

1 低侵襲「光」ドラッグデリバリー研究

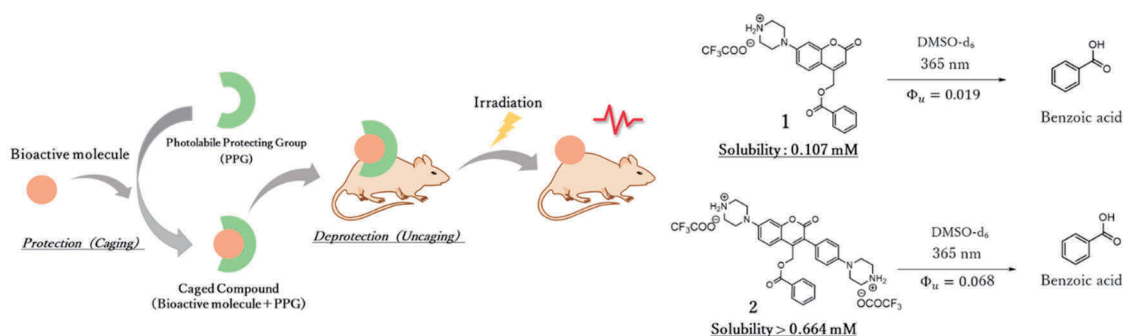
安倍 学

【目的】 生物活性物質の活性部位を光解離性保護基 (PPG) で保護 (ケーシング) し、一時的に生物不活性となった化合物はケージド化合物と呼ばれる。ケージド化合物は中性・無試薬条件下で生物活性物質を時空間的に制御することができ、光照射による脱保護 (アンケーシング) によってその活性を再生できる。神経伝達物質などをケーシングすることで、生物活性物質の機能発現のメカニズムの解明や、ドラッグデリバリー、神経科学、薬理学などの医療分野での応用が期待されている。本研究では新規ケージド化合物 **1** と **2** の合成、光反応性と水溶性の調査することにした。

【方法】 7-hydroxy-4-methylcoumarin を出発物として、目的化合物となる **1** と **2** の合成に取り組んだ。目的化合物 **1** は 7 ステップ・全収率 20% で合成を達成した。また、目的化合物 **2** は 10 ステップ・全収率 1.7% で合成を達成した。合成した化合物 **1** および **2** が光照射により安息香酸を放出するか否かの光反応性を ^1H NMR スペクトルにより追跡した。その結果、化合物 **1** および **2** が CD_3OD および DMSO-d_6 中でケージド化合物として機能することを確認した。水溶液中において発色団 **1** および **2** がプロトン化する際に、本研究で新たに導入したピペラジン部位の 2 つの窒素原子のうち、どちらの窒素に優先的にプロトン化するかを pH 効果の評価により決定した。まず、対照実験として窒素原子を一つしか保持していない DEACM で測定を行ったところ、1M HCl 溶液を加えた酸性条件下で溶液中のプロトン数が多くなるにつれ、吸収が明らかに減衰していき短波長シフトが確認された。その後、1 M NaOH 溶液を加え塩基性条件とすると吸光度が復元され、中性条件下の吸光度と同等の吸収が見られた。発色団 **1** および **2** のサンプルで同様の実験を行ったところ、DEACM に比べ pH の影響をほとんど受けず吸収を保ったままであった。なお、DEACM、発色団 **1** および **2** は pH の値により可逆的に変化した。強酸性または強塩基性条件下では数時間で吸収が減衰し分解している様子が確認できた。各発色団の電子供与性置換基のアミノ基がプロトン化された状態の量子化学計算を行い、プロトン化されたピペラジンおよびジエチルアミノ基の電子供与性を調査した。DEACM はアミノ基がプロトン化されるとクマリン骨格に対してほぼ直角となる様子が算出された。また、プロトン化された発色団では HOMO-LUMO における電子遷移がほとんど見られなかった。これにより窒素原子のプロトン化による電子供与性の喪失が示唆された。一方で発色団 **1** および **2** は末端のアミノ基がプロトン化された後もピペラジン基とクマリン骨格の傾きは大きく変化せず、電子供与性が保たれている様子が示唆され、HOMO-LUMO における電子遷移の様子も確認された。分子末端ではなくクマリン骨格側のアミノ基がプロトン化された場合、DEACM と同様にピペラジン基がクマリン骨格に対してほぼ垂直となるような構造となり、電子供与性の喪失が示唆された。

【結果】 本研究ではクマリン型光解離性保護基に新たにピペラジン基を導入し光反応性と水溶性の両立を目指して、新規ケージド化合物 **1** および **2** の設計・合成・物性調査に取り組んだ。ケージド化合物 **1** および **2** は 365 nm の光照射により安息香酸の効率的かつ効果的なアンケーシング反応を示した一方で、生理学実験に十分に应用可能な水溶性も有ることが分かった。今後の展望として、ケージド化合物 **1** および **2** の二光子アンケーシング反応を行い、二光子吸収特性を評価する。

光解離性保護基を用いるケーシングとアンケーシングによる光ドラッグデリバリー概念図と本研究の結果



2 新規な認知機能改善薬探索のための分子設計法の開発

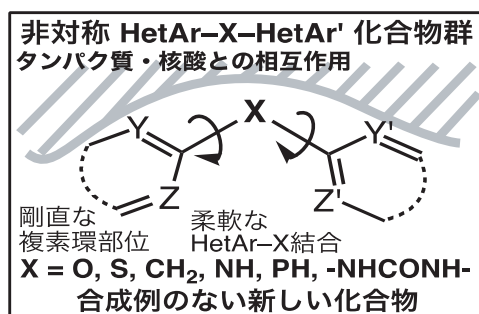
有澤 美枝子

【目的】 人類の健康増進に深く関係する医薬品等の生物活性物質の開発や、医療を支える機能性材料のための物質供給法の開発が求められている。特に認知症は、認知機能障害を主症状とする疾患であり、2050年に全世界の認知症患者数は1億3千人を超えると推計されている。そのため、脳疾患とその進行に伴い発症する多岐に渡る周辺症状に应答できる医薬品が切望されている。ところで合成医薬品の開発では、高度で精密な生物機能の発現と調節の観点から、窒素・酸素・イオウ・リン等のヘテロ hi 原子を空間的に適切な位置に導入した複素環化合物が広く用いられている。ここでは、炭素で形成される分子骨格の適切な位置にヘテロ原子を配置する分子設計法と有機合成法が重要である。特にヒット化合物からリード化合物を探索する方法として 1) 優れた活性と物性、2) 特許性の観点から新規構造化合物の取得、3) 系統的で多様な誘導体合成、4) 短段階大量供給が可能であること等を満たす展開可能基本構造の設計が重要であると考えた。本研究では、展開可能基本構造として、多様な活性化合物を系統的かつ効率的に合成する目的で、生体親和性が極めて高い非対称ビス複素環 HetAr-X-HetAr' 構造に着目する。ここでは、候補薬剤が脳内で薬効を発現するために、血液と脳を隔てる血液脳関門 (Blood Brain Barrier : BBB) と呼ばれる脳特有のバリア機構を透過する必要がある。従って、脳疾患改善薬の開発研究では、新規な分子設計および分子骨格を有し適切な薬効を発現する薬剤の開発と、BBB 透過性を有することが重要になる。

【方法】 既存の医薬品の privileged structure として、ジフェニルメタン構造 Ar-CH₂-Ar' が汎用されている。この芳香環 Ar 基は剛直な構造であり、一方でリンカー部の sp² C-sp³C 結合が自由回転して擬ヘリックス構造を含む多様なコンフォメーションをとる。従って、分子のコンフォメーションを変化させて、タンパク質や核酸のような生体高分子の表面構造に合わせて特異的に結合して生物活性を発現すると考えた。この考えに基づき、Ar 基を複素環 HetAr 基で置換した非対称ビス複素環 HetAr-X-HetAr' 化合物は、多様な生物活性の発現に利用できると期待した。本研究では、脳疾患改善効果を有する新規化合物の創生を志向して、ロジウム触媒を用いる複素環交換反応を開発して、本方法で得られる新規物質の機能評価を行うことにした。加えて、複素環と同様にヘテロ元素を多数含有する生体親和性の高い構造として、ペプチド誘導体に着目した新しい化学修飾法の実施した。

【結果】 非対称 HetAr-X-HetAr' 化合物の効率的な合成法として、ロジウム触媒を利用した非対称複素環ウレア HetAr-NHCONH-HetAr' 化合物の新規合成法を開発した。次いで、一方の複素環をステロイド骨格に置換した非対称複素環ステロイド Steroid-X-HetAr 誘導体の合成法を確立した。加えて、高次構造を損なうことなく機能を付与する化学修飾法として、無保護ペプチド中のシスチン S-S 結合に直接官能基を挿入するロジウム触媒的な化学修飾法を開発した。これらの合成法を利用すると多数の新規化合物を簡便に提供できるので、系統的な生物活性評価が可能である。実際に本手法で合成した新規化合物を用いて脳機能改善効果を評価した結果、*in vivo* で活性を示す新規構造の化合物を見出した。これらの成果をまとめて特許出願した。

非対称ビス複素環化合物群 HetAr-X-HetAr' の合成と生物活性

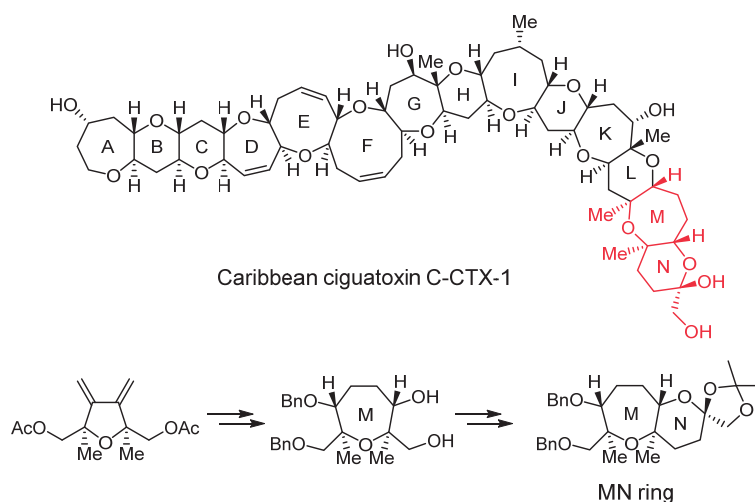


【目的】 カリビアンシガトキシン C-CTX-1 (C-CTX-1) は、カリブ海沿岸に生息する魚介類によって発生する食中毒シガテラの原因毒である。マウスに対し腹腔内投与で LD_{50} 値 $3.6 \mu\text{g}/\text{kg}$ と強い毒性を示す。C-CTX-1 の構造決定は Lewis らによって行われ、アセタールを含む 14 個のエーテル環および 31 個の不斉中心を有する分子量 1,140 の梯子状ポリエーテルであることが明らかとなった。食中毒の原因となる汚染された魚介類の毒素を特定するためには、C-CTX-1 の標品が不可欠であるが、天然からの供給量が限られていることが問題になっており、全合成による供給が世界的に望まれている。また、汚染された魚介類の識別法の開発や、食中毒の治療法の開発のためには、C-CTX-1 に対する抗体の調製が社会的に望まれている。本研究では、抗体調製に必要な部分構造として C-CTX-1 の MN 環部の合成を検討した。

【方法】 C-CTX-1 の N 環部は、Horner–Wadsworth–Emmons (HWE) 反応およびアセタール化を経由して構築することにし、M 環部はメソ体のテトラオールに対する非対称化反応により合成する計画を立てた。*trans*、*syn*、*trans*-構造を有するテトラオールは β -ヒドロキシケトンからジアステレオ選択的還元を行うことで、その前駆体であるジケトンはシクロブテンからオレフィンの酸化開裂を経由する環拡大反応によって、シクロブテンは文献既知の *exo*-ジエンから光電子環状反応によって得ることとした。

【結果】 文献を参考に合成した *exo*-ジエンに対してフローリアクターを用いた光反応を行った。すなわち、*exo*-ジエンのヘキサン溶液 (0.02 M) を窓枠が石英ガラスでできた光フローリアクター (Photo Flow System T-1) に 5.0 mL/h で流し込みながら低圧水銀灯 (10 W×4) を照射し、流出液を濃縮することでシクロブテンを高純度で得た。得られたシクロブテンに対しオゾン分解による環拡大を行うことでジケトンへと変換した。さらに、アセチル基の除去を塩基性固体触媒 (Dowex1×4, MeO⁻ form) を用いたフロー条件で行うことで、高極性化合物である生成物を効率的に得ることができた。得られた β -ヒドロキシケトンに対して Saksena–Evans 還元を行うことで、*trans*、*syn*、*trans*-テトラオールを単一のジアステレオマーとして得た。さらに、テトラオールに対し L-カンファ-誘導体を用いたアセタール化を行うと、非対称化が高ジアステレオ選択的に進行し、モノアセタールを単一のジアステレオマーとして得ることに成功した。なお、生成物の絶対配置は *p*-プロモベンゾエート変換した後、X 線結晶構造解析により決定した。ジオールをベンジルエーテルに変換後、アセタールの加水分解を行うことで M 環部に相当する光学活性ジオールへと変換した。さらに、M 環部から Swern 酸化によるアルデヒドへの変換、HWE 反応によって得られたエノンの 1,4-還元、およびアセタール化を経由することで、カリビアンシガトキシン C-CTX-1 の MN 環部の合成に成功した。

カリビアンシガトキシン C-CTX-1 の MN 環部の合成

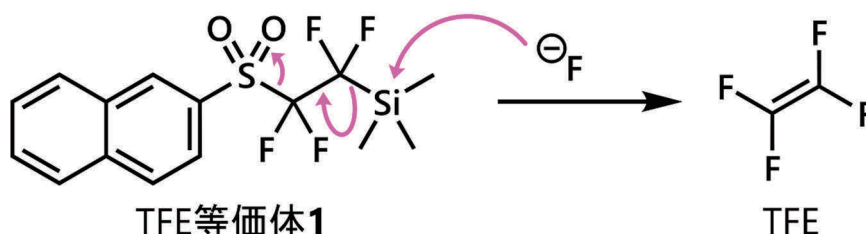


【目的】有機フッ素官能基の導入は医薬品の性質向上の常とう手段である。新たな有機フッ素官能基の候補としてトリフルオロビニル基が挙げられる。我々はこれまで、テトラフルオロエチレン (TFE) を用いたトリフルオロビニル化合物の合成法を開発してきた。しかし、TFE は毒性や爆発性を有する気体であり、一般的な有機化学の研究室で取り扱うことはできない。そこで、本研究では創薬分野にて簡便に使用できるトリフルオロビニル基導入試薬を、安価で安定供給されている TFE から製造する技術開発に取り組んだ。

【方法】我々はこれまで、Mg および ZnCl₂ を用いた TFE の還元的な脱フッ素メタル化反応の開発に成功している。この反応で得られるトリフルオロビニル亜鉛試薬は様々なトリフルオロビニル化合物の前駆体となることが示されたが、通常の有機亜鉛試薬同様、空気・水に極めて不安定であり、また定量が煩雑など、創薬分野で使いやすい試薬といえる状況ではなかった。そこで、より安定なトリフルオロビニルシランの合成を検討した。しかし、これらの検討ではあまり芳しい結果は得られなかった。そこで、TFE を反応系中にて発生させることができる分子の開発に切り替えることとした。図の化合物 1 はフッ化物イオンの作用によりフルオロシランおよびスルフィン酸塩の脱離を伴いながら TFE を発生させると期待した。また、この分子を利用したワンポットでのテトラフルオロエチレン化反応の開発に着手した。

【結果】方法でも述べた通り、トリフルオロビニルシランの合成はあまり芳しい結果が得られなかった。合成自体は可能であったものの、反応性が低く、トリフルオロビニル化剤としての性能は低かった。一方、TFE 等価体 1 の合成には成功した。この分子はフッ化物イオンを作用させると TFE を発生させることができる。また、発生した TFE からワンポットでフルオロアルキル銅錯体が合成できることも見出した。この錯体はトリフルオロビニル化合物をはじめ、様々なフッ素化合物の原料となりうることを示した。

TFE 等価体 1 の構造、合成および利用



■ *In-situ generation of TFE*

■ *Shelf stable precursor*

■ *Rapid TFE generation with F⁻*

5 哺乳類の適応進化に関わる神経毒ペプチドの機能解明

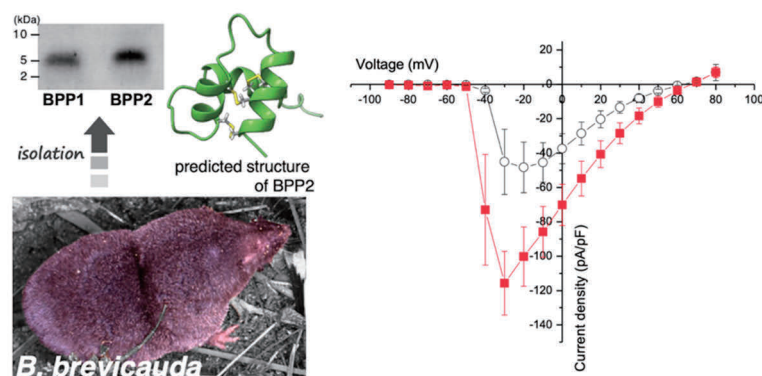
北 将樹

【目的】 北米に生息するブラリナトガリネズミ *Blarina brevicauda* は哺乳類の中でも特に強い毒を持ち、その唾液にはプロテアーゼ毒 *blarina toxin* だけでなく、獲物を瞬時に麻痺させる強力な神経毒が含まれることが、長年の生態観察から予想されてきた。著者はこれまでに、ミールワーム麻痺活性を指標に用いて、この動物の顎下腺から神経毒ペプチド BPP (Blarina paralytic peptide) 1, 2 を単離し、酵素消化と MS/MS 解析によりそれらの全アミノ酸配列を推定した。BPP 類はヒトのオピオイドペプチドの前駆体 synenkephalin (SYN) の一部と高い相同性を示すが、オピオイドペプチド自体の配列は含まれず、哺乳類に普遍的な SYN の生理活性も不明である。このように、ヒトでは脳内で分泌され鎮痛に関わるペプチドホルモンの前駆体部分が、トガリネズミでは唾液とともに顎下腺から分泌され獲物を捕獲する麻痺物質として機能することは、生態学および進化学の観点からも非常に興味深い。このような背景から、哺乳類の適応進化に関わる神経毒ペプチドの構造と機能の解明を目指して本研究を実施した。

【方法】 ペプチド固相法により C 末端にアシルヒドラジドを持つ 1~22 セグメントと N 末端に遊離の Cys 残基を持つ 23~52 セグメントをそれぞれ合成し、native chemical ligation (NCL) 法で連結して、保護基を除去、次いで cystine /cysteine を用いた酸化・還元平衡条件によるフォールディングにより BPP2 を合成した。天然品 BPP2 との同一性は HPLC における保持時間の比較により、また BPP2 の立体構造は CD スペクトルの波形パターンを立体構造予測プログラム ColabFold で得た推定構造との比較により行った。合成品 BPP2 のジスルフィド結合様式は、段階的な還元と 2 種類の S-アルキル化剤による反応産物の MS/MS 解析により決定した。また電気生理学実験に関しては、Ca チャネルを発現させた HEK293 細胞を用いて、ホールセルパッチクランプ法により行った。

【結果】 ラット由来の SYN のジスルフィド結合様式は Cys (I) -Cys (IV) ,Cys (II) -Cys (V) ,Cys (III) -Cys (VI) (Type-I 型) と報告されていた。しかし ColabFold プログラムで BPP 類の立体構造を予測したところ、上記とは異なる Cys (I) -Cys (V) ,Cys (II) -Cys (IV) ,Cys (III) -Cys (VI) (Type-II 型) と示唆され、この両方の可能性を考慮して BPP2 の合成を進めた。全長で 52 アミノ酸残基からなる無保護ペプチドのフォールディングにより、BPP2 がほぼ単一の生成物として得られ、その HPLC 保持時間は天然品と一致した。さらに合成品の CD スペクトルの波形パターンや二次構造における α -ヘリックス構造の占有率は ColabFold プログラムで予測したものと良く一致した。さらに合成品を部分分解して解析した結果、天然品 BPP1, 2 のジスルフィド結合様式は ColabFold プログラムから予測された Type-II 型であると決定した。BPP2 は顕著なミールワーム麻痺活性 ($5.6 \mu\text{g/g body weight}$) を示し、また主に脳や心臓で発現し、心拍の形成や痛覚の伝達に関与するヒト T 型 Ca チャネル (hCa_v3.2) を $1.77 \mu\text{M}$ という低濃度で活性化し、その活性化閾値を約 10 mV 低下させることが分かった。hCa_v3.2 を活性化して膜電位の変化に対するチャネルの感度を高める化合物はこれまで報告はなく、今回見出した BPP2 の活性は新規性が高いと言える。

ブラリナトガリネズミ由来の麻痺性神経毒ペプチド BPP2 はヒト T 型 Ca チャネル hCa_v3.2 を活性化する



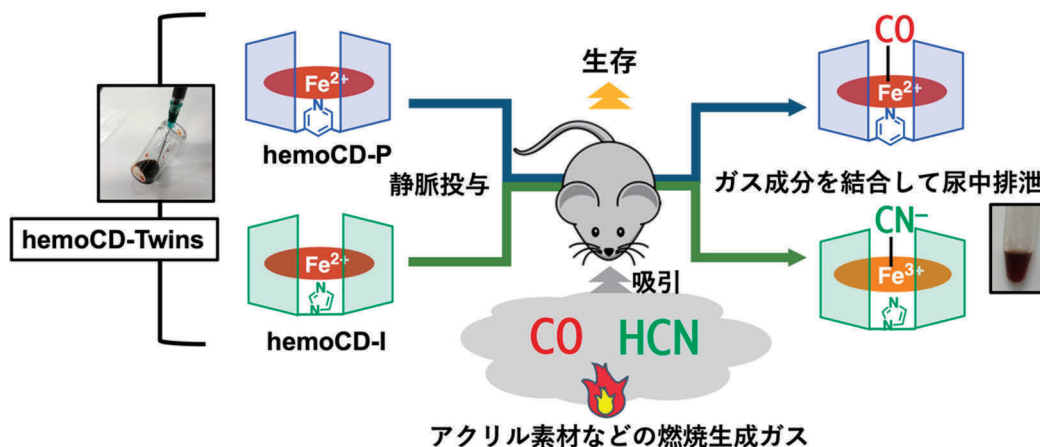
6 火災ガス有毒成分を体外除去する人工ヘモグロビン錯体	北岸 宏亮
------------------------------------	--------------

【目的】 火災において発生する一酸化炭素 (CO) は毒性ガスとして有名である。CO 中毒として多くの方が犠牲になっている。一方で建物火災ではアクリル等の燃焼によりシアン化水素 (HCN) も発生する。CO 中毒として死因が特定されているにも関わらず、血中 CO 濃度が低いケースもあり、HCN との同時中毒が疑われる。現在までに、CO 中毒をはじめとする火災ガス中毒を治療する方法は開発されていない。そのため現場において医療介入できずに亡くなってしまいう犠牲者が後を絶たない。我々はこれまでにポルフィリンとシクロデキストリンの2つの化合物を組み合わせ、人工ヘモグロビンモデル錯体 hemoCD を開発し、物性研究などを行ってきた。その際、生体内において CO を特異的に結合する hemoCD-P, HCN を特異的に結合する hemoCD-I という二種類の興味深い化合物を発見した。本研究では、これらを組み合わせた「hemoCD-Twins」というシステムを開発した。この hemoCD-Twins は、投与によって体内から CO と HCN を同時に除去できる薬剤であり、これまで治療薬のなかった火災ガス中毒に対するアンメット・メディカルニーズを満たすものである。本研究では、hemoCD-Twins の設計から薬効試験までを行ったので、その成果を報告する。

【方法】 hemoCD-Twins は、合成ポルフィリン錯体 (F) と二種類のシクロデキストリン二量体 (P および I) の粉末を混合し生理食塩水に溶解させ、還元剤である亜ジチオン酸ナトリウム (S) を加えることで調製した。この溶液をマウスおよびラットに投与することで、薬効試験を行った。

【結果】 hemoCD-Twins は予想どおり CO および HCN の両方を結合する性質を示した。CO/HCN 同時中毒マウスを作製し、そこへ hemoCD-Twins を投与すると、濃度依存的に生存率の向上が見られた。さらに CO/HCN 同時中毒ラットを用いて、血中濃度測定などの動態解析を行い、hemoCD-Twins の投与による CO および HCN の同時除去と、それによる血圧のすばやい回復を観測した。投与した hemoCD-Twins は、ガス成分を吸着したまま定量的に尿中排泄され、体内に残存しない薬剤であることが判明した。この薬剤は将来救急救命の現場で使用することを想定してデザインしており、それに最適な物性および薬物動態特性を示した。

火災で発生する CO/HCN の同時解毒システム hemoCD-Twins



7 O結合グリコシル化制御によるサルコペニア治療法開発

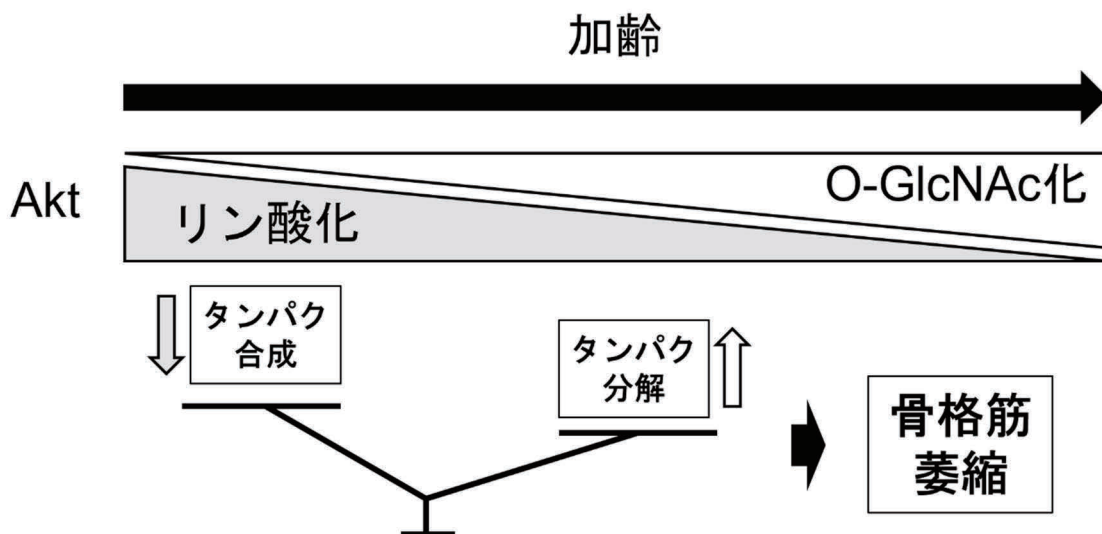
絹川 真太郎

【目的】 高齢社会において、加齢性サルコペニアの予防・治療法を開発することは極めて重要な研究課題である。サルコペニアの中心病態である骨格筋萎縮はタンパク合成と分解のバランスの破綻によってもたらされる。Akt リン酸化はタンパク合成およびタンパク分解の両者に重要な役割を果たしており、その制御方法を明らかにすることがサルコペニアへの有効な予防・治療法の開発につながると考えられる。O-GlcNAc 化はタンパク翻訳後修飾の一つであり、熱ショック、低酸素、栄養欠乏などの細胞ストレスに対して、タンパクの機能を変化させる。さらに、面白いことにO-GlcNAc 化とリン酸化の部位は同じ場所もしくは近傍で起こるため、タンパクリン酸化の制御に重要な役割を果たしていると考えられる。しかしながら、これまでに骨格筋萎縮におけるO-GlcNAc 化の役割はほとんど明らかにされていない。本研究の目的は、加齢による骨格筋萎縮の進展にタンパク合成や分解に関わる種々のタンパクのO-GlcNAc 化修飾が重要な役割を果たしているかどうかを明らかにすることであった。

【方法】 3 か月齢、6 か月齢、12 か月齢の C57BL/6J マウスから深麻酔下（ペントバルビタール 200 mg/kg の腹腔内投与）に下肢骨格筋が摘出された。重量測定後に、骨格筋組織は組織学的評価（ヘマトキシリン—エオジン染色）、ウエスタンブロットに用いられた。

【結果】 マウスの体重は年齢とともに有意に増加したが、下肢骨格筋重量—体重比は加齢とともに減少した（3 か月齢：14.3±0.3 mg/g、6 か月齢：13.4±0.6 mg/g、12 か月齢：12.3±0.5 mg/g、 $p<0.05$ ）。骨格筋の組織学的評価では、12 か月齢マウスの骨格筋において3 か月齢マウスと比較して細胞断面積が10%縮小した。Akt および mTOR タンパク発現は各年齢において違いがなかった。12 か月齢マウスの骨格筋において3 か月齢マウスと比較してAkt リン酸化レベルは22%減少し、mTOR リン酸化レベルは19%減少した。さらに、12 か月齢マウスの骨格筋において3 か月齢マウスと比較して atrogen-1 および MuRF1 タンパク発現は43%、71%増加した。従って、タンパク合成・分解系のバランスが破綻していた。12 か月齢マウスの骨格筋において3 か月齢マウスと比較して、骨格筋タンパクのO-GlcNAc 化修飾は有意に増加した（ $p<0.05$ ）。O-GlcNAc 化を制御する分子タンパクを評価したところ、glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase (GFAT) 1 は有意に増加した。一方、GFAT2、O-GlcNAc transferase (OGT) や O-GlcNAcase (OGA) は有意な変化がなかった。

加齢性骨格筋萎縮の進展におけるO-GlcNAc 化の役割

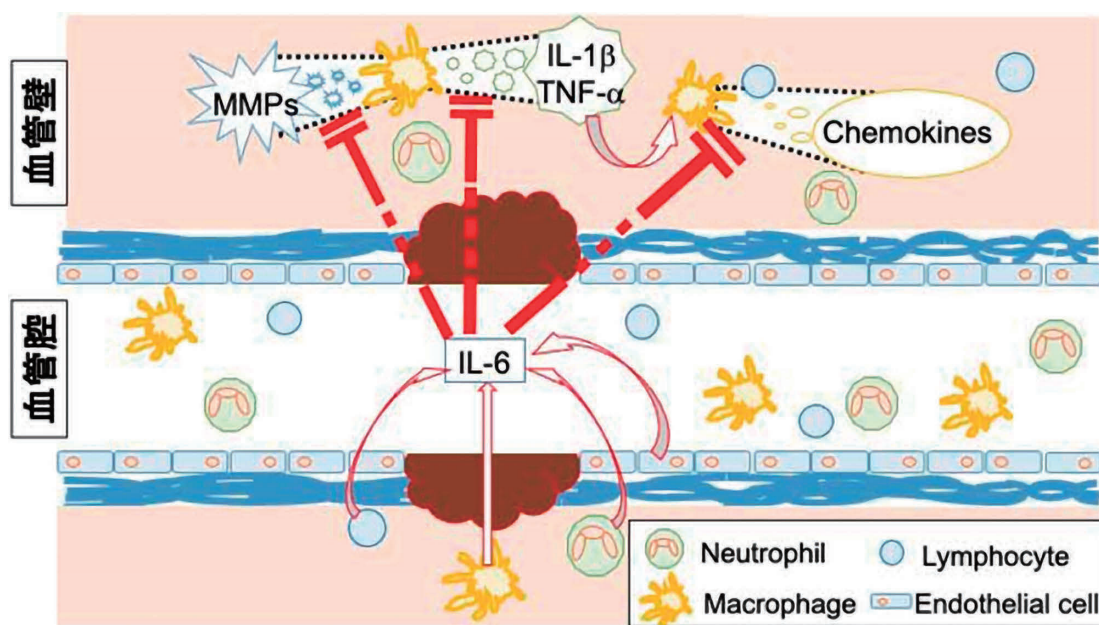


【目的】突然死例の約半数の死因は、急性心筋梗塞、大動脈瘤破裂、肺動脈血栓などの心臓・大血管疾患である。特に大動脈瘤は通常無症状のまま進行し、破裂による致死率は80~90%である。本邦では年間5万人を超える突然死の10%以上が大動脈瘤破裂によると推定されている。大動脈瘤に対する人工血管置換術やステント留置等の外科治療技術は進歩したが、効果的な予防法・治療薬は未だ確立されていないため、大動脈瘤の発症過程の細胞・分子機構の解明に基づいた予防法あるいは薬物治療法などの開発が望まれている。大動脈瘤の発生・進展は皮膚損傷治癒や肺線維症の病態生理と同様に炎症反応に伴う組織の再構築異常としてとらえることで、サイトカイン等の炎症性メディエーターを介した炎症細胞と線維芽細胞・平滑筋細胞のクロストークの大動脈瘤成立過程への関与を想定するに至った。そこで、炎症性サイトカインの一つ、インターロイキン-6 (Interleukin-6 : IL-6) が大動脈瘤の発生・進展にどのように関与しているのかの分子メカニズムを解析する。

【方法】8週齢の Balb/c バックグラウンドの *IL-6* 遺伝子欠損マウス (*IL-6*KO) マウスと野生型マウス (WT) マウスを用いて、麻酔下で背部に切開を加えて、ミニポンプを植え込みアンジオテンシンII (1.4 mg/kg/day) の持続的投与により大動脈解離を誘発した。また、HE染色や免疫染色などの病理学的所見の観察や Real-Time RT-PCR による mRNA 発現量の比較はアンジオテンシンII投与後5日目に採取した大動脈を用いて行った。

【結果】アンジオテンシンII投与により *IL-6* の発現量は増大しており、大動脈瘤形成・進展において *IL-6* が重要な役割を担っていることが考えられた。大動脈瘤の発症率を検討したところ、*IL-6* KO マウスでは WT マウスと比較して発症率が有意に高値であった。さらに、大動脈瘤破裂による生存率解析においては、WT マウスの死亡率は約20%程度であったが、*IL-6* KO マウスの死亡率は約90%であった。大動脈瘤病変部における炎症細胞の浸潤は、*IL-6* KO マウスで WT マウスと比較して、種々の炎症性サイトカイン・ケモカインの発現亢進を伴って増強していた。また *IL-6* KO マウスでは、病変部におけるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) -9 および MMP-12 の発現が顕著に亢進していた。*IL-6* は、炎症性サイトカインやケモカイン、MMPs の発現を抑制し、血管の炎症反応や血管壁の脆弱化に対して防衛的に働くことが示唆された。

大動脈瘤形成における IL-6 の役割

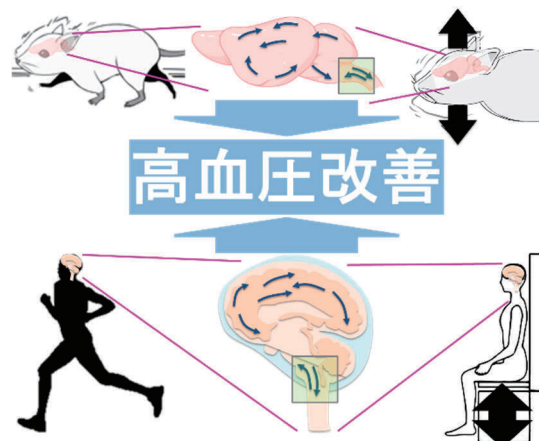


【目的】日本を含め高齢化問題を抱える諸国において、健康寿命の延伸が喫緊の課題とされて既に久しい。「適度な運動」は、要介護状態の主原因となった疾患・障害のうち老衰以外の全てに有効性が示されており、健康寿命延伸にオールマイティと言える。世界中で「Exercise is Medicine」すなわち運動は（万能）薬と提唱され、その効果検証に関する研究が盛んに行われている。しかし、「適度な運動」の効果の背景にある分子機構には未解明なところが多く、「適度な運動」の明確な定義は確立されていない。それどころか分子生物学レベルでは、「適度な運動」の本体は可視化（具現化）されていない。このことが運動習慣の定着や、肢体不自由障害者や高齢者など、運動したくても運動できない者に適用可能な擬似運動療法の開発の妨げとなっている。運動行動の不足・欠如、すなわち身体不活動は、筋萎縮・糖代謝障害・心血管障害などの障害を通して運動実施能力を低下させ、さらなる身体機能低下を来すという悪循環につながる。「適度な運動」効果の分子メカニズム解明に基づく治療法・予防法を開発すれば、この悪循環を断つことができる。「適度な運動」の本体を可視化し、運動実施困難な者にも適用可能な擬似運動療法開発の基盤を構築することが本研究の目的である。

【方法】当初の計画通り、マウスで後肢不動化実験を行い、炎症関連タンパク質である MCP-1 を観察する方針とした。これまで用いてきた周期的下腿三頭筋圧迫実験系を改良し、いわゆる衝撃波様ではない力学的刺激（メカニカルストレス）を与える系の開発・製作に取り組んだ。しかし、滑らかな筋内圧変化の導出に関して技術的な問題が生じたため、骨格筋へのメカニカルストレス印加実験系の確立には遅滞が生じた。そこで、研究期間内の成果を最大限とするために、運動効果をメカニカルストレスで再現する研究の一環として骨格筋以外の臓器の解析も行うとともに、頭部へのメカニカルストレスによる高血圧改善実験の推進を図った。

【結果】両後肢不動化を行ったマウスで肝臓における MCP-1 の発現が促進され、それが身体へのメカニカルストレス印加により抑制されるという結果を得た。また、ラットの脳へのメカニカルストレス印加実験で、高血圧改善効果を有する受動的頭部上下動の条件を検討した。ピーク加速度 0.5 G の受動的頭部上下動は有意な降圧効果を示した一方で、ピーク加速度 0.2 G の受動的頭部上下動による降圧効果は認められなかった。0.5 G と 0.2 G の間に高血圧改善に必要な力学的刺激の強度が存在することになる。前後方向の受動的頭部運動（ピーク加速度 1 G）は有意な降圧効果を示した一方で、左右方向の受動的頭部運動（ピーク加速度 1 G）による降圧効果は認められなかった。これらの動物実験の結果と、本課題とは別個の研究として進めたヒト高血圧者を対象とした座面上下動椅子搭乗による高血圧改善効果の検証の結果を合わせ、速歩き～軽いジョギング程度の適度な運動による高血圧改善効果は、延髄の血圧調節中枢における間質液流動促進に伴う神経系細胞への流体剪断力（シアストレス）というメカニカルストレスを介すると結論した（下図）。

運動時（足接地時）に頭部（脳）に伝わるメカニカルストレスが高血圧改善をもたらす



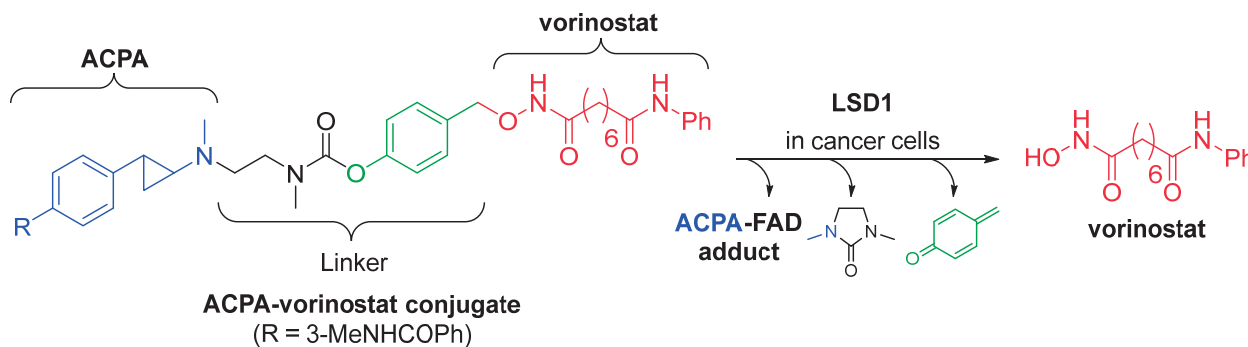
10 副作用低減を目指した新規抗がん剤プロドラッグの創製	鈴木 孝禎
------------------------------	-------

【目的】 一般に、抗がん剤は副作用が大きいことから、それらの副作用が低減したブレイクスルーとなる抗がん剤の登場が望まれている。本研究では、悪性がんを標的として、副作用の低減した新規抗がん剤プロドラッグの創製を目指した。これまでに開発された副作用低減のための抗がん剤プロドラッグは、抗体などの高分子構造に基づくものがほとんどである。高分子型抗がん剤プロドラッグの代表例として、抗体-薬物複合体 (antibody-drug conjugate : ADC) が挙げられる。これまでに、国内外問わず数多くの ADC の研究開発が行われ、臨床試験されているものや実際に臨床利用されているものもある。しかし、ADC は分子量の大きな生物製剤であるため製造コスト・品質面における問題や生体内安定性、免疫原性などの副作用の課題が残されている。高分子型がん細胞選択的プロドラッグの問題を解決し得る中分子型プロドラッグとして、小分子-薬物複合体 (small molecule-drug conjugate : SMDC) の開発が進められている。SMDC にはリガンド-タンパク質間の選択性の低さや分子量の大きさに由来した投与方法の制限等課題も残されている一方で、SMDC では、化学合成により純粋な SMDC を生産することが可能であり、ADC と比較すると一定品質のものを安定供給出来ることが利点である。今後、SMDC の研究開発が進み、臨床応用されることが期待される。そこで、本研究では、がん細胞に大過剰に発現するリシン脱メチル化酵素 (LSD1) に着目し、SMDC の開発を行った。

【方法】 フラビン依存性のリシン脱メチル化酵素 (LSD1) は、正常細胞には発現せず、乳がん、大腸がん、肺がん、膀胱がん、白血病、脳腫瘍、膵臓がんなどのがん細胞において、大過剰に発現し、がんの増殖に関与するため、がんのバイオマーカーかつ抗がん剤の標的タンパク質として注目を集めている。これまでに、我々は、標的がん細胞に高発現する LSD1 を認識して抗がん剤を放出するがん細胞選択的プロドラッグを創出した (Ota Y., Suzuki T. *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 16115–16118. Ota Y., Suzuki T. *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.* **2019**, *66*, 192–195.)。本研究では、本プロドラッグシステムを副作用の高い抗がん剤 vorinostat に応用した。具体的には、がん細胞選択的プロドラッグの設計、合成、活性評価を行うことで、がん細胞選択的に抗がん剤 vorinostat を放出するプロドラッグの創製を目指した。

【結果】 LSD1 阻害薬である phenylcyclopropylamine (PCPA) の LSD1 阻害機構をもとに、arylcyclopropylamine (ACPA)-vorinostat conjugate を設計した。ACPA-vorinostat conjugate は LSD1 を高発現するがん細胞においては LSD1 阻害に伴い、vorinostat を放出し、抗がん作用を示す一方で、LSD1 をほとんど発現しない正常細胞においては vorinostat が放出されず、vorinostat 由来の副作用の低減が期待された。実際、合成した ACPA-vorinostat conjugate は、正常細胞に影響せず、抗がん効果を示した。

がん細胞選択的に抗がん剤 vorinostat を放出する ACPA-vorinostat conjugate



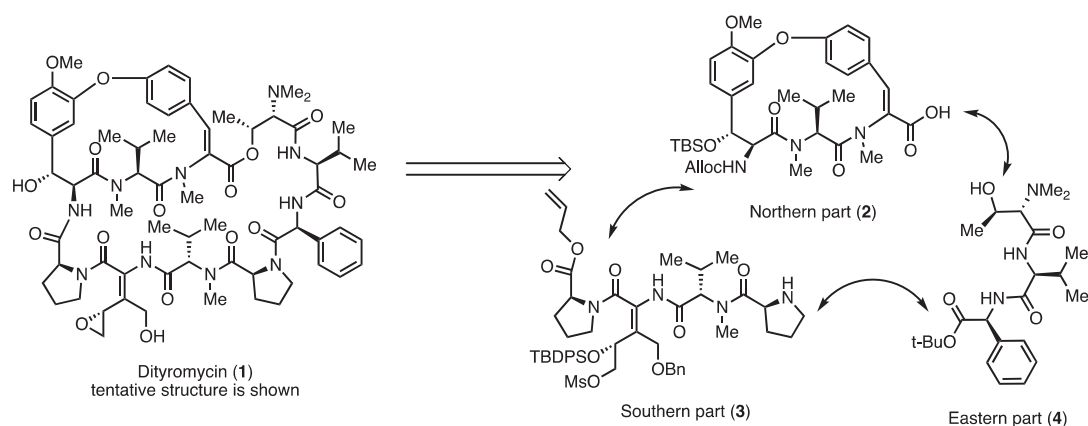
vorinostat: cancer cell selectivity = 3.92 (MDA-MB-231); 22.2 (NCI-H526)
ACPA-vorinostat conjugate: cancer cell selectivity > 22.3 (MDA-MB-231); > 100 (NCI-H526)

【目的】 本研究の合成標的である Dityromycin (1) は、1977 年に北里研究所の大村らによって放線菌 *Streptomyces* sp. AM-2504 株より単離された中分子天然物である。構造的特徴として 1 は、イソジチロシン型環状トリペプチド構造とデヒドロイソロイシン酸化型異常アミノ酸を含む大環状デカデシペプチドである。単離から 45 年が経過した現在もなお、本化合物の絶対立体構造の決定はなされていない。また、その生物活性として 1 は、偏性好気性、嫌気性菌に対し、70S リボソーム内 S12 タンパクと結合することで、翻訳伸長因子 EF-G とのタンパク質間相互作用 (PPI) を阻害する。そこで我々は 1 の新規 PPI 阻害剤としての開発を目指し、1 の誘導体創製を指向した全合成経路の確立および全合成的アプローチによる絶対立体構造の決定を行うこととした。

【方法】 1 の全合成を目指すにあたって、のちの効率的な誘導体ライブラリー創製を可能とする収束的な逆合成を立案した (下図)。すなわち 1 を大きく 3 つのフラグメント、Northern part (2)、Southern part (3)、Eastern part (4) に分割し、それぞれの合成経路を確立し終盤にて結合させることによって全合成を目指すものである。これにより、構造、官能基変換を施した各々のフラグメントを組み合わせることによって多様な誘導体合成が迅速に実現できると考えた。

【結果】 先に示した逆合成に従って、フラグメント 2、3、4 のグラムスケール合成にも許容な合成経路を確立し、各フラグメント 2、3、4 を大量合成し、全てを連結したデカペプチドの合成まで達成した。現在、我々は 6 における保護基の除去およびマクロ環化を行う検討を行っており、残り数工程にて 1 の全合成を達成する予定である。

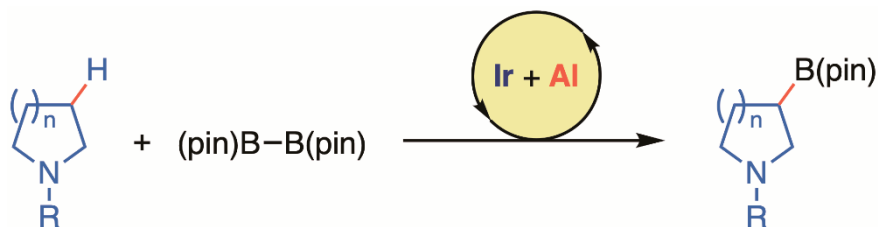
Dityromycin (1) の合成戦略



【目的】創薬研究において、ドラックライクネス（薬らしさ）に及ぼす重要な指標として知られるようになった F_{sp^3} (sp^3 炭素の数/全炭素の数) は、小さいほど、すなわち平面性が高いほど溶解性の懸念が高まり、開発難度が上がると言われている。したがって、より F_{sp^3} の大きく (sp^3 炭素が多い)、三次元性の高い化合物の効率的な合成手法が、現代の創薬において求められる有機合成化学の重要な使命である。その中で最も有用な反応と考えられるのが、C(sp^3)-H 結合官能基化である。特に、入手容易な分子骨格の C(sp^3)-H 結合を、官能基、反応サイト、およびエナンチオ選択的に変換できる反応は、創薬およびプロセス化学において革新的な反応として期待される。しかしながら、現状、このような反応の例は極めて少なく、汎用性に優れたものは皆無と言っていい。本研究では、ホウ素が多様な有機基あるいは官能基に容易に変換できることに加え、それ自身が生理活性発現の鍵官能基となりえること、また C-H ホウ素化反応の官能基選択性が他の C-H 官能基化に比べ優れることに着目して、同反応のサイトおよびエナンチオ選択性の制御に取り組んだ。

【方法および結果】医薬品によく見られる飽和含窒素複素環化合物の窒素をアシル保護することによって、ルイス塩基部位を有する反応基質を合成した。これを、イリジウム触媒、および光学活性アルミニウムルイス酸触媒存在下、ホウ素化剤としてビス（ピナコラート）ジボロンと反応させて、不斉 C-H ホウ素化反応を検討した。いくつかの光学活性アルミニウムルイス酸触媒を検討したところ、3,3'-位に *p*-置換アリール基、6,6'-位にトリイソプロピルシリル基を有する光学活性ピナフトール誘導体とトリアルキルアルミニウムとの反応によって反応系中で調製したルイス酸触媒が良好なエナンチオ選択性を与えることがわかった。生成物の立体絶対配置は、酸化反応によってボリル基を水酸基へと変換して得られた生成物の旋光度を、文献既知の光学活性体と比較することによって決定した。本反応の律速段階は、C-B 結合を形成する還元的脱離の段階にあること、この時に 3,3'-位のアリール基のパラ位置換基と Ir 上のボリル基との立体反発がエナンチオ選択性の発現に寄与していることを、密度汎関数法を用いた理論化学計算によって明らかにした。いくつかの *N*-ピバロイル飽和含窒素複素環化合物の不斉 C-H ホウ素化を検討した結果、中程度から良好なエナンチオ選択性で反応が進行し、光学活性ホウ素化生成物が中程度の収率で得られた。得られたホウ素化体の C-B 結合は、炭素求核剤と続く酸化剤との反応によって、立体化学を損なうことなく C-C 結合に変換することができた。したがって本研究成果は、有機基をはじめとするさまざまな官能基を有する飽和含窒素複素環化合物の不斉合成に有用であるものと期待できる。

イリジウム/アルミニウム協働触媒によるエナンチオ選択的 C(sp^3)-H ホウ素化反応



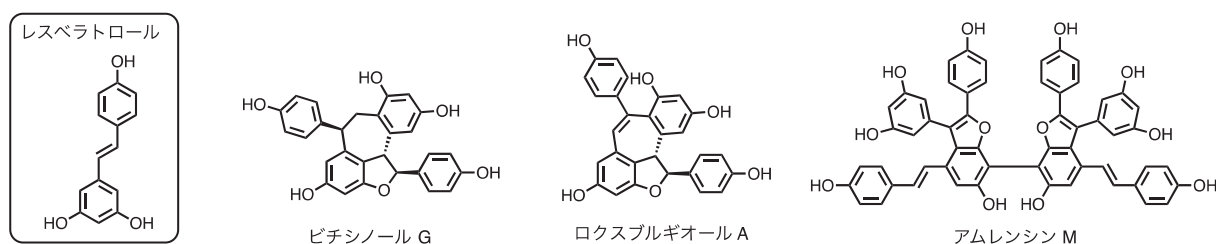
- **exclusive β -selectivity**
- **enantioselectivity by cooperative Ir/chiral Al catalysis**

【目的】 レスベラトロールは、抗酸化作用や心血管疾患予防作用が知られる天然物であり、ブドウ科などの植物が生合成するレスベラトロールオリゴマーのモノマー単位である。レスベラトロールのラジカル重合により生合成されるレスベラトロールオリゴマーは、重合パターンが多様で、かつ立体異性体を含む類似の構造体が数多く存在することから、全合成が構造確認のための強力かつ確実な手段となっている。しかし、これまでに合成された天然物は、200 を超えるレスベラトロールオリゴマー誘導体の一部でしかなく、不斉合成に至っては殆ど達成されていない。天然からの単離量も微量であることから、生物活性評価研究に関しても十分には行われておらず、創薬化学的に未開拓の天然物群と言える。我々は、これらの背景を踏まえ、未開拓天然資源からの創薬有用分子の創出を目的に、レスベラトロールオリゴマー類を標的とした合成研究を進めている。

【方法】 我々の研究の方法論的な特徴として、合成戦略立案における計算化学の活用が挙げられる。予想生合成経路に対応する分子変換過程を DFT 計算することでエネルギーダイアグラム化し、相対立体配置の妥当性を評価する試みを近年行っており、これまでにレスベラトロールダイマーとなるマリバトール A、*epi*-パチカハイノール A、*epi*-パチカハイノール B、ホピーハイノール A の全合成に成功した。特に、*epi*-パチカハイノール A、*epi*-パチカハイノール B に関しては、報告されていた立体配置の訂正に至った。本成果を基盤に、レスベラトロールダイマーとなるピチシノール G、ロクスブルギノール A の全合成、また、レスベラトロールテトラマーとなるアムレンシン M の合成研究を本研究にて行った。

【結果】 ピチシノール G の全合成研究を開始するにあたり、想定生合成経路に対応する分子変換過程を DFT 計算によりエネルギーダイアグラム化して、合成ルート of 妥当性評価を行った。その結果、想定されるエポキシド中間体のフェノール性水酸基を全てアセチル基で保護した場合に、*Semi-pinacol* 転位を経由する *Friedel-Crafts* 反応が効率よく進行することが予測された。実際、*Lewis* 酸存在下で検討を行った結果、目的の反応が円滑に進行し、ピチシノール G の全合成に成功した。ロクスブルギノール A の全合成に関しては、構造の類似性からアンペロシン A からの脱水反応による合成を試みたが、予想に反し、カルボカチオン生成後にフェノールユニットが転位したピチシノール G が得られるのみであった。そこで、*e*-ビニフェリンより誘導されるアルデヒド体を中間体にアルキン側鎖を導入し、*Lewis* 酸存在下、*Friedel-Crafts* 反応を行うことでロクスブルギノール A の全合成に成功した。アムレンシン M は、*e*-ビニフェリンが酸化されたアムレンシン H のベンゾフラン上で、 $C(sp^2)-C(sp)$ 結合が形成され 2 量化したレスベラトロールテトラマーである。すなわち、アムレンシン H のベンゾフラン上に位置選択的にハロゲンを導入することができれば、カップリング反応を行うことでアムレンシン M を合成できるものと考えた。検討の結果、TMEDA の存在下、オルトリチオ化を行いヨウ素でアニオンをトラップすることで、収率 21%ながらも目的の位置のみがヨウ素化された生成物を得ることに成功した。

レスベラトロールと、合成研究を行なったレスベラトロールオリゴマー

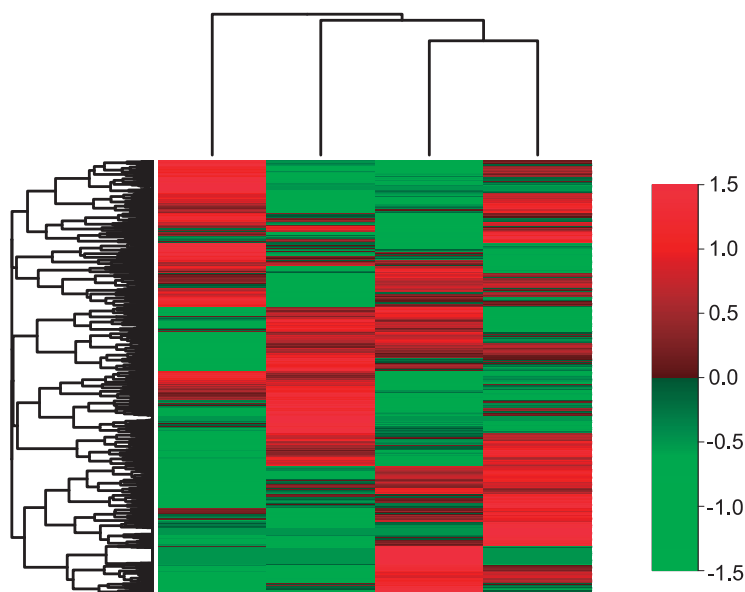


【目的】本研究では異所性の核 DNA、異所性のミトコンドリア DNA、そして細胞外から侵入したウイルス DNA のそれぞれのセンサーおよびそれらが惹起する細胞内応答、細胞外応答、個体病理を比較することでそれぞれの特徴を描出する。さらにモデル動物において異所性の核 DNA、異所性のミトコンドリア DNA が惹起する近隣や遠隔への臓器連関、あるいは老化や加齢関連疾患の臓器連関、を *in vivo* で検証する。それらにより現在は明確な区別がなされていない、老化 vs. 加齢関連疾患、および異所性の核 DNA vs. 異所性のミトコンドリア DNA、それぞれのもたらす特徴的な生体局所の病理と臓器連関を明らかにし、老化や各種疾患への介入シーズの同定につなげる。

【方法】Hela 細胞などの汎用株化細胞および主だったヒト細胞の初代培養細胞などを併用し、各種異所性 DNA に対するセンサーを網羅的に解析した。また各種 DNA 導入法を用いて培養細胞の細胞質に各種異所性 DNA を導入し、それぞれに対して RNA シークエンスを用いた網羅的トランスクリプトーム解析を実施した。同様の手法を用いて、各種異所性 DNA それぞれの場合に培養上清に分泌されたタンパク質を回収し、DIA プロテオーム解析により分泌形質の種類や量の違いを網羅的に解析することを試みた。

【結果】各種異所性 DNA に対するセンサー候補の網羅的な同定を行った。ここではミトコンドリア DNA に対して実施した結果の一部を提示する。このようにいくつかのセンサー候補分子が同定されたため、ついで各分子が本当にセンサーとして機能しているかどうかを siRNA による遺伝子ノックダウンや KO 細胞の樹立による解析を行った。cGAS KO、IFI16 KO、STING KO 細胞では異所性のミトコンドリア DNA に対する炎症が抑制されることを明らかにした。同様にして精製した各種 DNA を各種細胞に導入し、網羅的トランスクリプトーム解析を実施した。こちらは現在公表に向けてデータの収集や整理を行っている。細胞外応答の網羅的同定については、まず培養細胞上清を定量的に分析するための様々な条件検討を行った。適切と判断された条件のもと、培養細胞上清を DIA プロテオーム解析に供することで、細胞外分泌タンパクの網羅的な同定に成功した。

