

1 運動制御性臓器連関から解明する発がん予防メカニズム

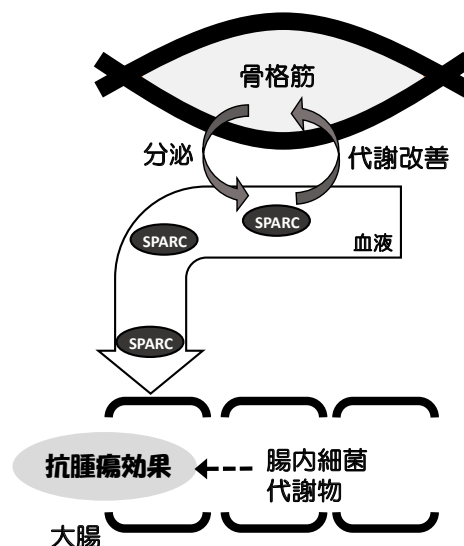
青井 渉

【目的】 我が国における大腸がんによる死亡率は年々高まっている。各国の疫学研究から、大腸がんの罹患リスクを低下させるための生活習慣として、運動習慣が効果的であることが示されているものの、その機序の詳細は不明である。我々は、Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC) が、運動による発がん予防効果に寄与する可能性を示唆してきた。本研究は、骨格筋特異的 *Sparc* 遺伝子欠損マウスを用いたマイオカイン SPARC の機能、便移植法を用いた腸内容物の機能を明らかにすることを目的とし、運動習慣による大腸発がん予防のメカニズムについて筋と腸の臓器連関の観点から検討した。

【方法】 骨格筋特異的 *Sparc* 欠損型マウスおよび野生型マウスを用いて、アゾキシメタン誘発大腸発がんモデルにより評価した。アゾキシメタンを投与した後、各マウスを運動群と安静群にそれぞれ分け、運動群には低強度走運動を馴化させた。大腸上皮の Aberrant crypt を観察し、群間で比較した。また、欠損型マウスと野生型マウス（ドナー）から便を採取し、無菌マウス（レシピエント）に経口投与した。大腸発がんモデルにおいて大腸上皮の Aberrant crypt の形成を評価した。

【結果】 野生型マウスにおいて、大腸上皮における Aberrant crypt 形成は運動群で有意に少なかった。この効果に、caspase を介したアポトーシス活性化が関与すると示唆された。一方、*Sparc* 欠損型マウスでは、Aberrant crypt 形成およびアポトーシス活性に運動馴化による影響はみられなかった。また、*Sparc* 欠損型マウスでは、骨格筋糖代謝シグナル活性が低く、血糖上昇を誘発することが観察された。便移植試験において、レシピエントにおける大腸の Aberrant crypt 形成に、ドナーの遺伝子型による影響はみられなかった。以上より、骨格筋由来の SPARC が、直接あるいは代謝改善作用を介して大腸発がんの予防に寄与することが示唆された。

筋腸連関を介した発がん予防



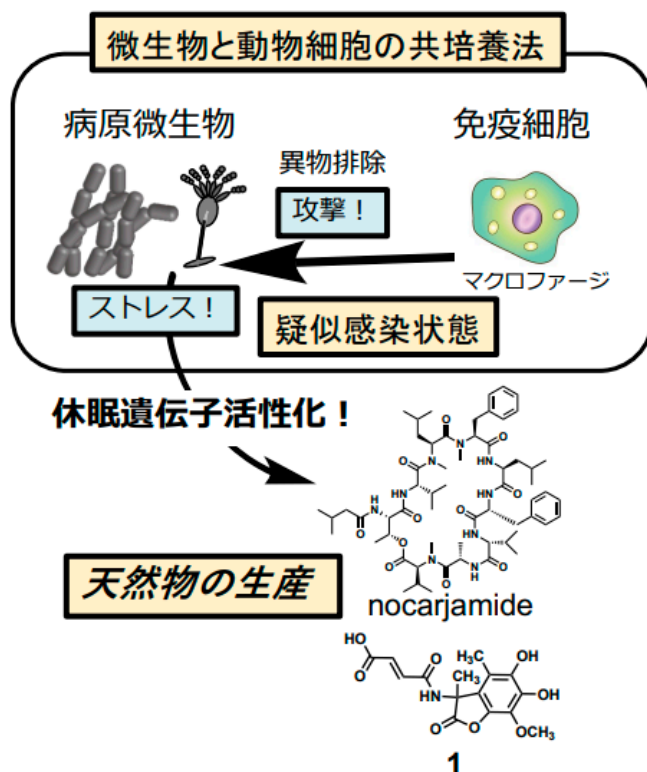
2	病原微生物の浸潤進化に学ぶ休眠遺伝子活性化と創薬	荒井 緑
---	--------------------------	------

【目的】放線菌や真菌は、多くの有用な化合物を提供してきた。しかしながらその遺伝子は2割程度しか働いておらず、新たな新規天然物を生産するであろう生合成遺伝子が眠ったままの休眠遺伝子であることがわかっている。我々は近年、病原放線菌と動物細胞の共培養法を開発し、休眠遺伝子活性化に成功している。この新規手法は、病原微生物が動物に感染する際の状況を再現し、疑似感染状態を模倣したもので、国内外でも初めての例であり独創的で新規性が高い。本研究では、本共培養法を病原真菌にも応用し、新たな共培養特異的化合物を見だし、その生産機構に迫ることを目的とする。

【方法】千葉大学真菌医学研究センターが保有する臨床検体から分離された病原真菌と免疫細胞（マウスマクロファージ様細胞 J774.1、RAW264）を様々な条件下共培養を行った。細胞のみの培養、菌のみの培養および、共培養の際の化合物生産を HPLC で比較し、共培養特異的化合物を見いだした。

【結果】病原放線菌 *Nocardia tenerifensis* とマウスマクロファージ J774.1 の共培養により生産される nocarjamide の生産機構の解明に向け種々検討し、nocarjamide の産生には *N. tenerifensis* とマウスマクロファージ J774.1 の物理的接触は必要ないことが明らかとなり、*N. tenerifensis* は、マクロファージの出す比較的大きいタンパク質に反応している可能性があるとして推定した。病原真菌 *Aspergillus fumigatus* 株とマウスマクロファージ様細胞 RAW264 の共培養を行い、共培養特異的に産生される化合物 **1** を単離・構造決定した。アゾール耐性を持たない *A. fumigatus* 株で同様に共培養を行ったが、共培養特有ピークは見出されなかったことから、感染に有利なアゾール耐性株特有の化合物生産と予想した。また、RNA-seq により、fumarylalanine の生合成クラスター SidE が共培養特異的に発現上昇することを見いだした。*A. fumigatus* とマウスマクロファージ様細胞 RAW264 との共培養で、fumarylalanine の生合成が上昇し、化合物 **1** は、fumarylalanine を用いて生合成されたと推測した。

微生物と動物細胞の共培養による休眠遺伝子活性化と天然物生産



3 ビタミンE及びその類縁体の効率的な不斉合成法の開発

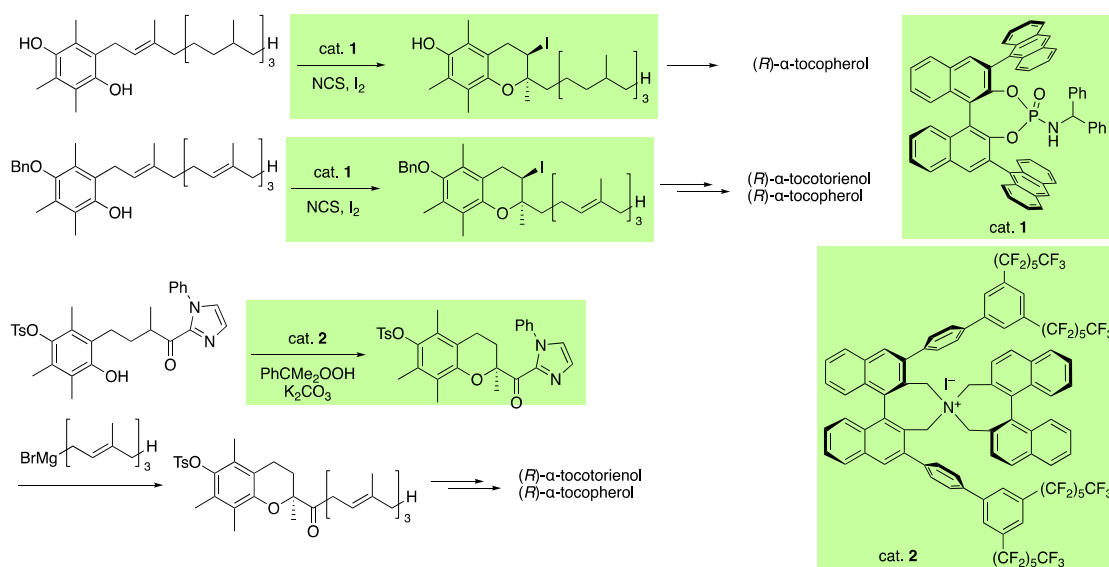
石原 一彰

【目的】 ビタミン E に代表される光学活性クロマン類は多彩な生理活性を有するテルペノイドの仲間であり、医薬品やサプリメントとして高い需要がある。世界のビタミン E 市場は 5.5 万トンであり、そのうち 5 万トンは安価な鎖状テルペン由来の合成品である。天然ビタミン E は光学活性であるが、合成ビタミン E のほとんどはラセミ体 (1.1 IU/mg) である。ビタミン E の生理活性はその主成分である (R,R,R)- α -トコフェロール (1.49 IU/mg) が最も強い。また、驚くべきことに近年になって α -トコトリエノールの抗酸化作用が α -トコフェロールの 40~60 倍であることがわかり、さらに注目が集まっている。このような状況において、光学純度の違いにより薬理活性の強さも薬理作用も異なる共通クロマン骨格を有する α -トコフェロール、 α -トコトリエノール、トロロックスなどのキラル生理活性物質については、不斉合成によって望む薬理活性の高いエナンチオマーを選択的に合成するのが理想的であり、光学活性クロマン類の効率的合成法の開拓は経済的にも環境的にも急務である。そこで、本研究課題では入手容易で安価な鎖状テルペンを原料に、高付加価値のある光学活性な α -トコトリエノール、 α -トコトリエノール、トロロックスを短段階で大量生産するための不斉合成技術の開発を目的とする。

【方法】 既に我々はビタミン E 類に共通するクロマン骨格の触媒的不斉合成法としての応用が期待される方法として次の二通りの方法を開発済みである。一つはキラル Lewis 塩基触媒 1 によるエナンチオ選択的ヨードエーテル環化反応である (K. Ishihara et al. J. Am. Chem. Soc. 2018, 140, 6039–6043)。もう一つの方法はキラルヨウ素触媒 2 を用いるエナンチオ選択的酸化的エーテル環化反応である (K. Ishihara et al. Science 2010, 328, 1376–1379)。この二つの不斉触媒反応を鍵段階に、ビタミン E 類に共通するクロマン骨格の触媒的不斉合成及びその反応を鍵とする薬理活性物質の全合成を検討した。

【結果】 まず、一つ目の方法として、キラル Lewis 塩基触媒 1 によるエナンチオ選択的ヨードエーテル環化反応を鍵段階に光学活性クロマン類の不斉合成を検討した。光学活性クロマン類の一つである α -トコフェロールは 2,3,5-ジヒドロキノンとイソフィトールから一段階でエナンチオ選択的ヨードエーテル環化反応の原料が合成できる可能性がある (K. Ishihara et al. Angew. Chem. Int. Ed. 2003, 42, 5731–5733)。次に、二つ目の方法として、キラルヨウ素触媒 2 を用いるエナンチオ選択的酸化的エーテル環化反応を鍵段階に光学活性クロマン類の不斉合成を検討した。

不斉触媒反応を鍵段階に用いるビタミン E 類の不斉合成



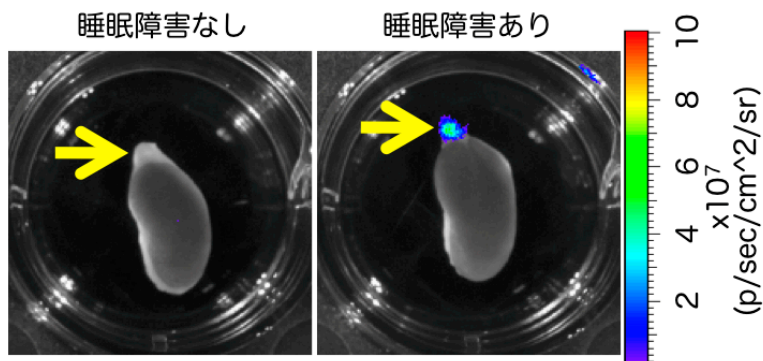
4 細胞ストレス応答の解析から迫る疲労メカニズム	岩脇 隆夫
---------------------------------	--------------

【目的】「疲労」は「発熱」や「痛み」と共に生体 3 大アラームと言われ、私たちの生命や健康を維持する上でカラダが発する重要なシグナルである。しかしその研究と理解は発熱や痛みに比べて遅れており、科学が進んだ現代でも疲労の実態は掴めていない。そこで本研究では疲労が生じる際や疲労が回復する際のカラダの仕組みを分子生物学および細胞生物学のレベルで解明することに目標を定めている。特に細胞ストレス応答で機能する分子や細胞の働きと疲労との関連性に着眼して研究を進めている。細胞ストレス応答や炎症反応は生体内で生じる異常からカラダを守るために生き物が有する防御反応であり、疲労と密接な関係にあっても不思議ではないと考えている。また重要なのは、この研究から明らかになることが単に基礎的な生命科学へ貢献するだけでなく、疲労が生む社会問題（健康障害から事故・自殺に至るまで）に対する解決への新たな糸口になる可能性を十分に含んでいることである。

【方法】疲労負荷の手段として睡眠障害モデルを採用した。具体的には回転カゴを利用した専用の装置でマウスを飼育して安定した睡眠を妨害した。解析対象のマウスは以下の 3 種類（ERAI-LUC マウス、OKD48-LUC マウス、および UMAI-LUC マウス）とした。睡眠障害に曝されたマウスおよび曝されなかったマウス（対照群）を生体イメージング解析にかけた。さらに同マウスから摘出した臓器から RNA を抽出して細胞ストレス応答遺伝子群の発現変化を定量的 PCR 解析にて評価した。

【結果】採用した装置による睡眠障害は概ね期待通りに機能して、マウスが本来なら寝ている時間帯にも起きていることが確認できた。生体イメージング解析では睡眠障害により副腎の小胞体ストレス応答および統合ストレス応答が活性化されることを見出すことができた。定量的 PCR 解析からは加えて酸化ストレス応答も副腎で活性化されることを確認できた。

UMAI マウスの副腎（矢印）から得られる発光シグナル

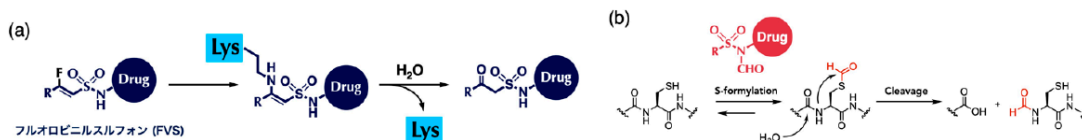


【目的】 本研究の目的は、共有結合阻害剤（コバレントドラッグ）に有用な新しい有機反応化学を開拓し、これを活用して標的選択性に優れたコバレントドラッグの創出に貢献する事である。特に本研究では、これまでにない反応阻害様式を実現できるコバレントドラッグの創薬有機化学を提案し実証する。さらに、これらの反応化学を取り入れた薬剤分子設計に基づいて、副作用のない安全性の高いコバレントドラッグの創出を目指す。

【方法】 我々は、コバレントドラッグの創薬有機化学の確立を目指し、従来のコバレントドラッグとは異なる新しい反応化学（阻害モード）を提案、これを実現できる一連の反応化学の開発を進めている。本研究では、① 可逆反応性を持つ新しい反応基の開発と創薬応用、② 標的タンパク質を切断するコバレントドラッグの開発を目指して研究を進め、コバレントドラッグのための新しい反応化学の拡大を目指した。①については、リジン残基に対して可逆反応性を持つ反応基としてフルオロビニルスルホン（FVS）基を用いた反応化学の検討、②についてはシステイン残基のホルミル化によるタンパク質主鎖の切断反応について検討を進めた。

【結果】 ① リジン残基に対して可逆反応性を持つ新しい反応基の開発と創薬応用：リジン残基を標的とした可逆的反応基としてβ-フルオロビニルスルホン（FVS）の検討を行った。FVS 誘導体の *N*-アセチルリジンに対する反応性評価を行ったところ、スルホニル基のβ位の置換基が反応性に影響を与えることが確認された。また、これらのアミン付加体は、中性水溶液中では2時間ほどで付加体が加水分解される可逆性を示す事を明らかとした。次に上皮成長因子受容体（EGFR）のATP結合ポケット内に存在するLys745を狙ったEGFR阻害剤の開発を試みた。既存のEGFR阻害剤であるerlotinibの骨格を鋳型にFVS基を導入したプローブを設計し、C797S変異型EGFRと反応させたところラベル化反応が進行したことが確認された。さらにFVSの適用範囲の拡大を目的として、親水環境にあるリジン残基（K58）を有するヒートショックプロテイン90（Hsp90）を標的したFVS基を有するコバレントリガンドをデザインした。その結果、細胞内でFVSプローブがHsp90と共有結合を形成することをgel-based ABPPを用いて明らかとした。② システイン残基のホルミル化によるタンパク質主鎖切断法の開発：本研究では、ペプチド鎖の切断反応を簡便に評価する蛍光アッセイ法を構築して、システイン残基を修飾するアシル化剤を用いて切断効率を評価した。その結果、システイン残基のホルミル化が効率よくタンパク質のアミド結合を切断することを見出した。ペプチド配列については、アスパラギン酸（Asp）やアスパラギン（Asn）を有するDCやNC配列でS-ホルミル化後の切断反応の効率が大きく向上することを明らかにした。また、S-ホルミル化分子の構造について検討を行った結果、ホルミル基周辺に嵩高い置換基を導入することで、高い水中安定性とシステイン選択性を示すS-ホルミル化分子を見出す事に成功した。次にシステインを有するペプチドタグを融合したMBPタンパク質に対して、S-ホルミル化分子を有する亜鉛錯体プローブを用いた切断を検討した。その結果、ペプチドタグと亜鉛錯体プローブとの相互作用に依存して、低濃度（25 μM）のプローブ添加を用いて効率よくペプチドタグが切断されることを明らかとした。本研究により見出したシステインホルミル化による切断反応は、触媒量の試薬、穏やかな中性、室温条件で進行する生体適合性の高い新たな反応である。

(a) FVS 基によるタンパク質リジンの可逆的ラベル化、(b) システイン残基ホルミル化によるタンパク質切断反応

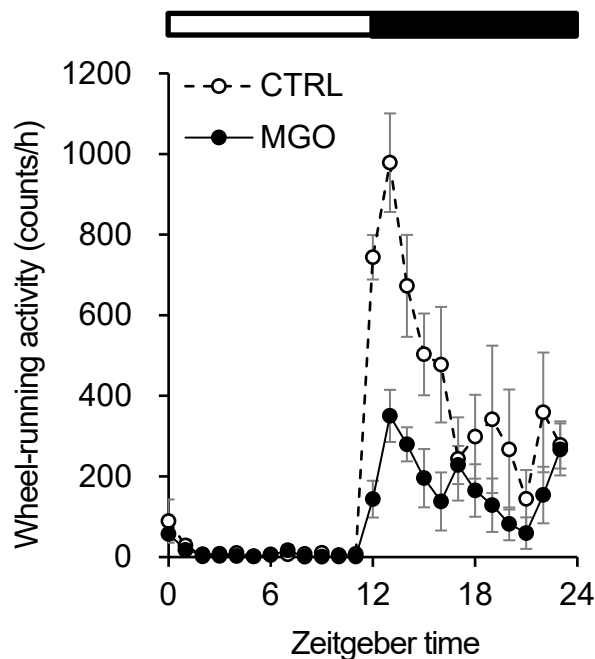


【目的】 高齢者では、睡眠覚醒リズムの乱れのみならず、深部体温や血圧などの様々な生体リズムの乱れが頻繁に認められる。本研究では、加齢に伴う睡眠障害や生体リズムの乱れのメカニズムを明らかにするために、認知症や血管障害などの加齢性疾患との関連性が指摘されている糖化ストレスに着目し、糖化最終生成物 (AGEs) の中枢神経系への蓄積が、睡眠や体内時計システムに与える影響について、培養神経細胞やモデルマウスを用いた解析により明らかにする。さらに、哺乳類と類似した体内時計システムを有し、加齢に伴う生体リズムの減衰も認められるショウジョウバエを用いた解析により、糖化ストレスが生体リズムに与える影響について、種を超えた普遍的な制御メカニズムを明らかにすることを目的とした。

【方法】 培養神経脂肪を用いた解析では、PER2::LUC マウスの胎仔脳由来の神経前駆細胞を *in vitro* で分化誘導し、培地へのメチルグリオキサール (MGO) 代謝酵素 GLO1 の阻害剤 S-p-ブロモベンジルグルタチオンシクロペンチルジエステル (BBGC) の添加により糖化ストレスを負荷し、リアルタイム発光検出システムを用いて時計分子 PER2 の発現リズムに与える影響を調べた。マウスを用いた解析では、MGO を飲水投与し、活動リズムや睡眠脳波に与える影響を調べた。ショウジョウバエを用いた解析では、飼料用寒天に MGO を添加し、活動リズムと睡眠覚醒リズムを調べた。

【結果】 PER2::LUC マウス由来の神経細胞を使った解析では、BBGC の培地への添加により、発光周期の短縮と振幅の減少が認められた。マウスに対する慢性的な MGO の投与では、暗期 (活動期) の活動量が顕著に低下するとともに、覚醒時間の減少とノンレム睡眠時間の増加が認められた。明期 (非活動期) においては、明期前半の覚醒時間の増加とレム睡眠時間及びノンレム睡眠時間の減少が認められた。ショウジョウバエの活動リズム及び睡眠リズムへの MGO 投与の影響においては、明期前半の活動期 (モーニングピーク) の活動量が増加するとともに、明期中期の睡眠 (昼寝) への移行が顕著に遅れており、明期後半の活動期 (イブニングピーク) における睡眠時間の減少が抑制されていた。MGO の投与は、マウスやショウジョウバエにおいて、活動リズムや睡眠覚醒リズムに影響する可能性が示されたが、MGO には糖化ストレス以外にも多様な作用が知られており、さらなるメカニズムの解明が必要である。

マウスの活動リズムに与える MGO 投与の影響



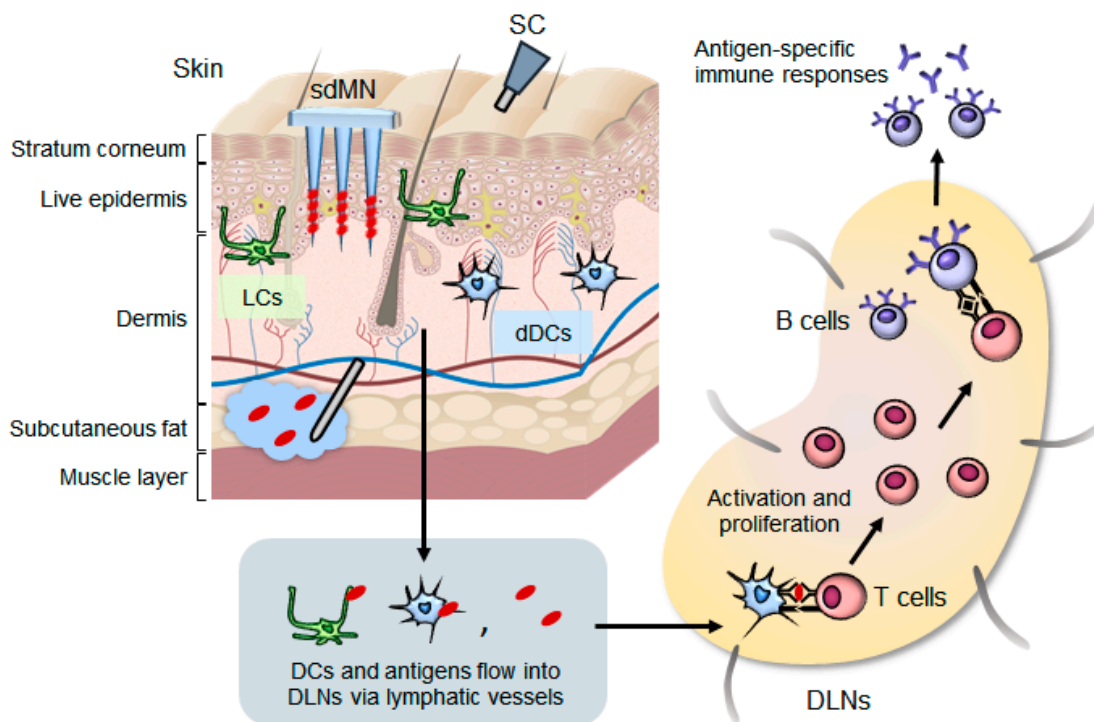
8 皮膚を標的とする免疫制御技術の開発	岡田 直貴
----------------------------	--------------

【目的】 皮膚は、生体を外界環境から隔離・保護し、生体の水分保持や体温調節、外来異物の侵入防御など生命維持に必要な不可欠な機能を司っている。角質層下の生きた表皮や真皮には、免疫学的バリアを構築するランゲルハンス細胞や真皮樹状細胞といった多種多彩な抗原提示細胞が存在しており、外来異物に対する生体防御機構において重要な役割を担っている。さらに、生きた表皮を構成する細胞の 90%以上を占めるケラチノサイトは、異物の侵入を感知してサイトカイン・ケモカインなどの炎症メディエーターを産生し自然免疫応答の誘導に関わっている。我々は、これらの免疫担当細胞により形成される皮膚免疫システムを利用した経皮ワクチン製剤の開発を推進してきた。独自の自己溶解型マイクロニードルパッチ (sdMN) を用いた経皮ワクチン製剤は、従来の注射型ワクチン製剤と比較して抗原特異的免疫応答の誘導に優れており (Dose-sparing effect)、皮膚表層に抗原を投与する経皮ワクチン製剤には従来の注射型ワクチン製剤とは異なる特有の免疫応答誘導機序が存在することを想起させた。そこで本研究では、経皮ワクチン製剤の有効性・安全性に対する理論的・科学的根拠に資する情報収集として経皮免疫誘導機序の解明に取り組んだ。

【方法】 マウスに Ovalbumin (OVA) 装填 sdMN による経皮投与あるいは OVA 溶液の皮下投与を施し、誘導される血清中 OVA 特異的抗体価を ELISA により測定した。また、マウスに sdMN 貼付、皮内注射、または皮下注射を施し、適用部位の皮膚組織について、病理組織学的解析および遺伝子発現変動解析を実施した。さらに、各種投与経路により抗原接種したマウスにおける抗原提示細胞ならびに抗原特異的 T 細胞の挙動・活性化に関する免疫学的解析を行った。

【結果】 sdMN を貼付した皮膚局所では、穿刺に伴う物理的な刺激によって炎症性サイトカインや Alarmin の遺伝子発現レベルが顕著に増大しており、これに伴って皮膚常在性樹状細胞の所属リンパ節への遊走が亢進し、抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞が強力に感作・活性化されることを明らかとした。さらに、sdMN による経皮抗原送達は、皮下注射投与と比較して所属リンパ節における抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞のメモリー T 細胞への分化や胚中心形成を高めることも明らかとし、これら一連の免疫イベントによる B 細胞の活性化および抗体産生細胞への分化の促進が経皮ワクチン製剤の優れた抗原特異的抗体産生につながったと結論付けた。

sdMN を用いた経皮ワクチン製剤による免疫誘導機序予測

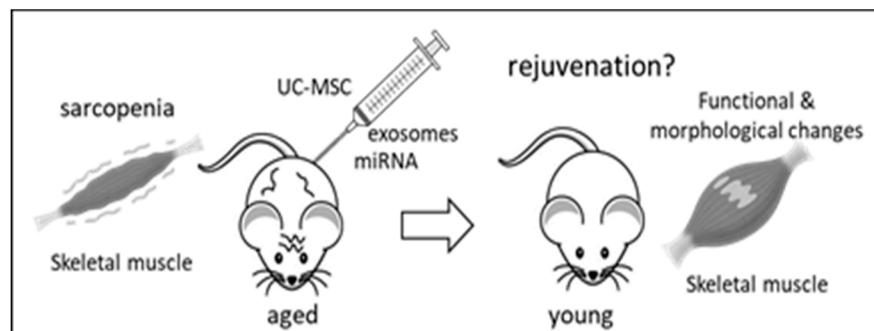


【目的】サルコペニアとは、加齢に伴い骨格筋の量や筋力・機能が低下した状態を指し、高齢者のフレイル状態や、転倒・骨折、インスリン抵抗性とも関連し、超高齢社会に突入している我が国でも大変注目されている疾病概念である。一方で、この加齢性サルコペニアへの介入方法としては、運動（特にレジスタンス運動）、栄養介入、特にたんぱく質強化以外に、今のところ効果的な薬物療法は確立されていない。近年、様々な組織由来の間葉系幹細胞（Mesenchymal Stem Cells : MSCs）による種々の治療法の開発が進んでいるが、加齢性サルコペニアへの効果は不明である。本研究の目的はサルコペニアをターゲットとして、臍帯由来間葉系幹細胞臍帯由来の MSCs（umbilical cord-derived mesenchymal stem cells : UC-MSCs）さらにはその細胞由来の exosome を含む液性因子が老化を制御し、サルコペニアを抑制できるかどうかを老化促進マウス（SAMP10）を使用して検討する。

【方法】老化促進マウス（Senescence-Accelerated Mouse : SAM）prone 10（SAMP10）24 週齢の尾静脈より passage 4 の UC-MSCs、または UC-MSCs から得られた exosomes を注入した。対照として PBS を同量投与した。36 週齢時に両側下肢組織ならびに血清を採取し、以後の実験に使用した。経過中 4 週間ごとにマウス下肢筋力ならびに持久力を小動物用握力測定器ならびに小動物用トレッドミルで評価した。筋肉組織の以下のタンパク質を Western blotting 法を用いて定量化し、筋組織内の以下の mRNA を RT-PCR 法を用いて定量化した。対照ならびに実験群の骨格筋を以下の免疫組織染色、透過型電顕観察（特にミトコンドリア形態観察）を実施した。a) H&E 染色、b) CD45、c) CD68、d) TUNEL 染色、e) Masson's trichrome 染色、f) laminin & desmin 二重染色を実施した。さらに筋肉組織のミトコンドリアのサイズならびに数を評価するために×15,000 での電子顕微鏡下の評価を実施した。

【結果】加齢性サルコペニアのモデルとして使用した SAMP10 マウスの加齢に伴う四肢骨格筋の萎縮ならびに筋力や持久力などの身体機能の低下が UC-MSCs 投与により改善することを示した。UC-MSCs の投与により、骨格筋における AMPK/Sirt1 シグナルの活性化および Akt/mTOR を介する筋タンパク質の合成促進を観察した。同様に UC-MSCs はミトコンドリアの機能不全を抑制し、実際筋組織におけるミトコンドリアの biogenesis に重要な役割を果たす PGC1- α の発現を亢進させた。さらに UC-MSCs 投与により酸化ストレス産生の重要な酵素である gp91phox の発現を低下させ、筋肉における TNF- α や MCP-1 などの炎症性サイトカインの発現を抑制し、筋肉内のマクロファージの浸潤を抑制していた。Exosomes の尾静脈を介する投与も UC-MSCs とほぼ同様な効果を認めたことより UC-MSCs のパラクライン作用により SAMP10 のサルコペニアを抑制したと考えられた。

加齢性サルコペニアに対する臍帯由来間葉系幹細胞治療の可能性



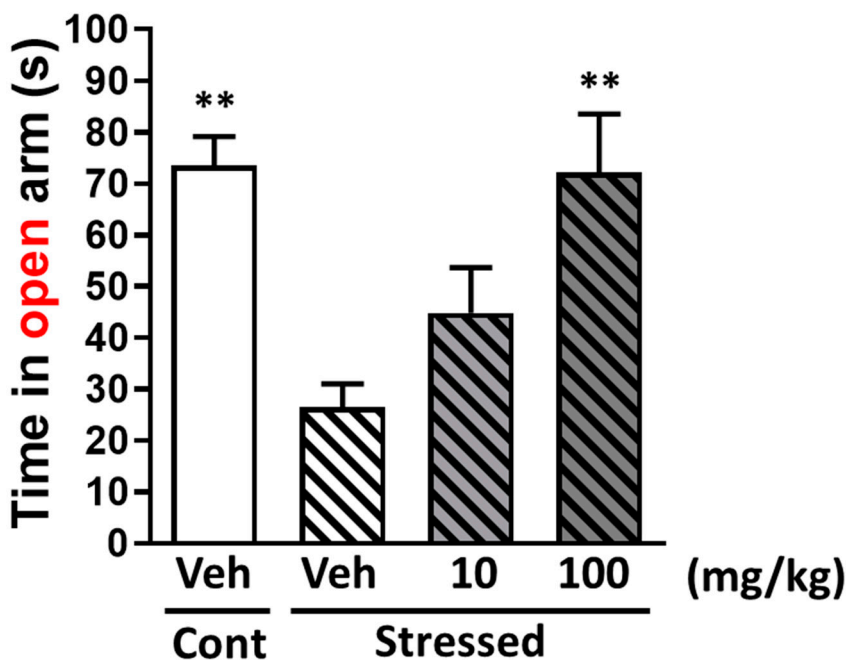
10	神経回路網再構築を介した根本的不安障害治療法の確立	久保山 友晴
----	---------------------------	--------

【目的】 不安障害の治療には、ストレス要因の除去と共に、選択的セロトニン再取り込み阻害薬や、ベンゾジアゼピン系薬物が用いられるが、難治性の患者が一定数存在する。私は、不安障害では軸索や樹状突起の萎縮による神経回路網の破綻が生じ、器質的な要因により脳機能に障害が生じるのではないかと仮説を立てた。もしそうだとすれば、既存の抗不安薬は、モノアミンの量を増やしたり GABA 受容体を刺激したりするシナプス機能調節を目的としたものであるため、もし器質的障害が生じていた場合は、一時的に症状を改善させたとしても、根本的に治療することが困難となっている可能性がある。そこで軸索や樹状突起を伸長させ、神経回路網を再構築することができれば、脳機能が回復し、根本的に不安障害を治療できるのではないかと考えた。本研究は、この仮説を証明することを目的とした。

【方法】 初代培養神経細胞に生薬 X エキスを処置し、軸索・樹状突起伸長作用を検証した。また、新規不安障害モデルマウスを作製し、フルオキセチンおよび生薬 X エキスの作用を検証した。さらに、生薬 X エキス投与後のマウスの脳組織を解析し、軸索密度が変化したかどうか、検証した。

【結果】 生薬 X エキスは、初代培養神経細胞において、軸索・樹状突起伸長作用を示した。私は新規ストレス負荷を考案し、本ストレスをマウスに 14 日間負荷したところ、不安様行動を示した。本不安様行動は、選択的セロトニン再取り込み阻害薬・フルオキセチンでは改善しなかった。一方、生薬 X エキス投与により、本不安様行動は改善した。さらに組織解析を行った結果、生薬 X エキス投与により前辺縁皮質において軸索密度が増加する傾向が見られた。以上のことから生薬 X エキスは、軸索伸長を誘発して神経回路網を再構築し、抗不安作用を示したと考えられた。今後生薬 X が軸索・樹状突起を伸長する機序を明らかにし、その機序を阻害した時に抗不安作用が消失するのかどうかを検証する予定である。これにより、神経回路網再構築による不安障害治療の可能性を示したい。

生薬 X エキスによる抗不安作用



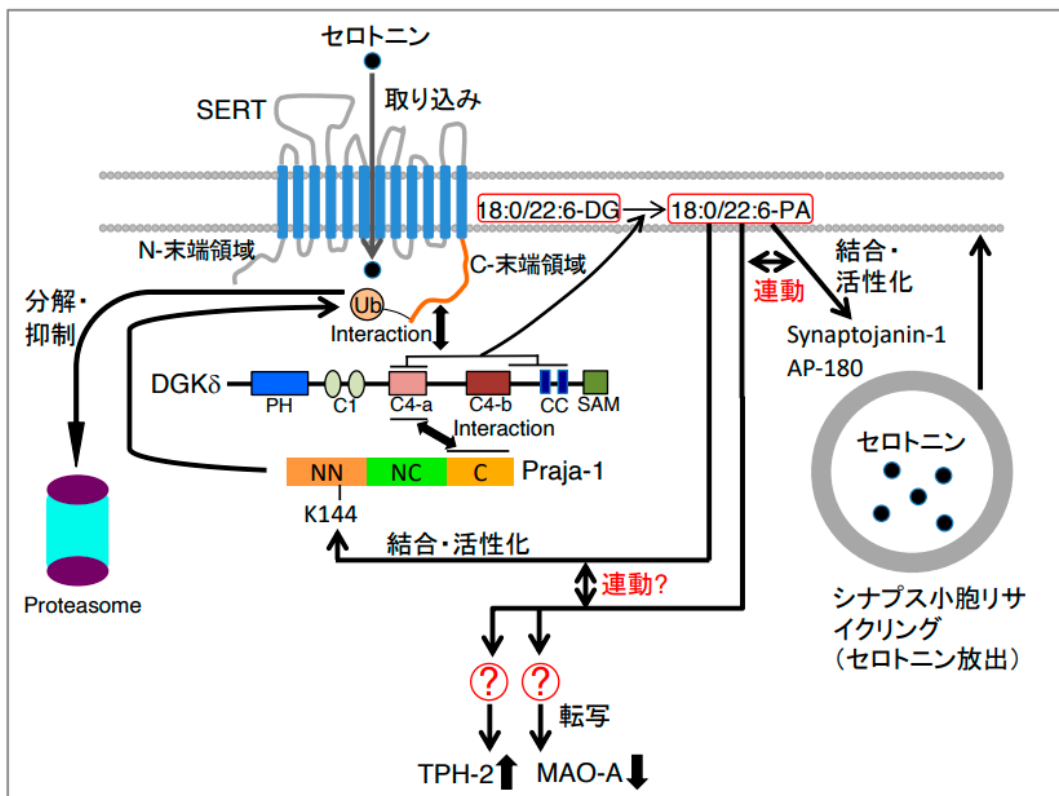
11 ドコサヘキサエン酸が脳機能を改善する新奇メカニズム 坂根 郁夫

【目的】 長年ドコサヘキサエン酸 (DHA、22:6) の摂取が不安やうつ、認知症に効果があるとされているが、そのメカニズムは未だハッキリしていない。我々は最近、その効果が DHA そのものではなく、DHA を取り込んだホスファチジン酸 (18:0/22:6-PA) がセロトニントランスポーター (SERT) を分解する新奇経路を介することを示した (下図)。しかし、その分子メカニズムは未だ不明な点が多いので明らかにすることを試みた。

【方法】 免疫沈降法やリボソーム沈降法を用いて、蛋白質 - 蛋白質相互作用、及び、蛋白質 - 脂質相互作用を検出した。

【結果】 18:0/22:6-PA と結合して活性化する SERT ユビキチン (Ub) 化酵素 Praja-1 は、18:0/22:6-PA と N 末領域 (NN) で相互作用すること、更に、その中の Lys144 が結合に重要であることが明らかになった (下図)。また、Praja-1 は 18:0/22:6-PA 産生酵素ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) δ と C 末領域 (C) で結合することが分かった。また、DGK δ は主に N 末側の触媒領域 (C4-a) が Praja-1 と結合することが分かった (下図)。18:0/22:6-PA はシナプス小胞リサイクリングに関与する Synaptojanin-1 (SYNJ1) と強く結合して、D4-phosphatase 活性を選択的に亢進した (下図)。18:0/22:6-PA はやはりシナプス小胞リサイクリングに関与する Clathrin coat assembly protein AP180 にも強く結合し、AP180 と clathrin との相互作用を阻害した (下図)。以上より、今回、DGK δ -18:0/22:6-PA による SERT の分解促進 (セロトニンのシナプス間隙からの取り込み阻害) の分子機構の理解を一步進めることができ、また、DGK δ -18:0/22:6-PA がシナプス小胞のリサイクリング (セロトニン放出) も連動して亢進している可能性も示した (下図)。

DGK δ -18:0/22:6-PA による serotonin 再取り込み・合成・分解とシナプス顆粒リサイクリングの連動制御

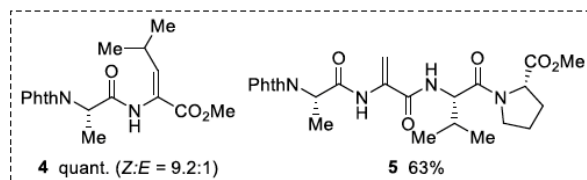
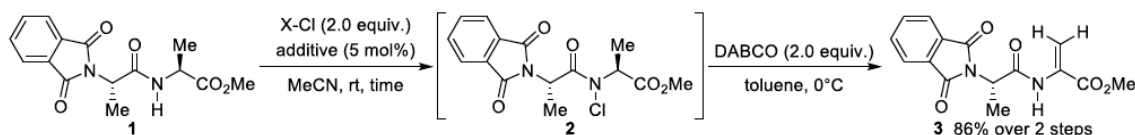


【目的】 α, β -デヒドロアミノ酸 (Δ AA) は天然にも広く見られる非タンパク質構成アミノ酸の一種である。その剛直な構造がペプチド鎖に安定性や活性の変化をもたらすだけでなく、 Δ AA を足掛かりにしたペプチドの化学修飾法も数多く報告されているため、そのペプチド鎖への Δ AA の効率的な導入法の開発は重要な研究課題である。 Δ AA が連結部位となるペプチド縮合はその低反応性と基質の分解が問題となるため、ペプチド鎖の構築後に Δ AA 部位を構築するのが一般的であるが、 Δ AA に簡便に変換可能なアミノ酸残基をあらかじめ導入しておく必要がある。また、近年では Δ AA の構築を伴うペプチドカップリングによる多置換 Δ AA の立体選択的合成等も報告されているが、いずれも特殊なアミノ酸・ペプチドユニットを調製する必要があり、ペプチド中の単純なアミノ酸残基を利用できる Δ AA の構築法はこれまで皆無であった。

【方法】 そこで、筆者らはペプチド鎖中の単純なアミノ酸残基を変換できる手法の開発に着手し、その中でペプチド鎖に普遍的に存在する第二級アミド構造に着目した。すなわち、ペプチド主鎖のアミドに対して *N*-クロロ化を行い、その後適切な塩基を作用させることで、単純なアミノ酸残基を利用できる一般性の高いペプチド鎖への Δ AA 導入法となるのではないかと考えた。

【結果】 単純な基質のアミド *N*-クロロ化で良好な結果を与えることが報告されている TCCA や t BuOCl は、ペプチドに適用するには反応活性が不十分で、低変換率に留まった (下図 entries 1 and 2)。そこで種々検討した結果、求電子的クロロ化剤に触媒量のキヌクリジンを追加することで、極めて短時間かつ高収率でペプチド主鎖アミドも *N*-クロロ化できることを新たに見出した (entry 4)。なお、得られた *N*-クロロペプチドはカラム精製や長期保存に耐える程度に安定であった。さらに *N*-クロロ化体に対して適切な塩基を作用させることで、対応する Δ AA 含有ペプチドを高収率で得ることも成功した。本反応は温和かつ短時間で進行し、種々の官能基を含む幅広いペプチドに適用可能であり、ペプチド内の任意の側鎖を Δ AA に変換できた (4, 5)。さらに本法により大環状構造を有する生物活性ペプチドや医薬品ペプチドへの Δ AA 導入にも成功した。

N-クロロ化を経由したデヒドロアミノ酸 (Δ AA) モチーフの合成



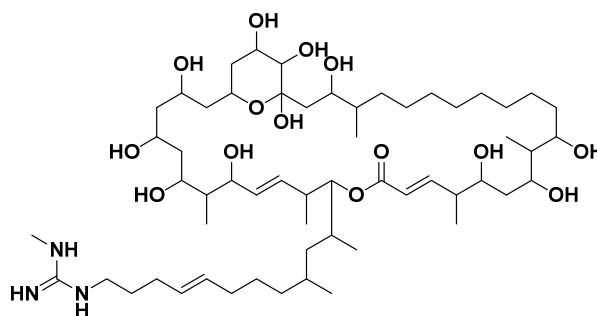
entry	X-Cl	additive	time (h)	yield of 2 (%) ^a	rsm (%) ^a
1	TCCA	-	3	15	81
2	t BuOCl	-	3	0	97
3	t BuOCl	pyridine	1	20	81
4	t BuOCl	quinuclidine	1	92	0

^aNMR yield.

【目的】非結核性抗酸菌 (NTM) 症は、結核菌以外の抗酸菌により引き起こされる感染症であり、近年世界的にその蔓延が問題となっている。NTM 症のうち、肺に感染した肺 NTM 症がその 80% を占め、重症化しやすく、10 年生存率は 20~50% 程度である。現在 NTM 症は、公衆衛生上重要なアンメットメディカルニーズの高い感染症として認識されている。NTM 症治療には、リファンピシン (RFP)、クラリスロマイシン (CAM)、エタンブトール (EB) など既存の抗結核薬による多剤併用療法がとられているが、1 年以上の長期投与の必要性、低い治療効果、また耐性菌出現頻度の増加から、世界レベルで新たな治療薬の開発が求められている。そこで我々は微生物培養液から新規 NTM 症治療薬候補の発見を目的に、スクリーニングの実施及び、以前に発見した創薬シーズである新規 OPMA 物質の各種評価を行った。

【方法】スクリーニングでは NTM の中で最も患者数の多い MAC 症起因菌 (*Mycobacterium avium* と *M. intracellulare*, MAC 症はこれらの複合感染で起こる) と最も毒性の強い *M. abscessus* の 3 種を検定菌とした評価系を用い、放線菌及び真菌の微生物培養液より、抗酸菌症原因菌に対して抗菌活性を示すサンプルを探索した。放線菌の生産する新規 OPMA 物質に関しては、全合成及び半合成による OPMA 類縁体を作製した。また、培養開始時に放射標識前駆体である^[3H]チミジン、^[3H]ウリジン、^[3H]ロイシンおよび^[3H]N-アセチルグルコサミンを与え、それぞれの高分子画分、すなわち、DNA、RNA、タンパク質および細胞壁への取り込みに対する OPMA の影響を調べた。さらに、ビオチン標識化した OPMA を半合成し、NTM より調製した抽出液に混合し、標識体をアビジンビーズで回収することにより、結合するタンパク質を検出し、その中から特異的に結合するタンパク質を LC-MS/MS 解析により特定した。加えて、遺伝学的アプローチとして、OPMA に対する抗酸菌耐性株を取得し、ゲノム上の変異部位を特定した。

【結果】放線菌培養液 2,528 サンプル及び真菌培養液 1,356 サンプル、合計 3,884 サンプルをスクリーニングし、NTM に選択的な抗菌活性を示し、RFP、CAM 及び EB に耐性な *M. avium* に対しても抗菌活性を示したサンプルは 37 サンプルであった。放線菌からは *nicrophorusamide A* や *toyocamycin* 等の既知化合物の他、新規物質として *kimidinomycin* と命名した 38 員環マクロライド系抗生物質を 1 成分取得した (下図)。真菌からは既知化合物 *helvolic acid* の他、新規性の高い物質を 1 成分取得した。研究分担者の長光らにより OPMA の全合成を達成した。確立した合成法や半合成を利用し OPMA 類縁体を 8 成分取得したが、天然物である OPMA が最も優れた活性を示した。放射標識前駆体の取り込みに対する影響を評価した結果、OPMA は^[3H]チミジンおよび^[3H]ロイシンの取り込みを強力に阻害したことから、DNA 及びタンパク質合成に影響を与えていることが示された。ビオチン標識化 OPMA を用いたプルダウンアッセイの結果、特異的に結合するタンパク質として 4 種を同定した。遺伝学的アプローチでは、OPMA 耐性菌として 3 株取得することができた。これら耐性菌すべてに共通して変異していた遺伝子を 1 種同定した。以上 2 種の作用点の解析から、複数の作用点が存在することが推定された。この点は DNA とタンパク質の合成を阻害することを説明するものと考えている。

新規抗 MAC 化合物 *kimidinomycin* の平面構造

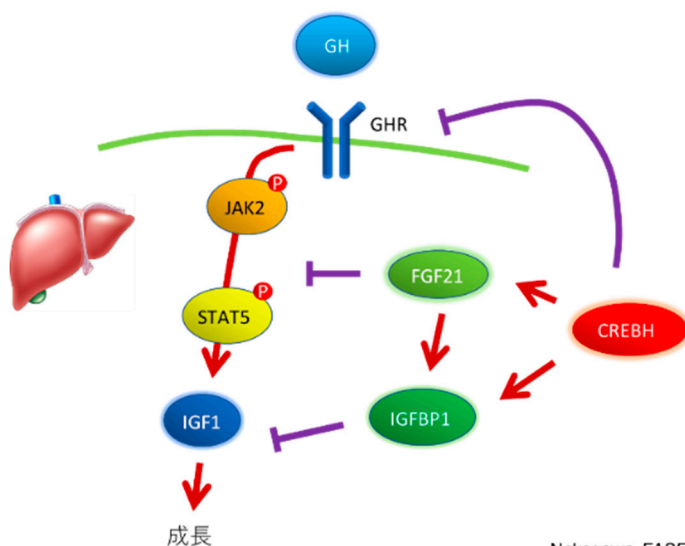
14 栄養代謝異常から肝がん発症を繋ぐ栄養応答性制御因子	中川 嘉
------------------------------	------

【目的】 CREBH が肝臓、小腸で栄養代謝を制御し、生活習慣病に大きく関連することが明らかになっているが、そのメカニズムについては詳細な研究がなされてきていなかった。本課題ではそのメカニズムを解析することを目的とし、解析に必要な遺伝子改変マウスを作製するとともに、*CREBHKO* マウスに MCD 食を負荷した際に見られる異常な肝障害の発症メカニズムについて網羅的解析を行った。

【方法】 1. 組織特異的 *CREBH* 過剰発現マウスの作製：Cre-LoxP システムで *CREBH* を過剰発現する *CREBH^{flox}* Tg マウスを作製した。得られたマウスと肝臓特異的 Cre Tg (Albumin Cre Tg) マウスと交配し、肝臓特異的 *CREBH* 過剰発現 (*CREBHL-Tg*) マウスを作製した。生後 1 か月のマウスを解析した。2. *CREBHKO* マウスへの MCD 食負荷実験：8 週齢 *CREBHKO* マウスに 8 週間、MCD 食を負荷し、経時的 (1、4、8 週) に肝臓を摘出し、サンプリングした。肝臓から mRNA を抽出し、網羅的に遺伝子発現を解析した。

【結果】 1. 肝臓特異的 *CREBH* 過剰発現マウスは成長ホルモン抵抗性により成長遅延を呈した：肝臓特異的 *CREBH* Tg (*CREBHL-Tg*) マウスは生後 1 か月の離乳期にすでに体長、体重がコントロール (flox) マウスと比べ、著しく低値を示した。血中成長ホルモン (GH) 値は異常高値を、血中 IGF1 値は異常低値を示し、明らかな成長ホルモン抵抗性を示した。また、FGF21 は高値を示した。肝臓では成長ホルモン受容体 (GHR) の低下に伴い、その下流分子である JAK2、STAT5 活性がともに低下し、GH シグナルが低下していた。その結果、IGF1 を含む STAT5 の標的遺伝子の発現も低下し、成長遅延を助長したと考えられた。FGF21 は成長遅延を引き起こすため、*CREBHL-Tg* マウスと *FGF21* KO マウスを交配し、*FGF21 CREBHL-Tg* マウスを作製したところ、このマウスでも成長遅延が生じた。したがって、CREBH は FGF21 に依存しない GH シグナル抑制が成長遅延を引き起こすことを明らかにした。CREBH は栄養代謝とともに、個体成長を制御することを新たに明らかにした。2. *CREBH* 欠損による肝障害：*CREBH* KO マウスにメチオニン・コリン欠損 (MCD) 食を負荷すると異常なまでの肝障害を生じる。MCD 食負荷 1 週間で GO 解析から *CREBHKO* マウスでは脂質代謝とサーカディアンリズムに関連する遺伝子群が特に変動した。MCD 食負荷 8 週間では脂質代謝とともに酸化還元のプロセスに関連する遺伝子群も変動した。*CREBHKO* マウスでは炎症性サイトカイン *Lcn2*、鉄代謝異常が引き起こす細胞死 (フェロトーシス) を誘導する遺伝子群の発現が促進し、酸化還元に関与する *Ak2* は低下した。*CREBH* 欠損による病態悪化に、鉄代謝異常が引き起こす酸化還元、フェロトーシスが原因であることを見出した。

栄養代謝と成長を繋ぐ分子として CREBH を同定

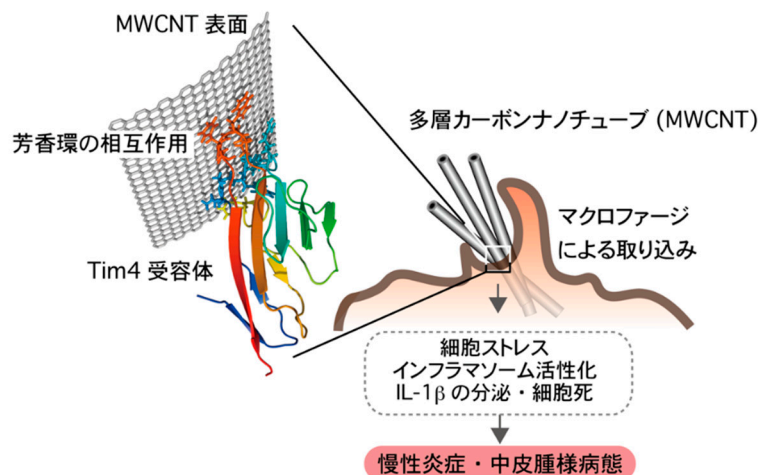


【目的】PM2.5 や排出ガスといった大気汚染物質の曝露による健康被害は国際的な社会問題となっているが、その詳細な機序は良く判っていない。環境微粒子の主成分はシリカ（二酸化珪素）および炭素であるが、それが生体内に入るとマクロファージなどの食食細胞に取り込まれる。最近の国内外の研究から一部の結晶粒子を食食したマクロファージでは炎症性細胞死（パイロトーシス）と NLRP3 インフラマソームの活性化が起きることが判ってきた。しかしながら、なぜマクロファージが細胞表面上で結晶粒子をこれほど効率よく認識するのか未だによく判っていない。我々はこれまでにシリカ受容体としてクラス B スカベンジャー受容体 SR-B1 を同定してきたが、SR-B1 は炭素微粒子を認識しないことも判明した。そこで本研究ではマクロファージによる炭素微粒子の認識機構を解析した。

【方法】炭素微粒子を認識する受容体の探索として、マウス線維芽細胞株 NIH-3T3 に種々のマクロファージ受容体の遺伝子を導入し、カーボンブラックナノ粒子（CBNP）あるいは多層カーボンナノチューブ（MWCNT）との結合能をフローサイトメトリー（FACS）による側方散乱光強度解析により測定した。マクロファージ細胞レベルでの MWCNT 毒性評価として、C57BL/6 マウス腹腔マクロファージによる炭素微粒子の認識能および IL-1 β 分泌をそれぞれ FACS および ELISA で測定した。マウス個体レベルでの MWCNT 毒性評価として、C57BL/6 マウス腹腔内に MWCNT を投与し、その 7 日後の横隔膜腹腔側中皮細胞層の肉芽腫病態を観察した。同定した炭素微粒子受容体 T cell mucin immunoglobulin (Tim) 4 の機能解析には、抗マウス Tim4 中和モノクローナル抗体 RMT4-54 を用いた。

【結果】スカベンジャー受容体、C 型レクチン、Fc 受容体、補体受容体、ホスファチジルセリン（PS）受容体といったマウスマクロファージ受容体の炭素微粒子（球状構造を示す CBNP と針状構造を示す MWCNT）の認識能を解析した結果、とりわけ PS 受容体の Tim4 がいずれの炭素微粒子も効率よく認識することが判明した。さらに Tim4 変異体を用いた解析から、Tim4 の細胞外領域 IgV ドメインに存在する芳香属アミノ酸クラスターが炭素微粒子との結合に必須であることが判明した。その一方で Tim4 は炭素を含まないアスベストは認識しなかった。これらの結果は、Tim4 は炭素微粒子受容体として機能し、その認識様式は、PS 認識様式とは異なり π - π 相互作用が重要であることを示唆する。RMT4-54 を用いた *in vitro* および *in vivo* 実験から、C57BL/6 マウス腹腔マクロファージは Tim4 を介して MWCNT を食食し、リソソーム障害を介して IL-1 β の分泌を誘導し、その結果、横隔膜の腹腔側の中皮細胞層に肉芽腫形成を起こすことが判明した。一方、CBNP も Tim4 を介してマクロファージに食食されるが、リソソーム障害が起きないため炎症を惹起しないことが判明した。これらの結果は、マクロファージは Tim4 を介して炭素微粒子を食食するが、その炎症応答は炭素微粒子の形状に起因することを示唆する。

Tim4 を介するマクロファージの多層カーボンナノチューブ（MWCNT）取り込み機構



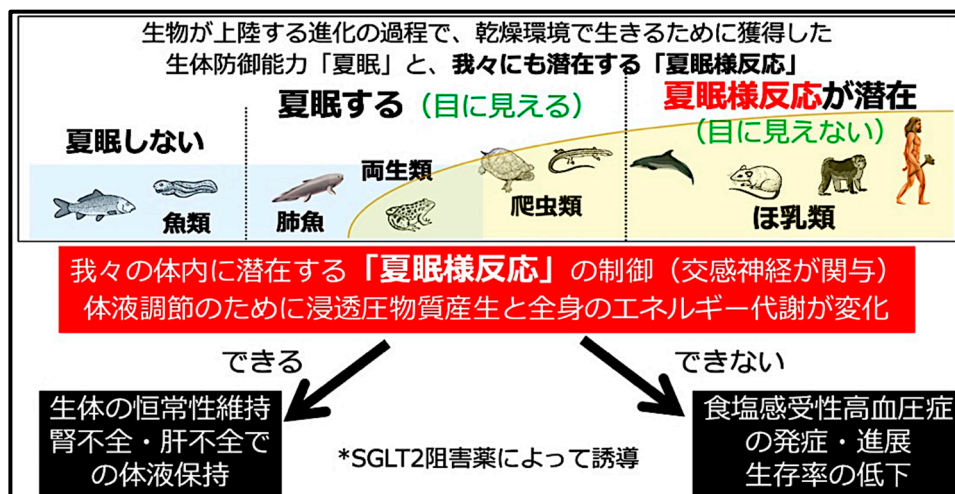
16 夏眠メカニズムの解明とその制御	西山 成
--------------------	------

【目的】 生物が水中から陸上へ移動した進化の際、水の少ない乾燥環境に適応するために「夏眠」して体液を保持する防御能力を獲得したとされている。例えば、肺魚は乾季に土中に潜り、数ヶ月から数年もの間、「夏眠」して水を全く飲まずに雨を待つ。この乾燥に対する「夏眠」と呼ばれる生体の反応は、尿素などの浸透圧物質を産生し、その浸透圧の力によって水分を保持するための「適応現象」として知られているが、これまで研究はほとんど行われていない。これに対して我々は、「夏眠」に類似した生体反応が、陸上高等動物であるマウスやヒトでも脱水に対する適応能力として保存されていることを世界で初めて発見し、これを「夏眠様反応 (aestivation-like response)」と名付けた。これらの発見に基づき、我々は生体の環境適応能力「夏眠様反応」の全容の解明を最終目的としたプロジェクトを開始しているが、本研究はその基盤となるものとして、以下の具体的な研究のテーマに対して様々な研究アプローチを用いて検証することを目的として実施された。

【方法】 1. 「夏眠様反応」の制御メカニズムの探究：ラット・マウスに高食塩投与による脱水ストレスを与え、テレメトリー法で交感神経活性を測定し、肝臓の尿素産生量とアルギナーゼの活性を指標として「夏眠様反応」をモニタリングした。別のマウスでは、両腎の交感神経の外科的切除術による影響を検討した。2. 病態における「夏眠様反応」の役割の検証：ダール食塩感受性高血圧ラットと 5/6 腎臓摘出 (Nx) による腎不全ラットと diethylnitrosamine 投与による肝不全ラットにおける「夏眠様反応」の役割を検証した。さらに、宇宙空間で飼育したマウスでの体液変化も検証した。3. 「夏眠様反応」制御法の探求：体液ロスを生じる SGLT2 阻害薬とバズプレッシン V2 受容体拮抗薬の「夏眠様反応」への影響を検証した。

【結果】 ラット・マウスに対する高食塩負荷による脱水ストレスは夏眠様反応を誘導し、交感神経活性と心拍数を有意に減少させることが実証された。また、腎神経の切除がこの反応の一部を抑制した。一方、ダール食塩感受性高血圧ラットでは夏眠様反応が誘発されず、血圧の上昇と死亡率の増加が認められた。さらに、5/6Nx 腎不全ラットや肝不全ラットでは、夏眠様反応によって体液の喪失が一部抑制されていること、宇宙空間で飼育したマウスでは体液分布が著しく変化していることが明らかとなった。一方、SGLT2 阻害薬は夏眠様反応に似た生体反応を誘導したが、バズプレッシン V2 受容体拮抗薬は影響を与えなかった。以上、本研究期間 (2020~2021 年度の約 2 年間) での研究により、夏眠様反応における交感神経活動の役割が明らかとなり、各種病態においての関与も実証された。さらに、SGLT2 阻害薬で夏眠様反応に似た生体反応が誘導されたことから、これが臨床報告されている SGLT2 阻害薬の心血管腎臓保護作用につながっている可能性も示唆された。

「夏眠様反応」について、これまでの研究で明らかになったこと

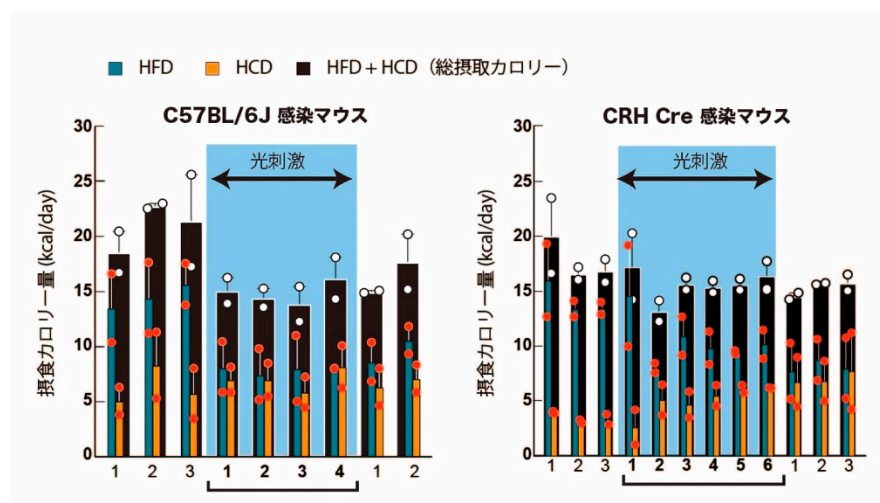


【目的】 世界人口の約 3 分の 1 が肥満もしくは過体重である現代において、肥満症として包含される一連の代謝性疾患、脳・心血管病、がんの治療に多大な医療コストが費やされている。多くの肥満者が動物性脂肪に対して強い嗜好性を示して必要量以上のカロリーを摂取し、様々な抗肥満治療を施しても改善されず、リバウンドを繰り返すケースが少なくない。本研究では、マウスの恐怖や不安制御に関わる分界条床核 (BNST) に存在するストレス応答ホルモンであるコルチコトロピン放出ホルモン (CRH) 産生ニューロン (BNST-CRH ニューロン) に着目し、マウスが動物性脂肪を摂取する度に光遺伝学的手法により時間的な遅延を伴うことなく BNST-CRH ニューロンを選択的に活性化することによって脂肪嗜好性と総摂取量を同時に抑制出来る可能性を検証した。

【方法】 1. 動物性脂肪摂取直後に BNST-CRH ニューロンを無侵襲に刺激するため、対照マウスである C57BL/6J マウスと CRH Cre ノックインマウスの BNST にチャネルロドプシン (ChR2) をコードするアデノ随伴ウイルス (AAV) を接種し、光刺激により無侵襲で随意に BNST-CRH ニューロンのみを活性化できるモデルマウスを作製した。2. 作製したモデルマウスを食嗜好性測定ケージで飼育し、ラード主体の高動物性脂肪餌 (HFD) および蔗糖主体の高炭水化物餌 (HCD) それぞれの摂取量を測定した。HFD 側に赤外線ゲートを設置し、HFD 摂食時に連動して光刺激を与え、BNST-CRH ニューロンを活性化させた。さらに、各餌へのアクセス回数、摂食時間、摂食量、嗜好性を計測した。3. HFD の摂食抑制効果を確認した後、赤外線ゲートを外し、自由摂食下における HFD 摂取量低下を確認し、脂肪嫌悪記憶の定着を検証した。

【結果】 C57BL/6J マウス BNST ニューロンに AAV ベクターを用いて ChR2 を発現させ、脂肪摂取直後に BNST ニューロンを光刺激すると、予想通り、脂肪摂取量が減少し炭水化物嗜好性が増加した。総摂取カロリー量は 20%、減少し (下図左)、行動量は約 50%、減少した。また光刺激終了後においても、脂肪摂取抑制効果は 2 日間以上持続した。そこで、CRH Cre マウスの BNST ニューロンに flox-ChR2-YFP をコードする AAV ベクターを感染させ、BNST-CRH ニューロン特異的に光刺激を施した。BNST-CRH ニューロンに限定して刺激すると、CRH Cre マウスでは光刺激による嗜好性変化は観察されたが、C57BL/6J マウスと異なり総摂取カロリー量の減少は観察されなかった (下図右)。以上の結果から、総摂取カロリー量の制御には BNST からの CRH ニューロン以外の神経連絡経路の関与が示唆された。

光刺激による食嗜好性と総接種カロリー量の変化

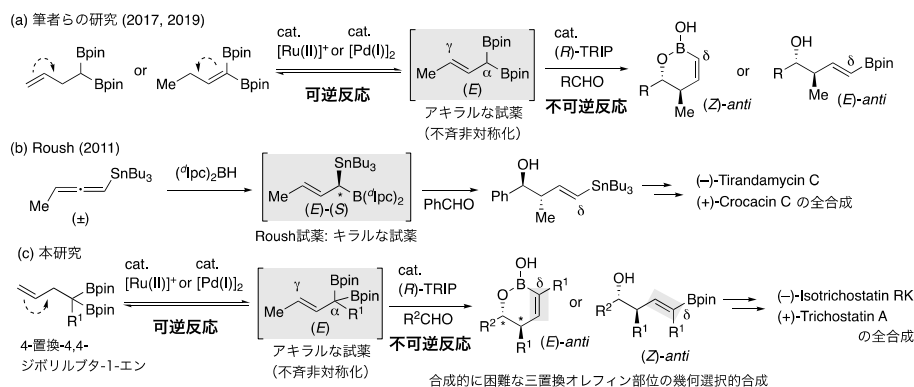


【目的】ポリケチド天然物を合成する際に、ホモアリルアルコールは重要なビルディングブロックの1つである。そのため、これらを立体選択的に合成する方法が数多く報告されている。なかでもアリルホウ素化反応は、簡便で信頼性の高い方法である。長い間、キラル補助基を持つアリルやクロチルホウ素化試薬を使用するジアステレオ選択的の反応が用いられてきたが、2010年に Antilla (米) がキラルリン酸触媒 (chiral PA) による不斉反応を報告し、エナンチオ選択的な方法も可能になっている。しかし、アリルやクロチルホウ素化試薬など原料合成法が確立されているものを除き、 α 位や γ 位に置換基を持つアリルホウ素化試薬を立体選択的に調製することは必ずしも容易ではなく、試薬の簡便な合成手法の開発が望まれている。そこで筆者は、遷移金属触媒による2重結合異性化反応を利用して、 γ 位に置換基を持つアリルホウ素化試薬を、入手容易な末端アルキンからワンポットで合成する新しい方法を開発した。さらに筆者は最近、本方法を利用して α 位にホウ素がさらに置換したアリルホウ素化試薬を調製し、次いで、キラルリン酸触媒を用いたアルデヒドとの不斉アリルホウ素化反応と結びつけること (ドミノ触媒反応化) により、ワンポットで δ 位にホウ素が置換したホモアリルアルコールが得られることを報告した。本手法 (下式 (a)) では、 α 位に置換基を持つアリルホウ素化試薬を用いた不斉反応にもかかわらず、「不斉非対称化」を利用した不斉アリルホウ素化反応であるため、Roush 試薬 (下式 (b)) のように試薬を不斉合成する必要がない。本研究では、この手法を基盤とする発展的なドミノ触媒反応を開発し、ヒストン脱アセチル化酵素の阻害作用を有し抗がん剤としての応用が期待されているポリケチド天然物「トリコスタチン A とその類縁体の網羅的合成」を行うことを目的とする。

【方法】置換ジボリルメタンと臭化アリルより簡便に調製される 4-置換-4,4-ジボリルブタ-1-エンを用いたドミノ触媒反応を開発した。これにより「3置換オレフィン部位を持ち」 δ 位にボリル基が置換したホモアリルアルコールを幾何選択的に合成することができた (下式 (c))。2重結合異性化触媒として Grotjahn 触媒 ($[\text{Ru}(\text{II})]^+$) を用いた場合、*E*体のホモアリルアルコール誘導体 (環状ボロン酸エステル) が得られた。一方、 $[\text{Pd}(\text{m-Br})(\text{P}t\text{-Bu}_3)_2]$ 触媒 ($[\text{Pd}(\text{I})_2]$) を用いた場合には、*Z*体のホモアリルアルコールが得られた。

【結果】本研究で開発したドミノ触媒反応を用いてヒストン脱アセチル化酵素阻害剤として重要な(+)-トリコスタチン A の形式全合成、さらに(+)-イソトリコスタチン酸および(-)-イソトリコスタチン RK の全合成を達成した。ポリケチド天然物には3置換オレフィン部位を持つものが数多くある。今回、開発した反応は、簡便かつ両方の幾何異性体を作り分けることができるため、これらを合成するのに有用な一つの手法になり得ると考えている。また最近、上記の2重結合異性化を伴うドミノ触媒反応では合成することができない3,3-ジ (ピナコラトボリル) ブタ-1-エンを、別の方法により合成することができることを見出した。これにより「3置換オレフィン部位を持つ」ポリケチド天然物を合成する際に、 α 位にボリル基とメチル基を置換基に持つアリルとクロチルホウ素化試薬の両方を使用することが可能となった。

δ 位にボリル基やスタニル基が置換したホモアリルアルコールの不斉合成

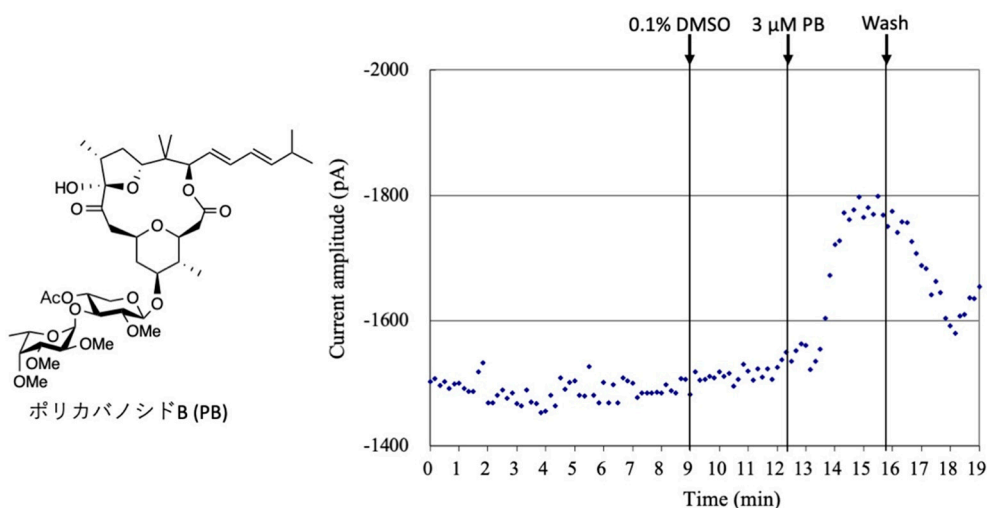


【目的】 ポリカバノシド (polycavernoside) A および B (PA、PB) は、1991年にグアムで発生した紅藻カタオゴノリ *Gracilaria edulis* による致死性食中毒の原因物質として単離、構造決定した化合物で、共役トリエンまたは共役ジエンを有する配糖体マクロリドである。この事例では13名が発症し3名が死亡した。さらに、2002~2003年にもフィリピンで同様の食中毒が発生し、36名が発症し8名が死亡した。PA、PBのマウス腹腔内投与毒性はLD₅₀ 200~400 μg/kgであった。その作用機序として、これまで、非天然型の合成PA類縁体をヒト神経芽細胞腫 BE(2)M-17細胞に作用させて蛍光色素で検出する系で、細胞外Ca²⁺が細胞内へ流入し、脱分極が誘発されることが報告されたが、作用機序の詳細は解明されていなかった。本研究は、ポリカバノシド類の作用機序の解明を目的とした。

【方法】 上記の食中毒発生時に天然から精製したポリカバノシド類は、微量で作用機序の研究には用いることができなかった。しかし、藤原、村井らによる1998年のPAの初の全合成をはじめ、複数のグループの全合成が報告された。さらに、東北大学大学院生命科学研究科の佐々木誠教授らが2017年にPA、PBの全合成に成功し、PBを合成中間体とともに供与いただいた。これを用いて本研究の作用機序の研究を行った。ポリカバノシド類の作用機序として、その症状から神経毒が疑われたため、電位依存性Naチャンネル(Na_v)および電位依存性Caチャンネル(Ca_v)にターゲットを絞って調査した。まず、マウス神経芽細胞腫 Neuro2A にウアバインとベラトリジンを追加し、細胞毒性を指標にNa_vに対する作用を調べる Neuro2A アッセイを行った。次に、Na_v、Ca_vを対象とした電気生理実験(パッチクランプ法)を実施した。また、合成中間体は一部化学誘導して構造活性相関研究に用い、Neuro2A アッセイで評価した。

【結果】 マウス神経芽細胞腫 Neuro2A 細胞にウアバインとベラトリジン共存下、PBを作用させると5 μM、10 μMで細胞生存率の上昇が示された。この現象からNa_vの阻害作用が疑われたため、共同研究者の此木がNeuro2A細胞を用いたNa_vのパッチクランプ法を行ったが、25 μMで阻害活性はみられなかった。この結果および既報から、Ca_vに対する作用が考えられた。そのため、ヒトCa_v1.2(hCa_v1.2/β2/α2δ1)をCHO細胞に発現させた系で、電気生理実験を実施(委託)したところ、上図のようにPB 3 μMで弱い活性化作用が観測された。このことから、ポリカバノシド類の作用機序の一つとして、Ca_v1.2の活性化作用が示唆された。しかし、この作用が二次的な作用である可能性は残されている。Neuro2A アッセイによる合成中間体を用いた構造活性相関研究では、側鎖がビニル基の場合は10 μMで活性が示されなかったが、ヨウ化ビニル基の場合はPB(EC₅₀約3 μM)の約1/2の活性が見られた。この結果から、二糖を有する場合、側鎖が短くても電子豊富でかさ高い置換基(ヨウ素)があれば活性を示すことが初めて明らかになった。

ポリカバノシド B (PB) の化学構造と PB (3 μM) のヒト Ca_v1.2 に対する電気生理実験の結果



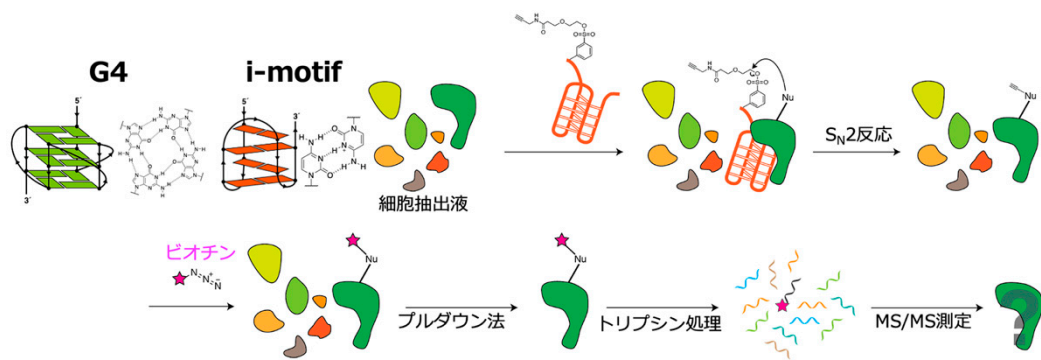
20 非標準核酸制御因子の探索と細胞内挙動解析	山元 淳平
--------------------------------	--------------

【目的】 生体中の遺伝情報を担う DNA は、特異的な塩基対形成に基づく二重らせん構造を形成することで、その遺伝情報の複製・維持を担っている。しかし、従来の二重らせん構造のほかにも、DNA は安定な非標準三次元構造体を形成することが知られている。なかでも、グアニンリッチな DNA 配列において形成される DNA 四重鎖構造（グアニン四重鎖、G4）は、代表的な非標準核酸構造であり、DNA 複製や転写の阻害をきたすことが報告されている。それゆえ、G4 を特異的に認識してその機能を自在に制御する生体機能が存在することが予見され、実際に G4 構造を安定化したり解きほぐしたりするタンパク質の存在が報告されている。一方で、G4 形成配列の相補鎖にはシトシンリッチな配列が存在する。この配列では、i-motif と呼ばれるシトシン四重鎖が形成されることで、同様に DNA 複製を阻害することが知られている。従って、G4 同様、i-motif を特異的に認識して生体機能を制御する機構が存在することが考えられるが、現在までにそのような機能を示すタンパク質はほとんど発見されていない。本研究では、i-motif 結合タンパク質をターゲットとし、相互作用の大小を問わず、近接効果による化学反応を利用したタンパク質ラベル化による非標準核酸結合タンパク質のスクリーニング、およびそれらの細胞内挙動の同定を行うことを目的とした。

【方法】 i-motif 形成オリゴヌクレオチドの 5'末端に対して反応性リンカーを介して生体直交性のアルキンを導入したプローブ分子を調製した。このプローブ分子を細胞核抽出物と混ぜたのち、Click 反応によりビオチン修飾を導入し、ストレプトアビジン含有ビーズと作用させることで、ターゲット核酸に近接した履歴のあるタンパク質をプルダウンした。得られたタンパク質を質量分析法により同定し、i-motif 結合候補タンパク質を網羅的に調べた。候補タンパク質の一部を遺伝子組換えタンパク質として得、i-motif 結合能を試験管内で評価した。

【結果】 プロテオーム解析の結果、様々な i-motif 結合候補タンパク質が得られた。中でも、ヌクレオリン (NCL) と DHX9 に着目した。NCL は核小体の構成タンパク質であり、G4 に結合してその構造を強固にすることが知られているタンパク質である。また、DHX9 はヘリカーゼの一つであり、G4 に結合してその構造を緩和させることが知られているタンパク質である。これら G4 の構造調節タンパク質が i-motif にも結合し、構造調節を担う可能性が認められたため、これらを遺伝子組換えタンパク質として調製した。NCL は大腸菌から調製し、i-motif との結合能を評価したところ、G4 と同様に結合が認められた。また、i-motif を形成する DNA 配列をテンプレートとして用いた DNA ポリメラーゼによる DNA 伸長反応を行ったところ、NCL の非存在下では DNA 伸長が i-motif の箇所では停止したものの、NCL の添加により DNA 伸長が加速される兆候が見られた。このことから、NCL は i-motif の構造調節因子である可能性が示唆された。また、DHX9 については現在昆虫細胞発現系にてタンパク質調製を試みている。予試験として、DHX9 を HeLa 細胞にて過剰発現して免疫染色したところ、DHX9 は核小体に局在していることが明らかとなった。今後、核小体や核スペckルなどの核内構造体と i-motif の関係性に着目し、研究を進める予定である。

非標準核酸制御因子の同定戦略

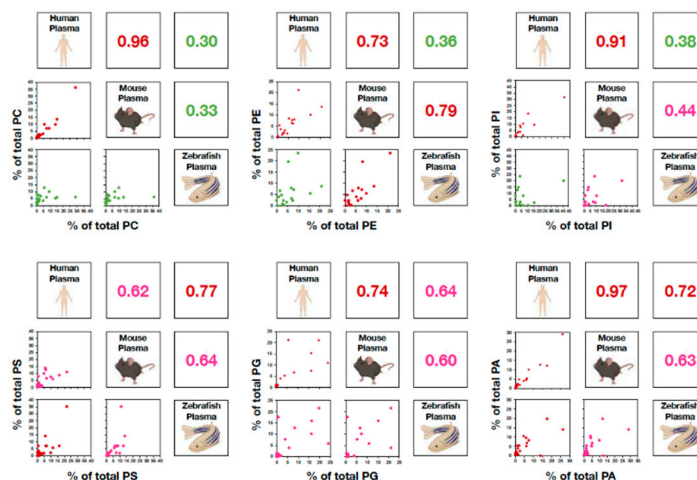


【目的】細胞膜の主成分であるリン脂質は、グリセロール骨格の *sn*-1 位と *sn*-2 位に脂肪酸（アシル基）が、*sn*-3 位にリン酸基と極性基から成る極性頭部が結合した構造を持つ。極性基と脂肪酸の組み合わせにより、生体内には 1,000 種類以上のリン脂質分子種が存在し、その一部は特定の細胞やオルガネラに偏在し固有の機能を持つことが明らかになっている。このような多様なリン脂質分子種の機能を解明するためには、それぞれのリン脂質分子種の産生に関わる酵素群を明らかにする必要がある。それら酵素群の中で我々は、リゾリン脂質アシル基転移酵素（Lysophospholipid acyltransferase : LPLAT）に着目している。LPLAT はリゾリン脂質に脂肪酸を導入してリン脂質を合成する活性を有するリン脂質産生の最終段階の酵素であり、ヒトゲノムには 14 種類の LPLAT 遺伝子（*LPLAT1*~*14*）が存在する。これまでに遺伝子ノックアウト（KO）マウスを中心とした解析から、*LPLAT12*/*LPCAT3* が C20 : 4（アラキドン酸）含有リン脂質の産生を通じて小腸における正常な中性脂質輸送に、*LPLAT3*/*AGPAT3* が C22 : 6（DHA）含有リン脂質の産生を通じて正常な網膜の層構造の形成や精子形成に寄与することが明らかにされた。しかし、14 種類の LPLAT の多くは、基質特異性などの生化学的機能や個体レベルでの機能が未解明である。一般に、マウスを用いた生理機能解析は遺伝子多重欠損体作出が容易ではない、発生期の解析の難易度が高いなどの欠点がある。よって、哺乳類と類似の脂質組成や LPLAT 保存性を有するモデル生物を導入することで LPLAT 研究が加速できる。

【方法】本研究ではまず、マウスに次ぐ新たなモデル生物を検討した。哺乳類とのリン脂質分子種組成の類似性、LPLAT の保存性を指標に幅広いモデル生物を探索した結果、ゼブラフィッシュが LPLAT とリン脂質分子種を解明するためのモデル生物として有用であることを見出した。本研究ではさらに、当研究室において培養細胞やマウス個体レベルでリン脂質の *sn*-1 位に C18 : 0（ステアリン酸）を導入する LPLAT として見出された *LPLAT7*/*LPGAT1* に着目し、CRISPR/Cas9 法を用いて *lpgat1* KO ゼブラフィッシュを作製しその生理機能解析を実施した。

【結果】さまざまモデル生物種（マウス、ゼブラフィッシュ、ショウジョウバエ、線虫、酵母、大腸菌）について、LC-MS/MS を用いたリン脂質分子種組成解析と、LPLAT 分子の保存性の解析を行い、ゼブラフィッシュのリン脂質分子種組成は哺乳類と高い相関性を示した（図）。哺乳類に保存される LPLAT 分子も、ゼブラフィッシュでほぼ完全に保存されていた。*lpgat1* KO ゼブラフィッシュは発生異常、精子受精異常を示し、ステアリン酸（C18 : 0）含有ホスファチジルエタノールアミン（PE）が特異的に減少していた。一方、C18 : 0-PE を相補するように、パルミチン酸（C16 : 0）含有ホスファチジルエタノールアミン（PE）が顕著に増加していた。以上の結果は、魚類以上の高等真核生物では、LPLAT 分子すなわち、リン脂質分子種は高度に保存され特異的な機能を持つこと、生体はリン脂質脂肪酸鎖長のわずかな違い（C18 : 0 と C16 : 0 の炭素数 2 の違い）を認識する機能があることを示唆する。

リン脂質分子種の種間での保存性



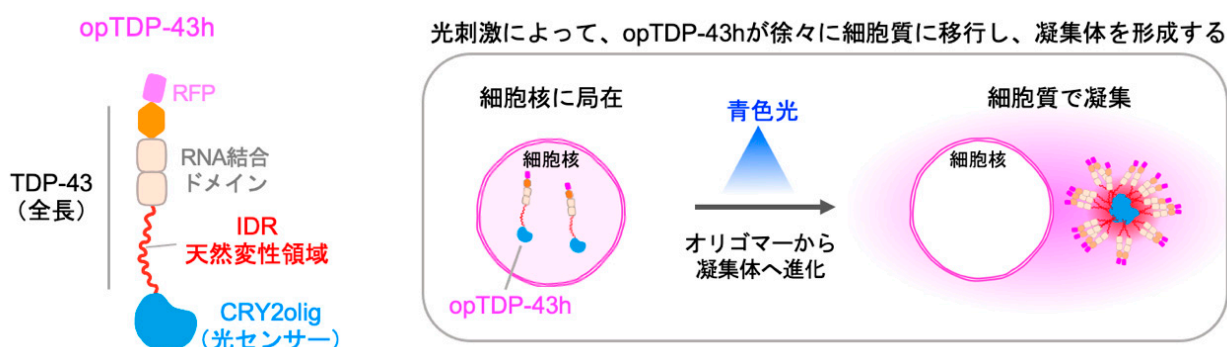
22 光遺伝学TDP-43を用いたALS病態の理解と制御	浅川 和秀
------------------------------	-------

【目的】筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、脳からの運動指令を筋肉に伝達する神経細胞「運動ニューロン」が変性によって失われ、全身の筋力が致死的に衰退する難病である。ALS 全体の 90%以上を占める遺伝子変異に連鎖しないタイプの ALS (孤発性 ALS) には、変性運動ニューロンの細胞質に凝集した TDP-43 タンパク質が蓄積する、という特徴がある。本研究に先立って、我々は、青色光を吸収するとクラスター化する CRY2olig タンパク質を TDP-43 に融合した光遺伝学型 TDP-43 (opTDP-43h) を開発した。opTDP-43 を熱帯魚ゼブラフィッシュ仔魚の運動ニューロンに発現させ、仔魚に青色光を照射すると、細胞核に豊富に局在していた opTDP-43h が、次第に細胞質へと移行し、凝集体を形成することを見出した。我々は、この光照射による opTDP-43h の凝集が、ヒトや既存の ALS 動物モデルでは研究が困難とされてきた、変性初期の運動ニューロンの状態を再現している可能性があると考えた。本研究では、光刺激によって opTDP-43h の細胞内局在が、細胞核から細胞質への移行する現象において、TDP-43 の RNA への結合が果たす役割を検証することで、初期の運動ニューロン変性のメカニズムを明らかにしようと試みた。

【方法】2つの RNA 結合ドメイン (RRM1 と RRM2) を欠失させた opTDP-43h (opTDP-43hdRRM12) を脊髄運動ニューロンに発現するトランスジェニックゼブラフィッシュ Tg[mnr2b-hs:opTDP-43hdRRM12] を構築した。Tg[mnr2b-hs:opTDP-43hdRRM12]仔魚に青色光を照射し、opTDP-43hdRRM12 の細胞内局在の変化をリアルタイムで観察した。

【結果】青色光を照射する前の Tg[mnr2b-hs:opTDP-43hdRRM12]仔魚においては、opTDP-43hdRRM12 は細胞核に局在した。opTDP-43h は、青色光を 24 時間照射すると細胞質に移行して凝集するが、opTDP-43hdRRM12 は、青色光の照射後も細胞核への局在を維持した。この結果は、opTDP-43h の細胞質への移行には、RNA 結合ドメインが必須であることを示していた。青色光の照射によってクラスター化した opTDP-43h は、RNA と結合して細胞質に移行する可能性が示唆された。また、内在性の TDP-43 遺伝子が破壊された Tg[mnr2b-hs:opTDP-43hdRRM12]仔魚においては、青色光照射の有無にかかわらず、opTDP-43hdRRM12 が細胞体や神経軸索の接続部に大きな顆粒構造を形成した。この結果から、細胞核に豊富に局在するという典型的な TDP-43 の細胞内分布パターンには、RNA への結合が必須である可能性が示唆された。

光照射による TDP-43 凝集



23 血管内皮shear stress応答に関わる脂質シグナルの解明

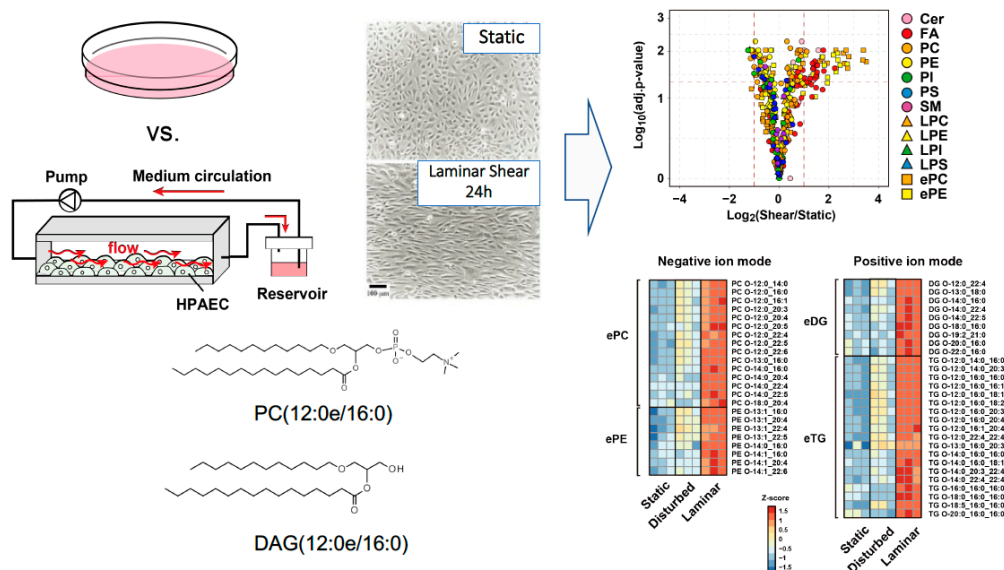
有田 誠

【目的】 血管内皮細胞は血流に起因するずり応力 (shear stress) に応答して、遺伝子発現や形態、機能を変化させる。一方で、粥状動脈硬化は血流が大きく変化する血管の湾曲部や分岐部に好発することが知られており、shear stress 環境の変化が内皮細胞の形質を変化させ、粥状硬化、動脈瘤、血管炎、など、血管病変の進展を左右すると考えられている。このような shear stress に応答する血管内皮ホメオスタシスの分子機序を明らかにすることは、血管病変に対する予防、治療の開発への道を開くと思われる。そこで本研究では、生化学的解析が可能なスケール (10⁶オーダーの細胞数) で培養した血管内皮細胞に流体力学的に設計された流れ負荷装置で定量的な shear stress を作用させ、細胞内脂質代謝の変化や遺伝子発現制御を包括的に解析することで、shear stress に対する未知の細胞応答メカニズムを捉え、それらの血管病態における役割を解明することを目的とした。

【方法】 ヒト肺動脈内皮細胞 (HPAEC) を培養し、定常的な流れずり応力 (shear stress) を細胞に負荷した。経時的に細胞を回収し、遺伝子発現パターンの変化について RNA-Seq 解析、および細胞内脂質代謝の変化について、質量分析システム (LC/QTOF-MS) とデータ解析ソフトウェア (MS-DIAL) を用いたノンターゲットリポドミクス解析を行った。

【結果】 HPAEC に動脈の正常域の laminar shear stress (15 dynes/cm²) を 24 時間負荷することにより、炭素数 12~14 の中鎖アシル側鎖を含有するエーテル型脂質 (エーテル型ホスファチジルコリン (ePC)、エーテル型ホスファチジルエタノールアミン (ePE)、エーテル型ジアシルグリセロール (eDG)、エーテル型トリアシルグリセロール (eTG)) が特徴的に増加することを見出した。細胞内でのエーテル型脂質の生合成およびβ酸化による中鎖脂肪酸の生成は主にペルオキシソームで行われることから、laminar shear stress の負荷に応答してペルオキシソームの脂質代謝機能が制御されている可能性が示唆された。さらに、代謝前駆体である中鎖アルキルグリセロール (12-alkyl glycerol, 12AG) を細胞に添加すると、中鎖アシル側鎖を含有するエーテル型脂質の増加に伴い、ホルボールエステル (PMA) 刺激による接着因子 VCAM-1 の発現誘導が顕著に抑制された。同様の現象は正常な laminar shear stress に晒された血管内皮細胞でも見られ、今回見いだされた事象は細胞内の脂質リモデリングを介した新しい環境適応メカニズムであると考えられた。また、本研究で見いだされた中鎖脂肪酸含有エーテル脂質の新機能からは、新しい機能性脂質として動脈硬化症や血管炎など血管病変の病態解明、および予防・治療に適用される可能性が示唆された。

血管内皮細胞の Laminar shear stress 応答に関わる細胞内脂質リモデリング



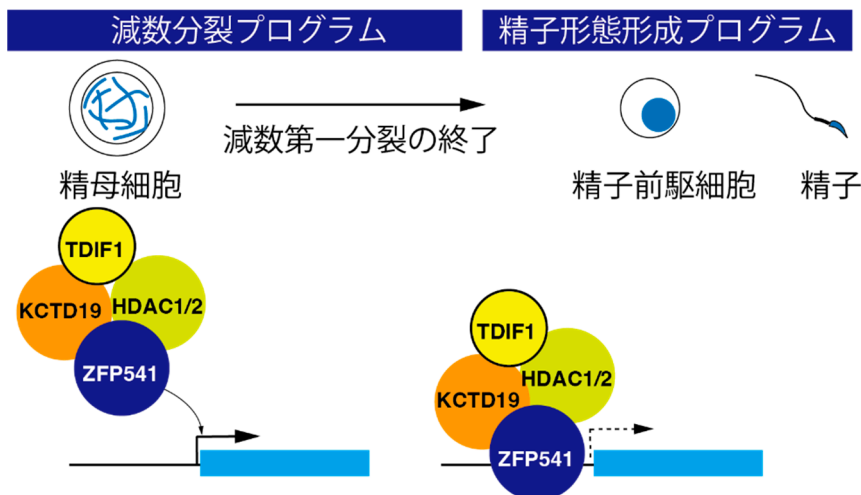
24 減数分裂開始因子MEIOSINの標的遺伝子の解析	石黒 啓一郎
-----------------------------	--------

【目的】最近、我々はマウス生殖細胞より体細胞分裂から減数分裂へのスイッチに決定的な役割を果たす新規の転写因子 MEIOSIN を同定した。MEIOSIN は減数分裂関連遺伝子のプロモーターへの結合を介して減数分裂プログラムの活性化を制御する。MEIOSIN の標的遺伝子にはゲノムデータベースに眠る未解析のものが多く含まれるが、これらの遺伝子には精子・卵子の正常な形成に必要とされるものが含まれる可能性が考えられた。本研究では MEIOSIN の標的遺伝子の機能解析により、精子・卵子の正常な形成に必須とされる新規遺伝子の同定を目的とした。

【方法】MEIOSIN によって発現制御を受ける未解析遺伝子群の中から、精巣・卵巣で特異的に発現を示すものを RT-PCR 法により同定した。次いで、それらの遺伝子について受精卵への CRISPR-Cas9 導入による遺伝子破壊を行い、8 週齢 F0 個体の精巣が萎縮を示すか否かを指標に表現型を解析した。そのうち、遺伝子欠損により不妊を示す遺伝子として *Zfp541* 遺伝子を新規に同定した。*Zfp541* 遺伝子欠損マウスの組織学的解析、免疫沈降と質量分析法を用いた相互作用因子の解析、ChIP-seq によるゲノム結合部位の解析などを駆使して *ZFP541* の特性について検討した。

【結果】*Zfp541* 遺伝子は減数分裂に進行した精母細胞および円形精子細胞で特異的な発現パターンを示すことが明らかとなった。これと符合して、免疫染色の解析から *ZFP541* タンパク質は精巣内では減数第一分裂前期の中盤に相当するパキテン期から円形精子細胞までのステージで核内に出現することが明らかとなった。*Zfp541* 欠損マウスのオスでは精母細胞はいったん減数分裂を進行するものの減数第一分裂前期の終盤で死滅して、精巣の萎縮をともなって不妊となることが判明した。*ZFP541* と結合する *KCTD19* においても、その欠損マウスでは減数第一分裂前期で死滅して不妊となることが判明した。*ZFP541* は *KCTD19* と共に転写抑制複合体を形成して、精子形成プログラムに先駆けてクロマチン・エピジェネティクスに関連する遺伝子群の発現を抑制することにより、減数第一分裂前期のプログラムを終結させることが明らかとなった。

ZFP541-KCTD19 複合体によるクロマチン関連遺伝子群の発現抑制

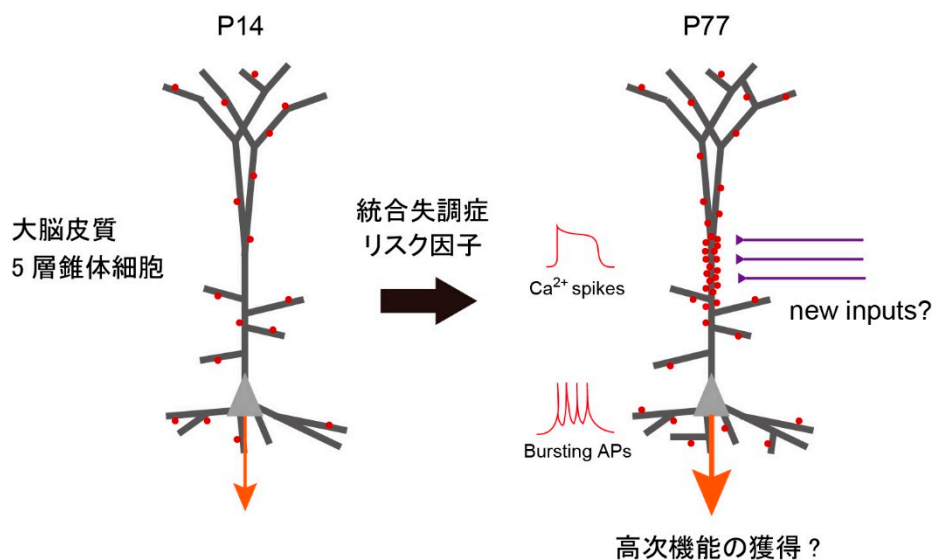


【目的】 統合失調症は人口の約1%に発症することが知られているが、その原因については未だ不明な点が多く、根本的な治療法の開発には至っていない。統合失調症は思春期以降に発症することが良く知られており、思春期における神経回路の再編成と関連している可能性が指摘されてきた。従来、思春期には大脳皮質のシナプスが刈り込まれて減少すること、思春期におけるシナプスの過剰刈り込みが統合失調症の発症に関与していることが提唱されていた。しかしながら、我々が独自に開発した透明化法と超解像蛍光イメージングを駆使し、発達期における樹状突起スパインの大規模高精細解析を行ったところ、思春期にはむしろ5層ニューロンの先端樹状突起において、スパインの密度が顕著に増加していることが見出された。そこで本研究では、複数のモデルマウスを用いることにより、思春期におけるスパイン形成の異常が統合失調症に関連している可能性について検討を行った。

【方法】 統合失調症のモデルとして、Schnurri-2 ノックアウトマウス、DISC1 ドミナントネガティブ変異体発現ニューロン、時期特異的 NMDAR ノックアウトニューロンの解析を行った。SeeDB2 法による脳スライスの透明化を行い、超解像顕微鏡によって樹状突起の分布を解析した。

【結果】 Schnurri-2 ノックアウトマウスおよび NMDAR 時期特異的ノックアウトニューロンにおいて、5層ニューロンにおけるスパインの密度を解析したところ、先端樹状突起においてのみスパインの密度上昇の障害が観察された。基底樹状突起や思春期前のニューロンではスパイン密度に異常は見られなかった。これらのことから、思春期における樹状突起部位特異的なスパイン形成が統合失調症の発症に関与している可能性が示唆された。今後、思春期特異的に形成されるスパインが樹状突起演算にどのような影響を与えるかを調べることで、統合失調症における大脳皮質機能の異常を明らかにすることができると期待される。

思春期における樹状突起スパインの発達と統合失調症に関する仮説

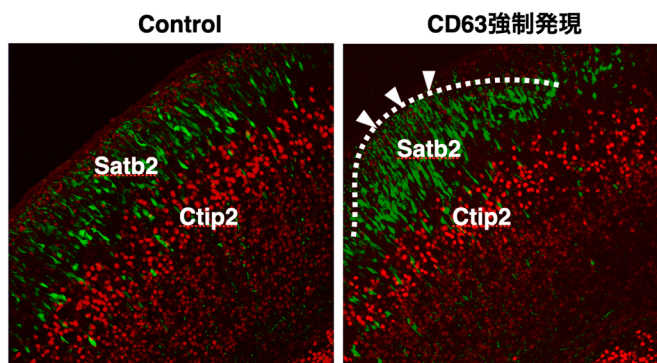


【目的】 脳の形態学的・機能的な違いは遺伝的に98%の相同性を示すヒト・サルでも明らかであり、実験動物として汎用されるマウスも、殆どの遺伝子セットを共通に利用しているが、独特な神経系を獲得している。したがって、マウス神経系解析の医療応用には、この難題に対処することが必須となる。タンパクになれないノンコーディング RNA (ncRNA) セットは種間多様度が極めて高いことから、ほ乳類脳の種特異性成立メカニズムにおいては、種特異的な ncRNA が機能することが想定できる。実際に最近、5種5組織の計25サンプルの大規模比較トランスクリプトーム解析を行い、種特異的プロモーターncRNA (pancRNA) を進化的に獲得すると、特定の細胞群でのみ遺伝子発現を達成できることを発見していた (Uesaka et al., BMC Genomics, 2017)。pancRNA は研究代表者らが発見した長鎖 ncRNA (lncRNA) であり、下流遺伝子のエピジェネティクスを活性型に変換し下流遺伝子の特異的に発現上昇させることのできる ncRNA である。種を超えて保存されていない配列の獲得が、種特異的 ncRNA 産生/エピジェネティック変換を介して、遺伝子発現スイッチの獲得に至ると考え、本課題ではマウスとヒトの脳神経幹細胞における種特異的 pancRNA を有する遺伝子を網羅的にデータベース化し、機能的意義を明らかにすることとした。

【方法】 イルミナ社の HiSeq2500 と HiSeqX により、pancRNA と mRNA 発現情報を取得した。pancRNA がヒトにありマウスにない遺伝子として、*MEIS1*、*UCP2*、*NRSN2*、*CD63* を選択し、ヒト神経幹細胞におけるノックダウン (KD) 実験と *in utero* エレクトロポレーションによるマウス脳への賦与実験を行った。

【結果】 ほ乳類脳の未分化期は代謝経路として解糖系が優位である一方、分化後は酸化的リン酸化を用いる代謝リプログラミングが起こる。ヒトとマウスでは大脳皮質の機能や形態が大きく異なり、種差形成には代謝リプログラミング経路の適応が伴っていることが想定される。そこで、ヒト特異的 pancRNA 駆動型遺伝子として同定できたミトコンドリア内膜のタンパク質 Mitochondrial uncoupling protein 2 (*UCP2*) について、ヒト神経幹細胞における KD によりマウス型遺伝子発現を模倣する解析を行った。ヒト iPS 細胞由来の神経幹細胞株 AF22 を用いた EdU の取り込み実験と active Caspase3 抗体染色から、*UCP2* あるいは *pancRNA* を KD すると、いずれも細胞増殖の有意な抑制と細胞死の増加傾向が認められ、この結果は KD サンプルの RNA-seq データにも支持された。反対に、子宮内エレクトロポレーションによるマウス胎仔脳へのマウス *Ucp2* 過剰発現から神経幹・前駆細胞の増加傾向が認められた。同様に、例えば、エクソソーム膜で機能することが知られるヒト特異的 pancRNA 駆動型遺伝子 *CD63* について、マウス大脳発生中の神経幹細胞においてヒト型発現を模倣すると、大脳新皮質の層構造のうち、深層ニューロン (*Ctip2*⁺) の数は変化させずに、浅層ニューロン (*Satb2*⁺) の数が増大し、さらに、マウスではみられないはずのしわの原基のような構造が、改変当時神経幹細胞だったニューロンにより構築された (下図)。したがって、*pancRNA* 獲得に伴うこれらの遺伝子の発現量種差は、大脳神経幹細胞増殖変化を介して表現型の差異形成に寄与してきたことが強く示唆された。

ヒト特異的 pancRNA を有する遺伝子 *CD63* の強制発現によるマウス大脳の拡大

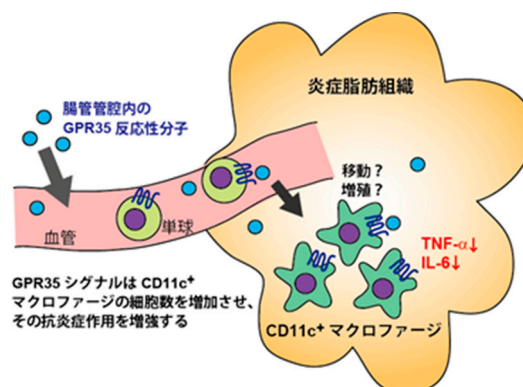


【目的】 現在社会において肥満症は健康を脅かす要因として世界的な問題となっている。肥満の基盤病態として慢性炎症が知られ、肥満の脂肪組織では組織そのものが炎症性変化を示す。肥満に伴う脂肪組織炎症にはマクロファージなど自然免疫系の細胞が重要な役割を果たすことが知られる。脂肪組織マクロファージ (ATM) には、複数の細胞集団が存在することが報告されており、個々のマクロファージ集団が異なる肥満病態に関与すると考えられている。GPR35 はキヌレン酸等などの代謝分子に結合する G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) ファミリー分子である。GPR35 はキヌレン酸や 5-ヒドロキシインドール酢酸 (5-HIAA) などの代謝分子に結合することが知られる。近年、GPR35 シグナルは脂肪細胞において、 β アドレナリン受容体シグナルを促進することで、エネルギー消費を増加させることが報告された。一方で、GPR35 は白血球に高発現するが、ATM における GPR35 の生理的役割については不明な点が多いことから、本研究では ATM における GPR35 シグナルの役割および肥満時の GPR35 結合分子を解析した。

【方法】 野生型マウスおよび *GPR35* 欠損マウスに高脂肪食を 6 週間投与し、白色脂肪組織 (体脂肪および皮下脂肪) における ATM 集団をフローサイトメトリーにより解析した。また、このときの脂肪組織におけるサイトカイン産生を定量 PCR により評価した。食物や腸内細菌由来の成分に GPR35 反応性分子が含まれることを想定し、大腸内容物に含まれる GPR35 反応性分子を、種々のクロマトグラフィーを用いて精製した。

【結果】 ATM は $CD11c^-$ および $Tim4^-$ の発現を指標に $CD11c^+Tim4^-$ マクロファージ、 $CD11c^-Tim4^-$ マクロファージ、 $CD11c^-Tim4^+$ マクロファージに分けられる。定量 PCR の結果、これらの集団はいずれも *gpr35* 遺伝子を発現していた。野生型マウスおよび *GPR35* 欠損マウスに高脂肪食を投与した結果、高脂肪食を投与した野生型マウスでは、内臓脂肪および皮下脂肪において $CD11c^+Tim4^-$ マクロファージが増加したが、*GPR35* 欠損マウスではこの増加は殆ど認められなかった。 $CD11c^+Tim4^-$ マクロファージは炎症性集団としての報告がある一方、抗炎症性分子を産生するという一見相反する知見も報告されている。高脂肪食を投与したマウスの脂肪組織における炎症性サイトカインの発現を評価したところ、*GPR35* 欠損マウスで *tnfa* および *il6* 遺伝子の発現上昇が認められた。したがって、GPR35 シグナルは $CD11c^+Tim4^-$ マクロファージの動員もしくは増殖を促進し、炎症性サイトカイン産生を制御することにより、脂肪組織の炎症反応を抑制する可能性が考えられた。 $CD11c^+$ マクロファージは肥満発症後期に死んだ脂肪細胞を除去して、肥満に防御的に作用する *metabolically activated* マクロファージに近い遺伝子発現を示すことから、今後、 $CD11c^+Tim4^-$ マクロファージにおける GPR35 シグナルの役割について、更に解析を行う予定である。また、食物や腸内細菌由来の成分に GPR35 反応性分子が含まれることを想定し、大腸内容物から調製した抽出物における GPR35 反応性を検討したところ、水溶性画分に GPR35 に対する反応性が認められた。現在、この GPR35 反応性分子の精製を段階的に行っているが、現時点でこの分子は既知リガンドのキヌレン酸や 5-HIAA と異なる分子である可能性が高いと考えられた。以上の知見から、ATM における GPR35 を介したシグナルは肥満病態を抑制する可能性があり、その詳細な分子機構については今後の更なる解析が求められる。

作業仮説



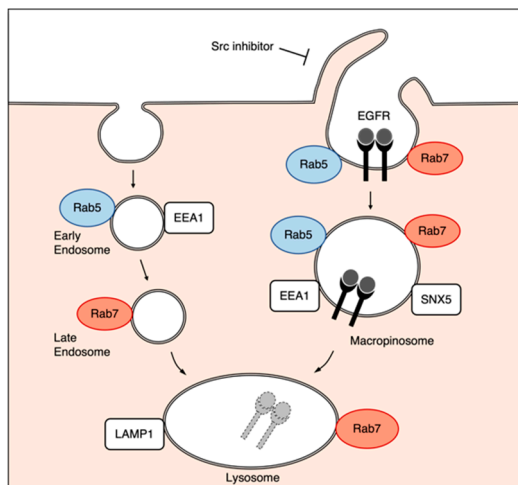
28 遷移状態にあるオルガネラの解析と生理的意義の解明	大場 雄介
-----------------------------	-------

【目的】 エンドサイトーシスは細胞外の栄養素や病原体、細胞膜の受容体を取り込む機構であり、重要な細胞生理機能の一つである。エンドサイトーシスによって取り込まれた様々な物質はエンドソームと呼ばれる小胞に内包されると、リソソームへと運ばれて分解される分解経路と、再び細胞膜に戻されるリサイクリング経路に振り分けられる。また、エンドソームは初期エンドソーム、後期エンドソーム、リサイクリングエンドソームと明確に分けられており、取り込まれた物質や受容体はこれらのエンドソームを通して適切に輸送されると考えられている。我々は最近、上皮増殖因子 (Epidermal growth factor : EGF) 受容体刺激によってエンドサイトーシスを誘導した時、細胞膜から小胞が形成される初期段階で、初期エンドソームマーカーである Rab5 と後期エンドソームマーカーである Rab7 が同時に局在する小胞が存在することを見出した。このような遷移状態にあるオルガネラはこれまでに報告がなく、このオルガネラの役割や形成メカニズムは未知である。そこで、Rab5⁺Rab7⁺小胞の特徴や形成に関わる因子を検証し、この小胞の生理的意義を明らかにすることを目指した。

【方法】 発現プラスミドを導入した A431 細胞を血清飢餓処理し、EGF で刺激して共焦点蛍光顕微鏡でタイムラプス観察した。内在性の Rab5 および Rab7 は EGF 刺激後に細胞を固定し、免疫染色法により可視化して観察した。得られた蛍光顕微鏡画像は MetaMorph ソフトウェアを用いて解析した。

【結果】 A431 細胞に EGFP-Rab5 および mCherry-Rab7 を発現させ、EGF 刺激後のエンドサイトーシスの様子をタイムラプス観察した。細胞膜から形成されたばかりのリング状に見える大きな小胞には、興味深いことに初期エンドソームマーカーである Rab5 と後期エンドソームマーカーである Rab7 が同時に局在していた。また、この Rab5⁺Rab7⁺小胞には EEA1 および SNX5 が共局在しており、その直径は 2~7 μm と比較的大きかったことから、この小胞はマクロピノサイトーシスによって形成されるマクロピノソームであることが示唆された。次に、Rab5⁺Rab7⁺小胞によって輸送される物質および輸送経路を調べた。EGF 刺激後に形成される Rab5⁺Rab7⁺小胞が EGF 受容体陽性であるかどうかを検証したところ、Rhodamine 標識 EGF との共局在が認められ、すなわち EGF 受容体が内包されていることが示された。また、Rab5⁺Rab7⁺小胞の挙動をタイムラプスイメージングで観察したところ、この小胞はリソソームマーカーのみと共局在したことから、EGF 受容体を分解経路に輸送することが示唆された。次に、Rab5⁺Rab7⁺小胞の形成に関わる因子を探索した。Src 阻害剤である PP2 で処理した細胞では、EGF 刺激後に Rab5⁺Rab7⁺小胞の形成が抑制された。Src は Rab7 をリン酸化するという報告があることから、Rab7 のリン酸化状態が Rab5⁺Rab7⁺小胞の形成に関与すると予想した。そこで、Rab7 のリン酸化模倣変異体およびリン酸化不全変異体を用いて、Rab5⁺Rab7⁺小胞の形成を評価した。予想外に、リン酸化不全変異体 Rab7 の過剰発現により Rab5⁺Rab7⁺小胞の形成が促進され、脱リン酸化状態の Rab7 がこの小胞形成に関与することが示唆された。

本研究の概要図

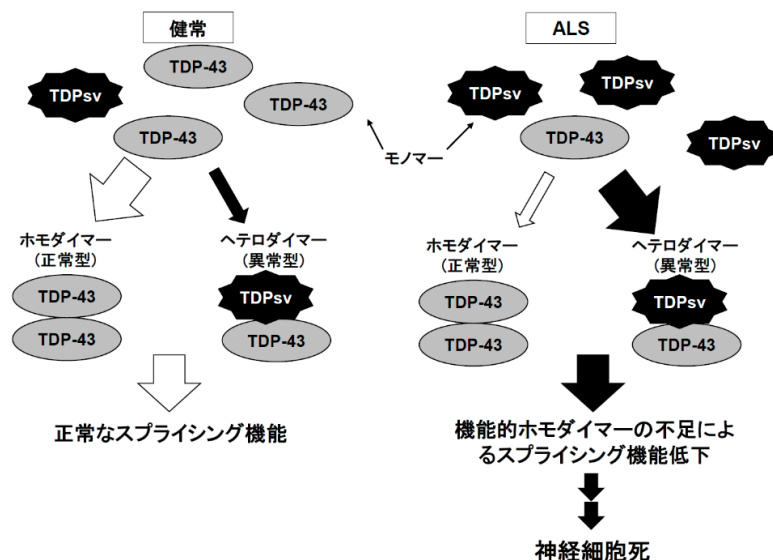


【目的】 RNA 結合タンパク質 TDP-43 は、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 患者の運動ニューロン細胞質への沈着、異常リン酸化等の特徴的病理所見を認めることが知られている。我々はこれまでの研究において TDP-43 のスプライスバリエーションの一つ (TDPsv-1) が翻訳され、ALS 患者の運動ニューロンにおいて局在パターンが変化することを見出した (未発表)。さらに、本スプライスバリエーションは正常型 TDP-43 (全長 TDP-43、TDP-FL) のスプライシング機能をドミナントネガティブに阻害することを発見したが、その詳細は不明であった。本研究では、この TDP-43 スプライスバリエーションに着目し、その神経毒性および正常型 TDP-43 の阻害機構を解明することを目的とした。

【方法】 TDPsv の細胞ストレスおよび細胞死への影響について検証する為、TDPsv-1 を培養細胞に発現させ、ストレス顆粒マーカーおよび細胞死マーカーの陽性率を免疫染色法により解析した。ストレス顆粒の解析には HeLaS3 細胞、細胞死マーカーの解析には iPS 細胞由来ニューロン (iNeurons) を用いた。また、TDPsv-1 が TDP-43 のスプライシング機能に必須の TDP-FL ホモダイマー形成を競合的に阻害する可能性を考え、両者を HEK293T 細胞に共発現させ免疫沈降法により複合体形成能を解析した。また、TDP-43 は標的のイントロン中のエクソンに似た配列 (偽エクソン) を抑制する機能を持ち、TDP-43 の機能低下により偽エクソンが誤って選択されることが知られている。本研究では TDP-43 機能の指標として 2 種類の標的の偽エクソンについて、その選択を RT-PCR により解析した。偽エクソンの検出は TDP-43 の機能低下を示し、我々の先行実験により TDPsv-1 を培養細胞に過剰発現させるとこの偽エクソンが検出されることを見出している。これについて TDPsv-1 と TDP-FL の複合体形成依存的に TDP-43 標的の偽エクソンが選択されるか検証した。

【結果】 HeLaS3 細胞に TDPsv-1 を過剰発現させたところ、著しいストレス顆粒の形成促進が認められた。さらに、iNeurons に TDPsv-1 を過剰発現させると CC3 陽性率の上昇を認めた。これらのことから、TDPsv-1 過剰状態は細胞ストレスとして認識され、神経細胞死を促進することが示唆された。また、TDPsv-1 と TDP-FL の共発現実験により、両者は複合体を形成することがわかった。さらに、TDPsv-1 は TDP-FL よりも複合体形成能が高く、TDPsv-1 は TDP-FL と競合的にヘテロダイマーを形成することが示唆された。TDPsv-1 の N 末端ドメインに変異を導入すると TDP-FL との複合体形成が抑制され、それと相関して TDP-43 標的の偽エクソンが検出されなくなることから、TDPsv-1 のドミナントネガティブ活性は、TDP-FL とのヘテロダイマー形成により競合的に TDP-FL ホモダイマー不足を引き起こすことによるものであることが示唆された。

TDP-43 スプライスバリエーションのドミナントネガティブ活性による RNA 代謝異常仮説



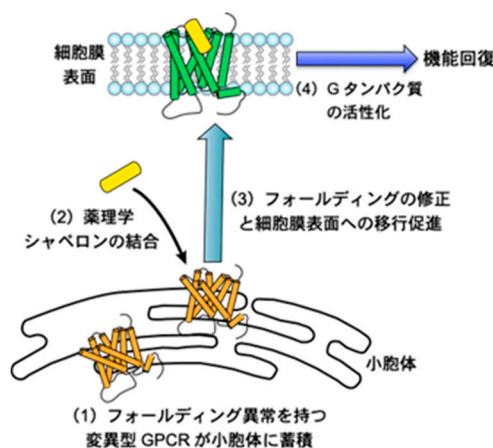
<p>30 希少腎疾患治療に向けた膜受容体の構造解析及び創薬</p>	<p>加藤 英明</p>
------------------------------------	--------------

【目的】先天性腎性尿崩症 (congenital Nephrogenic Diabetes Insipidus : cNDI) は、尿中の水分再吸収が阻害された結果、1日15リットルにも及ぶ多飲多尿を強いられる腎・泌尿器系の希少疾患である。cNDIの主原因は抗利尿ホルモンであるバソプレシン (AVP) のシグナル異常であり、その殆どが AVP の膜受容体である 2 型バソプレシン受容体 (AVPR2) の遺伝子変異に由来すると考えられている。AVPR2 は腎臓の集合管細胞の細胞膜表面に発現する G タンパク質共役型受容体 (GPCR) であり、通常 AVP を受容した AVPR2 は Gs タンパク質の活性化を介して水チャネルタンパク質の細胞膜局在を促し、尿からの水再吸収を促進する。しかしながら、変異型 AVPR2 の多くは、翻訳まではされるもののフォールディング異常により小胞体 (ER) にトラップされてしまい、作用する場である膜表面に局在できず結果として機能喪失に至る。こうした状況下で、一部の脂溶性 AVPR2 リガンドは ER に局在した変異型 AVPR2 タンパク質にアクセスし、そのフォールディング異常を正し、更には膜表面への局在を助けることが可能であることが判明し、注目を集めている。これらのリガンドは従来のタンパク質型の分子シャペロンと区別して、薬理的シャペロン (pharmacological chaperone : PC) と呼ばれ、その開発と臨床応用が模索されてきた (Mouillac et al., 2014, Pharmacol. Res.) (図)。これらの PC は既に一定の成果を挙げているものの、NDI の発症に繋がると報告されている 200 以上の AVPR2 変異の中には、既存 PC によってレスキュー可能なものと不可能なものが存在しており、そのことが PC を用いた NDI 治療の確立を妨げる一因となっている。そこで本研究では、AVPR2 の PC として最も効果を挙げている tolvaptan に着目し、「tolvaptan がどのように AVPR2 に結合し、どのようにフォールディング異常を正すことで膜局在の正常化を促しているのか」、また「tolvaptan がフォールディング異常を正すことの出来る変異とできない変異には本質的にどのような違いが存在するのか」という問題の解明を目指した。

