

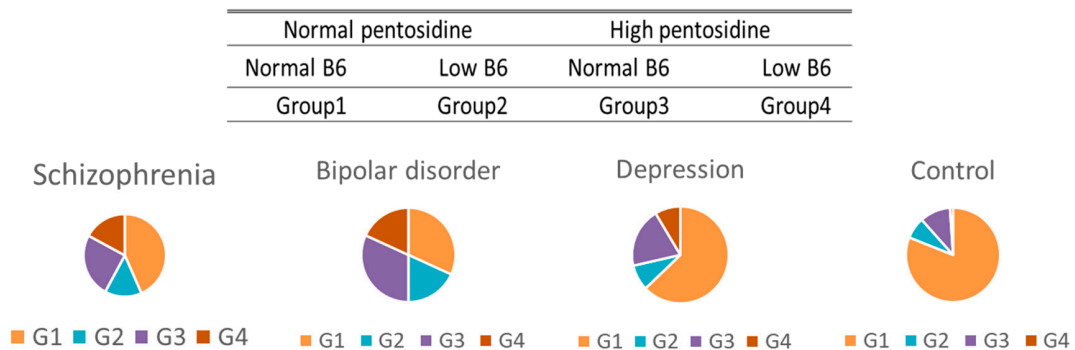
1 カルボニルストレスに着目した精神疾患発症機序の解明	新井 誠
------------------------------------	-------------

【目的】 精神疾患発症機序の解明において、異種性回避を念頭にしたバイオマーカー同定とその分子基盤に基づいた病因、病態の理解が早期診断、治療、予防法の創出のために必要不可欠である。本研究は、カルボニルストレス (carbonyl stress : CS) マーカーを軸に、精神疾患の新たな心身統合的な早期診断・予防・治療法創成のため、病態基盤を解明することを目的とした。

【方法】 ヒト生理検体について HPLC-MS 分析を行い、精神疾患罹患者と健常者の血中 CS 変動を比較し、血中 CS と臨床情報との関連について検討を行った。また、一般集団の被験者における CS 指標について、皮膚 AGEs 値を測定、栄養疫学調査を実施し、それらとの関連についての検討を試みた。動物モデル研究においては、glyoxalase I (*GLO1*) ノックアウトマウスを用いた行動試験、遺伝子発現解析を実施した。加えて、細胞株あるいは iPS 細胞モデルを活用した抗 CS 作用のある天然物由来 bioactives の探索等を試みた。

【結果】 CS マーカーである PEN、VB6 が重篤な陰性症状の一つである思考の解体、思考障害と強い関連を示すことが明らかとなった。また、躁うつ病と統合失調症という 2 大内因性精神疾患において、その一部には CS 病態基盤の共通性が示唆された。さらに、統合失調症において、PEN 蓄積が再燃・再発リスクや予後予測の因子となる可能性も示唆された。AGEs マーカーを非侵襲的に皮膚から簡便に測定する体制を確立し、統合失調症では健常者と比較して皮膚 AGEs 値が有意に増大すること、早期発症、入院回数、入院期間、抗精神病薬服用と関連することを明らかにした。*GLO1* KO マウスの行動解析においては、行動量の減少、強制水泳試験における無動時間の短縮、驚愕反応の減少を明らかとした。CS 性統合失調症、健常者の iPS 細胞を樹立し、アストロサイトへ分化、誘導する系を確立した。精神疾患の多くの症例において糖尿病、心血管疾患、肥満など様々な合併症が問題視されているが、今後、身体疾患の増悪とも関連のある CS を軸として、CS データ資源を十分に有効活用することは、早期からの精神疾患、身体疾患の予防介入、心身健康の増進に資する予防医学にも貢献できるものと考えられる。

各精神疾患におけるカルボニルストレス性 (グループ G4) の割合

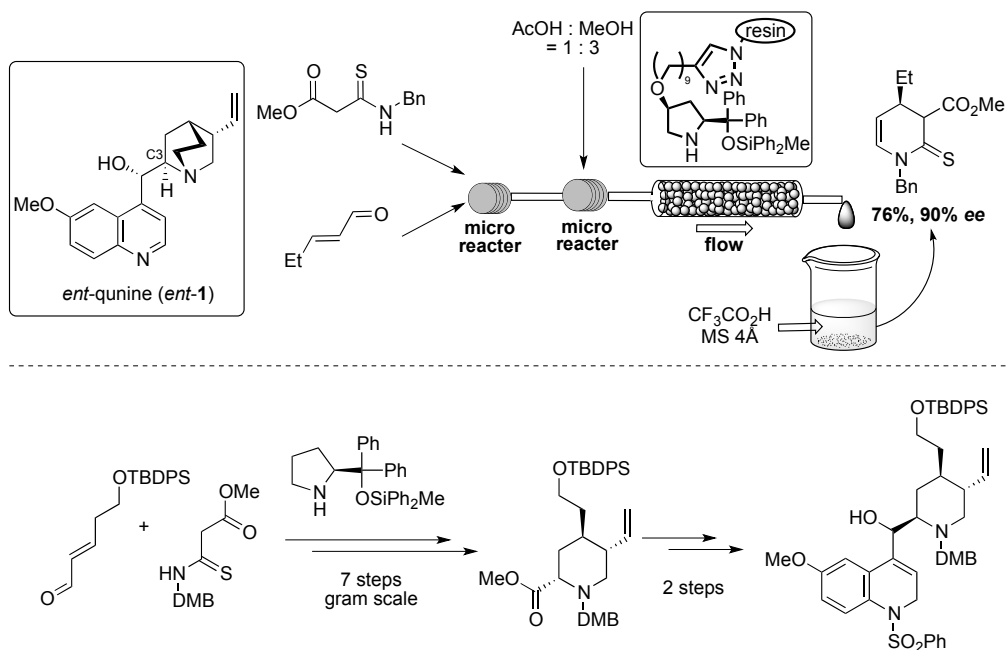


【目的】 キナの木に含有されるアルカロイド“キニーネ (1)” はマラリアの治療薬として古くから用いられてきた歴史的に重要な化合物である。一方、最近では不斉有機触媒として再び脚光を集めている。不斉有機触媒反応では高い不斉を誘起することも重要であるが、それぞれのエナンチオマーを作り分けられることが絶対的に求められている。現時点で、天然物であるキニーネ (1) のエナンチオマーの供給ルートはなく、疑似エナンチオマーとして天然から単離される 1 の立体異性体のキニジンが用いられている。しかしながら、両天然物を触媒として不斉反応を行う際、同じエナンチオ選択性でそれぞれの鏡像体を得ることは難しく、反応として不完全であることは否めない。今回、筆者らは工業化に向けた非天然型キニーネ (*ent*1) の実践的合成を目的に、鍵となる不斉有機触媒反応を固体担持有機触媒を利用したマイクロフローシステムへと展開し、続いて、非天然型キニーネ (*ent*1) 全合成研究を行った。

【方法】 鍵工程となる二級アミン型不斉有機触媒反応の実用的利用を目指し、触媒量の低減化に続くマイクロフローシステム構築を行った。すなわち、触媒量 0.1 モル% で反応する反応システムを構築したのち、触媒担持カラムに基質を流すだけで目的とする光学活性ピペリジン環化合物をグラムスケールで得られる手法へと発展させた。一方、非天然型キニーネ (*ent*1) の全合成研究を行った。

【結果】 市販品から 2 段階で調製可能なチオマロナメートを原料として、7 段階で鍵となる光学活性ピペリジン誘導体をグラムスケールで合成することができた。キヌクリジン環をこの時点で構築すると、C3 位ジアステレオマーの熱力学的な安定性に差がない事を明らかとし、*ent*1 の全合成においてキノリン環導入のタイミングが重要である事を認識することができた。さらに、キノリン環導入反応において、キノリン環 C4 位のアニオンもしくはその等価体の反応性が極めて低い事を明らかとする一方で、ジヒドロキノリンの 4 位の反応性はアルキルアルデヒドと反応させる上で、十分な活性を有している事を見出した。以上の知見を利用し、光学活性ピペリジン誘導体へのジヒドロキノリン環の導入に成功した。非天然型キニーネ (*ent*1) の全合成のために残された化学変換は、キヌクリジン環構築反応、ジヒドロキノリンからキノリンへの酸化反応であり、現在検討中である。

非天然型キニーネの全合成研究



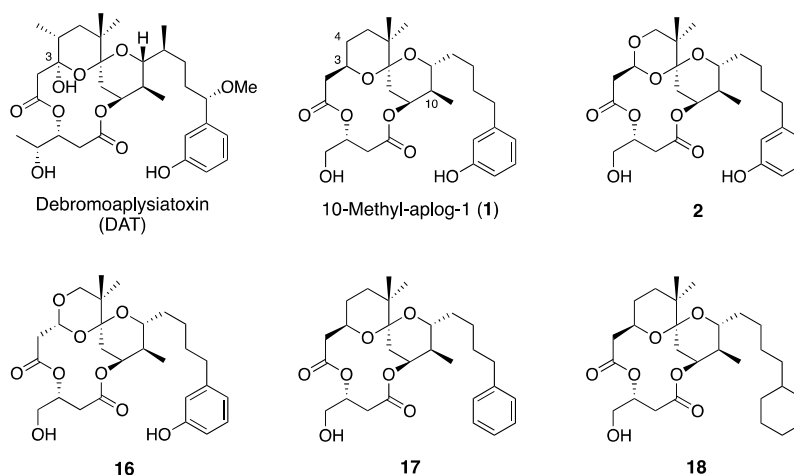
【目的】 プロテインキナーゼ C (PKC) は、細胞の増殖、分化、アポトーシス等において、情報伝達の中枢を担っているリン酸化酵素である。天然の PKC 活性化剤は、特定のがん細胞株の増殖を抑制するが、同時に発がん促進性や炎症性といった副作用を示すことから医薬品として用いることは困難であった。一方、本研究グループが開発したデブromoaplysiatoxin (DAT) の単純化アナログ・10-methyl-aplog-1 (**1**) はこれらの副作用を示さない PKC 活性化剤であり、新しいタイプの抗がん剤シードとして期待されている。本研究では、**1** の合成段階数の短縮とがん細胞増殖抑制活性の更なる改善を目的として、新規誘導体の合成と各種生物活性評価を行った。

【方法】 化合物 **1** の 3 位アセタール型アナログ (**2**) は、*m*-ヒドロキシ桂皮酸から収束的な経路で合成した。次に、**1** の *m*-ヒドロキシフェニル基を、フェニル基あるいはシクロヘキシル基に還元した。これらのアナログの PKC アイソザイムに対する結合能、各種がん細胞に対する増殖抑制活性、ならびに副作用である発がん促進活性と炎症作用を調べた。各種がん細胞増殖抑制活性の評価は、新学術領域研究・分子プロファイリング支援班に依頼した。

【結果】 まず、合成段階数の短縮を目的として **1** の 4 位の炭素原子を酸素原子に置き換えた **2** を設計した。スピロ環およびマクロラクトン環の同時形成反応を適用することによって、**2** を最長直線工程数 18 段階で合成することに成功した。しかしながら、熱力学的により安定な 3 位のエピマー (**16**) が優先して生成したことから、収率の改善には至らなかった。また、**2** の PKC 結合能およびがん細胞増殖抑制活性は、**1** と比べて 1 オーダー程度低かったことから、4 位周辺の疎水性が活性発現に重要であることが判明した。一方で、**2** と **16** は異なる PKC アイソザイム選択性を示したことから、アイソザイム選択的な誘導体を開発するうえで 3 位周辺の構造修飾が有効であることが示唆された。

次に、**1** の *m*-ヒドロキシフェニル基をフェニル基またはシクロヘキシル基に変換した **17** および **18** を合成した。化合物 **17** は、**1** と同程度の強さで PKC δ C1B ドメイン (δ -C1B) に結合したが、**18** は 1 オーダー近く結合能が低下した。ドッキングシミュレーションによって各誘導体と δ -C1B の結合様式を解析したところ、**1** および **17** のフェノール性水酸基およびフェニル基は δ -C1B の Met-239、Pro-241 との間に水素結合または CH/ π 相互作用を形成することが示唆された。化合物 **18** のシクロヘキシル基はこれらの相互作用を形成できないため結合能が低下したと予想される。また、**17** は **1** と同様にマウス背部皮膚において発がん促進性を示さなかったのに対し、**18** は炎症性と弱い発がん促進性を示した。以上より、**1** の *m*-ヒドロキシフェニル基は δ -C1B との結合を強めるとともに、副作用の抑制に関与していることが判明した。今後、側鎖の長さや芳香環の電子密度を調整し、C1 ドメインとの結合を強化すれば、優れた抗がん剤シードを提示できると考えられる。

Debromoaplysiatoxin (DAT) とその単純化アナログの構造



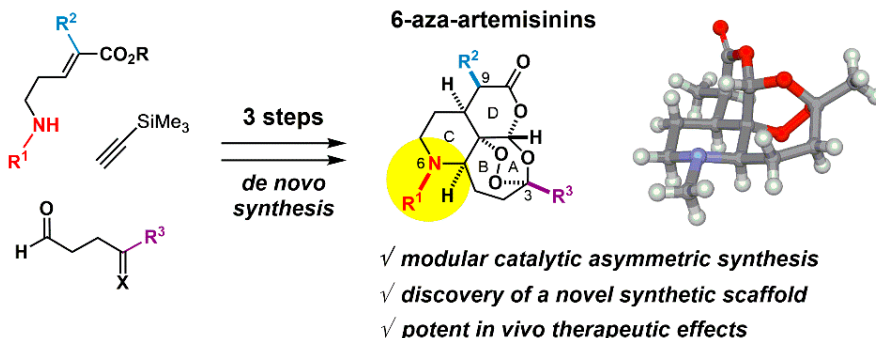
【目的】 漢方薬の有効成分であるアルテミシニン¹は、赤血球内に侵入したマラリア原虫をほぼ一掃する薬効を示し、マラリア治療に革新をもたらした。最近では、がんや他の感染症の治療に適用する試みも活発になってきた。従来、アルテミシニン類を誘導化するアプローチとしては、ラクトンを活用する半合成法にほぼ限定されていた。次世代の抗感染症・制ガン剤開発や分子プローブ創出を目指し、本研究ではアルテミシニン系薬剤の構造を簡略化せずに窒素官能基や非天然型置換基を導入した6-アザアルテミシニン群を設計した。四環性母骨格6位に存在する不斉炭素を窒素に置き換える“元素置換戦略”により、①迅速合成、②骨格の改変、③置換基の多様化、④母骨格の水溶性改善を目論んだ。実際、三つの構築ブロック連結から3工程で6-アザアルテミシニンを触媒的不斉合成するプロセスを開発した。*De novo*化学合成した化合物群の中からアルテミシニンよりも優れた抗マラリア活性を発現するリード化合物の創製に成功した。

【方法】 窒素の反応性を活用したアプローチで、シンプルな三つのセグメントから僅か3工程の変換で6-アザアルテミシニンの四環性骨格を触媒的不斉合成するプロセスを開発した。キラルな銅触媒でアミン・アルデヒド・アセチレンを一挙に集積化する三成分連結反応を適用し、高い光学純度のエンイン環化前駆体を高収率で得た。次に、三置換ビニルシランを導入しながらピペリジン環を構築した。低原子価チタンを活用するエンインの環化により、ピペリジン骨格を高ジアステレオ選択的に構築できることを見出した。ペルオキシド架橋を持つ縮環骨格の構築については、i) カルボニル保護基の除去、ii) アミノ基の保護、iii) ビニルシランとオゾンとの1, 3-双極子付加、iv) シリルペルオキシドとアルデヒドの導入、v) 連続的なアセタール形成をワンポットで進行させるアプローチを実現した。これにより、構築ブロックの連結から僅か3工程で6-アザアルテミシニン骨格を触媒的不斉合成することができた。

【結果】 合成した四環性骨格に導入した窒素を足掛かりとして還元的アミノ化やアシル化を施し、ベンジル基やベンゾエートを連結した6-アザアルテミシニン群を合成した。*N*-メチル基を導入した化合物のX線結晶構造解析から、6-アザアルテミシニンがアルテミシニンとほぼ同一の三次元構造を持つことが分かった。

北里大学と共同で、マラリアを感染させたマウスモデルに6-アザアルテミシニン群をそれぞれ1日おきに四回投与(15 mg/kg x 4)し、*in vivo*でのマラリア治療効果をアルテミシニンや半合成薬アルテスネートと比較した。窒素にベンジル型の置換基を導入した6-アザアルテミシニン群では、アルテミシニンよりも優れた治療効果を発現することを発見した。更に、9位メチル基、6位を*N*-ベンジル基としたアザアルテミシニンは、マラリア化学療法²の切り札となっている第一選択薬アルテスネートとほぼ同等の治療効果を示した。赤血球へ感染するマラリア原虫の成長や増殖を強力に阻害し、即効性が高く副作用の少ない抗マラリア治療効果が確認された。天然物の構造と機能の知見に基づいた元素置換戦略により、第一選択薬に比肩する抗マラリア活性を示す6-アザアルテミシニン群の設計と*de novo*化学合成に成功した。

6-アザアルテミシニン群の設計とモジュラー式迅速合成プロセス開発



5 ジフェニジンの毒性発現に必要な部分構造同定

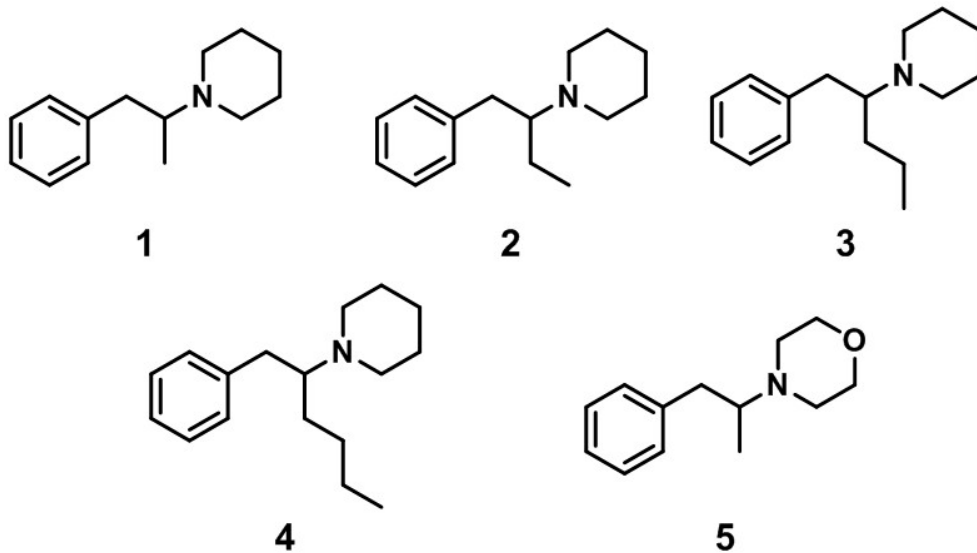
太田 茂

【目的】 近年、危険ドラッグの蔓延が大きな社会問題となっている。化学物質の工業的利用において障害となる安易な規制を避けるためには、特に強力な作用を有する危険ドラッグの構造を明らかにし、真に危険な化学構造を有する物質のみを優先的に規制する必要がある。そこで本研究では、指定薬物ジフェニジンの毒性発現に、ジフェニジン化学構造のどの部分が重要であるかを明らかにする目的で研究を行った。

【方法】 指定薬物ジフェニジンに化学構造の似たフェネチルアミン誘導体を合成し、その一部に関して細胞毒性、ドパミン再取り込み阻害試験、ドパミン放出促進試験、自発的運動量測定試験、条件づけ場所嗜好性試験を行い、構造とこれら活性の相関を調べた。

【結果】 化学構造の違いと各活性の関係に一定の相関が認められた。特に化合物 3 は強力なドパミン再取り込み活性を有しており、かつ報酬効果に対する精神依存性が認められた。これらの結果から、ピペリジン構造と、1 位にプロピル基程度の大きさの炭素鎖を有する構造がジフェニジンに関連する毒性に重要であると考えられる。

実験に用いた化合物の構造式



6 難消化性多糖・食事介入による高血糖抑制分子機序解明

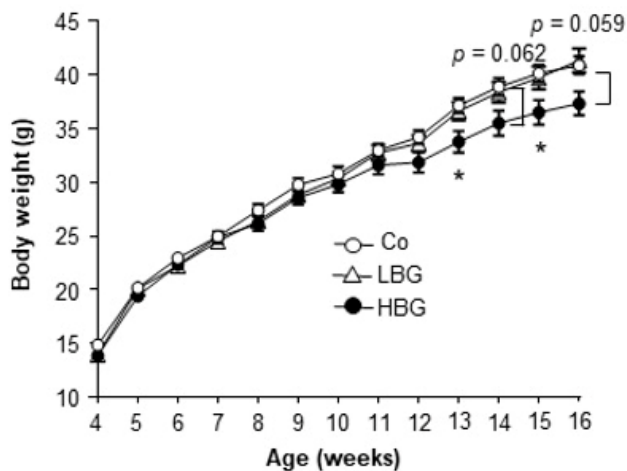
木村 郁夫

【目的】 従来、食物繊維の摂取は糖代謝を改善し、抗肥満効果、生活習慣病の予防にも繋がるとの報告がいくつか為されていたが、その科学的根拠に基づいた証明がなく、作用機序については不明なままであった。食物繊維・難消化性多糖である大麦β-グルカンの摂取は、摂食抑制、体重減少、および血糖コントロールのような代謝機能改善を有すると考えられている。しかしながら、その詳細な作用機序は、未だ明らかになっていない。本研究において、高脂肪食誘発性肥満のマウスモデルを用いて、大麦β-グルカンの代謝機能改善作用の分子機序の解明を目指した。

【方法】 4週齢のC57BL/6J雄マウスに、高β-グルカンまたは低β-グルカン含有20%大麦粉高脂肪食を、通常環境と無菌環境において12週間投与した。さらに、マウスに、5%セルロースまたは5%大麦β-グルカンを含む高脂肪食のいずれかを同様に12週間投与した。次いで、代謝パラメーター、腸内細菌叢組成、および糞便短鎖脂肪酸の産生を分析した。

【結果】 高β-グルカン大麦粉含有食を与えたマウスの体重増加および脂肪量は、16週齢のコントロールマウスよりも低かった。さらに、腸管ホルモンPYYおよびGLP-1の分泌が高β-グルカン含有大麦粉摂食マウスで増加し、腸内細菌叢を変化させ短鎖脂肪酸を増加させることにより摂食抑制を示した。これらの効果は、無菌環境下で消失した。さらに、β-グルカン含有飼料においても同様に、セルロース負荷群と比較して、PYYおよびGLP-1分泌を増加させ、摂食抑制を示した。これらの結果は、腸内細菌産生短鎖脂肪酸を介して促進される腸管ホルモン分泌によって誘導される、食欲の抑制およびインスリン感受性の改善に起因する、大麦β-グルカンの代謝機能改善効果によるものであることを示唆している (Miyamoto et al. PLoS One 13, e0196579, 2018)。

大麦由来難消化性多糖 β-glucan は高脂肪食誘導肥満を抑制する



7 ヌクレオシド系抗菌剤開発を指向した生合成機構の解明

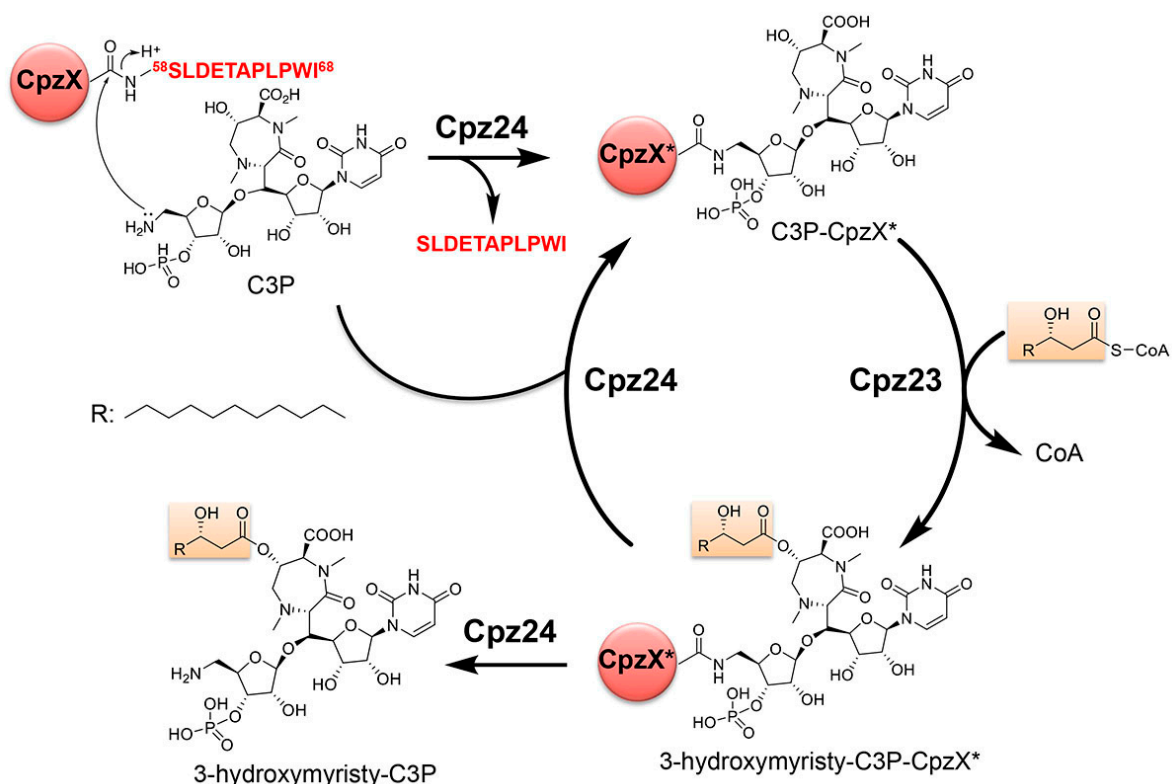
葛山 智久

【目的】 カブラザマイシン (CPZ, caprazamycin) は2003年に放線菌 *Streptomyces* sp. MK730-62F2 より単離されたヌクレオシド系抗生物質である。近年、その誘導体である CPZEN-45 は優れた選択的抗結核菌活性を有すること、さらにその作用機序についても報告され、新たな抗結核菌薬として期待されている。一方でその生合成遺伝子クラスターは同定されてはいるものの、生合成経路に関する知見は少なく、CPZ の抗菌活性に必須であるアシル化修飾などの生合成機構については未解明のままである。そこで、本研究では CPZ の生合成経路を明らかにすることで、新規酵素の発見や CPZ の効率的な生産につながる知見を得ることを目的としている。

【方法】 CPZ の各生合成遺伝子の機能を明らかにするため、各種遺伝子破壊株が蓄積している生合成中間体を単離精製し、NMR 解析に供することで構造決定を行った。次に、得られた生合成中間体を基質として、大腸菌で生産させた各種組換え酵素を用いて *in vitro* の活性検出を行った。これらの結果を統合することにより CPZ のアシル化修飾の生合成機構を提唱した。

【結果】 CPZ の抗菌活性に必須であるアシル側鎖の付加反応が、68 個のアミノ酸からなる小タンパク質 (CpzX) がキャリアタンパク質として機能する前例のない生合成機構を介して触媒されることを明らかにした。

CPZ 生合成におけるアシル側鎖の付加機構

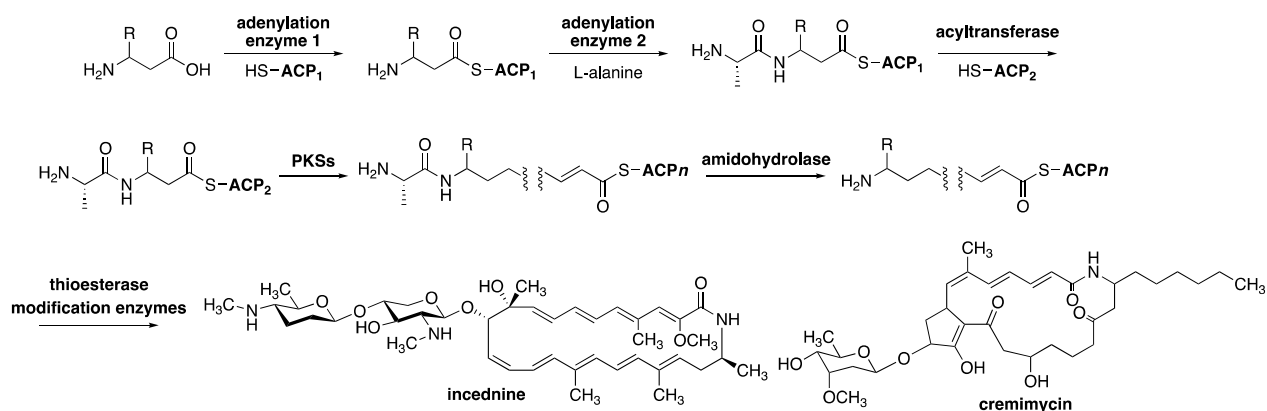


【目的】 微生物が生産する生理活性天然物として多種多様なマクロラクタム抗生物質が知られている。これら抗生物質の生合成酵素遺伝子を基質特異性の異なるものと入れ換えることで、対応する部分構造が変化した新たな抗生物質の生産が期待できる。しかしながら生合成酵素の基質認識機構やタンパク質間相互作用に関する知見は不十分であり、合理的な遺伝子組換えにはさらなる酵素化学的情報の蓄積が重要である。本研究では、合成分子プローブを用いて、アシルキャリアープロテイン (ACP) が介在するマクロラクタム生合成酵素の基質認識機構を解明することを目的とした。本研究ではまず、β-アミノ酸を選択して活性化し ACP へとロードするアデニル化酵素と ACP との相互作用の解明を目指した。また、ACP 上のアミノアシル基を別の ACP へと転移させるアシル基転移酵素と ACP との相互作用の解明を目指した。

【方法】 アデニル化酵素に関してはプローブと反応させるための活性部位情報が不足していたので、まずはいくつかの基質特異性の異なる酵素の結晶構造解析を行った。並行して、ACP 側を修飾するためのパンテテインミミックを分子プローブとして合成した。さらに CoA 合成酵素とホスホパンテテイン基転移酵素を用いて、分子プローブで修飾された ACP を調製した。この修飾 ACP と変異導入したアデニル化酵素をクロスリンクして複合体化を検討することにした。さらに複合体の結晶化を検討し、結晶構造解析によりタンパク質間相互作用を明らかにする。アシル基転移酵素に関しては、基本的な考え方はアデニル化酵素の場合と同様であるが、β-アミノ酸をスターター部位に有するマクロラクタム抗生物質の生合成酵素に特有と考えられる基質のミミックとなる分子プローブを合成してクロスリンクを検討することにした。

【結果】 Incednine 生合成において (S)-3-アミノブタン酸を認識する酵素 IdnL1 と cremimycin 生合成において 3-アミノノナン酸を認識する CmiS6 の結晶構造解析に成功し、基質認識に関わる活性部位情報を得ることができた。また、分子プローブとして用いるパンテテインミミックを合成した。現在、修飾 ACP を調製し、アデニル化酵素とのクロスリンク反応を検討している。アシル基転移酵素に関しては、これまでクロスリンク反応に用いてきたビスマレイミドエタンはシステイン変異導入した部位との選択的な反応はせず、期待とは異なる位置と反応してしまうことがわかった。そこでアデニル化酵素の場合と同様に、パンテテインミミックを分子プローブとして利用したクロスリンク反応を検討することにした。現在までに、2-クロロアセトアミドなどの分子プローブを用いたときにクロスリンク反応が進行することを見出した。

β-アミノ酸をスターター部位に有するマクロラクタム系抗生物質の共通的生合成経路

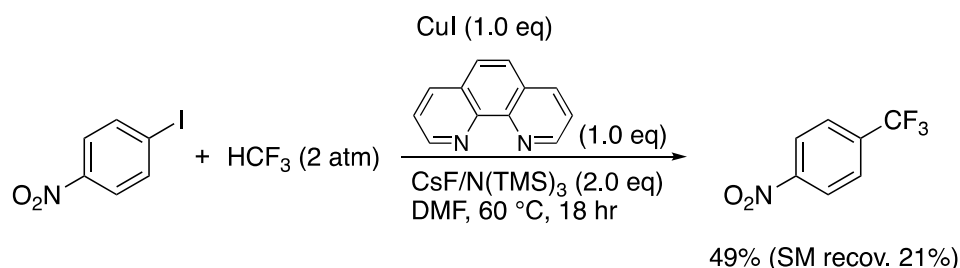


【目的】 フッ素 (F) は、全元素中でもっとも大きな電気陰性度を持つが、立体的には水素 (H) の次に小さな原子半径を持つ。そのため、生物活性化合物中の H 原子を F に置換した化合物は、その性質が大きく変化するものの、生体はその変化を立体的に認識できず、生体内に取り込まれることが知られている。トリフルオロメチル (CF₃) 基は、F 原子による効果が顕著な官能基である。アルキル基の一種であるが、塩素原子と同程度の電子求引性を示し、またイソプロピル基に匹敵する嵩高さを持っている。CF₃基の導入により、化合物の疎水性の向上や体内での代謝安定性が向上することも知られており、CF₃基を含有する医薬品も数多く開発されてきた。そのため、有機合成化学においては CF₃基を化合物に導入するための反応開発が活発に行われてきた。しかし、現在 CF₃基の導入に汎用される Ruppert-Prakash 試薬や Togni 試薬は、その合成の際に国際的に使用が厳しく規制されている CF₃Br を必要とし、実用面で問題点が多い。本研究では、テフロンなどの生産時に大量に生じる副産物のフルオロホルム (HCF₃、別名 フロン 23 (HFC-23)) を利用する新規 CF₃基導入反応の開発を目的とする。

【方法】 Cu 触媒によって進行するヨウ化アリーのトリフルオロメチル化反応において、通常使用される Ruppert-Prakash 試薬の代わりに HCF₃ を CF₃源として用いることができるかどうかを検討した。また、本反応の実用性を拡大するため高活性な Cu 錯体の創製を目指し、Cu 触媒の電子密度を向上させるための配位子として二座配位型含窒素ヘテロカルベン (NHC) 配位子を設計・合成し、上記の反応に適用することでその機能評価を行なった。

【結果】 ヨウ化アリーのトリフルオロメチル化反応は、Cu 錯体存在下、Ruppert-Prakash 試薬 (Me₃SiCF₃) を用いることで進行することが 1991 年に瀧上らにより見出され、2009 年には網井らにより配位子として 1,10-phenanthroline を用いることにより触媒的に進行することが見出されている。そこで、本反応において Ruppert-Prakash 試薬の代わりに HCF₃ を用いることができるか検討した。その結果、2 atm の HCF₃ 雰囲気下、1-iodo-4-nitrobenzene のトリフルオロメチル化は、1,10-phenanthroline を配位子とした Cu 錯体を用いると、量論量の Cu 錯体を必要としたものの進行し、対応する生成物が 49%の収率で得られることを見出した。

HCF₃を用いた Cu 錯体によるヨウ化アリーのトリフルオロメチル化反応

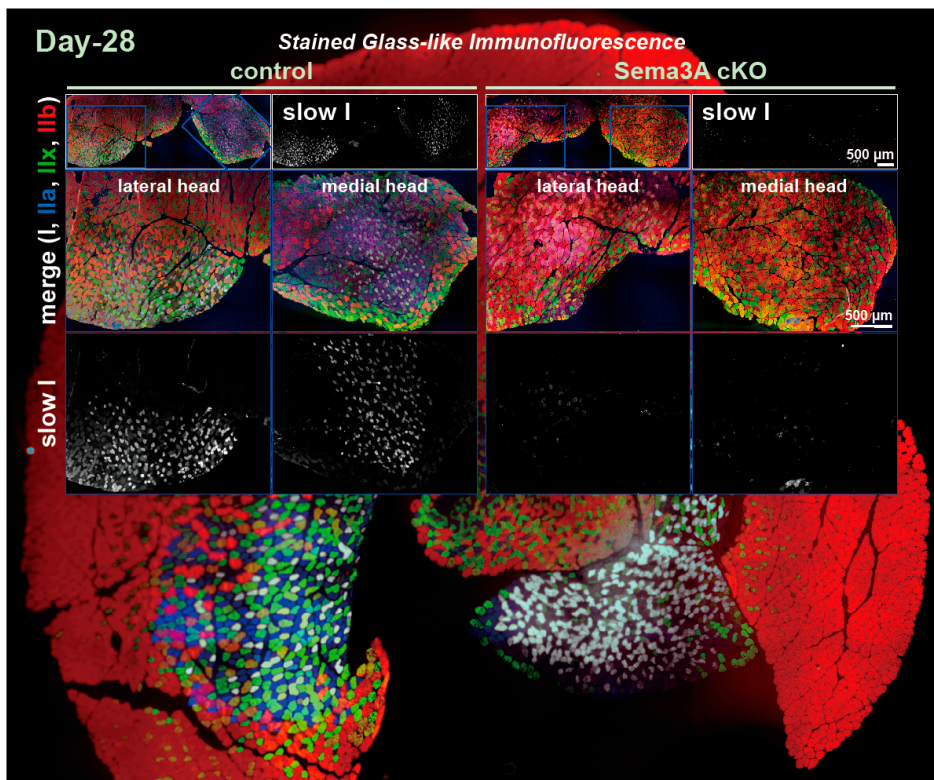


【目的】 骨格筋の主体である筋線維（筋細胞）は、収縮特性やエネルギー代謝特性の違いから、抗疲労性筋線維（遅筋型筋線維）と易疲労性筋線維（速筋型筋線維）の2つの型に分類される。動物の出生後の筋成長および筋損傷後の再生過程で形成される筋線維の型を決定する機構は不明である。代表者はこれまでに、筋幹細胞（衛星細胞）が合成・分泌する多機能性制御因子 *semaphorin 3A* (*Sema3A*) によって抗疲労性筋線維の形成が誘導されることを細胞培養系を用いて示唆した。この新奇制御系を *in vivo* で直接検証することを本研究の目的とした。

【方法】 衛星細胞特異的に *Sema3A* 発現をコンディショナルノックアウトしたマウス (*Sema3A*-cKO: タモキシフェン投与によって活性化した *Pax7CreER^{T2}-Sema3A^{fllox}*) の後肢下腿部筋の表現型を解析した。

【結果】 筋の再生および初期成長のいずれの場合でも、*Sema3A* 発現を cKO すると抗疲労性筋線維は有意に減少し、易疲労性筋線維 (IIb 型) の代替的增加が認められた (抗 *myosin* 重鎖アイソフォーム抗体による4重蛍光免疫染色; 図のカラー画像参照)。この結果は、*myoglobin*, *porin*, 遅筋型・速筋型 *myosin* 重鎖などの筋線維型関連因子の mRNA 発現変化および後肢下腿部の筋持久力の低下とも符合した。従って、衛星細胞分泌因子 *Sema3A* によって作動するシグナル伝達軸は、神経支配や転写制御因子 *PPAR δ -PGC1 α* 系が確立する前に筋線維型を初期決定 (コミット) する強力な分子機構であることが明確になった。また、*Sema3A* の細胞膜受容体と同定した *neuropilin2-plexinA3* のアゴニスト活性を食品成分に見出したので、抗疲労性筋線維の形成を栄養機能学的に促進できると期待された。

筋幹細胞特異的 *Sema3A*-cKO による抗疲労性筋線維の激減
(再生筋の *myosin* 重鎖アイソフォーム4重蛍光免疫染色)

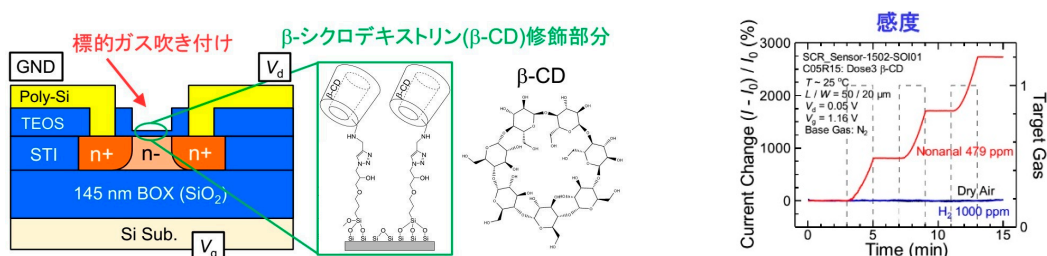


【目的】 データの高速処理技術が発達した現代において、その分析対象である一次情報をより大量に、詳細に、リアルタイムに収集するセンシング技術の需要が急増している。実際、人間の視覚・聴覚・触覚にあたる光・振動・温度といった物理量センサの高性能化は著しく、既にスマートフォン等のモバイル機器に実装されつつある。一方で、嗅覚・味覚に相当する化学量センサの技術は大きく遅れており、感度・応答速度・サイズ・消費電力のいずれの面でも未だに課題を残している。これは、物質には種類があるために、標的物質の識別あるいは選択という、無機材料を用いた従来のセンサでは困難な技術が必要となるためである。この現状を踏まえ、本研究では、有機化学の知見を駆使することで特定の物質を、高速・高感度・高選択的に、超小型かつ低消費電力なデバイスによってセンシングする技術開発を目指す。

【方法】 ガス中の有機化合物 (VOC) は各種作業環境における重要な指標であるだけでなく、人体の疾病状態をあらわすマーカーとしてきわめて有用であることが知られている。実際に、呼気や汗などに含まれる様々なマーカー分子を GC-MS 等で分析することにより、高い信頼性で病理診断可能な技術が開発されている。しかし、これらの分析手法は時間・サイズ・コスト等の面から実用面での応用範囲は極めて限定的である。一方、電界効果トランジスタ (FET) のような超小型電子素子によってセンシングできれば、誰でもどこでも早期に非侵襲型の疾病診断が可能となり、病理診断の現場に大きなブレイクスルーをもたらすことができる。そこで本研究では、包接能を有するシクロデキストリン等の超分子化合物と、配位能を有するポルフィリン等の遷移金属錯体を組み合わせ、高次の分子認識を発現する超分子・錯体センサを nm スケールの FET 構造を有する極細電荷チャネル界面 (シリコン・導電性共役分子等) に導入し、ガス、代謝物、環境ホルモン等の多種多様な標的物質を極小エネルギーで高感度・高選択的に検出可能な多機能センサの構築を目指す。創製した疫病診断センサは、スマートフォンや車に搭載することにより、呼気や発汗などの生体出力を非侵襲で収集することで重大疾患の予防やテーラーメイド医療の実現を可能とし、環境や人体への負荷が高い VOC を常時モニタリングし安全・安心社会を実現する技術になると期待される。

【結果】 β -CD を基板表面に導入した FET に対してガスを吹き付けながら電極間に流れる電流モニタリングすることでガスセンシング能を調べた。ゲート電位を一定に保ち、各種ガスを流通させ、その電流値変化を観測した結果を図 2 に示す。VOC としては、炭素数 9 のアルデヒドであるノナナルを採用した。肺がん罹患した患者の呼気からはいくつかの特徴的な有機化合物が微量検出されることが知られているが、ノナナルはその代表例であり、センシング対象としての社会的意義が大きい。乾燥空気、あるいは水素 (1000 ppm in N_2) を流通させたところ、ほとんど電流値変化が観測されなかったのに対し、ノナナル (479 ppm in N_2) については大きな変化が見られた。本実験ではノナナルを含むガスと N_2 ガスを交互に吹き付けながら電流値変化をモニタリングしているが、ノナナルを流通させた時のみ電流値変化が観測されており、リアルタイムでノナナルに感応していると分かる。ノナナルを 6 min 程度流通させることで、最終的に電流値は元の値の約 30 倍に達した。CD の修飾を行っていないデバイスでコントロール実験を試みたところ、CD を修飾したものと異なり、何れも変化量は元の電流値の 1.4 倍程度であり、FET のチャネル界面の CD 修飾によって、作製した有機-無機ハイブリッドセンサが特異的にノナナルに対するセンシング能を獲得した。

分子認識能を有する超分子化合物により有機修飾した FET 型センサ



【目的】 本研究の最終目的は、障害を有するアスリートにおける脳の機能再編成とトレーニングとの関係を探求することで、効率的に中枢神経の機能再編を導き、身体の機能回復を企図するニューロリハビリテーションの基盤理論構築につなげることにある。今回の研究では特に、義足のアスリートを対象として、トレーニングに伴う脳の機能再編を探求することを目的とした。

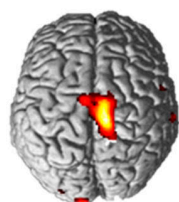
【方法】 義足アスリートの運動野機能地図が特異的に再編されるのかどうかを明らかにするために、脳機能画像検査法 (fMRI) を用いた実験を実施した。実験参加者は、3 テスラの MRI のガントリー内で仰向けになり、左右下肢関節をそれぞれ一定のペースで周期的に動かす、あるいは該当する筋を収縮させる課題を実施した。すなわち、1) 足関節底・背屈運動、2) 膝関節筋収縮、3) 大臀筋収縮、を左右それぞれで計 6 種類の課題を行った。それぞれの課題遂行中に活性化される脳領域を同定した。参加者は、義足競技者 4 名、義足非競技者 4 名および健常競技者 12 名であった。

【結果】 本研究の結果、次のことが明らかとなった。すなわち、1) 膝下切断による義足競技者において、義足側膝関節周囲筋を収縮させる時のみ両側運動野が活性化、2) 下腿義足非競技者、健常競技者には観察されない、3) 大腿切断による義足競技者では義足側股関節周囲筋収縮時に両側性運動野活性が観察された。

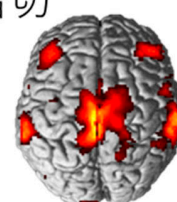
膝関節周囲筋収縮時の運動野活動領域 — 義足競技者と対照群の比較—

左膝関節

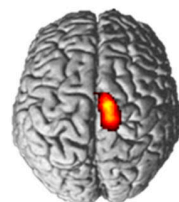
右膝関節



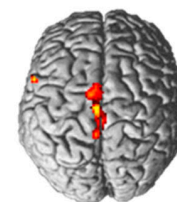
MR



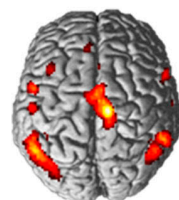
義足 & 踏切



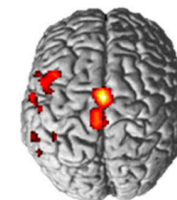
義足
非競技者



義足



健常者
走幅跳選手



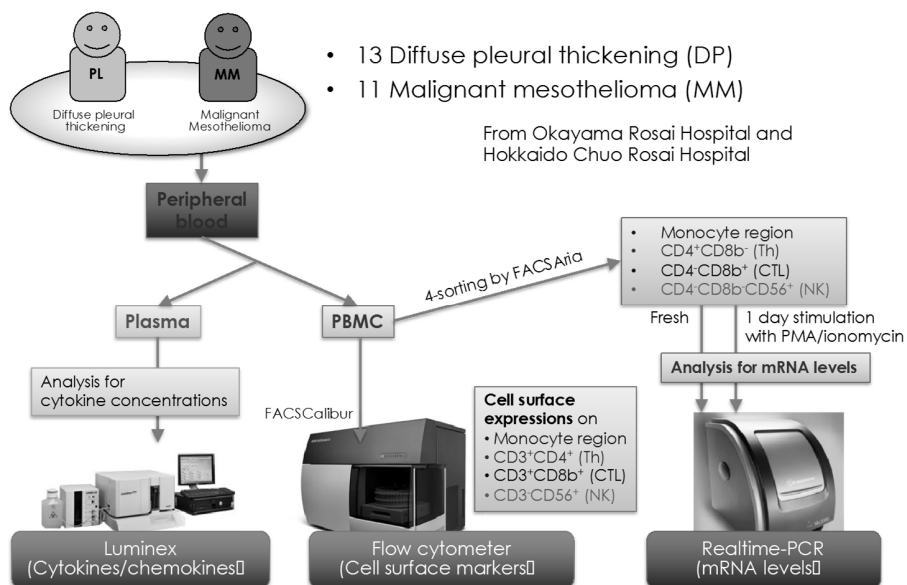
踏切

【目的】 悪性中皮腫 (MM) は石綿曝露により引き起こされ、発症機序の解明が求められている。我々は、石綿曝露による免疫機能影響の解析に取り組み、T・NK細胞の特徴的機能低下を明らかにしてきた。最近、胸膜プラーク陽性非担癌者とMMの包括的免疫機能解析を行い、MMにおいて制御性T細胞 (Treg) 機能指標と炎症性サイトカイン血中濃度の上昇を明らかにした。そこで、石綿関連良性疾患であるびまん性胸膜肥厚 (DP) 患者とMM患者について同様の解析を行い比較した。

【方法】 PBMC中の単球(Mo)・CD4⁺T(Th)・CD8⁺T(CTL)・CD56⁺NK(NK)細胞の細胞表面タンパク質発現量をFACSで解析した。PBMCを前述4群にソートし、一部をそのまま、残りをPMA/IM刺激下で、Moは刺激せず、1日培養後、凍結保存した。MilliplexとリアルタイムRT-PCRで血漿中サイトカイン・ケモカイン濃度および凍結細胞中の各種遺伝子mRNAレベルを測定した。

【結果】 DPに比べ、MMではTh上のGITR, CD69発現量が高く、CTL上のCXCR3, CD69発現量は高値であった。Th中のRORC、NK中のc-Rel mRNAレベルはMMで高値であった。他方、DPはTh中の高いGATA-3、CTL中の高いPRF1 (perforin) mRNAレベルを示した。CTLのmRNAについてはgranzyme B量と正相関性を示すperforin量がMMで有意に低値であった。GATA-3 mRNA量は細胞表面CTAL-4、GITR量と負相関性を、RORC mRNAは細胞表面GITRと正相関性を示した。以上の結果は、MMとDPは免疫機能状態が大きく異なり、ThおよびCTL機能の差異が顕著であることを示す。ThにおけるGATA3とRORCの両転写因子の発現量変動が関わるTreg機能亢進およびCTLにおけるperforin産生能減弱に起因する細胞傷害性低下とMM発症機序との関連が示唆される。

研究全体総覧図



14 血清ビタミンDへの日光曝露・食事の寄与割合の検討

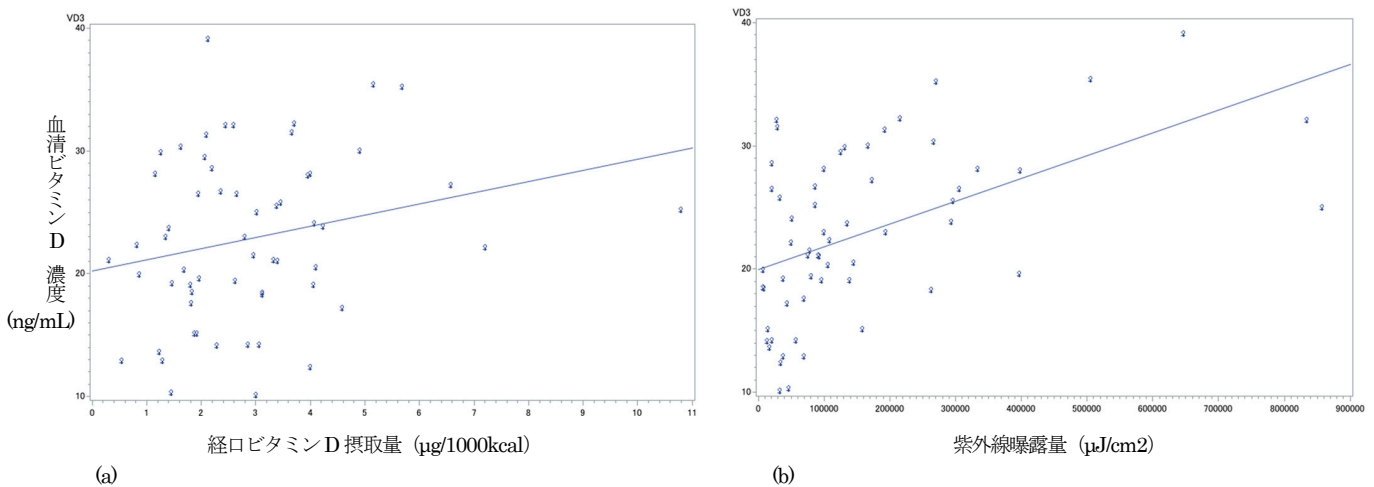
西脇 祐司

【目的】 ビタミンDは健康維持に不可欠な栄養素であり、適切な健康状態を保つためには一定の血清中ビタミンD濃度を維持する必要があるとされている。ビタミンDの摂取源は魚介類を主とする食品と紫外線曝露による皮膚での合成であるが、どちらがどの程度血清ビタミンD濃度の維持に寄与しているのかは明らかではない。そこで本研究では日光曝露量と経口ビタミンD摂取量のそれぞれが血清ビタミンD濃度とどのように関連するかを定量的に検討した。

【方法】 北海道積丹町在住・在勤の20～60代の健康な成人男女59人を研究対象者とした。2017年8月末～9月中旬に紫外線曝露量、経口ビタミンD摂取量、血清ビタミンD濃度を定量的に測定し、それぞれの値の関連を検討した。紫外線曝露量はUV dosimeter badgeで測定した。経口ビタミンD摂取量は自記式食事歴法質問票を用いて習慣的摂取量を推定した。血清ビタミンD濃度はLSIメディエンス社に検査を依頼し、LC-MS/MS法で測定した。

【結果】 経口ビタミンD摂取量・紫外線実曝露量と血清ビタミンD濃度との関連を散布図に示した。図中(a)のx軸は経口ビタミンD摂取量、y軸は血清ビタミンD濃度、(b)のx軸は紫外線実曝露量、y軸は血清ビタミンD濃度である。Spearmanの相関係数を算出すると、男性では経口ビタミンD摂取量、紫外線実曝露量の両方が血清ビタミンD濃度と有意に相関していた。女性では紫外線実曝露量が血清ビタミンD濃度と有意に相関しており、経口ビタミンD摂取量は有意には相関していなかった。今後、紫外線実曝露量の算出にあたり、天気や曝露部位、日焼け止めの有無なども考慮し、適切な血清ビタミンD濃度の維持に必要な紫外線曝露時間、露出体表面積などを検討予定である。

経口ビタミンD摂取量・紫外線曝露量と血清ビタミンD濃度の関連（散布図、男女統合データ）



(a)

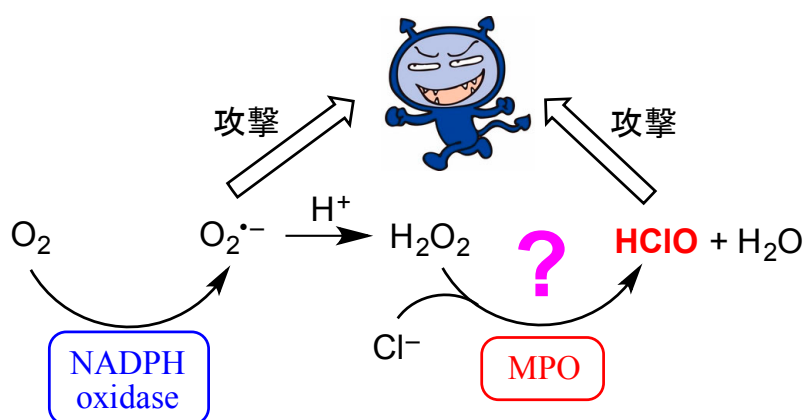
(b)

【目的】 ミエロペルオキシダーゼ (MPO) が作り出す次亜塩素酸は、好中球が細菌を攻撃するための重要な武器になっている。我々の体が病原菌と戦う過程を分子レベルで理解するための最も基礎となる反応であるが、今日においても未解明の点が多い課題である。我々は MPO のモデル化学物を用いて、MPO による次亜塩素酸合成機構の解明と生体防御機構の分子レベルでの理解をめざした。

【方法】 MPO のモデル化合物は、既報の手法で合成した。モデル化合物の吸収スペクトル、NMR、EPR の結果は、これまでの報告と一致した。オゾンガスは、高純度酸素ガスに紫外線を照射して合成した。本研究で用いた試薬、溶媒は、市販されているものをそのまま使用した。合成後はさらなる精製は行わず、すぐに使用した。低温下での分光測定は、液体窒素を用いた温度制御可能なクライオスタットを用いて行った。

【結果】 MPO の活性反応中間体として知られる compound I のモデル化合物を合成し、塩素イオンとの反応を試みた。その結果、ある酸化還元電位を境にして反応が大きく変わることを見いだした。この電位から compound I は塩素イオンと 2 電子過程で反応し塩素ガスを生成できることが解明された。さらに、次亜塩素酸付加錯体の反応性についても研究を行った。その結果、次亜塩素酸付加錯体の反応性は、ヘム周りの環境に非常に敏感であることが示された。MPO の環境は、次亜塩素酸を活性化するのではなく、むしろ安定化する環境であるという興味深い結果が得られた。この成果は、MPO では次亜塩素酸を合成したあと、その次亜塩素酸をさらに活性化して細菌と反応させているのではなく、細菌と直接反応するまで次亜塩素酸が分解しないように逆に安定化していることを示唆した。

好中球による抗菌作用の機構

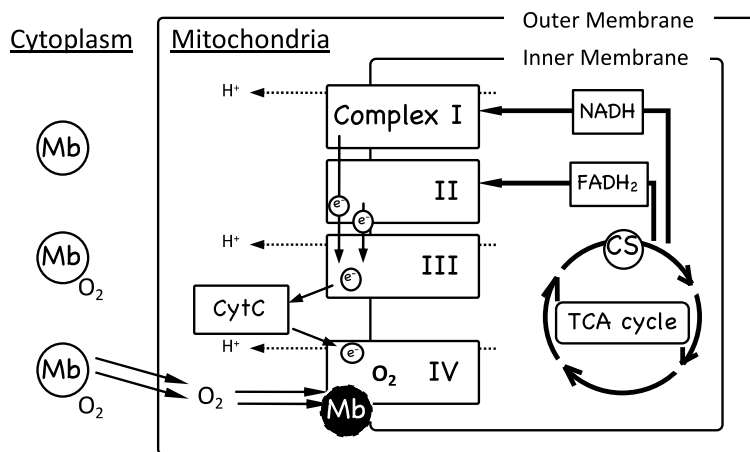


【目的】 運動を通じた健康の維持・増進のためにはエネルギー代謝の要である筋細胞内のミトコンドリアの呼吸活性を高く保つことが重要である。ミトコンドリアは運動トレーニングの継続によって増加し、筋持久力の向上に寄与することはよく知られている。こうしたコンセンサスの一方、近年、我々は筋細胞内にて酸素貯蔵機能を担っていると従来から考えられてきたミオグロビン (Mb) がミトコンドリア内部にも局在し、ミトコンドリアの呼吸機能を上方調節していることを見出した。これらの新たな知見は、Mb がミトコンドリアの基質酸化力の亢進に寄与する可能性を強く示唆するものであるが、ミトコンドリアと Mb との機能的相互作用についてはこれまでに検証がなされていない。本研究では、Mb がミトコンドリアの中に内在するとすればどこに存在しているのかという点や、ミトコンドリアと Mb の発現量を増加させる因子の探索や、運動トレーニングによる影響を明らかにするために個体から細胞までの生理学的・細胞生物学的解析によって検証することを目的とした。

【方法】 Wistar 雄性ラットの腓腹筋から単離したミトコンドリアに対して、タンパク質分解処理や低張液処理などによってミトコンドリア膜構造を段階的に破壊しながら Mb の有無を Western Blotting によって検証した。

【結果】 分析の結果、Mb が膜間腔や内膜に存在している可能性が示された。過去の我々の検討結果を踏まえると、呼吸鎖複合体 4 に相互作用している可能性がある。また、運動トレーニングを実施した骨格筋では、ミトコンドリアに相互作用している Mb が増える傾向にあることも明らかになった。さらにミトコンドリア生合成が促進する因子の中で、カルシウムシグナル系が Mb 発現を上昇させることやアミノ酸混合液などによっても発現が促進されることが明らかとなった。こうした検討結果から、骨格筋や心筋のミトコンドリアには Mb の一部が内在し、呼吸鎖タンパク質と相互作用することによってミトコンドリアの呼吸機能を亢進させている可能性があることが示唆された。

ミトコンドリアの呼吸機能に対するミオグロビンの作用機序

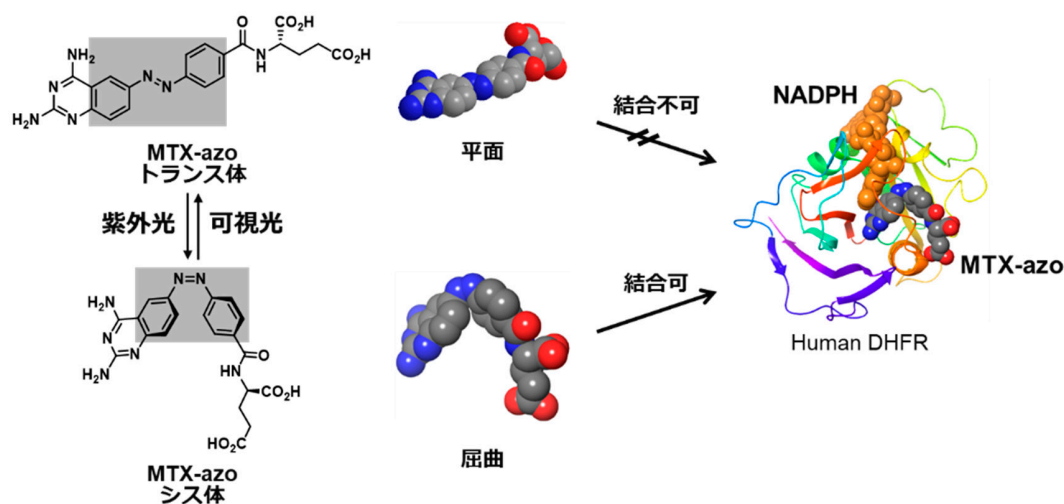


【目的】 生体機能を光により時空間的に制御する技術は、動的な生体分子機能解析に有用なツールとなる。また、化合物の薬理活性を光により制御できれば、光を照射した部分にのみ薬理効果を発現させることも可能である。フォトクロミック分子を用いることで、ある波長の光により薬剤を活性化する一方で、別の波長の光により薬剤を不活性化することなども可能であり、このような手法が実現されれば、副作用を最小限にするような機能性薬剤の開発につながる事が期待できる。そこで、本研究では抗がん剤およびリウマチ治療薬として知られているメトトレキサート (MTX) のフォトクロミック類縁体を開発し、メトトレキサートの細胞内標的酵素である葉酸代謝関連酵素 [ジヒドロ葉酸還元酵素: dihydrofolate reductase (DHFR)] の活性を可逆的に光制御する手法の開発に取り組んだ。

【方法】 MTX の構造の中央部分に可逆的に異性化するフォトクロミック化合物構造を導入した新規光応答性 MTX 類縁体 (MTX-azo) を設計した。MTX-azo は紫外光照射によりジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) への結合能及び阻害活性を持つ一方、可視 (黄色) 光の照射により DHFR から解離すると予想した。MTX-azo は 5 段階で合成し、NMR および質量分析によって構造を同定した。また、MTX-azo の光異性化特性、および各異性体の DHFR 活性の阻害能について評価を行った。

【結果】 紫外光の照射によって MTX-azo は熱平衡状態のトランス体からシス体に、黄色光の照射によりシス体からトランス体に異性化することが確認された。また、紫外光を照射していない MTX-azo を酵素反応溶液に添加した場合、酵素反応の進行が確認できたが、紫外光を照射した MTX-azo を添加した際には酵素反応の進行が抑制された。以上から、DHFR 活性を異なる波長の光照射によって可逆的に制御する新規化合物の開発に成功した。

光応答性 MTX 類縁体 (MTX-azo) の構造と光異性化によって DHFR への結合能が変化する概念図



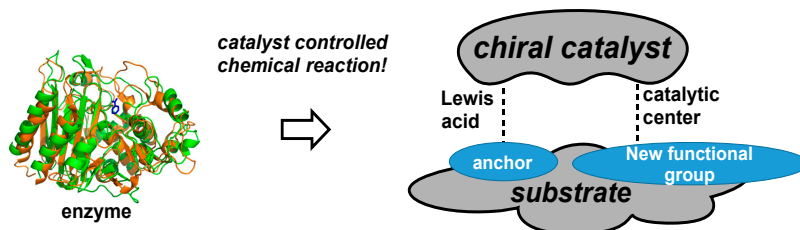
<p>18 基質支配の位置選択的反応開発</p>	<p>山本 尚</p>
--------------------------	-------------

【目的】 有機合成は歴史的には古く反応剤支配の化学反応から始まった。基質支配の化学反応は必ずしも十分には開発されていなかった。本研究では基質の官能基を起点として、様々な位置に立体選択的な革新的反応を開発する。これら触媒の一般化に成功すれば、これによって得られる新触媒は、古典的有機合成化学を一変させる。即ち、化合物構築に於いて、並列に炭素-炭素骨格を結びつける合成ではなく、骨格の所望の位置に自在に官能基を選択的に導入する新たな手法を提供し、これによって飛躍的な合成工程の短縮化を実現する。言い換えれば、提案する触媒設計の概念は、従来の単機能型触媒反応ではなく、その分子の所望の位置での自在の官能基化を可能にし、結果的には、酵素を模倣・再現する人工触媒を創生する。

【方法】 「基質支配の化学反応」とは、アンカーに水酸基、エーテル基、アミノ基、カルボニル基等を用い、遠隔位のカルボニル基、二重結合や C-H 基を自在に官能基化する化学反応である。具体的には、基質支配の化学反応でアンカー基から離れた位置の、連続不斉中心を思い通りの立体化学で自在に発生させる。特に、ラジカル反応、アミド化反応、エステル化反応、C-C 結合生成反応や C-H 活性化反応を実現できた。本研究で、古典的反応では位置の制御ができない反応を、位置と立体化学の双方を満足する触媒的不斉合成反応を実現させ、有機合成に「基質支配の化学反応」という新研究分野を開いた。

【結果】 従来の反応では達成できなかった幾つかの遠隔不斉酸化反応に成功した。

基質支配の反応の概念図

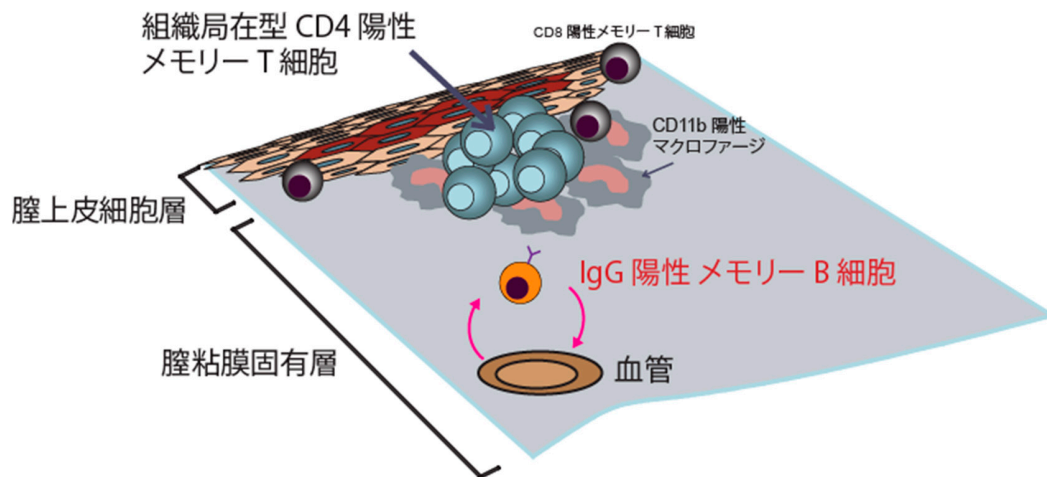


【目的】 粘膜組織より分泌される抗体は、様々な病原体から生体を防御するために重要な役割を果たす。腸管粘膜組織では、形質細胞が抗体分泌を促すが、腔粘膜組織を含む他の粘膜組織では、B細胞及び形質細胞の重要性は以前不明である。そこで、単純ヘルペスウイルス2型 (herpes simplex virus type 2 : HSV-2) 腔感染モデルを用いて、腔粘膜組織におけるB細胞の役割を解析することを目的とした。

【方法】 HSV-2 弱毒株をマウスの腔粘膜組織に免疫5週間後、感染部位にCD4陽性T細胞がクラスターを形成することが明らかとなっている。これらのマウスに、HSV-2 野生株を再感染させると、ウイルスの感染部位から神経組織への移行を完全に阻害することを以前に報告している。一方で、HSV-2 弱毒株をマウス腔粘膜組織に免疫後、血液中にCD4陽性メモリーT細胞のみならず、HSV-2 特異的抗体やメモリーB細胞が形成される。しかしながら、腔粘膜組織における役割に関しては不明である。フローサイトメトリー解析や免疫組織染色法により抗体やメモリーB細胞の局在を明らかにした。

【結果】 HSV-2 弱毒株をマウスの腔粘膜組織に免疫5週間後、腔粘膜組織におけるメモリーB細胞は、血中から絶えず循環する細胞群であること、メモリーB細胞はCD4陽性T細胞クラスターに局在していないことが明らかとなった。また、HSV-2 再感染後早期にIgG陽性メモリーB細胞が集積することが確認された。

HSV-2 感染後の腔粘膜組織におけるIgG陽性メモリーB細胞の局在

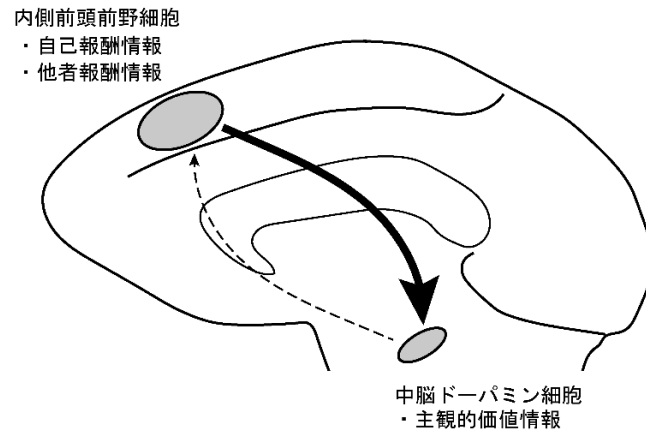


【目的】 報酬は行動調節の重要因子であり、動機づけ、学習、意思決定など、様々な高次脳機能発現の基盤となる。実社会における行動の適応的制御においては、自己が得る報酬に加えて他者が得る報酬についての情報も重要である。しかし、他者の報酬情報の脳内処理機構に関する研究は進んでいない。本研究では、他者の報酬情報処理が脳内のどの領域（間）でどのようになされているのかを、マカクザルを用いたシステム生理学的研究により明らかにする。

【方法】 対面する2頭のマカクザルに対して社会的古典的条件づけをおこない、その際の神経活動を内側前頭前野及びドーパミン作動性中脳核から同時計測した。各脳領域の単一神経細胞活動を解析するとともに、同時計測された局所フィールド電位に対して Granger 因果性解析を適用し、領域間の情報流を解析した。

【結果】 内側前頭前野細胞は自己報酬情報又は他者報酬情報を選択的に表現するのに対して、中脳ドーパミン細胞は自己報酬の主観的価値を表現することを明らかにした。また、Granger 因果はドーパミン作動性中脳核から内側前頭前野に向かう方向よりも、内側前頭前野からドーパミン作動性中脳核に向かう方向に対して有意に高頻度に認められた。

研究成果の概念図

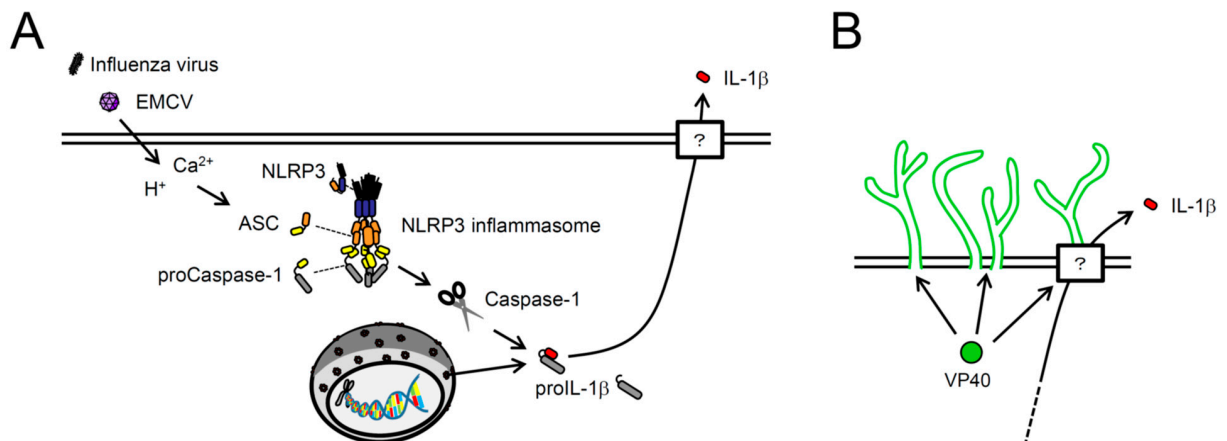


【目的】 インフルエンザウイルスや脳心筋炎ウイルスのviroporin（ウイルスがコードするイオンチャネルタンパク質）は、細胞質中の自然免疫受容体であるNLRP3を活性化する（図A）。これにより活性化したcaspase-1が未成熟型のproIL-1 β を切断し、成熟化したIL-1 β はいまだに不明な点が多いunconventional protein secretion pathway（非典型的タンパク質分泌経路）により細胞外へ放出される（Cell, 2008）（図A）。マウスを用いた研究からエボラウイルス感染による過剰なIL-1 β の産生が、ウイルスの病原性に関与しているという報告がある（J Infect Dis, 2015）。しかしエボラウイルスによるIL-1 β 分泌の制御機構は未知である。そこで本研究では、エボラウイルスタンパク質によるIL-1 β の産生制御機構を明らかにすることを目的とした。

【方法】 HEK293FT細胞を用いたNLRP3 inflammasomeの再構築系に、EGFPまたはエボラウイルスの各ウイルスタンパク質を発現するプラスミドを導入し、24時間後の培養上清中のIL-1 β の量をELISAで測定した。またVP40が作るvirus-like particles (VLPs)をショ糖密度勾配超遠心法により回収した。さらにHeLa細胞にEGFP融合VP40発現プラスミドを導入し、細胞を共焦点顕微鏡で観察した。

【結果】 エボラウイルスのVP40タンパク質は、NLRP3 inflammasome依存的なIL-1 β の分泌を促進させた。しかしVP40タンパク質が作るVLPs中にはIL-1 β を検出することができなかった。細胞にVP40タンパク質を発現させると細胞膜表面にひも状構造が観察できるが（図B）、このひも状構造を作らないC末端欠損VP40タンパク質は、NLRP3 inflammasome依存的なIL-1 β の分泌を促進しなかった。現在、VP40タンパク質によるIL-1 β 分泌促進機構について解析を続けている。

ウイルス感染によるNLRP3 inflammasomeの活性化

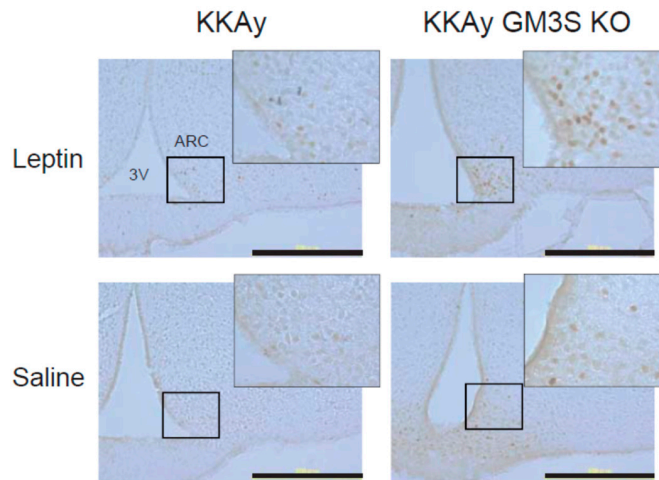


【目的】 過食・高脂肪食摂取などのストレスは、視床下部の炎症を介して肥満およびレプチン抵抗性を引き起こすが、その詳細な分子機序には不明な点が多い。糖脂質ガングリオシドは、肥満による脂肪組織の炎症や2型糖尿病・高脂血症患者の血液中で増加し、インスリン受容体シグナルに深く関与している。本研究では、過食・肥満モデルにおけるガングリオシド欠損 (GM3S KO) マウスの解析により摂食・代謝に関わる受容体の機能および視床下部炎症におけるガングリオシドの役割について検討を行った。

【方法】 GM3S KO マウス (C57BL/6) を過食・肥満モデルである KKAY マウスと8世代戻し交配を行い、KKAY GM3S KO マウスを得た。レプチン応答性については、レプチンの腹腔内投与後の視床下部弓状核における神経細胞活性化を免疫組織化学的染色にて評価した。また、視床下部由来神経細胞株 N41 における GM3S KO 細胞を作成し、レプチン受容体シグナルについて野生型細胞との比較を行った。

【結果】 KKAY GM3S KO マウスは、体重、摂餌量ともに KKAY マウスよりも大きく減少していた。KKAY マウスは比較的早期にレプチン抵抗性を生じるが、KO マウスではレプチン応答性が有意に保たれており、体重・摂餌量の減少を裏付ける結果であった。N41 GM3S KO 細胞では、野生型細胞に比べてレプチン添加後の STAT3 リン酸化はやや減弱が見られたのに対し ERK のリン酸化が亢進していた。N41 細胞を低濃度の炎症性サイトカインで処理した際にガングリオシドの発現増加がみられることから、視床下部炎症と摂食制御機能の異常発症との間にガングリオシドの発現変化とその関与が示唆される。

レプチン腹腔内投与後の視床下部弓状核における応答性



23 迷走神経による非アルコール性脂肪性肝疾患の進行制御

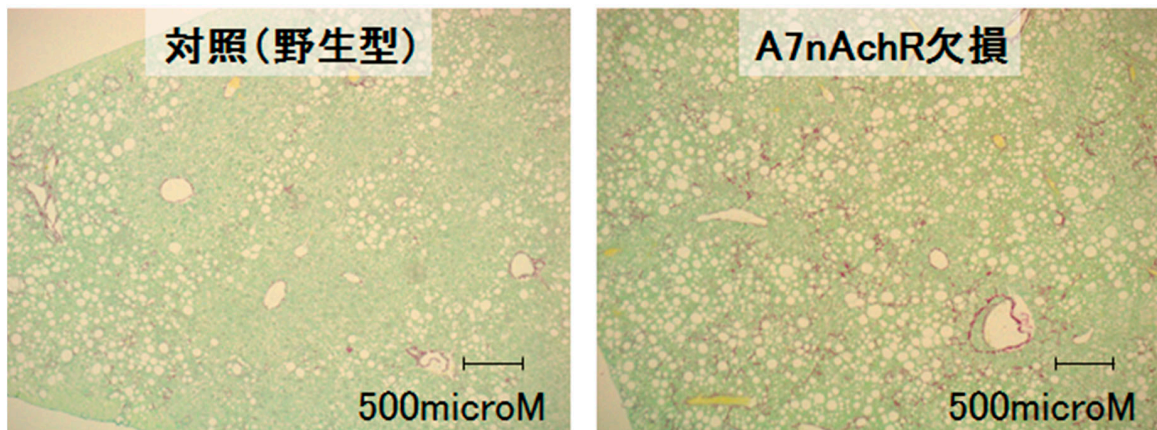
井上 啓

【目的】非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) の進行に、肝臓炎症が重要な役割を果たしており、炎症抑制因子が、NAFLD の予防・治療法の候補と考えられている。迷走神経 $\alpha 7$ 型ニコチン受容体 (A7nAchR) 作用が、炎症抑制作用を発揮することが知られている。本研究では、A7nAchR 欠損マウス (A7KO) を用いて、その NAFLD の発症・進行への作用を検討した。

【方法】A7KO に対し、非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) を誘導する高脂肪高コレステロール餌 (HFHC 餌) の投与を行い、NASH における A7nAchR 作用の役割を検討した。NASH への効果は、炎症または線維化関連の肝臓遺伝子発現解析、シリウスレッド染色による肝組織解析により行った。

【結果】A7KO は、HFHC 餌投与 32 週間後に、肝臓線維化関連遺伝子である Col1a1 と、肝臓炎症関連遺伝子である Ccl2 の有意な発現増加を呈した。肝組織像解析でも、A7KO は、明らかな線維化の増悪を呈した (下図)。これらの結果は、A7nAchR 欠損によって、HFHC 餌により誘導される NASH が増悪することを示しており、迷走神経 A7nAchR 作用が、NAFLD 発症・進行抑制に重要な役割を担う可能性が示唆された。

$\alpha 7$ 型ニコチン受容体 (A7nAchR) 欠損による非アルコール性脂肪肝炎の増悪

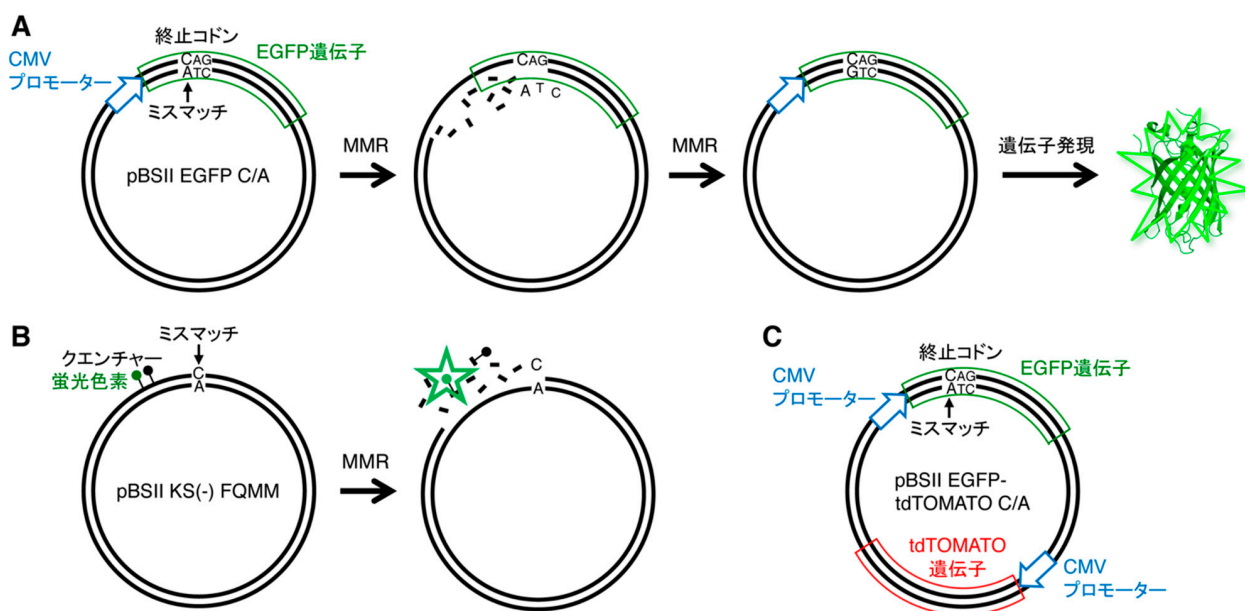


【目的】 DNA 複製時の誤ったヌクレオチドの取り込みにより生じるミスマッチは突然変異を引き起こし細胞の死やがん化の原因となるが、ミスマッチ修復 (MMR) により修復され遺伝情報が正しく維持される。本研究では、MMR の欠損により起こるリンチ症候群の診断のためのスクリーニングに応用することを最終的な目標とし、蛍光色素とクエンチャー (消光剤) を付けたミスマッチを含むプラスミドを蛍光プローブとして用いる細胞の MMR 能の蛍光検出法を開発することを当初の目的とした。しかし、期待どおりの実験結果が得られなかったため、既に成功している蛍光タンパク質遺伝子の発現系を用いた MMR の検出法を改良して、より確実な方法とすることを新たな目的とした。

【方法】 2 本鎖を形成させた時に 1 ヶ所にミスマッチが生じる配列を有し蛍光色素 (フルオレセイン) とクエンチャー (ダブシル) を塩基部に付けたオリゴヌクレオチドをプライマーとし、1 本鎖環状 DNA にハイブリダイズさせて DNA ポリメラーゼと DNA リガーゼにより図 B に示すプラスミドを作製した。Lipofectamine 2000 を使ってこれを HaLa 細胞ならびに MMR が欠損した LoVo 細胞に入れ、蛍光顕微鏡で観察した。遺伝子発現系を用いる蛍光検出においては、偽陰性の結果が出ることを防ぐために、図 A の EGFP (緑色蛍光タンパク質) 遺伝子発現プラスミドに tdTOMATO (赤色蛍光タンパク質) 遺伝子発現系を入れ (図 C)、HaLa 細胞ならびに LoVo 細胞での遺伝子発現を調べた。

【結果】 以前の報告と同様の方法で pBSII KS(-) FQMM (図 B) を調製し、超遠心により精製した。これを HeLa 細胞と LoVo 細胞に入れて蛍光顕微鏡で観察したが、HeLa 細胞において期待された MMR による蛍光が検出されず、実験を複数回繰り返したが結果は同じであった。期待どおりの結果が得られない原因として、蛍光色素とクエンチャーが MMR で働くエキソヌクレアーゼ I (Exo I) による分解を阻害したかもしれないので、プライマーとして用いたそれらが付いたオリゴヌクレオチドを Exo I で処理したが、分解による蛍光が検出されたためその可能性は否定された。それ以外にも可能性がいくつか考えられるがいずれも検証に時間を要するため、蛍光タンパク質遺伝子の発現系を用いた MMR の検出法 (図 A) を改良することにした。この方法で問題となるのはトランスフェクションの失敗のため MMR が正常な細胞において蛍光が検出されない場合があることで、tdTOMATO 遺伝子の発現によりトランスフェクションを確認することができるプラスミド (図 C) を作製し、HaLa 細胞と LoVo 細胞を使ってその有用性を示した。