異所性の核 DNA に対する細胞外分泌因子の解析結果

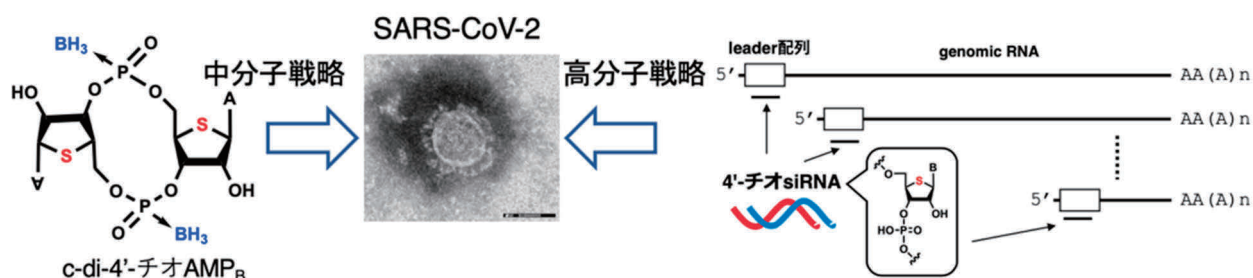


【目的】 本研究において、我々はRNAウイルス感染症、特に新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）の治療薬開発のための新しい方法論確立を目的とする。具体的には、我々がこれまで独自に開発してきた4'-チオ核酸（核酸の糖部フラノース環酸素原子を硫黄原子に置換した核酸の総称）の技術を基盤とし、膜透過性環状ジヌクレオチド（**c-di-4'-チオAMP_B**：図左）開発による中分子戦略とヌクレアーゼ抵抗性 **small-interfering RNA**（**siRNA**）開発による高分子戦略（図右）を実践し、これらにより SARS-CoV-2 との闘いに勝利するための礎を築く。

【方法】 中分子戦略の目的化合物である **c-di-4'-チオAMP_B** の合成にあたっては、過去に参考となる前例が極めて少なかった。そこでまずモデル化合物として二つのウリジンモノマー1と2を用いて **c-di-UMP_B** を合成することで、立案した合成経路の妥当性を検証することにした。化合物1と2を *N*-PhIMT を活性化剤として用いてダイマーとした後、ボラノホスフェート（PB）型ダイマーとするためボラン・ジメチルスルフィド錯体と処理した。続いて、得られたダイマー体の5'位水酸基の保護基を除去し、ジアミダイト試薬を用いたアミダイト化を行った後、連続して *N*-PhIMT を活性化剤とした環化とボラン・ジメチルスルフィド錯体との処理を行い、**c-di-UMP_B** を合成した。一方、高分子戦略であるヌクレアーゼ抵抗性 **siRNA** 開発については、まず天然型の **siRNA** を用いて標的配列の最適化を検討した。当初予定した leader 配列の他、ウイルスが独自にコードするRNA依存性RNAポリメラーゼ（RdRp）などを標的とした **siRNA** を計11種類調製し、SARS-CoV-2 感染細胞（Vero E6細胞）を用いたプラークアッセイを行うことで最適な配列を見出した。続いて、最適な **siRNA** のパッセンジャー鎖とガイド鎖の各位置を4'-チオ体で修飾し、それらの **RNAi** 効果と修飾様式の相関解析を行った。

【結果】 モデル化合物である **c-di-UMP_B** を合成するために、まず二つのウリジンモノマー1と2の縮合とボラン・ジメチルスルフィド錯体による酸化を行い、ボラノホスフェート（PB）型ダイマーを達成した。続いて、ダイマー体の5'位水酸基の保護基を除去した後、*N*-PhIMT 存在下でのアミダイト化、環化と酸化を連続的にを行い **c-di-UMP_B** 保護体の合成を達成した。最後に保護基を除去し、**c-di-UMP_B** の生成をマスマスペクトルにより確認した。高分子戦略であるヌクレアーゼ抵抗性 **siRNA** 開発については、*in vitro* でのプラークアッセイの結果、検討した11種類の配列の中でRdRpを標的とした **siRNA** に顕著な抗ウイルス活性が観察された。そこでこの配列のパッセンジャー鎖とガイド鎖に、Gを除く4'-チオ体を1残基ずつ導入した4'-チオ **siRNA** を合成し、その抗 SARS-CoV-2 を先と同様のプラークアッセイにより評価した。また、ルシフェラーゼ遺伝子の下流に標的配列を組み込んだレポータープラスミドを調製し、デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイにより修飾体導入位置が **RNAi** 活性に与える影響を調べた。その結果、活性に若干のばらつきはあるものの、パッセンジャー鎖とガイド鎖のいずれの修飾も天然 **siRNA** に匹敵する **RNAi** 効果を示すことが明らかとなった。

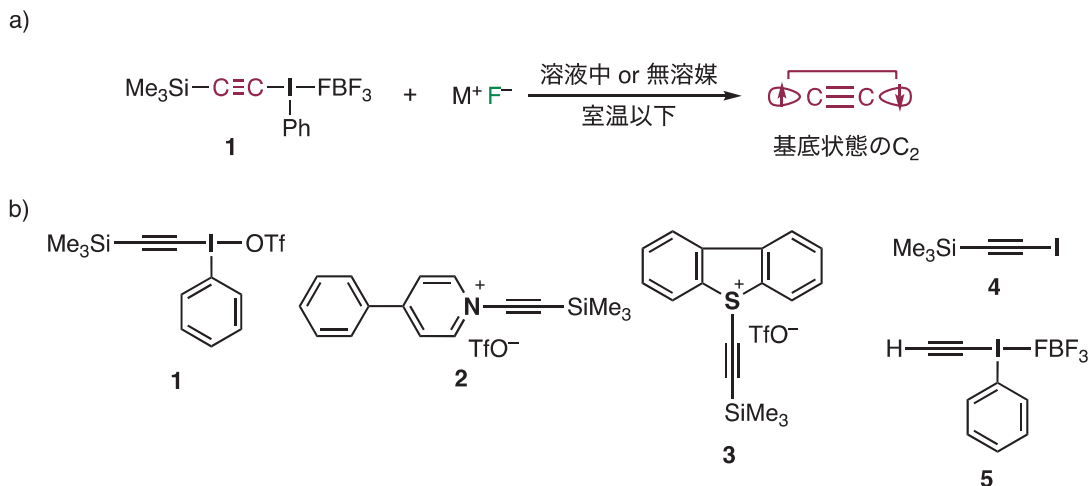
本研究戦略の概要



【目的】 有機化学において、これまで多くの新しい中間体の発見（カチオン、アニオン、ラジカル、カルベン等）が、新しい化学理論を切り拓き、ひいては新反応や新物質の創製に貢献してきた。しかし、高度に実験的手法が成熟した現在でも、実験化学的に発生が難しい活性種は依然として多数存在する。そのうちの二原子炭素（ C_2 ）は、近年、基底状態で炭素間に四重結合性を持つと推定されている（S. Shaik ら *Nat. Chem.* 2012, 4, 195）。 C_2 は、星間物質や超高温（約 $3,500^\circ\text{C}$ 以上）で生じる炭素蒸気中に存在する活性種で、フラスコの中で温和な条件下に発生させることは困難と考えられてきた。他方、宇宙空間（星間雲など）には C_2 が豊富に存在することが確認されており、近年 C_2 由来のさまざまな炭素材料や、生命起源の候補分子の生成機構が予想されている。本研究では、宇宙や原始地球の環境を模した様々な条件下において、フラスコ内で化学的に発生させた C_2 がどのような分子に変化していくか、それらの説を多面的に検証し、実験化学的根拠を提示することを目的とする。ひいては、人類共通の知的好奇心の興味の中心にある上記の謎を解明することに繋げることがより長期的な目標である。

【方法】 最近我々は、超原子価ヨウ素化合物の一つ、アルキニルヨードン **1** を用いると、室温以下（ $> -30^\circ\text{C}$ ）という極めて温和な条件下に、基底状態の C_2 が選択的に生成することを発見した（下図 a, Miyamoto, Uchiyama ら *Nat. Commun.* 2020, 11, 2134）。さらに、この反応を無溶媒条件下で行うと、さまざまな炭素同素体（フラーレン（ C_{60} ）、単層/多層カーボンナノチューブなど）が生成することも明らかにしている。本研究では、さらに各種条件（液相、固相、前駆体の構造、塩基の種類）を変更し、生成する C_2 のそれぞれの条件下における反応性について詳細に調べた。

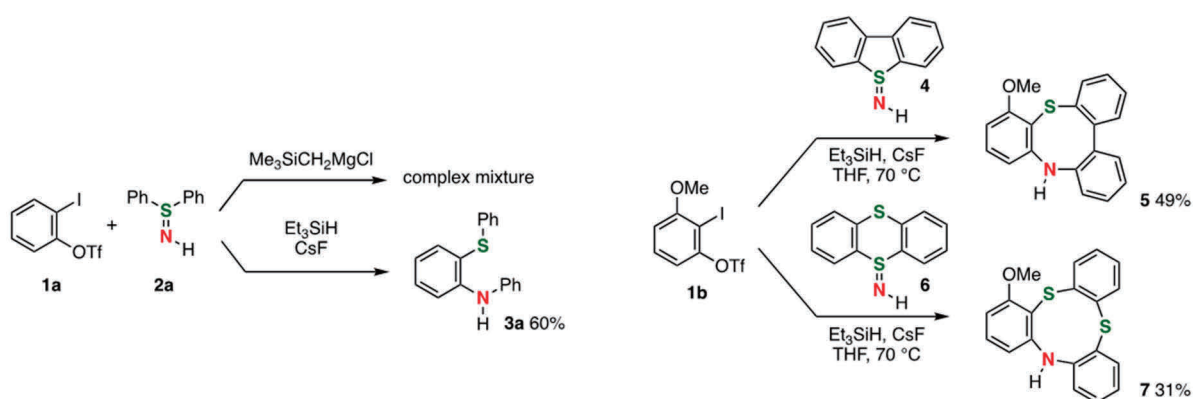
【結果】 まず、前駆体の構造を変化させても C_2 が発生可能であるか検証したところ、超原子価ヨウ素化合物以外の前駆体（ピリジニウム塩 **2**、スルホニウム塩 **3**）を用いても発生できることがわかった（下図 b）。一方、一価のヨードアセチレン **4** からは発生困難であることも確認された。理論計算による検証では、脱離能の低い場合には、単分子機構より二分子機構がより有利な経路であることが示唆された（Rzepa, Miyamoto, Uchiyama ら *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2022, 24, 25816–25821）。 C_2 はアルキニルヨードン **5** にフッ化物イオンのほか、適切な塩基を用いても発生可能であり、固相で強い塩基（ Cs_2CO_3 など）を作用させた場合にも各種炭素同素体が得られることがわかった。同様の反応を水中/水存在下で行った場合、重合生成物の成分にはフラーレン C_{60} が含まれていた。一方、揮発性成分中にはアセチレンのほか、ジアセチレンやエチレン、エタンなどが含まれることが判明した。これらは星間雲などにおける基底状態の C_2 の反応挙動についての重要な情報を提供するものと考えられる。現在、低分子とのユニークな反応性についても明らかにしつつある。

常温・常圧下での C_2 の化学合成、および各種前駆体の構造

【目的】 本研究では、多置換フェノチアジン類の簡便合成のための新しい変換の開発に取り組んだ。フェノチアジン類は、硫黄と窒素を含む三環式ヘテロ環化合物であり、創薬研究だけでなく、材料科学、有機光触媒化学等の幅広い分野において注目を集めている。特に、創薬研究において古くから重要な役割を果たしている。例えば、魅力的な生物活性化合物の中心骨格 **privileged scaffold** の一つとして注目され、クロロプロマジン等をはじめ、様々な置換基を有するフェノチアジン類が抗精神病薬として広く利用されてきた。これに対して、本研究では、多置換フェノチアジン合成に役立つ手法として、*o*-ヨードアリールトリフラートのチオアミノ化反応の開発に成功した。

【方法】 まず、私たちは、*o*-ヨードフェニルトリフラートとスルフィリミンに対して、アラインを発生させるための活性化剤を加え、チオアミノ化反応が進行するかどうかを調べた。次に、反応条件の最適化後、様々な *o*-ヨードアリールトリフラートをスルフィリミンと反応させることで、広範な *o*-アミノジアリールスルフィド合成を検討した。

【結果】 *o*-ヨードフェニルトリフラート **1a** とスルフィリミン **2a** を用いる、アラインのチオアミノ化反応を進行させる反応条件を見つけることができた (左図)。具体的には、*o*-ヨードフェニルトリフラート **1a** からアラインを発生させるために活性化剤としてシリルメチル Grignard 反応剤を用いる、以前に私たちが見つけた条件でスルフィリミンとの反応を行った場合には、目的とするチオアミノ化体は得られなかった。その一方で、トリエチルシランとフッ化セシウムを活性化剤とする、最近新たに見いだしたアライン発生条件で本反応を試みたところ、目的のチオアミノ化体 **3a** を良好な収率で合成できることを明らかにした。次に、様々な *o*-ヨードアリールトリフラートをアライン前駆体として用いて、スルフィリミンとの反応を検討したところ、幅広い *o*-アミノジアリールスルフィド類の合成に成功した。さらに、環状スルフィリミンをアラインの反応相手として用いたときには、環拡大が進行し、フェノチアジンに類似した中員環骨格を形成できることを明らかにした (右図)。本反応で構築できるようになった新骨格は、電子材料等に期待されることから注目を集めている。今後、本反応のさらなる発展により、医農薬や有機材料などの広範な機能性分子の開発につながると考えている。

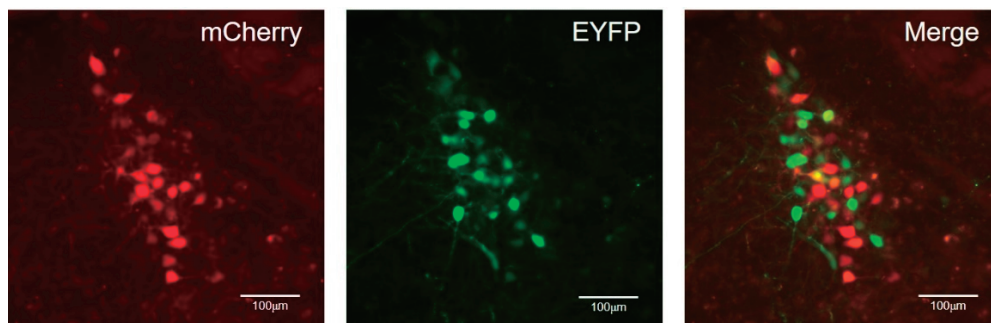
アライン反応による*o*-チオアニリン類の合成と環拡大反応

【目的】 私たちの行動を支える脳機能である記憶は、意識的に想起する過去の体験や知識などの宣言的記憶と無意識的に想起される習慣や条件反射などの手続き的記憶に分類される。これらの性質の異なる記憶を状況に応じて統合的に制御することが、柔軟で適応的な行動に重要であると考えられている。これまでに我々は、この記憶間の制御に神経伝達物質のノルアドレナリンが関与することを明らかにしてきた。ノルアドレナリンは脳幹に位置する脳領域の青斑核を構成するノルアドレナリン作動性ニューロンにより脳全体へ放出されるが、青斑核ノルアドレナリン作動性ニューロンによる記憶間の統合的な制御の神経回路メカニズムは不明である。本研究では、青斑核ノルアドレナリン作動性ニューロンが宣言的記憶に関わる前頭前野と手続き的記憶に関わる扁桃体を調節する神経回路メカニズムを明らかにすることを目的とした。

【方法】 青斑核ノルアドレナリン作動性ニューロンと記憶関連領域が構成する神経回路を解析するため、前頭前野と扁桃体へ投射する青斑核ノルアドレナリン作動性ニューロンをそれぞれ異なる蛍光タンパク質（mCherry、EYFP）で標識した。また、記憶関連領域におけるノルアドレナリン動態を検討するため、新規環境学習中マウスの前頭前野におけるノルアドレナリン放出をノルアドレナリンセンサーGRAB-NEを用いたファイバーフォトメトリー法により検討した。

【結果】 前頭前野と扁桃体へ投射する青斑核ノルアドレナリン作動性ニューロンを標識した結果、mCherry と EYFP の両方の蛍光タンパク質で標識された青斑核ノルアドレナリン作動性ニューロンは少なく、多くの青斑核ノルアドレナリン作動性ニューロンは mCherry あるいは EYFP の一方の蛍光タンパク質で標識された。これにより、前頭前野と扁桃体が異なる青斑核ノルアドレナリン作動性ニューロン群と神経回路を形成していることが示された。また、新規環境学習中のマウスの前頭前野のノルアドレナリン動態は、宣言的記憶に基づく行動が優位となる環境探索開始直後に増加し環境の学習が進むにつれて減少した。これらの結果から、性質の異なる記憶は異なる青斑核ノルアドレナリン作動性ニューロン群の働きにより制御がされていることが示唆された。

前頭前野と扁桃体に投射する青斑核ノルアドレナリン作動性ニューロンの標識

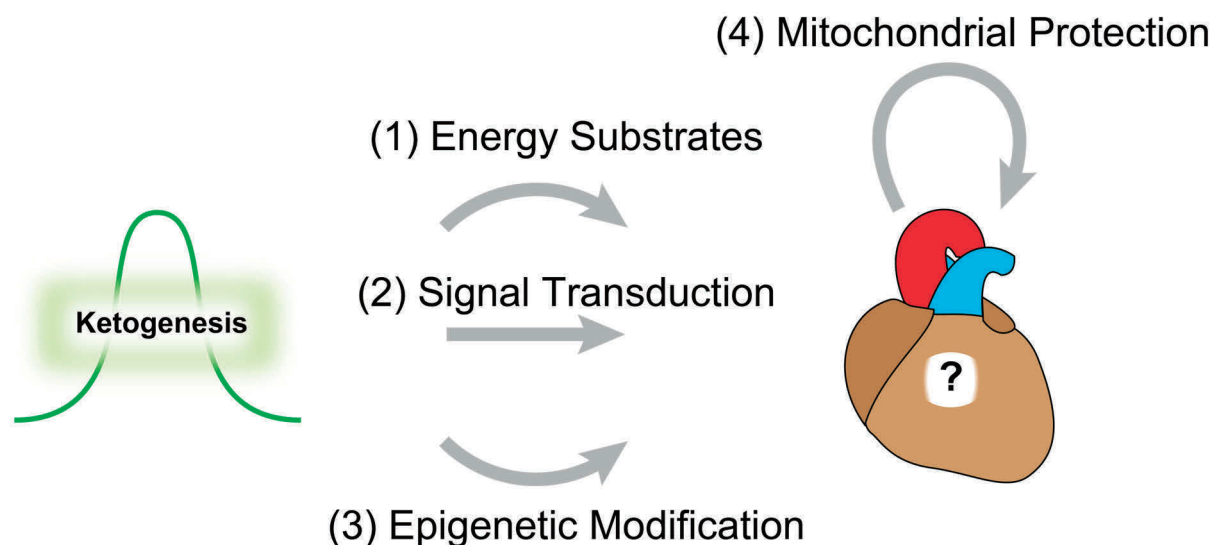


【目的】 ケトン体は飢餓時のエネルギー源として知られる代謝産物であるが、近年多面的作用を持つことが明らかとなり注目されている。我々は、ケトン体合成の律速段階酵素である HMG-CoA synthase2 (Hmgcs2) のノックアウトマウスを作製し、ケトン体代謝の新たな機能として、ミトコンドリアを保護する作用があることを明らかにした。また、核においてはケトン体の一つである β ヒドロキシ酪酸の欠乏に伴い、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) の阻害作用が減弱してヒストンの脱アセチル化が亢進することも確認し、これらの結果は、ケトン体が単に空腹時のエネルギー基質として機能するだけでなく、ミトコンドリアの機能やエピゲノム構造を制御することで、多面的な作用をもたらしていることを示した。今回の研究では心臓を対象として、ケトン体代謝の持つ多面的作用の何が循環器制御機構に重要であるかを検証することを目指し、研究を進めた。

【方法】 新生児期の心臓におけるケトン体合成の意義を明らかにするため、ケトン体合成不全マウスを用いて新生仔期における心筋成熟能を評価した。また、心筋成熟に関わる機序として、ミトコンドリア機能や転写制御・ヒストン修飾の変化を、それぞれメタボロミクス解析、一核解析、ChIP-seq 解析を実施して検証した。

【結果】 Real time PCR 法を用いてケトン体代謝が変化する時期を検討した結果、新生仔期の生後 3 日から 5 日目にかけて心筋細胞で広範囲に Hmgcs2 が発現し、ケトン体合成が亢進することを確認した。続いて、新生児期の心臓におけるケトン体合成の意義を明らかにするため、ケトン体合成不全マウスを用いて表現型を解析した結果、野生型と比較してケトン体合成不全マウスでは有意に心筋の成熟が遅延していることが確認された。最近の報告にてミトコンドリア機能障害がケトン体合成不全による心筋成熟不全の原因になるとの報告があったが、我々の検討では明らかなミトコンドリア機能障害は確認できなかった。そこで、心筋成熟不全の背景にある未知の分子メカニズムを明らかにするため、1 細胞解析を実施した結果、成熟した心室心筋において発現する Tnnt2 などの遺伝子発現が有意に低下していることが確認された。心筋成熟過程における Tnnt2 の発現は、ヒストンタンパクのアセチル化修飾により制御されることが知られていたため、心筋細胞特異的な ChIP-seq 解析を実施した結果、野生型と比較して、心筋細胞特異的に H3K27 のアセチル化が低下していることが確認された。以上の経過より、新生仔期のケトン体合成は、ヒストン修飾を介して心筋細胞の成熟に寄与している可能性が示唆された。

ケトン体代謝による多面的な作用

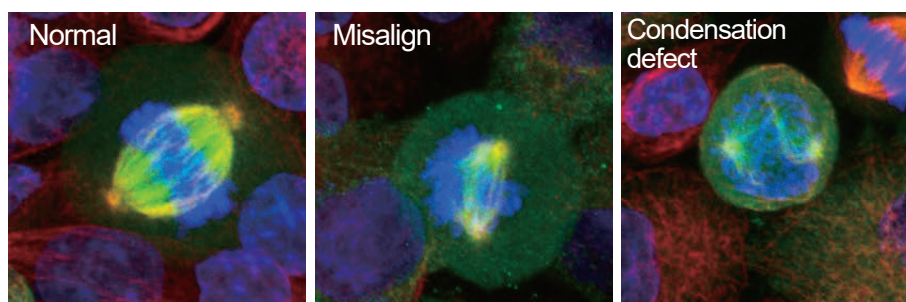


【目的】細胞分裂では微小管からなる紡錘体が染色体を正確に娘細胞に分配する。微小管は α チューブリンと β チューブリンで構成されるチューブリン二量体が管状に数珠つなぎになることで形成される。微小管を構成するチューブリンは多数のユニークな翻訳後修飾を受ける。その中に α チューブリンのカルボキシル末端のチロシンが切断除去される脱チロシン化、さらに次のグルタミン酸が切断除去される $\Delta 2$ 化がある。我々は以前、 $\Delta 2$ 化されたチューブリンからさらに次のグルタミン酸が切断除去される $\Delta 3$ 化を発見同定した。本研究は、この新規の翻訳後修飾 $\Delta 3$ 化が微小管、特に細胞分裂時の紡錘体微小管に与える影響を検証することを目的として行われた。

【方法】 α チューブリン $\Delta 3$ 化の影響を検証するために、膵癌細胞株 PANC-1 細胞に対して $\Delta 3$ 化した α チューブリンを導入した。対照として未修飾状態の α チューブリンを導入した PANC-1 細胞を用意した。導入方法は一過性の過剰発現と、ゲノム編集技術を用いてゲノム上の α チューブリン遺伝子座にノックインする方法の2種類を用いた。 $\Delta 3\alpha$ 化チューブリンを発現させた PANC-1 細胞、未修飾 α チューブリンを発現させた PANC-1 細胞の紡錘体の形態を解析し、紡錘体に対する α チューブリン $\Delta 3$ 化の影響を検証した。さらに、 $\Delta 3$ 化 α チューブリン、未修飾 α チューブリンをノックインした PANC-1 細胞を培養し、1日毎の細胞数を計測し、細胞の分裂能に対する α チューブリン $\Delta 3$ 化の影響を検証した。また、 $\Delta 3$ 化 α チューブリン、未修飾 α チューブリンをノックインした PANC-1 細胞の核の大きさを定量解析し、染色体分配に対する α チューブリン $\Delta 3$ 化の影響を検証した。

【結果】一過性過剰発現、ノックインによる安定恒常発現いずれにおいても、 $\Delta 3$ 化 α チューブリンの発現により、PANC-1 細胞において異常な形態を示す紡錘体の発生頻度が上昇した。さらに、 $\Delta 3$ 化 α チューブリンのノックイン安定恒常発現により、PANC-1 細胞の分裂増殖が減少した。紡錘体の形態異常発生頻度の増加に合致して、 $\Delta 3$ 化 α チューブリンのノックイン安定恒常発現により PANC-1 細胞において核の肥大化が観察された。以上のことから、 α チューブリンの $\Delta 3$ 化は紡錘体の構造を不安定化し、染色体の分配異常、それらに起因する細胞分裂の異常による細胞増殖の低下を引き起こすことが示唆された。

$\Delta 3$ 化 α チューブリンの発現による紡錘体の形態不安定化

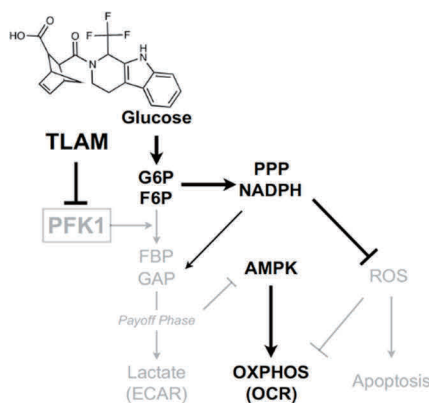


【目的】多様な遺伝子変異によって引き起こされる不均一なミトコンドリア機能障害疾患の総称であるミトコンドリア病において、機能異常の主体はエネルギー産生低下と考えられている。ミトコンドリア異常はアルツハイマー病、パーキンソン病、加齢に伴う認知機能障害等、多くの神経疾患に認められるが、ミトコンドリア病とこれらの主要な神経疾患はいずれも根本的な治療法が存在しない。本研究開発では、我々が見出した解糖系酵素 PFK1 の新規阻害剤 TLAM によるミトコンドリア機能の適応的向上が神経変性の治療標的となるか検証する。

【方法】具体的に以下の項目を計画し、実際に検証を行った。1. PFK1 阻害剤によりどの患者由来 iPS 細胞で神経関連障害を回復できるか評価した。2. PFK1 阻害剤によりどの患者由来 iPS 細胞で神経関連障害を回復できるか評価した。3. PFK1 阻害剤で Leigh 脳症モデルマウスでの脳障害が軽減されるか評価した。4. PFK1 阻害剤で加齢性の神経変性を軽減できるか異なるマウスモデルでも評価した。

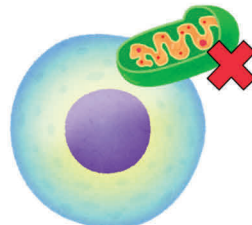
【結果】1. 細胞レベルのトランスクリプトーム解析において、ミトコンドリア病の原因となるミトコンドリア遺伝子変異を有する細胞と、保有しない親株での発現パターンには大きな差異があった。一方で、TLAM 投与後 48 時間経過の時点において、ミトコンドリア病型の発現パターンから正常型の発現パターンへの回復は認めなかった。この結果は、解糖系阻害による短期間でのミトコンドリア機能向上には必ずしも転写レベルの作用が必要とされないことを示唆する一方で、より長期的な改善効果には転写変動が寄与する可能性は否定されない。2. 疾患 iPS 細胞を、ミトコンドリア病で最も重篤な類型である Leigh 脳症の原因遺伝子変異 (*Ndufs4* KO) を導入した疾患 iPS 細胞をゲノム編集で作製した。健常者由来 iPS 細胞と *Ndufs4* KO iPS 細胞から分化誘導した線維芽細胞と神経幹細胞において、TLAM 添加により、解糖系が阻害されるとともにミトコンドリア呼吸能が改善した。3. Leigh 脳症モデルマウス *Ndufs4* KO マウスにおいて、TLAM (100 mg/kg/day) の腹腔内投与で寿命が延長するとともに、運動機能 (rotarod assay) が向上した。病理学的解析により、主要な病変である小脳において神経細胞死の抑制と神経炎症 (ミクログリア活性) の低下が介入に伴って起きることを確認した。4. 異なる神経変性モデルとして、加齢性アルツハイマー病モデルマウス SAMP8 を用いて、TLAM の効果を確認した。TLAM (100 mg/kg/day、腹腔内投与) を 2 ヶ月投与した群と 4 ヶ月投与した群でいずれも空間認知記憶評価試験 (Barnes maze) の結果が、溶媒のみ投与した群に比べて有意に改善した。4 ヶ月投与群では別の試験 (Y maze) の結果も有意に改善した。

解糖系酵素 PFK1 阻害剤 TLAM はミトコンドリア異常を伴う神経変性モデルで改善効果がある



解糖系阻害剤 TLAM は代謝変化を介してミトコンドリア機能を有し

ミトコンドリア病原因変異を持つ細胞で呼吸能を改善し



ミトコンドリア病とアルツハイマー病モデルマウスで改善効果を持つ

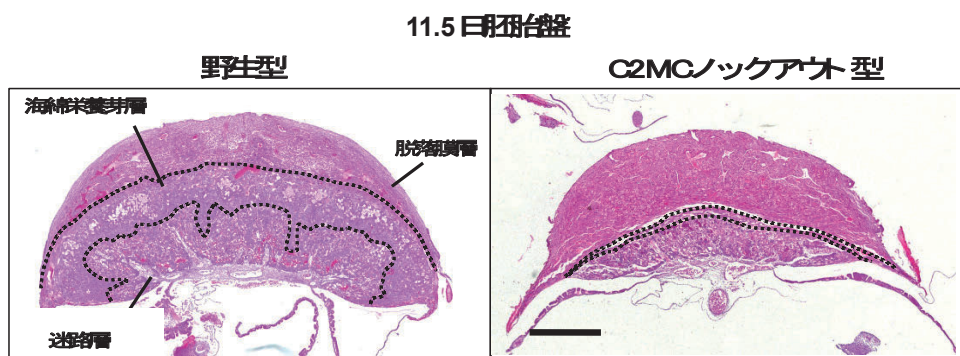
22 胎盤形成におけるマイクロRNAクラスターの機能解明	井上 貴美子
---------------------------------	--------

【目的】 本研究においては、胎盤形成時における胎盤発現マイクロRNA (miRNA) クラスター (MC) の役割とそれにより制御されるがん抑制因子との関連性を明らかにすることを目的としている。我々は実験動物を用いたこれまでの研究により、胎児期の胎盤成長にはタンパク質をコードしない短いRNAであるmiRNAの適切な発現が重要であることを報告している(下図)。この過程で胎盤形成に必須とされるmiRNAは2番染色体上に72個の遺伝子を含む大規模なクラスター構造(chromosome2MC:C2MC)を取っており、その標的遺伝子として多くのがん抑制因子が含まれていることを明らかにした。C2MCは齧歯類特異的MCであるが、ヒトには同様に胎盤で高発現を示すMCであるChromosome19MC(C19MC)が存在する。C19MCは、46個の連続したmiRNA遺伝子を含むヒトゲノム上で最大のMCの一つであり、C2MCとの配列類似性も示唆されているものの、その機能は未だ明らかにされていない。本研究では、胎盤形成において抑制的に制御されているがん抑制因子とmiRNAとのカスケードを明らかにすると共に、ヒト型C19MCが胎盤形成においてどのような役割を持っているのかを明らかにするためにマウスモデルを作製することを目的としている。

【方法】 本研究では、第一に、胎盤形成過程においてC2MCにより抑制的な制御を受けているとされる102個の遺伝子のうち、(1) C2MC KO マウス胎盤で発現上昇が大きいこと、(2) 胎盤での機能が未知であること、を指標として12個の遺伝子を本課題に供する遺伝子として選別し、これら12種類の遺伝子において、Triple target CRISPRと呼ばれるゲノム編集方法によりノックアウト産仔を作製した。Founder世代にて妊娠満期である19.5日齢で帝王切開を行い、(1) 産仔体重、胎盤重量を測定した。また、(2) 遺伝子発現量を測定した上で、(3) 胎盤形態を観察した。得られた産仔は里親に哺乳させ、(4) 離乳まで成長を観察した。Negative controlとしてチロシナーゼ遺伝子をターゲットとすることで、産仔体重・胎盤重量、離乳率を測定し、同時に毛色を観察することで、同手法を用いたゲノム編集効率も測定した。齧歯類型のC2MCに対して、ヒトにはこれに類する胎盤発現性のC19MCが存在している。本研究ではC19MCの機能を明らかにするために、マウス受精卵にヒト大腸菌人工染色体(bacterial artificial chromosome:BAC)を導入することで、C19MCを導入したモデルマウスを作製することも試みた。

【結果】 Negative controlとして行ったチロシナーゼ遺伝子ノックアウトによるゲノム編集効率は97%であった。同様の方法を用いて、12種類の遺伝子においてノックアウト産仔の作製を行ったところ、1遺伝子において胎盤重量の低下が観察された。また、3遺伝子においては産仔体重の低下が観察された。4種の遺伝子においては胎盤重量に有意差はないものの、胎盤の層構造に変動が見られた。また、C19MC導入マウスを作製するために、ヒトBACを用いて、マウス受精卵への遺伝子導入を行った。現状では、遺伝子導入が認められる生存個体は得られていないが、胚移植後、妊娠中に死亡した胎仔には導入されていることが認められた。したがって、C19MCの過剰発現は、胎仔の正常な発生に影響している可能性が示唆される。

野生型とC2MCノックアウト型における胎齢11.5日胎盤形態



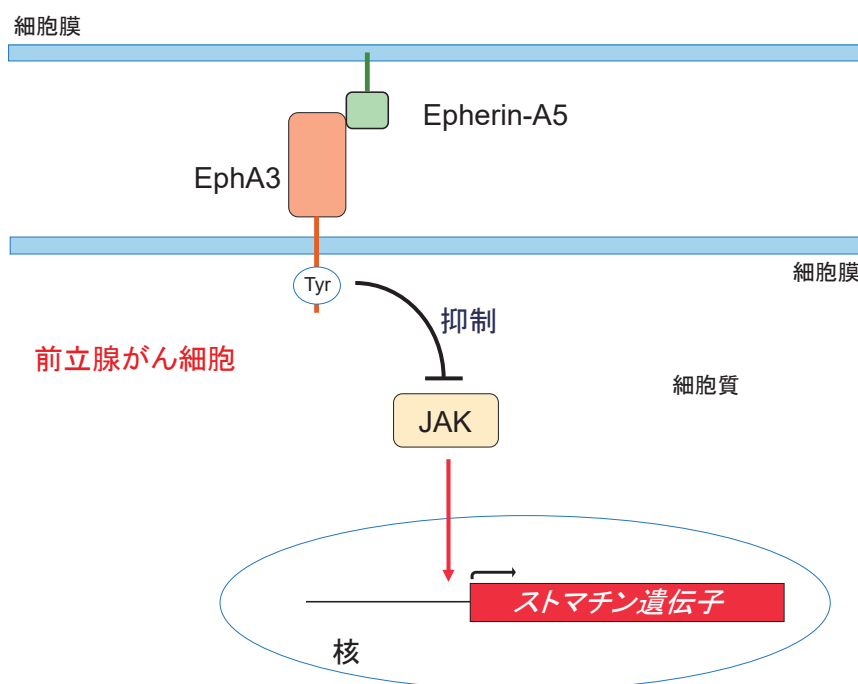
スケールバー: 1mm

【目的】前立腺がんは全体としては比較的予後の良いがんとして知られているが、一部に去勢抵抗性（アンドロゲン非依存性）となり悪性化するものがある。この去勢抵抗性の分子メカニズムについては未解明の部分が多く残されており、その解明は泌尿器腫瘍領域における重要な課題の一つである。本研究では、我々が独自に見出した抗腫瘍作用を持つ細胞膜裏打ち分子ストマチンに着目し、この分子と去勢抵抗性前立腺がんとの関連について検証することを主な目的とする。さらに、解明した分子メカニズムをもとに、去勢抵抗性前立腺がんに対する新たな治療法開発研究に向けた基盤構築についても検討する。

【方法】前立腺がんにおけるストマチンの発現制御機構に EphA-ephrin-A 系が関与していないか調べるため、これらの分子のノックダウン、qPCR、ウェスタンブロッティングを施行した。EphA3 による細胞内シグナルとストマチンの発現との関連を調べるため、EphA3 の細胞内シグナル伝達に必要な C 末端を欠失した EphA3 発現ベクターを作製し、免疫染色実験を行った。EphA3 下流のシグナル伝達に関わる JAK の阻害薬を使用した。前立腺がん細胞が増える速度について調べるため、一定数の細胞を培養ウェル上に播いた後、2 日ごとに細胞数をカウントした。

【結果】抗腫瘍作用を有するストマチンの発現が低下した前立腺がんは去勢抵抗性となり悪性度（増殖能・運動能の亢進）が高くなるが、ストマチンの発現を抑制する機構として、がん細胞間での EphA3 と ephrin-A5 の結合が重要であることを見出した。逆に、LNCaP 細胞で EphA3 または ephrin-A5 をノックダウンするとストマチンの発現量が増加した。さらに、このノックダウン細胞では LNCaP 細胞の増殖が抑制された。C 末端を欠失した EphA3 を LNCaP 細胞に過剰発現させてもストマチンの発現が増加したことから、EphA3 による細胞内シグナル伝達がストマチン発現抑制に必要であった。一方、EphA3 ノックダウンによるストマチン発現増加は、JAK 阻害薬の追加投与により、コントロールレベルにまで抑制されたことから、EphA3 シグナルは JAK を抑制することでストマチンの発現を抑制していると考えられた。

EphA-ephrin-A 系によるストマチン発現制御機構



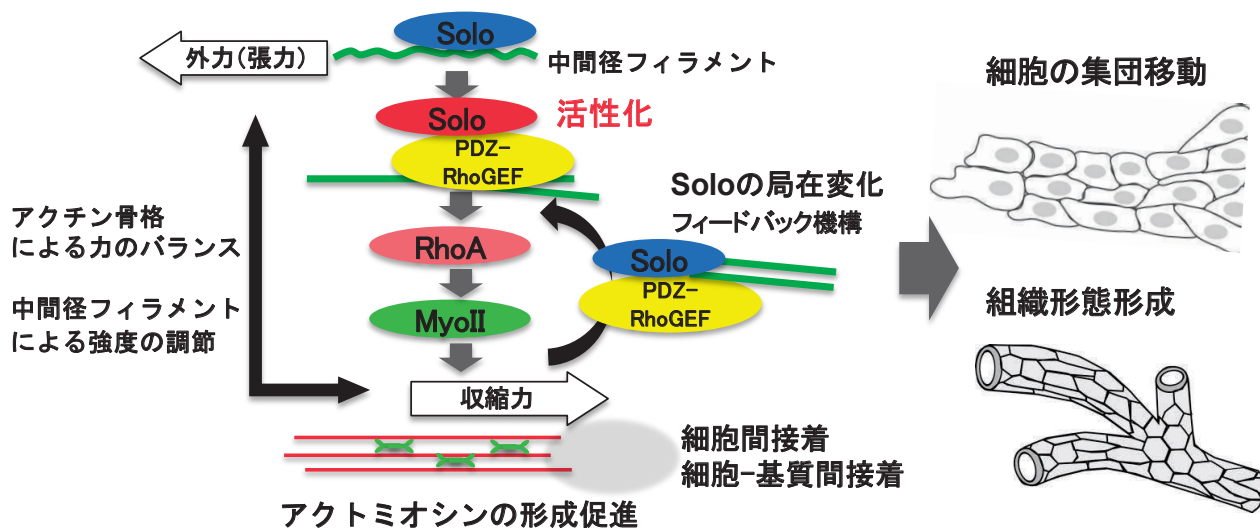
24 上皮細胞集団の力学的秩序を制御する分子機構の解明	大橋 一正
------------------------------------	--------------

【目的】 細胞は、多様な機械的な力を受けており、これを感知して応答する（力覚応答）を行うことが知られている。細胞内アクチン骨格は、細胞の形態と運動を制御する主要な細胞骨格であり、力覚応答においても力の発生や形態の制御に重要な機能を担っていると考えられるが、その分子機構は未だ多くの部分が不明である。私たちは、アクチン骨格の再構築を制御する低分子量 G 蛋白質 Rho ファミリーの活性化因子である Rho GDP-GTP 交換因子 (RhoGEF) に注目して探索し、細胞の力覚応答に関与する Solo を同定した。さらに、Solo は、中間径フィラメントであるケラチン 8/18 繊維と結合して機能することを見出し、上皮細胞の集団移動や管腔形成に関与することを明らかにしてきた。本研究は、Solo と相互作用する蛋白質を網羅的に探索するとともに、細胞への力負荷実験方法を確立し、細胞に負荷される力を感知し、Solo を介してアクチン骨格とケラチン繊維ネットワークの再構築を行う分子機構とその生理的意義を解明することを目的に行った。

【方法】 1. Solo の結合蛋白質の網羅的探索：Solo に関与する蛋白質の網羅的探索は、生細胞における近位依存性ビオチン標識法により関心蛋白質の相互作用蛋白質を同定する BioID 法と質量分析を組み合わせたプロテオーム解析によって行った。見出された蛋白質の中で Solo と機能的関与が見出された PDZ-RhoGEF について、イヌ腎上皮 MDCK 細胞をモデルにアクチン骨格の再構築に対する Solo と PDZ-RhoGEF の相互作用の働きを解析した。2. 細胞への張力負荷実験方法：細胞を簡単に引っ張るために、MDCK 細胞を用い、化学誘導二量体化法を用いて任意の時に収縮させることができる MDCK 細胞（収縮細胞）を作製した。この収縮細胞を用いて蛍光蛋白質 YFP を融合した Solo (YFP-Solo) を発現する MDCK 細胞が収縮細胞によって引張られる様子を蛍光顕微鏡によって観察した。

【結果】 1. Solo の結合蛋白質の網羅的探索：BioID 法を用いた Solo の相互作用蛋白質のプロテオーム解析より、これまでに見出されていたケラチン 8/18 に加え、アクチン骨格と中間径フィラメントとの結合蛋白質や細胞膜骨格の構成蛋白質、Solo と同じ RhoGEF である PDZ-RhoGEF が同定された。2. Solo 結合蛋白質としての PDZ-RhoGEF の機能解析：PDZ-RhoGEF について、Solo に対する機能を解析した結果、PDZ-RhoGEF は、Solo が集積する細胞基底部に集積し、その部位での Solo によるアクチン重合を促進した。これらの結果から、Solo と PDZ-RhoGEF は、カスケードを形成して力覚応答に働いていることが強く示唆された。3. 細胞間接着部位への力負荷依存的な Solo の局在化機構の解析：YFP-Solo を発現する MDCK 細胞を収縮細胞によって引張った結果、引張開始から 30 分以降に細胞間接着部位へ YFP-Solo が集積する様子が観察された。この結果から、Solo は、細胞間接着部位の張力によって局在が制御され、ケラチン繊維ネットワークを再構築して、細胞間接着部位の強度の調節を担っている可能性が考えられた。

Solo を介したアクチン骨格と中間径フィラメントの共役による細胞の力学的環境の制御

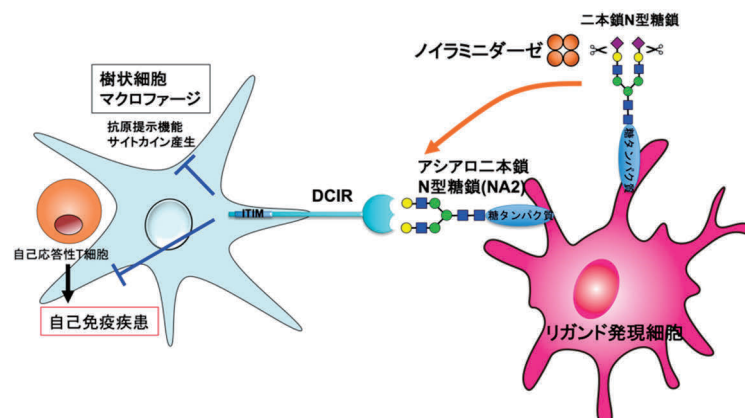


【目的】関節炎発症関連遺伝子のひとつとして同定された C 型レクチン受容体 DCIR (Dendritic Cell ImmunoReceptor) は細胞内領域に抑制シグナルを惹起する ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif) モチーフを持ち、樹状細胞等のミエロイド系細胞に発現する。この構造的特徴と発現細胞の種類から DCIR は免疫システムの抑制的制御を担う受容体のひとつであることが推測された。実際に、我々は *Dcir*^{-/-}マウスが加齢に従い自己免疫様疾患を発症すること、関節部位に骨量増加を伴う強直を自然発症することを見出した。これらのことから DCIR は免疫システムと骨代謝系を制御するユニークな C 型レクチン受容体であり、その制御破綻は疾患発症につながる事が示された。受容体の機能発揮にはリガンドとの相互作用が重要であるが、DCIR の機能的リガンドは不明であった。DCIR は細胞外領域に糖鎖認識部位を持つことから糖鎖と結合することが予想された。我々は独自に DCIR リガンドの探索を行い、高感度 glycan microarray 法を用いて DCIR がアシアロ二本鎖 N 型糖鎖 (NA2) に結合することを発見した。また DCIR-NA2 の相互作用は細胞機能を抑制的に制御することから NA2 は機能的リガンドであることが判明した。これらのことから末端の糖鎖修飾状態が免疫応答の制御に関与する可能性が示唆されたことから、DCIR-NA2 の相互作用がどのように免疫応答を制御するのかを明らかにする研究を着想した。

【方法】自己免疫疾患の発症に関与する責任細胞のひとつである T 細胞に DCIR は発現していない。DCIR は T 細胞の分化・機能を制御する樹状細胞 (DCs) に発現することから、DCIR-NA2 による DCs の機能制御機構と二本鎖糖鎖の脱シアル化機構を解明することを目指した。CD11c⁺細胞の RNA-seq 解析から *Dcir*^{-/-}DC は TLRs 関連の遺伝子の発現上昇が認められたことから、GM-CSF で誘導した樹状細胞 (GM-DCs) を TLRs アゴニストで刺激し上清中のサイトカイン濃度を ELISA 法にて検出した。また糖鎖末端を修飾するシアル酸の修飾制御を調べるために GM-DCs と M-CSF で誘導したマクロファージから mRNA を回収し、ノイラミニダーゼ (Neu1-4) とシアルルトランスフェラーゼの遺伝子発現を検討した。

【結果】糖鎖認識受容体 DCIR による DCs の機能制御を調べるために、WT と *Dcir*^{-/-}マウスから誘導した GM-DCs を各種 TLRs アゴニストにより刺激し、上清中のサイトカイン濃度を測定した。その結果、検討したアゴニストの刺激において *Dcir*^{-/-}GM-DCs は一種類の TLR アゴニストの刺激に対してサイトカインの産生が亢進した。GM-DCs と M-CSF で誘導したマクロファージから mRNA を回収し、Neu1-4 とシアルルトランスフェラーゼの遺伝子発現を検出した。GM-DCs では Neu1 の発現が最も高く、またノイラミニダーゼとシアルルトランスフェラーゼの発現が *Dcir*^{-/-}GM-DCs において減少傾向であった。マクロファージにおいても Neu1 の発現が最も高く、*Dcir*^{-/-}マクロファージにおいて Neu1 の発現が有意に増加していた。さらにシアルルトランスフェラーゼに関しても *Dcir*^{-/-}マクロファージではその発現が有意に亢進していることが明らかになった。

DCIR を介した免疫応答制御機構



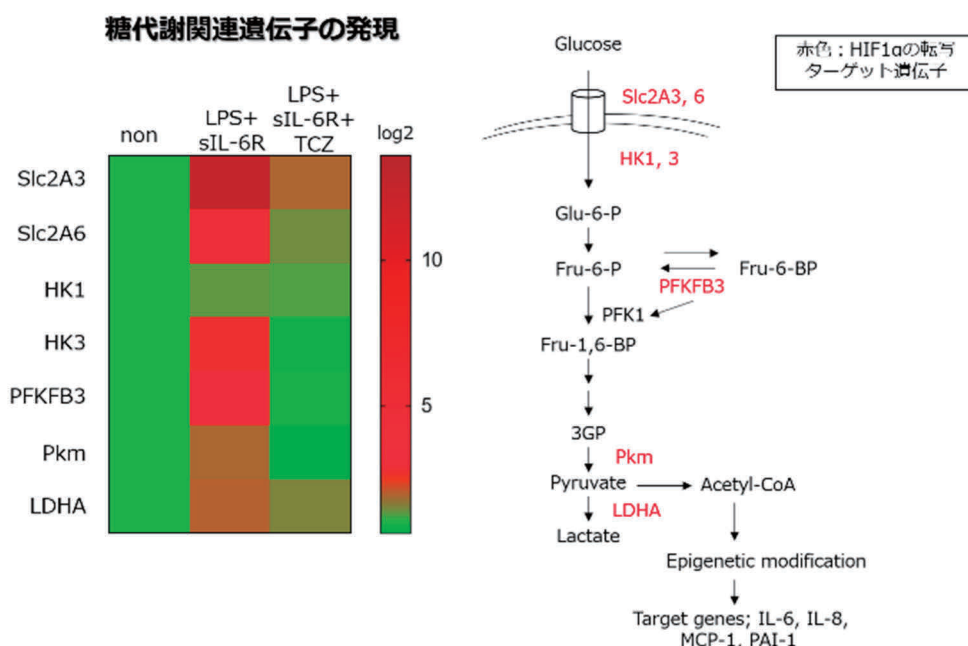
26	血管内皮細胞におけるエピゲノムと代謝のクロストーク	姜 秀辰
----	---------------------------	------

【目的】 組織損傷や感染によって血管内皮細胞に炎症が生じると、凝固因子の発現が増加し、血栓形成を強力に誘導する。このような血管内恒常性の破綻は全身性炎症反応の重症化に大きく関与する。しかし、何故血管内皮細胞の傷害で凝固と炎症のカスケードが誘導されるのかについては未だに不明である。本研究では、IL-6 受容体シグナルにより誘導される代謝分子である HIF1 α 因子に着目して「血管内皮細胞における代謝と炎症のクロストークの分子基盤の解明」を目指す。

【方法】 血管内皮細胞における IL-6 受容体シグナルの詳細を解明するため、RNA-seq を行った。siRNA による gp130 をノックダウンした HUVEC を用い、糖代謝およびエピゲノム解析を行った。更に血管内皮細胞特異的 gp130 欠損マウスを作製し、敗血症、ARDS、熱傷などの様々なサイトカインストームマウスモデルを用い、生体における gp130 シグナルを評価した。

【結果】 HUVEC を用い、gp130 遺伝子をノックダウンすると IL-6 受容体シグナルに対し炎症性サイトカイン産生や PAI-1 の産生が減少した。さらに、IL-6 受容体の下流シグナルにおける遺伝子制御機構を明らかにするため、RNA-seq 解析により、IL-6 受容体シグナル依存的に HIF1 α 及びその下流遺伝子が制御されることが明らかとなった。この結果から、IL-6 受容体の下流に存在する HIF1 α は糖代謝を介して血管内皮細胞活性化を制御することが明らかとなった。HIF1 α は gp130 シグナルによりその発現が制御されることから、IL-6 受容体シグナル活性により糖代謝に必要な酵素発現を検討した。その結果、HIF1 α により転写制御される複数の糖代謝関連酵素遺伝子の発現が IL-6 受容体シグナル依存的に誘導された。さらに、HIF1 α の阻害剤である PX-478 をマウスに投与し、エンドトキシンモデルにおけるグリコカリックスの脱落を検討した結果、PX-487 処理群は血中 syndecan-1、PAI-1 が対処群と比べ、顕著に減少した。これらの結果から、血管内皮細胞における IL-6 受容体—HIF1 α パスウェイが血管内皮細胞のグリコカリックスの安定化を制御することが明らかとなった。

IL-6 受容体シグナルによる血管内皮細胞における解糖系経路関連遺伝子の発現

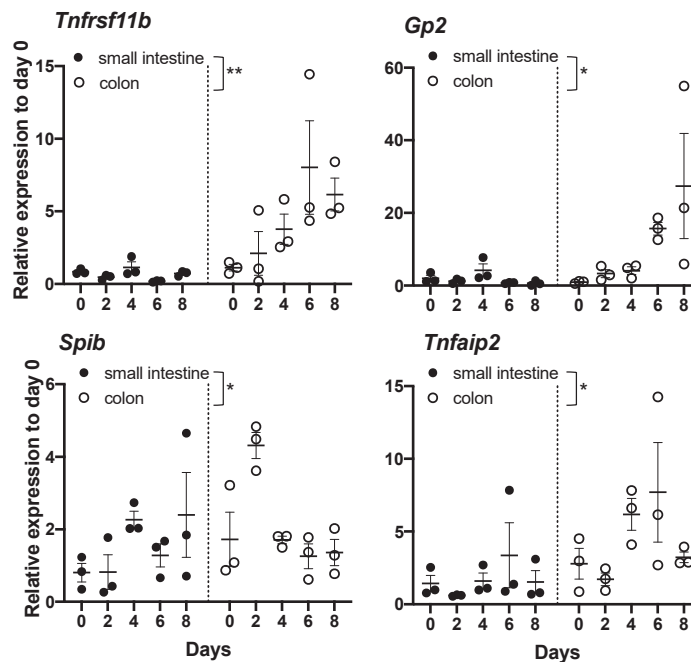


【目的】 内なる外である消化器には多くの外来抗原や常在微生物が存在している。これらの異物に対する個体防御のため、消化管は高度な免疫システムを備え、生体恒常性の維持に貢献する。免疫システムの誘導装置として機能するパイエル板などのリンパ組織は、絶えず外来抗原をモニターし、分泌型 IgA の産生を行う。こうした免疫監視が正常に機能するためには粘膜上の抗原が上皮下のリンパ球に認識される必要がある。そのため、パイエル板を覆う濾胞上皮には M 細胞と呼ばれる特殊な上皮細胞が存在し、粘膜面に存在する抗原を取り込み、粘膜免疫応答を活性化する役割を持つ。M 細胞は抗原取り込みに特化するための様々な特徴を備える。管腔側の微絨毛は通常の吸収上皮に比べて疎であり、そこに存在する糖衣も薄く、外来抗原が細胞に接触しやすい構造となっている。さらに M 細胞表面には Glycoprotein 2 (GP2) を始めとする病原性微生物に対する受容体が発現しており、M 細胞からの抗原取り込みを促進する。一方で、バリアが脆弱な M 細胞の構造は異物が侵入しやすいという側面も持ち合わせている。実際にある種の病原微生物や毒素は選択的に M 細胞を標的として生体内に侵入する。このような理由から M 細胞の分化は自己抑制機構を含む厳密な制御下におかれ、その数が制限されている。このような制御機構のもとで、定常状態ではパイエル板の濾胞上皮に限局し、小腸絨毛、大腸上皮にはほとんど存在しない。ところが、炎症性腸疾患、感染症においては M 細胞の異所性の出現が認められる。しかしながら、これらの炎症性 M 細胞の病態における役割は不明である。そこで、本研究では、炎症誘導 M 細胞の性状解析を行い、その分化メカニズム、炎症性腸疾患における役割を明らかにすることを目的とした。

【方法】 デキストラン硫酸ナトリウム塩 (DSS) による大腸炎モデルマウスを作製し、その腸管上皮を分離し、定量的 PCR 法、免疫組織染色法により M 細胞関連分子の発現を解析した。

【結果】 DSS 処理後 2 日で M 細胞関連因子の発現上昇並びに M 細胞の出現が大腸上皮において認められた。

DSS 大腸炎モデルの大腸上皮における M 細胞関連分子の発現上昇



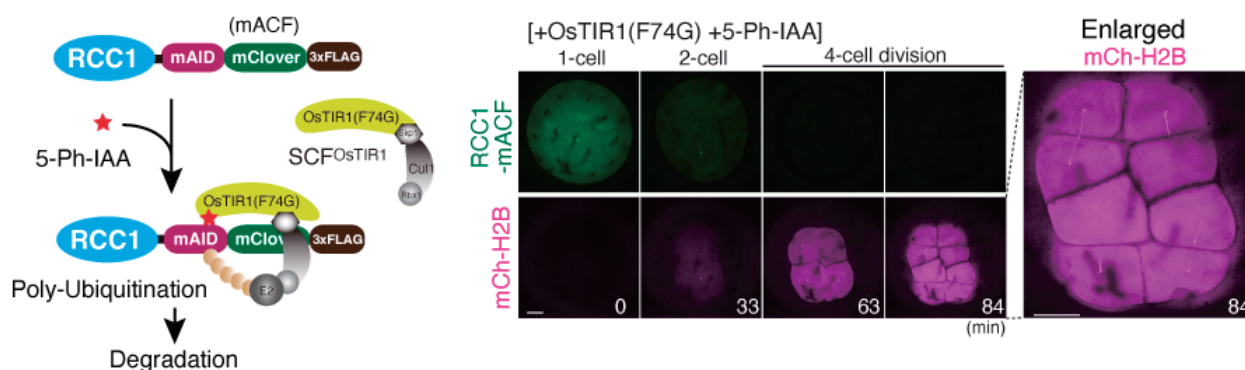
【目的】 初期胚分裂の異常は、出生異常や発生異常につながりうる。しかしヒトの初期胚分裂の研究は、技術的、倫理的制約があるため、体細胞分裂に比べてほとんど進んでいない。また脊椎動物の初期胚は、分裂周期が速く、かつ母親由来の mRNA やタンパク質をすでに内包するため、DNA や mRNA を標的とした従来の手法では必須遺伝子の機能を適切なタイミングで十分に解析することができない。本研究では、最新のタンパク分解技術である改良型オーキシン誘導デグロン (auxin inducible degron 2 : AID2) 法をメダカ初期胚に適用し、メダカ初期胚分裂において必須遺伝子を同定するための実験系を樹立することを目的とした。標的遺伝子としては、高度に保存され、初期胚でも発現が見られると予想される *RCC1* 遺伝子とダイニン重鎖遺伝子 (*DHC1*) を選定した。