【方法】「野生型 AVPR2-tolvaptan 複合体のクライオ電子顕微鏡構造解析」、そして「計算科学的手法を用いた tolvaptan による PC 効果の作用機序解明」という 2 つのアプローチを用いることで、上記の目的達成を目指した。特に前者について、AVPR2 の結晶構造解析は 30 年以上多くの研究者が挑戦しているにもかかわらず、いまだにその構造決定には至っていないことから、X 線結晶構造解析ではなくクライオ電子顕微鏡 (cryo-EM) を用いて構造解析を行うことにした。この際、AVPR2 を含む class A GPCR は cryo-EM で構造決定するには分子サイズが小さすぎたため、その手法開発を行うところから挑戦した。

【結果】30 以上のコンストラクトと 100 以上の発現精製条件を検討した結果、野生型ヒト AVPR2、2 種の抗 BRIL 抗体の発現精製系の確立に成功した。また、AlphaFold2 と自作のスクリプトを組み合わせることで、構造解析に適したコンストラクトを迅速に *in silico* screening するためのパイプラインを開発することができた。また、見出したコンストラクトと抗体を用いて、実際に cryo-EM 構造解析に適した AVPR2-BRIL-抗 BRIL 抗体複合体を形成することに成功した。

GPCR における薬理的シャペロン (PC) の作用機序

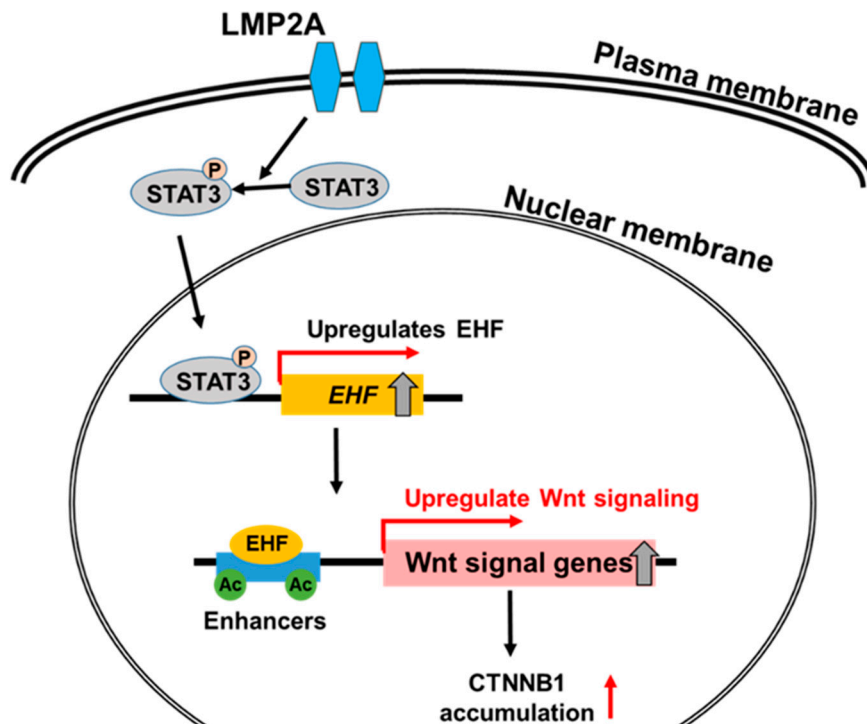


【目的】 ウイルス感染がもたらす特異なエピゲノム変化とエンハンサー異常活性化を解明し、ウイルス陽性癌におけるエピゲノム発癌分子機構を明らかにすることを目的とする。

【方法】 EBV、HPV などウイルス感染により発癌する悪性腫瘍のうち、EBV 陽性胃癌を対象に臨床胃癌標本および細胞株を用いて解析を行った。トランスクリプトーム解析を RNA-seq 法により行った。エピゲノム解析についてヒストン修飾および転写因子結合領域を ChIP-seq 法より行った。3D クロマチン構造を Hi-C 法にて解析した。候補となる因子について siRNA あるいは shRNA を用いたノックダウンを行い、機能解析を行った。蛋白発現量について、細胞株に対してウエスタンブロッティング法により、臨床標本に対して免疫染色法によりそれぞれ検証した。

【結果】 EBV 胃癌のトランスクリプトーム解析により、正常胃上皮細胞と比較して EBV 胃癌細胞株は有意に Wnt シグナル関連遺伝子が発現上昇しており、 β カテニンの活性化を伴って Wnt シグナルが亢進していることを認めた。正常胃上皮細胞や EBV 陰性胃癌細胞株に EBV を感染したモデルにおいても同様に β カテニンの活性化を伴った Wnt シグナルの亢進を認めた。EBV 胃癌細胞株および *in vitro* EBV 感染モデルの網羅的エピゲノム解析により、活性化したエンハンサー領域において転写因子 EHF モチーフが有意に濃縮していること、および EHF の発現が亢進していることを認めた。EBV 蛋白 LMP2 が、STAT3 をリン酸化し、p-STAT3 が EHF 遺伝子のプロモーターおよびエンハンサーに結合することにより EHF 発現を誘導していた。EHF の下流標的遺伝子は有意に Wnt シグナル関連遺伝子を含み、STAT3、EHF、下流標的遺伝子のノックダウンにより EBV 胃癌細胞株の増殖は有意に低下した。また STAT3 ノックダウンによる増殖低下は、EHF の強制発現によりレスキューされた。EBV 胃癌において LMP2A-STAT3-EHF axis によるエンハンサー領域の異常活性化が重要であることを示唆された。

EBV 胃癌におけるエンハンサー領域活性化と Wnt シグナル亢進



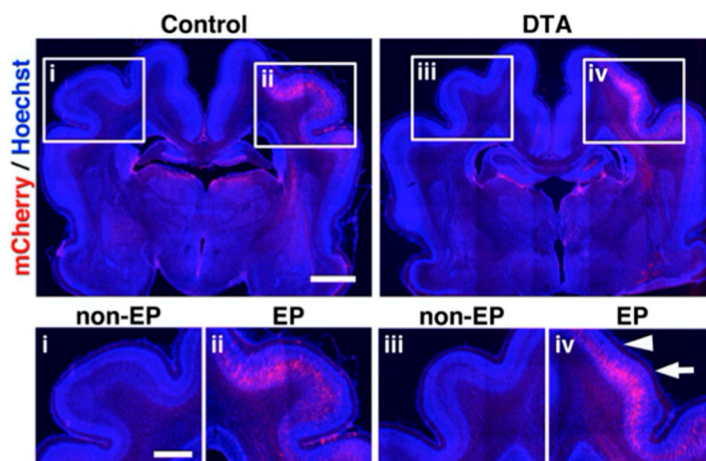
32 フェレットを用いた大脳形成と進化の分子機構の解明	河崎 洋志
----------------------------------	-------

【目的】 ヒトに至る哺乳類の進化の歴史のなかで大脳は著しく発達してきた。大脳は巨大化し、表面には多くの脳回（表面の皺）が形成された。神経細胞が増加したのみならず、アストロサイトなどのグリア細胞も増加してきた。このような発達した大脳の形成機構や大脳の進化の分子機構の解明は重要な研究課題のひとつであるが、マウスよりも大脳が発達した哺乳動物を用いた分子生物学的研究技術があまり整備されていなかったことから、これらの研究は遅れていた。そこで我々は、サイズが大きく脳回を持つなど大脳が発達した食肉類哺乳動物フェレット (*Mustela putorius furo*) に着目して研究を進めてきた。我々はフェレットを用いた研究を推進するために、フェレットに使用可能な分子生物学的研究技術を独自に確立してきた。これらの技術を用いて我々は、大脳皮質神経細胞の増加と脳回形成に線維芽細胞増殖因子 (FGF) シグナルとソニックヘッジホッグ (Shh) シグナルが重要であることを報告してきた。本研究ではグリア細胞であるアストロサイトに焦点を絞り、進化の過程でアストロサイトを著しく増加させてきた分子機構を解析した。

【方法】 子宮内電気穿孔法は以下の手順で行った。深麻酔したのちに胎仔の側脳室へプラスミド溶液を注入した。エレクトロポレーターECM830を用いて50~100 V、50 msの電気パルスを1秒間隔で5回、胎仔に処置した。電気穿孔が終了した後に、胎仔を腹腔内に戻した。免疫組織染色法は以下の手順で行った。組織を固定し30%スクロースで処理し、OCT compoundに包埋した。クリオスタットを用いて切片を作製した。ブロッキングののちに1次抗体を4℃で一晩反応させた。洗浄したのちに、蛍光物質で標識した2次抗体で室温2時間反応させた。洗浄したのちにカバーガラスで封入した。

【結果】 1. フェレットとマウスの大脳皮質アストロサイトにおける遺伝子発現の比較解析：公開データベースで解析した結果、FGF1がマウスのアストロサイトで多く発現していることがわかった。マウスと同様にフェレットのアストロサイトでもFGF1が高発現していた。さらにフェレットのアストロサイトにFGF受容体FGFR2とFGFR3が発現していた。おもしろいことに、マウスに比べて、フェレットのアストロサイトでFGF1の発現量が著しく多いことがわかった。2. アストロサイトの増殖におけるFGFの重要性：これらの結果から我々は、アストロサイトから分泌されるFGF1がアストロサイトの分裂を促進するというautocrine的なメカニズムがあると仮説を立てた。この仮説に一致して、フェレット大脳皮質アストロサイトをFGF1で処理したところ、Ki-67陽性率が増加した。逆にFGFR阻害剤であるBGJ398で処理したところ、Ki-67陽性率が減少した。3. 脳回形成におけるアストロサイトの重要性：脳回を持つ動物ではアストロサイトが多い傾向にあることから、アストロサイトの増加が脳回形成に重要であると仮説を立てた。子宮内電気穿孔法を用いて、フェレット大脳皮質で選択的にアストロサイトを減少させたところ、脳回形成が阻害された(下図)。本研究よりアストロサイトの数の制御機構と、脳回形成におけるアストロサイトの重要性が明らかとなった。

フェレットを用いた脳回形成におけるアストロサイトの重要性の解析

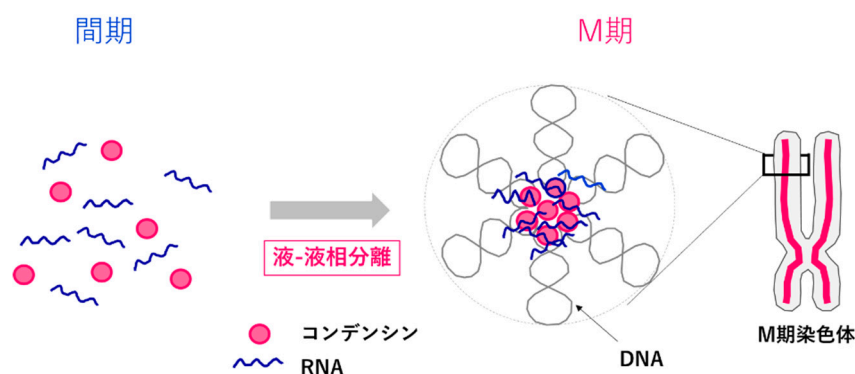


【目的】液-液相分離は、溶液が均質に混じりあわず2相に分離する現象で、*Science* 誌の2018年の“Breakthrough of the Year”に選ばれるなど、近年注目を集めている。液-液相分離は、特定のタンパク質やRNAのある領域への濃縮に寄与し、核小体などの膜を持たないオルガネラの形成、ヘテロクロマチンの形成と転写調節、オートファジーの制御など、多様な生命現象に関与することがわかりつつある。我々は、分裂期（M期）染色体からRNAを除去することにより、染色体骨格タンパク質コンデンシンIの染色体結合量が減少することを見出した。コンデンシンIサブユニットに液-液相分離に関与する天然変性領域（IDR）が複数箇所存在すること、液-液相分離がRNAによって促進されることから、RNAにより促進された液-液相分離がコンデンシンIのM期染色体の軸領域への濃縮に寄与するとの仮説をたてた。本研究では、RNAとコンデンシンIとの液-液相分離を検証し、M期染色体の構造制御における液-液相分離の生理学的な意義を解明することを目的とした。

【方法】M期染色体をスライドグラスに固定し、RNase A 処理によりRNAを除去して染色体を構成するタンパク質の局在、及びM期染色体の形態を詳細に観察した。また、M期に同調した細胞に液-液相分離の阻害剤1,6-ヘキサンジオール（1,6-HD）を添加して、染色体の形態、及びコンデンシンIの局在変化を調べた。さらに、1,6-HD除去と同時に、レンサ球菌の酸素感受性毒素ストレプトリジンO（SLO）を用いて細胞膜に一時的に孔をあけた細胞を、RNase A 存在下、非存在下で回復培養して、コンデンシンIの局在を調べた。さらに、精製したコンデンシンIにM期細胞から精製したRNAを添加し、液滴の形成を観察することにより、試験管内で液-液相分離の検証を行った。

【結果】スライドグラスに固定したM期染色体をRNase A 処理したところ、M期染色体が脆弱で細くなり周囲に繊維が伸びる構造変化が生じることを見出した。この構造変化は、機械学習による生体画像のパターン認識により定量化できた。また、RNase A 処理によって、コンデンシンIの染色体局在が約50%に低下した。一方で、RNA polymerase I 阻害剤の添加により、M期染色体表層部位のタンパク質局在は消失したが、コンデンシンIの局在は変化しなかった。この結果は、rRNA以外のRNAがコンデンシンIの染色体局在に関与することを示唆する。また、M期に同調した細胞を1,6-HD処理をしたところ、1,6-HDの濃度依存的、時間依存的にコンデンシンIが染色体から解離した。1,6-HDを除去することによってコンデンシンIの染色体局在は回復したが、同時にRNase A 処理をしたところコンデンシンIは染色体から解離したままであった。また、精製したコンデンシンIにM期細胞から精製したRNAを添加したところ、液滴が形成された。以上の結果は、RNAがコンデンシンIの液-液相分離を促進することを、試験管レベル、及び細胞レベル支持する。以上の研究結果から、RNAにより促進された液-液相分離がコンデンシンIの染色体の軸への濃縮に寄与し、コンデンシンIのDNAループ形成能力と相まってM期染色体骨格を形成するとのモデルを提示したい。

液-液相分離によるコンデンシンIの染色体軸への濃縮とM期染色体構築（モデル）

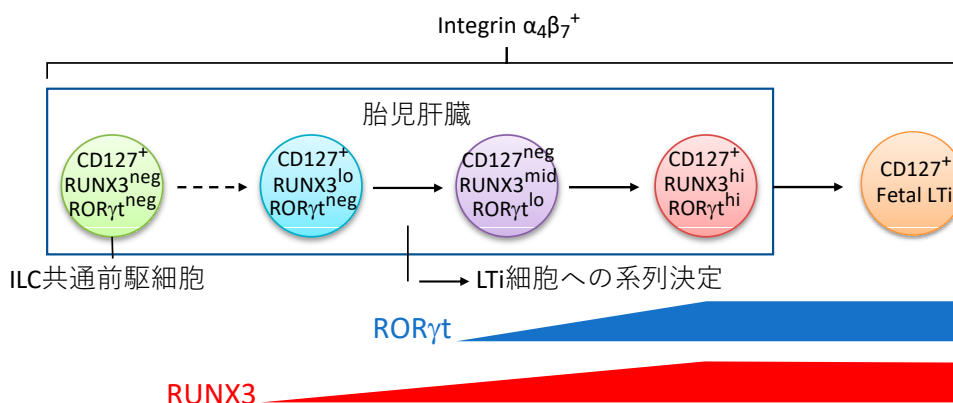


【目的】 リンパ節に代表される二次リンパ組織は、免疫応答の起点として働く重要な「場」であり、二次リンパ組織形成の破綻は生命維持に重大な支障を来す。リンパ節形成は、胎生期においてリンパ球の一種である Lymphoid Tissue Inducer (LTi) 細胞によって開始される。近年、LTi 細胞は、自然免疫様の反応様式を備え、自然免疫系と獲得免疫系の橋渡しに寄与する自然リンパ球 (Innate Lymphoid Cell : ILC) の一種であると再定義された。実際、LTi 細胞は、ILC の共通前駆細胞より出現するとともに、その発生は ILC3 と同様に転写因子 ROR γ t に依存する。しかしながら、LTi 細胞は他の ILC 細胞集団とは発生の様式や機能が異なることも明らかになっており、どのような分子機構によって LTi 細胞と ILC の分岐がもたらされ、LTi 細胞の特徴が形成されるのかその実態は未だ未解明のままである。本研究では、転写因子と DNA 上の転写調節領域 (プロモーター、エンハンサー、サイレンサー) の相互作用によって誘導されるゲノム上のエピジェネティックな変化を捉えることで、LTi 細胞の分化に関わる分子機構を明らかにすることを目的とする。

【方法】 本研究ではまず、LTi 細胞を含む転写因子 ROR γ t 陽性細胞集団に対し ATAC-seq 解析を実施し、ゲノムワイドにオープンクロマチン領域を確認した。その結果より、LTi 細胞特異的なゲノム上のオープンクロマチン領域を同定し、LTi 分化のどの段階で当該領域がオープンになるか (活性化されるか) を確認した。さらに、オープンクロマチン領域を対象とした転写因子フットプリント解析を実施し、オープンクロマチン領域を制御する転写因子の候補を抽出した。加えて、CUT&RUN 法によって候補転写因子の当該オープンクロマチン領域への結合を確認した。また、候補転写因子の発現状況を確認し、転写因子欠損マウスを利用することで当該転写因子の役割を検討した。

【結果】 ATAC-seq 法によって得られたオープンクロマチン情報に対し、主成分分析によってオープンクロマチン領域のプロファイルの細胞種間類似度を求めたところ、LTi 細胞およびその前駆細胞は他の ROR γ t 陽性細胞集団とは異なるオープンクロマチンパターンを保有することが確認された。ゲノムワイドなオープンクロマチン領域の探索によって、ROR γ t をコードする遺伝子領域 (*Rorc*) に LTi 細胞特異的なオープンクロマチン領域が見出された。この領域は ROR γ t の発現が低い LTi 前駆細胞では認められず、ROR γ t を高発現する前駆細胞以降の分化段階において確認されることから、ROR γ t の発現を高発現化するためのエンハンサー領域と考えられた。本領域の塩基配列解析によって結合転写因子を予測したところ、複数の転写因子候補が抽出された。ATAC-seq データおよび転写因子結合配列情報を統合した転写因子フットプリント解析の結果、レチノイン酸受容体 (RAR:RXR)、転写因子 RUNX、芳香族炭化水素受容体 (AhR)、および転写因子 RUNX の結合配列へのタンパク質結合が予測され、これらが ROR γ t エンハンサーを活性化する転写因子の有力候補であると考えられた。実際、CUT&RUN 法によって当該領域への転写因子の結合を確認したところ、RUNX3 の結合が確認された。RUNX3 の発現は、転写因子 ROR γ t の発現に先立つ傾向が確認されたことから、ROR γ t の発現制御を介した LTi 細胞の分化制御における RUNX3 の関与が想定された。

RUNX3 と ROR γ t の発現に注目した LTi 細胞分化系列決定モデル

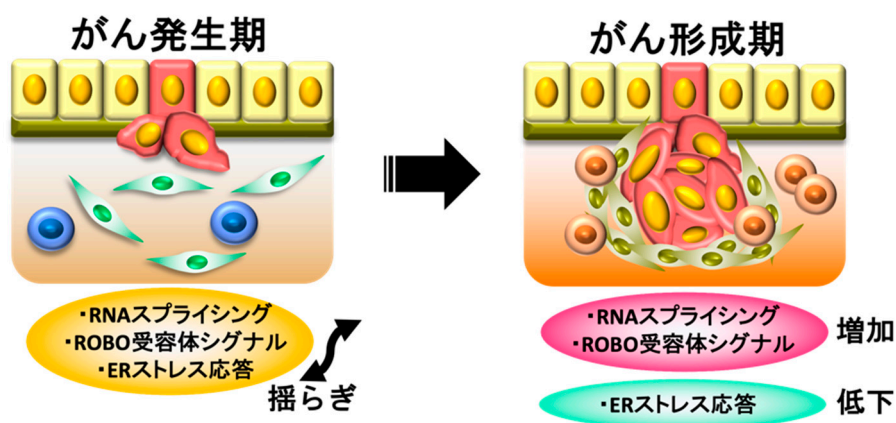


【目的】長い間、がんは本邦における死因の第一位であることから、その発症機序と病態の解明、そしてこれらの科学的知見に基づいた革新的な治療法の開発が現在も希求されている。これまでのがんの基礎研究の大半は、最終的に悪性化した腫瘍組織もしくはがん細胞を対象として、これらと正常組織もしくは正常細胞との性状の違いを調べることにより、「がん」という疾病を理解しようとされてきた。しかしながら、がん細胞が誕生した瞬間、すなわち平和的な多細胞社会に突如としてがん細胞が出現した際にどのような生体内反応が生じるかはよく分かっていない。がん細胞に従順し、がん細胞の生存・増殖を支持するような環境を整備するのか、もしくはがん細胞に抗い、がん細胞を駆逐しようとするのか、その実態は不明である。また、がん細胞が産生されて腫瘍が形成する過程において、どの段階より正確に「がん」と判断できるのかを具体的に定義されたことはなく、何をもち「がん」とするのか曖昧のままである。がん成立という特異的臨界点の直前では組織を正常化する機能が弱まり、がん化と正常化のプロセスの拮抗作用により大きな揺らぎが生じるという仮説を立て、何らかの細胞の遺伝子発現量の少なくとも一部が強い同期性揺らぎを示すだろうとの着想に至った。そこで本研究では、研究代表者らが作出した単一細胞レベルでがん細胞が基底膜を超えて間質組織内へと浸潤し発がんする *de novo* 発がんマウスモデルを用いて、がん細胞が正常間質をがん間質へと遷移させる「がん臨界」の分子実体を同定することを目的とする。

【方法】研究代表者らが作出した *de novo* 型発がんマウスを用いて、正常期、少数のがん細胞で構成されるがん発生期、さらには多数のがん細胞で包巣が形成されたがん形成期のトランスクリプトーム情報を空間的オミクス解析法である Visium により取得した。この情報を基に、がん形成過程における遺伝子発現変化の遷移を網羅的に解析した。さらには、Gene Ontology (GO) 解析を行い、がん発生期ではその発現に揺らぎが生じるが、がん形成期には安定的に発現が増加もしくは低下する GO 遺伝子群を同定した。また、腫瘍部で特徴的に遺伝子発現変化する分子を解析し、がん細胞のリンパ管侵襲に関連し得る遺伝子を探索した。

【結果】正常期、がん発生期、がん形成期における Visium による空間的遺伝子発現解析の結果、がんの発生期で RNA スプライシング制御や ROBO 受容体シグナルなどの GO 遺伝子群の発現に揺らぎが生じるが、がんが形成されると安定的にその発現が増加することが分かった。一方、ER ストレス応答もまた同様にがん発生期においては、細胞集団によってその発現にばらつきが認められるものの、がん形成期では安定的に発現が低下することを見出した (下図)。また、Visium 解析の結果、腫瘍部ではリンパ管内皮細胞が内皮-間葉転換 (Endothelial-Mesenchymal Transition: EndMT) する際に発現が変動することが知られているマーカー分子の変容が認められた。そこで、実際に腸管 whole mount 染色により EndMT マーカーを免疫染色した結果、がん細胞に近接したリンパ管内皮細胞で EndMT マーカーの発現が観察された。

本研究成果



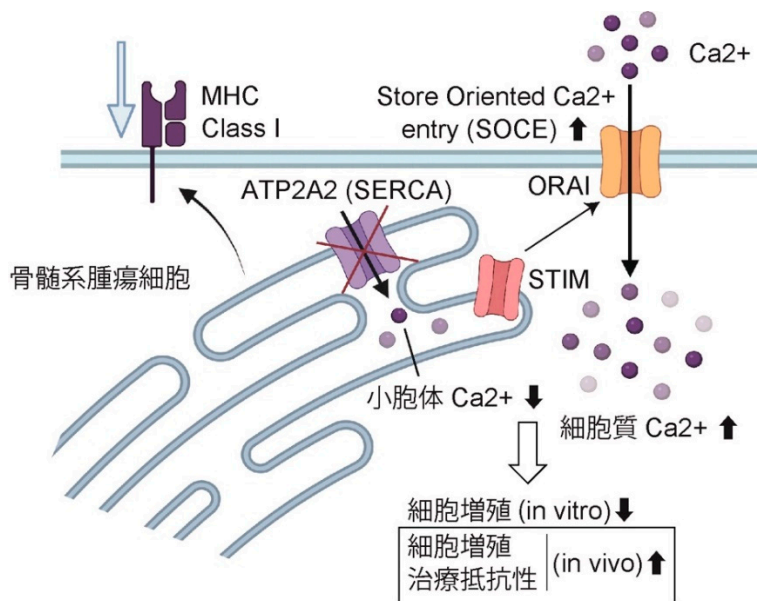
36 がんの悪性を制御するカルシウムシグナルの役割解明	山 進
--------------------------------	-------

【目的】 最近のゲノム編集技術の発達、特に CRISPR/Cas9 法の普及により、がん細胞を用いた CRISPR library スクリーニングが盛んに行われるようになり、がん細胞の増殖を制御する分子についての情報が飛躍的に増大した。しかし、これらのスクリーニングの多くは *in vitro* の培養系を用いたものか、もしくは最初に *in vitro* 培養系で候補分子を絞った上で *in vivo* 実験を行ったものであり、生体内特異的にがん細胞の増殖を制御する分子に関する情報は、現在でもまだ不足している。著者は、マウス骨髄系腫瘍モデルを用いて *in vivo* CRISPR/Cas9 library スクリーニングを行い、骨髄系腫瘍の増殖を生体内特異的に抑制する分子として Ca²⁺シグナル制御分子 Atp2a2 (Serca) を同定した。そこで本研究では、Atp2a2 欠失が引き起こす Ca²⁺シグナルの異常が生体内特異的に骨髄系腫瘍の悪性を誘導するメカニズムの解析を行なった。

【方法】 MLL-AF9 をマウス骨髄細胞に導入して作製した急性骨髄性白血病細胞 (MLL-AF9 細胞) と、変異型 ASXL1・変異型 SETBP1 を導入して作製したマウス骨髄異形成症候群細胞 (combined expression of SETBP1 and ASXL1 Mutations : cSAM 細胞) に Cas9 および Atp2a2 標的 sgRNA を導入し、骨髄系腫瘍の増殖に及ぼす影響を移植モデルおよび *in vitro* 培養系で検証した。また、コントロールおよび Atp2a2 欠失細胞における細胞質、小胞体 Ca²⁺濃度を Fura-red を用いて測定し、Ca²⁺シグナルの変化を解析した。さらに、RNA-seq およびメタボローム解析を行い、Ca²⁺シグナルの変化が骨髄系腫瘍に及ぼす影響を多角的に解析した。

【結果】 Atp2a2 を欠失した骨髄系腫瘍細胞は、*in vivo* では増殖が促進されるのに対し、*in vitro* では逆に増殖が抑制された。これにより、骨髄系腫瘍細胞において Atp2a2 が生体内特異的に腫瘍抑制遺伝子として働いていることを確認した。さらに、Atp2a2 欠失骨髄系腫瘍細胞は生体内で抗がん剤に対する薬剤抵抗性を示すことを見出した。また、Atp2a2 欠失により小胞体内 Ca²⁺濃度の低下、細胞質内 Ca²⁺濃度の上昇、および store-operated Ca²⁺ entry (SOCE) の活性化などカルシウムシグナルに異常が生じることを突き止めた。さらに Atp2a2 欠失骨髄系腫瘍細胞が生体内特異的に増殖優位性を獲得する機序の 1 つとして、MHC class1 の発現低下により、T 細胞からの攻撃が減少することを明らかにした。本研究により、Atp2a2 欠失による Ca²⁺シグナル異常が生体内特異的に骨髄系腫瘍の悪性を促進するメカニズムが明らかとなった。また、腫瘍の発症・進展を生体内で制御する分子を探索するための *in vivo* CRISPR/Cas9 library スクリーニングの有用性を示すことができた。

Ca²⁺シグナル制御因子 ATP2A2 は、骨髄系腫瘍の増殖を生体内特異的に抑制する

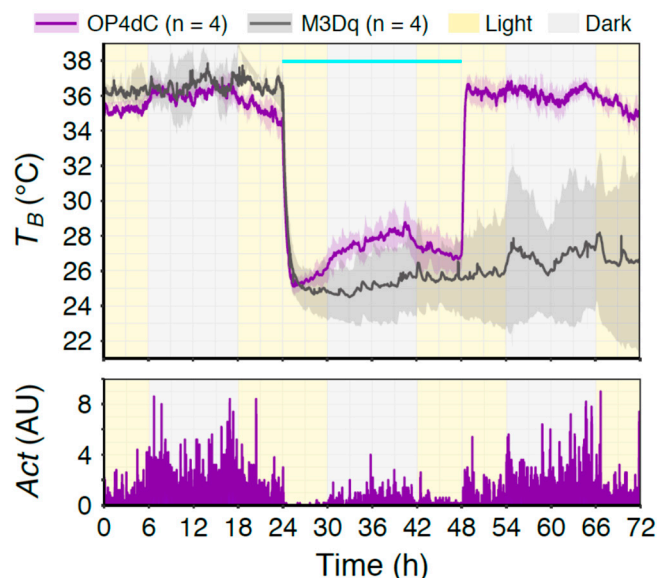


【目的】我々は、最近、視床下部前腹側脳室周囲核 (AVPe) に存在し、*Qrfp* 遺伝子を発現する少数の神経細胞群 (Q ニューロン) を操作することにより、本来冬眠を行わないマウスやラットにおいて、冬眠状態と非常によく似た、環境温度に近い低体温・低代謝状態を数日にわたり誘導することが可能であることを見出した。非冬眠動物にも冬眠様の制御された低代謝・低体温状態 (QIH) を誘導できるという知見を利用して、将来ヒトやペット・家畜などに人工冬眠を導入する技術基盤を支える生物学的知見を得ることを目的とした。

【方法】1. 研究全体の推進のため、極弱光により長期間の QIH 誘導を可能にするツールを作製した。C 末端を中心に OPN4 に改変を加えたものを数種作製し、AAV ベクターを用いて *Qrfp-iCre* マウスの AVPe に発現させ、光ファイバーを留置して QIH 誘導を行い、体温はサーモグラフィーでモニターした。系の確立後、QIH 中の体温動態および心拍数の変動をテレメトリーによりモニターし、QIH 導入および回復時の心機能の変化を明らかにした。2. Q ニューロンのターゲットニューロンの同定を目指し、Q ニューロンを興奮させたときに興奮する視床下部背内側核 (DMH) ニューロンをラベルするために、TRAP2 マウスの AVPe に *Qrfp* 遺伝子プロモーターを用いた AAV ベクターにより変異型 OPN4dC を発現させ、DMH に hM3Dq を Cre 依存的 AAV ベクターにのせて投与したのち、AVPe に留置した光ファイバーを用いて光遺伝学的に QIH を導入した。Tamoxifen 投与により、QIH 起動時に興奮したニューロンを hM3Dq にてラベルした後、CNO 投与により QIH のような低体温・低代謝状態が誘導できるか検討した。

【結果】1. 光操作をもちいた QIH 誘導法の開発: QIH 状態を高い時間分解能でオン・オフできる、光操作による QIH 誘導法を確立した。これを用いて QIH 導入および QIH からの離脱時の自律神経応答を明らかにした。OPN4 を改変したオプシン (OPN4dC) を用いて、極めて微弱な光で 24 時間にわたり QIH を操作できるようになった。このことにより、QIH 導入時だけではなく、復温時のダイナミックな生体機能の変化を測定できるようになった。QIH 導入時には心拍数の低下は体温の低下より早く観察され、復温時も、心拍数の増加が体温の上昇に先行して見られることが分かった (Takahashi et al. Cell Rep Methods, in revision)。この方法により、今後、QIH 中が睡眠だけではなく、記憶・情動などに及ぼす影響を解析できると思われる (下図)。2. Q-flp マウスの作製: 現在繁殖を行っており、Q ニューロンサブタイプの機能解析やターゲットニューロンの同定に用いる予定である。3. 10×Chromium を用いて、Q ニューロンを含む AVPe 領域の単細胞解析を行い、Q ニューロン発現遺伝子に関する情報を得た。

OPN4dC をもちいた QIH 誘導における深部体温 (上、 T_B) と行動量 (下、Act) の経時変化



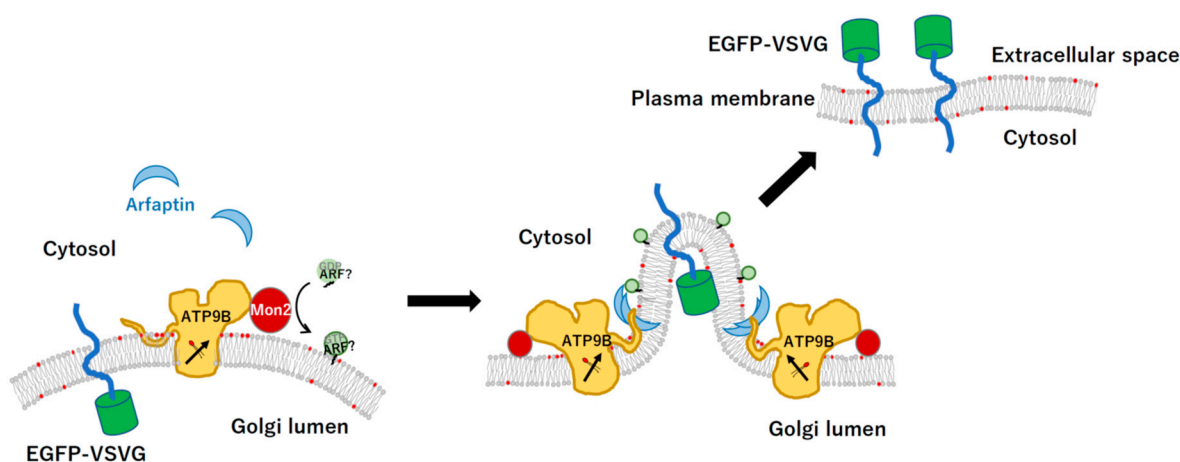
38 タンパク質分泌経路における脂質フリッパーゼの機能	申 惠媛
----------------------------------	------

【目的】 生体膜は、脂質二重層からなり内葉と外葉において脂質組成の非対称性を保持している。P4-ATPase（フリッパーゼ）は、膜脂質を外葉から内葉に移動（フリップ）させることで、脂質非対称性を調節しているが、P4-ATPaseの調節メカニズムやその生理機能についてはよく分かっていない。これまでに遺伝学的研究から、酵母のP4-ATPaseがメンブレントラフィックに関与することが報告されていたが、ヒトの14種類のP4-ATPaseとメンブレントラフィックの関連はよくわかっていなかった。その中で私たちは、細胞膜におけるP4-ATPaseのフリップ活性の亢進が膜変形を引き起こすことでエンドサイトーシスを促進することおよびP4-ATPaseのATP9Aがエンドソームから細胞膜へのリサイクリング経路に関わることを示した。しかし、タンパク質分泌経路におけるP4-ATPaseの機能は不明であった。そこで、本研究では、ゴルジ体に局在するP4-ATPaseに着目し、タンパク質分泌経路におけるP4-ATPaseの機能やそのメカニズムを明らかにすることを目的とした。

【方法】 主にゴルジ体を含む細胞内オルガネラに局在するATP9AとATP9Bの細胞膜への輸送は、細胞表面のビオチン化により調べた。また、ゴルジ体局在を決定するATP9BのN末端サイトゾル領域の膜との結合様式については、digitoninを用いた限定的に生体膜を透過させる方法で調べた。タンパク質分泌経路におけるATP9AやATP9Bの機能を調べるために、CRISPR/Cas9システムを用いてATP9AおよびATP9Bのノックアウト細胞を作製した。これらのKO細胞に温度感受性変異を持つ膜タンパク質のVSVG (tsO45)を発現させ、その細胞膜への輸送を調べた。

【結果】 私たちはこれまでに、ATP9Aは主にエンドソームやゴルジ体に局在し、ATP9Bはゴルジ体だけに局在することを示した。一方で、本研究によりATP9Aおよび一部のATP9Bが細胞膜を介して細胞内でサイクルしていることが分かった。また、ATP9BのN末端疎水性領域はゴルジ体膜に一部埋め込まれていることを示し、ATP9Bがより強固にゴルジ体に留められていることが考えられた。ATP9AやATP9Bのノックアウト細胞を用いてVSVG (tsO45)の細胞膜への輸送を調べたところ、どちらの細胞においてもVSVGのゴルジ体から細胞膜への輸送が有意に遅延することが分かった。したがって、ATP9AやATP9Bはゴルジ体から細胞膜へのタンパク質輸送経路において重複する機能を持つことが考えられた。さらに、ATP9AとATP9Bの結合タンパク質を調べたところ、両方ともにメンブレントラフィックに関連するMon2と結合することを見出した。ATP9AやATP9Bは、Mon2のような結合タンパク質と協調してゴルジ体以降のタンパク質分泌経路に関与することが考えられた。

P4-ATPaseを介したゴルジ体から細胞膜へのメンブレントラフィックのモデル

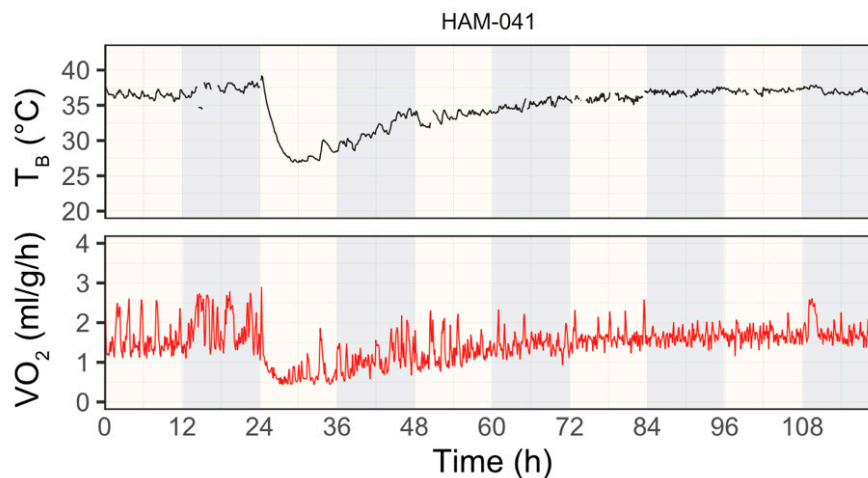


【目的】 冬眠は一部の哺乳類が呈する省エネ機構であり、冬季・飢餓などのエネルギー供給が危機的な状況において、代謝を能動的に低下させることで必要なエネルギーを低下させて、少なくなったエネルギー供給でも生存をはかる戦略である。基礎代謝が正常状態の1~30%程度まで低下するのにも関わらず、動物の臓器・組織は障害を受けることなく長時間に渡る低代謝・低体温に耐性を発揮する。このような低代謝適応能を人間に実装し、人工冬眠を実現できれば臨床において高い代謝が原因で障害をもたらす様々な病態に有効であると考えられる。たとえば、急性疾患が発症し病院に搬送されるまでの期間を冬眠することで、現在では救命できない患者を救える可能性がある。冬眠のもつ低代謝適応能を理解するためには冬眠を研究することが王道と言えるが、既存の手法では冬眠動物は任意のタイミングで冬眠を誘導することができない。我々は2020年に非冬眠動物であるマウスを冬眠様状態に誘導することに成功した。この冬眠マウスモデルは、視床下部の *Qrfp* 陽性神経を化学遺伝学・光遺伝学的手法を用いて特異的に興奮させると、冬眠と似た低代謝・低体温状態を数日間に渡って誘導することができる (QIH: Q 神経誘導性低代謝)。QIH の最大の特徴は、誘導開始から約 30 分で冬眠様状態になることである。同冬眠マウスモデルにより冬眠研究の飛躍的な前進が期待される一方、低代謝・低体温の程度が冬眠動物には及ばないという課題も残っている。そこで、本研究課題では我々が開発したマウスの冬眠様状態の誘導法を基盤に、冬眠動物の人為的な冬眠誘導法の開発に挑戦する。

【方法】 ハムスターAVPe の神経を興奮させるために、AAV9-CamK II-hM3Dq-mCherry を作製し、シリアンハムスター (オス、10 週齢、n=3) に対して、脳固定装置 (David Kopf, Model940) にてブレグマより X+0.40 mm ; Y 2.56 mm ; Z -7.80 mm、にウイルス量 0.3 μ L を注射した。AAV の注射から 3 週間後に、体温測定装置を全身麻酔下にて腹腔内に留置した。AAV 投与から 4 週間後に代謝測定装置に移動させ、環境温度が 20°C、明暗周期が 1 日の始まりから明暗=12 時間: 12 時間に保たれた環境にて、酸素消費量と体温を 5 日間測定した。測定開始から 24 時間目に CNO (Abcam, ab141704) を生理食塩水に溶解し 100 μ g/mL としたものを、腹腔内に投与した (1 mg/kg)。

【結果】 ハムスターAVPe の興奮性神経を非特異的に興奮させると、ラットと同様に QIH 様状態が誘導されることが確認された。しかし、冬眠を誘導できなかったため、今後は更に特異度の高い方法でハムスターの Q 神経を興奮させることを検討する。さらに、ハムスターの自然な冬眠を誘導できる神経回路の探索をおこなう。

冬眠動物における QIH 様状態の誘導

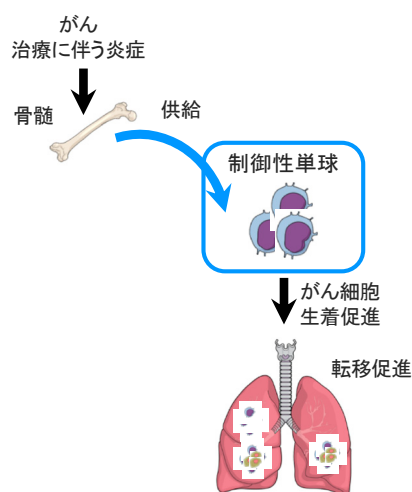


【目的】 がんの遠隔転移は、がん患者の予後を規定する最も重要な要素の一つであり、転移のメカニズムの解明とその制御法の開発は、がん治療における最重要課題である。がん転移の成立には、EMT などのがん細胞そのものの性質の変化に加えて、転移先の組織において、がん細胞の生着および増殖を可能にする局所の環境が整備されることが必要と考えられている。この環境は前転移ニッチ (premetastatic niche) と呼ばれ、免疫細胞や線維芽細胞等により形成される。これまでの研究により、この前転移ニッチの形成は炎症によって促進されることが明らかになっている。さらに、この炎症に伴う前転移ニッチ形成促進は、骨髄由来細胞、特に単球・マクロファージ系の細胞が重要な役割を担うことが報告されている。しかし、この炎症に伴う前転移ニッチ形成の鍵となる単球・マクロファージ系細胞の詳細は未解明であり、このことが、前転移ニッチ形成機構解明の大きな障壁となっている。本研究では、この前転移ニッチの形成における $Ym1^+Ly6C^+$ 制御性単球の関与を明らかにすることを目的とした。

【方法】 がんの遠隔転移の評価には、B16 メラノーマ細胞株を用いた炎症誘発性血行性肺転移モデルを使用した。Ym1 発現細胞可視化マウスとして、Ym1-Venus マウスを用いた。また、Ym1 陽性細胞を選択的に消去する目的で Ym1-DTR マウスを用いた。炎症誘導には、LPS などの Toll-like receptor のリガンドを用いた。また、がん原発巣の治療として、外科切除あるいは放射線照射を行った。

【結果】 本研究で我々は、 $Ym1^+Ly6C^+$ 制御性単球が、炎症に伴う前転移ニッチの形成に重要な役割を担っていることを明らかにした。種々の TLR 刺激による炎症誘発性血行性肺転移モデルを用いた検討により、LPS 投与による炎症誘導により肺に前転移ニッチが形成され、がんの肺転移が促進されることが明らかとなった。Ym1 発現細胞可視化マウス (Ym1-Venus マウス) を用いた検討により、LPS 投与後に多数の $Ym1^+Ly6C^+$ 制御性単球が増産されること、および、 $Ym1^+Ly6C^+$ 制御性単球を選択的に消去したマウス (Ym1-DTR マウス) では、この炎症に伴うがんの肺転移が著明に減少することが明らかとなった。さらに、LPS を投与したマウスの骨髄から $Ym1^+Ly6C^+$ 制御性単球を分取し、これを健常マウスに移入するだけで、肺に前転移ニッチが形成され、転移促進がみられることが分かった。これらの知見より、 $Ym1^+Ly6C^+$ 制御性単球が、炎症により誘導される前転移ニッチ形成に必要な細胞であり、がん転移促進の鍵となる細胞であると結論づけた。さらに、がん原発巣に対する外科治療や放射線治療に伴う炎症によっても、 $Ym1^+Ly6C^+$ 制御性単球の増加、および、肺転移促進が見られたことから、がん治療を契機としたがんの転移促進にも本細胞が関与している可能性が示された。

炎症に伴うがん転移促進機構

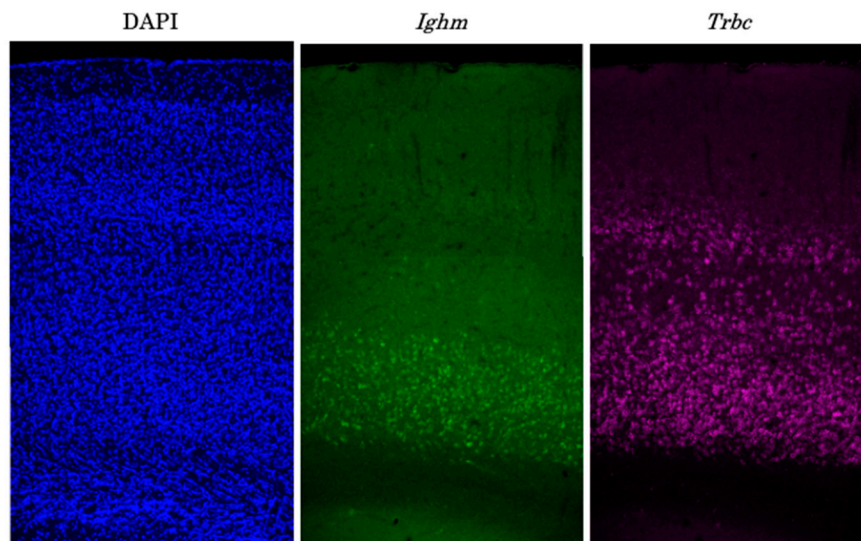


【目的】 我々の大脳皮質は数百億個にのぼる神経細胞から構成され、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリアといったグリア細胞とも複雑に相互作用して、多様かつ特異的な神経回路網を形成することで様々な入力に対して秩序だった適切な応答をすることができる。さらに近年、その機能には、脳実質の回路網に直接関わる細胞だけでなく、末梢組織から進入してくる B 細胞や T 細胞などの免疫細胞も関与することが明らかになりつつある。神経系と免疫系はともに多様性と特異性を最大の特徴として持つことから共通の分子群を用いていることが想定され、これまでに神経ガイダンス因子である Semaphorin や Eph/Ephrin、補体系、Toll 様受容体 (Toll-like receptor : TLR)、ケモカイン、サイトカインなど多くの分子が両方で用いられていることが明らかになりつつある (Morimoto et.al., Front Neurosci. 2019)。一方、既報では自然免疫系に関わる分子の神経系での役割の報告が主であり、獲得免疫系に関わる分子については知見が乏しい。神経系の多様性を免疫関連分子で担保するには、ほぼ無限の相手の特異的に認識できる B 細胞受容体 (B cell receptor : BCR) すなわち免疫グロブリン (Immunoglobulin : Ig) や、T 細胞受容体 (T cell receptor : TCR) が有力な候補になると予測し、本研究ではこれらの脳における発現の検討を行った。

【方法】 発生期および成体のマウス脳を用いて、*in situ* hybridization chain reaction、免疫組織化学染色、逆転写後 PCR、single cell RNA-seq (scRNA-seq) のデータを用いた解析を行い、Ig と TCR をコードする mRNA を発現する細胞を調べた。

【結果】 IgM の重鎖の定常領域である *Ighm* の成体脳における発現を *in situ* hybridization chain reaction 法を用いて調べたところ、大脳皮質深層神経細胞で発現することがわかった。皮質深層の神経細胞には *Ighm* mRNA 陰性の細胞も見出されたことから、同部位には *Ighm* を発現する神経細胞と発現しない神経細胞とが混在していることが示唆された。次に、生後 0 日及び 8 週齢のマウスの大脳皮質から調製した RNA を用いて逆転写後に PCR を行ったところ、*Ighm* mRNA は成体期のみならず発生期においても発現していることが見出された。次に TCR について生後 5 日のマウス大脳皮質の scRNA-seq のデータを用いて検討した結果、TCR α 鎖の定常領域をコードする *Trac* が少数の細胞に発現することが明らかになった。また、TCR β 鎖に関しては、*Trbc1* と *Trbc2* のうち *Trbc2* が主に発現していることが見出された。そこで次に *in situ* hybridization chain reaction を行ったところ、*Trbc* は生後直後は視床で発現するものの生後 4 日頃からは大脳皮質深層でも発現するようになり、その後大脳皮質での発現は浅層にも広がり成体においては広く大脳皮質に発現することが明らかになった。

大脳皮質における免疫グロブリン IgM 定常領域 (*Ighm*) および T 細胞受容体定常領域 (*Trbc*) の mRNA の発現



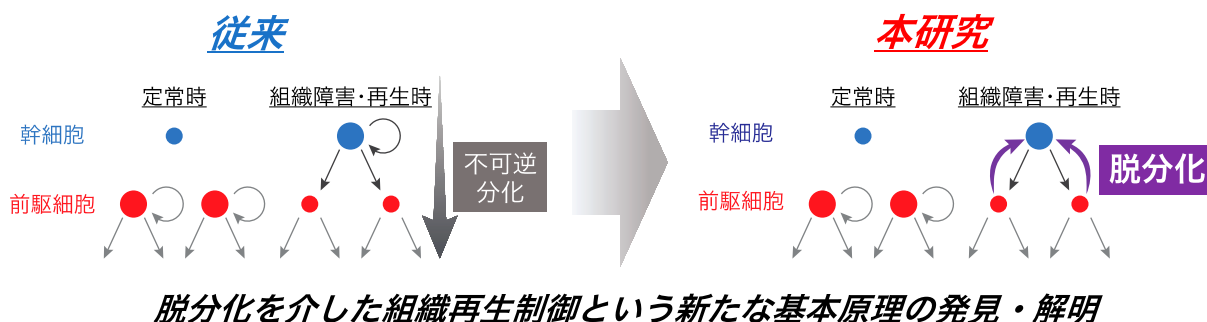
42 幹前駆細胞の分化・脱分化による組織維持再生制御	中西 未央
----------------------------	-------

【目的】 幹細胞と前駆細胞は組織の状態変化に応じて、細胞供給における各々の役割を劇的に変化させる。例えば造血幹前駆細胞の場合、定常状態では幹細胞がほとんど造血に貢献せず、各種の前駆細胞が活発に自己複製・分化して造血を担う。これに対し、放射線照射した骨髄への移植時や薬剤による骨髄破壊後の組織再生時には、幹細胞が活発に自己複製・分化して造血と骨髄再生に寄与する。このような幹前駆細胞間の活性バランスの変化は、消化管上皮や表皮などでも観察されており、組織の状態変化に応じた幹前駆細胞間の活性バランス調節が恒常性維持と修復再生制御の鍵であると考えられる。しかし、このような幹前駆細胞間のバランス制御メカニズムは明らかになっていない。我々は最近、ヒト多能性幹細胞（ES 細胞および iPS 細胞）の一部に、前駆細胞様の特徴をもつ細胞を見出し、これを多能性創始細胞（ファウンダー細胞）と名づけた。予備的解析の結果興味深いことに、ファウンダー細胞は分化関連遺伝子の発現にもかかわらず、幹→前駆（ファウンダー）細胞への分化だけでなく、前駆→幹細胞への脱分化も可能である事が示された。この結果は多能性幹細胞集団において、幹細胞から前駆細胞への分化が可逆的であり、幹前駆細胞が互いに分化と脱分化を繰り返して動的なバランス制御を行っている事を強く示唆する。そこで本研究では、我々が多能性幹細胞集団で確立したモデルを組織幹前駆細胞（特に造血幹前駆細胞）へと敷衍し、幹前駆細胞が分化・脱分化により互いのバランスを動的に変化させ、組織維持や再生を制御することを明らかにし、その未知の相互制御メカニズムを解明することを目的とした。

【方法】 ヒト ES 細胞社会で観察された幹前駆細胞間の分化・脱分化を介したバランス制御が、マウス造血系でも起こり得るかを、近年確立された造血幹細胞 *ex vivo* 培養法をもちいて調べた。また造血幹・前駆細胞の相互作用が互いの分化・脱分化に及ぼす影響を幹・前駆細胞（識別のためコンジェニックマウスから分離）の共培養実験で調べた。次に、造血幹細胞が前駆細胞の脱分化を制御する未知のシグナルを、造血幹前駆細胞 1 細胞 RNAseq データをもちいて予測した。さらに骨髄切片の多重免疫染色・共焦点顕微鏡観察により、造血幹前駆細胞の相対的位置関係を調べた。

【結果】 マウスの 4 種の前駆細胞のうち巨核球・赤血球系前駆細胞（MPP2）の一部が、造血幹細胞と同じフェノタイプへと自発的に脱分化しうることが示された。さらに幹細胞との共培養によって前駆細胞の脱分化が減少したことから、幹細胞に由来するシグナルによって前駆細胞の脱分化が抑制されている可能性が示唆された。幹細胞と巨核球・赤血球系前駆細胞とに特異的に発現する遺伝子を抽出し、幹細胞由来の脱分化制御シグナルのリガンド：レセプター候補を予測した結果、造血幹細胞から前駆細胞への脱分化制御シグナル候補として直接的な細胞接触（cell-cell interaction）を介したものが多数同定された。実際に組織学的解析により、マウス・ヒト骨髄で造血幹前駆細胞が数～十数細胞の密接したクラスターを形成していることが初めて明らかとなった。

幹前駆細胞による組織維持・再生制御の新モデル

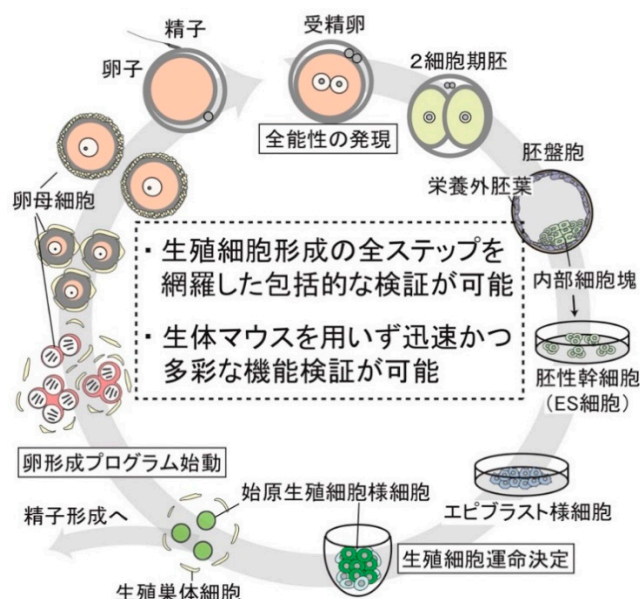


【目的】 卵子は次世代個体発生を担保する生命継承の担い手であり、その形成機構の異常は不妊や先天異常の原因となる。卵子は、発生初期に形成される始原生殖細胞を起源とし、減数分裂による新たな遺伝的組み合わせの創出、母性エピゲノムの獲得、母性因子の蓄積を介して全能性を賦与する細胞形質を獲得する。卵形成を構成するこれらのプロセスがどのように連動して制御され、全能性をもたらす機能的な卵子の産生へとつながるかは理解されていない。本研究の目的は胎生期から始まる卵特異的な転写ネットワークがどのように段階的に構築されていくかを理解し、全能性を賦与する細胞形質の構築機序を解明することである。

【方法】 研究代表者はこれまでに、多能性幹細胞を起点とした生殖細胞の試験管内誘導系を活用し、始原生殖細胞から卵母細胞を誘導するシグナル・転写制御機構の解明に成功し、雌性性決定因子である ZGLP1 を同定した。本研究では、マウス卵母細胞の試験管内誘導系を活用して、ZGLP1 によって早期に活性化される転写因子群の機能解析を行い、胎生期から始まる卵形成転写ネットワークの構築機序解明を目指した。

【結果】 はじめに、ZGLP1 の遺伝子破壊および強制発現した生殖細胞において網羅的な遺伝子発現解析を行い、ZGLP1 により早期に活性化される遺伝子群を同定した。そして、それら遺伝子群の卵形成各過程における発現動態を調べたところ、(1) 胎生期の卵母細胞のみで一過的に発現のある因子群、(2) 生後、成体においても発現が維持または発現が上昇される因子群の 2 群に大別することができた。これらの因子群の中から卵母細胞における機能が不明な転写因子群に注力し、CRISPR/Cas9 システムを用いて遺伝子欠損 ES 細胞株を樹立した。卵母細胞試験管内誘導系を用いて遺伝子欠損 ES 細胞由来生殖細胞の卵形成における動態を解析したところ、(i) 性決定後の生殖細胞の早期喪失、(ii) 減数分裂進行の異常、(iii) 原始卵胞形成の阻害、(iv) 卵母細胞数の増加、という卵形成の様々な過程を制御する遺伝子群が含まれていることが明らかになった。これは、ZGLP1 による雌性性決定直後から卵形成を構成する複数の機能モジュール (減数分裂期相同組換え形成、細胞周期、品質管理チェックポイント、レトロトランスポゾン制御、卵胞形成、母型エピゲノム構築) が連動して活性化されていることを示唆している。また、二次卵胞の形成までには顕著な表現型を示さない遺伝子もあり、*in vitro* 誘導系を用いた卵形成必須遺伝子スクリーニングの有用性も確認できた。今後、遺伝子変異 ES 細胞を起点とした *in vitro* 卵母細胞誘導系を活用してゲノムワイドな遺伝子発現解析、また、ヒストン修飾の変遷を ChIP-seq により解析し、胎生期から構築される卵特異的な転写ネットワークの構築機序のさらなる解明を目指す。

試験管内再構築系を駆使した生命継承機構の解析

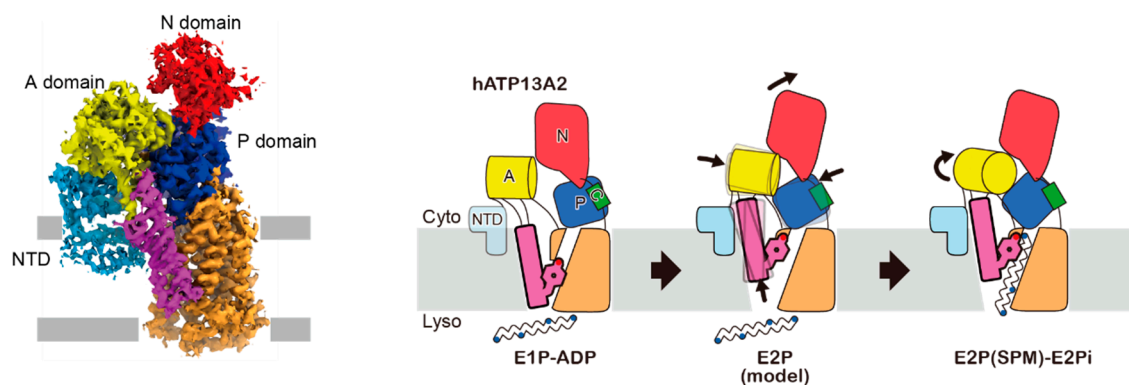


【目的】 *ATP13A2* (*PARK9*) はパーキンソン病などの神経変性疾患の原因遺伝子として特定された遺伝子である。最近の研究から *ATP13A2* はリソソームにおけるポリアミン輸送体としてはたらくことで、細胞質のポリアミン濃度維持に関わり、種々の細胞毒性から保護していることが明らかになった。*ATP13A2* は P 型輸送体に属しており、分子量が 100~200 程度のポリアミンを輸送する。他の P 型輸送体の多くはカチオン輸送体としてはたらくのに対して、基質のサイズや性質が著しく異なることから、その輸送機構に関して多くの疑問が残されていた。本研究では、*ATP13A2* の持つ独自の仕組みを明らかにすることを目的として、クライオ電子顕微鏡による構造解析、および構造をもとにした変異体解析を行った。

【方法】 ヒト由来の *ATP13A2* を対象として、クライオ電子顕微鏡による単粒子構造解析を行った。輸送サイクルにおける構造変化、および輸送基質の認識機構を明らかにするために、種々の阻害剤、および基質であるスペルミンを加えた状態で単粒子構造解析を行い、最終的に 4 つの反応中間体の構造を明らかにした。さらに、得られた構造から明らかになったポリアミン結合に関わるアミノ酸に対して、変異を導入して *ATP13A2* のスペルミン依存的な ATPase 活性に与える影響を評価することで、これらのアミノ酸のスペルミン輸送における役割を評価した。これらの結果から、*ATP13A2* の持つ独自の輸送機構に関して考察を行った。

【結果】 ヒト *ATP13A2* の複数の反応中間体の構造から、輸送サイクルの大まかな構造変化が明らかになった。特に ATP の自己リン酸化に伴って、E1 から E2 へと遷移する過程の詳細な構造変化が明らかになった。リン酸化を受けた P ドメインに対して A ドメインが近づくように動き、その動きが M1-2 の二本の膜貫通ヘリックスを介して構造変化が伝わり、リソソーム内腔のゲートを開けるようにして、スペルミンの結合するトンネル状の溝を作り出すことが明らかになった。この溝の周囲には、負電価を持つアミノ酸、芳香族性アミノ酸が多く存在しており、これらの変異はいずれもスペルミンの輸送活性を著しく低下させることが明らかになった。したがって、基質であるスペルミンは特定のアミノ酸によって強く認識されるのではなく、複数の似たような性質を持つアミノ酸によって広範囲に渡って認識されることがわかった。このような認識機構は、*ATP13A2* が示す種々の線形ポリアミンに対する幅広い基質選択性によく合致した。さらに、*ATP13A2* に特異的にみられる N 末端側のドメイン (NTD) は脂質膜に部分的に突き刺さったような特徴的な構造を示しており、その密度は E2 状態でのみ観察されたことから、E2 状態の安定化に寄与しているのではないかと考えられた。実際に、これまでの研究によって、NTD には PIP₂ などの脂質結合領域が存在しており、これらの脂質の結合によって、輸送サイクルを促進することが報告されている。したがって、本研究によって得られた結果から、NTD は脂質膜へアンカーされることで E2 状態を安定化して、*ATP13A2* の輸送サイクルを促進するという独自の性質をもつことが明らかになった。

クライオ電子顕微鏡によって明らかになった hATP13A2 の輸送サイクル

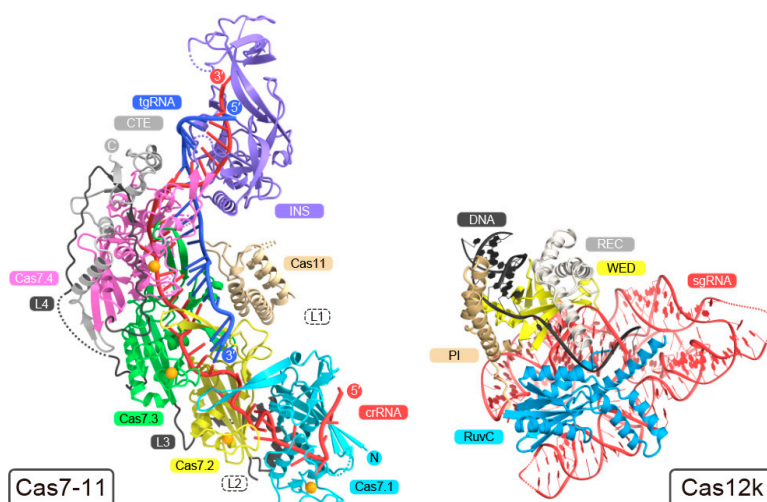


【目的】 原核生物のもつ CRISPR-Cas 獲得免疫機構に関与する Cas タンパク質はガイド RNA と複合体を形成し様々な反応を触媒する。RNA 依存性 DNA 切断酵素 Cas9 はガイド RNA と相補的な 2 本鎖 DNA を切断する性質をもつため、ゲノム編集をはじめとする様々な新規技術に利用されている。近年、DNA 組換え反応を触媒する CAST (CRISPR-associated transposase) 複合体が報告され注目を浴びている。CAST は I 型 Q-Cascade と V 型 Cas12k に分類される。CAST はトランスポゾン因子 (TnsA, TnsB, TnsC, TniQ) と協働しドナー DNA をターゲット DNA に挿入する。さらに、ごく最近、新規の CRISPR-Cas 酵素として Cas7-11 が発見された。Cas7-11 は 4 つの Cas7 ドメイン (Cas7.1~Cas7.4) と 1 つの Cas11 ドメインをもち、ガイド RNA と相補的な 1 本鎖 RNA を特異的に切断する。Cas7-11 は特異性が高く細胞毒性の低い RNA 切断ツールとして期待されている。しかし、CAST や Cas7-11 の作動メカニズムは不明な点が残されている。本研究では、CAST および Cas7-11 の作動メカニズムの解明を目指し、クライオ電子顕微鏡解析を行った。

【方法】 Cas12k および Cas7-11 を大腸菌で大量発現させ、カラムクロマトグラフィーによりに精製した。精製した Cas タンパク質、ガイド RNA、標的 DNA/RNA を混合することにより、複合体を再構成したのち、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて精製した。精製試料を用いてクライオ電子顕微鏡単粒子解析を行い、複合体構造を決定した。

【結果】 クライオ電子顕微鏡単粒子解析により、Cas12k-ガイド RNA-標的 DNA 複合体、および、Cas7-11-ガイド RNA-標的 RNA 複合体の立体構造を決定した。Cas12k-ガイド RNA-標的 DNA 複合体構造から、Cas12k は WED、REC、PI、RuvC ドメインからなることが明らかになった。Cas12k のガイド RNA は既知の Cas タンパク質のガイド RNA とは異なる複雑な立体構造をとり、Cas12k によって特異的に認識されていた。標的 DNA は PI ドメインと REC ドメインによって認識されていた。以上の結果から、Cas12k による DNA 認識の分子メカニズムが明らかとなった。Cas7-11-ガイド RNA-標的 RNA 複合体構造から、Cas7-11 は 4 つの Cas7 ドメイン (Cas7.1~Cas7.4)、Cas11 ドメイン、INS ドメイン、CTE ドメインが 4 つのリンカー領域 (L1~L4) で連結した構造をもつことが明らかになった。ガイド RNA の 5' タグ領域は Cas7.1、Cas7.2 によって認識されていた。一方、スパーサー領域は標的 RNA と対合し、Cas7.2-Cas7.4、Cas11、INS によって認識されていた。ガイド RNA-標的 RNA の 4 番目、10 番目の塩基はそれぞれ Cas7.2、Cas7.3 との相互作用により、フリップアウトし、切断されるホスホジエステル結合の近傍に触媒残基 (D429、D654) が位置していた。変異体解析の結果、D429、D654 はそれぞれ標的 RNA の塩基 3~4 間、塩基 9~10 間のホスホジエステル結合の切断に関与することが明らかになった。これらの結果から、Cas7-11 による RNA 切断の分子メカニズムが明らかになった。

Cas7-11-ガイド RNA-標的 RNA 複合体および Cas12k-ガイド RNA-標的 DNA 複合体のクライオ電子顕微鏡構造



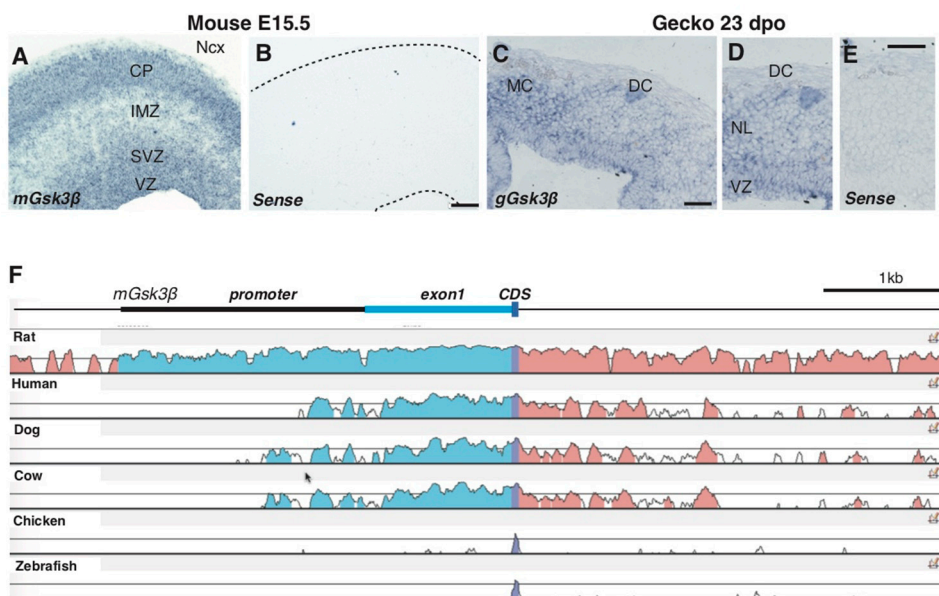
46 Wntシグナルの時間的制御による神経細胞の形態変化 野村 真

【目的】 大脳皮質の発生過程において、神経前駆細胞から分化した興奮性の神経細胞は脳の内側から表層（軟膜側）へと放射状に移動し、大脳皮質に特徴的な6層構造を構築する。発生の時期に依存した神経細胞の分化と移動の精緻な制御は大脳皮質の局所神経回路網の構築に不可欠であり、大脳皮質発生プログラムの破綻は長期ライフステージにおける高次脳機能の発達に深刻な影響を及ぼす。Wntシグナルはこうした大脳皮質の発生過程における神経細胞分化、移動に重要な役割を果たすことが明らかとなっている。そこで本研究では、Wntシグナルの活性を細胞内で制御するタンパク質の1つであるGsk3βに着目し、大脳皮質の発生過程におけるGsk3βの転写制御に関わるシス・トランス制御因子を明らかにすることで、神経細胞の分化・移動におけるWntシグナル活性の細胞自律的な制御メカニズムを解明することを目的とした。

【方法】 まず、ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements) のエピジェネティックデータを参照することにより胎児期マウス大脳皮質におけるオープンクロマチン状態を検討し、シス制御領域の候補となるゲノム領域を同定・単離した。この配列がGsk3βの時間的発現制御モジュールとしての活性を持つかどうか、神経前駆細胞あるいはHEK細胞を用いたリポーターアッセイにより検討した。さらに、単離した発現モジュールの活性を変化させるトランス因子を同定するため、神経前駆細胞あるいは神経細胞で発現する様々な転写因子をリポータープラスミドと共に培養細胞に導入し、ルシフェラーゼの発現変化を測定した。また、Gsk3βのゲノム配列の種間比較を行い、シス制御領域の保存性と実際の遺伝子発現との対応について *in situ hybridization* 法によって検討した。

【結果】 マウス E14.5 の前脳クロマチン免疫沈降法に基づく ENCODE データより、Gsk3βの5'側2 kb領域が神経前駆細胞あるいは神経細胞におけるシス制御領域として機能することを見出した。さらに、このシス制御領域(2 kbプロモーター領域)は神経前駆細胞で発現するSoxファミリー転写因子によって活性化されること、また神経分化を促進するNeurogenin2によって抑制されることを見出した。さらに、2 kbプロモーター領域の配列の種間比較を行ったところ、この領域の配列は哺乳類間で高度に保存されていること、また羊膜類の各系統においては配列の多様性が見られることが明らかとなった。Gsk3βの発現が哺乳類と爬虫類で高度に保存されている知見と合わせると、Gsk3βを介したWntシグナルの時間的制御には種特異的なゲノム配列の進化が基盤となっている可能性が示唆された。

哺乳類および爬虫類大脳皮質におけるGsk3βの発現とシス制御領域の多様性



47 自己免疫性Th17細胞の疾患制御機構の解明

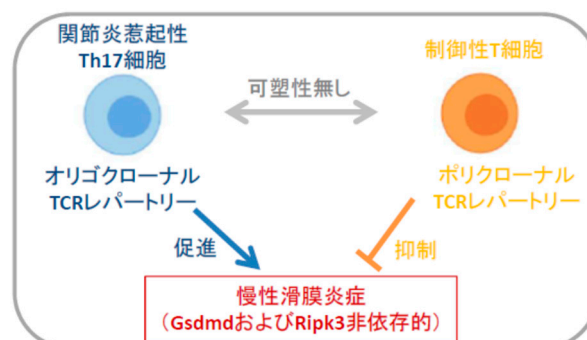
廣田 圭司

【目的】 インターロイキン-17 (IL-17) を産生する炎症性 CD4⁺T ヘルパー (Th17) 細胞は、生理的には粘膜組織の感染防御に重要なサブセットである。一方、自己抗原に対する過剰な免疫応答により自己免疫疾患を惹起する。疾患特異的な T ヘルパー細胞の制御機構を標的とした免疫学的治療法の開発には、標的となる自己抗原の理解が鍵となる。しかし、自己免疫性 Th17 細胞の T 細胞受容体 (TCR) が認識する疾患惹起性の自己抗原および抗原特異的な炎症維持機構については未だ不明な点が多い。本研究では、関節炎を制御する自己免疫性 Th17 細胞と制御性 T 細胞の TCR レパートリーを解析し、疾患特異的な TCR レパートリーの特徴を明らかにする。また、関節の滑膜炎に寄与する Th17 細胞、滑膜ストローマ細胞、滑膜自然リンパ球がどのような外的環境因子・炎症細胞死プログラム (Necroptosis, Pyroptosis など) によってクロストークし組織炎症を増悪・慢性化させているのか、これまで明らかになっておらず、関節炎発症・維持における Necroptosis および Pyroptosis の関与を明らかにする。

【方法】 インターロイキン-17 (IL-17) を産生する炎症性 Th17 細胞によって惹起される自己免疫性関節炎モデル (Il17a^{eGFP} Foxp3^{hCD2} SKG) マウスを用いて、関節炎局所に局在する IL-17 産生 Th17 細胞と Foxp3⁺制御性 T 細胞をセルソーターで分取する。全 RNA 抽出、cDNA ライブラリーを作製後、次世代シーケンサーを用いて TCR α 鎖、TCR β 鎖、それぞれの CDR 領域のシーケンス情報を取得した。炎症関連細胞死プログラムである Necroptosis と Pyroptosis に焦点をあて、それぞれの鍵となる分子 Ripk3 と Gsdmd KO マウス (Balb/c 背景) を Crispr/Cas9 システムを用いて作製した。関節炎の発症、増悪化における Necroptosis、Pyroptosis 経路の意義について SKG 関節炎モデルを用いた解析をおこなった。

【結果】 Il17a^{eGFP} Foxp3^{hCD2} SKG マウスを作製したことにより、従来の非特異的な再刺激をおこなった後の細胞固定処理をする必要がなくなり、炎症関節組織中で活性化した IL-17 産生 Th17 細胞、Foxp3⁺制御性 T 細胞が解析可能となった。レポーター発現を指標に、関節炎局所の Th17 細胞、制御性 T 細胞をソートし、TCR レパートリーの解析をおこなったところ、関節炎惹起性 Th17 細胞と制御性 T 細胞は異なる TCR レパートリーのパターンを示すことを見いだした。Th17 細胞はオリゴクローナルな TCR レパートリーを有し、制御性 T 細胞はポリクローナルな TCR レパートリーを示した。加えて、Th17 細胞と制御性 T 細胞の TCR レパートリー間の重複は認められなかった。これらの結果は、Th17 細胞と制御性 T 細胞間の可塑性が乏しいことを示唆しており、それぞれ異なる自己抗原に反応して活性化および機能が制御されていることが示唆された。これまで Th17 依存性の関節炎における Necroptosis、Pyroptosis 経路の役割は分かっておらず、それぞれの鍵となる分子である Ripk3 と Gsdmd KO SKG マウスを用いて、Th17 細胞の分化および病態の表現型を評価した。コントロール SKG マウスと同様に、Ripk3 KO SKG と Gsdmd KO SKG マウスに関節炎が誘導された。また、これら経路は Th17 細胞の分化・活性化にも影響を与えなかった。本研究によって、Th17 細胞依存性の自己免疫性関節炎モデルの病態発症および炎症維持にこれら経路は関与しないことが明らかになった。

慢性滑膜炎を制御する CD4⁺ T 細胞の TCR レパートリーと細胞死プログラムによる炎症維持機構



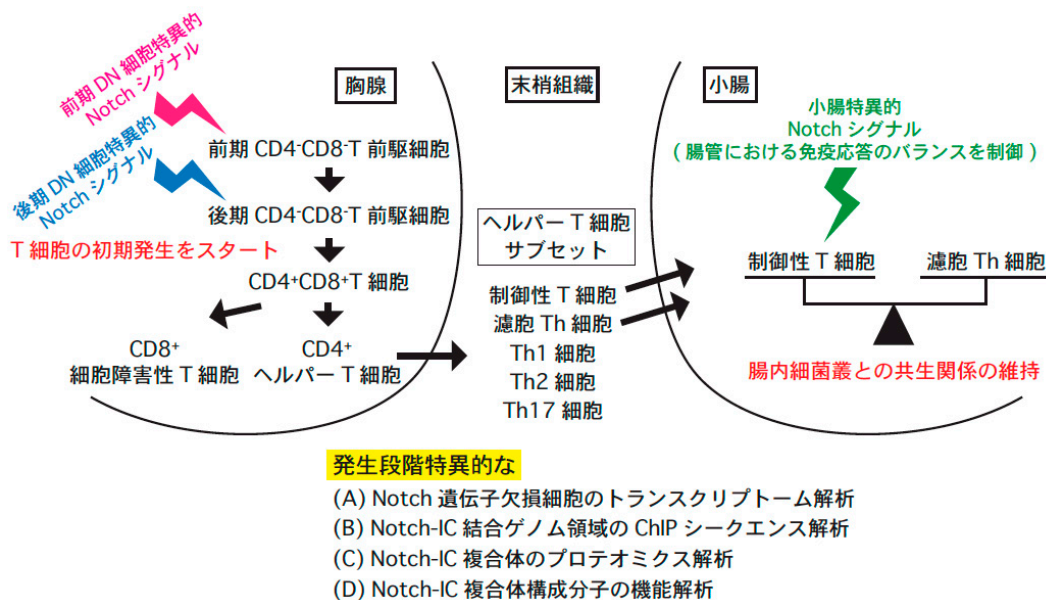
48 T細胞の運命を制御する時空間特異的Notch経路 細川 裕之

【目的】 私たちの体を形成する 50 兆を超える細胞はたった 1 つの受精卵に由来し、200 種類以上の細胞から成ると言われている。幹細胞から機能分化した細胞系列を作り出す分子機構の解明は、生命現象を理解するための根幹に位置する極めて重要な研究課題である。ひとつの転写因子またはシグナル経路が同一細胞系列の異なる発生段階で繰り返し重要な役割を担うことや、近縁の細胞系列では異なる役割を果たすことを多くの研究者が想定しているものの、その分子メカニズムについては未だ明らかにされていない。本研究では、免疫細胞の一種である T 細胞をモデルとして、Notch シグナルが時空間特異的に異なる遺伝子群の発現を制御し、様々な細胞の運命を同時にコントロールする分子メカニズムの解明を目指す。

【方法】 本研究では、前期および後期 T 前駆細胞を用いて、(A) CRISPR/Cas9 システムによる発生段階特異的な Notch 遺伝子欠損、または Notch-IC 過剰発現細胞のトランスクリプトーム解析、(B) ChIP シークエンス解析による発生段階特異的な Notch-IC 結合領域の網羅的同定、(C) Notch-IC が形成する発生段階特異的なタンパク質複合体のプロテオミクス解析、(D) 発生段階特異的な Notch-IC 会合分子の機能解析、を組み合わせることで、Notch シグナルが発生段階特異的な機能を発揮する分子メカニズムの統合的な理解を試みた。

【結果】 本研究により、Notch シグナルは胸腺内において、T 前駆細胞の前期と後期でそれぞれ発生段階特異的なターゲット遺伝子の発現を制御し、T 細胞の初期発生に必須の役割を果たす事が示された (Romero-wolf et al., *J Cell Biol*, 2020)。一方で、小腸のパイエル板においては、Notch シグナルが制御性 T 細胞と濾胞 Th 細胞のバランスをコントロールすることで、腸内細菌叢との共生関係を維持している事が明らかになった (Yazawa et al., *Int Immunol*, 2021)。

本研究の概要

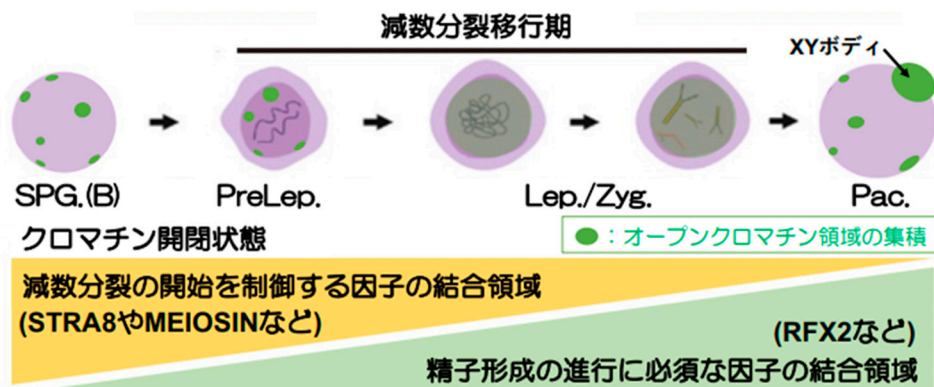


【目的】 生殖細胞系列は、初期胚発生における運命決定、配偶子への分化、受精を介した個体発生、全能性の再獲得といったサイクルにより、生命の次世代への継承を担う。配偶子形成期において、生殖細胞は細胞分裂を繰り返して細胞数を増やし、ある時期が来ると減数分裂を起こし、やがて精子もしくは卵に分化する。生殖細胞特有の現象である減数分裂は、種の多様性を生み出すと共に、配偶子形成に不可欠なプロセスである。配偶子形成期において、生殖細胞が分化し減数分裂期へ移行する際には、数千もの遺伝子発現が変化し、体細胞型の遺伝子発現プロファイルから配偶子形成期特有の遺伝子発現プロファイルへと切り替わる。これまでに我々はマウス精子形成期をモデルに、減数分裂移行期の前後でみられる大規模な遺伝子発現変化が、生殖細胞特異的なエピゲノム変化及びクロマチン構造変化によってもたらされることを明らかにした。しかし、このような精子形成の進行に必須な遺伝子発現パターンの切り替えが、減数分裂期への移行と進行の過程で、どのような段階を経て調節されているかは不明であった。そこで本研究では、減数分裂移行期の分化段階に焦点を当て、精子形成の進行に重要な遺伝子発現を制御するクロマチン動態の解明を目的とした。

【方法】 減数分裂移行期にあたる分化段階の生殖細胞をマウス精巢からセルソーターを用いて分取し、Omni ATAC-seq法を用いたオープンクロマチン解析を行った。クロマチン開閉状態の意義を明らかにするために、ChIP-seq法による転写因子の結合領域およびエピジェネティックマークの分布との比較解析を行った。分化進行に伴うオープンクロマチン領域の局在変化を可視化するために、ATAC-seq法と免疫染色法を組み合わせた細胞イメージング解析を行った。

【結果】 マウス精巢より単離した減数分裂移行期の生殖細胞では、分化の進行に伴って数万領域ものクロマチン開閉状態が段階的に変化していた。これらの領域には、複数の転写因子結合モチーフが含まれており、特にプレレプトテン期からレプトテン期精母細胞へと分化が進行する過程で、顕著なクロマチン開閉状態の切り替えが生じていた。精原細胞で機能する転写因子および減数分裂の開始を制御する転写因子の結合領域は減数分裂移行期に凝集する傾向にあった。一方で、減数分裂期および減数分裂後に機能する転写因子の結合領域は減数分裂移行期に弛緩する傾向にあった。ATAC-seq法を用いてオープンクロマチン領域の空間配置を可視化したところ、減数第1分裂前期に生じる相同組換えの前後の時期でオープンクロマチンクラスターが観察されたことから、ゲノム中の転写活性化領域が集積していることが示唆された。驚くべきことに、精母細胞の性染色体不活化領域 (XY body) においてもオープンクロマチンクラスターが観察された。性染色体特異的に形成されるオープンクロマチンは、PRDM9 依存的な SPO11 による DNA2 本鎖切断を起点に、性染色体全体に生じていることが示唆された。XY body は、DNA 損傷応答修復 (DDR) 因子が性染色体へ集積することで形成され、精子形成の正常な進行に必須である。本研究より、クロマチン凝集を伴わない転写不活化機構が、性染色体不活化の過程で機能していることが明らかになった。

減数分裂移行期における、クロマチン開閉状態変化を伴った転写因子結合領域の切り替わり

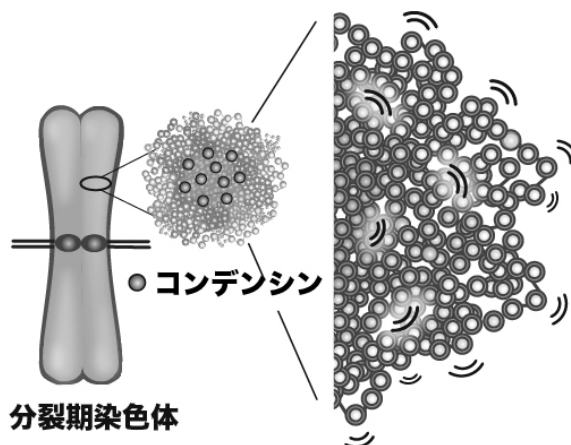


【目的】細胞の分裂期染色体の凝縮は、複製されたゲノムクロマチンを姉妹染色分体へと分離する驚異的な自己組織化過程であり、この過程の不具合は染色体異常、さらには細胞のがん化に直結する。この染色体の構築には、巨大なタンパク質複合体コンデンシン I、II やトポイソメラーゼ II α の関与が知られているが、長いゲノム DNA からどのように染色体が構築されるのか？その原理は依然不明な点が多い。従来の定説によるモデルでは、まず負電荷を持つゲノム DNA が正電荷に富むヒストンに巻かれた構造であるヌクレオソームを作る。そしてヌクレオソームが規則正しく配置された 30 nm 線維、さらにはらせん状に折り畳まれた階層構造を形成するとされてきた。しかし、前島らのクライオ電子顕微鏡や、SPring-8 の放射光散乱を用いた解析では、ヒト分裂期染色体には 30 nm 線維を含めた階層構造が存在せず、ヌクレオソームの線維が不規則に折り畳まれていることが明らかになった。その後、同様な知見は様々な電顕技術を用いて他グループでも確認されている。このように不規則に折り畳まれたクロマチンは、規則的構造に縛られている場合に比べて物理的束縛が少なく、よりダイナミックに動く予想された。実際、前島らが、生きた分裂期細胞内においてまばらに蛍光標識したヌクレオソーム 1 分子の動きを斜光照明顕微鏡で観察したところ、個々のヌクレオソームが 50 ms の短い時間にも数十 nm と大きく揺らいでいることが分かった。すなわち分裂期を含め細胞のクロマチンは不規則でダイナミックな構造であることが明らかになった。本研究では、分裂期染色体凝縮過程をヌクレオソーム動態変化として捉え、1 分子ヌクレオソームイメージングを用いて、染色体の個々のヌクレオソームの動きの変化を経時的に測定、解析することを目的とする。さらに、染色体凝縮に必須な因子とされているコンデンシン I、II の迅速除去操作を組み合わせ、これらの因子が染色体内のヌクレオソームの動きをどのようにコントロールしているのか？新しい観点から染色体構築過程を明らかにする。

【方法】細胞周期の間期のクロマチン、分裂期染色体の個々のヌクレオソームの動態を 1 分子イメージング技術で可視化した。具体的にはヒト HeLa 細胞、あるいは HCT116 細胞に HaloTag を融合させたヒストン H2B を安定的に発現させた。H2B-Halo を少量の HaloTag リガンド TMR で標識し、斜光照明顕微鏡で個々のヌクレオソームをイメージングした。輝点の中心を正確に決定し、ヌクレオソームの動きのトラッキングを行った。トラッキングデータより個々のヌクレオソームがどのくらい拡散するのかを知る指標である平均二乗変位 MSD を算出し、動態を解析した。

【結果】イメージングを用いて、間期クロマチンが主に熱ゆらぎによって揺らいでいることを示唆し、この局所的なヌクレオソーム運動が間期を通じてほぼ一定であることを明らかにした。一方、分裂期の染色体のクロマチンは、間期のそれよりも拘束され、動きが抑えられていることが分かった。さらに、コンデンシンはそのクロマチンの拘束を担っていることを示した。

分裂期染色体のヌクレオソームのゆらぎ



51 子宮内圧力に依存したマウス初期胚の前後軸決定機構

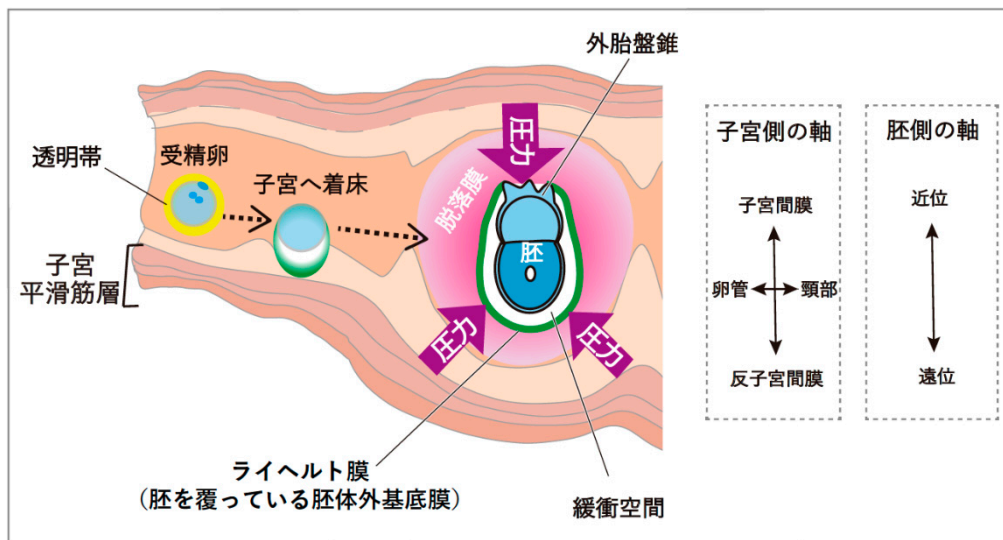
松尾 勲

【目的】我々は、子宮着床直後のマウス胚には、子宮筋収縮によって生じる圧力がかかっていること、また、胚全体が、基底膜（ライヘルト膜）に覆われることで、胚にかかる圧力が緩衝されて、胚は、押しつぶされずに球形から卵円筒形へと伸長し、前後軸が形成されることを明らかにしてきた（下図）。しかし、子宮内圧力が、胚の近遠方向（将来の前後軸方向）にそって胚を細長く伸長させる機構の詳細は依然として不鮮明である。本研究では、子宮筋から胚にかかる圧力や緩衝可能な部位に一定の方向性があるのかについて検討を行った。

【方法】子宮平滑筋から胚にかかる圧力に異方性があることで、マウス胚が一定の方向性をもって伸長する可能性を検討するため、子宮内圧を異なる方向から計測・定量化した。また、胚の近位側方向には、ライヘルト膜は存在しないことから、緩衝作用を持つ別な組織が、ライヘルト膜の代わりに機能を果たしているかどうかについて、免疫組織染色法を用いて細胞外マトリクス分子の発現を解析することで検討した。

【結果】子宮筋から脱落膜内の胚にかかる圧力は、子宮間膜・反子宮間膜軸方向と卵管・頸部軸方向とも有意差は観察されなかった。本結果は、子宮筋収縮によって発生する力は胚に対してほぼ均一にかかっており、圧力には異方性が認められないことが強く示唆された。また、6.5 日目胚においてラミニン $\alpha 1$ 分子の発現は、胚の近位側となる外胎盤錐（ectoplacental cone）周辺で、強く認められた。この結果から、外胎盤錐周辺に細胞外マトリクスが広範囲に強く沈着することでライヘルト膜が存在しない近位側からの圧力も緩衝できることが示唆された。

マウス胚は、着床後に子宮平滑筋収縮による圧力を受けている

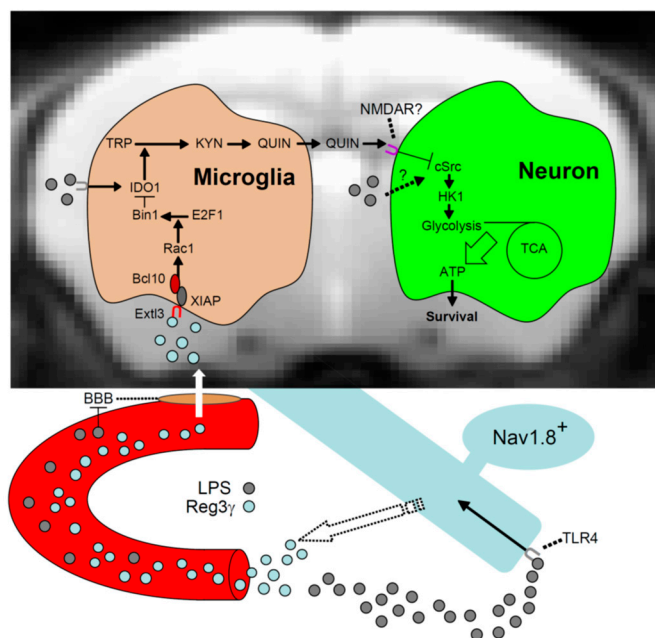


【目的】 敗血症は、炎症を誘発するグラム陰性菌成分の LPS 等が原因で 3 割が絶命する重篤な疾患である。地球全体では 3 秒に 1 人が敗血症で死亡しているとされ、その直接死因は過剰な炎症にあるものと考えられているが、炎症を標的とした分子標的薬やステロイドの救命効果が限定的であることから、これまでにない新しい病態仮説の提唱が求められている。我々は、無痛覚神経マウス (Nav1.8Cre Rosa26DTA) が、末梢組織の炎症状態が野生型マウスと同程度であるにもかかわらず、LPS の投与に対してきわめて脆弱であることを見出した。当該マウスは LPS 投与後、痙攣を伴いながら死亡したため、中枢異常が直接死因となっている可能性を考えて脳の FDG-PET とメタボローム解析を実施したところ、脳全域にわたる FDG の集積障害と解糖系・TCA サイクルの減弱、ならびにキヌレニン経路代謝産物の増加が観察された。これらの結果は、LPS を投与されたマウスの痛覚神経がなんらかのメカニズムで脳の細胞呼吸低下とキヌレニン経路の過剰な活性化を抑制していることを意味する。そこで本研究では、こうした LPS に対する痛覚神経性トレランスの分子機序解明を通じて、これまでにない病態仮説に立脚した新しい敗血症治療戦略の提案を目指した。

【方法】 LPS を投与された無痛覚神経マウス脳組織のトランスクリプトーム・メタボローム、ならびに後根神経節のトランスクリプトームデータをもとに、敗血症の際の脳代謝を正常化させる痛覚神経由来因子の同定を目指した。

【結果】 脳ミクログリアにおける IDO1 の発現上昇に伴うキノリン酸の過剰産生によってもたらされる脳のエネルギー不足が、敗血症の真の死因であることを示唆する知見が得られた。エンドトキシンで刺激された痛覚神経は、抗菌ペプチドの一種である Reg3 γ を産生することで脳ミクログリアの IDO1 の発現を抑制し、敗血症の死亡率を低減させていることも判明した。

痛覚神経性トレランスの分子機構



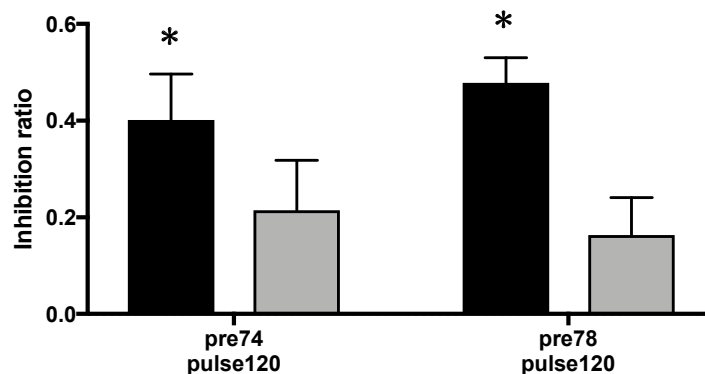
【目的】 統合失調症は妄想・幻覚といった陽性症状と気分の平板化等の陰性症状を主体とする精神疾患である。社会復帰が困難な患者も多く、そのメカニズム解明とそれに基づいた新規治療法開発は喫緊の課題である。グルタミン酸 AMPA 受容体はシナプス機能を担う最重要分子であり、精神・神経機能における重要性が明らかになっている。AMPA 受容体の発現量が統合失調症等の精神疾患モデル動物において変化することが報告されているが、これらモデル動物の多くはヒトにおけるシナプス機能に基づいて作製・最適化されておらず、ヒト病態を正確に反映しているか否かについては議論が多い。本研究では、我々が臨床研究により明らかにした「統合失調症の症状特異的に AMPA 受容体量が変化する脳領域」の情報を基に構成概念妥当性が高い精神疾患モデル動物の創出を行うことを目的とした。同定された脳領域が統合失調症疾患病理を形成する責任領域であるかを動物実験により明らかにすることで、構成概念妥当性が高い統合失調症モデル動物の創出を行うことを目的とした。

【方法】 本研究は以下の 3 つの方法により、統合失調症患者で得られた知見が科学的に正解であるかを検証した。

1. 失調症モデルマウスの作製。2. 統合失調症モデルマウスの電気生理学実験。3. 統合失調症モデルマウスの行動実験。プレパルス抑制 (PPI) 試験、オープンフィールド試験、3 チャンバー社会的相互作用 (社会的選好) 試験。

【結果】 本研究では脳領域 A の AMPA 受容体のノックダウンマウスを作製し、統合失調症に関連するいくつかの行動評価を行った。その結果、プレパルス抑制試験、オープンフィールド試験および 3 チャンバー社会認識試験のすべてにおいて正常マウス (scramble RNA 投与マウス) と比較し、それら行動結果が著しく障害されることが明らかとなった。こうした複数の行動評価により、当該モデルマウスが統合失調症患者と類似した行動表現型を示すことが明らかになった。このように脳領域 A の AMPA 受容体を局所的にノックダウンした動物モデルは、構成概念妥当性が高く、このモデル動物を用いた解析により、統合失調症の発症を規定する脳領域・神経回路網を同定すれば、統合失調症における AMPA 受容体を標的とした治療法開発の選択肢拡大に繋がると期待される。

脳領域 A における AMPA 受容体のノックダウンは AMPA 受容体電流を低下させる

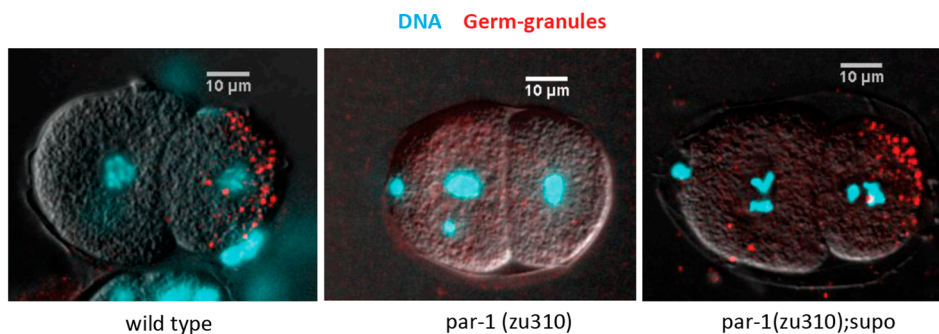


【目的】 多細胞生物の発生では、細胞が空間パターンの「対称性」と「非対称性」をコントロールすることで、形態形成の基盤を作る。細胞の非対称性は「細胞極性」と呼ばれ、組織や器官の生理的機能の確立と恒常性に寄与すると示唆されるが、発生における細胞極性の確立と細胞極性破綻を誘導する仕組みの理解は不足しており、多くの未解決問題が残されている。本研究では、細胞と組織における極性確立と恒常性の両者を司る分子サーキットの全体像を明らかにすることを目標とする。線虫をモデル生物として利用し、極性形成に重要な PAR キナーゼのサプレッサー因子を単離し、その機能解析を個体発生ライフサイクル全体で行うことで、細胞極性の役割を「組織破綻を抑制するメカニズム」という類例のない観点から解析し、発生と恒常性の制御機構に新しい知見を提供する。本研究から得られる知見は、癌化をはじめとする細胞極性異常が引き起こす疾患を抑制するための治療法開発へ繋がるかと期待できる。

【方法】 線虫 *C. elegans* を多細胞動物のモデル系に用いて、PAR キナーゼの破綻による表現型を抑制する「サプレッサー遺伝子変異」を網羅的に同定した。PAR-1 の温度感受性変異体 *par-1* (*zu310*) は、キナーゼドメインに点変異を有し、飼育温度 25°C ではキナーゼ活性の低下によって 100% 胚性致死を示す。この *par-1* (*zu310*) 変異体を 15°C で飼育した後に、突然変異を導入し、第二世代以降に 25°C で生育する個体を単離した。突然変異処理した約 200,000 個体から、24 種の個体が 25°C で生育可能となり、これらの個体に導入された遺伝子変異群を *supo* (*suppressor of par-1*) と命名した。これら *supo* 変異が発生に及ぼす影響を調べることで、PAR-1 と *supo* 変異の機能的関連を解析した。

【結果】 ほぼ全ての *supo* 変異は劣勢変異であり、ヘテロ遺伝子変異では *par-1* (*zu310*) の 25°C 致死性を回復できなかった。PAR-1 依存的に形成される生殖顆粒の形成を 25°C で生育した *par-1* (*zu310*) 変異体と *par-1* (*zu310*) ;*supo* 二重変異体において観察したところ、生殖顆粒は *par-1* (*zu310*) 変異体では消失するが、ほとんどの *par-1* (*zu310*) ;*supo* 二重変異体では観察された (下図)。興味深いことに、*par-1* (*zu310*) ;*supo* 二重変異体における生殖顆粒形成と生育率との関係には必ずしも相関関係が見られなかった。この結果は、PAR-1 キナーゼ失活による胚性致死は、生殖顆粒の消失に依存していない可能性を示唆しており、胚発生における未知の PAR-1 機能を提示した。

PAR-1 キナーゼの機能欠損による生殖顆粒 (赤) の消失は *supo* 変異によって相補される



【目的】造血幹細胞は、自己複製能（一生涯持続）と多分化能（赤血球・血小板・白血球を産生）を持った未分化な血液細胞と定義される。造血幹細胞は、加齢に伴い自己複製・多分化能が変化し、さらには骨髓異形成症候群等の血液疾患や代謝性疾患に関与すると考えられている。しかし、そのメカニズムの多くは未だ不明である。マウスとヒトでは造血幹細胞のマーカーや機能分子が異なる場合が多く、必ずしもマウスで得られた知見がヒトには適用できるわけではない。つまり、ヒトへの応用という観点で考えると、よりヒトに近い、自家移植を用いた動物実験モデルの構築が望まれる。非ヒト霊長類であるカニクイザルは、寿命が20~30年と長く、遺伝子配列などマウスよりヒトに近い。また多くのヒト抗体との交差性があり、造血幹細胞はヒトと同じく CD34 陽性 CD38 陰性 CD45RA 陰性 CD90 陽性画分に存在すると報告されており、ヒト造血幹細胞研究においても有用であると考えられる。以上のことからカニクイザル研究から得られた知見は、ヒトへの外挿がマウス研究より容易であると期待できる。また、ヒト研究とは異なり、カニクイザル由来の血液細胞をカニクイザルに移植して機能を評価する自家移植の系が利用できることが非常に大きな利点となっている。このように、カニクイザルなどの非ヒト霊長類は実験動物モデルとして非常に優位性が大きい。倫理的な問題や設備上の制約などから、使用するにはハードルが高く、世界的にも非ヒト霊長類を用いた血液、特に造血幹細胞研究はアメリカ国立衛生研究所の一研究室で行われているのみでほとんど行われていない。我々の現在の所属先であるヒト生物学高等研究拠点には、霊長類遺伝子改変コアやシングルセル解析コア、非ヒト霊長類飼育施設もあり、非ヒト霊長類研究を行う環境がそろっている。

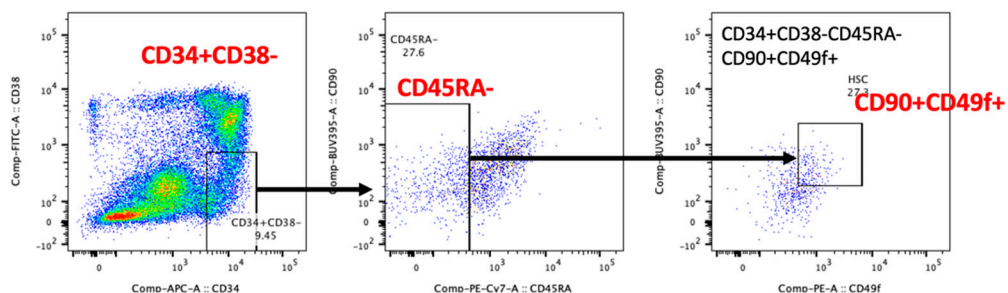
【方法】我々は、非ヒト霊長類であるカニクイザルを動物モデルとして用い、造血幹細胞の表面マーカーの同定、自己複製・多分化能のメカニズム解明を行うことを目的とした。具体的には、シングルセルレベルで細胞系譜追跡が可能となる細胞のバーコード化技術を応用し、カニクイザル造血幹細胞をバーコード化し、自家移植を行う。その後、定期的に末梢血・骨髓細胞を解析することによりメカニズム解明を行う。

【結果】まず、カニクイザルの胎児肝臓・骨髓細胞を用い、その中のどの画分が実際に機能的な造血幹細胞であるかフローサイトメトリーと免疫不全マウスへの移植系を用いて同定した。さらに、その画分のシングルセル遺伝子発現解析を行った。また、細胞系譜追跡実験系を確立するために RNA バーコード実験系を確立した。本研究助成により、RNA バーコード実験系の確立を行い、さらに、カニクイザルに実際に造血幹細胞の機能を有する細胞が含まれることを同定した。

カニクイザル胎児肝臓の造血幹細胞

Human HSC (cord blood, bone marrow)= CD34+CD38-CD45RA-CD90+(CD49f+)

Cynomolgus fetal liver (day 50-60)



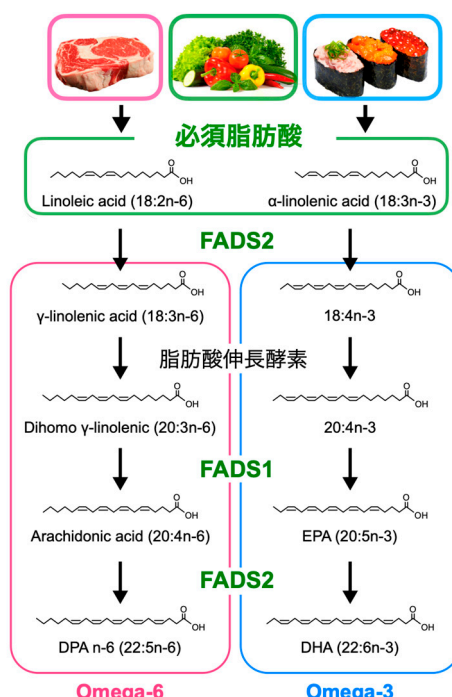
56 高度不飽和脂肪酸分子種の発生における役割の解明 横溝 岳彦

【目的】 分子内に 2 つ以上の二重結合を有する脂肪酸を高度不飽和脂肪酸 (PUFA) と総称する。生体内や食物には多種類の PUFA が含まれており、近年では ω 3PUFA (エイコサペンタエン酸やドコサヘキサエン酸) の抗炎症作用が強調され、これらを含むサプリメントが広く販売されている。PUFA には多数の分子種が存在するものの、その分子種ごとの役割の違いの詳細は必ずしも明らかになっていない。その原因の一つに、マウスをはじめとした実験動物で PUFA の分子種と量を人為的にコントロールする実験系が存在しなかったことがあげられる。本研究では、マウス PUFA 合成に必須の不飽和化酵素 *FADS2* 遺伝子欠損マウスを作製し、1) PUFA を含有しない餌を投与することで PUFA 欠乏状態を作り出し、表現型を解析すること、2) 特定の分子種の PUFA を餌に混ぜて PUFA 欠乏マウスに投与し、表現型の回復を観察することで、PUFA 分子種の生体内における役割の解明を試みた。

【方法】 C57BL/6J マウスの受精卵を材料に CRISPR/Cas9 システムを用いて *FADS2* 遺伝子欠損マウスを作製した。このマウスを、PUFA を含有しない特殊餌で 8 週間飼育することで PUFA 欠乏マウスを樹立した。PUFA 欠乏マウスの肝臓と精巣の脂質を回収して網羅的リン脂質解析を行った。精巣ライディッヒ細胞をゴナドトロピン (hCG) で刺激してステロイドを産生させた際の PUFA 欠乏の影響を観察した。PUFA 欠乏ライディッヒ細胞におけるステロイドホルモン産生をレスキューする PUFA 分子種の探索を行った。

【結果】 *FADS2* 遺伝子欠損マウスを樹立し、全ての臓器で *FADS2* の発現が消失していることを見いだした。これらのマウスを、PUFA を含有しない特殊餌で 8 週間飼育することで作製した PUFA 欠乏マウスの臓器では、アラキドン酸 (ARA) やドコサペンタエン酸 (DPA) などの ω 6PUFA を含有するリン脂質がほぼ消失するのに対し、 ω 3PUFA であるドコサヘキサエン酸 (DHA) を含有するリン脂質は比較的保持されており、特に精巣で保たれていた。*FADS2* が高発現する精巣ライディッヒ細胞におけるステロイドホルモン産生は PUFA 欠乏によって大きく減弱し、 ω 6 脂肪酸の添加によりレスキューされた。以上より、ライディッヒ細胞におけるステロイドホルモン産生には ω 6PUFA が必要である事が明らかになった。

ω PUFA の生合成系路

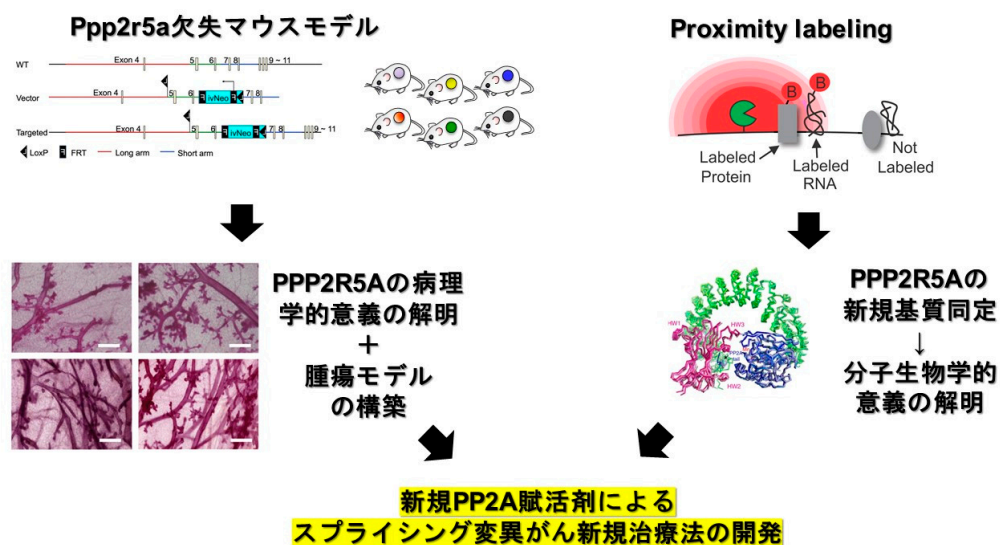


【目的】 RNA splicing factor の遺伝子変異（以降 SF 変異）ががんにおいて高頻度に同定されることが発見されて以来、世界では毎年 SF 変異がん罹患する患者が 40~60 万人にも上ることが明らかになり、SF 変異によるがんの病態解明と治療法開発は喫緊の課題である。我々は最近、がんで最も多い SF 変異である *SF3B1* 遺伝子変異が、PPP2R5A の mis-splicing を介して MYC を活性化し慢性リンパ性白血病の発症に関わることを報告した。この研究結果から、我々は *SF3B1* 変異がんにおいて PPP2R5A が病態形成の中心的役割を果たしている可能性が高いと考えた。これまでに PPP2R5A の機能喪失が各国形癌においてどのようにして発がんに関わるのか、それぞれのがん種ごとに PPP2R5A を B サブユニットとして含む PP2A 複合体の基質は何であるのか、どのようにして PPP2R5A の喪失を治療応用に結びつけばよいのかはまだ明らかになっていないことから、本研究においてはこれらの疑問点の解明に取り組むこととした。具体的には、PPP2R5A 機能喪失の生物学的影響の解析および PPP2R5A の結合タンパク質（PPP2R5A を含む PP2A 複合体の基質）の同定を通じて PPP2R5A の病理学的、分子生物学的意義を明らかにするとともに、その過程で開発される PPP2R5A 喪失腫瘍モデルを用いて、新規 PP2A 賦活剤の治療効果を評価し、新規治療法の開発を目指すこととした。

【方法】 *Ppp2r5a* 条件的欠失マウスの解析のため、*Ppp2r5a* 条件的欠失マウスの個体・組織を用いて表現形質を検討した。また、Proximity labeling 技術により PPP2R5A の新規基質の同定を試みた。

【結果】 まず我々は *PPP2R5A* 遺伝子の mis-splicing に関する解析をがん横断的に実施し、*PPP2R5A* 遺伝子の mis-splicing は特に乳がんにおいて強く生じていることを突き止めた。乳腺特異的に *Ppp2r5a* を欠失させるために *Ppp2r5a* 条件的欠失マウスと Mmtv-cre transgenic マウスを掛け合わせたところ、4 か月齢の Mmtv-cre *Ppp2r5a*^{-/-} マウスでは、対照群と比較して Ductal Hyperplasia が認められ、発がんに関連する表現形質が既に観察された。また、APEX2 を利用した Proximity labeling 技術を導入することにより、PPP2R5A の結合蛋白質を Mass spectrometry で検出した。この中には新規 PPP2R5A 基質候補が含まれていた。

本研究の全体像

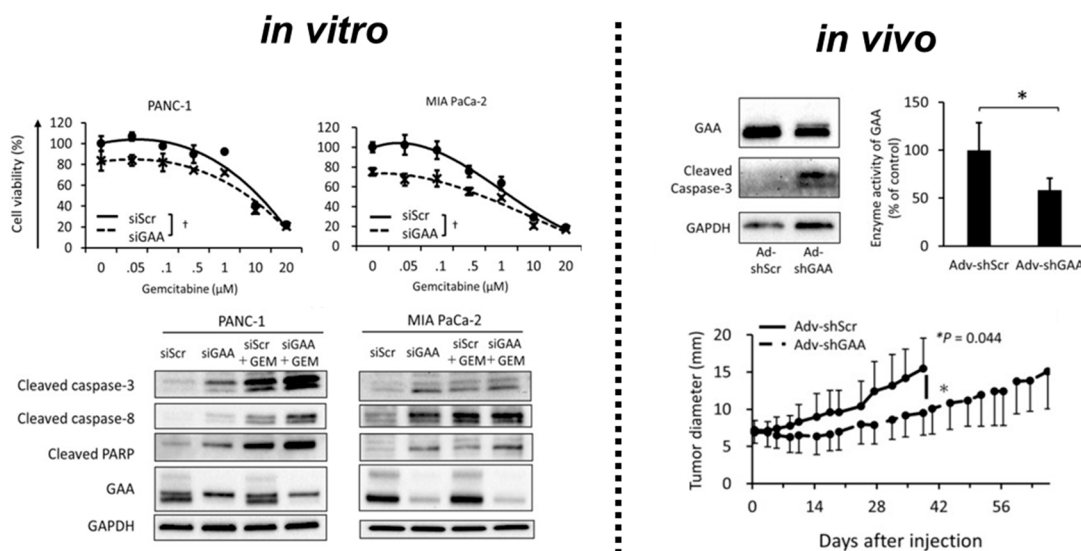


【目的】膵癌は腹部臓器に発生する固形悪性腫瘍のうち最も悪性度の高い癌腫であり、根治術不能あるいは根治術可能であっても局所および全身に再発する症例が極めて多い。本研究ではオートファジーの実態がライソゾームにおける基質分解にあることに着目し、膵臓癌におけるライソゾームの働き及びオートファジーの調整機構を解明することである。

【方法】ヒト膵癌細胞株に対し塩酸ゲムシタピン (GEM) を投与し、抗がん剤抵抗性とオートファジーの関係の評価およびターゲット酵素の選定を行ったのち、siRNA 法を用いて酸性 α グルコシダーゼ (GAA) の発現を抑制し、抗腫瘍効果、ミトコンドリア機能、オートファジー誘導効果の解析に加え、抗がん剤抵抗性におけるライソゾーム酵素の役割を明らかにした。また、shGAA を搭載したアデノウイルスベクター (AdV-shGAA) を作製し、マウス皮下腫瘍モデルに局注し抗腫瘍効果の検討を行った。

【結果】EM 投与により膵癌細胞のライソゾーム酵素遺伝子およびオートファジー関連遺伝子の発現増強を認め、ライソゾーム活性が上昇した。中でも GAA の発現は著明に亢進していた。GAA の酵素活性値は GEM 濃度依存的に上昇し、細胞内での要求が上昇した。また、GAA 遺伝子の抑制により GEM による抗腫瘍効果が増強することから、ライソゾーム機能が抗がん剤治療抵抗性の原因となっていることが明らかとなった。さらに GAA の発現抑制によりライソゾーム活性が低下し、オートファジー関連タンパクの発現が抑制された。細胞内では膜電位の低下した異常ミトコンドリアが蓄積し、アポトーシス誘導タンパクの発現増加を確認し、細胞増殖能の低下を認めた。In vivo においても AdV-shGAA よりマウス皮下腫瘍モデルにおいて抗腫瘍効果が確認された。ライソゾーム酵素発現抑制によりオートファジー機構が制御され、膵臓癌細胞がアポトーシスに誘導された。抗がん剤耐性にライソゾーム酵素が関与していることが示され、新たな治療標的となりうることが示唆された。

in vitro および *in vivo* における GAA 阻害によるオートファジー抑制と腫瘍増殖抑制

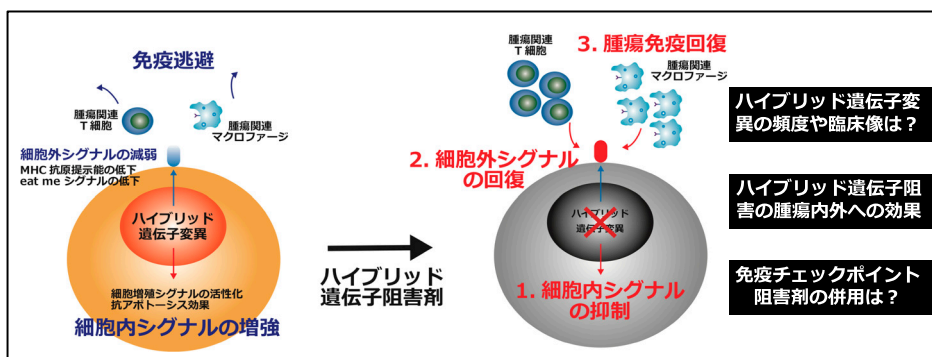


【目的】 これまで我々は、難治性悪性リンパ腫において、BCR や NF- κ B など腫瘍内シグナルの活性化を引き起こす遺伝子の変異が、同時に細胞外シグナルを抑制し、免疫原性を低下させる事で腫瘍の免疫逃避を引き起こす事を発見してきた。さらに、これらの遺伝子の阻害剤は、腫瘍細胞自体の増殖抑制効果だけでなく、強力な腫瘍免疫を動員する事で高い抗腫瘍効果をもたらす事を突き止めた。このような細胞内外シグナルを同時に制御する遺伝子変異（ハイブリッド遺伝子変異）を標的として、腫瘍の内と外から同時に攻撃する治療戦略は、次世代の癌治療戦略として非常に注目されている。本研究では、B細胞性リンパ腫の大規模コホートを用いたマルチオミクス解析により新規ハイブリッド遺伝子変異を同定し、新たな治療戦略、特にエピゲノム阻害剤と免疫チェックポイント阻害剤の新規併用療法の開発を目的として、細胞株、動物モデルを使用した生物学的検証を行う。さらに、これらの検証に必要な解析技術として、シングルセルマルチオミクス解析を実施し、ハイブリッド遺伝子変異が免疫微小環境に与える影響をシングルセルレベルで解析する。

