵素内部での複雑な多段階連続反応によって生合成される。しかも、いくつかの酵素は、現在の有機化学では難しいとされる反応さえ簡単に触媒してしまう。ここで得られる知見は、新反応開発にとっても、大変興味深い。生合成は、一般に多段階にわたる連続反応を、緻密に、正確に、短時間で、効率的に行う。このことは同時に、“反応性が高く”“寿命が短い”“手に取り出せない”各種中間体の単離・構造決定や生合成機構の全貌解明が非常に難しいことを示している。一般に、実験化学では、反応機構を明らかにするために、同位体標識化合物のトレーサー実験を行ったり、生合成の各段階を触媒する酵素を単離精製してその性状を調べたり、あるいは速度論的な実験を行う。これらは、反応（生合成）経路に関する情報、すなわち中間体の構造、あわよくば反応遷移状態に関する情報を得ることを目的としている。遷移状態は、化学変換に決定的な役割を果たすからである。しかしながら、実験的手法では、遷移構造を直接『見る』ことはできない。唯一、その姿を直接『見る』ことができる方法が『計算化学』である。計算機ならびに理論手法の発達により大規模系のシミュレーションも可能となりつつある計算化学は、実験困難な化学現象を予測できるポテンシャルを秘めている。そこで本研究では、計算化学的手法を基盤として、当研究グループが独自に開発してきた『遷移構造解析』『反応経路自動探索法』などを駆使して、未解明生合成経路の全容解明を目指し研究を行った。遷移状態を正確に理解することで、これまで理論的な解明が遅れてきた「多段階連続反応」「触媒反応」である生合成の未解明機構解析に挑んだ。

【方法】本研究で用いたすべての計算は、Gaussian16 プログラム上で行い、必要に応じて GRRM11 プログラムを援用し行った。

【結果】本研究を通じて、①「Brasilane 型構造生合成のカラクリ（異常な連続骨格転位反応）(図)」を解明し、また共同研究にて、②インドールジテルペンにおける「Lolitremane 骨格形成 (ラジカル機構による立体選択的環化反応)」、③「Shimalactone 生合成におけるダブルビシクロ環化反応における生合成の謎 (立体選択性に酵素は必要なのか？)」、ならびに④「PreasperterpenoidA の生合成経路に 2 級カチオンは本当に現れるのか？」などを明らかにすることができた。本研究を通じて、理論計算が生合成機構解析にも極めて有効なツールとなることを示せたと考えている。経験と実測を得意とする『実験化学』に、理論を武器とする『計算化学』が加わると、生合成研究に新たな世界が拓けると信じている。理論計算によって得られる三次元構造や立体電子構造は実験化学者の直感を刺激し、また計算化学により思いがけない未知の構造や機構と出会うこともある。理論と実験の協奏により、「超連続」「触媒」反応である生合成経路・遷移状態を正確に理解することで、新たな天然物化学研究を展開したいと考えている。

本研究により明らかになった Brasilane 型構造生合成における異常な連続骨格転位反応



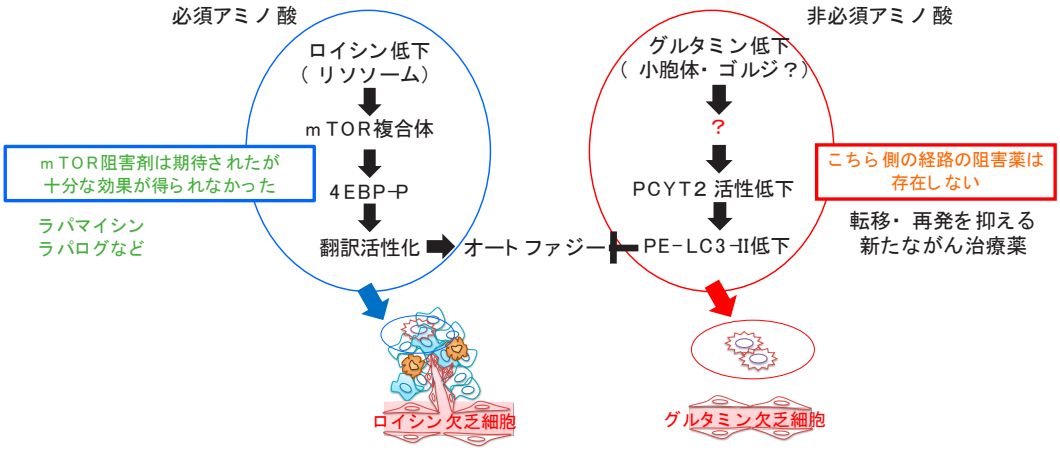
6　がん細胞のアミノ酸欠乏適応機構の解明と治療法の開発	大澤　毅

【目的】がんの転移・浸潤・薬剤耐性などの悪性化には腫瘍微小環境が重要な役割を果たす。必須アミノ酸の欠乏には mTOR 複合体を介した感知メカニズムが広く知られている。一方、我々は非必須アミノ酸欠乏で、がん細胞は mTOR 複合体を介さない感知し適応機構を見出している。本研究では、アミノ酸欠乏の感知・適応機構の探索から新規がんの治療法の開発につながる研究を目的とする。

【方法】本研究は、低栄養のがん細胞の生存の鍵となるアミノ酸欠乏に対する新しい感知・適応メカニズムの解明を目的とし、我々が持つ独自の低栄養培養系（Osawa et al.PNAS 2011、Osawa et al.Cell Reports 201）に、アミノ酸を 1 種類ずつ添加することで、これまで他の栄養素の作用が混在し解析が困難であった 1 アミノ酸に起因する系統的な遺伝子発現解析、エピゲノム解析やメタボローム解析を正常細胞とがん（HeLa、PANC）細胞の比較から実現することを目的とし研究を行った。具体的には、我々独自の実験系を駆使して研究期間内で、1. グルタミンを基軸としたアミノ酸欠乏感知機構の解明、2. グルタミンを基軸としたアミノ酸欠乏に対する細胞適応機構の解明、及び、1、2 で同定した標的について 3. *in vivo* における抗腫瘍効果の検討、の 3 項目を検討した。

【結果】本研究では、グルタミンを基軸としたアミノ酸欠乏感知機構の解明のために、独自の低栄養培地に各アミノ酸のみを添加した培地を作製し 1 種類ずつの各アミノ酸存在下で、繊維芽細胞とがん細胞（HeLa、PANC1 細胞）を 24 時間培養し、グルタミンで誘導され、ロイシンやその他のアミノ酸では変動しない遺伝子群、プロモーター、エンハンサーの同定し、上流転写因子や制御機構因子候補として、NRF や SLC 蛋白質群を同定した（未発表）。次に、アミノ酸欠乏に対する細胞適応機構の解析のため、アミノ酸各種欠乏培地でがん細胞を培養し、LC3Ⅱの蛋白発現を指標として、オートファジーの活性化の検討を行った。ロイシンなどの欠乏は、オートファジーが活性化する。一方、我々は、グルタミン欠乏が PE 合成を抑制しオートファジーを抑制する可能性を発見した。これらの標的候補に関して引き続き抗腫瘍効果を検討している。

アミノ酸の新たな感知・適応機構の解明が画期的ながん治療法につながる



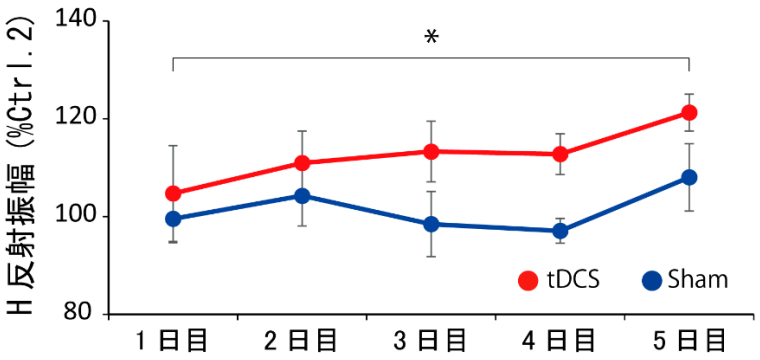
7　ヒト脊髄運動学習に伴う脳内ネットワーク再編の解明	小幡　博基

【目的】これまで意欲（やる気）という精神的なものがどのように運動機能回復に影響を及ぼすのか、その神経機序についてはよくわかっていなかった。しかしながら近年の動物実験を用いた先駆的な研究により、脳の報酬系である側坐核の機能的、構造的変化が、運動機能回復や長期間を要する運動学習課題修得の背景にあることが明らかになってきた。一方、ヒトにおいては、“ほめる”という社会的報酬を与えることで運動学習の記憶がより強固に定着することや金銭的報酬を与えることで脊髄反射や皮質脊髄路からの応答（入出力特性）を学習することが可能であることが報告されている。しかしながら、これらのヒトにおける研究結果は社会的・金銭的報酬が運動学習に影響を与えることを示したものではあるが、ヒトにおける脳の報酬系の活動がどのような機序をもって中枢神経系の可塑性促進と関係するのかを示したものではない。本研究の目的は、報酬系の活性化が中枢神経系の可塑性を促進するか否かをヒトにおいて明らかにすることである。

【方法】本研究ではH反射のオペラント条件付けを脊髄反射の学習課題として行った。H反射オペラント条件付けは、H反射振幅の変化と金銭的報酬を関連付けることで、脊髄反射興奮性の亢進あるいは抑制を長期間のトレーニングにより誘導する方法である。先行研究のプロトコルに従い、ヒラメ筋 H 反射振幅増大の成功率に応じて金銭的報酬が加算されるトレーニングを計5日間行った。本研究ではトレーニング中の報酬系の活動レベルを高めるために、背外側前頭前野への経頭蓋直流電気刺激（tDCS）を行った（n＝11）。また比較条件として、別グループにおいて偽刺激（Sham）を行った（n＝11）。1回のトレーニングは、tDCS/Sham 前のベースライン試行（Ctrl.1）、H反射振幅増大が要求される条件付け試行、tDCS/Sham 後のベースライン試行（Ctrl.2）と条件付け試行から構成された。

【結果】計5日間のH反射オペラント条件付けトレーングを行った結果、1日目と5日目で有意なH反射振幅の変化が認められたのは tDCS/Sham 後の条件付け試行のみであった。そこで、この試行の経時的変化について詳しく調べた。図は各被検者の tDCS または Sham 後の条件付け試行の平均値をベースライン試行の平均値（Ctrl.2）で標準化後、各グループの平均値を求めたものである。二元配置分散分析を行ったところ、トレーニング期間（1 日目から 5 日目）と刺激条件（tDCS と Sham）において主効果が認められた（トレーニング期間：$F_{(4,\ 80)}$ ＝2.860、刺激条件：$F_{(1,\ 20)}$ ＝5.430、それぞれ P＜0.05）。その後の検定において各刺激条件における1日目と2日目から5日目を比較したところ、tDCS 群においてのみ1日目と5日目の有意な差が認められた（Dunnett 検定法、P＜0.05）。これらの結果から、左背外側前頭前野への tDCS は脊髄反射の運動学習を促進することが明らかになった。

H反射オペラント条件付けにおける tDCS の効果



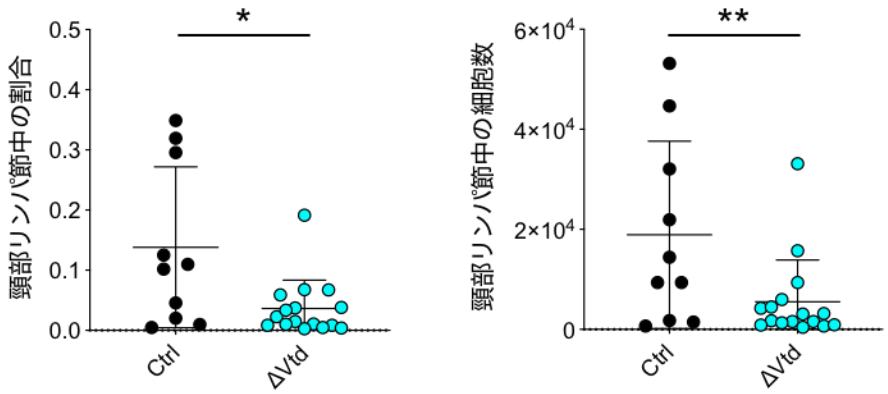
8　予防医学としてのビタミンDの免疫及び感染防御作用	金城　雄樹

【目的】ビタミン D は生体のみでは合成することができず、食事から摂取する、あるいは紫外線を介して皮膚で合成することで生体での利用が可能となる。食事や皮膚での合成で得られたビタミン D は不活性型であり、血中のカルシウム濃度に応じて腎臓で活性型ビタミンD（1,25（OH）2D）へと変換される。活性型ビタミンD はカルシウム吸収を促進させることで骨の恒常性を維持しており、その欠乏は小児ではくる病、成人では骨軟化症や骨粗しょう症の原因となる。活性型ビタミン D の核内受容体である vitamin D receptor（VDR）は骨組織の細胞のみならず免疫系細胞全般に発現が認められ、その作用を介して様々な免疫応答に関与することが知られている。とりわけビタミンD は T 細胞からの IFNγや IL-17 産生を負に制御することが報告されており、病態形成において種々の炎症性サイトカインが重要とされる様々な疾患の予防に重要であることが示唆されている。しかし、感染症を予防するワクチンの免疫応答におけるビタミンD の重要性に関しては明らかになっていない。

【方法】これまでに私たちは、生体内のナチュラルキラーT 細胞（NKT 細胞）というリンパ球の活性化を利用した新規肺炎球菌ワクチンを樹立している。そこで、当該ワクチン経鼻投与によって誘導される抗体産生応答においてビタミンD の作用を明らかにする目的で、ビタミンD 欠乏飼料を長期摂取させたマウスを用いて解析を行った。また、活性型ビタミンD であるカルシトリオールを経鼻投与することで、ワクチン効果への影響を調べた。

【結果】長期のビタミン D 欠乏飼料摂取により、当該ワクチン効果の指標であるワクチン抗原特異的な胚中心 B 細胞（GC B 細胞）の誘導が有意に低下することがわかった。また、この低下は当該ワクチンの効果をもたらすキープレーヤーである濾胞性ヘルパーNKT 細胞（NKTfh 細胞）分化が損なわれていることによる可能性が示唆された。一方で、活性型ビタミン D であるカルシトリオールの過剰摂取は NKTfh 細胞分化誘導を促進することはなかった。そのことから、ビタミンD はNKTfh 細胞分化に重要な役割を担うものの、過剰量投与により NKTfh 細胞分化の増強効果をもたらすものではないことが示唆された。実際に、所属リンパ節ではビタミン D 欠乏飼料摂取により NKTfh 細胞分化の基盤となる NKT 細胞サブセットバランスが乱れており、このことが当該ワクチン効果を損なう一つの原因となっている可能性が考えられた。これらの結果は、NKT 細胞が介在する当該ワクチンの作用におけるビタミン D の重要性を示すのみならず、ビタミン D が末梢の NKT 細胞サブセットバランスに影響を及ぼすことが示唆された。今後のワクチンへの応用及び免疫学的に重要な知見に繋がる可能性が示唆される。

ビタミンD 欠乏飼料接種マウスにおける抗原特異的GC B 細胞の誘導低下



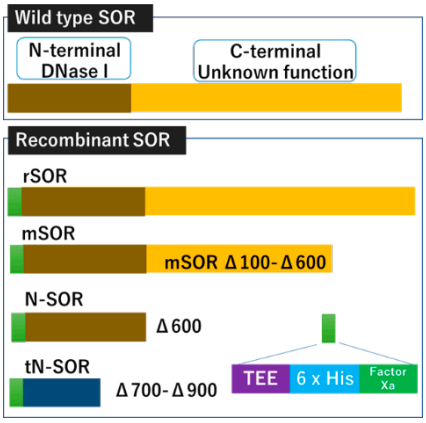
9　海綿由来蛋白質毒を用いた新規核内デリバリー素子	酒井　隆一

【目的】西表島に生息する *Spongosorites* 属海綿はジフテリア毒素といった細菌毒素に匹敵する強力なタンパク毒ソリテシジン（SOR）を含んでいる。ソリテシジンは細胞内に侵入し、核に移行することで DNA を分解し毒性を示すことが示唆されていたが詳細は不明であった。ソリテシジンの核内移行メカニズム知ることができれば、ソリテシジンもしくはその最小機能構造（mSOR）をドラッグデリバリーシステムとして利用することができる。そこで本研究では、まずソリテシジンを海綿より抽出しその構造、作用機構を解明するとともに、発現タンパク質を調製し、核内に移行する単位構造を見出すことを目指した。

【方法】海綿は沖縄県にて採集した。ソリテシジンは硫安沈殿、イオン交換カラム、ゲルろ過カラム、分取電気泳動で分離するとともに、変性 SOR をウサギに接種し抗体を作製した。ソリテシジン のアミノ酸配列はエドマン分解および LC-MS/MS による *de novo* ペプチドマッピングにより解析した。海綿から抽出した mRNA およびゲノム DNA を用い遺伝子を取得した。ソリテシジンの細胞内での挙動はソリテシジンを FITC ラベル化し共焦点レーザー顕微鏡で調べた。作用機構の解明にはエンドサイトーシスおよび逆行輸送阻害剤を用いて、ソリテシジンの毒性を軽減するか否かを指標に調べた。ソリテシジンの縮小変異体（mSOR）は前 947 アミノ酸残基の C-末端側から 50 残基ずつ削除し、大腸菌で発現し用いた。

【結果】ソリテシジンは N-末端側に 310 残基程度の DNase-I および C-末端側に 650 残基程度の機能未知配列、計 947 残基からなる新規の一本鎖ペプチドで、細胞に侵入し核内に移行する能力を持つ毒素であることを立証した。各種阻害剤を用いて細胞内移行経路を検討したところ、ソリテシジンはエンドサイトーシスにより細胞に侵入、エンドゾーム成熟後に脱出、ゴルジ体を逆行して小胞に移動すること、また独自の機構で核内に侵入していることが示唆された。次に、細胞侵入から核内移行までの過程に必要な最小構造単位（mSOR）を探索するために C-末端側からアミノ酸 50 残基ずつ削除したソリテシジン変異体計 15 種を作製し、DNA 分解活性と細胞毒性を調べたところ、C-末端側 650 残基以上を削除した tN-SOR の DNA 分解活性が大きく損なわれたことから、配列解析で予想したように N-末端側 300 残基程度が DNase 活性を持つことが立証された。しかし、全長発現体を含むどの変異体にも細胞毒性は見られず、発現タンパク質では膜透過能が失われたと考えられる。この結果から、ソリテシジンにおいて：1. N-末端側約 300 残基は DNase として機能する最小単位であるが、2. N-末端の DNase 単独では細胞（核内）侵入できないことがわかった。これらの結果より、天然のソリテシジンの活性を再現するためには糖鎖を含む翻訳後修飾、ジスルフィド結合などタンパク質の構造の精密な再構築が送達体の開発には必須である可能性が高い。今後は天然ソリテシジンの物性と機能を再現するためにさらに詳細な構造解析を進めてゆく。

SOR と発現変異体



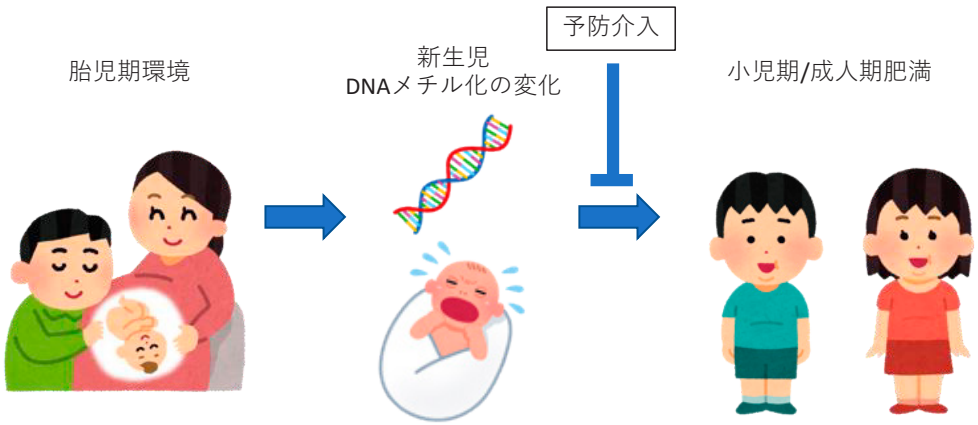
10　出生コホートを基盤とした肥満への統合的アプローチ	櫻井　健一

【目的】胎児期の子宮内環境や出生後早期の環境因子が成人期のメタボリックシンドロームや 2 型糖尿病を含む noncommunicable diseases（NCDs：非感染性疾患）の発症に関与しており、「Developmental Origins of Health and Disease（DOHaD）説」として提唱されている。このようにライフコースの早期に曝露された環境因子が長期間を経て成人期の疾患に影響を及ぼすメカニズムとしては、DNA メチル化を含むエピジェネティックな変化が想定されている。そこで、本研究では胎児期環境因子が胎児組織の DNA メチル化に与える影響を明らかにするとともに、肥満との関連を明らかにすることを目的とする。

【方法】1. 出生コホート研究「Chiba study of Mother and Child Health（C-MACH）」の参加者を対象とした。出産時に採取した臍帯の DNA メチル化と妊娠中の母体体重増加量（GWG）との相関を検討した。2. 前記検討により相関を認めたプローブを含む領域の DNA メチル化を脱メチル化するため、pPlatTET-gRNA2 プラスミドに標的領域に設定したガイド RNA 配列を組み込み、培養細胞において当該領域を脱メチル化し、遺伝子発現の変化を検討した。3. H19 遺伝子領域において DNA メチル化を改変したマウスの脂肪組織における遺伝子発現の変化を RNAseq により検討した。

【結果】1. 臍帯 DNA を用いて DNA メチル化アレイを行なった。メチル化を表すβ値と GWG との相関を検討したところ女児において六つのプローブで有意な相関を認めた。そのうち二つは同一遺伝子（gene1）上に位置していた。母体の栄養状態が胎児組織の DNA メチル化に影響を与えることが示唆された。2. gene1 上にガイド RNA を設定し、pPlatTET-gRNA2 に挿入したプラスミドを作製した。HEK293 細胞に導入したところ、DNA メチル化の低下と gene1 の発現増加を認めた。この結果、gene1 の当該領域のメチル化が遺伝子発現調節に関与していることが示唆された。今後は脂質代謝関連遺伝子への影響を検討する必要がある。3. 我々は妊娠中の母体栄養状態と *H19* 遺伝子の DNA メチル化に関連があることを報告している。そこで、*H19* 遺伝子 DNA メチル化改変マウスの脂肪組織における RNA 発現を野生型マウスと比較したところ、発現に有意な差を示す遺伝子を認めた。これらの中には脂質代謝に関連する遺伝子が含まれており、*H19* 遺伝子の DNA メチル化が脂肪細胞における機能に重要であることが示唆された。以上の結果から、胎児期環境因子が DNA メチル化の変化を介して脂肪細胞の機能に影響を与える可能性が示された。

出生時の DNA メチル化を標的とした肥満予防



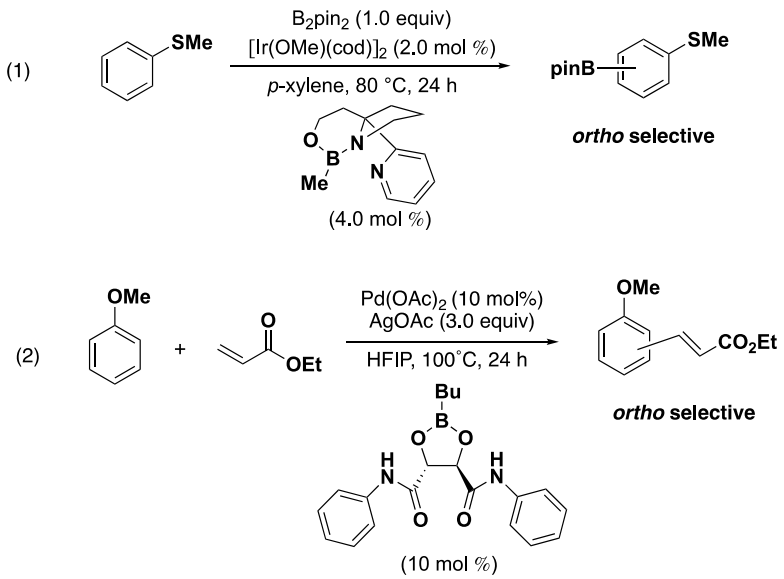
11　二官能性補助分子を活用するC-H結合直接官能基化反応	澤田　大介

【目的】本報告者は遷移金属触媒を用いた C-H activation を行う上で、位置選択性発現に配向基を必須とする、という課題を解決するべく、共有結合性配向基を必要としない位置選択的 C-H activation の開発に取り組む。本研究は炭素-水素結合直接官能基化反応の実践的な化合物合成への応用を可能にすべく、配向基の導入・除去が不要な新たな反応様式の開拓を目的とする。

【方法】共有結合性配向基を必要としない位置選択的 C-H activation の開発の手段として、配位結合により配向基の代わりとなる分子を導入することとした。その際、多くの天然物や医薬品化合物が分子内にヘテロ原子を有することに着目し、分子内ヘテロ原子のルイス塩基性を利用することを着想し、基質に配位するルイス酸性部位と触媒となる遷移金属に配位するルイス塩基性部位をもつ二官能性補助分子を用いることにより、ルイス酸–ルイス塩基相互作用により分子内ヘテロ原子の近傍の炭素-水素結合を反応点にできると考えた。

【結果】二官能性補助分子として、ボロナミドと酒石酸誘導体の二種を考案した。ボロナミドは対応するアミノアルコールとアルキルボロキシン、あるいはアルキルボロン酸との縮合により合成した。酒石酸誘導体は、酒石酸のカルボン酸部をアミドへと変換しジオール部をアルキルボロン酸と反応させることにより合成した。1. ボロナミドを用い、Ir 触媒による芳香族化合物のボリル化反応の検討を行った（式 1)。チオアニソールを基質として、Ir 触媒を 2 mol%、二官能性補助分子を 4 mol%用い、キシレン溶媒中、80℃で 24 時間撹拌した。得られた化合物の位置選択性を精査し、オルト、メタ、パラ位へのボリル基の導入比を算出した。二官能性補助分子を用いたところ、分子内にピリジンを有する二官能性補助分子では、メタ位、パラ位置換化合物と比べ 30 倍のオルト置換化合物を与えた。dtbpy を使用した従来の一般的なボリル化反応では、メタ位、パラ位置換化合物が優先して得られることから、二官能性補助分子によって位置選択性が逆転する結果が見られた。2. 二官能性補助分子：酒石酸誘導体を用いて、Pd 触媒による芳香族化合物のアルケニル化反応の検討を行った（式 2)。アニソールを基質として、Pd 触媒を 10 mol%、二官能性補助分子を 5〜30 mol%用い、HFIP 溶媒中、100℃で 24 時間撹拌した。得られた化合物の位置選択性を精査し、オルト、メタ、パラ位へのアルケニル基の導入比を算出した。この反応では、二つのアルケニル基が導入された化合物の副生も確認された。文献値ではパラ位への置換基導入が優先するが、二官能性補助分子の添加によって位置選択性に変化が見られた。特に、アミド部に芳香族化合物をもつボロン酸誘導体を用いた場合にオルト置換体の生成比が増加し、パラ位への導入よりも優先するものが見られた。

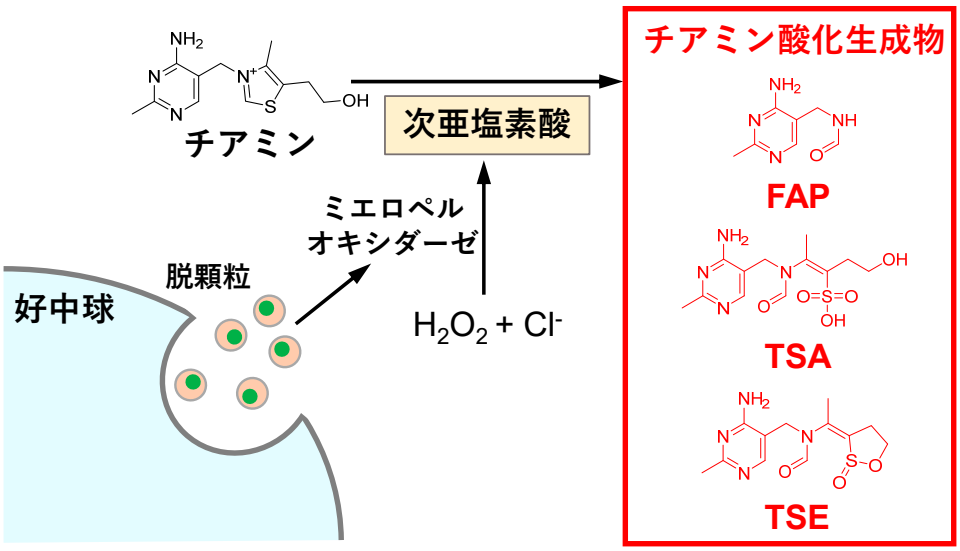
二官能性補助分子を用いた C-H activation



12　ビタミンB1由来酸化生成物の解析とその生理作用の解明	柴田　貴広

【目的】ビタミン B1（チアミン）は様々な食品中に豊富に含まれている水溶性ビタミンの一種である。生体内においてピロリン酸化されたビタミン B1 は補酵素として作用し、糖代謝や分岐鎖アミノ酸などの代謝において重要な働きを示すことが知られている。このような機能に加えて、ビタミン B1 は一重項酸素といった活性酸素種に対するスカベンジャー活性などの抗酸化性を有することが報告されている。このことはビタミン B1 自身が酸化的な代謝を受けやすいということを意味している。しかしながらビタミン B1 の酸化反応過程や酸化生成物に関する解析はほとんどなされておらず、チアミンジスルフィドやチオクロームなどのごく限られたビタミン B1 酸化生成物しか報告されていない。また生体内におけるビタミン B1 酸化物の生成や、その生理作用に関する報告は全くなされていない。そこで本研究では、ビタミン B1 に由来する酸化的代謝産物を同定し、その生理作用を明らかにすることを目的とした。
【方法】チアミンを様々な酸化剤により処理したのち、質量分析装置により解析した。酸化生成物については、単離、精製し、各種機器分析によりその化学構造を同定した。同定された酸化生成物について、質量分析装置による高感度検出定量法を確立した。この定量法を用いて、ホルボールエステルにより活性化したヒト好中球様細胞の培養上清中のチアミン酸化物の定量を行った。また、リポ多糖の投与による炎症誘導モデルマウスの肺組織におけるチアミン酸化物を定量的に解析した。
【結果】チアミンと次亜塩素酸を反応させることにより、新たに生成される三つのピークを検出した。これらの生成物の化学構造を解析した結果、formylaminopyrimidine（FAP）、thiamine sulfonic acid（TSA）、thiamine sulfinic ester（TSE）であることが判明した。それぞれの安定同位体標識物を内部標準物質とした定量法により、好中球様に分化させた HL60 細胞の培養上清において、ホルボールエステル処理により 3 種の酸化生成物が増加することがわかった。またこれらの酸化生成物はミエロペルオキシダーゼ依存的に生成されることも確認された。さらに、リポ多糖を投与したマウスの肺組織において、ミエロペルオキシダーゼの発現上昇とともに、FAP および TSE が増加することを見出した。これらの結果から、ビタミン B1 は生体内において、次亜塩素酸により酸化的代謝物へと変換されうることが示唆された。

次亜塩素酸によるチアミン酸化物の生成



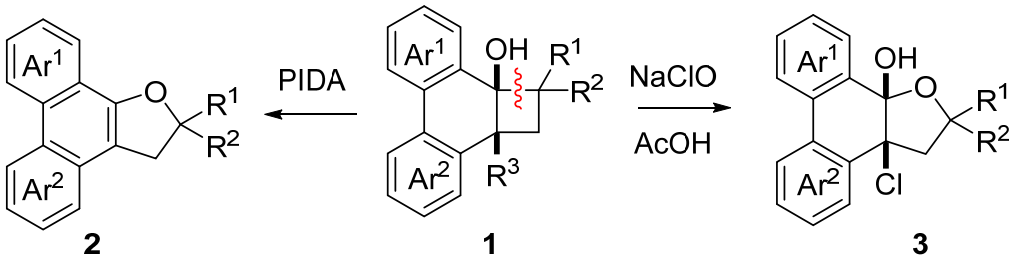
13　特異な生物機能を有する高エネルギー分子の設計と開発	高須　清誠

【目的】分子ひずみを持つ化合物は、反応化学的、構造化学的にも興味が持たれる対象である。小員環化合物はひずみエネルギーを持つため、温和な反応条件においても速やかに反応することができるが、通常の状態では安定に存在し単離可能な場合も多い。我々は、ひずみ化合物の特性の理解を深めるため、ひずみ化合物の合成法の開発、ひずみ化合物の反応性を利用した新たな合成化学的利用、および生体機能分子設計への展開について研究を進めている。本研究課題では、縮環シクロブタンの高エネルギー特長に焦点をあて、酸化刺激により構造変化して機能を発現する分子の創製を目指して検討を行った。

【方法】我々がすでに合成法を報告している芳香族縮ビシクロ［4.2.0］オクタノール 1 は、酸性や塩基性の刺激を与えるとひずみエネルギーの解消を駆動力として種々の分子変換が進行するが、ここでは酸化剤でどのような反応が進行し、生成物の性質にどのような変化がみられるか検討することとした。具体的には、酸化剤として超原子価ヨウ素反応剤および次亜塩素酸を用いて検討を行った。

【結果】酸化剤として（ジアセトキシヨード）ベンゼン（PIDA）を用いたところ、1 は速やかに反応が進行しフラン環をもつ多環芳香族炭化水素 2 を与えた。この際、π 共役が拡張することで、生成物の紫外可視吸収スペクトルは基質に比べ長波長シフトすることが明らかとなった。一方、酸化剤として次亜塩素酸を用いたところ、1 は塩素化体 3 に良好な収率で変換されることが分かった。3 は化合物 2 が脱芳香族的クロロ化（酸化）されて得られることも明らかになった。この分子変換を利用すると、酸化刺激を与えることにより光学的に OFF／ON の信号変換する物質の創製が期待できる。

芳香族縮環シクロブタノールの酸化による分子変換



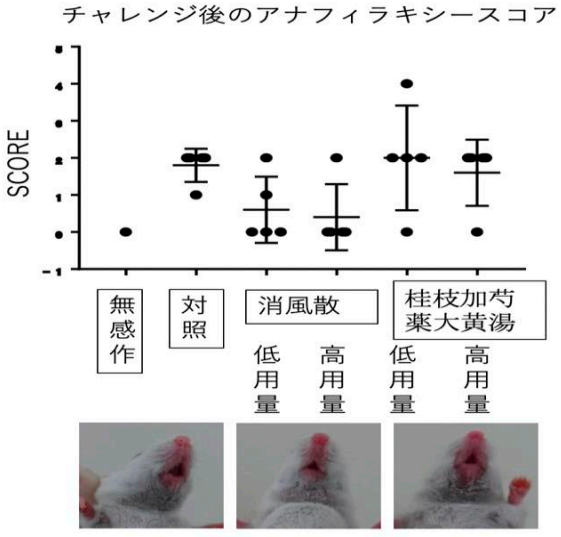
14　経皮感作食物アレルギーに対する東洋伝統薬物の有用性	常山　幸一

【目的】近年食物アレルギー患者は増加傾向にある。ミルクやそば、米などのアレルギーが多い小児患者のみならず、エビ、カニなどのアレルギーを有する成人患者も潜在的に増加しており、罹患患者は小児から成人までが食事という生の根幹において日々QOL が妨げられている。食物アレルギーの発症メカニズムには諸説があるが、近年、食物成分に含有されるアレルゲンが皮膚に接触して感作が成立するという経皮感作説が注目されている。我々は、漢方（中医学）やアーユルベーダ、ユナニ医学など 1,000 年以上に渡ってヒトへの投与が記録されている伝統医学に注目し、伝統医学で利用されている様々な生薬や伝統薬物の有用性の検討を続けている。これら伝統薬物は安全に長期間の摂取が可能なものが多く、食物アレルギーの予防・治療に有用性が高いと考えられる。本研究では、2 種類の経皮感作食物アレルギーモデル動物を用いて、東洋の知を集積した伝統薬物の中から、食物アレルギーの予防・治療能を有すると期待される 3 種類の生薬・伝統薬を選択し、その有効性を科学的に検証した。

【方法】8 週齢の雌の Balb/c マウスに 0.5 mg のオブアルブミン（OVA）を濾紙に染み込ませて背部に塗布し、感作を繰り返すことで OVA 経皮感作食物アレルギーモデルマウスを作製した。このマウスに、種々の濃度のモリンガを餌に混じて持続投与し、OVA を経口負荷（チャレンジ）した後に直腸温と血清 IgE 値を検討し、モリンガの食物アレルギー抑制効果を検証した。また、4 週齢の雌の Balb/c マウスに、0.1 mg のトロポミオシンを濾紙に染み込ませて背部に塗布し、感作を繰り返すことでトロポミオシン経皮感作食物アレルギーモデルマウスを作製した。このマウスに消風散や桂枝加芍薬大黄湯を低用量、あるいは高用量投与し、トロポミオシン経口投与（チャレンジ）した後に直腸温と血清 IgE 値、およびアナフィラキシースコアを検討し、消風散や桂枝加芍薬大黄湯の食物アレルギー抑制効果を検証した。

【結果】OVA 感作モデルマウスの実験では、モリンガ低用量投与群は、他の群に比してチャレンジ後の直腸温の減少が軽微であった。トロポミオシン感作モデルマウスの実験では、消風散高用量群で IgE 値の上昇が抑制されており、1 回目のチャレンジ後にアナフィラキシーを生じた個体は認められなかった。2 回目のチャレンジ後も消風散低用量群、高用量群はいずれもアナフィラキシースコアが低値であった。本研究では、検討した伝統薬物それぞれに食物アレルギー抑制効果が認められた。使用した実験系が異なるため、効能を単純に比較することはできないが、アーユルベーダ、ユナニ生薬の一つであるモリンガと、漢方方剤である消風散には食物アレルギーを抑制する作用があると考えられた。

伝統薬物投与におけるアナフィラキシーの改善効果



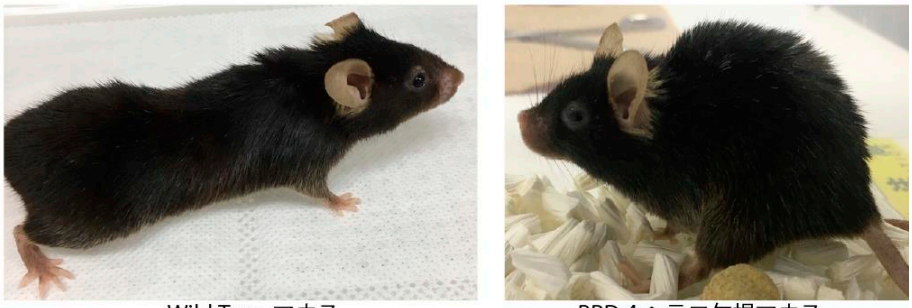
15　代謝異常からサルコペニアを呈する動物モデルの構築	望月　和樹

【目的】高齢期における代謝異常が、サルコペニア等の低栄養症状の発症の主要因であるが、代謝異常からサルコペニアを示す動物モデルは確立していない。本研究では、代謝遺伝子群の発現を促進するエピジェネティック因子 BRD4 のヘテロ欠損マウスがサルコペニアを示すか（実験 1）、BRD4 を活性化する中鎖脂肪が *Brd4* ヘテロ欠損マウスで観察されるサルコペニアを抑制できるか（実験 2）について検討することを目的とした。

【方法】実験 1．13～46 週齢の、C57BL/6J 雄野生型マウスおよび *Brd4* $^{(+/-)}$ /C57BL/6J マウスを、マウスの通常食である MF で約 100 週齢まで飼育して剖検を行い、各臓器を採取した。実験 2．54～84 週齢の雄老齢 *Brd4* $^{(+/-)}$ /C57BL/6J マウスを対照食群（con 群）、低中鎖脂肪食群（中鎖脂肪食群、対照食のラードの半分量を中鎖脂肪で置き換え）に分け、約 5 ヶ月間自由摂食させた。試験食摂取開始から約 5 ヶ月後に血漿および各組織を採取した。血中生化学指標に加え、腓腹筋のアザン染色を行うとともに、RNA マイクロアレイ解析およびリアルタイム qRT-PCR 法により、腓腹筋、ヒラメ筋の mRNA 遺伝子発現を定量した。

【結果・考察】実験 1．*Brd4* ヘテロ欠損マウスは、骨格筋重量と握力の顕著な低下および加齢性円背が認められ、老齢期サルコペニアモデルとして有用である可能性が示唆された。実験 2．*Brd4* ヘテロ欠損マウスへの中鎖脂肪の投与によって、副睾丸周囲脂肪の低下傾向が観察されたが、体重低下は観察されなかった。アザン染色により、中鎖脂肪食群では、筋線維周囲のコラーゲン蓄積抑制の傾向が伺われた。RNA マイクロアレイ解析および qRT-PCR 法により、中鎖脂肪食群において解糖系の副路であるペントースリン酸経路阻害関連遺伝子 *Cndp2*、クエン酸回路促進関連遺伝子 *Pcx*、脂肪滴分解に関与する *Plin3*、活性酸素種除去関連遺伝子 *Gpx2-ps 1* などの遺伝子の発現増大が確認された。さらに、腓腹筋において筋サテライト細胞からの筋再生に関与する *Myh3* の発現増大も確認された。一方、ヒラメ筋では、筋構成タンパク質をユビキチン化することにより筋萎縮を誘導する *Atrogin1* および *Murf1* の発現低下が観察された 。また、ヒラメ筋では、中鎖脂肪食群でタンパク合成関連遺伝子（*Rpl32*、*Rps21* など）の発現増大が見られた。以上のことから、老齢 *Brd4* ヘテロ欠損マウスにおける中鎖脂肪摂取は、体重や内臓脂肪量の低下を引き起こさないことが明らかとなった。さらに中鎖脂肪は、骨格筋の代謝が改善されるとともに、腓腹筋において筋サテライト系からの筋再生経路の活性化、ヒラメ筋において筋合成の活性化、筋分解が抑制され、サルコペニアのリスクを低減する可能性が考えられた。

Wild Type マウス（左）と *BRD4* ヘテロ欠損マウス（右）



Wild Type マウス　　BRD 4 ヘテロ欠損マウス

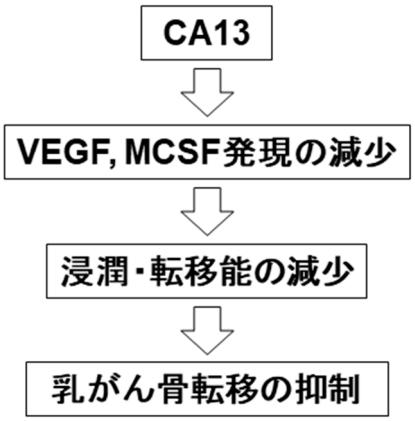
16　脂質代謝による栄養状態制御を介した乳がん骨転移機構	吉田　清嗣

【目的】近年、乳がん、大腸がん、卵巣がんなど様々ながん細胞において脂質代謝の亢進が認められ、化学療法の標的として期待されている。しかしながら、がん細胞やその低栄養微小環境における脂質代謝やその制御機構は、未だ不明な点が多く残されている。我々は、これまで乳がん幹細胞株 iCSCL-10A を用いて、乳がんの骨転移機構の解析を行ってきた。iCSCL-10A 細胞は、リプログラミング因子（OCT4、SOX2、Klf4、c-Myc）を乳腺上皮細胞株 MCF-10A に導入することによって樹立された細胞株である。本細胞株は、自己再生能、多分化能、薬剤耐性能、造腫瘍能などのがん幹細胞の性質を保持しているが、その転移能、分子機序については不明であった。そこで、*in vivo* 蛍光イメージングにより iCSCL-10A 細胞の転移の有無およびその分子機序に関わる新規因子を同定し、乳がんの転移の効果的治療法や診断マーカーの開発を目指した基礎的知見を得ることを目的とした。

【方法】近赤外蛍光タンパク質 iRFP713 を iCSCL-10A 細胞に安定発現させ、免疫不全マウスに心腔内投与し、*in vivo* 蛍光イメージングにより転移の有無を調べた。次に、iCSCL-10A 細胞の骨転移に関与する遺伝子を探索するため、骨転移巣から iCSCL-10A 細胞を単離し、網羅的遺伝子発現解析により移入前後での遺伝子発現変化を調べた。さらに、iCSCL-10A 細胞の骨転移に関わる新規候補遺伝子を過剰発現させた iCSCL-10A 細胞を作製し、浸潤能、転移能について検討した。また、乳がん患者における全生存期間、無病生存期間の検討を行った。

【結果】iCSCL-10A 細胞は、移植 4 週間後から高率に骨転移を認めた。また、骨転移巣から単離した iCSCL-10A 細胞において、細胞質型炭酸脱水酵素（CA）ファミリーの一つである carbonic anhydrase 13（CA13）の顕著な発現減少が認められた。CA ファミリーは細胞質、膜結合型などに分類され、その機能は局在により異なる。膜結合型 CA は、細胞外 pH 調節を介してがん微小環境を酸性化し、がん細胞の脂質代謝リプログラミングを活性化することにより、がんの進展・転移促進に働くことが知られている。このことから、細胞質型 CA13 は、細胞内 pH 調節を介して脂質代謝を減少させ、細胞内を低栄養状態にすることで、乳がん細胞の浸潤・転移能を抑制するというモデルの提唱に至っている。そこで、CA13 の乳がん細胞における機能を調べるため、CA13 を過剰発現させた iCSCL-10A 細胞（CA13 細胞）を作製し、検討したところ、CA13 細胞において浸潤能、骨転移能の有意な減少が認められた。次に、細胞外酸性化により発現誘導され、癌の浸潤・転移を亢進する VEGF-A、破骨細胞の分化、溶骨に関与する M-CSF の発現を調べたところ、CA13 細胞において VEGF-A、M-CSF の発現減少が認められた。さらに、CA13 高発現乳がん患者では、全生存期間、無病生存期間の延長を認めた。以上のことから、CA13 は、細胞内酸性化と VEGF-A、M-CSF の発現減少を介して、乳がん細胞の浸潤能、骨転移能の抑制、溶骨に関与する新規分子であることが明らかとなった。さらに、CA13 は、乳がんの新規診断マーカーとなりうることが示唆され、新たな治療法開発にもつながることが期待される。

CA13 による新規骨転移抑制機構



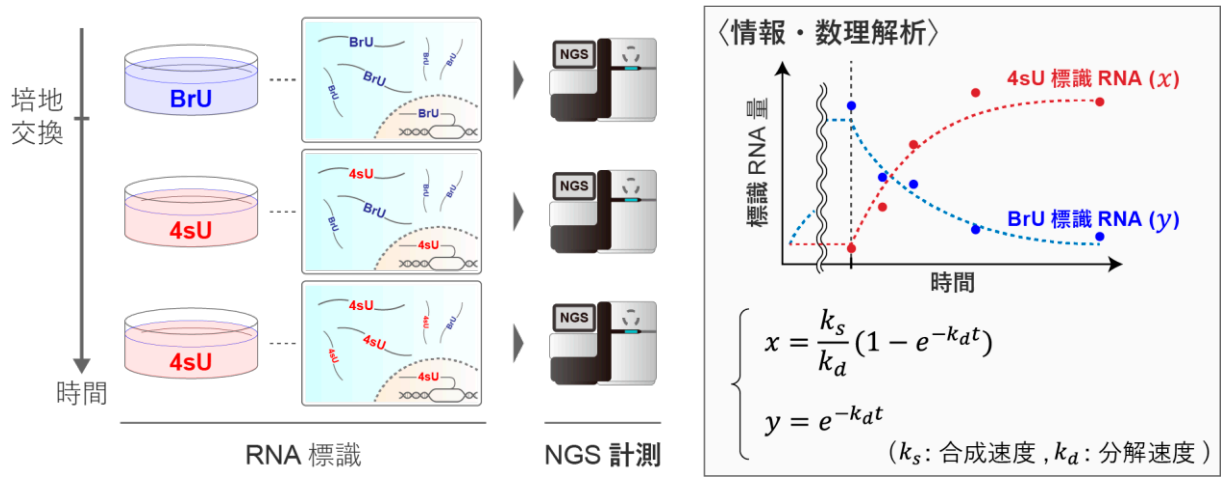
17　RNA dynamics recordingで解明するインスリン応答	秋光　信佳

【目的】遺伝子発現は細胞の状態を決定する最も基本的な調節因子の一つである。細胞内 RNA は、インスリン刺激などの様々な刺激に応答することで変動を示し、その量は合成と分解のバランスにより制御を受ける。近年、SLAM-seq や BRIC-seq など、核酸アナログによる RNA 標識を用いて RNA 合成速度や分解速度を計測する手法が多く開発されている。しかしながら、これらを同時に定量する手法は未だ存在しない。したがって本研究では、複数の核酸アナログを用いて細胞内 RNA の合成速度および分解速度を同時かつ網羅的に計測する新規手法を開発した。

【方法】本研究では、4-チオウリジン（4sU）と 5-ブロモウリジン（BrU）の同時標識を用いて、細胞内 RNA 合成および分解速度を同時かつ網羅的に計測する新規手法 “Dyrec-seq” を開発した。初めに BrU を含む培地を用いてヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞を培養し、細胞内 RNA を BrU 標識した。続いて、培地を 4sU を含むものと交換し、時系列で細胞内 RNA を回収・精製した。培地交換に伴って、BrU 標識 RNA は時間依存的な減少を、4sU 標識 RNA は時間依存的な増加を示す。次世代シーケンサ（NGS）を用いて回収した RNA を解析することにより、培地交換後の各時点における 4sU 標識 RNA および BrU 標識 RNA を情報学的に定量した。また、これらの標識 RNA の時間的変化を、微分方程式を用いた数理モデルにフィテッィングすることで、個々の RNA の合成速度と分解速度を定量した。

【結果】本研究により、4,702 遺伝子に由来する細胞内 RNA について合成速度と分解速度を同時計測した。またそれぞれの合成速度と分解速度により遺伝子を分類・機能解析を行うことで、遺伝子の生物学的機能によって RNA の合成速度や分解速度が決定されている可能性が示唆された。さらに数理解析と実測値を比較した結果、細胞内 RNA 量は合成速度および分解速度の比で決定される一方、外部刺激に対する応答速度は分解速度のみで決定されることが明らかになった。これらにより遺伝子発現プロファイルの形成には、転写のみならず RNA 分解も重要であることが明らかになった。この様に複数の核酸アナログを用いて各段階の RNA 制御を実測する手法を総称し、我々は “RNA dynamics recording” という概念を提唱している。今後は本研究で開発した Dyrec-seq を用いて、インスリン刺激に応答する RNA 合成速度および分解速度の変化を定量する。これにより、インスリン刺激に応答した遺伝子発現変動に対する転写制御および分解制御の寄与を解明する予定である。

RNA 合成および分解速度を同時定量する新規手法 “Dyrec-seq” の概要



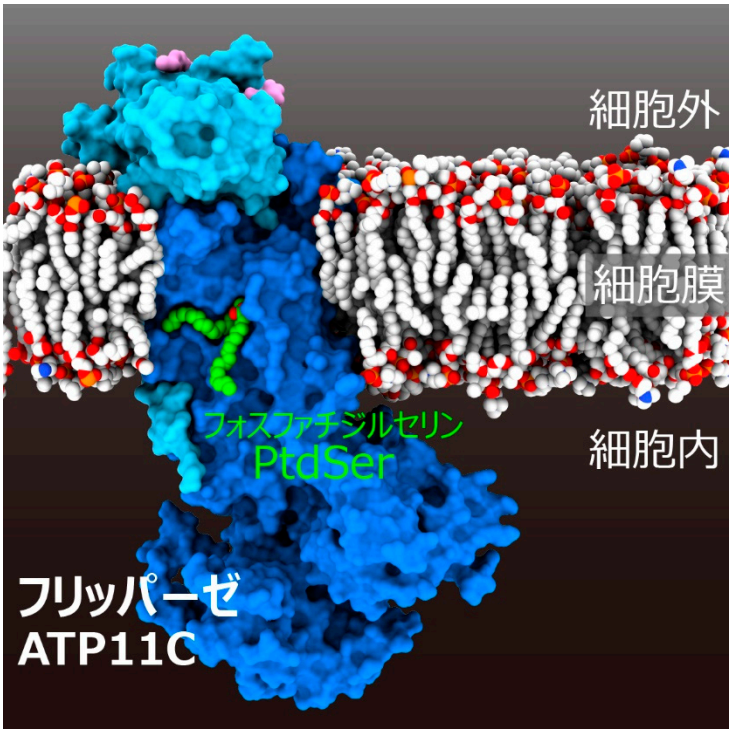
18　物質不均衡を司る能動輸送体の構造解析と創薬	阿部　一啓

【目的】細胞膜を隔てた物質不均衡分布の形成を担う P-type ATPase の中でも、特徴的かつ生理的に重要な胃プロトンポンプと脂質フリッパーゼについて、その作動機構や基質認識機構を明らかにし、これらをターゲットとした創薬に資することを目的とした。

【方法】ヒト由来培養細胞により標的タンパク質を大量発現した。界面活性剤によって可溶化、抗体カラム、ゲルろ過カラムによって精製した。濃縮した精製標品を脂質と混合し三次元結晶化に供した。結晶化条件を最適化、得られた良質な三次元結晶のみを大型放射光施設 SPring-8 BL41XU、BL45UX にてマイクロフォーカスビームによる回折データを取得した。胃プロトンポンプは単結晶から 3.0 Å、脂質フリッパーゼに関しては 1,500 個以上の単結晶からのデータをマージすることで結晶構造（3.9 Å）を得た。脂質フリッパーゼの CryoEM による構造解析は、精製サンプルをグリッドにアプライし、液化エタンを用いて急速凍結したものを、低温電子顕微鏡 (Titan Krios) によって観察した。粒子像は Gatan K3Summit によって撮影した。得られた電子顕微鏡画像は Relion 3.0 ソフトウェアによって解析し 3.0〜4.0 Å 分解能において複数の構造を得た。

【結果】1. 胃プロトンポンプの薬剤結合構造：韓国で上市された胃酸抑制剤 Tegoprazan の結合構造を 3.0 Å 分解能で解析し、その結合様式を初めて明らかにした。2. 脂質フリッパーゼの結晶構造：アポトーシスの際に死細胞が提示する Eat me シグナル、フォスファチジルセリン（PtdSer）の輸送を担う脂質フリッパーゼ ATP11C の結晶構造解析に始めて成功した。得られた構造は、細胞膜外葉から PtdSer を取り込む状態であった。変異体による機能解析と併せて、ATP11C が PtdSer を輸送する経路を明らかにした。3. 脂質フリッパーゼの Cryo-EM 構造：輸送基質である PtdSer もしくは PE が結合した三つの構造を含む、脂質輸送サイクルにおける五つの中間体、合計六つの構造を解析した。ATP 加水分解と共役した脂質の細胞膜外葉からの取り込み、閉塞に関する一連の分子メカニズムと、特異的な脂質認識機構を明らかにした。

脂質フリッパーゼ ATP11C の CryoEM 構造



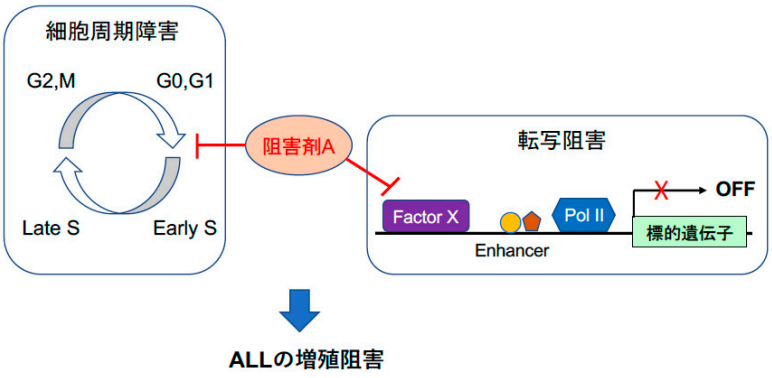
19　急性リンパ性白血病の新規治療薬の開発	伊川　友活

【目的】急性リンパ性白血病（Acute Lymphoblastic Leukemia：ALL）は小児期に発症する悪性腫瘍の中で最も頻度が高く、その大半を B 細胞性 ALL（B-ALL）が占める。小児 ALL のうち約 3／4 は何らかの染色体転座を有し、転座の結果生じる融合遺伝子が B-ALL の一因であることが知られているが、発症メカニズムの詳細は明らかでない。17;19 転座型（*TCF3-HLF* 型）ALL は B-ALL の 0.5%を占める比較的稀な転座型であるが、近年の強化された化学療法においても大部分の症例が 1 年以内に再発しており、新たな治療法の開発が急務である。そこで *TCF3-HLF* 型 ALL 細胞株および正常血液前駆細胞を用いて、B-ALL 細胞の増殖を特異的に阻害する化合物（約 3,000 個）を探索したところ、免疫プロテアソーム阻害剤やエポキシケトン阻害剤など約 10 種類の阻害候補薬が同定された。そこで本研究では、*TCF3-HLF* 型 ALL 細胞株における阻害候補薬の増殖抑制効果を *in vitro* のアッセイ系を用いて詳細に検討するとともに阻害剤の作用機序を明らかにすることを目的とする。

【方法】化合物スクリーニングによって同定された阻害候補化合物の有効性を検討した。まず、*TCF3-HLF* 型 ALL 細胞株を用いて、IC_{50}を算出した。次に、同じ培養系を用いて、化合物添加後の細胞周期およびアポトーシスを検討した。続いて阻害メカニズムを解明するために、化合物を添加した細胞としていない細胞を用いて RNA-seq 解析を行った。

【結果】候補化合物のうち阻害剤 A は *TCF3-HLF* 型 ALL 細胞株に対して高い増殖抑制効果を示した。そこで、*TCF3-HLF* 型 ALL 細胞株（YCUB2、Endokun）、1;19 転座型（*TCF3-PBX1* 型）ALL 細胞株（697）および正常細胞としてヒト臍帯血 CD34 陽性細胞を用いて阻害効果を検証した。具体的には、これら細胞株の培養液中に様々な濃度で阻害剤を添加し 48 時間培養すると、わずか 40 nM でいずれの細胞株に対しても 80%以上の増殖阻害効果が認められた。細胞株に対する IC_{50} はいずれも 20 nM 以下であった。また、この阻害剤は *TCF3-PBX1* 型 ALL 細胞株（697）に対しても有効であった。次に、阻害剤 A を 40 nM 添加して *TCF3-HLF* 型 ALL 細胞株を 8 時間培養した後に細胞を回収し、細胞周期およびアポトーシス解析を行ったところ、驚いたことに S 期の細胞が完全に消失し、アポトーシスが亢進していた。従って、阻害剤 A は低濃度でも B-ALL 細胞選択的に細胞周期を G0/G1 期で完全に停止させることが示された。続いて、阻害剤 A による遺伝子発現への影響を RNA-seq を用いて解析したところ、コントロールに比べて発現が 2 倍以上上昇する遺伝子が 856 個、低下する遺伝子が 2,644 個認められた。発現が低下した遺伝子群には、*TCF3-HLF* 型 ALL で高発現している *LMO2* や *EP300*、JAK2/3 だけでなく、細胞周期（*CDK12*、*CDC6* など）、アポトーシス（*BCL2L1*、*BAK* など）、BCR シグナル伝達（*BLNK*、*PTPN4* など）、転写・エピゲノム制御（*IKZF2*、*PAX5* など）、NF κ B シグナル（*RELA*、*TAB1* など）などが含まれており、こうした B-ALL の生存・増殖に関わる数多くの遺伝子の発現が顕著に低下していた。このことから、阻害剤 A は難治性 ALL に対する新規治療薬としての可能性があることが示唆された。

ALL の増殖を特異的に阻害する化合物



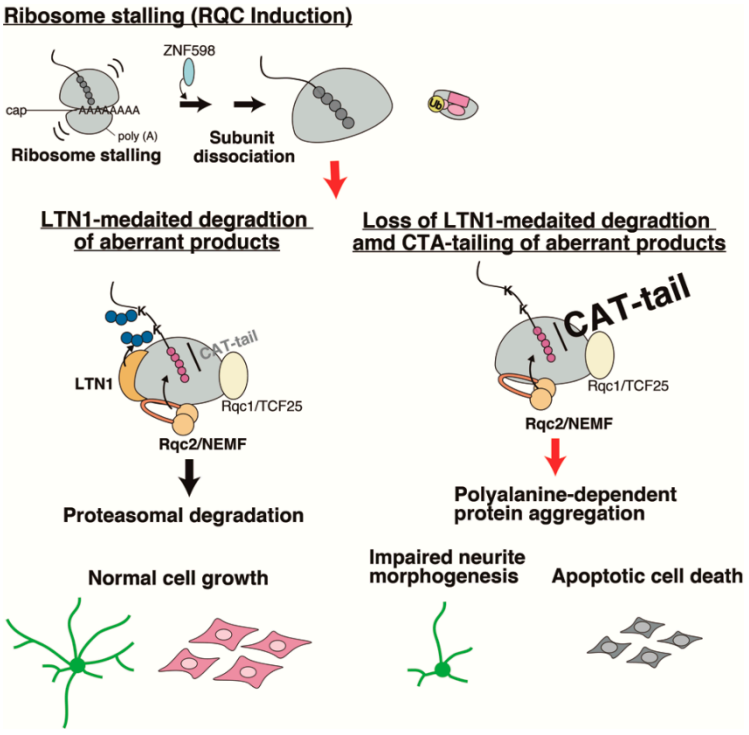
20　翻訳品質管理機構RQCの神経細胞での生理機能の解明	稲田　利文

【目的】RQC 関連因子の欠損による翻訳異常の実体や、記憶学習における RQC の機能はほとんど不明のままである。リボソーム機能の異常を認識し排除する分子機構の全体像が解明されつつある現状を踏まえ、本研究では RQC の神経細胞における機能解析を目的とした。

【方法】RQC により新生タンパク質が分解される過程では、新生タンパク質の末端に CAT テイルとよばれる、アラニンとスレオニンからなるペプチドが付加され、この配列の付加により異常新生タンパク質が効率良く分解される。一方で、RQC が破綻した際には CAT テイル化タンパク質が凝集体の蓄積を誘導することも報告されている。一方、異常新生タンパク質に CAT テイルを付加する反応は、ヒトを含む哺乳類細胞では確認されていない。本研究では、品質管理機構の破綻により神経変性が発症する原因の解明を目的に、神経初期培養細胞での神経突起伸長の阻害効果や神経細胞死とその分子基盤を解明することで、RQC の生理機能の解明を進めた。

【結果】異常タンパク質をユビキチン化し分解する E3 ライゲースである LTN1 と CAT テイル付加に必須な NMEF の発現低下条件における異常タンパク質の発現と神経細胞機能への影響を解析した。①哺乳細胞における CAT テイルの確認とアミノ酸組成解析：RQC の標的となる異常タンパク質を精製し、質量分析を行った。その結果、哺乳細胞において RQC 因子である NMEF 依存に CAT テイルが付加されること、またその特徴的なアミノ酸組成が明らかとなった。②哺乳細胞における異常タンパク質への CAT テイルによる細胞死誘導：哺乳細胞における異常タンパク質への CAT テイルの付加によって、アポトーシスが誘導されることが確認された。③マウス神経初代培養細胞の神経突起伸長における RQC の機能解析：shRNA を用いてマウス神経初代培養細胞で RQC 因子をノックダウンし、神経突起伸長を Sholl 解析によって解析した結果、RQC 因子である LTN1 による異常タンパクの分解が欠損すると CAT テイルが付加され、神経突起伸長が阻害されることが明らかとなった。以上の実験結果により、RQC の破綻による異常タンパク質への CAT テイル化が、細胞死や神経突起伸長阻害を誘導することが明らかとなった（Udagawa, Seki, Okuyama *et al.*, *Cell Rep.* 2021）。本研究成果は、タンパク質恒常性の破綻に繋がる異常翻訳の実体解明に貢献するものである。

RQC の破綻による異常タンパク質への CAT テイル化が、細胞死や神経突起伸長阻害を誘導する



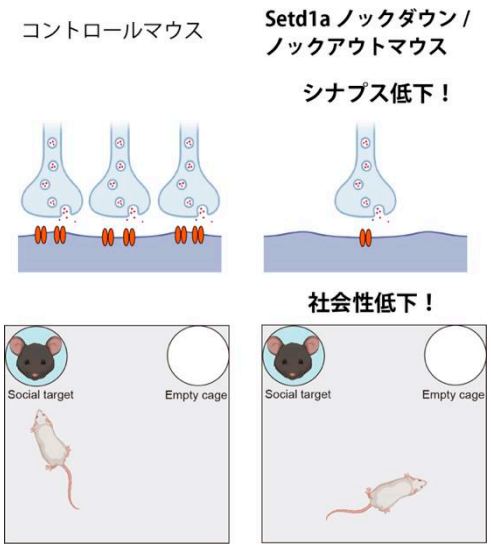
21　シナプス刈り込みの破綻による疾患発症の機構解明	上阪　直史

【目的】本研究では、遺伝性が強いとされている自閉スペクトラム症や統合失調症に着目し、それらの病態の解明や発症関連遺伝子の同定を目指した。これまでに、自閉スペクトラム症や統合失調症のヒト患者の組織を用いた大規模な遺伝子解析で、多数の遺伝子が病態に関与することが示唆されている。しかし、それらの遺伝子変異が神経細胞においてどのような機能的な異常を引き起こし、自閉スペクトラム症や統合失調症の発症にどれだけ影響を及ぼすのかよくわかっていない。これまでのモデル動物を用いた研究は自閉スペクトラム症や統合失調症の病態や発症原因として、神経細胞のシナプス機能異常がある可能性を示している。そこで本研究では、シナプス異常と行動異常を指標にそれらの精神疾患関連遺伝子の機能を解析することで遺伝子—シナプス—行動の関係を明らかにし、自閉スペクトラム症や統合失調症の病態や発症メカニズムの解明に貢献することを目指した。

【方法】この目的を達成するために、神経回路やシナプスの分子メカニズムが比較的良く調べられており、筆者が研究してきた小脳の登上線維—プルキンエ細胞シナプスと大脳皮質前頭前野シナプスを研究対象とした。小脳や大脳皮質前頭前野は精神疾患との関連が多く報告されており、遺伝子—シナプス刈り込み—精神疾患の三つの関連を調べるために最も適した神経系である。

【結果】本研究では、遺伝子—シナプス—精神疾患の関係を明らかにし、遺伝子異常によるシナプスの破綻が精神疾患様行動を引き起こすか検証するために、以下二つの研究開発項目に分けて進めた。1. シナプス異常を引き起こす精神疾患リスク遺伝子の同定：本研究では、精神疾患への関与が示唆されているエピジェネティック遺伝子群とレトロトランスポゾン LINE1 に着目し、それらの遺伝子をノックダウンした時のシナプス異常を解析した。その結果、ヒトで統合失調症のリスク遺伝子として知られている遺伝子 *SETD1A* をノックダウンしたときに神経細胞同士の機能的な結合を反映する興奮性のシナプス伝達が低下することを見出した。2. 精神疾患様行動に関わる遺伝子の同定：遺伝子 *SETD1A* の変異マウスを作製し、行動を調べた結果、統合失調症の陽性症状に関連する活動量の上昇、陰性症状の一部を反映する社会性行動の低下、認知機能障害の一つである作業記憶障害、意欲の低下に関連した回避行動の異常など、統合失調症の臨床的特徴をより幅広く再現することを見出した。統合失調症を含む精神疾患の発症原因の一つと考えられているヒストン修飾と、脳内遺伝子発現、シナプス機能、行動との関係を解明したことで、統合失調症の病態解明や治療戦略の開発に貢献することが期待される。

Setd1a 変異マウスにおけるシナプスと社会性の低下



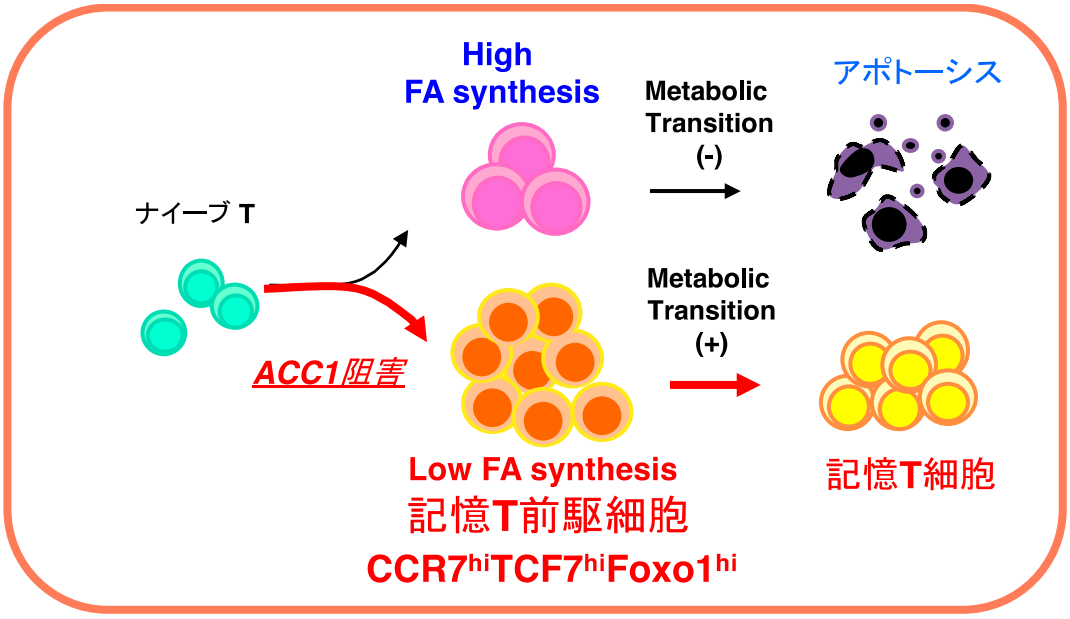
22　記憶T前駆細胞分化を司る脂肪酸代謝checkpointの解明	遠藤　裕介

【目的】ジェンナーが行った人類初のワクチンは、現在、感染症の予防や治療法として普及しているが、これは我々脊椎動物の持つ免疫システムの中枢である「免疫記憶」の原理を利用している。生体内で長期間生存する抗原特異的記憶 T 細胞は免疫記憶の司令塔としての役割を担っているが、どのような特徴を示す細胞が、いかなるメカニズムで記憶 T 細胞になり、生体内で長期間生存するのか？未だ不明な点が多い。記憶 T 細胞は静止期の細胞で、活性化したエフェクターT 細胞の一部から生まれる。活性化した細胞（ATP の消費による Anabolic な代謝中心）からどのように静止期（ATP を産生する Catabolic な代謝中心）の記憶 T 細胞が生み出されるのか？もしかしたら、代謝経路をコントロールすることで記憶 T 細胞の産生を制御できないか？という挑戦的な疑問に対して答えを出すべく、「免疫記憶を代謝で制御する」ことを目指す。

【方法】本研究では T 細胞の脂肪酸代謝不均一性に焦点をあて、記憶 T 前駆細胞の遺伝子発現プロファイルの解明を行うため、グローバルな single-cell RNA 解析を行った。また、記憶 T 前駆細胞を特徴付ける遺伝子群を明らかにするため、ハイスループットな Cas9 システムを用いてメカニズム解析を推進した。さらに、記憶 T 前駆細胞がどのような環境シグナルを介して誘導されるのか？様々なサイトカインによる脂肪酸代謝、および記憶 T 前駆細胞分化への影響について解析を行った。

【結果】Single-cell RNA 解析を用いて、記憶 T 前駆細胞の遺伝子プロファイルを単一細胞レベルで解析したところ、*Ltb4r1*、*Casp9*、*Prdm1*（*=Blimp1*）などエフェクター機能、細胞死、および細胞疲弊と関連の強い遺伝子群は低く、一方、*Klf2*、*Tcf7*、*Foxo1* など記憶 T 細胞の形成と関連の深い遺伝子群は高発現が認められた。これらの因子についてさらに Cas9 システムを用いて記憶 T 前駆細胞形成への作用について解析を行ったところ、*Tcf7* や *Foxo1* の遺伝子欠損により細胞生存能の低下が示された。また、IL-4、IL-12、および IL-6 などの各種 Th サブセット特異的なサイトカインの濃度依存的に脂肪酸合成酵素の発現の増強が認められ、逆に Tcf7 や Klf2 などの発現量は低下することが明らかとなった。

不均一な脂肪酸代謝による記憶 T 前駆細胞の誘導



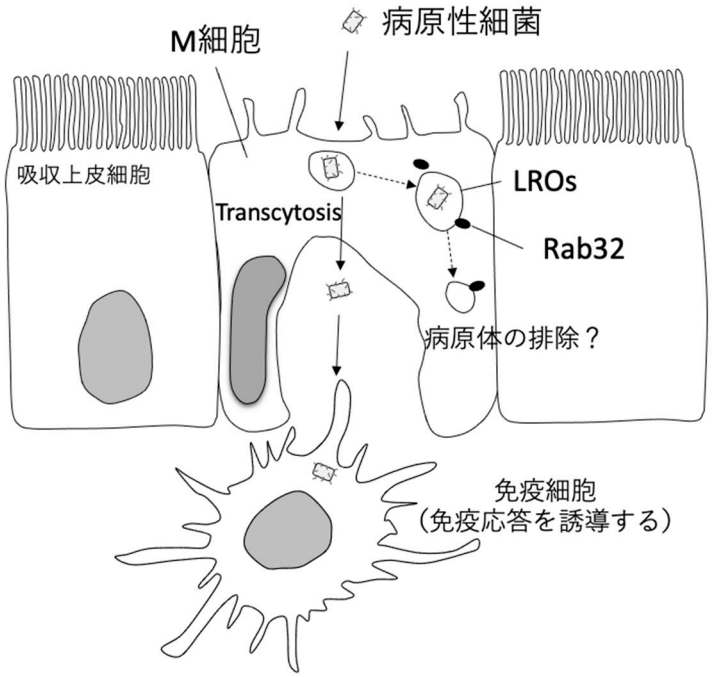
23　腸内細菌に対する免疫応答に重要なM細胞の総合的理解	大野　博司

【目的】M 細胞は腸管における免疫応答の誘導の開始点としての役割を担っている。これまでに筆者は M 細胞に GP2 などの分子が発現することを見出し、これらが特定の細菌の取り込み受容体として機能することを明らかにした。他にも様々な分子が M 細胞に発現することが見出されているが、その殆どが M 細胞の機能と結びつけられておらず、特にトランスサイトーシスに関わる分子は全く同定されていない。本研究では M 細胞のトランスサイトーシスの仕組みを明らかにするため、細胞内の小胞輸送を制御する低分子量 G タンパク質である Rab ファミリーに着目した。

【方法】M 細胞に発現する Rab ファミリー遺伝子を同定するため RNA-sequence 解析を行った。Rab32 のタンパク質レベルでの発現を解析するため抗 Rab32 抗体を用いた免疫染色を行った。

【結果】RNA-sequence の結果、Rab32 が FAE において高発現することが見出された。免疫染色の結果、M 細胞は Rab32 を発現することが明らかとなった。Rab32 の細胞内局在を観察したところ、リソソームおよびリソソーム関連オルガネラ（lysosome-related organelles : LROs）のマーカーである Lamp-1 と共局在することが観察された。よって Rab32 は M 細胞のリソソームもしくは LROs に局在することが明らかとなった。

M 細胞は Rab32 を発現する



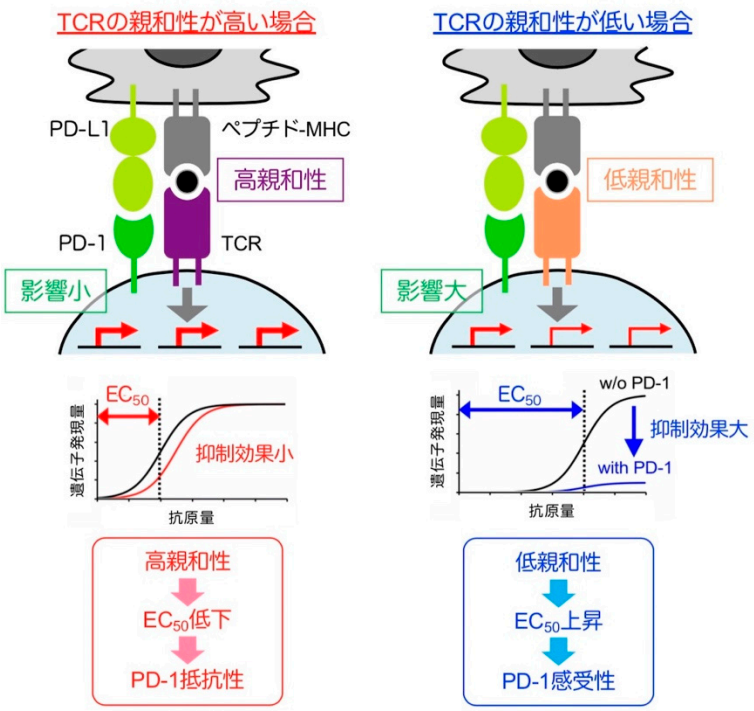
24　PD-1によるT細胞活性化制御機構の解明	岡崎　拓

【目的】獲得免疫応答において主要な役割を担うT細胞は、細胞表面に発現する抗原受容体（T細胞受容体：TCR）が抗原提示細胞上のMHC分子に提示される抗原ペプチドを認識することにより活性化を開始する。抗原特異的なTCRシグナルに、多様な興奮性および抑制性の免疫補助受容体を介した免疫補助シグナルが組み合わさり、T細胞の活性化の程度および活性化後の機能が決定される。近年、抑制性免疫補助受容体であるPD-1およびCTLA-4を標的としたがん免疫療法の成功により、抑制性免疫補助受容体は大きな注目を集めている。実験動物およびヒトを対象とした様々な研究から、PD-1は自己に対する不適切な免疫応答やがん免疫応答を抑制する機能を担うことが明らかになっているが、依然、その機能には多くの謎が残されている。特に、PD-1が実際にどのようなT細胞を抑制しているのか、PD-1阻害によりそれらのT細胞がどのように変化するのかについては、多くの研究報告があるものの、明確な解答は得られていない。そこで本研究では、T細胞の応答特性がPD-1による抑制効果に与える影響を解析した。

【方法】同一の抗原に対して異なる親和性を有するTCRを発現するT細胞を抗原刺激し、発現が誘導される遺伝子のEC_{50}とPD-1感受性を評価した。また、MHCの発現量が異なる抗原提示細胞を用いてT細胞を抗原刺激し、抗原刺激応答性に発現するレポーター遺伝子のEC_{50}とPD-1感受性を評価した。

【結果】TCRの抗原親和性が低い場合ほど、PD-1による抑制効果が強く認められた。MHCの発現量は遺伝子発現誘導に必要な抗原量は大きく変化させたが、PD-1 感受性には影響を与えなかった。これらの結果から、PD-1 は個々のTCRから伝えられるシグナルの強度が低い場合ほど、強い抑制効果を示すことが示唆された。

TCRの抗原親和性が低い場合ほどPD-1による抑制効果が強く認められる

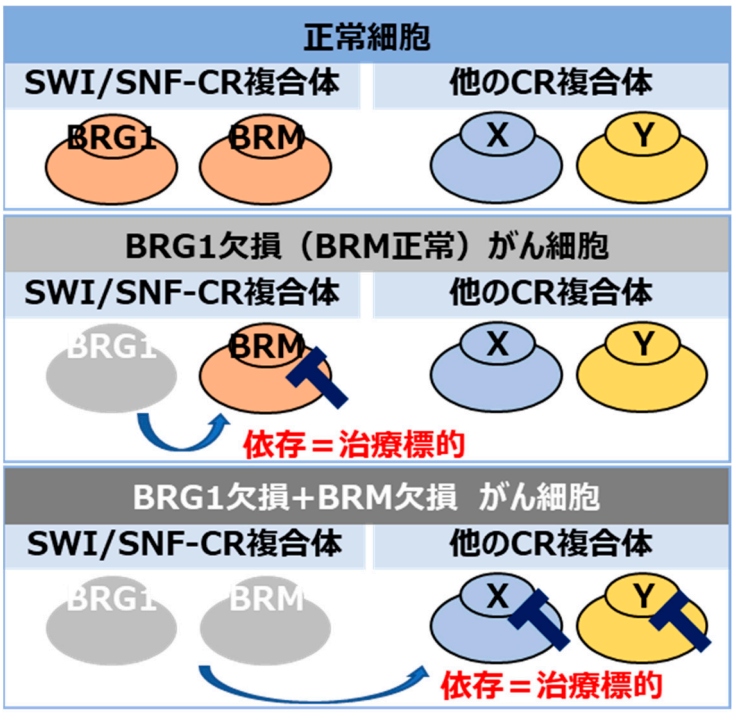


25　SWI/SNF複合体欠損がんにおける合成致死治療法の開発	荻原　秀明

【目的】SWI/SNF クロマチンリモデリング複合体は、BRG1 を含む複合体と BRM 含む複合体から成るクロマチンリモデリング複合体ファミリーの一つである。BRG1 と BRM の両方が欠損したがん（SWI/SNF 欠損がん）が、非小細胞肺がん（10%）、肺大細胞がん（31%）、肺多形がん（23%）、小細胞卵巣がん・胸部肉腫（100%）で存在する。SWI/SNF 欠損がんはいずれのがん種においても未分化がんであり悪性度が高く予後の悪いがんである。とくに難治がんである肺腺がんは毎年 50 万人以上の死因となる。そして肺腺がんの 10%（5 万人以上）で BRG1 と BRM が両方欠損している。そこで本研究では、SWI/SNF 欠損がんにおける有望な治療標的を同定することで、SWI/SNF 欠損がんを対象とした合成致死治療法の開発を目指す。

【方法および結果】SWI/SNF 欠損がんが依存するクロマチンリモデリング複合体を探索するために、ヒト細胞で 20 種類ほど存在するクロマチンリモデリング複合体の ATP 加水分解酵素因子（複合体の機能に必須因子）を siRNA でノックダウンしたときに、SWI/SNF 欠損型細胞株で選択的に致死性を示す複合体因子を探索した。その結果、X 複合体と Y 複合体を同定した。X あるいは Y を抑制したとき、正常型細胞株（WT: $BRG1^{+}/BRM^{+}$）にはほとんど影響が認められなかったが、SWI/SNF 欠損型（$BRG1^{-}/BRM^{-}$）細胞株群で特異的に生存率が顕著に低下した。しかし、BRG1 単独欠損細胞株（$BRG1^{-}/BRM^{+}$）では、X あるいは Y を抑制しても、生存率の低下は部分的にしか認められなかった。さらに、SWI/SNF 欠損型（$BRG1^{-}/BRM^{-}$）細胞において、X あるいは Y を抑制することで細胞が死ぬ現象が、BRG1 と BRM の両方が欠損していることに特異的な現象であるかを検討するために、SWI/SNF 複合体欠損型細胞株（$BRG1^{-}/BRM^{-}$）SBC-5 における *BRG1* の cDNA を導入した細胞株（+BRG1）を樹立した。SWI/SNF 複合体欠損型細胞株（$BRG1^{-}/BRM^{-}$）SBC-5 において、X あるいは Y を抑制すると致死性を示したが、BRG1 を強制発現させると、その致死性は救済された。これらの結果から、BRG1 と BRM の両方が欠損した細胞は、細胞生存のために X あるいは Y に依存していることが考えられた。このように本研究では SWI/SNF 欠損がんに有望な治療標的としてクロマチンリモデリング複合体因子 X および Y を同定した。

本研究の概念



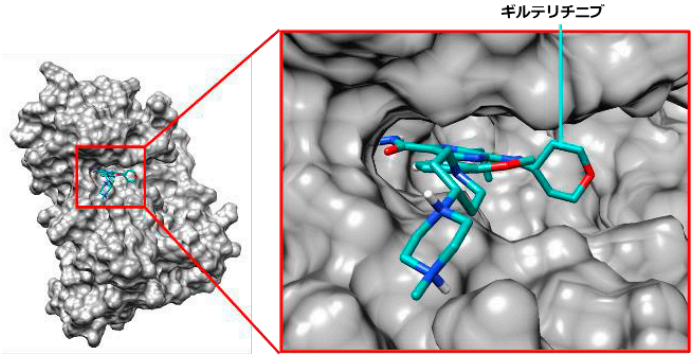
26　がん遺伝子産物の過剰活性化を応用した新規治療法探索	片山　量平

【目的】次世代シーケンサーを用いた包括的解析が進み、肺がんをはじめ様々ながんにおいて、がんの遺伝子変異の“カタログ”情報が蓄積されてきている。それにより、これまでも言われてきたことではあるが、一つのがんには概ね一つのドライバーがん遺伝子のみが存在し相互排他的である、ということも改めて確認されてきている。しかし、なぜドライバーがん遺伝子の存在が相互排他的であるかについての分子基盤はほとんど明らかになっていない。ドライバーがん遺伝子陽性の肺がんは、分子標的薬に著効を示す一方でほとんどの症例で耐性を獲得して再発してしまうが、我々は、EGFR 活性化変異や、ALK、ROS1 融合遺伝子陽性肺がんにおける各種 EGFR／ALK／ROS1 阻害薬耐性機構の研究を臨床サンプルと培養実験系の両方を対比させながら行い、種々の耐性機構を明らかにしてきた。これらの研究の過程で我々は、がんが「阻害薬」への耐性を獲得していく段階で逆に阻害薬に依存して生きている現象も発見してきた。そこで本研究では、肺がんを中心に、がんの治療薬抵抗性機構の探索しつつドライバーがん遺伝子の相互排他性に関わる分子基盤を解明し、ドライバーがん遺伝子産物の活性制御が治療へ応用できるかを探ることを目的とした。

【方法】肺がん、中でもドライバーがん遺伝子陽性の肺腺がんを中心に、EGFR 活性化変異、ALK、ROS1、NTRK 融合遺伝子陽性の患者由来がん細胞株（分子標的薬治療前および耐性獲得後の検体由来）や、購入可能なドライバーがん遺伝子陽性がん細胞株、Ba/F3 や NIH3T3 細胞にドライバーがん遺伝子を過剰発現させた細胞を作製し、細胞増殖試験、薬剤感受性試験、マウスゼノグラフトモデルでの抗腫瘍効果、シーケンス解析等の手法を用いて性状解析を行う。

【結果】本研究を遂行するために、がん分子標的薬による治療を計画されているまたは治療を受けている、治療を受けた患者からの検体（胸水や生検の残余検体など）を収集し、遺伝子変異等の解析を進めるとともに、細胞株を樹立してその性状解析、薬剤耐性時の検体の場合には耐性機構の探索、更には耐性克服法の探索を行った。そして、並行して分子標的薬が存在するときにより腫瘍増殖が促進される様な細胞株も発見し、背景にある分子機構の解析を進めた。その結果これまでに、*ALK* 融合遺伝子陽性肺がんにおいてあらゆる承認済み ALK 阻害薬に耐性を示す変異体にも有効な薬剤としてギルテリチニブを発見した。ギルテリチニブは、耐性変異のない ALK 融合タンパク質だけでなく、様々な単独および重複変異体にも高い阻害活性を示すこと、ALK と相同性の高い ROS1 や NTRK1 にも高い阻害活性を示すこと、AXL の過剰発現を介した ALK 阻害薬耐性にも単剤で抗腫瘍効果を示すことを発見した。また、EGFR 変異陽性肺がんにおいては、現在第 1 選択薬として使用されているオシメルチニブ（第 3 世代 EGFR 阻害薬）を、かつて使用されてきた 2 次治療以降での使用（第 1、2 世代 EGFR 阻害薬に耐性となり EGFR T790M 変異が確認された症例）の時に見られる獲得耐性変異のモニタリングと、未同定の耐性機構の探索を行い、血中モニタリングにより耐性変異が臨床画像評価に先んじて変動すること等を発見し報告した。また、低頻度に存在する EGFR 活性化変異（今回は L747P 変異）が、どのようにして EGFR を恒常的に活性化し、いくつかの EGFR 阻害薬に耐性を示すのかを、長時間の分子動力学シミュレーションにより明らかにすることができ、報告した。一方、薬剤存在下で増殖が促進する（薬剤非存在下でやや増殖が阻害される）耐性細胞やモデル細胞の樹立にも成功し、それらがある阻害薬に特異的に感受性を示すことにも成功し、そのメカニズムの詳細な理解と一般化可能性については今後さらなる検証を行う予定である。

ALK にギルテリチニブが結合している様子の予測モデル



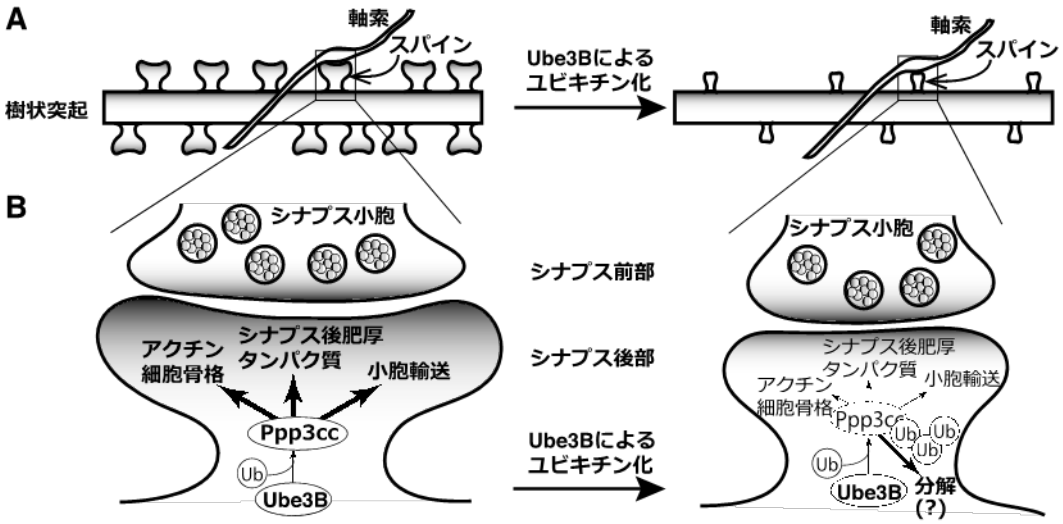
27　カウフマン症候群原因遺伝子*Ube3B*の機能の解明	川辺　浩志

【目的】知的障害は、中枢神経系の発達異常が原因となる疾患で、その有病率は約 1%に達する。知的障害を伴う全身の発達障害の一つに Kaufman oculocerebrofacial syndrome（KOS）があり、ユビキチン化を触媒する E3 リガーゼ遺伝子 *Ube3B* がその原因遺伝子として報告されている。しかしながら、神経細胞での *Ube3B* の機能は不明な点が多い。我々はすでに脳特異的 *Ube3B* 条件付き欠損マウス（*Ube3B*bcKO）を作製した。*Ube3B*bcKO の海馬神経細胞ではシナプス後部が含まれるスパインの数が増加し、スパインヘッドが拡大していた。この結果から、*Ube3B* はスパイン数を減少させてスパインヘッドを縮小させる機能を持つと結論した（下図）。KOS では、スパインを介したシナプス伝達に異常がある可能性が考えられたが、神経細胞での *Ube3B* の機能と KOS の発症機構は十分に明らかになっていない。本研究では、Ube3B を介したユビキチン化によるスパイン形成の制御機構を超解像 STED 顕微鏡によって解明する方法の開発を目的とする。

【方法】本研究が始まる前に、すでに Ube3B の基質としてカルシウム・カルモジュリン依存的セリン／スレオニン脱リン酸化酵素 Calcineurin の触媒サブユニットである Ppp3cc を同定していた。しかしながら、そのユビキチン化の生理学的性状解析は不十分であった。本研究では、超解像 STED 顕微鏡を用いて Ube3B による Ppp3cc のユビキチン化の生理的意義を明らかにするための手法を立ち上げた。

【結果】生化学的に Ube3B が Ppp3cc に対してプロテアソームに認識されるタイプのポリユビキチン鎖（K48 鎖）を融合することが明らかになった。この結果から *Ube3B* bcKO の神経細胞では Ppp3cc が分解されないために、その発現量が増加してスパイン数の増加とスパインヘッドの拡大につながる可能性が考えられた。この可能性を検討するために野生型神経細胞にリコンビナントの Ppp3cc を過剰発現させたところ、*Ube3B*bcKO と同様の表現型を示した。この結果を形態学的に詳細に解析する目的で、超解像 STED 顕微鏡を用いてスパインと細胞骨格を観察する実験系を立ち上げることに成功した。本研究で使った超解像 STED 顕微鏡を応用して、神経細胞内の細胞骨格の形態を観察したところ、すでに報告されているように F-アクチンと微小管の微細形態を観察することができた。さらに脳組織内でも細胞骨格の微細形態を観察することに成功した。今後はこれらの手法を *Ube3B* bcKO の解析に使って Ube3B と Calcineurin の活性がどのように細胞骨格を制御してスパインと樹状突起の形態形成を制御するか解析していきたい。

Ube3B によるスパイン数とスパイン形態の制御機構



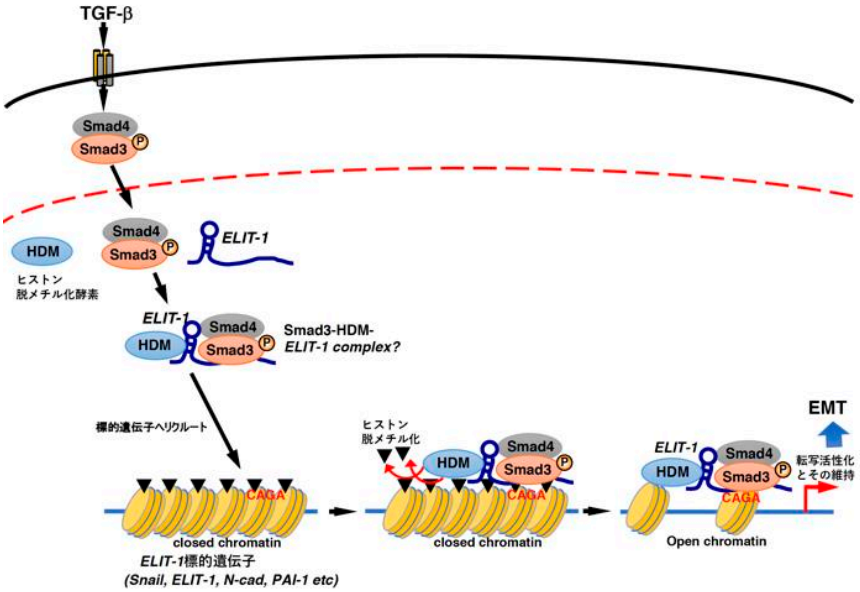
28　ヒストン脱メチル化の遺伝子特異性を担う長鎖ncRNA	北川　雅敏

【目的】我々はTGF-βで誘導され上皮間葉転換（EMT）に関与する新規長鎖ノンコーディングRNA（lncRNA）として *ELIT-1*（EMT-promoting lncRNA induced by TGF-1）を見出した。*ELIT-1* はTGFβ刺激に反応する多種の細胞株で誘導された。*ELIT-1* 遺伝子の上流にSmad結合配列があり、TGF-β－Smad経路を介して *ELIT-1* は転写誘導された。*ELIT-1* の機能においては、*ELIT-1* はTGF-β－Smad経路による *Snail*、*N-cadherin*、*vimentin*、等のEMT関連遺伝子の転写を促進し、EMTを正に制御していることが示唆された。*ELIT-1* は標的遺伝子のプロモーターへのSmad3のリクルートを促進することにより *Smad3* の遺伝子発現を助けるlncRNAであることが示唆された。一般に転写活性な遺伝子上ではヒストンのメチル化修飾の変動によりクロマチン構造の弛緩が誘導されるが、このエピゲノム制御の遺伝子特異性のメカニズムは不明である。我々は *ELIT-1* がエピゲノム因子と結合して、TGF-β－Smad3経路の標的遺伝子のエピゲノム制御を担っていると考え、本研究でそれを検証する。

【方法】1. *ELIT-1* の標的遺伝子の解析はマイクロアレイによって行った。2. *ELIT-1* との相互作用の解析をRIPアッセイによって行った。3. *ELIT-1* の標的遺伝子の転写誘導機構の解析をレポーターアッセイおよびChIPアッセイによって行った。4. *ELIT-1* と結合するヒストン脱メチル化酵素の解析をRIPアッセイによって行った。

【結果】1. *ELIT-1* の標的遺伝子の解析：マイクロアレイにより発現遺伝子解析を行い、ジーンオントロジー解析を行ったところ、*ELIT-1* の標的経路の多くはTGF-βの標的経路であることが判明し、*ELIT-1* はTGF-β経路の正の調節因子であることが示された。2. RIPアッセイによる *ELIT-1* とSmadの相互作用の解析：RIP-qPCR解析により、TGF-β刺激により *ELIT-1* は選択的にSmad3と結合することが示唆された。3. *ELIT-1* の標的遺伝子の転写誘導機構の解析：Smad結合配列を持つレポーター活性はTGF-β刺激により上昇し、*ELIT-1* のノックダウンで抑制された。標的遺伝子の上流領域に対するTGF-β依存的なSmad3の結合は *ELIT-1* のノックダウンにより抑制された。*ELIT-1* はTGF-β依存的にSmad3として結合し、Smad3の標的遺伝子プロモーターへのリクルートを促進し、遺伝子発現を活性化してEMTの誘導に機能することが判明した。4. *ELIT-1* と結合するヒストン脱メチル化酵素の解析：RIPアッセイによって *ELIT-1* とヒストン脱メチル化酵素（HDM）の結合を見出した。*ELIT-1* がHDMと結合してTGF-β－Smad3経路の標的遺伝子特異的なエピゲノム制御を担っている可能性が示唆された。

TGF-β－Smad3－*ELIT-1* axisとヒストン脱メチル化酵素のリンクの可能性



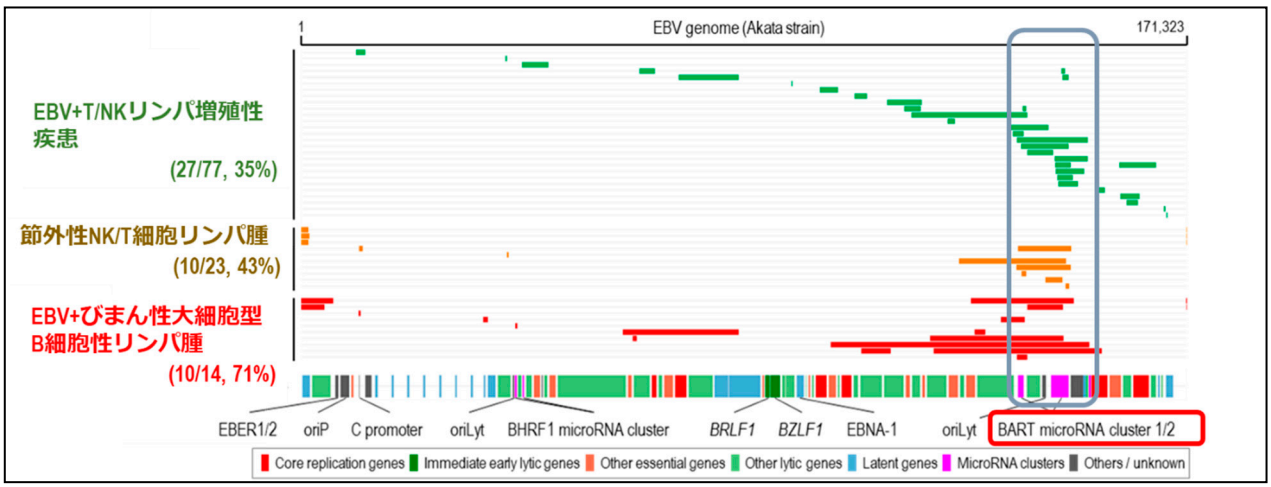
29　ウイルスmiRNAがリンパ腫発生に果たす役割の解明	木村　宏

【目的】Epstein-Barr virus（EBV）は、最も古いがんウイルスであり、リンパ球に潜伏感染し、様々なリンパ腫と関連している。最近、我々は次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析を行ったところ、EBV 関連リンパ腫では、高率に EBV 遺伝子の一部が欠失すること、また欠失が特定の領域に集中することを見出した。共通して欠質する領域には、ウイルスがコードする複数の miRNA をはじめ、これまでウイルス増殖・持続感染に促進的に働いていると考えられてきた遺伝子が存在する。一方、EBV 陽性リンパ腫の多くでは、これらの領域を欠損していることから、腫瘍化には抑制的に働いていると考えられる。本研究の目的は、ウイルス miRNA をはじめとする *EBV* 遺伝子のリンパ腫原性における役割を明らかにすることである。

【方法】先行する網羅的遺伝子解析で高頻度に欠質していた *EBV* 遺伝子を欠損した組換え EBV を作製し、細胞株を用いた *in vitro* 機能解析、および免疫不全マウスを用いた *in vivo* 機能解析により、各遺伝子役割の解明を試みた。

【結果】*EBV* 欠失は BART microRNA cluster と呼ばれる領域に最も集中していたため、まずこの領域を欠く変異ウイルスの作製を試みた。作製したウイルスはいずれも感染性を欠いたため、次のステップであるヒト初代 B 細胞やヒト化マウスへの感染実験に至らなかった。次いで 2 番目に欠失が集中していた core replication genes の一つである *BALF5*（viral DNA polymerase）を欠失させた変異 EBV を作製し、感染により樹立したヒト B 細胞株を免疫不全マウスに移植したところ、*BALF5* 欠失 EBV では野生株に比してリンパ腫形成能が増していた。また、*BALF5* 欠失 B 細胞株は野生株に比べ前初期／初期遺伝子が亢進していた。また、同様に欠質が集中していた *C promoter（Cp）* を欠損した変異ウイルスを作製し、野生株と比較したところ、*Cp* 欠損株は、野生株よりも効率的に B 細胞の形質転換を引き起こした。さらに、EBV を臍帯血単核球細胞に感染させた後に免疫不全マウスに移入するリンパ増殖性疾患モデルでは、*Cp* 欠損株は野生株に比し、病勢の進行を早めることがわかった。欠損ウイルスと腫瘍との関連については、これまでも他の腫瘍ウイルスでは多くの報告がなされてきた。しかし、EBV のように 70 以上の遺伝子を有する大型ウイルスでの遺伝子欠失の成り立ちと意義については、未だ不明な点が多かった。今回我々は、ウイルス miRNA をはじめいくつかの *EBV* 遺伝子を欠質したウイルスはリンパ腫を発生しやすいことを示した。詳細なメカニズムの解明はこれからであるが、欠損ウイルスでは、*EBV* 前初期遺伝子／初期遺伝子の発現亢進により、宿主細胞増殖と染色体不安定性が促進され、ドライバー遺伝子変異の蓄積、エピジェネッティック修飾が加わり、リンパ腫／白血病と変容すると考えている。

EBV 関連リンパ腫におけるウイルス遺伝子欠損



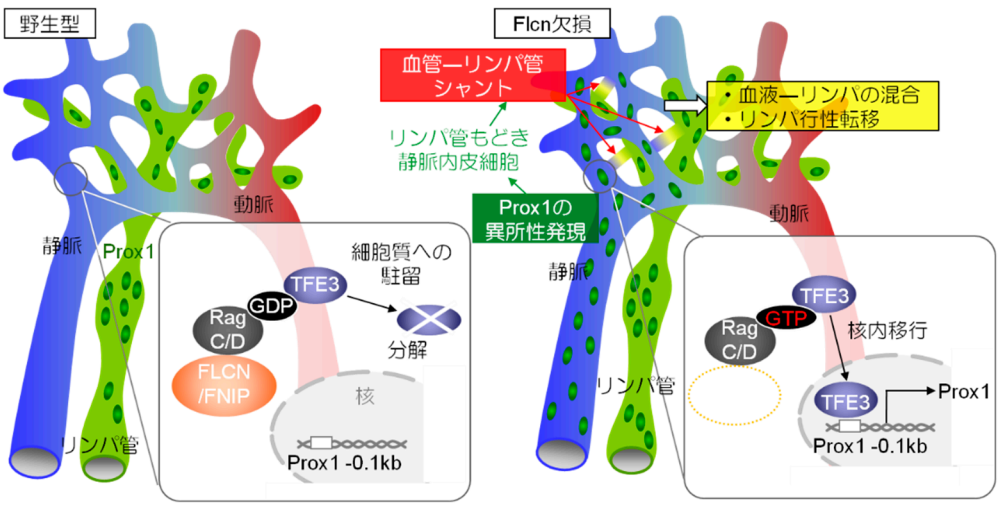
30　血管とリンパ管が独立したネットワークを構築する原理	久保田　義顯

【目的】血管とリンパ管は、別々のネットワークを全身に張り巡らせ、それぞれ独立した機能を発揮する。血管の機能としては、主に肺から取り入れた酸素を、赤血球を担体として末梢組織に運搬し、毛細血管で組織に受け渡す。一方、リンパ管は毛細血管が回収しきれなかった組織液を取り込むとともに、抗原提示細胞のリンパ節への経路、つまり免疫システムの一部として働く。血管とリンパ管は、最終合流地点である頸部の静脈角（胸管と鎖骨下静脈の吻合部位）まで一切接続すること無く、各々が独立したネットワークを形成する。血管とリンパ管、特に静脈とリンパ管の構造・組織学的特徴を比べると、ほぼ見分けがつかないほど酷似しており、両者がお互いをどのように見分け、独立性を担保しているのかは古くからの疑問として残されてきた。本研究は、放っておくと（デフォルト経路として）血管とリンパ管同志は吻合してしまうため、それを防ぐための固有の分子機構が存在するという観点からのアプローチによりその実体を同定すべく進められた。

【方法】多発性肺嚢胞、腎がん、線維毛包種などを典型的症状とする Birt-Hogg-Dubé（BHD）症候群の原因遺伝子として知られる Folliculin（Flcn）に関し、タモキシフェン誘導性血管内皮特異的 *Flcn* 欠損マウス（*Cdh5-Cre*$^{ERT2+}$*Flcn*$^{fl/fl}$）を作製するとともに、リンパ管発生のマスター転写因子である Prox1 や bHLH 型転写因子 TFE3 との重複欠損マウスを作製し、その表現系を解析した。また、培養血管内皮細胞株における、ルシフェラーゼアッセイ、ChIP 法、siRNA によるノックダウン、過剰発現の系や単一細胞 RNA シークエンスなどにより、Flcn と Prox1 とを結びつける分子経路、*Flcn* 欠損血管内皮細胞の遺伝子発現プロファイリングを行った。

【結果】出生後のタモキシフェン誘導性血管内皮特異的 *Flcn* 欠損マウスでは、静脈とリンパ管との異常吻合による静脈への血球の充満が見られた。また、Flcn が Prox1 の発現量を負に制御しており、血管内皮細胞においてこの制御が破綻すると、血管がリンパ管を接続すべき同志であると認識してしまうことを、*Prox1* とのダブルノックアウトにより見出した。メカニズムとしては、ChIP-seq において、Flcn によって核内移行が制御される TFE3 が Prox1 の E-box 配列を 2 個含む新規エンハンサー領域に結合することを見出した。また、培養血管内皮細胞株における、ルシフェラーゼアッセイ、ChIP 法、siRNA によるノックダウン、過剰発現の系により、Flcn と Prox1 の間を媒介するのが TFE3 であることを確認した。さらには、*TFE3* の欠損マウスの交配により、*in vivo* でもこの経路がワークしていることが示された。さらには、単一細胞 RNA シークエンスにより、Flcn が静脈内皮において欠損すると『リンパ管もどき静脈内皮細胞』、つまりリンパ管内皮マーカーの発現が静脈内皮細胞とリンパ管内皮細胞の中間に位置する細胞ポピュレーションが生じ、これが全身いたるところで発生することが、*Flcn* 欠損マウスにおける血管－リンパ管吻合の原因であると考えられた。

血管とリンパ管の分離が維持される仕組み



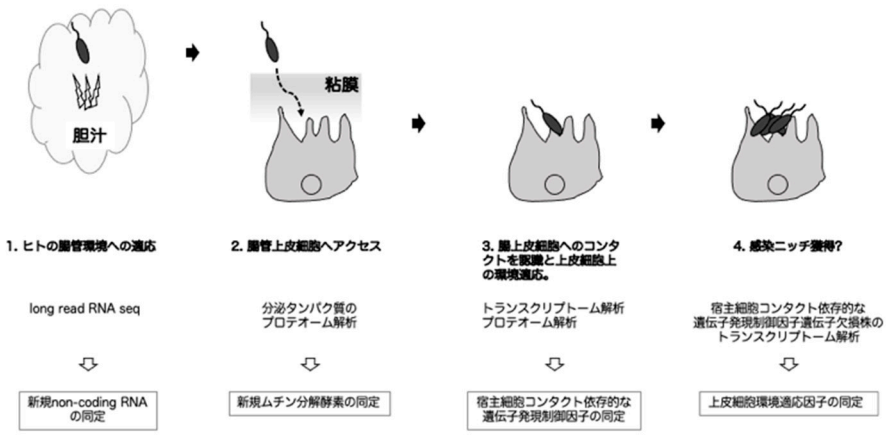
31　病原細菌の宿主環境適応機構の解析	児玉　年央

【目的】病原細菌がヒトに感染し疾患を引き起こすには、環境の変化を感知し、その環境に適応し、宿主の障壁を乗り越える必要がある。本研究では、腸管病原細菌である腸炎ビブリオをモデルにし、病原細菌の宿主環境適応機構の解明を目指した。本菌の下痢誘導には、小染色体上の *Vibrio parahaemolyticus* pathogenicity island（Vp-PAI）にコードされる 3 型分泌装置（T3SS2）が必須である。一般的に T3SS は、宿主細胞にコンタクト依存的にエフェクターと総称される機能性のタンパク質を直接注入し、様々な病態形成に寄与する。病原細菌が宿主細胞にエフェクターを効率よく注入するには、1. ヒトの腸管環境に適応し、2. 感染の場である腸管上皮細胞にアクセスし、3. 腸上皮細胞にコンタクトしたことを認識し、上皮細胞上の環境に適応する必要がある。本研究では、各ステップにおける腸炎ビブリオの遺伝子発現制御機構および分泌制御機構を解析し、宿主環境適応機構を包括的に理解することを目的とした。

【方法】腸炎ビブリオの遺伝子発現および分泌制御に関する遺伝子の欠損株を作製し、様々な培養条件におけるプロテオーム解析および RNA seq 解析を行うことで、環境適応因子の同定を試みた。同定された因子については遺伝子欠損株の作製、表現型および病原性の解析（qRT-PCR、ウェスタンブロッティング、ウサギ腸管結紮ループ試験等）を行った。

【結果】1. ヒト腸管環境適応機構の解析：ヒト腸管に存在する胆汁は、腸炎ビブリオの病原因子の発現を誘導するトリガーの一つである。ヒトの腸管環境適応機構をより詳細に解析するために、long read 次世代シーケンサーを用いた発現解析を行い、ゲノムワイドに遺伝子転写単位を決定するとともに、21 種類の新規の non-coding RNA を同定した。2. 腸管上皮細胞へのアクセス機構の解析：胆汁刺激によって発現上昇する遺伝子群の中で、腸上皮細胞へのアクセスに寄与する遺伝子のスクリーニングを行い、他の病原細菌が保有するムチン分解酵素の活性部位と相同性を持つ遺伝子（*vseM*）を同定した。*vseM* は、本菌の Vp-PAI 領域にコードされる他の病原因子と同様に胆汁刺激によって発現誘導された。また、*vseM* 遺伝子欠損株の下痢誘導活性は有意に低下した。腸上皮細胞上に存在するムチン層は、バリア機能を担っている。したがって、本研究で同定した VseM は、腸炎ビブリオが腸管上皮細胞にアクセスする過程に寄与している可能性が示唆された。3. 腸上皮細胞コンタクト認識機構の解析：T3SS2 の分泌制御因子変異株（ゲートキーパー変異体）は宿主細胞とのコンタクトした状態を模擬していると考えられる。そこでゲートキーパー変異体のトランスクリプトーム解析および分泌タンパク質のプロテオーム解析を行い、本菌が腸上皮細胞とのコンタクト依存的な遺伝子発現制御機構を持つこと、このコンタクト依存的な遺伝子発現制御に関わる因子（VtrN）の同定に成功した。*vtrN* 遺伝子欠損株のトランスクリプトーム解析を行ったところ、T3SS2 遺伝子群がコードされる領域（Vp-PAI 領域）の遺伝子発現が上昇した。したがって、本菌が細胞とのコンタクトを契機に病原因子の発現を上昇させる機構を持つことが明らかとなった。