【方法】 まずは CRISPR/Cas9 法を用いて、メダカの汎用系統 OK-Cab の *RCC1* 遺伝子部位に mAID-mClover-3×FLAG (mACF) タグを挿入し、ホモ接合体を作製した。次に、AID2 法に必要な補因子 OsTIR1 (F74G) と mCherry-H2B を共に発現する mRNA を合成し、それをホモ接合体のペアから採取した 1 細胞期の初期胚にマイクロインジェクションした。インジェクションした初期胚を、オーキシンアナログの 5-Ph-IAA (10 μM) に 30 分間浸した後、顕微鏡観察用の dish に移動し、5-Ph-IAA を含む溶液中で分裂の様子を観察した。撮影は、スピニングディスク型共焦点顕微鏡 (CSU-W1) と 20×水浸レンズを用いて行った。コントロールとしては DMSO、あるいは OsTIR1 (F74G) を含まない mRNA を用いた。

【結果】 ビオチン化 dsDNA をドナーに用いることにより、mACF タグの cDNA を *RCC1* 遺伝子にノックインすることに成功した。同様の手法により *DHC1* 遺伝子にもインジェクションを行ったが、複数回の試行にも関わらずノックイン系統を取ることができなかったため、その後の実験は *RCC1*-mACF ノックイン系統を用いて行った。*RCC1*-mACF の緑色蛍光は、ヒトの培養細胞同様に、間期核と分裂期染色体上に強く観察された。OsTIR1 (F74G) と mCherry-H2B を発現させると、mCherry-H2B の赤色蛍光が、2 細胞期あたりから観察され、4 細胞期あたりにはより強く観察された。コントロールの DMSO を浸しても *RCC1*-mACF の緑色蛍光の様子に変化は見られなかったが、5-Ph-IAA を添加すると、mCherry-H2B の赤色蛍光の輝度の増加に伴い、*RCC1*-mACF の緑色蛍光は減少し、4 細胞期あたりにはほとんど検出されなくなった。コントロールの細胞ではこのような *RCC1*-mACF の輝度の減少は見られなかったことから、メダカの初期胚において、AID2 法による標的タンパク分解系の樹立に成功したと結論付けた。

また重要なことに、*RCC1* を分解した細胞では、分裂期に進行するものの、染色体が正しく娘細胞に分配されずに異常に伸びて収縮環に挟まれる様子が観察された。コントロールの細胞では、このような染色体の異常分配の様子は全く観察されなかったことから、メダカ初期胚では *RCC1* が染色体の均等な分配に必須の役割を担うことが示唆された。

AID2 法の概要とメダカ初期胚における *RCC1* タンパク分解の様子

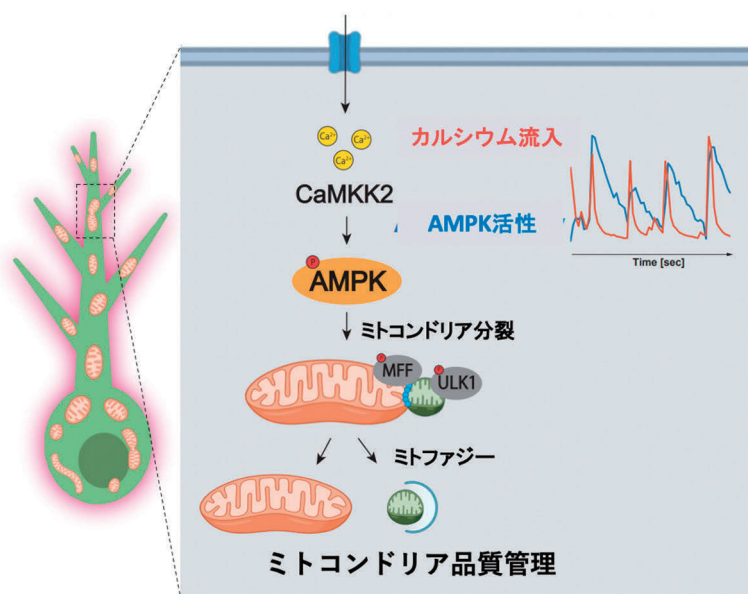


【目的】 ニューロンは神経活動に伴う間断ないイオン能動輸送のため多くの ATP エネルギーを要する。特に未成熟なニューロンは、急速な突起伸長に伴う細胞骨格再編成と細胞内輸送に莫大な ATP エネルギーを必要とし、ミトコンドリアを盛んに生合成して突起全長へ運搬することが明らかになっている。近年ミトコンドリア分裂・融合および共役する品質管理、生合成の細胞分子機構は急速に解明されているが、ニューロンのような活動状態が時空間的に激しく変動する細胞において、ミトコンドリアダイナミクスの平衡が如何に動的に制御されるかは明らかでない。本研究では、海馬錐体ニューロンの神経活動依存的な樹状突起発達において、ミトコンドリア分裂・融合の時空間ダイナミクスとその制御機構を明らかにすることを目標とした。

【方法】 1. ライブ観察：マウス胎児から採取した海馬ニューロンを初代培養し、pAAV-CAG-mitoDsRed を導入してミトコンドリア動態を、スピニングディスク共焦点顕微鏡 CV1000 を用いて観察した。AMPK 活性は AMPKAR-EV および jRGECO1a を導入したニューロンを用いて蛍光顕微鏡 IX83 で 5 秒間隔 5 分間解析した。TMRM 計測は、mito-GFP を導入した培養ニューロンを 20 nM TMRM で 1~2 時間処理したのち CV1000 を用いて 5 秒間隔 10 分間行った。活性酸素発生は、mito-SOX を導入したニューロンを CV1000 で観察して定量評価した。2. 免疫染色：培養ニューロンを 4%パラホルムアルデヒドで固定後、0.25%TritonX-100/PBS で透過処理した。一次抗体と二次抗体で反応後、レーザー共焦点顕微鏡 FV1000 で観察した。

【結果】 培養下でシナプス形成前の未熟な海馬ニューロンの自発発火を抑制し、成長を遅延させた樹状突起では、ミトコンドリア分裂が阻害され長大化していた。この時期に活性が上昇する AMPK を shRNA ノックダウンすると、神経活動の抑制と同様に樹状突起成長が遅延し、ミトコンドリア分裂が阻害され長大化した。AMPK 活性を FRET プローブでライブ観察すると、カルシウムスパイクと同期して振動しており、カルシウム依存性 CaMKK2 の制御を受けることが明らかになった。さらに神経活動は AMPK を介してミトコンドリア分裂制御因子 MFF とオートファジー制御因子 ULK1 を活性化することが明らかになった。AMPK 欠損下では樹状突起ミトコンドリア呼吸が低下する兆候が認められた。以上の結果より、神経活動が CaMKK2-AMPK 経路を活性化し、樹状突起成長に必要なミトコンドリア品質管理を制御することが明らかになった。

発達中の樹状突起における神経活動によるミトコンドリア品質管理の分子経路



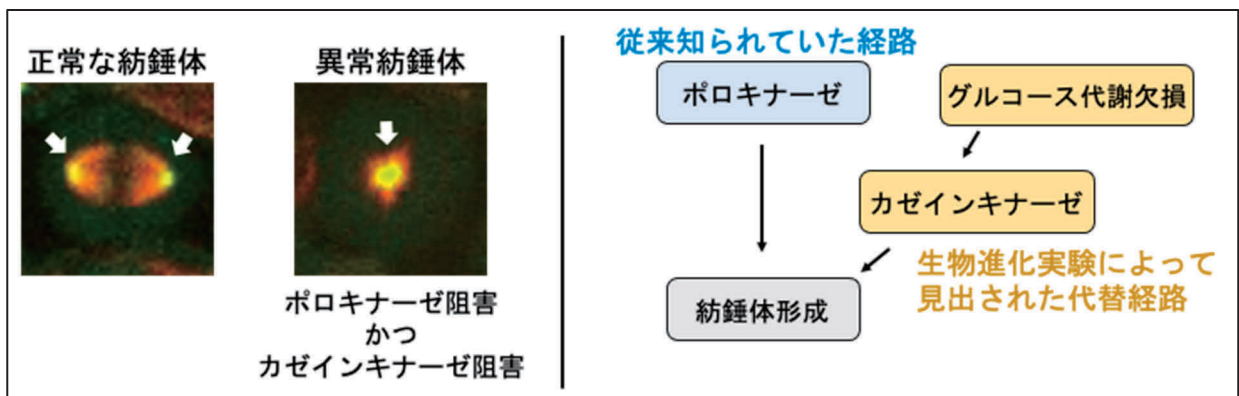
30 増殖する細胞の分裂阻害を無力化する機構の解明	五島 剛太
---------------------------	-------

【目的】 細胞分裂装置・紡錘体の形成には数十の遺伝子の働きが必要である。紡錘体形成に必要な遺伝子は、単細胞生物の酵母から多細胞の動物や植物に至るまで、広く共通していることが多いが、一方で、特定の遺伝子を持っていない生物種も存在する。この場合、その生物種は進化の過程で、まだ私たちが把握できていない遺伝子を使った機構を発達させたと考えられる。一方、細胞分裂制御タンパク質の阻害剤は抗癌剤として有力視されているが、別遺伝子の変異により必須性がバイパスされれば薬剤耐性となる（Synthetic Rescue : SR）。本研究では、細胞分裂に必須の遺伝子に対してSR現象を見出し、その機構の詳細を解明することを目標とした。それにより、細胞分裂の隠された制御機構を明らかにすることだけでなく、薬剤耐性の一因となるSR現象が生まれる要因を追究できると考えた。

【方法】 紡錘体形成に必須のタンパク質リン酸化酵素「Polo キナーゼ」に着目した。細胞分裂研究のモデルとしてよく用いられる分裂酵母に対し、生物進化実験と呼ばれる、実験室内で生物の遺伝子変異を蓄積していく方法を適用した。また酵母とヒト培養細胞において、Polo キナーゼ欠失条件での紡錘体の動態をライブイメージングした。

【結果】 Polo キナーゼを欠失しながら紡錘体をなお形成できる酵母の人為的作出に成功した。そのような酵母の多くはグルコース代謝経路に変化が生じていて、別のタンパク質リン酸化酵素「Casein キナーゼ 1」を介した紡錘体形成経路が働いていることがわかった。この経路が紡錘体形成に働くことはこれまで想定されておらず、新規の紡錘体形成機構が明らかになった。さらに、Polo キナーゼと Casein キナーゼ 1 の同様の関係性は、ヒトの大腸癌患者由来の培養細胞においても確かめられた。Polo キナーゼはヒトの癌細胞で発現量が上昇していることから、その阻害剤は抗癌剤として有力視されているが、癌細胞の分裂（増殖）を抑えるためには、新規機構との二重阻害が必要かもしれないことも示唆された。

細胞分裂制御キナーゼで見出された必須性バイパス機構



【目的】 マウスは生命科学研究における中心的な実験動物であり、多くのヒトの生物学の理解に貢献してきた。一方で、近年、ヒトとマウスの遺伝学的、生理学的違いも明確になってきており、このため、単純にマウスで得られた知見をヒトに外挿することが困難であることも広く理解され始めている。ゴールデンハムスター (Golden Syrian hamsters/golden hamster : *Mesocricetus auratus*) はヒトの生理学的および薬理的反応に似た多くの特徴を示すため、ヒトの病気、特に癌や感染症の発症研究や生殖研究に早くから実験動物として用いられてきた歴史がある。今回の Covid-19 パンデミックに際しても、感染・発症機構の解析に広くモデル動物として使用されている。しかしながら、マウスやラットのように近交系が十分に樹立されていないこと、ゲノム情報が不足していること、卵子や初期胚が光、温度、pH などの影響を極めて受けやすく発生工学技術の応用が難しいことから、遺伝子機能を解析するモデル動物として利用されることはなかった。本研究はゴールデンハムスターをヒト疾患モデル動物として利用するため、正確なゲノム DNA 配列情報の取得とゲノム編集技術の開発を目的とした。

【方法】 ゴールデンハムスター DNA のショートリード (イルミナ) とロングリード (PacBio) を組み合わせた解析を行い、高品質のゲノム配列情報を取得した。さらに、HiC (MesAur1.0_HiC、DNA Zoo) データを用いることで、これらを染色体レベル (2n=24) にまで組み立て、精巧な遺伝子のアノテーションを達成した。このゲノム配列情報を利用し、CRISPR-Cas9 システムを用いることで特定の遺伝子を不活化した (ノックアウト/KO) ゴールデンハムスターの作出に成功した。この際、ゴールデンハムスターの卵や初期胚が光の影響を極めて受けやすいため、暗室における胚操作技術を確認した。

【結果】 *PIWI* 遺伝子は哺乳類だけでなく多くの動物に保存された遺伝子群であり、それらがコードするタンパク質は生殖細胞特異的小分子 RNA (25~33 塩基長) である piRNA と複合体を形成し、転移因子 (トランスポゾン) が引き起こすゲノム配列・構造変異を抑制している。マウスでは 3 種の *Piwi* 遺伝子が存在し、それらが精巣でのみ機能していることが明確になったため、PIWI-piRNA 経路は哺乳類の卵子形成における機能はないと考えられてきた。一方、ヒトを含む多くの哺乳動物は 4 種の PIWI 遺伝子を有しており、このことから多くの哺乳動物は、マウスとは異なる PIWI-piRNA 経路による遺伝子の発現制御を有する可能性が提唱された。これを検証するために、ゴールデンハムスターの 4 種の *PIWI* 遺伝子の内、卵子で強く発現している 2 種類の *PIWI* 遺伝子 (*PIWIL1*、*PIWIL3*) の KO ハムスターを作製した。その結果、作製した *PIWI* KO ハムスター雌は不妊を示した。これらの結果はマウスを用いた研究では得られないものであり、哺乳動物の遺伝子解析におけるゴールデンハムスターの価値が示された。

遺伝子 KO ゴールデンハムスターの作製



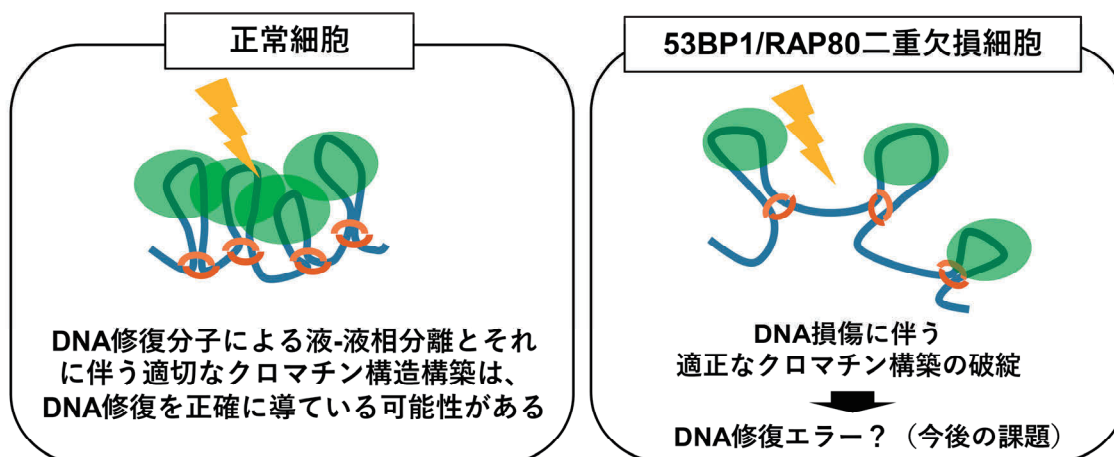
	number of founder pups	number of mutant pups	mutant hamster lines
gR-1	10	1	-
gR-2	4	4	#25A ^{del89} , #25B ^{del4} , #25C ^{del300} , #26A ^{del192} , #26B ^{del41} , #26C ^{del2} , #26D ^{del39} , #26E ⁺⁴
gR-3	4	3	#33A ^{del8} , #33B ^{del172} , #33C ^{del329} , #36A ^{del8} , #36B ^{del4}

【目的】 DNA 損傷の中でも、DNA 二本鎖切断 (DSB : DNA double strand break) は欠失・挿入変異や染色体転座を誘発することから最も重篤な損傷の一つと考えられている。これまでの我々の研究から、非相同末端連結 (NHEJ : non-homologous end joining) および相同組換え (HR : homologous recombination) が、「DSB 末端の削り込み」によって制御されていることが明らかになってきた。さらに我々は、NHEJ と HR の両方の修復経路が利用可能な G2 期において、NHEJ が第一経路として働き、NHEJ が停滞した場合に、DSB 末端を削りこむ DNA ヌクレアーゼ MRE11/CtIP が HR を開始させ、修復経路を HR へと向かわせることを発見した。また、DSB 近傍のクロマチン構造を蛍光イメージングにより解析すると、乳がん原因遺伝子である BRCA1 が 53BP1 の空間的再配置を促進させ、DSB 末端の削り込みを促進することを見出し報告している。すなわち、DSB 発生直後、53BP1 は DSB 近傍に集積し DSB 末端の削り込みを一時的に抑制し、その後 HR の進行時に伴い、53BP1 は DSB 遠位へと移動していた。一連の研究により得られた知見を統合することで、我々は「DSB 発生後、53BP1 が一過性に DNA 損傷部位に集積し不必要な削り込みを抑制することで、正確な DSB 修復経路へと導いている」という仮説を現在導き出している。一方、その他の研究グループから 53BP1 は液-液相分離により DNA 損傷部位に集積することが示された。また、次世代シーケンスを用いた ChIP-seq 解析から、1 か所の DSB に対して 53BP1 は 1~2 Mbp と非常に広範囲にわたり分布することが明らかになってきた。このように最新の知見を統合すると、53BP1 は DSB 部位に 1~2 Mbp と広範囲にわたり集積し、それらが液-液相分離を使い、DNA 修復に最適なクロマチン構造を再構築している可能性が考えられた。そこで本研究では、53BP1 およびその関連 DNA 修復分子について、超解像顕微鏡を使いその複合体の解析を行った。

【方法】 ヒト正常網膜色素上皮 (RPE : Retinal Pigment Epithelium) に対して X 線照射により DSB を誘発し、53BP1 および RAP80 を蛍光免疫染色によりラベルした後、超解像画像は 3D-SIM 顕微鏡 (DeltaVision OMX バージョン 4、GE Healthcare UK Ltd) により取得した。得られた画像は Imaris 8.1.2 (Bitplane) により解析を行った。

【結果】 ヒト正常細胞である RPE 細胞に対し、1 Gy の X 線を照射し、30 分後の 53BP1 シグナルを 3D-SIM OMX を用いて超高解像イメージングを行った結果、53BP1 は DSB 周囲に微小な集積体 (ナノドメイン) を形成することを見出した。すなわち DNA 損傷近傍において 53BP1 は、ヌクレオソームが構成するドメイン単位で修復を促進している可能性が考えられた。また我々は、53BP1 が欠損した状態だと別の修復因子である RAP80 が 53BP1 に代わり損傷部位に集積することを見出した。興味深いことに、53BP と RAP80 の同時欠損細胞を用いて、DSB 近傍のクロマチン構造を gH2AX シグナルによりモニターすると、異常な DNA 修復クロマチン構造体を示すことを見出した。以上の結果から、53BP と RAP80 は DSB 近傍にそれぞれ排他的に集積することで損傷近傍のクロマチン構造を制御し、DNA 修復を促進している可能性が考えられた。

DNA 修復タンパク質による適正なクロマチン構造構築



33 腎臓間質線維芽細胞による酸素供給恒常性の統合的制御

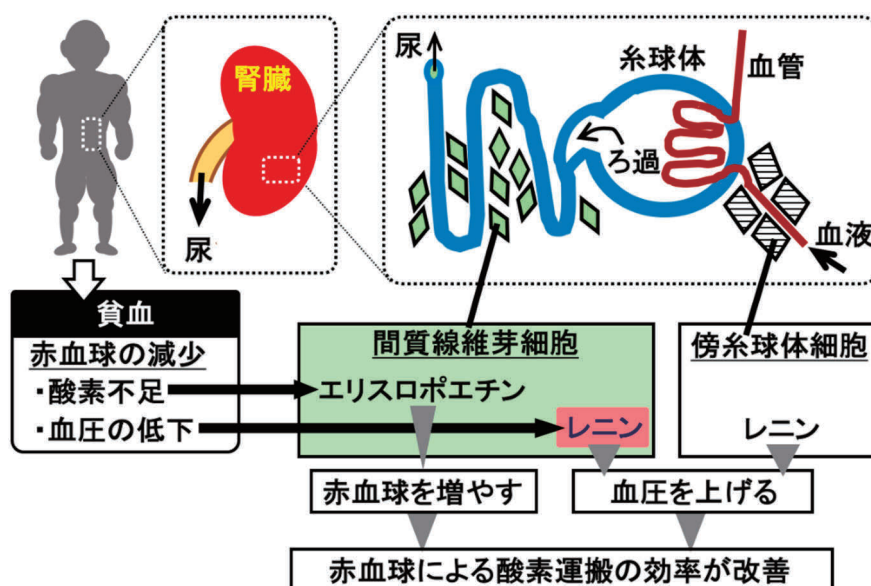
鈴木 教郎

【目的】腎臓の間質線維芽細胞は、赤血球増殖因子エリスロポエチンを低酸素誘導性に分泌することにより、酸素を運搬する赤血球の数を調節している。また、血圧を上昇させるレニンは、腎臓の傍糸球体細胞から分泌されることが知られていたが、研究代表者らは最近、血圧低下時に腎間質線維芽細胞でレニンの産生・分泌が誘導されることを発見した。以上の独自の知見は、腎間質線維芽細胞がエリスロポエチンやレニンを産生・分泌することにより、赤血球の分化増殖と循環を制御し、全身への酸素供給の恒常性を維持するうえで重要な役割を担うことを示唆している。そこで本研究では、これらの液性因子の腎間質線維芽細胞における産生制御様式を解明し、酸素供給維持機構に関する新知見を得ることを目的とした。

【方法】マウスの貧血モデル、腎障害モデルおよび低酸素曝露モデルを用いて、様々な負荷に対するレニン-アンジオテンシン系関連遺伝子の臓器別発現様式を RT-PCR 法より解析した。また、*in situ hybridization* 法により、エリスロポエチンおよびレニンの発現を組織レベルで調べた。ラットについても、同様の解析を実施した。さらに、腎臓病患者の腎生検組織切片の *in situ hybridization* を行い、ヒトにおける腎間質レニン産生について検討した。

【結果】貧血マウスの血圧を測定したところ、正常マウスよりも有意に低下していた。また、重篤な貧血時には、腎間質線維芽細胞から血圧を上昇させる作用のあるレニンが分泌されることをマウスおよびラットを用いた解析から確認した。そこで、貧血による低酸素と低血圧のいずれが腎間質線維芽細胞のレニン産生に影響を及ぼすかを検討したところ、低酸素ではなく、血圧低下であることが判明した。また、腎障害による腎線維化は腎間質のレニン産生を強く誘導し、マウスの全身血圧を上昇させることがわかった。以上の結果から、腎間質線維芽細胞は、エリスロポエチンとレニンを貧血誘導的に産生する能力を備えているが、その誘導機構は異なることが示された。

腎間質線維芽細胞による赤血球循環の制御



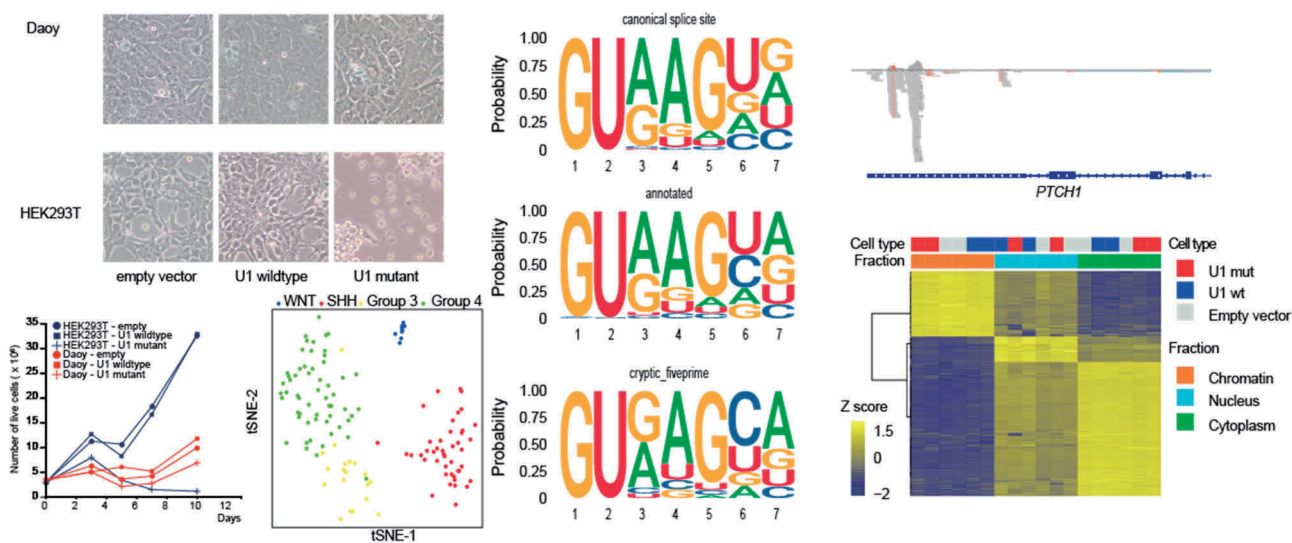
34 髄芽腫におけるスプライシング異常の解明 鈴木 啓道

【目的】 髄芽腫は小児悪性脳腫瘍の中で最も頻度が高く極めて悪性度の高い疾患である。これまでの研究で、ノンコーディング遺伝子である U1 small nuclear RNA (U1 snRNA) に変異が好発していることを発見した。U1 snRNA の主な機能はスプライスサイトの認識であり、変異が生じることにより髄芽腫細胞内ではスプライシング異常が生じていることがわかっていた。スプライシング異常は 1,000 を超える遺伝子に生じているが、有効な治療開発のための治療標的は病態の形成に不可欠なイベントを標的にする必要がある。そのため本研究では、病態の形成・維持に関与する重要な RNA スプライシング異常を同定し、具体的な治療開発につなげていくことを目的とする。

【方法】 レンチウイルスベクターを用いて U1 snRNA 発現髄芽腫細胞株を作製した。日本小児がん研究グループのご協力を得て、髄芽腫 173 例に対し、アレル特異的な PCR と RNA-seq を用いて、U1 snRNA 変異の検出と髄芽腫サブグループ分類を行った。自験例 RNA-seq に加え、公開されているシーケンスデータ 221 例を用いてスプライシング異常解析を行った。また、2 例については一分子ロングリードシーケンスによる全長 RNA シーケンスデータを取得した。RNA 細胞内代謝プロセスの解明のため、ポリアデニル化領域が解析可能な 3'READS+法の改良を行った。また、細胞内 RNA 局在を解析できる、subRNA-seq の手法を確立した。

【結果】 変異型 U1 snRNA 発現細胞株は確立され、発現が確認された。173 例の臨床検体は髄芽腫の分子分類を行い、分子診断を確定し、以後の研究に使用した。スプライシング解析では 1,000 を超える遺伝子にスプライシング異常が同定された。公開データを用いた解析と比較すると、そのうちの約 30%は共通して認められていた。スプライシング異常の多くは影響がほとんどない passenger な異常であると考えられる一方、共通の異常も生じていることからその中にドライバーイベントが存在すると考えられた。スプライシング異常はスプライスサイト配列解析の結果変異により生じていることが確認された。改良型 3'READS+法を確立し、シーケンスリードの約 3 分の 1 がポリアデニル化領域を含んでいる効率的な濃縮が可能となり、ポリアデニル化領域の解析が可能となった。また subRNA-seq 手法の確立にて、細胞分画ごとの発現解析が可能となり、クロマチン領域では変異の導入にて 1,353 個の発現差異遺伝子が同定された。髄芽腫細胞内における RNA の代謝異常の解明が進み、今後解析を進めることでドライバーイベントの同定に繋げていく。

髄芽腫細胞株と臨床検体を使用したスプライシング異常の解析

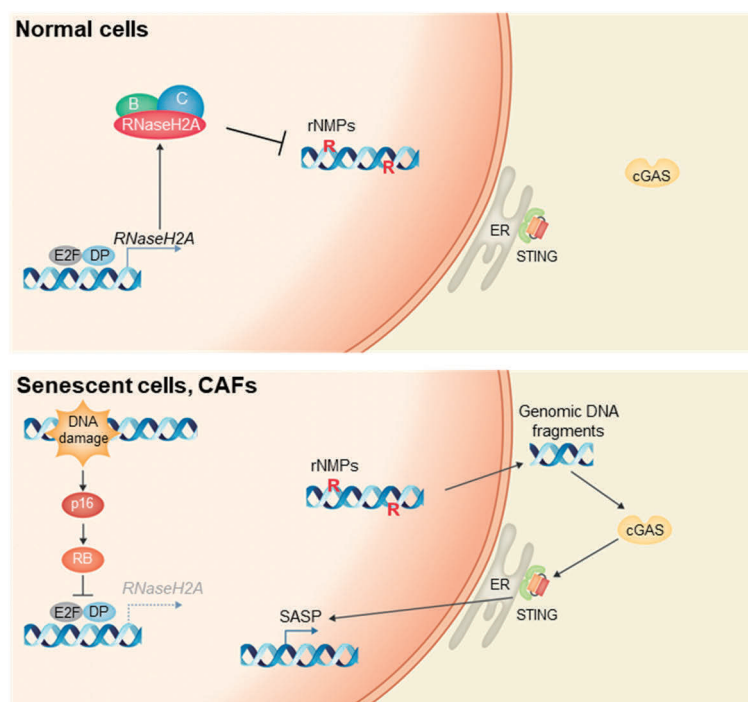


【目的】加齢に伴うがんの罹患率の上昇と体内に蓄積してゆく老化細胞の数には正の相関関係が認められ、老化細胞が炎症性蛋白質を分泌する SASP (Senescence-associated secretory phenotype) を介して、発がんやがんの進展に関与していることが明らかになりつつある。老化細胞では、細胞質のゲノム DNA の断片が細胞質核酸センサー経路を活性化することが SASP の誘導に重要であり、DNA/RNA ハイブリッドの過剰産生も自然免疫応答の活性化と SASP を誘導するという知見を得ていたが、なぜ老化細胞ではゲノム DNA 断片や DNA/RNA ハイブリッドのような核酸リガンドが産生されるのか、その分子メカニズムは不明であった。そこで、SASP 誘導の引き金となる核酸リガンドの産生機構と新規核酸センサーの活性化メカニズムを明らかにすることを目的として研究を行った。

【方法】ヒト正常線維芽細胞 (TIG-3) に継代培養もしくは活性化型 Ras 誘導性の細胞老化を誘導する前後の細胞の RNA シークエンス解析から、ゲノム DNA の不安定性と断片化に関わる因子の探索を行った。

【結果】染色体の不安定性と RNA/DNA ハイブリッドの産生に関わる因子として、老化細胞では RNA 分解酵素である RNaseH2 の触媒サブユニットの RNaseH2a の発現が低下していることを見出した。ヒト *RNaseH2a* 遺伝子のプロモーター解析から、細胞老化で転写活性化が低下する E2F 転写因子複合体が結合する配列が複数存在し、E2F 転写因子複合体が *RNaseH2a* 遺伝子の発現誘導に機能していることを見出した。老化細胞では RNaseH2 活性が有意に低かったため、細胞老化誘導前後の細胞のゲノム DNA をアルカリ条件下でアガロース泳動を行うと、老化細胞では DNA 断片の長さが有意に低下しており、多くのリボヌクレオチドがゲノム DNA 中に残存していることが示された。TIG-3 細胞で RNaseH2A のノックダウンを行ったところ、SA- β -Gal 活性の増加と細胞質におけるゲノム DNA 断片蓄積と、各種老化マーカーが確認された。さらに、細胞質核酸センサーである cGAS もしくは STING のノックダウンにより SASP 因子の発現が抑制されたことから、RNaseH2A の発現低下によって核酸リガンドが産生されることが、細胞質核酸センサーの活性化を介して SASP 遺伝子の発現を誘導することが示された。最後に、TCGA データベース解析によって、大腸がん・子宮頸がん・卵巣がんの患者組織において RNaseH2a と E2F1 の発現には強い相関があること、また RNaseH2A の低発現が患者の予後不良に関わることを見出した。

老化細胞における RNaseH2a の発現低下と SASP 誘導のメカニズム



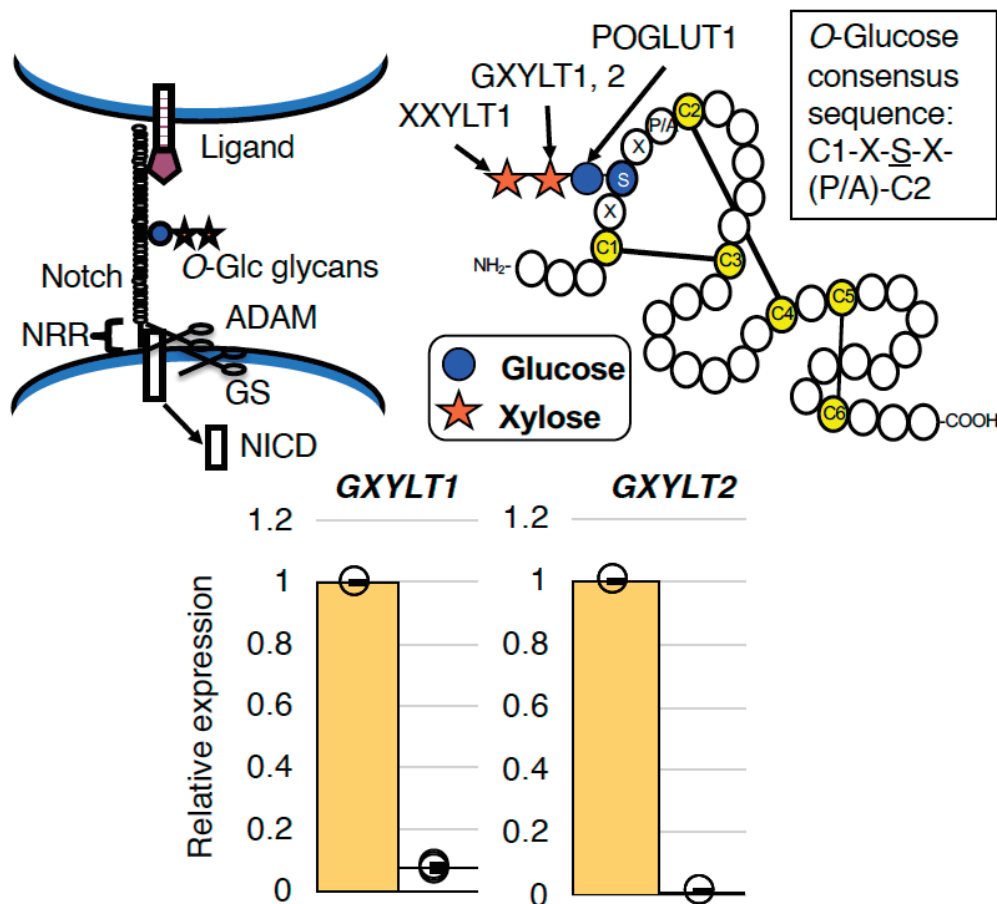
36 NOTCH糖鎖修飾による白血病細胞の増殖制御機構の解明 竹内 英之

【目的】 Notch シグナルの破綻が多くの種類の癌の発生、悪性度の進展、そして、転移に関わっている。急性骨髄性白血病 (AML) においては、*NOTCH1* の不活性化が細胞増殖を促進する。AML では Notch リガンドも *NOTCH1* 受容体も発現しているにもかかわらず、*NOTCH1* 受容体は不活性化しており、その機序は不明である。著者らは、Notch の細胞外部位における糖鎖修飾が、その活性化に重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。本研究では、AML の細胞増殖の亢進は、キシロース伸長の亢進によって *NOTCH1* の分子内相互作用が阻害されることによる *NOTCH1* の不活性化に起因するという仮説を立て、研究に取り組んだ。

【方法】 HL-60 細胞からゲノム DNA を抽出し、*GXYLT1* の当該領域を PCR により増幅、ベクターにクローニングしてシーケンス解析を行った。HEK293T 細胞と HL-60 細胞における *GXYLT1* および *GXYLT2* の遺伝子発現レベルを RT-qPCR 法により解析した。*O*-グルコース糖鎖のキシロースによる伸長の影響を解析するために、ヒト *NOTCH1* の EGF8-13 に相当する組換えタンパク質を作製した。キシロース転移酵素阻害剤探索のための受容基質 *NOTCH2*EGF12 を大腸菌発現系にて作製し、さらに、*in vitro O*-glucosylation 法を用いて、酵素学的に *O*-グルコース単糖を付加した。

【結果】 HL-60 細胞における *GXYLT1* のナンセンス変異 (R295*) は、ヘテロ変異であることが強く示唆された。*GXYLT1* および *GXYLT2*、いずれの遺伝子も、HL-60 細胞において発現していること、そして、HEK293T 細胞における発現レベルに比べて、低いことが分かった。今後の相互作用解析に用いる *NOTCH1*EGF8-13 タンパク質を作製可能であることが分かった。精製度の高い *O*-グルコース単糖の付加された EGF 受容基質を作製することに成功した。

NOTCH 受容体糖鎖修飾と生合成の関わる糖転移酵素

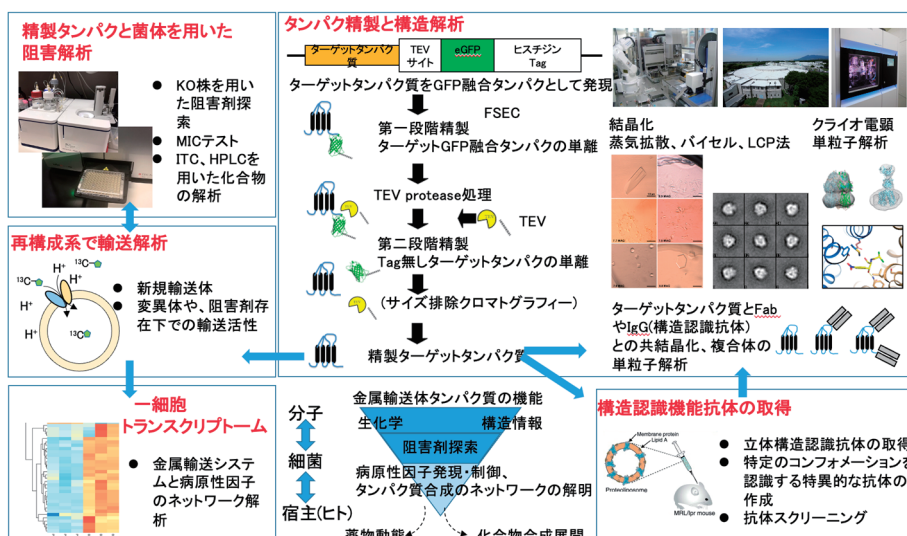


【目的】 薬剤耐性を持つ細菌が引き起こす感染症への対策として、1) 新規抗菌薬、2) 病原因子／毒素の抑制剤、3) ワクチンの開発が挙げられる。この3つの要素を同時に開発していくことを最終的な目標とする。本研究では特に肺炎の起原因菌となる肺炎球菌や黄色ブドウ球菌をモデルに、菌の生育と病原因子獲得の両方に重要な膜タンパク質群である金属イオン輸送体とその輸送システムに焦点を当て、これらの新規阻害剤を探索／発見し、活性を阻害することで感染細菌の病原性を抑え弱毒化する。精製タンパク質をベースに生化学と構造情報を利用し、小分子もしくは機能阻害抗体から、細胞レベルでの現象の解明と病原菌への感染予防を目指す。

【方法】 本研究は以下に示す6つのマイルストーンを達成することを目標とした。1) *Streptococcus* 属、*Staphylococcus* 属より、その生育に重要な影響を及ぼすことが示唆されており、かつ病原性を低下させる候補となる様々な膜輸送ファミリーに属する膜タンパク質を選定した。その中でも特に5つのタンパク質を標的として研究を開始した。今回まずターゲットとして選んだ膜タンパク質は、1) 鉄の排出輸送体 (P型ATPase)、2) 新規で機能未知のタンパク質 (ABC transporter)、3) 鉄イオン取り込みタンパク質 (ABC transporter)、4) シデロフォア輸送体 (MFS transporter)、5) 鉄の取り込みに重要なエンテロバクチン合成にも関わる薬剤排出トランスポーター (MFS transporter) である。これら標的タンパク質を大腸菌に発現し、精製し、活性測定を行った。既に阻害剤の開発が進んでいるタンパク質に関しては、入手可能なものはそれらを手し活性測定を行った。また標的タンパク質と阻害剤の立体構造解析のために、結晶化やクライオ電顕単粒子解析法を用いて構造解析を開始した。

【結果】 ターゲットとしたタンパク質に関してはどれも粗精製することができたが、安定性が低いタンパク質に関しては研究の進行を保留し、再度良質なタンパク質を得るための条件を探索している。その中でATPaseの活性測定や、輸送活性を測定し、さらに構造解析に適したものが得られたと考えられたものはKEK構造生物学研究センターが有する結晶化ロボットや200 kVクライオ電顕を用いてスクリーニング、また高分解の取得のため300 kVの電顕を用いて単粒子解析を開始した。うち2)のABC輸送体に関しては、現在4Åを超える分解能が得られ、構造予測プログラムAlphaFold2と組み合わせて解析することで構造モデルの構築に成功した。現在進行形で解析を引き続き行っている。5) 鉄の取り込みに重要なエンテロバクチン合成に関わる薬剤排出トランスポーターに関しては、同定されている阻害剤と一緒に現在抗体取得に向けて進行している。これらのトランスポーターの阻害により菌の毒性が妨げられるかまでは、本期間内には達成することができなかったが、引き続きその解析を続ける予定である。

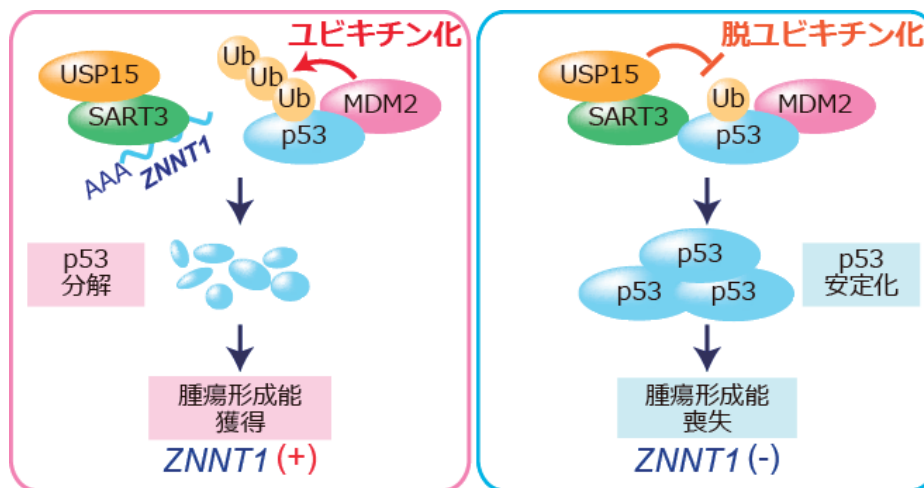
本研究で用いた実験手法とワークフロー



【目的】 ヒトゲノムの大部分の領域からタンパク質をコードしないノンコーディング RNA (ncRNA) が転写されていることが知られている。かつてはその大半がジャンクだと考えられてきたが、増殖・発生・分化・幹細胞性の維持といった様々な生物学的プロセスにおいて重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。中でも 200 塩基以上の長鎖 ncRNA は種類も極めて多様であり、それぞれ多様な特性を持っていると考えられている。また長鎖 ncRNA (lncRNA) は DNA や RNA、タンパク質などと相互作用することで、転写やスプライシング、翻訳など、多くの機能を有していることが報告されており、その機能破綻ががん化を引き起こすことが明らかになってきた。我々は、*UPAT* や *ASBEL* といった新規 lncRNA が大腸癌や卵巣癌の腫瘍形成能を制御することを見出し、その機能解析を行ってきた。研究内容をさらに発展させ、lncRNA *ZNNT1* が RNA 認識モチーフ (RNA recognition motif : RRM) を 2 つ有する核内 RNA 制御因子である *SART3* と結合し、p53 依存的に大腸癌の腫瘍形成能を維持していることを見出した。本研究課題では、*ZNNT1*-*SART3* 複合体によるユビキチン-プロテアソーム機構を介した p53 制御機構を明らかにすることより、*ZNNT1*-*SART3* 複合体が有する p53 依存的な腫瘍形成能維持機構の分子メカニズムを解明する。

【方法及び結果】 まず、HCT116 細胞において *ZNNT1* が p53 にどのような影響を及ぼすのかを調べた。qPCR 解析およびウェスタンブロット解析の結果、*ZNNT1* の発現抑制によって、p53 mRNA には影響がなく、p53 タンパク質量が増加することを見出した。また、*ZNNT1* の発現を抑制すると、p53 のユビキチン化が抑えられることが明らかとなった。続いて、*SART3* が *ZNNT1* による大腸腫瘍形成能にどのような影響を与えるのかを確認した。*SART3* の発現を抑制すると *ZNNT1* の発現抑制による HCT116 細胞株の増殖抑制及び腫瘍形成能の減少が緩和された。また、*ZNNT1* の発現抑制による p53 タンパク質の増加が、*SART3* の発現抑制によって緩和されることを見出した。さらに、*ZNNT1* の発現を抑制すると、*SART3* と p53 の結合が増加することを見出した。次に、*SART3* による p53 タンパク質の安定化機構を明らかにするために、*SART3* 結合タンパク質の同定を進めた結果、脱ユビキチン化酵素 USP15 が *SART3* に結合することが明らかとなった。そこで我々は、*ZNNT1* ノックダウン細胞において、*SART3* が USP15 を p53 にリクルートするのではないかと仮説を立て、USP15 の発現を抑制すると、*ZNNT1* ノックダウンによる p53 タンパク質の増加が抑えられることを明らかにした。また USP15 の発現抑制によって、*ZNNT1* ノックダウンによる HCT116 細胞の増殖抑制が緩和されることが明らかとなった。以上の結果から、*ZNNT1* が *SART3*-USP15 複合体と p53 タンパク質の結合を阻害することによって、p53 タンパク質の分解を促進していると考えられる (図)。

ZNNT1 は *SART3*-USP15 複合体を介して p53 を不安定化し、大腸癌の腫瘍形成能を制御する

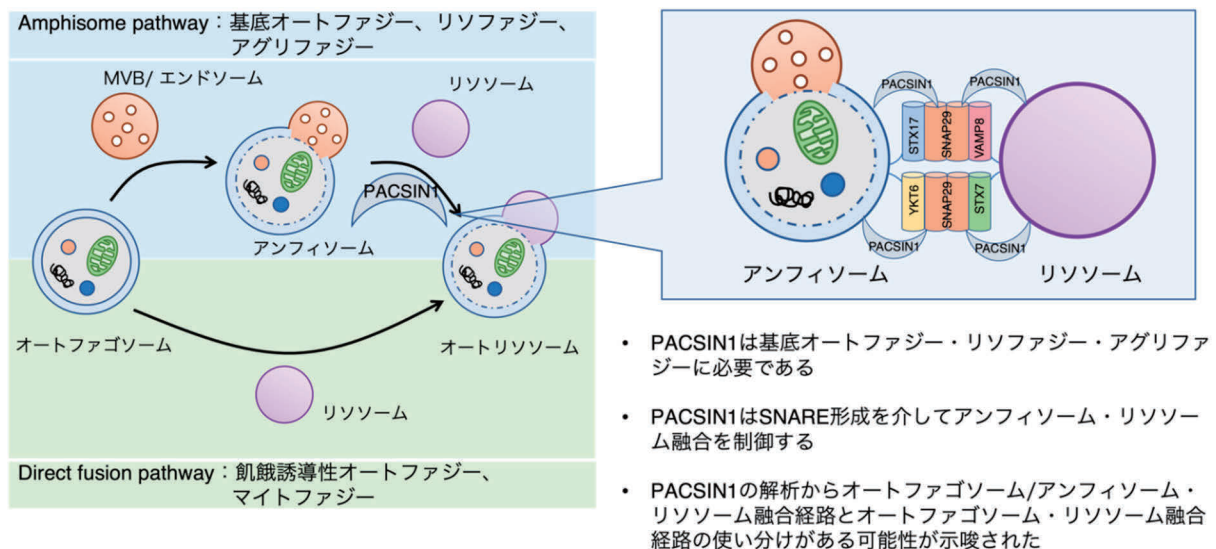


【目的】 オートファジーは真核生物に共通して存在する細胞内の分解システムで、様々なストレスに応じて誘導され、細胞の恒常性維持に必須の役割を持つ。オートファジーが誘導されるとオートファゴソームと呼ばれる小胞が細胞内に形成され、これが対象物をランダムあるいは選択的に取り込み、リソソームへと運んで分解する。このリソソームは細胞内外の様々な要因で損傷を受けることが知られており、傷ついたリソソームは細胞にとって有害となるが、細胞がこれにどう対処しているかよく分かっていなかった。我々は以前、選択的なオートファジーのひとつリソファジーによって損傷リソソームが特異的に除去され、これが細胞の恒常性維持に必須な働きを持つことを見出した (Maejima et al., *EMBO J*, 2013, Nakamura et al., *Nat Cell Biol*, 2020)。しかしながらリソファジー制御の詳細やその生理学的意義については多くが不明であり、本研究ではこれらを明らかにすることを目的とした。

【方法】 PACSIN ファミリータンパク質は F-BAR ドメインを介して脂質膜に結合し、膜の湾曲を促進することで、カベオラやシナプス小胞の形成などに寄与することが明らかにされているが、オートファジーでの働きはよく分かっていなかった。PACSIN ファミリーのうち新たなオートファジー制御因子として PACSIN1 を同定し、詳細な機能解析を行った。

【結果】 PACSIN1 は基底状態のオートファジーの他、リソファジーやアグリファジーといった一部の選択的オートファジーに必要であることが明らかとなった。一方、PACSIN1 は飢餓誘導性のオートファジーやミトファジーには不要であった。古くから、オートファゴソームからリソソームへの輸送過程はオートファゴソームが後期エンドソーム/MVBs と融合してアンフィソームと呼ばれる中間体を形成したのち、リソソームと融合する経路 (Amphisome pathway) とオートファゴソームが直接リソソームと融合する経路 (Direct fusion pathway) の 2 経路が存在することが知られていたが、この経路の制御機構や存在の意義は不明であった。我々の解析から PACSIN1 はアンフィソームとリソソームの融合を制御する因子であることが明らかとなり、2つの経路が栄養条件やストレスに応じて使い分けられていることが明らかとなった (Oe et al., *PLoS Genet*, 2022)。

研究成果の概要

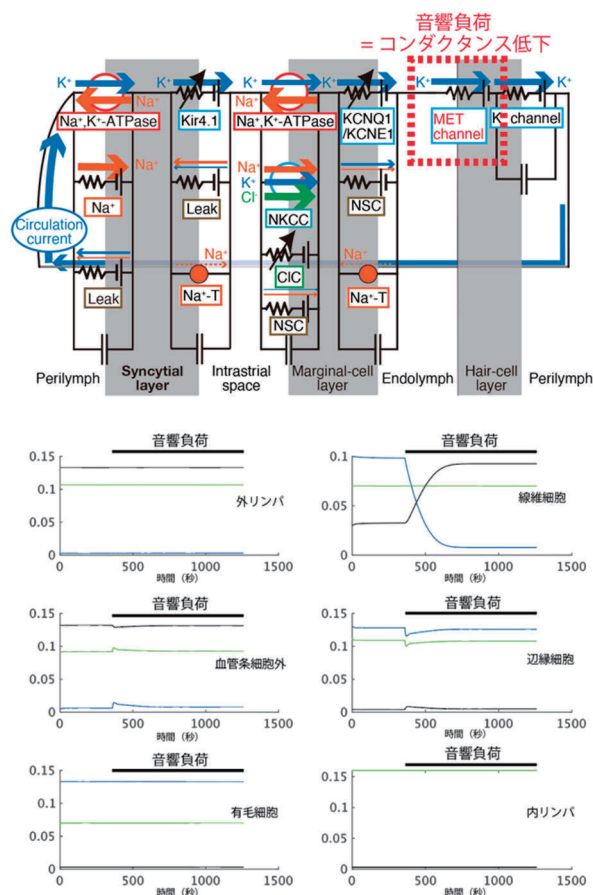


【目的】本研究では、蝸牛の生体内電気環境「内リンパ液高電位」を成立させる血管条内のイオン・電位環境に関して、音響外傷時に起こる変化を理論科学的にシミュレーションし、予測された変化を、生動物を用いた *in vivo* 電気生理実験により検証する研究を行った。

【方法】理論科学的手法として、過去に著者らが発表した蝸牛内のイオン濃度・電位を再現できる「fibrocyte-integrating Nin-Hibino-Kurachi model」を用いてシミュレーションを行った。電気生理実験としては、全身麻酔をかけたモルモットを対象に、ガラス微小電極法を用いた蝸牛内電位計測を行った。

【結果】音響外傷時には、有毛細胞が損傷することで感覚毛の先端にある機械・電気変換チャネルのコンダクタンスが上がることを想定した。数理モデル内では、同部位のコンダクタンスを5倍に増強し、この時におこる蝸牛内各部位でのイオン濃度と電位変化を計算した。その結果、パラメータを変化させた有毛細胞部位とは異なり、線維細胞部位で K^+ 濃度の低下と Na^+ 濃度の上昇が示唆された。さらに、内リンパ液、血管条細胞外の両方の部位での電位は、長時間の音響曝露により負の電位を示すことが予測された。この結果を検証すべく、電気生理実験を行ったが、半導体供給遅延などにより実験装置の整備に時間を要したため、本助成期間では内リンパ液の電位計測の実行に留まった。期間終了後も引き続き研究を進め、近い将来に血管条内の K^+ 濃度・電位計測を実行する予定である。

蝸牛血管条内イオン濃度・電位環境を再現する数理モデルを用いたコンピュータ・シミュレーション

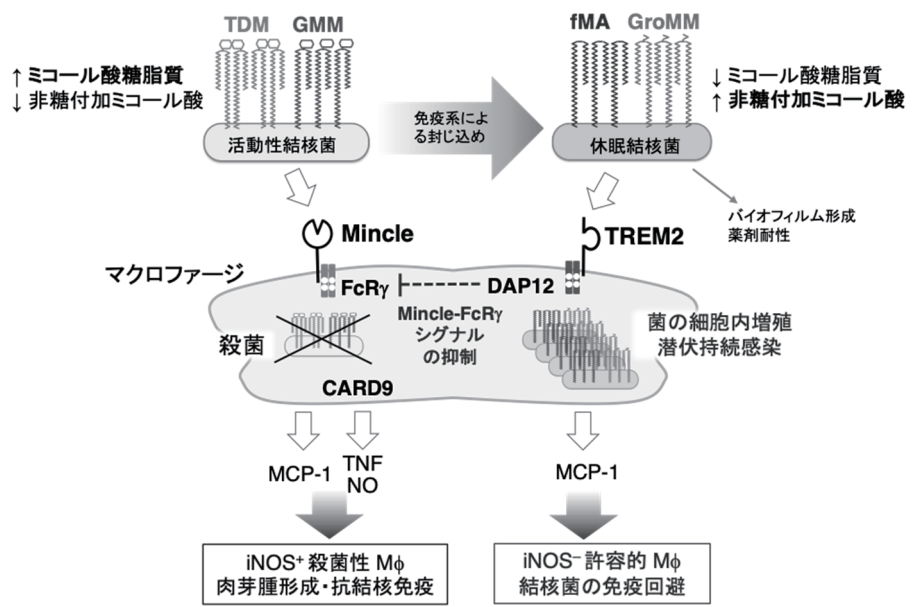


41 結核菌の免疫制御と長期潜伏感染機構の解明	原 博満
-------------------------	------

【目的】 毎年およそ 150 万人が結核により命を奪われる。マクロファージは結核菌に対する防御免疫の主体となる免疫細胞であるが、同時に結核菌のニッチでもある。結核菌はファゴリソソームの形成を阻害し、NO 合成酵素 (iNOS) や TNF の発現が低い「許容的マクロファージ」と呼ばれる非殺菌的マクロファージを誘導し、この中で増殖、潜伏感染すると考えられている。抗酸菌は細胞壁に豊富な脂質を有する。その主成分はミコール酸 (MA) であり、MA は様々な遊離形態で細胞壁表層に発現し、菌の生活環に応じてその構成が変容する。MA 糖脂質 (TDM、GMM など) は活動性結核菌に多く発現し、強い免疫賦活活性を有する。一方、休眠結核菌では遊離ミコール酸 (fMA) や GroMM などの非糖付加 MA 脂質の発現が優位となる。これらの非糖付加 MA 脂質は、糖脂質とは異なる免疫応答や免疫抑制活性をもつことが報告されており、MA 脂質の構成変化による宿主応答の制御が結核菌の休眠、再燃の平衡に関わっている可能性がある。高病原性結核菌 W 北京株の細胞壁表層に発現するフェノール糖脂質 (PGL) は許容的マクロファージを動員することで病原性を発揮する。Sulfolipid-1 (SL-1) もまた一部の結核菌種が発現する細胞壁脂質であり、その含有量は菌の病原性と比例することが知られている。しかし、これら病原性脂質の作用機構は未だ不明な点が多い。