【方法】 まず、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 1,500 例の核酸を抽出し、トランスクリプトーム解析並びにゲノミクス解析を行った。トランスクリプトーム解析で MHC など腫瘍表面抗原と腫瘍周囲免疫担当細胞の定量を行い、ゲノミクス解析では 300 遺伝子の変異情報を得た。これら 2 つのオミクスデータを統合解析し、腫瘍内シグナルと腫瘍外微小免疫環境に影響を与えるハイブリッド遺伝子変異の同定を行った。次に、既知あるいは新規に発見されたハイブリッド遺伝子変異を、先行研究同様 CRISPR-Cas9 などを用いて細胞株に導入し、細胞外シグナルに与える影響を評価した。その際、シングルセル RNAseq を用いて、単一細胞レベルでの免疫細胞の多様性と腫瘍微小環境内での空間位置関連性を解明し、ハイブリッド遺伝子変異との相関を検証した。

【結果】 大規模臨床検体を用いたマルチオミクス解析により、腫瘍微小環境にも影響を与えるハイブリッド遺伝子変異として *EZH2*, *CREBBP*, *TMEM30A* に加え、*GNA13* や *TNFRSF14* などが新たに同定された。これらの遺伝子変異は、腫瘍表面の MHC だけでなく、HVEM-BTLA など B 細胞性リンパ腫と免疫微小環境のクロストークで中心的な役割をもつ免疫チェックポイントにも影響を与えていた。これらの結果は、シングルセル解析で詳細に検証され、さらに CRISPR-Cas9 にて作製した *TMEM30A*-KO *in vitro* モデルにて、マクロファージチェックポイントである Phosphatidylserine (PS) (eat me signal) の露出が増加するなど、次世代の免疫併用療法の基盤となるデータが得られた。

ハイブリッド遺伝子変異による腫瘍内外シグナル制御と新規治療モデルの仮説



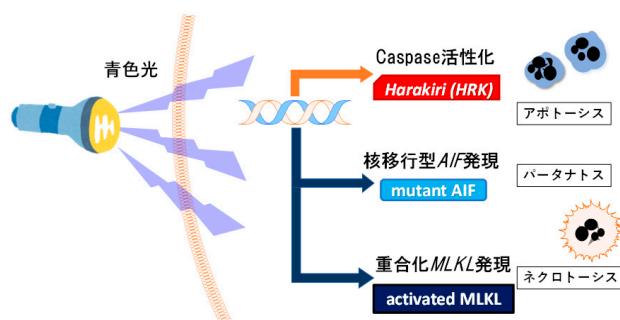
60 光を利用した体に優しいがん治療技術の開発	尾崎 倫孝
-------------------------	-------

【目的】 国民に対する啓発活動、健康意識の高まり、健康診断の浸透などにより、以前と比べて“がんは早期に発見され、早期に治療”されるようになった。早期発見・早期治療は、現時点でがん治療の基本となる考えであるが、現実的には進行した状態で見つかる場合は多い。進行した固形がんは、基本的にマクロあるいはマイクロでの遠隔転移を伴うが、これらの転移巣一つ一つに対して外科的治療を行うことは大きな侵襲を伴うにもかかわらず、不十分な治療で終わってしまう可能性が高い。そのため、転移を伴う進行がんに対しては、種類、分化度、発生・転移の部位などを勘案して化学療法、放射線療法等を適宜選択し治療されているが、有効性・特異性・安全性においてまだ課題が残されている。このような状況において、今回これまでに得られた分子生物学的な知識、細胞死誘導の機構、光工学的技術を活用し新たに「光の特性を利用した技術」を生み出すことで、体に優しいがん治療法の開発を行う。新たな視点に立ち、光を用いた“より安全で（より副作用・侵襲が少なく）”、“より特異的”かつ“繰り返し施行可能な”治療法の開発を目指す。最終的には近赤外光と青色光を組み合わせた光癌治療法の開発を目指す。今回はその第一段階として青色光照射によるプログラム細胞死誘導法の研究開発を行う。

【方法】 分子生物学的手法および細胞生物学的手法を用いて、1.青色光による遺伝子発現を誘導するシステムの構築、2. 種々の細胞株を用いた特定の遺伝子発現によるプログラム細胞死の誘導の可否とその効率、3. 1と2を組み合わせることによる青色光照射によるプログラム細胞死誘導の確認、4. 近赤外光がランタニドナノ粒子によりアップコンバージョンにより変化した青色光による分子操作の可否を検討した。

【結果】 1. 人工転写因子 GAVPO を用いた青色光誘導性遺伝子発現システムの構築：システム構築のために、ルシフェラーゼ遺伝子を利用した。GAVPO は、二量体化能を弱めた転写因子 GAL4 の DNA 結合ドメイン、青色光照射により二量体を形成する LOV ドメインを有する VVD、及び転写因子 p65 の転写活性化ドメインをタンデムに連結したシステムであるが、青色光を照射すると VVD を介して GAVPO は二量体化した。その結果、GAL4 の DNA 結合ドメインが二量体化することで DNA 結合能が上昇して 5×UAS に結合し、p65 の転写活性化ドメインによる転写開始複合体が TATA ボックスに生成され、その下流のルシフェラーゼ遺伝子の転写が活性化した。2. 種々の細胞株を用いた特定の遺伝子発現によるプログラム細胞死の誘導：アポトーシス、パータナトス、ネクロトーシスの3つのプログラム細胞死をターゲットとし、それぞれの細胞死の誘導経路の活性化あるいは抑制経路の不活化を目的として、種々のプローブを設計し検討した。アポトーシス、パータナトス、ネクロトーシス誘導のために、それぞれ *Harakiri* 遺伝子、mutant *AIF* 遺伝子、mutant *MLKL* 遺伝子をデザインし、種々の細胞に遺伝子導入し、細胞死誘導能を検討した。その結果、mutant *MLKL* 遺伝子が最も効率よく細胞死を誘導した。3. 青色光照射によるプログラム細胞死誘導の確認：上記1、2の成果より、mutant *MLKL* 遺伝子を青色光誘導性遺伝子発現システムに挿入した後、それを癌細胞に安定導入した。このプローブ遺伝子を安定発現する癌細胞株に対して、青色光を照射し実際にプログラム細胞死が誘導出来ることを確認した。4. ランタニドナノ粒子を利用した光分子操作：近赤外光をランタニドナノ粒子に照射し、アップコンバージョンにより生じた青色光が Akt 分子を活性化することを確認した。

青色光を利用した癌細胞特異的細胞死誘導システム



61 T細胞リンパ腫における微小環境の多様性の解明

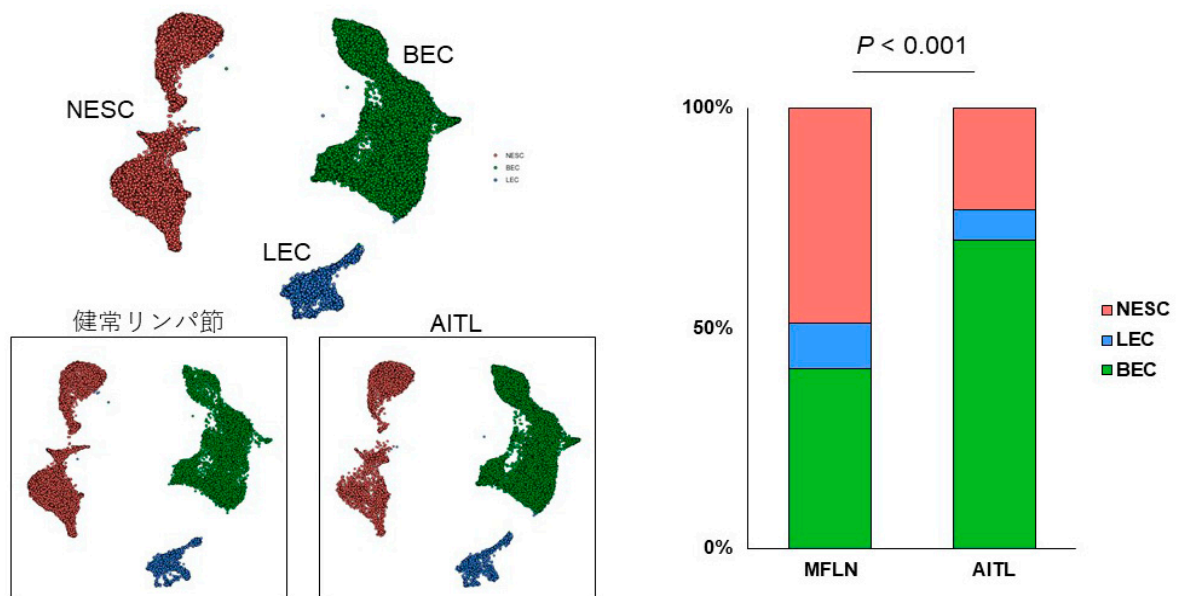
坂田(柳元) 麻実子

【目的】 血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫は悪性リンパ腫と呼ばれる血液がんの一つである。血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫の発生と進展のメカニズムにおいて、間質細胞の役割が示唆されてきたが、詳細は明らかにされてこなかった。本研究では、間質細胞の多様性という観点から、血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫の病態を解明するために行った。

【方法】 当該リンパ腫および「健常」リンパ節から診断用に採取された検体の残余検体を用いた。コントロールの「健常」リンパ節としては、がん患者の郭清時に採取されたリンパ節の一部を採取し、転移がないことを確認したものを使用した。非血液細胞成分をセルソーターにより分離した後、Chromium (10x Genomics 社) を用いて 3'RNA シーケンス用のライブラリを作製し、シーケンスを行った。データ解析には、Seurat (Satija Lab) などの各種パイプラインを用いて、Quality control、Batch effect を除去してデータを統合し、クラスタリングを行い、クラスタ間の遺伝子発現差を抽出するなどの解析を行った。

【結果】 ヒトのリンパ節は非血液細胞の主要な 3 つの分画（血管内皮細胞、リンパ管内皮細胞、非内皮性間質細胞）に分類された。各分画はそれぞれ 10 種類、8 種類、12 種類のサブタイプに詳細に分類されることを見いだした。これらの各間質細胞のサブクラスタについて、遺伝子発現の特徴を明らかにするとともに、免疫染色により局在を明らかにし、単一細胞レベルでの間質細胞のアトラスを作製した。本アトラスを基に、T 細胞リンパ腫の間質細胞について調べたところ、T 細胞リンパ腫でも概ねこれらのサブタイプは維持されていた。一方で、他のリンパ腫（具合的には主として濾胞性リンパ腫を用いた）では濾胞樹状細胞は増加していたものの、血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫では相対的には減少していた。血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫では、病理組織学的には濾胞樹状細胞が増加しているというのは特徴的所見とされてきたが、これを覆す結果であった。そこで、こうした新技術により同定された新たな細胞分画と古典的な細胞分画の知見を統合し、病態理解を深める必要性が示唆された。

「健常」リンパ節、T 細胞リンパ腫における非血液分画（間質細胞分画）の違い

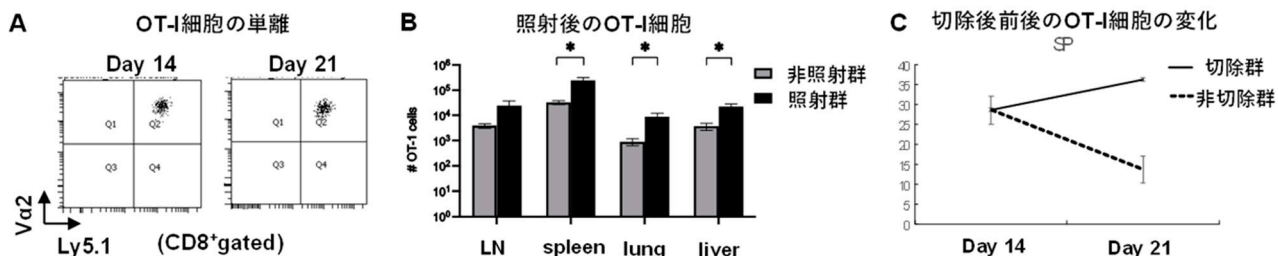


【目的】 近年、免疫チェックポイント分子阻害薬の有効性が明らかとなり様々な癌種で臨床応用されているが、その効果は限定的で、更なる CD8T 細胞の疲弊化誘導メカニズムが存在することが想定される。我々が独自に確立したマウス腫瘍モデルでは抗原特異的 CD8T 細胞を生体内の 10~50 倍程度まで誘導でき、その細胞を詳細に解析することが可能となる。このモデルを用いて以下の 2 点を解析し新規癌免疫療法の開発につなげる。1. 疲弊化 CD8T 細胞を単離し、遺伝子発現変化を網羅的に解析し新規免疫チェックポイント分子を同定する。2. 外科的切除後または放射線治療後のメモリー細胞の産生・維持の分子機構を解明し新規アジュバント療法を確立する。

【方法】 1. OT-I マウス (OVA₂₅₇₋₂₆₄ 特異的 T 細胞レセプタートランスジェニックマウス) の脾臓から CD8T 細胞を単離し C57BL/6 マウスに移入後、EG.7 (卵白アルブミン産生 EL-4 細胞) を皮下接種した。経時的に脾臓における OT-I 細胞の動態、その機能および疲弊化マーカーをフローサイトメータで解析した。さらに 14 日目と 21 日目の OT-I 細胞をそれぞれセルソーターで単離後、RNA を抽出し網羅的解析が可能か評価した。2. 放射線照射モデル: OT-I 細胞を移入した系で腫瘍接種 14 日目に腫瘍照射 (10 Gy: CR 量) し、7 日目のリンパ組織および非リンパ組織における OT-I 細胞の誘導とメモリーマーカーの発現を非照射群と比較検討した。続いて、メモリー細胞の長期維持を照射 60 日目の OT-I 細胞の割合で調べ、さらに二次免疫応答をペプチドパルス骨髄由来樹状細胞投与または腫瘍再投与で評価した。腫瘍切除モデル: OT-I 細胞を移入した系で腫瘍接種後 14 日目に腫瘍を切除し上記と同様の検討を行った。

【結果】 ①腫瘍接種後、脾臓で誘導される OT-I 細胞は 14 日目でピークを迎え以後減少し、14 日目又は 21 日目のその細胞の IFN- γ 産生またはグランザイム発現は、それぞれ 70%と 35%、30%と 1%であり、14 日目は活性化細胞、21 日目は疲弊化細胞であると判断した。それぞれの OT-I 細胞を単離すると 100%の純度で単離でき (図 A)、RNA を抽出し定量したところ、21 日目では少なく網羅的解析のためには PCR での増幅が必要だった。また、RNA 分解度の解析で RIN 値は 5.0 未満でソーティング操作にて細胞ダメージがあり条件を検討する必要があった。②照射モデル: 照射後 7 日目の OT-I 細胞は非照射群と比較しリンパ組織だけでなく非リンパ組織においても著明に増加し (図 B)、その表面マーカーはエフェクター細胞とエフェクターメモリー細胞がそれぞれ増加していた。60 日目ではリンパ組織および非リンパ組織でメモリー細胞が維持され、その 2 次免疫応答ではペプチドパルス樹状細胞投与または腫瘍再投与で OT-I 細胞はすみやかに再活性化した。これらから照射で誘導されるメモリー細胞は再発制御に有効な細胞で、IL-7R を発現し IL-7 が有効な癌免疫療法の候補として考えられた。腫瘍切除モデル: 腫瘍切除後 7 日目の OT-I 細胞は非切除群と比較しリンパ節では差がなかったが脾臓で有意に増加し (図 C)、表面マーカーではエフェクターメモリー細胞が誘導されていた。このことから外科的切除後でも IL-7 がアジュバント療法で有効な可能性が示唆された。

新規モデルによる癌免疫療法の開発

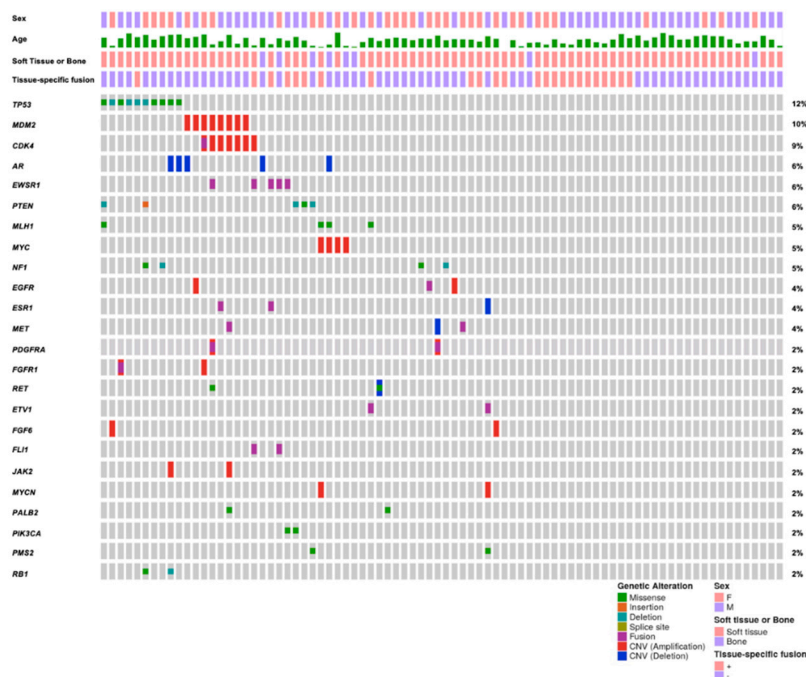


【目的】骨軟部肉腫の治療成績は依然極めて不良であり、「希少がん」であるが故に限られたデータ量や、それに伴う消極的取組みが影響し新規治療の開発が滞っている現状がある。軟部肉腫の研究は組織型特異的融合遺伝子（ユーイング肉腫_*EWS/FLI1*、滑膜肉腫_*SS18/SYT*、横紋筋肉腫_*PAX3/FOXO1*など）が発見され、各組織診断に有用なマーカーとなっている。また肺がんなどのメジャーキャンサーでは、近年次世代シーケンサー（NGS）の開発により EGFR 変異などの発生・悪性度因子を治療標的とした（Tyrosine Kinase）TK 阻害剤治療が盛んであり、その治療成績はめざましく改善している。またその開発に伴い、プレジジョンメディスン（がんクリニカルシーケンス（がん CS））が近年急速に欧米では進み、メジャーキャンサーでは多くの診断と治療の恩恵が高率的に進んでいるが、骨軟部腫瘍においては未だその約 60%には組織特異的遺伝子変化は不明であり（非組織型特異的融合遺伝子肉腫：complex karyotype sarcomas）、現在までにそのがん CS の恩恵は少ない。以上の背景より発生・発癌因子の解明とその理論に基づいた治療法開発が骨軟部腫瘍において急速に求められている。

【方法】近年がん CS の主流 DNA-seq パネルが TK 融合遺伝子同定に対して極めて低い精度である問題点が指摘されていることより、本研究では独自のトランスクリプトーム解析の手法に基づき、骨軟部肉腫の直接の治療標的となり得る TK 融合遺伝子などの解明を骨軟部腫瘍にて進めた。

【結果】骨軟部腫瘍手術検体 82 例に対して RNA-seq パネル及び NanoString を用いてハイブリッドトランスクリプトーム解析を行った。軟部腫瘍 74 例、骨腫瘍 8 例に対して解析を行った。特に今回注目している融合遺伝子に関しては、82 例中 27 例に融合遺伝子を認め、*NTRK*、*ALK*、*FGFR*、*EGFR*、*PDGFRA*、*PDGFB*、*MET*、*KDR*、*CDK4* など治療標的になりうるキナーゼ融合遺伝子も多く認められた。その TK 融合遺伝子は骨軟部腫瘍の特徴である組織型特異的融合遺伝子を持たない非組織型特異的融合遺伝子群にほとんどが同定され、組織型特異的融合遺伝子を基軸とした相互排他性が存在することを示唆した。現在、検証コホートを用いてその相互排他性は解析中であり、同定されたキナーゼ融合遺伝子は機能解析を進めている。その検証実験と機能解析は骨軟部肉腫の悪性度解明や新規治療法開発に繋がると考えている。

骨軟部腫瘍 82 検体の高頻度遺伝子変化を示した OncoPrint



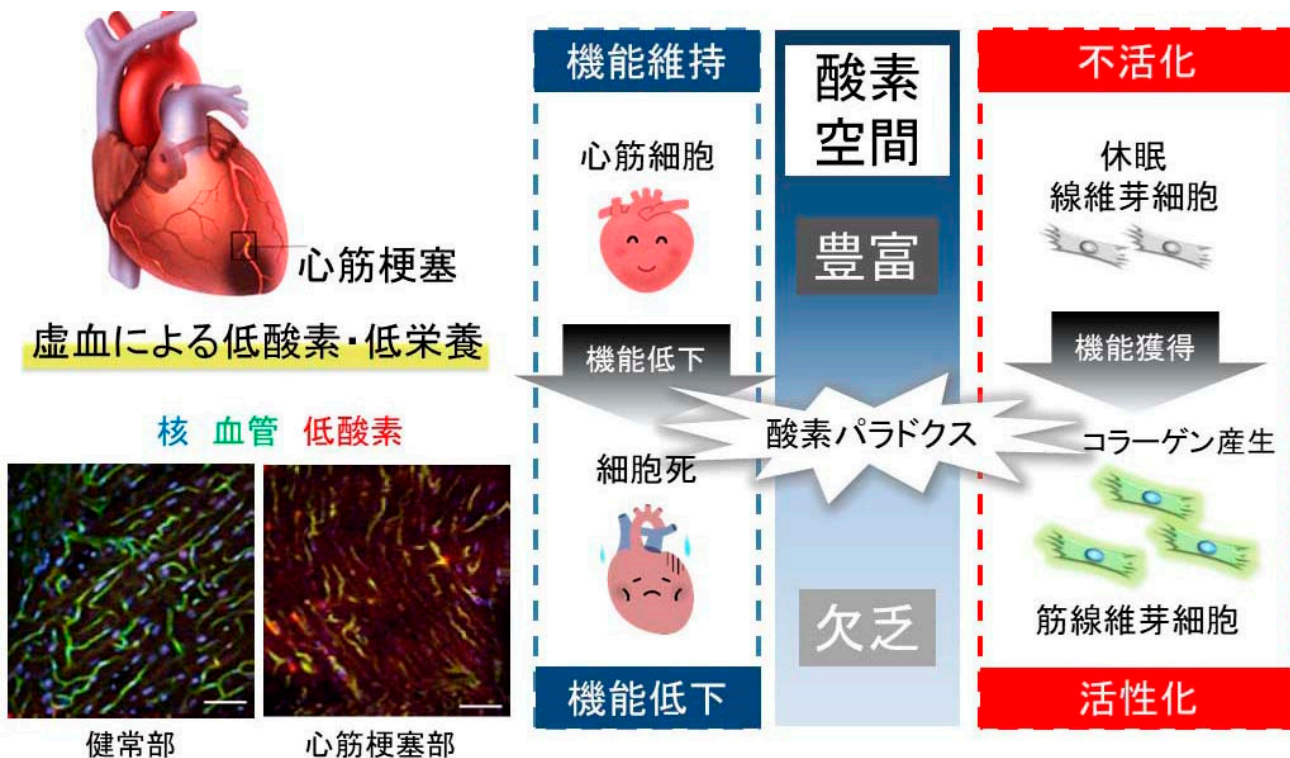
64 心臓線維化病態の解明と心不全治療法の開発 武田 憲彦

【目的】心臓はポンプとして収縮・拡張を繰り返すことで全身に血液を駆出しており、心臓の収縮あるいは拡張機能が低下するとそれぞれ収縮不全・拡張不全と呼ばれる心不全病態が引き起こされる。心臓線維化は拡張不全の主な原因であるが、なぜ心臓線維化が引き起こされるのかその分子病態は未だ明らかではない。本研究は心臓線維芽細胞が活性化する機構を解明し、心不全に対する治療法開発へと繋げることを目的とする。

【方法】本研究では酸素・栄養素環境に着目し心臓線維化における役割を検証した。線維芽細胞の培養株である NIH3T3 細胞から放出される細胞外マトリクスを用いて検出し、虚血環境が線維芽細胞活性化に与える影響とその分子機構の解明に取り組んだ (計画 1)。次に心臓線維芽細胞活性を検出するレポーター細胞を作製し、心臓線維芽細胞活性化の分子機構を理解すべく、その細胞内シグナルの探索を行った (計画 2)。

【結果】計画 1：線維芽細胞株 NIH3T3 細胞を、酸素濃度を 21%から 1%へ低下させる (低酸素負荷)、あるいは培養液中の血清を除いた条件 (無血清負荷) および低酸素・無血清負荷を加えた環境で培養し、培養上清に含まれる細胞外マトリクスをシリウスレッド染色および I 型コラーゲン抗体で検出した。その結果、低酸素負荷、無血清負荷によりそれぞれ NIH3T3 培養上清中に放出されるコラーゲン量が増加すること、低酸素・無血清負荷では著しく増加することを見出した。計画 2：コラーゲンプロモーター下に GFP を発現するマウス (Collagen-GFP、Col-GFP) より心臓線維芽細胞を単離し SV40 を用いて不死化した。不死化した心臓線維芽細胞をクローン化し、コラーゲン産生を GFP シグナル強度として検出できる細胞株 B1-1 を樹立した。レンチウイルスを用いてプール型 shRNA を導入し、線維芽細胞活性化を制御する細胞内シグナルの探索を行った。

心臓線維芽細胞における酸素パラドクス

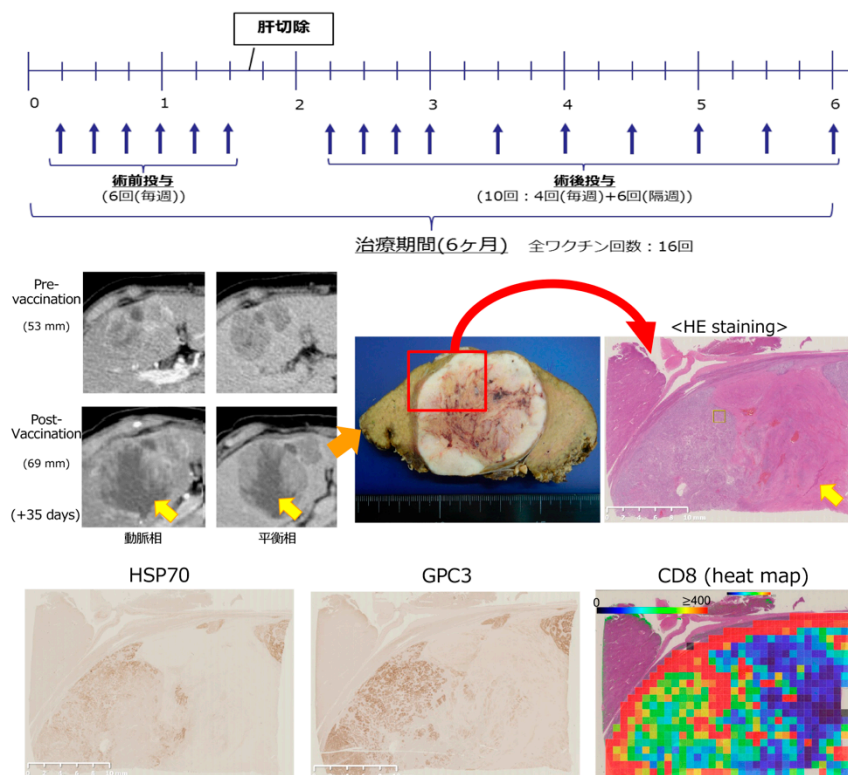


【目的】 肝細胞癌 (HCC) は仮に根治切除を施行しても高率に残肝再発をきたす難治性疾患である。近年、各種消化器癌に対する免疫チェックポイント阻害剤 (ICI) を用いたがん免疫療法が標準治療となりつつある。しかし、HCCの中でICIが奏効するのは免疫原性が高く細胞障害性T細胞 (CTL) が多数浸潤している一部のいわゆる Hot tumorのみであり HCC の約 20% に過ぎない。したがって、HCC における ICI の抗腫瘍効果を高めるためには、免疫原性が低いことで CTL が浸潤しにくい Cold tumor をいかにして Hot tumor に誘導するかが大きな課題である。我々は新規がんペプチドワクチン療法を開発し、第 I 相試験で安全かつ高い確率で抗原特異的 CTL を誘導することを証明した。そこで、肝細胞癌患者を対象に、同ワクチン療法を周術期として行う第 I 相試験を行った。今回、切除標本の病理学的、免疫学的特徴について報告する。

【方法】 Heat shock protein 70 (HSP70) および Glypican 3 (GPC3) 由来のペプチドと 2 種のアジュバント (Poly-ICLC+hLAG-3Ig) を組み合わせて皮下注射した。本ワクチン療法は手術前に 6 回、毎週投与した。切除標本は H&E 染色および HSP70、GPC3、CD8 の免疫組織化学的解析を行った。また、腫瘍浸潤リンパ球を抽出し 53 種類の抗体を用いてマスサイトメトリー (CyTOF) により解析した。さらに、本ワクチン療法と抗 PD-1 抗体併用療法の有用性を評価するため、マウス腫瘍モデルを用いた検討を行った。

【結果】 20 例に周術期ワクチン療法を行った。病理組織学的解析の結果、10 名の患者において腫瘍内への高い CD8⁺T 細胞の浸潤が認められ、これらの患者は免疫学的 Hot と考えられた。腫瘍浸潤リンパ球のマスサイトメトリー解析では、病理学的に Hot と判断した症例は Cold な症例と比較して、CD8⁺細胞上のチェックポイント分子 (PD-1、TIGIT) の高発現を認めた。マウス腫瘍モデルを用いたワクチン療法と抗 PD-1 抗体の併用療法の抗腫瘍効果の検討では、無治療、ワクチン単剤、抗 PD-1 抗体単剤と比較して併用療法は有意な抗腫瘍効果および生存期間延長効果を認めた。以上の結果より、本ワクチン療法と抗 PD-1 抗体の併用は、相乗的に作用し高い抗腫瘍効果をもたらす可能性が示唆された。

HCC に対する周術期ワクチン療法と腫瘍微小環境の変化

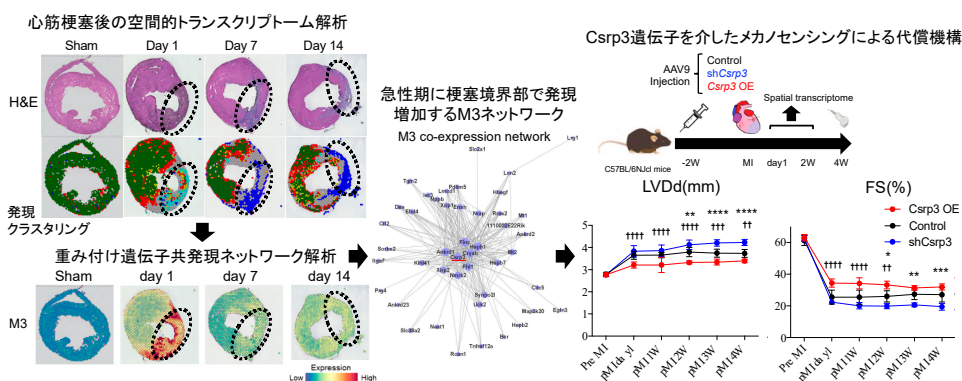


【目的】 高血圧や脂質異常症などの生活習慣病は動脈硬化を介して虚血性心疾患を発症させる。我々は虚血性心疾患を含んだ 17 万人以上のゲノム解析を実施して疾患関連遺伝子座を特定し、それらを用いた遺伝的リスクスコアによって虚血性心疾患の発症や心血管疾患による死亡を予測できることを実証してきた。実際に心筋梗塞を発症すると、病的な心臓リモデリングを経てその後に不整脈や心不全を生じ、命の危険にさらされる。しかしながら、心臓リモデリングは時間的・空間的にダイナミックに生じるため、その分子機序の多くは明らかでない。その機序を明らかにして介入することで、心筋梗塞後の予後を改善できる可能性がある。

【方法】 我々は以前、世界で初めて心臓のシングルセル RNA-seq 解析技術を確立して報告した。本研究では、マウスに心筋梗塞を施して 1 日後、7 日後、14 日後にランゲンドルフ灌流法によって心筋細胞を単離し、その後に核を抽出してから Chromium (10X Genomics) で single-nucleus RNA-seq ライブラリを作製して NovaSeq6000 (Illumina) にてシーケンスを実施した。さらに心臓組織における空間的な細胞局在を保持したまま全遺伝子発現情報を取得する空間的トランスクリプトーム解析 (Visium (10X Genomics)) を実施した。また遺伝子機能解析のためには心筋特異的に遺伝子導入が可能な AAV9 に標的遺伝子を改変するベクターを導入してマウスに投与した。

【結果】 心筋梗塞後 (1 日後、7 日後、14 日後) の梗塞部・遠隔部における心筋細胞の single-nucleus RNA-seq 解析によって、心筋梗塞後の急性期に梗塞部で特徴的な遺伝子発現パターンを呈する細胞集団が出現することを発見した。その細胞集団は、*Ankrd1* (Ankyrin repeat domain 1) や *Csrp3* (Cysteine and glycine rich protein 3) といったメカノセンシングに関わる遺伝子を高発現していた。続いて心筋梗塞後の心臓組織を Visium により空間的トランスクリプトーム解析したところ、梗塞領域・境界領域・遠隔領域といった各領域で時間的に特徴的な遺伝子発現変化をしていることがわかった。WGCNA (重み付け遺伝子共発現ネットワーク解析) によって空間的遺伝子発現と関係する遺伝子モジュールを同定し、梗塞後境界部で急性期に活性化しているモジュールを見出し、そのネットワーク解析によって *Csrp3* などメカノセンシング関連遺伝子が中心的に位置していることがわかった。*Csrp3* 遺伝子の空間的な発現プロファイルは 1 分子 RNA *in situ* hybridization によって確認した。さらに、心筋細胞に特異的に遺伝子を導入できる AAV9 に *Csrp3* shRNA および *Csrp3* 遺伝子を導入したベクターを組み込んでそれぞれマウスに投与し、心筋梗塞を施した後の心臓機能評価および空間的トランスクリプトーム解析を実施した。*Csrp3* knockdown (KD) によって梗塞後の病的リモデリングは増悪して *Csrp3* overexpression (OE) によって改善した。さらに *Csrp3* KD で梗塞境界部に急性期に認められる *M3* 遺伝子発現が消失して *Csrp3* OE によって増強したことから、*Csrp3* を介したメカノセンシング経路は *M3* 遺伝子発現を上流から制御していることを見出した。以上より我々は、single-nucleus RNA-seq と空間的トランスクリプトーム解析を統合して梗塞境界部で急性期に活性化するメカノセンシング遺伝子群を同定し、それが *Csrp3* 遺伝子によって制御された遺伝子プログラムであることを見出し、このプログラムが梗塞後の病的な心臓リモデリングを代償的に制御していることを解明した。

心筋梗塞の時空間的シングルセル解析で明らかになった梗塞境界部の心筋メカノセンシング機構



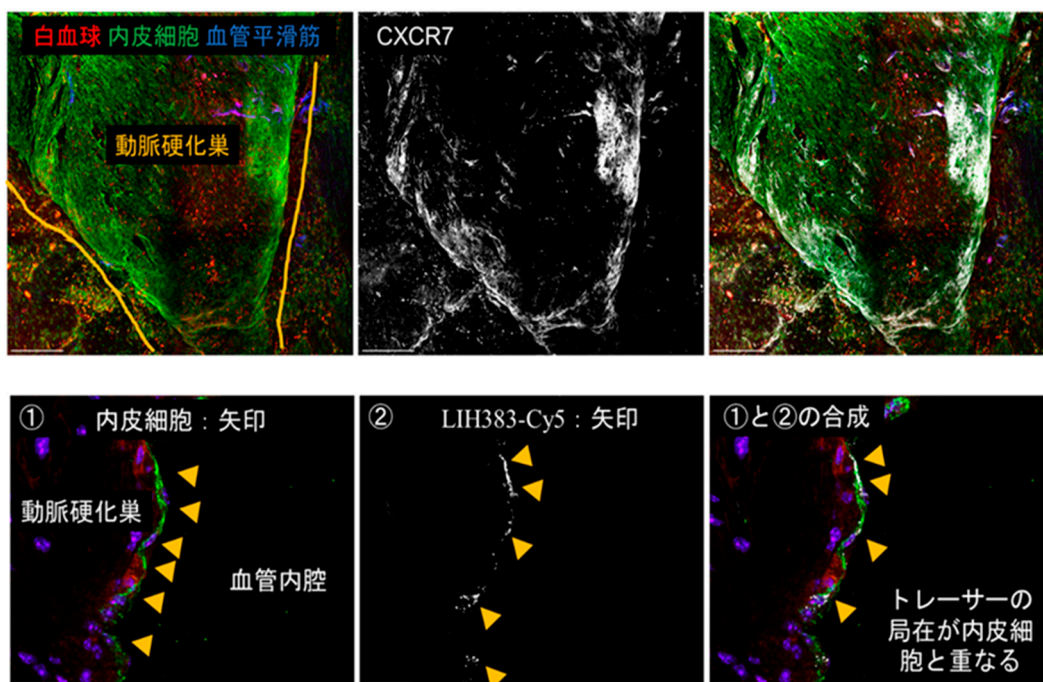
67	CXCR7特異的PETトレーサーを用いた動脈硬化の病態解明	馬場 理
----	-------------------------------	------

【目的】 非定型的ケモカイン受容体 CXCR7 は動脈硬化進展において重要な機能を持つと考えられるが、その動脈硬化巣における発現分布を含めて判明していないことが多い。一方、PET 検査は生体内での分子動態を非侵襲的に評価できる点で、近年、動脈硬化性疾患領域でも注目を浴びている。本研究の目的は、マウス動脈硬化モデルを用いて動脈硬化巣中の CXCR7 の発現細胞および CXCR7 の動脈硬化形成における機能を明らかにすることである。具体的には、1. マウスモデルを用いた動脈硬化巣における CXCR7 の発現および機能解析、2. 臨床応用に向けた CXCR7 特異的 PET トレーサーの開発およびマウスモデルでの動脈硬化巣における PET シグナル解析を行っていった。

【方法】 1. マウス動脈硬化巣における CXCR7 の発現を免疫染色、Whole mount 染色、そしてフローサイトメトリーを用いて解析した。2. CXCR7 特異的ペプチド LIH383 を Cy5 によって標識し、アポ E 欠損マウスに投与、動脈硬化巣における分布を免疫染色で確認した。

【結果】 1. 動脈硬化含有大動脈の Whole mount 染色によって、CXCR7 が動脈硬化巣に高発現していることが判明した。さらに、動脈硬化巣の血管内皮細胞、特にプラークの裾野や端部に発現していることが明らかになった。また、血管平滑筋細胞にも発現が認められることを明らかにした。血管内皮における CXCR7 の動脈硬化進展に与える影響を評価するために血管内皮特異的 CXCR7 欠損マウスを作製した。2. CXCR7 特異的ペプチド LIH383 は主に動脈硬化巣の血管内皮に集積することが判明した。これにより LIH383 を用いたトレーサーが動脈硬化巣に実際に集積すると考えられたために、CXCR7 特異的 PET トレーサーの開発を開始した。

動脈硬化巣における CXCR7 の分布（上）と LIH383-Cy5 の動脈硬化巣内皮細胞への集積（下）

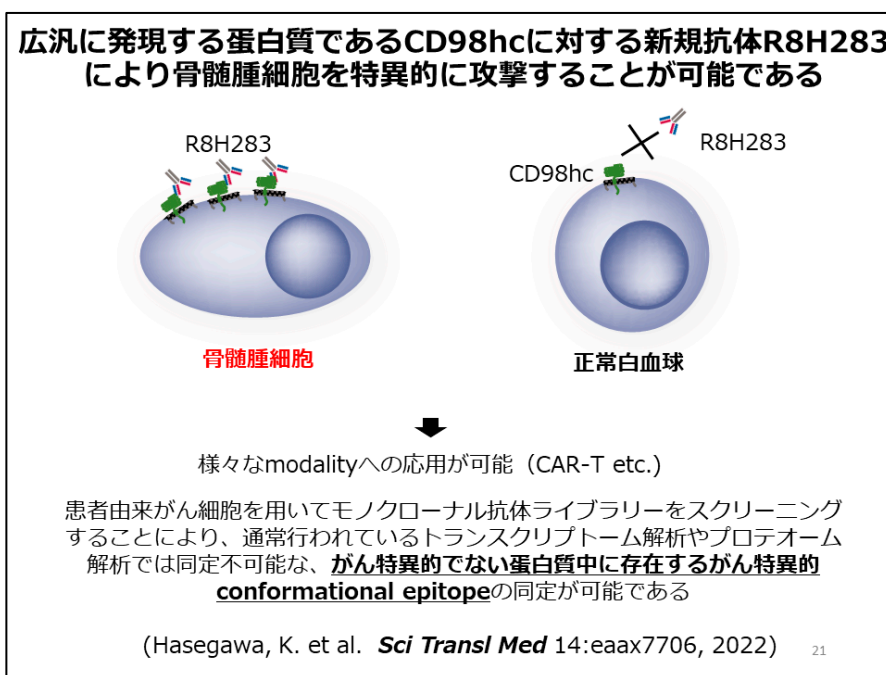


68	多発性骨髄腫の微小残存病変を排除する治療法の開発	保仙 直毅
----	--------------------------	-------

【目的】 多発性骨髄腫は代表的な血液がんであり、プロテアソーム阻害剤、免疫調整薬（レナリドミド等）、抗体医薬の導入により予後の改善は著しい。しかし、治癒は極めて稀であるのが大きな問題であり、微小残存骨髄腫細胞を排除し、骨髄腫患者を治癒に導く方法の開発が望まれている。その一つとして、CAR-T 細胞は有望であり、世界中で開発が進められている。我々は骨髄腫の治癒を目指した治療として活性型インテグリンβ7 を標的とした CAR-T 細胞（MMG49 CAR-T 細胞）を開発した。今後、更に多くの治療標的抗原を同定し、複数の抗原を標的とした CAR-T 細胞治療が進んでいくと考えられ、新たな骨髄腫特異的抗原の同定が必要である。そこで、本研究において我々は、新たな多発性骨髄腫特異的抗原の同定を目指した。

【方法および結果】 多発性骨髄腫特異的な細胞表面抗原は、抗体治療及びその派生物である CAR-T 細胞治療などの理想的な治療標的である。しかし、トランスクリプトーム解析を使用した広範な努力の結果、骨髄腫細胞に特異的に発現する遺伝子にはもはや未同定なものは残っていないと考えられる。そこで、我々は蛋白質の翻訳後変化によって形成される骨髄腫特異抗原の同定を目指して、自作した 10,000 を超える抗骨髄腫細胞モノクローナル抗体をスクリーニングし、骨髄腫細胞に結合するが、正常な造血細胞または非造血細胞には結合しない抗体として R8H283 を同定した。R8H283 は CD98hc を認識したが、CD98hc 蛋白質を発現する正常な血液細胞には結合しなかったことから、何らかの骨髄腫に特異性の高いエピトープを認識していると考えられた。正常な白血球に発現している CD98hc は、骨髄腫細胞で発現される CD98hc とは、付着している N 型糖鎖に大きな違いがあることが明らかになった。また、N 型糖鎖の成熟に必要な酵素を欠損する細胞では、R8H283 の結合が優位に上昇した。これらのことから、CD98hc に付着する N 型糖鎖構造の違いが、R8H283 が正常白血球に結合しない原因となっている可能性が強く示唆された。R8H283 の投与はマウスでの異種移植モデルにおいて、有意な抗骨髄腫効果を発揮した。これらの発見は、R8H283 が骨髄腫に対する新しい治療用抗体の候補であり、CAR-T 細胞などへの応用が期待されることを示している。また、患者由来がん細胞を用いてモノクローナル抗体ライブラリーをスクリーニングすることにより、通常行われているトランスクリプトーム解析やプロテオーム解析では同定不可能な、がん特異的でない蛋白質中に存在するがん特異的 conformational epitope の同定が可能であることを改めて示した。

多発性骨髄腫に対する新規治療用抗 CD98hc 抗体

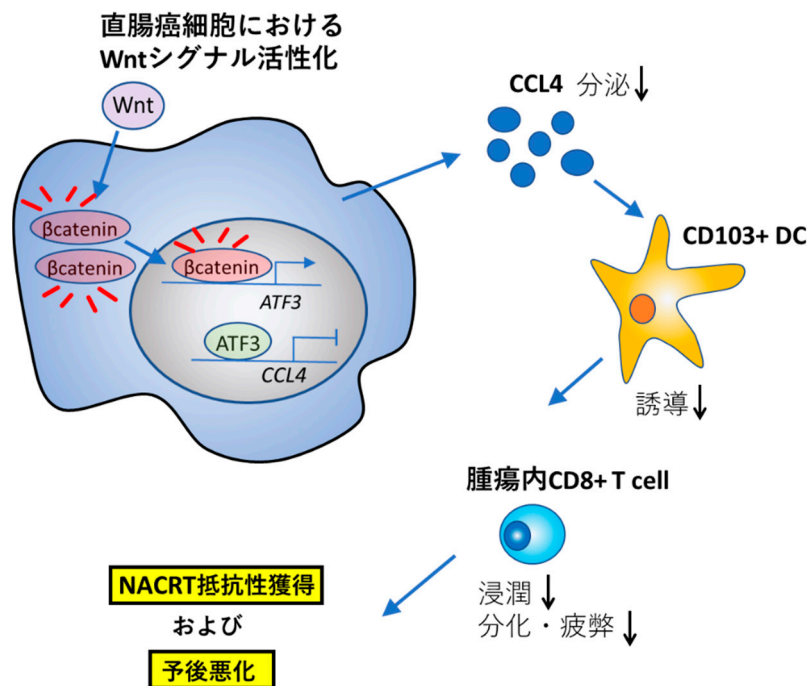


【目的】 直腸癌術前化学放射線療法（NACRT）の喫緊の課題は病理学的完全奏効（pCR）率の向上であるが、そのためには、NACRT 抵抗性獲得機序の解明が必須である。本研究は、直腸癌 NACRT 抵抗性獲得における Wnt/ β -カテニンシグナル（Wnt シグナル）の役割を、腫瘍免疫微小環境（Tumor immune microenvironment : TIME）の変化に着目して解析し、Wnt シグナル制御によって pCR 率を向上する新規 NACRT 治療戦略の開発を試みる。

【方法】 ①NACRT 直腸癌生検組織を用いて Wnt シグナル関連分子（ β -カテニン）発現を免疫組織学的に調べ、 β -カテニン発現強度（無・弱・中・高）と NACRT 組織学的奏効度および腫瘍学的予後との関連性を解析した。②NACRT 直腸癌手術組織を用いて、CD8 浸潤の程度を調べ、NACRT 組織学的奏効度および腫瘍学的予後との関連性を解析した。③BALB/c マウスに CT26 マウス大腸癌細胞株を用いて、放射線腫瘍マウスモデルを作製し、放射線照射量に関する治療効果、CD8⁺T 細胞の浸潤、および Exhaustion を含む分化状態の評価を行った。

【結果】 ①NACRT 直腸癌生検組織において、 β -カテニン発現強度と NACRT 奏効度は有意に相関しており、 β -カテニン強発現群において、NACRT 奏効度は低かった（ $P=0.0001$ ）。全生存率は β -カテニン強発現群（中・高）と弱発現群（無・弱）で有意差は無かったが（ $P=0.234$ ）、 β -カテニン高発現群（高）はその他（無・弱・中）よりも有意に予後不良であった（ $P=0.0143$ ）。一方、無再発生存率は、各群間で有意差はなかったが、 β -カテニン発現最弱群（無）は、他の3群よりも良好な傾向があった。②NACRT 後直腸癌において、CD8⁺浸潤の程度と組織学的奏効度は高い相関性を示した（Cut off 1,320/mm², AUC=0.7986）。また、CD8⁺の高浸潤群は、低浸潤群と比較して、有意に無再発生存率が良好であった（ $P=0.020$ ）。一方、レジデントメモリーCD8⁺T 細胞（CD103、CD8 double positive）の細胞密度は、無再発生存率に寄与しなかった。③大腸癌培養細胞株移植マウスモデルにおいて、放射線照射量依存的な抗腫瘍効果を示した。また、放射線照射量依存的に CD8⁺T 細胞が誘導された。さらに、抗原刺激に対して反応し、疲弊・分化したと思われる PD-1⁺Tim-3⁺CD8⁺T 細胞が増加を示した。

Wnt シグナル活性化に伴う CD8⁺T 細胞浸潤抑制による NACRT 抵抗性獲得



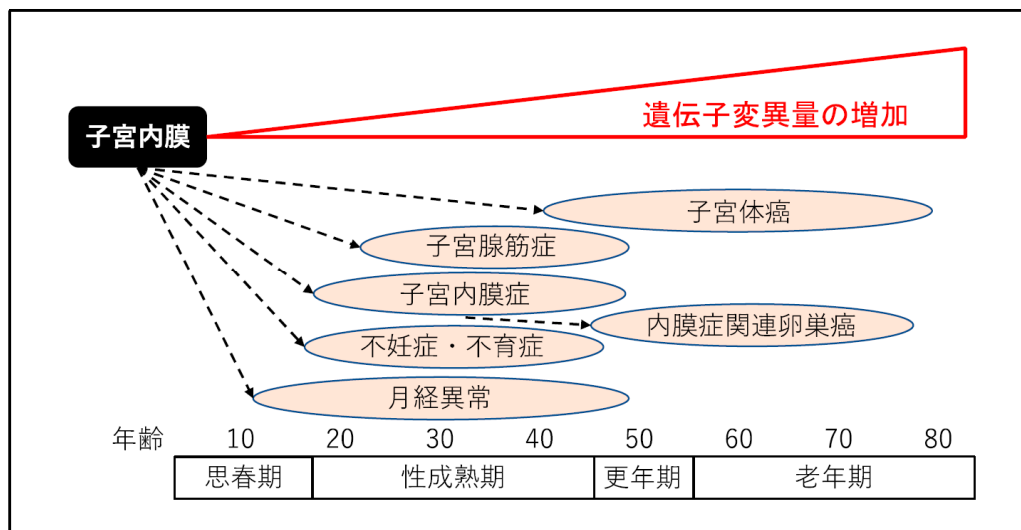
70 正常子宮内膜の癌遺伝子変異は疾患予防に役立つか? 吉原 弘祐

【目的】 先行研究において、卵巣子宮内膜症・正常子宮内膜に対するゲノム解析を実施しており、癌関連遺伝子の体細胞変異が子宮内膜症上皮や正常子宮内膜に認められることを世界に先駆けて報告している。しかし、正常子宮内膜組織における癌関連遺伝子変異の意義については依然として不明なままである。そこで本研究では、正常子宮内膜における癌関連遺伝子変異の生物学的意義を検証することを目的とした。

【方法】 20 歳から 60 歳までの年齢を対象として、1 症例あたり 10 本以上の腺管を分離し、単一腺管シーケンスデータを取得した。年齢・月経回数・分娩回数・喫煙歴などの臨床情報とゲノム情報との相関を検討した。また、腺管を採取した子宮内膜の位置情報とゲノム情報を紐付けすることで、子宮内腔におけるゲノム異常がどのように広がるのかを検証した。ゲノム異常の空間的広がりを 3 次元で解釈するために、子宮内膜に対する 3 次元構造解析を行い、ゲノムデータと 3 次元構造データを結合させることで、正常子宮内膜のゲノム異常の生物学的意義を検討した。

【結果】 32 症例より 891 本の腺管 (1 症例あたり平均 27.8±14.6 本) を収集し、単一腺管シーケンスを実施したところ、癌遺伝子である *PIK3CA* と *KRAS* の体細胞変異をそれぞれ 15.6% と 10.9% で認めた。次に、遺伝子変異量と臨床病理学的因子で関連解析を行ったところ、遺伝子変異量は年齢 ($r=0.79, p=7.5 \times 10^{-8}$) と累積月経回数 ($r=0.81, p=2.4 \times 10^{-8}$) と強い正の相関があることを明らかにした。子宮内膜における癌関連遺伝子変異の空間的評価を行うために、摘出子宮から 20×30 mm の子宮内膜全層を採取し、5×5 mm の区域に分割した。各区域から 5 本ずつ腺管を分離してシーケンスを行った。その結果、隣接した複数の区域で共通する癌関連遺伝子変異を有する腺管を同定した。3 次元位置情報を加味した単一腺管全ゲノムシーケンスを行い、地下茎構造でつながりのある腺管は共通の遺伝子変異を有し、同一発生源であることを明らかにした。

子宮内膜におけるゲノム異常と疾患



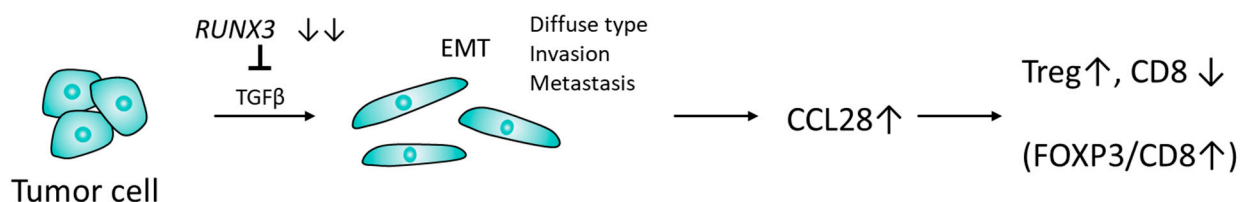
【目的】 上部消化管腺癌は次の4つの分子亜型: EBウイルス (EBV) 関連、高レベルマイクロサテライト異常 (MSI-H)、ゲノム安定性 (Genomically stable : GS)、染色体不安定性 (Chromosomal instable : CIN) に分類される。このうち、EBV 関連と MSI-H 腫瘍には、PD1/PD-L1 系抑制の免疫チェックポイント阻害剤が有効とされているが、その他の腫瘍 (Non-EBV/non-MSI-H) では、PD1/PD-L1 系以外の免疫回避機構の関与が示唆されている。抗腫瘍作用を有する CD8⁺細胞傷害性 T 細胞は、FOXP3⁺制御性 T 細胞により抑制を受け、腫瘍局所における両者のバランス (FOXP3⁺細胞数/CD8⁺細胞数=FOXP3/CD8 比) が、腫瘍の悪性度と関与するのではないかと着想した。また、腫瘍間質が腫瘍免疫微小環境に及ぼすことから、FOXP3/CD8 比の悪性度への影響は、組織型 (びまん型、分化型) によって異なるのではないかと考え、Non-EBV/non-MSI-H の食道胃接合部腺癌を対象とし、その仮説の検証とメカニズムを探索することとした。

【方法】 CD8 および FOXP3 の免疫染色が可能であった国内多施設の Non-EBV/non-MSI-H の食道胃接合部腺癌 (N=303) を対象とした。ホルマリン包埋連続切片を自動免疫染色機で染色し、CD8⁺細胞および FOXP3⁺細胞の数を、腫瘍内部と浸潤部のそれぞれにおいて3箇所、デジタル画像を使って測定した。腫瘍内部と浸潤部それぞれの FOXP3⁺/CD8⁺比を算出し、中央値で高群・低群に分け、悪性度の指標としては疾患特異的予後との比較検討を、メカニズム解明には選択的メチル化解析を行った。

【結果】 pStage I~III (N=250) において、びまん型腫瘍 (N=57) では FOXP3/CD8 比高群で有意に予後不良であった (疾患特異的5年生存率、高群 57.1%、低群 88.9%、 $P=0.0096$)。多変量解析では、びまん型において FOXP3/CD8 比高群は独立した予後因子であり、そのリスク比は 8.47 ($P=0.0033$) であった。さらに、びまん型と分化型において、FOXP3/CD8 比の予後に与える影響は顕著に異なり、両者の交互作用は有意であった (P for interaction = 0.022)。びまん型症例においては、代表的な 11 個の CpG アイランドメチル化形質マーカーのメチル化解析で、RUNX3 の高メチル化症例の FOXP3/CD8 比が上昇していることが判明した ($P=0.010$)。RUNX3 メチル化異常を伴うびまん型腫瘍細胞におけるケモカイン関連遺伝子発現状況を TCGA パブリックデータベースで検索したところ、CCL28 高発現のみが FOXP3/CD8 比の上昇と相関傾向にあることが判明した ($P=0.088$)。

Non-EBV/non-MSI-H の食道胃接合部腺癌において、RUNX3 メチル化によって発がんするびまん型腫瘍の免疫微小環境では、CCL28 の高発現を介した制御性 T 細胞の誘導と、それによる細胞傷害性 T 細胞の抑制を引き起こしていることが、抗腫瘍免疫を回避するメカニズムであると考えられた。

Non-EBV/non-MSI-H 食道胃接合部腺癌のびまん型における抗腫瘍免疫回避メカニズム



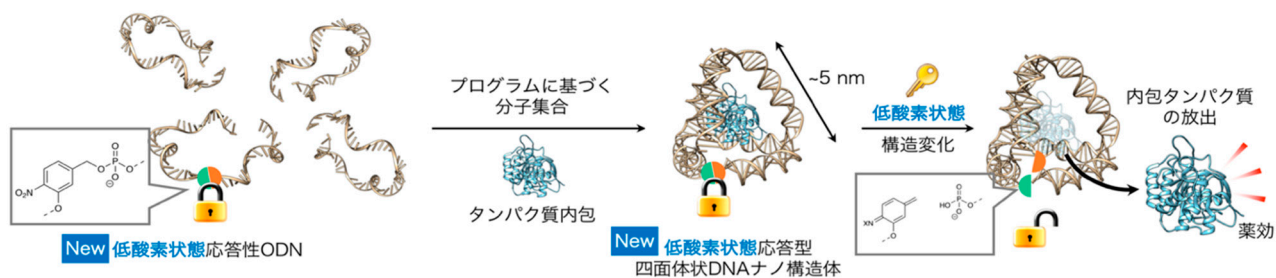
72 低酸素状態にตอบสนองする新たなDNAナノ構造体の創製	池田 将
----------------------------------	------

【目的】 本研究の目的は、低酸素状態にตอบสนองして精密な構造変化を示す新規な DNA ナノ構造体の創製である。DNA ナノ構造体に関する研究は、ナノテクノロジーの中核分野へと発展し、DNA 鎖の長さ・配列・組み合わせ等を設計することによって新たな形状の DNA ナノ構造体が創出され続けている。近年、このような DNA ナノ構造体は、生体・医療用ナノ材料としての活用が期待されている。しかしながら、狙った刺激にตอบสนองする DNA ナノ構造体の構築やそのための化学的な方法論の開発は、ほぼ未着手のまま残されている。本研究では、低酸素状態に関連する還元的な環境にตอบสนองする DNA 構造体の構築を目的とし、新たな分子の設計・開発を行い、その有用性を検証した。DNA ナノ構造体に特定の疾病に関連する生体内環境を刺激としてตอบสนองする機能を搭載できれば、バイオナノテクノロジー分野のブレークスルーとなる可能性があり、生命科学・医療分野において大きな意義がある。

【方法】 本研究の目的を達成するために、ニトロアリアル基を組み込んだ ODN を、核酸自動合成装置によって構築するためのモノマー分子の有機合成法を確立した。合成したモノマー分子を用いて核酸自動合成装置によって ODN を構築した。構築した低酸素状態ตอบสนอง性新規 ODN は、HPLC によって精製し、MALDI-TOF MS によって同定した。次に、低酸素状態に関連する還元刺激にตอบสนองした ODN 鎖の切断が、設計通りに進行することを PAGE および MALDI-TOFMS によって実証した。次に、低酸素状態ตอบสนอง性 ODN からなる DNA 構造体を創製し、その還元ตอบสนอง性を評価した。得られた構造体のサイズや形状は、蛍光顕微鏡観察および電子顕微鏡観察によって評価した。

【結果】 上記の分子設計指針に基づき合成した ODN が還元ตอบสนอง性を有していることを明らかにした。さらに、サーマルアニーリング操作によるハイブリダイゼーションによって、球状の DNA 構造体を構築した。構築した球状の DNA 構造体が還元環境にตอบสนองして崩壊することを各種測定により実証した。以上の結果から、ODN、および ODN からなる DNA 構造体に還元ตอบสนอง性を付与できる新たな分子設計指針を確立することに成功した。

低酸素状態にตอบสนองする新たな DNA ナノ構造体の創製

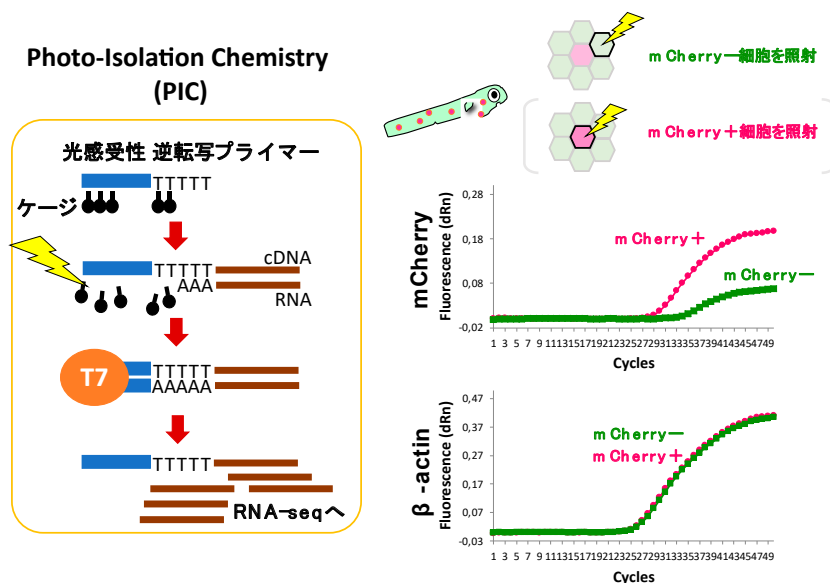


【目的】 近年の NGS 解析の発展により、胚発生期に生じた不良細胞が多様な成人疾患の発症に関与することが明らかになってきている。この事実は、胚の細胞品質が成体の疾患リスクに関わることを示しており、同時に、胚の細胞品質の向上により個体の生涯の疾患発症リスクを低減可能であることを示唆する。一方で我々は最近、動物胚が細胞間コミュニケーションを介して細胞品質を向上させるシステムを備えていることを発見した。具体的には、正常なゼブラフィッシュ胚発生においてシグナル伝達異常細胞など多様な不良細胞が頻繁に自然発生するものの、これらの不良細胞の多くは細胞死を起こして消失することを発見した (Akieda et al., Nat Commun, 2019)。しかしながら、隣接正常細胞が異常細胞の細胞死を促す仕組みの詳細は不明である。また、不良細胞が出現するメカニズムもよくわかっていない。これらを理解するためには、不良細胞と隣接細胞のそれぞれの遺伝子発現・シグナル動態を網羅的に解析し、空間情報を保持したまま実行可能な単一細胞レベルのオミクスが有効であるが、そのような技術は胚の研究において実用例がない。そこで本研究では、オミクス技術開発を行う研究者と異分野連携を行い、最新鋭の空間オミクス技術をゼブラフィッシュ胚解析に実装し、これを用いた解析を行うことで、胚の細胞品質管理機構の包括的理解を目指す。

【方法】 小型魚類ゼブラフィッシュへの最新の空間トランスクリプトミクス系 PIC (Honda et al., Nat Commun, 2020) の実装を試みた。また、トランスクリプトミクス系を駆使して、不良細胞内・隣接細胞内それぞれで起こるトランスクリプトーム変化を解析し、不良細胞の出現・感知・排除に関わる分子・シグナルの候補を抽出した。さらに、これら候補分子、候補シグナルの機能改変実験と不良細胞のイメージング解析を併用して行った。これにより、不良細胞の出現・感知・排除のメカニズムの解明を目指した。

【結果】 ゼブラフィッシュへの PIC の実装を試み、任意の細胞のトランスクリプトームを取得することに成功した (下図)。また、確立済みのトランスクリプトーム技術とイメージング技術を駆使して不良細胞の出現・感知・排除のメカニズムを解析した。その結果、ゼブラフィッシュ正常発生過程では多様な異常を持つ不良細胞が出現し、これらが品質管理機構によって細胞死誘導されるが、不良細胞の種類を問わず共通して発現誘導される分子が存在し、これが不良細胞の細胞死誘導において重要な役割を果たすことを明らかにした。また、ゼブラフィッシュ稚魚上皮にがん遺伝子 *Ras* の活性化を起こした“がん原細胞”を少数誘導すると隣接正常細胞とのコミュニケーションを経て不可逆的な増殖停止 (細胞老化) を誘導され、最終的に上皮から排除される現象も見出した (Haraoka et al., Nat Commun, 2022)。

空間トランスクリプトミクス PIC (左) とゼブラフィッシュへの実装 (右)



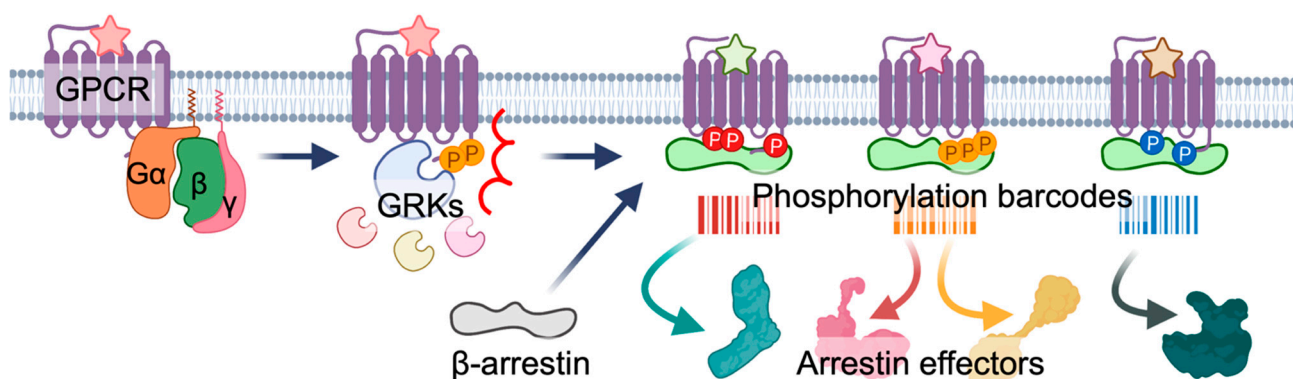
74	GPCRリン酸化バーコードによるアレスチン機能の理解	井上 飛鳥
----	----------------------------	-------

【目的】 Gタンパク質共役型受容体 (G-protein-coupled receptor : GPCR) は既存薬の約30%もの作用標的を占めることが知られ、創薬開発の最重要のタンパク質群に位置付けられる。GPCRのシグナル伝達分子は主に三量体Gタンパク質 (以下、Gタンパク質) によって担われるが、近年、βアレスチン (以下、アレスチン) による多様な作用に着目されている。アレスチンの活性化機構として、リン酸化されたGPCRに結合し構造変化が生じるとされるが、GPCRリン酸化のパターンやアレスチンのフィンガーグループの役割、その他の活性化因子の機構など不明な点が多く残されている。本研究ではアンジオテンシン受容体 (AT1R)、スフィンゴシン1リン酸受容体 (S1PR1)、ケモカイン受容体 (CCR2とD6R) およびニューロテンシン受容体 (NTSR1) をモデルとしてアレスチンの活性化機構の解析を行った。

【方法】 GPCRリガンド刺激依存的なアレスチンとの結合を評価するため、NanoBiT補酵素断片法を用いた。Direct法ではGPCRのC末端にSmBiTを融合したコンストラクトとアレスチンのN末端にLgBiTを融合したコンストラクトを用いた。Bystander法ではアレスチンのN末端にSmBiTを融合したコンストラクトとLgBiTにCAAXモチーフに融合した膜局在コンストラクトを用い、C末インタクトのGPCRを共発現させた。これらのNanoBiTコンストラクトをHEK293A細胞またはGPCRキナーゼ (GRK) を欠損させたHEK293A細胞 (GRK2/3二重欠損、GRK5/6二重欠損、GRK2/3/5/6四重欠損) にリポフェクション法を用いて導入し、発光基質を取り込ませた後にGPCRリガンドを添加し、発光シグナル変化を発光プレートリーダーにより計測した。

【結果】 AT1Rにおいては内因性リガンドであるAng IIがGRK2/3/5/6を介してアレスチンをリクルートする一方、バイアスリガンドのTRV027はGRK5/6を選択的に活性化することでアレスチンをリクルートし、S326のリン酸化が重要であった。S1PR1の構造研究からバイアスリガンドのフィンゴリドリン酸はトグルスイッチの構造変化が中間状態であり、これがS1P結合型とは異なる受容体内のコンタクトネットワーク変化を誘導し、細胞内側の構造がアレスチンを好む形状につながるということがわかった。リガンドを共通とするバランス型受容体CCR2とアレスチンバイアス型受容体D6Rとの比較から、D6RのアレスチンリクルートにはGRK2/3/5/6が不要であり、アレスチンの活性化構造がD6R誘導型とCCR2誘導型で異なることがわかった。NTSR1の研究から、機能性膜脂質であるホスファチジルイノシトール4,5-ビスリン酸 (PIP₂) がアレスチンのGPCRへの結合とアレスチン活性化を促進しており、PIP₂結合がGPCR内在化の分類を説明できることを見出した。

GPCRのリン酸化形成とアレスチンによるバーコード依存的な機能

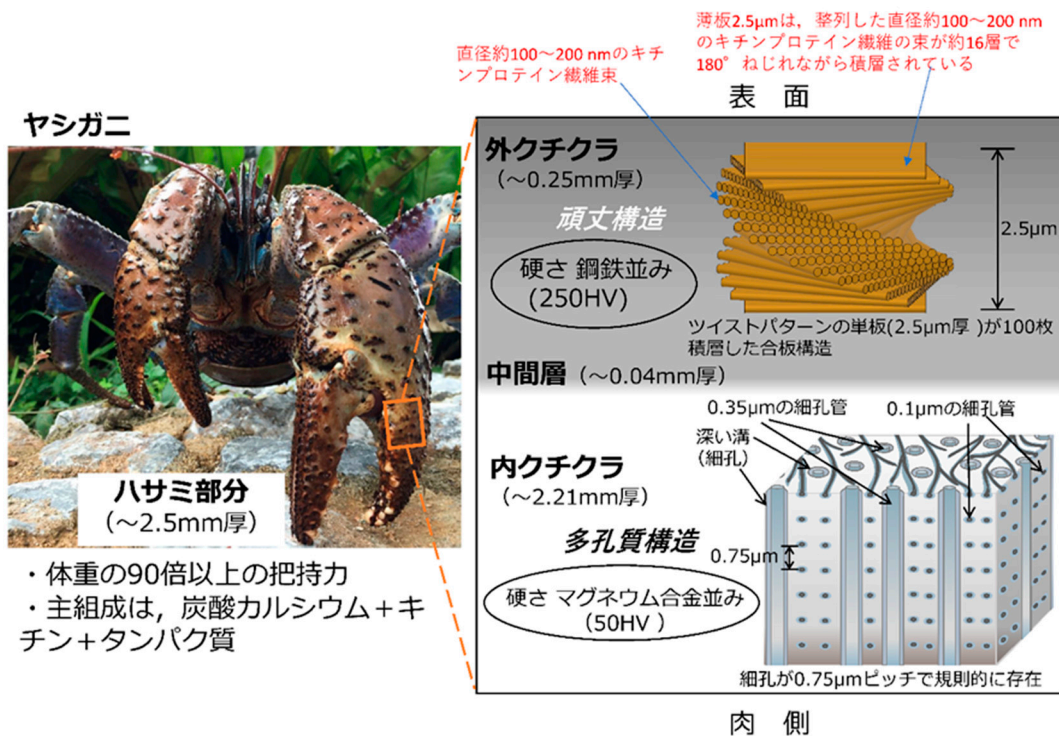


【目的】 手術患者への負担軽減や安全性向上を目的とした低侵襲手術の推進により、医療機器（超音波生検針、呼吸器内視鏡鉗子など）の一層の小型化が叫ばれている。今後の小型化における最大のネックは、使用素材の特性と安全性である。しかし、素材を薄肉化・小径化した場合、結晶組織に関連した加工性の低下や表面粗さ・破損確率の向上が顕在化することは知られていない。その上、材料は高強度化することで脆くなるため、結晶粒の単なる微細化だけでは素材・部材の安全性は担保できない。よって、“超微細結晶粒+ α （アルファ）”の考えが、今後の医療機器小型化へのニーズに応えるための必要条件である。しかしながら、 α のアイデアも希薄であり、医療機器を素材開発から見据えた検討は皆無である。本研究では、今後の極細径鉗子などの小型医療機器への展開を見据え、陸生甲殻類最大種で、生物界最強の把持力を有する「ヤシガニ」のハサミの微視組織と構造および成分を観察・分析し、かつ硬度試験を通して、その強靱化発現機構を解明することを目的とした。

【方法】 本研究は、①検体の抽出、②組織解析・分析、③ビッカース硬さ・ナノインデンテーション硬さ試験、④まとめからなり、これらを順次実施した。特に、組織解析においては、材料科学分野における最先端の装置を活用し、微視組織の3次元可視化を実施した。

【結果】 堅牢なハサミの外骨格は、硬い外クチクラ層と軟らかい内クチクラ層、そして両層の間の中間層で大別されていた。外クチクラでキチン繊維とプロテインの細長い束が、厚さ方向にねじれながら積み重なって1枚のねじれパターンの薄板を形成し、これらが数百枚積層した合板構造で非常に密に強く石灰化されていた。一方、内クチクラでは石灰化したマトリックスに数百ナノの細孔が規則的に存在する多孔質構造で有機相（キチン、タンパク質）が多く存在していた。これらの石灰化と組織構造の相違によって、ビッカース硬さは中間層を境に5倍ほど変化した。すなわち、硬いヤシガニのハサミは250 HVの高強度鋼並みの2.5 μ m厚の薄い層とそれより1/5倍の硬さと10倍弱厚いクッションのような役割を担う多孔質層による「剛」と「柔」の複合構造であり、軽さと強靱さを兼ね備えていることがわかった。

ヤシガニのハサミの内部組織構造の模式図

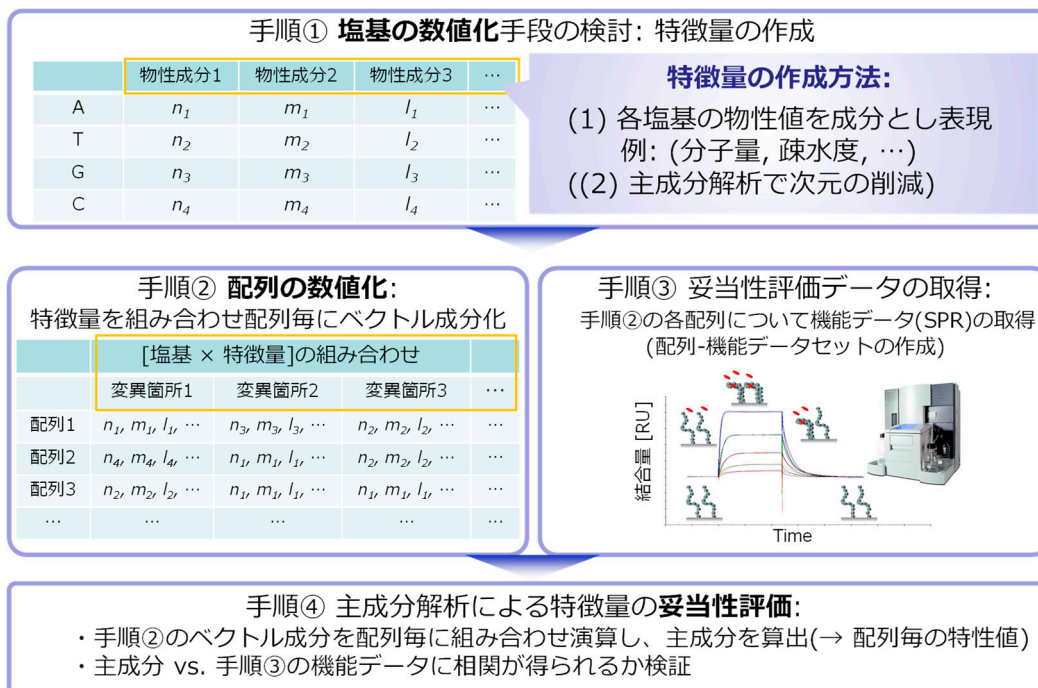


【目的】 DNA アプタマーは化学合成が可能であり、有機化合物と同程度のコストで精製できる利点があると共に、抗体分子と同様な特定標的分子へ特異的に結合できる機能を有する。しかし、タンパク質と同様に目的の機能をもつ分子を見つけた作業はそれなりの資金と時間が必要なため、リスク・リターン・達成速度のアンバランスが参入障壁になっている。我々は、タンパク質で培った機械学習と連携した進化分子工学による配列空間探索法を利用することによって、目的機能をもつDNA アプタマーを取得できる確率を向上し作業時間を短縮できる手法の開発ができると考え、本研究では機械学習による高結合性DNA 配列予測や設計を可能とするための塩基配列の数値化手法を検討した。

【方法】 数値化用の単位構造としてヌクレオチド単位と塩基単位を抽出し、各々に対して既存ソフトウェアを用いて化学構造から9種の物性値を計算し、それら物性成分セットを特徴量とした。また、それら物性値を一度主成分解析し配列機能をより表現可能な特徴量として合成することも試み、それら特徴量と実測測定値との相関について主成分解析を行って検証した。

【結果】 トロンビン結合アプタマーおよびその変異配列について、ソフトウェアより計算された9種の物性値そのものを特徴量として数値表現に展開した。ヌクレオチド単位と塩基単位の両パターンについて、変異箇所と物成分を組合せた45次元の数値で各アプタマーの塩基配列を表現し、配列-機能実測値データセットを作成した。そして、主成分解析により各配列が持つ45次元の成分を組合せ演算し、各配列の特性値として16次元の主成分を得て各主成分と結合量の相関解析を行ったところ、いずれも、異なる結合力を持つ配列が類似の主成分値に偏った結果となり、配列の特性表現性が不足することがわかった。そこで、それらを一度主成分解析し配列機能をより表現可能な特徴量の合成を試みた。塩基の物性成分に対し主成分解析を行い、塩基の特徴づけを強調した4成分の特徴量を新たに合成した結果、各配列の主成分値の偏りが減少して結合量との相関係数が向上し、特性表現性が良好な特徴量を構築できた。

DNA アプタマー配列予測・設計を可能とするための塩基配列の数値化



【目的】 がんに対する免疫チェックポイント阻害剤 (ICI) 療法は高い治療効果を示す一方、治療奏率が低いことが知られており、また免疫に関連する副作用が問題となっている。そのため、ICI 治療の効果を早期に予測する手法の開発が求められている。グランザイム B およびパーフォリンは活性化 T 細胞から放出される分子であり、パーフォリンはがん細胞膜上で重合して孔を形成し、セリンプロテアーゼに属するグランザイム B がこの孔を通じてがん細胞に侵入し、がん細胞の DNA を分解することによりアポトーシスを誘導することが知られている。そのため、グランザイム B およびパーフォリンはICI の治療効果予測のための重要なバイオマーカーとなる可能性が示唆されている。そこで本研究では、活性化 T 細胞関連分子であるグランザイム B およびパーフォリンを標的とする生体分子イメージング法の開発を目的として、生体でグランザイム B およびパーフォリンに高い選択的結合性を示す新規 PET プローブの開発を計画した。

【方法】 グランザイム B に対する親和性が報告されているアミノ酸配列をグランザイム B 認識部位として選択し、*N*-succinimidyl 4-fluorobenzoate (SFB) を介して PET 用核種である¹⁸F を導入した [¹⁸F]GC-1 を設計・合成した。また、パーフォリンの阻害活性が報告されているベンゼンスルホンアミド誘導体を基盤とした¹⁸F 標識 PC-1 および PC-2 を設計・合成した。GC-1、PC-1、および PC-2 の非標識体を用いたグランザイム B またはパーフォリン阻害実験により、各候補化合物の標的への親和性を評価した。また、がんモデルマウスを作製し、ICI または生理食塩水を投与したマウスの PET 撮像実験を [¹⁸F]GC-1 を用いて行い、その後の腫瘍成長との相関を評価した。さらに、ICI 治療を行ったモデルマウスに [¹⁸F]PC-2 を投与し、*ex vivo* オートラジオグラフィ (ARG) 実験を行った。

【結果】 非標識体である GC-1、PC-1、PC-2、および [¹⁸F]PC-2 の標識前駆体である化合物 A をそれぞれ総収率 80、12、6、および 13% で得た。非標識体を用いたグランザイム B 阻害実験において、GC-1 はグランザイム B に対する結合性を示したが、GC-1 の母体化合物と比較してわずかに親和性が低下した。また、非標識体を用いたパーフォリン阻害実験において、PC-1 および PC-2 はパーフォリンの細胞障害活性を阻害することが示唆された。 [¹⁸F]GC-1 および [¹⁸F]PC-2 はそれぞれ放射化学的収率 12 および 2% で得た。ICI または生理食塩水を投与したモデルマウスについて [¹⁸F]GC-1 を用いた PET 撮像を行ったところ、ICI 治療の有無に関わらず [¹⁸F]GC-1 は腫瘍への顕著な集積を示さなかった。しかし、PET 撮像後にモデルマウスの腫瘍容積を経時的に観測したところ、ICI 治療マウスでは顕著な腫瘍成長が認められなかった一方、生理食塩水投与マウスでは腫瘍容積の増大が認められた。これより、ICI 治療効果を予測するためには [¹⁸F]GC-1 から性能を改善したプローブの開発が必要であることが示された。また、 [¹⁸F]PC-2 を用いた ICI 治療マウスの *ex vivo* ARG 実験では、 [¹⁸F]PC-2 が腫瘍組織に発現したパーフォリンに結合したことが示唆された。以上より、 [¹⁸F]PC-2 がパーフォリンイメージングプローブとして基礎的性質を有することが示唆された。

グランザイム B およびパーフォリンイメージングプローブの性能評価

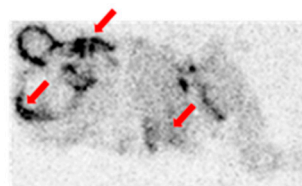
グランザイム B イメージングプローブ [¹⁸F]GC-1

Affinity for granzyme B

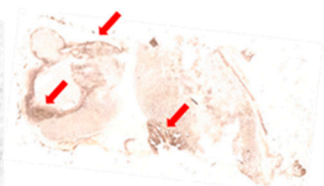
	IC ₅₀ (nM)
GC-1	602 ± 85
[Ac]IETD[CHO] (control)	159 ± 32

パーフォリン イメージングプローブ [¹⁸F]PC-2

Autoradiography



Perforin

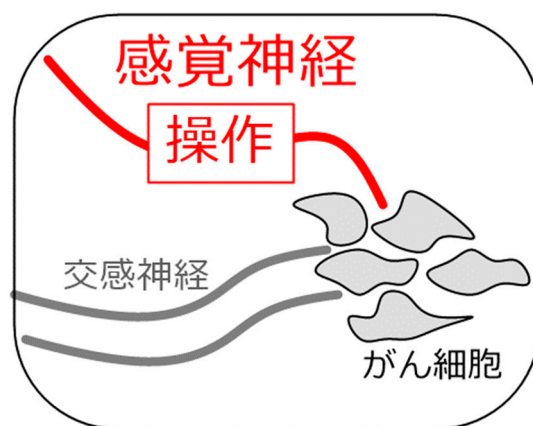


【目的】 自律神経系（および感覚神経）は、正常な器官に対して分布して機能調節するだけでなく、最近、がん組織と連関する可能性が見出されている。たとえば、がん細胞には、交感神経や副交感神経の神経伝達物質を受け取ることの出来る、受容体が発現していることが多くある。また、がん組織は、がん細胞だけでなく、非がん細胞（免疫細胞、内皮細胞、線維芽細胞など）によって、腫瘍微小環境を構成している。この腫瘍微小環境内の非がん細胞もまた、交感神経や副交感神経の神経伝達物質に対する受容体が発現していることが多くある。このため、自律神経系は、がん細胞に直接影響を及ぼしたり、また、非がん細胞に作用して間接的にがんに影響を及ぼしたりすることによって、がんの動態に連関する可能性が高い。そこで、本研究では、皮膚に発生する悪性黒色腫（メラノーマ）を対象として、感覚神経ががん組織に分布するかどうか、また、感覚神経ががんにどのように影響し得るかを、検討することを目的とした。

【方法】 C57BL6/J マウスにカプサイシンを複数回に渡って皮下注射し（1日目と2日目、カプサイシン 10 mg/kg ; 3日目、15 mg/kg ; 11日目と12日目、10 mg/kg ; 13日目、15 mg/kg）、感覚神経を除去した。C57BL6/J マウス由来のメラノーマ細胞である B16-F10 細胞（ 5.0×10^4 個）をマトリゲルと混合して、マウス右腹部（鼠径部）の皮下に移植し、メラノーマモデルマウスを作製した。細胞移植 9 日後に、マウスを灌流固定し、腫瘍サイズを計測し、腫瘍組織の凍結切片を作製して免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡でイメージング解析した。

【結果】 がん組織に分布する神経のイメージング解析：B16F10 細胞をマウスの右腹部の皮下に移植して 9 日後にマウスから摘出したがん組織を免疫染色解析したところ、感覚神経マーカー CGRP 陽性神経が腫瘍組織に分布し、特に、腫瘍塊内の辺縁部と腫瘍塊周囲の間質部分に相対的に高い頻度で走行していた。さらに、血管内皮細胞マーカー CD31 を用いて多重染色したところ、この CGRP 陽性の感覚神経は、CD31 陽性の血管の近くを走行することが多いことが、観察された。辛み成分受容体 TRPV1 のアゴニストであるカプサイシンを投与して、感覚神経を除去した後、B16-F10 細胞をマウスに細胞移植して、メラノーマモデルマウスを作製したところ、細胞移植 9 日後のがんの大きさは、カプサイシン投与群では、コントロール群に比べて、腫瘍サイズが有意に大きかった。

神経系とがんの連関、および、神経系の操作によってがんを抑制する構想



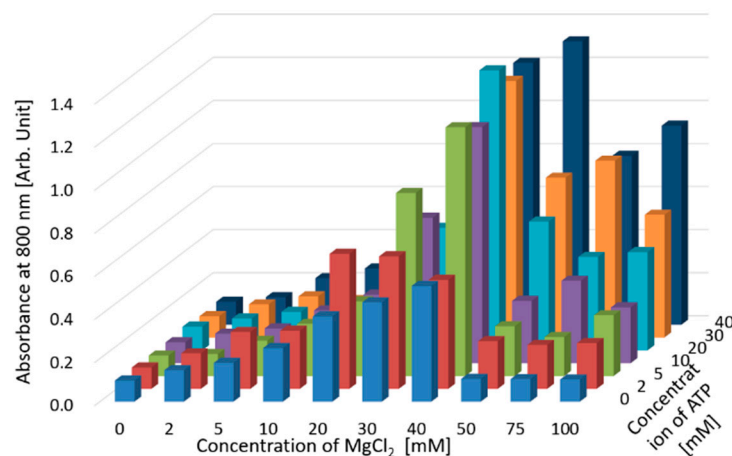
【目的】メタボリックシンドロームや肝臓病、糖尿病、がんなどの各種病態において血液中のアミノ酸濃度バランスが健常な状態とは異なってくるということが知られている。臨床医療や予防医療の分野において、検体の分析を「その場」において行うことは、疾患の早期発見や疾病の病態管理に非常に有効であり、また必要とされている技術である。とくに、個人個人の健康を管理するために家庭で健康状態が検査できるツールは予防医学的に重要である。

我々は、20種類のアミノ酸濃度を迅速かつ簡便、安価に計測可能なアミノ酸計測用の小型装置を開発し、家庭やベッドサイドにおいての健康診断へ応用することを最終目標として研究を行っている。本研究においては20種類のアミノ酸の識別に用いる酵素であるアミノアシル tRNA 合成酵素 (aaRS) について各20種類のアミノ酸濃度を計測するのに最適な条件を確立し、さらに紙を分離・反応媒体に用いる「アミノ酸計測用ペーパーマイクロ流路デバイス」を開発して4種類のアミノ酸濃度が同時に計測可能であることを示すことを目的として研究を行った。

【方法】100 μM ヒスチジン、45.9 μM ヒスチジン結合性 aaRS の HisRS、アデノシン三リン酸 (ATP)、塩化マグネシウム (MgCl_2) を含む 200 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) を反応溶液とし、ATP と MgCl_2 の濃度を 70 通りの組み合わせで加えて 40°C で 30 分間反応させ、反応停止後、呈色試薬のリン-モリブデン溶液を加えて 800 nm の吸光度を計測することで結合能の評価を行った。また、ろ紙とラミネートフィルムを貼り合わせて作製した基板の上に、4か所の酵素反応部および検出部を有するペーパーマイクロ流路デバイス (μPAD) を作製し、応答の評価を行った。

【結果】マイクロプレート内でアミノ酸の1種のヒスチジンについて、ヒスチジン結合性 aaRS を用いて反応性の評価を行った結果、40 mM ATP、50 mM MgCl_2 を添加した時に高い応答性を示し、1~150 μM のヒスチジンが選択的に定量可能であることを示した。また、作製した μPAD についてトリプトファン、グリシン、ヒスチジン、リジンの4種類のアミノ酸を同時計測可能な μPAD の応答の評価を行ったところ、それぞれ数 μM ~ 100 μM の濃度範囲で目的のアミノ酸が選択的に計測可能であり、検出限界はそれぞれトリプトファン (1.1 μM)、グリシン (3.3 μM)、ヒスチジン (1.9 μM)、リジン (1.8 μM) であることが示された。

ヒスチジン結合性 aaRS 反応における ATP と MgCl_2 の添加量の検討

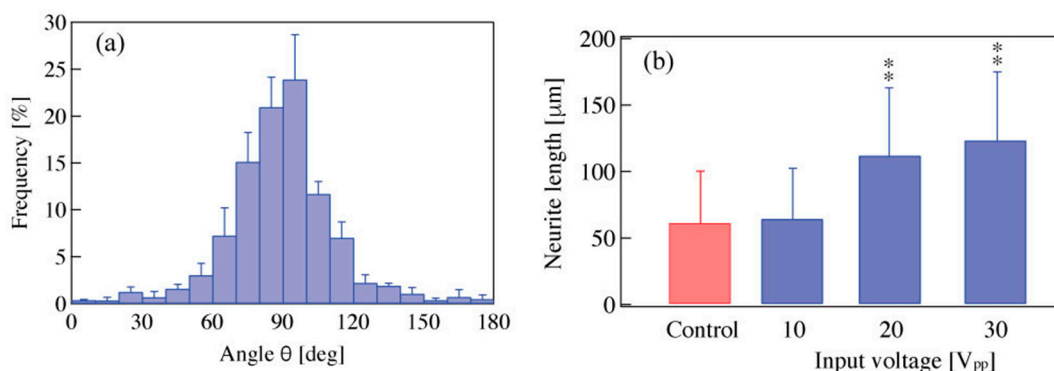


【目的】 一般的に中枢神経の再生は困難とされており、その治療法の一つとして培養容器内で細胞を増殖・組織化させ、得られた培養細胞や組織を患者の疾患部に移植する手法が検討されている。これまでに細胞培養環境下において幹細胞から必要な性質を持つ細胞へ分化、誘導する細胞の培養制御技術が検討されており、化学素材や電界を用いた手法が研究されている。これまで我々のグループでは、超音波振動を用いた各種細胞の培養制御技術を検討している。本手法では化学素材などを別途添加することなく、また培養ディッシュに複雑な加工を行うことなく、ディッシュに直接超音波振動を励振することによって、非接触で細胞の培養環境を制御することが可能であり、他手法と比較して低コストかつ簡易なシステムの構築を目指している。本研究では、培養ディッシュ底面に超音波振動を励振可能な超音波培養ディッシュを作製し、神経様細胞を分化させることで、超音波振動が細胞の成長に与える影響について検討した。

【方法】 神経様細胞として褐色種由来の接着細胞である PC12 細胞（理化学研究所）を用いた。PC12 細胞に神経成長因子 (NGF) を添加・培養することで、細胞は神経突起を形成し神経様細胞に分化する。PC12 細胞を 10% FBS、10% HS、1% ペニシリン・ストレプトマイシン混合溶液を添加した D-MEM 培地を用い、37°C、CO₂ 濃度 5% の環境下にて培養を行い、週 1 回の頻度で継代を行った。超音波実験には、リング型超音波圧電振動子 (PZT、内径 10 mm、外径 20 mm、厚さ 1 mm) を接着したガラス円板（直径 35 mm、厚さ 1.1 mm）を下面に接触した直径 35 mm のガラス底面を有する培養ディッシュを用いた。超音波培養ディッシュを温度、湿度、および CO₂ 濃度を制御可能な小型チャンバー内に設置した。ディッシュ内には、NGF を添加して約 20 時間培養した PC12 細胞を D-MEM 培地 2 mL と共に播種した。超音波培養ディッシュに周波数 83 kHz、振幅 10~30 V_{pp} の連続正弦波を連続 72 時間入力し、その後ディッシュ中央部近傍 (10×10 mm²) の細胞の様子を位相差顕微鏡でタイムラプス撮像した。撮像画像より神経突起の配向方向および長さを計測することで、神経突起の成長に対する超音波振動の影響を定量的に評価した。また PC12 細胞の分化に関連した遺伝子 (*synapsin-1* 遺伝子および *adenosine A2A receptor* 遺伝子) 発現に対する超音波振動の影響をリアルタイム PCR 法により評価した。

【結果】 作製した超音波培養ディッシュに周波数 83 kHz の連続正弦波信号を入力すると、ディッシュ底面にはその中心部分 ($r = 0$ mm) で振動振幅が最も大きく、 $r = 4.5$ mm の位置に最も小さい振動節円が存在する同心円状の振動接円を持つ共振たわみ振動が励振された。超音波駆動下において細胞は円周方向 (図 a 中 90° 方向)、すなわち振動振幅が同一の方向に配向する傾向が認められた。また超音波駆動下における神経突起長さは Control と比較してディッシュ全体に渡って有意に長い結果を示し、超音波駆動が神経細胞の成長を促進することが示唆された (図 b)。特に、超音波培養ディッシュへの入力電圧が 20 V_{pp} 以上の場合、PC12 細胞の分化は有意に促進されることが明らかとなった。遺伝子解析結果より、Control と比較して超音波駆動下では、SynI は有意に活性化し、Adora2a は入力電圧の増加に伴い抑制される結果となった。本結果より、遺伝子レベルにおいても PC12 細胞の神経細胞様への分化誘導が超音波振動によって促進されることが証明された。

超音波駆動下における PC12 細胞の配向分布 (a) と神経突起長さの変化 (b)

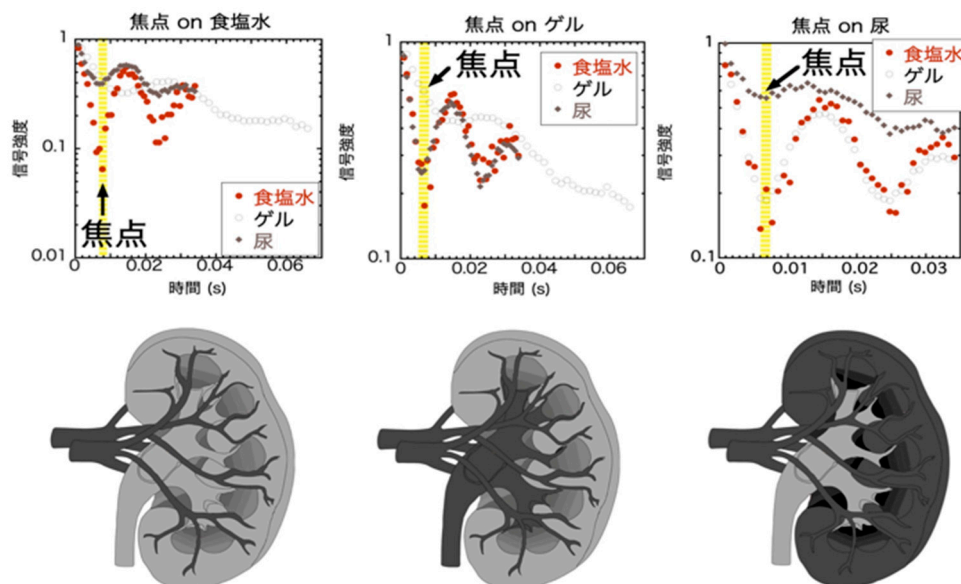


【目的】 MRI とは、物理分野において開発された核磁気共鳴法 (NMR) と呼ばれる「根幹技術」によって得られた「応答信号」(この信号には空間依存性はない) に対して、「画像化処理」(上層技術) を施すものである。つまり「MRI=NMR (根幹技術) +画像化技術 (上層技術)」である。我々は、これまで「根幹技術」である NMR 装置を自作し、様々な物理現象を解明してきた。特にこの 20 年ほどは、「量子コンピュータ」(既存のコンピュータとは全く異なる原理で作動するコンピュータ) を NMR で実現するための基礎研究に従事してきた。その過程で、本課題の“肝”となる「量子パルス」を「固体」に適応することで、先駆的な報告をしてきた。4 年ほど前に、この技術を「固体」ではなく、「食塩水」や「尿」などの「液体」中の「Na」元素に適用したところ、応答信号は「固体」の場合と著しく異なり、時間的に顕著に「振動」する「現象」を見出した (図)。この現象から、「振動による著しい強度比を画像化すれば、これまでに無い革新的な MRI が実現できるのでは」との着想を得た (図上は Na-NMR 信号の振動、図下は simulation)。本研究課題では、この「量子パルス」による「振動」現象の再現性を明らかにし、可能な限りその「学理」に迫ること、そして医学・医療への展開の観点から、NMR で見出された現象を「画像化」することで、これまで弁別不能であった臓器や体液に対し、所望部位を可視化する MRI を実現する可能性を明らかにする。

【方法】 まず、「再現性」が担保される条件を明らかにすることを試みた。その後、「振動現象」の本質を解明すべく、様々な対象物質からの「量子パルス」の応答を系統的に調べた。さらに、NMR における「振動現象」の「画像化」を試みた。

【結果】 「再現性」の必要十分条件を明確に決定した。「学理」については、一般に広く採用されている「量子パルス」では全く効果がなく、我々が独自に採用してきた APCP が最も有効であることを見出した。また、「振動現象」の「本質」は、「量子パルス」の種類だけではなく、対象となる物質の「粘性」と正の相関があることを明らかにした。

量子パルス照射による NMR 信号の振動現象とそれに基づく MRI 画像のシミュレーション

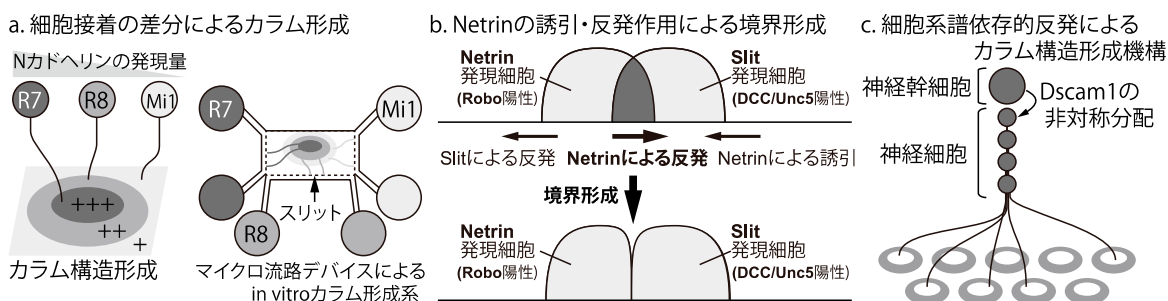


【目的】 生物は様々な遺伝子や分子の役割によって自発的に機能的な脳を生み出す。実際の脳の形成過程を制御するメカニズムについては発生生物学的な研究によって明らかにされ、得られた知見をもとに、実際の脳組織を作り出す構成生物学的研究が注目されている。分化細胞の働きに着目し、個々の細胞の働きを操作することによって目的の組織を作り出す、ボトムアップ的なアプローチが重要であり、これによって例えば人工的にデザインした神経回路に計算をさせる、というような技術が可能になると期待される。多数の神経細胞が集積することで脳の緻密な神経回路が形成されるが、この時、複数の神経細胞が円柱状に集積してカラム構造と呼ばれる脳の機能単位を形成し、複数のカラムが規則正しく集積することで脳の機能が実現する（下図）。我々はショウジョウバエの脳をモデル系として、複数の神経細胞が自発的に集合してカラム構造を形成するメカニズムを研究している。ハエの脳においては 100 程度の神経細胞が集積してカラム構造を形成し、様々な遺伝子の働きを自在に操作することができる。我々はこれまでに細胞接着因子である N カドヘリン、軸索走行制御因子の Netrin、ダウン症の原因因子であり反発性因子である Dscam1 による *in vivo* におけるカラム形成機構を解明してきた。しかし、複数の神経細胞の接着や反発によってカラム構造が形成される過程を直感的に理解することは困難である。共同研究者の Carrillo と村川が研究してきた細胞の運動についての数理モデルはカラム構造の形成過程と親和性が高く、これまでに神経細胞間の接着力の差によって自発的にカラム構造が形成される仕組みを明らかにしてきた。本研究ではこれらの知見をもとに、*in vitro* でカラム構造を再構成することを目的とする。N カドヘリン、Netrin、Dscam1 といった分子を発現する神経細胞を培養し、神経突起がドーナツ状のカラム構造、細胞集団間の境界、カラムの等間隔配置を再現する技術を確立することを目指す（下図）。

【方法】 市販のマイクロ流路デバイス中でハエの視神経および脳神経細胞を培養し、神経軸索がデバイス中のスリットを通過し、カラム様の構造を形成する条件を探索した。一方、細胞接着および反発による細胞間の相互作用を組み込んだ数理モデルによってカラム構造の形成過程を再現する数理モデルを構築し、*in vitro* における実験結果とコンピューターシミュレーションの結果をすり合わせるための基盤を構築した。

【結果】 マイクロ流路デバイス中でハエの神経軸索を伸長させるプロトコルを考案し、これを用いて視神経細胞の培養と軸索の伸長を確認した。しかし、デバイス中のスリットを通過するほどの長距離の伸長を確認することは出来なかった。一方、細胞間の接着力と反発力を組み合わせた数理モデルにより、カラムの 6 角形配置を再現することに成功した。*in vivo* においては細胞間の接着力を弱めると、6 角形配置が 4 角形配置に変化することを見出しているが、同様な変化を再現するための条件を見出した。

細胞間相互作用によるカラム形成機構



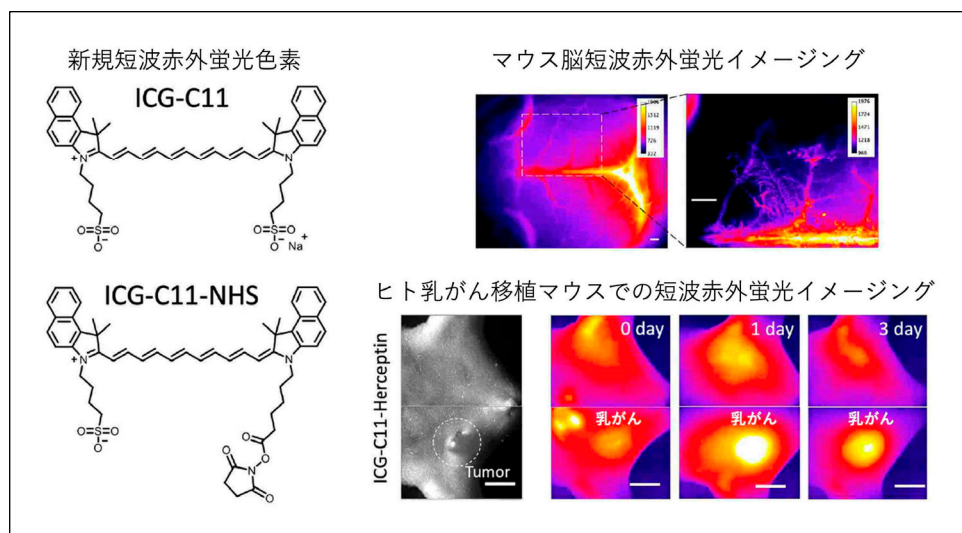
【目的】 短波赤外領域（波長 1.0~1.4 μm 、生体の第 2 光学窓）の光は、細胞、組織、臓器、さらには個体レベルで細胞状態を非侵襲で可視化、操作するのに非常に適している。その第一の理由は、可視、近赤外の光に比べて数倍エネルギーが低いため光照射によるダメージが少なく、長時間でのイメージングが可能なことである。第二の理由は、生体組織による光吸収が少なく組織透過性に優れており、また組織中での光散乱が少なくなるため、従来法に比べ格段に鮮明な生体深部画像が得られることである。本研究では、ヒト乳がんの光診断を目指した「生体の第 2 光学窓（波長 1.0~1.4 μm ）における個体中での、細胞、組織、臓器の非侵襲短波赤外イメージング技術」の開発を行う。

【方法】 本研究では、ヒトでの早期乳がんの光診断を目指した「生体の第 2 光学窓（波長 1.0~1.4 μm ）における個体中での、細胞、組織、臓器の非侵襲短波赤外イメージング技術」を開発するため、以下の方法により研究を行った。

1. 生体親和性の高い短波赤外蛍光有機色素の合成。2. 乳がん検出用短波赤外蛍光分子イメージング用プローブの合成。3. ヒト乳がんモデルマウスにおける短波赤外蛍光分子イメージング。

【結果】 1. 生体での蛍光イメージングで最も重要となるプローブ特性は、毒性がなく生体親和性が高いことである。本研究では、すでに安全性が高く臨床応用がおこなわれているシアニン系色素のインドシアニンググリーン（ICG）を利用した短波赤外蛍光有機色素の合成を行った。ICG の共役二重結合を延長することにより、生体の第 2 光学窓（波長 1.0~1.4 μm ）で蛍光発光する短波赤外蛍光有機色素（ICG-C11）の合成に成功した。2. 乳がん検出用短波赤外蛍光分子イメージング用プローブを開発するために ICG-C11 を用いた短波赤外蛍光ラベル化剤（ICG-C11-NHS）を開発した。この蛍光ラベル化剤の開発により、モノクローナル抗体への短波赤外蛍光の修飾が可能となり、乳がん検出用短波赤外蛍光分子イメージング用プローブが作製できた。3. 乳がん検出用短波赤外蛍光分子イメージング用プローブにより、ヒト乳がんモデルマウス（KPL-4 細胞移植マウス）において乳がん腫瘍の短波赤外蛍光検出に成功した。開発した分子イメージング用プローブが、HER1 および HER2 陽性乳がん腫瘍など様々なタイプのがんの光診断に応用可能であることを示した。

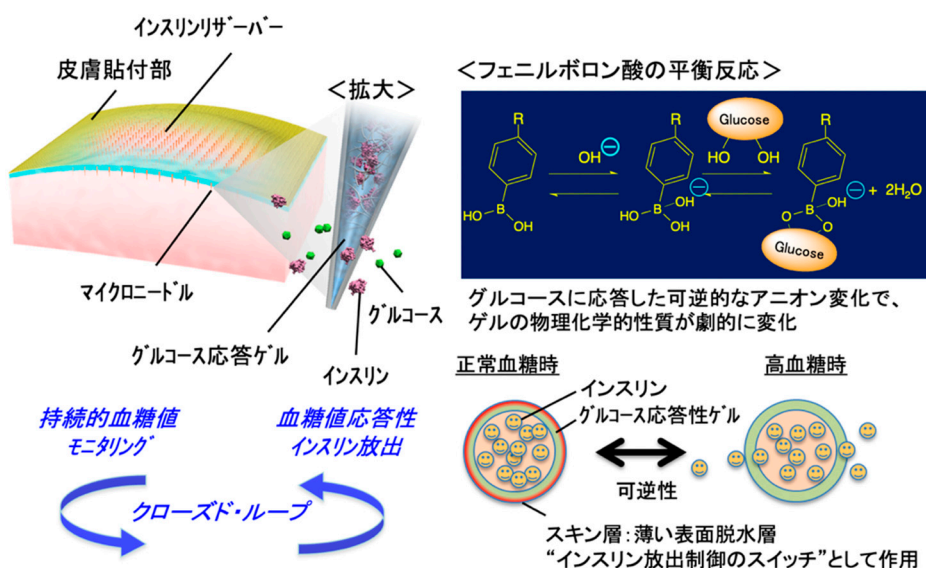
新規開発短波赤外蛍光色素による生体非侵襲蛍光イメージング



【目的】 本研究では、独自に考案した“グルコース応答性ゲル”を用いて、血糖変動にตอบสนองして自律的にインスリンを放出する人工膵臓様デバイスを開発し、革新的な糖尿病治療の実現を目指す。糖分子と可逆的に結合するフェニルボロン酸を高分子ゲル中に導入すると、その物理化学的性質が劇的に変化し、ゲル表面の物質交通が遮断される。この“スキン層”と呼ばれる薄い脱水収縮層は極めて短時間で可逆的に生じるため、濃度勾配に従って拡散放出されるインスリンの制御スイッチとして利用することを着想した。これまでに、グルコース応答性ゲルとカテーテル、中空糸、マイクロニードルなどを融合させて人工膵臓デバイスを作製してきた。スケールアップと侵襲性の低減を両立する方策として最終的にマイクロニードルを選択し、本研究では、臨床応用に向けた要素課題の解決を目的とした。

【方法と結果】 1. マイクロニードル融合型デバイスの作製：当初、再生絹フィブローインを用いて、多孔性でかつ連通孔様の微小構造を有する材料を新規に開発し、マイクロニードル融合型デバイスを作製した。グルコース濃度依存性のインスリン放出やマウス皮膚を用いて良好な刺入性を確認したが、ヒト糖尿病治療に十分なインスリン放出能が得られないと判断し、グルコース応答性ゲルのみでマイクロニードルを作製することを試みた。ゲル組成として、モノマー濃度や架橋密度、ボロン酸組成を変化させたところ、刺入に必要な力学的強度と十分な水和によるインスリン放出能を両立する適切な条件を見出すことができた。グルコース負荷試験や絶食飢餓状態において、血糖依存性にゲルタブレットからインスリンが放出されることを確認した。2. テレメトリーシステムを用いたリアルタイム機能評価：デバイスを装着後、どの程度のタイムラグで効果が発揮されるか、また糖尿病合併症の主要な原因となる血糖日内変動に対してデバイスが有効性を示すかなどは、臨床応用時に非常に重要な観点となる。そこで、テレメトリーシステムを用いて、血糖値のリアルタイム連続測定を実施した。テレメトリーシステムの利点として、リアルタイムに連続測定が可能なこと、2~3週間の長期データの取得が可能なこと、採血不要でラットのストレスがないことなどが挙げられた。3. マイクロニードル穿刺部位の病理組織学的解析：本デバイスは、表皮バリアを破ってインスリンを投与することにより効果を発揮する。本研究では、種々のマイクロニードルにより明確な穿刺痕を観察し、病理組織学的にマイクロニードルが皮膚上皮層を穿破していることを確認した。一方、皮膚の穿刺痕は1時間後には概ね消失し、皮膚へのダメージは必要最小限と考えられた。

貼るだけ人工膵臓の概要

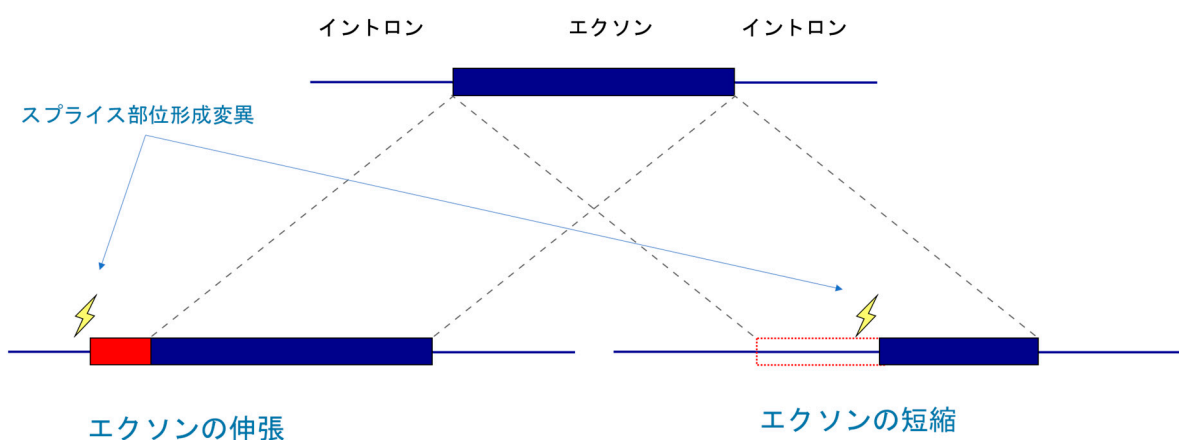


【目的】 遺伝性疾患の原因変異として、これまで主にコード領域内でアミノ酸置換やフレームシフトを起こすものやスプライス部位を壊すものが同定されてきた。しかし、近年、新たなスプライス部位を形成する変異により通常用いられるエクソンとは異なるエクソン（偽エクソン）が活性化されることで有害な転写産物がもたらされるために疾患となる事例が報告されるようになった。このような変異は、機能を持っていない領域で起こる変異であることから、これまで見過ごされることが多かった。そこで本研究は、スプライス部位を形成することで遺伝性の希少疾患の原因となるレアバリエーションの網羅的な同定を目的とした。本研究は、遺伝性疾患について、これまであまり注目されてこなかったスプライス部位形成変異に着目することで新たな原因変異を同定し、確定診断が困難なことが多いそれらの疾患の診断率の向上に貢献することを目指すものである。

【方法】 対象とする疾患は特定のものに絞らず、遺伝性疾患全般について原因変異を探索する疾患横断的なアプローチをとった。方法としては、バイオインフォマティクス解析を中心とし、公共データベースに蓄積しているヒトの変異データに対し、スプライス部位の予測プログラムを適用することで、スプライス部位形成能を持った有害な変異を探索した。得られた候補変異については、その変異を有する個人のトランスクリプトームデータを解析し、実際にその変異がスプライスに変化をもたらしているかを検証した。これらを通し、様々な遺伝性の希少疾患について、その原因となる新たな変異を同定した。

【結果】 遺伝性疾患の原因となることが知られている約 4,000 遺伝子を対象に、ヒトの変異データベースに登録されている約 7 万人分の変異データの中から、既知エクソン内、あるいはその周辺に存在する変異を抽出した。それらの変異について、統計的手法および人工知能を応用したスプライス部位予測法を適用することで、各変異のスプライス部位形成能を評価した。その結果、5,656 個のスプライス部位形成変異を得た。さらに、これらの変異について、コドン読み枠のズレや終止コドンの挿入、タンパク質ドメイン構造内の挿入・欠失などにより、病原性が考えられるかを評価したところ、3,942 個の変異を病原性があると判断された。実際の変異の機能について、その変異を持つ個人の RNA-seq データで検証したところ、実際にスプライス部位を形成する変異であることが確認された。今回の手法を、原因変異が未同定の繊維病患者から得られた変異データに適用したところ、新規原因候補となるスプライス部位形成変異の同定に成功した。

本研究で解析対象とした変異とそれらにより生成される異常なエクソン

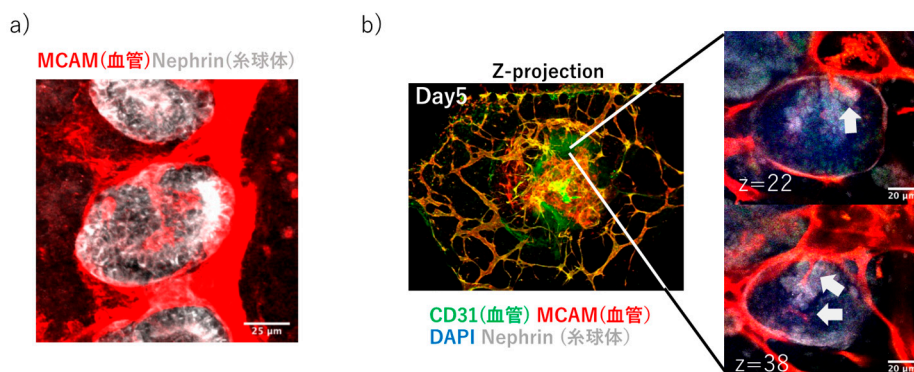


【目的】慢性腎臓病（CKD）は、多くの疾患の死亡率を押し上げる重大なリスク因子である。我が国において、CKD は年々増加傾向にあり、国民の生命と健康にとって、CKD 病態の新たな理解に基づいた革新的な医療を創生していくことが喫緊の課題である。そのために、CKD 病態の本体である糸球体ろ過機能が破綻するメカニズムを、これまでになく角度から解明する研究が切望される。近年のオルガノイド技術は、それを可能にする有用な研究ツールとして期待されている。しかし、これまで確立されてきた腎オルガノイドでは、ネフロン構成要素である尿細管構造に加えて、部分的な糸球体構造は形成されるものの、糸球体は血管化されず、十分成熟した糸球体構造は誘導されていない。最近、腎オルガノイドに流れを付与すると、糸球体内に一定程度血管を誘導できることが報告された。一方、腎オルガノイドの発生誘導後、培地内浮遊下に回転培養を行うことにより糸球体内への血管侵入が惹起される可能性が、我々の研究から示唆されてきた。しかし、いずれの方法においても十分成熟した糸球体血管はこれまで誘導できていない。本研究では、回転浮遊培養法と、別途我々が確立してきた血管灌流チップ技術をうまく組み合わせることで、腎オルガノイド糸球体の成熟化・維持とろ過機能を生体外で再現し、その構造および機能の成立メカニズムを解明することを目的とした。

【方法】神経管との共培養で発生誘導をかけたヒト iPS 由来腎臓前駆細胞スフィア（腎糸球体オルガノイド）を、培地内に浮遊させ、ガス交換を行いながらチューブ内で回転培養した。また、気液界面培養にて一定期間さらに発生を誘導した後に、回転浮遊培養を行い、腎糸球体血管化を最も効率よく誘導できる培養法を探索した。一方、ヒト肺繊維芽細胞と隔離共培養を行うことで、微小流体デバイス上の細胞外基質内に血管内皮細胞による3次元血管網を誘導し（血管灌流チップ）、血管網外の細胞外基質内に、気液界面培養、そして、回転浮遊培養の併用により適度に血管化を進めたオルガノイドを移植後、血管内培地灌流下に培養した。それにより、チップ血管とオルガノイド内血管の連結と糸球体血管の成熟化を誘導する最適培養条件を探索した。糸球体の成熟化は、ホールマウント免疫染色によって組織学的に評価した。

【結果】腎糸球体オルガノイドを、7日間気液界面培養後に回転浮遊培養に移行すると、3日後には糸球体様構造内に血管が侵入していた。また、10日後に最も血管侵入が進んでいた（図 a）。しかし、14日間まで培養を継続しても、糸球体内血管の成熟化は進まず、むしろ糸球体構造が崩壊した。一方、同様に7日間の気液界面培養後に血管灌流チップ内に腎糸球体オルガノイドを埋め込むことで、オルガノイド内血管網とチップ内の血管網が連結し、血管内灌流をかけ5日間培養後には、オルガノイド内糸球体様構造内へ血管が侵入していた（図 b）。しかし、その後の培養期間延長のみでは、成熟した糸球体血管網は形成されなかった。また、浮遊回転培養後に、血管灌流チップに導入しても、糸球体構造内に血管は侵入するものの、成熟した糸球体血管網は形成されなかった。さらに、ペリサイトとの共培養、血管新生因子（Angiopoietin-1、S1P）、低酸素状態等、付加的な培養条件での糸球体血管化誘導法の改善を試みたが、いずれも付加しても、糸球体内の血管侵入度と成熟化にはあまり変化はなかった。

回転浮遊培養と血管灌流チップによる腎糸球体オルガノイドの血管化誘導

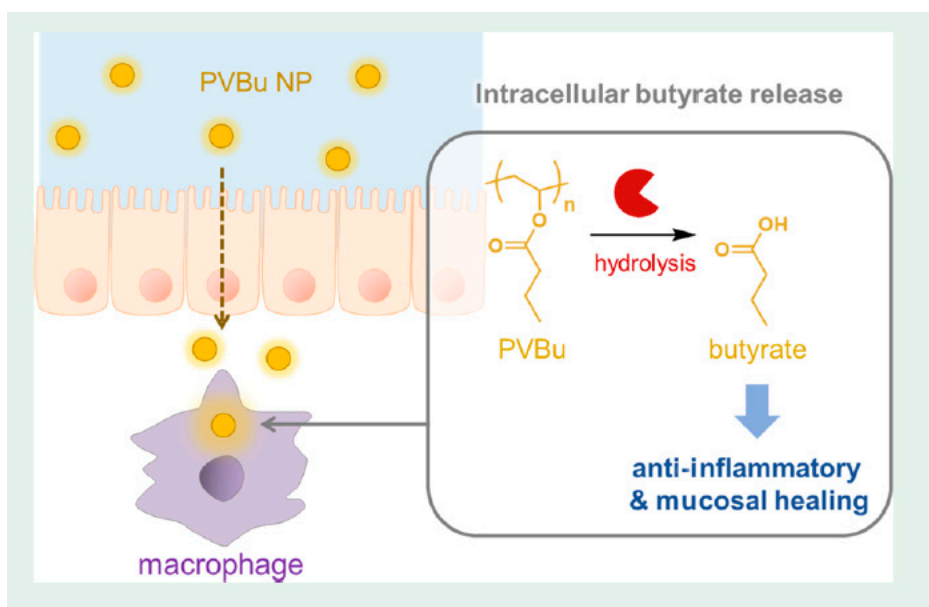


【目的】 近年、免疫制御性ナノ粒子を用いて炎症・アレルギー疾患を治療とする試みが複数報告されている。しかし、その多くはナノ粒子内部に薬剤を封入するか、ナノ粒子表面に免疫抑制性のリガンドを付加したものであり、十分や薬効が得られるものは少ない。またほとんどが注射剤であり全身投与でしか効果を発揮しない。炎症・アレルギー疾患の多くは長期の慢性疾患であることを考慮すれば、患者さんの負担軽減のため経口投与が可能で、十分な薬効を示す免疫制御性ナノ粒子の開発が求められている。我々はこれまでに腸内代謝物の酪酸が免疫寛容（トレランス）の成立に関わる Treg 細胞を誘導する活性を有することを見出している。そこで、本研究では生体分解性のポリビニル酪酸ナノ粒子の内部に抗原を封入することで、経口投与による免疫制御ナノ粒子『トレロソーム』の開発を試みた。