ミスマッチ修復の蛍光検出法



25 クロマチンリモデリングの染色体安定性における機能

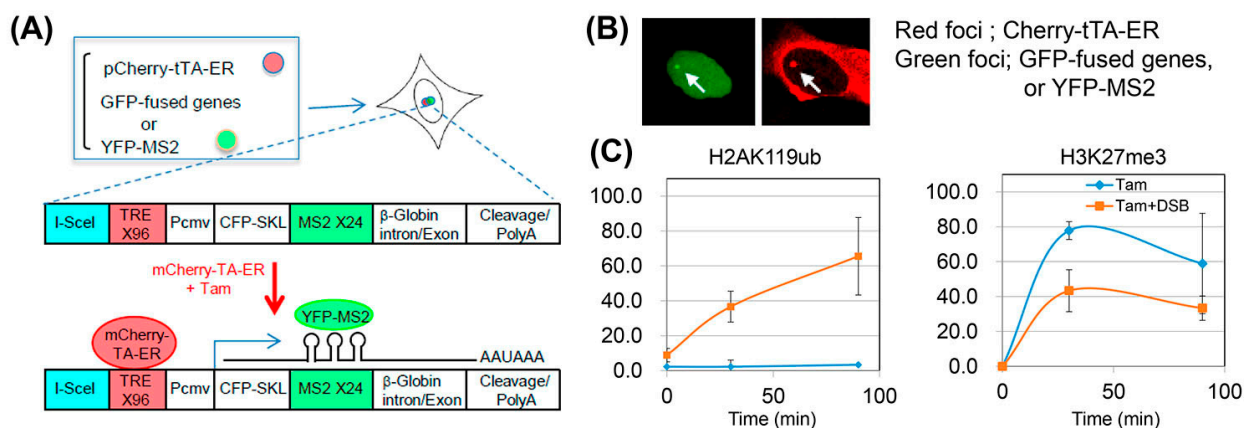
宇井 彩子

【目的】 クロマチンの構造変化に伴うクロマチンリモデリング・ヒストン修飾に関与する因子は、細胞がん化や細胞老化に関与していることが知られている。近年、我々は転写近傍で DNA 二重鎖切断が起きると、転写と DNA 修復が共役して働き、ゲノム安定性維持に寄与することを見出した。本研究では新たに、転写の伸長期に加えて開始期を観察するための実験系を構築し、転写の開始と伸長期において DSB の誘導した際の転写とヒストン修飾の変化を解析した。またがん細胞におけるクロマチンリモデリング因子の発現解析を行った。

【方法】 近年、我々は U2OS 細胞のゲノムに転写を活性化し、ライブあるいは免疫染色により観察できる実験系を構築した (図 A)。この実験系を用いて、GFP タグをつけた転写因子クロマチンリモデリング因子やヒストン修飾因子をトランスフェクションすることにより、これら因子の転写部位への結合がライブで観察できる (図 B)。また、ヒストン修飾を観察する際には、タモキシフェン処理より経時的に固定し、免疫染色を行った。転写活性化と同時に DSB を誘導する際には、上記 1 のプラスミドのトランスフェクションの際に I-SceI を発現するプラスミドを同時にトランスフェクションする。DSB の導入効率に関しては、DSB のマーカーである γ H2AX の免疫染色により確認する。

【結果】 今回の結果より、DSB の誘導により転写の伸長に関わる因子の一部が転写活性化部位から離脱することにより、伸長の時期が抑制されることが明らかになった。また、転写伸長期のマーカーである RNA polymerase II の S2 のリン酸化も減少した。このことにより、DSB が起きた際には、転写の開始よりも RNA polymerase II が RNA を合成している時期である転写伸長期の RNA polymerase II のリン酸化を制御することにより、RNA polymerase II のテンプレート DNA 上の移動が抑制されるのではないかと考えられた。また、この RNA polymerase II のリン酸化の変化に伴って、この際に特に H3K4 のジメチルとトリメチルが減少すること、それとは反対に H2AK119 のユビキチン化が誘導されることが明らかになった。このことにより、DSB の誘導により Trithorax 群に属する MLL の活性が弱まり、一方で Polycomb 群に属する PRC1 の活性が上昇することが明らかになった。このため、RNA polymerase II のテンプレート DNA 上の移動とクロマチン構造の変化が機能的に関連することにより、転写の伸長期が抑制される可能性が示唆された。今後はさらに、Trithorax 群と Polycomb 群の酵素と、これらのヒストン修飾に影響を与える因子のノックダウンした際の影響を観察することにより、どのようなクロマチンの構造変化が転写の伸長期を抑制しているのかを明らかにしたい。

転写・クロマチン構造変化と DSB 修復を同時に検出する実験系の構築

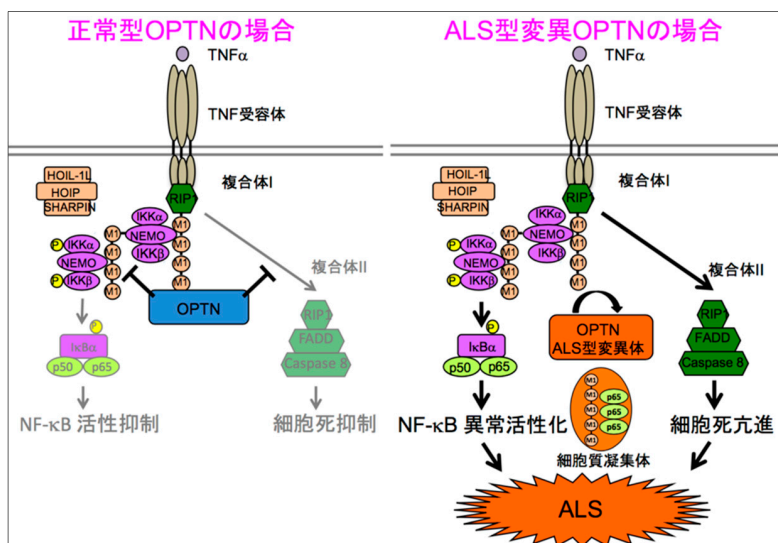


【目的】 ALS（筋萎縮性側索硬化症）は、運動ニューロンが選択的に侵される神経難病で、約 90%は発症原因が不明な孤発性である一方、約 10%は遺伝子変異が関連する家族性であり、これまでに約 20 の原因遺伝子が見出されている。その一つとして、*OPTN* 遺伝子が重要な病因因子であることが、2010 年に日本のグループから報告されている。以前、筆者らのグループでは、ユビキチンの N 末端を介した特殊な連結様式により形成される「直鎖状ユビキチン鎖」が、炎症や免疫に重要な NF-κB シグナルを制御し、慢性皮膚炎や B 細胞リンパ腫などを含む各種免疫疾患と非常に密接に関連する事を世界に先駆けて報告してきた。また、*OPTN* (optineurin) はユビキチン結合タンパク質としても知られることから、今回、*OPTN* 変異を伴う ALS 発症に対する直鎖状ユビキチン鎖の寄与について研究を進めた。

【方法】 まず、*OPTN* と ALS との関連性、特に *OPTN* が備える生理機能を解明する目的で、野生型及び 12 種の疾患関連 *OPTN* 変異体を作製し、LUBAC による NF-κB 活性化への影響を調べた。また、CRISPR/Cas9 法を用いて *OPTN* ノックアウト HeLa 細胞を作製し、NF-κB 活性化を解析すると共に、*OPTN* と直鎖状ユビキチンの結合を結晶構造解析により評価した。さらに、*OPTN* 変異を伴う ALS 患者由来の組織標本染色を行った。

【結果】 *OPTN* 変異体を用いた Luc assay において、野生型および全ての緑内障を引き起こす *OPTN* 変異体は強く NF-κB 活性化を抑制したが、ほとんどの ALS 関連 *OPTN* 変異体では NF-κB 活性阻害能を失ったことから、*OPTN* による NF-κB 活性阻害には UBAN ドメインが重要性であることが示された。また、共結晶構造解析により、2 分子の *OPTN*-UBAN の両側に直鎖状ユビキチンが結合していることが明らかになった。さらに、*OPTN* ノックアウト HeLa 細胞の解析においては、*OPTN* 欠損によって NF-κB 活性化が亢進し、TNF-α とシクロヘキシミドによって惹起されるアポトーシスも亢進した。重要なことに、*OPTN* の Q398X や E478G 変異による ALS 患者由来の組織標本染色から、これら患者の運動ニューロンでは直鎖状ユビキチンや活性化型 NF-κB 因子が細胞質に TDP-43 と共局在する凝集体に共局在していること、そのような細胞ではカスパーゼ 3 が活性化していることを見いだした。これらの結果から、*OPTN* は正常細胞では NF-κB と細胞死を抑制しているが、ALS を引き起こす変異体発現下では NF-κB 活性やアポトーシスが亢進し、最終的に ALS に至る可能性が示され、直鎖状ユビキチン鎖が ALS の新たな治療ターゲットになる可能性が示唆された。

OPTN による直鎖状ユビキチン鎖を介した細胞生死シグナル制御と ALS への関与

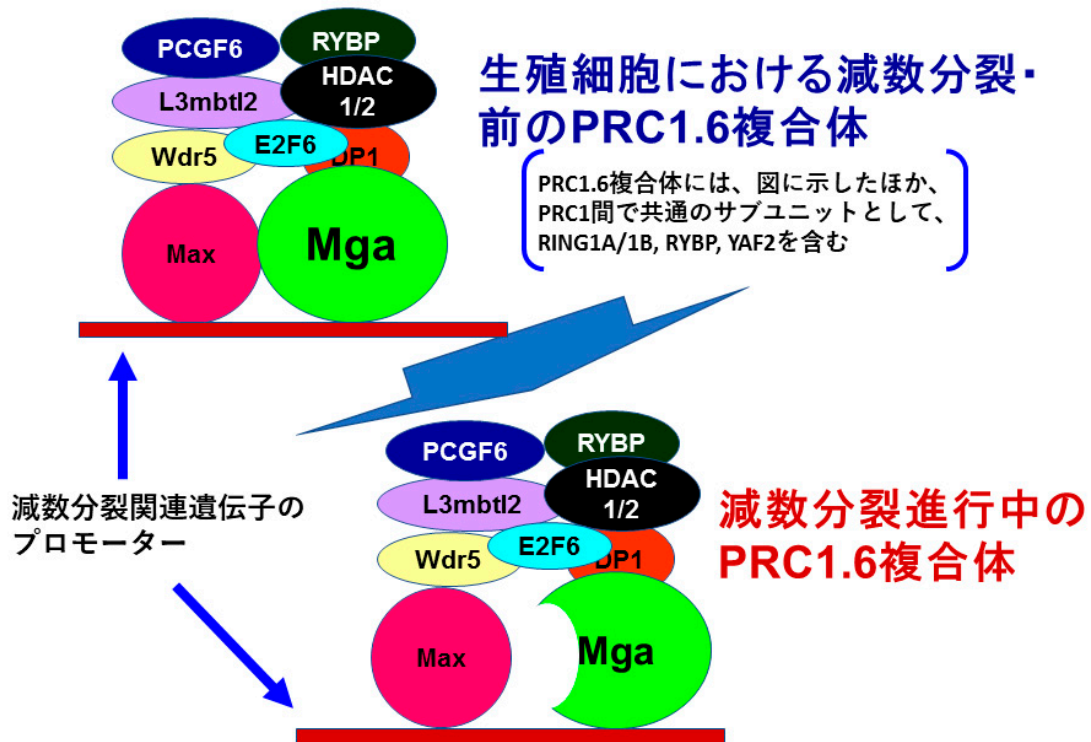


【目的】 私たちを含むいくつかの研究グループは、最近、PRC1 複合体の中の 1 つのサブタイプである PRC1.6 が生殖細胞における減数分裂関連遺伝子の発現を抑制しており、生殖細胞は、減数分裂を開始するに先立って、この複合体の機能を破綻させていることを示した。本研究では、一つには、そのメカニズムの解明を目指した。さらには、その解明する分子メカニズムが、様々ながん細胞におけるがん・精巣抗原遺伝子の発現の機構にも同じメカニズムが当てはまる可能性について検討した。

【方法】 生殖細胞の減数分裂誘導前と後で、PRC1.6 複合体を構成するサブユニットをコードする遺伝子の発現の差、バリエーションの存在等について調べた。また、マウス線維芽細胞とメラノーマ細胞の間で PRC1.6 複合体のサブユニットの量を比較した。

【結果】 PRC1.6 複合体では、MGA と MAX が相互作用し、複合体のコアを形成するが、cDNA の解析から、MAX とは相互作用できない MGA タンパク質をコードする Mga バリエーションが生殖細胞特異的に発現していることを見出した。マウス正常線維芽細胞とメラノーマ細胞では、後者において PRC1.6 複合体のタンパク質量が少ないことが確認された。

生殖細胞における Mga バリエーションの産生を介した PRC1.6 複合体の機能の抑制

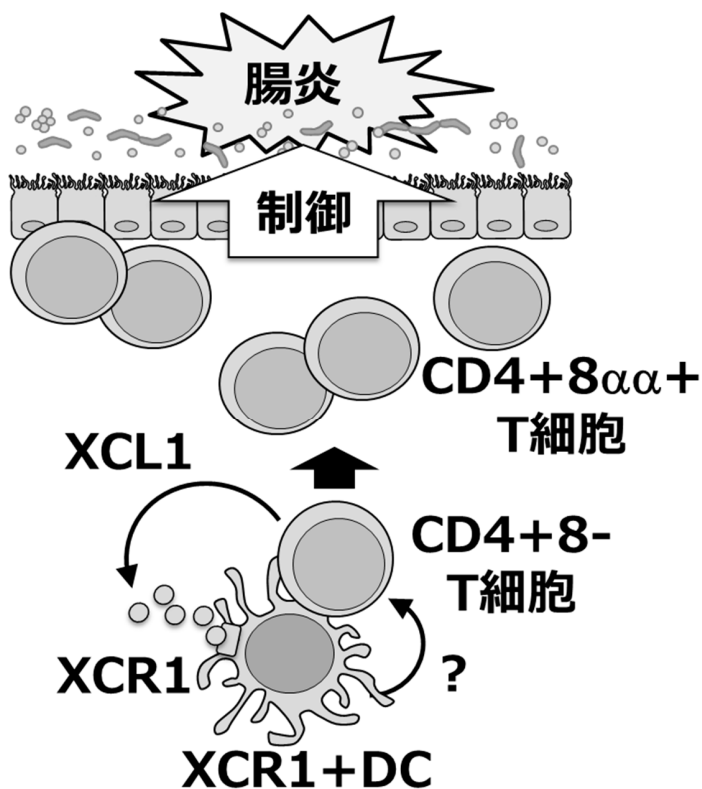


【目的】 ケモカイン受容体 XCR1 を発現する樹状細胞サブセット (XCR1⁺DC) の新しい機能的意義として、腸管 T 細胞とのクロストークを介して腸管免疫の恒常性を制御していることをこれまでに明らかにしてきた。本研究では、その制御機構のさらなる解明を進めた。

【方法】 XCR1⁺DC を恒常的に欠失するマウス (XCR1-DTA マウス) において、腸管特有の T 細胞サブセットおよびの前駆細胞に関して解析を行った。また、XCR1 以外に、XCR1⁺DC 優位に発現する機能分子群の欠損マウスの作製を進め、GTP 分解活性を有し、エンドソームやリソソームに局在する Rab7b に関して欠損マウスを解析した。

【結果】 XCR1-DTA マウスにおいて、腸管特有のサブセットが著明に減少していたが、その前駆細胞に関しては数も分化能も保たれていた。この結果から、XCR1⁺DC が恒常的に欠失しても、腸管 T 細胞の前駆細胞は存在し続けること、そして腸管局所における XCR1⁺DC の重要性が明らかになった。また、Rab7 欠損マウスにおいては、腸管 T 細胞は数としては正常に存在していた。今後、T 細胞や DC における膜タンパクの表現型や様々な免疫アジュバントあるいは病原体に対する腸管免疫応答を解析すると共に、他の候補機能分子の解析を進める。

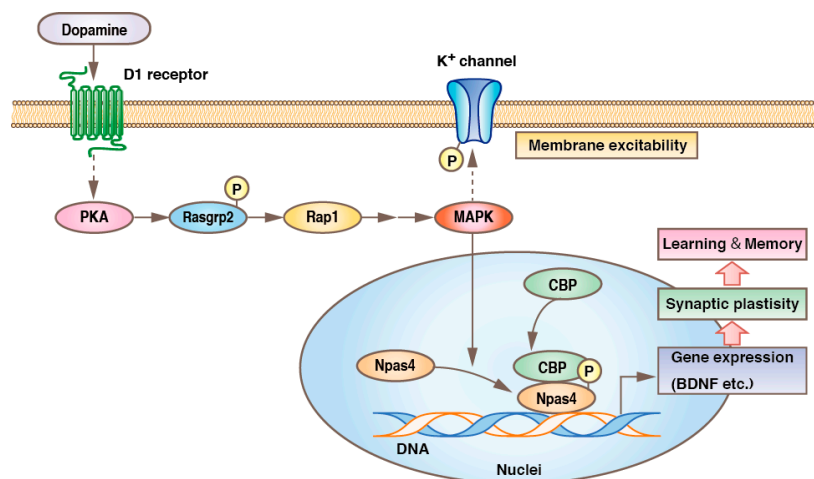
XCR1 を発現する樹状細胞による腸管免疫制御



【目的】 ニューロモジュレーターは、樹状突起や細胞体上の G 蛋白質共役型受容体を介して、種々のリン酸化酵素を活性化させることで、比較的ゆっくりとしたタイムコースで、神経細胞の興奮性やシナプスの可塑性、遺伝子発現を制御していると考えられている。ドーパミンは、最も注目されているニューロモジュレーターの1つであり、側坐核の中型有棘神経細胞に働き、D1 受容体を介して PKA や MAPK (ERK) などの蛋白質リン酸化酵素を活性化する。これらの蛋白質リン酸化酵素は下流の基質蛋白質をリン酸化することで、神経細胞の興奮性や遺伝子発現を制御し、報酬関連行動とその学習・記憶の形成に貢献すると考えられている。しかしながら、ドーパミンがどのように遺伝子発現を制御し、報酬学習・記憶に関与しているのかについては不明な点が多い。本研究では、ドーパミンシグナルの下流でリン酸化される転写関連因子を網羅的に同定し、そのリン酸化による遺伝子発現の制御機構と報酬学習・記憶の制御機構を明らかにすることを目的とする。

【方法および結果】 報酬学習・記憶に関与する転写共役因子である CREB binding protein (CBP) を固相化したアフィニティカラムを用い、側坐核の中型有棘神経細胞で働く転写因子の網羅的同定を行った結果、Neuronal PAS domain protein 4 (Npas4) などの転写因子が同定された。Npas4 は MAPK によってリン酸化され、MAPK による Npas4 のリン酸化により Npas4 と CBP との結合量が増加した。Phostag-SDS PAGE を用いた解析により、MAPK による Npas4 のリン酸化部位 (T423、T427、S577、S580、T611、S615) を同定した。Npas4 の 427 番目のスレオニン残基のリン酸化を特異的に認識する抗体を作製し、細胞内での Npas4 のリン酸化を解析した結果、培養線条体神経細胞において脱リン酸化酵素阻害剤や cAMP 活性化剤により Npas4 のリン酸化が亢進し、そのリン酸化は MAP2K (MEK) 阻害剤により抑制された。BDNF プロモーターなどを用いたレポーター解析を行った結果、MAPK による Npas4 のリン酸化により Npas4 の転写活性が増強した。Npas4 が報酬関連の学習および記憶と関連しているかどうかを調べるために、コカインによる条件付け場所嗜好性試験を行った。その結果、側坐核の D1 受容体発現細胞で特異的に Npas4 を欠損させたマウスでは、報酬学習・記憶能の低下が認められた。Npas4 欠損による報酬学習・記憶能の低下が Npas4 の野生型を発現させることで回復出来たのに対し、Npas4 のリン酸化部位欠損変異体では回復できなかった。以上の結果から、Npas4 が MAPK によるリン酸化依存的に CBP と結合し、BDNF などの遺伝子発現を調節することで、報酬学習・記憶に関与することが示唆された (下図)。

MAPK による Npas4 リン酸化は遺伝子発現を調節することで、報酬学習・記憶を制御する



30 脳神経系の形成機構とその異常による疾患病態の解明	河崎 洋志
------------------------------------	--------------

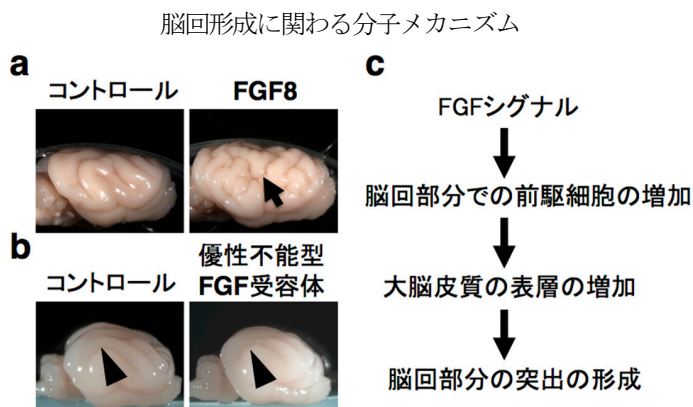
【目的】 高等哺乳動物の大脳皮質には脳回（大脳皮質表面のシワ）が存在しており、脳回は大脳の高機能化の鍵となった重要な構造と考えられている。従って発生・発達期における脳回の形成メカニズムの解明は非常に重要な研究課題のひとつである。しかし、高等哺乳動物の分子生物学的解析技術が整備されていなかったことから脳回の解析は遅れていた。そこで我々は高等哺乳動物フェレット（*Mustela putorius furo*）に注目して、フェレットの脳神経系に使用可能な分子生物学的技術を独自に確立してきた。子宮内電気穿孔法を高等哺乳動物に応用することに初めて成功し、フェレット大脳皮質への遺伝子導入を可能とした。そこで我々は脳回形成における神経前駆細胞の役割を解析した結果は、外側放射状グリア（oRG）もしくは中間前駆細胞（IPC）が脳回形成に重要であることを実験的に証明した。本研究ではこの研究の流れを引き継ぎ、神経前駆細胞を制御する上流の分子機構、および神経前駆細胞の下流で脳回という形態形成に至る機構を解析した。

【方法】 子宮内電気穿孔法は以下の手順で行った。深麻酔をかけたのちに皮膚を切開した。子宮筋を經由して胎仔の側脳室へガラスキャピラリーでプラスミドを注入した。プラスミドには FastGreen を入れて色を付けておき、注入が確実に行われていることを確認した。その後、ECM830 を用いて 50~100V, 50 ms の電気パルス を 1 秒間隔で 5 回与えた。処置中は組織が乾かないように PBS を持続的に滴下した。皮膚を縫合し麻酔より回復させた。

また免疫組織染色法は以下の手順で行った。固定の後に 30% スクロース処理を行い OCT に包埋した。クリオスタットで 14~50 μm の切片を作成した。1 次抗体を滴下し 4°C で一晚反応させた。PBS で洗浄したのちに、蛍光標識した 2 次抗体で室温 2 時間反応させた。PBS で洗浄したのちにカバーガラスで封入した。

【結果】 1. 神経前駆細胞から脳回形成に至るメカニズム。我々は、脳回形成には大脳皮質の表層側と深層側の量比が重要であると仮説を立てた。この検証を行うために、まず我々は CRISPR/Cas9 と子宮内電気穿孔法を組み合わせ、マウスおよびフェレットの大脳皮質での遺伝子ノックアウト技術を確立した。フェレット大脳皮質で *Cdk5* をノックアウトしたところ脳回形成が阻害された。続いて、大脳皮質の表層側もしくは深層側のいずれか一方に優性不能型 *Cdk5* を発現させた結果、表層側に優性不能型 *Cdk5* を発現させた場合にのみ脳回形成が阻害された。この結果は、大脳皮質の深層側に対して相対的に表層側が増加することが脳回形成に重要であるとの仮説を支持している。

2. 神経前駆細胞の増殖を制御する上流分子機構。FGF8 をフェレット大脳皮質に発現させたところ脳回数の数が著しく増加することを見いだした。逆に、優性不能型 FGF 受容体をフェレット大脳皮質へ発現させたところ、脳回形成が抑制された。さらに FGF シグナルにより、oRG や IPC 神経前駆細胞の細胞分裂と細胞数が制御されていることも見いだした。従って、FGF シグナルが、oRG や IPC などの神経前駆細胞の数の制御や脳回形成に重要な役割を担っていることが明らかとなった。

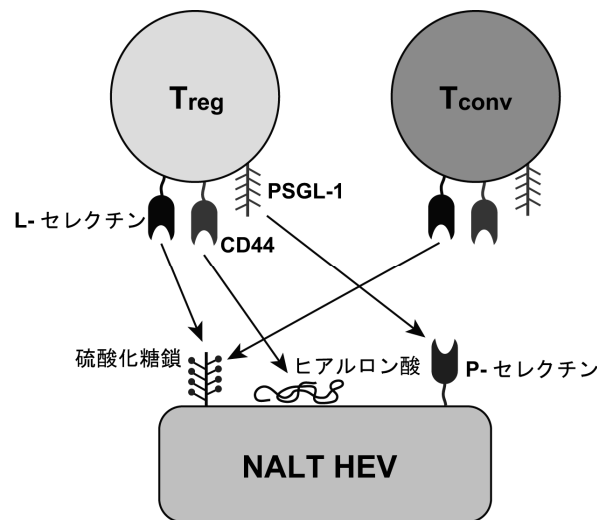


【目的】本研究では、独自開発した新規抗糖鎖抗体を用いて、制御性T細胞の糖鎖発現および体内動態機構を解明するとともに、その体内動態の人為的制御に基づくアレルギー性疾患の治療効果を検証することを目的とする。

【方法】各種の抗糖鎖抗体 (*J. Biol. Chem.*, 2010, 2015) を用いて、制御性T細胞における糖鎖発現をフローサイトメトリーで解析するとともに、経鼻的に侵入する抗原の蓄積するマウス鼻咽頭関連リンパ組織 (NALT) の高内皮細静脈 (HEV) における糖鎖発現を免疫蛍光染色により解析した。さらに、HEV に反応性が見られた抗糖鎖抗体の制御性T細胞のNALTへのホーミングに及ぼす影響を解析するとともに、同抗体を前投与し、卵白アルブミン (OVA) の経鼻投与により誘導するアレルギー性免疫応答の抑制効果を検討した。

【結果】制御性T細胞にシアリルルイスX糖鎖抗原が発現し、マウスNALTのHEVにおいては、抗硫酸化糖鎖抗体S2により認識される硫酸化糖鎖抗原が発現することが分かった。興味深いことに、S2抗体は鼻咽頭関連リンパ組織への通常型リンパ球のホーミングを有意に抑制したが、制御性T細胞のホーミングには影響せず、制御性T細胞のNALTへの蓄積を誘導した。さらに様々な阻害抗体を用いた検討の結果、制御性T細胞 (T_{reg}) および通常型T細胞 (T_{conv}) とNALTのHEVとの相互作用には各々異なる糖鎖と糖鎖結合分子の相互作用が関与することが分かった (下図)。そこでS2抗体の投与により通常型T細胞のホーミングに主要な役割を果たすL-セレクチンと硫酸化糖鎖の相互作用を選択的にブロックしたところ、OVA特異的IgE抗体産生およびアレルギー症状が有意に軽減することが分かった。以上の結果から、抗硫酸化糖鎖抗体S2は、制御性T細胞のNALTへの蓄積を誘導し、アレルギー症状を軽減することが示された。

制御性T細胞 (T_{reg}) と通常型T細胞 (T_{conv}) とNALT HEV との相互作用

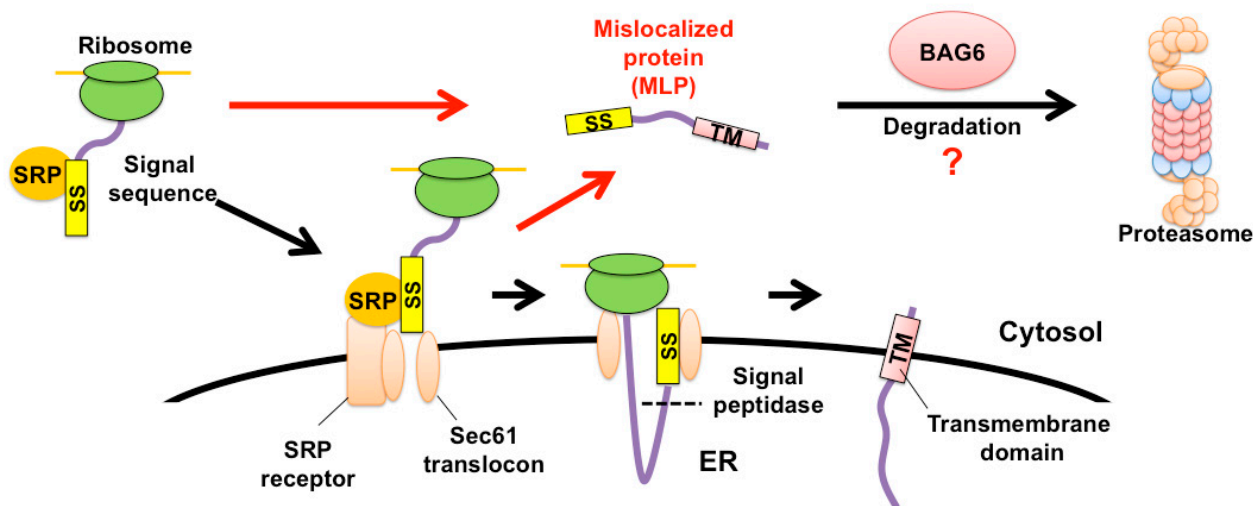


【目的】 我々は、膜タンパク質の品質管理を担う新しい細胞質シャペロンとして BAG6 タンパク質を見出し、その結合パートナーUBQLN4 タンパク質と共に、これらがプレエンブティヴ品質管理の中核として機能することを発見した。同年、RDP に関連した症状を示す若齢神経変性疾患患者 (1 名) の全エクソーム解析がハーバード医大のグループから報告され、我々が見出したUBQLN4 基質認識領域にユニークな点変異を持つことが見出された。これらの報告から、UBQLN4 の基質認識異常が細胞のプロテオスタシスの異常を引き起こす可能性が浮かび上がり、その仮説を実験的に証明することを目的に本研究を展開した。

【方法】 本研究にて、我々は UBQLN4 疾患関連点変異を導入した細胞ラインを新しく構築し、不良膜タンパク質モデルとしての IL-2R aDSS (シグナル配列を欠損させたインターロイキン受容体 a 鎖) との親和性を免疫沈降法にて定量した。さらに、新しい不良タンパク質モデルとして、MHC class I 依存的な抗原提示を受けることが報告されている GPI アンカー型膜タンパク質 PSCA と BAG6 複合体との関係についても検討した。

【結果】 UBQLN4 タンパク質に点変異を導入することにより、不良膜タンパク質モデル基質、ならびにポリユビキチン化基質との親和性が增大していることを新しく見出した。また、基質との親和性が增大した結果として、当該基質のプロテアソーム依存的分解を強く阻害することが判明した。これらの実験結果から、UBQLN4 変異をヘテロザイゴートで有する神経変性疾患患者の神経細胞変性、ひいては疾患発症機構の一部を説明できる可能性が浮かび上がってきた。加えて、MHC class I 依存的な抗原提示を受けることが報告されている GPI アンカー型膜タンパク質の代謝に BAG6 複合体が関与することを本研究で新しく示した。

BAG6 複合体を介したプレエンブティヴ品質管理経路



【目的】 心的外傷後ストレス障害 (Post Traumatic Stress Disorder; PTSD) は生死に関わるトラウマ体験、すなわち、トラウマ記憶を原因とする精神疾患である。現在、PTSD の治療方法開発を目指して、トラウマ記憶のモデルである「恐怖記憶」の制御機構に注目が集まっている。我々は恐怖記憶再固定化の制御機構を解析し、再固定化と消去は行動・細胞・分子レベルで極めて対照的な性状を示すこと、さらに、再固定化と消去は独立したプロセスではなく、相互作用することを明らかにしてきた。この中で、恐怖記憶が再固定化（維持あるいは強化）される場合には海馬が活動し、一方で、消去（恐怖軽減）が誘導される場合には海馬の活動が抑制されることを見出した。以上の結果を通して、エピソード記憶制御の中核である海馬がトラウマ記憶制御の中心であり、海馬の活動を通して、トラウマ記憶の維持や消去がダイナミックにコントロールされているとの仮説に至った。そこで、本課題では PTSD 治療方法開発を目指す基礎研究として、マウスにおける恐怖条件づけ文脈記憶並びに受動的回避反応記憶をトラウマ記憶モデルとして海馬によるトラウマ記憶制御機構の解明を試みた。

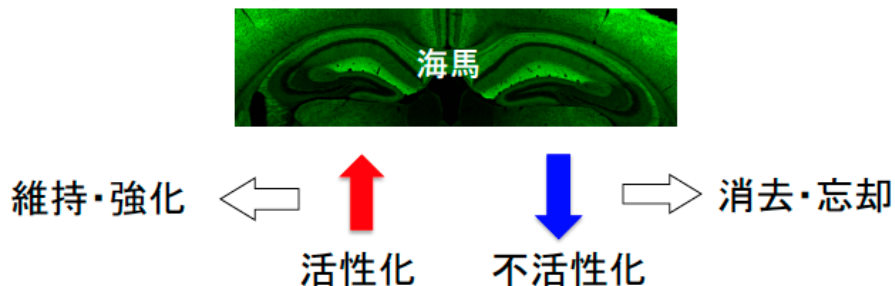
【方法】 前脳特異的にチャネルロドプシン2またはアーチロドプシンTを発現するトランスジェニックマウスを用いて、恐怖記憶想起中に海馬を光遺伝学的手法を用いて人為的に活性化あるいは不活性化させた影響を解析した。さらに、恐怖記憶固定化に対する海馬カルパインの役割を薬理的に解析した。

【結果】 光遺伝学的手法を用いて短時間の恐怖記憶想起中に海馬を不活性化させると、その後に恐怖記憶が減弱すること、一方、長時間の恐怖記憶想起中に海馬を活性化させると、消去の阻害が観察されることが示された。以上の結果から、恐怖記憶の想起時に、海馬の活性変動を介して、恐怖記憶が維持（再固定化）される、あるいは、消去されるかが決定されるメカニズムの存在が強く示唆された。

また、海馬カルパインの阻害により短期記憶は正常であったものの、長期記憶形成に障害が観察されたことから、海馬カルパインが恐怖記憶再固定化に必須であることが示唆された。一方、海馬カルパインの阻害により、想起後の記憶が破壊され、海馬カルパインが恐怖記憶固定化にも必須であることが示唆された。以上の結果から海馬におけるカルパインによる恐怖記憶制御機構が初めて明らかにされた。

海馬の活性制御を介して恐怖記憶が正負に制御される

海馬により恐怖記憶が維持・強化されるか、あるいは、消去・忘却されるかが決定される

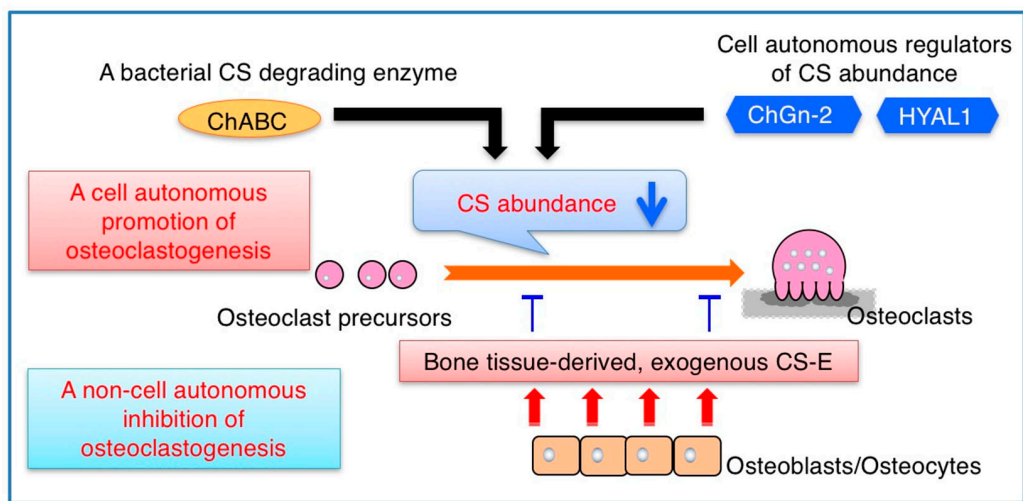


34 骨粗鬆症治療を目指したコンドロイチン硫酸の機能解析	北川 裕之
------------------------------	-------

【目的】 骨粗鬆症に代表される骨吸収性疾患は、骨リモデリングのバランスに異常が生じた疾患の一つで、破骨細胞による骨吸収が進み、骨芽細胞による骨形成が追いつかなくなることが主な原因である。その治療には、ビスホスホネート製剤を始めとする破骨細胞の働きを抑える薬剤が主に選択されているが、破骨細胞の機能抑制は、骨吸収に共役した骨形成にも悪影響を及ぼすことが知られている。したがって、骨粗鬆症のより有効な治療法を確立するためには、骨形成および骨吸収に関わる細胞分化過程の制御メカニズムを体系的に理解する必要がある。コンドロイチン硫酸鎖は、骨組織の主要な細胞外マトリックス成分であることから、骨芽細胞分化と破骨細胞分化を包括的に制御し、骨形成ならびに骨吸収の両イベントの仲介役として機能していることが十分期待される。そこで本研究では、破骨細胞分化過程におけるコンドロイチン硫酸鎖の役割と制御メカニズムの解析を試みた。

【方法・結果】 骨芽細胞非存在下での破骨細胞分化誘導系 (RAW264.7 および骨髄由来マクロファージ) を用いた解析から、コンドロイチン硫酸鎖の発現量が破骨細胞の分化の進行に伴い減少すること、この減少がコンドロイチン硫酸生合成酵素・分解酵素の機能発現とよく相関することを見出した。興味深いことに、コンドロイチン硫酸鎖の発現を減少させると、多核化を指標とした破骨細胞の形成が有意に亢進した。一方で、破骨細胞の分化は、骨芽細胞によって産生される特定のコンドロイチン硫酸サブタイプによって負に制御されることがわかった。これらのことから、破骨細胞の分化・成熟は、細胞自律的なコンドロイチン硫酸鎖の代謝調節と骨芽細胞より供給されるコンドロイチン硫酸サブタイプを介した細胞非自律的な抑制メカニズムのバランスによって成り立っていることが示唆された。

コンドロイチン硫酸 (CS) 鎖による破骨細胞分化・成熟過程の制御メカニズム

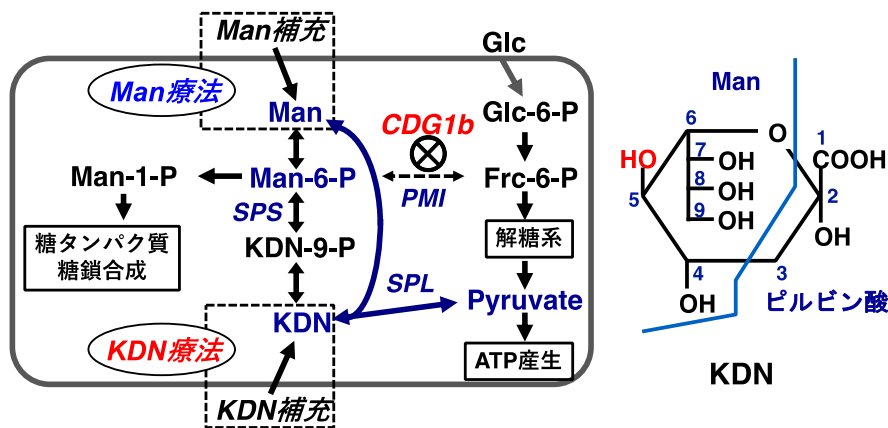


【目的】 先天性糖鎖合成異常症 (CDG) は、不完全な糖鎖構造形成が原因となって精神・運動発達遅延、肝や消化管機能異常を起こす遺伝病である。殆どの CDG は治療法がない難病であるが、CDG タイプ 1b (CDG1b) は唯一治療が可能である。CDG1b はフルクトース 6-リン酸をマンノース 6-リン酸 (Man-6-P) に変換する酵素 PMI の遺伝子異常が原因となって、糖タンパク質糖鎖の生合成に必須な Man-6-P レベルが激減することによって発症する。それに対してマンノース (Man) を補充すると正常化されるため、Man 補充療法が治療法として利用されている。しかし、Man 療法では、長期間の大量 Man の摂取が患者負担となること、大量 Man 投与の毒性、進行性肝障害、下痢や激しい腹痛症状が報告されていることから改善が期待されている。本研究ではその改善を目的としている。

【方法】 KDN は代謝的に Man とピルビン酸から形成されるシアル酸の一種であり、細胞内で分解されて Man を与える。また、細胞毒性が低く、細胞への取り込み効率も高いメリットがあり、Man の代替薬になる可能性がある。そこで、KDN の取り込みから代謝さらに CDG 症状の緩和について、細胞レベル、個体レベルで解析した。

【結果】 種々の試行にも関わらず CDG1b 細胞である PMI ノックダウン安定株の樹立ができず、大幅に計画が遅れている。現在、PMI ノックアウトマウスの線維芽細胞を入手しており、今後、その細胞を用いて KDN 療法の有効性を検証する予定である。一方、Man と KDN の代謝物を正確に微量定量する方法など周辺技術の確立は完了した。また、KDN の細胞への取り込み機構が他のシアル酸と異なるという驚きの発見をすることができ、KDN 療法の機構解明における有用な知見になると考えている。

先天性糖鎖異常症 CDG1b の代替治療法の可能性

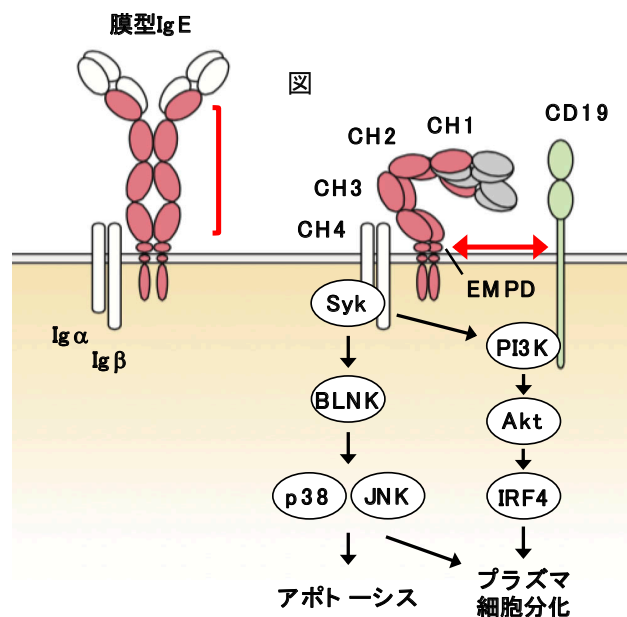


【目的】 これまでに膜型 IgE から BLNK と CD19 を介した自発的シグナルが胚中心 B 細胞の形質細胞への分化と死を誘導すること、そのシグナル経路の異常が IgE 型胚中心 B 細胞の増殖維持とその長期生存プラズマ細胞および記憶 B 細胞への分化に至り、長期高 IgE 血症に至ることをマウスの系で見出した。この一連の過程の分子機構の全容を解明し、それらがヒトアレルギー病の成因である可能性を探る目的で研究を進めた。

【方法】 ナイーブ B 細胞を独自のフィーダー細胞上で IL-4 を加えて培養することによって、IgG1 および IgE にクラススイッチした胚中心 B 細胞 (iGB 細胞) を著しく増殖させる系 (iGB 細胞培養系) を用いた。この系で、内在性 IgH 遺伝子を除去した上で IgE を強制発現させたり、種々の遺伝子を導入して強制発現やノックダウンを行い、その結果をウェスタンブロット法やフローサイトメトリーにより解析した。また、アレルギー罹患者の末梢血 B 細胞を iGB 細胞培養系で IL-21 を加えて培養し、その中から膜型 IgE 陽性 iGB 細胞を独自の方法で選択的に増殖させ、その細胞と、コントロールとしての非 B 細胞白血球のエクソーム解析を行い、膜型 IgE 陽性 B 細胞に特異的な遺伝子変異を体細胞変異として抽出した。

【結果】 転写因子 STAT3 が BLNK および CD19 を介した自発的膜型 IgE シグナルにより活性化すること、その活性化 STAT3 が *in vitro* で胚中心 B 細胞から形質細胞への分化を誘導し、*in vivo* では IgE 陽性胚中心 B 細胞の増殖維持を抑制することを見出した。また、アレルギー罹患者の IgE 陽性記憶 B 細胞に存在する種々の体細胞変異遺伝子を見出した。

IgE 型胚中心 B 細胞の排除を促す膜型 IgE シグナル経路



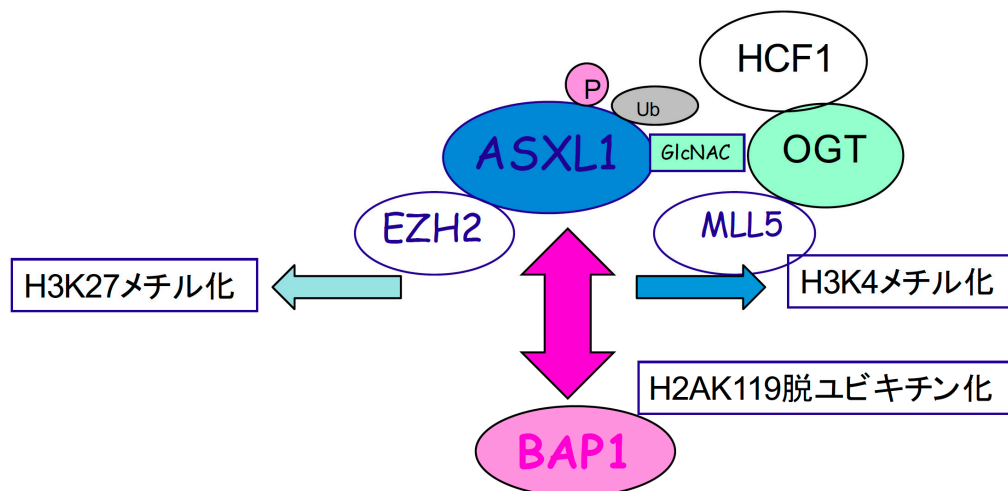
【目的】クローン性造血の病態と白血病に進展する分子機序を解析する目的でC末欠失型ASXL1変異体(ASXL1-MT)をRosa26座にノックインしたマウスを作成し、Vav-Creマウスと掛け合わせることで造血細胞でのみASXL1-MTを発現するASXL1-MT-KIマウスを作成した。

【方法】ASXL1-MT-KIマウスを、血算、フローサイトメーター、コロニー形成法、骨髄移植モデル、RNAseq、GSEA、ChIPseq、ウエスタンブロット、real-time PCR、CellRox、Mitotracker、 γ H2AXのIF、コメットアッセイを利用して解析した。

【結果】ASXL1-MT-KIマウスは若年時には血算は正常であるが、1歳以降には大球性貧血、血球の軽度形態異常、血小板増多を認めた。また出生時に白血病レトロウイルスを感染させると、2ヶ月～15ヶ月で全例急性白血病を発症した。一方、ASXL1-MT-KIマウス由来骨髄細胞に変異型Runx1導入した細胞は移植マウスにおいて6～7ヶ月でMDS/AML発症を誘導した。これらの結果から、ASXL1-MT-KIマウスは前白血病状態でありクローン性造血の良いモデルと考えられた。最近、我々はASXL1-MT-KIマウスの骨髄細胞でミトコンドリア活性化、ROS上昇、DNAダメージ亢進が認められることを見出した。この結果はクローン性造血から白血病の発症頻度が高く、ASXL1-MT-KIマウスが前白血病状態であることと合致した。

次に造血器腫瘍発症の分子機構を調べるためにASXL1-MT-KIマウスを詳細に解析した。造血幹細胞は若年期から減少するが1年以上経つと増加することが判明した。マウスは野生型マウスと比較して早期にミエロイド優位の造血を示し、老化型の造血パターンであった。またクロマチン沈降法/シーケンズ(ChIPseq)で、ASXL1のゲノムへの結合は代表的ヒストン活性化マークであるH3K4me3と強く相関し、ASXL1-MTが存在するとH3K4me3が著しく抑制されることが判明した。ASXL1はEZH2/PRC2と共同して代表的ヒストン抑制マークであるH3K27にメチル基を付加する(H3K27me3)とされていたが、ASXL1とH3K27me3は全体としては相関がなかった。別の抑制マークH2AK119UbはASXL1結合と強い相関を見せた。我々はその後、ASXL1-MTがBAP1と強く結合してBAP1活性を高め、H2AK119Ubの脱ユビキチン化を誘導し、HoxA9、IRF8の発現上昇を介してミエロイド系腫瘍発症に寄与することを明らかにした。これらの結果はASXL1-MTが様々なエピゲノム制御の破綻を介して造血器腫瘍発症に寄与することを示した。

エピゲノム調節において重要な働きをするASXL1の破綻が白血病発症の原因となる



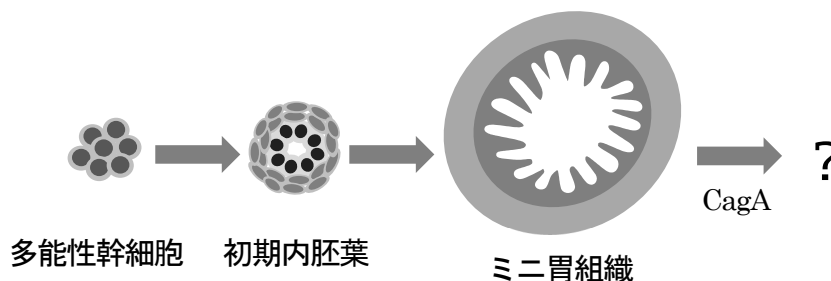
【目的】 胃がんはわが国では肺がんに次いで患者数の多いがんであり、毎年 10 万人が胃がんと診断され、5 万人が胃がんで死亡している。これまでの研究から、日本でも胃がん患者の大半が長年のピロリ菌感染による慢性炎症が原因と考えられており、早期のピロリ菌の除去が胃がんの発症を抑制する有効な方法であることが示されている。

最近我々は、多能性幹細胞として知られる ES 細胞から胃組織を試験管内で丸ごと作製する培養技術を開発した。この胃組織は内側に胃腺構造を有し外側を平滑筋組織に覆われた蠕動運動をする直径 2 mm 程度の風船状組織であり、ペプシノゲンなどの消化酵素やムチン粘液を分泌し、ヒスタミンに応答して胃酸を分泌する機能的な胃組織である。そこで本申請研究では、ヒト iPS 細胞を材料にして我々の試験管内胃組織作製技術を発展させるとともに、胃がん治療薬候補探索に利用できる胃がんの試験管内モデルの構築を目的として研究を開始した。

【方法】 我々が構築したマウス胃組織分化培養方法を改良し、ヒト iPS 細胞でも安定して胃組織へと分化させることができる培養プロトコルへと各分化段階で培養条件を最適化する。また、ピロリ菌感染後の胃組織のモデルを構築するため、ピロリ菌の病原因子として報告されている CagA を発現誘導する幹細胞株を樹立し、胃組織へと分化誘導させた後、CagA を過剰発現させることで、ピロリ菌病原因子により胃組織に引き起こされる現象の詳細を解析する。

【結果】 ヒト iPS 細胞の胃組織分化培養方法の最適化に関しては、今までほとんど作製できなかった初期内胚葉組織を効率的かつ安定的に作製する培養条件を構築した。また、CagA ノックイン幹細胞株についても複数株樹立し、CagA の発現誘導についても確認した。現在、CagA ノックイン株からミニ胃組織を作製中であり、今後、CagA 発現誘導がどの程度ピロリ菌感染による現象を再現できるのか検証する予定である。

多能性幹細胞を用いた *in vitro* ミニ胃組織の作製とピロリ菌病原因子 CagA 発現の影響の解析

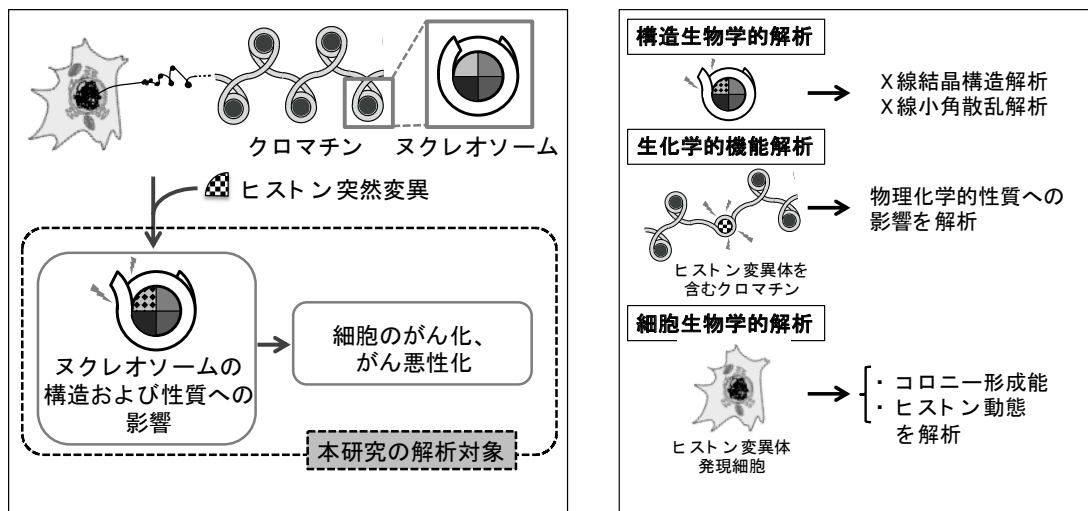


【目的】がんは我が国が克服すべき疾病の1つであり、日本人の死因のおよそ3割を占める。がんに対する効果的な治療法の開発、更にはその予防を実現して、この疾病を克服するためには、細胞がん化やがん抑制機構の分子基盤の理解が必須である。近年、悪性脳腫瘍や骨腫瘍に代表される多様ながん細胞において、染色体構造の基盤因子であるコアヒストンタンパク質群の変異が同定され、これらの変異により細胞のがん化・悪性化が引き起こされることが示された (Schwartzentruber *et al. Nature* 2012; Behjati *et al. Nat. Genet.* 2013)。しかし、これらのヒストンの変異による細胞がん化のメカニズムは未だ不明瞭である。本研究の目的は、がん細胞でみられる変異型ヒストンの機能解析を行い、ヒストンの変異による未解明の発がん機構を明らかにすることである。

【方法】本研究では、がん細胞でみられるヒストンの変異が、ヌクレオソームの構造および細胞での染色体機能に与える影響を解析した。まず、研究対象のヒストン変異の探索を行った。ヒストンバリエント H3.3 の6種類の変異 (K27M、G34R/V、G34W/L、K36M) は、それぞれ膠芽腫 (H3.3 K27M、G34R/V)、骨巨細胞腫 (H3.3 G34W/L)、および軟骨芽細胞腫 (H3.3 K36M) の原因変異 (ドライバー変異) として、すでに報告されていた。これらの変異に加え、がんゲノムデータベースを用いて、新たなヒストン変異を探索した。次に、これらの変異を有するヌクレオソームを試験管内で再構成し、これらのヌクレオソームの立体構造を X 線結晶構造解析によって明らかにすると共に、これらのヌクレオソームの性質を生化学的解析によって明らかにした。さらに、これらのヒストンを細胞内で強制発現し、細胞に与える影響を細胞生物学的解析によって調べた。

【結果】がんゲノムデータベースを用いて、新たなヒストン変異を探索した。その結果、多様ながん細胞で共通して存在するヒストンの変異 (H2B E76K、H3.1 E97K、H4 R92T) を、3つの主要型に関して同定した。これらの変異に加え、これまで報告された膠芽腫、骨巨細胞腫、および軟骨芽細胞腫におけるドライバー変異 (H3.3 K27M、G34R、G34W/L、K36M) を含むヌクレオソームをそれぞれ試験管内で再構成し、すべてのヌクレオソームについて、X 線結晶構造解析もしくは X 線小角散乱によってその構造的性質を明らかにした。その結果、H2B E76K、H3.1 E97K のヒストン変異については、ヌクレオソームの構造および、安定性が通常のヌクレオソームから、大きく変化することが明らかになった。そこで、これらの変異を有するヒストンを細胞内で発現させ、その形質の変化を解析した。本研究の結果から、このような変異を有するヒストンが、細胞内で不安定なヌクレオソームを形成し、がん細胞の悪性化に関与することが示唆された。本研究によって得られた知見は、ヒストン変異を介した発がんメカニズムを理解するための重要な基盤情報となる。

本研究の目的と研究方法

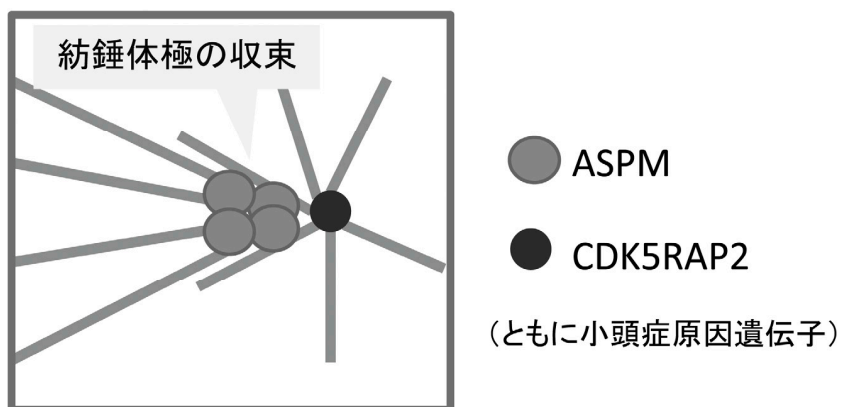


【目的】 *ASPM*は、常染色体劣性遺伝性疾患である小頭症（autosomal recessive primary microcephaly, MCPH）の原因遺伝子として同定された。現在までに、MCPHの原因として10を超える遺伝子が特定されているが、そのうち最も頻繁に変異が認められるのが *ASPM* 遺伝子である。*ASPM* タンパク質は紡錘体の極に局在するが、細胞分裂における機能はほとんど明らかになっていなかった。

【方法】 *ASPM* の紡錘体内機能を検証するため、ヒト培養細胞である HCT116 細胞を用いた細胞生物学的解析を行った。

【結果】 まず、*ASPM* ノックアウト株を作製し、生細胞観察を行ったが、紡錘体の形態や分裂期の進行に関する異常は認められなかった。ところが、別の小頭症原因遺伝子で中心体に局在する *CDK5RAP2* を分解すると、*ASPM* ノックアウト株で紡錘体の極収束異常と分裂期の著しい遅延が引き起こされることを発見した。これにより、紡錘体の極形成過程において、*ASPM* が *CDK5RAP2* と冗長的に機能することが示された。さらに、小頭症患者の *ASPM* 変異が細胞内で及ぼす影響を検証するため、患者から同定された *ASPM* 変異を導入した株を作製した。その結果、*CDK5RAP2* が存在しない条件で、同じような極収束異常が観察された。

ASPM と CDK5RAP2 による紡錘体極収束



【目的】 変異タンパク質の発現やカルシウムイオンの恒常性破綻によって小胞体の機能に異常をきたすと小胞体内腔に折りたたみ不全タンパク質が大量に蓄積する（小胞体ストレス）。小胞体ストレスは神経変性疾患をはじめとする様々な疾患の発症や病態形成と密接に関わることが報告されている。小胞体ストレスが発生すると、小胞体ストレスセンサーとして機能するATF6やOASISファミリー（BBF2H7、OASIS、AlbZIP、Luman、CREBH）はsite-1 protease（S1P）およびS2Pによる2段階の膜内切断を受けて活性化し、小胞体ストレスを回避するためのシグナルを発信する。本研究課題では、BBF2H7が小胞体ストレス依存的な2段階の切断を受ける際に産生されると予想される小ペプチド断片（小胞体マイクロフラグメント）の物性ならびに生理的意義を明らかにすることを目的とした。

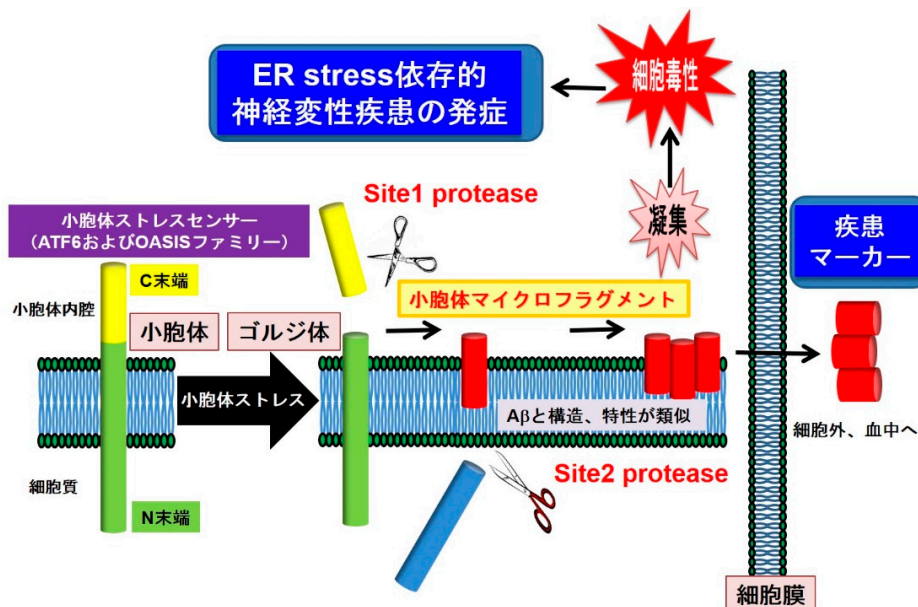
【方法】 BBF2H7 もしくは BBF2H7 の S1P 認識配列に変異を加えたコンストラクトを挿入した発現プラスミドを遺伝子導入したヒト胎児腎がん由来細胞 HEK293T 細胞もしくは S2P 欠損 CHO 細胞（M19 細胞）の細胞破碎液を用いて western blotting を行った。

小胞体マイクロフラグメントのアミノ酸配列を決定するために、N もしくは C 末端側に GST を融合させた BBF2H7 を HEK293T 細胞に発現させて小胞体ストレスを負荷し、産生された GST 融合 BBF2H7 の N もしくは C 末端断片を回収・精製した後、トリプシン消化して末端配列を LC-MS/MS 解析によって調べた。また、小胞体マイクロフラグメントを特異的に認識する抗体を用いて免疫沈降を行ってマイクロフラグメントを回収し、エドマン分解法によるアミノ酸配列の解読を行った。

BBF2H7 小胞体マイクロフラグメントの凝集性を検討するために、人工的に合成した小胞体マイクロフラグメントを 37°C でインキュベート後、透過型電子顕微鏡によってその形態を観察した。

【結果】 BBF2H7 小胞体マイクロフラグメントは小胞体ストレス依存的に S1P および S2P による段階的な膜内切断を受けて産生されることを見出した。BBF2H7 小胞体マイクロフラグメントは S2P による少なくとも 3 カ所以上の膜内切断を受けて産生されることと、主要な BBF2H7 小胞体マイクロフラグメントは BBF2H7 の 386 番目から 430 番目に存在する 45 個のアミノ酸が切り出されたペプチド断片であることが分かった。このフラグメントは高い凝集性を示し、fibril 様構造を形成することがわかった。

小胞体ストレスセンサーの切断と小胞体マイクロフラグメントの産生



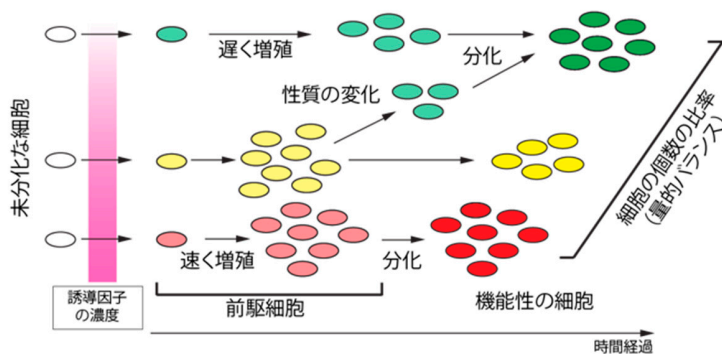
【目的】脊椎動物の中枢神経系には極めて多様な細胞が適切な量的バランス（細胞数の比率）をもって配置されている。これは、発生段階において生じる各神経前駆細胞の増殖や分化が、細胞内外のメカニズムによって制御されているからである。（下図）はその様子を概念的に示したもので、未分化な細胞が細胞外因子（誘導因子と呼ばれるもの）によって大まかに性質を付与されて「前駆細胞」となり、それらが固有の増殖スピードまたは分化のタイミングをもって特定の機能を獲得していく様子を表している。本研究は、そのメカニズムの一端を知る目的で、ソニック・ヘッジホッグ（Sonic Hedgehog: Shh）シグナルと神経前駆細胞の分化の関連について明らかにすることを目的とした。

Shh は分泌因子の1つで、神経分化・増殖、四肢の発生など多様な生物学的活性を持つ。一方、Shh を受ける細胞の反応は様々だが、特に神経前駆細胞が Shh シグナルに暴露されるといったん細胞内活性が上昇し、その後フィードバック効果によって細胞内活性が減弱化していく。この減弱にかかる時間（半減期）の違いが細胞の分化方向を決定していると考えられている。本研究では、このフィードバックに関与する遺伝子を同定してその機能を解析することにより、領域ごとの量的バランスを司るメカニズムの一端を明らかにすることを目的とした。

【方法】ニワトリ胚の神経前駆細胞塊に異なる濃度の Shh を作用させ、反応して発現が上昇する遺伝子を網羅的に単離した。その後 *in situ* ハイブリダイゼーションを用いて発現領域を確認した。次に、候補遺伝子を神経管内で強制発現し、パターン形成に対する影響を抗体染色によって解析した。また、si-RNA を同じく神経管に導入して機能喪失実験を行った。さらに、マウス胚性幹細胞（ES 細胞）の神経分化システムを利用して、ニワトリ胚と同様のことが起こっているかを検証した。

【結果】本スクリーニングから、G タンパク質共役受容体 GPR17 がこのフィードバックを制御することがわかった。GPR17 遺伝子の発現は Shh シグナルによって誘導される一方、GPR17 をあらかじめ強制発現した細胞では Shh シグナルを阻害した。また、si-RNA を用いた実験から、神経管の腹側領域（Shh によって影響を受ける領域）が異常拡大することも明らかになった。さらに、マウス胚性幹細胞（ES 細胞）の神経分化系を用いて、ニワトリ胚同様に GPR17 が Shh シグナルに対して負の作用を持つことが明らかになった。Shh シグナルの継続的な活性化は細胞にがん化を引き起こすこともあるため、本研究は前駆細胞の分化タイミングを制御するメカニズムの一端を明らかにしたのもとして重要である。

未分化細胞（白の丸印）が一定の量的比率を持った機能性細胞へ分化していく概念図

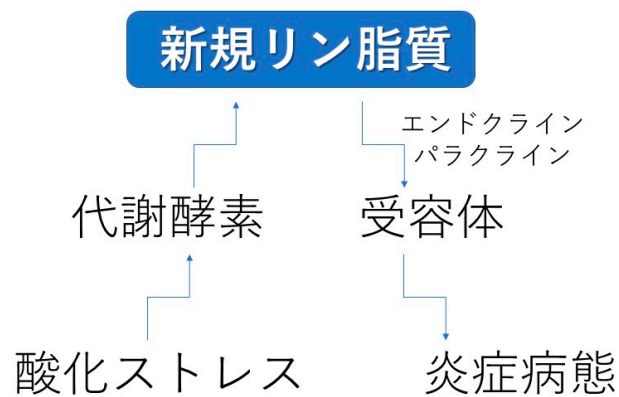


【目的】我々は、がんや炎症の病態モデルマウスで大きく変動する脂質を、高感度リン脂質測定技術によって探索し、いくつかの新規構造をもつ脂質を発見している。本研究では、新規リン脂質の生成・分解機構、動態、作用点と生理機能の理解を目的とした。

【方法】リン脂質キナーゼ/ホスファターゼの哺乳動物細胞での発現ベクターは常法に従って作製した。培養細胞や血液から Bligh-Dyer 法で脂質を抽出し、その後陰イオン交換カラムで酸性リン脂質画分を濃縮した。メチル化反応により得た誘導体を、以下の脂質解析に供した。逆相カラムクロマトグラフィー、三連四重極型質量分析計での選択反応モニタリングによって新規脂質を特異的に測定した。新規リン脂質の受容体探索には、TGF α 切断アッセイを適用した。

【結果】本新規リン脂質の合成・分解に関与する酵素として、phosphoinositide 3-kinase、SHIP1 などいくつかのリン脂質キナーゼ/ホスファターゼを同定した。また、新規リン脂質は酸化ストレスに応答して上昇し、細胞培養上清中に検出され、動物レベルでは血液中に存在することが明らかとなった。マウスへのエンドトキシン投与による全身性の炎症の惹起に伴い、血中レベルが増加した。肝炎、喘息の病態形成への関与が考えられる G タンパク質関連型受容体に作用することが示唆された。

新規リン脂質の生成、分解、動態、作用点と生理機能



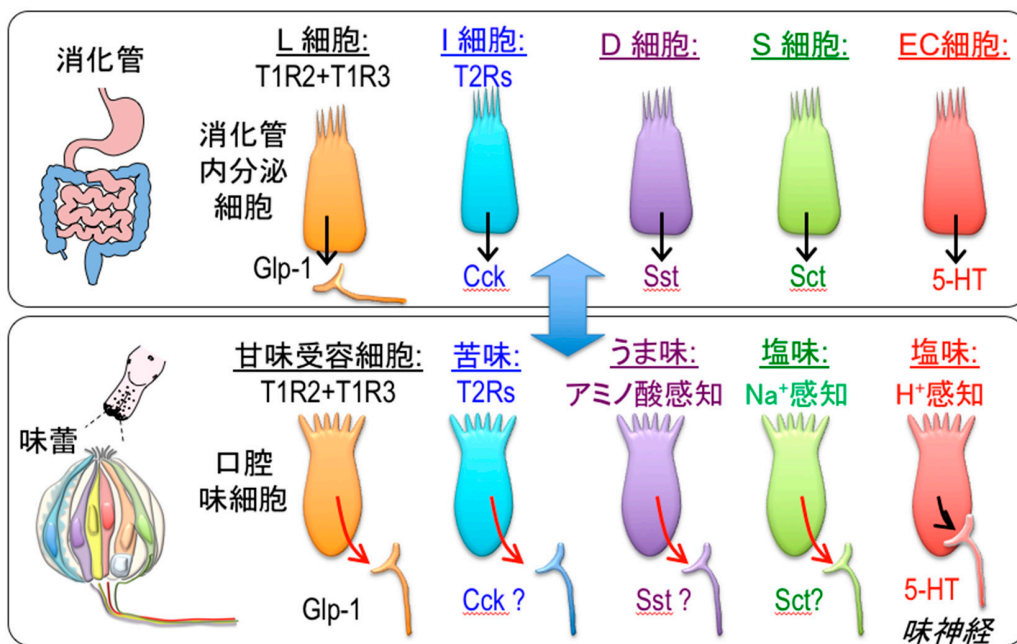
44 味覚情報伝達の分子機序と消化管ホルモン作用との関連 重村 憲徳

【目的】 味細胞で生じた味情報は神経伝達物質を介して味神経へ伝えられる。しかし、その神経伝達物質についての詳細はほとんど不明である。消化管内分泌細胞は、機能的に少なくとも5つの細胞に分類され、Glp-1、コレシストキニン (Cck)、セクレチン (Sct)、ソマトスタチン (Sst)、セロトニン (5-HT) など特異的なホルモンを分泌し、液性調節だけでなく神経伝達物質としても栄養素代謝に関与することが知られている。近年、この消化管内分泌細胞に、甘味受容体 T1R2+T1R3 や苦味受容体 T2Rs 等が発現し、味物質刺激により上記ホルモンの分泌が促進することが明らかにされた。そこで本研究では、この味細胞と消化管内分泌細胞との化学感覚受容の共通性に着目し、味細胞から分泌される消化管ホルモンの種類、またそれらの機能を明らかにすることを目的とした。

【方法】 マウス舌味覚器 (茸状乳頭と有郭乳頭) と味神経節 (膝神経節) をもちいて GeneChip 解析、RT-PCR、*in situ* hybridization、免疫組織化学解析の分子生物学的解析等を行った。

【結果】 Cck およびその受容体 Cck-AR と -BR がそれぞれ味細胞および味神経節細胞に発現していることが分かった。また、Sct および Sst 関連分子も味覚関連組織に発現していることが明らかとなった。以上のことから、味細胞においても、これらの消化管ホルモンが分泌され、味覚情報伝達・修飾などの機能を担うことで、味覚を介した摂食調節 (体内栄養物質ホメオスタシス維持) に関与している可能性が示唆された。

消化管内分泌細胞と味細胞との化学感覚受容における共通性



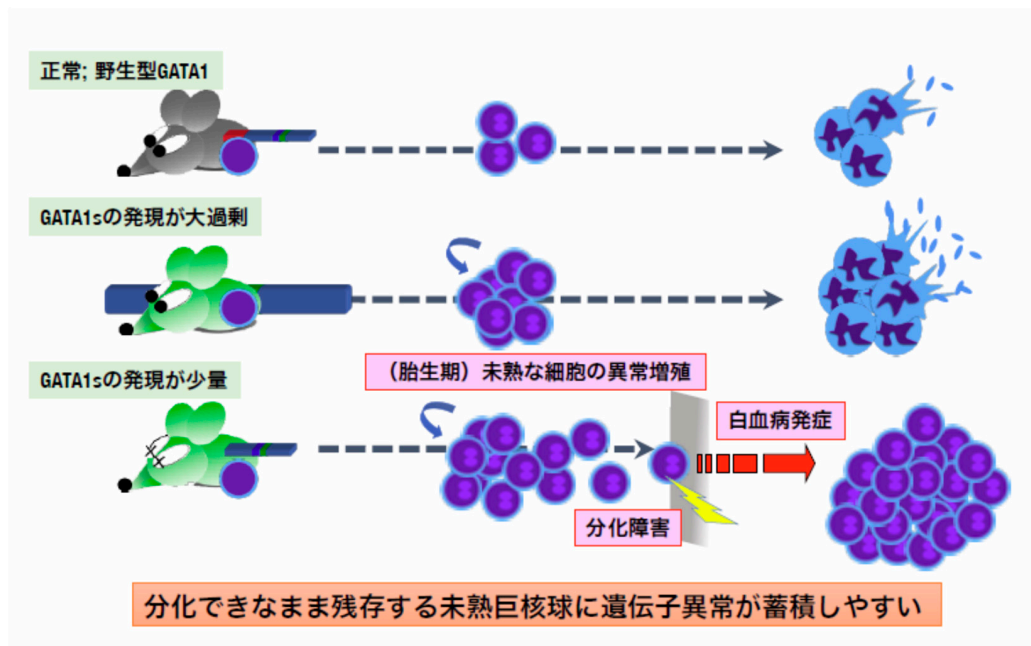
味細胞からも消化管ホルモン分泌？機能？

【目的】ダウン症群患児の約 10%において、胎生期または出生直後に一過性骨髄異常増殖症 (TMD) を発症する。TMD では、白血病芽球に酷似した細胞が異常増殖すること、また、臓器浸潤による患児の早期死亡もまれではないことから、病態的には急性白血病と鑑別が困難である。TMD は、通常、生後三ヶ月程度で自然退縮するが、TMD 既往を持つダウン症群患児の約 20%程度が数ヶ月後から数年後に、今度は真の巨核芽性白血病 (AMKL) を発症する。この TMD 発症、自然寛解、AMKL 発症の形質転換にどのような分子メカニズムが関与しているかについては、いまだ、詳細は明らかにされていない。近年、TMD や引き続く AMKL のほぼ全例でアミノ末端側の転写活性化領域を欠失した短型 *GATA1* (*GATA1s*) を発現していることが明らかになった。私たちは、*GATA1* がアミノ末端側とカルボキシ末端側にそれぞれ独立した転写活性化領域を持つことを発見し、*GATA1* が二つの領域を巧妙に使い分けて転写調節をしていることを提唱してきた、本研究では、*GATA1s* 変異による白血病発症には、一方の転写活性化領域を欠失したことによる転写調節不均衡が白血病発症に関与するという仮説を検証する。

【方法】*Gata1* 遺伝子破壊マウスに *Gata1* 遺伝子発現制御領域を用いて *GATA1s* を発現させ、*GATA1s* の発現量が異なる複数のマウス系統を樹立し、*GATA1s* 発現量による巨核球への影響、および、AMKL 発症の分子機構を解析する。

【結果】*GATA1s* のみを発現する遺伝子改変マウスは、*GATA1s* 発現量の多寡にかかわらず、全例で胎児肝臓での未熟巨核球の異常増殖をみとめた。この未熟巨核球の異常増殖は思春期までには消失し、成獣期には観察されなかった。一方、*GATA1s* 発現量が少ないマウスは生後 2 ヶ月齢から白血病を発症するが、*GATA1s* 発現量が多いマウスでは白血病を発症しなかった。また、*GATA1s* 発現量が少ないマウスの巨核球は血小板産生能が減弱していたが、*GATA1s* 発現量が多いマウスでは比較的保たれていた。このことは、*GATA1s* は、その発現の多寡にかかわらず、巨核球増殖制御を代償できないこと、一方で、大量の *GATA1s* があれば巨核球分化を代償できるが少量の *GATA1s* では代償できないことを示している。すなわち、*GATA1s* による AMKL 発症には、巨核球分化制御における *GATA1* の調節不均衡が関与していると考えられる。

GATA1s 変異による巨核球分化異常と白血病発症



46 アレルギーの多様性を担うアレルゲン親和性の役割	鈴木 亮
-------------------------------	------

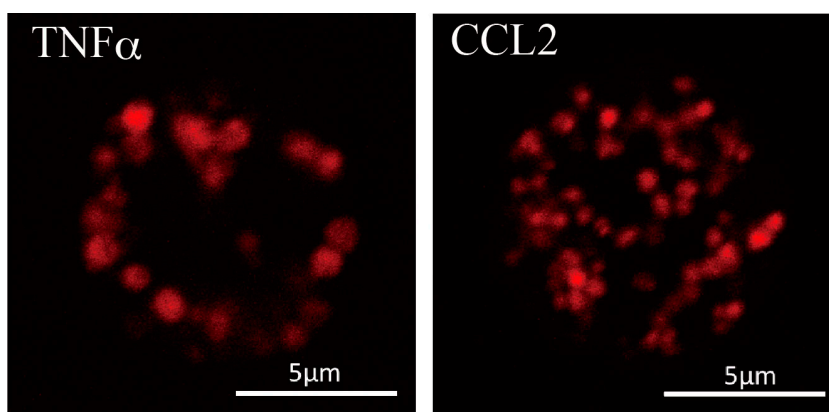
【目的】花粉症、アトピー性皮膚炎、喘息などのアレルギー疾患は、国民の半数以上が何らかのアレルギー症状を示しているにもかかわらず、その根治療法は未だ確立されていないのが現状である。その要因の一つとして、発症部位、病態、重症度など、アレルギー反応が示す多様性が挙げられる。これらアレルギー疾患には、マスト細胞が中心的な役割を担い、アレルゲン、アレルゲン特異的 Immunoglobulin E (IgE)、IgE 受容体 (FcεRI) の3者の関係が、IgE 受容体の活性化調節をはじめ多様性制御に重要な役割を担っていると考えられる。そのような中、我々はアレルゲン親和性がアレルギー反応の「強弱」だけでなく「質的」にも異なるアレルギー応答を示すことを明らかにした。

本研究では、先に得られた研究成果をさらに発展・展開し、個々の分泌顆粒の不均質性とその分泌制御メカニズム、また、アレルゲン親和性特異的に誘導される浸潤細胞とマスト細胞の相互作用など、アレルギー反応における各ステップでの分子メカニズムを追究することによって、アレルギーの多様性制御メカニズムを明らかにすることを試みた。

【方法】本研究では、骨髄由来マスト細胞やマウス耳介組織、そして相互作用の解析には骨髄好中球を用いた。骨髄由来マスト細胞は、マウス骨髄細胞をサイトカイン存在下で培養・分化させたものを用いた。また、骨髄好中球の単離・精製は、骨髄細胞の密度勾配遠心法により行った。画像解析機器としては、共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss LSM-510、LSM-800)、走査型 (HITACHI、S-4300) 及び透過型電子顕微鏡 (HITACHI、H-7600) を用いた。

【結果】アレルゲンと IgE の親和性によって、分泌するサイトカイン (高親和性アレルゲン) やケモカイン (低親和性アレルゲン) の種類が厳密に制御されていることが明らかになった。このことから、外来アレルゲン情報によって複雑な分泌反応が誘導されることによって、多様なアレルギー反応が誘導されている可能性が示唆された。本研究では、単一分泌顆粒レベルでの分泌制御機構を追究し、個々の分泌顆粒には特異的なケミカルメディエータや分泌機能蛋白質 SNARE (soluble NSF attachment protein receptor) が局在していることが明らかになった。また、多様性の一因と考えられるアレルゲン親和性選択的な浸潤細胞 (ここでは好中球) とマスト細胞の相互作用についても独自の共存培養システムを構築し追究した。アレルゲンによってアレルギー反応を誘導したマスト細胞では、脱顆粒反応 (ケミカルメディエータの開口放出) が誘導され、それに伴って浸潤細胞 (好中球) がマスト細胞と相互作用していることが明らかになった。さらに、マスト細胞と好中球は、接着部位を介して細胞間シグナル伝達を行っていることが、両者の生細胞カルシウムイメージングをはじめとする画像解析によって明らかになった。

マスト細胞の分泌顆粒の不均質性



47 非閉塞性乏精子症の発症機序・予防・治療に関する研究

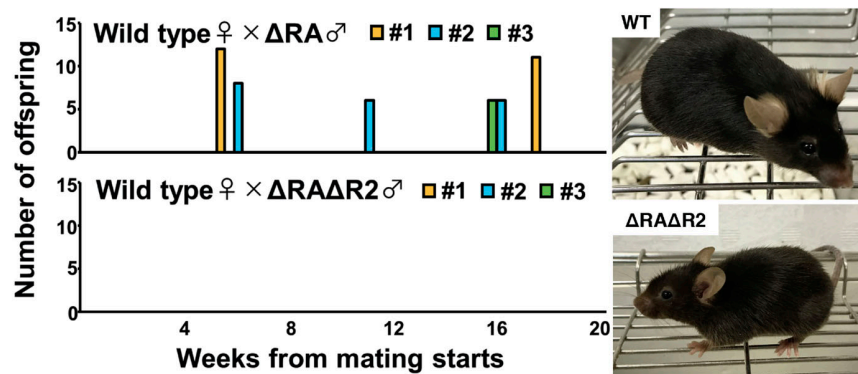
高島 誠司

【目的】 我が国は人口減少局面に際しており少子化対策は喫緊の課題であり、実際カップルの6組に1組は不妊治療を必要としている。不妊の原因の半数は男性にあり、そのうち3割は補助生殖医療適用が困難な非閉塞性乏精子症/無精子症である。本研究の目的はヒト疾患モデル動物を用いた非閉塞性乏精子症の病態メカニズム解明である。

【方法】 本研究で用いる遺伝子改変マウスは東京理科大学の岩倉洋一郎教授より導入し繁殖させて使用した。精巣その他の組織解析は病理切片作製、遺伝子発現解析はリアルタイムPCRにより行なった。

【結果】 我々はヒト乏精子症を発症するヒト疾患モデルマウス『 $\Delta RA \Delta R2$ マウス』を見出した。このマウスは炎症性サイトカインIL1の拮抗阻害分子IL1RA及びおとり受容体IL1R2の双方を欠損しており、IL1シグナルが過剰に入力される。このマウスは雄性不妊であり、精巣重量の低下、精巣内伸長精子細胞の減少、精巣上体内での精子消失と円形精子細胞の異所性局在、ライディッヒ細胞の退縮、を確認した。さらに、下垂体における生殖ホルモンの発現抑制、及び精巣におけるテストステロン合成遺伝子の発現低下を見出した。IL1シグナルの過剰入力は、何らかの形で下垂体機能低下をもたらし、結果として精巣機能低下を誘導したと推察される。

雄性不妊を示す $\Delta RA \Delta R2$ マウス



【目的】我々は、造血幹細胞不全と MDS (Myelodysplasia) を発症した日本人若年の患者 6 例において、アセトアルデヒド分解酵素である *ALDH2* (ヘテロ) とフォルムアルデヒド分解酵素 *ADH5* (ホモ) の遺伝子欠損を同定した。我々が従来解析してきた同様の造血不全・MDS を発症するファンコニ貧血 (FA) は、*ALDH2* のバリエーション型 (Lys504 アレル) をホモで持つ場合著しく重症化するため、内因性アルデヒドによるゲノム損傷の修復不全と考えられる (Hira et al. Blood 2013)。一方、今回発見したこれらの患者は FA 遺伝子異常を持っておらず、細胞内代謝によって産生されるアルデヒド分解浄化機能の低下によるゲノム損傷蓄積 (修復可能なレベルを超えた蓄積) によって発症すると理解され、FA とは鏡像的な位置づけとなる可能性がある (表 1)。本研究の目的は、このアルデヒド分解酵素遺伝子欠損による小児遺伝性血液疾患の病態解析と、アルデヒド分解酵素群のゲノム維持における分子機構の解明にある。

【方法】同定した患者 2 名の初代繊維芽細胞から倫理委員会の承認を得て iPS 細胞化を行い、疾患 iPS 細胞を樹立し、*ADH5* 遺伝子で相補した。健常人 iPS 細胞からのゲノム編集による iPS ノックアウトも試みた。これらの細胞を用いて *in vitro* コロニー法によって造血系へ分化誘導を行った (京大 CiRA, 中畑研究室, 斉藤准教授に指導を受けた)。リンパ球由来細胞株やがん細胞株を用いて、ゲノム編集による *ALDH2* および *ADH5* の遺伝子破壊を行いモデル系として解析した。