【方法と結果】 我々は抗酸菌 MA を認識する新規受容体として TREM2 を同定した。TREM2 は非糖付加ミコール酸に高い親和性、MA 糖脂質には低い親和性を示した。この性質は Mincle のそれと逆相関するものであった。TREM2 は非糖付加 MA 脂質が誘導する許容的マクロファージ活性化に必須であり、さらに、*TREM2* 欠損によって Mincle を介したマクロファージの活性化が増強し、抗酸菌を感染したマウスからの菌排除が促進された。このことは、TREM2 が Mincle を介した抗抗酸菌免疫応答を抑制することで、菌の免疫回避に働いている可能性を示唆していた (下図)。癌の微小環境においても TREM2 依存的に誘導される免疫制御性マクロファージが報告されており、がんと結核菌が TREM2 を利用した同様の機構で宿主免疫を回避している可能性が考えられた。我々は PGL を認識する受容体 (PGLR) を同定した。PGL は、非糖付加 MA と同様に許容的マクロファージ活性化を誘導することを見出し、この応答は PGLR と DAP12 に依存することを見出した。我々は、Mincle が SL-1 を認識することを見出した。SL-1 と TDM の Mincle への親和性は同等であったが、SL-1 は TDM に比べ殺菌的マクロファージ活性化能が著しく低いことがわかった。従って、SL-1 は Mincle のパーシャルアゴニストとして働いて Mincle 活性化を抑制している可能性が示唆された。

結核菌ミコール酸含有脂質の変容と TREM2 を介した結核菌の免疫回避

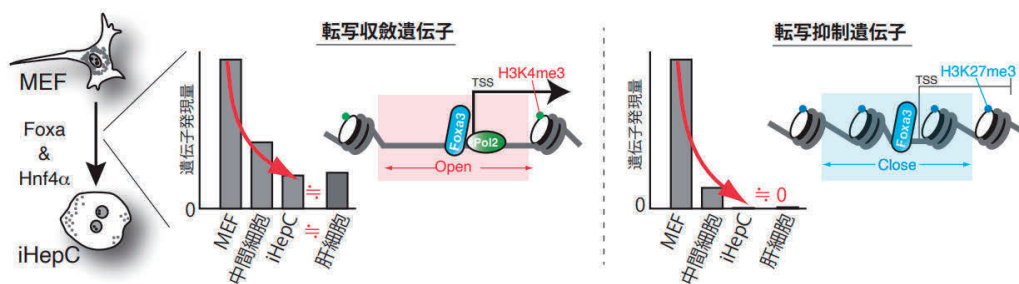


【目的】 本研究では、人為的な細胞分化誘導技術である「ダイレクトリプログラミング」において、特定の遺伝子群の転写がリプログラミングの標的細胞における発現量と同等レベルに収束する現象の分子機序を明らかにすることを目的とした。近年、iPS細胞を用いた再生医療技術の開発が進められているが、細胞の質・量・作製コストなどの点でまだ多くの課題が残る。一方ダイレクトリプログラミングは、初期化を経ずに特定の細胞を別の系譜の体細胞から直接分化誘導できる技術である。著者所属の研究室では、世界に先駆けてマウス誘導肝細胞様細胞 (iHepC) を創出することに成功し、肝臓移植以外に抜本的な解決方法の無い重篤な肝疾患に対する治療法として非常に大きな期待を集めている。iHepC の臨床応用のためには、そのリプログラミング過程における分子メカニズムの理解が必須であり、著者らはiHepC 誘導転写因子 (Foxa および Hnf4α) の核内挙動・転写制御機能に着目して研究を進めてきた。その過程において、RNA ポリメラーゼ II などの状態が転写活性化のまま発現量のみ抑制される遺伝子が存在することを発見した。それら遺伝子のほとんどは、リプログラミング終了時に生体の肝細胞における発現レベルに非常に近い状態にまで転写が収束することから、著者はこの現象を「転写収斂」と名付け、ダイレクトリプログラミングにおける中心的な分子メカニズムであると考えた (下図)。本研究ではその仮説を検証するために、種々のクロマチン解析技術を応用して iHepC を解析することで得たマルチオミクスデータを用い、ゲノムワイドな情報解析による検証を行った。

【方法】 マウス胎仔線維芽細胞 (MEF) から iHepC へのダイレクトリプログラミング系をモデルとして、これまでの研究で蓄積した次世代シーケンス (NGS) による遺伝子発現情報やクロマチン情報を活用した解析を行うと共に、新たなクロマチン解析技術を導入し、異なる階層の新規 NGS データの取得を行った。まず、筆者らがこれまでの研究において取得した、iHepC および MEF の遺伝子発現、転写因子結合、ヒストン修飾 (H3K4me3, H3K27me3) などの NGS データを用い、時系列に沿ったマルチオミクス解析を行うことで iHepC 誘導転写因子の結合によって転写収斂を起こす遺伝子セットをゲノムワイドに同定した。続いて、iHepC 誘導転写因子の結合と Enhancer/Promoter の活性、および転写制御を正確に紐付けた解析を行うために、H3K4me3 HiChIP 解析を行い Promoter-Enhancer (P-E) ループを網羅的に同定した。また、iHepC 誘導転写因子の転写収斂における役割をより詳細に解析するために、degron tag を融合したコンストラクトを作製し、iHepC 誘導転写因子の発現を正確に制御する実験系の構築を行った。

【結果】 MEF から iHepC へのダイレクトリプログラミング過程の遺伝子発現解析データを用いてクラスタリングを行い、さらにダイレクトリプログラミング時に先導的な働きをする iHepC 誘導転写因子 Foxa3 のクロマチン結合データによるサブクラスタリングを行った。その結果、ダイレクトリプログラミング過程において Foxa3 によって発現抑制される遺伝子群を、ヘテロクロマチン化が進行して発現がほぼ完全に抑制される「転写抑制」遺伝子と、活性型のクロマチンを維持しながら標的細胞における発現状態に近づく「転写収斂」遺伝子に大別することができた (下図)。またこれまでの研究から Foxa3 とは異なる様式で同じ遺伝子セットを制御することが分かっていた Foxa2 は、Enhancer 上から P-E ループを介して Foxa3 と同様の転写制御を行なうことが、今回新規に取得した H3K4me3 HiChIP データより明らかになった。以上の解析からダイレクトリプログラミング過程において、Foxa は 2 つの異なる分子機構を並行して制御し、遺伝子発現状態を標的の状態に誘導していることが明らかになった。

ダイレクトリプログラミングにおける「転写収斂」と「転写抑制」

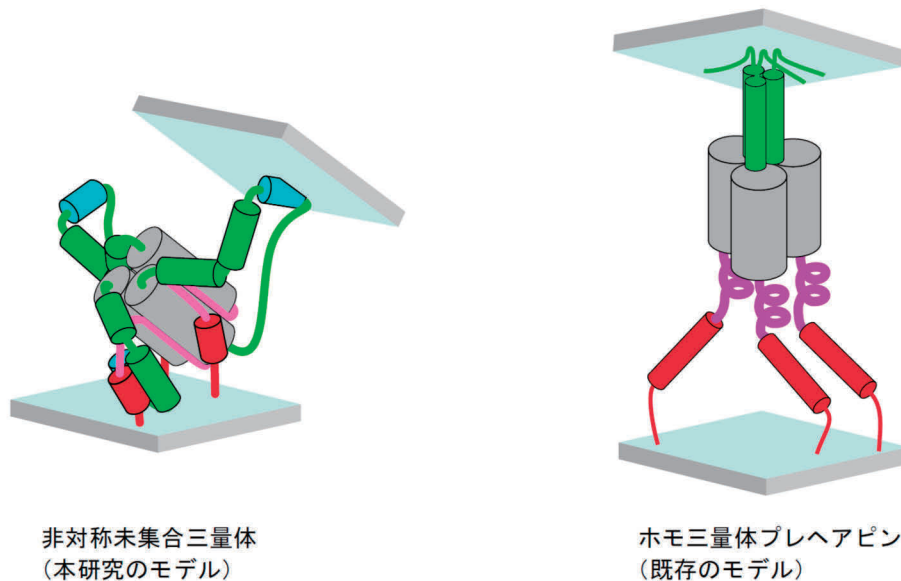


【目的】 ウイルス学分野の未解明問題「膜融合蛋白の活性化機構」を、生化学的手法を用いて解析する。生化学的実験データから不安定な構造を推定し、より矛盾の少ない構造変化中間体モデルの構築を目指す。

【方法】 マウスのコロナウイルスである mouse hepatitis virus 2 (MHV-2) は非解裂の膜融合蛋白 Spike を持つが、レセプター結合の後に宿主のプロテアーゼが存在しなければ構造変化を起こさないため、中間体の解析に適している。Spike のプロテアーゼ解裂部位は、構造変化に伴って位置が変わることが知られているが、プロテアーゼが Spike 表面の微妙な違いを認識して切断する性質を逆に利用して、Spike の構造の推定を行った。レセプターとトリプシンによって Spike の二段階構造変化を誘導し、さらにプロテイナーゼ K で処理することにより、Spike 中のコア構造を切り出した。プロテアーゼ分解産物はウェスタンブロット法で検出した。

【結果】 コロナウイルスの Spike の構造変化中間体について、一般的なモデルである「ホモ三量体プレヘアピン」に代わり得る「非対称未集合三量体」モデルを提案する。対象的な構造をもつ Spike は、レセプター結合がきっかけとなって非対称で未集合の三量体を形成し、それに伴いホモ三量体の回転対称性が崩れ、その後、プロテアーゼによる解裂が引き金となって、内部のヘリックス構造が集合し、強固な三量体が形成されると考えられる。この Spike 内部で引き合う力がウイルス膜と細胞膜を融合させると考えられる。

コロナウイルス Spike の構造変化中間体



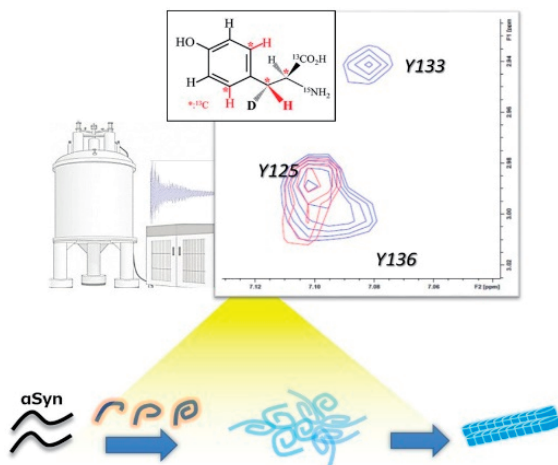
44 相分離を介したαシヌクレインの線維形成機構の解明	宮ノ入 洋平
--	---------------

【目的】本課題では、独自の安定同位体標識 NMR 法を駆使して、相分離過程を介した α シヌクレイン蛋白質 (α Syn) のアミロイド線維形成機構を原子分解能で解明することを目的とする。 α Syn を種々の溶液条件下において NMR 測定を行い、相分離および線維形成に伴う構造変化を原子分解能で解析する。その際に、独自に開発を進めてきた立体整列安定同位体標識 (Stereo Array Isotope Labeling : SAIL) 法も活用し、種々の神経変性疾患に關与する線維形成機構の解明を目指す。

【方法】均一に ^2H 、 ^{15}N 標識した α Syn を、大腸菌生合成系を用いて調製し、各種溶液条件にて NMR 測定を行った。特に、塩濃度とリン脂質を添加した際に NMR 測定を行い、 α Syn の線維形成および相分離形成に伴う構造変化を、各アミノ酸残基のアミド基を対象に解析した。その後、 α Syn の Tyr 残基を特異的に NMR で観測するために、改良型の SAIL-Tyr 残基 (SAIL-Tyr) を設計し、合成を依頼した。合成された SAIL-Tyr を大腸菌の培養培地に添加することで、SAIL-Tyr 標識 α Syn を調製した。この標識体を用いて、Tyr 残基の芳香環 δ 位に由来する ^{13}C - ^1H ならびに ^{12}C - ^1H 信号を NMR にて特異的に観測し、 α Syn の線維形成・相分離過程における Tyr 残基の変化を原子分解能で解析した。

【結果】著者らは、 α Syn 単量体が NaCl および CaCl_2 の濃度に依存して、そのコンフォメーションが変化し、パーキンソン病 (PD) 等にみられる rod 型の α Syn 線維が形成されることを見出した。実際に、 ^2H 、 ^{15}N 標識した α Syn について ^1H - ^{15}N HMQC スペクトルを確認したところ、おもに α Syn の C 末端領域と中央部 (NAC) 領域において、アミド基由来の NMR シグナルに変化が見られた。また著者らは、 α Syn とリン脂質との相互作用が PD にみられる rod 型線維およびレビー小体といった凝集体形成を促進していることを示し、 ^2H 、 ^{15}N 標識 α Syn を利用した同様の NMR 実験より、 α Syn の N 末端領域が中心となり、PI-3,4,5- P_3 と強く結合していることを明らかにした。これらの結果から、 α Syn が単量体から特定のコンフォメーションを形成し、rod 型線維の形成を促進することが示唆された。一方で、これらアミド基を対象とした NMR 実験では、そのコンフォメーション形成過程を高い分解能で明らかにすることは困難であり、コンフォメーション形成や線維形成のカギとなるアミノ酸残基や相互作用様式を明らかにすることができなかった。そこで、観測対象を α Syn のチロシン残基 (Tyr) に限定し、Tyr の芳香環側鎖由来の NMR 信号を高感度かつ高分解能に捉える手法を確立した。具体的には、独自の安定同位体標識技術である SAIL 法を活用し、芳香環 δ 位 CH 基に由来する NMR シグナルを高感度かつ高分解能に観測することに成功した。その結果、従来法では捉えることができなかった α Syn の Tyr 芳香環を介したコンフォメーション変化を直接的に捉えることに成功した。本手法は粘性の高い溶液条件下でも NMR シグナルを高感度に検出することが可能であり、相分離状態における α Syn の相互作用様式を詳細に解明することが期待できる。

革新的安定同位体標識による α Syn 線維形成機構の解明



【目的】 REV7 は DNA 損傷、細胞周期調節、遺伝子発現に関与する多機能蛋白であり、精巣の生殖細胞に高発現している。遺伝子改変マウスを用いて成体になってから *Rev7* をノックアウトすると、1 ヶ月後には精巣は著しく萎縮し、精細管内の生殖細胞はほぼ完全に消失した（下図）。このことは、REV7 が精巣の生殖細胞生存・精子形成に必須であることを示している。本研究の目的は、個体の遺伝情報を次世代に伝える役割を担う精巣の生殖細胞において、生殖細胞維持・精子形成をコントロールする新たな分子メカニズムを提唱することである。DNA 損傷応答、細胞増殖、遺伝子発現に関与する多機能蛋白 REV7 に着目して、生殖細胞における役割と作用機序を明らかにする。

【方法】 1. Tamoxifen 誘導性に *Rev7* をノックアウトできる遺伝子改変マウスを用いて、*Rev7* ノックアウト前後の精巣から RNA を抽出し、cDNA マイクロアレイにより遺伝子発現変化を解析した。2. 精巣胚細胞腫瘍細胞株を用いて、BioID（近位依存性ビオチン標識）法により REV7 結合蛋白を共沈させ、質量分析にて網羅的に同定した。その中から、生殖細胞の生存に重要と思われる分子を同定した。3. ルシフェラーゼアッセイによるヒト *REV7* 遺伝子プロモーター解析を行った。そして、*REV7* 発現に重要な転写調節領域を決定し、その領域に結合する転写因子の候補を同定した。4. 男性不妊症患者の精巣生検検体を用いて、REV7 蛋白発現を免疫組織化学染色にて評価し、精子成熟度との関係を統計学的に解析した。5. Tamoxifen 投与により *Rev7* をノックアウトした遺伝子改変マウスの精巣を用いて、生殖細胞の生存に関係するヒストンメチル化への影響を解析した。

【結果】 1. *Rev7* ノックアウトにより、精巣で早期に発現が変化するマウスの遺伝子を多数同定した。パスウェイ解析により、spermatogenesis のパスウェイ遺伝子に発現低下傾向が認められることが半明した。2. ヒト REV7 に結合する新規蛋白候補を多数同定した。その中で、精子形成に重要な役割を担っていることが明らかになっている蛋白 B について、免疫沈降法により REV7 との結合を確認した。3. ヒト *REV7* プロモーター領域内に 2 カ所の転写活性化領域を同定した。その領域でバイオインフォマティクス解析により転写因子結合配列を同定し、その配列に結合する転写因子が *REV7* の発現を調節していることを明らかにした。4. 男性不妊症患者の精巣生検検体を用いて、精原細胞での REV7 発現と精子成熟度との関連を解析した結果、REV7 発現と精子成熟度が相関する傾向があることが明らかになった。5. *Rev7* ノックアウトにより、精巣で早期に H3K9me2 が蓄積し、H3K9me3 が減少することを western blotting により確認した。

Tamoxifen 誘導性 *Rev7* ノックアウトによる生殖細胞の消失



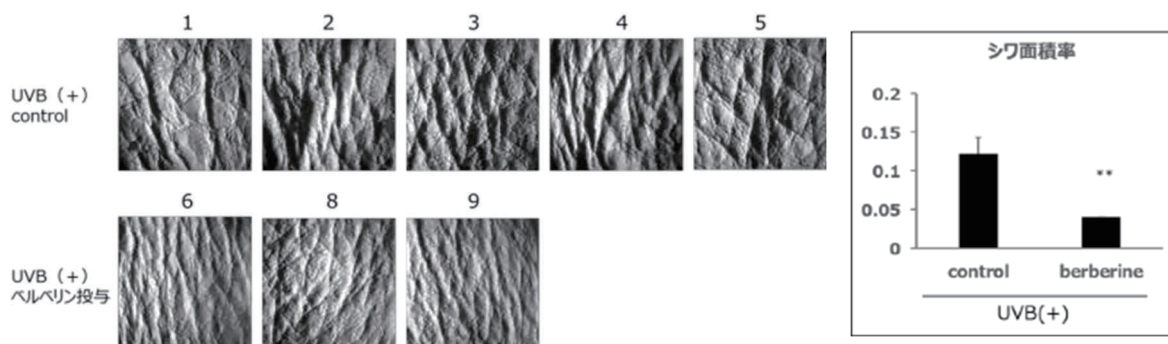
46 ミトコンドリア賦活剤の開発	柳 茂
---------------------	-----

【目的】 MITOL はミトコンドリア外膜に局在する膜型 E3 ユビキチンリガーゼであり、ミトコンドリアの品質管理に重要な役割を果たしている。皮膚組織特異的 *MITOL* 欠損マウスを作製したところ、生後 6 ヶ月頃から肉眼的に白髪・脱毛・皮膚炎症が観察され、病理組織解析においても皮脂腺の増加・表皮の肥厚・細胞死の増加など顕著な老化所見が観察された。また、正常のマウス皮膚組織においても *MITOL* の発現が老化と共に有意に減少することより、*MITOL* の発現低下は活性酸素の産生を誘導し老化を引き起こしていることが示された。そこで、本研究では *MITOL* 発現を上昇させる薬剤を探索することにより、ミトコンドリアを標的にした新たな創薬を目指す。

【方法】 1. 表皮角化細胞に対する *MITOL* 遺伝子発現上昇作用素材の評価：ヒト表皮角化細胞を、被験物質を含有する培地に交換し 24 時間培養した。リアルタイム PCR システムにより、*GAPDH*、*MITOL* のそれぞれの mRNA の発現量を測定し、*MITOL* の発現量を *GAPDH* 発現量により補正した。測定した mRNA 発現量を Control 群と比較し、被験物質による *MITOL* 遺伝子の発現の影響を評価した。2. マウスへのベルベリン投与による *MITOL* 発現促進作用の評価：ベルベリン塩酸塩を、純水を用いて 0.2% (w/v) に溶解し、9 日間または 8 週間自由摂水させた。ベルベリン非投与群には純水を自由摂水させた。8 週間の自由摂水後、マウス耳を採取した。心臓・脳・骨格筋サンプルの採取は 9 日間の自由摂水後、臓器を摘出した。それぞれの臓器における *MITOL* 発現量をウェスタンブロット法にて解析した。3. 紫外線照射ヘアレスマウスへのベルベリン投与による影響評価：紫外線照射は、UVB (1 週目：70 mJ、2 週目：80 mJ、3 週目：90 mJ、4 週目以降：100 mJ)、3 回/週の照射を行った。8 週の照射完了後に皮膚組織をカミソリで 5 mm 幅に切り分け、パラフィンで包埋した。レプリカ解析は、UVB 照射時に週一回及び 8 週間の UVB 照射後、反射用レプリカ作製キットを用いてレプリカを採取した。レプリカ画像の取得及び解析には反射用レプリカ解析システムを用いた。

【結果】 1. 表皮角化細胞に対する *MITOL* 遺伝子発現上昇作用素材の評価：表皮角化細胞の *MITOL* 遺伝子発現上昇素材として、コメヌカ発酵エキス、オウバク抽出液、オウレン抽出液、センブリ抽出液、ハマメリス抽出液、ボタンピ抽出液、モモ抽出液などの 12 種が見出された。2. マウスへのベルベリン投与による *MITOL* 発現促進作用の評価：各種組織のウェスタンブロット及びバンドを定量化した。マウスにベルベリン塩酸塩を投与することにより、ベルベリン非投与群 (control) と比較して *MITOL* のタンパク発現量が有意に上昇することが確認された。3. 紫外線照射ヘアレスマウスへのベルベリン投与による影響評価：紫外線照射 8 週間後の外観写真、レプリカ写真、レプリカ解析結果を示す (下図)。レプリカ解析により、control 群と比較してベルベリン投与群においてシワの形成が有意に抑制されていることが確認された。以上のことから、ミトコンドリア賦活剤としてベルベリンは有望であると思われる。一方、ベルベリンには抗炎症作用があることも知られているので、本当に *MITOL* の発現増加を介して作用したかどうかは不明である。今後、*MITOL* 欠損マウスにベルベリンを投与して今回の効果が消失するかどうか判定することが必要である。

レプリカ写真とシワ面積率の比較



47 加齢に伴う腸管機能低下と腸内細菌叢変化の機構解析

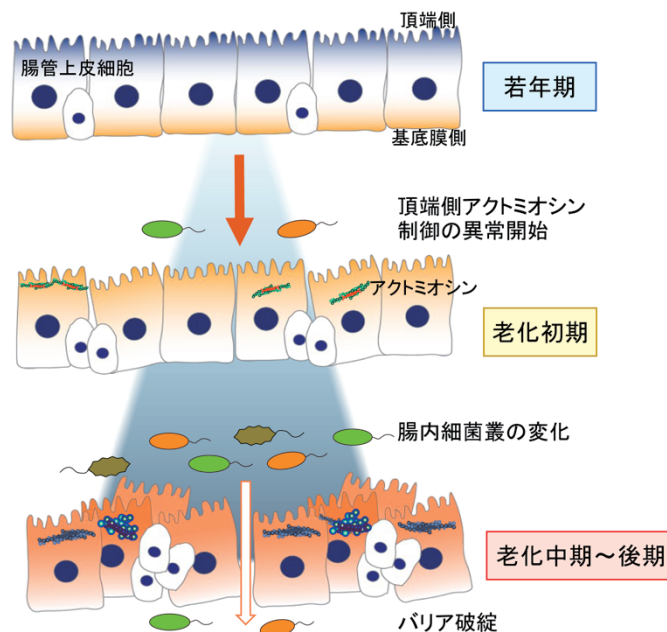
矢野 環

【目的】 腸管上皮組織は腸管管腔内の物質、とくに腸内細菌由来の免疫を活性化しうる物質の体腔内への漏出を防ぐ物理的バリアとして重要である。このバリア機能は加齢と共に低下し、全身性の炎症の原因となり、生活習慣病等の病態悪化をおこすため、バリア破綻の分子機構解明が重要である。しかし、加齢依存的な現象は個体差や環境要因との相互作用がおおきいことから解析が難しく、その分子機構は多くが不明である。本研究は加齢に伴う腸管機能低下の分子機構を、特に老化初期に着目して解析した。

【方法】 本研究はショウジョウバエ成虫腸管をモデルとして用い、筆者らがこれまでに検討してきた、老化による機能低下を模倣する遺伝学的手法を用いて、RNA-sequence 解析を行った。また、その結果を基に、組織学的な検討を行った。

【結果】 RNA-sequence 解析の結果、老化初期にアクチン骨格制御に関与する遺伝子発現が上昇すること、その発現上昇は JNK 経路活性によりさらに顕著となることが明らかとなった。腸管上皮細胞の頂端側には細胞接着部位の張力を規定するアクトミオシンが機能している。上皮細胞における非筋ミオシンの局在を検討したところ、老化によりその局在が異常になること、JNK 活性化により、より若年から局在異常が生じること、ミオシンの機能低下、あるいは活性化によるアクトミオシン張力の上昇のいずれもが老化時のバリア破綻を悪化させることが明らかとなった。老化初期におけるアクチン骨格制御因子の発現上昇は、腸内細菌叢の変化以前に生じており、宿主の変化が加齢依存的な機能低下のきっかけとなっている可能性が示唆された。

老化初期の腸管上皮細胞頂端側のアクトミオシン制御異常が老化中後期のバリア破綻の発端となる



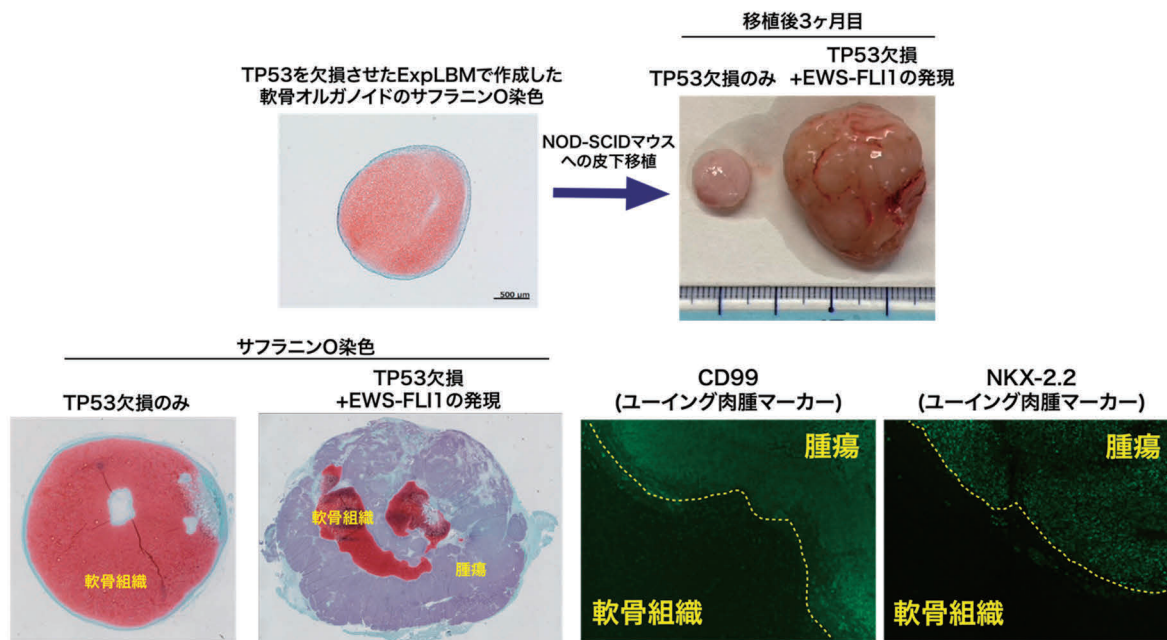
48 ヒト肢芽間葉系細胞を用いた腫瘍モデルの構築	山田 大祐
---------------------------------	--------------

【目的】 マウス肉腫モデルを用いた先行研究により、肢芽間葉系細胞系譜の細胞が肉腫の起源となることが示されているが、ヒト肢芽間葉系細胞を用いた肉腫モデルに関してはこれまで樹立されていなかった。そこで本研究では、ヒト肉腫の発症ならびに悪性化機構の解明を行うために、ヒト多能性幹細胞から誘導した拡大培養が可能な肢芽間葉系細胞 (Expandable limb bud-like mesenchymal cells : ExpLBM) を用いた肉腫モデルの構築を行った。

【方法】 CRISPR-Cas9 の系を用いることで、*TP53* の機能欠損を有するヒト iPS 細胞株 414C2 (414C2 *TP53* 欠損株) を樹立した。次に、ドキシサイクリン誘導的に 3×FLAG-EWS-FLI1 の発現を可能にする piggyBAC ベクターを作製し、エレクトロポレーションにて 414C2 (野生型) 及び 414C2 *TP53* 欠損株に導入した。これらの細胞株から ExpLBM を誘導した後、浮遊培養条件下にて軟骨分化誘導を行うことでヒト肢芽間葉系細胞由来軟骨オルガノイドを作製し、NOD-SCID マウスの皮下への移植を行った。ドキシサイクリン投与を開始してから 3 ヶ月後に移植組織を回収し、組織学的解析を行った。

【結果】 ExpLBM への分化誘導後、細胞をドキソルビシン処理した結果、野生型では *TP53* の標的遺伝子である P21 の発現誘導が確認されたが、*TP53* 欠損株では P21 の発現誘導は生じなかった。ドキシサイクリン処理によって、3×FLAG-EWS-FLI1 の発現誘導が確認された ExpLBM を用いて、ドキシサイクリン非存在下で軟骨分化誘導を行ったところ、野生型と *TP53* 欠損の両株で軟骨オルガノイドの形成が確認された。同オルガノイドを皮下移植した NOD-SCID マウスにドキシサイクリンを 3 ヶ月飲水投与した結果、*TP53* 欠損株でユーイング肉腫マーカー (CD99、NKX-2.2) 陽性の腫瘍が形成された。

ヒト肢芽間葉系細胞由来ユーイング肉腫モデルの構築

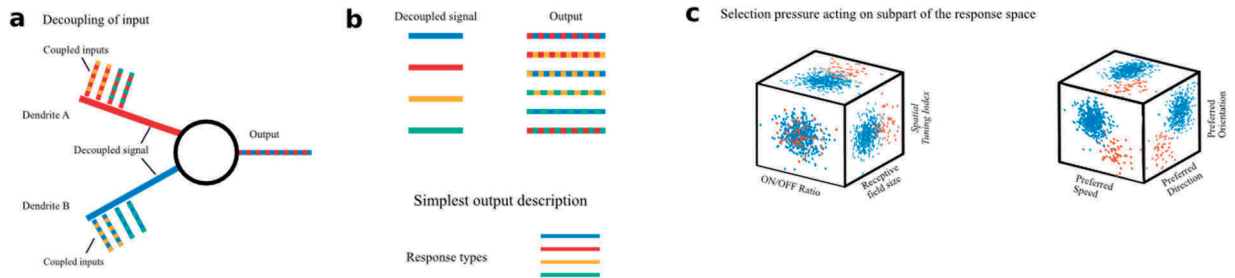


【目的】 神経回路の機能単位を理解することを目的とした現代の神経回路研究において、細胞種の離散的な集合を同定することは大きな目標となっている。この考え方は、網膜などの感覚領域では、刺激 X に対するある細胞型の応答が刺激 Y に対する応答を予測するという低次元の神経表現が前提となっている。しかし、近年、高次視覚野で高次元の神経表現が発見されたことから、細胞種の定義に関する論争が起きている。我々はマウスにおいて主要な視覚中枢である上丘の応答空間の次元性を調べ、この次元性が上丘細胞を機能的に分類する能力に影響を与えるかどうかを調べた。

【方法】 本研究では、覚醒マウス上丘表層部のカルシウムイメージングを行い、6,872 個の神経細胞から輝度変化刺激（ON-OFF 刺激）および運動刺激に対する光応答を記録した。シリコンプラグを上丘の上部に挿入することで上丘に覆い被さった大脳皮質を脇に押しやって上丘を露出させて、大脳皮質を傷つけることなく上丘のイメージングを行った。機械学習である教師なしクラスタリングを行い、上丘細胞の機能的多様性を明らかにした。個々の細胞について輝度変化刺激および動き刺激に対する光応答の相互情報量を求めた。

【結果】 驚いたことに、相互情報量の解析から、輝度と動きに対する個々の神経細胞の応答が統計的に独立していることから、細胞の機能的多様性が最大化されていることとともに、上丘においては従来の 1 次元の細胞タイプ分類は不可能であることを明らかにした。一方、応答空間において近接する機能応答（例えば、ON 応答と OFF 応答）は、依然として相互依存的であった。そこで、神経応答の大域的な高次元性と局所的な低次元性を捉えるために、局所的な低次元構造においてのみ機能分類が意味を持つ多次元応答型モデルを提案した。上丘が行う高次の認知課題は、高次元の応答空間構造を必要とすると考えられるため、本モデルは上丘の役割に適していると考えられた。1 次元の細胞タイプ分類が行われている網膜から多次元応答型モデルの上丘への情報変換を司ると考えられるシナプス接続モデルを立てた。

網膜から上丘の情報変換に関する仮説

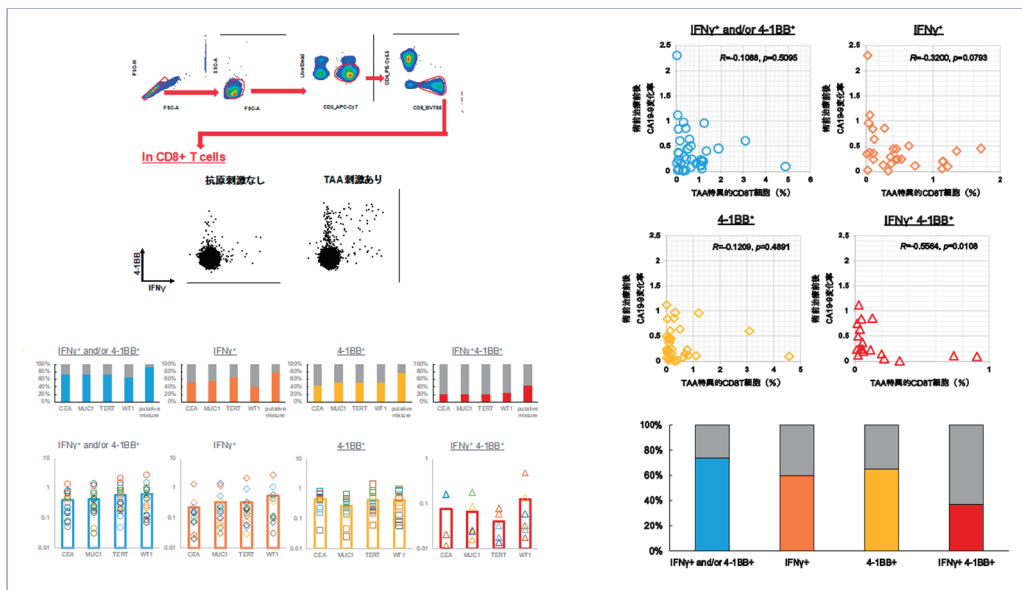


【目的】膵癌は予後不良な癌であり、新たな治療戦略の開発が望まれる。複数の悪性腫瘍に対し、免疫チェックポイント分子阻害剤を中心とした免疫療法が臨床的に使用されるようになってきたが、膵癌においては未だ治療選択肢とはなっていない。本研究では、膵癌特異的癌抗原に対し、患者由来末梢血単核球細胞 (PBMC) を用いた膵癌特異的免疫応答反応の検出 assay を構築し、腫瘍関連抗原 (tumor-associated antigen : TAA) 反応 CD8⁺T 細胞と病態との関連についての検討を行った。

【方法】TAA データベースより膵癌で発現する癌抗原を同定し、膵癌患者の実際の PBMC を用いて癌抗原特異的免疫応答反応の実験系を確立する。さらに Stage I ~ III の未治療膵癌患者 58 名から採取した PBMC を用い、抗原特異的反応の臨床的意義について検討した。

【結果】403 種類の TAA が登録されている TAA データベースから、過去の報告をもとに CEACAM5 (CEA)、MUC1、TERT、WT1、NY-ESO-1 (CTAG1A)、TRP2 (DCT) の 6 種類を選択した。次に 1,404 種類の細胞株の RNAseq による mRNA 発現データセットを用いて、選択した 6 種類の TAA について発現を調べたところ、CEACAM5、MUC1、TERT、WT1 の 4 種類について複数の膵癌細胞株での発現を認めた。最後に TCGA に登録されている 178 膵癌検体の遺伝子発現データにより、ヒト膵癌検体で実際に高発現していることを確認した。以上より、CEACAM5、MUC1、TERT、WT1 を PBMC 刺激に用いる TAA として選択した。次に、様々な治療フェーズにおける膵癌患者由来 PBMC 検体を用いて、TAA 特異的 CD8⁺T 細胞反応を検出した。本研究では検出感度を上げるために、まず PBMC をペプチドプールで刺激後、IL-2 存在下で 10 日間培養し、さらにペプチドプールで再刺激し、フローサイトメーターを用いて TAA 特異的 CD8⁺T 細胞を検出した。その結果、44.00% のドナーで各 TAA 特異的 CD8⁺T 細胞反応を検出することができた。最後に total Taas 特異的 CD8⁺T 細胞反応の有無と術前治療開始時患者背景の関連性に関して検討した。IFN γ ⁺/4-1BB⁺total Taas 特異的 CD8⁺T 細胞反応の有無は、年齢、性別、血算などを含むその他の治療開始時の患者背景と、有意な相関は認められなかった。一方、IFN γ ⁺/4-1BB⁺total TAAs 特異的 CD8⁺T 細胞反応の頻度は術前療法前後の CA19-9 変化率との間に有意な逆相関が見られた (R=-0.56, p=0.011) (図)。これにより TAA 特異的 CD8⁺T 細胞反応は、術前治療の効果に関与している可能性が示唆された。

膵癌患者の PBMC における膵癌特異的癌抗原免疫応答反応の臨床的意義



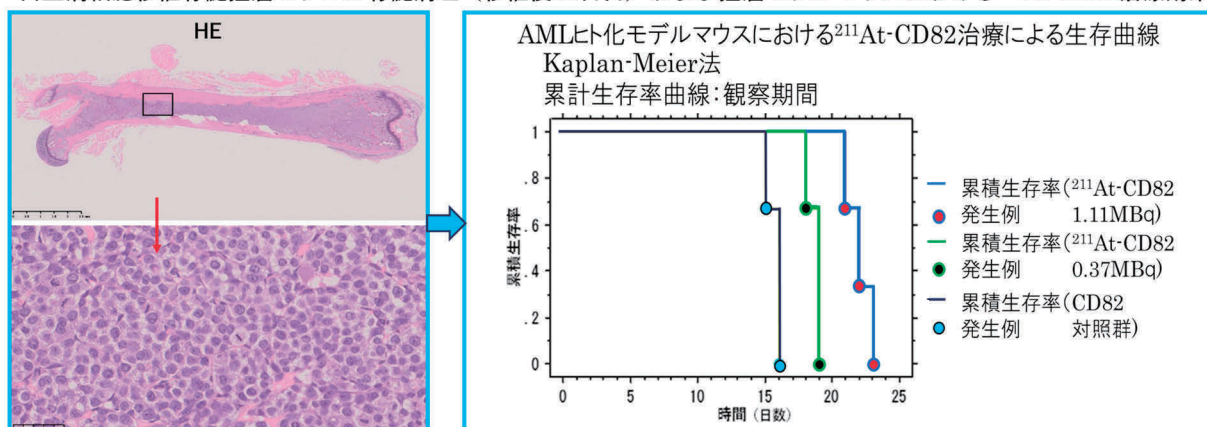
【目的】 急性骨髄性白血病 (Acute myeloid leukemia : AML) の長期生存率は未だ 5 割に届かない。その主な原因は抗がん剤治療後の抵抗性獲得と再発である。すなわち、抗がん剤治療後も骨髄中の微小環境 (ニッチ) に留まる白血病幹細胞が治療抵抗性を獲得し、再発に関与しているためと考えられている。我々は白血病幹細胞が CD82 抗原を高発現し、抗がん剤への抵抗性獲得やニッチへの接着に中心的な役割を果たしていることを明らかにした。α線はβ線に比べて、線エネルギー付与 (LET) が非常に高く、組織内の飛程が非常に短いため、α線放出核種を抗体に搭載してニッチ中の白血病幹細胞に集中させることで、正常組織への副作用を回避しながら、高い治療効果が得られる。そこで本研究では CD82 抗原を標的とした抗体を α線放出核種アスタチン-211 (^{211}At) で標識した抗体薬を作製し、白血病幹細胞の根絶を目指す革新的な核医学治療法を開発する。

【方法】 白血病幹細胞を標的とした ^{211}At 標識抗 CD82 抗体 (^{211}At -CD82) の放射免疫療法への応用可能性を確認するため、ヒト白血病細胞皮下・骨髄担癌モデルマウスを作製し、担癌モデルマウスにおける ^{211}At -CD82 の体内動態を検討した。ヒト白血病細胞皮下担癌モデルマウスに ^{211}At -CD82 (約 0.2 MBq) を投与し、1 分、1 時間、6 時間、12 時間及び 24 時間後に心臓より全採血し、腫瘍および各臓器・組織を摘出し、その放射能 (%ID/g) を測定した。さらにヒト白血病細胞皮下・骨髄担癌モデルマウスを用いて、 ^{211}At -CD82 の皮下担癌腫瘍の抗腫瘍効果と骨髄担癌マウスの寿命延長効果を検討した。治療群には ^{211}At -CD82 (1.11 MBq) を投与し、経時的に腫瘍体積を測定、またはマウスの寿命を観察した。

【結果】 AML 細胞、AML 細胞皮下移植担癌腫瘍組および AML 細胞移植骨髄担癌骨髄腫瘍組織において、CD82 の発現が認められた。 ^{125}I 標識抗 CD82 抗体は AML 細胞に発現している CD82 抗原に特異的に結合した。AML 細胞皮下移植担癌モデルマウスにおいて、腫瘍組織への ^{211}At -CD82 集積は時間とともに増加し、24 時間に最も高かった (11.3%ID/g)。ヒト化 AML 細胞骨髄担癌モデルにおいて、腫瘍組織への ^{211}At -CD82 集積は、移植後 12 日目の投与群の 24 時間では 35.9%、移植後 8 日目の投与群の 24 時間では 13.4%であった。AML 細胞皮下担癌モデルマウスにおいて、 ^{211}At -CD82 治療により生存有効な抗腫瘍成長効果が認められた。ヒト化急性骨髄性白血病モデルマウスにおいても、 ^{211}At -CD82 治療によりヒト化急性骨髄性白血病モデルマウスの有効な生存延長効果が認められた。白血病幹細胞を標的とした ^{211}At 標識抗 CD82 抗体は急性骨髄性白血病の治療薬として有望であると考えられる。

白血病細胞移植骨髄担癌モデルマウスにおける ^{211}At -CD82 の抗腫瘍効果

白血病細胞移植骨髄担癌モデルの骨髄病理 (移植後12日目) および担癌モデルマウスにおける ^{211}At -CD82 治療効果

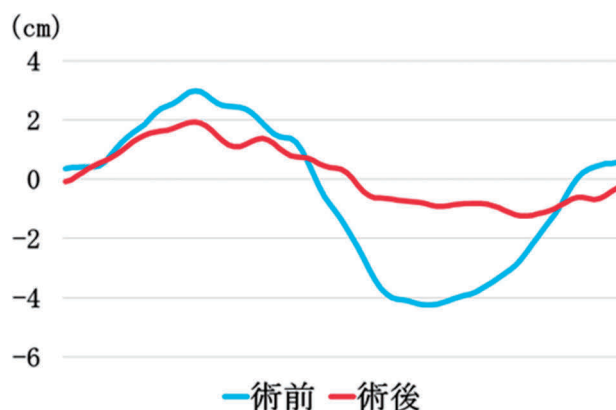


【目的】人工股関節全置換術（THA）は変形性股関節症の手術として広く普及しており、除痛に優れ、歩行能力、日常生活動作能力、生活の質の改善に有効である。古くから THA の術後合併症として脱臼が問題視されてきたが、近年は至適なインプラント設置条件が確立され、THA 術後の長期成績は大幅に改善してきている。一方で、日本では超高齢社会を迎え、健康寿命の延伸や要介護リスクの低減が望まれる中で、ロコモティブシンドローム（ロコモ）という概念が提唱された。THA では他の下肢の手術よりもロコモが改善する症例が多いものの、49%の症例には変化がみられず、身体機能の改善の余地があることが示された。この結果から、これまで追及されてきた合併症リスクを低減させるという視点に加えて、手術後の歩行能力を最大化させるという視点で患者一人一人に合わせたインプラント設置を検討する必要があると考えた。本報告では、その第一段階として、手術後の歩行能力を予測する学習モデルを作成することを試みた。現在、データの収集中であるため、途中経過を報告する。

【方法】2022年7月から2023年1月の間に、当院で初回片側 THA を施行した 29 例 29 股を対象とした。マーカーレス動作解析装置「鑑（AKIRA）」を用いて、手術前と手術後（退院時）の通常歩行を 3 次元的に計測した。計測データから、①歩行の左右対称性、②歩行安定性、③歩行推進力を算出した。左右対称性は、各歩行周期中の身体重心の手術側への最大偏位量を非手術側への最大偏位量で除して、100 分率で表した値とした。歩行安定性は、重複歩距離の変動係数で表した。歩行推進力は、歩行中の股関節最大伸展角度で表した。手術前と手術後の歩行パラメータの比較には、対応のある t 検定を用い、危険率は 5%とした。さらに、手術後の歩行パラメータを予測する機械学習モデルを作成した。目的変数は、①～③の歩行パラメータ、説明変数は患者基本情報や手術前の形態学的パラメータ、手術中のパラメータとした。データを、訓練データセットとテストデータセットに 1 : 1 の割合で分割した。eXtreme Gradient Boosting アルゴリズム（XGBoost）を用いて、訓練データを学習させた。精度評価には、決定係数を用いた。

【結果】対象の平均年齢は 65.7 歳、男性 2 例で女性 27 例、手術側は左下肢が 17 例、右下肢が 12 例であった。脚長差は、手術前は 8.92 mm、手術後は 0.34 mm と手術前後ともに手術側で長く、手術後に有意に改善した。3 次元大腿骨 オフセットは、手術前は 38.3 mm、手術後は 43.3 mm と、手術後に有意に大きくなった。歩行の左右対称性は、手術前は 183.2%、手術後は 147.8%で有意な変化は認めなかった。しかし、症例を見ると、歩行中の過度な重心偏位が明らかに改善する症例も存在した（図）。歩行安定性は、手術前は 3.2%、手術後は 2.3%と有意な改善を認めた。歩行推進力は、手術前は 19.1 度、手術後は 22.1 度と有意な変化は認めなかった。各歩行パラメータを予測するモデルの決定係数は、歩行左右対称性では 0.05、歩行安定性では 0.01、歩行推進力では 0.05 と低い予測性能であった。

手術前後の歩行中の重心偏位の 1 例

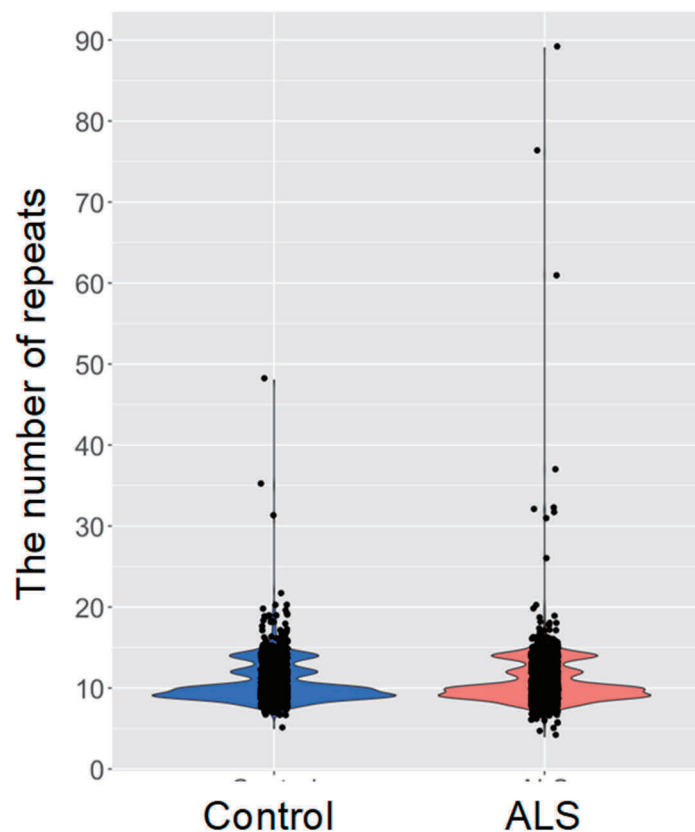


【目的】筋萎縮性側索硬化症（ALS）は運動神経の変性による筋力低下、呼吸筋麻痺を呈する神経変性疾患である。現在、進行を停止させる治療法は無く、病態の解明が望まれる。およそ10%が家族性といわれ、*SOD1*ははじめとしていくつかの遺伝子が同定されてきた。しかしながら、未だ30~50%程度の多くの家族性ALSの遺伝子が不明であり、これらの解明に新規なアプローチが求められている。本研究では、多数例の解析と患者由来 iPS 細胞を用いた機能解析により、新規リピート伸長変異がどのように筋萎縮性側索硬化症に関わるかについて明らかにする。

【方法】遺伝子未同定の2家系を連鎖解析、ショートリードシーケンサーおよびロングリードシーケンサーにより解析した。また患者末梢血より iPS 細胞を樹立し、運動ニューロンに分化させ、組織化学的に検討した。

【結果】2家系に共通して、患者特異的に、新規遺伝子 A のリピートの伸長を認めた。さらに広島大学の ALS コホート 1,000 人をスクリーニングすると、3 人で 60~90 内でリピートの伸長を認めた。うち、2 人は孤発性で 1 人は、家族性であった。患者由来 iPS 細胞から分化させた運動ニューロンでは、核外にリン酸化 TDP-43 を認め、さらに核内には、リピートを含む RNA 封入体を認めた。ALS 発症に関するリピート伸長を新規に同定し、RNA リピートを介した神経細胞死が関与する可能性を明らかにした。

ALS に見られるリピート伸長

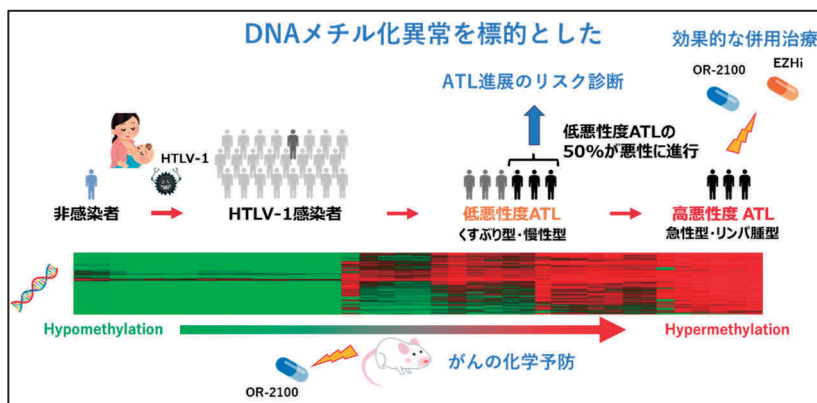


【目的】 成人T細胞白血病・リンパ腫 (ATL) はレトロウイルスであるヒトT細胞白血病ウイルス1型 (HTLV-1) に感染した T 細胞がクローン性の増殖能を獲得することで発症する予後不良の血液腫瘍である。ATL 発がんは、HTLV-1 感染から数十年の潜伏期間において感染細胞にゲノム異常やエピゲノム異常が蓄積することで、一部の感染者から発症し、病態が進展すると考えられており、ATL の発症、病態の進展リスク診断法や効果的な治療法、あるいは予防法の開発が求められている。我々は最近、ATL の発がん、病態の進行に伴い、HTLV-1 感染細胞や ATL 細胞に特徴的な DNA メチル化亢進異常が蓄積することを明らかにした。また、共同研究にて開発を進めている新規経口脱メチル化薬 OR-2100 は抗 ATL 作用を発揮した。以上より、HTLV-1 感染細胞や ATL 細胞で認められる特徴的な DNA メチル化亢進異常が ATL 発がんに関与していると考え、本研究では DNA メチル化を標的とした、ATL の新しい診断法、OR-2100 をベースとした治療法を確立するため、ATL の病態が進展する患者に特徴的な DNA メチル化異常部位を同定するとともに、ATL 細胞に対して効果的に作用する DNA 脱メチル化薬の併用療法を開発することを目的とした。また、リンパ腫自然発症マウスモデルを用いて OR-2100 がん予防効果を検証した。

【方法】 ATL の病態が進展する患者に特徴的な DNA メチル化異常部位を探索するため、筆者らがすでに公開している健常人、HTLV-1 感染者、ATL 患者の正常 T 細胞、及び HTLV-1 感染細胞のメチル化プロファイル (GSE136189) を再解析した。得られたメチル化異常部位について、HTLV-1 感染者コホート共同研究班 (JSPFAD) より提供されたくすぶり型 ATL 患者由来の DNA を用いて、メチル化の程度がその後の病態の進行を反映するか、バイサルファイト-パイロシーケンスにて検討した。また、DNA 脱メチル化薬と EZH タンパク質阻害薬の併用による抗腫瘍効果について、培養細胞株を用いた *in vitro* 解析、及び、異種移植マウスモデルを用いた *in vivo* 解析から検証した。さらに、OR-2100 のがん予防効果について、内在性レトロウイルスがリンパ腫の自然発がんに関与するとされる AKR マウスを用いて検討した。

【結果】 HTLV-1 感染細胞において急性型 ATL で特に強くメチル化が亢進している CpG 部位について、くすぶり型 ATL 患者 DNA を用いて解析したところ、いくつかの遺伝子の CpG 部位のメチル化において、病態がその後に進展したくすぶり型患者では優位にメチル化が高い傾向が認められ、病態リスク診断に有用な部位と考えられた。OR-2100 は EZH 阻害薬との併用により ERK 脱リン酸化酵素 DUSP5 の発現誘導を伴い、ATL 細胞の増殖を強く抑制し、DNA メチル化とヒストンメチル化を標的とした併用 ATL 治療は、ATL 治療成績の向上に貢献できると考えられる。また、リンパ腫を高頻度に自然発症する AKR マウスにおいて、OR-2100 は安定した長期投与が可能であり、個体の生存を大きく延長したため、レトロウイルスが関与するリンパ腫の発がんにおいて、がん予防にも効果が期待される。以上の結果より、DNA メチル化異常は、ATL の診断、治療、予防において有用な標的であると考えられる。

DNA メチル化異常を標的とした ATL の診断・治療・予防法の開発

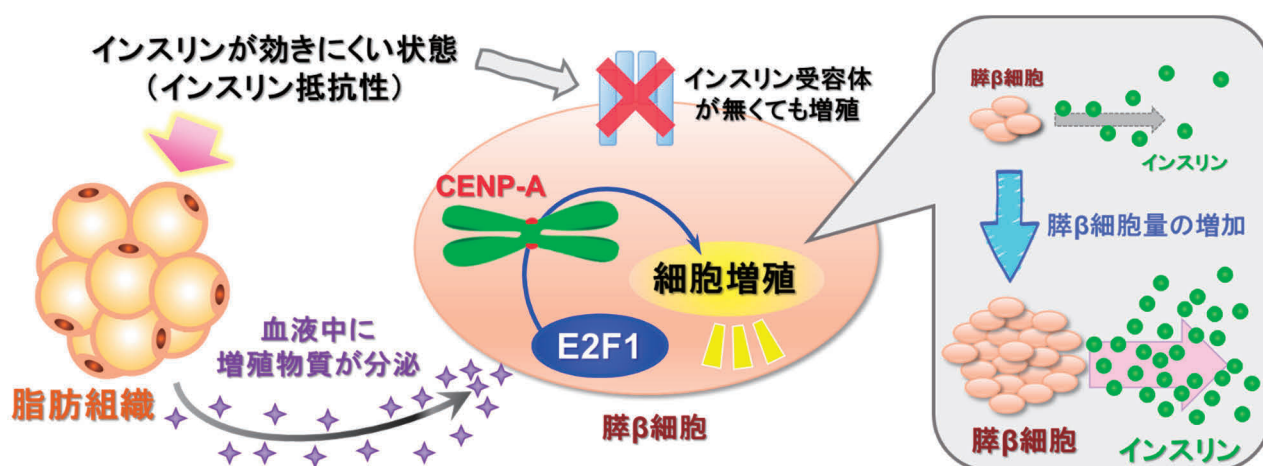


【目的】 本研究の目的は、膵β細胞量調節機構に関する分子を同定し、その機序を明らかにすることにより、「臨床に還元できる膵β細胞に着目した糖尿病治療法開発」を目指したトランスレーショナルリサーチを展開することである。糖尿病の病態解明および治療法開発において重要な、膵島にあるインスリンを産生する膵β細胞は、生体内において他臓器との連関により機能や量が制御されている。肥満やインスリン抵抗性状態では、インスリンの需要増大に適応するため、代償的に膵β細胞の量が増加する。しかし、この過程において生体内で実際に起きている多面的な組織間ネットワークに加え、環境要因や遺伝因子、加齢との複合による膵β細胞量の調節機構は不明な点が多い。そこで、本研究では、ヒト膵島と複数の組織や細胞との共培養系の樹立や、膵島の生理学的機能を統合的に解析できる基盤を形成し、生体内環境を再現しその機序に迫る。これより、肥満やインスリン抵抗性状態における膵β細胞量を規定する機序の包括的理解から、糖尿病治療への応用を目指すことが目的である。