【方法】 ビニル酪酸とアゾビスイソブチロニトリルを反応させて、ポリビニル酪酸（PVBu）ナノ粒子を作出した。PVBu に蛍光色素を結合させた PVBu-DiR を経口投与し消化管内での動態を調べた。さらに免疫制御作用を有する活性ビタミン D₃ を内包させた PVBu-D₃ ナノ粒子も作出した。PVBu および PVBu-D₃ ナノ粒子を経口投与して、デキストラン硫酸ナトリウム（DSS）誘導性大腸炎に対する効果を検証した。

【結果】 PVBu を経口投与した結果、3 時間までに盲腸や大腸に到達することが判明した。さらに、DSS 誘導性大腸炎モデルにおいて PVBu 投与群は対照群と比較して有意な体重減少および病態スコアの改善を示した。この効果は酪酸そのものを投与するよりも顕著であった。また PVBu-D₃ ナノ粒子は PVBu よりもさらに有効な効果を示した。メカニズムの解析から、PVBu および PVBu-D₃ ナノ粒子は抗炎症性マクロファージを誘導することで、炎症抑制効果を発揮することが明らかとなった。現在、本ナノ粒子を更に改善することで、抗原特異的に免疫応答を抑制可能なトレロソームの開発を行っている。

PVBu ナノ粒子による抗炎症作用

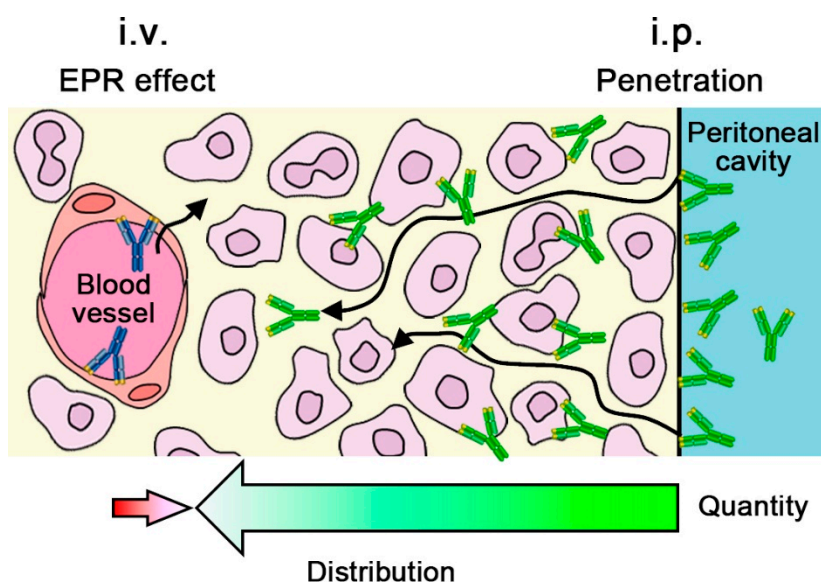


【目的】 腹膜播種など腹腔内腫瘍の転移は予後が極めて不良であり新たな治療法が求められている。抗がん剤の腹腔内腫瘍への送達効率と治療効果の向上を目的に、抗がん剤を腹腔内 (i.p.) 投与する腹腔内化学療法の臨床研究が進められているが、静脈内 (i.v.) 投与と比較し明確な生存期間の延長は認められていない。近年、免疫チェックポイント阻害剤 (ICI) によるがん免疫療法は従来の治療では根治困難な進行がんにも効果を示すことが報告されているが、奏効率は20%で、必ずしも多くの患者では効果がなく、奏効率の向上が課題である。ICI の腹腔内腫瘍への送達効率の向上と奏効率改善を目的として、腹膜播種モデルマウスにおいて ICI である抗 PD-L1 抗体の i.p.投与の有用性を i.v.投与と比較し検証した。

【方法】 大腸がん細胞 MC38 を i.p.投与し腹膜播種モデルマウスを作製し、¹¹¹In を標識した抗 PD-L1 抗体を i.v.もしくは i.p.投与後、血液や腫瘍組織中の放射活性から濃度推移を、また SPECT/CT により全身分布を評価した。腹膜播種組織内の抗 PD-L1 抗体の分布を蛍光組織免疫染色で評価した。また抗 PD-L1 抗体を i.v./i.p.投与後の腹膜播種重量や腹水量から抗腫瘍効果を評価した。

【結果】 ¹¹¹In 標識抗 PD-L1 抗体を i.v./i.p.投与後の SPECT/CT 評価の結果、i.p.投与後は腹腔内における濃度が高く維持されていた。体内動態評価の結果、i.v.投与と比較し i.p.投与後に腹膜播種へ約 10 倍移行量が向上していることが示された。i.v.投与後は抗 PD-L1 抗体は血管周囲にのみ局在していたのに対し、i.p.投与後は、時間依存的に腫瘍表面から深部へ浸透している様子が観察された。Ex vivo 腹膜播種でも抗 PD-L1 抗体は時間依存的に組織表面から深部への浸透が確認された。従って、i.p.投与後、抗 PD-L1 抗体は腹腔内空間から腹膜播種へ直接移行し浸透することで、i.v.投与の 10 倍の移行量が達成されたと考えられる。その結果、抗 PD-L1 抗体の i.v.投与と比較して i.p.投与後の腹膜播種重量は有意に減少し一部個体では腫瘍が消失していた。またがん進行に伴い増加する腹水の減少も確認された。一方で、体重減少など副作用は観察されなかった。以上より、腹腔内投与は ICI の治療において有用な投与経路であり、ICI の腹膜播種治療における奏効率の向上に向け、今後ヒトにおける腹腔内 ICI 投与法の臨床研究が進むことが期待される。

i.v./i.p.投与後の免疫チェックポイント阻害剤の腹腔内腫瘍移行メカニズム

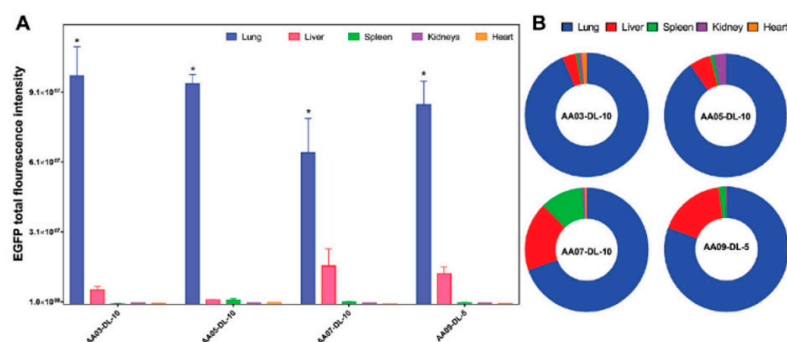


【目的】本研究では、内因性リガンドを用いた組織選択的薬物送達システムという、新しい戦略に基づいて、従来の選択性・機能性を遥かに凌駕する薬物送達システムを創製することを最終目的としている。ウイルスは自然界で最適化された天然型遺伝子送達システムであり、進化の過程を経て超高機能を獲得し、種々の組織移行性と細胞内動態制御能を獲得した。我々は、生体内交通を支配している未知の内因性リガンドを、ナノ構造体の網羅的解析により探索し、従来の人工的な標的化リガンドから天然型のリガンドへと進化させる。そのためには、膨大な数の表面特性・内部構造を有する脂質ナノ粒子 (LNP) の生成が必要となる。我々はすでに、工学研究院の佐藤教授等と連携して、種々の物理化学的多様性を有するポリエステルポリマーを作製し、LNP の表面特性を網羅的に解析することが可能となっている。本研究では、ポリエステルポリマーライブラリーを構築し、種々の表面特性を有する LNP 群の中から肺選択性の高い LNP を、マウス個体を用いて網羅的に探索した。

【方法】1. ポリエステルポリマーライブラリーの生成：N 基を含むアルコール性開始剤 (AA01~AA11) と ϵ -caprolactone あるいは ϵ -decalactone を開環重合反応によってポリエステルポリマーライブラリーを合成した。2. LNP の構築：各ポリエステルポリマーと DMG-PEG を用いて、mRNA 搭載 LNP を調製した。3. mRNA 発現による *in vivo* スクリーニング：EGFP の mRNA を LNP に搭載し、肺、肝臓、心臓、腎臓、脾臓の遺伝子発現活性を測定した。

【結果】1. ポリエステルポリマーの合成：有機触媒開環重合反応により、アミノアルコールが AA01~AA11 の 11 個、ポリエステルポリマーの重合度が 3、5、10 kDa の 3 種類、合計 33 個 (AA01-DL-3/5/10、AA02-DL-3/5/10、AA03-DL-3/5/10、AA04-DL-3/5/10、AA05-DL-3/5/10、AA06-DL-3/5/10、AA07-DL-3/5/10、AA08-DL-3/5/10、AA09-DL-3/5/10、AA10-DL-3/5/10、AA11-DL-3/5/10) のポリエステルポリマーライブラリーを合成した。2. ポリエステルポリマーライブラリーによる脂質ナノ粒子の調製：ポリエステルポリマーと DMG-PEG および mRNA を用いて LNP を調製した。ポリエステルポリマーと DMG-PEG の比率はモル比で 9 : 1 を用いた。LNP の平均粒子径、PDI (多分散度指数)、ゼータ電位を測定したところ、平均粒子径は 200~300 nm、PDI は 0.19~0.35、ゼータ電位は -29.0~-10.5 mV であった。3. ポリエステルポリマーライブラリーに基づく LNP 群の遺伝子発現解析：*in vivo* のスクリーニングは、mRNA のマウスへの投与量を 0.25 mg/kg とし、LNP 溶液を尾静脈より静脈内投与し、8 時間後の EGFP の蛍光共同を測定した。ε-DL を用いた LNP の中でも、AA03-DL-10、AA05-DL-10、AA07-DL-10 そして AA09-DL-5 の LNP は、その遺伝子発現活性において極めて高い肺特異性を示した (図 A、B)。これらの高い肺特異性は、内因性因子が介在している可能性を強く示唆した。そこで、肺における遺伝子発現活性とリポポリマーの構造との関係をさらに詳細に解析するために、第二世代のライブラリー構築を行い、解析を進め肺選択性の高いポリマー群を見出すことに成功した。

高い肺移行性を示した LNP の遺伝子発現

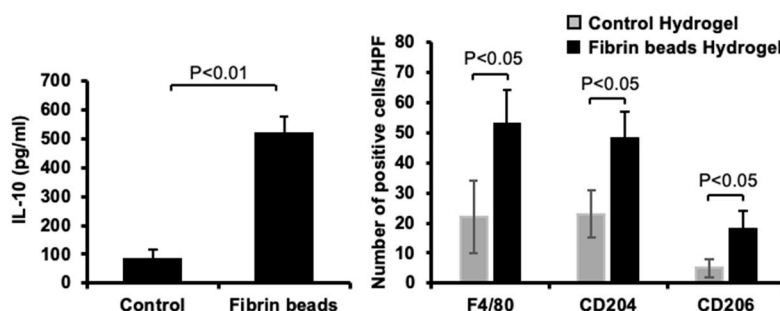


【目的】 マクロファージ (Mφ) は活性化の違いにより炎症惹起性の古典活性化 Mφ (M1 Mφ) と抗炎症性・組織修復性のオルタナティブ活性化 Mφ (M2 Mφ) の 2 種類に大別される。また、Mφ の起源は、卵黄嚢由来・組織在住 Mφ と骨髄・単球由来 Mφ の 2 種類に大別される。現在、M1/M2 Mφ を区別するマーカー分子は存在するが Mφ の起源を正確に区別するマーカー分子はないことから、起源の違いによる Mφ の機能的違いや各疾患に対する役割については未解明である。近年、M2 Mφ を組織幹細胞と共に動員する薬剤のハイドロゲル局所徐放化技術による組織幹細胞の再生・組織構築能を向上させるバイオマテリアル開発が行われているが、起源の違う 2 種類のどちらの M2 Mφ を動員すべきかは明確ではない。Mφ 特異的分子である CD163 は M2 Mφ の代表的な細胞表面マーカーであり、CD163 陽性 Mφ が強い組織修復能を有すると共に臓器に常在していることが知られている。ゆえに、CD163 が卵黄嚢由来・組織在住 Mφ のマーカーになりうる可能性や組織再生バイオマテリアル開発において動員すべき M2 Mφ は CD163 陽性 Mφ である可能性を考えた。そこで、本研究では Mφ の CD163 に着目したマウスにおける卵黄嚢・組織在住 Mφ の分布と単球由来 Mφ との機能差異を解析し、マウスとヒトにおける CD163 陽性 Mφ の優れた組織修復能を明らかにすることで、その促進的制御による再生医療材料への応用を目指した基礎的知見を得ることを目的とした。

【方法】 Mφ としてはヒト単球由来 Mφ、マウス骨髄由来 Mφ ならびにマウス腹腔 Mφ を用い、組織としてはマウス自然発生多重がん組織および、クロドロン酸リポソームにて Mφ を除去したマウス肝臓組織を用いて CD163 の発現をウエスタンブロット、Cell-ELSA、免疫細胞染色、免疫組織染色にて解析した。また、フィブリンビーズ (FB) や FB 含有ハイドロゲル、kakkalide 含有ハイドロゲルの Mφ に対する作用をマーカー (CD163、CD204、CD206、IL-10、TNF-α 等) の発現・分泌をウエスタンブロット、ELISA、qPCR、免疫細胞染色、免疫組織染色にて解析することで評価した。

【結果】 マウス骨髄由来 Mφ には CD163 の発現は認められず、マウス腹腔 Mφ では発現が認められた。また、マウスに自然発生した多重がん組織 (Hepatoma と Histiocytic sarcoma) では、肝細胞に由来するがんである Hepatoma の組織では CD163 陽性 Mφ は認められず、肝在住の Mφ であるクッパー細胞に由来するがんである Histiocytic sarcoma の組織では CD163 陽性 Mφ が認められた。さらに、クロドロン酸リポソームにて臓器 (肝臓) 中の組織在住の Mφ を一時的に除去し、骨髄・単球から供給される Mφ の CD163 発現を解析したところ CD163 陰性であり、マウス胎仔組織の卵黄嚢に存在する Mφ では CD163 陽性であったことから、マウスでは CD163 が卵黄嚢由来・組織在住 Mφ のマーカーになりうることを示唆された。また、フィブリンビーズ (FB) は Mφ に対して抗炎症マーカー (CD163、CD206、IL-10 等) の発現・分泌を誘導し、LPS による炎症刺激に対しては炎症マーカーである TNF-α の分泌を抑制したことから、FB は Mφ を抗炎症性のフェノタイプに誘導することを明らかにした。さらに、FB 含有ハイドロゲルを移植したマウスではハイドロゲル中に浸潤する Mφ が顕著に増加すると共に抗炎症性の M2 Mφ が増加していた。ゆえに、FB 含有ハイドロゲルは *in vivo* でも Mφ の抗炎症性フェノタイプを誘導する効果を持つ有用な組織再生バイオマテリアルとなりうる可能性が示唆された。

マクロファージを抗炎症性フェノタイプへ誘導するフィブリンビーズ

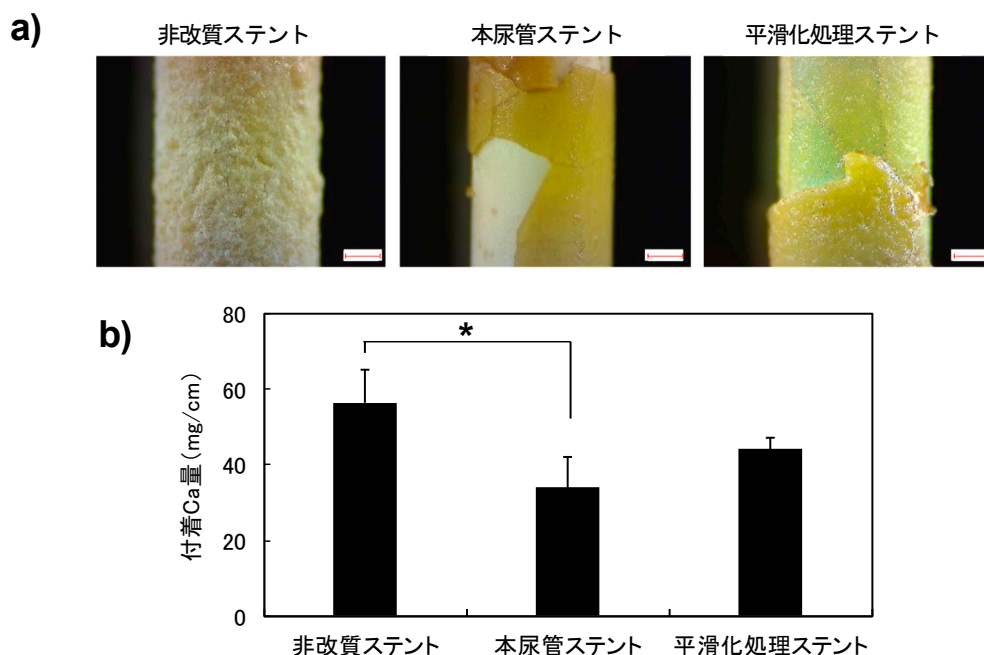


【目的】 泌尿器科患者で特に尿管狭窄や尿管結石などの場合、尿管が閉塞もしくは尿の流れが停滞するため、尿路を確保する目的で尿管ステントを留置する。しかしこの尿管ステントは長期の留置により、主に結石などの異物が付着、堆積するため尿管ステント自体が閉塞し、逆に尿管閉塞を助長する。尿管ステントへの結石付着には、細菌が介在する機序と、細菌を介さず結石成分が直接ステント表面で析出する機序の大きく分けて2つの機序がある。このような機序の全体もしくは一部を抑止することで、結石の付着を予防し得る。これまで尿管ステントの閉塞予防や耐久性の確立のために様々な工夫がなされてきたが、現在市販されている尿管ステントでは結石付着の原因である尿中溶解カルシウム塩の付着に対する抑制効果は十分ではなく、今もまだニーズを十分に解決する製品があるとは言い難い。本研究では、結石付着阻止効果が高くかつ生体親和性が高い生体類似材料を用いて尿管ステント表面をコーティングし、その結石付着阻止効果および生体内での安全性を評価することで、新しい尿管ステントの医療機器開発を目的とした。

【方法】 生体類似材料を用いて表面をコーティングした本尿管ステント、既存製品の非改質尿管ステントおよび平滑化処理尿管ステントを使用して、結石付着阻止効果および生体内留置における安全性の比較評価を行った。具体的には、1. 人工尿中への5週間浸漬実験、2. エチレングリコールおよび塩化アンモニウムを経口投与し尿中結石の生成を促したラットの膀胱内への8週間留置実験、を行い、実体顕微鏡での尿管ステント表面観察像およびICP元素分析による結石成分付着量から、各尿管ステントの結石付着阻止効果を評価した。さらに、ラット膀胱組織に対してヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色および免疫組織化学染色 (IHC) を行い、炎症や細胞浸潤有無などを指標とした本尿管ステントの生体内留置における安全性を評価した。

【結果】 人工尿中への5週間浸漬では、本尿管ステント表面への結石付着およびCa定量値が他の尿管ステントよりも少なく、本尿管ステントの結石付着阻止効果が認められた。また、ラット膀胱への8週間留置においても本尿管ステントは他の尿管ステントと比較して表面への結石付着およびCaの付着を抑制しており ($p < 0.05$, one-way ANOVA)、ラット膀胱内における本尿管ステントの結石付着量阻止効果が認められた。さらに、ラット膀胱組織へのHE染色およびIHCでは各尿管ステント群で炎症、細胞浸潤などに有意な差は見られず、本尿管ステントの生体内における安全性が示唆された。

結石モデルラットにおける本尿管ステントの結石付着阻止効果

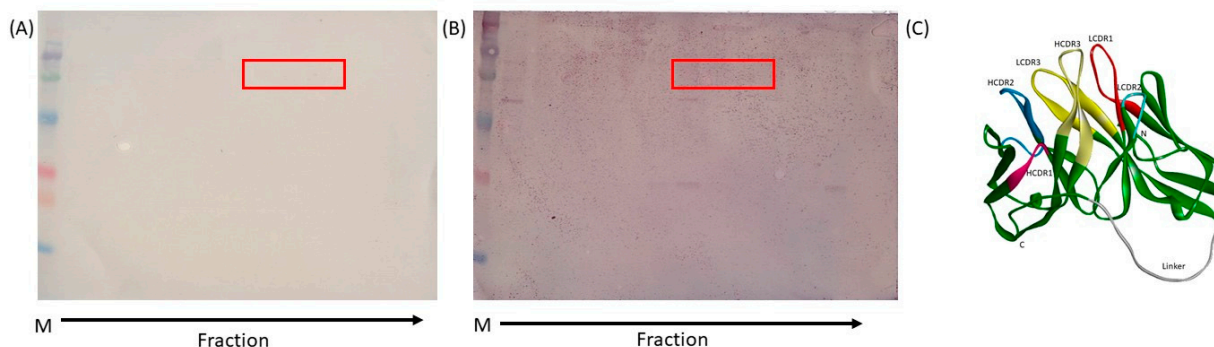


【目的】 アレルギーで苦しむ人の数は世界で増加の一途をたどっており、先進諸国においては何等かのアレルギー症状を呈する人が人口の半数近くを占めるとまで言われている。食品を摂取した時にアレルギー症状を示す食物アレルギーや花粉などの環境抗原に対してアレルギー症状を示す患者が増加し、重篤なアレルギー症状を引き起こす危険を抱え、日々の継続する症状により生活の質を大きく低下させることも多い。様々なアレルギー性疾患の病態の研究が進み、治療法および診断法の開発が試みられている。IgE抗体が抗原と結合することにより、マスト細胞などから化学物質を放出することによりアレルギー症状を引き起こされる。そして、IgE抗体には糖鎖が結合しており、その構成成分にシアル酸が結合している複合糖鎖が含まれる。最近、IgE抗体の糖鎖に含まれるシアル酸がアレルギー症状に関わることが示唆されている。このようなIgE抗体の糖鎖の構成成分の寄与はアレルギーの重篤度にも関わる可能性もある。本研究では、IgE抗体に結合するシアル酸に対する抗体を作製し、IgE抗体中のシアル酸量を簡易に定量するためのツールを開発する。

【方法】 定常領域のみに対するヒトIgE抗体の発現用ベクターを用い、可変領域については主要なカバノキ花粉の抗原であるBet v 1に対するIgE抗体の構造情報に基づいて設計し、遺伝子を人工合成して、ヒト培養細胞で発現させた。精製したプラスミドをExpiFectamineと複合体を形成させ、細胞にDNAを導入した。4~6日後に細胞および培地を回収した。培養液を濃縮したものを滅菌ろ過して、Superdex200 Increase 10/300GLカラムにより、培養液を分画した。この試料について抗IgE抗体およびレクチンでのシアル酸検出を行った。一方、ニワトリ抗体ライブラリーからファージディスプレイによりスクリーニングされたシアル酸に対する単鎖可変領域フラグメントの組換えタンパク質調製のため、大腸菌発現系を構築した。MBP融合タンパク質として発現を確認し、部分精製を行った。シアル酸との相互作用について検証するため、この単鎖可変領域フラグメントについて構造予測を行った。

【結果】 還元剤の添加および非添加の条件において、SDS-PAGEにおいて複数のバンドが検出された。ゲル中のタンパク質をニトロセルロース膜に転写し、HRP結合させたヒトIgE抗体に対するgoat-ポリクローナル抗体を用いて組換え型IgE抗体を検出した(図A)。IgE抗体における複合糖鎖の結合を検証するために、レクチンであるSiaFind Lectenzを用いた。SiaFind Lectenzにより、いくつかのバンドが明確に発色するとともに、抗体と予想される領域も発色した(図B)。組換え型IgE抗体中の複合糖鎖を検出する抗体を作製するために、ニワトリ抗体ライブラリーからファージディスプレイによりスクリーニングされた単鎖可変領域フラグメントの大腸菌発現系を構築し、発現の確認とともに部分精製を行った。さらに、複合糖鎖と抗体との相互作用を検討するために、シアル酸に対する単鎖可変領域フラグメントの構造を推測した(図C)。

組換え型IgE抗体の複合糖鎖の検出

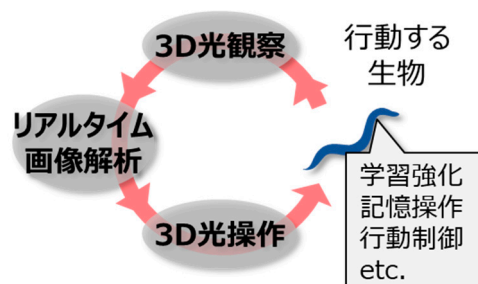


【目的】人間の脳神経の理解のため、比較的単純な神経系を持つ様々なモデル動物（マウス、線虫、ゼブラフィッシュ等）の脳神経を対象とした研究が精力的に行われているが、最も簡単な脳神経系を持つモデル生物である線虫ですら、脳神経系の働きについて未解明である点が多く残されている。線虫は約200個の神経細胞からなる、脳に相当する神経系を有するが、現在の技術を用いても、行動中の線虫における脳神経系の活動を満足にとらえることも操作することもできていない。そこで本研究では、先端光学技術および情報技術を開発、統合することにより、包括的リアルタイム3D神経系観察・制御法の開発に取り組む。

【方法】開発手法は3つの要素技術、すなわち高速3D蛍光撮像技術、二光子3D追跡・操作技術、高速画像処理技術からなる。動作としては、高速3D蛍光撮像技術によって取得された画像データに対して高速画像処理を行うことにより各神経細胞の位置を特定し、二光子3D追跡・操作により所望の神経細胞の活動を制御する。この一連の動作を、対象とする線虫の動きに追従しながら連続的に行う。本研究では、本手法の動作実証に向け、各要素技術の検討およびシステム全体の動作時定数の検証を行った。高速3D蛍光撮像技術については、本研究開始以前より開発してきた独自方式の高速ライトシート顕微鏡を用いて線虫頭部神経の3D画像を安定的に取得するための技術改良を行った。二光子3D追跡・操作については、空間光変調器を用いた計算機ホログラフィの手法を採用し、評価用実験セットアップを構築して本方式の基本的な動作の検証を行うとともに、システム全体の動作時定数の検証も併せて行った。高速画像処理技術の開発においては、複数の深層学習ネットワークを組み合わせた合成人工ニューラルネットワークを開発し、高速動作に有利な低解像度画像から高精度に細胞位置を特定することを試みた。

【結果】高速3D蛍光撮像技術については、顕微鏡装置の複数の不具合を解消することで、線虫の頭部神経の3D撮像を行い、各神経細胞が3D画像上に明瞭に表れていることが確認された。このときの撮像速度は毎秒50ボリュームであり、同一の対象をこれまでに観察した報告と比較して10倍程度高速になっている。二光子3D追跡・操作については、線虫の神経細胞を模擬した $1\mu\text{m}$ のビーズを明視野像で取得し、ビーズの傍にレーザー光が集光されるよう空間光変調器を駆動し、レーザー光の集光スポットがビーズの動きに追従する動作を確認した。この動作時のループ時定数は100~160ms程度であった。高速画像処理技術の開発においては、低解像度画像を用いても細胞領域の形状を概ね推定できていることが確認された。一方で、推定が不正確な領域も確認されたため、解像度と推定の精度のトレードオフについてより詳細に検討する必要がある。本研究により、評価用実験セットアップを用いて実際のループ時定数およびその内訳が測定され、要求仕様との比較による議論が可能になった。自由行動する線虫の移動速度に基づくループ時定数の要求仕様は数10ms程度であり、ハードウェア起因の所要時間が20ms程度であることが実験で確かめられたことから、ソフトウェア起因（データ処理）の所要時間を10ms以内程度で行う必要があることが明らかになった。今後、データ処理時間についての詳細検討、ハードウェアの工夫による高速化、さらには細胞位置検出アルゴリズムの修正による要求仕様の緩和など、複数の課題に取り組んでいく。

包括的リアルタイム3D神経系観察・制御法の概念図

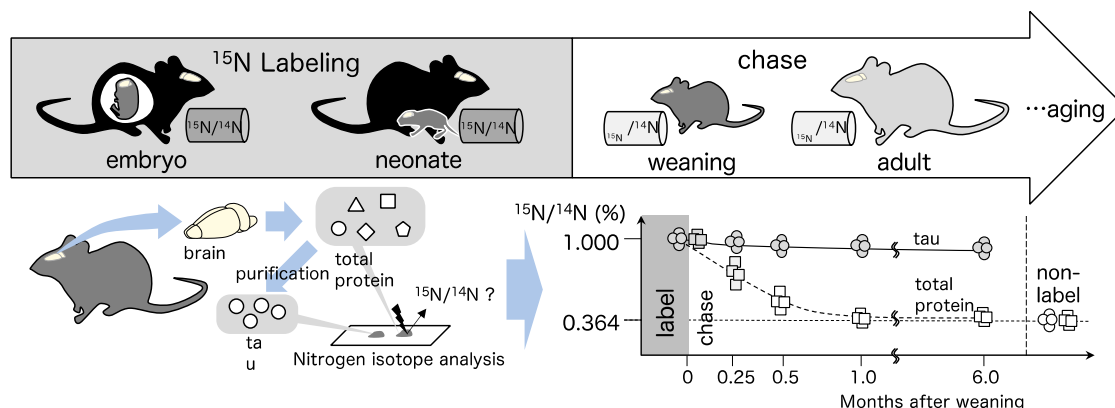


【目的】 タンパク質は合成と分解の代謝回転により常に入れ替わっている。しかし、一部のタンパク質は、産生された後分解されず生涯使い続けるものが知られている。このような長寿命タンパク質の機能維持には、代謝回転とは異なる品質管理が求められる。アルツハイマー病脳の神経細胞にはタウタンパク質の異常蓄積が認められ、神経変性に関与しているとされている。この異常蓄積が分解系の異常に起因していると想定される一方、タウが実はほとんど分解されない長寿命タンパク質である可能性も提唱されている。タウの異常蓄積メカニズムの解明にむけて、脳内におけるタウの半減期を明らかにする必要がある。タンパク質の半減期解析は、同位体による一過性の標識（ラベル）とその後の定量的追跡（チェイス）からなる。生体を対象とした応用例はあるものの、従来法では同位体標識のコストや質量分析計の精度の点で正確な測定が困難であった。そこで本研究では、体内窒素のごく一部を安定同位体である ^{15}N で置換し、高精度の二次イオン質量分析法を用いて同位体を定量することにより生体内タンパク質の半減期を測定する解析系の開発を目的とした。

【方法】 >98%の窒素が ^{15}N で構成されているスピルリナを一定濃度混入させたマウス用飼料を作製した。C57BL/6系統マウスについて交配を行い、膺プラグの形成を確認するとともにラベル化飼料に変更し、出産後も継続して飼育した。生後28日目において離乳後、産仔について通常飼料に変更し継続飼育させた。各解析時期においてマウスより組織を採取し、冷凍保存させた。飼料および採取した組織より総タンパク質画分を調製し、一部をタンパク質、一部を2次イオン質量分析計による窒素原子の同位体解析を行った。

【結果】 はじめに、二次イオン質量分析計の感度と精度について検証を行った。任意のタンパク質量に調製したリコンビナントタウにイオンビームを照射し、検出されるイオン数から安定して検出できるタンパク質量を検討した。その結果 $0.1\mu\text{g}/\text{spot}\sim 1.0\mu\text{g}/\text{spot}$ の範囲で安定してイオン化した同位体を検出できた。また ^{15}N 標識および未標識のスピルリナからタンパク質を抽出し、任意の割合で混和した試料を同位体分析することで二次イオン質量分析計の精度について検証した。その結果、 ^{15}N の天然存在比0.364%に対し、わずか0.1%の混入であっても正確に分析できることを確認した。次に ^{15}N で標識した飼料をマウスへ一定期間投与し、採血、大脳皮質の摘出を行った。血漿、大脳皮質タンパク質を抽出し、これらの組織タンパク質がどの程度 ^{15}N によって標識されるかどうかを検証した。その結果、血漿、大脳皮質タンパク質ともに餌に含まれるタンパク質中の ^{15}N と同程度にまで標識された。さらに ^{15}N ラベル後、5週間のチェイスを行った結果、血漿タンパク質では通常飼料中の ^{15}N 濃度にまで低下したのに対し、大脳皮質由来のタンパク質では ^{15}N の残存が認められた。

マウスを用いたタンパク質寿命測定法の概要

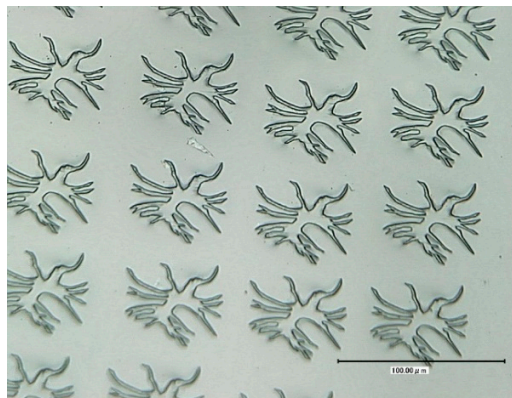


【目的】ダイレクトリプログラミングは、幹細胞へ戻す初期化プロセスを経ないため、初期化プロセスを経る分化誘導法と比して効率が約 10 倍増加する。しかし既存のダイレクトリプログラミング手法は、体細胞を iPS 細胞へ戻す初期化プロセスと基本的に同じ遺伝子導入法を用いている。そのため、プロセス数は軽減されるが、発がん化リスクおよびコストの問題などは解決されていない。そこで本研究では、新しいダイレクトリプログラミング技術として、細胞の「形態」に着目した。私たちの体を構成する細胞は、それぞれの機能に応じた特徴的な形態をもっている。そのため、細胞の形態を操作することにより、その機能を変化させることができる可能性を秘めている。すなわち、細胞の形態制御が、ある体細胞から別の体細胞への直接的な変化を実現する可能性である。これは、既存の再生・細胞医療の複雑なプロセスを劇的に簡略化させるとともに、そこに内包されるがん化リスク、コスト問題を克服する。本課題では、線維芽細胞（スタート細胞）から脳組織を構成するアストロサイト（ターゲット細胞）へのダイレクトリプログラミングを試みた。アストロサイトをターゲット細胞とした理由は、脳組織を構成するアストロサイトなどの細胞は一度損傷を受けると再生が難しく、再生医療技術による展開が強く必要とされる一つの細胞であるためである。

【方法】スタート細胞にはヒト新生児皮膚線維芽細胞を用いた。ターゲット細胞には、脳神経アストロサイトを使用した。アストロサイトを形態拘束なしに二次元培養し、その画像を取得した。そして、フォトリソグラフィを使用し、ガラス基板にそのパターンを形成し、モールドとした。そのモールドの細胞培養基板となる PDMS を流し、パターンが凸状となる細胞培養基板を作製した。その後、凸部に細胞接着分子であるフィブロネクチンをコーティングし、スタート細胞であるヒト新生児皮膚線維芽細胞を播種した。

【結果】形状拘束を行わず二次元培養したヒト新生児皮膚線維芽細胞においても、アストロサイトの分化マーカーである GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) は発現されたが、それよりも高い発現が、アストロサイトのパターン上に播種されたヒト新生児皮膚線維芽細胞において観察された。この結果は、スタート細胞をターゲット細胞の形状に制御することにより、スタート細胞がターゲット細胞へ分化する可能性を示唆している。

アストロサイト形状のマイクロパターン

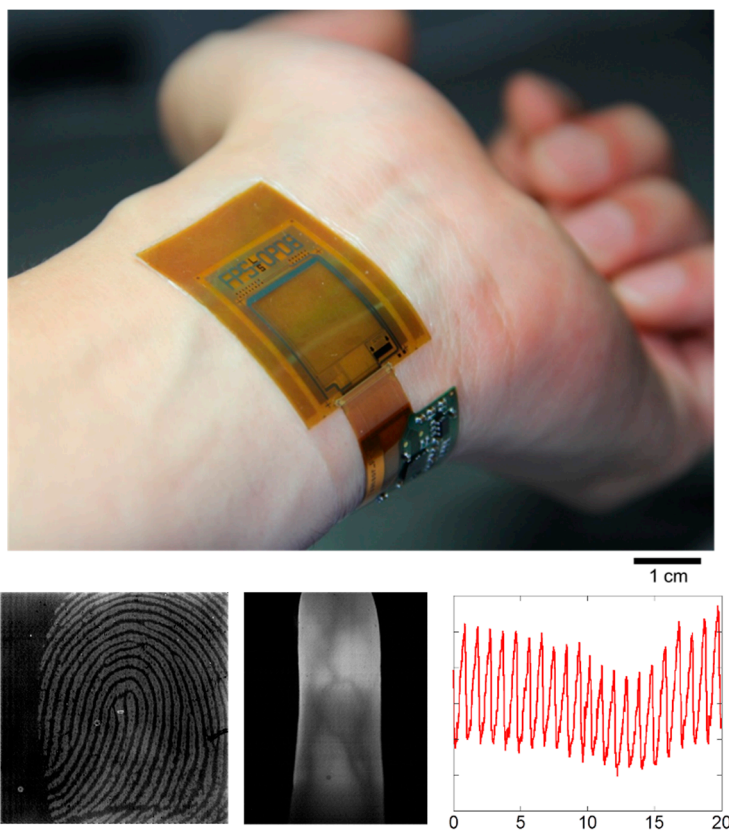


【目的】 本研究では、 $20\mu\text{m}$ 以下の超柔軟なフレキシブル基板の上に、高解像度のイメージング素子を作製し、患部に直接貼り付けて血流状態をマッピングするシステムの開発を目指す。

【方法】 本研究では、 $10\mu\text{m}$ のフィルム基板の上に低温ポリシリコンのバックプレーンと有機受光素子を集積化することで、フレキシブルな有機イメージセンサーを実現した。作製したイメージセンサーは、解像度が 508 dpi、撮像速度が 41 fps であり、 850nm の近赤外領域において高い感度を有していた。

【結果】 本研究で開発したフレキシブルイメージセンサーを用いて、生体信号の計測を行った。イメージセンサー上に指を直接置いたところ、従来の CMOS イメージセンサーと同等の指紋画像を検出することに成功した。さらに、開発したイメージセンサーの高速性を生かすことで、脈波の検出を行うことにも成功した。また、レンズなどの光学系と組み合わせることで、指の静脈の撮像にも成功した。

本研究で開発したシート型イメージセンサー

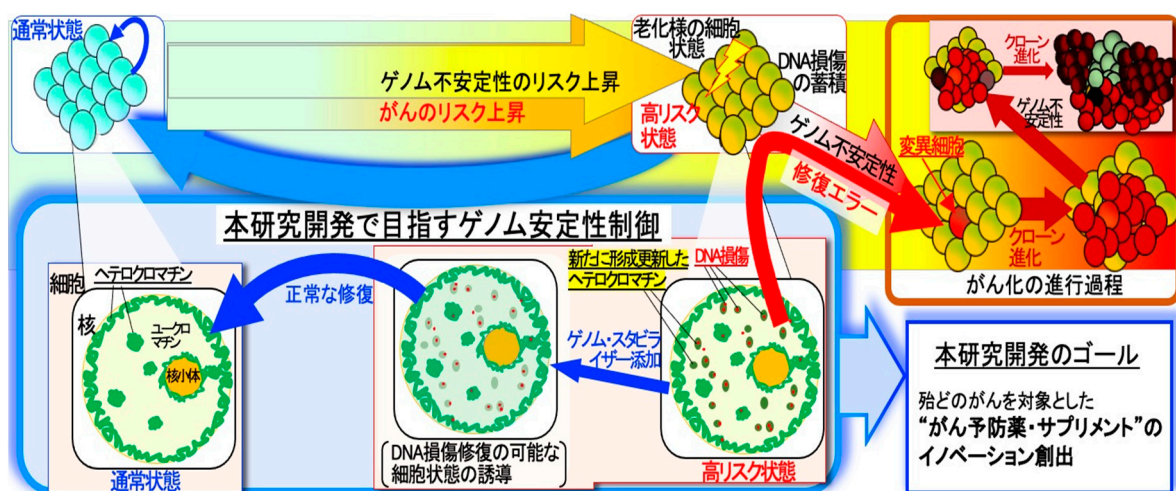


【目的】 がん化過程は変異細胞のクローン進化によって進行し、このクローン進化が複数回誘導されて発がんに至ると考えられている。最近の我々の解析からは、このクローン進化には、ゲノム不安定性が引き金となること
 が示された。実際、殆どのがんは、ゲノム不安定性に伴って発症している。重要なことに、この知見からは、原理的に、『これらのがんは“ゲノム安定性が保持・制御”される限り抑制される』と考えられる。そこで本研究では、ゲノム安定性制御を作用点とした新規がん予防法の創出を目指し、そのための基礎概念の構築を目指す。

【方法】 まず、ゲノム不安定性の高リスク状態を明確にすることを旨とし、共焦点レーザー顕微鏡によるイメージング解析によってクロマチン因子を解析した。ゲノム不安定性のリスク上昇の要因となる責任因子の特定を目指して、クロマチン状態変化に関わるクロマチン因子のノックアウト細胞を作製し、その影響解析によって責任因子を特定した。一方で、これまでに我々が“ゲノム安定性を促進する効果”を誘導することを見出した一部のポリフェノールをリード化合物と位置づけ、その抑制効果を解析した。さらに、『どの様にゲノム不安定性の高リスク状態が形成されているのか』、その状態変化への影響を解析した。

【結果】 ゲノム不安定性の高リスク状態では、ヘテロクロマチンのフォーカス形成が亢進していることが見出された。本研究で、さらに、ヘテロクロマチン形成の亢進につき、これを制御するヒストンメチル基転移酵素 X の関与が明確になった。実際、ヘテロクロマチン領域は液-液相分離 (LLPS) 状態を形成し、相同組替え修復能が低下した領域であることが知られている。このため、ゲノム不安定性のリスクの高い状態が現れると考えられる。一方で、幾つかの低分子化合物の投与で、有意なゲノム安定性の促進効果 (高リスク状態の抑制効果) が認められている。本研究で、これは、DNA 損傷の修復を誘導する効果と過剰なヘテロクロマチン形成の亢進を抑制する効果に伴って誘導されていることが示された。さらに、DNA 損傷修復とヘテロクロマチン抑制を指標とし、高リスク状態を抑制する成分のスクリーニング、その効果の最適化テストを行い、ヘテロクロマチン液-液相分離 (HC-LLPS) 抑制剤を作製し、この HC-LLPS 抑制剤の効果を解析したところ、実際に、有意な HC-LLPS の抑制効果、これに伴う DNA 損傷の修復誘導の効果が現れることが示された。さらに、次世代シーケンサーによる解析でも、その状態が“低リスク状態と同程度の状態”にまで戻っていることが認められた。現在、動物モデルでの影響解析、作用機序の解析が進行しており、最終的には、実際の“がん予防効果”に与える影響を明確にすることを旨とする。

ゲノム不安定性リスクの高い状態の誘導と“ゲノム安定性制御”を作用点としたがん予防への挑戦の概念図

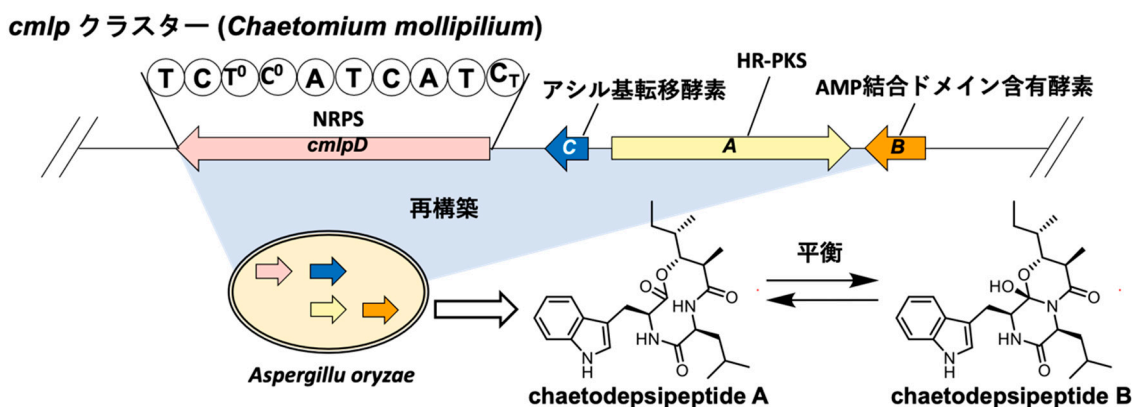


【目的】 新しい天然物の発見は、天然物化学研究の醍醐味の一つであり、また、様々な分野の発展を促す可能性を持つ重要な研究課題である。また、天然物は、これまでに、数多くの医薬品開発に貢献してきた最も魅力的な医薬資源の一つである。近年、遺伝子解読技術の進展やそれともなう天然物生成研究成果の蓄積により、微生物のゲノム上には、膨大な未開拓の天然物生成に関わる遺伝子資源が存在することが明らかにされた。すなわち、遺伝子資源は、ポストゲノム時代における天然物の重要な探索資源であり、これらをいかに活用するかが、新規天然物探索の鍵となる。ペプチド天然物は、構造多様性に優れ、また、生物活性を示す化合物が多く存在する重要な天然物のグループである。また、ペプチド天然物の生合成に関わる非リボソーム型ペプチド合成酵素 (NRPS) 遺伝子は、糸状菌のゲノム上に豊富に存在し、また、そのほとんどがどのような天然物を生合成するか明らかにされていない、未開拓の資源である。そこで本研究では、ゲノムマイニングと異種発現を基盤とする合成生物学的手法により、糸状菌ゲノム情報を材料として、新規ペプチド天然物を発見することを目的として研究を行った。

【方法】 独自に収集した糸状菌ゲノム情報ライブラリーに対して、NRPS 遺伝子と高還元型ポリケタイド合成酵素 (HR-PKS) 遺伝子の両方を有する生合成遺伝子クラスターをゲノムマイニングし、見出された生合成遺伝子クラスターをバイオインフォマティクス解析により、生合成される天然物の新規性を評価した。新規天然物をコードすると予想された遺伝子クラスターについて、モデル糸状菌である *Aspergillus oryzae* の異種発現系を用いて再構築することで、標的生合成遺伝子クラスターにコードされる天然物の単離と生合成経路の解明を行った。

【結果】 NRPS 遺伝子と HR-PKS 遺伝子を指標にゲノムマイニングを行ったところ、*Chaetomium mollipilium* のゲノム上に、NRPS 遺伝子 (*cmlpD*) と HR-PKS 遺伝子 (*cmlpA*) に加え、AMP 結合ドメイン含有酵素遺伝子 (*cmlpB*) とアシル基転移酵素 (*cmlpC*) からなる、*cmlp* クラスターを見出した。バイオインフォマティクス解析の結果、*emericellamide* 類生合成遺伝子クラスターと相同性があり、*emericellamide* 類と類似の環状デブシペプチド天然物が生合成されることが予想された。さらに、類似のクラスターを探索し、それらに含まれる NRPS の A ドメインの数を比較した結果、A ドメインを 2 つ有する *CmlpD* と関連づけられる天然物が存在しないことから、新規天然物の生産が期待された。次に、*cmlp* クラスターを *A. oryzae* で再構築した結果、期待通り、アミノ酸 2 分子とポリケタイド鎖からなる新規環状デブシペプチド *chaetodepsipeptide A* が得られた。また、構造解析の結果、*chaetodepsipeptide A* は、天然物ではこれまで報告例のない、6/6 シクロール構造を有する *chaetodepsipeptide B* と平衡で存在していることを明らかとした。また、*chaetodepsipeptide* 類の生合成経路を明らかにし、アシル基転移酵素による新しい HR-PKS からのポリケタイド鎖の加水分解機構を発見し、NRPS の生合成に関与するドメインを特定した。

ゲノムマイニングに基づく新規デブシペプチドの発見

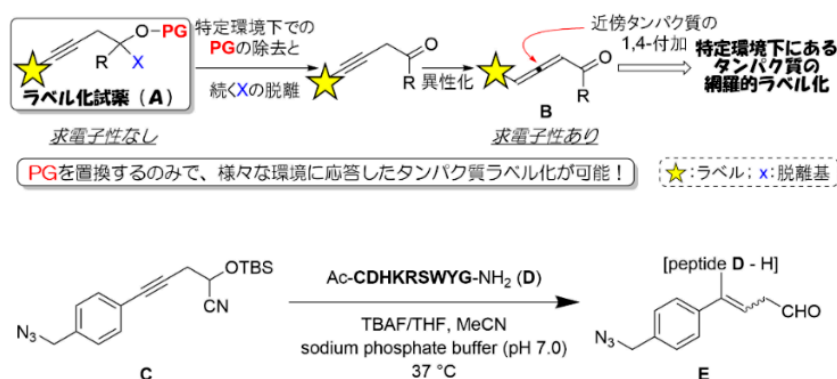


【目的】生体内には多くの物質が存在し、様々な化学反応を起こしている。これら物質や反応の生理的意義を解明するうえで、細胞や生体内において当該物質周辺や反応点近傍に存在するタンパク質の網羅的解析が重要となる。このような、特定環境下のタンパク質のみを網羅的に解析するアプローチは、コンディショナルプロテオミクス (CP) と呼ばれている。CP 研究では、対象とする物質や反応を認識・検知して近傍のタンパク質をラベル化する試薬が必要となる。このようなラベル化試薬は、現在までいくつか報告されている。しかし、特定の物質 (イオン) をトリガーとしてラベル化を惹起するよう設計されているため、汎用性に難があった。すなわち、新たな物質や反応をトリガーとするにはラベル化試薬を一から設計しなおす必要があり、この煩雑さが CP の発展を阻害していた。そこで著者は、保護基 (PG) を置換するのみで様々な物質・反応をトリガーとしたラベル化を可能とする、新たな高汎用性ラベル化試薬を開発することとした。なお、標題の「論理ゲート型プロテオミクス」とは CP のことであり、特定の環境下にあるタンパク質のみを対象とした、すなわち“特定の環境”と“タンパク質の有無”を AND ゲートとしたプロテオミクスを意味する。

【方法】これまで著者らは、PG を置換するのみで様々な環境に応答しペプチド結合を切断する環境応答型アミノ酸の開発を行ってきた。本研究ではこの際の知見を活かし、CP のための新たなラベル化試薬を設計した。ラベル化試薬 A は三重結合を挟み、一方にラベルを、他方に PG により保護された水酸基を有する。この試薬は求電子性を持たないため、タンパク質のラベル化は起こさない。しかし、特定環境下で PG が除去されると生じた中間体が分解され、アレノン B を生じる。アレノンは求電子性が高いため、近傍に存在するタンパク質の求核性部位による共役付加反応を受ける。この結果、特定環境下にあるタンパク質のみが網羅的にラベル化される設計である。本研究ではまず、ラベル化試薬の反応性精査を目指し、PG 部分には生体内環境ではなくフッ化物イオン処理で容易に除去可能な *tert*-ブチルジメチルシリル (TBS) 基を導入することとした。また合成の容易さを考慮し、X はシアノ基と、R は水素原子とした。さらに、クリックケミストリーを利用してラベル部分に多様性を持たせることを可能とし、かつ紫外線吸収を指標とした HPLC による追跡を容易にするため、アルキン末端をベンジルアジド誘導体としたラベル化試薬 C を設計した。

【結果】ラベル化試薬 C の合成経路を確立したのち、タンパク質の代わりにモデルペプチド D を用いて反応性の検証を行った。両化合物をアセトニトリル/リン酸緩衝液に溶解したのち、テトラブチルアンモニウムフルオリドを加えて 37°C でインキュベートした。得られた反応液を HPLC で解析したところ、複数のピークが観測された。溶出液の質量分析を行った結果、いくつかのピークにおいて、ペプチド D にラベル化試薬が付加した目的物 E と一致する質量が観測された。以上の結果は当初の設計通り、ラベル化試薬 C が PG の除去をトリガーとして標的と結合したことを示唆している。なお、ラベル化実験では目的物 E に一致する質量を検出できたものの、構造不明の副生成物も多く観測された。この原因は、ラベル化試薬の反応性が高すぎることにありと著者は考えている。そこで今後は、ラベル化試薬 A の R 部分を種々変更し、ラベル化試薬の求電子性を調節することで副反応の抑制を試み、CP のための真に実用的な論理ゲート型ラベル化試薬の開発を進める計画である。

研究の概要と結果

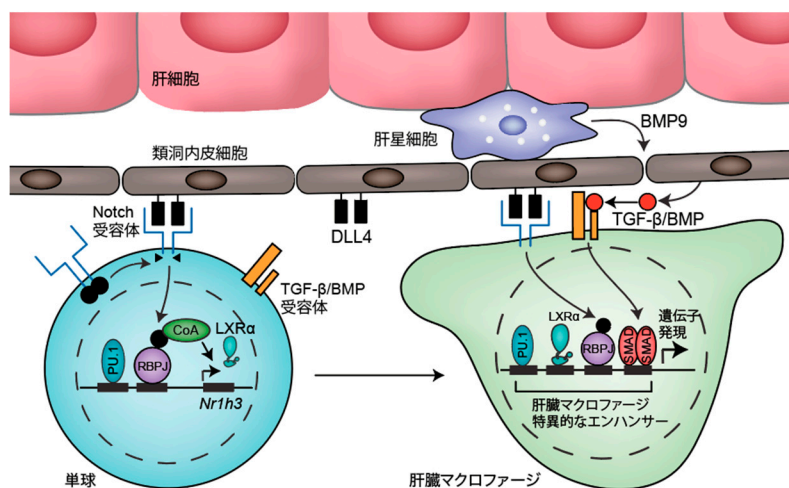


【目的】 組織マクロファージの形質は、組織環境におけるシグナルによって確立・維持されているが、その分子メカニズムは十分に理解されていない。クッパー細胞は肝臓洞に存在する組織マクロファージであり、自然免疫および鉄代謝に重要な役割を果たしている。我々はこれまでに、クッパー細胞に必要なニッチシグナルの同定を行った。その結果、Notch-RBPJ シグナルと TGF-β/BMP-SMAD シグナルの活性化と、肝臓由来の内因性 LXR アゴニストがクッパー細胞に特異的な遺伝子の発現に必要なことが明らかとなった。本研究では、肝臓由来シグナルを再現することで、クッパー細胞に特異的な遺伝子を発現するマクロファージの分化法を開発する。

【方法】 低濃度 LPS が DLL4 による転写因子 LXRα の発現誘導に与える影響を評価し、非アルコール性脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis : NASH) において類洞内皮細胞上に増加する Notch リガンドである JAG1 がマクロファージの遺伝子発現に及ぼす効果を DLL4 と比較解析した。また、ヒト単球由来マクロファージにおいて、DLL4 によるヒトのクッパー細胞特異的遺伝子の発現誘導を試みた。さらに、Cas9-ER-Hoxb8 細胞を作製し、*in vitro* において組織マクロファージの分化を解析するためのツールとしての可能性を検討した。

【結果】 骨髄由来マクロファージにおいて、低濃度 LPS 刺激は Notch リガンド DLL4 による転写因子 LXRα の発現誘導を増強することが明らかとなった。腸管由来 LPS は、クッパー細胞の分化・機能維持に必要な環境シグナルの一つとして機能している可能性がある。また、Notch リガンド JAG1 は、DLL4 と比較してクッパー細胞の系統決定的転写因子の発現誘導効果が弱いことが明らかとなった。JAG1 には DLL4 に拮抗する作用が報告されていることから、NASH における JAG1 の増加が NASH におけるクッパー細胞の変化を促進している可能性がある。DLL4 によるクッパー細胞特異的遺伝子の発現誘導は、ヒト CD14 陽性単球由来マクロファージにおいても確認された。ヒトの肝臓マクロファージにおける疾患依存性の変化を *in vitro* で解析するツールとして利用できる。Cas9-ER-Hoxb8 細胞においても、DLL4 によるクッパー細胞特異的遺伝子の発現誘導を確認できたため、ゲノム編集によるクッパー細胞の分化メカニズムの解析に有用と考えられた。

肝臓由来シグナルによる単球・マクロファージのリプログラミング機構の解析



肝臓由来シグナルによるマクロファージのリプログラミング機構の理解

*In Vitro*におけるクッパー細胞の系統決定的転写因子の発現誘導

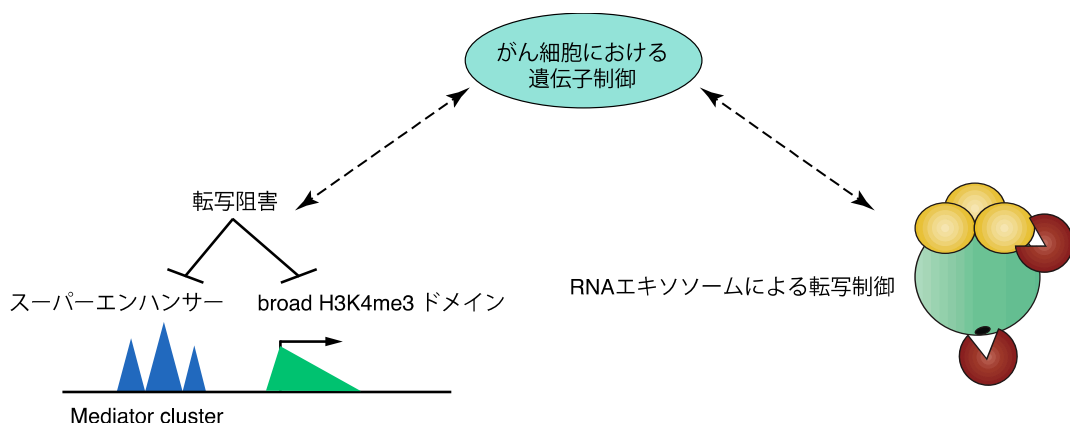


【目的】 がんの分子標的治療の多くは、がん細胞がその増殖や生存の維持において依存している特定のシグナルやがん遺伝子を標的にしており、このようながん遺伝子への依存性 (oncogene addiction) の理解はがんの創薬シーズを探索する上で重要な戦略の一つである。スーパーエンハンサーは、マスター転写因子と一般的な転写制御因子である Mediator 複合体が高濃度に集積した複数のエンハンサー領域がクラスターを形成したゲノム領域であり、細胞種特異的な遺伝子やマイクロ RNA の発現において中心的な役割を果たす (Suzuki HI et al., Cell, 2017)。スーパーエンハンサーは、がん研究において、がん細胞で *Mye* などのがん遺伝子の発現がスーパーエンハンサーに依存していること、Brd4 などの近年同定されたがんの治療標的の分子メカニズムを説明する上でスーパーエンハンサーが重要であることから注目されている。一方で、がん細胞における転写への依存性 (transcriptional addiction) がスーパーエンハンサーの挙動によって十分に説明できるかは明らかとなっていない。このような背景を踏まえ、本研究計画では、がんの治療介入ポイントとしての転写の脆弱性の共通性と多様性の包括的理解を進め、転写標的治療の応答性の理論的基盤を構築し、新規のがん転写治療標的を探索することを目的とした。

【方法】 Brd4 の阻害剤に対する遺伝子応答について、スーパーエンハンサーと、その他のエピジェネティックドメイン、特に、broad H3K4me3 ドメインの関係性に注目して解析を行なった。また、近年、注目されている液-液相分離と転写の関係に焦点を置き、細胞内のエンハンサー-RNA などの RNA をゲノムワイドで分解する RNA エキソソームをノックアウトした際に転写がどのような影響を受けるかを解析した。

【結果】 がん細胞において、スーパーエンハンサー近傍の遺伝子群にあわせて、broad H3K4me3 ドメインによって制御されている遺伝子群も Brd4 の阻害剤 JQ1 によって優先的にその発現が抑制されることを見出し、スーパーエンハンサーと broad H3K4me3 ドメインの両方によって制御されている遺伝子群が特に抑制されやすいことを見出した。今後、がん細胞のより詳細なゲノム・エピゲノム解析とがん遺伝子スクリーニングを統合することにより転写依存性を標的とした治療標的の同定を進めていく。

スーパーエンハンサーに注目したがんの転写脆弱性の理解

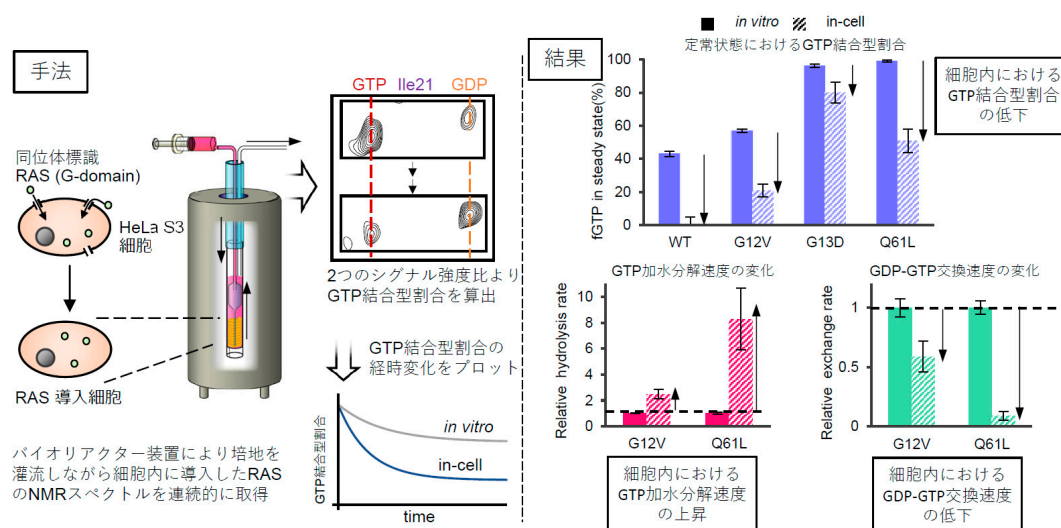


【目的】 Ras は低分子量 GTPase の一種であり、不活性型の GDP 型から活性型の GTP 型に変換することで下流にシグナルを伝達する分子スイッチとして機能する。Ras の活性化の指標である GTP 結合型の存在割合（以後、活性割合）は GTP 加水分解速度 (k_{hy}) と GTP 交換速度 (k_{ex}) によって決定されるが、これまでの *in vitro* 解析によって得られた野生型 Ras の活性割合は 40%程度であり、シグナル依存的に活性化する分子スイッチとしての役割を説明することが出来なかった。そこで本研究では、生細胞内でのタンパク質の構造情報を取得できるインセル NMR 法を用いて細胞内 RAS の GTP 結合型割合の観測を行った。さらに、細胞内で RAS の k_{hy} や k_{ex} を変調させる要因の探索を行い、特定のタンパク質をノックアウトした細胞を用いたインセル NMR 法を確立して細胞内因子が Ras の活性に与える影響の定量を試みた。

【方法】 Ile 側鎖メチル基を選択的に ^1H - ^{13}C 標識した Ras（野生型および発癌性変異体）を HeLaS3 細胞に導入し、バイオリアクターを用いて培地を灌流しながら連続的な NMR 測定を行い、細胞内における Ras の GTP 結合型割合のリアルタイム観測を行った。

【結果】 細胞内における Ras の GP 型割合は野生型、発癌性変異体のいずれにおいても *in vitro* よりも低下していた。特に野生型 Ras については *in vitro* では 40%が GTP 型として存在したのに対し、細胞内では不活性型の GDP 型に保持されていたことから、細胞内での計測結果は Ras の分子スイッチとしての役割を正しく反映していることが示された。また、細胞内における GTP 結合型割合の低下の要因として、細胞内では Ras の k_{hy} が上昇し、 k_{ex} が低下していることが明らかとなった。細胞内における k_{hy} と k_{ex} の低下の要因を探るため、様々な分子クラウダーを添加して、細胞内分子混雑環境を模倣した条件下における k_{hy} ならびに k_{ex} の測定を行った。その結果、グリセロール存在下では k_{ex} が野生型および全ての変異体で顕著に低下したことから、粘性の増大によって細胞内 Ras の k_{ex} の低下が引き起こされていることが明らかとなった。また、細胞内における k_{hy} が上昇する因子を探索するため、HeLa 細胞の破碎液存在下における Ras の k_{hy} の測定を行った。その結果、Ras の加水分解促進因子 (GAPs) に非感受性の発癌性変異体 G12V についても加水分解の促進が観測されたことから、破碎液中に未知の加水分解促進因子が存在することが明らかとなった。また、破碎液を分子量サイズで分画して検討を行った結果、分子量 30~50 KDa の画分に Ras の GAPs が含まれることが明らかとなった。さらに、ノックアウト細胞を用いたインセル NMR 法を開発し、コントロール細胞との比較から特定の細胞内因子の寄与を定量できることを示した。

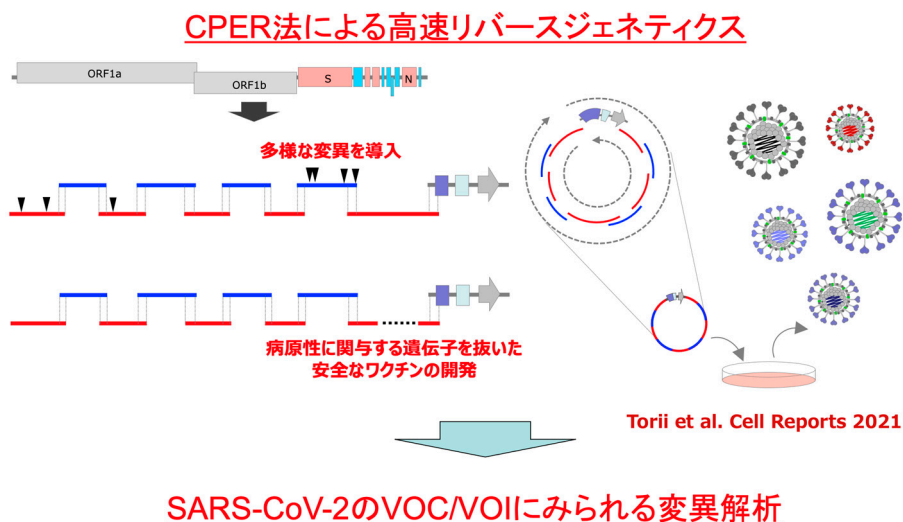
インセル NMR 法を用いた細胞内 Ras の GTP 結合型割合の定量



【目的】我々は SARS-CoV-2 の高速リバーシジェネティクス系を確立し、組換えウイルスを簡便かつ高速で作製できるようになった（下図）。この Circular Polymerase Extension Reaction (CPER) 法と呼ばれる手法は、PCR によってウイルスゲノムを断片的に増幅し精製したのちに、再度の PCR 反応により連結させ環状化し、感受性細胞に直接導入する。導入後 4 日で親株と同等の性状を持つ感染性組換えウイルスが産生される。本研究では、この技術を用いて、次々に出現する変異 SARS-CoV-2 を作製し、変異の意義の解明を行なった。

【方法および結果】本研究内で以下の 4 種類の変異解析を行った。1. 流行株の大規模な配列解析により、HLA-A24 によって認識されるエピトープ部位の変異、Y453F と L452R を同定した。Y453F 変異は、HLA-A24 から逃避し、感染受容体 ACE2 への結合性を高める能力を持つが、この変異を持つ B.1.1.298 系統は、2020 年秋のデンマークでの一過的な流行以降に収束した。一方、L452R 変異は、HLA-A24 から逃避するのみならず、感染受容体 ACE2 への結合性を高め、ウイルスの膜融合活性を高めることによってウイルスの感染力を増強させることを明らかにした。2. デルタ株 (B.1.617.2 系統) が、従来株に比べて病原性が高いことを明らかにした。また、デルタ株のスパイクタンパク質の細胞融合活性は、従来株や他の変異株に比べて顕著に高く、その活性は、スパイクタンパク質の P681R 変異によって担われていることを明らかにした。そして、P681R 変異を持つウイルスを CPER 法にて人工合成し、ハムスターを用いた感染実験を実施した結果、P681R 変異の挿入によって、病原性が高まることを明らかにした。3. 「オミクロン株 (B.1.1.529, BA 系統)」が、従来株に比べて病原性が低いことを明らかにした。また、オミクロン株のスパイクタンパク質の細胞融合活性は、従来株やデルタ株に比べて顕著に低いことを明らかにした。また、数理モデリング解析により、オミクロン株のヒト集団内における増殖速度は、デルタ株に比べて 2~5 倍高いことが明らかになった。4. オミクロン BA.2 株のヒト集団内における相対的実効再生産数は、オミクロン BA.1 株に比べて 1.4 倍高いことがわかった。また、オミクロン BA.2 株の抗原性が、オミクロン BA.1 株とは異なることを明らかにした。さらに、オミクロン BA.2 株のスパイクタンパク質の合胞体形成活性は、オミクロン BA.1 株に比べて有意に高いことを解明し、オミクロン BA.2 株スパイクタンパク質を持つウイルスは、オミクロン BA.1 株スパイクタンパク質を持つウイルスに比べてハムスターにおける病原性が高いことを明らかにした。

CPER 法によるリバーシジェネティクスを駆使した SARS-CoV-2 の変異解析

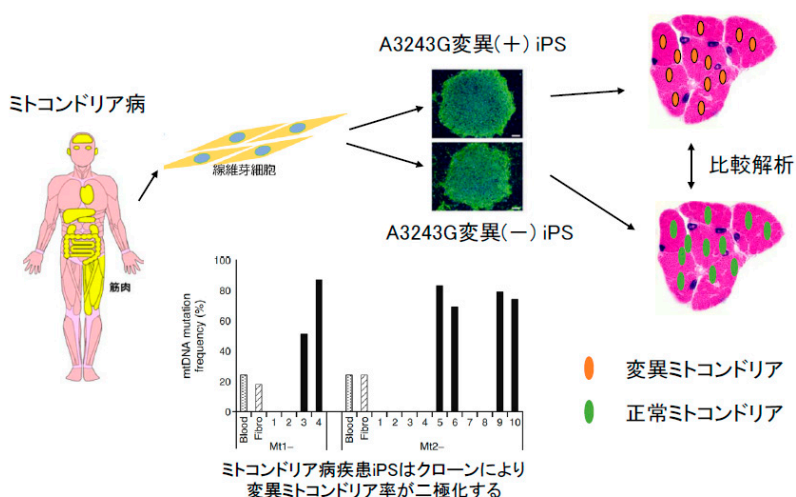


【目的】 本研究では、mtDNA の A3243G 変異を有する疾患 iPS 細胞から誘導した骨格筋細胞を用いて、*in vitro* でミトコンドリア機能と骨格筋細胞機能の関連を評価できる系を確立することを目的とする。ミトコンドリア DNA はホストの核 DNA とは異なり、細胞毎にヘテロプラスミーを持ち、その変異率は細胞毎に異なる。我々の以前の検討では、mtDNA の A3243G 変異を有するミトコンドリア病患者の線維芽細胞から iPS 細胞を樹立した場合、大部分が変異ミトコンドリアで占められる iPS クローンと、変異ミトコンドリアを有さない iPS クローンに二極化する現象を報告している。すなわち、我々は同一の患者より大部分のミトコンドリアが A3243G 変異を持つ iPS クローンと変異ミトコンドリアを検出できない iPS クローンの両者を樹立することに成功している。これら核遺伝子背景は共通しているがミトコンドリア遺伝子異常の有無のみが異なる iPS クローンから誘導した骨格筋細胞を用いて、その細胞機能の違いを比較解析することにより、ミトコンドリア機能が骨格筋細胞機能に及ぼす影響を *in vitro* で詳細に解析する。また、この系を用いて、ミトコンドリア機能低下が骨格筋代謝におよぼす負の影響を治療する薬剤の開発にも応用を目指す。

【方法】 2名のミトコンドリア病患者から樹立した Mt1 iPS 細胞、Mt2 iPS 細胞を用い、それぞれ変異が検出されないクローン (Mt1-1、Mt1-2) (Mt2-3、Mt2-8) と変異の比率が 70%を超えるクローン (Mt1-3、Mt1-4) (Mt2-5、Mt2-6) を用いて、解析を行った。骨格筋への誘導は、既報の方法に準じて行った。骨格筋マーカーの蛍光免疫染色および RT-PCR で骨格筋への分化を確認し、XF24 Extracellular Flux Analyzer を用いてミトコンドリア機能の解析を行った。

【結果】 Mt1、Mt2、どちらの患者の iPS 細胞からも、mtDNA の A3243G 変異の程度に関わらず骨格筋への分化誘導が行えた。誘導した骨格筋細胞においても、Invader アッセイにて変異ミトコンドリアの比率は大きく変化せず、2名の患者より変異 (-) の骨格筋細胞と変異 (+) の骨格筋細胞を誘導することができた。細胞外フラックスアナライザーを用いた解析にて、変異 (+) と (-) の骨格筋細胞で Basal OCR、Maximal Respiration、ATP production、Proton Leak などに差異を認めたにもかかわらず、Non-Mitochondrial Oxygen Consumption には差異を認めなかった。今後、両群での糖代謝機能の解析を行い、ミトコンドリア機能が骨格筋の糖代謝機能に与える影響を明らかにする。

本研究の概念図

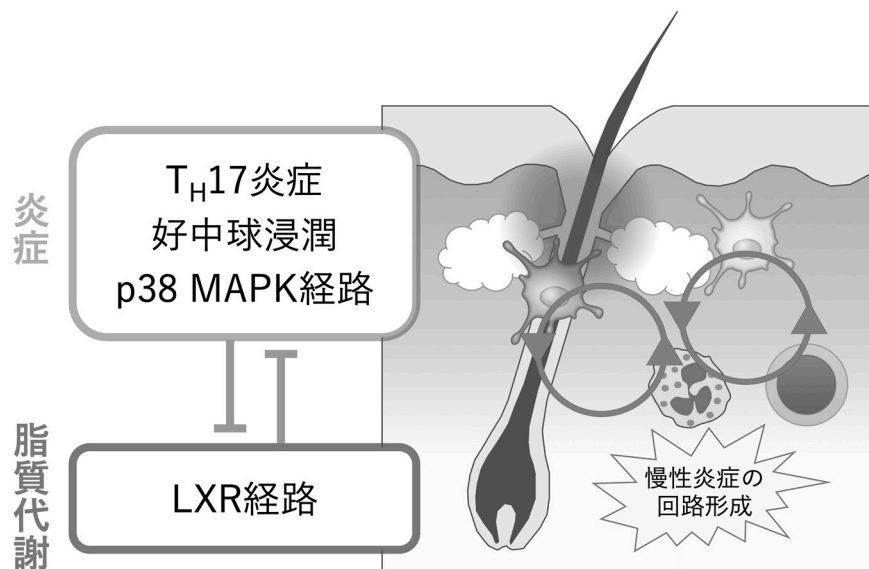


【目的】 ざ瘡（にきび）の治療は 30 年以上大きな進展がない。ざ瘡は、角化異常、好中球遊走、T ヘルパー（T_H）17 型炎症がおこる点で、乾癬と似ている。我々はこれまでに、上皮細胞の p38-mitogen-activated protein（MAP）キナーゼの活性化が、乾癬型の炎症の十分条件になることを示し、上皮を中心とする微小環境が慢性炎症の回路を形成することを提案した。本研究では、脂質代謝経路の肝臓 X 受容体（LXR）経路に着目し、動物モデル、および初代培養細胞を用いて、上皮細胞の炎症性メディエーターの産生に関わる活性化と脂質代謝の相互作用を明らかにし、ざ瘡の発症機序の解明に結びつける。

【方法】 皮膚炎症のモデルとして、Toll 様受容体（TLR）7 のリガンドであるイミキモドの塗布による皮膚炎を用いた。病変部の耳介厚の変化および病理組織学的変化、遺伝子発現、フローサイトメトリーで評価した。また、培養細胞での評価に、マウスの初代培養ケラチノサイト、およびヒトケラチノサイト細胞株である HaCaT を用いて、細胞の活性化を、遺伝子発現、およびウエスタンブロットティングで評価した。LXR 経路の活性化に、LXR アゴニストである GW3965 を用いた。

【結果】 マウスを用いたイミキモドによる皮膚炎の誘導により、皮膚の LXR の遺伝子発現は低下した。逆に、LXR アゴニストの GW3965 の塗布による皮膚の LXR 経路の活性化により、イミキモドによる皮膚炎は減弱した。また、T ヘルパー（T_H）17 型サイトカインの産生や、T_H17 細胞の活性化や遊走に関わるメディエーターの発現も、好中球の浸潤も、GW3965 の塗布により低下がみられた。GW3965 によるマウス初代培養ケラチノサイトの LXR 経路の活性化は、炎症性メディエーターの発現も、p38-mitogen-activated protein（MAP）キナーゼの活性化も抑えた。さらに、ヒトケラチノサイト細胞株の HaCaT でも同様の結果が得られた。以上の研究成果より、ケラチノサイトの LXR 経路は、定常状態において p38-MAP キナーゼ経路の制御を介して炎症を制御している可能性、毛包脂腺系上皮細胞でも、この制御機構の破たんがざ瘡の発症に関与する可能性が示唆された。

ざ瘡の上皮 - 免疫微小環境（EIME : epithelial-immune microenvironment）における
炎症と脂質代謝経路の相互制御の概念図



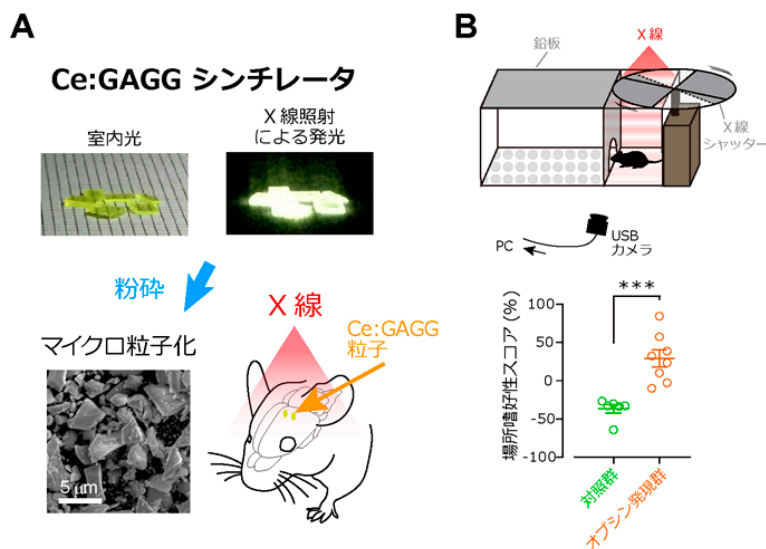
106	X線吸収性発光ナノ粒子による細胞機能操作法の開発	山下 貴之
-----	--------------------------	-------

【目的】 光感受性タンパク質を用いて光照射により細胞分子機能を制御する技術（光操作技術）は、時空間精度の高さを背景として、ゲノム編集などの最新の生命科学技術と融合する形で生物医学系分野で広く活用されはじめており、副作用の少ない次世代の低侵襲治療法として幅広い医学応用が期待されている。ところが、光操作技術は、生体組織内で散乱・吸収されやすい可視～近赤外光を刺激光とするため、深部や広範囲の組織へのアプローチを苦手とする。従来、刺激光を組織深部に届けるためには光ファイバーなど光照射装置を組織内に埋め込む手法が用いられているが、組織侵襲や有効体積の小ささなどが問題となる。そのため光操作技術は潜在能力を十分発揮する形での臨床応用が進んでおらず、根本的な問題解決が求められている。そこで、私たちは、生体組織を透過する X 線を可視光へと変換する発光素材である無機シンチレータ粒子を組織に注射し、体外からの X 線照射により遠隔的に光操作を行う独自技術（X 線光操作法）を開発してきた。これまで、光操作技術の進歩が著しい神経科学分野での本技術の適用を目指して、高効率で X 線を可視光に変換でき、かつ、潮解性を持たないため扱いやすい Ce:GAGG を用いた技術開発を進めてきた。本研究では、Ce:GAGG 粒子をマウス脳内に埋め込み、低線量のパルス X 線照射により神経機能の操作を試みるとともに、本手法の安全性をさらに高めるため、Ce:GAGG ナノ粒子の作製と本技術への応用も検討した。

【方法】 まず、Ce:GAGG 発光により効率よく開口する光感受性イオンチャネル（オプシン）をスクリーニングした。次に、Ce:GAGG 結晶の生体親和性を培養細胞とのインキュベーションおよび脳内への粒子注入により確認した後、スクリーニングにより見出した最適オプシンを生体マウス中脳ドーパミン神経に発現させ、X 線照射により神経活性マーカーである cFos の発現が誘導されるか、ドーパミン神経が関与する場所嗜好性に変化が現れるか、を検討した。さらに、化学合成により Ce:GAGG ナノ粒子を合成し、様々な合成条件を検討することで蛍光量子収率の高い材料の作製を目指した。

【結果】 Ce:GAGG 発光により興奮性オプシンである ChRmine と抑制性オプシンである GtACR1 が効率よく活性化することが分かった。また、Ce:GAGG 結晶には顕著な細胞毒性がなく、Ce:GAGG マイクロ粒子は注射部位に長期間留まることが分かった。X 線照射により、脳内に注射した Ce:GAGG 粒子塊が発光し、ChRmine 発現細胞に cFos の有意な発現が誘導された。また、動物に悪影響を及ぼさない低線量のパルス X 線照射により自由行動下のマウスの中脳ドーパミン神経を活性化し、場所嗜好性を変化させることに成功した。さらに、蛍光量子収率で 90% 程度の Ce:GAGG ナノ粒子が完成した。

Ce:GAGG シンチレータを用いた X 線光操作実験

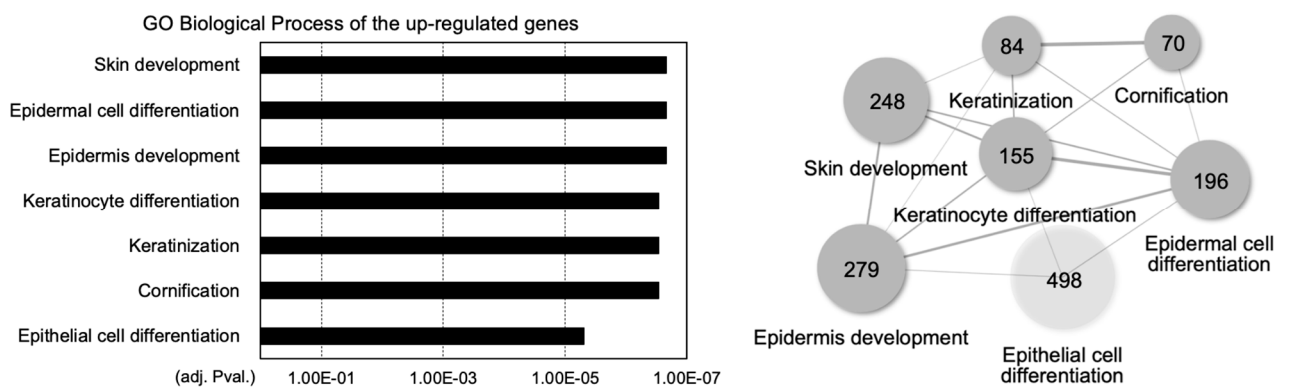


【目的】 近年、本邦では、加熱式たばこが製造・販売されている。燃焼タバコは、心臓血管疾患、呼吸器疾患、口腔がん、歯周炎の発症に関係している。加熱式たばこは、燃焼式たばこと同様にエアロゾルが発生するため、加熱式たばこによる種々の疾病の発症リスクは、可燃性の紙巻きタバコと同じかそれ以上になる可能性も考えられる。最近になって加熱式たばこの使用が気道上皮細胞と血管内皮細胞に損傷を与えることが報告された。加熱式たばこを使用すると、エイジングのリスクも高まる可能性がある。本研究では、加熱式たばこ抽出物 (HTP) が、歯肉上皮細胞のエイジングのメカニズムを解明するために、RNA-seq にて遺伝子発現およびRRBS にて DNA メチル化を網羅的に解析した。

【方法】 Ploom TECH⁺ たばこカプセルを分解し、たばこカプセル内のたばこ葉を 1.5 ml チューブに回収した。タバコ葉 1 g あたり 3 ml の水を添加混合後、60°C で 120 分間加熱した。加熱後、15,000 rpm で 15 分間の遠心分離によりタバコの葉と上澄みを分離し、上澄みを回収して抽出物 (HTP) とした。正常歯肉上皮細胞 (HGEP) は Epithelial Culture Medium に HTP を添加したものと非添加したものを 3 日間ずつ交互に交換し、1 ヶ月間培養を行った。コントロールには超純水を添加したものをを用いた。それぞれ RNA および DNA を抽出した後、次世代シーケンサーを用いて網羅的にゲノム解析を行った。RNA-seq のデータは、Trimmomatic、HISAT2、featureCounts で処理した。さらに、iDEP を用い生物学的解釈について検討した。RRBS のデータは、Trim galore、Bismark、methylKit で処理し、CpG-island のメチル化レベルを解析した。

【結果】 全遺伝子中、2 倍以上の遺伝子発現増加が認められたのは 284 遺伝子、1/2 以下の遺伝子発現低下が認められたのは 145 遺伝子であった。GO 解析では、HTP の長期刺激により Cornification、Keratinization、Epidermis development、Epidermal cell differentiation、Skin development、Keratinocyte differentiation、Epithelial cell differentiation のパスウェーが上昇した。HTP の長期刺激により歯肉上皮細胞の上皮の角化に影響する可能性が示唆された。RRBS から CpG-island のメチル化が 2 倍以上に上昇したものは 158 遺伝子、1/2 以下に低下したものは 171 遺伝子認められた。これらの CpG-island のメチル化と遺伝子発現レベルの変化に相関性は認められなかった。一方、老化に関連する遺伝子に関して RNA-seq および RRBS からは認められなかった。

遺伝子発現プロファイリング

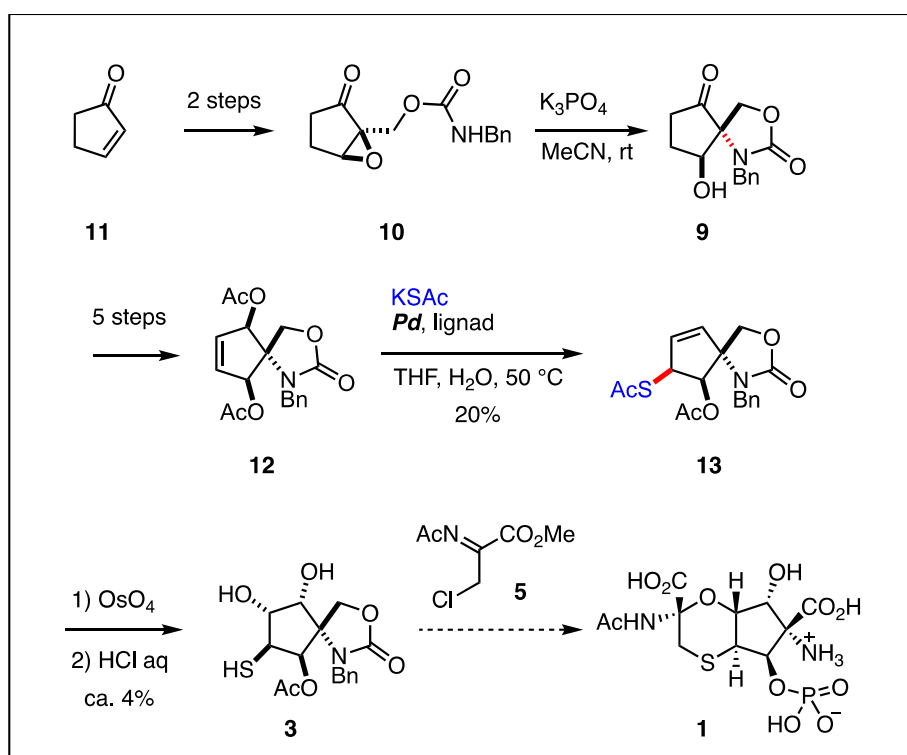


【目的】 植物に対する細菌性毒素として単離された Tagetitoxin (TGT, **1**) は、ヌクレオチド三リン酸と非競合的に RNA ポリメラーゼ (RNAP) に結合することで転写過程にある複合体を安定化し、RNAP の機能を阻害する特異な活性を示すことから、その詳細な作用機序に興味を持たれるとともに、抗がん剤や抗菌薬としての利用が期待されている。一方、RNAP の基質となる核酸分子と TGT の化学構造を比較すると、5 員環部分に置換基の種類や立体配置に類似性が認められる。そこで本研究では、構造活性相関研究などへの利用を指向して、5 員環部分の誘導化が可能である効率合成法の開発を目的とし、TGT の全合成に取り組んだ。

【方法】 5 員環部分の誘導化のために、以下の点を特徴とする合成戦略を立案した。すなわち、1. TGT の 1,4-オキサチアン環を合成の最終段階で構築し、5 員環部分を独立して修飾可能である点、2. あらかじめ構築した 5 員環炭素骨格に官能基を順次導入していくことで、5 員環上の官能基を適宜変更可能である点、および、3. 必要な官能基を順次導入していくと同時に、次の官能基化のための足掛かりを構築し、従来の合成法にみられるような酸化還元や保護基の脱着といった余分な工程を削減できる点である。これにより、反応剤を選択することで種々の官能基化が可能な「プログラム化された」誘導体合成が可能となる。

【結果】 はじめに、市販のシクロペンテノン (**11**) を出発原料とし、2 工程でエポキシカーバメート **10** へと導いた。次に、得られた **10** をアセトニトリル中リン酸カリウムで処理すると、エポキシドの開環を伴う分子内求核置換反応が円滑に進行し、75%の収率で含窒素四置換炭素を有するヒドロキシケトン **9** を与えた。5 工程でメソ体のアリルビスアセテート **12** へと変換したのち、テトラヒドロフラン・水混合溶媒中、量論量のパラジウム錯体存在下、チオリン酸カリウムとともに 50°C に加熱すると、辻-Trost 反応が進行し、ラセミ体のアリルチオアセテート **13** が低収率ながら得られた。次いで、オレフィン部位の酸化とで硫黄上のアセチル基の除去により 5 員環上の全ての不斉炭素中心を備えた中間体 **3** の合成に成功した。

Tagetitoxin (**1**) の全合成および誘導化を指向した 5 員環中間体 **3** の合成

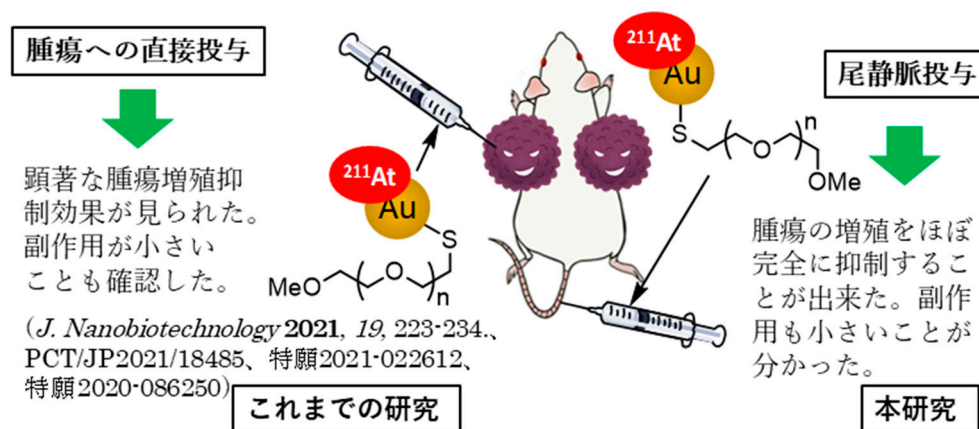


【目的】我々は、 α 線放出核種アスタチン-211 (^{211}At) 標識金ナノ粒子の合成と抗腫瘍効果の評価を行った。核医学治療は RI 内用療法とも呼ばれ、がん患者に対する身体的・精神的な負担が小さいため、新規がん治療法としての期待が大きい。特に α 線は、既存の放射線治療に用いられる β 線や γ 線よりもがん殺傷能力が高い。加えて、飛程がヒト細胞数個分と短いため、周辺の臓器や正常細胞への侵襲が少ない。よって、 α 線放出核種をがん細胞に選択的に取り込ませることにより、高い治療効果の獲得と副作用の抑制が期待できる。我々が着目している ^{211}At は、容易に入手可能なビスマス-209 (^{209}Bi) から比較的容易に製造できる。加えて、適度に短い半減期 (7.2 時間) のため、通院による進行がんの治療が可能であり、がん患者の更なる生活の質 (QOL) の向上が期待できる。一方でハロゲン族である ^{211}At は、ヨウ素と似た性質を持っているため、投与後速やかに甲状腺に集積する。この性質を打ち消すため、我々は ^{211}At を金ナノ粒子表面に固定化した。この ^{211}At 標識金ナノ粒子を担がん動物に投与し、抗腫瘍効果の評価を行うこととした。

【方法】まずは、薬剤である ^{211}At 標識金ナノ粒子の合成を行った。金ナノ粒子は、生体内では凝集することが懸念される。そこで我々は、金ナノ粒子表面をメトキシポリエチレングリコール (mPEG) で修飾した。さらに、がん集積性や細胞透過性の向上を目的として、ペプチドでの表面修飾も行った。その後、得られた表面修飾金ナノ粒子に対し、 ^{211}At 標識化を行った。合成した種々の ^{211}At 標識化金ナノ粒子を PANC-1 移植マウスに投与した。その後、マウスを解剖し、各臓器の放射能を測定することにより、 ^{211}At 標識金ナノ粒子の体内分布を評価した。この評価で最も腫瘍に集積した ^{211}At 標識金ナノ粒子を用いて、抗腫瘍効果の評価を行った。腫瘍は、定期的にサイズを測定し、数週間後に摘出した。副作用の有無を評価するため、体重の増減も定期的に測定した。

【結果】金ナノ粒子の表面修飾は、室温下、数時間攪拌を行うことにより簡単に進行した。合成した表面修飾金ナノ粒子は、遠心による精製中や生理食塩水条件下でも凝集などは見られず、安定であることが分かった。その後の ^{211}At 標識化も、室温で 5 分程度振とうするだけでほぼ定量的に進行した。合成した ^{211}At 標識金ナノ粒子を PANC-1 移植マウスに投与した結果、mPEG のみで表面修飾を行った金ナノ粒子が、最も腫瘍へ集積することが分かった。表面修飾にペプチドを用いた金ナノ粒子は、肝臓へ多く集積した。そこで、mPEG 修飾 ^{211}At 標識金ナノ粒子を、PANC-1 移植マウスに再び投与して抗腫瘍効果の評価を行った。その結果、腫瘍の成長をほぼ完全に抑制することに成功した。また、マウスの顕著な体重減少なども見られなかったことから、副作用も小さいことが分かった。

^{211}At 標識金ナノ粒子の投与による抗腫瘍効果の評価



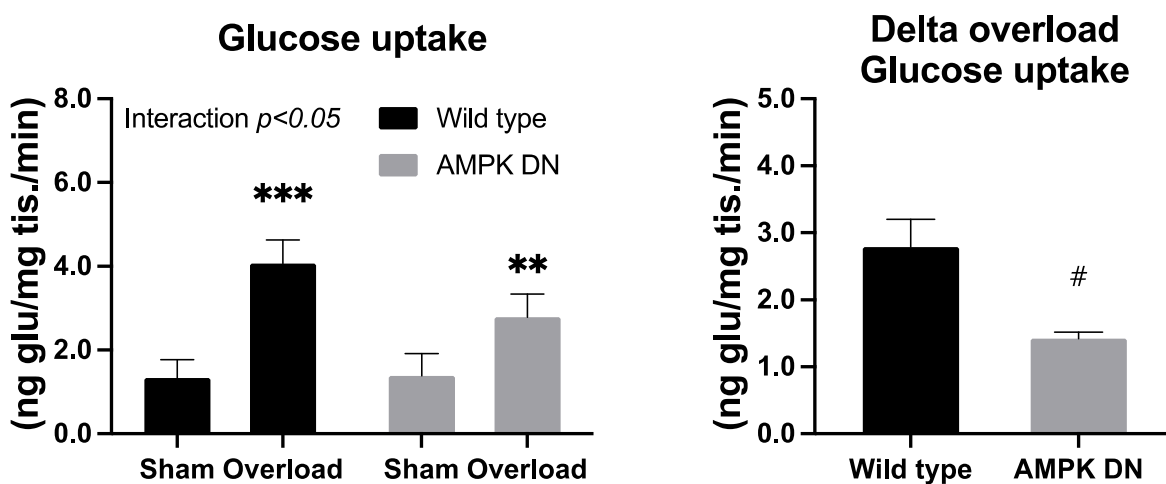
110 慢性運動によるインスリン非依存的な糖代謝亢進機序	木戸 康平
------------------------------	-------

【目的】 慢性的な骨格筋への過負荷は、骨格筋の肥大を引き起こすとともに単位筋重量あたりのインスリン非依存的な糖取り込みも高める。骨格筋の AMPK は、その活性によって糖取り込みを促進する一方で、タンパク質合成に対しては抑制的に作用する。しかしながら、慢性的な過負荷による筋肥大と糖取り込みの促進に対して、AMPK が担う役割は明らかでない。そこで本研究では、骨格筋特異的に AMPK のドミナントネガティブ変異体を発現する遺伝子改変マウス (AMPK DN マウス) に対して協働筋切除による機能的過負荷を施し、AMPK の役割を確認することを目的とした。

【方法】 雄性の野生型 (WT) および AMPK DN マウスの片脚ヒラメ筋および腓腹筋を摘出し、足底筋に対する過負荷を施した。対側脚には擬手術を施し、対照コントロールとした。手術後 14 日間マウスを飼育した後、放射性同位体で標識された 2 デオキシグルコースを眼窩投与することで足底筋の糖取り込み速度を測定した。また、足底筋の湿重量も同時に測定した。

【結果】 WT および AMPK DN マウスの足底筋の糖取り込みは、14 日間の過負荷によって有意に上昇した (左図) が、その適応は、AMPK DN マウスの方が WT マウスより有意に低値を示した (右図)。また、14 日間の過負荷は、骨格筋の GLUT4 発現を増加させたが、その増加の程度は WT マウスと比較して AMPK DN マウスで有意に低値を示した。足底筋湿重量は、WT マウスに対する 14 日間の過負荷によって有意に増加した。しかしながら、この筋肥大応答が AMPK DN マウスで促進されるという結果は観察されなかった。つまり、骨格筋の AMPK は、14 日間の過負荷に伴う代償性筋肥大を抑制する働きはないが、骨格筋の糖取り込みを促進する役割を担っていることが明らかになった。さらに、骨格筋の AMPK は、過負荷に伴う GLUT4 発現増加を介して、骨格筋の糖取り込みを促進している可能性も示唆された。

代償性筋肥大に伴う骨格筋の糖取り込み促進効果

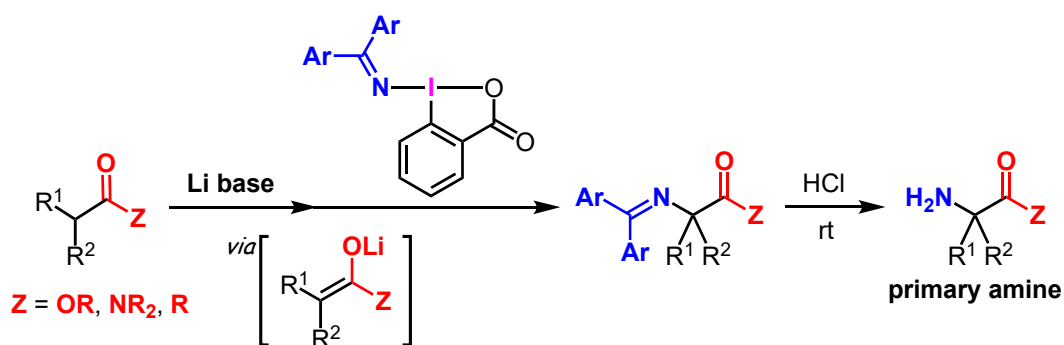


【目的】 α -アミノカルボニル化合物 (例えば α -アミノ酸や α -アミノケトンなど) は天然物や医薬品合成におけるビルディングブロックであり、有機合成化学や薬品合成化学における重要な化合物群である。そのため、 α -アミノカルボニル化合物の合成手法の開発は盛んに研究されている。中でも、入手容易なカルボニル化合物 (エステルやケトンなど) の α 位に窒素官能基を導入する手法 (α 位アミノ化) は、 α -アミノカルボニル化合物の最も直截的かつ効率的な合成手法である。本研究では、独自に開発したジアリールメチレンアミノ基を有する超原子価ヨウ素試剤を活用することで、エステルやアミド、ケトンなどの幅広いカルボニル化合物に適用可能な汎用性の高いアミノ化を開発し、第一級 α -アミノカルボニル化合物の簡便合成法の確立を目的とした。

【方法】 フェニル酢酸メチルをモデル基質として、反応系中でリチウムエノラートを発生させる手法を採用し、種々の塩基や溶媒検討することで、最適な反応条件を探索した。エステル、アミド、ケトンなどの種々のカルボニル化合物に対する反応を検討し、本アミノ化の適用範囲を調査した。カルボニル化合物のラジカルクロック実験を実施し、本アミノ化がイオン的かラジカル的かどちらの機構で進行するかを検証した。

【結果】 フェニル酢酸メチルに対して THF 溶媒中 -78°C でリチウムジイソプロピルアミド (LDA) を作用させることで、リチウムエノラートを反応系中で発生させ、ジアリールメチレンアミノ基を有する超原子価ヨウ素試剤を作用させたところ、目的のアミノ化が進行し、 α -アミノエステルが得られることを見出した。本アミノ化を種々のカルボニル化合物に対して適用したところ、エステルやアミド、ケトンなどの幅広いカルボニル化合物に適用可能な汎用性の高い手法であることがわかった。また、合成した α -アミノカルボニル化合物は、有用なビルディングブロックである第一級 α -アミノカルボニル化合物に容易に変換できることを実証した。さらに、カルボニル化合物のラジカルクロック実験として α 位にシクロプロピル基を有するアミドを用いてアミノ化を検討した結果、本アミノ化はイオン的な経路とラジカル的な経路の両経路を含んでいることが示唆された。

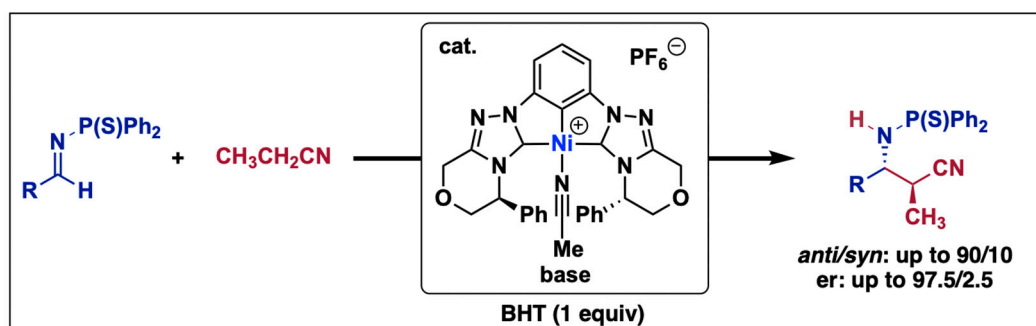
超原子価ヨウ素試剤を活用するカルボニル化合物の α 位アミノ化による第一級 α -アミノカルボニル化合物の合成



【目的】 現在臨床適用されている低分子医薬品の多くは不斉炭素を有する光学活性化合物であり、その自在合成を可能にする不斉合成は多大なる発展を遂げてきた。しかしながら、その進歩は精密な立体化学制御を可能にした反面、目的生成物以上の廃棄物を副生することも多々あるのが現状である。本研究ではその現状を打破すべく、安価な原料から医薬合成に直接利用可能な高付加価値光学活性化合物を量産する技術の開発を目指すこととした。アセトニトリルをはじめとするアルキルニトリルは一般に極性有機溶媒として利用され、有機合成反応における基質として用いられることは少ない。しかしながら、アルキルニトリルの廉価性と汎用性を考慮すれば、その特異的活性化を可能にする合理的触媒デザインにより炭素求核剤として利用することで、有用なキラルビルディングブロックを提供できる C-C 結合形成反応の創出に繋がると考えられる。我々の所属する研究室はこれまで、アセトニトリルからの直接的かつ触媒的なシアノカルバニオン系中発生を軸とした求電子剤との不斉 C-C 結合形成反応を精力的に研究してきた。しかしながら、長年の系統的な触媒系探索にもかかわらず、生成物の不斉収率は中程度に止まっていた。この類を見ない難易度はアセトニトリルの極度に小さい立体バイアスに起因すると推察され、合成化学的に有用な高い立体選択性を実現するためにはそれを補完する剛直かつ包括的な不斉空間を有する触媒構造を再デザインする必要があると考えられた。そこで、我々は上記の条件に合致する新規 Ni (II) ビスカルベン錯体をデザインし、アルジミンへのアセトニトリルの直接的付加反応に適用したところ、高い立体選択性 (平均 95% ee 以上) で β -アミノニトリルを与えることがわかった。本反応は本来溶媒として用いられるほど反応性に乏しいアセトニトリルを有用な C2 ユニットとして実用的な ee で不斉合成に利用可能であることを示した世界初の例である。今回、我々は上述のアセトニトリルのアルジミンへのエナンチオ選択的付加反応において優れた反応成績を示したビス NHC 型ピンサー錯体触媒系を拡張し、プロピオニトリルのアルジミンへの触媒的不斉付加反応を見出し、ジアステレオ選択的な反応に応用させることに成功した。

【方法・結果】 ジフェニルホスフィノイル基 [P(S)Ph₂] を有するイミンを、2 mol% のピンサー型ニッケル錯体 ([Ni]-PF₆)、および同量塩基、プロトン源として 1 当量の BHT の存在下においてプロピオニトリルと反応させたところ、目的のプロピオニトリル付加体が概ね高いジアステレオ選択性および立体選択性で得られた。これまでアルキルニトリルを触媒反応の基質に用いた反応においては、相対的な反応性の問題や立体選択性の問題からほとんどアセトニトリルが用いられており、プロピオニトリルなどのアルキルニトリルはほとんど検討されてこなかった。すなわち、本反応は同系統の触媒的不斉合成反応においてジアステレオ選択性を実用性に足るものとした数少ない例となる。

プロピオニトリルのアルジミンへの触媒的不斉付加反応



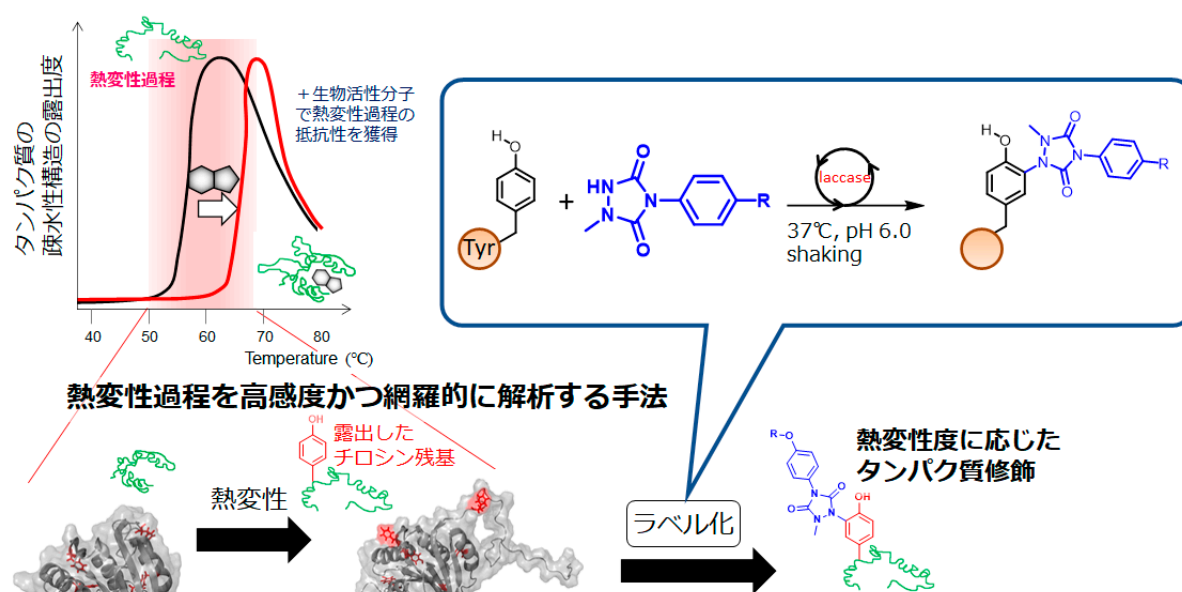
【目的】 生物活性分子の標的タンパク質同定は、生体関連化学分野における最も重要な研究課題の一つであり、多くの研究者の共通の研究対象である。従来の標的タンパク質同定研究では、生物活性分子のプロープ分子を作製し、そのプロープ分子を用いて結合タンパク質を同定するという研究手法がとられてきた。しかし、生物活性分子のプロープ化には、リンカー構造、リンカー導入部位、標識官能基の種類、等の検討が必要であり、生物活性分子の標的同定研究におけるボトルネックとなっている。「生物活性分子のプロープ化を必要とせずに、分子の結合タンパク質を同定できる手法」は、生化学者およびケミカルバイオロジー分野の研究者の長年の理想であり、創薬科学、生体関連化学分野の研究を効率化する技術になると期待できる。本研究では、生物活性分子がタンパク質に結合すると、タンパク質の熱変性に対する抵抗性が向上するという原理を利用して、新たな標的同定法を開発することを目指した。タンパク質の熱変性時に起きる特徴的な現象として、本来タンパク質の内部に埋もれているチロシン残基が熱変性によってタンパク質表面に露出するという現象に着目した。そこで、タンパク質表面に露出するチロシン残基を選択的に標識する技術の開発を目指した。

【方法】 熱変性過程のタンパク質にチロシン残基修飾を適用することで、熱変性度に応じてタンパク質の修飾効率が向上する修飾法が開発できると考えた。この目標を達成するためには、タンパク質が熱変性するような反応条件でも適用できるチロシン残基修飾法を開発する必要があった。そこで、以下 2 つの新たなアプローチを本研究で試行した。

1. Urazole radical を使ったチロシン残基選択的修飾。2. 熱耐性 laccase を使ったチロシン残基選択的修飾。

【結果】 本研究によって、2 種類の新規チロシン残基修飾法を開発することができた。1. Urazole radical を使ったチロシン残基選択的修飾の検討においては、従来のチロシン残基修飾剤の課題であるチロシン残基への選択性を改善した修飾剤を開発することに成功した。モデルタンパク質を使った反応部位レベルでの解析を行い、チロシン残基を特異的かつ効率的に修飾する修飾剤を見出した。2. 熱耐性 laccase を使ったチロシン残基選択的修飾についても検討し、従来のチロシン残基修飾反応と比較して極めて反応効率が高く、速い反応性を示すチロシン残基修飾法を開発することに成功した。また、モデルタンパク質の熱変性度に応じて、タンパク質修飾効率が変化する修飾法であることが示唆された。

タンパク質熱変性時のチロシン残基の表面露出を捉える手法の開発

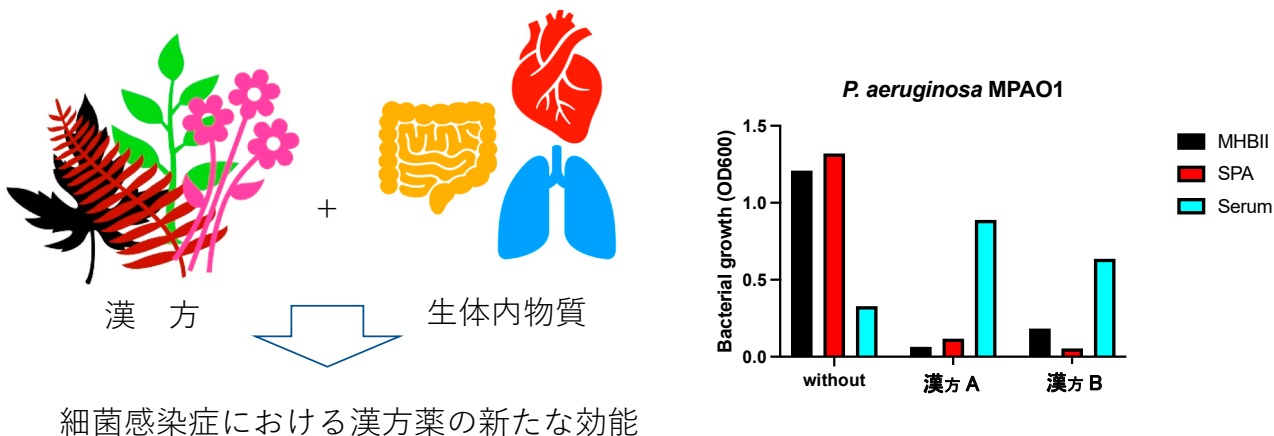


【目的】多剤耐性菌にも有効な抗菌薬開発や新たな薬剤耐性菌を生み出さない科学技術の創世が国際社会から求められている。本研究では、我々が有する感染部位特異的抗菌活性物質の検索・評価系を漢方薬に適用することにより、漢方薬の新たな効能（＝感染部位特異的抗菌活性効果）を評価することを目的し、感染症領域における東洋医学の位置付けを新たに提供することを最終目標とする。

【方法】本研究では、漢方薬の感染部位特異的抗菌活性を評価するために、市販および医療用の計 126 種の漢方薬を用いて各種病原性細菌（緑膿菌、肺炎桿菌、大腸菌）に対する 1. 各生体内物質（サーファクタントプロテイン、血清、尿）存在下における各細菌種の増殖抑制効果の評価、2. 各生体内物質存在下による各細菌種の増殖抑制効果の増強能の評価、3. 漢方存在下での増殖に必須となる細菌因子の網羅的推定を行った。

【結果】各菌種において菌の増殖が認められた漢方数は、緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）では、無添加時で 34、サーファクタントプロテイン A (SPA) 添加時で 33、血清 (Serum) 添加時では 0 であった。肺炎桿菌（*Klebsiella pneumoniae*）では、無添加時、SPA、Serum のいずれの添加時でも本菌の増殖を抑制する漢方は認められなかった。大腸菌では、無添加時および Serum 添加時には本菌の増殖を抑制する漢方は認められなかったが、尿添加時に本菌の増殖を抑制する漢方が 1 種類認められた。各生体内物質存在下で菌の増殖抑制効果が増強された漢方は、*P. aeruginosa* において SPA 添加時に 11 種類、大腸菌において尿添加時に 1 種類認められた。*P. aeruginosa* において増殖能の抑制効果と SPA 添加時に増殖能抑制効果の増強が認めれたそれぞれ 1 種類の漢方（漢方 A および漢方 B）を用いて漢方存在下での増殖に必須となる細菌因子の網羅的推定を行った結果、それぞれ 3 および 19 の細菌因子を抽出した。うち 3 因子（*oxyR*、*pvdE* および *fpvA*）は、両漢方において共通して抽出された遺伝子であったため、これらの細菌因子が漢方 A および漢方 B 存在下での *P. aeruginosa* の増殖に重要な役割を果たしていると考えられた。

細菌感染症における漢方薬の新たな効能の評価



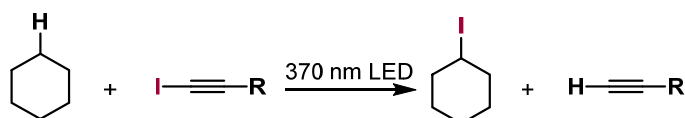
【目的】高い反応性を有するラジカル (X[•]) は、不活性 C(sp³)-H 水素の引き抜き (Hydrogen Atom Transfer : HAT) による炭素ラジカル生成を行い、従来法では修飾を施すことができなかった位置に官能基を導入可能とする。しかし、これまでの X[•]を用いた HAT による修飾法では、結合解離エネルギー (BDE) の小さいメチン水素 (BDE : 93 kcal/mol) の引き抜きによる修飾は効率的に進行するものの、BDE が大きいメチレン水素 (BDE : 97 kcal/mol) やメチル水素 (BDE : 100 kcal/mol) の効率的変換には課題を残している。そこで本研究において、高反応性のアルキニルラジカル (C(sp)-H 結合の BDE : 131 kcal/mol) の活用に着目して検討を行い、HAT を効率的に行うための知見の取得、さまざまな C(sp³)-H 結合変換反応へと展開する基盤を固めることを目的とした。

【方法】ヨードフェニルアセチレンに光照射すると、C(sp)-I 結合の均等開裂が進行してアルキニルラジカルが生成する。そこで、さまざまなヨードアルキンを実験前駆体とし、光照射下、シクロヘキサンを基質に C(sp³)-H ヨウ素化反応をモデルとして、検討を行った。また、ヨードアルキン以外のアルキニルラジカル前駆体についても探索を行ったところ、想定外の反応としてアルデヒドとアルキニルスルホンの還元的カップリング反応を見出し、詳細に検討した。

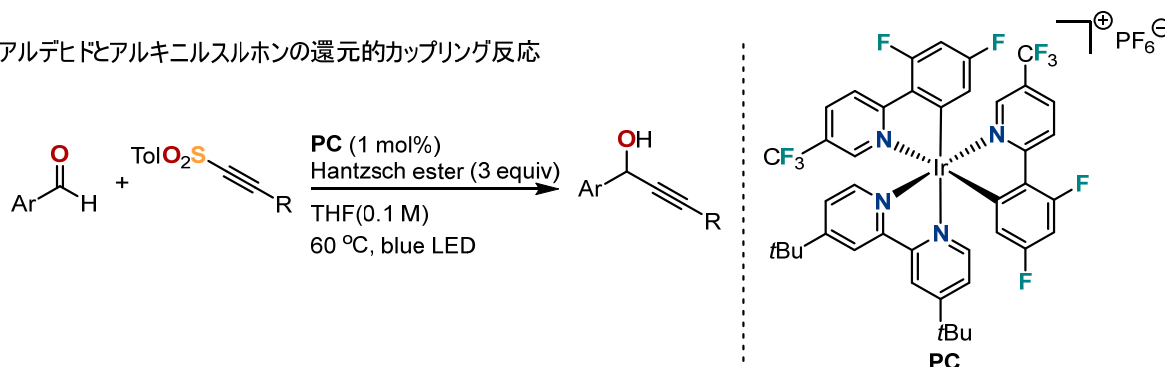
【結果】370 nm LED 照射条件において種々のヨードアルキンを用いて検討を行った。その結果、芳香環もしくはケイ素置換のアルキンを基本骨格として、立体的かさ高さによりアルキン部位を保護する設計が効率的な C(sp³)-H 結合変換反応に必要であることが明らかとなった。アルデヒドとアルキニルスルホンの還元的カップリング反応は、アルデヒドの 1 電子還元によって生じた高反応性のケチルラジカルと求電子性のアルキニル化剤との極性転換型の反応であると考えられた。光酸化還元触媒存在下、Hantzsch エステルを末端還元剤として 60°C 条件にて青色 LED を照射すると良好な収率で種々のプロパルギルアルコールが得られた。本反応は、他のカルボニル基が共存する基質を用いても、芳香族アルデヒド選択的にアルキニル化が進行する特徴をもつ。

高反応性ラジカルを活性種とした変換反応

シクロヘキサンのC(sp³)-Hヨウ素化反応



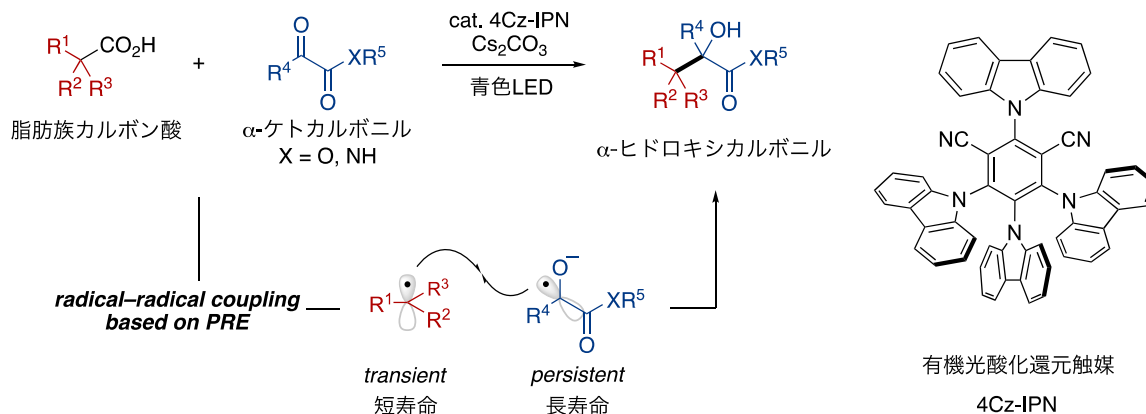
アルデヒドとアルキニルスルホンの還元的カップリング反応



【目的】 アルコールは多くの医薬品や生体分子に含まれる重要な官能基群の一つである。アルコールの隣接位の水素は体内で代謝され易いため、近傍に嵩高い置換基を導入することで医薬品の代謝安定性を向上させることが期待される。しかしながら、嵩高いアルコールは立体障害のため、合成が難しい。アルコールは一般的に、対応するカルボニル化合物への有機金属試薬の付加反応で合成されてきた。嵩高い、特に第三級アルキル金属試薬はその前駆体も含めて調製が困難である、有機金属試薬の潜在的な官能基許容性の低さから医薬品合成や生体分子修飾に応用できない、などの問題点が挙げられる。したがって、これらの問題を解決するには新たな結合形成反応の構築が必要である。本研究は、医薬品合成や生体分子の修飾へと応用できるレベルの官能基許容性を備えた、嵩高いアルコールを合成する触媒システムの開発を目的とする。