【結果】同定された 6 例の患者は *ALDH2*Lys504 アレルを必ず伴っており、本症は *ADH5* 単独欠損によるものではなく、複合型欠損症であることが示唆される。*ADH5* 単独変異による発症も完全には否定できないが、*ADH5* 単独で変異を持った個人は今まで発見できず、本疾患の発症メカニズムを確立するには、インビトロでの病態再現が必須である。そこで、患者由来 iPS 細胞をインビトロで造血系へと分化させたところ、*ADH5* の相補によって、コロニー形成能が著しく改善した。また、健常人由来 iPS 細胞から作成した *ADH5* と *ALDH2* の単独ノックアウトでは CD45 陽性細胞への分化に問題なく、*ALDH2*^{+/+}*ADH5*^{-/-} および *ALDH2*^{-/-}*ADH5*^{-/-} では低下が観察された。我々は、B 細胞株 BL2、大腸がん細胞株 HCT116、白血病細胞株 K562、ハプロイド細胞株 HAP1 等を用いて、*ALDH2*^{-/-}*ADH5*^{-/-} ダブルノックアウト細胞を作成した。いずれにおいても増殖の低下や細胞周期停止などは見られず、強いホルムアルデヒド感受性が認められた。HAP1 細胞において、姉妹染色分体交換 (SCE) を測定したところ、通常培養条件で野生型、*ADH5*^{-/-}、*ALDH2*^{-/-}*ADH5*^{-/-} を比較して SCE レベルの上昇はなく、0.5 μM のフォルムアルデヒド添加によって *ALDH2*^{-/-}*ADH5*^{-/-} において明確な SCE 上昇を認めた。正常人血液中のフォルムアルデヒド濃度が 50~100 μM と報告されていることを考えると、培養細胞ではほとんどフォルムアルデヒドの産生は起こっておらず、造血細胞への分化などの状況で初めて *ADH5* と *ALDH2* の要求性が生じると考えられる。これらの結果は、今回発見された患者の造血不全が *ALDH2* の Lys504 アレルとの複合によって発症していることをサポートしている。今後、*ADH5* と *ALDH2* をはじめとしたアルデヒド分解酵素群が、造血分化などの状況下で発生するアルデヒドを分解して造血幹細胞を維持する分子機構を明らかにしていきたい。

遺伝子型と表現型の関係

FA 遺伝子	ALDH2	ADH5	表現型
-/-			ファンコニ貧血 (FA)
-/-	AA		重症型 FA
	AA		健常 (エタノール不耐性)
		-/-	健常? (症例発見できず)
	AA	-/-	症例発見できず
	GA	-/-	BMF/MDS, 精神発達遅延
	AA	+/-	健常

空欄は遺伝子が野生型であることを示す。

G, Glu504 allele; A, Lys504 allele;

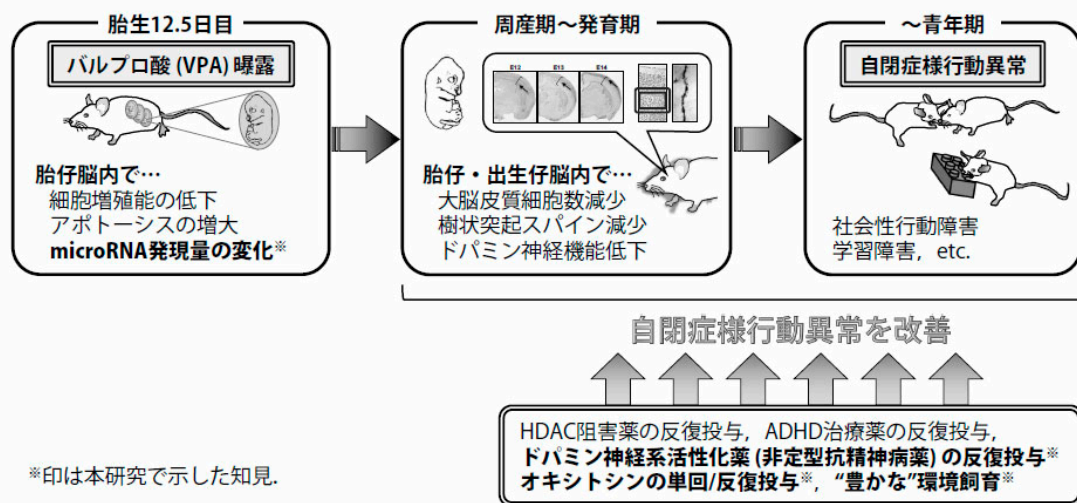
BMF, bone marrow failure; MDS, myelodysplasia

【目的】 自閉症は、社会的なコミュニケーションの障害、興味の限定・反復的な常同行動を主徴とする発達障害の1つである。近年、自閉症は遺伝的要因と環境要因相互作用により発症することが明らかとされ、双生児を対象とした疫学調査において、環境要因の占める割合は55%にのぼると算出されている (Arch. Gen. Psychiatry, 2011)。また、母親の妊娠中のウイルス感染や薬物摂取によって自閉症の発症リスクが増大することが示され、胎生期・周産期の環境要因についても、広義の意味で、自閉症発症に関わる生物学的環境因子として考えられるようになった。バルプロ酸 (VPA) は、てんかんの治療をはじめ幅広く臨床応用されている薬であるが、妊娠期の服用による催奇形性や出生児の自閉症発症リスクの増大が知られている (JAMA, 2013)。我々は、胎生 12.5 日目に VPA を曝露したマウスの行動学的、神経組織学的解析を進め、自閉症モデルマウスとしての有用性を示してきた (Hara et al., J. Pharmacol. Sci. 118: 543-546, 2012; Kataoka et al., Int. J. Neuropsychopharmacol. 16: 91-103, 2013; Takuma et al., Pharmacol. Biochem. Behav. 126: 43-49, 2014 他)。本研究では、胎生期 VPA 曝露マウスを用いて、自閉症の病態分子基盤の解明と新規治療法の開発を目的とした。

【方法】 動物は妊娠 12.5 日目に VPA 500 mg/kg を腹腔内投与した ICR 系マウス由来の胎仔および出生仔を用いた。対照群として生理食塩水を投与した妊娠マウス由来の胎仔および出生仔を用いた。mRNA および microRNA の発現量変化は胎仔全脳由来の標品を用いて行った。また、8 週齢時に、行動学的解析および Golgi 染色法により樹状突起スパイン密度変化の解析を行った。環境強化飼育は、4 週齢時より 4 週間実施した。

【結果】 胎仔脳での解析において、VPA 曝露後 2-12 時間に microRNA である miR-132 の発現量が増加すること、また miR-132 の抑制標的分子である MeCP2 および p250GAP の mRNA 量が、それぞれ VPA 曝露 6 および 24 時間後に減少することを明らかとした。非定型抗精神病薬であるリスペリドンならびにアリピプラゾールの慢性投与が、胎生期 VPA 曝露マウスの社会性行動障害や認知機能障害を改善させ、前頭前皮質の樹状突起スパイン密度の低下も回復することを見だし、定型抗精神病薬であるハロペリドールはこのような改善効果を示さないことを明らかとした。また、オキシトシンの単回投与により、胎生期 VPA 曝露マウスの社会性行動障害が改善されることを見いだした。さらに、発育期の環境強化飼育が、胎生期 VPA 曝露マウスの自閉症様の異常行動を改善すること、ならびに胎生期 VPA 曝露マウスの脳海馬領域で認められたシナプス関連分子である PSD-95 および Shank2 の mRNA 量の低下を改善することを見いだした。

胎生期バルプロ酸曝露マウスにおける自閉症様行動の発現分子機序とその制御

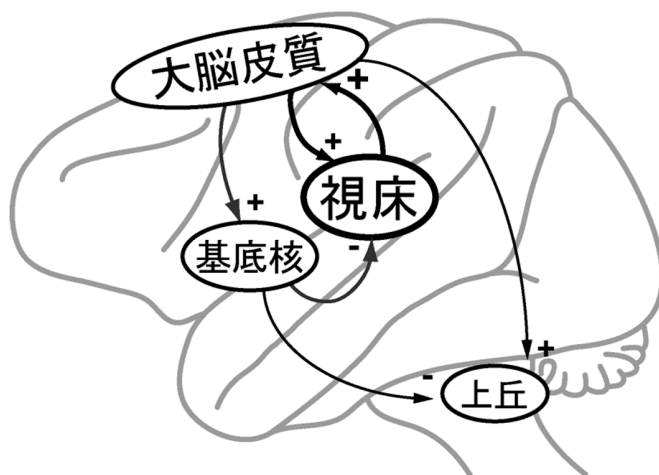


【目的】 脳基底核ループの中で視床は単なる中継核とみなされてきた。しかし最近、大脳皮質からの興奮性入力と大脳基底核からの抑制性入力が見られることが鳥のさえざり学習において重要であることが示唆されている。本研究では、サルの運動性視床でみられる課題関連活動への皮質性入力の関与を光遺伝学的手法を用いて調べる。脳基底核ループの動作原理の一端を明らかにし、疾患時の病態生理の理解に貢献できる。

【方法】 眼球運動課題を訓練したニホンザルの補足視野に、CMV プロモータ下で光感受性塩素イオンポンプ（ハロロドプシン、NpHR3.0）を発現する順行感染性のアデノ随伴ウイルスベクター（AAV2）を接種した。回復を待って、視床からの神経活動記録を開始した。行動課題としては、視床の関与が示されている時間生成課題を用いた。ベクター接種から約 1 か月後より単一ニューロン活動の記録中に光刺激を行い、皮質からの入力を終末で抑制した際の課題関連活動の変化を調べた。

【結果】 多くのニューロンでは、照射によって課題非関連のベースライン活動に変化を認めなかった。一方、一部のニューロンでは、サッカドに関連した応答に明らかな変化が見られ、運動方向選択的に活動が低下するものや、逆に活動が上昇するものなど様々であった。これらのことから、皮質視床経路は視床におけるゲイン調節に関与していることが示唆された。その詳細を調べるため、複数個体からのデータ収集を進めている。

大脳基底核ループと運動性視床

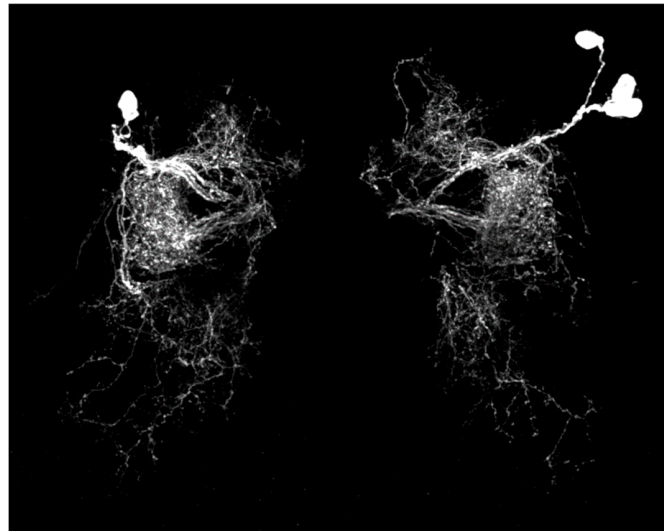


【目的】 物事の価値を的確に評価し判断することは、将来の行動を決定するのに重要な脳機能であり、その破綻は現実離れした「楽観・悲観主義」に繋がる。食欲や睡眠欲など、さまざまな欲求が満たされるとき、私たちヒトを含むさまざまな動物種の脳内では、ドーパミンと呼ばれる神経伝達物質が細胞外に放出される。すなわち、特定の脳部位でのドーパミン量の増加が脳内の報酬を伝達する。ドーパミン神経の活動を調節する回路メカニズムを同定することは、報酬量の適切な制御メカニズムを明らかにする上で重要である。

【方法】 GAL4 /UAS システムを用いて、報酬情報を伝達する PAM クラスターと呼ばれるドーパミン神経細胞群に存在する標的細胞を人工的に活性化・不活性化することで、匂い学習での影響を測定した。また、その細胞種にカルシウムセンサーを発現し、神経活動のライブイメージングを行った。

【結果】 本研究では、刺激の無い状態でも自発的に活動しているドーパミン神経を同定し、その活動の一過的な減少が報酬シグナルとなることを突き止めた。さらにこの神経細胞の活動が、ハエの空腹が満たされた時や「満腹感」に関係するホルモンによって、一過的に抑制されることを見出した。本成果は、報酬伝達におけるドーパミンの役割の多様性と、ドーパミン神経の「定常状態」の機能的意義を明らかとし、価値判断を制御する細胞生物学的機構の一端に貢献した。

自発活動の抑制によりドーパミンの定常放出が減少し報酬を伝達する神経細胞

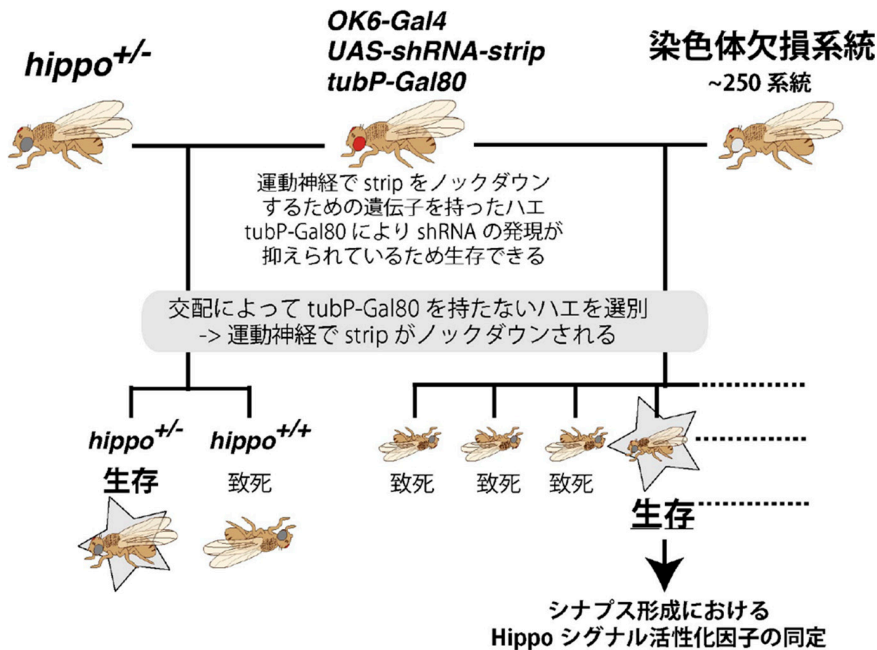


【目的】 がん抑制シグナル経路として知られる Hippo シグナル経路は、個体発生やがん形成に重要な役割を果たす。近年、Hippo シグナル経路の構成因子の同定・解析は爆発的に進み、その主要構成因子が続々と単離・解析されてきた。しかし、Hippo シグナル経路に関する研究の殆どは上皮系細胞の増殖・細胞死に関する研究であり、神経細胞における Hippo シグナル経路の機能は殆ど分かっていない。このような状況において私は「Hippo シグナル経路が神経においても機能する可能性」を見出すことに成功していた (Nat Commun 5, 5180, 2014)。具体的には、進化的に保存された Hippo キナーゼ活性の抑制因子 Strip が神経シナプス部位に局在しシナプス形態を制御していることを見出していた。よって本研究では、Hippo シグナル経路による神経機能調節メカニズムの解明を目指した。

【方法】 本研究ではモデル生物としてショウジョウバエを用いた。まず、神経系における Hippo シグナル経路に関わる因子の遺伝学的探索を行った (遺伝学的スクリーニング：下図)。更に得られた候補因子に関して遺伝学、個体行動解析を行うことで、神経系における Hippo シグナル経路の作動基盤解明を目指した。

【結果】 ショウジョウバエゲノム 77%をカバーするゲノム欠損系統セットを用いた遺伝学的スクリーニングを行うことで、進化的に保存されたアミノ酸トランスポーター-HiAT (Hippo-interacting Amino acid Transporter) が hippo シグナルと遺伝学的に強く相互作用することを見出した。これまで数多くの Hippo シグナル経路に関する遺伝学的スクリーニングが行われてきたが、HiAT は発見されていない。これは本スクリーニングを神経系で行った成果であろうと考えられる。また、Hippo キナーゼおよび HiAT は個体活動量に影響を与えることも明らかになった。今後は HiAT の解析を更に進めることにより、神経系における Hippo シグナル経路の生理機能が明らかになると期待される。

神経系における Hippo シグナル経路関連因子の遺伝学的スクリーニング

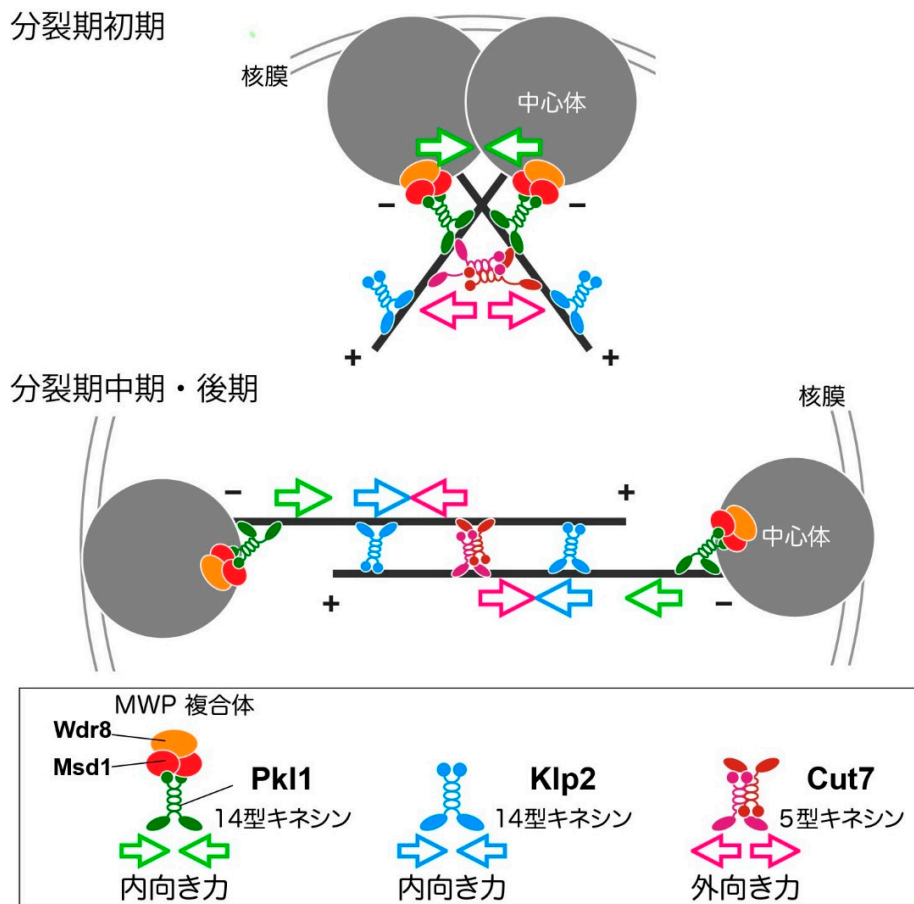


【目的】 微小管は、細胞内小器官である中心体を核として重合する細胞骨格で、染色体分配、細胞運動、タンパク質輸送等に重要な役割を担う。本研究では、微小管を中心体に係留するアンカー因子・MWP 複合体に関して、その制御機構の解明と生物学意義の統合的理解を研究目的とした。またヒト 14 型キネシンに対する特異的阻害剤探索を可能とする、酵母細胞を使ったアッセイ系の開発も目指した。

【方法】 遺伝学が容易な分裂酵母を用いた。また *in vitro* 生化学的実験には、大腸菌で産生、精製したタンパク質を使用した。

【結果】 MWP 複合体は中心体に存在し、微小管末端を中心体に係留する役割を担う。その際、構成サブユニットであるマイナス端方向性 14 型キネシン Pkl1 が、微小管に対して内向き力を付与する。本研究では、別の 14 型キネシン Klp2 が Pkl1 とは独立に、しかし協調的に内向き力を生み出すことを発見した。細胞内では Klp2 は MWP 複合体/Pkl1 とは異なり、微小管上に存在する。すなわち双極性紡錘体は、Pkl1 と Klp2 という 2 つのマイナス端方向性キネシンの時空間的共同作業によって、その形態が維持されることが半明した。さらにこれら内向き力は、プラス端方向性の 5 型キネシン Cut7 が生み出す外向き力と相反的に作用することも示した。以上の結果から、紡錘体微小管は方向性の異なるキネシン分子が生み出す相反する 2 つの力バランスによって、その構造が構築・維持されることが明らかになった。

分裂酵母微小管アンカー因子と双極性紡錘体構造の構築機構

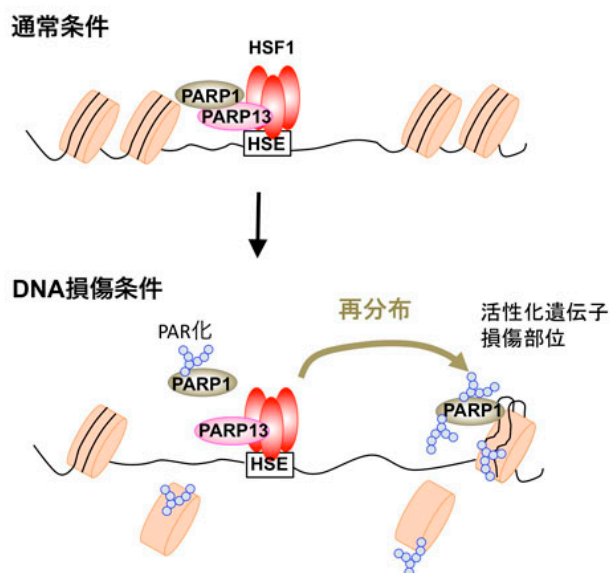


【目的】細胞はタンパク質や核酸などの細胞構成成分の恒常性を維持することによりその健全状態を保つ。様々な環境および代謝変化によるその破綻に対処するために、細胞は巧みな仕組みを進化させてきた。その一つである DNA 損傷応答は、様々なシグナルタンパク質の働きにより、最終的には DNA 傷害を修復し、DNA 複製を促進する適応機構である。その中でも、ポリ ADP リボシル化酵素 1 (PARP1) は、DNA 傷害部位へ最初集積して DNA 修復を促進し、さらに活性化された遺伝子座にも局在して転写を促進することが知られている。しかし、DNA 損傷時に PARP1 が DNA へ再分布する機構については不明であった。

【方法】我々は、HSF1 と複合体を形成する PARP 群を GST プルダウン法や共免疫沈降法などを用いて検索した。さらに、その複合体の存在下および非存在条件下での DNA 修復を相同組換えレポーターなどを用いて調べた。また、DNA 損傷誘導性遺伝子発現は DNA マイクロアレイ法や RT-qPCR 法などで調べた。その際の HSF1 や PARP 群のゲノム上での局在は、ChIP 法および ChIP-seq 法などで明らかにした。

【結果】我々は、タンパク質恒常性調節の鍵因子である熱ショック転写因子 HSF1 が、PARP13 を介してあらかじめ PARP1 をゲノムに留めておくことを見出した。DNA 損傷ストレスにより、活性化されて自己 PAR 化された PARP1 は HSF1-PARP13 から解離し、DNA 損傷部位および DNA 損傷誘導性遺伝子座へ再分布した。HSF1-PARP13-PARP1 複合体形成を阻害すると、DNA 損傷時の PARP1 の再分布は抑制された。同時に、遺伝子発現誘導と DNA 修復は低下した。さらに、この三者複合体形成と PARP1 の再分布は、DNA 損傷から細胞を保護するだけでなく、PARP 阻害剤感受性の BRCA1 欠損乳がん細胞の増殖と腫瘍形成を促進した。以上の結果は、HSF1 がゲノム恒常性の調節因子であることを示し、この役割が特定の乳腺腫瘍形成に寄与することを明らかにした。

DNA 損傷ストレスによる HSF1 を介する PARP1 再分布のモデル

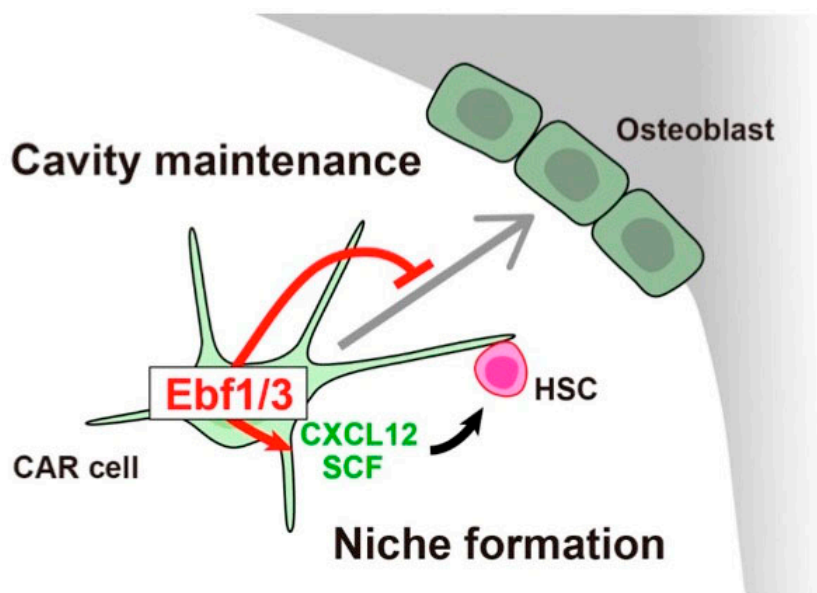


【目的】 骨髄で造血幹細胞や造血前駆細胞が接着し、その維持に必須の限局した微小環境はニッチ (niche) と呼ばれる。私たちは、造血幹細胞の維持、免疫担当細胞の産生に必須である CXCL12 を高発現する長い細胞突起を持った間葉系細胞 (CAR 細胞) が CXCL12 と SCF の主たる産生細胞で、造血幹細胞・前駆細胞ニッチを構成することを証明した。また、転写因子 Foxc1 が CAR 細胞特異的に発現し、造血幹細胞・前駆細胞ニッチの形成と維持に必須であることを明らかにしたが、Foxc1、CXCL12、SCF のみで CAR 細胞による造血支持の機構を説明できず、未知の分子機構の解明を研究目的とした。

【方法】 成体の CAR 細胞で Foxc1 の欠損により発現量が変化する遺伝子のうち転写因子に注目し、生体での役割を検討した。

【結果】 転写因子 Ebf3 が CAR 細胞で特異的に発現することを明らかにし、Ebf3 発現細胞を一過性に標識できるマウスを作製し、CAR 細胞が骨髄の間葉系幹細胞であることを証明した。次に、CAR 細胞特異的 Ebf3 欠損マウスを解析したところ、26 週令で造血幹・前駆細胞数が約半分に減少し、90 週令では、骨髄で骨棘が著増し、重度の大理石病症状を呈していた。半減した骨髄腔に残存した CAR 細胞は、骨芽細胞への分化が亢進しており、骨髄腔あたりの造血幹・前駆細胞数が著減し、造血幹・前駆細胞ニッチが障害されていた。以上より、CAR 細胞特異的に発現する Ebf3 が、老齢マウスにおいて CAR 細胞の骨芽細胞への分化の抑制と、造血幹・前駆細胞ニッチの維持に必須であることが明らかになった。これより、CAR 細胞は、造血幹・前駆細胞ニッチの維持に必須の 2 つの転写因子 (Foxc1、Ebf3) を特異的に高発現する骨髄特有の間葉系幹細胞であることが示された。

Ebf3 は CAR 細胞特異的に発現し、造血幹細胞・免疫細胞ニッチを維持し、CAR 細胞の骨芽細胞への分化を抑制する



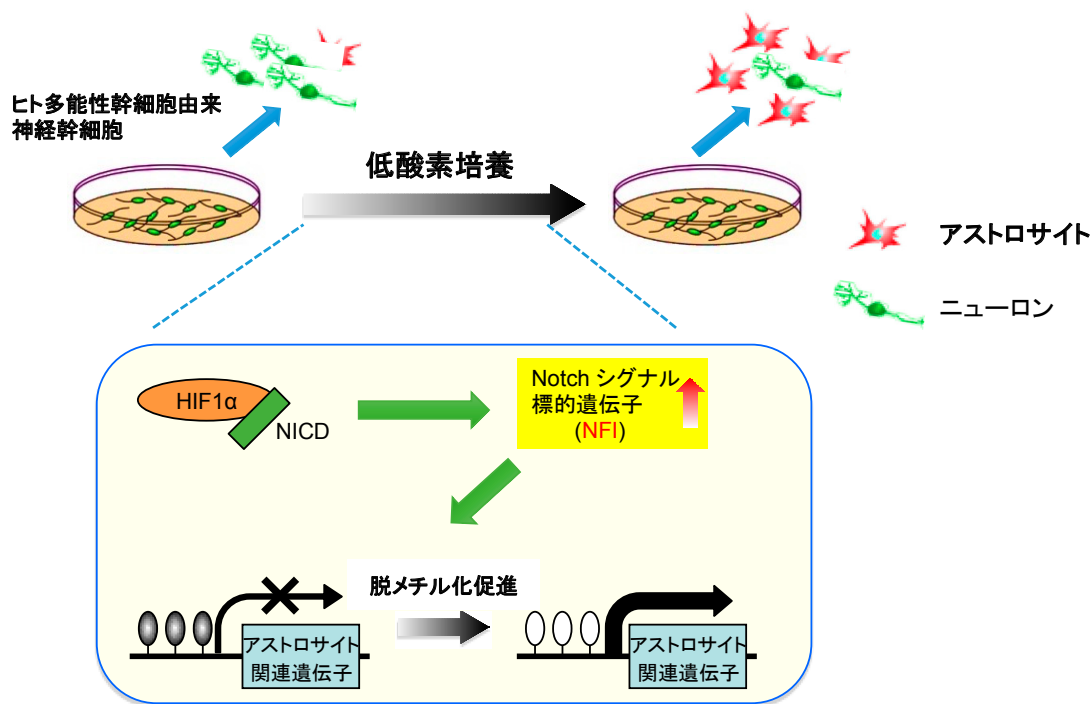
Seike, M. *et al.*, *Genes Dev* 2018

【目的】 ヒト多能性細胞由来神経前駆細胞は強いニューロンへの分化傾向を示し、アストロサイトやオリゴデンドロサイトといったグリア細胞への高率な分化誘導には長期間の培養が必要であり、その多分化能獲得の制御機構はこれまで不明であったため、グリア細胞研究の発展の障害の一つとなってきた。

【方法】 本研究グループはヒト iPS 細胞由来神経幹細胞の酸素濃度による分化傾向の変化を細胞・分子生物学的に捉えることにより、低酸素誘導因子 (hypoxia-inducible factor 1 α : HIF1 α) と Notch シグナルの協調的な働きによって、アストロサイト特異的遺伝子プロモーター領域の DNA 脱メチル化をきたし、アストロサイト分化能が獲得されることを見出した。

【結果】 このエピジェネティックな遺伝子発現制御機構を応用し、レット症候群患者由来ヒト神経前駆細胞の早期のアストロサイトへの分化誘導を行い、レット症候群患者由来アストロサイトがニューロンの発達を阻害することを発見した。

低酸素培養によるヒト神経幹細胞の多分化能獲得



57 酸化ストレスによるミクログリア活性化機構の解明

中別府 雄作

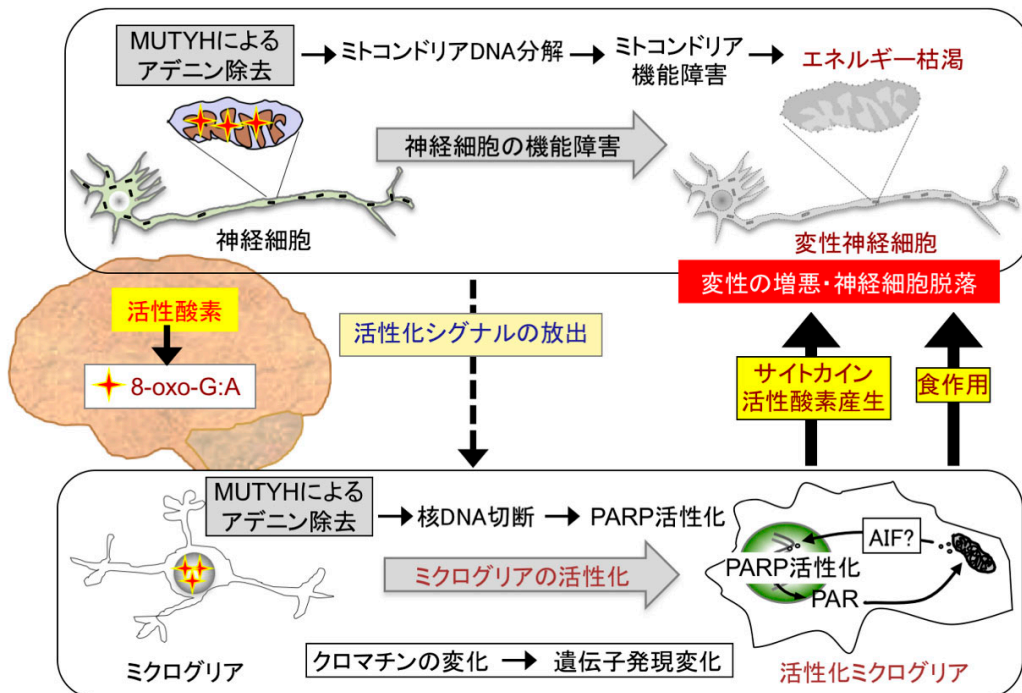
【目的】アルツハイマー病 (AD) をはじめとする様々な神経変性疾患の発症と進行においてミクログリアの活性化が神経炎症応答の 1 つとして注目されている。酸化ストレスがミクログリアの活性化に重要な役割を果たすことから、レドックス制御を受ける AP-1 や NF- κ B によるミクログリア特異的な遺伝子発現の誘導機構に注目した研究が展開されている。しかし、これまでの研究ではミクログリアの活性化に至る酸化ストレスに由来するシグナルは不明であり、ブラックボックスであった。我々は、炎症反応により生成される活性酸素がミクログリアのゲノム DNA の酸化を介して、ミクログリアの活性化を引き起こすという仮説を提唱している。

本研究では、この仮説を証明する目的で、活性酸素に由来するシグナル候補として DNA 中に蓄積した酸化塩基「8-オキシグアニン」に注目し、そのミクログリアの活性化への関与と活性化の分子機構を解明することを目指した。

【方法】本研究では、8-オキシグアニン (8-oxoG) のゲノム DNA 中への蓄積がミクログリアの活性化にどのような影響を及ぼすのか、8-oxoG のゲノム DNA 蓄積を抑制する 2 つの遺伝子 (MTH1、OGG1) の欠損をアルツハイマー病モデルマウスに導入し、個体レベルでの行動・病態解析、脳組織の分子病理学的な解析を中心に行った。

【結果】ヒト由来の *APP^{Swe}* と *MAPT^{P301L}* トランスジェン、マウスの *Psen1^{M146V}* 変異を持つトリプルトランスジェニック AD モデル (3xTg-AD) マウスに MTH1 と OGG1 の二重欠損を導入すると、生後 4~5 ヶ月齢で短期および長期記憶保持能の低下を認め、さらに顕著な学習能の低下を示した。また、ミクログリアの核ゲノム DNA 中の 8-oxoG の蓄積が顕著に増加し、その結果ポリ ADP リボース・ポリメラーゼ (PARP : poly [ADP ribose] polymerase) の活性化、核内タンパク質のポリ ADP リボシル化 (PAR : poly ADP-ribosylation) をともなって、ミクログリアの慢性的な活性化と神経細胞の脱落を引き起こし、AD 病態の悪化を加速するということが明らかになった。ミクログリアの阻害剤、ミノサイクリンの長期投与によりミクログリアの活性化を抑制すると、8-oxoG の蓄積、核内タンパク質のポリ ADP リボシル化 (PAR) が抑制され、神経細胞の脱落と認知機能の障害も改善した。

8-オキシグアニンのゲノム DNA 蓄積によるミクログリアの活性化と神経変性のモデル

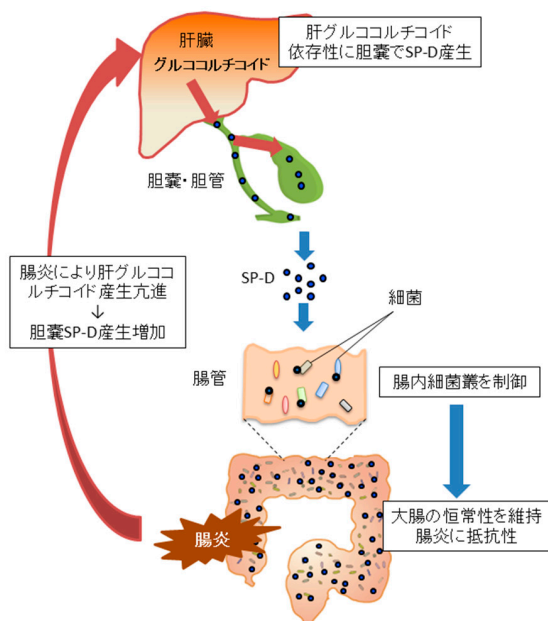


【目的】 サーフアクトンタンパク D (SP-D) は、肺胞上皮細胞から主に分泌される抗菌タンパクとして呼吸器系の感染病原体の排除に貢献していることが知られている。しかし、他の臓器における SP-D の役割は知られていない。そこで、SP-D の消化器系臓器での役割を検討することを目的として本研究を行った。

【方法】 臓器及び培養細胞の SP-D 遺伝子 (*Sftpd*) 発現の検討には quantitative RT-PCR (qRT-PCR) 法を用いた。胆汁、培養上清中の SP-D 濃度は ELISA にて行った。糞便中の SP-D の検出には、免疫沈降後ウェスタンブロット法にて行った。腸内細菌叢および SP-D 結合細菌の解析には、細菌 16S リボソーム RNA 解析により行った。SP-D の腸内細菌への結合性の検討では、糞便より採取した細菌を抗 SP-D 抗体と蛍光標識二次抗体で染色し、フローサイトメトリー解析を行うと同時に、セルソーターを用いて SP-D 結合細菌と非結合細菌を分離採取した。SP-D による *Lactobacillus murinus* の増殖抑制の検討には、MRS broth 中にリコンビナント SP-D を添加し、CTC アッセイにて生菌数を測定した。デキストラン硫酸塩 (DSS) 誘導性大腸炎は、野生型マウス、SP-D 欠損 (SP-D^{-/-}) マウス、または、これらのマウスの糞便を経口投与した無菌マウスに 3~3.5% DSS を飲水に入れて 7~9 日間投与し誘導した。疾患活動性スコア (DAS) は、体重変化、糞便性状をもとに決定した。各臓器のコルチコステロイド濃度の検討には、臓器ホモジナイズの上清あるいは組織培養上清を用い ELISA 法で測定した。

【結果】 消化器系臓器の中では特異的に胆嚢で SP-D が産生され、胆汁を介して消化管内へ分泌されていた。SP-D^{-/-} マウスでは、野生型マウスと比べて腸内細菌叢が変化しており、*Clostridia* IV 群や XIVa 群に分類される数種の細菌が減少し、*L. murinus* が著しく増加していた。細菌フローサイトメトリー解析により、腸内細菌中の *L. murinus* は SP-D と直接結合していることが判明した。実際 *in vitro* では SP-D が *L. murinus* の増殖を抑制することを見出した。さらに、SP-D^{-/-} マウスでは、DSS 誘導性腸炎に対する感受性が增強していたこと、また、SP-D^{-/-} マウスあるいは野生型マウスの糞便を投与した無菌マウスで DSS 誘導性腸炎を誘導すると、SP-D^{-/-} マウス糞便を投与したマウスで大腸炎が有意に重篤になったことから、SP-D が腸内細菌叢を制御し腸管恒常性維持に貢献していることが示された。一方、大腸炎においては、肝臓におけるグルココルチコイドの産生が亢進し、それにより胆嚢における SP-D の発現が高まることを見出した。一連の結果から、“肝-胆嚢-腸内細菌叢を軸とした SP-D による腸管恒常性の維持機構”が存在することが示唆された。

肝-胆嚢-腸内細菌叢を軸とする SP-D による恒常性維持機構

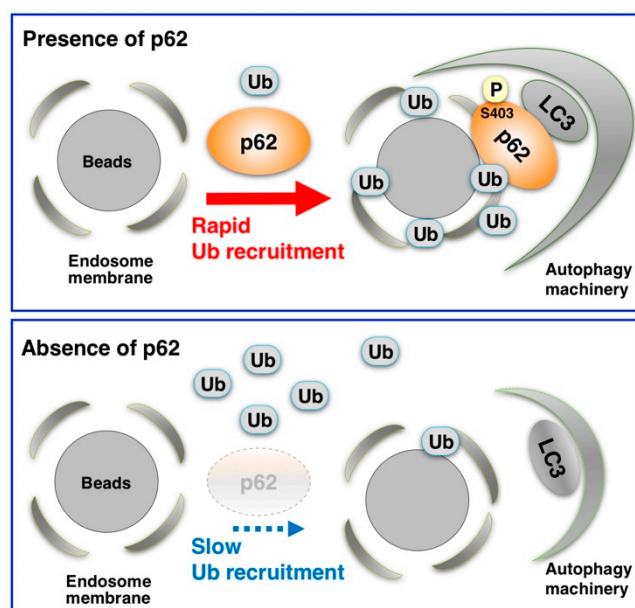


【目的】細菌感染やウイルス感染を受けた場合には、それら外来の“異物”を迅速に捉え、排除することが、細胞の生存に極めて重要なことである。そのような細胞内“免疫”機能のひとつとして、オートファジーがあげられる。一方、遺伝子治療を行いたい場合や、効率よく遺伝子導入を行いたい場合には、目的の外来DNAを何らかの方法で細胞内（とりわけ核内）に入れる必要がある。しかし、非ウイルスベクターを用いたトランスフェクションでの外来DNAの挙動や、細胞応答についての知見はほとんどなく、試薬・方法開発上の問題となっていた。本研究は、外来DNAの細胞内での挙動を明らかにし、外来遺伝子侵入を阻もうとする細胞の仕組みを解明しようとするものである。

【方法】人工ビーズ（直径約3 μm、磁気ビーズ）に、エフェクター分子としてDNA（約8 Kbp）を結合させたもの（DNAビーズ）あるいは結合していないビーズに、pH指示薬であるpHrodoを結合させ、トランスフェクション試薬（Effecteneなど）を用いて細胞内に導入した。ビーズを入れる細胞として、GFP-Ubwt（ubiquitin、野生型）を恒常的に発現するマウス胚線維芽細胞（MEF）およびp62ノックアウトマウス胚線維芽細胞（p62-KO MEF）、GFP-LC3とmCherry-Ubwt（野生型）恒常的に発現するp62ノックアウト胚線維芽細胞（p62-KO MEF）などを用いた。これらの細胞に、人工ビーズを導入し、生きたままの状態、蛍光顕微鏡を用いて経時観察を行った。必要に応じて、蛍光観察した同一細胞およびビーズを、電子顕微鏡を用いて観察した。

【結果】GFP-Ubwtを発現するMEF細胞にビーズを導入したところ、エンドソーム膜破裂後（pHrodoシグナル消失後）に、GFP-Ubwtのシグナルが集積するのが観察された。ユビキチン化に要する時間（約3分）は、GFP-LC3が集積する時間（約8分）より短く、ユビキチン化がオートファジーの隔離膜形成に先行して起こることが分かった。p62をノックアウトしたMEF（p62-KO/GFP-Ubwt MEF）細胞にビーズを導入したところ、エンドソーム膜破裂後のユビキチンのビーズへの集積は、約10分まで遅延した。マウスp62の405番目のセリン残基（ヒトでは403番目）をアラニンに置換した変異体p62（p62S405A）を発現させると、p62活性は、ノックアウト変異体と同様のレベルまで低下した。それに対して、野生型のp62あるいは405番目のセリン残基をリン酸化状態に近いグルタミン酸（E）にした変異体（p62S405E）を発現させると、正常と同等のレベルに戻った。この結果は、外来DNAの侵入に対して、p62のリン酸化型が、ユビキチン化を迅速化することで異物除去に働くことを示している。

外来DNAの侵入を阻む細胞内免疫としてのp62タンパク質の機能

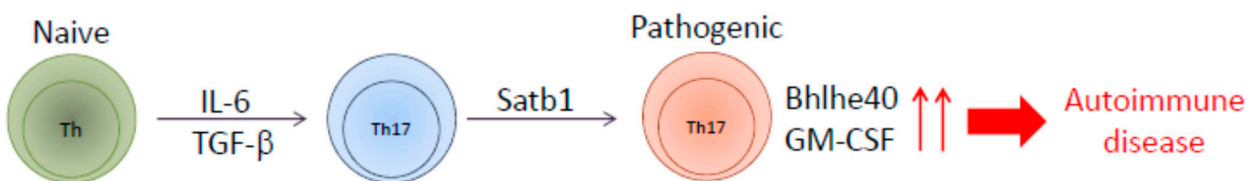


【目的】 Th17 細胞のエフェクターサイトカイン産生の制御機構の解明は、治療法の確立されていない感染症や自己免疫病に対する新規治療法開発に繋がる重要な医学研究課題である。本研究では、炎症性 Th17 細胞における Satb1 による転写制御機構と Pathogenic Th17 細胞誘導の分子基盤の解明を目指した。

【方法】 CD4⁺T 細胞条件的 Satb1 欠損 (*Thpok^{Cre} Satb1^{fllox}*) マウス、Th17 細胞分化後特異的に Satb1 遺伝子が欠損する Th17 細胞条件的 Satb1 欠損レポーター (*IL-17^{Cre} Satb1^{fllox} R26R^{YFP}*) マウスを用いて、Satb1 による Th17 細胞特異的な転写・機能制御機構を解析した。各組織の T 細胞分画の FACS 解析、FACS ソートをおこない、細胞フェノタイプと遺伝子発現解析をおこなった。Experimental autoimmune encephalomyelitis を誘導し、Pathogenic Th17 細胞の機能解析、疾患惹起能を評価した。

【結果】 Satb1 は T 細胞初期分化に必須の因子であるが、Th17 細胞の初期分化および生存・組織遊走に必要な因子ではなかった。Satb1 による Th17 細胞の制御機構は生体内の微小環境の影響を大きく受け、炎症環境下においては Satb1 によって GM-CSF 発現を上昇させた。さらに、Pathogenic Th17 細胞の機能発揮のためには、Satb1 が Bhlhe40 発現を上昇させ、その結果、疾患惹起能を強めた。

Satb1 による Pathogenic Th17 細胞の機能制御機構



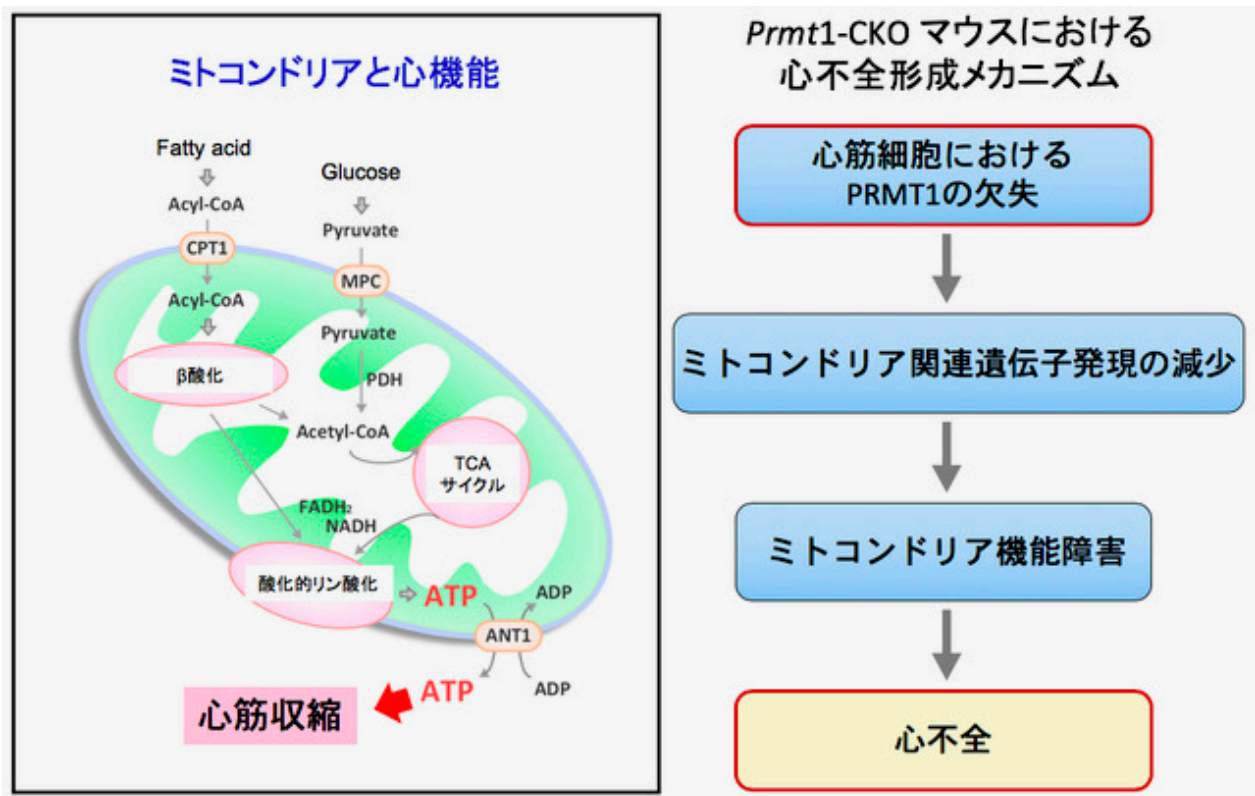
【目的、方法】

PRMT1は、タンパク質のアルギニン残基のメチル化修飾を担うメチル基転移酵素であり、*in vitro*の解析を中心に、遺伝子発現や翻訳などを制御することが知られている。近年、心疾患時の心臓でPRMT1の発現が上昇することが報告されたが、心臓におけるPRMT1の役割や、ミトコンドリア機能に対する生理的意義については不明である。本研究では、心筋細胞特異的な *Prmt1* 欠損 (*Prmt1*-CKO) マウスを作出し、PRMT1が担うアルギニンメチル化の心臓機能やミトコンドリア制御との関連を検討した。

【結果】

Prmt1-CKO マウスは、若齢より心不全を呈し、出産後8週間以内に死亡することが判明した。また、*Prmt1*-CKO マウス心臓の網羅的遺伝子発現解析から、*Prmt1*-CKO マウス心臓では、β酸化、酸化リン酸化やTCAサイクルなど、ミトコンドリア機能に関連する遺伝子の発現が広範囲に低下していることを突き止めた。これら結果から、心筋細胞のPRMT1はミトコンドリア機能関連遺伝子の発現を正に制御することで、心機能を維持し、生後の生存に必須であることが明らかになった。

心筋細胞特異的 PRMT1 欠損による心不全



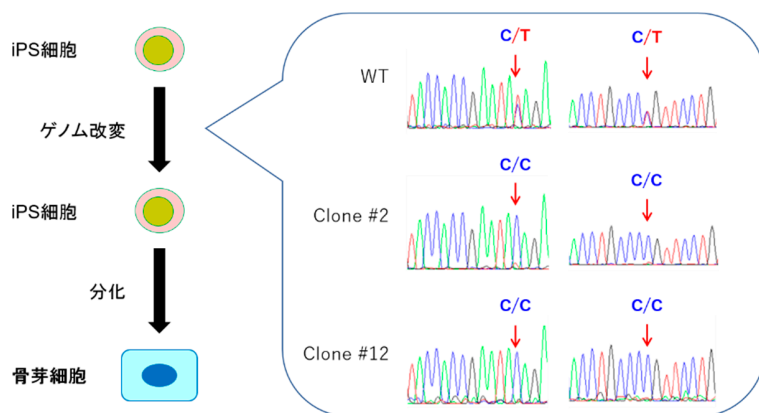
【目的】 骨粗鬆症は、高齢化に伴って罹患者が 1,000 万人に増加しており、骨脆弱性を基盤とした骨折が多発している。骨粗鬆症の発症には遺伝的素因があり、骨粗鬆症に関連した多数の SNPs (一塩基多型) が GWAS で見出されている。しかし、これらの SNPs がどのようなメカニズムで骨粗鬆症の病態発現に関与するのかについてはほとんど明らかになっていない。このようなメカニズムを解明するためには、対象とする SNP のアロタイプのみが異なり他のゲノム配列は同一である細胞のペアを準備し、それらの機能を比較する必要があるが、従来ヒトの細胞ではこのような実験は容易ではなかった。ゲノム改変技術の進歩は、このような細胞のペアをヒトの体細胞でも供給することを可能とした。本研究では、骨密度と強い相関を示す Wls 遺伝子領域の 2 か所の SNPs に着目した。これらの SNPs は、骨芽細胞における Wnt の産生に関与する可能性が考えられるが、Wls SNP と Wnt の制御を結びつける分子機構は不明である。マウスではこの SNP 近傍配列はヒトとは異なるので、ヒト骨芽細胞でなければ解析できない。

そこで Wls 遺伝子領域の 2 か所の SNPs のアロタイプを特異的に改変した骨芽細胞を作出し、上記の分子機構の解明につなげることを目的とした。本研究の成果は、低骨密度型アロタイプを有する骨粗鬆症患者の病態を理解し新しい治療法の創出に繋がるものと期待できる。さらには、患者由来の骨芽細胞にゲノム矯正を施し、骨形成能を増強してから自家移植するという、骨粗鬆症に対する新しい「遺伝子矯正再生治療」につながるも期待される。

【方法】 ヒト iPS 細胞の Wls 遺伝子座のゲノム配列をシーケンシングし、Wls 遺伝子領域の 2 か所の SNPs がヘテロタイプである 1 株を選んだ。この細胞のゲノムを改変し、上記 SNPs が低骨密度型のホモタイプである 2 クロンを樹立した。Wnt 遺伝子、βカテニン遺伝子、および骨芽細胞特異的遺伝子群の mRNA 発現を、real time RT-PCR にて定量解析した。

【結果】 WT、Clone #2、および Clone #12 の 3 種の細胞株それぞれについて、分化誘導前後の Wnt 遺伝子と βカテニン遺伝子の発現を解析したところ、WT に比して Clone #2 では Wnt2 の発現が上昇し Clone #12 では Wnt1 の発現が上昇していた。βカテニン遺伝子の mRNA 発現は、3 種の細胞間で差を認めなかった。分化誘導後の細胞の骨芽細胞特異的遺伝子の発現では、WT に比して、Clones #2 と #12 から誘導した骨芽細胞は、いずれも Runx2 と Osteocalcin、遺伝子の mRNA 発現が有意に低かった。このことから、低骨密度型のアリルをホモに有する細胞では、すくなくともこの誘導条件下においては、骨芽細胞への誘導能が低い、あるいは骨芽細胞としてのフェノタイプが十分でない細胞にしかならな誘導されないことが強く示唆された。Clones #2 と #12 の差異には、エピジェネティックな差異が寄与している可能性があると考えられる。

骨粗鬆症関連 SNPs が病態発現に寄与する機構の解析

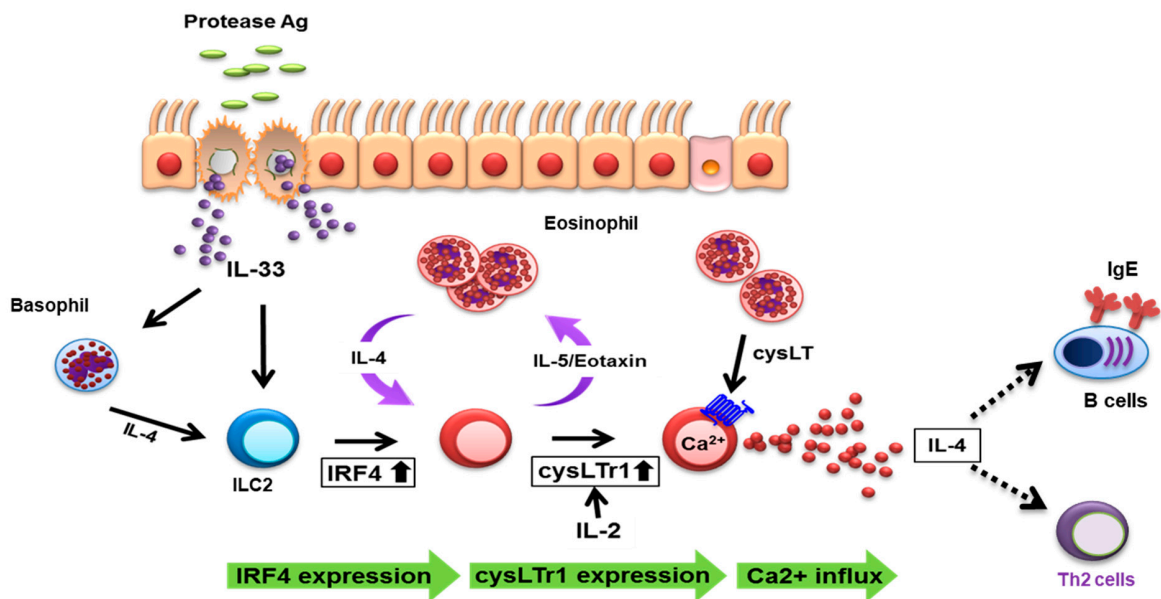


【目的】 6 番目のリンパ球として 2010 年に報告した 2 型自然リンパ球 (Group 2 innate lymphoid cells : ILC2) は、上皮細胞から産生される IL-25 や IL-33 によって多量の 2 型サイトカイン、IL-5、IL-6、IL-13 を産生する。ILC2 の発見は 2 型サイトカインが関与する寄生虫感染機構やアレルギー性疾患発症機構の理解へとつながったが、ILC2 同様に 2 型サイトカインを抗原刺激によって産生する Th2 細胞が IL-5、IL-6、IL-13 に加え IL-4 を産生するのに対し、ILC2 の IL-4 産生は遺伝子発現レベルでは検出されるもののタンパクレベルでの検出は疑問視されてきた。そこで本研究では、ILC2 がどのような状況で IL-4 を産生し、その IL-4 がどのように獲得免疫機構に影響を与えるかについて調べた。

【方法】 本研究では、計画を①ILC2 による IL-4 産生機構の解明と②ILC2 による IL-4 を介した獲得免疫誘導機構の解明に分けて解析を行った。①では ILC2 による IL-4 産生がどのような因子がどの時期に働くかによって起きるかを中心に papain 誘導性喘息モデルマウスを用いて解析した。②では IL-4 によって誘導されることが知られている Th2 細胞の分化と B 細胞による IgE 産生に焦点を当て解析した。

【結果】 本研究から ILC2 は IL-33 によって活性化することで転写因子である IRF4 を発現し、その後 IL-2 刺激が入ることで LTD4 受容体である cysLT₁ を発現することが明らかになった。LTD4 刺激を受けることでカルシウムシグナルが ILC2 内で伝達され、その結果 IL-4 産生が起こる。ILC2 によって産生された IL-4 は Th2 細胞を誘導し、ナイーブな B 細胞を IgE 産生 B 細胞へとクラススイッチさせることが明らかになった。この抗原非依存的な IgE は肥満細胞や好塩基球などの Fcε 受容体に結合し、生存維持に働くことが明らかになった。

ILC2 の IL-4 産生機構と獲得免疫誘導機構

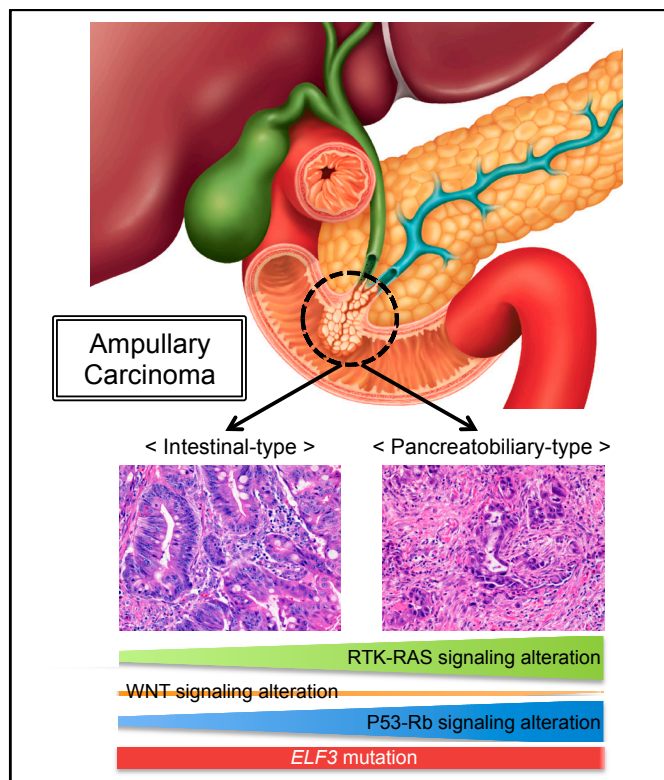


【目的】 膵頭部領域のがんは ①膵臓がん、②胆道がんと③十二指腸部乳頭がんに分けられる。いずれも「難治がん」である。このうち十二指腸部乳頭がん (Ampullary carcinoma) は希少がゆえに、その分子遺伝学的な特徴は不明である。本研究は十二指腸部乳頭がんを研究対象とし、網羅的なゲノム解析により治療標的を探索し、さらに新たな治療薬開発の基盤となるデータを蓄積することを目的とする。

【方法】 日米の多施設から収集した 172 例の十二指腸部乳頭がん患者を研究対象とした。臨床・病理学的な解析に加え、凍結組織 (がん部と非がん部) を研究試料として核酸 (DNA と RNA) を抽出し、全エクソーム解析、コピー数解析、トランスクリプトーム解析等を行う。

【結果】 十二指腸部乳頭がんは組織・形態像と免疫組織化学染色により、腸型 (Intestinal-type) と膵胆型 (Pancreatobiliary-type) に分類することが出来る。臨床・病理学的検討から、腸型が膵胆型と比較して有意に腫瘍径が大きいにもかかわらず、リンパ節転移は膵胆型で有意に多く認められた。全エクソーム解析の結果、24 個の Significantly mutated genes が同定された。そのうち、新規のがん関連遺伝子 *ELF3* を同定した。トランスクリプトーム解析の結果、その遺伝子発現に基づき複数のクラスターに分類できた。本研究で解析した 172 例のうち、約半数 (51%) の症例で治療標的となり得る遺伝子異常を有し、がんの個別化治療への応用が期待された。

十二指腸部乳頭がんの遺伝子異常

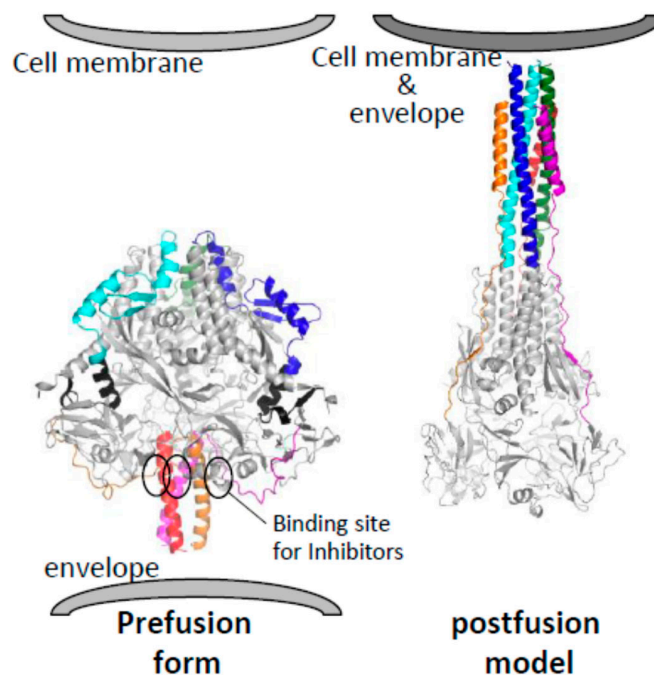


【目的】 脂質二重膜のエンベロープで被われたウイルスは、エンベロープと細胞膜の膜融合を起こすことにより、ウイルスゲノムを標的細胞内に侵入させ、子孫ウイルスを産生する。この膜融合は、エンベロープ上のウイルス蛋白質と細胞膜上の受容体の相互作用によって起こる。本研究では、パラミクソウイルスの膜融合機構、さらにそれに関連して、麻疹ウイルスの神経細胞感染機構、麻疹ウイルスに対する融合阻害剤の作用機構、ムンプスウイルスの受容体構造を解明することを目的とした。

【方法】 ヒト培養細胞を用いて麻疹ウイルス F 蛋白質、ムンプスウイルス HN 蛋白質を発現し、精製・結晶化の後、構造解析を行った。膜融合は、エンベロープ蛋白質の発現によって得られた合胞体の面積を定量することにより行った。レチノイン酸でニューロンに分化させた NT2 細胞に緑色蛍光色素発現組換え麻疹ウイルスを感染させ、感染後のウイルス伝播を蛍光顕微鏡および共焦点顕微鏡で観察した。

【結果】 膜融合に関わる麻疹ウイルス F 蛋白質の結晶構造解析から、融合阻害剤が F 蛋白質 3 量体の head 領域と stalk 領域の境界領域に結合すること、変異を起こすことにより F 蛋白質の構造不安定化と膜融合能の亢進をもたらすアミノ酸残基の多くが同じ境界領域に存在することがわかった。この領域は膜融合の調節に重要な役割を担っていると考えられた。麻疹ウイルスが神経細胞で伝播するには、膜融合能が亢進した F 蛋白質を持つことが重要であった。構造及び機能的解析から、ムンプスウイルスの受容体は末端に $\alpha 2, 3$ 結合型シアル酸を持つ 3 糖であることがわかった。

麻疹ウイルス F 蛋白質 3 量体の膜融合前後の構造変化



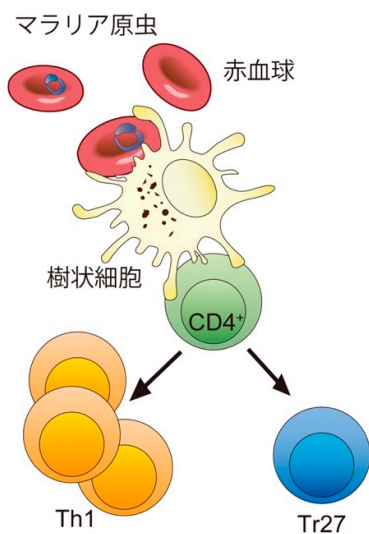
(doi: 10.1073/pnas.1718957115 より引用)

【目的】 マラリア原虫感染では、制御性サイトカイン IL-27 を産生し免疫応答を制御する T 細胞 (Tr27 細胞) が誘導される。この細胞は、マラリア原虫抗原を認識したナイーブ T 細胞が活性化し、一方は Th1 細胞に、もう一方は Tr27 細胞へと分化したものと考えられた。本研究では、マラリア原虫感染マウスから Tr27 細胞と Th1 細胞を分離し、両者の遺伝子発現を網羅的に比較することにより、Tr27 細胞の分化・活性化を特徴付ける遺伝子を抽出することを目的とした。

【方法】 マラリア原虫感染マウスから Foxp3⁻CD11a^{hi}CD49d^{hi}CD4⁺細胞分画をソーティングにより分離し、シングルセルレベルでサイトカイン遺伝子発現を調べ、IL-27 産生細胞と IFN- γ 産生細胞を分離同定した上で、両細胞の網羅的遺伝子発現を比較することにした。当初シングルセルレベルで IL-27 産生を検出することができなかつたため、試験管内で T 細胞を刺激し、その後シングルセル解析を行った。

【結果】 TCR 刺激を加えることにより、シングルセルレベルで T 細胞の IL-27 産生を検出することはできた。しかしながら陽性細胞の頻度が十分に高くなかつたため、蛍光タンパク発現で IL-27 をモニターできるマウスを用い、解析を行うことにした。今後、このマウスを用いてシングルセル解析に進める予定である。研究を進める中で様々な問題に直面し、予定より時間がかかってしまったが、解決の目処はあり着実に成果につなげていきたい。

マラリア原虫抗原を提示された CD4⁺ T 細胞の Tr27 細胞への分化

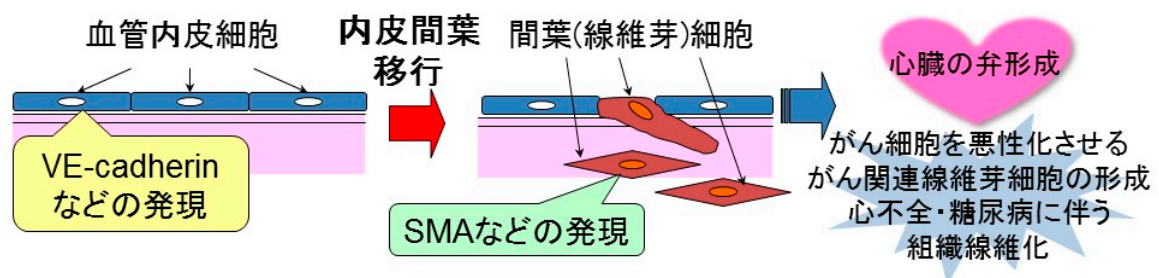


【目的】血管は全身に分布し、組織に酸素や栄養分を供給することで生体の恒常性を維持するために中心的な役割を果たしている。近年、がんや心不全などの病的状態において血管を構成する血管内皮細胞が可塑的に変化し、間葉系細胞へと移行することがあきらかになりつつある。この内皮間葉移行 (Endothelial Mesenchymal Transition: EndMT) は、胎生期の心臓の弁形成において見出された生理的現象であるのみならず、がん・心不全に加えて、糖尿病・動脈硬化など様々な疾患の治療の新規標的として注目を集めている。我々はこれまで transforming growth factor (TGF)- β シグナルが内皮間葉移行を誘導することを報告してきたが、内皮間葉移行を制御する詳細な分子機構についてはいまだ不明な部分が多く、関連疾患の診断や治療を困難なものにしている。そこで本研究においては、内皮間葉移行の詳細な分子機構をゲノムレベルで理解することにより、がん・心不全・糖尿病などの内皮間葉移行により悪性化する疾患の新規診断・治療法を開発することを目的とする。

【方法】マウスならびにヒトの培養血管内皮細胞を用いて、TGF- β による内皮間葉移行の誘導に対する線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) や骨形成因子 (BMP-9) の作用を、 α SMA などの間葉系マーカーの発現を定量的 RT-PCR、Western blotting、細胞免疫染色などの手法により検討した。また、内皮間葉移行を制御する BMP-9 シグナルの腫瘍形成に対する作用を検討するために、BMP-9 受容体である ALK1 の細胞外領域に抗体の Fc 領域を結合したキメラ受容体 (ALK1-Fc) ならびに ALK1-Fc にさらに血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) 受容体の細胞外領域を加えた ALK1FLT1-Fc を作製して、BxPC3 ヒト膵臓がん細胞において発現させたものを免疫不全マウスへ移植した

【結果】マウス血管内皮細胞を用いた解析により、腫瘍血管内皮細胞において発現が高い FGF-2 存在下では TGF- β による内皮間葉移行の誘導は抑制され、FGF シグナルの下流因子である MEK の阻害剤により FGF-2 シグナルを阻害すると内皮間葉移行が亢進することが示された。また、ヒト血管内皮細胞に対して様々な腫瘍組織において発現が高い BMP-9 を加えたところ、複数の間葉系マーカーの発現が上昇すること、そして BMP-9 シグナルを阻害すると血管内皮細胞における TGF- β 受容体の発現が低下することにより、内皮間葉移行の誘導は抑制されることが示された。以上の結果から、がん微小環境におけるさまざまな因子がバランスをとって血管内皮細胞の性質を決定していることが示唆された。さらに、BMP-9 シグナルと VEGF シグナルを同時に抑制する Fc キメラ受容体を発現させた BxPC3 膵臓がん細胞を免疫不全マウスの皮下に移植すると、腫瘍形成が低下することが示された。以上の結果から、内皮間葉移行を標的とした新たながんの治療方法の開発が期待されるという点で本研究成果のインパクトは大きい。

様々な病態の進行における内皮間葉移行の関与

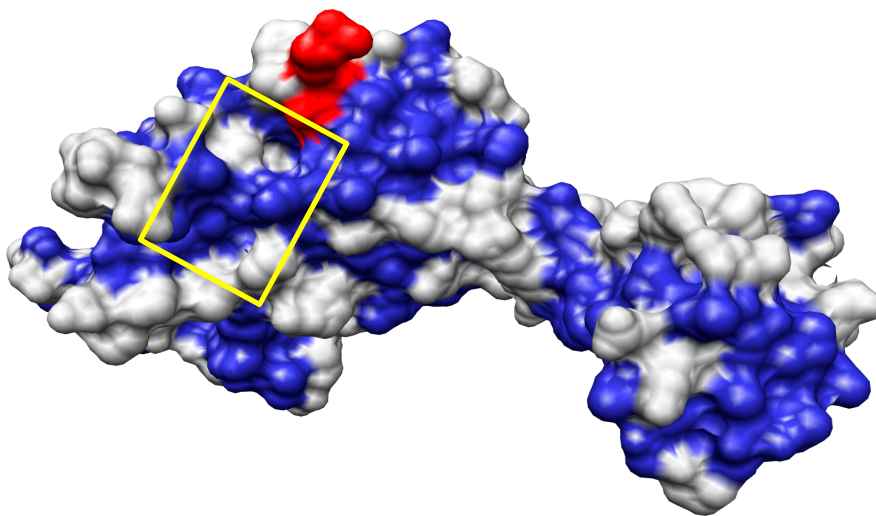


【目的】 本研究は、HIV-1 (HIV) 粒子を形成する構造蛋白である capsid (CA) に結合し、更に CA の自己崩壊 (自壊) を誘導する事で HIV の増殖を抑制する、全く新しい機序を有する抗 HIV 剤の開発を目指すものである。

【方法】 HIV CA 結晶の表面構造を解析する事で CA の標的部位近傍に疎水性 cavity を同定 (下図)、800 万個超の化合物データを基に docking simulation により各化合物と CA 間の結合スコアを計算、良スコアの化合物は購入し抗 HIV 活性を評価した。ELISA や WB により同定抗 HIV 化合物群の CA に対する作用の有無を評価した。また電顕で成熟 HIV 粒子に対する CA 自壊化合物の影響を観察した。欠損変異 CA を作製し CA-化合物間での結合部位の推測を行った。

【結果】 筆者らは上記手法により 40 種超の抗 HIV 化合物を新規に同定した。更に HIV CA に直接作用して著明な蛋白自壊を誘導する事で抗 HIV 作用を発揮する 3 種類の化合物 (CA 自壊化合物) を同定した。成熟 HIV 粒子浮遊液において、CA 自壊化合物の添加により著しい HIV 粒子の形態異常が誘導される事が判明、CA 自壊化合物は HIV 生活環での異なった phases で抗 HIV 作用を発揮する事が示唆された。部分欠損 CA を用いた実験の結果、CA 自壊化合物は CA の N 末端側に結合する事が示唆された。同定した CA 自壊化合物の合成展開を進め、更に同定した CA 自壊化合物に関して特許を出願した。

HIV CA 単量体の表面構造上に同定し、docking simulation の標的とした疎水性 cavity



【目的】我々が発見したトロンボモジュリン (TM) 由来新規血管内皮保護ペプチドを、造血細胞移植後合併症である類洞閉塞症候群 (SOS) 予防薬としての薬事承認を目指した治験に橋渡しするため、現在の候補化合物の中から最終開発化合物を決定することを目的とする。

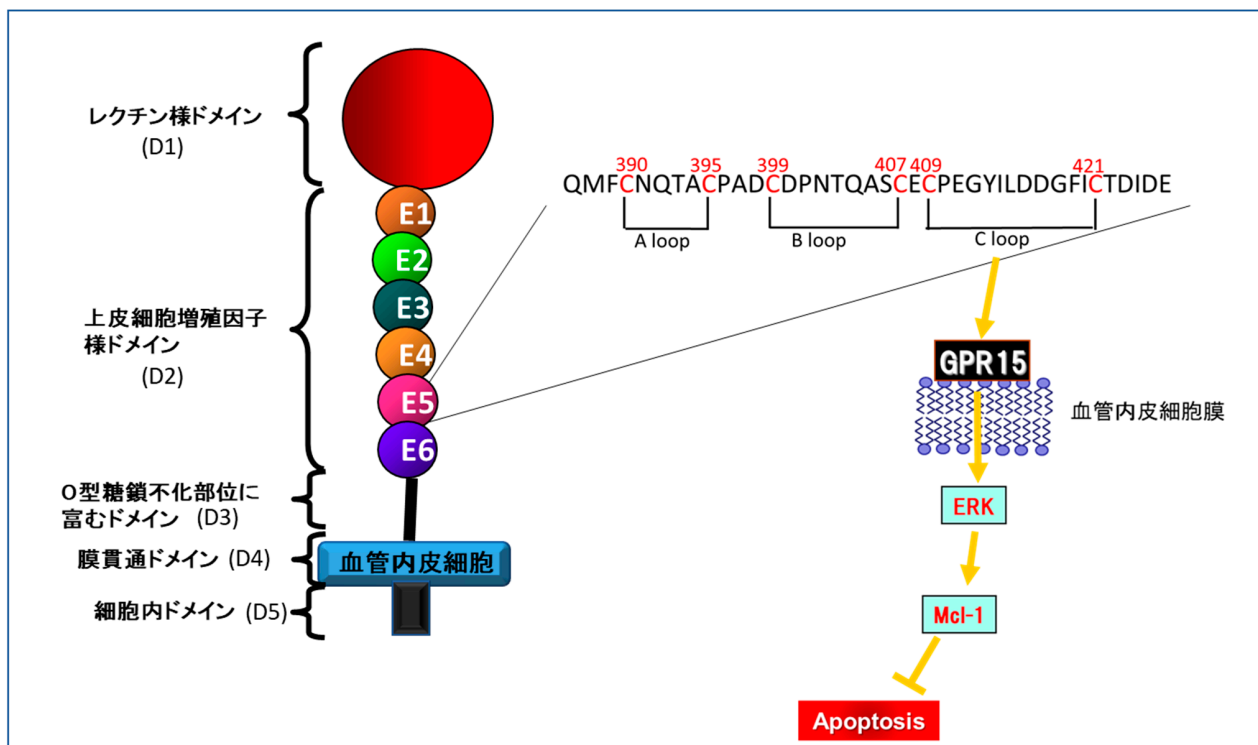
【方法】これまでに TM 分子の 40 アミノ酸からなる 5 番目の上皮細胞増殖因子様領域 (E5) に血管新生作用や血管保護作用が存在することを見出している。E5 は 2 つの S-S 結合により 3 つのループ構造 (A, B, C ループ) をもつため、それぞれの構造をペプチド合成し、どのループにこのような作用が局在するのか培養血管内皮細胞を用いて検討する。

造血細胞移植後に SOS を発症する場合は輸血不応性の血小板を併発していることが多い。従って SOS の予防剤は血液凝固系に作用しないものが望ましい。E5 にはトロンビンとの結合能が残存しているため、血小板減少患者に使用すると出血の副作用が懸念される。内皮保護活性をもつループが血液凝固系へ与える影響をプロトロンビン時間 (PT) や活性化部分トロンボプラスチン時間 (APP) を測定して確認する。

培養血管内皮細胞を用いた実験で血管保護作用をもつ TM の最小分子が決定されれば、その効果をマウス移植 SOS モデルで検証する。

【結果】E5 の C ループに血管内皮細胞増殖刺激作用や、タクロリムスによるアポトーシスから血管内皮細胞を保護する作用があることが明らかとなった。また、この C ループは PT や APTT に影響しないことから、血液凝固系への作用はないと判断された。マウス SOS モデルにおいて SOS の予防効果も確認できた。

トロンボモジュリンの構造と血管内皮保護作用を発揮する最小単位の同定とその機序

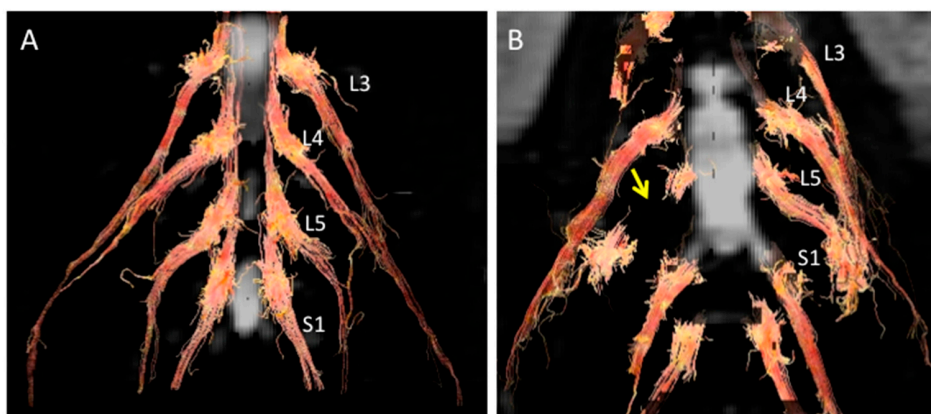


【目的】 本研究ではマンガン造影 MRI、拡散テンソル画像など最先端の MRI を駆使して、慢性痛の原因を可視化する手法を開発し、慢性痛機序解明に寄与することを目的とした。

【方法】 ①ラット膝関節内にマンガン造影剤を投与し膝関節由来の坐骨神経を可視化を試みた。新たな低毒性の MRI 用神経経路トレーサーとして、Mn 錯体にデキストラン分子を結合して高分子化し、ナノ粒子ゲルの網目構造内に高濃度で封入した Dex-Mn-Gel を開発した。ラット左膝関節内に造影剤を 50 μ l 注入し、MnCl₂ (M 群, n = 5)、Dex-Mn-Gel (DMG 群, n=5)、および Control (n=3) で比較した。24 時間後、7T-MRI を用いて T1 強調画像を撮影した。②生体組織内の水分子の拡散の方向性を強調化したものが拡散テンソル画像であり、神経を可視化できる。Voxel size を小さくする手法 reduced field of view (rFOV) を用いた高分解法と従来法と比較した。

【結果】 ①膝関節所見は DMG 群の方が M 群より炎症所見が少なかった。両群とも造影側で Control より有意に造影効果を認めた。膝関節造影側で坐骨神経造影効果を認め神経トレーサーとして可視化できることが示された。本研究からマンガン造影 MRI は非侵襲的に疼痛メカニズムを可視化できる可能性があり今後、臨床応用が期待できる。②高分解テンソル画像は、は従来法に比べて、腰神経を鮮明に描出でき、検者間・検者内信頼性が高く、Signal-to-noise (SNR) が高かった。高分解テンソル画像により制度の高い神経病変の可視化・定量化が可能となり臨床応用が期待できる。

腰椎神経のテンソル画像 A) 健常者, B) 椎間孔狭窄患者
狭窄部を可視化できる (矢印)



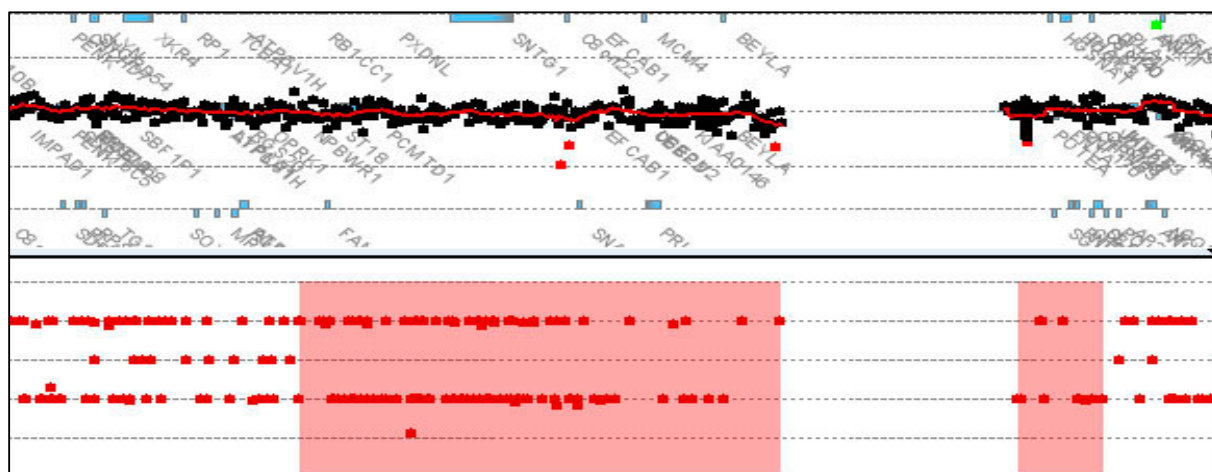
【目的】 本研究の目的は、原因不明の希少難治性疾患である胆道閉鎖症と肝芽腫を有する患者の遺伝学的解析によって、これらの疾患の発症機序を解明することである。本研究では、国立成育医療研究センターで集積された患者の腫瘍組織および血液の解析を行った。

【方法】 下記の3項目について研究を実施した。

1. 肝芽腫のエピゲノム解析：肝芽腫 11 例について、摘出腫瘍組織および周辺の正常肝組織から抽出したゲノム DNA のメチル化解析を行った。既知インプリンティング疾患関連 6 座位のメチル化可変領域のメチル化率を算出し、異常メチル化を示す座位を同定した。2. 肝芽腫のゲノム解析：上記の肝芽腫由来ゲノム DNA を用いてアレイ comparative genomic hybridization (CGH) を行い、ゲノムコピー数異常について検討した。3. 胆道閉鎖症のゲノム解析：胆道閉鎖症 18 例のゲノム DNA を対象に、既知疾患関連遺伝子および候補遺伝子の網羅的シーケンスおよびアレイ CGH 解析を行った。

【結果】 1. 肝芽腫のエピゲノム解析：9 サンプルにおいて、明らかな DNA メチル化異常が同定された。とくに、11 番染色体 H19-DMR の高メチル化と Kv-DMR の低メチル化が多数の患者で認められた。これは、肝芽腫の発症にエピゲノム異常が重要な役割を果たすことを明確とするものである。インプリンティング遺伝子の多くが細胞増殖の制御に関与することから、これらの遺伝子の発現異常が腫瘍の形成に寄与している可能性がある。2. 肝芽腫のゲノム解析：7 サンプルにおいて、染色体の一部もしくは全体を包含するコピー数変化が同定された。コピー数異常は 1 番および 2 番染色体にとくに多く同定された。11 番染色体や 7 番染色体にコピー数異常を呈する症例はなく、上記の DNA メチル化変化を染色体構造異常によって説明することは不可能であった。したがって、肝芽腫腫瘍組織においては何らかの未知の機序でエピジェネティック制御の破綻が生じていることが示唆される。また、今回同定されたゲノムコピー数異常領域には、腫瘍の発生や進展に関与する遺伝子が含まれる可能性がある。現在、これらの点について研究を進めている。3. 胆道閉鎖症のゲノム解析：胆道閉鎖症 18 例のゲノム DNA を対象に、既知疾患関連遺伝子および候補遺伝子の網羅的シーケンスおよびアレイ CGH 解析を行った。18 例中 3 例においてヘテロ接合性もしくは複合ヘテロ接合性 *ARHGEF10* 非同義塩基置換を同定した。また 1 例で 7 番染色体微小欠失と 8 番染色体 loss-of-heterogeneity を同定した (図)。現在これらの疾患との関連について検討している。