【方法】 肥満やインスリン抵抗性時に、複雑な環境要因や臓器間ネットワークを介して、生体内で膵β細胞の量が代償的に増加している機序を、独自の共培養系を立ち上げ、膵島を統合的かつ包括的に解析できる基盤を整備し解析した。特に、短期間で膵β細胞量が急速に増大するものの、これまで膵β細胞増殖機序が不明であった急性インスリン抵抗性モデルに注目して解析した。

【結果】 急性インスリン抵抗性による代償的な膵β細胞増殖は、これまで重要とされていたインスリン受容体シグナルに非依存的に膵β細胞増殖を促進させることを見出した。さらに、その膵β細胞増殖には転写因子である E2F1 を介した FoxM1/CENP-A/PLK1 の活性化によるシグナル伝達が必須であることを明らかにした。インサートメッシュを挿入したプレートと、混合比率を最適化した培地を用いて膵島を培養することにより、浮遊細胞や接着細胞などのあらゆる初代培養細胞と、接触することなく共培養する系を開発した。そこで、インスリン受容体を特異的に阻害する S961 ペプチドを、オスモティックポンプで持続注入したインスリン抵抗性マウスで、上記の膵島との組織共培養によるスクリーニングを行った。その結果、脂肪細胞と膵島の共培養にて、脂肪組織から膵β細胞を増やす液性因子が分泌されることを見出した。この現象は、マウス膵島だけでなくヒト膵島でも認められた。生体内で膵β細胞を増やすためには、膵臓だけではなく脂肪組織などの代謝臓器における臓器間ネットワークの制御が重要であることが示された。

急性インスリン抵抗性下において脂肪由来の液性因子が臓器連関を介して膵β細胞増殖を促進する



56	肺癌の遺伝子多様性の解析と分子モニタリングの確立	杉尾 賢二
-----------	---------------------------------	--------------

【目的】原発性肺癌は局所進行肺癌であるⅡ～Ⅲ期では完全切除が行われても再発率は約50%、5年生存率も40～60%と未だ不十分な成績であり、薬物治療を主とする集学的治療が必須である。癌細胞の遺伝子変化は、初期においては単一の変化 (clone) であり、増殖・進展とともに種々の遺伝子変異が加わり遺伝子多様性が増すことになる。本研究では、手術時の標本から早期変異主体の癌細胞と進展変異を有する癌細胞という空間的多様性を検討した。手術後の定期的な血液や再発時腫瘍組織のMRD (minimal residual disease) を検出することは再発早期発見や治療開始に極めて重要であり、遺伝子学的分子モニタリング (molecular monitoring) としての確立にも繋がる。

【方法】病理病期Ⅱ～Ⅲ期の非小細胞肺癌患者の手術摘出検体の原発腫瘍から核酸を抽出し、オンコマイン Dx Target Test 等による網羅的遺伝子解析で遺伝子多様性 (空間的多様性) の解析を行い、clone、subclone を同定した。病理病期Ⅱ～Ⅲ期の肺腺癌4例について、術後経過観察中の定期的採血された血漿からcfDNAを調製し、次世代シーケンサー (NGS) による遺伝子解析を施行した。同一症例の原発巣と術後血漿の遺伝子変異の相違点 (時間的多様性) を解析した。これらの結果から遺伝子学的分子モニタリング (molecular monitoring) の確立を試みた。

【結果】術後再発を認めた2症例に腫瘍由来と考えられる新たな遺伝子変異を認めた。また、再発を認めなかった2症例でも、PTENやMAP2K1の変異を認め、これらの変異は腫瘍由来である可能性がある。1症例において、脈絡膜再発後の血漿では手術検体と同じEGFR変異が検出されており、眼球摘出した手術検体からも同じEGFR変異が検出された。眼球摘出後の血漿では、EGFR変異は検出されず、再発部の手術により腫瘍由来のctDNAが消失した可能性が示唆され、分子モニタリングを提示した症例となった。他の症例においては、モニタリングした血漿から腫瘍由来と考えられる同一の変異は検出されず、分子モニタリングは確立できず今後の検討を要する。

切除標本とモニタリング血漿の遺伝子変異

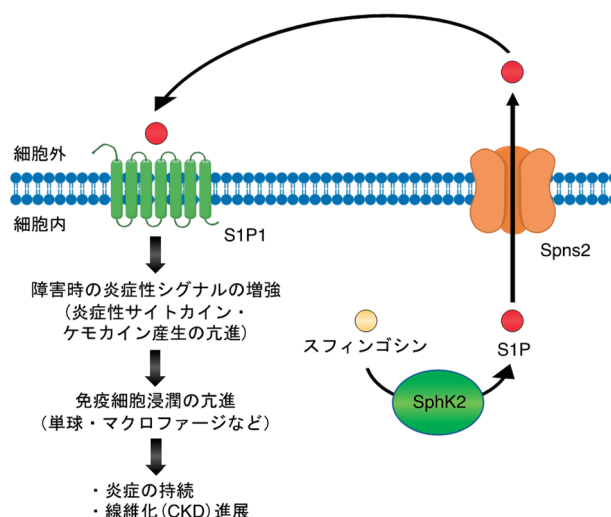
Case	Stage	Recurrence	Primary tumor	Plasma	
				preop (eye)	postop (eye)
No. 4	IVA	+	EGFR L858R	EGFR L858R	-
					BRCA2
					FGFR2
					PDGFRA
					STK11
					TP53

【目的】慢性腎臓病（CKD）は多くの場合腎機能の低下を伴い、持続する炎症と進展性の線維化を特徴とする。CKD 進展の詳細なメカニズムは不明であり、現在の治療戦略は血圧管理など非特異的なものがほとんどである。スフィンゴ脂質代謝産物であるスフィンゴシン 1-リン酸（S1P）は、スフィンゴシンキナーゼ（SphK1、SphK2）の働きにより、細胞内でスフィンゴシンから合成され、細胞外へ輸送された後、細胞膜上に存在する G 蛋白質共役型受容体である S1P1-S1P5 のリガンドとして働き、細胞の接着・遊走・増殖など様々な応答を引き起こす。著者の留学先（前所属先）を含む複数の研究室が、これまで全身の *Sphk2* ノックアウトや SphK2 阻害剤投与が CKD 進展（線維化）を抑制することを動物実験で報告してきたが、その詳細なメカニズムは不明であった。そこで著者は、腎臓の線維化進展に重要な役割を果たす perivascular cells（pericytes/fibroblasts）の SphK2 が CKD 進展に寄与する、という仮説を立て、以下の予備実験結果を得た。(1) 腎臓の perivascular cells では S1P は主に SphK2 によって産生され、未知のトランスポーターによって細胞外へ輸送される。(2) 細胞外の S1P は perivascular cells 自身の S1P1 に結合し、これが腎障害時の perivascular cells 内の炎症性シグナリングを増強させ、炎症性サイトカイン・ケモカインの産生を増加させ、免疫細胞浸潤とそれに続く線維化を促進する。これらを背景に、本研究では、腎臓の perivascular cells に発現する未知の S1P トランスポーターを同定し、その阻害が腎臓の炎症及び線維化を軽減するかを検証することを目的とする。

【方法】腎臓 perivascular cells に発現する S1P トランスポーターとして、内皮細胞ではすでに報告されている Spns2 を候補として検討を行った。細胞実験ではマウス腎臓から単離した primary kidney perivascular cells を用いた。動物実験では、perivascular cell 特異的 Cre マウスとして Foxd1Cre マウスを用い、Spns2 flox マウスと掛け合わせることで、perivascular cell 特異的 Spns2 ノックアウトマウスを作製し実験に供した。CKD（腎線維化）モデルとしては、片側腎虚血再灌流モデル（Day 0：左腎虚血再灌流、Day 13：右腎摘、Day 14：採材）を用いた。また臨床応用を見据え、共同研究者と開発した新規 Spns2 阻害剤である SLF1081851 の効果も細胞・動物実験において検証した。

【結果】マウス primary kidney perivascular cells において Spns2 をノックダウンすると、培地中に含まれる S1P 濃度が低下した。この結果は Spns2 が腎臓 perivascular cells において S1P トランスポーターとして働いていることを示唆する。さらに Spns2 のノックダウンは、LPS で刺激した際の炎症性サイトカイン・ケモカインの発現を低下させた。動物実験では、perivascular cell 特異的 Spns2 ノックアウトマウスでは腎線維化が軽減しており、上記細胞実験結果と合致する所見であった。さらに新規開発した Spns2 阻害剤である SLF1081851 を用いた実験を行い、細胞実験では炎症性サイトカイン・ケモカイン発現の低下、動物実験では腎線維化の軽減、という結果を得た。これらの結果は、新規 CKD 治療薬としての Spns2 阻害剤の有用性を示すものである。

腎臓 perivascular cell における SphK2/Spns2/S1P1 シグナリングは炎症・線維化を促進する

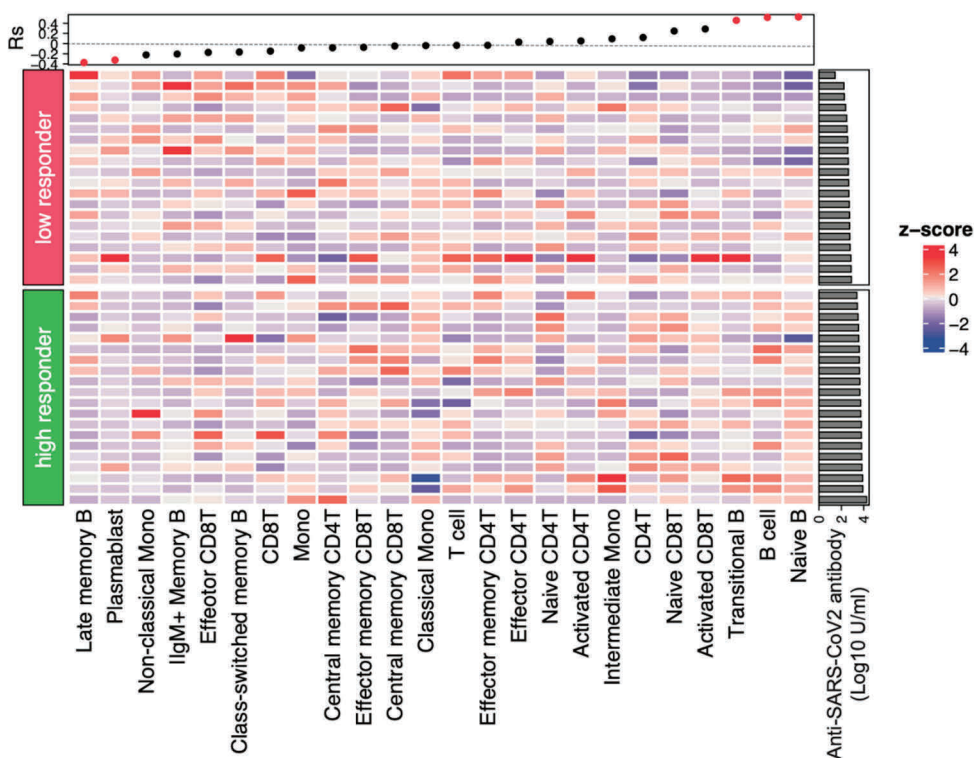


【目的】 新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の感染拡大防止の切り札として、mRNA 型ワクチンの接種が広く行われ、クラスター発生阻止や高齢者の重症化防止に効果を上げている。一方で、頻度の高い副反応として、接種部位の疼痛、倦怠感、頭痛、筋肉痛、悪寒、発熱、関節痛があり、これらの副反応は若年者・女性で頻度が高く、軽視できない個人差が存在し、ワクチン忌避の理由の一つとなっている。これらの副反応の背景には免疫の関与が示唆されるが、その詳細は明らかになっていない。これらの副反応と抗体価の上昇を始めとするワクチン効果との関連も依然として不明である。本研究では、ワクチン副反応の多面的、経時的で膨大な情報をテンソル分解の手法を用いて解析し、極めて多彩な副反応は4個のコンポーネントに分解され、個人の副反応はそれらコンポーネントの和として表現されることを明らかにした。そして4個のコンポーネントのうち、コンポーネント1のみが抗体価と正に相関することを見出した。以上より、抗体価の上昇や副反応の背景にある免疫学的特徴を詳細に解析することにより、副反応の少ないワクチンの開発が可能となることが期待される。本研究では、ワクチンの有効性 (抗体価上昇) と副反応の背景にある免疫応答の特徴を解析することにより、副反応に寄与する免疫応答と有効性に寄与する免疫応答を分離し、副反応の少ない mRNA ワクチンの開発基盤を構築することを目的とした。

【方法】 ファイザー社製 mRNA ワクチン BNT162b2 の接種をうけた千葉大学病院教職員約 1,800 名の人口統計学および臨床的情報、詳細な副反応情報、接種前及び2回目の接種3週後の抗スパイク蛋白抗体価 (Elecsys® Anti-SARS-CoV-2S で測定) のデータを取得した。接種前及び接種3週後の血清と末梢血単核球 (PBMC) を用いて、1) BNT162b2 接種後の副反応コンポーネントと関連する免疫学的特徴の抽出、2) BNT162b2 接種後の抗スパイク蛋白抗体価の上昇と関連する免疫学的特徴の抽出を行った。

【結果】 BNT162b2 接種後の抗スパイク蛋白抗体価の上昇には接種前のナイーブ B 細胞プールの大きさと (図)、接種後の T 細胞活性関与していることが明らかとなった。

抗スパイク蛋白抗体価高反応群と低反応群におけるワクチン接種前の免疫フェノタイプの特徴

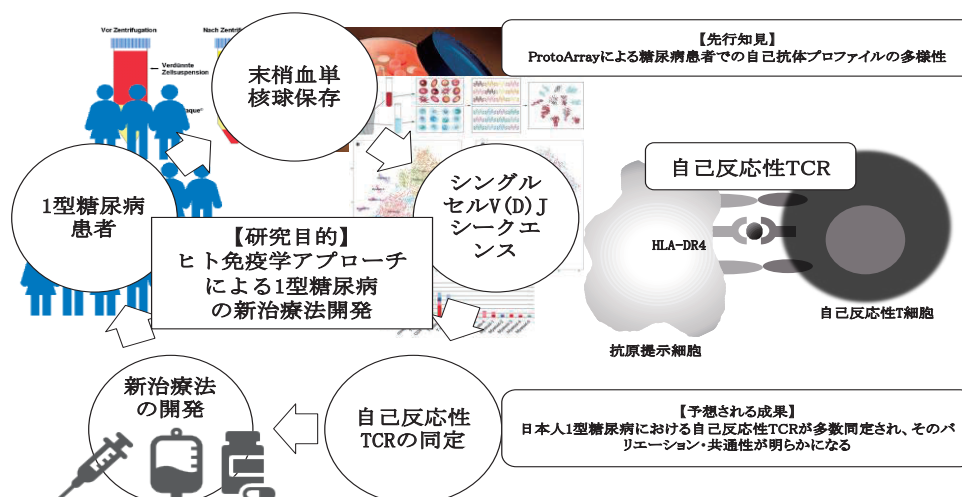


【目的】 1型糖尿病では、自己膵島抗原に反応するエフェクターT細胞の出現がその病態の本質と考えられている。自己膵島抗原に反応する特有のT細胞受容体(TCR)を有するエフェクターT細胞が、モノクローナルに活性化していることが想定されている(Cole DK, et al. J Clin Invest. 2016)。すなわち、1型糖尿病において病因となるTCRを有するT細胞を同定し、除去することが予防および治療法の確立につながる。TCRとの抗原結合部位は、遺伝子再構成により決定され、ヒトの体内では 10^{10} オーダーの多様性を獲得している。従来、これらの膨大な数に及ぶ抗原受容体のレパートリーの全容を知ることは困難であったが、核酸シークエンス技術の飛躍的發展により、所望の細胞集団に発現されているTCRの遺伝子配列を個々のクローンのレベルで同定することが可能となった。現在、このような網羅的免疫シークエンス技術が、免疫応答の*in vivo*モニタリングや抗体医薬品・ワクチン・細胞医薬品等の創薬に応用されつつあり、今後もさまざまな医療の領域に大きな革新をもたらすことが期待されている。本研究では日本人1型糖尿病における特徴的な自己反応性T細胞のTCR配列をシングルセルVDJシークエンスにて明らかにするとともに同定した自己膵島反応性T細胞が膵β細胞に対して実際に免疫応答を行うことを*ex vivo*およびヒト化マウスを用いて確認する。これらの研究により1型糖尿病の予防法を開発する。

【方法】 我々のグループで実施している大規模糖尿病患者コホート・KAMOGAWA-DMコホート研究から日本人GAD抗体陽性1型糖尿病症例4例を選出した。BD Rhapsody・VDJシークエンス用アプリケーションにより単一細胞化し、分子バーコード化cDNAライブラリーを作製する。作製したcDNAはマクロジェンに外注の上、次世代シークエンス(NGS)を実施する。得られたシークエンスはBDパイプラインによりリードカウント情報のデータマトリックスを取得し、SeqGeqにて解析した。TCR配列の多様性については相同性検索によるV領域、D領域、J領域遺伝子の決定、アミノ酸変換、リード数集計を実施し、各群の多様性を比較することで、日本人1型糖尿病においてclonal expansionを起こしているV領域、D領域、J領域遺伝子を解析した。さらにほかの1型糖尿病患者4名の末梢血単核球に特異的自己抗原の候補であるGAD65、IA-2、insulinのオーバーラップペプチドを投与、食食させ抗原提示させ、抗原特異的T細胞の活性化を単一細胞分析で解析した。

【結果】 1型糖尿病患者のCD8⁺T細胞で発現が増加している遺伝子は、主に細胞傷害性関連遺伝子(PRF1、GZMH、ITGB2、NKG7、CTSW、CST7)であり、一方でCD4、CD7、CD5、HLA-A、CD27、IL-32の発現が減少していることが示された。また、オーバーラップペプチド刺激により、CD8⁺T細胞ではAIM2、CD70、CD27、CCNB1、CCR1、BCL2、CD5、CD3GなどのCDマーカーやケモカインに関する遺伝子発現はinsulin群とGAD群で上昇し、FASLG、BCL2、LTB、GZMK、ICOS、IL12RB2、CD70、IL6などのサイトカインに関する遺伝子発現はIA-2群で上昇した。

自己反応性T細胞を標的とした1型糖尿病発症予防法の開発



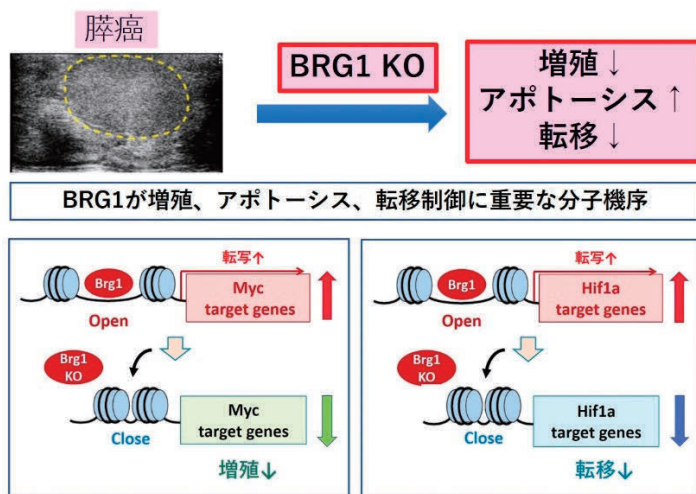
60 膵癌の進行・転移におけるクロマチン制御因子の役割	福田 晃久
-----------------------------	-------

【目的】 膵癌は予後不良な最難治性癌で、新規治療法開発は喫緊の課題である。我々は、SWI/SNF クロマチンリモデリング複合体の中で必須ATPase ユニットとして働くクロマチンリモデリング因子 BRG1 に着目し、世界に先駆けて、膵癌における BRG1 の機能的役割をこれまで解明してきた (Nat Cell Biol 2014, J Clin Invest 2018)。我々は、①BRG1/SOX9 経路が、膵癌の形成促進に働き、BRG1 が SOX9 のプロモーターに直接結合して発現を促進することから、SOX9 が BRG1 の下流の鍵分子であること、②BRG1 ノックアウト (KO) により、既に形成された膵前がん病変がアポトーシスをきたして退縮すること、③BRG1/SOX9 経路はヒト膵癌においても保存されていることを見出した (J Clin Invest. 2018)。本研究では、既に形成された膵癌の増殖と転移における Brg1 の機能的役割を解明することを目的とした。

【方法】 Dual recombinase システムを用いて、膵特異的に Kras 変異と p53 欠失を導入し、かつ形成された膵癌においてタモキシフェン投与により任意の時期に Brg1 を KO できる独自の膵癌モデルマウスを作製した。

【結果】 Brg1 KO により膵癌細胞の増殖が低下し、アポトーシスが増加し、自然発症の膵癌モデルマウスの個体レベルでも膵癌の増大が有意に抑制された。転移能に関しては、脾臓移植肝転移モデルおよび腹腔内移植モデルにおいて、Brg1 KO により転移能が著しく抑制され、Brg1 が転移巣の形成に必須であることが明らかになった。さらに、Brg1 が膵癌細胞の幹細胞性、生存 (アポトーシス回避) に重要であることが示された。網羅的遺伝子解析の結果、Brg1 KO した膵癌細胞では hypoxic pathway の発現が著しく減少しており、Hif1a が標的遺伝子に結合して Hif1a の標的遺伝子を発現させるのに Brg1 が重要であることが示された。以上より、Brg1 は膵癌の幹細胞性、増大、転移巣形成に重要な働きをしていること、そのメカニズムとしては Brg1 による cMYC および Hif 経路の発現制御によるものであることが明らかになった。またヒト膵癌組織標本の免疫染色の結果、ヒト膵癌の約 8 割では BRG1 を発現していることが示された。以上の取り組みから、BRG1 が膵癌に対する有力な新規創薬・治療ターゲットになり得ることが明らかになった。さらに、既に形成されたヒト膵癌に対する BRG1 遮断効果を検討し、ヒト膵癌における治療標的としての妥当性をさらに検証した。その結果、BRG1 を発現しているヒト膵癌細胞、ヒト膵癌オルガノイドに対して、CRISPR/Cas9 による BRG1 KO を行った結果、BRG1 阻害によりヒト膵癌細胞、ヒト膵癌オルガノイドの増殖が抑制された。

クロマチン制御因子 BRG は膵癌の進行、転移に重要な働きをする

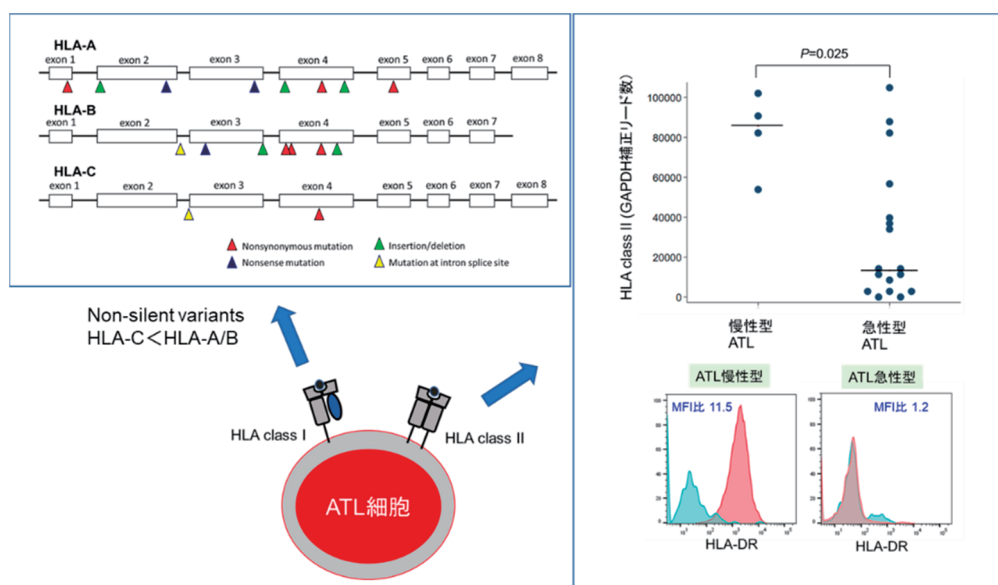


【目的】 HLA は免疫応答を司る最も重要な分子である。HLA の個人差が免疫応答性を決定し、感染症や自己免疫疾患の疾患感受性に大きく影響する。HLA class I は CD8 陽性 T 細胞への抗原提示をするだけではなく、NK 細胞受容体のリガンドとなり NK 細胞の機能を制御する。ウイルスが持続感染した細胞やがん細胞では HLA class I 発現レベルの低下が認められ、T 細胞から認識されなくなり、NK 細胞の攻撃対象となる。抑制型受容体は HLA class I をリガンドとしており、個人の HLA class I アレルの組み合わせによってライセンスを受ける NK 細胞の免疫応答性が異なる可能性が報告されている。我々は ATL が予後不良である要因として、ATL 細胞に生じる HLA 遺伝子異常が免疫回避機構に重要である可能性に着目して研究を進めてきた。特に、HLA の発現が低下した細胞を標的として応答をする NK 細胞が ATL 発症や病勢進展の制御に重要であるという作業仮説を検証することを目的に、ATL に生じる HLA の異常について基盤となるデータを解析し、さらに HTLV-1 キャリアから ATL の発症に特定の HLA が関与するか探索する。

【方法】 1. ATL 細胞に生じるゲノムレベルの HLA 遺伝子全領域の解析は、long-range 法を用いた super high resolution for single molecule-sequence-based typing (SS-SBT) で実施した。ATL 細胞における HLA 遺伝子の発現解析については、Capture-RNA-Seq 法で行った。2. HTLV-1 感染 CD4⁺T 細胞における HLA class I と HLA-DR の細胞表面上の発現はフローサイトメトリーで解析した。3. ATL 症例 110 例、HTLV-1 キャリア 70 例の DNA を用いて、Luminex 法による *HLA-A*、*-B*、*-C*、*-DRB1*、*-DQB1*、*-DPB1* のタイピングを実施し、ATL 発症に関連する HLA アレルの探索を行った。

【結果】 ATL の急性型 20 症例中 8 症例に LOH (loss of heterozygosity : ヘテロ接合性喪失) を認め、2 例は *HLA-A*、2 例は *HLA-B*、*-C*; 2 例は *HLA-A*、*-C*、*-B*; 1 例は *HLA-DRB1*、*-DQA1*、*-DQB1*、*-DPA1*、*-DPB1*、1 例は *HLA-A* から *-DQB1* のすべての遺伝子に LOH を認めた。20 例中 8 例に 17 個の non-silent variants (NSVs) を認め、*HLA-A* に 8 個、*HLA-B* に 7 個、*HLA-C* に 2 個であった。HLA class II 遺伝子においてはゲノム異常をほとんど認めなかったが、HLA class II の RNA 及び細胞表面上の発現は慢性型よりも急性型において発現が低下していた。ATL と HTLV-1 キャリアの HLA アレル頻度の比較より、ATL のリスクとなる可能性のある *HLA-C* が検出された。

ATL 細胞に生じる HLA の変化

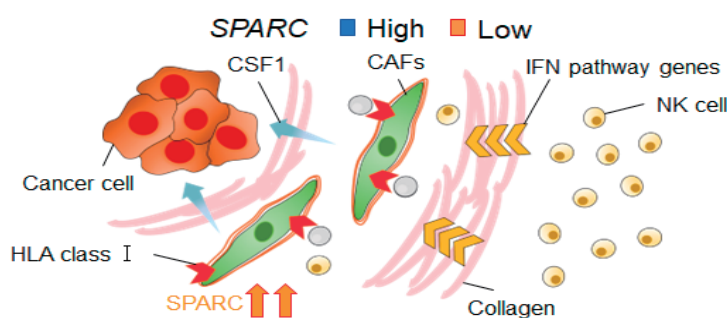


【目的】 本研究は癌間質の転移進展機序を解明し新規治療法開発を目指すものである。我々は、これまでに独自の結腸癌原発組織由来の DNA および mRNA に対して *secreted protein acidic and rich in cysteine* (*SPARC*) の DNA メチル化および遺伝子発現定量を行い、臨床病理学的解析を行った。前者は癌細胞の、後者は癌間質細胞における *SPARC* 分子状況を反映していると考えられ、結腸癌の進展や予後に関係していたのは、癌の DNA 異常ではなく癌間質の発現異常であった。microdissection により癌細胞と間質細胞を分けて包括的遺伝子発現解析を行った結果、*SPARC* の間質発現は癌細胞の 17 倍であった。*SPARC* 発現は癌に面する fibroblast に限局していることが報告されているため、*SPARC* の癌転移への関与は、癌間質の cancer-associated fibroblast (CAF) における *SPARC* の下流変化が原因であると仮説を立てた。そこで、CAF 細胞 YS1 において *SPARC* ノックダウンを行い下流遺伝子の探索を行った。

【方法】 YS1 の *SPARC* ノックダウンを行い、マイクロアレイを用いて遺伝子発現変化を同定した。遺伝子変化は real time PCR で検証した。YS1 の *SPARC* ノックダウンを行い表現型の変化を調べた。線維芽細胞転移活性を反映する gel contraction assay を行い、また癌細胞への影響を見るために癌細胞との共培養による癌浸潤能と nude mouse の移植率を算定した。癌間質プロファイルの public database (GSE35602) 解析を行い、癌間質における *SPARC* と下流遺伝子の関係を検証した。さらに、包括的遺伝子探索を行い *SPARC* と関連する CAF marker 候補を同定した。CAF marker 候補遺伝子の予後解析 (GSE17538) を行い AUC で順位付けを行った。*SPARC* 下流で発現が誘導され、癌間質で *SPARC* との高い相関を示した *CSF1* に注目した。*CSF1*、*CSF1R* のノックダウンによる *SPARC* 誘導癌浸潤能変化を調べた。

【結果】 YS1 の *SPARC* ノックダウンを行い下流遺伝子として collagen family、補体 C1 family、IFN-stimulated gene (ISG)、HLA family を同定し、さらに癌間質において *SPARC* との相関が強い遺伝子 ($R=0.9$ or beyond) を絞った。Collagen family として、COL1A1、COL3A1、COL8A1、COL5A2、COL5A1 等が、C1 family として C1S、C1R が、ISG として IFIH1、IRF7 等が、HLA family として HLA-F 等が real time PCR で検証された。YS1 の *SPARC* ノックダウンにより gel contraction が有意に抑制され、*SPARC* は CAF 細胞の転移能活性化に関わる可能性が示唆された。癌細胞との共培養により *SPARC* は癌浸潤能亢進とヌードマウス生着率増加に関与していた。YS1 と癌細胞のクロストークを探るために、*SPARC* が標的とする secretion factors に注目した。cS/E 比が低く *SPARC* との関連が高い遺伝子を包括的に探索して *CSF1* を同定した。一方で、CAF marker 候補として、*SPARC* と関連が強く ($R=0.9$ or beyond)、cS/E ratio=10 or beyond の条件で発現の強い 115 個の遺伝子を同定した。すでに知られている CAF marker (FAP、VIM、ACTA2、PDGFRB) が含まれていた。CAF marker 候補遺伝子の発現が強かった 76 個の遺伝子について予後解析を行うと 63 個が有意 ($p<0.05$) な悪性予後因子であった。AUC で順位付けを行うと最も強い予後因子には COL family (COL8A1、COL5A2、COL5A1、COL6A3、COL11A1、COL12A1) が enrich された。YS1 と癌細胞の共培養において、YS1 および癌細胞をそれぞれ *CSF1*、*CSF1R* でノックダウンすると癌細胞の浸潤が抑制された。以上から、*SPARC* による癌浸潤に *CSF1*-*CSF1R* axis が関わっている可能性が示唆された (図)。

SPARC による癌転移機序モデル

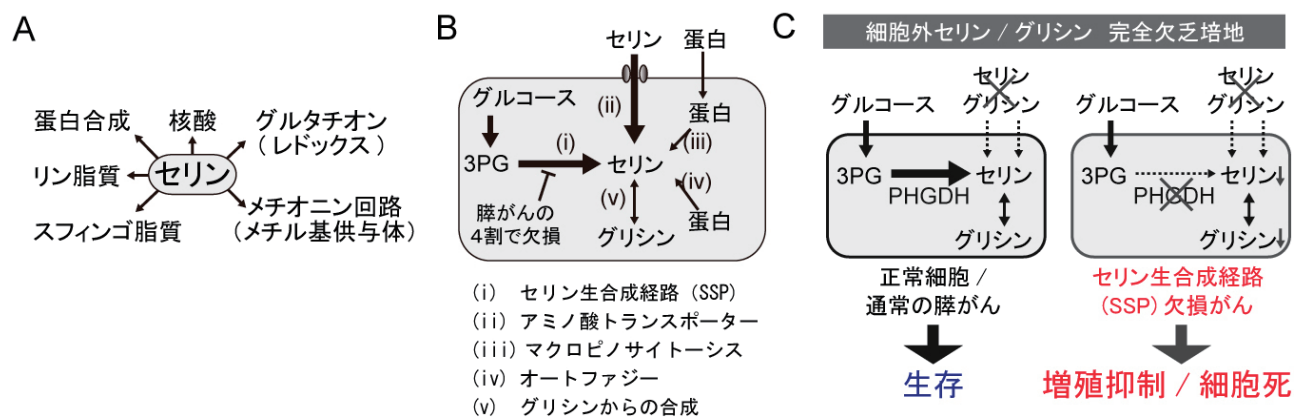


【目的】細胞外セリン濃度が低下すると、正常細胞はグルコースを基質としてセリンを新規に合成する（セリン生合成経路 serine synthesis pathway : SSP）。我々は、膵癌の約4割が、SSPの律速酵素であるPHGDHを欠損しており、セリン不含培地では生存できないことを発見、世界に先駆けて報告した。こうした膵癌症例では、セリン制限食によって膵癌細胞の増殖を特異的に抑制できる可能性がある。しかしながら、マウスモデルでの検討では、セリン欠乏食によってSSP欠損膵癌の増殖は抑制されたものの、腫瘍の完全消失にはいたらなかった。さらなる検討の結果、これは生体内では腫瘍の間質細胞から癌細胞へのセリン供給経路が存在しているためと判明した。このため、こうした腫瘍微小環境からのセリン供給経路を同定し遮断すること、またセリンが不足した環境でSSP欠損膵癌に特異的に生じる脆弱性を同定することが必要と考えた。

【方法】SSPの欠損によって膵癌細胞に生じる代謝特性の変化・差異を検出するためには、SSPの有無以外の条件の揃ったコントロール細胞との比較することが望ましい。また、生体内における膵癌細胞と腫瘍微小環境中の細胞との相互作用、特に免疫細胞も含めた解析を行うためには、免疫系が正常なマウスモデルを用いた検討が不可欠である。こうした背景から、C57BL/6背景のKPCマウスより樹立したマウス膵癌細胞株（KPC細胞）を用いて、SSP経路の律速酵素であるPHGDHの安定ノックアウト（KO）細胞を作製した。単一細胞に由来するクローンを複数樹立し、様々な濃度のセリン・グリシン存在下での増殖速度を比較検討した。樹立した細胞にドキシサイクリン誘導性にPHGDHを発現可能なコンストラクトを作製・導入することで、ドキシサイクリン濃度依存性にPHGDHすなわちSSP活性を制御可能なマウス膵癌細胞を樹立した。これらの細胞を用いて、SSPの有無が、様々なセリン・グリシン濃度下において、細胞増殖や（想定される）種々のセリン獲得経路に与える影響を評価した。

【結果】PHGDH-KOマウス膵癌細胞では、培地中のセリン・グリシンの多寡によらずPHGDHの発現が喪失していること、セリン・グリシン不含培地で増殖が顕著に抑制されることを確認した。得られたPHGDH-KO細胞を用いて、ドキシサイクリン誘導性にPHGDH発現を回復できる細胞を複数樹立した。これらの細胞では、ドキシサイクリンの存在下でのみPHGDH発現/SSP活性が回復し、セリン・グリシン欠乏状態での生存が可能になることを確認した。現在、これら細胞を用いて、膵癌細胞におけるSSPの有無が、膵癌細胞の代謝にどのような影響を及ぼすか、また、マウス生体内で、腫瘍微小環境中の間質細胞における代謝経路にどのような影響を及ぼすか、検討を進めているところである。なお、これらの細胞を用いた検討から、SSP欠損膵癌では、低セリン・グリシン条件下ではオートファジー活性が増強することを見出した（下図B (iv)）。このことから、オートファジー阻害によってセリン制限食による抗腫瘍効果を増強できる可能性があり、現在、*in vitro*、*in vivo*で検証を進めているところである。

膵癌におけるセリン代謝経路とその異常



64 ゲノム多型の地域差に着目した疾患関連遺伝子の探索	今西 規
------------------------------------	-------------

【目的】日本人のゲノム多型には地域差があり、それが各種疾患の発症率の地域差に関連していると予想される。われわれはヒト白血球抗原である HLA 遺伝子群について都道府県単位での遺伝子頻度を推定したが、大きな地域差があることが明らかになり、これが自己免疫疾患等に関連する可能性が示唆された。網膜色素変性症 (retinitis pigmentosa) は網膜の視細胞が変性・消失することにより視力の低下や失明に至る指定難病で、原因解明と治療法の開発が期待されている。日本の 47 都道府県における HLA 遺伝子頻度の分布と、人口 10 万人あたりの網膜色素変性症の患者数を比較したところ、HLA-DRB1 遺伝子の DRB1*04:05 対立遺伝子の頻度が患者数と正の相関を示した。患者数の地理的分布は環境要因や HLA 以外の遺伝的要因などの影響を受けるため、相関だけでは立証したことにはならない。そこで、HLA 遺伝子が網膜色素変性症と関連するのかどうかを検証するために、実際の患者のゲノム DNA を使った研究を実施した。

【方法】互いに血縁関係のない網膜色素変性症患者 152 名のゲノム DNA を医薬基盤・健康・栄養研究所難病研究資源バンクより取得し、HLA 遺伝子のタイピングを行った。クラス I 遺伝子の HLA-A、B、C とクラス II 遺伝子の HLA-DRB1、DQB1、DPB1 の合計 6 座位を対象として、long PCR と次世代シーケンサー-MiSeq による塩基配列決定、さらに HLA 対立遺伝子の判定ソフト TypeStream Visual V2.1.0.40 により実施した。患者群における各遺伝子座の対立遺伝子頻度を推定し、これを健常群と比較して有意差があるものを探した。なお、本研究は東海大学医学部臨床研究審査委員会の承認を得て実施した (21R149)。

【結果】152 人の患者群における HLA 遺伝子の対立遺伝子頻度を計算し、健常人 (HC : healthy control) と比較した (下表)。その結果、健常人と患者群の間で頻度に有意差がある対立遺伝子が複数見出された。クラス I の HLA-A*02:10 対立遺伝子は患者群で高頻度に出現した (OR=3.70)。また、クラス II の HLA-DQB1*06:09 対立遺伝子も患者群で高頻度に出現した (OR=7.19)。このほか、患者群で有意に頻度が低い対立遺伝子も見出された。患者群で高頻度の対立遺伝子は網膜色素変性症に関連することが示唆され、逆に患者群で低頻度の対立遺伝子は疾患に抵抗性があると考えられる。また、当初より注目していた HLA-DRB1*04:05 についてはオッズ比が 0.75 となり、患者群では健常群よりも頻度が低く、地理的分布からの予想とは逆の結果となった。以上の結果から、網膜色素変性症には自己免疫疾患的な側面がある可能性が示唆された。一方で、地理的分布のみを参考にして疾患関連遺伝子を見つけることは困難であり、より強い証拠をそろえることが必要と考えられた。

有意差が認められた HLA 対立遺伝子

HLA-A 遺伝子

alleles	Patients		HC		OR	p
	allele	frequency	allele	frequency		
A*24:02	120	39.47	35191	36.63	1.14	0.3047
A*02:01	32	10.53	10759	11.20	0.94	0.7098
A*02:06	33	10.86	8700	9.06	1.23	0.2753
A*11:01	30	9.87	8679	9.03	1.11	0.6126
A*31:01	28	9.21	8501	8.85	1.05	0.8248
A*26:01	10	3.29	6997	7.28	0.43	0.0074
A*33:03	19	6.25	7415	7.72	0.80	0.3377
A*02:07	6	1.97	3184	3.31	0.59	0.1918
A*26:03	10	3.29	2281	2.37	1.40	0.2954
A*26:02	2	0.66	1752	1.82	0.36	0.1288
A*24:20	2	0.66	720	0.75	0.88	0.8532
A*02:10	5	1.64	434	0.45	3.70	0.0020
A*01:01	2	0.66	467	0.49	1.36	0.6668
A*03:01	3	0.99	423	0.44	2.26	0.1513
other	2	0.66	557	0.58		
total	304	100.00	96060	100.00		

HLA-DQB1 遺伝子

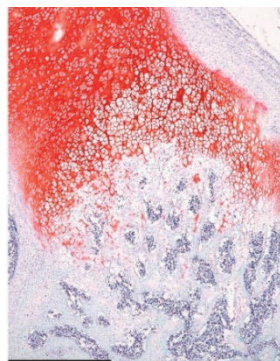
alleles	Patients		HC		OR	p
	allele	frequency	allele	frequency		
DQB1*06:01	73	24.01	571	19.10	1.34	0.0395
DQB1*03:03	49	16.12	465	15.55	1.04	0.7954
DQB1*04:01	31	10.20	386	12.91	0.77	0.1754
DQB1*03:01	31	10.20	342	11.44	0.88	0.5154
DQB1*03:02	25	8.22	287	9.60	0.84	0.4354
DQB1*06:02	27	8.88	214	7.16	1.26	0.2713
DQB1*05:01	15	4.93	197	6.59	0.74	0.2627
DQB1*06:04	6	1.97	155	5.18	0.37	0.0134
DQB1*04:02	8	2.63	126	4.21	0.61	0.1833
DQB1*05:03	12	3.95	118	3.95	1.00	0.9994
DQB1*05:02	11	3.62	79	2.64	1.38	0.3198
DQB1*06:03	4	1.32	18	0.60	2.20	0.1455
DQB1*06:09	12	3.95	17	0.57	7.19	0.0000
other	0	0.00	15	0.50		
total	304	100.00	2990	100.00		

【目的】 骨・軟骨運命決定と分化の分子機構、特にマスター転写因子群による遺伝子発現制御機構に関しては、マウス等のモデル動物において知見が集積されている。しかしながら、ヒトにおけるそれらの妥当性と分子メカニズムについては検証されていない。そこで本研究では、胚性幹細胞 (ES 細胞) および人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) といったヒト多能性幹細胞の間葉系細胞誘導系を用いてヒトの骨格発生における軟骨内骨化過程を再現し、各段階の遺伝子発現プロファイルとオープンクロマチン領域を単一細胞レベルで明らかにすることを目指して行われた。一連のデータをもとに、ヒトの軟骨内骨化過程における細胞系譜を追跡しながら、遺伝子発現制御ネットワークの観点から異なる中胚葉 (沿軸中胚葉～椎板、側板中胚葉～肢芽間葉) における骨・軟骨の細胞運命決定機構を比較することを最終目標とした。

【方法】 ヒト多能性幹細胞より軟骨内骨化過程を再現する誘導系の開発を行った。続いて、誘導した椎板細胞を免疫不全マウスの腎被膜下に移植し、形成された組織を放射線学的、組織学的に解析した。また、一連の誘導系における複数のポイントで single-cell RNA-seq (scRNA-seq) および single-cell ATAC-seq (scATAC-seq) を行い、取得したデータをバイオインフォマティクス的手法により解析した。

【結果】 沿軸中胚葉～椎板の誘導においては、Wnt、Hedgehog (Hh)、transforming growth factor (TGF) - β 、bone morphogenetic protein (BMP) の各種シグナルを調節する 5 種類の低分子化合物を段階的に 2 次元培養系で用いることで、5 日間で椎板細胞を誘導するプロトコルを確立した。さらに、誘導した椎板細胞を免疫不全マウスの腎被膜下に移植すると、2 カ月頃よりマイクロ CT 上で X 線不透過性の構造物が出現し、そのサイズは経時的に増大していった。移植後の各時点で構造物の組織学的解析を行うと、軟骨内骨化によって発生する長管骨に類似した組織構造を有することが明らかとなった (図)。側板中胚葉から肢芽間葉系細胞の誘導においても、肢芽発生に重要な数種のシグナル経路を調節する低分子化合物の組み合わせを同定し、基礎培地の種類・組成、培養期間、低分子化合物の処理濃度と期間の最適化が完了しつつある。次に、ヒト多能性幹細胞由来椎板細胞を用いた軟骨内骨化誘導系において、分化誘導前、沿軸中胚葉～体節～椎板細胞誘導時、腎被膜下移植後の軟骨内骨化初期 (7 週)、腎被膜下移植後の軟骨内骨化後期 (19 週) の scRNA-seq データを取得した。遺伝子発現パターンをもとにクラスタリングを行い、細胞集団の特徴づけを行った。その結果、誘導された軟骨内骨化構造体は、①未分化な骨軟骨前駆細胞様集団、②各分化段階の軟骨細胞系列、③各分化段階の骨芽細胞系列、④血球・血管系細胞集団、から構成されていた。ヒト胎児の長管骨の公共データと統合して解析したところ、本法がヒト胎児の骨発生過程を部分的に再現していることも示唆された。最後に、軟骨内骨化後期のサンプル (腎被膜下移植後 20 週) に対して、single-cell multiome (scRNA-seq・scATAC-seq) を行った。single-cell multiome データにおいて、オープンクロマチン領域における各転写因子のモチーフ解析を行うとともに、各転写因子の遺伝子発現とモチーフの集積状態を統合的に解析した。その結果、各細胞集団において異なる転写因子群が活性化している状態 (遺伝子制御ネットワーク) が明らかとなった。以上の通り、異なる中胚葉 (沿軸中胚葉～椎板、側板中胚葉～肢芽間葉) において骨・軟骨の細胞運命決定機構を比較する準備が整いつつある。

マウス腎被膜下においてヒト多能性幹細胞由来椎板細胞から形成された軟骨内骨化組織



(スケールバー : 1 mm)

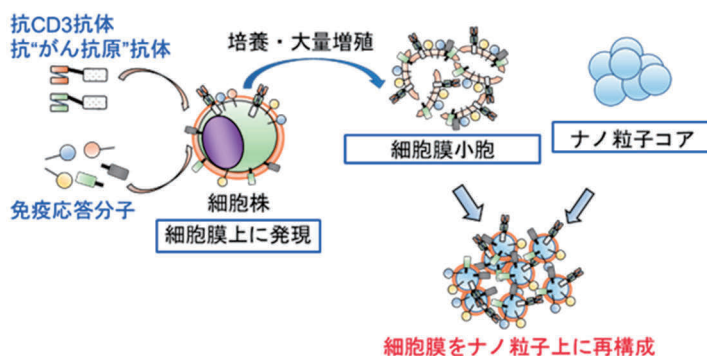
66	人工ナノ粒子による新規がん免疫療法の開発	籠谷 勇紀
----	----------------------	-------

【目的】 がんに対する免疫療法の中でも、がん抗原を特異的に認識・攻撃できるキメラ抗原受容体 (chimeric antigen receptor) 導入 T 細胞を輸注する CAR-T 細胞療法は、難治がんを治癒に導き得る治療法として期待されている。しかし今のところ固形がんを含む多くの悪性腫瘍においてその治療効果は不十分であり、この原因として種々の免疫抑制環境による T 細胞機能の阻害が知られている。別の観点からの問題として、CAR-T 細胞を患者から個別に作製・準備するための極めて高い製造コストがあり、より規格化・一括化された製造方法の確立が現実的に必要である。CAR と類似した原理で細胞製剤を用いずに免疫応答を誘導する治療法として、抗 CD3 抗体とがん抗原に対する抗体を連結することにより、内在性の非特異的 T 細胞に抗腫瘍効果を誘導する二重特異性抗体 (Bispecific Tcell engager : BiTE) が開発されており、コスト・安定供給性という面から優れているが、抗腫瘍効果が弱い。本研究ではこれらの治療モダリティの短所を克服して、効果、汎用性に優れる治療薬の導出に向けた基盤技術開発を目的とした。

【方法】 我々は、がん抗原特異的な T 細胞の活性化に加えて、共刺激シグナルやサイトカインシグナルを一括して付与できる人工ナノ粒子を開発した。ナノ粒子表面に BiTE と同様の原理でがん細胞と T 細胞を引き寄せるためのがん抗原特異的な抗体と抗 CD3 抗体、共刺激分子、サイトカイン分子を発現させる目的で、これらを細胞表面に安定発現させた細胞株を準備して細胞膜小胞として単離した上で、PLGA などの粒子表面上に再構成した。この技術を背景として、固形がんにおける腫瘍微小環境を制御する目的で、免疫チェックポイント分子に対する阻害抗体、免疫抑制シグナル解除に寄与するサイトカイン分子を追加搭載したナノ粒子を作製した。同ナノ粒子が生体内の免疫細胞に対して有効な抗腫瘍効果を引き起こせることを示すために、固形がんマウスモデルを用いて検討を行った。一方、実用化に向けた検討では、ナノ粒子を作製する手順をより簡略化する目的で、(ナノ粒子コアを使用せずに) 細胞膜断片から作製する膜小胞のみを使用した場合の免疫応答効果を検証した。

【結果】 製法については、PLGA 上に細胞膜断片を被覆した場合と、膜小胞として得られたものを比較して、*in vitro* における機能では遜色ないことを確認した。また膜小胞の単離工程で、従来超遠心で分離していたところを磁気ビーズによる分離方法を試し、より簡便に分離を行えることを確認した。固形がんに対する治療効果の改善については、免疫チェックポイント分子 (PD1/PDL1, CTLA など) に対する阻害抗体、及び免疫微小環境に改変に寄与することが知られているサイトカイン分子を表面に搭載したナノ粒子を作製して、マウス固形腫瘍モデルに局所注射を行った。腫瘍微小環境における作用を観察する目的、本実験ではマウス T 細胞に対するナノ粒子を別途作製し、大腸癌細胞株 CT26 を皮下移植する腫瘍モデルを用いて効果検証を行った。これまでに作製した BiTE 分子と共刺激分子のみを含むナノ粒子においても無治療と比較して有意な治療効果が示されたが、微小環境改変シグナルを搭載することで、さらに高い治療効果を示した。さらに、腫瘍内に存在する免疫細胞の構成を調べると、CD8 陽性 T 細胞の増加、免疫抑制マクロファージの減少などが見られたことから、目的とする微小環境改変効果が確かに得られていることが確認された。

難治がんに対する多様な免疫応答を誘導するナノ粒子の開発

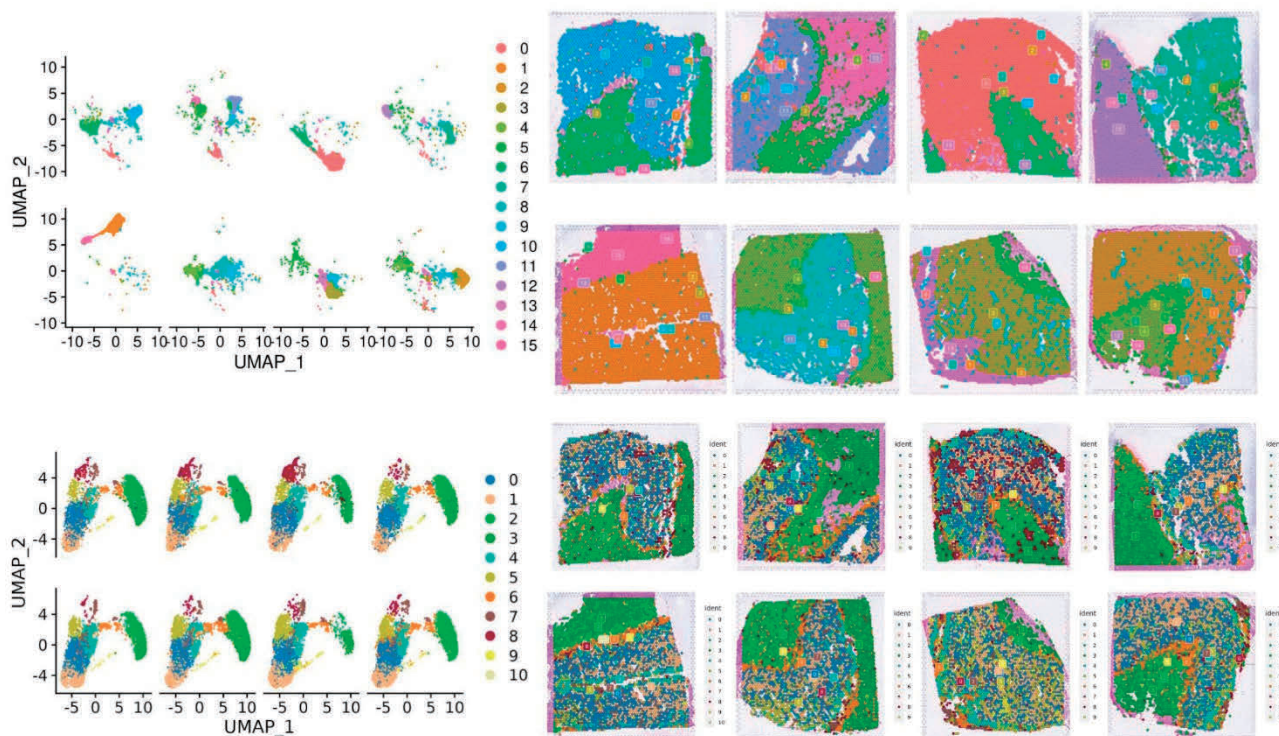


【目的】 近年、単一細胞解析 (single cell RNA sequence) の技術が進展し、さらに、細胞の空間配置と結びついた解析が可能な空間的遺伝子発現解析 (Spatial transcriptomics ; Visium、GeoMx DSP 等、2021 年 1 月の Nature Methods で “Method of the Year 2020” に選ばれた) が登場した。これらの解析で得られる情報量は膨大であるため、情報学的解析が必須となる。そこで、生命科学と情報学が連携して融合研究を行うことにより、脳全体での解析では不明な変化も、細胞集団特異的に、かつ、細胞の空間配置と関連付けながら、検出することが可能になると期待される。このため、本研究は、最先端の遺伝子発現解析技術と情報学との融合研究により、統合失調症の病態において鍵となる細胞集団を明らかにすることを目的とした。

【方法】 統合失調症に罹患した患者と正常対照者の稀少な死後脳組織を用いて、単一細胞解析と最先端の空間的遺伝子発現解析を行い、得られた大規模データを用いて、情報学的解析を行った。解析結果について、死後脳の組織を用いて、免疫組織化学法および *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いた組織学的検証を行った。

【結果】 単一細胞解析と最先端の空間的遺伝子発現解析で得られたデータの情報学的解析を行ったところ、統合失調症の死後脳組織では、正常対照群と比較して、アストロサイトに関連する分子の遺伝子発現が増加していることを見いだした。免疫組織化学法および *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いた組織学的検証を行ったところ、確かに統合失調症の死後脳組織において、アストロサイトに関連するシグナルの増強が確認された。アストロサイトは脳実質内において、脳血管を取り巻いて血液脳関門を形成するとともに、血流、代謝の維持・調節に重要な役割を担っている。精神疾患の発症には、発生・発達段階での様々な要因が関与することが想定されているが、それらの要因によって、今回見出されたアストロサイト関連シグナルの変化が生じている可能性があると考えられた。

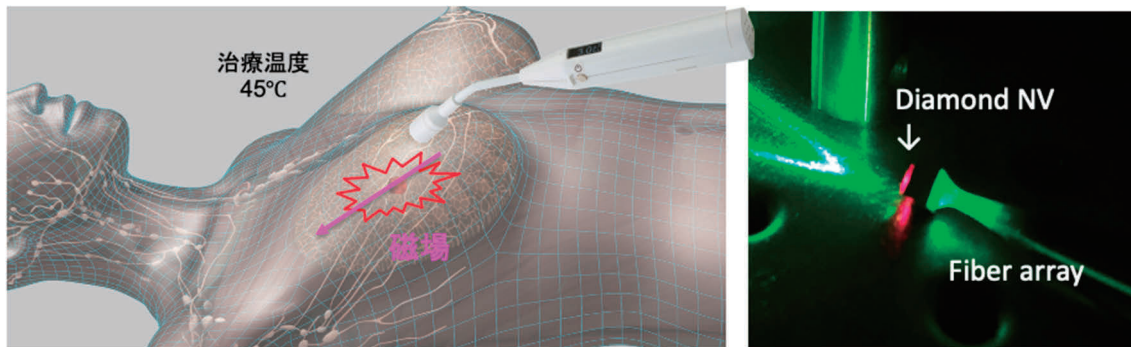
統合失調症の患者と正常対照者の死後脳組織の空間的遺伝子発現解析



【目的】がんを低侵襲に治療するために、磁性ナノ粒子と交流磁場を用いた磁気加熱がん治療（磁気ハイパーサーミア）が注目されている。がんへと直接投与された磁性ナノ粒子を外部から交流磁場を用いて加熱する（43～45℃以上）ことで、低侵襲にがんを死滅させることが可能である。しかしながら、過度な加熱（47℃以上）は正常組織に対してもダメージを与えてしまうため、磁気加熱治療と同時に、がんの温度をモニタリングし、加熱パワーをコントロールできる医療システムの開発が期待されているが、未だに治療と診断が同時に可能なシステムは開発されていない。本研究では、治療技術として、磁気加熱コイルならびに磁気加熱交流磁場形状を最適化することで、低侵襲かつ加熱の効率を向上させる。ならびに、診断技術として、がん治療中の磁性ナノ粒子の加熱温度をモニタリングするために、固体量子センサであるダイヤモンド窒素-空孔中心（ダイヤモンド NV センタ）を用いて、磁場温度を計測できるシステムを開発する。