【方法】 長寿命ラジカル効果に基づく選択的ラジカルーラジカルクロスカップリングを活用することで、立体障害に強く、高い官能基許容性を有するアルコール合成法を開発できるのではないかと着想した。可視光酸化還元触媒を用いてアルキルラジカル前駆体を一電子酸化、カルボニル化合物を一電子還元することで、短寿命なアルキルラジカルと長寿命なケチルラジカルを温和な条件下発生させ、ラジカルーラジカルクロスカップリングを試みた。金属を含まない有機光酸化還元触媒と入手容易かつ安価なカルボン酸などをアルキルラジカル前駆体として利用することで、従来の手法で問題となった有機金属試薬の調製に伴うコストや廃棄物を削減した。開発した反応を医薬品の合成後期官能基化とアミノ酸やペプチドを基質とした結合形成反応に応用することで、本手法の合成的価値を示した。

【結果】 我々は青色 LED 照射下、1,2,3,5-tetrakis (carbazol-9-yl) -4,6-dicyanobenzene (4Cz-IPN) を有機光酸化還元触媒として用いることで、脂肪酸カルボン酸と α -ケトカルボニル化合物の脱炭酸型クロスカップリングが進行し、 α -ヒドロキシカルボニル化合物が合成できることを見出した (*Organic Letters* 2021, 23, 4420–4425 に掲載)。本反応は第一級から第三級脂肪酸カルボン酸をカルボニル化合物のアルキル化剤として利用することが可能であり、目的とする嵩高いアルコールが高収率で得られた。 α -ケトカルボニル化合物としては α -ケトエステルや α -ケトアミドが適用可能であり、温和な反応条件かつ一工程でムスカリン受容体拮抗薬類縁体の網羅的合成やペプチドの官能基を実現した。シュテルン-フォルマー蛍光消光実験とラジカルクロック実験の結果から、脂肪酸カルボン酸塩は光励起した有機光酸化還元触媒によって一電子酸化されて脱炭酸後に、アルキルラジカルを生じることがわかった。従って本反応では想定通り、光励起した有機光酸化還元触媒が脂肪酸カルボン酸塩の一電子酸化後、 α -ケトカルボニル化合物を一電子還元することで、アルキルラジカルとケチルラジカルを生じる。生成した短寿命 (transient) なアルキルラジカルと長寿命 (persistent) なケチルラジカルは選択的にラジカルーラジカルカップリングを起こし、アルコール生成物を与えた。また、アルケンを加えることでラジカルリレー型の三成分カップリング反応へも展開した。

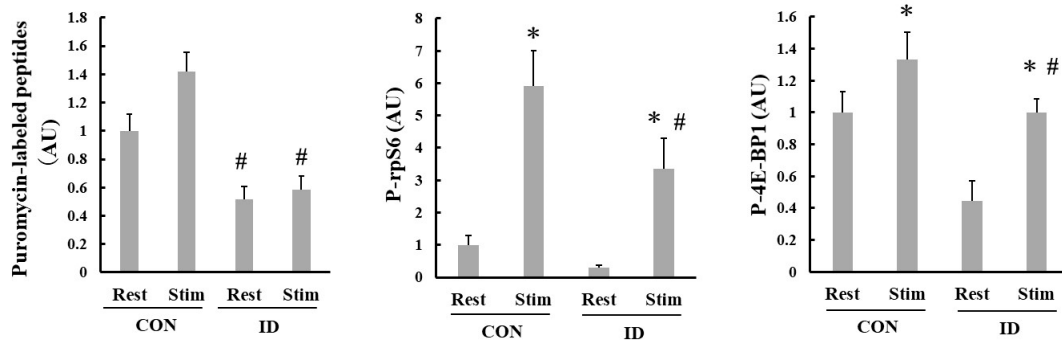
有機光酸化還元触媒による脂肪酸カルボン酸と α -ケトカルボニルの脱炭酸クロスカップリング

【目的】加齢による骨格筋量および筋力の減少はサルコペニアと呼ばれ、身体機能の低下を引き起こすだけでなく、糖尿病をはじめとする様々な疾患の引き金となる。また、サルコペニアはフレイルの一因となるため、サルコペニアの予防は、本邦のような高齢社会における QOL の向上や健康寿命を延伸するために重要な課題である。近年の疫学調査から、鉄摂取不足による貧血（鉄欠乏性貧血）がフレイルやサルコペニアの危険因子となる可能性が示されており、骨格筋量や筋力の維持に鉄が重要な働きを担っている可能性が考えられる。そこで、本研究では、鉄栄養状態が骨格筋のタンパク質代謝に及ぼす影響について検討を行った。

【方法】SD 系雄性ラットに対し、普通食または鉄欠乏食を 3 週間摂取させた。食事介入後、電気刺激による筋収縮を行い、タンパク質合成およびタンパク質合成シグナル経路を解析した。

【結果】3 週間の鉄欠乏食摂取により、ヘマトクリットおよびヘモグロビン濃度が顕著に低下した。また、骨格筋の総鉄含量と鉄含有タンパク質（シトクロム c）が低下した。普通食を摂取したラットでは、筋収縮によるタンパク質合成およびタンパク質合成促進シグナルの活性化が認められたが、鉄欠乏食を摂取したラットでは、これらの増加が抑制された。

鉄欠乏が骨格筋のタンパク質合成に及ぼす影響

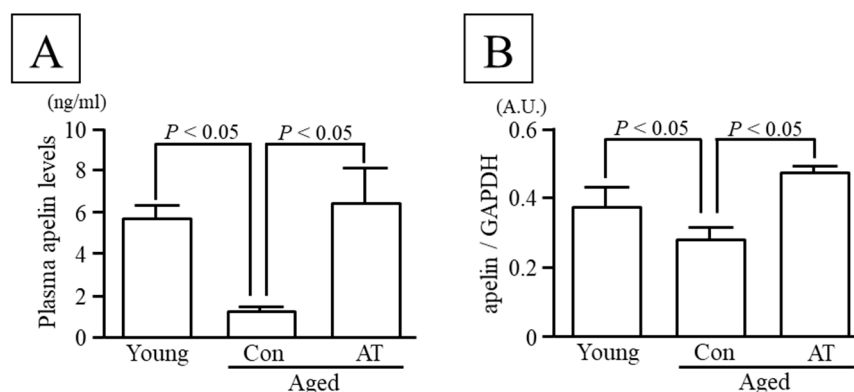


【目的】有酸素性トレーニングによる動脈硬化度の低下効果のメカニズムに血管内皮由来の血管拡張物質である一酸化窒素 (Nitric Oxide : NO) が関与する。骨格筋から分泌される生理活性物質・マイオカインは自己作用だけでなく、血液を介して脂肪細胞や骨細胞といった他臓器にも作用する可能性が報告されている。最近では、マイオカインが動脈血管にも作用して、動脈機能に影響する可能性が報告されている。しかしながら、習慣的な運動刺激によって誘発されるマイオカインが動脈硬化の低下効果に関与するか否かの検討は国内外を見ても明らかとなっていない。そこで、本研究では、これまでの我々のヒト研究の成果を基盤として、動物実験を用いて、習慣的な有酸素性運動によるマイオカイン分泌の変動が血液を介して動脈硬化度を低下させるか否か検討することを目的とした。本報告書では、検証を試みた複数のマイオカインのうち、最も解析の進んだ **apelin** に着目して報告することとした。**apelin** は動脈血管の内皮型 NO 合成酵素 (endothelial NO synthase : eNOS) を増加調節し、動脈血管の NO 産生の調節に関与することが報告されている。我々は、これまでに、中高齢者における 8 週間の有酸素性トレーニングが血中 **apelin** 濃度を増大させ、その増大は動脈硬化度の低下効果と相関関係があることを明らかにしてきた。

【方法】本研究では、老化促進モデルマウスである 38 週齢の雄 SAMP1 マウスを老齢モデルマウスとして、12 週間の有酸素性トレーニング (回転車輪を用いた自発走) を行う老齢運動 (Aged-AT) 群と同期間安静飼育する老齢安静 (Aged-Con) 群の 2 群に分割した。さらに、加齢の影響を検討するために 13 週齢の雄 SAMP1 マウスを若齢マウスとし、若齢 (Young) 群として、12 週間安静飼育した。動脈血管の内皮機能は、等容性ミオグラフを用いて、動脈血管に対して血管内皮依存性血管弛緩作用を有するアセチルコリン (ACh) を添加することで評価した。骨格筋 **apelin** タンパク発現や動脈血管 Akt および eNOS リン酸化は Western blot 法、血中 **apelin** 濃度は ELISA 法、動脈血管の nitrate/nitrite (NOx : NO の代謝産物) 濃度は Griess 法で測定した。

【結果】血管標本に対して血管内皮依存性血管弛緩作用を有する ACh を 10^{-9} M~ 10^{-4} M まで濃度依存的に添加した結果、すべての群において有意な血管拡張作用は認められ、Young 群よりも Aged-Con 群の同量の ACh 添加に対する血管拡張率は有意に低値を示していたが、Aged-AT 群の同量の ACh 添加に対する血管拡張率は Aged-Con 群よりも有意に高値を示した ($P<0.05$)。Aged-Con 群の動脈血管の Akt リン酸化、eNOS リン酸化、NOx 濃度は、Young 群と比較して有意に低値を示したが、Aged-AT 群の Akt リン酸化は Aged-Con 群と比較して有意に高値を示した ($P<0.05$)。加えて、Aged-Con 群の血中 **apelin** 濃度および骨格筋 **apelin** タンパク発現は、Young 群と比較して有意に低値を示したが、Aged-AT 群の血中 **apelin** 濃度は Aged-Con 群と比較して有意に高値を示した ($P<0.05$)。さらに、血中 **apelin** 濃度と骨格筋 **apelin** タンパク発現 ($r=0.526$, $P<0.05$)、動脈血管の eNOS リン酸化 ($r=0.562$, $P<0.05$) および動脈血管の NOx 濃度 ($r=0.553$, $P<0.01$) とは有意に正の相関関係が認められた。

血中 **apelin** 濃度および大腿四頭筋 **apelin** タンパク発現の群間比較

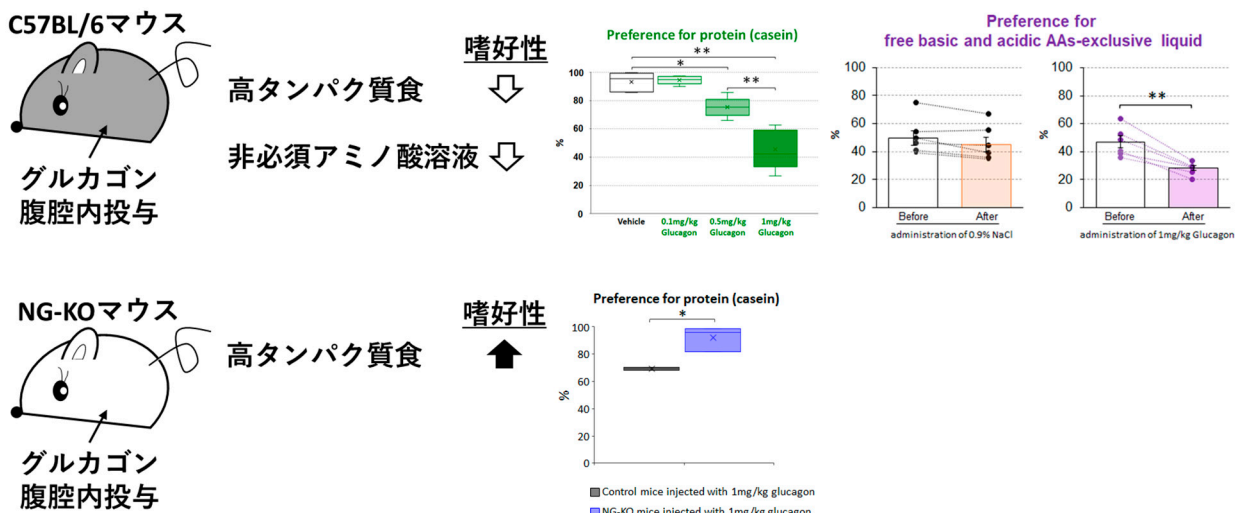


【目的】 ヒトを含む生物は、栄養素を摂取し代謝することで生体の恒常性を維持しており、各栄養素に対する個別の食欲を持っている。生命維持にとって最も重要なタンパク質に対する食欲が、エネルギー摂取とは別個に調節されていることが昔から知られているものの、その調節機序は全く未解明である。タンパク質の需給を脳に伝える代謝性シグナル、および、脳内での調節責任領域のどちらも解明されていない。近年、主に膵臓α細胞で合成・分泌されるグルカゴンの主要かつ特異的生理作用は、アミノ酸代謝の恒常性維持であることが提唱されている。このことから、グルカゴンはアミノ酸の恒常性を維持するために、タンパク質の食欲制御に関わると着想した。そこで本研究では、未解明である「タンパク質に対する食欲」の調節機序を、グルカゴンをツールとして利用して解明することを目的とする。

【方法】 9週齢雄 C57BL/6 マウスに 0.1、0.5、1 mg/kg body weight のグルカゴンを腹腔内 (ip) 投与し、普通食 (NC) vs. 高タンパク質食 (HP : カゼイン)、高脂肪食 (HFD) および高ショ糖食 (HSD) の食餌選択試験を行った。次に、9週齢雄 C57BL/6 マウスに 1 mg/kg body weight のグルカゴンを ip 投与し、経時的な食餌選択 (NC vs. HPD) の変化を観察した。さらに、9週齢雄 C57BL/6 マウスに 1 mg/kg のグルカゴンを ip 投与し、二瓶選択試験を行った。試験溶液には 1%カゼイン中に含まれるアミノ酸組成で作製した必須アミノ酸と非必須アミノ酸溶液を用いた。また、神経特異的に Cre を発現する *Tau-Cre* マウスと *Gcgr* (*glucagon receptor*) *-flox* マウスを交配し、神経特異的 Gcgr ノックアウト (NG-KO) マウスを作製した。作製したマウスを用いて、NC vs. HPD の食餌選択試験を行った。

【結果】 0.5、1 mg/kg グルカゴン投与で顕著なタンパク質嗜好性抑制作用が認められた。他方、同様の検証を高ショ糖食、高脂肪食でも行ったが、それらの食餌に対する嗜好性の変化は認められなかった。さらに、グルカゴンによるタンパク質嗜好性効果は、投与してから 10 時間経過後に認められた。二瓶選択試験の結果は、グルカゴン投与で非必須アミノ酸溶液に対する嗜好性抑制作用が認められた。他方、必須アミノ酸溶液に対する嗜好性の変化は認められなかった。また、NG-KO マウスへの 1 mg/kg グルカゴン投与は、グルカゴンによるタンパク質嗜好性抑制効果が認められなかった。

グルカゴンはタンパク質の摂取を調節している



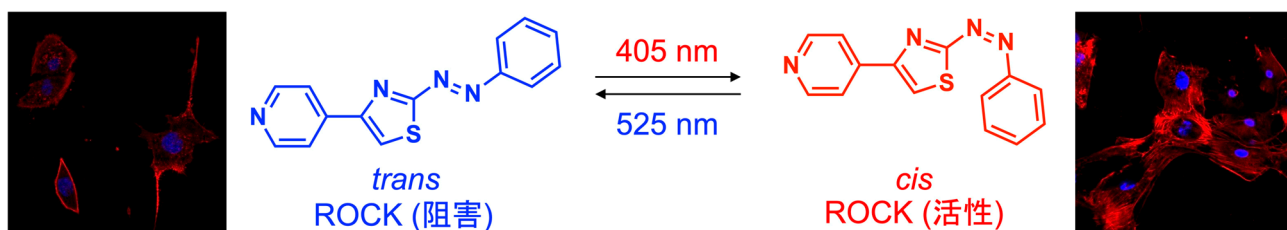
120 細胞内構造体を光操作する分子ツールの開発	松尾 和哉
--------------------------	-------

【目的】細胞分裂は、1つの親細胞が2つの等価な娘細胞へ分かれる現象であり、細胞核分裂と細胞質分裂に分かれる。細胞分裂の一連の流れとして、遺伝情報の発現や伝達などにおいて中心的な役割を果たす染色体（DNA・タンパク質複合体から成る構造体）が複製された後、均等に分配される細胞核分裂と、細胞膜が収縮環（ミオシンとアクチンから構成される構造体）によってくびり切れ、細胞質が等価に分配される細胞質分裂が連続して起こる。ところが、染色体や細胞質が不均一に分配され、非対称な細胞分裂が生じると、細胞は異常分化し、癌の発生など重篤な病態を引き起こす要因となる。細胞分裂は様々なタンパク質によって駆動されるが、本研究では、我々がこれまでに独自に確立してきた細胞分裂関連酵素の可逆的な光制御法を応用し、細胞質分裂で機能する ROCK（Rho-associated protein kinase）の活性を、「光」で可逆的に制御できる阻害剤を開発することを目的とした。

【方法】既存の ROCK 阻害剤を参考に、光で可逆的に *cis/trans* 異性化反応を誘起できるフォトクロミック部位を導入した光制御型 ROCK 阻害剤を、ドッキングシミュレーションを利用し、設計・合成した。得られた光制御型 ROCK 阻害剤の光異性化反応の解析を行い、各光定常状態における精製 ROCK の阻害活性の *in vitro* 試験を行なった。また、ウェスタンブロッティング法により細胞内の ROCK を阻害できるか否かをミオシン軽鎖のリン酸化状態で確認した。さらに、光制御型 ROCK 阻害剤を用い、細胞内アクチンストレスファイバーの維持および崩壊を光制御できるかを蛍光イメージングにて検討した。

【結果】ドッキングシミュレーションの結果、*trans* 体が効果的な ROCK 阻害剤として機能し、*cis* 体は ROCK 阻害効果が低いことが示唆された。実際に、合成した光制御型 ROCK 阻害剤に 405 nm の光を照射すると、*cis* 体 rich な光定常状態（94% *cis* 体）となり、525 nm の光を照射すると、*trans* 体 rich な光定常状態（83% *trans* 体）となった。また、精製 ROCK を用いて阻害活性を測定した結果、光照射前の状態（100% *trans* 体）で $IC_{50}=19\mu M$ 、525 nm の光照射時には $IC_{50}=34\mu M$ で阻害したのに対し、405 nm の光照射によって $IC_{50}=238\mu M$ と大きく阻害効果が減弱し、ドッキングシミュレーションの結果を支持するものであった。次に、光制御型 ROCK 阻害剤を細胞に投与し、各波長の光照射の有無によって、ROCK 依存的なミオシン軽鎖のリン酸化状態を検証した結果、光照射前あるいは 525 nm の光照射時にはミオシン軽鎖のリン酸化を阻害し、405 nm の光照射時にはその阻害効果は消失した。以上から、開発した光制御型 ROCK 阻害剤は、*in vitro* だけでなく、細胞系でも機能することを明らかとした。最後に、光制御型 ROCK 阻害剤を用いて、ROCK が関与する細胞内のアクチンストレスファイバーの崩壊・維持を蛍光イメージングによって検討し、光照射前および 525 nm の光照射時には、アクチンストレスファイバーは崩壊し、405 nm の光照射時には ROCK 阻害剤を添加していない条件と同様に、アクチンストレスファイバーが維持されることを見出した。以上から、本研究によって、細胞内構造体であるアクチンストレスファイバーの崩壊・維持を光操作できる分子ツールの開発に成功した。

光制御型 ROCK 阻害剤によるアクチンストレスファイバーの光操作

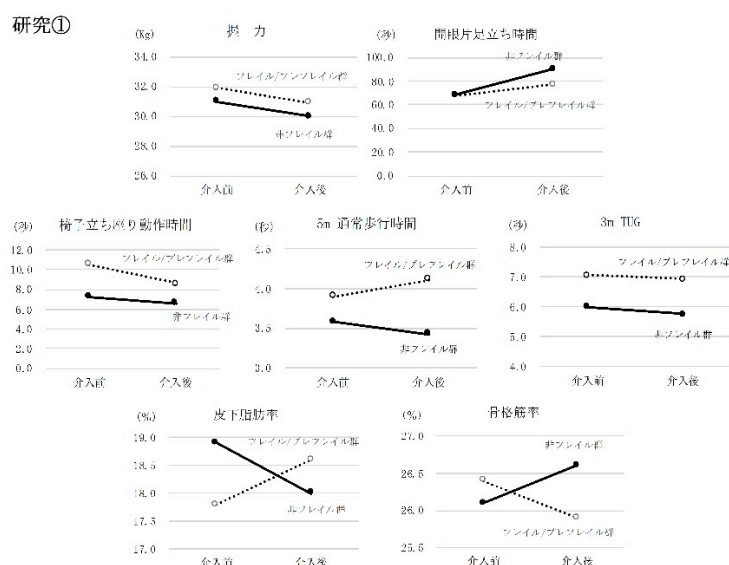


【目的】 後期高齢者における要介護の原因の1位は老衰（フレイル）であり、2020年度よりフレイル健診が開始されるなどフレイル予防への取り組みが急速に進んでいる。本研究では、地域在住高齢者を対象として、①IoTを活用した口腔機能向上プログラムが口腔機能および身体機能に与える影響、②口腔機能プログラムの提供方法による介入効果の違いを検討することを目的とした。

【方法】 研究①：地域在住高齢者49名を対象として、3か月間の舌等尺性運動による口腔機能向上プログラムを実施した。身体機能測定（BMI、身体組成、握力、5m歩行速度、5回椅子立ち上がり時間、開眼片足立ち時間、3mタイムアップ・アンド・ゴー（TUG））、および口腔機能測定（最大舌圧、舌口唇運動機能（ODK））を実施した。介入方法は、週3回の訓練器を用いた舌の等尺性運動を指示した。介入前後での変化、およびベースライン時における身体的プレフレイル/フレイル群および非フレイル群に分け、2群間における口腔機能及び身体機能の変化の違いを検討した。研究②：最大舌圧が30kPa未満であった65～79歳の高齢者26名を研究対象とした。口腔機能プログラムは、タブレット端末の動画を見ながら行う方法（IoT群）と、その動画を静止画として記載した紙媒体を用いる方法（紙媒体群）とし、ランダムに対象者の割付を行った。口腔機能評価として、舌苔付着状態、口腔乾燥、最大舌圧、ODK、咀嚼機能、最大咬合力を評価した。また、身体機能評価として、BMI、InBodyによる身体組成、握力を測定した。さらには、食習慣、栄養状態（BDHQ）、生活習慣に関する質問紙調査および認知機能検査を実施した。口腔機能向上プログラムは、準備体操、7種類の口腔周囲筋の筋力トレーニングを含んでおり、介入期間中は週3回実施するよう指示をした。紙媒体群の対象者にはIoT群で用いるプログラムと同内容を示した運動マニュアルを配布し、同様に週3回のプログラムを行うように指示した。

【結果】 研究①：身体的フレイル/プレフレイル群と非フレイル群を比較した二元配置分散分析において、時間の主効果が認められた項目は、最大舌圧、ODK（/pa/、/ta/、/ka/）、握力、開眼片足立ち時間、椅子立ち座り時間であった（ $P<0.05$ ）。群間の主効果が認められた項目は、椅子立ち座り時間、5m通常歩行時間および3mTUGであった（ $P<0.01$ ）。皮下脂肪率、骨格筋率では、非フレイル群において有意な改善を認めた（ $P<0.05$ ）。研究②：IoT群および紙媒体群における口腔機能の変化について二元配置分散分析を行った結果、いずれの項目においても、群間における主効果は認められなかった。

フレイル/プレフレイル群および非フレイル群における介入前後の身体的変化

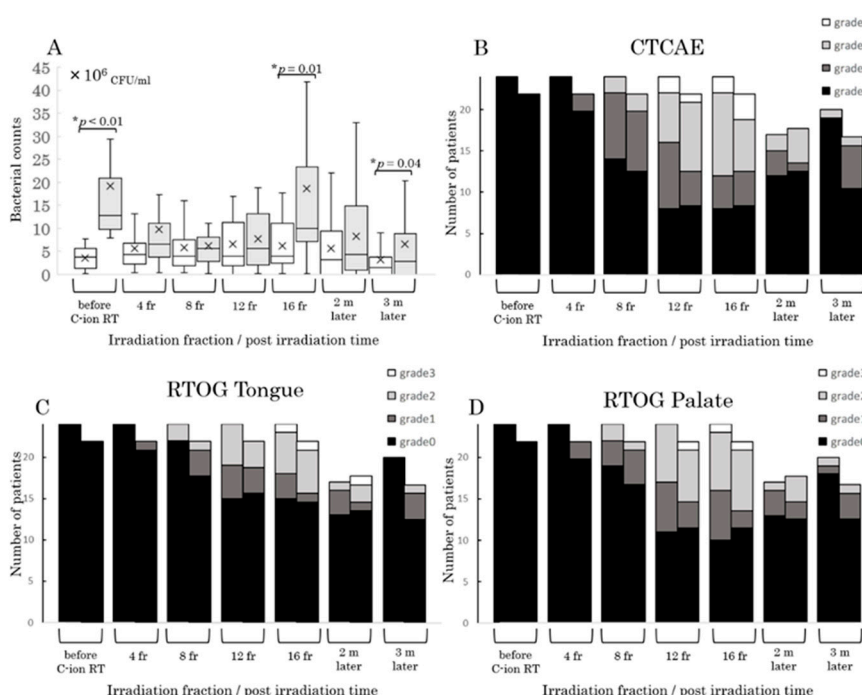


【目的】 患者個々に作成された放射線治療計画から粘膜モデルを作製することで、粘膜炎の発症を事前に把握することが可能である。それにより粘膜炎の発症部位を事前に情報共有することで、患者指導や医療従事者への情報提供としても視覚的に訴えることが可能である。粘膜モデルにて粘膜炎発症線量付近の部位がある場合、口腔清掃状況により口腔細菌による口腔の粘膜炎拡大を予防できる可能性も期待されることから、看護介入の一手段として、粘膜モデルと粘膜炎発症の推移に併せて、口腔細菌数との関連について検討した。

【方法】 2017～2019年に群馬大学重粒子線医学センターで頭頸部領域の重粒子線治療（16回分割）を施行した46名が前向き研究として登録された。重粒子線治療中に発症する粘膜炎の検討部位は口蓋及び舌とし、MIM Maestro ver.6.0.2（MIM Software Inc.USA）にて口腔粘膜線量を3次元的に表した粘膜モデルを作製し、患者個々の粘膜面への線量を解析した。粘膜炎については治療開始より経時的にCTCAE version 4.0とRTOG grading systemにて評価した。口腔細菌数の計測は細菌カウンタ（パナソニックヘルスケア社）を使用し、唾液および舌背部より検体を採取し計測した。計測は治療開始前、治療回数4回毎、治療後2及び3か月後に経時的に施行した。粘膜炎発症の経時的推移と粘膜への照射線量、口腔細菌数との関連を解析した。

【結果】 口蓋と舌の粘膜炎は治療開始後に徐々に増加し、16回の照射完了後、粘膜炎 grade は3ヶ月間にわたり徐々に低下した。唾液中の平均細菌数は、開始時から徐々に増加し、16回で最大値となった。一方、舌背部の平均細菌数は、開始時に既に高かったが、治療の継続により減少し、16回で最大値となり、その後減少した。口腔内細菌数は患者によってばらつきがあり、治療前の舌背部における口腔内細菌数の平均値は 7.8×10^6 （最大値： 60.0×10^6 、最小値： 2.3×10^6 ）CFU/mLであった。ばらつきの多さから、舌背部細菌数を平均値より高値と低値の2群に分類し、追加解析した。高値群では、舌背部の細菌数は治療開始前から照射8回まで徐々に減少し、その後増加、16回でピークとなった。一方、低値群では変化が見られなかった。粘膜炎の重症度のピークはいずれの基準でもほぼ同等であったが、高値群では低値群に比べ粘膜炎の発症が早く、治癒も遅い傾向であった。特に舌背の口腔内細菌数の経時的推移と粘膜炎の経時的推移のグラフは類似していた。

舌背部の細菌数別の細菌数の経時的推移と細菌数別の粘膜炎の経時的推移

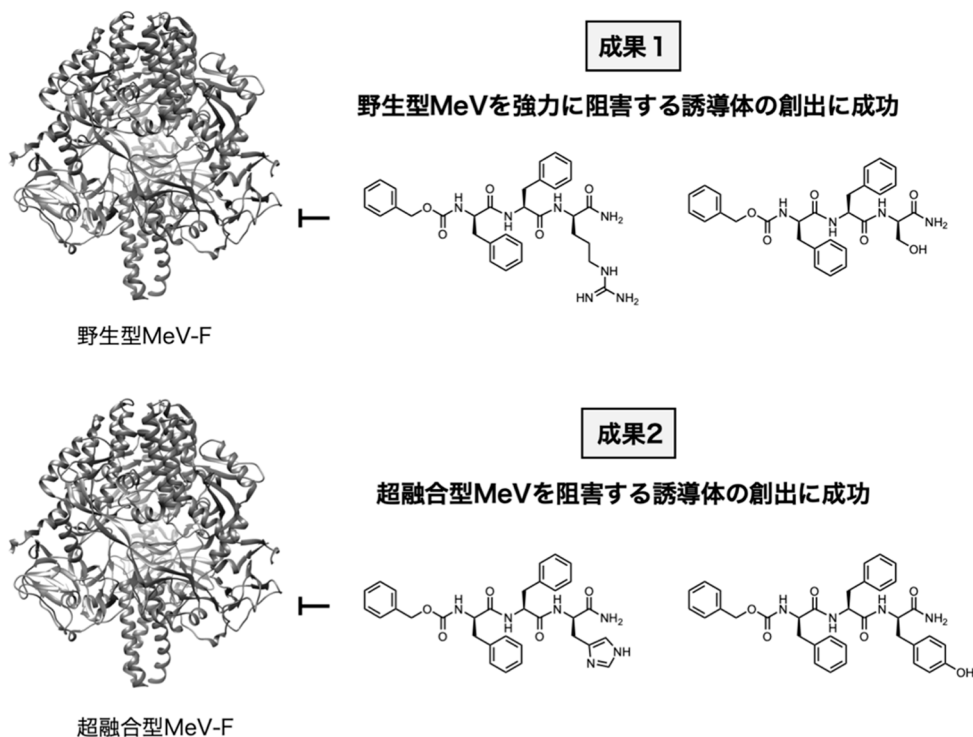


【目的】 本研究では、麻疹ウイルスに対する感染阻害剤として知られる融合阻害ペプチド (FIP : Fusion Inhibitor Peptide) の構造展開を行い、より活性が高く、超融合型麻疹ウイルスに対しても阻害効果を発揮する阻害剤の開発を試みた。

【方法】 本研究では、まず、FIP とその誘導体をペプチド固相合成法により合成し、HPLC により精製することによって、調製した。次に、これらの化合物の阻害活性を、細胞融合実験をもとに評価した。細胞融合実験で有望な結果を示した化合物については、共同研究先において、ウイルス感染の阻害アッセイについてもを行い、阻害活性を評価した。さらに、これらの化合物の構造活性相関を理解するために、各化合物と MeV-F との結合親和性の測定や MeV-F の熱安定性に対する効果など物理化学的な物性の評価を行った。

【結果】 細胞融合アッセイの結果、合成した誘導体のうち 7 つについて FIP よりも低濃度で阻害活性を示し、阻害活性が向上していることを確認した。これらの化合物は、ウイルス感染の阻害アッセイにおいても FIP よりも高い阻害活性を示した。特に、最も強い阻害活性を示した 2 種のペプチドについては、FIP よりも 10 倍低い IC_{50} の値を示した。さらに、超融合型変異体の MeV-F を用いた細胞融合実験の結果、別の 2 種のペプチドが、FIP よりも低濃度で阻害活性を示した。本研究から、ペプチド性阻害剤である FIP は、合成が容易であることから多数の誘導体を容易に調製することが可能であり、それによって、超融合型変異体を含む MeV-F を強力に抑える阻害剤を創出することが可能であることが示された。今後、今回の誘導体化によって阻害活性が向上した理由を明らかにしていくことによって、さらに強力な阻害効果を示す FIP 誘導体や他の超融合型変異体の MeV-F にも有効な阻害剤が創出されると期待される。これらの阻害剤は、野生型と超融合型変異体の双方の MeV 感染に対して、有望な治療薬の候補となることが期待される。

本研究成果の概要

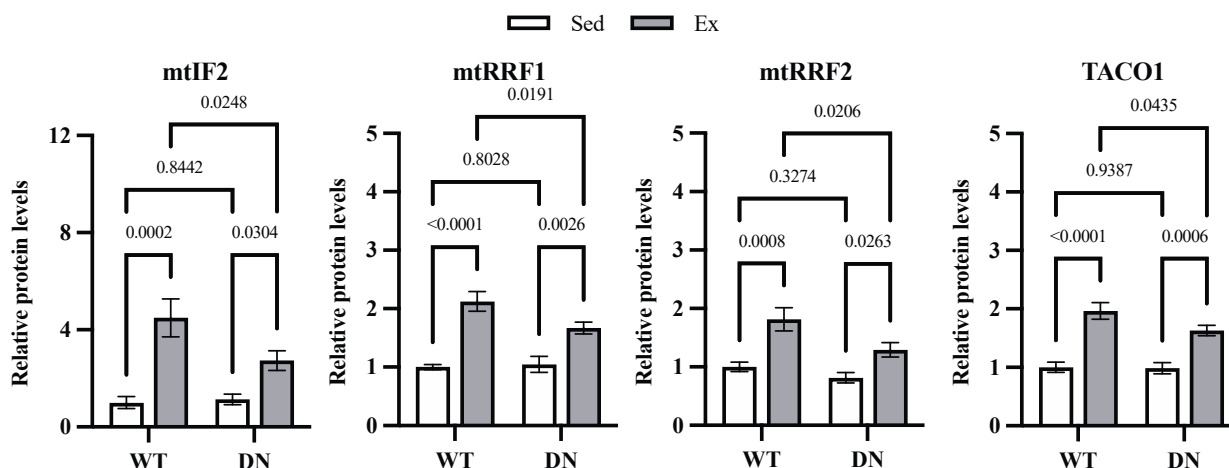


【目的】ミトコンドリア機能・生合成を制御する因子として、ミトコンドリア DNA (mtDNA) に由来するタンパク質の翻訳制御分子(ミトコンドリア翻訳因子)が報告されている。骨格筋のミトコンドリア翻訳因子は運動により増加することが明らかとなっているが、その分子機序は不明である。運動により活性化する骨格筋の 5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) は、ミトコンドリア生合成を制御することが示唆されている。以上より、本研究では運動による mtDNA 由来タンパク質ならびにミトコンドリア翻訳因子の発現亢進に骨格筋 AMPK が関与する可能性を検討することを目的とした。

【方法】骨格筋特異的ドミナントネガティブ変異体 AMPK α 発現 (AMPK-DN) マウスならびに野生型マウスに 4 週間の自発性走運動を施した後、ヒラメ筋・足底筋・腓腹筋をサンプリングした。足底筋を用いて、核ならびに mtDNA にコードされているミトコンドリアタンパク質・ミトコンドリア生合成の制御因子である peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 (PGC-1) ファミリー・ミトコンドリア翻訳因子の発現量をウェスタンブロット法により測定した。

【結果】野生型マウスでは、4 週間の自発性走運動によりミトコンドリアタンパク質・PGC-1 ファミリー・ミトコンドリア翻訳因子の包括的な増加が観察された。一方で、AMPK-DN マウスでは、核 DNA 由来のミトコンドリアタンパク質である mitochondrial NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 8 (NDUFB8)・ATP synthase subunit alpha (ATP5A)、mtDNA 由来の mitochondrial cytochrome c oxidase 1 (MTCO1)、AMPK 依存的に制御されている PGC-1 α の自発性走運動による発現増加が減弱していた。加えて、ミトコンドリア翻訳因子のうち、mitochondrial initiation factor 2 (mtIF2)・mitochondrial recycling factor (mtRRF) 1・mtRRF2・translational activator of cytochrome c oxidase 1 (TACO1) についても、運動に伴う発現増加の抑制が AMPK-DN マウスにて観察された。従って、骨格筋 AMPK は運動トレーニングに伴うミトコンドリア翻訳因子の増加・ミトコンドリア生合成の亢進に関与することが示唆される。

AMPK シグナルの抑制により運動誘導性のミトコンドリア翻訳因子の増加が減弱する

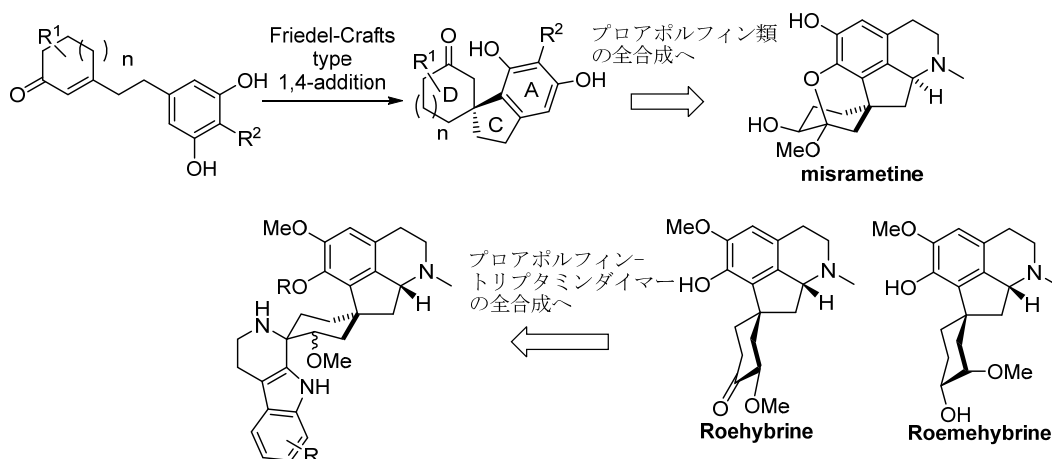


【目的】プロアポルフィンアルカロイドは、スピロインダン-シクロヘキサジエノン構造を有するアルカロイドである。1985年に初めて(−)-mecambrineが単離されて以来、多くの類似化合物が単離されている。構造がモルヒネに類似するこれらの化合物は、 α -あるいは β -アドレナリン作動遮断作用や鎮静作用等いくつかの生物活性が報告されている。しかしながら、光学活性体としての全合成例は我々の研究開始当初にはなく、これら化合物の精密な生物活性の報告例は非常に少ない。昨今の医療現場においてがん疼痛の緩和や終末期医療の際、モルヒネ等のオピオイド化合物が頻用されるが、そのもっとも懸念される副作用は中毒性、依存性である。そのため依存性のない強力な疼痛抑制薬の開発は常に望まれている。プロアポルフィンアルカロイド類は医薬品として用いられるアポモルヒネの生合成中間体として知られ、中にはモルヒネに類似する構造を有するものが存在する。そのため、強力な疼痛薬のリード化合物になれる潜在的な能力を秘めている。しかしながら、プロアポルフィンアルカロイド類はその構造中に全炭素不斉四級炭素を含め、連続する不斉点をもつものが多い。全炭素不斉四級炭素の効率的あるいはエナンチオ選択的な構築法の開発は現在でも容易でなく、有機合成における重要な研究課題となっている。そのため、がん疼痛に対してプロアポルフィンアルカロイド類を用いてスクリーニング評価を行うためには、天然物および類縁体を効率よく入手するための全炭素不斉四級炭素の新規合成法の開発および複数の天然物が合成可能な多様性をもたせた合成ルートの確立の可否が重要となる。そこで我々は、様々な置換様式を持つスピロインダンおよびスピロテトラリンの効率的合成の開発と、その反応を用いることで、プロアポルフィンアルカロイドおよびプロアポルフィン-トリプタミンダイマー類を網羅的に全合成することを目的とする。

【方法】天然物および類縁体を効率よく入手するために全炭素不斉四級炭素の新規合成法の開発を行った。さらにその方法を用いてプロアポルフィンアルカロイドおよびプロアポルフィン-トリプタミンダイマー類を網羅的に全合成可能なルートの検討を行った。

【結果】本研究では、まず様々な置換様式を持つスピロインダンおよびスピロテトラリンの効率的合成の開発に取り組んだ。環状 α , β -不飽和ケトンの β 位と芳香環がエチレン鎖でつながった化合物に対して触媒Friedel-Crafts型の1,4付加反応が効率的に進行する条件を検討した。その結果、トリフルオロメタンスルホン酸(TfOH)をトルエン溶媒中で基質に対して30 mol%用いると反応が円滑に進行することが分かった。つづいて反応条件をもとに基質適用反応を検討した結果、様々な置換基を有する基質に対して反応は円滑に進行することが分かった。これを基盤としてプロアポルフィンアルカロイドの中でも特異な五環性骨格を有するミスラメチンの全合成に成功した。本全合成は官能基選択的な脱メチル化反応を鍵とした。さらに、プロアポルフィン-トリプタミンダイマー類を網羅的に全合成すべく、そのプロアポルフィン部位であるロエヒブリンの全合成に着手し、立体化学の整った四環性骨格を合成することに成功した。

全炭素不斉4級炭素合成からプロアポルフィン類の全合成へ



【目的】 必須微量栄養素セレン (Se) は、抗酸化酵素の活性中心に存在するなど、生体内で重要な機能を果たしている。しかし、生体内でのセレンの輸送や代謝過程には不明な点も多く残されている。著者らは、これまでにタンパク質の遊離チオール基と、亜セレン酸の代謝中間体であるセレノトリスルフィドのチオール交換反応が、血中でのセレンの輸送に関与していることを報告している。さらに、ラットの複数の臓器から、肝臓型脂肪酸結合タンパク質 (L-FABP) や、ミオグロビン (Mb)、peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A (PPIase A) などの複数のセレン結合性タンパク質を検出してきた。本研究では、セレンの代謝や輸送過程を明らかにするため、これらのセレン結合性タンパク質がセレン輸送などに関与する可能性を検討した。

【方法】 3~5 週齢雄性 Wistar ラットから摘出した脊髄後根神経節 (DRG) 細胞およびヒト肝臓がん由来 HepG2 細胞へ種々のセレン化合物を添加して一定時間培養後、細胞質のセレン含有酵素グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) 活性の測定、細胞内セレンの定量、細胞内セレン結合性タンパク質の発現量を調べた。また、購入もしくはラット臓器から得られたセレンと反応性を有するチオール基を含むタンパク質と、セレン化合物を反応させ、セレンを結合したタンパク質を調製し、細胞への添加および他のセレン結合性タンパク質との反応により、セレン結合性タンパク質に結合したセレンの反応性を検討した。

【結果】 ラット DRG 細胞および HepG2 細胞に種々のセレン化合物を添加して培養した結果、細胞内セレン濃度が上昇し、セレン含有酵素 GPx の活性が上昇した。特に、タンパク質に結合させたセレンも、亜セレン酸などの低分子セレン化合物と同様に細胞に取り込まれ、セレン含有酵素の生合成に利用されたと考えられた。しかし、細胞内のセレン結合性タンパク質である、PPIase A や L-FABP の細胞内の発現には大きな変動は見られなかった。一方、著者らがこれまでに検出したセレン結合性タンパク質に、セレノトリスルフィドを介して結合したセレンは、他のセレン結合性タンパク質へ移行できることが示された。以上のことから、これらのセレン結合性タンパク質が、セレンの輸送に関与している可能性が示された。

セレン結合性タンパク質とチオール交換反応

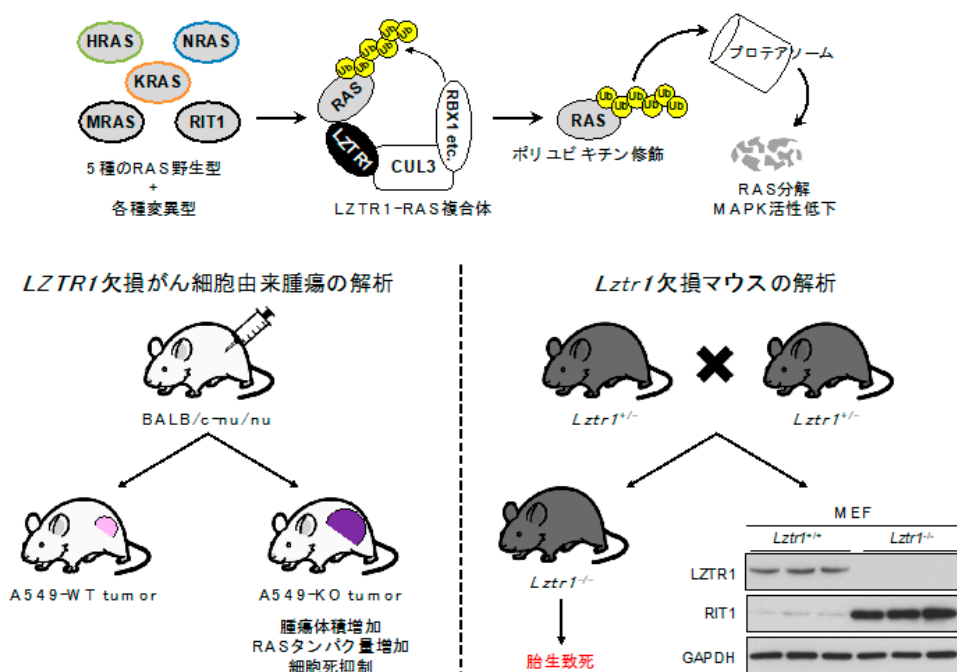


【目的】 がん原遺伝子産物 RAS の遺伝子変異はがんの約 30%で同定され、RAS は腫瘍増殖における重要なドライバー因子であり組織分化、免疫など多種多様な恒常性維持に寄与している。RAS の活性化レベルは、GTP が結合した活性化型と GDP が結合した不活性化型を交互に繰り返す GTP/GDP-サイクルにより制御されるとの考えが一般的である。最近我々は、CUL3 型ユビキチン E3 リガーゼの基質アダプターとして機能する LZTR1 (leucine zipper like transcription regulator 1) はユビキチン・プロテアソーム経路を介して RAS の分解を促し MAPK シグナル活性化を抑制するという新規活性化制御機構を報告した。他方、*LZTR1* 遺伝子変異は RAS/MAPK シグナル経路に生殖細胞系列の遺伝子変異が挿入されることで先天性心疾患、骨格異常、精神発達遅滞、易発がん性など多彩な症状を呈する遺伝性先天奇形 Noonan 症候群を引き起こす。しかしながら、*LZTR1* 機能障害による RAS の恒常性維持機構 (プロテオスタシス) の破綻が腫瘍増殖や個体発生に与える影響は未だその詳細は明らかとなっていない。以上を踏まえ本研究では、1. *LZTR1* 欠損による RAS 依存性腫瘍増殖との関係性、2. RAS プロテオスタシスの破綻が個体発生に与える影響、2 点の解明を目的に研究を実施した。

【方法】 BALB/c-nu/nu マウスに非小細胞肺癌株 A549 細胞由来 *LZTR1* 欠損細胞と親株を皮下移植し腫瘍増殖能を評価し、*LZTR1* 欠損細胞の性質をプロテオミクス解析により解析した。*Lztr1* 欠損マウスを作製し、心臓肥大や骨格異常などの RASopathies 罹患者特有の表現系と RAS の異常蓄積の有無を解析した。

【結果】 xenograft model の解析により、*LZTR1* 欠損細胞では親株に比べて腫瘍増殖能が高く、pan-RAS や RIT1 の発現量が増加しており、TUNEL 陽性の細胞数が減少していた。プロテオーム解析の結果、*LZTR1* 欠損細胞では RAS ファミリー分子の発現が増加しており、細胞接着分子や上皮間葉転換関連分子の発現変動が抽出された。実際に *in vitro* での検討により *LZTR1* 欠損時には上皮間葉転換が促進されることが明らかになった。他方 *Lztr1* 欠損マウスでの解析では、*Lztr1*^{+/-}マウスは出生可能であるものの *Lztr1*^{-/-}マウスは胎生致死性を示し、マウス胎児由来線維芽細胞を用いた検討では *Lztr1* 欠損時に KRAS などの異常蓄積が認められた。KRAS の異常活性化はマウスの胎生致死を引き起こすことが知られており、*LZTR1* 機能障害による RAS プロテオスタシスの破綻は発生段階での異常を引き起こすことが示唆された。

本研究の概要と結果

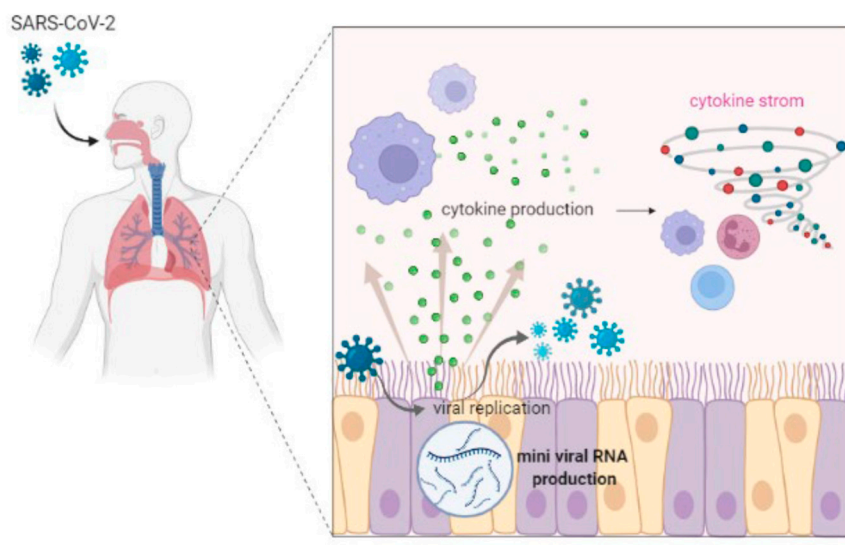


【目的】自然界には様々な病原ウイルスが存在し、それぞれが特有の宿主をもつ。ウイルスはその進化の過程で変異を繰り返しており、変異の蓄積により時に特有の宿主と異なる新しい宿主への感染性を獲得する。現在ヒトで流行する季節性コロナウイルスや季節性インフルエンザウイルスも従来はラクダや水菌類などの野生動物を起源とし、長い間ヒトで流行する過程で完全なヒト適応性を獲得し、ヒトへの病原性や致死率を低下させた。一方で新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) や新型インフルエンザウイルスのように新興ウイルスがヒトにおいて初めて検知された際、ウイルスは本来の宿主からヒト宿主への適応過程の過渡期にあるため、ウイルスによるヒトへの病原性は高い傾向にある。現在世界で流行する SARS-CoV-2 は、重症肺炎・血栓症を伴うサイトカインストームによって重症化病態を引き起こす特徴をもつ。しかし、現在までに当該重症化メカニズムに関わるウイルス学的要因は解明されていない。本研究では SARS-CoV-2 がヒト宿主への適応過渡期の新興ウイルスである点に着目して、一般的な風邪を引き起こすウイルスである季節性コロナウイルスと比較することによりその重症化メカニズムを解明することを目的とした。

【方法】サイトカイン産生を誘導するウイルス側の因子を探索するべく、SARS-CoV-2 が産生する 200 nt 未満の RNA に着目し、SARS-CoV-2 又は季節性コロナウイルス感染細胞から抽出した 200 nt 未満の RNA を small-RNA sequence により解析した。当該解析結果に基づき、SARS-CoV-2 が感染細胞内で産生する不完全なウイルス RNA (短鎖 viral RNA) 配列を同定し、当該配列を模した RNA を *in vitro* transcription (IVT) により合成した。IVT-RNA を細胞にトランスフェクションし、培養上清中のサイトカイン量を測定することにより RNA 配列及び長さによるサイトカイン誘導能の違いを検証した。さらに、これまで出現している SARS-CoV-2 変異株による短鎖 viral RNA の産生性を real time PCR により測定し産生量を比較した。

【結果】SARS-CoV-2 は季節性コロナウイルスと比較して多量に短鎖 viral RNA を細胞内に蓄積していた。これらの SARS-CoV-2 由来短鎖 viral RNA は細胞質内の RNA センサーに結合し、サイトカイン産生を誘導した。また、興味深いことに SARS-CoV-2 Wuhan 株及び Delta 株は短鎖 viral RNA の高い産生性を保有するにもかかわらず、SARS-CoV-2-Omicron 株においては当該 RNA の産生性は低い傾向にあった。

SARS-CoV-2 が産生する短鎖 viral RNA とサイトカイン産生

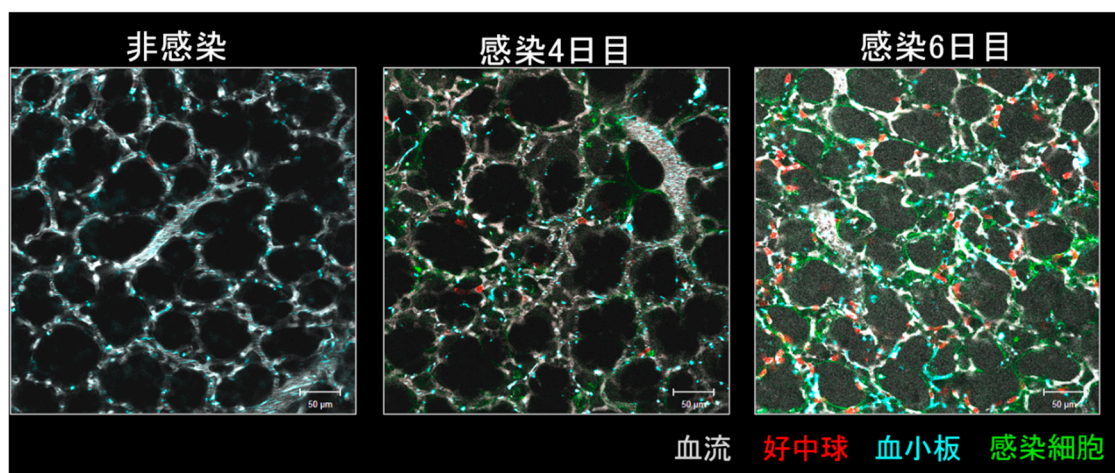


【目的】 2019年末に発生した新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) 感染症 (COVID-19) の世界的流行が続いている。COVID-19 症例の多くは、発熱、咳、鼻汁、咽頭熱などの軽い呼吸器症状でおさまるが、高齢者や基礎疾患を有する者などは重度のウイルス性肺炎を併発して重症化し、死に至ることも少なくない。重篤なウイルス性肺炎を呈した患者には、呼吸器症状や全身症状に応じた対処療法が行われるが、有効な治療法は確立していないのが現状である。COVID-19 重症例の肺では大量の免疫細胞の浸潤が認められ、病態の増悪に寄与することが示唆されているが詳細については不明である。SARS-CoV-2 の感染部位における炎症進展ならびに組織障害のメカニズムを解明するためには、感染から重症化に至るまでの感染個体の体内で起きている様々な生理学的事象を可視化して解析する必要がある。私たちはこれまでに、2光子励起顕微鏡を用いた生体イメージングシステムを開発したことで感染動物の肺を高解像度で観察し定量化解析が可能な実験系を確立してきた。本研究では、SARS-CoV-2 感染肺における免疫細胞の役割について、生体肺イメージングシステムを用いて解析し、COVID-19 肺炎の病態を解明することを目指した。

【方法】 本研究では SARS-CoV-2 に高い感受性を示すヒトアンジオテンシン変換酵素 2 (hACE2) 発現トランスジェニック (Tg) マウスに蛍光レポーターSARS-CoV-2 を感染させ生体イメージング解析に供した。肺の血流と好中球ならびに血小板を可視化するために蛍光 Dextran、蛍光標識抗 Ly-6G 抗体ならびに抗 CD41 抗体を経静脈的に投与した。感染マウスは麻酔下で管理し人工呼吸器で補助しながら開胸し、露出させた肺を肺吸引保定器で保持した。感染肺の病態生理学的な変化を、顕微鏡を用いてタイムラプス像として撮影し、画像解析ソフトを用いて定量化解析を行った。

【結果】 蛍光レポーターSARS-CoV-2 に感染した hACE2 Tg マウスの肺を観察すると、Venus 陽性の I 型肺胞上皮細胞と II 型肺胞上皮細胞が観察され、これらの肺胞上皮細胞種が SARS-CoV-2 に感染することが示された。蛍光標識 Dextran を hACE2 Tg マウスの血管内に投与すると血流が可視化され、Dextran の分子量を選択することで血管の透過性を評価することが可能である。血中アルブミン (66 kDa) とほぼ同程度の分子量の蛍光標識 Dextran (70 kDa) を投与すると、蛍光レポーターSARS-CoV-2 に感染した hACE2 Tg マウスの肺では Dextran の肺胞腔への漏出が認められた。その一方で、非感染マウスでは肺毛細血管からの蛍光標識 Dextran の漏出は認められなかった。また、SARS-CoV-2 に感染した hACE2 Tg マウスの肺では、肺毛細血管中の好中球の数が感染経過に従って増加し、その移動速度が低下することが示された。さらに、SARS-CoV-2 感染肺において好中球は血小板との複合体からなる微小血栓様の凝集塊が形成されることが明らかとなった。

SARS-CoV-2 に感染したマウス肺の生体イメージング



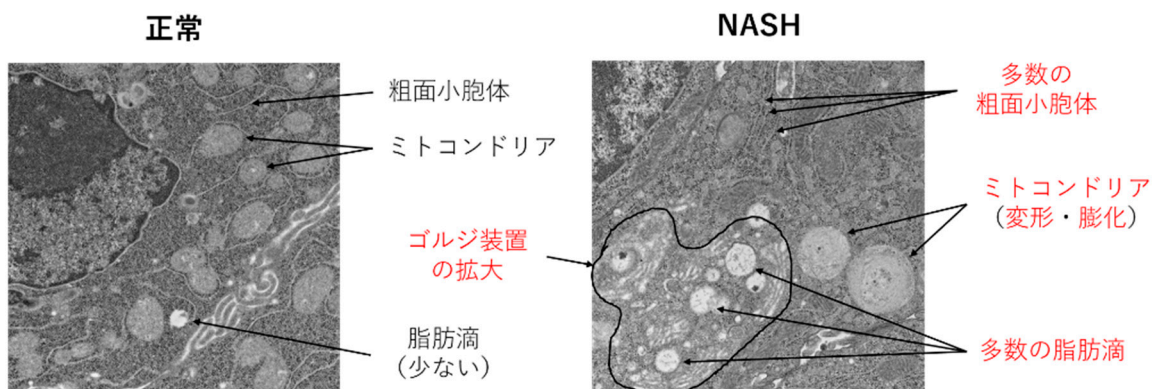
130	NASH病態進行における細胞内小器官異常機構の解明	臼井 達哉
-----	---------------------------	-------

【目的】 近年、アルコール非依存性に脂肪肝を発症し、将来的に肝硬変・肝がんに進行する非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) 罹患者が増加しており、国内には約 1,000 万人以上の患者およびその予備軍が存在する。NASH の前段階の病態である非アルコール性脂肪肝疾患 (NAFLD) 発症の最も重要な要因は肥満であり、糖尿病、脂質代謝異常、高血圧症などの生活習慣病や、性別、年齢、遺伝的素因も NAFLD/NASH の発症および進展に影響を及ぼすことが知られている。また、最近では酸化ストレスや小胞体 (ER) ストレス、ミトコンドリア機能異常、オートファジーおよび腸内細菌叢の変化なども NASH における肝線維化の進行に関与することが示唆されているが、治療法開発につながる詳細なメカニズムは明らかになっていない。そこで本研究課題では、我々が開発した NASH 肝臓オルガノイドを用いた詳細なメカニズム解明を進めることで、従来の NASH 研究とは異なる切り口で NASH 病態の改善につながる新たな治療薬開発や、有用な診断法の確立につなげることを目的とした。

【方法】 12 週齢の NASH モデルマウスの肝臓組織由来オルガノイドと正常マウスの肝臓組織由来オルガノイドを用いて電子顕微鏡による細胞内小器官の観察を行った後に、活性酸素種 (ROS) 産生、ミトコンドリア呼吸鎖関連分子の発現量の変化を比較した。さらにミトコンドリア融合あるいは重合タンパク質阻害剤を NASH モデルマウス由来肝臓オルガノイドに 6 日間処置した後に、オルガノイドの形態や、線維化関連遺伝子 collagen I および α -SMA 発現に及ぼす影響を検討した。

【結果】 NASH 肝臓オルガノイドにおいて正常肝臓オルガノイドに比べて脂肪滴および粗面小胞体の増加、ミトコンドリアの形態異常 (変形や膨化) が観察された。そこで、ミトコンドリア由来の ROS 産生を、mtSOX を処置して観察したところ、NASH 肝臓オルガノイドにおいてスーパーオキシド産生の増加が認められた。さらに、NASH 肝臓オルガノイドにおいてミトコンドリア分裂・融合関連タンパク質 MF1、DRP1 および OPA1 発現が亢進することが明らかになった。ミトコンドリア分裂阻害剤 Mdivi-1 を NASH 肝臓オルガノイドに 6 日間処置したところ、NASH 肝臓オルガノイドで特徴的に認められる樹状様形態を減少させ、オルガノイドの平均サイズを増加させた。さらに、Mdivi-1 処置は NASH 肝臓オルガノイドにおいて DRP1 タンパク発現を減少させ、Collagen I および α -SMA の mRNA 発現を抑制した。しかしながら、NASH 肝臓オルガノイドに OPA1 阻害剤を 6 日間処置した際には NASH 肝臓オルガノイドの形態変化には影響を及ぼさなかった。これらの結果から、我々が開発した NASH モデルマウス由来肝臓オルガノイドにおいてミトコンドリアの機能異常による活性酸素種の異常産生が線維化の進展に影響を及ぼすことが初めて明らかになった。

正常の肝臓オルガノイドと NASH 肝臓オルガノイドにおける細胞内小器官の構造比較

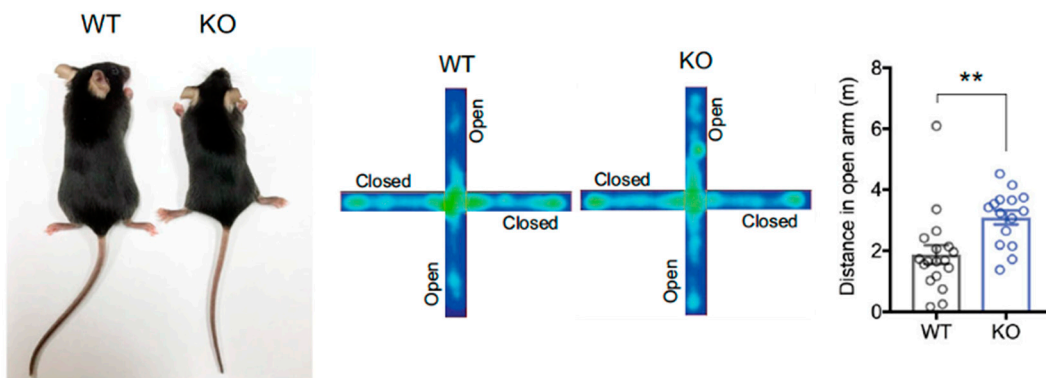


【目的】 統合失調症をはじめとする様々な精神疾患では衝動性の制御が障害されており、自殺行動、自傷行為、暴力、攻撃性、反社会性行動などの衝動性リスク行動が問題となっている。また、衝動性リスク行動は薬物やギャンブルなどの依存症だけでなく、思春期の若者にみられる社会的問題行動（暴力行為、無免許運転による事故など）とも深く関わっており、大きな社会問題となっている。本研究で着目している衝動性リスク行動は統合失調症など様々な精神疾患に見られる問題行動の一つである。衝動性リスク行動は衝動的な行動と、リスク行動の両方を意味しており、認知機能の低下によって行動にリスクが伴うのかを認知して判断する能力が低下している状態、または衝動性が高いために、結果としてリスクのある行動を冒してしまう状態の2通りが考えられる。統合失調症における衝動性は攻撃性に関連しており、関連する脳部位として背外側前頭前野、腹外側前頭前野、前帯状皮質、前頭眼窩野、および縫線核が報告されているが、詳しいことはわかっていない。そこで、本研究では統合失調症患者で変異が同定された *ZBTB16* 遺伝子のノックアウトマウスを用い、統合失調症における衝動性リスク行動の神経基盤を明らかにすることを目的とした。

【方法】 7 週齢雄の *Zbtb16* ノックアウトマウスを用いた行動解析、脳の組織学的解析、遺伝子発現解析を行った。行動解析ではオープンフィールド試験、高架式十字迷路試験、3チャンバー社会性相互作用試験、新規物体認識試験を行った。脳の組織学的解析では免疫染色によって大脳皮質の層構造と線条体を中心に解析を行った。遺伝子発現解析では RNA シークエンスによって前頭皮質の遺伝子発現解析を網羅的に解析した。

【結果】 *Zbtb16* ノックアウトマウスはオープンフィールド試験での中央部の行動量の増加、高架式十字迷路でのオープンアームの行動量の増加が観察されたことから、衝動性リスク行動を示すことを見出した。3チャンバー社会性相互作用試験では社会新規性の低下、新規物体認識試験では認知機能の低下が観察され、統合失調症様行動を示すことを見出した。また、*Zbtb16* ノックアウトマウスでは大脳皮質の層が薄くなっており、第6層の神経細胞数の減少と薄層化を、線条体では面積の減少を見出した。統合失調症の病態に白質が関わっていることから白質について解析したところ、*Zbtb16* ノックアウトマウスでは大脳皮質のミエリン形成領域が減少しており、ミエリン形成が障害されていることを見出した。さらに、前頭皮質の遺伝子発現解析の結果、*Zbtb16* ノックアウトマウスでは発現が変動する 533 個の遺伝子を同定し、これらの遺伝子が神経発生やミエリン形成に関わることを見出した。*Zbtb16* ノックアウトマウスで発現が低下した遺伝子は統合失調症患者の死後脳で発現が低下した遺伝子と関連性も示した。以上から、統合失調症患者で変異が同定された *ZBTB16* 遺伝子は衝動性リスク行動に関連する遺伝子であることを見出した。

統合失調症患者で変異が同定された *ZBTB16* 遺伝子は衝動性リスク行動に関連する



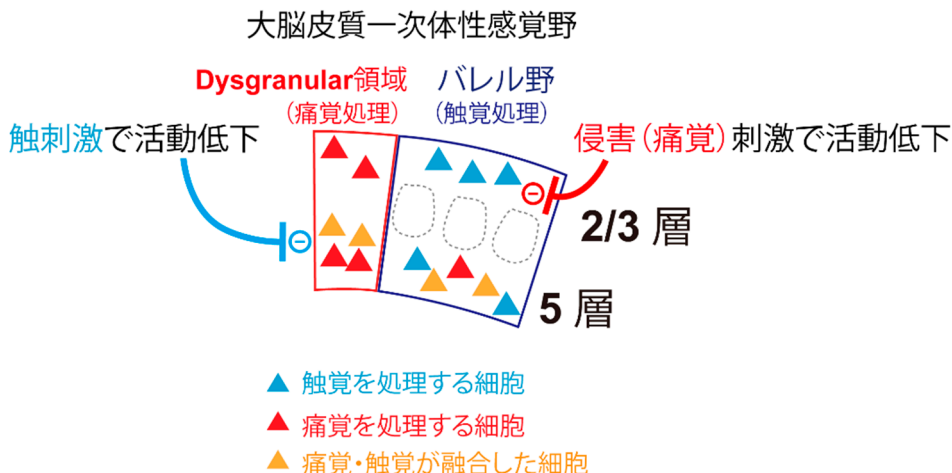
132 触覚が痛みを修飾する中枢メカニズムの解明	尾崎 弘展
--------------------------	-------

【目的】 痛みは脳内神経回路で生み出されるものであり、処理の過程で様々な修飾を受けながら、「痛み」として認知される。そうした様々な要素によって痛みの強さは変化するため、身体に加わった侵襲の程度と痛みの強さは必ずしも相関しない。しかし、そういった痛みを修飾するメカニズムを神経回路レベルで詳細に検証することは難しく、十分に理解が進んでいない。痛みの感覚要素である痛覚は、皮膚の感覚受容器で受容された侵害刺激のシグナルが、脊髄・大脳視床を経て大脳皮質一次体性感覚野 (S1) に運ばれ、痛覚情報として処理されることで生み出される。これは、皮膚の感覚受容器で受容される触刺激のシグナルが、大脳視床を経て S1 へと運ばれ、触覚情報として処理されるのと同様である。したがって、痛覚と触覚が S1 においてどのように処理をされ、修飾されるのかを理解することは痛みの脳内情報処理のメカニズムの一端を解明することに繋がると考えられる。そこで本研究では、痛みの感覚要素である痛覚と同じく S1 で処理される触覚が S1 においてどのように表現され、触覚刺激が痛覚情報処理に影響を及ぼしうるのかということを検証した。

【方法】 痛覚情報と触覚情報がどのように S1 において処理されているのかを明らかにするため、麻酔下齧歯類マウスの S1 から細胞外電位記録を行った。S1 は組織学的に 4 層が発達したバレル野と 4 層が狭くなる領域である dysgranular 領域に分類されるため、本研究ではその両部位から同時に神経活動を記録するため 4 本で構成される多点電極を用いた。侵害 (痛覚) 刺激、または触刺激を加え、それぞれの刺激に対する神経活動の応答を計測した。痛覚刺激はペルチエ素子を使い、ヒゲパッドに対して侵害熱刺激を加えた。触覚刺激はピエゾ素子によりヒゲの角度を変化させることで行った。各刺激に対する神経細胞の応答から、触覚、痛覚それぞれに対する選択性の高さで、記録した細胞を分類した。

【結果】 S1 では、痛覚情報と触覚情報はとくに浅層である 2/3 層において主に処理される領域が分かれていた。触覚情報は従来から良く知られているようにバレル野と呼ばれる 4 層が発達している領域で主に処理されていた。一方、痛覚情報は dysgranular 領域において主に処理されていた。5 層においても痛覚情報は dysgranular 領域において、触覚情報はバレル野において主に処理されているという関係は一貫していたが、痛覚にも触覚にも応答する細胞の割合が、両方の領域で増加していた。これら異なる機能的役割を担っていると考えられる両領域において、触覚と痛覚が活動を抑制しうるのか検証した結果、主に痛覚を処理している領域である dysgranular 領域においては 5 層の神経細胞が触刺激で活動が低下しており、主に触覚を処理している領域であるバレル領域においては 2/3 層の神経細胞が侵害刺激で活動が低下する現象が発見された。以上の結果は、大脳皮質レベルで痛覚と触覚が相互に作用しうることを示していた。

大脳皮質一次体性感覚野における痛覚および触覚情報処理

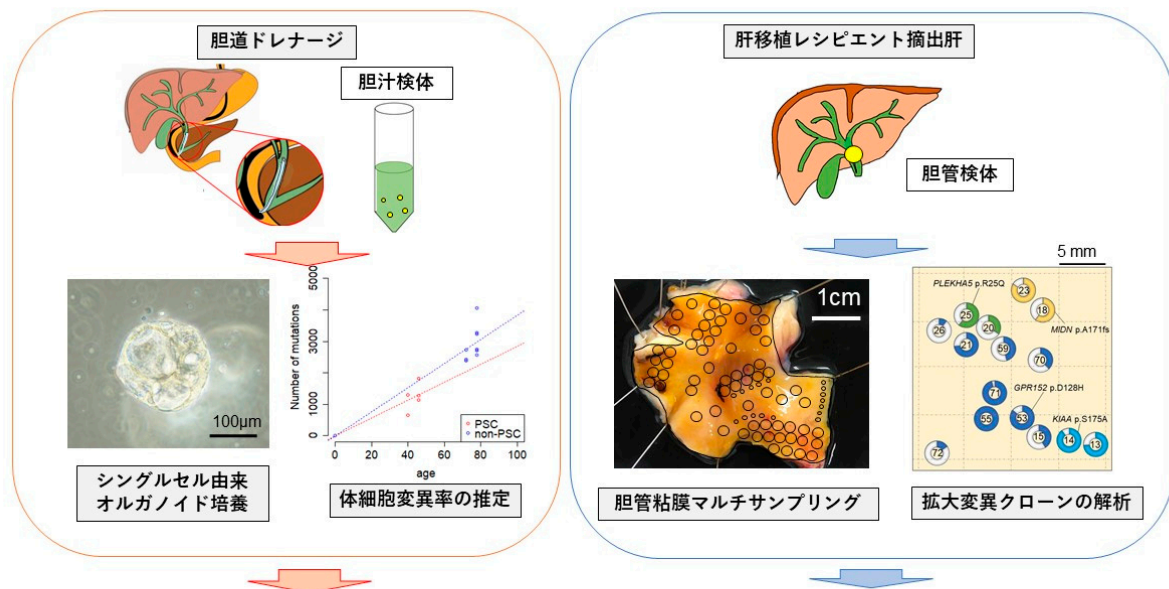


【目的】 原発性硬化性胆管炎 (primary sclerosing cholangitis : PSC) は、肝内外の胆管の線維性狭窄を生じる進行性慢性炎症疾患である。胆汁鬱滞による肝不全のため患者の1割強は肝移植を要し、しばしば胆管癌を合併するが、その病因は未だ不明で病態の理解は進んでいない。近年ゲノム解析から、一見正常な組織にも加齢に伴って遺伝子異常が蓄積し、がんで観察されるような遺伝子異常を有するクローンが拡大しており、発癌リスクとなっていることが明らかになった。このような遺伝子変異の解析はがんの原因を特定するだけにとどまらず、慢性炎症疾患の病態を解明することも可能にする。本研究は、これまで検体収集や純度の高い上皮クローンの採取の難しさからクローン解析が進んでこなかった胆管領域において、胆管上皮オルガノイドを用いた解析方法を確立し、PSCの病態および発がんメカニズムの解明を目指すものである。

【方法】 胆汁から胆管上皮オルガノイドを作製し、全ゲノム解析を行い、PSCおよび対照群の胆管上皮に蓄積する変異を解析しその蓄積を評価した。PSC肝移植例の胆管をマルチサンプリングし、オルガノイド培養を用いて上皮を純化し全エクソーム解析を行い、変異クローンの広がり进行评估した。

【結果】 胆汁中には個細胞状に上皮が浮遊しており、単個の上皮細胞からオルガノイドを培養することで単クローン性のオルガノイド培養が可能であった。PSC2症例(各40歳、46歳)から合計5個、非PSC3症例(72~78歳、平均76歳)から合計9個のシングルセル由来オルガノイドを全ゲノム解析した。変異の蓄積率は両群で有意差は認めなかった ($P=0.029$, Two-sided Mann-Whitney U test) が、慢性炎症下であるにもかかわらずPSCにおいて変異率の上昇はみられなかった。PSC患者3症例の肝移植例の肝門部胆管のマルチサンプリング解析では、うち2症例で隣り合ったサンプルで共有される変異クローンの広がりを認めた。*ARID2*や*PIK3CA*などのがんドライバー変異を有するクローンが観察された。今後解析サンプル数を増やし更なる検討を行う。本研究により、胆管オルガノイドをモデルとして、上皮クローンの綿密な解析が可能となり、発癌に関連する可能性のある遺伝子変異を同定するとともに、複雑で異種性の混じたPSCの病態が示唆された。

原発性硬化性胆管炎の上皮クローンのゲノム解析



原発性硬化性胆管炎の病態の解明

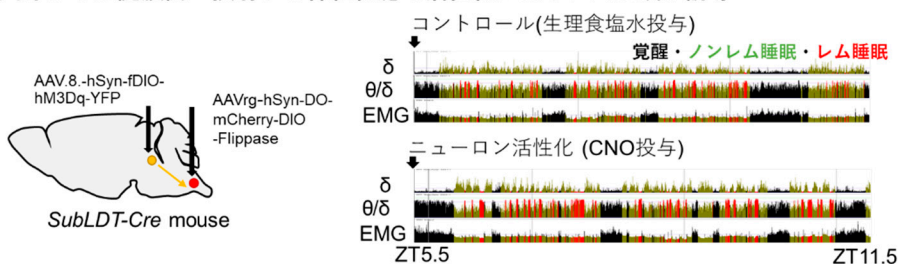
【目的】 我々ヒトを含む哺乳類の睡眠はレム (Rapid Eye Movement) 睡眠とノンレム (non-REM) 睡眠という2つのステージから構成される。ノンレム睡眠中には大脳皮質がゆったりと同期した活動を示し徐波と呼ばれる脳波が観察され、ノンレム睡眠中の徐波は記憶の固定に関わる。その一方、レム睡眠中の大脳皮質の神経細胞は覚醒時と同様の活発な活動を示し、レム睡眠中は急速な眼球運動を伴うなど末梢でも大きな変化が起きる。睡眠の制御メカニズムを明らかにしようとこれまで数多くの研究が行われてきた。本研究では、とりわけ理解が進んでいないレム睡眠の誘導のメカニズムの解明を試みた。古典的な破壊実験・薬理実験から注目されてきた脳幹に着目した。脳幹は様々な機能に関わる神経細胞が混在するため、破壊実験や薬理実験では特異性を欠き、レム睡眠を誘導する神経機構の詳細な解析は難しいと考えた。そこで遺伝学的手法を用い、レム睡眠の誘導を担う神経細胞の同定を試みた。

【方法】 破壊実験・薬理実験からレム睡眠の誘導に重要であるとされる脳幹の橋被蓋野に着目した。同領域で遺伝子組換え酵素 Cre を発現するノックインマウス (*SubLDT-Cre*) マウスを作製した。同マウスの脳幹の橋被蓋野に蛍光分子を発現するアデノ随伴ウイルスベクターを注入し、同領域の投射先を調べた。次に高効率で軸索末端から感染するアデノ随伴ウイルスベクターと化学遺伝学を組み合わせて、橋被蓋野内の神経細胞を投射経路ごと活性化した際にレム睡眠に与える影響を調べた。本研究で用いた化学遺伝学の hM3Dq 受容体は、マウスの内在性のリガンドには反応せず、人工リガンド CNO (clozapine-N-oxide) により一過性の神経発火を促す人工受容体である。

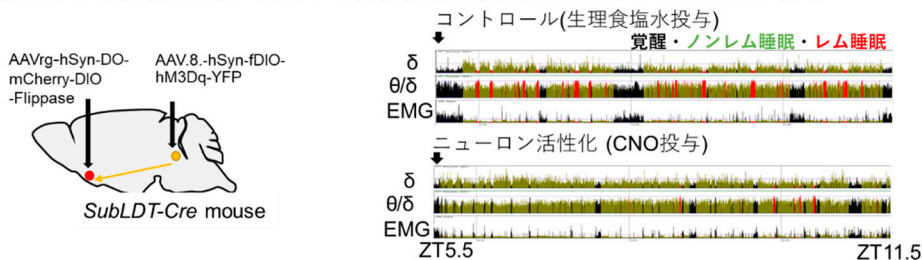
【結果】 *SubLDT-Cre* マウスにおける橋被蓋野の神経細胞の投射先を調べるために、同マウスの橋被蓋野にプレシナプスで蛍光分子を発現するアデノ随伴ウイルスベクターを微量注入した。レム睡眠中の筋弛緩の制御に重要とされる延髄の腹側部と覚醒時の脳波の制御に関わるとされる前脳基底部に強い投射が観察された。まず橋被蓋野から延髄腹側へと投射を送る神経細胞の活動を化学遺伝学により活性化させたところレム睡眠量が増加した。本結果からこれまで謎であったレム睡眠を誘導する神経細胞が実際に橋被蓋野に存在することが明らかになった。また、同様の手法を用いて橋被蓋野から前脳基底へ投射する神経細胞の活動を化学遺伝学で操作したところ、前述の結果とは反対にノンレム睡眠が誘導された。本研究により、マウス橋被蓋がレム睡眠とノンレム睡眠の誘導それぞれに重要であることが明らかになった (柏木ら、未発表)。

本研究で明らかにした睡眠を制御する新規神経回路

橋被蓋野から延髄腹側へ投射する神経細胞の活性化によりレム睡眠が誘導



橋被蓋野から前脳基底核へ投射する神経細胞の活性化によりノンレム睡眠が誘導

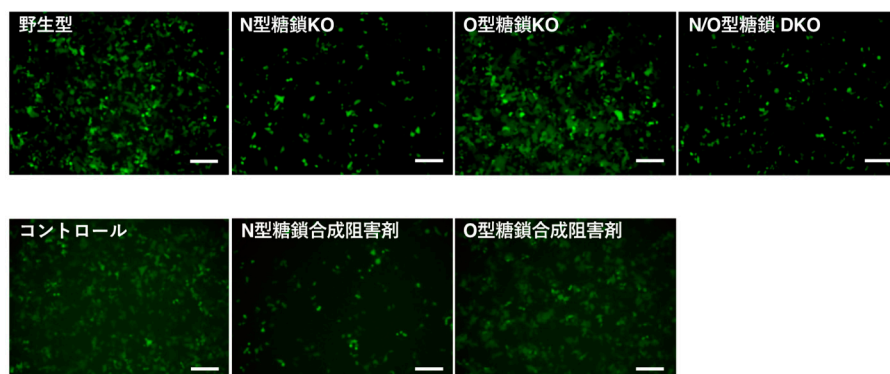


【目的】 流行性耳下腺炎（ムンプス）は小児の代表的なウイルス性感染症で、耳下腺の腫脹・疼痛を主症状とし、加えて無菌性髄膜炎や精巣炎、難聴などの重篤な合併症を伴う疾患である。ムンプスの原因はパラミクソウイルスに分類されるムンプスウイルス（Mumps virus : MuV）である。飛沫を介して感染したウイルスは、ウイルス血症により全身の標的組織へと伝播し、ウイルス増殖に伴う局所的な炎症を引き起こす。MuV は他のパラミクソウイルスには見られない特徴的な組織指向性（耳下腺、中枢神経、膵臓、生殖器など）を示すが、それを規定するウイルスならびに宿主因子については明らかになっていない。パラミクソウイルス科ウイルスは呼吸器症状から全身症状まで多様な病態を引き起こすことが知られているが、多くのパラミクソウイルスの組織指向性ならびに感染病態は細胞侵入過程に規定されることが知られている。そこで本研究では、他のパラミクソウイルスと同様に、MuV 感染においても組織指向性および感染病態がウイルスの細胞侵入過程に規定されると仮定し、MuV の感染受容体の解析を通して、MuV の組織指向性の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

【方法】 各種糖鎖を欠損した細胞または合成等を阻害する阻害剤を処理した細胞に AcGFP 発現の組換え MuV (rMuV/AcGFP) を感染させた。感染効率は蛍光顕微鏡による観察に加え、FACS による定量解析によって評価した。293T 細胞を用いて発現・精製した HN タンパク質を bait に糖鎖アレイスクリーニングを実施した。

【結果】 近年 MuV の受容体結合タンパク質である Hemagglutinin-neuraminidase (HN) タンパク質の X 線構造解析が行われ、HN タンパク質が α 2,3 結合型シアル酸を含む三糖構造と結合することが明らかになった。そこで MuV 感染におけるシアロ糖鎖の重要性について解析を行った。 α 2,3-Sialidase (0.2 U/mL) を用いて、細胞表面の α 2,3 結合型シアル酸を除去した HeLa 細胞に rMuV/AcGFP を感染させた。感染 24 時間後の細胞を蛍光顕微鏡によって観察した結果、未処理細胞と比較して、Sialidase 処理細胞における感染効率は約 1/20 に低下していた。次に α 2,3 結合型シアル酸が付加されるバックボーンについて検討を行った。N 型糖鎖および O 型糖鎖の合成に必須の MGAT1 および C1GalT1 をそれぞれ単独または両方ノックアウトした HeLa 細胞に rMuV/AcGFP を感染させた。その結果、N 型糖鎖を欠損させた HeLa 細胞において、有意に MuV の感染性が低下した。さらに N 型糖鎖および O 型糖鎖の合成を阻害する化合物を用いて検討した結果、N 型糖鎖合成阻害剤である 1-dMM 処理細胞において、有意に MuV の感染が抑制され、MuV の感染には O 型糖鎖よりも N 型糖鎖として付加されるシアロ糖鎖が重要であることが示された。MuV の感染受容体糖鎖に関して、さらに詳細な特徴を明らかにするために、HN タンパク質と相互作用する糖鎖種を、糖鎖アレイを用いて探索した。その結果、MuV の HN タンパク質はヘパラン硫酸およびヘパリンに対して強い親和性を有することが示された。そこで、ヘパラン硫酸を欠損させた HeLa 細胞を用いて、MuV の感染性を評価した結果、野生型 HeLa 細胞に比べて、ヘパラン硫酸を欠損した HeLa 細胞では MuV の感染性が有意に亢進した。すなわちヘパラン硫酸は MuV の感染受容体ではなく、HN タンパク質と結合することで感染阻害効果を有する因子であることが明らかとなった。

MuV 感染における N 型糖鎖の必要性



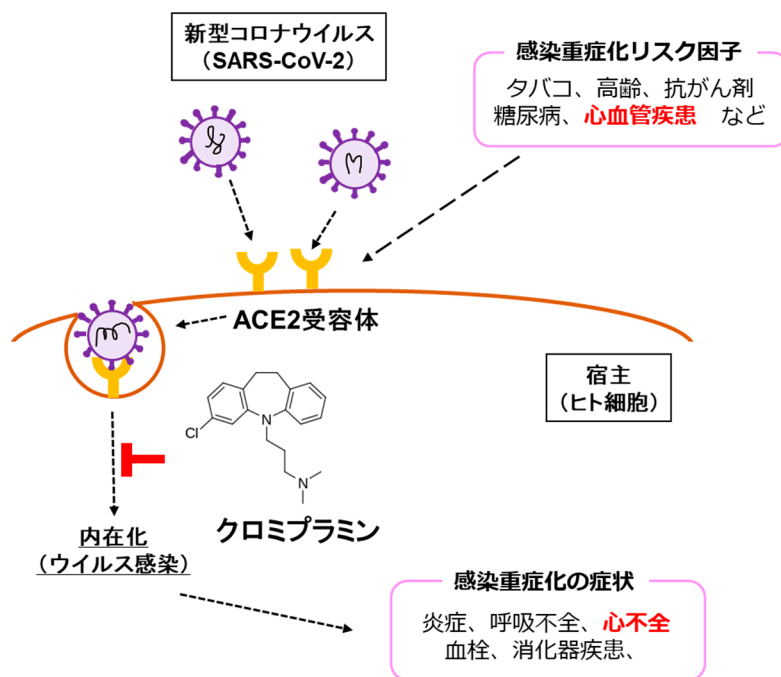
<p>136 ACE2に着目したCOVID-19重症化機構の解明とその応用</p>	<p>加藤 百合</p>
---	--------------

【目的】 2019 年末に中国の武漢で発生した新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の感染拡大は 2 年経過した今なお世界中で大きな問題となっている。COVID-19 の原因ウイルスである SARS-CoV-2 によるウイルス感染や重症化メカニズムが明らかになりつつあり、ワクチン接種や RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ活性や炎症応答を標的とする治療薬が次々と承認されているものの、未だに有効な治療薬・治療法は確立できていない。本研究では、SARS-CoV-2 感染経路において重要である angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) に着目し、COVID-19 重症化機構を明らかにするとともに、ドラッグリポジショニングにより既承認薬の中から候補治療薬を探索することで、新たな感染重症化の予防・治療につながる新規概念の確立を目的とした。

【方法】 ACE2-EGFP 安定発現株に人工三量体の精製スパイクタンパク質 (S タンパク質) を処置する *in vitro* 偽感染モデルを確立し、ACE2 内在化機構を抑制する化合物を探索した。見いだした化合物が実際に SARS-CoV-2 感染を細胞レベルで抑制するか検証した。また、COVID-19 重症化リスク因子や後遺症に心疾患や心不全が含まれていることから心臓に着目し、*in vitro* 偽感染モデルを用いて心筋細胞における心機能への影響を検討した。

【結果】 当研究室が以前同定した心不全を抑制する候補薬のうち、ACE2 内在化を強く抑制するクロミプラミン (三環系抗うつ薬) 見だし、さらにクロミプラミンは SARS-CoV-2 感染を細胞レベルで抑制した。心筋細胞では S タンパク質処置によりミトコンドリア機能が抑制され、心筋収縮力も低下することが明らかとなった。さらに、クロミプラミンにより S タンパク質によるミトコンドリア機能障害および心筋収縮力抑制が改善することも明らかとなった。

ACE2 を介した SARS-CoV-2 感染経路

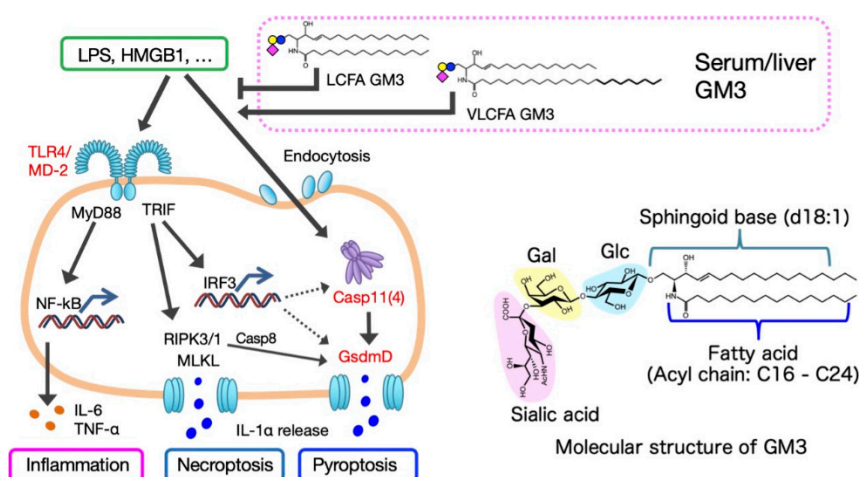


【目的】 Toll-like receptor (TLR) や Caspase (Casp) ファミリーを介した慢性炎症は、メタボリックシンドロームやがんをはじめとする多様な疾患の原因となりうる。当研究グループでは、ヒト血清や脂肪組織中のスフィンゴ糖脂質：ガングリオシドGM3が、TLR4の内因性リガンドとして働くこと、その生理活性は脂質（アシル鎖）構造によって制御されることをこれまでに見出している。本課題では、GM3が、TLR4に加えて、Casp4/11を介した炎症性細胞死の誘導や制御に関与する可能性を検討した。また、GM3の生理活性解析に適したマウスモデルを探索した。

【方法】 マウスマクロファージ系細胞 (RAW264.7細胞、BMDM等) に対し、LPS (大腸菌O111:B4) およびガングリオシドGM3分子種 (d18:1-12:0~24:0)、その他のガングリオシド・スフィンゴ糖脂質分子種 (GlcCer、LacCer、GM2) を用いて共刺激を行った。刺激後、TLR4活性化およびCasp4/11による細胞死によって産生される炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-1 α) をELISA法によって定量し、炎症応答および炎症性細胞死応答の誘導レベルを評価した。さらに、種々の阻害剤や遺伝子欠損の影響を評価した。また、マウス血清および肝臓のガングリオシド分子種 (GM2またはGM3) について、薄層クロマトグラフィーおよびLC-MS/MSを用いて分析し、ヒトと同様にGM3が循環する近交系マウス系統を探索した。同定した系統について、関与する糖転移酵素周辺のゲノム構造をPCR法によって解析した。

【結果】 マウスマクロファージ系細胞をLPSおよびGM3分子種で共刺激した結果、極長鎖アシル鎖構造をもつGM3分子種 (d18:1-22:0、d18:1-24:0) の存在下では、TNF- α 産生量およびIL-1 α 放出量が著しく増大することがわかった。一方、より短い長鎖アシル鎖構造をもつGM3分子種 (d18:1-12:0、d18:1-16:0) の存在下では、IL-1 α の放出が大幅に抑制されることがわかった。このような応答は、GM3前駆体のスフィンゴ糖脂質や、さらに糖鎖付加を受けたGM2 (d18:1-18:0) ではほとんど生じなかった。上記のIL-1 α の放出は、Casp11/4/11阻害剤やマウスGsdmD阻害剤によって阻害され、同様に、Casp11-KO細胞およびGsdmD-KO細胞においても抑制された。さらに、LPS/GM3共刺激によるIL-1 α 放出に関与する因子を探索した結果、GM3の糖鎖構造を認識する一部のGalectinファミリータンパク質が、IL-1 α の放出を増大させた。以上の結果から、GM3は、TLR4に加えて、Casp11による細胞死応答を介した炎症性サイトカイン産生を正と負に制御すること、その生理活性が脂質構造と糖鎖構造の双方によって規定されること、さらに一部の糖鎖認識分子群がその応答に関与することが示唆された。加えて、ヒトと同様にGM3が血中を循環する近交系マウス系統を新たに同定し、その原因がGM2合成酵素遺伝子 (*B4galnt1*) 上流領域の大幅な欠損である可能性と、その領域が齧歯類選択的に存在することを見出した。今後、GM3が循環するガングリオシドヒト型マウス系統を用いることで、GM3による自然免疫・炎症応答の制御メカニズムをマウス個体レベルで解析できるものと期待される。

ガングリオシドGM3によるTLR4およびCasp4/11を介した炎症・細胞死応答の制御機序 (模式図)

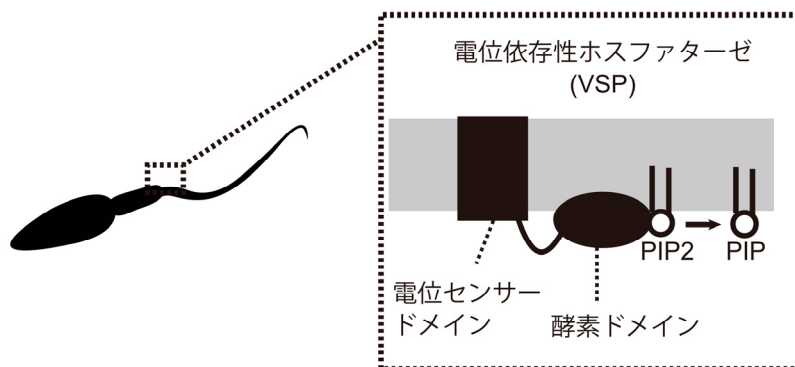


【目的】 脳波や心電図の計測から分かるように、我々の身体中では常に、「電気信号」が生成されている。このような「電気信号」の生成・感知メカニズムについては教科書的には、主に「電位依存性イオンチャネル」が重要な役割を示すと考えられてきた。しかし最近になって我々は、これとは異なる電位感知蛋白質である、電位感受性フォスファターゼ (Voltage-sensing phosphatase : VSP) がマウスの精子で機能し、その運動性を制御していることを明らかにした。この VSP は細胞の膜電位に応じてイノシトールリン脂質へのフォスファターゼ活性を示すという、いわば「細胞の電気信号を化学信号に変換する」という分子である。興味深いことに、我々は精子の鞭毛上にイノシトールリン脂質の極性分布が存在することを明らかにし、これが VSP によって形成されていることも明らかにした (Kawai et al., PNAS, 2019)。一方で、これまでの研究では、このような VSP が精子の電気信号を成熟段階のどの段階で感知しているのか、またその空間的なイノシトールリン脂質の分布はどのようなメカニズムで形成されるのかについては明らかになっていない。そこで本研究では、精子の成熟過程に着目し、VSP によるイノシトールリン脂質の制御機構がどのような時間軸で生じてくるのかの検証、或いは検証を行うための準備を行った。

【方法】 まず、VSP に Flag タグを融合させた蛋白質を発現する遺伝子改変マウスを作製し、VSP の詳細な分布を検証することを試みた。また様々な成熟段階にある精子を採取し、そのイノシトールリン脂質の量を比較することで、この点を解析しようと考えた。そのために様々な成熟段階の精子を、フローサイトメトリーや遠心法などによって分離し、その測定を東京医科歯科大学の佐々木雄彦教授に依頼することによって行った。最後に、マウス VSP の分子機能を検証するため、細胞発現系で測定可能なマウス VSP 分子を作製することを試みた。実験については、アフリカツメガエルの卵母細胞を用い、VSP 活性はこれによって制御される KCNQ2/3 電流を計測することで測定した。

【結果】 VSP の局在については、遺伝子改変マウスについては予定通り作製されたものの、残念ながらその局在を可視化することが出来なかった。一方で、VSP の酵素活性については、試行錯誤の結果、各成熟段階の精子を分離することに成功し、またそのイノシトールリン脂質量をそのアイソタイプごとに測定できることも明らかとなった。さらに、マウス VSP についても、試行錯誤の結果、卵母細胞で発現するマウス VSP 分子の作製に成功し、これによって今まで明らかでなかった、マウス VSP の具体的な生理機能を明らかにすることに成功した。

精子に於いて電気信号が化学信号に変換されるメカニズム



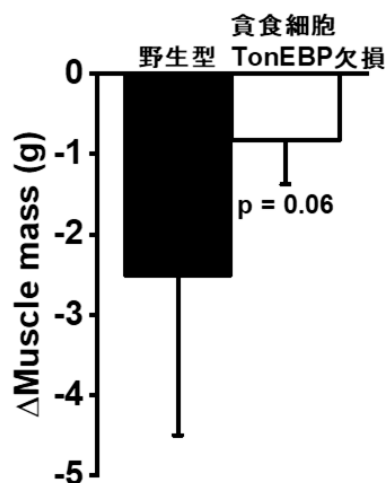
精子成熟のタイミング？
精子における空間情報は？

【目的】現代の生活習慣や加齢に伴う筋肉量および筋力の低下（筋萎縮）は、生活習慣病、代謝疾患、骨折、寝たきり、死亡などのリスクを上昇させ、生活の質（QOL）や健康寿命を低下させてしまうが、具体的な予防・治療法が存在しないのが現状である。筋萎縮に対する予防・治療法の開発が困難な理由のひとつとして、加齢や生活習慣の変化に伴い何故筋萎縮が生じるのか、その詳細なメカニズムが明らかでないことがあげられる。我々は、腎臓に加えて肝臓や筋肉もナトリウムイオン（Na⁺）・体液バランス調節に重要であり、高食塩摂取下で体液の恒常性を維持するためには、①浸透圧物質である尿素を利用した腎臓の水再吸収増加、②肝臓の尿素産生亢進、③尿素産生に必要なアミノ酸・エネルギーを供給するために筋肉の蛋白質異化（カタボリズム）が亢進し、筋肉量が減少することを発見した。本邦は、食塩摂取量が多い国のひとつであり、高食塩摂取による筋肉のカタボリズム亢進（筋肉量減少）は、加齢や現代の生活習慣に伴う筋萎縮メカニズムの一因である可能性が考えられる。しかしながら、高食塩摂取に伴う筋肉量減少メカニズムは不明である。そこで本研究では、予備検討にて関与が疑われる単核貪食細胞/TonEBP に焦点を当て、高食塩摂取による筋肉量減少メカニズムを解明し、加齢や現代社会の生活習慣に伴う筋萎縮機序の一端を明らかにすることを目的とした。将来的には本研究の成果を基盤とし、食塩の摂り過ぎや加齢による筋萎縮に対する予防・治療法の開発へつなげ、ヒトの健康寿命延長を目指す。

【方法】単核貪食細胞特異的 *TonEBP* 欠損マウス (*LysM^{cre}TonEBP^{fllox}*) およびその野生型マウス (*LysM^{wt}TonEBP^{fllox}*) に対して、高食塩摂取による筋肉量減少を誘導した。本実験より、単核貪食細胞の *TonEBP* が欠損していると、高食塩摂取に伴う筋肉量低下が抑制されるかを検証した。また、マウス培養マクロファージ (RAW 細胞) を用いて、単核貪食細胞/TonEBP による筋肉量制御メカニズムの探索も実施した。

【結果】野生型マウスに高食塩を2週間摂取させると、 2.53 ± 1.97 g の筋肉量減少が認められたが、単核貪食細胞特異的 *TonEBP* 欠損マウスではその減少量が 0.83 ± 0.54 g に抑制されていた (図)。また同マウスの筋肉組織を用いて RNA sequence を実施したところ、高食塩摂取に伴う筋肉量減少と関連する遺伝子として蛋白質 A を同定した。マウス培養マクロファージ (RAW 細胞) に対して高 NaCl 培地を処置すると、*TonEBP* 発現量の増加および蛋白質 A の発現量・分泌量の減少が認められた。また、高 NaCl 培地刺激によるこれらの変化は、*TonEBP* siRNA によって、完全に抑制された。以上の実験結果より、高食塩摂取に伴う筋肉量減少には、単核貪食細胞/TonEBP/蛋白質 A が関与している可能性が示唆された。

高食塩摂取2週間後における野生型および単核貪食細胞特異的 *TonEBP* 欠損マウスの筋肉の減少量



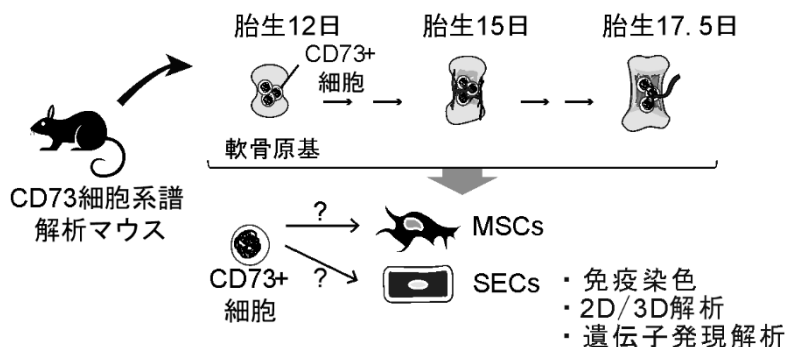
140 細胞系譜解析から紐解く骨髄微小環境形成機構の解明 木村 健一

【目的】 間葉系幹細胞 (MSCs) は、その多分化能や組織再生能を利用した再生医療のツールとして注目され、骨疾患治療など多くの疾患に対し臨床試験が始まっている。しかし、MSCs の生体内での動態や分化能について未だ不明な点が多く、治療の有効性や作用機序が不明確なまま、臨床応用が先行しているケースも少なくない。そのため、安全で効果的な治療法の確立のため、生体内の MSCs の性質の解明が望まれている。MSCs は生体内で特殊な微小環境 (ニッチ) によって保持されている。そのニッチの一つとして知られる骨髄ニッチは、類洞血管内皮細胞 (SECs)、造血細胞、周皮細胞などにより形成され、様々な液性因子、サイトカイン、細胞間接着により緻密に制御されている。近年、骨髄内ニッチを構成する細胞群の特徴が明らかになりつつあるが、ニッチを構成する細胞の起源やニッチの維持に関わる分子機構は未だ不明である。本研究では、ニッチを形成する MSCs と SECs に高発現する CD73 に着目し、これら CD73 陽性細胞がどこから発生し、どのようにニッチを形成するかを明らかにし、骨髄ニッチ維持機構における役割の解明を目指した。

【方法】 CD73 発現細胞がどのように組織障害に応答し、ニッチの再構築に関わるかについて、CD73-BAC-EGFP マウスに大腿骨骨折モデルを作製し解析した。7、14、28 日後に組織切片を作製し、免疫染色による細胞種の特定および造血幹細胞との関わり、骨髄内の MSCs、SECs が血管新生、骨・軟骨形成およびニッチの再構築にどのように寄与するか解析した。さらに、このマウスから CD73 陽性 MSCs と CD73 陰性 MSCs を単離し、*in vitro* での性質を比較するとともに、骨折部位に細胞を移植し *in vivo* における骨形成能を解析した。CD73 陽性細胞がニッチを形成する挙動を追跡するために、CD73CreERT² : R26-tdTomato マウスを作製した。胎生から段階的にタモキシフェンを投与し、骨組織への分布を解析した。

【結果】 骨修復における CD73-EGFP 陽性細胞の動態を解析したところ、CD73-EGFP 陽性細胞は骨芽細胞や軟骨細胞に分化し、新生骨軟骨形成に寄与していた。一方、骨折部位の新生血管は、術後 7 日目において EGFP の発現は見られなかったが、14 日目になると一部の新生血管において EGFP 発現が認められた。この EGFP 陽性血管周囲には、c-kit 陽性造血幹前駆細胞が集積していたことから、骨髄類洞血管における CD73 発現はニッチの再構築に重要な役割を示すと考えられた。細胞系譜解析では、tdTomato 陽性細胞は胎生 14.5 日から出現し、海綿骨、関節軟骨、滑膜において存在が確認された。また、tdTomato 陽性細胞は血管周囲に局在し、マウスの成熟とともに皮質骨内へ移動し骨細胞へと分化することが明らかとなった。本研究により、CD73 陽性細胞が骨髄ニッチ形成に果たす役割の一端を明らかにできた。今後は、細胞系譜解析をさらに進め、骨髄ニッチを構成する CD73 陽性細胞を包括的に解析する予定である。

骨髄内の MSCs・SECs の細胞系譜追跡実験

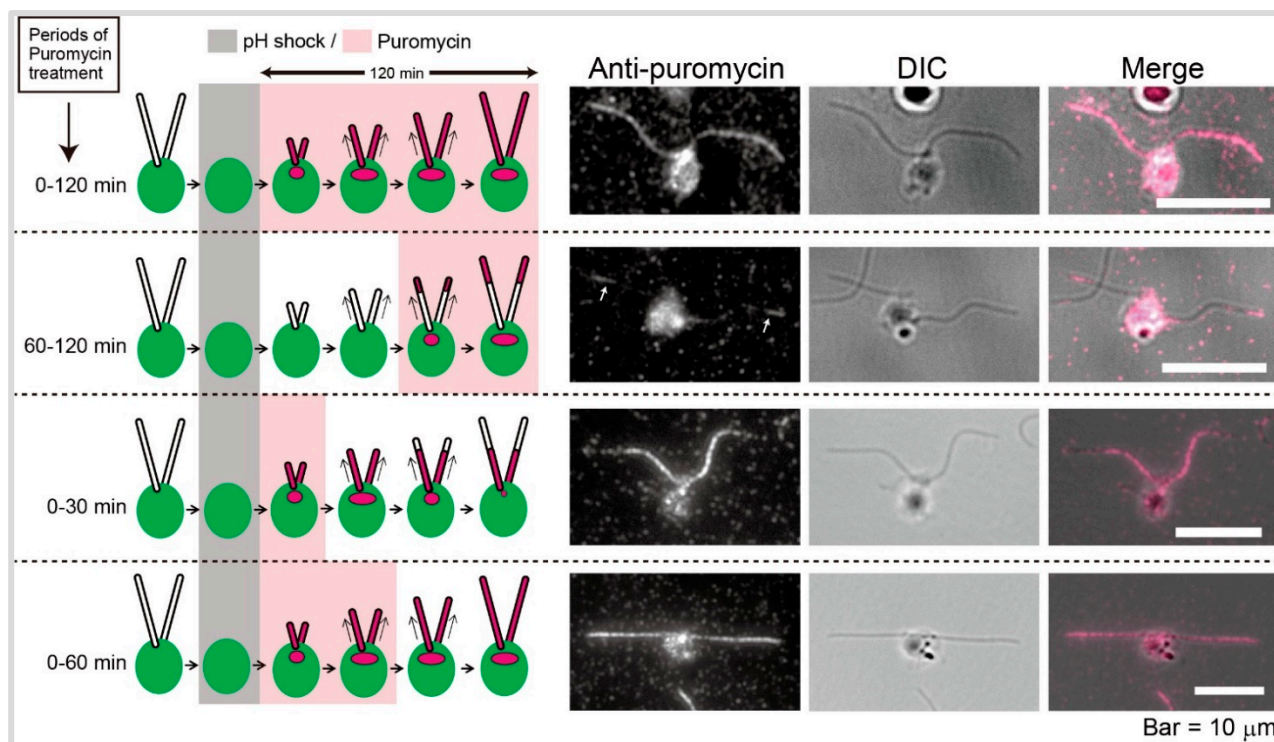


【目的】 真核生物の鞭毛（繊毛と同義）は細胞運動、生体内の水流形成、シグナル伝達に関わる高度に保存された細胞小器官である。鞭毛の構築異常はヒトの「繊毛病」と総称される疾患を引き起こす。したがって、鞭毛がどのように構築されるのかを理解することは基礎生物学的にだけでなく、基礎医学的にも重要な課題である。本研究の大きな目標は、鞭毛前駆体の実体を解明することにより、真核生物一般に共通な鞭毛構築機構を理解しようとするものである。助成期間中は、クラミドモナスという 2 本の鞭毛を持つ単細胞緑藻類において新規合成蛋白質の標識方法を検討し、鞭毛前駆体の実体解明に向けた足掛かりとした。

【方法】 クラミドモナスは pH ショックなどの刺激によって鞭毛を脱離するが、その後約 2 時間かけて元の長さに鞭毛を再生する。鞭毛前駆体の実体に迫るため、本研究では、Surface sensing of translation (SUnSET) 法が鞭毛再生中のクラミドモナスに適用できるかを検証した。SUnSET 法は、新規合成ポリペプチド鎖に取り込まれた抗生物質ピューロマイシンを特異的な抗体によって生化学的に検出する方法である。

【結果】 本助成期間中、主に次の結果が得られた。1. クラミドモナスに SUnSET 法を適用する場合、ピューロマイシンの至適濃度は $50 \mu\text{g/ml}$ 程度である。2. 鞭毛再生中の細胞は、細胞体および鞭毛にピューロマイシン標識蛋白質を効率良く取り込む。3. 新規合成蛋白質は、再生中の鞭毛の先端から取り込まれる（下図）。4. シクロヘキシミド（蛋白質合成阻害剤）はピューロマイシンの取り込みを著しく阻害する。

新規合成蛋白質の鞭毛先端からの取り込み

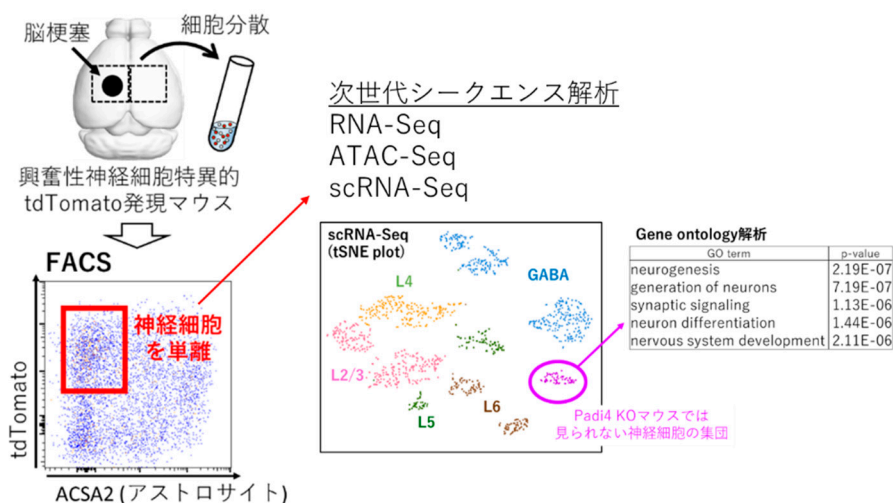


【目的】脳卒中後の機能回復には、失われた機能を代償する神経回路の再構築が必要であると考えられているが、具体的にいつ、どのような神経回路が構築されることが機能回復に必要であるのかは分かっていなかった。また、神経回路再構築の分子メカニズムに関しても未解明であった。そこで我々は、脳梗塞モデルマウスを用いて、大脳新皮質の局所的な脳梗塞後にどのような神経回路が再構築されるのか、皮質領野間の神経回路構造変化を明らかにすることを目指した。また、神経回路再構築が起こる際に働く遺伝子を解析することで、神経回路再構築の分子メカニズム解明を目指した。分子メカニズムとしては、神経回路再構築において中心的役割を担うマスター転写因子の同定と、脳梗塞後の炎症から神経修復への切り替えにおいて重要な役割を担うと考えられる細胞外の脂肪酸代謝物に注目して研究を行った。

【方法】Photothrombosis 法による大脳新皮質の局所的な脳梗塞あるいは中大脳動脈の閉塞による脳梗塞モデルマウスを用いて実験を行った。大脳新皮質の興奮性神経細胞特異的にカルシウム感受性蛍光タンパク質 GCaMP6f を発現するマウスを用いて、大脳新皮質全域の広域カルシウムイメージングを行った。イソフルラン麻酔下の自発神経活動を計測し、神経活動の相関から皮質領野間の機能的結合強度を見積もった。脳梗塞周囲の組織から FACS によって単離した神経細胞から RNA あるいはゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンスによって遺伝子発現やオープンクロマチン領域の解析を行った。

【結果】広域カルシウムイメージングによる皮質領野間の機能的結合解析の結果、脳梗塞によって低下した皮質領野間の機能的結合は、脳梗塞 2~3 週間後に回復が見られ、梗塞巣周囲をハブとする結合に増強が見られた。リハビリテーションによって機能的結合の増強が起こったことから、脳梗塞後に活動依存的に皮質領野間の結合が強化されることが機能回復に重要であることが示唆される。脳梗塞後に発現増加する遺伝子を RNA-Seq によって解析した結果、および脳梗塞後にクロマチンがオープンになるゲノム領域を ATAC-Seq によって解析した結果から、脳梗塞後の神経修復で働く転写因子を複数同定した。それら転写因子を Neuro2a 培養細胞に強制発現させた結果から、神経修復で中心的役割を担っている転写因子の候補を見出した。脳梗塞後におけるホスホリパーゼの発現および *Pla2* ノックアウトマウスの解析から、*Pla2g2e* によって産生される脂肪酸代謝物が脳梗塞後の機能回復に重要であることが示された。この脂肪酸代謝物によって発現誘導される *Padi4* 遺伝子の役割を次世代シーケンス解析によって検証したところ、*Padi4* が修復性の神経細胞サブタイプの誘導に重要である可能性が示された。

単離した神経細胞から次世代シーケンス解析を実施



【目的】 癌内炎症環境で産生される各種サイトカインは、癌細胞が主要な癌特性を獲得するための重要な誘導因子であると同時に、その多くは細胞死を誘導するデスリガンドとしても機能する。従って、各癌組織が独自の炎症環境を成立・維持するためには、「癌内浸潤性免疫細胞群」と「癌細胞特有の炎症誘導能」に加え、炎症性サイトカイン誘導性の細胞死（炎症誘導性細胞死）に対して持続的な抑制機能を発揮する「炎症環境寛容システム」を加えた三者の相互連携が必須であると考えられる。癌細胞自身の炎症学的ながん特性と炎症環境寛容システムの両者には因果関係が存在することが想定されており、本研究では、炎症誘導性細胞死の抑制シグナルに重要である LUBAC ユビキチンリガーゼの機能消失がもたらす各種サイトカインへの細胞死感受性獲得をリードアウトとし、癌細胞が誘導する炎症学的特性の理解を目指す。炎症反応を担う癌内浸潤性の免疫細胞群に着目した従来の研究提案とは異なり、癌細胞自身を解析対象とすることで、個々の癌がもつ微小環境の炎症学的な特徴をシンプルかつ統合的に理解し、癌細胞がもつ炎症学的特性に主眼を置いてがんを分類する方法論を確立することを目的とする。

【方法】 LUBAC 機能を消失させたマウスメラノーマ細胞株 B16F10 を NSG (NOD/ShiLtJ を背景系統とする重度免疫不全 SCID と IL2 受容体 γ 鎖の欠損を併せ持つ超免疫不全マウス) の皮下に移植し、自己崩壊による進展抑制効果を確認した。次に主要なサイトカイン受容体を欠損させ、実験に用いて新規細胞死誘導因子の同定を試みた。最後に、その誘導因子が癌細胞自身によって発現誘導されるか組織染色や遺伝子発現解析などから確認した。

【結果】 LUBAC 機能を消失させた B16F10 は培養条件での増殖阻害は起こらないが、マウスに移植すると明らかな進展障害を示した。宿主マウスが野生型マウスの場合その効果はとりわけ顕著だが、NSG においても明らかに進展抑制が認められた。さらに、LUBAC 欠損癌の細胞死を誘起するサイトカインとして IFN- γ が重要な候補として同定されたため IFN- γ を産生する腫瘍組織内の細胞を探索した結果、癌細胞自身が発現していることを見出した。さらに、この癌の進展には従来抗腫瘍効果をもつと考えられている IFN-g \cdot STAT1 シグナルが必須であることが明らかとなった。今回炎症寛容システムとの相互作用に着目した癌内炎症要素の探索から新たに IFN- γ のオートクラインシグナルが B16F10 の腫瘍進展に必須であることを証明した。

癌細胞自身の炎症特性と炎症寛容機構の関連解析から見てきた癌病態における IFN- γ の新たな役割

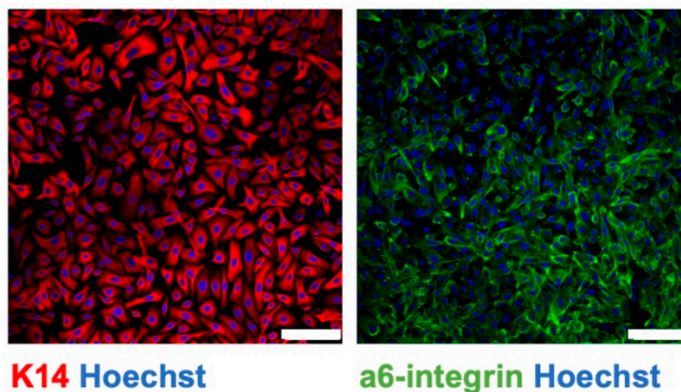


【目的】 ヒト表皮幹細胞を用いた皮膚再生医療は大きく発展してきたものの、臨床的な有用性が示されているのは、組織の最も表層にある「表皮」の再建にとどまり、結合組織も含めた複雑な皮膚の構造を完全に再生することは困難である。ヒト皮膚において、表皮と真皮の境目は平坦ではなく、上皮脚と呼ばれる表皮が真皮に入り込んだ凹凸構造をとることが知られている。組織学的・病理学的観察により、上皮脚は、①表皮幹細胞の局在と関係すること、②皮膚の加齢や病変により形状が変化すること、が示唆されている。しかし、マウス皮膚には上皮脚が存在しないこと、表皮幹細胞マーカーが長年未同定であったことから、幹細胞制御や皮膚の機能に対する上皮脚構造の役割を実証するのは困難であった。筆者はこれまでに、マウス皮膚において分裂頻度の異なる 2 種類の表皮幹細胞集団を同定している (*Nat. Cell Biol.* 2016)。さらに、マウスで唯一上皮脚を持つ組織である口腔粘膜上皮に着目し、分裂頻度の異なる 2 種類の上皮幹細胞が、組織の凹凸構造と対応した局在パターンを示すことを見出した。本研究では、このような自身の先行研究をもとに、組織の凹凸構造と上皮幹細胞局在を三次元的に捉え、表皮幹細胞のパターニングや増殖・分化に最適な環境因子を同定することで、より生体に近い臓器再生に向けた基盤をつくることを目的として実施した。

【方法】 *Fbln5* 欠損マウスの皮膚、口腔組織を 2、6 ヶ月齢で採取し、切片またはホルマウント免疫染色により上皮幹細胞の増殖と分化の変化について検証した。培養実験では、凹凸構造を模倣したマイクロパターンゲルとアロダーム（無細胞ヒト真皮）を用い、上皮幹細胞のパターニングを誘導する最適な力学的環境と培養条件について検証を行った。ゲル上に、マウス皮膚、マウス口腔から単離したケラチノサイト、またはヒト皮膚ケラチノサイトを播種し、高カルシウムおよび気相液相界面培養により分化・重層化を誘導した。

【結果】 研究計画 1 では、柳沢裕美（筑波大学）との共同研究により、2 種類の表皮幹細胞の不均一性を制御する環境因子として *fibulin-5* に着目し、ノックアウトマウスの表現型解析を行った。*Fbln5* 欠損マウスの皮膚においては、分裂頻度の異なる 2 種類の表皮幹細胞由来の分化マーカーの発現が変化していることを見出した。一方、口腔組織においても、2、6 ヶ月齢のマウスにおいて同様な表現型解析を行ったが、*Fbln5* 野生型と欠損マウスで明らかな差は認められなかった。研究計画 2 では、泉健次（新潟大学）との共同研究により、凹凸構造を保持した足場であるアロダームおよびマイクロパターンゲル培養を用い、上皮組織を構築する条件の検討と、表皮幹細胞不均一誘導の評価を行った。本研究では始めにヒト皮膚ケラチノサイトをアロダーム上で三次元培養する条件を確立した。またマウス口腔ケラチノサイトの単離・培養条件を確立し、責任著者として論文発表した (*J Vis Exp.* 2021、図)。一方、マイクロパターンゲルを用いた三次元培養は、ヒト皮膚ケラチノサイト、マウス皮膚ケラチノサイト、マウス口腔ケラチノサイトのいずれにおいても上手くいかず、さらなる条件検討が必要である。