胆道閉鎖症で同定された loss-of-heterogeneity



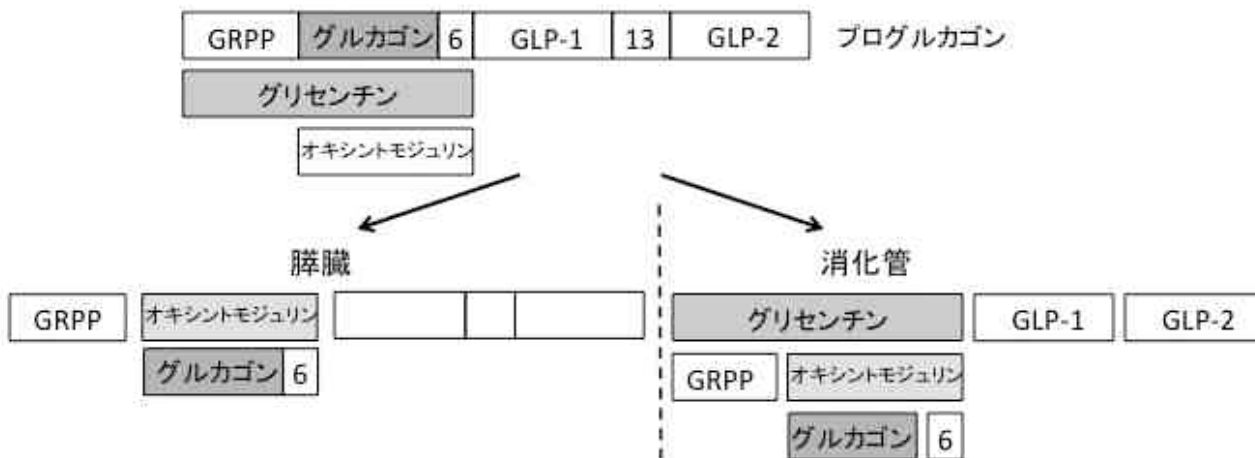
72 消化管グルカゴン関連ペプチドと糖尿病、肥満との関連	北村 忠弘
-------------------------------------	--------------

【目的】 糖尿病領域において、DPP4 阻害薬や GLP-1 受容体作動薬などの臨床応用に伴って、GLP-1 とグルカゴンに注目が集まっているが、プログルカゴンからはグルカゴン、GLP-1 以外にも複数のペプチドホルモン（図参照）が産生されており、これらがグルカゴンの正確な測定を困難にさせてきた。そこで、筆者らが開発した質量分析を用いたグルカゴン測定法（LC-MS/MS）及び、サンドイッチ ELISA で種々の病態におけるグルカゴン濃度を再評価した。また、グルカゴン関連ペプチドが消化管のどの細胞から分泌されているかについても未解明であり、組織学的に検討する必要がある。

【方法】 まず、LC-MS/MS とサンドイッチ ELISA の測定値に良好な相関が認められるか評価した。次に、これらの測定系を用いて、健常者や糖尿病患者で食後の血中グルカゴン濃度変化を解析した。また、LC-MS/MS とサンドイッチ ELISA で測定値に解離が認められる症例も検討した。オキシントモジュリン測定系の開発、並びに種々のグルカゴン関連ペプチド分泌細胞の組織学的解析も行った。

【結果】 食後の血中グルカゴン濃度の変化は従来考えられていたものとは異なり、タンパク質成分によって上昇することが明らかとなった。また、糖負荷後はグルカゴン濃度が低下したが、2 型糖尿病の病態ではこの低下が遅れることも判明した。一方、膵臓摘出では現行のサンドイッチ ELISA と LC-MS/MS の測定値に大きな解離が認められ、恐らくグリセンチンによる交叉反応の可能性が考えられたことから、さらに高特異性のグルカゴンサンドイッチ ELISA の開発が必要と考えられた。また、オキシントモジュリンに関しても、引き続き特異的な測定系の開発途中である。一方、グルカゴンに関連するペプチドホルモンが消化管のどの細胞から分泌されているかについても未解明であり、これらのペプチドに対する様々な抗体を用いた組織免疫染色に関しても現在検討中である。今後の本研究の継続によって、糖尿病や肥満に対する新しい治療標的の同定、並びに新しい治療法の開発につながることを期待している。

膵臓と消化管におけるプログルカゴンから産生されると予想されるホルモン

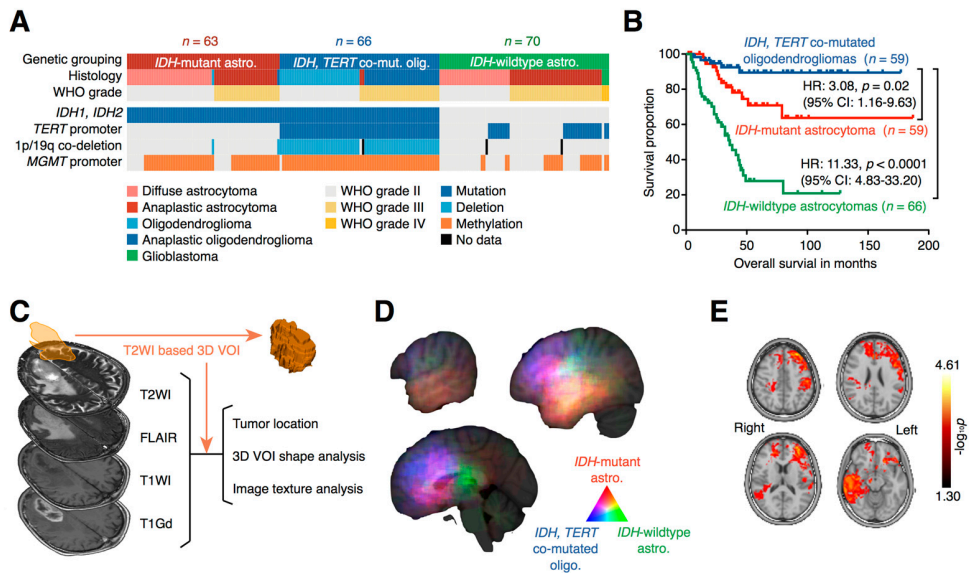


【目的】 神経膠腫は中枢神経系に発生する希少がんで、手術・放射線治療・化学療法を組み合わせた集学的治療が実施されているが、低悪性度のものの5年生存率は75%、高悪性度ものに至っては10%未満と予後不良な疾患である。神経膠腫の発生活動や再発・増悪に関する病態の解明は十分に進んでいないものの、ここ数年に得られた新たな知見から、神経膠腫は分子生物学的には数種類の異なった機序で発症していることが明らかになってきており、分子生物学的手法を用いた新たな病態理解・診断・治療のアプローチが求められている。腫瘍の分子情報の取得には腫瘍組織の採取が必須であり、脳腫瘍の場合には開頭術という侵襲的な手技を経由する必要がある。このような侵襲的な手技を回避すべく、放射線画像という非侵襲的な診断技術で腫瘍の分子情報の取得を試みようとするのが本研究の主たる目的である。

【方法】 199例のWHO grade II/III 神経膠腫を収集し、初発時MRIからT1強調画像、T2強調画像、FLAIR画像、造影T1強調画像をRadiomic解析した。Radiomic解析では腫瘍局在解析、ヒストグラム解析、テキストチャー解析が行われた。全ての解析が施行できたものを「フル解析」と定義した。169例でフル解析が可能であり、199例で腫瘍局在解析が行われた。フル解析により109画像特徴量を取得することができた。フル解析できた169例を111例の探索コホートと58例の検証コホートにランダムに振り分け、探索コホートを用いて、109画像特徴量から*IDH*遺伝子変異有無の予測モデルをLASSO regressionにより構築した。構築されたモデルの予測精度を検証コホートにより検証した。さらに、同様の解析を*IDH*遺伝子変異と*TERT*プロモーター変異を組み合わせた、神経膠腫の分子3分類に対しても行った。

【結果】 199例のWHO grade II/III 神経膠腫の分子分類を腫瘍標本のDNAシーケンスから行い、astrocytoma, *IDH* mutant; oligodendroglioma, *IDH* mutant, *TERT*p mutant; astrocytoma, *IDH*-wildtypeに分類された。それぞれの腫瘍は特徴的な腫瘍存在局在を示した。Radiomic解析から*IDH*変異は87%の精度で診断可能であり、3群分類は56%の診断精度を達成した。

神経膠腫のRadiomic解析

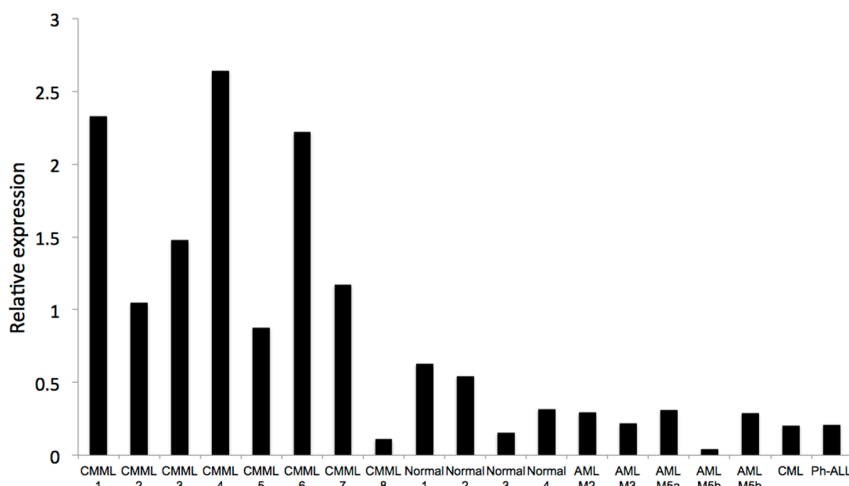


【目的】慢性骨髄単球性白血病（CMML）は難治性の血液がんであり、効果的な治療法開発に至る適切な病態モデルが存在しない。われわれは疾患特異的 iPS 細胞化技術を活用してヒト CMML 疾患モデルを構築し、マルチオミクス解析から病態候補遺伝子である *SLITRK4* (SLIT and NTRK like family member 4) を同定した。本研究の目的は、*SLITRK4* の機能や制御遺伝子群について解析し、これまで未解明であった CMML の発症および分化異常の制御に関わる機構を解明し、新規治療薬の開発につなげることである。

【方法】ヒト臨床検体を用いて *SLITRK4* の発現量について確認した。正常骨髄マウス細胞、ヒト白血病細胞株に *SLITRK4* を過剰発現させ、増殖能、形態、シグナル伝達経路の活性度について評価した。また、CMML 細胞由来 iPS 細胞、正常骨髄細胞由来 iPS 細胞それぞれについて、RNA 干渉による転写抑制実験を通じて血球分化に及ぼす影響を解析した。

【結果】正常マウスの骨髄より採取した幼若造血細胞に *SLITRK4* を過剰発現させメソカルトで培養したが、コロニー形成能、形態、細胞表面抗原についていずれも変化は見られなかった。また、ヒト白血病細胞において *SLITRK4* を過剰発現させ、いくつかのリン酸化シグナル経路について評価したが有意な差は認めなかった。iPS 細胞を血球分化させ、造血前駆細胞（HPC）に *SLITRK4* の shRNA を導入し転写を抑制させると、正常骨髄細胞由来 HPC ではノックダウンの効果がほとんど見られなかったのに対して、CMML 由来 HPC ではコロニー形成能が落ちることを確認した。

ヒト検体での *SLITRK4* の発現量



【目的】 ウサギ頸静脈グラフトモデル、ウサギ頸動脈自家動脈グラフトモデルを用いて、静脈グラフト内膜肥厚、動脈グラフトの内膜肥厚および内皮依存性弛緩反応について NO と EDHF に注目して、正常血流モデルおよび異常血流モデルを作製し検討した。

【方法】 1. 静脈グラフトモデル作製：ウサギ静脈グラフトモデルを用いて検討した。総頸動脈の一部を外頸静脈グラフトで置換した（正常血流）。また、より内膜肥厚を顕著にするために末梢の4本の動脈のうち3本を結紮した異常血流モデルを作製しグラフト置換した（異常血流モデル）。

2. 動脈グラフトモデル作製：オスの日本白色種ウサギを用いて、全身麻酔下に頸部を切開し、右総頸動脈を摘出した。内腔をヘパリン化生理食塩水で洗浄後、元の部位に戻し、端々吻合を行い、総頸動脈グラフトを作製した。

3. 内膜肥厚：術後 28 日目に右総頸動脈グラフト (G 群) とコントロールとして左総頸動脈 (C 群) を摘出し、HE 染色を行い内膜肥厚の有無を評価した。

4. 等尺性収縮張力法：血管のリング標本作製し、アセチルコリン (ACh) による内皮依存性弛緩反応を測定した。

5. cGMP の測定：定常状態と ACh 投与下の cGMP を測定した。

6. 微小電極法：EDHF 評価のために微小電極法で ACh、A23187 投与下の平滑筋細胞の膜電位を測定した。

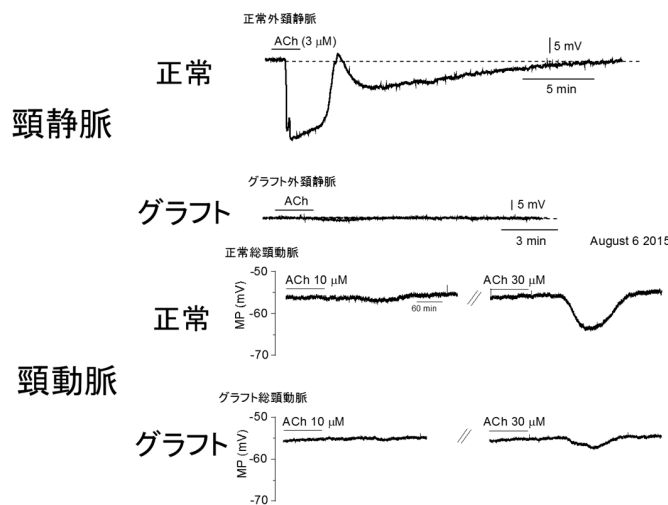
【結果】 1. 正常血流頸動脈と異常血流モデルでの動脈の内皮機能

収縮弛緩反応は異常血流モデル作製後 4 週間目の動脈標本を用いた。異常血流動脈の弛緩反応が正常血流に比べ障害されていた。

2. 静脈グラフトでは正常静脈でみられた EDHF の反応が消失していた。一方、動脈グラフトでは EDHF は低下を認めが残存しており、静脈グラフトと動脈グラフトの EDHF 反応に違いがあることが明らかになった。これらの静脈グラフトと動脈グラフトの EDHF の反応の違いが、動脈グラフトの良好な開存率に寄与している可能性があると考えられた。

3. 動脈グラフト群では ACh による内皮依存性弛緩反応が増強し、cGMP の産生も増加する傾向であったため、ACh による NO 産生が増強している可能性が考えられた。このことが動脈グラフトの内膜肥厚を最小限に抑え、動脈グラフトの良好な開存率に影響していると考えられた。

静脈グラフトと動脈グラフトの EDHF 比較



【目的】 各癌腫、特に消化管癌における標準治療と免疫チェックポイント阻害剤の併用効果に関する知見はほとんどないのが現状である。大腸癌では、マイクロサテライト不安定性 (microsatellite instability, MSI) を高頻度に認める症例 (MSI-H) に免疫チェックポイント阻害剤が有効であることが報告されている。しかし、免疫チェックポイント阻害剤にどのような種類の細胞が応答しているか特定できていない。

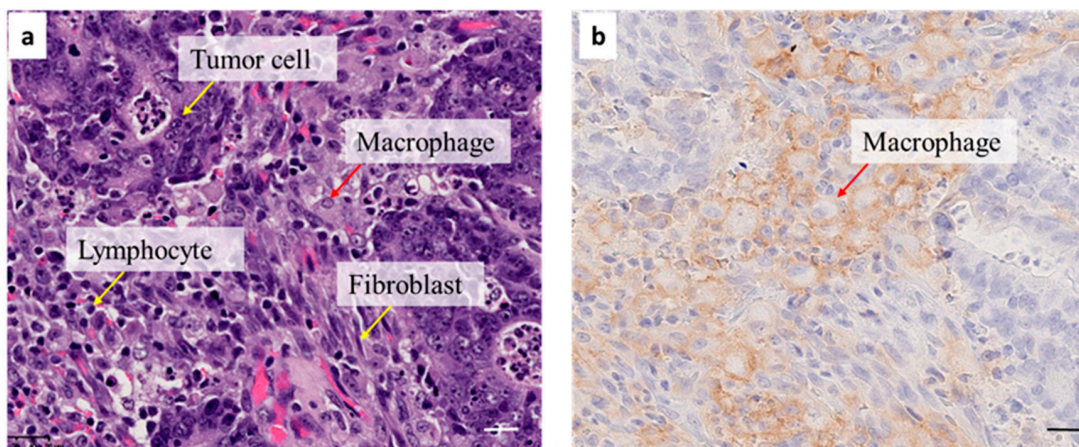
今回、我々は腫瘍先進部における免疫微小環境を解析するため、MSI-H およびマイクロサテライト不安定性のない (MSS) 大腸癌症例における programmed cell death-ligand 1 (PD-L1) と関連タンパクの発現を評価し、奏効性の高い免疫複合療法開発のためのエビデンス構築を目指した。

【方法】 当科で外科的切除を施行した大腸癌 499 例を対象に MSI ステータスを解析した。499 例中 48 例が MSI-H であった。プロペンシティスコアマッチングを行い、組織学検討が可能であった MSI-H 36 例、MSS 37 例を対象に免疫組織化学染色を行い、PD-L1、PD-1、CD8 陽性 T リンパ球、CD68 陽性マクロファージの発現を評価した。PD-L1 は腫瘍細胞における発現 (PD-L1[T])、骨髄由来の免疫系細胞における発現 (PD-L1[I]) に分けて評価した。

【結果】 MSI-H 症例で PD-L1 (T) 陽性を 36.1%、PD-L1 (I) 陽性を 72.2%、MSS 症例で PD-L1 (T) 陽性を 5.4%、PD-L1 (I) 陽性を 27%に認めた。MSI-H 症例では、PD-L1 (T) は低分化腺癌、リンパ管侵襲、脈管侵襲と相関を認めた ($P < 0.05$)。また、PD-L1 (I) は pStage I/II、budding grade2/3 と相関を認めた ($P < 0.05$)。MSI-H 症例では、腫瘍中心部に比較して腫瘍先進部の免疫系細胞に多く PD-L1 が発現していた ($P < 0.005$)。CD8・CD68 陽性細胞も腫瘍先進部に多数浸潤していた ($P < 0.005$)。

MSI-H 大腸癌の腫瘍先進部における腫瘍進展と免疫回避に PD-L1 陽性の腫瘍細胞とマクロファージが関与していることが示唆された。これらの結果は MSI-H および MSS 大腸癌に対する有効な標準治療と免疫チェックポイント阻害剤の複合併用療法開発の手がかりとなる可能性がある。

MSI-H 大腸癌症例の腫瘍先進部における PD-L1 の免疫組織化学染色像



(bars: 100μm)

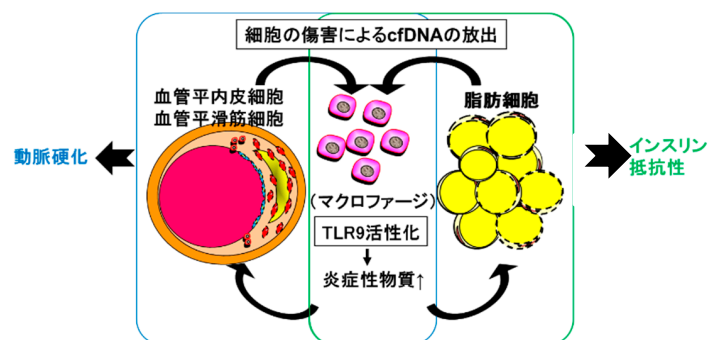
【目的】メタボリックシンドロームや動脈硬化の病態においては、脂肪組織や血管壁における無菌的慢性炎症が大きな役割を担うことが広く知られている。しかし、生活習慣病によってどのようにして慢性炎症が惹起されるのか十分に明らかになっていない。*Toll* 様受容体-9 (*TLR9*) は、本来、外来性の病原体由来の DNA 断片を認識した自然免疫受容体であるが、最近では、自己由来の遊離核酸断片 (cell free DNA, cfDNA) を認識して、自己免疫性疾患などの病態に関与していることが報告されている。そこで、生活習慣病によって慢性炎症が生じる機序について、特に cfDNA と *TLR9* の果たす役割について検討を行った。

【方法】(1) 野生型マウスならびに、*TLR9* 欠損に高シヨ糖高脂肪食を投与して、血中の cfDNA、脂肪組織における炎症、インスリン抵抗性を比較した。また、骨髄移植を行い、慢性炎症に関与した細胞群を同定した。また、オリゴヌクレオチドを用いて、*TLR9* をブロックしたことで、肥満による慢性炎症が制御できるかどうかを検討した。(2) *TLR9* 欠損マウスとアポリポ蛋白 E 欠損 (*ApoEKO*) マウスを交配して *TLR9/ApoE* 二重欠損マウス (*TLR9/ApoE dKO*) を作製して、Angiotensin II (Ang II) 持続投与下における動脈硬化病変ならびに慢性炎症を *ApoE* 欠損マウスと比較検討した。また、骨髄移植を行い、動脈硬化、慢性炎症に関与した細胞群を同定した。また、オリゴヌクレオチドを用いて、*TLR9* をブロックしたことで、動脈硬化を制御できるかどうかを検討した。

【結果】(1) 肥満に伴って脂肪組織から、cfDNA が放出された。そして、*TLR9* が cfDNA によって活性化され、脂肪組織での慢性炎症ならびにインスリン抵抗性が引き起こした。*TLR9* 欠損マウスでは、脂肪組織での炎症が減弱しており、肥満に伴うインスリン抵抗性が軽減していた。骨髄移植の実験から、骨髄細胞上の *TLR9* が重要であることが明らかになった。*TLR9* の阻害オリゴヌクレオチドは、肥満による脂肪組織の炎症とインスリン抵抗性を改善した。(2) *ApoEKO* マウスに Ang II を投与したことで、血漿中の 1 本鎖 DNA などの cfDNA が増加した。また、大動脈において、cfDNA の受容体となりうる *TLR9* の発現が Ang II 投与により有意に増加し、主たる発現細胞はマクロファージであった。*ApoEKO* と *TLR9/ApoE dKO* 間で体重、血圧、血漿脂質値に差を認めなかったが、*TLR9/ApoE dKO* マウスの動脈硬化病変およびプラーク内脂質量は、*ApoEKO* マウスに比べて有意に少なかった。また、*TLR9/ApoE dKO* マウスの腹部大動脈において、MCP-1 などの炎症性物質の発現やマクロファージの浸潤が減少していた。さらに、骨髄移植実験により、血管壁より骨髄の *TLR9* が重要であることが明らかとなった。*TLR9* の阻害オリゴヌクレオチドは、血管での慢性炎症と動脈硬化を抑制した。

以上の結果より、メタボリックシンドロームや動脈硬化における慢性炎症において、cfDNA-*TLR9* 経路は重要な役割を担っており、新たな生活習慣病治療の標的になると考えられた。

cfDNA-*TLR9* 経路は、マクロファージの活性化を介して、脂肪組織の炎症や動脈硬化病変の形成に関与した

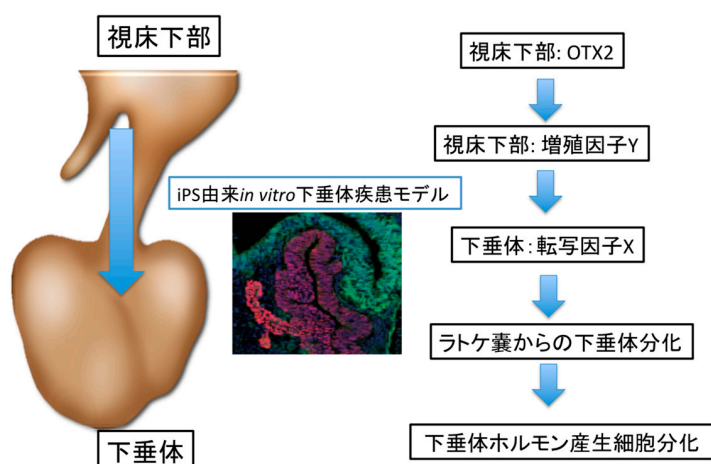


【目的】先天性下垂体形成不全は小児下垂体機能低下症の中で比較的頻度の高い疾患であり、多くは新生児期に低血糖や低Na血症、乳幼児期に成長障害などで診断される一方、成人期に副腎不全など重篤な病態を契機に初めて診断されることもまれではない。これまでその原因として下垂体関連転写因子である *PROP1*, *HESX1*, *LHX3*, *LHX4*, *GLI2* などの遺伝子変異が報告されているが、未だ 80~90%の原因は不明である。今回これまで報告された先天性下垂体形成不全とは明らかに異なる先天性前葉・後葉形成不全の症例に遭遇したことが本研究のきっかけとなった。近年 iPS 細胞から様々な組織への分化誘導法が開発され、再生医療、疾患モデル作製、創薬スクリーニングなどに応用されつつある。下垂体/視床下部への分化誘導法も報告されているが、これまでに疾患モデルを作製した報告はされていない。本分化誘導法は下垂体の原基である口腔外胚葉と視床下部を試験管内で同時に分化誘導し、それらの相互作用を *in vitro* で再現し自己組織化を誘導する方法であることから胎生期の下垂体発生をよく再現しており、先天性下垂体機能低下症の疾患モデル作製に最適だと考えられる。本研究では、エクソーム解析と疾患特異的 iPS 細胞を用いた *in vitro* モデルの病態解析により先天性下垂体形成不全の原因および病態解明を目指して研究を行った。

【方法】本研究では、ヒト iPS 細胞からの下垂体分化プロトコルの確立、先天性下垂体低形成症例から疾患特異的 iPS 細胞の樹立と樹立した疾患特異的 iPS 細胞 *in vitro* 分化異常の有無と臨床的表現型の関連についての解析を行った。また下垂体分化異常を認めた場合にはその機序の詳細について解析を行った。さらに原因不明の先天性下垂体前葉、後葉機能低下症例におけるエクソーム解析による責任遺伝子の同定とその発症機序の解析を行った。

【結果】原因不明の先天性下垂体前葉、後葉機能低下症例由来の疾患 iPS 細胞の解析によって、下垂体前葉細胞分化能が著しく障害されていることが明らかになった。エクソーム解析によって視床下部下垂体に発現する転写因子 *OTX2* 遺伝子異常を同定した。さらに疾患 iPS 細胞の *in vitro* 下垂体分化モデルを用いた解析から、*OTX2* は下垂体発生過程において視床下部に発現し、視床下部の増殖因子 Y のシグナルを調節し、口腔外胚葉の転写因子 X の発現を上昇させることで下垂体発生を促すことが明らかとなった。*OTX2* 遺伝子変異はこれまでも下垂体前葉低形成の原因になることが報告されていたが、今回の我々の検討から下垂体前葉だけではなく後葉形成不全もきたしうること、視床下部における *OTX2* が視床下部における増殖因子を介して下垂体分化に必須の転写因子発現を調節し分化を促進するという新たな機序を明らかにした (図)。さらに本研究において、疾患特異的 iPS 細胞を下垂体疾患の病態解明に世界で初めて応用し、非常に有用な手法であることを証明した。

下垂体低形成疾患特異的 iPS 細胞解析から明らかになった新たなヒト下垂体分化の機序

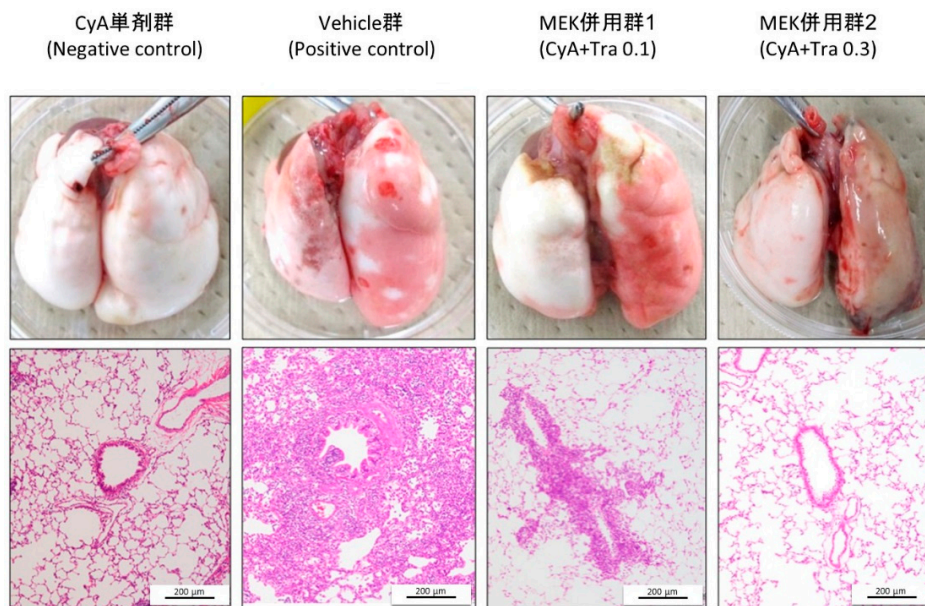


【目的】 肺移植後慢性期の最大の死因は慢性拒絶であるが、拒絶を防ぐための免疫抑制は、感染を惹起する諸刃の剣である。肺は、外界と直接通じる固形臓器であるため、免疫力が強く拒絶を起こしやすい一方、感染源との接触のリスクも高い。したがって、肺移植において、免疫力を低下させない免疫抑制が重要である。今回、自然免疫を低下させないMEK阻害剤を用いた新規免疫抑制法を開発する。

【方法】 Lewis Rat をレシピエントに Brown norway Rat をドナーにした左片肺移植モデルを用いた。肺移植後2週間のサイクロスポリン (CyA) を用いた免疫抑制を行い、その後2週間、種々の設定で薬剤投与を行った。CyA単剤群 (残りの2週間もCyAを投与)、MEK阻害剤を4週間、CyAと併用して投与する群 (MEK併用群) と Vehicle群 (DMSOのみを投与) での比較実験を行った。

【結果】 CyA単剤群に対して、MEK併用群で、病理学的には肺血管周囲のリンパ球浸潤を有意に抑制していた。MEK阻害剤の量については、0.3 mg/kg/dayの方が、0.1 mg/kg/dayよりも移植肺の拒絶反応が抑制されており、CyA単剤投与と同等であった。この結果は、その後の追加実験においても再現性をもって示された。

MEK阻害剤を用いた肺移植実験結果

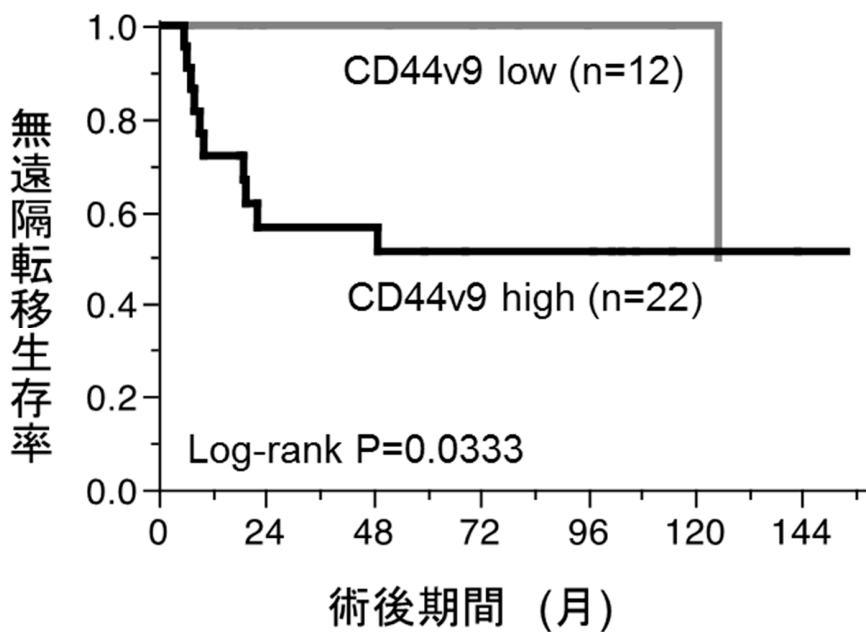


【目的】 乳癌の治療方針はホルモン受容体 (ER、PgR)、HER2 などにより決定されるが、治療抵抗性で予後不良な高悪性度症例が存在する。これらの治療抵抗性、予後不良要因の分子機序解明はさらなる治療効果改善においては不可欠である。本研究では、がん幹細胞性と腫瘍免疫、がん免疫チェックポイント機構に注目し、治療効果との関連を解明することを目的とした。

【方法】 1. トリプルネガティブ乳癌 (TNBC) : 術前化学療法施行 48 例を対象とし、がん幹細胞マーカーCD44v9 や BRCA1、vimentin などの発現を解析し、治療効果、予後との関連を解析した。2. HER2 陽性乳癌 : 術前化学療法施行 75 例を対象とし、腫瘍浸潤リンパ球 (TIL)、PDL1 発現を解析し、治療効果、予後との関連を解析した。

【結果】 1. TNBC における検討 : 非著効例において、CD44v9 高発現症例では有意に予後不良であった。術後追加治療の適応を検討する上で治療前 CD44v9 発現が有用である可能性が示唆された。2. HER2 陽性乳癌における検討 : TIL と奏効率には正の相関を認めたが、高 TIL でも PD-L1 陽性例では奏効率が低く、PDL1 が治療抵抗性の一因となる可能性が示唆された。

トリプルネガティブ乳癌 (TNBC) における治療前 CD44v9 発現と予後



【目的】 自閉スペクトラム症 (Autism Spectrum Disorder: ASD) は有病率の上昇により臨床的にも注目されている神経発達障害の一つで、診断基準は現在なお流動的である。今回の診断基準改訂において主症状が二つにカテゴリー化された。一つは社会的コミュニケーションともう一つは限局された反復的な行動であり、この二つが揃って初めて ASD と診断される。しかしながら、全く相互関係のない異なる症状の二つが融合することで疾病が成り立つことは病態学的に未解明である。我々が得た過去の研究結果より、ASD は二つの疾患の合併症であり、それらは遺伝学的要因が決定し、環境要因は症状の重症度に関与するとの仮説を考案した。また先行研究における Genome-Wide Association Study の結果では、欧米人サンプルにアジア人サンプルを含んで解析すると有意差がなくなることから、本研究では、コミュニティベースの日本人サンプルを用いて、特徴的なコピー数異常領域を見出すことを目的とした。

【方法】 遺伝学的研究を行うにあたり、コミュニティベースかつ後天的な影響の少ない 5 歳児の健常者 129 (男児:64、女児:65) 名、ASD 患者 67 (男児:43、女児:24) 名の末梢血由来ゲノム DNA を用いて、Affymetrix Genome-Wide Human SNP6.0 キットによる Copy Number Variation (CNV) 解析を行った。サンプルデータは Penn CNV および Partek Genomics Suite7.0 を用いて、隠れマルコフモデルにより Copy Number を推定し、CN=2 以外をコピー数異常領域とした。健常者と比較して ASD 患者群においてコピー数異常が見られた領域は、Chi-squared test により算出し、 $P < 0.05$ で有意差ありと見なした。

【結果】 欧米人を対象とした先行研究では、健常者と比較して ASD 患者 1 人あたりのコピー数異常領域の箇所が多いことが報告されていたが、我々の研究では、健常者 37.8 (男児:38.2、女児:37.4) 箇所、ASD 患者 37.4 (男児:38.0、女児:36.8) 箇所と有意差は認められなかった ($P = 0.466$)。また、下記に示すようなゲノム領域において ASD 患者で有意にオッズ比が高いコピー数異常領域を検出した。欧米人を対象とした CNV 解析では、いずれの領域も ASD 患者では高い頻度でコピー数異常があることが報告されており、日本人においても共通のコピー数異常領域があることが明らかになった。先行研究の場合オッズ比が 1.2~1.6 と小さいが、日本人を対象とした本研究の結果ではオッズ比が 2.0~3.5 と比較的高い値を示したことから、日本人においては ASD 発症により関わるコピー数異常領域であることが示唆された。

日本人 ASD 患者に特徴的なコピー数異常領域

染色体	領域	CNV タイプ	健常者該当者数 (人/129 人)	ASD 患者該当者数 (人/67 人)	オッズ比	P-value
chr12	q21.31~ q21.33	deletion	11 (8.53%)	15 (22.39%)	2.63	0.013
chr4	q13.2	duplication	8 (6.2%)	12 (17.91%)	2.89	0.02
chr8	p23.1	deletion-duplication	5 (3.88%)	9 (13.43%)	3.47	0.03
chr18	q12.3	deletion-duplication	15 (11.62%)	16 (23.88%)	2.05	0.043

82 寝たきりゼロを目指す疾患・臓器横断的オミックス研究	成田 一衛
-------------------------------------	--------------

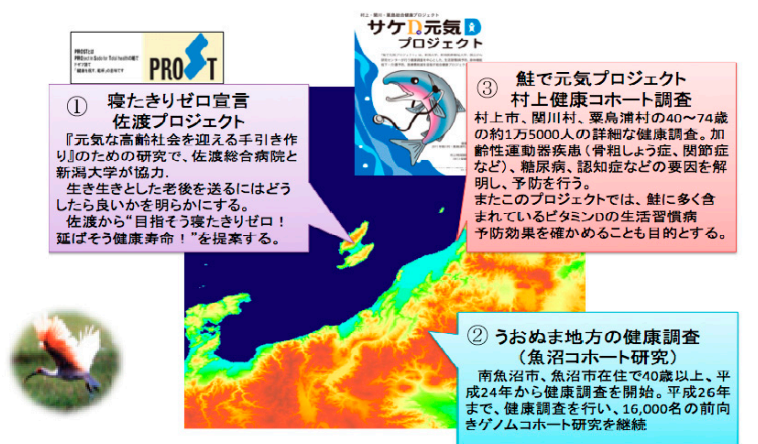
【目的】 わが国の国民的な問題である自立障害、いわゆる“寝たきり”の原因疾患は、脳卒中 21%、認知症 15%、衰弱 13%、関節疾患 11%、骨折転倒 10%の順に多い（平成 22 年厚生労働省）。これらの骨・血管・神経等の病態は、糖尿病・循環器疾患・腎臓病などが基盤となることから、共通の多因子による発症・進展機序が作用しているが、未解明な点が多く効果的な介入が不可能である。そこで、臨床情報、生体試料の臓器横断的なオミックス解析を行い、加齢性変化の共通の分子基盤を同定する。加齢病態のリスク層別化、予防方法と治療戦略の創出を目指す。

【方法】 著者らが今まで 10 年以上にわたり個別に構築してきたゲノム、および他の生体試料、ならびに臨床データからなる研究リソース（図 1）を活用し、加齢性変化を規定する共通の、あるいは地域・環境特異的な機能的異常を探索し同定する。観察期間における、認知症、大腿骨近位部骨折等の骨粗鬆症による脆弱性骨折、腎機能低下（血清クレアチニン上昇）、などの発症を明確に定義し、臨床表現型として明らかにし、糖尿病の有無および環境因子（食塩摂取量、運動習慣など）との関連を解析した。併行して著者らが保存してきた腎生検データベースと生体試料を使用して、IgA 腎症など主要な腎臓病の疾患発症のメカニズムを解析した。

【結果】 佐渡島におけるすべての腎不全（血液透析）患者の認知機能を MMSE（mini-mental state examination）を用いて定量的に評価した。年齢、既知のリスク因子で補正した結果、血液透析患者は、病院に通院または入院している他の患者（非透析患者）に企画して約 2.5 倍認知症の発症リスクが高いことが判明した。また、透析導入時点で大腿骨近位部骨折のリスクは健康人の約 5 倍と著しく高いことが示された。大腿骨近位部骨折は生命予後に影響するばかりか、患者および家族の QOL を著しく損なうものであり、腎臓病患者の転倒予防、認知機能維持、ならびに骨代謝の恒常性維持が重要であることが明らかになった。腎臓病の新たな発症を抑制するうえで、生活習慣の修正が重要であることを前向き研究で定量的に証明した。

一方、主要な腎臓病の一つである IgA 腎症では、扁桃における細菌叢を解析しその結果を報告した。16s rRNA 解析による属レベルの分類では、小児扁桃肥大と明確に異なる細菌叢が存在することが明らかになったが、成人の習慣性扁桃炎との相異は検出されなかった。したがって、環境因子に対するホストの免疫学的応答の異常が発症を規定すると考えられる。そこでさらに腎生検標本のプロテオミクス解析、摘出扁桃や末梢血の遺伝子解析を行い、APRIL 遺伝子の関与が明らかとなった。

新潟大学におけるコホート（ゲノム、生体試料収集済み）



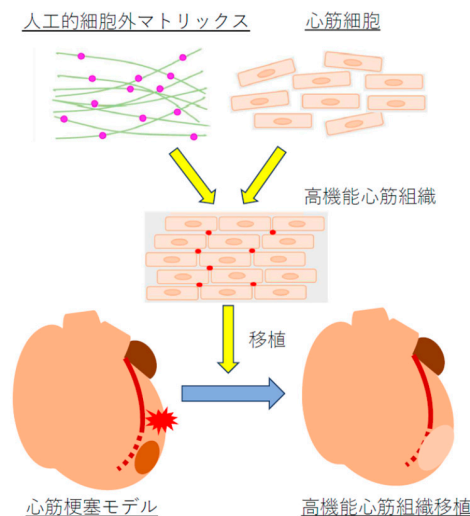
高齢化率35%（日本の都市部の30年後）で、地域特性の高い3つの地域でのコホート研究 村上“鮭で元気プロジェクト”、“佐渡”寝たきりゼロプロジェクト”、魚沼コホート、包括的・多目的臨床疫学を進めている。

【目的】 iPS 細胞由来心筋細胞を用いた心筋組織による重症心不全に対する心筋再生治療が行われようとしているが、その有効性をあげるためには、心筋組織内の心筋細胞のバイアビリティーを向上させ、移植心筋組織の機能を向上させる必要がある。これまで、心筋組織において、細胞外マトリックス (Extracellular Matrix: ECM) であるラミニン 221 は心筋細胞の成熟の足場となるだけでなく、インテグリン $\alpha 7$ を介した刺激を心筋細胞に与え、成熟・生存を促進することが報告されている。本研究では、ラミニン 221 を用いて心筋細胞と特異的に結合し、心筋細胞の活性を向上させるような人工 ECM を作製し、心筋組織に付加することで高機能な iPS 細胞由来心筋組織を開発することを目的としている。

【方法】 ラミニン221が心筋細胞に与える影響については、ラミニン221を加えて培養した心筋細胞を用いて、モーションアナライザーによる収縮弛緩機能の評価、ミトコンドリア機能の評価、低酸素ストレスに対する耐性、免疫染色の評価、心筋関連・ミトコンドリア関連遺伝子の発現についてRT-PCRで検討した。また、人工細胞外マトリックスを付加した心筋組織の機能の評価については、人工細胞外マトリックス付き高機能心筋組織を免疫不全ラットの梗塞心に移植する。心機能評価を心エコー検査で評価を行った。

【結果】 ラミニン 221 を加えて、心筋細胞を培養した群においてはモーションアナライザーにて iPS 由来心筋細胞の収縮速度、拡張速度有意な増加を認めた。またミトコンドリア機能テストにおいては最大呼吸量の有意な増加を認めた。また、低酸素条件下における生存細胞数や細胞障害性の評価においてもそれぞれ有意に低酸素条件に耐性を持つことが示された。また RT-PCR においては成熟心筋を示唆する構造遺伝子の発現増加、その他カルシウムチャンネル関連遺伝子、ミトコンドリア増殖関連遺伝子の発現増加を認めた。一方で、ラミニン 221 を用いた人工的 ECM はフィブリンにラミニン 221 を加えることで作製しその中に iPS 由来心筋細胞を加え、人工的 ECM 付加 iPS 由来心筋組織を作製した。8 週齢のヌードラットの心臓前下行枝を結紮し心筋梗塞モデルを作製、10 週齢時に作製した iPS 由来心筋組織を移植した。人工的 ECM 付加 iPS 由来心筋組織を移植群は、コントロール群である、フィブリン移植群に比べて有意に左室駆出率の改善を認め、また人工的 ECM を付加しない iPS 由来心筋組織のみを移植した群に比べて左室駆出率の改善が良い傾向を認めた。ラミニン 221 は iPS 由来心筋細胞の機能成熟を向上しうることを示唆し、またフィブリンを用いた ECM 付加 3 次元心筋組織をヌードラット心筋梗塞モデルに移植することでその心機能を向上させ得る可能性が示唆された。

心不全に対する人工細胞外マトリックスを用いた心筋細胞移植



84 心筋ミトコンドリア局在蛋白キナーゼ系の構成と機能	三浦 哲嗣
------------------------------------	--------------

【目的】 細胞壊死誘導機構であるミトコンドリア透過性遷移孔 (mitochondrial permeability transition pore、mPTP) を制御する蛋白キナーゼが、ミトコンドリア内でどのように局在し機能連関しているのか解明することを目的とした。

【方法】 心筋細胞株 H9c2 細胞、HEK293 細胞、ラット心筋サンプルを用い、ミトコンドリア単離キットならびに段階的遠心分離法によってミトコンドリアを単離したうえで段階的トリプシン処理を行い、外膜、内膜、マトリックスそれぞれのマーカー蛋白を基に、外膜溶解、内膜溶解、マトリックス蛋白溶解後のサンプルを調整し、Akt、ERK、GSK-3βと関連ホスファターゼのミトコンドリア内分布を Western blotting で同定した。細胞保護シグナル活性化のミトコンドリア局在蛋白キナーゼ/ホスファターゼへの影響を解析するため、培養細胞を insulin-like growth factor-1 (IGF-1、50 nM) で 45 分間処理した群、酸化ストレスの影響を解析するため、mitochondrial complex III 阻害薬である antimycin A (AA、100 μM) に 30 分間暴露した群、また AA と IGF-1 の両者で処理した群を設けた。蛋白キナーゼ、ホスファターゼの機能関連を明らかにするため、siRNA を用いて標的蛋白の発現を抑制した。細胞死は、培養液中の LDH 放出量を指標に定量した。

【結果】 ミトコンドリアの段階的トリプシン処理においてトリプシン 0 μg/ml 処理と 1 μg/ml 処理の差をミトコンドリア外膜でのレベル、1 μg/ml 処理と 1,000 μg/ml 処理の差をミトコンドリア内膜レベルと評価した (下図)。生理的な条件 (Control) では、ERK、GSK-3βは主にミトコンドリア外膜に、Akt は外膜、内膜とも同程度に存在した。

蛋白ホスファターゼとして、これまで報告のあった PHLPP1 に加え、核にのみ局在するとされていた DUSP5 がミトコンドリアに存在することを、Western blotting と GFP-DUSP5 の発現実験で見出した。

酸化ストレスは、細胞質の DUSP5、PHLPP1 のミトコンドリア移行、外膜での ERK と Akt の脱リン酸化、それらの下流にある GSK-3βリン酸化の減弱、非リン酸化 GSK-3βと cyclophilin D との結合増加をもたらし、細胞死を誘導した。siRNA を用いた DUSP5 の発現抑制は酸化ストレスによる細胞死を有意に抑制した。

IGF-1 による細胞保護シグナルの起動は、ERK、Akt、GSK-3βの細胞質からミトコンドリア外膜への移行の増加とそれらの外膜、内膜でのリン酸化を亢進させ、酸化ストレスによる細胞死を抑制した。

以上の結果と我々既報の成績を総括すると、酸化ストレスによる mPTP の開口には、PHLPP1 と DUSP5 のミトコンドリア移行による Akt、ERK 脱リン酸化を介した細胞保護シグナルの遮断が寄与していること、また細胞保護シグナルによって mPTP と直接結合し抑制的に機能するリン酸化 GSK-3βのレベルは、細胞質からミトコンドリアへの GSK-3βの移行と、外膜での Akt によるリン酸化、また内膜での ERK によるリン酸化によって制御されていることが考えられた。

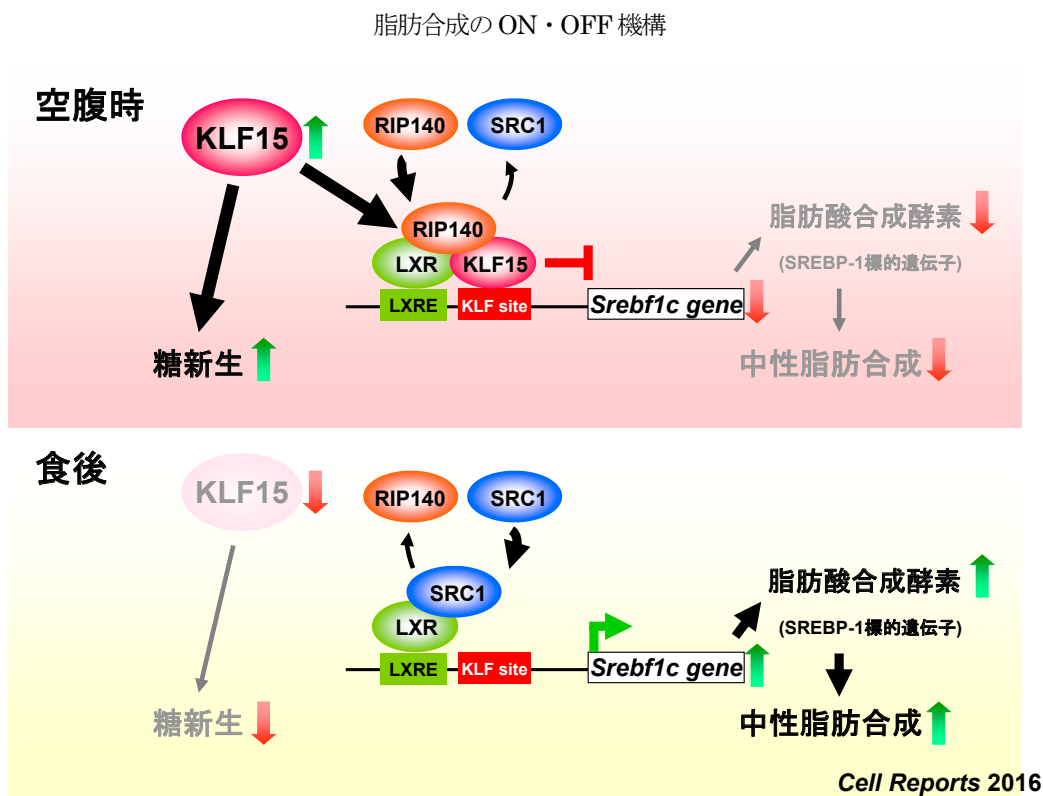
ミトコンドリア部分分解サンプルの蛋白キナーゼレベル
細胞保護シグナル活性化 (IGF-1)、酸化ストレス (AA) の影響



【目的】 多様なエネルギー代謝制御シグナルの核内への情報伝達を時間的・空間的に分解し、エネルギー代謝制御を担う未知の核内情報処理機構を明らかにしていく。特に体内の貯蔵エネルギーの大半を占める中性脂肪に関し、その摂食・絶食による合成経路の ON・OFF 機構を解明する。

【方法】 *in vivo* Ad-luc 解析法とは、我々が独自に確立してきた、生体内臓器で直接にゲノム上の cis 因子解析を行うレポーターアッセイシステムであり、TFEL (Transcription Factor Expression Library) scan 法とは、転写因子複合体解明のための技術基盤として我々が数年がかりで独自に開発してきた、転写因子を網羅する発現プラスミドライブラリのことである。本研究では、これら独自開発の *in vivo* Ad-luc 解析法と TFEL scan 法を用い、エネルギー代謝制御シグナルの核内への情報伝達を時間的・空間的に分解することを試みた。

【結果】 SREBP-1 の上流の制御因子として我々が最近同定した、糖代謝と脂質代謝を繋ぐ重要な転写因子 KLF15 の上流経路において、いくつかの新規転写調節因子の関与が明らかになった。

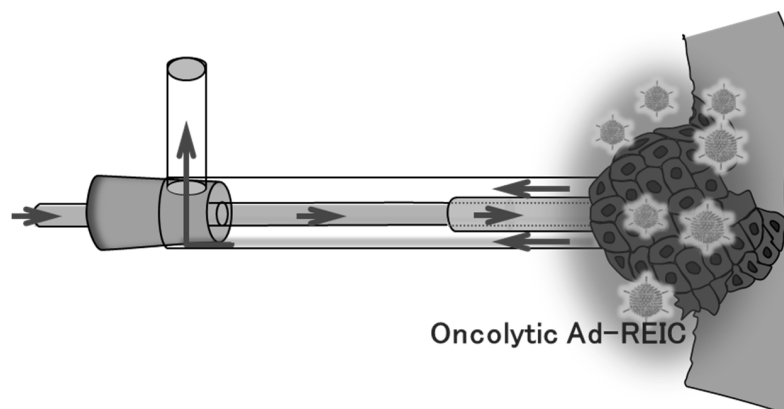


【目的】近年、抗癌ウイルス医薬（遺伝子治療製剤や腫瘍融解ウイルス製剤）は、遺伝子発現やウイルスの制限増殖というこれまでの医薬品とは異なる作用機序で働く新しい医薬品として、難治性癌疾患の分野においてその実用化が期待されている。我々は従来、癌治療遺伝子 *REIC/Dkk-3* の臨床利用に関する研究を実施しており、制限増殖型アデノウイルスベクター（Oncolytic Adenovirus）に *REIC/Dkk-3* 遺伝子を搭載した新規の癌治療剤：Oncolytic Ad-REIC の開発に成功している。そこで、当該治療剤の抗腫瘍効果を検証・最適化することで、次世代の抗癌治療法としての基盤の確立を目指した。

【方法】本研究では新しい *REIC/Dkk-3* 遺伝子治療として制限増殖型アデノウイルスベクター：Oncolytic Ad-REIC を展開するべく、癌細胞株に Oncolytic Ad-REIC を添加した場合の抗腫瘍シグナルについてその動態を解析した。さらに我々が独自に開発した *In situ* 浸透システムを用いて、治療剤の局所注入による浸透・拡散について最適化をはかる為の基盤研究を実施した。

【結果】ヒト前立腺癌細胞株 PC3 細胞において Oncolytic Ad-REIC およびそのコントロール：Oncolytic Ad ウイルスベクターにより癌細胞死が誘導された。いずれのベクターについても添加により、細胞内の c-Myc 発現の著明な減少およびリン酸化 GSK3 β の発現増強が認められた。癌細胞死誘導効果およびリン酸化 GSK3 β の発現増強は、Oncolytic Ad を添加した場合に比べ Oncolytic Ad-REIC の場合に顕著であった。また、Oncolytic Ad-REIC 等を *In situ* 浸透システムを用いてより効果的に腫瘍内に局所注入する為の予備検討研究を実施し、特定の溶媒において一定の成果が得られた。当該システムについて、今後、更なる改良を行う予定である。本研究において、Oncolytic Ad-REIC により惹起される抗腫瘍シグナルの一端が明らかとなり、このシグナリングにより Oncolytic Ad-REIC の強力な抗腫瘍効果が誘導されている可能性が示唆された。

抗癌ウイルス医薬の局所投与法最適化の概念図



【目的】 NO、CO に続き H_2S が第三のガス状生理活性物質として近年注目を集めている。 H_2S による様々な生理機能がこれまでに明らかになってきたが、その働きに関して未解明な点が多い。このような状況のもと、生体内での H_2S の働きを解明するべく生細胞内の H_2S を可視化する蛍光プローブが開発されて、本分野の研究は大きく進展してきた。

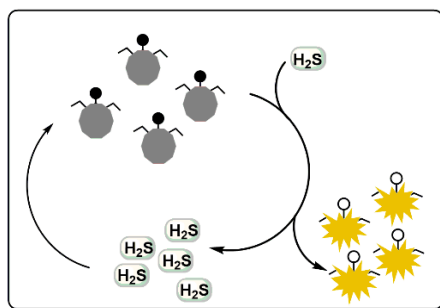
しかしながら、現在開発されているプローブでは生理的条件下での微量の H_2S を精度よく検出するには感度が不足している。さらに、酸化ストレス応答等において NO、CO、 H_2S それぞれ単独の働きのみならず、これら分子のクロストークによる様々な生体制御が近年明らかになってきたが、細胞内でのこれら活性種の時空間的な制御に関しては明らかになっていない。とりわけ、 H_2S と CO は互いにその産生酵素を通して feedback しあう関係にあることが明らかになってきており、これらのクロストークに興味を持たれる。

そこで、このようなクロストークの機構と生理的意義を明らかにするべく、これら活性種のそれぞれに対応する複数の蛍光プローブを用いて蛍光顕微鏡によって観察するマルチカラーイメージングの基盤を確立することを目指し、本研究ではこれらガス状シグナル分子のライブセル マルチカラーイメージングによる時空間的解析の研究基盤となる H_2S 蛍光プローブを開発することを目的とした。本研究によって H_2S が関わるクロストークを明らかにできれば、ガス状シグナル分子を基軸とする生命システムの制御機構解明研究に大きく貢献し、発がんや老化、生活習慣病など様々な疾病治療に波及効果をもたらすことが期待される。

【方法】 本研究では xanthene 系の蛍光色素を活用し、高感度化を指向した turn on 型の H_2S プローブの設計を行った。本化合物は H_2S 選択的に脱保護反応が進行することにより連鎖的に H_2S と蛍光を増幅して H_2S を高感度に検出できることが期待される。すなわち、 H_2S をトリガーとして 1,4-脱離反応が進行し、等量以上の H_2S 等価体が放出されると同時に消光されていたプローブ分子が蛍光性の化合物へと変換され、放出された H_2S はさらに未反応のプローブ分子と反応し、連鎖的に H_2S と蛍光を増幅して高感度に検出できる H_2S 増幅型センサー分子である。

【結果】 まず、fluorescein を Duff 反応に付してホルミル化を試みたところ、得られた生成物は溶解性などの物性に乏しく、目的とするテトラホルミル体を得ることができなかった。そこで、2',7'-dichlorofluorescein を用いて反応を行ったところ目的化合物が収率良く得られ、ついで NaBH_4 還元を行ってヒドロキシメチル体へと導いた。また、生体イメージングに有利な近赤外蛍光を活用するべく、10 位 O を置換した xanthene 系色素の合成にも取り掛かり、中間体へと導いた。今後、各工程の収率の向上を図るべく合成ルートの見直しを行うと同時に、さらなる変換を行って標的プローブの合成を達成し、続いて H_2S との反応性の評価を行って、シグナル増幅能を持たない既存の H_2S 蛍光プローブと比較し評価する。さらに、*in vitro* 培養細胞系での H_2S 検出実験に適用し、プローブの妥当性を検討していく。

H_2S 増幅型蛍光プローブ

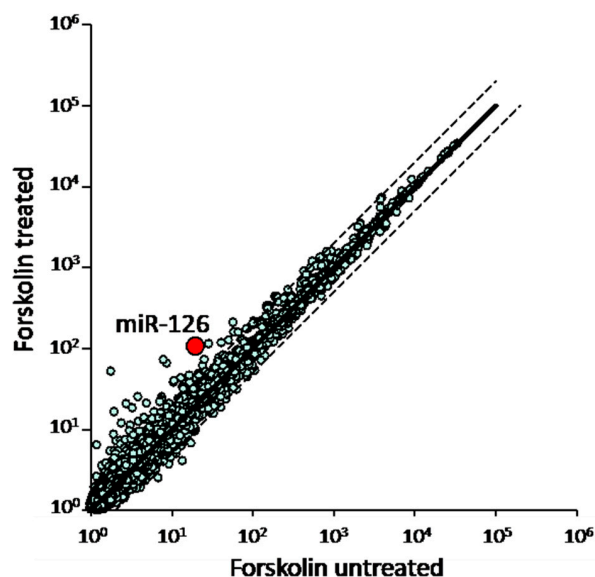


【目的】妊婦層への薬物治療の拡大には、妊娠に伴う薬物動態変動を規定する機構の解明が重要である。そこで本研究では、胎盤および母体における薬物動態規定因子発現に及ぼす胎盤由来 miRNA の影響を解明することを目指し、研究を行った。具体的には、胎盤関門形成に及ぼす miRNA の影響に加え、胎盤由来エクソソーム中 miRNA が肝実質細胞における薬物代謝酵素活性に与える影響を明らかにすることを目的とした。胎盤特異的 miRNA を妊婦体内動態評価のマーカーとしても活用できれば、妊婦における薬物動態変動予測における問題を解決する突破口ともなる。

【方法】Forskolin あるいは miR-126 を添加したヒト絨毛癌由来 JEG-3 細胞における miRNA または mRNA の発現を、マイクロアレイおよび定量 PCR 法で解析した。3'非翻訳領域を介した miR-126 による遺伝子発現制御は、ルシフェラーゼアッセイで評価した。JEG-3 細胞の培養上清からエクソソームを抽出してヒト肝癌由来 HepG2 細胞の培養液中に添加し、培養後の mRNA 発現の変動を定量 PCR 法で解析した。

【結果】1. 胎盤関門形成における miRNA の役割: JEG-3 細胞に PKA アゴニストである forskolin を添加することで、合胞体化因子や関門トランスポーター発現が促進される。Forskolin 添加後の miRNA 発現変動をマイクロアレイで網羅的に解析した結果、miR-126-3p の変動が大きく、発現量が約 5 倍に上昇することを見出した (図)。さらに、miR-126 を導入後の JEG-3 細胞において、胎盤関門形成時の合胞体化抑制機能を持つ可能性がある *LIN28A* や *F3* の発現が有意に減少した。一方、miR-126 は胎盤栄養膜細胞の融合を担う *syncytin-1* および *syncytin-2* に加えて、*syncytin-2* の受容体である *MFSD2A* の発現を上昇させることが示された。これらは、forskolin 添加後の JEG-3 細胞における発現変動パターンと相関していた。*LIN28A* あるいは *F3* 遺伝子の 3'非翻訳領域をルシフェラーゼ遺伝子の下流に組み込んだプラスミドを遺伝子導入した JEG-3 細胞において、miR-126 導入はルシフェラーゼ活性を半分以下に低下させた。加えて、*LIN28A* 遺伝子の 3'非翻訳領域のうち、miR-126 との結合予想領域の一部に変異を加えると影響は消失した。以上の結果から、miR-126 は PKA 活性化に伴い発現量を上昇させ、*LIN28A* の 3'非翻訳領域と結合してその発現を抑制することが明らかとなり、miR-126 が胎盤関門形成に大きな役割を果たす可能性が示された。2. 母体薬物代謝に及ぼす胎盤由来 miRNA の影響: JEG-3 細胞の培養上清から抽出したエクソソーム画分は、HepG2 細胞における *CYP3A4* および *CYP1A2* の発現量を上昇させる一方、*CYP2C9* および *CYP2D6* の発現量は減少させることが示された。胎盤エクソソームは肝臓における薬物代謝酵素の発現を調節可能であることが示され、少なくとも *CYP3A4* の発現上昇は、妊娠時における薬物代謝活性変動と相関していた。

PKA アゴニストが JEG-3 細胞における miRNA 発現量に及ぼす影響

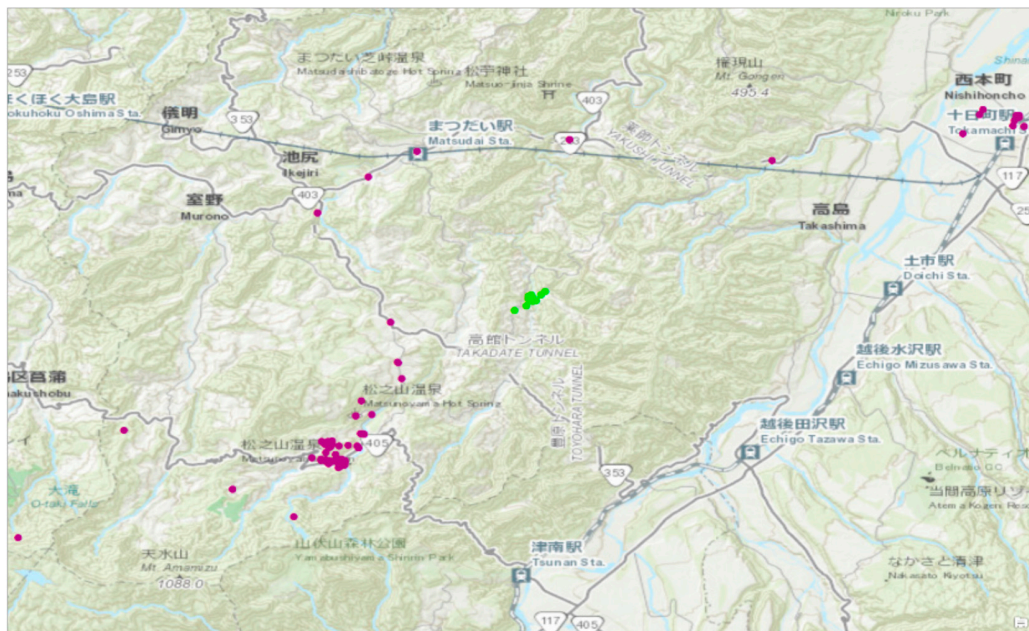


【目的】 本研究は、高齢化のすすむ新潟県十日町において、高齢者をGPSで追跡することで、物理的・社会的環境と行動パターンがどのように認知症と関連するのかを明らかにすることを目的に行った。

【方法】 新潟県十日町において、65歳以上の要介護状態にない全数にアプローチし、アンケート調査及びGPSを用いて位置情報を連続的に測定・記録することで、参加者が地域のどのような場所にとどのような時間帯でどの程度過ごしているのかを把握した。そして得られた500人のデータを地図上のマッピングし、個人レベルの行動パターンを客観的に観察した。

【結果】 本研究での参加者は男性249名、女性278名の計527名であった。GPSは1週間装着してもらうことができ、その動きには個人によって大きな違いがあることがわかった。今後はさらに解析を進め、環境要因と実際の行動エリアが認知機能をどの程度説明するのかを明らかにしていきたい。

参加者の行動範囲例



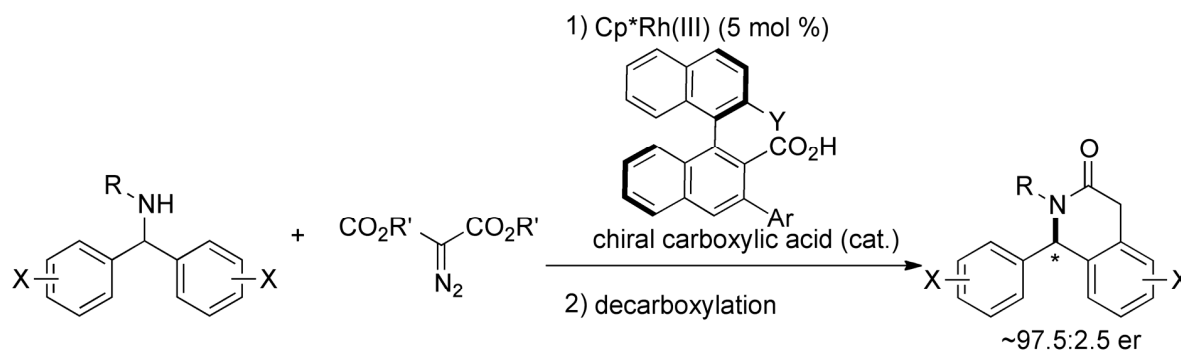
【目的】 本研究では、これまで我々がエノラートの化学で培った不斉触媒設計の知見と C-H 結合活性化反応の開発を通じた触媒設計に関する知見を融合した新規触媒の創製を目的として設定した。不活性 C-H 結合の活性化を担う触媒活性種をキラル環境下で発生させ、C-H 活性化と極性官能基との反応における立体制御の実現を目指した。C-H 活性化分野において、「不斉化」はいまだ実現可能な方法論が限定的であり、本研究で開発した触媒系がブレイクスルーになるものと期待している。

【方法】 不斉 C-H 官能基化の実現に向けて、3つのアプローチで挑んだ。(1) C-H 活性化に有効なソフトな遷移金属種を組み込むための新たなスルホキンド含有複核シッフ塩基触媒の創製と利用、(2) 複核ロジウム触媒の利用とロジウム触媒を代替する新規触媒の創製、(3) キラルアニオン戦略に基づく不斉 C-H 官能基化、の3つである。

【結果】 (1) 「スルホキンド含有複核シッフ塩基触媒の創製」：キラルスルホキンドにより外部配位場を構築した新規複核シッフ塩基配位子を設計し、各種キラルジアミンから合成を行った。内部 N_2O_2 配位場に種々の第一列遷移金属を導入、精製後に、酢酸パラジウムとビススルホキンドとの錯形成を *in situ* で行った。分子内アリル位 C-H アミノ化反応の不斉化各種複核触媒の評価を行い、Ni(II)/Pd(II) 複核触媒 を利用した際に、87:13 er にて生成物を得ることに成功した。(2) 「複核ロジウム触媒の利用とロジウム触媒を代替する新規触媒の創製」：二核ロジウムと類似の外輪型骨格を有する各種ヘテロ、ホモ複核錯体を合成して機能探索を進めた。Ru(II)、Ru(III) の二核触媒に対してキラルアミドやキラルカルボン酸を組み込んだ各種キラル錯体の合成法を確立し、様々な不斉反応への適用を検討した。例えば、触媒的不斉 C-H アミノ化が最高 94.5:5.5 er の選択性で進行するなど興味深い不斉誘導特性を示すことを明らかにした。

(3) 「キラルアニオン戦略に基づく不斉 C-H 官能基化」： $Cp^*Rh(III)$ に対してキラルスルホン酸由来のアニオンを組み込んだ触媒の開発に成功し、エノンへの 1,4-付加型の反応において、最高 95:5 er のエナンチオ選択性で目的物を得ることに成功した。モデル基質である 2-アリールピリジンに加え、生物活性が期待できる核酸誘導体である 6-アリールプリン触媒的不斉 C-H 官能基化にも成功した。6-アリールプリンの触媒的不斉 C-H 官能基化は、世界初の例である。さらに、キラルカルボン酸由来のアニオンを活用した C-H 活性化段階における立体制御に関しても、ビナフチル骨格由来のキラルモノカルボン酸を新たに開発することにより、97.5:2.5 er という極めて高い選択性を実現した。

キラルカルボン酸アニオンを活用した不斉 C-H 官能基化

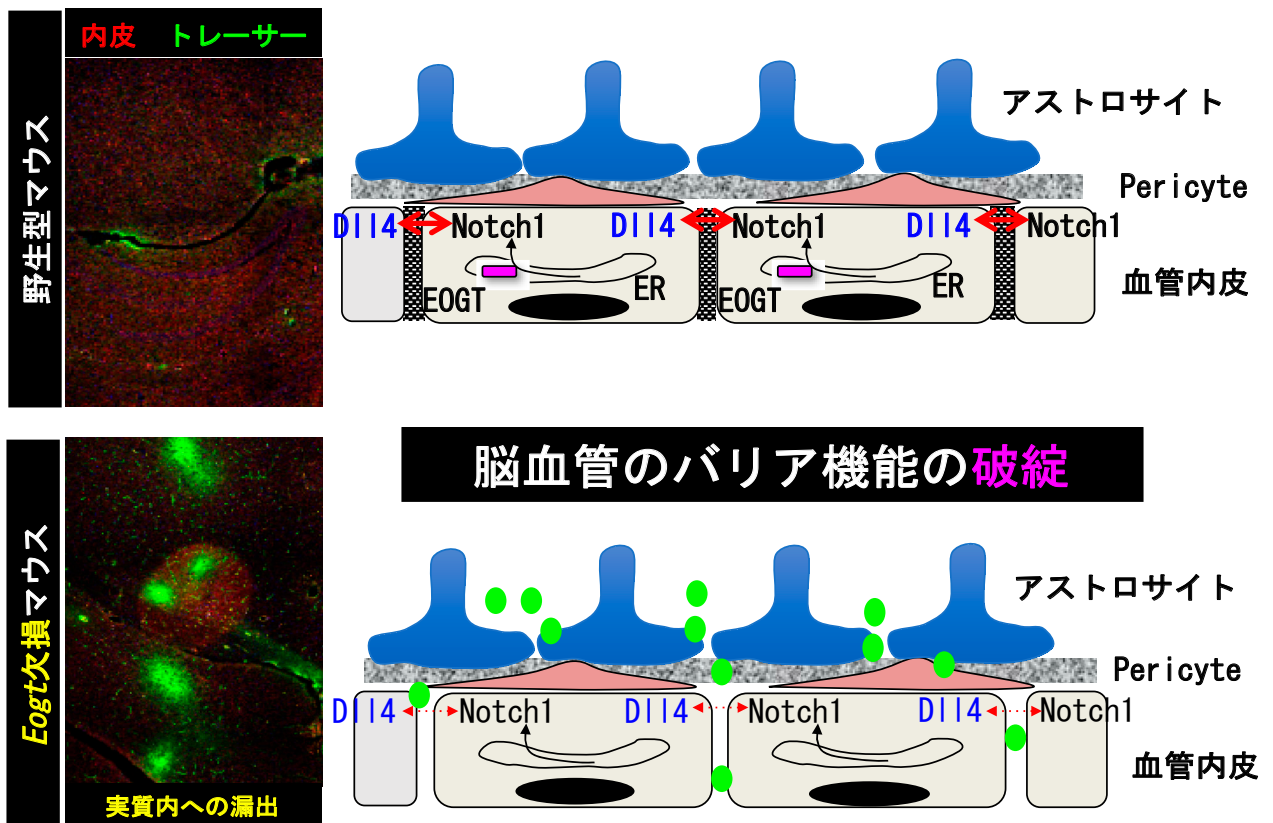


【目的】 NOTCH 受容体は、その特徴の1つとして細胞外領域に約36個の連続した上皮成長因子ドメイン (EGF) リピートを有し、特有なO-結合型糖鎖修飾を受ける。私は、これまでの研究で、Notch 受容体のEGFリピートの新規の糖修飾である細胞外O-GlcNAcを発見し、小胞体に局在するO-GlcNAc転移酵素 EOGTを同定した。さらに、EOGTによるNotch受容体のO-GlcNAc修飾がDLL4を介したNotchシグナルを制御することを明らかにした。本研究では、このようなNotchシグナルの精密制御に関わるO-GlcNAc修飾の役割を明らかにすることを目的とした。

【方法】 *Eogt* 欠損マウスを用いて網膜と脳血管の表現型の解析を行なった。また、血管のバリア機能の解析には、トレーサーとして、Sulfo-NHS-LC-biotinの灌流実験を行なった。

【結果】 *Eogt* 欠損マウスにおいて、トレーサーの血管外漏出が認められた。また、血管内皮特異的な *Eogt* 欠損マウスでも同様な表現型が認められたことから、血管内皮細胞における EOGT 発現が、血管バリア機能に必要であることが明らかになった。また、N-カドヘリンに加えて、タイトジャンクション構成因子の発現低下が認められ、EOGT 依存的な Notch シグナルを介する血管バリア機能の新たな制御機構の存在が示唆された。

EOGTによる血管バリア機能の保持機構



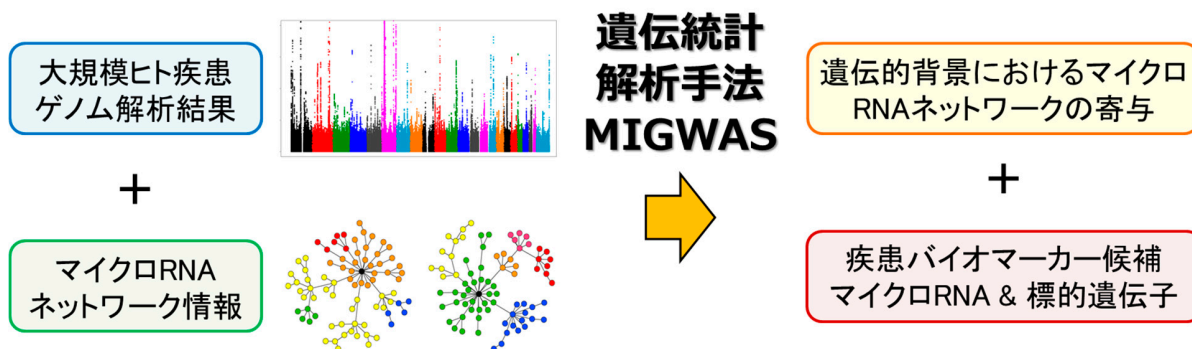
92 遺伝統計解析手法MIGWASに基づく核酸ゲノム創薬	岡田 随象
------------------------------	-------

【目的】 マイクロ RNA (miRNA) は生体内に存在する機能性小分子 RNA であり、多彩なヒト疾患において、バイオマーカーや治療標的としての役割が期待されている。既存の miRNA スクリーニング手法は、少数サンプルを対象に一部の miRNA に対する発現定量比較試験などの機能的実験により実施されており、より大規模かつ網羅的なスクリーニング手法の開発、特にゲノムビッグデータ解析により同定された疾患感受性遺伝子の情報を活用した新たな miRNA スクリーニング手法の開発に期待が高まっていた。本研究は、遺伝統計解析により大規模疾患ゲノム解析の成果を miRNA-標的遺伝子ネットワークと融合する、解析パイプライン MIGWAS (**miRNA enrichment analysis in GWAS**) の実装を進めることにより、疾患ゲノム情報に基づく miRNA および標的遺伝子のインシリコ・スクリーニング手法の確立を目的とする。

【方法】 次の 5 点において MIGWAS 解析パイプラインの改良を行った。1. miRNA-標的遺伝子におけるスコアの画一的な再計算、2. データ格納方式の変更、3. プログラム言語の変更、4. 解析パイプラインの一元化、5. 並列計算処理の実装。公的データベースより組織特異的 miRNA 発現情報を取得し、細胞組織間および miRNA 間の分散を考慮した正規化処理を実施した。日本人集団 60 名を対象に、次世代シーケンサー HiSeq2500 を用いて末梢血単核球由来の miRNA 発現定量解析を実施した。

【結果】 MIGWAS 解析パイプラインの改良の結果、大幅な計算時間の短縮と解析操作の簡素化を実現した。細胞組織特異的な miRNA 発現情報に対して正規化処理を実施し、異なる細胞組織間であっても、適切な正規化処理を実施することで組織特異性の miRNA 発現量の相対的な比較検討が可能となることを確認した。次世代シーケンサーのリード上におけるクオリティ・スコアの評価を実施したところ、成熟した miRNA の塩基長である 22 塩基までの範囲において良好なスコアを得ることができた。取得・正規化された組織特異的 miRNA 発現情報を MIGWAS 解析パイプラインに統合することによって、組織特異的なバイオマーカー-miRNA のインシリコ・スクリーニングの実装を進めていく。

遺伝統計解析手法 MIGWAS による疾患ゲノム情報を活用した miRNA インシリコ・スクリーニング



【目的】 自然免疫は感染初期の生体防御に必須であり、炎症応答やナイーブT細胞のプライミングを介して獲得免疫系を活性化させる。一方で、近年宿主細胞から放出されるエクソソームと呼ばれる細胞外小胞が機能的な RNA 等を選び細胞間情報伝達を担うことが明らかとなってきたが、その自然免疫に於ける役割については不明である。

本研究では、細胞間情報伝達を担うエクソソームが、自然免疫応答に果たす役割とそのメカニズムを明らかにすることで、自然免疫の新規メカニズムを解明することを目的とする。

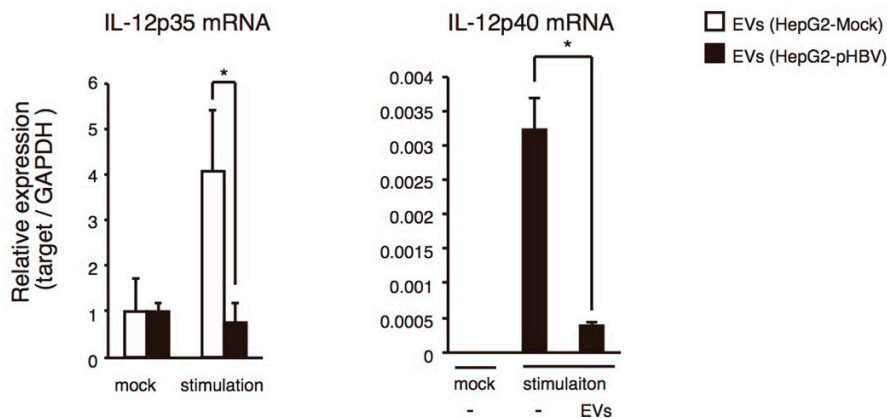
【方法】 B型肝炎ウイルス (Hepatitis B virus: HBV) 感染時の自然免疫応答について、感染ウイルス粒子とヒト肝細胞を用いた試験管内の実験を実施した。また、マウスへのインフルエンザウイルス感染実験による生体内での解析に加え、健康人由来の血清と、ヒト末梢血単核細胞、ヒトマクロファージ細胞株などを用い、エクソソームが自然免疫応答に果たす役割について検討した。

【結果】 HBV やインフルエンザウイルスを用いた研究から以下の事実を発見した。1. HBV は、感染肝細胞から放出されるエクソソームを介して宿主 IL-12 産生を抑制する、2. インフルエンザウイルス感染時には、血清のエクソソーム内の miR-451a 量が増加する、3. エクソソーム内の miR-451a はマクロファージのサイトカイン産生を抑制する。

また、ヒト血清を用いた実験から下記の事実を明らかとした。1. ヒト血清細胞外小胞内の miR-451a 量は健康人では約 10 倍程度の個人差がある、2. miR-451a 量の変化が、マクロファージの応答性を制御する。

上記の研究成果から、ウイルス感染時の自然免疫応答において細胞外小胞が重要な役割をしていることが明らかとなった。特に、宿主の自然免疫は細胞外小胞を利用して感染細胞内のウイルス RNA を検出するのにに対し、ウイルスは細胞外小胞を介して自然免疫応答を制御することが明らかとなった。

ウイルス感染細胞から放出されるエクソソームによるサイトカイン産生制御

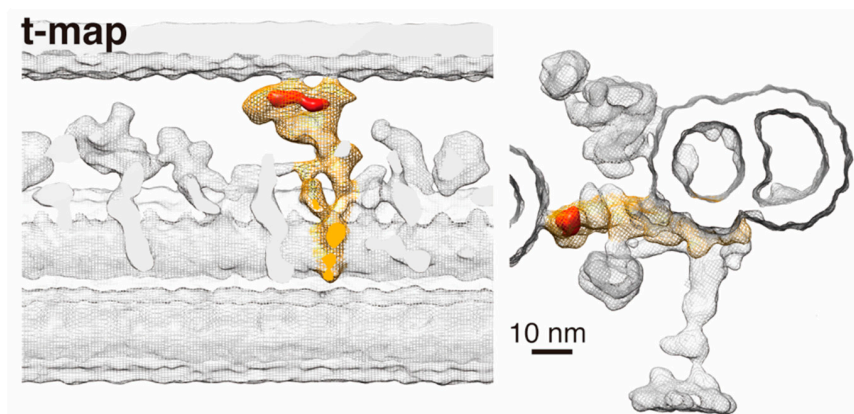


【目的】 繊毛・鞭毛は真核生物に広く保存された運動性の細胞小器官であり、哺乳類においては、精子の運動や気道粘液の排出、脳脊髄液の攪拌、そして初期発生における左右差決定など様々な生理現象に関わっている。繊毛の中心構造は軸糸と呼ばれ、9本の二重微管が円周上に配列した「9+2構造」を持つ。軸糸微管を構成する tubulin は様々な翻訳後修飾を受けているが、その局在や機能的意義には不明な点が多かった。本研究では、ポリグルタミル化 (polyE) tubulin の三次元的局在を明らかにすると共に、遺伝子改変により繊毛運動における polyE チューブリンの機能的意義を解析した。

【方法】 緑藻クラミドモナスの鞭毛から単離した軸糸を抗 polyE-tubulin 抗体でラベルし、クライオ電子トモグラフィで三次元構造を再構成した。

【結果】 PolyE-tubulin が微小管とダイニン制御複合体 (N-DRC) と呼ばれる微小管架橋構造との接点に局在することを発見した。さらに表面電荷を改変した N-DRC タンパク質を繊毛に発現させることで、N-DRC と微小管との電荷的相互作用が繊毛運動を制御していることを突き止めた。

クライオ電子トモグラフィによる polyE 化 tubulin の位置同定

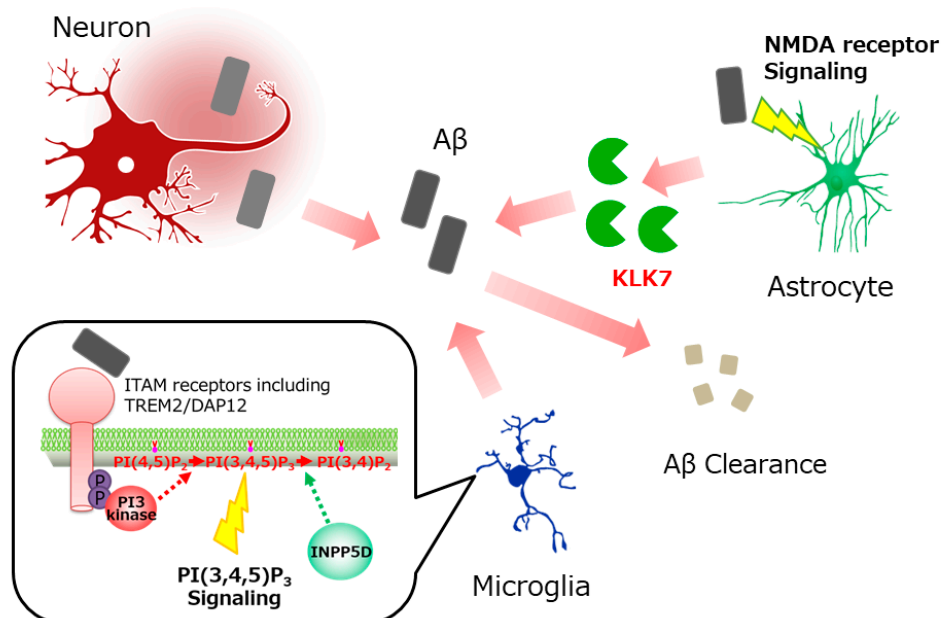


【目的】アルツハイマー病を始めとする神経変性疾患における病理学的特徴として、アミロイド β ($A\beta$) やタウなどが高度に線維化した凝集体の蓄積に加え、主にグリア細胞の活性化に代表される脳内炎症反応が挙げられる。遺伝学および病理学的な解析からこの蓄積病態によって惹起される慢性脳内炎症が認知症発症のタイミングと進行速度を決定づけていると考えられているが、その詳細な分子メカニズムは不明である。そこで本課題においては、認知症発症機構における異常凝集タンパク質に対するグリア細胞における慢性炎症性応答を解析し、その分子・細胞病態の解明を通して、脳内炎症制御法の確立と新規グリア細胞創薬研究を遂行することを目的として研究を行った。