【方法と結果】高い効率で磁性ナノ粒子を加熱するために、磁性ナノ粒子の磁性体の濃度を濃縮し、同じ磁場を印加した場合でも加熱効率が向上することを確認した。ならびに、磁気加熱緩和物理現象に基づく数値シミュレーションによって、加熱に適した磁気コイル交流パルス磁場波形を印加することでさらに加熱効率が向上できることを実証した。絶対熱量 100 W/kg、加熱効率が 100 nHm²/kg となる交流磁場パルス波形形状を明らかとした。がんの温度として、磁気加熱中の磁性ナノ粒子の温度を 2 次元でモニタリングするために、ダイヤモンド NV センタを用いた 2 次元のイメージングシステムを開発した。数値シミュレーションとの比較検証結果から、イメージングの空間分解能が約 1～2 mm であることを明らかとした。磁気加熱がん治療の動物模擬実験を実施し、磁気加熱中のがんの温度（磁性ナノ粒子の温度）をモニタリングすること、加熱温度を制御できることを実証した。誤差 1.3℃の温度モニタリング精度であり、治療温度を制御できることを明らかとした。

磁気を用いたがん治療と診断システム



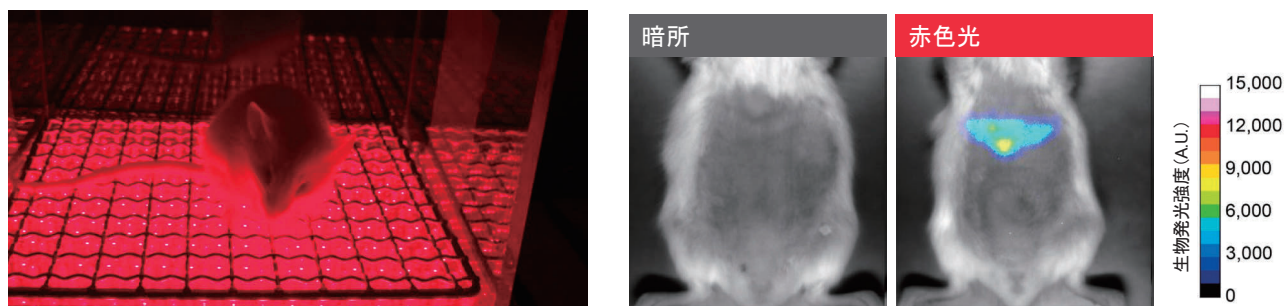
①生体内での磁気加熱原理, ②がん診断医療機器の開発, ③固体量子センサの生体応用

【目的】 研究代表者らは、生命現象を光で操作するために「Magnet」と名付けた光スイッチを2015年に開発した。Magnetは、青色光を吸収すると結合する二つのタンパク質のペアであり、操り人形で言えばヒモとか棒に相当する、光操作の基盤技術である。Magnetの開発によって、青色光で指令を与え、生命現象に関与するさまざまなタンパク質の働きを私たちの意図で操作することが可能になった。Magnetを応用した研究が進む一方で、Magnetの課題も明らかになっている。青色光は生体組織透過性が低いため、生体外からの光照射で操作可能な部位は、生体表面から近い組織や器官に限定されてしまう点である。この技術的な課題を克服するために、本研究では、生体組織透過性が高い赤色光でコントロール可能な新たな光スイッチを開発することを目的とした。

【方法】 MagRedを開発するために、さまざまな細菌が有する赤色光受容体（バクテリオフィトクロム：BphP）と呼ばれるタンパク質を検討し、特に放射線抵抗性細菌（*Deinococcus radiodurans*）の赤色光受容体（DrBphP）に着目した。DrBphPは哺乳類細胞に内在する化合物のビリベルジン（BV）を補因子として取り込み、赤色光を吸収すると構造変化する性質を持っている。しかし、DrBphPのこの性質だけを利用してさまざまなタンパク質の働きを操作するのは困難である。研究代表者らは、赤色光によるDrBphPの構造変化を認識してDrBphPに結合するタンパク質（以下、結合パートナー）を開発することで、赤色光で作動する光スイッチを開発できると考えた。

【結果】 上述の着想を実現するために、アフィボディと呼ばれる抗体様分子の変異体ライブラリーを作製し、リボソームディスプレイ法を用いて、赤色光を照射した条件でのみDrBphPと結合するアフィボディを結合パートナーの候補として単離した。この進化分子工学的アプローチで得られたバインダー候補に対してアミノ酸変異や末端のアミノ酸の削除といった改変を加えることで、赤色光照射時の結合効率を改善した結合パートナーの開発に成功した。このDrBphPと結合パートナー（アフィボディ）からなる光スイッチを、Magnetの赤色バージョンという意味を込めて「MagRed」と名付けた。MagRedは光操作の基盤技術なので、さまざまな応用が可能である。本研究では、MagRedを用いて赤色光による遺伝子発現の光操作技術を開発した。研究代表者らは先行研究で、ゲノム編集技術のCRISPR-Cas9システムとMagnetを用いて、遺伝子発現の光操作技術「CPTS」を開発していた。CPTSに導入したMagnetをMagRedで置き換えることで、赤色光による遺伝子発現の光操作技術（Red-CPTS）を開発することができた。Red-CPTSはCRISPR-Cas9システムを用いているので、ガイドRNAの塩基配列を設計するだけで、ゲノムにコードされたどんな遺伝子でも、その発現を赤色光で操作できる点が非常に使いやすい。研究代表者らは、Red-CPTSをマウスの肝臓に導入し、生体外から非侵襲的に赤色光を照射することで、Red-CPTSが生体深部の遺伝子の働きを効率良く操作できることを実証した。

赤色光による生体内での遺伝子発現の光操作

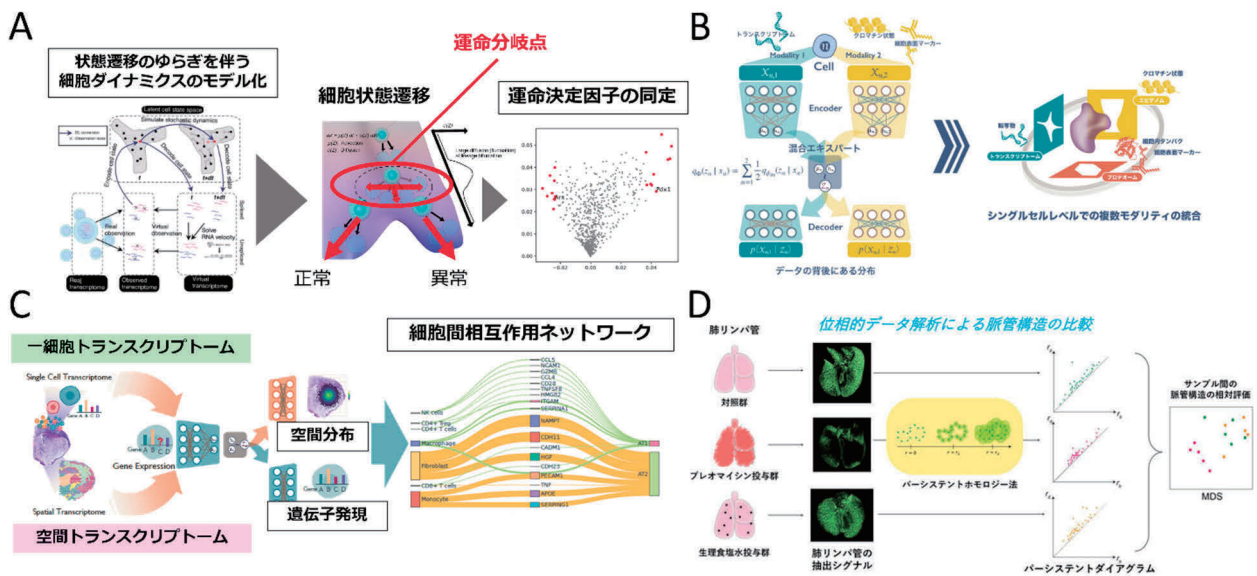


【目的】 生体内のさまざまな微小環境において、細胞集団は相互作用を介した複雑な生態系（エコシステム）を形成している。近年、一細胞オミクス測定技術の進歩により、エコシステムを形成する細胞レベルでのオミクス情報の取得が可能となり、分子・細胞レベルでの生命システムの理解が期待されている。しかしながら、刻々と移り変わるシステムに対し、そこに内在される基本原理をあぶり出すためには、要素還元論に基づく従前のアプローチには限界がある。本研究では、目に見えない分子・細胞集団の移り変わり（ダイナミクス）を捉え、多細胞が作り出すエコシステムを俯瞰するための、最先端のベイズ推論と深層学習に基づく新たな解析プラットフォームを開発することを目的とする。

【方法】 一細胞および空間オミクス計測技術から得られる分子・細胞情報を基に、細胞間相互作用・ダイナミクスを推定するとともに、これらが作り出す多細胞のエコシステムを俯瞰するための解析技術として、1. 細胞動態シミュレーションのための深層生成モデル、2. マルチモーダル細胞情報を統合する深層生成モデル、3. 細胞間相互作用ネットワークを推定する深層生成モデル、4. 多細胞が作り出す組織構造変化を抽出するベイズ機械学習、5. 多分子が作り出すタンパク構造変化を抽出するベイズ機械学習、を開発した。

【結果】 解析技術の有効性を示すために、扁平上皮がん微小環境における線維芽細胞とその細胞間コミュニケーションの同定、大腸癌浸潤先進部がん微小環境における SPP1⁺マクロファージとその細胞間コミュニケーションの同定、肺線維症モデルにおけるリンパ管構造変化、および肺転移モデルにおけるリンパ管構造変化の可視化を行った。本研究の成果により、開発した技術による解析結果の再現性を確認するとともに、開発した技術が腫瘍微小環境に対する新たなターゲット探索や病態モデルにおける構造変化パターン解析の解析基盤として有効であることが示された。

開発した情報解析技術の概念図



【目的】加齢に伴う機能変化や生理的な予備能力の低下により、様々なストレスに対して脆弱性が亢進し、容易に健康障害を招きやすい状態はフレイル (frailty) と呼ばれ、高齢期における自立度の低下、要介護状態に陥る要因となる。近年、睡眠時間や睡眠の質とフレイル、認知機能障害との関係が報告されており、睡眠はフレイルへの介入の新たな標的となりうる。しかし、それらの多くは、質問表での睡眠評価に基づくもので、客観性が乏しい。そこでフレイルと関連がある客観的かつ簡便な睡眠の質評価法の確立が急務と考えた。そして、我々が主催する高齢者コホート研究 FESTA においてこれまで蓄積してきた普及型の活動量計を用いた睡眠時データの再利用の可能性を推測した。よって本研究の目的は、(A) 問診表 (Pittsburgh Sleep Quality Index : PSQI) と、actigraph と普及型の腕時計型活動量計の同時装着により得られたデータの解析から、簡便な睡眠の質評価法を作成すること、(B) FESTA 研究においてフレイルや認知機能障害と主観的・客観的な睡眠指標との関係を明らかにすること、であった。

【方法】1. actigraph と普及型活動量計同時記録によるデータ比較。actigraph (GT9X : Actigraph 社) と Actiband (東芝ヘルスケア社) の記録データの妥当性を健康成人で検討した。2. FESTA 研究での睡眠の質に関するデータの収集と解析。兵庫県丹波圏域在住高齢者を対象とした FESTA 研究において、参加者に PSQI を記載してもらい、actigraph を非利き腕の上腕に装着し、身体活動量を 1 週間にわたって記録した。睡眠指標を日本版 Cardiovascular Health Study (J-CHS) と基本チェックリスト (KCL) を用いたフレイル分類で比較した。認知機能障害疑いは MMSE で判定した。最終的に睡眠指標とフレイル、認知機能障害疑いとの関連を、多変量ロジスティック回帰分析を用いて解析した。

【結果】1. 日中の覚醒時の身体活動度指標の計測は、Actiband で十分解析は可能であるが、睡眠時の様々な評価指標を得るためには Actiband 単独では現時点で不可能との判断に至った。2. 解析対象は、2022 年度の FESTA 研究参加高齢者 329 名中、PSQI の記載と睡眠中の actigraph 装着の両方が実施できた 315 例 (男性 109 名、女性 206 名) とした。J-CHS、KCL によるフレイル診断におけるロバスト、プレフレイル、フレイル例の割合、認知機能障害疑い例の割合には男女差がなかった。J-CHS によるロバスト群と非ロバスト群 (プレフレイル群+フレイル群) との間で、年齢と PSQI スコア、Duration of wakening time after sleep onset において有意な差を認めた。KCL によるロバスト群と非ロバスト群との間で、年齢、PSQI スコア、Sleep latency において有意な差を認めた。認知機能正常群と障害疑い群との間に睡眠指標は差を認めなかった。J-CHS でのロバストまたは非ロバストを従属変数として解析した場合、非調整モデルと基本属性による調整を加えたモデル 1 において PSQI スコアは、非ロバストと有意な関連性を認めた。しかし交絡因子を追加投入したモデル 2 では、PSQI スコア非ロバストとの関連性は消失し、うつ症状の有無、食事多様性スコア、年齢が非ロバストとの間に有意な関連性を示した。次に KCL によるロバストまたは非ロバストを従属変数として解析した場合、すべてのモデルで PSQI スコアと非ロバストとの関連性は有意であった。年齢、性別に加え、併存疾患数、うつ症状の有無も非ロバストとの間に有意な関連性が認められた。認知機能障害疑いと睡眠指標との間に有意な関係性は見られなかった。以上の結果を表にまとめた。

本研究におけるフレイル、認知機能障害と睡眠指標との関連 (横断的解析)

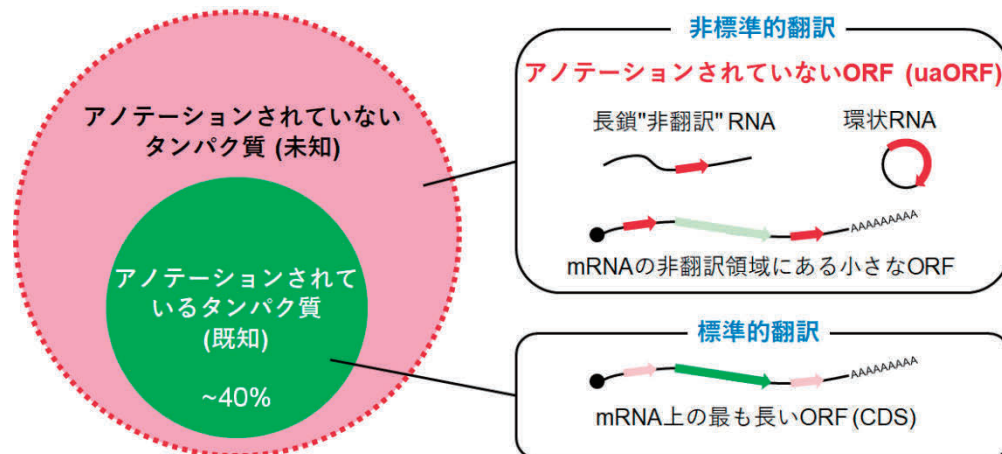
	フレイルとの関連 (J-CHS による評価)	フレイルとの関連 (KCL による評価)	認知機能との関連 (MMSE による評価)
PSQI (主観的睡眠評価)	△	○	×
Actigraph による睡眠指標 (客観的睡眠評価)	×	×	×
年齢	○	○	
性別	×	○	
併存疾患数	×	○	
食事の多様性	○	×	
うつ症状の有無	○	○	

【目的】 従来、真核生物において、mRNA 中の一番長い open reading frame (ORF) 配列である coding sequence (CDS) のみがタンパク質として翻訳されると考えられてきた。しかし、リボソームプロファイリング法により翻訳されている RNA の領域を調べたところ、CDS 以外の非翻訳と考えられてきた領域も翻訳されていることが示唆されている。質量分析により細胞で発現するタンパク質の解析を行うと、CDS 由来の既知タンパク質と一致するスペクトルは約 40%である。これまで、残りの 60%はデータとして高品質で信頼性が高いものであっても、CDS がコードする既知タンパク質と一致しないという理由で無視されていた。本研究では、これら既知のタンパク質をコードしない小さな ORF を一括りにして unannotated ORF (uaORF) と定義し、研究対象とする。uaORF がコードするタンパク質はほとんどが未同定・未解析であり、細胞や生物を説明する上で「足りないもの」の極めて有力な候補である。現在までに同定されている既知タンパク質に uaORF がコードする新規タンパク質を加えれば、現行のプロテオームデータが大幅に拡張でき、細胞機能の実行役を担うプレイヤーが出そろおうだろう。そこで本研究では、ヒト多能性幹細胞における uaORF の同定とマッピングを目的とする。

【方法】 二つの独立したヒト多能性幹細胞を用いて、直鎖 RNA (mRNA および長鎖非翻訳 RNA) のマッピング、環状 RNA のマッピングおよびリボソームプロファイリングによる翻訳領域の同定を行った。

【結果】 直鎖 RNA (mRNA および長鎖非翻訳 RNA) は通常の RNA-seq を実施することでデータを得た。次に環状 RNA を濃縮する目的で、直鎖 RNA を特異的に消化する RNase R でトータル RNA を処理し、環状 RNA を RNA-seq により効率的に検出した。結果として、二つの独立したヒト多能性幹細胞株でそれぞれ 10,000 種類の環状 RNA が検出され、共通して発現していた環状 RNA は 6,788 個であった。さらに、リボソームプロファイリングを実施し、データベース上に存在しない新規翻訳領域を塩基レベルで見出した。uaORF マッピングデータとリボソームプロファイリングデータと組み合わせることにより、uaORF のうち、実際に翻訳されている領域を一塩基レベルで正確に決定した。その結果、検出した全 ORF のうち 62%が既知の CDS であった。一方で、新規の uaORF は 4,500 個以上同定され、その割合は全 ORF の 19%であった。また、報告されている翻訳開始点とは異なる位置から翻訳が開始されている CDS のバリエーションは全 ORF の 19%であった。

これまで見過ごされてきたアノテーションされていないタンパク質

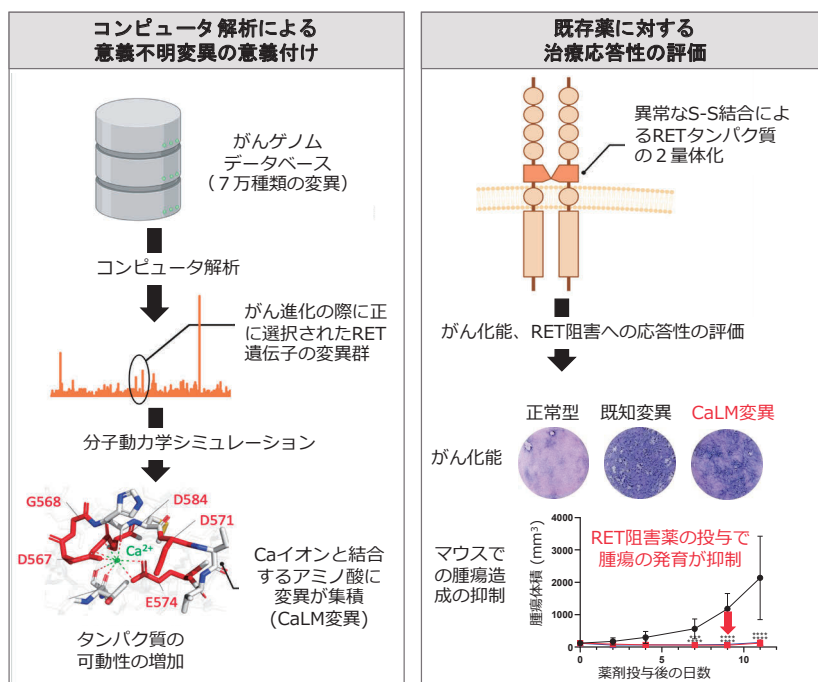


【目的】 本研究では、がん患者の大規模ゲノム情報を用いて情報統計学的アプローチにより遺伝子変異を機能構造単位に集積する変異集積として捉え、分子シミュレーションによる表現型理解を実験データと融合させることで、体系的な遺伝子変異の機能アノテーション法を構築することを目的とする。

【方法】 本研究では、がん変異データベース GENIE (<https://www.aacr.org/professionals/research/aacr-project-genie/>) に登録される7万個以上の遺伝子変異に対して、コンピュータを用いるインシリコ技術によりがんの進化の過程での正の選択やタンパク質の可動性への影響を評価した。実験手法による変異機能アノテーションとして、変異クラスター構成遺伝子変異を発現する細胞モデルと精製タンパク質を作製し、形質転換能やタンパク質相互作用解析を行った。解析対象変異を導入し、タンパク質の安定性変化やエネルギー変化に着目した分子動力学シミュレーション計算より機能推定を行った。

【結果】 71,756個の変異体を対象とした計算機シミュレーションによる変異選択と、110個の代表的なRET変異体の網羅的機能解析により、複数のヒト癌が保有する発がんや治療における意義がわからない意義不明変異(VUS: variants of unknown significance)の3次元クラスターを明らかにした。これらの変異体はRearranged during transfection (RET) タンパク質のカルモジュリン様モチーフ (CaLM) におけるアミノ酸置換を引き起こす。分子動力学シミュレーションの結果、CaLM変異はCa²⁺イオン周辺の相互作用を減少させ、CaLMを含むRETシステインリッチドメインの立体構造に歪みを引き起こすことが示された。RETのCaLM変異は、異常なジスルフィド結合形成を介したRETタンパク質のホモ二量化により、リガンド非依存的にRETキナーゼを構成的に活性化させることがわかった。RET CaLM変異体のがん原性/腫瘍形成活性は、RETを標的とする既存のチロシンキナーゼ阻害剤によって抑制された。本研究は、カルシウム結合低下変異を従来のRETがん遺伝子における新しいタイプのがん原性変異群として同定するとともに、治療標的であるがん遺伝子のVUSをインシリコ手法によりアノテーションすることが今後の有望な治療戦略となることを示すものである。

分子シミュレーション駆動による変異アノテーション

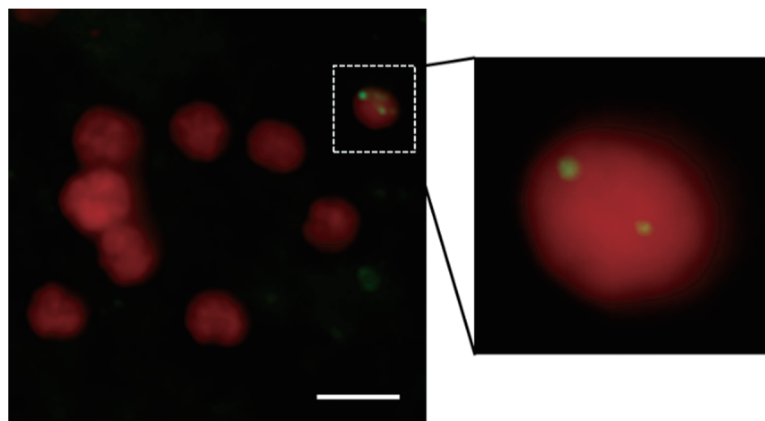


【目的】 現代社会において、ストレスをマネジメントし、ストレス緩和策を確立することは我が国の喫緊の課題である。その一方で、「ストレス」と表現される負荷の定義は非常に不明瞭であることに加え、近年ではストレスには、人々にネガティブな影響を与えるストレス（ディストレス：Distress）とポジティブな影響を与えるストレス（ユーストレス：Eustress）が存在することが明らかになってきている。これまで漠然とストレス（負荷）と捉えられていた身体的刺激および社会的刺激が、その程度や、時期、外部環境などによってユーストレスにもディストレスにもなり得ることを示す研究報告が数多くなされるなど、バイオマーカーなどに基づいたストレスの切り分けによる効果的なストレスマネジメントの確立が求められている。そこで本研究では、現代社会におけるヒューマンレジリエンスの確立に貢献することを最終目的として、ストレスの定量的かつ統合的バイオマーカーとしての生体内 DNA 損傷に着目し、DNA 損傷レベルを軸とした良いストレスと悪いストレスを切り分けるためのストレスバイオマーカーパネルを確立することを目指した。

【方法】 本研究では、ディストレスとユーストレスの切り分けを可能とする新規ストレスバイオマーカーパネルを確立し、ポジティブ・ネガティブな影響の両面から心身のストレス状態を DNA 損傷モニタリング等により定量的に計測できる手段の確立を目指した。作製したディストレスおよびユーストレスマウスモデルに対して不安様行動解析を含む様々な行動試験を行うとともに、各マウスから血液、肺、肝臓、胸腺、腎臓などの生体サンプルを採取し、DNA 損傷モニタリングを行った。物理的ストレスに対するストレスバイオマーカー探索においては、力学的ストレスと DNA 損傷応答の相関性についてリアルタイムイメージングによって解析した。さらに、皮膚などに対する機械的圧縮や、皮下腫瘍形成に伴う腫瘍周辺細胞の局所的な圧縮などを想定した *in vitro* での圧縮実験モデルを検討した。

【結果】 慢性的社会的敗北ストレスを暴露したマウスは、うつ様行動等を示すことがすでに報告されているが、DNA 損傷評価を行った結果、一部のリンパ球で明確な DNA 二本鎖切断損傷が検出された。ユーストレスマウスにおける行動試験では、ユーストレスマウス群は標準飼育群と比べて不安様行動の減少が観察された。また、リアルタイムイメージングを用いて細胞の核内空間変化と DNA 損傷修復タンパク質の密度および局在変化を解析した結果、細胞同士の運動による圧縮効果によって核内空間が大きく変化し、それに伴い DNA 損傷修復タンパク質の密度・局在も変化することが示された。ガラスビーズによる細胞への人工的な圧縮実験では、興味深いことに直接圧縮を受けている細胞だけではなく、その周辺の非圧縮細胞においても DNA 損傷修復タンパク質の局在変化が認められた。これらの結果は、細胞への力学的ストレスによって DNA 損傷応答が活性化されることに加え、DNA 損傷活性化に対する力学的刺激のバイスタンダー効果の存在が示唆された。

慢性社会的敗北マウス由来リンパ球における DNA 損傷の検出

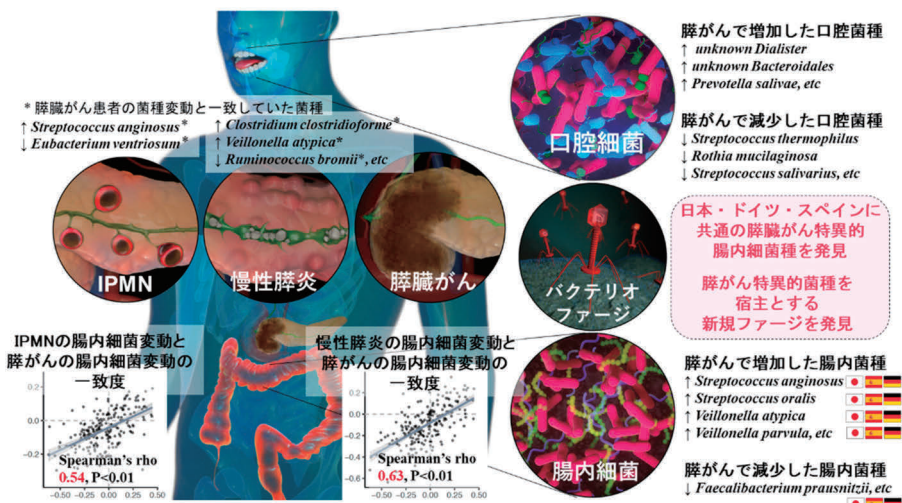


【目的】 マイクロバイオームが膵がんの新たな診断のバイオマーカーとして利用できる可能性を検証する。また、世界で利用できるバイオマーカー同定のために、ヨーロッパ（ドイツ人とスペイン人）の口腔・腸内マイクロバイオームも調べ、日本人の結果と比較する。また、近年、動物実験から特定の腸内細菌種の存在が抗がん剤の効果を決定することが分かっているが、ヒトでは十分な研究が行われていない。そこで、膵がん患者において、マイクロバイオームが抗がん剤効果の予測のバイオマーカーになり得るかも検証する。

【方法】 日本、スペイン、ドイツの多国間研究を実施した。糞便と唾液のマイクロバイオームと詳細なメタデータを前向き登録・統合し Japanese 4D (Disease Drug Diet Daily life) マイクロバイオームプロジェクトに参加した被験者のうち、未治療の膵がんを有する日本人患者 47 人と日本人の非膵がんコントロール 235 人を選出した。被験者のほとんどが高齢者であったため、絶食後、午前中に唾液サンプルを採取した。以前の研究において、大腸内視鏡検査のための腸管洗浄剤は腸内細菌叢に多大な影響を及ぼすことが示されていたため、糞便サンプルの採取は腸管洗浄後 1 ヶ月以内のサンプル採取は避けるようにした。唾液と糞便サンプルは、ショットガンメタゲノムシーケンシングを行った。日本人コホートの腸および口腔メタゲノムデータからバクテリオファージゲノムを同定した。

【結果】 日本人の膵がん患者に特徴的な口腔内・腸内細菌種を同定し、がん予測に有用であることを示した。さらに、日本人から同定した膵がんの特徴的であった腸内細菌種が、ドイツ人やスペイン人の膵がんの腸内細菌と一致することを見出した。次に、膵がんの特徴的な細菌叢が「がんの早期発見」のためのバイオマーカーとして利用できるかを検証した。口腔と腸内細菌叢の膨大な情報から機械学習法を用いて膵がんの予測能を調べたところ、特定の口腔や腸内細菌を数菌種用いると高い確率で膵がんを予測できることが判明した。さらに、従来の血液マーカー（例、CA19-9、CEA など）と口腔や腸内細菌種を併用すると、血液マーカー単独よりも膵がんの予測精度が高まることを発見した。腸内細菌叢を「膵がん発見のマーカー」としてだけでなく、「膵がん診断後の治療効果予測」にも利用できるのではないかと考え、治療前に採取した糞便の腸内細菌と抗がん剤治療後の死亡率との関連を前向きコホート研究で調べた。死亡リスクが低いグループ A に豊富に見られる菌種の多くは酪酸や酢酸など短鎖脂肪酸を産生する菌と判明した。実際、グループ A の菌種を有する患者は、グループ B を有する患者と比較し有意に抗がん剤治療後の生存率が長いことを見出した。短鎖脂肪酸には免疫の恒常性を保つ働きがあることが分かっており、グループ A の菌種の存在が宿主の免疫応答を調整することで予後良好な結果になっている可能性が示唆された。最後に、膵がん患者で 3 カ国に共通して増加していた 4 種を宿主とする新規バクテリオファージ 58 種を発見した。

日本とヨーロッパで膵がんの特徴的な共通の腸内細菌種を発見



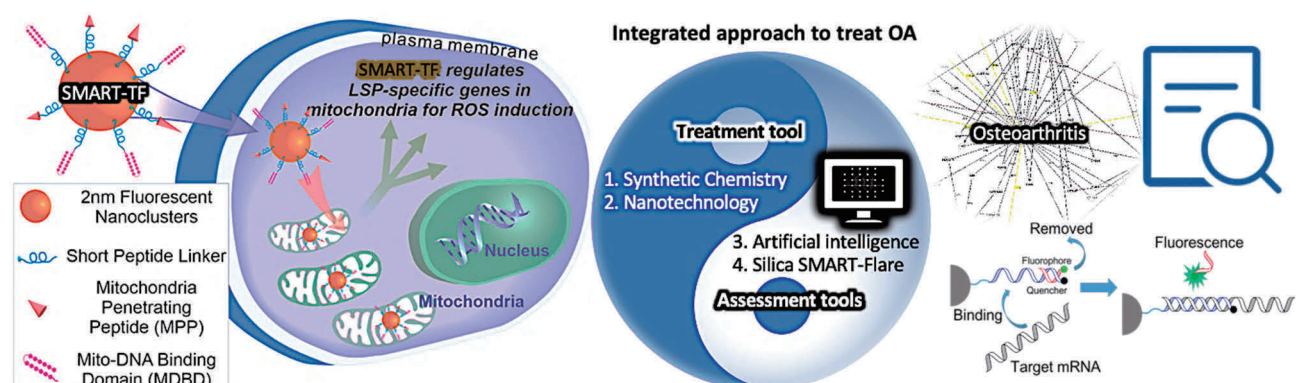
Nagata N, et al. Gastroenterology. 2022;163:222-238. より一部改変

【目的】変形性関節症 (OA) は、世界中で非常に多く見られる退行性関節疾患である。最近の OA 膝関節の軟骨細胞を用いた研究では、ミトコンドリアの機能障害やミトコンドリア DNA (mtDNA) の変異が炎症や OA の進行を促進していることが示唆されている。ミトコンドリアの生合成・炎症・変異した mtDNA の発現を人工的に制御することで、軟骨細胞の機能回復につながる事が明らかになりつつある。しかし、ミトコンドリア活性に関連する複数の因子を生細胞内の分子レベルで制御するプログラム可能なツールは存在しない。小分子は外来の遺伝子を含まないため、薬剤として投与するのが簡単であり、イデベノンや CoQ10 のような抗酸化剤が効果的であることが示されている。ただし、mtDNA 変異の定常的な機能回復は行えないため、継続的に投与する必要がある。一方 DNA ベースの治療法は、変異型 mtDNA を直接標的にして排除することにより、問題となる部分を逆転させ、治療が可能であると考えられる。

【方法】学際的な手法により、3つの異なるワークパッケージ (WP) の下で OA 治療用回復ツールを開発した。WP1: 初めに、DNA 結合ドメインとして選択的 DNA 結合ピロールイミダゾールポリアミドを、局在化ドメインとしてミトコンドリア透過性ペプチドを、機能ドメインとして生理活性小分子を用いた。これらを順次組み立てることにより、ミトコンドリアを標的とするナノ粒子ベースの SMART (=プログラム可能な分子認識) 転写因子 (TF) を開発した。また、機能化されたナノ粒子と、OA で高発現している免疫グロブリン G (IgG) との相互作用についても調査した。WP2: 人工知能 (AI) を利用して、ゲノム全体の関連研究とメタ分析を実行し、新しい創薬標的を特定していった。また、ケミカルバイオロジーとインフォマティクスの手法を統合して、RNA エピジェネティクスを解読した。WP3: OA 患者で高度に発現することが知られている IL-6 の mRNA を検出するシリカナノ粒子ベースの SMART フレアを合成した。

【結果】WP1: ナノ粒子ベースの SMART-TF の設計に成功し、OA を引き起こすことが知られている活性酸素種に関連するミトコンドリア遺伝子 *ND6* の制御を達成した。さらに、*in vitro* 細胞株モデルおよび *in vivo* 動物モデルでのナノバイオ相互作用研究により、IgG のコンフォメーションを変化させない最適な処理条件を特定した。WP2: 化学プローブや AI プログラムによって、イノシンとプソイドウリジンによる RNA 修飾部を解読できることが実証された。3,757 人それぞれの免疫プロファイルの AI ベースのメタ分析により、変形性関節症の発症に関連する標的として CD33 および CCR2 が特定され、検証研究を実施するために OA および正常なドナーから軟骨細胞を分取した。この細胞を用いた実験を続けている。WP3: 本研究室に所属している安倍克彦は、JSPS 交換留学プログラムにて ARI (スイスの AO 研究所) を訪問し、IL-6 や TGF β R1/2 の mRNA を標的とする、シリカ SMART フレアプローブの開発に成功し、線維芽細胞や間葉系幹細胞を用いた最適化研究を続けている。まとめると、4つの異なる研究分野 (合成化学・ナノテクノロジー・機械学習・再生医療) を融合した研究において、OA のより良い治療につながる可能性のあるデータの取得に成功した。

変形性関節症におけるミトコンドリア機能障害の回復ツールの概略図

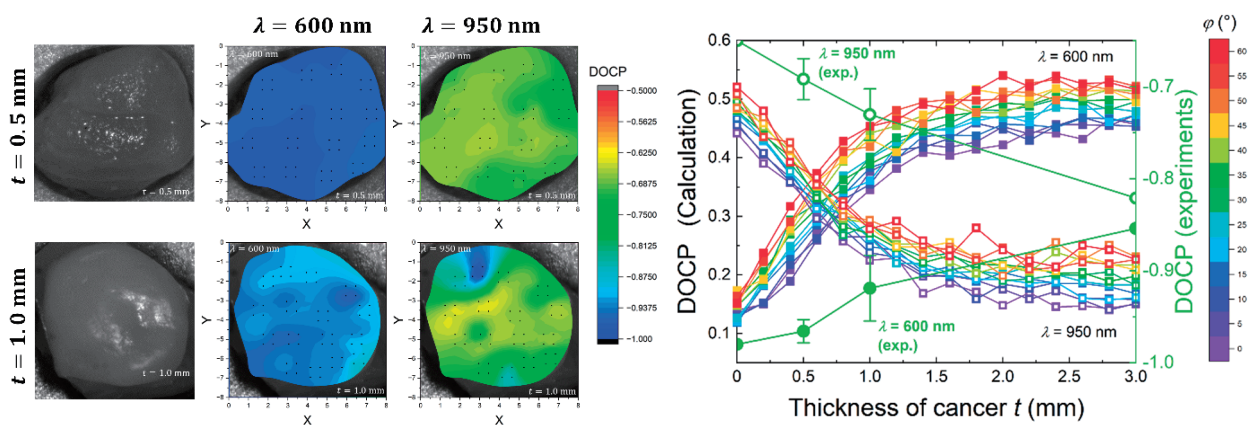


【目的】円偏光を生体組織に照射すると内部で主に細胞核によって散乱され、徐々に偏光が減衰（偏光解消）する。この偏光解消の度合いを計測することで組織内の細胞核の大きさや密度などの差異を検出することができる。これを円偏光散乱法と呼ぶ。本研究では、円偏光散乱法による生体組織中のがん評価技術を確立することである。特に既存のイメージング技術では検出や同定が困難である①初期の消化器系がんの深達度（がん進行度）の非侵襲な定量的計測、および②瀰漫性の胃がん（スキルス胃がん）の定量的かつ客観的な診断を内視鏡観察によって実現することをターゲットとする。

【方法】両ターゲットに対してシミュレーションと実験の両面から研究を遂行した。シミュレーションでは単純化した生体組織モデルに対して偏光散乱を計算し検出の可否を検討した。また実験では、それぞれ以下の通り生体組織を準備し計測、検出の可否を検証した。①初期胃がんの深達度計測に関しては、マウスから正常組織と腫瘍組織を重ねて人工的に2層構造としたがん/正常組織に対して円偏光照射、検出実験を実施した。②スキルス胃がん検出に関しては、スキルス胃がんのモデルマウスの胃に対してがんが発生していると思われる患部を含む広い領域に対して同様に円偏光照射と検出実験を行った。

【結果】①シミュレーションでは波長 600 nm および 950 nm 円偏光を照射した際にかん層の厚さに対して増減が逆になるふるまいが得られ、1.5 mm 程度までの厚さのがんを定量的に計測できることが示唆された。この計算結果を実証すべく表層からのがん層厚 0.5 mm および 1.0 mm の検体に対して円偏光散乱を測定した。結果、がん層厚に応じた散乱光偏光度の変化が観測され、変化の傾向はシミュレーションの結果とよく一致した。②シミュレーションでは組織内のがん細胞の割合に応じた偏光度の変化が示され、がん細胞の割合 20%以上であれば検出が可能であることが示唆された。スキルス胃がん検体を用いた実験的実証を現在進めており、がん細胞比の高いと考えられる点を特定できるに至った。現在、さらなる詳細な計測と断面組織観察との対比を進めている段階である。

円偏光散乱を用いた初期がんの深達度計測結果

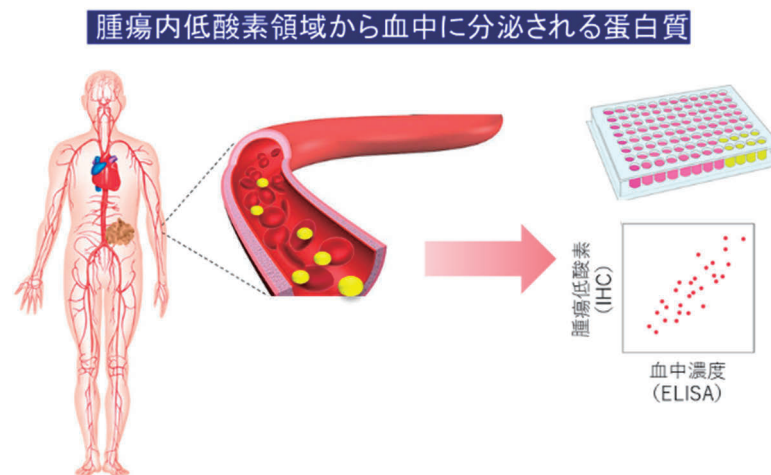


【目的】悪性固形腫瘍（がん）内の酸素環境は不均一で、血管から離れた領域に低酸素領域が存在する。低酸素刺激にさらされたがん細胞は悪性形質と治療抵抗性を獲得し、がんの再発と患者の予後不良の原因となる。この問題を克服するために、低酸素がん細胞を標的とする治療法の開発が進められているが、これを治療成績の向上に繋げるためには、患者ごとに異なる「腫瘍内低酸素領域の量」をモニターし、腫瘍内低酸素領域が多く、低酸素標的治療が有効な患者を選別する検査法を確立することが不可欠である。この様な背景の下、予備研究を通じて我々は、低酸素刺激を受けたがん細胞が血中に分泌するタンパク質として SPINK1 を発見し、血中の SPINK1 濃度を指標に腫瘍内低酸素をモニターする手法（下図）を着想した。この手法の Proof-of-Concept を取得すること、および本手法を実現する上で必要となる、力価と特異性の高い独自の抗 SPINK1 抗体を作製するために重要な情報の取得を目的として本研究を実施した。

【方法】*in vitro* と *in vivo* の実験を実施して、これまでの研究で独自に見出していた低酸素誘導性分泌タンパク質 SPINK1 に着目し、その血中濃度を指標に腫瘍低酸素をモニターする手法の proof-of-concept を取得した。また、特異性と力価の高い抗 SPINK1 抗体を作製するために、抗原として最適な領域を計算科学的に同定した。

【結果】各種のヒト由来がん細胞株を様々な酸素分圧下（20～0.1%未満）で培養することにより、酸素濃度 0.1% 未満という極めて重度の条件下でのみ、SPINK1 の発現が転写開始段階で誘導されることを見出した。低酸素刺激依存的に新規産生された SPINK1 タンパク質は細胞外に分泌された。培地に蓄積した SPINK1 タンパク質の濃度は、細胞内 SPINK1 mRNA 量と正に相関した。ヒト由来がん細胞株を下肢大腿部皮下に移植した実験腫瘍モデルにおいて、SPINK1 タンパク質は血管遠位の低酸素領域で強く発現していた。SPINK1 蛋白質は低酸素領域近傍においても僅かに検出され、低酸素領域から拡散していることが伺えた。移植腫瘍において SPINK1 タンパク質と内在性低酸素マーカー CA9 タンパク質の発現量は強い相関を示した。移植腫瘍に供給される酸素量を薬理的に低下させた場合に、その程度に相関して腫瘍内 SPINK1 発現量と血漿中 SPINK1 濃度がともに増加した。これらのデータから、低酸素領域から血中に分泌された SPINK1 を指標に腫瘍内の低酸素分画を予測できる可能性が示された。血中タンパク質を検出・定量する手法として ELISA 法が一般的であるが、良好な抗 SPINK1 抗体がないことが問題であった。そこで本研究では、力価と特異性の高い抗 SPINK1 モノクローナル抗体を作製するために必要な、最適な抗原となり得るペプチド配列を計算科学的に同定した。

低酸素誘導性分泌タンパク質の血中濃度を指標に腫瘍低酸素をモニターする手法の概略図



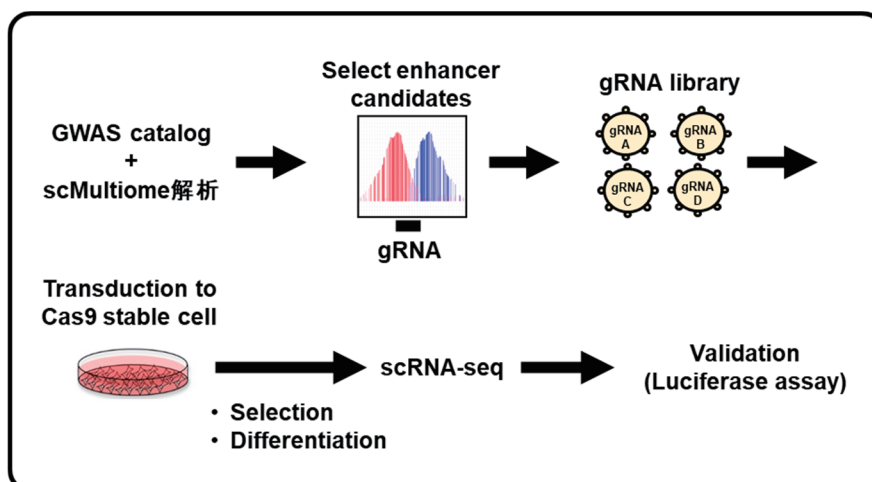
80	一細胞CRISPR解析を用いた疾患関連SNP探索法の開発	北條 宏徳
----	------------------------------	-------

【目的】近年、人の遺伝病や生活習慣病を対象としたゲノムワイド関連解析 (Genome Wide Association Study: GWAS) が活発に行われ、疾患との関連が示唆される一塩基多型 (SNP) のビックデータが蓄積している。最近の研究で、これら疾患と関連する SNP (GWAS-SNP) の多くが遺伝子制御領域であるエンハンサー領域に集積していることから、SNP によるエンハンサー活性の変化が疾患と深く関連することが明らかになってきた。そこで本研究では、研究代表者がこれまで取り組んできた、ゲノム編集と一細胞 RNA-seq を統合したエンハンサースクリーニング法を用いて、GWAS-SNP データから表現型に寄与する SNP を効率的に選別する手法の開発を行った。さらにその proof of concept を示すため、骨格系疾患に関する GWAS-SNP データベースから疾患の病因となる SNP の同定を目指した。

【方法】1. ヒト SNP 関連骨発生エンハンサー候補選定：ヒト GWAS-SNP データとヒト骨芽細胞エンハンサーデータセットの統合解析により、骨関連疾患への関与が疑われる SNP の中で、エンハンサー領域に位置する候補を選定した。2. ガイド RNA (gRNA) レンチウイルスライブラリーと CRISPR レポーター細胞の作製：各エンハンサー候補領域を標的とするガイド RNA ウイルスライブラリーの作製のため、CROPseq ベクターを用いた。Cas9 を恒常的に発現する骨芽細胞株を用いた。3. エンハンサースクリーニングおよび機能検証：樹立した CRISPR 細胞に gRNA ウイルスライブラリーを感染させた後、骨芽細胞への分化誘導を行い、細胞を単離した。10x Genomics 社の Chromium システムによる一細胞 RNA-seq 解析を行った。有望エンハンサーの機能検証としてルシフェラーゼアッセイを行った。

【結果】1. ヒト SNP 関連骨発生エンハンサー候補選定：ヒト GWAS-SNP データとして、GWAS catalog データベースから骨関連疾患との関与が疑われる SNP プロファイルを取得した。また、ヒト骨芽細胞エンハンサープロファイルとして、研究代表者らが開発したヒト骨発生モデルを用いたシングルセル多層解析 (scMultiome) を行った。以上の統合解析により候補エンハンサーを取得した。2. ガイド RNA (gRNA) レンチウイルスライブラリーと CRISPR レポーター細胞の作製：マウス MC3T3E1 細胞において Cas9 が恒常的に発現する細胞株 (Cas9-MC3T3E1) を用いて検討を行った。同定した骨格系疾患と関連する SNP を有する骨芽細胞エンハンサー候補領域の中で、マウスにおいても配列が保存された有望領域 50 領域選定し、50 領域に対するガイド RNA を設計した。各 gRNA 配列を CROPseq ベクターにクローニングし、gRNA レンチウイルスライブラリーとした。3. エンハンサースクリーニングおよび機能検証：gRNA レンチウイルスライブラリーを Cas9-MC3T3E1 細胞に感染させ、薬剤セクションおよび骨芽細胞分化誘導を行った後、10x Genomics 社の Chromium システムによる一細胞 RNA-seq 解析を行った。解析の結果、有望なエンハンサーとして Enh1 を同定した。Enh1 の機能検証を行うため、Enh1 配列を有するルシフェラーゼレポーター DNA を構築した。線維芽細胞と骨芽細胞を用いてレポーターアッセイを行ったところ、線維芽細胞および分化誘導前の骨芽細胞に比べて、分化誘導後の骨芽細胞ではレポーター活性が顕著に促進した。

本研究の概念図

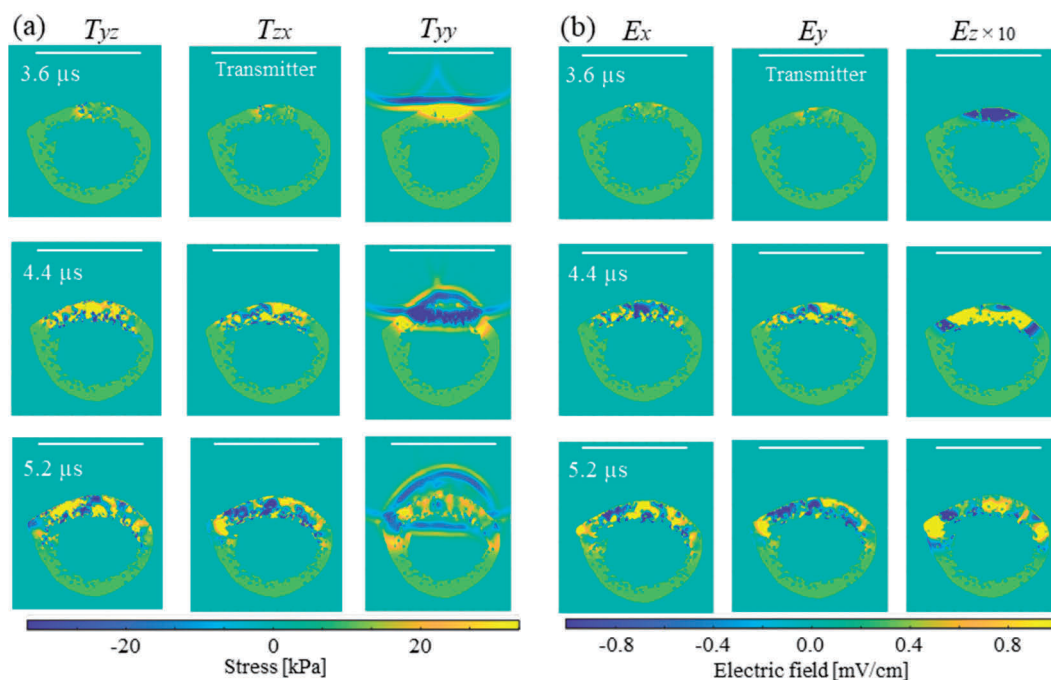


【目的】LIPUS (low-intensity pulsed ultrasound) は保険治療として整形外科領域で利用されるが、MHz 域の超音波による応力刺激が、細胞に検知されるメカニズムは不明である。一方で電磁気的手法による骨折治療も報告されていることから、超音波と電磁気的特性をつなぐ骨の圧電性に着目して、より効果的な超音波照射法を検討する。まずは有限差分時間領域 (FDTD) 法に媒質の圧電効果 (Piezoelectricity) を組込んだ PE-FDTD 法によるシミュレーション技術を確立し、ヒト橈骨モデルの解析から、特に圧電に寄与する超音波の伝搬モードを検討する。その結果をもとに、実際に超音波照射実験を行うための、プロトタイプ超音波照射システムの構築を行う。

【方法】弾性 FDTD に圧電効果と逆圧電効果を導入した PE-FDTD 法のシミュレーションプログラムを自作した。シミュレーションでは、骨を一軸異方性の弾性体とし、弾性定数は超音波計測の文献値、圧電定数は低周波域の文献値を用いた。音波が骨中を伝搬する際の音波減衰は、文献から骨軸 (体荷重) 方向の縦波減衰を 2.1 dB/cm/MHz、円周・半径方向の縦波減衰を 3.1 dB/cm/MHz とした。せん断波の減衰は縦波平均減衰の 2 倍と仮定して 5.2 dB/cm/MHz とした。まずプレート状骨に発生する超音波誘導電位のシミュレーションと実測を行い、シミュレーションの妥当性を確認した。その後、66 歳女性の橈骨の高分解能末梢骨用 CT (HR-pQCT、Scanco Medical、Xtreme CTII) データを用いて 3 次元橈骨デジタルモデルを作成した。シミュレーションでは、この橈骨に入射角を変えてパルス超音波を照射し、骨内部に発生する誘導電位を算出した。

【結果】図に超音波が橈骨側面に垂直に入射した場合の、直下の音波伝搬と電位発生を示す。音波が骨部分を回り込むように伝搬し、電位が発生した。せん断応力 T_{yz} や T_{zx} の影響が大きく、せん断波 (横波) 伝搬が誘導電位に大きく影響することを確認できた。つまり骨中に積極的に横波を伝搬させると、誘導電位も大きくなる。骨中の誘導電位の時間変化を検討したところ、超音波が縦波の臨界角より大きい入射角で入射した場合、横波が強く発生し、発生する電位も大きくなった。つまり、骨の圧電性を考慮して超音波照射の効果を検討する際には、超音波は現状の LIPUS のように骨折部に垂直に照射するのではなく、横波を効率的に励起する照射手法が有効であると考えられる。これらの結果をもとに、骨中に横波を励起しやすい小動物用超音波照射システムのプロトタイプを構築した。

超音波照射後の (a) 音波伝搬 (骨内の応力分布) と (b) 誘導電位

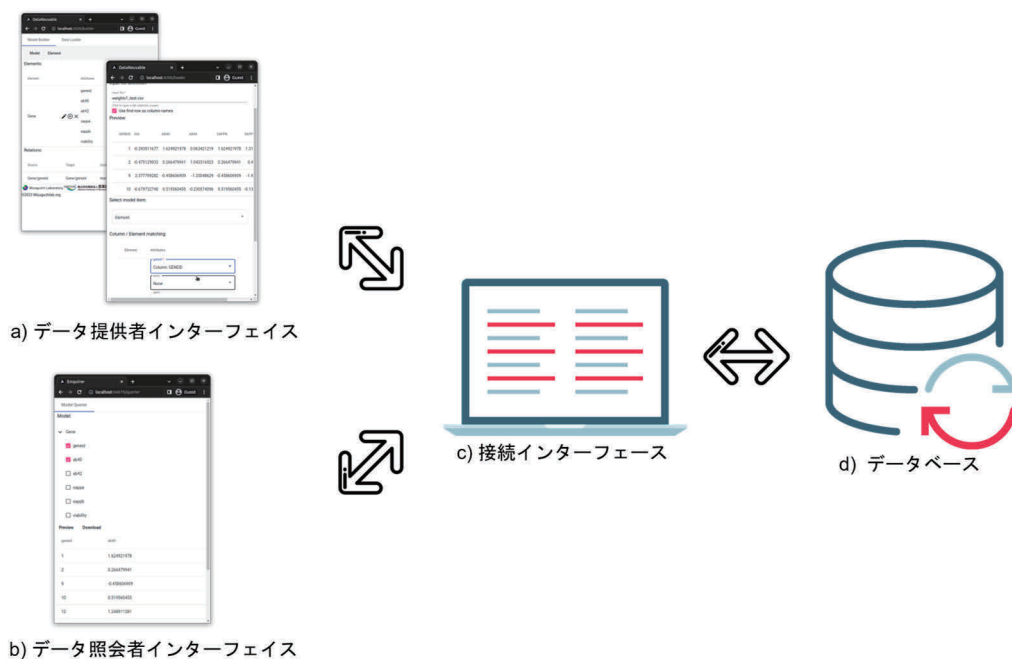


【目的】生命科学分野では、研究成果のデータを適切にオープンにすることが求められ、FAIR 原則が提唱されている。生物学データの再利用性を担保するために、異種のデータを統合して共有・活用できる形に整理する必要があるが、その作業には多大な労力が必要である。一方、整理されたデータから、新たな解析目的に応じて柔軟に部分データを再構築できれば、研究データの再利用性を超えた利活用が期待できる。本研究では、TargetMine データウェアハウスの開発経験を生かして、生命科学分野の研究データ再利用性担保及び学習データ自動生成プラットフォームを構築することを目的とした。

【方法】データ（ファイル）とデータを照会するために使用するツール（ソフトウェア）の両方を共有できるプラットフォームを設計した。データベースを使用して共有するすべてのデータを格納し、データ提供者と照会者両方の要求に対して柔軟に対応可能なユーザーインターフェースを持つシステムを開発した。プラットフォーム内の各要素をモジュールとして構成し、それぞれの機能を実装した。

【結果】実装したプラットフォームは、1) 提供者用アプリケーション、2) 照会者用アプリケーション、3) 共有データベース、4) これらを接続するインターフェース、の4つの独立したモジュールから成る。提供者用アプリケーションにより、どのような種類の生物学データを共有するかをユーザーが自由に規定し、データをアップロードできる機能を実装した。照会者用アプリケーションにより、必要な部分データを柔軟に取得することを可能にした。アミロイド前駆体タンパク質の産生メカニズム解明を目的とした網羅的遺伝子ノックダウンとタンパク質間相互作用データとを組み合わせたデータセットデータの共有を例として、これらの機能を実証した。将来的には、本プラットフォームを通して、データ提供者が Docker イメージ作成などの汎用的な方法でデータを公開できる機能の付加を予定している。