腸炎ビブリオの感染過程



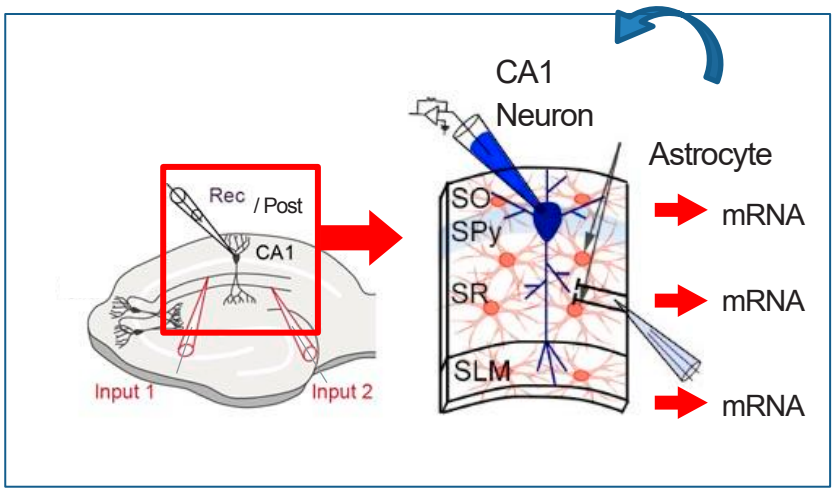
32　アストロサイトによる双方向性シナプス制御機構の解明	合田　裕紀子

【目的】脳ではグリア細胞の一種であるアストロサイトが神経細胞間のシナプス伝達制御に関わる。アストロサイトの細胞体からは多くの突起が伸びて、その細かく分岐した末端が個々のシナプスと密に接触することで、アストロサイトが局所的にシナプスを制御すると考えられる。ただし、アストロサイトはギャップ結合により 100 個ほどから成る合胞体を形成しており、かつアストロサイトは多様で、その形状や遺伝子発現パターンなどが脳部位で異なることが報告されている。アストロサイト多様性と脳部位や経路特異性との相関関係、およびそれらによる神経回路制御の仕組み、またアストロサイトがいつどのようにして統合的なシナプス制御へ動作するのか、あるいは個々のシナプスを局所的に制御するのか、などは未解明である。記憶と学習に重要な役割を持つ海馬神経回路においても、アストロサイトがシナプス制御に関与する。本研究では 3 層からなる CA1 部位に着目し、それぞれの層に特異的な入力をターゲットとした、アストロサイトによるシナプス制御の分子・細胞メカニズムを解析した。

【方法】8〜16 週齢の Bl/6J コントロールマウス、あるいは海馬 CA1 部位アストロサイトに発現する NMDA 受容体 GluN1 サブユニットをノックダウンしたマウス脳から海馬急性切片を作製し、電気生理学の手法で CA1pyramidal ニューロンよりシナプス応答を記録した。海馬 CA1 ニューロンおよび *stratum oriens*（SO）、*stratum radiatum*（SR）、*stratum lacunosum moleculare*（SLM）に局在するアストロサイトをパッチクランプして RNA を採取して、NMDA 受容体サブタイプの qRT-PCR 解析を行い、さらにはシングルセル RNA 解析（patch-RNAseq）のパイロット実験を実施した。

【結果】海馬 CA1 ニューロンへ入力するシナプス前終末強度分布のアストロサイトによる制御へは GluN2C サブユニットからなる NMDA 受容体が関与することを突き止めた。ニューロンでは GluN2A、GluN2B サブユニットが多く発現しているのに対してアストロサイトでは GluN2C の発現量が高いことを確認した。また、アストロサイト NMDA 受容体によるシナプス前終末強度制御は SR への入力に特異的であった。興味深いことに、GluN2C 自体は SO、SR、SLM 3 層に渡って局在しているものの、NMDA 受容体機能に必須な GluN1 サブユニットに依存的なアストロサイトシグナリングは SR のアストロサイトでは顕著に見られるが SO、SLM のアストロサイトでは見られなかった。これらの結果は海馬 CA1 部位のアストロサイトは各層で異なることを示唆しており、シングルセル RNA 解析も 3 層のアストロサイトは種類が異なることを裏付けた。

海馬 CA1 部位 3 層にわたるアストロサイトによる CA1 ニューロンのシナプス強度制御の解析



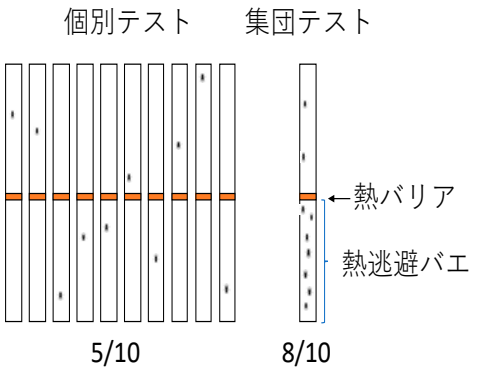
33　情動伝染を担うショウジョウバエ神経回路	齊藤　実

【目的】他者の痛みや悲しみなどの情動状態の共感は人間が社会性を形成する心理学的基盤である。しかし進化の過程で共感性がいつ現れたのか？どのような神経機構の働きによるのか？なぜ孤立化やストレスで低下し、自閉症や発達障害などで欠如するのか？多くのことが不明である。我々は共感性の原初的形態である情動伝染が、単純な神経回路を持つショウジョウバエでも起こることを見出した。本研究ではショウジョウバエを新たなモデル動物として、情動伝染を担う神経回路を同定し、集団飼育により回路が形成される仕組み、その形成機構と動作原理を一細胞レベルで明らかにする。社会性を持たないショウジョウバエの簡便な脳神経回路の働きから、社会性の基盤となる情動伝染を理解することで、情動伝染から共感性・社会性への進化を、神経科学から解き明かす糸口を与える。また情動伝染が生まれる仕組みを遺伝学的に解析することで、各種精神神経疾患や発達障害で顕在化する共感性の消失を分子レベルで理解する。

【方法】ハエの反走地性を利用して熱回避行動を調べた。ハエがバイアルを登っていく途中にある熱バリアを越えて、さらに登っていくか、熱バリアを回避して登るのを止めるかを定量観察した。個別テストでは一つのバイアルにハエを 1 匹入れて、集団テストでは一つのバイアルに 10 匹のハエを入れて熱回避行動を観察した（下図）。行動薬理学的実験では 5-HT2A 受容体、5-HT1A 受容体、D2 受容体、AMPA 受容体、NMDA 受容体、GABAA 受容体、ニコチン受容体、ヒスタミン Hi1 受容体阻害剤、セロトニン合成酵素阻害剤、セロトニン取り込み阻害剤を用いた。熱逃避行動の亢進を担う感覚は各種感覚受容変異体と、熱遺伝学的手法による各種感覚神経細胞の人為的な活動制御により調べた。同定された神経細胞の形態や神経活動の痕跡は共焦点レーザー顕微鏡により調べた。

【結果】ショウジョウバエ熱回避行動が個別と比べて集団で亢進すること、この熱回避行動の亢進が熱回避行動を取る他者からの、恐らく翅を対象とした、視覚情報によって誘導されることが分かった。哺乳類集団内での侵害刺激に対する応答の増強は、感情の伝染（情動伝染）によって引き起こされると考えられている。熱回避行動の集団性亢進は、哺乳類の情動伝染と同様に、拘束ストレスによって抑制され、幼少期の集団飼育が必要であった。また熱回避行動の集団性亢進はセロトニン受容体阻害剤で抑制された。セロトニン作動性神経細胞は幾つかのクラスターを形成しているが、脳両側の PMPD クラスターにある一組のセロトニン神経細胞（R23E12-Tph 神経細胞）の出力を熱遺伝学的手法で阻害すると熱回避行動の集団性亢進が消失し、活性化すると拘束ストレスで消失した熱回避行動の集団性亢進が回復するだけでなく、個別の熱回避行動も亢進した。さらに R23E12-Tph 神経細胞は他人の熱回避行動を観察したときだけでなく、自身が熱刺激を受けることでも活性化した。これらの結果から、熱回避行動の集団性亢進は情動伝染によるものであり、R23E12-Tph 神経細胞はショウジョウバエで情動伝染を担うミラーニューロン様の細胞であることが示唆された。

集団による熱回避行動の亢進



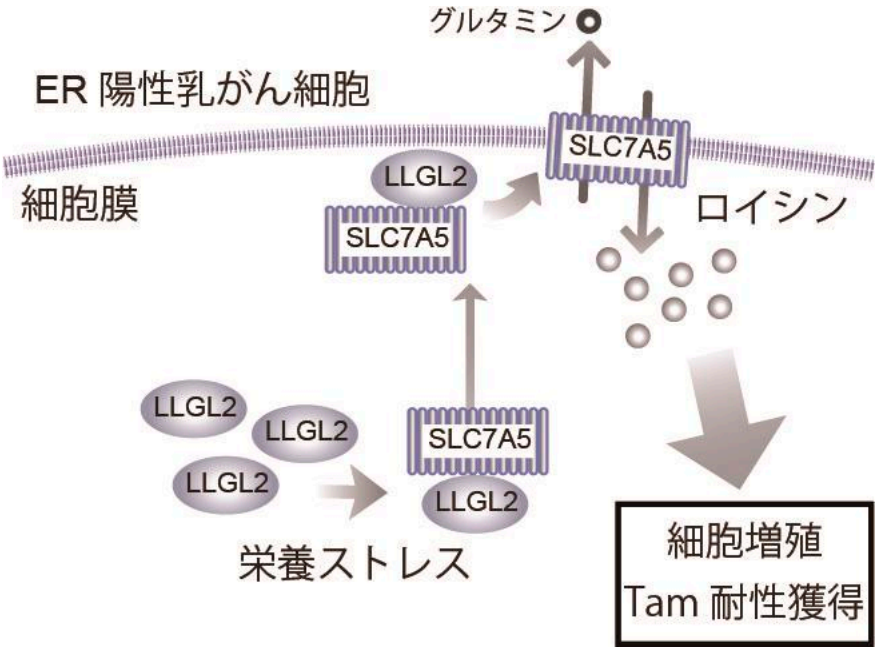
34　アミノ酸トランスポーターによる薬剤耐性獲得分子機序	齊藤　康弘

【目的】日本において乳がんは罹患率ならびに死亡率ともに非常に高い疾患である。乳がんは特徴的な遺伝子発現によりエストロジェン受容体（ER）陽性乳がん、HER2 陽性乳がん、Basal 型乳がんの大きく三つに分類される。中でも ER 陽性乳がん細胞は乳がん全体のおよそ 80%を占める。ER 陽性乳がん患者は治療の過程においてホルモン療法が適用されるが、ER 陽性乳がん患者の内およそ 20～30%の患者ではホルモン療法に対して耐性が認められる。ホルモン療法に用いられる ER を直接阻害するタモキシフェンは非常に有効な薬であるが、一部の乳がん患者では耐性が認められる。これまでに我々は ER 陽性乳がん細胞において細胞極性タンパク質 LLGL2 が過剰発現しており、アミノ酸トランスポーターである SLC7A5 の細胞膜局在を制御していることを明らかにした。また、SLC7A5 の過剰発現がタモキシフェン耐性獲得に関与していることから、本研究ではタモキシフェン耐性獲得における SLC7A5 の機能的役割ならびにその分子機序を明らかにすることを目的とした。

【方法】SLC7A5 過剰発現によるタモキシフェン耐性獲得機序を明らかにするため、SLC7A5 過剰発現細胞における質量分析装置を用いたメタボローム解析を行った。SLC7A5 過剰発現により細胞内濃度の上昇が認められたアミノ酸に対してタモキシフェン耐性獲得の評価を行った。

【結果】メタボローム解析により SLC7A5 過剰発現は必須アミノ酸であるフェニルアラニン、トリプトファン、ロイシン、チロシン、バリン、ヒスチジン、メチオニン、イソロイシンの細胞内濃度を上昇させることが明らかとなった。タモキシフェン耐性獲得における八つのアミノ酸の機能を明らかにするため、それぞれのアミノ酸を過剰に添加し、タモキシフェン存在下の増殖能を検討したところ、単独のアミノ酸ではタモキシフェン耐性獲得は認められなかった。また、八つのアミノ酸をそれぞれ培地中から取り除き、同様にタモキシフェン存在下での増殖能を検討したところ、いずれのアミノ酸もタモキシフェン耐性獲得において重要であることが示唆された。

LLGL2-SLC7A5 経路による ER 陽性乳がん細胞の増殖機構



35　栄養素に対する食欲の調節機序の解明	佐々木　努

【目的】生活習慣病対策として健康的な食生活を指導しても、「実践し続けてもらえない」という課題がある。根本的な解決には、背景に潜む「食欲の調節機序（生理）」と「病態におけるその変容（病態生理）」を分子レベルで解明することが必要である。そのために、本研究では栄養素に対する食欲の調節機序（生理的メカニズム）の解明をめざす。
【方法】栄養素のうち、生体恒常性の維持に対する影響が大きい三大栄養素に焦点を絞り、三大栄養素（糖質、脂質、タンパク質）それぞれに対する特異的な食欲（嗜好性）の調節機序を解明するために、栄養素特異的に変動するホルモンのシグナルに着目し、条件付け遺伝子組換えマウスに対して、食行動解析とオミクス解析を行った。各栄養素特異的な臓器連関シグナルへの介入手段として、条件付き遺伝子組換えマウスを作出した。また、食行動（嗜好性）は、2 種類の餌での食事選択試験（食事中の三大栄養素の配合比率が変わる）と、2 種類の水溶液での 2 瓶選択試験（特定成分のみ操作できる）で評価した。実験 1．単純糖質への嗜好性の検証：FGF21 受容体の発現に必要なβ-Klotho をコードする *Klb* 遺伝子を、OXT 神経特異的に欠損させた Oxt-Cre; Klb-flox マウスを作製、解析した。実験 2．中鎖脂肪酸への嗜好性の検証：中鎖脂肪酸の摂取を脳に伝えるシグナル“X”を肝臓のマルチオミクス解析により探索するために、中鎖脂肪酸が代謝される肝臓特異的に中鎖脂肪酸のβ酸化に必須な MCAD（中鎖脂肪酸 CoA デヒドロゲナーゼ）を欠損させた Alb-Cre; Acadm-flox マウスの作製を試みた。また、肝臓の初代培養細胞と、視床下部細胞株を活用し、シグナル X の探索系を構築した。実験 3．タンパク質への嗜好性の検証：分枝鎖アミノ酸摂取により血中濃度が上昇するグルカゴンの受容体（Gcgr）を脳特異的に欠損させた Tau-Cre; Gcgr-flox マウスを作製、解析した。
【結果】Oxt 神経特異的 FGF21 受容体欠損マウスは、摂取時に血中 FGF21 濃度を上昇させる単純糖質に対する嗜好性が亢進していたが、血中 FGF21 濃度を変化させない人工甘味料や多糖類に対する嗜好性は変化していなかった。肝臓特異的 *MCAD* 欠損マウスの作製は、flox マウスのトラブルで遅延したが、その間別の実験を行い、シグナル”X”候補の絞り込みを進めることができた。薬理量のグルカゴン投与による NEAA 嗜好性の制御は、グルカゴンがまず神経系に作用してから、他臓器などに指令を送り、その臓器での代謝変化が再度脳に伝わり、NEAA 嗜好性を調節すると推察された。

三大栄養素の摂取を調節する臓器連関シグナルと脳内標的の関係

栄養素の摂取	臓器連関シグナル	脳内標的	表現型
単純糖質	肝臓 FGF21分泌	視床下部Oxt神経 （活性化）	摂取の抑制
中鎖脂肪酸 トリグリセリド	肝臓 シグナルX分泌	視床下部Gal神経? （活性化）	摂取の促進
BCAA （生理的）	グルカゴン （薬理量投与）	「？→末梢臓器→中枢」 【仮説モデル】	摂取の抑制 （NEAA）

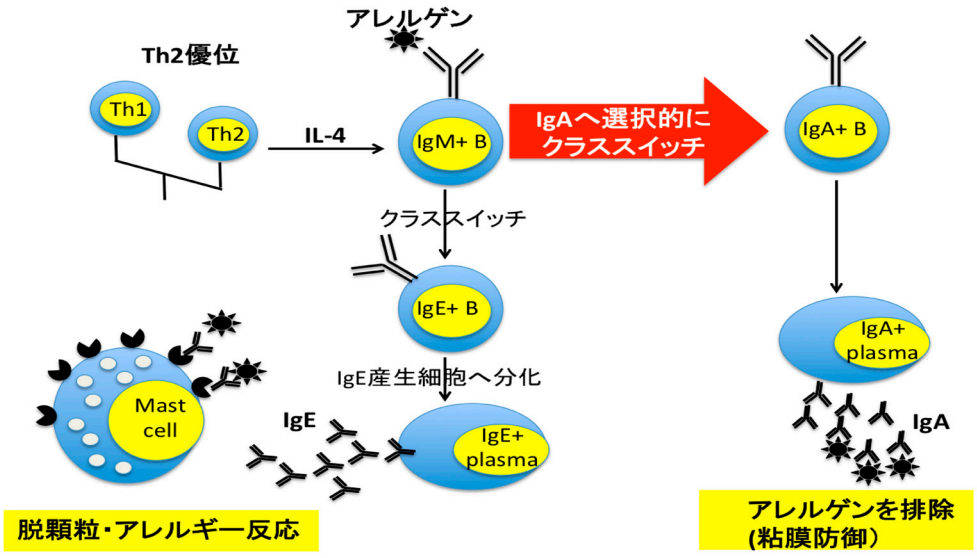
36　IgA選択的クラススイッチ誘導による粘膜バリア強化	新藏　礼子

【目的】現在、アレルギーにおいては、まず Th2 優位な状況がアレルギー病態のおおもとであると考えられている。なぜ Th2 優位であるかについては議論があるがよくわかっていない。我々はアレルゲンが体内に侵入することがその根本原因ではないか？と考えている。つまり、アレルギーの根本治療はアレルゲンの体内侵入を減らすことであると考える。今回、我々が提案する研究は、下図に示したように、IgE を産生するための一連の免疫反応の流れをどこかで遮断するのではなく、アウトプットを横道にそらし（IgA への選択的クラススイッチ誘導）、その結果として IgE 産生を減少させるだけでなく IgA による粘膜防御を強固にすることでアレルゲンの侵入を減らし、反応のおおもとである Th2 優位な状況を是正しようという試みである。

【方法】約 3,400 種類の化合物スクリーニングで見出した IgA への選択的クラススイッチを誘導する 3 種の候補化合物は、いずれもプロテインキナーゼ C（PKC）活性化剤であった。文献検索により見出した発ガンではなく抗ガン作用のある PKC 活性化剤 Bryostatin 1 を用いて、マウスの花粉アレルギーモデルにおいて PKC 活性化剤が実際に粘膜で IgE 産生を抑制し、かつ IgA を誘導することでアレルギー症状を改善するか？について検討する。

【結果】スギ花粉によるマウスアレルギーモデルにおいて、Bryostatin 1 の経鼻投与により、以下のアレルギー随伴症状の改善を確認した。1. 肺胞洗浄液中の IgE 抗体価の減少、好酸球・リンパ球の減少。2. 血清 IgE 抗体価の減少。3. 鼻掻き様行動回数、くしゃみ回数の減少。また、*in vitro* のクラススイッチ誘導実験において、Bryostatin 1 の添加により、IgA へのクラススイッチ効率の増加、および IgE へのクラススイッチ効率の減少を確認した。クラススイッチの変化の一因は Bryostatin 1 により *IgE* 遺伝子の転写活性が減少し *IgA* 遺伝子の転写活性が増加すること、すなわち B 細胞内の遺伝子転写制御によるものであることがわかった。

IgA 選択的クラススイッチ誘導による粘膜バリア強化



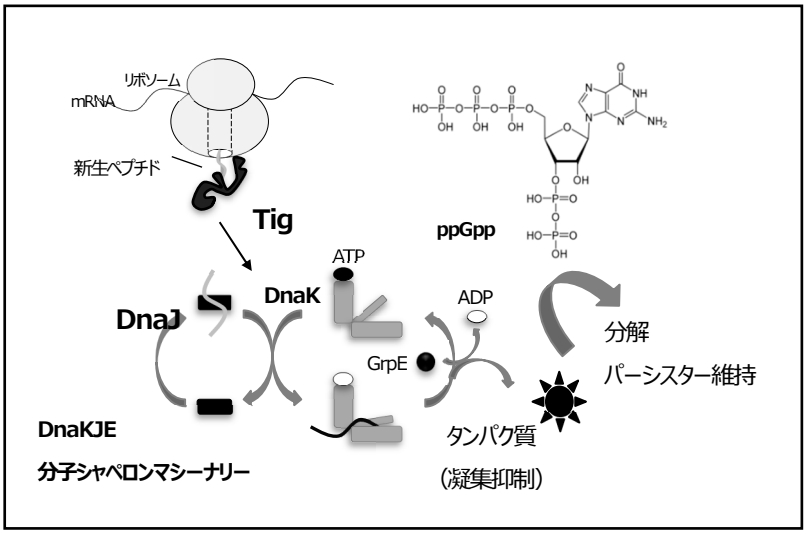
37　分子シャペロンによるpersister制御の分子基盤	高屋　明子

【目的】均一なゲノムをもつ細菌集団の一部に存在するパーシスター（persister cells）は、抗菌薬曝露によるストレスに応答することで生じ、耐性因子は獲得しないにもかかわらず高濃度の抗菌薬存在下でも生存することができる。そして、抗菌薬を取り除くと再び増殖する。DnaKJ 分子シャペロンマシーナリーは凝集タンパク質を脱凝集することでパーシスター制御に関わることが示唆されている。本研究では、基質と相互作用する因子 DnaJ、Tig の寄与について検討した。

【方法】グラム陰性病原細菌であるサルモネラ分子シャペロン遺伝子変異株を用いて、フルオロキノロン系抗菌薬シプロフロキサシン処理によるパーシスター形成について調べた。また、パーシスター形成時の凝集タンパク質の蓄積について調べた。

【結果】サルモネラの DnaKJE 分子シャペロンマシーナリーは、パーシスター形成に重要であった。DnaJ 単独欠損株は CPFX 処理 5 時間までは DnaKJ 欠損株と同等の感受性であったが、24 時間では野生株の 0.05%が生存していた。また、Tig 欠損株は 24 時間でも野生株よりも少ないもののパーシスター形成がみられた。このことから DnaJ は初期の基質運搬に関わり、Tig は補助的な役割を担うことが示唆された。パーシスター形成の初期には凝集タンパク質が蓄積するが、凝集タンパク質を分解するプロテアーゼはパーシスター形成に必須ではなかった。以上より、DnaJ、Tig はパーシスター形成に関わるタンパク質の凝集抑制に関わる可能性が示唆された。

DnaKJE 分子シャペロンマシーナリーによるタンパク質凝集抑制を介したパーシスター制御



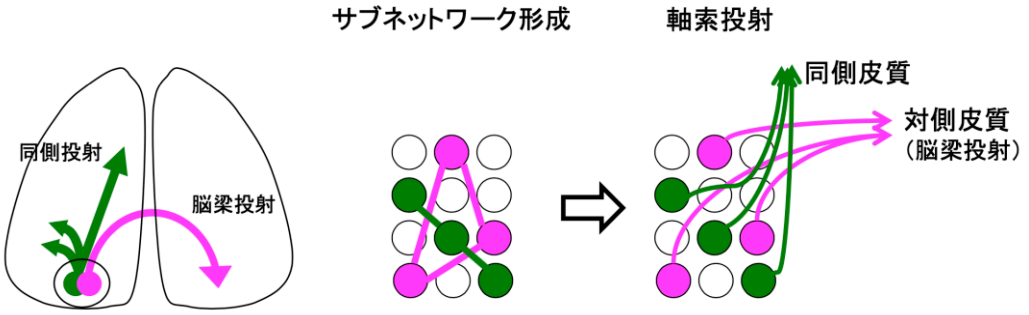
38　哺乳類大脳の広域・局所神経回路構築ロジックの解明	田川　義晃

【目的】高次脳機能を生む哺乳類大脳の神経回路は、複雑な神経ネットワークからなる。大脳をマクロな視点でみると、様々な領域・領野からなり、その間は特異的なパターンでつながれている。一方、局所に目を向けると、同一の層に様々な投射先をもつ神経細胞が混在している。投射先が異なる神経細胞は、発生発達期にどのように配置され、どのようにして配線（それぞれの投射先へ正しく軸索を伸ばして回路を形成）するのであろうか？本研究では、大脳の代表的な長距離神経回路である脳梁投射をモデルとして用いて、その形成機構を明らかにする研究を行った。具体的には、1．活動依存的な脳梁軸索投射に重要な自発神経活動パターンを明らかにすること、2．脳梁軸索発達過程のダイナミックな形態変化とその制御機構を明らかにすることを目的とした。

【方法】目的 1 に対しては、時期特異的な神経活動操作技術を用いた。神経活動を抑制する分子ツール Kir2.1、子宮内電気穿孔法、Tet-off 遺伝子発現システムを組み合わせて、脳梁投射形成過程の目的の時期に神経活動を操作する実験を行った。目的 2 に対しては、新生仔マウスの大脳において、蛍光標識した脳梁軸索を数日間 *in vivo* タイムラプスイメージングする実験を行った。

【結果】神経活動を抑制する分子ツール Kir2.1 イオンチャネルを脳梁投射細胞に E15 から P15 まで発現させると、P15 において脳梁軸索投射が阻害される。Tet-off 遺伝子発現システムを組み合わせた実験系を用いて、P6 から Dox を投与することで Kir2.1 発現を P10 からオフにすると、P15 において脳梁投射の回復が見られた。Kir2.1 発現オフによって回復した神経活動パターンを解析したところ、活動記録した領域の大多数（>60%）の細胞が参加する同期活動（H event とよばれる）ではなく、参加細胞の割合がより少ない同期活動（L event：参加細胞の割合は 20〜60%）が回復していた。この結果は、脳梁軸索投射の形成・回復には、L event とよばれる同期自発活動があれば十分であることを示唆する。さらに、大脳皮質スライス標本で脳梁投射細胞同士、または脳梁投射細胞とそれ以外の投射細胞の間でのシナプス形成の確率を比較する実験を行ったところ、脳梁投射細胞同士の方がより高い確率でシナプス形成しているという結果が得られた。これらの結果を合わせて考えると、脳梁投射細胞同士は回路形成期に機能的なサブネットワークを作っており、L event の一部はその脳梁投射細胞群の同期活動であり、この同期神経活動が投射先特異的な軸索投射パターン形成に重要な役割を担う可能性が示唆された。また、*in vivo* 脳における脳梁軸索のタイムラプスイメージング実験からは、軸索の伸長と縮退、分枝の形成と消失というダイナミックな形態変化を観察することができた。特に P11 から P13 の間で、1 日 100 μm 以上の軸索分枝の伸長と縮退が観察された。どの軸索分枝が伸長して定着しやすくどの枝が縮退、消失しやすいのか、軸索発達ダイナミクスを制御するルールを明らかにする解析を現在進めている。

活動依存的な脳梁軸索投射のメカニズム（仮説）



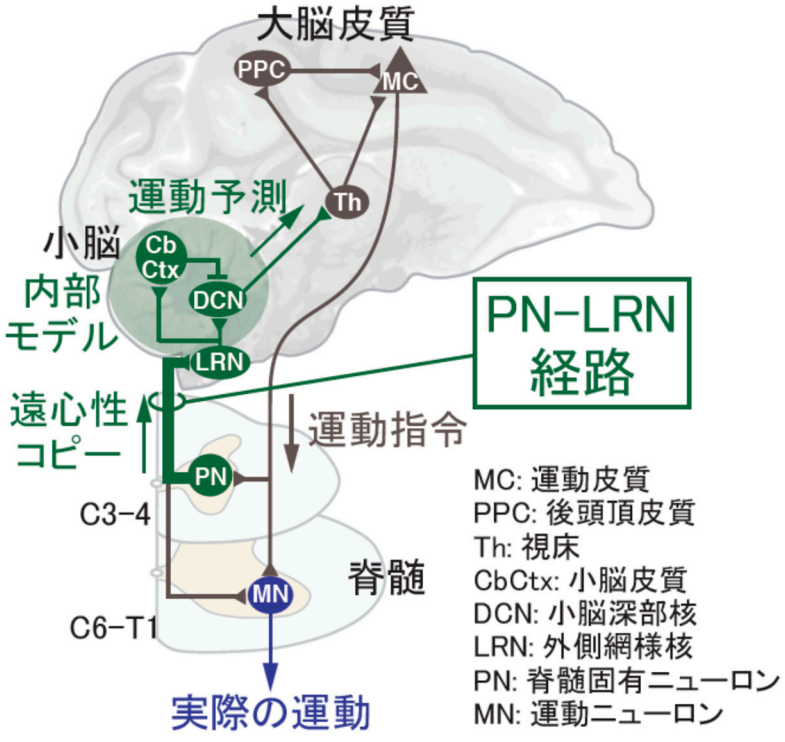
39　脊髄損傷後の運動機能回復における脊髄小脳路の機能	武井　智彦

【目的】脊髄損傷後の運動機能障害から回復する場合、失われた神経連絡や神経機能の「復元」を目指す一方で、患者自身が「思い通りに動かない身体」を受容し、それに対して適切に行動を適応させていくことが重要である。これまでのネコにおける急性電気生理学的実験から脊髄固有ニューロン（propriospinal neuron：PN）が脳幹外側網様核（lateral reticular nucleus：LRN）を介して小脳に投射する間接脊髄小脳経路（PN－LRN 経路）が運動指令の遠心性コピーを表現して、運動の結果を予測しているという説が有力である（図）。そこで本研究では、霊長類を対象としてウィルスベクターを用いて PN-LRN 経路を選択的に遮断する技術を確立することで、PN－LRN 経路が健常状態での運動制御および脊髄損傷からの機能回復過程にどのように貢献しているのかを明らかにすることを目的とした。

【方法】健常なマカクザル（2 頭）を対象として脊髄 C3-T1 に順行性ベクター（AAVDJ-hSyn-hM4Di-mCherry または AAV2.1-hSyn-hM4Di-mCherry）を注入し、脊髄上行路に抑制性人工受容体（hM4Di）を発現させた。さらにターゲット部位である LRN に人工受容体のリガンド（DCZ 溶液）を注入することによって PN から LRN へのシナプス伝達を選択的に阻害し、その効果を麻酔下電気生理学実験および行動学的実験により評価した。

【結果】まず免疫組織学的検討によって同側 LRN への神経軸索にレポータータンパク質の発現を認めた。これにより頸髄から同側 LRN へ投射する間接脊髄小脳経路の軸索に hM4Di を発現させることに成功した。一方、リガンド注入によりこの経路を抑制した効果を電気生理学的および行動学的に解析したが神経応答および行動指標いずれも有意な変化は認められなかった。この要因として麻酔下電気生理学的な神経伝達抑制効果の評価方法、および人工受容体の発現量の問題などによる可能性が考えられた。これらの結果は人工受容体による経路選択的な操作法を確立する上で検討すべき要因を特定するための有用な知見を与えた。

間接脊髄小脳路の機能仮説



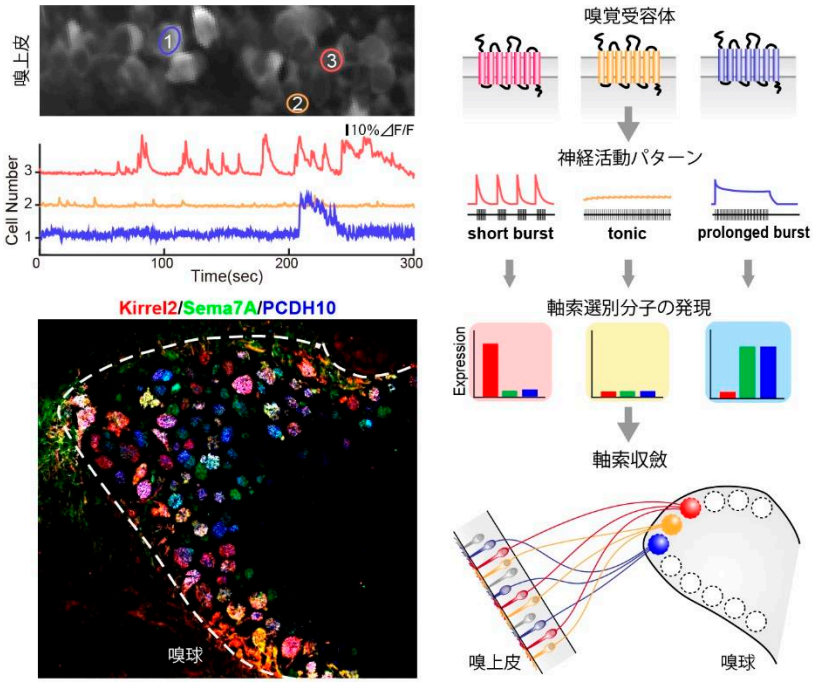
40　神経活動依存的な嗅覚回路の形成原理の解明	竹内　春樹

【目的】高等動物の神経回路は、遺伝的プログラムに加え発達期に生じる電気的な神経活動を介した精緻化を経て完成される。マウス嗅覚系では、個々の嗅細胞は発生の過程で一種類の嗅覚受容体遺伝子を発現し、その発現した受容体の種類に応じて軸索の選り分けが行われる。我々の先行研究から、発現した嗅覚受容体分子は神経活動を介して多数の軸索選別分子の発現を調節し軸索末端にそれらの分子の組み合わせからなる分子コードを作り出すことによって、受容体の種類に依存した軸索収斂を制御していることを明らかにしてきた。しかしながら、多数存在する”嗅覚受容体の種類”という情報が神経活動、即ち発火パターンの中にどの様に書き込まれ、どのような細胞内シグナル伝達経路を介して受容体の種類を反映した軸索選別分子群の発現量へと変換されているのかについてはほとんど解明されていない。

【方法】本研究では、マウス嗅覚系における神経活動依存的な回路形成機構を明らかにするために、以下に示す1．神経活動の記録、2．光遺伝学による神経活動操作とそれに伴う軸索選別分子の発現変化の検証の二つの実験を実施した。

【結果】その結果、嗅細胞は発達段階において匂い入力がない状況において自発的に活動すること、そしてその自発的な神経活動の時間パターンは、発現する嗅覚受容体によって規定されていることが分かった。また、光遺伝学的手法による嗅細胞の神経活動操作実験より、異なる神経活動パターンは異なる軸索選別分子の発現を制御していることが分かった。以上より、発現する嗅覚受容体の種類という情報は、神経活動の時間的なパターンへと変換されることで軸索末端に軸索選別分子の発現パターンが形成されることが分かった。

嗅覚系における神経活動依存的な軸索収斂の分子機構



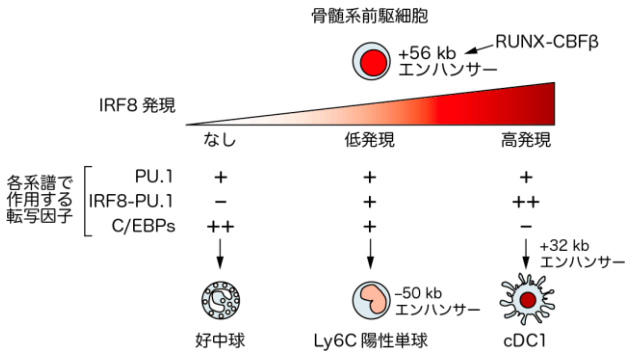
41　転写因子による単核貪食細胞の分化制御機構の解明	田村　智彦

【目的】造血幹細胞から血球細胞への分化においては、各細胞種特異的な遺伝子発現パターンの確立が必須である。この遺伝子発現パターンの確立には、遺伝子発現を調節するエンハンサーと、そこに結合する鍵となる転写因子が重要な役割を果たす。Interferon regulatory factor 8（IRF8）は単球と樹状細胞からなる単核貪食細胞の分化に必須の転写因子であり、一方で好中球の分化を阻害する。IRF8 の発現は多能性前駆細胞から開始され、単球ー樹状細胞前駆細胞で発現が上昇する。この発現上昇は 1 型古典的樹状細胞（cDC1）への分化過程でさらに強まる一方、Ly6C 陽性単球への分化過程で発現が低下する。*Irf8* の発現は、*Irf8* 遺伝子座に存在する複数のエンハンサーによって制御されており、Ly6C 陽性単球では 50 kb 上流のエンハンサー（−50 kb）が、共通樹状細胞前駆細胞から cDC1 への分化においては 41 kb 下流と 32 kb 下流のエンハンサーが重要な役割を持つ。しかし IRF8 の発現がより上流の前駆細胞でどのように制御されているのか、また、この単一の転写因子がどのように単球と樹状細胞という二つの系譜の分化を支持するかは不明であった。

【方法】エンハンサーによる *Irf8* の発現制御に着目し、まず単核貪食細胞への分化過程の各細胞種における *Irf8* 遺伝子座の活性化ヒストンの状態をクロマチン免疫沈降シーケンス（ChIP-seq）によって網羅的に解析した。この解析により、造血幹前駆細胞から単核貪食細胞前駆細胞への分化段階で活性が高まっていく新規エンハンサー領域を *Irf8* の転写開始点の 56 kb 下流（+56 kb）に同定した。CRISPR/Cas9 システムを用いてこのエンハンサー領域を欠損したマウス（Δ+56 kb）を作製し、生体内におけるこのエンハンサーの機能を解析した。

【結果】Δ+56 kb マウスでは、多能性前駆細胞から骨髄系細胞全体で *Irf8* の発現が著減した。さらに共通樹状細胞前駆細胞が失われた一方で、Ly6C 陽性単球が過剰に産生された。IRF8 欠損造血前駆細胞に外来性に IRF8 を導入することで、IRF8 高発現細胞ならびに低発現細胞の分化能を評価した。その結果、IRF8 高発現細胞は cDC1 へ、IRF8 低発現細胞は Ly6C 陽性単球へ分化した。IRF8 欠損細胞は好中球へ分化したことから、造血前駆細胞における IRF8 の発現量が好中球・単球・樹状細胞の分化運命を決定することが明らかになった。また、野生型、Δ+56 kb と IRF8 欠損マウスにおける単核貪食細胞系の様々な分化段階の細胞のエンハンサー分布を ChIP-seq で解析したところ、IRF8 の発現量に応じて協調（PU.1 など）あるいは抑制（C/EBP）する転写因子が変化することで、適切な遺伝子発現パターンが確立されることがわかった。さらに、+56 kb エンハンサーの制御転写因子を同定するために、+56 kb エンハンサー領域と同様の活性化パターンの推移を示す領域をゲノム規模でモチーフ解析した結果、RUNX–CBF β が候補として浮かび上がった。*Cbfb* のノックダウン実験やレポーターアッセイによって、RUNX–CBF β は+56 kb エンハンサーへ直接作用することにより造血前駆細胞で *Irf8* 遺伝子発現を正に制御し、樹状細胞分化をもたらすことが明らかになった。以上の結果から、RUNX–CBF β によって駆動される+56 kb エンハンサーによって制御される IRF8 発現量によって、好中球・単球・樹状細胞のいずれに分化するかという前駆細胞の運命決定がなされることが明らかになった（発表論文：Murakami et al, *Nat Immunol* 22: 301-311, 2021）。

IRF8 発現量依存性の単核貪食細胞分化運命決定モデル



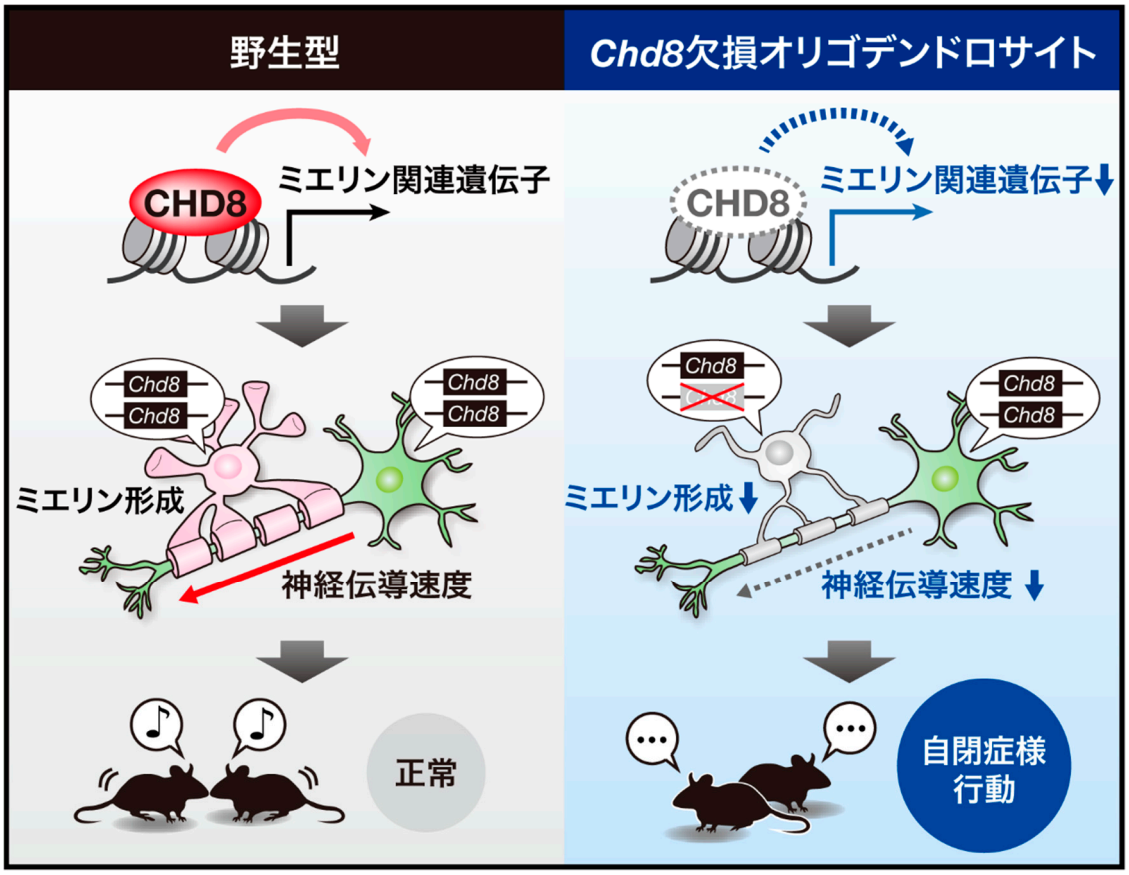
42　自閉症モデルからコミュニケーションの形成機構に迫る	西山　正章

【目的】クロマチンリモデラーCHD8 をコードする遺伝子の変異は、自閉スペクトラム症（ASD）と強く関連している。CHD8 ハプロ不全は、ヒトとマウスに ASD の表現型をもたらす。髄鞘形成の欠陥は ASD 患者で観察されているが、オリゴデンドロサイトの機能障害が ASD の表現型の原因であるかどうかは不明のままである。

【方法】*Olig1-Cre* マウスと floxed *Chd8* 対立遺伝子がヘテロ接合であるマウスを交配することにより、オリゴデンドロサイト系列細胞で *Chd8* が削除されている *Olig1-Cre/Chd8*$^{+/F}$ マウスを作製した。遺伝学、細胞生物学、組織学、および行動テストによってこれらのマウスを特徴づけた。

【結果】オリゴデンドロサイトにおける CHD8 の発現低下は、マウスに ASD 関連の行動表現型を引き起こした。特にマウスのオリゴデンドロサイトにおける *Chd8* の除去は、ランビエ絞輪の構造変化とニューロン伝導速度の低下に関連して薄いミエリン鞘を示した。一貫して、オリゴデンドロサイト系統特異的 *Chd8* ヘテロ接合変異マウスは、不安の増加や社会的行動の変化などの行動障害を示した。

Chd8 変異によるオリゴデンドロサイト機能異常はマウスの行動障害を引き起こす



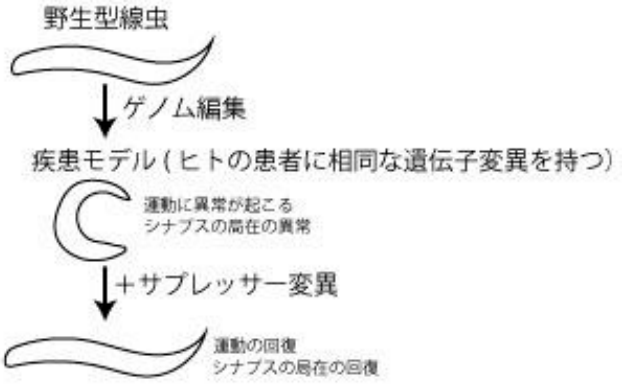
43　軸索輸送病モデル線虫を用いた治療標的分子の探索	丹羽　伸介

【目的】シナプス形成を制御する軸索輸送モータータンパク質 KIF1A の遺伝的変異は先天性神経疾患の原因となる。痙性対麻痺、自閉症、発達障害、視神経の萎縮など広汎な神経症状を引き起こすので、それらを KIF1A-associated neuronal disorder（KAND、KIF1A 関連神経疾患）と呼ぶ。本研究では軸索輸送のモデルとして広く使われている線虫に KAND 患者で見つかったのと相同な遺伝子変異を導入して疾患モデル線虫を確立する。

【方法】ヒト KIF1A の線虫オルソログである UNC-104 の変異体に変異型 KIF1A の cDNA を導入してレスキュー実験を行うことで、R254Q や P305L といった KAND 変異が機能喪失変異であるか、機能獲得変異であるかを決定した。機能喪失型変異であることがわかった R254Q 変異と相同な変異を導入するために CRISPR/cas9 法によるゲノム編集を行い KAND モデル線虫を確立した。この KAND モデル線虫を用いて EMS を用いたランダム変異導入を行った。それと同時に、軸索輸送を変化させる可能性がある遺伝子の変異体とかけ合わせる候補遺伝子スクリーニングを行い、サプレッサー変異体の探索を行った。

【結果】分子モータータンパク質 KIF1A 自体の遺伝子変異、および jip-1（哺乳類の JIP1）の機能喪失型変異が KAND モデル線虫の運動異常や軸索輸送の減少を回復させることがわかった。JIP1 阻害剤は KAND の治療薬となり得ることが示唆される。

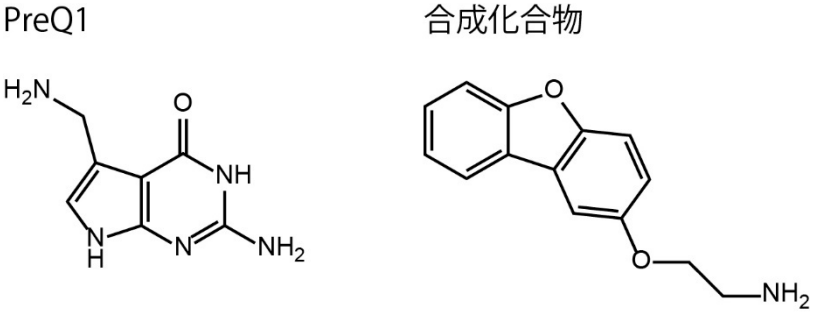
KIF1A 関連神経疾患モデル線虫のサプレッサー変異の同定



44　細菌の非コードRNAの生化学的解析と創薬への展開	沼田　倫征

【目的】細菌 RNA を標的とした新規薬剤の創製を目指す。細菌は mRNA の 5’非翻訳領域にリボスイッチとよばれる RNA 領域を持つ。リボスイッチはリガンドと結合し、下流にある当該リガンドの合成遺伝子の発現を調節する。PreQ1 リボスイッチは、PreQ1（図左）の合成に関わる遺伝子の発現を調節する。細菌は PreQ1 を遊離塩基として合成する。その後、tRNA のアンチコドン 1 字目のグアニン塩基が PreQ1 と交換され、tRNA に PreQ1 が取り込まれる。PreQ1 を取り込むことで tRNA は正しいコドンを認識できるようになる。この修飾塩基は真核生物にも存在し正確なタンパク質合成に不可欠である。しかし、真核生物は PreQ1 合成経路を持たず、食餌や腸内細菌から摂取する。つまり、細菌だけが PreQ1 を合成する。従って、PreQ1 リボスイッチと結合する合成化合物は、PreQ1 の生合成を抑制する新規抗生剤の候補となり得る。これまでに、PreQ1 リボスイッチと結合する合成化合物を同定しリボスイッチとの相互作用機構を解明した。また、化合物がリボスイッチの下流遺伝子の転写を抑制することを示した。本研究では、合成化合物の化学構造に基づき、第二世代の化合物を合成して転写抑制活性が向上する合成化合物の創製を目指した。
【方法】*Thermoanaerobacter tengcongensis* 由来 PreQ1 リボスイッチ RNA は、Dharmacon から購入し、脱保護したあと真空乾燥して水に溶解することにより調製した。これまでに低分子マイクロアレイを用いたスクリーニングによって PreQ1 リボスイッチと結合するジベンゾフラン骨格を持った合成化合物（図右）を同定していた。この合成化合物を親化合物として、ジベンゾフラン環から他の複素環への置換、複素環への窒素、酸素、硫黄の導入、側鎖長の変更、メチル基などの導入により 10 種類の誘導体化合物を合成した。λ_{PR} プロモーター、26-nt C-less 配列、*Staphylococcus saprophyticus* 由来 PreQ1 リボスイッチとその下流 DNA 配列を含んだ鋳型 DNA を調製し、*in vitro* における転写終結活性を測定した。合成化合物の添加量を増加させ転写終結効率を測定し、各合成化合物の EC_{50}値を算出した。*T. tengcongensis* PreQ1 リボスイッチと合成化合物の共結晶を作製し、SPring-8 およびフォトンファクトリーにて結晶の回折データを測定した。分子置換法により複合体の結晶構造を決定した。
【結果】ジベンゾフラン化合物の化学構造（図右）を基盤にして 10 種類の誘導体化合物（化合物 A～J）を合成し、*in vitro* における転写終結活性を測定した。その結果、四種類の誘導体（化合物 A～D）の転写抑制効率は親化合物と比較して 30～75 倍程度にまで上昇していることが明らかとなった。次に、化合物 A、B、C、D と結合した *T. tengcongensis* PreQ1 リボスイッチの結晶構造を分解能 2.1 から 2.6 Å で決定した。結晶構造を解析した結果、これら化合物はいずれも天然のリガンドである PreQ1 と類似した部位に結合していた。誘導体化合物は主に PreQ1 リボスイッチで保存された塩基とのスタッキング相互作用により結合が安定化されていた。また、少数ではあるが保存された塩基との間に水素結合も形成していた。親化合物が結合した PreQ1 リボスイッチの立体構造と比較すると類似していたが、化合物の化学構造の変化に伴って結合部位が少しシフトし、水素結合のパターンが異なることが明らかとなった。この構造の違いが転写抑制効率の上昇と関連すると考えられる。今後、これら誘導体が結合した PreQ1 リボスイッチの立体構造を基盤にして更なる誘導体の作製を試み、細菌の遺伝子発現を効率よく調節する化合物の創製を目指す。

PreQ1 およびジベンゾフラン化合物の化学構造



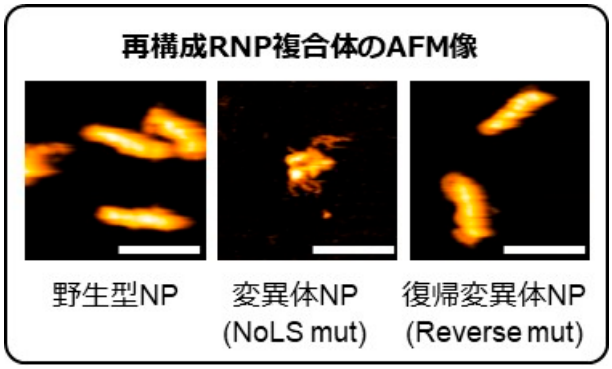
45　インフルエンザウイルスの核内複製機構の解明	野田　岳志

【目的】インフルエンザウイルスは、8 分節にわかれた一本鎖マイナス鎖 RNA をゲノムとして持つ。各ゲノム RNA 分節は、それぞれ異なるウイルスタンパク質をコードしており、ウイルス RNA ポリメラーゼとウイルス核タンパク質 NP とともにリボ核タンパク質複合体（RNP 複合体）を形成する。RNP 複合体は二重らせん構造をとり、ゲノム RNA の転写および複製を担う。他の多くの RNA ウイルスと異なり、インフルエンザウイルスは感染細胞の核内で転写、複製を行う。インフルエンザウイルスのゲノム RNA の転写は核内の宿主 RNA polymeraseII の近傍で起こることが知られている。一方で、ゲノム RNA の複製とそれに伴う RNP 複合体の形成が細胞核内のどこで起こっているかに関しては、全く明らかにされていない。そこで本研究では、インフルエンザウイルスゲノムの複製の場および RNP 複合体形成の場を明らかにすることを目的とする。

【方法】我々のこれまでの研究をもとに、本研究では核小体に着目し研究を進めた。ウイルス感染細胞において、抗 NP 抗体や抗ポリメラーゼ抗体を用いて、経時的に RNP 複合体構成因子の核内局在を解析した。また、RNP 複合体の構成因子のうち、NP タンパク質のみが核小体移行シグナルを持つことから、核小体移行シグナルに変異を導入した変異体 NP を発現するプラスミドを作製した。これらの変異体 NP を用いて、ゲノム RNA の転写および複製能をミニゲノムアッセイおよび RT-qPCR により解析した。また、RNP 複合体の形成を確認するため、免疫沈降法や高速原子間力顕微鏡解析を実施した。

【結果】インフルエンザウイルス感染細胞において、NP およびポリメラーゼ構成因子が核小体に局在することを確認した。核小体移行シグナルに変異を導入した変異体 NP を発現させると、核小体への局在が認められなかった。一方で、変異体 NP のアミノ末端に核小体移行シグナルを付加した復帰変異体 NP は、核小体に局在した。これら変異体を用いてゲノム RNA の転写および複製を調べたところ、核小体移行シグナルを欠いた変異体 NP は転写と複製のどちらもサポートできなかった。一方で、復帰変異体 NP は、転写と複製のどちらもサポートした。そこで、これら変異体 NP をゲノム RNA およびウイルス RNA ポリメラーゼとともに細胞内で再構成し、免疫沈降および密度勾配遠心により精製後、高速原子間力顕微鏡により RNP 複合体の形成を解析した。その結果、核小体移行シグナルを欠いた変異体 NP は正常な形態の RNP 複合体を形成できず、ゲノム RNA と NP の凝集体を作るのみだった。一方で、復帰変異体 NP を用いて再構成した RNP 複合体は、野生型 NP と同様に、二重らせんの RNP 複合体を形成することが明らかになった。これらの結果から、NP が核小体に移行することが機能的にも形態的にも正常な RNP 複合体を形成するために重要であり、核小体において RNP 複合体を形成すると考えられた。

精製 RNP 複合体の高速原子間力顕微鏡イメージ



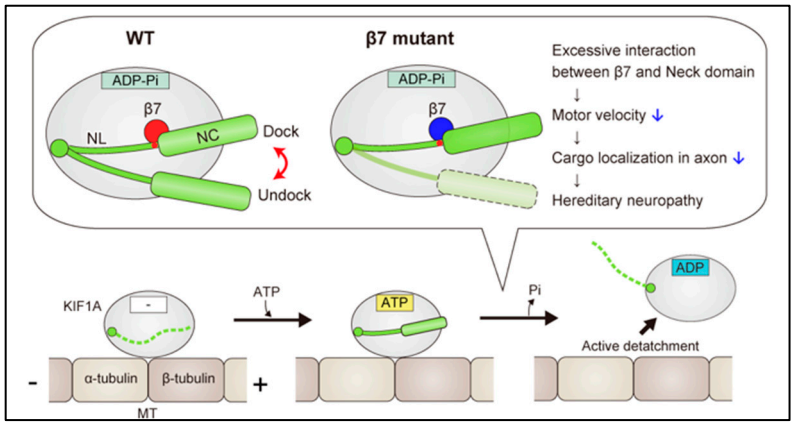
46　分子モーターの遺伝子変異による神経難病病態生理の研究	廣川　信隆

【目的】KIF1A は、ATP の加水分解エネルギーを使用してシナプス小胞前駆体や高親和性ニューロトロフィン受容体を軸索先端に輸送する分子モーターである。軸索型シャルコー・マリー・トゥース病（CMT2）の患者家系において、KIF1A の一塩基変異を同定した。この変異により、KIF1A タンパク質のモータードメイン内にある β7 領域に電荷の逆転が生じる。β7 領域は、モータードメインの中で機能的に重要とされてきたヌクレオチド結合領域や微小管結合領域とは離れた領域であり、その機能は不明である。本研究では、KIF1A の軸索輸送における β7 の機能と、β7 変異による CMT2 発症のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

【方法】β7 変異が KIF1A の軸索輸送にどのような影響を与えるかを明らかにするため、*Kif1a*$^{+/-}$マウスの DRG ニューロンに β7 変異体を導入し、痛みや熱さの感覚の発生に関わる KIF1A カーゴである TrkA 及び TRPV1 の軸索遠位部での局在を調べた。次に、軸索における β7 変異体のモーター活性を調べるため、蛍光標識した β7 変異体を DRG ニューロンに発現させ、コンフォーカルレーザー顕微鏡を用いてライブイメージングを行い、軸索輸送の速度・頻度・方向を野生型 KIF1A と比較した。さらに β7 領域のモーター活性能をより詳細に調べるため、ATPase 活性を保持する最小単位のモータードメインコンストラクトを用いて、β7 変異体の *in vitro* モーター活性を測定した。微小管滑走運動アッセイと ATPase アッセイを行い、ガラスに固定した KIF1A が微小管を動かす速度、微小管上運動に伴う ATP 加水分解速度、微小管との親和性について、野生型 KIF1A と変異体を比較した。

【結果】先行研究による報告と同様に、*Kif1a*$^{+/-}$マウスの DRG ニューロンでは細胞表面の TrkA の局在が有意に減少していた。この *Kif1a*$^{+/-}$マウスの DRG ニューロンに野生型 KIF1A を発現させると細胞表面の TrkA の局在は回復したが、β7 変異体を発現させた場合は細胞表面の TrkA の局在は回復しなかった。細胞表面の TRPV1 についても同様の結果が得られ、β7 変異体はカーゴの輸送に障害があることがわかった。また、蛍光標識した野生型と変異型の KIF1A を DRG ニューロンに導入し、遠位軸索の粒子の動きを観察したところ、軸索内輸送の速度が β7 変異体の方が野生型よりも約 25%遅いことがわかった。この遅い輸送の原因を探るため、*in vitro* での運動活性を確かめた。微小管滑走運動アッセイにより KIF1A が微小管を動かす速度を測定すると、軸索内での動きと同様、β7 変異体の方が野生型よりも約 22%遅かった。さらに微小管存在下での ATP 加水分解速度を測定すると、β7 変異体は野生型よりも ATPase 活性が低かった。一方で、微小管への親和性に違いはなかった。このことから β7 変異は、微小管との結合に影響しないが、ATP 加水分解のサイクルに遅れをもたらすことがわかった。キネシンの三次元構造から β7 領域は ATP 結合時にネックリンカー領域と相互作用するため、β7 変異体では電荷の逆転によってネックとの間に異常に強い相互作用が生まれることが示唆される。その結果、ネックリンカーの構造変化に伴うリン酸の放出が遅れ、モーター活性の低下につながると考えられる。

β7 変異体が CMT2 を引き起こすメカニズム



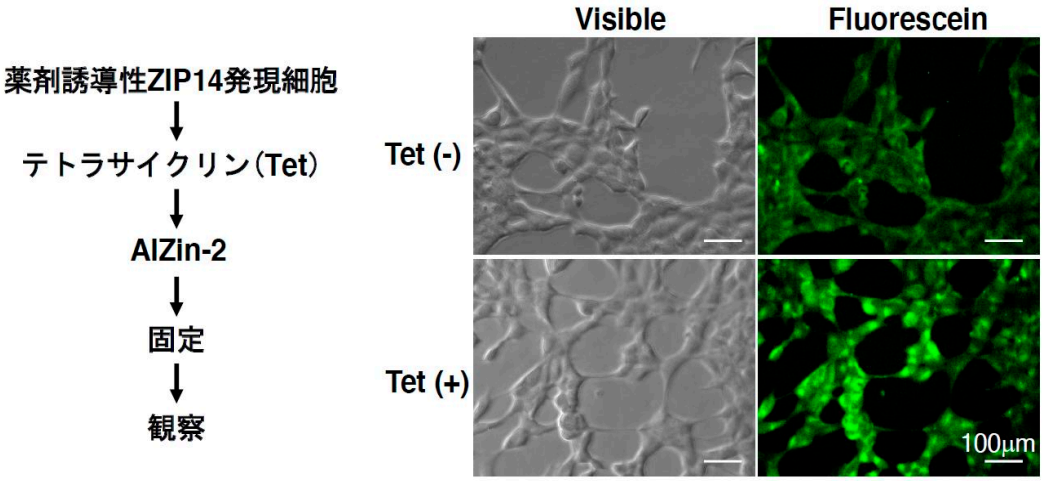
47　亜鉛シグナリングの機序解明とその制御による創薬研究	深田　俊幸

【目的】本研究の動機は、亜鉛トランスポーターから放出される亜鉛イオンが、細胞内シグナル因子として機能すること（亜鉛シグナリング）、この亜鉛シグナリングが骨格筋と皮膚の維持に重要であることの発見にある。具体的には、転移がんの増殖に伴って亜鉛トランスポーターZIP14 が骨格筋で発現し、ZIP14 の亜鉛シグナルが筋萎縮（がん悪液質）をもたらすことを見出した。さらに、亜鉛トランスポーターZIP10 を介する亜鉛シグナルが表皮形成に必須であり、アトピー性皮膚炎患者の皮膚では、ZIP10 が減少していることを発見した。これらは、亜鉛シグナリングが骨格筋と皮膚の維持に関与することを示しているが、亜鉛シグナリングの機序と創薬については十分に研究されていない。一方、高齢化が進む日本では、運動機能障害や皮膚脆弱化による QOL の低下が問題視されている。骨格筋および皮膚の疾患の予防と治療に係る方法の開発は、今後迎える超高齢化に備えるべき急務な課題であると考えた。これらの研究背景から、骨格筋と皮膚の理解と治療戦略に亜鉛シグナリングから究明することを目的として本研究を開始した。

【方法】1. 筋萎縮における ZIP14 の役割解明：筋萎縮における ZIP14 の役割を解明するために、ZIP14 発現細胞の特徴を解析する目的で、*Zip14* プロモーター下流に *EGFP-IRES-creERT2* 遺伝子カセットを挿入（knock-in：KI）した *Zip14-GFP*-KI マウスを作製した。さらに、AIZin-2 試薬を用いた Zn^{2+}conditional proteomics 法を適用して、ZIP14 の亜鉛シグナリングの標的分子を同定する実験系を構築した。2. 表皮形成における ZIP10 役割解明：表皮形成における ZIP10 役割を解明するために、ZIP10 発現細胞の特徴を解析する目的で、*Zip10* プロモーター下流に *EGFP-IRES-creERT2* 遺伝子カセットを KI した *Zip10-GFP*-KI マウスを作製した。3. 創薬関連研究：ZIP14 の機能や発現に影響を与える化合物のスクリーニング系の構築を試行した。

【結果】1. *Zip14-GFP*-KI マウスを完成した。さらに、Zn^{2+} conditional proteomics 法を薬剤（Tet）誘導性 ZIP14 発現細胞に適用して、ZIP14 の発現に依存した細胞内の蛍光発色を確認した（下図）。2. *Zip10-GFP*-KI マウスを完成した。ZIP10 発現細胞の子孫細胞を可視化するために、*Zip10-GFP*-KI マウスと *tdTomato*-KI マウスを交配して *Zip10-GFP/Tomato*-KI マウスを作製した。さらに、本マウスの皮膚における ZIP10 発現細胞の子孫細胞の存在を免疫染色法で確認した。3. 薬剤誘導性 ZIP14 発現 HEK293 細胞を適用して、ZIP14 の発現に依存した亜鉛の導入による細胞増殖抑制作用を確認した。さらに、ZIP14 依存的な細胞増殖抑制作用に焦点を当てた化合物スクリーニング系を確立した。

Zn^{2+} conditional proteomics 法を用いた ZIP14 亜鉛シグナルの標的分子の可視化



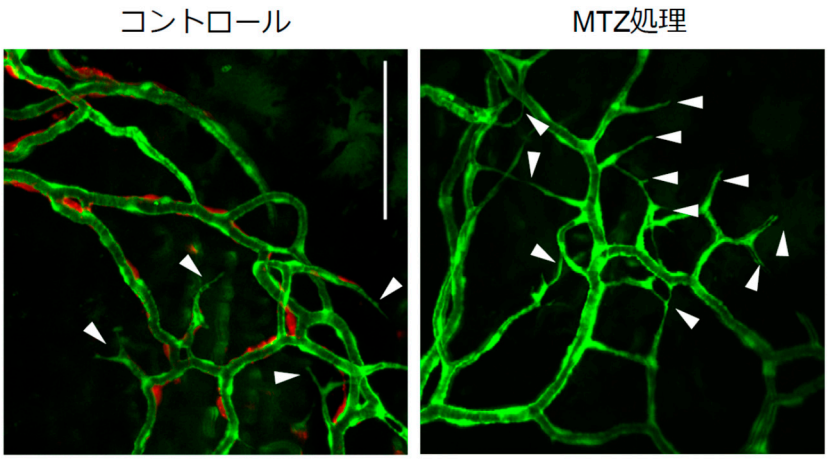
48　血管新生と血管構造の維持におけるペリサイトの役割	福原　茂朋

【目的】全血管の 90%以上を占める毛細血管の血管壁にはペリサイトが被覆している。ペリサイトは、血液脳関門の形成・維持に重要であり、これまで中枢神経系におけるペリサイトの機能が精力的に研究されてきた。しかし、末梢組織の毛細血管を被覆するペリサイトの機能に関しては、ほとんど研究が進んでいない。一方、組織が虚血状態に陥ると血管新生が誘導され、虚血組織に新たな血管網を構築する。これまで血管新生では、血管新生因子が血管壁からペリサイトを剥離し、血管の出芽・伸長を促すと考えられてきた。また、癌や糖尿病網膜症などの疾患で起こる病的血管新生では、ペリサイトが新生血管に動員されず、それにより機能的に未熟な血管が形成され、これら疾患の病態を悪化させると考えられている。しかし、血管新生におけるペリサイトの機能とその制御メカニズムに関しては、未だ不明な点が多いのが現状である。我々はこれまで、ゼブラフィッシュ成魚の長時間ライブイメージング法を独自に確立し、成魚皮膚の創傷治癒過程の血管新生における内皮細胞・ペリサイトの動態を数ヶ月に渡って詳細に観察した。その結果、創傷による血管新生の誘導によって、ペリサイトの血管壁からの乖離は認められず、逆にペリサイトは血管内皮細胞とともに増殖し、蛇行血管を構築する内皮細胞を被覆することが分かった。これらの知見は、「血管新生の誘導によってペリサイトは血管壁から乖離し内皮細胞の出芽を促す」という従来から信じられてきた血管新生におけるペリサイトの機能とは明らかに矛盾する。そこで我々は、「生理的血管新生において、ペリサイトは増殖し血管壁を被覆することで、過剰な内皮細胞の出芽を抑え、機能的な血管網の形成に寄与する一方、病的血管新生では、ペリサイトによる血管壁の被覆が起こらず、それにより過剰な内皮細胞の出芽が起こり、未熟な血管が形成される」との仮説を立てた。本研究では、本仮説の検証を通して、血管新生におけるペリサイトの真の機能とその制御機構の解明を目的とした。

【方法】ニトロ還元酵素（Nitroreductase : NTR）／メトロニダゾール（Metronidazole : MTZ）システムを利用してペリサイトをコンディショナルに除去可能なトランスジェニックゼブラフィッシュを樹立し、ペリサイト存在下及び非存在下における、創傷治癒に伴う血管新生を蛍光ライブイメージングにより解析した。

【結果】ペリサイト存在下及び非存在下で創傷により血管新生を誘導したところ、ペリサイト存在下のときに比べ、ペリサイト非存在下では、血管枝の出芽数が優位に多かった。また、ペリサイト存在下では、損傷血管は一直線状に伸長し、損傷前と同様に走行する血管を再生したのに対し、ペリサイトを除去した損傷血管は蛇行して伸長し、損傷前と異なる血管ネットワークを形成した。以上の結果から、ペリサイトは血管新生における過剰な出芽を制限するとともに、血管の伸長方向を制御していることが示された。

ペリサイト除去により血管新生における血管枝の出芽が増加する



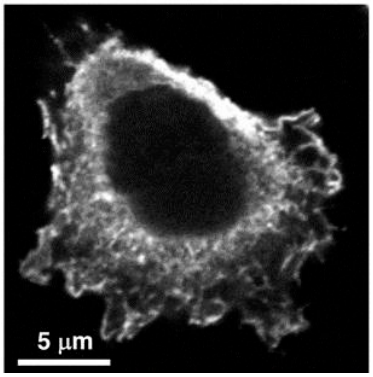
49　膜脂質の疎水性領域を可視化する逆転レプリカ法の開発	藤田　秋一

【目的】分子生物学の飛躍的発展とそれに基づくゲノミクス、プロテオミクスの展開により、DNA・RNA と蛋白質についての知見は急速に増加している。生体膜についても膜蛋白質に関する研究は高度化し、多くの知見が集積されている。しかし膜脂質に関しては有力な解析技術が少ないため、まだまだ未知の点が多く残されている。我々は、急速凍結・凍結割断レプリカ標識法（Quick-freezing & freeze-fracture replica labeling method : QF-FRL）によって膜脂質を特異的に標識することが可能であることを示し、各種脂質の二次元的分布をナノレベルで解明することに成功した。生体膜を構成する脂質は“頭部”の親水性部位とそれに結合する脂肪酸の“尾部”である疎水性部位により構成される。QF-FRL 法では、生体膜を構成する脂質の“親水性頭部”に結合するプローブで標識することにより、生体膜を構成する各種脂質の微細分布を可視化することは可能となった。しかしながら、今まで用いてきた QF-FRL 法では疎水性“尾部”の脂肪酸は全く解析することが不可能である。本研究では、QF-FRL 法をさらに改良することにより、逆転凍結レプリカ脂肪酸標識法を新たに開発し、生体膜における脂肪酸分布をナノレベルで解析することを可能にする。アルキン化した脂肪酸を投与してから急速凍結する時間を変えることにより、経時的に局在部位、微細分布の変化を明らかにし、脂肪酸が持つ生理活性化発現機序の解明を目指す。

【方法】HeLa 細胞の生体膜のオレイン酸を代謝標識するために，培養液内にアルキン化オレイン酸を混入して一昼夜（14 hr）37℃で培養した。固定後、biotin-azide 溶液で処置し、クリックケミストリー反応を起こして、生体膜内のアルキン化オレイン酸を biotin で標識した。その後、マウス抗 biotin 抗体、そして Alexa488 標識抗マウス IgG 抗体で蛍光標識を行った。生体膜レプリカ標本については以下の方法を用いた。アルキン化オレイン酸存在下で培養した HeLa 細胞を加圧凍結装置により凍結し、凍結割断後レプリカ標本を作製した。レプリカ薄膜を PBS で洗浄後、上述の様に、クリックケミストリー反応を起こして，マウス抗 biotin 抗体、そして 10 nm 金コロイド標識抗マウス IgG 抗体で標識を行った。

【結果】HeLa 細胞の細胞膜、および細胞内の構造体に蛍光標識が確認できた（下図）。培養液内のアルキン化脂肪酸を入れて哺乳類培養細胞を培養することにより、生体膜の脂肪酸を蛍光標識し可視化できることが確認できた。一方、逆転凍結レプリカ脂肪酸標識法を用いて電子顕微鏡により脂肪酸の微細分布を検討する実験を行った。エッチングを行ったレプリカ薄膜では、アルキン化オレイン酸あるいはアルキン化アラキドン酸共に、生体膜において特異的な標識を得ることはできなかった。一方、逆転凍結レプリカ脂肪酸標識法を用いて電子顕微鏡により脂肪酸の微細分布を検討する実験を行なった。エッチングをしなかったレプリカ薄膜では、アルキン化アラキドン酸のアルキン基を標識することに成功した。これらの結果から、生体膜に存在するアラキドン酸が親水性領域側にアルキン基、つまり脂肪酸の末端が露出していることが示唆された。

アルキン化オレイン酸を取り込ませた Hela 細胞



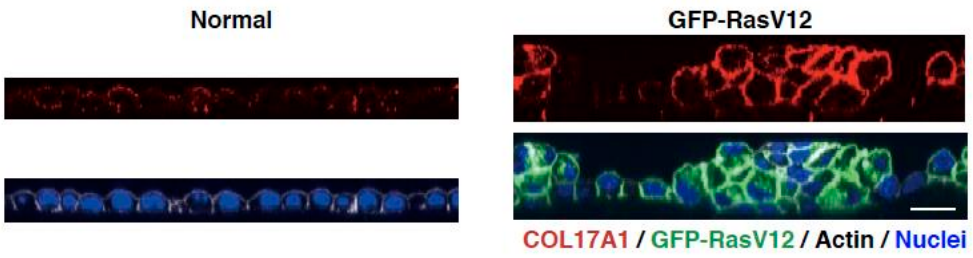
50　細胞競合を制御する膜タンパク質の同定	藤田　恭之

【目的】単層上皮のがん化の初期の段階で多層化現象が起こることは広く知られているが、がん原性の変異がどのような分子メカニズムで多層化を生じるかについては、多くが謎として残されていた。本研究において我々は、Collagen 17A1（COL17A1）と CD44 が多層化現象に機能的に関与する重要な分子であることを突き止めた。研究成果は上原記念生命科学財団への謝辞とともに Current Biology 誌にアクセプトされた。

【方法】新規上皮制御因子の同定のために、ファージディスプレイスクリーニングを行なった。ライブラリには 10^{11}〜10^{13}種類の多様なファージ抗体を含んでおり、この中から細胞パンニングと呼ばれる操作により、変異細胞に特異的に結合するものを選別した。まず正常細胞の単一培養下の細胞にファージライブラリを反応させ、これらに結合するファージをライブラリから取り除いた。その後、正常細胞と変異細胞の共培養下の細胞に残りのファージを反応させ、結合したファージを溶出し、大腸菌に感染させて増幅させた。その後、単離されたファージクローンのもつ抗体を用いて正常・変異細胞の共培養下で網羅的に免疫染色を行い、ハイスループットイメージングにより、正常細胞と変異細胞の境界部位に特異的な染色を示す抗体を同定した。

【結果】正常 MDCK 細胞と RasV12 発現 MDCK 細胞を用いてファージディスプレイスクリーニングを行い、RasV12 変異細胞を特異的に認識するファージ抗体を同定することに成功した。この抗体を用いて免疫沈降を行った結果、エピトープ分子が COL17A1 であることが分かった。またファージディスプレイスクリーニング以外にも、Cell Surface Marker Screening Panel を用いたスクリーニングを行い、RasV12 発現によって形質膜への集積が亢進する膜タンパク質として CD44 を同定した。COL17A1 と CD44 の発現上昇と形質膜への集積が RasV12 の発現だけではなく、Src や ErbB2 によっても誘起することを見出した。さらに、COL17A1、CD44 の両者ともに、多層化した変異細胞層の上層部の細胞間接着部位に強く集積することが分かった（下図）。また、膵管上皮特異的に *K-Ras* と *p53* の変異を誘導する KPC マウスの膵臓で多層化した前がん病変について組織免疫染色を行ったところ、COL17A1、CD44 ともに形質膜への集積が観察された。続いて、COL17A1 と CD44 が実際に多層化現象に機能的に関与しているかを調べるために、それらのノックダウン、あるいはノックアウトが変異上皮細胞の多層化にどのような影響を与えるかを調べた。すると COL17A1、CD44 の発現低下によって、変異細胞の多層化が強く抑制されることが分かった。これらのデータは、COL17A1 と CD44 ががん化の初期に生じる単層上皮の多層化現象を制御する重要な因子であることを示している。さらに、CD44 ノックダウンによって COL17A1 の集積が抑制されることから、CD44 が COL17A1 の集積を制御していることも明らかになった。今回の我々の研究によって、上皮多層化のプロセスに COL17A1 と CD44 が重要な役割を果たしていることが明らかになった。これらの研究成果は、COL17A1 と CD44 が上皮の多層化というこれまでがん診断・治療の対象になっていなかったプロセスの標的分子となる可能性を示している。

多層化した RasV12 変異上皮細胞層の上層部の細胞間接着に集積する COL17A1



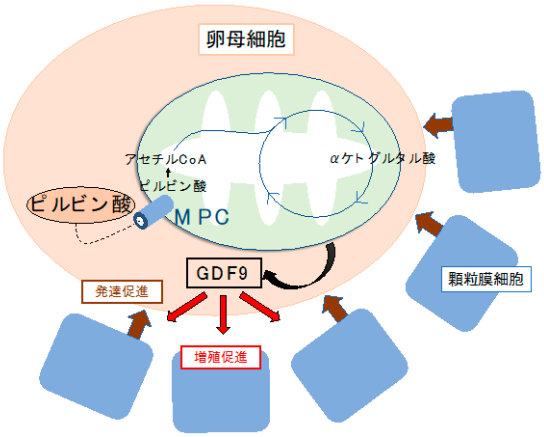
51　胎仔生殖細胞の代謝制御の役割と子孫への影響	松居　靖久

【目的】次世代個体の健康な発生・成長を担う生殖細胞の分化機構に関して、エピジェネティック制御が生殖細胞の形成や、その後の分化段階で起こる減数分裂などに必須な役割を果たしていることが示されてきた。一方、細胞外環境に敏感に反応し、さまざまな細胞状態の制御に重要な代謝状態と、その制御機構に関しての生殖細胞に関する知見は少なく、特に胎仔期生殖細胞の代謝状態に関してはこれまでほとんど調べられてこなかった。そこで本研究の代表者らは、これまでにマウス胎仔生殖細胞のメタボローム・プロテオームの統合解析を行い、胎仔生殖細胞が生殖巣の体細胞や多能性幹細胞と比較して、高いミトコンドリア代謝などの特徴的な代謝状態にあることを明らかにしてきた。その知見をもとに本研究では、胎仔生殖細胞で亢進している、解糖系から分岐するセリン生合成経路やミトコンドリア代謝の、胎仔生殖細胞から精原細胞や卵母細胞が形成される際の役割と作用機構を明らかにすることを目的とした。

【方法】マウス胎仔精巣の器官培養に、解糖系から分岐するセリン生合成系経路の律速酵素 PHGDH の阻害剤である CBR-5844 を添加すると、胎仔生殖細胞の精原細胞への変化が促進されることが、これまでの研究でわかった。そこで、セリン生合成経路の下流で精原幹細胞への分化制御に働く遺伝子候補を同定するために、阻害剤の有無で発現が変化する遺伝子を、RNA-seq によるトランスクリプトーム解析で調べた。一方、ピルビン酸のミトコンドリアへの取込みを担う MPC タンパク質の阻害剤である UK5099 をマウス胎仔卵巣の器官培養系に添加し、卵母細胞への分化に対する影響と下流遺伝子候補を調べた。また *Mpc2* 遺伝子の生殖細胞特異的欠損マウスの解析により、*in vivo* での役割を調べた。さらに妊娠期に糖質制限をすると、MPC 阻害による影響と類似した卵母細胞の異常が見られるかを、糖質を含まず脂質が主体の高ケトン食を給餌することにより調べた。

【結果】PHGDH の阻害剤存在下で培養した胎仔精巣の生殖細胞では、エピゲノム制御に関連する遺伝子の発現上昇が見られ、それらが精原細胞への変化に関与することが示唆された。一方、マウス胎仔卵巣の器官培養系に MPC の阻害剤を添加すると卵胞形成の初期段階が抑制され、さらにミトコンドリア代謝の中間代謝産物で、DNA やヒストンの脱メチル化の制御に関与するαケトグルタル酸およびコハク酸が、阻害剤の影響を緩和することがわかった。また卵母細胞で発現し、卵母細胞を取り巻く顆粒膜細胞の増殖に必要な分泌性因子 GDF9 の遺伝子発現が阻害剤により低下し、さらにまた GDF9 の添加が阻害剤の影響を緩和することが明らかになった。さらに *Mpc2* の欠損マウスでも、同様な初期卵胞発達の抑制が確認された。これらの結果から、ピルビン酸のミトコンドリアへの効率の良い取込みを介して、トリカルボン酸回路のαケトグルタル酸などが十分に確保されることにより GDF9 の発現が保たれ、それにより卵胞形成が円滑に進行すると考えられた。一方、高ケトン食給餌を行ったマウスから産まれた雌マウス卵巣を調べたが、卵胞形成に異常は見られなかった。

卵母細胞におけるピルビン酸のミトコンドリアへの取込の役割



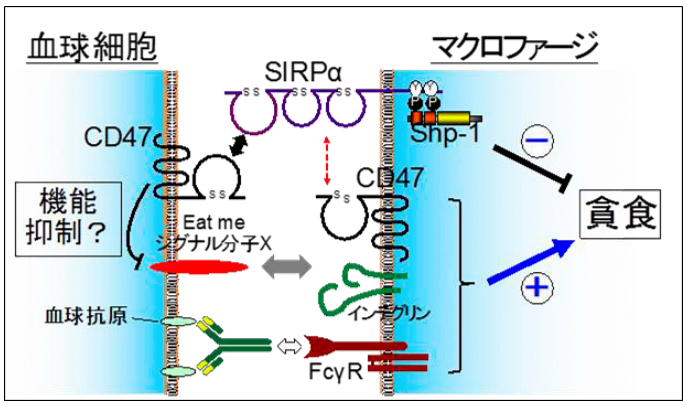
52　マクロファージによる生体恒常性維持の分子基盤	的崎　尚

【目的】老化細胞、炎症性細胞やがん細胞などの異常な生細胞をマクロファージ（MΦ）が如何にして認識し捕食、異化するのか、さらには健康な生細胞はいかに MΦ からの貪食を回避しているのか、その分子機構については多くが不明である。一方で、これまでに研究代表者は、MΦ による正常・異常な生細胞の認識機序の鍵となると考えられる細胞間シグナル“CD47−SIRPα系”を見出していた。SIRPαは、研究代表者が発見した 1 回膜貫通型のレセプター型分子であり、その細胞外領域を介してリガンドであり 5 回膜貫通型分子である CD47 とトランスに結合する。本研究では、研究代表者が独自に得てきたこれまでの知見を踏まえ、CD47−SIRPα系による MΦ の生細胞貪食制御の全容を分子レベルで解明しようと試みた。さらに、その成果を貪食細胞を利用した新たながん治療法の開発に応用しようと試みた。

【方法】CD47 を欠損した細胞で現れると想定している MΦ に対する「Eat me シグナル分子 X」の同定を行うことを目的に、野生型および CD47 欠損赤血球の膜タンパク質について生化学的な解析を行った。さらに、Eat me シグナル分子 X に対する機能阻害抗体の作製を試みた。また、脾臓 MΦ 上に発現する CD47 や SIRPαの CD47 欠損赤血球の貪食における役割を明らかにすることを目的として、CD47 および SIRPα欠損マウス由来脾臓 MΦ を用いて CD47 欠損赤血球に対する貪食を *in vitro* で検討した。さらに、CD47 と SIRPαを共発現させた細胞株を用い、近接ライゲーションアッセイ（PLA）による同一細胞上での CD47 と SIRPαの結合を解析した。最後に、CRISPR-Cas9 システムを利用し、CD47 の発現を失ったマウス由来がん細胞（CD47 KO がん細胞）を樹立し、得られた CD47 KO がん細胞が野生型がん細胞に比べマウス生体内において効率的に排除され得るかについて評価を行った。さらに生体内でのがん細胞の CD47 の発現抑制を行う目的で、マウス由来がん細胞を用いマウス CD47 の発現を抑制する siRNA の検索を進めた。

【結果】MΦ に対する「Eat me シグナル分子 X」になりうる野生型および CD47 欠損赤血球の膜タンパク質間で発現量の異なるタンパク質については見出せなかったが、「Eat me シグナル分子 X」の機能を制御している可能性のあるラットモノクローナル抗体を得た。現在、この抗体が認識するタンパク質についてこの抗体を用いたアフィニティー精製、同定を進めている。一方で、MΦ 側の CD47 や SIRPαはシス結合する可能性や、MΦ 上の CD47 や SIRPαは CD47 欠損赤血球に対する貪食作用を正に制御している可能性も見出した。さらに、CRISPR-Cas9 システムを利用し、CD47 の発現を失ったマウス由来がん細胞（CD47 KO がん細胞）を樹立し、生体内でのがん細胞の CD47 発現抑制が、MΦ によるがん細胞の貪食排除を高め、効果的な抗腫瘍効果をもたらす可能性を明らかにした。また、CD47 の発現を抑制する siRNA の検索を進めた結果、CD47 の発現を効果的に抑制する siRNA（CD47 siRNA）を取得するに至った。この結果をもとに、リポソームに内包したマウス CD47 siRNA を用い、*in vitro* および *in vivo* において MΦ を介した抗腫瘍効果を増強するかについて現在解析を進めている。

CD47–SIRPα系によるマクロファージの新たな貪食制御機構



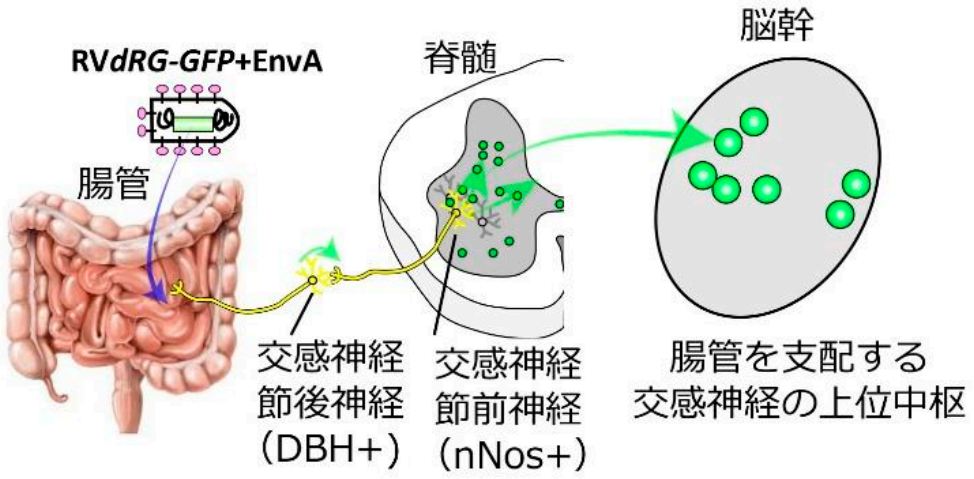
53　交感神経機能コネクトームの分子遺伝学的解析	宮道　和成

【目的】本研究の目的は、自律神経の形成する神経回路を可視化するため、消化管を起点として脊髄における交感神経ネットワークを分子レベル、細胞レベルで同定する手法を開発することである。この技術は、交感神経ネットワークの機能的多様性を解明し、消化器の狙った機能だけを特異的に操作するような技術の基盤となり、将来的には内臓機能の不調を原因とする多くの疾患や損傷の治療戦略にも貢献するものである。この目的のため、中枢神経系で利用されているトランスシナプス標識法を末梢神経系に応用するための新規マウス系統の開発と機能評価を実施した。

【方法】交感神経系に特異的な標識を実現するため、交感節後ニューロンに発現するドーパミンβ水酸化酵素（*Dopamine beta hydroxylase*, *DBH*）の遺伝子座に薬剤タモキシフェン誘導型の *CreER*^{T2}遺伝子を CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集により導入する遺伝子操作を行った。得られた産仔を PCR により遺伝子型決定し、Cre 依存的に TdTomato 赤色蛍光レポーターを発現する *Ai9* マウスと交配し、幼若期にタモキシフェンを導入して Cre 活性を誘導した。また、Cre 依存的に狂犬病ウイルストランスシナプス標識法を駆動するため、新規にマウス第 8 番染色体に位置する *Tightly Regulated*（*TIGRE*）遺伝子座に rabies glycoprotein、TVA 受容体、および核局在型赤色蛍光たんぱく質 nuc-mCherry を共発現するトランスジェニックマウスを CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集により作出した。このマウスは *Ai162* マウスの遺伝子座を改変することで作出したので、以後 *Ai162-nCTG* と呼称する。新規トランスジェニックマウスの性能を評価するため、Cre 組換え酵素を発現するアデノ随伴ウイルス（adeno-associated virus, AAV）を運動野に導入して狂犬病ウイルスを感染させ、トランスシナプス標識が起きるかどうかを調べた。

【結果】*DBH-CreER*^{T2}マウスはノックイン効率約 80%で組換え体を得た。雄 3 匹から系統を樹立し、*Ai9* との掛け合わせにより二重陽性個体を得て、生後 15～18 日目にタモキシフェンを投与した。その結果、DBH 陽性と知られる青斑核や本研究の標的である上腸間膜神経節に多数の tdTomato 陽性細胞が得られた。一方、新生児期に異所的発現が知られている脊髄には標識はみられなかった。従って、交感節後ニューロン特異的な標識系が確立されたといえる。*Ai162-nCTG* マウスに関しては、ノックイン効率は 1.2%だったものの、一匹の組換え体を得ることができた。これを繁殖させ、F1 世代において大脳皮質運動野（M1）に Cre を発現する AAV を導入し、10 日後に狂犬病ウイルスツールを導入したところ、M1 に多数の starter cells が形成され、既知のシナプス前構造である対側の運動野、同側の体性感覚野、同側の視床などに多数の狂犬病ウイルス標識細胞が現れた。この結果は、Cre 依存的に効率よく狂犬病ウイルストランスシナプス標識法を駆動することのできるトランスジェニックマウスの作出に初めて成功したものであり、*DBH-CreER* と組み合わせることで臓器を起点とした交感神経経路の特異的標識法の構築を可能とするものである。

本研究で実装を目指した Organ-initiated two-step trans-synaptic labeling of sympathetic pathway（O2TLS）法



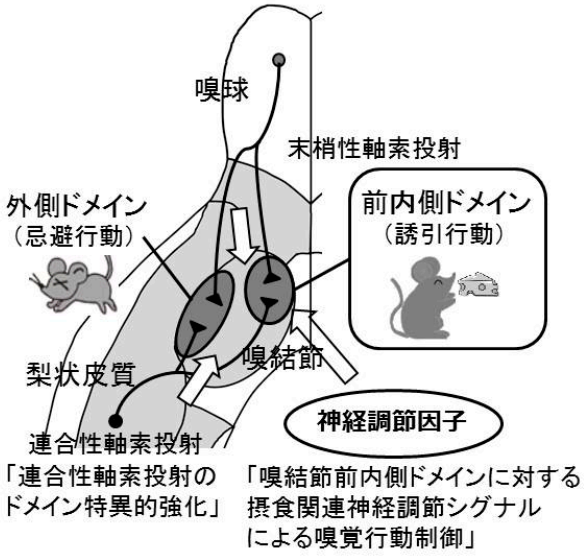
54　嗅覚行動学習を担う神経投射の可塑性と分子機構の解明	山口　正洋

【目的】嗅覚刺激は意欲を促進して行動を導く。また嗅覚行動の多くは学習によって獲得され、同じ匂いであっても経験次第でその匂いが好きにも嫌いにもなる。我々はマウス嗅覚系において、匂いを学習によって意欲的行動に結びつける特定領域を見出した。嗅皮質の一領域である「嗅結節」の「前内側ドメイン」は匂いの誘引行動学習の際に活性化し、「外側ドメイン」は忌避行動学習の際に活性化する。しかし、匂いが学習に応じて特定の嗅覚脳領域を活性化する神経回路の可塑性機構は不明である。本研究では嗅結節ドメインを足掛かりに、匂いを特定の意欲的行動に結びつける神経回路の可塑性機構を、匂いの誘引行動の代表例である食行動を題材に、「強化される神経投射」の同定および「神経調節因子」の役割から明らかにする。そのために、食行動に関係する神経調節因子の嗅覚脳領域における発現を調べ、神経調節性シグナルが匂いの意欲的行動と神経回路の可塑性に与える役割を検討する。

【方法】遺伝子改変マウスに対するウイルス投与によって、特定の嗅覚神経回路にチャネルロドプシンと赤色蛍光蛋白を発現させ、光刺激とえさ報酬あるいは電気ショックとの連合学習を行い、学習成立後に嗅結節ドメインにおける活性化軸索末端の構造変化を組織学的に検討した。また、嗅覚脳領域において摂食調節に関わる神経調節シグナル分子の発現を調べ、嗅結節前内側ドメインに高発現する分子に着目してその嗅覚行動学習における役割を検討した。

【結果】1. 強化される神経投射の同定について：嗅結節は、嗅球からの末梢性軸索投射によって匂い情報を受けるだけでなく、梨状皮質など他の嗅皮質領域や扁桃体など様々な領域から連合性軸索投射を受ける。しかし、どの投射入力が強化されるかは全く分かっていない。光遺伝学を用いて解析したところ、連合性軸索投射の光刺激と誘引行動の連合学習を行った場合には軸索末端が嗅結節前内側ドメイン特異的に大きく発達した。反対に、連合性軸索投射の光刺激と忌避行動の連合学習を行った場合には軸索末端が嗅結節前外側ドメイン特異的に大きく発達した。2. 神経調節因子の役割の解明について：神経活動を調節する神経調節因子のうち、摂食行動に関わる分子を選んで発現レベルを調べ、多くの分子が嗅結節前内側ドメインに高発現していることを見出した。その中で摂食促進に働くオレキシン受容体に着目し、アンタゴニストを嗅結節前内側ドメインに局所投与したところ、匂い刺激に対する誘引行動学習が抑制され、更に匂いの忌避行動が促進された。

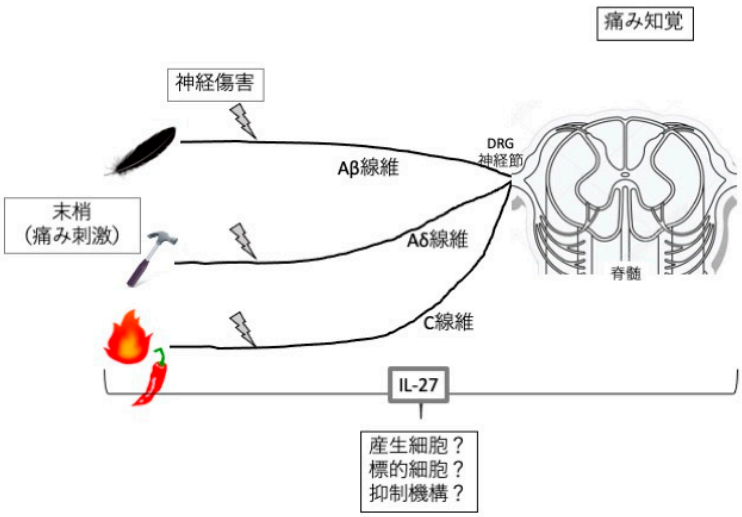
嗅覚行動学習による嗅結節への連合性軸索の可塑的変化と前内側ドメインへの摂食関連シグナルの役割



55　IL-27による新規疼痛制御機構の解明と治療応用	吉田　裕樹

【目的】インターロイキン 27（IL-27）は、IL-12 サイトカインファミリーに属するサイトカインであり、p28 サブユニットと EBI-3 サブユニットからなる。IL-27 は Th1 誘導作用に加え、免疫・炎症抑制作用を持つユニークなサイトカインであり、特にその免疫・炎症抑制作用は、自己免疫疾患や生活習慣病の背景にある自然炎症、あるいは感染に引き続く過剰な炎症を抑制しうる新規の抗炎症・免疫抑制剤の標的として注目されている。近年、我々は、IL-27 には疼痛抑制作用があることを見出した。IL-27 サブユニット、あるいは受容体（WSX-1 分子）を欠損するマウスは、痛み刺激に過敏になり、また神経障害に伴う神経因性疼痛が過剰になる。IL-27 による疼痛抑制作用は、既知の消炎鎮痛薬やオピオイド受容体を介したものとは全く異なる新規の疼痛抑制作用によるものと考えられる。本研究では、この IL-27 による疼痛抑制作用に関して、以下の点を明らかにすることを目的とする。1. IL-27 産生細胞、およびその標的となる細胞（例：皮膚に存在する細胞、伝達神経、中枢神経系の細胞など）を同定し、その分子機構を明らかにする。2. IL-27 投与と同様の効果を持つ低分子物質などのスクリーニングを行い、新規鎮痛薬のシーズを探索する。
【方法】IL-27 産生細胞を同定する目的で、IL-27 p28 サブユニットの下流に Venus（蛍光色素）をコードする遺伝子を導入したレポーターマウスを作製し、組織切片を蛍光顕微鏡で解析を行った。IL-27 標的細胞を同定する目的で、痛覚を伝える C 線維を単離し、RT-PCR 法で受容体（WSX-1 分子）の発現を解析した。また、IL-27 シグナル欠損時の疼痛過敏の責任細胞（神経線維）を同定する目的で、生体外に単離した神経線維を刺激し、各神経線維の興奮（発火）を測定した。また、神経線維以外に、皮膚や、中枢神経系が IL-27 の産生細胞・標的部位となっている可能性を考え、単離可能な細胞に関して IL-27 やその受容体の発現を解析した。IL-27 に関する創薬シーズの探索について、上記 IL-27 レポーターマウスと同様のレポーターベクターを遺伝子導入したレポーター細胞を作製し、IL-27 産生を誘導する物質の探索に方針を変更、スクリーニングを行った。
【結果】IL-27 レポーターマウス組織の蛍光顕微鏡による観察では、皮膚、神経線維、中枢神経系ともに、無刺激状態で蛍光シグナルを発する細胞は観察されなかった。IL-27p28、および WSX-1 を欠損するマウス由来の C 線維はともに、野生型に比べ過剰な神経興奮を示した。しかし、これらの細胞において p28 や WSX-1 の発現は確認できなかった。皮膚ランゲルハンス細胞、中枢内グリア細胞では、WSX-1 の発現が確認できた。レポーター細胞を用いたスクリーニングでは、複数の IL-27 産生誘導物質候補を得ることが出来た。

IL-27 による疼痛制御；産生細胞と標的部位



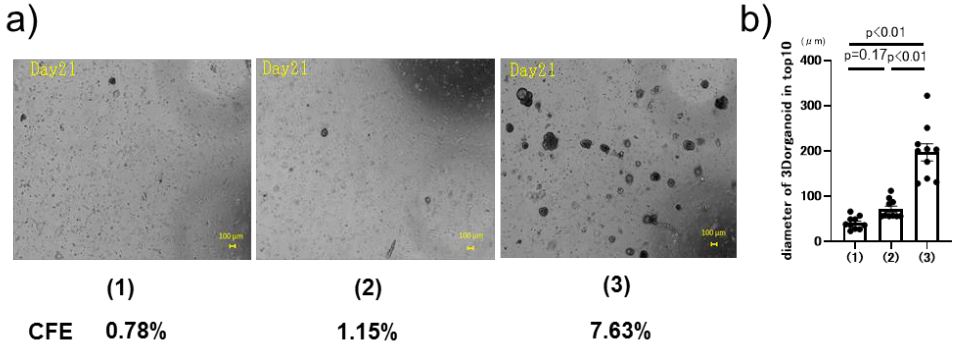
56　II型肺胞上皮細胞の組織幹細胞としての不均一性の解明	荒屋　潤

【目的】II型肺胞上皮細胞（AT2）はI型肺胞細胞に分化しうる組織幹細胞であり、肺胞構造及び機能の恒常性維持で最も重要な細胞である。慢性閉塞性肺疾患（COPD）で、AT2における細胞死、細胞老化、治癒過程での機能異常などが病態進展に関与する可能性は過去に報告されている。AT2は不均一な表現型の細胞集団である可能性があり、表現型の変化や幹細胞性低下がCOPD病態進展に関与する可能性がある。さらにAT2表現型不均一性の相違がCOPD病態における肺気腫及び細気道病変の混在における多様性の原因となる可能性もあるが、その不均一性の詳細は解明されていない。近年のsingle-cell transcriptomic analysis手法の確立により、個々の細胞における遺伝子発現の違いをベースにしたcell clusteringにより、様々な病態に関与する新規細胞集団が同定されている。肺から分離したAT2のみにfocusしたsingle-cell transcriptomic analysisによりAT2の表現型や組織幹細胞の不均一性を明らかにすることは、COPD病態を理解する上での重要な知見となる可能性がある。AT2の表現型不均一性や、その機能評価をするためには、患者肺由来AT2の大量培養系の確立が必要である。近年、肺組織から分離したAT2としての形質を維持しながら増殖可能な、3次元培養系がいくつか報告されている。そこで、より効率的にAT2の増殖が可能な3次元培養系を確立し、正常、COPD肺組織から分離したAT2を3次元培養系で増殖させた上で、single-cell transcriptomic analysisを行うことを目的とした検討を行うこととした。AT2のstemnessを含む表現型不均一性を評価し、COPD病態進展に、より特異的に関与するAT2のcell clusterを同定し、さらに細胞死や細胞老化の制御機構で、COPD病態変化に関与が報告されている蛋白恒常性維持機構能の役割を明らかにすることを最終的な目的とする。

【方法】手術肺検体からLung Dissociation Kitを使用しsingle cell suspensionを作製した。CD45microbeadsを用いて血球成分を除去し、AT2マーカーであるEPCAMとHT2-280を用いて、両者の陽性細胞をcell sorterにて回収した。細胞懸濁液とマトリゲルを混合し3Dドーム構造を形成し、マトリゲルを固形化してから培地を投与し3次元培養を行った。3Dドーム構造を形成するヒトAT2の3次元培養系の報告は過去に3報あり、より効率的な増殖が得られるmedium、inhibitor、growth factorの組み合わせを、それらの報告をもとにして検討した。1. 培地にSAGMを使用し3日毎にmedium交換し、マトリゲルにJagged-1を加えた方法、2. 培地にAdvanced DMEM/F-12を使用し3日毎にmedium交換し、Nicotinamideなどを添加した方法、3. 培地にAdvanced DMEM/F-12を使用し3日毎にmedium交換し、多種のinhibitor、growth factorを添加した方法を比較検討した。

【結果】三つの培養法すべてでAT2増殖が得られたが、3. の方法が他と比較し有意差をもって、AT2の形態を維持しながら最も効率的な細胞増殖が得られた（培養開始21日目の10個のオルガノイド径、細胞増殖が得られた比率（colony-forming efficiency：CFE）にて評価）。以上より、3. の方法が、より増殖能がある患者肺由来のAT2の3次元培養系として有用である結果を得た。

3種類のオルガノイド3次元培養法の比較（day21評価）



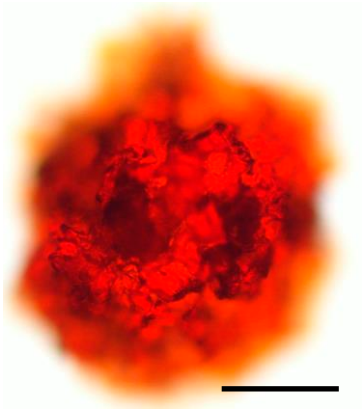
57　脂肪組織から作製したインスリン産生細胞自家移植	池本　哲也

【目的】I 型糖尿病は機序不明な自己免疫反応による膵島破壊によって生じた体内のインスリン絶対的枯渇を主体とし、根治的治療の登場が待たれる疾患である。欧米では膵島移植が I 型糖尿病の根治的治療のオプションであるものの、絶対的ドナー不足に悩む我が国においては、新たな cell source の開拓が急務である。この問題点の解決策として、我々がこれまでに研究を行ってきた脂肪由来幹細胞（adipose-derived stem cell : ADSC）がある。我々は再生医療技術を用いて、臨床応用可能なレベルのインスリン産生細胞（insulin-producing cell : IPC）を ADSC より効果的に分化誘導することに成功した。そこで、「I 型糖尿病患者自身の少量の脂肪から IPC を分化誘導し、これを自家移植する」という治療戦略を計画中であるが、実際に臨床応用を考慮するにあたり、「I 型糖尿病患者の脂肪から ADSC を分離し、機能的 IPC を作製できるのか」「自家移植した IPC は自己免疫による破壊を受けないで生着するのか」という科学的疑問を追求する必要がある。

【方法】1. I 型糖尿病自然発症モデルである NOD マウスを用いた。糖尿病を自然発症したマウス皮下脂肪からコラゲナーゼ遠心分離法で ADSC を分離精製・培養し、我々の protocol で IPC を分化誘導、作製した。H.E.および Dithizone 染色、インスリン蛍光免疫染色、mRNA（Ins1,MAFA）を評価した。また、手術時廃棄される脂肪のうち、I 型糖尿病患者から得られたもので同様の検討を行った。STZ 誘導糖尿ヌードマウスの腎被膜下に 2.0×10^6個の IPC を移植し、全身状態・血糖および犠死後の組織を検討した。2. NOD マウスの糖尿病を自然発症したものをドナーおよびレシピエントとして、ドナーの脂肪組織より 1 の方法で IPC を分化誘導し、レシピエントの腎被膜下に 2.0×10^6個の IPC を移植し、「I 型糖尿病の IPC 自家移植モデル」を確立した。血糖変動および組織（リンパ球浸潤・IPC の破壊度・抗 GAD 抗体、PDL1 抗体、ZnT8）を評価した。

【結果】本 protocol から作製された IPC は I 型糖尿病患者の脂肪組織から作製された IPC であっても *in vitro／in vivo* ともに十分な機能を発揮することが証明された。また、I 型糖尿病モデルマウスである NOD マウスを用いて、I 型糖尿病発症後の IPC 自家移植モデルを確立し、糖尿発症後の脂肪組織から分化誘導した IPC を移植すると、少なくとも 30 日まで血糖値が正常化すること、および IPC が移植早期では自然免疫および自己免疫により破壊を受けないことを証明した。

I 型糖尿病患者の脂肪より作製された IPC



100 μ m

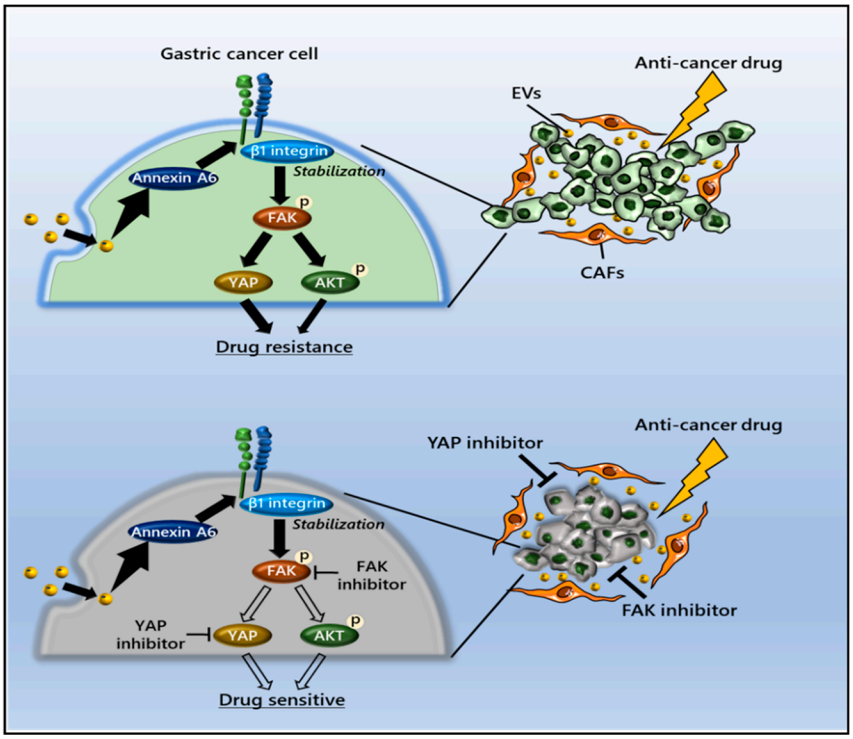
58　胃癌腹膜播種を促進する細胞間クロストーク機構の解明	石本　崇胤

【目的】近年、胃癌に対する薬物療法においてもハーセプチンなどの分子標的薬が認可され従来の抗がん剤との併用によって一定の効果を示しているが、腹膜播種を有する進行・再発胃癌のコントロールは困難である。本研究の目的は、腹膜播種を伴うスキルス胃癌において、がん - ストローマ細胞ネットワークの分子メカニズムについてシングルセルプロテオミクス解析技術を用いて明らかにすることである。

【方法】研究方法の具体的項目は、1. がん性腹水の成分解析、2. 同腹水の細胞分画・活性化シグナル解析、3. 抗がん剤抵抗性に関わる CAFs 由来因子の同定、4. 腹膜播種マウスモデルを用いた *in vivo* 検証を行うことであった。

【結果】現在までに 28 症例の胃がん性腹水サンプルを用いて、LC-MS/MS による網羅的なプロテオミクスを実施した。その結果、肝硬変由来の腹水と比較してがん性腹水において特異的に発現が高い細胞外マトリックスタンパク質を同定した。同時に、マスサイトメトリーを用いたシングルセルプロテオミクスを実施し、がん性腹水中の mesenchymal cell 分画において、老化関連分泌形質（SASP）を呈する P16 high／IL-6 high の細胞群が存在することを確認した。CAFs および胃がん細胞由来エクソソームの網羅的プロテオミクスを行った結果、CAFs 由来エクソソーム特異的に Annexin A6 タンパク質が発現することを明らかにした。Annexin A6 は胃がん組織内においても腫瘍間質のみで発現することを確認した。さらに CAFs 由来エクソソームに含有される Annexin A6 は胃がん細胞のインテグリン β1 タンパク質を細胞膜上に安定化させることで、細胞内で FAK-YAP シグナルを活性化し、マトリックス環境下において抗がん剤抵抗性を促進する。という新しい知見を見出した。

CAFs 由来エクソソームを介した抗がん剤抵抗性分子機構



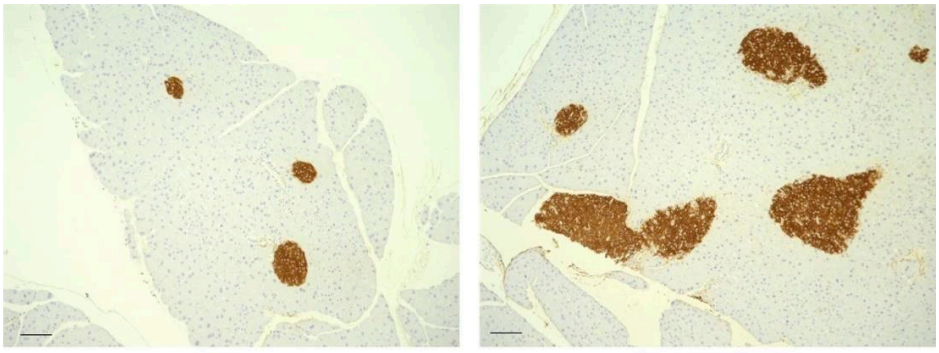
59　神経シグナルによる代償性細胞増殖制御機構の解明	今井　淳太

【目的】生物においては、臓器傷害などの個体の状況の変化に応じて、それを修復するため、あるいはその状況に適応するために実質細胞の増殖を促進する機構が存在する。本研究では、この状況に応じた細胞増殖を、神経シグナルが制御するメカニズムを解明することが目的である。

【方法】1. 膵臓に分布する迷走神経を選択的に活性化するマウスの解析：迷走神経を活性化することが膵β細胞や肝細胞の増殖において十分条件であるかは明らかでない。また、生体リズムとの関連を含め、どのタイミングでの迷走神経刺激が効果的に膵β細胞の増殖を惹起するかなど、全く不明である。そこで、光遺伝学的な手法で迷走神経遠心路を選択的に刺激する手法を想起し、それを用いて膵β細胞や肝細胞増殖を引き起こすか否かを検討した。cholinergic neuron で選択的に Cre リコンビナーゼを発現する ChAT-Cre マウスと、Cre リコンビナーゼにより誘導され、CAG プロモーター下で光活性化タンパクである ChR2 を発現するマウスを交配することにより、acetylcholine 作動性神経特異的 ChR2 発現マウスの樹立に成功した（ChAT-ChR2 マウス）。このマウスを用いて膵へ投射する迷走神経を選択的、安定的かつ持続的に刺激した際の膵β細胞増殖を観察した。2. 生きた状態で細胞増殖をモニターするマウスを用いた迷走神経活性化による細胞増殖の経時的観察 : 血中のルシフェラーゼ活性を定量することにより同一個体において膵β細胞や肝細胞の増殖をモニターできるマウスを作製した。このマウスで、肝臓 - 膵β細胞間神経ネットワーク経路を刺激した際の膵β細胞の増殖を経時的に観察した。

【結果】1. 膵臓に分布する迷走神経を選択的に活性化するマウスの解析：ChAT-ChR2 マウスを用いて、横隔膜下迷走神経を特異的に光刺激するために、光ファイバー留置手術を開発した。この方法によって膵臓に分布する線維を含む迷走神経を 2 週間にわたって刺激したところ、膵島内 BrdU 陽性細胞が対照マウスに比較して有意に増加した。このことから、持続的な迷走神経刺激によって膵β細胞増殖が誘導されることが明らかになった。さらにこのマウスにおいて 2 週間迷走神経刺激を行い、膵β細胞量を観察したところ、膵β細胞量は有意に増加した（下図）。2. 生きた状態で細胞増殖をモニターするマウスを用いた迷走神経活性化による細胞増殖の経時的観察：血中のルシフェラーゼ活性を測定することで、肝臓の増殖をモニターできるマウス（肝細胞増殖モニターマウス）において、肝臓部分切除を行った。このマウスで経時的に血中ルシフェラーゼ活性を測定したところ、組織学的な肝細胞増殖所見とほぼ一致して血中でのルシフェラーゼ活性の著明な増加が認められた。一方、膵β細胞増殖モニターマウスにおいて、肝臓への遺伝子導入によって肝臓 - 膵β細胞間神経ネットワーク経路を刺激した。このマウスで経時的に血中ルシフェラーゼ活性を測定したところ、組織学的な膵β細胞増殖所見とほぼ一致して血中でのルシフェラーゼ活性が著明に増加した。