【方法】本課題においては、1. CRISPR/Cas9システムを利用した、新規グリア細胞炎症性反応分子の Cell based スクリーニング、2. $A\beta$ に応答して発現変動する新規アストロサイト炎症性プロテアーゼ $KLK7$ の活性制御法の開発、2つを柱項目とし、*in vitro*、*in vivo*において研究を進めた。

【結果】1. については、蛍光標識された $A\beta$ を用いてその取り込み量を FACS によって定量的に評価する系を確立し、全ゲノムを対象とした guide RNA ライブラリーを用いて様々なゲノム編集が行われた細胞集団において異常な蛍光強度を示す細胞集団をソートし、標的遺伝子を次世代シーケンサーによって解析した。得られた遺伝子群の情報から over-representation analysis、インタラクトーム解析により、AD の遺伝学的リスク因子である *Inpp5d* 及び *Cd2ap* がスクリーニングで得られた遺伝子群の近傍に同定され、これらの遺伝子が関与する、ミクログリアにおける PI (3, 4, 5) P₃ シグナリングが $A\beta$ 取り込みに関与していることが示唆された。2. については、我々が新規 $A\beta$ 分解酵素として同定した $KLK7$ の発現量を上昇させる化合物を初代培養アストロサイトにおいて探索し、アルツハイマー病治療薬として認可されている、NMDA 受容体拮抗薬であるメマンチンに $KLK7$ 発現上昇能が認められた。またアルツハイマー病モデルマウスにおいて、メマンチン投与によりアミロイド斑の減少が確認された。すなわち、アストロサイトにおける NMDA 受容体シグナル経路の抑制が $KLK7$ の発現量を上昇させ、抗 $A\beta$ 作用をもたらすと考えられた。

$A\beta$ によって惹起される慢性炎症反応の分子機構

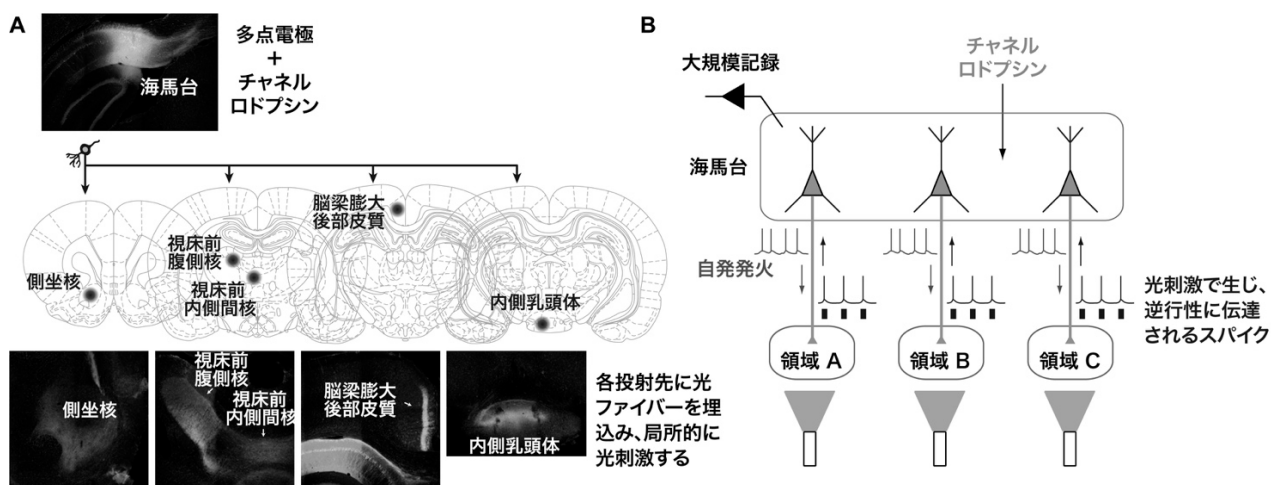


【目的】 記憶に重要な海馬からの出力の大部分が海馬台と呼ばれる脳領域から出るが、海馬台からどのような情報がどの脳領域へ送られているのかは全く分かっていない。本研究ではまず、光遺伝学と大規模記録法を組み合わせることで、自由行動中のラットから同時に記録している 100 個程度の神経細胞を投射先によって分類する技術の開発を目指した。この技術を使って、海馬台からどのような情報がどの脳領域へ伝達されるのかを明らかにすることを目的とした。

【方法】 海馬台の神経細胞を投射先脳領域により分類する目的で、アデノ随伴ウイルスを使って海馬台の主細胞にチャネルロドプシンを発現させた。自由行動中のラットの海馬台で大規模記録を行いつつ、投射先脳領域で光刺激を行い、チャネルロドプシンを発現している軸索で生じて逆行性に伝達されるスパイクを海馬台で記録した。

【結果】 投射先脳領域を光で局所的に刺激して、軸索で生じて逆行性に伝達するスパイクを海馬台で記録することで、自由行動中のラットから大規模記録法で記録している海馬台の個々の神経細胞を投射先により分類することができた。この方法を用いて、投射先を同定した海馬台神経細胞の活動を複数の行動課題中に記録し、どのような情報を表現している神経細胞がどの脳領域へ投射しているのかを調べるシステムを構築することができた。

多点電極を用いた大規模記録法と光遺伝学的手法の融合による海馬台神経細胞の投射先同定法

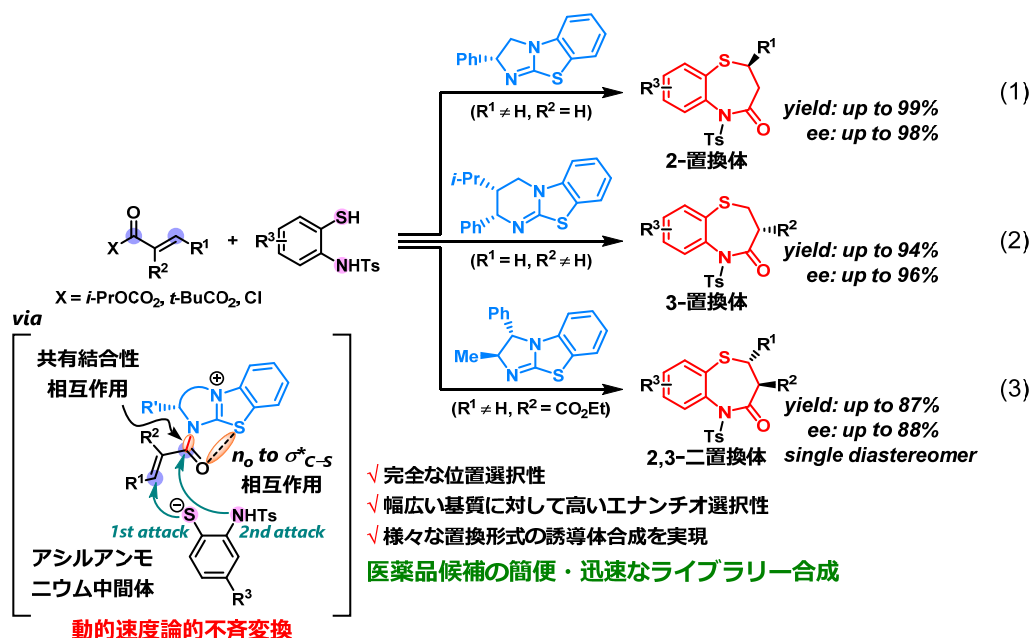


【目的】 1,5-ベンゾチアゼピン誘導体は医薬品候補の代表的な化合物で、様々な薬理活性を示すことで知られている。例えば、今や世界 100 カ国以上で利用されている狭心症薬・ジルチアゼム（ヘルベッサ）は特に有名だが、その開発においては、ランダムスクリーニング技術の導入により、元々抗うつ剤を探索していた化合物にカルシウム拮抗作用が発見されたことで抗狭心症薬としても利用されるようになったことが知られている。すなわち、多様な 1,5-ベンゾチアゼピン誘導体およびその類縁体の迅速不斉合成に基づく医薬品探索は、様々な疾患に対処する新薬を創製するうえで重要な技術になりうる。そこで、その環構造を一挙に構築できる環化付加反応により様々な類縁体を位置・立体選択的に合成できる手法が有効と考えられるため、本研究では形式的環化付加反応によりあらゆる置換形式の類縁体を簡便かつ網羅的に合成できる手法の確立を目指した。

【方法】 本研究に着手するまでに、カルボン酸誘導体と光学活性イソチオウレア触媒から発生する α, β -不飽和アシルアンモニウム中間体と 2-アミノチオフェノールによる形式的環化付加反応が優れた位置・立体選択性で進行し、2-置換 1,5-ベンゾチアゼピン誘導体が合成できることを既に見いだしていた（(1) 式）。本反応の立体選択性は、硫黄のマイケル付加（1st attack）の選択性には依存せず、可逆的なマイケル付加を経て環化（2nd attack）の段階で動的速度論的不斉変換により決定される。そこで、本手法を 3-置換体や 2,3-二置換体の合成にも応用した。

【結果】 触媒構造や反応条件を最適化した結果、本手法により 3-置換（(2) 式）および 2,3-二置換（(3) 式）1,5-ベンゾチアゼピン誘導体が高立体選択的に得られることを見いだした。我々の研究（(1) 式）を契機に、触媒的不斉 2-置換 1,5-ベンゾチアゼピン合成が他のグループからも報告されたが、様々な置換形式の誘導体合成に展開できる点は他法とは一線を画した本手法の長所である。これにより、代表的な医薬品候補である 1,5-ベンゾチアゼピン群の迅速不斉合成が可能になり、生成物のひとつからは抗うつ剤・チアゼシムの短工程合成も実現した。本研究で実現した 1,5-ベンゾチアゼピン類の迅速ライブラリー構築法は、医薬品探索の高速化に寄与することが期待できる。

形式的環化付加による 1,5-ベンゾチアゼピン誘導体のライブラリー合成

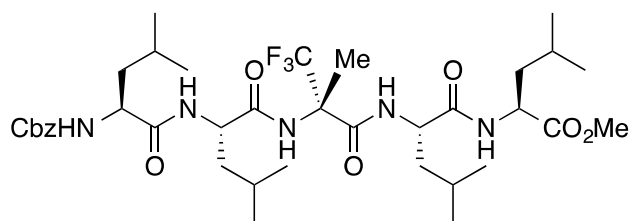
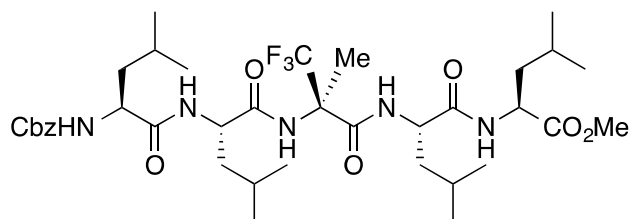


【目的】 天然の L- α -アミノ酸の α 位の水素をアルキル基で置換したものは、 α, α -ジ置換アミノ酸と呼ばれており、天然の L- α -アミノ酸にはない特徴を有する。今回、 α 位にフッ素を導入したアルキル基を有する光学活性な α, α -ジ置換アミノ酸を導入したアミノ酸を合成し、ペプチド中に導入することでペプチドの機能化を目指した。

【方法】 α -トリフルオロメチルアミノ酸をラセミ体で合成し、その後に光学分割するアプローチを計画した。そして α -CF₃-ジ置換アミノ酸をロイシンペプチド中へ導入して得られるペプチドの二次構造解析を行うことで、 α -CF₃-ジ置換アミノ酸がペプチド全体へ与える影響を調べた。

【結果】 入手容易な出発原料から、種々のラセミ体 α -トリフルオロメチルアミノ酸を 3 工程で合成することができた。合成したラセミ体の光学分割は (*R*)-BINOL エステルへと誘導化することで達成し、光学純度の高いアミノ酸を得ることができた。この光学活性体をペプチド中に導入することで、ペプチドの二次構造に関する様々な情報を得ることができ、今後機能性ペプチドのデザインに応用することが期待される。

フッ素導入ジ置換アミノ酸含有ペプチド

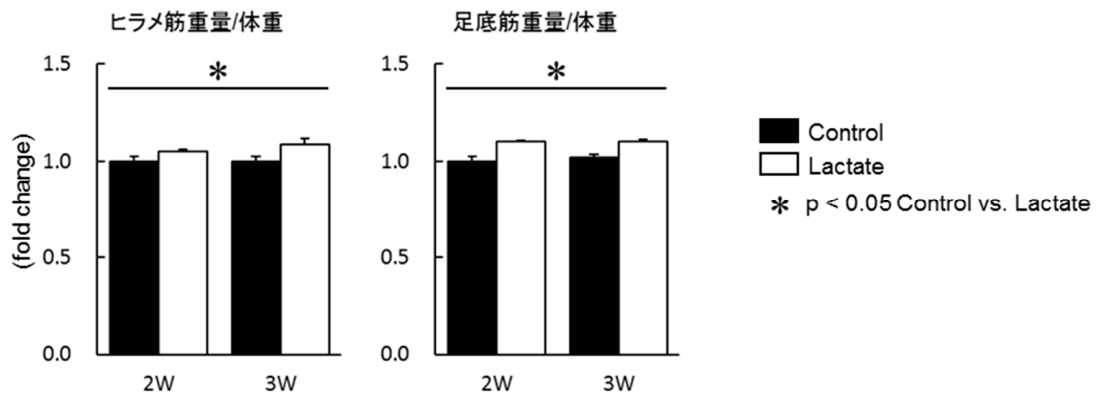
**(S)-5****(R)-5**

【目的】 運動は骨格筋機能の向上をもたらす筋量増加を引き起こす。一方、運動に伴い、骨格筋から乳酸を含む様々な生理活性物質が分泌される。骨格筋には乳酸受容体が存在するため、骨格筋から分泌される乳酸が骨格筋自身に作用すると考えられる。しかしながら、骨格筋における乳酸受容体の役割には不明な点が多い。そこで本研究では骨格筋における乳酸受容体の存在に着目し、乳酸受容体刺激が骨格筋量の増加に及ぼす影響について検討した。

【方法】 乳酸ナトリウムまたは乳酸受容体アゴニストをマウスへ経口投与した後、骨格筋重量を測定した。また、骨格筋細胞の培養培地に乳酸受容体刺激を負荷した後、筋核数を測定した。

【結果】 マウスへの乳酸ナトリウムの経口投与により、骨格筋重量の増加が認められた。乳酸受容体アゴニストの経口投与も筋重量を増加させた。これらの結果から、乳酸受容体刺激は骨格筋量の増加を引き起こすことが示唆された。また、骨格筋細胞に対する乳酸受容体刺激が筋核数に及ぼす影響について検討した結果、乳酸ナトリウムおよび乳酸受容体アゴニストによる筋管細胞の核数の増加が認められた。したがって、乳酸受容体は筋芽細胞の融合、筋管細胞の形成に関与することが示唆された。

乳酸ナトリウムが筋重量に及ぼす影響

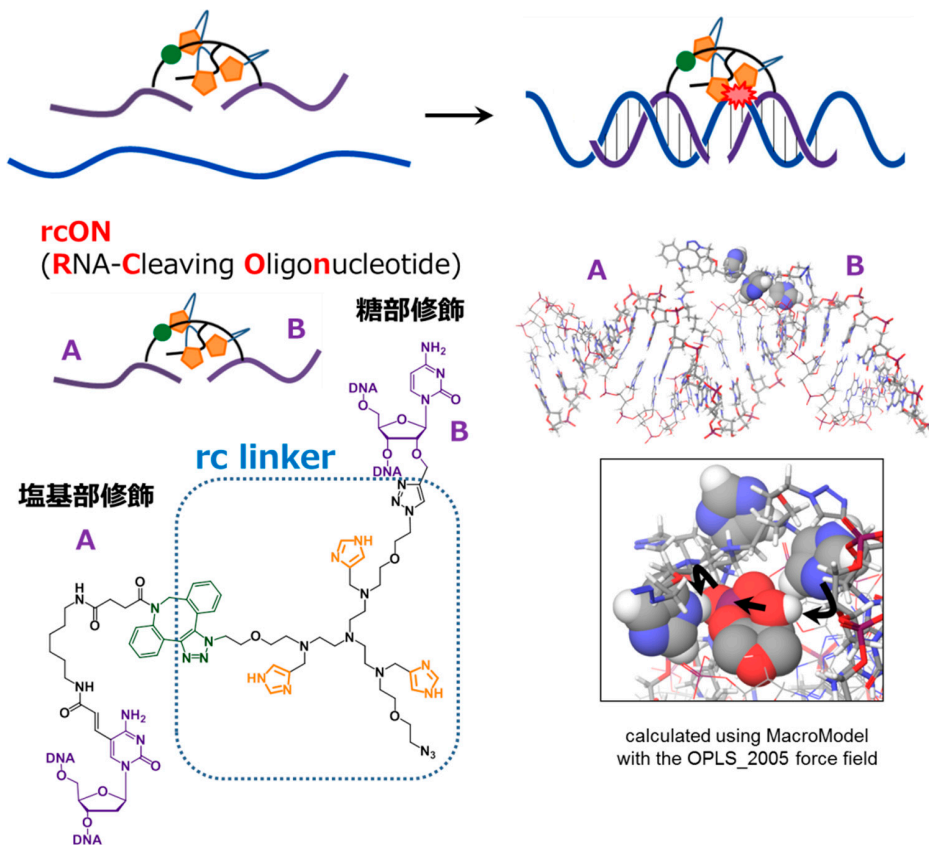


【目的】 RNAは遺伝情報の伝達や制御を担う重要な生体高分子であり、その配列選択的な切断を誘起する人工核酸の開発は核酸医薬分野にとって非常に重要である。本研究では、RNase Aの切断メカニズムを参考に、標的RNAを化学的に切断可能な人工核酸 rcON を新たに設計した。rcONの基本骨格は我々が開発した擬ロタキサン形成核酸研究により得られた核酸構造を基にした。本研究では生理的条件下、酵素非依存的かつ触媒的に mRNA を切断する新規人工核酸の開発を目的とし、従来とは異なる骨格を持つ機能性核酸の設計・合成・RNA切断能評価を行った。

【方法】 三分岐リンカーのそれぞれの鎖にイミダゾールおよびアジド基を有する rc リンカーを合成、クリックケミストリーを利用することでオリゴヌクレオチドにコンジュゲートし設計した rcON を合成した。RNA切断反応は、pH7の緩衝液中で行い、ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて解析した。

【結果】 合成した rcON は、低収率ながら標的 RNA を選択的に切断可能であることが明らかになった。しかし、反応が低収率で止まることおよび切断点が期待した位置と異なったことから、正確な切断活性種（活性複合体）およびメカニズムは現在までのところ明らかにできていない。今後これらを明らかにし、高効率、高収率かつ触媒的に切断可能な人工核酸の創製を目指す。

RNA切断反応の概念図と設計した人工核酸 rcON の構造



101 福島県内除染作業員の作業内容別被ばく線量の分析

各務 竹康

【目的】福島県では、東京電力福島第一原子力発電所事故後、除染作業が行われている。除染作業は低線量の放射線被ばくをうける職業であるといえる。本研究は、除染作業における作業内容の違いが作業員の外部被曝線量にどのような差を与えるのか明らかにし、代表者による測定が妥当であるのか検討することを目的とした。

【方法】福島県の避難区域で除染作業を行う A 社およびその下請け企業を含めた企業群の従業員を対象として研究を行った。4月から12月までの全期間通算して在籍した者について、作業内容は、従業員の所属する作業班別の作業記録を元に分類した。本研究の対象期間は農地除染を主に実施しており、作業内容を作業工程により、「事務局」、「表土および草木の除去」、「除去土壌等の集積」、「汚染土壌等の袋詰及び運搬」、「非汚染土壌による被覆」の5群に分類した。平成28年度にA社にて除染作業に従事した242人の、作業期間である4月から12月における月別の従事者数および、外部被ばく線量を分析し、月別の被ばく線量の比較を行った。次に、4月から12月までの全期間通算して在籍した者について、作業内容別に外部被ばく線量の比較を行なった。作業内容別の従事者数被ばく線量の分布を集計し、比較を行った。群内の比較はKruskal-Wallis検定、その後の多重比較はSteel-Dwass法を用いた。

【結果】調査期間内にA社の実施した除染作業に従事した242人のうち215人(88.8%)が男性であった。また、全体の53.7%にあたる130人(うち女性17人)が期間全てにおいて作業に従事していた。その他の112人について、従事期間の中央値は5ヶ月であった。4月が最も被ばく線量の中央値が大きく、範囲も分散していた。多重比較の結果では、6月が、被ばく線量が最も少なく、ついで12月、8月の被ばく線量が少なかった。調査対象期間9ヶ月における総外部被ばく線量の中央値(25~75パーセンタイル)は0.82(0.72~0.91)mSvであった。多重比較の結果、事務局と表土および草木の除去、除去土壌等の集積、汚染土壌等の袋詰及び運搬($p < 0.01$)、非汚染土壌による被覆と除去土壌等の集積($p < 0.05$)、非汚染土壌による被覆と表土および草木の除去、汚染土壌等の袋詰及び運搬($p < 0.01$)、除去土壌等の集積と汚染土壌等の袋詰及び運搬($p < 0.05$)の間に有意差を認めた

【考察】本研究の結果より、代表者による線量測定の結果を全員に当てはめた場合、被ばく線量の過大評価、過小評価が生じ、将来健康影響等が発生した際にその影響を正確に推定できない可能性が示唆された。低線量下での除染作業について、線量測定の方法は、現在認められている方法では必ずしも十分と言えず、個別の線量測定の必要性を示すための貴重な資料となると考えられる。職業性の低線量放射線被ばくについて、将来的な健康影響との関連性を検討するためには、就業時に正確に曝露量を測定していることが重要である。除染作業は、帰還困難区域での作業が本格的に始まるなど、今後も継続して行われる見込みであるが、空間線量の大小に関わらず、全ての作業場において個々の正確な被ばく量を測定し、記録することが望ましい。

多重比較による作業内容別総外部被ばく線量の比較

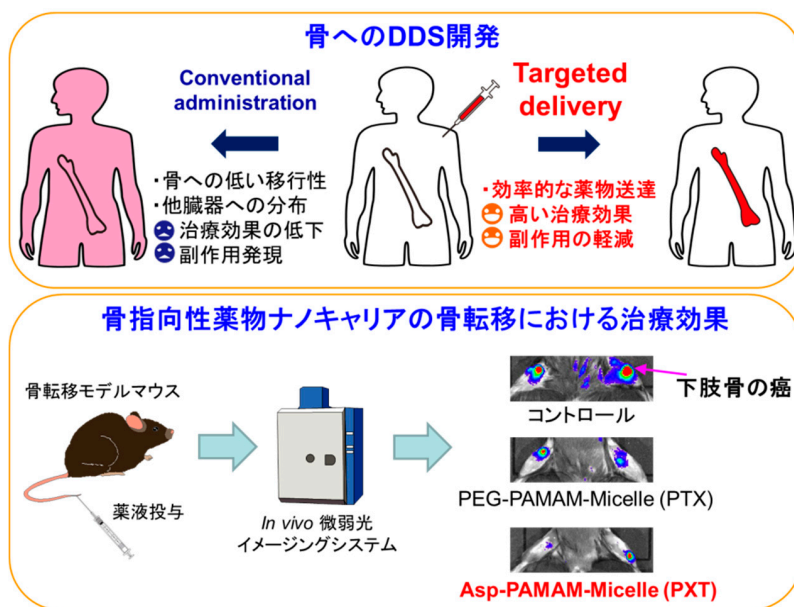
	被ばく線量(mSv)	1	2	3	4	5
1. 事務局	0.64 (0.57-0.71)	-				
2. 表土および草木の除去	0.88 (0.79-0.96)	<0.001	-			
3. 除去土壌等の集積	0.79 (0.75-0.90)	<0.001	0.313	-		
4. 汚染土壌等の袋詰及び運搬	0.96 (0.91-0.99)	<0.001	0.265	0.017	-	
5. 非汚染土壌による被覆	0.71 (0.65-0.77)	<0.226	<0.001	0.022	<0.001	-

【目的】 人口の高齢化に伴い、骨転移や骨粗鬆症などの骨疾患治療の重要性が高くなり、薬物を標的部位である骨に効率よく送達する DDS 開発が切望されている。最近、筆者らはアスパラギン酸 (Asp) などのカルボン酸のポリマー配列が骨に対して高親和性を有すること及び、カルボン酸修飾が高分子の骨ターゲティングに有用であることを見出した。そこで本研究では、様々な薬物を封入可能なナノ粒子へのカルボン酸修飾化による汎用性の高い骨ターゲティングシステムの開発及びそれらを用いた新規骨転移治療法の構築を試みた。すなわち、体内動態と薬効を基盤とした合理的な粒子設計により、高い有効性と効率的な治療が得られる骨指向性薬物ナノキャリアの創製を試みた。

【方法】 骨指向性薬物ナノキャリアの調製 : Asp 修飾樹状高分子 (Asp-PAMAM) に水溶性のポリエチレングリコール (PEG) と疎水基 (L) を結合させた両親媒性分子を合成し、溶液中で自己集合させたナノ粒子 (Asp-PAMAM-Micelle) を調製した。Asp-PAMAM-Micelle と抗がん剤であるパクリタキセル (PTX) を混合することで PTX を封入した Asp-PAMAM-Micelle (PEG-Asp-Micelle (PTX)) を調製した。Asp-PAMAM-Micelle の粒子径及び表面電荷測定 : 動的光散乱法及び電気レーザー・ドップラー法により測定した。マウスを用いた薬物及びキャリアの体内動態 : ^3H -PTX 封入 ^{111}In -Asp-PAMAM-Micelle を用いて評価した。骨転移治療効果 : ルシフェラーゼ遺伝子を導入した癌細胞株 B16-BL6/Luc 細胞を用いて作製した骨転移モデルマウスに Asp-PAMAM-Micelle (PTX) を投与した後の癌増殖を評価した。

【結果】 Asp-PAMAM-Micelle の粒子径は 約 50 nm を示し、またその表面電荷は負の値を示すことが確認された。Asp 未修飾の ^{111}In -PEG-PAMAM-Micelle (^3H -PTX) をマウスに静脈内投与したところ、投与後 3 時間でミセル及び PTX の骨移行率はそれぞれ、5.6%、7.7% を示した。一方、Asp 修飾を施した ^{111}In -Asp-PAMAM-Micelle (^3H -PTX) 投与後のミセル及び PTX の骨移行率はそれぞれ、26%、22% となり、Asp 未修飾体に比べ高い値を示した。骨転移モデルマウスを用いた検討では、Asp-PAMAM-Micelle (PTX) の投与により下肢骨における癌増殖が顕著に抑制され、骨転移治療における Asp-PAMAM-Micelle の有用性が示された。

骨への DDS 開発の概念と骨指向性薬物ナノキャリアの骨転移における治療効果

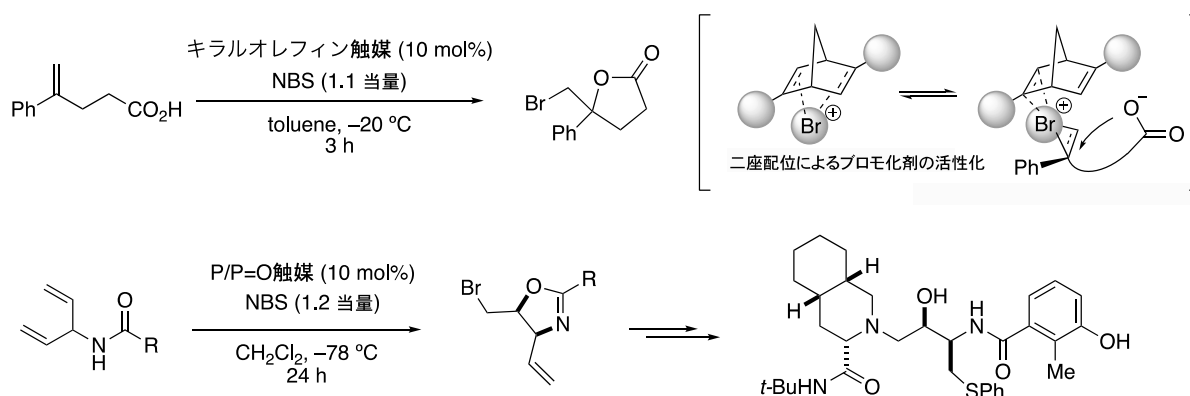


【目的】本研究の目的は、未だ実現していない不活性オレフィン類の不斉ハロ環化反応を導出することにより創薬研究に供給可能な含ハロゲン有用キラル合成素子のケミカルスペースを飛躍的に拡大することである。課題実現のための戦略として、不斉ハロ環化反応の研究において盲点となっているキラルオレフィンの触媒的応用を提案し、キラルオレフィンを基盤とする新しい不斉触媒デザインが高活性なキラルハロゲン化剤の生成に繋がるかを検証する。既存のアプローチでは改善の余地を残す基質適用制限を、新たな立体制御原理に基づく触媒開発により打破する。これにより、不斉ハロ環化反応を魅力的な構造や生物活性を有する含ハロゲン天然物の合成、反応生成物を組み込んだ新規医薬品や既存医薬品の短工程合成化に資する実用的技術へと発展させる。

【方法】キラルオレフィンを不斉ブロモ化触媒として利用するには、触媒オレフィンが基質オレフィンよりも高い反応性を有することが必要である。これを踏まえて、林・カレイラらによって開発された市販のキラルジエンを触媒に用いて、すでに公知の不斉プロモラクトン化反応によりアイデアの妥当性を検証した。

【結果】キラルジエンは二座配位によって基質に優先してブロモ化剤を活性化できると期待され、不斉制御下でのオレフィン交換による基質の立体選択的ブロモ化と目的環化反応が進行すると想定したが、有望な立体制御能や反応加速効果を見出すことは困難であった。一方で、これまでに筆者らが見出していたリン化合物を触媒とする不斉プロモ環化反応に関して大きな進展があった。すなわち、対称ビスアリルアミド化合物の非対称化型不斉プロモ環化反応の開発に成功し、これを鍵反応とした抗 HIV 薬の短工程合成に成功した。

オレフィン触媒を用いるプロモラクトン化およびリン化合物を用いる非対称化型プロモ環化反応



【目的】 中脳ドパミン神経系の異常は、統合失調症、うつ病など、様々な精神疾患に関与すると考えられている。これらの疾患は思春期に好発し、また、同時期にドパミン神経系が大きく発達することから、思春期におけるドパミン神経系の変化を観察することは、これらの疾患の病態解明に大きく貢献すると考えられる。

近年のMRIの撮影技術の発展により、これまでイメージング研究では観察が困難だった中脳の微細構造を描出することが可能となってきた。しかし、未だに、中脳腹側被蓋野 (VTA)、側坐核などの微細構造を描出し、これらを中心とした脳神経系結合を、思春期群や疾患群において描出した研究は存在しない。

本研究では、ドパミン神経系に関する微小脳構造描出技術の確立、東京ティーンコホートサンプルを用いた大規模縦断MRIデータへの応用、及び東大精神科統合失調症、うつ病MRIデータへの応用を行う。

【方法】 まず、VTAの関心領域 (ROI) 設定について、過去の研究 (Murty et al. 2014) で作成されたROIのほか、13名についてニューロメラニン法によるマニュアルトレーシングを実施し、VTAを同定し、これをもとにしたROI作成を行った。MurtyらのROI、マニュアルトレーシングでのROI、新たに作成したROIをシーズにした安静時機能結合を行い、どのROIが妥当性があるか検討した。

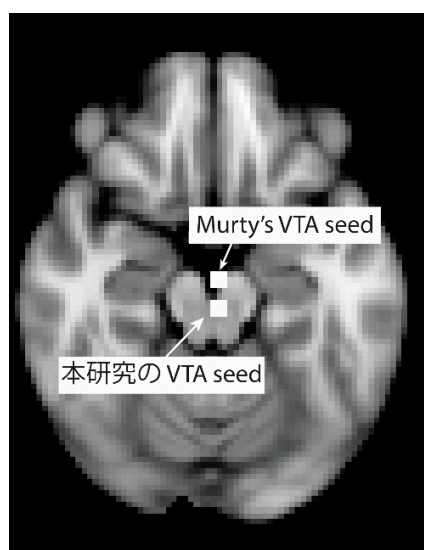
次に、この解析法を用いて、東京ティーンコホートサンプルにおいて、安静時機能結合を描出した。続いて、統合失調症患者33名、大うつ病性障害患者48名、健常対照者107名をにおいても安静時結合解析を行い、比較検討した。

【結果】 VTAのROIについては、MurtyらのROIだと、VTA seedが第4脳室と近接し、適切に位置しなかった (下図)。マニュアルトレーシングによるVTAのROIでは、動物を用いた解剖学的研究およびヒトを対象としたMurtyらなどの安静時脳結合解析研究と、今回作成したROIを用いた安静時脳結合解析が同様の結果を示したため、その後の解析ではこのROIを使用することとした。

東京ティーンコホートサンプルにおいて、VTAは全脳と強く結合していることが明らかになった。また、年齢が高まるにつれ、外側後頭葉や中心前回とVTAの機能結合が強くなることがわかった。

疾患データを用いた解析では、健常対照群と比較すると、大うつ病群では後帯状皮質においてVTAとの結合が弱く、内側前頭葉とVTAとの結合が強かった。また、健常対照群と比較すると、統合失調症群でも後帯状皮質においてVTAとの結合が弱かった。疾患群同士の比較では、大うつ病群と統合失調症群の間に有意な神経結合の違いはみられなかった。

VTA seedの違い



漢方薬・鍼灸による全身麻酔合併症の包括的予防法に関する研究を行った。

臨床研究① 鍼灸によるダビンチ手術での術後顔面浮腫軽減効果の研究

【目的】 現在、ロボット支援前立腺全摘術は多くの施設で行われている。しかし、術中は長時間気腹下に頭低位の姿勢を維持するため、術後の合併症として顔面浮腫がしばしば発生する。翳風穴は耳鳴りのツボ（経穴）として知られているが、顔面浮腫にも効果があると言われている。今回我々は手術中に翳風穴の SSP（Silver Spike Point）刺激の顔面浮腫に対する影響について、前向きランダム化臨床試験を用いて検討したので報告する。

【方法】 本研究は倫理委員会で承認され事前臨床試験登録も行った。全身麻酔下にロボット支援下前立腺全摘除術を受ける成人患者20名を鍼灸群10名とコントロール群10名に封筒法を用いてランダム化した。麻酔はプロポフォール、レミフェンタニル、ロクロニウムで導入した。鍼灸群では麻酔導入後に翳風穴に SSP 刺激を 3Hz 20mA で加え、抜管前まで刺激を続けた。導入直後と抜管直前に、顔面浮腫の程度を、下顎角から顎先、目の高さでの頭周囲、上顎の高さでの頭周囲を計測した。また、眼球の浮腫、視覚異常、覚醒後興奮の程度を調べた。統計はマンホイットニーU検定で行い、 $P < 0.05$ を有意とした。

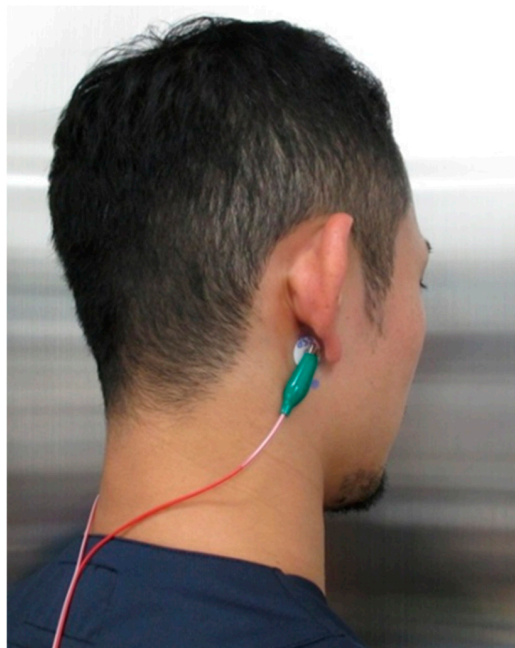
【結果】 下顎から顎先までの長さは術前では鍼灸群とコントロール群には有意差を認めなかったが ($P = 0.129$)、術後では両群で有意差を認めた (鍼灸群 13.3 ± 1.5 cm コントロール群 14.9 ± 1.5 cm, $P < 0.001$)。また、目の高さでと上顎の高さでの頭周囲も術前では鍼灸群とコントロール群に有意差はなかったが (目の高さ $P = 0.491$ 、上顎の高さ $P = 0.068$)、術後には有意差を認めた (それぞれ $P < 0.001$)。

SSP を用いた翳風穴刺激はロボット支援前立腺全摘術後の顔面浮腫を軽減する可能性が示唆された。

臨床研究② 術前柴苓湯内服による周術期不安の軽減に関しては、有意な効果は認めなかった。

臨床研究③ 術前治打撲一方内服による抜歯後疼痛軽減効果に関しては、継続中である。

SSP を用いた翳風穴刺激



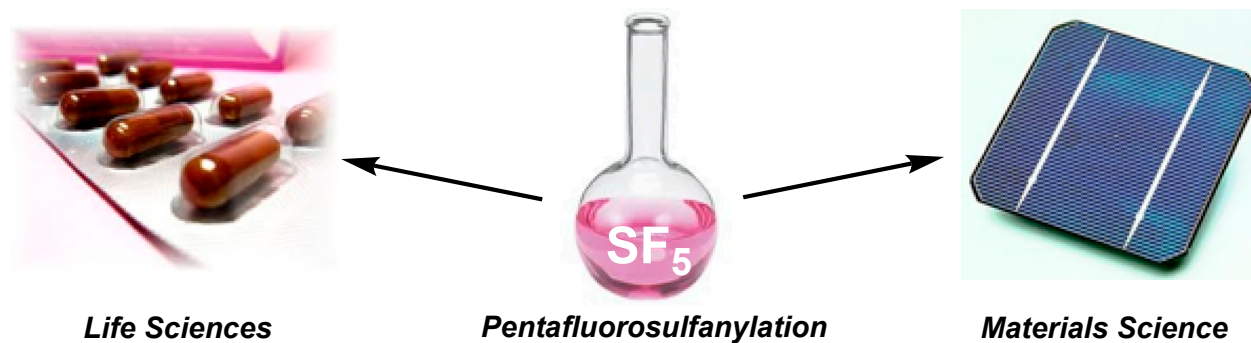
106 芳香環への直接的なSF ₅ 基導入法の開発	平野 圭一
--------------------------------------	-------

【目的】 ペンタフルオロスルファニル (SF₅) 基は「熱的に極めて安定」であるのみならず、強酸性・強塩基性条件および遷移金属による分解も受けない「化学的にも極めて安定」な置換基である。また、SF₅ 基は CF₃ 基よりも強力な誘起効果 (Hammett 置換基定数 σ : SF₅=0.55 vs. CF₃=0.39) と高い脂溶性を示すことから (Hansch 疎水性定数 π : SF₅=1.51 vs. CF₃=1.09) スーパー CF₃ 基と呼ばれ、「生理活性分子の CF₃ 基を SF₅ 基に置き換えることによる活性のチューニング」や、「新たな含 SF₅ 分子のデザインによる機能の創出」が注目を集めている。しかしながら、Sheppard による初の SF₅-ベンゼン類の合成から 56 年を経た今日においても SF₅ 基の有機合成化学はまだ黎明期にあり、その導入には厳しい反応条件が要求される。本研究の目的は、銅アート塩基を用いて (ヘテロ) 芳香族 C-H 結合を官能基許容性よくメタル化し、銅の酸化還元反応を活かして様々な芳香環に SF₅ 基を位置・化学選択的に導入する一般的な方法を開発することである。

【方法】 我々は、これまでに銅アート塩基による芳香環のオルトメタル化反応と生じる芳香族銅アート中間体の酸化還元反応 (Cu^I → Cu^{III} → Cu^I) を組み合わせることにより、芳香族 C-H 結合が高い官能基許容性をもって水酸基およびアミノ基に変換され、複雑に置換されたフェノールとアニリンが一挙に得られることを見出している。これを基に SF₅ 基の化学の新展開として、芳香族銅アート種に酸化的な SF₅ 源、すなわち SF₅-Cl/SF₅-Br を作用させることにより、銅の酸化還元能を利用した芳香環の直接的 SF₅ 化反応を目指した。中心金属の酸化還元能をもたない、あるいは乏しい典型有機金属試薬を用いると、アリールアニオンが SF₅-X のハロゲン原子を攻撃してハロベンゼン誘導体が得られるのに対し、銅を中心金属とした場合には銅原子の酸化が優先して Ar-[Cu^{III}]-SF₅ が発生し、素早い還元的脱離を経て Ar-SF₅ 類が得られると期待した。

【結果】 本研究遂行に必要な SF₅-Cl/SF₅-Br の国内生産はなく、米国からの高腐食性ガス状試薬輸入となり予想以上に時間がかかった。その間、本コンセプトによる SF₅ 基導入反応のための芳香族メタル化反応の開発に取り組んだ。新たな高位置・化学選択的脱プロトン化反応剤としてアミド型銀アート錯体をデザインし、これを用いた芳香族メタル化反応条件を精密に検討した。今後、実際に SF₅ 基導入反応を行う予定である。

ペンタフルオロスルファニル化反応の開発と期待される波及効果

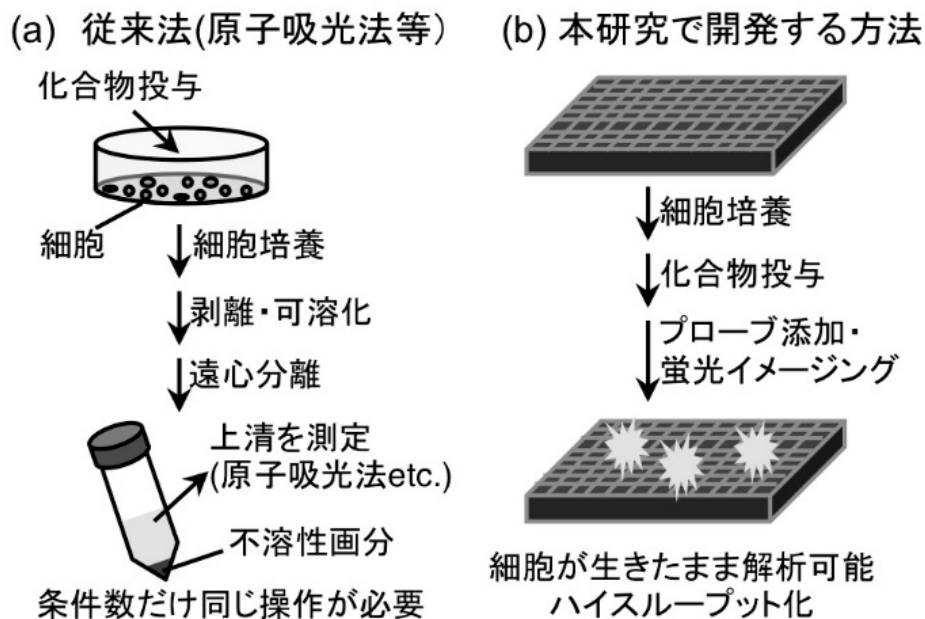


【目的】 本研究では、我々がこれまでに開発してきた細胞内二価鉄イオン検出蛍光プローブをさらに高感度化し、これまで原子吸光法によって行われてきた細胞内鉄定量法に代わる新たな細胞内鉄濃度評価系、特に生細胞を使った鉄変動ハイスループット解析法を確立することを目的とした。さらに、本解析法を化合物スクリーニングへと応用し、細胞内の鉄動態を制御する新たな生理活性化合物を見出すことを最終的な目的とした。

【方法】 まず、蛍光プローブ分子 RhoNox-1 (*Chem. Sci.* 2013, 4, 1250) をもとに、構造活性相関研究を実施し、ハイスループット解析に耐える高感度な蛍光プローブ分子を創出する。次に、得られたプローブを使い、生細胞内での鉄濃度変動を精度良く解析できる実験条件の最適化を行なった。最後に、本解析法を使い、東京大学創薬機構より供与いただいた化合物ライブラリのスクリーニング実験を行なった。

【結果】 蛍光プローブの構造最適化研究から、RhoNox-1 を超える蛍光応答を示す化合物 RhoNox-4 を見出した。本プローブは二価鉄イオン添加に伴い蛍光強度が 100 倍以上に増大し (RhoNox-1 は約 30 倍)、細胞実験においても極端に良好な応答を示した。RhoNox-4 を使い、細胞の処理条件・撮影条件の最適化により、96well プレートでの再現性の高い測定条件を決定した。この方法を使い、約 3,400 化合物より現在 7 つの鉄制御候補化合物を見出すことに成功した。

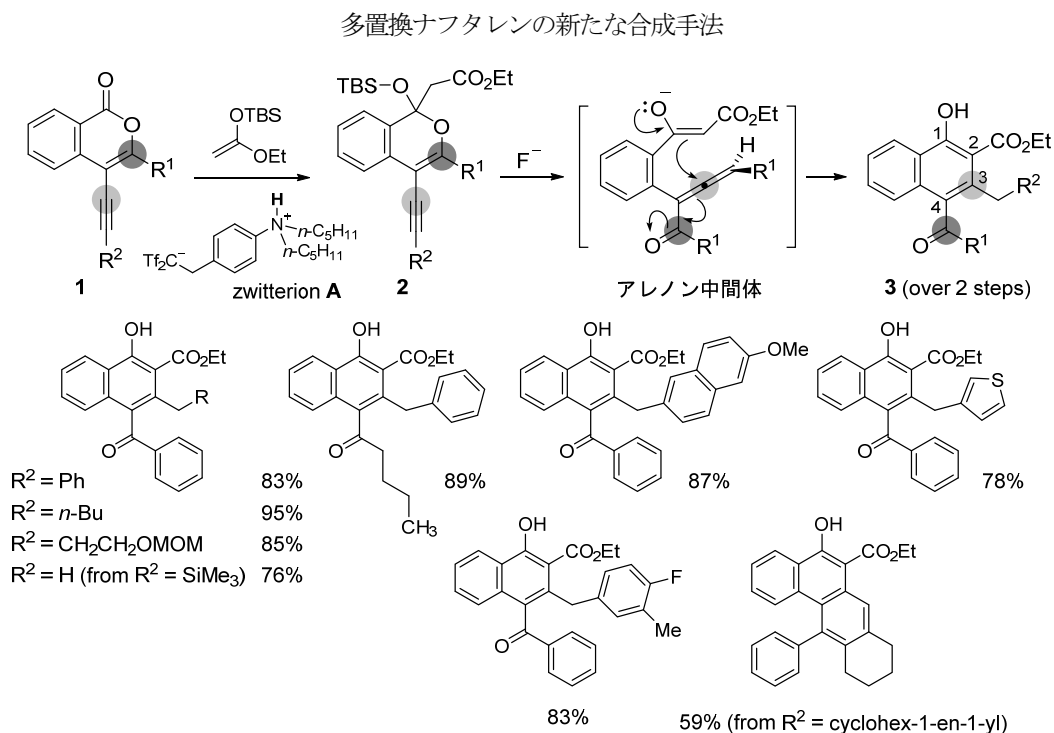
従来法 (a) と本研究にて実施する手法 (b) の比較



【目的】 Taiwanin 類や Justicidin 類といったアリールナフタレン型リグナンには、生物活性を示す化合物が多く知られ、創薬研究の対象になってきた。こうした化合物は、ナフタレン環上に複数の異なった置換基をもち、その合成では如何に置換基を位置選択的に導入するかが問題になる。多置換芳香族化合物の合成では、しばしば芳香族求電子置換反応の組合せが採用される。しかし、一般に立体障害の影響を受け易く、望む異性体が得られないケースも稀ではない。実際、1,3-二置換ベンゼンの2位に置換基を選択的に導入することすら難しく、ましてや1,2,3,4-四置換ナフタレンとなるとその合成手法は大きく限定される。また、複数のベンゼン環や複素環が縮環した多環式芳香族化合物を自在に構築することも容易ではない。従来、芳香族化合物に関する合成研究では、主としてこれら2つの問題が別々に検討されてきた。本研究の目的は、この「芳香環上における置換基の位置制御」と「多置換式芳香族骨格の構築」という問題を敢えて同時に考慮することで、多置換・多環式芳香族化合物への斬新な合成アプローチを提示することにある。さらに、芳香環は生物活性分子の開発する際のスキヤフォールドとして盛んに利用されてきたが、研究成果を通じてより複雑で設計自由度の高い分子構造が自在に利用できるようになるのではないかと期待した。

【方法】 本研究では、独自の触媒 **A** を用いてラクトン基質 **1** から簡便に合成できるラクトールシリルエーテル **2** を合成中間体とした多置換ナフタレン **3** の合成を検討した。また、ナフタレン骨格上に置換基が密集する **3** の構造的特徴を生かした高次多環式芳香族化合物の選択的な合成を検討した。すなわち、①側鎖間での結合形成を経る高次多環式芳香族化合物への誘導と、②適切な分子設計に基づく新規カスケード反応の開発である。

【結果】 双性イオン触媒 **A** を用いたラクトールシリルエーテル合成法を改めて詳細を検討し、様々な置換基をもつ基質に適用できることを明らかにした。エンイン構造をもつラクトン **1** に対しても、反応が上手く進行した点は特筆に価する。得られたラクトールシリルエーテル **2** は、引き続きフッ化物イオン処理によって特異な環の「巻き変え」反応が起こり、置換基が全て異なる1,2,3,4-四置換ナフタレン **3** を特異的に与えた。さらに、**3** の置換基間での環形成反応と、ジエンイン構造をもつラクトールシリルエーテルからの新たな連続反応によって、高次多環式芳香族化合物が得られることを明らかにした。

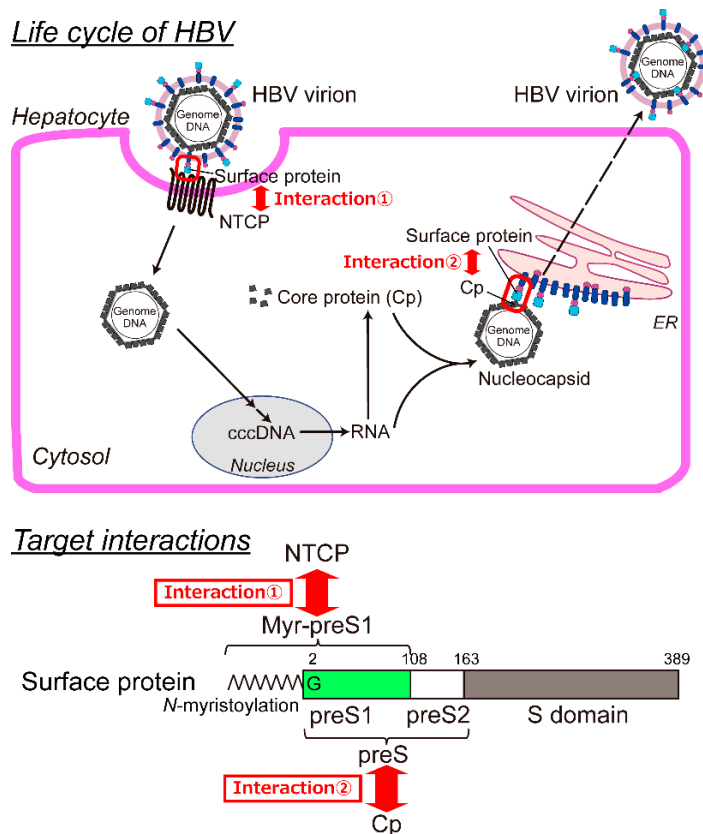


【目的】 B型肝炎ウイルス (HBV) は、肝細胞に侵入し、肝炎を引き起こす DNA ウイルスである。全世界には約 3 億 5 千万人の HBV 感染患者が存在するが、現在までに確実な治療法は確立されておらず、新たな作用点を持つ画期的治療薬の創製が望まれている。そのためには、HBV の生活環を明らかにすることが有用である。本研究では、近年明らかとなった HBV の受容体である Na⁺・胆汁酸トランスポーター (NTCP) と HBV の外殻タンパク質の結合による肝細胞への侵入機構、および肝細胞内で複製した HBV のヌcleoキャプシドと外殻タンパク質の結合による HBV 粒子の形成機構に着目した。これらのタンパク質-タンパク質間相互作用様式を明らかにすることで、これらの相互作用を阻害することによる革新的抗 HBV 薬の創製を目指した。

【方法】 HBV の外殻タンパク質の preS、preS1、preS2 領域、ヌcleoキャプシドを構成する HBV のコアタンパク質 (Cp) は大腸菌発現系を用いて調製した。PreS1、preS2 は ¹³C、¹⁵N 標識体の溶液 NMR 解析より主鎖シグナルの帰属を行った。溶液 NMR 法により、preS1 および preS2 と Cp の相互作用、preS1 への N 末端ミristoil化の影響を解析した。NTCP は大腸菌発現系を用いたサンプル調製法の確立を試みた。

【結果】 溶液 NMR 解析により、外殻タンパク質上の Cp 結合領域を同定した。Myr-preS1 は、ミristoil基近傍の N 末端領域が膜と結合することが示唆された。NTCP は大腸菌での発現をウェスタンブロットで確認した。

B型肝炎ウイルスの生活環と本研究において標的とするタンパク質-タンパク質相互作用

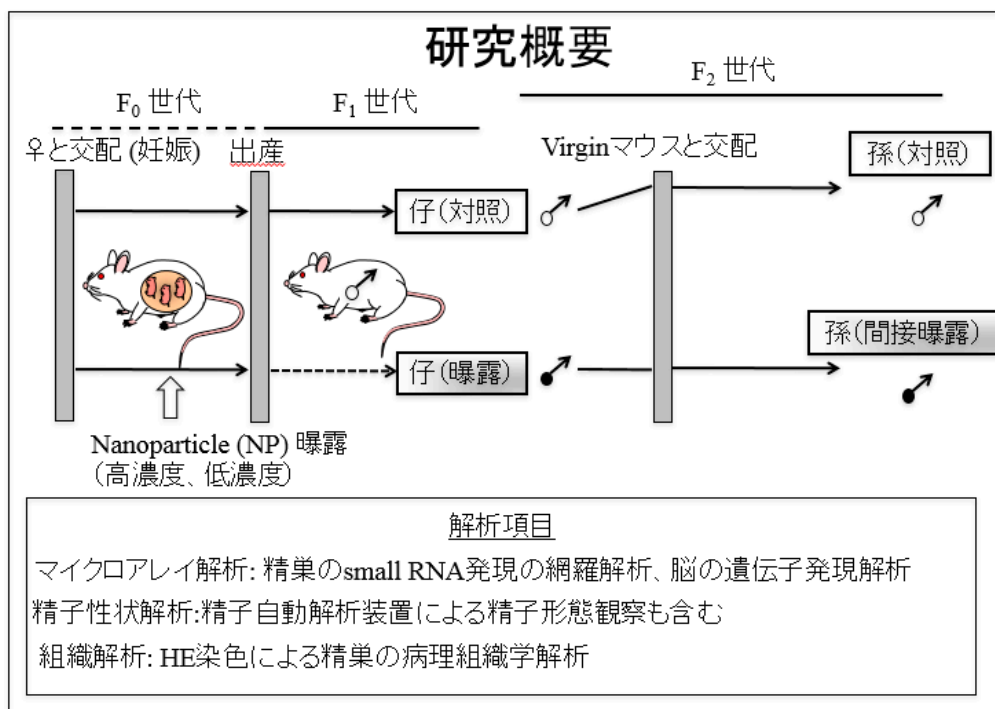


【目的】 近年、環境ストレスにより生じる多世代・経世代影響に関する研究報告がなされているが、「本当にそのような現象が起こりえるのか？また、そのメカニズムの実体は何なのか？」という疑問に対する答えは明確にされていない。私たちはこれまでに超微小粒子の妊娠期曝露により生じる仔マウス（F1 世代）の脳神経と雄性生殖に及ぼす影響を解明してきた。特に、雄性生殖への影響は、様々な種類の超微小粒子曝露で共通の所見を認めている。生殖細胞は次世代に遺伝情報をつなぐ唯一の細胞であることから、この点に着目し、本研究課題では、超微小粒子胎仔期曝露が仔（F1 世代）の雄性生殖系に及ぼす影響を明らかにすること、さらに、直接曝露を受けていない孫（F2 世代）の脳神経機能に及ぼす影響を明らかにすることを目指し、多世代・経世代影響に関する重要な分子マーカーを探索するべく研究に着手した。

【方法】 銀ナノ粒子を高濃度（50 μg : High 群）、低濃度（5 μg : Low 群）、対照（溶媒投与群）に分け、気管内投与を妊娠マウスに行った。雄性産仔（F1 世代）の精子性状に及ぼす影響を sperm class analyzer により解析した。また、F2 世代大脳皮質と海馬の遺伝子発現解析は、マイクロアレイ解析により網羅的に評価を行った。

【結果】 まず、F1 世代雄マウスの精子性状解析を行ったところ、曝露により精子の細胞死の割合並びに形態異常が多く認められた。精巣組織所見では顕著な変化は認められていないものの、詳細な定量解析を現在進めているところである。一方で、Gene chip を用いて、F2 世代雄マウスの大脳皮質と海馬での遺伝子発現変化を解析したところ、海馬では行動異常に関連する遺伝子群の発現変化を網羅的に捉えた。しかし、大脳皮質では曝露による顕著な変化を認めることができなかった。すなわち、脳領域ごとで異なる結果が得られ、雄性生殖細胞系から次世代の脳領域への transgenerational effect の詳細に関して、今後明らかにする必要がある。現在、生殖細胞のエピゲノム解析を進めており、transgenerational epigenetic inheritance に関連し得る分子マーカーの同定を試みている。

超微小粒子（ナノ粒子）曝露により生じる多世代・経世代影響の概念図



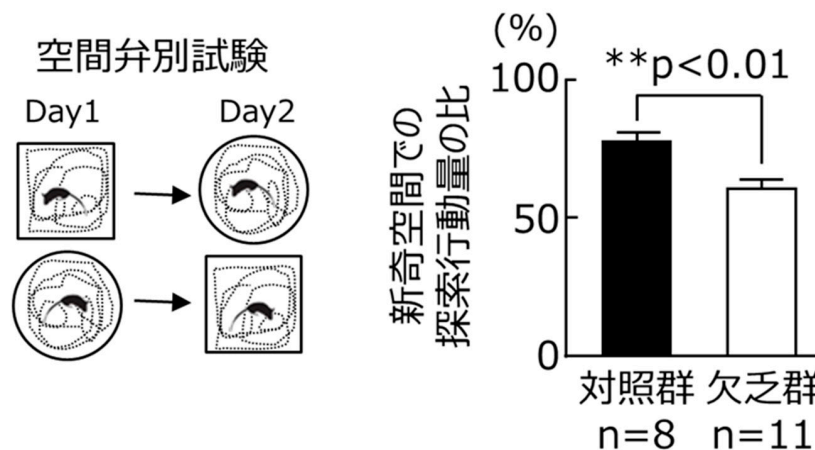
【目的】 高齢化社会が進む中で、認知症患者の増加は社会問題となっている。認知症の中核症状は進行性の学習・記憶の障害であり、日常生活に支障をきたすこともある。初期の段階では記憶障害の程度は軽いため、この時点で進行を抑制することが望まれるが、頭部 MRI 画像や CT 画像などで異常を発見出来るのは中後期となってしまふ。近年、認知症患者と診断される数年前の時点でも空間認知・空間弁別（短期記憶）などの高次機能が低下することが報告された。学習・記憶の基盤となる細胞レベルの素過程は神経細胞間の信号伝達が持続的に向上する現象、長期増強（LTP）である。神経細胞同士はシナプス結合を介して情報のやり取りをしており、LTPに伴い樹状突起棘（スパイン）の機能とその協調性が制御されることが重要であり、シナプス後部の分子構築が動的なアクチン細胞骨格と学習・記憶関連分子の活動依存的局在変化の相互作用により規定されることが示されている。セプチン細胞骨格は 14 種類のサブユニットからなる細胞分裂蛋白質として発見され、最終分化した神経系で最も高発現し、アルツハイマー病（Kinoshita et al., *Am J Pathol* 1998）のような神経疾患にも関与することが示唆されている。我々は、特定のセプチンサブユニットがニューロンの形態形成には関与しないものの空間弁別処理に重要な役割を持つことを見出した。空間弁別の中枢は海馬歯状回であることが組織破壊実験や LTP 阻害実験から示され（McHugh et al. *Science* 2007）、空間弁別の基盤となる分子メカニズムの解明が期待されている。しかしながら、これまでの実験結果はセプチン慢性欠損マウスを使用しており領域特異性については確認出来ていない。そこで本研究ではセプチン欠損/野生型マウスの歯状回における局所的セプチン補填/枯渇が空間弁別障害を救済/再現するかを精査することを目的とした。

【方法】 歯状回選択的セプチン補填：セプチンと発現モニタリング用 GFP を共発現するアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターと、GFP のみを発現する対照ベクターを調製し、セプチン欠損マウスの両側歯状回に脳定位固定装置を用いて注入した。歯状回選択的セプチン枯渇：セプチンを標的とする shRNA と発現モニタリング用 GFP を共発現する AAV ベクターと標的配列部分をスクランブルした対照ベクターを調製し、培養細胞での動作確認の後、野生型マウスの両側歯状回に注入した。空間弁別試験：Day1：実験群・対照群の各々を 2 群に分け、素材と床面積が共通で形状のみ異なる 2 つの箱（立方体、円筒）のいずれかにマウスを入れて箱の中を探索させ、移動距離を計測した。Day2：Day1 とは異なる箱での移動距離を計測した。移動距離の比を算出し検定を行った。

【結果】 セプチン欠損マウスでの歯状回選択的セプチン補填実験では、新奇空間での探索行動はレスキュー群が有意に高かった（ $72 \pm 5.3\%$ vs. $93 \pm 8.7\%$, $p < 0.05$, $n = 7, 7$ ）。野生型マウスでの歯状回選択的セプチン枯渇実験では、セプチン欠乏群が有意に低かった（図： $76 \pm 3.4\%$ vs. $59 \pm 2.8\%$, $p < 0.01$, $n = 8, 11$ ）。

今回の実験から、歯状回においてセプチンが発現することが空間弁別に必要であることと、セプチン欠損マウスの空間弁別障害の正常化には歯状回に局限したセプチンの発現で十分であることが検証できた。

セプチンを海馬歯状回選択的に枯渇したマウスの空間弁別試験結果

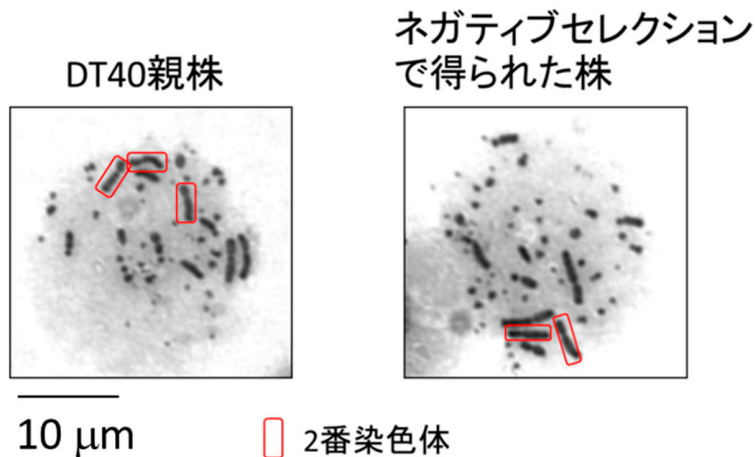


【目的】 通常ヒトの二倍体細胞は、22 対の常染色体と 1 対の性染色体、計 46 本の染色体を持っており、染色体数が増減しないように制御されている。この恒常性の破綻、つまり染色体の異数化はダウン症（21 番染色体トリソミー）やエドワーズ症候群（18 番染色体トリソミー）で見られるようにヒトの遺伝病の原因となる他、多くの癌細胞で染色体の異数化が観察される。このため細胞がどのように染色体数の恒常性を保っているのかを明らかにすることは、ヒトの病気の原因解明や新たな治療法の開発につながる可能性がある。現在、染色体の異数化を定量的に評価する良い実験系が存在しないことから、本研究では染色体の異数化を検出する新たな系の構築とその応用を目指した。

【方法】 ニワトリ B リンパ球、DT40 細胞は核型が比較的安定な細胞株であるが、2 番染色体がトリソミーになっている。本研究ではこの 2 番染色体のうちの一つに HSV-TK 遺伝子や Ecogpt 遺伝子などのネガティブセレクションマーカーをノックインした細胞を作製した。これらの細胞において薬剤セレクションを行い、得られたクローンの染色体を解析した。またダイソミーである 22 番染色体に Ecogpt をノックイン後、薬剤セレクションを行い、モノソミーとなった細胞が得られるかどうか検討した。

【結果】 薬剤セレクションの結果得られたクローンでは HSV-TK と Ecogpt どちらを用いた場合でも 90%以上の確率で 2 番染色体を失っていた。これはネガティブセレクションマーカーに機能不全となる変異が入るよりも遥かに高い確率で 2 番染色体を失ったことを意味している。この結果から、本実験系を用いることで染色体の異数化を引き起こす薬剤や遺伝子変異のスクリーニングなどが可能であると考えられる。また同様の実験を通常のダイソミーである 22 番染色体で行ったところ、22 番染色体がモノソミーとなった細胞を得た。このため、本実験系は染色体の異数化を測定するだけでなく、人工的に染色体の数を変化させるための手法として広く活用できると考えられる。

ネガティブセレクションの前後における染色体数の変化



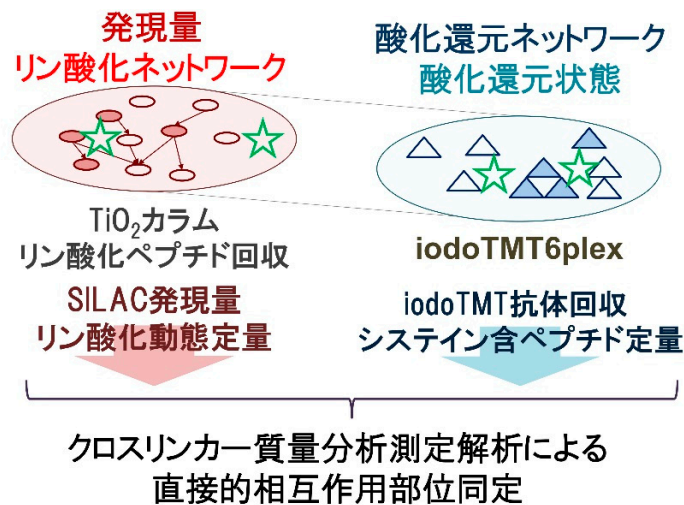
【目的】 タンパク質の翻訳後修飾は、タンパク質機能や活性の制御を通して生命現象の恒常性維持に重要な役割を果たしている。プロテオミクス分野では近年、測定機器の精度向上や周辺技術の進展により、発現量や翻訳後修飾などのタンパク質関連情報の定量法が開発されてきている。しかしながら、複数の翻訳後修飾の関連性やクロストークに関する計測はこれまでほとんど行われていなかった。そこで本研究では、代表的翻訳後修飾であるリン酸化と酸化修飾の動的なクロストークをとらえるための定量解析系の構築と、直接的なクロストークを検出するための相互作用同定技術の開発を進めた。

【方法】 リン酸化修飾状態の定量解析にはチタンカラム等を用いたリン酸化ペプチド回収技術を利用し、酸化還元状態の定量化には、還元状態と可逆的酸化状態のシステイン残基を安定同位体型の質量の異なる **isobaric** ラベル体でそれぞれ修飾することにより定量化を行った。また、システイン残基を介した相互作用部位同定手法の構築を試みた。

【結果】 本研究により、定量化計測法の高度化とともに、レドックス反応性の高いシステイン残基を中心とする相互作用部位の同定につながる実験系の構築に成功した。これらの技術は、システイン残基を介したタンパク質間のクロストークを中心に、シグナル伝達経路を検証する上でも有用性の高いツールと考えられる。

プロテオミクス定量技術に基づく翻訳後修飾間の関連性解析

質量分析定量測定

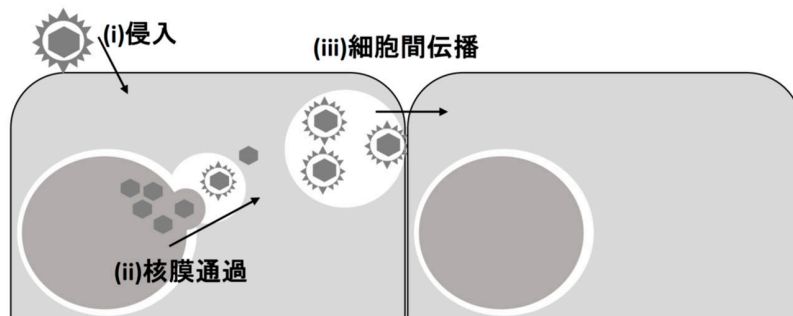


【目的】 ヘルペスウイルス科に属する単純ヘルペスウイルス (HSV: herpes simplex virus) は、我々人類にとって、もっとも身近に存在を認識できるウイルスといえるかもしれない。全世界でその感染率が 70%に上る HSV は、口唇ヘルペスの原因となるだけでなく、脳炎、性器ヘルペス、皮膚疾患、眼疾患、全身性の新生児ヘルペスといった多様な疾患を引き起こす。HSV がコードする膜タンパク質は、ウイルスエンベロープと細胞膜との間の融合を引き起こすことで標的細胞への侵入を仲介する。同時にこれらの膜タンパク質は、宿主細胞膜の変性や融合を引き起こすことでウイルス粒子形成にも貢献している。

【方法】 本研究では、HSV 膜タンパク質の中でも、特に細胞間感染を引き起こす糖タンパク質である glycoprotein E (gE) と、核膜通過を引き起こすウイルスタンパク質複合体である Nuclear Egress Complex (NEC) に注目し、gE と相互作用する宿主因子および NEC の機能発現に必要なアミノ酸残基を解析した。

【結果】 HSV gE と相互作用する宿主因子の発現抑制により、HSV による gE 依存的な細胞間感染は著しく低下した。すなわち、当該因子は gE の機能発現に重要な役割を担っていると考えられた。宿主細胞内でしか増殖できないウイルスにとって、膜融合は必要不可欠の行程といえ、ウイルスと宿主細胞膜との関係性の理解は、新しい抗ウイルス戦略構築に貢献すると考えられる。

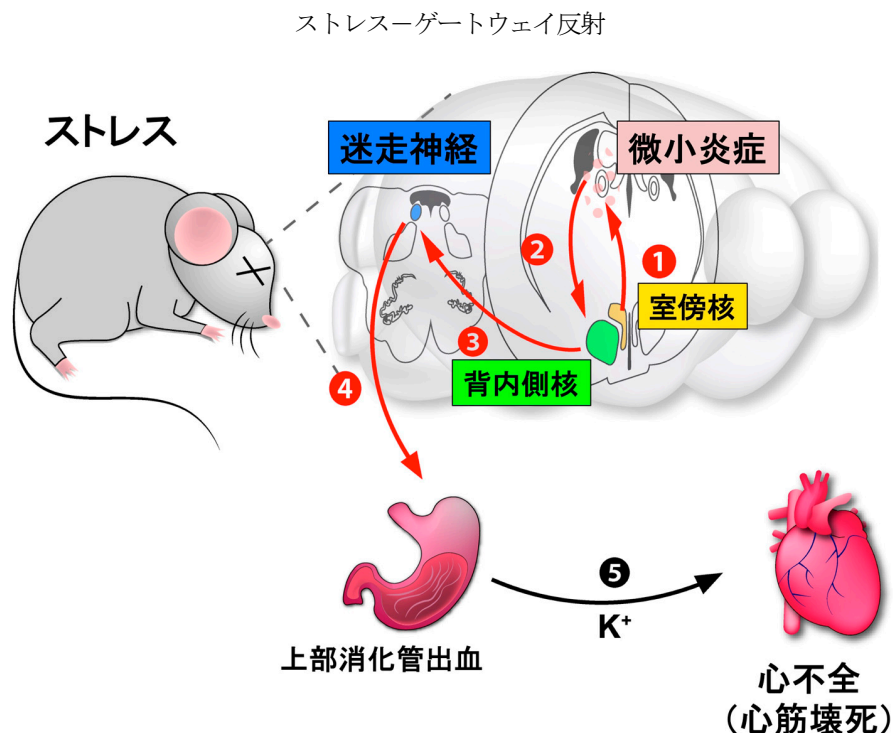
HSV の感染環と膜融合



【目的】 過度のストレスは、多くの病気に寄与することが知られているが、その分子機構は未だ不明であり、現代社会の多くの病気の機序を解明するためにストレスと病態形成の関係性の解明が急がれている。本研究では、ストレスによって誘導される過剰な神経活性化が、どのような分子機序にて、炎症病態の増悪に寄与するかを解析する。本研究成果はなぜ過度のストレスが良くないのかを説明できる点で非常に意義深い研究であり、本解析で明らかとなる分子機構を基盤とし、新規治療薬の創出を目指すことで、社会に大きく還元することできる。

【方法】 慢性ストレスを誘導するため、睡眠障害作製ケージや床敷を湿らせたケージを用いた。これらのマウスに実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を誘導する中枢神経系抗原ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質 (MOG) 認識 CD4⁺T 細胞を移入し、その病態を観察した。またストレスと病態の関連性を検討するため、ストレスに関連する脳領域を電気的、薬理的に遮断し、また脳内微小炎症を模倣するため、サイトカインや免疫細胞を直接脳内へ投与する実験を行った。さらに、胃・十二指腸、心臓での機能障害も観察されたため、各臓器での外科的、薬理的な解析を実施し、慢性ストレスによる末梢臓器の機能障害についても検討を行った。

【結果】 慢性ストレス下での EAE 誘導はマウスに突然死を引き起こした。突然死の詳細を解析した結果、免疫細胞の侵入口が脳内に形成されることを発見した。この細胞集積による微小な炎症の役割について解析を行うと、通常時では誘導されない神経回路活性化を引き起こし、最終的に上過剰な迷走神経活性化が生じることで、胃・十二指腸潰瘍が起り、出血、それに伴う血中カリウムイオン濃度の上昇が心機能障害を引き起こし、マウスの突然死を誘導した。



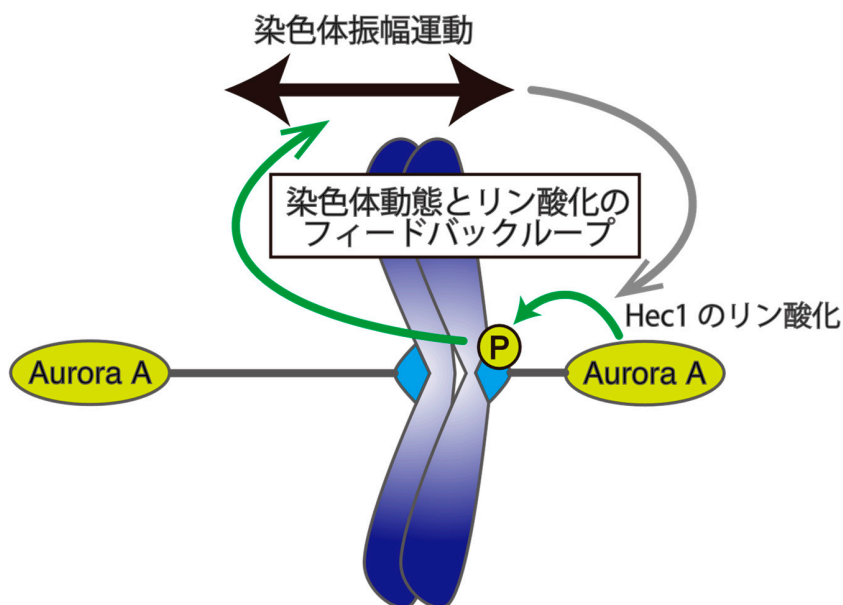
【目的】 多くのがん細胞で染色体の異数化がみられる一方、正常細胞の染色体の数は常に一定に保たれている。染色体の異数化は細胞分裂の際に染色体が娘細胞に均等に分配されないこと（染色体不安定性）に起因することから、がん細胞では正常細胞に比べて染色体を均等に分配するシステム（染色体均等分配システム）の堅牢性が低いことが予想される。しかし、正常細胞とがん細胞間の染色体均等分配システムの堅牢性の違いを生み出す原因は不明である。

本研究では、正常細胞とがん細胞における染色体均等分配制御に関わる Hec1 のリン酸化の違いが、分裂期染色体動態（染色体振幅運動）及び染色体均等分配課程にどのように影響するのかという点について解析することで、がん細胞で見られる染色体均等分配システムの堅牢性の低下が何に起因するのかを明らかにする。

【方法】 分裂期中期 Hec1 のリン酸化に対する責任キナーゼを明らかにするために、正常二倍体細胞株 RPE-1 細胞をプロテアソーム阻害剤 MG132 で処理することで分裂期中期に同調し、Aurora キナーゼ阻害剤を添加した後、抗 Hec1 抗体及び抗リン酸化 Hec1 抗体を用いて免疫染色することで、Hec1 のリン酸化強度を定量した。また、動原体と微小管を可視化した RPE-1 細胞を同様に処理し、生細胞観察することで、染色体振幅運動に対する Aurora キナーゼの寄与を検証した。加えて、動原体を可視化した RPE-1 細胞を上記と同様に処理し、抗 α -tubulin 抗体を用いて免疫染色することで、分裂期中期における誤った動原体-微小管結合と分裂期後期における染色体分配異常の発生頻度を測定した。

【結果】 正常二倍体細胞において分裂期中期 Hec1 は中心体キナーゼ Aurora A によってリン酸化されることをみいだした。また、正常二倍体細胞の分裂期中期で Aurora A を抑制すると、分裂期中期 Hec1 のリン酸化に必要な染色体振幅運動が减弱するとともに、誤った動原体-微小管結合の増加と染色体分配異常が引き起こされた。分裂期中期 Hec1 が染色体振幅運動に依存してリン酸化されるという他の研究結果を踏まえると、正常二倍体細胞では、染色体振幅運動により Aurora A が Hec1 をリン酸化し、そのリン酸化を以て染色体の振幅運動は更に駆動するというフィードバックループ機構により、染色体均等分配システムの堅牢性が維持されているというモデルが示唆された。

染色体振幅運動と Hec1 のリン酸化のフィードバックループ

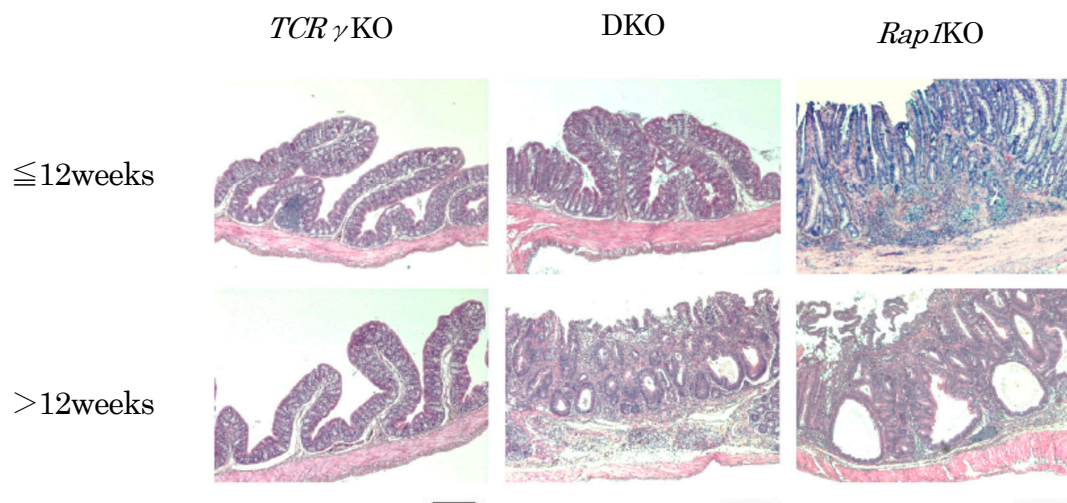


【目的】潰瘍性大腸炎やクローン病に代表される炎症性腸疾患は、腸内細菌に対する過剰応答によって引き起こされる自己免疫疾患であることが示唆されているが、原因不明の難病で新規治療法の開発が求められている。生涯にわたって炎症の再燃と寛解を繰り返し、高い確率で多発性大腸がんを発症する。我々は、T細胞特異的に *Rap1* を欠損した conditional knockout マウス (*Rap1* KO マウス) を作製したところ、生後数週間で大腸炎及び高度異型腫瘍を自然発症し、速やかに大腸がんへ進展することがわかった。本研究課題ではこの大腸炎自然発症モデルマウスを用いて、 $\gamma\delta$ T細胞の大腸炎発症における役割について解析を行った。

【方法】*Rap1* KO マウスと *TCR γ* KO マウスを掛け合わせ、全身で $\gamma\delta$ T細胞を欠損させた double knockout マウス (DKO マウス) を作製し、体重の増減、炎症スコアを比較した。また、フローサイトメトリーを用いて、*Rap1* 欠損マウスで増加していた $\gamma\delta$ T細胞のサブセット解析を行った。

【結果】*Rap1* KO マウスでは、大腸炎発症時に腸管膜リンパ節や大腸の粘膜固有層で $\gamma\delta$ T細胞が著しく増加していた。DKO マウスでは大腸炎の発症時期が遅れたことから、 $\gamma\delta$ T細胞は大腸炎の発症初期の悪化に関与している可能性が示唆された。また、増加した $\gamma\delta$ T細胞のサブセット解析を行ったところ、mLN では V γ 4 が増加し、LI-LP では V γ 6 が減少しており、それぞれのサブセット中の IL-17A 産生細胞の割合は増加していることが明らかとなった。

12 週齢以下ならびに 12 週齢以上の *TCR γ* KO マウス、*Rap1* KO マウス、DKO マウスの大腸組織の HE 染色像



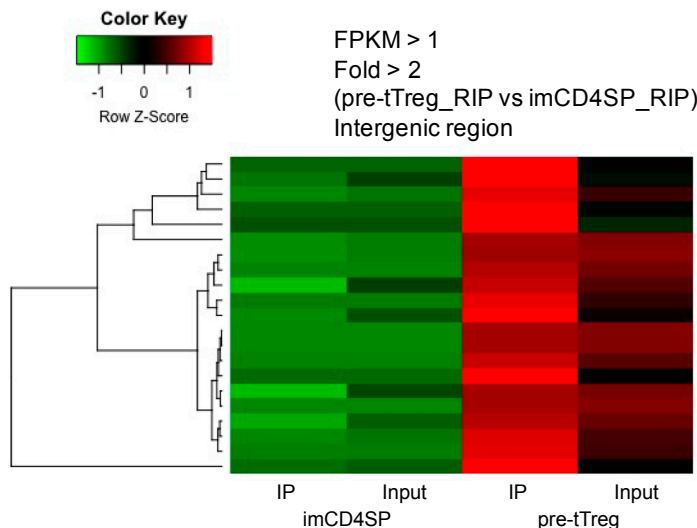
118 制御性T細胞の発生における長鎖非翻訳RNAの役割解明	市山 健司
--------------------------------	-------

【目的】 制御性T細胞 (Treg) は免疫自己寛容の確立・維持において重要な役割を担うことが知られており、その発生機構の解明が現在免疫学の重要研究課題のひとつとされている。これまでにTregの正常発生には胸腺Treg前駆細胞 (pre-tTreg) におけるクロマチンリモデリング因子SATB1を介したTreg特異的なエピゲノム形成が必須であることが明らかとなっているが、そのエピゲノム形成においてSATB1がどのようにしてTreg特異性を獲得するのかその詳細な分子機構に関してはまだよく分かっていない。近年、長鎖非翻訳RNA (LncRNA) がクロマチンリモデリング因子のリクルート等の様々な作用機序を介して標的遺伝子の発現を制御することが明らかとなってきた。このことから、胸腺のpre-tTreg細胞において特異的に発現するLncRNAがSATB1を介したTreg特異的なエピゲノムの形成を制御する可能性が考えられる。そこで、本研究ではTregの胸腺における発生を制御する新規LncRNAの探索・同定およびその機能解明を目的とする。

【方法】 pre-tTregで特異的に高発現し、かつ転写因子SATB1と結合するLncRNAを網羅的に探索するために次世代シーケンサーを用いてRNAシーケンスおよびRIPシーケンスを行い、候補因子を選出した。さらに、SATB1によるTreg特異的なエピゲノム形成に関与する共同因子を同定するため、既知のクロマチン再構成複合体の構成因子に焦点を絞り共免疫沈降法によりSATB1と相互作用する因子の探索を行った。

【結果】 次世代シーケンサーを用いた網羅的な解析により、21個の新規LncRNAsをpre-tTreg特異的な機能性LncRNAの候補因子として選出した。さらに、胸腺細胞においてSATB1の結合因子として転写因子Xを新たに同定した。興味深いことに、RNase A処理をすることでSATB1と転写因子Xの結合が消失することからこれら因子の結合にはRNAが必須であることが明らかとなった。LncRNAはタンパク質複合体のスキヤホールド因子として作用することが知られており、このことからSATB1は胸腺においてLncRNAを介して転写因子Xと複合体を形成する可能性が示唆された。