マウス口腔ケラチノサイトの単離・培養系の確立



K14 Hoechst

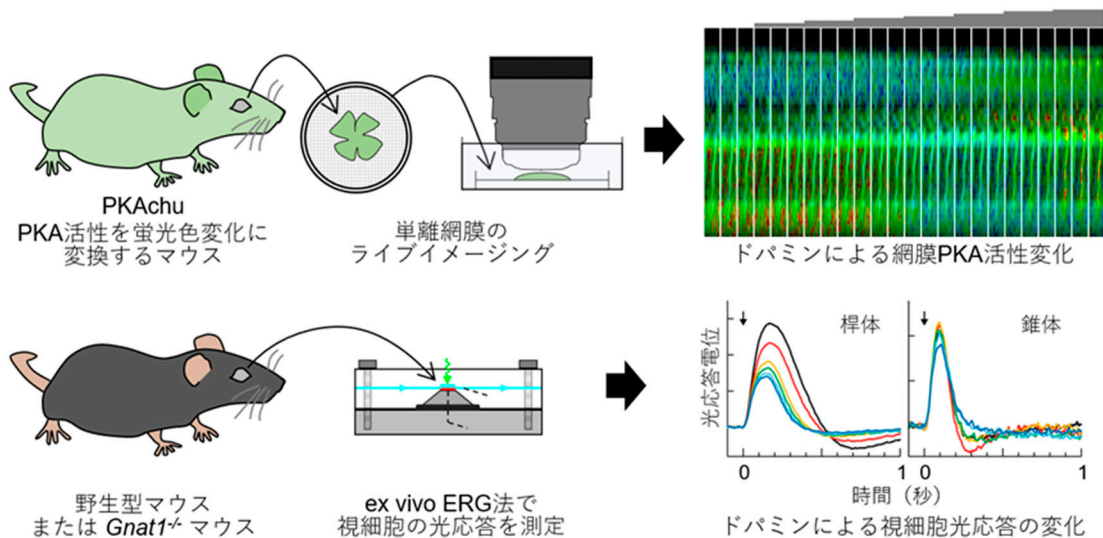
a6-integrin Hoechst

【目的】 私は2020年に桿体視細胞のProtein Kinase A (PKA) が光オフで活性化する現象を発見したが、同研究では桿体におけるPKAの役割を示すまでは至らなかった。本研究では、PKAが桿体の夜間視感度を増強する、という仮説を検証した。具体的には、ドパミンによる視細胞PKA活性阻害をライブイメージング実験で、ドパミンによる光応答抑制を電気生理学的な測定で定量的に示し、PKA活性と光感度調節の関係を明確に示すことを目的とした。

【方法】 1. 多光子顕微鏡による単離網膜のライブイメージング法。PKA活性を可視化するFRETバイオセンサーを全身で発現するPKAchuマウスから網膜試料を作製し、灌流下で3Dタイムラプスイメージングを行った。イメージング中にドパミン濃度を段階的に増加させ、網膜の各細胞層が示すPKA活性変化を観察した。2. *ex vivo* ERG法による視細胞フラッシュ光応答の電位測定。桿体応答は野生型マウス網膜に一定の時間間隔で弱いフラッシュ光を照射して測定した。錐体応答は、桿体光応答能を欠損する*Gnat1*^{-/-}マウス網膜から測定した。測定開始10分時点から10 μ Mドパミンを灌流して、応答波形の変化を分析した。

【結果】 タイムラプスイメージングにより、10 nMドパミンで桿体PKAが抑制されること、1 μ Mドパミンで網膜内層の細胞においてPKAが活性化すること、および100 μ Mドパミンで錐体PKAが活性化することが、それぞれ分かった。このデータから10 μ Mドパミンでは、桿体で強いPKA抑制が起こる一方、錐体ではほとんど変化がないと分かった。そこで、10 μ Mドパミンがそれぞれの視細胞のフラッシュ光応答波形に与える影響を*ex vivo* ERG法で評価した。その結果、桿体では光応答の減弱と短縮が検出された一方、錐体の応答波形はほとんど変化しなかった。

ドパミンが網膜PKA活性と視細胞の光感度に及ぼす影響の分析

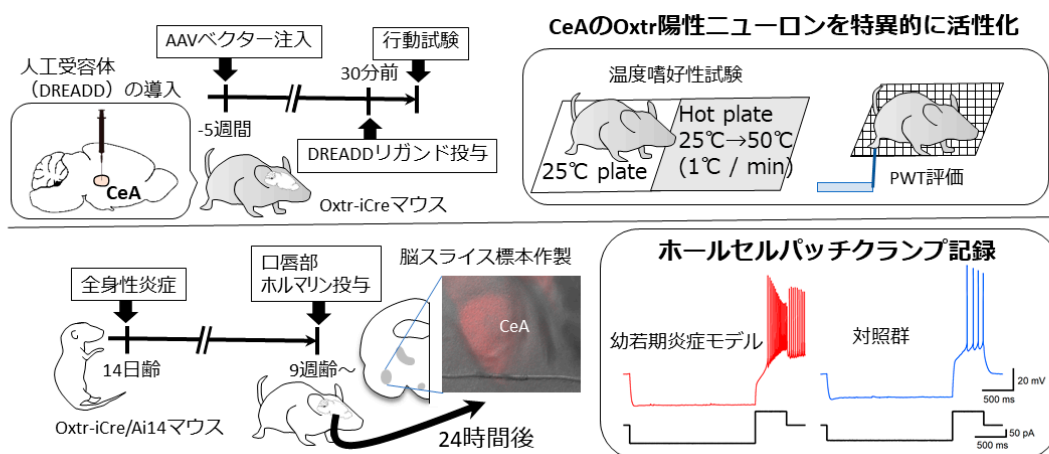


【目的】慢性痛は患者に苦痛を与え、日常生活や就労の障害、有効性の低い治療法への医療費支出など大きな社会的損失を生むが、広く奏功する治療法は確立していない。近年、慢性痛の発症と難治化の過程・機構に幼少期の疼痛体験や虐待経験などの精神的・身体的ストレスが影響を及ぼすことが疫学研究で示されてきた。基礎研究でも幼若期に炎症などのストレスを与えた動物で、成熟期の侵害受容閾値低下や疼痛行動の変容が報告されているが、その機構の解明は十分に進んでいない。本研究では、脳内痛みネットワークを構成する核のひとつである扁桃体中心核 (CeA) において、鎮痛作用を有するオキシトシンの受容体 (Oxtr) が豊富に発現していることに着目し、幼若期の炎症ストレスが CeA におけるオキシトシンシグナル系の可塑的变化を引き起こし、中枢性疼痛制御回路のプライミングを起こすという仮説を検証することを目的とした。

【方法】1. 人工受容体 DREADD (designer receptors exclusively activated by a designer drug) をコードするアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター (AAV5_hSyn-DIO-hM3D (Gq)-mCherry) を、Oxtr プロモーター制御下に iCre リコンビナーゼが発現するマウス (Oxtr-iCre マウス) の CeA に微量注入した。対照群には AAV5_hSyn-DIO-mCherry を注入した。5 週間後に DREADD リガンドを投与して、CeA の Oxtr 陽性ニューロンを特異的に活性化し、温度嗜好性と後肢足底の paw withdrawal threshold (PWT) を測定した。2. Oxtr-iCre マウスと Ai14 マウスを交配して得られた仔 (Oxtr-iCre/Ai14 マウス) に対し、生後 14 日目に全身性炎症を誘発するリポ多糖 (LPS) (または対照群として生理食塩水) を投与し、成熟期に広汎性痛覚過敏を誘発する口唇部ホルマリン (または対照群として生理食塩水) 投与を行った。口唇部投与から 24 時間後に急性脳スライス標本作製し、CeA の Oxtr 陽性ニューロンからホールセルパッチクランプ法によって膜電位を記録し、発火パターンなどの電気生理学的特性を解析した。

【結果】1. CeA の Oxtr 陽性ニューロンを活性化すると PWT は変化しなかったが、高温での嗜好性に変化が認められた。2. 幼若期に炎症を起こしたマウスの CeA における Oxtr 陽性ニューロンでは持続発火が多くみられる傾向があった。炎症の有無にかかわらず、CeA の Oxtr 陽性ニューロンには遅延発火型ニューロンが多かった。本研究の結果から、1) CeA の Oxtr 陽性ニューロンの温度嗜好性への関与、2) 幼若期炎症ストレスによる Oxtr 陽性ニューロンの発火特性の変化が明らかになった。

CeA の Oxtr 陽性ニューロンの侵害受容における機能と幼若期炎症ストレスによる可塑的变化の検証

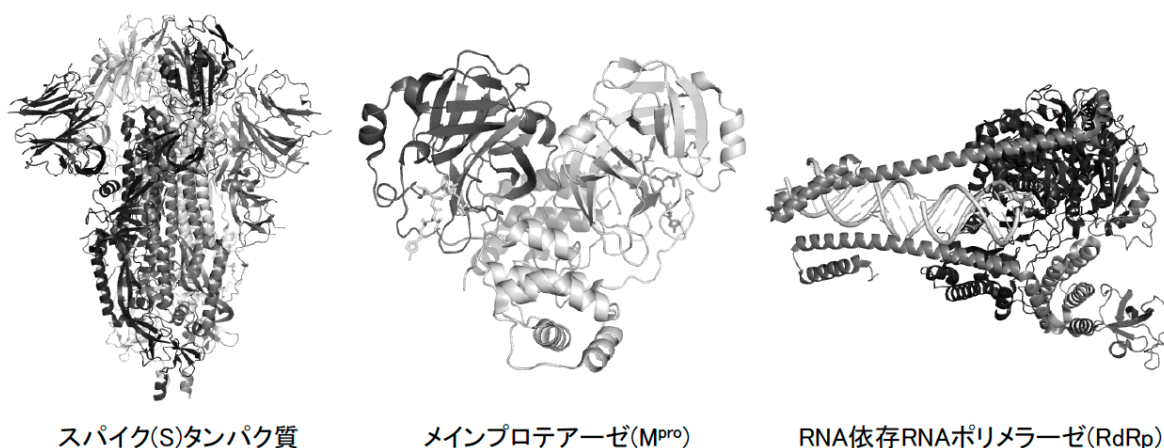


【目的】 新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) は世界全体で 5 億人以上の感染者と 600 万人以上の死者を出しており (2022 年 4 月 26 日現在)、その原因ウイルスである SARS-CoV-2 に対する抗ウイルス薬の開発は喫緊の課題である。現在、ウイルスタンパク質の立体構造を利用したバーチャルスクリーニングのヒット化合物や、同じベータコロナウイルスに属する SARS-CoV、MERS-CoV に対して実験室レベルで有効な薬剤等の中から治療薬候補が探索されている。そして、これらの内で安全性や薬物動態が試験済みの既存薬を、短期間で COVID-19 治療薬として適用することを目指すドラッグリポジショニングにより、一定の治療効果が認められた薬剤が選定された。しかしながら、特効薬となる治療効果の高い薬剤はまだ存在しないことから、より効果的な新規抗ウイルス薬の開発が望まれている。本研究の目的は、COVID-19 新規治療薬開発に必要な治療薬シード-ウイルスタンパク質複合体の構造的基盤を提供することである。

【方法】 SARS-CoV-2 由来の組換えスパイク (S) タンパク質、メインプロテアーゼ (M^{pro})、RNA 依存 RNA ポリメラーゼ (RdRp) を調製し、ウイルスタンパク質に対して阻害活性を持つ治療薬シード化合物のスクリーニング、ヒット化合物の評価、治療薬シード-ウイルスタンパク質複合体の立体構造解析を行った。

【結果】 我々は日本国内の研究機関から S タンパク質に結合する創薬シード (中和抗体・ペプチドなど) の提供を受けており、クライオ電子顕微鏡を用いて S タンパク質と治療薬シード複合体の立体構造解析を行うための基礎的な検討を行った。ショウジョウバエ由来 S2 細胞から精製した S タンパク質をクライオ電子顕微鏡で解析したところ、解析に適した粒子は確認できなかった。そこで、S タンパク質の安定性の向上が必要と考え、S タンパク質に対して 6 つのプロリン変異の導入、ジスルフィド結合の導入を行ったところ、それぞれ 3.2 Å、2.7 Å 分解能で構造解析に成功した。国立感染症研究所との共同研究により、ヒト化マウスを用いて SARS 関連コロナウイルスに対して広範な中和活性を持つ抗体 NT-193 を分離した。S タンパク質の受容体結合ドメイン (RBD) と NT-193 の複合体の結晶構造解析を行い、立体構造に基づいて中和メカニズムを明らかにした。東京大学創薬機構との共同研究により、組換え M^{pro} タンパク質に対して阻害活性を持つ化合物を、質量分析機を用いてスクリーニングした。ヒット化合物を、ウイルスを用いた細胞感染阻害実験で評価したところ、抗ウイルス活性を持つ 8 つの化合物が同定された。

ターゲットタンパク質の立体構造



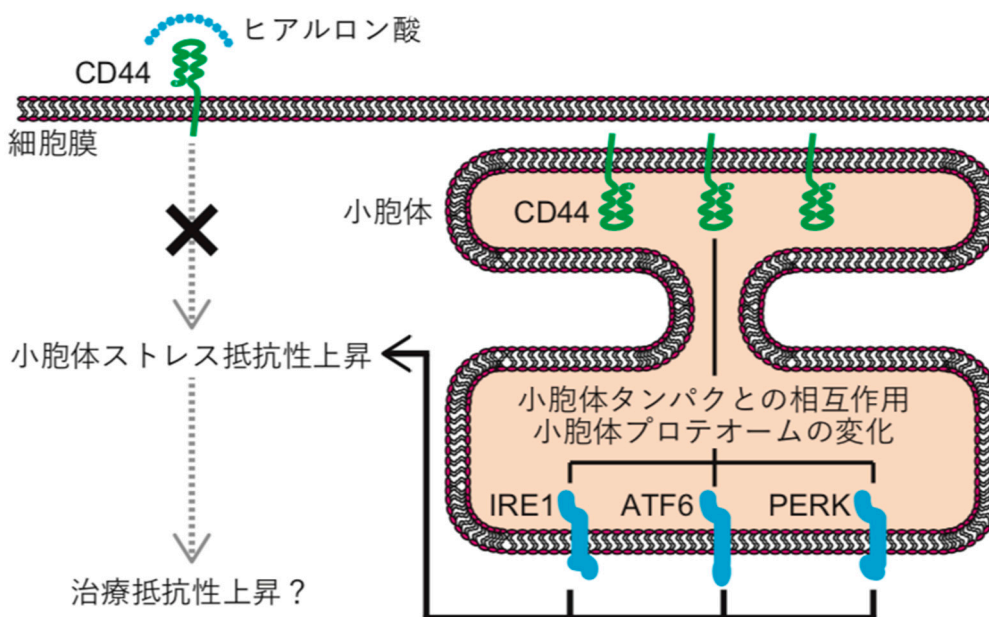
<p>148 HA受容体CD44によるがん幹細胞代謝特性制御機構の解明</p>	<p>高杉 征樹</p>
---	--------------

【目的】 超高齢化社会を迎えつつある中でがんの予防・治療に向けた基礎研究の重要性が増している。加齢は発がんの主要なリスク要因であり、そのメカニズムを明らかにする事で効率的ながん予防および治療法の開発が可能となる事が期待される。我々は最近、発がん抵抗性の超長寿齧歯類であるハダカデバネズミが産生する超高分子ヒアルロン酸がCD44を覆い隠す事でそのタンパク質間相互作用を抑制し、がん抑制作用を発揮する事を見出した。しかしながら、CD44のタンパク質間相互作用がどのようにして発がんに結びつくのかについては未だに大部分不明なままである。そこで、CD44のタンパク質間相互作用プロファイルを共免疫沈降-質量分析により解析したところ、興味深い事にこれまで基本的に細胞膜上にもみ発現すると考えられていたCD44がミトコンドリアマトリックスにも局在する可能性が示唆された。CD44はがん幹細胞の最も一般的なマーカーでもあることから、CD44による新規ミトコンドリア調節機構ががん幹細胞の代謝特性の制御に関わっている可能性が考えられる。そこで、本研究ではCD44に着目したがん幹細胞克服の新たな戦略の創出を目指した。

【方法】 先ずは我々がCD44の機能評価をこれまでも進めてきたヒト正常線維芽細胞IMR90を用いて、CD44の細胞内局在を共焦点顕微鏡で詳細に解析し、局在が認められたオルガネラの機能との関わりを主にCD44ノックダウン細胞に生ずる変化を調べる事で明らかにした。

【結果】 CD44とオルガネラマーカーとの共焦点顕微鏡解析から、CD44がミトコンドリアではなく、同じく共免疫沈降-質量分析データから局在が示唆され、かつがん幹細胞の代謝特性に関わりうる小胞体に局在する事が示された。解析の結果、CD44はがん幹細胞の幹細胞性の制御に重要な働きを示す事が知られる小胞体ストレス応答制御因子ATF6の活性を高める事が明らかとなった。CD44は小胞体に局在し、多数の小胞体タンパクと相互作用するだけでなく小胞体プロテオームを変化させ、小胞体の膜タンパクの可溶性を低下させATF6のゴルジ体移行を促進させる事が示された。結果、CD44はATF6を含むunfolded protein response (UPR) 制御因子依存のかつヒアルロン酸非依存的に細胞の小胞体ストレス抵抗性を高める事が示された。

CD44をUPR制御因子依存的に細胞の小胞体ストレス抵抗性を上昇させる

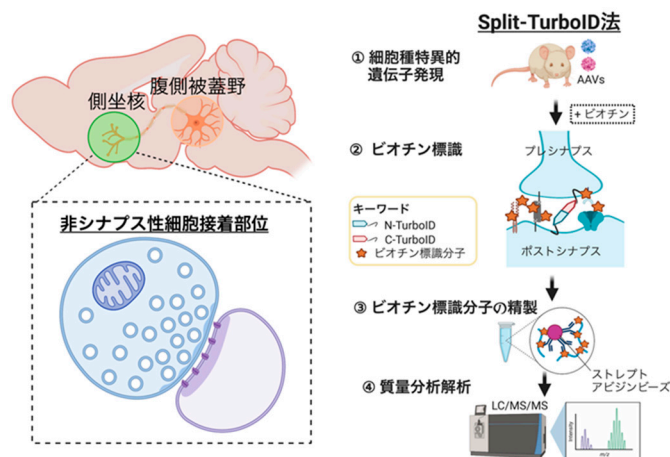


【目的】 脳内において、神経細胞は主に「シナプス」と「非シナプス性接着」という 2 種類の細胞間相互作用により、記憶・情動・意欲などの脳高次機能を担う複雑な神経回路網の構築や再編成、神経活動を制御している。神経細胞のシナプスは、シナプス前膜と後膜にシナプス小胞や受容体が集積した非常に特徴的な接着構造を形成し、グルタミン酸や GABA などの神経伝達物質を介した速い情報伝達（配線伝達）を行う。一方で、非シナプス性接着構造はグリア細胞 - 神経細胞間やドーパミン作動性神経細胞 - 中型有棘神経細胞間で観察され、この非シナプス性接着構造では比較的遅い情報伝達（拡散性伝達）を行う。興味深いことに、ドーパミン作動性神経細胞の非シナプス性接着部位では神経伝達物質と受容体がミスマッチした「異種結合」であることもわかってきた（内ヶ島ら、*PNAS*, 2016）。また、ドーパミンの拡散性伝達はグルタミン酸神経伝達への応答性を高めることで情動行動を制御しており（永井ら、*Neuron*, 2016）、情動行動の異常は統合失調症、自閉症、気分障害などの多くの精神疾患と密接に関連している。しかし、拡散性伝達を担う非シナプス性接着構造を構成する分子メカニズムについては十分に分かっていない。近年、私達は分割型近依存性ビオチン標識（Split-TurboID）法を開発し、特定の細胞間接着部位に存在する構成分子のビオチン標識と網羅的探索を行ってきた（高野ら、*Nature*, 2020；高野ら、*Neurosci Res.*, 2021）。そこで、本研究課題では、Split-TurboID 法を腹側被蓋野 - 側坐核のドーパミン作動性神経細胞に適用することによって、生体内ドーパミン作動性神経細胞の非シナプス性接着に関与する分子ネットワークの網羅的同定と生理的意義を解明することを目的とした。

【方法】 私達は、まず野生型マウスを用いて Split-TurboID の断片 N TurboID を腹側被蓋野に、もう一方の断片 C TurboID を側坐核に細胞種特異的アデノ随伴ウイルス（AAV）を用いて遺伝子導入した。3 週間後にビオチン投与を行い、ビオチン標識を誘導した。その後、ドーパミン作動性神経細胞特異的 Cre マウス（dopamine transporter 遺伝子-Cre マウス）を用いて同様の実験を行った。Split-TurboID によるビオチン標識を免疫組織染色、silver staining にて検討し、また質量分析を用いてビオチン標識分子を解析した。

【結果】 マウス脳内において、腹側被蓋野から側坐核において長距離に投射されるドーパミン作動性神経細胞の非シナプス性細胞接着部位において Split-TurboID 法によりビオチン標識が誘導されることが分かった。また私達は、これらのドーパミン作動性神経細胞の非シナプス性細胞接着部位のビオチン標識タンパク質を streptavidin ビーズによるアフィニティークロマトグラフィーによって精製できることを確認し、質量分析解析を行った。その結果、ドーパミン作動性神経細胞の非シナプス性細胞接着部位を構成する分子として、194 もの分子を同定した。興味深いことに、これらの分子はシナプス関連分子が非常に多く含まれており、非シナプス細胞接着部位はシナプスとよく似た分子機能によって制御されている可能性が考えられた。

Split-TurboID 法を用いたドーパミン作動性神経細胞接着部位の構成分子の網羅的探索

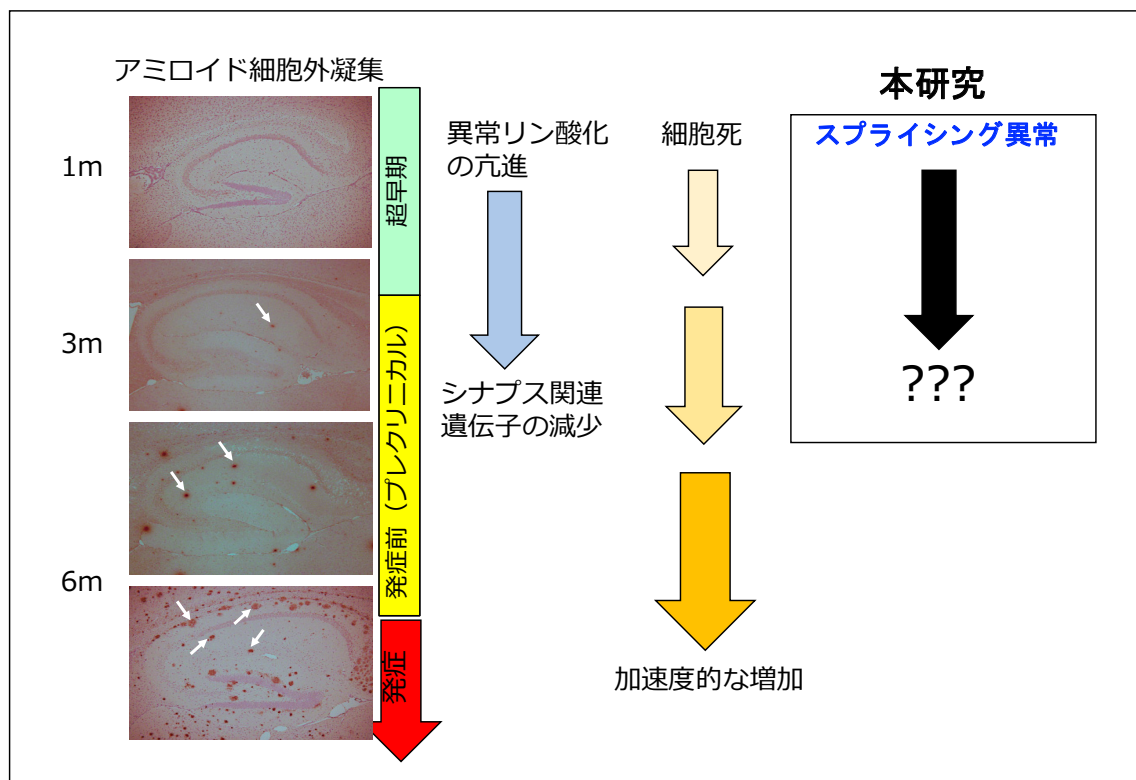


【目的】 アルツハイマー病 (AD) は、社会の高齢化に伴い、国内のみならず世界的にも罹患数が増加している神経変性疾患である。そしてこれまで、AD の病態の最上流は細胞外のアミロイドβ (Aβ) の蓄積だと考えられ、細胞外Aβの除去を治療戦略としたアミロイド抗体を用いた多くの臨床試験が行われてきた。しかし、アミロイドの除去には成功したものの認知機能の改善に十分な成果を得られていない。一方、研究代表者の先行研究において発症前及び細胞外Aβの蓄積前からすでに超早期病態が起こっていることを明らかにした。そして、この超早期病態では遺伝子のスプライシング異常が起こっている可能性が先行研究で示唆された。そこで、本研究ではこのスプライシング異常の影響を明らかにすることを目的とした。

【方法】 スプライシング異常が有意に確認された遺伝子のうち、特にヒトとマウスで配列に相同性の高い遺伝子に着目した。しかし、この遺伝子の機能はほとんど明らかとなっていなかったため、この遺伝子の機能解明を中心として、超早期アルツハイマー病態へ及ぼす影響を調べた。

【結果】 機能未知遺伝子 X のミスプライシングは超早期アルツハイマー病モデルマウスで顕著に増加しており、またこのミスプライシングはヒト患者死後脳においても確認された。また、全長遺伝子 X と Exon 欠損遺伝子 X では異なる局在を示し、その下流へと及ぼす影響は異なることが明らかとなった。そして、この機能未知遺伝子 X はアルツハイマー病態だけでなく、今後複数の遺伝子制御に重要となる遺伝子である可能性が示唆された。

本研究の概要

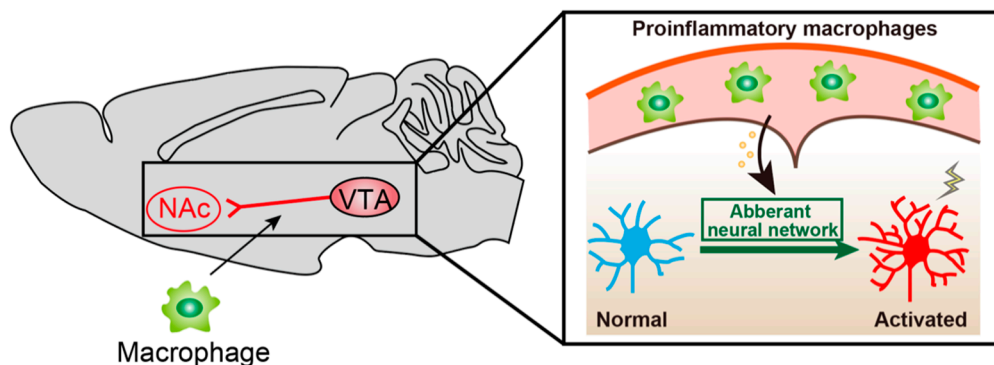


【目的】 脳の髄膜や脈絡叢に局在する免疫系細胞は脳の発達に関与することが知られているが、脳内の免疫系の異常が脳発達障害に関わるのかは明らかになっていない。過去の研究から、発達期のマウスの髄膜に炎症を誘導すると注意欠陥・多動性障害に類似した行動異常が観察されること、側坐核で神経が過剰に活性化することを見出していた。本研究では、幼若期の髄膜炎に伴う行動異常に関わる脳領域の特定とそのメカニズムの解明を目的に研究を行った。

【方法】 生後7日のマウスに炎症性物質であるカラギーナンを投与して髄膜炎を誘導した。成熟後、アデノ随伴ウイルスを用いて神経活動を薬理遺伝学的に抑制する hM4D (Gi) を側坐核に投射しているドパミン作動性神経特異的に発現させ、オープンフィールド試験、プレパルス抑制試験を行った。また、マクロファージを除去できるクロドロン酸リポソームを発達期のマウスに投与し、カラギーナンを投与して髄膜炎を誘導した。

【結果】 hM4D (Gi) のリガンドである Clozapine-N-Oxide (CNO) を投与して神経活動を抑制させると、NAc の過剰な神経活動が抑制された。さらに行動学的な解析から多動行動が大きく抑制され、プレパルス抑制の減弱も正常化することを確認できた。カラギーナンの投与後には脳でマクロファージが大幅に増加する。クロドロン酸リポソームを投与した上でカラギーナンを大槽内に投与すると脳内のマクロファージが減少していることが確認できた。成熟後に行動学的な解析を行ったところ、多動行動が抑制され、PPI の減弱も抑制される傾向が得られた。

炎症性のマクロファージにより異常な神経回路が形成される

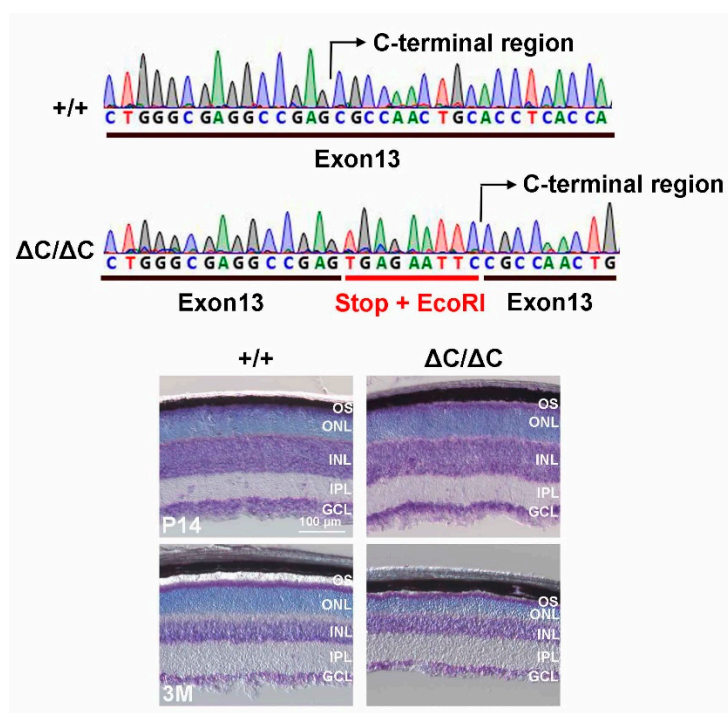


【目的】 繊毛は細胞の表面に突出した微小管を軸とした細胞小器官であり、生物の発生や恒常性維持に重要な役割を担っている。ヒトにおける繊毛の機能不全は、水頭症、網膜色素変性症、嚢胞腎、肥満、糖尿病、不妊、内臓逆位、難聴、多指症、短肢症などの症状が見られる「繊毛病」と呼ばれる一群の疾患を引き起こす。しかし、繊毛病の根本的な治療法はまだ確立されておらず、繊毛病の発症・病態メカニズムについてもまだ不明な点が多く残っている。私たちは以前、互いに相同性の高いセリンスレオニンキナーゼである Intestinal cell kinase (Ick) と Male germ cell-associated kinase (Mak) が、繊毛内タンパク質輸送と繊毛の長さを制御することを明らかにした。ヒト *ICK* 遺伝子のミスセンス変異は、致死となる繊毛病の原因であることが報告されている。また、ヒト *MAK* 遺伝子の変異は網膜色素変性症の原因となることが知られている。

【方法】 繊毛病の分子病態メカニズムを明らかにするため、Ick と相互作用する分子を酵母ツーハイブリッド法により探索し候補因子を得て、免疫沈降法によって Ick や Mak との結合部位を同定した。結合部位を欠損するマウスを CRISPR/Cas9 法を用いたノックインにより作製し、網膜における組織学的解析を行った。

【結果】 Ick と相互作用する分子をスクリーニングにより探索し、繊毛病原因遺伝子として知られる *Serologically defined colon cancer antigen 8 (Sdccag8)* を候補因子として同定した。免疫沈降法によって、Ick と Mak は Sdccag8 の C 末端領域 (Sdccag8-C) と相互作用することが明らかとなった。ヒト *SDCCAG8* の C 末端領域を欠損させると考えられる短縮型変異が、網膜の変性などの様々な臓器の異常と関連すると報告されていることを踏まえ、私たちは、*in vivo* における Sdccag8-C の役割を明らかにするために、ゲノム編集を用いて Sdccag8-C が欠失するように終止コドンでノックインした *Sdccag8* 部分欠失 (*Sdccag8*^{ΔC/ΔC}) マウスを作製した。*Sdccag8*^{ΔC/ΔC} マウスを解析したところ、*Sdccag8*^{ΔC/ΔC} マウスは、繊毛病で見られる表現型の 1 つである網膜変性を示した。また、*Sdccag8*^{ΔC/ΔC} マウスの表現型は、*Ick* 欠損マウスや *Mak* 欠損マウスの表現型と一部類似していた。以上の結果から、Sdccag8-C は繊毛形成に必要であること、Sdccag8 は Ick、Mak と機能的に相互作用していることが示唆された。本研究により、繊毛病原因タンパク質の相互作用ネットワークと繊毛病の病態メカニズムの一端が解明されたと考えられる。

Sdccag8^{ΔC/ΔC}マウスの作製と網膜における表現型解析

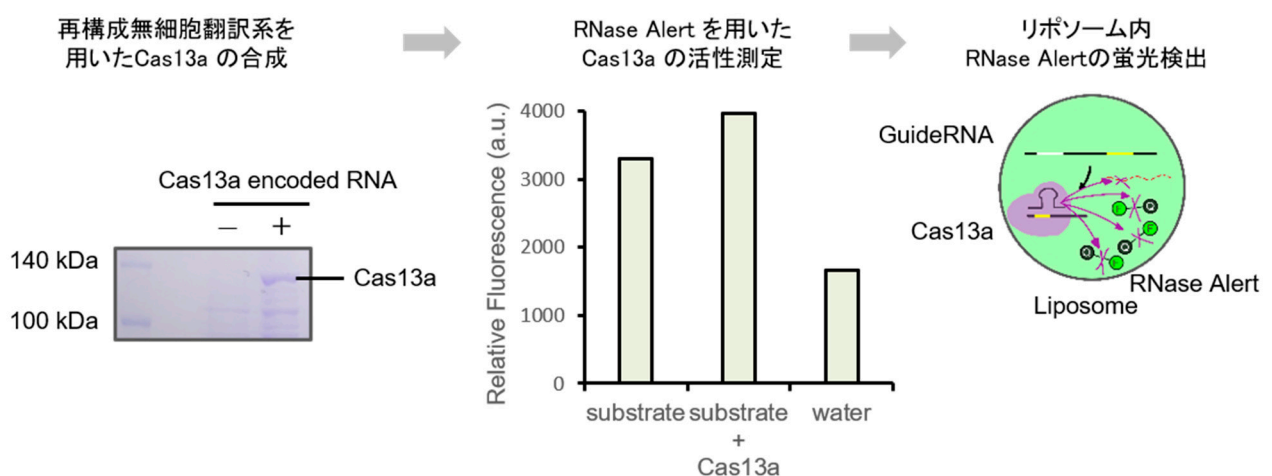


【目的】 染色体構造は、長鎖DNAを細胞の核内に収納するだけでなく、染色体を構成するタンパク質やDNAが化学修飾を受けることで、ゲノム情報に依存しないエピジェネティックな経路で遺伝子の発現制御に重要な機能を持っている。この構造を人工的に再構成することは、細胞の新規制御法の確立や、非天然修飾による染色体構造制御機構の開発、染色体構造の生化学的な機能解明など様々な分野・技術開発に重要である。しかし、未だ、染色体構造を再構成し、非細胞環境下で転写・翻訳することや、エピジェネティック制御の細胞外再構成は達成されていない。その理由として、細胞外で、Widom 601 配列などのヒストンタンパク質と相互作用しやすい配列を用いずにヌクレオソーム構造を再構成することが困難である、という課題が挙げられる。そこで、ヌクレオソーム構造を脂質二重膜小胞（リポソーム）に封入し、セルソーターによってヌクレオソーム構造を検出・分取することで、再構成効率の低いヌクレオソームを精製できるようになり、人工染色体の作製と発現系の開発が可能になると考えた。具体的には、ヌクレオソーム構造を形成していないDNAを内封したリポソーム内では、活性化されたCas13aによりRNase Alertの蛍光が検出され、ヌクレオソーム構造が形成されている場合には、リポソーム内で赤色蛍光タンパク質が無細胞翻訳されることで、蛍光の種類によってヌクレオソームの有無を識別し、分取する手法の開発に取り組んでいる。本研究では、その基盤技術となるCas13aの精製、無細胞翻訳系によるCas13aの合成、Cas13aのRNA切断活性の検出を行った。

【方法】 再構成無細胞翻訳系 PUREfrefx 1.0 を用いて Cas13a を合成した。その後、独自に設計した crRNA と target RNA を加え、RNA 切断により蛍光が検出できる RNase Alert を用いて、無細胞翻訳した Cas13a の酵素活性を検出した。まず、UV ランプによる切断された RNase Alert の蛍光検出と plate reader を用いて Cas13 の有無による相対的な蛍光輝度を測定した。

【結果】 再構成無細胞翻訳系によって合成された Cas13a が構造を形成し、酵素活性を有すること、および本研究でデザインした crRNA および target RNA が機能することを示した。しかし、Cas13a の分子数に対して、crRNA、target RNA 分子が不足しており、RNase Alert 切断量が低いためにフローサイトメーターを用いて蛍光を検出できない可能性が示唆された。そのため、無細胞翻訳系で Cas13a を合成した後に精製するため、N 末端に His-tag を導入し、精製、濃度の決定と RNA 濃度の検討を行う必要がある。RNase Alert を RNaseA で切断した場合にはフローサイトメーターで蛍光を検出できたため、Cas13a の活性を上げることで、セルソーターでの検出は可能になると考えられる。

ヌクレオソーム構造がないときのリポソーム内蛍光検出の概略

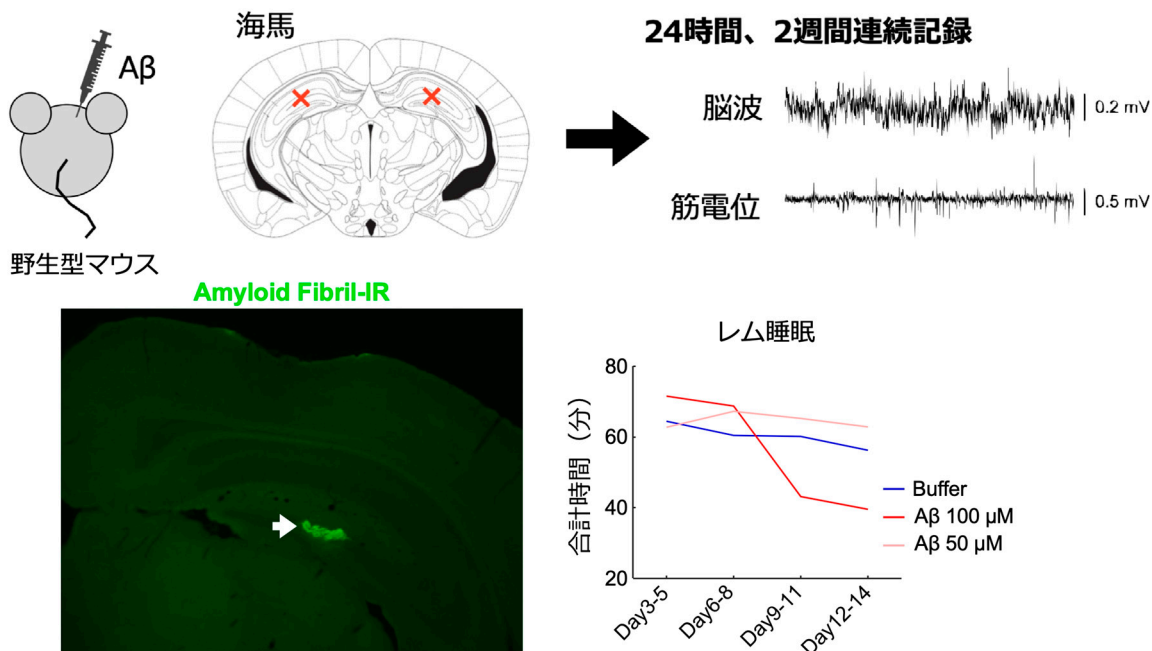


【目的】 加齢によりノンレム睡眠が浅くなり、睡眠時の中途覚醒の頻度が増加し、結果として睡眠の質が低下する。しかしながら、なぜ加齢により睡眠の量や質が変化していくのか、そのメカニズムは未だ不明である。アルツハイマー症やパーキンソン病といった神経変性疾患は加齢と共にその発症リスクが増加する。その発症原因のひとつとして、加齢によるタンパク質のアミロイド線維化が挙げられる。タンパク質が天然立体構造を維持できず、その結果、蓄積・凝集化してしまうことで脳に不可逆的なダメージを与える。これらのことから、私たちは加齢に伴い蓄積、凝集化した不良タンパク質による脳ダメージが睡眠変化を誘発しているのではないかと考えた。そこで本研究では、マウスに対して不良タンパク質を投与することで加齢を模倣し、加齢による睡眠変化メカニズムを解明することを目的とする。

【方法】 3~4ヶ月齢の若い成熟マウスの両側海馬に精製したアミロイドベータ (A β) を投与した。コントロールには Buffer を両側海馬に投与したマウスを用いた。同時に脳波筋電位を測定するための電極を留置した。手術後3日目より自由行動下でマウスの脳波と筋電位を24時間連続で記録し、14日目まで記録した。その後、オフラインで睡眠覚醒ステージ判定や脳波の解析を行った。

【結果】 投与した A β が、マウス脳内でアミロイド線維を形成しているかどうかを蛍光免疫染色により確認した。検出したアミロイド線維の周辺に反応性アストロサイトや活性化ミクログリアが局在していることを見出した。A β 投与後の睡眠覚醒ステージや脳波を解析した。その結果、睡眠覚醒ステージの中でもレム睡眠合計時間が経時的に減少して行くことを見出した。さらに、レム睡眠中の脳波を詳細に解析すると、レム睡眠時に特徴的な脳波であるシータ波 (5~10 Hz) が経時的に減少することを明らかにした。今後更なる検討が必要ではあるが、A β の投与による加齢模倣では睡眠覚醒ステージの中でも特にレム睡眠異常が観察される可能性を示した。

本研究の方法と結果

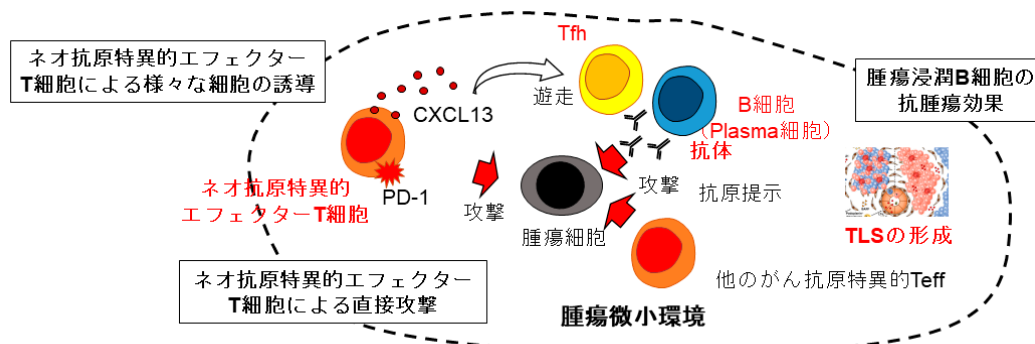


【目的】 がん免疫療法の効果が証明されたが、未だ効果は不十分で、抗腫瘍免疫応答の本態解明、効果予測バイオマーカー、より効果の高い治療が望まれている。体細胞変異由来のがん抗原（ネオ抗原）は非自己として強い免疫応答を起こすことができるため、抗腫瘍免疫応答に重要で、ネオ抗原を特異的に認識して腫瘍細胞を攻撃するエフェクターT細胞が、抗PD-1抗体により活性化して抗腫瘍効果を発揮するとされている。我々は患者由来の腫瘍浸潤リンパ球（TIL）をシングルセルシーケンスでT細胞受容体（TCR）も同時に解析し、同じ患者から樹立した腫瘍細胞株とエフェクターT細胞をアッセイすることで、ネオ抗原特異のエフェクターT細胞を正確に同定した。網羅的遺伝子発現データからは、ネオ抗原特異のエフェクターT細胞がPD-1などの従来から報告のある分子を発現していたが、より特異的な分子としてCXCL13を同定した。CXCL13は濾胞性ヘルパーT細胞（Tfh）/B細胞を誘導し腫瘍局所3次リンパ様構造（TLS）形成に重要なケモカインであり、ネオ抗原特異のエフェクターT細胞自らTfh/B細胞浸潤を促しTLS形成を誘導して、様々な抗原に対するエフェクターT細胞を誘導して抗腫瘍効果を発揮している可能性が考えられた。そこで、ネオ抗原特異のエフェクターT細胞と腫瘍浸潤Tfh/B細胞の関係、その抗腫瘍免疫応答での役割を解明する目的で本研究を計画した。

【方法】 マウスモデルに抗PD-1抗体感受性細胞株と耐性細胞株を皮下に移植し、TILをフローサイトメトリーで解析した。さらにCD8陽性エフェクターT細胞の影響を明らかにするため、マウスモデルに感受性株を皮下移植して抗CD8抗体によりCD8陽性T細胞を除去もしくは抗CXCL13抗体でブロックし、TILをフローサイトメトリーで解析した。また、MHCクラスI（MHC-I）をCRISPR/Cas9を用いて腫瘍細胞株で発現を調整してTILを解析した。さらに、マウスにとってのネオ抗原であるOVAの発現もウイルスを用いて腫瘍細胞で調整して同様に解析した。さらに臨床検体のTILのBCRと同時に遺伝子発現を解析した。

【結果】 B6マウス由来のマウス細胞株MC-38、E.G7、B16F10、LL/2をB6マウスに皮下移植し、TILを解析したところ抗PD-1抗体感受性の細胞株MC-38、E.G7ではTfhやB細胞浸潤が多く、耐性の細胞株B16F10、LL/2では少なかった。またCD8陽性T細胞でのCXCL13発現も解析したところ、PD-1陽性CD8陽性T細胞でのCXCL13発現が感受性の細胞株では高かった。これらからCD8陽性エフェクターT細胞がCXCL13を介してTfh/B細胞浸潤を促しTLS形成に関わることが示唆された。Tfh/B細胞浸潤・TLS形成におけるCD8陽性T細胞の重要性が示唆されたため、抗CD8抗体でCD8陽性T細胞を除去したところ、Tfh/B細胞浸潤は有意に減少し、また抗CXCL13抗体でも同様であった。さらにOVAを腫瘍細胞株に導入したところ、PD-1陽性CXCL13陽性CD8陽性T細胞浸潤、Tfh/B細胞浸潤も増えた。以上からTILの中でもネオ抗原特異のエフェクターT細胞がCXCL13を介してTfh/B細胞浸潤を促し抗腫瘍免疫応答に寄与していることが示唆された。臨床検体の解析ではB細胞とPlasma細胞の浸潤を確認し、今後BCRの解析を統合する予定である。

腫瘍微小環境でのネオ抗原特異のエフェクターT細胞とTfh/B細胞の関係

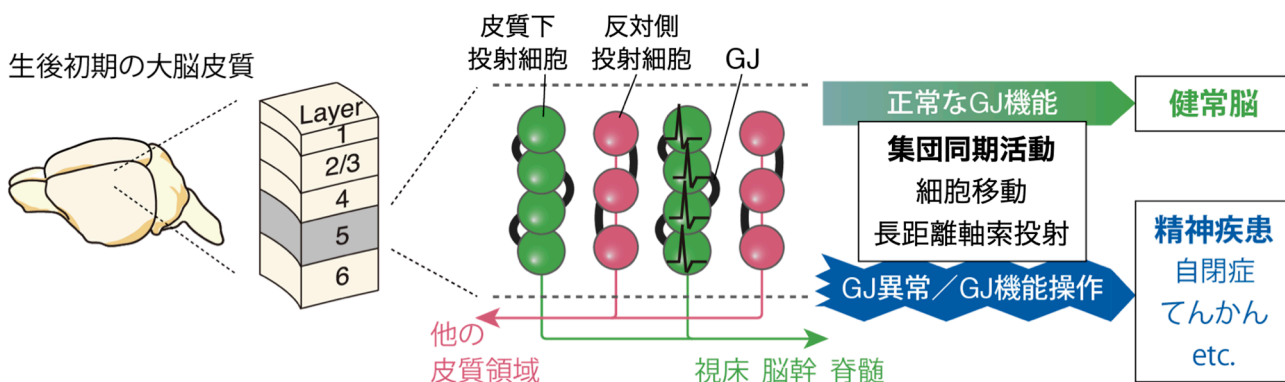


【目的】 大脳皮質の興奮性細胞には多くの種類が存在し、それぞれ独自の回路を持つ。新生児期の大脳皮質で見られる細胞集団の自発的な同期活動は、活動依存的なメカニズムにより投射パターンや皮質内局所回路などの精密な回路の形成に関わると考えられ、この機能の破綻は自閉症やてんかんなどの精神疾患につながる可能性がある。近年著者らは、マウス急性脳スライスを用いた実験で、発達期の興奮性細胞がギャップ結合による精密なネットワークを持ち、細胞間の活動レベルを調節することで発達期の神経回路形成を制御している可能性を明らかにした。そこで本研究では、第1に第5層神経細胞の集団同期活動の解析を試み、第2に神経活動レベルを人為的に操作した際の発達期大脳皮質の回路形成への影響を解析する。

【方法】 1. 発達期大脳皮質の集団同期活動の解析では、マウス胎児に子宮内電気穿孔法で、神経活動を光に変換する Ca^{2+} 指示緑色蛍光タンパク質 GCaMP の発現プラスミドを神経細胞に導入した。右脳一次体性感覚野バレル皮質（ヒゲの感覚を司る脳領域）上の頭蓋骨に穴を開け、直径 3 mm の円形のカバーガラスを載せイメージング窓を作製した。マウスを二光子顕微鏡下に置き単一細胞レベルの GCaMP イメージングを開始し、麻酔濃度を下げて観察される自発活動を解析した。2. 発達期大脳皮質の神経活動レベル操作による回路形成への影響の解析では、第2/3層神経細胞に子宮内電気穿孔法で、電位依存性ナトリウムチャンネル Nav1.2 の機能獲得型変異であり発達性およびてんかん性脳症 11 の原因変異でもある T773I 変異体を導入し、神経活動を亢進させた。神経前駆細胞から生まれた細胞が正しい位置に移動するプロセスと、異なる脳領域を正しく結ぶ長距離軸索投射プロセスを、形態学的に解析した。

【結果】 1. GCaMP を第4層細胞に導入した実験では、麻酔濃度の低下に従って、個々のバレルで散発的なパッチワーク状同期活動が観察された。一方、GCaMP を第5層細胞に導入した実験では、遺伝子導入された個体の選別や発現位置の特定ができなかったこと、細胞種の特用に用いる逆行性トレーサー投与が頭蓋骨の発達を阻害しイメージング窓作製時に問題が生じること、など方法論に難点があり目的の実験を成功させることができなかった。これらの問題点を、新生児マウスからの GCaMP 生体イメージングによる自発活動計測の方法をまとめた論文に盛り込み、学術雑誌に投稿する予定である。2. Nav1.2^{T773I} の強制発現は一部の細胞で細胞移動を障害した。一方、脳梁投射軸索の白質における伸長を顕著に減少させ、反対側皮質への軸索投射を完全に消失させた。これらの影響は、ナトリウムイオン流入亢進による神経活動亢進が遺伝子発現変化やその他の影響を引き起こした結果だと考えられる。生後の発達時期に神経活動は適切なレベルに調節される必要があることが示唆され、イオンや小分子を通す細胞間結合であるギャップ結合はこの調節に関与し回路調節を行っている可能性が示唆された。

新生児期の大脳皮質における集団同期活動の神経回路形成への寄与およびギャップ結合 (gap junction : GJ) の関与

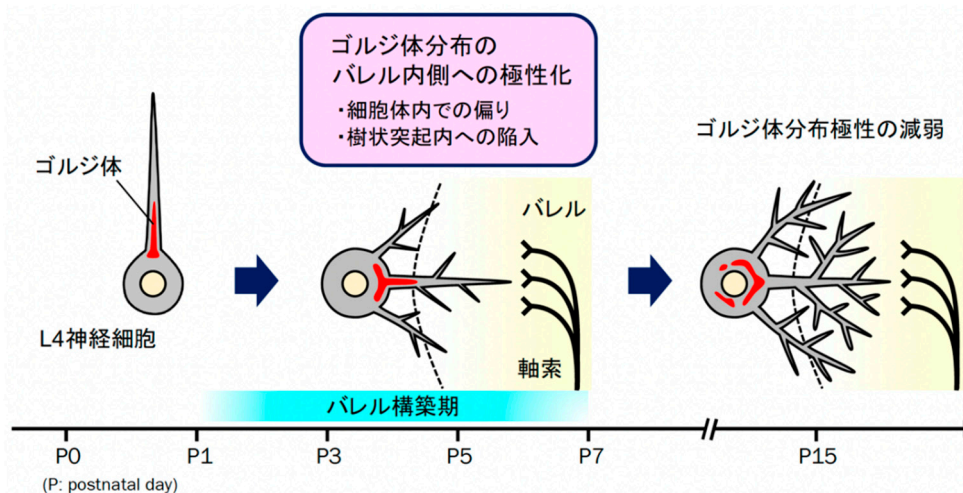


【目的】 哺乳類大脳皮質の感覚野第4層 (Layer 4 : L4) では、視床を経由して伝達される末梢感覚器からの入力を受けて、機能的に独立したモジュール (単位回路) の並列構造が構築され、成体での高度な情報処理の回路基盤となる。例えば、マウス体性感覚野 (バレル皮質) においてヒゲ触覚情報処理を担うモジュールである「バレル」では、視床皮質軸索 (Thalamocortical axon : TCA) が大脳皮質 L4 神経細胞に入力し、各頬ヒゲからの個別の触覚情報を伝達する。L4 神経細胞は、生後一週間の間に、所属するバレルの TCA 終末に向けて選択的に樹状突起を伸長することで、単一ヒゲ触覚の特異的な受容を可能にする。したがって、バレル皮質 L4 神経細胞の樹状突起選択的伸長を制御する細胞内機構の解明は、大脳皮質モジュール構築機構の理解に繋がると考えられる。樹状突起の伸長には、細胞膜成分や接着分子、シナプス関連分子などの供給が必要であり、特定の樹状突起への選択的な物質輸送が樹状突起の選別に関与すると考えられることから、細胞内小胞輸送のハブであるゴルジ体に着目した。本研究では、バレル構築過程における L4 神経細胞内のゴルジ体局在動態を生体内で解明することを目的とした。

【方法】 ICR マウスを使用し、子宮内電気穿孔法を用いて、ゴルジ体移行性 GFP (Golgi-EGFP) と樹状突起観察用の RFP をバレル皮質 L4 神経細胞に発現させた。単一細胞形態解析を行うため、Supernova 法を用いて神経細胞をまばらに標識した。バレル構築開始前 (生後 1 日齢 : P1)、バレル構築期 (P3、5、7)、およびバレル構築完了後 (P11、15) の各時点で大脳皮質組織切片を作製し、vesicular glutamate transporter 2 (vGlut2) 抗体染色によって TCA 終末を可視化した後、単一神経細胞レベルでゴルジ体局在と樹状突起形態の同時解析を行った。

【結果】 上記の方法を用いて、発達段階での樹状突起形態の成熟に伴うバレル皮質 L4 神経細胞のゴルジ体局在変化を解析した。まず冠状断切片を用いて解析した。バレル皮質 L4 神経細胞のゴルジ体局在は、バレル構築開始前の P1 では、主に先端樹状突起 (apical dendrite : AD) 内部に局在していたが、P3 から P5 へと発達が進むにつれて細胞体へと局在が変化した。P5 では、一部の細胞において、細胞体に加えて基底樹状突起 (basal dendrite : BD) 内部にゴルジ体が陥入していた。接線方向の組織切片を用いて、L4 神経細胞のゴルジ体局在とバレルとの空間関係を詳細に解析したところ、P5 の L4 神経細胞では、細胞体のバレル内側領域にゴルジ体が偏って分布していた。さらに、バレル内側に向けて伸長した、長く複雑な BD の内部に特異的にゴルジ体が陥入していることが明らかとなった。このゴルジ体の極性化した分布 (細胞体でのバレル内側への偏りと、バレル内側に伸びた BD への陥入) は、P5、7 で顕著に見られた一方で、バレル構築完了後の P11 から P15 にかけて徐々に減弱した。したがって、L4 神経細胞のゴルジ体分布極性は、バレル構築期のみみられる一過性の現象であり、樹状突起の選択的伸長に寄与する可能性が示唆された。

バレル構築期 L4 神経細胞のゴルジ体局在動態



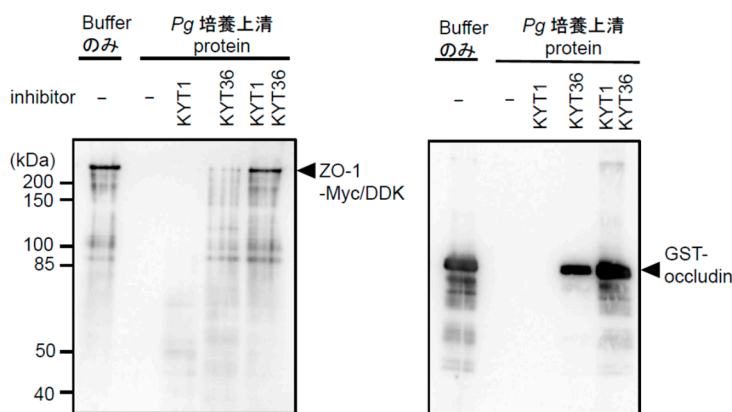
158 歯周病による腸管バリア破綻がもたらす認知障害の機序	野中 さおり
-------------------------------	--------

【目的】 近年、唾液と共に飲み込まれて腸内に達した歯周病菌が腸内細菌の組成を変え、異常な組成の腸内細菌由来の分子が脳に移行してアルツハイマー病を発症させると予想されている。それには、腸内細菌由来の分子が強固な腸管バリアを通過して全身循環系に移行する必要があるが、その機構は不明である。本研究は、歯周病菌による腸管バリアの破綻機構を解明し、そのマウスの認知機能障害に対する関与を調べることを目的とした。我々の研究グループは、代表的な歯周病菌であるジンジバリス菌が分泌する歯周組織破壊酵素「ジンジパイン」がミクログリアの protease-activated receptor2 (PAR2) を活性化することを報告している。さらに、PAR2 の活性化により腸上皮細胞や腎糸球体の血管内皮細胞の透過性が増大することが知られていた。このことから、我々は「飲み込まれて腸内に移行したジンジバリス菌が産生するジンジパインが PAR2 を活性化して、腸上皮細胞の密着結合の構造的変容を促し、透過性を高める」という着想に至った。本研究では、この検証とそのアルツハイマー病様の認知障害に対する関与を調べることを目的とした。

【方法】 研究当初は PAR2 の関与を予想していたが、「ジンジパインによる脳バリア破綻の仕組み」を調べている過程で、ジンジパインは PAR2 を介さず密着結合タンパク質の ZO-1 やオクルディンを直接分解することが示唆された。そこで、ジンジパインによる腸上皮バリア破綻も同じ仕組みである可能性が高いと予想し、それを検証する方針に切り替えた。具体的には、分泌性のジンジパインを含むジンジバリス菌の培養上清からタンパク質を硫酸沈殿により濃縮し、それを ZO-1 及びオクルディンの組換えタンパク質とインキュベート後、これらタンパク質の減少が見られるか、及びそれがジンジパインの阻害剤 (KYT1 及び KYT36) で阻害されるかを、反応産物に対する抗 ZO-1 抗体及び抗オクルディン抗体を用いたウェスタンブロッティングにより調べた。

【結果】 ZO-1 及びオクルディンの組換えタンパク質は、ジンジバリス菌の培養上清由来タンパク質 (*Pg* 培養上清 protein) との混合で分解された。ジンジパインには、切断認識配列の異なる 2 種類があり、Arg-ジンジパインはアルギニンの後、Lys-ジンジパインはリジンの後のペプチド結合をそれぞれ切断する。これらタンパク質の分解に対する Arg-ジンジパイン阻害剤の KYT1 及び、Lys-ジンジパイン阻害剤の KYT36 の効果を調べた結果、ZO-1 は Arg-ジンジパインと Lys-ジンジパインの両方が協調して、また、オクルディンについては、主に Lys-ジンジパインが直接分解すると考えられた (下図)。ZO-1 やオクルディンのアミノ酸配列を調べたところ、ジンジパインによる切断認識配列はすべて細胞質内にあった。よって、ジンジパインは腸上皮細胞の細胞質内に侵入してこれらの密着結合構成タンパク質を分解し、腸バリアの透過性を上げていると考えられた。ジンジバリス菌のようなグラム陰性細菌は、outer membrane vesicles (OMVs) と呼ばれる小胞を外膜から切り出すような形で分泌し、様々な病原性因子を宿主細胞へと運ぶことが知られている。今後は、ジンジパインが OMV に結合した形で腸上皮細胞内に侵入して腸上皮バリアの破綻を促すかを *in vitro* 及び *in vivo* の実験系で調べると共に、OMV 上のジンジパインがジンジバリス菌の経口投与時にマウスで引き起こされるアルツハイマー病様の認知機能障害を促進するかを検証していく。

ジンジパインによる ZO-1 及びオクルディンの直接分解

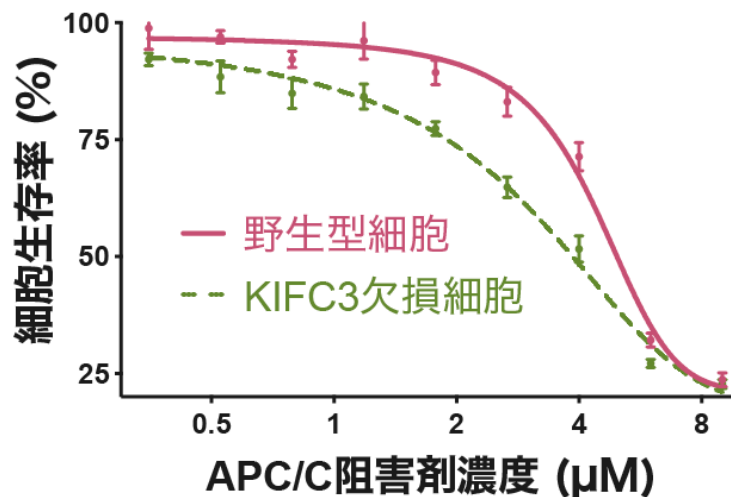


【目的】紡錘体が担う染色体の正確な伝達は、生物における根源的な生命現象である。このため、細胞分裂機構は高い頑健性を有するように進化してきた。その一方で、がん細胞はこの頑健性を失うことにより染色体分配異常を引き起こし、悪性化が進行していく。このため、この頑健性の違いを利用して、がん細胞において頑健性の低い分裂素過程を標的とすることで、正常細胞には影響を与えずにがん細胞を選択的に駆逐できる可能性がある。これまでの我々の研究により、中心体分離という分裂素過程が、ある種のがん細胞に特有の脆弱部位であることが示唆されている。そこで本研究では、中心体分離を標的とした副作用の少ない新規抗がん剤の創薬基盤を確立するために、中心体分離がこのようながん細胞の脆弱部位となっている原因を解明することを目的とした。

【方法】中心体の分離タイミングの異常を示す *KIFC3* (kinesin family member C3) 欠損正常細胞を対象とし、細胞生存率を指標とすることで、細胞分裂機構の様々な制御分子を標的とする阻害剤のスクリーニングを行った。また、中心体の分離タイミングに異常を示すがん細胞株を探索した。

【結果】中心体の早期分離を示す *KIFC3* 欠損正常細胞株は、分裂期の制御に重要な役割を果たす後期促進複合体 APC/C の阻害剤を処理すると、その細胞生存率が野生型と比べて顕著に低下することを見出した (図)。また、この原因として、分裂期を完了させるのにより長い時間を必要とするためであることが示唆された。このことから、中心体が早期に分離した際に APC/C が適切に分裂期を進行させることで、細胞分裂機構の頑健性を担保していると考えられる。さらに、中心体の分離タイミングが異常となっているがん細胞として、ヒト大腸がん由来の HCT116 細胞を同定した。中心体分離が遅延したこの HCT116 細胞に分裂素キナーゼの 1 つである Aurora A の阻害剤を処理することで、このがん細胞の細胞分裂に顕著な異常が生じることを見出した。

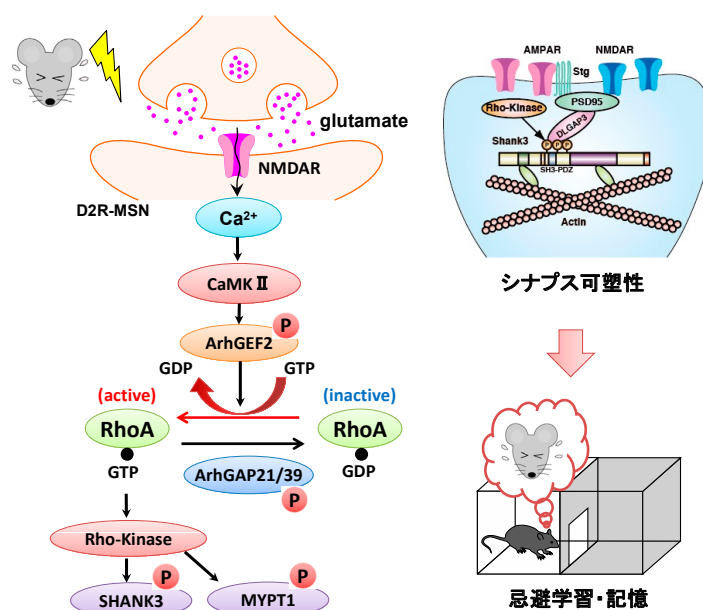
中心体の早期分離を示す *KIFC3* 欠損細胞は APC/C の阻害剤に対して高い感受性を示す



【目的】 中枢神経系の主要な神経伝達物質の1つであるグルタミン酸はNMDA (N-メチル-D-アスパラギン酸) 受容体を介して樹状突起スパインにカルシウムイオン (Ca^{2+}) の流入を誘導する。刺激誘発性の Ca^{2+} 流入は、カルシウム/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMK II) などの Ca^{2+} 依存性プロテインキナーゼを活性化させる。CaMK II は神経細胞内で受容体・イオンチャネル、シグナル分子、転写因子などの様々な標的蛋白質 (基質) をリン酸化することで、樹状突起スパインの形態可塑性やそれに引き続く長期増強 (LTP : long-term potentiation) を誘発し、情動・意欲・認知機能に関与すると考えられている。しかしながら、CaMK II がどのような基質をリン酸化するのか完全には理解されていないため、どのような機構で神経細胞のシナプス可塑性や情動・意欲・認知機能が制御されているのか、依然として不明な点が多い。

【方法および結果】 本研究では、グルタミン酸シグナルの下流でリン酸化される基質を同定するため、線条体/側坐核スライスを培養し、高カリウム (KCL) や NMDA 受容体作動薬 (NMDA) による刺激を行った。リン酸化プロテオミクス解析の結果、KCL 刺激や NMDA 刺激によってリン酸化が亢進する 100 種類以上のタンパク質を同定した。その中で低分子量 G タンパク質 RhoA の制御因子 ARHGEF2 は CaMK II によってリン酸化されることで、その GEF 活性が増強した。また、マウスに忌避刺激 (足裏への電気ショック) を与えた際、側坐核のドーパミン D2 受容体を発現する中型有棘細胞 (D2R-MSN) 内に Ca^{2+} が流入し、CaMK II による ARHGEF2 のリン酸化と RhoA/Rho-kinase 経路の活性化が誘導された。さらに、アデノ随伴ウイルス (AAV) により D2R-MSN 特異的に Rho-kinase のドミナントネガティブ変異体 (DN) を発現させ受動回避学習試験を行った結果、Rho-kinase-DN を発現するマウスでは忌避学習能が低下した。また、Rho-kinase はポストシナプスの足場タンパク質 SHANK3 をリン酸化し、NMDA 受容体や AMPA 受容体との相互作用を増加させることを見いだした。以上の結果から、マウスに忌避刺激が与えられた際、D2R-MSN 内で CaMK II/RhoA/Rho-kinase 経路が活性化され、Rho-kinase によって SHANK3 がリン酸化されることでスパインの構造可塑性および学習・記憶が制御されることが示唆された。

NMDAR/CaMK II/RhoA/Rho-kinase 経路は忌避学習を制御する



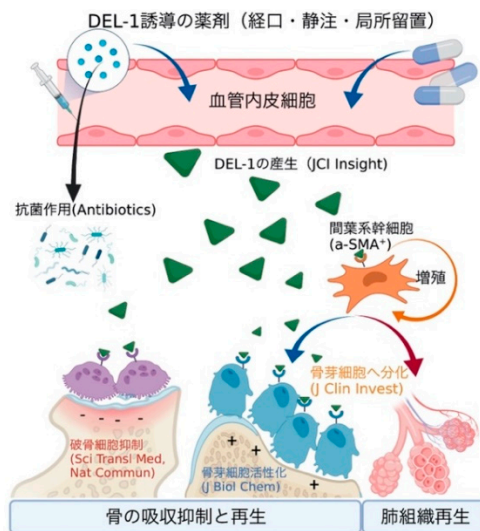
162 DEL-1が繋ぐ口腔の細胞間ネットワーク機構解明	前川 知樹
------------------------------	-------

【目的】 Developmental endothelial locus-1 (DEL-1) は、主に血管内皮細胞および破骨細胞・骨芽細胞に産生が認められる分子であり、骨代謝や幹細胞に対する作用や制御性T細胞の誘導等、多彩な機能をもつ。また DEL-1 は炎症や老化に伴い減少傾向を認めることから、抗加齢効果を発揮している可能性も高い。これら多機能の DEL-1 を生体内に誘導することが可能となれば、加齢性疾患や骨破壊性疾患および再生領域に与える影響は大きい。そこで、加齢とともに増加する歯周炎と肺炎の2つの粘膜疾患と加齢性黄斑症を対象として、マクロライド系抗菌薬のエリスロマイシン、クラリスロマイシンおよびアジスロマイシンが与える影響を DEL-1 に着目して解析を行うこととした。さらに、マクロライド系抗菌薬の耐性菌誘導に対する対策として抗菌作用を除去したエリスロマイシン改変体を使用することで、耐性菌を生じない DEL-1 誘導法による骨代謝関連疾患治療法の可能性および加齢に関する疾患への展開ができないか検討することとした。

【方法】 野生型および *Del1*^{-/-}マウスの若齢および老化マウス (77 週齢) を用い、歯周炎、肺炎および加齢性黄斑症をモデルとして、マクロライド系抗菌薬の DEL-1 誘導能について検証した。歯牙に絹糸を9日間結紮することで炎症と骨吸収を引き起こす歯周炎モデルを使用した。肺炎は LPS の気管内噴霧によるモデルを作製し、肺炎誘導後の組織再生を組織免疫染色によって解析した。加齢性黄斑症は若齢および老化マウスの眼球の遺伝子発現および組織切片から評価を行った。

【結果】 エリスロマイシン、クラリスロマイシンおよびアジスロマイシンは血管内皮細胞、マウス歯周組織、肺組織および骨芽細胞において DEL-1 の発現を上昇させることが明らかになった。さらに、歯周炎モデルマウスにおけるマクロライド系抗菌薬投与の結果から、マクロライド系抗菌薬は DEL-1 依存的に好中球の遊走抑制および破骨細胞への分化抑制や骨・組織再生能を発揮していることが明らかとなった。特に老齢マウスの歯周組織において、マクロライド系抗菌薬による老化細胞の減少と破骨細胞の減少が認められた。さらに抗菌作用活性を改変したエリスロマイシン (ERM523) においても破骨細胞と炎症抑制作用がみられた。骨芽細胞においては、マクロライド系抗菌薬による骨のジュールの形成促進と、破骨細胞においては破骨細胞分化抑制と吸収活性の抑制が認められた。加齢性黄斑症においては、マクロライド系抗菌薬の投与により、ドルーゼンの形成の減少とそのマーカーである ApoE および C5 の発現の減少が認められた。さらに、網膜上皮細胞へマクロライド系抗菌薬を添加すると、2つのマーカーの発現減少と IL-17 によるマーカーの上昇が抑制された。この結果から、炎症および骨吸収抑制作用と、老化細胞の除去に伴う組織再生能力を期待したマクロライド系抗菌薬のドラッグリポジショニングの可能性が示唆された。

マクロライド系抗菌薬による DEL-1 の誘導と組織再生への展開

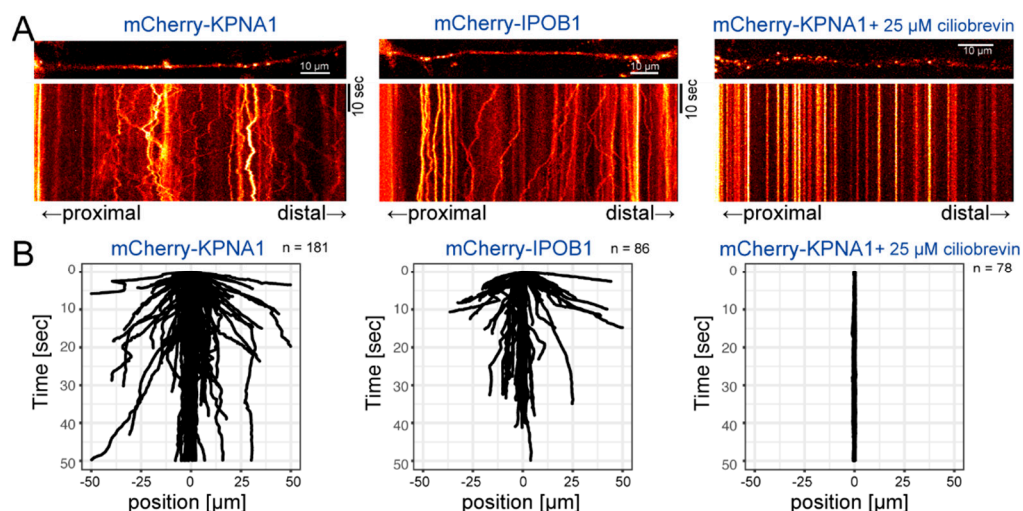


【目的】 神経細胞における細胞体から神経終末に至るまでの軸索輸送は記憶・学習・情動など高次脳機能において決定的な役割を果たす。インポーチン α (KPNA) やインポーチン β (IPO β) は代表的な核移行因子であり、細胞質から核内への基質の輸送により様々なシグナルを核内へと伝える機能を持つ。近年、統合失調症や自閉症スペクトラム障害 (ASD)、注意欠如・多動性障害 (AD/HD) などの精神・発達障害に核移行因子が関与することが報告されている。また、ストレス顆粒や凝集体の解消にインポーチンがシャペロンとして機能するなど、インポーチンが核移行以外の機能を有する多機能因子であることが明らかとなりつつある。本研究で代表者らは神経軸索中の KPNA の機能に着目した。特に、KPNA ファミリーの中でも脳内で顕著に高発現がみられる KPNA1 に着目した。細胞質ダイニン (以下ダイニンと呼称) との関係に着目し、核移行とは異なるインポーチンの神経軸索における機能の解析を目指し、精神・神経疾患の新たな治療方法開発を目指した。

【方法】 まず、ラットの大腿神経をモデルに構成タンパク質群を LC-MS/MS による質量分析を用いて同定した。さらに、大腿神経を結紮し抗細胞質ダイニン中間鎖 (DIC) 抗体、抗 KPNA1 抗体を用いて免疫沈降を行い、それぞれの分子複合体の単離を試み、質量分析による同定を行った。加えて、GFP/RFP 誘導体と KPNA、IPO β 、DIC 等との融合タンパク質を共焦点顕微鏡で観察する他、FRAP による動態解析を試みた。さらに、様々な変異を有する KPNA1 を作製し、蛍光観察することでその動態の変化を調べた。

【結果】 ラット大腿神経軸索抽出物を LC-MS/MS による質量分析で解析した結果、複数のインポーチン α/β 分子、低分子量 G タンパク質 Ran などが含まれることが明らかとなった。また、同抽出物からダイニン中間鎖および KPNA1 抗体で免疫沈降を行った結果、ダイニン中間鎖によりインポーチン分子が、KPNA1 抗体によるダイニンの沈降が確認され、インポーチンとダイニンが軸索中で複合体として存在することが示唆された。さらにマウス後根神経節 (DRG) の一次培養細胞に GFP/RFP の誘導体とダイニンもしくはインポーチン関連因子との融合タンパク質の遺伝子導入を行い、その動態を解析した。FRAP や共焦点顕微鏡観察の結果、KPNA1 や IPO β が軸索中においてアクティブに運搬され、さらにドット状の顆粒を形成して軸索中に局在している様子が観察された。これらの顆粒は順行方向、逆行方向に分子モーターによって運搬されていた。統合失調症の原因となる変異を有する KPNA1 を導入し、その動態を観察したところ、核への異常集積が確認された。現在はこの変異におけるダイニンと KPNA1 の相互作用変化を確認中である。以上の結果は、核移行とは異なる軸索におけるインポーチンの機能と、疾患の原因を考える上で非常に重要な知見である。

後根神経節細胞軸索におけるインポーチン α/β 分子の運動軌跡



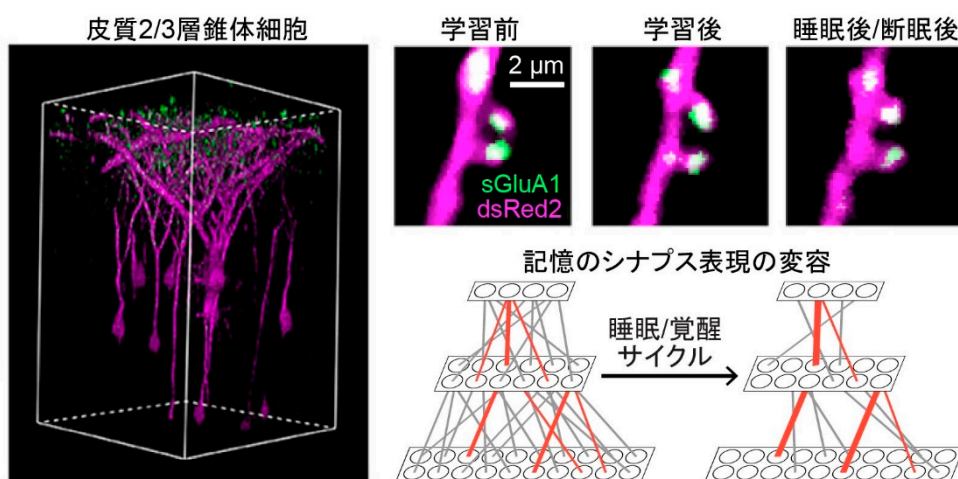
164 睡眠時のメモリーリプレイを担う樹状突起伝搬の解明	宮本 大祐
------------------------------	-------

【目的】 覚醒時の学習は脳の神経細胞を活性化して、興奮性シナプス伝達を担う樹状突起スパインにおいて、グルタミン酸受容体である AMPA 受容体の量を増加させる。そして、睡眠時において、学習した情報を再生するメモリーリプレイが生じる。しかし、睡眠時のメモリーリプレイがシナプス回路をどの様に再編するのにはよく分かっていない。これまでに、睡眠によって記憶関連脳領域である大脳皮質や海馬のシナプスの大きさや AMPA 受容体の量が平均的に減少することが、電子顕微鏡による解剖学的手法やウェスタンブロッティングによる生化学的手法で解明されている。死後脳を扱う解剖学的・生化学的手法では、学習や睡眠による脳のダイナミクスを追跡することは困難であるため、本研究は樹状突起スパインの AMPA 受容体を生体マウスにおいてイメージングして、学習と睡眠を通じたシナプス動態を解析した。

【方法】 AMPA 受容体の GluA1 サブユニットを蛍光可視化するために、SEP (Super Ecliptic pHluorin) -GluA1 を用いた。SEP は pH 依存的な緑色蛍光タンパク質であり、細胞外と細胞内の pH の違いを利用して、細胞膜上の機能的な受容体を選択的に蛍光可視化出来る。また、神経細胞の形態を蛍光可視化するために、赤色蛍光タンパク質の dsRed2 を用いた。SEP-GluA1 と dsRed2 の発現を誘導するために、E14.5 胚に子宮内電気穿孔法を適用した。その後、成体マウスにおいて、頭蓋骨にガラス窓を設置した。そして、二光子顕微鏡を用いて、一次運動皮質の 2/3 層錐体細胞が有する 1 層のタフト樹状突起において、運動学習と睡眠期間を通じて経時イメージングを行った。

【結果】 記憶固定化に睡眠を必要とする運動学習試験として、Complex Wheel 試験を用いた。運動学習はスパインの AMPA 受容体量を平均的に増加させた。一方で、運動学習前及び運動学習後の睡眠は、スパインの AMPA 受容体量を平均的に減少させた。運動学習によって AMPA 受容体量が特に増加した一部のスパイン (Max スパイン) は、運動学習後の睡眠や断眠の影響を受けずに保護されていた。一方で、その他のスパインは運動学習後の睡眠時に AMPA 受容体量が減少し、この減少は断眠によって阻害された。そして、運動学習後の AMPA 受容体量の減少は、運動記憶成績と相関していた。これらより、運動学習後の睡眠は、大部分のシナプスをクールダウンさせて、運動記憶を担うシグナルを相対的に強化していると考えられる。

生体マウスにおける樹状突起スパインの AMPA 受容体のイメージング (宮本大祐, Medical Science Digest, 2021)

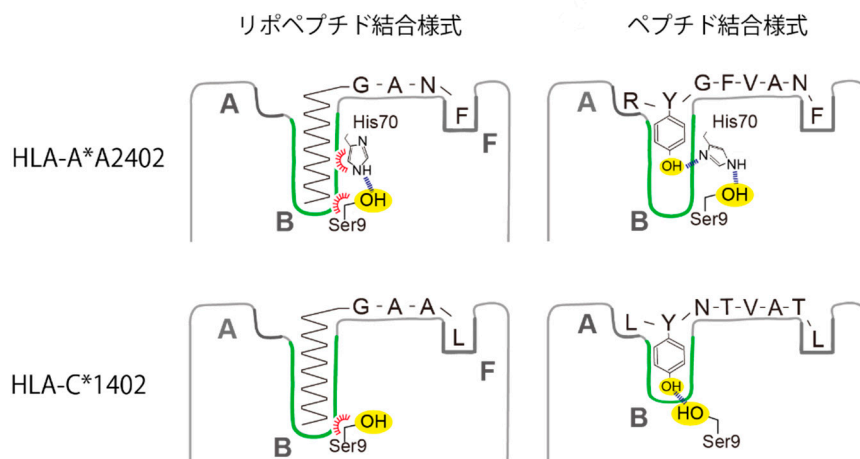


【目的】 本研究は、研究代表者がアカゲザルエイズモデルの解析をもとに世界に先駆けて発見した「MHC クラス 1 分子によるリポペプチド抗原提示」を土台として、サルからヒトへの展開と新たなヒト免疫病態の解明を目指すものである。リポペプチド免疫応答の視点から、ウイルス感染に伴って誘起される自己免疫疾患の成立機構を個体レベルで解明することを目的として、ヒトのリポペプチド提示 MHC クラス 1 (以下、LP1 と記載する) アリル群の同定と構造解析、ならびに LP1 トランスジェニック (Tg) マウスの作出と機能解析を行った。

【方法】 リポペプチド結合試験については、HLA (ヒト MHC) 重鎖の大腸菌リコンビナント蛋白質をリポペプチドあるいはペプチドリガンド存在下に緩衝液中にリフォールディングさせ、ゲル濾過クロマトグラフィーにて評価した。また、高度に精製した各 HLA 複合体を用いて X 線結晶構造解析を実施した。Tg マウスについては、HLA 遺伝子をマウス MHC クラス 1 遺伝子 (H2Kb) プロモーター下流につないだトランスジーンを作製し、これをマウス受精卵前核にインジェクションすることにより作出した。イミキモド乾癬モデルについては、イミキモドクリームをマウス右耳に 7 日間、連続塗布した後、組織解析に供した。

【結果】 サル LP1 分子のアミノ酸配列情報ならびに構造学的特徴をもとに、ヒト LP1 分子のスクリーニングを実施し、HLA-A*2402 および HLA-C*1402 において高いリポペプチド結合能があることを見出した。これらの HLA 分子はともにペプチド抗原提示分子でもあることから、リポペプチド複合体ならびにペプチド複合体の X 線結晶構造解析を実施し、リポペプチドとペプチドという 2 種類のリガンドをともに結合できる dual function について、その構造基盤を解明した。リガンドを収納するポケット構成アミノ酸の一部が、その側鎖の配向をダイナミックに変化させることでポケット構造や水素結合ネットワークが再構築され、ポケットの大きさや疎水性環境がリガンドの種類に応じて最適化されることを見出した (図)。また、HLA-A*2402 については Tg マウスの作出を完了し、個体レベルでの解析準備が整った。さらに、先行していたアカゲザル LP1 (Mamu-B*098) Tg マウスを活用し、代表的な自己免疫モデルのひとつであるイミキモド乾癬モデルにおいて、non-Tg マウスと比較して、B*098 Tg マウスには顕著な炎症反応が惹起されることを見出した。

HLA-A*2402 と HLA-C*1402 によるリポペプチドならびにペプチド結合様式の分子モデル



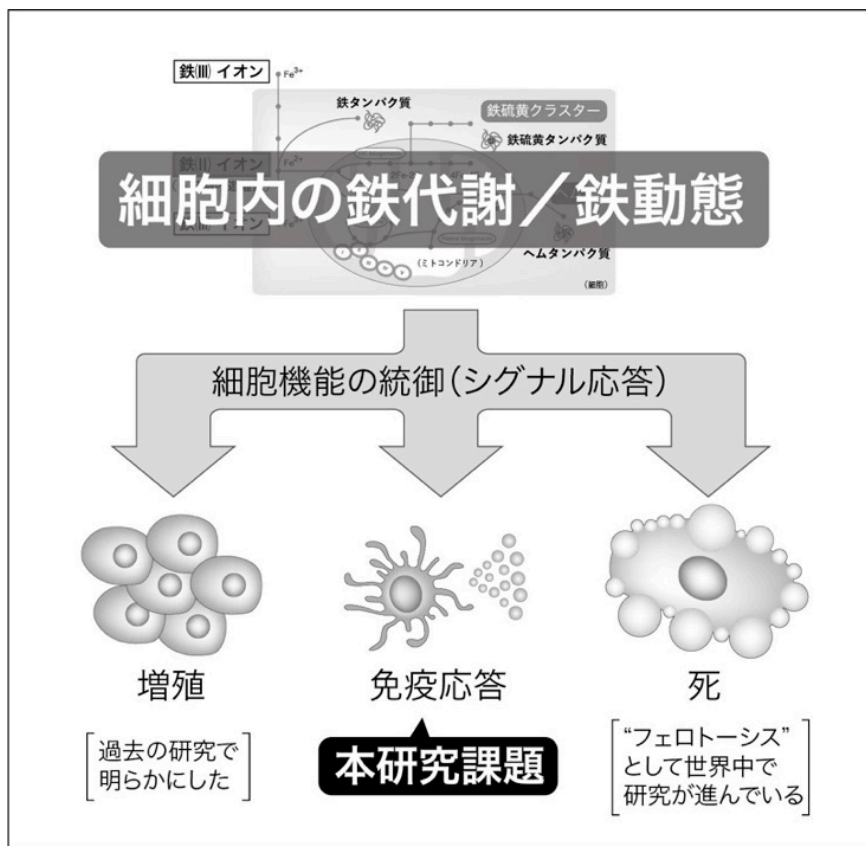
166 鉄による細胞内シグナル制御機構の解明	諸石 寿朗
------------------------	-------

【目的】鉄は地球上に重量比で最も多く存在する元素であり、生命はその起源から鉄を利用して代謝活動を行ってきた。われわれ哺乳類においても、鉄や鉄補欠分子族（ヘムなど）は呼吸鎖複合体や代謝経路、エピジェネティクスの制御などに関わる酵素の活性に必須である。このように、鉄は電子を容易に授受しやすい化学的性質から酸化還元反応の足場となり、多くの酵素の補因子として働くため、ほとんどの生物にとって広範な生命機能に必須の役割を担う。われわれは過去の研究において、細胞における鉄代謝が細胞内シグナルと連動して細胞機能を制御する可能性を見出した。特に、癌の進展において鉄代謝の変容と免疫応答の変化が示唆された。そこで、本研究では、全身性の鉄代謝制御に重要な役割を担うマクロファージに着目し、近年腫瘍微小環境中で存在が注目されている細菌に対する応答性と細胞内鉄量の関係性を調べることで、鉄による細胞機能の新たな制御機構の解明を目指した。

【方法】腫瘍微小環境中存在することが知られている細菌 (*Fusobacterium nucleatum*) とヒト THP-1 マクロファージを共培養し、細胞内鉄量の増減と遺伝子発現変化の関係を RNA シーケンス法にて調べた。また、細胞内鉄量の変化に伴うシグナル応答の変化について、分子生物学・細胞生物学的手法により検討した。さらに、ヒト大腸癌において *F. nucleatum* 感染とマクロファージにおける鉄の蓄積、および患者予後の関係性を調べた。

【結果】マクロファージにおける細胞内鉄量の変化は、NF κ B シグナルに影響を及ぼすことにより *F. nucleatum* に対する炎症応答を制御することが分かった。この現象はヒトの大腸癌の進展に関与している可能性があり、生体における鉄とシグナル応答の連関の重要性が示唆された。

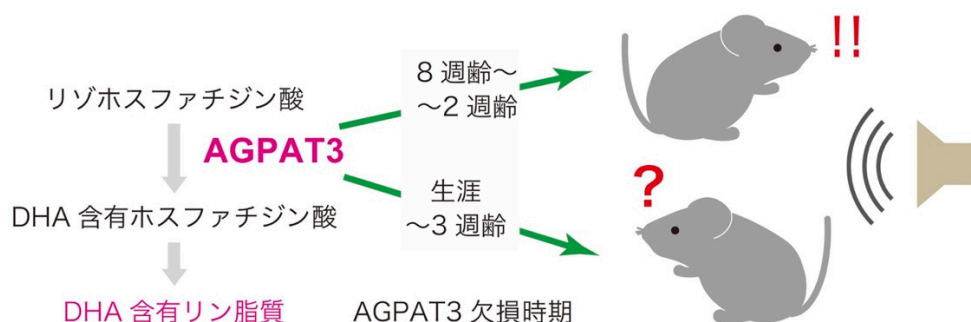
本研究のねらい：鉄による炎症・免疫応答の新たな制御機構を解明する



【目的】本研究はドコサヘキサエン酸 (DHA) が聴覚の発達や恒常性に果たす役割およびその分子メカニズムを明らかにし、DHA 介入による難聴の予防・治療戦略の可能性に迫ることを目的とした。難聴は様々な原因で生ずる。特に先天的な難聴や加齢性難聴など多くのタイプの難聴においてその発症メカニズムは不明な点が多く、予防法・治療法は確立されていない。DHA は食事からの摂取が必要な必須脂肪酸であり、主に生体膜中のリン脂質に存在する。DHA の中枢神経系における重要性についてはこれまで国内外で精力的に研究が進められてきたのに対し、聴覚領域においてはその重要性はほとんど注目されてこなかった。近年、DHA を含む ω 3 脂肪酸の高用量摂取により加齢性難聴が予防できる可能性を示唆する疫学調査が報告され、DHA 介入が難治性難聴の予防・治療戦略となりうる可能性が高まってきている。しかしながら、DHA の過不足が実際に聴覚の発達や恒常性に影響するのか、さらにその分子メカニズムについては全くわかっていないのが現状である。本研究では、DHA 含有リン脂質生合成酵素である *AGPAT3* に注目し、時期特異的に DHA 含有リン脂質を操作できるマウスを活用し、聴覚の発達や維持への DHA の関与、およびそのメカニズムを明らかにすることを試みた。

【方法】まず DHA 含有リン脂質欠乏の聴覚機能への影響を検討すべく、DHA 含有リン脂質生合成酵素 *AGPAT3* の欠損マウスを用い、その聴覚性驚愕反射および聴性脳幹反射を検討した。次にタモキシフェン投与により特定の時期より *AGPAT3* 発現を欠失および回復させるマウスを樹立し、聴覚の発達や維持に DHA 含有リン脂質が必要となる時期の絞り込みを行った。また、複数の Cre 系統を用いることで *AGPAT3* 欠損マウスにおいて難聴表現型の原因となる責任細胞について検討を行った。最後に免疫染色により、*AGPAT3* 欠損マウス内耳に解剖学的異常がないか検索を行った。

【結果】聴覚性驚愕反射および聴性脳幹反射の検討の結果、*AGPAT3* 欠損マウスが難聴の表現型を呈することがわかった。成獣後に *AGPAT3* を欠損させた場合、当該マウスにおいて聴覚性驚愕反射に異常は認められなかったため、成獣後の DHA 含有リン脂質生合成は正常聴覚の維持に必須ではないことが示唆された。さらに、2 週齢より *AGPAT3* 発現を回復させた欠損マウスにおいては正常な聴覚性驚愕反射反応が認められたものの、3 週齢より *AGPAT3* 発現を回復させた欠損マウスにおいては通常の *AGPAT3* 欠損マウスと同様に聴覚性驚愕反射反応が認められなかった。従って、通常飼育時の正常聴覚の発達あるいは維持には少なくとも生後 2 週齢から *AGPAT3* の発現が必要であることがわかった。また複数の Cre 系統を用いた検討により、*AGPAT3* 欠損マウスで認められる難聴の責任細胞として支持細胞、骨組織、血管内皮細胞などが否定された。*AGPAT3* 欠損マウス内耳組織の免疫染色の結果、有毛細胞や支持細胞、聴毛の分布や数、構造等の明らかな異常は観察されなかったため、当該マウスにおいては構造的変容によらない聴覚受容や伝導の異常により難聴となる可能性が考えられた。

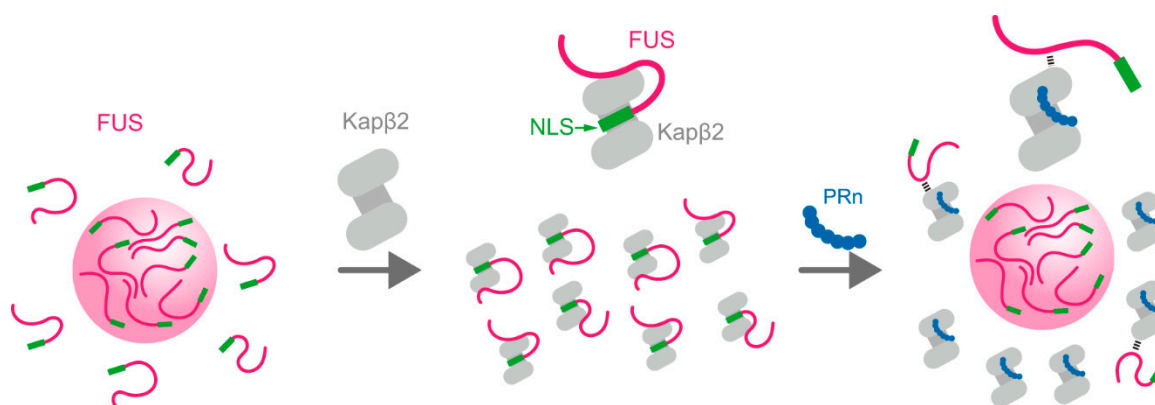
DHA 含有リン脂質生合成酵素 *AGPAT3* の遺伝子改変マウスにおける難聴表現型

【目的】 トランスポーチン1 (カリオフィリン $\beta 2$: Kap $\beta 2$) は核内輸送受容体タンパク質であり、細胞質で翻訳されたタンパク質の核移行シグナル (Nuclear localization signal: NLS) を認識して結合し、核内へと輸送するはたらきを持つ。Kap $\beta 2$ が核内へと輸送するタンパク質群は高い相分離性を有しており、Kap $\beta 2$ のもうひとつの機能として相分離を抑制するはたらきが近年明らかとされた。相分離性タンパク質の相分離異常が基となる凝集沈着物は、疾患とも密接に関わることが示唆されている。したがって、Kap $\beta 2$ による輸送および相分離制御は極めて重要な機構であると考えられる。重篤な神経変成疾患である筋萎縮性側索硬化症 ALS において、Kap $\beta 2$ の輸送基質のひとつである RNA 結合タンパク質 FUS の細胞質での凝集体形成が報告されている。また、遺伝性 ALS の原因因子として *C9orf72* 遺伝子の繰り返し配列の増幅が挙げられる。*C9orf72* 遺伝子の繰り返し配列の増幅によって、5 種類の 2 アミノ酸の繰り返しペプチドが産出されるが、それらのうち、アルギニンを含むプロリン-アルギニン (PR) またはグリシン-アルギニン (GR) の繰り返しペプチドが特に高い毒性を示すことが報告されている。本研究では、これらの繰り返しペプチドが Kap $\beta 2$ による FUS の相分離制御に与える影響を明らかとし、繰り返しペプチドに起因する相分離破綻のメカニズムを解明することを目的とした。

【方法】 本研究では生化学的な観点から、精製タンパク質を用いた相互作用解析を中心に行った。相分離の抑制制御は、濁度法および蛍光顕微鏡観察により評価した。相互作用解析にはプルダウンバイndィングアッセイ法、等温滴定カロリーメトリー法、SEC-MALS 法、NMR 法を用いた。

【結果】 *C9orf72* 遺伝子の繰り返し増幅が産出し得る 5 種類の繰り返しペプチドが Kap $\beta 2$ による FUS の相分離抑制に与える影響を評価したところ、PR または GR の繰り返し配列が Kap $\beta 2$ の機能を阻害した。繰り返し PR (PRn) と Kap $\beta 2$ との相互作用をプルダウンバイndィングアッセイ法により検出したところ、繰り返し回数依存的な結合であった。等温滴定カロリーメトリー法および SEC-MALS 法により、PRn と Kap $\beta 2$ との結合が 1 対 1 であることを明らかとした。NMR 法により PRn は Kap $\beta 2$ の NLS 結合部位に、競合的に結合することが示唆された。

プロリン-アルギニン繰り返しペプチド (PRn) による Kap $\beta 2$ の相分離抑制阻害のモデル

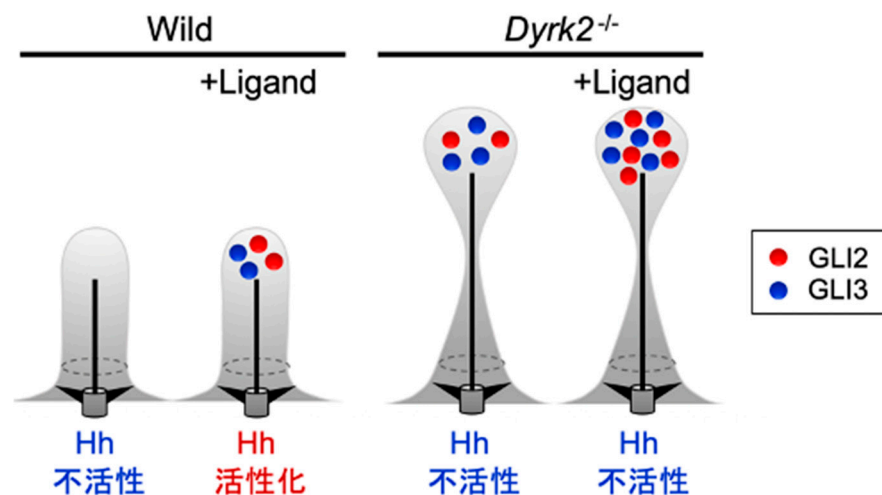


【目的】 組織発生は、シグナル分子 (Hedgehog、FGF、Wnt など) により時空間的に制御され、その異常は様々な発生異常や奇形疾患を呈する。近年、細胞に 1 本だけ存在する細胞小器官「一次繊毛」の組織発生における重要性が明らかになってきた。したがって、新規の一次繊毛制御因子の同定は、組織発生の制御機序、さらに、それらの異常による奇形疾患 (織毛病) の発症機序解明に繋がる。本研究では、哺乳類の組織発生に関して知見のなかったリン酸化酵素 Dual-specificity tyrosine-regulated kinase (DYRK2) の欠損マウスを用いて、組織発生との関連を評価した。

【方法】 作出した *DYRK2* 欠損マウスを用いて、個体レベルにおける組織形成異常の有無を評価した。さらに、*DYRK2* の制御するシグナルを同定するために、*DYRK2* 欠損マウスから胎仔線維芽細胞 (MEF) を樹立し、Hedgehog リガンドへの応答性を解析した。また、細胞免疫染色ならびに走査型電子顕微鏡観察により、一次繊毛の異常を検証した。

【結果】 *DYRK2* 欠損マウスの解析から、*DYRK2* が哺乳類の広域な組織発生に必須な分子であることを明らかにした。その分子機序として、*DYRK2* は細胞小器官である一次繊毛の形成・機能を制御し、Hedgehog シグナルを正に制御する新規リン酸化酵素であることを明らかにした。

リン酸化酵素 *DYRK2* は一次繊毛を介して Hedgehog シグナルを制御する



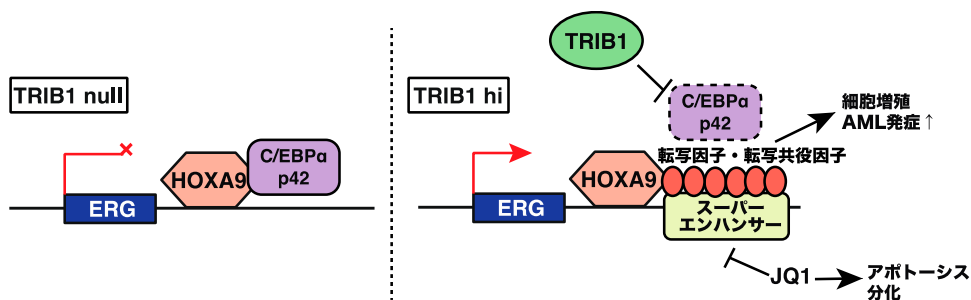
170	AMLにおけるTRIB1のスーパーエンハンサー制御	芳野 聖子
-----	---------------------------	-------

【目的】 急性骨髄性白血病 (AML) の発症と悪性化において、発がん性転写因子は大きな役割を担っている。中でも HOXA9 の発現亢進と C/EBP α の機能欠失変異は、原因遺伝子や予後不良因子として極めて重要である。Pseudokinase TRIB1 は、AML 原因遺伝子かつ HOXA9 協調遺伝子として同定された。TRIB1 による白血病誘導機構として、MEK1 / ERK 経路の活性化促進と、C/EBP α の分解誘導が挙げられる。TRIB1 は核に優位に局在することから、クロマチンとの親和性が示唆されるが、TRIB1 と HOXA9 との協調作用の本態は不明であった。一方で、AML において、C/EBP α と HOXA9 がクロマチン上でしばしば共局在していることが報告され、TRIB1 が HOXA9 の転写調節機構に影響を及ぼしている可能性が予想された。

【方法】 TRIB1 の発現量の違いによる白血病細胞の性質および遺伝子発現の比較を行うため、TRIB1 KO マウス由来の造血細胞に HOXA9 を導入して不死化細胞を樹立し (TRIB1 null)、さらに TRIB1 を強制発現した細胞 (TRIB1 hi) を樹立した。TRIB1 null および TRIB1 hi 細胞について、マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。また、FLAG (HOXA9)、C/EBP α および活性化ヒストンマークとして知られるヒストン H3K27ac に対する ChIP-seq を行い、ROSE program により、スーパーエンハンサーの同定を行った。続いて、スーパーエンハンサーの構成因子である BET 系プロモドメインタンパク BRD4 の阻害剤 (JQ1) への感受性を、*in vitro* および *in vivo* で検証した。

【結果】 TRIB1 null と hi 細胞の性状の比較から、TRIB1 を発現する細胞では細胞増殖と白血病発症が促進されるとともに、遺伝子発現プロファイルの大規模な変化が認められた。ChIP-seq の解析から、この変化の少なくとも一部は TRIB1 が引き起こしたスーパーエンハンサーの改築によるものと考えられた。スーパーエンハンサーは、がん細胞の特性を規定し、増殖や未分化性などのがんの悪性化に関与している。続いて、変動するスーパーエンハンサーの近傍遺伝子の中で、造血に重要な役割を担う ERG に着目した。解析の結果、TRIB1 は C/EBP α の分解を介して、ERG の造血器特異的スーパーエンハンサーを増強し、ERG の発現を亢進することが明らかとなった。スーパーエンハンサー上には多数の転写因子に加えて、BRD4 など BET ファミリータンパクが結合し複合体を形成する。スーパーエンハンサーを標的とする BRD4 の阻害薬 JQ1 により、ERG を初めとする TRIB1/HOXA9 の標的遺伝子の発現低下と白血病の増殖抑制が認められた。この変化はヒト急性骨髄性白血病細胞でも共通に認められた。本研究により、Pseudokinase TRIB1 が HOXA9 と協調し ERG の発現制御することを明らかにした。さらに本成果から、TRIB1 とスーパーエンハンサーを標的とする難治性急性骨髄性白血病に対する治療が期待される。

TRIB1 によるエンハンサーリプログラミング

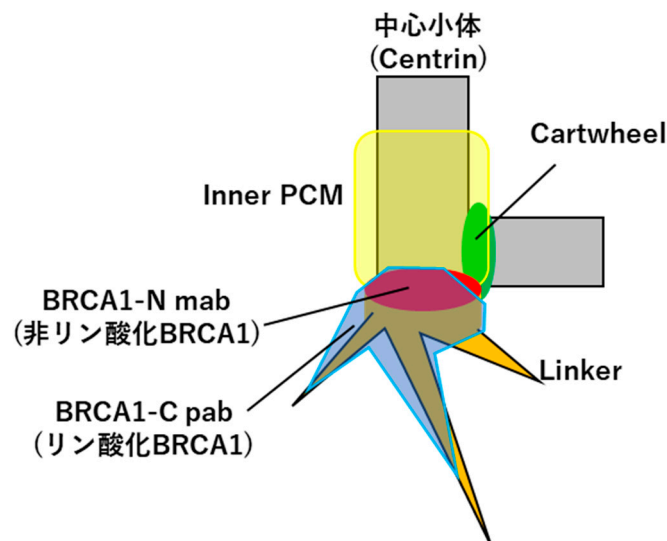


【目的】 BRCA1 は癌抑制遺伝子であり、生殖細胞系列の変異は遺伝性乳癌卵巣癌症候群を引き起こす。BRCA1 は相同組換え修復による DNA 損傷修復や中心体制御を介してゲノム安定性の維持に寄与している。DNA 損傷修復系において、BRCA1 は複数のアミノ酸残基が ATM や CHK1 などのキナーゼによってリン酸化されることが機能に必要なことが明らかになっているが、中心体制御系における BRCA1 の機能制御機構は明らかになっていない。本研究では、BRCA1 のリン酸化修飾が BRCA1 の中心体局在制御に及ぼす影響を解析した。

【方法】 乳癌細胞株 MCF7 を遺伝子編集し、中心小体のマーカーである Centrin2 の C 末端部に GFP 配列をノックインすることで、内在性に Centrin2::GFP 融合タンパク質を発現する細胞を作製し、観察に用いた。局在の解析には共焦点レーザー顕微鏡を用いた。スクリーニングに用いた抗 BRCA1 抗体は市販、および自作の抗体を用いた。モノクローナル抗体のエピトープマッピングは、抗体作製時に用いられた抗原領域を分割したフラグメント、またはその一部を欠損させた変異体を HEK293T 細胞に発現させ、Western blotting によって抗体との反応性を調べることで行った。変異体の作製は PCR-directed mutagenesis によって行った。抗リン酸化 BRCA1 特異抗体はリン酸ペプチドを抗原とし、ウサギに免疫して作製した。

【結果】 抗 BRCA1 抗体によって免疫染色を行うと、多くの抗体で中心小体近傍に加え、中心体周囲の細胞質にもシグナルが認められた。抗体のスクリーニングの結果、BRCA1 の N 末端側を抗原とするモノクローナル抗体 (BRCA1-N mab) は中心小体近傍の BRCA1 とのみ反応することが明らかになった。BRCA1-N mab のエピトープマッピングを行ったところ、BRCA1 の N 末端側の 20 アミノ酸領域までエピトープを絞り込むことができた。さらに、この領域に含まれるスレオニン残基を変異させると抗体との反応性が完全に消失し、同スレオニン残基が BRCA1-N mab のエピトープとして重要であることが明らかになった。同スレオニン残基をリン酸化したペプチドを抗原として抗体を作製したところ、リン酸化 BRCA1 と特異的に反応する抗体が得られた。この抗リン酸化 BRCA1 特異抗体を用いて免疫染色を行ったところ、抗リン酸化 BRCA1 特異抗体は主として中心体周囲の細胞質に局在する BRCA1 と反応することが明らかとなった。これらから、中心体関連 BRCA1 は、中心体周囲の細胞質にリン酸化状態で、中心小体近傍に非リン酸化状態で存在することが示唆された。

中心体における BRCA1 の局在と修飾様態

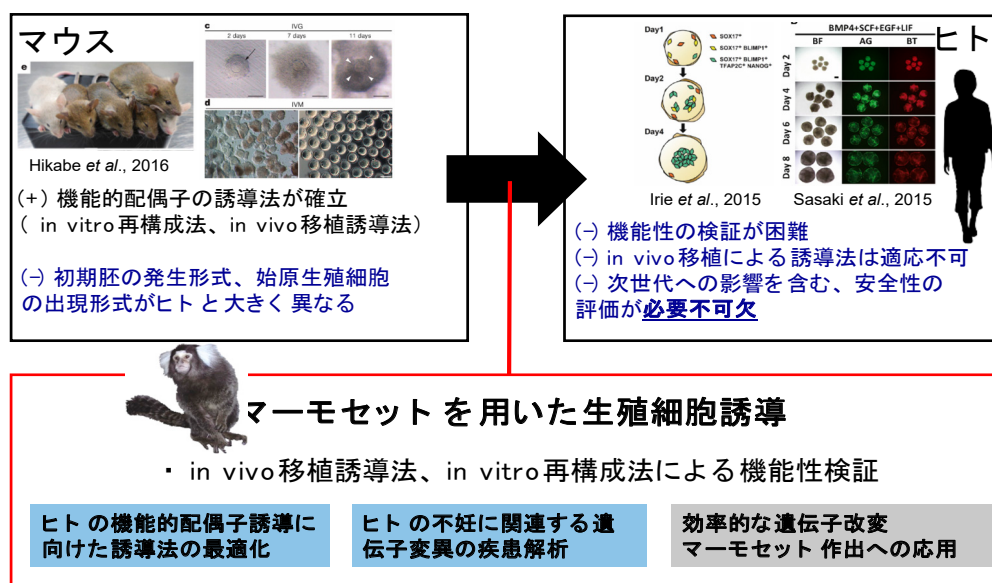


【目的】 生殖細胞系譜は次世代に遺伝情報を伝達し、生物進化の連続性を担う基幹的役割を担うことから、その系譜分化の機構究明は進化生物学・発生学上の重要課題とされてきた。近年、マウス多能性幹細胞から生殖系列細胞を誘導し産仔形成能をもつ機能的配偶子が作出されたという成果 (Hayashi et al, Cell 2011、Hayashi et al., Science 2012、Hikabe et al, Nature 2016) は、「多能性幹細胞からの *in vitro* での配偶子形成」という革新的生殖技術に繋がり、ヒト ES/iPS 細胞についても *in vitro* 配偶子形成研究の新領域を拓いた。しかし、マウス (齧歯類) と霊長類の生殖発生の機序には明確な進化的隔差があり、ヒト生殖医療への応用を踏まえた場合、実験的検証を可能とする非ヒト霊長類の細胞を用いた培養系の開発が求められていた (図)。

【方法】 そこで本研究では、1年という限られた期間ながら、小型霊長類のコモンマーモセットを対象として、多能性幹細胞から生殖系列細胞、生殖幹細胞からの配偶子分化を *in vitro* で再現する培養系の確立を目標とし、ヒトでは倫理的に不可能である正常産仔形性能という機能的検証を行う事を目指した。

【結果】 報告者はこれまでに、マーモセット多能性幹細胞における高効率なノックイン型遺伝子改変系の確立や、将来的な多能性幹細胞からの配偶子誘導に向けた“Transgene-free”マーモセット iPS 細胞の樹立、始原生殖細胞様細胞 (Primordial germ cell-like cells : PGCLCs) の分化誘導法の確立を行った。まず多能性幹細胞からの生殖系列細胞分化を可視化する 3 種類の蛍光レポーター-BLIMP1-Venus (BV : 始原生殖細胞マーカー)、STELLA-Cerulean (SC : 多能性幹細胞及び成熟生殖細胞マーカー)、VASA-tdTomato (VT : 成熟生殖細胞マーカー) をマーモセット ES/iPS 細胞に導入した。さらに、これらの細胞において始原生殖細胞の分化に関わるサイトカイン (Activin-A、BMP4 等) の処理及び遺伝子 (SOX17、BLIMP1) の強制発現を組み合わせることで、BV 強陽性の PGCLCs の出現を認め、これらの細胞の RNA-seq 解析によって、生殖細胞特異的な遺伝子発現を示す細胞特性を明らかにした。マウスやヒト多能性幹細胞を用いた研究において (Hikabe et al, Nature 2016、Yamashiro et al, Science 2018)、PGCLCs の成熟・減数分裂、機能的配偶子の誘導には、同種の胎児生殖巣由来体細胞 (GSCs) との共培養が必要とされた。しかしながら、胎児の霊長類に由来する組織はマーモセットに限らず極めて希少性が高く、その検証は今まで実施困難であった。そこで本研究においては、所属先の九州大学のグループで開発された、多能性幹細胞から生殖単体細胞系列の誘導による“胎児組織に依存しない配偶子誘導法”を検討するために、GSC レポーター系の確立を行った。

非ヒト霊長類を用いた生殖細胞誘導研究の意義

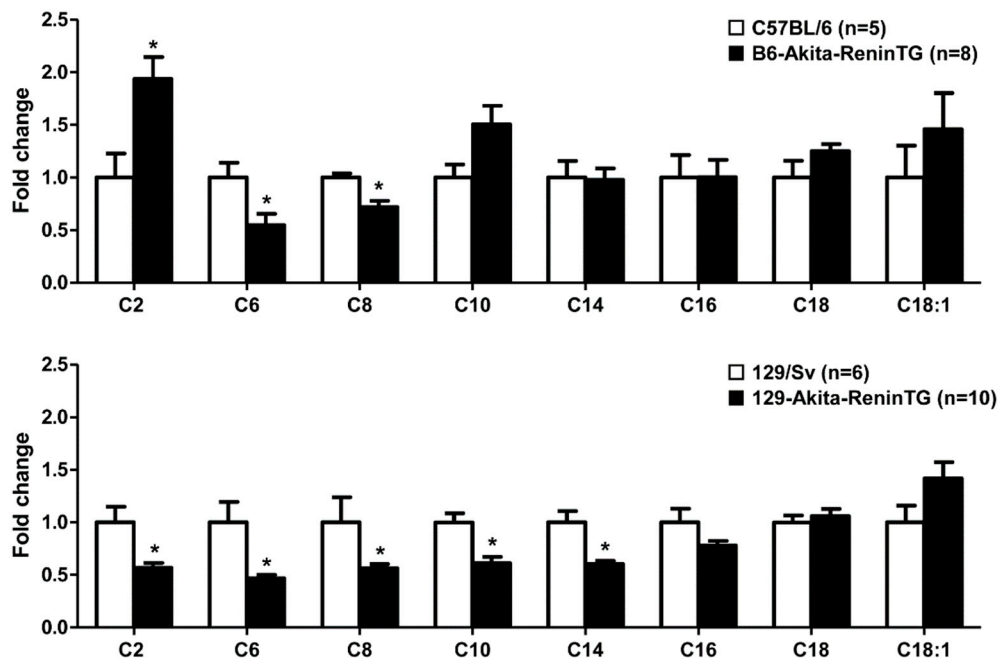


【目的】慢性腎臓病（Chronic Kidney Disease : CKD）の発症・進展に関わる新規機序の一つとして、腎臓におけるエネルギー代謝障害、特に脂肪酸酸化（Fatty Acid Oxidation : FAO）障害が重要な役割を担っていることが明らかになってきたが、糖尿病性腎臓病（Diabetic Kidney Disease : DKD）における腎エネルギー代謝の意義を検討した報告は少ない。本研究は我々が開発した DKD 抵抗型マウス（C57BL/6-Akita-ReninTG）と DKD 増悪型マウス（129/Sv-Akita-ReninTG）を用いて、DKD の発症・進展において腎エネルギー代謝障害、特に FAO 障害がどのように関わっているかを解明することを目的に行われた。

【方法】DKD 抵抗型マウスおよび DKD 増悪型マウス、そして各々の野生型対照マウス（C57BL/6 マウスおよび 129/Sv マウス）を 24 週齢の時点で代謝ケージを用いた蓄尿を施行後に解剖した。メタボローム解析を用いて腎臓におけるエネルギー代謝変化をミトコンドリア FAO（アシルカルニチン）に焦点を当てて評価するとともに、qPCR 法を用いて FAO 関連遺伝子発現の解析も行った。

【結果】DKD 増悪型マウスの腎臓では、ミトコンドリアにおける FAO 機能を反映している可能性がある偶数鎖アシルカルニチンの幅広い減少が見られるとともに、FAO 関連遺伝子の mRNA 発現が有意に変化していた。これらの変化はヒト DKD の特徴有する DKD 増悪型マウスでのみ見られ、DKD 抵抗型マウスでは認められなかった。本研究結果は、他の CKD の病態生理と同様に、FAO 障害に起因する腎エネルギー代謝の変化が DKD の進展に関連していることを示唆している。腎エネルギー代謝、特に FAO への介入は DKD を治療するための新しい治療候補となり得るため、今後さらなる研究が必要である。

DKD 抵抗型および DKD 増悪型マウスの腎臓における偶数鎖アシルカルニチンの分布

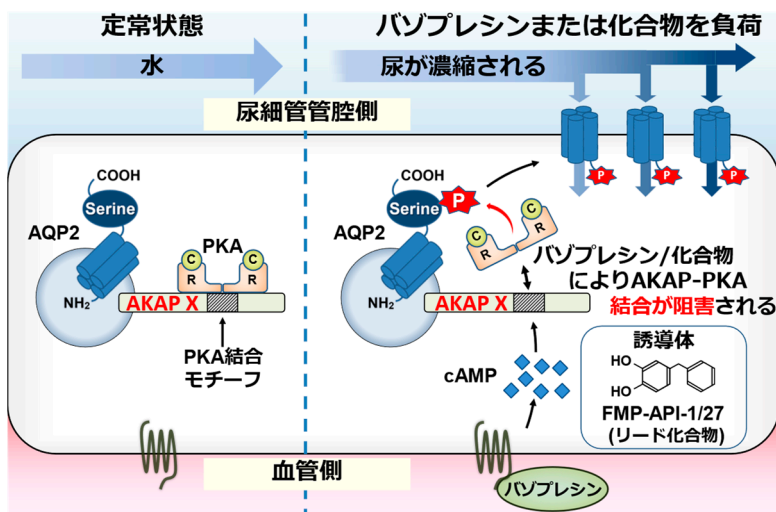


【目的】 本研究では、我々が発見した新規 Protein kinase A (PKA) 制御法を用いることで、先天性腎性尿崩症や肥満症などの治療薬開発に難渋している PKA 関連疾患の病態解明と新規治療戦略の提言を目指す。研究代表者は、腎臓集合管において尿濃縮力を調節するバゾプレシン/cAMP/PKA/AQP2 水チャネルシグナル伝達系の研究を行っており、最近 cAMP を介さずに直接的に PKA を活性化し、AQP2 をリン酸化できる低分子化合物 FMP-API-1/27 を発見した。この化合物には、PKA と PKA のアンカー蛋白 (AKAP) との結合を阻害する作用が報告されている。そこで、50 種類以上の AKAP の中から、化合物が標的とする AKAP X を同定し、新規尿濃縮病態の解明を進めた。

【方法】 RNA-Seq やプロテオミクス解析で同定された腎臓に発現する主要な AKAP を HEK293T 細胞に強制発現させ、免疫沈降法を用いて FMP-API-1/27 がどの AKAP - PKA 結合を阻害できるのかを評価した。次に、化合物が標的としていた AKAP X をノックアウトしたマウスを作製し、メタボリックケージを用いて尿浸透圧・尿量・飲水量を測定した。Akap X ノックアウトマウスは尿崩症の表現型を呈していたため V2R agonist : [deamino-Cys1, d-Arg8]-vasopressin (dDAVP) (0.4 μg/kg) を腹腔内投与し多尿の原因を検討した。FMP-API-1/27 の構造類似化合物の中には尿濃縮効果がないが、肥満症の治療標的である褐色脂肪細胞の PKA を強力に活性化する化合物 X があった。マウスを通常食群、高脂肪食 (カロリー比 60%脂質含有) 負荷群、化合物 X 添加 (0.05%) 高脂肪食負荷群に分け 16 週間各食餌・薬剤を負荷し抗肥満作用を検証した。