実装したプラットフォームのコンセプトとスクリーンショット



83 光合成細菌を活用する癌光療法の開発

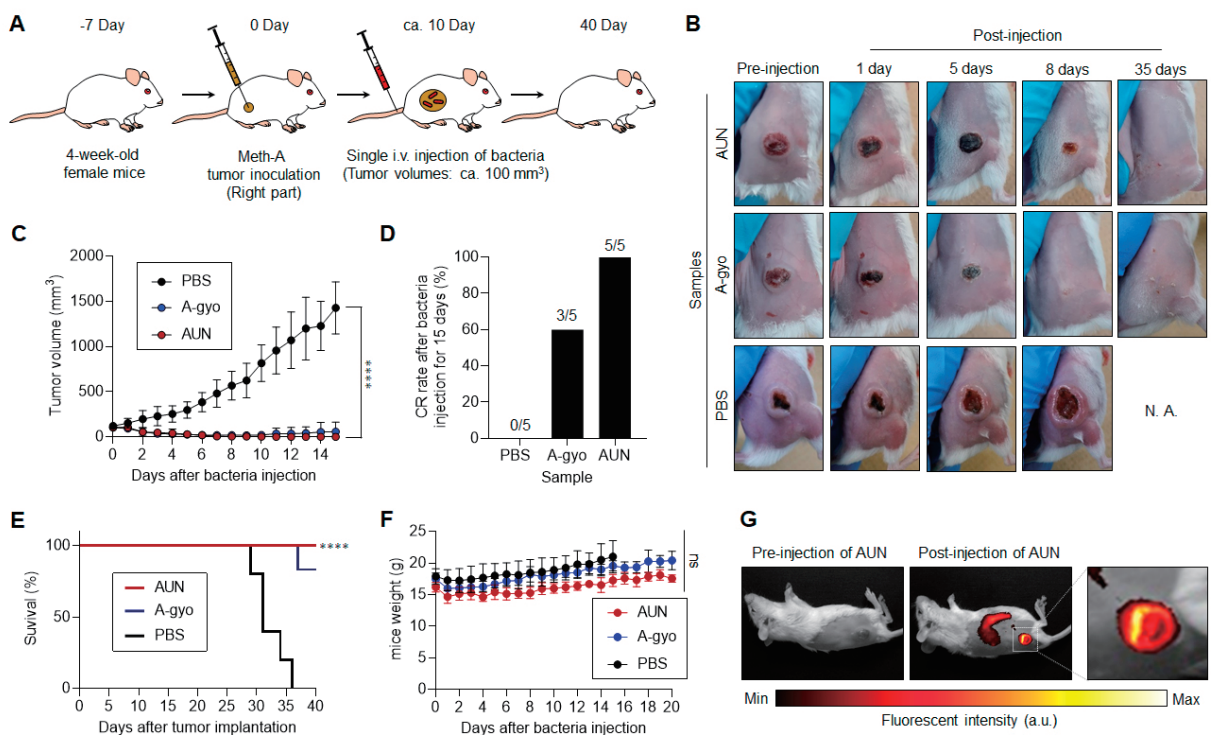
都 英次郎

【目的】 近年、低酸素状態の腫瘍内部で選択的に集積・生育・増殖が可能な嫌気性微生物（細菌）を利用した癌標的治療に注目が集まっている。従来の癌細菌療法は、既に米国や欧州ではヒトへの臨床試験が行われ、第3相試験に進んでいる例もある。本研究では、天然の光合成細菌が有する特異な抗癌活性・蛍光放射性と集積・増殖性を利用したマウス体内における癌光療法の有効性を検討することを目的としている。

【方法】 サルコーマ (Meth-A)、大腸癌 (colon-26)、薬物耐性乳癌細胞 (EMT6/AR1) を背面移植した担癌モデルマウスならびにメラノーマ細胞 (B16F10) をマウスの尾静脈に投与することで作製した転移性肺癌モデルマウス体内における光合成細菌（研究代表者が発見した細菌：A-gyo、AUN と命名）の性能評価・機能制御を検証した。

【結果】 マウス尾静脈に細菌投与後（単回、ボーラス）、特に AUN を用いた場合、再現性良く腫瘍が完治することが判明した（下図A～F：代表例としてサルコーマモデルマウスの薬効試験を示す）。また、当該 AUN は火傷を伴わない温和な強度の近赤外光照射により、薬物耐性乳癌モデルマウス体内で腫瘍特異的に発光することが分かった（下図 G）。

サルコーマモデルマウスに対する薬効試験と薬物耐性乳癌モデルマウス体内で発光する光合成細菌

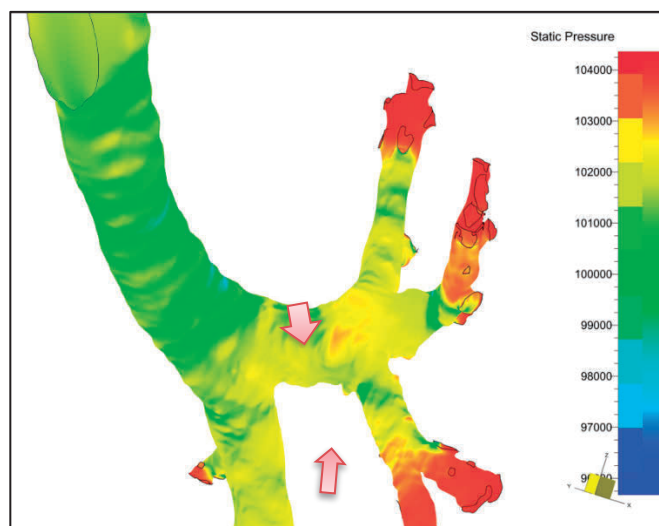


【目的】 我々の研究グループでは呼吸時の鼻腔・口腔・咽頭気流の渦、摩擦、流れの剥離の発生等による吸気流れの抵抗についてヒトデータからシミュレーション力学モデルを作製してきた。こうした研究結果を発展させる形で、バイオメカニクス的手法を利用して鼻腔から肺胞までの気道全長に渡ってシミュレーション力学モデルを作製し、作製した力学モデルを利用して種々の呼吸器領域の各種課題に応用していくことを最終目標としたいと考えている。今回は、ヒトのデータを利用してバイオメカニクスの技術を利用して気道シミュレーションモデルを構築し、その力学シミュレーションから速やかな肺虚脱を得られる胸腔内陽圧の条件を検討することでそのモデルの妥当性を検証するとともに、妥当性を向上するための適切なパラメータの設定を試みた。

【方法】 ブタ肺でのモデル化と同様なプロセスでヒト肺データを用いた気管支肺モデル化を進めた。まず 1D+3D modeling の解析領域と形状モデルを検討した。すなわち、全体を 1 次元気管支気道モデルとし、中枢部分のみ 3D モデルを作製する方針とした。3D 構造解析では、気管支壁は軟骨と平滑筋の 2 部材でモデル化を実施して適切な条件を検索した。また、1D モデルでは気管支気道内面を円筒に近似した。3 次元 CFD モデルでは実形状を使用した。抽出した気管支の STL データを作成し、格子生成プログラムで読み取れることを確認した。格子生成プログラムで解析範囲の内部気道に格子を生成した。解析範囲外の気管支流れの 1 次元計算と CFD の境界条件の設定を行った。妥当性のある条件設定が整ったところで、胸腔陽圧を実施した 2 症例の術前 CT 画像データからモデルを作製し、CFD 解析結果を比較した。気管支閉塞が認識できた部位を中心にその特徴を解析し、一般化を図った。

【結果】 気管支閉塞の原因検索において、先行研究結果を参考に、主気管支から 2 分岐までの領域を描出するようにして、細かい分枝に注目した。さらに、気管支壁の内側がより正確に描出される条件を設定した。加えて、画像の粗さのために壁が抜けてしまう部分を補充するため、データの平滑化により可能な限り細かい分枝を再現するボリュームレンダリング手法を導入した。胸腔陽圧を用いた際に気道閉塞を確認できた 2 症例について、CFD 解析を実施しいずれの症例においても閉塞が確認された部位に相当する領域において、周囲と比較して突出して静的圧力の低下を認めていた。この結果から、臨床で経験した気道閉塞を確認でき、本法で作製したモデルでの CFD 解析には妥当性があるものと考えられた。当該分枝が比較的中枢に近いところに存在することで負圧効果が強くなりやすい可能性、更にリング状軟骨による気管支内部気道の凹凸によって流速が増減することで圧力低下部の負圧が増長される可能性等が示唆された。

胸腔陽圧時に気道閉塞をきたした症例での流体力学 3 次元解析結果

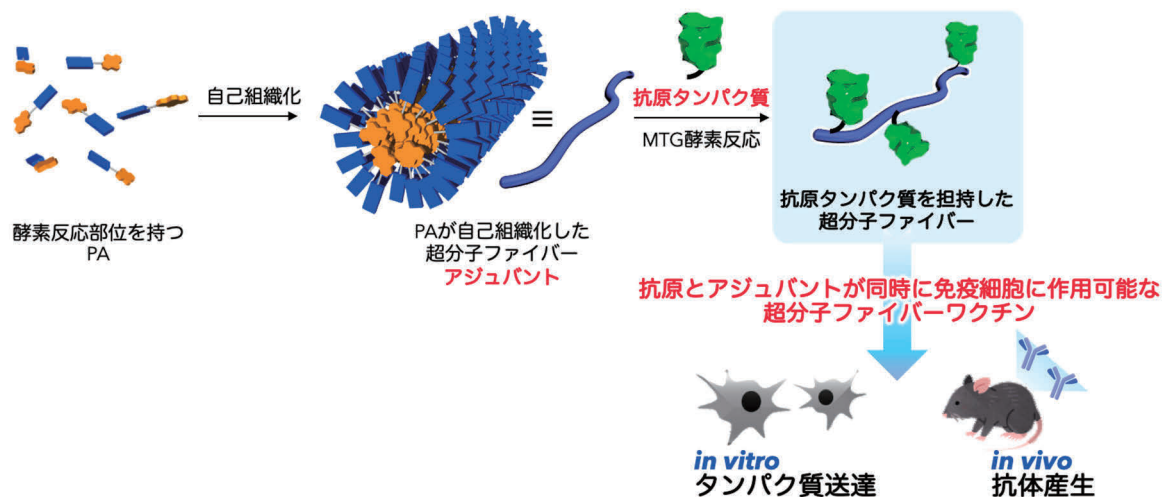


【目的】本研究の目的は、高いワクチン効果と誘導される免疫反応の制御が可能なワクチンの創製である。そのために、抗原タンパク質と免疫賦活剤（アジュバント）を同時に免疫細胞に作用できる材料が有効であると考えた。そこで本研究では、アジュバント能を示すことが報告されている、両親媒性ペプチド（PA）が自己組織化により形成する超分子ファイバーに対し酵素反応性を付与することで、酵素反応を用いて抗原タンパク質を直接結合可能な超分子ファイバーの創製とワクチン応用を目指した。

【方法】我々がこれまでに開発している微生物由来トランスグルタミナーゼ（MTG）反応性の PA の分子設計を基に、本研究では細胞への送達能を考慮し、新たに疎水部に Pyrenyl 基を持つ 2 種類の PA、Pyr-L2QG と Pyr-L3QG を設計・合成した。水溶液中での自己組織化、形成された超分子ファイバーへの MTG 反応によるモデル抗原タンパク質 Ktag-EGFP の担持と免疫細胞への送達能、およびマウスへの免疫化による抗体産生について評価を行った。

【結果】本研究で新たに設計・合成した 2 種類の PA は、いずれも Pyrenyl 基間の π - π 相互作用とペプチド間の水素結合形成により自己組織化し、一次元に成長した超分子ファイバーを形成した。これらの超分子ファイバーは高い MTG 反応性を持ち、モデル抗原タンパク質 Ktag-EGFP の反応率はいずれの PA 超分子ファイバーに対しても 80% 以上であった。また反応後のファイバー上に EGFP が担持されていることが蛍光顕微鏡観察により確認された。マウス由来樹状細胞 DC2.4 細胞を用いた細胞への送達性評価においては、Ktag-EGFP 単独、あるいは超分子ファイバーとの物理混合物と比較して、ファイバーへ直接担持したサンプルを用いた場合に、抗原タンパク質の送達性が有意に高くなることが確認された。これはマウスを用いた免疫化実験においても同様であり、抗原特異的な抗体産生が向上することが確認された。つまり、超分子ファイバーは抗原と同時に投与することでアジュバント能を示すものではなく、直接抗原を担持することで免疫細胞への高い送達能と抗体産生を可能にするものであることが示され、抗原タンパク質とアジュバントを直接結合するという本研究の戦略の有効性を示すことに成功した。

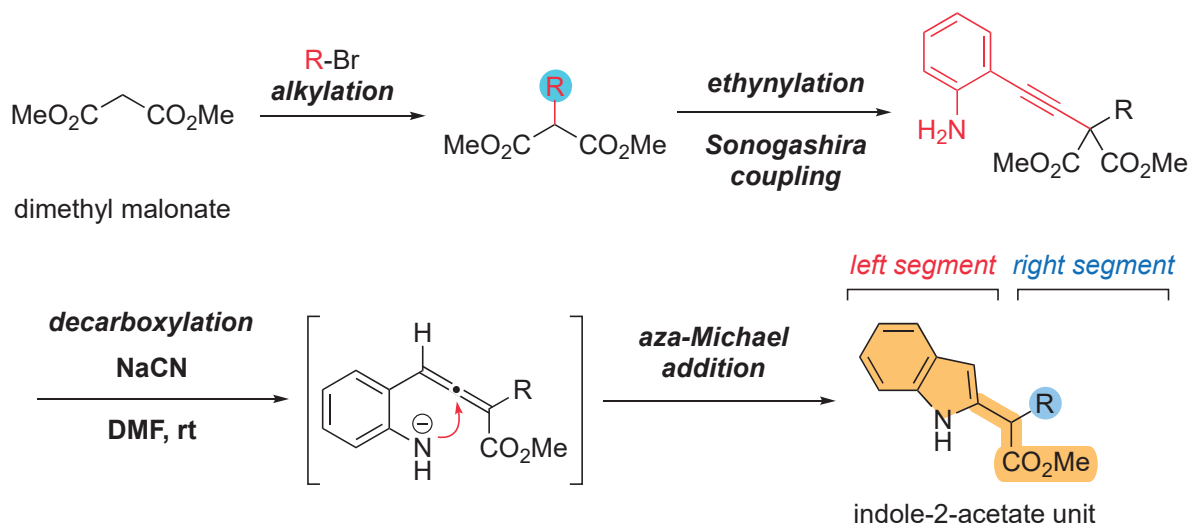
抗原タンパク質を直接担持した超分子ファイバーの創製とワクチン応用



【目的】ベンゼン環とピロール環が縮環した構造を有するインドールは、必須アミノ酸であるL-トリプトファンに含まれており、それに伴って植物、細菌、海洋生物の二次代謝産物（天然物）の構造中に散見される。また、人類が化学合成により生み出してきた重要な医薬品、染料、有機電子材料の構造中にも数多く見受けられる。多数の反応性官能基が存在する様な状況下で、温和な条件かつ高収率で進行するインドール合成法には大きな需要がある。これまでもその様な要望に応えるべく数多くのインドール合成法が開発されてきたが、複雑な天然物全合成に展開することを鑑みれば、まだまだ開発の余地が残されている。本研究では、効率的かつ温和な条件で進行する新しいインドール合成法を開発し、天然物全合成研究へ展開することを目的とする。

【方法および結果】今回、我々は、創薬シーズとして有望なモノテルペノイドインドールアルカロイドの集団的な全合成およびそれらの誘導体合成を見据えた、アレン中間体を經由する新規インドール合成法を開発した。基質には、 α -アルキニルマロン酸エステル構造を組み込み、右セグメントと左セグメントをアルキル化、菌頭カップリング反応により自在に官能基導入できる様に設計した。最適化した新規インドール合成法では、わずか2当量のシアン化ナトリウムを室温で作用させることで速やかに反応が進行し、脱炭酸に続く分子内 aza-Michael 反応により、インドール-2-酢酸誘導体が高収率で得られる。本反応の反応機構を実験的に精査した結果、本反応においては、通常 *Krapcho* 脱炭酸法の反応機構ではなく、反応系内で *Mander* 試薬が生成し、続いてカルバマート中間体を經由して反応が進行することが明らかとなった。さらに、本インドール合成が、幅広い基質一般性を有していること、加えて、アレン中間体に対する分子内求核付加反応を利用する本ヘテロ環構築反応が、インドールに限らず、ベンゾフランや、イソキノリン合成へも応用できることを明らかとした。この極めて温和な条件で進行するインドール合成法は、天然物全合成の終盤でも難なく進行することが強く期待される。

アレン中間体を經由する新規インドール合成法

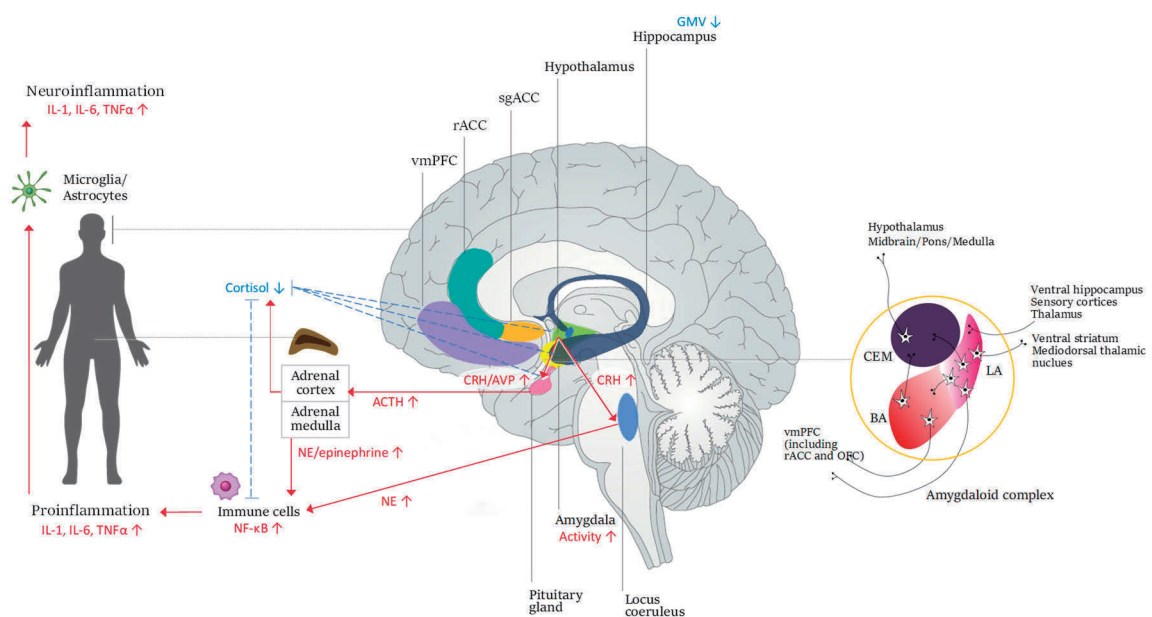


【目的】 記憶バイアス（多数の刺激のなかでもネガティブな刺激はよく記録・想起する一方、それ以外の時空間・感覚知覚詳細に関する文脈情報をよく思い出せない傾向）を持つ者は、不安障害やうつ病といったストレスに関連した精神障害を発症・増悪させやすいことが知られる。また幼少期に虐待など不適切な養育を受けた経験（ACEs）も同様に、不安障害やうつ病の発症リスクを高めることが知られる。本研究は、記憶バイアスや ACEs の神経生物学的機序、および不安や抑うつ症状に対する記憶バイアスを緩和する認知介入プログラムの有効性について検証することを目的とした。ここでは、研究期間中に公表された研究成果について、1. 記憶バイアスの神経生物学的機序、および 2. ACEs に関連する神経生物学的変異、の 2 つに分けて報告する。

【方法】 本研究はヘルシンキ宣言および厚生労働省・文部科学省・経済産業省「人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針」に基づき、北里大学および関連施設の倫理審査委員会の承認を得て実施した。対象者は、18～59 歳の主要な身体疾患および精神・神経疾患を持たない者であり、うち介入研究に参加した者はストレス関連精神障害に対する脆弱性の一つとして指摘される不安/抑うつになりやすい性格特性を平均より 1SD 以上高く有していた。参加者は、書面によるインフォームドコンセントを提供後、精神疾患診断構造化面接および認知機能検査、磁気共鳴画像（MRI：機能および構造画像）を受けた。また各種の心理質問票（ACEs の測定を含む）および行動課題を実施し、参加当日から 2 週間以内に自宅にて 1 日 5 時点連続 2 日間にわたり唾液採取を実施した。さらに介入プログラムに割り当てられた対象者は、所定のプログラムを 1 ヶ月間実施し、プログラム終了後から 2 週間以内に初回調査と同様の調査項目を受けた。

【結果】 1. 記憶バイアスの神経生物学的機序について、不安および抑うつになりやすい人ほど、ポジティブな刺激と比べてネガティブな刺激を符号化しやすく、またそれを明確な想起意識なしに想起しやすかった。このネガティブな刺激に対する潜在的想起の個人差は、扁桃体外側基底核（BLA）と前帯状皮質膝下部（sgACC）との機能結合、そしてストレスホルモン・コルチゾールおよびノルアドレナリンの主要代謝産物（MHPG）との相互作用によって予測されることをヒトにおいて初めて示した。また 2. ACEs に関連する神経生物学的影響について、システマティックレビューを通して同定するとともに（下図）、ACEs と免疫・炎症系との関連について検証し、幼少期被虐待経験を有する者では、対照群と比べて、インターロイキン-6 の日内変動が鈍化していることを世界で初めて見出した。

ACEs がもたらす神経生物学的影響（Hakamata et al. *Frontiers in Neuroendocrinology* 2022 より抜粋）

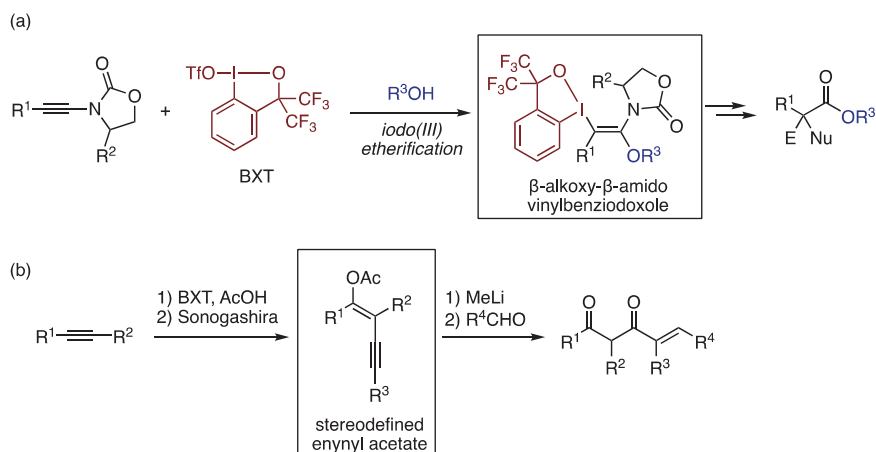


【目的】 エノラートは有機合成化学における最も有用な反応活性種のひとつであり、生物活性天然物や医薬品分子の合成に不可欠な炭素骨格形成反応において、基礎研究・応用研究を問わず数多く利用されている。エノラート類は、最も一般的には、カルボニル化合物の脱プロトンにより事前にあるいは反応系中で調製される。しかし、この方法は、例えば非対称カルボニル化合物の脱プロトンの位置の制御や、エノラート C=C 結合の幾何異性の制御は必ずしも容易ではない。本研究では、アルキンを出発物質とする新規エノラート等価体・前駆体の創出と、その反応制御による高難度のエノラート変換反応の開発を目的として検討を行った。

【方法】 筆者らのグループは以前、三価ヨウ素化合物ベンズヨードキソールトリフラート (BXT) を求電子剤として用いるアルキンの *trans*-二官能基化反応を開発した。例えば、アルキンに対して BXT とアルコールを作用させるとヨード (III) エーテル化反応が位置および立体選択的に進行し、既存の手法では得難い多置換ビニルエーテル化合物が得られた。この反応様式を、電子豊富なアルキンとして有用なイナミド類へと展開し、多置換エステル・アミド由来のエノラートの等価体合成とその合成的応用に取り組んだ。さらに、カルボン酸を求核剤とするアルキンの *trans*-ヨード (III) アシロキシ化と引き続くクロスカップリングによって得られる多置換ビニルエステルを、高度に立体の制御されたエノラートの前駆体として利用する試みも行った。

【結果】 オキサゾリジノンを窒素置換基としてもつイナミドに対して、BXT (1.2 当量) とアルコール (5 当量) を室温下、ヘキサフルオロイソプロピルアルコール (HFIP) またはジクロロメタン中で作用させることにより、*trans*-ヨード (III) エーテル化反応が円滑に進行し、対応する β -アルコキシ- β -アミドビニルベンズヨードキソール (VBX) が中程度から良好な収率で得られた。反応は完全な位置および立体選択性を伴って進行し、種々の第一級および第二級アルコールに加え、脂肪族および芳香族置換基をもつイナミドへと適用可能であった。本生成物は、ヨウ素 (III) 部位を利用したクロスカップリング反応と、それによって得られる α -アルコキシエナミドへの求電子的臭素化を施すことにより、高度に官能基化されたエステル類へと導くことができた。一方、BXT とカルボン酸を用いたアルキンの *trans*-ヨード (III) アシロキシ化反応と、引き続く菌頭カップリングによって、種々の多置換エニルアセテートを位置および立体選択的に得ることができた。これらのエニルアセテートのメチルリチウムによる脱アセチル化によって発生させた多置換 α -アルキニルエノラートが種々のアルデヒドと反応し、 γ, δ -不飽和- β -ジカルボニル化合物を高収率で与えることを見出した。DFT 計算の結果、本反応は、アルデヒドに対するエノラート γ 位での付加 (アルキニロガスアルドール反応) および分子内環化によるオキセタン中間体の生成と開裂を伴うカスケードプロセスを経て進行することが示唆された。

アルキンを起点とするエノラートの等価体および前駆体の合成と反応

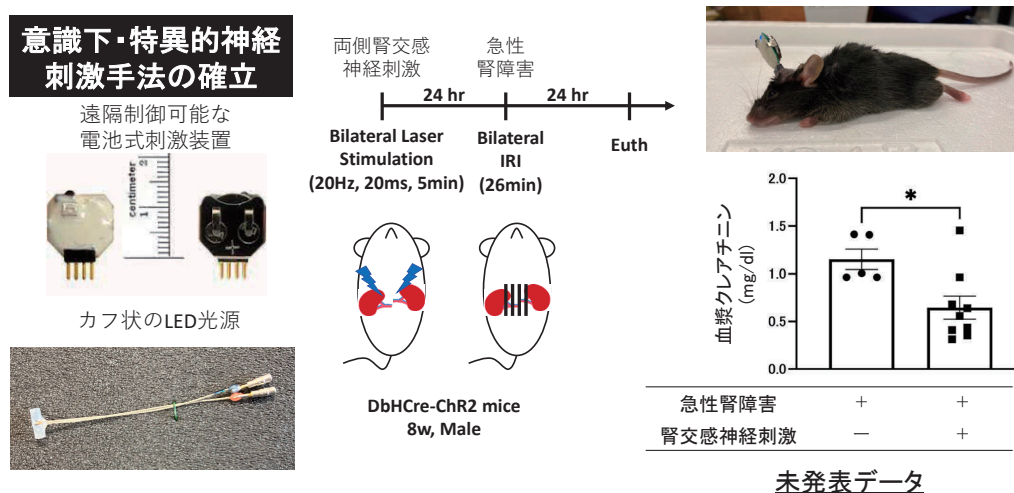


【目的】腎臓の線維化に特徴づけられる慢性腎臓病（CKD）は、昨今の高齢化社会や生活習慣の欧米化に伴って世界的に急増しており、本邦でも現在 1,330 万人（成人 8 人に 1 人）の慢性腎臓病患者が存在する（日本腎臓学会）。慢性腎臓病が進行し、末期腎不全となると血液透析などの腎代替療法が必要となるが、本邦での現在の透析医療費は年間 1 兆 6,000 億円に上ると推計されており（2019 年現在）、これは総医療費の 4% を占める。残念ながら腎臓病の根本的な治療法はいまだに存在せず、新たな治療法の開発は喫緊の課題であり、新たな視点からの治療法探索が非常に重要であると考えられる。我々はこれまでに、神経系（自律神経および神経細胞）-免疫系を介した腎臓保護作用メカニズムについて、数々見出してきており、本分野で世界をリードしてきた。本研究では、最新の論文報告に我々がこれまで得た知見および蓄積したデータ・確立した技術を踏まえ、腎交感神経による腎疾患制御機構に着目した。

【方法】オプトジェネティクス的手法を活用した腎交感神経の特異的的刺激については、作製した遺伝子改変動物（交感神経特異的にチャネルロドプシン 2（ChR2）蛋白を発現させたマウス：DbHCre-ChR2 マウス）の雄マウスを使用した。急性腎障害モデルとして、両側腎虚血再灌流障害（ischemia-reperfusion injury：IRI）を使用した。光による腎交感神経刺激は、青色 LED 光源を腎門部に配置し、両側腎交感神経に照射（5 Hz、20 ms、片側 5 分間ずつ）を行った。マウス腎臓における組織ノルアドレナリン濃度の測定には Mouse Noradrenaline（NA）ELISA Kit を使用した。細胞実験として HK2 細胞（ヒト近位尿細管細胞株）を使用し、細胞傷害を lipopolysaccharide（LPS）10 μg/ml を用いて誘導した。β2 アドレナリン受容体（β2AR）作動薬としてサルブタモールを使用した。データの解析に関しては、多重比較には一元配置分散分析を適用し、post-hoc 多重比較検定（Tukey's test）を行った。2 群間の比較には Student's t-test を使用した。

【結果】HK2 細胞に LPS とサルブタモールを同時に投与し、24 時間後に尿細管障害マーカーである Ngal の発現レベルを RT-qPCR で評価したところ、サルブタモールの濃度依存的に Ngal の発現が低下した。このことから、交感神経刺激による尿細管に対する直接的な保護作用が存在することが示唆された。そこで、オプトジェネティクス的手法を活用し、光による腎交感神経の特異的制御法を確立した。本手法を用いて、腎交感神経刺激による腎臓への影響を評価したところ、光による腎交感神経の特異的的刺激によって急性腎障害から腎臓が保護されることが明らかとなった。

光による腎交感神経刺激によって腎臓が保護される

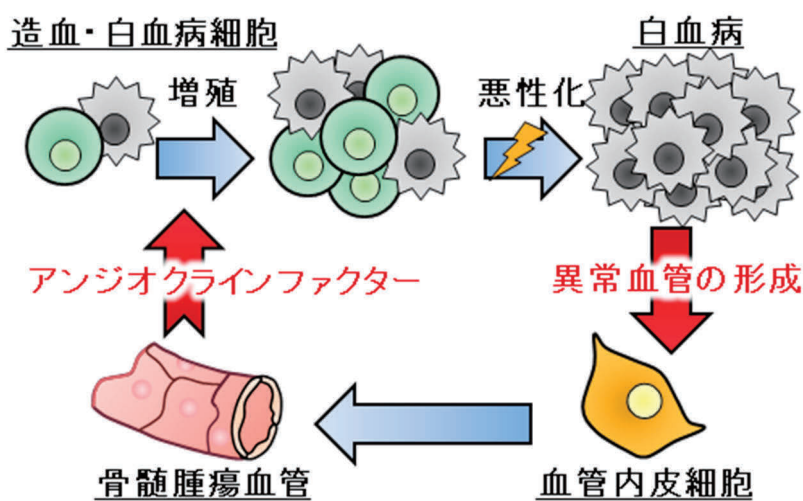


【目的】 本研究では、白血病の進展における骨髄微小環境に着目し、特に固形がんの治療においては一般的な治療標的となっている腫瘍血管の解析を進めた。白血病には抗がん剤が効果を示すことから臨床では併用化学療法が行われており、完全寛解および治癒が期待できるようになっている。しかしながら、治療後の患者の多くに再発が認められ、白血病の治療においては寛解後の再発の抑制および、再発後の治療法の開発が課題となっている。白血病は「血液のがん」であるが、血液の恒常性は造血幹細胞を中心としたシステムによって維持されている。造血幹細胞は骨髄微小環境によって構築されるニッチと呼ばれる特殊な微小環境によって分化や増殖が制御されており、白血病の進展過程においてもニッチが作用している可能性が高い。ニッチの構築においては血管の重要性が示されているが、白血病の進展と骨髄血管の関連については未解明であるため解析を進めた。

【方法】 本研究では急性骨髄性白血病を自然発症する *Regnase-1* 遺伝子欠失マウスを用いて解析を進めた。血球細胞系特異的に *Regnase-1* を欠損するマウス (*Vav1-Cre : Regnase-1^{fllox/fllox}*) を作製すると、AML 様の症状を呈することが明らかとなっている。この白血病を自然発症するマウスを用いて、白血病における骨髄血管の構造的および機能的な変化の解析を進めた。また、骨髄血管の異常化がどのようなメカニズムで白血病の進展に影響を与えるかを検証するため、アンジオクリンファクターと呼ばれる分子群の解析を進めた。さらに、血管異常化を誘導する分子機構の解明のため、白血病の骨髄血管内皮細胞にて活性化しているシグナルを同定し、その検証を行った。

【結果】 マウスが白血病を発症した後に骨髄血管を組織学的に解析したところ、白血病の発症に伴って骨髄中の血管数の増加や血管構造の異常が起きており、いわゆる「腫瘍血管化」が起きていることが確認できた。特に活性化した血管内皮細胞が増加しており、血管内皮細胞に大きな特性変化が起きていることが明らかとなった。このような白血病に伴う骨髄血管の変化は、*Regnase-1* 遺伝子欠失マウスにおいて特異的に起きる現象ではなく、他の白血病モデルマウスにおいても同様に確認された。次に、白血病マウスの異常化した骨髄血管から特異的に産生される分子を探索したところ、2 つの候補分子を同定した。さらに、白血病骨髄血管の異常化が BVFR によるシグナルによって誘導されていることを発見した。これらの結果から、骨髄血管の異常化が白血病の進展に伴うことが明らかとなった

白血病を進展させる骨髄腫瘍血管



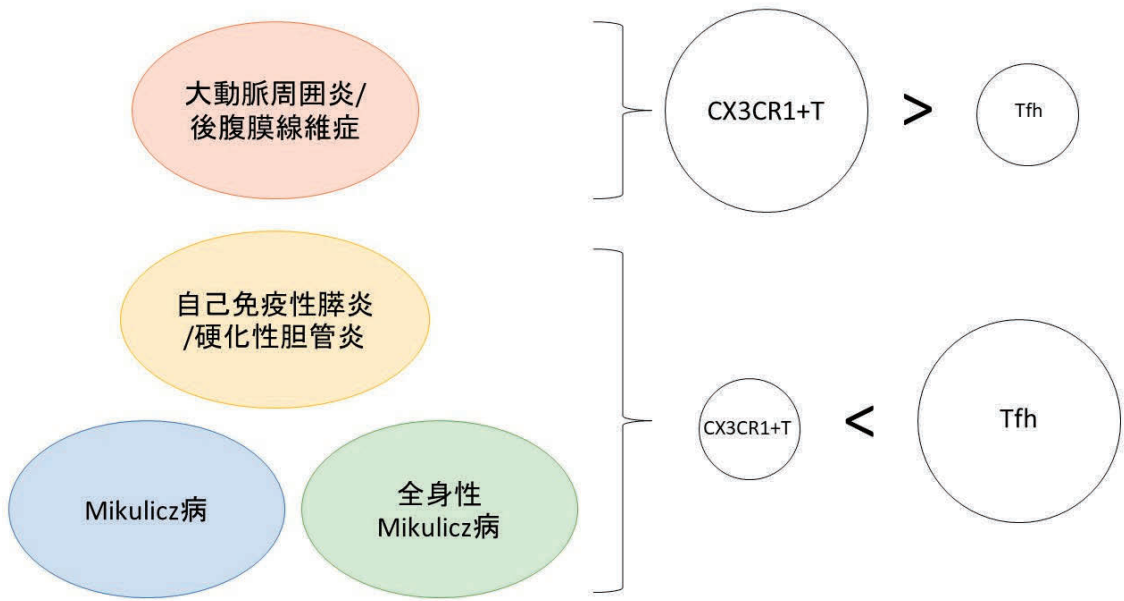
91	IgG4関連疾患の臓器横断的病態解明	金子 祐子
----	--------------------	-------

【目的】 IgG4 関連疾患 (IgG4-related disease : IgG4-RD) は、全身諸臓器に腫大や肥厚を来たし機能障害をもたらす慢性炎症性疾患である。病変は複数臓器に及ぶため臓器横断的なアプローチにより各臨床病型の違いを明らかにすることと、その病態に基づいた治療エビデンスの構築が望まれる。本研究では、組織障害と炎症に関与することで知られる CX3CR1 陽性細胞障害性 T 細胞に着目し、臓器横断的 IgG4-RD 患者コホートと臨床検体を用いて臨床病型別の病態の理解を深めることを目的とする。

【方法】 54 人の IgG4-RD 患者、疾患コントロールとして 57 人の pSS 患者、40 人の健常者から検体提供を受けた。末梢血中の CD4 T 細胞または CD8 T 細胞における CX3CR1 陽性細胞の比率を、フローサイトメトリーを用いて解析した。臨床データとの関連解析における 2 群間の比較は Mann Whitney 検定 (非ペアサンプル) または Wilcoxon matched-pairs signed rank 検定 (ペアサンプル)、3 群間の比較は、Kruskal-Wallis 検定による分散分析を行った後、Dunn's multiple comparisons による多重検定を行った。相関分析は Spearman の r を用いた。非再燃生存曲線は Kaplan-Meier 分析を用いて作成し、log-rank 検定によって比較した。

【結果】 CX3CR1 陽性 CD4 および CX3CR1 陽性 CD8 T 細胞の比率は、健常人と比較して IgG4-RD と pSS で有意に増加していた。また、増加した CX3CR1 陽性 CD4 T 細胞の比率は CX3CR1 陽性 CD8 T 細胞の比率と正の相関を示した。臨床病型別解析では、後腹膜線維症と大動脈周囲炎を合併した IgG4-RD 患者は、涙腺唾液腺炎合併患者と比較して CX3CR1 陽性 CD4 および CX3CR1 陽性 CD8 T 細胞の比率が有意に高かった。また、疾患活動性と CX3CR1 陽性 CD4 および CX3CR1 陽性 CD8 T 細胞の比率が正に相関していた。さらに、グルココルチコイド治療による臨床的改善とともに CX3CR1 陽性 CD4 および CX3CR1 陽性 CD8 T 細胞の比率が減少し、治療前の CX3CR1 陽性 CD4 および CX3CR1 陽性 CD8 T 細胞の比率が高い IgG4-RD 患者では臨床経過中の非再燃生存率が高かった。

IgG4-RD の臓器横断的アプローチによる臨床病型別病態解明

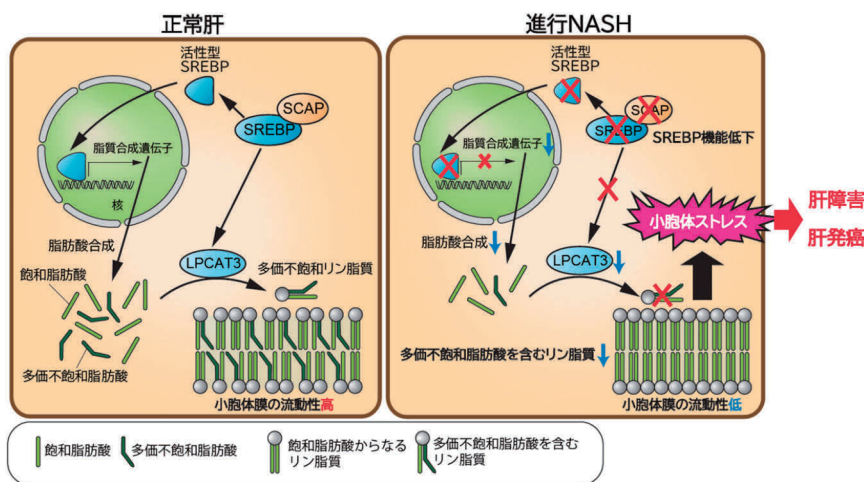


【目的】我々は以前に非アルコール性脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis : NASH)・肥満関連肝癌に起きている代謝変化を網羅的に解析し、SREBP 活性化に伴う脂質合成亢進はNASH・肥満関連肝癌だけでなく肝細胞癌において幅広くみられる現象であることを見出した。そこで同経路が治療標的となると考え、NASH 肝癌マウスモデルを用いて検証を行った。

【方法】SREBP 活性化を伴ってNASH からHCC (肝細胞癌) を発症する肝臓特異的 *PTEN* 欠損マウスに、SREBP 活性化に必須の分子 SCAP を欠損させ、肝臓特異的 *PTEN* 欠損 SREBP 不活性化マウスを作製し (PS DKO マウス)、そのフェノタイプを解析した。

【結果】PS DKO マウスでは予想通り肝細胞の脂肪滴形成が著明に抑制されたが、肝細胞障害・炎症はむしろ悪化し、5 か月齢でヒト進行NASH の一病態である burned-out NASH のような肝硬変、7 か月齢で多発HCC を発症するという全く予想に反する結果となった。一方同週齢の *PTEN* KO マウスは脂肪肝にはなるものの炎症・線維化は軽度で、SCAP KO マウスはほぼ正常であった。PS DKO マウスの肝臓に活性型 SREBP1 を導入すると細胞死や炎症、発癌が著明に改善したことから、*PTEN* KO マウスにおいて SREBP を介した脂質合成はむしろ保護的に働いていることが示唆され、肝細胞に脂質が蓄積する病態において脂質合成を強力に阻害することは、むしろ肝病態を悪化させる可能性が示唆された。次いで肝組織を用いてトランスクリプトーム解析を行ったところ、PS DKO マウスでは小胞体ストレス経路の著明な活性化が生じており、実際に電子顕微鏡でも小胞体の異常が観察された。そこでウイルスベクターを用いて PS DKO マウスの肝臓にシャペロンタンパク GRP78 を導入すると、小胞体ストレスの軽減とともに肝障害の改善を認めたことから、同マウスの肝障害には小胞体の異常が関与していることが明らかとなった。さらにメタボロームによる網羅的脂質分析を行ったところ、PS DKO マウスの肝臓においてリン脂質の脂肪酸組成が大きく変化しており、これが小胞体膜の流動性を低下させ、小胞体ストレス・肝障害を引き起こしていると考えられた。特に多価不飽和脂肪酸を含むホスファチジルコリンの減少が顕著であり、これは脂肪酸合成低下に加えて、脂肪酸をリン脂質へ組み込む酵素である LPCAT3 の発現低下が関与していることが明らかとなった。実際にホスファチジルコリンの補充や LPCAT3 の発現回復により小胞体ストレスが改善した。さらに NAFLD (非アルコール性脂肪性肝疾患) 患者の肝生検体を用いた RNA-seq 解析によって、ヒト進行NASH でも肝線維化進行に伴い SCAP-SREBP-LPCAT3 axis の活性が低下していくことも確認された。これらの研究結果から、進行した burned-out NASH で生じている SREBP を介した脂質合成機能低下は、リン脂質組成の変化を介して病態進行を促進している可能性があり、リン脂質の補充や脂肪酸組み込み異常の是正が、進行NASH の治療法の一つとなる可能性が示唆された。

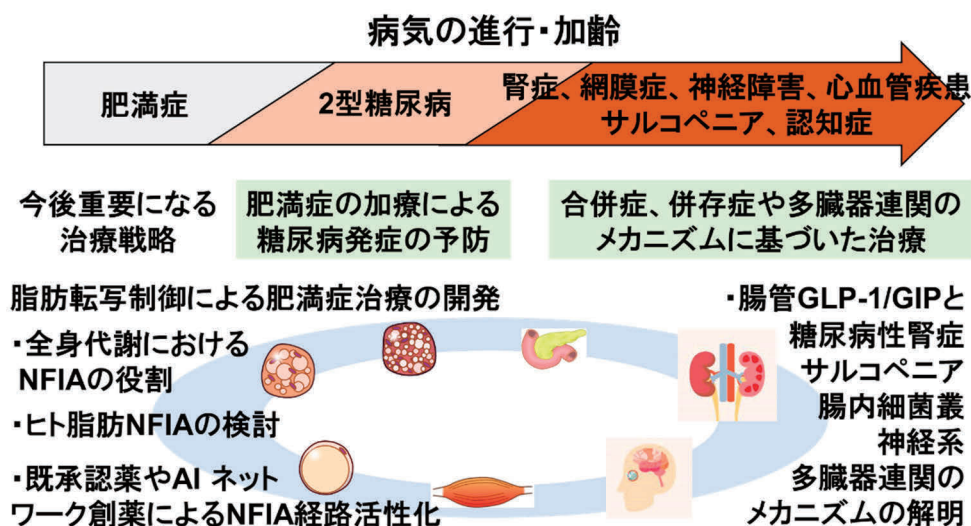
進行NASHにおけるリン脂質代謝異常を介した病態悪化機序



【目的】 脂肪細胞における褐色脂肪遺伝子の転写プログラムの制御因子として同定した NFIA の遺伝子改変マウスの表現型の解析で、この因子が全身の糖・脂質・エネルギー代謝に大きな役割を果たすことが示唆された。腸管インクレチンである GIP 受容体や GLP-1 受容体は脂肪細胞や腎臓にも発現しており、それぞれの欠損マウスは高脂肪食負荷に抵抗性、腎症の悪化を認めるほか、近年では糖尿病性腎症におけるサルコペニア発症メカニズムや GLP-1 による腸内細菌叢の変化と交感神経系の関与、SGLT2 阻害薬による腎保護のメカニズムなど、多臓器間の連関を明らかにしてきた。本研究では 2 型糖尿病の治療戦略の上で、今後重要になると考えられる「肥満症の加療による糖尿病や関連疾患の発症の予防」と「合併症、併存症や多臓器連関のメカニズムに基づいた治療」に向けて、脂肪細胞の転写や分化研究で培った細胞レベル、細胞核、エピゲノムレベルでの解析技術を、腸管インクレチンと腸腎筋神の多臓器連関の研究に活かし、二つの重要な治療戦略を両輪として、得意とする手法を互いに応用し、相乗的な発展と新たな研究の展開を目指す。

【方法および結果】 Fapb4 プロモーターエンハンサーに NFIA 遺伝子の cDNA を導入した NFIA トランスジェニックマウスを作製し、脂肪細胞における NFIA 過剰発現は高脂肪食による耐糖能低下や肥満に対して抵抗性に作用することを明らかにした。白色脂肪組織由来初代培養前駆脂肪細胞の網羅的なトランスクリプトーム解析と遺伝子オントロジー解析から、NFIA はミトコンドリアの酸化的リン酸化経路を増強し、炎症関連遺伝子群を抑制する作用を有していた。ChIP-seq 解析では褐色脂肪遺伝子群とは対照的に、炎症遺伝子群の近傍のエンハンサーに NFIA は結合するものの、PPAR γ は共局在しておらず、NFIA の結合によってエンハンサーのヒストンアセチル化は減少しており、遺伝子の転写抑制の原因となっていることが示唆された。GIP 受容体は食事に伴い分泌される消化管インクレチンホルモンであるが、欠損マウスの検討から、脂肪細胞の糖取込みを促進し、肥満を助長する可能性が示されている。GIPR は骨格筋間質に発現しており、GIPR 遺伝子改変マウス等の検討から GIP が筋線維間脂肪の制御に役割を果たすことが示唆された。

褐色脂肪特異的転写制御と腸管インクレチンによる多臓器連関のメカニズムに基づいた 2 型糖尿病の治療戦略

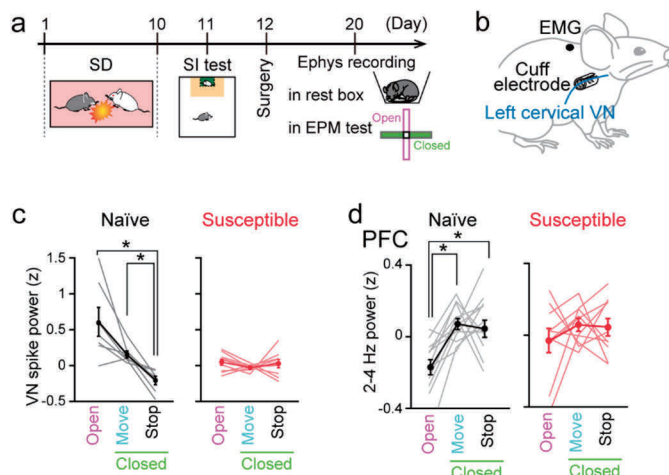


【目的】 迷走神経は、末梢臓器と脳の相互作用において重要な役割を果たす。近年、迷走神経を介した内受容感覚は、脳の情動や意思決定の機能に大きな影響を与える可能性が示唆されており、情動を維持するための基礎生理学的な基盤として重要であると考えられる。しかし、迷走神経の活動がどのように外部環境に応答して不安状態を表現しているか、あるいは迷走神経によるそのような生理メカニズムが精神疾患などの病的状態において、どのように変化するかは解明されていない。そこで本研究では、ストレス負荷を与えたマウス、迷走神経を切断したマウスにおいて、迷走神経活動や脳波信号を同時に記録することにより、これらの生理学的課題に取り組んだ。また、迷走神経刺激は精神障害の効果的な治療戦略であるが、実際の生理学的メカニズムと作用部位はほとんど知られていない。本研究では、迷走神経刺激がストレス感受性マウスの不安行動や不安に関連した脳活動パターンをどのように回復できるか調べた。

【方法】 マウス (C57Bl/6J) に社会的敗北ストレスを負荷するために、攻撃的で体格が大きい CD-1 マウスから 10 時間の社会的敗北ストレスを 10 日間負荷した。ストレス後のマウスのストレス感受性は、社会相互作用テストを使用して評価した。ストレス感受性を特定した後、マウスの左迷走神経にカフ型電極、および前頭前皮質、扁桃体に脳波 (局所場電位) 計測電極を埋め込み、これらのマウスの活動を高架式十字迷路において記録した。

【結果】 ストレスを負荷していないマウスは、ストレス感受性マウスよりも高い迷走神経スパイク頻度を示した。この結果は、ストレス後の迷走神経活性がストレス感受性マウスで特異的に減少したことを示している。前頭前皮質-扁桃体の局所場電位パワーと迷走神経活動の相関を調べたところ、2~4 Hz または 20~30 Hz のパワーとの相関を見出した。そこで、高架式十字迷路における変化を解析したところ、2~4 Hz の前頭前皮質パワーはクローズアームよりもオープンアームの方が有意に低く、20~30 Hz 前頭前皮質パワーはクローズアームよりもオープンアームの方がそれぞれ有意に高かった。これらの結果は、前頭前皮質の 2~4 Hz および 20~30 Hz の局所場電位パワーが、不安行動によって動的に変化することを示唆している。一方で、こうした迷走神経と脳の活動の協調が、ストレス感受性マウスにおいてどのように変化するか調べたところ。オープンアームとクローズアームの間で、前頭前皮質-扁桃体において 2~4 Hz または 20~30 Hz の両方のパワーにおいて、有意差は観察されなかった。これらの結果は、迷走神経スパイクと不安関連の前頭前皮質-扁桃体回路の活動の相関関係が、ストレス感受性マウスでは破壊されたことを示している。さらに、迷走神経を物理的に切断し (迷走神経切除術)、前頭前皮質の信号を記録したところ、ストレス感受性マウスと同様に、迷走神経切断マウスでは、オープンアームとクローズアームの間で、前頭前皮質-扁桃体において 2~4 Hz または 20~30 Hz の両方のパワーにおいて、有意差は観察されなかった。これらの結果は、不安環境で前頭前皮質の局所場電位パワーに動的な変化をもたらすには、迷走神経の活動が必要であることを示唆している。

ストレス感受性にかかわる迷走神経活動・脳波パターンの解析

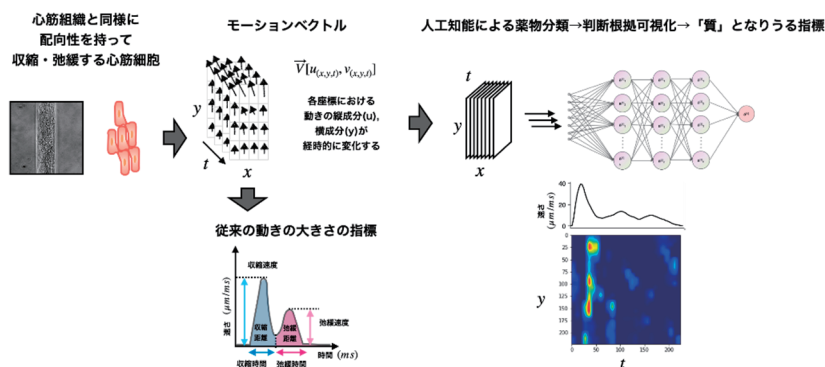


【目的】 心不全は様々な疾患が原因となって心臓のポンプ機能が低下し、むくみや息切れといった症状が生じる症候群であり、世界中でその患者数は増え続けている。心不全患者の予後を改善させる薬物は存在するもののその効果は限定的であるため重症心不全患者の予後は進行癌と同様に不良であり、心不全に対する画期的な治療薬の開発は望まれ続けている。心不全は心臓のポンプ機能低下が引き起こす症候群であるため、短絡的には心筋細胞の収縮力を向上させる薬物は心臓のポンプ機能を向上させ、心不全症状を軽減できると考えられる。ところが実際には、カテコラミン等の心筋細胞の収縮力を向上させる薬物は心不全患者の長期予後を悪化させ、心不全治療において中心的な役割を果たしているβ遮断薬は心筋細胞の収縮力を低下させる。また、心筋細胞の収縮力を低下させる薬物であってもNaチャンネル遮断薬や非DHP系Ca拮抗薬（以下Ca拮抗薬）、心毒性を示す薬物は心不全を増悪させる。これらの臨床的な事実は、心不全の治療薬を開発する目的で実施する薬物スクリーニングにおいて「心筋細胞の収縮力」だけを指標にしても臨床的に有用な薬物は同定できない可能性を示している。本研究の目的は、心筋細胞の動きの「質」を評価する人工知能を開発し、「心筋細胞の収縮力」ではなく「心筋細胞の動きの『質』」を指標とした表現型スクリーニングを通じて心不全に対する新規治療薬の開発を可能にすることである。

【方法】 一定の幅で播種できるよう培養底面を加工した96 wellプレート（マイクロパターンプレート）にヒトiPS細胞由来心筋細胞（iPS心筋）を播種し、拍動する様子をSI8000（SONY社）を用いて撮像した。続いて、撮像した動画からモーションベクトルを算出するシステムを構築し、算出されたモーションベクトルからiPS心筋に投与された薬物を予測する深層学習モデルを構築し、動きの質の指標となりうる特徴量を考察した。

【結果】 マイクロパターンプレートに播種した心筋細胞は、一般的な分散培養の実験系に比べて配向性を付与した方向に細胞の動きが集中していた。この結果から、マイクロパターンプレートを用いた実験系は、分散培養の実験系より生体の心筋細胞に近い配向性を持った収縮弛緩運動が起き、心筋の動きの「質」を評価しやすい細胞実験系である可能性が示唆された。続いて、心筋の動きの「質」を評価するために重要な特徴量を調査するため、前工程で抽出したモーションベクトルから薬物添加の有無を予測する畳み込みニューラルネットワークベースの深層学習モデルの構築を試みたところ、I型心筋症を誘導する抗がん薬ドキソルビシン、II型心筋症を誘導するトラスツズマブの添加の有無を予測する深層学習モデルにおいて約85.6%の予測精度を達成した。構築モデルの予測根拠を可視化したところ、ドキソルビシンを添加したデータでは弛緩の終了時、トラスツズマブを添加したデータでは収縮の終了時におけるモーションベクトルが予測に強く寄与していることが明らかとなった。これらの結果は、収縮や弛緩の終了時のモーションベクトルのバランスが、収縮最大速度や収縮弛緩総移動距離といった既存の「収縮力の大きさ」ではない心筋細胞の動きの「質」を表す特徴量になりうることを示唆していると考えられる。

本研究の概略

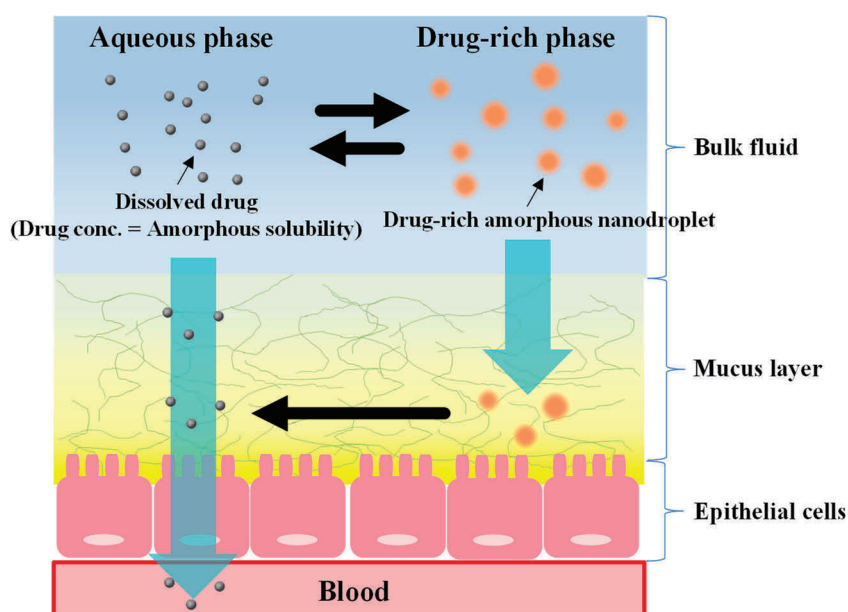


【目的】 難水溶性薬物の溶解性・吸収性改善を目的として過飽和溶解薬物の液-液相分離 (Liquid-liquid phase separation) を活用した過飽和製剤が検討されている。本研究では、液-液相分離により形成される薬物濃縮相の製剤添加剤による安定化メカニズムの解明を目的として、溶液 NMR を含めた分子状態評価による検討を行った。加えて、薬物濃縮相が形成された溶液からの薬物経口吸収性改善能を比較評価した。