Treg 前駆細胞で発現が高く、SATB1 と結合する新規 LncRNAs のヒートマップ

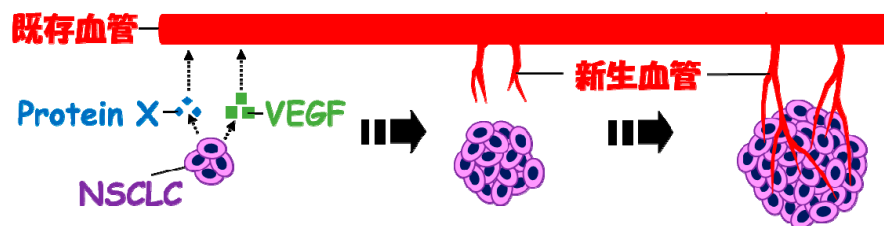


【目的】 肺癌は日本を含む世界における癌関連死病因の第 1 位であり、非小細胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) は肺癌患者の約 8 割以上を占めている。腫瘍の大部分は自身に栄養と酸素を供給させるため、腫瘍に向かって新たな血管を既存血管から新生させる (腫瘍血管新生)。血管新生に重要な働きをする血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) は NSCLC を含む多くの腫瘍で発現・分泌されており、VEGF ファミリーの 1 つである VEGF-A と血管内皮細胞 (endothelial cells, EC) に発現する VEGF 受容体 (VEGF receptor, VEGFR)、特に VEGFR2 が結合することで腫瘍血管新生は強く誘導される。近年、腫瘍の増大・浸潤・転移を防ぐことを目的に VEGF-A/VEGFR2 軸をターゲットとした抗血管新生療法が大腸癌、NSCLC、脳腫瘍、卵巣癌、乳癌などの腫瘍に選択されている。扁平上皮癌を除く NSCLC の 1 次療法に抗 VEGF-A モノクローナル抗体であるベバシズマブを併用する、または、NSCLC の 2 次療法に抗 VEGFR2 モノクローナル抗体であるラムシルマブを併用することで NSCLC 患者の奏効率、無増悪生存期間、全生存期間に有意な改善が見られた。しかし、VEGF 系を阻害しても NSCLC は増大・進展する症例が多数あり、VEGF とは異なる因子が血管新生を制御する可能性が強く示唆されるが、その因子は依然不明である。

【方法】 細胞培養には血清などの細胞外因子が用いられるが、それらを除去しなければ、細胞が分泌する液性因子を特定することは困難である。本研究では、NSCLC 細胞が分泌する VEGF とは異なる血管新生因子を探索するために、ヒト NSCLC 細胞株 A549 と EBC-1 を無血清培養に使用した。無血清培養後の NSCLC 細胞株の細胞死は光学顕微鏡による細胞観察とフローサイトメトリーを用いた解析から判断した。その後、無血清培養下においても生存可能な細胞株の培養上清を回収し、コラーゲンゲルを用いた管腔形成実験、ウェスタンブロット解析、ELISA アッセイを行った。EC にはヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein EC, HUVEC) を使用した。また、その無血清培養上清に対して LC-MS/MS を用いた網羅的タンパク解析を実施し、その上清中の分泌タンパクを同定した。同定されたタンパク質の中から血管新生関連因子として報告のあるタンパク質の遺伝子に対する RNA 干渉を NSCLC 細胞株に行い、その細胞株の無血清培養上清を回収することで血管新生の関与を解析した。

【結果】 無血清で培養することで A549 細胞では細胞死が観察されたが、EBC-1 細胞には細胞死は誘導されなかったことから、EBC-1 細胞は無血清培養下でも生存可能な細胞株であることが示された。EBC-1 細胞の無血清培養上清 (EBC-1 sup.) を回収して 3 次元培養下の HUVEC に添加したところ、濃度依存的に管腔形成が観察された。加えて、抗 VEGF 中和抗体を EBC-1 sup. に添加したところ、完全ではないが管腔形成は抑制された。これらの結果から、EBC-1 sup. による管腔形成は VEGF と VEGF とは別の血管新生因子によって制御されていることが示された。EBC-1 sup. を網羅的タンパク解析した結果、1,007 個のタンパク質が同定され、その中から血管新生に関与すると報告のあるタンパク質 X の遺伝子に対する RNA 干渉を EBC-1 細胞に行い、その無血清培養上清を回収して管腔形成実験を行った。その結果、タンパク質 X をノックダウンした EBC-1 sup. による管腔形成は、コントロール処理した EBC-1 sup. と比べて軽度ではあるが有意に抑制された。以上の結果より、タンパク質 X が VEGF 非依存性の血管新生因子である可能性が示唆された。

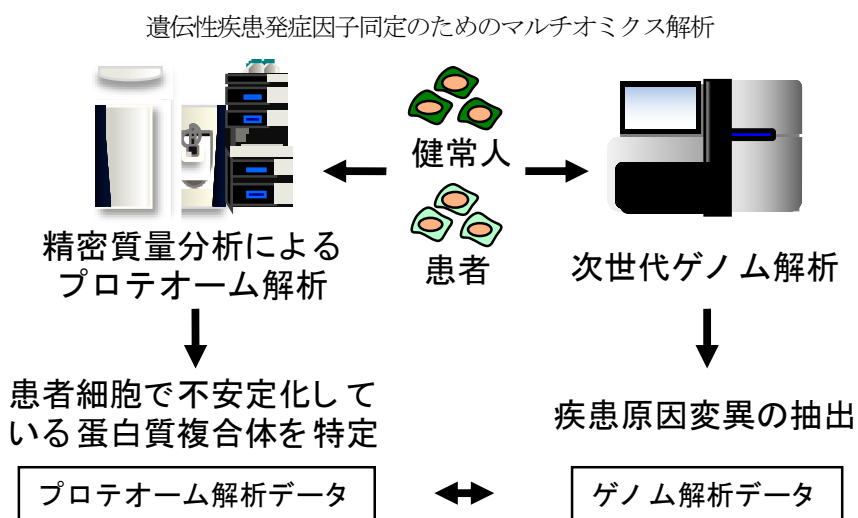
非小細胞肺癌 (NSCLC) は血管内皮増殖因子 (VEGF) とタンパク質 X を介して腫瘍血管新生を誘導する



【目的】 発症頻度が極めて低い遺伝性疾患で、弧発症例のゲノム解析データのみを用い、過去に報告の無い疾患発症原因となる遺伝子変異を絞り込むことは極めて困難である。そこで、次世代ゲノム解析のみでは候補遺伝子の絞り込みに至らなかった小頭症を伴う希少遺伝性疾患に関して、精密質量分析装置を利用したプロテオーム解析を実施し、ゲノム解析から得られたデータと統合することで、疾患発症因子の同定を行う。

【方法】 精密質量分析装置を用いたプロテオーム解析を行うことで、健常人と遺伝性小頭症患者由来の細胞内に発現している蛋白質を網羅的かつ定量的に測定し、次世代ゲノム解析結果と統合することで、疾患発症に関わる因子の絞り込みを行う。

【結果】 プロテオーム解析により、トリオの全エキソーム解析では同定に至らなかった遺伝性小頭症発症患者の疾患原因が RNASEH2 複合体の発現量低下であることを明らかとした。RNASEH2B のイントロン深部にスプライス供与部位の挿入を確認した。以上の結果から、患者は RNASEH2B の RNA スプライシング異常により発症したアイカルディ・ゴーティエ症候群であることが示唆された。

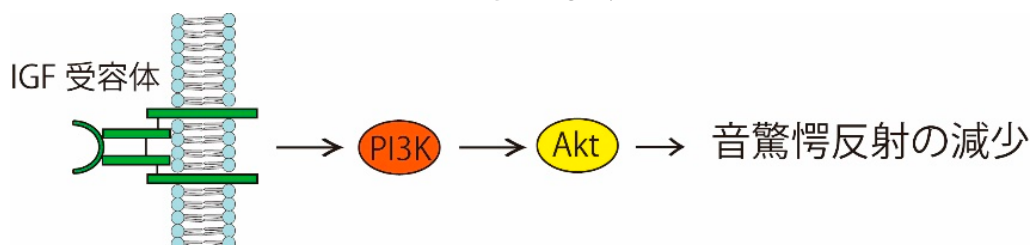


【目的】 不意に大きな音が鳴ると、動物は驚愕反射を示す。魚類においてはマウスナー細胞が聴覚神経からの入力を受けて興奮することが音への驚愕反射の引き金となる。一方で、音刺激を繰り返し与えると音刺激に慣れて驚愕反射が起きにくくなる。これはマウスナー細胞へのグリシン作動性抑制性シナプス伝達が増強されたことでマウスナー細胞の興奮性が低下したためであると考えられている。この現象は1998年に報告されたが、どのようにしてグリシン作動性シナプス伝達が増強されるのかは明らかにされてこなかった。これまでの研究で研究代表者は、音刺激が繰り返し与えられると、マウスナー細胞においてカルシウム/カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ II (CaMKII) が活性化し、この活性に依存して抑制性シナプスの足場タンパク質である *gephyrin* がリン酸化されること、このリン酸化によって *gephyrin* とグリシン受容体の結合が強化されることでシナプス部位のグリシン受容体が増加すること、これによってマウスナー細胞の興奮性が低下し音驚愕反射が減少することを明らかにしている。Wolman らによって PAPPAA-IGF1 受容体シグナル経路の活性化が繰り返し音刺激による音驚愕反射減少に関与することが報告されたが、音驚愕反射減少の基盤となる分子機構は明らかにされていなかった。研究代表者は、このシグナル経路の活性化と研究代表者が見出したグリシン受容体集合促進機構との関連性を検討することで、グリシン作動性シナプス可塑性を制御する機構の解明を進めようとした。

【方法】 Wolman らによって提唱されたモデルでは、IGF1 受容体-PI3K-Akt シグナル経路が PAPPAA によって活性化された IGF によって活性化されることが繰り返し音刺激後の音驚愕反射の減少に必要であるとされていた (図 1)。この経路と研究代表者が見出したグリシン受容体増加による音驚愕反射の減少の関連性を検討するため、IGF1 受容体の阻害剤である BMS-754807 と Akt の活性化剤である SC-79 を投与した状態で、繰り返し音刺激後の音驚愕反射とグリシン受容体集積の変化をゼブラフィッシュ稚魚を用いて解析した。

【結果】 ゼブラフィッシュは *pappaa* と *pappab* の 2 つの *pappaa* 遺伝子を持っている。*pappab* 遺伝子をノックアウトした稚魚では野生型と同様に繰り返し音刺激による驚愕反射の減少が起きたが、*pappaa* 遺伝子をノックアウトした稚魚では繰り返し音刺激による驚愕反射の減少が起きなかった。また、BMS-754807 を用いて IGF1 受容体を阻害すると、音刺激を繰り返し与えても音驚愕反射減少が起きなくなり、グリシン受容体のシナプスへの集合促進が起きなくなった。これらの結果は、PAPPAA-IGF1 受容体シグナル経路が、マウスナー細胞でのグリシン受容体集合促進と音驚愕反射の減少に関与していることを示唆する。PAPPAA-IGF1 受容体経路と CaMKII がどのように関連しているのかを検討するため、Akt キナーゼの活性化剤である SC-79 を投与し音驚愕反射とグリシン受容体集合状態を観察した。SC-79 の投与では音驚愕反射減少もグリシン受容体集合も誘導されなかった。この結果は、PAPPAA-IGF1 受容体経路の活性化は音驚愕反射減少もグリシン受容体集合を誘導するために必要であるが、それだけでは十分でないことを示している。すなわち、繰り返し音刺激が与えられることで、PAPPAA-IGF1 受容体経路と CaMKII の両方が活性化されることが、グリシン受容体集合と音驚愕反射の減少を誘導するためには必要なのかもしれない。

Wolman らによるモデル

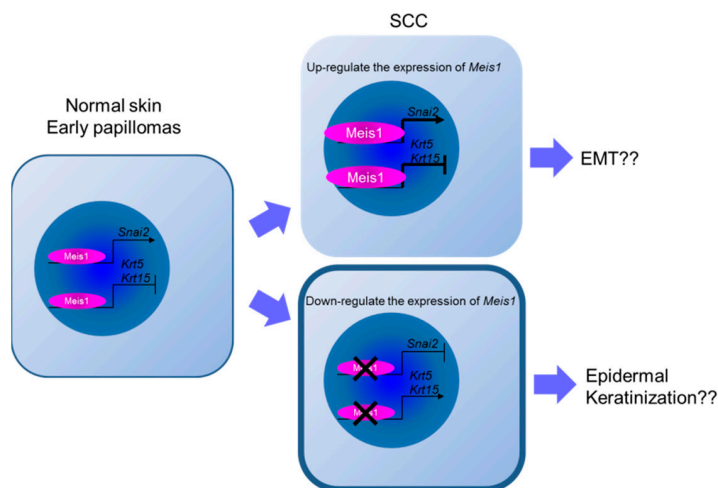


【目的】 *Meis1* は転写因子であり、近年では造血器腫瘍だけでなく、固形がんにおいても *Meis1* が強発現することが報告されているが、不明な点が多い。これまでに我々は、化学発がん剤 DMBA/TPA を用いた多段階皮膚発がんマウスモデルにより *Meis1* が発がん機構に重要な役割もつことを明らかにしてきた。上皮性腫瘍における *Meis1* 下流遺伝子ネットワークの解明を目的として悪性化過程の表皮由来細胞株を用いた RNA-seq と ChIP-seq データとを統合し、*Meis1* の新規標的因子の同定を試みた。

【方法】 マウス正常皮膚由来細胞株 C5N および同マウス発がんモデルの腫瘍から樹立された細胞株 B9 (扁平上皮がん)、D3 (スピンドル型扁平上皮がん) のそれぞれの *Meis1* ノックダウン細胞株 (*Meis1* KD) を作製し、RNA-seq を実施した。

【結果】 C5N、B9 および D3 の *Meis1* KD において発現量が 2 倍以上 (\geq FC2) 変動した遺伝子の抽出に成功した。それらの中で悪性化を通して変動する遺伝子群としてサイトケラチンが認められた。特に、上皮性細胞マーカーにも用いられる高分子型の *Krt5/6a/6b/14/15* が C5N および B9-*Meis1* KD で発現上昇していた。さらに EMT 関連転写因子の *Snai1/2* や間葉系細胞マーカーの *Vim* が *Meis1* KD で発現低下する傾向が認められた。一方、すでに取得済みであった多段階悪性化過程の *Meis1*-ChIP-seq データと併せて解析した結果、*Krt5* および *Krt15* において正常皮膚および早期良性腫瘍で両遺伝子の 5' UTR 上流にリードピークが検出された。一方、EMT 関連転写因子 *Snai2* においても同様に検索した結果、早期良性腫瘍においてピークが検出された。そこで *Krt5*、*Krt15* および *Snai2* の 5' UTR 上流の配列を検索した結果、1 kb 以内に *Meis1* 結合モチーフのコンセンサス様配列がそれぞれ 1 つ以上確認できた。これらのことから、*Meis1* が直接的に *Krt5*、*Krt15* および *Snai2* の発現調節をしていることが予測され、RNA-seq のデータと照合すると *Meis1* が発がんステージの早期段階で *Krt5* や *Krt15* を発現抑制し、*Snai2* を発現亢進させることが考えられた。

多段階皮膚発がん悪性化に関する *Meis1* 下流候補因子とその発現制御モデル

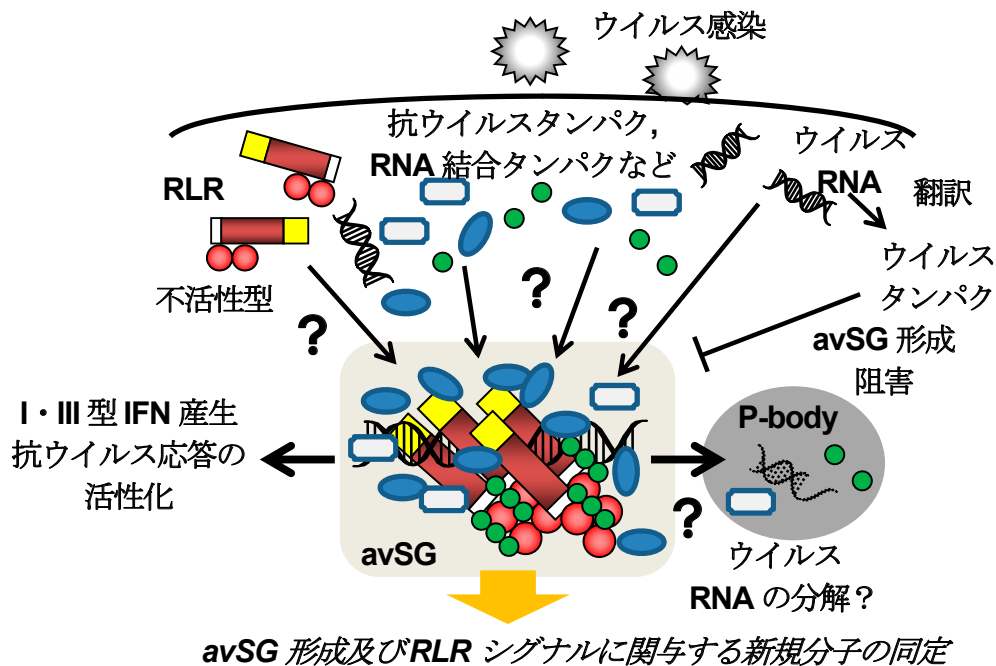


【目的】細胞質内ウイルス RNA センサーである RIG-I-like receptor (RLR) は、I・III 型 Interferon (IFN) を中心とした抗ウイルス自然免疫応答を発動するための必須な分子群である。一方で、RLR が細胞質内のどこでウイルス RNA を感知しているかについては不明な点が多く残されている。我々はこれまでに、抗ウイルスストレス顆粒 (antiviral-stress granule: avSG) と呼ばれる細胞内凝集体が RLR のウイルス RNA 検知とシグナル伝達に重要であることを明らかにしてきた。しかし、avSG の形成メカニズムやその構成因子については殆ど明らかとなっていない。そこで本研究では、avSG 形成制御及び局在する分子を同定し、抗ウイルス自然免疫応答における avSG の機能を解明することを目的に解析を行った。

【方法】ウイルス感染細胞から avSG を単離・抽出し RIG-I と会合する新規タンパク質の探索を行った。また並行して siRNA ライブラリーを用いて IFN シグナルに関与する分子のスクリーニングを行った。上記方法によって得られた標的候補分子群の機能解析を行った。

【結果】ウイルス感染特異的に RIG-I と結合する複数の分子を同定した。また siRNA ライブラリーを用いたスクリーニングから avSG に局在し IFN 産生制御に関与する新規分子を得ることが出来た。

avSG を介したシグナル伝達モデル図



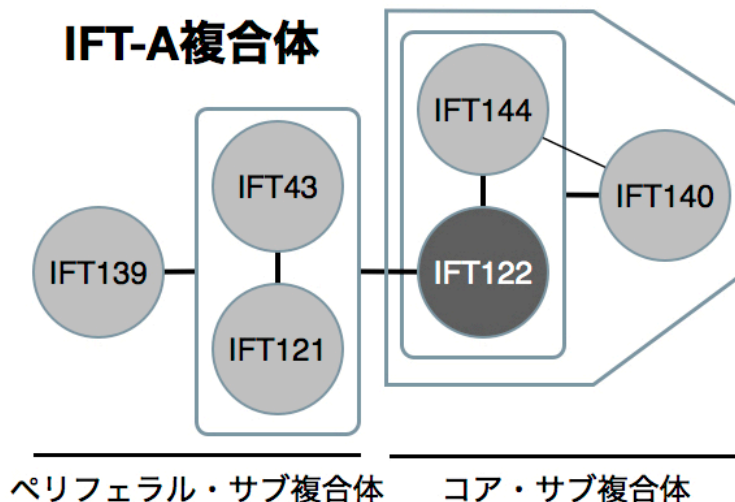
【目的】 一次繊毛は細胞のアンテナとして機能するオルガネラであり、その異常は多様な重篤症状を呈する繊毛病を引き起こす。一次繊毛の形成や機能の維持には繊毛内タンパク質輸送 (Intraflagellar transport: IFT) が基盤となっている。本研究では、IFT-A 複合体のサブユニットの 1 つである IFT122 に着目し、IFT122 の繊毛内タンパク質輸送における機能を解明すること、および、IFT122 の変異が繊毛病の一種である頭蓋外胚葉異形成 (Cranioectodermal dysplasia: CED) を引き起こすメカニズムを解明することの 2 つを目的として研究を行った。

【方法】 Visible immunoprecipitation (VIP) アッセイを用いて、IFT122 と IFT-A サブユニットの相互作用を解析した。CRISPR/Cas9 システムを用いて、IFT122 ノックアウト (KO) 細胞を樹立し、その表現型解析を行った。CED の原因となるアミノ酸変異を導入した IFT122 変異体を用いて相互作用解析とレスキュー実験による表現型解析を行った。

【結果】 IFT122 は IFT-A 複合体のコア・サブ複合体とペリフェラル・サブ複合体をつなぐというハブとしての役割を果たしていることを分子レベルと細胞レベルで解明した。IFT-A 複合体のサブユニットである IFT139 や IFT144 の KO 細胞では、繊毛長は短くなるものの繊毛は形成できるのに対して、IFT122-KO 細胞では繊毛がほとんど形成されないことから、繊毛形成において IFT122 が極めて重要であることが示唆された。

一方、CED 型 IFT122 変異体は他の IFT-A サブユニットとの相互作用が消失または減弱することにより、IFT-A 複合体を正常に形成できなくなった。その結果、繊毛内の逆行輸送が異常になり、CED の発症につながると考えられる。

IFT-A 複合体の相互作用マップ

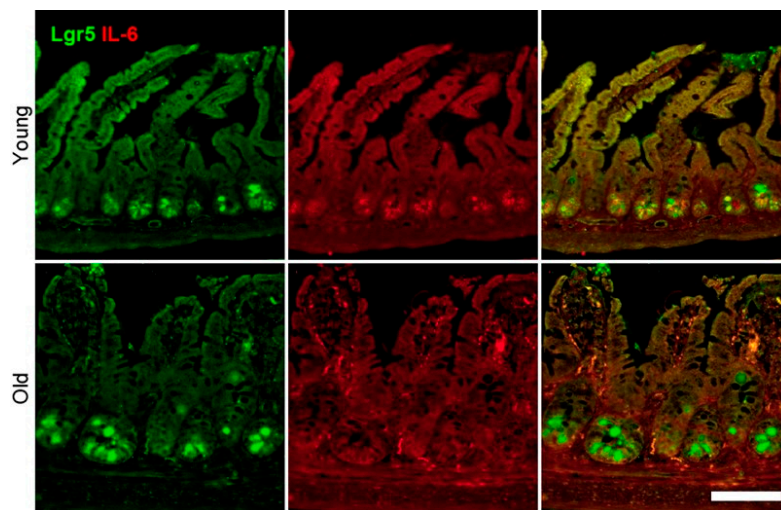


【目的】 独自に見い出した microRNA によるコンピテンシーの制御の観点から、幹細胞老化に共通する根幹的なメカニズムを解明し、組織恒常性の破綻および個体老化プロセスの分子機構を明らかにすることで生体恒常性の維持・回復法の創出を目指す。

【方法】 若齢（3ヶ月齢）および老齢（24ヶ月齢以上）マウスから間葉系幹細胞（MSC）や造血幹細胞（HSC）を採取し、網羅的遺伝子発現解析を行った後、実際に老化にともなう機能障害に関与する microRNA（miRNA）をスクリーニングしてメカニズムを明らかにする。そこで得られた知見を基にコンディショナルノックアウトマウスを作製し、人為的に幹細胞老化を誘導して組織恒常性の破綻・個体老化への影響を調べる。

【結果】 主に MSCs を用いて機能解析を行った結果、miR-17 だけでなく広範な miRNA の発現が低下しており、DNA 損傷応答（DDR）にともなう miRNA の誘導も喪失していた。これにより DDR 能の喪失が起こり、DNA 損傷が蓄積することが幹細胞老化の根幹的なメカニズムだと示唆された。また、DDR 能に必須な miRNA の同定にも成功した。実際に生体内における DDR 能の喪失を、老齢マウスの腸管上皮幹細胞（ISC）で確認した。また、幹細胞老化に重要だと明らかになった miR-17 ファミリーを ISC でノックアウトすると、老齢時と同様にオルガノイド形成能の低下や炎症の誘導が確認された。

腸管上皮幹細胞の老化にともなう DNA 損傷応答能の低下

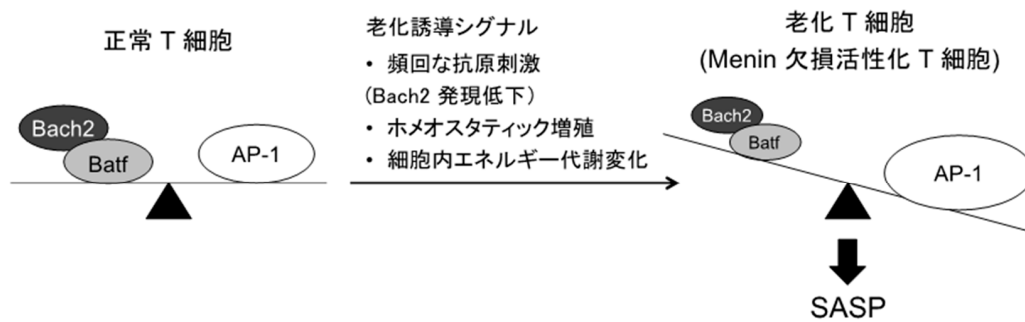


【目的】 老化 T 細胞は senescence-associated secretory phenotype (SASP) 様の形質を獲得し、炎症性サイトカイン、炎症性ケモカイン、血管新生誘導因子、細胞外マトリックスリモデリング因子などを高発現する。しかしながら、T 細胞 SASP 制御機構の全容は解明されていない。本研究では、Bach2-Batf 複合体による T 細胞 SASP 制御を明らかにすることを目的とした。

【方法】 T 細胞特異的 *Menin* KO/*Bach2*TG、*Menin* KO/*Batf*KO、*Bach2*KO/*Batf*KO マウスを作製し、活性化 T 細胞における SASP 因子の誘導を検討した (*in vitro*)。代謝リックプロファイリングを行い、細胞内エネルギー代謝変化と T 細胞老化の関与を検討した。

【結果】 *Menin* 欠損によって誘導される SASP は *Bach2* の過剰発現および *Batf* の欠損によって抑制された。従って、Bach2-Batf 複合体は T 細胞 SASP を制御していることが示された。また、*Menin* 欠損活性化 T 細胞ではグルタミン代謝が活性化しており、ヒストン H3K27me2/3 の脱メチル化を介して T 細胞 SASP が誘導されていることがわかった。

Bach2-Batf 複合体による T 細胞 SASP 制御機構

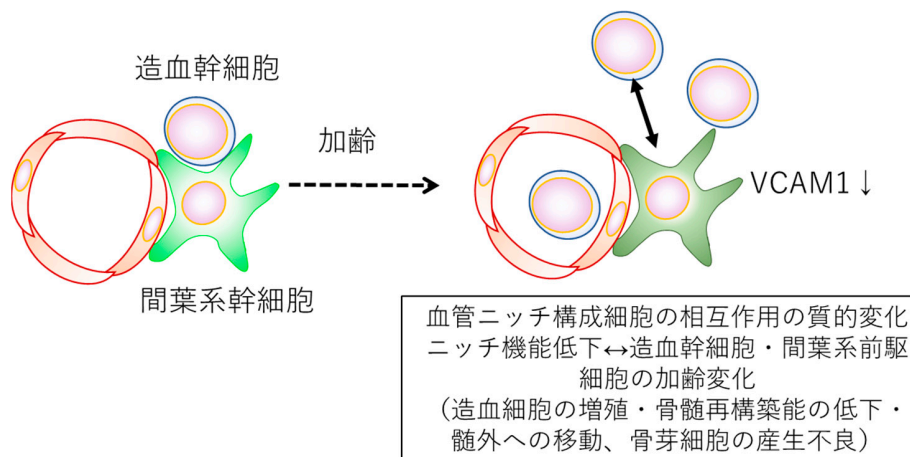


【目的】 造血幹細胞は加齢に伴い造血再構築能および正常な分化能が徐々に失われる一方、骨髄中の幹細胞の総数はヒトにおいてもマウスにおいても増加する。造血幹細胞の加齢変化についてはゲノム・エピゲノムの変化を含めて個々の細胞で多様な変化も影響しており単一細胞レベルでその多様性を理解することが不可欠である。

【方法】 若齢および様々な加齢段階の造血幹細胞に対して単一細胞 RNA シークエンス (scRNA-seq) を実施し、若齢から高齢に至るまでの造血幹細胞の性質の細胞ごとの経時的な変化を解析した。さらに細胞分裂と造血幹細胞の加齢変化との関係を明らかにするために細胞分裂履歴マウスを用いて scRNA-seq を行い、加齢マウスとの遺伝子発現の相違を比較した。同様に造血幹細胞ニッチとして知られる骨髄間葉系幹細胞 (MSC) も 10 週齢および 2 年齢の個体から採取し scRNA-seq を実施した。

【結果】 加齢造血幹細胞に高発現する遺伝子は 7 ヶ月齢から発現が上昇しており、以降明瞭な違いは認めない。加齢に特徴的な遺伝子発現プロファイルはより高い未分化性を示していた。細胞分裂履歴は加齢変化に伴う遺伝子発現よりもむしろ細胞分裂の亢進と分化の傾向を示しており、短期的には細胞分裂は加齢形質に影響を与えなかった。間葉系幹細胞のうち、造血幹細胞維持に関連する液性因子の発現変化は認められなかったが、接着因子の *Vcam1* の発現低下が認められた。

造血幹細胞とニッチ細胞の相互作用の質的变化

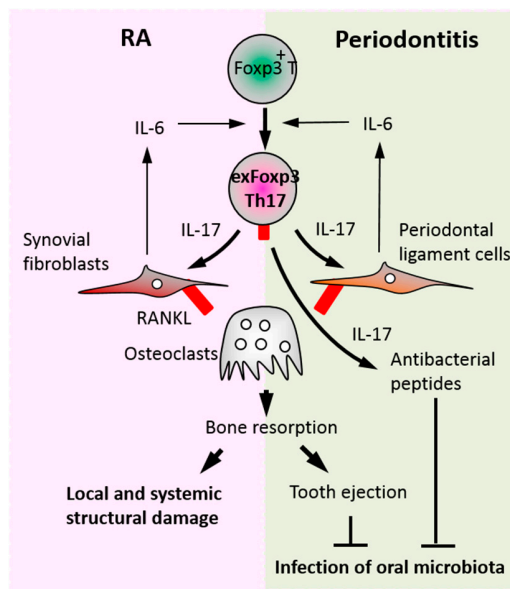


【目的】 自己免疫疾患はT細胞免疫の破綻が原因となって生じる。我々は以前、 $Foxp3^{+}T$ 細胞から分化転換した関節炎を惹起する新規 Th17 細胞サブセットを同定したが、本研究では関節リウマチの骨破壊における病理的意義の確立と口腔内恒常性の破綻時における病理的意義の解明を目的として研究を行った。

【方法】 新規 Th17 細胞の遺伝子発現網羅解析を行うと共に、マウス自己免疫性関節炎モデルや歯周炎モデルを用いて骨破壊や免疫応答における新規 Th17 細胞の関与を μ CT解析、FACSなどで評価を行った。

【結果】 新規 Th17 細胞の病原性を司る候補遺伝子を複数同定し遺伝子欠損マウスを樹立した。関節リウマチにおいては新規 Th17 細胞-滑膜線維芽細胞-RANKL が骨破壊の主軸の一つとなることが示された。歯周炎においても新規 Th17 細胞は最も強力な骨破壊誘導性 T 細胞であるとともに、骨破壊に伴う感染巣である歯の脱落と、抗菌免疫の誘導を介して、生体防御に重要な役割を果たすことが明らかとなった。したがって新規 Th17 細胞は、関節リウマチでは構造破壊を引き起こす悪玉細胞であるのに対し、歯周炎においては局所での口腔内細菌の制御や全身への伝播の抑制により感染防御に寄与するという善玉細胞としての一面をもつことが明らかとなった。

新規 T 細胞の病理学的意義



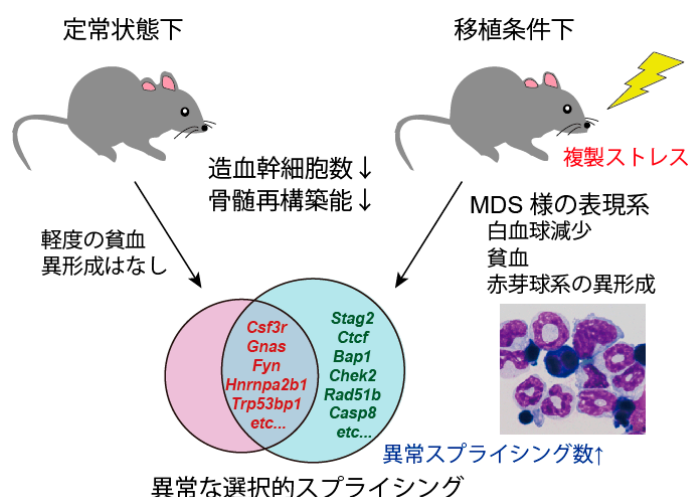
【目的】骨髄異形成症候群 (MDS : myelodysplastic syndromes) とその関連疾患は、血球形態の異常を伴った骨髄不全と急性骨髄性白血病 (AML : acute myeloid leukemia) への移行を特徴とし、高齢者に好発する慢性骨髄性腫瘍である。高齢者に適応可能な根治的治療手段を欠く一方で、その本質的な病因については、本症を特徴づける変異が知られておらず長く不明であった。近年、我々およびその他の研究グループにより、RNA スプライシング因子の変異が本症に高頻度かつ特異的に認められることが発見され、病態の理解に大きな突破口が認められた。一方で、その機能的側面については多くが未解明であり、新規遺伝子変異による MDS 発症の分子メカニズムを解明することが、治療抵抗性の MDS の病態の理解、さらには分子診断・治療法の改善のために強く望まれている。そこで、本研究は、スプライシング因子変異の機能解析を通じて、治療抵抗性の MDS の病態の理解とその克服に資することを目的とした。

【方法】スプライシング因子 *SRSF2* に集積するホットスポット変異 (P95H) に関するコンディショナルノックインマウスモデルを作成した。造血系組織の病理組織学的評価およびフローサイトメトリーによる表現マーカー解析による造血細胞分画プロファイルの解析を行った。また、競合的骨髄移植実験により造血幹細胞の長期骨髄再構築能を評価した。さらに、RNA シーケンスにより、*Srsf2* 変異による発現異常およびスプライシング異常の標的遺伝子の探索を行った。

【結果】本研究では主に次の 5 点について明らかになることができた。1) *Srsf2* P95H 変異マウスは大球性貧血を示すものの長期観察 (~2 年) にて MDS を発症しない、2) *Srsf2* 変異マウスは造血幹前駆細胞数の減少と骨髄再構築能の低下を示す、3) 致死量放射線照射したマウスに *Srsf2* 変異骨髄細胞を移植すると、レシピエントマウスは MDS 様の表現型、および造血不全による生存率低下を示す、4) *Srsf2* 変異造血幹前駆細胞は、移植のストレス下において MDS 症例に特徴的な発現異常を示す、5) *Srsf2* 変異造血幹前駆細胞は、多数の標的遺伝子 (*Csf3r*, *Fyn*, *Gnas*, *Hnrnpa2b1*, *Trp53bp1* など) において、異常カセットエクソンを代表とするスプライシング異常を示す。

Srsf2 変異の単一の効果では MDS を発症しないものの、移植による造血ストレス下で MDS 発症が促進されるという観察結果は、加齢による遺伝子異常の蓄積や造血環境が病態に重要な役割を果たすことを示唆している。興味深いことに、移植による複製ストレス下では、定常状態下と比較しより多数の遺伝子がスプライシング異常を示しており、加齢による遺伝子異常の蓄積や造血環境が MDS の病態に重要であることが明らかとなった。

Srsf2 P95H 条件的ノックインマウス



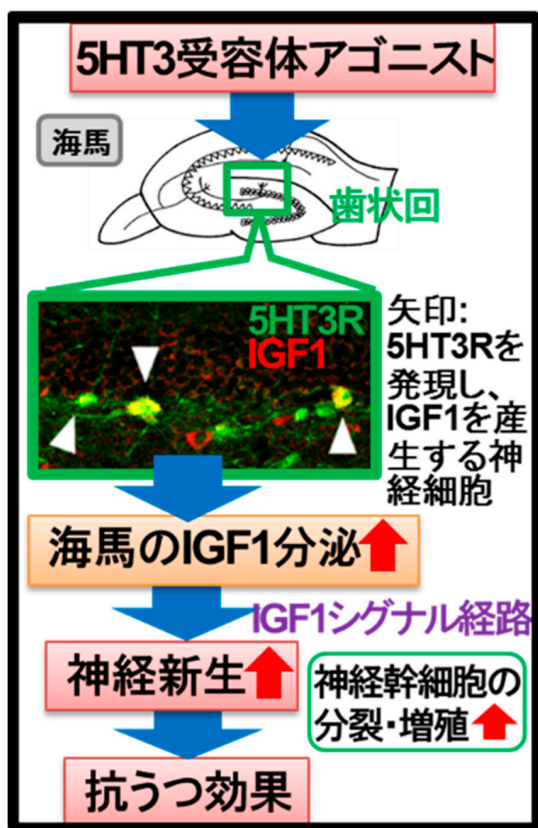
130 抗うつ薬抵抗性の難治性うつ病に対する新規治療薬開発	近藤 誠
-------------------------------	------

【目的】 現在、うつ病治療には、SSRI が第一選択薬として用いられているが、寛解率は半数以下であり、既存の抗うつ薬抵抗性の難治性うつ病に対する新たな治療薬開発が望まれている。近年我々は、運動による海馬神経新生の増加や抗うつ効果に、5HT3 受容体が必須の働きをしていることを見出した。本研究では、運動の抗うつ効果に着目してうつ病治療効果の分子機序を解明し、難治性うつ病の治療薬開発を目指す。

【方法】 マウスを用いて、5HT3 受容体とうつ行動および海馬神経新生との関連について以下の検討を行った。1. 5HT3 受容体アゴニストがうつ行動に与える影響の薬理的解析、2. 5HT3 受容体アゴニストが海馬神経新生に与える影響の形態学的解析、3. 海馬における 5HT3 受容体発現細胞の形態学的解析、4. 5HT3 受容体アゴニストが海馬の細胞外液中 IGF1 濃度に与える影響の解析、5. 5HT3 受容体アゴニストによる海馬の IGF1 分泌と神経新生との関連の形態学的解析。

【結果】 海馬の 5HT3 受容体発現細胞は IGF1 を産生しており、5HT3 受容体アゴニストをマウスに投与すると、海馬の IGF1 分泌が促進され、IGF1 シグナル経路を介して神経新生が増え、既存の抗うつ薬 SSRI と異なる機序で抗うつ効果が得られることを見出した。既存薬と作用機序が異なる、うつ病の新たな治療メカニズムを明らかにした。

うつ病の新たな治療メカニズム



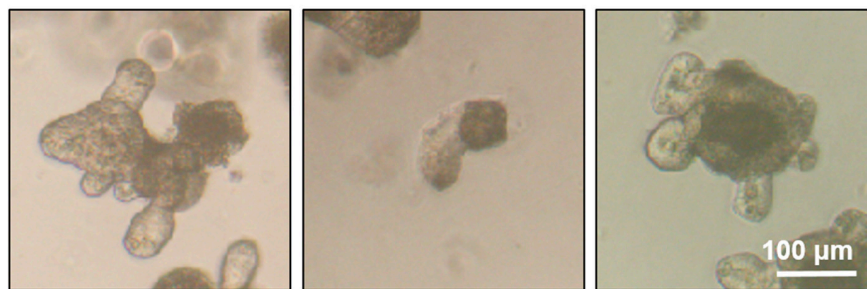
【目的】 小腸上皮細胞は、他の細胞に比べ極めて短い周期で寿命を全うするが、寿命制御機構の全容は未だに明らかとなっていない。特に、小腸上皮細胞の寿命制御には細胞内シグナル伝達とその活性を調節する細胞外因子が重要であると考えられているものの、生体内で作用している具体的な細胞外因子に関しては未だに多くの点が未解明のままとなっている。そこで本研究では、腸管内腔に存在する物質中より、小腸上皮細胞の寿命制御に関わる新規因子を探索し、その作用機序の解明を試みた。

【方法】 本研究では、小腸上皮細胞に対する腸管内腔の因子の直接的な作用について評価するため、*ex vivo* の実験系である腸オルガノイド培養を用いた解析を行った。腸オルガノイドの培養培地に、腸管内腔の因子である因子Xを添加し、腸オルガノイドの発達に与える影響について解析した。

【結果】 腸管内腔に存在する因子Xは、腸オルガノイドの通常培養で使用されている上皮成長因子 (epidermal growth factor: EGF) の代わりに添加した場合に、腸オルガノイドの発達を有意に促進させる作用があることが明らかとなった。

腸管内腔の因子Xによる腸オルガノイドの発達促進

培養4日目の腸オルガノイドの発達



通常培養

EGF除去

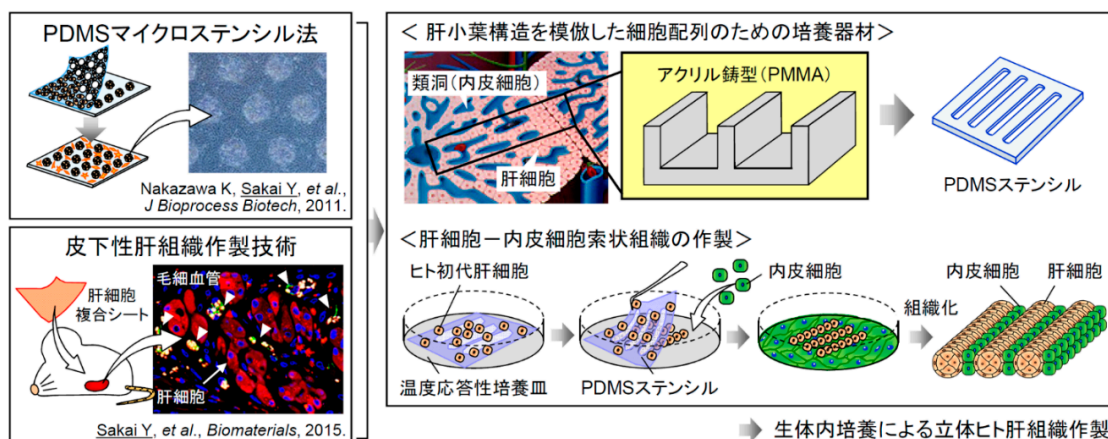
EGF除去+因子X

【目的】皮下は低侵襲性と高い安全性を両立した移植部位であるが、肝細胞の生着や立体組織化は困難を極めている。これらの課題を打開するため、肝小葉構造に基づいた細胞の立体配置を制御することができれば効率的な酸素供給等が可能となり、立体組織化が達成できると着想した。本研究では、マイクロステンシル法と皮下性肝組織作製技術を融合した二次元細胞配列／三次元培養技術を確立し、立体ヒト肝組織を作製することを目的とした。

【方法】肝小葉のサイズを踏まえて設計した鋳型（マイクロ流路）でポリジメチルシロキサン（PDMS）を重合し、多数の貫通孔を持つPDMS ステンシルを作製した。I型コラーゲンをコーティングした温度応答性培養皿にPDMS ステンシルを貼り付け、ヒト初代肝細胞を播種した。培養3日目にPDMS ステンシルを除去した後、ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）を播種した。さらに、培養6日目にヒト脂肪由来幹細胞（hADSC）を播種し、培養8日目に温度を20℃に低下させて細胞組織体を回収した。

【結果】マイクロ流路を用いることにより、ライン状の貫通孔を多数有するPDMS ステンシルを作製できた。ヒト初代肝細胞は密に凝集し、パターン化し得た。HUVEC と共培養することによって、ヒト初代肝細胞－内皮細胞索状パターンニングを作製することができた。hADSC は、HUVEC の管腔様構造の形成を支持した。ヒト肝細胞－内皮細胞索状組織を回収することができ、移植可能な組織体であることが示唆された。

二次元細胞配列／三次元培養による立体ヒト肝組織作製の概念図



【目的】 古典的なモデルにおいて、組織幹細胞は、細胞分裂頻度を低く抑えることで、分裂に伴って起こる DNA 損傷・テロメア短縮等の影響を最小限にし、がん化や老化を防ぐと考えられてきた。しかし我々は近年、マウス表皮において、活発に分裂する幹細胞の存在を見いだした。従って、幹細胞の分裂頻度と老化メカニズムを再考する必要性が生じた。本研究は、分裂頻度の異なる 2 つの独立した幹細胞を持つマウス表皮をモデルとし、幹細胞の老化メカニズムを、細胞・分子レベルで明らかにすることを目的として遂行した。

【方法】 始めに、分裂頻度の異なる幹細胞間で老化表現型に違いが見られるかを野生型 2 歳齢マウス皮膚の組織学的解析により解析した。次に、分裂頻度の低い表皮幹細胞と高い表皮幹細胞では、細胞の性質や老化に対する応答・制御メカニズムに違いがあるのではないかという仮説のもと、若年マウスにおいて、分裂頻度の低い表皮幹細胞と高い表皮幹細胞の単離、トランスクリプトーム解析を行った。最後に、老化によって幹細胞ダイナミクスがどのような影響を受けるかを明らかにするため、細胞系譜解析を遂行した。

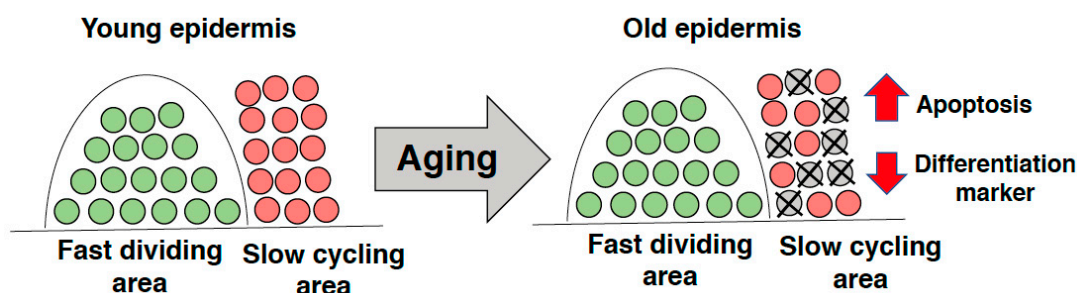
【結果】 加齢マウスでは、分裂頻度の低い表皮幹細胞の局在領域において、アポトーシスの増加、DNA 損傷の蓄積、分化マーカーの発現低下が見られた。細胞増殖は分裂頻度の低い表皮幹細胞でも高い表皮幹細胞でも全体的に減少傾向にあった。このように、当初の予想とは異なり、分裂頻度の高い幹細胞よりも、低い幹細胞でより顕著に加齢の影響が見られた。

分裂頻度の異なる幹細胞で 2 倍以上発現が高い遺伝子群の Gene Ontology 解析の結果から、分裂頻度の低い表皮幹細胞では、アポトーシス抑制に関わる遺伝子が高発現していることが推定された。さらに、2 つの幹細胞集団では、代謝に関わる遺伝子群に発現の違いが見られることも分かった。このような遺伝子発現の違いが、老化、特に DNA 損傷や分裂ストレスに対する細胞の応答性を変えている可能性が示唆された。

細胞系譜解析の結果、タモキシフェン投与 1 年後までは、2 種類の表皮幹細胞は、それぞれ特異的な領域に位置しており、互いのニッチへの移動はほとんど観察されなかった。今後、一方の幹細胞の機能が低下した際に、もう一方の幹細胞が機能を補完するような現象が見られるかを、タモキシフェン投与 2 年後まで、時間経過を追って解析していく。

今後は、加齢マウス皮膚の組織学的解析の結果と、遺伝子プロファイリング、細胞系譜解析で得られた結果を総合的に解釈することで、組織・細胞レベルでの加齢変化を、分子レベルでの加齢変化と結びつける。また、表皮幹細胞の老化メカニズムが、表皮以外の幹細胞システムにも普遍的に存在するかに迫るため、他の組織においても、候補遺伝子群の発現・機能解析を遂行する。

分裂頻度の異なる表皮幹細胞の加齢変化



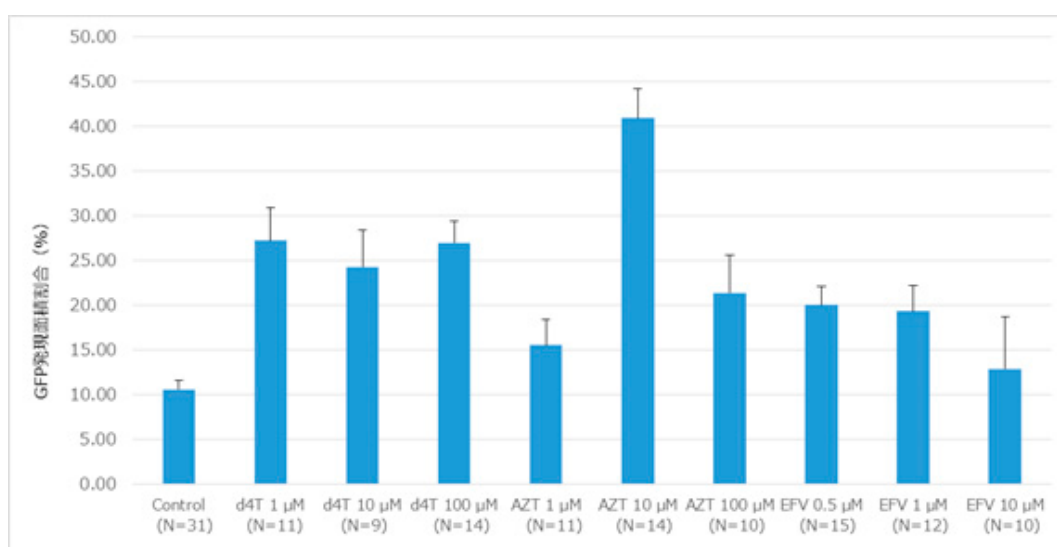
【目的】 精子形成は、精子幹細胞の分裂増殖、2回の分裂を伴う減数分裂、そしてダイナミックな形態変化を伴う精子変態から構成され複雑かつ緻密な分化過程である。以前、我々は器官培養法によって、未熟な精原細胞から精子へ至る精子形成過程を、体外において進行させることが可能な培養法を開発した。器官培養は培養液の組成を自在に変更できるため、生体内では実現が難しいような精巣内環境でさえ作れるという強みがある。それゆえ、男性不妊治療に応用できる可能性もあると期待される。レトロトランスポゾン抑制を抑制する遺伝子である *Piwi* 経路構成遺伝子を欠損すると精子形成不全となり不妊となることが知られている。本研究では、*Piwi* 経路構成遺伝子ノックアウトマウスを不妊モデルとして、精巣器官培養法によって、精子形成不全を *in vitro* で治療する方法を開発することを目的として開始した。これまで *Piwi* 経路構成遺伝子ノックアウトマウスの一つ、*Tdrd7* KO マウスを対象に取り組んできたが、現在までに有効な方法の確立には至っていない。しかし、その研究過程で使用した逆転写酵素阻害剤が、野生型マウスの精巣の器官培養において、*in vitro* 精子形成効率を改善することを示唆する結果が予想外に得られた。我々の開発した精巣の器官培養法は、効率が低いという点が問題となっていた。そのため本結果は、この問題を解決する突破口となり得る重要な結果であると思われた。そこで逆転写酵素阻害剤の精巣の器官培養における精子形成誘導効率の改善効果とその作用機序の解明を行った。

【方法】 本研究では、3種の逆転写酵素阻害剤について *in vitro* 精子形成の誘導効率への影響を調べた。精子形成のレポーターマウスである *Acr-GFP* マウスの新生仔の精巣を、それぞれの逆転写酵素阻害剤を添加し器官培養を行った。

【結果】 逆転写酵素阻害剤を添加した群では、*GFP* の発現面積割合が向上し、精子形成誘導効率の改善が認められた。

逆転写酵素阻害剤は、レトロトランスポゾンの転移を抑制することが報告されているため、生体内精巣と培養した精巣の生殖細胞のレトロトランスポゾンのコピー数をそれぞれ調べた。その結果、生体内精巣に比べ培養した精巣ではレトロトランスポゾンのコピー数の増加が認められた。このことから、前述の逆転写酵素阻害剤による *in vitro* 精子形成効率の改善効果は、培養下の精巣組織で減弱した生殖細胞中のレトロトランスポゾン抑制の働きが、逆転写酵素阻害剤により補われ、レトロトランスポゾンのレトロ転移による、生殖細胞ゲノムへのダメージを抑制していることによると考えている。

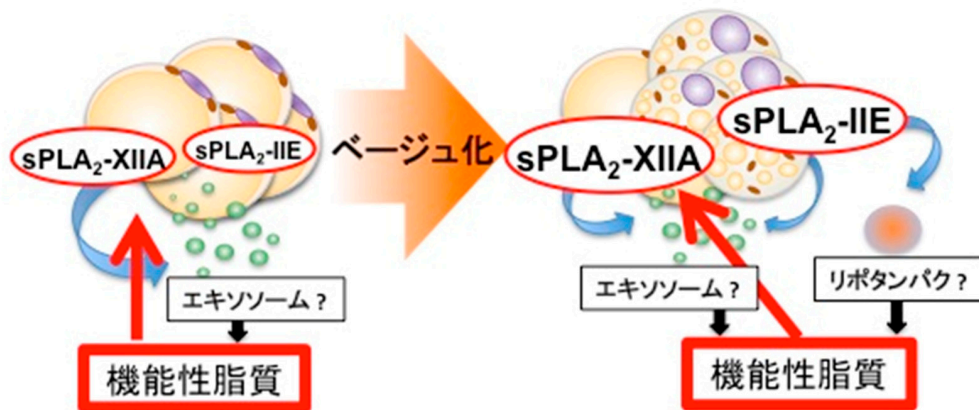
今後、培養環境においてレトロトランスポゾンの抑制を減弱させる原因を探索し特定することで、より生体内の環境に近い培養法を開発し、高効率な精子形成誘導が可能になると予想している。

逆転写酵素阻害剤の添加による *Acr-GFP* 発現面積割合への影響

【目的】近年、白色脂肪細胞のベージュ細胞への分化誘導は肥満症や糖尿病の新規かつ根本的な治療方法として注目されている。したがって、白色脂肪細胞の褐色化を規定する因子の同定とその作用機序の解明は重要な課題である。本研究では、脂肪細胞の褐色化との関連が示唆される2種類の細胞外リン脂質代謝酵素である「sPLA₂-IIE」、「sPLA₂-XIIA」に着目し、脂肪組織の褐色化において各 sPLA₂ を起点として動員される機能性脂質とそれによる代謝の新規調節機構を解明することを目的とした。

【方法】*Pla2g2e*、*Pla2g12a* 欠損マウスに寒冷暴露および β 3 アドレナリン受容体作動薬 (CL316,243) 投与を施し、脂肪組織の熱産生関連遺伝子の定量的 PCR による発現解析により、脂肪細胞の褐色化について評価した。*Pla2g2e*、*Pla2g12a* 欠損マウスの白色脂肪組織から調整した前駆脂肪細胞のベージュ細胞への分化について熱産生関連遺伝子の定量的 PCR による発現解析により、脂肪細胞の褐色化について評価した。

【結果】白色脂肪組織の褐色化により顕著に発現が誘導されるリン脂質代謝酵素として sPLA₂-IIE と sPLA₂-XIIA が同定された。*Pla2g2e*、*Pla2g12a* 欠損マウスともに寒冷暴露により脂肪組織の *Ucp1* などの熱産生関連遺伝子の発現が対照マウスと比べ減少していた。白色脂肪細胞に CL316,243 を添加すると、*Pla2g2e*、*Pla2g12a* 欠損マウス由来の白色脂肪細胞の *Ucp1* 発現増加は、対照マウス由来の白色脂肪細胞と比べ抑えられた。これらの結果から、sPLA₂-IIE と sPLA₂-XIIA とともに白色脂肪細胞の褐色化促進因子であることが明らかとなった。

sPLA₂による脂肪細胞の褐色化の時空間的制御 (仮説)

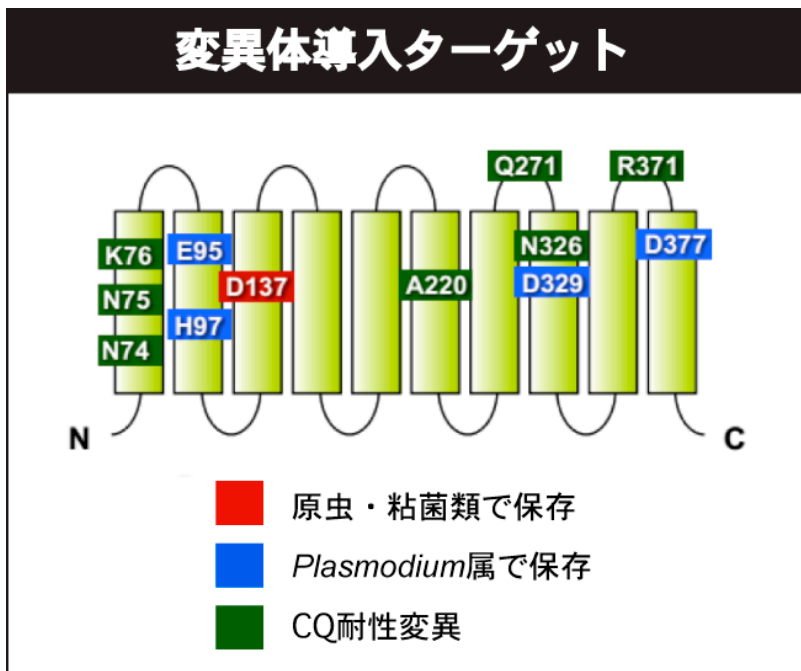
【目的】 マラリアはマラリア原虫の感染により毎年数億人が罹患し、数百万人が死亡する、人類に取り最悪の感染症である。Plasmodium falciparum chloroquine resistance transporter (PfCRT) はマラリア原虫にクロロキン耐性を付与する膜タンパク質である。マラリア原虫の薬剤耐性に主要な役割を果たすと考えられているが、生理的意義が不明であり、薬剤耐性に有効な抗マラリア原虫薬を開発する上で大きな障害となっていた。我々は最近、この問題をブレイクスルーし、PfCRTの本性を見いだした。すなわちPfCRTはアミノ酸等の食胞内で精製される栄養物の排出体することを明らかにした (PNAS 112, 3356 (2015))。

さらに耐性化のない抗マラリア薬作製のため、部位特異的変異導入法を用いた解析から、輸送に必須なアミノ酸残基を同定するため、粘菌や他の原虫のPfCRTを系統的に遺伝子比較したことで、必須アミノ酸の同定と、その役割を解明した。

【方法】 膜貫通領域の電荷のあるアミノ酸残基を中心に、部位特異的変異導入した変異体コンストラクトを作製した(下図)。PfCRTを大腸菌へ大量発現・精製し、既に構築した輸送活性測定系を用いて速度論的に解析した。

【結果】 一つのアミノ酸残基で有意に活性が低下し、さらにその部位を詳細に検討した結果、プロトンの授受に関わるアミノ酸であることがわかった。

今回作製した変異体導入部位

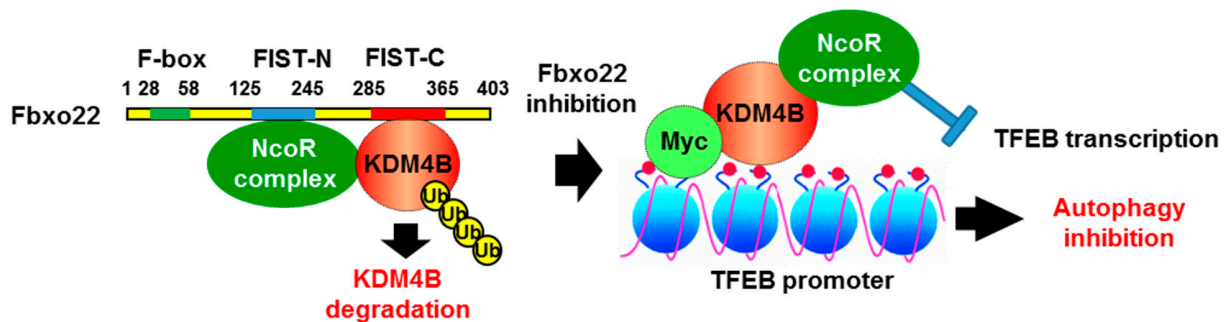


【目的】近年の研究により、細胞老化は恒久的な増殖停止を介して、発がん防御機構として働くだけでなく、SASP と呼ばれる炎症性サイトカインを中心とした生理活性因子の発現・分泌を介して、個体老化も促進すると考えられている。しかし、恒久的な増殖停止や SASP を制御する機構は不明な点が多い。本研究では、老化細胞で発現が上昇する転写因子 TFE3、およびそのファミリー遺伝子 TFEB の発現制御、およびその機能解析を目的とした。

【方法】筆者らによる RNA-seq を用いた網羅的遺伝子解析により、Fbxo22 ユビキチンリガーゼが TFE3、および TFEB の発現制御に関わる可能性が示唆された。そこで、RNAi 法を用いて、老化細胞における Fbxo22 の発現抑制を行い、TFE3、および TFEB の発現に与える影響を解析した。さらに、その制御機構を解明するために、プロモーター解析、Fbxo22 によるユビキチン化アッセイ、および免疫沈降法による相互作用の解析を行った。また、RNAi 法により、TFE3、および TFEB の発現抑制が細胞老化に与える影響を解析した。

【結果】老化細胞における Fbxo22 の発現抑制の結果、TFE3 ではなく、TFEB の発現が特異的に抑制されることが分かった。また、その制御機構として、Fbxo22 が転写抑制因子 NcoR と複合体を形成した KDM4B を分解することで、Myc 依存的な転写を制御することも明らかになった。さらに、老化細胞における TFEB の発現抑制により、SASP の主要な構成因子の発現が抑制されることを見出した。

Fbxo22 ユビキチンリガーゼによる TFEB 発現制御メカニズム

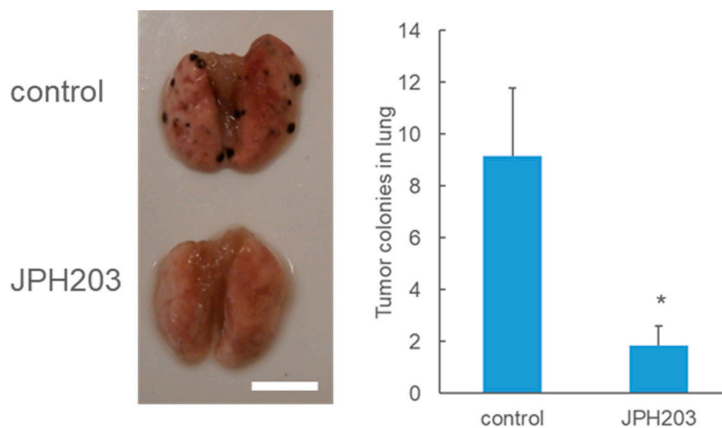


【目的】 LAT1 はがん微小環境で見られる低酸素、飢餓状態などのストレスによって誘導される中性アミノ酸トランスポーターであり、種々の必須アミノ酸を細胞内外へ輸送している。我々はこれまでの研究の中で炎症性因子にさらされた内皮細胞にて LAT1 が誘導されること、LAT1 阻害薬 JPH203 が炎症接着分子 VCAM-1 の誘導を転写レベルで阻害し、内皮活性化を抑制することを見出した。内皮活性化は多くの遺伝子発現変化をともなうが、そのなかの炎症性サイトカインによる炎症接着分子の誘導はがんの生着、浸潤に必須であることが知られている。以上の背景から、本研究では LAT1 を介した内皮活性化機序を分子レベルで検討し、LAT1 阻害ががん転移においてどのように寄与するかについて明らかにすることを目的とした。

【方法】 LAT1 を介した内皮活性化機序を分子レベルで明らかにするため、LAT1 阻害薬を前処理した臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いて、① DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析、② シグナル伝達分子のリン酸化抗体を用いたウェスタンブロッティング、③ H3K4me3、H3K27ac 抗体を用いた ChIP-seq 解析を行った。LAT1 阻害ががん転移においてどのように寄与するかを明らかにするため、LAT1 阻害薬を前投与したマウスに B16F10 メラノーマを静脈投与し、血行性転移モデルを作成することで検討を行った。

【結果】 HUVEC を用いた DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析、ChIP-seq によるヒストン修飾解析から、LAT1 阻害でストレス応答性の転写因子である ATF4、CHOP が誘導されること、また抗酸化因子である NQO1、SQSTM1、FTH1 誘導されることから、それら共通の発現調節因子である NRF2 の関与が示唆された。B16F10 メラノーマを用いた血行性がん転移モデルでは、LAT1 阻害により有意に肺へのがん転移が抑制されることが認められた。その抑制はがん転移初期段階での内皮活性化の抑制によると考えられた。

LAT1 阻害薬による B16F10 メラノーマ肺転移の抑制

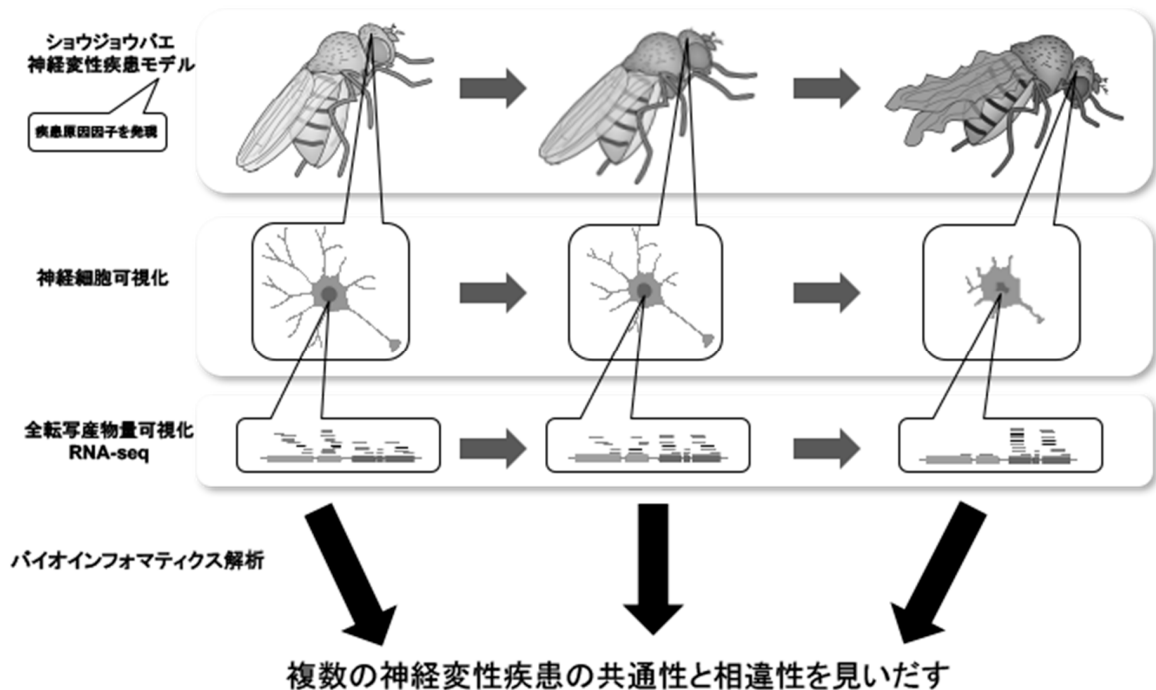


【目的】 アルツハイマー型認知症、パーキンソン病、ハンチントン病等、脳の広範囲で神経細胞の変性が進行する疾患があり、それぞれの疾患に対応する原因タンパク質が近年特定されてきている。アルツハイマー型認知症に関与する $A\beta$ やリン酸化 Tau をはじめ、パーキンソン病に関与する α -synuclein、ハンチントン病に関与するポリグルタミン鎖が伸長した Huntingtin 等が挙げられる。しかしながら、これらの異なる疾患原因タンパク質によって引き起こされる神経変性の病態機序の共通性または相違性についてほとんど理解が進んでいない。本研究では、モデル生物のショウジョウバエを用いて、神経変性の進行を疾患間で比較をすることによって、神経変性の共通性と相違性を見いだすことを目的とした。

【方法】 ショウジョウバエの脳内のキノコ体という特異的な神経組織で蛍光タンパク質と共に神経変性疾患原因因子である Tau、 α -synuclein、Huntingtin を発現させ、経時的に樹状突起、軸索で起こる神経変性を記載した。

【結果】 アルツハイマー型認知症に関与する病気型 Tau は長期的な発現により、軸索が矮小化する表現系が確認された。しかし、樹状突起は異常な構造を取ることは確認されなかった。パーキンソン病の原因因子である α -synuclein においては、軸索及び樹状突起の構造異常は見られなかった。これは、 α -synuclein がショウジョウバエではホモログが存在しないため細胞への毒性が効果的でなかった可能性が示唆された。ハンチントン病に関して、ポリグルタミン化していないヒト Huntingtin では6週間後でも軸索及び樹状突起に構造異常が認められなかった。一方で、ポリグルタミン化した Huntingtin では軸索は1週間後では異常が見られなかったものの、6週間後では軸索の矮小化が観察された。

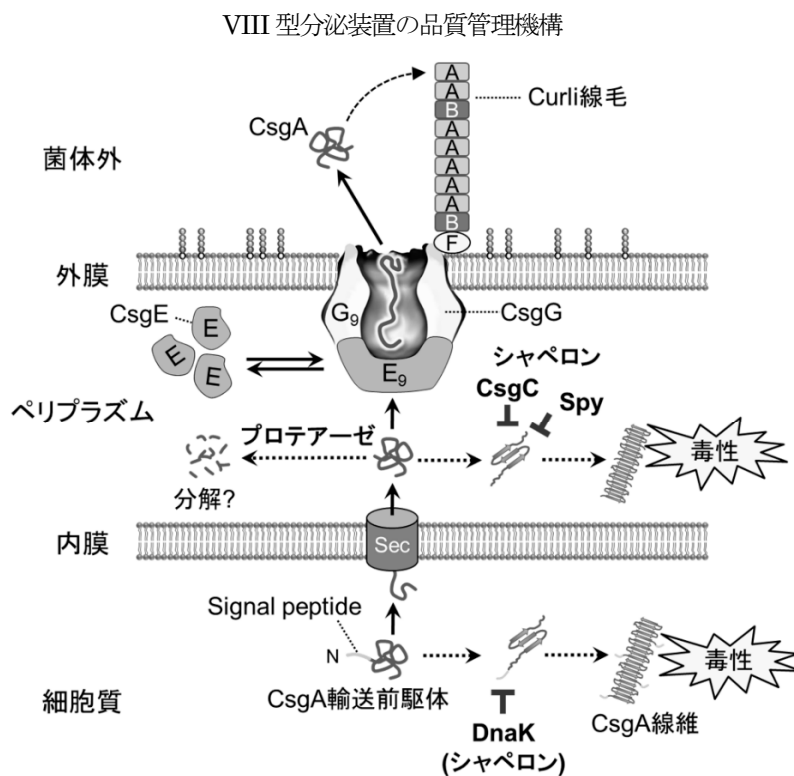
ショウジョウバエモデルを用いて、個体・細胞・分子レベルで神経変性疾患の全体像を理解する



【目的】 細菌は多様なタンパク質分泌装置 (I~IX 型) を有する。なかでも、VIII 型分泌装置はタンパク質の分泌と Curli 線毛と呼ばれる菌体外アミロイド線維の形成が共役したユニークな分泌装置である。Curli 線毛は、大腸菌やサルモネラなどの腸内細菌科細菌において“バイオフィーム”と呼ばれる菌の集合体の形成と宿主への付着に重要な役割を担う。そのため、VIII 型分泌装置の作動原理の理解は細菌感染症の予防や治療にも繋がると考えられる。しかし、Curli 線毛を構成するタンパク質が菌体内でアミロイド線維を形成しないようにどう制御されているかは不明である。本研究では、Curli 線毛構成タンパク質の細胞内における品質管理機構を明らかにすることを目指した。

【方法】 大腸菌一遺伝子欠損株ライブラリーを用いて、Curli 線毛の産生に必須な分子シャペロン・プロテアーゼ遺伝子を探索した。Curli 線毛の産生の有無は、Congo Red 含有平板培地による呈色試験、Western blotting、透過電子顕微鏡観察により評価した。試験管内タンパク質合成システム (PURE System) を用いて、タンパク質のフォールディングや凝集に与える分子シャペロンの効果を評価した。蛍光タンパク質を融合した Curli 線毛構成タンパク質 (CsgA-sfGFP) を発現させることで、大腸菌細胞内での動態を可視化した。表面プラズモン共鳴法やペプチドスキャン法を用いて、分子間相互作用を詳細に解析した。

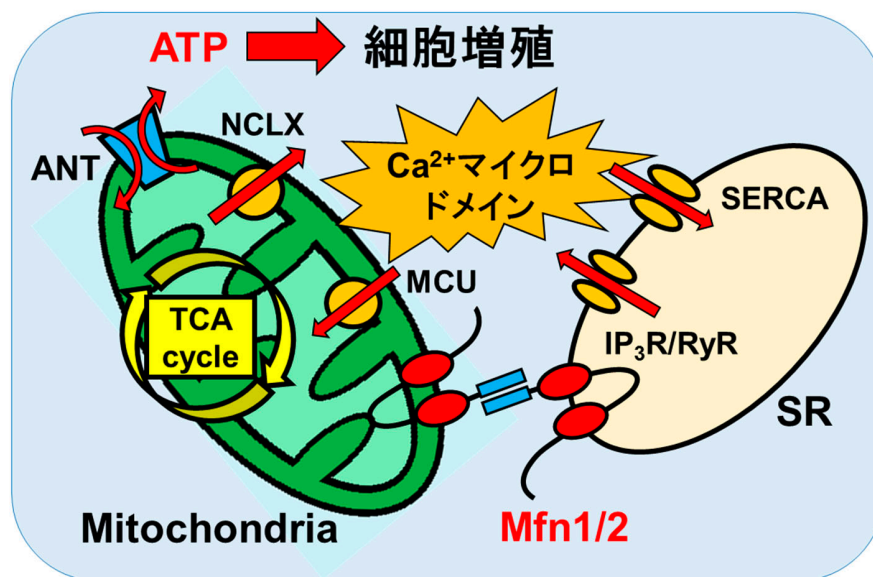
【結果】 Curli 線毛の産生に必須な因子として、細胞質においてタンパク質のフォールディングを助ける分子シャペロン DnaK を同定した。DnaK は Curli 線毛の産生に必須な転写因子 RpoS および CsgD のフォールディングを助けることで VIII 型分泌装置の遺伝子発現を正に制御することが分かった。また、DnaK は凝集しやすい性質を持つ CsgA のシグナル配列の N 末端数アミノ酸を認識して結合することで、細胞質での凝集体形成を抑制し、ペリプラズムへの輸送を促進することが分かった。さらに、ペリプラズムでは、複数の分子シャペロンとプロテアーゼが CsgA の質と量を制御することを見出した。以上より、VIII 型分泌装置の細胞内における品質管理機構の一端を明らかにした。さらに詳細な分子機構を明らかにすることで、バイオフィームに関連した感染症の予防・治療法の開発に繋がると期待される。



【目的】 平滑筋増殖は様々な疾患の形成に重要であるが、その機構に関して未だ不明な点が多い。そこで我々は、この機構にオルガネラ間の Ca²⁺シグナルの機能的ネットワーク (Ca²⁺ネットワーク) が関与すると仮定した。本研究では、ミトコンドリアと筋小胞体 (SR) の物理的連結に重要とされる mitofusin2 (Mfn2) に着目し、Mfn2 の Ca²⁺ネットワークおよび平滑筋増殖に対する役割を検証した。

【方法】 ラット大動脈平滑筋細胞に対して、siMfn2 を導入し Mfn2 をノックダウンさせた。細胞質内・ミトコンドリア内・SR 内の Ca²⁺濃度変化やミトコンドリア膜電位、ATP 濃度を共焦点レーザー顕微鏡により可視化解析した。また、平滑筋細胞増殖の測定にはイメージアナライザーを使用した。

【結果】 Mfn2 をノックダウンした平滑筋細胞において、ミトコンドリアの断片化およびミトコンドリア-SR 間相互作用の減弱が観察された。さらに、アゴニスト刺激後の細胞質内 Ca²⁺濃度上昇の減衰速度が低下し、ミトコンドリアへの Ca²⁺取り込みも減少した。また、Mfn2 のノックダウンにより、ミトコンドリア膜電位が減少し、ATP 濃度も低下した。細胞数を計測したところ、Mfn2 をノックダウンした細胞で増殖速度が低下した。以上より、Mfn2 は Ca²⁺ネットワークの構築と ATP 産生を介して血管平滑筋細胞増殖に関与し、循環器疾患発症メカニズムの一端を担う可能性がある。

Ca²⁺ネットワークによる平滑筋細胞増殖促進メカニズム

142 分子の動態の可視化による中心体複製メカニズムの解明	高尾 大輔
--------------------------------------	--------------

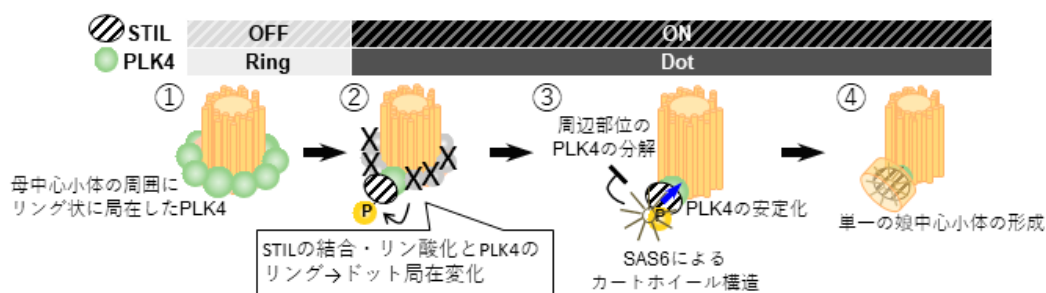
【目的】 中心体は、動物細胞において進化的に保存された細胞小器官であり、微小管形成中心として働くなど多くの重要な機能を担っている。例えば細胞分裂においては、二極化した紡錘体の形成に関わっている。また、中心体は細胞周期において一度だけ複製されるよう厳密に制御されている。これにより、正常な細胞分裂が維持されている。過剰複製などの異常は、細胞癌化などの疾病につながると考えられている。

母中心小体から厳密に 1 コピーの娘中心小体が形成されるメカニズムとは何か？細胞、ひいては組織・個体の機能・発生に重要な、中心体複製の分子メカニズムを解明することが本研究の目的である。我々の最近の研究成果により、中心体複製メカニズムの概要が見えてきた (Ohta et al., 2014, Nature Communications)。我々のモデルでは、PLK4、STIL、SAS6 という少なくとも 3 つの分子が主要な役割を果たす。特に、PLK4-STIL 複合体形成と安定化により PLK4 の局在パターンがリングからドットへ変化し、その選ばれた部位だけに厳密に 1 コピーの娘中心小体が形成されるステップが重要であると考えている。

【方法】 これまでの多くの研究では、主に分子生物学的手法や生化学的手法が用いられてきた。これらの手法は、分子間の相互作用やリン酸化シグナルの検出という点においては非常に有用である。しかし、PLK4 のリングからドットへの局在パターン変化に代表されるように、分子の時間的・空間的な挙動を知ることが、中心体複製メカニズムの解明には重要である。本研究では、徹底的な顕微鏡観察により主要な分子の動態を明らかにし、中心体複製メカニズムをモデル化する方法を用いた。

【結果】 STED 超解像イメージングの応用により、PLK4 リングの詳細な解析を行った。これにより、これまで連続的だと思われていたリングが実はドットが数珠上に連なった離散的なリングであることを明らかにした。この観察データから簡単な数理モデルを構築した。今後さらに詳細な解析とモデルのチューニングが必要である。また、PLK4 など内在性の主要因子を長時間 (30 時間) ライブ観察するシステムを構築した。これも非常に大きな成果であり、今後数理モデル化に取り組む。

厳密に 1 コピーの中心小体が複製されるメカニズム：現在のモデル

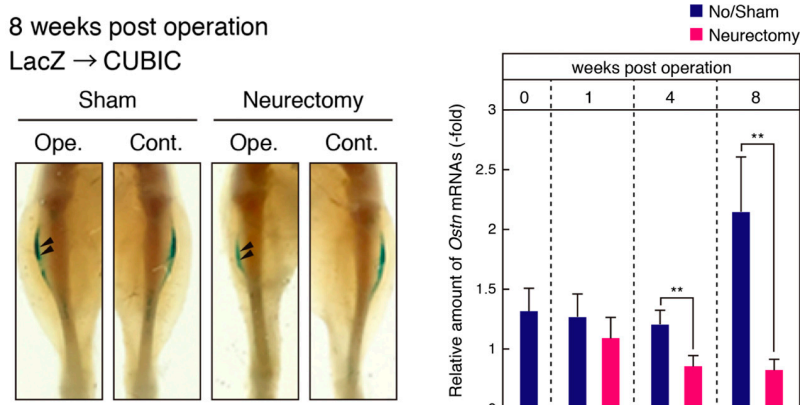


【目的】 長管骨の成長は、軟骨細胞依存の長軸成長と骨芽細胞依存の短軸成長により達成される。長軸成長は、成長板における軟骨細胞の増殖、肥大軟骨細胞への分化とそれに続く骨への置換という一連の流れから構成される、いわゆる「軟骨内骨化」により行われる。一方で、短軸成長は骨芽細胞が石灰化を引き起こす「膜性骨化」が骨膜上で行われる。骨成長時には、軟骨内骨化による骨の伸長と、これを支えるための骨径の増加が同時に起こるので、強度が維持されると考えられる。したがって、骨成長に伴った「長軸-短軸成長のカップリング機構」が存在すると考えられるが、不明である。私たちが着目している Osteocrin (OSTN) はナトリウム利尿ペプチド (NP ファミリー: ANP, BNP, CNP) 様配列を含むが環状構造をとらないので、ANP や BNP 受容体 (GC-A, GC-B) とは結合しない。しかし、NP のクリアランス受容体 (NPR3) には結合するために OSTN は NP の分解を阻害することで、生理作用を発揮すると考えられる。内因性 OSTN の生理機能について OSTN-KO マウスを用いて解析したところ、OSTN は骨の長軸-短軸成長を促進することが明らかになった。さらに OSTN 遺伝子座に LacZ をノックインして、全身性に発現解析を行うと、OSTN は脛骨の内側面に高発現しており、伸展刺激のかかる部位と一致していることがわかった。そこで、本研究では内因性 OSTN が如何に発現制御されるかについて、荷重刺激に着目して解析する。

【方法】 OSTN の発現が荷重によって制御される可能性を、マウス個体と骨膜細胞を用いた *in vitro* のアッセイにより検討した。荷重免除モデルとしては、大腿坐骨神経切除を採用した。また、機械刺激非依存的な骨量低下モデルとして卵巣摘出モデルを適用した。発現部位のモニターには OSTN の遺伝子座に LacZ をノックインしたマウスを使用して LacZ の活性染色により検討した。発現量の定量は qPCR により検討した。

【結果】 脛骨にかかる荷重を免除するために、マウスの片脚に大腿・坐骨神経切除手術を施し、OSTN の発現量を qPCR によって検討した結果、OSTN の発現部位には顕著な変化を認めなかったが、OSTN の発現レベルの低下を認めた。さらに OSTN 量を qPCR により定量化した結果、OSTN の発現量は術後、4 週から対照群の約半分程度にまで有意に低下した。一方で、卵巣摘出により骨量低下を引き起こしても、OSTN の発現量は低下しないことから、OSTN の発現は骨量には依存せず、荷重刺激が必要であることが明らかになった。

OSTN の発現は機械ストレスにより制御される

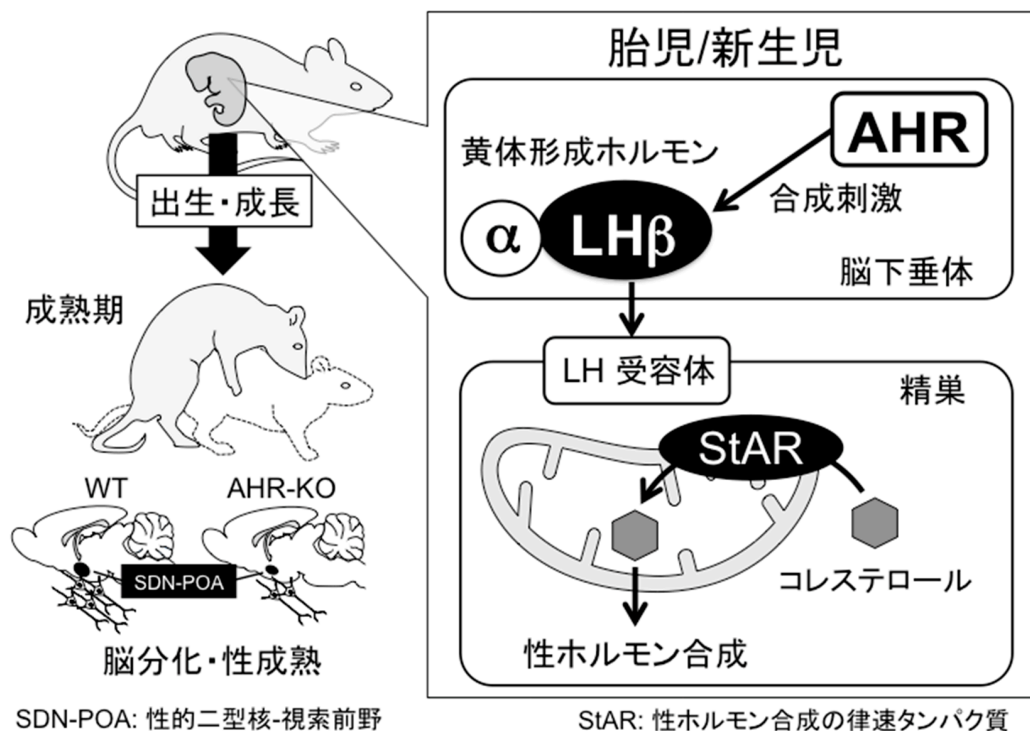


【目的】 芳香族炭化水素受容体 (aryl hydrocarbon receptor : AHR) は、リガンド活性化型の転写因子である。欠損マウスを用いた表現型解析により、AHR は肝血管系、生殖腺および免疫機能の機能維持などの多彩な生理機能を有することが示唆されている。一方、AHR は発生期から恒常的に発現しており、未分化細胞で発現が高く分化に伴って低下する。すなわち、発生期の細胞分化・成熟過程に重要な役割を担うと推定されるが、胎児期における役割には不明な点が多い。本研究では、AHR が胎児脳下垂体における黄体形成ホルモン (luteinizing hormone : LH、性ホルモン合成の制御因子) の正常発現に重要であり、これによって生殖腺の性ホルモン合成を制御し、脳分化・性成熟に重要な役割を演じるとの新たな可能性に着目した検討を実施した。