【結果】 腎臓集合管において AKAP X と AQP2 の局在は一致していた。Akap X ノックアウトマウスを解析したところ尿浸透圧が低下し、尿量・飲水量が増加していた。dDAVP を投与しても Akap X ノックアウトマウスの AQP2 はリン酸化されず、尿浸透圧が上昇しないことから、AKAP X はバゾプレシンシグナルにおいて AQP2 のリン酸化を仲介する最も重要な AKAP であることが明らかとなった。さらに、リード化合物 FMP-API-1/27 の誘導体展開や類似構造を指標とした *in silico* のスクリーニングにより多数の PKA 活性制御薬の開発を進め、尿濃縮薬として有望な化合物の特許を出願した。褐色脂肪培養細胞において PKA 活性化作用を有する化合物 X は、高脂肪食誘発肥満モデルマウスの体重をポジティブコントロールであるミラベグロンと同等に低下させることができた。化合物 X には、褐色脂肪のミトコンドリアを保護する効果があり、ミトコンドリアにおける熱産生作用の改善から抗肥満効果を発揮したと考えられた。AKAP - PKA 結合阻害剤は新しいカテゴリーの PKA 制御剤であり、治療薬のみならず新規病態機構を解明するためのツールとしても有用であることから、様々な分野のシーズ創出に貢献し得る。

AKAP X は尿濃縮機構に必須の分子である

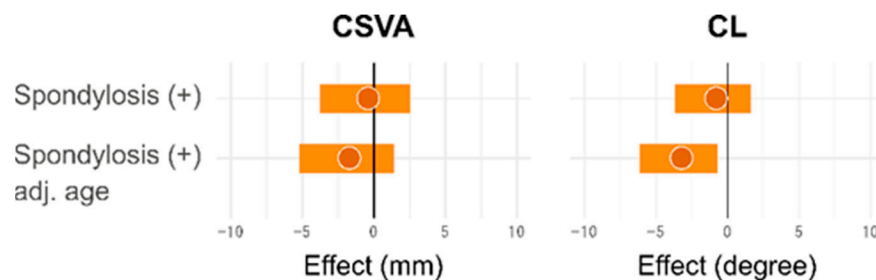


【目的】 高齢者の地域居住の増加に伴い、背骨の姿勢と QOL の関係が注目されている。しかし、この関係の詳細はまだ十分に分かっていない。近年の日本人集団コホート疫学運動調査（おぶせスタディ）により、C2-C7 頸椎矢状軸（CSVA）が男性では 60 代から増加し始め、女性では増加しないことが明らかになった。本研究は、頸椎症性変化の病態を明らかにすることを目的としている。

【方法】 協力町の住民基本台帳から無作為抽出で 50 歳から 89 歳の 411 名（男性 202 名、女性 209 名）を抽出した。CSVA、C2-C7 頸椎前弯（CL）、T1 傾斜（T1S）、矢状軸（SVA）を含むいくつかの矢状軸アライメントパラメータの測定のため、すべての参加者に立位での側面 X 線撮影を実施した。また、頸椎症性変化の有無も記録した。頸椎矢状面アライメントと頸椎症との関連、および頸椎矢状面アライメントと全脊柱アライメントとの関連について検討した。

【結果】 頸椎症の有病率は、男性（81%）が女性（70%）より有意に高かった（ $p=0.01$ ）。CL は年齢で調整すると、頸椎症患者において有意に小さかった（ 3.4° 小さい、 $p=0.01$ ）。T1S から CL を引いた値は、男性、女性ともに CSVA と中程度の正の相関を示した（それぞれ $r=0.49$, 0.48 、いずれも $p<0.01$ ）。男性のみ、CSVA と CL は年齢とは無関係に SVA と弱い正の相関を示した（それぞれ $r=0.31$ と 0.22 、いずれも $p<0.01$ ）。頸椎のミスアライメントは、男性よりも女性において、SF-8 スコアの低下とより明確に関連していた。地域在住の高齢者において、頸椎症に伴う頸椎矢状面のアライメント変化は、全脊柱のアンバランスを補うための機能低下として現れることが明らかとなった。

頸椎症が頸椎アライメントパラメータに与える影響

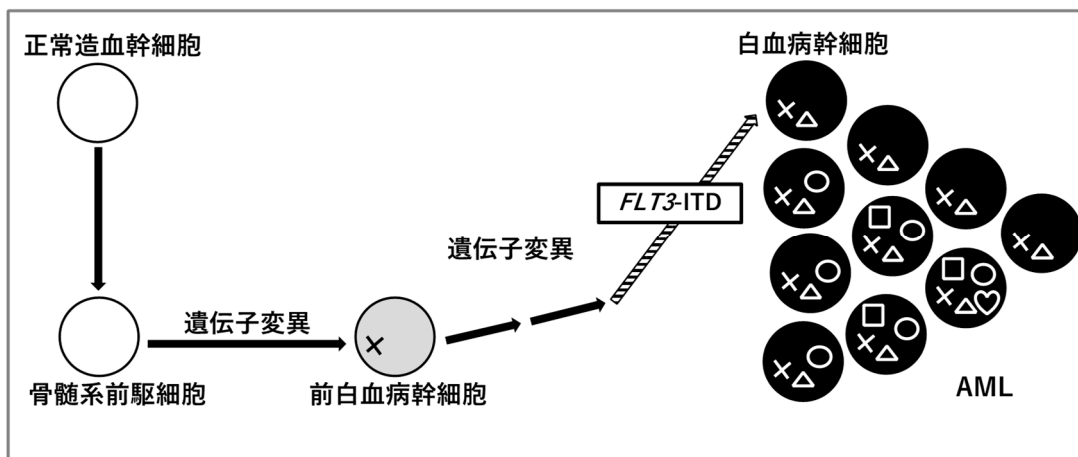


【目的】 FLT3の遺伝子内縦列重複（internal tandem duplication：FLT3-ITD）変異陽性白血病は、急性骨髄性白血病（AML）の中でも、特に予後不良として知られている。近年、白血病幹細胞に関する研究が進み、幹細胞活性は、エピゲノム変化によるものであり、遺伝子変異とは独立した予後不良因子であることが明らかになった。本研究では、「FLT3-ITD変異が、何らかのエピゲノムの変化をもたらし、幹細胞活性を付与することにより、FLT3-ITD変異陽性白血病の難治性をもたらす」という仮説の検証、機序の解明を目的とした。

【方法】 まず表面抗原として白血病幹細胞分画を有する白血病細胞株に野生型 FLT3、FLT3のチロシンキナーゼドメイン（FLT3-TKD）変異、FLT3-ITD変異を導入した。そして、それらの細胞の性質をシグナル伝達経路、増殖能、幹細胞活性の観点から検証した。

【結果】 FLT3-ITD変異は、野生型 FLT3、FLT3-TKD変異と異なり、白血病細胞株に幹細胞活性を誘導した。しかし、その機序に関しては未だ不明である。

概念図：AMLにおける白血病幹細胞の発生起源と FLT3-ITD 変異

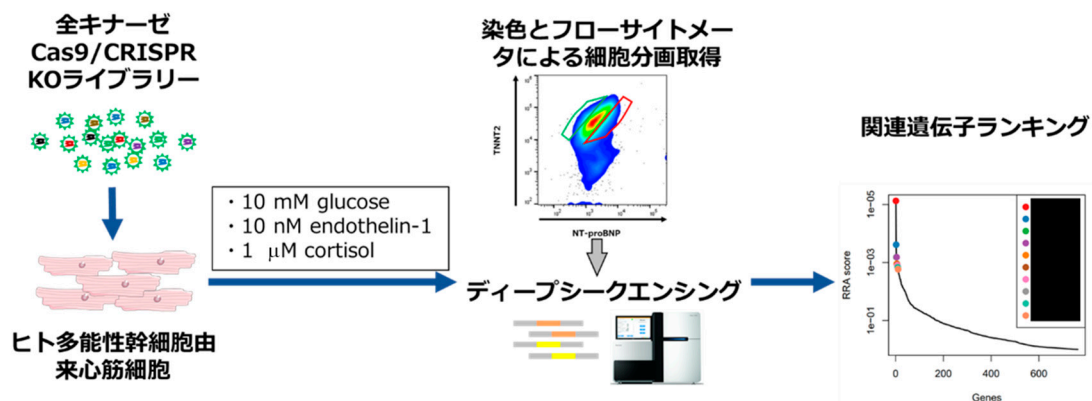


【目的】心不全に対する治療法の進歩に伴い、心不全患者の予後やQOLは大きく改善してきた。しかし、現在の標準的治療薬として用いられる β 遮断薬やレニンアンジオテンシン系阻害薬は収縮不全を伴った心不全においては高い有効性を示すものの、高齢者の心不全の主体である拡張不全型心不全では有効性が乏しいことが明らかになっている。そのため新規の治療薬開発が必要であるものの、拡張不全型心不全の病態は未だに不明な点が多く残されており、治療標的の同定も困難な状態である。そこで本研究では、ヒト多能性幹細胞より心臓構成細胞を作出し、CRISPR/Cas9システムを用いた遺伝子ノックアウトスクリーニングを行い、拡張不全型心不全の病態に寄与する遺伝子の候補を探索することで、新規治療標的となりうる分子生物学的機序を明らかにすることを目的として研究を実施した。

【方法】健康人由来のヒト人工多能性幹(iPS)細胞に対して、CRISPR/Cas9システムによるゲノム編集を用いてAAVS1領域に誘導性 Cas9 発現配列を組み込んだ iPS 細胞株を複数作製した。これらの細胞株にドキシサイクリン添加を行い、フローサイトメトリーおよび免疫染色にて Cas9 の発現確認を行った。ヒト心臓線維芽細胞はヒト iPS 細胞より Wnt パスウェイ関連低分子化合物およびレンチノイン酸を用いて心外膜系譜細胞を誘導し、線維芽細胞成長因子を用いて誘導を行った。リアルタイム PCR、フローサイトメトリーによる遺伝子発現および顕微鏡による形態観察にてヒト心臓線維芽細胞の評価を行った。ヒト心筋細胞はヒト iPS 細胞より Wnt パスウェイ関連低分子化合物により誘導を行い、Wnt アゴニスト存在下の低密度培養で増殖を行ったのちに実験に使用した。全キナーゼを標的とした遺伝子ノックアウト Cas9 レンチウイルスプールライブラリーより作製したレンチウイルスベクターをヒト心臓線維芽細胞、ヒト心筋細胞に導入し、Puromycin による薬剤選択を行った後にヒト心筋細胞に対してはグルコース、エンドセリン1、コルチゾールにて3日間刺激を行った。その後 Brefeldin A にて処理後に細胞を固定し、抗 NT-ProBNP 抗体および抗 TNNT2 抗体にて免疫染色を実施した。これらの細胞をフローサイトメトリーにて TNNT2 陽性集団より NT-ProBNP の強/弱信号分画の細胞を各々回収し、NGS を用いてライブラリーを標的としたディープシーケンスを実施した。得られた結果より MAGeCK プログラムを用いて各遺伝子における RRA スコアを算出した。計4回のスクリーニングを実施し、最終的な RRA スコアを算出した。

【結果】当初の計画に従い誘導性 Cas9 発現ヒト多能性幹細胞の作出に成功した。しかし、細胞集団内で Cas9 を安定して誘導することが困難であったことから、計画を変更し、分化誘導後の細胞に直接 Cas9 および gRNA を発現するベクターを導入することとし、研究を継続した。ヒト iPS 細胞から心筋細胞を誘導し、さらに幼弱心筋細胞の増殖を引き起こすことで大量の心筋細胞を作出することに成功した。これらのヒト心筋細胞を用いて行った全キナーゼを標的とした CRISPR スクリーニングでは拡張不全型心不全の病態形成に関与が疑われる遺伝子候補の同定に成功した。ヒト心臓線維芽細胞は既存の報告に基づき誘導することは可能であったものの、長期培養により心外膜系譜様細胞への形質転換が認められたため、今後培養プロトコルの最適化が必要と考えられた。

ヒト多能性幹細胞由来心筋細胞を用いた心不全発症関連遺伝子探索のための全キナーゼ CRISPR スクリーニング



178 RNAのメチル化異常による消化管癌の増殖機構の解明 工藤 健介

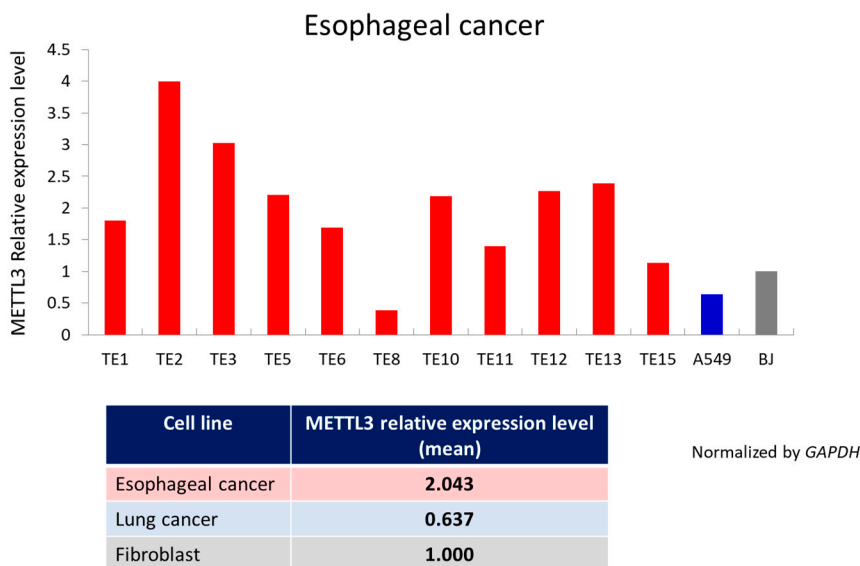
【目的】 我々の細胞の RNA は、DNA やヒストンと同様にメチル化修飾を受けており、肺癌や急性骨髄性白血病などの悪性腫瘍の発生や増殖において重要な役割をもつ事が報告され注目を集めている。消化器癌においては近年胃癌における RNA メチル化酵素 METTL3 の過剰発現が胃癌の増殖と肝転移を促進すると報告された。しかし、RNA のメチル化に関する研究はほとんどが基礎的実験に基づくデータについて論じたものであり、臨床応用には至っていないのが現状である。本研究では、消化管癌と RNA メチル化異常との関連性を探索することを目的とした。

【方法】 先行研究として、骨格筋芽細胞を用いて、RNA メチル化修飾酵素 METTL3 発現を制御する事により骨格筋分化に与える影響について検証した。METTL3 による骨格筋分化制御が RNA のメチル化修飾 (N6-methyladenosine: m⁶A) を介しているかどうか、m⁶A-seq によって評価した。さらに消化器癌への応用として、食道癌/胃癌/大腸癌の cell line 及び臨床検体を用いて、METTL3 の mRNA レベルを RT-qPCR にて定量し、その他の細胞株、正常組織との比較検討を行った。

【結果】 マウス骨格筋芽細胞において METTL3 の siRNA を用いてノックダウンすると、骨格筋分化に必要な転写因子 MyoD の mRNA レベルが有意に低下し骨格筋分化も抑制された。さらに m⁶A-seq により MyoD mRNA の m⁶A 修飾部位が、5' UTR、3' UTR 主体に存在することを同定し、5' UTR を欠損させた MyoD mRNA は通常の MyoD mRNA と比較し安定性の低下を認めた。食道癌/胃癌/大腸癌細胞株において qPCR を行い METTL3 の発現を定量すると、胃癌、大腸癌と比較し食道癌細胞株では非癌細胞株や肺癌細胞株と比較し総じて METTL3 の発現が高い傾向を認めた。また、食道癌検体における癌と非癌部の METTL3 の発現を定量したが有意差はみられなかった (P=0.1389)。

【まとめ】 骨格筋前駆細胞において、METTL3 が m⁶A 修飾を介して MyoD の mRNA を維持し骨格筋分化に必要である事を示した。また、食道癌細胞株において、非癌細胞と比較し METTL3 が高発現している傾向を認めた。更なる研究により、食道癌と METTL3 の関連性、制御メカニズムの解明が期待される。

食道癌細胞における METTL3 mRNA の発現

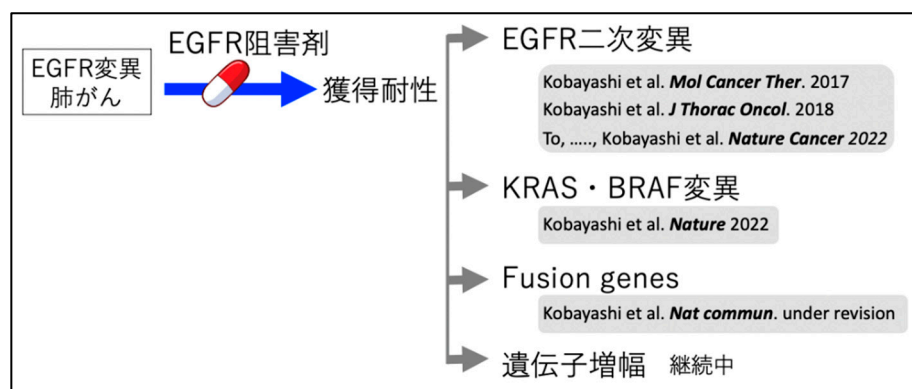


【目的】 肺がんは最も死亡者が多いがん種である。肺腺がんのうち日本人の50%、欧米人の20%にEGFR遺伝子変異があり、このタイプにはEGFRチロシンキナーゼ阻害剤、特に第3世代オシメルチニブが著効する。しかし、一度効いても約1~2年後に必ず耐性となり再増悪してしまうことが問題である。本研究は、CRISPR-Cas9ゲノム編集技術を活用して、薬剤耐性としての点変異・融合遺伝子・遺伝子増幅を持つモデルを作製することによってその機序解明と耐性の克服を目指す。

【方法】 EGFR活性型変異(exon 19の欠失変異)のある肺腺がん細胞株PC-9から、CRISPR-Cas9ゲノム編集技術を活用して、内因性のKRAS変異、BRAF変異、CCDC6-RETやESYT2-BRAFなどの融合遺伝子をもつモデルを作製した。それぞれのモデルで薬剤感受性試験を行った。KRAS変異に関しては、スプライシングを評価した。融合遺伝子については、有効な併用療法で治療を続けた後のさらなる耐性機序も解析した。

【結果】 4種類のKRAS変異を持つモデルのうちG12C、G12D、A146Tの3種類の変異は期待通りEGFR阻害剤に対して耐性となったが、KRAS Q61Kだけは予想外に薬剤耐性を起こさなかった。詳細な解析により、KRAS Q61Kが薬剤耐性を引き起こすには隣のコドンG60にアミノ酸が変化しないサイレント変異を伴うことが必須であり、その機序としてスプライシングが関わっていることを明らかにした。CCDC6-RET融合遺伝子とESYT2-BRAF融合遺伝子を作製したモデルはEGFR阻害剤に耐性となった。RET阻害剤とEGFR阻害剤の併用、MEK阻害剤とEGFR阻害剤の併用によってこれらの融合遺伝子による耐性を克服できることを見出した。さらに、これらの併用療法で長期間治療を続けるとCCDC6-RETの遺伝子増幅とESYT2-BRAFの遺伝子増幅、YAP1の遺伝子増幅、EGFR野生型の遺伝子増幅など様々な遺伝子増幅が起こった。これらのことから、PC-9モデルは薬剤耐性としての遺伝子増幅を起こしやすい特性を持っていると考えられた。その素因を明らかにするために、超低継代全ゲノムシーケンス(ULP-WGS)でゲノム上のどの領域に遺伝子増幅が起こったかを明らかにしながら、原因遺伝子の同定を継続中である。

EGFR変異肺がんの主な薬剤耐性機序とその克服



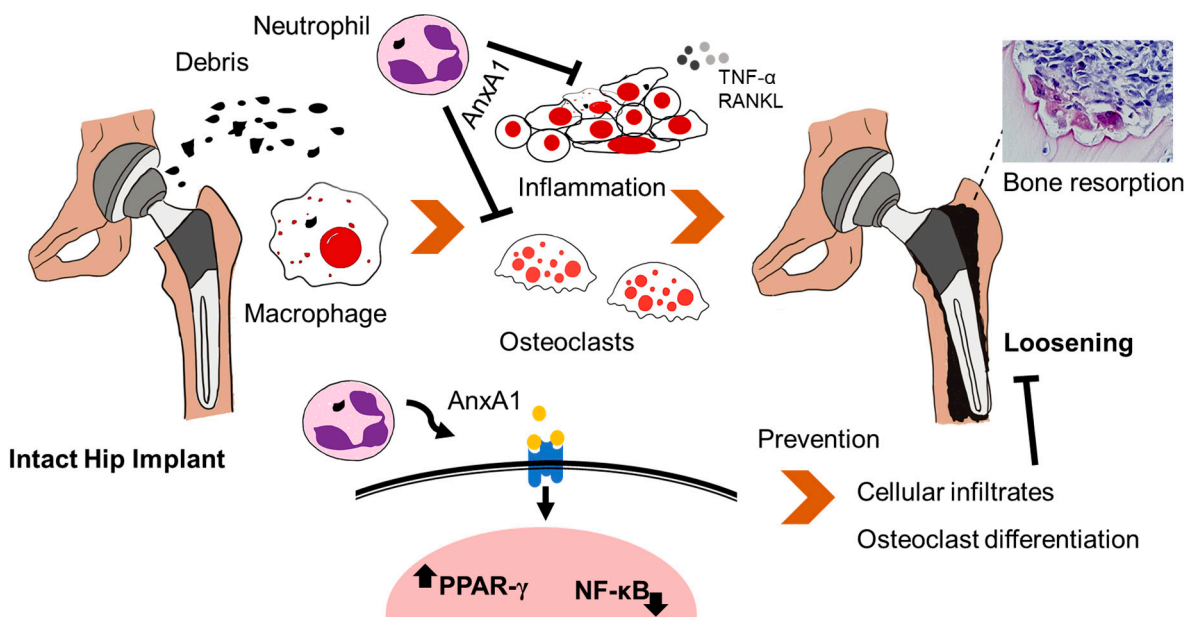
180 骨破壊疾患における好中球の機能解析と新規治療開発	清水 智弘
------------------------------	-------

【目的】好中球は過剰な炎症反応に寄与する貪食細胞として機能しているものの、骨軟骨疾患における病的骨吸収においては単球/マクロファージ系細胞における機能解析・治療開発が進められているのが現状であり、病的骨吸収における好中球の機能については依然として不明な点が多く存在する。そこで本研究では、病的骨吸収（炎症性骨吸収、骨溶解）における好中球の機能解析と治療実験を行い新規治療開発することを目的とした。

【方法】人工関節術後弛みの症例の滑膜及び関節液を採取し、好中球抗体の発現を調査した。マウス頭頂骨溶解モデルを作製し、好中球抗体を投与し、骨破壊の程度をMicro-CT・組織学的検討を行い、RNA シークエンスによる関連分子の同定を行った。人工関節術後弛みの症例の滑膜において、同定した分子の発現を調査した。同定した分子を同様の頭頂骨溶解モデルを用いて外的に投与し、骨破壊の程度を検証した。同定した分子の遺伝子欠損マウスを用いて、頭頂骨溶解モデルを作製し骨破壊の程度を検証した。同定した分子を *in vitro* で破骨細胞分化の際に投与し、破骨細胞分化への影響と遺伝子発現の差異を網羅的に解析し、関連するシグナルを同定し、ウェスタンブロッティングで発現を確認した。

【結果】好中球抗体を投与すると骨溶解が促進し、好中球を外的に投与すると骨溶解が抑制された。このことから好中球が骨溶解に対して抑制的に作用することが明らかとなった。さらに、RNA シークエンスを行い網羅的な解析を行ったところ、好中球由来骨吸収抑制因子として、Annexin A1 (AnxA1) を同定した。AnxA1 抗体投与を行うと、骨溶解が亢進しており、定量的評価においても、骨溶解領域の有意な上昇があった。AnxA1 遺伝子欠損マウスにおいても、AnxA1 抗体投与時と同様に、骨溶解が亢進しており、定量的評価においても、骨溶解領域の有意な上昇があった。AnxA1 を投与することにより、破骨細胞分化は抑制された。また、網羅的遺伝子解析の結果、NF-κB 経路を抑制しPPAR γ 経路を亢進させることが明らかとなった。ヒトマクロファージの細胞株にAnxA1 の刺激を加えて、PPAR γ 経路の蛋白発現をウェスタンブロッティングにより検証したところ、AnxA1 刺激により、PPAR γ 、 β -actin の発現の上昇が確認された。

AnxA1 は人工関節弛みに代表される骨溶解疾患の新規治療候補因子である

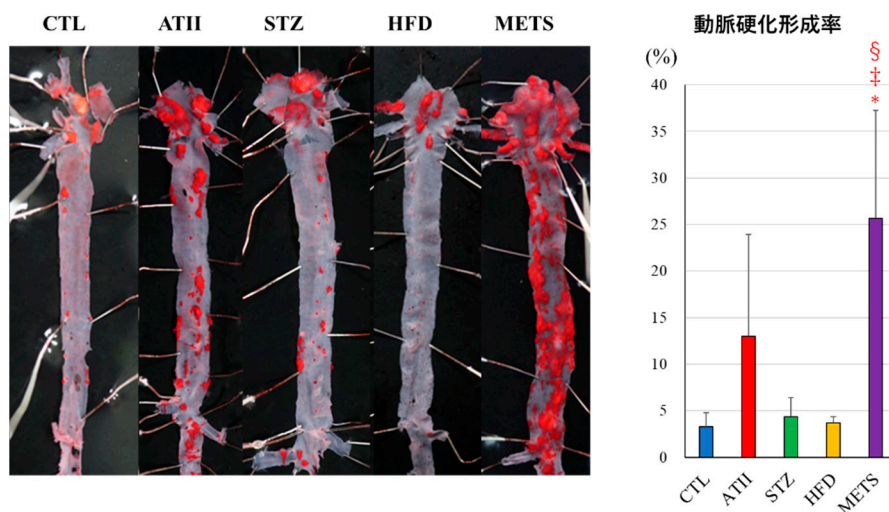


【目的】アテローム性動脈硬化症は致死性心血管疾患を引き起こす。アテローム性動脈硬化症の研究は臨床的ニーズのある研究である。高血圧症、糖尿病、脂質異常症はアテローム性動脈硬化症のリスク因子であり、それぞれ個別のアテローム性動脈硬化症への関わりについては多く研究されてきた。しかし、メタボリック症候群におけるアテローム性動脈硬化症の病態生理については、あまり報告がない。本研究は、メタボリック症候群におけるアテローム性動脈硬化症の発生機序について解明し、関わる血管内皮細胞受容体やリガンドを特定することで、アテローム性動脈硬化症の診断薬、治療薬を開発していくことを目的とした。

【方法】12週雄性アポEノックアウトマウスに12週間高脂肪食を負荷して、脂質異常症の病態を作製した。更に12週時から浸透圧ポンプを用いて、0.7 mg/kg/day アンジオテンシンIIの持続皮下投与を12週間行い、高血圧症の病態を作製した。また、18週時に80 mg/kg ストレプトゾトシンを腹腔内投与することで、2型糖尿病の病態を作製し、メタボリック症候群モデル (METS 群) とした。この他、コントロール (CTL 群)、アンジオテンシンII (ATII 群)、ストレプトゾトシン (STZ 群)、高脂肪食 (HFD 群) の単独投与モデルも作製し、その違いを評価した。主要評価項目はアテローム性動脈硬化症であり、摘出した大動脈をオイルレッドO染色して評価した。また大動脈の組織学的な評価も行った。その他の評価項目としては、体重、非観血的血圧、血糖値、血中脂質パラメーター、その他の肝機能や腎機能等の血液検査を行った。経胸壁心エコー検査で心機能も評価した。これらの評価項目がCTL群と比較して、疾患モデルにより異なるかどうかを評価した。

【結果】体重はHFD群とMETS群の2群で経時的に増加しており、高脂肪食の影響と考えられた。血圧はATII群での上昇はなかったが、METS群で上昇していた。血糖値はSTZ群を含めて、いずれの群でも有意差を認めず、ストレプトゾトシン80 mg/kgは血糖値を上昇させるには、今回のマウス群では低用量であった。血液検査ではHFD群のAST、ALT、LDHといった肝機能が上昇しており、脂肪肝が考えられた。METS群でも肝機能増悪を認めたが、有意な上昇ではなかった。脂質パラメーターではHFD群で有意差を認めなかった、METS群でLDL-C、HDL-Cが有意に増加した。主要評価項目である動脈硬化形成率の図を示した。仮説通り、METS群で高く、次に高いのはATII群であった。また、大動脈の組織学的評価では、特に細胞間接着分子1のメッセンジャーRNA発現量がMETS群で増加しており、今後のアテローム性動脈硬化症の診断薬、治療薬の開発に活用できる可能性が示唆された。

各群における動脈硬化形成率の違い

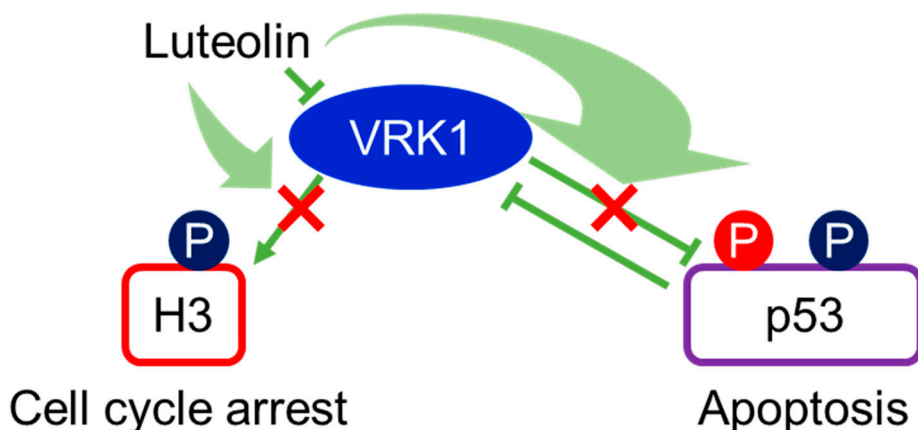


【目的】卵巣癌は婦人科領域において最も予後不良な癌種の一つであり、抗癌剤への容易な耐性獲得がその主因である。VRK1はセリン・トレオニンキナーゼの一種で、Barattaら(2015)による網羅的ノックダウンスクリーニングによって見いだされた卵巣癌の新規治療のターゲット遺伝子である。同スクリーニングでは、AURKA1、ERBB3、CDK2、mTORなどの既知のものに加えてBRD4、VRK1、GALK2などが新規の治療標的分子として報告されているが、同論文では低分子阻害剤がすでに存在するBRD4にのみ最終的に着目しており、VRK1に関する実験データは示されていない。VRK1阻害の癌細胞増殖抑制効果は*in vitro*での報告がこれまでに散見されるが(Kim et al. 2013, Zang et al. 2017)、*in vivo*で阻害剤の薬効を確認した報告は胃癌(Ming-de et al. 2017)と大腸癌(Wu et al. 2018)の2報しかなく、婦人科癌における報告はまだない。また、いずれの報告も、細胞株由来動物モデルを用いたものであり、次なる前臨床試験として患者組織由来動物モデルであるPDXでの薬効試験が重要となる。本研究では、我々が樹立したVRK1を高発現する卵巣癌患者腫瘍由来モデルにおいて、①VRK1阻害による抗腫瘍効果やシスプラチン耐性解除効果を生体モデルで初めて実証し、②それらを引き起こす分子生物学的メカニズムを解明することを目的とする。

【方法】1. VRK1の発現を抑制するフラボノイドであるルテオリンを用いて、卵巣癌細胞株を用いた*in vitro*の各種アッセイを行った。2. ルテオリンの*in vivo*における効能を明らかにするため、VRK1を高発現する卵巣癌PDX腫瘍をヌードマウスに分割移植して擬似的担癌集団を作製し、ルテオリン投与による抗腫瘍効果と副作用の評価を行った。3. ルテオリンの抗腫瘍効果のメカニズムを解明するため、リン酸化アレイによる解析を行った。腫瘍検体を用いて免疫組織学的な評価を行った。

【結果】1. 卵巣癌細胞株にルテオリンを添加すると、用量依存性に細胞増殖が抑制された。細胞周期のフローサイトメトリーではG2/M期細胞の割合が増加し、ルテオリンの抗腫瘍効果は細胞分裂の阻害であることが示唆された。2. ルテオリン50 ppm混餌の摂取によって腫瘍増殖が抑制された。ルテオリン投与による体重減少は認めなかった。3. 卵巣癌細胞株に対してルテオリンを添加することで、p53のリン酸化亢進が認められた。上記のPDXモデル腫瘍を免疫組織学的に評価すると、細胞分裂のマーカーであるヒストンH3(Ser10)のリン酸化が抑制されていた。また、p53のリン酸化が亢進しており、*in vitro*で確認された抗腫瘍効果メカニズムが*in vivo*でも再現された。

ルテオリンの抗腫瘍効果メカニズム

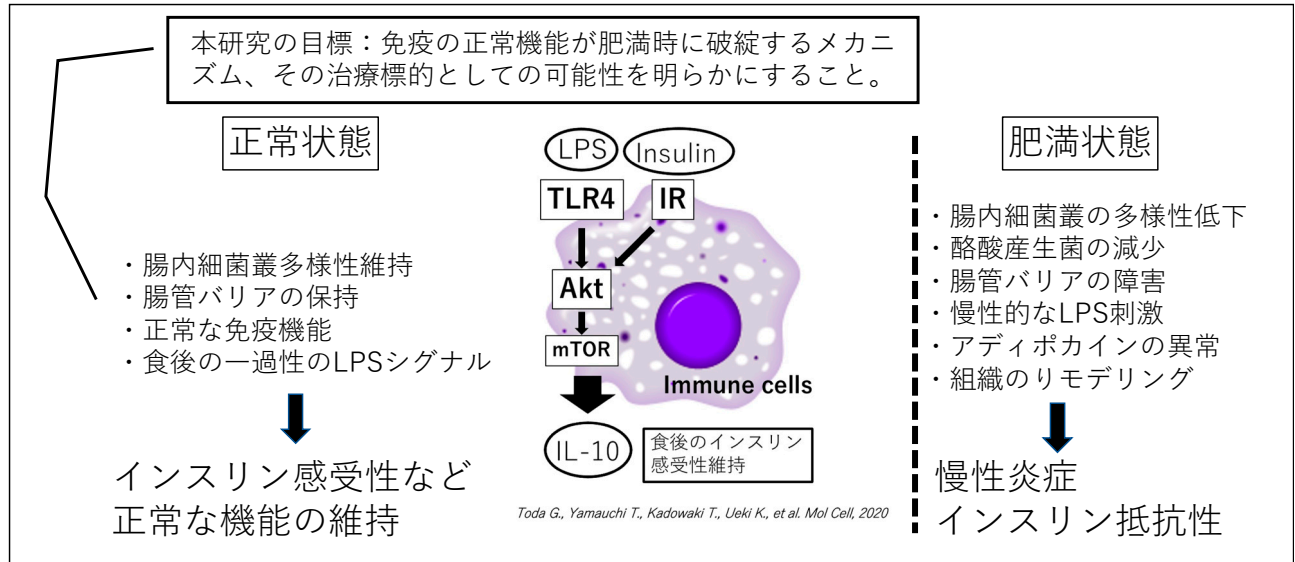


【目的】 免疫系は感染症における病原体だけでなく、栄養素など体外に存在する因子に対し細胞内シグナルを介して反応することができ、サイトカインなどの因子を放出することにより恒常性へ影響を与えることができると考えられる。肥満の病態形成でも免疫機能の一つである炎症が病態を促進していることは多くの報告から明らかになっている。一方で近年正常時の免疫細胞の機能についても明らかにされつつあり、筆者らの過去の検討から食後に増強するインスリン、腸内細菌由来の LPS のシグナルが免疫細胞での Akt-mTOR 依存的な応答により食後の糖新生を抑制し、その正常応答は肥満したマウスでは障害されていると考えられた。このような免疫細胞の食後の正常反応が肥満時に破綻するメカニズムを明らかにすることにより、免疫の食事への正常反応を維持する治療や異常を検出するバイオマーカーの開発につながりうると考えられた。本研究は肥満・糖尿病の環境因子に着目した治療を、正常時の免疫細胞の機能を維持することにより行うことを目標におき、外界への腸内環境、免疫の正常反応と肥満での変化を解析した。

【方法】 食後に食物が流入する小腸で腸内細菌に最も近接する小腸パイエル板細胞を 1 細胞レベルで解析し、食後に活性化される因子を免疫細胞で siRNA を用いて knockdown することによりその機能を解析した。

【結果】 小腸パイエル板で骨髄系細胞、リンパ系細胞で食後 NF- κ B 関連遺伝子が活性化し、RT-PCR を用いた解析で肥満状態や腸内細菌を殺菌した状態では障害されていた。肥満に対し保護と報告されている酪酸により I κ B α 蛋白の Hsp70 依存的な分解が促進された。肥満状態では NF- κ B の正常な活性化が障害されることにより免疫細胞の機能異常をきたす可能性があると考えられた。

腸内細菌叢、免疫の正常代謝、肥満の病態への影響と、本研究の目標



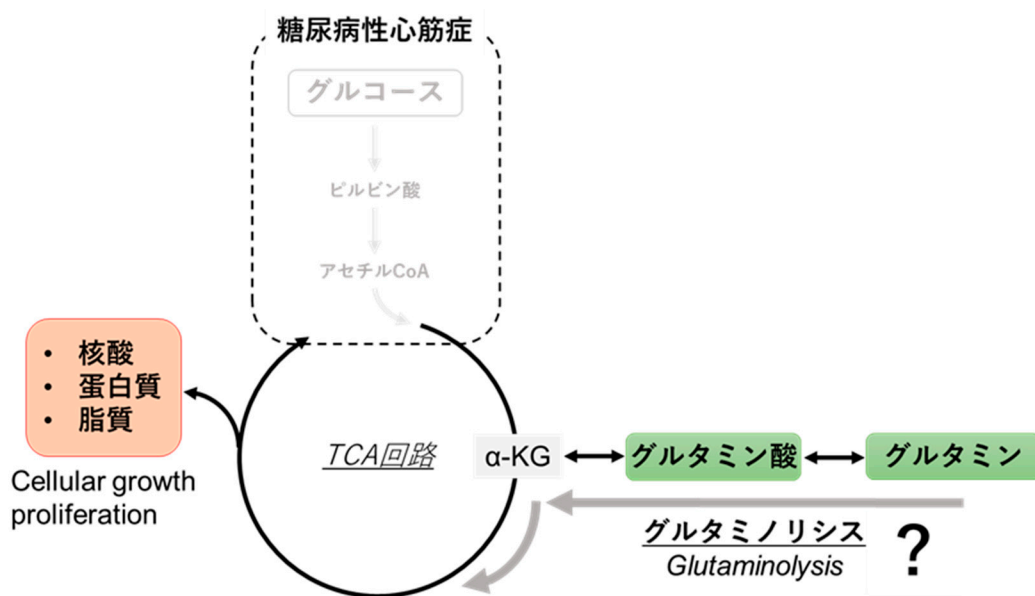
184 グルタミン代謝を標的とした糖尿病性心筋症の病態解明	長尾 学
--------------------------------------	------

【目的】 2型糖尿病は心不全の独立した危険因子であることが報告され、その原因として“糖尿病性心筋症”という病態が知られている。本研究では2型糖尿病における心筋でのグルタミン代謝に注目した。グルタミンは血中に最も豊富に存在するアミノ酸で、細胞増殖に必要な核酸や脂質の合成に利用される他、“グルタミノリシス”と呼ばれる代謝経路を通して、生体の主要なエネルギー産生系であるTCAサイクルへ、 α -ケトグルタル酸を補填している。腫瘍学分野ではグルタミノリシスは精力的に研究され、細胞増殖能の高い癌細胞は、グルタミンをエネルギー源としてのみでなく、細胞増殖に必要な核酸や脂質・タンパク質合成のための炭素・窒素の供給源として利用するため、グルタミンに強く依存することがわかっている。一方、インスリン抵抗性により、糖利用が障害された心筋におけるグルタミン代謝機構や役割については明らかにされていない。そこで本研究では糖尿病性心筋症におけるグルタミン代謝制御機構を明らかにし、同疾患の病態を解明する。

【方法】 インスリンシグナルにおいて中心的な役割を担う分子である3-ホスホイノシチド依存性プロテインキナーゼ(PDK1)を脂肪細胞特異的にノックアウトしたマウス(*Adipo-PDK1* KOマウス)を2型糖尿病のモデル動物として用いた。最初に同マウスの心臓phenotypeおよび心筋インスリン抵抗性について評価した。続いて、血中・心臓組織中のアミノ酸やグルタミノリシス関連代謝物を液体クロマトグラフィー質量分析計で測定した。さらに、安定同位体(^{13}C)で標識したグルタミンを同マウスに投与し、標識された代謝物をガスクロマトグラフィー質量分析計で測定することで、2型糖尿病という病態下でのグルタミン利用を定量評価した。

【結果】 *Adipo-PDK1* KOマウスの心筋はインスリン抵抗性を示し、糖尿病性心筋症の特徴の一つである心肥大を呈することを確認した。また、心臓組織中のグルタミンに加えて、グルタミン酸、 α -ケトグルタル酸もノックアウト群で有意な増加を示した。安定同位体を用いた実験では投与した外因性のグルタミンが心臓組織中の全グルタミン量に占める割合は数%程度で、外因性グルタミンはほぼ心臓には取り込まれなかった。

糖尿病性心筋症におけるグルタミン代謝制御

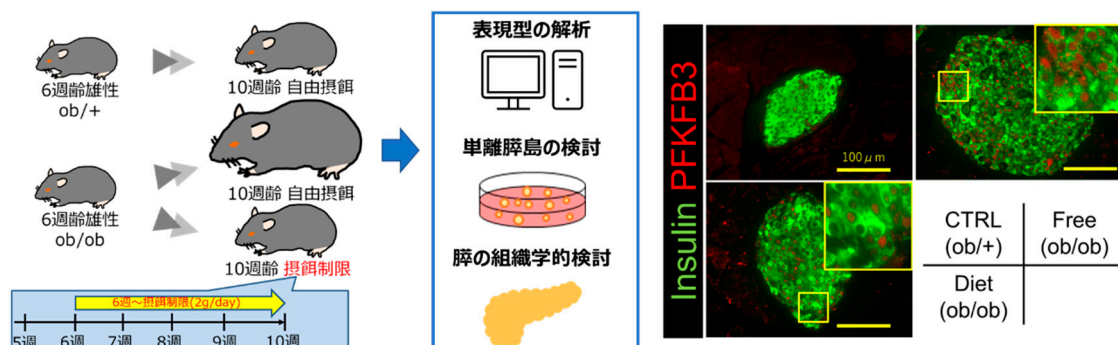


【目的】 近年、2型糖尿病モデル動物の膵島では、十分な酸素下においても癌細胞と同様に解糖系が亢進しており (Warburg 効果)、この病態がインスリン分泌不全へ関与していることが提唱された。しかしその詳しいメカニズムは不明であった。これまで我々は、ヒト膵島ならびに糖尿病モデル動物を用いて、糖尿病病態下の膵β細胞においては、ミトコンドリアの機能障害を端緒とした低酸素誘導因子 HIF1 α の安定化とそれに引き続く解糖系酵素 PFKFB3 の活性化により、細胞内代謝がミトコンドリア中心から解糖系にシフトする代謝のリモデリングを生じていることを明らかにした。しかしこのような代謝変化の意義 (膵β細胞機能障害の原因か結果か) や、代謝リモデリングが糖尿病への治療や予防的介入により是正しうるのか (可変性)、細胞内代謝への介入が糖尿病病態を改善させるか (治療標的か) はこれまで不明であり検討する意義があると考え検討を行った。

【方法】 1. 肥満糖尿病モデルマウスにおける膵島の代謝変化: 肥満・糖尿病モデルマウスである ob/ob マウスを用いて、週数別に表現型と膵島における代謝変化について、解糖系酵素 PFKFB3 の発現を中心に検討した。2. 肥満糖尿病モデルマウスへの摂餌制限による膵島の代謝変化: 解糖系の明らかな亢進が認められる前の、6週齢の雄性 ob/ob マウスへ4週間の摂餌制限を行うことで、体重・血糖値を正常化させ、膵島の代謝変化に影響を及ぼすかを検討した。3. 膵島の代謝変化が進行した状態における肥満・糖尿病病態への介入効果の検討: 既に解糖系の亢進が生じている、8週齢の雄性 ob/ob マウスへ4週間の摂餌制限ないし SGLT2 阻害薬の投与を行うことで血糖値を低下させ、膵島の代謝変化に影響を及ぼすかを検討した。4. ラット由来膵β細胞株 INS-1 832/13 細胞・マウス単離膵島を用いた検討: INS-1 832/13 細胞ならびに雄性 C57BL/6J マウスの単離膵島を用いて、培地中のグルコース濃度の変化が解糖系酵素群の発現にどのような影響を及ぼすかを検討した。

【結果】 ob/ob マウスは週数の進行とともに経時的な体重・血糖値の上昇を認めた。膵β細胞における解糖系酵素 PFKFB3 の発現は、6週齢と比較し8週齢・10週齢において発現が亢進した。6週齢から4週間の摂餌制限を行うことで有意に体重と血糖値の低下が得られ、摂餌制限を行ったマウスでは膵島・膵β細胞の PFKFB3 ならびに解糖系酵素の発現は低下した。PFKFB3 の発現が亢進している8週齢から4週間の摂餌制限においても同様に、体重・血糖値の抑制とともに、膵島の PFKFB3 の発現は低下した。単離膵島を用いた DNA マイクロアレイ解析では、コントロールマウス (ob/+マウス) と比較し自由摂餌を行った ob/ob マウスでは解糖系パスウェイに存在する遺伝子群の発現亢進と Pcx の発現の低下が認められたが、一方で摂餌制限を行った ob/ob マウスではこれらの変化は是正された。INS-1 細胞やマウス単離膵島を用いた *in vivo*、*ex vivo* の検討においては、培地中のグルコース濃度依存性に PFKFB3 の発現が変化し、可変性が確認された。今後はこのような細胞内代謝変化への介入が病態を修飾しうるかを検討することが望ましい。

肥満糖尿病体が膵島の解糖系酵素の発現に与える影響と病態への介入効果

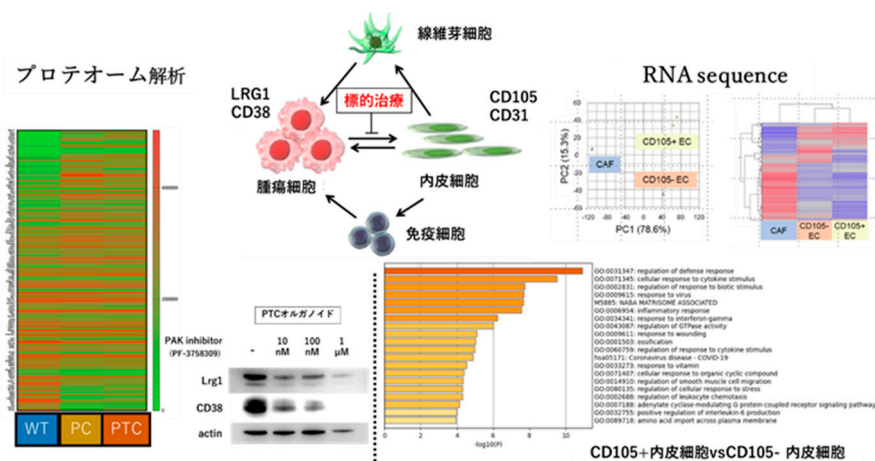


【目的】 本研究では印環細胞型胃癌でみられる著明な線維化、いわゆるスキルス性形成のメカニズムにおいて、血管内皮細胞の異常活性化によって誘導される機構をオミクス解析により解析し、新規治療標的を提示することを目的とした。

【方法】 スキルス胃癌マウスモデルとして、独自に樹立した *Tff1*-Cre; *LSL-p53*^{R172H}; *Tgfb* r2^{F/F}; *Cdh1*^{F/F} (T1-PTC) マウスを用いた。腫瘍免疫微小環境の解析を行うため、マウス胃腫瘍組織を用いて FACS を施行し、血管内皮細胞・線維芽細胞を選択的に回収し、各々の RNA シークエンスを施行した。具体的には、先行実験により T1-PTC マウス胃腫瘍細胞で *Lrg1* 遺伝子が高発現していることが判明しており、*Lrg1* により誘導される CD105 陽性血管内皮細胞と CD105 陰性血管内皮細胞における遺伝子発現の差異を比較した。また、粘膜内の印環細胞癌を発症するものの浸潤傾向を示さず、長期生存が可能である *Tff1*-Cre; *LSL-p53*^{R172H}; *Cdh1*^{F/F} (T1-PC) マウスと T1-PTC マウスにおける線維芽細胞の遺伝子発現の差異も比較した。さらに、先行実験により T1-PTC マウスに対する新規治療標的候補として CD38 を特定しており、CD38 特異的抗体による治療を行ったマウス胃腫瘍組織からも FACS を用いて線維芽細胞を回収し、治療前後の RNA 発現を比較した。加えて、WT・PC・PTC 変異胃オルガノイドを樹立し、3種についてリン酸化プロテオーム解析を行い、PTC 腫瘍オルガノイドに特異的な活性化 pathway を検索した。

【結果】 T1-PTC マウス胃腫瘍内の CD105 陽性血管内皮細胞と CD105 陰性血管内皮細胞の遺伝子発現の差異を比較した結果、CD105 陽性血管内皮細胞においては *Myc*・*Tgf-β* シグナル関連遺伝子群の高発現を認め、また血管新生亢進に関連する遺伝子群の高発現が確認された。さらに *CSF3*・*MADCAM1*・*SELP* といった白血球遊走に関連する遺伝子の上昇を認め、CD105 陽性血管内皮細胞による血管新生のポジティブフィードバック機構や白血球遊走亢進による炎症誘導機序の存在が示唆された。次に線維芽細胞について解析を行ったところ、T1-PTC マウスの胃腫瘍内線維芽細胞は T1-PC マウスの線維芽細胞に比し、ケモカインを中心としたサイトカイン関連遺伝子が高発現しており、T1-PTC マウスにおいては CD105 陽性血管内皮細胞と線維芽細胞は協調して白血球遊走と炎症を誘導し、腫瘍優位の腫瘍免疫微小環境を形成していると考えられた。さらに、CD38 特異的抗体による治療を行った T1-PTC マウスの胃腫瘍組織内線維芽細胞においては、白血球遊走関連遺伝子群の高発現が一部キャンセルされていたことから、CD38 は血管内皮細胞を誘導するのみならず、スキルス胃癌においては線維芽細胞による炎症の誘導にも関連する可能性があり、CD38 を抑制することで腫瘍免疫微小環境全体の形成機序を抑制しうる可能性が示唆された。一方、胃腫瘍オルガノイドのリン酸化プロテオーム解析の結果、PTC 腫瘍オルガノイドにおいて PAK 蛋白のリン酸化が亢進していた。そこで PTC 胃腫瘍オルガノイドに *in vitro* で PAK 阻害剤の投与を行ったところ、腫瘍オルガノイドで高発現している CD38 を抑制した。したがって、PAK 阻害剤はスキルス胃癌における血管内皮細胞誘導機序を抑制する可能性があり、新規治療薬候補として考えられた。

腫瘍細胞のプロテオーム解析と内皮細胞・線維芽細胞の RNA シークエンスによる腫瘍免疫微小環境解析

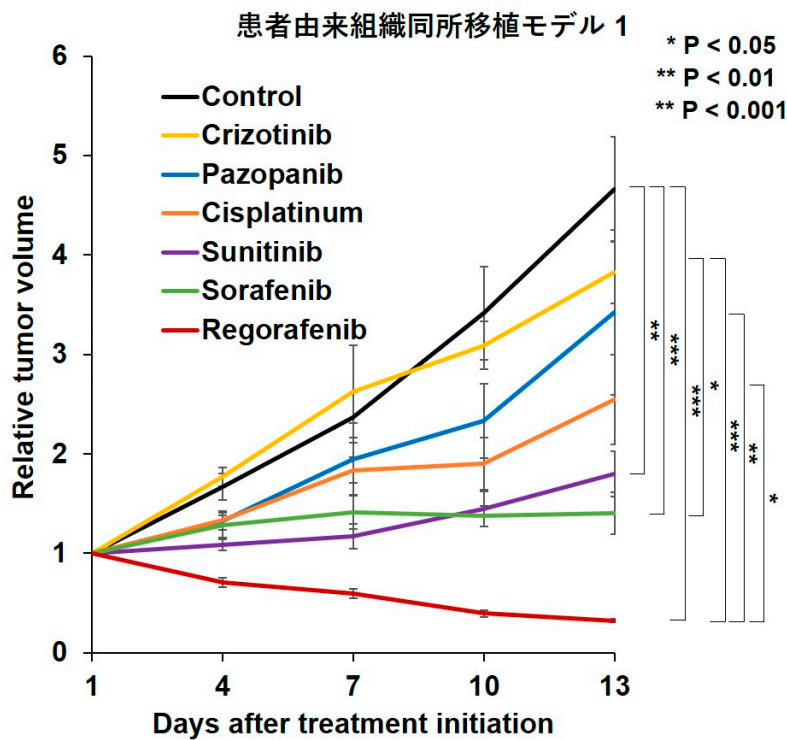


【目的】 我々は、患者由来組織同所移植モデルを用いて、骨肉腫に有効な薬剤を網羅的に解析し、マルチキナーゼ阻害薬 (multi-kinase inhibitors : MKIs) の一部が骨肉腫に効果的である可能性を報告した。本研究では、骨肉腫の患者由来組織同所移植モデルを樹立し、MKIsの中から、骨肉腫に効果のある薬剤を見出し、その抗腫瘍効果のメカニズムを病理学的に明らかにすることである。

【方法】 骨肉腫患者 2 例の腫瘍組織を用いて、骨肉腫患者由来組織同所移植モデルを 2 系統樹立し、コントロール群、cisplatin (標準治療) 群と各種 MKIs 群 (pazopanib 群、crizotinib 群、sunitinib 群、sorafenib 群、regorafenib 群) にランダムに振り分け、2 週間の治療を行った。治療中は、腫瘍サイズとマウスの体重を週 2 回計測した。治療終了後に腫瘍を切除し、治療効果を組織学的に評価した。

【結果】 いずれのモデルでも、cisplatin 群、crizotinib 群、pazopanib 群では有意な増殖抑制効果を認めなかった。Sunitinib 群と sorafenib 群では、片方のモデルでのみ有意な増殖抑制効果を認めた。Regorafenib 群では両モデルで有意な増殖抑制効果を認め、切除腫瘍において広範な壊死と線維化を認めた。すべての群において、治療前後の有意な体重減少を認めなかった。

骨肉腫患者由来組織同所移植モデルにおける各 MKI 治療群の腫瘍増殖曲線

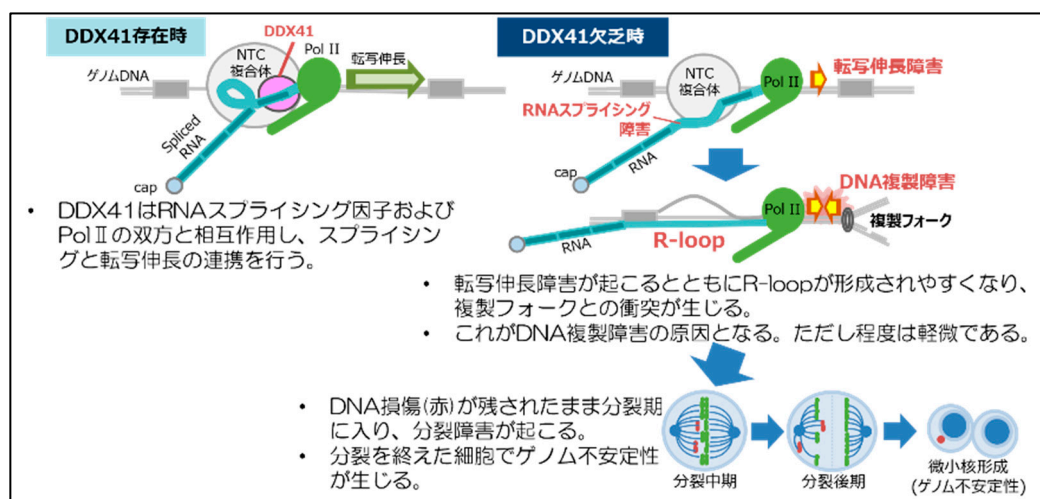


【目的】 近年、急性骨髄性白血病（AML）や骨髄異形成症候群（MDS）などの骨髄性造血器腫瘍において、RNA ヘリケースをコードする遺伝子の変異を伴う例があることが明らかにされた。特に興味深いのは DEAD-box 型 RNA ヘリケースの *DDX41* に変異を有する例で、他の AML/MDS と異なり骨髄不全を示す傾向が多いなど、典型的な AML や MDS とは異なる疾患表現型を示す傾向がある。しかしながら、RNA ヘリケースの遺伝子変異が、造血幹・前駆細胞におけるどのような生命現象に障害をもたらす腫瘍化させるのか、これまで明らかにされていない。RNA ヘリケースは、転写・翻訳・リボソーム RNA 合成など、RNA 代謝を伴うほぼすべての局面において重要な役割を担うが、そうであるが故に、特定の RNA ヘリケースの障害が実際に細胞内で何をもたらすか解析することを困難にしている。そこで本研究では、特に *DDX41* に焦点を絞り、1) RNA ヘリケース異常が DNA 複製障害とゲノム不安定性をもたらす機序、2) RNA スプライシングにおける *DDX41* の役割、3) RNA スプライシング異常が転写伸長を障害するメカニズム、を中心に詳細な解釈を加えることとした。

【方法】 CLIP シーケンス法により、*DDX41* が RNA に結合する配列や部位の解析を行った。また、*DDX41* の発現を抑制させた場合の RNA スプライシングパターンの変化や、*DDX41* が相互作用する分子の解析を通じて、*DDX41* の RNA スプライシングへの関与を検討した。さらに、細胞周期を同調したうえで *DDX41* の発現や機能を阻害することで、*DDX41* が DNA 複製においてどのような役割を担うか検討した。

【結果】 *DDX41* が、主にコーディング RNA の 5'スプライスサイト（SS）に結合することを見出し、また実際、本分子が多く RNA スプライシング関連分子と相互作用することが確認された。一方で、*DDX41* の発現抑制は特定の RNA スプライシング変化を呈さず、この点は、MDS ですでによく知られている RNA スプライシング関連遺伝子の変異の場合と異なるが、これは、*DDX41* が RNA スプライシングの後半である C 複合体において機能するという解析結果と整合性がとれるものであった。細胞周期の S 期のみにおいて *DDX41* を阻害すると、S 期の進行は軽度障害され、これには R-loop の増加を伴うが、この際の DNA 損傷応答シグナルの活性化は限定的であった。しかしながら、この細胞は分裂期に時間を要し、分裂後の細胞において顕著な DNA 不安定性を示した。加えて、ChIP シーケンスなどの結果から、*DDX41* が転写伸長複合体とスプライシング複合体の双方と相互作用し、両者をコーディネートする役割を担うことを明らかにした。以上の結果から、*DDX41* は RNA スプライシングの効率的な遂行を介して、転写伸長を制御することがわかった。*DDX41* 変異・発現低下による RNA スプライシング異常や DNA 複製障害はあくまで軽微であるが、軽微であるがゆえにチェックポイント機構がこれを見逃し、そのまま細胞分裂を迎え、分裂後に顕著な DNA 複製障害が生じるという機序が明らかになった。

DDX41 障害がゲノム不安定を伴う造血障害をもたらす機序

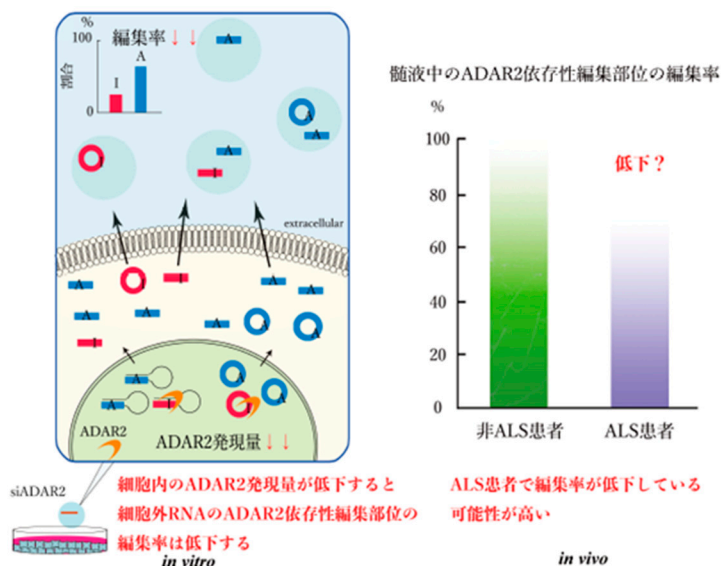


【目的】筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は致死性の神経変性疾患であり、現時点で根本的な治療法はなく、その開発には、診断および治療モニタリングを可能にするバイオマーカーの存在が必須である。我々は、孤発性 ALS の下位運動ニューロンで、RNA 編集酵素である adenosine deaminase acting on RNA 2 (ADAR2) の発現量が低下し、GluA2 のグルタミン/アルギニン (Q/R) 部位の RNA 編集異常が起こり、通常は発現しない Q/R 部位未編集型の GluA2 が発現していることを同定し、この RNA 編集異常によるグルタミン酸興奮毒性が、孤発性 ALS で認める運動ニューロン死の一次的な原因となることを証明した。また、細胞外 RNA の ADAR2 依存性編集部位の編集率が、細胞内の ADAR2 発現量と相関することを発見し、細胞外 RNA の ADAR2 依存性編集部位の編集率変化が、孤発性 ALS の疾患特異的バイオマーカーとなる可能性を示した。そこで本研究では、中枢神経由来の細胞外 RNA が存在している髄液中で ADAR2 依存性編集部位の編集率を測定し、運動ニューロンでの ADAR2 の発現量低下を同定し、孤発性 ALS の診断および治療モニタリングのバイオマーカーになり得るか検討した。

【方法】髄液 1 ml より髄液中に存在する細胞外 RNA を抽出し、細胞外 RNA の総量を測定し ALS 群と非 ALS 群で比較した。そして、その細胞外 RNA を鋳型として ADAR2 依存性編集部位を含む mRNA を増幅させた。編集率を孤発性 ALS 群および対照群で統計学的比較を行い、診断バイオマーカーとなり得るか検討した。引き続き、編集率と ALS 機能評価スケール (ALS Functional Rating Scale-Revised : ALSFRS-R) や呼吸機能検査 (%VC) との相関を調べた。

【結果】髄液中に存在する細胞外 RNA の総量は微量であり、ALS 群 (N=10) と非 ALS 群 (N=13) で有意な差はなかった (ALS 群 : 504~1,368 pg/ml、非 ALS 群 : 444~1,584 pg/ml、Mann-Whitney *U*-test、 $P=0.208$)。ALS 群で髄液中に存在する細胞外 RNA の総量と ALSFRS-R との間に有意な相関はなかった (Spearman の順位相関係数、 $R^2=0.0053$ 、 $P=0.524$)。ADAR2 依存性編集部位のうち、髄液中で ADAR2 依存性編集部位 site A を含む mRNA を検出し、その編集率は ALS 群で有意に低下していた (ALS 群 (N=9) : 82.4~100%、非 ALS 群 (N=9) : 95.0~100%、Mann-Whitney *U*-test、 $P=0.024$)。そして、その編集率は ALSFRS-R および %VC との間には、有意な相関は認めないものの、編集率が低下すると ALSFRS-R および %VC は低下する傾向にあった。以上の結果から、髄液中に存在する site A の編集率は、運動ニューロン内の ADAR2 発現量を反映する可能性が高く、運動ニューロンで ADAR2 発現量が低下している孤発性 ALS の疾患特異的な診断バイオマーカーおよび疾患の進行モニタリングマーカーとなる可能性が示唆された。

細胞外 RNA の ADAR2 依存性編集部位の孤発性 ALS における疾患特異的バイオマーカーの可能性

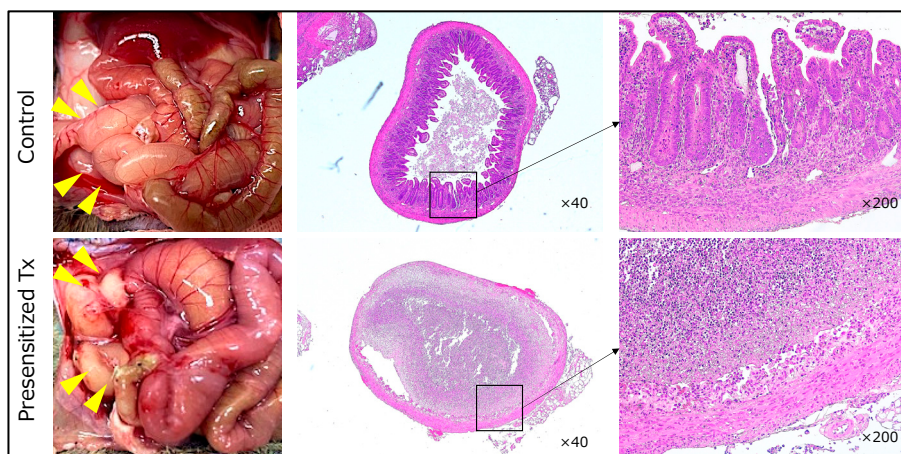


【目的】 小腸移植において抗体関連型拒絶はグラフト喪失の主な原因の一つであるが、小腸移植後抗体関連型拒絶のメカニズムおよび診断根拠となり得る病理組織像は未だ確立されていない。しかし小腸移植後ドナー特異的抗体 (DSA) と慢性拒絶の発生率やグラフト生着率低下との関連も報告されており、抗体関連拒絶反応のメカニズムやその特徴的病理像を解明することは今後の小腸移植後成績の向上に大きく貢献できるものと考えられる。近年、マウス腎臓移植モデルにおいて、術前にあらかじめドナーマウスの皮膚の一部をレシピエントマウスの背部に移植し感作させることでレシピエント体内に **preformed DSA** を作製し抗体関連型拒絶反応を再現することが可能であると報告された。本研究では、同様の手法で **preformed DSA** を作製したマウスを用いて小腸移植を行い抗体関連型拒絶反応誘導し、小腸移植後の抗体 関連型拒絶反応のメカニズムの解明することを目的とした。

【方法】 MHC ハプロタイプ異なる 25~30 g のマウス間で同種異系間移植を行った。B6 マウスの皮膚 8~10×10 mm² を C3H マウスの背部に移植した。2 週間後、C3H マウスの末梢血を採取し、B6 の splenocytes (0.5×10⁶) と室温で反応させ抗体価 (IgG) をフローサイトメトリーにて測定した。B6 マウスの小腸 10 cm 長採取し、皮膚移植後 2 週間目の C3H マウスに異所性小腸移植を行った。移植後 2 日目、4 日目、7 日目でグラフト摘出し、急性拒絶反応の程度を、皮膚移植を行っていないマウスと比較評価した。

【結果】 B6 マウスの皮膚を C3H に移植し 2 週間経過すると、皮膚移植グラフトは拒絶された。その時点で C3H マウスは B6 マウスに対する DSA を保有していることをフローサイトメトリーで IgG 抗体価の上昇で確認した。皮膚移植により前感作させ **preformed DSA** を有した C3H マウスに B6 マウスの小腸を移植すると、**preformed DSA** を有さないコントロールマウスと比較して移植後 2 日目では急性拒絶反応に差は認められなかったが、4 日目、7 日目 (下図参照) では有意に拒絶反応が促進され、抗体関連型拒絶が誘発されていることが示唆された。これによりマウス小腸移植抗体関連型拒絶モデルの作製に成功した。現在、グラフトの詳細な病理学的所見の評価や免疫染色で補体 C3、C4d、C5 などの血管壁への沈着や CD8 陽性細胞の粘膜固有層への浸潤程度を比較しており、これにより小腸移植における抗体関連型拒絶の診断根拠となり得る特徴的病理所見像の提唱が可能となることが期待される。また、それらの結果に基づき、有効な可能性のある治療 (抗補体抗体など) を用いた治療実験を行うことで新規治療法の確立を目指す。

移植後 7 日目の急性拒絶反応

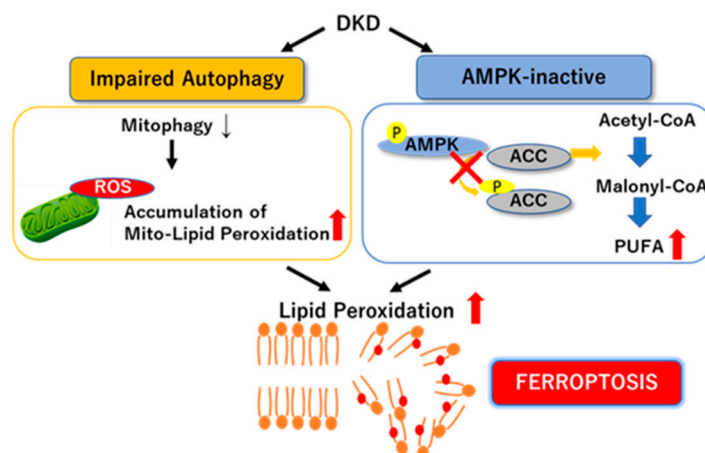


【目的】1998年以降、糖尿病性腎臓病 (Diabetic Kidney Disease : DKD) は透析導入の原疾患第一位であり、RAS 阻害薬を中心とした多角的治療でも制圧できていない。近年、DKD においてオートファジー調節不全が病態に関与すること、多くの腎疾患の発症・進行に、新しい制御性細胞死であるフェロトーシスが関与することが判明しているが、それら病態をつなぐ機序の解明は行われていない。そこで本研究では、「高血糖やオートファジー不全状態は腎尿管フェロトーシスを促進する」との仮説をたて、DKD におけるフェロトーシスの病的意義を検討し、フェロトーシスとオートファジーの相互関係の細胞生物学的基盤を明らかにし、さらに病態解明に基づきフェロトーシスを制御することによって腎保護実現に道筋をつけることを目的とした。

【方法】1型DKDの高血糖状態およびオートファジー不全がフェロトーシスに及ぼす影響を検討するために、STZ誘発性1型糖尿病モデルオートファジー不全マウスと対照群に対して腎虚血再灌流傷害 (IRI) を行った。フェロトーシス特異的抑制薬 Ferrostatin-1 (Fer-1) を投与することで障害が軽減される程度をフェロトーシスによる障害と判断した。次に2型DKDを用いた検討では、オートファジー活性化がフェロトーシスに及ぼす影響を検討するために、2型糖尿病 (DM) db/db マウスと対照群に対して IRI を行い、オートファジー活性化薬ラパマイシンの効果を評価した。さらに高血糖状態における AMPK や脂質代謝の異常がフェロトーシス亢進に関与しているかを検討するために、AMPK 活性化薬 AICAR を投与し IRI 時の腎障害を評価した。機序追究のため培養近位尿管細胞 (Atg5 (-)・Atg5 (+)) を用いて低酸素再酸素化 (H/R) によって引き起こされるフェロトーシスに対して高血糖およびオートファジー不全が与える影響を評価した。

【結果】非DM群と比較してSTZ群では、また野生型と比較してオートファジー不全群では腎障害が悪化しており、さらにSTZ群のオートファジー不全マウスは相乗的に腎障害の増悪を示しており、それらは Fer-1 投与で改善した。オートファジー不全を示唆する p62 凝集塊陽性近位尿管で、フェロトーシスを示唆する 4HNE やフェロトーシス促進因子である ACSL4 が陽性であり、特にオートファジー不全尿管でフェロトーシスが強く起こっていることがわかった。db/+と比較して db/db マウスではフェロトーシスによる腎障害は悪化した。ラパマイシン投与により Fer-1 と同程度に腎障害は改善した。非DM群では AICAR による腎障害抑制効果がみられなかった一方で、DKD 群では AICAR 投与による腎障害軽減を認めた。高血糖状態の Atg5 (-) 細胞は相乗的に細胞死増悪を示し Fer-1 投与で改善した。以上より、DKD におけるオートファジー不全と脂質代謝異常はフェロトーシス亢進を介して腎障害を悪化させることがわかった。今後、食事や運動、薬剤によるオートファジー調整、あるいは直接的なフェロトーシス抑制を介して、DKD 進行やストレス脆弱性への対策を確立できる可能性がある。

糖尿病性腎臓病におけるオートファジー不全と代謝異常はフェロトーシス亢進を介して腎障害を悪化させる

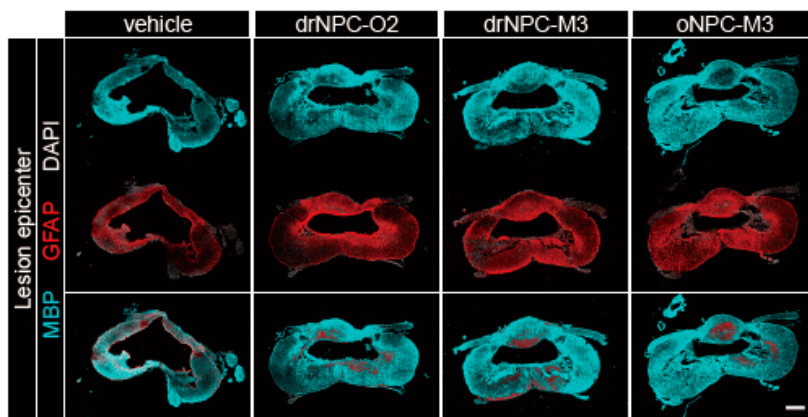


【目的】 これまでに我々は脊髄損傷に対する幹細胞移植の治癒機転メカニズムの一部を明らかにしてきた。しかし、過去の研究で用いられてきた胎児由来組織の神経幹細胞を再生医療へ応用するためには、倫理的問題が解決されない限り困難であると考えられる。iPS細胞やES細胞を代表とする多能性幹細胞も脊髄損傷に対する細胞移植療法の細胞源として候補に挙げられるが、移植後に腫瘍形成の危険性を孕んでおり、安全性が担保されているわけではない。腫瘍化しない安全な多能性幹細胞由来の神経幹細胞導入方法も未だ確立されていない。我々はヒト体細胞から神経幹細胞への直接誘導法 (Direct reprogramming) を開発した。この手法は、ヒト血液中の造血幹細胞に特定の初期化遺伝子を導入することで、2週間という短い培養期間かつ40%という非常に高い効率で神経幹細胞 (drNPCs : directly reprogrammed neural precursor cells) を作製することができる。この手法を用いれば、iPS細胞に比べて、効率よく短い期間で神経幹細胞を作製することが可能で、かつ胎児組織由来の神経幹細胞が有する倫理的問題も解決することができる。本研究の目的は、脊髄損傷に対するヒト体細胞由来神経幹細胞移植の効果を明らかにすることである。

【方法】 メス成体の免疫不全ラットを使用し、脊髄損傷モデルラットを作製した。脊髄損傷2週後にdrNPCを損傷部周囲 (頭側に2箇所、尾側に2箇所) に移植した。免疫組織学的解析・遺伝子発現解析で神経幹細胞の性質や細胞移植の効果について調査した。運動機能評価で損傷後ラットの運動機能の推移を調査した。

【結果】 1. 神経幹細胞が *in vitro* で3系統に分化することを確認した。2. 神経幹細胞が *in vivo* で3系統に分化することを確認した。3. 移植した神経幹細胞が生着し、脊髄損傷後の髄鞘再生に寄与していることを明らかにした。4. 異なる培養条件の神経幹細胞移植を比較し、候補を3つに絞り込んだ。5. 神経幹細胞移植が、脊髄損傷後の残存髄鞘を増加させることを明らかにした。6. 神経幹細胞移植が、頸髄損傷後の機能回復を促進させることを明らかにした。今回、我々はヒト体細胞由来神経幹細胞移植が脊髄損傷後の組織修復や機能回復を促進することを明らかにした。移植されたdrNPCは移植後3ヶ月経過した時点でも損傷脊髄内に生着しており、免疫拒絶を受けることなく生着し得ることが確認できた。また生着した移植細胞による腫瘍形成も認められなかった。神経幹細胞はヒト体細胞から直接誘導されて形成された細胞で、神経系の細胞へ分化誘導し易く、臨床応用を考慮する上で有用だと考えられる。生着した細胞は、オリゴデンドロサイトやニューロンに分化することで、脊髄損傷後の髄鞘形成を高める働きをしていた。また、移植細胞が神経系の細胞に分化し、組織的な再生に寄与しただけではなく、移植した細胞が発現する液性因子が損傷脊髄に対して保護的に機能した可能性も考えられた。

ヒト体細胞由来神経幹細胞移植が脊髄損傷部の髄鞘修復を促進する。

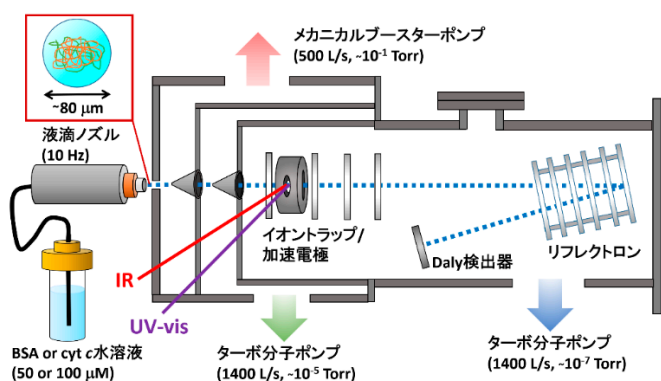


【目的】 生体分子は一般的に生体環境に近い水溶液中で固有の構造と機能を持ち、適材適所でその役割を果たす。この性質はより高次の生体分子であるほど顕著であり、DNA/RNA やタンパク質レベルでは水和状態がその安定構造に強く影響を与える。このような生体分子の水和状態と安定構造の関係を解明する手段として、最近では孤立状態での気相分光法が脚光を集めている。我々も、孤立状態（1分子レベル）のタンパク質でその水和状態と安定構造の関係を調べるため、液滴分子線赤外レーザー蒸発法と孤立気相分光法を組み合わせた独自の装置開発を行い、ウシ血清アルブミン（BSA）にみられる3次構造変化の観測に成功した。しかしこれは、天然状態から変性状態へ化学変性する際に生じる3次構造の変化を観測したもので、水和状態がこの3次構造変化にどの程度影響しているのかについては十分に考察できていなかった。また観測したBSAイオンの価数は1価～4価が混在した条件となっており、タンパク質の構造変化における価数依存性については測定できていなかった。そこで本研究では新たにイオントラップ電極を作製し、価数選別を行ったタンパク質イオンを標的に脱溶媒和による構造変化を観測した。またタンパク質の変性において、脱溶媒和の効果が変性構造に与える影響をタンパク質イオンの価数ごとに分離して議論することを目指した。

【方法】 BSA およびシトクロム *c* (cyt *c*) 水溶液（50 および 100 μ M）を液滴ノズルより直径 $\sim 80 \mu$ m の液滴として 10 Hz で射出し、試料液滴をそれぞれ独自の気相分光装置（図）に導入した。加速電極部に到達した試料液滴に赤外レーザー光（3,590 cm^{-1} , 5.5 mJ/pulse）を照射して液滴中の試料を気相単離した。生成したイオンはパルス電場で加速し、飛行時間型質量分析計を用いて観測した。また本研究では新たに作製したイオントラップ電極を用いて、加速電極部内で 70 ms のイオントラップもを行い、価数選択的なイオン信号の観測を試みた。観測したタンパク質イオンの構造解析を行うため、紫外 - 可視レーザー光を照射して光電子脱離収量（PDY）分光法および光解離（PD）分光法を用いた気相スペクトルを測定し、脱溶媒和条件での価数選択的構造解析を行った。

【結果】 タンパク質での価数選択的な構造解析を実現させるため、新たなイオントラップ電極を作製して BSA 負イオンのイオントラップ条件を模索した。しかし BSA レベルの巨大生体分子の負イオンでは、赤外レーザー光で加熱された後の冷却過程で多量の熱電子が放出されるため、イオントラップ中で分子内電荷を失い、中性化が進行しやすいことが明らかになった。そこで BSA の代替として正イオンでも観測可能な cyt *c* を用いてイオントラップを行った。その結果、1 価の cyt *c* 正イオンを選択的にトラップすることに成功した。またトラップした cyt *c* から解離するヘムイオン ($m/z=546$) の信号を用いることで、1 価の cyt *c* 正イオンの PD スペクトルの測定に成功した。量子化学計算との比較を行ったところ、このスペクトルに観測された cyt *c* ヘム中の鉄原子の電子スピン状態はこれまで天然状態で報告されてきた低スピン状態とは異なり、中間状態が支配的であることが明らかになった。また cyt *c* では等電点が高いため、イオントラップ電極を用いずに負イオンを観測すると 1 価の cyt *c* 負イオンを選択的に観測できる。我々は、このイオンに対して PDY 分光法と量子化学計算を適用することで、観測された cyt *c* ヘム中の鉄原子の電子スピン状態は、低スピン状態、中間状態、高スピン状態が 0.3 : 1 : 1 の存在比で分布しており、正イオンとは異なることを明らかにした。

液滴分子線赤外レーザー蒸発法を用いた独自の気相分光装置

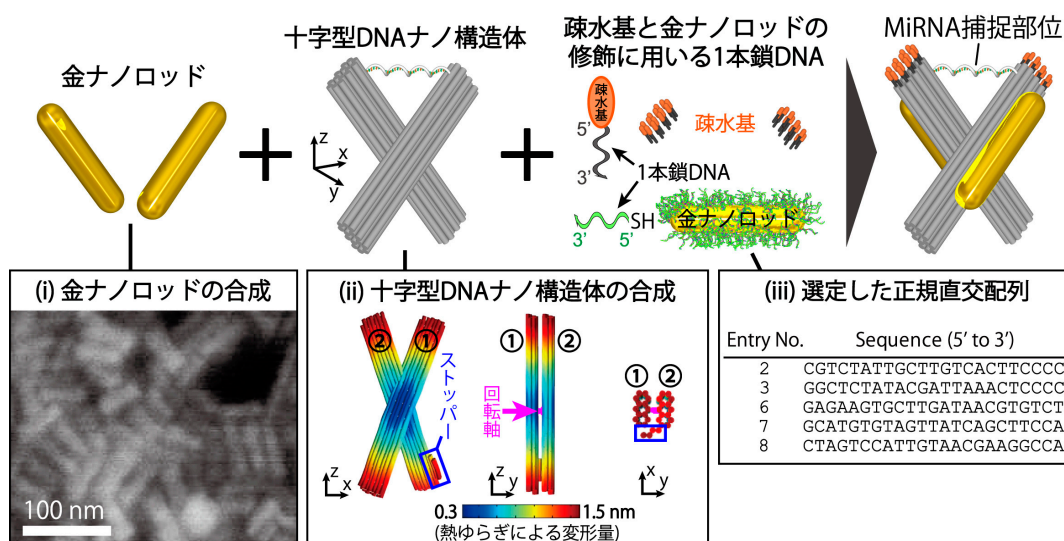


【目的】 極微量なマイクロRNA (miRNA) 検出手法の開発には、疾患の早期発見、簡便かつ精確な診断の実現という社会的に重大な意義がある。これは、がんや新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) など、疾患の原因となる多くのウイルスの遺伝子が DNA ではなく RNA だからである。これらの検出に一般に利用される PCR 法に代わって、近年キラルなプラズモン場を利用した光学的な検出法が注目されている。特に、DNA ナノテクノロジーを利用した水溶液中 miRNA の光学的検出は、高精度かつ簡便な手法として実用化が期待されている。本研究では、キラルなプラズモン場を有する金ナノロッド固定両親媒性 DNA ペンチを開発し、これを用いて構築した界面膜において、水相中 miRNA を超高感度で検出することを目的とする。

【方法】 目的達成のため、[目標 1] キラルプラズモニック DNA ペンチの開発、[目標 2] 液液二相界面 DNA ペンチの力学的変形の確認、[到達点] DNA ペンチによる水相中 RNA 検出という目標と到達点を設定した。研究期間中に [目標 1] のうち、1. 金ナノロッドの合成、2. 十字型 DNA ナノ構造体の設計およびその作製条件の最適化、3. 疎水基および金ナノロッド修飾用 1 本鎖 DNA の設計まで達成した。

【結果】 1. 金ナノロッドの合成：固定する足場となる十字型 DNA ナノ構造体に収まるサイズのコロイドを得るために、合成に必要な各種試薬の濃度設定の検討を行い、意図するサイズの金ナノロッドを得ることに成功した。また、金ナノロッドの合成に用いる金シード溶液の濃度と金ナノロッドのアスペクト比の依存性を見出した。2. 十字型 DNA ナノ構造体の設計およびその作製条件の最適化：DNA オリガミを用いて十字型 DNA ナノ構造体を設計した。DNA オリガミによるナノ構造体設計は、フリーソフトウェア caDNAno で行い、常温において開いた十字型を取り、軸を中心に自由回転可能な、かつ構造体の熱ゆらぎが小さく、常温で設計通りの構造を維持するという条件を満たす構造を得ることに成功した。さらに、十字型 DNA ナノ構造体を作製するためのアニリング時の温度条件とカチオン濃度の最適化を行った。3. 疎水基修飾および金ナノロッド固定用 1 本鎖 DNA の設計：十字型 DNA ナノ構造体への疎水基修飾および金ナノロッド固定を、互いが干渉することなく実施するために、最適な正規直交配列から選定した。これまでに報告されている 37 本の候補に対して 3 つの熱力学的計算をウェブソフトウェア NUPACK で行い、十字型 DNA ナノ構造体に最も干渉しにくい 5 本の正規直交配列を選定した。

キラルプラズモニック DNA ペンチの開発

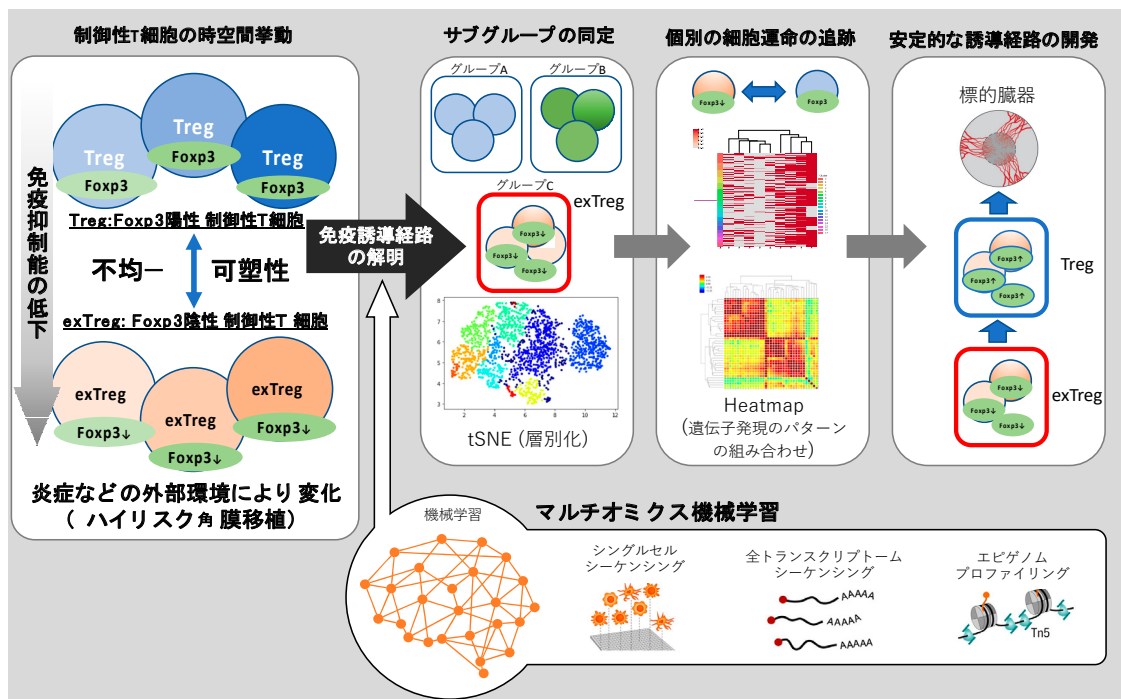


【目的】 角膜移植は世界で年間 180,000 件以上行われる最も多い臓器移植であるが、感染症や再移植で血管新生や炎症が惹起された高リスク角膜に対する移植では 40~90%の拒絶反応を伴う。角膜移植の拒絶反応において、免疫抑制的に働く制御性 T 細胞が注目されているが、炎症等の外部環境の変化により転写因子である **Foxp3** の発現を失って免疫抑制能が低下する現象「制御性 T 細胞の可塑性」や、**Foxp3** や免疫抑制分子等の発現や分化状態が不均一な「制御性 T 細胞の不均一性」が明らかになってきた。そこで、本研究では、マウス高リスク角膜移植モデルを用いて、局所炎症環境下における拒絶反応・炎症反応に関する免疫細胞に対してマルチオミクス解析を実施し、そこから得た多角的なデータで免疫細胞の可塑性・不均一性に関連する分子プロファイルの時空間挙動を機械学習で解明する。

【方法】 無血管組織である角膜に手術的侵襲によって新生血管・炎症を誘導したマウス高リスク角膜移植モデルを作製した。マウス高リスク角膜移植モデルの術後 14 日目の角膜移植片を採取し、RNA シークエンスを実施し、発現変動遺伝子の特定、Gene Ontology 解析、ネットワーク解析を実施した。さらに、同サンプルを用いて、シングルセル RNA シークエンスを実施し、角膜移植片における免疫細胞の層別化を実施した。

【結果】 新生血管・炎症を眼局所環境に誘導したマウス高リスク角膜移植モデルを作製した。マウス高リスク角膜移植モデルの術後 14 日目の角膜移植片を採取し、RNA シークエンスを実施した。発現変動遺伝子は高リスク角膜移植に 409 遺伝子、コントロールに 150 遺伝子特定された。高リスク角膜移植における発現変動遺伝子の Gene Ontology 解析では、高リスク角膜移植では、T 細胞の活性化、T 細胞の活性化の制御、炎症応答、制御性 T 細胞のシグナリング経路に発現変動遺伝子の濃縮を認めた。シングルセル RNA シークエンスにより、角膜移植片の免疫細胞は 31 のクラスターに層別化された。

マルチオミクス機械学習による免疫細胞の時空間挙動の解明



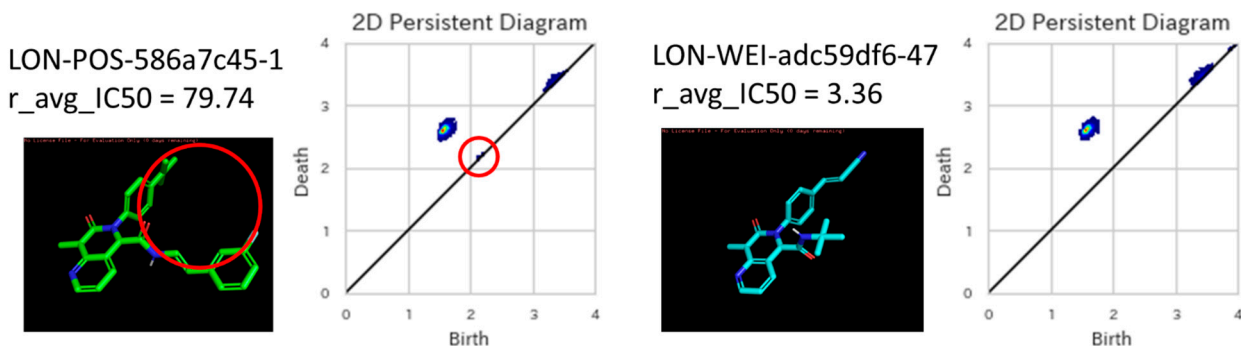
196 タンパク質の阻害に寄与する3次元構造の探索方法開発	江崎 剛史
----------------------------------	-------

【目的】 時間と費用を削減して効率的に創薬を進めるため、薬の化学構造と生理活性の関係性を見出す研究への期待は大きく、近年は特に人工知能を始めとした計算科学手法が注目されている。昨年末から世界中で脅威をふるっている新型コロナウイルスは治療薬の早急な開発が求められており、承認までの早さから既存薬の転用に向けた検討が行われているが、順調とは言えない。問題として「患者数が少なく、治療薬の十分な効果と安全性を確認できない」ことがあるため、医薬品候補を探す計算科学手法の重要性が改めて認識されてきている。薬の性質はタンパク質との立体的な相互作用が大きく関わっているが、機械学習手法に使用される記述子は、ほとんどが2次元の情報である。そこで、従来の構造記述子と3次元の位相的な距離を特徴量として使用し、Mproの阻害性を予測する手法の検討を行った。

【方法】 COVID19のメインプロテアーゼであるMproの阻害性試験のデータを収集し、50%阻害濃度の実験値が存在する659化合物のデータを分析対象とした。部分構造を表す構造特徴量として、4つのFingerprintを算出し、Mproの阻害予測に最も適した特徴量を選択した。また、構造特徴量だけでは見つけることができない情報を取得するため、Mproの立体構造を取得してドッキングシミュレーションを行い、化合物の3次元結合座標を取得した。発生させた化合物の3次元構造から位相的な特徴量を算出するPersistent Homologyを実装した。選択した構造特徴量と位相的特徴量を合わせて、Random Forestによって判別モデルを構築した。

【結果】 構造特徴量の検討によりMACCSとMorganが適した構造特徴量であると決定し、位相的特徴量と合わせてRandom Forestによる判別モデルを構築したところ、多くの特徴量で80%を超える正解率を出した。著しい精度の違いはなかったが、Morganが同じであるにも関わらず、阻害性が大きく異なる2つの化合物を比べたところ、Persistent Homologyによって立体的な特徴量を得ることができたことが確認できた。タンパク質との立体的な結合を表すためには、従来使用していた構造特徴量だけでなく、位相的特徴量も組み合わせて検討を行うことが望ましいことが示唆された。

位相的距離を用いた化合物の立体構造の特徴量化による重要構造の探索

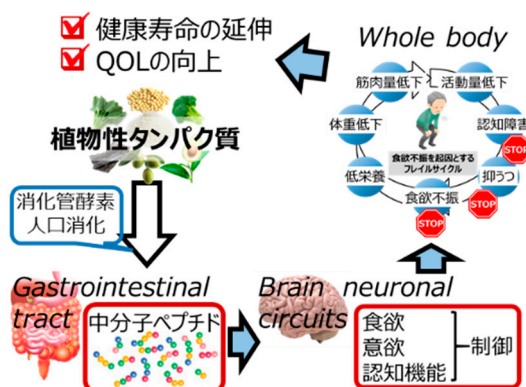


【目的】 食による老化予防の実現には脳機能とのクロストークの実態解明が鍵となる。その理由として、加齢に伴う食欲不振/低栄養状態がフレイル発症の中核を成すことが挙げられる。もし食による正常食欲・正常体重の維持が可能となれば、中高年の肥満のみならず高齢者のフレイル対策が可能となり、健康長寿の新戦略となる。視床下部の食欲中枢機能は栄養情報を脳に伝えるホルモン（インスリンやレプチンなど）により制御されている。最近、我々は、腸管由来のインクレチンホルモン GIP の視床下部 GPCR を介したホルモン感受性制御機構を解明し、視床下部のホルモン感受性が腸脳連関を介した内因性・外因性の GPCR リガンドの制御下にあること示した (*Cell Rep* 2016、*J Clin Invest* 2019、*Endocrinology* 2020、*JCI Insight* 2021)。近年、食品成分が GPCR に結合することが数多く報告され、我々も経口投与した緑葉由来ペプチドが中枢 NPY 系を介して食欲を増進すること、さらには、2 年齢の老齢マウスにおいても食欲増進効果を発揮することを見出した (*Mol Nutr Food Res* 2014 他)。さらには、緑葉ペプチドによる中枢メラノコルチン系を介した高脂肪食摂取の抑制効果も明らかにしている (*Am J Physiol* 2014、*Peptides* 2021)。これらの成果は食品成分がリガンドとして脳機能を積極的に制御していることを示唆する。そこで本研究は、腸脳連関を介した食品成分による新しい脳機能制御メカニズムを解明し、食品成分が脳機能を積極的に制御しているという新しい概念を提示することを目的とした。温室効果ガスを排出する畜肉や魚肉ではなく、植物性タンパク質の中から、食欲抑制ホルモンであるレプチンとの相互作用を示す新規生理活性ペプチドの同定と作用機序の解明を目指した。

【方法】 視床下部器官培養系はマウス新生仔（約 9 日齢）より作製した脳スライスを用い、実際の脳組織に近い状態でホルモンや外因性成分の応答性が高い再現性をもって検出できる独自の評価系である。本系を駆使し視床下部ホルモンシグナルと相互連関を示す食成分の同定を進めた。食成分で前処理した後にレプチン依存性 STAT3 リン酸化、インスリン依存性 AKT リン酸化、LPS 誘導炎症反応などを指標とした免疫組織化学、ウェスタンブロット、qPCR 等によりホルモンシグナル伝達における食成分の効果を解析した。さらに視床下部器官培養系にて効果が判明した食成分をマウス個体に経口投与することにより、レプチン感受性への効果を検証した。

【結果】 消化管を想定した酵素条件（ペプシン+パンクレアチン）により緑葉ルビスコを酵素消化した。緑葉ルビスコ消化物についてペプチド一斉分析を実施し、得られた包括的なペプチド情報と我々の研究室で独自に蓄積した構造-活性相関情報から生理活性ペプチドを探索した。探索の結果、緑葉ルビスコ由来の 6 アミノ酸残基ペプチド YHIEPV を選定した。そこで視床下部器官培養系を用い、レプチンシグナルに及ぼす効果を検討したところ、生理食塩水を添加したコントロール群と比較して、YHIEPV を添加した群では、レプチンによる STAT3 リン酸化（レプチンの中核シグナル伝達経路）が有意に増加し、YHIEPV が細胞内レプチン感受性を増強することを見出した。さらにマウス個体を用いた検討を実施した結果、経口投与した YHIEPV により肥満マウスにおける視床下部レプチン感受性の増強を確認した。

植物性タンパク質による脳機能をターゲットとした機能性食品開発



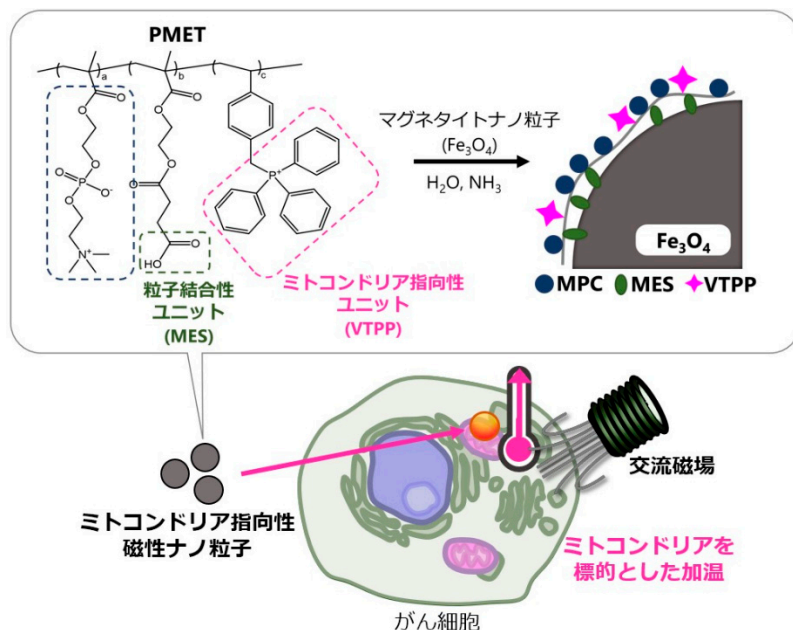
198 オルガネラ標的磁性ナノ粒子によるがん温熱治療	金子 真大
-------------------------------	-------

【目的】 がん温熱療法は、腫瘍組織を 42.5℃以上に加熱して細胞死を誘導するがん治療法である。外部磁場や近赤外線レーザーの照射により発熱するナノ粒子を利用し、ナノ粒子を腫瘍患部へ送達することで、腫瘍部位の局所的な加熱が可能である。ここで、温熱治療による治療効果を高めるには、腫瘍部位へのナノ粒子の送達量の向上、あるいは一定量のナノ粒子による殺細胞効果の向上といった方策が考えられる。本研究では、一定量のナノ粒子による殺細胞効果の向上を目指しオルガネラの一つであるミトコンドリアに注目した。ミトコンドリアは熱ストレスなどの外部刺激に対して敏感であり、刺激に応じて細胞死を誘導しうる。これを踏まえ、ナノ粒子によりミトコンドリアを局所的に加熱することで、温熱治療効果が向上するのではないかと考えた。高い親水性と細胞親和性を有する 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) ポリマーを基体とし、マグネタイト表面への結合能力を有する 2-methacryloyloxyethyl succinate (MES) ユニット、ミトコンドリア指向性を有する 4-vinylbenzyl triphenylphosphonium (VTPP) ユニットを用いて、poly (MPC-co-MES-co-VTPP)を合成した。PMET をマグネタイト表面に修飾することでミトコンドリア指向性マグネタイトを合成し、マウス結腸がん CT26 細胞に対する交流磁場照射による温熱治療効果を検討した。

【方法】 MPC、MES および VTPP をモノマーとして、poly (MPC-co-MES) (PME) と PMET を原子移動ラジカル重合により合成した。鉄イオン水溶液とアンモニアを用いた共沈法によりマグネタイトナノ粒子を合成し、その反応液に PME または PMET を加えて攪拌することで、ポリマー被覆マグネタイトを調製した。CT26 細胞培地にポリマー被覆マグネタイトを加え 24 時間培養し、交流磁場を 15 分間照射した後、細胞生存率を評価した。

【結果】 図に、合成したポリマー被覆マグネタイトナノ粒子の模式図を示す。FT-IR 測定と熱重量分析により、粒子表面に PME または PMET が存在することが確認された。CT26 細胞にポリマー被覆マグネタイトナノ粒子を添加し、24 時間培養することでマグネタイトを取り込ませた細胞に対して、交流磁場を照射した後の細胞生存率を評価した。その結果、PME を被覆したマグネタイトを添加した系に比べ、PMET を被覆したマグネタイトを添加した系において、細胞生存率がより大きく低下する傾向が認められた。この結果は、ミトコンドリア指向性を有する VTPP ユニットの利用により、温熱治療効果が向上可能であることを示している。

ミトコンドリア指向性マグネタイトを用いた温熱治療の模式図

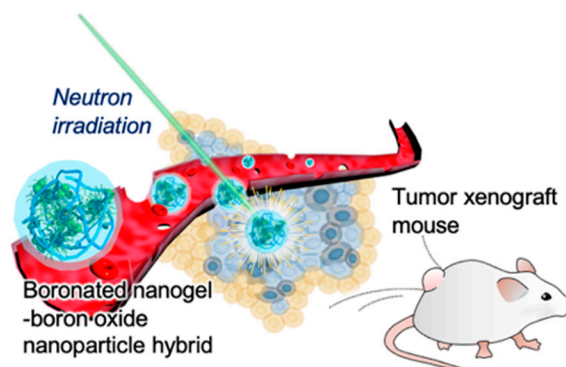


【目的】 ホウ素中性子捕捉療法の治療効果を改善する高密度ホウ素薬剤を開発し、がん治療へと繋げる。近年、ホウ素中性子捕捉療法 (Boron Neutron Capture Therapy, BNCT) が極めて侵襲性の低いがん治療法として期待されている。この治療法の治療効果の成否を分ける大きな鍵はホウ素薬剤の癌細胞への送達能にある。現在、臨床研究に用いられているホウ素薬剤には送達上の課題が残されている。本研究では、効率的な治療を実現するためのホウ素薬剤の開発を目指し、高度にホウ素原子が集積したナノホウ素薬剤の開発とその BNCT 用ホウ素薬剤としての性能を評価した (図)。

【方法】 直鎖状多糖であるプルランに対して、カルボランを導入し、核磁気共鳴分光法により化合物の同定を行った。合成物を用いてナノゲルを作製し、動的光散乱測定 (DLS) や透過型電子顕微鏡 (TEM) により物性評価を行った。その一方で、オレイン酸被覆ホウ素酸化物ナノ粒子はメカノケミカル的手法を用いて合成した。合成は赤外分光測定 (IR)、熱重量測定 (TG)、TEM により確認した。目的のハイブリッドナノゲルはナノゲルとオレイン酸被覆ホウ素酸化物ナノ粒子を混合することにより作製した。ハイブリッドナノゲルは DLS と TEM により物性評価を行った。ハイブリッドナノゲルの細胞との相互作用について評価を行った。マウス結腸がん細胞 (Colon26) に対して、ハイブリッドナノゲルを添加し、取込み量を定量した。また導入後の細胞内滞留性についても同様の方法で評価した。共焦点レーザー顕微鏡観察により、細胞内動態について評価を行った。これらの結果を元に中性子線照射を行い、殺細胞効果について評価した。この時、対照として、臨床薬の L-BPA/fructose 錯体を用いた。ハイブリッドナノゲルの担腫瘍マウスにおける BNCT の治療効果について検討した。まず体内動態評価により腫瘍組織に集積したホウ素量を定量し、ホウ素の腫瘍集積の極大時間に中性子線を照射することで治療効果を評価した。

【結果】 カルボラン置換プルランを水中に分散させて、ナノゲルを形成させた。ナノゲルの DLS 測定を行った結果、直径 220 nm 程度のナノゲルを形成していることを明らかとした。この粒子径は EPR 効果に適した粒子系をもつことから、腫瘍集積性が期待できる。オレイン酸被覆ホウ素酸化物ナノ粒子とナノゲルを混合することでハイブリッドナノゲルを調製した。その結果、ハイブリッドナノゲルの粒径は直径 180 nm であった。また TEM の結果からホウ素酸化物ナノ粒子が集積したナノ構造が TEM により観察された。ハイブリッドナノゲルの細胞毒性について、L929 と Colon26 細胞について評価した結果、安全性が高いことが確認された。Colon26 におけるホウ素薬剤の取り込み量をハイブリッドナノゲルと L-BPA/fructose 錯体と比較すると、ハイブリッドナノゲルの方が 2 倍以上高い取り込み能を示した。また共焦点レーザー顕微鏡観察の結果から、核膜周辺に集積していた。さらに中性子線を照射することで効率的に細胞障害性を誘導していることを明らかとした。ハイブリッドナノゲルの体内動態について検討すると、腫瘍組織へと効率的に集積していた。最後に中性子線照射に基づく治療効果について評価を行った。体内動態評価で見積もった腫瘍組織への集積の極大時間において中性子線を照射した。その後、腫瘍の体積を計測した。その結果、ハイブリッドナノゲルを用い、中性子線を照射した群は対照として用いた L-BPA/fructose 錯体よりも高い治療効果を実現した。

本研究の概念図



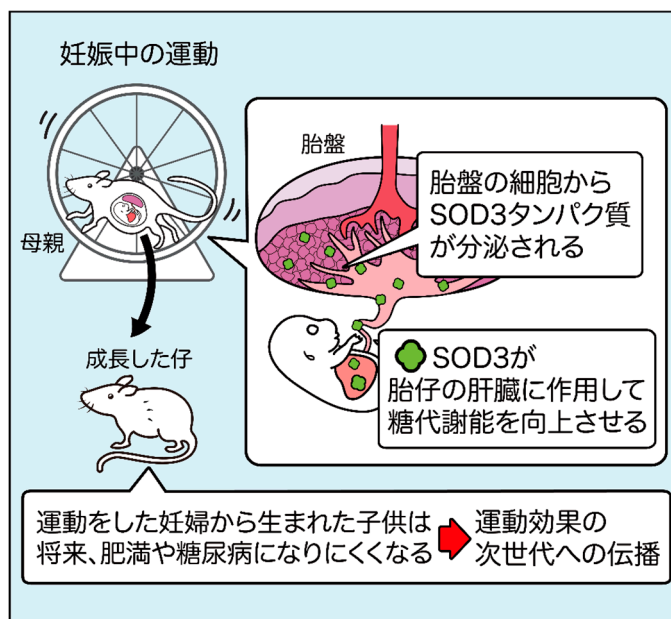
200 運動変数と胎盤解析による妊娠期運動の次世代効能予測	楠山 譲二
-------------------------------	-------

【目的】 日本の糖尿病有病者は 1,000 万人を超え、米国でも 2030 年までに米国人口の 15%以上が糖尿病に罹患する可能性が報告されている。そのため、糖尿病やその付随疾患が個人、公衆衛生、経済レベルでもたらす社会的コストの増大は世界的な重大課題である。近年、母親の肥満や糖尿病は自身の健康に害悪を及ぼすだけでなく、子に対して糖尿病の発症リスクを伝播させることが分かっている。我々は妊娠中の母マウスを車輪の設置された飼育ケージで飼い自発運動させたところ、母親の肥満による仔マウスの耐糖能機能の低下を改善できることを見出した。更に妊娠期運動によって胎盤から分泌される superoxide dismutase 3 (SOD3) が情報伝達に必須の分子であることを同定した。妊娠期運動の有益性をヒトに応用するためには、妊娠期運動による胎盤由来 SOD3 分泌を正確に評価することが求められる。そこで本研究ではヒト妊婦コホートとマウス運動モデルを用いて、胎盤由来 SOD3 の量を予測できる因子の探索を行った。

【方法】 東北大学、オーフス大学、オタワ大学との共同研究によって、ヒト妊婦の運動コホート解析とサンプル収集を行った。妊婦の 24 時間の運動レベルはウェアラブルデバイスによって、歩数、エネルギー消費量、MET (Metabolic equivalents : 運動強度の単位) を計測した。血液は妊娠各 3 期に採取、出産時に胎盤を採取し、SOD3 レベルを測定した。更に血清のメタボライト解析を行い、胎盤由来 SOD3 レベルと相関のある因子を絞り込み、マウスモデルを用いてその因子の多寡に関する影響を解析した。

【結果】 血清中の SOD3 量は妊娠第 1 期および第 2 期と比較して第 3 期で有意に高く、胎盤重量と正の相関があった。妊娠第 2 期における血清 SOD3 量は、活動的な妊婦で有意に増加していた。また、出産後に採取した活動的な女性の胎盤では、SOD3 の mRNA の発現レベルが有意に上昇していた。SOD3 量と血清中のビタミン D レベルには弱い相関があった。マウスモデルにおいて食餌中のビタミン D 量を変化させたところ、胎盤における SOD3 レベルは血清中のビタミン D レベルと強い相関があった。

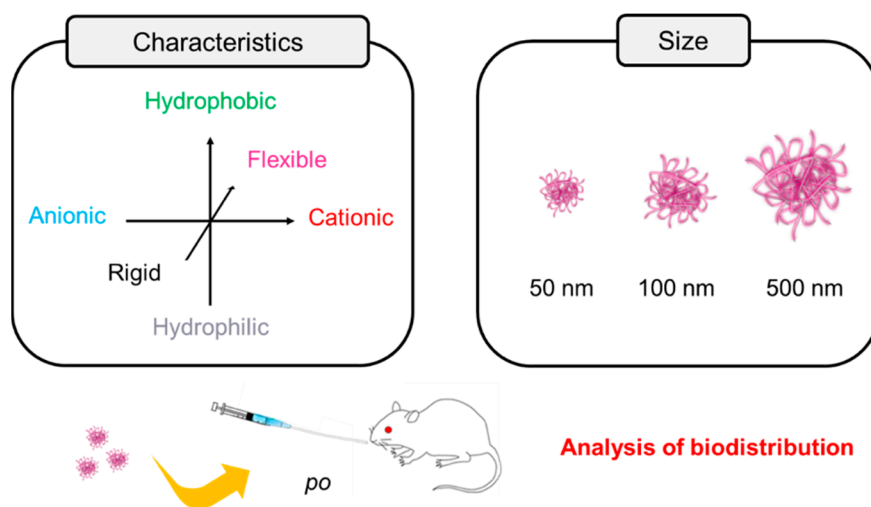
妊娠時運動によって分泌される SOD3 による次世代情報伝達



【目的】慢性腎不全や糖尿病などの特定の疾患下では、インドールやグルコースなど特定分子の消化管吸収を制限することが疾患の発症、増悪を予防する上で重要である。しかし、現在臨床で用いられている吸着剤は非特異的に標的分子を吸着してしまうために、投与量が多く、治療満足度が低い。そのため、消化管で標的分子を特異的に吸着する医薬品開発が望まれている。我々はこれまでに、標的分子と非共有結合が可能な種々の機能性モノマーを組み合わせることで、消化管内で標的分子を特異的に認識し、吸着できる合成高分子ナノ粒子の開発を行い、経口投与剤としての有用性を示してきた。しかし、合成するナノ粒子は非分解性であることから、消化管吸収されると臓器に長期間蓄積してしまうことから予期せぬ副作用を引き起こす可能性がある。そのため、ナノ粒子の臨床応用には、経口投与後の体内動態に関する情報が必要不可欠である。本研究では、経口投与されたナノ粒子の体内動態に関する知見を得るために、ナノ粒子を構成する様々な因子を変化させ、経口投与後の体内動態に与える影響を解析することを目的とした。

【方法・結果】ナノ粒子は *N*-isopropylacrylamide (NIPAm) と架橋剤である *N,N'*-Methylenebis (acrylamide) (Bis) を用いて合成した。まずナノ粒子を構成する因子として粒子径に着目した。ナノ粒子の粒子径は、機能性モノマーの濃度など反応手法・条件を変えることで精密に制御可能である。本研究では³Hにて放射標識したNIPAmを少量組み込んだ50~400 nmの放射標識ナノ粒子を合成した。様々な粒子径の放射標識ナノ粒子をマウスに経口投与し、24時間後の体内動態を解析した。経口投与されたナノ粒子は、粒子径の増大により主要な臓器への蓄積量が減少した。一般的にリポソームやミセルなどの粒子の粒子径が増大すると、細胞への取り込み量が減少すると報告されている。本検討においても、ナノ粒子の粒子径を増大させることで腸管上皮細胞を介した消化管吸収量が減少した結果、主要な臓器への蓄積量が減少したものと考える。次に、架橋剤であるBisの組み込み比を変えることで、柔軟性の異なるナノ粒子の合成を試みた。本検討では、柔軟性以外の影響を排除すべく、同一の粒子径のナノ粒子が合成できる条件を最適化した。最後に、疎水性モノマーである *N-tert*-Butylacrylamide (TBAm) の組み込み量を変えることで疎水度の異なるナノ粒子の合成を行い、その体内動態を解析した。疎水度の異なる放射標識ナノ粒子の体内動態を解析した結果、経口投与されたナノ粒子はその疎水性の増大に比例して臓器への蓄積量は減少した。この結果より、ナノ粒子の疎水度が消化管固有の構造である親水性の粘膜層による排泄効率に深く関わっていることが示唆された。以上より、NPsのサイズ、柔軟性、疎水性は経口投与後の体内動態に大きな影響を与えることが明らかになった。

本研究ではナノ粒子の電荷、疎水性度、密度、粒子径が経口投与後の体内動態に与える影響を解析する。

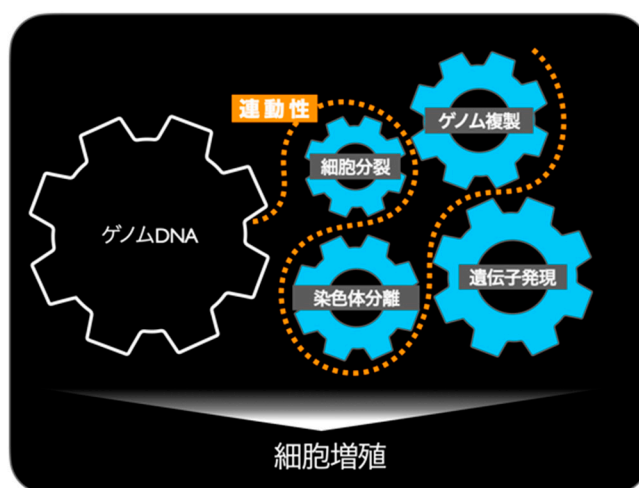


【目的】 細胞増殖のカスケードは細胞周期として理解され、真核生物ではチェックポイントなどと共に良く研究されている。しかしながら原核生物における細胞周期はほとんど解明されていないのが現状である。特にゲノム DNA それ自体はこれまで単なる情報として扱われることが多く、それ自体が与える影響は矮小化されてきた。情報密度の高い原核生物ゲノムでは一対の複製開始・終結点が対称に配置され、その軸から線対称に遺伝子の配向性、モチーフ配列の分布、そして塩基組成の偏りなどが存在している。ところがシミュレーションでは遺伝子発現の ON/OFF、バイオインフォマティクスでも遺伝子の有無だけが扱われ、こうしたゲノム情報構造と生命機能の関係性は未だ明らかにされていない。ところが実際はゲノムの情報構造を起点としたゲノム複製、染色体分離、核酸挙動、細胞分裂、そして各生化学反応といった複数レイヤーをまたぐシステム同士の連動性を支える高次元な構造体としてシームレスな動態を制御している。ゲノム DNA が如何にゲノム複製、遺伝子発現、染色体分離、そして細胞分裂を連動させながら細胞増殖を機能させているのかを、合成生物学・バイオインフォマティクスを組み合わせたアプローチで解明し、細胞増殖という生命機能の発現・制御メカニズムの普遍的な説明を目指す必要がある。

【方法】 ゲノム上の情報構造がより高次元の現象にどのような影響を与えているのかを定量的に理解するためには、バクテリアを対象としたマーカーレスのゲノム構造多型検出アルゴリズムを開発し、ゲノムシャッフリングの影響探索を可能にする必要がある。そこで本研究ではロングリードシーケンサーによるゲノム構造多型検出手法の開発を行った。さらに高効率に同時多発的な変異をゲノムスケールで引き起こすことのできる MAGE 法の新たな可能性について検証した。

【結果】 ロングリードシーケンサーを用いたゲノム構造多型検出プログラムの構築に成功した。このプログラムは既存ツールとカスタムスクリプトを組み合わせた解析パイプラインとなっており、低カバレッジのシーケンスデータにも対応可能となっている。MAGE 法の改良版となる TM-CspRecT-MAGE を検証したところ、条件付きでの変異導入効率の改善を観察することに成功した。しかし全ての環境で変異導入効率が改善されたわけではなく、今後の課題を明らかにした。

細胞増殖を導く連動性

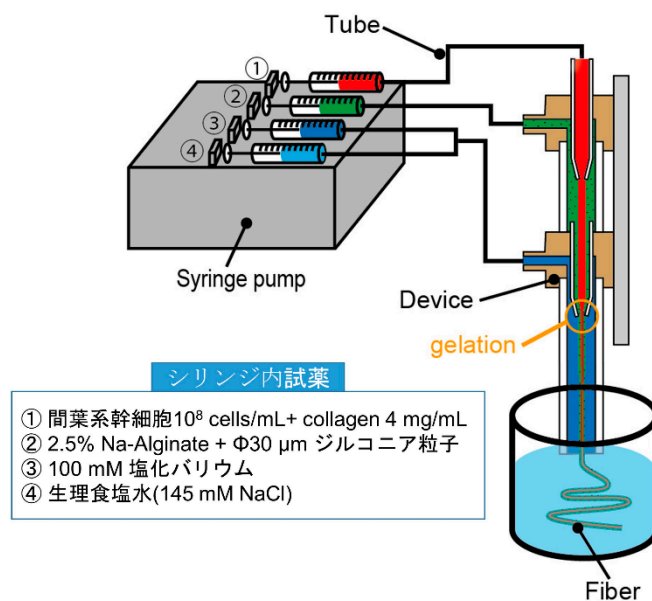


【目的】 既存治療では克服できない疾患に対して細胞治療が期待され、細胞をシート状もしくはスフェロイド状に培養し体内へ投与する方法が報告されている。一方、細胞をファイバー化し侵襲性の低い血管内治療への応用は行われていない。本研究の目的は、血管内治療に応用可能な細胞を含有したハイドロゲルファイバーを開発することである。また開発したハイドロゲルファイバーを応用可能な脳梗塞モデルと慢性腎障害モデルを作製し、治療効果を証明する。

【方法】 二重管の内側にヒト間葉系幹細胞とコラーゲン懸濁液、外側に X 線不透過ジルコニアとアルギン酸ナトリウム水溶液を流し、アルギン酸カルシウムを生成し、直径数百 μm のハイドロゲルファイバーを作製した。X 線不透過性を評価するため、6 種類の異なる濃度 (10~60%) のジルコニア粒子を含むアルギン酸プレゲル溶液を用いて調製し、デジタルサブトラクション血管撮影装置による X 線画像を撮像した。ヒト脂肪由来間葉系幹細胞含有 X 線不透過ハイドロゲルファイバーから分泌されるサイトカイン量を経時的に測定し、ヒト脂肪由来間葉系幹細胞懸濁液と比較した。我々が開発した小型実験動物に対する経皮的尾動脈穿刺による全身の血管イメージング法を応用し、ハイドロゲルファイバーを留置可能なラットの中大脳動脈選択的閉塞脳梗塞モデル (MCAO)、腎臓間動脈選択的閉塞慢性腎障害モデルを作製した。小型霊長類であるマーモセットにおいても、経皮的尾動脈穿刺による全身血管イメージング法を応用し、血管造影を行った。