遺伝学的手法による膵臓迷走神経特異的刺激による膵β細胞量増加



対照　　迷走神経刺激

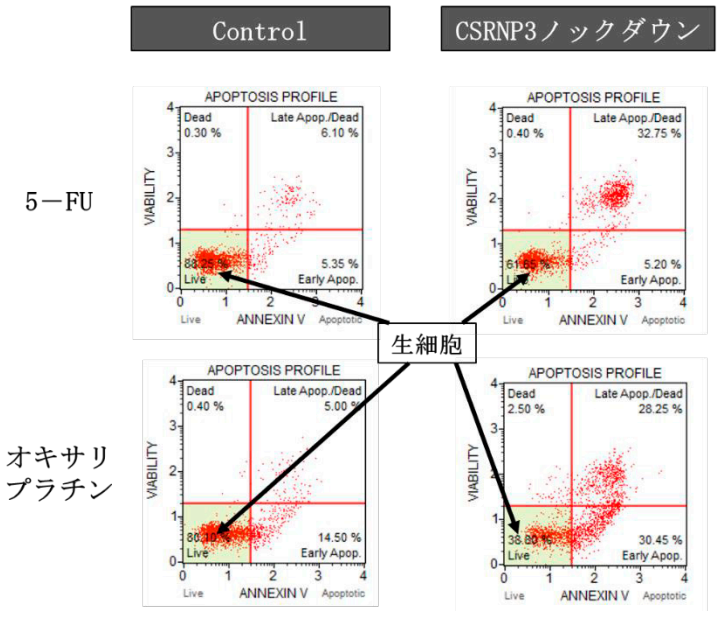
60　胃癌周術期化学療法効果予測バイオマーカーの探索	神田　光郎

【目的】再発率の高い Stage Ⅲ胃癌を対象に、S-1＋オキサリプラチン併用療法（SOX 療法）による術前補助化学療法を加えた周術期化学療法の優越性を検証する試験ランダム化比較第Ⅲ相試験 JCOG1509 が実施中である。術前補助化学療法の効果が全ての対象症例において均一であるとは考えにくく、治療効果が事前に予測できれば、個々の患者に応じた最適な治療法選択が可能となる。将来の JCOG1509 附随研究（術前 SOX 療法の効果予測因子を同定するためのバイオマーカー研究）に向けて、pilot 研究として、名古屋大学医学部附属病院で術前化学療法を施行した進行胃癌を対象に①JCOG1509 附随研究で解析対象とするバイオマーカー候補分子の同定のためのマルチオミクス解析を行う、②術前生検検体からの癌パネル解析が実施可能かを確認する、③化学療法耐性への関与が示唆される新規バイオマーカー候補について基礎実験を行う、ことを目的とした。

【方法】化学療法著効例と抵抗例（各 4 例）を対象に、組織検体を用いた RNA-sequencing、血漿検体を用いたプロテオーム解析と microRNA array を実施し、候補バイオマーカーを抽出した。患者固有の胃癌ゲノムの状態を評価するための検体としては治療前癌組織が理想的である。FFPE 検体の作製工程や長期保存による DNA 損傷や検体量不足ががんパネル解析実施において不利な要素となりうるため、がんパネル解析が試料量の少ない治療前生検 FFPE 試料においてどの程度の精度で実施可能であるか、術前化学療法により本来得られるべきゲノム情報がどの程度の影響を受けるかといった点について検討した。SOX 療法と同様の FU 系薬剤とプラチナ系薬剤の併用化学療法耐性への関与が示唆される新規バイオマーカー候補について基礎実験を行った。

【結果】組織検体を用いた RNA-sequencing により、化学療法抵抗例の胃癌原発巣組織中で特異的に高発現する 16 分子を同定した。そのうち、cysteine and serine rich nuclear protein 3（CSRNP3）を有望な胃癌化学療法感受性の調整因子かつバイオマーカーと考え、詳細に調査した。組織中 CSRNP3 発現度は進行胃癌の切除後再発や化学療法奏効度と相関していた。また特異的 CSRNP3 ノックダウン胃癌細胞株を樹立し、CSRNP3 阻害によって化学療法抵抗性胃癌細胞株の 5-FU とオキサリプラチンに対する感受性が増加することを明らかにした。血漿検体を用いたプロテオーム解析と microRNA array により、化学療法に抵抗した胃癌症例の血液中に特徴的な発現を示すタンパクと microRNA 群を同定した。内視鏡下生検検体から、がんパネル解析に必要な量および質のゲノム DNA が調製可能であることと、パネル解析に必要なシーケンスデータ取得が可能であることが確認された。

化学療法感受性調節分子 CSRNP3 ノックダウンによる生細胞率減少



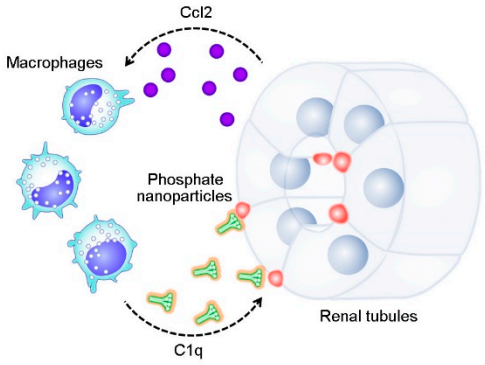
61　食塩感受性の分子基盤の解明	柴田　茂

【目的】高血圧は日本人の国民病であり、脳心血管疾患や腎臓病の進展を介して国民の健康に重大な影響を及ぼしている。高血圧は食塩の摂取量と密接に関連するものの、食塩摂取に伴う血圧上昇には大きな個人差があり、食塩摂取が心血管系や腎機能に及ぼす影響も一律ではない。このような食塩感受性の本態や、食塩感受性高血圧に伴う臓器障害の分子基盤については多くの未解明の領域が残されている。昨今、慢性腎臓病に合併する無機リン酸（以下リン）の代謝異常と臓器障害との関連が注目されているが、腎臓においては近位尿細管でナトリウムとリンが共輸送されている。本研究では、食塩感受性高血圧に合併する心腎障害におけるリン代謝異常の関与を検討した。

【方法】Dahl 食塩感受性高血圧ラットを用い、通常食飼育群（DSN）、高食塩食飼育群（DSH）、および腸管においてリンを吸着するスクロオキシ水酸化鉄を投与した群（DSH＋2.5%SF 群）にて検討を行った。4 週後に心・腎を採取し、組織所見や蛋白発現を比較検討するとともに、マイクロアレイにより網羅的に遺伝子プロファイルを解析した。また近位尿細管由来の NRK-52E 細胞を用いてリンの直接作用を検討した。

【結果】DSN 群と比較し DSH 群では有意な血圧上昇とアルブミン尿の増加が認められた一方で、DSH＋2.5%SF 群では血圧は DSH 群と同程度であったものの尿中アルブミン排泄は有意に軽減しており、組織所見においても腎障害の軽減が確認された。DSH 群では近位尿細管近傍に顕著な炎症細胞浸潤が認められたが、DSH＋2.5%SF 群ではこの所見が改善していた。本モデルでリン代謝に関連するパラメータについて詳細な検討を行ったところ、血中リン濃度については群間で有意差が認められなかったが、尿中リン排泄量ならびにリン排泄分画は DSH 群で有意に上昇していることが判明した。DSH＋2.5%SF 群ではこの変化が抑制されており、リン排泄分画と炎症細胞浸潤との間に有意な相関が認められたことから、リン排泄分画の変化が近位尿細管の炎症誘導と関連する可能性が考えられた。腎尿細管におけるナトリウム・リン共輸送体については、NaPi2a・NaPi2c ともに DSN 群と DSH 群では明らかな差異が認められず、DSH＋2.5%SF 群にて有意な上昇が認められた。心組織での検討では、DSH 群、DSH＋2.5%SF 群ともに同程度の心肥大が認められたが、炎症細胞の浸潤は DSH＋2.5%SF 群で有意に軽減していた。リン代謝異常と臓器障害との関連を明確にするため、近位尿細管細胞由来の NRK-52E での検討を行ったところ、リン添加によって炎症性サイトカインである Ccl2 の発現誘導が認められた。この変化は NaPi2a のノックダウンでは消失しなかった一方で、リン含有微粒子（phosphate-containing nanoparticle）の除去によって完全に抑制されたことから、calciprotein particle などのリン含有微粒子が近位尿細管で炎症誘導作用を有することが示唆された。最後に、マイクロアレイ解析により DSH 群と DSH＋2.5%SF 群の遺伝子発現を比較したところ、補体成分の遺伝子発現に差異が認められた。実際に DSH 群では主に近位尿細管近傍に C1q の沈着が認められたが、DSH＋2.5%SF 群ではこの変化が抑制されていることが明らかとなった。以上の解析から、食塩感受性高血圧ではリン代謝異常の合併が認められ、尿細管へのリン負荷がリン含有微粒子の形成を介して尿細管の炎症を誘導する可能性が示された。

食塩感受性高血圧とリン代謝異常による尿細管障害のメカニズム



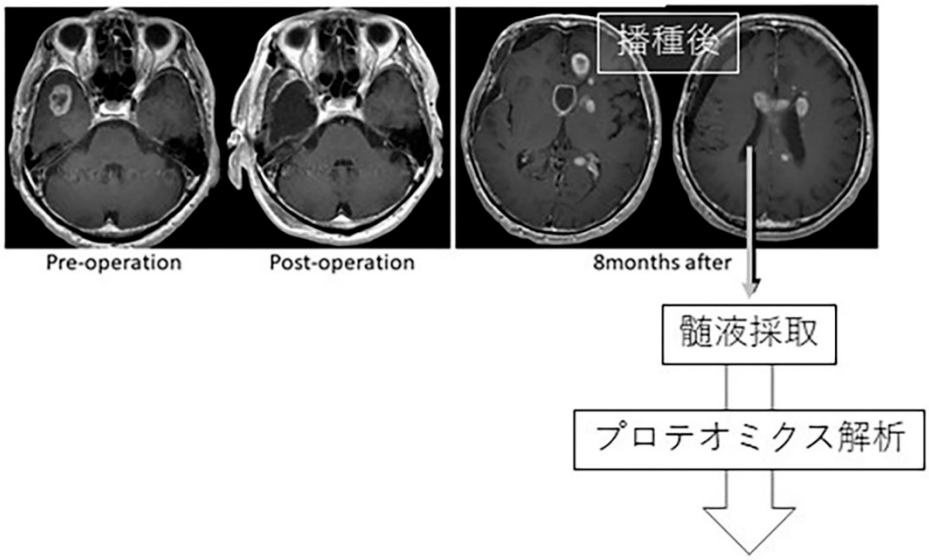
62　膠芽腫髄液を用いたプロテオミクスによる播種病態解明	柴原　一陽

【目的】膠芽腫は脳原発悪性腫瘍で、5 年生存率 10%未満、全生存期間中央値 14 か月と予後不良の疾患である。無再発生存期間は 7〜9 か月とされ、局所再発または原発巣と異なる遠隔部に再発する播種再発を認める。本研究の目的は、膠芽腫の予後不良の一因である播種病態に関与する因子をプロテオミクス解析で明らかにすることである。

【方法】播種病態に髄液が関与すると想定し、膠芽腫播種後髄液を対象試料とした。プロテオミクス解析は、本学理学部附属疾患プロテオミクスセンターとの共同研究で行い、使用した質量分析計は Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific) ベンチトップ型四重極フーリエ変換ハイブリッド質量分析計であった。初めに、非膠芽腫例の髄液を用いて、髄液を用いたプロテオゲノミクス解析が可能かどうかの予備実験を行った。続いて安定供給できる膠芽腫培養細胞の上清を用いたプロテオゲノミクス解析を行い、最後に、膠芽腫播種後髄液を用いた解析を行った。

【結果】非膠芽腫例の髄液を用いた予備実験ではわずか 10 μL の髄液から 768 種類のタンパクを同定することが可能で、分泌タンパクが 367 種類、膜タンパクが 179 種類含まれていた。培養上清を用いた解析は、血清培地と無血清培地の 2 通りを行い、血清培地 10 μL から 206 種類のタンパクの同定に成功した。無血清培地に関してはまだ動態が安定せず再検討している。そして、膠芽腫播種後髄液 4 検体を用い、同様に 10 μL から 939 種類のタンパク同定が可能であった。特に、非膠芽腫例の髄液の結果を比較対象とすると、45 種類が $p<0.1$ で膠芽腫播種後髄液に特徴的であった。

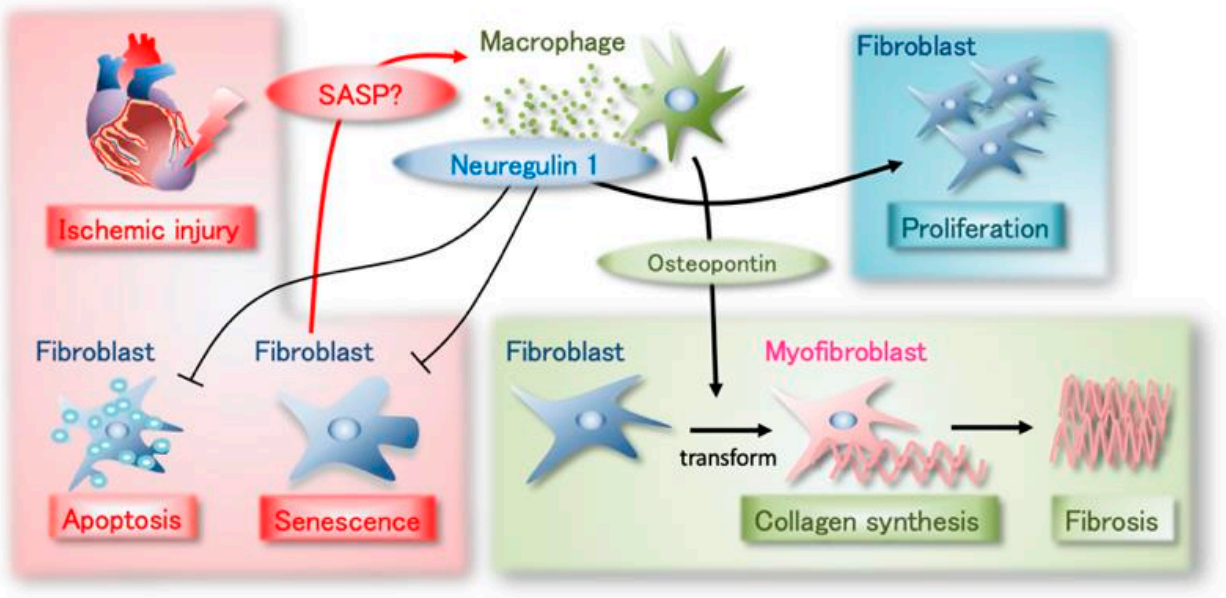
播種再発を呈した膠芽腫症例の経時的 MRI 及び研究シェーマ



63　心筋梗塞後組織修復と心不全発症のメカニズムの解明	白石　学

【目的】近年、心筋梗塞の救命率は上昇したものの、心不全患者は増加傾向であり、死亡率も極めて高いことから、心不全の根本的な病因究明と新たな治療法の確立が急務である。本研究の目的は、心筋梗塞発症後の十分な組織修復の誘導と心機能確保のために、虚血侵襲から線維芽細胞を保護するための主要調節因子及びメカニズムを特定することである。心筋梗塞時に障害を受けた線維芽細胞の長期的予後に対する影響も少なく無いことが予想され、本研究によって得られる研究成果は、心筋梗塞後の心不全発症の病態解明と梗塞時に線維芽細胞のダメージを抑制することに焦点を当てた新たな切り口からの治療法開発の基盤になると期待され、心筋梗塞後の生命予後向上に重要な意義を有している。
【方法】虚血障害による線維芽細胞の老化やアポトーシスを制御する分子を同定する目的でマウス心臓からマクロファージを採取し、遺伝子発現の網羅的な解析を行った。線維芽細胞とマクロファージの共培養実験で同定した分泌タンパクの受容体をブロックする抗体を使用し、培養線維芽細胞の老化メカニズムの解析を行った。また、心筋梗塞モデルマウスに同定した分泌タンパクの受容体をブロックする抗体を投与し、生体内において線維芽細胞の老化進行が線維化に与える影響を解析した。
【結果】虚血障害による線維芽細胞の老化やアポトーシスを制御する分子としてマクロファージが分泌する Neuregulin1（Nrg1）を同定した。更に線維芽細胞の Nrg1 受容体をブロックすると線維芽細胞の老化が進行し、心筋梗塞領域のみならず遠隔領域にも過剰に線維化が亢進すること発見し、心不全発症メカニズムの一端を解明した。

心筋梗塞における線維芽細胞の老化・アポトーシスの制御機構と線維化の関係



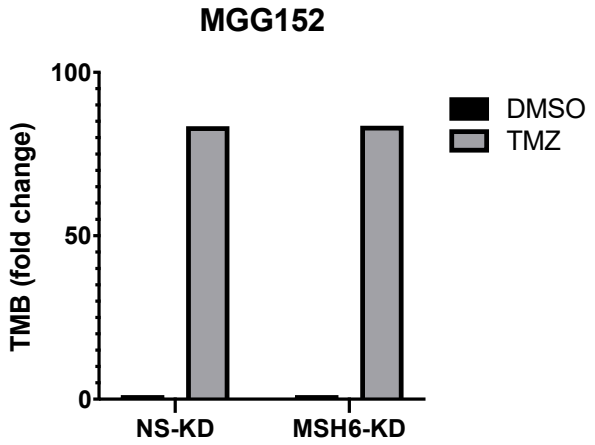
64　神経膠腫に対するDNA高変異発現と免疫応答機序の解明	立石　健祐

【目的】神経膠腫（グリオーマ）のアルキル化剤治療後に生じる DNA 高変異状態と悪性転化の機序解明を図ること、また DNA 高変異状態を呈したグリオーマに対する治療標的の探求を図ることを研究目的に掲げた。

【方法】本研究期間では DNA 高変異モデルの作製と樹立細胞に対する薬剤感受性試験を中心とした検討を図った。具体的にはアルキル化剤である temozolomide（TMZ）を独自に樹立した IDH1 変異グリオーマ細胞株に投与することで外因的な DNA 高変異モデルの樹立を試みた。また DNA 高変異状態が腫瘍形成促進に及ぼす影響を検証した。さらにはエクソームシークエンスにより変異パターンを解析するとともに、ドライバー遺伝子候補を検討した。加えて high-throughput drug screening（HTS）を行い、コントロールモデルとの対比を通じて治療薬剤候補を探求した。その他内因性 DNA 高変異グリオーマ（YMG6R）に対して経時的に採取した腫瘍から細胞株樹立を行いドライバー遺伝子異常の同定と DNA 高変異がどのように変化するか検討した。

【結果】独自に樹立した内因性 IDH1 変異グリオーマ MGG152 細胞を用いて mismatch repair 遺伝子の一つである MSH6 のノックダウンを図った。この細胞とコントロール細胞に対し TMZ を長期間にわたり連続投与した。Whole exome sequencing（WES）を用いて変異状態を検討したところ、コントロール細胞と比較して tumor mutational burden がおおよそ 80 倍と上昇しており、またアルキル化剤投与後に特有の塩基置換パターンが確認されたことから TMZ 誘発性に DNA hypermutation phenotype（HM）が発生した可能性が強く示唆された。次に MGG152 細胞に対し同様の条件で TMZ を投与後、DNA を採取した。WES 解析の結果 MMR 変異が内因性に発生しており、また HM の存在が確認された。これらのペア腫瘍細胞モデルはいずれも *in vitro* 培養下で安定して増殖可能となった。これにより DNA 高変異状態の及ぼす生物学的特徴を検証可能な IDH1 変異グリオーマ細胞株の樹立を世界に先駆けて成功した。その結果、DNA 高変異状態への移行プロセスを研究レベルでモニタリング可能となった。これらの細胞に対して HTS を行い、複数の化合物を候補薬剤として見出しており、現在さらなる解析を進めている。またコントロール細胞と TMZ 長期投与後 HM を呈した MGG152 細胞をマウス脳内に定位的に移植し生存分析を行ったが、両群間で予後に有意な差は認められなかった。加えて内因性 DNA 高変異グリオーマモデル（YMG6R）から細胞株を作製した。経時的に得られた再発検体と細胞株をそれぞれ検討したところ、HM は可逆的な変化を示した。このことからも HM 自体がグリオーマの悪性化促進に及ぼす影響は乏しいことが判明した。

temozolomide 誘発性 DNA hypermutation phenotype



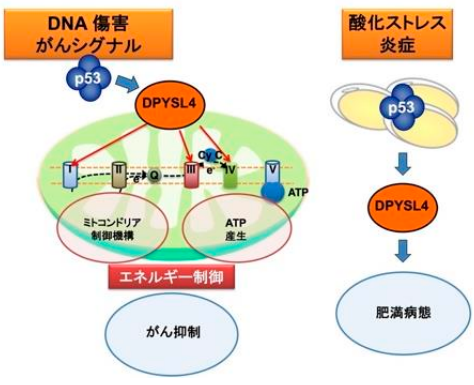
65　呼吸鎖超複合体を介した癌と生活習慣病の分子基盤解明	田中　知明

【目的】ミトコンドリアは約 1,200 種にも及ぶタンパクが複雑な構造体を構成し、ダイナミックに変化することで、生体に必要なエネルギーを産み出すと同時に、老化やがん化シグナル・代謝環境変化に応じて多くの細胞内代謝経路を統括する「要」として機能する。重要なことに、呼吸鎖複合体は、超複合体と呼ばれる高次構造を形成して機能的役割を果たすことが分かってきた。本研究では、「ミトコンドリア超複合体の多面的機能とその制御メカニズムは何か？そして、超複合体とそのエネルギー・代謝機能の変容は、肥満や糖尿病の分子病態にどのように寄与するのか？」という学術的命題に対し、細胞内代謝調節におけるがん抑制遺伝子 p53 に着目し、がんと肥満における共通の分子シグナル経路の中で代謝環境応答変化・細胞内外の代謝制御と細胞増殖・浸潤・腫瘍造成を直接的に結びつけるメカニズムを探索するという新たな切り口からアプローチすることで、がんと肥満の病態形成に共通するミトコンドリア分子基盤の探索とそのエネルギー代謝に与える病態整理的影響を明らかにすることを目的とした。

【方法】大きく分けて五つの検討項目を検討した。1. RNA-seq と ChIP-seq による p53 依存的新規ミトコンドリア代謝調節機能分子の探索：ヒト前駆脂肪細胞を用いて、RNA-Seq 解析、p53ChIP-seq、ヒストンコードの特異抗体（AcH3、H3K4me3、H3K9me3、H3K27me3）を用いた ChIP-seq による統合解析。2. CE-TOFMS を用いたメタボロームによる細胞内代謝産物の網羅的定量解析：メタボローム解析により、DPYSL4 の強制発現もしくはノックダウン時の細胞内代謝産物量の変化を解析した。3. 細胞外フラックスアナライザーによるミトコンドリア機能解析 4. ミトコンドリア超分子複合体解析：ミトコンドリア内膜に存在する五つの複合体と DPYSL4 の会合と機能について解析した。5. マウスにおける病態モデルの作製と解析：細胞株で観察される DPYSL4 の役割が実際に生体においてどのようにがんと代謝変化の病態に関わるのかを検討した。

【結果】ゲノムワイドの統合解析から、ミトコンドリア局在分子である DPYSL4 を同定した。DPYSL4 は、核酸代謝酵素 dihydropyrimidinase と約 60%のアミノ酸の相同性を有する分子である。構造学的には 4 量体を形成し、DPYSL family はヘテロマーを形成することが分かっている。そこで、ミトコンドリアのエネルギー・代謝調節機能と機能的複合体との関わりを検討した。脂肪細胞と種々のがん細胞を用いて解析した結果、DPYSL4 はミトコンドリア超複合体に会合することでミトコンドリア機能を正に調節する機能を持つことが明らかとなった。マウスモデルを用いて DPYSL4 の病態的役割を検討した結果、がんに関しては肺転移能の抑制効果を認め、がん抑制機能を示した。一方で、DPYSL4 はヒト脂肪組織でも発現し、ヒト肥満脂肪組織においてマクロファージマーカー（INFγ、MCP1、CD68）の遺伝子発現とともに、DPYSL4 の高発現を認めた。特に、INFγの発現と肥満度を示す Body Mass Index（BMI）は、DPYSL4 の発現と相関していた。本研究結果から、がんと肥満を結ぶ新たなミトコンドリア機能制御因子 DPYSL4 を同定できた。DPYSL4 はがん細胞においてミトコンドリアでのエネルギー調節を介したがん形成や細胞増殖に関わる重要な p53 下流遺伝子であることが示された。一方で、脂肪組織においては、炎症が p53 - DPYSL4 シグナルを活性化させ、肥満病態に関与する可能性が示唆された。

ミトコンドリア機能調節因子DPYSL4のがんと肥満におけるエネルギー制御機構



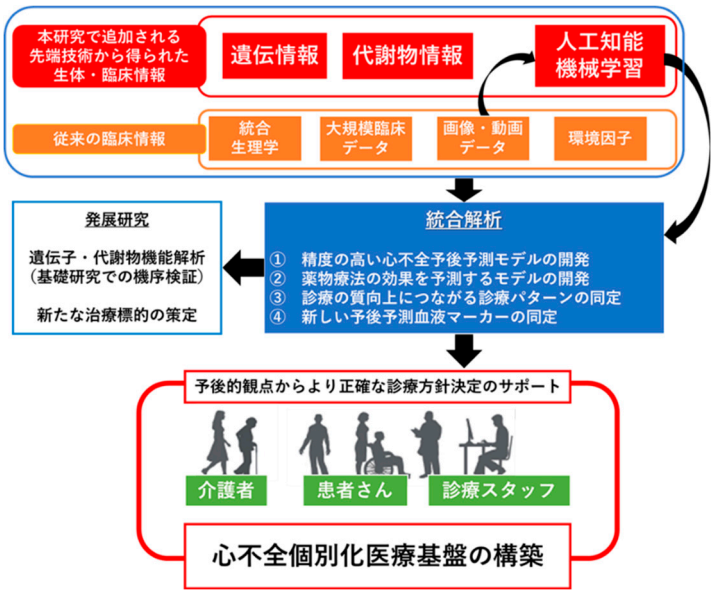
66　先端生体情報統合解析による心不全個別化診療基盤構築	永井　利幸

【目的】高齢化社会の進行に伴い、本邦における心不全患者は増加の一途にあり、心不全医療への介入は喫緊の課題である。心不全診療ガイドラインでは、特に左室機能低下症例に対する神経体液性因子阻害薬を軸とした至適薬物療法を予後改善のため強く推奨している。ところが、中には薬物療法への反応性が著しく乏しい症例も存在する一方で、これらを予測する有効な指標は現在のところ存在しない。各推奨薬剤は独自の作用点と代謝経路を持つため、それらに関連する遺伝子、蛋白合成、代謝物の異常により、薬物効果に個体間相違が生じる可能性が高い。本研究の目的は、心不全症例における従来の臨床背景や簡易バイオマーカーを用いた予後予測モデルに加え、遺伝子・オミックス解析を行うことにより、至適薬物療法に対する、不応メカニズムを解明し、精度の高い薬物効果予測モデルを開発すること、そして人工知能を用いた臨床画像・動画データ解析を合わせ、高精度の心不全予後モデルを開発し、日本人独自の心不全個別化医療基盤を構築し、臨床現場にフィードバックすることである。

【方法】道内 22 施設から Web 登録システムを用いて詳細な臨床情報とともに 2,000 症例を目標に登録し、以下のように各種解析・予後追跡を行う方針とした。1. 各種解析：共同研究施設に各種血液検体・画像データ提供を行い、各種心不全バイオマーカー測定や画像・動画を対象とした人工知能解析、ゲノムワイド関連解析、ジェノタイピング・オミックス解析を実施。心不全バイオマーカーは病態進展の各段階にかかわる項目を測定。ジェノタイピング、オミックス解析に関しては、レニンーアンジオテンシンーアルドステロン系阻害薬、β遮断薬に関わる候補遺伝子および蛋白機能に関わる解析を実施。2. 至適薬物治療の実施と予後追跡：その後全症例にガイドラインベースの治療を厳格に推奨したうえで、2 年間有害事象・アウトカム（死亡・心不全による再入院・左室駆出率 10%以上の低下）追跡を実施。3. 各種予後モデルの開発：有害事象（左室機能低下症例においては至適薬物療法の効果が乏しい）と関連する因子を統計学的に同定し、ネットワーク関連解析を含む統合解析を行うことで、高精度な心不全予後モデル（左室機能低下症例：薬物療法効果予測モデル）を開発。

【結果】令和元年 12 月 20 日に北海道大学医学部倫理委員会の承認が得られ、予定通り上記基準に該当する心不全症例の登録を開始し、令和 3 年 2 月末までに 700 例の症例登録が得られた。また、機械学習による心不全患者の歩行パターン動画研究に関しては企業と共同で、OpenPose®を用いた歩行動画解析法を開発し、特許出願に至った。

本研究の概念図



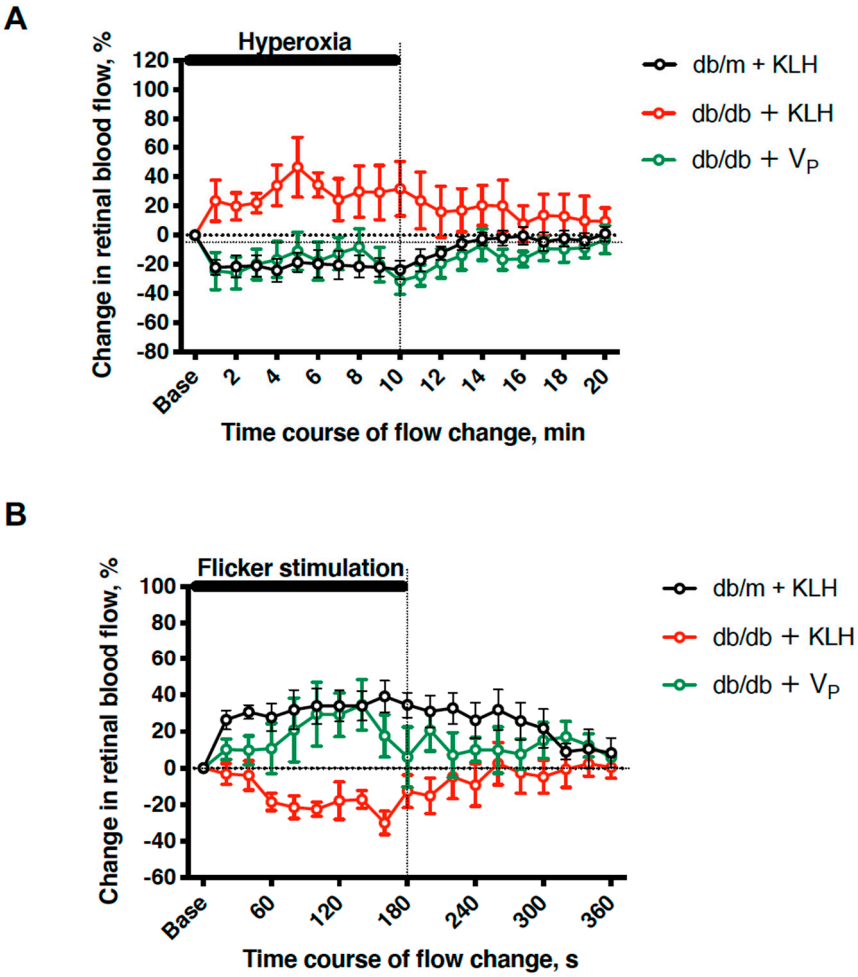
67　神経血管連関とワクチンに着目した糖尿病網膜症治療	長岡　泰司

【目的】早期から適切な介入を行い、眼循環障害を改善することで、その後の糖尿病網膜症の発症・進展を予防できると考えている。すなわち、眼循環を定量的に評価し早期循環障害を捉え、適切な時期から循環改善治療を行うことにより、糖尿病網膜症・黄斑浮腫の早期治療につながると考えられる。我々はペプチドワクチン技術を応用してプロレニンに対するペプチドワクチンの作製に成功しており、このプロレニンワクチンを糖尿病動物に投与して網膜循環および網膜機能の改善効果を検討したい。

【方法】糖尿病マウスと正常血糖マウスを対象として、レーザースペックル血流計（LSFG）を用いてマウス網膜血流量を測定した。高酸素負荷（100%酸素吸入）とフリッカー刺激（12 Hz、3 分間）を投与して網膜血流反応を評価した。

【結果】糖尿病モデルマウスを生後 8 週から経時的に経過観察したところ、高酸素負荷とフリッカー刺激に対する網膜血流反応は正常血糖マウスに比べて減弱していた。プロレニンワクチン投与により、網膜血流反応障害は改善していた。

プロレニンワクチン（Vp）投与により網膜血流調節障害が改善した



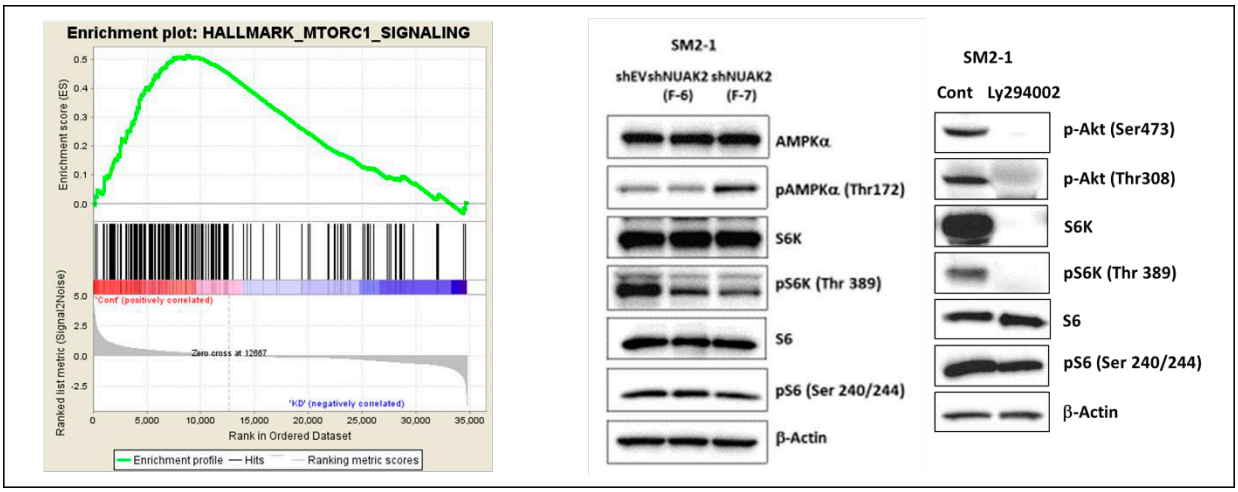
68　NUAK2を標的とした悪性黒色腫の新規治療法の開発	並木　剛

【目的】悪性黒色腫は悪性腫瘍の中でも特に悪性度が高い腫瘍として知られている。我々は末端黒子型悪性黒色腫のゲノム異常解析より予後と強く相関する遺伝子として *NUAK2* をすでに特定している。さらに *in vitro* および *in vivo* の解析より悪性黒色腫の細胞増殖および細胞遊走に強く関わっていることを示している。しかしながら NUAK2 をターゲットとした新規治療法は未だに開発途上である。本研究計画では、NUAK2 をターゲットとした新規治療法の開発を進めるための研究基盤を確立するため NUAK2 の詳細な細胞増殖制御機構を解明し、NUAK2 の機能を抑制可能な薬剤の特定および解析のモデルとなるトランスジェニックマウスの作出と解析を進めていく。

【方法】本研究では、レンチウイルスベクターである pLKO.1 に NUAK2 に対する shRNA を挿入した 2 種類のベクターを NUAK2 のノックダウンに使用。NUAK2 のノックダウン後に悪性黒色腫細胞より RNA を抽出しマイクロアレイ解析とした。マイクロアレイは SurePrint G3 Human GE 8×60K ver3.0 を使用。

【結果】1. NUAK2 に制御される mTOR 関連遺伝子の検討：マイクロアレイを用いて網羅的遺伝子解析を施行し NUAK2 のノックダウンによる遺伝子変動につき解析を行った。NUAK2 をノックダウンした SM2-1 細胞を使用してエンリッチメント解析（Gene Set Enrichment Analysis：GESA 解析）を施行し統計学的有意差（P≦0.05）を示した mTOR 経路を含めた 12 の経路を特定（図）。さらに mTOR 経路の下流に位置する遺伝子（S6K および S6）の発現およびそのリン酸化につき検討。NUAK2 のノックダウンにて S6K のリン酸化の抑制が見られた（図）。また PI3K 経路を Ly294002 にて抑制し mTOR 経路にどのような作用があるのかも検討。Ly294002 で処理した SM2-1 細胞は S6K の発現が減少（図）。これらの結果より、NUAK2 と PI3K は双方ともに mTOR 経路を制御するもののその制御作用は異なることが判明した。**2. NUAK2 をより特異的に阻害できる薬剤の検討：**NUAK2 を阻害する薬剤として糖尿病薬でもあるメトホルミンにつき、その悪性黒色腫細胞数の抑制作用を検討しメトホルミン処理による悪性黒色腫細胞数の抑制効果が示された。**3. Dct-NUAK2 KI マウスにおける悪性黒色腫発症の検討：**色素細胞における NUAK2 の機能を *in vivo* にて検討するためメラニン生合成に枢要な遺伝子である Dct のプロモータ下に NUAK2 を挿入し CRISPR/CAS9 のシステムを用いることでトランスジェニックマウスを作製した。

mTOR 経路のエンリッチメント解析の結果および mTOR 経路下流の遺伝子変動



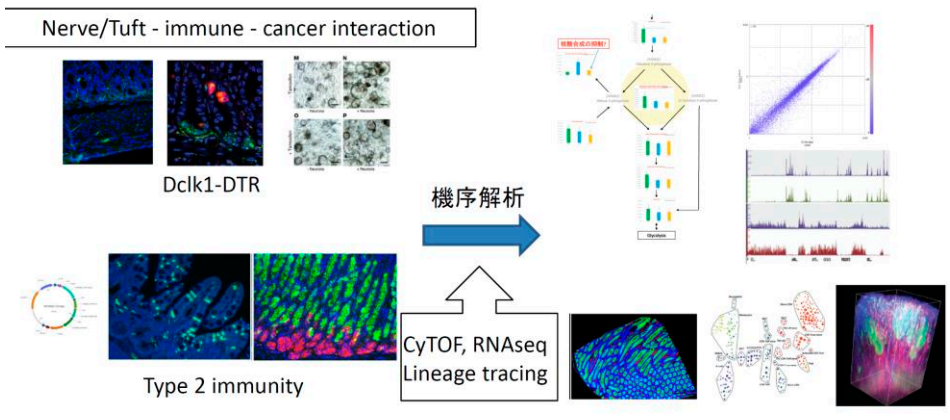
69　神経・免疫連関による胃癌制御機構の解明	早河　翼

【目的】本研究では Tuft 細胞を介したシグナルが免疫系と協調しながら胃癌進展に与える影響を、オミクス解析および系譜解析実験を用いて検討し、神経 - 免疫 - 胃癌連関機構を包括的に解明するとともに、新規治療標的を提示することを目的とした。

【方法】マウス胃炎モデルとして高容量タモキシフェンモデル、IL1β過剰発現モデル、胃癌モデルとして *Mist1*-CreERT ; *Apc*F/F モデルを用い、Dclk1 陽性 Tuft 細胞アブレーションを施行した *Dclk1*-DTR マウスの胃組織における免疫応答状態・遺伝子発現状態・代謝状態の比較を行った。具体的には、FACS/免疫染色による免疫細胞のプロファイリング・RNA シークエンス・メタボローム解析を行った。胃炎・胃癌発生過程において放出される神経伝達物質であり、Tuft 細胞と関連する 2 型免疫との関連が報告されている NMU の働きを解析するため、*NMU* 欠損マウスを用い、免疫・転写プロファイルを比較した。さらに、2 型免疫サイトカインを高発現する AAV ベクターの投与を用い、Tuft 細胞～2 型免疫シグナルの胃組織内免疫応答に与える影響を検討した。また、Tuft 細胞は細胞周期制御因子である p57 を高発現しており、これが自身の持続的静止期を実現している可能性を考えた。Tuft 細胞を特異的に標識できる新規遺伝子改変マウス（*Trpm5*-CreERT マウス）と *Rosa26* レポーターマウスを組み合わせ系譜追跡実験を行い、さらに新規に樹立した *p57*^{flox} マウスを組み合わせることで、Tuft 細胞の脱分化に及ぼす p57 の役割を検討した。

【結果】胃炎モデルである高容量タモキシフェン投与モデル・IL1β過剰発現モデル、さらに胃癌モデルとして *Mist1*-CreERT ; *Apc* F/F モデルともに、*Dclk1*-DTR マウスによる Tuft cell ablation によって有意に上皮細胞増殖が低下した。RNA シークエンスの結果、Tuft cell 消失後にアミノ酸代謝を含む各種代謝関連遺伝子群の発現低下と、MAPK 経路関連遺伝子の発現低下が認められた。胃組織のメタボローム解析を実施した結果、*Dclk1*-DTR アブレーションによりセリン・プロリン系の代謝産物の減少が認められ、これが細胞増殖の低下を引き起こした可能性がある。胃炎モデルと組み合わせた *NMU* 欠損マウスにおいて、前癌病変である化生性病変の出現が有意に抑制された。胃内に浸潤する免疫分画のうち、Mast cell、ILC2 の減少を認め、上皮中では Tuft 細胞が減少していた。胃炎組織中の血球分画の scRNAseq の結果、Mast cell、ILC2 は 2 型サイトカインである IL33、IL13、IL4 を高発現していることがわかった。これらのサイトカインを発現する AAV ベクター投与により、胃内に化生性変化と Tuft 細胞の増生が誘導された。2 型サイトカイン発現細胞と Tuft 細胞の間には相互に活性化を誘導する機構があり、これが化生性変化の原因となっていると考えられる。最後に Tuft cell の脱分化機能の検証のために作製した *Trpm5* CreERT ; *p57* F/F; *R26*-Tomato マウスの解析により、p57 の欠損により Tuft cell が脱分化し幹細胞様機能を有するようになることが示された。炎症および腫瘍遺伝子の変異導入により Tuft 細胞中 p57 の発現が低下することも分かり、実際それらの環境下では Tuft cell が癌起源細胞としての役割も持つようになることが分かった。

神経・免疫連関による胃癌制御機構の解析



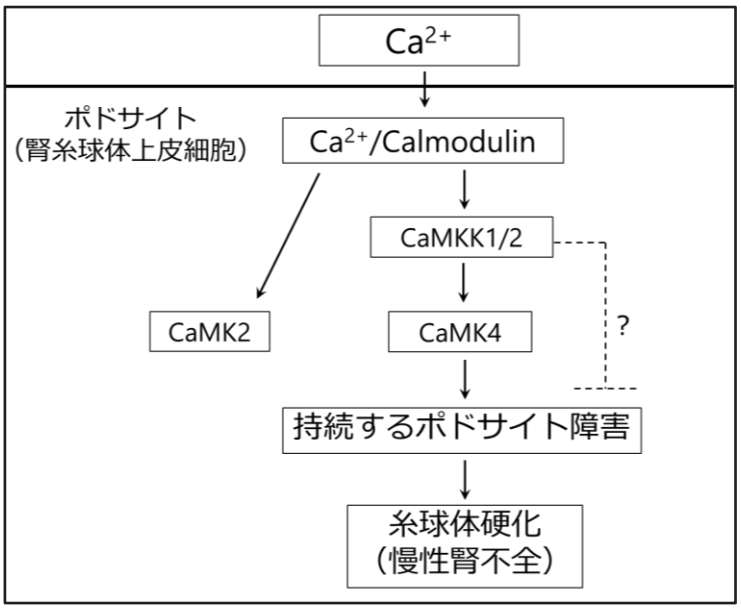
70　慢性腎臓病の進展を抑制するポドサイト標的治療の開発	丸山　彰一

【目的】近年、世界的に増加する慢性腎臓病（CKD）は、心血管疾患の独立したリスク因子であり、透析治療を含め大きな問題となっている。持続するポドサイト障害は、糸球体硬化そして慢性腎不全へと進行する CKD の共通のメカニズムであり、ポドサイトを標的とした治療開発が望まれている。今回、ポドサイト障害に重要な役割を担っているカルシウム（Ca）シグナルの中でも Ca／カルモジュリン依存性キナーゼに着目し、ステロイド抵抗性ネフローゼ症候群などの難治性腎疾患におけるその役割と、治療ターゲットとなり得るか否かについて検証した。また、治療有効性の向上や副作用の軽減を目的に、ドラッグデリバリーシステムを使用した細胞標的治療の開発や腎疾患への臨床応用も望まれているが、現在までのところ実現に至っていない。我々は、ループス腎炎における有効性を報告したポドサイト標的治療としてのネフリン抗体コートナノ粒子につき、難治性ネフローゼ症候群における有用性を検討した。

【方法】ヒト巣状分節性糸球体硬化症（FSGS）患者における Ca／カルモジュリン依存性キナーゼ（CaMK）各分子の発現の評価を、腎生検検体を用いて行った。また、ポドサイト特異的 *CaMK4* 欠損マウス、*CaMKK*（CaMK キナーゼ）欠損マウス、野生型マウスに、FSGS マウスモデルであるアドリアマイシン誘導性腎障害モデルを作製し、CaMK 各分子の発現の変化、尿蛋白の程度の評価を行った。同 FSGS マウスモデルに対して、CaMK4 阻害薬を封入したナノ粒子に抗ネフリン抗体をコートし、腹腔内投与を行った。

【結果】ヒト FSGS 患者では、ポドサイト上における CaMKK、CaMK4 発現は上昇していたが、CaMK2 の発現上昇を認めなかった。ポドサイト特異的 *CaMK4* 欠損マウスにおいてアドリアマイシンにて腎障害を誘導したが、野生型に比して尿蛋白を認めなかった。CaMK4 の活性化に必須の *CaMKK* を欠損させたマウスにおいては、有意差はないものの逆に悪化する傾向がみられた。ネフリン抗体をコートしたナノ粒子に CaMK4 阻害薬を封入したものをアドリアマイシン誘導性のマウスモデルに投与すると、同量のフリーの CaMK4 阻害薬を投与した群に比して有意に蛋白尿を減少させた。

ポドサイトにおける CaMKK－CaMK4 シグナル



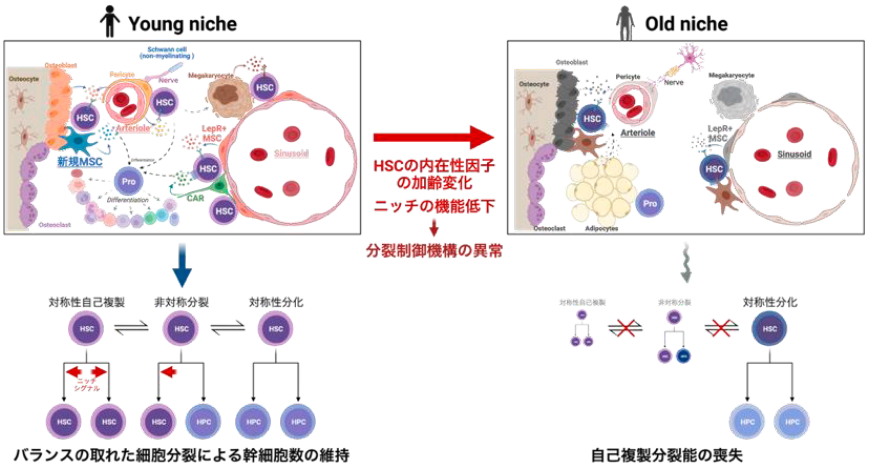
71　老化ニッチによる造血幹細胞の分裂制御異常の分子機構	新井　文用

【目的】加齢に伴う造血微小環境（ニッチ）の機能低下は、造血幹細胞（hematopoietic stem cell：HSC）の分裂パターン ー対称性自己複製分裂・非対称分裂・対称性分化分裂ー に影響を及ぼすことによって、自己複製能の低下と分化異常につながると考えられる。そこで本研究では、HSC の細胞分裂パターンの加齢変化とニッチの老化の関連を明らかにすることを目的とした。

【方法】1. 細胞分裂アッセイ：幼若（4 週齢）、成体（8 週齢）、老齢（18 カ月齢）マウスの造血幹・前駆細胞のシングルセル定量 PCR アレイデータを学習させた人工ニューラルネットワーク（artificial neural network：ANN）を構築した。細胞分裂アッセイでは、学習済 ANN を用いて HSC の娘細胞のアイデンティティーを識別し、その結果に基づいて、分裂パターンとその加齢変化を解析した。2. 新規ニッチ細胞・ニッチ分子の同定：骨内膜領域のライニング細胞（bone lining cell：BLC）のシングルセル定量 PCR アレイ解析、骨髄ストローマ細胞（$CD45^{-}TER119^{-}CD31^{-}$ 細胞）のシングルセル RNA-Seq 解析を行い、ニッチ細胞分画の同定、および HSC の自己複製分裂の制御に関わるニッチ分子の探索を行った。3. 人工ニッチの作製：Matthias P. Lutolf 博士（スイス連邦ローザンヌ工科大学）からの技術指導によって人工ニッチを作製し、HSC の分裂アッセイに用いた。

【結果】1. HSC の分裂パターンの加齢変化：老齢マウスの HSC は、*in vitro* での自己複製分裂能を失っていることが分かった。2. 新規ニッチ細胞・ニッチ分子の同定：骨内膜領域で、主に骨芽細胞から構成される $ALCAM^{+}$ BLC 中に存在する未分化な間葉系幹細胞（mesenchymal stem cell：MSC）に特異的な細胞表面マーカーとして α8-integrin（Itga8）を同定した。さらに、$ALCAM^{+}Itga8^{+}$ BLC は、骨、脂肪、軟骨への多分化能をもつ MSC であり、さらには HSC の骨髄再構築能を維持する能力が高いことを明らかにした。また、骨髄ストローマ細胞のシングルセル RNA-Seq 解析によって、レプチン受容体（LepR）と Cxcl12 を発現する MSC 分画を同定し、この分画が *Igfbp5*、*Adipoq*、*Ibsp* を高発現していることを見いだした。3. 人工ニッチを用いた分裂様式の解析：HSC の分裂解析に用いる人工ニッチとして、ポリエチレングリコール（polyethylene glycol：PEG）ハイドロゲルを基材としたマイクロウェルを作製した。

老化に伴うニッチ機能の低下と HSC の自己複製分裂低下



72　光タイムテーブル法による体内時刻測定法の開発	飯郷　雅之

【目的】体内時計の乱れに関して社会的な興味が高まっている。以前我々はメタボローム法により体内時刻を推定する方法を報告した。また、我々は可視光〜近赤外領域の光を高強度で発生する広帯域光源を作製することに成功した。そこで本研究ではこれらを活用し、ヒト体内時刻の非侵襲リアルタイム計測法開発を目指す。さまざまな時刻に開発済の広帯域光源から光を照射し、さまざまな波長の散乱光または吸収を経時測定することにより「光タイムテーブル」を作成し、個人個人の体内時刻を非侵襲的に簡便に計測するリストバンド型健康機器の開発を目指す。家庭レベルでの睡眠管理や時差ボケの調節など、QOL 向上に資することが期待される。本研究においては、可視光〜近赤外領域の光を活用して、非侵襲的にヒトの体内時刻を測定する方法を開発しようと考えた。さまざまな時刻に開発済の広帯域光源から光を照射し、さまざまな波長の散乱光を測定することにより「光タイムテーブル」を作成し、個人個人の体内時刻を非侵襲的に簡便に測定することができるかどうかを検討することを目的とした。

【方法】生体に損傷を与えずに非侵襲で血中成分を検出できるように、小型・可搬型の光源検出システムを新たに開発した（下図）。生体材料を診断でき、かつ、時間履歴も記録できるように設定した。また本光源を用いて、マウス（CBA/N 系統、雄、7 週齢）の尾および後肢を対象に複数の波長の光源を用いて光照射を行い、その吸収特性を測定することを試みた。

【結果】本研究で開発した小型・可搬型の光源検出システムに用いた光源と検出器の発光スペクトルと感度スペクトルは赤外領域にある。光源の発光スペクトルはやや広いが、ターゲットとしている分子構造の吸収スペクトルと合致した発光スペクトルを有しており、定量評価できる光源となった。検出器の感度スペクトルは可視光〜近赤外領域を検出可能な感度を有していた。小型・可搬型システムの光源には放物面ミラーを取り付け、ビームの空間分布を制限した。このため、所望の領域のみに光照射を行うことが可能となった。マウスを対象にした光照射実験では、マウスの動きのために光源と検出器のアラインメントが安定せず、出力される波形は安定しなかった。今後さらに研究を続けることにより、マウス等の実験動物、さらにはヒトを対象とした研究を進め、「光タイムテーブル法」による体内時刻測定法の開発を進めていきたい。

今回開発した小型・可搬型光源・検出システム

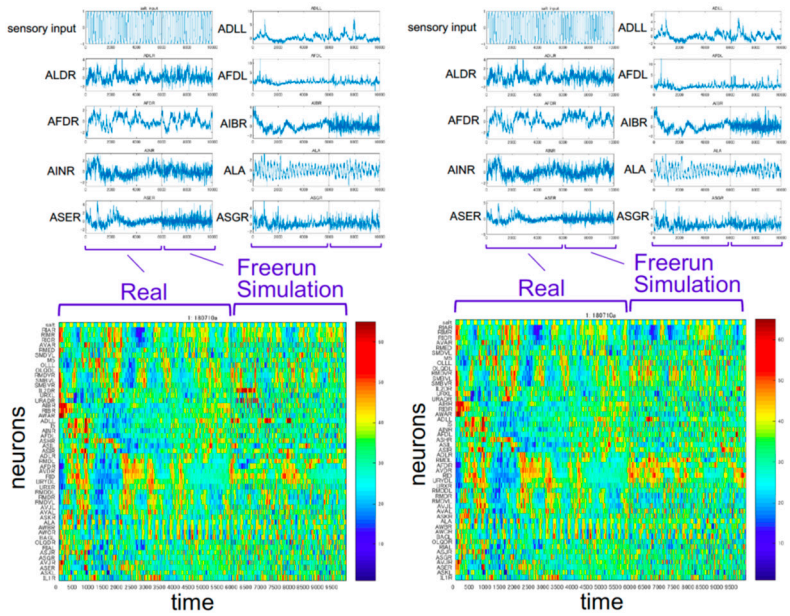
73　遺伝子・シナプスレベルでの行動の個体差の生成機構	飯野　雄一

【目的】あらゆる生物は個体差を持っている。個体差の原因としては、「遺伝的な差異」、「環境の差異」、「発生過程における確率的な要因」などが考えられる。個体差について特に興味深いのは、脳神経系の個体差である。本研究では、遺伝的な差異が排除できる線虫 *C. elegans* を用いて神経系の個体差と行動の個体差がどう生じるかを明らかにすることを試みた。本報告ではそのうち神経系の個体差の定量化とモデリングによる個体差の原因の検討について報告する。

【方法】線虫カルシウムプローブ Yellow Cameleon 2.60 を全神経に発現する線虫を微小流路チップに保定し、塩濃度変化の感覚刺激を与えつつ、対物レンズを高速に上下動させながら共焦点画像を取得する「4D イメージング」の装置により時系列立体画像を取得し、コンピュータビジョンにより定量化した。得られたデータから、カーネル法の一種、gKDR 法を発展させた gKDR-GMM 法を用いてシナプスのモデル化を行い、それらのモデルを用いて神経系全体の活動のシミュレーションを行った。

【結果】すべての個体について、塩の感覚刺激の周期で活動する一群の神経がみられた一方、感覚刺激とは異なるタイミングで同期して活動状態が変化する（自発的活動とみなされる）神経群が見られた。最も大きな同期集団は自発的活動を示すグループで、反転した活動を示す神経群もみられる。これら正逆のグループのサイズが個体により異なることが認められた。このような神経活動が生じる機構を探るため、線虫の神経回路の情報をもとに、各神経細胞の活動がそれにシナプス入力する神経の活動に影響されて決まる関係を上記で考案した方法により数理モデル化した。このモデルによりシミュレーションを行ったところ、図のように、実際の神経活動と同様の同期性、偶発性をもった神経活動が再現された。このモデルにおけるシナプス連絡強度を調べたところ、単一の神経が多数の神経に影響を与えて同期活動を作っている形跡はなく、弱い多数の相互作用をもとにした自己組織化により同期活動が生成されていることがわかった。個体差についても、単一の大きな差異ではなくシナプス連絡の軽微な差異が積み重なって神経系全体の活動の差異を生じていることが推定された。

頭部全神経の活動測定データに基づく神経ネットワークのシミュレータを作成し個体差の要因を探った



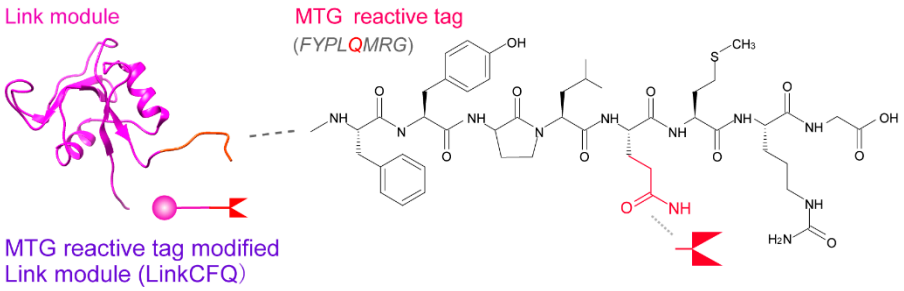
74　Link moduleを用いた炎症制御性癒着防止材の開発	伊藤　大知

【目的】術後腹膜癒着は多くの外科医に取って永遠の課題である。 外科手術により腹膜中皮細胞層が障害され消化器や生殖器と腹壁や臓器同士が癒着し腸の通過障害・不妊・2 次手術のリスクを増大させる。臨床においては特に肝臓がん切除に伴う腹膜癒着が重篤でありヒアルロン酸 （HA）を主原料にした Seprafilm 等の既存の癒着防止材の性能が不十分である。そこで本研究では、再生医療においてステロイド治療抵抗性の GVDH に承認された MSC 細胞製品が、IL10 非依存的な炎症ルートとして着目されている TSG-6 を分泌することの重要性に着目し，その HA 結合部位であるリンクモジュールを用いた炎症制御性 injectable ハイドロゲルの開発を目指した。

【方法】リンクモジュールの C 末端に微生物由来トランスグルタミナーゼ（MTG）反応性 tag を付加した機能化リンクモジュールを設計後、大腸菌で発現しアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。等温滴定型カロリメトリー（ITC）により HA 結合能を定量的に評価した。また、ゼラチンとの混合系を用いて異なる pH 条件下における機能化リンクモジュールの MTG 反応性を検討した。さらに、医用応用のためのエンドトキシン除去法の検討を行った。最後に機能化リンクモジュールを HA およびゼラチンと混合し MTG で架橋することでハイドロゲル作製を検討した。

【結果】設計したリンクモジュールの発現・精製に成功し、＞1 mg/L culture スケールを達成した。精製した機能化リンクモジュールは pH 依存的な HA 結合特性を示し、pH6.0 から pH7.4 において相互作用に伴うエンタルピー変化が減少するとともに、タンパク当たりに結合可能な HA の単糖数が減少することが示された。機能化リンクモジュールとゼラチンの混合系での MTG 反応性は、より高い pH において反応が進み pH8.0、9.0 では 90%以上の反応率を示した。ゼラチンと HA のゲルでは白濁したゲルが得られた一方で機能化リンクモジュールの混合系では、透明のゲルが形成されハイドロゲルの作製に成功した。押し込み試験によってゲルの力学強度を評価した結果、機能化リンクモジュールの混合系では Young’s modulus が増加する傾向にあることが示された。

機能化リンクモジュールの設計とハイドロゲルの作製



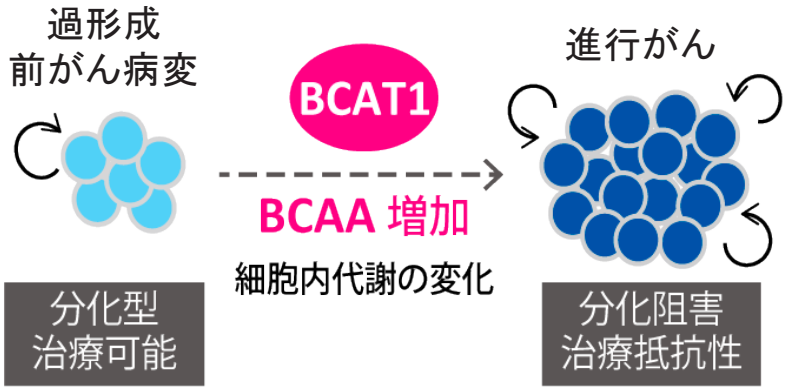
75　固体NMR技術の利用による新しいがん細胞生物学の創出	伊藤　貴浩

【目的】これまでの研究で私たちは、骨髄性白血病の悪性化に伴って細胞内代謝のリプログラミングが生じることを見出している。この代謝変動にはアミノ酸代謝酵素 BCAT1 の発現上昇が必要で、この酵素の発現や機能を阻害するとがん幹細胞が消失して治癒が可能であることをマウスモデル・患者検体を用いた解析で明らかにした。この研究は、特定の代謝経路の阻害が有望ながん治療戦略となる可能性を示しており、がん代謝の精密な観測とそれに基づく代謝制御機構の理解が重要な課題となっている。本研究では、がんの代謝リプログラミング現象の分子機構の解明のための新たな代謝解析法を確立することを目的として、固体核磁気共鳴分光法（NMR）の一技術であるマジック角回転（Magic Angle Spinning : MAS）と高分解能 NMR を組み合わせた High Resolution NMR MAS（HR-MAS）技術を生きた細胞に適用し、細胞内代謝をリアルタイムで検出するシステムを構築することを目指した。

【方法】ヒト白血病細胞株を、バリンを含まない培地に懸濁し、NMR 測定用ロータに移した。ここに安定同位体 ^{13}C で標識されたケトイソ吉草酸を添加し、すぐに NMR スペクトルの測定を開始した。1 次元インバース異種核相関（1D HSQC）実験とそのスペクトルの取得は Avance III HD console を有する 600 MHz 超伝導磁石にて TopSpin（Bruker）を用いて行った。128 走査分を単位時間当たりのスペクトルとした。測定後、スペクトルは MNova（Mestrelab Research）で解析した。

【結果】ヒト慢性骨髄性白血病細胞株 K562 を用いて ^{13}C 同位体標識したケトイソ吉草酸（^{13}C-KIV）を培地に添加して HR-MAS による計時測定を行ったところ、^{13}C-バリン（Val）に由来するシグナルが検出された。すなわち、HR-MAS 法によって生きた細胞中での分岐鎖アミノ酸の出現をリアルタイムで検出できることがわかった。新しく開発したこの方法を応用した解析を行ったところ、白血病細胞内では BCAA 分解よりも産生が亢進していること、同様の現象がヒト急性骨髄性白血病細胞でも観察されること、またがんで頻回に観察される遺伝子変異によってこの BCAA 産生が変化しうること、が明らかになった。今後、非破壊で連続的に代謝状態を解析できるという本解析系の利点を生かして、患者ごとのがん細胞の代謝様式プロファイリングや患者層別化への利用について検討する技術基盤を構築できたと考えている。

細胞内代謝変動によるがん進行の制御



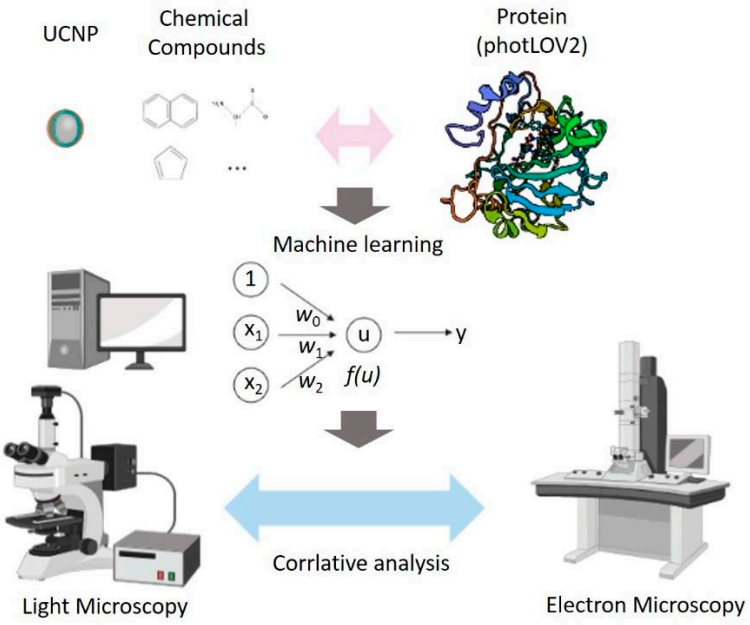
76　機械学習的アプローチによる神経回路の機能解析	岩﨑　広英

【目的】近年、神経回路の網羅的解析（コネクトーム解析）のプロジェクトが全世界的に展開されている。特に FIB-SEM や SBF-SEM、ATUM などの走査型電子顕微鏡を用いた諸技術の急速な進歩に伴い、脳組織の三次元再構築に対する障壁が低減しつつあり、コネクトーム研究の加速化に貢献している。一方、三次元再構築された脳の電子顕微鏡像から特定の神経細胞を抽出する、いわゆるセグメンテーションの自動化については、機械学習的アプローチをはじめとする様々なアルゴリズムが開発されているものの、現時点で決定的な手法は確立されていない。また、蛍光タンパク質等で神経細胞を標識することで得られる特定の神経細胞の脳内における分布や投射先などの広域情報をシナプスレベルでの超微細形態情報と対応づけることはセグメンテーションをはじめとするコネクトーム解析において有用であるが、光学顕微鏡像と電子顕微鏡像とを対応付けるための光-電子相関顕微鏡法（CLEM）について決定的な手法が確立されていない。その理由の一つとして電子顕微鏡用試料作製過程におけるオスミウム酸固定や脱水過程により、大半の蛍光タンパク質が消光することが挙げられる。そこで本研究では機械学習的手法を用いて CLEM に利用可能な蛍光プローブの開発を目指した。

【方法】電子顕微鏡用試料作製過程におけるオスミウム酸固定と脱水過程に耐えうる蛍光標識法として、低分子蛍光化合物に着目し、とくに電子顕微鏡用樹脂の有する自家蛍光を回避するため、アップコンバージョンナノパーティクル（UCNP）に着目した。また、蛍光タンパク質の中では植物における光屈性を誘導する光受容タンパク質フォトトロピンに着目した。フォトトロピンの LOV2 ドメイン（photLOV2）にはフラビンモノヌクレオチド（FMN）が結合し、蛍光を発する。FMN の蛍光がオスミウム酸固定や脱水処理に影響されないことに着目し、photLOV2 に結合しうる低分子化合物を機械学習的アプローチにより探索した。また、photLOV2 の FMN との結合に関わるアミノ酸に突然変異を導入し、安定な蛍光を発する分子の探索を試みた。

【結果】電子顕微鏡用試料作製処理におけるオスミウム酸固定や脱水処理を行っても蛍光が消光しない photLOV2 変異体を作製することに成功した。また、機械学習によるドッキング解析から、photLOV2 と結合することが予想される低分子性化合物の候補分子を複数見出すことができた。

機械学習的アプローチによる CLEM プローブ開発



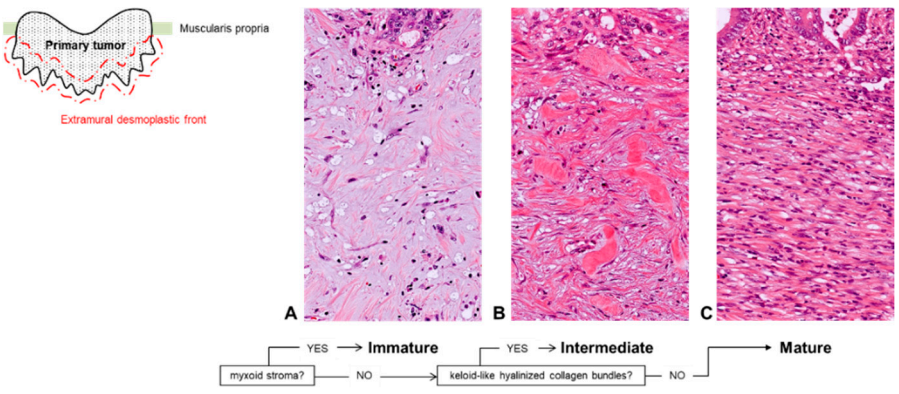
77　大腸癌のDR分類のAI診断と分子生物学的背景の解明	上野　秀樹

【目的】我々はこれまでに大腸癌の癌浸潤先進部の特異的な形態学的変化に着眼し、先進部に特徴的な線維性癌間質の新たな評価・分類法（DR 分類）を提唱してきた（図）。DR 分類の予後分別能は極めて高いことが複数の多施設研究で示されている。本研究では、1. 画像解析と deep learning 手法、いわゆる AI（Artificial Intelligence）技術を用い、再現性の高い DR 分類の診断を確立しその意義を探索すること、2. DR 分類の分子生物学的背景を解明することの二つを目標とした。

【方法】1. 528 例の大腸癌症例を対象として単一の最深部を含む HE 染色標本を選択し、デジタルスライドを作製した。75%の 396 例を training cohort、25%の 132 例を test cohort とした。41 例の myxoid stroma を含む症例を無作為に選出し、HALO® software を用いて同領域の annotation を行い、DenseNet neural network に myxoid stroma を学習させ、これを同定する classifier を作製した。作製した classifier の精度は Dice Coefficient を用いて評価し、training cohort と test cohort において予後解析を施行した。2. ①大腸癌手術切除検体から DR 分類別に採取した CAF の増殖能を評価すると共に、大腸癌細胞株とを混合してヌードマウスの背部皮下または盲腸漿膜下層に移植し、腫瘍の増大を経時的に観察した。②大腸癌手術切除検体から DR 分類別に採取した CAF で発現する ADAM 分子について DR 分類別に比較検討した。③手術標本から新鮮凍結標本を採取し、レーザーマイクロダイセクションを用いて癌浸潤先進部の間質を DR 分類別に採取し、ADAM 分子の mRNA 発現と DR 分類との関連を評価した。④免疫組織化学染色にて ADAM 分子のタンパク質発現の局在について検討した。⑤DR 分類別に CAF の培養上清を採取し、大腸癌細胞株と共培養後に細胞増殖アッセイを行った。

【結果】1. AI 技術を用いた DR 分類の診断と意義：作製した classifier の精度を検証した結果、Dice score は 0.87 であった。classifier により同定された myxoid stroma 領域を 528 例の training set において Multivariate Cox regression 法を用いて解析した結果、AI 診断された総 myxoid stroma 領域面積は最も強い予後因子であり、予後分別能は N stage を凌ぐものであった。AI を用いた myxoid stroma の分類法は従来の方法による DR 分類よりも術後生存率を良く分別する結果であった。2. DR 分類の分子生物学的背景：mature 症例と比較し immature 症例から採取した CAF と大腸癌細胞株とを混合しマウスに移植した場合、皮下ならびに盲腸漿膜下層での増殖が亢進した。大腸癌切除検体から CAF を培養し、CAF で発現する ADAM 分子を網羅的に解析した結果、ADAM9 は mature 症例に比べて immature 症例から採取した CAF において有意に高発現していた。新鮮凍結標本よりレーザーマイクロダイセクションを用いて癌先進部間質を DR 分類別に採取し、real-time qPCR 法で定量すると、ADAM9 の発現は immature に最も高く、次いで intermediate、mature の順であった。mature 症例と比較し immature 症例から採取した CAF の培養上清と共培養した大腸癌細胞株（HCT-116、HT-29）は増殖が有意に促進され、shRNA を用いた ADAM9 の発現抑制によりその増殖は抑制された。

Desmoplastic Reaction（DR）分類の診断フローチャート



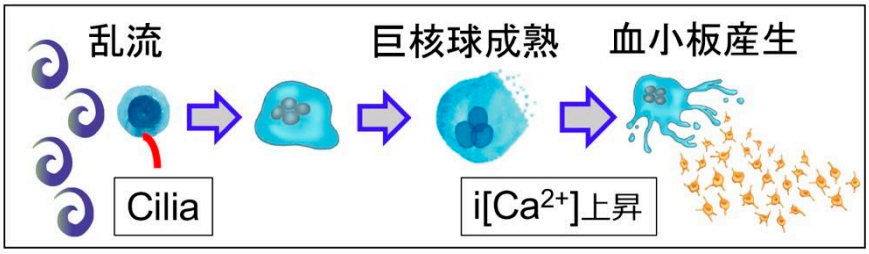
78　血小板造血乱流センシングのモニタリング法開発	江藤　浩之

【目的】献血だけでは供給に限界がある状況を補完することを目的に開発されている iPS 細胞由来血液製剤は、ドナー確保が困難な稀な血液型製剤も供給可能と期待されている。また血小板は、室温保存特性のために有効期限が 4 日と短く、需要供給制御の難しさも伴う。我が国の血小板の基本輸血量は約 2,000 億個と膨大であり、iPS 細胞から如何にして作製するかが大きな課題である。この課題解決のため、ヒト iPS 細胞由来巨核球前駆細胞株（imMKCL）の作製によって巨核球を量産化する技術を開発した。次に、マウス骨髄内の血小板造血の場で流体物理因子“乱流”が関与していることを発見し、その物理作用を培養技術に応用し、8 L 培養槽から 1,000 億個の止血機能を有する血小板（iPS 血小板）を得る製造法を見出した。一方、生体内の血小板造血に近似する高効率の生体外製造を実現させて産業化に発展させるには、培養槽内部の乱流による巨核球への最大限の刺激を達成する培養条件の最適化が必須である。そこで、最も重要な物理負荷因子として同定した「乱流エネルギー」の細胞刺激応答をモニタリングする技術を開発し、巨核球成熟を可視化することで 100%の巨核球が再教育される物理負荷条件や培地条件の最適化を達成する。具体的には、巨核球の成熟が乱流刺激の複数の機械刺激受容体の感受性変化によるという仮説を実証し、乱流刺激に応答する感受性変化のモニタリングとしての細胞内シグナルを規定する。

【方法】乱流エネルギーセンサーの候補として cilia（繊毛）に着目した。imMKCL 成熟期における外界の刺激や流体等の細胞外環境の変化を感知する cilia 形成の有無を観察し、cilia の形成と imMKCL の血小板産生能について検討した。Cilia を通じた細胞内 Ca^{2+}シグナルに関わる候補機械刺激受容体を欠失させた imMKCL を作製し、乱流環境下における imMKCL 成熟期の細胞内 Ca^{2+}動態を観察した。

【結果】imMKCL 成熟培養の経時的な cilia 形成をアセチル化α-tubulin 免疫染色によって観察し、成熟培養 1 日目に cilia の形成が認められた。持続的な乱流刺激は、cilia の進展を逆に阻害した。また、cilia 形成を薬物で阻害すると imMKCL の血小板産生能が低下した。これらの所見は、乱流刺激依存的な血小板産生機構に cilia が関与することを示唆している。次に cilia の細胞内下流シグナルとして想定される機械刺激受容体を欠失させた imMKCL を準備し、観察したところ成熟培養 5 日目から 6 日目にかけて細胞内 Ca^{2+}濃度が野生型と比べ低下し、血小板産生能も低下していた。以上の結果から、cilia センシングメカニズムには、Ca^{2+}シグナルに関わる機械刺激受容体が関わり、巨核球成熟における血小板産生に寄与することが示唆された。特に、成熟期後期に imMKCL 細胞内への急激な Ca^{2+}上昇が観察され、imMKCL 成熟のマーカーの一つになることが明らかとなった。

血小板造血乱流センシング機構



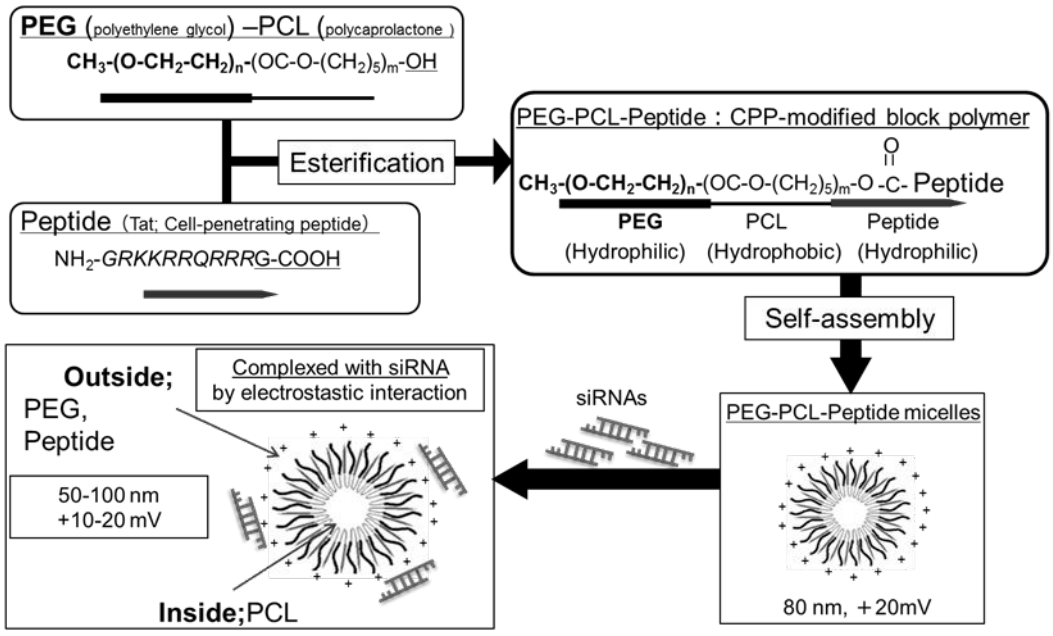
79　特定の中枢部位標的次世代型Nose-to-Brain核酸DDS開発	金沢　貴憲

【目的】近年、新たな中枢輸送経路として、経鼻投与によって、全身循環血液への分布を伴わずに直接中枢に届く『Nose-to-Brain 経路』が期待されている。一方、核酸医薬の本経路を介した中枢への分布動態に関しては、これまで報告はほとんどない。これは、鼻腔内から中枢までの Nose-to-Brain 動態を再現良く、定量的に解析する技術がなかったためである。また、Nose-to-Brain 経路を利用した中枢への DDS 研究の大部分は、中枢全体を標的としたものであるが、一方で、中枢全体への薬物送達は正常な脳機能に影響を与えてしまう危険性が高い。そこで、本研究では、上記課題を解決することを目的とし、Nose-to-Brain 動態の解析手法の確立とモデル核酸を用いた Nose-to-Brain 動態の解析および特定の中枢部位として脊髄を標的とする Nose-to-Brain 核酸 DDS の確立を行った。

【方法】はじめに、Nose-to-Brain 動態の解析手法の確立を目的に、実験動物への負担の少ない吸入麻酔下で、安定に経鼻投与する方法を二つ構築し、これら経鼻投与法を用いて、モデル核酸として膜透過性の低い［^{14}C］- 水溶性高分子を投与した際の脳・脊髄を含む体内分布を定量的に解析した。次に、鼻粘膜や中枢組織内における安定性の向上を期待して、生体安定性に優れたナノミセルを形成する Methoxy PEG-PCL（MPEG-PCL）に着目し、これと膜透過ペプチドである Tat を結合させた MPEG-PCL-Tat（下図）を設計し、その核酸の Nose-to-Brain 動態ならびに筋萎縮性側索硬化症（G93A-SOD1）モデルマウスにおける中枢部位での標的遺伝子発現を解析した。

【結果】いずれの経鼻投与法においても静脈内投与（iv）に比べて高い脳および脊髄への分布を示した。また、蛍光標識モデル核酸を用いて脳矢状断面を光イメージング観察したところ、嗅神経からつながる嗅球、ならびに大脳の前方領域および脳幹に特に強い蛍光が見られた。次に、PEG-PCL-Tat 併用によるモデル核酸の Nose-to-Brain 動態を解析した結果、嗅球、脳、脊髄のいずれの部位における移行性は、単独投与と比べて有意に向上した。またこのとき、単独投与に対する PEG-PCL-Tat 併用投与の分布効率の相対値から各組織における PEG-PCL-Tat 併用による向上効率を比較した結果、脊髄内分布の向上効率が、嗅球や脳内分布よりも有意に高く、最大で単独投与の 3 倍以上向上した。そこで、MPEG-PCL-Tat に SOD1 標的 siRNA を搭載して G93A-SOD1 モデルマウスへ経鼻投与した結果、naked siRNA に比べて、脊髄における SOD1 mRNA の発現を有意に抑制することを実証した。

膜透過性ペプチド修飾高分子ミセル型ナノキャリア（PEG-PCL-Peptide）の概要



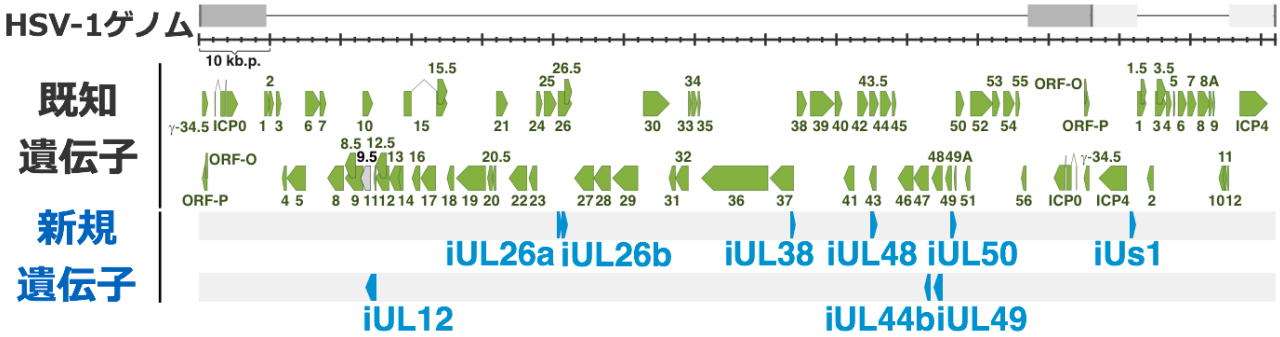
80　スパコンを用いた次世代型ウイルス感染制御機構の解明	川口　寧

【目的】ウイルスは宿主細胞に感染後、そのゲノムより遺伝子産物を新規合成し、宿主細胞の環境を変化させ、様々な疾患を引き起こす。すなわち、ウイルス感染に伴う病態の理解には、ウイルス遺伝子産物の包括的な同定が不可欠である。進化の過程において、ウイルスは限られたゲノムサイズに、多様な遺伝情報を搭載するため、ノンカロニカル（非標準的）な翻訳エレメントを獲得してきた。しかしながら、これらの非標準的なエレメントは、一般的な塩基配列上の特徴を欠くため、従来のアノテーション法により同定することは困難である。そこで、本研究では、非標準的なウイルス遺伝子産物を直接的かつ包括的に検出する新たな手法の開発を試みた。

【方法】本研究では、新規合成蛋白質特異的な質量分析である BONCAT と高感度質量分析を融合させた chemical proteomics 解析を実施し、得られた質量情報の実測値とゲノム情報から構築された仮想質量情報を、高速計算機により比較解析することで、実際に細胞内で発現している未解読のウイルス遺伝子産物を包括的に同定した。

【結果】本研究により、我々は単純ヘルペスウイルス 1 型（HSV-1）がコードする 9 種類の新規遺伝子を同定した。興味深いことに、同定された新規遺伝子は、いずれも既知の遺伝子に内包される形でコードされる internal ORF (iORF) と呼ばれる非標準的な遺伝子産物であった。そして、同定した新規遺伝子の一つである iUL49 は、HSV-1 の神経病原子を司る病原因子であった。確立された新たな非標準的ウイルス遺伝子解読法は、様々なウイルスにおける遺伝情報の解読に広く応用される可能性があると期待される。

新たなウイルス遺伝子産物解読法により同定された HSV-1 新規遺伝子に関する概要図



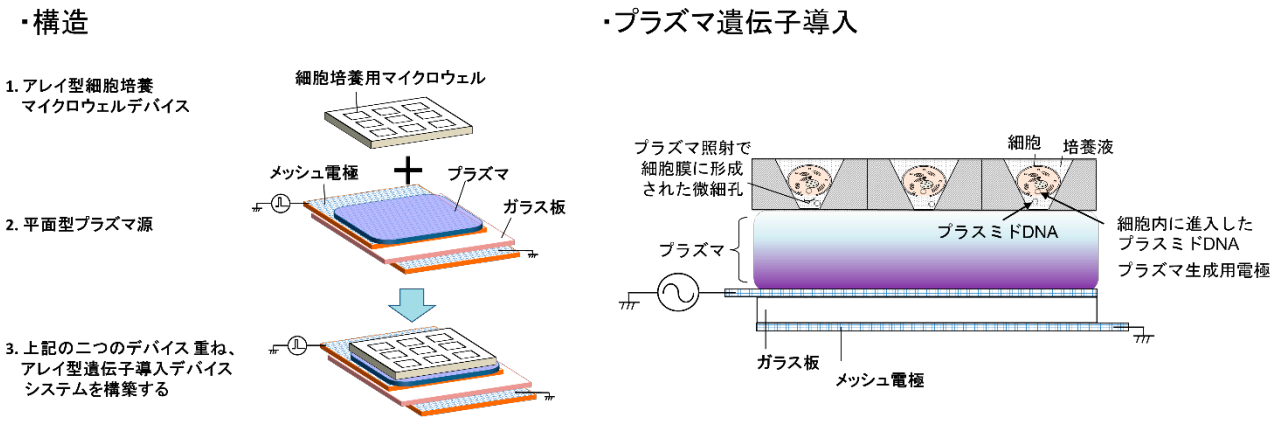
81　大気圧プラズマを用いた革新的遺伝子導入法の開発	熊谷　慎也

【目的】遺伝子導入により細胞機能をコントロールすることは医療において強力な手法となりつつあり、世界各国で導入方法の開発が進められている。例えば、患者の細胞を元に、山中 4 因子を導入して iPS 細胞を樹立し再生医療に用いるには、複数の細胞株の中から質の良い細胞株を選択することが必須である。これは砂場の中から金の粒を探す作業に等しく、時間的・経費的に非効率である。導入された 4 因子の量に依存して iPS 細胞の質が影響を受ける為、高効率で定量的な遺伝子導入が実現できれば、最初から高効率で質の良いクローンを作り出せる可能性が高く、クローン化さえ必要なくなることも考えられる。しかし、この要求を満たす遺伝子導入方法はいまだに確立されていない。近年工学研究者により、新たな遺伝子導入手法として、物質の第 4 状態であるプラズマを用いることが提案された。プラズマとは電離気体のことであり、荷電粒子・ラジカル・フォトンといった活性種を含んでいる。これらの活性種に起因するプラズマの効果によって、細胞内部への物質導入が促進されると考えられている。この手法の可能性を切り拓くため、本研究では、マイクロ電気機械システム技術（Micro ElectroMechanical Systems、MEMS）技術を用いてプラズマ照射型遺伝子導入システムを作製し、高効率に遺伝子導入する手法の開発を行った。

【方法】複数の細胞への遺伝子導入を行うため、アレイ型プラズマ照射遺伝子導入マイクロシステムを開発した。本システムを、細胞を培養するマイクロウェルデバイスと、遺伝子導入促進のための平面型プラズマ源とを組み合わせて構成した。マイクロウェルデバイスでは、プラズマ照射部に細胞が誘導されるように、ウェルの側壁部分に勾配を持たせた。大気圧プラズマ照射による細胞内への物質導入過程の解析を迅速に行うため、マウス線維芽細胞 L929 に対してプラズマを照射し、蛍光色素 DiYO-1 を導入して、その蛍光強度から導入効率を評価することとした。

【結果】マイクロウェルに細胞を播種して培養し、プラズマ照射を行って、蛍光色素の導入を行った。位相差顕微鏡および蛍光顕微鏡を用いて観察したところ、プラズマ照射によって細胞内への物質導入が促進された。この蛍光色素導入は、デバイスチップの中に含まれるアレイに並べられた各マイクロウェルで同時に実現できた。今後、共同研究者と協力し、本研究で開発したマイクロデバイスを用いて、ヒト人工多能性幹細胞（hiPSC）への応用など、関連分野を大きく発展させることを考えている。

プラズマ照射型マイクロ遺伝子導入システム



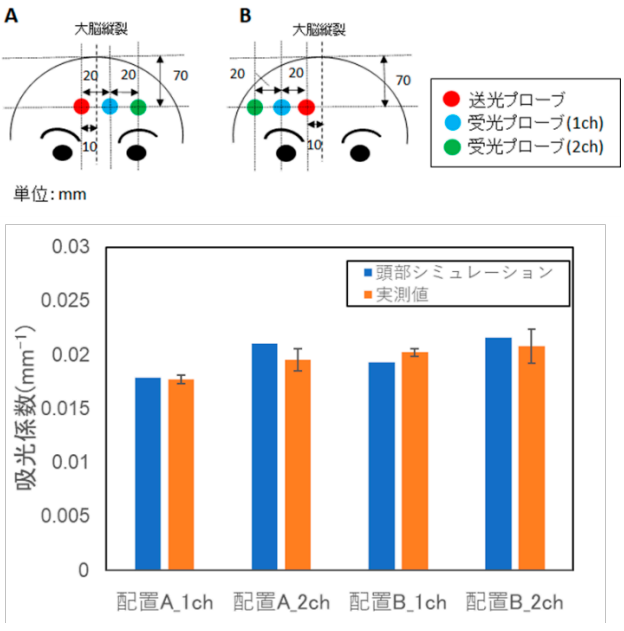
82　遅延光学系と多重時間解析を活用した脳機能定量評価法	小谷　潔

【目的】近赤外光を用いた脳機能評価法はその非侵襲性から着目されている。しかしながら、その評価には被験者の頭部形状の影響や複数の組織による拡散、遅れを解析しなければならない。本研究では遅延フィードバックを含んだレーザダイナミクスの数理モデルである Lang-Kobayashi 方程式のモード分解を行い、遅延光学系を活用することで近赤外レーザの入力光をデザインする方法を進展させる。さらに、被験者の解剖学的な脳構造を模したモデルを構築し、頭部モデルシミュレーションおよび被験者に近赤外光を照射する実験から、頭部の解剖学的な構造と吸収散乱特性評価の関係を解析する。

【方法】レーザ光源に関する解析として Lang-Kobayashi 方程式の縮約を行い、解析的な見通しのよい位相方程式の導出を行った。さらに複雑に不安定化したレーザの制御理論を構築する目的で、理想化された問題に対して位相振幅方程式の解析を行った。また、磁気共鳴画像（MRI：Magnetic Resonance Imaging）によって得られた被験者の頭部解剖画像から頭皮、頭蓋骨、脳脊髄液、灰白質・白質の 4 層を抽出した頭部モデルを作成し、数理解析で得られた GHz 帯域での周期変調レーザ光源およびパルス光を用いたシミュレーションを行った。さらに、近赤外パルス光を用いた頭部計測実験から解剖学的構造に起因する吸収散乱特性の評価を行った。

【結果】はじめに、Lang-Kobayashi 方程式に対して時間遅れ系の位相縮約理論を適用し、時間遅れフィードバックによってレーザ強度が変調する状態において、周期外力によって振動周期を制御できることを示した。次に、被験者の頭部 4 層構造モデルを構築し、そのシミュレーションを行った。その結果、周期変調レーザに対する位相差を検出することで、頭部の構造に起因する微細な吸収散乱特性の評価が可能であることを示した。さらにパルス光を入射したシミュレーションでは、算出された平均吸光係数はプローブ間隔 20 mm（1ch）の場合よりも 4 mm（2ch）の方が高く、またともに配置 A（大脳縦裂を跨くプローブ配置）に比べて配置 B（側頭部の配置）の方が高いという結果が得られた。さらに、実際の被験者に近赤外パルス光の照射と複数プローブによる受光実験を行った結果、頭部シミュレーションと同様の特徴が得られた。

被験者の頭部構造の 4 層モデルを用いたシミュレーションと近赤外光照射実験による吸光係数の比較



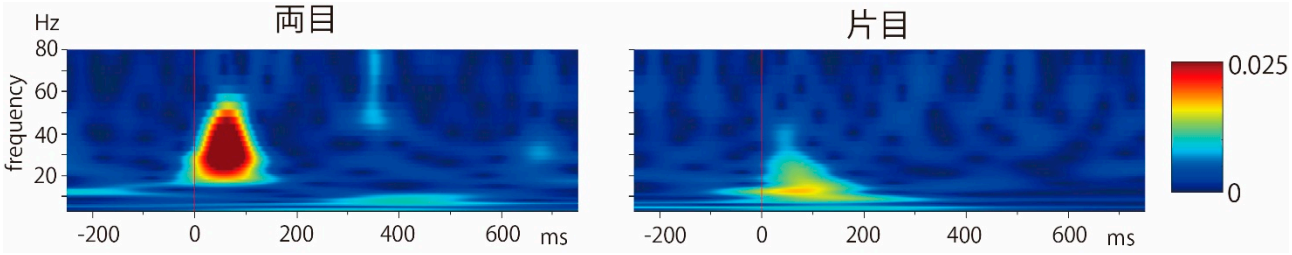
83　視知覚における充填を生み出す脳情報処理機構の解明	小松　英彦

【目的】充填知覚（フィリング・イン）とは視野で情報の存在しない場所（暗点）の内部が、暗点の周りの視野に存在する色や明るさ、模様などの情報によって知覚的に埋められる現象を指す。充填知覚は正常な視知覚を成り立たせる重要な要素の一つだが、その仕組みは良く分かっていない。また臨床的にも充填知覚の意義が注目されている。そこで、本研究では充填知覚の仕組みの理解を深めることを目的とする。

【方法】注視課題を行っているマカクザルの一次視覚野で盲点対応領域を同定し、多チャンネルリニアアレイ電極を刺入し、さまざまな視覚刺激に対して皮質各層においてどのようなニューロン活動および局所電場電位の応答が生じるかを調べた。

【結果】盲点において充填知覚が生じている時に、一次視覚野の盲点対応領域の深層だけでなく、浅層においても視覚刺激によって応答が誘発されることが示された。また、両目を開いた条件では浅層から深層にかけてガンマ帯域の応答が誘発されるのに対して、片目を遮蔽して充填知覚が生じる条件では、浅層から第 4 層にかけてアルファ帯域の応答が誘発されるという違いが見いだされた。

一次視覚野の盲点対応領域で生じた局所電場電位の周波数スペクトル



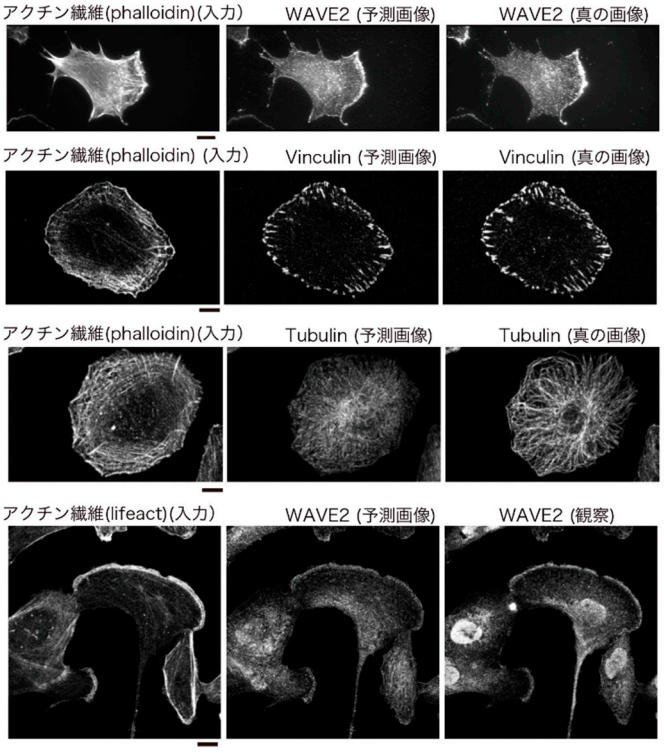
84　深層学習と細胞生物学の融合による細胞運命予測と応用	末次　志郎

【目的】いわゆる人工知能（AI）の一つである深層学習アルゴリズムは、画像間の関係性を判定することや、関連画像を生成することに用いられている。本研究では、深層学習による画像変換を、細胞の分子局在を示す画像に適用し、細胞内の分子局在の相互推定を試みる。さらに、その推定精度から分子間の関係性の推定と分子局在による細胞運命の予測を行う。

【方法】深層学習アルゴリズムによる学習では、細胞の輪郭抽出を行う場合、通常の細胞画像と、教師データとして与えた細胞輪郭の画像（分割の答え）の間の関係の学習から、細胞の輪郭抽出を行う予測器を作成する。この予測器を、新規の画像に適用すると、細胞の輪郭抽出が可能となる。本研究では、関連する二つのタンパク質の局在を示す画像を教師データとして学習させ、二つのタンパク質の局在を示す予測器を作成した。その結果、あるタンパク質の局在から、関連するタンパク質の局在を推定した画像の作成を行うことができることを見出した。

【結果】アクチン繊維と、アクチン繊維の部分構造であるラメリポディアに局在するタンパク質（WAVE2）の画像を学習させると、アクチン繊維の画像から WAVE2 の局在を推定できる予測器を作成することができることがわかった（図）。また、WAVE2 の結合タンパク質である IRSp53 の画像も同様に予測できた。ラメリポディアに存在する細胞接着部位に局在するビンキュリンの予測も可能であった。これに対して、アクチン繊維とは関係の薄いと思われる微小管の曲材は十分に予測できなかった。以上のことから、予測器は分子間の関係性に基づいて、それらの局在を示す画像を生成していることが示唆された。上記の予測は細胞を化学固定したのちに取得した画像を用いてなされたが、生細胞に発現させたアクチン繊維のマーカーである lifeact を用いた画像を用いても、WAVE2 の局在の予測が可能であり、WAVE2 の局在した部位は、ラメリポディアを形成していた。これらの分子局在の予測は、そのさきの細胞運命を示していると考えられ、深層学習により細胞の運命が予測できる可能性が示された。

深層学習によるタンパク質局在画像生成



スケールバー　10 μ m

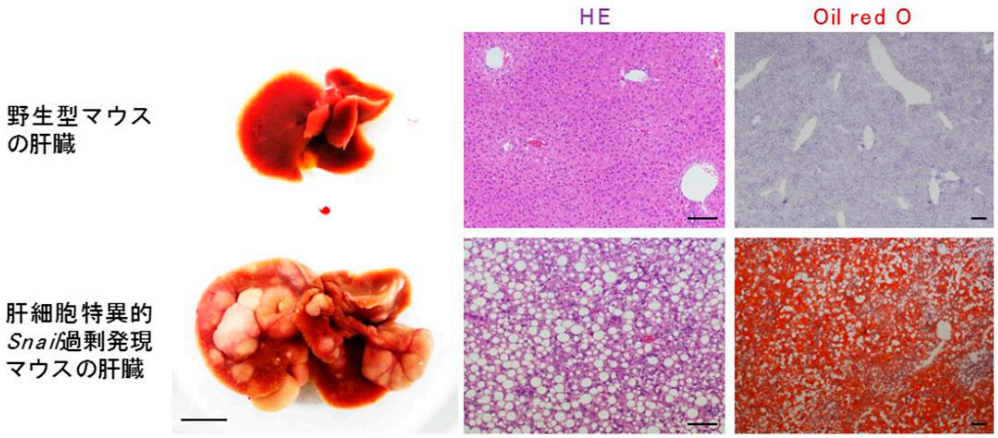
85　トランスオミクス解析による肝再生機構の理解	鈴木　淳史

【目的】本研究では、肝細胞に生じる遺伝子発現変化やエピジェネティック変化などについて解析を行い、それら多階層オミクスデータの統合的解析から肝再生メカニズムの理解を深めることを目的とする。また、得られる情報を活用することで、肝再生不全による疾患の発症機構やリプログラミング誘導による肝細胞の創生に関する研究も行い、がん治療や再生医療への貢献を目指す。

【方法】1. 肝再生制御因子過剰発現マウスの作製と解析：細胞の運動や分化、増殖、生存などにおいて重要な機能を有する転写因子 Snail の分解が肝再生時の肝細胞増殖活性化のトリガーとなることがわかっている。そこで本研究では、肝細胞において *Snail* が過剰に発現し続けると肝臓にどのような影響が生じるのかを明らかにするため、任意の時間で肝臓や肝細胞特異的に *Snail* を過剰発現できるマウスを作製し、肝臓に生じる表現型を解析した。2. 肝細胞リプログラミングを誘導する分子メカニズムの解析：線維芽細胞から「誘導肝細胞（iHepC）」へのダイレクトリプログラミングでは、誘導因子の導入後、迅速かつ劇的に細胞の運命転換が進行するが、その分子メカニズムは不明であった。そこで本研究では、iHepC へのダイレクトリプログラミングを誘導する転写因子の挙動を詳しく解析するとともに、線維芽細胞が肝細胞の運命を獲得する過程で生じる遺伝子発現変化やクロマチン状態変化、エピゲノム状態変化などを統合的に解析した。3. ヒト iHepC 誘導法の開発：iHepC の誘導技術は、将来、肝疾患治療への応用が期待されることから、マウス iHepC に続き、ヒト iHepC の作製を試みた。誘導された候補細胞の性状については、生体外における遺伝子／タンパク質発現解析や種々の肝機能解析、並びに生体内における肝臓組織再生能の解析によって評価した。

【結果】1. 新規肝発がんモデルの発見とメカニズムの解明：作製された肝臓・肝細胞特異的 *Snail* 過剰発現マウスは脂肪肝とそれに続く肝がんを発症し、死に至ることが判明した。当該マウスにおいて、Snail は *Cldn3* や *occludin* などの遺伝子発現を抑制するとともに、胆汁酸合成に関わる酵素の遺伝子発現も抑制することで、肝細胞間に形成される毛細胆管構造を破壊し、異常な胆汁酸の血中放出を促すことが判明した。その結果、当該マウスは黄疸を呈し、胆汁酸による肝障害が続くことで脂肪肝や肝がんを発症すると考えられた。2. 肝細胞誘導メカニズムの解明：iHepC 誘導において、導入した転写因子の DNA 結合から始まる一連のダイナミックな細胞状態変化の全容を解明し、さらに Foxa 転写因子ファミリーの作用機序の違いについて興味深いデータを得ることに成功した。3. ダイレクトリプログラミングによるヒト肝前駆細胞の直接誘導：作製したヒト iHepC の増殖能が低いことから、高い増殖能と分化能を有する肝前駆細胞をダイレクトリプログラミングの手法によって作製できないかと考え、実験を行った。その結果、3 種類の転写因子をヒトの血管内皮細胞に導入することで、長期培養による安定的な増殖と、肝細胞・胆管上皮細胞両者への分化能を併せ持つ「誘導肝前駆細胞（iHepPC）」を作製することに成功した。

肝細胞特異的な *Snail* の過剰発現による脂肪肝・肝がんの発症



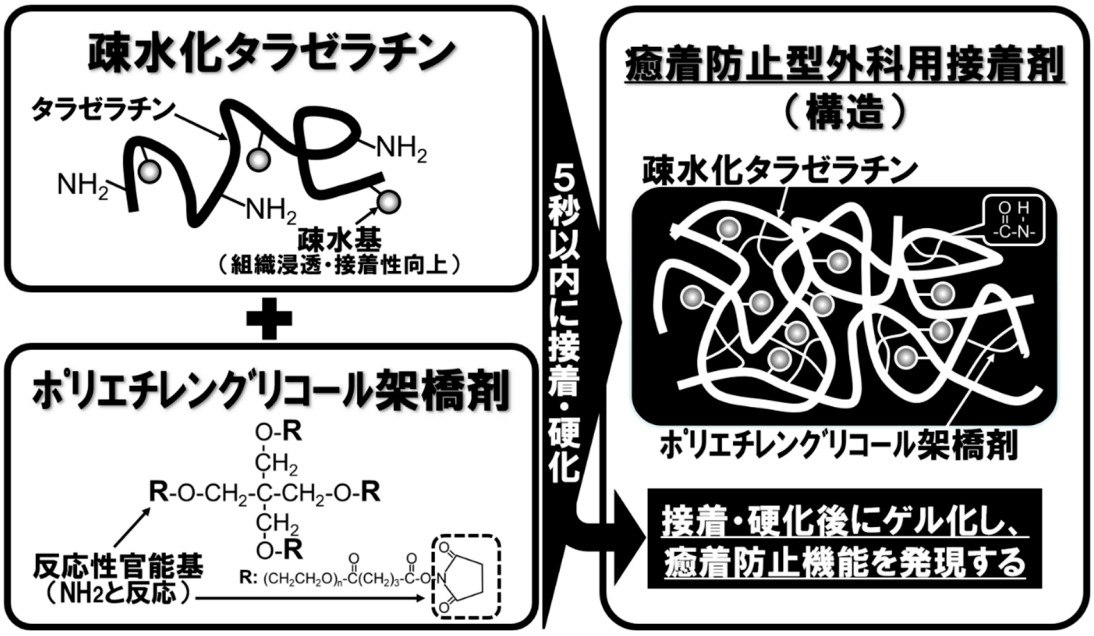
86　硬化後に癒着防止機能を有する外科用接着剤の開発	田口　哲志

【目的】腹腔鏡を用いた消化器外科手術においては、縫合だけで創部を閉鎖し、その後に生じる癒着を防止することは困難であり、外科用接着剤や癒着防止剤が必要となる。既存の外科用接着剤や癒着防止剤は、接着能あるいは癒着防止能の単独機能しか有していないため、外科手術における術部の精密な管理には、①創部の閉鎖には外科用接着剤を使用し、②創部と周辺組織との癒着を防止するために癒着防止剤を適用するという 2 種類の生体材料を用いた処置が必要となっている。本課題では、第 1 成分を「疎水化タラゼラチン」、第 2 成分を「ポリエチレングリコール（PEG）架橋剤」とする「癒着防止型外科用接着剤」を開発し、新鮮ブタ大腸組織に対する接着性試験および癒着防止効果の *in vitro* および *in vivo* 評価を行い、単独の生体材料で接着能と癒着防止能を実現が可能かどうかを検証した。

【方法】スケソウダラ由来ゼラチン（ApGltn）中のアミノ基をオクタナールで修飾した疎水化タラゼラチン（C8-ApGltn）を合成した。得られた C8-ApGltn 中のアミノ基を、末端にスクシンイミジル基を有するポリエチレングリコール系架橋剤により *in situ* 架橋することで、接着剤を得た。生体接着能・癒着防止能の *in vivo* 評価モデルとして、ラット盲腸への擦過傷形成および腹膜切除部位形成により、癒着評価モデルを作製した。擦過傷形成部および腹膜切除部位形成部に、癒着防止型外科用接着剤を適用後、1 週および 2 週後に開腹し、癒着レベルのスコア化により癒着形成を定量化した。さらに、癒着面周辺組織を取出し、ヘマトキシリンーエオジン（HE）染色により材料への細胞浸潤、炎症反応を観察した。

【結果】下図左には、ラット盲腸ー腹膜癒着モデルに、開発した接着剤、市販接着剤（Fibrin）および市販癒着防止膜（HA/CMC）を適用し 1、2 週後の外観を示す。未処理および Fibrin において癒着の形成が認められ、HE 染色においても盲腸ー腹膜間に明らかに癒着組織（POA）層が認められた。一方、癒着の程度をスコア化した結果から、未処理および Fibrin においてのみ、癒着スコアが高いことが明らかとなった。一方、C8-ApGltn 接着剤、未処理タラゼラチン（Org）接着剤および HA/CMC においては、外観および組織写真において癒着が認められなかった。摘出大腸組織に対する *in vitro* 耐圧（シーリング）強度の評価結果および *in vitro*、*in vivo* 癒着防止効果の評価結果から、C8-ApGltn 接着剤は、強固に組織欠損部に接着することでシーリング・接着効果を示し、硬化後の接着剤は癒着防止効果を発現することが明らかとなった。

本研究の概念図



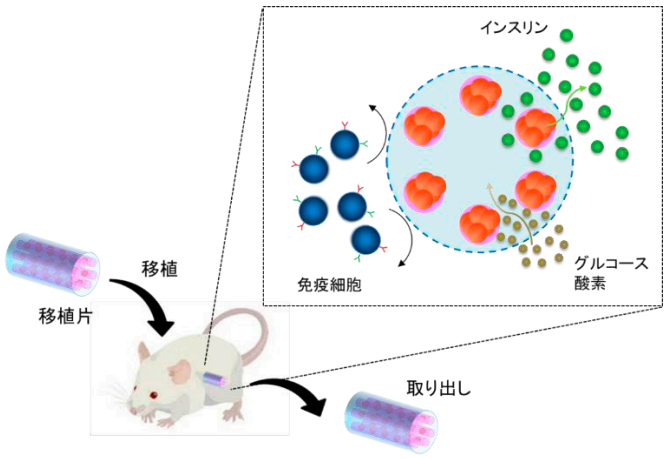
87　糖尿病治療のための取り出し可能な膵島移植片の開発	竹内　昌治

【目的】糖尿病の治療法として、ドナーから得た膵島を糖尿病患者に移植することによって、糖尿病患者の血糖値を正常化する細胞移植療法が世界中で盛んに研究されている。特に近年、ヒト iPS 細胞から分化によって膵島の細胞を調整する方法が進展し、ドナーに依存しない移植療法の可能性が高まり、さまざまな移植方法が開発されている。ヒト iPS 細胞由来の膵島を移植する際は、異物反応から細胞を保護し体内で長期間維持するだけでなく、未分化細胞混入のリスクなどから患者の安全性を確保し、緊急時には移植した細胞を取り出しできることが重要だと考える。これまでの研究で、ハイドロゲルなどを用いて細胞を保護して移植する方法が開発されているが、ヒト iPS 細胞由来膵島とホスト間の強い異物反応を抑制し、かつ完全に取り出すことができる移植片の実現は困難であった。本研究では、マイクロ流体技術を応用して、糖尿病治療のための取り出し可能な膵島移植片を開発した（下図）。膵島はヒト iPS 細胞から分化誘導して調製したものを使用し、直径 6 mm のハイドロゲル内にレンコン状構造にカプセル化することで取り出しに必要な強度とカプセル化した細胞機能の維持が可能となった。

【方法】まず、ハイドロゲル内のどの位置に細胞を配置するかを調べるために、直径 6 mm のハイドロゲルにランダムに細胞をカプセル化した移植片を作製し、細胞の生存率を評価した。次に、レンコン状構造に細胞を配置するためのデバイスを作製し、それを用いてヒト iPS 細胞由来膵島をレンコン状にカプセル化した移植片を作製した。作製した直径 6 mm の移植片と既存の直径 1 mm の移植片を、免疫系をもつマウスに移植し、強度と異物反応による細胞の付着度合いを比較した。さらに、直径 6 mm の移植片を、糖尿病モデルマウスに移植し、随時血糖値を測定し血糖値の制御を行った。移植片は適宜、マウス体内から取り出すことで、高血糖の再発および移植片の取り出し性能を確認した。

【結果】ハイドロゲル内のどの位置まで細胞が生存しているかを調べたところ、ハイドロゲルのエッジから 1 mm 以内にある細胞は十分に生存していることを確認した。そこでエッジから 1 mm 以内に細胞が配置されるようなレンコン状構造をもつ移植片を作製した。作製した移植片を、免疫系を持つマウスの腹腔に移植したところ、既存の 1 mm 移植片に比べ、異物反応による線維化が抑制され、また移植後 1 年の長期にわたり移植片の形態を保つことが確認できた。この移植片を、糖尿病モデル免疫不全マウスの腹腔に移植したところ、移植後最大半年以上という長期での血糖値正常化を達成した。移植したマウスには、癒着や腫瘍形成などは起こらず安全性も確認でき、適宜体内から移植片を取り出すことにも成功した。