【方法】 AHR 欠損ラット雄胎児および新生児より脳下垂体、精巣および血清を採取し、LH および性ホルモン合成系タンパク質の発現を解析すると共に、血中のホルモンレベルを定量した。さらに、成長後の AHR 欠損雄ラットを用いて交尾行動試験を行うと共に精巣および精巣上体の組織学的解析および精子数測定を行い、野生型との違いを比較した。

【結果】 AHR 欠損ラット胎児においては、野生型胎児に比較して LH 合成量が低下しており、これと符合して精巣における性ホルモンレベルが低値を示した。AHR 欠損による LH/性ホルモンレベルの低下は、新生児期までは同様に見られたが成長後には消失し、出生前後に一過的であることが確認された。出生前後の一過的な性ホルモン刺激は、脳の性分化に必須である。この事実と合致して、AHR 欠損雄ラットでは脳の性分化の指標である視床下部の神経集合核が縮小すると共に交尾行動能力が低下することが明らかになった。加えて、精巣および精巣上体の組織学的解析により、精巣細胞の萎縮と精子数および精子運動能の低下傾向も観察された。以上の成果から、AHR は出生前後の脳下垂体 LH の発現制御に重要であり、これによって精巣の性ホルモン合成系、ひいては脳の性分化・性成熟に寄与する可能性が見出された。

脳分化・性成熟への AHR の寄与：胎児期の脳下垂体・生殖腺軸における性ホルモン合成制御



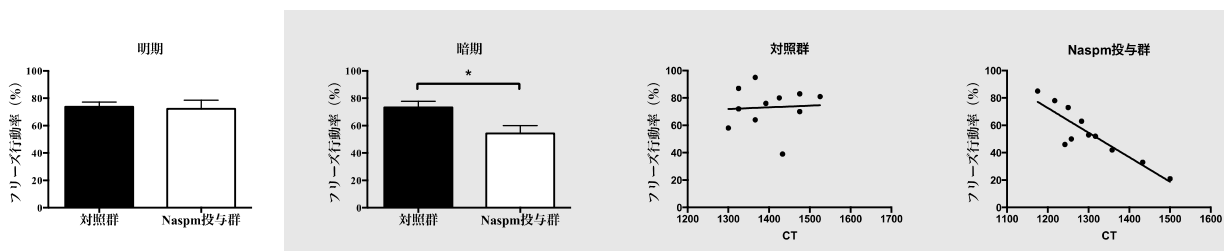
【目的】現象の中に普遍的な法則を見いだす事が科学の真髄であるが、例外の発見がこれまでには思いもよらなかった、より普遍性の高い法則の発見へとつながることがある。私は全くの偶然で、海馬における記憶の分子メカニズム、具体的にはカルシウム透過性 AMPA 型グルタミン酸受容体 (CP-AMPA) の記憶想起への関与に概日リズムが存在することを見出した (未発表データ)。本研究の目的は、このリズムの詳細と意義を明らかにし、海馬機能を支える分子メカニズムのより包括的な理解を目指すと同時に、様々な精神疾患に伴う記憶障害の治療に時間薬理学の概念を導入することである。これが実現すれば、投与タイミングを調整することで既存の認知症薬の効果を高めることができるのみならず、この海馬概日リズムを生かした革新的な新規認知症薬の開発をも期待できる。

【方法】本研究では、1. 海馬への薬理的な操作と行動実験、および 2. 自由行動下マウス海馬でのテトロド記録という二つのアプローチを用いて、CP-AMPA の記憶想起への関与とその機序に迫った。

1. CP-AMPA が文脈記憶の想起に関与する程度が概日によって異なるのかを決定するため、文脈恐怖条件づけを行ったマウスの海馬へ CP-AMPA 選択的阻害剤 Nasp^m を記憶テスト直前に注入し、記憶テスト時の文脈フリーズレベルを評価した。この時、半分のマウスは明期に、残り半分のマウスは暗期に薬剤投与およびテストを行った。2. 海馬の記憶エンGRAMが概日時間や動物の状態によって異なる活動パターンを示すのかどうかを解析した。具体的には、c-Fos-tTA マウスを用いて文脈恐怖条件づけ時に海馬 CA1 に形成された記憶エンGRAMを光感受性ナトリウムチャンネル (Channelrhodopsin, ChR2) で標識し、青色光 (473 nm) への応答性からテトロド電極を通して同定した。同定した記憶エンGRAMが概日時間や動物の状態によって活動パターンを変えるのかどうかを解析し、概知の CP-AMPA の作用機序からこの分子の関与を検証した。

【結果】1. Nasp^m 投与下で文脈記憶テストを行ったところ、記憶テストが明期に行われた場合には対照群との差が見られなかったのに対し、テストが暗期に行われた場合には記憶想起が阻害された (図 1)。そして、Nasp^m 注入とテストが暗期に行われたマウスでは、記憶パフォーマンス (%フリーズ) とテストを行った概日時間 (CT) との間に有意な相関関係が認められた。以上の結果は、文脈記憶想起に対する CP-AMPA の関与の程度が概日時間とともに変動することを示している。2. 同定された海馬 CA1 記憶エンGRAMの活動を、明期/暗期、および馴化環境での静止中と新規環境の探索中それぞれで解析したところ、最大発火率や平均発火率といった基本的な活動量に概日時間による影響は認められなかった。しかしながら、記憶エンGRAMと近傍の抑制性介在ニューロンとの活動相関に概日時間と状態の相互作用が示唆された。

文脈記憶想起に対する CP-AMPA 薬理的阻害の影響は概日リズムを示す

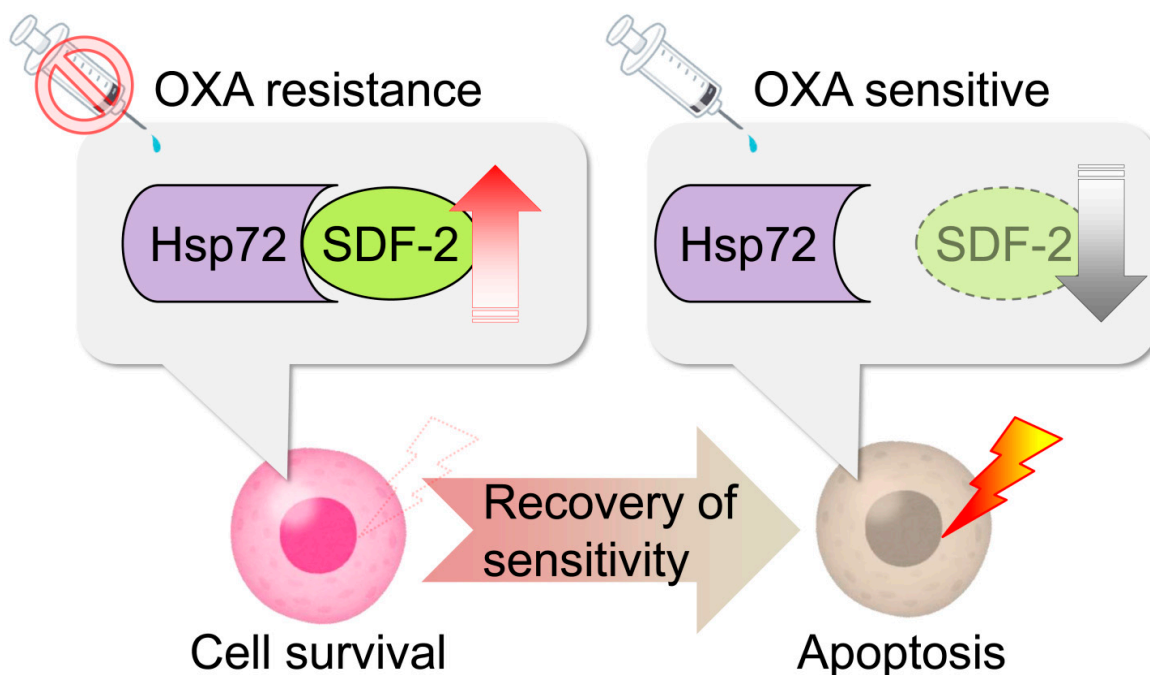


【目的】 スキルス胃がんは腹膜やリンパ節に転移しやすい難治性がんの1つであり、発見時には外科的治療が困難な場合も多く化学療法に頼らざるを得ない。近年、オキサリプラチンは本邦において切除不能進行・再発胃がんに適応となったが、早期に耐性が生じるため奏効する期間は短い。オキサリプラチン耐性の分子機構は報告されているものの、これらの耐性因子を標的とした治療薬の開発には至っておらず、耐性の解除が化学療法における重要な課題である。著者らはスキルス胃がん細胞株を用い、オキサリプラチンの新規耐性因子として **Stromal cell-derived factor-2 (SDF-2)** を同定した。SDF-2 は分子シャペロンである **Hsp72** により安定化されることで、オキサリプラチン耐性を生じさせるが、SDF-2 が耐性を生じさせる分子機構については解明できていない。そこで本研究では、SDF-2 の分子機能の解明を中心にオキサリプラチンの新たな耐性機構の解明を目指した。

【方法】 オキサリプラチンまたは小胞体ストレスの誘導剤を細胞に添加したときの、遺伝子発現およびタンパク質発現を定量し、ストレス条件下における SDF-2 の分子機能を評価した。遺伝子発現はリアルタイム PCR 法にてタンパク質発現は免疫蛍光染色およびウェスタンブロット法にて評価した。

【結果】 SDF-2 はこれまでに報告されている耐性因子の発現に影響を与えることなく、胃がん細胞株に耐性を獲得させていることが明らかとなった。さらに、SDF-2 はオキサリプラチンだけではなく、小胞体ストレスによってもタンパクレベルが上昇することから、ストレス応答を制御する機能を持つことが示唆された。しかし、SDF-2 は小胞体ストレス応答のシグナル伝達には影響を与えないことから、タンパク質プロセッシング、小胞輸送やカルシウム濃度制御など小胞体機能の正常化に貢献し、オキサリプラチン耐性を生じさせている可能性が示唆された。

SDF-2 の安定化はオキサリプラチン耐性を生じさせる

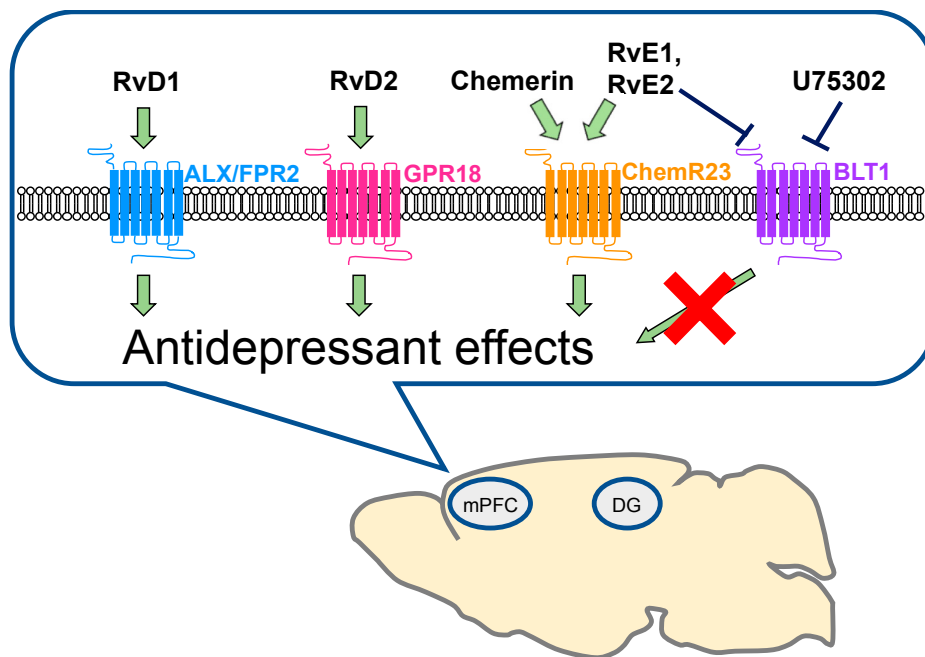


【目的】 近年、NMDA 受容体拮抗薬ケタミンが、既存薬にはない即効性の抗うつ作用を示すことが明らかになった。ケタミン自体の抗うつ薬としての臨床応用は、依存性などの副作用のため制約があるが、ケタミンの抗うつ作用機序の解析から得られた知見を活かし、より安全な代替薬を見いだすことが、アンメットニーズを満たす近道であると考えられる。我々はこれまでに、ドコサヘキサエン酸由来の活性代謝物レゾルビン D1 (RvD1)、D2 (RvD2)、エイコサペンタエン酸由来のレゾルビン E1 (RvE1)、E2 (RvE2) が、ケタミンと同様に mTORC1 活性化を介して抗うつ作用を示すことを明らかにしてきた。新たな即効性抗うつ薬の創薬標的となる可能性があるレゾルビン類であるが、その抗うつ作用に関与する受容体や脳部位などは不明のままであった。そこで、今回これらの同定を試みた。

【方法】 うつ病モデルとしてリポポリサッカライド誘発うつ病モデルマウスを用いた。レゾルビン類と各種薬物は、側脳室内、内側前頭前野 (mPFC) 内または海馬歯状回 (DG) 内に投与した。

【結果】 chemerin 受容体 ChemR23 が RvE1 と RvE2 の抗うつ作用に関与している可能性を見いだした。また、RvD1 と RvD2 はそれぞれ、FPR2/ALX、GPR18 を介して抗うつ作用を示すことが明らかとなった。さらに、mPFC と DG がレゾルビン類の抗うつ作用に重要な脳部位であることが明らかとなった。

レゾルビン類の抗うつ作用に関与する受容体と脳部位



148 分裂期スピンドル方向異常が誘導する腫瘍化機構の解明	中嶋 悠一郎
-------------------------------	--------

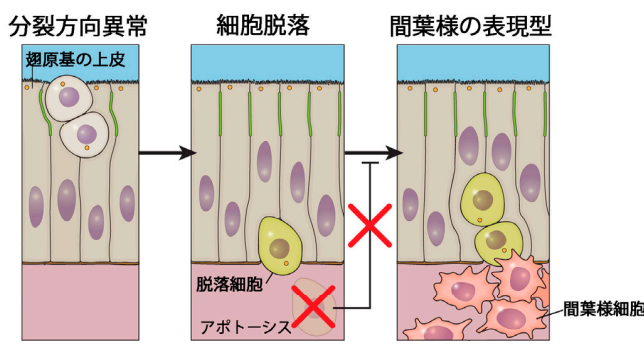
【目的】 ヒトのがんの約9割は上皮組織に由来する。上皮性の腫瘍においては、極性や接着といった上皮細胞が本来備える性質に異常がみられ、上皮構造の破綻が広く観察される。また悪性化した腫瘍は上皮間葉転換 (EMT) を経て上皮性を失い、間葉様の表現型を示す。がん遺伝子やがん抑制遺伝子の変異に注目した研究が精力的に行われてきた一方で、どのような異常細胞の振る舞いによって上皮構造の破綻が誘導され、腫瘍化が進行するのか、腫瘍形成の段階的な発生の仕組みの多くは未だ不明である。上皮細胞は通常、上皮シートに対して平行な細胞分裂を行う。細胞分裂時に形成される分裂期スピンドルの方向は、細胞分裂方向と一致しており、発生や恒常性維持の過程において厳密に制御されており、その異常は腫瘍形成やがんなどの病態への関与が示唆されている。しかしながら、生体内上皮において分裂期スピンドル方向に注目した研究は少なく、上皮と平行な分裂期スピンドル方向の生理的意義は明らかでなかった。本研究では遺伝学的ツールが豊富で、単純な上皮構造をもつショウジョウバエ翅成虫原基をモデルとして、分裂期スピンドル方向の異常が誘導する EMT および腫瘍形成メカニズムの解明を目指す。

【方法】 本研究では分裂期スピンドル方向の異常が誘導する EMT の分子および細胞レベルの特徴を明らかにするために、1. 分裂期スピンドル方向の異常を示す細胞の振る舞いを細胞生物学的に明らかにするアプローチ、そして 2. 上皮から間葉細胞への変化に伴うゲノムワイドな遺伝子発現変化を RNA-seq 解析で明らかにする。また 3. 間葉様細胞で変化がみられる遺伝子発現を遺伝学的に操作し、EMT 形質の獲得および腫瘍化に必要な因子やシグナルを明らかにすることまでを試みた (図)。

【結果】 分裂方向の異常は上皮性の喪失に先行していること、そして間葉系マーカーの発現が基底側に脱落した細胞において観察された。また EMT に伴う遺伝子発現変化を RNA-seq 解析した結果、翅原基の運命を失い、ストレスシグナル経路やサイトカイン、EMT 転写因子の発現といった間葉様細胞に特徴的な分子ダイナミクスが明らかとなった。さらに遺伝学的なアプローチによって JNK 経路や Yki 遺伝子が EMT 表現型の誘導に必要であることが示唆され、EMT 転写因子の発現によっても分裂期スピンドル方向の異常を伴う EMT 効果が観察された。これらの結果は、分裂期スピンドル方向の異常で誘導される EMT において、分裂期スピンドル方向の異常を起点としたメカニカルシグナルやストレスシグナルの関与や転写因子を介したフィードバックの仕組みが EMT 形質の獲得に寄与する可能性を示唆する。EMT は腫瘍の悪性化の様々な段階に関与することを考慮すると、上皮の分裂期スピンドル方向の異常が誘導する腫瘍の発生を体系的に明らかにすることは、ヒトにおける腫瘍発症機序の理解の向上につながると考えられる。

本研究計画が扱う現象の概念図とストラテジー

分裂期スピンドル方向異常が誘導する腫瘍化機構の解明



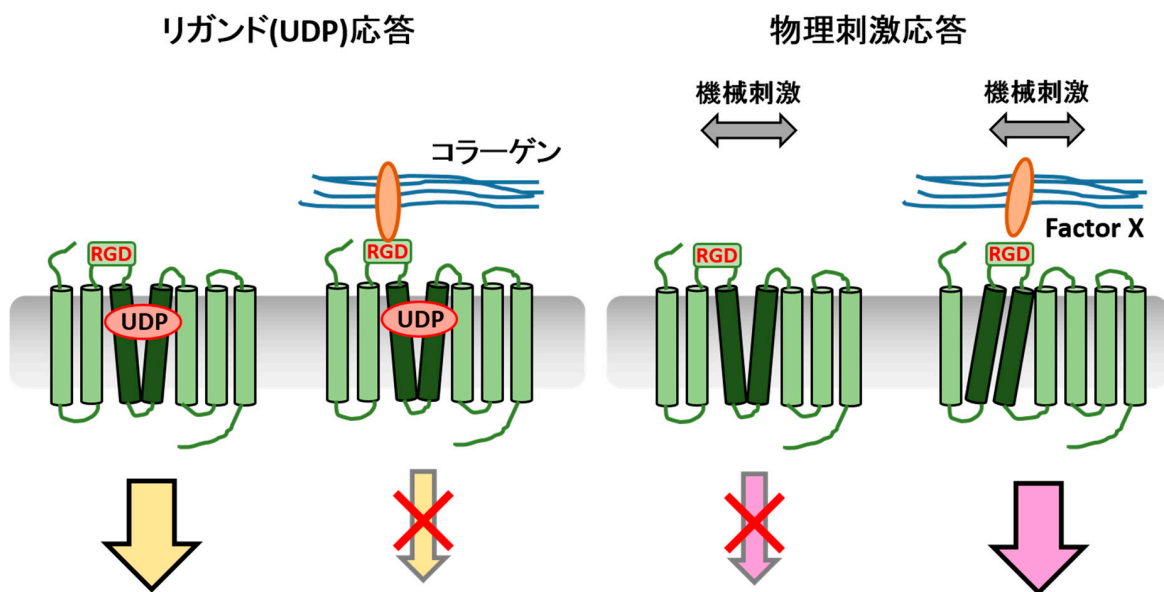
- (1) 細胞脱落から間葉様細胞化へのプロセス
- (2) 間葉様細胞の単離とRNA-seqによる遺伝子発現解析
- (3) EMT表現型および腫瘍化に関与する因子の同定と機能解析

【目的】加齢や病的状態により血行力学的負荷に適応できなくなると心血管組織の恒常性は破綻し、様々な心血管疾患を引き起こす。我々はこれまでに、細胞外ヌクレオチドをリガンドとするプリン作動性G蛋白質共役型受容体(GPCR)の一種である P2Y6R が圧負荷誘発性心不全に関与することを明らかにしてきた。この研究過程において、P2Y6R は従来のリガンドである UDP だけでなく、物理刺激にも応答する可能性が見出された。本研究では、心筋細胞における P2Y6R の物理刺激応答性を検証すると共に、細胞外環境に依存した P2Y6R のリガンド応答性、物理刺激応答性機構を明らかにする。

【方法】P2Y6R の活性化は細胞内カルシウムイメージングもしくはMAPK のリン酸化を指標にして評価した。P2Y6R を過剰発現させたラット心筋細胞株 H9c2 をストレッチチャンバーにまき、チャンバーを 20% 伸展させることで物理刺激を行った。

【結果】H9c2 細胞において、P2Y6R は一過性の伸展刺激により活性化されること、この活性化は細胞外の RGD モチーフに依存していることが明らかとなった。細胞外マトリックスであるコラーゲンは P2Y6R の伸展刺激応答性を促進する一方で、UDP 応答性を低下させることが明らかとなった。

細胞外環境による P2Y6R のリガンド応答性、物理刺激応答性の変化



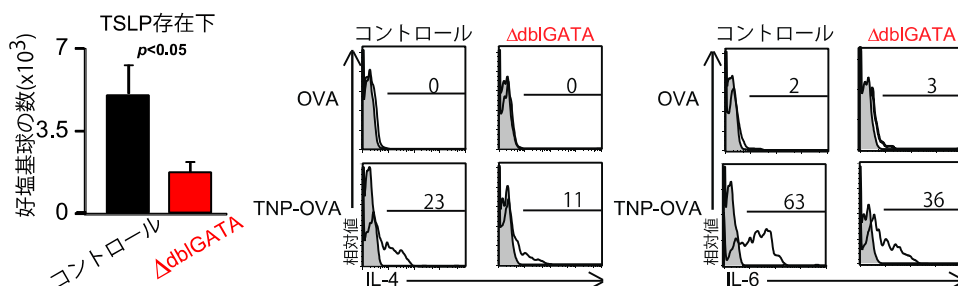
【目的】 好塩基球は最も数の多い末梢血中でも 0.5% と非常に数の少ない細胞集団の一つであるが、近年我々を中心として好塩基球特異的な抗体、欠損マウスの樹立、好塩基球のイメージング技術が確立され、好塩基球がアレルギー疾患や寄生虫感染防御応答において重要な役割を果たしていることが明らかになった (Blood 2007, Proc. Natl. Acad. Sci. 2013)。しかしながら、好塩基球の分子生物学的解析となると数の少なさがハードルとなり、まだまだ明らかになっていないことが多い。我々は、好塩基球を制御する転写制御因子の解析に取り組み、好塩基球の分子制御メカニズムを明らかにした。

【方法】 1. [マウス] BALB/c background の Δ dblGATA マウスを Jackson laboratory より購入し、実験に用いた。2. [定量 PCR 法 (qRT-PCR)] フェノールクロロホルム法を用いて RNA を抽出し、cDNA を作製した。得られた cDNA を HPRT および GATA1 の遺伝子発現をサイバークリーン法で測定し、相対値を測定した (Proc. Natl. Acad. Sci. 2013)。3. [フローサイトメトリー実験] CantoII (BD) にて解析した。4. [*in vivo* 試験] マウスに抗原特異的 IgE を投与して抗原を耳介皮内に投与後、耳介の厚さを経日的に測定した。

【結果】 転写因子 GATA1 は赤血球および顆粒球の一つである好酸球の分化制御因子として知られているが、好塩基球の機能に GATA1 が関与するかについては十分に解析されていなかった。我々は、好塩基球は GATA1 を好酸球ほどではないが、好中球よりも強く発現していることを見出した。さらに、GATA1 の転写調節領域に遺伝子変異の入った Δ dblGATA マウスの好塩基球の GATA1 の発現が低下していること見出し、好塩基球の機能における GATA1 の機能を *in vivo* および *in vitro* で解析した。その結果、GATA1 の発現低下によって、好塩基球数の減少と、抗原刺激によるサイトカイン IL-4 および IL-6 の産生の低下に影響することを見出した。さらに、好塩基球誘導性の慢性アレルギー炎症のモデルでも炎症が低下した。

以上のことから、好塩基球の分子制御に関与する分子として、転写因子 GATA1 が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。GATA1 は好塩基球の分化および機能を制御することが明らかとなり、通常好酸球欠損マウスとして用いられてきた Δ dblGATA マウスが好塩基球も数の面でも機能の面でも欠損したマウスであることが明らかとなった。好塩基球はアレルギー疾患や寄生虫感染防御応答に深く関与することが知られていることから、GATA1 を利用したアレルギー疾患および寄生虫感染症の新たな治療薬、ワクチンの開発が非常に有意義であることが示唆された。また、この結果は Δ dblGATA マウスによって見出される実験結果は好塩基球欠損マウスもしくはその他の好酸球欠損マウスで検討をすることが有意義であることを強く示唆した。

GATA1 の発現が低下する (Δ dblGATA) では好塩基球の形成と機能が抑制される

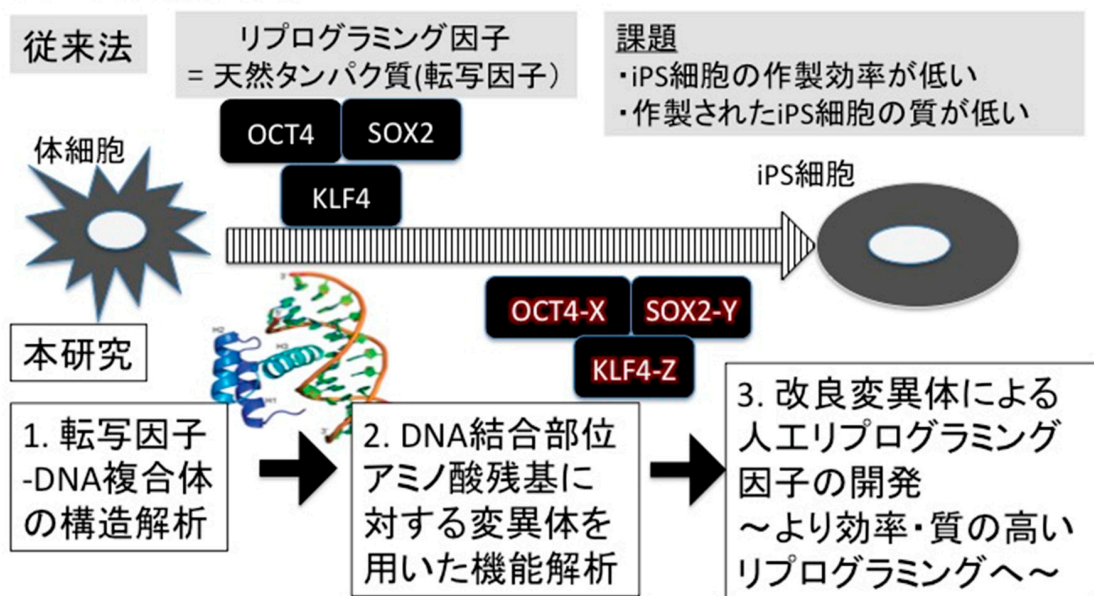


【目的】 誘導多能性幹 (iPS) 細胞の開発に端を発し、細胞種を遺伝子工学的に操作する「リプログラミング」技術が基礎生物学と再生医療における革新的技術として進展してきた。しかし、リプログラミングの効率が低い、リプログラミングした細胞の分化能が不十分、などが依然として問題となっている。その原因として、リプログラミングに用いられる遺伝子である「転写因子」の基本的な分子基盤が十分に解明されていないことが挙げられる。

【方法】 本研究計画においては、①リプログラミングで中心的役割を果たす転写因子、特に iPS 細胞の作製に用いられる OCT4、SOX2、KLF4 の分子構造基盤を解明する。②これらの分子構造基盤に基づいて、天然型タンパク質よりも優れた改良リプログラミング因子とそれを用いた 画期的なリプログラミングの制御技術を開発する。

【結果】 これまでに KLF4 については改良型変異体を得ることができ、NANOG-GFP レポーターを指標とした iPS 細胞の作成効率の上昇が見られた。この結果は、タンパク質の構造と機能の知見から、野生型タンパク質よりも優れたリプログラミング能を持つ「人工リプログラミング因子」の開発が可能であることを実証している。

本研究計画の概要

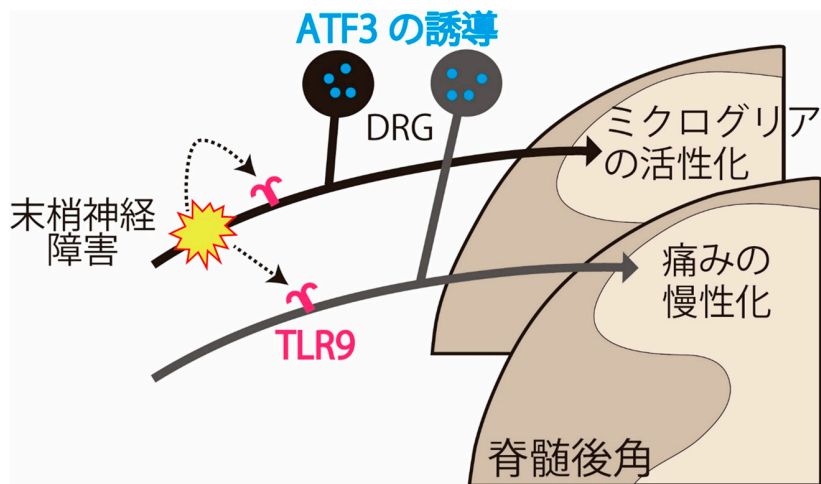


【目的】 神経障害性疼痛は末梢神経障害が治った後も長期的に持続する慢性痛の一種であり、中枢神経系の可塑的变化が病態の原因であるとして理解されている。神経障害性疼痛時には中枢神経系の変化に先駆けて一次求心性神経の細胞体 (DRG) で Activating Transcription Factor 3 (ATF3) が必ず発現誘導されることが分かっている。種々の痛みのモデルにおいても同様に DRG での ATF3 の発現誘導が認められている。しかし、中枢神経系の可塑的变化に先行した DRG での ATF3 の発現誘導がどのような役割があるのかは不明のままであった。そこで本研究では疼痛における ATF3 の役割を明らかにすることを目的とする。

【方法】 第4腰椎 (L4) 神経を切断することで神経障害性疼痛モデルマウスを作製し、行動学的な解析を行う。その後、これらのマウスの DRG 及び脊髄を用いて免疫組織化学的な解析を行う。また、神経障害性疼痛モデル作製 5 日目より *Atf3* に対する siRNA を脊髄腔内投与により *in vivo* ノックダウンを行う。

【結果】 神経障害性疼痛モデルマウスで生じる痛みは *Atf3* の siRNA により改善された。また、*Unc93b1* 変異マウスでは神経障害性疼痛に抵抗性を示した。UNC93B1 が担う代表的な経路として TLR9 があるため、TLR9 のリガンドを L4 脊髄神経に処置することで疼痛が生じた。以上のことから、ATF3 が痛みの慢性化のスイッチとして働いていることを見出し、ATF3 の制御により痛みを改善できることが明らかとなった。また、これらの現象を開始させる起始点が末梢神経に発現する TLR9 であることが明らかとなった。

末梢神経障害により DRG で誘導される ATF3 は痛みの慢性化を規定する

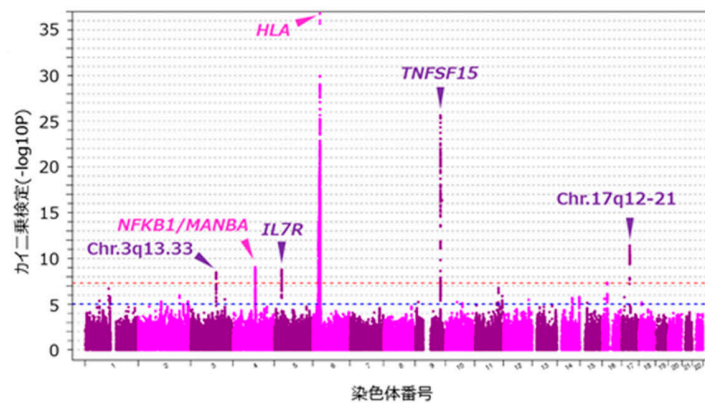


【目的】 多因子疾患の感受性遺伝子探索法であるゲノムワイド関連解析 (GWAS) 単独では、「発症に直接関与する機能的遺伝子多型 (causal variant)」を同定し、それに起因する発症機序を解明することが困難である。近年、GWAS・全ゲノム DNA 配列データ・機能解析の三者を組み合わせる post-GWAS 研究の基盤がようやく整ったため、多因子疾患の一つである原発性胆汁性胆管炎 (PBC) を対象とした post-GWAS 研究を実施した。

【方法】 本研究では、PBC を対象にした GWAS データ (Kawashima M et al, 2017) と東北大学東北メディカル・メガバンク機構 (ToMMo) が保有する日本人全ゲノム DNA 配列データを利用した全ゲノムインピュテーションおよび症例対照関連解析、および *in silico* / *in vitro* 機能解析を実施した。

【結果】 過去の報告と本研究により、すべての日本人 PBC 感受性遺伝子領域における causal variant およびそれに起因する発症機序の解明へと至った。さらに、PBC 感受性との強い関連を示す SNPs の一部は、近傍の遺伝子ではなく、やや離れた遺伝子 (エフェクター遺伝子) を制御していた。

GWAS から発症機序の解明へ



Causal variant

Effector遺伝子



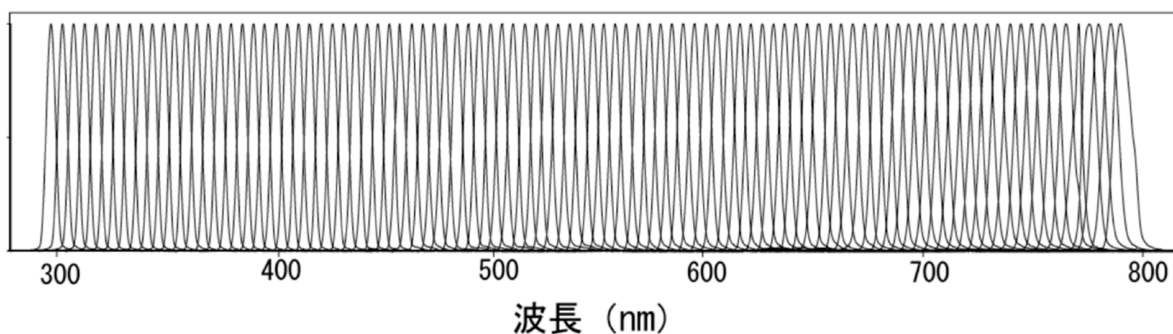
発症機序の解明へ

【目的】 オプトジェネティクスとは、光を用いて生体活動を制御する技術であり、生体へ影響が低く、光照射の領域や時間の制御が容易な点から注目されている。オプトジェネティクスでは、様々な生物種から発見された光受容体を、生体活動を制御するためのスイッチとして利用する。生物の持つ未知光受容体を効率的に同定する手法を開発できれば、異なる波長の光や、異なるシグナル伝達経路を制御する光受容体をオプトジェネティクス分野に供給できる。我々は、新奇光受容体を同定する新しい手法として、全遺伝子発現の作用スペクトルを次世代シーケンサーによって取得する「フォトーム解析」と命名した手法を提案している。本研究では、フォトーム解析のための高分解能多波長光照射を製作し、有効性を検証するとともに、フォトーム解析を応用して、原核生物の光スイッチプロモーター配列の網羅同定を行った。

【方法】 フォトーム解析において多検体試料へ光照射を行うための多波長光照射装置を開発した。キセノンランプ白色光源を回折格子にて分光し、光ファイバーにて取り出したを波長 300~800 nm の光を 5 nm 間隔ごとに 96 ウェルプレートに照射する仕様の装置を制作した (下図)。さらに、各ファイバー先端に減光フィルターを設置することで、照射光の強度を光子単位で均一化した。この装置により、光照射から RNA 精製、次世代シーケンサーライブラリ調製までを 96 ウェルプレート上で一貫して行うことが可能となった。続いて、大腸菌とシアノバクテリアの細胞に対して製作した多波長光照射装置を用いて光照射を行い、RNA を抽出した。得られた RNA からシーケンサーライブラリを調整し、次世代シーケンサーによる RNA-Seq 解析とクラスター解析を行い、全遺伝子発現の波長依存性を網羅的に同定した。

【結果】 RNA-Seq 解析による全遺伝子発現の定量と、それらのクラスター解析により、紫外~遠赤色光までの幅広い光によって波長依存的に発現制御を受ける遺伝子を網羅的に同定した。これまでの研究で使用されていた LED 光源よりも高い分解能で遺伝子発現の波長依存パターンを取得でき、さらに、格段に少ない試料量で解析できることを実証できた。これらの結果は、より幅広い生体試料に対してフォトーム解析を応用することができる可能性を強く示している。興味深いことに、シアノバクテリア光応答遺伝子の数は、大腸菌と比べて豊富であり、多様な光環境で生息する光合成生物における光受容体の探索の有効性を強く示唆していた。また、今回の解析では、リード数の大きな次世代シーケンサー HiSeq システムを利用したが、取得したリードのうち 90%以上がリボソーム RNA 領域にマッピングされ、低発現遺伝子については波長依存パターンの精度が低下した。リボソーム RNA を除去してメッセンジャー RNA を濃縮する工程が、ゲノムサイズが小さな生物種であっても必要であることが明らかとなった。

本研究で使用した高分解能多波長光照射装置の発光スペクトル

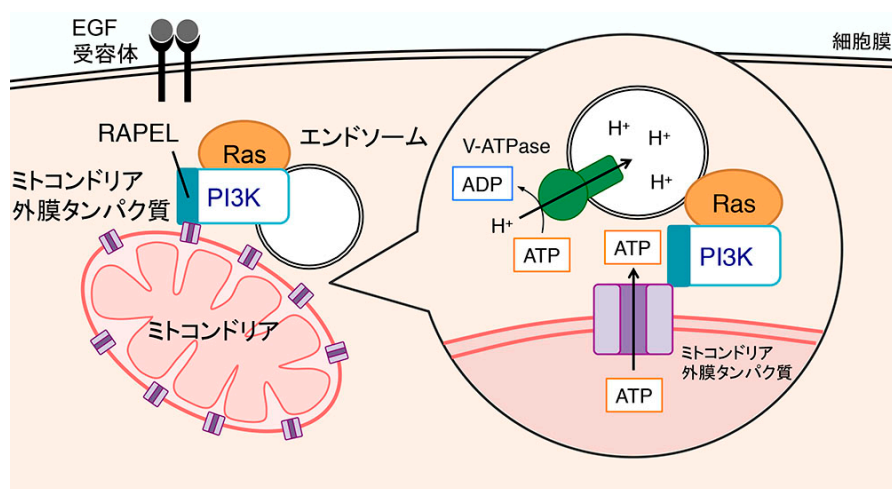


【目的】 細胞内オルガネラは細胞生理機能に必須の役割を担っているが、それぞれが固有の機能を有しており、互いに相互作用するか否かについては、一部の現象を除きよく解っていない。これまで我々は、蛍光イメージング手法による生きた細胞におけるシグナル伝達研究により、低分子量 GTP 結合タンパク質 Ras と phosphoinositide 3-kinase (PI3K) がエンドソームからシグナルを発することがエンドサイトーシスの制御に重要であることを明らかにしてきた。その研究の過程で、Ras-PI3K 複合体を時空間的に制御する因子がミトコンドリアに局在することを突き止め、エンドソームとミトコンドリアという異種オルガネラ間相互作用に興味を持ち研究を行うこととした。

【方法】 本研究では、Ras-PI3K 複合体を時空間的に制御する因子の機能解析とともに、エンドソームとミトコンドリア接触時のエンドソームの分子メカニズムと、接触がエンドソームに与える影響を、オプトジェネティクスをはじめとするバイオイメージング技術を用いた研究により明らかにした。

【結果】 我々はエンドソームとミトコンドリアが相互作用することを明らかにした。また、この相互作用には Ras-PI3K 複合体を時空間的に制御する因子が関与することを示した。さらに、エンドソームとミトコンドリア間相互作用をオプトジェネティクスにより人為的に誘導する系の構築に成功し、この相互作用を誘導した際にエンドソームの酸性化が促進することが示唆された。以上から、エンドソームとミトコンドリア間相互作用がエンドサイトーシスを促進するという、既存の概念を覆すような現象を捉えることができた。

エンドソームとミトコンドリア間相互作用を介したエンドソーム酸性化機構

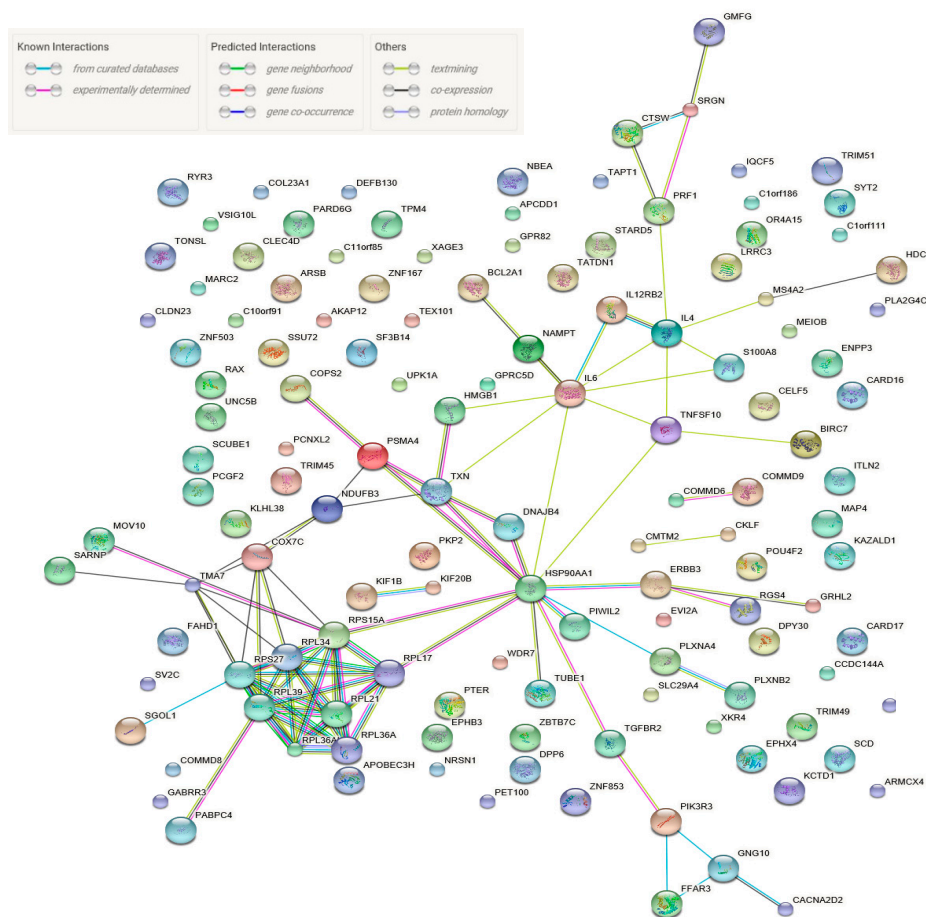


【目的】 うつ病の病因は未解明であり、その主要リスク因子とされるストレス脆弱性の本態も不明である。本研究は、ストレス脆弱性の表現型と分子基盤を統合的に解析し、さらにストレス脆弱性とうつ病の連続性を検討することにより、精神疾患発症予測に資するエビデンスを創出することを目的とした。

【方法】 初めに、一般人口から募集した健常者を対象に、潜在プロフィール分析を用いて各個人の心理特性プロフィールに基づいて行ったストレス脆弱性分類と、末梢血 RNA を用いてマイクロアレイにより測定したトランスクリプトームの関連を検討した。ストレス脆弱性に密接に関与する少数の遺伝子を選定し、これらの遺伝子について、独立のマイクロアレイデータおよびqPCRにより、健常対照者と比較したうつ病患者における発現変動を調べた。

【結果】 分散分析およびfold changeの基準を用い、ストレス脆弱性に関連して発現が変動する遺伝子群を同定した。これらの遺伝子群に対してパスウェイ・ネットワーク解析、共発現解析を適用することにより、リボソーム遺伝子群の有意な濃縮が見出された。中でも重要性が示唆された *RPL17* と *RPL34* については、うつ病患者においても、健常者のストレス脆弱性に関連した発現変動と同様の変動が認められた。

Stress vulnerable 群と Stress resistant 群の間での発現変動遺伝子によるタンパク質間相互作用解析



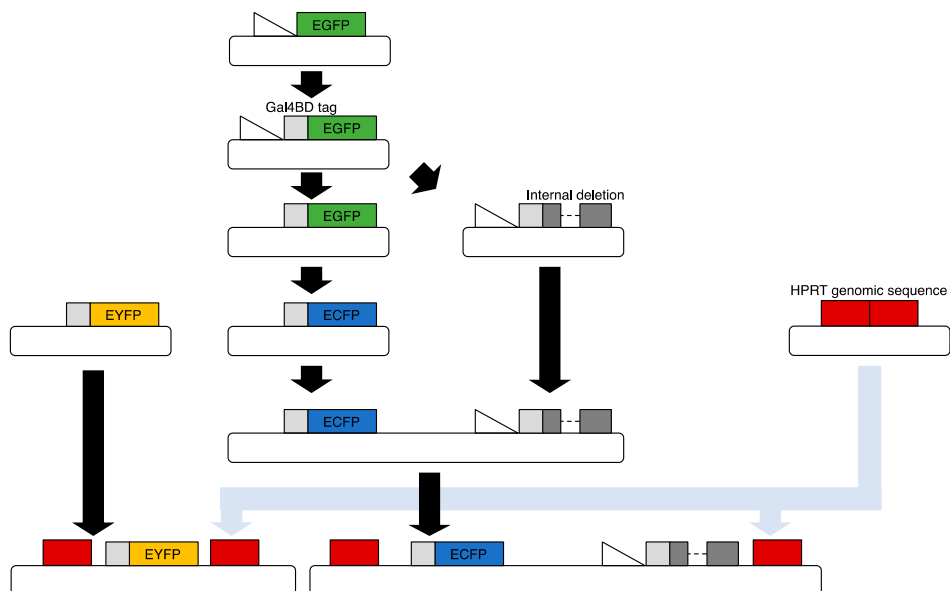
【目的】本研究では、発ガン過程で見られる転座や異所組換えなどの染色体再編をヒト培養細胞内で再現する実験系を確立し、染色体不安定化による発ガンメカニズムの基礎的知見を得ることである。

【方法】蛍光タンパク質 GFP バリエントの EYFP と ECFP を用いて姉妹相同染色体間の組換え体を検出するヒト細胞株を作製する。EYFP と ECFP は GFP のバリエントであり、その DNA 配列は高い相同性（全体で 97.8%、N 末端と C 末端は 100%）を示す。一方で、励起・発光波長が異なるため FACS（fluorescence activated cell sorting）により検出、分離が可能である。この特性を利用し、姉妹染色体間の組換えが起きた場合 EYFP が、相同染色体間の組換えが起きた場合には ECFP が発現するような細胞株を作製する。また、異所組換え、染色体腕部全体の欠失を検出するために、mCherry を同染色体腕部に導入する。組換え体（交叉型／非交叉型）の違いは制限酵素の多型を用いて区別する。

プラスミド構築の追加点、改善点は以下の通りである。EYFP、ECFP の N 末端、C 末端の相同領域の長さが相同組換えを行うことができる最低限の長さであったため、Gal4-bindig タグを付加することで、左右の相同領域の長さを調整した。DNA 二重鎖切断を誘導した際、単純なライゲーションで修復されてしまうもの、切断されていないもの等を除外するため切断部位に制限酵素配列を付加した。ゲノム DNA への挿入において CRISPR/Cas9 のシステムを用いて挿入を行った。

【結果】今回、GFP バリエントによる組換え体検出システムのプラスミド構築とゲノム DNA への挿入を行った。上述のように実際に想定される副産物等を除外できる改善を行った。ゲノム DNA への挿入では、予想に反して細胞株を得ることができなかつたが、CRISPR/Cas9 システムを用いることで目的配列が挿入された細胞株を作製することができた。当初予定していた計画よりも遅れはしたものの、順調に実験系の構築は進んでいる。またゲノム DNA への挿入の実験と同時に CRISPR/Cas9 システムによる遺伝子破壊、点変異の挿入方法を確立できたので、作製した細胞株を用いた解析にスムーズに移行できると考えられる。

相同／姉妹染色体間の組換えを検出する蛍光蛋白質カセットの構築

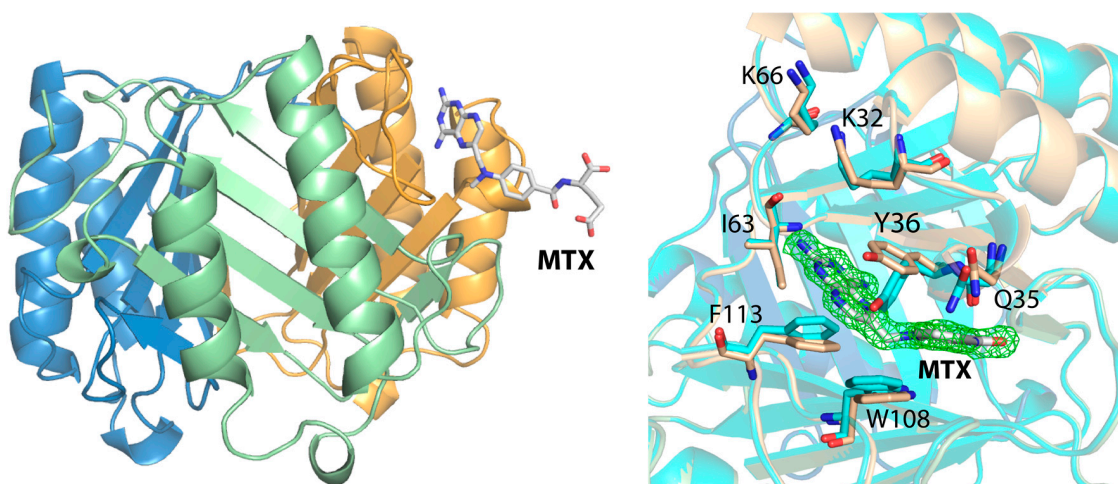


【目的】メトトレキサート (MTX) は、急性白血病の治療薬として開発されたが、その後、炎症性関節炎患者に有効であることが判明し、現在では関節リウマチの第一選択薬として広く利用されている。急性白血病治療における MTX の薬理作用は、ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) に対する葉酸代謝阻害効果による DNA 合成の抑制に起因することが明らかになっている。しかしながら、免疫調節薬としての MTX の作用機序については、DHFR に対する阻害効果だけでは説明することが難しい。また、MTX によるリウマチ治療では、副作用として間質性肺炎を合併することが報告されており、その発生機序も明らかになっていない。そこで本研究は、MTX の免疫系における作用機序及び副作用の発生機序の解明を目的として、新規 MTX 標的タンパク質の探索同定を行い、MTX の標的タンパク質の機能及び構造への影響、ならびに標的タンパク質が誘導する炎症性サイトカイン産生への影響を検討した。

【方法】MTX の新規標的タンパク質を探索するために、MTX を Sepharose 樹脂に固定化したアフィニティークラムを用いたドラッグアフィニティークロマトグラフィーを行った。SDS-PAGE により、MTX に特異的に結合したタンパク質を分離し、ゲルから抽出後、逆相クロマトグラフィー質量分析法により各種タンパク質の同定を行った。ヒト末梢血単核球 cDNA からマクロファージ遊走阻害因子 (MIF) 遺伝子のクローニングを行い、pET-21b に導入し、大腸菌発現ベクターを構築した。E. coli BL21(DE3) の形質転換を行い、大量培養後、弱陰イオン交換カラム (DEAE Toyopearl)、弱陽イオン交換カラム (CM Toyopearl) により、ヒト MIF リコンビナント体を精製した。単一精製した MIF を各生化学測定、結晶構造解析に用いた。細胞実験には、ヒト単球性白血病細胞株 THP-1 を用いて、MTX 存在下、非存在下における MIF 曝露による IL-8 分泌量変化を ELISA で測定した。

【結果】ドラッグアフィニティークロマトグラフィーの結果、MTX に特異的な結合を示す数種類の炎症関連タンパク質の同定に成功した。本研究では、それらのタンパク質のなかで、受容体 CD74 を介した炎症反応を惹起するシグナル伝達に関与している炎症性サイトカイン MIF に着目し研究を進めた。MIF は、サイトカインとしての生理機能を有するほか、L-ドーパクロムメチルエステルの互変異性を触媒することが知られている。MIF の L-ドーパクロムメチルエステル互変異性化に対する MTX の阻害効果を評価したところ、MTX の添加に伴い、MIF の互変異性化活性の低下が観測された。次に、MTX と MIF の結合様式を分子レベルで解析するために、MTX と MIF 複合体の X 線結晶構造解析を行った。その結果、MTX は受容体 CD74 との結合に重要であると予想されている MIF の基質ポケット近傍に結合することが明らかになった。また、ヒト単球性白血病細胞株 THP-1 を用いて、MIF 曝露による IL-8 分泌量変化に対する MTX の影響を検討したところ、MTX の添加量増加に伴い IL-8 の分泌量の減少が観測された。

MTX と MIF 複合体の X 線結晶構造全体図と結合部位の拡大図

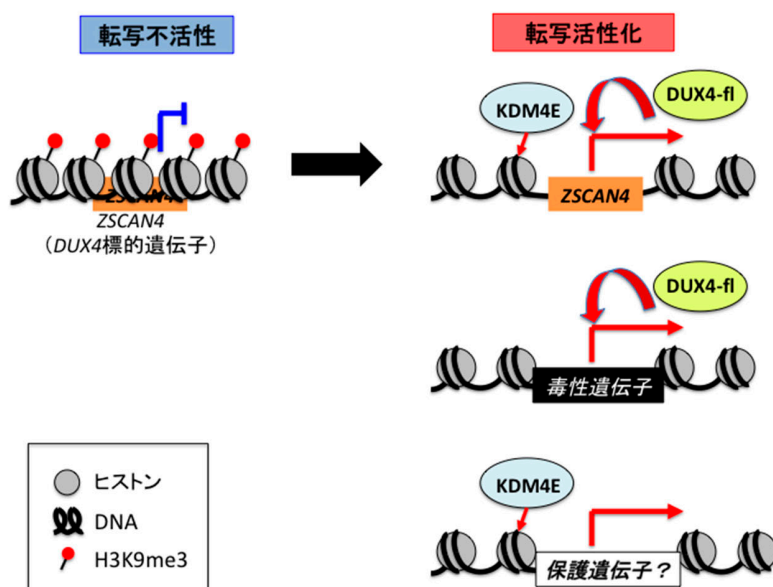


【目的】本研究は、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー（FSHD）の原因遺伝子である DUX4-fl と、エピジェネティック因子の関係性について明らかにすることを目的とする。

【方法】DUX4-fl は転写因子としてはたらしき、FSHD 患者の骨格筋で *ZSCAN4* などの初期胚特異的な遺伝子群を活性化させるが、この際にエピジェネティック修飾の変化が生じていると予想した。本研究では DUX4-fl 標的遺伝子群が H3K9me3 ヒストン修飾を受けていることから、ヒストンリジン脱メチル化酵素 KDM4 ファミリーに着目し、KDM4 ファミリーの発現解析、cDNA クローニング、過剰発現とノックダウンをおこない、DUX4-fl との関連を調べた。

【結果】その結果、*KDM4E* の発現が DUX4-fl によって制御されていることを見出した。また、*KDM4D*、*KDM4E* の過剰発現により *ZSCAN4* の発現量が増加することが明らかとなった。RNAi による *KDM4E* の発現抑制は DUX4-fl 依存性の細胞死を増悪させた。反対に、DUX4-fl と *KDM4E* の共発現をおこなうと DUX4-fl による細胞毒性がわずかに減少した。以上の結果から、*KDM4E* が DUX4-fl 依存的な細胞毒性に保護的な役割を持つ可能性が示唆された。

DUX4-fl による転写制御と本研究の概略

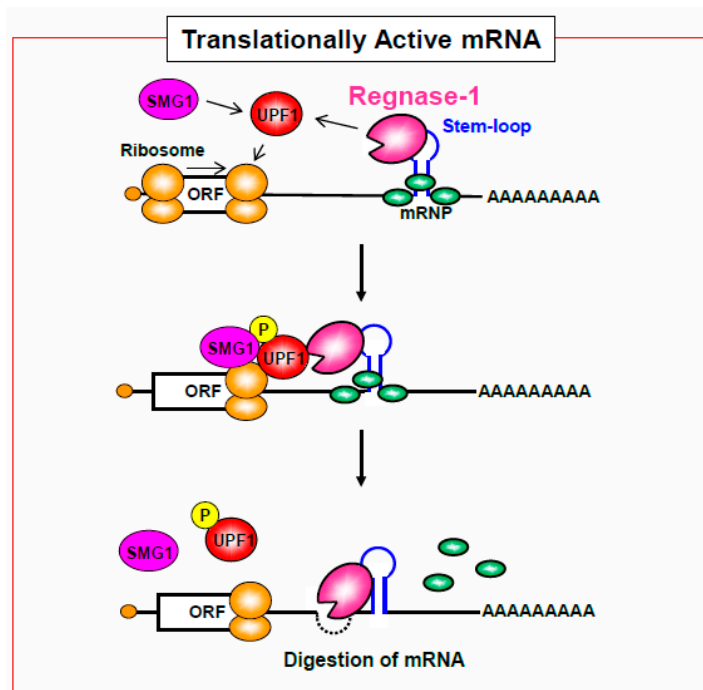


【目的】 自然免疫は、病原体感染を最初に認識し、炎症性サイトカインを介して急性炎症を引き起こす。病原体による免疫刺激に対する炎症性サイトカインの発現は、転写および転写後制御により厳密に制御されており、中でも RNA の安定性や翻訳を制御する転写後制御はサイトカイン産生を制御する重要なプロセスの一つである。我々はこれまで新規 RNA 分解酵素 Regnase-1 が炎症性サイトカイン mRNA を分解することで過剰な免疫応答を抑制するサイトカイン産生のブレーキ役を担っている事を見出し、そして最近 Regnase-1 は RNA helicase UPF1 依存的にタンパク質翻訳が生じている (translationally active) mRNA を分解していることを明らかにした。しかしながら、どのように UPF1 が Regnase-1 による mRNA 分解に関与しているのかほとんど分かっていなかった。そこで、本研究ではその作用メカニズムについて検討した。

【方法】 Regnase-1 と UPF1 の相互作用のメカニズムを検討するために、Regnase-1 と相互作用している UPF1 の領域を様々な Regnase-1 変異体と UPF1 変異体を用いた免疫沈降法により検討した。更に、その Regnase-1 と UPF1 の相互作用が Regnase-1 による mRNA 分解に必要などうかを検討するために、ルシフェラーゼ遺伝子の下流に Regnase-1 の標的 3' UTR (*Il6* および *Ptgs2* の 3' UTR) を挿入したレポーターアッセイを行なった。また、UPF1 リン酸化のキナーゼを同定するために、siRNA によるノックダウン実験を行なった。

【結果】 UPF1 の T28 リン酸化が Regnase-1 と UPF1 の相互作用に必要であった。更に、PI3 キナーゼファミリーの一つである SMG1 によりこの UPF1 の T28 リン酸化は生じ、SMG1 による UPF1 の T28 リン酸化が Regnase-1 と UPF1 の相互作用を制御し、Regnase-1 による mRNA 分解に必要な事を明らかにした。すなわち、SMG1 は Regnase-1 による mRNA 分解を介した炎症性サイトカイン産生の新しい転写後制御因子である事が明らかとなった。

SMG1 による Regnase-1 を介した炎症関連 mRNA 制御

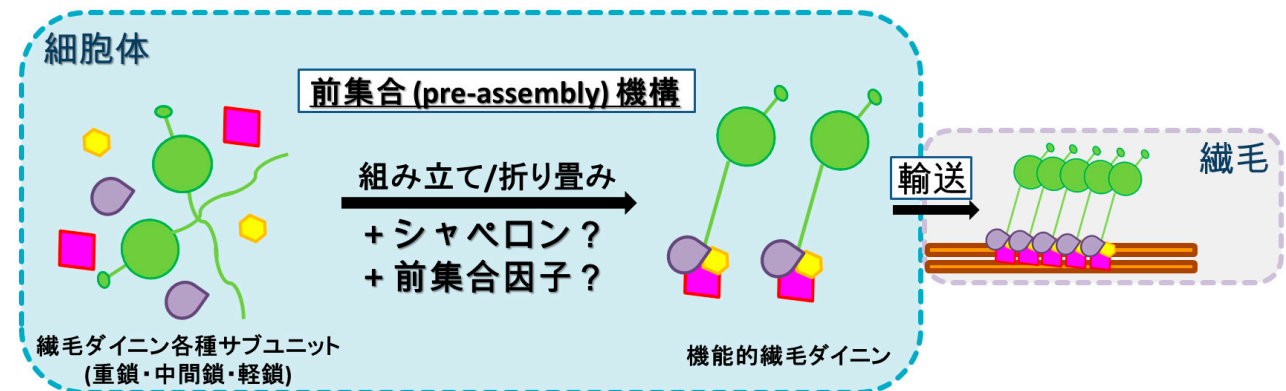


【目的】「繊毛」は多様な動物細胞表面に観察されるアンテナ状の細胞小器官である。繊毛は、大きく「運動性繊毛」と「非運動性繊毛」とに分けられ、特に、運動性繊毛は高等動物の恒常性維持・正常発生・異物排出・生殖等に不可欠な役割を担っている。運動性繊毛の波状運動は繊毛内部の巨大モータータンパク質「繊毛ダイニン」により駆動され、繊毛の運動異常は高等動物において水頭症・気管支炎・不妊等の多様な疾患（繊毛病）を引き起こす。複数種類存在する繊毛ダイニンは、繊毛内に運び込まれる前に細胞質内において『前集合 (pre-assembly)』と呼ばれるプロセスにより組み立て/折り畳まれることが現在までの研究で示されており (図)、この繊毛ダイニン前集合異常が高等動物において繊毛病の引き金となることも示されている。しかしながら、その重要性にも関わらず、繊毛ダイニン前集合への関与が示唆された分子（前集合因子）の数は限られており、またその詳細な分子基盤も解明されていない。本研究で、私は2本の運動性繊毛を持つ単細胞緑藻クラミドモナス (*Chlamydomonas reinhardtii*) を用いて繊毛ダイニン前集合機構の包括的な理解を目指した。

【方法】所属研究室内にクラミドモナスを完全培養可能な系を確立し、遺伝子変異導入薬剤でクラミドモナスを処理することにより、クラミドモナスの変異株ライブラリーを作製した。このライブラリーから、運動性・繊毛長・細胞全体ダイニン量・繊毛内ダイニン量等を指標としてスクリーニングを行った。

【結果】繊毛ダイニン前集合に関与する因子に変異を持つと期待される株を15株程度単離することに成功した。今後は、遺伝子多型株を用いた4分子解析法による mapping を通して変異遺伝子決定を行う予定であり、これからの研究により、複数の新規繊毛ダイニン前集合因子が同定されることが期待される。

繊毛ダイニン前集合機構の概念図

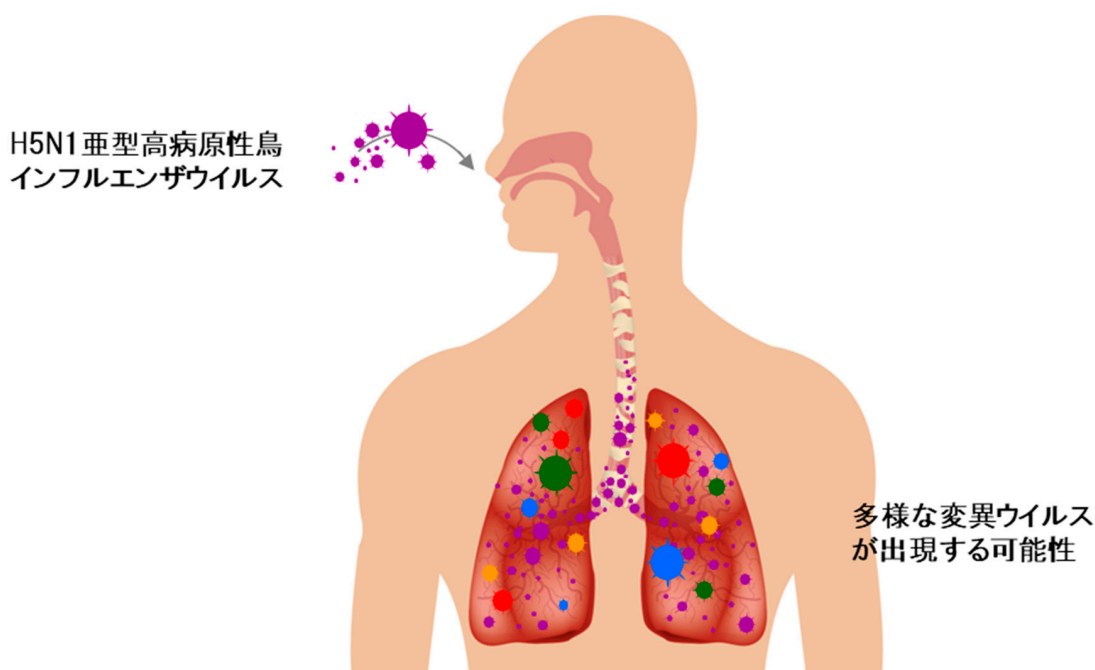


【目的】 H5N1 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルス (H5N1 ウイルス) は現在、アジア・アフリカ地域において鳥類で伝播を繰り返す常在域を獲得している。当該地域における鳥間または鳥-ヒト間のウイルス伝播の過程で、H5N1 由来新型インフルエンザウイルスが出現する可能性が指摘されている。そのため、鳥インフルエンザウイルスのヒト適応化機構を先駆的に解明することは、より効果的なパンデミックインフルエンザ対策を施策する上で極めて重要である。本研究では、インフルエンザウイルスの感染性を決定する表面抗原の HA に着目して、H5N1 ウイルスが初代ヒト呼吸器上皮細胞での複製過程において獲得する HA 変異群を探索すると共に、選択された変異がウイルス性状変化に与える影響を評価することで、鳥インフルエンザウイルス宿主適応機構の分子基盤を解明することを目的とした。

【方法】 H5N1 ウイルスを初代ヒト呼吸器上皮細胞に感染させ、感染 96 時間後までに生み出された子孫ウイルス集団における HA 遺伝子多型を網羅的に探索した。リバーシジェネティクス法に基づいて、同定された 32 種類の変異を導入した組換え H5N1 ウイルスを作成することで、当該ウイルス群が獲得したレセプター糖鎖結合特異性、膜融合 pH 閾値、ヒト呼吸器細胞での増殖性と飛沫伝播性の指標となる熱安定性を解析した。

【結果】 H5N1 ウイルスがヒト呼吸器上皮細胞での複製過程において、ヒト型レセプター糖鎖と膜融合活性を高く変化することで、急速にヒト細胞感染性を獲得することが明らかとなった。また、H5N1 ウイルスにおいては、ヒト生体局所環境での細胞感染性と個体間の伝播性が一義的にバランス関係にあることが示された。これらの知見は、鳥インフルエンザウイルスのヒト適応化機構の全容を解明する上で極めて有用な情報基盤を提起している。

H5N1 ウイルスがヒト呼吸器細胞で複製する過程において、様々な HA 変異ウイルス群が出現する

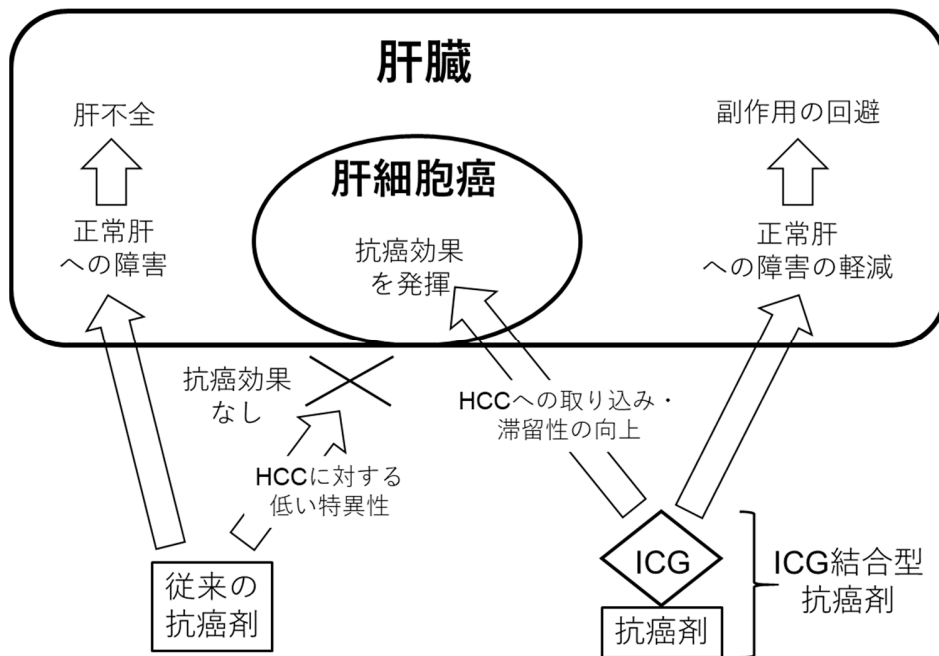


【目的】 Indocyanine green (ICG) は、肝細胞癌組織に滞留する性質を有する。しかし、その滞留性を導くメカニズムは明らかではない。本研究では、肝細胞癌細胞における ICG の滞留性を導く因子を検討するとともに、ICG を結合させた抗癌剤を合成し、肝細胞癌細胞への滞留性を活かした特異性の高い抗癌剤の創出を試みた。

【方法】 ICG と既存の抗癌剤 A を結合させた ICG 結合型化合物 A を各種肝癌細胞に作用させ、細胞内における蛍光発光、*in vitro* での殺細胞効果を検討した。皮下移植腫瘍モデルマウスを作製し、ICG 結合型化合物 A を静脈投与あるいは腫瘍へ直接投与し、生体内での ICG 結合型化合物 A の分布や抗腫瘍効果を評価した。肝細胞癌細胞における ICG の取り込みに関与するとされる organic anion-transporting polypeptide 1B3 (OATP1B3) の発現を低下させた細胞を作製し、ICG 及び ICG 結合型化合物 A の取り込みへの効果を評価した。

【結果】 ICG と既存の抗癌剤 A を結合させた ICG 結合型化合物 A は、抗癌剤 A と比較して *in vivo* において高い抗癌効果を示した。ICG 結合型化合物 A は、皮下移植腫瘍組織において 8 日以上滞留していた。また、ICG 結合型化合物 A の *in vitro* での正常細胞に対する毒性は、抗癌剤 A より軽減した。以上の結果から、本研究で作製した ICG 結合型化合物 A は肝細胞癌に対する新規化学療法剤として有用であると示唆される。さらに、OATP1B3 の発現を低下させた細胞では、ICG を作用させた細胞の細胞内の蛍光強度は未処理の細胞に比べて低下したが、ICG 結合型化合物 A を作用させた細胞の蛍光強度は低下しなかった。この結果は、OATP1B3 の発現が、肝細胞癌細胞における ICG の滞留性に寄与することを示唆している。一方で、肝細胞癌細胞における ICG 結合型化合物 A の滞留性には、ICG の滞留性と異なる機構が存在すると考えられる。

ICG 結合型抗癌剤の開発意義に関する概略

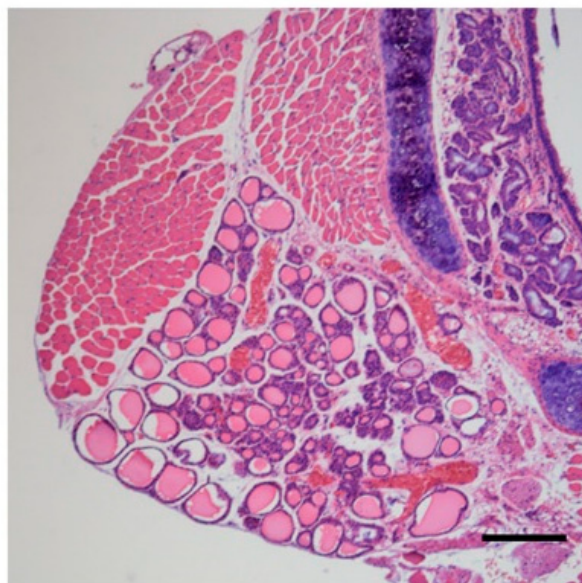


【目的】 免疫チェックポイント阻害薬は種々の進行悪性腫瘍に対して有効性が示されてきたが、自己免疫機序を介すると考えられる有害事象（免疫関連有害事象：irAEs）への対策が課題となっている。irAEsは肺、消化管、皮膚、神経・筋、内分泌器官など全身の様々な部位で認められ、内分泌irAEsは下垂体、甲状腺、副腎、膵、副甲状腺で報告されているが、その臨床的特徴は明らかではない。内分泌irAEsの特徴を明らかにする目的で、名古屋大学医学部附属病院において抗PD-1抗体のニボルマブ（Niv）が使用され、内分泌irAEsを発症した症例の臨床的特徴およびバイオマーカーの解析を行い、抗PD-1抗体による甲状腺炎動物モデルの作成を試みた。

【方法】 対象は、Nivを使用した80名。治療期間中の内分泌irAEs発症を解析。また、甲状腺自己抗体のサイログロブリン抗体（TgAb）および抗サイロペルオキシダーゼ抗体（TPOAb）を評価。次に、抗PD-1抗体投与による甲状腺障害モデルマウスを作成するため、抗PD-1抗体をCBA/Jマウスの腹腔内に投与。投与1ヶ月後に甲状腺を摘出し、病理組織学的評価を施行。また、投与前後で甲状腺ホルモン（total T4）を測定。

【結果】 Nivで治療された80例中5例で破壊性甲状腺炎が認められた。Niv治療前の甲状腺自己抗体陽性率は破壊性甲状腺炎発症者で、非発症者と比べて有意に高値であった。Niv投与前に抗甲状腺抗体（TgAb and/or TPOAb）が陽性であった患者8例中4例、陰性であった患者72例中1例で破壊性甲状腺炎が認められ、その累積発症率はNiv投与前に抗甲状腺抗体が陽性の集団において有意に高値であった（ $p < 0.001$, log-rank test）。したがって、治療前の抗甲状腺抗体は破壊性甲状腺炎の高リスクマーカーとして有用である可能性が示唆された。抗PD-1抗体による破壊性甲状腺炎の病態を解析するため、抗PD-1抗体をCBA/Jマウス腹腔内に連続投与したが、コントロール抗体および抗PD-1抗体による甲状腺への炎症細胞浸潤は認められなかった（下図）。また、total T4は抗PD-1抗体およびコントロール抗体のいずれにおいても投与前後で有意な変化は認められなかった。

抗PD-1抗体投与後の甲状腺組織像

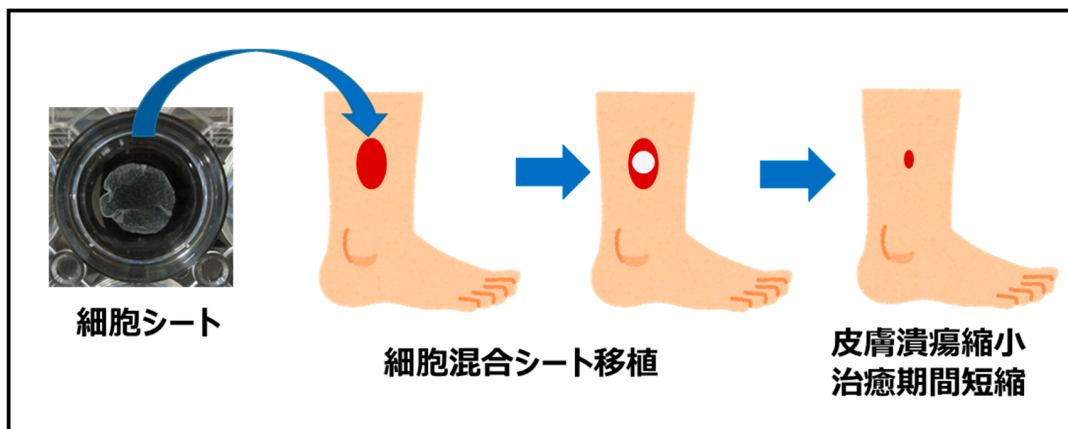


【目的】我々が所属する研究室では、これまでに難治性皮膚潰瘍に対して末梢血単核球と線維芽細胞から成る単層細胞混合シート移植の治療法の開発を行ってきた。本研究では、治療効果を高める為に、積層細胞混合シートの開発を行い、その機能を検証した。

【方法】末梢血単核球および線維芽細胞を用いて、積層細胞混合シートおよび積層線維芽細胞シート作製し、その培養上清中の成長因子等の濃度の測定を評価した。ルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだ積層線維芽細胞シートを NOD / Scid マウスの背部に作製した皮膚欠損部位に移植して細胞シートの残存期間を観察した。積層細胞混合シートを NOD / Scid マウスの背部に移植して3ヶ月後の造腫瘍性を評価した。

【結果】積層細胞混合シートは VEGF、HGF、Angiopoietin-1、SDF-1 α を分泌していた。NOD / Scid マウスの背部に移植したルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだ積層線維芽細胞シートは、移植後 35 日目まで発光が観察されたが、移植後 45 日目には発光は観察されなかった。積層細胞混合シート移植3ヶ月後の NOD / Scid マウスにおいて、造腫瘍性は観察されなかった。

難治性皮膚潰瘍に対する細胞シート移植治療

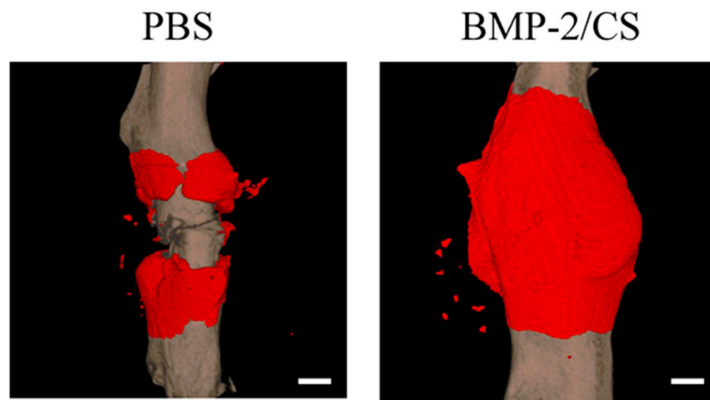


【目的】 交通外傷による骨・軟部損傷は血流障害や骨欠損や骨折の修復に重要な骨膜組織の著しい損傷を伴うため、治療に難渋する。本研究では、高純度ヒト間葉系幹細胞シートと成長因子を併用した機能性間葉系幹細胞シートによる難治性骨折治療法の確立を目指し検討を行った。

【方法】 ヒト骨髄からセルソーターを用いてヒト骨髄組織から間葉系幹細胞を採取した。フィブロネクチン/ゼラチン (F/G) コーティング技術を用いてコラーゲン膜状に間葉系幹細胞を積層し、細胞シートを作製した。bFGF、BMP-2 を細胞シートに吸着後、免疫不全マウス難治性骨折モデルに移植した。移植後、micro-CT を用いて新生骨量、骨塩量の測定と骨癒合率の判定を行った。

【結果】 F/G コーティング技術を用いることで、2 日間で骨形成促進能を有するヒト間葉系幹細胞シートを作製することが可能であった。骨折部に PBS を投与した群は全例偽関節であった。一方、BMP-2 を吸着させたヒト間葉系幹細胞積層シートを移植した群では全例に骨癒合が認められた。BMP-2 を吸着させたヒト機能性間葉系幹細胞シートは難治性骨折治療法として有用である可能性が示唆された。

マウス難治性骨折モデル作製後 4 週の microCT 像

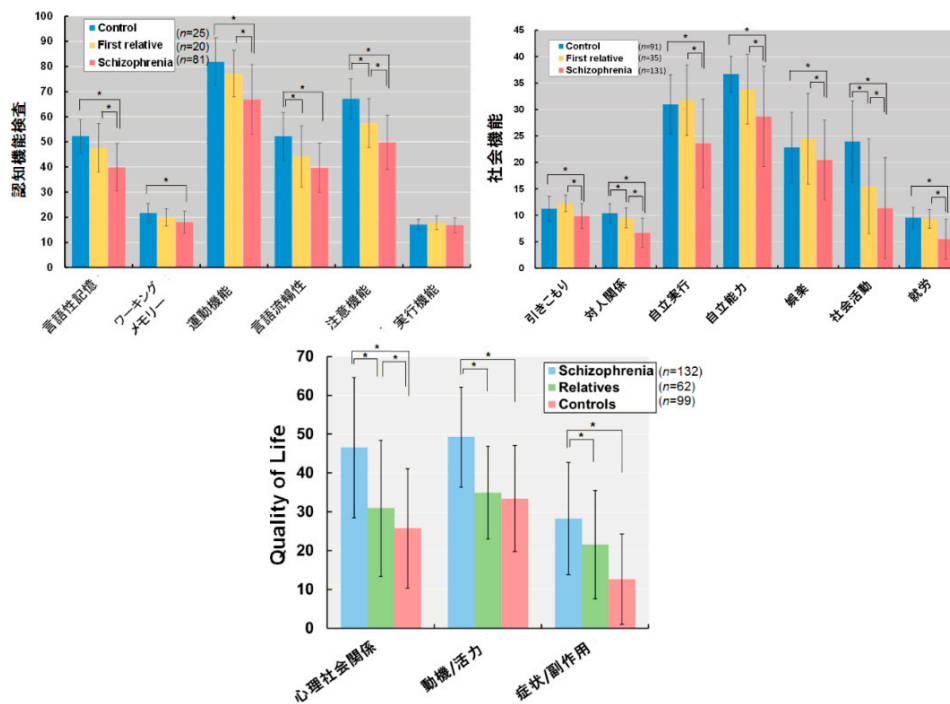


【目的】統合失調症は、遺伝率 80%の多因子遺伝疾患である。同胞を含むその非罹患第 1 度近親者は、患者の半分の遺伝的リスクを有する。非罹患近親者は、罹患期間、重症度および服薬の影響を受けず統合失調症にて障害される認知機能、脳構造、神経生理機能などの中間表現型との関連の検討に有用である。しかし、サンプル収集が難しく世界的にも非罹患近親者を対象とした中間表現型研究は少ない。本研究では、統合失調症の非罹患近親者における包括的中間表現型解析を行い統合失調症の分子遺伝学的基盤の解明を試みた。

【方法】認知機能、社会機能、Quality of Life (QoL) などを用いて、統合失調症患者、非罹患第 1 度近親者および健常者間で包括的中間表現型解析を行った。3 群間における候補中間表現型の比較は analysis of covariance (ANCOVA) にて解析した。候補中間表現型を従属変数、診断を独立変数とした。さらに、Fisher's Least Significant Difference にて *post hoc* 解析を行った (図、**post hoc* $p < 0.05$)。

【結果】認知機能では言語流暢性と注意機能、社会機能では対人関係と社会活動、QoL では心理社会関係において統合失調症と健常者間の差異だけでなく、非罹患第 1 度近親者はその中間の障害であることを見出した (図)。これらは 3 群間で差異を認め、有用な中間表現型であることが示唆された。さらに、診断情報に関係なく認知機能結果のみを用いて対象者を 3 群の認知機能 Cluster : (i) 認知機能正常群 (Cluster 1)、(ii) 中等度認知機能障害群 (Cluster 2)、(iii) 重度認知機能障害群 (Cluster 3) に分類した。認知機能が正常域である Cluster 1 は主に健常者と非罹患者から形成され、認知機能障害が重度である Cluster 3 は患者と非罹患者から形成された。認知機能障害が中等度の Cluster 2 は各群から形成された。さらに、認知機能と脳構造画像を用いて、前帯状回体積における診断効果および認知機能 Cluster 効果を同定した。以上より統合失調症患者、非罹患近親者、健常者はスペクトラムと知られているが認知機能障害もスペクトラムであり、認知機能は特に前部帯状回に関連していることが示唆された。

統合失調症患者、非罹患第 1 度近親者および健常者における認知機能、社会機能、QoL の差異



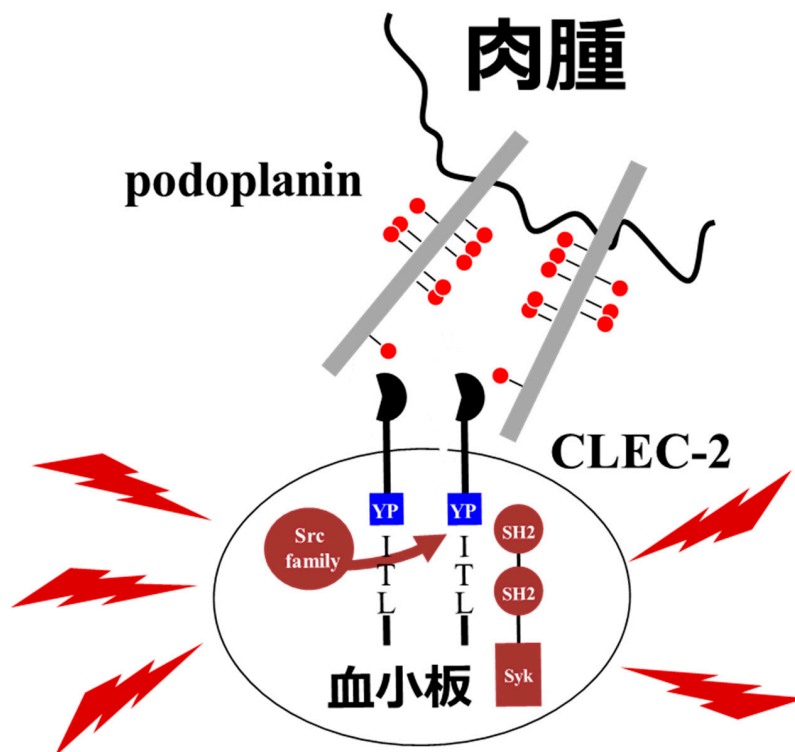
【目的】 骨軟部肉腫は年間新規患者数が約 3000 人程度の希少癌の一つであり、化学療法と手術での広範切除の施行で生存率は上昇したが、遠隔転移例の予後は依然不良である。遠隔転移の大半が肺転移であるため、特に肺転移機序の解明は予後改善に直結する。以前より癌の血行性転移に血小板が促進的に働くとの報告があり、近年他癌腫ではあるが、血小板 C-type lectin-like receptor-2 (CLEC-2) と腫瘍ポドプラニンとの相互作用が注目されている。本研究において、骨肉腫ポドプラニンと血小板 CLEC-2 の相互作用を解明することで新規治療ターゲットへと発展させたい。