【結果】 ヒト間葉系幹細胞を含有した X 線不透過ハイドロゲルファイバーの作製が可能であった。30% (W/W) 以上のジルコニア粒子濃度でファイバーを視認出来ることを確認した。作製したヒト脂肪由来間葉系幹細胞含有 X 線不透過ハイドロゲルファイバーの HGF と TGF- β 1 の分泌能は、ヒト間葉系幹細胞懸濁液と同等であった。従来の intraluminal suture モデルと比較し、虚血範囲の再現性が高く、モデル作製成功率が高く、24 時間以内の死亡やくモ膜下出血の発症率が低い、間葉系幹細胞含有ハイドロゲルファイバーを留置可能なラット MCAO を作製出来た。腎障害モデルにおいては、中等度、重度と障害の程度を区別してモデルを作製することが可能であった。小型霊長類であるマーモセットの全身血管、特に脳血管を造影し、ファイバー留置可能なマーモセット脳梗塞モデル作製に必要な血管情報を得た。

ヒト間葉系幹細胞含有 X 線不透過ハイドロゲルファイバーの作製

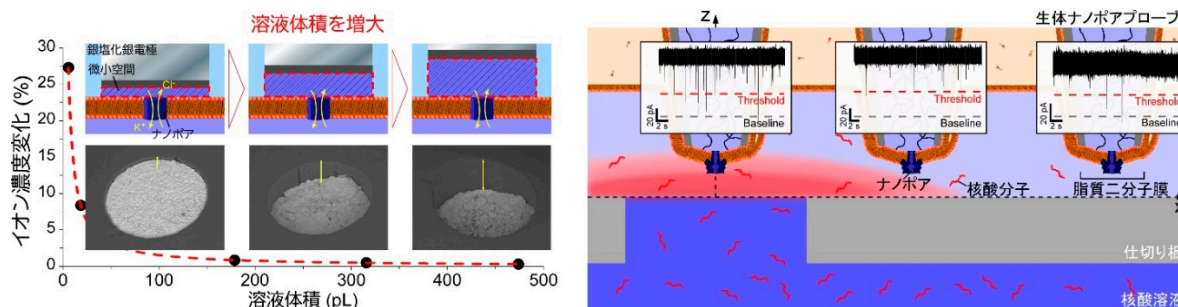


【目的】 短鎖のノンコーディング 1 本鎖 RNA であるマイクロ RNA (miRNA) は、細胞の発生・分化・増殖など様々な生命現象を調節する機能を担っている。さらに、細胞外に放出される分泌型 miRNA は、細胞間の情報伝達機能を有し、miRNA の分泌量がガンや心疾患など様々な病気に応じて変化することが知られている。そのため、細胞から放出される miRNA をリアルタイムで計測することは、細胞が関係する様々な生命現象の解明に繋がり、細胞生物学・創薬科学・診断医学など多くの学術分野への貢献が期待できる。分泌型 miRNA の検出・解析方法としては、定量 PCR、miRNA アレイ、RNA シークエンサが従来からよく用いられており、近年では検出感度の向上および検出時間の短縮を目指し電気化学 DNA (e-DNA) センサやナノポアセンサなどの手法が応用されている。しかしながら、どの解析手法においても、前処理プロセスが必要であり、細胞から放出された miRNA のオンサイト・リアルタイム検出は達成されていない。一方我々のグループでは、マイクロ・ナノ電極先端に脂質二分子膜形成しポア形成膜タンパク質を再構築した生体ナノポアプローブを開発することで、ナノポアセンシングによる局所的なケミカルセンシング技術を確立している。本生体ナノポアプローブでは、脂質溶液と水溶液が層となった浴溶液に電極を挿入することで脂質二分子膜を形成可能であり、ナノポアの分子通過を電氣的に計測するナノポアセンシングプラットフォームとして非常に有用である。そこで本研究では、本生体ナノポアプローブ技術を応用し、細胞近傍に脂質二分子膜を形成することで細胞から放出される miRNA の検出が可能なプローブ型人工細胞膜システムの開発を目的とする。

【方法】 人工細胞膜プローブシステムの基礎的技術を確立させるために、マイクロ電極先端に形成される微小空間の最適化および生体ナノポアプローブの位置制御による局所核酸分子検出実験を行った。プローブ型人工細胞膜システムでは、浴溶液に対しプローブ側の溶液量が非常に少ないため、ナノポアセンシングによる移動によって溶液内のイオン濃度が変化し電流値が減衰するという問題点があった。そこで、電極をエッチングすることでマイクロ電極先端に形成される微小空間サイズを制御し、微小空間サイズに対するイオン電流の減衰の関係性を明らかにした (図左)。局所核酸分子検出実験では、プローブをナノメートルレベルで位置制御可能な走査型プローブ顕微鏡システムを構築し、細胞を模擬したマイクロメートルスケールの細孔から放出される核酸分子の検出実験を行った (図右)。

【結果】 微小空間サイズの最適化においては、微小空間サイズを 200 pL 以上とすることでチャンネル電流測定における電流減衰を低減可能であることが分かり、生体ナノポアプローブ開発における設計指針を確立することができた。今後は、ナノポアセンシングによる微小空間内への核酸分子の取り込み量の影響についても検討し、プローブサイズの最適化を試みる。一方、局所核酸分子検出実験においては、プローブ - 試料間の距離によって変化するイオン電流値からプローブ - 試料間の距離を補正した後に、プローブを試料と水平に移動させることで細孔から放出される核酸分子濃度勾配をマッピングすることに成功した。以上のように本研究では、生体ナノポアプローブの設計指針の確立、生体ナノポアプローブを用いた局所核酸分子の検出に成功した。今後は、新たな細胞観察機能として本システムを応用し、細胞伝達機能の調査および細胞情報伝達に関連する様々な疾患の病理メカニズムの解明を目指す。

生体ナノポアプローブの最適化および局所核酸分子検出実験

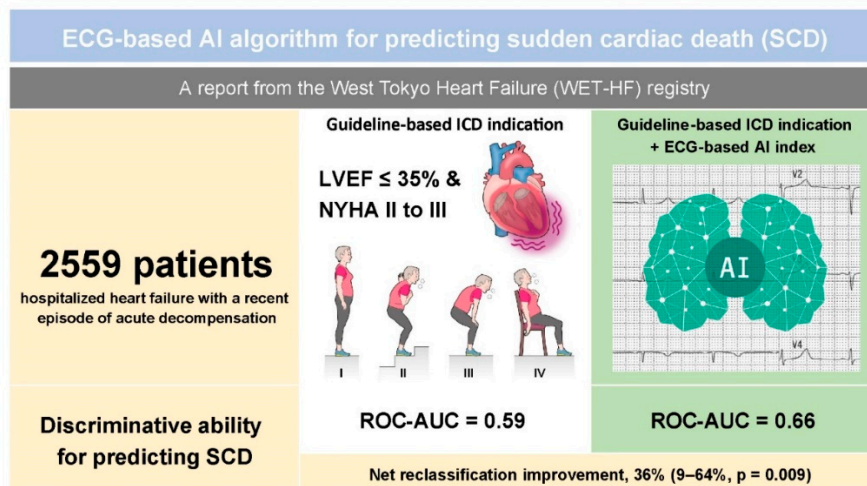


【目的】 心臓突然死 (Sudden Cardiac Death : SCD) は心不全患者における主要な死因の一つであり、その予測と適切な介入 (例 : 植込み型除細動器 [ICD]) が臨床で極めて重要である。しかしながら、既存の SCD 予測アルゴリズムの精度は十分ではなく、その有用性は限定的である。本研究では、心電図 (ECG) データをもとに人工知能 (AI) を使用した新しい SCD 予測指標 (ECG-AI index) を開発し、さらに ECG-AI index と従来の予測指標 (既存のガイドライン推奨) を組み合わせることでその精度が向上するか検証を行う。

【方法】 東京首都圏の基幹病院から構成される、多施設共同心不全レジストリ (West Tokyo Heart Failure Registry) に登録された 2,559 名の心不全入院患者を対象とした。入院中・退院前に記録した心電図 (各誘導における時系列電位データ) とアウトカム指標 (SCD の発生) を AI モデルに学習させ、各患者における SCD 予測率 (=ECG-AI index) を算出した。患者は ECG-AI index を作成するコホート (Derivation : 病院 A)、校正するコホート (Validation : 病院 B)、そして最終的に精度を確認するコホート (Test : 病院 C と D) にそれぞれ分割された。従来の SCD 予測指標である左室駆出率 (LVEF) と NYHA 機能分類 (心不全の重症度分類の一つ)、ならびに競合リスク (非心臓突然死 [non-SCD]) を考慮した上で、ECG-AI index とエンドポイントとの関連性を、回帰モデルを用いて評価した。主要エンドポイントは観察期間中の SCD 発生ならびに ICD 作動 (電氣的除細動と抗頻拍ペーシング) とした。

【結果】 各コホートの患者背景は、年齢 73~78 歳また LVEF 40~48% であり、NYHA 機能分類 II~III の割合はそれぞれ 75.2%、92.4%、93.4% であった。また ICD 植込みは 3.0~8.4% の患者で観察された。最終 Test コホートにおいて、236 例 (1,077 例中の 21.9%) の死亡が発生し、その内訳は 48 例の SCD と 188 例の non-SCD となり、さらに 4 例の ICD 作動が観察された。従来の予測指標 (LVEF \leq 35% と NYHA 機能分類 II~III) に ECG-AI index を追加することで、SCD 予測能は有意に改善した (ROC-AUC, 0.66 vs. 0.59 [p=0.017 for Delong's test]; p=0.11 for Hosmer-Lemeshow test [Calibration]; net reclassification improvement, 36% [95%信頼区間 9~64%], p=0.009)。競合リスク (non-SCD) を考慮した Fine-Gray 競合モデルにおいても、ECG-AI index は有意に SCD 発生と関連していた (調整後 subdistributional hazard ratio, 1.25 [95%信頼区間 1.04~1.49]; p=0.015)。さらに、ECG-AI index が高値になるほど、死因に占める SCD の割合 (proportional risk) は有意に上昇していることが観察された (ECG-AI index の三分位で分割 : 低リスク群 16.7%、中等度リスク群 18.5%、高リスク群 28.7% [p for trend=0.023])。最後に、ECG-AI index を重要な患者背景による層別解析で評価したところ、年齢 75 歳以下、非虚血性心不全、LVEF が 35% 上回る患者群においても同様の精度が確認された (Shiraishi Y. doi: <https://doi.org/10.1101/2022.03.20.22272659>)。

Central illustration of the present study

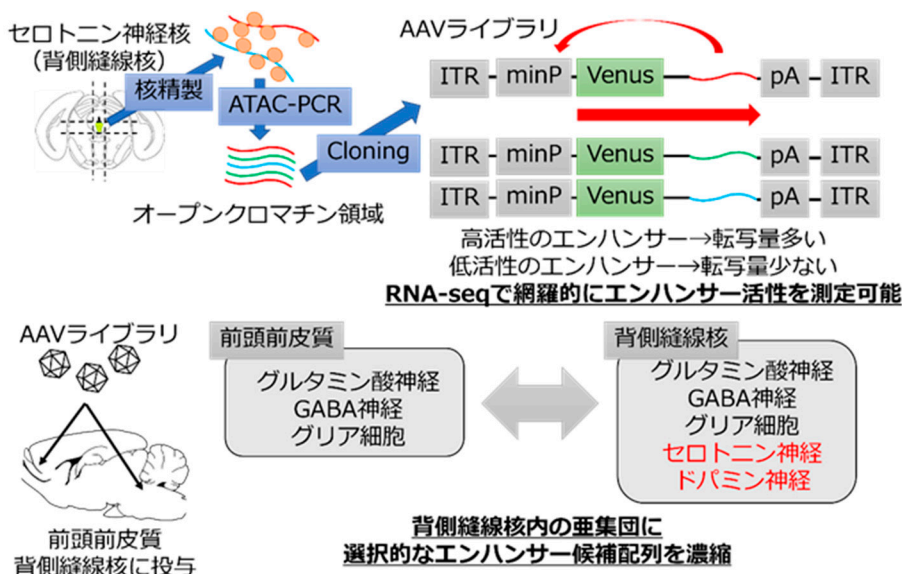


【目的】 本研究では、細胞亜集団の制御手法の開発を目指し、新たな制御因子活性網羅的測定手法の開発を情動制御において重要なセロトニン神経核である背側縫線核を一例として実施した。さらに情報科学的アプローチから任意の核酸配列の制御因子活性を予測する手法の開発を実施した。

【方法】 エンハンサー活性が特に高いゲノム配列を濃縮するため、マウス背側縫線核から ATAC 法によりオープンクロマチン領域配列を単離した。単離した配列のエンハンサー活性は STARR-seq 法を用いて測定した。AAV のパッケージング後、マウス背側縫線核および前頭前皮質に投与した。4 週間の回復後、背側縫線核および前頭前皮質を単離し total RNA を回収し、逆転写反応および PCR 増幅を行ったのち次世代シーケンサーで解析した。制御因子活性の *in silico* 予測のため、まず核酸配列の前処理を行い 2,002 次元×201 ビン (200 bp/ビン) のクロマチン特徴量を算出した。このクロマチン特徴量を入力として線条体の神経細胞亜集団の遺伝子発現量を出力するような予測モデルを、WaveNet、DenseNet あるいは画像認識で一般的に用いられる 2 次元の畳み込みを多層に配置したニューラルネットワークを用いて構築した。ハイパーパラメーター探索は GPyOpt によるガウス過程最適化により行った。

【結果】 縫線核に由来する AAV ライブラリであることから、まず縫線核が含まれる中脳領域の細胞種決定に重要な転写因子群の結合配列が濃縮されているか否かを調べたところ、神経細胞の細胞種決定に重要である CTCF、Nfil3 および Rfx1 について AAV ライブラリ中で高度に濃縮されていることが明らかになった。次に背側縫線核および前頭前皮質における結果を解析したところ、両神経核でのピークは高度に類似しており、単独の神経核の解析では細胞集団選択的エンハンサー候補の単離が困難であることが示唆された。そこで、両神経核のデータを定量比較した結果、背側縫線核のみで高度に発現するエンハンサー領域を 6 か所同定することに成功した。本結果は、今回開発した手法の高い有用性を示すものと考えられた。次に、核酸配列のみからその制御因子活性を予測する手法を開発した。その結果、画像同様の 2 次元の畳み込みフィルターを多層に重ねた手法が、その他の手法よりも高い精度で予測を行えることが明らかになった。また学習に使わなかった評価データセットについて、構築した予測モデルを用いた遺伝子発現予測値と実測値の相関を調べたところ、そのスピアマンの相関係数は 0.607 ($P=2.26 \times 10^{-9}$) と有意な相関を示すことが明らかになった。これらの結果は、本予測手法の高い性能と妥当性を示すものと考えられた。今後、前項で得られた制御因子活性の網羅的測定手法と組み合わせるさらなる学習を行わせることで、あらゆる核酸配列の制御因子活性の予測が可能になると考えられる。

網羅的エンハンサー活性測定法による亜集団選択的エンハンサー配列の濃縮

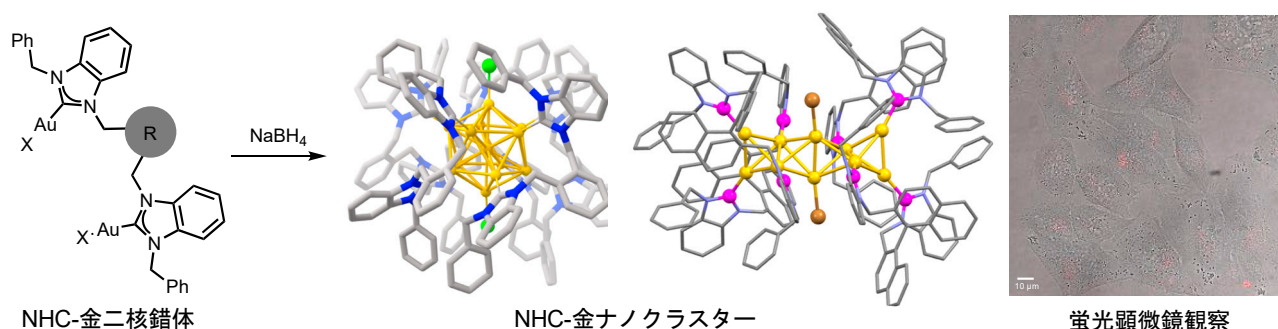


【目的】 本研究では含窒素ヘテロサイクリックカルベン (NHC) 配位子を活用した安定金ナノクラスターを創出することで、生体イメージングを志向した新規ナノ材料の開発を目的とした。具体的には独自の NHC 配位子の設計によって安定性の高い金ナノクラスターを精密に作り分ける合成法を確立し、その光学特性を調査した。また得られた金ナノクラスターに対して HeLa 細胞を用いてイメージング材料としての応用可能性を検証した。

【方法】 1. 2 座 NHC-金ナノクラスターの合成：2 座 NHC 配位子から金錯体を調製し、還元によって金ナノクラスターの合成を行った。得られた金ナノクラスターの物性および安定性の評価を行った。2. 光学的に純粋な NHC-金ナノクラスターの合成：光学活性なピナフチル骨格を含む 2 座 NHC 配位子を設計し、これを用いた金ナノクラスターの合成を行った。3. イメージング材料としての応用可能性の検証：蛍光を示す金ナノクラスターを用いて HeLa 細胞の顕微鏡観察を行った。また MTT アッセイを用いて細胞毒性を評価した。

【結果】 金ナノクラスターの安定性の向上を期待し、NHC を様々な置換基で架橋した 2 座配位子から塩化金二核錯体を調製した。さらに NaBH_4 による還元を行い、その後塩酸処理を行うことで金原子 13 個、NHC 配位子 5 つ、塩素原子 2 個から成る金ナノクラスターが選択的に得られることを見出した。詳細な構造は単結晶 X 線構造解析によって確認し、興味深いことに NHC 配位子はアキラルにも関わらず金ナノクラスターは螺旋キラリティを有していることが分かった。得られた金ナノクラスターは赤色発光を示し、その量子収率は 23% と既存の金ナノクラスターの中でも極めて高いものであった。溶液を長時間の可視光照射や加熱を行ってもほとんど分解が見られなかったことから非常に高い安定性も兼ね備えていることが明らかとなった。またキラルなピナフチル骨格を含む 2 座 NHC 配位子を有する臭化金二核錯体を調製し、 NaBH_4 による還元を行ったところ金原子 10 個、NHC 配位子 4 つ、臭素原子 2 個から成ることが示された。単結晶 X 線構造解析によって、中心骨格は 2 つの四面体構造を 2 つの金原子で架橋した様な新奇な扁長楕円体をしていることが明らかとなった。本合成法は光学分割することなく純粋な NHC-金ナノクラスターを得るための有用な手法の 1 つであると考えられる。蛍光を示した NHC-Au₁₃ ナノクラスターに関しては溶液を HeLa 細胞に加えて蛍光顕微鏡にて観察を行った。その結果、HeLa 細胞内に発光が検出され金ナノクラスターが細胞内に取り込まれていることが確認された。次に MTT アッセイを用いて金ナノクラスターの細胞毒性評価を行った。その結果、実際に観察を行った際の溶液においても致命的な細胞死は確認されなかったことから金ナノクラスターの毒性は低いと考えられ、金ナノクラスターのイメージング材料の応用可能性を示すことができた。

NHC-金ナノクラスターの創出とイメージング材料への展開



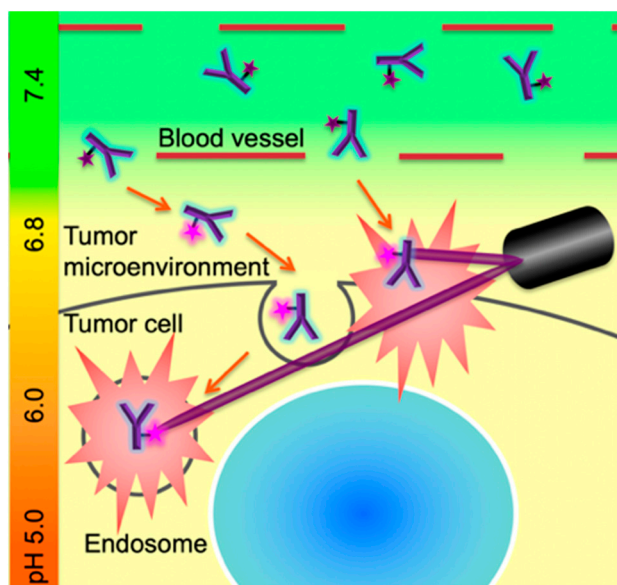
<p>208 pH応答性光増感剤修飾抗体によるがん選択的光熱療法</p>	<p>蛭田 勇樹</p>
--------------------------------------	--------------

【目的】 光熱療法 (photothermal therapy : PTT) は、近赤外吸収を持つ光増感剤が吸収した光を熱エネルギーに変換することを利用して、光増感剤の集積かつ強い近赤外光を照射した部位を特異的に発熱させ、熱に弱い固形がんの深部からがんを死滅させる方法である。そのため、正常組織への侵襲性が低く、副作用の小さな治療法になると考えられている。しかしながら、インドシアニングリーンや IR-780 などの PTT プローブは、腫瘍への選択性、血中半減期が短いといった課題がある。そこで、本研究では、pH 応答性近赤外蛍光プローブの開発、そして、このプローブの抗体医薬とのコンジュゲートにより、がん選択的光熱療法への応用を検討した。

【方法】 目的の pH 応答性近赤外蛍光プローブを合成した。紫外可視近赤外分光光度計により吸収スペクトル、分光蛍光光度計により蛍光スペクトルを測定した。HeLa 細胞に蛍光プローブを添加し、pH 6.4 および pH 7.4 で蛍光顕微鏡により観察した。また、それぞれの pH 条件で 808 nm レーザー (1 W/cm²) を照射した際の細胞生存率を評価した。ラベル化部位を導入した蛍光プローブと抗体の複合体を作製し、紫外可視近赤外分光光度計、分光蛍光光度計、サイズ排除クロマトグラフィーによって得られた複合体の評価を行った。

【結果】 置換基を変えることで数種類の pH 応答性近赤外蛍光プローブを合成した。置換基を変えることで、応答する pH を任意に調節することが可能であった。また、正常組織周辺の pH 7.4 とがん組織周辺の pH 6.4~6.8 程度を認識して、吸光度・蛍光強度が OFF/ON 制御できる誘導体も開発することができた。細胞の蛍光イメージングにおいて、pH 7.4 と比較して、pH 6.4 では強い蛍光を示したことから、pH 応答性近赤外蛍光プローブが細胞の pH を認識して蛍光を OFF/ON 制御できることが示された。PTT への応用を見据えて、pH 応答性近赤外蛍光プローブを細胞にインキュベーションし、レーザー照射した際の細胞毒性を評価した。pH 7.4 では細胞毒性がみられないのに対して、pH 6.4 では細胞毒性を確認することができた。これらの結果より pH 選択的な光熱療法への応用可能性が示唆された。ラベル化部位を導入した蛍光プローブと抗体の複合体について、反応時間、当量を変えて検討した。サイズ排除クロマトグラフィーにより、複合体の形成を確認することができたが、複合体に伴い、抗体の凝集体が確認された。今後は、複合体について検討を行い、凝集体が形成されないような条件検討を進めていく。

本研究の目的

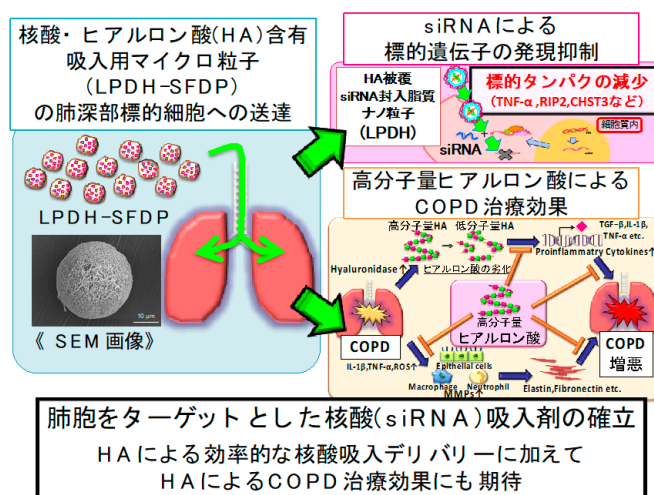


【目的】肺胞まで到達する吸入剤は、肺疾患の治療のみならず、種々の薬物の全身投与手段としても極めて有望である。また、特定遺伝子の発現亢進に起因する疾患治療のため、siRNA (small interfering RNA) 薬の開発が期待されている。しかし、siRNA 吸入剤の開発において、肺深部の肺胞まで siRNA を安全かつ効率的に送達させることがボトルネックとなっている。本研究では、我々が開発を進めてきた核酸・ヒアルロン酸 (HA) 含有吸入用マイクロ粒子製剤 LPDH-SFDP (Spray-freeze-dried particles (SFDP) containing a hyaluronic acid (HA) -coated liposome-protamine-DNA complex (LPDH)) の疾患治療への応用を試み、siRNA 吸入剤の実現を目指す。本研究では、疾患治療、特に COPD 治療への応用を目指すにあたり、LPDH-SFDP 作製法の再検討を行う。既存の作製法より低密度な粒子の作製を期待し、直径 $1\mu\text{m}$ 以下の微細気泡であるウルトラファインバブル (UFB) の応用を試みる。加えて、COPD モデルラットの作製を行い、LPDH-SFDP 吸入投与による治療実験に進む。

【方法】UFB は、独自に開発したベンチュリー式 UFB 作製装置により、ガス成分を大気として作製した。ナノトラッキング法による粒子径測定により UFB の物理物性を評価した。UFB は、LPDH 分散液に分散させて加えた他、LPDH-SFDP の作製法は過去の研究とほぼ同様である。COPD 治療に向けた siRNA を内封する HA 被覆脂質ナノ粒子 (LPDH) を作製し、さらに、糖アルコールを用いた噴霧凍結乾燥法により、核酸および HA を肺胞まで送達する低密度の多孔性マイクロ粒子 (LPDH-SFDP) を作製した。作製した LPDH-SFDP の物性評価は、走査型顕微鏡 (SEM) を用いた形状評価により行った。また、ブタ膀胱エラスターゼ (PPE) (100 U/0.5 ml) を SD ラットの肺へ均等に曝露し、COPD モデルラットを作製した。

【結果】作製した UFB の粒子径を測定したところ平均粒子径 $135.1\pm 2.6\text{ nm}$ であり、全体として 200 nm 以下の微細気泡の作製を確認できた。粒子濃度は、 $1.5\times 10^9\pm 2.0\times 10^7$ 個/ml であった。LPDH-SFDP を作製する際、この微小で高濃度の UFB を LPDH 分散液に含有させてマイクロ粒子を作製することで、マイクロ粒子の骨格となるマンニトールが物理的に阻害され、既存の作製法より低密度な粒子が作製できると考えている。作製した LPDH-SFDP を SEM 画像で確認したところ、UFB の有無に関わらず、平均粒子径約 $30\sim 40\mu\text{ m}$ の粒子が観察された。空隙率に関しても、観察できる差異はなかったが、今回用いた UFB の平均粒子径は 130 nm と小さく、目視できるレベルにない。少なくとも、UFB を用いても粒子を破壊するような悪影響がないことは確認できた。今後、この粒子の空気動力学径を測定し、肺深部への送達性を評価していく。COPD モデルラットの作製では、エラスターゼ投与により肺胞の破壊がみられ軽度の COPD 病態の作製に成功した。現在、この COPD モデルラットに、LPDH-SFDP を吸入投与する治療実験を進めている。

本研究の概要

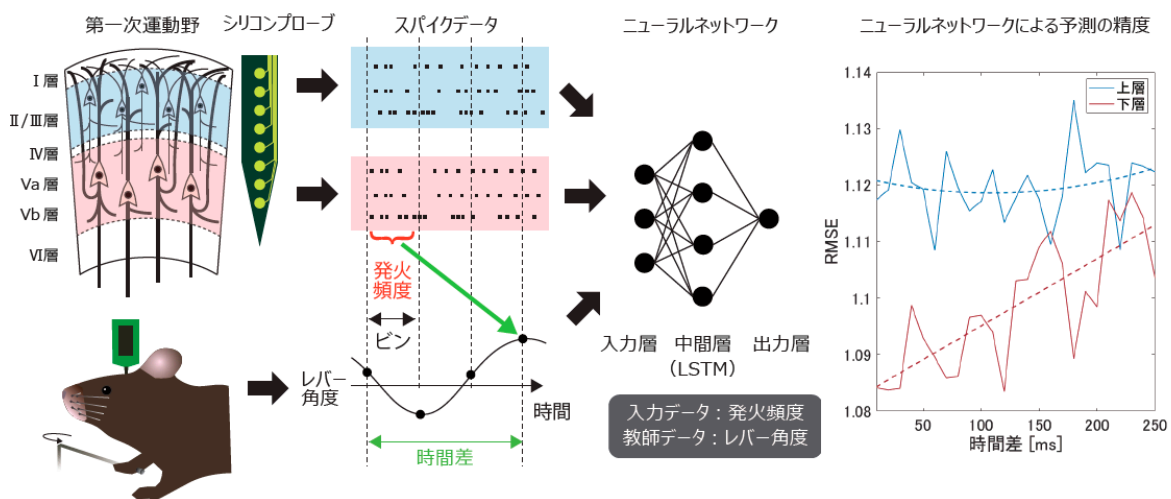


【目的】 哺乳類の大脳新皮質は6つの層から成っているが、層ごとの機能や層を形成することによってどのような信号処理を行っているのかなどについては未だ不明確なことが多い。本研究では2/3層と5層では時間的に異なる情報を扱っているとの仮説の下、運動課題中のマウスの脳活動と運動を計測し、ニューラルネットワークを用いて未来の時刻の運動状態を予測させた場合に、予測の精度に2/3層だけを入力として用いた場合と5層だけを用了場合で違いが現れるか調べることを目的とした。

【方法】 マウスのレバー操作課題中のレバー角度と運動野の神経細胞から活動電位を計測した。神経発火頻度データを入力データ、レバー角度を教師データとして、教師有り学習によってニューラルネットワークを学習させた。ニューラルネットワークは3層構造で、中間層にLong-short term memory (LSTM) を用いた。計測データを課題1試行毎の長さに分割し、それらを学習用データとテストデータへとランダムに分類した。学習用データを用いてネットワークを学習させ、テストデータで予測を行い、予測したレバー角度と実際のレバー角度の違いを Root Mean Square Error (RMSE) を用いて評価した。全てのテストデータから得られる RMSE の平均値によって、その学習データとテストデータ全てに対するネットワークの機能の評価値とした。本研究の目的を果たすために、入力データとした神経発火頻度と予測したいレバー角度の間に時間差を設けてニューラルネットワークを学習させ、この時間差による予測精度への影響を調べた。更に、運動野の階層による違いを調べるために、入力データを上層と下層の2つに分け、それらによる予測精度への影響を調べた。

【結果】 学習したニューラルネットワークにより、神経活動データからレバー角度が予測されることを確認した。更に、時間差と入力データの神経領域による影響を調べたところ、下層部は線形な右肩上がりの傾向にあり、上層部では下に凸の傾向にあった。今回の結果は、下層部では時間差が小さいほど予測精度が良く、上層部ではある時間差のところで局所的に予測精度が上昇したことを示した。これは、脳の領域に応じて異なる時刻の情報が取り扱われているということが、ニューラルネットワークによって抽出できる可能性があることを示唆している。

ニューラルネットワークを用いた神経活動に基づく運動の予想と予測精度に対する脳領域の違いによる影響

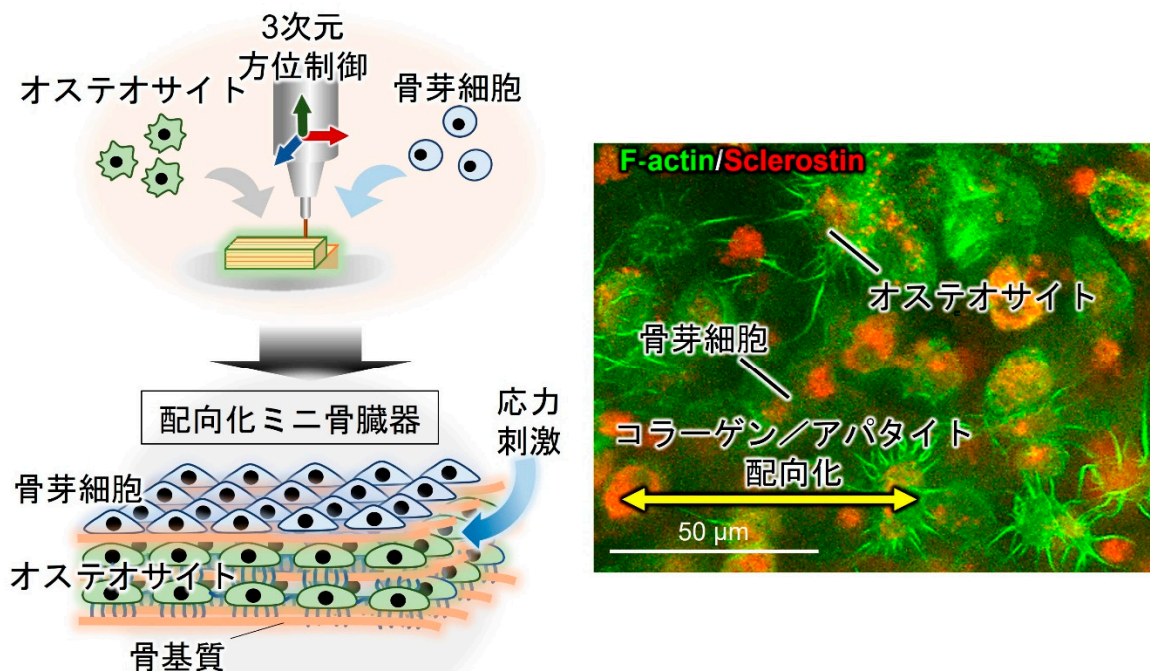


【目的】 バイオプリンティングは細胞外マトリクスタンパク質や細胞そのものの吐出により単一細胞レベルで分子・細胞の配置制御が可能であり、生体内での構造を模擬した機能的な組織・臓器を創製することで、再生医療はじめ生命科学の飛躍的進歩につながると注目される画期的技術である。特に、緻密に制御された異方性微細構造に基づき健全な力学機能発現を可能とする骨組織の再生には、細胞制御に基づく配向化構造の回復が必要不可欠である。骨の配向化構造は、骨中の微小空隙である骨小腔に存在する骨系細胞の一種であるオステオサイトにより制御され、細胞突起構造を介した多細胞ネットワークを構築し、力学的環境の変化に対応した骨配向化構造を構築する。本研究では、バイオプリンティングを駆使した骨系細胞の配列制御に基づき、骨類似配向化構造体を構築するとともに、その制御機構に基づいた骨配向化の生体分子メカニズム解明を目的とする。

【方法】 マウス由来初代オステオサイトとコラーゲン配向化の3次元プリンティングにより、骨類似の異方性組織を作製した。具体的には、マウス長管骨より逐次的酵素処理により初代オステオサイトを抽出、ノズル吐出の速度および方向性制御により3次元配向化コラーゲンとの共培養を行った。オステオサイトの異方性ネットワークは免疫染色法にて可視化、コラーゲン配向性解析には複屈折顕微鏡を用いた。遺伝子発現解析にはリアルタイム RT-PCR により定量解析を行った。流体刺激により、作製した骨類似配向化構造体の応力応答性を解析した。

【結果】 コラーゲン基板の分子配向性を制御することで、オステオサイトの細胞体・細胞突起伸展の異方性を制御し、外場刺激（流体流動刺激）に応答して機能する配向化骨類似材料を得た。構造体内部ではオステオサイトが細胞突起を形成し異方性ネットワークを構築し、バイオプリンティングを用いたオステオサイトの3次元異方性制御に成功した（図）。さらには流体刺激に応じた細胞突起方位変更の分子機序が明らかになった。本成果は、配向性（同時に骨強度）劣化をもたらす異常状態の骨（骨折時の再生骨、骨粗鬆症・関節リウマチなどの疾患骨、寝たきり等による免荷骨）の配向性向上や維持を可能とする新規骨治療法の創出、医療デバイス開発へとつながることが期待される。

バイオプリンティングによる3次元配向化骨の創製



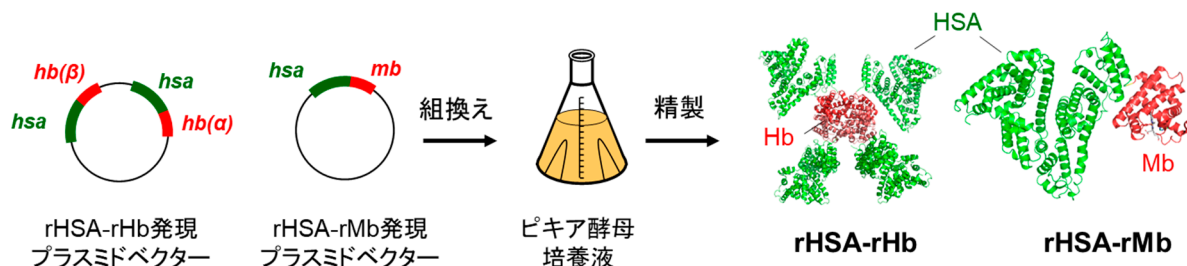
212 遺伝子組換え融合蛋白質からなる人工酸素運搬体の創製	森田 能次
-------------------------------	-------

【目的】 日本は少子高齢化の影響により、献血者層人口が減少すると、輸血液の安定供給に支障をきたす恐れがある。そのため、赤血球代替物として機能する人工酸素運搬体の実現が望まれている。これまでも国内外において、期限切れ赤血球製剤から精製したヘモグロビン (Hb) に化学修飾を施した人工酸素運搬体 (PEG-Hb、高分子化 Hb、分子内架橋 Hb など) が合成されてきた。我々は、Hb にヒト血清アルブミン (HSA) を連結した Hb-HAS₃ クラスタを合成し、それが安全性の高い人工酸素運搬体として機能することを明らかにした。しかし、修飾 Hb に共通の課題は、献血液由来のヒト Hb を原料としていることであり、恒久的な Hb の安定確保ができなければ、製剤の供給は難しい。本研究は、遺伝子組換え技術を用いて、HSA と酸素結合蛋白質である Hb やミオグロビン (Mb) を連結した融合蛋白質 (rHSA-rHb、rHSA-rMb) の発現系を構築し、発現量を比較するとともに、酸素結合能を明らかにする。

【方法】 HSA のアミノ酸配列をコードする塩基配列と、Hb あるいは Mb のアミノ酸配列をコードする塩基配列を連結したプラスミドベクターをそれぞれ構築した。まず、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により、組換え Hb (rHb)、組換え Mb (rMb) をコードした DNA フラグメントを合成した。次に、In Fusion 反応により、それぞれの DNA フラグメントを組換え HSA (rHSA) 発現プラスミドベクターに挿入し、融合蛋白質を発現するプラスミドベクターを合成した。得られたプラスミドベクターをエレクトロポレーション法によりピキア酵母に挿入し、融合蛋白質発現ピキア酵母を作製した。発現誘導剤であるメタノールを含む培養液 (BMMY 培地) で 20°C、5 日間、振盪培養し、融合蛋白質を発現した。培養液の蛋白質定量を行い、融合蛋白質の産生量を求めた後、培養液を遠心分離し、菌体を除去した。上清を透析により脱塩し、アフィニティークロマトグラフィー (AC)、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) により、融合蛋白質を精製した。電気泳動、SEC から融合蛋白質の同定を行い、円偏光二色性 (CD) スペクトルから蛋白質の二次構造を評価した。自動酸素解離曲線測定装置 (HEMOX Analyzer) により、生理条件 (リン酸緩衝生理食塩水、pH 7.4、37°C) での融合蛋白質の酸素親和性を明らかにした。

【結果】 遺伝子組換え技術により、rHSA-rHb と rHSA-rMb の発現プラスミドベクターを合成した。次に、形質転換したピキア酵母を BMMY 培地で培養し、それぞれの融合蛋白質を産生した。rHSA-rMb の発現量は 0.3 g/BMMY-1L であるのに対して、rHSA-rHb の発現量は 0.04 g/BMMY-1L と著しく低いことがわかった。発現量の比較から、Hb の α鎖やβ鎖が単独では不安定であるため、rHSA-rHb の発現量が低下することが示唆された。rHSA-rMb の SDS-PAGE には、分子量 80 kDa 付近に単一なバンドが現れた。また、SEC 曲線にも HSA より高分子量側に単一なピークが観測され、目的の融合蛋白質が純度高く単離できたことがわかった。rHSA-rMb の CD スペクトルは、HSA と Mb のスペクトルの和と一致し、rHSA-rMb の各蛋白質ユニットの二次構造は保持されていることがわかった。また、rHSA-rMb の酸素親和性は天然 Mb と一致した。つまり、rHSA-rMb は天然 Mb と同等の酸素親和性を有する優れた人工酸素運搬体であることが明らかとなった。

遺伝子組換え融合蛋白質からなる人工酸素運搬体 (rHSA-rHb、rHSA-rMb) の調製方法

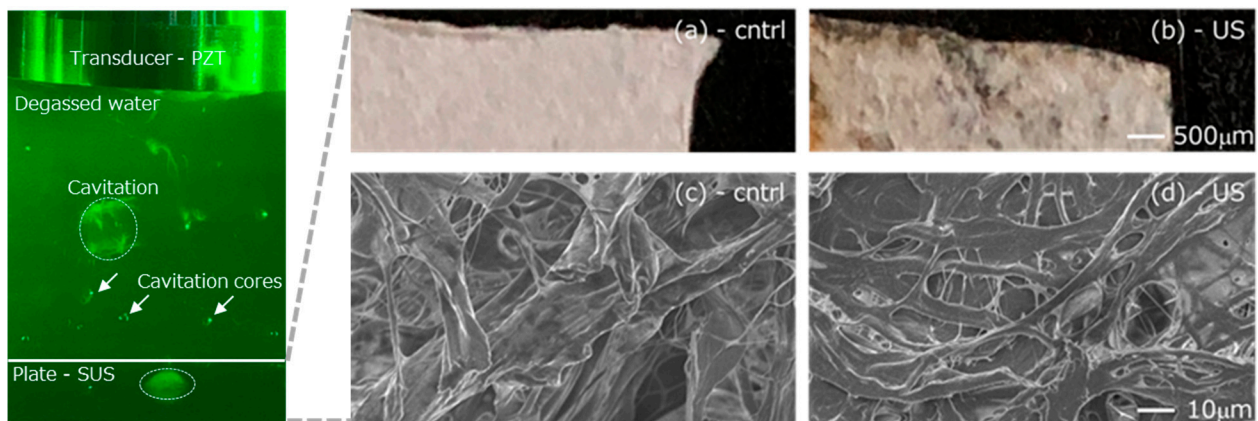


【目的】 線維化はコラーゲンなどの細胞外マトリクスが異常に蓄積する病気であり、いまだ根治療法が存在しない未解決の医療問題である。本研究では非収束性の超音波を使用して非侵襲的な治療法を提案し、生体を模擬した線維性組織が超音波により受ける機械的特性の変化を調査する。

【方法】 超音波振動子を金属板と対向させ、その間で定在波を生成した。この金属電極表面にコラーゲン線維性のシートを配置して、その前後の様相の変化および機械的特性の変化を観測した。

【結果】 定在波の発生領域ではキャビテーションと呼ばれる大小の気泡が発生し、この膨張収縮および破裂過程で線維性シートに機械的・熱的な負荷がかかることで、シートは大きく減肉し、線維成分は細くなることを確認した。一方、シートの機械的強度を表す破断強度およびヤング率は、超音波照射 40 秒後において 44.6%および 48.2%に減少していることを確認した。以上より、非収束性の超音波照射は対象組織に対してより広範囲で均一な治療を提供することができ、組織の硬さにあたる機械強度を低下させることを示した。

超音波照射域の気泡群、および照射前後のコラーゲンシートの様相（上：明視野、下：電子顕微鏡）



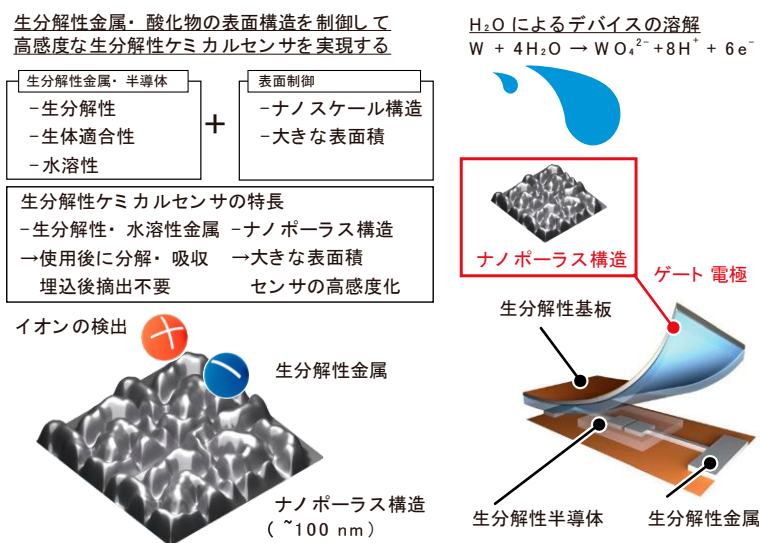
214 ナノポーラス構造をもつ生分解性ケミカルセンサの開発 山田 駿介

【目的】少子高齢化が急速に進展している現状を考慮すると、高齢者が健康的な暮らしを営み、社会に参画することは、健康の観点からだけでなく、労働力の観点からも重要である。地方など過疎化が進んだ地域では、医師の診断や処方を受ける機会が少なく、診療サービスの低下による、疾病の早期発見はできなかった。そのため、体内埋め込みデバイスによるデータ収集と AI 技術によるきめ細やかな見守りや遠隔診療が、医師の診断に変わる新規の治療方法として注目を集めている。しかしながら、従来の埋め込みセンサは、摘出する必要があるなど、体への負荷やコストの面で実用化には至っていない。近年、生体中に含まれる微量金属を用いた、吸収・分解するデバイスが報告されている。一方、化学物質を検出するケミカルセンサは電極の表面積がセンシング感度を決定するため、カーボンを使用することが多いが、生分解性がなく、吸収・分解するケミカルセンサは実現できていない。本研究の目的は、大きな表面積と生分解性をもつ電極を作製して、使用後に吸収・分解されるケミカルセンサを開発することである。本研究では、生分解性と水溶性を示す金属・半導体・電解質を用いて、使用後に体内に吸収されるセンサを実現できると考えた。本研究の核となる大きな表面積をもつ電極に関しては、カーボンやポリマーを使用するのではなく、ナノ多孔質金属および、その酸化物を使用することで、生分解性と大きな表面積を確保する。

【方法】スパッタリングにより合金 CuMg を成膜して、塩酸 1 mM に浸すことでナノポーラス構造を作製した。作製したナノポーラス構造の形状・組成を電子顕微鏡・エネルギー分散型 X 線分光法を用いて観察した。ケミカルセンシングを行う MOSFET に関しては、半導体 ZnO を用いて作製した。スパッタとフォトリソグラフィにより電極、半導体をパターニングし、ゲート絶縁層にはイオンゲルを使用した。上記ナノポーラス電極を MOSFET のゲート電極に使用したデバイス作製を行った。

【結果】上記方法で大きさ 20~50 nm のポアが得られ、Mg が溶解していることから、銅のナノポーラス構造が得られたことを確認した。また、ZnO を用いた MOSFE も良好な電気特性を示し、しきい値電圧が 5.2 V であることが判明した。ナノポーラス電極を MOSFET のゲート電極に応用するさいに、ZnO が塩酸によりダメージを受けることが判明しており、作製プロセスの見直しをした。

本研究の概念図

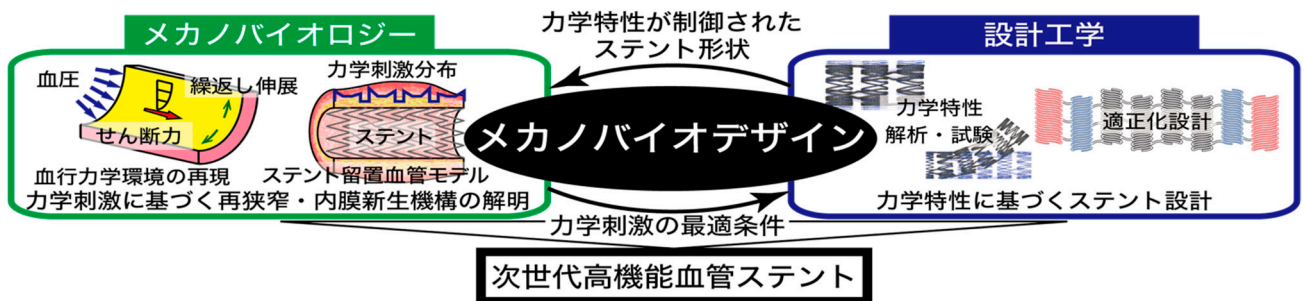


【目的】 本研究では、メカノバイオロジーの観点から、特にステントが血管壁に及ぼす力学刺激の影響に着目し、ステント内再狭窄の発症と血管内膜新生の機構を解明する。得られた力学刺激に対する血管の応答をステントの形状と剛性の設計にフィードバックすることで、再狭窄抑制効果と内膜新生促進効果を備えた高機能生分解性ステントを実現する。一連の研究により、メカノバイオロジーの知見に基づいて医療器具を設計する理論（メカノバイオデザイン理論：図）を確立し、循環器系疾患医療の技術革新を目指す。

【方法】 設計変数による拡張力の操作が容易で競合他社のライセンスに抵触しない新ステント形状を設計し、その特性（剛性）マップを作製した。また、設計・試作したステントを直接留置可能な内径 6 mm の培養血管モデルの開発を試みた。生分解性素材であるポリ乳酸によるステントの開発と並行して、我々がこれまで開発を続けてきた NiTi の形状記憶合金を素材とする自己拡張型ステントの開発に取り組んだ。

【結果】 本研究で設計したステント形状は、設計変数の変動幅が比較的小さい場合においても、半径方向の剛性を大きく変化させることが可能であることを確認した。今後明らかにする血管炎症応答の定量データをフィードバックすることで、得られた半径方向の剛性マップから最適なステント形状が導出でき、血管炎症応答に合わせて多様な設計戦略を取ることが可能であることが確認できた。また、培養血管モデルの外膜に相当する厚さ 500 μm のポリジメチルシロキサン（PDMS）薄膜を円筒構造体の開発に成功した。PDMS 製の円筒構造体の内側表面に血管平滑筋細胞を含有したコラーゲン基質を配置し、その表面に血管内皮細胞を配置することで中規模血管径（5~6 mm）の培養血管モデルの構築を実現できる。

本研究のねらい（メカノバイオデザイン理論）

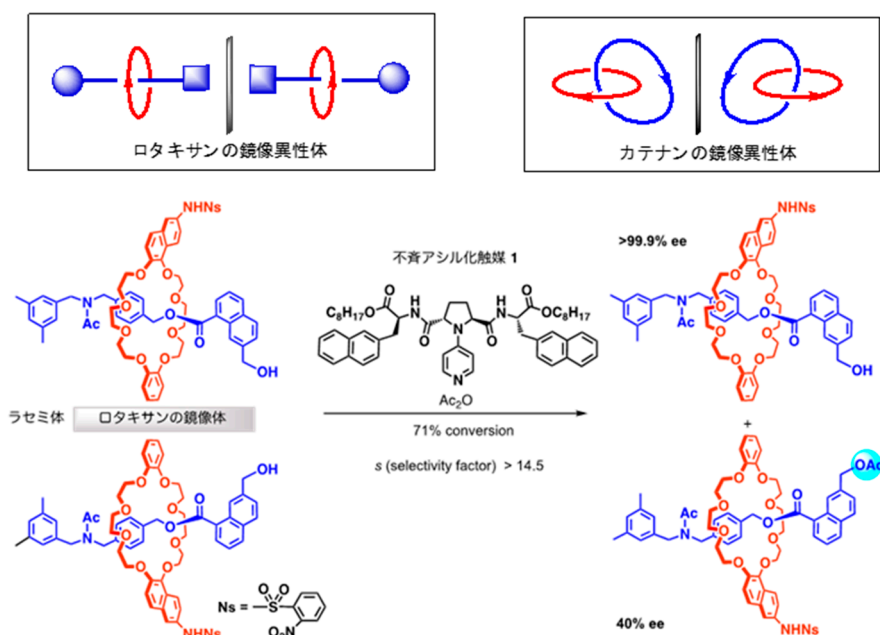


【目的】 本研究では創薬科学に斬新なケミカルスペースを導入することを目的に、ロタキサンやカテナンなどの超分子（インターロック分子）の不斉合成研究を行う。下図に示すように、ロタキサンは軸成分と輪成分が、カテナンは2つの輪成分が、非共有結合でそれぞれ繋がった構造を持つインターロック分子である。この軸成分及び輪成分が非対称性を持つ時、これらの構成要素からなるロタキサンやカテナンは、インターロック分子特有の **topological chirality**（位相幾何学的キラリティー）を持つ（ロタキサンのキラリティーは厳密には **mechanically planar chirality**）。これらの分子はその特異な構造から、分子マシンやデバイスへの応用が期待され、盛んに研究が行われている。一方で、これほど特異な構造的特徴を持つ分子にもかかわらず、創薬に向けた利用はほとんど行われていない。その主な理由として、これらのインターロック分子の創薬関係者への認知が充分でないことと、その不斉合成法の困難さが挙げられる。これらのインターロック分子の不斉構築法は世界的視野からみても極めて未発達で、創薬テンプレートとして要求される光学活性体での供給が困難である。このような状況に鑑み、本研究ではロタキサン及びカテナンの不斉合成法を開発する。

【方法】 不斉合成研究は大きく進歩し、我が国は世界を先導している。効率的な不斉誘導法が次々に確立され、不斉合成研究は成熟期にさしかかりつつある反面、未解決課題も残されており、これには遠隔位不斉誘導とインターロック分子の不斉合成が挙げられる。不斉合成の選択性は主に立体障害に基づいて発現する場合が殆どである。即ち、反応点が不斉源から遠隔位にある場合、不斉誘導が原理的に困難となり、このため、遠隔位不斉誘導の方法論自体が欠如している。当然の帰結として、遠隔位不斉誘導が要求されるロタキサンやカテナンなどのインターロック分子の不斉構築法は極めて未発達で、高度にエナンチオ選択的な構築法は、当研究以前は皆無であった。このような状況下、本研究では分子認識型触媒を用いるラセミ体ロタキサンの不斉アシル化による速度論的分割により本課題に取り組んだ。

【結果】 我々が開発した分子認識型不斉アシル化触媒 **1** を用いるラセミ体ロタキサンの速度論的分割で、**topological chirality** を持つロタキサンを **>99.9% ee**、**29% 収率**で得ることに成功した（速度論的分割の選択性 s 値 **>14.5**）。これはロタキサンやカテナンなどのインターロック分子の高度にエナンチオ選択的な構築法の世界初の例である。本反応では、大きなロタキサン分子の末端に位置する水酸基をアシル化するのみで分子全体のキラリティーの識別が高度に達成されており、本触媒による分子認識が遠隔位キラリティーの厳密な識別にも有効なことを示している。

トポロジカルキラリティーを持つラセミ体ロタキサンの不斉アシル化による速度論的分割

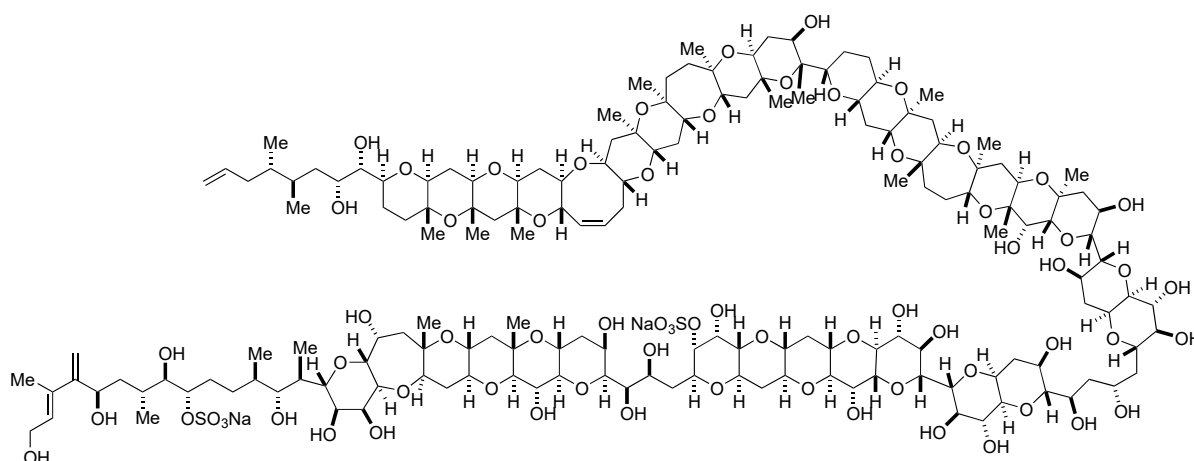


【目的】マイトトキシン (Maitotoxin : MTX) (下図) は渦鞭毛藻 *Gambierdiscus toxicus* の培養抽出物から単離され、1996 年、絶対立体化学を含めた全立体構造が決定された梯子状ポリエテルである。1982 年、薬理に関する初めての研究成果が公表されて以来 40 年が経過したが、極低濃度で各種培養細胞に対して Ca^{2+} 流入をもたらし、天然毒として最高級の急性致死毒性 (マウス) を示す作用機序は不明のままである。2018 年、我々は一細胞中の全遺伝子を標的とする CRISPR スクリーニングを行い、MTX の細胞毒性を増強、または減弱させる遺伝子を同定した。本研究では CRISPR スクリーニングの結果検証を目的とした。

【方法】1. 電気生理学的手法の一つである (Contact Bubble Bilayer : CBB) 法を適用し、特定の脂質に対する MTX の作用を調べた。2. 細胞膜、微小管、アクチン、核を染色する各種蛍光試薬、 Ca^{2+} 濃度をモニターする蛍光試薬を予め添加した培養細胞 CHO-K1 に対して MTX を添加し、ライブセルイメージングを行った。3. siRNA を用いて単一遺伝子のノックダウンを試み、MTX に対する感受性を野生株と比較した。4. HAP1 細胞 (野生株)、ならびにその単一遺伝子欠損細胞株に対する MTX の細胞毒性を調べ、欠損遺伝子の影響を調べた。

【結果】1. 福井大学の老木成稔先生、岩本真幸先生にご指導賜り CBB 法を習得した。CBB を構成する脂質に予め MTX を混合した場合、膜透過性亢進は観測されなかった。CBB 形成後、MTX を添加する戦略を試みたが、極めて困難であり実現できなかった。戦略を切り替え、 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ や Ca^{2+} 感受性蛍光色素である Fluo 3 を用いたが、MTX はリボソームに対して Ca^{2+} 流入を起こさなかった。2. MTX は CHO-K1 細胞膜の Blebbing を伴う急性細胞毒性を示すこと、Blebbing が Ca^{2+} 流入、微小管崩壊の後に生じることがわかった。細胞膜の Blebbing はカルシウムイオノフォアである A23187、抗生物質である Amphotericin B、界面活性剤である Triton X-100 を添加した場合にも観測されたが、MTX は 10,000 分の 1 程度の濃度で Blebbing を生じることがわかった。3. MTX の細胞毒性を増強、または減弱させることが推測された 16 個の遺伝子に対して siRNA を設計しトランスフェクションしたが、MTX の細胞毒性に与える影響は観測されなかった。4. そのため、7 つの遺伝子に絞り単一遺伝子欠損株を調製または購入し、MTX の細胞毒性に与える影響を調べたところ、野生株と比較して MTX の細胞毒性を増強、または減弱させる単一遺伝子欠損株が一株ずつ見出された。

マイトトキシン (Maitotoxin : MTX)



218 腸内細菌を介した糖尿病性腎症の治療	阿部 高明
-----------------------	-------

【目的】 本邦における透析患者の最多原疾患は糖尿病性腎臓病 (diabetic kidney disease : DKD) であり全体の約 4 割を占める。透析導入患者数の抑制のためには糖尿病患者の中で末期腎不全に進展するリスクが高い患者を早期に見極め、積極的に治療することが重要である。これまでに報告者は①腸内細菌が産生に関わるフェノールの代謝物であるフェニル硫酸が DKD の原因物質の 1 つであること、②糖尿病患者を対象にしたヒトの臨床研究の結果からフェニル硫酸は DKD 増悪の予測因子であること、③フェニル硫酸産生を抑えるとアルブミン尿と腎機能が改善することからフェニル硫酸を低下させることが DKD の新たな治療法開発のターゲットとなり得ることを報告してきた。従ってこの是正が新しい DKD の治療法となりうると考えられた。

【方法】 ヒト糖尿病患者糞便中のフェノール産生菌の単離とその酵素の精製、それを用いた酵素発現系を用いてヒトにおけるフェノール産生メカニズムの解明と阻害薬の探索を行い、糖尿病性腎症の発症予防と治療法の探索を行った。併せて便のショットガンメタゲノム解析を行い糖尿病患者に特有な菌叢、代謝経路解析とヒトゲノム解析法の開発を行った。

【結果】 ヒトでフェノール産生菌 7 種についてフェノールの産生とゲノムからフェノール産生酵素 (tyrosine phenol-lyase : TPL) の遺伝子を増幅し、すべての組換え大腸菌でフェノールの遊離を同定した。またフェノール産生阻害剤を検索し、植物に含まれている数種類の化合物群に強い非競合阻害的 TPL 阻害活性を同定し特許申請を行った (特願 2021-033128 出願日 2021/03/03)。同様にトリプトファンからインドールを産生するトリプトファンインドールリアーゼ (TIL) の酵素阻害活性を抑制する 4 つの化合物がインドールの産生を抑制することも明らかとなった (特許申請準備中)。一方、大正製薬が開発した SGLT1 阻害薬剤の一つである SGL5213 に、フェニル硫酸と動脈効果の原因物質であるトリメチルアミン-N-オキシドの血中濃度の低下作用と腎機能改善効果を見いだした。糖尿病性腎症患者のメタゲノム解析と糖尿病患者 362 人の血中メタボローム解析から尿毒症物質と腸内細菌の有意な相関を認め、そのうち正の相関を示したものは 14 種、負の相関を示したものは 7 種が同定された。またヒトの菌叢解析から血中フェニル硫酸濃度と相関する菌種 1 種類、また同じく腸管由来の尿毒素である p-クレシル硫酸濃度と正の相関を示す菌種 2 種類、負の相関を示す菌種 2 種類が同定された (特許申請準備中)。患者糞便のショットガンメタゲノム解析から、フェノール産生経路に属する遺伝子系路を検索したところ、糖尿病になると腸内環境で X 遺伝子の存在量が増大する傾向があり、今後検体数を増やして検討する予定である。さらに糞便中の DNA のヒトゲノムマップ率を検討した結果、糞便中の DNA は血液検体と比べて 1/200 のリード数であったが 6 割弱はヒト由来であった。これらのデータから宿主ミトコンドリア情報を解析する手法を開発した。フェニル硫酸は食事に含まれるチロシンから腸内細菌によって作られる代謝物であり、血液中のフェニル硫酸濃度は 2 年後の糖尿病性腎臓病の悪化を予測する因子である。さらにフェニル硫酸はそれ自身が毒性を持つ悪化要因である。従ってその血中濃度を測り、その値が高いヒトはチロシンを中心とした低アミノ酸に着目した栄養指導、プレバイオティクス・プロバイオティクスを用いて複合的に介入を行うことで腎不全への進展が抑えられる可能性が示唆された。

フェノール産生抑制による包括的糖尿病性腎症の診断と治療 (PS=フェニル硫酸)

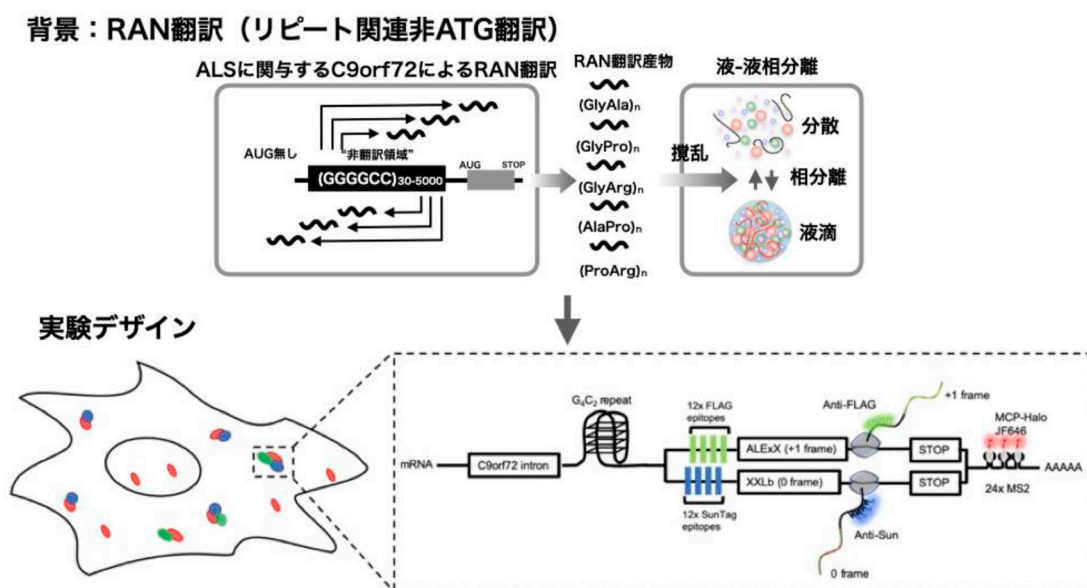


【目的】 生命のセントラルドグマの終端である翻訳過程に大きな未開のバイオロジーがあることがわかってきた。翻訳は、遺伝子読み枠 (ORF) 内の開始コドンから始まって最後に終止コドンにて終わるだけではない。非典型的な翻訳に関して近年、神経変性疾患に関与する塩基リピート配列内から、開始コドン ATG に依らない翻訳開始が起こり、細胞毒性を有する翻訳産物が合成されることがわかってきた。この非典型的な翻訳開始は「RAN (Repeat-Associated Non-ATG) 翻訳」と呼ばれ、これまでのアミロイド研究の枠を超えて神経変性疾患の分子機構解明の鍵を握っていると目されているが、その分子機構や細胞内でどのように RAN 翻訳が起こるのかなどよくわかっていない。そこで、本研究では、最近、開発された生細胞内で mRNA と複数の翻訳フレームの新生ポリペプチド鎖を可視化する系を応用して、細胞内での RAN 翻訳の分子機構に迫ることを目的とした。

【方法】 生細胞内で RAN 翻訳イメージングを行うためには 1 本の mRNA と各翻訳フレームの新生ポリペプチド鎖を可視化する必要がある。そのために 1 本の mRNA で複数の翻訳フレームを別々の蛍光で可視化できる実験系を用いて RAN 翻訳の可視化を試みることにした。具体的には、RAN 翻訳のターゲットとして、ALS の原因遺伝子 *C9orf72* が持つ (GGGGCC) *n* リピート配列を選択し、RAN 翻訳の可視化を行なった。本研究では、上原記念生命科学財団のサポートによって観察用のプラスミドを作製後、予備的な観察を東京工業大学で行ったのちに、共同研究先である米国コロラド州立大学の Tim Stasevich ラボで詳細な観察、解析を行う予定とした。

【結果と考察】 (GGGGCC) 80 リピートを含む *C9orf72* 遺伝子を複数の翻訳フレームを検出できるプラスミドに組込んだ。作製したプラスミドを新生ポリペプチド鎖可視化のための抗体、mRNA の可視化に使う MCP とともに細胞に導入しライブセルイメージングを行なった。その結果、RAN 翻訳 (0 フレーム) と見られる輝点が確認されたが、他のフレームは観察できなかった。予備研究が終了したところで渡米する予定であったが、新型コロナウイルスの感染拡大により、渡米が不可能となった。そこで、生細胞観察にも必要となる RAN 翻訳の分子機構解析を再構築型無細胞翻訳系で実施する系を立ち上げた。以上、上原記念生命科学財団の多大な支援を賜ることで、RAN 翻訳研究において世界的にも非常にユニークな実験系を確立することができた。最終的には、RAN 翻訳に関わる神経変性疾患の治療戦略や創薬にも結びつくことが期待される。

本研究の概念図



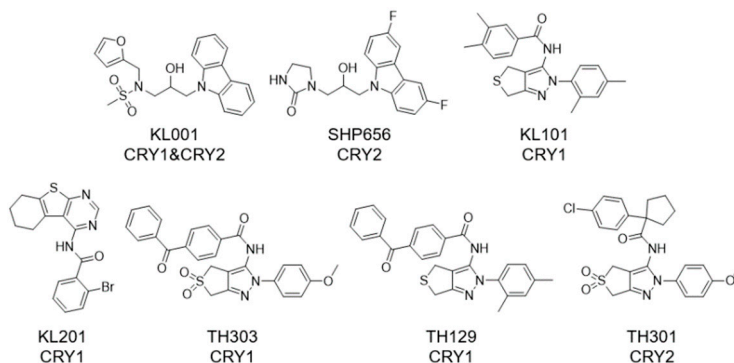
220 概日時計によるがん細胞増殖制御の分子機構	廣田 毅
--------------------------	------

【目的】 睡眠・覚醒や代謝など、様々な生理現象は一日周期のリズムを示す。これらのリズムを支配するのが、体内に存在する概日時計である。シフトワークや遺伝子変異によって概日時計が攪乱されると、睡眠障害やがん、代謝疾患などの多様な病気につながる。概日時計の分子機構に関する知見を、どのようにヒトの健康増進に役立てていくのかが今後の重要課題である。私たちは、時計タンパク質の直接かつ定量的な機能操作を可能にする「時計調節化合物」を多数発見し、GO289 と名付けた時計調節化合物がタンパク質キナーゼ CK2 を標的として、腎細胞がんの細胞株および急性骨髄性白血病モデル細胞の増殖を細胞種に依存して抑制することを見出した。本研究では新規の時計調節化合物の作用メカニズムを解明し、これを用いてがん細胞の増殖を制御することを目的とした。

【方法】 時計調節化合物が CRY1 と CRY2 の半減期に与える影響を、ルシフェラーゼとの融合タンパク質を発現する細胞を用いた分解アッセイによって解析した。同様に、CRY の変異が化合物の効果に与える影響を分解アッセイによって解析した。CRY と化合物の相互作用を熱シフトアッセイによって解析した。化合物の作用における CRY アイソフォームの役割を、*Per2* ルシフェラーゼレポーターをノックインしたマウス (Wild type、*Cry1* KO、*Cry2* KO、*Cry1/Cry2* KO) の線維芽細胞を用いて解析した。CRY の変異が化合物の効果に与える影響を、*Cry1/Cry2* KO マウスの線維芽細胞に *Bmal1* ルシフェラーゼレポーターと *Cry1* または *Cry2* 発現ベクターをトランスフェクションして解析した。

【結果】 CK2 に加えて、時計タンパク質の CRY はがん細胞増殖制御の有望なターゲットである。すなわち、私たちが発見した KL001 という CRY に作用する化合物やその誘導体である SHP656 が、悪性脳腫瘍であるグリオブラストーマ幹細胞の増殖を抑制することが報告された。CRY には CRY1 と CRY2 というふたつのアイソフォームが存在し、それぞれに選択的に作用する化合物は各アイソフォームの機能解明に大きく役立つに違いない。しかし、CRY1 と CRY2 の化合物結合ポケットは高度に保存されており、KL001 は両者に作用することから、アイソフォーム選択的な化合物のデザインは困難であった。標的未知の時計調節化合物の解析から、CRY1 に選択的に作用する KL101、KL201、TH303 と TH129、および CRY2 に選択的な TH301 を発見した。化合物結合ポケットのアミノ酸は CRY1 と CRY2 の間で同一であるものの、「ゲートキーパー」と名付けたトリプトファン残基の向きがアイソフォーム間で異なることを見出した。この向きを変化させるような変異体では KL101 と TH301 に対する応答が逆転したことから、ゲートキーパーの向きが化合物の選択性を生み出すと考えられた。一方、SHP656 は KL001 の誘導体であることから、CRY1 と CRY2 の両方に作用すると予想された。しかし解析の結果、興味深いことに SHP656 が CRY2 選択性を示すこと、およびこの選択性にもゲートキーパーが関与することを見出した。さらに、SHP656 の R 体が活性型であることを見出し、グリオブラストーマ幹細胞の増殖を抑制することを明らかにした。以上の結果から、CRY2 が概日時計を介したグリオブラストーマ幹細胞増殖制御のターゲットとなることを明らかにし、それを制御するユニークな化合物を見出すとともに作用メカニズムを解明することに成功した。

概日時計タンパク質の CRY に作用する化合物

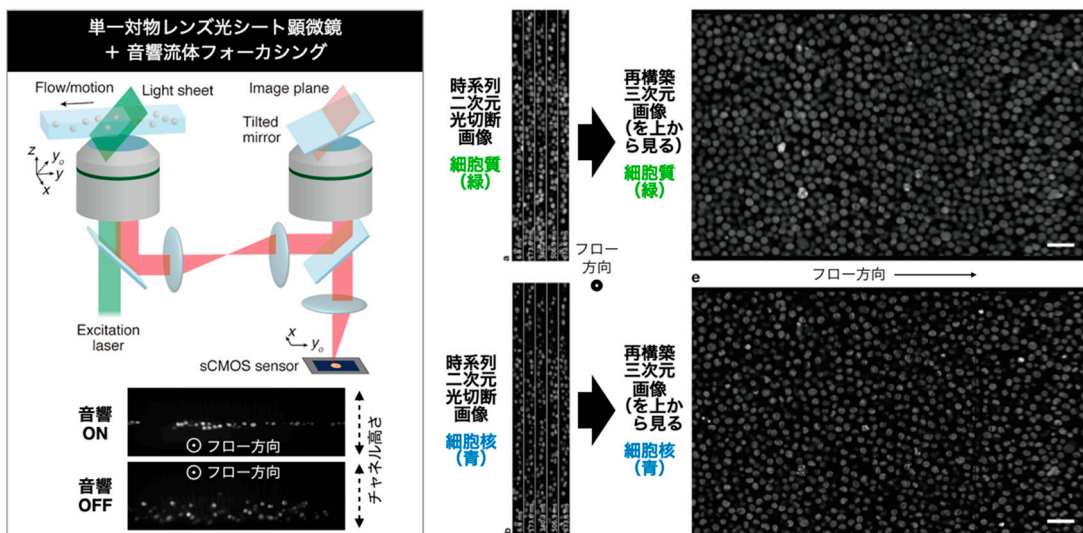


【目的】 大量データの真価を生かして自然科学の可能性を拡張すべく、生物データを教師とする機械学習モデル BSML (Biologically supervised machine learning) の実現が最終的な目標である。この BSML を実現すべく、本研究では、時間や装置間の断絶を越えて異計測データを 1 細胞単位に紐付ける光核酸バーコーディング技術を軸に、大量細胞の形態・応答・遺伝子発現情報をハイスループットに多角計測する細胞マルチモーダル計測技術開発を目指してきた。

【方法】 光核酸バーコーディング技術では、まず、光学イメージ識別情報と 1 対 1 対応する固有 DNA バーコードで修飾した、イメージ核酸バーコードハイドロゲルビーズ (optical and DNA barcode beads : odBB) を、新規開発した手法に基づき、大量に作製した。細胞と共に微小ユニット液滴中に封入することにより、大量の細胞をユニークに光学バーコーディングされる。このユニットを光イメージングして、各ユニットに含まれる odBB を光イメージ情報から同定した上で、1 細胞シーケンシングを行って、各細胞の遺伝子発現と同じユニットにいた odBB を DNA バーコードから同定し、1 細胞単位に形態と発現情報を紐付けした。一方で、本研究のスループットの律速の一つは、イメージング技術にあることが浮き彫りとなり、そこで、ライトシート光顕微鏡技術と音響を用いたマイクロ流体細胞整列技術の融合により、高速の三次元蛍光イメージング技術を開発した。

【結果】 光核酸バーコーディング法の開発を達成した。odBB の大量安定生成手法の開発と、効率的な核酸と色素の修飾手法の開発に成功した。そして市販装置を用いたイメージング、機械学習を用いた光学イメージからの迅速かつ正確なビーズ同定手法の開発、odBB・1 細胞遺伝子発現計測系の確立、イメージデータ中の odBB とシーケンズデータ中の odBB の照合を実現し、数百細胞の明視野画像と遺伝子シーケンシング情報のマルチモーダル計測を達成した。さらに、世界最速のスループットで、流路を流れる細胞の高速な三次元光イメージングを達成し、これを適用して、光核酸バーコーディング法のスループットとスケールの向上を進めている。本報告では、既に論文を公開している、解析パイプラインの中核をなす新規イメージング技術の実証データを中心に報告する。

単一对物レンズライトシートイメージング技術と音響粒子整列技術の融合による
高速三次元イメージングフリーサイトメトリー技術



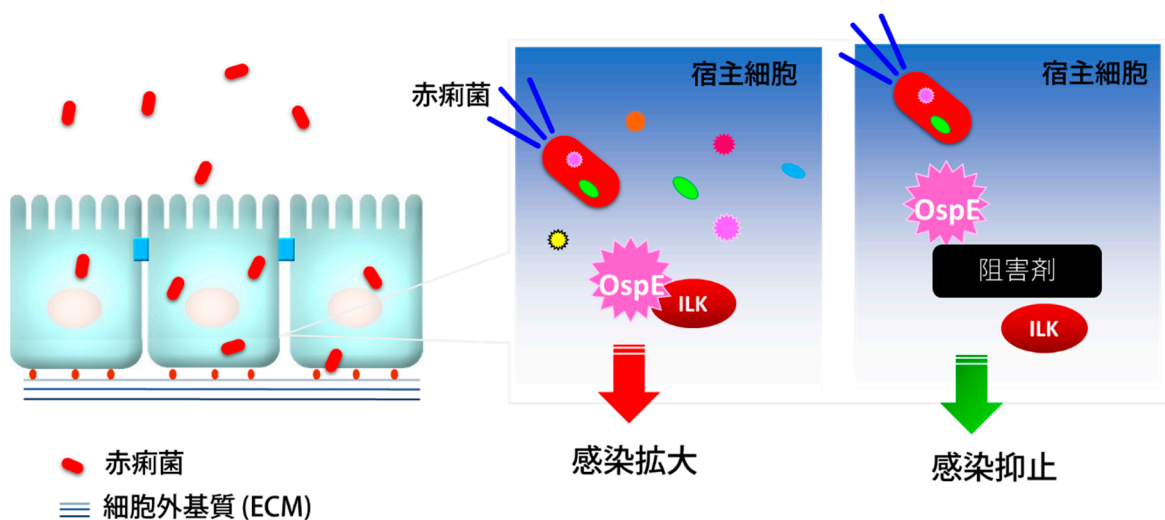
222 新奇抗菌薬を開発するモダリティの創出	金 玫秀
------------------------	------

【目的】 サルモネラ菌や赤痢菌に代表される腸管病原細菌は、飲食物により宿主の体内に侵入し、腸管の粘膜上皮細胞を足場に感染を拡大する。これら病原細菌による腸管感染症の治療は抗生剤に依存しているが、近年、既存の抗生剤に対する多剤耐性菌の増加、ワクチンの不在に加え、抗生剤による副作用が重大な問題になっている。既存の抗生剤は、細菌細胞壁の合成、転写反応に対する阻害剤など、病原細菌にも常在菌にも効き、細菌全般を殺傷する結果、腸内細菌叢を破壊する薬剤が多い。また、破壊された細菌から出てくる内・外毒素は溶血性尿毒症などを引き起こして、病態を悪化させ、死亡に至る場合も多い。そのため、1. 既存抗生剤とは作用機序が違い、多剤耐性菌にも効く、2. 病原細菌のみに効き、常在菌や宿主（ヒト）には作用しない、全く新奇の細菌感染治療薬が世界的に求められている。そこで、本研究では広範な腸管病原細菌に対しての、既存の抗生物質とは異なる新奇抗菌薬の開発を究極の目的として、病原細菌の病原因子の機能阻害剤の開発を進めた。幅広い腸管病原細菌に保存されている病原因子（OspE）とその宿主相互作用分子 Integrin linked kinase（ILK）に注目し、1. OspE による ILK の制御メカニズムを明らかにし、2. OspE と ILK の結合を制御する新しい化合物の創出を目指す。

【方法】 均一系時間分解蛍光エネルギー転移測定法を用いて、OspE と ILK の相互作用を定量的に検出できるアッセイ系を確立した。さらに、OspE と ILK の構造解析のために大腸菌や細胞から蛋白質を精製し、結晶化を行った。

【結果】 OspE による ILK の制御メカニズムを解明するために、OspE と ILK の立体構造解析を行った。さらに、均一系時間分解蛍光エネルギー転移測定法を用いて、OspE と ILK の結合を定量的に解析した。

抗生物質に代替となる新しい治療薬の開発～概略図

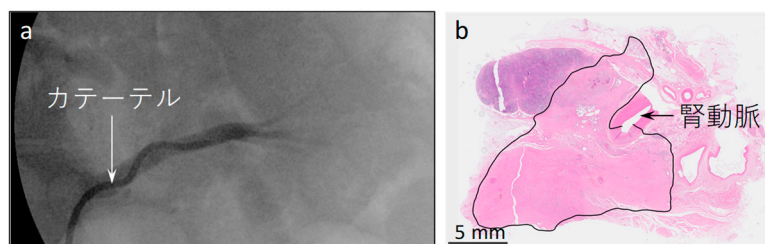


【目的】 日本での高血圧患者数は約 4,300 万人と言われており、降圧薬を中心とした薬物治療が行われている。一方、3 種類以上の降圧薬を内服しても血圧が至適域に到達しない治療抵抗性高血圧患者が全体の 10 分の 1 程度存在し、こうした患者に対するさらなる治療オプションが必要とされている。こうした中、近年、治療抵抗性高血圧患者に対して、アブレーションカテーテルを腎動脈に導入し、血管内から腎動脈周囲の交感神経線維を焼灼することで交感神経活動を抑制し降圧効果を得る“腎デナベーション (Renal Denervation : RDN)”と呼ばれる新しい治療法が開発され、臨床応用が検討されている。現在、RDN を行うための様々なアブレーション用カテーテルが開発され、臨床治験が世界中で行われている。しかしながら、現在までのところ、薬事承認を目指して行われている大規模なランダム化比較試験では必ずしも良い結果が出ていない。この一つの大きな要因として、焼灼の深度が浅く、自律神経が十分に焼灼・不活化されていない可能性が指摘されている。多くのアブレーションカテーテルは神経焼灼に用いるエネルギー源として高周波電流を採用している。高周波電流カテーテルでは、カテーテル先端（電極）部分が特に加熱されるため、これを血管の内膜に押し当て、その深部にある神経を熱伝導によって焼灼する必要がある。ところが、腎動脈周囲の交感神経は血管の奥（5 mm 以上）にも存在するため、この領域まで高周波電流によってしっかり熱エネルギーを届け、神経を焼灼しようとする、カテーテル直下の血管内膜の熱損傷が強くなりすぎるという問題がある。したがって、これを避けるためには、どうしても焼灼が不十分にならざるを得ず、結果として明確な降圧効果がみられないのではないかと考えられている。そこで本研究では、マイクロ波を用いた RDN カテーテルの開発を計画した。マイクロ波は、その名の通り、波動としてエネルギーを伝達するため、血管に非接触で加熱することが可能であり、かつ、血管から比較的深部に位置する神経も焼灼可能であると考えられる。本研究では、マイクロ波 RDN カテーテルを計算機シミュレーションや生体等価ファントムを活用した工学的手法で開発し、その有効性を動物実験により確認することを目的とする。

【方法】 まず、筆者らがこれまでに開発してきた細径同軸ケーブルで構成した同軸スロットアンテナを基本形として、RDN に適合可能なカテーテル構造を検討した。臨床で使用可能なカテーテルに応用するためには、(1) 焼灼の位置を制御できる、(2) 深部神経の焼灼が可能、(3) 血管内膜および周囲血流を過度に加熱しない、の 3 項目を満たす必要がある。そこで、マイクロ波アンテナ部分を電磁界シミュレータで解析し、周囲の発熱分布やアンテナ反射係数から、上記の性質を満たすカテーテル構造を同定した。さらに、試作したカテーテルで卵白を凝固させる予備実験を行い、このカテーテルが実使用できることを確認し、最終的に生体ブタの腎動脈周囲組織の焼灼実験を行った。

【結果】 生体ブタ左腎動脈の血管造影画像を図 a に示す。腎動脈の血管径は 5.9 mm であった。カテーテルは、血管に沿って螺旋形状展開していることがわかる。焼灼の中心であるアンテナ上のスロットを尾側に配置し、入力電力 50 W、焼灼時間 60 秒で焼灼した。焼灼直後および 2 週間後の造影画像では、焼灼部直上の血管および末梢の血流に問題は見られなかった。図 b に、焼灼した腎動脈と周囲組織の病理画像 (HE 染色) を示す。ここで、黒線は周囲組織の損傷領域を示す。血管外部の比較的深部の周囲組織にまで熱影響がおよんでいることがわかる。また、血管壁にも熱影響はあるものの、高周波電流のデバイスと比較して、損傷の程度が抑えられていることもわかる。以上のように、マイクロ波デバイスは、腎動脈周囲の交感神経線維を焼灼する高血圧治療において、有望であると考えられる。

生体ブタの腎動脈周囲組織の焼灼実験 (a : 血管造影画像、b : 腎動脈周囲組織の病理画像)

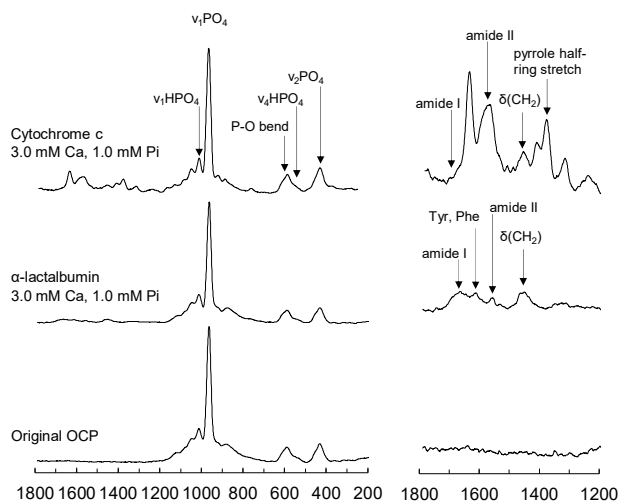


【目的】 骨アパタイト結晶の前駆物質と見做されているリン酸八カルシウム (octacalcium phosphate、OCP : $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) は、高い骨伝導性を示すことから骨欠損の治療が必要とされる医療分野で人工合成の骨補填材としての使用が期待されている材料である。OCP は、生体内で血清由来タンパク質に高い親和性を示すことから、特定の化学環境下で骨の形成に関わるタンパク質の集積を促進して、材料を活性化できるかどうかを調べることを目的として、モデルタンパク質を用いてその親和性を検討した。そのために、モデルタンパク質、カルシウムおよびリン酸のイオンを含む水溶液の過飽和度を調節して、酸性および塩基性のモデルタンパク質の吸着および徐放の特性を調べた。

【方法】 α -ラクトアルブミン (α -lactalbumin、等電点 4.8) およびシトクロム c (cytochrome c : cytC、等電点 9.6) を吸着質とした。異なる濃度のカルシウムイオン (Ca^{2+}) および無機リン酸 (inorganic phosphate、以下 Pi) のイオンを含み、OCP に関して飽和あるいは過飽和な組成を持つ pH7.4 のトリスヒドロキシメチルアミノメタン (Tris) - HCl 緩衝液にこれらのタンパク質を溶解した。過飽和度は溶液上清を分析して、それらのイオン活動度積 (IP) を溶解度積 (Ksp) で除することで算出した。OCP を湿式合成で調製して $53\ \mu\text{m}$ 径に整粒した OCP を吸着媒とした。OCP を cytC あるいは α -lactalbumin を含む緩衝液に浸漬し、吸着平衡後に OCP を回収して凍結乾燥した後、OCP 上に吸着した状態のタンパク質をラマン分光法で同定した。

【結果】 ラマン分光の分析から、OCP のリン酸基由来の振動や変角のモードが $400\sim 600\ \text{cm}^{-1}$ および $1,000\ \text{cm}^{-1}$ 前後に検出されるが、ラマンシフトが $1,300\sim 1,700\ \text{cm}^{-1}$ の範囲に cytC もしくは α -lactalbumin に固有の振動モードが検出され、塩基性タンパク質 cytC および酸性タンパク質 α -lactalbumin が過飽和環境により吸着が促進されていると考えられた。タンパク質上清の分析から算出した吸着量の解析では、タンパク質の平衡濃度により吸着促進が生じることがわかった。この結果は先に報告した血清アルブミンの過飽和環境による吸着促進 (Hamai R et al. Materials 12, 2019) を支持する結果となった。次に、cytC の OCP からの徐放挙動を分析した。過飽和環境下で cytC を吸着させた OCP を 37°C のリン酸緩衝液 (PBS) に浸漬した後、上清を回収し、cytC 濃度を測定することで OCP から放出された cytC の積算量を算出した。過飽和環境下で吸着した cytC は、浸漬初期に急激な放出は生じず緩やかに PBS 中に放出される傾向にあった。本研究と同様の条件で血清アルブミンを用いて検討した過飽和環境下では OCP 上に新たな微細な結晶が添加的に形成されることで吸着が促進されることが示唆されている。今後は、本研究で得られたモデルタンパク質の吸着と徐放のメカニズムを生体由来タンパク質に適用し、OCP 骨補填材の活性化の可能性およびそのメカニズムについて生体材料学の観点で明らかにする。

Cytochrome c および α -lactalbumin が吸着した OCP のラマン分光スペクトル

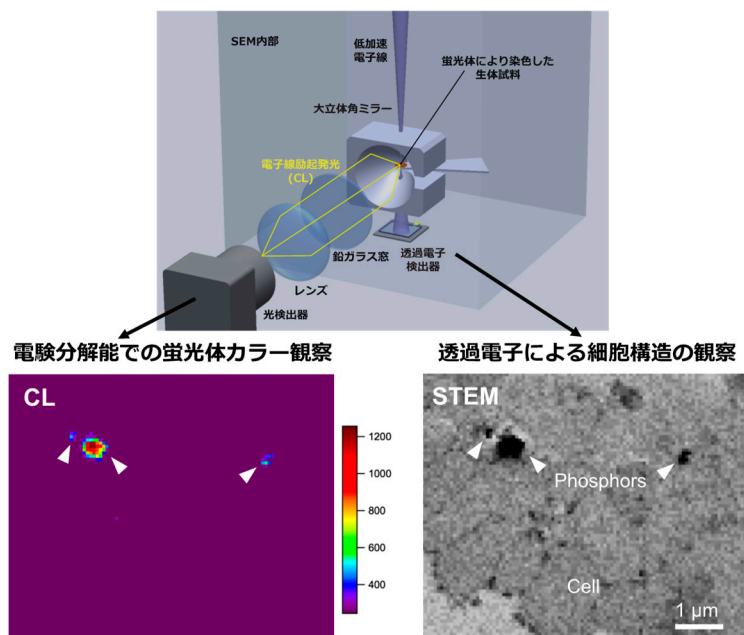


【目的】 生体内では、数万種を超える分子が相互作用して機能を発現しているため、複数分子種の分布とその周囲の細胞内微細構造を同時に分子スケールの空間分解能で可視化する手法は、分子生物学的・形態学的な生命機能解明において極めて重要である。この実現に有力な手法として、電子線励起による発光であるカソードルミネッセンス (CL) によるカラー分子種観察と二次電子もしくは透過電子による微細構造観察を同時に行う CL・電子相関顕微鏡法がある。しかしながら、この方法は、CL 検出系の感度不足や蛍光体の輝度不足、電子線照射での発光褪色が実用化への課題となっており、未だ基礎研究段階である。そこで本研究では、大立体角 CL 検出系、透過電子検出系、低加速電子線の 3 つを特徴とする高感度 STEM-CL イメージングシステムを開発することで、従来の課題を解決し、プローブである希土類蛍光体の発光分布と細胞内微細構造の同時観察を電子顕微鏡分解能で実現することを目的とする。

【方法】 1. 大立体角放物面ミラーを有する CL ミラーユニット、透過電子検出系、CL 検出系、制御系の設計と作製を行った。2. 作製した STEM-CL イメージングシステムと市販の SEM-CL イメージング装置を用いて、合成した $Y_2O_3:Eu$ ナノ蛍光体の電子線イメージング及び CL イメージングを行い、イメージング特性の比較を行った。3. エンドサイトーシスで $Y_2O_3:Eu$ ナノ蛍光体を取り込ませた細胞切片を用いて、細胞内微細構造とナノ蛍光体の同時イメージングを行った。4. $Y_2O_3:Eu$ 蛍光体よりも小さい粒径と高い発光効率を有する $NaGdF_4:Eu$ ナノ蛍光体を合成し、STEM-CL イメージングを行った。

【結果】 開発した大立体角の放物面ミラーを有する STEM-CL イメージング装置を用いることで、市販装置の約 5 倍の S/B 比で CL イメージングが可能となった。これにより、粒径 100 nm 以下の $Y_2O_3:Eu$ ナノ蛍光体の CL イメージングが可能となった。このときの CL 像の空間分解能は STEM 像とほぼ同等であることを確認した。細胞構造の STEM イメージングにおいては、細胞切片における細胞構造を SEM 像より高いコントラストでイメージング可能であることを確認した。また、同じ細胞試料を用いて CL イメージングを行った結果、細胞内に食作用で取り込まれた $Y_2O_3:Eu$ ナノ蛍光体の STEM 像と CL 像の同時取得に成功した。さらに、より高い空間分解能での CL イメージングを目指して、直径約 10~20 nm の $NaGdF_4:Eu$ ナノ蛍光体の合成を行い、STEM 像と CL 像を取得することに成功した。

低加速 STEM-CL 相関バイオイメージング法のコンセプトとバイオイメージング結果

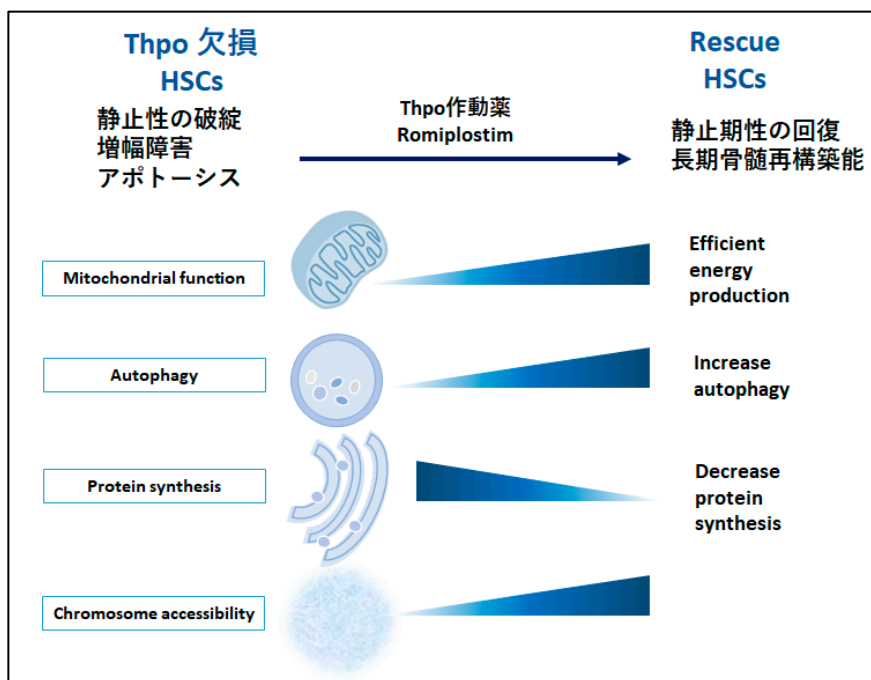


【目的】 造血幹細胞 (hematopoietic stem cell : HSC) の分化・増殖により一生に渡り生体の成熟血球が供給される。健全な造血システムにおいて、HSC はストレス造血時などに備え、一定のプールが骨髄中で細胞周期静止期の状態で維持される。生体内で産生されるサイトカイン、Thrombopoietin (Thpo) は骨髄 HSC の静止期維持及び分化・増殖の双方に関与しているが、その詳細なメカニズムや制御機構は不明な点が多い。本研究は、Thpo によるエネルギー代謝制御に焦点を当て、ミトコンドリアの恒常性による HSC の骨髄内での細胞周期静止期の維持制御機構を解析することを目的とした。

【方法】 Thpo による静止期 HSC の誘導機構及び mitochondria 代謝能との関連性並びに *Thpo* 欠損下で生存する HSC をさらに詳細に解析した。*Thpo* 遺伝子欠損マウスに Romiplostim を投与し、HSC 及び mitochondria 機能の詳細な解析を行った。また、Mitochondria を可視化できる Mito-Dendra2 マウスを *Thpo* 欠損マウスと交配させ、mitochondria の形態解析を行った。また、autophagy や mitochondria turnover による mitochondria 機能変化、mitochondria 代謝の活性化・抑制について遺伝子発現解析などから検証した。また、*Thpo* 遺伝子欠損マウスと正常マウスより HSC を分離し、RNA sequencing、ATAC sequencing 解析を行い、遺伝子発現と epigenetic 制御解析を行った。さらに、*Thpo* 遺伝子欠損マウスに recombinant Thpo 又は Thpo 受容体 agonist (Romiplostim) を投与し *Thpo* 欠損状況で変動のある遺伝子などを抽出し、その機能解析をさらに行った。

【結果】 *Thpo* 遺伝子欠損マウスと野生型マウスの HSC の増殖性・数・分化などの変化より、*Thpo* 遺伝子欠損マウスでは Romiplostim の連続投与により静止性の高い HSC の増幅が認められた。RNA sequence 解析にて、*Thpo* 遺伝子欠損マウスでは野生型マウスに比較し、HSC における mitochondria 代謝関連遺伝子群の有意な変動が認められた。Mitochondria の機能及び形態の詳細な解析では *Thpo* 遺伝子欠損マウスの HSC では mitochondria 体積量の減少、ROS 産生の上昇、ATP 産生低下が有意に認められ、これらは Romiplostim の連続投与により改善を認めた。Thpo シグナル及び mitochondria 代謝が HSC の細胞周期静止期の維持に貢献し、造血システムの維持に重要である。

サイトカイン Thpo を介した HSC 代謝変動による幹細胞能の維持機構

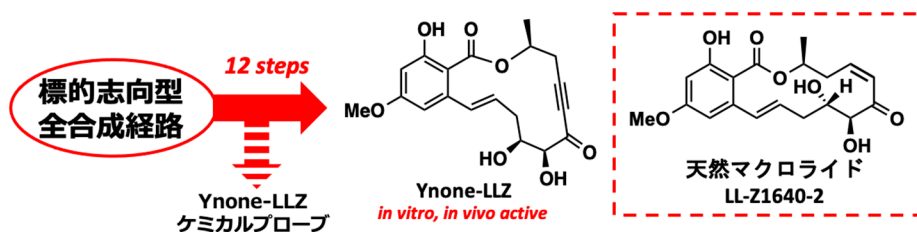


【目的】 超高齢社会を迎えた日本にとって、加齢により罹患リスクの高まる疾患の克服は急務の課題である。特に、骨に損傷を伴う疾患は、高齢罹患者の治癒実績が低く、患者の QOL を著しく低下させるだけでなく、周囲への影響も甚大である。このため骨喪失疾患治療薬の開発は今後ますます重要となる。骨喪失を伴い、かつ治癒実績の低い悪性腫瘍として多発性骨髄腫がある。本疾患は形質細胞ががん化することで免疫異常を含む様々な症状を呈するが、骨破壊性病変の形成が特徴的である。筆者らは多発性骨髄腫の克服を目指す中で、天然マクロライド LL-Z1640-2 が多発性骨髄腫に対して顕著な治癒効果を示すことを明らかとした。そこで、本化合物を鋳型として多重結合異性体ライブラリーを構築し、骨髄腫細胞を用いた細胞傷害活性を評価した結果、LL-Z1640-2 のファーマコフォアを *cis*-enone から *ynone* へと変換した新規化合物 Ynone-LLZ が有望な生物活性を有することを見出した。本化合物は *in vitro*、*in vivo* ともに有効ではあるものの、その作用メカニズムは親化合物である LL-Z1640-2 とは全く異なることが示唆された。そこで、Ynone-LLZ のケミカルプローブを作製し、pull-down アッセイにより生体内作用標的分子を明らかとすることを計画した。

【方法】 ケミカルプローブには、タンパク精製等に必要アルキルタグを導入する必要がある。そこで、Ynone-LLZ の供給に利用してきた「多様性志向型全合成経路」によるケミカルプローブ合成と、選択的に Ynone-LLZ を合成するための「標的志向型全合成経路」の開発を行った。

【結果】 これまでに開発してきた「多様性志向型全合成経路」の利用を試みたが、鍵反応である閉環メタセシス反応では望まない立体化学を有する化合物しか得られず、Ynone-LLZ のケミカルプローブを合成することはできなかった。そこで、分子内に含まれる二重結合の幾何異性を完全に制御できる「標的志向型全合成経路」を新たに開発することとした。分子間 Heck 反応を鍵反応に用いて市販化合物から数工程で合成したユニット同士の連結を試みたところ、高収率で目的の幾何異性を有するカップリング生成物を得ることができた。さらに、分子内光延反応を活用することで 14 員環マクロライド骨格を構築し、Ynone-LLZ の初の選択的合成経路を確立することに成功した。

Ynone-LLZ ケミカルプローブ合成に向けた標的志向型全合成経路の開発



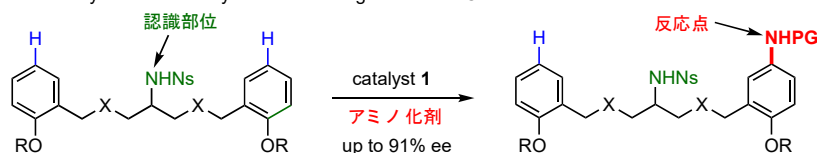
【目的】 C-H 結合官能基化は、化合物の高付加価値化や Late-Stage Functionalization を可能にする。しかし、通常有機化合物は反応性の類似した C-H 結合を複数有するため、位置・化学・立体選択性の制御が本領域の当面の課題であった。これまでに、反応点近傍の配向基による制御、基質本来の反応性に準拠した制御が検討されてきたが、これら手法では適用可能な基質・反応点が大きく制限される。そこで本研究では、反応点から遠隔位の分子認識に基づく選択的 C-H 結合官能基化反応の開発を目指した。特に、制御の難しい配座自由度の高い化合物の遠隔位認識に焦点を当て、自在に反応を操ることを究極の目標とする精密有機合成化学の深化を目指した。

【方法】 自由度の高い分子に対する選択性制御を困難にしている主要原因として、1. 認識されていない基質に対する非選択的反応、2. 基質が種々の配座を取りうる事による選択性の低下が挙げられる。これらの解決には、遠隔位の官能基認識と基質の配座制御の双方を達成する必要があると考えた。本研究では酵素のように活性部位近傍に立体的・電子的に制御された“ポケット”を有する触媒を開発することで上記達成を目指した。

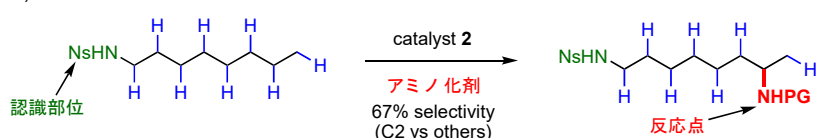
【結果】 柔軟な化合物の遠隔位認識に優れるピロメリット酸ジイミド構造を有する新規不斉 Rh(II)二核錯体 **1** の開発に至った。錯体 **1** を用いて C-H 官能基化反応を行うと、プロキラルな長鎖 1,7-ビスアレーンに対し位置および化学選択的不斉 C-H アミノ化による非対称化が進行し、キラルな化合物が高い不斉収率で得られた (下図 a)。本反応では、非酵素法では前例のない距離である反応点から 6 結合遠隔位の立体環境が明確に識別される。また、同じくビスイミド構造を有する錯体 **2** を用いることで、直鎖化合物の位置選択的 C-H 結合官能基化が進行することを見出した (下図 b)。さらに、本反応を超分子の不斉合成に適用した結果、アキラルロタキサンの非対称化が進行し機械的平面不斉を有するロタキサンが得られた (下図 c)。本反応によりロタキサンの複雑性を上昇させながら一挙に機械的平面不斉を構築することが可能になった。以上のように、本研究の遂行により有機化学の未解決課題であった遠隔位不斉非対称化・遠隔位認識による C-H 結合官能基化の選択性制御・超分子の不斉合成を達成できた。

新規不斉 Rh(II)二核錯体を用いた遠隔位認識に基づく選択的 C-H 官能基化

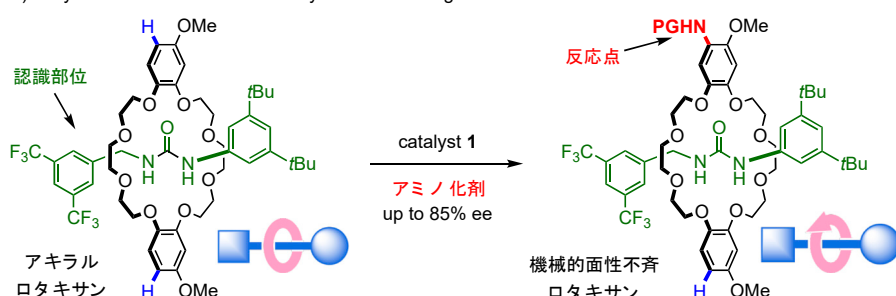
a) remote desymmetrization by chemo- and regio-selective C-H amination



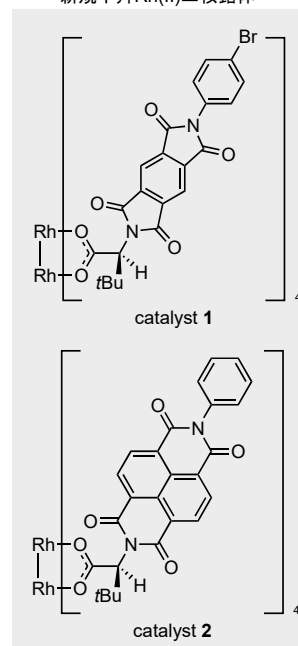
b) remote site-selective C-H amination



c) desymmetrization of a rotaxane by chemo- and regio-selective C-H amination



新規不斉 Rh(II)二核錯体

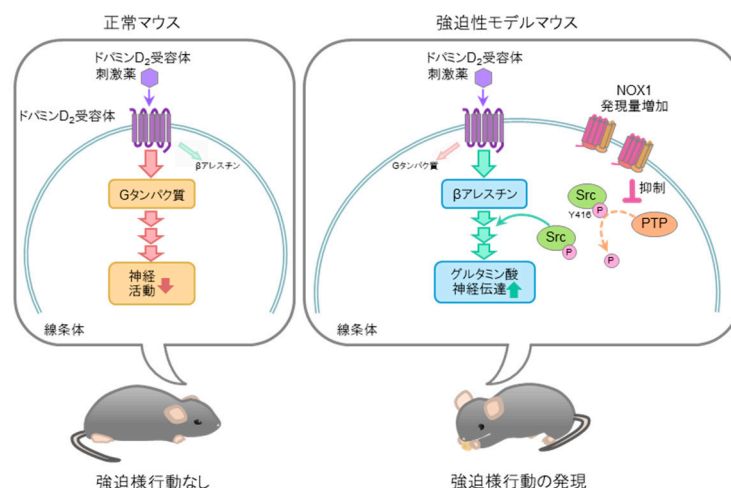


【目的】 アルコール依存症は、飲酒行動に対して自己コントロールが失われた状態と定義され、アルコール過量摂取による中毒症状のみならず、高血圧、糖尿病、認知症などの多種多様な生活習慣病発症の深刻なリスク因子となる。しかし、アルコール依存症の直接的な治療薬は存在せず、認知行動療法などの心理社会的治療が一般的であるが再発率は非常に高く、有効な治療法の開発が切望されている。こうした、治療の困難さや再発率の高さには精神依存の形成が関与しており、飲酒をやめたくても自らの意志では止めることができない、『強迫性』はその主要な要素となっている。強迫性の発現には、ドパミン神経系、特に、ドパミン D₂ 受容体のシグナル異常の関与が示唆されているが、ドパミンシグナル異常が強迫性を引き起こすメカニズムは依然として未解明である。一方で、我々は活性酸素産生酵素の1種である NADPH オキシダーゼ 1 (NOX1) が様々な神経機能異常に関与することを報告してきた。中枢神経系においても、ドパミンシグナルの異常が関与するうつ病の病態モデル動物において、NOX1 の発現亢進が快情動の消失などのうつ病様症状の発現に寄与していることを報告していることから、NOX1 はドパミン神経系の異常に起因するその他の中枢神経症状の発現にも関与することが示唆される。そこで、本研究では、アルコール依存症をはじめ、強迫性を呈する疾患に共通するドパミン D₂ 受容体のシグナル異常を模した、独自の強迫性モデルマウスを用いて、強迫症状が発現する神経メカニズム、および NOX1 の関与について、検討を行った。

【方法】 強迫性モデルマウスは、マウスにドパミン D₂ 受容体のアゴニストである quinpirole (1 mg/kg) を毎日腹腔内投与することによって作製し、7~12 回の投与を受けたマウスを強迫性モデルマウスとして実験に使用した。強迫性は飼育ケージにおける自発的行動や T 字迷路を用いた逆転学習試験により評価した。電気生理学的検討には、quinpirole を 8 回投与したマウスを用い、最後の投与の翌日に、線条体や眼窩前頭皮質を含む急性単離切片を作製して whole-cell patch-clamp 法による記録を行った。

【結果】 *Nox1* ノックアウトマウスや NOX1 阻害薬の急性投与により、quinpirole 反復投与による強迫様行動が有意に減弱した。また、強迫性モデルマウス線条体中央部において、*Nox1* 遺伝子の有意な発現上昇が認められた。電気生理学的検討から、強迫性モデルマウスでは、D₂ 受容体刺激時に線条体中央部の間接路中型有棘神経において、興奮性シナプスの長期増強が引き起こされており、この現象には、NOX1、およびβアレスチンを介したシグナルが関与することを見出した。以上の結果から、*Nox1* 発現上昇に起因する、線条体におけるドパミンシグナル異常が依存症における強迫性発現に関与することが明らかとなり、アルコール依存症を始めとする様々な依存症への新規治療標的として NOX1 が有望である可能性が示唆された。

研究成果の概念図

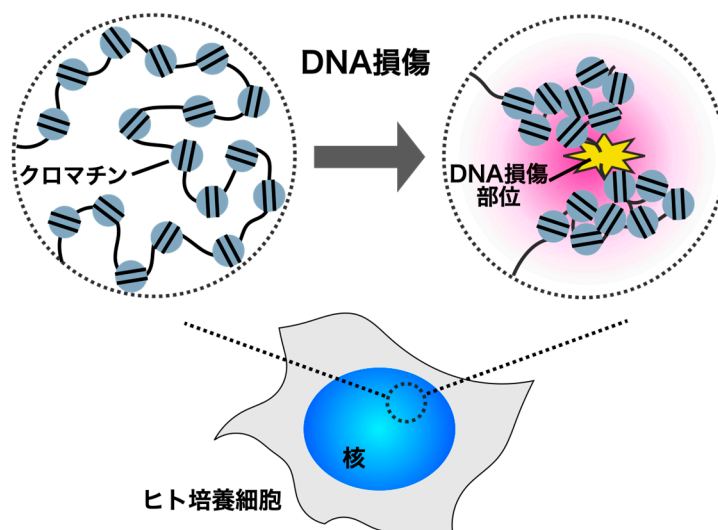


【目的】 がんの発生・進展の要因の1つとして、ゲノムの安定化の維持を担うDNA損傷修復の機能の脆弱化が挙げられる。実際に、がん細胞でDNA損傷が相当に蓄積していることが、がんの全ゲノム解析によりわかってきた。しかしながら、DNA損傷修復に関与するタンパク質やシグナル分子が、いかにDNA損傷修復という生化学的な反応を適正にそして効率的に進めていくのか、関連分子の空間的な制御や、ポリマーとしての物性を持つクロマチンの動態はほとんど明らかとなっていない。そのため、DNA損傷修復のメカニズムに沿った理解は立ち遅れた状況にあり、なぜがんでDNA損傷が蓄積するのかといった、がんのゲノムの不安定性の本質的な理解には未だ至っていない。そこで本研究では、適正なDNA損傷修復反応がいかに制御されているのか、その局所に作り出される微小環境についての理解を目指し、DNA損傷に伴ってクロマチンにいかなる構造変換が誘導されるのかを解析する。

【方法】 ヒトの正常2倍体細胞であるhTERT-RPE1を用いて、DNA損傷に伴ってクロマチンに集合する53BP1タンパク質の動態を解析し、DNA損傷によりクロマチンの構造変換が誘導されるタイミングを検討した。続いて、標的クロマチン全域を蛍光標識するOligopaint DNA-FISH法を立ち上げ、クロマチンの体積を定量的に解析する系を構築した。そして、UV照射によりCas9の活性を誘導しDNA二本鎖切断を導入できる細胞系であるvery fast CRISPR (vfCRISPR)法を用いて、DNA損傷を導入し、標的としたクロマチンの構造変換を定量的に解析した。

【結果】 53BP1は、DNA損傷を誘導するとDNA損傷のマーカーであるリン酸化ヒストンH2AX (γ H2AX)が豊富な損傷クロマチンの局所に集合した。その53BP1の集合体は、損傷の導入から3分後には小さな円形をしていたが、30分後にはフィラメント状に形を変え、120分後には γ H2AXで標識された損傷クロマチンを取り囲むように観察された。53BP1はクロマチンに結合する性質を持つことから、53BP1集合体の形の変化はクロマチンの構造変化を反映していると考えられ、損傷を受けたクロマチンは時間経過とともに構造変換することが示唆された。そこで、vfCRISPR法によりDNA損傷を誘導し、その30分後にOligopaint DNA-FISH法を用いて標的クロマチンを可視化し解析すると、損傷クロマチンは顕著に凝縮して観察された。この観察より、DNA損傷を受けたクロマチンは顕著に凝縮することが明らかとなった。クロマチンはDNA損傷に伴ってダイナミックにその構造を再編成し、DNA損傷の修復反応を進める場を作り出していると考えられる。

DNA損傷に誘導されるクロマチン構造変換



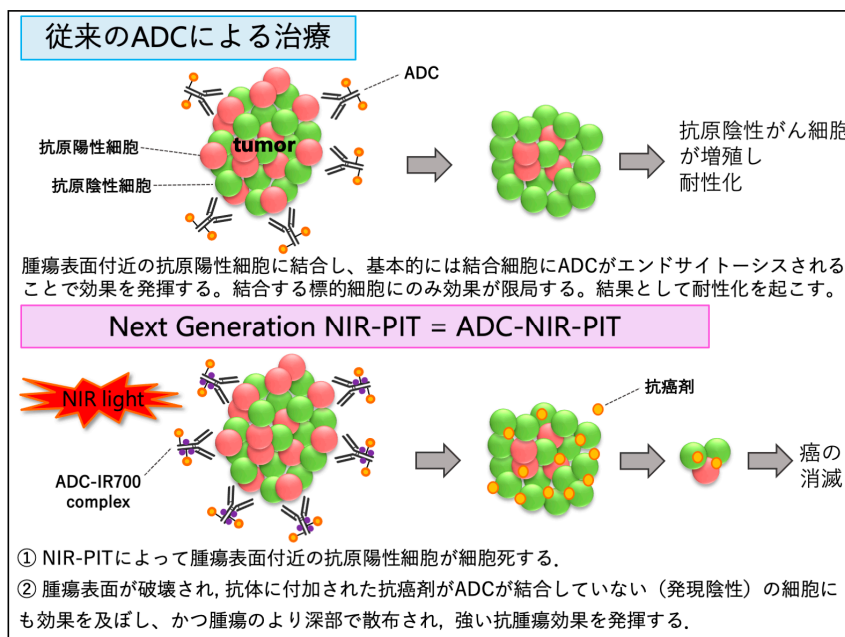
231 抗体薬物複合体を用いた新規光治療開発研究	佐藤 和秀
--------------------------	-------

【目的】 抗体医薬の中には抗体と低分子医薬品を結合させ効果を高めるコンセプトで開発された抗体薬物複合体 (ADC) がある。近年、癌治療で注目を集めており、今後の標的癌治療として期待されている。しかしながら、固形腫瘍の不均一性 (heterogeneity) のため、腫瘍内のターゲット分子の発現量が一定ではないことから、ADC の効果に腫瘍内でばらつきができてしまい、再発・抵抗性に繋がってしまうという問題があった。そこで、本開発研究では、臨床認可を受けている ADC に光感受性物質である IRDye700DX (IR700) を付加し、近赤外照射によって結合した標的細胞は近赤外光線免疫療法で破壊し、その近傍の ADC が結合しなかった癌細胞を光遊離した抗癌剤が破壊する新規の光ドラッグリリースがん根治概念を樹立する。

【方法】 臨床で既に用いられている TDM1 (カドサイラ) に IR700 を付加し、抗原陽性細胞と陰性細胞を混ぜたモデルでその効果を *in vitro* と *in vivo* で検討した。抗原陰性細胞への細胞死効果をイメージングで計測するために、luciferase を遺伝子導入しモニターできるように実験系を組んだ。

【結果】 TDM1-IR700 を作製し、*in vitro* のミックスカルチャーでターゲットする細胞のみならず、非ターゲット細胞も細胞死に至らしめることを確認した。本治療概念は、ADC を用いたがん治療の新しい展開をしめすものであり、光による ADC の効果増強法として画期的なものであると考えられた。

従来の ADC の問題点と本研究のねらい



【目的】 肝再生医療や薬剤代謝予測アッセイ技術を確立するため、培養肝組織体を利用した技術が期待されている。培養した肝細胞組織体に血管網を付与する多くの研究が進められているものの、肝毛細胆管（肝細胞間に構築）から胆汁を排泄する肝内胆管の再構築はほとんど報告されていない。管腔構造を有する培養胆管は、一般的に胆管上皮細胞や肝前駆細胞をコラーゲンゲル等に包埋して形成させるため、肝細胞と接着できない。そこで、平板上で胆管形成できる Chemically-induced Liver Progenitor (CLiP：初代肝細胞を低分子化合物でリプログラミングした肝前駆細胞) に着目した。本研究では、CLiP 由来胆管作製と多孔質フィルム（ハニカムフィルム）を組み合わせ、機能性胆管ネットワークを簡便かつ高密度に作製する技術を確立するとともに、肝毛細胆管と胆管を接合させることを目的とする。

【方法】 ラット初代肝細胞を 0.25 、 1.0 、 5.0×10^4 cells/cm² で 12 日間培養してラット CLiP を作製した（それぞれ rCLiP-0.25、rCLiP-1.0、rCLiP-5.0）。コラーゲンコートディッシュに MEF を 5.3×10^4 cells/cm² で 1 日間培養した後、ラット CLiP を 1.3×10^5 cells/cm² で播種した。また、細胞足場（ハニカムフィルム）が胆管形成に及ぼす影響を評価するため、ポリ乳酸製のハニカムフィルム（ $\phi 25 \sim 30 \mu\text{m}$ ）にコラーゲンをコーティングし、MEF を 1.1×10^5 cells/cm² で 1 日間培養した後、ラット CLiP を 2.6×10^5 cells/cm² で播種した。2%マトリゲルを含む mTeSR1 培地で胆管上皮細胞へ 12 日間分化誘導した。生細胞トレーシング蛍光試薬（Cell Tracker）による管腔構造解析、遺伝子発現解析による特徴付けにより、CLiP 作製条件やハニカムフィルムが胆管誘導に及ぼす影響を評価した。胆管を誘導した後、ラット初代肝細胞を 3 日間共培養した。胆汁酸類似蛍光試薬（Choly-lysyl-fluorescein：CLF）を反応させ、肝細胞から取り込んだ CLF が培養胆管に排泄されるかを評価した。また、細胞骨格等の蛍光染色によって、立体構造を評価した。

【結果】 MEF を利用することによって胆管形成効率が向上したが、MEF や CLiP の播種密度を高くしても形成効率の向上は見られなかった。一方、rCLiP-5.0 を利用した場合、胆管の形成数が向上した。CLiP 作製時の肝細胞密度が高いほど、肝成熟マーカー（*Alb* 等）や肝前駆細胞マーカー（*Afp* 等）の発現が抑制され、胆管マーカー（*Aqp*、*Cfr* 等）の発現は同等に見られた。ハニカムフィルムでは、コラーゲンコートディッシュと比較して遺伝子発現に顕著な違いは見られなかった。rCLiP-5.0 から誘導した培養胆管の一部で、CLF の管腔への蓄積が見られた。肝細胞と共培養すると、CLF の蓄積は広範囲で認められた。ハニカムフィルムで肝細胞を共培養すると、高頻度で CLF の蓄積が見られた。ハニカムフィルムの物理的な仕切りが培養胆管と肝細胞との接触機会を増加させ、効率的な胆管-肝毛細胆管接合が促進したと考えられる。

CLiP 由来胆管とハニカムフィルムを組み合わせた機能性胆管ネットワーク