ヒト iPS 細胞由来膵島をカプセル化したレンコン状構造の移植片の模式図



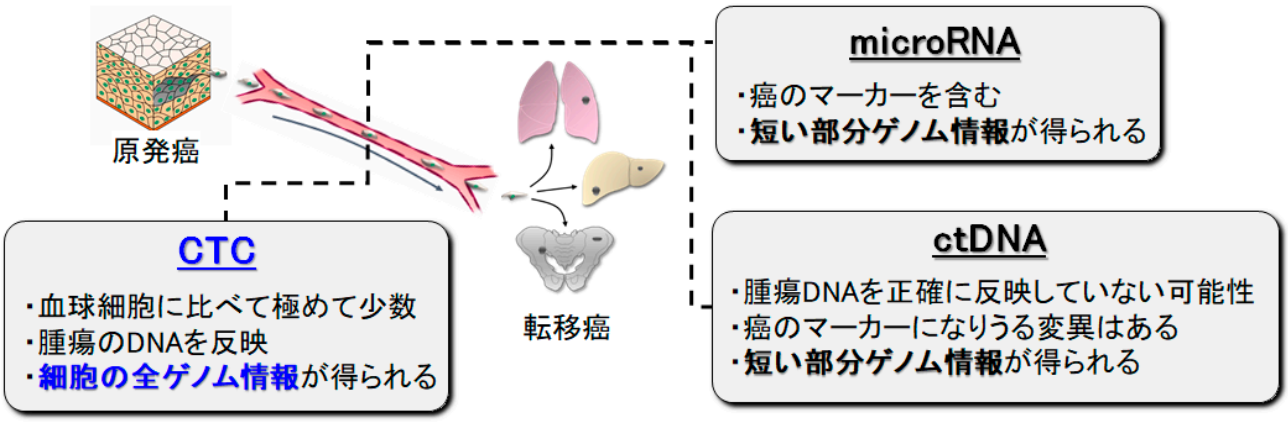
88　がん早期診断用の選択的分離バイオマテリアルの設計	田中　賢

【目的】健康長寿社会の実現のために、がんの超早期診断技術のニーズが高まっている。近年、がん診断の液体生検（リキッドバイオプシー）として、原発腫瘍から血管内に浸潤した、血中循環癌細胞（CTC）や細胞外小胞のエクソソームが注目を集めている。CTC やエクソソームは、ステージ 0 や 1 においても血管中に浸出している一方で、MRI、CT、PET では容易に検出できない。例えば、CTC を血中から分離回収することにより、がんの超早期診断に使うバイオマーカーとして利用することが期待されている。また、患者個人に適した抗がん剤を選択するための検査をすることも期待されている。がん患者の多くは、原発腫瘍ではなく転移がんにより亡くなるので、CTC を対象とした検査は、抗がん剤の効果を直接的かつより正確に評価できる。患者個人に適した抗がん剤を選択する技術が開発されれば、患者 QOL の向上と国民医療費の低減が期待できる。本研究では、物質や細胞の選択的な分離に大きな役割を担う生体表面の水分子に着目し、独自に発見した生体物質の人工材料への吸着性を制御可能な中間水のコンセプトをもとに、全血からハイスループットかつ選択的にがん細胞を分離回収する技術を構築する。さらに、吸着・接着選択性の発現機構を明らかにするために、中間水の役割を解明することにより、さらに高機能なバイオマテリアル開発のための設計指針の構築を目指した。

【方法】主鎖・側鎖構造の異なる高分子を新規に精密合成し、血液中の血漿タンパク質、血球細胞、がん細胞の吸着・接着性を調べた。目的の吸着・接着選択性を示す中間水量を有する材料の精密合成手法の検討を行った。目的細胞を含む血液と材料の接触時間、接触条件（静置、撹拌速度）との関係を検討した。また、CTC の接着・回収効率を向上させるために、特定の中間水量を有する高分子を用いた微粒子を作製した。

【結果】高分子の側鎖官能基の密度、側鎖の運動性の変化によって水和状態が受ける影響を検討するために、モデル高分子の合成を行った。regio 選択的開環メタセシス重合にて血球細胞の非接着性を示す poly（2-methoxyethyl acrylate）（PMEA）の主鎖ポリエチレン骨格に対する側鎖導入間隔（X）を変更した新規高分子（HPXs）を合成した。側鎖導入間隔（X）を拡大することで含水時の中間水量が変化することが分かった。したがって、HPXs は、水和状態と血球細胞やがん細胞の接着状態を理解するための高分子であることが明らかになった。ついで、血球細胞の接着実験を行ったところ、中間水量の増加に伴って血球細胞の接着数が減少することが分かった。一方、がん細胞の接着実験を行ったところ、接着することを確認した。以上の結果から、目的細胞以外の非特異吸着を防止し、目的の CTC の分離を行うために必要な合成高分子の中間水量制御のための指針が得られた。本研究の結果より、ラベルフリー技術による「CTC 分離培養キット」、医療機関によるがん診断に用いられる「がん診断用キット」、抗がん剤治療に用いられる「抗がん剤感受性診断用キット」を作製するために、PMEA 誘導体をプラスチックチップもしくは微粒子に被覆した、CTC を分離・回収可能な全く新しいバイオマテリアルを提唱した。

リキッドバイオプシーの対象と CTC の有用性



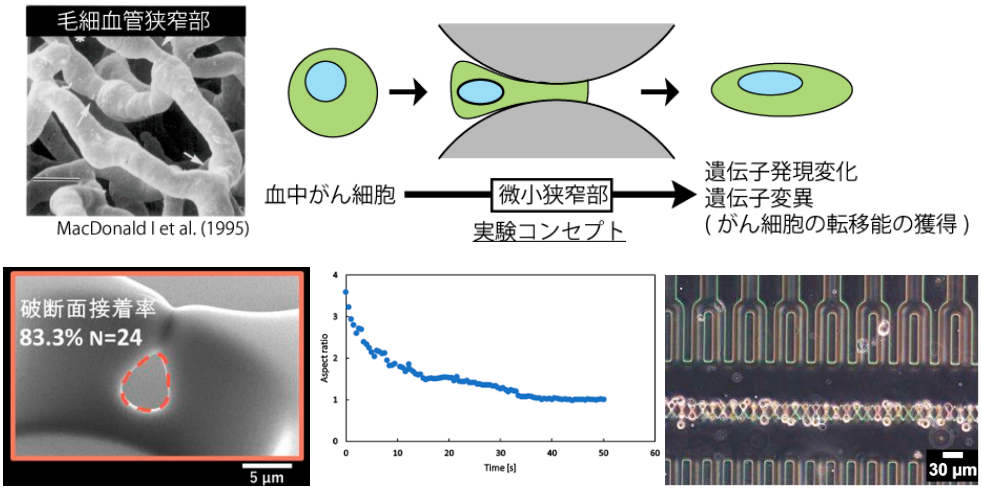
89　1細胞進化動力学を目指したがん細胞微小循環モデル	寺尾　京平

【目的】本研究は、血中がん細胞が血管狭窄部を通過した際に生じる遺伝子発現の変化と遺伝子変異の蓄積を解析する方法論を実現する。それにより、血中がん細胞が如何にして血液循環中に「進化」し、他臓器への転移能を獲得する（あるいは抑制される）に至るのか、という疑問にアプローチする。そのために、毛細血管の狭窄部を再現した 3 次元微細構造を半導体微細加工技術によって作製し、ライブイメージングによる狭窄部通過前後の 1 細胞毎の計測を通じて、がん細胞と細胞核の物理的挙動について可視化するとともに、狭窄部通過後のがん細胞を回収し、遺伝子発現・変異を評価することで細胞機能の変化を解析する。

【方法】以下の三つの要素に関して、マイクロナノテクノロジーを用いて、装置及び手法の開発と評価を行い、血中がん細胞進化解析に関する新たな方法論を確立した。1. 血管狭窄部の 3 次元モデル形成：ヒトの血管最小狭窄部は直径約 6μm の円形に近い断面を持っている。これを生体外で再現するため、半導体加工技術とポリマーの自己組織化を利用したマイクロブリッジ鋳型形成手法を開発した。2. 1 細胞観察デバイス：蛍光顕微鏡下に *in vitro* 血管モデルとなる 1 の狭窄部構造を有したマイクロ流体デバイスを設置し、がん由来の細胞株をサンプルとして、狭窄部通過前後のがん細胞および細胞核の変形と形状回復に関するデータを物理刺激の履歴として取得するとともに、細胞内動態を蛍光ライブイメージングにより可視化し、進化の駆動因子として評価する。そのために、狭窄部通過後の細胞を微細構造でトラップするデバイスを開発した。3. 多細胞回収デバイス：狭窄部を通過した細胞群をマイクロ流体デバイスから回収し、特にがんの転移に関わる機能の評価を行う。回収細胞群の遺伝子発現解析を行うために、解析に十分な細胞数を回収することが必要なことから、*in vitro* 血管狭窄部モデルをマイクロ流体デバイス内で多数並列化することで単位時間当たりの回収細胞数を向上させること取り組んだ。また、それを実現するために、細胞をアレイ化した狭窄部構造に均等に分配する分岐型流路の設計と評価を行った。

【結果】三つの技術要素について、研究開発に取り組み、細胞計測に用いるための技術を確立した。1. 血管狭窄部の 3 次元モデル形成：微細加工時の様々なパラメータを検討することで、メニスカスを用いたマイクロブリッジ鋳型により 6μm 径の円形断面を有した微小狭窄構造の形成に成功した。2. 1 胞観察デバイス：がん由来細胞株 MDA-MB-231 を用いて狭窄部通過実験を行い、細胞の狭窄部通過による変形と、通過後の細胞の変形からの回復挙動を顕微鏡によりイメージングした。変形回復挙動から、線形粘弾性モデルにより形状回復の時定数が 8 秒程度であることが見積もられた。3. 多細胞回収デバイス：細胞を均等分配する分岐型流路と 512 個の狭窄部アレイを有したマイクロ流体デバイスを作製した。熱交換器設計を参考に、数値流体解析と細胞を用いた実験を行い、細胞を効率よく狭窄部に誘導・分配するマイクロ流路設計の最適化を行った。

in vitro 微小血管狭窄部 3 次元モデルと細胞計測



90　腎細胞がん患者における生殖細胞系変異の大規模探索

中川　英刀

【目的】腎細胞がんでの遺伝性腫瘍は数%程度とされており、von-Hippel-Lindau（VHL）病や Bitt-Hogg-Dube 症候群などがあり、生殖細胞系遺伝子変異が発症や病勢進行に寄与すること、さらには治療方針も決定することが報告されている。しかし、本邦において腎細胞がんに対する生殖細胞系変異の探索はほとんど行われていない。本研究は、大規模な日本人腎がん症例および非がん症例における遺伝性腫瘍関連遺伝子の rare variants の探索を行い、個々の遺伝子 variants について臨床的意義の解釈を試みて、日本人集団での遺伝性腎がんの頻度を明らかにするものである。

【方法】バイオバンクジャパン（BBJ）、秋田大学、京都大学より腎がんと診断された症例群 1,665 例と非がん対照群（60 歳以上で、がん既往歴なし、がん家族歴なし）23,780 例の DNA を解析に用いて、遺伝性乳がん卵巣がん症候群やリンチ症候群などの原因遺伝子を含む 27 遺伝子（*BRCA1/2* など）の翻訳領域のターゲットシークエンスを行った（セット 1）。また、遺伝性腎がんと関連が報告がされている 19 遺伝子（*VHL*、*BAP1*、*FH*、*FLCN*、*TSC1*、*TSC2*、*SDHA/B/C/D* など）パネルを新たに追加し（セット 2）、腎がんと診断された症例群 1,665 例と非がん対照群 5,993 例の DNA のターゲットシークエンスを行った。これらの遺伝子の翻訳領域は合計 137 kb になり、multiple PCR にてこれらのゲノム領域を増幅し、それらのシークエンス解析を行った。様々なシークエンスのフィルターをかけた後に、これら遺伝性腫瘍関連の 46 遺伝子の翻訳領域の variants を抽出し、得られたバリアントのうち、Loss of Function バリアントまたは ClinVar に登録された病的バリアントを、病的バリアントと考え、腎がん群と非がん群間でのアレル頻度での関連解析を実施した。

【結果】大規模パネルシークエンス解析の結果、セット 1 については、201 個の病的 variants を同定した。セット 2 は、38 個の variants を同定した。セット 1 の遺伝性腫瘍関連遺伝子について、腎がん症例（1,617 例）と非がん例（2,3716 例）での病的 variants の保有者数の比較を行うと、*BRCA1* 遺伝子の病的 variants のみが、有意に腎がん症例で多かった（$P=7.28\times10^{-3}$、Odds 比 4.90）。一方、セット 2 の腎がん関連遺伝子については、腎がん症例（1,660 例）と非がん例（5,993 例）での病的 variants の保有者数の比較を行うと、*BAP1* 遺伝子（$P=2.24\times10^{-5}$）、*FH* 遺伝子（$P=4.78\times10^{-4}$）、*FLCN* 遺伝子（$P=0.034$）、*TSC1* 遺伝子（$P=0.047$）の病的 variants が、有意に腎がん症例で多い、または多い傾向にあった（表）。

遺伝性腎がん関連遺伝子の病的 variants の保因者の割合

遺伝子名	合計の病的バリアント	症例群(n=1,660) 病的バリアント保有者(人)	症例群(n=1,660) 病的バリアント保有者の割合(%)	対照群(n=5,993) 病的バリアント保有者(人)	対照群(n=5,993) 病的バリアント保有者の割合(%)	*P*- value	Odds比　(95% CI)
BAP1	5	7	0.422	0	0	2.24E-05	Inf (5.217-Inf)
FH	4	5	0.301	0	0	4.78E-04	Inf (3.314-Inf)
FLCN	3	3	0.181	1	0.017	0.034	10.842 (0.87-567.7)
TSC1	1	2	0.12	0	0	0.047	Inf (0.678-Inf)
SDHA	10	5	0.301	8	0.133	0.172	2.26 (0.581-7.847)
TSC2	1	1	0.06	0	0	0.217	Inf (0.093-Inf)
VHL	3	4	0.241	7	0.117	0.268	2.065 (0.443-8.135)

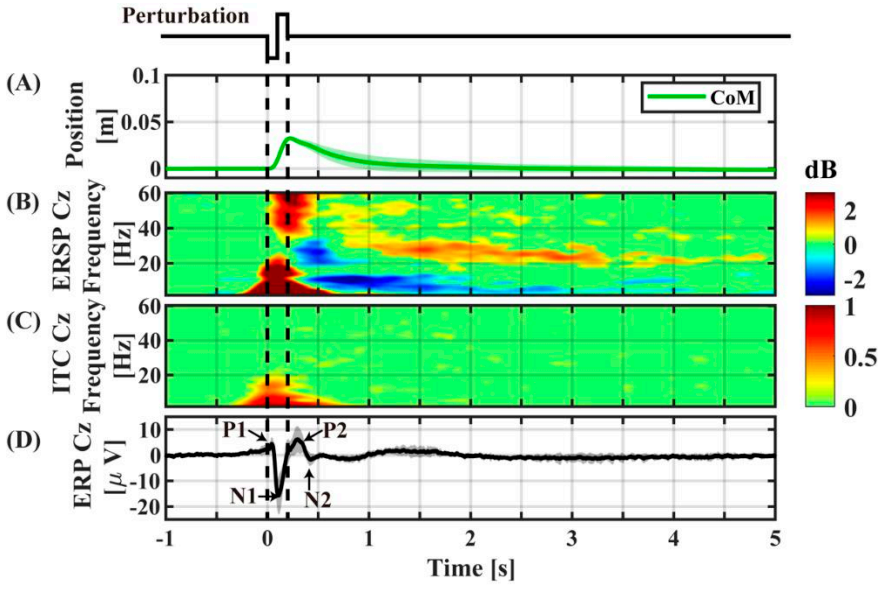
91　ヒト立位姿勢制御の脳内メカニズムの解明	野村　泰伸

【目的】ヒト立位姿勢は、ふくらはぎの抗重力筋の持続的活動と伸張反射に因る足関節の高剛性によって安定化されると考えられてきた。10 年前、我々はこの定説と対立する間欠制御仮説を提案した。ここ数年、生体情報学分野の複数の研究者、および我々の研究グループによって、新仮説モデルと静止立位姿勢動揺データをデータ同化する試みがなされ、定説よりも我々の新仮説モデルの方が、データ当てはめの精度（モデルのデータ説明能力）が格段に高いことが示されつつある。また、神経内科分野の権威ある雑誌 BRAIN に、パーキンソン病患者に対する深部脳刺激が姿勢機能に与える影響の評価には、我々が提唱する間欠制御モデルの制御パラメータ値を動的バイオマーカーとして用いるべきであるという記事が掲載された。このように、今後は間欠制御仮説が立位姿勢制御メカニズムの定説として定着することが予想される。そこで、本研究では、立位姿勢のバイオメカニクス計測に加え、姿勢の神経制御に関わる脳活動（脳波）を計測し、立位姿勢の間欠制御仮説の脳内メカニズムの解明を目指した。随意的運動の終了後や運動実行抑制時に現れる脳波ベータ帯域の同期現象（β リバウンド）の機能的意味の解明は上肢の運動関連脳波研究の主要な課題の一つであるが、自動運動である立位姿勢制御に対する関連研究はほとんどなされていない。そこで、本研究では、インパルス的床面移動外乱に対する立位姿勢応答とそれに伴う脳波・筋電図応答を計測し、β リバウンドに対応する脳波応答の存在を示し、それが姿勢制御に対して果たす役割に迫った。特に、間欠制御に基づく立位姿勢制御モデルに当該外乱を加えたコンピュータシミュレーションにおいて、立位姿勢応答に長潜時（1 秒以上）で、かつ長時間（数秒間）に渡って発生する間欠的フィードバック制御のスイッチをオフにする現象が、能動的な姿勢への介入を伴わない姿勢の直立性の能動的モニタリング機能を反映したβ リバウンドとして出現するという仮説を立て、その検証を目指した。

【方法】9 名の若年健常者から、床面摂動に対する姿勢応答、および脳波・筋電図応答を計測し、その動態を解析した。

【結果】すでに知られている摂動後 0.3 秒以下の短潜時で発生する事象関連電位に引き続き、1 秒程度の長潜時で高 β 帯域リバウンドと θ 帯域の脱同調が統計的に優位な振幅で発生すること、および、これらの活動は姿勢の回復が完了する前に始まり、長時間（約 3 秒間）に渡って持続することを示した。また、これらの同期・脱同期活動の発生は、姿勢の間欠的フィードバック制御器のスイッチがオフになる時間帯と一致した。これらの結果は、基本的には身体の受動的機械力学的特性を利用して姿勢の安定化を謀りつつも、必要に応じて適切なタイミングで能動的介入を行えるように、姿勢状態の能動的モニタリングしている脳内状態を反映していることを示唆する。

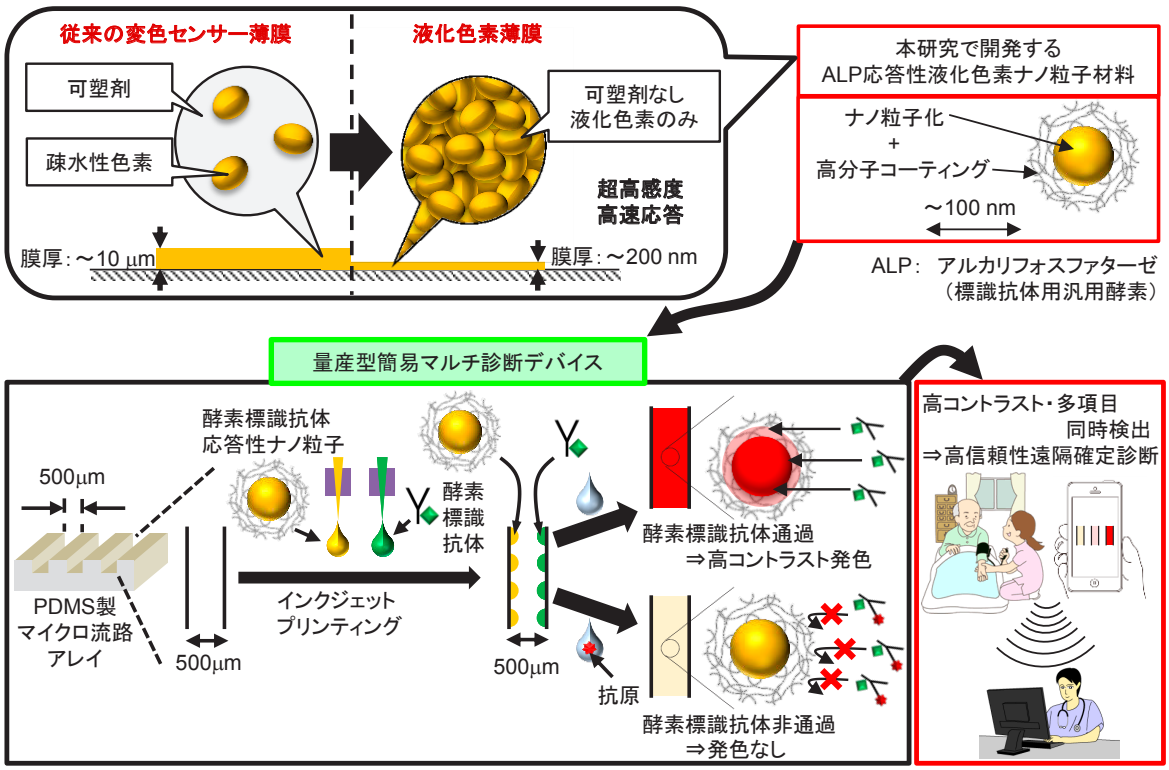
床面移動外乱に対する立位姿勢応答とそれに伴う脳波 β および θ 帯域の持続的な応答



92　液化色素ナノ粒子によるマルチ診断デバイス開発	久本　秀明

【目的】今後の普及が予想される遠隔、在宅での血液検査に基づく確定診断精度向上に寄与できる「超高感度1 ステップイムノアッセイ用液化色素ナノ粒子材料」の創製とマルチ診断デバイスを開発する。
【方法】1. 分子サイズ選択透過性・酵素基質液化色素ナノ粒子の創製・評価：酵素標識抗体の標識酵素として汎用性の高いアルカリフォスファターゼ（ALP）に変色応答する液化色素を合成した。高速攪拌下の水溶液に分散させて液化色素ナノ粒子を作製し、蛍光強度変化を系統的に評価した。また、従来型のナノ粒子も同時に作製し、感度の違いを評価した。2. インクジェットプリントに基づく超高感度・量産型 1 ステップ診断デバイスの作製・評価：本項目ではインクジェットプリント技術でポリジメチルシロキサン（PDMS）製流路内の両サイドにスポッティング固定したデバイスを作製し、診断マーカー（CRP）への蛍光応答を評価した。
【結果】1. 分子サイズ選択透過性・酵素基質液化色素ナノ粒子の創製・評価：ALP 応答性液化色素ナノ粒子の作製に初めて成功した。粒子サイズは約 165 nm 程度であった。ALP に対する著しい蛍光強度の増加が確認され、従来型と比較したところ、約 3.8 倍高感度であることが明らかとなった。2. インクジェットプリントに基づく超高感度・量産型 1 ステップ診断デバイスの作製・評価：インクジェットプリント法に基づく試薬固定化法を確立した。流路内両サイドに固定する方法が再現性良い固定に重要であることを明らかにした。試薬固定化時の添加剤濃度を最適化し、カットオフ値を含む濃度範囲の CRP に応答するデバイス作製に成功した。

本研究のコンセプト図



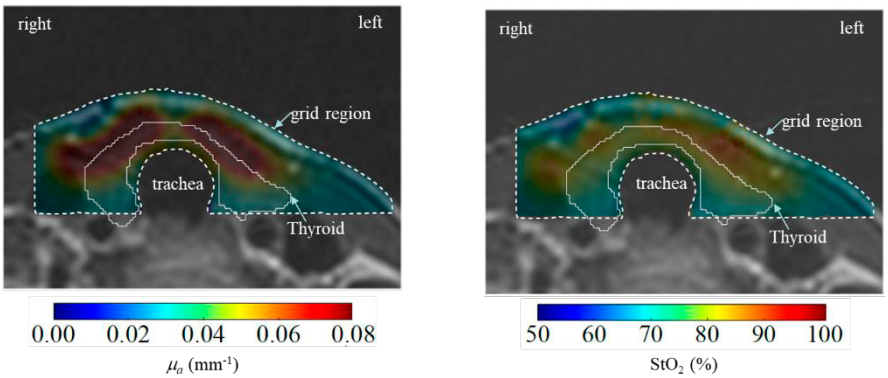
93　高速・高性能拡散光トモグラフィによる甲状腺がん診断	星　詳子

【目的】甲状腺がんのほとんどは高分化がん（乳頭がん、濾胞がん）で比較的予後は良く、頸部腫瘤や頚動脈超音波検査などで見つかることが多い。乳頭がん（PTC）は，超音波検査と穿刺吸引細胞診により診断されるが，甲状腺がんの約 5%をしめる濾胞癌（FTC）は、よりアグレッシブタイプに変異しやすく、がん細胞に核異型が認められず、甲状腺全摘手術が必用である。しかし、組織像からも確定診断が難しい場合があり、過剰診断・治療が問題になっている。近赤外線を用いる拡散光トモグラフィ（DOT）はがん組織内の低酸素領域を検出することができ、非侵襲的甲状腺濾胞がんの診断法として期待される。しかし、頸部の構造が複雑であるため画像再構成に必須の光伝播数理モデル構築が困難で、これまで DOT の甲状腺への応用は報告されていない。本研究では、画像再構成に必要な最小限の頸部領域を核磁気共鳴画像から抽出し、気管の空洞領域を除外した頸部の有限要素グリッドを作製することでこの問題の解決を試み、甲状腺の DOT 画像再構成を目的とした。

【方法】DOT 計測に 3 波長のパルス光源を搭載する 8 チャンネルタイムドメイン計測装置を用いた。健康成人女性を対象に、頸部光ファイバホルダの作製と、適切な照射、検出ファイバの配列を決めるために、まず核磁気共鳴画像法（MRI）で頸部を撮像した。MR 画像から気道を含めない 3D 有限要素グリッドモデル（気道ー組織グリッド）と比較の為に気道を組織で埋めたモデル（一様組織グリッド）を作製した。モデルベース逐次近似画像再構成アルゴリズムに従って、光伝播数理モデルとして時間依存光拡散方程式（PDE）を用い、まず PDE の数値解を有限要素法で求めた。最適化逆問題における評価関数のデータタイプに検出光の重心を用い、換算散乱係数は定数として非線形共役勾配法によって吸収係数を求めた。さらに、吸収係数から組織ヘモグロビンの濃度と組織酸素飽和度（StO_2）を算出した。

【結果】気道ー組織グリッドでは、実際の甲状腺の位置よりはやや前方（皮膚側）よりではあったが、ほぼ甲状腺の位置に高吸収係数領域が再構成された。一方、一様組織グリッドモデルでは、高吸収係数領域は甲状腺とは異なる領域に再構成された。甲状腺領域の StO_2は 82～92%で、主として筋肉で構成される甲状腺周辺組織の StO_2（約 65%）よりはるかに高く、甲状腺内の低酸素領域検出には有利な結果であると考えられた。画像の性能向上には気管壁における光の反射・屈折の影響を考慮した数理モデルが必要など、まだ課題は残されているが、世界で初めてヒト甲状腺の DOT 画像再構成に成功し、がん組織内に生じる低酸素領域の検出は可能であると結論した。

甲状腺の拡散光トモグラフィ画像



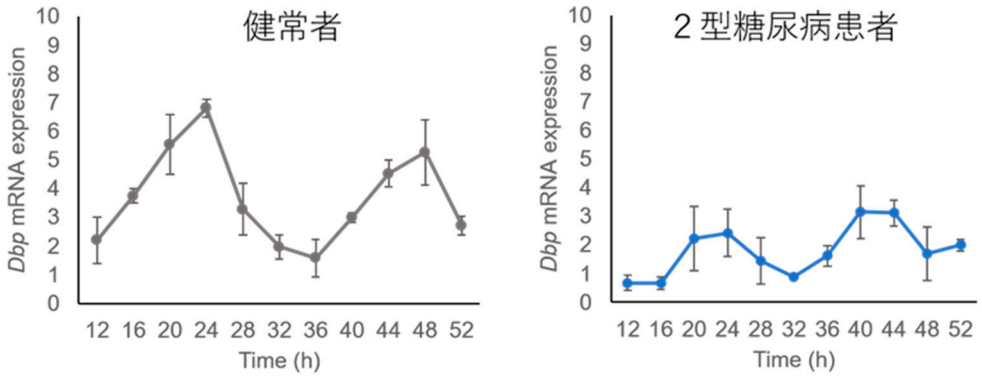
94　時計遺伝子を指標とした幹細胞製剤の開発	堀口　道子

【目的】幹細胞を用いた再生治療において、移植の成功を左右する重要な課題は、移植に必要な品質の高い幹細胞を培養する技術である。そして、移植後も安定した高い再生治療効果を有する幹細胞製剤の開発である。幹細胞は培養条件に依存し、分化し幹細胞性を失うと、再生治療材料としての能力が急激に低下してしまう。また、幹細胞は、生物由来製剤であり、その由来となるドナーの条件によって品質が影響を受ける。一方、時計遺伝子は、周期的な振幅により生体の様々な機能の恒常性維持を司っており、時計遺伝子の変動は幹細胞の細胞状態を反映する指標となる。本研究では、移植効率の高い幹細胞製剤を構築するため、時計遺伝子を指標として幹細胞の評価を行った。本研究によって、時計遺伝子に着目し、移植効率の高い幹細胞ドラッグデリバリー製剤を構築する。

【方法】生活習慣病の基礎疾患を有するドナーより採取した幹細胞の時計遺伝子（*Dbp*、*Per2*、*Cry1*）の発現を定量的PCR 法により 4 時間おきに解析した。幹細胞の時計遺伝子の振幅は、細胞の恒常性に大きな影響を与える。そこで、幹細胞のエネルギー産生を担う細胞小器官ミトコンドリアを透過型電子顕微鏡により観察した。さらに、ミトコンドリア酵素活性を、MTT アッセイ法を用いて定量し、ミトコンドリア DNA コピー数を定量的 PCR により定量した。移植効果の違いを明らかにするため、我々が開発した幹細胞スフェア培養法により幹細胞製剤を調製し、免疫不全マウスの背部皮下に移植した。幹細胞割合を明らかにするため、フローサイトメトリーを用いて幹細胞マーカー（CD90、CD73、CD105）陽性細胞を定量した。細胞障害を評価するため、核膜タンパク質の発現を免疫染色法・ウエスタンブロット法を用いて定量した。

【結果】本研究では、移植効率の高い幹細胞製剤を構築するため、時計遺伝子を指標として幹細胞の評価を行った。Ⅱ型糖尿病患者由来の幹細胞では、時計遺伝子の発現振幅が健常者由来の幹細胞に比較して弱い事ことを明らかにした。時計遺伝子の振幅が低下したドナー由来の幹細胞製剤では、ミトコンドリアが変性し、ATP 活性やミトコンドリア DNA コピー数が低下することを明らかにした。時計遺伝子の振幅が低下したドナー由来の幹細胞製剤では、幹細胞割合が低下することで移植効率が悪くなることを明らかにした。本研究により、幹細胞製剤を開発する上で、時計遺伝子を定量することの重要性が明らかとなった。本研究成果は、幹細胞製剤の開発に重要な成果となり、再生治療の普及に繋がるものであった。

幹細胞における時計遺伝子の発現変動



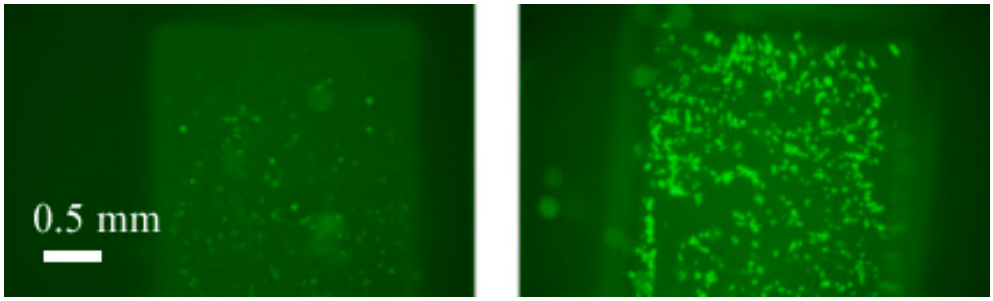
95　微小気泡と音響放射力による3次元血管形成技術の開発	桝田　晃司

【目的】現在、3D 細胞プリントに代表されるバイオプリンタの分野の発展は目覚ましく、組織や器官の形成等が数多く報告されており、実際の生体の組織構造を再現できることが期待されている。本研究では、代表者がこれまで研究してきた音響放射力による微小物体の動態制御技術を応用し、血管内皮細胞を管腔構造に構成するための基盤技術を創生することを目的とする。微小気泡はその内部に含まれる気体によって、生体内で音響力学特性が変化することを利用し、細胞の空間的密度を低減する。本研究では、任意形状の血管形成技術を開発することを目指し、細胞が制御される条件での細胞生存率の計測と、流路内での細胞培養の可能性について検証した。

【方法】本研究では、ウシ由来の頚動脈正常血管内皮細胞（HH 細胞）と、共同研究者である帝京大学薬学部薬物送達学研究室より提供された微小気泡を用いた。HH 細胞は cRGD ペプチドが結合するため、表面に同ペプチドを結合させた微小気泡と、通常の微小気泡を用意し、細胞と混合した懸濁液を作製した。細胞周囲の状況と超音波照射に対する細胞生存率への影響を調べるため、微小気泡なし、通常の微小気泡、ペプチド結合微小気泡、の 3 パターンで生存率を計測、比較した。超音波の中心周波数は 3 または 5 MHz とした。各懸濁液は、総細胞数 1.0×10^4 個となるように調製し、超音波の照射後、細胞の生死判定のための試薬を注入して生存率を算出した。また、細胞を人工流路内で培養して血管形状に形成するため、基盤となる流路材質に対する培養への影響を検証した。シリコン流路にコラーゲンコーティングを行った後、細胞懸濁液を注入し、培養を行った。懸濁液注入後の流路内の状況を、正立顕微鏡にて 24 時間経過観察した。なおこの際、流路表面にエキシマレーザによる表面改質を行った。

【結果】超音波の照射条件は、過去の研究で細胞の動態制御が良好に確認された最大音圧 400 kPa とした。音波が照射と休止を繰り返している比率（Duty 比）は、30、60、100%の 3 種類とした。まず微小気泡が存在しない場合は、細胞に対する影響は見られないことを確認した。次に、cRGD ペプチドが付与されていない通常の微小気泡を混入させた場合は、特に周波数 3 MHz では、照射時間が長くなるほど、音圧が高いほど生存率が顕著に低下した。一方、5 MHz ではこれらの傾向は見られなかった。これに対し、cRGD ペプチドが付与された微小気泡では、3 MHz、5 MHz どちらの周波数でも、生存率の低下はみられなかった。よって細胞表面に微小気泡が付着していれば、微小気泡の破壊が細胞に与えるダメージを低減することができることが分かった。流路内での細胞培養に関しては、図に示す通り、左のレーザ照射なしの場合に比べて、右のレーザ照射ありの場合で、細胞が流路の全体的に存在しつつ扁平形に変化したため、良好に接着している様子が確認された。これらの結果より、超音波により壁面に押し付けられた細胞がその状態のまま増殖し、血管のような構造体を形成できる可能性があることが分かった。

レーザ照射条件に対する流路内での細胞培養結果（左レーザ照射なし、右レーザ照射あり）



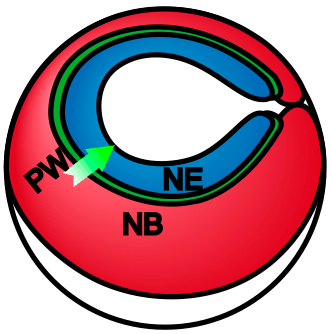
96　時空間パターンを記述する新規数理モデルの創出と検証	八杉　徹雄

【目的】多細胞生物の発生過程は、様々な細胞間相互作用によって制御されている。これらは拡散性の物質や、隣接する細胞と相互作用する膜タンパク質の働きによるシグナル伝達を含む。このような細胞間相互作用に依存する発生現象を、数理モデルを用いて理解する際、対象とする領域を四角形あるいは六角形の格子に分割し、その格子の一つひとつを細胞と仮定し、その格子上の状態は一様だと仮定して、空間の独立変数が離散量である数理モデルを構築する。このような空間離散モデルは細胞のサイズや形状の情報を取り入れて、実験結果に近い形で構築されるので実験との相性がよい。一方で、従来の離散モデルは「時空間的パターンの形成機構を数学的に調べるのが困難である」「細胞増殖を記述しにくい」「個別の現象を説明できても、他の生命現象への適用性が低い」などの問題点があった。この問題を克服するために、これまで細胞の大きさを極小にして極限をとることによる連続化手法が報告されてきたが、この手法では空間の離散的な構造がなくなり、実際の生命現象でみられる離散的な現象が再現されなくなることがある。この問題を解決するために、我々は細胞の大きさや格子の形状を保持したまま離散モデルを連続モデルに変換する新規の数理手法の開発とその有用性の証明を目指した。

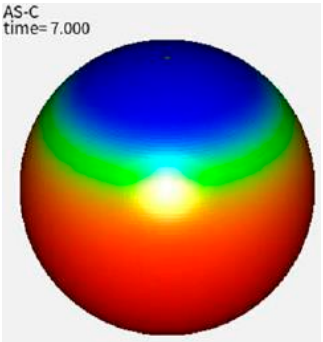
【方法】本研究ではまず、細胞の大きさや格子の形状を保持したまま離散モデルを連続モデルに変換する手法を考案した。次に、既存の離散モデルにこの連続化の手法を適用し、離散モデルで示される時空間パターンが連続モデルで再現されるか調べた。その具体例として、ショウジョウバエ視覚中枢の発生の数理モデルに着目し、離散モデルの連続化を行った。さらに、連続モデルを用いたシミュレーションを行った。

【結果】本研究ではまず、平行移動作用素と合成積作用素を用いることで、細胞の大きさや格子の形状を保持したまま離散モデルを連続モデルに変換する手法を考案した。連続モデルでは、空間の独立変数が連続になる。この連続化手法により、非線形の連続モデルでは、空間の独立変数が連続になる。我々は、この連続化手法により、非線形の離散モデルは系統的に連続モデルに書き換えることができ、両者の方程式は初期値が同じであれば各点的に同値となることを示した。

連続モデルを用いた分化の波のシミュレーション結果



視覚中枢における
「分化の波 (PW)」の伝播



連続モデルを用いた
シミュレーション結果

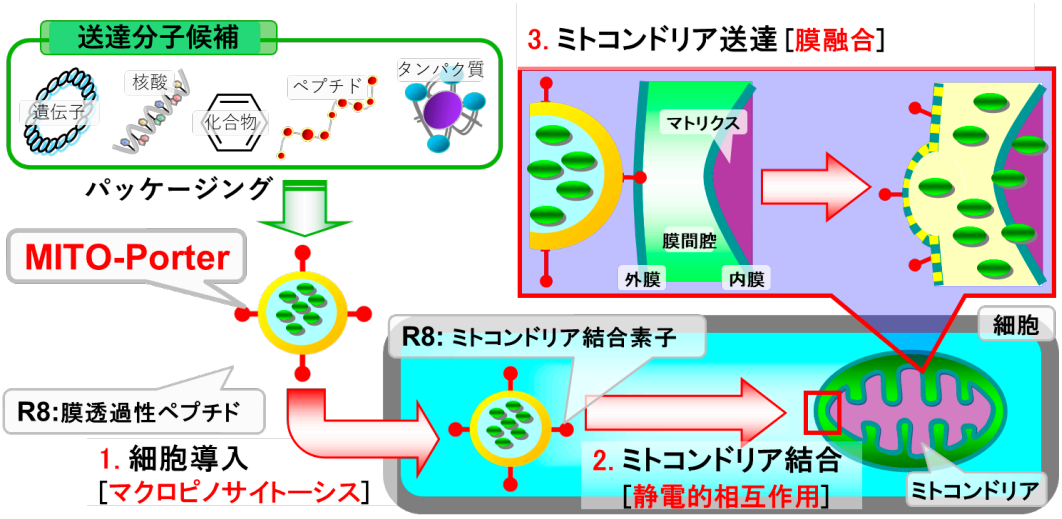
97　ミトコンドリア標的型タウリン封入DDSの構築	山田　勇磨

【目的】ミトコンドリアは多彩な機能を有した細胞内小器官であり、その機能異常によって様々な症状を呈するミトコンドリア病を発症する。2019 年に「タウリン」がミトコンドリア病に対する治療薬として保険適用され、有効な治療法が確立されていない本疾患の治療方針として非常に明るい話題となっている。一方で、薬物療法に用いられる薬物は、疾患細胞への細胞導入能が乏しく、ミトコンドリア移行性が無いため、継続的に大量投与する対症療法が主流である。研究代表者らはミトコンドリア膜との膜融合を介して内封物質を送達する MITO-Porter を開発し、培養細胞ミトコンドリアへの機能性分子送達に成功している。研究代表者は、MITO-Porter システムに疾患細胞への細胞導入能を付加した「疾患細胞ミトコンドリアを標的とした Drug Delivery System（DDS）を構築」することで、ミトコンドリア病の革新的治療が可能になると考え、本研究を提案した。本研究では、「疾患細胞標的型 MITO-Porter の構築」、「疾患細胞を用いた細胞内動態の最適化および治療効果の検証」、「動物を用いた毒性試験」に関する研究を進めた。

【方法】1. 疾患細胞標的型 MITO-Porter の構築 : 疾患細胞標的型 MITO-Porter（RP/KALA-MITO-Porter）の調製、マイクロ流体デバイスを利用したコエンザイム Q_{10}（CoQ）などの候補薬剤の封入検討を行った。調製した DDS の粒子物性（粒子径、均一性、表面電位）を測定し最適化を図った。2. 疾患細胞を用いた細胞内動態の最適化および治療効果の検証 : 患者由来疾患細胞を用いた実験を行うため、自主臨床研究の整備を進めた。疾患細胞の細胞内動態観察、ミトコンドリア機能評価を行い DDS の治療効果を検証した。3. 動物を用いた毒性試験 : DDS 投与後に、血液・生化学検査を行い、臓器毒性などを評価した。

【結果】1. RP/KALA-MITO-Porter の構築に成功した。また、マイクロ流路デバイスを利用して CoQ を封入する方法を確立した。2. 自主臨床研究を整備し、3 種のミトコンドリア疾患細胞を用いた実験をする環境を整えた。また、調製した MITO-Porter が疾患細胞ミトコンドリアにアクセス可能であることを示した。3. RP/KALA-MITO-Porter を静脈内投与した際に肝臓、腎臓、膵臓に対する毒性を示さなかった。

MITO-Porter を用いたミトコンドリアへの分子送達戦略



98　磁気研磨法の医用材料（ステント）への展開

吉原　佐知雄

【目的】現代の金属製品の使用範囲は幅広く、加工しやすさ、強度といった観点から様々な用途において重要な役割を担っている。このような金属製品において、表面仕上げ工程は、表面の欠陥を低減かつ排除し、耐食性と疲労寿命を向上させたデバイスを生産するために重要な工程である。製造工程では、酸化皮膜などの瑕疵を生じることがあり、最終工程である研磨により除去される。表面処理の業界標準の研磨法は電解研磨である。電解研磨では、鋭利な部分ほど電流密度は高くなり、研磨前の粗さや欠陥の影響を受ける。また、工作物が複雑形状である場合、電流密度が不均一になるという難点もある。そこで、研磨工程に磁気研磨法の適用を検討した。磁気研磨では、機械的研磨であるが、磁性砥粒という小さな粒子を用いるため、高精度な精密加工を可能とし、複雑形状にも適用可能と考えた。現在、金属製品の仕上げ工程には平滑性向上、耐食性付与のため電解研磨が用いられる。しかし、電解研磨では、酸化被膜の除去工程が必要であること、電解液の条件調節が煩雑であるという問題点がある。そこで本研究では、磁気研磨で医用目的の金属材料を仕上げることができないか検討した。本研究では、医用材料（ステント）への展開として、チタンニッケル製ワイヤーの製造工程で生じる酸化被膜を磁気研磨による除去や表面平滑化を試みた。

【方法】磁性砥粒には Fe-Al_2O_3からなる粒子 KMX-80（東洋研磨工業）を用いた。研磨液には水とヤシ脂肪酸ジエタノールアミドを 1 : 1 で混合したものを用いた。研磨に用いた試料は線径 0.75 mm、直径 6 mm、長さ 17 mm のコイル状である。Ni-Ti の形状記憶合金であり、引き延ばしても、50℃まで昇温すると元の形状に戻る性質がある。このため、磁気研磨の際に試料を引き延ばし内面となる部分を研磨し、元の形状に戻すということが可能である。以下に磁気研磨装置を用いた研磨と、既存の装置を元に磁気研磨装置の改良を試みた研磨について記す。研磨後の工程として、研磨液、砥粒除去のため水洗、エアブローを行った。表面観察には、走査型電子顕微鏡（SEM）、元素分析にエネルギー分散型 X 線分光法（EDX）、表面形態や粗さ評価に原子間力顕微鏡（AFM）を用いた。磁気研磨装置（A）を用いた研磨：試料を 17 cm まで引き延ばし、中央に穴が開いたステンレスステージ上に設置、マスキングテープで固定した。ステージを磁気研磨装置に設置し、磁極に研磨液を塗布した KMX-80 砥粒を保持、磁極を近づけ回転させることで研磨を行った。磁気研磨装置（B）を用いた研磨：同様に試料を 17 cm まで引き延ばした。伸ばした試料は、アルミ製の留め具を用いて両端をモーター（オリエンタルモーター製、AZM14AK）に接続した。モーターは、モーター間の距離が可変なステージ（MiSUMi 製、PCKUED14-370-A-U-DPR-SCW）に設置された。磁極に研磨液を塗布した KMX-80 砥粒を保持、磁極を近づけた。

【結果】研磨前の試料には、一方向に並んだ筋が確認された。研磨後の試料では、どちらの方法でも筋が取り除かれ、研磨前に比べて平滑らしい表面が得られた。磁気研磨装置（A）の方法で研磨した試料では縦筋模様が残っている箇所が存在しており、磁気研磨による加工力が偏在していることが示されている。磁気研磨装置（A）では、磁極が上下方向にしか存在しなかったため、側面が磨けていない様子が見られたが、改良した装置（B）では、試料を回転させることで全体の研磨が可能となり酸素含有量の減少にも繋がった。AFM 測定結果を下表に示す。改良後の装置（B）の研磨の場合、試料の回転が研磨の駆動力になるため、磁極間中心の磁束密度が磁極付近に比べて弱くなるという影響が軽減され均一に磨けるため、Ra 値が他の試料に対して小さいと考えられる。

研磨前と研磨後の AFM 測定結果

	研磨前	研磨後（A）	研磨後（B）
Ra[nm]	201	244	86.3

Ra：平均粗さ、研磨後

（A）：装置 A を用いた場合、研磨後

（B）：装置 B を用いた場合

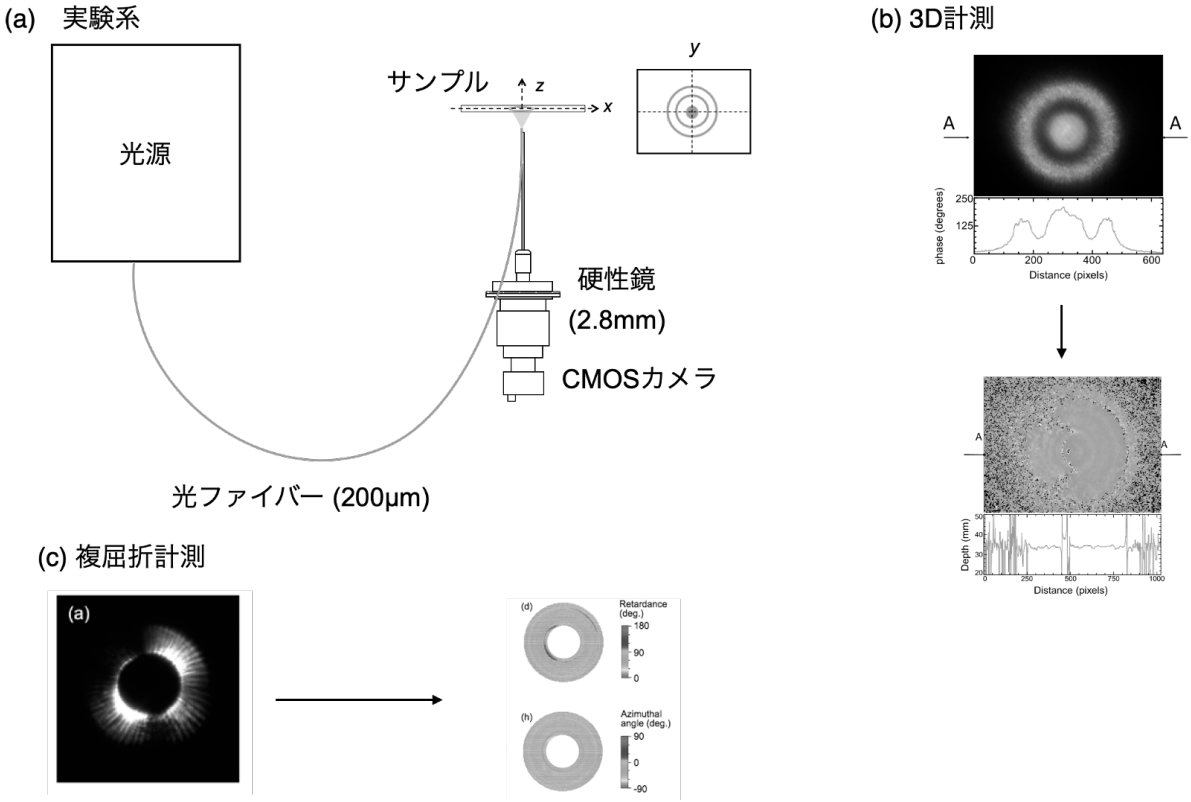
99　生体組織診断可能なロボット手術支援用3D内視鏡の開発	若山　俊隆

【目的】本研究では生体組織診断可能なロボット手術支援用の 3D 内視鏡の開発を目的とする。半導体レーザーを時空間に精密制御し、極細径の 0.2 mm 以下の光ファイバー型構造光高速投影制御を実現する。生体組織に照射されたカラーの光強度分布を赤、青、および緑色で分離できる CCD によってチャンネル毎に同時に撮像する。独自に開発したシングルショット偏光解析と 3 次元形状計測技術を用いてがん組織と周辺組織を精密に分離・登録する次世代ロボット支援手術の 3D 内視鏡の開発を目的としている。

【方法】生体組織診断可能な新しい 3D 内視鏡に必要な技術として構造光制御技術、3D 内視鏡の校正技術、および生体組織診断のためのシングルショット複屈折計測技術がある。これらの三つを本研究で研究開発し、それらの基礎特性を明らかにした。構造光制御技術は印加する電圧信号の振幅と周波数で構造そのものを制御できるようにした。その特性を位相分布で評価し、この位相分布から 3D 内視鏡の校正技術を開発した。さらにシングルショット複屈折計測を行うために我々が独自に開発してきた軸対称波長板による偏光変調法を導入した。

【結果】構造光制御によって±180°で位相制御が行えることになった。高さがあらかじめわかっている平面を用いて精度検定を行った結果、計測精度は±1 mm 程度となった。シングルショットマルチスペクトル複屈折計測では、軸対称な偏光変調によってサンプル内の複屈折分布をエンコードし、デコードすることが可能となった。これらの技術によって生体組織診断可能な 3D 内視鏡技術が揃ったので、今後、この研究をさらに発展させていく。

本研究の概要



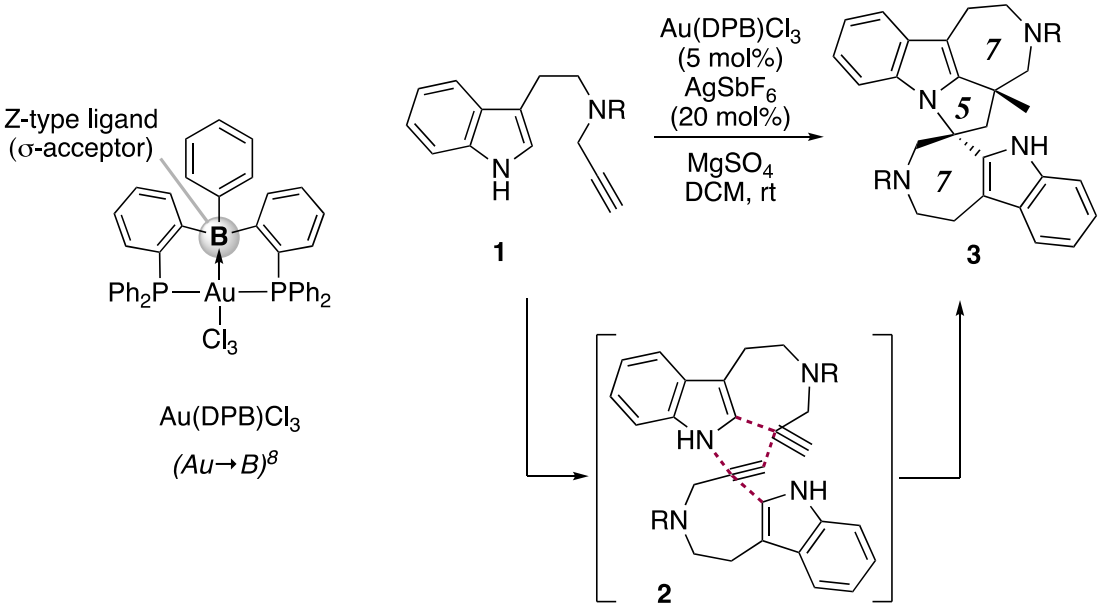
100　Z型配位子含有金属触媒による新規中員環構築法の開発	稲垣　冬彦

【目的】配位子の精密な設計は、その触媒の反応性に大きく寄与するため、遷移金属触媒反応において重要である。触媒反応に用いられる遷移金属錯体には、一般的に電子供与性の L 型配位子や共有結合性を有する X 型配位子が用いられている。一方で、電子受容性を有する Z 型配位子を利用した遷移金属錯体を用いた触媒反応はほとんど知られていない。以上の背景下、我々は新規反応性創出を目的とし、Z 型配位子を持つ金属錯体による触媒反応の開発に着目している。これまでに、種々の触媒的環化反応において、Z 型配位子を有する金錯体 Au(DPB)Cl（DPB＝diphosphine-borane）が従来の金触媒よりも高い触媒活性を示すことを見出している。これは、Z 型配位子の電子受容性が従来の金触媒よりも金中心の電子密度を低減することで、金のルイス酸性が高まるためであると考えている。今回我々は、さらなる触媒活性の向上を目的とし、新たに *(Au→B)*[8]型の電子配置を有する金錯体の合成とその触媒反応を検証した。

【方法】すでに合成している Z 型配位子含有金錯体 Au(DPB)Cl に、酸化剤である $PhICl_2$ を添加して $Au(DPB)Cl_3$ を合成し、本錯体を用いた触媒反応を検討した。

【結果】上記方法に従い、新たに *(Au→B)*[8]型の電子配置を有する $Au(DPB)Cl_3$ を合成した。この金錯体と $AgSbF_6$ から調製した $Au(DPB)(SbF_6)_3$ 触媒をイン-インドール基質 1 との環化反応に適用したところ、スピロ構造を含む 7/5/7 員環の 3 環式構造を有する生成物 3 が得られることを見出した。これは、2 に示したように非等価な二量化と四つの C-C 結合形成、二つの 4 級炭素構築を伴いながら高ジアステレオ選択的に進行する興味深い反応である。反応機構として、二つの分子内 7-exo 環化反応と、非等価な分子間［3＋2］環化付加反応による二量化が進行し、生成物を形成していると考えている。なお、従来の金触媒では生成物 4 は得られなかった。このことから、*(Au→B)*[8]型の電子配置を有することで従来の金触媒よりも高いルイス酸性獲得に成功した結果、新規反応性を創出できたと考えている。

Au（DPB）Cl_3 を用いた新規中員環構築法



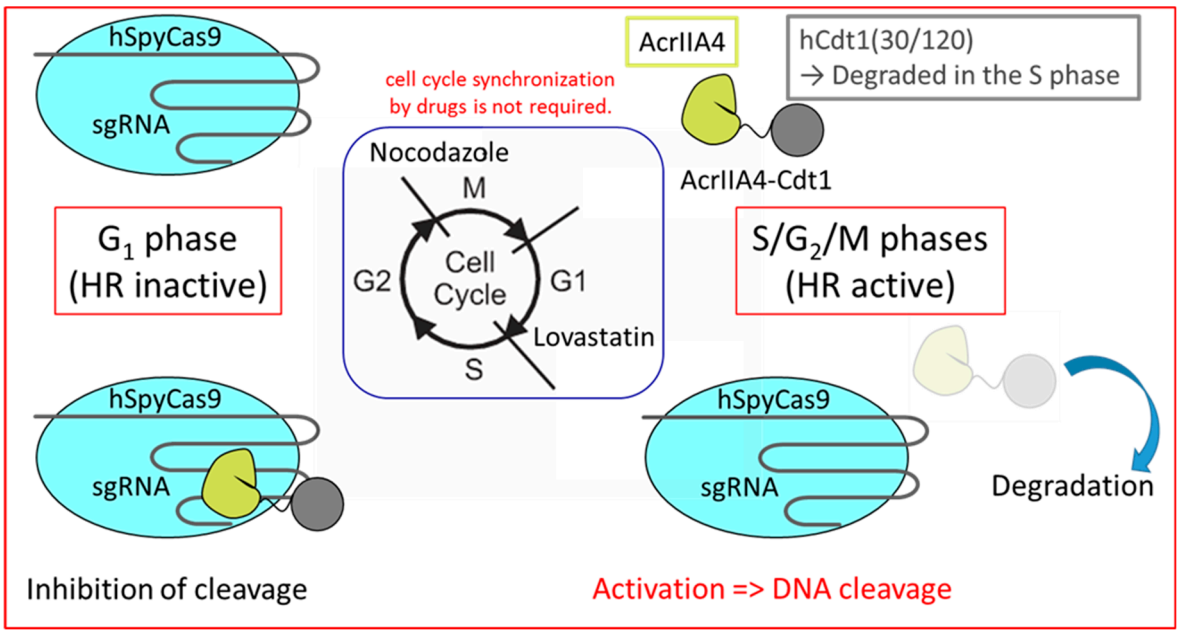
101　高精度ゲノム編集用ウイルスデリバリー技術の構築	野村　渉

【目的】ゲノムを構成する塩基配列を容易に置換、変換する手法として CRISPR-Cas システムを利用したゲノム編集技術が急速に発展し、細胞治療法や遺伝子治療への応用も期待されている。哺乳動物細胞をはじめ、適用範囲の拡張が進められており、塩基配列変換手法として中心的な役割を担う。その一方で、解決すべき課題も挙げられており、その中でも最も重要な課題の一つと考えられるのがオフターゲット作用の抑制である。また、Cas ヌクレアーゼ切断後の修復パスウェイのうち相同組換えでは外部ドナー配列を加えることで修復後に生成する配列を制御できるため、より精密なゲノム編集が可能になる。本研究では細胞周期を利用した手法を開発することによって外部刺激の必要ない高精度なゲノム編集方法の開発、またその *in vivo* への利用を見据えたデリバリー手法の確立を目的とした。

【方法】汎用されている SpCas9（*Streptococcus pyogenes* 由来）に対して阻害作用を有している Anti-CRISPR である AcrIIA4 を利用して、G1 期特異的に発現する Cdt1 ドメインとの融合体を構築した。これによって G1 期では AcrIIA4 - Cdt1 が Cas9 を阻害し、非相同末端結合（Non homologous End Joining）による修復過程が抑制され、G1 期以外の細胞周期においては Cas9 が活性化されるため、相同組換えによる正確な修復過程が優先して起こると考えられた。AcrIIA4 - Cdt1 融合タンパク質と Cas9 を細胞内において等量発現させるためにエピソーマルベクター上に T2A ペプチド配列を介してそれぞれの遺伝子を搭載した。また、ドナー遺伝子には環状プラスミドと ssODN を利用して効率の比較を行った。アデノ随伴ウイルス（Adeno associate virus：AAV）ベクターでは搭載できる遺伝子サイズが限定されるため、*SpCas9* の前半部分と後半部分の遺伝子を 2 種類のベクターに分けることで、細胞への導入後に *SpCas9* 遺伝子が再構成されて全長の SpCas9 が発現する手法を利用することにした。

【結果】SpCas9 と AcrIIA4-Cdt1 を同時に発現させることで相同組換え効率が向上していることが示された。さらに、オフターゲット作用の抑制にも効果があることが示された。また、ssODN を利用することで相同組換え効率がより向上することが示された。オフターゲット作用をより効率的に抑制する手法としてガイド RNA の配列認識部位の長さを短くすることが有効であると考えられた。外部からの刺激を必要としない仕組みのため、細胞に対する毒性も低く、*in vivo* での利用にも適しているゲノム編集技術として期待されるため、AAV ベクターを利用したデリバリーの適用も進めていく。

細胞周期特異的な発現量変化とアンチクリスパーを利用した高精度ゲノム編集技術の概要



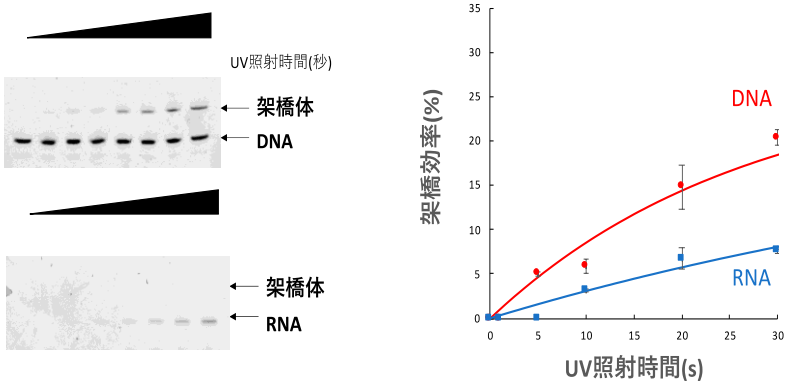
102　プロウイルスゲノムを標的とした光ゲノム編集技術開発	山吉　麻子

【目的】ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型（HTLV-1）は、成人 T 細胞白血病や HTLV-1 関連脊髄症などの難病を引き起こすレトロウイルスである。HTLV-1 に感染すると、ウイルス由来の遺伝子（プロウイルスゲノム）が宿主 DNA に組み込まれるため、HTLV-1 が半永久的に産出される。現在、HTLV-1 感染性疾患に対する治療法として、複数種の抗がん剤を組み合わせた多剤併用療法が適用されているが、その効果は一過性であり、根治には至らない。そこで我々は、2 重鎖 DNA に対して配列特異的に結合する 3 重鎖形成核酸が、DNA の複製過程を阻害することで二重鎖切断（double-strand break：DSB）を誘導する現象に着目した。本研究では、この現象に着目し、光応答性分子であるソラレンを導入した 3 重鎖形成核酸（Light-Scissors）を設計・合成し、ゲノム DNA に対する光架橋効率ならびに DSB 誘導能を検証・最適化することで、光をトリガーとした新規ゲノム編集技術を開発し、プロウイルス遺伝子のノックアウト（無効化）と HTLV-1 感染性疾患の根治を目指す。具体的には、Light-Scissors を用いた『人為的ゲノム DNA 損傷』の作製、それに続く DSB の誘導、DSB 修復機構によるゲノム編集の誘導を目指す。本法より、外来タンパク質酵素を用いず、DNA 切断配列に制限の無いゲノム編集技術の実現が可能となる。さらには、その時空間的制御技術を *in vivo* で可能にする光照射技術を開発することに挑戦する。

【方法】ソラレンは DNA 中のピリミジン塩基と架橋する性質を持つ。このため、まず、DNA 中のチミン塩基に対する架橋選択性を向上させるため、ソラレンをアデノシン糖環 2'位に導入するリンカーの化学構造に着目し、従来型の柔軟なエトキシメチレンリンカーに代わり、比較的剛直なアミドメチレンリンカーを採用した新しいヌクレオシドの開発を行った。次に、HTLV-1 プロウイルス遺伝子の無効化効率の迅速アッセイ系の構築ならびに Light-Scissors の機能評価を行った。実験系として、HTLV-1 のプロモーター下流にホタルルシフェラーゼならびにオワンクラゲルシフェラーゼ遺伝子をコードするプラスミドを構築し、293FT（ヒト胎児腎臓細胞）にトランスフェクション後、トランスフォーマントを樹立した。

【結果】まず、合成した Light-Scissors と標的 DNA あるいは RNA とを混合し、それぞれの架橋効率を評価した。その結果、Light-Scissors は一塩基の違いをも認識して標的 DNA 特異的に架橋する性質を持つことが見出された。次に、上述の迅速アッセイ系で Light-Scissors のゲノム編集効率を評価した。我々が樹立した細胞系では、HTLV-1 プロモーター遺伝子に DSB が起こり、ホタルルシフェラーゼ遺伝子の 1 部が欠損して、ゲノム DNA 配列が組変わると、オワンクラゲルシフェラーゼ遺伝子が発現するシステムとして機能する（細胞樹立後、CRISPR/Cas9 システムを用いてコントロール実験を行うことで想定した系が動くことを確認している）。この系を用いて合成した Light-Scissors のゲノム編集効率を評価したところ、光照射を行った系にのみ、ホタルルシフェラーゼ活性が減少し、オワンクラゲルシフェラーゼ活性が上昇することが確認された。以上の結果より、Light-Scissors がゲノム DNA 中の HTLV-1 プロモーター遺伝子に結合した後、細胞内の遺伝子修復機構が働くことによって DSB が起こり、ゲノム編集が誘起されることが示された。

開発した Light-Scissors と標的 DNA／RNA の架橋効率の評価



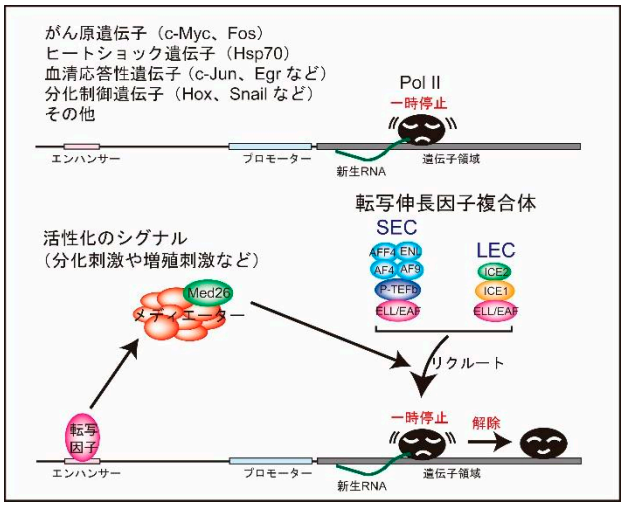
103　Med26による細胞増殖から分化への制御機構の解明	高橋　秀尚

【目的】近年のゲノムワイドな解析により、非常に多くのヒトの遺伝子（約 30%と示唆される）で、転写開始直後に RNA ポリメラーゼⅡ（PolⅡ）がプロモーター近傍（転写開始点の 20～50 塩基下流）で一時停止していることが明らかとなった。PolⅡの一時停止が解除され PolⅡが新生 RNA 鎖の合成を再開するためには転写伸長因子の働きが必要である。ところが、これらの転写伸長因子が、どのようにして特定の遺伝子領域に時期特異的にリクルートされるのかについて未知であった。私はこれまでに、メディエーター複合体のサブユニット Med26 が、二つの異なる転写伸長因子複合体 Super elongation complex（SEC）と Little elongation complex（LEC）を、それぞれ異なる種類の遺伝子領域へとリクルートし、それらの遺伝子の転写伸長を促進することを明らかにした。さらに、最近の解析によって、Med26 と LEC は、snRNA（small nuclear RNA）遺伝子や複製依存性ヒストン遺伝子などの発現を制御することがわかった。snRNA 遺伝子や複製依存性ヒストン遺伝子の転写産物（メッセンジャーRNA：mRNA）はポリアデニル化（ポリ A 付加）されない。興味深いことに、Med26 と SEC は mRNA にポリ A がある腫瘍関連遺伝子（*c-Myc*、*Hox*）の転写を制御する一方で、Med26 と LEC はポリ A のない複製依存性ヒストン遺伝子や snRNA 遺伝子の転写を制御することがわかってきた。本研究では、Med26 が SEC や LEC と共役することによって PolⅡの一時停止を解除し、さまざまな細胞や組織の増殖維持や分化への移行においてどのような役割を果たすのかについて解明する（図参照）。さらに Med26 が LEC と共役して、ポリ A のない遺伝子の転写を制御する機構に関して解明する。

【方法】1. SEC がポリ A のある遺伝子の転写を制御し、LEC がポリ A のない遺伝子の転写を制御するのかについて解明する。2. LEC がポリ A のない遺伝子の転写を制御するメカニズムを明らかにする 3. Med2 が、さまざまな組織（血液、肝臓、脳など）においてどのような生理的役割を果たすのかについて解明する。

【結果】本研究において、MED26 は LEC をリクルートすることで、mRNA にポリ A のない遺伝子群（snRNA 遺伝子や複製依存性ヒストン遺伝子など）の転写終結を制御し、mRNA にポリ A が付加されないように制御することを明らかにした。このように、MED26 は SEC と LEC を使い分けることによって、それぞれ mRNA にポリ A のある遺伝子とポリ A のない遺伝子の発現を制御することが明らかとなった。Med26 は SEC と共役し細胞増殖関連遺伝子の発現を促進する一方で、LEC と共役して細胞周期の S 期にヒストン遺伝子の発現を促進することで細胞増殖を促進する。今後、細胞分化の際に Med26 の機能が抑制され、細胞が増殖から分化へとスイッチするのかについての解明が重要となる。

Med26 と転写伸長因子複合体による PoⅡの一時停止解除



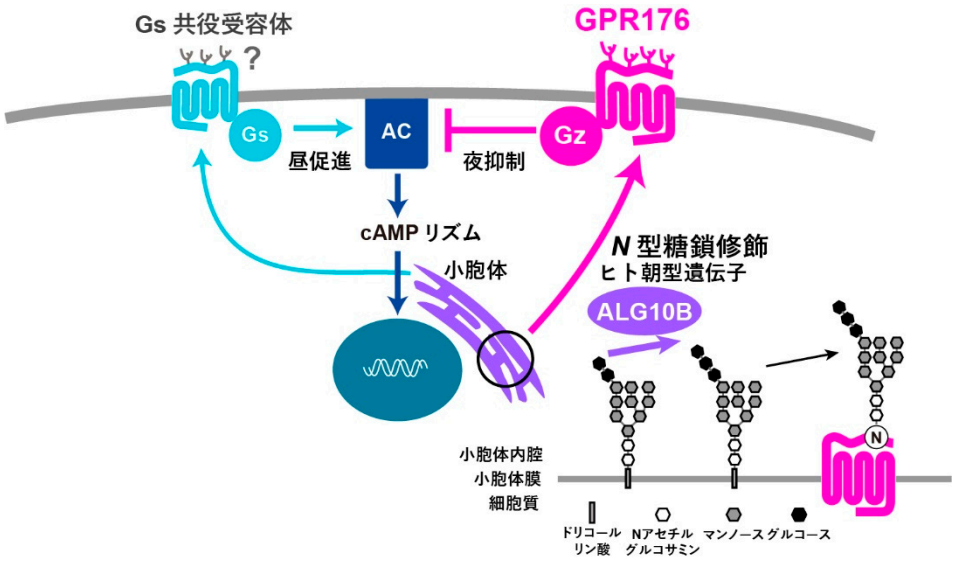
104　生体リズムを基盤とした時間医薬科学の展開	土居　雅夫

【目的】G 蛋白質共役受容体（GPCR）は、薬理学上最も重要でかつ効率の良いターゲットとして知られる分子群である。しかし、未だに 100 種類以上のオーファン GPCR が存在し、その蛋白質機能や生化学的特徴が明らかにされていない。オーファン受容体 Gpr176 は、体内時計の最高位中枢である視交叉上核（SCN）に発現し、生体リズム調整能を有するオーファン受容体であることから、生体リズム異常を伴う不眠症や生活習慣病に対する新しい治療薬の標的となることが期待される（Doi et al., Nature Commun 2016; Miyake & Doi, Trends Endocrinol Metab 2019; Doi et al., Nature Commun 2019）。しかしこれまで Gpr176 の活性調節につながる受容体蛋白質の生化学的特徴は明らかにされてこなかった。そこで本研究では、生体リズムを基盤とした時間医薬科学の展開に向け、Gpr176 の機能を制御する翻訳後修飾の探索・同定を行うことを目的とした。

【方法】翻訳後の化学修飾の候補として、リン酸化、アセチル化、メチル化、水酸化、sumo 化などの種々の化学修飾を検討するとともに、ヒトの朝型／早朝覚醒クロノタイプに相関することが大規模コフォート解析において示された *N* 型糖鎖修飾（Hu et al., Nature Commun 10448, 2016）に着目した研究を進めた。

【結果】生体リズム調節能を有するオーファン受容体 Gpr176 の *N* 型糖鎖修飾に関して次の 1〜6 の所見を得た。1. Gpr176 は体内時計の最高位中枢であるマウス視交叉上核 SCN において *N*型糖鎖修飾を受ける。2. ヒト GPR176 もマウス Gpr176 と同様に N 末端細胞外領域の保存サイトにおいて *N* 型糖鎖修飾を受ける。3. *N* 型糖鎖修飾は Gpr176/GPR176 の効率的なタンパク質発現に必須である。4. Gpr176/GPR176 の *N* 型糖鎖修飾変異体はタンパク質発現量の低下に伴い細胞内の基礎活性も低下する。5. 一方、*N* 型糖鎖修飾は Gpr176/GPR176 の分子当たりの基礎活性レベルには影響を与えない。6. ヒト GPR176 の *N* 型糖鎖修飾に影響を与える一塩基多型（SNP）が存在する。このように、リガンド未定のオーファン GPCR の恒常的基礎活性が翻訳後修飾によって巧妙に制御される可能性をヒトおよびマウスにおいて示すことができた（Wang et al., Sci Rep 2020; Nakagawa et al., Int J Mol Sci 2020）。体内時計の中枢を標的とした生体リズム調整薬の開発において今後の研究展開の基礎となる重要な所見を得ることができたと考えている。

GPR176 の機能発現における *N* 型糖鎖修飾の役割（模式図）



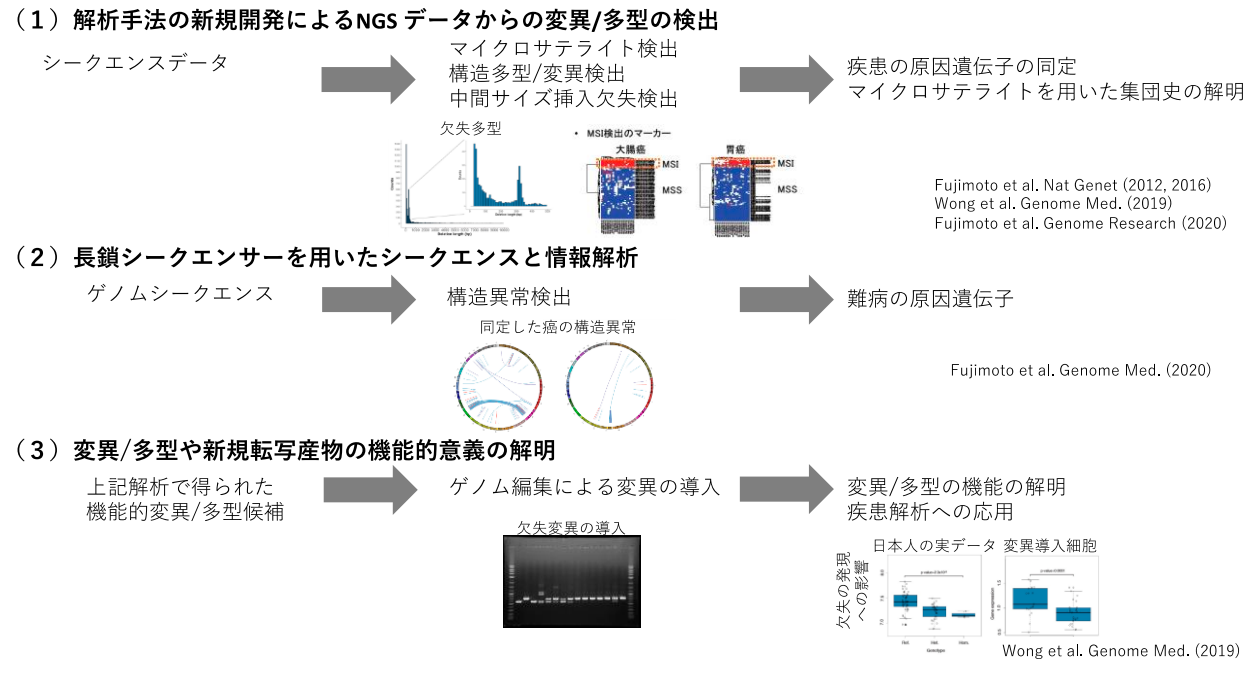
105　未検出の変異／多型の検出と機能的意義の解明	藤本　明洋

【目的】人類集団には、様々な遺伝的多様性が存在し、疾患のリスクや表現型の個人差に関わっていることが知られている。また、がんにおいても様々な種類の体細胞変異が発癌の原因となることが知られている。近年のゲノム配列決定技術の発展により、多くの大規模ヒトゲノム、がんゲノムシークエンス研究が行われている。しかしながら、シークエンスデータは、主に読み取り長が 100 bp 程度の短鎖シークエンサー（いわゆる次世代シークエンサー：NGS）を用いて取得されており、情報解析が困難なタイプの変異や多型の検出は行われていない。近年入手可能になった長鎖シークエンス技術は、検出困難な多型や変異の検出に有効であると期待されているが、エラー率の高さなどの欠点があり導入が進んでいない。我々は、1. 情報解析手法を開発し従来の手法では検出が困難な変異／多型の検出、2. 長鎖シークエンサーの情報解析手法の開発による変異／多型の検出、3. 変異／多型の機能的意義の解明、を目的として研究を行った。

【方法】エラー率が高く検出が難しいマイクロサテラトの変異／多型の検出法の開発、中間サイズ（30～5,000 bp 程度）の挿入・欠失の検出、逆位・転座などの構造異常の検出法の開発を行った。また、がんの体細胞変異や日本人の正常組織の多様性を解析した。長鎖シークエンサーを用いてがんサンプルの全ゲノムシークエンスを行った。また、変異／多型検出する手法を開発し長鎖シークエンスデータを解析した。さらに、ゲノム編集技術を用いることで中間サイズ欠失が遺伝子発現に与える影響を解析した。

【結果】3,000 サンプルのがんの全ゲノムシークエンスを解析し、マイクロサテライト領域の体細胞変異を検出した。その結果、変異率が高いがん（マイクロサテライト不安定性）サンプルを検出した。さらに、マイクロサテライトの変異率に影響を与える要因を見出した。中間サイズの挿入や欠失の同定を行い、遺伝子発現の個人差との関係を調査した。その結果、数%の中間サイズの挿入や欠失が遺伝子発現の個人差に関係し、機能的であることが示唆された。CRISPR-Cas9 法を用いて細胞株に欠失を導入し、機能的意義を解析したところ、データ解析の予測と合致する結果が得られた。長鎖シークエンサーを用いてがんサンプルの全ゲノムシークエンスを行った。解析の結果、挿入多型には、トランスポゾン由来のものが多いことや、欠失の多型は非相同組換えなどのさまざまな要因で生じていることが判明した。

本研究の結果の概要



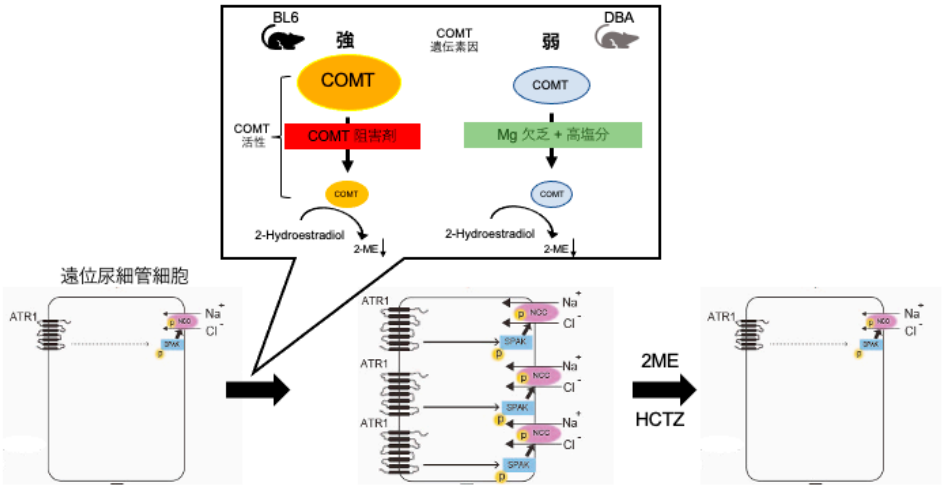
106　COMT機能不全が惹起する健康被害の分子機構解明	金﨑　啓造

【目的】人類の 20%以上がマグネシウム（Mg）欠乏であると考えられる。Mg 欠乏は代謝疾患、心血管疾患、神経疾患などの発症との相関が報告されているが、分子機序解明は未だなされていない。生態内カテコールを基質とする代謝酵素 catechol-O-methyltransferase（COMT）は活性に Mg イオンが必須である。Estradiol は肝臓でシトクロム P450 により hydroxyestradiol に代謝された後、COMT により 2-methoxyestradiol（2-ME）に変換される。2-ME は糖・脂質代謝や血圧恒常性維持など様々な生理活性を有しており、妊娠高血圧腎症（PE）発症においても 2-ME 欠乏の寄与が知られている。塩分感受性高血圧（SSH）は女性では閉経後に発症リスクが増大することが知られ、エストロゲン及びその代謝産物欠乏との関連が示唆される。ヒトでは COMT の活性低下を誘導する single nucleotide polymorphisms が高血圧や PE などの発症と関連すると報告されている。本研究では「遺伝的な COMT 活性低下と Mg 欠乏がさらなる COMT 不全と 2-ME 欠乏を惹起し、SSH を誘導する」という仮説を立て、解析を行った。

【方法】実験 1．3'UTR 構造の違いから遺伝的に高 COMT 活性を有する C57BL/6J（BL6）雄マウスと低 COMT 活性を有する DBA/2J（DBA）雄マウスを用い、7 週齢からコントロール（C）食もしくは Mg 欠乏食を与え、9 週齢より同じ Mg 濃度の高塩分負荷食に変更した。10 週齢より 2-ME、サイアザイド（HCTZ）の連日腹腔内投与を行い、12 週齢で安楽死させた。実験 2．BL6 マウスに C 食を投与後、8 週齢より COMT 阻害剤の連日腹腔内投与を開始した。9 週齢以降は実験 1 と同様に行った。実験 3．DBA 雌マウスを用いて、Mg 欠乏食開始前に卵巣摘出を行い、雄マウスと同様のスケジュールで実験した。

【結果】実験 1、2（COMT 活性の異なる 2 系統のマウス・COMT 阻害剤を用いた解析）：Mg 欠乏は DBA マウスでのみ SSH を誘導し、2-ME は降圧効果を示した。腎臓 COMT 活性は Mg 欠乏・高塩分負荷食を摂取した DBA マウスで低下したが、2-ME 投与で変化を認めなかった。腎臓 COMT 活性低下に関連した SSH は、Na 出納を調節し SSH 発症に寄与するアンジオテンシン受容体 type1-SPAK-NaCl 供輸送体（NCC）経路活性化促進、及び 2-ME による抑制を認めた。COMT 阻害薬でも同様の結果が得られ、さらに NCC 阻害剤である HCTZ は両 SSH 群で降圧効果を示した。実験 3（卵巣摘出雌 DBA マウスを用いた解析）：Mg 欠乏は卵巣摘出群でのみ SSH を誘導し、2-ME 投与は降圧効果を示した。SSH を発症した雌マウスは他群に比し尿アルブミンが増加し、2-ME 投与で有意に低下した。

Mg 欠乏は COMT 活性抑制を介して 2-ME 欠乏を惹起し、SSH を惹起する



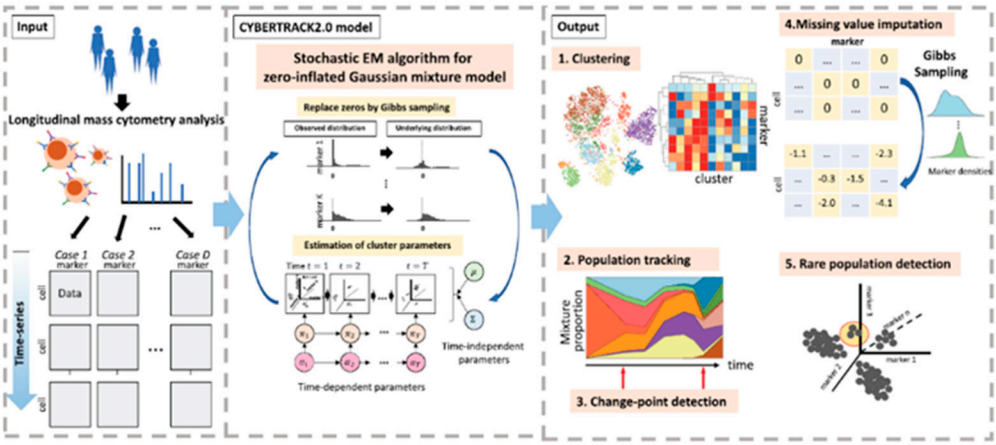
107　がん免疫複雑系ダイナミクスを炙り出す数理モデリング	島村　徹平

【目的】腫瘍微小環境において、がん細胞が形成する生態系は数理科学分野における「複雑系」として定義される。近年、一細胞オミクス測定技術の進歩により、がんの病態解明が進むことが期待されているが、がんの多様性がもたらす治療抵抗性の因果関係に迫るためには、要素還元論に基づく従前のアプローチには限界がある。本研究では、がん免疫複雑系を対象として、一細胞レベルでがん多様性が治療抵抗性を生み出すメカニズムを解明するため、最先端の数理モデリング・人工知能を駆使した一細胞解析基盤を開発することを目的とする。

【方法】マスサイトメトリーデータから臨床情報に関連する細胞集団を同定するための解析手法として、LAMBDA（Latent Allocation Model with Bayesian Data Analysis）と呼ばれる新しい解析手法を開発した。また、未知の細胞集団の同定と、これら細胞集団の経時的ダイナミクスの発見を同時に行うための解析手法として、CYBERTRACK という新しいモデルベースの統計的フレームワークを構築した。

【結果】開発手法の有効性を示すために、ヒト黒色腫腫瘍浸潤 T 細胞集団を包括的にプロファイリングしたマスサイトメトリーデータ、抗 PD-1 免疫療法を受けたメラノーマ患者 10 名（治療反応群：5 名、治療非反応群：5 名）における末梢血生検のマスサイトメトリーデータ、ヒト臍帯血から造血幹細胞および前駆細胞（HSPCs）を精製し、赤血球を促進する環境下で採取した時系列マスサイトメトリーデータにそれぞれ適用し、未知の細胞集団を同定するとともに、抗 PD-1 治療に対する反応性の強力な予測因子となりうる細胞集団や細胞運命決定に関わる細胞集団のダイナミクスを経時的に追跡できることを確認した。これらの結果から、開発手法が細胞集団の時間的ダイナミクスを容易に解釈できるツールとして有用であることが示された。

マスサイトメトリーデータから細胞集団のダイナミクスを同定するベイズモデリング技術



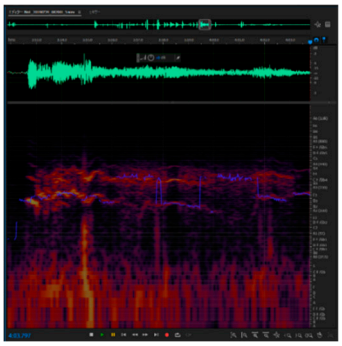
108　上気道音の集積データによる換気困難患者評価法の確立	堤　保夫

【目的】呼吸停止時や心肺蘇生時などの緊急時では、停止または減弱した患者の呼吸を外的に補助する必要がある。バッグ・マスク換気による気道確保と呼吸補助は医療従事者がまず行う基本的な手技であり、救急科・麻酔科研修などで一定期間のトレーニングを行うべきとされている。また、熟練者であっても一定の割合でバッグ・マスク換気が困難な患者も存在し、不適切なバッグ・マスク換気が患者の予後を悪化させることなどが知られている。緊急時の確実なバッグ･マスク換気は容易ではなく､バッグ･マスク換気の成否は患者の生死を左右する基本的かつ重要な課題である。バッグ・マスク換気を困難にする原因として、舌根沈下や声門閉鎖などが知られている。これらの対処法はそれぞれ異なるので、バッグ・マスク換気が難しい場合、その原因を早期に診断することが重要となる。一般に、換気が正常に行われているか否かの判断には施行者の主観的な評価（バッグを押したときの手応え、聴診器による呼吸音の聴診、胸郭の動きの観察など）およびモニタによる客観的な評価（カプノグラフィー、パルスオキシメーター）が用いられる。しかし、主観的評価が行えるようになるには熟練が必要であり、客観的評価については現行のモニタでは換気が行えていることの証明にはなるものの、対処法の異なる舌根沈下と声門閉鎖を区別することができないという問題点がある。本研究は、この主観的な評価により行っている上気道閉塞の原因の診断を、上気道音をモニタしスペクトラム解析することにより、客観的に評価する評価方法を確立することを目的とした。

【方法】広島大学病院倫理委員会の承認のもと患者本人から同意を得られた予定手術患者を対象とした。全身麻酔導入前に咽頭マイク／アンプ（Nanzu electric Co.）、を輪状軟骨部に装着し、全身麻酔時における同部位で音声の評価を行った。全身麻酔薬投与後にバッグ・マスク換気を行い、主観的な換気状況の評価を記載した。同時に上気道音を録音した。記録した上気道音は、術後にスペクトラム解析を行い、麻酔導入中のイベントと紐づけることで、イベント時の上気道音の特徴を抽出した。麻酔科医の診断した気道閉塞の原因と、既存の異常呼吸音の集積データによる上気道音の診断を比較した。

【結果】本モニタ装着に伴う合併症は特に認められなかった。声門閉鎖は､バッグ･マスク換気の初期段階で 4 人(57%)の患者に発生し、数秒から数分以内に消失した。声門閉鎖について、麻酔科医は測定期間中に 39 ポイント（4 人の患者からそれぞれで 2、4、15、18 ポイントを取得）を声門閉鎖と認識した。この声門閉鎖時の上気道音を既存の異常呼吸音集積データにより解析したところ、39 ポイントのうち 5 ポイントを「rhonchi（いびき音）」、34 ポイントを「喘鳴」と診断した。また、無呼吸を「rhonchi（いびき音）」、「喘鳴」、または「減衰音」と診断した。その他、測定期間中に舌根沈下､声門閉鎖､気管チューブの挿入及びカフの拡張／脱気､食道挿管時の送気による咽頭からのリーク、声門上気道確保器具の位置異常、嚥下など、さまざまな状況においてそれぞれ特徴的な音声を聴取できた。今後、聴取した音声を上気道音の集積データ（ライブラリ）としこれを機械学習させることで気道確保における医療支援システムの構築を行う予定である。迅速な解決が求められる換気困難時では、リアルタイムに換気状態の良否のみならずその原因の判別が行えることが望ましい。上気道音のモニタリングと自動解析は上気道の異常を詳細に連続評価する新たなモニタとなる可能性がある。

マスク換気中の上気道音のスペクトログラム解析



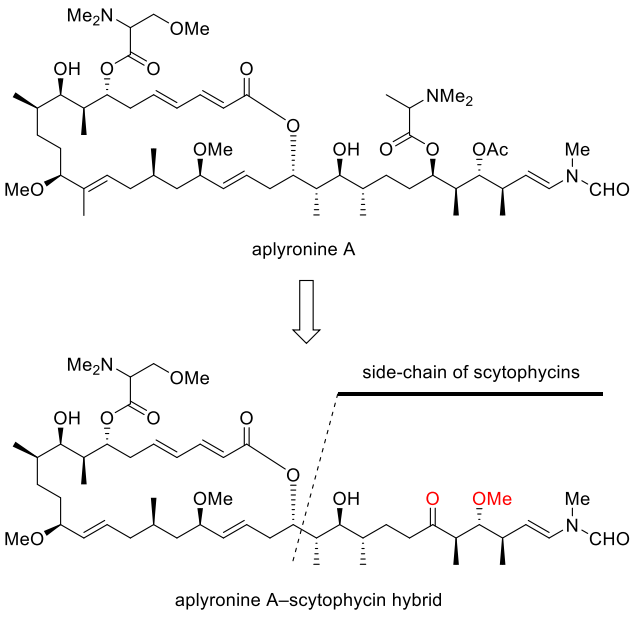
110　タンパク質間相互作用に基づく新規抗がんリードの創出	大好　孝幸

【目的】海洋天然物アプリロニン A は海洋軟体動物アメフラシから我々の研究グループにより単離されたマクロリド化合物であり、その抗腫瘍活性は既存の抗がん剤を大きく上回る。2013 年には、その強力な抗腫瘍性の作用機序はアプリロニン A が細胞骨格タンパク質であるアクチンとチューブリンとのタンパク質間相互作用を引き起こすという新規メカニズムであることを明らかにした。しかし、天然からの供給量が限られており、17 個の不斉中心、分子量 1,000 を超える本化合物自身を用いての創薬展開は、サンプル供給の面、誘導化の面から制限されている。そこで、アプリロニン A の構造活性相関研究を行い、創薬リードへの展開を目指すことにした。

【方法】アプリロニン A はその側鎖部でアクチンと結合し、生じたアプリロニン A－アクチン複合体がチューブリンと作用することで抗腫瘍活性を発現する。そのため、アクチン脱重合活性と抗腫瘍活性の強弱は比例関係にあることが予想される。すなわちアクチン脱重合活性を示す側鎖部をアプリロニン A マクロラクトン部に連結するハイブリッド化による構造活性相関研究を行うことにした。そこでまず、アプリロニン A の側鎖部と同じ位置でアクチンと結合するスウィンホライド A、イエジマライド B、サイトファイシン C の側鎖部を設計・合成し、アクチン脱重合活性を評価することにした。その後、得られた情報を基にハイブリッド化を検討することにした。

【結果】スウィンホライド A、イエジマライド B、サイトファイシン C 側鎖部を合成し、アクチン脱重合活性を評価したところ、サイトファイシン C 側鎖部がアクチン脱重合活性を示すことを明らかにした。そこで、アプリロニン A－サイトファイシンハイブリッド化合物を合成することにした。現在、三つに分割した各セグメントの合成を完了し、それぞれの連結について検討している。

アプリロニン A－サイトファイシンハイブリッド化合物の設計



111　福島原発事故後の住民の帰還意向と生活の質との関連

折田　真紀子

【目的】2011 年 3 月 11 日の東日本大震災に伴う東京電力福島第一原子力発電所事故により原子力発電所から 10～20 km に位置している福島県双葉郡富岡町は、事故直後から全町民が避難を余儀なくされた。2017 年 4 月に帰還困難区域を除く、すべての避難指示区域が解除されたが、2020 年時点で富岡町へ帰還した住民は 10%程度にとどまっている。帰還を希望する住民が感じている放射線被ばくに関する不安や精神的な健康へのニーズに寄り添ったリスクコミュニケーションの実施が求められていると考えられる。さらには、原子力災害によって避難を余儀なくされている住民の生活の質（Quality of life：QOL）の向上も重要であると考えられるが、一方で、原発事故後の富岡町町民における生活の質と帰還意向との関連は明らかにされていない。そこで、本研究は、富岡町において、QOL と帰還意向との関連を明らかにすることを目的とする。

【方法】20 歳以上の富岡町住民に対して無記名自記式アンケート調査を実施した。聴取項目は、基本的属性（性別、年代、同居の家族構成、18 歳以下の子や孫との同居の有無）、富岡町への帰還意向、放射線リスク認知、生活の主観的満足度、QOL 尺度 8-Item Short-Form Health Survey（SF-8）、ストレス対処能力尺度 sense of coherence13（SOC-13）であった。帰還意向に関連する因子の分析はカイ 2 乗検定を用いて解析し、帰還意向に独立して関連する因子の分析はロジスティック回帰分析を用いて解析した。

【結果】対象者の回答が得られた人数の内、1,018 名を解析対象とした。133 人（13%）はすでに帰還し（グループ 1）、222 人（22%）は帰還に悩んでいた（グループ 2）、663 人（65%）は帰還しないと決めていた（グループ 3）。グループ 1 に比べて、グループ 2 と 3 は有意に富岡産の食材を摂取することに懸念を持つ人が多く、グループ 1 は、グループ 2 とグループ 3 と比べて、有意に放射線被ばくによる自身へのがんなどの健康影響が起こると懸念している人が少なかった。また、グループ 1 は、グループ 2 とグループ 3 と比べて、有意に放射線被ばくによる子孫への健康影響が起こると懸念している人が少なかった。SF-8 の身体的な健康観、「身体能力」、「全体的健康観」のスコアが、グループ 1 と 3 に比べて、グループ 2 において有意に低かった。また SF-8 の精神的な健康観の内、「社会生活機能」、「心の健康」のスコアが、グループ 1 と 3 に比べて、グループ 2 において有意に低かった。グループ 1 はグループ 2 と比較して、その他の因子に独立して有意に 60 歳以上の人が多く、SF-8 の身体的な健康観が高かった。また、グループ 1 はグループ 2 と比較して、性別と年代に独立して、有意に SOC-13 のスコアが高かった。グループ 2 は、グループ 3 と比較して、その他の因子に独立して有意に身体的な健康観と精神的な健康観が低かった。グループ 1 と 3 を比較した結果、身体的な健康観と精神的な健康観において、有意な差は見られなかった。

帰還意向と基本的な属性、生活満足感、放射線リスク認知との関連

		グループ 1 (n=133)	グループ 2 (n=222)	グループ 3 (n=663)	*p 値*
性別	男性/女性	79/54 (59.4%)	122/100 (54.7%)	349/314 (52.4%)	0.340
60 歳以上	はい/いいえ	100/33 (75.2%)	147/75 (66.2%)	456/207 (68.8%)	0.200
18 歳以下の子と同居	はい/いいえ	8/125 (6.0%)	39/183 (17.6%)	146/517 (22.0%)	<0.001
主観的生活満足感	平均±標準偏差	5.01±2.3	4.89±2.3	5.87±2.4	<0.001
地元の食材を摂取することへの不安の有無	はい/いいえ	38/95 (28.6%)	124/98 (55.9%)	388/275 (58.5%)	<0.001
放射線被ばくによる自身の健康影響への不安	はい/いいえ	32/101 (24.1%)	102/120 (45.9%)	359/304 (54.1%)	<0.001
放射線被ばくによる遺伝的な影響への不安の有無	はい/いいえ	53/80 (39.8%)	142/80 (64.0%)	411/255 (62.0%)	<0.001

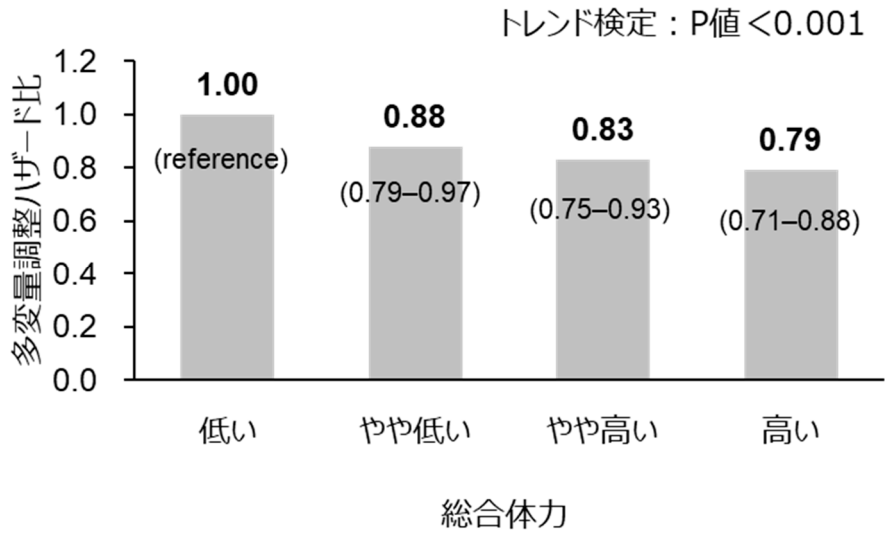
112　各種体力要素と難聴発症に関する予防疫学研究	川上　諒子

【目的】ノイズ曝露は聴力低下の主要なリスクとして知られているが、研究室レベルの実験系研究において、高い全身持久力はノイズ曝露による一時的な難聴を抑制することが報告されている。また、いくつかの横断研究によると、全身持久力が高いことや筋力が強いことが良い聴力と相関する可能性が報告されている。以上の知見は、高い体力を保持している人では難聴の発症リスクが低い可能性を示唆している。しかしながら我々の知る限り、体力と難聴発症の関係を縦断的に調査した研究は見あたらない。そこで本研究では、最長 8 年間にわたって難聴の発症有無を追跡調査した人間ドックの健康診断データを用いて、5 種類の体力と難聴発症の関連を縦断的に検討した。

【方法】2001 年度の人間ドック受診者のうち、各種体力テストおよび純音聴力検査を受けた難聴でない 21,907 人（男性 13,992 人、女性 7,915 人）を対象とした。その後 2007 年度までの定期健康診断における純音聴力検査において難聴の発症を観察した。労働安全衛生規則に基づき、1,000 Hz（低音）においては 30 dB、4,000 Hz（高音）においては 40 dB のいずれかの音が聴き取れなかった場合を難聴の発症と判定した。握力、垂直とび、閉眼片足立ち、前屈、全身反応時間の各体力テストに基づいて算出した性・年代別の Z 値の合計を総合体力の指標とした。2001 年度のベースライン測定における総合体力および各種体力レベルに基づきそれぞれ性・年代別の四分位に群分けをした。Cox 比例ハザードモデルを用いて、年齢、年齢の 2 乗、性別、BMI、喫煙習慣、飲酒習慣、高血圧、脂質異常症、糖尿病を調整した多変量調整ハザード比および 95%信頼区間を算出した。

【結果】追跡期間は中央値 5.8 年（総計 101,090 人年）であった。追跡期間中、2,765 人において難聴の発症が確認された。高い総合体力レベルは難聴発症の低いリスクと関連した（トレンド検定 : P 値＜0.001）。各種体力テストのうち、垂直とび、および閉眼片足立ちにおいて、難聴発症との間に負の関係が認められた（トレンド検定 : P 値＜0.001、＜0.001）。本研究の結果より、高い体力は難聴発症の低いリスクと関連することが示唆された。各種体力要素のうち特に、筋パワー（垂直とび）とバランス（閉眼片足立ち）が難聴発症と関連することが示唆された。

総合体力レベル別にみた難聴発症の多変量調整ハザード比



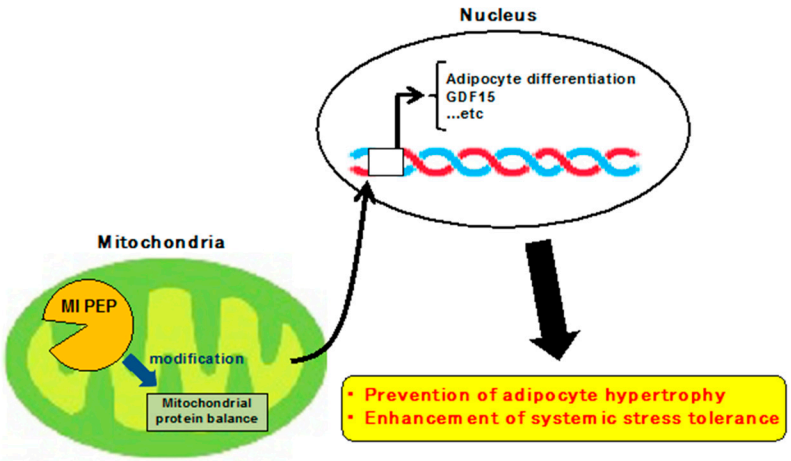
113　肥満予防を志向した新規ミトコンドリア制御機構の解明	小林　正樹

【目的】肥満は様々な生活習慣病の発症原因となる病態であり、その予防法、治療薬に関する研究が国内外において活発に行われている。白色脂肪組織（White Adipose Tissue：WAT）の性質変化は肥満病態と密接に関連していることから、WAT の質の制御を理解することは肥満予防戦略となり得る。摂取カロリー制限（Caloric Restriction：CR）は健康寿命延伸や代謝改善効果を有することから、肥満の予防および改善に有効な介入法である。我々は、WAT におけるミトコンドリア機能改善が CR 効果に重要であることを明らかとした。同時に、WAT において CR により発現誘導される新規ミトコンドリア関連因子として、MIPEP（mitochondrial intermediate peptidase）を同定した。MIPEP はミトコンドリアマトリクスに存在するミトコンドリアペプチダーゼであり、ミトコンドリアタンパク質の成熟活性化を担う。これより我々は「MIPEP が CR によるミトコンドリア機能改善において重要である」との仮説を立てた。本研究の目的は、この仮説を細胞および動物レベルで検証することで、MIPEP を介したミトコンドリア制御機構を CR 効果模倣に基づく効果的な肥満予防戦略の開発への端緒とすることである。

【方法】レトロウイルスベクターを用いて、*Mipep* 過剰発現マウス白色前駆脂肪細胞株 3T3-L1 細胞を作製した。この細胞を成熟脂肪細胞に分化させた後、脂肪滴量、ミトコンドリア DNA 量、フラックスアナライザーによる酸素消費量、蛍光試薬 mitoSOX による活性酸素種（ROS）量の測定を行った。動物レベルでの検討については、*Mipep*-flox マウスと Adipoq-Cre を掛け合わせることにより脂肪組織特異的 *Mipep* 欠損マウスを作製し、呼吸商や自発運動量、WAT 量や WAT における脂肪細胞分化マーカーや MIPEP 基質タンパク質発現量を中心に解析した。

【結果】*Mipep* OE 細胞では脂肪滴量の減少に加え、脂肪細胞分化マーカー遺伝子 *Perilipin A* の発現量も低下していた。一方で、ミトコンドリア DNA 量、酸素消費量、ROS 量などのミトコンドリア機能に関連する指標はいずれも *Mipep* OE 細胞において変化しなかった。*Mipep* KO マウスは野生型に比べ、自発運動量や呼吸商に大きな差はなかったのに対し、WAT 量は減少した。これと相関して、成熟脂肪細胞マーカー遺伝子である *Adiponectin* と *Leptin* の発現量も低下していた。*Mipep* KO マウスの WAT において、MIPEP の基質である SIRT3 と COXIV は減少していたのに対し、MDH2 は増加していた。加えて、ミトコンドリアストレス反応により誘導されるマイトカインである *Gdf15* の遺伝子発現が顕著に増加した。以上より、MIPEP のミトコンドリア機能への直接的な寄与は確認されなかったが、MIPEP が脂肪細胞の分化やマイトカインの転写レベルでの誘導に関与することが示された。

脂肪細胞機能に対する MIPEP の寄与とそのメカニズム



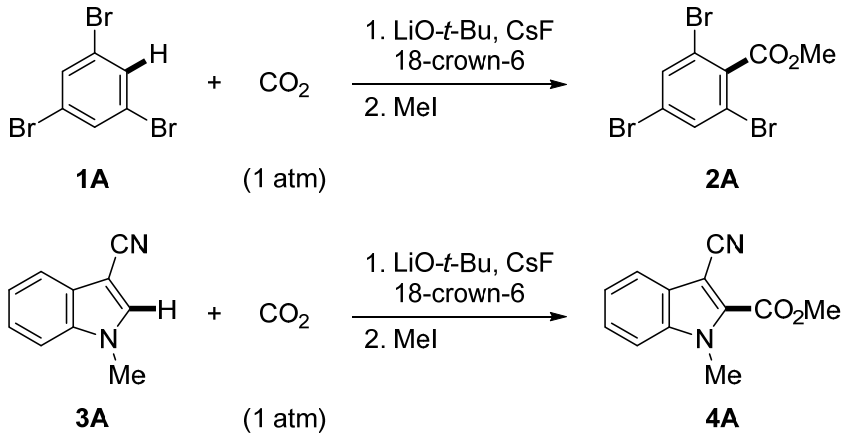
114　複合塩基を用いる直截的芳香族カルボキシル化反応	重野　真徳

【目的】二酸化炭素は安価であることに加えて、低毒性、不燃性、遍在性、大きな賦存量の観点から、その有効利用法の開拓は産学問わず関心が持たれる。芳香族および芳香族複素環カルボン酸は、生理活性天然物、医薬品、農薬に広く見られる構造モチーフであり、二酸化炭素を1炭素源とした効率的な合成法の確立は重要である。特に、芳香族化合物の炭素－水素結合を反応点とした直截的なカルボキシル化反応は興味深い。これは、出発物質が予め官能基化された化合物（有機金属、有機ケイ素、有機ハロゲン化合物等）と比較してより単純な構造で入手容易であり、ステップおよびアトムエコノミーの観点から優れるためである。本研究では、芳香族化合物の効率的なカルボキシル化反応を開発することを目的とする。

【方法】先に我々は、複合ブレンステッド塩基（LiO-*t*-Bu、CsF、18-crown-6 の組み合わせ）を用いると、電子豊富な芳香族複素環化合物（ベンゾチオフェンやベンゾフラン等）を反応基質としたカルボキシル化反応が効率的に進行することを明らかにした。これらの反応点は、pKa 32 以上の酸性度が低い炭素－水素結合であり、単独の塩基を用いる従来の反応系では用いられないとされていた。本研究では、この複合ブレンステッド塩基の反応系を取り上げた。

【結果】本研究では、複合ブレンステッド塩基を用いて、芳香族環の炭素－水素結合およびインドール2位炭素－水素結合のカルボキシル化反応の開発に取り組んだ。アルコキシド塩基、アルカリ金属塩、配位子の組み合わせの効果を検討して、これらのカルボキシル化反応においても、LiO-*t*-Bu、CsF、18-crown-6 の組み合わせが反応の進行に有効であることを示した。また、炭素－ハロゲン結合やエステル・アミド等の求電子性官能基が共存できることを示し、基質一般性が高い反応系として確立した。

複合ブレンステッド塩基による芳香族炭素－水素結合およびインドール2位炭素－水素結合のカルボキシル化反応



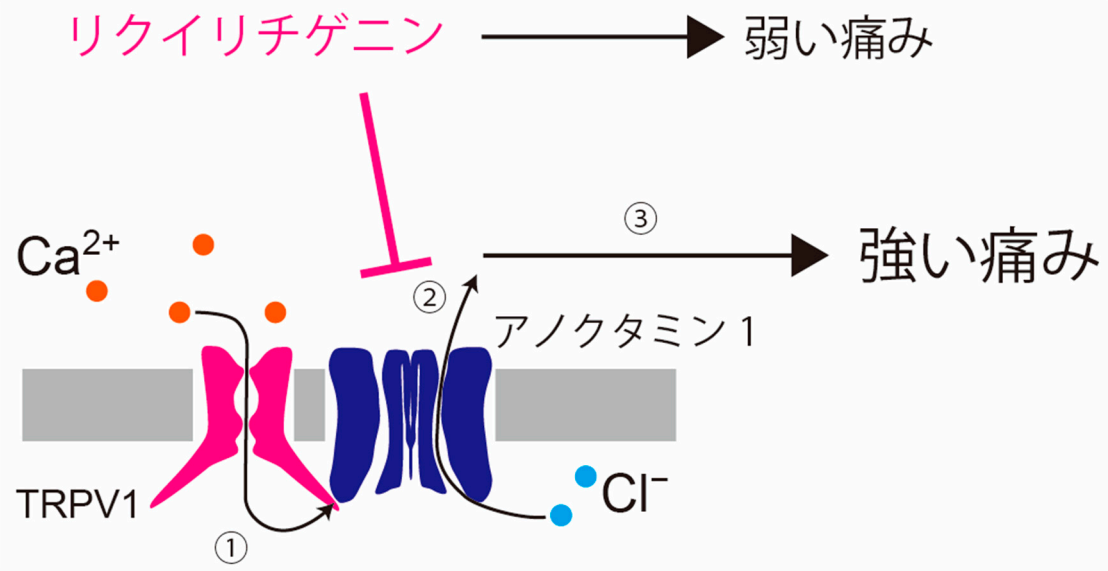
115　アノクタミン1に対する生薬由来成分の薬理学的検討	高山　靖規

【目的】漢方薬は古くから広く使用されており、2019 年からは世界保健機構によっても認められたものの依然として科学的根拠に欠けている。漢方薬には様々な効力があるとされているが、本研究では鎮痛作用について主に検討した。これに際し、カルシウム活性化クロライドチャネル・アノクタミン 1 に着目した。アノクタミン 1 は痛覚神経に発現し、その活性化により疼痛や炎症が増悪する。そのため、生薬由来成分の中にアノクタミン 1 阻害剤となるものがあれば、漢方薬の持つ鎮痛および抗炎症作用について新たな機序を提言できると考えた。そこで、「生薬に含まれる天然化合物のアノクタミン 1 に対する薬理作用の検討」および「生体での漢方薬作用における分子メカニズムの解明」を目的として研究を進めた。

【方法】1. アノクタミン 1 を強制発現させた HEK293T 細胞においてホールセルパッチクランプ記録を行い、アノクタミン 1 電流に対する各種天然化合物の作用を検討した。2. マウスにおける薬理学的行動試験によって同定した天然化合物の鎮痛および抗炎症作用を検討した。

【結果】1. 甘草に由来するフラボノイドであるリクイリチゲニンによってアノクタミン 1 は阻害された。2. 生理活性がリクイリチゲニンと似ているエストロゲンによってもアノクタミン 1 は阻害された。3. リクイリチゲニンの皮下投与はカプサイシンによる急性疼痛をやや抑えた。4. リクイリチゲニンの皮下投与はカプサイシンによる炎症性疼痛を抑える傾向にあった。