【方法】 血小板は健常人から採取し、ヒト骨肉腫細胞として高肺転移株 143B を使用し、以下の実験を計画した。

1. 骨肉腫ポドプラニンの発現の有無、更に血小板との凝集の有無と凝集におけるポドプラニンの役割、2. 血小板を骨肉腫細胞との共培養で活性化した上清と活性化していない上清を用いて、骨肉腫の増殖・移動能への影響、3. 血小板 CLEC-2 をターゲットにした新規治療の可能性、について実験を行った。

【結果】 1. 骨肉腫 143B 細胞でのポドプラニンの発現を FACS で確認した。また、143B とヒト血小板との凝集を凝集計で確認した。更に、この凝集はポドプラニンブロッキング抗体で抑制された。2. 143B とヒト血小板を共培養して反応させた上清を回収した。ヒト血小板に 143B を共培養した反応液が、増殖、移動能とも最大であった。3. CLEC-2 抗体により CLEC-2 欠損モデルを使用し、143B を尾静脈から注射すると有意に肺転移が抑制された。

肉腫ポドプラニンと血小板 CLEC-2 との相互作用



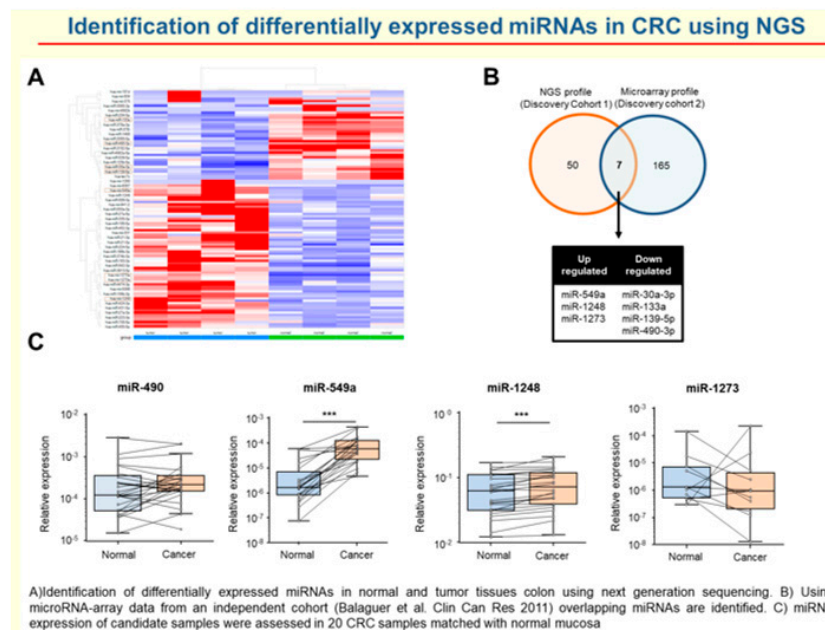
【目的】 大腸癌の予後は依然不良であり、遠隔転移再発を早期に発見するのみならず、転移再発高リスク患者を選別する新たなバイオマーカーの確立や、転移そのもののメカニズムを解明することによる転移抑制の新たな治療法の開発が急がれる。本研究は、様々な発癌・転移過程において大腸癌発癌・転移に関与するあらたな **Epigenetic change** を同定し、新たな **Biomarker** の確立と、癌進展機序解明からの新規治療法開発を目的とする **Two way approach** を行い、現在、極めて予後不良な経過をたどる大腸癌患者の予後・QOLの向上を目指すことを目的とする。

【方法】 大腸癌組織ならびに正常粘膜を用いて同定した新規 non-coding RNA の発現解析を行うことによる臨床的意義をあきらかにするとともに、その機能解析を *in vitro*/*in vivo* analysis を行い解明した。

【結果】 癌組織において特異的に発現上昇する ncRNA としては miR-549a が同定され、この発現変化は3つのコホートで validation 可能であった。また miR-549a 高発現は、深達度、脈管侵襲、リンパ節転移陽性、遠隔転移陽性と有意に相関し、全生存期間、無再発生存期間の独立した予後不良因子であった。miR-549a 発現低下は、大腸がん細胞株の増殖能、浸潤能、遊走能、アノキス抑制性を抑制する一方、miR-549a 過剰発現は、それらの oncogenic role を促進しがん抑制遺伝子の一種を発現調節する可能性が示唆された。一方、miRNA 以外の ncRNA として circRNA-X が癌組織特異的には発現低下し、発現低下群は有意に全生存期間、無再発生存期間において予後不良であった。

以上のことから、大腸癌発癌・転移進展に、特異的に様々なエピゲノム変化が関わる可能性が示唆された。

miR-549a の発現解析と機能解析



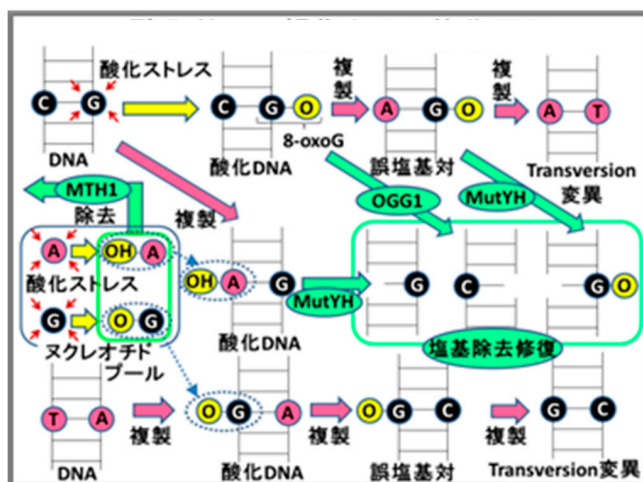
【目的】食道癌においては酸化了的 DNA 損傷から誘発されるタイプのトランスバージョン変異が p53 遺伝子変異型の頻度解析において最も多くみられる変異であり、他の癌腫に比較して多いことを発見し、食道癌が酸化ストレス発癌との関わりが強い癌腫であることを初めて報告し発表した。

細胞内では酸化了的 DNA 損傷を修復する機構があり、これが発癌を抑制する重要な役割を担っている。酸化了的 DNA 損傷を受けたヌクレオチドを塩基除去修復する機構を備えており、OGG1、MutYH、MTH1 の 3 つの修復に関わる酵素が重要な役割を果たすことで遺伝子変異を抑制していることが分かっている（下図）。OGG1 と MutYH の二重欠損マウスでは、より多くの腫瘍が発生すると予想されたが、予想に反して OGG1 単独欠損マウスでみられる肺癌の自然発生頻度が野生型マウスよりも低いことが報告された。OGG1 と MutYH の二重欠損マウスの臓器のゲノム中には野生型マウスの数倍以上の 8-oxoG が蓄積しており、過度の 8-oxoG のゲノム蓄積は細胞死を誘発し、結果として発癌頻度の低下をもたらし、MutYH は癌の存続に寄与していた可能性が報告された。そこで癌組織における MutYH の発現を調べることで、MutYH が癌のアポトーシスを抑制している可能性を検討し、MutYH を抑制することで癌を細胞死に導く新規薬剤のターゲット因子となり得るかを検討することを本研究の目的とした。

【方法】 1. ヒト食道癌組織の薄切プレパラートを作製し 8-oxoG、OGG1 と MutYH について、発現量やその強度を評価して臨床病理学的因子と比較検討することで OGG1 と MutYh の臨床的な表現型を探索する。2. 同様に OGG1 と MutYH について蛍光免疫染色を施行し、共発現しているかなどの局在を評価して臨床病理学的因子と比較検討することで、共発現している部位と共発現していない部位で、酸化了的 DNA 損傷因子である 8-oxoG の蓄積量やアポトーシス因子の発現を調べ、癌組織の細胞死に関して OGG1 と MutYH の役割を推察する。3. 食道癌細胞株で OGG1 や MutYH の発現を免疫組織化学染色法や Western Blotting 法、qRT-PCR 法を行う。4. OGG1 や MutYH を単独あるいは組み合わせで Knockdown や Knockout した細胞株で生存率やアポトーシスの割合を MTT Assay や TUNNEL 法で評価し MutYH が癌細胞のアポトーシスを抑制していることを検討する。

【結果】 MutYH の免疫染色では MutYH は癌部で高発現していた。MutYH と TUNEL の蛍光 2 重染色では MutYH 発現癌細胞で TUNEL 陰性であり MutYH が癌のアポトーシスを抑制しているという仮説に矛盾しない結果であった。MutYH 強発現群では予後不良であり、こちらも MutYH が癌細胞のアポトーシスを抑制しているという仮説に矛盾しない結果であった。

酸化了的 DNA 損傷とその修復因子



171 口腔がん発症に關与する細菌叢と免疫応答の解明

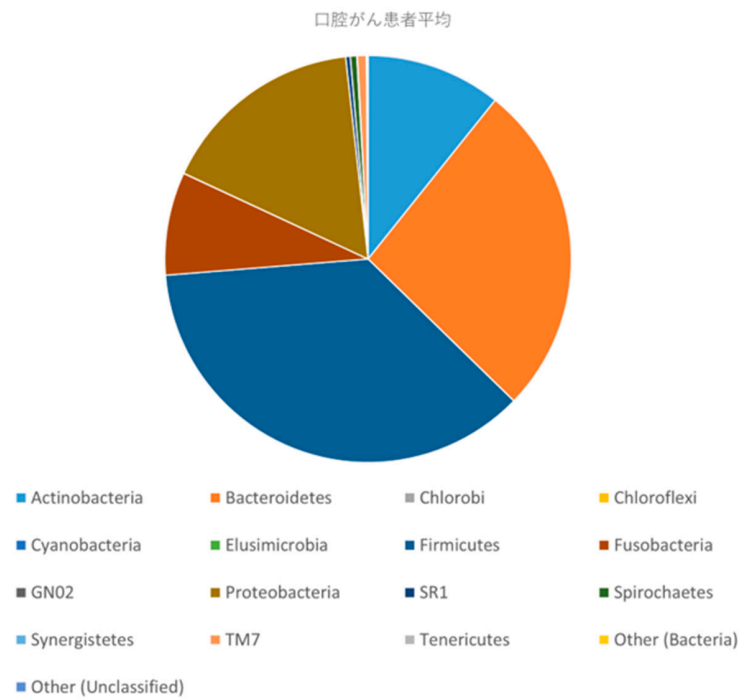
熊谷 賢一

【目的】 本研究では、口腔がん患者を研究対象とし、唾液中の口腔内細菌叢の変化を比較検討することで、口腔がんの発症に關与する口腔内細菌叢を解明することを目的とした。

【方法】 口腔癌患者 13 名と健常者 16 名を研究対象とし、唾液中の菌叢を次世代シーケンサーによるメタゲノム解析を実施した。

【結果】 門レベルでは口腔がん患者と健常者ともに Firmicutes、Bacteroidetes、Proteobacteria、Actinobacteria の順での存在頻度は同一であったが、口腔がん患者では Fusobacteria、TM7、健常者では TM7、Fusobacteria の順であった。Fusobacteria が口腔がん患者の唾液中に多く認められたことから、口腔がん患者の発癌に關与している可能性が示唆された。

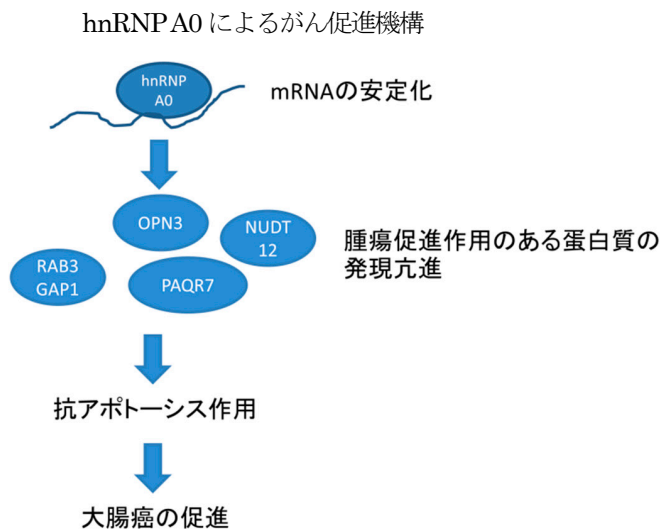
口腔がん患者の唾液中の菌叢 (門レベル)



【目的】 RNA 結合蛋白 (RBPs)、特に heterogeneous ribonucleoproteins (hnRNPs) は RNA の安定化やスプライシングの制御、分解、核内外の輸送、翻訳など発生や分化、組織の形成において極めて重要な機能を持っていることが知られている。一方で hnRNP A1 や A2B1 など複数の hnRNPs は細胞増殖やアポトーシスを制御することで癌細胞の進展に関与していること、また hnRNP A1 や E2 はマイクロ RNA (miRNA) の結合標的となりその蛋白機能が障害を受けることが報告されている。しかしながらどの hnRNPs が癌の発育に関連深いのか、またその hnRNP の結合パートナーとなる miRs や mRNAs は明らかではなかった。本研究では、腫瘍促進的に働きかける hnRNPs を網羅的に明らかにし、その hnRNPs を介した miRNAs や mRNAs などの RNA Regulation と癌促進の関連を検討することを目的とした。

【方法】 ヒト大腸癌細胞株である HCT116 に siRNA を導入し、細胞増殖能への影響を評価した。また、蛋白質質量の変化は Western blotting 法、mRNA の発現量変化は RT-PCR 法により定量化した。hnRNP A0 と結合する miRNA および mRNA は RNA 免疫沈降法とマイクロアレイ解析およびトランスクリプトーム解析を組み合わせることで網羅的に同定した。死細胞は TUNEL 染色により染色した。データは ANOVA および Student-t 検定により検定し、p 値が 0.05 未満を有意な差と判定した。

【結果】 癌の発育に深く寄与する hnRNPs として hnRNP A0 を新たに同定し、hnRNP A0 が大腸癌細胞株や大腸癌検体の癌組織において過剰に発現していることを明らかにした。また、hnRNP A0 が癌細胞のアポトーシスを強く抑制していることで腫瘍促進的に働きかけていること、さらに、hnRNPs に結合する miRNAs や mRNA を網羅的に明らかにし、PAQR7、OPN3、RAB3GAP1、NUDT12 mRNA の安定化を介して大腸癌細胞にアポトーシスを抑制することを初めて証明した。

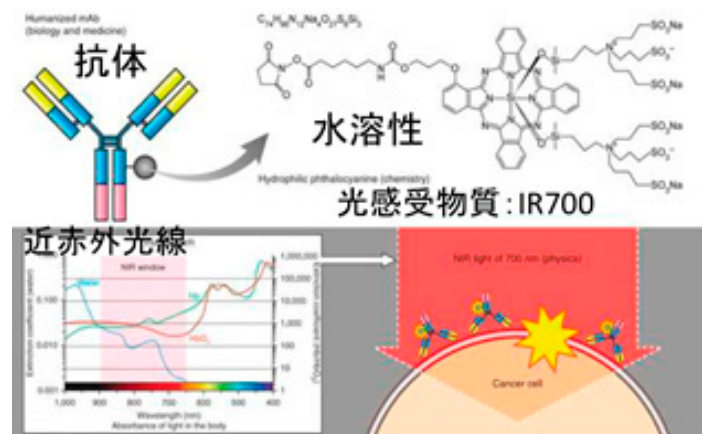


【目的】 肺がんはがんによる死因の第1位であり、現在わが国では年間5万人以上が肺がんで死亡しており、死亡者数は増加している。肺がん全体の治癒率は20%以下と予後が極めて悪い疾患で、その対策が急務となっている。現在の治療は、手術ができない場合は、放射線治療、化学療法が主流だが、その効果は大変限定的である。このことで、我々は呼吸器内科医として臨床の現場において数々の壁にぶつかってきた。国内外の様々な研究が、肺がんのような難治がんに対して各々アプローチを行い、理想の治療法を模索してきたが、いずれも満足のいくような治療法としての結果は得られていない。我々は次世代のがん治療として、がん細胞表面の抗原に特異的な抗体に近赤外線に反応する probe をつけ、局所的に近赤外線を当てる事で治療を行う Near-Infrared Photoimmunotherapy (PIT) を見だし、肺がんを含めた難治がんの診断や治療に応用するための研究を行ってきた(下図)。PITにより引き起こされる細胞死の生物学的な基礎メカニズムとそれに続くダイナミックな生理学的変化や免疫反応を解明し、さらなる臨床応用を目指している。本研究計画では、PITの新規ターゲットとして近年注目されている immune check point 分子である PD-L1 (programmed Death ligand-1) に焦点を当てる。将来の臨床応用を目的として担癌マウスモデルを用いてイメージングなどの評価系を利用し、PD-L1をターゲットとしたPITを新規治療法として確立し、様々な癌において臨床応用することを目的として、それに引き続く抗腫瘍免疫応答を評価する。

【方法】 マウス同系移植担癌モデルを用いてPD-L1ターゲットの光超効果を検討する。IgG抗体を酵素法にて消化し、HPLC分取を行うことでF(ab')₂を精製した。HPLC精製された抗PD-L1-F(ab')₂とプローブIR700DXを反応させ、PD-L1-F(ab')₂-IR700を作製し、SDS-PAGEにより評価後、マウス肺腺がんLL/2細胞への抗原性を確認した。現在、マウスより採取した樹状細胞にて*in vitro*の実験を遂行中である。今後、*in vivo*での評価を行う予定である。

【結果】 Full IgGのPD-L1抗体をペプシン消化し、HPLCにてF(ab')₂の精製を終了した。F(ab')₂のIR700との結合をSDS-PAGEにて確認した。PD-L1を高発現した、LL/2細胞を作製し、抗原性をWesternblotとFlow Cytometryにて確認した。現在、マウス同系移植担癌モデルを用いてその抗腫瘍効果を検討中である。

近赤外光線免疫療法 Photoimmunotherapy

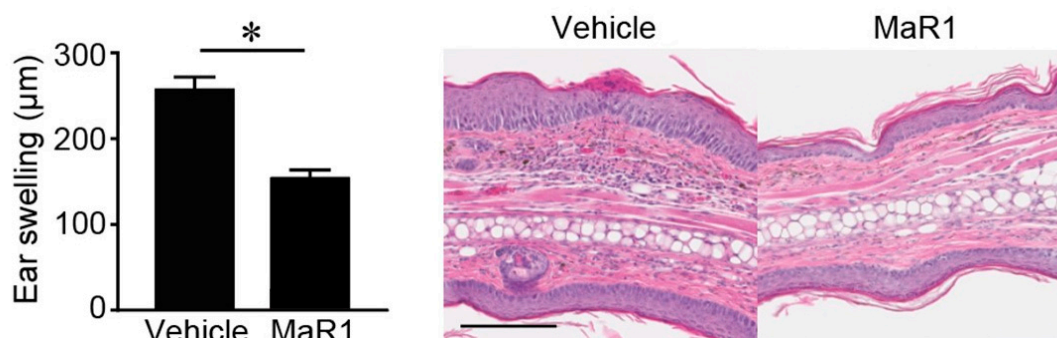


【目的】 魚類などに含まれるエイコサペンタエン酸やドコサヘキサエン酸を代表とするオメガ 3 脂肪酸は抗炎症効果を有していることが知られている。オメガ 3 脂肪酸はヒトの体内で生成できないが、食べ物から摂取され体内で代謝された後、種々の抗炎症性物質が生成されることが知られている。しかし、そのメカニズムはいまだ不明な点が多い。近年、ドコサヘキサエン酸由来の脂質メディエーターも抗炎症効果を発揮することが知られており、その中でも Maresin 1 は、マクロファージの食食抑制効果や好中球の遊走の抑制効果を介して、腸炎モデルマウスや喘息モデルマウスでの抗炎症効果を発揮することが分かってきている。しかし、皮膚における抗炎症効果については全く検討されていない。本研究では Maresin1 の抗炎症効果を検討するため、代表的な炎症性皮膚疾患である乾癬をターゲットとして、乾癬モデルマウスを用いて検討するとともに、その詳細な作用メカニズムを解明するため、種々の炎症細胞に対する効果を検討した。

【方法】 Maresin 1 の皮膚炎に対する抗炎症効果を検討するため、イミキモド誘導乾癬モデルならびに IL-23 皮下注射乾癬モデルでに対する抗炎症効果を検討した。また、その詳細な作用メカニズムを検討するため、IL-23 受容体の発現について skin suspension cell を用いて検討を行った。

【結果】 Maresin 1 投与群において有意にイミキモド誘導皮膚炎の減弱効果を認め、IL-17A 産生 γ δ T 細胞ならびに Th17 細胞が Maresin 1 投与群において減少していた。PCR によるサイトカインプロファイル解析では、IL-17A の発現低下を認めるものの、IL-23p19 の発現に差は認めなかった。以上の結果より、Maresin 1 は IL-23p19 より下流のシグナルを阻害している可能性が考えられた。IL-23 皮下注による乾癬モデルにおいても同様の現象が観察された。したがって、Maresin 1 により IL-23 に対する反応性が低下している可能性が示唆された。Maresin 1 は IL-17A 産生 γ δ T 細胞ならびに Th17 細胞の RoR γ t ならびに IL-23 受容体の internalization を介して IL-23 受容体の発現を減弱することが確認された。

イミキモド誘導乾癬モデルマウスにおける Maresin 1 の抗炎症効果



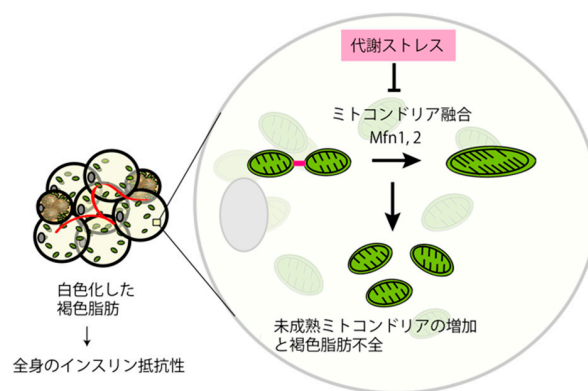
【目的】本研究課題において、肥満ストレスに伴い褐色脂肪細胞においてミトコンドリアダイナミクス異常が生じる詳細な分子機構と、その病的意義の解明に挑んだ。

褐色脂肪細胞はミトコンドリアに富み、熱産生という形で膨大なエネルギーを消費する可能性を秘めた活発な代謝臓器である。肥満ストレスに伴う低酸素シグナルにより褐色脂肪の白色化と機能不全が生じ、全身の代謝異常が惹起されることがこれまでの検討の結果明らかとなっている。ミトコンドリアは分裂と融合を繰り返し、恒常性が制御されているが、褐色脂肪細胞におけるミトコンドリアダイナミクスの制御機構はほとんどわかっていない。

【方法】1) 肥満モデルマウスの作製：野生型マウスに高脂肪食を負荷し、肥満モデルを作製した。肥満モデルマウスの褐色脂肪における、ミトコンドリアダイナミクス関連分子の発現レベルを解析した。予備的検討の結果 Mitofusin1、Mitofusin2 の発現が低下することが明らかになっているが、再現性の確認を行った。2) 遺伝子改変マウスの作製と解析：褐色脂肪特異的 Mitofusin1、Mitofusin2 ダブルノックアウトマウス (BAT Mfn1; Mfn2 DKO) は、UCP1-Cre マウスと floxed Mfn1、Mfn2 マウスを交配することで作製し、表現型の解析を行った。DKO マウスの血液を用いてメタボローム解析を行い、褐色脂肪選択的機能不全モデルマウスにおいて全身の代謝的リモデリングが生じるか詳細な検討を行った。3) 培養系実験による検証：分化褐色脂肪細胞を用いて、代謝ストレス下で Mitofusin1 や Mitofusin2 の発現が低下する機序を明らかにした。予備的検討の結果、低酸素ストレスによりこれらの分子の発現が低下することがわかっていたが、再現性を確認した。

【結果】肥満ストレス下にある褐色脂肪組織では Mitofusin1、Mitofusin2 というミトコンドリア融合に必須な分子の発現が低下することが明らかとなった。褐色脂肪特異的 Mitofusin1、Mitofusin2 ダブルノックアウトマウス (BAT Mfn1; Mfn2 DKO) では著明な褐色脂肪の白色化が生じることもわかった。また、BAT Mfn1;Mfn2 DKO マウスの血液を用いてメタボローム解析を行った結果、DKO マウスの血液では酸化型コリンのレベルが上昇することがわかった。酸化型コリンはミトコンドリアの恒常性を負に制御することも明らかとなり、心筋組織及び骨格筋のミトコンドリア異常が生じることもわかった。褐色脂肪細胞を用いた検討の結果、脂肪酸ストレスでは Mitofusin1、Mitofusin2 の発現レベルが変わらないものの、低酸素刺激によりこれらの分子の発現が低下することがわかった。以上の結果から、肥満ストレスに伴い褐色脂肪におけるミトコンドリアダイナミクス抑制を介して褐色脂肪不全が生じ、その結果全身の代謝不全が生じるということが明らかとなった。褐色脂肪のミトコンドリアダイナミクスを制御することで、心不全やサルコペニアといった加齢性疾患の病態を抑制できる可能性が強く示唆される。

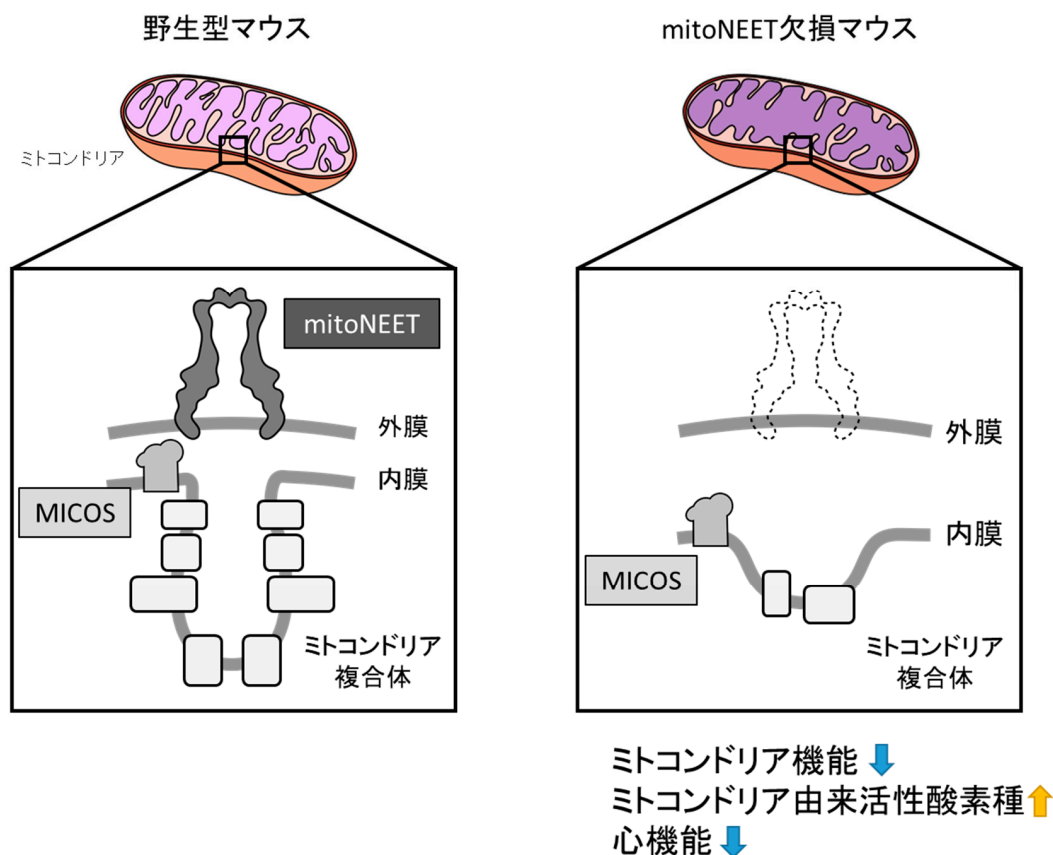
ミトコンドリアダイナミクス不全を介して生じる褐色脂肪不全の病的意義



【目的】 心不全の病態基盤は、心筋細胞肥大・細胞死や間質線維化からなる心筋リモデリングであるが、その形成・進展には心筋細胞ミトコンドリアの機能不全・酸化ストレスの亢進が密接に関与している。mitoNEET はミトコンドリア外膜に存在し、ミトコンドリアのエネルギー産生を調整すると報告されているが、その制御方法については明らかではない。

【方法および結果】 そこで本研究はミトコンドリアの構造・機能制御における mitoNEET の役割を解明することを目的とした。その結果、mitoNEET (*Cisd1*) の欠損マウスの心筋ミトコンドリアの形態は電子顕微鏡画像から崩壊することがあきらかとなった。同様に、ミトコンドリア機能(高感度ミトコンドリア呼吸能測定装置)、複合体 (BN-PAGE) の発現レベルは低下、活性酸素種の産生は増加し、それらに伴い、心機能 (心エコー) は低下した。mitoNEET はクリステ構造維持のために重要な MICOS 複合体の構成タンパクとの相互作用 (質量分析および免疫沈降法) があることを見出した。mitoNEET はミトコンドリアの形態を制御することで機能および活性酸素種の産生を制御しうることが考えられる。ミトコンドリア形態および機能障害における mitoNEET の役割が明らかとなれば、心不全の形成・進展の分子機序に関する理解がさらに一層深まることが期待される。

mitoNEET によるミトコンドリア形態・機能制御機

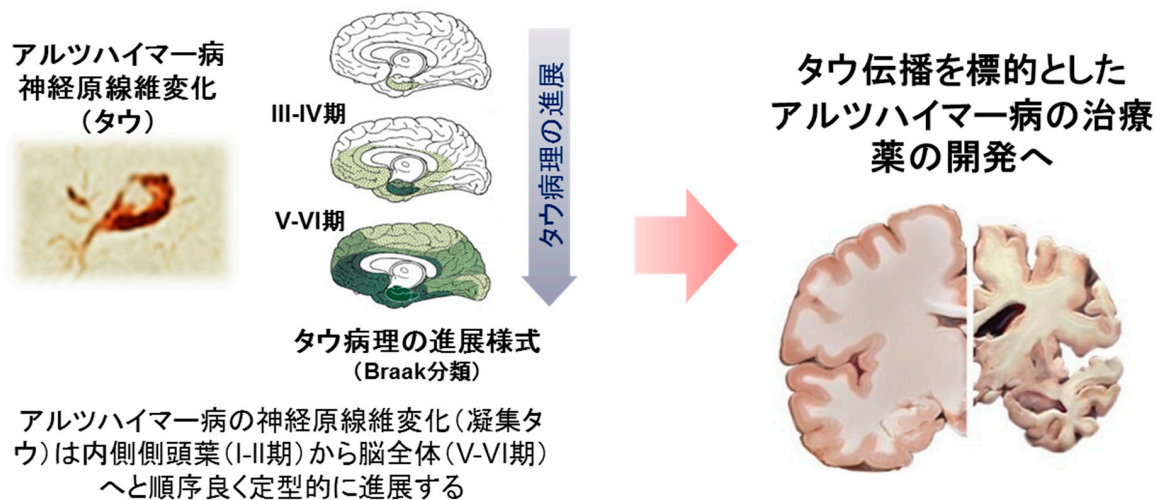


【目的】 超高齢化社会における認知症患者の急増が深刻な社会問題となっている。認知症の原因で最も多いのがアルツハイマー病であるが、その根本的な病態の解明や治療法の開発には至っていない。アルツハイマー病では変性タウ蛋白の神経細胞内凝集体が脳内に出現し、時間の経過とともに一定の順序で脳内を徐々に広がっていく（下図）。脳内での進展過程は神経線維の連絡に沿った領域を順序良く進むことから、変性タウ蛋白が神経細胞間を伝播するというタウ伝播仮説が近年提唱されている。本研究ではアルツハイマー病の病態進行の基盤となっているタウ伝播の機序を明らかにし、アルツハイマー病新規治療法の開発のための基盤的研究を行うことを目的とした。

【方法】 本研究は以下の3項目に分けて行った。1. 変性タウ蛋白の細胞間伝播能を評価するためのハイスループットスクリーニング系の構築。2. タウ関連髄液バイオマーカー探索のためのプレクリニカルモデルの開発。3. モデルマウスを用いた糖尿病がタウ伝播に与える影響の解析。

【結果】 タウ伝播活性を *in vitro* で評価するためのアッセイ系の最適化を行い、コンパウンドライブラリーを用いてタウ伝播阻害因子の探索を開始した。また、覚醒・自由行動下でのマウス脳脊髄液持続回収系を確立した。この系は脳内タウ病理の進展をモニターするための髄液マーカーの開発に非常に有用であると考えられる。糖尿病とタウ病理に関するモデルマウスを用いた解析では、高脂肪食負荷による耐糖能異常はタウ Tg マウスの行動障害を促進することが示された。

アルツハイマー病におけるタウ脳内伝播と治療法の開発



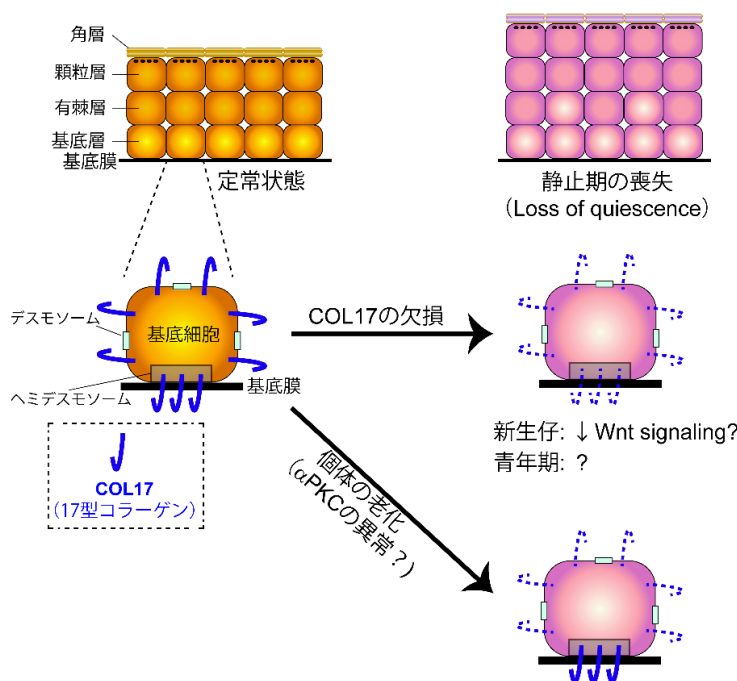
【目的】 皮膚は全身を覆う人体最大の臓器であり、外表面に位置していることから老化の表現型を容易に捉えることができる。皮膚の上皮である表皮は、表皮幹細胞の自己複製と分化によって維持されている。表皮幹細胞は、表皮基底膜をニッチにしており、加齢においても表皮基底膜の変化が生じると考えられている。

筆者らは最近、加齢によって a) 毛包間表皮は過増殖に至ること、b) 17 型コラーゲン (COL17) に代表される表皮基底膜領域蛋白の分布が変化すること、c) COL17 を表皮で強制発現させることによって加齢による過増殖の表現型が解除されることを明らかにした。また、先行研究において皮膚の毛包幹細胞では、タンパク分解酵素 ELANE の活性が上昇することによって、COL17 が加齢にもなって減少するとされる。本研究の目的は、筆者らの研究成果と先行研究をさらにすすめ、早老化モデルである COL17 ノックアウトマウスの毛包間表皮を詳細に観察し、COL17 をはじめとした表皮基底膜領域蛋白の表皮幹細胞に与える役割を解明することである。また、同時に正常ヒト表皮における表皮基底膜蛋白の分布も観察する。

【方法】 COL17 ノックアウトマウスとその同腹仔の対照群マウス (ノックアウトヘテロマウス) 8 週齢の個体を安楽死させ、その掌蹠の表皮を毛包間表皮として解析した。皮膚切片に対してケラチン 14、ケラチン 6、インテグリン β 1、ロリクリンを免疫染色した。また、正常ヒト皮膚の COL17、インテグリン β 1、インテグリン α 6 の分布を免疫染色で解析した。

【結果】 COL17 ノックアウトマウス毛包間表皮では、表皮幹細胞マーカーである K14、ITGB1 陽性の表皮層が対照群と比較して厚くなっていた。また、K6 陽性細胞が COL17 ノックアウトマウス毛包間表皮で広範囲に分布していた (図 4)。正常ヒト毛包間表皮において、表皮幹細胞マーカーである ITGB1、ITGA6、COL17 は、増殖の強い表皮稜側ではなく、真皮乳頭層と接する表皮に強く分布していた。

毛包間表皮の模式図

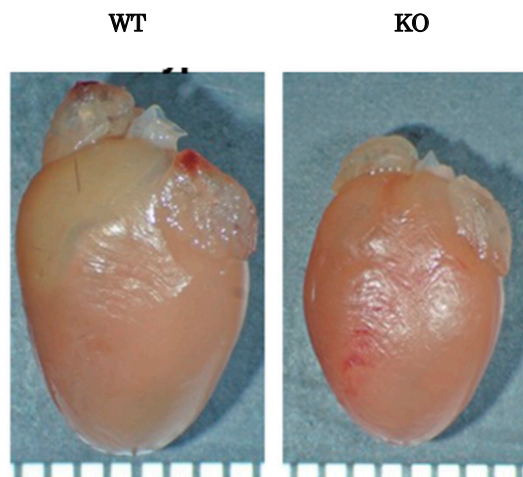


【目的】 心肥大・心不全において重要な長鎖非コードRNA (long non-coding RNA) のスクリーニングおよび機能解析を行う。

【方法】 網羅的スクリーニングにより心不全マウスモデルで発現変動する lncRNA のスクリーニングを行った。lncRNA の機能解析のために、結合タンパクの同定を行い、クロマチン免疫沈降、RNA pulldown 等により lncRNA-タンパク複合体の機能を解析した。また、*in vivo* での lncRNA の役割を調べるため、lncRNA 欠損マウスを作製し、心肥大・心不全モデルでの表現型解析を行った。

【結果】 網羅的スクリーニングにより、複数個の候補 lncRNA を得た。その中から、lncRNA#5 が圧負荷 (TAC) モデルにて、一貫して発現上昇することが判明した。この lncRNA#5 は、骨格筋と心臓という筋組織で特異的に発現していた。さらに、質量分析にて lncRNA#5 の結合タンパクを同定した。lncRNA#5 のノックアウトマウスの作製にも成功し、このマウスは圧負荷による代償性の心肥大が不十分であることが判明した。この結果は、心肥大および心不全における新たな機序を示している。

lncRNA#5 ノックアウトマウスの心臓

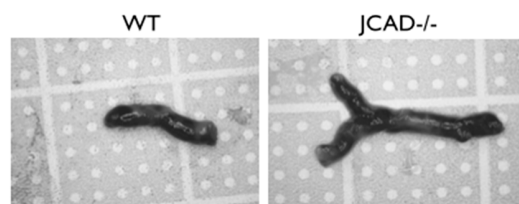


【目的】 血管内皮接着因子 (JCAD : Junctional protein associated with coronary artery disease) は、近年のヒトゲノムワイド関連研究 (GWAS) によって、心筋梗塞に関連する新規の分子として同定された (Eur Heart J. 2011, Nat Genet. 2011)。それと同時期に、我々と共同研究グループは新規接着因子の同定、という全く異なる生化学的アプローチから、独自に JCAD を同定し (BBRC, 2011)、JCAD の生理的機能として、血管新生を制御していることを明らかにした (Hara et al, ATVB, 2018)。JCAD は血管内皮細胞に発現し、VE-Cadherin 依存的に細胞接着部位に局在することを報告したが、JCAD が心筋梗塞を制御する機序は不明である。そのような中で、JCAD はトロンビン刺激でリン酸化修飾をうけることが網羅的解析によって偶然明らかになった (Blood, 2014)。すなわち、JCAD は血管内皮における、トロンビン刺激による血栓形成カスケードを制御することで、心筋梗塞を含む、血栓症の発症に関与しているのではないかと着想した。

【方法】 1. JCAD^{-/-}マウスを用いた血栓症の発生における JCAD の影響の解明：独自に作製した JCAD^{-/-}マウスにおいて、我々が近年、独自に開発した頸静脈結紮モデル (Hara T et al, *Circulation*. 2014) や、wire injury による大腿動脈血栓モデルにより、マウスに血栓を作製した。形成された血栓のサイズを野生型マウスと JCAD^{-/-}マウスで比較することによって、JCAD が静脈および動脈血栓形成を制御することを直接的に明らかにした。2. 培養細胞を用いた JCAD の血栓形成にかかわる分子メカニズムの解明：培養ヒト血管内皮細胞 (HUVEC など) に siRNA 等を用いて JCAD 特異的なノックダウンや過剰発現を誘導し、トロンビン刺激による血管内皮細胞の血栓性変化に関わる影響を分子細胞学的に検討した。具体的にはトロンビン刺激後の組織因子などの血栓性分子の発現変化や、Erk などのシグナル伝達経路を比較した。

【結果】 1. JCAD^{-/-}マウスを用いた血栓症の発生における JCAD の影響の解明：我々と共同研究グループは独自に JCAD を同定し、血管内皮の接着部位に発現することを報告した。さらに、JCAD^{-/-}マウスの作製にも既に成功している。その JCAD^{-/-}マウスにおいて、下大静脈に DVT を作製したところ、JCAD^{-/-}マウスでは大型の DVT が作製された。すなわち、JCAD は抗血栓的に働く分子であることが生体で明らかとなった。2. 培養細胞を用いた JCAD の血栓形成にかかわる分子メカニズムの解明：培養ヒト血管内皮細胞 (HUVEC など) に siRNA 等を用いて JCAD 特異的なノックダウンや過剰発現を誘導し、トロンビン刺激による血管内皮細胞の血栓性変化に関わる影響を分子細胞学的に検討した。VEGF 刺激による ERK のリン酸化は JCAD の特異的なノックダウンにより抑制されたが一方、AKT のリン酸化経路は抑制されなかった。また JCAD 特異的なノックダウンにより VEGFR のリン酸化とその発現レベル自体も抑制された。

JCAD ノックアウトマウスにおける大型 DVT の形成

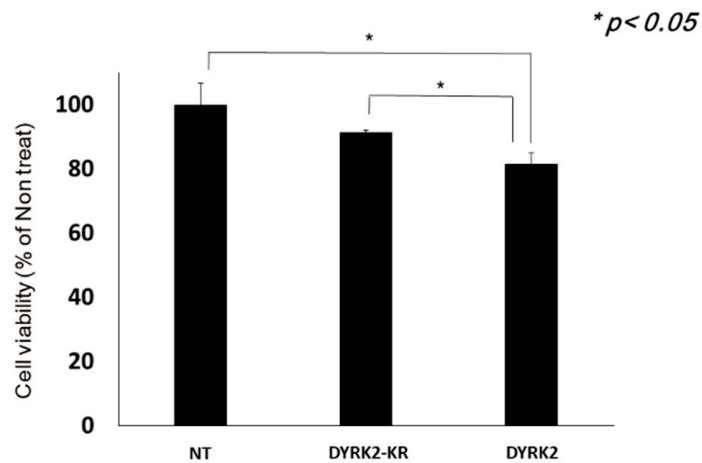


【目的】 DYRK2 (dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 2) は、DNA 損傷に応答して p53 のセリン 46 をリン酸化しアポトーシスを誘導する機能的なキナーゼであると報告され癌における DYRK2 の働きが注目されている。本研究は、DYRK2 を膵臓癌細胞に遺伝子導入することによる抗腫瘍効果を検討しアデノウイルスベクターを用いた新規治療法の開発を目指すものである。

【方法】 1. PANC-1 においてプラスミドベクターpcDNA3 により DYRK2 を強制発現させ、抗腫瘍効果を検討した。
2. Cre/loxP 発現制御システムを用い、MIAPaCa-2 においてアデノウイルスベクターにより DYRK2 を強制発現させ、抗腫瘍効果を検討した。

【結果】 1. プラスミドによる DYRK2 強制発現群では、コントロール群と比較して細胞増殖抑制効果を認めた (p 値 = 0.008)。2. アデノウイルスベクターを用いた DYRK2 強制発現群では、未治療群、キナーゼ活性の無い変異型 DYRK2 発現群と比較して有意に細胞増殖抑制効果を認めた (それぞれ p 値 = 0.014、0.008)。

アデノウイルスベクターによる DYRK2 強制発現の抗腫瘍効果

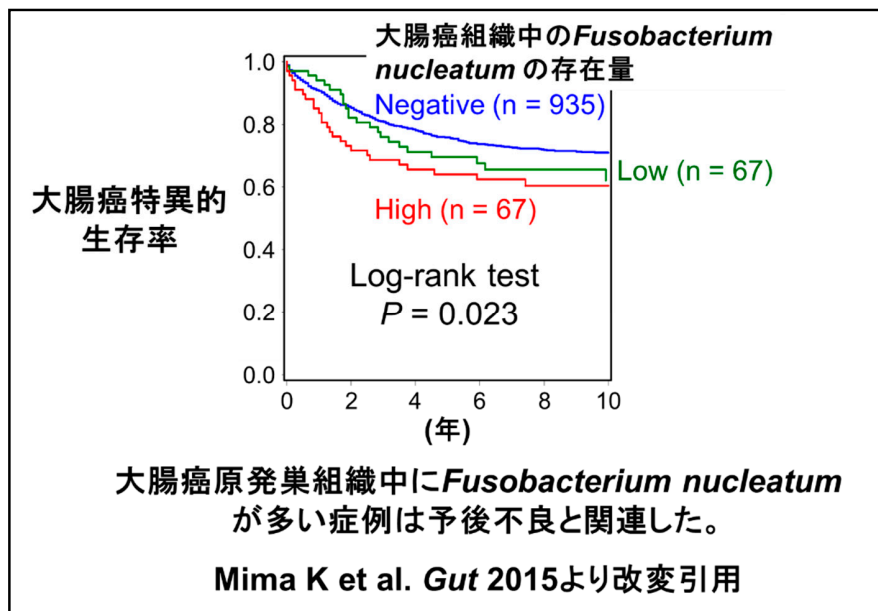


【目的】 本邦において大腸癌の罹患数および死亡数は増加している。最新の研究で腸内細菌が抗腫瘍免疫応答を抑制し大腸癌の発育を促進することが示唆されている。しかし、細菌や細菌叢の変化が大腸癌による死亡の主な原因である遠隔転移や化学療法感受性に関与するかは不明である。大腸癌術後の縫合不全は重大な合併症の1つで、患者の quality of life の低下、入院期間延長、予後不良と関連することが報告されている。

【方法】 大腸癌原発巣および転移巣の切除標本から DNA を抽出し、大腸癌と関連することが示唆されている *Fusobacterium nucleatum*、*Escherichia coli*、*Bacteroides fragilis*、*Enterococcus faecalis*、*Bifidobacterium* の存在量を quantitative polymerase chain reaction 法を用いて測定した。

【結果】 大腸癌転移巣において *Fusobacterium nucleatum* が検出された症例は転移巣切除後の予後不良と関連した ($P=0.031$)。大腸癌原発巣組織中に *Bifidobacterium* genus ($P=0.009$) が検出された症例では縫合不全発生率が有意に高かった。

大腸癌原発巣組織中の *Fusobacterium nucleatum* と予後との関係



【目的】ビタミンDはインスリン分泌やインスリン抵抗性といった糖代謝に関わる機序を制御している。血中25(OH)D濃度と糖尿病発症に関するコホート研究の成績が欧米から報告されているが、インスリン分泌能が低いアジア人において血中25(OH)Dとの関連を調べた前向き研究は少ない。本研究の目的は、日本人労働者においてコホート内症例対照研究により血中ビタミンDと糖尿病リスクとの関連を明らかにすることである。

【方法】2008年度の職域健康診断で血清サンプルを研究に提供し、かつその時点で糖尿病でない4,754名(34~69歳)においてコホート内症例対照研究を行った。5年の追跡期間に受けた定期健康診断にて、空腹時血糖126mg/dl以上、ヘモグロビンA1c 6.5%以上、糖尿病治療中のいずれかに初めて該当した時点をもって糖尿病発症とした。症例1名に対し、性・年齢(2歳以内)・採血時期(2週間以内)をマッチさせた対照2名を選択した。症例および対照の保存血清検体を用いて25-ヒドロキシビタミンD濃度(ビタミンD₂及びD₃)をLC-MS/MSにて測定した。これらの値を対照群の4分位で群分けし、条件付きロジスティック回帰モデルにより最低位群に対する最高位群の糖尿病発症のオッズ比およびその95%信頼区間を算出した。肥満度、糖尿病家族歴、喫煙、飲酒、運動を調整した。健診を受けた季節別の分析と前糖尿病に限った分析を行った。

【結果】ビタミンD測定データのそろった人は症例336名、対照668名であった。ベースライン時の血清25(OH)D₃濃度が高いほどその後の糖尿病発症のリスクが低かった。この関連は、糖尿病リスクに関連する諸要因を調整した後も統計学的に有意であった。多変量調整モデル(モデル2)において、血清25(OH)D₃濃度が最も低い群を基準とした場合の最も高い群の糖尿病のオッズ比(95%信頼区間)は0.58(0.36~0.92)であった(傾向性P=0.032)この関連はBMI調整後、多少弱まり有意ではなくなった(モデル3)。血清25(OH)D₂は、ほぼ全員が測定限界以下であった。

条件付きロジスティック回帰モデルによる血清25(OH)D₃濃度(4分位)と糖尿病リスクとの関連

	オッズ比(95%信頼区間)				傾向性P
	Q1(基準) 15.5 ng/mL未満	Q2 15.5~19.5 ng/mL	Q3 19.6~24.2 ng/mL	Q4 24.3 ng/mL以上	
症例数/対照数	103/168	77/169	79/161	77/170	
モデル 1†	1.00	0.68(0.46-1.01)	0.71(0.48-1.07)	0.63(0.40-0.98)	0.06
モデル 2‡	1.00	0.68(0.46-1.02)	0.67(0.44-1.03)	0.58(0.36-0.92)	0.03
モデル 3§	1.00	0.74(0.48-1.14)	0.62(0.39-0.99)	0.65(0.40-1.08)	0.08
季節別解析(モデル2)					
11月~4月	1.00	0.51(0.30-0.84)	0.51(0.28-0.93)	0.45(0.23-0.87)	0.01
5月~10月	1.00	1.19(0.57-2.50)	1.14(0.57-2.29)	0.94(0.44-2.01)	0.70
		交互作用P=0.16			
前糖尿病					
モデル 4	1.00	0.76(0.49-1.17)	0.63(0.40-0.98)	0.63(0.39-1.02)	0.04

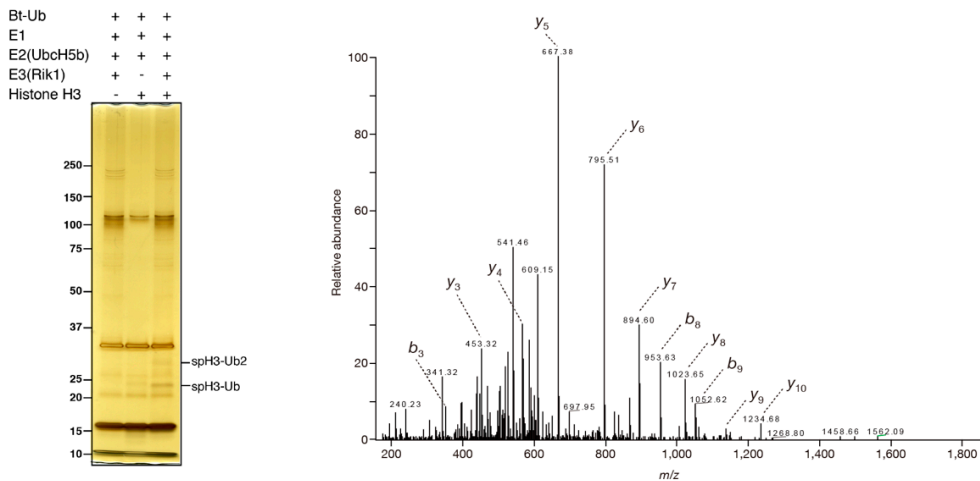
†モデル1:未調整、‡モデル2:余暇の身体活動、職業上の身体活動、喫煙、飲酒、交替勤務、睡眠時間、糖尿病家族歴、高血圧治療中を調整、§モデル3:さらにBMI(kg/m²)を調整、||モデル4:非条件付き分析(モデル2の調整要因に年齢、性、健診時期を追加)

【目的】 エピジェネティクスとは、DNA 塩基配列の変化を伴わない遺伝子機能の変化であり、発生や分化、さらにはがんや神経疾患にも深く関与している。ヒストンの翻訳後修飾はこのエピジェネティクスの制御に重要な役割を果たしており、これまでの研究から、ヒストンの修飾はそれぞれ単独で機能しているのではなく、共役的に制御されていることが示唆されている。本研究では分裂酵母のヒストンメチル化酵素複合体 CLRC に着目し、ヒストンのメチル化とユビキチン化修飾との共役機構の解明を目指した。

【方法】 まずアフィニティー精製によって分裂酵母の抽出液から CLRC 複合体を精製した。次に精製した CLRC を使って *in vitro* ユビキチン化アッセイ法を行い、候補となる基質を検討するとともに、実際に分裂酵母内でその修飾が存在するか検討した。さらに、ユビキチン化の有無によってメチル化酵素の活性がどのように影響を受けるか検討した。

【結果】 分裂酵母から精製した CLRC を用いた *in vitro* アッセイによって、CLRC がヒストン H3 に対するユビキチン化活性を有すること、また質量分析による解析から、ユビキチン化されたヒストン H3 が実際に分裂酵母のクロマチン上に存在していることが分かった。さらにユビキチン化されたヒストン H3 を基質として、メチル化酵素の活性を検討したところ、ユビキチン化修飾の存在がメチル化酵素の活性を促進することが明らかになった。

ヒストン H3 を基質にしたユビキチン化アッセイ (左) と質量分析の結果 (右)

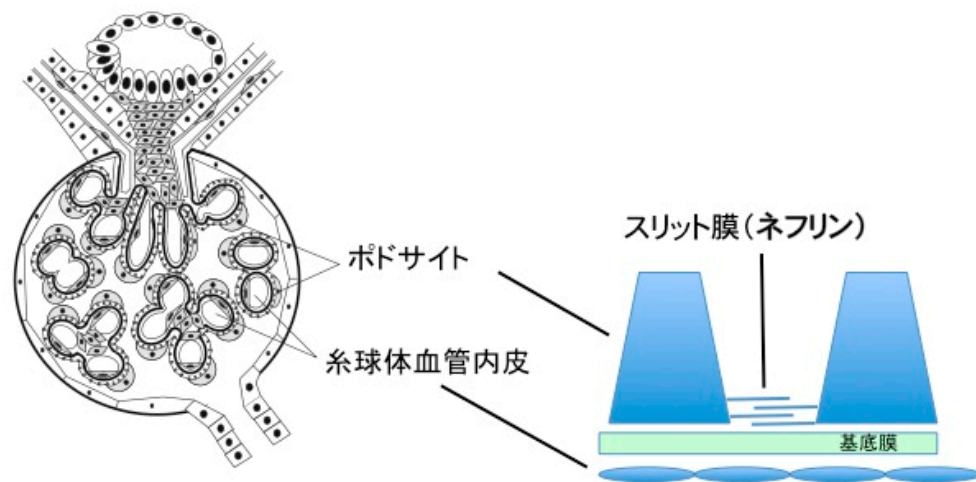


【目的】慢性腎不全による国内の人工透析患者は32万人を越えており、医療費は年間1.5兆円に達する。腎機能を完全に回復させる内科的治療は存在せず、腎移植が唯一の根治療法であるが、ドナーは決定的に不足している。このような状況の中、我々はヒトiPS細胞から糸球体と尿細管を含む腎臓の3次元構造を試験管内で誘導できることを報告した。しかし誘導された糸球体の細胞形態は未熟であり、血管内皮も存在しなかった。本計画ではこの腎臓組織、特に糸球体をさらに成熟させる方法を*in vitro*及び*in vivo*で開発することを目的とした。

【方法】*in vitro*では糸球体ポドサイトをFACSで単離し、2次元培養を試みた。*in vivo*ではiPS細胞由来ネフロン前駆細胞を免疫不全マウスの腎臓皮膜下に移植し、20日後に解析することによって、成熟化を検討した。

【結果】*in vitro*の2次元培養ではポドサイトの形質が維持されなかった。一方、移植によって、ポドサイトの細胞突起の複雑化とスリット膜の形成が見られ、血管内皮との相互作用による成熟機構の存在が示唆された。

糸球体とスリット膜の構造



【目的】 グアニン4重鎖構造（以下 G4 と記載）は、一本鎖 DNA 上のグアニンの連続配列が存在する部位に形成される。G4 を形成する potential を有する配列は、ヒトゲノム上に 37 万箇所以上存在すると推定される。最近の研究から、G4 は転写、組換え、転移、エピゲノム制御など染色体の種々の動態・機能に関与することが示唆されると同時に、その異常な形成は、神経変性疾患などの原因にもなることが示唆されている。本研究では、G4 の生物学的意義についてゲノム複製を中心に解析することを目的とする。

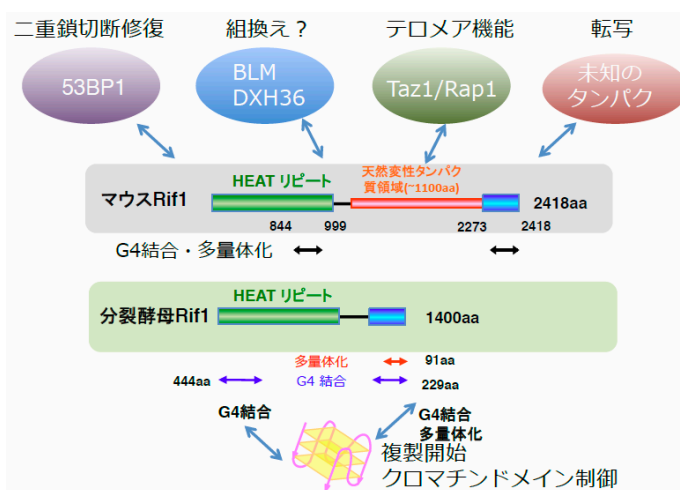
【方法】 精製したタンパク質と G4 との相互作用をゲルシフトなどで解析した。また、タンパク質のオリゴマー形成を未編成ゲル、ゲルろ過などで解析した。分裂酵母を用いて、細胞内の G4 を、ヌクレアーゼ感受性で検出する方法を開発した。

【結果】 我々は、G4 が、DNA 複製制御において果たす負と正の役割について解析した。その結果、①ゲノム上に多数存在する G4 の一部に Rif1 タンパク質が結合し、クロマチンを束ね核膜近傍に複製開始に阻害的な染色体高次構造体を形成することを明らかにした。Rif1 タンパク質の生化学的解析から、C 端領域に、G4 結合ドメイン、多量体化ドメイン、クロマチン会合領域が存在することが示された。又、②複製開始における G4 の役割について解明するために、大腸菌染色体および plasmid DNA の、RNaseH (RNA-DNA ハイブリッド上の RNA を選択的に分解するヌクレアーゼ) 欠損株で効率よく観察される第二の DNA 複製様式をモデルに G4 依存的複製機構の解明を試みた。その結果、RNaseH 欠損下で観察される染色体複製は、G4 形成を阻害する LiCl で阻害されること、その配列要求性から、G4 の重要性が示唆された。また plasmid 複製開始においても、G の連続配列の重要性、G4 リガンドによる複製阻害、primer RNA 内の guanine の 7deaza guanine (B 型二重らせんは形成できるが、G4 を形成できない) への置換による複製阻害などから、G4 の関与が示唆された。

次に、細胞内での G4 形成のメカニズムとその存在を検証するため、まず *in vitro* で G4 形成配列をもつ二本鎖 DNA の転写により RNA と DNA を含む RNA-DNA ハイブリッド上に G4 が形成されることを示した。実際、上記の Rif1 結合部位 G4 は非コード転写領域の中に存在する。また、複製開始においても転写は重要な役割を果たし、G4 を含む RNA-DNA ハイブリッドが安定に維持される条件で効率よく開始する。また、細胞内での G4 のダイナミクスを解析するために、G4 抗体ポリペプチドを蛍光分子に連結し G4 の可視化に成功した。さらに、G4 の構造的特性を利用して、細胞内での G4 形成を証明する技術を開発した。

これらの結果から、細胞内に実際に G4 は、転写と強く連動して形成され、形成された G4 は、種々のタンパク質と相互作用し、複製開始の負と正の制御に関与することが明らかとなった。これらの知見はまだ大部分未解決の高等動物の複製開始機構に重要な示唆を与えるものである。

G4 結合タンパク質 Rif1 の構造と、それによる DNA 複製、修復、組換え、転写などの制御

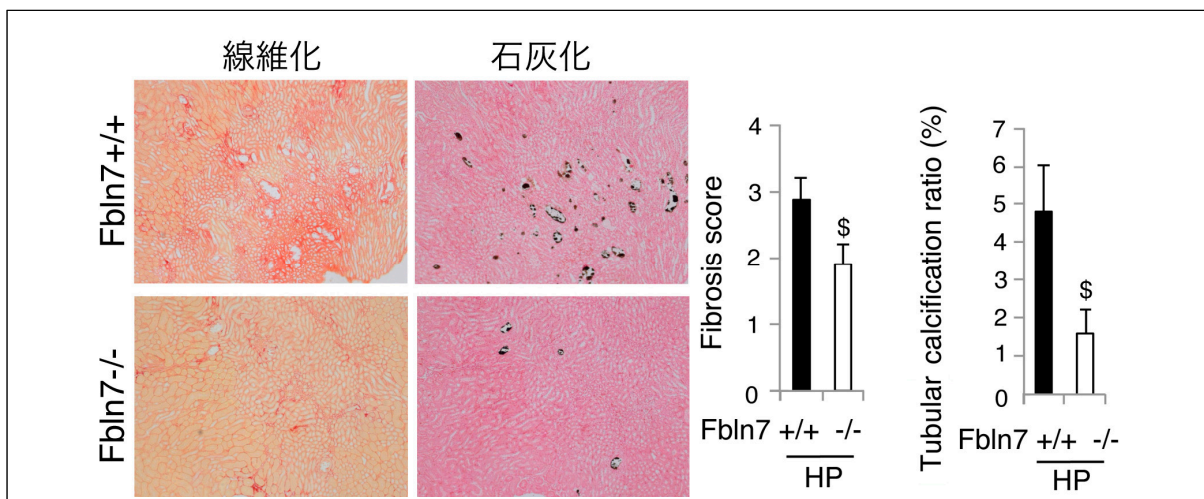


【目的】 組織の病的石灰化は慢性腎臓病・糖尿病・動脈硬化症などの慢性疾患に合併してみられ、予後の重要な指標である。しかし、局所における石灰化の詳細な分子機序は未だ明らかにされていない。本研究は、生体マウスの腎臓に高発現する新規分泌因子 *Fibulin-7* に着目し、その組織石灰化における役割を *fibulin-7* 欠損マウスを用いて、個体レベルで解明することを目的とした。

【方法】 ホモログスリコンビネーションによるジーンターゲット法を用いて *fibulin-7* 欠損マウス (*Fbln7* KO) を作製し、解剖学的、組織学的観察を行なった。4 週齢のオス野生型および *Fbln7* KO マウスを用いて、高リン食負荷を 4 週間行い、腎臓の石灰化を誘導した。腎機能、組織石灰化の評価、qPCR による遺伝子発現を検討した。

【結果】 *fibulin-7* は、細胞外基質 *fibulin* ファミリーの最も新しいメンバーであり、ヘパリン結合能を有し、成体マウスの腎臓に高発現する。*Fbln7* KO マウスは、発生段階での腎臓の形態異常や機能異常は認められなかった。4 週間の高リン負荷後では、野生型マウスと比べて、腎尿細管の石灰化 (Von Kossa 染色) と線維化 (Picrosirius Red 染色) が有意に抑制された。また、腎臓のマイクロ CT 解析からも、明らかな腎石灰化の減少が認められた。本研究から、*fibulin-7* は腎尿細管細胞の石灰化を誘導する分子であることが示唆された。

高リン負荷 (HP) 後の腎臓組織所見

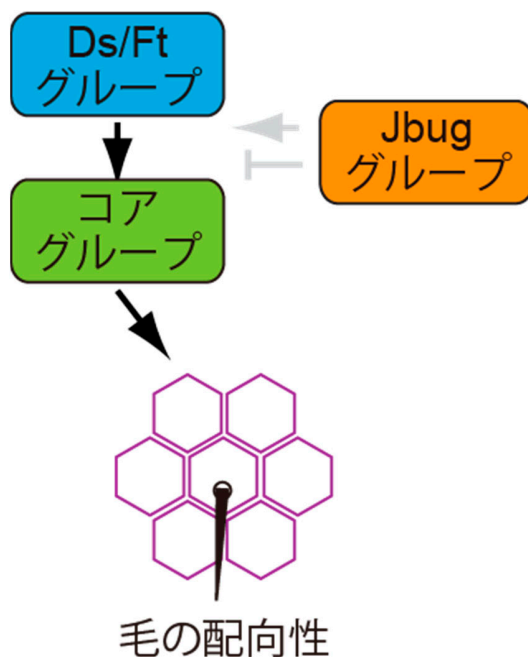


【目的】 平面内細胞極性 (planar cell polarity, PCP) とは、組織平面において細胞の向きが特定の方向に揃う現象であり、組織の構築と機能発現に重要な役割を担う。近年、様々な動物種において多くの PCP 制御分子が同定され、これらの分子のタンパク質間相互作用や細胞内局在の解析から、PCP 形成機構の理解が飛躍的に進展した。その一方で、一度形成された PCP が、発生過程や生後の成長過程において組織に作用する外力などに抗いつつ適切に維持される機構は不明である。これまでに我々はこの謎を解く鍵となる新規 PCP 分子群 (Jitterbug (Jbug) グループ分子群) を同定している (投稿準備中)。本研究では、これらの新規分子に着目して、PCP 維持機構に関する解析を実施した。

【方法】 ショウジョウバエ個体における任意の遺伝子の過剰発現およびノックダウンには、GAL4-UAS 系を利用した。また、本研究で使用した数理モデルは、以前我々が独自に作成した数理モデルを基に、本研究の実験で得た知見を導入することで構築した。

【結果】 実際のショウジョウバエ背板の表現型データに基づく、数理モデルを用いた解析から、筋肉による牽引が Jbug グループの機能低下による PCP 異常の主たる原因であることが示唆された。筋肉による牽引に起因する PCP 摂動機構を理解するために遺伝学的スクリーニングを実施した。Jbug グループの機能欠損による背毛の配向性異常の抑圧に関わる遺伝子を同定し、それらの分子の発現パターンを解析した。本研究により、Jbug グループの機能低下により惹起される PCP 異常の分子機構の一端が明らかとなった。

平面内細胞極性 (PCP) を司る制御経路の模式図

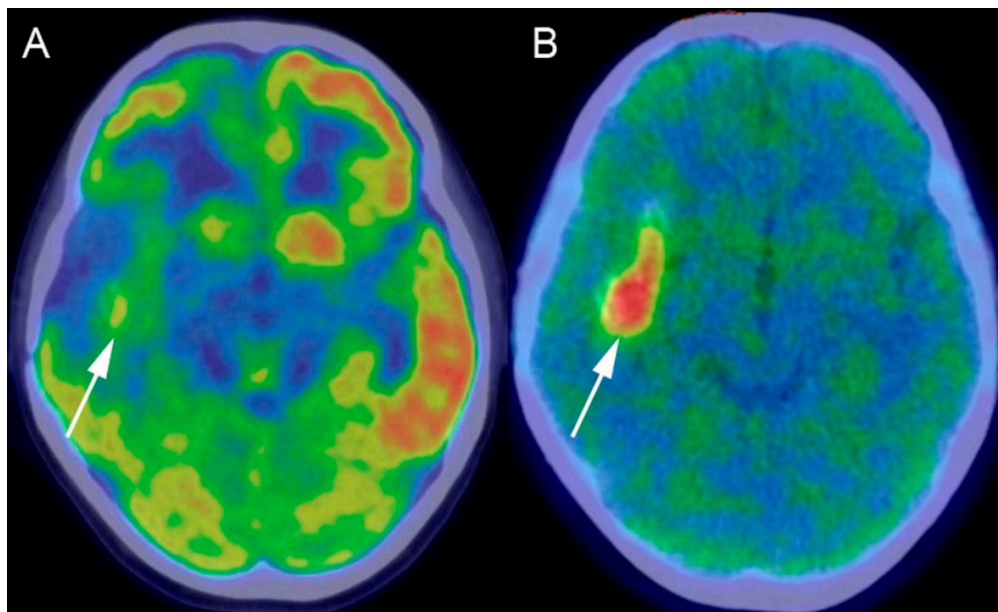


【目的】 生体が低酸素環境に曝露された場合、低酸素誘導因子 (HIF-1) が転写因子として発現し、血管増生、細胞増殖・分化、糖代謝が制御される。広く臨床検査として行われている FDG-PET は糖代謝を反映したものである。一方、FMISO-PET では、HIF-1 が活性化している領域で、且つ、生存している組織に集積が見られるとされる。FMISO-PET で集積を認める場合、生存しているが低酸素環境にあるため治療対象である領域であることを意味するが、低酸素環境と糖代謝は互いに影響しあう関係であり、病態の違いもあるため両者の関係性は明確ではない。

【方法】 本研究では、脳腫瘍、脳炎症性疾患において、低酸素環境評価と糖代謝評価の両者について病態ごとに検討を行った。

【結果】 脳腫瘍の場合は、糖代謝の亢進が無く、低酸素状態が認められない場合は低悪性度の神経膠腫が多く、糖代謝の亢進の有無に関わらず、低酸素状態が軽度～高度である場合は悪性神経膠腫が多く見られた。炎症性疾患の場合は、糖代謝、低酸素状態ともに高度であることが多く見られた。

糖代謝イメージングと低酸素イメージングの一例



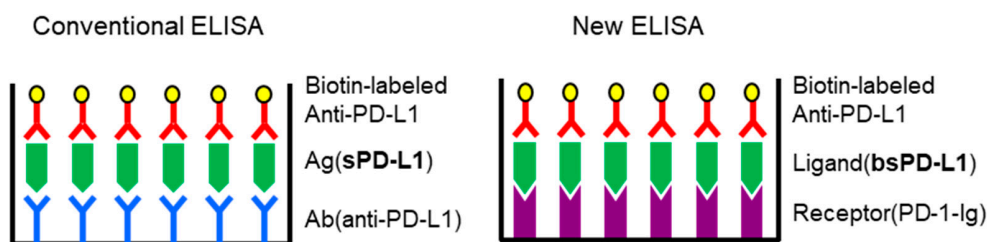
A) FDG-PET (糖代謝画像)、B) FMISO-PET (低酸素画像)。

【目的】 免疫チェックポイント阻害剤である抗 PD-1 抗体は、T 細胞上に発現する免疫抑制受容体 PD-1 を阻害することにより、免疫系のブレーキを解除してがんに対する免疫応答を高め抗腫瘍効果を発揮する。本邦では 2014 年に新薬として承認されたが、奏効率は概ね 20~30% で、感受性の高い患者群と低い患者群に分かれるが、両者を区別できるバイオマーカーは今のところ見つかっていない。本研究では血中に存在する可溶性 PD-L1 (soluble PD-L1: sPD-L1) に着目して、PD-1 受容体に対する結合能をもった可溶性 PD-L1 (PD-1 binding sPD-L1: bsPD-L1) を検出する新規 ELISA システムを開発した。

【方法】 従来型の ELISA システムでは、“抗原-抗体反応” を介して、固相化された捕捉抗体 (抗 PD-L1 抗体) により sPD-L1 を捕捉するが、新型 ELISA システムでは、“リガンド-受容体反応” により bsPD-L1 を捕捉するために、固相化抗 PD-L1 抗体を固相化 PD-1-Ig 融合蛋白質に置換した。この新型 ELISA を用いて、非小細胞肺癌患者血漿 75 検体について bsPD-L1 を測定した。

【結果】 新型 ELISA は従来型 ELISA に比べて検出頻度およびシグナル強度が著しく増強し、非小細胞肺癌患者 29 検体 (38.6%) で bsPD-L1 が検出された。さらに患者検体を脱グリコシル化処理するとシグナル強度が減弱することから、sPD-L1 の糖鎖修飾が PD-1 への結合に重要な役割を果たしていることが示唆された。bsPD-L1 と肺癌予後、免疫チェックポイント阻害剤感受性との関連について現在解析を進めている。

PD-1 結合能を指標とした血中 PD-L1 測定法の開発

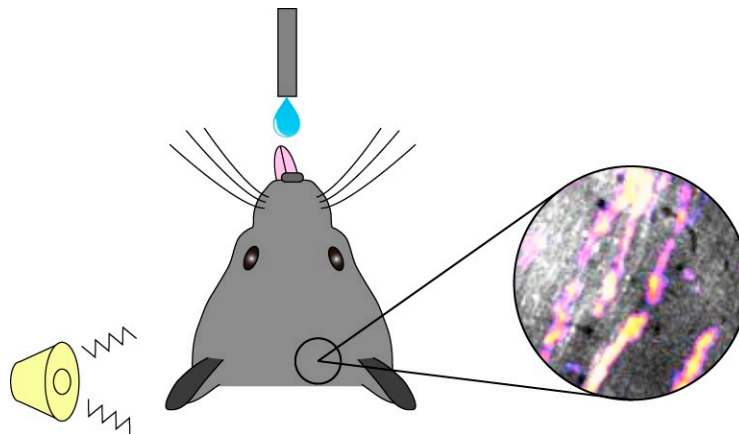


【目的】 大脳と小脳は、連携してはたらくことで、速くて滑らかで正確な運動の制御を実現している。本研究では、運動制御および運動学習における大脳-小脳連関の役割とそのメカニズムを明らかにすることを目的として、*in vivo* 2光子イメージングによる大脳-小脳連関の観察を行った。

【方法】 顕微鏡下においてマウスに音弁別 Go/No-go 課題を学習させ、学習過程における小脳プルキンエ細胞の活動を2光子顕微鏡で観察した。大脳皮質とループを形成していることが知られている小脳半球外側部において観察を行った。小脳の機能区分である帯域（ゾーン）構造を可視化するため、ゾーンのマーカー分子である *aldolase C/zebrin II* の発現を蛍光で観察することのできるマウスを用いた。

【結果】 小脳の機能モジュールごとに異なる情報が小脳および末梢から登上線維シグナルとして入力していることが明らかとなった。小脳半球外側部の *aldolase C* 陽性ゾーンでは、大脳からの運動指令を受け取り、運動の開始に重要であり、一方 *aldolase C* 陰性ゾーンでは、誤った行動を抑制するためのシグナルを受け取ると考えられた。また内側部においては行動のパラメータを表現することから感覚フィードバックを受け取ると示唆された。これらの結果は、小脳においては認知・運動・感覚の情報処理が異なるモジュールで同時に行われることで、高度に統合された行動学習が実現されていることを示している。今回開発した方法を用いることで、今後、小脳皮質における運動および高次機能を系統的に解析できると期待される。

行動課題学習中のマウス小脳における2光子イメージング

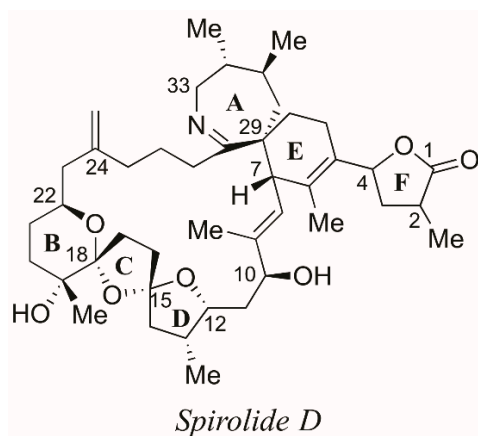


【目的】 1995年にWrightらにより単離・構造決定されたスピロリド類は、[6,7]-アザスピロ環、[6,5,5]-ジスピロケタール(BCD)環を含む大環状ポリエーテルであり、アセチルコリン受容体拮抗作用などの顕著な生物活性を示すことが知られている。これまでに、石原・畑山、Brimble、Zakarian、Landais、村田らのグループが合成研究を報告しているが、スピロリド類の全合成は未だに達成されていない。

【方法】 スピロリドDの初全合成実現に向けて、本研究ではジスピロケタール環部の立体選択的構築について検討した。スピロリドDに見られる[6,5,5]-ジスピロケタールの場合、熱力学支配生成物を与える酸性条件下での分子内ケタール化では、双極子反発を回避したトランスイド異性体が主生成物となることが知られている。そこで、二重ヘミケタール形成/ヘテロMichael連続型反応により速度支配生成物の取得を試みた。

【結果】 シソイド異性体を優先して得ることは成功したが、C12、C13位置換基間の立体反発のため望みの異性体を得ることはできなかった。この問題を解決するために、C12位の不斉中心を二重結合の立体選択的還元により構築する計画を新たに立案した。その結果、望みの異性体を主生成物として得ることに成功し、得られたジスピロケタールから8工程の変換を経ることによりスピロリドDのBCD環フラグメントを合成することができた。

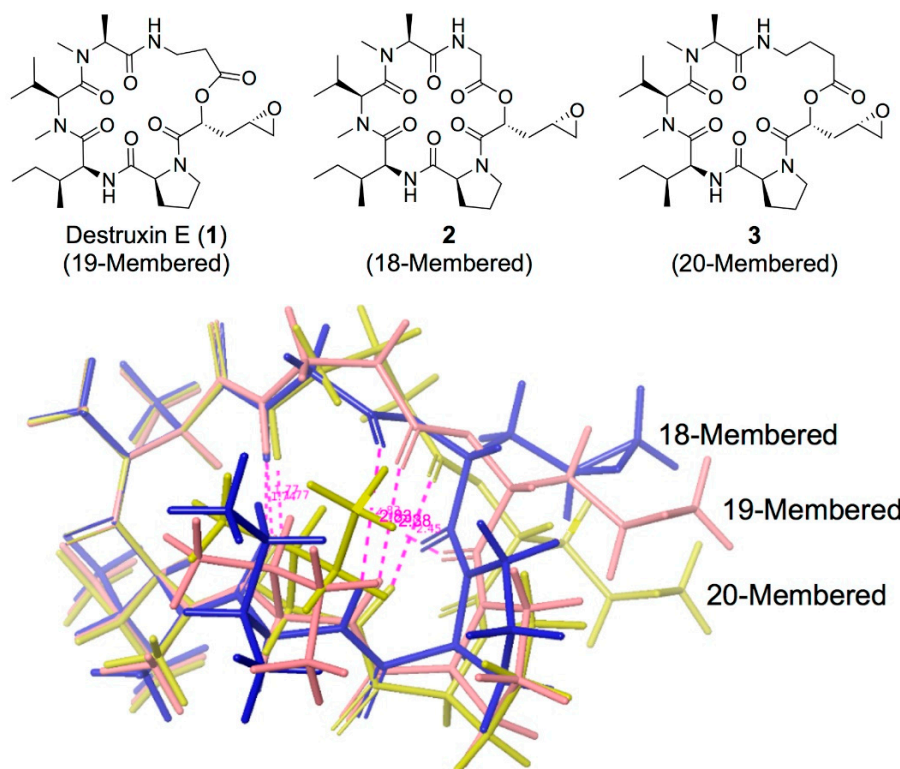
スピロリドDの構造



【目的】分子量が400から3,000程度の中分子環状ペプチド類は鎖状ペプチドとは異なり、環状構造を取ることによる代謝安定性や、分子量が1,000を超えていても膜透過性を有する等、創薬研究において必要とされる物性を示すことが知られている。このような理由から、特異な性質を示す中分子環状ペプチドを基盤とした創薬研究が注目されている。その基盤研究として我々は、骨吸収抑制作用を示し、新規骨粗鬆症治療薬のリードとして期待される中分子環状ペプチド destruxin E について、作用機構の解明に向けた誘導體合成と三次元構造解析を基盤とした構造活性相関研究を検討した。

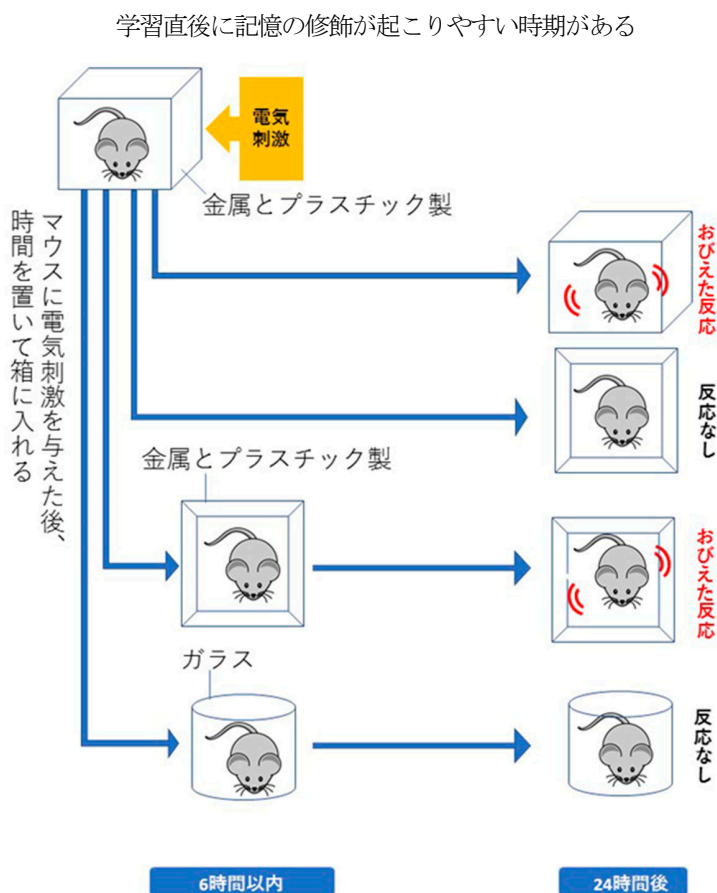
【方法と結果】立体配座と生物活性との相関を明らかにすべく、環状構造の員数を変えた誘導體について合成、二次元 NMR および分子力場計算による三次元構造解析を行った。環の員数を変化させても環状ペプチド構造の立体配座は大きく変化しないが、生物活性は著しく低下することが分かり、環状ペプチドの立体配座が活性発現に重要なエポキシド側鎖の空間配置を決定することを明らかにした。また、*N*-メチルアミド基をアミド基へ置換した場合、複雑な NMR スペクトルを与えたことから環状ペプチドの立体配座を保持できないことが示唆され、さらに生物活性も大きく低下したことから、活性発現に必須となる構造情報の取得に成功した。

Synthesis, Biological Evaluation, and Conformational Analysis of Destruxin E Analogues



【目的】 睡眠は記憶の形成過程に様々な機能を持つ。たとえば、ノンレム睡眠期間中に記憶が想起され固定化させるとする有力な実験的証拠が存在する。また逆に、覚醒中に強い情動刺激を受けるとその後の睡眠にも大きな影響がでる。最近の研究から、睡眠中に記憶の洞察が深まることが示された。これは、日常に受ける様々な情動刺激を睡眠中に処理し、その後同じ刺激が与えられても過剰に反応防ぐ（ことでその刺激に対してより良い対処を促す）メカニズムとして働く可能性がある。一方で、トラウマ記憶によってこのメカニズムが破綻すると心的外傷後ストレス障害（PTSD）となることが考えられる。実際、PTSD の患者ではトラウマ記憶を想起させるあらゆる刺激に、それを受けたときの精神的衝撃が鮮明に蘇る。

【方法・結果】 本研究では、マウスの記憶課題を用いて PTSD の症状をモデル化し、学習直後に記憶の修飾が起りやすい時期があることを見出した (図)。さらに、この期間の睡眠中に、学習に関連した音刺激を用いることで、マウスの恐怖記憶反応を減弱させることに成功した。現在、光遺伝学技術を用いこの回路メカニズムの精査を行っている。本研究が、PTSD などの治療に活かされる日が来ることを切に願う。



【目的】近年ではヒストンメチル化に加えて、非ヒストンタンパク質を対象としたタンパク質メチル化修飾の解析も行われるようになってきた。しかしながら、SET 型 MTase のヒストン以外の基質や、多くの SET ドメインを持たない (nonSET 型) MTase の基質、メチル化修飾を受けるタンパク質の全体像、あるいはメチル化の生理的機能等に関しては究明の途上であり、まだ不明な点も多い。本研究では、そのような機能未知の MTase である *METTL20* の生命機能を明らかにすることを目的とした。

【方法】SAM アナログ (ProSeAM) を指標としたメチル化タンパク質検出・同定系を用いて、*METTL20* の標的タンパク質をプロテオーム解析した。さらに、*Mettl20*KO マウスを作製し、その表現型について特に代謝変化に着目して解析した。

【結果】*METTL20* によるミトコンドリア局在タンパク質 ETFB (electron transfer flavoprotein beta subunit) のリシンメチル化を発見した。ETFB の機能としては脂肪酸代謝関連の役割が知られているので、*Mettl20*KO マウスを作製して同代謝が盛んに行われている肝臓での ETFB のリシンメチル化レベルを比較した。その結果、KO マウスでは ETFB のメチル化が消失することを確認した。

さらに肝臓での ETF 活性を比較したところ、KO マウスにおいて ETF 活性が顕著に増加した。ケトン食給餌下において、呼吸代謝測定を行ったところ、KO マウスでは酸素消費量と熱産生能が有意に増加していた。さらに 24 時間絶食したマウスの低温耐性試験の結果、KO マウスは同ストレスに耐性を示した。一方で、通常食給餌下ではこのような差が見られなかった。

*Mettl20*KO マウスの低温耐性試験