リクイリチゲニンによるアノクタミン 1 阻害を介した鎮痛・抗炎症



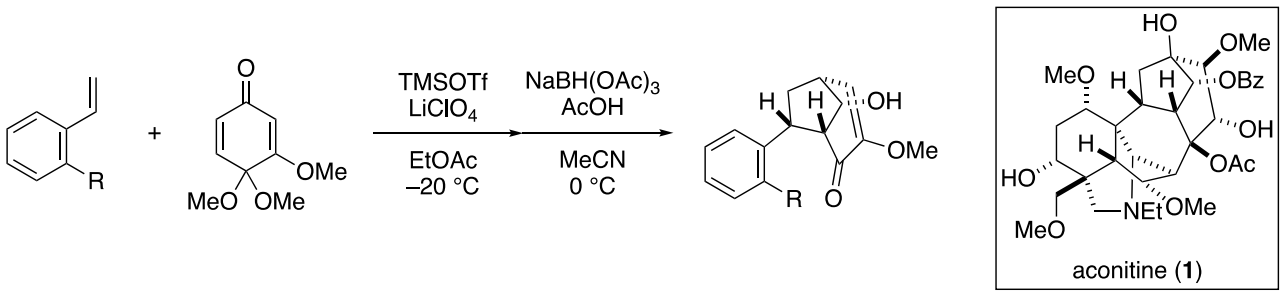
116　アコニチン型天然物の合成研究	西山　義剛

【目的】アコニチン型の天然物の合成は、アコニチンの特異な構造が明らかになって以来、50 年以上の長きにわたって多くの合成化学者を強く魅了しつづけてきた挑戦的な課題である。今までに、いくつかの天然物が全合成されてきたが、アコニチンのような酸素官能基の多いアコニチン型天然物の全合成はまったく達成されていない。これに対して、私たちは、アコニチン骨格の部分骨格を、酸素官能基を導入しながら効率よく構築する手法を開発することを目的に研究を行った。

【方法】私たちは、アコニチンが有する多官能性のビシクロ[3.2.1]骨格を効率よく構築する手法として、ヒドロキシベンゾキノン部位とオレフィン部位との環化付加反応に着目した。ヒドロキシキノンは、Lewis 酸存在下、オレフィンと[5+2]環化付加を起こし、三つの酸素官能基を有するビシクロ[3.2.1]化合物を与えることが報告されている。本反応の生成物の三つの酸素官能基は、ケトン、エノン、エノールとして、それぞれ区別して変換できることが期待でき、アコニチン類の酸素官能基を導入するのに適していると考えられる。

【結果】まず、分子内反応を検討した。ヒドロキシキノン部位とオレフィン部位の両方を有する化合物を合成し、これに対して、さまざまな Lewis 酸条件に付してみたが、いずれの場合にも複雑な混合物を与えるだけで、目的とする環化体を得ることができなかった。基質によっては、望みとは異なる形式での環化反応が優先して進行することが明らかになったことから分子内反応を断念し、分子間反応の検討へと移った。検討の結果、オレフィンとしてスチレン類を用い、ヒドロキシキノンの一方のカルボニル基がケタールを形成した基質を用い、さらに TMSOTf と過塩素酸リチウムの組み合わせを利用した時に最も効率よく反応が進行することを見いだした。とくに、オルト位にブロモ基を有するスチレンも適用することができ、その後の変換の足がかりとなる置換基を導入できることを明らかにした。得られた化合物に対して、穏和な還元剤であるトリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウムを付したところ、二つのカルボニル基のうち、5 員環上のカルボニル基のみが選択的に還元され、アルコールを得た。この化合物の NOESY を測定することによって、環化付加反応およびケトンの還元は、望みの立体選択性にて進行していることが明らかになった。以上のように、私たちは、ヒドロキシキノンとオレフィンとの環化付加反応により、アコニチン骨格の部分構造に相当するビシクロ[3.2.1]骨格を、立体選択的に構築することに成功した。構築した骨格上には、酸素官能基が導入されており、アコニチン類が有する酸素官能基へ容易に誘導できることが期待される。

ヒドロキシキノンの[5+2]環化反応によるアコニチンの部分骨格の構築



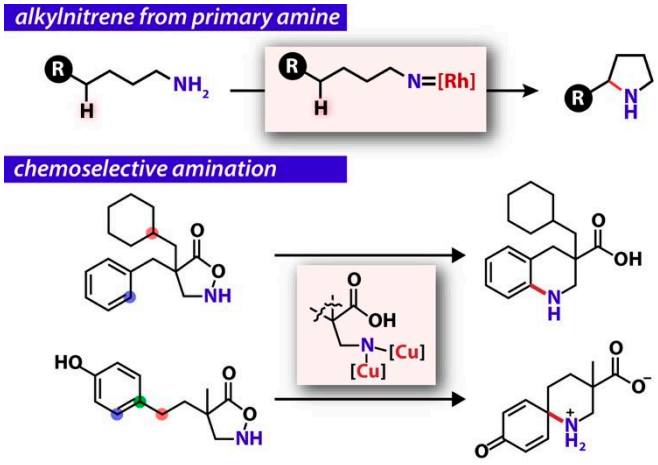
117　高反応性活性種の触媒制御による重要医薬骨格構築法	野田　秀俊

【目的】クロスカップリング反応とコンビナトリアルケミストリーの台頭によってもたらされた化合物ライブラリー中の sp^2炭素の割合増加と、続く多数の開発化合物の失敗を経て、創薬化学は近年急速に sp^3炭素を主骨格とする化合物へと舵を切っている。特にアニリドの代謝不安定性と毒性に起因する問題が多く見られたことから、ピロリジンやモルフォリンを始めとする多様な飽和N–ヘテロ環の重要性が益々高まっている。既存のN–ヘテロ環合成は、1. 環状化合物への置換基導入、2. 鎖状化合物の環化反応、の二種に大別される。前者の多くは、事前に環内窒素原子上に導入した配向基を足がかりとした隣接位の官能基化に依存しており、窒素の遠隔位に官能基を有するビルディングブロックの合成法は少ない。また多くの場合、生成物から配向基を除去することが困難である。後者のアプローチでは置換基導入の柔軟性は増すものの、やはり窒素原子上に除去困難な活性化基を有する場合が多く、生成物の有用性を著しく損なっている。従って窒素原子が即座に利用可能な無保護N–ヘテロ環の形で供給可能な方法論が近年強く求められている。本研究ではこの要請に対する一つの解決策を提案することを目的とした。

【方法】本研究ではアルキルナイトレンを用いた分子内 C–H 結合アミノ化反応を利用したアプローチに関し、1. 新規アルキルナイトレン生成法の開拓と飽和N–ヘテロ環合成への応用、2. 銅触媒を用いた化学選択的分子内アミノ化反応、の二つの反応に関する検討を行った。

【結果】既存のアルキルナイトレン前駆体はハロゲン化物を用いた求核置換反応やアルコールを原料とする光延反応によって合成されていた。そこで一級アミンを基質としたアルキルナイトレンの生成法の開発を検討することとした。窒素原子上の置換基を種々検討したところ、容易に導入可能な *O*-ベンゾイル基が最適であると同定した。この基質はロジウム触媒存在下、速やかに環化し無保護ピロリジンを与えた。ナイトレンは多様な反応性を有する高反応性活性種であるため、触媒による反応性制御も重要な研究課題である。そこで筆者らが以前開発したアルキルナイトレンを用いた分子内アミノ化反応に関し、化学選択性を発現する触媒系の探索を行った。検討の結果、一価銅と窒素系配位子を用いた触媒系により芳香環選択的なアミノ化が可能であることを見出した。本触媒系により、既存の触媒では副反応が問題となっていた C–H 結合への挿入や二重結合のアジリジン化などを防ぐことが可能であった。

助成研究の成果



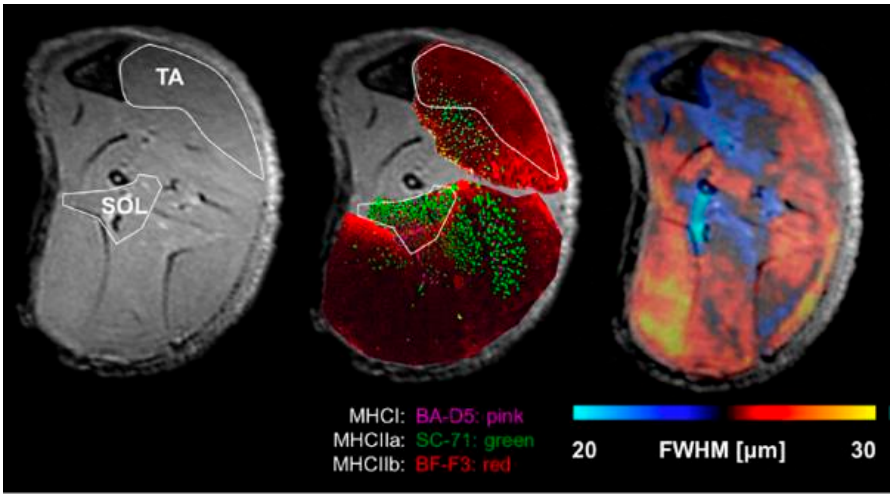
118　次世代MRIによる筋細胞構造・機能の定量計測法の開発	畑　純一

【目的】現在、骨格筋内の細胞構成比は、筋生検という筋肉の一部を切り取って行う検査により、測定するのが主流である。しかし、筋生検は身体への侵襲性に加え、手技の煩雑さが伴う。また現在の画像医学では、CT や MRI を用いた筋線維の可視化手法があるが、筋細胞の種類を識別できる解像度のものはなく、筋生検を用いた組織学と同等の情報を得ることは困難とされている。このため、高解像度かつ侵襲性の低い筋細胞検査技術の開発が望まれてきた。そこで我々は磁気共鳴画像法（Magnetic Resonance Imaging：MRI）による水分子の分子移動を計測し、生体マクロ構造自体のサイズを可視化する技術を開発することで、骨格筋の線維タイプを非侵襲的に識別することを目的とした。

【方法】水分子拡散現象を磁気共鳴信号へエンコードすることで筋細胞の種類鑑別を定量的に行う新規 MRI 技術の開発を目指す。このために本研究では大きく三つの実験を行った。一つは数値シミュレーション実験として、磁気共鳴数値シミュレーションとして、Bloch 方程式と物理方程式を考慮し、水分子のランダムシミュレーションを Matlab R2015a（The Math Works 社）を用いて開発し、シミュレーションした。二つ目は動物 MRI 計測実験ではシミュレーションにて得られた最適化数値を MRI 装置実機においてパルスシーケンンスプログラミングを行い、装置自体へ実装し生体下において実験動物の下腿部骨格筋の MRI 計測を行った。三つ目はヒト被験者 MRI 計測実験として、倫理委員会承認、そしてインフォームドコンセントによる同意後に MRI 計測を実施し、運動タイプの大きく異なる被験者を対象として、運動機能と開発手法による相関性を検討した。

【結果】骨格筋における数値シミュレーションによる水分子信号の挙動の結果、算出される骨格筋の構造径サイズは過小評価された。拡散計測法による構造評価にはΔ、δの特徴を十分に理解し、過大、過小評価をしないよう注意深く考察していく必要がある。また、骨格筋において正確に構造を評価する場合には 200 ms 以上の十分な拡散時間が必要であった。動物実験では従来法では判明できなかった筋細胞の種類を明確にコントラストつけて識別できるという結果が得られ、また免疫染色像と合わせることで開発手法を裏付けることができた。健常ボランティア実験では、筋肉の使い方が大きく異なる 2 タイプの健常ボランティアで開発手法による可視化を行うことで、筋肉の質が大きく異なるという結果が得られた。

下腿部骨格筋の免疫染色像と非侵襲細胞識別 MRI 法



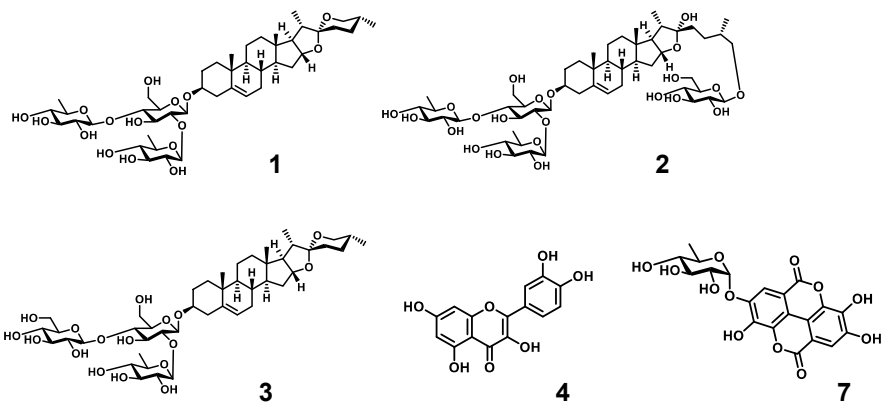
119　関節リウマチ滑膜細胞のアポトーシス誘導天然物の探索	原　康雅

【目的】関節リウマチは、慢性炎症を生じる自己免疫疾患である。本疾患では、関節内の滑膜組織に流入した免疫細胞がサイトカインを介して、滑膜線維芽細胞の異常増殖と滑膜線維芽細胞による炎症性サイトカインなどの産生を引き起こし、関節破壊に至る。異常増殖した滑膜線維芽細胞は、疾患初期の炎症発生や慢性期の免疫細胞とのサイトカインによる相互作用など、関節リウマチにおいて重要な役割を担っている。そのため、滑膜線維芽細胞の異常増殖の抑制あるいは異常増殖した滑膜線維芽細胞選択的なアポトーシスシグナル誘導は関節リウマチの新たな治療標的となりうる。そこで、今回、独自に保有する天然資源である熱帯植物や放線菌の抽出物から、関節リウマチ患者由来滑膜線維芽細胞株へのアポトーシス誘導作用を有する天然物を探索した。

【方法】タイ産植物抽出物および土壌放線菌培養抽出物を探索資源として、まず、細胞毒性を指標にスクリーニングを行った。各抽出物より、関節リウマチ患者由来の滑膜線維芽細胞株 MH7A の細胞生存率が 30%以下であるものを選択した後（1 次スクリーニング）、MH7A の細胞生存率が、ヒト胎児由来腎細胞株 HEK293 または正常ヒト由来肺線維芽細胞株 WI38VA13 sub 2 RA の細胞生存率より低いもの（2 次スクリーニング）をヒットサンプルとした。さらに、単培養抽出物で細胞生存率が 95%以上であった放線菌に関して、放線菌 2 種の共培養を実施し、単培養と比較して共培養抽出物に MH7A の細胞毒性が観察されたものをヒットサンプルとした。なお、細胞毒性は Fluorometric microculture cytotoxicity assay を用いて測定した。スクリーニングにて得られたヒットサンプルを大量に抽出し、MH7A への細胞毒性を指標に分画し、細胞死誘導作用を有する天然物の単離・精製を行った。

【結果】タイ産植物抽出物ライブラリー内の 724 種について、MH7A 細胞毒性を指標とした 1 次スクリーニングを実施した結果、211 種がヒットサンプルとして得られた。この 211 種のうち、HEK293 を用いた 2 次スクリーニングでは 85 種が、WI-38 VA13 sub 2 RA を用いた 2 次スクリーニングでは 38 種がヒットサンプルとして得られた。また、これらのうち 12 種は両細胞の生存率が MH7A の細胞生存率よりも高いサンプルであった。放線菌単培養抽出物ライブラリー内の 772 種の抽出物について、1 次スクリーニングにより 76 種がヒットサンプルとして得られた。次に、WI-38 VA13 sub 2 RA を用いた 2 次スクリーニングでは 15 種がヒットサンプルとして得られた。また、単培養抽出物で細胞毒性を示さなかった放線菌の共培養抽出物 15 種のうち、4 種が単培養抽出物と比較して、MH7A に対する細胞毒性を有していた。ヒットサンプルとして得られたオオホザキアヤメ科植物 *Cheilocostus speciosus* の根茎メタノール抽出物を、MH7A 細胞毒性を指標に分画することで、既知サポニンである化合物 **1**～**3** を得た。MH7A に対する化合物 **1**～**3** の IC_{50}はそれぞれ、2.9 μM、10.0 μM、3.5 μM であった。次に、ウルシ科植物 *Spondias mangifera* の葉部メタノール抽出物を分画し、既知化合物 **4**～**8** を得た。化合物 **4**～**7** はいずれも本植物より単離報告のある天然物であったが、化合物 **8** は本植物より初めての単離報告であった。化合物 **4**～**8** の MH7A に対する細胞毒性を評価したところ、化合物 **4** および **7** は MH7A に対する細胞毒性を有し、その IC_{50}はそれぞれ、158.7 μM、51.8 μM であった。

MH7A に対して細胞死誘導作用を有する天然物



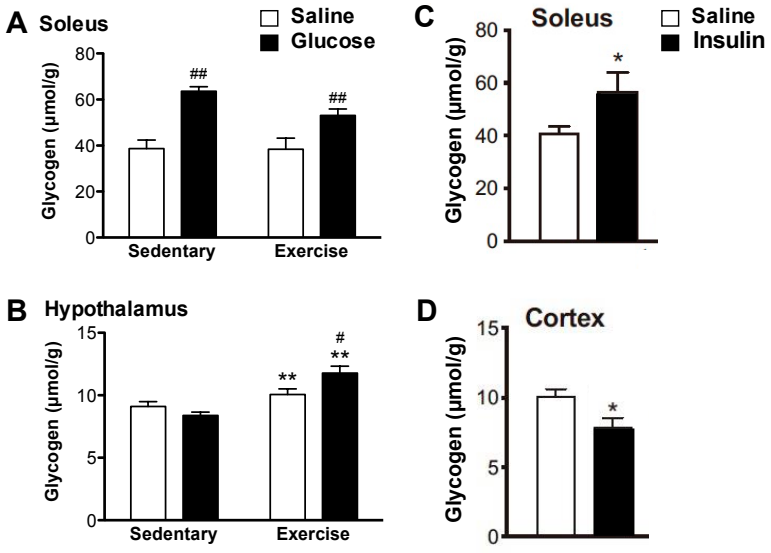
120　運動が引き出す脳グリコーゲン超回復の神経機構解明	松井　崇

【目的】脳内のアストロサイトに貯蔵されるグリコーゲンは、神経のエネルギーや修飾因子となる乳酸を産生･供給することで、記憶を担う神経－グリア連関を形成する（Magistretti ら、Nat Rev Neurosci、2018）。私は、急性運動により脳 GLY がモノアミン作動性に減少して身心の機能低下（疲労）に関与し（Matsui ら、J Physiol、2011 ; PNAS、2017）、その減少度に応じて運動前よりも高く回復する「脳グリコーゲン超回復」を見出した（Matsui ら、J Physiol、2012）。運動後の骨格筋におけるグリコーゲン超回復には、糖質摂取により高まるインスリンが重要な役割を果たし（Ivy と Kuo、Acta Physiol Scand、1998）、培養アストロサイトではインスリンがグリコーゲン合成を高めることから（Hamai ら、J Neurochem、1999）、脳でも同様に糖質摂取とインスリンが運動後のグリコーゲン超回復に関与することが想定された。

【方法】まず、成熟した雄性 Wistar ラットを運動群と安静群の 2 群に分け、疲労困憊に至るトレッドミル運動（分速 20 m）を課した。運動終了時、ラットに 50%ブドウ糖か生理食塩水を投与し、6 時間後にマイクロ波照射により屠殺後、脳（皮質、海馬、視床下部）とヒラメ筋のグリコーゲン、血中のインスリン濃度を定量した。次に、ストレスのない静脈投与を可能とするために外頸静脈にカテーテルを留置した安静ラットに、インスリン（30 U/kg）を投与し、2 時間後の脳とヒラメ筋のグリコーゲン濃度を定量した。

【結果】筋では、ブドウ糖投与が安静群のグリコーゲンを増加させ、運動群のグリコーゲン超回復を引き起こした（図 A）。脳では、グルコース投与は安静群のグリコーゲンを全く変化させず、グルコース投与無しでも生じた運動群のグリコーゲン超回復を視床下部で更に増強した（図 B）。血中インスリン濃度は筋グリコーゲン濃度と正の相関を示したが、脳グリコーゲンとは相関しなかった。さらに、インスリンの静脈投与は、筋のグリコーゲンを約 40%増加させる一方（図 C）、脳のグリコーゲンを約 30%減少させた（図 D）。これらの結果は、運動後の糖質摂取は脳グリコーゲン超回復に必須でないが、少なくとも視床下部ではグリコーゲン超回復を増強することを初めて示唆する。これは、脳の運動適応を促す代謝反応として重要かもしれない。しかしながら、血中インスリン濃度は脳グリコーゲン濃度と相関せず、インスリン投与は筋グリコーゲン量を高める一方、脳グリコーゲン量を減少させることから、脳は筋とは異なる血中インスリンとは無関係なグリコーゲン超回復機構を有する可能性がある。

運動が引き出す脳グリコーゲン超回復の神経機構に関する検討：糖質摂取とインスリン投与の効果



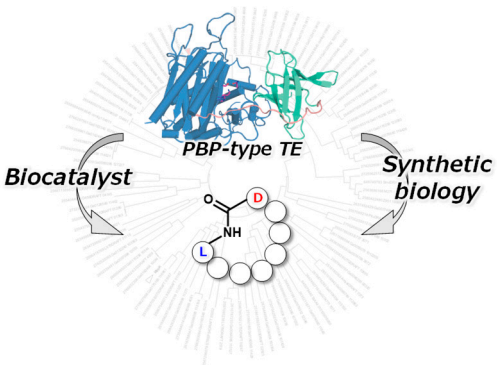
121　PBP type-TEによる環状ペプチドの化学・生物生産	松田　研一

【目的】ペプチドは環状化することで剛直な構造をとり、作用標的特異性、膜透過性、分解酵素への耐性が向上する。このため、ペプチドの大環状形成反応は生物活性を示すペプチドの化学合成において非常に重要なステップである。しかし、本ステップは、煩雑な保護・脱保護、異性化や分子間反応の抑制といった克服すべき問題を抱えている。一方、天然物の生合成では、各ペプチドに特化したペプチド環化酵素が、保護基を用いることなく位置選択的な環化を効率よく触媒する。このため、基質特異性の寛容なペプチド環化酵素は、ペプチド環化触媒としての応用が期待される。一方で我々は最近、海洋放線菌に由来する非リボソームペプチド surugamide 類の生合成に関わる新規ペプチド環化酵素SurEを同定した。一般的な非リボソームペプチドの生合成では、ペプチドの環化を触媒する末端ドメインはNRPSのC末端に融合しているのに対し、SurEはNRPSから独立した単独タンパク質である。SurEは従来の末端ドメインとは配列相同性を示さず、細胞壁合成を担うペニシリン結合タンパク質 PBP に類似することから、これを新しいタイプの末端ドメイン「PBP-type TE」として提唱している。データベース検索の結果、PBP-type TE は放線菌ゲノム情報中に 200 個以上見出され、普遍的な環状ペプチド生合成の仕組みであることが判明した。しかしこれらの基質選択性は全く明らかではなかった。そこで本研究では、化学合成した多数のペプチド基質を用いて、PBP-type TEファミリーの選択性を明らかにすることを目指した。同時に、タンパク質X線結晶構造解析およびモデリングにより、基質選択性発現のメカニズムを明らかにし、その発現に重要な「モチーフ残基」を同定することを試みた。これにより得られる知見は、合理的な酵素改変による改良型ペプチド環化触媒の創成のための基盤となる。加えて本研究では、PBP-type TE の *in vivo* における利用可能性についても検証した。具体的には、基質選択性の寛容な *PBP-type TE* 遺伝子を、微生物細胞内で人工 NRPS と協働させることにより、非天然型環状ペプチドの生物生産技術の確立を目指した。

【方法】*PBP-type TE* 遺伝子をデータベースから選定し、大腸菌を宿主として組換え酵素を調製した。ペプチド固相合成法によりモデル基質類を合成し、各組換え酵素と反応させることで基質選択性を検証した。また、X 線結晶構造解析により SurE の立体構造情報を取得した。得られた構造情報を基にホモログ酵素のモデル構造を作製し比較することで、基質選択性の違いが生じる構造的要因について考察した。

【結果】組換え酵素を用いた *in vitro* 試験の結果、SurE は 1. 基質内部のアミノ酸配列に対しては寛容な選択性を示すこと、および 2. 基質末端のアミノ酸残基に対して厳密な選択性を示すことが判明した。末端残基の立体化学に対する選択性は酵素ファミリー全体に共通した性質であることがデータベースの配列解析から示唆された。またタンパク質X線結晶構造解析に成功し、PBP-type TE のタンパク質構造を初めて明らかにした。さらにホモログ酵素PenAの機能解析により本酵素の短鎖ペプチドに特化した選択性を明らかにするとともに、選択性の要因となると考えられる特徴的なタンパク質構造モチーフを明らかにした。また、改変型 *NRPS* 遺伝子と *SurE* 遺伝子を有する放線菌による非天然型環状ペプチドの生物合成に成功し、SurEの基質寛容性は *in vivo* においても発揮されることを示した。

生体触媒ツールおよび合成生物学ツールとしてのPBP-type TEの応用可能性



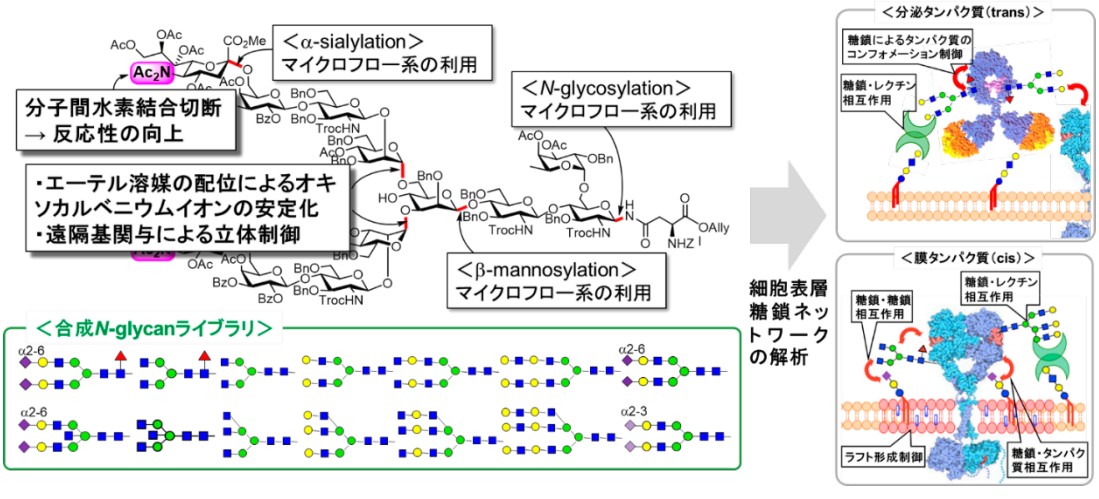
122　合成糖鎖ライブラリを用いた翻訳後修飾糖鎖の機能解明	真鍋　良幸

【目的】糖鎖は細胞表面を被覆するように大量に存在し、糖鎖－糖鎖相互作用や糖鎖－糖鎖認識タンパク質（レクチン）相互作用、ラフト形成などを介して、複雑な生体分子社会を形成する。この糖鎖を介した細胞表層ネットワークは、種々の膜タンパク質の動態・活性に影響を与える。一方で、糖鎖は構造多様性と不均一性に富み、その分子レベルでの解析は困難で、多くの場合、糖鎖の存在を無視して細胞膜上の現象の議論が進められ、糖鎖による膜タンパク質の機能調節の分子基盤はほとんど未解明である。本研究で対象とする *N*-結合型糖鎖（*N*-グリカン）はタンパク質のアスパラギン残基に結合する翻訳後修飾糖鎖で、多様な構造を持ち、その構造に基づき、タンパク質の機能を調節する。中でも、コアフコース、バイセクティンググルコサミン、ポリラクトサミン、末端ガラクトース、末端シアル酸などは、膜タンパク質の活性制御に重要であることが、生合成酵素のノックアウト実験により証明されている。これは、*N*-グリカンが、レクチンをはじめとする種々の分子と相互作用し、膜タンパク質の局在や運動性などの動態を調整して、タンパク質の機能を制御するためであると考えられるが、その詳細は明らかになっていない。本研究では、化学合成により、*N*-グリカンライブラリを構築し、これを用いて、各々の糖鎖が細胞表面で形成する相互作用ネットワークを解析し、糖鎖による膜タンパク質の機能制御の分子基盤を解明することを目的とする。

【方法】コアフコース、バイセクティンググルコサミン、ポリラクトサミン、末端シアル酸などの構造を含む *N*-グリカンを化学合成した。合成した糖鎖でタンパク質を修飾し、それぞれの糖鎖がレクチンをはじめとするさまざまな生体分子と相互作用して、その動態をイメージングにより調べた。加えて、その動態変化がタンパク質の活性に及ぼす影響に関しても考察した。なお、ここでは、細胞表層における、細胞外の糖鎖修飾タンパク質との相互作用（cis 相互作用）と同一細胞上での相互作用（trans 相互作用）についてそれぞれ調べた。

【結果】*N*-グリカンの効率的合成にあたり、グリコシル化をはじめとした一つ一つの素反応の効率化が必須であると考え、マイクロフロー反応を中心に効率的糖鎖合成の基盤を築いた。その結果、2〜4 糖程度の *N*-グリカンの合成中間体は 10 g 以上のスケールで合成可能となった。これを基盤として、複数の *N*-グリカンの合成を達成した。その際、合成ストラテジーや保護基パターンを精査し、さらには酵素合成も組み合わせることで、世界的に見ても有数の *N*-グリカンライブラリの構築に成功した。さらに合成糖鎖でタンパク質を修飾し、糖鎖－レクチン相互作用が細胞表層におけるタンパク質の動態を制御することを示した。例えば、抗体を、ガラクトースを持つ *N*-グリカンで修飾することで、その内在化を抑えることができた。また、膜タンパク質の動態に糖鎖が及ぼす影響を調べるために、HaloTag を用いて合成糖鎖を再蔵表層に提示するシステムを構築した。本系においても、糖鎖-レクチン相互作用が膜タンパク質の動態に影響を及ぼすことを明確に示した。

N-グリカンの効率合成と合成 *N*-グリカンを用いた細胞表層糖鎖ネットワークの解析



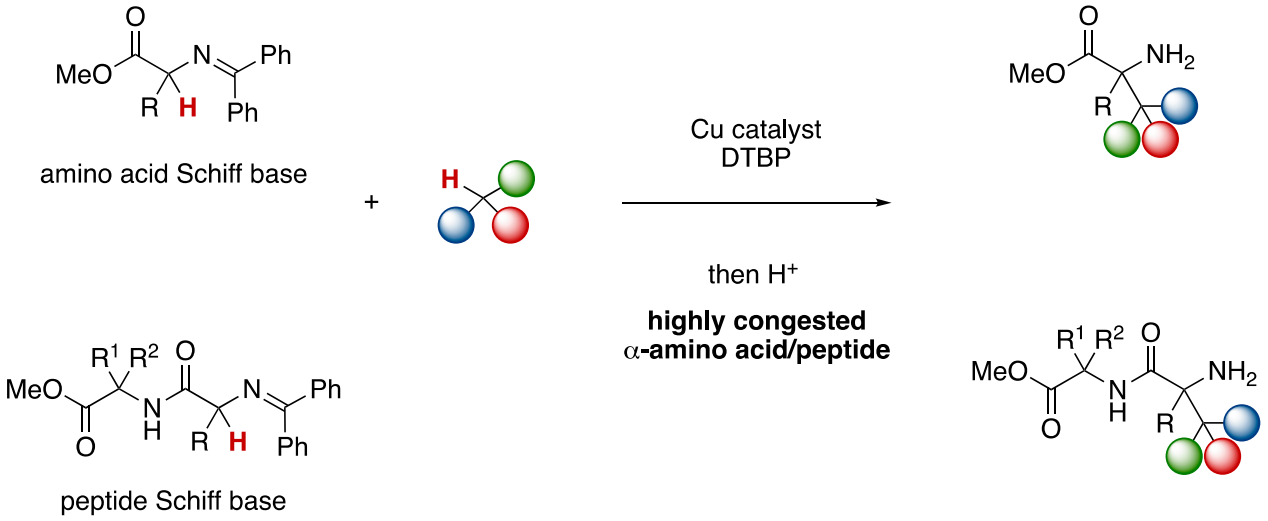
123　Fsp³-enriched医薬品創製を指向したアミノ酸合成	矢崎　亮

【目的】次世代型創薬研究において、医薬品の三次元的な構造の広がりを示し、融点が低い、水溶性が高いなどの特徴を示す Fsp³（＝sp³炭素数／全炭素数）-enriched 医薬品が注目されている［1］。中でも、コンパクトな三次元空間に高度に密集した sp³炭素を有する F sp³-enriched 分子は、膜透過性や受容体結合能が増強されるため、その効率的な合成法の確立が強く望まれている。しかし、これまでに医薬品合成に汎用されているクロスカップリング反応は、望みの反応が進行しやすいフラットな sp² 炭素を標的としており、高度に密集した sp³炭素を豊富に含有する医薬品を創製するための新規な合成法の確立が課題となっている。本研究では、入手容易なアルキル化試薬を用いた多種多様な F sp³-enriched 非天然型α-アミノ酸の合成法の確立とペプチド合成への展開を目的とし、PPI（タンパク質間相互作用）創薬のための新たなモダリティ創出への貢献を目指した。

【方法】本研究実施にあたり、反応基質として構造多様性に富んだアルキル化試薬として炭化水素に着目した。これまでアミノ酸 Schiff 塩基を用いた反応では初の脱水素型の酸化的クロスカップリング反応の開発を行った。

【結果】種々検討を行ったところ、銅触媒存在下、酸化剤として DTBP（di-*tert*-butyl peroxide）を用いることで、アミノ酸 Schiff 塩基とクメンをはじめとした炭化水素との連続四置換炭素構築型のクロスカップリング反応が円滑に進行し、種々の立体障害の大きな非天然α-アミノ酸誘導体を得ることに成功した。本反応では、これまで適用が困難であったアラニン誘導体をはじめとした様々なアミノ酸 Schiff 塩基や炭化水素を用いることが可能であった。また、炭化水素に関しては比較的活性なクメンやトルエン誘導体だけでなく、シクロヘキサンなどの単純アルカンも適用可能で、1〜3 級の炭化水素をアルキル化剤として用いることが出来た。また詳細な反応機構解析も行うことで、反応律速段階の同定や、触媒反応条件のさらなる温和化（室温）や触媒量の低減化（0.1 mol%）にも成功した。さらにペプチド由来の Schiff 塩基も適用可能であり、立体障害の大きなジペプチドの合成にも成功した。本反応で得られるα-アミノ酸やペプチドはこれまで合成例がなく、F sp³-enriched アミノ酸やペプチドライブラリーの構築や、ペプチドのコンフォメーション解析など詳細な検討を行うことで、今後ペプチド医薬品への導入による新たな創薬モダリティ創出が期待される。

アミノ酸 Schiff 塩基と炭化水素との脱水素型クロスカップリング反応



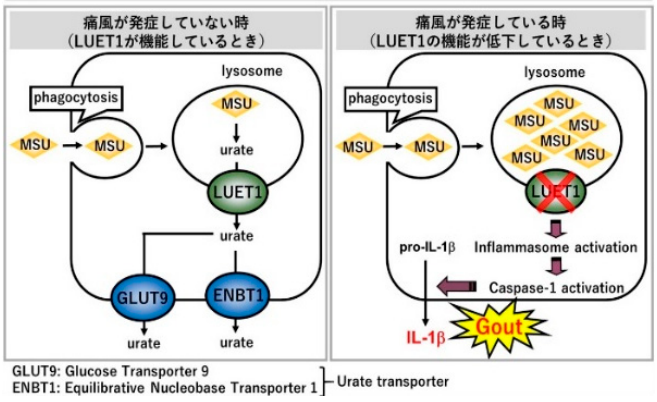
124　痛風を誘発するリソソームにおける尿酸動態の分子基盤	保嶋　智也

【目的】痛風は、血中の尿酸濃度が溶解度を上回り、尿酸結晶（MSU：monosodium urate）が生成されることに起因して発症する。このことから、血清尿酸値が飽和濃度付近である 7 mg/dl を超えると痛風発症のリスクを抱える高尿酸血症と診断され、その罹患者割合は高齢になるにつれ飛躍的に高まる。しかしながら、血清尿酸値が 7 mg/dl を超えた人のすべてが痛風を発症するわけではなく、痛風の 5 年発症率は、8.0～8.9 mg/dl の場合は 4.1%、9.0～9.9 mg/dl の場合は 19.8%、10 mg/dl 以上の場合では 30%とされている。逆に言うと、血清尿酸値が尿酸の溶解度を大きく上回る高尿酸血症罹患者においても、その 7 割が痛風を発症していない。このことから、我々は、生体においては、恒常的に結晶化した尿酸を可溶化させる機構が備わっており、その機能不全が痛風を発症させると考えた（下図）。痛風の治療は、血中尿酸値を低下させることが基本である。しかし、体内の尿酸は、強い抗酸化作用を示す重要な生理活性物質として機能している。体内の尿酸を含む抗酸化物質レベルと寿命には因果関係があると指摘されている。それゆえ、体内の抗酸化物質が低下傾向にある高齢者において、過度の尿酸値の低減は、生体への悪影響が懸念される。以上から、本研究課題では生体における MSU の可溶化機構を解明し、血中尿酸値の低下を標的としない全く新しい痛風治療の戦略構築を目指す。

【方法】LUET1 はリソソーム膜に局在するため、現状では、輸送機能評価に際しては、界面活性剤であるジギトニンでの処理により細胞膜透過性を上昇させ、尿酸を細胞質内へ移行させて輸送を評価している（1.【目的】における評価法）。しかし、ジギトニン処理の条件設定が難しく、再現性に問題がある。そこで、膜タンパク質をリソソーム膜に局在させる移行シグナルに着目した。LUET1 のアミノ酸配列を解析すると、N 末端側が細胞質内にあり、さらにその細胞質内領域に ExxxLL 配列を有していることが確認された。そこで、この配列を ExxxAA に変換することでリソソーム膜移行シグナルを除去した LUET1-LLAA 体を作製し、細胞膜輸送に基づいた尿酸輸送活性を評価した。また、LUET1-LLAA 体を用い、LUET1 介在性の尿酸輸送の親和性や、輸送駆動力等の基本的な特性を速度論的手法により解析した。

【結果】ヒト胎児由来 HEK293 細胞に、LUET1、LEUT1-LLAA 変異体をそれぞれ遺伝子導入し、細胞内への尿酸取り込みを評価した結果、mock 細胞に比べ、LUET1 では約 2 倍、LEUT1-LLAA では約 5 倍の細胞内取り込みの上昇がみられた。ウエスタンブロットで、LUET1、LEUT1-LLAA のタンパク発現量を検討したところ、その量はほぼ同等であったことから、リソソーム膜移行シグナルの除去で、多くの LUET1 の局在が細胞膜に変動したことが示唆された。また、LEUT1-LLAA の尿酸輸送は顕著な飽和性を示し、その親和性を表すミカエリス定数 K_m は、980 μM と算出された。また、LEUT1-LLAA を介した尿酸輸送は、顕著な pH 依存性を示した。そこで、LUET による尿酸輸送に H^+が駆動力として関与しているか、プロトノフォアの処理を行ったところ、細胞内尿酸取り込みは有意に減少した。このことから、LEUT1 の尿酸輸送は H^+との共輸送を駆動力としていることが示された。

想定される高尿酸血症時の痛風発症機構（マクロファージにおける機構）



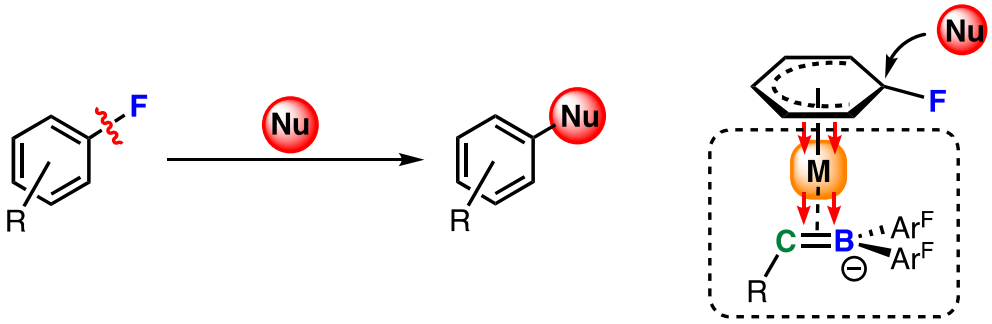
125　電子欠損型金属触媒による不活性結合の変換反応	渡邉　康平

【目的】医薬品の創出のために多様かつ迅速な医薬品候補化合物の合成法が求められ、合成終盤における分子構造・官能基のファインチューニング（late-stage functionalization）や、複雑構造の収束的なフラグメント合成を実現する骨格構築法の開拓は合成化学における大きな課題である。これらは共に位置および官能基選択性が鍵であると言え、その足がかりとして「不活性結合選択的な反応」の開発は最重要なターゲットである。そこで、炭素－フッ素（C-F）結合の変換反応に着目した。C-F 結合は強固な結合であり、分極や大きな結合エネルギーなど他の炭素－ハロゲン結合と比較しても性格を異にするため、クロスカップリング反応などにおいても不活性である。一方で、有機化学の教科書では、芳香族求核置換反応において C-F 結合は最も活性であると記されている。実際、医薬品の合成にも用いられることはあるがニトロ基などの強力な電子求引基の存在が必須であり、合成終盤での活用には極めて限定的で、実用的な反応とは程遠い。これまでに触媒的芳香族求核置換反応は数例あるものの、反応形式や効率が限られており、新たな戦略に基づく強力な方法論の開拓が必要である。本研究では、適切な触媒設計を基盤に基質一般性の高い C-F 結合変換反応の実現を目指した。

【方法】本反応の実現には芳香環上の電子密度の低下が鍵であり、金属原子の芳香環への配位による電子密度の低下を目論んだ。電子欠損型の金属錯体を芳香環に配位させることで効果的に芳香環の活性化が行えると着想し、π-アクセプター性とアニオン性を併せ持つボラタアルケン誘導体を配位子として組み込むことで高度に電子欠損な状態にある金属錯体の創製に向けて研究を行った。

【結果】ボラタアルケン配位子の合成法として、ホウ素上のアリール基（Ar^F）の自在なデザインが可能な手法の確立を目指した。その結果、ジブロモボランジメチルスルフィドを用いたオレフィンのヒドロホウ素化反応によって容易に誘導できるジブロモボラン誘導体に対し、アリールリチウム試薬を作用させることによって種々の電子不足なアリール基をホウ素上に導入できることを見出した。今後、この手法を足掛かりにボラタアルケン誘導体を合成し、配位子として用いることで電子欠損型金属錯体の創製、ひいてはそれを活用した芳香族求核置換反応の開発に向けて研究を行っていく。

電子欠損型金属触媒によるフッ化アリールの芳香族求核置換反応



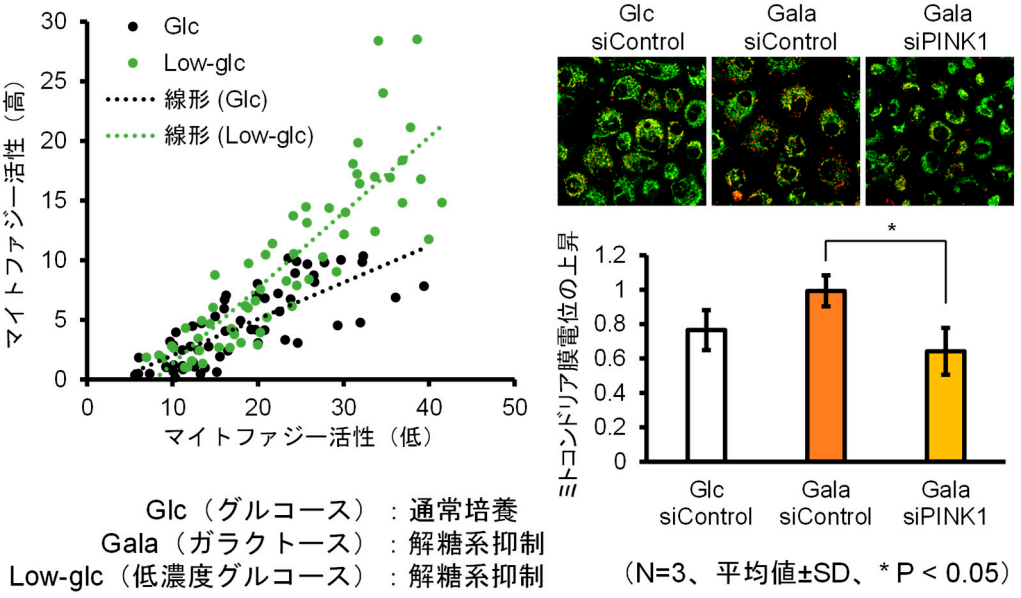
126　マイトファジーによるがん代謝リプログラミングの制御	青木　重樹

【目的】がん細胞は一般に解糖系に強く依存して生存しているが、解糖系の抑制時にも生存可能であり、細胞内代謝システムをリプログラミングしていることが推察される。そこで、その代謝リプログラミング様式を明らかにし、それを特異的に抑制することが、がん細胞内の代謝を標的とした治療に有効であると考えられる。本研究では特に、ATP産生オルガネラであるミトコンドリアに焦点を当て、解糖系の抑制時に認められる細胞内代謝リプログラミングの制御機構の解明を目的に、主として膵がん細胞を用いた検討を行った。

【方法】ヒト膵がん細胞株として PANC-1 細胞を用い、培養液中のグルコースをガラクトースや低濃度のグルコースに置換することで解糖系の抑制を図った。解糖系抑制時のミトコンドリア機能は、膜電位を評価可能な JC-1 染色試薬、および培養液中の酸素濃度の減少による呼吸活性を指標に測定した。また、解糖系抑制時の細胞内代謝物量の変動を、中心炭素代謝を中心とした 110 の代謝物のメタボローム解析から評価した。解糖系抑制時のオートファジー活性はオートファゴソームマーカーLC3 のフラックスアッセイから、マイトファジー活性はミトコンドリアターゲティング配列を付加した Keima-Red の励起波長の変化から観察した。さらに、マイトファジーを制御するタンパク質として PTEN-induced kinase 1（PINK1）に焦点を当て、その mRNA 発現量、および siRNA による発現抑制時のミトコンドリア活性を評価した。

【結果】培養液中の糖源が置換された PANC-1 細胞は、その解糖系は抑制されているものの、亢進したミトコンドリア機能に依存して生存し続けることが明らかとなった。また、解糖系抑制時の PANC-1 細胞の生存経路の変化と併せて、細胞内の代謝環境も大きく変化しており、特に TCA 回路中間産物の量の減少や多くのアミノ酸量の増加が認められ、これらはミトコンドリア機能依存的であることが示された。さらに、解糖系の抑制によって、細胞内タンパク質分解システムであるオートファジーの亢進が観察され、特にミトコンドリア特異的オートファジーであるマイトファジーの亢進も認められた。PANC-1 細胞におけるマイトファジーを制御する因子として PINK1 の mRNA 発現量上昇も確認され、PINK1 の発現抑制時にはミトコンドリア膜電位の上昇が制限されたことから、解糖系の抑制時に PINK1 依存的マイトファジーによってミトコンドリア機能が維持されていることが示唆された。

解糖系を抑制された膵がん細胞におけるマイトファジーによるミトコンドリア代謝制御



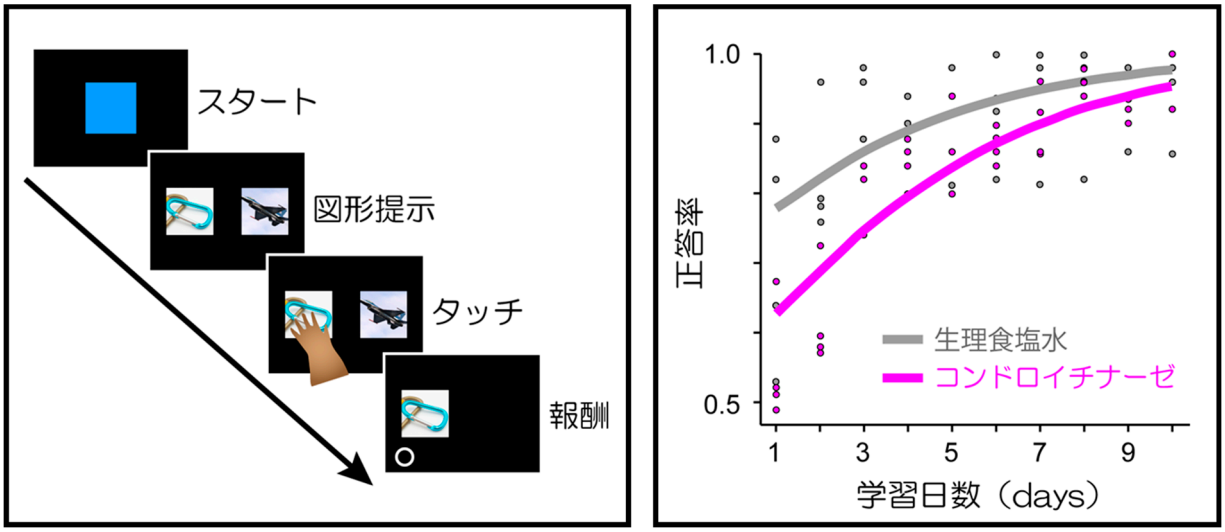
127　運動・認知スキルを担う大脳基底核メカニズムの解明	網田　英敏

【目的】大脳基底核疾患の一つであるパーキンソン病患者では、新規の学習やスキル習得が困難になる症状が見られる。そのメカニズムはいまだよくわかっておらず、新規治療法の開発のためにも大脳基底核回路におけるスキル形成メカニズムの解明が求められる。これまでの研究から「尾状核―黒質外側部」経路が視覚探索スキルの形成に重要であることが示唆されている。この黒質外側部には、シナプスを物理的に保護するペリニューロナルネット（PNNs）と呼ばれる細胞外マトリックス構造が顕著に存在していることから、黒質外側部の PNNs が視覚探索スキル形成に関わっているのではないかと考えた。そこで本研究では、構造的にも機能的にもヒトと類似した脳をもつアカゲザルを用いて黒質外側部の PNNs 分解を行い、スキル習得への影響を調べる実験を行った。

【方法】アカゲザルに対し、「報酬ディスペンサ付きタッチパネル装置」を用いて、飼育ケージ内で「図形―報酬」連合学習を実施した（左図）。「図形―報酬」連合学習では、タッチパネル上に一対の視覚図形を提示し、どちらかの図形をサルにタッチさせて選ばせた。片方の図形は報酬と結びついており、触れると正解音とともに報酬が与えられた（正解図形）。もう一方の図形は触れてもブザーのみで報酬は与えられなかった（不正解図形）。このような正解図形と不正解図形のペアを無作為に提示し、正解図形をタッチした割合を正答率として求めた。まず、コントロール条件として、生理食塩水を黒質外側部に注入し、注入後から 10 日間にわたって新規の図形ペアに対する正答率を調べた。つづいて、PNNs を分解するための薬剤（コンドロイチナーゼ ABC）を黒質外側部に注入し、注入後から 10 日間にわたって新規の図形ペアに対する正答率を調べた。生理食塩水とコンドロイチナーゼ ABC 注入後の正答率を比較することにより、PNNs 分解によるスキル習得への影響を調べた。

【結果】コンドロイチナーゼ ABC 注入後、「図形―報酬」連合学習において学習の遅延が認められた（右図）。とくに、注入後 1～3 日目は何度も同じ図形ペアにおいて不正解図形を選ぶ様子が確認された。10 日間にわたる反復学習によって正答率は徐々に上昇していったものの、生理食塩水を注入したときに比べて約 2.5 日の学習遅延が見られた。一方、PNNs 分解前に学習した図形ペアについては、PNNs 分解後も高い正答率を示した。また、摂食行動、歩行、リーチング動作、視覚的注意、情動表出などの行動については PNNs 分解後も変化がなかった。

「図形―報酬」連合学習（左図）とコンドロイチナーゼ ABC 注入（PNNs 分解）による学習への影響（右図）



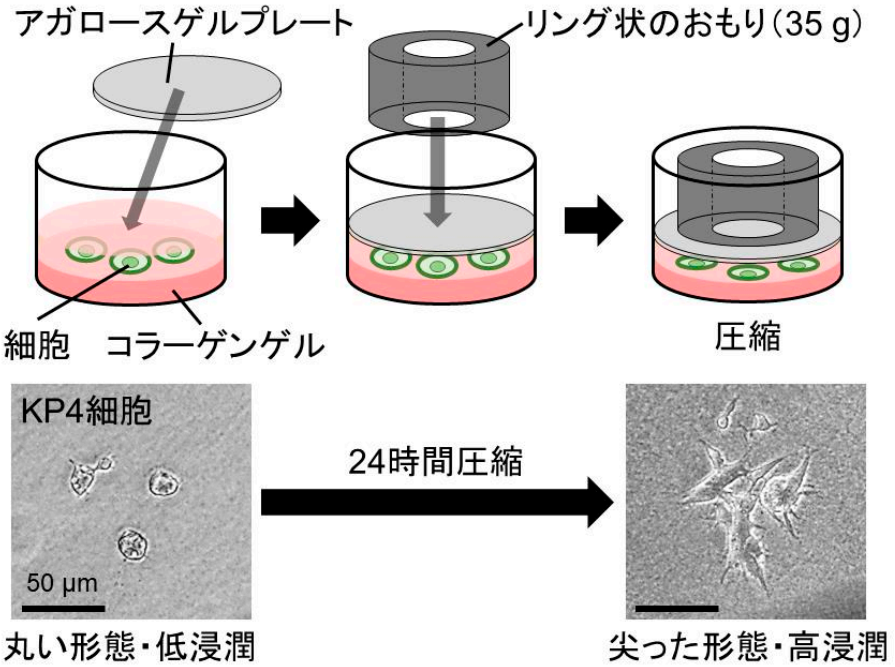
128　圧縮ストレスに引き起こされるがん細胞の浸潤能獲得	石原　誠一郎

【目的】本研究では、がん細胞が圧縮されることにより受けるストレス（圧縮ストレス）が、がんという病態を悪化させることを示し、その機序を明らかにすることを目指した。腫瘍中ではがん細胞は圧縮ストレスを受けている（図上）。がんが進行しがん細胞が増殖するにつれて腫瘍の体積が増加する。これにより周囲の組織が押されて、同時にその反作用で腫瘍中のがん細胞が圧縮ストレスを受ける。がん細胞は種々のストレスに応答して浸潤能を変化させることが知られている。しかし、圧縮ストレスががん細胞の浸潤能を変化させるかは未解明である。本研究では圧縮ストレスががん細胞の浸潤能を上昇させると仮説を立て、それを検証した。がん細胞が周囲の組織を破壊する能力を得ると、浸潤能は上昇する。それに大きく寄与するのが組織を分解する酵素である Matrix metalloproteinase（MMP）である。そこで圧縮ストレスにより MMP の発現増加が起こるかを検証した。また MMP が圧縮ストレスにより発現増加する分子メカニズムの解明を目指した。

【方法】我々は、がん細胞が浸潤することができるゲル（コラーゲンゲル）中に細胞を埋め込んだのちに細胞を圧縮する実験系を確立した（図中）。この方法では、コラーゲンゲル中で細胞を培養したのちにアガロースゲルプレートを載せ、その上からリング状のおもりを載せることにより細胞を圧縮することを可能とした。実際に細胞は体積比で 30% ほど圧縮されていた。リング状のおもりを用いることにより、その穴を通して細胞を観察することが可能である。

【結果】上記の実験系を用いて、圧縮後に膵臓がん細胞株 KP4 細胞がコラーゲンゲルを押しのけて広がっていく様子、すなわち浸潤する様子を観察することに成功した（図下）。さらに、圧縮された膵臓がん細胞株 AsPC1 細胞はコラーゲン分解能をもつ分子である MMP1 の発現を増加させることを発見した。加えて、圧縮ストレスによる MMP1 の高発現は、亜鉛依存的に活性化する ERK によって誘導されることを見出した。以上より、圧縮ストレスにさらされた膵臓がん細胞は MMP1 依存的に浸潤能を獲得することが示唆された。

圧縮ストレスを受けたがん細胞の浸潤を観察する新規実験系



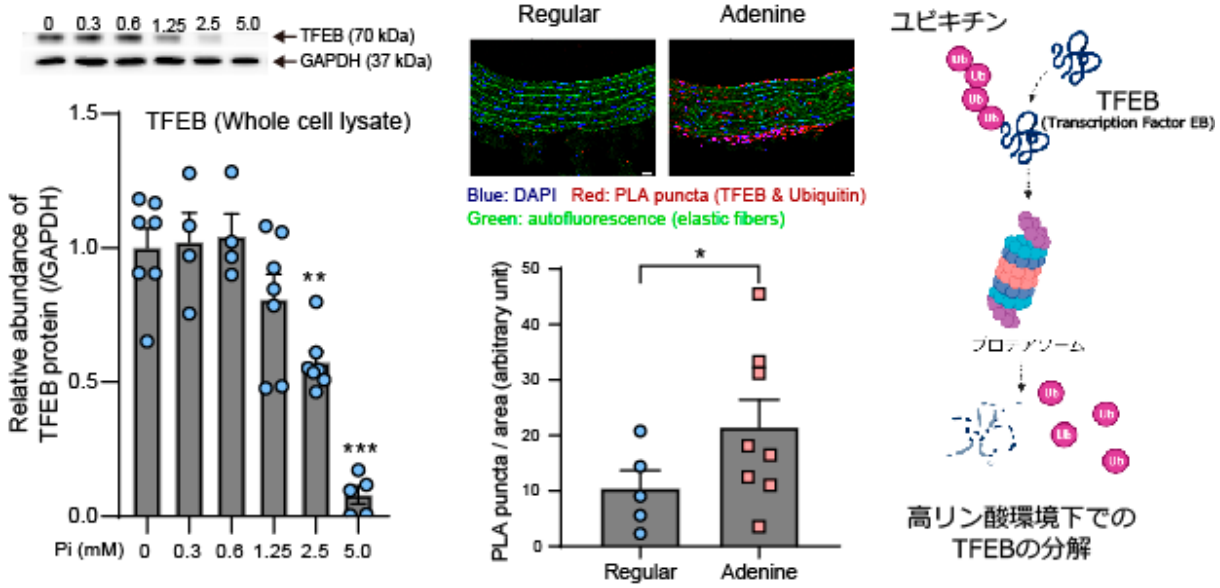
129　平滑筋ライソゾームを標的にした血管石灰化治療	石渡　遼

【目的】血管石灰化は、慢性腎不全の主要な合併症であり、慢性腎不全患者における心血管イベント関連死の危険因子である。高リン酸血症では、無機リン酸が石灰化基質の材料となるだけでなく、血管平滑筋細胞の形質転換を引き起こし、石灰化を誘導することが知られている。近年、高リン酸血症は血管平滑筋細胞におけるオートファジーーライソゾーム経路の機能不全を誘導することが示唆されたが、不全に至る機序は不明である。本研究では、ライソゾーム合成促進因子として注目されている転写因子 TFEB の機能不全が、血管石灰化の一因であるという仮説の基、TFEB の関与を明らかにし、潜在的な血管石灰化の治療戦略を見出すことを目的とし実験を行った。

【方法】ラットおよびヒトの大動脈平滑筋細胞、マウス大動脈器官培養系、ラット慢性腎不全モデルのそれぞれにおいて、高リン酸血症が血管平滑筋細胞における TFEB 発現に与える影響を検討した。ラットの慢性腎不全モデルはアデニン含有食の自由摂食により作製した。血管石灰化は、組織中のカルシウム沈着量の測定および、組織切片の Alizarin Red Stain（ARS）によって評価した。ユビキチン化 TFEB の定量は、Proximity Ligation Assay（PLA）によって行った。

【結果】高リン酸負荷下で、ラット、ヒトの大動脈平滑筋細胞およびマウス大動脈器官培養系において TFEB のタンパク質量はリン酸濃度依存性に低下した。一方、*Tfeb* の遺伝子発現はむしろ増加していた。ラット大動脈平滑筋細胞では、TFEB のノックダウンによってリン酸依存性の石灰化が増悪した。 ラット慢性腎不全モデルでは、5 週にかけて石灰化が亢進し、アデニン食中断後の 7 週では石灰化が退縮していた。 大動脈における TFEB のタンパク質量は、石灰化の形成期において減少し、石灰化の退縮期において増加する傾向にあった。 慢性腎不全ラットの大動脈組織では、タンパク質全体のユビキチン化が亢進すると共に、TFEB のユビキチン化が亢進していた。

本研究で得られた結果の概要



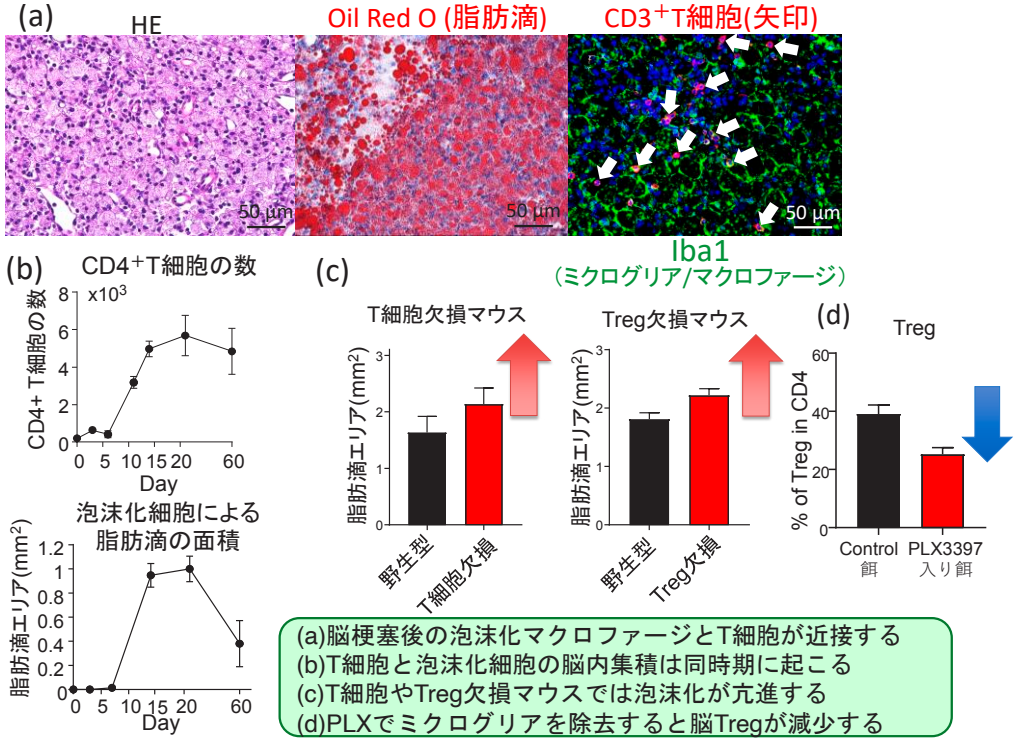
130　脳炎症時の免疫細胞や泡沫化細胞による修復機構の解明	伊藤　美菜子

【目的】泡沫化細胞はアテローム性動脈硬化症の特徴である脂肪蓄積したマクロファージで、マクロファージが酸化された LDL などの脂質を貪食することで生じる。脳組織は脂質の多い組織であるため、脳梗塞後によって死んだ脳細胞や残骸をマクロファージやミクログリアが貪食し、その結果として、脳梗塞慢性期の脳梗塞巣に大量の泡沫化細胞が出現することを見出した。本研究では、この泡沫化細胞と免疫細胞、さらに神経細胞との相互作用を解析し、組織修復機構への関与を解明することを目的とした。

【方法】C57BL/6J マウスに中大脳動脈閉塞（MCAO）モデルを実施した。具体的には、シリコンコートしたナイロン糸を内頚動脈から中大脳動脈の分岐点まで挿入し、虚血状態を作り 60 分間保持し、その後再灌流させた。フローサイトメトリー解析では、生食灌流後の脳半球をホモジェナイザーで潰し、パーコールグラジエントによりミエリンなどの debris を取り除き、単核球分画だけを分離した後に解析に用いた。組織学的な解析では、脳梗塞 2 週間から 3 週間後に生食灌流、パラホルムアルデヒドによる固定後に、凍結組織を作製し、Oil Red O 染色や免疫組織染色を行った。

【結果】脳梗塞慢性期の脳梗塞巣に大量の泡沫化細胞が出現し、それらは Iba1 陽性のミクログリアであった。また、この泡沫化細胞は CD3 陽性の T 細胞と近接することや、脳 Treg が脂肪細胞のマスター転写因子の Pparg を発現することを見出しており、関連が示唆された（a）。T 細胞の集積と泡沫化細胞による脂肪滴の集積が同じようなタイムコースで起こることが分かった（b）。T 細胞と泡沫化細胞の関連を調べるために、T 細胞や Treg を欠損するマウスを用いて脳梗塞を作製したところ、T 細胞や Treg を欠損すると梗塞巣に泡沫化細胞や脂肪滴が残存しやすいことが分かった（c）。PLX3397 を投与することでミクログリアを除去すると脳 Treg が減少することから、泡沫化細胞と脳 Treg の関与が示唆された（d）。

脳梗塞後の泡沫化細胞と T 細胞の関与



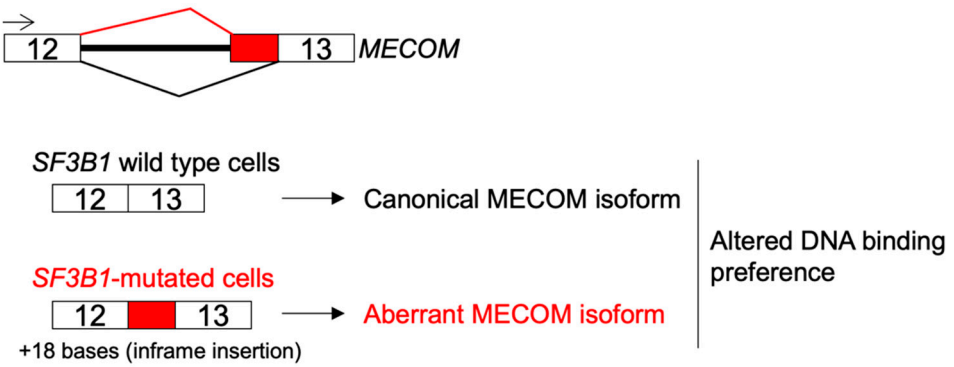
131　難治性白血病の病態解析と治療応用	井上　大地

【目的】急性骨髄性白血病（AML）の一部では、inv(3)あるいは t(3;3)などの染色体レベルでの異常により、がん遺伝子とされる *EVI1*（*MECOM*）遺伝子がエンハンサーハイジャッキングと呼ばれる現象を介して異所的に高発現しており、予後不良である。これらの特徴的な白血病では、RNA スプライシング因子である SF3B1 の変異がたびたび認められることが知られているが、その生物学的な意義は全く解明されていない。本研究では、*SF3B1* 遺伝子変異がもたらすスプライシング異常が inv(3)/t(3;3)AML とどのように協調するかについて、分子レベルで明らかとすることを目的とした。

【方法】Memorial Sloan Kettering Cancer Center の大規模 AML データベースの中から inv(3)あるいは t(3;3)を含む AML 患者を抽出し、体細胞変異の観点から SF3B1 変異が有意にオーバーラップしているか検討した。続いて、*Sf3b1* 変異ノックインマウスモデルと inv(3)モデルを交配したマウスモデルを作製し、*in vivo* での協調の有無を検討した。次に、inv(3)/t(3;3)と SF3B1 変異を同時に認める AML サンプル、どちらか一方をもつ AML サンプル、いずれも持たない AML サンプルの遺伝子発現とスプライシングについてヒト・マウス双方から解析を行った。

【結果】*SF3B1* 遺伝子変異は AML 全体では稀であるものの、63 例の inv(3)/t(3;3)AML のうち、17 例（27%）で検出され、最も高頻度に認められる体細胞変異であった。*Sf3b1* 変異ノックインマウスと inv(3)モデルマウスは、ミエロイド系列への分化誘導を伴い、協調的により早期に AML を発症させることを確認した（P=0.0021）。RNA-seq による発現解析では、遺伝子発現の変化とスプライシングの変化の大部分は、それぞれ、inv(3)と SF3B1 変異によって惹起されていた。興味深いことに、両者の異常を伴う造血幹細胞においては、MECOM の DNA 結合に関与する ZF2 ドメインに 6 アミノ酸がインフレームで挿入されるスプライシング異常が生じていた。ミニジーンアッセイの結果、SF3B1 変異体は通常とは異なる分岐点、3′スプライス部位、スプライシングエンハンサーを利用していた。ChIP-seq による解析から、この新規 MECOM バリアントは DNA への結合性を変化させており、発がんを誘導するアイソフォームと考えられた。さらに、先天性 MECOM-associated syndrome においても、同じ 3′スプライス部位の変異を有する症例が観察され、SF3B1 変異細胞と同様に 6 アミノ酸が挿入される新規のアイソフォームが形成されていた。以上より、SF3B1 変異が inv(3)/t(3;3)AML において誘導する新規アイソフォームと発がんとの関連性を示すことができた。

*SF3B1*遺伝子変異によるMECOMスプライシング異常



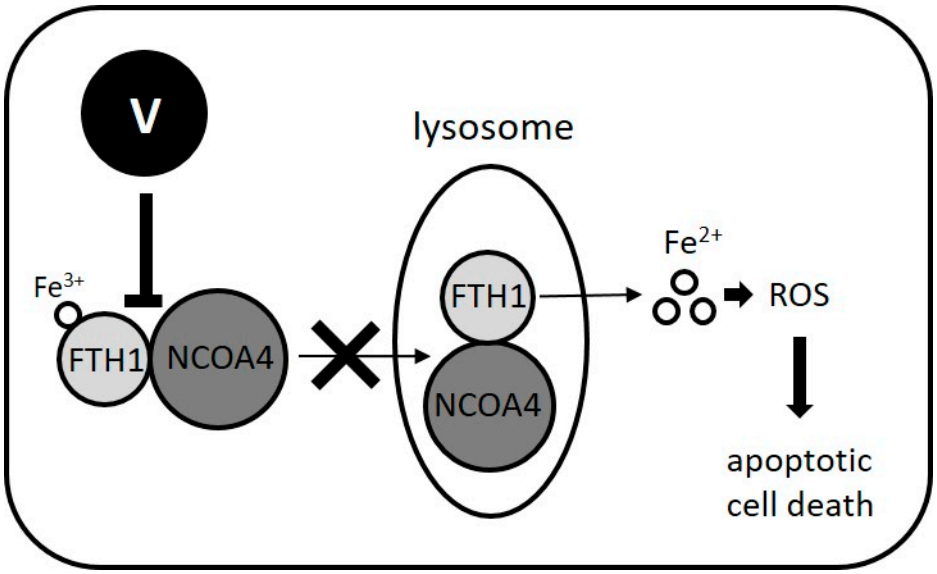
132　鉄代謝とヒトパラインフルエンザウイルス2型の関係	太田　圭介

【目的】鉄は細胞生存に必須であるが、過剰量の鉄は有毒な活性酸素種（ROS）の産生につながる。そのため、細胞内の鉄濃度は厳密に制御されている。鉄は ferririn と結合する形で貯蔵されているが、鉄欠乏時には nuclear receptor coactivator 4（NCOA4）がオートファジー経路を介して ferritin を分解することで鉄が細胞質に放出される。これを ferritinophagy と呼ぶ。予備実験により、ヒトパラインフルエンザウイルス 2 型（hPIV-2）の V 蛋白が、NCOA4 や ferritin のサブユニットの一つである ferritin heavy chain 1（FTH1）と結合することが明らかになったため、hPIV-2 増殖に鉄代謝が関与していると考えた。そこで、本研究では鉄代謝と hPIV-2 の関係を分子レベルで明らかにすることを目的とした。

【方法】FTH1、NCOA4 のノックダウン（KD）細胞株を作製し、プラークアッセイにより、上清中のウイルス量を定量した。FTH1 や NCOA4 とウイルス蛋白の結合の有無は、免疫沈降法により評価した。ferritin およびウイルス蛋白の細胞内局在の観察は、免疫染色法により行った。アポトーシスの検出は、DNA ラダー実験ならびに Caspase-Glo 3/7 assay により行った。

【結果】過剰量の鉄が存在すると ferritin はリソソームに顆粒状に存在するが、hPIV-2 感染細胞内では顆粒状ではなく細胞質全体に均一に広がっていた。FTH1 と NCOA4 の結合は ferritinophagy に必須であるが、V 蛋白存在下ではその結合が弱まることを見出した。FTH1 の KD 細胞株では、hPIV-2 増殖は抑制され、hPIV-2 によるアポトーシスが顕著に見られた。一方、NCOA4 の KD 細胞株では、hPIV-2 増殖が促進し、hPIV-2 によるアポトーシスは抑制された。これらの結果から、V 蛋白は FTH1 と NCOA4 の結合を阻害することで ferritinophagy を抑制することが示唆された。このように、V 蛋白は細胞内の鉄代謝機構を制御してアポトーシスを抑制することで、hPIV-2 増殖を促進することが考えられた。本研究により、鉄代謝の主役である FTH1 や NCOA4 に直接作用するウイルス蛋白が初めて同定された。

V 蛋白による ferritinophagy の阻害



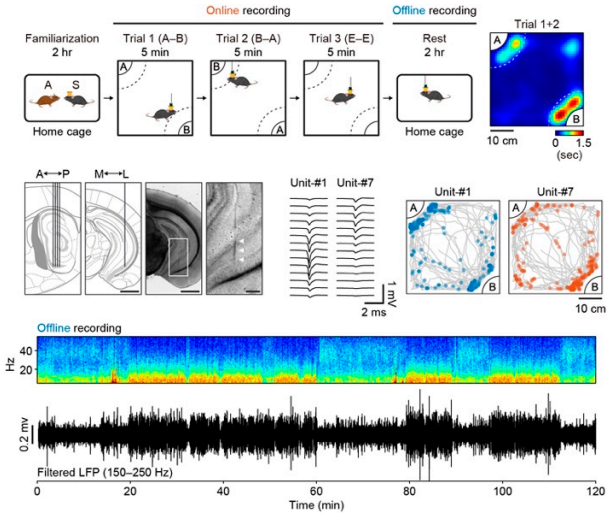
133　自閉症におけるオキシトシン作用の機能解析	奥山　輝大

【目的】自閉症が先天的な発達障害である点より、大規模遺伝子スクリーニングが精力的に行われ、Shank ファミリーなど数多くの原因遺伝子が同定された。それらの遺伝子の大半は、樹状突起スパイン（以下、スパインと表記）やシナプス形成に関与する、脳に広範に発現している分子をコードしていた。スパインは樹状突起にある棘状構造で、その構造上に興奮性シナプスが形成される点より、情報処理を行うための物理的な「足場」だと考えられている。以上の点より、自閉症病態の原因は、特定脳領域のスパインの形成異常の結果、適切な社会性行動を発現するための情報処理が行えなくなったことに起因すると推測されるが、「どの脳領域のスパイン形成異常が、どのようにして自閉症という病態を引き起こすのか」という本質的な問いは未だ解けていない。本研究では、社会性記憶に関与する海馬腹側 CA1（vCA1）領域に注目して、自閉症の病態解明を目指した。

【方法】本実験では、野生型マウス、および、自閉症モデルである Shank3-ノックアウト（KO）マウスを用いて、社会性行動中（Online セッション）・その後の睡眠中（Offline セッション）の vCA1 ニューロンの *in vivo* 電気生理学的な活動の解析を行った。Online セッションでは、テストマウスの行動と共に、vCA1 ニューロンの活動を記録し、その両方のデータをもとに社会性記憶ニューロンを同定した。Offline セッションでは、シャープウェーブリップル波（SPWR）の解析を行った。

【結果】ヒト臨床研究により自閉症患者は社会性記憶が低下することが報告されている。そこでまず、自閉症モデル Shank3-KO においても社会性識別テストによって社会性記憶を検証したところ、Shank3-KO は既知のマウス A にも未知のマウス B にも同程度接近し、社会性記憶に異常があることが分かった。さらに、Online セッション中の vCA1 ニューロンの活動を調べたところ、野生型マウスで観察されるような社会性記憶形成に依存したマウス A ニューロンの形成は見られないことがわかった。また、Offline 中の SPWR についても解析したところ、Shank3-KO では SPWR のピークアンプリチュードが低いことが分かった。さらに、アンプリチュードの強度ごとの SPWR のイベント数をカウントしたところ、Shank3-KO マウスでは強い SPWR の数が野生型よりも有意に少ないことがわかった。SPWR は記憶の定着に必須であることが、海馬背側 CA1 ニューロンの空間記憶タスクの研究で明らかになっている。本研究により、社会性記憶においても vCA1 ニューロンの SPWR が記憶定着に関与していることが示唆された。現在は、自閉症治療薬として期待されているオキシトシンシグナルと、上記異常の関係性について検証を行っている。

社会性行動社会性行動中（Online セッション）・その後の睡眠中（Offline セッション）の vCA1 活動記録



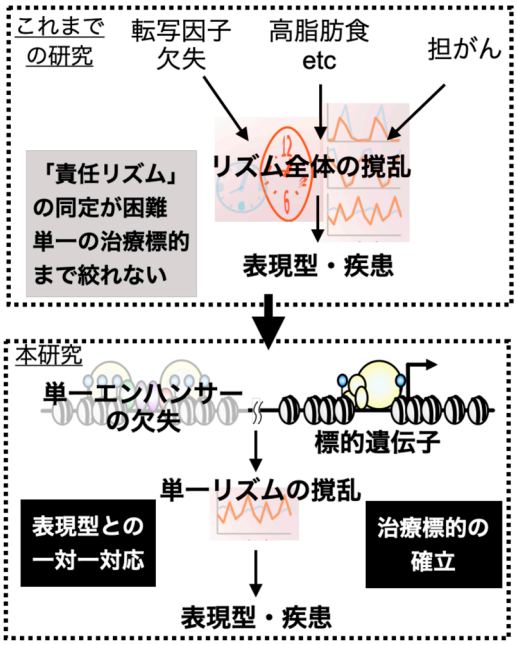
134　肝臓の恒常性を制御する新規非コードDNA領域の研究	河岡　慎平

【目的】多数の遺伝子の発現リズムにより形成される概日リズムは、肝臓の恒常性を支える重要な機構の一つである。肝臓においては、少なくとも 10%の遺伝子がリズミカルに発現する。概日リズム遺伝子が適切な時刻に適切な量で発現することは、肝臓が食事等の時刻依存的なイベントに効率よく適応し、恒常性を保つことに重要であると考えられている。概日リズムの破綻は、肝臓の恒常性の破綻、ひいては肝疾患を招く直接の要因となりうる。実際、肝疾患など、肝臓の恒常性が破綻した状態では、概日リズム遺伝子の発現パターンの撹乱が認められることが多い。我々も、担がん個体の肝臓において概日リズムが破綻し、さまざまな生理的異常が生じることを発見している。しかし、現時点では、「どの」遺伝子の「どのような」パターンの撹乱が肝臓の恒常性を破綻させるのか、という問題を解決することが難しい。概日リズムに実験的に介入する場合、転写因子の欠失や高脂肪食などによるストレスの負荷を用いることが常法である。この場合、多数の概日リズム遺伝子の発現パターンが異常となるため、個々の発現パターンと表現型・疾患とを一対一に対応させられない。以上から、概日リズムの破綻を伴う疾患の直接の原因となる単一遺伝子のリズム（責任リズム）を同定することは容易ではなく、責任リズムに基づく治療標的を同定することも困難であった。そこで、本研究では、単一遺伝子のリズミックな発現変動が肝臓の恒常性を制御するメカニズムを明らかにすることを目指した。

【方法】本研究の目的を達成するために、エンハンサー欠損法を用いた。エンハンサーとは、標的遺伝子がいつ・どこで・どのくらい発現するかを規定する非コード DNA 領域の総称である。マウスやヒトのゲノムには 10 万種類以上のエンハンサーが存在するとされ、適時・適所での遺伝子発現を可能にしている。本研究では、エピゲノム解析によって、単一の遺伝子のリズミカルな発現に必要なエンハンサーをリストアップし、ゲノム編集によって当該エンハンサーを欠失させることで、単一の遺伝子のリズムのみを喪失させることを試みた。

【結果】肝臓における単一遺伝子のリズミカルな発現に必要なエンハンサーを同定し、本エンハンサーを欠失させた新規マウス系統を確立した。さらに、本マウスを分析することによって、本リズムが肝臓の恒常性維持に重要であることを発見した。以上を要するに、肝臓の恒常性維持に必要な新しいエンハンサーを同定し、その機能を明らかにした。

本研究の概念図



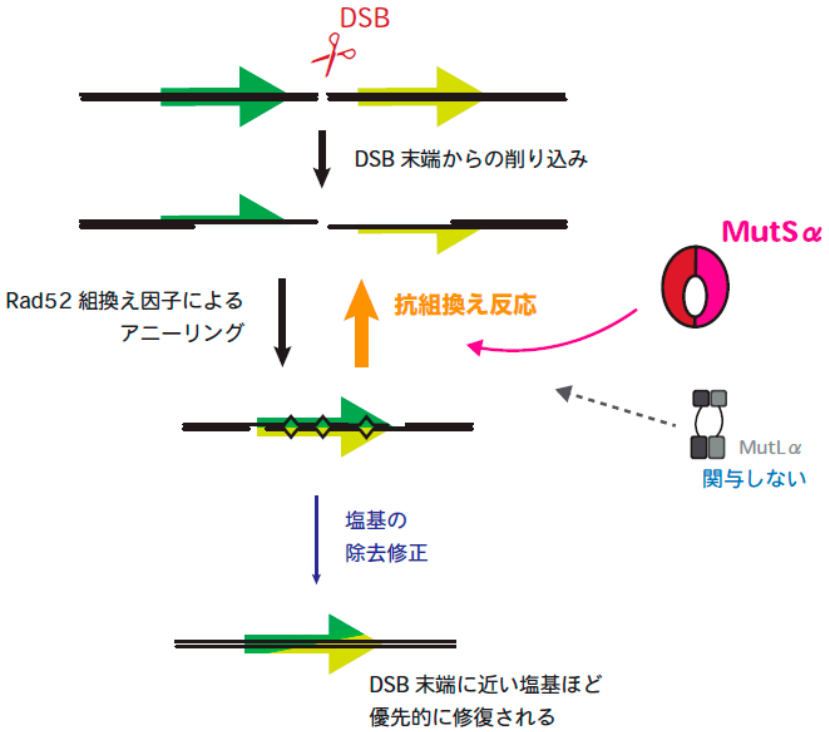
135　合成エラー修復／抗組換え反応の分岐機構の生化学解析	河添　好孝

【目的】細胞内では、さまざまな要因によって DNA の誤対合、ミスマッチが生じる。ミスマッチの生じる原因には、DNA 合成の誤り、もしくは類似するものの相同ではない配列間での組換え、という主に二つの反応が挙げられる。これら二つの反応によって生じたミスマッチは、ともにミスマッチ修復（mismatch repair：MMR）機構によって対処される。MMR 機構は、主要ながん抑制機構の一つであり、その機構の欠損はがん発生頻度の増加やがん細胞の悪性化に繋がる。MMR 機構はミスマッチを認識した後、ミスマッチが生じたそれぞれの原因に応じて異なった対応を取る。しかしながら、それら二つの反応がどのように制御されているのかは未だにわかっていない。本研究では、その制御機構を明らかにすることを目的として解析を行った。

【方法】ツメガエル卵核質抽出液（nucleoplasmic extract：NPE）は、MMR 反応や DNA 二重鎖切断（DNA double strand break：DSB）修復などのさまざまな DNA 修復反応を試験管内で再現する。本研究では NPE を用いて、DSB 修復経路の一つである一本鎖アニーリング（single-strand annealing：SSA）をモデル系として解析を行った。まず我々は、タンデムに配置した相同配列の片方の配列に塩基置換を導入することで相同性を低下させた基質を作製し、類似配列間での SSA を NPE 中で再現した。さらに、SSA による修復産物を精製してサンガー法によるシーケンス解析を行い、類似配列間に生じた DSB を SSA によって修復した産物の配列変化について解析した。

【結果】類似配列間での SSA は、NPE 中で大きく抑制されていた。さらに、その反応はミスマッチを認識する MutSα複合体に大きく依存しており、DNA 合成エラーの修復に必須の MutL エンドヌクレアーゼには依存していなかった。NPE 中で類似配列間の SSA は大きく抑制されていたものの、SSA 反応を完了させる分子も見られた。その分子の塩基配列を解析したところ、DSB 部位の 3′末端に近い塩基ほど優先的に塩基の除去修正を受けることがわかった。

ミスマッチ修復機構による相同組換え反応の正確性を維持する反応の制御モデル



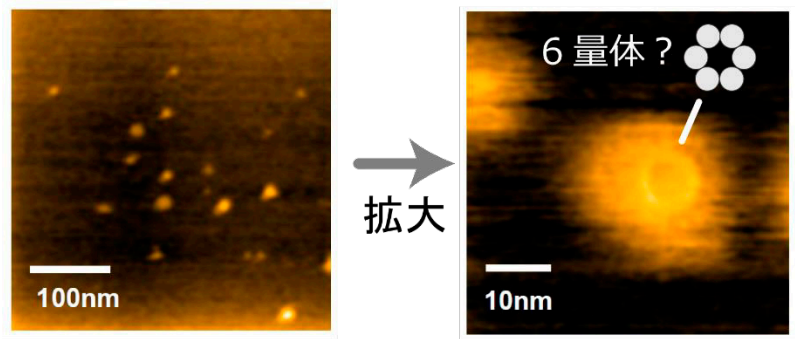
136　免疫に関わる膜蛋白質Hv1の多量体形成の分子基盤解明	川鍋　陽

【目的】好中球やマクロファージなどの免疫細胞では、侵入した病原菌を殺菌するために活性酸素の産生が行われており、その際に必要となるプロトンを供給するのが電位依存性プロトンチャネル Hv1 である。分子として見た場合の Hv1 は、一般的な電位依存性イオンチャネルでいう電位センサー部位のみで構成されるが、“電位を感じる”および“イオンを通す”の基本的機能を備えている。興味深いことに、Hv1 は単量体で機能完結しているにも関わらず、通常 2 量体を形成し、協調してチャネルの開閉を制御していることがこれまでの研究で提案されている［Fujiwara et al.（2012）*Nat Commun*］。一方、タンパク質精製におけるゲル濾過クロマトグラフィーの結果などから、Hv1 は 2 量体以上の多量体を形成している可能性も出てきた。また、Hv1 を発現させた細胞を観察した結果さらなる集積があることも示唆された。このように、Hv1 はこれまで想定されていた以上に多量体化・集積化している可能性がある。そこで本研究では、電位依存性プロトンチャネル Hv1 における多量体形成とそれがイオンチャネル機能に与える影響の分子基盤を明らかにすることを目的とした。

【方法】1. タンパク質精製：浮遊哺乳類培養細胞 Expi293 による培養を行った。マウス由来の Hv1 全長（mHv1）に His-tag を組み込んだプラスミドを作製した。増殖させた Expi293 に形質転換を行い、3〜5 日間旋回培養を行った。回収した細胞を超音波破砕、可溶化し Talon カラム（Co-NTA）で精製した。必要に応じて、ゲル濾過クロマトグラフィー（Superdex200）にて精製を行った。発現確認は SDS-PAGE を用いて行い、染色は CBB で行った。混合リン脂質溶液（POPE：POPC：POPS＝6：3：1）に、重量比 1：1,000 になるようにタンパク質を混合した。透析を 1 週間することで脂質への再構成を行った。2. 電気生理学的解析：培養細胞 HEK293T に上述のプラスミドを形質転換した。翌日、3.5 cm ディッシュに撒き直した後、ホールセルパッチクランプ法にて電流を計測した。3. 高速原子間力顕微鏡：可溶化精製および脂質再構成したサンプルをマイカ基板上へ滴下し、3 分間インキュベーションした後、未吸着のサンプルを洗い流し、緩衝溶液中で高速原子間力顕微鏡観察を行った。

【結果】これまで大量発現が難しかった全長 mHv1 タンパク質を Expi293 で発現した。発現サンプル量は 0.32 mg（培地量 25 mL）であり、培地量からするとかなりの高収率であり、大量発現に成功した。発現の経時変化を確認したところ、形質転換後 2 日程度で発現はプラトー相に達した。本研究で使用したタグ付き mHv1 の機能は電気生理学的解析により確認し、脱分極刺激に伴うプロトン電流が観測されたため基本機能が維持されていることを確かめた。多量体形成の評価を高速原子間力顕微鏡にて実施した。可溶化状態では、2 量体か単量体構造を形成していた。一方で脂質に再構成された mHv1 がリング状の構造を形成していることが判明した。この構造はサイズからすると 6 量体程度と考えられ、他の傍証で得られた結果を支持する多量体形成の有力な証拠となった。

電位依存性プロトンチャネル Hv1 の多量体形成評価



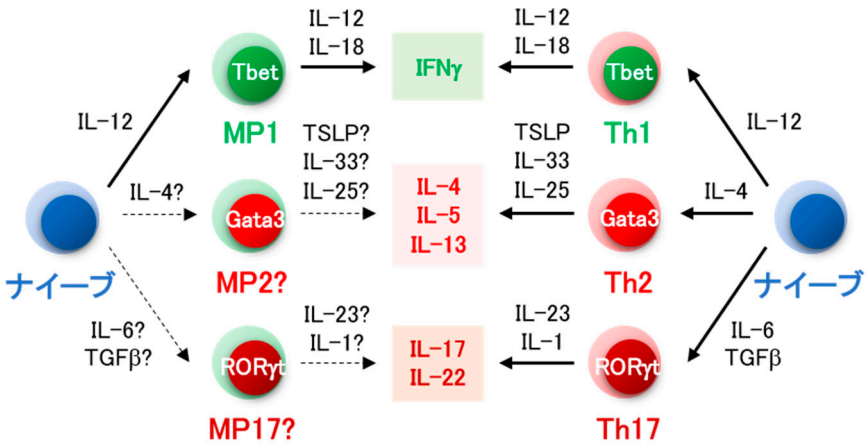
137　新規T細胞「MP細胞」による自己免疫疾患発症機構	河部　剛史

【目的】$CD4^+$T 細胞は外来抗原特異的獲得免疫応答に必須のリンパ球である。これに対し我々は、同細胞中に、外来抗原ではなく自己抗原特異的に産生され恒常的に準活性化状態を呈する新規「MP 細胞」を同定した。本細胞は、獲得免疫の中枢を担うはずの T 細胞にあって自然免疫機能を有するという極めて特異な性質を保持し、現在注目を集めている。MP 細胞は、図のように抗原認識非依存性かつサイトカイン依存性にエフェクター機能を発揮することから、本来は自然免疫的な様式で感染防御に寄与するものと考えられる。一方、MP 細胞は古典的 T 細胞とは異なり自己抗原特異性を有することから、病原体感染時などの炎症性サイトカイン亢進環境下においては本細胞が自己組織に過剰反応し、自己免疫・炎症性疾患を惹起する可能性が類推される。そこで本研究では、MP 細胞の分化・活性化機構を解明し、さらには同細胞による自己免疫・炎症性疾患発症機構を究明することを目的とする。

【方法】MP 細胞の分化機構を解明するために、T-bet/RORγt/Foxp3 レポーターマウスや各種遺伝子欠損マウスを用いた Single cell RNAseq ならびにフローサイトメトリー解析を行った。同細胞の感染防御機能を明らかにする目的で、トキソプラズマ感染実験を行った。MP 細胞による自己免疫・炎症性疾患発症機構を究明するために、MP 細胞を *Rag2* 欠損マウスに移入したうえで各種免疫学的・組織学的解析を行った。

【結果】1. MP 細胞サブセットの同定とその分化機構：生体内各臓器の MP 細胞が T-bet^+ MP1、RORγt^+ MP17、T-bet^- RORγt^- MP0 等の各種サブセットからなることが明らかになった。また、MP 細胞の約半数を占める MP1 細胞は 1 型樹状細胞由来の IL-12 により恒常的に分化誘導され、同 IL-12 産生は無菌的環境下において MyD88 ならびに CD40 シグナル依存的に起こることが分かった。2. MP 細胞サブセットの活性化機構と感染防御機能：上述の MP 細胞の自然免疫機能は主として MP1 サブセットにより担われることが明らかになった。3. 自己免疫・炎症性疾患発症における MP 細胞の機能：制御性 T 細胞の非存在下、MP 細胞は緩徐かつ全身性の Th1 型炎症を惹起する潜在性を有する可能性が示唆された。

MP 細胞（左）および古典的ヘルパーT 細胞（右）の分化ならびに活性化機構



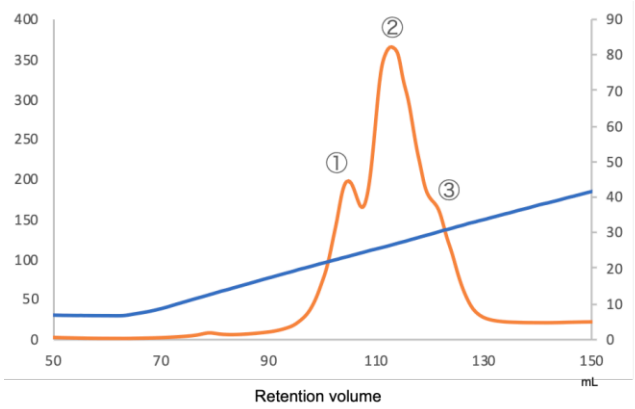
138　減数分裂に関わるHORMAD1の構造生物学的研究	菊池　壮太郎

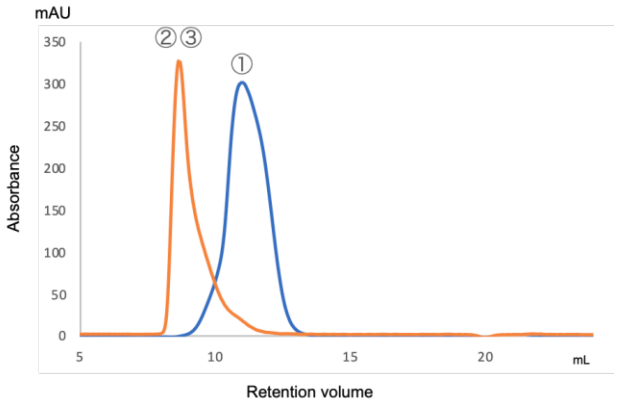
【目的】減数分裂はヒトを含む有性生殖を行う高等真核生物にみられる特殊な細胞分裂の様式であり、ゲノム多様性を生じさせつつ次代へとゲノム情報を継承していくために重要な機構である。遺伝的な多様性は、相同染色体同士の組換えと、組換えられた配偶子が娘細胞へと分配されることで紡がれていくが、染色体分配に異常が起きると、Down 症候群やKlinefelter症候群などの染色体異常疾患、また不妊症や早期の流産をひき起こすことが知られている。HORMAD1は減数分裂において、染色体の軸構造の形成に関わるタンパク質であり、DNA の二重鎖切断を引き起こす Spo11 を染色体にリクルートすることで組換えを制御している。HORMAD1 を欠損したマウスは多くの染色体不対合が観察され、また、トリプルネガティブ乳がん（TNBCs）においては HORMAD1 の発現量の増加が報告されている。染色体にどのようなメカニズムで HORMAD1 が局在・機能するかは不明な点が多く、姉妹染色分体の接着を担うコヒーシン複合体との相互作用も示唆されている。HORMAD1 は HORMA ファミリーに属しているが HORMAD1 の構造は未だ報告されていない。本研究ではヒト HORMAD1 の分子構造を X 線結晶構造解析によって明らかにし、減数分裂における HORMAD1 の構造基盤を得ることを目的とする。

【方法】大腸菌発現システムを用いてヒト HORMAD1 を発現誘導し、クロマトグラフィーシステムを用いて高純度な HORMAD1 を精製した。精製した HORMAD1 を用いて結晶化スクリーニングを行った。また、コヒーシンサブユニットである Smc3-Scc1 を調製し、HORMAD1 との相互作用を *in vitro* プルダウンアッセイにより確認した。

【結果】様々な条件で結晶化スクリーニングを行ったが、結晶を得ることができなかった。イオン交換クロマトグラフィーとゲル濾過クロマトグラフィーによって HORMAD1 が溶液中で単量体と多量体の状態で存在していることを明らかにした。またコヒーシンサブユニット Smc3 との相互作用を確認したところ、結合は見られなかった。HORMAD1 の構造解析に向けて、単量体として安定する変異やコンストラクトのさらなる探索や昆虫細胞発現系を用いた発現システムの構築を検討している。

溶液中において多量体を形成する HORMAD1





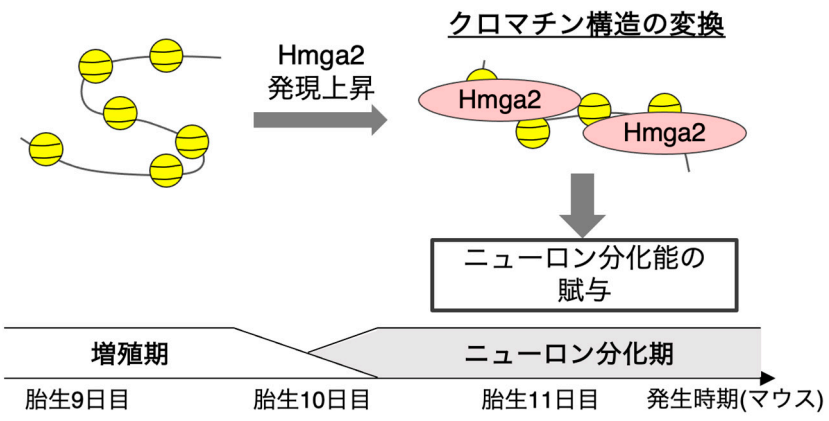
139　神経幹細胞のニューロン分化開始メカニズムの解明	岸　雄介

【目的】我々の高次脳機能をつかさどる大脳新皮質において主要な働きを担うニューロンのほとんどは、発生期に神経幹細胞から産生される。神経管閉鎖後、神経幹細胞は神経上皮細胞とも呼ばれ対称分裂にて一つの神経幹細胞が二つの神経幹細胞を産生し自己増殖を繰り返すことでその数を増やす。この増殖期のあと、神経上皮細胞は放射状グリア細胞となり、一つの神経幹細胞が一つの神経幹細胞と一つのニューロン前駆細胞を産生する非対称分裂によりニューロンを産生するニューロン分化期に移行する。神経幹細胞の増殖期からニューロン分化期への運命転換のタイミングは、最終的に産生される分化細胞の数を決定するため、成体における脳機能の獲得に重要であると考えられる。しかしながら、神経幹細胞がどのようにして増殖期から運命転換し、ニューロン分化を開始するか、という制御機構は、これまであまり明らかになってこなかった。

【方法】増殖期神経幹細胞の運命制御機構を明らかにするために、増殖期神経幹細胞に遺伝子導入を行う新規手法を開発した。また、網羅的遺伝子発現解析を行うことで、運命制御候補因子を挙げ、開発した新規遺伝子導入法と免疫染色などを組み合わせて機能解析を実施した。

【結果】私たちは新たに確立した増殖期神経幹細胞への遺伝子導入法を活用して、神経幹細胞のニューロン分化開始を担う遺伝子の同定を目指した。まずその候補遺伝子を挙げるために網羅的遺伝子発現解析を行った。E8 から E12 まで、1 日ごとに神経幹細胞を回収し RNA-seq を行った。その結果、この時期で発現が変化する数千遺伝子が検出された。私たちは、その中でも神経幹細胞がニューロン分化を開始するタイミングである E10 で一過的に発現が上昇する 284 個の遺伝子群の中に、神経幹細胞のニューロン分化開始を促進する遺伝子があると考えた。これらのうち発現量が高い遺伝子を調べると、クロマチン因子 *Hmga2* (high-mobility group, AT-hook 2) 遺伝子が含まれていることがわかった。*Hmga2* はこれまでの研究でニューロン分化期においてニューロン分化能を担う遺伝子として知られていたが、ニューロン分化開始における役割は不明であった。次に Hmga2 のノックダウンウィルスを E8 の胎児に導入しその影響を調べた。遺伝子導入したニューロン分化期に入った直後の E11 の胎児を回収して組織切片を作製し、早期ニューロンマーカーである Tbr2 による染色でニューロン分化を調べた。すると、Hmga2 のノックダウンにより Tbr2 陽性細胞が減少することがわかった。一方で、神経幹細胞マーカーSox2 陽性細胞の数は変化しなかったこの結果は、Hmga2 がニューロン分化の開始に必要であることを示唆する一方で、Hmga2 がニューロン分化期の神経幹細胞にてニューロン分化を促進している可能性もある。よって Hmga2 がノックダウンされた神経幹細胞の遺伝子発現パターンを RNA-seq によって調べた。その結果、Hmga2 をノックダウンするとより早期の神経幹細胞で発現が高い遺伝子の発現が増加することがわかった。すなわち、神経幹細胞の遺伝子発現パターンがより早期のそれに近づくことがわかった。以上の結果から私たちは、Hmga2 は神経幹細胞のニューロン分化開始を促進する因子であると考えた。

Hmga2 の発現上昇により神経幹細胞はニューロン分化を開始する



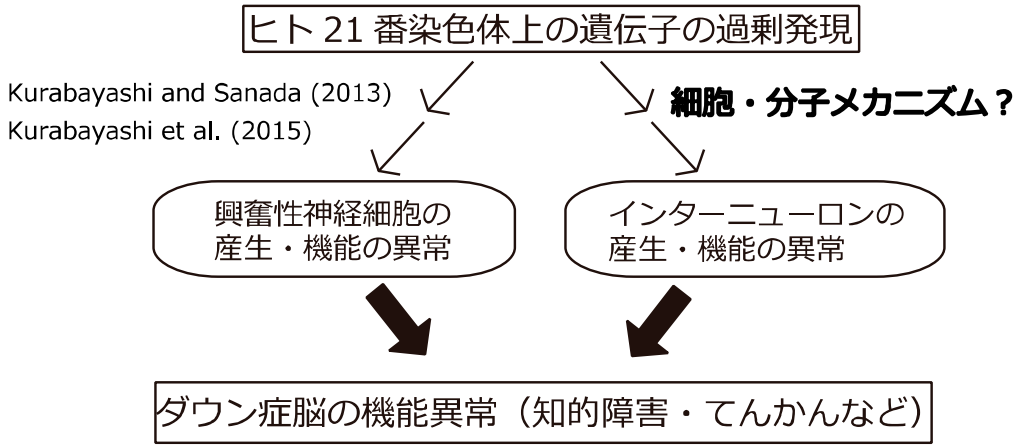
140　ダウン症モデル脳における抑制性神経細胞の機能解析	倉林　伸博

【目的】ダウン症はヒト第 21 番染色体の三倍体化（トリソミー）によって誘発され、およそ 700〜800 人の新生児あたり 1 人の割合で発症する。ほぼ全てのダウン症患者は知的障害を呈し、これに伴って脳の発生異常が認められることから、この発生異常が知的障害などの脳機能異常に寄与していると考えられている。これまでに私たちは、ダウン症モデルマウスを用いた研究から、大脳新皮質において興奮性の神経細胞の産生異常が引き起こされるメカニズムの一端を解明してきた。しかしながら一方で、ダウン症モデルマウス脳における抑制性の神経細胞（インターニューロン）の産生や機能の異常はほとんど理解されていない（図）。これを明らかにすることは、ダウン症において知的障害などの脳機能障害が引き起こされる機序の理解の前進に寄与すると期待できる。そこで本研究では、ダウン症モデルマウスの発生期大脳新皮質におけるインターニューロンの異常を明らかにすることを目的とした。

【方法】胎児期の大脳新皮質におけるインターニューロンを可視化するため、Nkx2.1-CreER マウスと Cre の活性依存的に TdTomato を発現するマウス（Ai9 マウス）を掛け合わせたマウスを使用した。このマウスとダウン症モデルマウス（Ts1Cje）とをさらに交配させることで Ts1Cje 胎仔脳におけるインターニューロンを可視化し、その大脳新皮質における分布を定量した。また一方で、成体脳におけるインターニューロンの分布を解析するため、Ts1Cje 成体脳の切片をインターニューロンのマーカー分子に対する抗体を用いて免疫染色し、各サブタイプのインターニューロンの分布を定量した。

【結果】Ts1Cje の胎仔を用いた解析から、胎児期の大脳新皮質において、移動中のインターニューロンの分布が異常になっていることを見出した。具体的には、脳室側の領域に存在するインターニューロンの割合が、Ts1Cje において増加していることが判明した。また一方で、Ts1Cje の成体脳の大脳新皮質においてインターニューロンのマーカーの一つである PV を発現する細胞の分布が変化していることが明らかになった。具体的には、第 2/3 層に位置する PV 陽性細胞の割合が減少していたのに対し、第 5 層に位置する PV 陽性細胞の割合が増加していた。

ダウン症の大脳新皮質における発生異常（モデル）



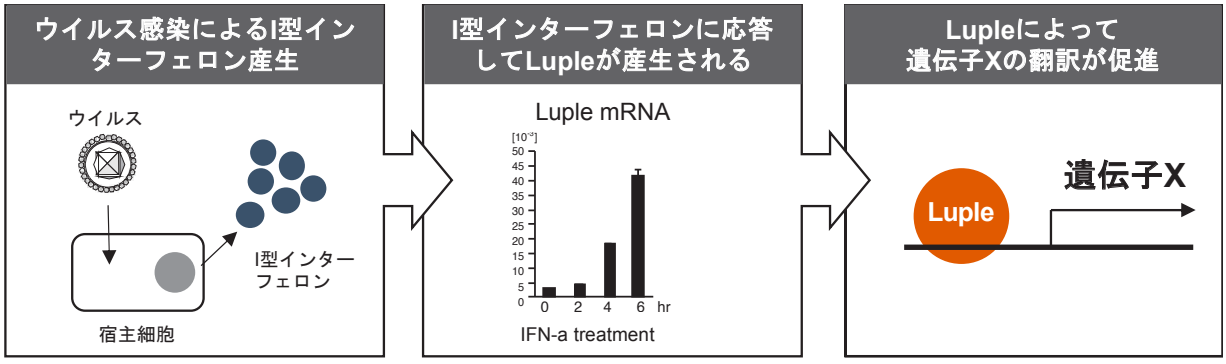
141　感染とヒトの疾患をつなぐ新規因子Lupleの解明	幸脇　貴久

【目的】新型コロナウイルスの世界的流行やジカ熱の流行など、ウイルス感染症は未だ解決されていない。ウイルス感染初期には自然免疫応答としてⅠ型インターフェロンなどのサイトカインが産生され、これが、ウイルスの排除に非常に重要な役割を果たす。一方で、この自然免疫の過剰な活性化は、自己免疫疾患の原因となることも知られている。そのため、ウイルスに対する自然免疫応答の分子メカニズムを解明することは、新たな抗ウイルス薬の開発や、自然免疫が原因となる自己免疫疾患の治療法の開発や創薬につながると期待される。筆者は、ウイルス感染時に発現が上昇する分子について網羅的に調べ、機能未知の分子を見つけ、Luple と名付けた。本研究ではこの新規分子 Luple に焦点を当て、その分子機構と、生体内での重要性を解明することを目的とした。

【方法】当該研究で筆者が発見した新規分子 Luple の機能を同定するために、Luple の発現制御機構を定量 PCR 法や共焦点顕微鏡を用いて検討した。また、生体内での機能を解明するために *Luple* ノックアウトマウスを作製し、ウイルス感染に対する遺伝子発現を網羅的に解析した。

【結果】培養細胞を用いた検討によって、Luple 分子は、インターフェロン刺激やウイルス感染によって発現量が上昇する分子であることが分かった。さらに、Luple 分子は核内に存在することがわかった。次に筆者は *Luple* 遺伝子ノックアウトマウスを作製した。*Luple* ノックアウトマウス由来の Mouse Embryonic Fibroblast（MEF）にウイルス感染後、マイクロアレイ解析を行った結果、ケモカインである遺伝子 X 発現が低下していた。さらに、Luple は DNA 結合ドメインを有していることから、ChiP アッセイを行いプロモーター領域との結合の有無について検討を行ったところ、遺伝子 X の上流に結合することを示唆するデータを得ることができた。

Luple はインターフェロンによって発現誘導され、遺伝子 X 産生を促進する



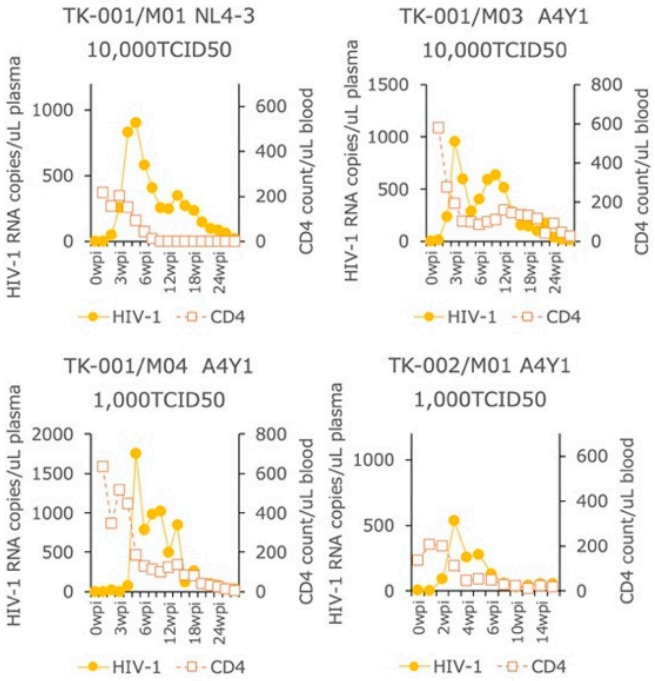
142　ウイルス感染症の克服に向けたヒト化マウスの構築	駒　貴明

【目的】HIV-1 をはじめとする宿主種特異性の高いヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型（HTLV-1）や Epstein-Barr virus（EBV）はマウス個体には感染できないため、動物モデルの開発が望まれている。超免疫不全マウス（NSG マウスなど）にヒトの臍帯血等由来の CD34 陽性造血幹細胞を移植してヒトの免疫系を構築したマウスを免疫系ヒト化マウス（CD34 マウス）と呼ぶ。ヒトの細胞がマウス内に生着することで、宿主種特異性の高いウイルスもヒト化マウスには感染することが可能となった。開発以降、宿主種特異性の高い病原体の研究に CD34 マウスが使用されてきたが、このマウスのヒト T 細胞はマウスの胸腺で教育されるため HLA 拘束性を持たず、また、細胞障害性 T 細胞（CTL）の誘導などの獲得免疫が十分に惹起されない等の問題点が指摘されている。具体的に、最もヒト化マウスを用いた研究が進んでいる HIV-1 感染においては、持続感染期（ウイルス学的セットポイントの維持）を達成できず、HIV-1 は個体内で増殖し続ける。これは、マウス個体内で細胞性免疫を中心とした獲得免疫が極めて弱いことを示唆する。従って、CD34 マウスはウイルスの病原性や感染病態の研究には不適当であり、現在のヒト化マウスは改良が必要とされ、強く望まれている。本研究では、ウイルスの代表として HIV-1 を用い、ウイルス感染後に獲得免疫を発動する免疫系ヒト化マウスの構築を目指した。

【方法】我々は、NSG マウスへの CD133 陽性造血幹細胞の骨髄腔内移植（IBMI 法）を行った。移植後 6〜7 ヶ月目に HIV-1 NL4-3 株または NL-A4Y1 株を腹腔内感染させた。一週間ごとに採血を行い、血中 HIV-1 コピー数とヒト CD4 陽性細胞数を測定した。

【結果】HIV-1 感染後の血中 HIV-1 コピー数を測定すると、感染 4 週目前後にピークが見られ、その後低下した。血中の CD4 陽性細胞数の著減（10 個／μL 前後）に伴う HIV-1 コピー数の減少は、HIV-1 が増殖可能な CD4 陽性細胞の枯渇によるものと考えられる。一方で、HIV-1 コピー数の低下時に CD4 陽性細胞数が 100 個／μL 前後で推移する個体（TK-001/M03、TK-001/M04）では、獲得免疫の発動により HIV-1 の増殖が抑えられたと考えられた。今後、このマウスの獲得免疫系（特に CTL 活性）について評価を行う。

HIV-1 感染後の血中 HIV-1 コピー数とヒト CD4 数



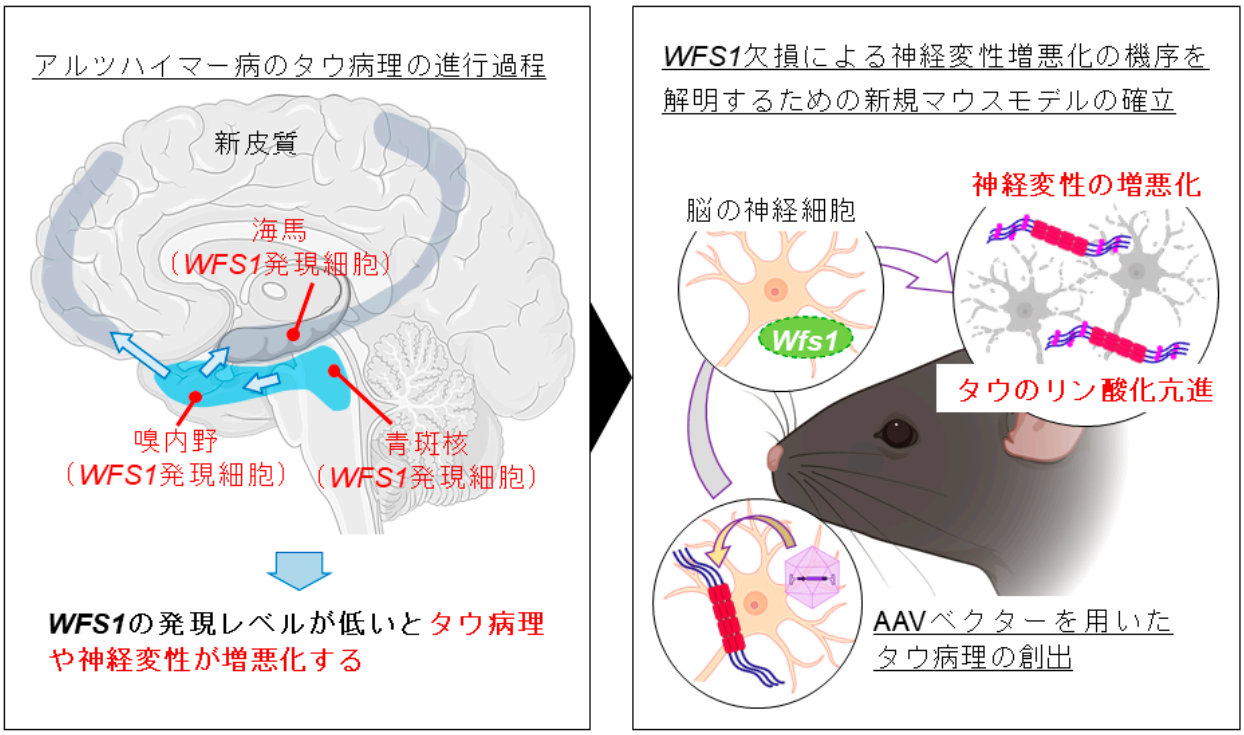
143　アルツハイマー病のタウ病理進行における*WFS1*の関与	榊原　泰史

【目的】糖尿病発症に関与する *WFS1* は、進行性の神経変性疾患であるウォルフラム症候群の原因遺伝子である。*WFS1* は神経細胞の生存や機能維持に重要な役割を果たしている可能性が示唆されており、私たちはショウジョウバエを用いてその可能性について検討し、*WFS1* の発現を抑制するとタウタンパク質による神経変性が増悪化することを明らかにした。アルツハイマー病において、タウ病理は最初期に青斑核、嗅内野に出現し、青斑核や嗅内野の神経細胞死に伴い海馬や大脳皮質へと拡大する。本研究では *WFS1* の発現レベルが低いと青斑核や嗅内野の神経細胞がタウ神経毒性に対して脆弱となり神経変性が増悪化するという仮説を立て、*WFS1* の発現レベルがアルツハイマー病のタウ病理進行と神経変性に及ぼす影響について明らかにすることを目的とした。

【方法】 *Wfs1* 欠損マウス脳で、青斑核の神経細胞に内在性タウ病理が出現している可能性を検討するため、リン酸化タウを認識する抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。また、青斑核でタウ病理を創出するため、青斑核の神経細胞で特異的にヒトタウを発現するアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを構築し、野生型マウスの青斑核に投与した後、タウ病理の出現について免疫組織化学染色にて調べた。

【結果】糖尿病がタウのリン酸化を亢進することから、加齢依存的に高血糖を呈する *Wfs1* 欠損マウスの脳では内在性にタウ病理が出現する可能性を想定し、*WFS1* 欠損による内在性タウ病理への影響について検討を行った。青斑核の神経細胞にリン酸化タウが蓄積しているかどうかを調べたが、15 ヶ月齢の個体では細胞体、神経軸索のいずれにおいてもリン酸化タウの蓄積は認められなかった。マウス脳内でタウ病理の進行過程を再現するため、青斑核の神経細胞で特異的にヒトタウを発現する AAV ベクターを構築し、野生型マウスの青斑核に投与した。投与 6 ヶ月後に、青斑核でヒトタウの発現、およびリン酸化タウの蓄積を検出した。これらの結果から、AAV ベクターを用いた遺伝子導入法によりタウ病理を創出できることが分かった。

タウ病理の進行に対する *WFS1* の関与を検証するための新規マウスモデルの確立



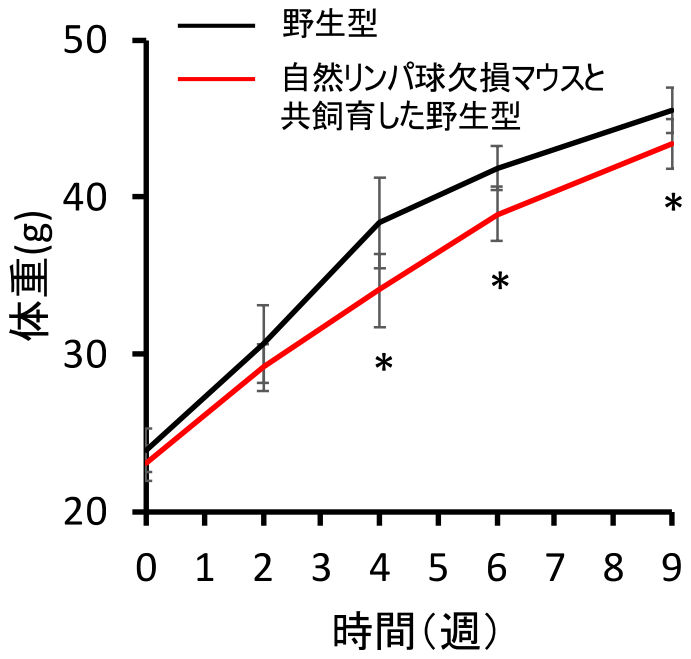
144　肥満における腸内細菌と自然リンパ球の相互作用解析	佐々木　崇晴

【目的】我々はこれまでに、近年新しく発見されたリンパ球「自然リンパ球（Innate lymphoid cells：ILCs）」が高脂肪食による肥満の誘導に関与することを見出した。しかし、小腸の自然リンパ球がどのように肥満を誘導するのか、その機構は不明である。これに対し近年、肥満の誘導やインスリン抵抗性の発症には腸内細菌が関与することが知られるようになったが、腸内細菌による肥満の制御機構についても不明である。そこで本研究では、自然リンパ球による肥満の誘導における腸内細菌の関与について検証し、関与する菌の同定を目指すことにした。

【方法】自然リンパ球による肥満、インスリン抵抗性の誘導に腸内細菌が関与するか調べるため、自然リンパ球欠損マウス（Il2rg$^{-/-}$Rag2$^{-/-}$マウス）を野生型マウスと同じケージ内で飼育して高脂肪食負荷を行い、体重を測定した。高脂肪食負荷マウスに対し、インスリンを投与して血糖値の測定を行う（インスリン感受性試験）ことによってインスリン抵抗性を評価した。これらのマウスの糞便と小腸内容物から DNA を抽出して 16SrRNA 遺伝子可変領域のシーケンシングによる菌叢解析を行い、マウスの表現型に関連する腸内細菌を探索した。

【結果】自然リンパ球欠損マウスと共に飼育した野生型マウスでは、単独で飼育した野生型マウスと比較して高脂肪食による体重増加が改善され、脂肪組織重量の減少が見られた。インスリン抵抗性試験でも有意な血糖値減少が見られたとともに、肝臓の組織標本では脂肪滴蓄積の減少が観察された。したがって、自然リンパ球欠損マウスの腸内細菌は、肥満とそれに伴うインスリン抵抗性を改善することが分かった。これらのマウス糞便を採取して菌叢解析を行った結果、自然リンパ球欠損マウスと共に飼育した野生型マウスの糞便において Bifidobacterium 属の細菌が増加していることがわかった。以上から、自然リンパ球は Bifidobacterium 属の細菌の排除に働き、これが肥満の誘導やインスリン抵抗性の悪化に関与する可能性が考えられた。今後は自然リンパ球がどのように Bifidobacterium の定着や排除の制御に関わるのかについて検証を行っていく予定である。

自然リンパ球欠損マウスの腸内細菌は肥満抑制効果を示す



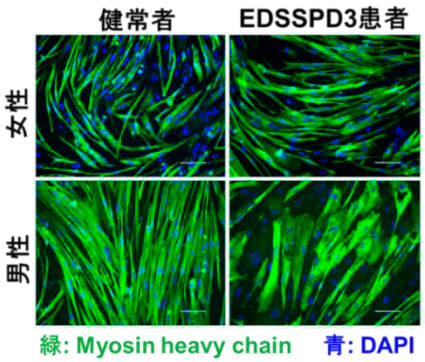
145　iPS細胞を用いた筋疾患の病態解明と治療戦略の構築	庄司　正樹

【目的】亜鉛の恒常性は、亜鉛トランスポーターによって制御されており、亜鉛トランスポーターを介する亜鉛イオンは、細胞内外でシグナル分子（亜鉛シグナル）として機能する。亜鉛トランスポーターSLC39A13/ZIP13（ZIP13）は、ゴルジ体に局在する細胞内亜鉛トランスポーターで、ゴルジ体から細胞質側への亜鉛輸送を担っている。最近、ZIP13の遺伝的点変異（G64D 型）により機能喪失した新しい脊椎手掌異形成型エーラス・ダンロス症候群（EDSSPD3）が発見された。当該患者は、骨・軟骨等の全身的な結合組織の脆弱性を有するだけでなく、骨格筋の筋力低下や反射の鈍化等を示す筋緊張低下を呈することが見出されている。当該疾患は、希少難病に指定されているが、治療方法が現時点で存在していない。これまで、「亜鉛シグナルがどのように骨格筋の形成と機能にかかわるのか」については、明示されていない。したがって、本研究では、当該患者由来の人工多能性幹細胞（iPS 細胞）から骨格筋細胞への分化誘導法を確立し、EDSSPD3 の骨格筋における病態再現とその機序を明らかにすることを目的とした。

【方法】EDSSPD3 患者 2 名（女性および男性）の皮膚繊維芽細胞にヒト iPS 細胞誘導用エピソーマルベクターを導入することで、iPS 細胞を作製した。iPS 細胞から骨格筋細胞への分化誘導は、Doxycycline（Dox）存在下で発現する骨格筋分化制御因子ヒト Myogenic differentiation 1（hMyoD1）と mCherry 遺伝子が繋がった発現カセット（*hMYOD-mCherry*）を導入する手法を用いた。すなわち、この発現カセットを健常者および EDSSPD3 患者由来 iPS 細胞のゲノムに挿入し、Dox 制御 *hMYOD-mCherry* 安定発現 iPS 細胞株を樹立した。これらの iPS 細胞株から骨格筋への分化誘導は、Dox を添加することで行った。そして、誘導した健常者および EDSSPD3 患者 iPS 細胞由来骨格筋細胞に対し、筋関連因子の蛍光免疫染色とリアルタイム PCR を行うことで、形態および遺伝子発現変化を比較解析した。さらに、筋機能を検討するため、グルコース取り込み能を比較解析した。

【結果】EDSSPD3 患者 2 名の皮膚繊維芽細胞にヒト iPS 細胞誘導用エピソーマルベクターを導入したところ、細胞表面上に未分化幹細胞マーカーが高発現した iPS 細胞コロニーが誘導されたことから、女性および男性 EDSSPD3 患者由来 iPS 細胞を作製した。これらの iPS 細胞に対し、Dox 制御 h *hMYOD-mCherry* を導入したところ、Dox 添加により mCherry 発現が見られたことから、*hMYOD -mCherry* 安定発現 iPS 細胞株を樹立できた。次に、Dox 添加による骨格筋分化誘導法を適用したところ、骨格筋タンパク質が強力に発現した繊維状の骨格筋細胞を作製することに成功した。EDSSPD3 患者 iPS 由来の骨格筋細胞の形態は、健常者由来と比較したところ、女性では変化は見られなかったが、男性では筋繊維化が減弱していた。次に、筋関連遺伝子の発現を解析したところ、EDSSPD3 患者 iPS 由来骨格筋細胞において女性および男性共に、有意に減少した。さらに、女性 EDSSPD3 患者 iPS 由来骨格筋細胞では、グルコース取り込み能も減少した。以上の結果は、ZIP13-G64D 点変異による EDSSPD3 患者の骨格筋において、筋関連因子発現の減少によりグルコース取り込み能などの筋機能が減弱し、筋疾患を呈することを示唆している。本研究成果により、EDSSPD3 の骨格筋における病態再現できたことで、本疾患への治療法開発に貢献すると考えられる。

健常者および EDSSPD3 患者 iPS 細胞由来の骨格筋細胞



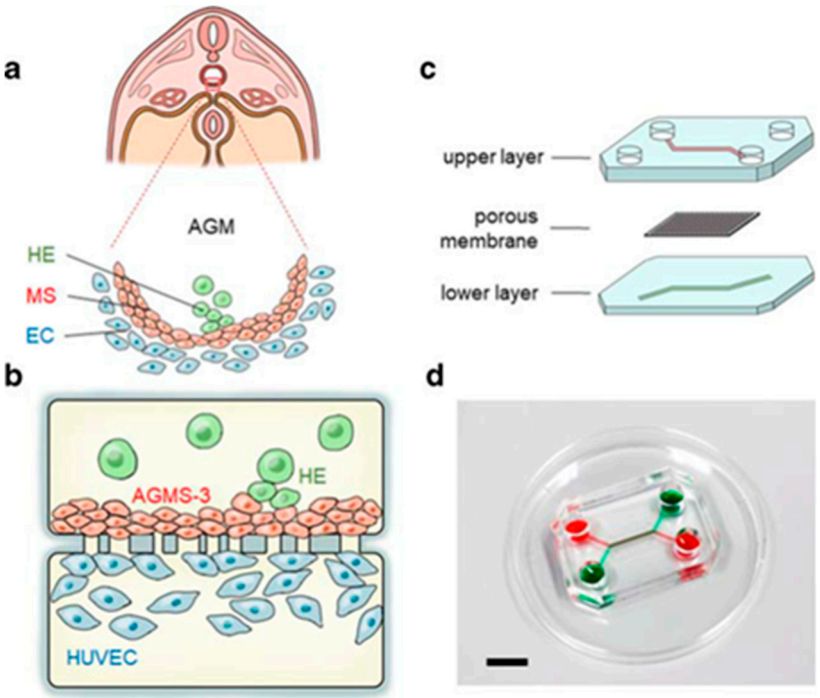
146　ヒトiPS由来造血前駆細胞のストレス制御因子の同定	杉村　竜一

【目的】造血幹細胞及び前駆細胞の誘導における基本的な制限は、ヒトの発達造血の不正確な理解である。本研究ではヒト発達造血を模倣するデバイスを構築することで分子相互関係を理解することを目的とした。

【方法】本研究では、多層マイクロ流体 Aorta-Gonad-Mesonephros（AGM）-on-a-chip を確立した。デバイスは、分離された 2 層のマイクロチャネルで構成されており、半透膜により、ヒト造血内皮細胞（Hemogenic endothelium：HE）と間質細胞の共培養が可能であった。

【結果】この AGM-on-a-chip で通常の浮遊培養と比較して、ヒト人工多能性幹細胞（Human Induced Pluripotent Stem Cell：hiPSC）由来の HE から造血幹細胞（Hematopoietic Stem Cell：HSC）への移行（endothelial-to-hematopoietic transition：EHT）を効率的に導き出した。間葉系間質及び内皮細胞の存在は、*in vitro* で機能的な造血前駆細胞を提供した。この結果から、本研究で用いたデバイスは、ヒト発達造血を模倣することで造血幹細胞及び前駆細胞の誘導に貢献した。

Aorta-Gonad-Mesonephros（AGM）-on-a-chip の模式図



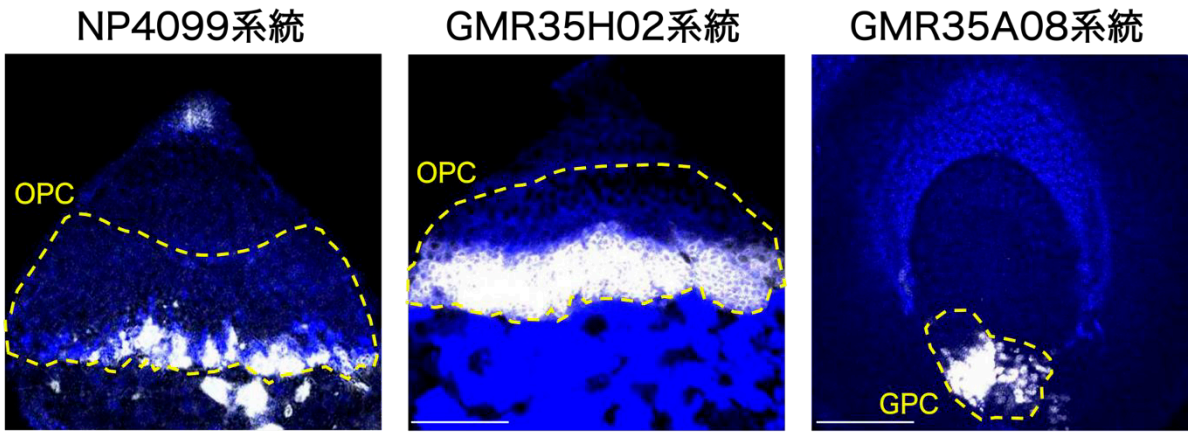
147　新規手法DamIDによる神経多様性創出機構の解明	鈴木　匠

【目的】神経幹細胞から生み出された多様な神経が、正しい場所に移動し、最適な相手と結合することで正確な神経回路が構築される。神経の産生に不具合が生じると顕著な脳機能障害が起こるため、神経産生の制御は神経回路形成に非常に重要である。神経幹細胞では、Temporal Factors（TFs）という転写因子群が特定の順序で発現することで、多様な神経を作り分けている。しかし、TFs の下流でどのような遺伝子が制御され細胞運命を決定しているのかについては、これまで適切な解析法がなかったため不明な点が極めて多く残されている。DNA アデニンメチル基転移酵素を利用して転写因子の DNA 結合パターンを解析できる新規手法 DamID を用いて TFs の標的遺伝子を同定し、神経の運命決定を直接制御する遺伝子を特定する。

【方法】本研究では、解析モデルとして、哺乳類の大脳皮質と多くの共通点を持つショウジョウバエの視覚中枢を用いた。ショウジョウバエの視覚中枢は、層・カラム構造といった哺乳類の大脳と共通した構造を持ち、解析可能な程度の複雑性を持つ。また、単一細胞レベルでの遺伝学的解析が可能であるため、脳神経発生の解析モデルとして優れている。まず、DamID 解析を行うために必要な TF-Dam 融合タンパク質の発現コンストラクトを作製した。次に、視覚中枢に存在する二つの幹細胞プールをそれぞれ特異的に操作できる系統の探索を行った。また、新規の TFs の探索と役割がわかっていない TF についての機能解析を行った。

【結果】公共のストックセンターから取り寄せた合計 137 種類の系統を用いて、幼虫期の脳におけるそれぞれの発現パターンを調べたところ、GMR35H02、GMR35A08 がそれぞれ、表層の幹細胞集団（OPC）、後方の幹細胞であるグリア前駆細胞（GPC）において特異的に発現していることがわかった。GMR35A08 については、GPC の 70%程度の範囲での発現が確認された。これによって、それぞれ OPC、GPC において特異的に DamID 解析を行うことが可能になった。また、発現スクリーニングによって、古い幹細胞で特異的に発現が見られる遺伝子、*ONB1*、*ONB2* を同定した。また、同時に行っていた NP 系統のスクリーニングによって、ONB2 の発現を再現する系統として NP4099 を同定した。この NP4099 系統を用いて、これまで役割がわかっていなかった TF である D の過剰発現を行ったところ、グリア細胞の過剰産生が見られた。

新規 TF の発現を再現する系統と、OPC、GPC を特異的に操作可能な系統の発現パターン



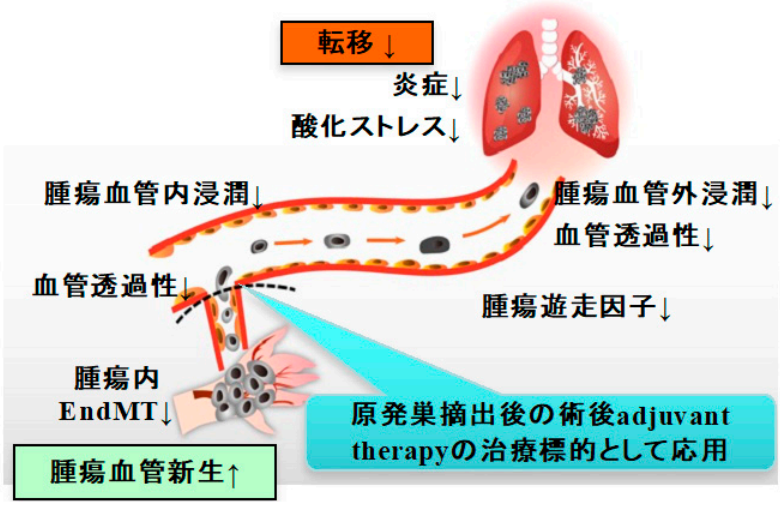
148　血管の恒常性制御に基づく、転移抑制法の開発	田中　愛

【目的】アドレノメデュリン（AM）は、血管をはじめ全身で広く産生され、多彩な作用を有する生理活性ペプチドである。我々は*AM*ノックアウトマウス（AM$^{-/-}$）と、AM 受容体活性調節タンパクである*RAMP2*のノックアウトマウス（RAMP2$^{-/-}$）が、共に血管の発生異常により胎生致死となることから、AM-RAMP2 系が、血管新生にも必須であることを報告してきた。一方、AM は、様々な癌においても産生される。本研究では、腫瘍の増殖と転移における AM-RAMP2 系の意義の検討を行った。

【方法】RAMP2$^{-/-}$は胎生致死のため、成体での解析が不可能である。そこで本研究では、誘導型の血管内皮細胞特異的 RAMP2 ノックアウトマウス（DI-E-RAMP2$^{-/-}$）を樹立し、成体になってから血管の*RAMP2*遺伝子欠損を誘導し、検討を行った。

【結果】DI-E-RAMP2$^{-/-}$を用いて、B16F10 メラノーマ細胞の皮下移植実験を行うと、コントロールマウスに比較して、腫瘍内血管新生は減弱し、腫瘍増殖は抑制された。その一方で、B16BL6 メラノーマ細胞を用いて、原発巣から遠隔臓器への転移モデルの検討を行ったところ、DI-E-RAMP2$^{-/-}$では肺への転移率が亢進するという、一見すると相反する結果となった。DI-E-RAMP2$^{-/-}$において腫瘍転移が亢進するメカニズムを解明するため、RAMP2 欠損誘導後に転移予定先臓器である肺に生じる変化を時系列的に観察した。その結果、腫瘍の転移前の早期の段階で、血管壁への炎症細胞の接着や浸潤、炎症性サイトカインの発現亢進が認められた。炎症は RAMP2 欠損誘導後も持続し、腫瘍の転移がはじまる直前の段階では、腫瘍細胞を転移巣へ誘導するとされる S100A8/A9 や SAA3 の発現亢進が確認された。次に、原発巣の腫瘍内血管について検討を進めた。DI-E-RAMP2$^{-/-}$では、腫瘍内血管の CD31（血管内皮細胞マーカー）陽性細胞が減少し、対照的にαSMA（間葉系細胞マーカー）陽性細胞が増加しており、内皮間葉系転換（EndMT）が生じていることが推測された。一方、血管内皮細胞特異的に RAMP2 を過剰発現させたトランスジェニックマウス（E-RAMP2 Tg）を樹立した。B16BL6 メラノーマ細胞を移植し、自然肺転移を観察したところ、E-RAMP2 Tg では、腫瘍の転移が抑制され、生存率の改善を認めた。以上の結果から、血管内皮細胞の RAMP2 欠損により、1. 転移予定先臓器の血管における慢性炎症が、癌細胞の転移前土壌となり、癌の遠隔臓器への転移を促進させること、2. 原発巣の血管では、EndMT による血管構造の不安定化が生じ、これにより腫瘍細胞の血管内浸潤が亢進すること、3. 逆に、血管内皮細胞の RAMP2 を過剰発現させることにより、転移が抑制されること、が明らかとなった。AM-RAMP2 系による血管恒常性維持機構に着目することで、癌転移を抑制する新しい治療法への展開が期待される。

AM-RAMP2 系の腫瘍増殖、転移における病態生理学的意義



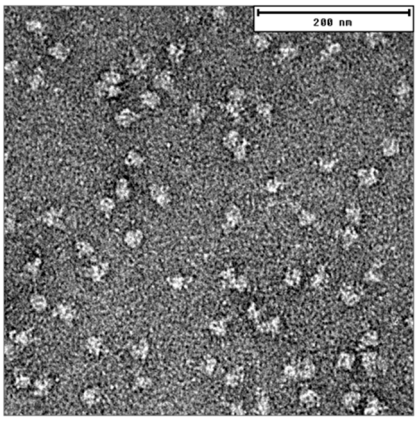
149　金属過不足疾患に関わる亜鉛輸送体の構造と機能の解明	田中　良樹

【目的】生命活動の維持のために、輸送体タンパク質によって細胞内部の分子濃度は一定の範囲に維持されている。輸送体の「選択性」と「輸送制御」が適切に機能することで、生体恒常性が保たれる。この輸送体のメカニズムの完全な理解のためには原子分解能レベルの構造情報が必要である。しかし、高分解能で構造解析されている大半の輸送体が原核生物由来のものであり、輸送体膜タンパク質の構造研究は発展途上にある。このため構造情報からのヒトの疾患に対する創薬への応用までの道程は長い状況にある。本研究では構造未知の真核生物由来の亜鉛輸送体タンパク質などの三次元構造に焦点をあてた研究を行う。

【方法】亜鉛などの金属イオンの輸送を担う輸送体膜タンパク質の立体構造決定を第一の目標とし、それに加えて構造情報に基づく解析を行うことにより、構造と機能の間の相関を解明し、既知の疾患などの原因を明らかにすることを目標に研究を行った。構造決定のためには純度の高いタンパク質試料が大量に必要となる。そのために必要となる試料は真核生物のタンパク質発現系の一つであるメタノール資化酵母を形質転換して調製した。研究代表者はこれまでにこの系を利用して植物の多剤排出輸送体の構造を決定し報告した [1]。複数の生物種から解析対象タンパク質の遺伝子をデータベースから検索し、DNA 合成により遺伝子を入手した。発現用ベクターに遺伝子を導入し、酵母発現系を構築した。発現条件の検討、精製条件の検討を繰り返し、精製試料を得る系を確立した。精製試料を用いて、結晶化や電子顕微鏡撮影を行った。結晶が得られた物に関して、大型放射光施設 SPring-8 BL32XU などのマイクロフォーカス X 線を用いて回折実験を行い、立体構造決定を試みた。同時にクライオ電子顕微鏡による構造決定も予定していたが、クライオ電子顕微鏡での構造解析を行うには輸送体の分子量が小さいという問題点があったため、抗体を結合させ、複合体で測定を行うことで分子量の小ささを解決する方法を試みた。解析対象に特異的結合する抗体を、マウスを用いて作製する方法と、特定のペプチドに結合する抗体を利用する方法の二つを進めた。

【結果】植物の亜鉛を含む 2 価金属イオン輸送体について、取り込み型と排出型のそれぞれについて大量発現系・精製系を確立した。特異的結合抗体を作製し、安定な複合体を形成することを確認した。共結晶化を行った結果、タンパク質結晶を得ることに成功したが、回折実験では高分解能データは得られていない。並行して、クライオ電子顕微鏡での構造解析の前段階としてネガティブ染色電子顕微鏡撮影を行った。ネガティブ染色での撮影像から、輸送体タンパク質と抗体複合体粒子を確認している (図)。クライオ電子顕微鏡像による高分解能の立体構造解析を可能とするためには、より均一で安定した複合体が必要と考えられたため、測定試料の調製方法の改良が必要であると結論付けた。

抗体複合体ネガティブ染色電子顕微鏡像



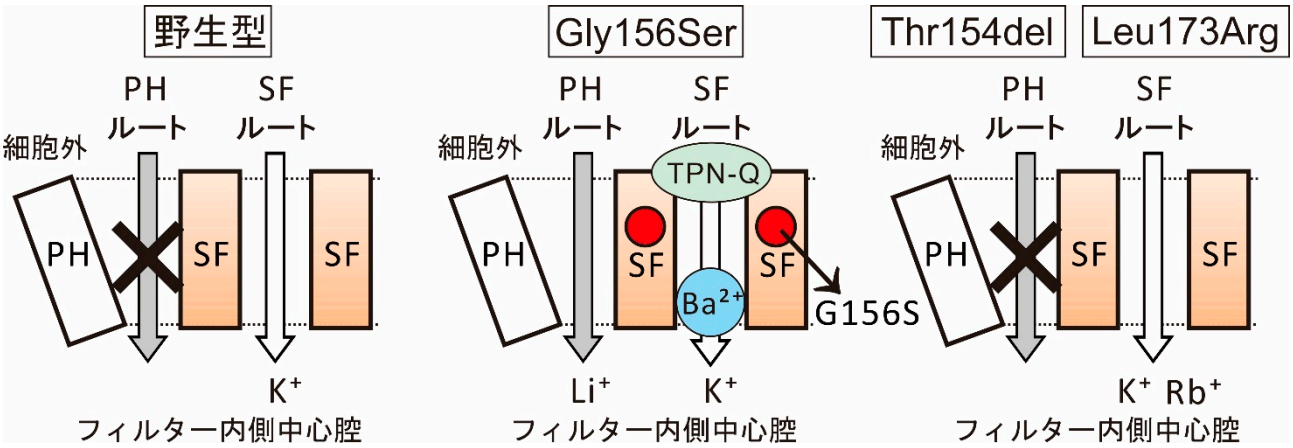
150　K⁺チャネル変異による遺伝性疾患の新規治療薬の探索	陳　以珊

【目的】GIRK チャネルはカリウムイオンを通す膜蛋白質の一種であり、脳の神経細胞の興奮や、心拍とホルモンの調節において重要な役割を果たしている。GIRK チャネルのサブユニット 2（GIRK2）は、中枢神経系の細胞に広く分布し、この分子をコードする *KCNJ6* 遺伝子の異変は、遺伝性疾患 Keppen-Lubinsky 症候群の原因であることが報告されている。Keppen-Lubinsky 症候群の患者は、重度の発育遅滞、知的障害、反射亢進・緊張亢進を伴い、小頭症と脂肪組織の減少による顔面異常の徴候を示す。患者から、GIRK2 チャネルのイオン選択性フィルター（SF）領域に Thr152del や Gly154Ser、第二膜貫通領域に Leu171Arg の異変が見つかり、チャネルのイオン選択性が異常であることがわかった。これまでの国内外の研究によって、Keppen-Lubinsky 症候群の原因が明らかになったが、GIRK2 の異変による異常なイオン選択性に繋がる SF の構造変化は未だに不明である。本研究の目的は、GIRK2 の種々異変による SF の構造変化を検証し、その異常のイオン選択性を正常化する新規制御機構による治療薬の探索である。我々は、GIRK2 変異体の異常なイオン選択性を是正することによって、過剰なイオン流入による細胞死をとめ、発育と代謝等の異常症状の進行を緩めることができると想定している。

【方法】本研究では、ヒト GIRK2 変異体に対応するマウス GIRK2 Thr154del、Gly156Ser と Leu173Arg 等異常なイオン選択性を示す変異体を部位特異的変異導入法により作製し、アフリカツメガエル卵母細胞を発現系として用い、種々の 1 価陽イオンのカリウムイオンに対する選択性を二電極膜電位固定法により電気生理学的解析を行った。

【結果】正常な GIRK2 はカリウムイオンに対する選択性が高いため、ほかのイオンは通り抜けない。それに対して、Gly156Ser 変異体はカリウムイオンに比してリチウムイオンとナトリウムイオンに対する選択性が高く、Thr154del と Leu173Arg 変異体はルビジウムイオンに対する選択性が高いことが明らかとなった。また、SF の構築するイオン透過路のブロッカーの投与により、Gly156Ser 変異体のイオン選択性が変わり、Thr154del と Leu173Arg 変異体のイオン選択性は変化しないことが観察された。これらの結果から、Gly156Ser の変異により、Thr154del や Leu173Arg 変異体とは異なる構造変化が起こり、通常の SF の構築するイオン透過路（SF ルート）とは異なるイオン選択性を持つ、第二のイオン透過路（ポアヘリックス PH ルート）が新たに形成された可能性が示唆された。本研究により、従来と全く異なる解釈である「新規イオン透過路の形成による異常のイオン選択性の発生」の新規制御機構の可能性が示唆された。この研究結果を基に、第二のイオン透過路の選択性阻害薬の同定によって、異常なイオン選択性を是正する Keppen-Lubinsky 症候群の新規治療薬の開発に繋がることが期待される。

GIRK2 チャネルの異変による異常なイオン選択性の構造基盤の想定モデル



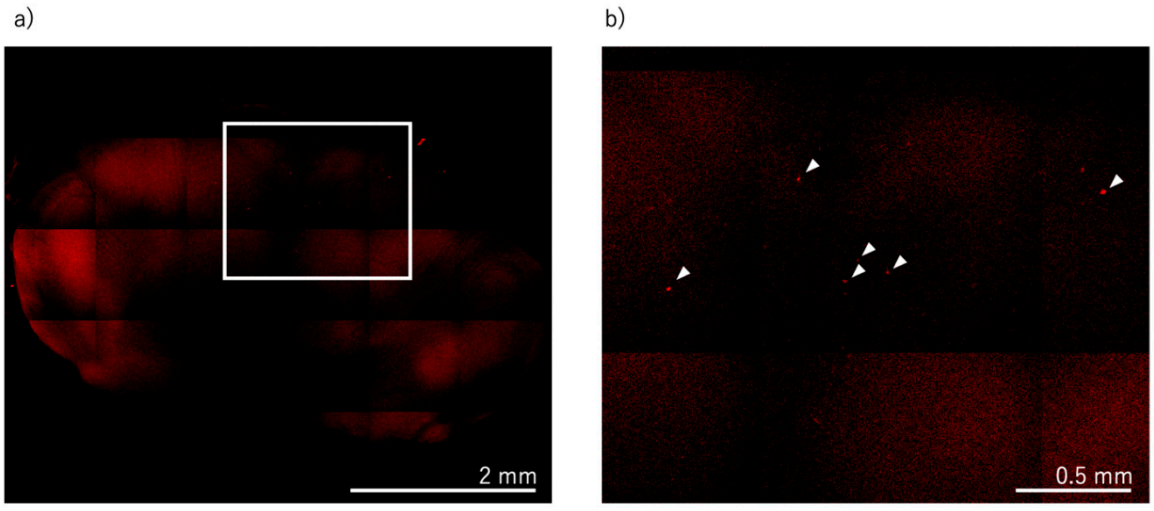
151　中枢神経による排便制御における脊髄の神経回路の解析	内藤　清惟

【目的】排便の制御は末梢性と中枢性の両方の調節を受けている。脳にある排便中枢が脊髄にある排便中枢を、脊髄の排便中枢が大腸の内在神経系をコントロールすることで、排便が制御されると考えられている。近年、過敏性腸症候群などのストレス性の排便障害が社会的に大きな問題となってきたことで、中枢神経系による排便の制御メカニズムの解明が重要視されるようになった。しかしながら、中枢神経系による排便制御の仕組みの解明はあまり進んでいない。我々は、これまで麻酔下のラットを用いた *in vivo* の実験法を用いて、脊髄による排便制御に着目した研究を行ってきた。本研究では、これまでの研究で明らかにしてきた脊髄排便中枢で作用する伝達物質が、脊髄または脳のどの領域から投射する神経に由来するのかを、逆行性トレーサーおよび蛍光抗体法を用いて組織学的に検討した。

【方法】実験には、SD 系統の雄ラット（250～300 g）を用いた。神経に蛍光タンパク質の mCherry を発現させるアデノ随伴ウイルスベクターを L6-S1 領域の脊髄に投与し、脊髄の排便中枢に投射する神経に mCherry を発現させた。4 週間回復させたラットに灌流固定を行い、脳と脊髄を摘出し 4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液で固定した。固定後、組織を 0.5 mm、1 mm、2 mm の厚さに切り出し、CUBIC-L 試薬によって脱脂・脱色し、CUBIC-R＋試薬によって屈折率を調整し、組織を透明化した。屈折率を調整した組織は、CUBIC-R＋試薬でマウントした。封入した組織は共焦点顕微鏡を用いて観察し、画像を取得した。一部のサンプルでは免疫蛍光染色も行った。脱脂・脱色後の組織を HEPES-TCS 緩衝液でブロッキングし、一次抗体と蛍光標識された Fab フラグメントの複合体を用いて組織に抗体を感作させた。抗体感作後、組織を洗浄・固定し、CUBIC-R＋試薬を用いて屈折率調整を行った。

【結果】脳の連続切片の透明化に適した切片の厚さを調べるために、0.5 mm、1 mm、2 mm 厚の脳切片を作製し検討した。0.5 mm 厚では連続切片を作製することが困難であり、2 mm 厚では透明化および共焦点顕微鏡での観察が困難であった。1 mm 厚で連続切片を作製したところ、厚さの安定した脳の連続切片を作製することができたため、以降の検討は 1 mm 厚の切片で行った。スライドグラスに封入した透明化組織標本を、共焦点顕微鏡を用いて観察・撮影し、画像を取得した。共焦点顕微鏡によって得られた画像上で、mCherry を発現した神経を確認することができた。このことは、L6-S1 領域に位置する脊髄排便中枢に脳から軸索を伸ばしている神経が存在することを示している。また、1 mm という非常に厚い組織スライスを観察に用いることで、標的細胞の 3 次元的な位置関係を知ることが可能となり、脊髄排便中枢を含む神経回路のより詳細な解析が飛躍的に進展することが期待できる。しかしながら、蛍光標識された神経を同定するためには、蛍光抗体を用いた免疫蛍光染色によって検討する必要がある。現在、蛍光抗体を用いた多重免疫染色を行い、mCherry と各種神経マーカーの共発現を検討している。

共焦点レーザー顕微鏡を用いた透明化組織標本の観察



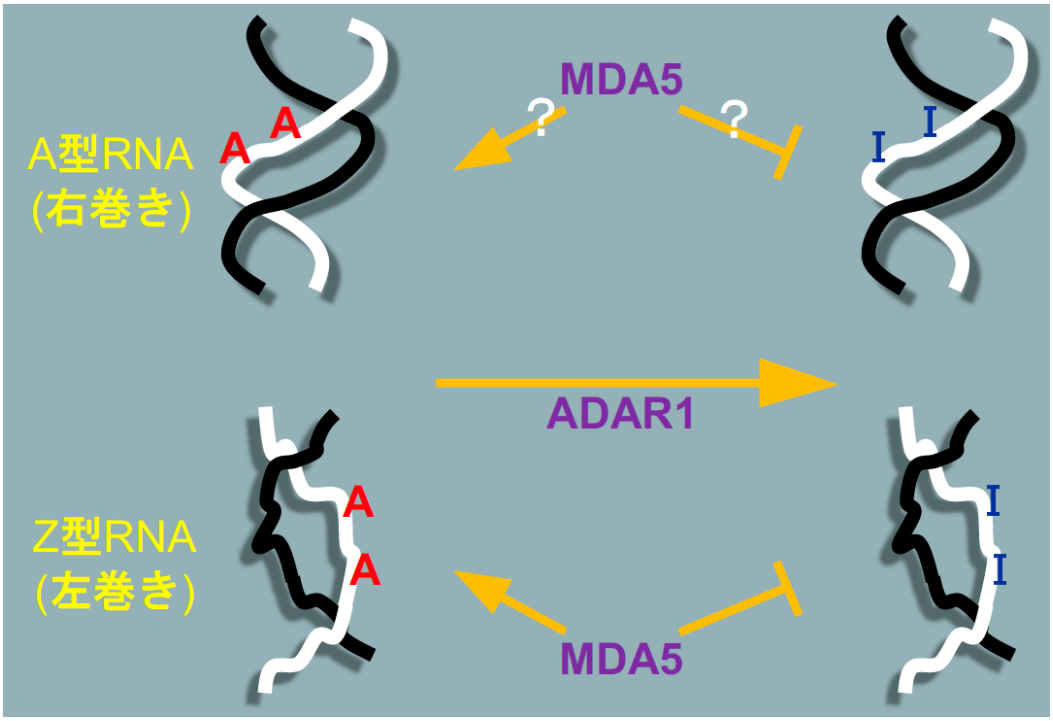
152　Z型RNA同定への挑戦とその生理的・病的意義の解明	中濱　泰祐

【目的】2 本鎖 RNA 中のアデノシンをイノシンへと置換する RNA 編集は ADAR1 により触媒され、2 本鎖構造を変えることで、内在 RNA がセンサー分子 MDA5 により異物として認識されることを回避する機構であると考えられている。この機構の破綻によって引き起こされる代表的な疾患として、エカルディ・グティエール症候群（AGS）が知られている。AGS は大脳基底核および白質の石灰化を特徴とする先天性脳症であり、*ADAR1* や *MDA5* などの遺伝子変異によって引き起こされるが、現状では、編集されなければ MDA5 を活性化する内在 2 本鎖 RNA は特定されていない。そこで、AGS 変異が Z 型 RNA 結合ドメインにおいても見つかっていることに注目し、Z 型構造を含む 2 本鎖 RNA の編集が MDA5 経路活性化の回避の鍵を握っているのではないかと着想した。しかし、左巻きの Z 型 RNA は、一般的な右巻きの A 型と比較すると不安定であり、今のところ生体内では同定されていない。そこで本研究では、RNA 編集を指標に、培養細胞を用いて生体内 Z 型 RNA を同定することに挑戦する。また、*ADAR1* 遺伝子に Z 型 RNA 結合能欠損型点変異をノックインしたマウスを解析し、Z 型 RNA の編集異常が AGS 病態の本質であることを明らかにする。

【方法】ゲノム編集により、ADAR1 を含むすべての RNA 編集酵素を欠損させた細胞株を樹立し、野生型あるいは Z 型 RNA 結合能欠損（W197A）変異型 ADAR1 コンストラクトを導入後、RNA-Seq にて編集部位を網羅的に解析した。また、*ADAR1* 遺伝子に W197A 変異をノックインした（W197A KI）マウスを樹立し、本マウスの表現型解析及び MDA5 活性化の有無について検証した。

【結果】培養細胞を用いた解析から、野生型に比べ、W197A 変異型では有意に RNA 編集効率が低下していることが明らかになった。また、W197A KI マウスは著しい発育不良を示し、脳をはじめとする様々な臓器においてインターフェロン誘導遺伝子群（ISG）の発現上昇が認められた。さらに、本マウスと MDA5 KO マウスを交配させたところ、これらの異常は正常化することが判明した。

MDA5 活性化の鍵を握るのは Z 型 RNA に生じる RNA 編集?



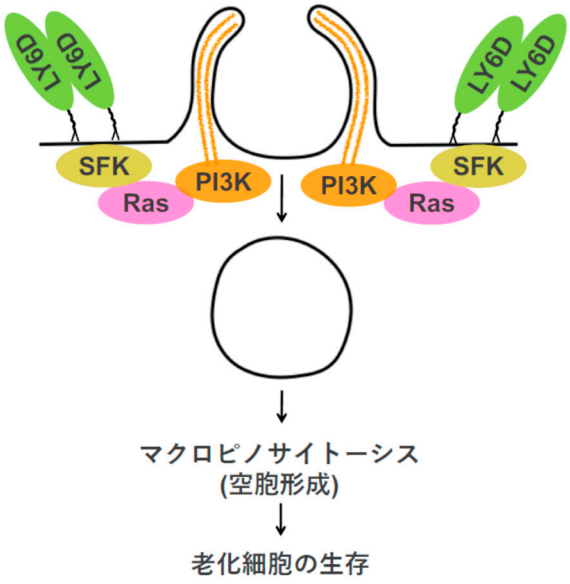
153　老化細胞の生存機構阻害による老化細胞除去法の開発	長野　太輝

【目的】近年、老化関連疾患の発症の原因として「細胞老化」が注目されている。老化細胞を体内から除去できるように遺伝子改変したマウスにおいて心血管疾患や認知症といった老化関連症状の改善および寿命の延長が見られたことから、体内の老化細胞を除去することが老化関連疾患の有効な治療法となる可能性が示されている。現在、老化細胞に細胞死を誘導することで体内から除去する薬剤の探求が盛んに行われているが重篤な副作用が発生することなどから実用化には至っていない。この課題を克服するためには、老化細胞で特異的に働いている生存維持メカニズムを阻害し、細胞死を誘導するための標的因子の同定が必要である。そこで本研究では、我々が独自に同定した老化細胞特異的な遺伝子である *LY6D* を標的とした老化細胞除去法の開発の基盤となる実験を行う。我々は現在までに、LY6D が老化時に発現上昇し Src Family Kinase（SFK）および Ras を介してエンドサイトーシスの一種であるマクロピノサイトーシスを誘導することを見出している。マクロピノサイトーシスは Ras 変異がん細胞において周囲の細胞外液を大量に取り込むことにより細胞の生存に必要な栄養分の補充を行っていることが報告されている。老化細胞はがん細胞と同様に高い代謝活性を持ち、生存に多量のエネルギーを必要とすることが知られているため、老化誘導に伴うマクロピノサイトーシスを阻害した際の細胞生存率の変化を解析する。また、LY6D がマクロピノサイトーシスを誘導する詳細な分子メカニズムも解析する。

【方法】LY6D がマクロピノサイトーシスを誘導する分子メカニズムについて、Ras 変異体を発現させた細胞における空胞形成率を調べた。また、LY6D が細胞膜上で相互作用する因子を同定するため、エピトープタグを付加した LY6D を細胞に過剰発現させた後、タグ抗体で免疫沈降を行い質量分析に供した。さらに、LY6D が誘導するマクロピノサイトーシスと細胞生存との関連を調べるため、LY6D をノックダウンした老化細胞における細胞生存率を測定した。

【結果】LY6D は SFK−Ras−PI3K 経路を活性化することでアクチンの重合を促進し、マクロピノサイトーシスを誘導することが明らかとなった。また、LY6D と細胞膜上で相互作用する因子として 30 種類の候補タンパク質を同定した。さらに、老化細胞は LY6D が誘導するマクロピノサイトーシスにより細胞外液中の物質を取り込み、栄養源として用いることで低栄養状態での生存を維持していることが明らかとなった。

LY6D によるマクロピノサイトーシス誘導のモデル図



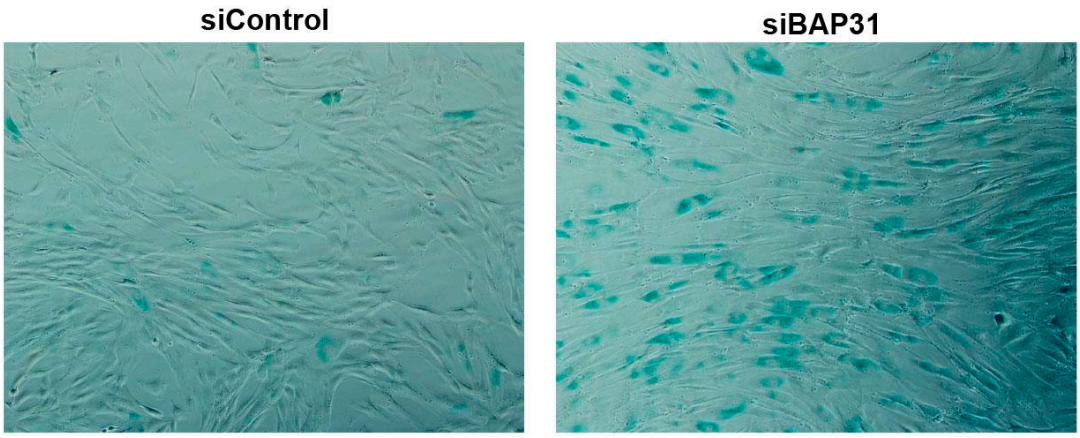
154　オルガネラコミュニケーションの破綻と老化機構の解析	難波　卓司

【目的】老化を遅らせ、若々しく健康に生きることは人類の共通の願いであるが、老化とは何か？何故老化するのか？という根本的な生命現象の答えは見つかっていない。私達の身体の最小の構成単位は細胞であり、細胞の老化に注目した細胞老化のメカニズムを明らかにすることで身体の老化の謎を解決しようと様々な研究がなされ老化細胞を除去することでマウスにおいては寿命が延長されることが分かり、老化は治療できる病気ではないかと注目されている。一方で細胞老化によりミトコンドリアの機能低下することが知られているが、老化によるミトコンドリアの機能が低下する機構、またミトコンドリアの異常が細胞老化を引き起こす機構はほとんど解明されていない。さらに小胞体ーミトコンドリア情報交換機構については全く解析されていなかった。そこで本研究では細胞老化の新たな誘導機構として小胞体ーミトコンドリア情報交換の破綻が関与しているのか、またその機構を解明することで老化細胞の形成防止と除去のための新たなターゲットの発見を目的とする。

【方法】遺伝子の発現変化を RNA-seq 法、qPCR 法、及びイムノブロット法により調べた。細胞老化については SA-β-gal 染色を用いて調べた。タンパク質複合体については免疫沈降法、タンパク質局在解析は細胞分画法を用いた。

【結果】NG1RGB 細胞（ヒト新生児由来、有限寿命）を培養期間 80 日以上の細胞（80d 細胞）について解析したところ、小胞体とミトコンドリア間のオルガネラコミュニケーション機構に重要な BAP31（小胞体局在）ーTom40（ミトコンドリア局在）複合体を調べたところ、この複合体が崩壊していることが示唆された。そこでミトコンドリアの機能維持に重要な BAP31 の発現を抑制し続けたところ、コントロールに比べて細胞老化が促進していることが明らかになった。さらに老化によりミトコンドリアタンパク質の局在が変化していることを発見し、これらのタンパク質がどのように細胞老化のシグナルに関与しているかを解析していった。

BAP31 の発現抑制は細胞老化を促進する（SA-β-gal 染色：老化細胞のマーカー）



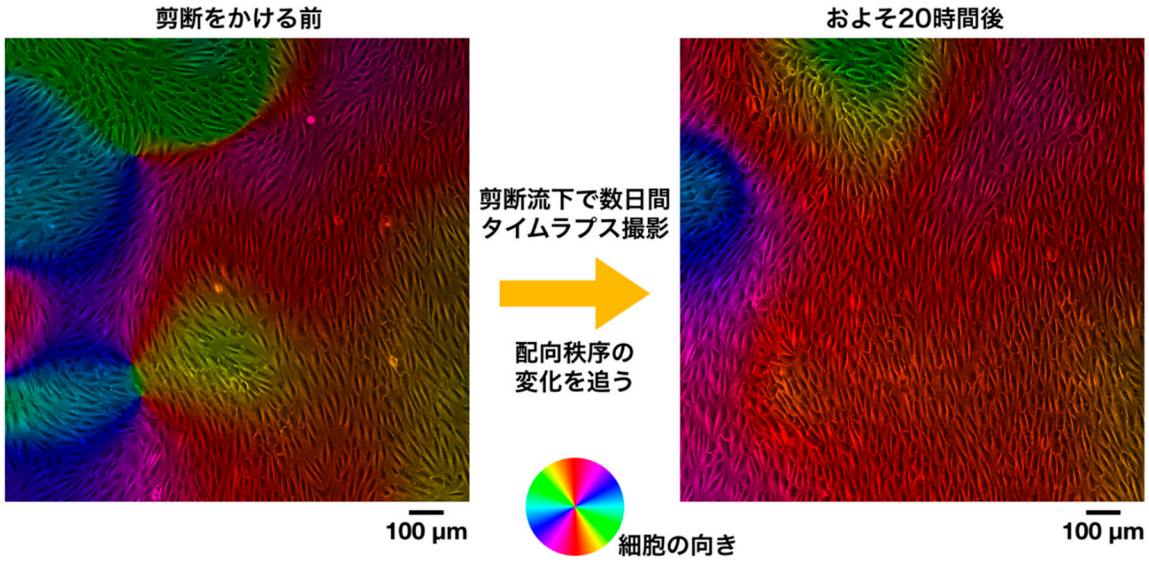
155　細胞集団運動の示すマクロ応答の定量計測	西口　大貴

【目的】多細胞生物の発生や生体組織の恒常性、血管新生などの生理現象の理解は生命科学・医学の重要課題である。これらの現象には、細胞の集団移動という共通点がある。一方で非平衡統計物理学において近年、細胞のような自己駆動する要素の集団を記述するアクティブマターという枠組みが整いつつあり、生命科学上重要な多細胞生命現象の理解への応用が期待されている。本研究では、集団運動が外場と結合した場合の理論の構築の足がかりとするため、集団運動の外場への応答を実験的に調査した。細胞集団の外場へのマクロな応答の定量計測を、血管の細胞の剪断流への応答を利用して行うことで、外場への応答を自然かつ現実に応用可能な形でアクティブマター理論に組み込む手がかりとなる実験結果を得ることを目的とした。

【方法】題材としてヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）を用いた。培養皿上を這い回る HUVEC は、その細長い細胞体のために、隣接する細胞同士が向きを揃えようとする相互作用を示す結果、ネマチック液晶に類似のトポロジカル欠陥の存在する集団運動パターンを示す。加えて、血管の細胞である HUVEC は、血流のような剪断流の向きに大域的に向きを揃える。この性質をアクティブマター研究に活用し、微小流体デバイス内で HUVEC を培養し、そこに剪断流を外場として加えることで、細胞集団が応答し向きを揃える過程での細胞配向と位相欠陥のダイナミクスを解析した。

【結果】微小流体デバイス内でまず静置して育てた細胞集団に、一方向の剪断流をくわえた結果、初めはトポロジカル欠陥の多数存在し全体としては向きの揃っていない状態であった細胞集団が、時間とともに剪断流の向きに大域的に向きを揃えていく非平衡ダイナミクスを観察できた。配向場を定量的に解析することで、向きを揃える過程でトポロジカル欠陥同士が頻繁に対消滅する過程や、単体のトポロジカル欠陥の外場中で運動する様子も捉えることができた。

剪断流下での細胞配向の秩序化



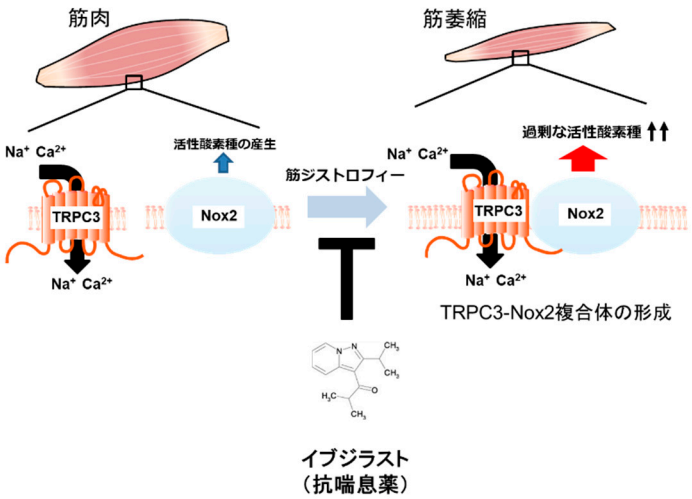
156　TRPC3-Nox2複合体形成と筋ジストロフィー治療への応用	西山　和宏

【目的】Transient receptor potential（TRPC）タンパク質は、神経液性因子受容体刺激やジアシルグリセロール産生によって開口活性化し、細胞外の物理的・化学的情報を細胞内に伝達する Ca^{2+}透過型チャネルタンパク質として知られているが、他のシグナルタンパク質と複合体を形成し、酸化・リン酸化へのシグナル変換・増幅を制御する足場的役割も担っている。当研究グループは、心不全の原因となる心筋萎縮や線維化の形成過程において、TRPC3 と活性酸素（ROS）産生酵素 NADPH oxidase（Nox2）との複合体形成を伴う過剰な ROS の産生が関与することを明らかにした。さらに、細胞外の ATP を介した P2Y2 受容体（P2Y2R）の活性化が複合体形成に寄与することを示した。加えて、TRPC3 - Nox2 複合体を評価する独自のスクリーニング系を構築し、既承認薬を用いたスクリーニングにより、PDE4 阻害剤であるイブジラストが TRPC3 - Nox2 複合体形成を阻害することを見出し、イブジラストが抗がん剤による筋委縮を抑制することを明らかにした。一方で、筋ジストロフィーは、筋線維の破壊・ 変性（筋壊死）と再生を繰り返しながら、次第に筋萎縮と筋力低下が進行していく遺伝性の筋疾患である。疾患の原因となるタンパク質が多数発見されているが、筋萎縮の形成過程における病態特異的タンパク質間相互作用は明らかにされておらず、有効な治療法も確立されていない。筋ジストロフィーでは、細胞からの ATP 放出が亢進しており、細胞外の ATP 濃度が上昇していることや Nox2 活性が異常亢進していることが知られており、TRPC3 - Nox2 複合体形成が病態発症の起点となっている可能性が高い。そこで本研究ではイブジラストの筋ジストロフィーに対する有効性を検証し、TRPC3 - Nox2 複合体の筋ジストロフィーにおける役割を明らかにした。

【方法】野生型 C57BL/10 およびデュシェンヌ型筋ジストロフィーモデル（X-chromosome-linked muscular dystrophy（mdx））マウス（4 週齢）にイブジラスト（10 mg/kg/day）を含んだ浸透圧ポンプを腹腔内に埋め込むことで持続投与した。4 週間後のマウス臓器重量、筋力（Hanging Wire test）、血中パラメーターを測定した後、遺伝子発現量の評価、近接ライゲーションアッセイ（PLA）による TRPC3 - Nox2 複合体形成率の評価を行った。

【結果】イブジラストは mdx マウスの筋萎縮マーカーMuRF1 発現量を低下させた。イブジラストは mdx マウスの Hanging time と筋損傷マーカー（Creatine Kinase（CK））値を改善した。イブジラストは mdx マウス骨格筋細胞膜における TRPC3 - Nox2 複合体形成率を減少させた。以上の結果より、イブジラストは筋ジストロフィーの主な病態である筋損傷、萎縮に効果があることが示唆された。

本研究結果のまとめ



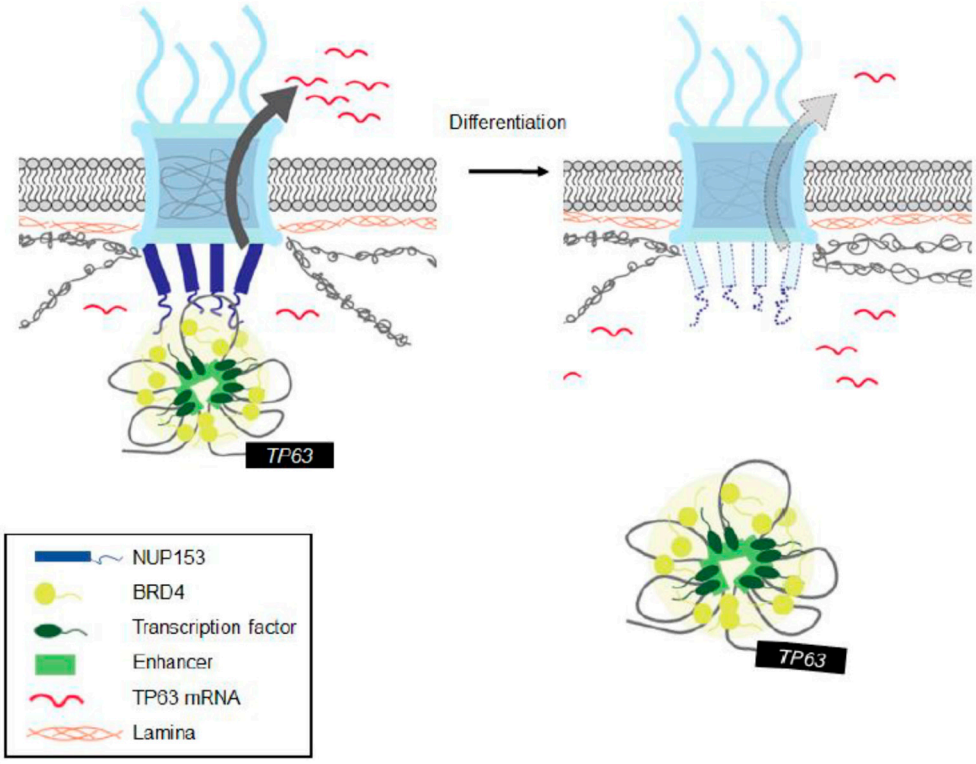
157　がん悪性化の根幹スーパーエンハンサー形成機構の解明	羽澤　勝治

【目的】スーパーエンハンサー（SEs）は遺伝子発現を強力に誘導するゲノム構造であり、がん悪性化シグナルの根幹をなす遺伝子発現ネットワークを確立する。核膜孔近傍に局在する SEs は、mRNA の核外輸送効率が高く、遺伝子発現に最適な環境（Gene-gating）であることがごく最近報告された。そのような核構造と結びついた SE の核内動態とその制御機序については不明である。本研究は、SE の形成因子であるとともに、SE 依存的に誘導されるがん遺伝子 TP63 に注目し、SE 形成機序を解明することを目的とした。

【方法】DNA-FISH 法、RNA-FISH 法、免疫蛍光染色法を組み合わせ、SE ならびに TP63 特異的 SE の核内空間における局在解析を行った。SE の局在制御における核膜孔構成因子 NUP153 の役割を調べるために、遺伝子干渉実験を行った。また、NUP153 と SE 領域ゲノム相互作用を調べるために ChIP-seq を実施した。

【結果】NUP153 との相互作用により、TP63 特異的 SE を含めた約 20%の SE は核膜周縁に局在し、TP63 - mRNA 核外輸送の効率が高く、遺伝子発現に有利な環境であることが明らかとなった。NUP153 をノックダウンした細胞では、SE が核膜孔近傍から核内へ移動し、TP63 の発現量は減少した。共焦点顕微鏡による NUP153 と SE 構成タンパク質の共局在化は観察できるが、免疫沈降法では、これら相互作用は検出できなかった。そこで、タンパク質に存在する天然変性領域（IDRs）を介した弱い分子間相互作用を再構成できる LAIP 法を創出し、分子間相互作用について調べた。LAIP 法により、NUP153 - BRD4 の相互作用が認められた。ChIP-seq 法による NUP153 のゲノム作用領域を解析したが、NUP153 が作用する近傍遺伝子の転写活性は NUP153 にほぼ依存しないことがわかった。これらより、相分離を介したタンパク質相互作用により、NUP153 は SE 形成と機能制御に関わることが明らかになった。

核膜孔複合体による SE 形成と機能制御メカニズム



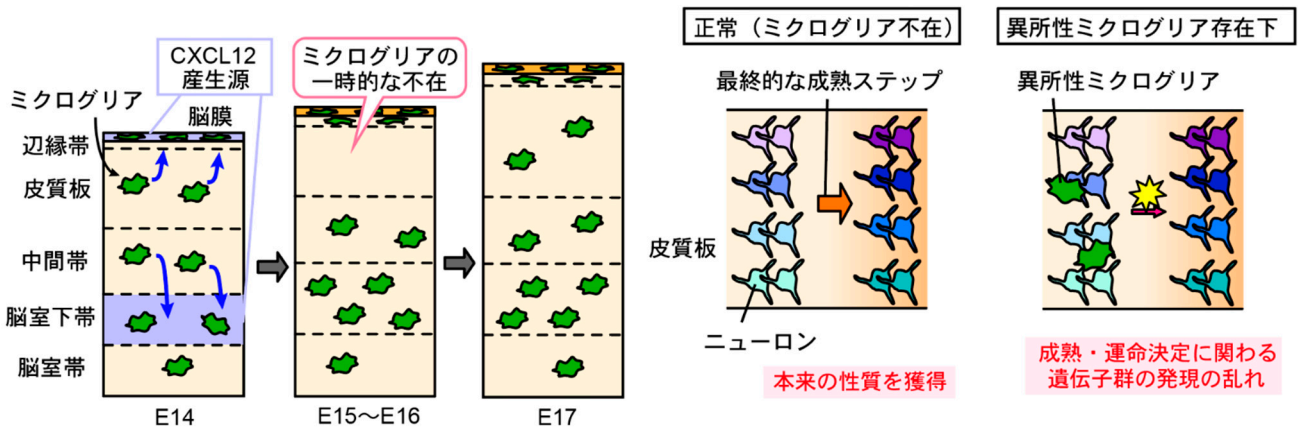
158　ニューロンの適切な個性化とミクログリア分布の関連性	服部　祐季

【目的】胎生期の大脳実質において、ミクログリアは胎齢の進行に伴い分布変化を示す。すなわち、マウス胎生 14 日目（E14）までは大脳実質全体に均一に存在しているが、E15 から E16 において皮質板から不在となる。そして、E17 以降には再び皮質板に分布する。そこで本研究では、ミクログリアが胎生中期皮質板から一過性に不在となる分子メカニズム、および、その生理学的意義について明らかにすることを目指した。

【方法】ミクログリアが皮質板から不在となる現象を理解するため、ミクログリア可視化 CX3CR1-GFP マウスの脳スライス培養下ライブイメージングを行った。その結果、ミクログリアは E14 で最も活発に動き、脳実質内を両方向に移動する傾向を見出した。ミクログリアの移動に関わる分子候補として CXCL12/CXCR4 を同定し、*Cxcr4* $^{-/-}$ マウスを用いたライブイメージングおよび組織学的解析を通じて、CXCL12/CXCR4 の相互作用がミクログリアの移動や分布に関わる可能性について検証した。次に、ミクログリアが胎生中期皮質板から離脱する意義を問うため、この時期にミクログリアを皮質板内に強制的に配置させることを試みた。例えば、脳スライスの髄膜側に CXCL12 ビーズを配置する方法、単離したミクログリアを直接皮質板に移植する方法、*in vivo* で皮質板へと移動を終えたニューロン特異的に CXCL12 を過剰発現させミクログリアを誘引する方法を選択した。ミクログリア近傍のニューロンへの影響を組織学的に解析した結果、ニューロンの機能成熟に関わる重要な遺伝子群の発現に乱れが生じていることを見出した。さらに、ミクログリアと共培養したニューロンについて RNA シークエンス解析を行い、ニューロンの成熟を乱すミクログリア由来分子を探索した。その結果、1 型インターフェロン（IFN-I）とインターロイキン 6（IL-6）が候補として浮上した為、上述の *in vivo* でミクログリアを強制的に皮質板へと誘引する方法と、候補分子に対する中和抗体の脳室投与を組み合わせ、その分子の関与について検証した。

【結果】ライブイメージングの結果、ミクログリアは E14 において脳実質内を両方向に移動する性質を有することを発見し、皮質板内に存在するミクログリアは髄膜方向へと、中間帯に存在するものは脳室方向に向かって移動することが分かった。そして、ミクログリアが髄膜および脳室下帯が産生する CXCL12 を感知して移動した結果、皮質板から離脱することを明らかにした。また、本来皮質板から不在となる胎生中期にミクログリアを皮質板へと強制的に配置すると、近傍のニューロンにおいてⅡ～Ⅳ層ニューロンマーカーである Satb2 や Cux1 等の発現が異常に高まり、逆に Ctip2 等のⅤ層ニューロンマーカーの発現は低下することを見出した。さらに、この発現変化をきたす要因としてミクログリア由来の IFN-I と IL-6 を同定した。以上の結果は、ミクログリアが一時的に皮質板から離れることによって皮質板に存在するニューロンの適切な成熟の進行を乱さないように自身の居場所を調節していることが示唆された。

胎生中期皮質板内の異所性ミクログリアはニューロンの成熟ステップを乱す



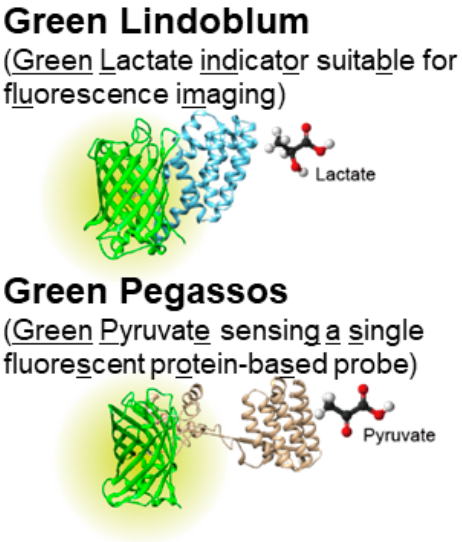
159　蛍光タンパク質センサーを用いた神経代謝活動の解析	原田　一貴

【目的】アストロサイトは脳内に最も豊富に存在するグリア細胞で、血液由来のグルコース、また自身で産生された乳酸をニューロンに供給すると言われている。ニューロンが過興奮して起こるてんかんなどの発作時には、ニューロン内でのクエン酸回路の阻害と乳酸濃度の上昇、さらに血液中への乳酸放出が報告されている。このことから研究代表者は、「アストロサイトからニューロンへのグルコースと乳酸の供給、およびニューロンでの適切な代謝が阻害されることがてんかん発作の発症に関与する」のではないかと考えているが、脳において個々の細胞のグルコース代謝関連分子の動態を観察する手段がないことがこの仮説を検証する上でのボトルネックとなっている。そこで、グルコース、ピルビン酸、乳酸の濃度変化に応答して輝度が変化する単色蛍光タンパク質センサーの開発と多色化を行い、ニューロンおよびアストロサイトでの代謝制御機構を分子レベルで理解することを目的とした。

【方法】蛍光タンパク質を分割し、乳酸やピルビン酸に対する結合ドメインを遺伝子工学的に融合した。両者の間のリンカーの長さやその配列を最適化することで、最適な蛍光輝度変化を示すセンサーを構築した。さらに、開発した各種センサーをニューロンまたはアストロサイトに発現させるためのウイルスベクターを作製し、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸を投与した際の細胞内乳酸、ピルビン酸、ATP、グルコース動態を観察した。

【結果】現在までに緑色乳酸センサーと緑色ピルビン酸センサーの開発に成功し、それぞれ Green Lindoblum（Green Lactate indicator suitable for fluorescence imaging）、Green Pegassos（Green Pyruvate sensing a single fluorescent protein-based probe）と命名した。Green Lindoblum は乳酸存在下で蛍光輝度が 5.2 倍、Green Pegassos はピルビン酸存在下で蛍光輝度が 3.3 倍に上昇し、ヒト胎児由来細胞株 HEK293T 細胞やヒト子宮頸がん細胞株 HeLa 細胞においても乳酸やピルビン酸に応じて蛍光輝度が上昇した。さらに、レンチウイルスベクターやアデノ随伴ウイルスベクターを用いて各種センサーをニューロンまたはアストロサイトに発現させ、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸を投与したところ、アストロサイトにおいて Green Lindoblum は蛍光輝度の低下を示し、先行研究で開発された緑色グルコースセンサーGreen Glifon 4000 では変化が見られなかった。また、ニューロンにおいては Green Glifon 4000、および先行研究で開発された緑色 ATP センサーMaLionG いずれも蛍光輝度の低下を示した。従来、ニューロンの興奮時にはアストロサイトから乳酸が供給され、ニューロンの ATP 需要を賄うとされてきたが、本研究の結果ニューロンが活性化されてもアストロサイトで乳酸産生は促進されておらず、ニューロンでの ATP 産生も促進されていない可能性が示された。

本研究で開発した Green Lindoblum と Green Pegassos の模式図



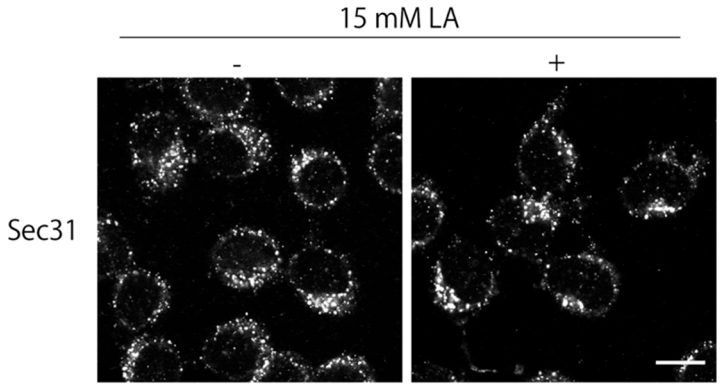
160　小胞体出芽部位の局在は分泌機能と関連するか？	馬場　崇

【目的】分泌タンパク質は小胞体内で合成されたのち、小胞体上の特別なドメインである ER exit site（ERES、小胞体出芽部位）から COPII 被覆小胞に詰め込まれ、ゴルジ体を経由して細胞外、もしくは細胞内の様々な膜区画へ運ばれる。1 細胞あたり数百個存在する ERES は、小胞体上に一様に存在するわけではなく、以下の二種類に大別される。ゴルジ体近傍に凝集した ERES（GERES）と細胞質に点状に散らばった ERES（CERES）である。CERES から出芽した小胞は、GERES から出芽した小胞に比べて、ゴルジ体まで長距離移動する必要がある。しかしながら、GERES と CERES の機能的差異に関する知見はほとんどない。細胞外の pH の低下は小胞体―ゴルジ体間輸送を遅延させることから、分泌経路における細胞外環境の重要性が増しつつある。腫瘍内では、がん細胞が解糖系亢進により多量の乳酸を産生・分泌し、結果、酸性環境である。乳酸は pH の低下だけでなく、腫瘍内に浸潤したマクロファージに作用し、*VEGFA* や *IL23A* の遺伝子発現の増加を引き起こす。一方で、乳酸がマクロファージの ERES の局在やタンパク質分泌に与える影響、また、分泌経路の各々の膜区画に与える影響は詳細に解析されていない。今回、1. 高乳酸環境における ERES の局在変化と小胞輸送との相関関係の解明、2. ERES が小胞体上を移動する分子機構の解明を試みた。

【方法】マクロファージ 様細胞株である J774.1 細胞を用いて乳酸存在下における ERES 及びその他分泌経路のオルガネラの細胞内局在や形態を免疫染色及び共焦点顕微鏡により観察した。さらに HeLa 細胞を用いた COPII タンパク質の発現抑制により ERES 局在を決定するタンパク質を探索した。

【結果】非乳酸存在下において、球状の J774.1 細胞の ERES は、主に核以外の領域に点状に局在していた。加えて、一部の細胞では核近傍に ERES が集積していたが、その割合は少なかった。これは細胞の形態が丸い影響か、もしくは細胞種差によるものであると考えられる。一方で、乳酸添加によりゴルジ体付近の ERES（GERES）の割合が多くなり、また数も少なくなった。乳酸が ERES の局在に何かしらの影響を与えることが示唆された。また、細胞膜―エンドソーム間をリサイクリングするトランスフェリン受容体は、乳酸により核近傍の局在が増加した。HeLa 細胞を用いた実験では Sec23 以外の COPII 因子も ERES 局在に寄与することが分かった。

乳酸存在下における J774.1 細胞の ERES の局在



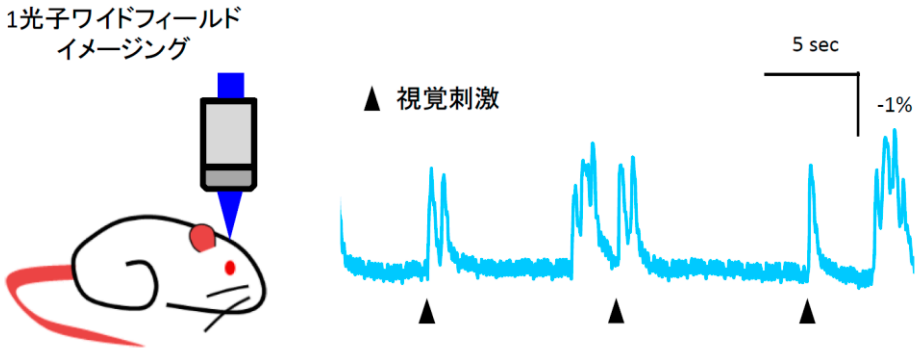
161　自閉症における社会性障害の神経メカニズム	阪東　勇輝

【目的】自閉症は、他者への無関心、他者との意思疎通の困難などの社会性障害を伴う。社会性が障害されるメカニズムの解明は、自閉症の治療戦略を確立し、自閉症患者が社会生活を送れるよう効果的な支援を可能にするために必要不可欠である。これまでに、自閉症関連遺伝子をノックアウトした自閉症モデルマウスでは、細胞レベルから局所神経回路レベルに至るさまざまな階層で異常が認められているが、これらの異常がどのように社会性障害につながるか、未だ明らかではない。それは、社会性行動は、感覚野、前頭前野、運動野など、大脳皮質及び大脳辺縁系、大脳基底核など、様々な領野が協調して引き起こされると考えられるが、社会性行動中の領野間相互作用は調べられていないからであると考えられる。そこで、野生型および自閉症モデルマウスにおいて、社会性行動中に大脳皮質の各領野の入出力特性を記録し、領野間相互作用を比較し、自閉症モデルマウスにおいて、社会性行動が障害されるメカニズムの解明を目指した。本研究では、まず、社会行動中のマウス大脳皮質の複数の領野から神経活動を記録するための技術開発を行った。

【方法】まず、標準的な分子生物学的手法を用いて緑色蛍光膜電位プローブ、ArcLight-MT を改良した。次に、ArcLight 変異体を、海馬初代培養神経細胞において 1 光子イメージング法を用いてテストした。これらの ArcLight 変異体を、子宮内電気穿孔法を用いてマウス大脳皮質 2/3 層神経細胞に発現させた。その後、生後 35～60 日齢において、1 光子ワイドフィールド、2 光子イメージング法を用い、麻酔下のマウスにおいて *in vivo* で視覚入力を記録した。

【結果】まず、シナプス入力を高感度に検出できる膜電位プローブの開発を行った。これまでの研究から、ArcLight-MT が 1 光子、2 光子イメージングの両方の手法でシナプス入力を検出することができることが明らかになった。そこで、本研究では、ArcLight-MT に突然変異を導入し、シナプス入力に対する感受性がより高い ArcLight-ST を開発した。ArcLight-ST は、1 光子ワイドフィールドイメージング法で広視野のシナプス入力の時空間分布をより高感度に可視化でき、2 光子イメージング法を用いた単一細胞レベルの高感度なシナプス入力検出に成功した。現在、膜電位イメージング法と Ca^{2+}イメージング法と組み合わせることで、大脳皮質全体から入出力を同時記録する技術開発を行っており、社会行動中のマウスへの適用を目指している。

新規蛍光膜電位プローブ、ArcLight-ST を用いたワイドフィールドイメージング



162　変形性関節症治療薬開発に向けた基盤研究	村山　正承

【目的】軟骨細胞は異化・同化作用により軟骨組織の恒常性を維持する。関節軟骨の損傷により生じる骨組織の変性や変形が特徴的な骨代謝疾患である変形性関節症は高齢化社会・生活習慣病が深刻化する日本では症状のある患者が約1,000 万人、潜在的な患者が 3,000 万人と推定され、早急に解決すべき医療課題の一つである。その治療には主に保存療法や手術療法が選択されるが根治療法が確立しておらず、治療薬・治療法の開発に向けた軟骨細胞制御機構の更なる理解が必要とされる。再生医療研究の発展に伴い再生医療技術による治療法の開発が進められているが、患者由来の幹細胞は増殖能が低いことが知られる。CTRP3 は軟骨細胞増殖活性を有することが知られていたが、その受容体は明らかでなかった。本研究では軟骨細胞株 ATDC5 を用いて CTRP3 受容体の同定を試みた。

【方法】軟骨細胞株 ATDC5 細胞を用いて、軟骨細胞増殖における CTRP3 受容体の同定を試みた。受容体候補である PAQR 受容体ファミリーの遺伝子発現解析、RNA 干渉による遺伝子発現制御を行い、CTRP3 受容体としての PAQR 受容体ファミリーを評価した。

【結果】本研究により、CTRP3 は軟骨細胞の増殖を、PAQR2 を介して制御していることを明らかにした。CTRP3 受容体の同定は世界で初めてのことである。本研究成果は *Translational and Regulatory Sciences* 誌にて発表した。

CTRP3 は受容体 PAQR2 を介して軟骨細胞の増殖を制御する

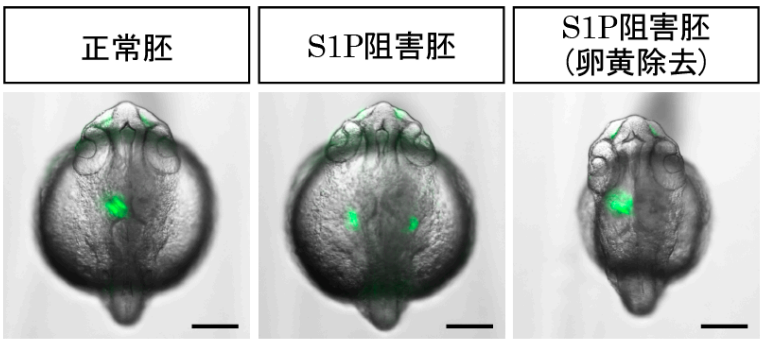
163　初期心臓形成における物理的特性の寄与の解析	森田　仁

【目的】脊椎動物の心臓は胚発生初期に側板中胚葉から分化した心臓前駆細胞が、正中線に向かって移動・融合し、さらにその後の形態変化を経て形成される。心臓前駆細胞の正中線への移動は、正常に進行しない場合心臓が左右に分かれた二股心臓を形成し個体は致死となるため、初期発生における重要なステップの一つである。心臓前駆細胞の移動についてはこれまで、内胚葉が前駆細胞の移動の足場として機能することが重要であると考えられてきており、スフィンゴシン-1-リン酸（S1P）シグナルが前方内胚葉の維持に必要であるというモデルが提唱されている。しかし、内胚葉が心臓前駆細胞の足場として機能していることを明確に示す知見はまだ報告されておらず、S1P シグナルが前方内胚葉に特に作用する理由もよくわかっていない。本研究では、心臓形成に関するこれまでの知見から、細胞・組織の物理的特性がこの現象に寄与している可能性を着想し、その検証を行うことで心臓形成時の細胞移動メカニズムの解明を目指すこととした。

【方法】心臓前駆細胞の移動における細胞・組織の物理的特性の重要性について検証を行うために、本研究では、1. ライブイメージングによる細胞移動の継時的な観察・定量化、2. 胚操作実験による心臓前駆細胞周辺の組織が物理的な障壁になる可能性の検証、3. 細胞・組織の物理的特性の測定のための単離条件の確立を行った。

【結果】共焦点顕微鏡を用いたライブイメージングによって心臓前駆細胞が移動して正中線で融合するまでの過程を細胞レベルで観察する系を確立し、S1P シグナル阻害胚でも心臓前駆細胞が正常胚と大きく変わらない速度で移動することを見出した。一方で S1P シグナル阻害胚では前駆細胞の移動方向に異常が見られ、これらのことは心臓前駆細胞が正中線に向かって移動できなくなるような物理的な障壁の存在を示唆するものと考えられた。心臓前駆細胞の移動経路において物理的な障壁となりうると考えられるものは神経管と卵黄嚢であったため、本研究では卵黄嚢の内容物である卵黄を大部分除去することによって障壁を取り除くことを試みた。その結果、卵黄を除去した S1P シグナル阻害胚では心臓前駆細胞が正中線まで到達して融合することがわかり、さらにその胚は拍動し形態的にも正常と見られる心臓を形成することを発見した。これらの結果は、心臓前駆細胞とその周辺の組織の相対的な硬さが適切でないと前駆細胞が正中線に到達できないという可能性を示唆していたことから、その可能性を検証するために各細胞・組織の硬さを計測することとし、まず検証の対象となる細胞・組織の単離を試みた。

卵黄の除去による心臓前駆細胞移動のレスキュー



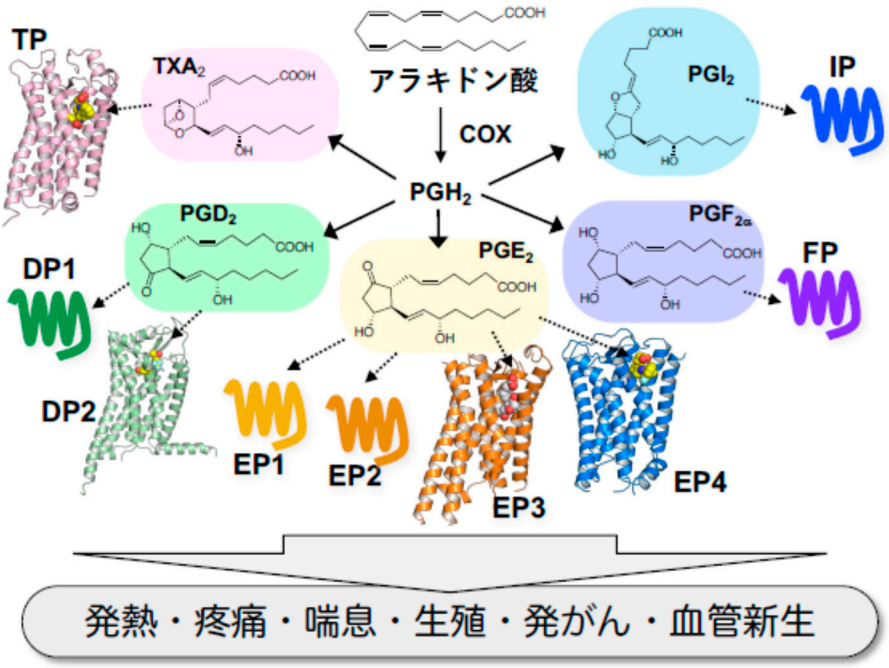
164　プロスタグランジン創薬に向けた受容体の立体構造解析	森本　和志

【目的】プロスタグランジン（PG）類は細胞膜リン脂質中のアラキドン酸から産生される脂質メディエーターであり、発熱や痛覚過敏などの炎症応答を初めとして、生殖・がん・骨形成・肥満・高血圧・ストレス応答など様々な生理・病態生理に関わる。PG 類には主なものとして PGD_2、PGE_2、$PGF_{2\alpha}$、PGI_2、トロンボキサン（TX）A_2の 5 種類が存在し、その受容体は DP1、DP2、EP1～4、FP、IP、TP の 9 種類の GPCR が存在する。これまで PG 受容体の立体構造解析は他の GPCR に比べ遅れていたが、最近になってアンタゴニスト結合型 DP2 の結晶構造がまず報告され、続いてアンタゴニスト結合型 TP の結晶構造が報告された。我々のグループでは EP 受容体の結晶構造解析に取り組み、アンタゴニストおよびシグナル抑制抗体を結合した不活性型 EP4 を分解能 3.2 Åで、内因性アゴニストである PGE_2が結合した活性型様 EP3 を分解能 2.9 Åでそれぞれ決定した。本研究では PG 受容体を対象とした創薬をより加速するため、立体構造未決定の PG 受容体の立体構造を決定することを目的とした。

【方法】FSEC-TS 法により可溶化した受容体の熱安定性を指標に受容体発現コンストラクトのスクリーニングを行った。決定したコンストラクトを昆虫細胞（Sf9）で発現し、精製・結晶化を行った。精製試料については SDS-PAGE、ゲルろ過クロマトグラフィー、CPM assay により評価した。また Sf9 で発現した EP4 受容体および G$\beta\gamma$、大腸菌で発現した安定化 Gs（miniGs）、Brevibacillus で発現したナノボディ（Nb）35 をそれぞれ精製し、PGE_2および apyrase 存在下で混合して複合体を調製、クライオ顕微鏡にて単粒子解析を行った。

【結果】本研究により PG 受容体 EP1 の精製方法が確立された。またこれまでに PG 受容体と G タンパク質の複合体構造の解析例はなかったが、miniGs や界面活性剤に GDN を用いることでクライオ電子顕微鏡による構造解析に成功した。本構造では PGE_2結合 EP3 と同様、膜貫通（TM）1 の細胞外側や TM6 の細胞内側の大きな変位が見られ、PG 受容体に共通の構造変位である可能性が示唆された。また Gs タンパクの C 末端の向きが既報のいずれの GPCR－G タンパク質複合体とも異なっており、新たな結合様式の可能性が示唆された。

プロスタグランジン（PG）の産生経路と受容体の結晶構造



165　初期化因子GLIS1の構造基盤の解明	安岡　有理

【目的】Zinc Finger 型転写因子 GLIS1 は、iPS 細胞の作製に用いられる山中 4 因子のうち KLF4 および c-MYC と互換性があり、特に c-MYC と置き換えた場合には初期化の不完全な細胞の増殖を抑えることで腫瘍化のリスクを大幅に下げることができる（Maekawa et al., 2011 *Nature*）。このことは、GLIS1 を初期化因子として用いることでより安全な iPS 細胞を効率よく作製し、再生医療への応用を促進できることを意味している。しかしながら、GLIS1 がどのような分子メカニズムで細胞の初期化に寄与しているのかについては、不明な点が多い。私はこれまでの研究で、GLIS1 の初期化因子としての進化的起源について、以下のことを明らかにしてきた。1. *GLIS1* は脊椎動物の共通祖先で起こった全ゲノム重複によって、*GLIS3* とともに祖先遺伝子 *GLIS1/3* から派生した。2. *GLIS1* は *GLIS3* よりも進化速度が速く、祖先遺伝子 *GLIS1/3* と *GLIS3* の間で高度に保存されたタンパク質相互作用モチーフの多くを失っている。3. GLIS1 はマウス、ウシ、ニワトリ、カエルの初期胚で母性因子として発現するが、メダカやゼブラフィッシュの GLIS1 および GLIS3、無脊椎動物の GLIS1/3 ではそのような発現がほとんど見られない。これらの結果は、脊椎動物の進化の過程で GLIS3 が祖先的な役割を保持する一方で、GLIS1 が新たに母性因子としての発現および初期化因子としての機能を獲得したことを示唆している（Yasuoka et al., 2020 *Mol. Biol. Evol.*）。そこで、本研究では各動物種の GLIS1 と GLIS3 のリプログラミング活性を比較し、進化のどの段階（脊椎動物、四足動物、羊膜類、あるいは哺乳類）で GLIS1 が高いリプログラミング活性を獲得したのかを明らかにする。GLIS1 および GLIS3 のリプログラミング活性は、既存の研究ではヒトおよびマウスの遺伝子でしか解析されてこなかったが、他動物種の遺伝子を解析に用いることでより厳密に活性の獲得に関わる GLIS1 タンパク質機能ドメインを特定することを目指す。

【方法】GLIS1 および GLIS3 のリプログラミング活性を比較するため、ヒト線維芽細胞にエピソーマルベクターを用いて遺伝子導入し、iPS 細胞の作製効率を評価した。ヒトとマウスの遺伝子に加え、スッポン、ツメガエル、ゼブラフィッシュ、ナメクジウオの遺伝子を新たにクローニングし、比較解析に用いた。もう一つのアッセイ系として、HEK293 細胞を用いた細胞 X へのダイレクトリプログラミング実験を行い、マーカー遺伝子 A の発現量によって、各種 GLIS1 および GLIS3 の活性を評価した（未発表のリプログラミング実験系のため、詳細は記載できない）。

【結果】ヒト線維芽細胞からのiPS細胞作製実験では、残念ながらGLIS1またはGLIS3による作製効率の向上を見出すことができなかったため、リプログラミング活性の比較をすることができなかった。一方、細胞Xへのダイレクトリプログラミング実験では、ヒト・マウス・カメのGLIS1が活性を示したのに対し、カエルのGLIS1は活性を示さなかった。また、ヒトGLIS1とカエルGLIS1のZinc Finger領域を入れ替えても活性は変わらず、C末端側領域に活性が依存していることが示された。さらに、ヒトGLIS1のC末端側領域のうち、羊膜類で保存された二つの領域を欠損させると活性が失われることも明らかにした。しかしながら、ゼブラフィッシュGLIS1aとGLIS1bの活性を調べたところ、カエルGLIS1よりもヒトGLIS1との相同性が低いGLIS1aがリプログラミング活性を示したのに対し、相同性が高いGLIS1bは活性を示さなかった。一方、ヒトGLIS3も弱いながらもリプログラミング活性を示し、ヒトGLIS1とヒトGLIS3のキメラでは、Zinc Finger領域とC末端側領域のどちらを入れ替えても大きく活性が減少したものの、弱い活性が残った。脊椎動物と近縁な無脊椎動物である頭索動物ナメクジウオのGLIS1/3についても調べたところ、リプログラミング活性は示さなかった。これらの結果は、GLIS1のヒト細胞におけるリプログラミング活性は少なくとも顎口類で獲得されたこと、その活性はC末端側領域に依存しているがアミノ酸配列の保存性との関連性は低いこと、リプログラミング活性に関わる共役因子はGLIS3とも結合できるように共進化していることが示唆された。

本研究で明らかとなった、GLIS1/3 遺伝子の機能進化

	ヒト		マウス		カメ		カエル		ゼブラフィッシュ			ナメクジウオ
遺伝子名	*GLIS1*	*GLIS3*	*Glis1*	*Glis3*	*Glis1*	*Glis3*	*glis1*	*glis3*	*glis1a*	*glis1b*	*glis3*	*gjlis1/3*
リプログラミング活性	✔✔✔	✔	✔	✔	✔	n.d.	✗	✗	✔	✗	✗	✗

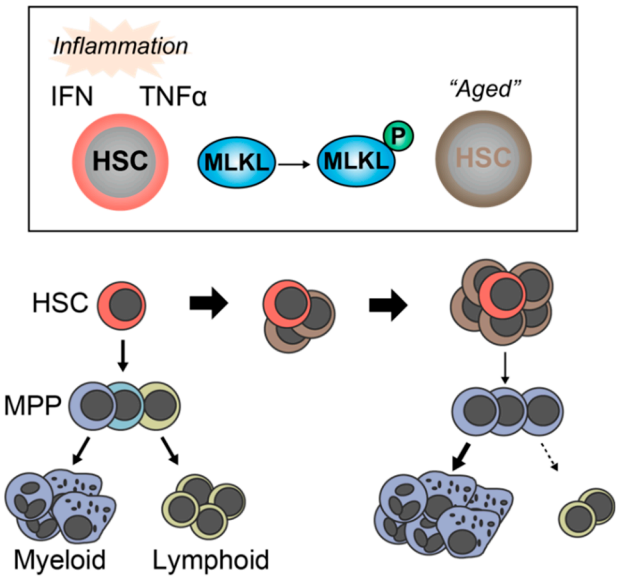
166　ネクロプトーシスを標的とした造血幹細胞の若返り戦略	山下　真幸

【目的】造血組織における老化は、貧血、免疫系の異常、クローン性造血及び造血器腫瘍の発症など、その影響は全身に波及する。そのため、造血組織の老化メカニズムの解明は個体老化の理解と介入を考える上で重要である。造血老化の重要な原因の一つとして、造血幹細胞の加齢性変化が挙げられる。造血幹細胞は自己複製能と分化多能性を併せ持ち、血液恒常性の維持および造血再生を担うが、加齢とともに自己複製の亢進、骨髄球系優位な分化など、造血幹細胞レベルでの変化が起きる。一方、造血幹細胞の機能は骨髄微小環境（ニッチ）に依存しているが、加齢に伴い骨髄内で慢性炎症が生じ、ニッチによる造血幹細胞支持能が変化する。造血幹細胞を取り巻くこれらの内因性・外因性変化の結果、老齢マウスでは造血幹細胞の数は増加するが、個々の造血幹細胞の再生能は低下する。しかしながら、造血幹細胞の加齢性変化の原因についてはまだ不明な点が多く、造血組織の「若返り」の方法も開発されていない。近年、慢性炎症の重要な発生源として、ダメージ関連分子パターンの放出を担うネクロプトーシスの関与が指摘されている。そこで筆者らは、ネクロプトーシスの実行因子である MLKL に着目し、*Mlkl* ノックアウト（*Mlkl* $^{-/-}$）マウスを用いて、炎症や造血老化モデルにおける MLKL の活性化が造血幹細胞の表現系に及ぼす影響を解析した。

【方法】野生型および *Mlkl* $^{-/-}$ マウスに炎症リガンド（poly I:C、LPS、TNF-α）を投与し、翌日に造血幹細胞をフローサイトメトリーで回収した。定量 PCR や Western blotting によって MLKL の発現量を評価するとともに、*in vitro* 増殖アッセイによって造血幹細胞の増殖能を評価した。また、野生型および *Mlkl* $^{-/-}$ マウスに 5-FU を投与することによって造血老化モデルを作製し、フローサイトメトリーによる造血解析および競合的移植を用いた造血幹細胞の機能解析を行った。

【結果】MLKL は造血幹細胞を含む未分化な造血細胞において選択的に発現しており、造血幹細胞の MLKL は poly I:C 投与によって活性化することが明らかになった。*Mlkl* $^{-/-}$ マウスを用いた検証の結果、poly I:C 刺激後に認められる造血幹細胞の機能低下は主に造血細胞の MLKL を介して誘導されることがわかり、MLKL の cell intrinsic な作用が機能抑制の主体であると考えられた。また、*Mlkl* $^{-/-}$ マウスを用いて造血老化モデルを作製すると、野生型でみられるような見かけの造血幹細胞数の増加や移植後の生着能低下、ミエロイド優位な分化といった造血幹細胞の老化様表現系が有意に抑制されることがわかった。これらの結果により、造血細胞における MLKL の活性化が造血幹細胞の老化様表現系の少なくとも一部を担う可能性が示唆され、MLKL の活性化を抑制するアプローチが造血老化の若返りに有効である可能性が示唆された。

MLKL は炎症により活性化し、造血幹細胞の加齢性変化を促進すると考えられる



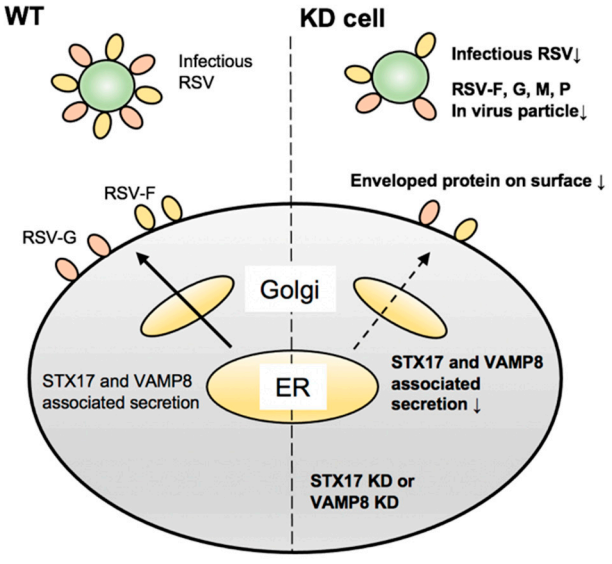
167　RSウイルス増殖に関与するオートリソソーム形成の解明	山本　聡

【目的】背景 : Respiratory Syncytial Virus（RSV）は、下気道炎を呈する呼吸器感染性ウイルスで生後 2 歳までにほぼ 100%の乳幼児が感染するが、RSV 感染の重症化、喘鳴の遷延，気管支喘息の発症・増悪への関与に対して、現在有効な予測因子や予防・治療法は確立されていない。オートファジーは細胞内における代表的な分解機構の一つであり、不要なタンパク質・小器官を分解することで細胞の恒常性を保つが、いくつかのウイルスにおいては複製に利用されることが報告されている。本研究に先駆けて研究代表者は、RSV はオートファジーを誘導し、オートリソソームに関連する因子を阻害すると複製が阻害されることを見出していたが、その分子機構の詳細及びオートリソソームの形成阻害が新規治療薬の開発の候補となるかは不明であった。本研究の目的は、RSV によるオートファジー誘導機構の詳細と、オートリソソームの形成と RSV 複製機構との関連性を明らかにし、これらの経路が新規治療薬開発の候補となりうるかを精査することである。

【方法】オートファジー関連因子の knock down（KD）細胞および knock out（KO）細胞を作製し、RSV 感染 24 時間後、上清中のウイルス力価、ウイルス粒子に含まれるウイルスタンパク質を測定した。また、Gaussia luciferase の分泌能を測定した。表面に分泌されたタンパク質は、ビオチン修飾後、アビジン沈降を行い western blotting で検出した。

【結果】RNA ウイルスであるムンプスウイルスとパラインフルエンザ 2 型ウイルス及び RSV によるオートファジー誘導能を比較すると、これらの中で RSV 感染が最も強くオートファジーを誘導した。またオートリソソーム関連因子 syntaxin17（STX17），SANP29，VAMP8 を KD すると、感染性 RSV の産生量や上清中に含まれるゲノム量が減少するのに対し、ムンプルウイルスでは確認されなかった。更に、放出されたウイルス粒子に含まれるウイルスタンパク質量を定量した結果、エンベロープタンパク質 G および F タンパク質や粒子内に内包される P および M タンパク質の顕著な減少を認めたのに対し、N タンパク質は変化しなかった。次に細胞内分解速度、分泌能の変化を検討した結果、STX17 と VAMP8 の KD において Gaussia luciferase の分泌能の低下が観察され、RSV の G および F タンパク質においても分泌能が著しく低下していた。しかしながら、KO 細胞においてはこれらの表現系が確認されなかった。以上の結果から、RSV の複製においてオートファジーは関与しないものと結論づけられたが、STX17 および VAMP8 の一時的な抑制は RSV 治療の戦略になりうる可能性があることを見出した。

本研究結果の概要図



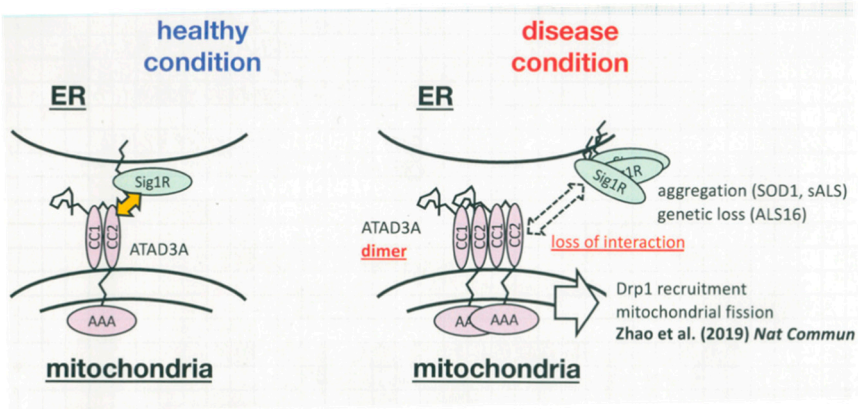
168　新規ミトコンドリア・小胞体連関維持機構の解析	渡邊　征爾

【目的】ミトコンドリアと小胞体の膜同士が近接した領域（mitochondria-associated membrane : MAM）は、細胞の機能維持に重要なマイクロドメインとして、近年、ATP 合成やオートファジーの制御など、様々な機能が明らかにされていた。著者は、これまでの MAM の機能的・構造的な破綻が筋萎縮性側索硬化症（ALS）で広く共通した病態であるという知見をもとに、新規の MAM の維持機構について分子レベルで明らかにすることを目指した。

【方法】本研究では、まず MAM 特異的タンパク質で MAM の維持に必須である σ 1 受容体（Sig1R）と相互作用するタンパク質としてミトコンドリア膜タンパク質 ATAD3A を同定した。次に、ATAD3A の部分欠損変異体を作製し、共免疫沈降法によって Sig1R との相互作用に必須の分子内ドメインを同定した。また、独自に開発した MAM の定量評価系である MAMtracker-Luc（Sakai et al., *FASEB J in press*）と作製した ATAD3A 部分欠損変異体を用いて、細胞内の MAM 量に影響を与える領域についても同定した。さらに、生体内での ATAD3A と Sig1R の相互作用の破綻が及ぼす影響を Sig1R 欠損マウスおよび ALS モデルマウスである変異 SOD1 マウスで検討を行った。

【結果】ATAD3A と Sig1R の相互作用は、ATAD3A の N 末端側に存在する二つの Coiled-Coil ドメイン（CC1、CC2）に依存していた。これは N 末端側がミトコンドリア外膜側に局在するとする先行研究と一致していた。興味深いことに、ATAD3A の野生型は非常に強く MAM の形成を誘導した一方、CC1、CC2、AAA ATPase ドメイン（AAA）のいずれを欠損しても MAM の誘導はされなくなった。そこで、各部分欠損変異体を HEK293 細胞に発現させて細胞内における局在を観察した結果、野生型と CC1 または CC2 の欠損変異体はミトコンドリアに局在した一方、AAA 欠損変異体は小胞体に局在することが明らかとなった。また、野生型マウス脊髄と Sig1R 欠損マウス脊髄また ALS モデルマウスである変異 SOD1 マウスで比較したところ、意外なことに ATAD3A の発現量や局在に大きな変化は見られなかった。しかし、ハンチントン病モデルで報告があった ATDA3A のオリゴマー化について、先行研究と同様の方法で検討を行った結果、これらのマウス脊髄においては ATAD3A のオリゴマー化が有意に促進されていることが明らかとなった。以上の結果、まず、1. ATAD3A は N 末端側の Coild-Coil ドメインを介して小胞体膜タンパク質と相互作用することによって、MAM の増強に寄与していることが判明した。また、2. Sig1R は ATAD3A の異常なオリゴマー化の抑制に重要であり、MAM の破綻は ATAD3A の異常なオリゴマー化の促進を介しても神経細胞に対して毒性的に作用する可能性が示唆された。

本研究により明らかとなった ATAD3A と Sig1R の相互作用の概念図



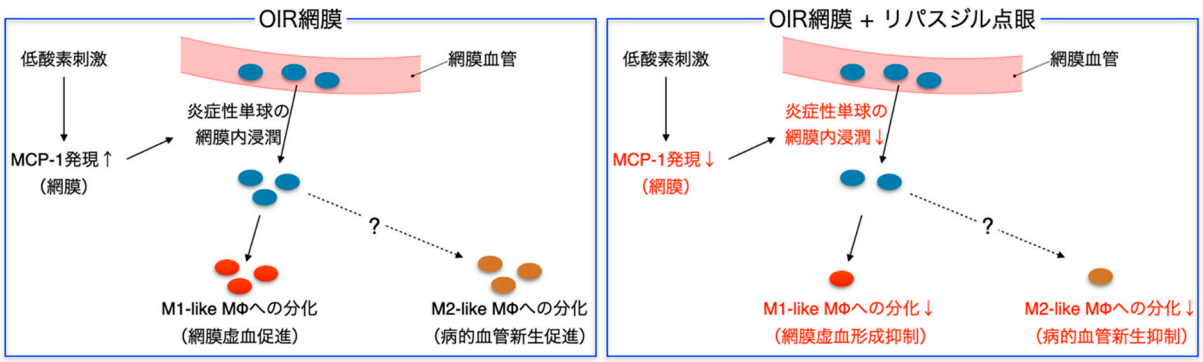
169　未熟児網膜症に対する点眼治療薬の創製	有馬　充

【目的】本研究は、未熟児網膜症（Retinopathy of prematurity：ROP）に対する点眼治療薬創製を目的とする。ROP は早産児虚血網膜に生じる血管増殖性疾患である。既存治療である網膜光凝固と抗血管内皮増殖因子抗体硝子体注射（抗 VEGF 治療）は、侵襲性が高く非可逆的神経合併症に関する懸念も大きい。我々はこれまでに、ROP 疾患モデル（Oxygen-induced retinopathy：OIR）マウス網膜の網羅的解析から、Rho キナーゼ（ROCK）の ROP 病態への関与を明らかにした。ROCK 阻害剤であるリパスジル点眼により ROP 病態の根幹である異常網膜血管新生、網膜虚血が減少したことから、点眼という世界初の ROP 低侵襲治療法開発に着手した。リパスジル点眼はグラナテック®点眼液として上市されている。そこでリパスジル点眼の ROP への適応拡大を目指し、リパスジルの薬効機序解明を行った。

【方法】我々は過去に OIR 網膜血管新生への M1-like、M2-like マクロファージ（MΦ）の関与を明らかにしている。本研究前に行った検証において、リパスジルにより OIR 網膜内炎症性サイトカインの発現が減少したことから、1. OIR 網膜における M1-like, M2-like MΦの局在と定量、2. 塩化ガドリニウム（GdCl3）およびクロドロン酸リポソーム（Cl2MDP-LIP）投与後の、OIR 表現型の変化、3. リパスジル点眼投与後の OIR 網膜における MΦの population・局在変化と OIR 表現型の変化、以上を免疫染色、FACS、PCR にて検証した。4. OIR 網膜 MΦの遺伝子発現解析および M1-like、M2-like MΦへの分化経路推定を目的とし、OIR マウス網膜から CD11b 陽性細胞を抽出し、シングルセル RNA シークエンスを行った。

【結果】1. OIR 網膜において、虚血領域では M1-like MΦが、異常血管新生周囲では M2-like MΦが増加した。2. GdCl3（M1-like MΦ消去）および Cl2MDP-LIP（M2-like MΦ消去）投与どちらにおいても、網膜虚血、異常血管新生領域はコントロールと比較して有意に減少したが、虚血抑制効果は GdCl3 の方が高く、異常血管新生抑制効果は Cl2MDP-LIP の方が高かった。3. リパスジル点眼により、OIR 網膜における M1-like、M2-like MΦはともに減少した。同時に OIR 網膜における単球走化因子 MCP-1 の発現も有意に減少した。そこで CCR2、F4/80、CD11b 共陽性細胞の定量を行ったところ、リパスジルにより有意に減少していた。OIR 網膜での同細胞の局在を確認したところ、虚血領域に存在していた。OIR に対して抗 MCP-1 抗体硝子体投与を行ったところ、リパスジルと同様に異常血管新生および網膜虚血が有意に減少した。解析の結果、CD11b 陽性細胞は九つのクラスターに分類された。今後 M1-like、M2-like MΦへの分化経路推定を行う予定である。

本研究で解明されたリパスジルの薬効機序



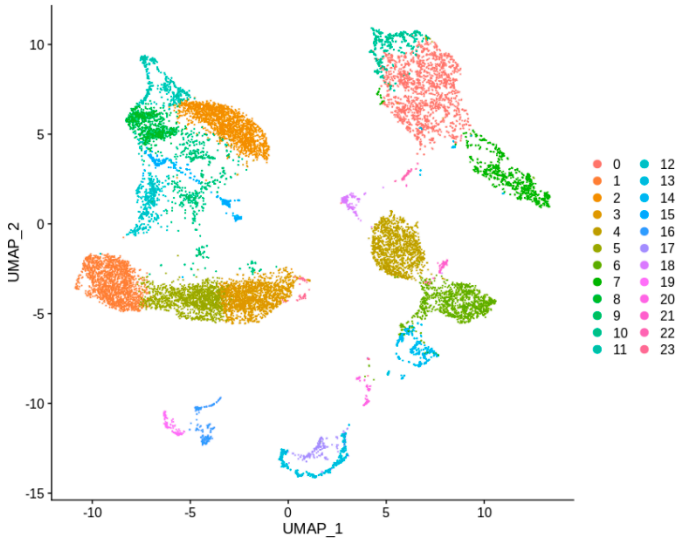
170　肥満によって生じるベージュ脂肪細胞の誘導抑制機構	池田　賢司

【目的】近年の研究から、ヒトと齧歯類では褐色脂肪細胞、ベージュ脂肪細胞の少なくとも 2 種類の熱産生脂肪が存在することが明らかとなった。熱産生脂肪の増加はエネルギー消費量を増加させることから肥満・2 型糖尿病に対する治療ターゲットとして期待されている。特にベージュ脂肪細胞はヒトにおいても長期の寒冷暴露や運動等によって誘導されるため、患者数が増加の一途をたどっている肥満・2 型糖尿病の治療のターゲットとして期待された。しかし、肥満によってベージュ脂肪細胞の誘導が低下することが明らかになり、ベージュ脂肪細胞をターゲットとした肥満治療開発にむけて大きな障壁となっている。そもそも、ベージュ脂肪細胞の分化制御については未だ不明な点が多く、ましてや肥満がベージュ脂肪細胞の誘導機構に及ぼす影響は、ほとんど明らかになっていない。本研究は、ベージュ脂肪細胞がヘテロな細胞集団であることを発見した独自の知見をもとに、これまでにない新たな切り口で、肥満・2 型糖尿病におけるベージュ脂肪細胞の誘導低下のメカニズムを解明し肥満病態下でもベージュ脂肪細胞を誘導することを可能とする標的分子の同定を目的としている。

【方法】室温条件下、寒冷刺激を行った非肥満マウスの皮下脂肪組織をシングルセルに単離し、シングルセル RNA-seq 解析を行い、遺伝子プロファイルから細胞群を同定し脂肪前駆細胞のサブタイプを同定した。また肥満マウスに対して寒冷刺激を行いベージュ脂肪細胞が誘導されるか検討を行った。

【結果】脂肪組織のシングルセル解析を行ったところ、脂肪組織を構成する細胞である脂肪前駆細胞と各免疫細胞（B 細胞、T 細胞、マクロファージ）等が細胞集団として同定された。脂肪前駆細胞においては、想定されていた結果通り、複数の細胞集団が同定された。更に、それぞれの細胞集団に選択的に発現しているマーカー遺伝子を同定した。その結果、寒冷刺激によって特異的に出現する細胞集団を同定した。今後、肥満マウスから非肥満マウスと同様に脂肪組織間質細胞のシングルセル解析を行い、比較検討を行う。また同定した細胞群について詳細に検討する予定である。同定したマーカーを用いた細胞群の単離、転写因子の網羅的解析を行いベージュ脂肪細胞分化制御に関わる候補転写因子の同定を行う。

シングルセル RNA シークエンス解析による皮下脂肪組織の細胞集団の同定



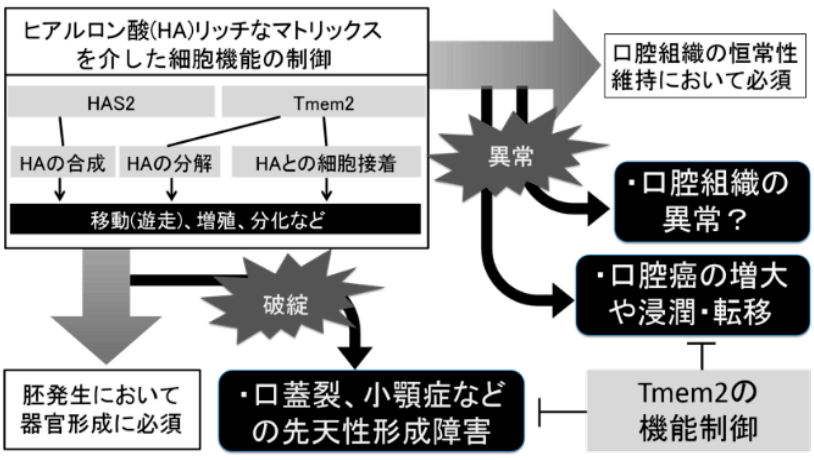
171　ヒアルロン酸を標的にした口腔疾患への新たな取り組み	犬伏　俊博

【目的】グリコサミノグリカン糖鎖（GAG 糖鎖）であるヒアルロン酸は機能性糖鎖と呼ばれ、特に胚発生時において羊水や胎児組織で豊富に存在しているため、ヒアルロン酸を介した細胞機能、特に細胞移動（遊走）の制御が器官形成には極めて重要であると考えられているが、その詳細については明らかになっていない。近年、ヒアルロン酸の合成・分解異常により口蓋裂や小顎症といった頭蓋顎顔面の先天異常が引き起こされることが明らかになってきており（Muggenthaler et al., 2017）、ヒアルロン酸が頭蓋顎顔面の形態形成に深く関わっていることは疑いがないが、その分子機構については国内外において未だ明らかにされていない。そこで、本研究ではヒアルロン酸合成酵素 2（HAS2）の頭蓋顎顔面特異的（Wnt1-Cre）コンディショナルノックアウトマウス（ホモ変異体 : $Has2^{f/f}$:Wnt1-Cre、ヘテロ変異体 : $Has2^{f/w}$:Wnt1-Cre）を作製し、ヒアルロン酸合成の低下が頭蓋顎顔面の形態形成に及ぼす影響について解析した。

【方法】本実験では、*HAS2* の頭蓋顎顔面特異的（Wnt1-Cre）コンディショナルノックアウトマウスの胎児を作製し用いた。対照群には同腹兄弟（$Has2^{f/f}$、$Has2^{f/w}$）を用いた。摘出した胎児は実体顕微鏡下での観察に加え、造影剤を用いたマイクロ CT 撮影により形態学的解析を行った。

【結果】1. *Has2* 遺伝子は胎生 9.5、10.5 日齢において顔面領域に発現する : 胎生 9.5 日（E9.5）では顔面突起（FP）、第一鰓弓（PA1）、第二鰓弓（PA2）、後根神経節（DRG）において発現が見られた。E10.5 では E9.5 に比べて発現は強くなっており、顔面突起（FP）、第一鰓弓（(PA1）、第二鰓弓（PA2）などで強発現が認められた。2. 顎顔面特異的（Wnt1-Cre）Has2 CKO マウスは小顎症を含む種々の顔面奇形を呈する : 顔面特異的 *Has2* CKO マウス（CKO）は、出生後すぐに死亡することが分かった。上下顎の著しい劣成長が認められた。その他、眼の異常、外脳症などといった種々の顔面奇形を認めた。一部では目の形成不全や外脳症を認めた。3. 顎顔面特異的 *Has2* CKO マウスは完全口蓋裂を発症する : E15.0 においても CKO において上下顎の劣成長が認められた。野生型 マウス（WT）では E14.5 から E15.0 にかけて 2 次口蓋の癒合が起こるが、CKO では癒合が起こらず、全例において完全口蓋裂を発症することが明らかとなった。4. 顎顔面特異的 *Has2* CKO マウスは歯の形成異常を伴う : 出生直後における WT と CKO マウスをマイクロ CT にて撮影し、全身の表現形をスクリーニングした。その結果、腸管に液体の貯留を認めた。矢状断面から、上下顎臼歯や上下顎切歯の形成について解析した。その結果、上下顎臼歯や上下顎切歯はいずれも CKO において小さく、上下顎臼歯の咬頭の形態異常を認めた。前頭断面から、CKO では口蓋裂（Asterisk）、舌の形態異常ならびに上下顎臼歯の形態異常が確認できた。

ヒアルロン酸による細胞機能の制御とその破綻による疾患の概要



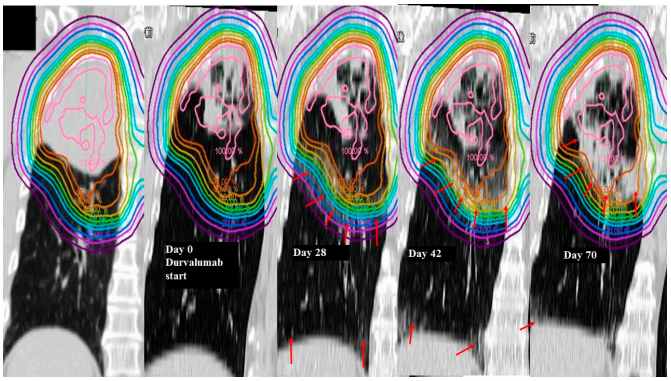
172　III期非小細胞肺癌に対する免疫陽子線治療の確立	岩田　宏満

【目的】これまで、多くの臨床試験結果より、Ⅲ期非小細胞肺癌に対する化学放射線治療は、徐々に治療成績は改善しつつあるが、2 年生存率が 50%程度と厳しいのが現状である。治療方針としては、さらに発展的で革新的な治療が必要と考えられる。現状では、Pacific trial の結果から、最も良好な予後が期待できる治療として、通常の X 線による同時併用化学放射線治療に 1 年間 durvalumab（抗 PD-L1 抗体）を継続投与する治療が世界的に行われているが、この X 線による放射線治療を、陽子線治療に置き換えることにより、1. 周辺臓器への副作用（特に肺臓炎、食道炎、心毒性、骨髄抑制など）の軽減による、抗 PD-L1 抗体の導入・維持の促進、2. より高い抗腫瘍効果による、免疫抗原提示による抗 PD-L1 抗体の増強、3. X 線治療とは異なり、正常肺リンパ節防護による免疫増強で抗 PD-L1 抗体の効能の維持、この 3 点において、さらに有望な治療が可能となると考えられ、本治療が切除不能の難治性であるⅢ期非小細胞肺癌に対して安全で治癒率のより高い革新的な治療法となるのではないか、という考えに至った。そのため、本研究において、同時併用化学陽子線治療＋抗 PD-L1 抗体の併用による、免疫陽子線治療の臨床の場における確立と、基礎的な効能等の解明を目的とした。

【方法】1. 臨床研究: 既にヒストリカルコントロールとして、同時併用化学放射線治療（X 線）とそれに durvalmab を追加したデータ (PACIFIC 試験) があり、さらに我々のグループで行った同時併用化学陽子線治療のデータ (IJROBP 2021, in press）がある。今回、新たに、Ⅲ期 NSCLC に対して、同時併用化学陽子線治療を行い、終了時の一次評価として増悪のない症例に対して、14 日以内（最長 42 日）に、抗 PD-L1 抗体（durvalmab）(10 mg/kg）を、1 年間投与し、その効果と安全性を評価した。2 項検定にて power を 80%、片側 95%CI の上限を 5%として、期待無増悪生存期間 25 ヵ月、閾値無増悪生存間 15 ヵ月、登録期間 48 ヵ月、追跡期間 36 ヵ月とした場合、(有意水準 5%、検出率 90%の場合)、必要症例数 39 例が必要となり、脱落例を見込み目標症例数を 42 例として設定し、登録を開始した。2. 基礎研究: 免疫放射線治療の鍵となる、癌細胞における PD-L1 発現および活性化キラーT 細胞による抗腫瘍活性に関して、陽子線治療がどの程度影響を与えるかについて評価を行うため、照射後の HMGB1 の放出量の違いを HeLa 細胞において検討した。

【結果】1. 臨床研究: 2021 年 3 月末時点で、現在 22 例をすでに登録しており、臨床試験継続中であり、最終評価は今後予定している。登録初期の同時併用化学陽子線治療後、14 日以内に dulvalmab を投与した 15 例中 3 例において、Grade2 の肺臓炎を認め、照射時期や陽子線治療計画図との対比から、通常の放射線肺臓炎とは異なり、免疫関連有害事象であることが判明した。Grade 3 以上への移行は認めず、安全性は X 線治療の併用より比較的保たれていると考えられた。2. 生物研究:HeLa 細胞に対して、X 線と陽子線 6 Gy をそれぞれ照射し、48、72、96 時間後の HMGB1 の放出量を検討すると、48、72 時間後において、陽子線照射の方が X 線照射より有意に放出量が上昇していることが分かった、つまり陽子線照射の方が、抗腫瘍免疫の活性化が明らかとなった。

化学陽子線治療後に抗 PD-L1 抗体を投与後 1 か月時点での免疫関連有害事象とその経過



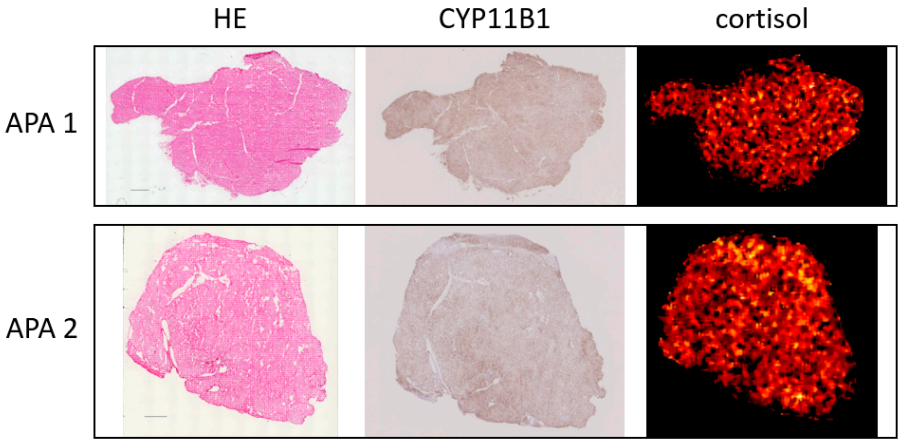
173　メタボロミクスを用いた副腎皮質腫瘍の代謝特性の解明	馬越　洋宜

【目的】副腎皮質腫瘍はステロイド最終産物の産生量に基づきアルドステロン産生腫瘍、コルチゾール産生腫瘍などの機能性腫瘍と“非機能性”腫瘍に分類され、治療適応は原則的に機能性の有無に基づき決定される。画像診断技術の進歩に伴い、副腎腫瘍が偶発的に診断される機会が増加し、約８割が非機能性腫瘍と診断される。近年、従来の診断法では非機能性と診断される副腎腫瘍においても、高率に代謝障害を生じることが報告されたが、成因は不明であり代謝合併症の抑制のために病態の解明・診療の精緻化が求められている。個別化医療への取り組みとして、代謝産物を包括的に測定するメタボロミクスが様々な疾患で行われはじめている。副腎領域では、ステロイドホルモンやその前駆体も含めたステロイドプロファイリングによりミネラルコルチコイド過剰病態である原発性アルドステロン症でグルココルチコイド中間代謝産物の過剰が示され、機能性副腎腫瘍における代謝特性の多様性が明らかになりつつある。本研究では副腎皮質腫瘍を対象として液体クロマトグラフィータンデム質量分析（LC/MS/MS）を用いた、ステロイドプロファイリングを行う。並行して腫瘍組織の統合解析を行い副腎皮質腫瘍における代謝特性の成因を解明する。

【方法】臨床診断において、アルドステロン産生腫瘍、コルチゾール産生腫瘍、非機能性副腎皮質腫瘍および非副腎皮質腫瘍と診断された例の腫瘍組織を対象として、免疫組織染色、LC/MS/MS に基づくメタボローム解析、ゲノム解析、トランスクリプトーム解析（RNA-seq 法）、イメージング質量顕微鏡によるオミクス解析を行った。

【結果】アルドステロン産生腫瘍、顕性コルチゾール産生腫瘍、不顕性コルチゾール産生腫瘍、非機能性副腎腫瘍を対象として、LC/MS/MS を用いて組織中のアルドステロン、コルチゾールの定量を行った。アルドステロンについては、アルドステロン産生腫瘍においてのみ有意な上昇がみられたが、コルチゾールにおいては、アルドステロン産生腫瘍は不顕性コルチゾール産生腫瘍と同定度のコルチゾール過剰分泌がみられた。アルドステロン産生腫瘍における、腫瘍内コルチゾール合成の局在を評価する目的で、代謝産物の可視化法として、イメージング質量顕微鏡を用いた解析を行った。免疫組織学染色のコルチゾール合成酵素（CYP11B1）の局在と一致して、コルチゾール合成が腫瘍内で均一的に行われることを同定した。次にアルドステロン産生腫瘍およびコルチゾール分泌が緩徐である、不顕性コルチゾール産生腫瘍を対象として、RNA-seq を施行した。315 遺伝子に発現変動が確認され、予想通り APA においてアルドステロン合成に関連するパスウェイがエンリッチされた。一方で、steroid metabolic process パスウェイもエンリッチされていたが、コルチゾール合成に関連する遺伝子発現は両腫瘍において差異は検出されなかった。

イメージング質量顕微鏡を用いたアルドステロン産生腫瘍におけるステロイド合成の可視化



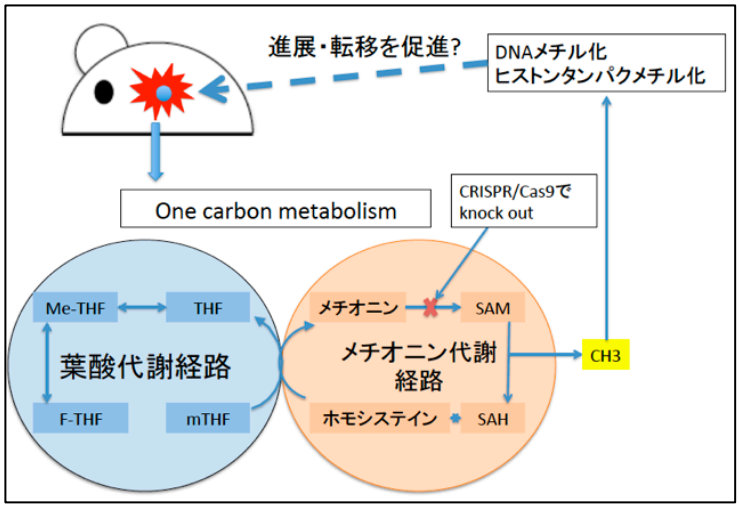
174　1C metabolismを介するエピゲノム変化と癌進展の関連	大西　紘太郎

【目的】これまでの癌研究は、遺伝子変異に重点をおいた研究が中心であった。近年次世代シークエンサーの進化に伴い、あらゆる癌種において全ゲノムに渡る網羅的解析が多数行われた結果、癌と genetics の分野では研究が飛躍的に進んでいる。一方次世代シークエンサーの進歩は DNA のメチル化やヒストンタンパク質の修飾といった epigenome 領域の研究にも大きな発展をもたらし、癌と関連した epigenome 変化も次々と報告されている。しかしながら、これまでに epigenome が関連した有力な癌治療薬やバイオマーカーが発見されたという報告は少ない。癌の進展・転移に epigenome 状態の変化が関与しているのは、過去の報告からも疑いはないが、その関係性にはいまだ不明な点が数多く残されていると考える。そこで研究代表者は、癌の進展・転移と epigenome 状態変化の間には、その他の要因が複雑に関与して、結果的に癌の進展や転移を引き起こしていると考えた。近年癌細胞における代謝の分野で注目されている、one carbon metabolism（以下 1C metabolism）は、ある特定の癌種において代謝が活性化していると言われている。この 1C metabolism の中間代謝産物には S-アデノシルメチオニン（以下 SAM）が含まれており、この SAM は DNA やヒストンタンパク質へメチル基を付与する供与体として働くことが知られている。そこで研究代表者は、1C metabolism を介した epigenome 状態変化が癌の進展・転移に関与しているのではないかと考えた。この 1C metabolism を介した epigenome 状態変化と癌の進展・転移との関係性を明らかにすることによって、新たな癌治療薬の開発や新規バイオマーカーの発見につながるのではないかと考え、本研究を立案した。

【方法】1C metabolism の代謝活性を低下させるため、筆者はヒト大腸癌細胞株である HCT116 及びヒト膵癌細胞株である PANC1 において、代謝経路の構成遺伝子である *MAT2A* 遺伝子の遺伝子発現を、CRISPR/Cas9 の技術を用いて低下させた。*MAT2A* 遺伝子変異株と元の癌細胞株をそれぞれ免疫不全マウスの皮下に投与し、皮下腫瘍を形成させた。形成された皮下腫瘍は組織学的解析を行った。また、腫瘍から RNA 及び DNA を抽出し、RNA-seq 及び whole genome bisulfite sequence を行った。また、癌のマウスモデルにおいて、通常餌投与群とコリン欠乏食投与群に分けて腫瘍形成能を比較検討した。

【結果】CRISPR/Cas9 によって樹立した *MAT2A* 遺伝子変異大腸癌細胞株は、元の大腸癌細胞株と比べ、免疫不全マウスの皮下に投与した際に形成される腫瘍の径が大きかった。また、ホルマリン固定後 HE 染色し観察したところ、*MAT2A* 遺伝子変異大腸癌細胞株由来の腫瘍では N/C 比の大きな未分化な腫瘍細胞が増生しており、元の大腸癌細胞株由来の腫瘍で見られる様な腺管構造は欠如していた。それぞれの腫瘍から RNA を抽出し、RNA-seq を行い網羅的な遺伝子発現解析をしたところ、元の大腸癌細胞株由来の腫瘍と比較して、*MAT2A* 遺伝子変異大腸癌細胞株由来の腫瘍では、KDM5 ファミリーの遺伝子発現が上昇していた。

1C metabolism を介した epigenome 状態変化と癌の関連性



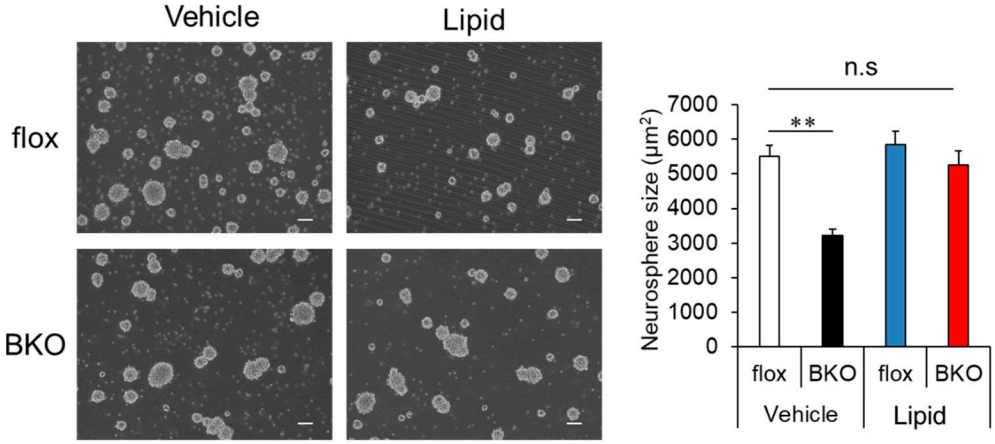
175　脂肪酸伸長酵素Elovl6による神経新生制御機構解明	大野　博

【目的】哺乳類の脳では、生涯にわたって神経新生が起こることが知られており、記憶・学習や情動行動、脳損傷後の修復・再生などに極めて重要である。脳は脂質を豊富に含む組織であり、脂質の主要な構成成分である脂肪酸は脳機能に深く関与し、近年、神経新生にも重要であることが報告されているものの、そのメカニズムは未だ不明な点が多い。Elovl family member 6（Elovl6）は、炭素数（C）12～16 の飽和・一価不飽和脂肪酸を基質とし、C18 の脂肪酸への伸長に必須の脂肪酸伸長酵素である。Elovl6 は、脂質を豊富に含む組織に高発現しており、脳においても高い発現を有する。これまでの研究から、*Elovl6* 欠損マウスでは、神経新生の低下や、記憶障害等の行動異常が認められることを見出している。本研究では、神経幹細胞における Elovl6 に着目し、神経幹細胞における Elovl6 の役割を明らかとし、Elovl6 による神経新生の制御機構を解明することを目的とした。

【方法】主に神経幹細胞に発現する Nestin のプロモーター下に Cre リコンビナーゼを発現させた Nestin-Cre マウスと *Elovl6*$^{flox/flox}$（flox）マウスを交配し、中枢神経特異的 *Elovl6* 欠損（brain- specific Elovl6 knockout : BKO）マウスを作製し、解析を行った。また、BKO マウスと flox マウスを交配させ、胎生 14 日目の胎仔の大脳皮質、あるいは成体の脳室下帯より神経幹細胞塊（ニューロスフェア）を調製し、自己複製能や分化を評価した。また、ニューロスフェアのサイズが回復した特定の脂質を多く含む食餌をマウスに与え、神経新生の評価を行った。

【結果】BKO のニューロスフェアのサイズは flox と比較して有意に低下することを見出している。また、特定の脂質の添加により、胎生 14 日目から調製した 1 次スフェアでは回復が認められず、1 度継代した 2 次スフェアでサイズの低下が回復することが明らかとなった。そこで、脂質の補充が 1 次あるいは 2 次ニューロスフェアのどちらにおいて重要であるかを検討したところ、2 次ニューロスフェアのみでの補充でサイズの回復が認められた。成体においても、脳室下帯より調製したニューロスフェアでは、BKO マウス由来のニューロスフェアはそのサイズが flox と比較して有意に低下した。したがって、Elovl6 は発達段階および成体のその両方において重要であることが明らかとなった。さらに、プラグチェックにより妊娠を確認した雌マウスに、ニューロスフェアサイズの回復が認められた脂質を豊富に含む食餌を新生マウスが離乳するまで与え続け、離乳したマウスの神経新生を評価したところ、脂質の補充により神経新生の回復が認められた。これらのことから、Elovl6 は神経新生において重要であり、特定の脂質を基軸として神経新生を制御していることが明らかとなった。

Elovl6 欠損によるニューロスフェアのサイズの低下と脂質補充による回復



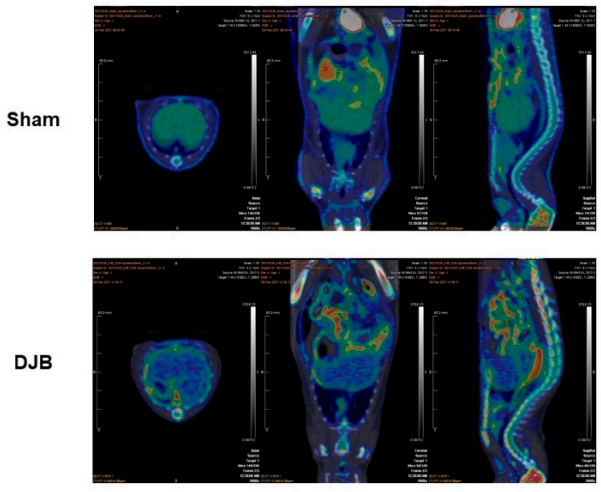
176　Bariatric surgery術後早期血糖上昇抑制に関する研究	柏原　秀也

【目的】近年、日本でも肥満手術である腹腔鏡下スリーブ状胃切除（LSG）が保険収載され、体重減少以外のさまざまな効果が報告されている。我々はこれまでに Duodenal-jejunal bypass（DJB）の耐糖能異常・非アルコール性脂肪肝炎（NASH）改善効果は、胆汁酸により産生増加した Glucagon-like peptide-1（GLP-1）が増加することによると報告した。また我々は DJB が術後腸内細菌叢を変化させることも報告している。さらにこの DJB の腸内細菌叢の変化が腸管炎症の抑制や腸管透過性の維持を引き起こし、これがインスリン抵抗性の改善や NASH 改善に寄与することを報告した。実臨床においては、内科的治療に抵抗性であった糖尿病患者に対し Bariatric surgery を施行すると、術後早期よりインスリン不要となる症例をしばしば経験する。しかし、これまでの基礎・臨床での報告をみてみると、術後 4 週以降の報告しかなく、術後早期での血糖上昇抑制効果に関する検討は未だ報告がない。本研究では Bariatric surgery による術後早期血糖上昇抑制効果のメカニズムについて検討を行った。

【方法】非肥満・糖尿病モデルラットである 12 週齢 Goto Kakizaki ラットを DJB 群と開腹のみの Sham 群に分け、24 時間後に sacrifice を行い、血糖・インスリン・GLP-1 測定、小腸（上部・中部・下部）の炎症性サイトカイン（IL-1β、TNF-α、IL-6、IFN-γ）、FXR、SGLT1 発現、腸内細菌叢を解析した。また、術後 24 時間で 18F-FDG PET を撮影し、糖利用の変化を評価した。

【結果】1. DJB 術後 24 時間での血糖、インスリン、GLP-1 値：術後 24 時間の血糖値は術前と比較し、有意に低下していた。さらに DJB 群では術後 24 時間でインスリンの上昇がみられ、回腸 L 細胞より分泌されインスリン分泌促進作用のある GLP-1 上昇がみられた。2. DJB における小腸炎症性サイトカイン、FXR、SGLT1 発現：肝臓や小腸、腎臓等で高発現し、胆汁酸が内因性リガンドで脂質代謝や胆汁酸代謝、インスリン抵抗性改善に関与しているとされる Fernesoid X receptor（FXR）を小腸各 segment で測定してみると、いずれの segment でも DJB 群で高発現していることが判明した。また小腸での糖吸収の調節に関わっており、GLP-1 分泌にも関与しているとされる Na／グルコース共輸送坦体（SGLT1）も上部・中部・下部三つの segment すべてにおいて DJB 群で高発現していた。3. 18F-FDG PET を用いた DJB 術後 24 時間での糖取り込みの変化：DJB 術後 24 時間でブドウ糖の取り込みにどのような変化がみられるのかを検討するため、18F-FDG PET を施行した。すると DJB において他の臓器と比べ、小腸に強く ^{18}F-FDG が集積することが明らかとなった。

DJB 術後 24 時間での 18F-FDG PET 画像



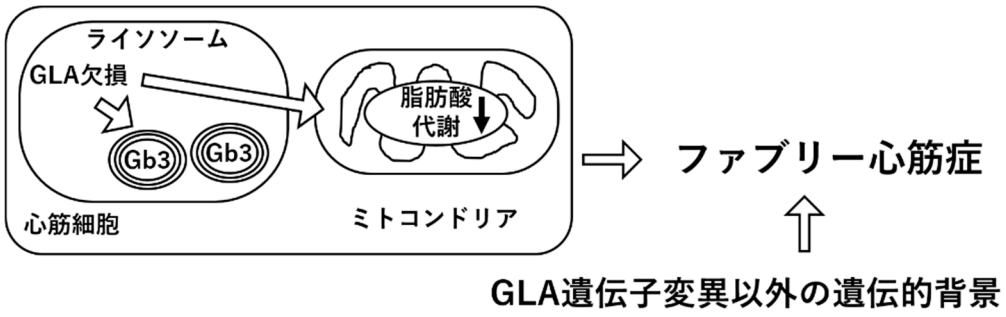
177　ファブリー心筋症のエネルギー代謝異常の機序解明	藏本　勇希

【目的】ファブリー病は先天性代謝異常症の一つで、ライソソーム酵素（αガラクトシダーゼA：GLA）が欠損していることで、基質であるグロボトリアオシルセラミド（Gb3）等が細胞内に蓄積するために起こる。心筋細胞へのGb3蓄積による心筋症の発症はファブリー病患者の主な死因となっているが、Gb3蓄積と心筋細胞障害をつなぐ病態進展の分子機序は未解明である。本研究ではファブリー心筋症の*in vitro*評価系として、患者由来iPS心筋細胞を作製し、そのモデルとしての検証を行い、さらに「ファブリー病の蓄積物が心筋エネルギー源である脂肪酸利用を障害することで心筋エネルギー代謝異常を来している」との仮説を立て、基礎、臨床の両面からファブリー心筋症の代謝異常症としての病態機序を解明し、その中から治療標的を見出すことを目的とする。

【方法】ファブリー心筋症の*in vitro*評価系の確立のため、ファブリー病患者よりiPS細胞作製を行い、心筋細胞へと分化させた。ファブリー病の特徴をiPS細胞、iPS細胞由来心筋細胞で検証し、エネルギー代謝異常の有無に関してフラックスアナライザーを用いて解析した。ファブリー心筋症患者の病態進展因子としてエネルギー代謝異常に関わる遺伝子の変異が関わっているかどうかを、ファブリー病患者の遺伝情報・臨床情報を用いて解析した。

【結果】ファブリー病患者よりiPS細胞株を作製し、GLA活性欠損とGb3の蓄積を確認した。ファブリー病モデルiPS心筋細胞をグルコース非含有培地で培養すると、健常対照iPS心筋細胞と比較して早期に収縮性の低下を認めた。また、フラックスアナライザーによる解析で、ファブリー病モデルiPS心筋細胞では脂肪酸添加時の酸素消費量増加が減弱していた。一方で正常iPS心筋細胞の*GLA*遺伝子ノックダウンによるモデルにおいても同様の結果が得られた。細胞モデルによる解析から脂肪酸の利用障害が示唆されたため、これがファブリー心筋症の重症度に関わっていないかどうかを調べた。ファブリー病患者からのエクソーム解析結果と臨床情報との関連を調べ、ファブリー心筋症の重症度に関わる*GLA*遺伝子変異以外の遺伝的背景因子の候補を見出した。

ファブリー心筋症進展の概念図



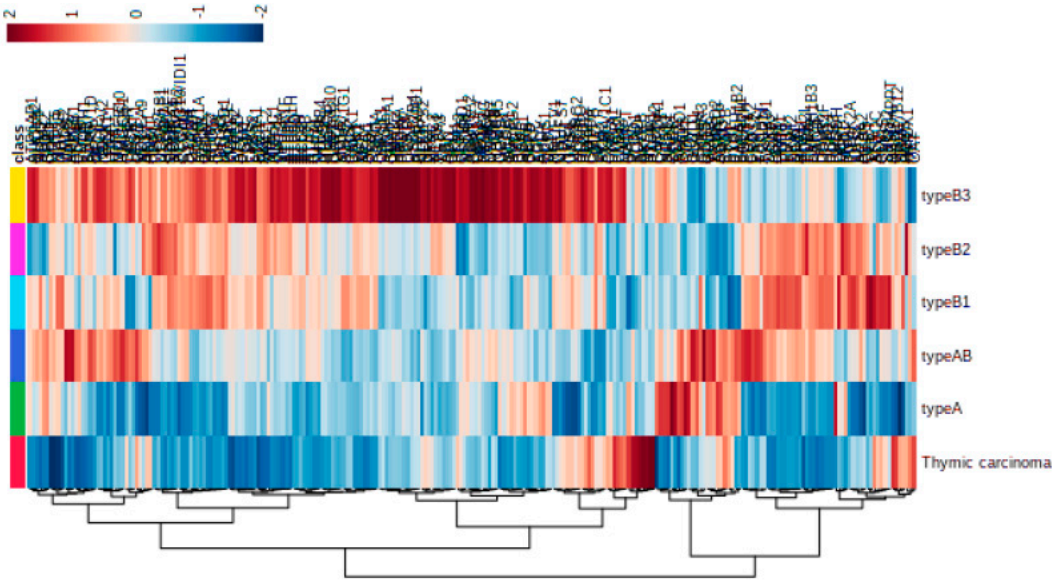
178　胸腺上皮性腫瘍における新規治療ターゲットの同定	上妻　由佳

【目的】胸腺腫および胸腺癌を含む胸腺上皮性腫瘍は縦隔腫瘍の 20%を占める最も頻度が高い疾患であるが、発症頻度が 10 万人につき 0.44〜0.68 人と稀な疾患である。胸腺上皮性腫瘍は多くが無症状であり、5 年無再発生存率は正岡 I 期、II 期では 90%を超えるものの、III期では 67%、IVa 期で 38%、IVb 期で 48%と進行期の予後は不良である。胸腺上皮性腫瘍に対して根治が望める唯一の方法は手術であるが、再発・切除不能な胸腺上皮性腫瘍に対する治療の選択肢は限られている。本研究では、次世代プロテオミクス「iMPAQT : *in vitro* proteome-assisted MRM for protein absolute quantification」法を用いて胸腺上皮性腫瘍における新規治療ターゲットの同定を目的とした。

【方法】ヒト胸腺上皮性腫瘍組織(胸腺腫 type A、AB、B1、B2 各 3 例、type B3 4 例、胸腺癌 4 例を用いて、iMPAQT 法により 342 種の代謝酵素を網羅的に定量解析した。

【結果】組織型毎に各グループの 代謝酵素発現量の違いが明瞭であり、特に胸腺癌及び TypeA グループでは全体的に発現量が低く TypeB3 で発現量が高い傾向にあった。One-way ANOVA では 68 種の代謝酵素が $p<0.05$ を示しており、エンリッチメント解析の結果、 多くはプリン代謝等の核酸合成寄与する因子であった。胸腺癌のグループでは多くの代謝酵素は他のグループよりも発現量が低かったが、核酸合成に関与する一部の代謝酵素に関しては胸腺癌グループで顕著に増加していた。

胸腺上皮性腫瘍の組織型による酵素発現の違い



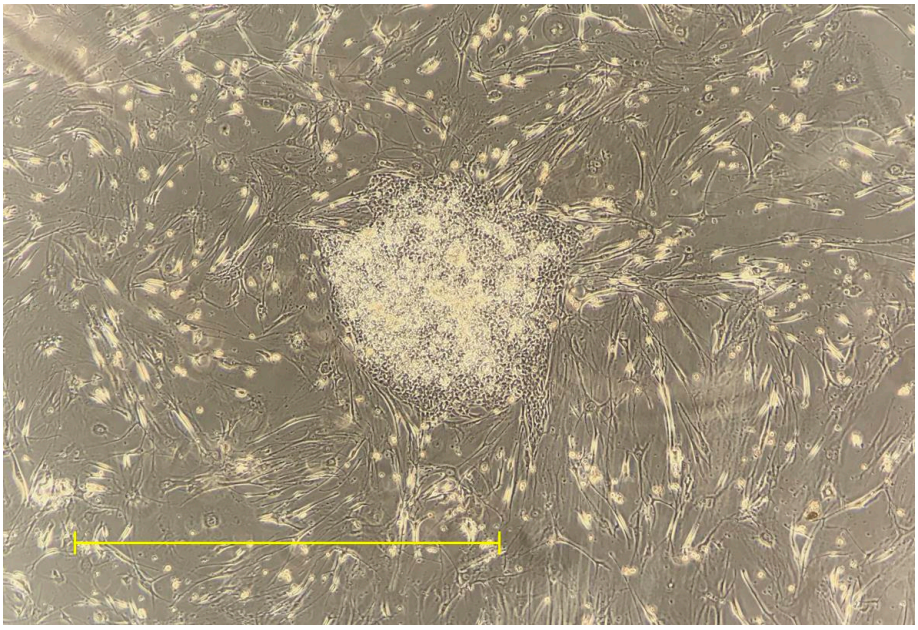
179　精神神経ループスにおける細胞内代謝の役割	河野　通仁

【目的】全身性エリテマトーデス（SLE）は若年女性に多く発症し、皮膚、腎臓、精神などを侵す代表的自己免疫性疾患の一つである。若年に発症するにも関わらず 10 年生存率は 90%前後と一般人口に比較して低い。精神神経ループス（NPSLE）は SLE の最も重要な臓器病変である。病態は不明で積極的治療にもかかわらずしばしば高次機能障害等の後遺症を残し、病態解明と新規治療開発が求められている。NPSLE 患者の脳細胞を得ることは非常に困難であり、SLE モデルマウスもヒトとは異なる点も多い。近年人工多能性幹細胞（iPS 細胞）を用いてミクログリアへ分化できることが報告された。本研究では NPSLE 患者から iPS 細胞を樹立し、ミクログリアへ分化させることで NPSLE の新たな病態を明らかにすることを目的とした。

【方法】NPSLE 患者の全血 20 ml から、比重遠心法にて末梢血単核球を分取し、Interleukin-6（IL-6）、stem cell factor（SCF）、Thrombopoietin（TPO）、Fms-like tyrosine kinase 3（Flt-3）含有培地で 4 日間培養した。その後センダイウイルスベクターを用いて OCT3/4、SOX2、KLF-4、L-MYC を導入し、感染から 3 日後にフィーダー細胞上に播種、培養を継続することで iPS 細胞を樹立した（図）。樹立した iPS 細胞は、未分化状態の評価のため Alkaline Phosphatase（ALP）染色、ならびに iPS 細胞未分化マーカーを用いた蛍光免疫染色を、三胚葉全てへの分化能保持を確認するため三胚葉分化試験を実施した。続いてミクログリアへの分化を試みた。

【結果】NPSLE 患者由来 iPS 細胞の樹立に成功した。ALP 染色、ならびに iPS 未分化マーカーを用いた蛍光免疫染色により、iPS 細胞が未分化状態であることを、また三胚葉分化試験より樹立した iPS 細胞は多分化能を保持することが確認された。今後分化させたミクログリアを用いた機能解析を行っていく。

樹立した精神神経ループス患者由来 iPS 細胞の例



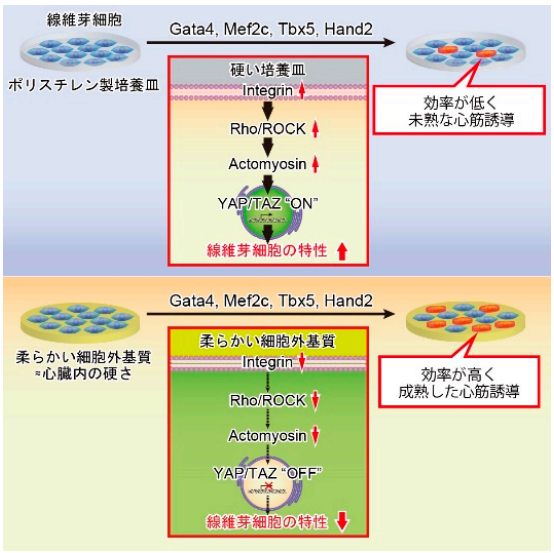
180　心臓幹細胞直接リプログラミングによる心臓再生の確立	貞廣　威太郎

【目的】線維芽細胞に心筋特異的転写因子を導入し、心筋細胞を誘導する心筋直接リプログラミング法は iPS 細胞を用いた心臓再生が抱える課題を解決するため開発された。しかし誘導された心筋細胞には増殖能がなく、心筋再生のためには十分な細胞数が得られない可能性がある。心臓中胚葉細胞は心臓全体の幹細胞であり、自己複製能を有する。本研究では、我々が発見した多能性幹細胞からの心臓中胚葉誘導因子 Tbx6 の知見を応用し、線維芽細胞から心臓中胚葉細胞を直接作製する、心臓中胚葉細胞直接リプログラミング法を開発する。

【方法】1. Tbx6 による線維芽細胞からの心臓中胚葉リプログラミングの検討：マウス胎児線維芽細胞に *Tbx6* 遺伝子を導入し、心臓中胚葉細胞を誘導する。心臓発生の過程で時期特異的な発現を示す遺伝子群を経時的に解析する。表面マーカーによる定量評価を行い、心臓中胚葉細胞の誘導効率を評価する。2. 心臓中胚葉からの心血管系分化を定量的に観察できる系統追跡システムの確立：心臓中胚葉細胞と、そこから分化した全ての細胞が GFP を発現する遺伝子改変マウス（Mesp1-Cre/GFP-loxP マウス）を作製した。このシステムにより誘導した心臓中胚葉からの心筋細胞分化の経時的な解析を行う。3. 心筋誘導を促進する細胞の足場の固さを検証する実験系の確立：心筋誘導効率を改善する目的で、生体内の環境を再現する。生体内は培養皿と比較し、約 10 万分の 1 の柔らかさであるため、この環境を再現するためにハイドロゲルを用いた培養系を構築し、任意の硬さの足場を再現できる実験系を確立する。

【結果】1. Tbx6 は線維芽細胞から心臓中胚葉細胞を誘導する：マウス胎児線維芽細胞に *Tbx6* 遺伝子を導入したところ、心臓中胚葉マーカー遺伝子が誘導され、長期にわたって発現が維持されていた。分化が進んだ心臓前駆細胞・胎児心筋に発現する遺伝子群は誘導されておらず、心血管系細胞への分化には Tbx6 以外に、心血管系への誘導を促進する遺伝子の追加が必要であることが示唆された。検討の結果、Tbx6 に加えて複数の因子を導入することで、一過性の心臓中胚葉遺伝子の上昇の後に、より分化した遺伝子群の上昇を認めた。遺伝子改変マウスの線維芽細胞を用いた検討では、一部の心筋細胞では、誘導した心臓中胚葉細胞から心筋細胞が分化したことが示された。一方で、その誘導効率は低く、心筋誘導を促進する必要があった。2. 心筋誘導を促進する柔らかい足場の発見と、分子生物学的機序の解明：これまでの先行研究の成果より、生体内でリプログラミングされた心筋細胞はより成熟した性質を持っていることがわかっている。我々は心筋誘導を促進する環境として、細胞周囲の足場の硬さに着目した。この環境を再現するため、我々はハイドロゲルを用いた培養系を構築し、任意の硬さの足場を再現できる実験系を確立した。心筋誘導効率は、硬い培養皿よりも足場が柔らかくなると改善することが判明し、その分子生物学機序がインテグリンシグナルを介した YAP／TAZ の抑制であることを明らかにした。

柔らかな足場は心筋誘導を促進する



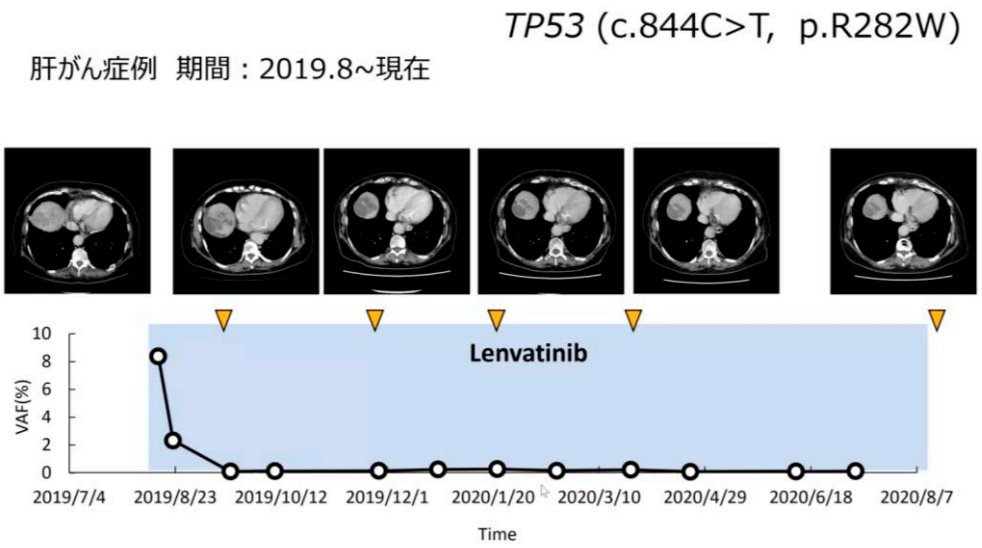
181　肝細胞癌個別バイオマーカーとしてのctDNAの臨床応用	鈴木　悠地

【目的】原発腫瘍組織のパネルシークエンスから同定した遺伝子変異を対象に、腫瘍由来血中循環 DNA（circulating tumor DNA、以下 ctDNA）の変異アリル頻度（腫瘍由来 DNA の血中全 DNA に対する比率、variant allele frequency : VAF）を計測すると、1. 化学療法に連動して VAF が変化する、2. 治療後 VAF の変化量により予後の層別化ができる、3. 画像で確認される再発に先行して VAF が上昇する、ということが示唆されている。ctDNA は、分子標的薬や免疫チェックポイント阻害剤を投与する切除不能進行肝細胞癌においても、1. 治療効果や予後予測に活用できる可能性、2. 画像検査よりも早期に増悪や再発を捉える可能性がある。しかしながら、切除不能進行肝細胞癌は出血や播種リスクを理由として原発腫瘍組織の採取が避けられてきた。したがって、切除不能進行肝細胞癌に対する ctDNA の臨床的有用性を検証するためには、生検リスクを回避した代替手段による評価が求められていた。本研究は、治療前の ctDNA を対象に次世代シーケンサー解析（NGS）を行い、追跡すべき遺伝子変異を同定する。同定した遺伝子変異について、超高感度デジタル PCR（dPCR）で追跡することで、切除不能肝細胞癌患者に対する ctDNA による治療効果予測や体内腫瘍量モニタリングを行うことの臨床的有用性を検証することを目的とした。

【方法】分子標的薬の開始前および治療開始後の定期受診時に通常採血と同時に ctDNA 抽出用の血液 10 cc を採取した。キアゲン社の QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit を用いて、0.5〜1 ng/μL の最終溶液でトータル 15 ng 以上（溶媒は ddH_2O またはキアゲン社の Elution Buffer を用いる）に調製した。ctDNA のパネルシークエンス解析は、委託アッセイ契約を締結した企業および国内共同研究契約を締結した研究期間で実施した。パネルシークエンスで同定した遺伝子変異について、0.01%の VAF でも安定した測定が可能な超高感度 PCR 機器、digital PCR で測定した。

【結果】切除不能肝細胞癌症例 9 例について、ctDNA を対象としたパネルシークエンスを実施した。その結果、9 例中 8 例（88.9%）について digital PCR での追跡対象となる遺伝子変異を同定した。8 例中 3 例について、digital PCR による治療経過中の経時的な ctDNA の追跡を行い、CT 検査などの臨床情報と対比した。その結果、追跡対象とした遺伝子変異について digital PCR による経時的な追跡が可能であることを確認した。特に、治療奏功が得られた症例では、ctDNA が鋭敏に低下し、その後 ctDNA は持続的に陰性化することが明らかとなった。

切除不能肝細胞癌に対する分子標的薬治療で画像上奏功が得られた症例についての ctDNA モニタリングの 1 例



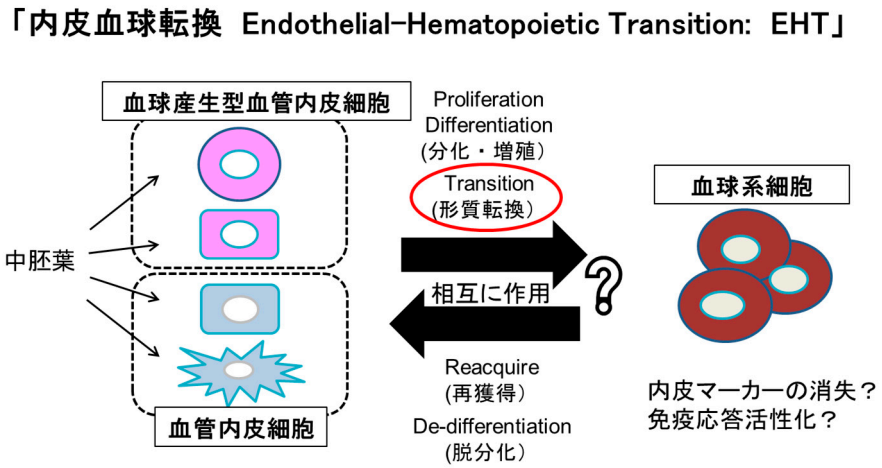
182　肺高血圧症疾患モデルにおける内皮血球転換機構の解明	関根　亜由美

【目的】呼吸器疾患における病態形成や組織再生応答において、内皮血球転換＝EHT がどのように関わっているのか未だその詳細なメカニズムは明らかにした報告はない。そこで本研究では肺高血圧症モデルを中心に肺循環系における EHT の分子メカニズムと血管新生機構を詳細に明らかにすることとする。

【方法】1. 肺高血圧症マウスモデルに対する右心カテーテル（Miller 社）を用いた血行動態評価と肺組織病理を解析した。2. マウス肺を使用した内皮血球転換（以下、EHT）における肺構成細胞の動態と機能解析を行った。3. 肺組織切片標本を用いて蛍光免疫染色を行い *in situ* での EHT 陽性細胞を可視化した。

【結果】Su5416 投与低酸素暴露 3 週マウス群（以下、SuHx 群）と慢性低酸素暴露モデル群（Hx 群）では、右室収縮期圧（RVSP）は両群ともに有意に上昇を認めた。組織学的評価でも SuHx 群と Hx 群では病態形成を反映する内皮の肥厚、筋性化レベルはほぼ同等であった。EHT 陽性細胞も病勢に一致して 2〜3 週にかけて有意に割合が増加していることを確認した。BrdU 標識を用いた増殖能評価では 3 週目で上昇している傾向を認めた。肺組織凍結切片上で Runx-1 VE-cadherin CD31 抗体を用いて 3 重染色を行った。コントロールとの評価では肺高血圧症モデルの肺血管での分布にてフローサイトメトリーでの結果に合致する傾向を認めた。以上から、Runx-1 を中心とする EHT 陽性細胞は肺高血圧症の病態形成に寄与している可能性が示唆された。

本研究の目的



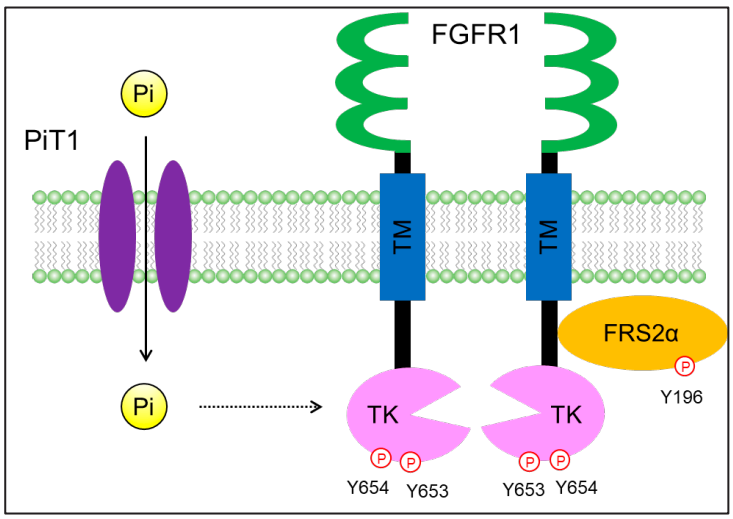
183　ファーストメッセンジャーとしてのリンの作用機序	髙士　祐一

【目的】骨は内分泌臓器としてホルモンを介し、全身性の代謝を制御することが明らかになりつつある。骨より産生・分泌されるホルモンである線維芽細胞増殖因子 23（fibroblast growth factor 23：FGF23）は、腎臓近位尿細管で作用し、血中リン濃度を低下させる。一方、FGF23 の産生・分泌を担う骨が、いかに血中リン濃度の変動を感知し、どのように血中 FGF23 濃度を調節しているのかは未解明である。報告者はこれまでの研究の中で、リンがファーストメッセンジャーとして作用し、骨においては FGF 受容体 1（FGF receptor 1：FGFR1）がリン感知分子として機能していることを見出した。しかし、ミネラルであるリンがファーストメッセンジャーとして、どのような機構を介して受容体型チロシンキナーゼである FGFR1 を活性化するのかは不明である。さらに、骨における FGF23 産生・分泌以外のリンによる生物作用にも FGFR1 が関与しているのかも明らかではない。そこで本研究では、リンによる FGFR1 活性化の分子基盤を解明すること、および骨以外の臓器を含めたリン感知分子としての FGFR1 の機能と臨床的意義について明らかにすることを目的とした。

【方法】FGFR1 と相互作用を示す蛋白として、Ⅲ型ナトリウムーリン共輸送体（PiT1、PiT2）に着目した。阻害剤や siRNA を用いた実験により、リン感知における PiT1 および PiT2 の関与について検討した。また、骨以外の臓器を含めた FGFR1 の機能と臨床的意義を明らかにするために、野生型マウスに FGFR 阻害剤の投与を行い、高リン食負荷に対する血中副甲状腺ホルモン（parathyroid hormone：PTH）濃度の変化を評価した。さらに、骨特異的 FGFR1 欠失マウスを長期飼育して、骨の FGFR1 の生存率への影響を検討した。

【結果】Ⅲ型ナトリウムーリン共輸送体の阻害剤である phosphonoformic acid（PFA）により、骨芽細胞様細胞株である UMR106 において、リン負荷に対する extracellular signal-regulated kinase（ERK）のリン酸化、およびリン応答遺伝子である *Galnt3* 発現の亢進が抑制された。Ⅲ型ナトリウムーリン共輸送体には PiT1 と PiT2 の 2 種類があるが、siRNA を用いた実験から、リン感知には PiT2 ではなく PiT1 が関与していることを明らかとした。また、野生型マウスに高リン食を摂取させると、血中 FGF23 濃度の上昇とともに血中 PTH 濃度の上昇が認められた。ここで、FGFR 阻害剤である NVP-BGJ398 を投与すると、高リン食負荷による血中 PTH 濃度の上昇が抑制された。すなわち、副甲状腺におけるリン感知にも FGFR1 が関与していることが示唆された。骨特異的 FGFR1 欠失マウスの長期飼育では、成長に伴う体重増加は 22 週齢までは骨特異的 FGFR1 欠失マウスとコントロールマウスとの間で有意差を認めなかったが、23 週齢以降骨特異的 FGFR1 欠失マウスで有意な体重減少が認められた。カプランマイヤー法により生存率を評価したところ、骨特異的 FGFR1 欠失マウスはコントロールマウスに比して有意に短命であることが明らかとなった。

ファーストメッセンジャーとしてのリンとリン感知機構



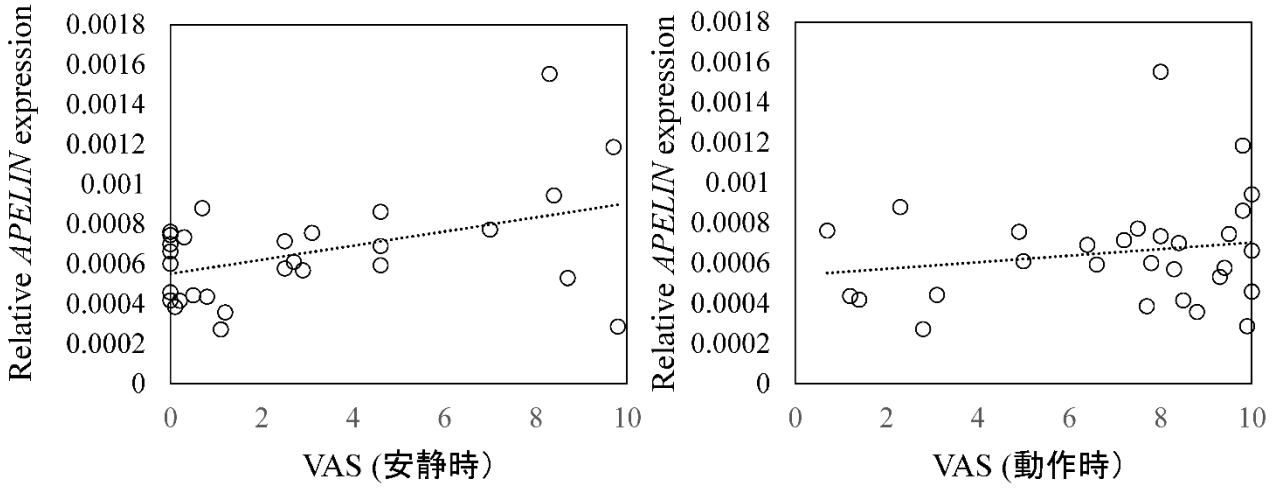
184　変形性膝関節症における炎症非依存性の疼痛機序の解明	高野　昇太郎

【目的】高齢化に伴い変形性膝関節症（OA）患者は年々増加している。これまでに炎症下での OA 疼痛機構に関しては多くの研究がなされてきた。しかし、非炎症性の OA における疼痛発生機序は未だ十分に明らかになっていない。本研究では、血管内皮増殖因子（VEGF）を介した炎症非依存性疼痛機序を解明するために、VEGF 関連神経ペプチドの同定と疼痛への関与、および Transforming growth factor-b（TGF-β）による VEGF 調節機構を検討した。

【方法】変形性膝関節症患者より採取した滑膜組織における VEGF の発現、疼痛スコア（Visual analog Scale : VAS）と VEGF の相関を検討した。滑膜細胞を VEGF で刺激後、発現が上昇する神経ペプチドおよび滑膜組織において VEGF と相関を示すペプチドを探索し、疼痛との関連を検討した。また、滑膜細胞を TGF-β および古典経路（Smad 経路）、非古典経路（MAPK 経路）阻害剤存在下で刺激後、VEGF の誘導とその経路について検討した。

【結果】滑膜組織における VEGF 発現は疼痛スコア（VAS）と正の相関を示した。VEGF 刺激により神経ペプチド Apelin mRNA、タンパクの発現が上昇した。また、Apelin の発現は安静時痛と正の相関を示した。Peptide Lv は VEGF の発現と強い相関を示した。Peptide Lv の発現は安静時痛と負の相関を示した。VEGF の発現は TGF-β によって誘導され、その発現は古典経路、非古典経路の阻害によって阻害された。本研究結果から VEGF は Apelin を介して疼痛に関与すること、その発現は TGF-β によって調節されている可能性が示唆された。本機構は VEGF を介した炎症非依存性の疼痛機構に重要な役割は果たしていると考えられる。

Apelin 発現と疼痛スコア VAS との相関



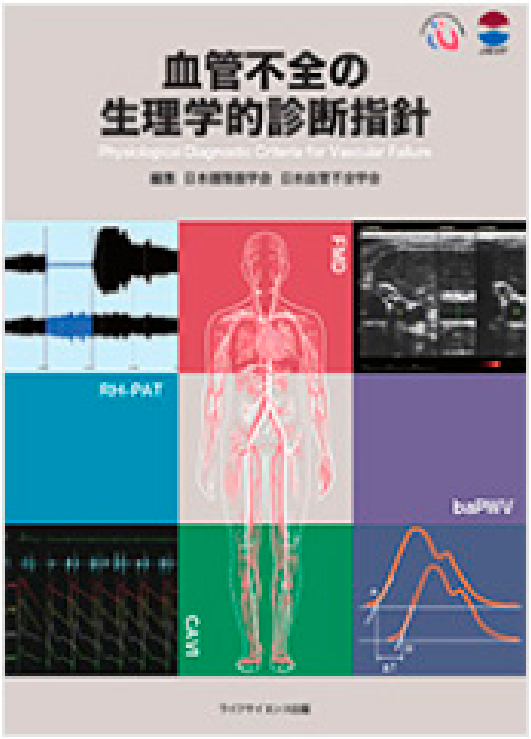
185　心血管病予防のための血管不全診断基準の策定と普及	田中　敦史

【目的】血管不全は、2006 年に井上と野出により提唱された包括的な血管障害を指す概念である。血管不全は、血管内皮機能障害、血管平滑筋機能障害、血管代謝機能障害を主な構成概念とし、その影響は動脈硬化に起因する心血管疾患のみならず、非心血管疾患も含む種々の疾病や機能障害に関連すると想定されている。つまり、血管不全が対象とする疾病領域は広く、予防医学における極めて重要なターゲットと考えられる。しかしながら、血管不全の定義は確立されたものの、明確な診断基準は確立されておらず、血管不全を臨床現場で早期かつ的確に評価・診断することは未だ困難である。そこで本研究の目的は、臨床現場で汎用される代表的な生理学的血管機能検査を用いた本邦独自の血管不全の診断基準を策定し、その普及へ向けた活動を推進することである。

【方法】本邦の日常診療に広く普及している血管内皮機能検査（FMD・RH-PAT）と血管平滑筋機能検査（PWV・CAVI）のそれぞれの検査法について、各検査法のコンセプトと心血管リスクファクターや心血管疾患リスクとの関連について過去の文献レビューを通じ、各検査法における正常値・境界値・異常値などに関するエビデンスの取りまとめを行い、その数値の臨床現場への普及活動（学会報告や書籍発行など）を実施した。

【結果】以下、各検査において血管不全との関連の観点から新たに提唱された正常値、異常値、境界域を示す。FMD の正常値は 7%以上、異常値は 4%未満、境界域を 4〜7%と設定した。RH-PAT の正常値は 2.10 以上、異常値は 1.67 未満、境界域を 1.67〜2.10 と設定した。（ba）PWV の正常値は 14 m/s 未満、異常値は 18m/s 以上、境界域を 14〜18 m/s と設定した。CAVI の正常値は 8.0 未満、異常値は 9.0 以上、境界域を 8.0〜9.0 と設定した。以上の結果をまとめ、我が国における血管機能検査を活用した先制医療の実現と、本診断指針の日常診療への更なる普及促進を図るため、日本循環器学会および日本血管不全学会と連携の上、実地医家を対象とした書籍を発行した。

書籍版「血管不全の生理学的診断指針」



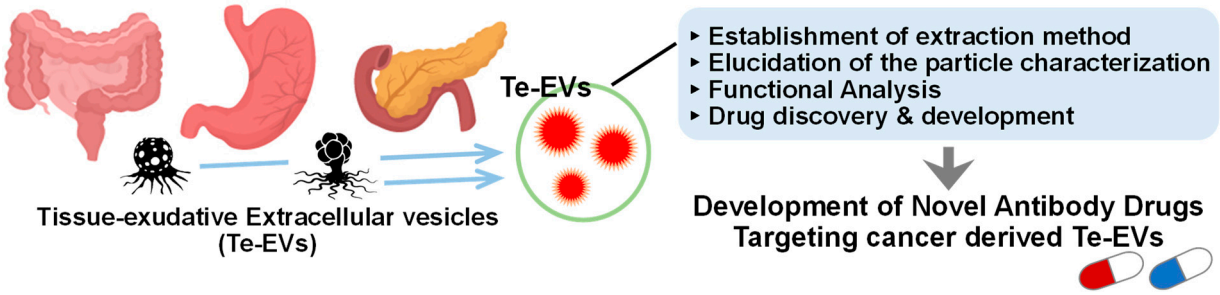
186　消化器癌組織由来細胞外小胞を標的とする新規創薬開発	谷口　高平

【目的】細胞外小胞（Extracellular vesicles：EVs）は、癌細胞が放出し、癌周囲の線維化や血管新生、転移など、癌微小環境を調節するモジュールとして注目されている。しかし、多くの実験が培養細胞を主としており、臨床の状態を反映しているか疑問の余地がある。そこで本研究では、新たな概念として、手術検体から組織由来 EVs（Tissue-exudative EVs：Te-EVs）を抽出し、形態や機能を解析することで Te-EVs を介した癌の病態や進展機構を解明することを第一の目標に設定した。更に、Te-EVs 中で特異的に発現する分子を同定し、EVs を標的とした創薬開発に向けた基盤を構築することを第二の目標とした。

【方法】より効率的な抽出方法の確立や、多数の予備検討を可能にするために、当施設で試料を豊富に採取することができる大腸癌を研究の対象疾患に設定した。Te-EVs の抽出方法をより最適にするための条件を検討し、抽出方法を決定した。また、内包されている遺伝子産物の機能解析に進む前段階として Nano Sight を用いた粒度分布解析や、透過電子顕微鏡（TEM）走査電子顕微鏡（SEM）を用いた微細構造の観察を実施し、Te-EVs の形態学的特徴を追求した。これらの形態学的観察で得られた Te-EVs の由来器官を探索するために手術切片組織を、TEM を用いて観察した。さらに、既知の EVs マーカーの発現をウェスタンブロッティング法で検討した。さらに、Te-EVs を 10,000 g、100,000 g の 2 段階で回収し、各々、Small Te-EVs、Large Te-EVs として大別し、癌部、非癌部の比較および、内包される遺伝子産物に関して RNAseq を実施し、miRNA を中心とした RNA の発現解析および機能解析を実施した。また、抗体ファージライブラリーを活用したバイオパンニングを実施し、大腸癌由来 Te-EVs を特徴的に認識する抗体の同定を試みた。

【結果】組織採取後に EVs 回収用の FBS を添加し、37℃で 3 時間培養することで Te-EVs の回収量がより増加した。粒度分布は 120 nm 付近にピークがあり、全体としては、癌部・非癌部由来 Te-EVs 間で大きな粒子径の差を認めなかった。SEM でも主として同様のサイズの粒子が観察された。一方、TEM では大きさや形状に様々な種類の小胞が顕著に観察された。高倍率の観察では、一部に羽状構造を有する Te-EVs が観察された。また、手術切片組織内にも形態の酷似した小胞が観察された。これの小胞は、粗面小胞体や Golgi 体近傍に観察される傾向にあった。EVs マーカーの発現解析では、テトラスパニンとして CD9 の発現が比較的容易に同定された。既報で大腸癌由来 EVs に発現していた CD147 も腫瘍由来 Te-EVs に高発現している傾向であった。Small、Large Te-EVs に大別した解析では、Te-EVs の粒子数は癌部由来 Te-EVs に多い傾向を認めた。含有されている small RNA の濃度は癌部由来 Te-EVs に多い傾向にあった。RNAseq の解析では、癌部、非癌部由来 Te-EVs で発現傾向に明らかな差異を認めた。癌部由来 Te-EVs で特異的に含有量が増加する miRNA を探索し、Small, Large 何れでも癌部由来 Te-EVs で発現量の多い miRNA を 6 種同定した。この内、大腸癌細胞株由来の EVs にも発現しており癌部由来 Large Te-EVs で変化率の大きい miR-20a-5p に関して機能解析を進めた。癌部由来 Large Te-EVs 中の miR-20a-5p の発現量は、病期の進行に沿って増加する傾向を認めた。バイオパンニングからは、大腸癌部由来 Te-EVs を特異的に認識する一本鎖抗体が同定された。

本研究の概念図



187　フレイル患者の栄養状態と腸内細菌叢との関連性の解明	土橋　昭

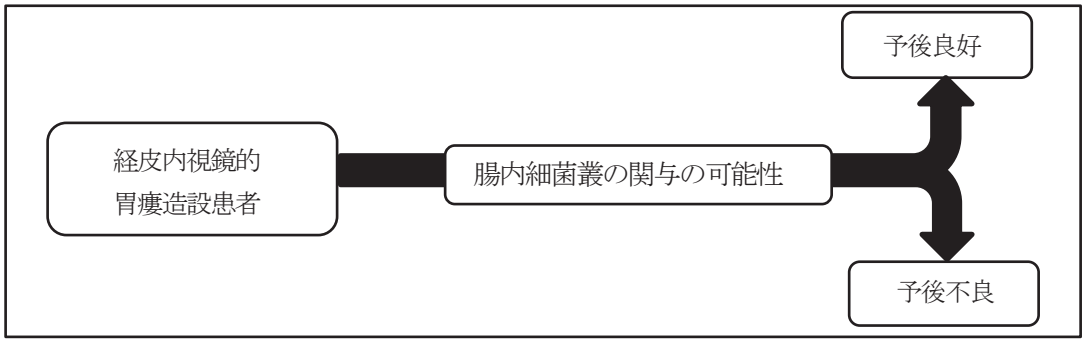
【目的】今後、更なる高齢化社会の到来により、経皮内視鏡的胃瘻造設（Percutaneous Endoscopic Gastrostomy：PEG）を行う患者のニーズが増えることが示唆される。PEG 患者の予後については、血液検査（CRP、Alb）や術前肺炎の有無などとの関連が知られているが、PEG 患者の予後を腸内細菌叢の観点から調べた報告はない。今回、メタ 16srRNA 法を用いて、PEG 前後での細菌叢の変化および造設前の細菌叢と短期予後について明らかにすることを目的に本研究を行った。

【方法】PEG 目的の症例を対象として、それぞれ口腔内・胃液・便のサンプリングを行い、－80℃ディープフリーザーで凍結保存した。解凍後、Lysozyme 酵素で DNA 抽出を行い 16S rRNA V1-V2 領域の PCR を経て、次世代シークエンサーMiSeq を使用してリードを得た。OUT（operational taxonomic unit）作成後、RDP CORE／NCBI Genome DB へアサインし、菌種同定を行った。評価項目は、口腔・胃・腸内の 3 時点（胃瘻造設前・造設 1 日後・造設 7 日後）における、各 taxon の相対的豊富度（Relative abundance）、α多様性（OTU 数、Chao1 index、Shannon's index、ACE index）とし、炎症の程度と栄養に関するバイオマーカーとの相関を解析した。

【結果】対象 6 例（男 1 例、女 5 例、平均年齢 80±8 歳）の背景疾患は、ALS （amyotrophic lateral sclerosis）2 例、脳血管障害 2 例、精神疾患 1 例、乳癌 1 例であった。胃細菌叢の PEG 前後の比較では、造設前から造設翌日にかけて門レベルで Proteobacteria が（P＝0.03）、属レベルで Acinetobacter 属が（P＝0.02）それぞれ増加していた。造設前から 1 週間後にかけての臨床バイオマーカーとの相関解析では、口腔内細菌叢では、Prabacteroides 属、Bacteroides 属、Eikenella 属の PEG 前の Abundance が、PNI 値の改善幅と有意な正の相関を示し、Haemophilus 属、Neisseria 属、Rothia 属、Shannon index と有意な負の相関を示した。胃内細菌叢では、Eikenella 属が白血球数の増加と負の相関を示した。また、Capnocytophaga 属は、アルブミン値の増加と有意な負の相関を示した。Bifidobacterium 属と Leptotrichia 属は、血小板数の上昇と正の相関を示した。Parabacteroides 属、Blautia 属、Erysipelatoclostridium 属は、CRP 値の上昇と正の相関を示した。腸内細菌叢では、Parabacteroides 属が術後のリンパ球数増加と有意な正の相関を示した。

【結論】本研究では、口腔内および胃内細菌叢が PEG 後早期の炎症の発生に関与している可能性が示唆された。今後は、被験者数を増やして今回確認された候補微生物の関与について確度を高めて調査するとともに、被験者をさらに長期間追跡し、長期的な栄養改善とマイクロバイオームとの関連性の解明を試みる。

経皮内視鏡的胃瘻造設後の患者における腸内細菌叢と予後の関連



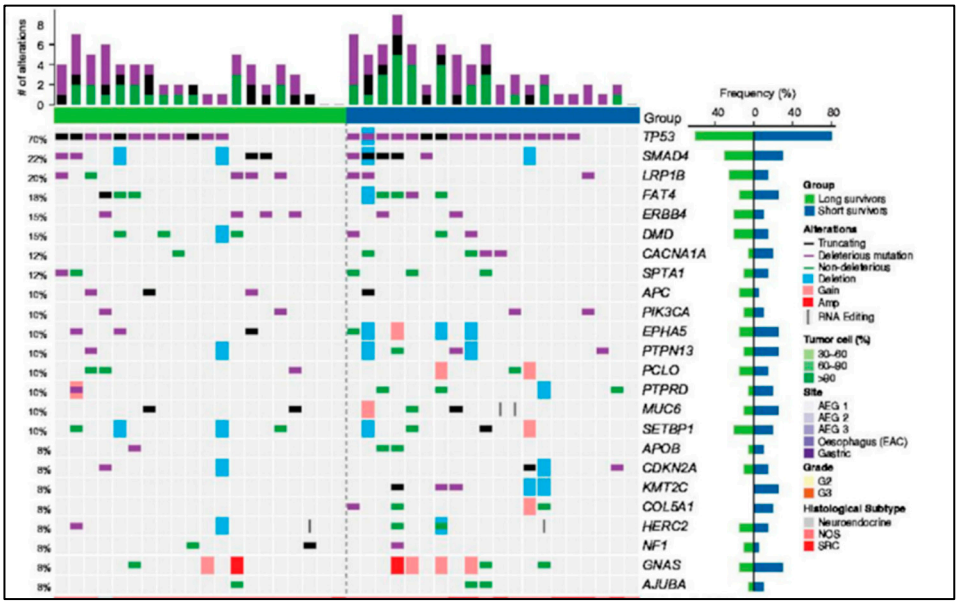
188　食道胃接合部癌の個別化医療を目指したゲノム解析	原田　和人

【目的】本邦において、食道腺癌の罹患率は急激に増加している。手術、化学療法、放射線療法を含む集学的治療の進歩にも関わらず、食道腺癌の 5 年生存率は 25%と不良である。切除可能な食道胃接合部癌に対しては、微小転移を制御し、術後の再発転移を予防するために術前治療が行われている。欧米では術前の化学放射線療法が術後の予後を延長することが報告されている（van Hagen et al. N Engl J Med 2012）。更なる予後の改善の為には、術前治療の感受性を予測するバイオマーカーの同定が必要であるが、その報告は少ない。切除不能食道胃接合部癌に対しても、癌細胞の分子生物学的特徴に基づいた個別化治療の研究が進んでいないのが現状である。本研究の目的は化学放射線療法で奏功した症例と治療耐性を示した症例の分子生物学的相違を Exome sequencing と RNA sequencing を用いて網羅的なゲノム解析を行うことである。治療が奏功した症例に特異的なゲノムの特徴を同定し、予後予測因子、抗癌剤感受性予測因子の同定を試みる。治療に耐性を示す症例に特異的なゲノムの特徴から抗癌剤耐性のメカニズムを解明することで、新規の分子標的治療薬のターゲットの同定、新規治療薬の創薬を進める。

【方法】切除不能なステージ 4 の食道胃接合部癌患者のうち、化学療法に奏功して 3 年以上生存した症例（longer survivors）と化学療法に奏功せずに半年以内に死亡した症例（shorter survivors）、それぞれ 20 例ずつを選択し NovaSeq6000 を用いて Whole-exome sequencing（WES）と bulk RNA sequencing（RNA-seq）を行った。

【結果】遺伝子変異解析では mutation burden は longer survivor と shorter survivors の両群で差は認めなかった。頻度の多い遺伝子変異は *TP53*（70%）、*SMAD4*（22%）、*LRP1B*（20%）、*ERBB4*（15%）、*APC*（10%）、*PIK3CA*（10%）、*PTPN13*（10%）、*KMT2C*（8%）であった。この中で *KMT2C* 変異は shorter survivors 群に有意に多く認められた（the Fisher exact test、$p<0.05$）。COSMIC mutational signatures を比較すると、sig2、sig12 の変異が有意に longer survivors で多く認められた。longer survivors と shorter survivors の copy number variations を比較すると、Chr4 の欠損が shorter survivors で有意に多く認められた。

longer survivors と shorter survivors の遺伝子変異



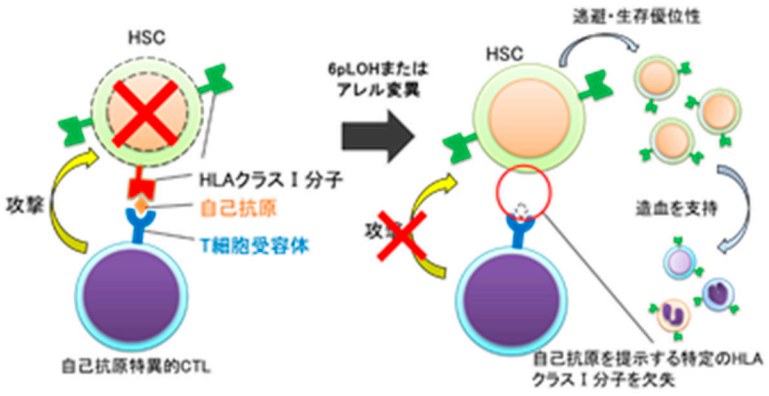
189　HLAにより提示される再生不良性貧血自己抗原の同定	細川　晃平

【目的】特発性再生不良性貧血（acquired aplastic anemia：AA）は汎血球減少を特徴とする血液難病であり、抗胸腺細胞グロブリンやシクロスポリンなどの免疫抑制療法が奏功することから、T 細胞の異常によって起こる一種の自己免疫疾患であると考えられる。造血幹細胞上の自己抗原を認識する細胞傷害性 T 細胞（CTL）が何らかの誘因によって誘導される結果、造血幹細胞が減少し発症すると考えられているが、CTL の標的となる自己抗原は不明である（下図）。我々のこれまでの研究から、HLA-B4002 が AA の自己抗原提示や CTL の誘導に最も強く関与していることが示唆されていた（Espinoza JL, et al. Blood advances, 2018）。本研究は AA 患者 iPS 細胞由来造血前駆細胞（HSPC）を用いて CTL を誘導し、その標的抗原を同定することを目的とする。

【方法】①HLA-B4002 陽性で、HLA クラス I アレル欠失が検出される AA 患者の末梢血から単球と CD8 陽性 T 細胞を単離し、単球から iPS 細胞を作製ののち、6pLOH 陽性・陰性のそれぞれから HSPC を誘導することとした。②上記 AA 患者の CD8 陽性 T 細胞から、6pLOH 陰性細胞は傷害するが、6pLOH 陽性細胞は傷害しない CTL クローンを単離する。細胞傷害活性を持つ CTL の TCR クロノタイプを決定し、健常者の T 細胞とレトロウイルスを用いて TCR 導入 T 細胞を作製した。③HLA-B4002、B5401 などの特定の HLA を発現させた K562 細胞に CD80・CD137L などの共刺激分子を導入した人工抗原提示細胞を作製し、TCR 導入 T 細胞の HLA 導入 K562 細胞や iPS 細胞由来造血幹細胞に対する細胞傷害活性を IFNγの ELISA 法により決定した。④HLA 導入 K562 細胞から HLA クラス I 抗体を用いて免疫沈降を行い、HLA 結合ペプチドを精製したのち、酢酸バッファーを用いて nanoLC-MS/MS で解析することにより、HLA 分子によりに提示されるペプチドを同定した。⑤④により明らかとなった遺伝子を CRISPR/Cas9 によりノックアウトした K562 細胞を作製し、③で決定した TCR 導入 T 細胞との反応性を IFNγの ELISA 法により評価した。

【結果】HLA クラス I アレル欠失陽性 AA 患者の CD8 陽性 T 細胞から、野生型 HSPC は傷害するが、B4002 欠失 HSPC は傷害しない CTL クローンを単離することに成功した。これらの中で高頻度に検出された TCR のうちの一つは、同一症例の発症時の骨髄 PD-1 陽性 CD8 陽性 T 細胞からも検出された。CTL のうち、高頻度に認められた 2 種類の TCR を導入した TCR 導入 T 細胞は HLA-B4002 拘束性に HLA-B4002 導入 K562 細胞または野生型の iPS 細胞由来 HSPC を傷害した。HLA-B4002 導入 K562 細胞を HLA クラス I 抗体により免疫沈降を行い、nanoLC-MS/MS で解析したところ、15 個のペプチドが同定されたが、そのうち 10 個は HLA-B4002 によって抗原提示されやすいアミノ酸配列を有していた。それらのペプチドのうち、造血幹細胞の増殖に重要な役割を果たしている特定の遺伝子 X を CRISPR/Cas9 によりノックアウトした K562-B4002 細胞を作製し、上記 2 種類の TCR 導入 T 細胞の反応を評価したところ、コントロールと比較して有意に反応が減弱していた。

HLA クラス I アレルを欠失した造血幹細胞の細胞傷害性 T 細胞からのエスケープ



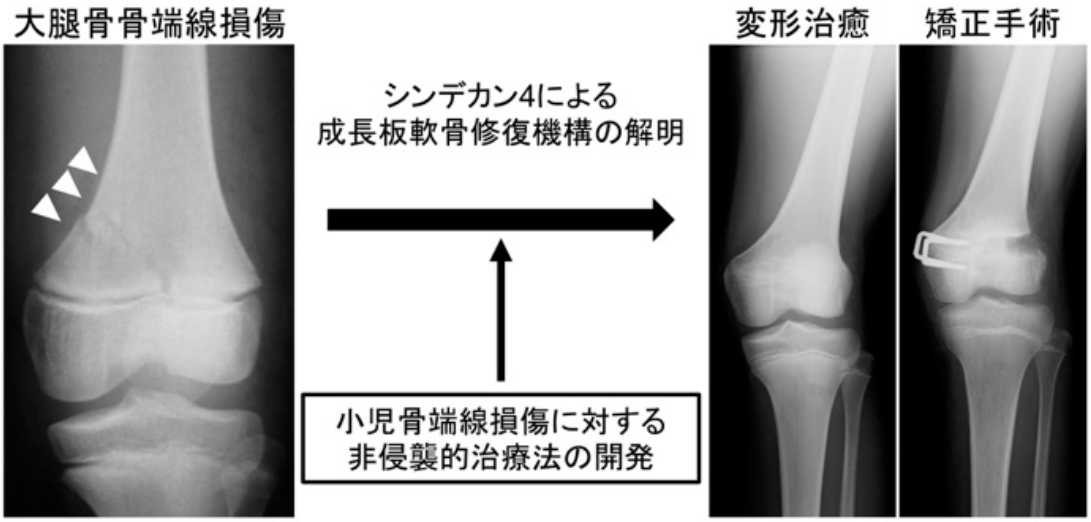
190　小児骨端線損傷後の治癒におけるシンデカン4の影響	松岡　正剛

【目的】小児骨端線損傷は小児骨折における 30%を占め、そのうち 10%が四肢の短縮、変形をきたすため社会的に重要な問題である。長管骨の長軸方向の成長は、成長板での軟骨細胞肥大化に引き続く血管侵入による骨組織への置換（内軟骨性骨化）により主に制御される。成長板軟骨損傷は損傷軟骨の部分的な骨化により成長障害を来たし、若年者に大きな負担を与えるがその詳細な機序は未だ明らかにされていない。一方、ケモカイン Stromal cell-derived factor-1（SDF-1）／pre-B cell growth-stimulating factor（以下 SDF-1）は、さまざまな組織の修復過程において重要な役割を担うことが知られている。我々はこれまでケモカイン SDF-1 が骨髄間葉系幹細胞を損傷部に誘導し、軟骨修復を促進することを明らかにした。さらに、生体内に広く分布する細胞膜貫通型ヘパラン硫酸プロテオグリカンであるシンデカン 4 が、骨髄間葉系幹細胞の遊走に重要な役割を担う SDF-1 と分子相互作用を有することに着目し、シンデカン 4 欠損が自己免疫性疾患における関節軟骨の恒常性維持に促進的役割を担うことを明らかにした。そこで、関節軟骨の恒常性維持に重要な役割を担うシンデカン 4 欠損は、成長板修復過程においても損傷軟骨細胞に対して促進的作用を及ぼす可能性があると着想し、成長板軟骨修復機構の更なる解明を目指す。

【方法】本研究の最終到達目標は、小児骨端線損傷による骨成長障害に対する非侵襲的新規治療法を開発することである。本研究期間内の到達目標はシンデカン 4 が成長板軟骨損傷の修復過程において果たしている役割を明らかにすることである。シンデカン 4 が果たす役割を明らかにするために、3 週齢の野生型マウスに成長板損傷モデルを作製しその表現型を解析した。*In vitro* の実験系としては、野生型マウス、シンデカン 4 ノックアウトマウス（KO マウス）より回収した間葉系幹細胞を用いて、増殖試験・遊走能試験を行った。

【結果】3 週齢の野生型マウスの修復過程を調査した。全身麻酔下に実体顕微鏡で観察を行い、膝関節に 5 mm の皮膚切開により脛骨近位成長板を明らかにし、脛骨外側より内側に向かって 25-G 針で直径 500 μm の成長板軟骨損傷を作製した。術後経時的に検体を回収し、成長板軟骨損傷が脛骨長を測定したところ損傷を受けた脛骨の全長は骨橋を形成し、健側と比較して短縮していた。本モデルを用いて KO マウスの表現型を評価したところ、術後 3 週において KO マウスの脛骨全長は WT と比較して成長障害が促進される傾向を示した。また、マウスより回収した骨髄間葉系幹細胞において増殖能試験では KO マウスと野生型マウスに差はなかったが、遊走能試験では KO マウスにおいて野生型マウスよりも有意に増加していた。

本研究計画の治療戦略



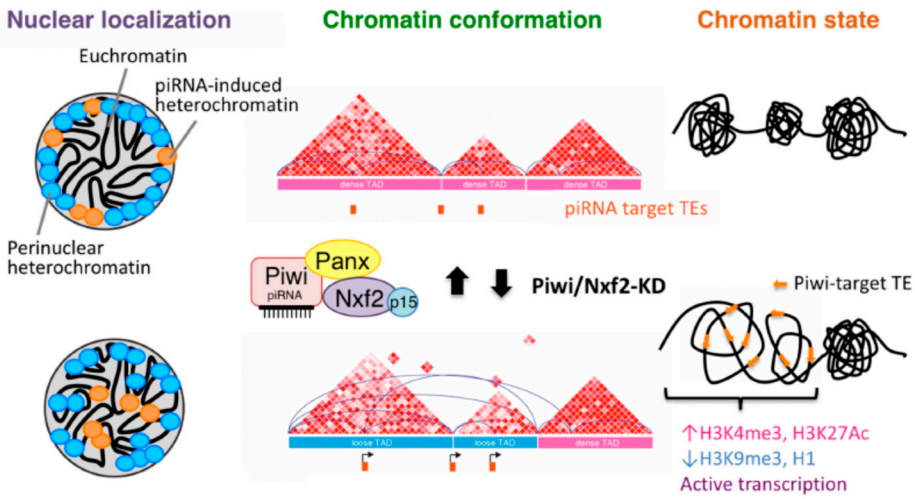
191　非コードRNAと転移因子が制御するゲノム三次元構造	岩崎　由香

【目的】真核生物ゲノムはトランスポゾンの無秩序増殖の脅威から自己防衛しつつ、生存に必須な遺伝子群の発現を確保している。近年、この自己防衛に PIWI-interacting RNA（piRNA）と呼ばれる 20〜30 塩基長の非コード小分子 RNA を中心とした RNA サイレンシングが主要な役割を果たすことが示唆された。piRNA は主にトランスポゾンに由来し、PIWI タンパク質群と複合体を形成する。*PIWI* 遺伝子変異個体では、トランスポゾンの発現が上昇し、生殖幹細胞発生異常が起こり、不稔となる。以上のことから、PIWI-piRNA 複合体はトランスポゾンを選択的に抑制することが示唆される。ショウジョウバエ PIWI タンパク質の一種である Piwi は核に局在し、piRNA と複合体を形成することにより、標的トランスポゾンとその周辺ゲノム領域に抑制性ヒストン修飾を付加し、転写を制御する。これまでに、Piwi-piRNA 複合体による転写制御の実態は、リンカーヒストン H1 等複数の因子の誘導を伴うクロマチン構造の変動によることを明らかにした。さらに、この制御が PolII の抑制を介した転写制御とヘテロクロマチン形成の二段階からなることを示した。これらのことから、piRNA は新たなエピゲノム因子として機能すると考えられる。本研究では、piRNA が標的トランスポゾン領域のヘテロクロマチン形成に伴うゲノムワイドな影響の解明を目指す。

【方法】ショウジョウバエ卵巣由来培養細胞（Ovarian Somatic Cell：OSC）を用いて Piwi ノックダウン条件下において Hi-C 解析を行い、Piwi による制御が阻害された際のゲノムの三次元構造の変化を解析した。さらに、同条件下で Lamin DamID-seq 解析および Oligo-FISH 解析を行い、転写制御の際に観察される核内での位置関係を明らかにした。これらに加えて、ヒストン修飾などを ChIP-seq 解析、遺伝子発現量を RNA-seq 解析で網羅的に同定することで、piRNA の制御に伴うエピゲノム変化の全体像を明らかにした。

【結果】Hi-C 解析の結果、Piwi ノックダウン条件下では、Piwi-piRNA に制御されるトランスポゾンが挿入されているゲノム領域特異的に TAD 内相互作用頻度の減少と長距離間相互作用頻度の増加が確認された。さらに、Lamin DamID-seq 解析および Oligo-FISH 解析の結果、Piwi-piRNA 標的トランスポゾンをコードするクロマチン領域について、Piwi ノックダウンに伴い核ラミナとの相互作用が減少することを明らかにした。これらの結果は、Piwi-piRNA によるトランスポゾンの抑制は、局所的な転写抑制にとどまらず、標的トランスポゾンを中心とした核内での空間的な配置やゲノム三次元構造の制御を伴うダイナミックな核内構造体形成であることを示唆する。

Piwi-piRNA は様々な階層でのエピゲノム制御を介してトランスポゾンを抑制する



192　創薬至適化合物を選出する深層ランク学習	大上　雅史

【目的】創薬標的への強い活性を持つ新薬候補化合物の創成や、薬剤候補化合物の薬物動態パラメータの正確な推定は、医薬品研究開発の加速やコスト削減に直接繋がる重要課題である。本研究ではこれまであまり予測手法が確立されていなかった体内動態パラメータとして、薬剤の血液胎盤関門の透過性に着目し、これを予測するための学習手法を開発した。当初は深層ランク学習技術を活用することを検討していたが、ウェブアプリ等の形式でユーザーが迅速にかつ簡便に予測値を得られるようにするというアプリケーション実装を考慮した結果、勾配ブースティング木による予測手法構築を採用した。

【方法】血液胎盤関門透過性を表す指標である logFM および CI を対象に、それぞれのデータセットを用いた予測モデルの構築を行った。logFM データセットは *in vivo* 測定として臍帯血と母体血の血中濃度比（F/M 比）から得られたデータであり、Takaku らが文献から収集した 55 化合物の logFM 値を用いた。CI データセットは、*ex vivo* 実験であるヒト胎盤灌流実験によって化合物が母体側から胎児側へ移動する速度から求められる血液胎盤関門透過性の評価方法であり、コントロール化合物であるアンチピリン（antipyrine）に対するクリアランスの比率 CI（clearance index）のデータである。CI データは Giaginis らが文献から収集した 88 化合物の CI 値を用いた。予測モデルの構築では、化合物の特徴ベクトルとして mordred 記述子を用いた。各データセットは、それぞれ先行研究と同一の分割方法にて訓練データとテストデータに分割し、予測モデルの学習および検証に用いた。予測モデルの構築には勾配ブースティング木の実装の一つである LightGBM を用い、optuna の LightGBM Tuner によってパラメータチューニングを行った。評価指標は決定係数 R^2 と根平均二乗誤差 RMSE を用いた。また、構築した LightGBM による予測モデルを用いて、テキストボックスに入力された化合物の SMILES 文字列から CI と LogFM の予測値を計算するウェブサービスを構築した。フロントエンドは Vue.js フレームワークを用い、バックエンドは Python と Flask を用いてシングルページアプリケーションとして構築した。あわせて https://pbpredictor.net/api/predict?smiles=[str] の URI によって SMILES 文字列から logFM と CI の予測値をリクエスト可能な REST API を実装した。

【結果】提案手法の LightGBM による予測は、logFM と CI の双方で従来手法の予測精度を上回る結果となった。特に、従来手法ではテストデータの精度が訓練データに比べて良くなかったが、提案手法ではテストデータでも良好な予測性能を示しており、汎化性能が良いことが示唆された。構築したウェブサービスは https://pbpredictor.net からアクセス・利用が可能である。

予測ウェブサービス PBPredictor の概観 https://pbpredictor.net

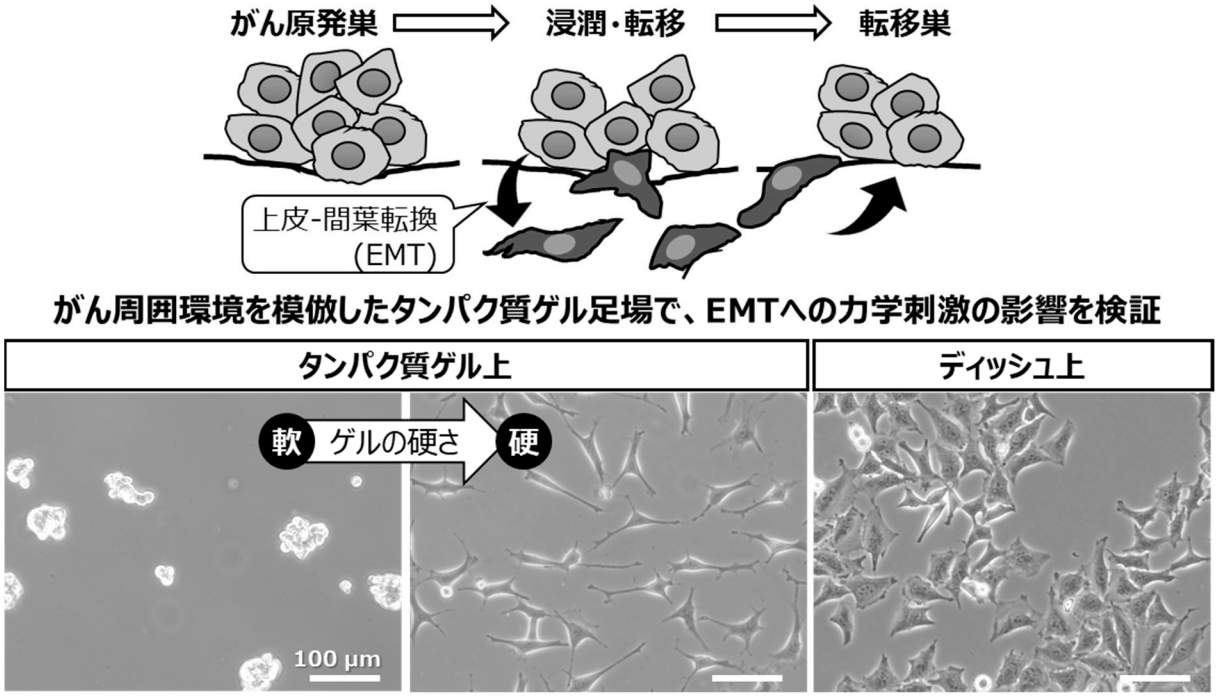
193　がんの浸潤・転移を引き起こす生体内力学刺激の解明	大山　智子

【目的】転移の有無は、がん治療の難易度を左右する重要な要素である。転移には、がん細胞間の接着性が失われ、個々の細胞が可動性を獲得する「上皮－間葉転換（EMT）」が関わっているとされる。しかし、EMT が起こるきっかけを含め、そのメカニズムの詳細は未だ解明されていない。本研究において着目したのは、生体内におけるがんの周囲環境（細胞外マトリックス）である。がん周囲の細胞外マトリックスはⅠ型コラーゲンが豊富に存在するため正常部位より硬いことが知られている。そこで本研究では、周囲環境からの力学的な刺激ががんの EMT に関わっているのではないかとの仮説を立て、がん周囲の細胞外マトリックスを模倣できるタンパク質ゲル足場を開発して、仮説を *in vitro* で検証することを目的とした。

【方法】量子ビーム（高度に制御した放射線）誘起反応を駆使した独自技術によって、タンパク質を架橋・ゲル化してタンパク質ゲル足場を作製した。さらに、架橋密度を調整することによって硬さの異なるゲル足場を作製し、がん細胞を培養して、特に細胞形態と EMT に関わる転写因子として TWIST の局在を解析した。

【結果】医療器具の滅菌処理に用いられるガンマ線を用い、架橋剤等の薬剤を一切用いずにタンパク質水溶液をゲル化させた。Ⅰ型コラーゲンの分解・精製物であるゼラチンを原料に用いた場合、得られたゲル足場は透明度が高く、水溶液の濃度やガンマ線の照射条件によって、生体軟組織の硬さ範囲のほぼ全域をカバーする圧縮弾性率（約 3～460 kPa）に自在に調整することができた。硬さの異なるゲル足場にがん細胞を播種して応答を解析したところ、ヒト子宮頸がん由来の HeLa 細胞の場合、軟らかいゲル上では 3 次元的な細胞塊を形成し、ゲルが硬くなるにつれ徐々に 2 次元的に伸展して、長細い突起を有する特徴的な形をとることが分かった。また、ゲルよりもはるかに硬いディッシュ上で 3 日間培養した細胞の場合、TWIST は核内に集積していたが、軟らかいゲル上で培養した場合は細胞質側に集積するなど、周囲環境の硬さががん細胞の EMT に関わることを示唆する結果が得られた。

本研究の目的と、タンパク質ゲルとディッシュ上でのがん細胞の様子



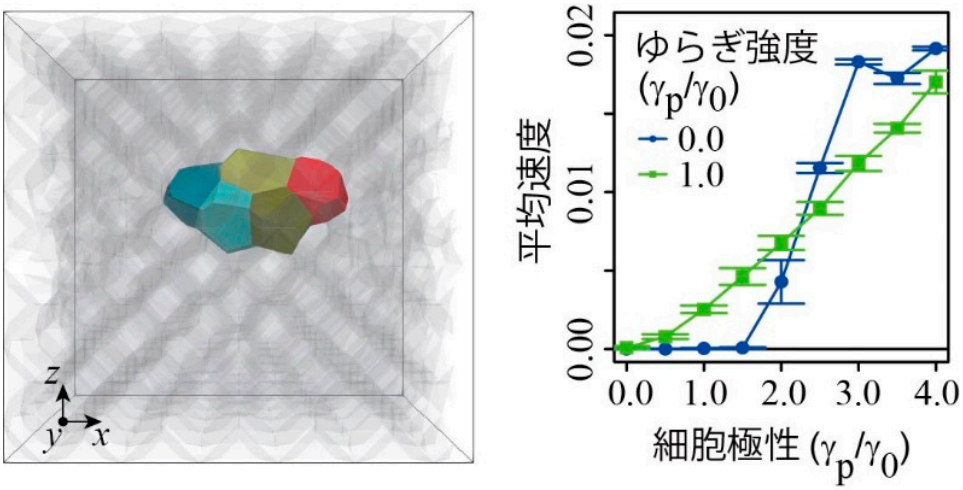
194　器官形成における細胞骨格の動的ゆらぎ特性とその役割	奥田　覚

【目的】多細胞生物の器官形成は、多細胞の自己組織的な変形過程であり、マクロな組織レベルにおいて頑強に制御されている。一方で、この器官形成は、細胞の力発生に駆動される非平衡過程でもあり、ミクロな分子・細胞レベルの大きな“ゆらぎ”を含んでいる。特に、細胞骨格等の力発生におけるゆらぎは、組織レベルの機械物性の制御に関わり、正常な器官形成に必要である。そこで本研究では、多細胞の集団運動を例とし、細胞の力発生におけるゆらぎがその集団運動に及ぼす影響を解明した。

【方法】3 次元バーテックスモデルを用いた数値シミュレーションにより、3 次元組織中における細胞の集団運動の過程を再現した。ここで、アクチン細胞骨格等の振る舞いから生じる細胞のゆらぎは、細胞間の界面張力のノイズとして表現した。

【結果】数値シミュレーションにより、細胞間の接着力や細胞表面の収縮力を表現する界面張力が、3 次元空間における細胞の集団運動を誘導することを示した。この過程では、界面張力がクラスター全体を通して前方から後方への細胞ー細胞境界の流れを誘導し、駆動力を生み出していた。特に、界面張力のゆらぎには細胞極性が弱い状況でも細胞の集団運動を引き起こす役割があることが明らかになった。

3 次元組織中における細胞の集団運動



195　RNA-小分子間相互作用大規模解析と情報データベース化	鬼塚　和光

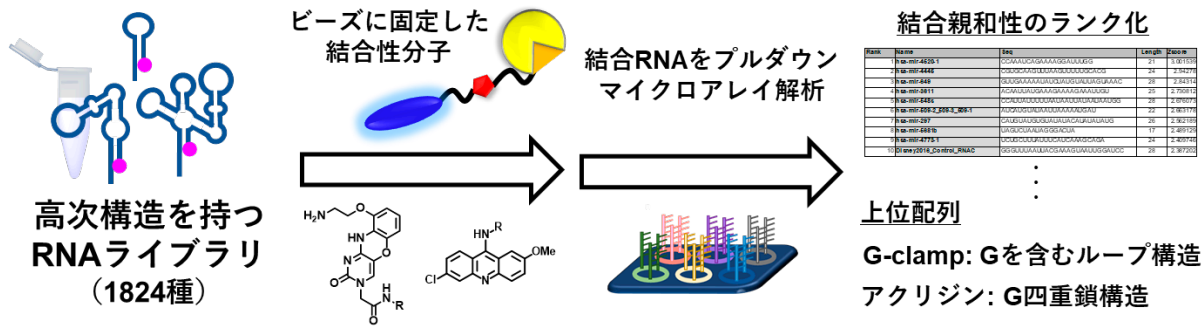
【目的】RNA 標的創薬は近年、オリゴ核酸に加え、経口投与可能な小・中分子でも効果を期待できる標的が増え、飛躍的に進展している。RNA 標的医薬の中には、重篤な遺伝性疾患に対して治療効果が期待できるものもあり、遺伝性・難治性疾患に対する新しい治療法として期待されている。RNA は様々な分子内相互作用により、様々な高次構造を形成することが知られている。創薬標的として、このような高次構造モチーフを小・中分子で狙う場合、多くの類似した構造から標的のみを選択的に認識し、強く結合する必要があるため、高い結合性と選択性を併せ持つ優れた RNA 結合分子の開発は容易ではない。そのため、標的特異的結合分子を創出する優れた評価法・探索法の開発が強く望まれている。このような背景のもと、本研究では RNA－小分子間相互作用の大規模解析技術を構築すること、およびそれら相互作用のデータベース化を目的とした。このような解析技術を確立できれば、化合物ごとに結合嗜好性のビッグデータを得ることができるため、データ駆動型の新たな RNA 化学が切り開けると考えた。

【方法】開発したバーコードマイクロアレイ法にてビーズに固定した化合物（G-clamp 誘導体、チオフラビン T およびアクリジン誘導体）と RNA 構造モチーフ（pre-miRNA およびリピート配列から抽出した 1,824 種の構造モチーフ）との親和性を一挙にランク化した（図）。また、アクリジン誘導体とビニルキナリゾン（VQ）誘導体をコンジュゲートした分子を合成し、類似のバーコードマイクロアレイ法にてアルキル化反応の大規模解析を行った。

【結果】設計した三種類の結合分子の RNA に対する親和性を大規模に解析した結果、G-clamp 誘導体は G を含むループ構造に強く結合し、チオフラビン T やアクリジン誘導体では G 四重鎖構造に対して極めて選択的であることが明らかになった。さらに、上記で得られたランク上位、中位及び下位の配列の RNA を用いて、化合物由来の蛍光変化をもとに解離定数を算出した。その結果、親和性のランクと解離定数は概ね相関したことから、本解析結果の妥当性が示された。アルキル化に関しては、G 四重鎖構造に高い結合選択性を持つアクリジン誘導体を用いたことから、G 四重鎖構造に対して選択的なアルキル化が観測された。

バーコードマイクロアレイ法

本研究で使用した RNA－小分子間相互作用大規模解析法



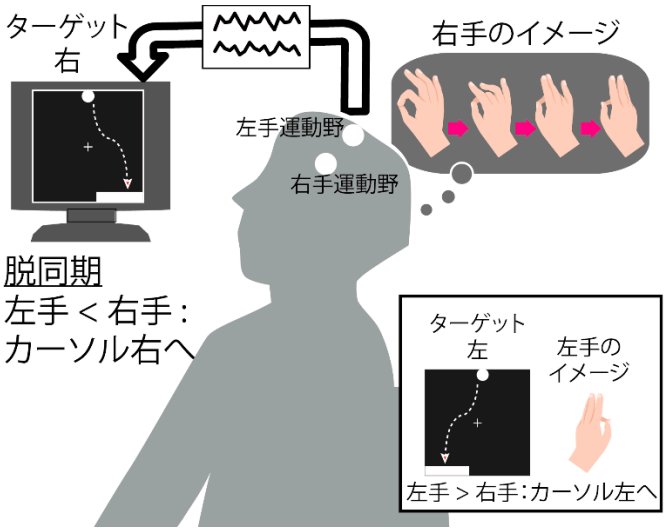
196　ブレイン・マシン・インターフェイスの個人差解明	笠原　和美

【目的】ブレイン・マシン・インターフェイス（BMI：Brain-Machine Interface）は、患者の脳活動を読み取り、その活動に基づいて車椅子やコンピューターなどの機械を動かすことで、病気やけがにより失われた脳機能を代替する技術として研究されている。一方、この BMI の操作能力には個人差があり、上手く使いこなせない患者も多い。その理由としては、脳の機能や構造、病態など一人ひとりの「脳」が異なることが挙げられる。我々は、BMI 技術を臨床に応用するためには、まずこの操作能力の「個人差」が脳の何に由来するかを解明し、そして個々の脳に合わせたテーラーメイドな BMI を提案する必要があると考えた。

【方法】健常被験者 24 名を対象に脳波に基づき駆動する脳波 BMI と機能的磁気共鳴画像法（fMRI：functional Magnetic Resonance Imaging）の同時計測を行った。この手法は、被験者が自発的に脳波をコントロールすることで BMI を操作すると同時に、操作中の脳活動を fMRI で計測する「脳波」と「fMRI」の同時計測である。本研究では、脳波 BMI の操作成績と fMRI で計測された脳活動を算出し、BMI 操作成績に影響する脳活動領域やその特徴を明らかにした。さらに、別の健常被験者 18 名を対象に、経頭蓋直流電気刺激による BMI の操作成績への影響を観察した。

【結果】高成績者と低成績者の BMI 操作中の脳活動を比べたところ、成績によって活動する領域に差はなかった。一方、その活動の広がり（活動体積）は、低成績者が高成績者よりも大きく、特に前部帯状皮質、下頭頂小葉、被殻で顕著であった。成績向上を狙った陽極経頭蓋直流電気刺激は、BMI 操作成績を向上させなかった一方で、運動誘発電位の振幅を減少させた。この運動誘発電位振幅の減少は、BMI を操作する時よりも安静時に顕著であった。また、陽極経頭蓋直流電気刺激による運動誘発電位の変化は、刺激前に成績が低い被験者で変化が大きく、刺激前に成績が高い被験者は変化が乏しかった。以上の結果は、BMI の操作に関わる個人差を解明するための糸口として非常に重要な知見であり、本成果は 2021 年 3 月に開催された IEEE 3rd Global Conference on Life Sciences and Technologies で paper award を受賞した。

本研究で用いたブレイン・マシン・インターフェイス



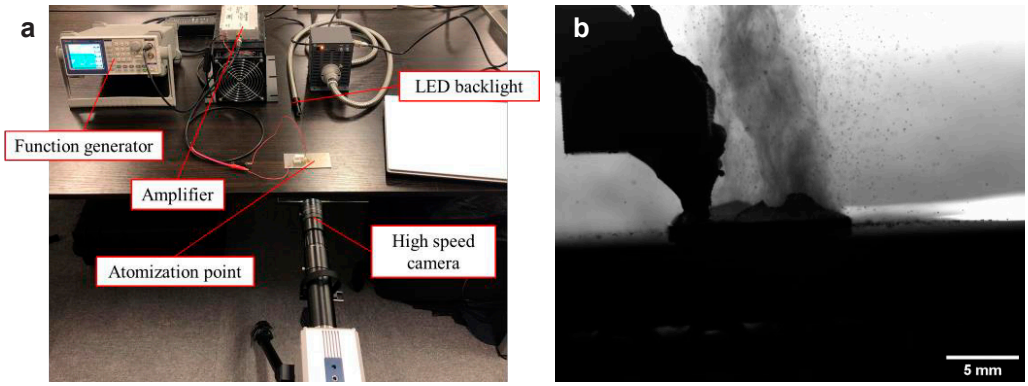
197　$LiNbO_3$を用いたウェアラブル超音波ディフューザの開発	倉科　佑太

【目的】これまでに、超音波噴霧技術はその基礎研究、および燃料噴霧等への応用が既になされており、一般居住空間の保湿を目的とした噴霧技術へも製品化が行われている。しかしながら、現状用いられている超音波噴霧は一般的には空間全体に噴霧する装置や噴霧した薬剤をマスクで吸引する装置などの設置型である。これは一般的に圧電素子として Piezo electric ceramic（PZT）を噴霧するための振動子として用いており、振動伝達効率が悪く装置が大型であることに起因する。加えて、PZT に印加する周波数が 1〜2 kHz であることから表面を伝達する Lamb 波を用いており、効率的に振動を伝達できていない。一方で、昨今のパーソナル空間の価値の向上から、USB 給電小型噴霧器などの個人ごとに適した湿潤環境をワークデスク上で構築することやセルフメディケーションに関心が高まっている。しかし、現状では、装置が設置型であることやマスクを使った吸引であることなど、大きさ制約があり、日常的に使用することは極めて難しい現状である。このような背景を鑑みて、本研究では従来の PZT の Lamb 波よりも効率的に噴霧することができるリチウムナイオベートの厚さ方向の振動モードを用いることで、デバイスの小型化を行う。加えて、超音波デバイスへの入力エネルギーや周波数帯域、霧の放射特性の関係、水滴径などの使用条件の最適化を行い、効率よく噴霧できるウェアラブル超音波ディフューザを製作する。さらに、パーソナル空間において十分に湿潤環境を達成することができるかを確かめる。

【方法】はじめに、霧を可視化するために、表面を金でスパッタリングしたリチウムナイオベートウエハを数十 mm 角で切り出し、MHz 帯の交流電圧を印加して、溶液の噴霧の様子を本研究費で購入予定のハイスピードカメラで観察し、その噴霧の様子を確認した。次に、入力エネルギーおよび入力周波数帯と霧発生の関係を評価した。超音波を発生させるためには、電気的な入力が必要であるが、その入力エネルギーや入力周波数帯と霧の発生量や液滴の大きさは、非線形な関係となっており、最適な噴霧を実現可能とするエネルギーと周波数について、入力エネルギーをパラメータとした検討によって確認した。この撮像によって霧の放射特性を把握し、下記の各種パラメータを変化させた際の放射特性の変化を検討した。

【結果】本研究では、図に示すようにファンクションジェネレータ、アンプとリチウムナイオベートのデバイスを接続して、ハイスピードカメラによりその噴霧挙動を撮影した。リチウムナイオベートに約 7 MHz の交流電流を印加して、素子の thickness 共振モードを励起して液滴を噴霧した。噴霧した液滴をハイスピードカメラで撮影して、液滴の大きさを評価した。その結果、液滴の大きさは直径 3〜4 μ m でピークとなった。これは従来のピエゾ素子による噴霧と比較すると粒径が小さくなることを確かめた。また、素子の大きさを変化させると、一定の値以上では噴霧効率が低下することが明らかとなった。すなわち、リチウムナイオベートを用いた噴霧装置には適した効率の大きさがあることが明らかとなった。

リチウムナイオベート基板を用いた超音波噴霧



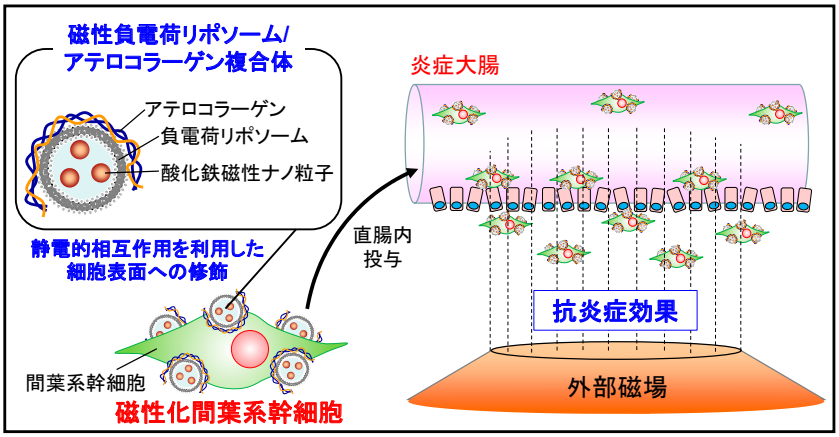
198　磁性体の細胞表面修飾による磁性化間葉系幹細胞の作製	河野　裕允

【目的】間葉系幹細胞（MSC）は、種々の免疫調節物質の産生を通して、炎症反応の抑制や損傷組織の修復に寄与することが知られている。そのため、MSC は、種々の炎症性疾患に対する有効な細胞製剤となることが期待されている。MSC を用いた細胞治療法を構築するうえでは、MSC が長期間疾患部位に留まることが望ましいが、生体内に投与された MSC の組織滞留性は低い。そのため、MSC を用いた効果的な細胞治療を実現するためには、疾患部位に MSC を滞留させる技術の開発が必要である。細胞を標的組織に滞留させる技術としては、細胞の磁性化と外部磁場による誘導を利用する手法が有用である。我々はこれまで、磁性ナノ粒子を内封した負電荷リポソームと正電荷を有するアテロコラーゲンの複合体を開発し、本複合体が MSC 表面に効率的に吸着することを明らかにしている。本研究では、磁性負電荷リポソーム／アテロコラーゲン複合体を利用して MSC 表面に磁性体を修飾し、本磁性化 MSC の大腸内滞留性、および潰瘍性大腸炎に対する治療効果の評価を行った。

【方法】蛍光標識磁性負電荷リポソームと種々の濃度のアテロコラーゲンを低温下で混合することで複合体を作製した。各複合体を MSC に添加し磁場負荷を施した後、MSC 表面に吸着した複合体量を測定した。また、細胞生存率を WST-8 アッセイで評価した。骨分化能、脂肪分化能については、各分化誘導培地中で MSC を培養した後、染色することで評価した。次に、作製した磁性化 MSC をマウス結腸がん由来細胞株 Caco-2 に添加し、磁場付加を施した際の細胞接着効率を評価した。さらに、磁性化 MSC を潰瘍性大腸炎モデルマウスに直腸内投与した際の、大腸内滞留性および抗炎症効果を評価した。

【結果】高濃度のアテロコラーゲンを用いて作製した磁性負電荷リポソーム／アテロコラーゲン複合体は、MSC に吸着した後、細胞表面に安定に留まることが明らかとなった。この時、磁性化による MSC の生存率の低下、および骨分化能、脂肪分化能の変化は認められなかった。この磁性化 MSC を Caco-2 細胞に添加し磁場付加を施した結果、Caco-2 細胞に短時間で顕著に接着した。また、Caco-2 細胞に接着した磁性化 MSC は、生理食塩水による洗浄を繰り返してもほとんど剥離しなかった。次に、磁性化 MSC を潰瘍性大腸炎モデルマウスに直腸内投与した結果、磁場付加を施すことで大腸内における MSC の滞留性が顕著に向上することが明らかとなった。さらに、大腸内における炎症性サイトカイン量が有意に減少することも示された。以上より、磁性負電荷リポソーム／アテロコラーゲン複合体を用いて作製した磁性化 MSC は、潰瘍性大腸炎に対する効果的な細胞製剤となる可能性が示された。

間葉系幹細胞の磁性化による大腸内滞留性向上戦略



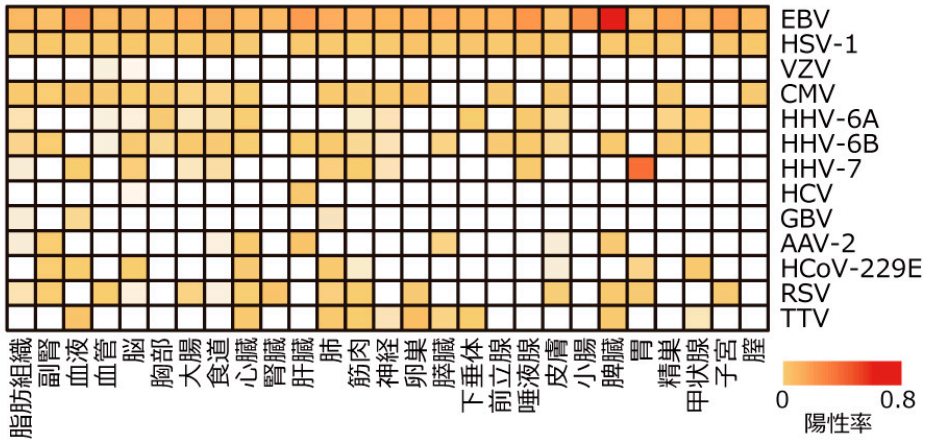
199　全ウイルスの網羅的検出法の開発と疾患との関連解析	佐藤　佳

【目的】多因子疾患や生活習慣病は、環境要因と遺伝要因が相加・相乗的に作用することにより発症する。多因子疾患の多くが、免疫・炎症の異常に関連があり、またこれらの異常は、ウイルス感染によって惹起されうる。そのため、ウイルス感染が疾患のリスクファクターの一つとなる可能性は充分に想定される。たとえば、RS ウイルス感染が、多因子疾患の一つである小児喘息と関連があることが指摘されている。他方、「衛生仮説（hygiene hypothesis）」で提唱されるように、ウイルスの不顕性感染が、疾患の発症を抑制する因子となる可能性も考えられる。実際に、ガンマヘルペスウイルス感染マウスモデルにおいて、このウイルスの感染により、気管支喘息の発症が抑制されることが示されている。このように、常在するウイルスの感染がヒトの健康に影響を与えている可能性は十分に考えられるが、常在ウイルスの解析のために健常人に侵襲的操作を加えることは倫理的にも極めて困難であり、解析が進んでいなかった。そこで本研究では、米国ブロード研究所が主導する Genotype-Tissue Expression（GTEx）プロジェクトに着目し、これまでは見出されなかった疾患の要因としてのウイルス感染の可能性を網羅的に検出することを目的とした。

【方法】GTEx には、検死検体などから取得された、547 人の 51 種類の組織からなる合計 8,991 サンプルの RNA シークエンス（RNA-seq）データが含まれている。もし、その検体のいずれかにウイルスが感染しているのであれば、その RNA-seq データの中にもウイルス由来の配列が含まれていることが想定される。そこで、RNA-seq データから 5,139 種類のウイルス由来の配列を識別し、定量化するためのパイプラインを構築し、GTEx に含まれる RNA-seq データ全てに対して網羅的にメタトランスクリプトーム解析を実施した。

【結果】GTEx が提供する計 8,991 サンプルの RNA-seq データの大規模メタ解析により、39 種類のウイルスが、ヒトのさまざまな組織に常在していることを明らかにした。また、ヒト遺伝子発現の関連解析により、ウイルスの感染が、ヒト遺伝子発現パターンに影響を与えていることを示唆する結果を得、研究成果を論文として発表した（Kumata et al., *BMC Biol*, 2020）。

描出した健常人のヴァイローム



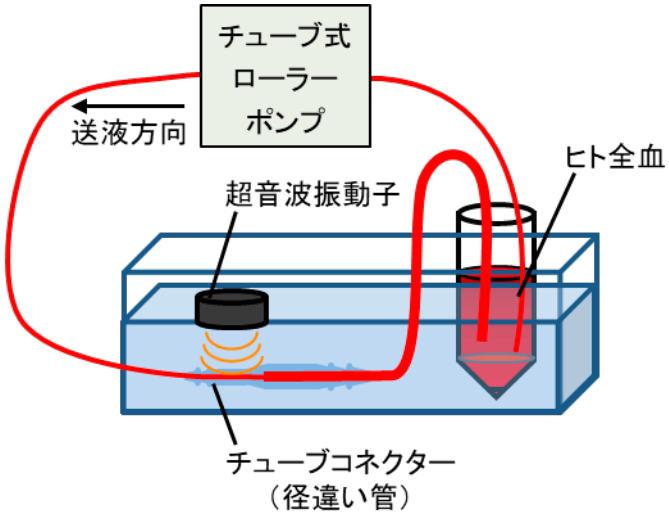
200　超音波による人工心肺装置起因性塞栓症の予防法開発	澤口　能一

【目的】体外循環により心肺機能を代行する人工心肺装置は、現代の心臓手術において必要不可欠である。また、人工心肺装置を応用した補助人工心臓等は、難治性重症心不全患者の治療に必須の治療機器となっている。しかし、これらの人工心肺装置の体外循環回路では、半日も使用すれば回路中に血栓が目に見えて形成され始め、この血栓が肺、腎、脳等の全身の様々な部位での塞栓源となり、無症候性の塞栓症から致命的な心筋梗塞や脳梗塞まで様々な血管閉塞性疾患を引き起こすことが問題となっている。体外循環における血栓の好発部位は、血流が滞留しやすい個所を含む人工肺や血流ポンプ（人工心臓）および、これらとチューブの接合部である。そのため、体外循環回路が起因となる塞栓症は、体外循環中だけに留まらず、むしろ回路の交換を行う際にチューブ接合部に溜まった比較的大きな血栓が飛ぶことで発症することが知られている。そこで、本研究ではヒト全血を用いて構築した *in vitro* 体外循環モデルにおいて、チューブ接合部に発生する血栓を超音波により抑制することが可能であるか基礎的検討を行った。

【方法】抗凝固剤にクエン酸ナトリウムを用いて採血した全血を用いて、ヒト全血を用いた *in vitro* 体外循環モデルを構築した。この体外循環モデルでは、37℃の水浴中でクエン酸全血を保温しながらチューブ式ローラーポンプを用いて 1 時間回路内を循環させた。また、血栓の好発部位を再現するため回路の途中にチューブコネクターを用い、チューブとチューブコネクターの接合部に超音波を照射することで血栓の形成を抑制できるか、目視およびチューブコネクター内の血栓重量を測定することで評価した。なお、本研究を実施するにあたっては、本学の臨床研究倫理審査委員会の承認を得た上で、採血を伴う学生実習において実習後に破棄される血液を学生の同意を得て供与いただいた。

【結果】ヒト全血を用いた *in vitro* 体外循環モデルを 1 時間循環させた結果、超音波照射群ではチューブとチューブコネクターの接合部に血栓はほとんど形成されなかった。一方で、超音波非照射群では、チューブとチューブコネクターの接合部には顕著に血栓が形成され、さらにチューブとチューブコネクターの間に形成された血栓が原因とみられる回路内の“つまり”により、1 時間循環させることができない例も観察された。チューブのコネクター内に形成された血栓の重量を比較すると、超音波照射群では 8.3±7.7 mg、超音波非照射群では 65.3±45.4 mg、超音波非照射群では 65.3±45.44 mg と採血ロットの違いにより大きなばらつきが認められたものの、P 値は 0.048（student t-test）となり、有意に血栓の形成を抑制する結果となった。本検討により、チューブとチューブの接合部に発生する血栓を超音波により抑制できたことから、体外循環回路の血栓の好発部位に超音波を照射することで血栓症の発症を抑制できる可能性が示唆された。

ヒト全血を用いた *in vitro* 体外循環モデル



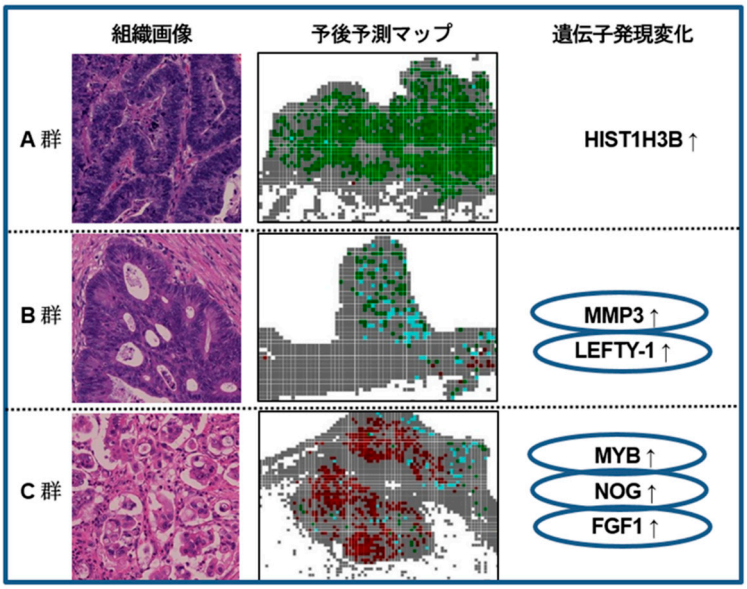
201　AIによる大腸癌予後予測：病理組織とゲノムの統合解析	高松　学

【目的】進行大腸癌の病理組織画像（HE 染色）を人工知能（AI）により解析し、予後に関連する病理組織形態を示す腫瘍成分の遺伝子発現解析を組み合わせることで、腫瘍内不均一性を考慮した予後予測モデルの開発を行う。

【方法】予後予測モデルを構築する症例群 1（モデル構築症例）は、2007 年～2009 年にがん研有明病院で手術された進行大腸癌 355 症例を対象とし、各症例の最大割面を含む組織スライドガラスをデジタル化（Whole-slide image：以下 WSI）した。症例は、転移の無い予後良好群（A、n＝182）、転移が有り 5 年間生存した群（B、n＝123）、転移があり 5 年以内に死亡した群（C、n＝25）の 3 群にわけ、それぞれの群の WSI から 299 μm 四方のタイル画像を切り出し、癌成分を含むタイル画像を選別するための組織型分類 AI モデルを作製した。得られたモデルにより癌画像を選択的に抽出し、それらを対象として A、B、C の各群を教師ラベルとする機械学習を行った。得られた予後分類 AI モデルを用いて、独立した症例群 2（2020 年 1 月～6 月の連続、151 症例）の予後予測マッピングを行い、A、B、C 各群に属すると予測されるタイル画像が、それぞれ集簇する症例を発現解析症例として選抜した。それぞれの群について、FFPE 切片において集簇するタイルに一致する範囲を選択的マイクロダイセクションにより回収し、RNA を抽出した。核酸デジタルカウント技術（nCounter）を用いて、各群の mRNA 発現量をパネル定量し、各群を特徴付ける発現変化のみられる遺伝子の特定を行った。

【結果】症例群 1 のうち、A 群は 234,252 枚、B 群は 158,583 枚、C 群は 33,866 枚の癌タイル画像が得られた。予後分類 AI による症例群 2 の分類では、A、B、C 各群に属すると推定される癌タイル画像の組織形態学的な特徴が、症例群 1 の分類結果と類似性を示した。A、C 群と予測するタイルは集簇する傾向がみられたが、B 群と予測するタイルは散在する傾向がみられた。発現解析のための選択的組織ダイセクションに適する症例は、A、B、C の各群と AI が予測するタイルが集簇する、それぞれ 12 症例、6 症例、12 症例の計 30 症例となった。遺伝子発現の階層クラスタリングでは、A 群と B および C 群との間で遺伝子発現パターンに差がみられ、特にドライバー遺伝子関連では比較的明瞭に区別された。特に発現差の大きかった遺伝子は、*NOG*、*CACNA2D4*、*MYB*、*FGF1*、*FGF10* 等であり、既知の予後関連遺伝子が含まれていた。B 群と C 群の比較では、A 群との比較ほど差がみられなかったが、一部の遺伝子（*MMP3*、*LEFTY-1* 等）で有意な発現差がみられた。これらの結果により、AI の予測する組織形態は遺伝子発現パターンと相関し、大腸癌の予後を規定し得る因子であることが確認された。

予後に関連する病理組織画像と AI による予後予測マップおよびそれに関連する遺伝子発現の変化



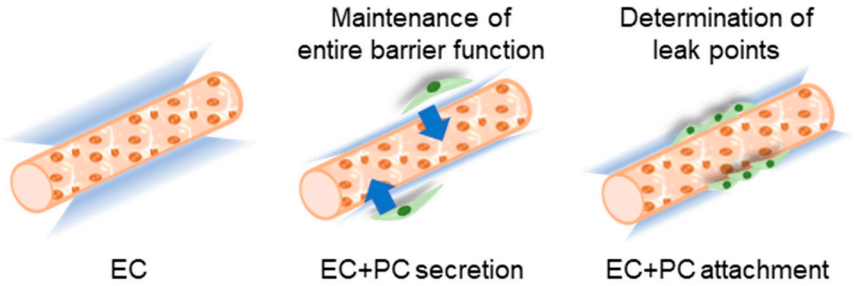
202　壁細胞が制御する血管恒常性解析モデルの確立	中島　忠章

【目的】毛細血管は酸素と栄養素の送達の役割を持ち、血管内部から内容物を漏出させることにより栄養素を各組織に運搬している。しかし、その漏出の量と場所がどのように制御されているか、という毛細血管機能の根幹については解明されていない。毛細血管を含む微小血管は、内腔に裏打ちされた内皮層と、それを囲むように配置された壁細胞よりなり、この壁細胞が血管透過性を制御していると考えられている。また血管透過性は血管微小環境（VME）に応じて変化する。糖尿病などの各種生活習慣由来の疾患においては、VME における生活習慣由来因子の変化によって、血管透過性が亢進することでその病状が悪性化し、その制御に壁細胞が関与していると考えられている。特に糖尿病性網膜症においては、壁細胞が網膜の毛細血管から剥離することで被覆率が減少し、血管の透過性が亢進することで発症するモデルが提唱されている。本研究においては、各組織由来の壁細胞が血管透過性に与える影響を *in vitro* で見える化するデバイスを開発し、そのデバイスを用いて、生活習慣由来因子の代表例として高血糖を模倣した VME が、血管透過性に与える影響を直接観察できる系を確立することを目的とした。

【方法】ポリジメチルシロキサン製のデバイス内にニードルを挿入してコラーゲンをゲル化させることで内腔を作製し、その内腔内にヒト血管内皮細胞単独または内皮細胞と同時に末梢・脳・胎盤由来壁細胞を播種することによって、内皮細胞のみで形成されたヒト微小血管モデルと、末梢・脳・胎盤由来の壁細胞と共培養したヒト微小血管モデルを作製した。この微小血管モデルを培養後、蛍光標識したデキストランを内腔より処理し、コラーゲンゲル側への拡散性を検出することで、壁細胞が血管透過性に与える影響を評価した。また、培養時に D-glucose 濃度を高めて高血糖 VME を模倣し、血管透過性に与える影響を解析した。

【結果】壁細胞は由来組織に関わらず内腔からの透過量を抑制した。壁細胞由来の血管透過性を抑制する分泌因子として知られているアンジオポイエチン 1 の遺伝子を、壁細胞にてノックダウンしたところ、壁細胞による透過量の抑制がキャンセルされたため、壁細胞は主に分泌によって血管透過量を抑制したことが示唆された。また、内皮細胞層に結合するタイプの壁細胞においてのみ、内腔からの漏出場所が局在化したため、壁細胞は内皮細胞への接着を介して漏出場所の制御を行っていると考えられる。高血糖 VME は、内皮細胞単独の微小血管モデルの透過性を変化させなかったが、壁細胞と共培養した微小血管モデルにおいて透過性を亢進させたことより、壁細胞が高血糖 VME を感受して、透過性を亢進させたと考えられる。本研究により確立された壁細胞共培養型ヒト微小血管モデルとその評価法を用いていることで、実際に生体の VME において常に変化している様々な生活習慣由来の弱い影響力を持つ因子が、微小血管の透過性に与える影響の解析に応用できる。

壁細胞の分泌と接着を介して制御される血管透過性



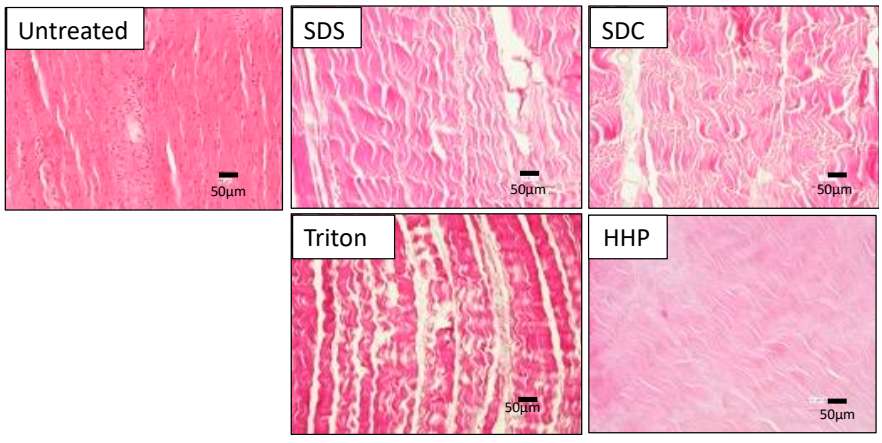
203　歯周靭帯再構築のための脱細胞化腱シートの開発	中村　奈緒子

【目的】歯周靭帯（歯根膜）は、歯槽骨や歯のセメント質と強固に結合して歯を固定しており、細菌による感染を防止する、咬合の感覚を司る、咬合時のショックを和らげる働きを担っている。現在の歯科用インプラントは、歯槽骨に埋入されて直接結合しているため、歯周靭帯の機能が欠如している。そのため、インプラント材料と歯槽骨の間に歯周靭帯様の組織を再構築することが期待されている。しかし、人工的に組織構造を再現することの困難さから実現には至っていない。そこで、本研究では歯周靭帯の線維構造に注目し同様の構造を持つブタの足底腱から歯周靭帯様細胞外マトリックスの脱細胞化腱シートを作製し、生体内における線維の配向性と骨組織との結合を明らかにすることを目的とした。

【方法】ブタ足底腱を薄切し、高静水圧処理法（HHP）および 3 種類の界面活性剤法（SDS：ドデシル硫酸ナトリウム、SDC：デオキシコール酸ナトリウム、Triton X-100）にて脱細胞化処理を行った。組織学的評価および残存 DNA 量により、細胞成分の除去および細胞外マトリックスの構造の維持について評価した。作製したシートをラットの頭蓋骨基質上と頭蓋骨の骨膜間に移植した。8 週間後に取り出し、脱細胞化腱シートと骨の界面の繊維の配向性や骨形成に関連する細胞に注目し評価を行った。コラーゲン線維の配向性を定量的に評価するために頭蓋骨と腱シートの線維がなす角の分布を求めた。ラットの頭蓋骨基質上に脱細胞化腱シート、表面処理したチタンプレートの順で移植し、12 週間後に、作製した脱細胞化腱シートを介したチタンプレートの頭蓋骨への結合を評価した。

【結果】高静水圧および界面活性剤処理法により、細胞成分の除去および細胞外マトリックスの構造の維持が可能であった。また、界面活性剤処理では、コラーゲン線維間に間隙が観察された。頭蓋骨基質上および骨膜間に移植した結果、両者にて多くの細胞が浸潤していることがわかった。また、骨基質を露出した骨基質上移植は破骨細胞も観察されたことより、脱細胞化腱シートと骨の間で骨のリモデリングが行われ、その過程でシートの線維が取り込まれ結合する可能性が示唆された。また、骨膜間および骨基質上への移植において、脱細胞化腱シートの構造が維持され、移植時の配向性が保たれていることがわかった。脱細胞化処理法によりコラーゲン線維の間隙の違いはあったものの、移植後はどのサンプルにおいても同様に構造が維持されていたことより、本実験で得られた程度の組織構造の違いは、再細胞化に影響を与えないことがわかった。脱細胞化腱シートをチタンプレートと骨基質上に移植し、12 週間後にチタンプレートを把持したところ、頭蓋骨と結合していることがわかった。以上より、脱細胞化腱シートを介したチタンプレートの頭蓋骨への結合の可能性が示された。今後、および脱細胞化腱シートとチタン表面の界面における骨形成を評価する予定である。

種々の方法により作製された脱細胞化腱シートの HE 染色



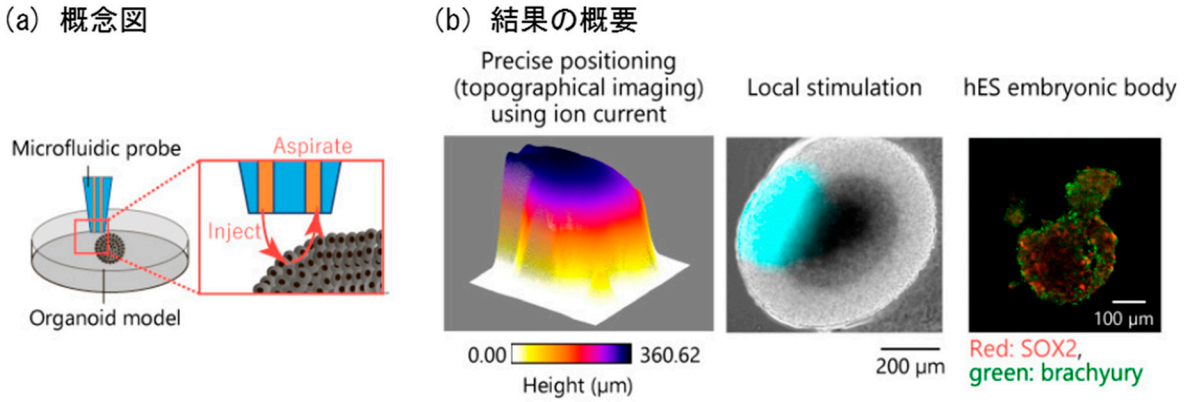
204　細胞分化の空間制御に資するマイクロデバイスの創出	梨本　裕司

【目的】ヒト幹細胞から誘導されるミニ臓器モデル（オルガノイド）は、現在、主に空間的に均一な刺激を逐次的に与えることで作製されている。しかし、実際の組織の発生過程は、空間的、時間的に複雑なシグナルが統合された現象であるため、均質な刺激のみでは、発生過程の再現、検証には不十分である。このため、発生の理解や検証には、時空間的な細胞へのシグナルを制御するためのツールが必要となる。マイクロ流体デバイスによる局所刺激は、新たな分化誘導ツールとして有望であるが、閉鎖された培養系では、適用可能なオルガノイドの大きさに制限があった。そこで本研究では探針型のマイクロ流体デバイス（マイクロ流体プローブ、MFP）を用い、数 mm 程度のオルガノイドまでを対象とする、空間的な分化刺激の付与システムの開発検討を行った。

【方法】探針の位置制御には、走査型イオンコンダクタンス顕微鏡（SICM）で利用されている、イオン電流を用いたフィードバックシステムを採用した。マイクロ流体プローブには、ガラス管の内壁が隔壁で仕切られた、θ 型のガラス管を用いた。一方の管路から、薬液による刺激を行い、他方の管路から吸引を行うことで、局所的な刺激が可能であるか試みた。基礎的な検討は、市販の細胞（ヒト乳腺がん細胞、MCF-7、ヒト肺線維芽細胞）を用いて行った。最終的な対象としては、ヒト胚性幹細胞（hES 細胞）を材料とするオルガノイドを用いることを見据え、基本的な培養システムの立ち上げと、分化誘導システムの検証を行った。

【結果】位置制御の精度を示すために、イオン電流値を基に探針のポジショニングを行い、胚様体と同様の形状を有する細胞凝集体（スフェロイド）の形状イメージを取得可能であるか、確認を行った。その結果、スフェロイドの形状と合致する形状イメージを取得することが可能であった。MFP によるスフェロイドの局所刺激を確認する目的で、導入口より、細胞核の染色試薬である Hoechst 33342 を 100 μg/mL の濃度で導入を行ったところ、細胞核の蛍光シグナルが、MFP を配置した位置に局在していることを確認した。また、hES 細胞の利用に関する倫理承認を得、hES 細胞の培養を介しするとともに、胚様体（EB）を用いた分化モデルの検討を行ったところ、BMP-4 の刺激による EB の分化の進行を確認できた。以上、イオン電流を用いた、胚様体様の大きさのサンプルを対象とした探針の位置制御システム、MFP を用いた局所的な薬剤刺激システムの基礎的な確認に成功するとともに、測定対象となる hES 細胞の培養環境の立ち上げに成功した。今後、検討した距離制御システム、局所薬剤刺激システムを用い、hES 細胞から誘導するオルガノイドモデルの分化制御を継続的に検討していく。

マイクロ流体プローブを用いた分化刺激の局所制御



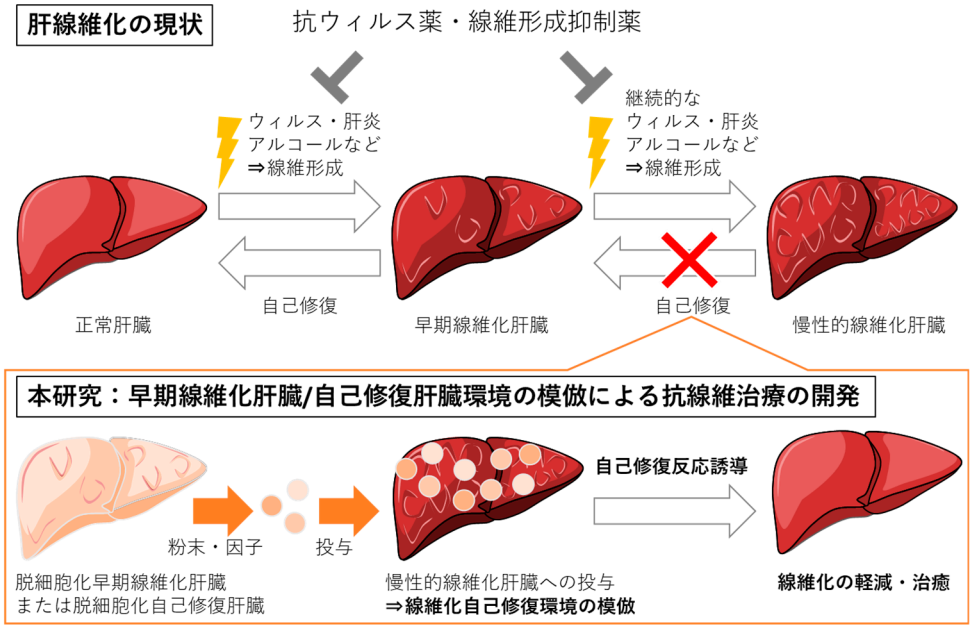
205　肝線維化自己修復環境模倣材料の抗線維化能の解析	根岸　淳

【目的】肝臓の線維化は、肝炎や脂肪肝の終末像であり、進行すると重度の肝硬変や肝臓がんを併発する可能性がある。アルコールや肝炎ウィルスの持続感染、種々の疾患により肝臓が損傷を受けると線維化が生じる。早期の線維化は自己修復するが、頻回損傷による慢性的な線維化は自己修復しない。現在、完成してしまった線維化に対する有用な治療法は確立されておらず、新たなアプローチによる抗線維化治療の開発が望まれている。本研究では、マウスの正常肝臓、早期線維化肝臓、自己修復肝臓（早期線維化後の回復段階の肝臓）と慢性線維化肝臓から脱細胞化肝臓粉末を作製し、線維化の自己修復環境を模倣することで線維化肝臓の線維溶解を助長できるかもしれないと仮説を立て、慢性線維化肝臓に対する線維溶解療法の基盤確立を目指した。また、各脱細胞化肝臓の細胞外マトリックス解析の抗線維化能評価から、抗線維化能を有する細胞外マトリックスの解明を目的とした（下図）。

【方法】チオアセトアミド（TAA）投与により早期線維化、自己修復および慢性線維化肝臓マウスを作製、正常肝臓と各段階の線維化肝臓を脱細胞化処理した。HE 染色とシリウスレッド染色により細胞除去と細胞外マトリックス中のコラーゲン線維沈着を評価した。また、作製した脱細胞化肝臓を粉末化し、SDS-PAGE によるタンパク解析および細胞毒性試験を行った。抗線維化評価として、肝星細胞の活性化試験および慢性肝線維化マウスを用いた脱細胞化肝臓粉末含有ゲル塗布試験を実施した。

【結果】TAA 投与期間を検討することにより、線維化進行度の異なる肝臓が得られた。脱細胞化処理により、すべての肝臓から細胞が除去されたことが認められ、また、線維化の進行度によって脱細胞化肝臓中のコラーゲン線維の沈着度合いが異なっていることも明らかになった。脱細胞化正常肝臓と比較し、脱細胞化線維化肝臓の抽出液のタンパク質濃度が高かったが、SDS-PAGE では脱細胞化線維化肝臓に特異的なバンドは認められなかった。脱細胞化肝臓粉末の生理食塩水抽出液に細胞毒性はなく、脱細胞化肝臓粉末添加による肝星細胞の活性化促進は認められなかった。さらに、慢性線維化肝臓マウスへの脱細胞化肝臓粉末含有フィブリンゲル塗布実験において、脱細胞化早期線維化肝臓および脱細胞化自己修復肝臓粉末含有ゲル塗布群のコラーゲン線維軽減が認められた。以上から、生体環境を模倣する脱細胞化肝臓粉末による抗線維化治療の可能性が示唆された。

肝線維化の進行と本研究の自己修復環境模倣材料による抗線維化治療のイメージ



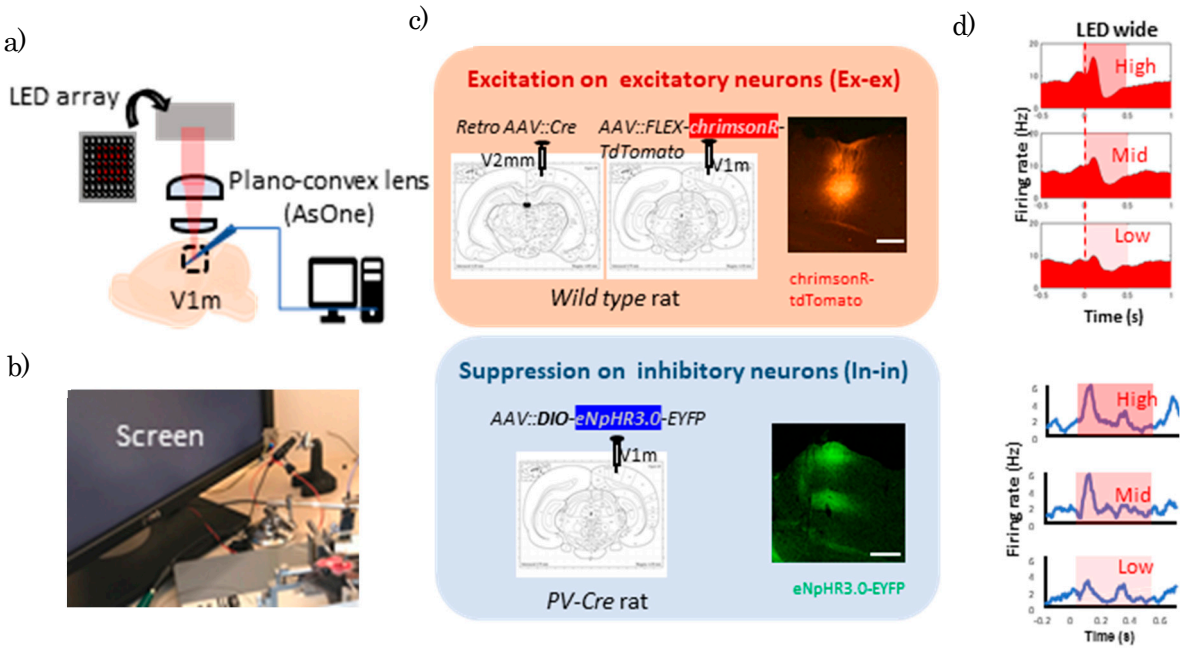
206　光遺伝学的な脳刺激型人工視覚の生理学的最適化	増田　明

【目的】全盲から回復させる治療法は現在非常に限られる。視覚を生み出すための情報経路である大脳皮質の視覚野を刺激することで、視覚体験を誘導させる「人工視覚」は、適応患者数が多いため有望な治療法の一つである。刺激方法として、現在の主流である埋め込み電極による電気刺激は侵襲度が高く、後遺症などのリスクが高い。光遺伝学的という光に応じたチャネルやポンプ開閉が可能な光駆動タンパク質を遺伝学的に細胞に導入することで、光による神経細胞の操作が可能になっている。脳外部から光照射することで、神経系を光遺伝学的に活性化できれば侵襲度が低い治療法として新たな有望な治療法となる可能性がある。光遺伝学では特定の細胞種のみを標的とした刺激も可能であり、本研究は人工視覚として光遺伝学が有効であることを検討し、さらに有望な神経活性化を生み出す光駆動タンパク質、細胞種の組合せを同定することを目的とした。

【方法】ラットの一次視覚野（V1）の神経細胞にアデノ随伴ウイルスベクター（AAV）を介して、興奮性細胞と抑制性細胞それぞれを標的に光による活性化、光による抑制を受ける光駆動タンパク質を導入した。光刺激システムとして、LED ドットマトリクス光を脳外部から脳表にレンズを介して集光する刺激装置を自作した。LED マトリクスを多点、同時に光らせる広範囲刺激と一点で光らせるドット刺激を用いて刺激中の視覚野への神経応答を、シリコンプローブを用いた電気生理学により測定した。

【結果】広範囲刺激によって活性化された神経細胞の数は、抑制性細胞を標的とした場合の方が、興奮性細胞を標的にしたものより統計的に有意に多かった。微小領域であるドット刺激時の神経応答では、興奮性細胞を標的としたものでは、応答を誘発するドット数が抑制性細胞を標的としたものよりも多かった。これらのことから、抑制性細胞を標的とした脳外部からの光遺伝学的刺激は、活性化細胞が多く、また限定した領域での刺激にも向いているという可能性が示唆された。

光遺伝学的脳視覚野刺激系と電気生理学実験による視覚野神経細胞の応答



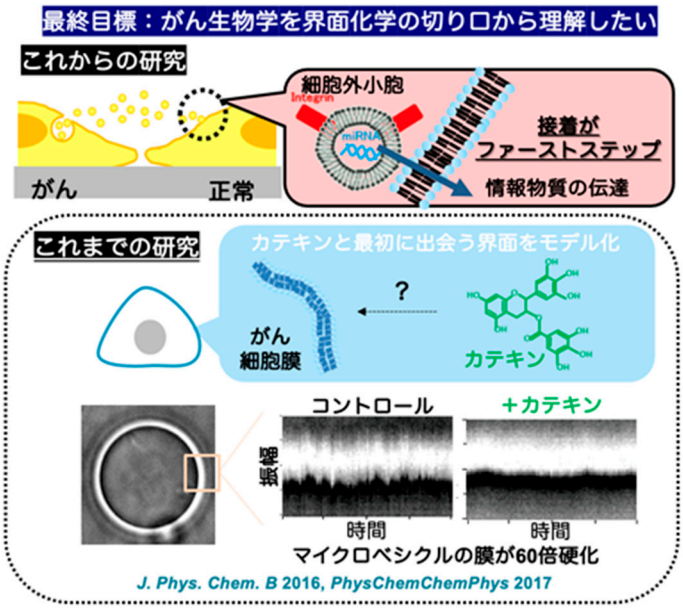
207　界面の硬さが切り拓くがん転移メカニズムの定量解明	松﨑　賢寿

【目的】本研究の最終目的は、がん転移メカニズムの解明に向けて、がん－正常細胞間相互作用における界面の硬さの役割を明らかにすることである。近年、がん細胞は細胞外小胞（Extracellular vesicle：EV）を細胞外に分泌して、周囲の正常細胞を調教して自分に都合の良い環境を作ることが示唆されてきた。その研究の中心は、EV に含まれる生物学的因子（遺伝情報やタンパク質）の中から、がん転移を促す要因を網羅的に探索することであった。しかし、そもそもがん細胞から分泌された EV は、正常細胞と“初めて出会う界面”である細胞膜と相互作用しなければ、情報物質の伝達は起こらず、その後の細胞性質の変換も起こり得ない（下図上）。そこでその相互作用を制御する基礎的な物理学的因子として、研究代表者は細胞膜の硬さに着目して研究を進めている。研究代表者はこれまでに抗がん効果を示す緑茶カテキンががん細胞と出会う最初の界面である細胞膜を約 60 枚程度硬化していることを明らかとしている（下図下）。膜の急激な硬化はがん細胞の基礎機能（細胞接着から転移運動まで）を大きく阻害したことを発見した経験から、EV 膜の硬さががんの悪性化を促すより身近な因子として膜の硬さがあると着想した。しかし、現状の界面解析技術では凍結乾燥によって変性した界面しか評価できておらず、膜物性そのものに着目した研究は未開の分野である。そこで、我々の独自の光技術をベースに“生きた”界面を「見て・測って・操る」実験プラットホームを構築することを第一目標とした。

【方法】その実験プラットホームを構築するためには、まず細胞膜を見て・測れる技術が必要となる。そこでまずはその顕微鏡システムの構築を目指した。具体的には、細胞膜の硬さ（ここでは膜の流動性）に応じて硬さが変化する蛍光物質（Laurdan）を用いた。既存の高価なレーザーソース（多光子レーザー）やスペクトルディテクターを用いずとも、独自のフィルターの組み合わせによって迅速かつ簡便に可視化し、それを定量評価する手法の開発を進めた。

【結果】構築した顕微鏡システムを用いて、EV が放出する直前の細胞内膜と細胞外膜の硬さの分布の精密な可視化に成功した。さらに初期アポトーシスが起こり、1μm 程度の EV が内部から放出される際に起こる細胞外膜の硬さの変化を追跡することにも成功した。これによって細胞膜表面の硬さがダイナミックに柔らかくなることで、EV が放出される初期的なデータ取得に成功した。これによって、研究代表者が有する細胞膜の硬さ制御技術と組み合わせて、“生きた”界面を「見て・測って・操る」実験プラットホームの構築が達成できた。現在では本プラットホームで、がん細胞から抽出した EV を用いて、より詳細ながん－正常細胞間相互作用における界面の硬さの役割を解析中である。

本研究の概要と着想に至った経緯



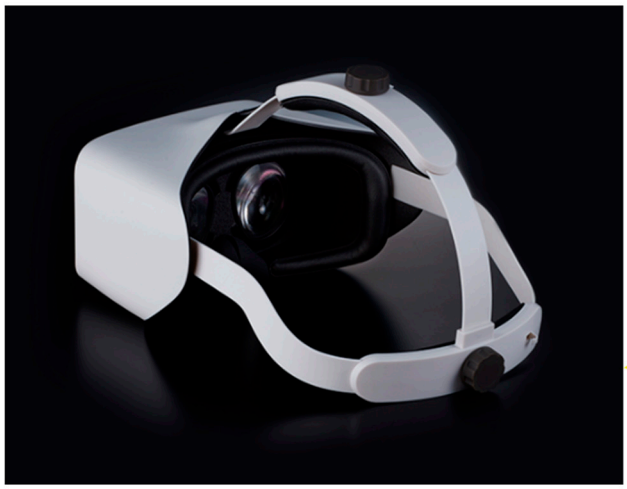
208　視点反応速度を用いた認知機能の客観的評価法の開発	三宅　正裕

【目的】視線分析型自動視野計は、視野障害のある部位とない部位で、出現した視標に反応するまでの時間が異なることを応用した視野障害評価機器である。我々は、京都大学附属ゲノム医学センターが主導する大規模ゲノムコホートであるながはまスタディにおいて本機器を使用する中で、平均的な視点反応速度に個人差があることを発見した。本研究では、我々の開発した機器で計測される視点反応速度を新たなバイオマーカーとして活用し、客観的なデータから認知機能障害を予測するアルゴリズムを構築することで、認知機能を短時間で簡便にかつ客観的に評価できるようになることを目的とする。

【方法】ながはまスタディで取得された本機器のデータのうち、最も単純化された指標である平均視点反応速度を用いて MoCA-J のスコアを予測するモデルの構築を行った。全データをランダムに 4 : 1 で学習データとテストデータに分割し、学習データセットで構築したモデルをテストデータセットで検証するという作業を 100 回試行し、それぞれの評価指標の平均値を最終的な評価指標として採用した。モデルは線形回帰とランダムフォレストを検討した。評価指標として平均絶対誤差（mean absolute error : MSE）と相関係数を用いた。解析には統計ソフト R（ver 4）を用いた。

【結果】ランダムフォレストよりも線形回帰による予測モデルの予測精度が上回った。線形回帰による予測モデルでは、prior knowledge に基づく予測モデルで、平均絶対誤差は 2.36（95％信頼区間 2.16～2.56）、相関係数は 0.43（95％信頼区間 0.35～0.52）であった。ステップワイズ法によって変数選択を行った場合の予測モデルでは、平均絶対誤差は 2.36（95％信頼区間 2.16～2.56）、相関係数は 0.43（95％信頼区間 0.33～0.53）であった。最も単純な指標で一定の予測精度が得られているため、今後使用するパラメータを精緻化することで更なる精度向上が期待される。

FINDEX 社と共同開発した視線分析型自動視野計



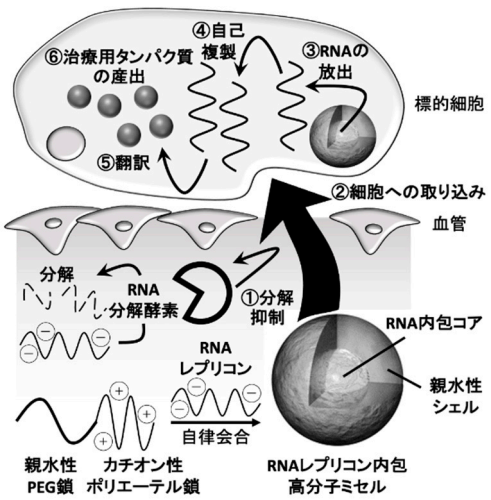
209　遺伝子治療を実現するポリエーテル型ミセルの開発	宮崎　拓也

【目的】RNA レプリコン（RepRNA）は自己複製によりメッセンジャーRNA（mRNA）を産出し、細胞質内において治療用タンパク質を翻訳することから核酸医薬としての応用が期待されている。しかし、RepRNA 単体の全身投与では、標的細胞における治療用タンパク質の産出に関して有効性を示さなかった。これは、生体内に存在する RNA 分解酵素が障壁となって、RepRNA が分解されタンパク質を翻訳できないうえ、RepRNA が惹起する副作用が原因で投与量を増やすことができないためであると考えられる。そこで、核酸医薬を標的細胞に届けるために、カチオン性脂質やレトロウイルスを用いた手法が試みられてきたが、カチオン性脂質を用いた手法においては RNA 分解酵素に対する低い安定性が、レトロウイルスを用いた手法においては内包できる RNA の分子量に大きな制限があることが問題となり、生体応用の障壁となっている。一方で我々は、高分子ミセルのコア形成鎖として柔軟なポリエーテル鎖を導入することで、分子量の大きな mRNA を 100%という非常に高い効率で高分子ミセルのコアに内包することができ、既存 DDS の 50 倍にも上る非常に高い RNA 分解酵素に対する安定性を付与することができることを示した。柔軟なポリエーテル鎖をコア形成鎖とする高分子ミセルは、コアに内包する RNA の構造に応じてコア形成鎖の立体構造が変化することから、分子量の非常に大きな RepRNA とも高い結合力を有することが予想される。本研究では、この様なポリエーテル型ミセルの優れた特徴を活かして、RNA と強く結合するアミノ酸に着目し、このアミノ酸をポリエーテル型ミセルに導入することによって RepRNA の RNA 分解酵素に対する安定性の向上を狙う（図）。

【方法】ミセルのコア形成鎖であるポリエーテル鎖の側鎖構造にトリプトファン、チロシン、ロイシンを導入することによって、RepRNA とのπ-π相互作用および疎水性相互作用によるミセル構造の安定化を目指した。また、トリプトファンを導入する際に生分解性エステル結合を用いることによって、標的細胞内での RepRNA 放出後のミセルの分解を図った。mRNA を内包したポリエーテル型ミセルを調製し、まず粒径分布を最適化した。続いて、構築されたポリエーテル型ミセルの mRNA 送達効果および安全性を確認するために、ポリアニオン・RNA 分解酵素に対する安定性、生分解性エステル結合の開裂を、蛍光相関分光法、RT-PCR、フルオレスカミン法により評価した。さらに、RepRNA を内包したミセルを調製し、培養細胞における遺伝子発現効率をルシフェラーゼアッセイ法により評価した。

【結果】合成したポリマーに関して、生理塩条件下で効果的な生分解性を示し、その結果、培養細胞に対して低い毒性を示した。また、ポリマーから調製したミセルは 60 nm 程度のサイズを示し、トリプトファン（PEG-PGTrp）から調製したミセルが最も優れた安定性を示した。そこで、PEG-PGTrp を用いて RepRNA ミセルを調製したところ、RNA 分解酵素共存下で培養細胞における高いトランスフェクション効率を示し、mRNA から調製したミセルに比べて効率的かつ持続的なトランスフェクションを達成した。

本研究で開発した RepRNA 内包高分子ミセルの概念図

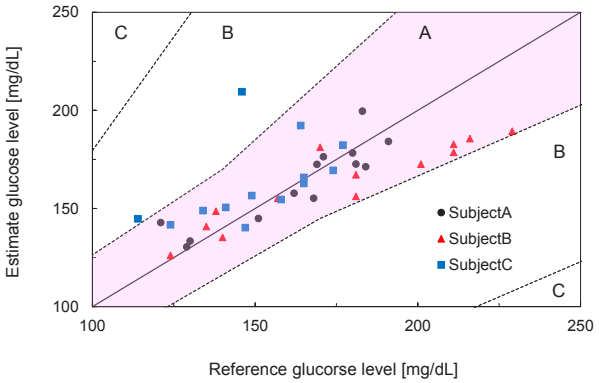


210　生体の複素誘電応答に基づく非侵襲的な血糖値計測法	村松　大陸

【目的】糖尿病は爆発的に罹患率が増加している病気の一つである。国際糖尿病連合の調査によると 2019 年の時点で世界の糖尿病患者は 4.6 億人におよび、有効な対策を施さなければ 2045 年には 7 億人に達する見通しである。糖尿病の進行は失明、四肢の壊死、脳梗塞、認知症など深刻な合併症を招くため、日常の血糖計測による血糖コントロールが必要不可欠となる。現在の血糖計測は酵素電極を用いる侵襲的な方法が一般的であり、 採血にともなう痛みや手間、消耗品のコストが問題となっている。本研究では、血液の電気定数が血中グルコース濃度によって変化することに着目し、ウェアラブル電極で測定した生体電磁応答から血糖値を推定する手法を検討した。

【方法および結果】血糖値とバイオインピーダンスの関係を明らかにするため、被験者の血糖値と手首のインピーダンスを同時に測定した。血糖値は市販血糖センサで指先を穿刺し測定した。バイオインピーダンスは左手首に装着した 1 対のステンレス電極（各 8×24 mm^2）をインピーダンスアナライザに接続し測定した。被験者は非糖尿病の 20 代男性 3 名（被験者 A、B、C）で、10 時間の絶食後、測定開始前に 75 g のグルコースを経口摂取し糖負荷とした。本研究の実験は東京理科大学臨床研究に係る倫理審査委員会の承認を経て行った。いずれの被験者においても血糖値の増加／減少にともないバイオインピーダンスが増加／減少する傾向が確認された。ここで血糖値とバイオインピーダンスの相関係数は、被験者 A で 0.89、B で 0.77、C で 0.52 と計算され、いずれも一定以上の相関が確認された。この結果から、生体電磁応答、特にバイオインピーダンスに基づいて血糖値の相対変化を推定できることが示唆された。一方で各被験者を比較すると、B や C における相関係数は A に比較して若干低下している。これは被験者 B と C は、グルコース摂取後 20〜40 分程度の血糖値が急激に増加する時間帯においてインピーダンスが減少していることが主な原因である。これはグルコースを摂取して測定を開始した直後、すなわちウェアラブル電極を装着した直後は、皮膚と電極の界面に滲む汗等の電解質に影響されインピーダンスが経時的に減少するためと考えられる。より高精度な血糖値推定を行うには、汗、体温、体動にともなう電極のずれといった、バイオインピーダンスに対する血糖値変化以外の影響を排除することが効果的と考えられる。得られた糖負荷試験下の血糖値とバイオインピーダンスの測定結果を用いて、バイオインピーダンスによる血糖値の推定式を導出した。各被験者における血糖値とバイオインピーダンスの相関係数 0.52〜0.89 は十分大きいと考え、血糖値の推定値を線形に定義した。本推定式の実用性を評価する指標として、コンセンサスエラーグリッドを用いた。図はエラーグリッド上に、市販の血糖センサで測定した血糖値を参照値、推定式で計算した血糖値を推定値として示したものである。エラーグリッドの表示範囲は 100〜250 mg/dL とした。データは被験者 C の 2 点を除きすべて範囲 A 内に分布しており、バイオインピーダンスを用いて高精度に血糖値推定が可能なことがわかる。さらに、血糖測定器に求められる臨床的正確性は ISO15197 において、「試験機器の測定値（今回は推定式による推定値）の 99%がエラーグリッド内の範囲 A および B に分布すること」と定められている。今回の検討では全被験者の全推定値がエラーグリッド内の範囲 A および B に分布しているため、ISO に規定された臨床的正確性の基準を満足している。

エラーグリッド分析による推定式の精度評価



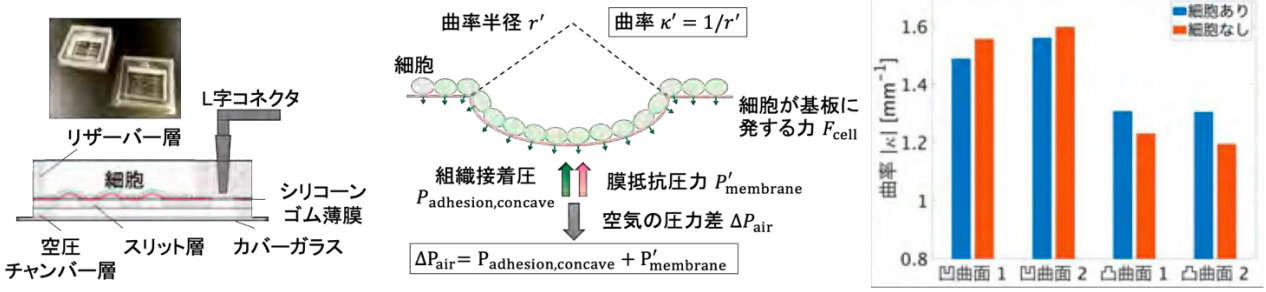
211　曲面上での組織張力アッセイ法の開発	山下　忠紘

【目的】体外での臓器構築の実現を目指す組織工学分野において、生体内で細胞が形成する精緻な立体構造やそれに由来する機能を再現するため、微細加工技術を用いたさまざまな形状の足場素材が製作され、細胞培養に用いられてきた。このような研究が進展するにつれ、これまで細胞の挙動に影響を与えることがないとみなされてきた曲率半径数百 μm の曲面構造が、組織の運動や形質の決定を誘導する物理的な入力であることが明らかになり，近年大きな注目を集めている。このような現象を説明するため、細胞には張力を用いて自らよりも巨大な構造の形状を認識する仕組みが備わっているものと予想されているが、立体面上で組織が発する力を定量的に評価する手法が存在せず、この予想は仮説の域を出ない。本研究は、細胞の形状認識機構を解明するための基盤技術として、凹凸曲面上で組織が発する力を評価する新規計測技術の開発を目的とする。

【方法】細胞が一様なシート上組織を形成して立体面上に存在するとき、組織はそれぞれの細胞接着部に対して力を及ぼす。その力の大きさを、組織の面積で除した量を組織接着圧 P と定義する。本研究は、曲率を操作可能な細胞培養環境を構築し、凹面上と凸面上で組織接着圧を評価可能な新しい計測系を構築した。まず、空気槽、シリコーンゴム薄膜、細胞培養槽からなるマイクロ細胞培養デバイスを製作した（図左）。このマイクロ細胞培養デバイスは、空気槽内の圧力を操作することで、細胞培養面の曲率を数 mm^{-1}の範囲で操作することが可能である。このマイクロ細胞培養デバイスの内部で、培養面を凹面もしくは凸面に保ちながらヒト大動脈血管平滑筋細胞（HASMC）をコンフルエント状態になるように培養し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて培養面の立体形状を観察した。次に、トリプシンを用いて HASMC を除去し、再び培養面の立体形状を観察した。最後に、細胞除去前後の培養面の曲率の僅かな変化から、HASMC が曲面状の培養面に及ぼしていた組織接着圧 P を評価した（図中央）。

【結果】マイクロ細胞培養デバイス内の空気槽内部の圧力を操作し、培養面の形状を凹面もしくは凸面に維持した状態で、HASMC はその上に一様なシート状構造を形成した。トリプシン処理により HASMC を除去した結果、凹面・凸面どちらの場合においても培養面の曲率が $0.1\,\mathrm{mm}^{-1}$前後変化した（図右）。細胞の有無に起因するこの曲率変化は、細胞が接着時に曲面に及ぼしていた力の大きさを反映しており、シリコーンゴム薄膜の特性から、その大きさは組織接着圧 P として凹面上で 19 hPa、凸面上で 34 hPa と算出された。培養面の曲率と細胞密度をもとに、この値を単一細胞あたりの張力に換算したところ、その値は凹面上で 3.1 μN、凸面上で 6.4 N であった。この値は、先行研究によって報告された、平面上で HASMC が発する張力の大きさ（4〜12 μN 程度）と比較しても妥当なスケールである。また、本研究では凸面上でより大きな組織接着圧が算出された。間葉系幹細胞（MSC）が凸面上で示す特異的な骨分化現象を報告した他グループによる先行研究では、凸面上で存在する MSC が核内に多くの中間径繊維 Lamin A を持ち、核により強い細胞張力が加わっていることが示唆されていたが、本研究の結果はこの既報とも符合する。今後、本手法を用いて、曲率を変えた様々な曲面上で組織が発する力の大きさを計測することで、細胞の曲面検知および応答において細胞張力が発する役割が明らかになると期待される。

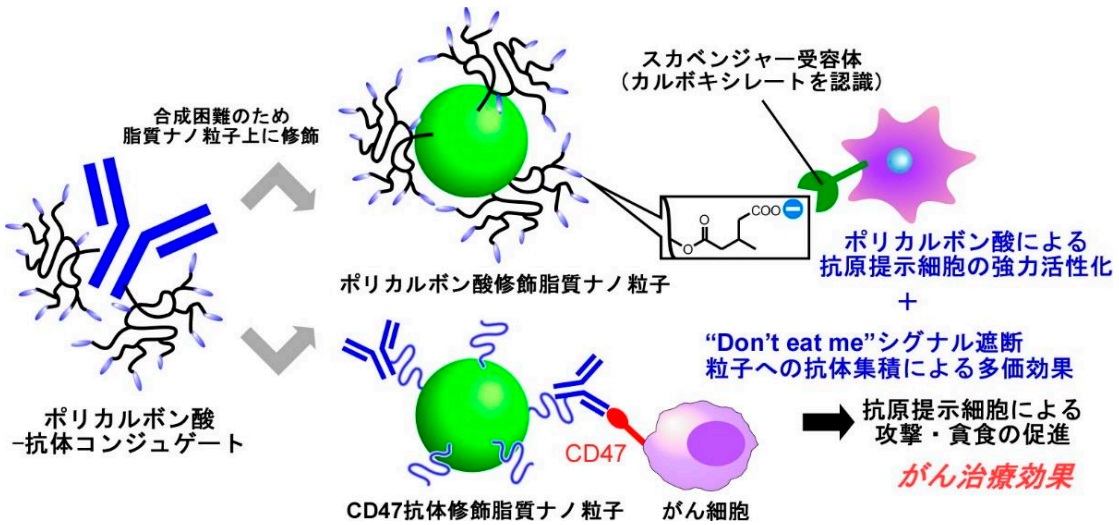
マイクロデバイスを用いる曲面上での細胞張力の測定



212　腫瘍免疫活性化のためのポリカルボン酸結合抗体の創製	弓場　英司

【目的】近年、免疫チェックポイント阻害剤の成功によって、がん免疫療法が大きな注目を集めている。現在臨床開発が進んでいる免疫チェックポイント阻害剤の一つ、CD47 抗体は、がん細胞上の CD47 に結合し、マクロファージに対する Don't eat me シグナルを遮断することで免疫細胞によるがん細胞の攻撃を誘導する。そこで本研究では、CD47 抗体に、抗原提示細胞に認識され、かつ活性化する機能をもつポリカルボン酸を結合させることで、免疫細胞を活性化すると同時にがん細胞と免疫細胞の相互作用を高め、その治療効果の増強をねらった。しかし、ポリカルボン酸と抗体の結合が困難であることが実験の過程で判明したため、それぞれを脂質ナノ粒子上に結合させ、機能評価を行った。
【方法】アジュバント作用をもつβグルカン（カードランまたはアクアβ）に、3-メチルグルタル酸無水物を反応させることで、アジュバント作用と抗原提示細胞への特異性をもつポリカルボン酸誘導体を合成した。導入した一部カルボキシ基にジアミンを EDC／Sulfo-NHS を用いて縮合し、アミノ基を導入した。このアミノ基と、チオール基を導入したモデルタンパク質（オボアルブミン：OVA）を、ヘテロ 2 官能性リンカーを介した結合を試みた。得られたサンプルは SDS-PAGE を用いて評価した。脂質ナノ粒子（リポソーム）への CD47 抗体の修飾は、ポリエチレングリコール脂質先端に導入したマレイミド基と、CD47 抗体に導入したチオール基との反応によって行った。また、ポリカルボン酸誘導体にデシルアミドアンカーを導入し、デシル基と脂質膜との疎水性相互作用を介してリポソームへ修飾した。得られた修飾リポソームの諸物性を測定するとともに、リポソーム処理した抗原提示細胞からのサイトカイン産生能を ELISA 法により、がん細胞への結合をフローサイトメトリーにより評価した。
【結果】アミノ基を導入したポリカルボン酸誘導体と OVA との反応物を SDS-PAGE により分析したところ、フリーのタンパク質に相当するバンドに比して明確な変化が認められず、結合反応がうまく進行していないことが示唆された。ポリカルボン酸誘導体の主鎖、リンカー構造などを変化させて検討を行ったが、結合の進行は観察されなかった。そこで、両者を一つの粒子上に結合することで当初の設計と同様の効果が得られると考え、抗体とポリカルボン酸誘導体を導入したリポソームの作製を試みた。ところが、抗体とポリカルボン酸誘導体を同じリポソームに修飾すると、ポリカルボン酸誘導体に由来するアジュバント作用が阻害されることが明らかとなった。ポリカルボン酸誘導体を修飾したリポソームは抗原提示細胞からのサイトカイン産生を強力に促進した。さらに、CD47 抗体を修飾したリポソームは、フリーの抗体やアイソタイプコントロール抗体を修飾したリポソームに比べ、がん細胞に有意に効率よく結合したことから、ナノ粒子上に抗体を修飾することで、がん細胞上のチェックポイント分子をより効率良く阻害できることが示唆された。

ポリカルボン酸・チェックポイント阻害抗体を組み合わせた免疫誘導システムの設計



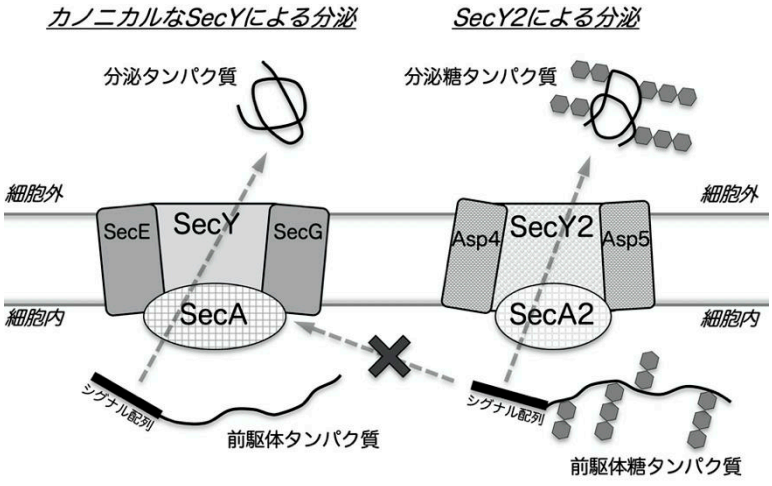
213　口腔病原菌バイオフィルムに関わる特殊な分泌装置の基盤	塚崎　智也

【目的】口腔内病原性細菌の多くは外毒素のような特殊なタンパク質の排出に特化したシステムを持っている。中には、特殊な糖タンパク質を排出し微生物叢であるバイオフィルム、いわゆる歯垢を形成するものもある。病原性の *Streptococcus* 属には、必須のカノニカルなタンパク質膜透過チャネル（SecY）に加え、特殊な糖タンパク質に特化したタンパク質膜透過チャネルとして SecY2（特化型 Sec トランスロコン）がある（下図）。SecY2 はいくつかのタンパク質と相互作用して機能するが、どうして SecY2 が基質特異性を示すのかなど、その分子メカニズムは不明であるため、構造生物学的な解析が必要である。

【方法】細胞質で合成された特定の基質タンパク質は、典型的な糖修飾酵素である GtfA、GtfB によって糖鎖が付加される。その後、アンフォールドの状態が保たれたまま、シグナル配列の情報に基づき Asp1/2/3 複合体によって膜へとターゲットされる。その後 SecY2 チャネルとモータータンパク質である SecA2 ATPase が相互作用しながらタンパク質を排出させていると考えられている。構造生物学的な解析によって、これら因子の構造を高分解能で解き明かすべく、サンプルの準備を進めた。また、タンパク質分泌反応の詳細を理解するためには、1 ユニット（反応最小単位）でのリアルタイム解析が必要な段階となっている。そのため、本研究では、MSP ナノディスクと呼ばれる粒子を用いた。このナノディスクは脂質と膜骨格タンパク質（MSP : membrane scaffold protein）から構成されるナノ粒子である。ナノディスク構成時に膜タンパク質が存在している場合に、膜タンパク質がナノディスク内に取り込まれ、膜タンパク質含有ナノディスクが構築される。SecYEG 含有ナノディスクを高速原子間力顕微鏡で測定を行った。

【結果】特殊糖タンパク質分泌に関わる因子の構造決定にむけたサンプル調製を進めた。Asp1/2/3 複合体については、純度の高いサンプルを mg オーダーで精製できる系を組み、構造生物学的な解析に向けて適切なサンプルとするために条件検討を重ねた。また、SecY2/Asp4/Asp5 複合体については、SecY2 の安定な発現を大腸菌内で確認し、精製の条件検討を行った。今後は、X 線結晶構造解析ならびにクライオ電子顕微鏡による構造決定をすべく研究を継続する。高速原子間力顕微鏡を用いたタンパク質分泌過程の観測に向け、ナノディスクに再構成した Sec タンパク質の測定を行った。条件を最適化することで、制御された二つの方向からナノディスクに再構成したタンパク質の分子動態をリアルタイムで直接観測することに成功した。

タンパク質の分泌



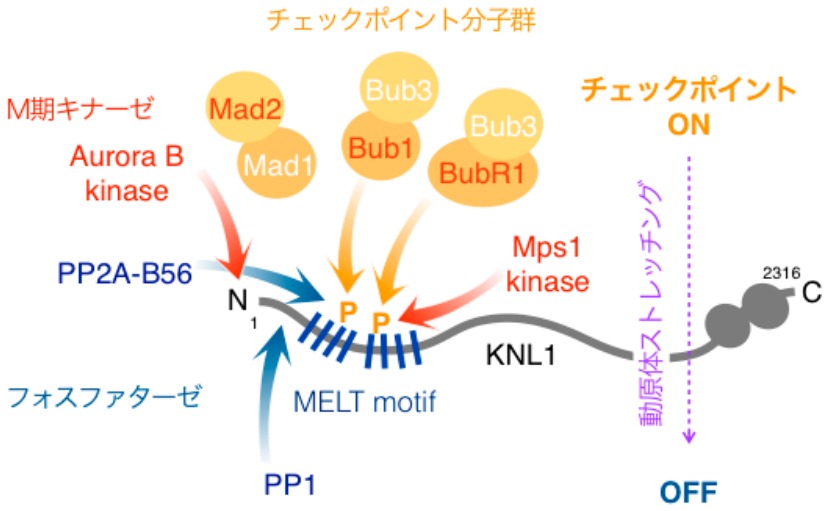
214　M期キナーゼによる動原体のホメオスタティック制御	広田　亨

【目的】動原体は、複数のタンパク質複合体から構成される超分子複合体であり、それらの相互作用ネットワークによって、安定性を備えたホメオスタティックな制御がなされている。微小管との結合を担う NDC80 複合体、M 期チェックポイントシグナルの発信に関わる KNL1 複合体、MIS12 複合体は、「KMN ネットワーク」と称され、複数の動原体機能を統合するシステムを形成している。動原体の心臓部にあたるこのシステムによって複数の機能がどのように統合されているのか、そのメカニズムはよくわかっていない。我々は、動原体の伸縮を繰返す「動原体のストレッチング」と呼ばれる現象を見出し、これが微小管結合と M 期チェックポイントの発信制御とを連動する可能性を検討してきた。また、微小管結合や M 期チェックポイントは、「M 期キナーゼ」と総称されるリン酸化酵素が複雑に相互作用しながら制御していることが示唆されている。そこで本研究では、動原体ストレチング現象において、M 期キナーゼがどのように関与するのかを明らかにすることによって、動原体が微小管結合と M 期チェックポイントシグナルの発信を統合的に制御するメカニズムを解明することを目的とした。

【方法】本研究では、動原体ストレッチングを基軸として、動原体の複数の機能がいかに統合され制御されているのか、またその制御機構の変化ががん細胞の染色体不安定性に寄与するのかを明らかにするために、以下の研究項目を実施した。1. 動原体ストレッチングの発生機序に基づき、同現象を操作可能な細胞を作製した。2. 動原体ストレッチングを抑制した細胞の染色体動態を、ライブイメージングにより解析した。3. 動原体ストレッチングと微小管結合、及び M 期チェックポイントとの関連を解析した。4. M 期チェックポイント制御の分子機構について、M 期キナーゼが関連する制御を基軸に検討した。5. M 期チェックポイント解除の遅延による染色体分配の影響を解析した。6. がん細胞における染色体不安定性と M 期チェックポイント制御機構の変化を検討した。

【結果】本研究によって、動原体が微小管と末端結合という安定した結合を達成すると、動原体ストレッチング現象が生じて、これによって M 期チェックポイントの解除が促進されて染色体分配を導くことがわかった。換言すると、動原体ストレチングは、微小管結合制御とチェックポイント制御の順序を保証する動原体機能を統合するメカニズムと捉えられ、その核心は「チェックポイント分子の動態に関わる KNL1 複合体のリン酸化制御」にあることが示唆された（図）。さらに、本研究によって、この動原体の制御機構の変化が、多くのがん細胞が陥っている染色体不安定性に寄与することが判明した。M 期チェックポイント機構ががん細胞でいかに変化しているのかは、長年の未解決の課題とであったが、本研究によって「M 期チェックポイントの解除過程の異常」という解答が得られ、染色体不安定性の成因を刷新したと言える。

KNL 複合体における M 期キナーゼの制御



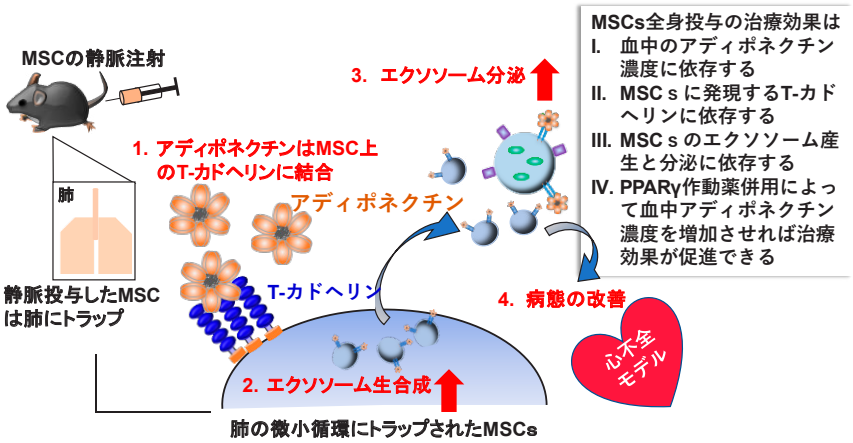
215　エクソソーム制御による個体機能維持機構の解明	下村　伊一郎

【目的】生理的多量体アディポネクチン（APN）はGPIアンカー型膜タンパクT-カドヘリン（T-cad）との高親和性相互作用によって細胞内後期エンドソームに集積し、エクソソーム（Exo）産生を促進することを見出した。APNや*T-cad*欠損マウスでは血中Exoが有意に低下しており、APNは本経路によって全身のExoレベルをも規定することを明らかにした。T-cadは細胞内シグナル伝達に通常必要とされる細胞内ドメインを有さないが、APNによって、セラミドをExoに搬出し、内皮細胞のセラミド蓄積を低下させるなどで、不要物・余剰物の除去に機能していることを明らかにした（Obata et al. JCI Insight 2018, Kita et al. JCI 2019）。一方、Exoはマイクロ RNAや生理活性タンパク・脂質を内包し、細胞間の情報伝達を担うことで注目される。間葉系幹細胞（MSCs）移植療法は様々な心血管疾患に有効性が示されている。興味深いことに、MSCsはT-cadを発現し、APN添加に応じてExo産生が亢進することを見出した。

【方法】マウスに大動脈縮窄（TAC）を処置し、2あるいは4週間後に心エコー装置を用いて心機能を評価した。ヒト脂肪由来間葉系幹細胞（hMSCs）は尾静脈より週3回投与した。血中Exoは PEG及び超遠心法で精製し、Exoマーカータンパクをウェスタンブロットにて評価した。また、フォスファチジルセリンアフェニティー法により精製し、散乱光分析ナノサイトにより粒子数と粒子径分布を評価した。PPARγ作動薬ピオグリタゾンは50 mg/kgを一日2回経口投与した。

【結果】野生型（WT）マウスでは大動脈縮窄（TAC）処置2週間後に心機能（EF%及びFS%）が低下し、ヒト脂肪由来hMSCsの週3回の尾静脈投与により有意に改善した。また投与hMSCs由来Exoが血中に産生されていることを確認した。Exo生合成複合体分子である*Alix*をノックダウンすることで、hMSCsの多分化能やサイトカイン産生に影響せず、Exo産生を顕著に抑制できた。このようなExo産生能欠損hMSCs（siAlix-MSCs）を投与したところ、血中Exoの増加が認められず、心機能も有意な改善を示さなかった。これらの心組織及びhMSCs産生ExoのRNAseq解析から、Exoに含まれる複数の主要なmiRNAsによる遺伝子発現制御が心機能の改善に寄与していると考えられた。次に、hMSCsはT-cadを発現しており、T-cad依存的かつ培養液に加えた多量体APNの濃度依存的にExo産生が増加すること、*APN*欠損マウスへの投与ではWTに比して血中へのExo産生が有意に減弱することを見出した。そこで、*APN*欠損マウスにTACを処置し、MSCsを投与したところ、血中Exoの有意な増加を認めず、また心機能の有意な改善を認めなかった。一方で、PPARγ作動薬投与により血中APN量を増加させたところ、MSCs投与による血中Exo量がさらに有意に増加し、心機能改善効果も有意に増強したが、これらの効果は*APN*欠損マウスでは認められなかった。また、hMSCsに発現している*T-cad*をノックダウンした細胞（siTcad-MSCs）では、WTマウスへの投与でも血中Exoの増加が認められず、心機能の改善効果も有意に減弱した。

間葉系幹細胞（MSCs）治療への応用



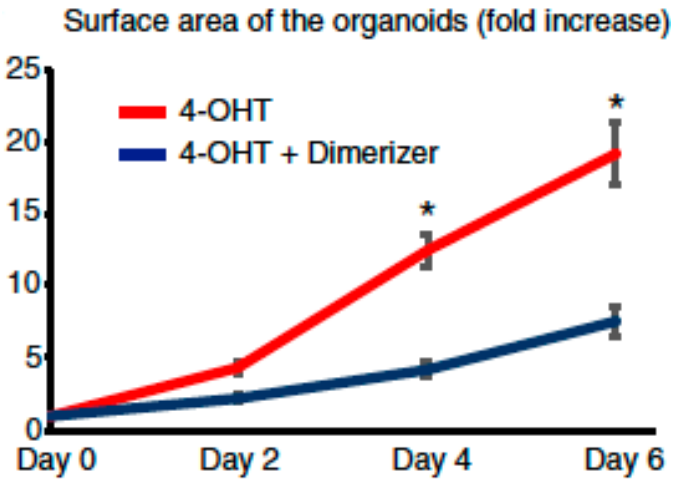
216　ヒト生体外モデルを用いた大腸癌幹細胞標的治療の検討	妹尾　浩

【目的】進行大腸癌に対する新しい視点からの治療ストラテジー開発が切望されるなか、癌幹細胞を標的とする新規治療法の開発が注目されている。研究代表者らは、DCLK1 陽性細胞の選択的排除により、正常大腸およびその他の臓器に傷害を起こすことなく、大腸癌（腫瘍）が劇的に退縮することを示してきた。そこで本研究では、様々な大腸癌幹細胞高発現因子を標的に、大腸癌幹細胞を傷害、排除する具体的な方策を検討することとした。

【方法】樹立済みのヒト大腸癌オルガノイド・ライブラリーのうち、DCLK1 陽性細胞を多く含むものを選択し、新たな癌幹細胞特異的なマーカー候補として研究代表者らが独自に絞り込んだ IL17RB、CRL4、TRPM5 などの下流に cre を挿入したコンストラクトを CRISPR-Cas9 技術により、tdTomato レポーターおよび inducible Caspase-9 コンストラクトをレンチウイルスにより挿入した。それらのオルガノイドを中心に、細胞系譜解析、癌幹細胞選択的排除、シグナル阻害および抗体治療の可能性を検討した。

【結果】ヒト大腸癌のオルガノイドにおいて、種々の癌幹細胞特異的なマーカー候補陽性細胞からの細胞系譜解析を行った。その結果、癌由来オルガノイドにおいては IL17RB 陽性癌幹細胞から子孫癌細胞が供給されることを可視的に観察した。また、inducible Caspase-9 コンストラクトを挿入して、dimerizer/inducible Caspase-9 系により癌由来オルガノイドが退縮するかを検討した。すると癌由来オルガノイドにおいては、IL17RB 陽性癌幹細胞の選択的排除によりオルガノイドの退縮が得られることが示された（下図）。さらに種々の癌幹細胞特異的なマーカー候補そのものの阻害により、それら因子が陽性の癌幹細胞が傷害され、癌由来オルガノイド／PDX（patient-derived xenograft）が退縮するかを確認したが、IL17RB についてはその機能的阻害により癌由来オルガノイド／PDX が退縮せず、IL17RB は直接の標的とならない可能性が示された。また抗 IL17RB 抗体を用いたヒト大腸癌細胞株に対する単独の増殖抑制効果は乏しかった。そのため、今後は抗体薬物複合体を用いた癌幹細胞標的治療を見据えた抗 IL17RB 抗体のブラッシュアップと、新たな細胞内シグナルの阻害による癌幹細胞標的治療の開発の双方を視野に入れた研究が必要と思われた。

IL17RB 陽性ヒト大腸癌幹細胞の選択的傷害、排除による癌由来オルガノイドの退縮効果



(Proc Natl Acad Sci U S A. 2019 Jun 25;116(26):12996-13005)

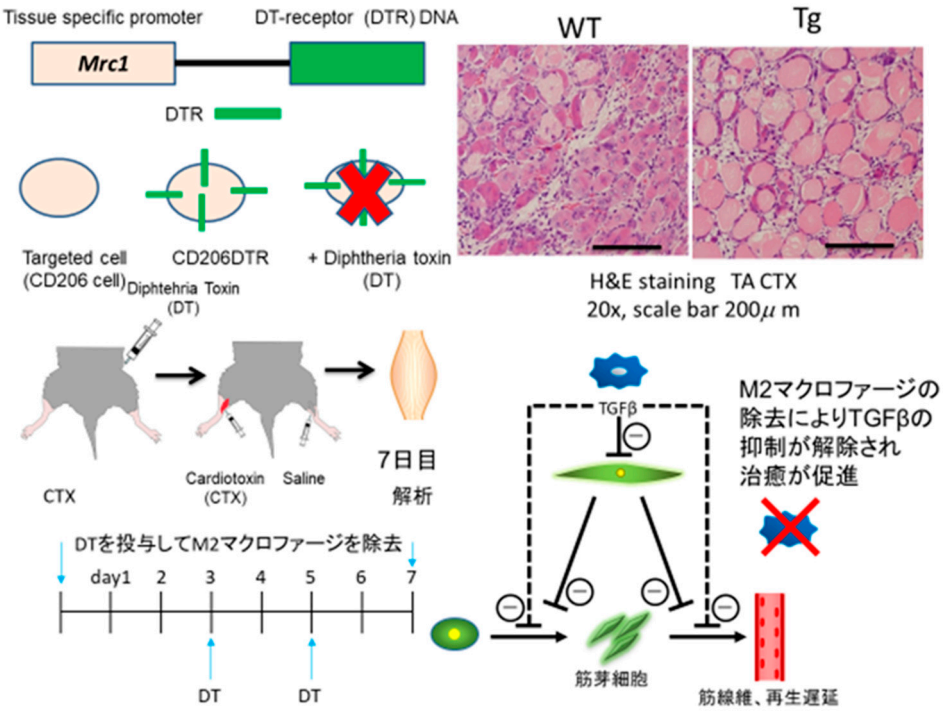
217　高齢者の骨格筋損傷からの回復を促進する治療法の開発	戸邉　一之

【目的】超高齢化社会を迎えた現代において、サルコペニア保有者数が増加しており骨格筋の量および質を維持するための有効な手段を講じることは緊急性の高い課題である。本研究では、糖尿病での骨格筋損傷からの回復遅延の分子機構を解明し、M2 マクロファージ（MΦ）に着目した骨格筋損傷からの回復を促進する治療法の開発を目指す。骨格筋損傷後の筋再生において、炎症とその後に起こる創傷治癒機転に重要な役割を果たすのが MΦである。骨格筋損傷後の筋再生において、初期は炎症性の M1 MΦが増加するが続いて抗炎症性あるいは修復を促進する M2 MΦが増加をして修復に寄与するというのがこれまでの定説である。私どもが注目したのは「骨格筋に在住する M2 MΦ」である。骨格筋損傷後に M2 MΦを除去し回復への影響を検討した。

【方法】M2 MΦを任意のタイミングで除去可能な遺伝子改変マウス CD206DTR マウスを用いて、cardiotoxin を前脛骨筋に投与し骨格筋損傷を誘導した。損傷後、3 日目、5 日目に、M2 MΦを除去し損傷からの回復に与える影響を検討した。次に高脂肪食・糖尿病モデルマウス、加齢マウスで同様の実験を行なった。

【結果】M2 MΦの除去により骨格筋損傷からの回復が促進された。肥満糖尿病モデルマウス、高齢マウスにおいてはともに骨格筋損傷からの回復が遅れているが、M2 MΦの除去により部分的ではあるが回復は促進された。

M2 マクロファージの除去により骨格筋損傷からの回復が促進



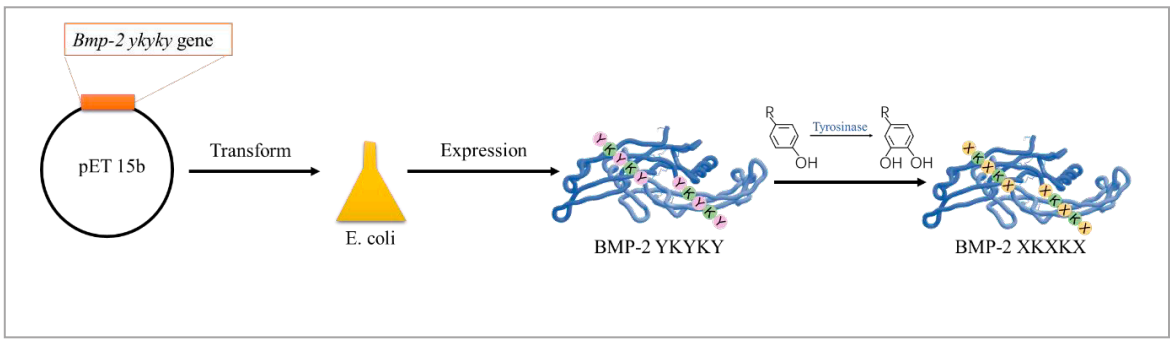
218　医用材料の生体機能化のための接着性成長因子の開発	伊藤　嘉浩

【目的】成長因子固定化は、医療用材料に生理活性を付与するうえで重要な技術である。しかし、これまでの成長因子の固定化は、有機系バイオマテリアルや生体組織が中心で、硬組織置換材料に用いられる無機系バイオマテリアルの金属（チタンなど）やセラミックス（ヒドロキシアパタイトなど）への固定化は困難があった。そこで、我々は、これら無機材料へも容易に固定化可能な接着性の成長因子タンパク質そのものを創り出すことを考え、ムール貝が分泌する水中接着タンパク質から発想を得、成長因子タンパク質のインシュリン様成長因子に、水中接着タンパク質の活性部位の主成分アミノ酸 3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン（DOPA）を導入し、チタン結合性の付与に成功した。本研究では、どのような成長因子にも基材接着性を付与できる、より一般的な DOPA 導入法を開発する。そして、応用性が高く、しかもチロシンが活性部位にある骨形成たんぱく質や血管内皮細胞成長因子への接着性付与を行った。

【方法】骨形成たんぱく質には、遺伝子組換え法で、末端にチロシン残基を含む配列を挿入し、タンパク質として発現させた後、チロシナーゼで処理することにより、DOPA を導入した。血管内皮細胞成長因子へは、ソルターゼを用いて、あらかじめ固相法で合成した DOPA を含むペプチドを結合させることによって調製した。

【結果】DOPA 導入骨形成タンパク質、血管内皮細胞成長因子、ともに合成をマススペクトルにより確認した。DOPA 導入骨形成タンパク質は、チタン結合性をもち、DOPA 導入血管内皮細胞成長因子は、クロム合金への結合性をもつことがわかった。また、DOPA 導入骨形成タンパク質はチタン表面で、UE6E7T-12 細胞の骨分化を促進し、DOPA 導入血管内皮細胞成長因子固定化表面は、ヒト血管内皮細胞の成長を促進することがわかった。

チタン結合性を付与された骨形成タンパク質の調製スキーム



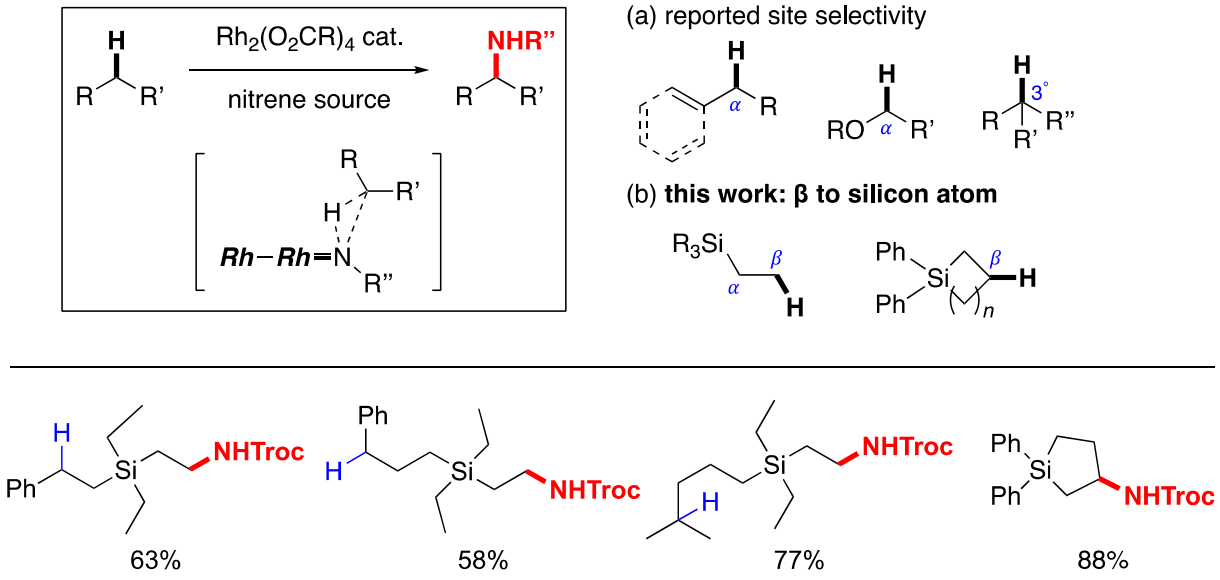
219　二方向性位置選択的C-H官能基化と含ケイ素複素環合成	上田　善弘

【目的】近年遷移金属触媒やラジカル種を活用した有機合成反応開発が進むことで、従来の求核剤、求電子剤といった観点では官能基変換の対象とならなかった C-H 結合を、官能基として捉えることが可能になりつつある。これまで合成のビルディングブロックとして想定されなかった化合物の合成利用を可能にし、工程数削減につながる直接的 C-H 結合官能基化反応は、環境調和の観点からも開発が望まれる。しかし、有機化合物は多数の C-H 結合を有するため、C-H 結合官能基化反応においては必然的に位置選択性が問題となる。本研究ではシリル基の立体電子効果を利用した新規位置選択的 C-H アミノ化研究に取り組んだ。

【方法】ロジウム二核錯体から生じるロジウムナイトレン種は強力な C（sp^3）-H アミノ化活性を有し、有機化合物に直接アミノ基を導入することができる触媒活性中間体として注目されてきた。分子間反応において、ロジウムナイトレンに対する C-H 結合の反応性が調べられ、第三級 C（sp^3）-H 結合やヘテロ原子 α 位、ベンジル位 C（sp^3）-H 結合等の立体電子効果により電子豊富な C-H 結合がより高い反応性を示すことが明らかとされてきた。シリル基は β 位に生じうるカチオンを安定化することが知られているため、ロジウムナイトレン種に対する C-H 挿入段階で生じると想定されるカチオンを安定化すると期待できる。本研究に着手するまでに、ロジウムナイトレン種を利用した分子間位置及び化学選択的 C（sp^2）-H アミノ化反応を開発しており、本触媒反応系を活用した様々な有機ケイ素化合物の分子間 β 位選択的 C-H アミノ化を検討した。

【結果】ロジウムトリフェニルアセテート $Rh_2(tpa)_4$ 触媒存在下、TrocNHOTs 及び K_2CO_3 をそれぞれナイトレン源及び塩基として用いる条件で、シリル基 β 位の第一級 C（sp^3）-H 結合選択的なアミノ化反応が進行することを見出した。通常反応活性とされる第三級 C（sp^3）-H 結合やベンジル位 C（sp^3）-H 結合及び酸素原子 α 位 C（sp^3）-H 結合存在下でも、シリル基 β 位選択的アミノ化が進行した。また、シラシクロアルカン類は非常に高い反応性を示した。ケイ素を炭素に置き換えた基質では反応が進行しないという実験結果や、計算化学による解析からも C-Si 結合の高い σ 供与性が反応の成否に重要であることがわかった。ケイ素は炭素の生物学的等価体として見なすことができるため、本研究で合成可能なアミノシラン類は、医薬品候補物質探索における有用なビルディングブロックとしての利用が期待される。

ケイ素の立体電子効果を活用した位置選択的 C-H アミノ化



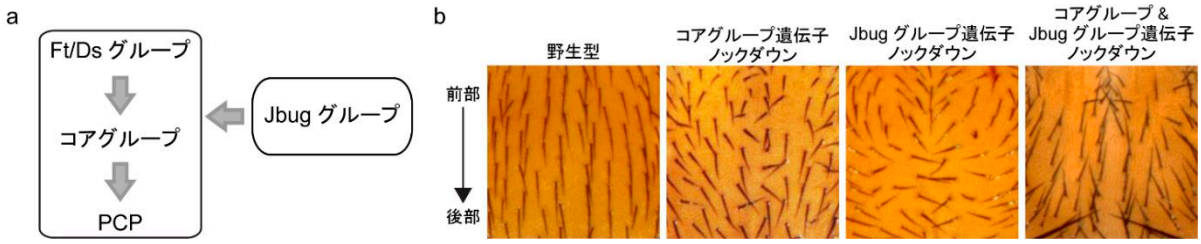
220　細胞動態に立脚した新奇PCP制御機構の解明	鮎川　友紀

【目的】平面内細胞極性（planar cell polarity：PCP）は、上皮細胞の頂端 - 基底軸と直交した極性であり、上皮細胞の向きはPCPの制御を受けることによって組織平面内で一定方向に揃えられる。PCPに関わる遺伝子はショウジョウバエで初めて同定された後、ヒトをはじめ哺乳動物でも相同遺伝子が見つかり、PCPは進化的に保存された機構であることが明らかにされた。PCPの制御グループは、その機能の違いから「コアグループ」と「Fat（Ft）／Dachsous（Ds）グループ」に分類されている。ショウジョウバエ背板を用いた組織特異的ゲノムワイドスクリーニングで得られた遺伝子の機能解析から、我々は、既存のPCP制御グループとは一線を画する機能を持つ遺伝子群を見出し、この遺伝子群をJitterbug（Jbug）グループと命名した。これまで、我々はJbugグループの構成遺伝子を七つ同定している（投稿準備中）。Jbugグループ遺伝子のノックダウンを背板で行うと、一般的なPCP遺伝子を欠失した個体と同様に背毛の配向が乱れる。コアグループ遺伝子やFt／Dsグループ遺伝子の単独または二重欠損では背毛の配向は乱れるのみだが、大変興味深いことに、Jbugグループ遺伝子とコアグループ遺伝子の二重ノックダウンを行うと、背毛は野生型と比べて逆向きに揃う。しかしながら、背毛が一定方向に揃う（逆方向ではあるが）分子機構は不明である。この謎を解き明かすために、我々はライブイメージング法を用いて蛹期における背板の細胞の動態を長時間解析した。野生型の蛹期背板では、蛹後方から前方に向かう細胞集団の移動（Tissue flow）が観察されるが、Jbugグループ遺伝子とコアグループ遺伝子の二重ノックダウンではTissue flowの向きが逆転し、蛹前方から後方に向かうTissue flowが観察された。この結果は、Tissue flowの反対方向にPCPを決定する分子機構の存在を示唆した。本研究では、Tissue flowとPCPの因果関係をさらに検証するとともに、Tissue flowの反対方向にPCPを規定する分子機構の解明を試みた。

【方法】ショウジョウバエ個体における遺伝子のノックダウンはRNAi法を用いて行った。ライブイメージング法を用いてショウジョウバエ蛹期における背板の細胞動態（Tissue flow）を長時間解析した。

【結果】Jbugグループ遺伝子とコアグループ遺伝子の二重変異体におけるTissue flowを遺伝学的な操作によって改変したところ、蛹後方から前方に向かうTissue flowが観察され、成虫個体の背毛は後方に向かって配向した。よって、Tissue flowの向きと反対方向にPCPが制御される可能性が裏付けられた。Tissue flowを介したPCP制御機構を明らかにするために、sGMCA系統（非筋型ミオシンIIの軽鎖をコードするspaghetti squash遺伝子のプロモーター制御下でMoesin::GFPを発現する）を用いて蛹期の背毛と背板上皮細胞を蛍光標識し、Tissue flowと背毛の動態を同時に観察した。野生型では、蛹前方へ向かうTissue flowが観察され、背毛は蛹後方に向けて伸長する。一方で、Jbugグループとコアグループの二重ノックダウンを行うと、Tissue flowは蛹後方に向かい、それに伴って背毛の方向は経時的に変化し、最終的には背毛が野生型と比べて逆方向に揃うことを見出した。最後に、遺伝学的な解析から、Tissue flowを介したPCP制御にはFt／Dsグループ遺伝子は関わらないことが示唆された。

PCP経路と背板におけるPCP表現型



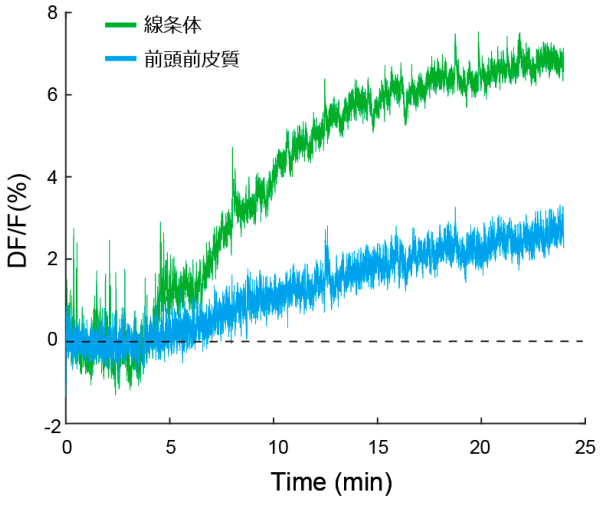
221　蛍光モノアミン測定による精神疾患メカニズムの解明	小澤　貴明

【目的】統合失調症は幻覚・妄想等の陽性症状、感情平板化等の陰性症状および認知機能障害等に特徴づけられ、現在100人に1人弱という極めて高い罹患率が示されている精神疾患である。その原因として様々な発症メカニズムが考えられているが、神経伝達物質に着目したものでは、1. グルタミン酸受容体（特にNMDA受容体）の機能低下に起因する「グルタミン酸仮説」と、2. 前頭葉のドーパミン機能の低下および皮質下脳領域のドーパミン機能の過活動に起因する「ドーパミン仮説」に基づいた研究が行われてきた。しかし、二つの仮説に関連性はあるのか、あるとしたらグルタミン酸受容体の機能低下は「いつ」「どこで」「どのような」脳内ドーパミン放出の異常を引き起こしているのかは明らかになっていない。この問題を解決するためには、グルタミン酸受容体の機能低下と関連した統合失調症モデル動物において観察される行動異常と、それに関連したドーパミン動態の異常を明らかにする必要がある。本研究では、グルタミン酸受容体の異常と関連したマウスモデルである「新生仔期NMDA受容体遮断マウス」の、統合失調症モデルとしての有用性を評価した。また、近年開発された高速蛍光ドーパミンセンサー、$GRAB_{DA}$を用いた皮質領域および皮質下領域におけるドーパミン変化量の測定法についても検討を行った。

【方法】メスマウスが出産した仔マウスを薬物処置条件に従って群分けした。MK-801条件群では生後数日間、NMDA型グルタミン酸受容体拮抗薬であるMK-801を1日1回皮下投与した。統制条件であるSAL群では生理食塩水を1 ml/kgの用量で皮下投与した。生後56日目から、プレパルス抑制テストおよびメタンフェタミン反応性テストを行った。また、蛍光ドーパミンセンサーである$GRAB_{DA}$を前頭前皮質および線条体に発現させ、ファイバーフォトメトリー法を用いて、メタンフェタミン腹腔内投与後に、$GRAB_{DA}$シグナル上昇の有無を検討した。

【結果】新生仔期MK-801が成体期マウスにおけるプレパルス抑制およびメタンフェタミン反応性に及ぼす影響について様々な用量および投与期間条件を用いて検討した。その結果、低用量の新生仔期MK-801によって、成体期におけるプレパルス抑制の障害およびメタンフェタミン反応性の増強が引き起こされることが明らかになった。また、線条体および前頭前皮質から$GRAB_{DA}$シグナル多点同時記録を行ったところ、どちらの領域においてもメタンフェタミン投与後に、有意な$GRAB_{DA}$シグナルの上昇が認められた。本研究により、1. グルタミン酸受容体の機能低下と関連した統合失調症のマウスモデルおよび、2. 蛍光ドーパミンセンサーと独自のファイバーフォトメトリー技術を用いたドーパミンの多点同時記録法を確立した。今後は、本研究で確立したモデルマウスが示す強いメタンフェタミン反応性に着目し、このドーパミン測定技術を適用することで、グルタミン酸受容体の機能低下により引き起こされる統合失調症の陽性様症状と関連したドーパミン放出の異常を明らかにする。

蛍光ドーパミンセンサーを用いた多点同時ドーパミン記録



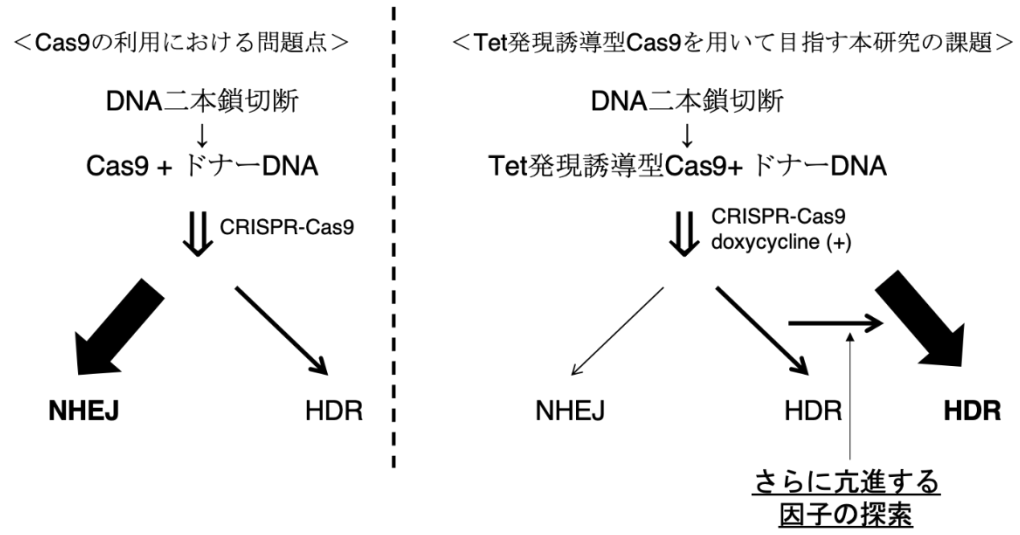
222　不活性型Cas9を用いた新規相同組換え修復因子の探索	加藤　朋子

【目的】CRISPR-Cas9 を中心としたゲノム編集技術は、遺伝性疾患に対する効果的な治療法として注目されている。特に疾患の原因となる変異の修復が高精度に実現されれば、生体内で直接ゲノムを編集することが可能となり、医療応用への期待を更に加速させる。ゲノム編集はゲノム DNA の二本鎖切断後に、ドナーDNA を用いた相同組換えを介して正確な修復を行う HDR と、ランダムな欠失や挿入を伴いながら修復を行う NHEJ によって生じる。しかし、一般的な条件では、HDR に比べて NHEJ がはるかに強く誘導されてしまうことが、医療応用の実現に向けて大きな障壁となっている。本研究では、他の細胞に比べて HDR 活性が高い HEK293T 細胞由来 cDNA ライブラリを用いて、過剰発現により、CRISPR-Cas9 が誘導する HDR を亢進する因子のスクリーニングを行う。本研究で見出された新規の HDR 因子は、疾患ゲノム変異を正確に修復するための医療技術にも応用できることが期待される。

【方法】本研究では FACS ソーティングが必要になるため、ヒト白血病由来 K562 細胞を用いた。HDR と NHEJ の同時活性測定が可能な Traffic Light レポーター、Tet 発現誘導型 Cas9 及び gRNA のそれぞれを Nucleofection により導入し、薬剤選択によって単一クローンを得た。樹立した細胞にドナーDNA を Nucleofection すると同時に、HEK293T 細胞由来の cDNA Library（Lentivirus として導入）と Cas9 の発現を ON にするための doxycyclin を添加した。1 週間後に顕微鏡下で蛍光観察を行い、FACS ソーティングにより HDR が生じている細胞（EGFP 陽性細胞）と NHEJ が生じている細胞（mCherry 陽性細胞)をそれぞれ分取した。分取した細胞からゲノムを抽出し、レンチウイルスベクター特異的なプライマーを用いて PCR により増幅し、その配列を Sanger sequence により確認した。

【結果】K562 細胞に Traffic Light レポーター、Tet 発現誘導型 Cas9 及び gRNA を Nucleofection し、薬剤選択により単一クローン化した細胞（K562-TLRiWTCas9-EGFPgRNA 細胞）を樹立した。この細胞は、doxycyclin 存在下で HDR 及び NHEJ 活性を誘導することができた。この細胞を用いてドナーDNA の Nucleofection、Lenti-HEK293TcDNA Library 及び doxycyclin の添加を行った上で FACS ソーティングを行ったところ、EGFP 陽性細胞と mCherry 陽性細胞をそれぞれ分取できた。また、これらの細胞のゲノムを抽出し、レンチウイルス特異的なプライマーを用いて配列を確認したところ、それぞれの集団で特異的な遺伝子配列を見出すことができた。

Cas9 の利用における問題点と Tet 発現誘導型 Cas9 を用いて目指す本研究の課題



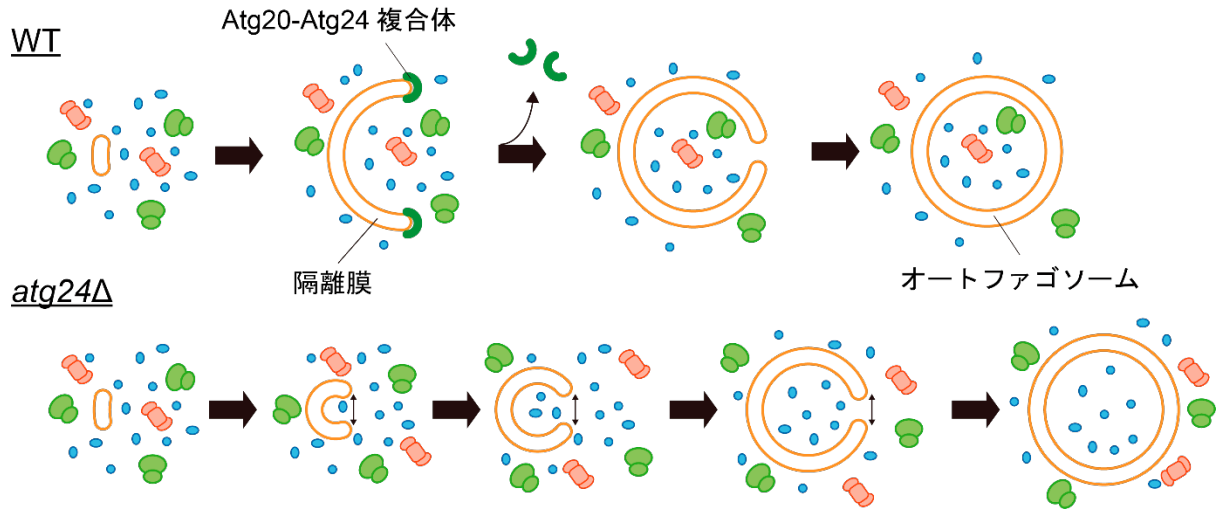
223　オートファジーにおける新たな基質選択機構の解明	小谷　哲也

【目的】オートファジーはタンパク質などの細胞質成分や細胞小器官を分解する機構であり、酵母からヒトに至るまで真核生物に広く保存されている。栄養飢餓などによりオートファジーが誘導されると、細胞質に「隔離膜」と呼ばれる扁平な小胞が現れる。隔離膜は細胞質の一部を取り込みながら球状へと伸張し、閉じることで、二重の膜構造を持ったオートファゴソームが形成される。完成したオートファゴソームは酵母の場合、液胞と融合し、液胞の内部にある分解酵素によってオートファゴソームの内容物が分解される。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いた研究により、オートファジーに関わる *ATG* 遺伝子／Atg タンパク質が同定され、オートファジーの分子機構の理解が飛躍的に進んだ。しかし、オートファゴソームの形成機構や分解基質の選択性決定機構にはまだ多くの謎が残されている。Atg20 - Atg24 複合体はミトコンドリアやペルオキシソーム、リボソーム、プロテアソーム、脂肪酸合成酵素のオートファジーによる分解に必要であることが報告されているが、Atg20 - Atg24 複合体の具体的な機能は明らかとなっていない。本研究では Atg20 - Atg24 複合体が隔離膜の開口端の曲率を認識して局在化し、開口端の大きさを維持あるいは拡張して、オートファゴソームへの巨大分子の取り込みを可能にしているという仮説を検証し、隔離膜の開口端の大きさ制御による基質選択という新たなメカニズムを提唱することを目的とした。

【方法】大きさの異なるモデル基質を用い、それらのオートファジーによる分解の効率を野生型細胞と *ATG24* 欠失細胞とで比較し、基質の大きさが分解効率に与える影響を解析した。また、野生型細胞と *ATG24* 欠失細胞においてオートファゴソームに取り込まれる細胞質成分を質量分析で同定し、量の比較を行い、Atg20 - Atg24 複合体依存的にオートファゴソームに取り込まれる因子の特徴を解析した。さらに Atg20 - Atg24 複合体の欠失または過剰発現がオートファゴソーム形成に与える影響について解析した。

【結果】本研究でのモデル基質を用いた解析やオートファゴソームに取り込まれる基質の網羅解析から、大きい分子ほど Atg20 - Atg24 複合体に強く依存してオートファゴソームに取り込まれることが示唆された。電子顕微鏡解析により *ATG24* 欠失細胞では隔離膜の開口部が狭くなることが明らかとなった。また、Atg20 - Atg24 複合体を過剰発現させると、オートファジーに欠損が生じた。隔離膜の開口端から Atg20 - Atg24 複合体が解離しにくくなり、開口部が閉じにくくなったことを示唆する結果を得た。

オートファゴソーム形成における Atg20 - Atg24 複合体の役割に関するモデル図



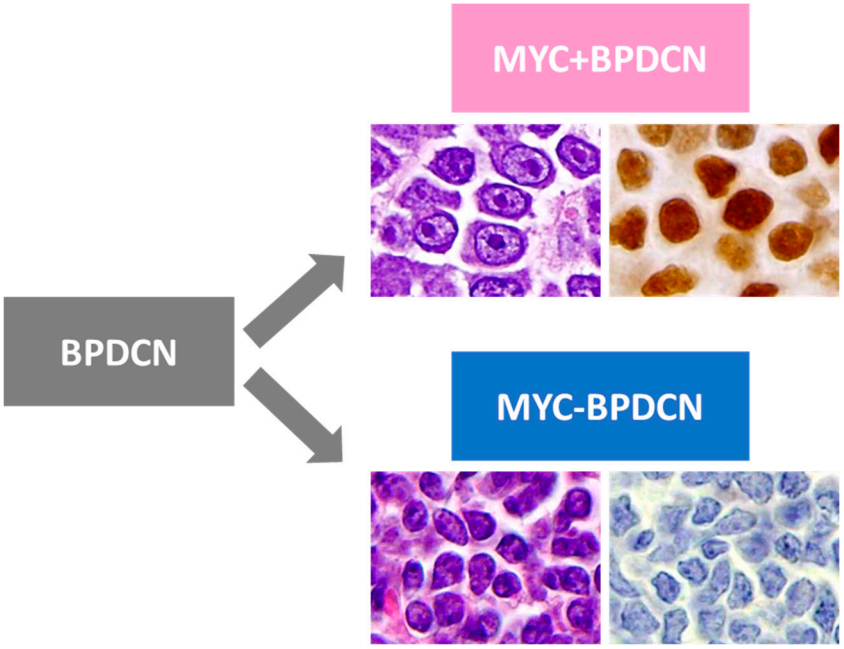
224　MYC陽性BPDCN：疾患概念の提唱と病態解明・治療法開発	坂本　佳奈

【目的】芽球性形質細胞様樹状細胞腫瘍（blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm：BPDCN）は、未分化な形質細胞様樹状細胞由来とされる稀な造血器腫瘍である。典型的には皮膚病変で発症し、当初は化学療法に反応することが多いものの早期に再発、白血化し、生存期間中央値が 10〜20 か月程度の予後不良な疾患である。疾患概念確立の遅れと疾患の稀少性により診断は容易でなく、実地診療において急性骨髄性白血病など他の造血器腫瘍との鑑別がしばしば困難となる。標準治療は定まっておらず、前述のごとく予後不良な疾患であるため、分子病態の理解および分子標的の同定が強く求められている。我々は、BPDCN と診断／疑診された症例の検体・臨床情報を収集し、厳密な病理組織学的検討により急性骨髄性白血病等の混在を排し、その結果選別された 118 例の BPDCN 症例群の病理学的解析により、BPDCN が、MYC の遺伝子再構成と発現異常を認める MYC^+ BPDCN（約 1／3）と、それらを認めない MYC^- BPDCN（約 2／3）に層別化されることを突き止めた。BPDCN が MYC 異常の有無により別個の疾患概念として分類されるべきなのか検討するため、一層の症例集積とゼノグラフトモデルの構築等を通じて、BPDCN の病態解明・治療法開発の基盤づくりを目指した。

【方法】協力機関各施設で BPDCN と診断、あるいは疑診された症例について、厳密な病理組織学的評価により BPDCN の診断確認を行い、非 BPDCN 症例を除外した。免疫染色、FISH 法を用いて MYC^+ BPDCN と MYC^- BPDCN に分類した。これらの症例について、条件の整った検体が得られた場合、ゼノグラフトモデルの作製を試みた。

【結果】稀少疾患である BPDCN の症例集積につながるシステムを整備し、症例集積を進めた。収集した症例について、MYC 異常の有無を含む詳細な臨床病理学的解析を行った。ゼノグラフトモデルを作製し、今後の BPDCN の病態解明、ひいては治療法開発の基盤を築いた。

BPDCN の MYC 異常による層別化



225　糖尿病性筋萎縮の克服を目指した新規分子基盤の解明	藤巻　慎

【目的】糖尿病は世界で最も罹患率が高い慢性疾患であり、その有病者数は爆発的に増加し続けている。糖尿病が筋萎縮を誘導することを示した論文は数多く報告されている一方で、その発生機序や治療法に関する知見は乏しいのが現状である。これまでの研究において、幹細胞機能を制御することが知られている Notch2 が成熟筋線維にも発現し、Notch シグナルが糖尿病性筋萎縮を誘導する可能性を見出した。そこで、筋線維における Notch2 の機能を明らかにし、糖尿病性筋萎縮の発生機序を解明することを目的とした。

【方法】筋線維特異的 *Notch2* 欠損マウス（N2-mKO）を作製し、ストレプトゾトシン（STZ）を投与することで糖尿病を誘導し、筋萎縮耐性を評価した。また、Notch の活性化に必要なγ-secretase の阻害剤である DAPT を投与したマウスでも同様の実験を行った。

【結果】N2-mKO マウスは定常状態で著明な表現系を示さなかった。STZ を投与して糖尿病を誘導し 14 日後に筋組織を回収したところ、野生型マウスで顕著な筋重量および筋線維横断面積の減少が確認された一方で、N2-mKO マウスはほとんど変化しなかった。このことから、*Notch2* を欠損させることで糖尿病による筋萎縮を抑制できる可能性が示唆された。また、γ-secretase 阻害剤である DAPT を投与したマウスにおいても、筋萎縮抵抗性が認められたことから、Notch2 によって誘導される筋萎縮は、γ-secretase の活性化によって生じる可能性が示唆された。以上より、本研究は糖尿病性筋萎縮を制御する分子基盤として Notch シグナルが関与することを突き止めた。今後は、Notch2 の上流および下流の制御因子を明らかにすることで、筋萎縮制御メカニズムの包括的な理解を目指す。

糖尿病による筋萎縮