【方法】 各種製剤添加剤ポリマー溶液中に非晶質溶解度以上の薬物を solvent-shift 法により添加し、薬物濃縮相を形成させた。薬物濃縮相が形成した各種溶液について溶液 NMR、Cryo-TEM 及び、ラットを用いた *in situ* 一回灌流法による消化管吸収試験を行った。

【結果】 各種製剤添加剤ポリマーによる薬物濃縮相からの結晶化抑制作用を評価した結果、Hypromellose (HPMC) 誘導体による顕著な結晶化抑制作用が認められた。溶液 NMR 測定による解析の結果、HPMC 誘導体が水相から薬物濃縮相に分配し、薬物濃縮相中の薬物分子運動性を抑制することが示された。更に、各種 HPMC 誘導体による結晶化抑制作用の強さの違いを比較評価した結果、薬物濃縮相へのポリマー分配量の増加に伴い、薬物結晶化がより強く抑制されることが示された。以上の結果より、薬物と親和性の高いポリマーを用いることで、より多くのポリマーが水相から薬物濃縮相液滴に分配し、薬物濃縮相からの結晶化を効果的に抑制することが示唆された。続いて薬物濃縮相の水分散安定性に及ぼす製剤添加剤ポリマーの影響を評価した結果、特に Hypromellose acetate succinate (HPMC-AS) 溶液において、薬物濃縮相液滴がナノサイズで維持された。薬物濃縮相液滴中への HPMC-AS の混合による Ostwald 熟成抑制および表面吸着した HPMC-AS による合一抑制作用が相乗的に働き、薬物濃縮相液滴がナノサイズに維持されたと考察した。ナノサイズの薬物濃縮相液滴が形成された溶液について、ラット小腸を用いた *in situ* 一回灌流法により薬物消化管吸収性を評価した結果、薬物濃縮相液滴サイズの減少に伴い、消化管吸収性が顕著に改善することが示された。薬物濃縮相のナノサイズ化は薬物濃縮相の拡散性を向上させ、より消化管近傍において薬物を供給し、薬物吸収性を効果的に改善したと考察した。以上の結果より、薬物と親和性の高く、粒子界面安定化作用の強い製剤添加剤ポリマーを用いることで薬物濃縮相液滴サイズをナノサイズで維持することが可能であり、難水溶薬物の経口吸収性を効果的に改善することが可能であることが示された。

ナノサイズの薬物濃縮相液滴形成による薬物吸収改善の模式図



【目的】 必須不飽和脂肪酸であるドコサヘキサエン酸 (DHA) の摂取は、子供の正常な脳発達に必要であることが明らかとなっているが、これらの作用機序は十分には明らかとなっていない。我々はこれまで、成獣を用いた検討から、DHA の摂取効果について、その生体内代謝物である DHDP が重要であることを明らかにしている。従って、子の脳発達においてもこれら DHA 代謝物の作用が関わっているのではと考えた。母親が摂取した DHA は胎盤や母乳を介して子へ移行し、脳内に蓄積する。しかし、母親の DHA 代謝物が子へ移行するのか、また子の脳内で DHA 代謝物が産生されるかは不明であり、DHA 代謝物の脳発達への影響も明らかにされていない。DHA は主に青魚に含まれているが、魚介類にはメチル水銀等の脳発達に悪影響を与える毒性物質も含まれていることから、妊婦が魚介類を多量摂取することは注意が必要であると厚生労働省により示されている。一方で、セーシェル諸島における疫学研究では DHA を含む ω -3 脂肪酸レベルが低い母親に限り、母親のメチル水銀濃度が高いほど子の精神発達遅延が観察されており、青魚を摂食することによる DHA 摂取は、メチル水銀毒性をある程度マスクしていると予想される。そこで本研究では、母体の DHA 摂取が、胎児脳のメチル水銀毒性を軽減できるか、またその効果に DHA 代謝物が関与しているかどうかを明らかにすることを目的とする。

【方法】 妊娠マウス (C57BL/6J) に妊娠時から仔が離乳する生後 3 週間までメチル水銀および DHA を摂取させ、仔マウス (オス) の生後 5 週間目に握力測定、及びロータロッド試験、Y 字迷路試験により仔マウスの運動機能や短期記憶を評価した。また仔の胎生期および乳児期における仔の脳内 DHA およびその代謝物を LC-MS を用いて調べた。また、マウス胎児および乳児の脳、肝臓に含まれる DHA 代謝酵素 (チトクローム P450 や sEH) の mRNA 量やタンパク質発現量を解析した。またマウス胎児大脳皮質から初代神経細胞を単離し、DHDP の生理活性を解析した。

【結果】 母体へのメチル水銀投与により、仔の成長後において運動機能及び短期記憶の低下が観察された。一方で、メチル水銀と共に DHA を母体に摂取させると、メチル水銀によるこれらの仔マウスへの影響が抑制され、DHA 摂取が仔のメチル水銀毒性に対して保護作用を示すことが示された。そこで、胎生 16 日、生後 0 日及び 14 日における仔マウスの脳内 DHA 代謝物を解析したところ、母体の DHA 摂取により胎児および乳児の DHA 代謝物である DHA エポキシ体 (19,20-EDP) 及び DHA ジオール体 (19,20-DHDP) が顕著に増加していることが示された。EDP は DHA がチトクローム P450 によりエポキシ化した代謝物であり、これがさらに可溶性エポキシド加水分解酵素 (sEH) により代謝されることでそのジオール体である DHDP となる。これらの酵素は、成獣では肝臓および脳に発現しているが、胎児では肝臓や脳ともに発現が低く、出生後、徐々に発現量が増加することが示された。そこで、胎児や乳児の脳に蓄積している DHA 代謝物は、仔の体内で生成したものではなく、母体から移行している可能性が示された。そこで、母乳中の DHA 代謝物を調べたところ、母乳に DHA 代謝物が検出され、DHA を摂取することで母乳中の 19,20-EDP 及び 19,20-DHDP が顕著に増加することが明らかとなった。これらの結果は、DHA 代謝物が母体から仔へ積極的に移行していることを示している。また 19,20-DHDP は、神経細胞において、抗酸化酵素の発現を誘導することで、メチル水銀による神経細胞死を軽減することが示された。従って、DHA を多く含む魚介類の摂取や、サプリメント等による DHA やその代謝物の摂取は仔のメチル水銀毒性軽減や脳発達促進に有効であると考えられる。

母体による DHA 摂取による仔のメチル水銀毒性の軽減

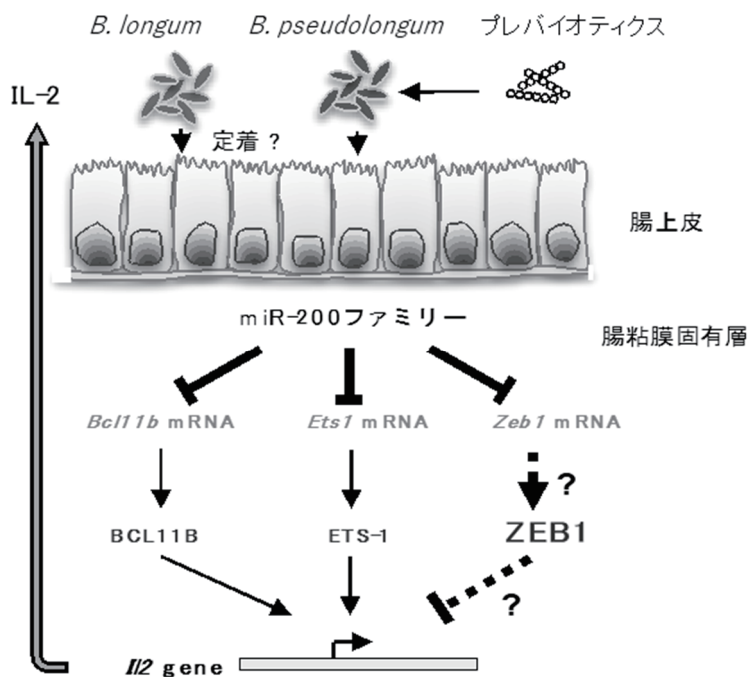


【目的】ビフィズス菌は腸内細菌叢を構成する細菌の一つであり、宿主に対してさまざまな健康機能を発揮する。また、ビフィズス菌はプロバイオティクスとして利用されるが、摂取したプロバイオティクスが腸管内に定着することは困難である。我々の最近の研究により、腸内細菌の定着に宿主のマイクロ RNA (miRNA) が関与することを示唆する知見を得た。そこで、本研究では、腸管に常在しているビフィズス菌が宿主の miRNA の発現を調節することにより自らの定着を有利にしているという仮説を立て、miRNA の遺伝子サイレンシングを介してプロバイオティクスが腸管へ定着するメカニズムを明らかにすることを目的とした。

【方法】マウスに常在する主要なビフィズス菌である *Bifidobacterium pseudolongum* を 2 日間、7 日間、あるいは 14 日間マウスに胃内投与し、大腸粘膜固有層白血球における miR-200 ファミリーの発現におよぼす影響をリアルタイム定量 PCR (qPCR) 法によって解析した。さらに、*B. pseudolongum* が大腸粘膜固有層白血球の miR-200 ファミリーの発現に直接影響しているかどうかを確かめるため、*B. pseudolongum* を含む数種類のビフィズス菌の死菌体をマウスから分離した大腸粘膜固有層白血球に添加し、qPCR により解析した。

【結果】*B. pseudolongum* をマウスに 7 日間投与すると、大腸粘膜固有層白血球における miR-200 ファミリーの発現が増加した。しかしながら、2 日間あるいは 14 日間投与による miR-200 ファミリーの発現変化は観察されなかった。このことは、ビフィズス菌の定着には大腸粘膜固有層白血球における miR-200 ファミリーの一時的な発現増加が寄与する可能性を示唆する。また、マウスから分離した大腸粘膜固有層白血球にビフィズス菌の死菌体を添加した結果、miR-200 ファミリーの発現増加は観察されなかった。今後は、miR-200 ファミリーの発現を変化させる因子を同定するため、ビフィズス菌の代謝産物などの別の腸内細菌因子の添加を検討するとともに、*B. pseudolongum* 投与による miRNA の遺伝子サイレンシングを介して実際にプロバイオティクスが定着するかどうかを検討する予定である。

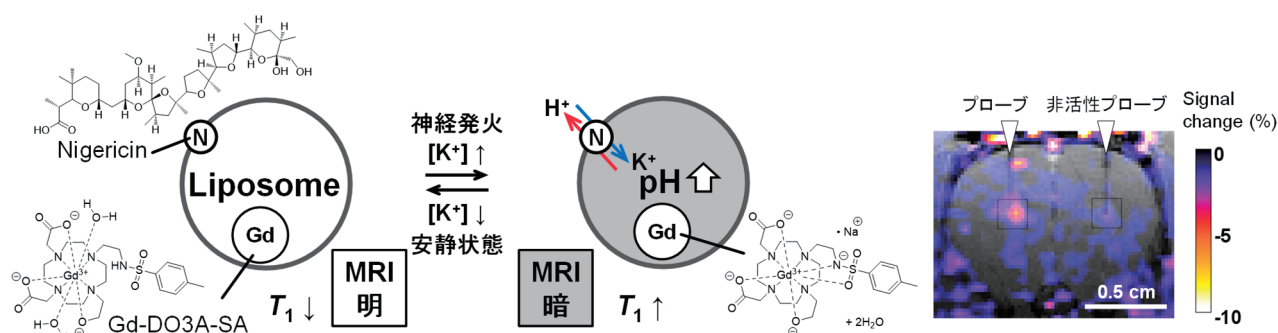
想定している腸内細菌の定着メカニズム



【目的】 fMRI (functional magnetic resonance imaging) は、ヒトからモデル動物に至って汎用される優れたニューロイメージング技術である。fMRI は、神経活動部位の血流上昇によって脳神経活動を検出するが、元画像の定量情報 (MRI 信号強度) が失われる上、興奮性・抑制性活動を見分けることは困難である。よって、神経活動に直結した指標に基づく高感度 fMRI が確立できれば、新たな神経回路の発見、脳疾患モデル動物の評価、中枢神経疾患薬の薬効評価といった、基礎神経科学から創薬に至る幅広い研究分野に大きなインパクトを及ぼすと考えられる。そこで本研究では、脱分極時に細胞外へ流出し、一過的な濃度上昇が起こることが知られている細胞外カリウムイオン (K^+) を可視化する MRI プローブを開発する。これにより、興奮性神経活動を特異的かつ高感度に検出可能な fMRI の確立を目指す。

【方法】 細胞外 K^+ を検出するプローブとして、抗生物質である nigericin と、MRI 造影剤である Gd-DO3A-SA を内包したリポソームをデザインした (図)。Nigericin は、脂質膜を介した K^+ 輸送の際に、等量の H^+ を逆輸送するアンチポーターである。Gd-DO3A-SA は、pH 6.8 以下では 2 つの水分子が Gd に配位し、水分子プロトンの NMR 縦緩和時間 (T_1) を大きく短縮する。一方 pH 6.8 以上では、脱プロトン化したスルホンアミド基が、Gd に配位することで水分子を追い出し T_1 が延長する。すなわち、細胞外 K^+ に応じて nigericin が引き起こしたリポソーム内 pH 変化を Gd-DO3A-SA が T_1 変化に変換することで、 K^+ 動態を T_1 強調 MRI で検出できると考えた。脂質および nigericin を溶解したクロロホルム溶液から、Bangham 法によって、10 mM HEPES (pH 7.4)、150 mM NaCl、15 mM Gd-DO3A-SA、レシオ型 pH 応答性蛍光色素 HPTS を内包したリポソームを調製した。調製したプローブは、蛍光測定、NMR 緩和時間測定、ラット脳 MRI 測定によって、各種機能を評価した。

【結果】 調製したプローブをリポソーム内と等浸透圧および等 pH の各種アルカリ金属塩化物緩衝液で希釈し、レシオ蛍光測定によってリポソーム内の pH 変化を追跡した。その結果、nigericin のアルカリ金属に対する親和性に応じたリポソーム内 pH 変化が観察された。同様に NMR 緩和時間測定から、縦緩和能 (r_1) を算出した。その結果、神経活動時における細胞外 K^+ の変動域である 0~50 mM の範囲で r_1 は約 40% 減少し、プローブが K^+ イメージングに適した親和性を有することがわかった。さらに、プローブをラット脳内線条体に投与し、7 テスラの MRI を用いて RARE 法による T_1 強調撮像を行った。投与部位を中心に半径 1.5~2 mm の範囲が高信号を示したことから、プローブが線条体の大部分に拡散していると考えられた。続いて線条体を 150 mM KCl で刺激しながら、FLASH 法による高速 T_1 強調撮像を用いた。刺激前からの信号変化率は、プローブ投与側で数%減少した一方、非活性プローブ投与側ではほとんど変化しなかった。以上から、開発したプローブが *in vivo* においても機能することが示唆された。

細胞外 K^+ 応答性 MRI プローブのデザインと、プローブによるラット脳線条体の K^+ イメージング

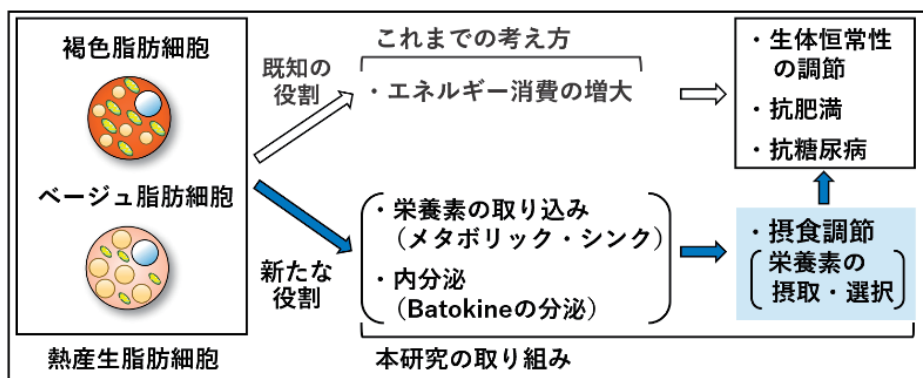
100 熱産生脂肪細胞による糖質摂取の調節機構の解明	小栗 靖生
----------------------------	-------

【目的】 熱産生脂肪細胞（褐色脂肪細胞、及び、ベージュ脂肪細胞）は、エネルギー消費量を増加させ、肥満症や糖尿病の予防、改善に寄与することが知られている。加えて、近年では熱産生脂肪細胞の新たな役割として、栄養素の取り込みと消費、および、液性因子を分泌する内分泌機能などが明らかにされている。しかし、熱産生脂肪細胞のこれらの機能を介した全身の代謝調節が、糖質の摂食行動を制御するメカニズムは未解明である（下図）。そこで、本研究では、熱産生脂肪細胞の活性化モデルマウスおよび欠損モデルマウスを作製し、熱産生脂肪と糖質の摂取調節の関係について検討した。

【方法】 C57BL/6J 雄性マウスの肩甲骨間に存在する褐色脂肪組織（Brown adipose tissue : BAT）を外科的手法により除去することで BAT 欠損マウスを作製した (BATectomy)。対照群には、偽手術を施した (Sham)。加えて、C57BL/6J 雄性マウスに選択的β3 アドレナリン受容体作動薬を投与することで、BAT の活性化モデルマウスを作製した。対照群には、生理食塩水を投与した。これらマウスに対し、通常食と高糖質食を用いて、食事選択試験を行った。選択的β3 アドレナリン受容体作動薬および生理食塩水の投与前後にマウスより採血を行い、ELISA 法により Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21) の血中濃度を測定した。また、BAT における *Fgf21* 発現を Quantitative PCR 法により評価した。

【結果】 BATectomy および Sham における高糖質食の摂取量を評価したところ、高糖質食の摂取量は、BATectomy では Sham と比較して高値であった。一方で、通常食の摂取量は、両群において統計学的に有意な差異を認めなかった。一方、選択的β3 アドレナリン受容体作動薬、または、生理食塩水の投与による、高糖質食の摂取量を評価したところ、高糖質食の摂取量は、選択的β3 アドレナリン受容体作動薬群では、生理食塩水投与群と比較して低値であった。次に、選択的β3 アドレナリン受容体作動薬、または、生理食塩水の投与による、FGF21 分泌の変化について解析した。選択的β3 アドレナリン受容体作動薬を投与することで、血中 FGF21 濃度は、生理食塩水投与群と比較して著しく増加した。また、選択的β3 アドレナリン受容体作動薬の投与群では、生理食塩水の投与群と比較して、BAT における *Fgf21* 発現が高値であった。

熱産生脂肪を介した摂食調節機構の探索

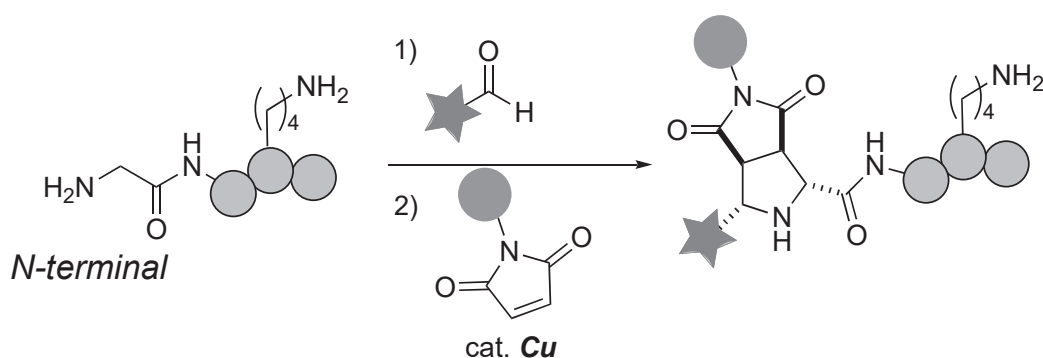


【目的】 ペプチドに対して蛍光分子などの機能性分子を導入する手法は、生命科学研究において有用であるため精力的に研究が行われている。一方で、通常、ペプチドにはリシンの ϵ -アミノ基や水素結合など、反応点や相互作用が多いため、選択的に分子を結合させて均質な生成物を得ることは容易ではない。これに対して近年、ペプチド内において 1 カ所しか存在せず、分子が新たに結合した場合にも立体構造に影響を与え難い N 末端に対して、選択的に分子を導入する手法が注目を集めている。一方で、これらの手法には、反応が平衡的であるため生成物が一部解離してしまう点などの課題が残されていた。このような背景から、強固な結合を形成し、生成物の平衡的な解離を伴わない手法の開発が求められている。

【方法】 上記の課題に対して、今回我々は、1,3-双極子であるアゾメチンイリドの構造的な発生要件に着目した、ペプチド N 末端修飾法を着想した。すなわち、アゾメチンイリドが発生するためには、無保護のアミノ基の同一炭素上にカルボニル基などの電子求引基が存在する必要があるため、要件を満たす N 末端ではアゾメチンイリドが発生するのに対して、リシンの ϵ -アミノ基や内部ペプチドからはアゾメチンイリドが発生しないため、N 末端のみで分子連結が行えるのではないかと考えた。このような考えのもとで、ペプチドの N 末端で発生させたアゾメチンイリドとマレイミドを用いる 1,3-双極子環化付加反応の検討を行った。

【結果】 検討の結果、銅触媒を用いることで、ペプチドの N 末端での 1,3-双極子環化付加反応が、高収率かつ完全なジアステレオ選択性で進行することが明らかとなった。本反応は、目論見通り、リシン側鎖のアミノ基が共存する場合にも N 末端選択的に進行することも明らかとなった。また、幅広い構造のイミノペプチドやマレイミド誘導体に利用できるのみならず、様々なケミカルバイオロジーツールの存在下でも利用できたことから、様々な機能性分子の導入に利用できるかと期待される。加えて、イミン形成および 1,3-双極子環化付加反応をワンポットで行う手法の確立にも成功した。本手法により、不安定で単離精製に課題のあるイミンを事前に合成・精製することなく、簡便かつ迅速に修飾することが可能となった。また、ワンポット反応により、2 つの機能性部位をペプチドに対して一挙に導入することが可能となった。本手法は、オリゴペプチドを利用した場合にも、簡便かつ高い収率で、2 官能基化された目的物を与えた。

N 末端選択的な 1,3-双極子環化付加反応

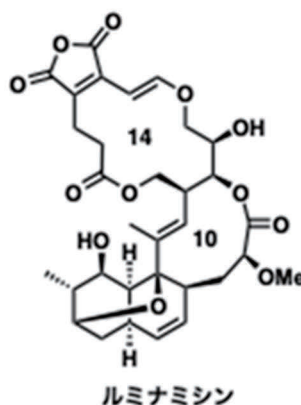


【目的】医療関連感染症の原因菌として最も多くみられるのが嫌気性菌であり（10～25%）、その中でも *Clostridioides difficile* (*C. difficile*) が原因で発症する抗菌薬関連腸炎や偽膜性大腸炎などの多様な *Clostridioides difficile* Infection (CDI) が世界的な問題となっている。CDI の深刻な問題として、重症化による死亡例はもちろん、その高い再発率が挙げられる。事実、CDI 患者の 20～35% は一度目の抗菌薬投与では完治することがなく、そのうちの 40～60% に症状の再燃が起きている。その様な背景のもと、大村智記念研究所で 1985 年に、放線菌 *Streptomyces* sp. OMR-59 株の培養液から嫌気性菌に対し選択的な抗菌活性を示す 10 員環、14 員環を有するマクロライド化合物ルミナミシンが見出された（下図）。ルミナミシンは嫌気性菌に対して選択的な抗菌活性を示す特徴を有している。実際に、臨床分離 *C. difficile* 株を用いた評価によると、MIC (minimum inhibitory concentration) = 0.25～2 μ g/mL であることが分かり、既存薬である vancomycin (MIC=0.5～2 μ g/mL) と同等の抗菌活性を示すことが明らかとなった。さらに、ルミナミシンは当研究所が有するハムスター *C. difficile* 感染モデルの系において、既存薬のバンコマイシンより優れた治療効果を示すことが明らかになっている。以上のように、ルミナミシンは既存薬とは異なる抗菌スペクトルと特徴的な構造を有することから新規作用機序を有することが期待される。しかしながら、その高い抗感染症薬としての潜在能力にも関わらず、ルミナミシンの抗菌活性メカニズムは明らかになっていない。そこで、本研究では新規抗感染症薬の創製を目指し、ルミナミシンの抗嫌気性菌活性の作用機序解明を目的に研究を行う。

【方法】まず *Streptomyces* sp. を培養し、天然物ルミナミシンを取得した。そして、作用機構解明に向けて、野生株 *C. difficile* (ATCC BAA-1382 strain 630) に対し、繰り返しルミナミシンで薬剤処理後、継代培養することでルミナミシン耐性株を取得した。そして、それぞれの株の total DNA を抽出し、変異点解析を行った。耐性化に必要な因子を解析し、標的分子の絞り込みを行った。さらに、天然物から新規誘導体を合成し、臨床分離株を含む 27 種類の病原体に対する抗菌活性を評価した。

【結果】野生株と取得したルミナミシン耐性株の total DNA を抽出し、変異点解析を行った結果、RNA polymerase に関わる遺伝子には変異が見られなかったことから、既存薬であるフィダキソマイシンとは異なる作用機序であると推測された。また、CwpV という細胞壁のタンパク質の可変部位をコードする遺伝子が欠損し、機能未知のタンパクをコードする遺伝子部分に変異していることがわかった。誘導体合成と活性評価の結果、ルミナミシン全体が活性発現に重要であり、特に無水マレイン酸、エノールエーテルといった高い求電子性官能基が活性に重要であることがわかった。その中でも、プロパルギルアミンを導入したマレインイミド体は嫌気性菌である *C. perfringens* に 1.0 mg/mL で活性を示した。本化合物はケミカルプローブとして活用できるため、今後の結合タンパクの同定に大きな知見を得ることができた。

放線菌由来マクロライドルミナミシンの構造

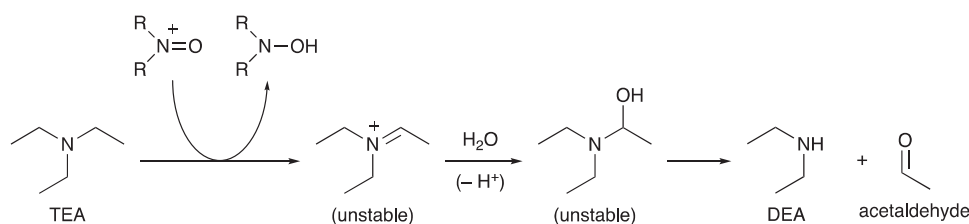
*Streptomyces* sp. OMR-59

【目的】 2,2,6,6-テトラメチルピペリジン *N*-オキシド (TEMPO) に代表される *N,N*-ジアルキルニトロキシルラジカルは、特異な酸化還元活性を示す。現在までに、ニトロキシルラジカルやその一電子酸化活性種であるオキソアンモニウム塩を用いた触媒的酸化反応が数多く報告されているが、ニトロキシルラジカルやオキソアンモニウム塩を用いた第三級アミンの酸化反応はほとんど研究されていない。近年我々は、ニトロキシルラジカルによる触媒的電解酸化を活用した、さまざまな基質の電気化学分析の研究を行う過程で、興味深いことに、ニトロキシルラジカルが第一級および第二級アミンだけでなく、第三級アミンを基質とした場合においても有意な酸化電流を示すことを見出した。この結果は、ニトロキシルラジカルが触媒的に第三級アミンを酸化したことを示唆している。そこで、本反応の詳細の解明とその合成化学的な有用性の開拓を目的として、本研究を実施した。

【方法】 我々は、キャピラリー電気泳動 - 質量分析 (CE-MS) がオキソアンモニウム種と第三級アミンの反応性を調べる手段として適していると考えた。CE-MS は、電気泳動による分離と質量分析による分子同定に基づく包括的な化学プロファイルを提供することができ、メタボローム解析に応用されている。オキソアンモニウム種と第三級アミンの反応を CE-MS で詳細に分析する場合、酸化生成物の量が問題になる。今回解決したい疑問、すなわち「オキソアンモニウム種と第三級アミンはどのように反応するのか」という疑問に対する答えを得るためには、第三級アミンと化学量論量の単離したオキソアンモニウム塩との反応混合物 CE-MS で迅速にモニターすることが最も適したアプローチであると考えた。CV と CE-MS の結果を相関させるのに適した試薬として、5-フルオロ-2-アザアダマンタン *N*-オキシド (5-F-AZADO) と、対応するオキソアンモニウム塩を選定した。

【結果】 5-F-AZADO および対応するオキソアンモニウム塩とトリエチルアミン (TEA) との反応の、CV および CE-MS による分析から、5-F-AZADO が触媒的に TEA を酸化し、酸化的脱アルキル化を惹起してジエチルアミン (DEA) を定量的に生成することが示された。また、本反応の合成化学的有用性は、トリ-*n*-ブチルアミンと AZADO 由来のオキソアンモニウム塩の反応によって、保護されたジ-*n*-ブチルアミンを単離することで実証された。

オキソアンモニウム種を活性種とする第三級アミンの酸化的脱アルキル化



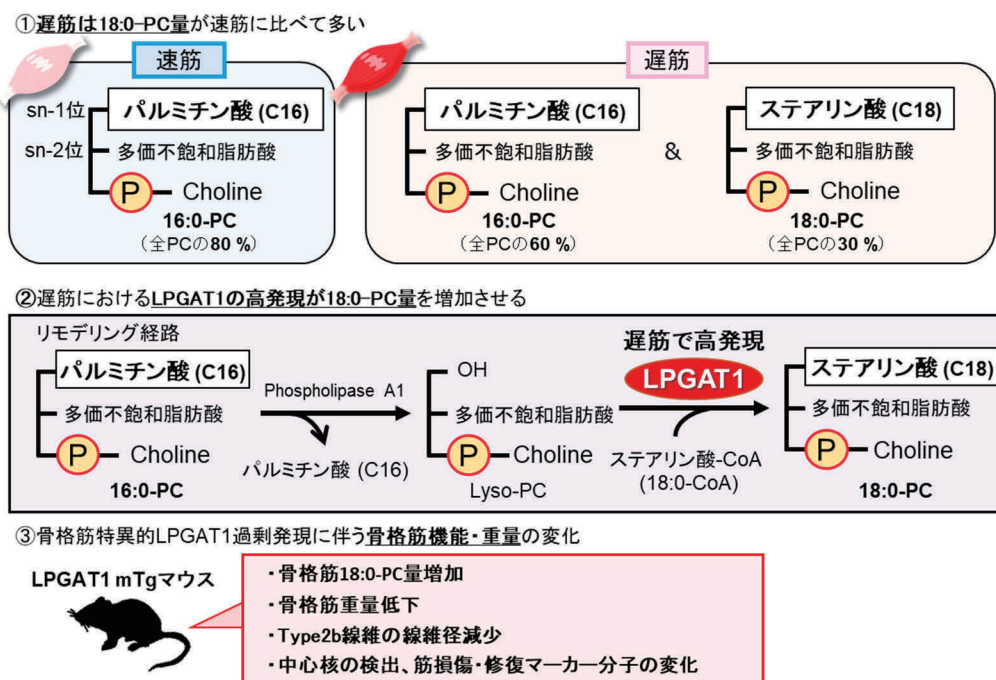
104 骨格筋膜リン脂質組成が骨格筋重量と機能を制御する 佐藤 友紀

【目的】筋線維は収縮特性の異なる速筋線維と遅筋線維に大別される。一方、生体膜の主な構成分子である phosphatidylcholine (PC) は、グリセロール骨格に2つの脂肪酸が結合するため、結合する脂肪酸の種類と組み合わせによって多種多様な分子種が形成される。筆者らはこれまでに、マウス骨格筋に存在する全 phosphatidylcholine (PC) 分子種のうち、速筋では1-palmitoyl型PC (16:0-PC) が約80%であるのに対し、遅筋では16:0-PCが60%、1-stearoyl型PC (18:0-PC) が30%存在することを見出した。加えて、この違いを生み出す責任酵素としてアシル基転移酵素LPGAT1を見出した。しかし、LPGAT1による18:0-PC形成が骨格筋機能に及ぼす影響は不明である。そこで本研究では、骨格筋特異的LPGAT1過剰発現(LPGAT1 mTg)マウスを作出し、骨格筋性状および筋機能変化を評価した。

【方法】LPGAT1 mTgマウスおよび野生型(WT)マウスの前脛骨筋(TA)、長趾伸筋(EDL)およびヒラメ筋(soleus)を採取し、凍結切片を作製した。免疫染色法で骨格筋線維タイプ別に染め分け、線維タイプ割合および筋断面積を測定した。加えて、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色によって組織学的評価を行った。タンパク質発現量変化の網羅的探索はプロテオミクス解析によって測定した。

【結果】LPGAT1 mTgマウスのEDL、soleusの筋線維タイプ割合はWTマウスと同様であった。一方で、EDLに存在する速筋線維であるType IIb線維の筋断面積がWTマウスに比して減少していた。TAの組織学的評価の結果、LPGAT1 mTgマウスの筋線維では中心核を含む線維が多く観察された。プロテオミクス解析結果よりEDL、soleusともにLPGAT1の過剰発現に伴い1,000を超えるタンパク質分子の発現量が有意に変化していた。その中でもEDLにおいて筋損傷・再生マーカーであるMyozタンパク質分子の発現量が有意に減少していた。LPGAT1 mTgマウスでは骨格筋における18:0-PC量の増加に伴い、速筋優位な筋線維(Type IIb線維)において筋横断面積が減少した。また、中心核を含む筋線維が多く観察されたこと、筋損傷・再生マーカーであるMyozタンパク質分子の発現量が有意に減少していたことから、LPGAT1過剰発現に伴うリン脂質クオリティの変化が骨格筋恒常性の維持に重要であることが示唆された。

LPGAT1 過剰発現マウスで観察された 18:0-PC 増加に伴う筋性状の変化

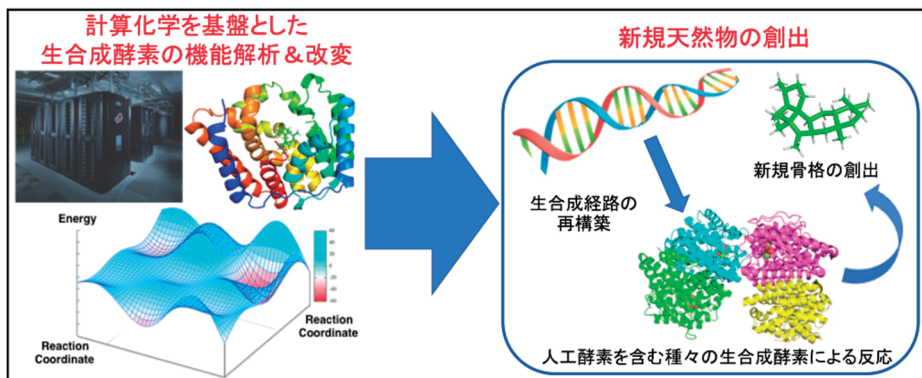


【目的】 人類が生活していく上で必要な「衣・食・住」は、植物や微生物が作り出す天然有機化合物（以下、天然物）に支えられている。例えば、カイコが生産するフィブロイン（ポリペプチド）は絹として使われ、植物の生産する天然ゴムはタイヤなど様々な工業製品に使われている。さらに、植物や菌類によって生産されるテルペン化合物は、医薬品、接着剤、プラスチックの改質剤、香料、洗浄剤、電子材料等、あらゆる分野の製品に応用されており、社会の基盤を支えている。そのため、新奇天然物の発見は衣食住の充実や新規材料の開発に直結する。しかし、天然資源の枯渇が問題となっている現代において、新奇天然物の発見やその安定供給は困難となっており、化学者に知恵と打開策が求められている。天然物化学・生合成研究の新たなチャレンジ：20世紀に入り、バイオテクノロジーの進歩と相まって様々な天然物の生合成遺伝子・酵素が発見された。さらに近年、人工的に生合成経路を再構築する合成生物学的手法が注目を集めている。植物など成長の遅い生物種の生合成遺伝子を大腸菌などに導入（異種発現）することにより、大量かつ安定的に天然物の安定供給が行えると期待されている。しかし、新奇天然物の効率的創出法は未だ存在しない。これは、従来の実験科学を主とする研究手法では酵素反応機構や基質認識メカニズムを完全に解明することが困難であることが大きな要因であり、このことが生合成遺伝子の二次利用を阻んでいる。そこで本研究では、理論と実験の両輪により、酵素反応機構を明らかにし、天然物がどのようにして構造多様性を創出しているのかを明らかにすることを目的とした。

【方法】 すべての計算は、Gaussian 16 パッケージを使用して行った。構造最適化は、M06-2X/6-31+G (d,p) を用いて行った。最適化と同じ計算レベルでの振動数計算を行い、すべての中間体が虚振動を持たないこと、各遷移状態が単一の虚振動を持つことを確認した。すべての遷移状態の IRC (Intrinsic Reaction Coordinate : 固有反応座標) 計算は、Gaussian 16 に基づく GRRM17 で実施した。

【結果】 本研究課題では、spiroalbatene、scalarane、peniroquesine という 3 種のテルペン化合物の生合成反応機構を、計算化学的手法を用いることにより解析した。Spiroalbatene 生合成では、cyclopropylcarbiny cation という非古典的カチオン種が中間体として存在することが予想されていた。しかし、計算の結果そのような非古典的カチオン種は生成しないことが明らかとなった。また、詳細な解析の結果、その制御がどのように行われているのかについて明らかにすることが出来た。Scalarane 型セスタテルペノイドの生合成反応機構解析では、ステロイド骨格における 7 員環生成機構のメカニズムを明らかにした。遠隔位に存在する Me 基によって協奏性と活性化エネルギーが制御されていることも明らかにした。また、peniroquesine 生合成では、複雑な骨格転位反応のメカニズムについて明らかにすることが出来た。

計算化学を用いた天然物生合成機構の解明

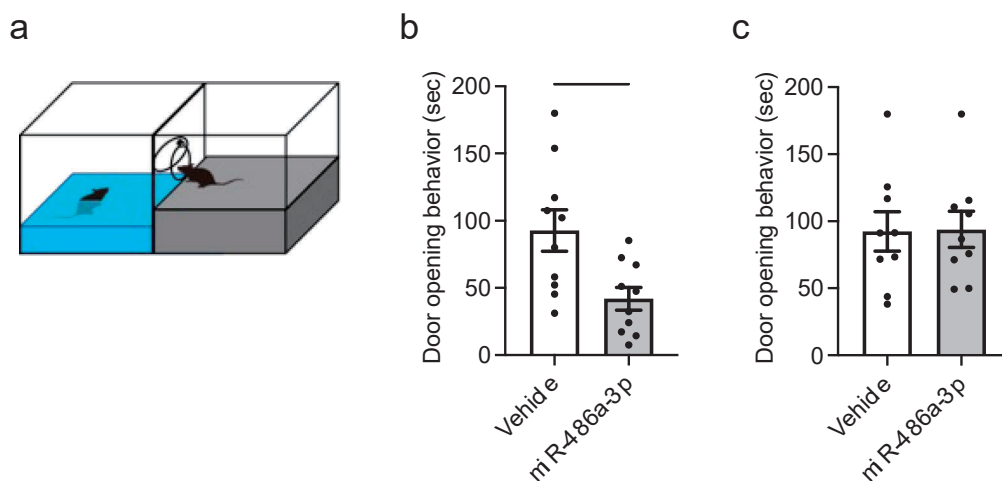


【目的】 他者との関係構築・円滑化において、情動理解に関わる機能である「共感性」が不可欠である。これまでに、共感性を高める分子としてオキシトシンが想定されているが、その臨床応用には課題が残っている。近年、脳由来神経栄養因子 (BDNF) が、オキシトシンと同様に共感性と関連することや、脳内の BDNF 発現を高めるような習慣的な軽運動が共感性を高めることが示された。特に、この軽運動を通じた共感性の向上に伴い島皮質内で高まる miR-486a-3p は、共感性の指標として評価された救助行動と有意な相関関係を示し、BDNF 発現の制御に関わりうる。そこで本研究では、miR-486a-3p mimic の腹腔もしくは島皮質局所への慢性的な投与が、マウスの共感性の指標となる救助行動の表出に及ぼす影響を評価し、miR-486a-3p が軽運動効果を模倣するかどうか検討する。

【方法】 8 週齢の C57BL/6J マウスを、1 週間の予備飼育後に miR-486a-3p mimic 投与群と溶媒投与群に二分した。miR-486a-3p mimic もしくは溶媒を、腹腔内 (8.0 nmol/kg B.W., 1 回/日) もしくは島皮質局所 (0.8 nM, 0.5 μ L/h) に 2 週間慢性的に投与した。その後、救助行動試験 (下図 a) を全てのマウスに課した。

【結果】 2 週間の miR-486a-3p mimic 腹腔内投与により、健康なマウスの救助行動の表出が有意に早まった ($p < 0.01$) (下図 b)。一方で、島皮質局所への 2 週間の慢性的な miR-486a-3p mimic 投与は、マウスの救助行動の表出に変化をもたらさなかった ($p = 0.945$) (下図 c)。

miR-486a-3p 投与による救助行動の変化

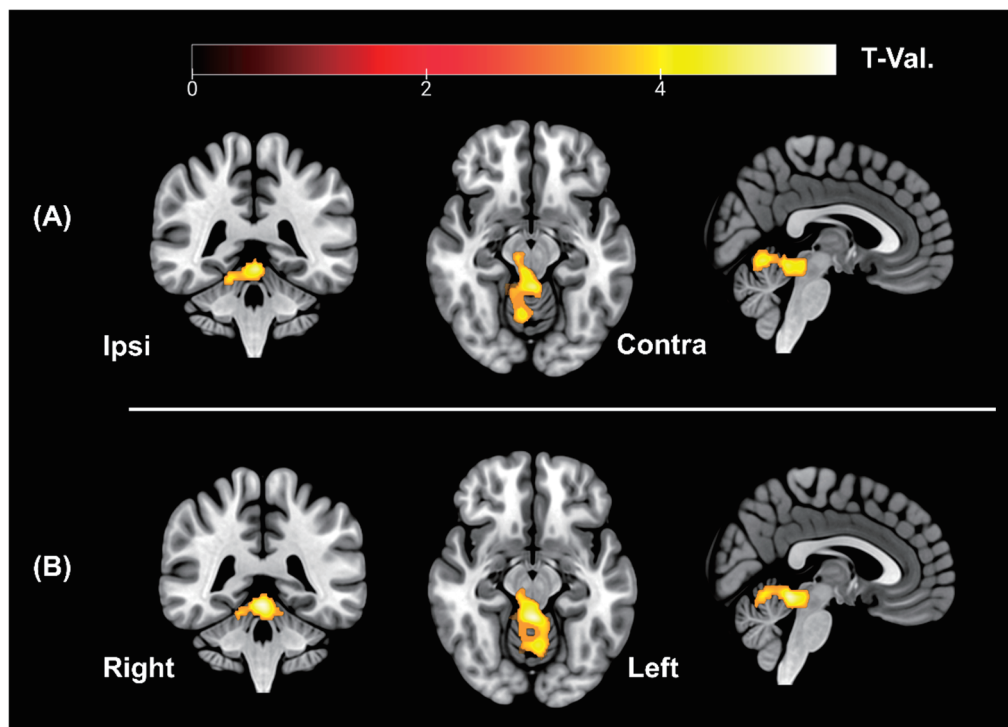


【目的】本研究の目的は、近年重要性を増している多モダリティの脳画像を解析し、てんかんの病態生理を深め、予防や実臨床に応用可能な指標の構築を試みることである。特に、近年進歩の著しい人工知能を用いた機械学習解析では、multimodal イメージングから得られる情報を最適化して用いることができる可能性がある。これらの解析を、特に難治性てんかんの病態把握や合併症のバイオマーカー確立に役立てることを目的として研究を行った。

【方法】まず精神病症状のバイオマーカー確立を目指し、発作間欠期精神病のある側頭葉てんかん患者 13 名、精神症状のない側頭葉てんかん患者 21 名の 18F-FDG-PET 画像を Statistical Parametric Mapping (SPM) 12 を用いて標準化し、群間比較を行った。次に、機械学習による新たな解析について、白質繊維のダメージに注目し、拡散テンソル画像を用いて解析を行った。257 名のてんかん群および 429 名の健常群を解析し、機械学習による脳年齢予測モデルを作成、白質繊維に基づく脳年齢解析を行った。また、212 名の焦点てんかん群における白質ダメージの経時的進行パターンについて、Subtype and Stage inference (SuStaIn) アルゴリズムによる機械学習を用いて解析を行った。

【結果】精神病症状を伴う側頭葉てんかんでは、小脳上部から上小脳脚・中脳にかけて糖代謝亢進が見られた。白質の脳年齢解析では、視覚的病変の無い側頭葉てんかんや側頭葉外てんかんで 4~5 年、海馬硬化を伴う側頭葉てんかんで 9.1 年の脳年齢上昇が起こっており、既報の脳形態画像に基づく解析結果が再現されたが、特発性全般てんかん群では有意な上昇を認めない点が過去の解析結果と異なっていた。焦点てんかんにおける白質ダメージの経時的進行のモデルについては、forceps と superior longitudinal fasciculus (SLF) が最初に障害され、その後、anterior thalamic radiations (ATR)、cingulum、inferior fronto-occipital fasciculus (IFOF)、uncinate fasciculus (UF) が障害されるモデルが算出された。

発作間欠期精神病を伴う側頭葉てんかんにおける上部小脳の糖代謝亢進所見
(Sone D, et al. Epilepsia Open 2022.)



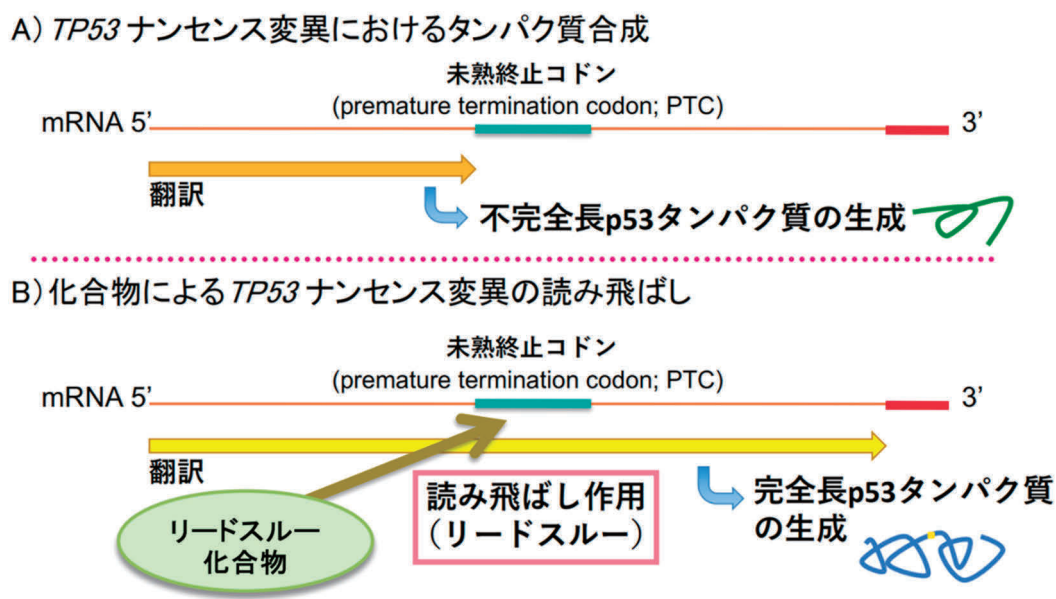
108	リードスルー作用に着目したがん化学療法剤の開発	田口 晃弘
-----	-------------------------	-------

【目的】 遺伝性疾患の約 20%はナンセンス変異により、病因となるタンパク質をコードする構造遺伝子上に未熟終止コドン (Premature Termination Codon : PTC) が遺伝的に生じることで、PTC で翻訳が停止する。そのため、機能を持つ完全長タンパク質が産生されず、疾患を発症する。このようなナンセンス変異型遺伝性疾患は約 2,000 種あると考えられており、その一つに「がん」が挙げられる。ヒトで発生するがんの 50%以上はがん抑制遺伝子 *TP53* の変異によるものであり、その内 10%がナンセンス変異に起因する。現在、ナンセンス変異に起因する遺伝性疾患に対する新規治療法候補として、リードスルー薬が注目されている。本剤は、翻訳段階で PTC を読み飛ばす作用 (リードスルー作用) を有し、完全長タンパク質を発現させることができる。当該活性を有する化合物として、アミノグリコシド系抗生物質が知られており、近年 *TP53* 遺伝子中にナンセンス変異を有するがん細胞に対して p53 タンパク質発現量を増大させる活性を示すことが報告された。しかし、当該化合物は耳・腎毒性といった副作用の観点から長期投与は困難であると考えられる。一方で、我々は、リードスルー化合物であるネガマイシンを基盤とした遺伝性疾患治療薬の開発を精力的に行い、複数の高活性を有する誘導体の獲得に成功している。そこで、ネガマイシン誘導体による *TP53* ナンセンス変異を標的としたがん化学療法剤の創製を目指した。

【方法】 *TP53* ナンセンス変異に対するネガマイシン誘導体のリードスルー活性を *in vitro* レポーターアッセイにより評価した。ネガマイシン誘導体を、*TP53* ナンセンス変異を有する小細胞肺癌細胞 (DMS-114 細胞) に添加し、完全長 p53 タンパク質の発現をウェスタンブロッティングにより解析した。また、ネガマイシン誘導体の同がん細胞に対する細胞増殖抑制活性を WST -1 により評価した。

【結果】 *in vitro* レポーターアッセイにより複数のネガマイシン誘導体において、*TP53* ナンセンス変異に対するリードスルー活性が認められた。また、DMS-114 細胞において、ネガマイシン誘導体のリードスルー作用により完全長 p53 タンパク質の発現が確認された。さらに、ネガマイシン誘導体は当該細胞に対し、比較的高い細胞増殖抑制活性を示した。従って、ネガマイシン誘導体は *TP53* ナンセンス変異のリードスルー作用に基づく、がん化学療法剤となりうると考えられる。

リードスルー化合物による *TP53* ナンセンス変異の読み飛ばし

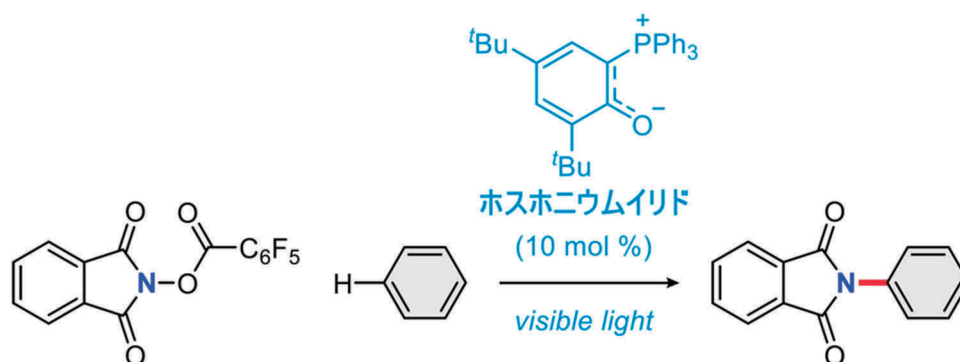


【目的】 芳香族アミンやヘテロ芳香族アミンは、医薬品、農薬、有機材料などに広く用いられる重要な化合物である。芳香族化合物の直接的な C-H アミノ化反応は、ハロゲン化アリールを必要としない魅力的な方法であり、その一つとしてフタルイミジルラジカルを利用する芳香族化合物の C-H イミド化反応が知られている。一方、近年、可視光レドックス触媒を利用した有機合成反応が盛んに研究されており、C-H イミド化反応においても Ir (III) 錯体を用いた例が報告されている。同反応はレドックス活性エステル *N*-アシロキシフタルイミドをフタルイミジルラジカル前駆体として用いる必要があるものの、可視光照射という穏やかな条件で進行する。当研究室でも最近、独自に開発したホスホニウムイリドを有機光レドックス触媒として用いることにより、同 C-H イミド化反応が可視光照射下で進行することを明らかにした。しかし、これらの反応では *N*-アシロキシフタルイミドに対して大過剰の芳香族化合物を使用しており、改善の余地が残されていた。そこで本研究では、ホスホニウムイリド触媒の改良による C-H イミド化反応の高効率化を目指した。

【方法】 まずメシチレンの C-H イミド化をモデル反応として、触媒のスクリーニングを行った。次に電子豊富芳香族化合物や電子不足芳香族化合物、ピリジン類、ピロール類、イミダゾール類などの含窒素ヘテロ芳香族化合物を中心に本反応を検討し、基質適用範囲を調査した。さらにサイクリックボルタンメトリー測定、蛍光スペクトル測定、蛍光消光実験、TEMPO を用いるラジカル中間体の捕捉実験を行い、反応機構を解析した。

【結果】 C-H イミド化反応は、10 mol% のホスホニウムイリド存在下、イミド化剤に対して 2.0 当量のメシチレンを用い、アセトニトリル中、25°C で 24 時間、青色 LED ランプにより可視光照射する条件で行った。その結果、反応は円滑に進行し、目的の C-H イミド化体が良好な収率で得られることを明らかにした。基質適用範囲を調べたところ、電子豊富芳香族化合物を用いた場合に電子不足芳香族化合物よりも収率が高くなる傾向が認められた。含窒素ヘテロ芳香族化合物に関しては、ピリジン類では 3 位選択的なイミド化反応が進行し、ピロール類では 2 位選択的なイミド化反応が進行することを明らかにした。イミダゾール類も適用可能であり、対応するイミド化体が得られることを明らかにした。続いて、反応機構に関する知見を得るために、ホスホニウムイリドのサイクリックボルタンメトリー測定、蛍光スペクトル測定、Stern-Volmer 蛍光消光実験を行った。各種測定および実験の結果から、ホスホニウムイリドからイミド化剤への電子移動は、光励起状態のホスホニウムイリドから発エルゴニックに進行することがわかった。さらにラジカル中間体の捕捉実験によって光誘起電子移動反応を示唆する結果を得ることができ、ホスホニウムイリドの酸化的消光を利用した可視光レドックス触媒系を構築することに成功した。

ホスホニウムイリドを可視光レドックス触媒として用いる芳香族化合物の C-H イミド化反応

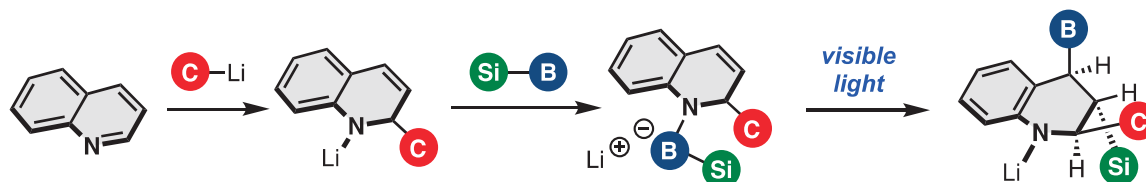


【目的】 有機ホウ素・ケイ素化合物は主に機能性材料の分野で利用されており、分子内に共役系を有する平面性の高い2次元化合物が求められていた。こうした2次元化合物は、 sp^2 炭素におけるクロスカップリング反応によって容易に合成・変換でき、多彩な分子が存在する。一方で近年では、ホウ素やケイ素を含む医薬品の承認や臨床開発などを皮切りに、創薬の観点においても有機ホウ素・ケイ素化合物が注目され始め、従来の医薬品をこれまでとは異なる方向へ多様化させると期待されている。また、ホウ素やケイ素官能基は他の多様な官能基へ変換できることから、有機ホウ素・ケイ素化合物は医薬品探索における合成プラットフォームとしても有用である。そのため、3次元の分子骨格を有する有機ホウ素・ケイ素化合物が求められるようになってきた。しかし、 sp^3 炭素で構成される3次元化合物は反応性が低いため、3次元分子を出発原料として網羅的な合成や誘導化を行うことは難しく、医薬品候補化合物の探索を妨げてきた。一方、多彩に存在する2次元分子から3次元分子を直接合成する(脱芳香族化反応)ことができれば、より多様な3次元化合物を直接的に合成できるが、ホウ素やケイ素を脱芳香族的に導入する反応例はほとんど存在しなかった。そこで私たちは、2次元化合物に対してホウ素・ケイ素を導入しながら3次元化させる魅力的な分子変換法を開発することを目指し、研究に着手した。

【方法】 代表的なヘテロ芳香族2次元化合物であるキノリンを対象に研究を開始した。研究グループはこれまでに、ホウ素-ホウ素結合を有するジボロン(B-B)と呼ばれる試薬と炭素アニオンを組み合わせることで、光エネルギーを利用した有機ホウ素化合物の合成法を報告している。この手法をシリルボラン(Si-B)に応用することを考えた。キノリンに対して、アルキルリチウムとシリルボラン(Si-B)を作用させ、シリルホウ素アート錯体中間体を経由する反応を設計した。このケイ素-ホウ素結合を選択的に活性化することで、キノリンへの脱芳香族的な炭素・ホウ素・ケイ素化反応が進行する反応条件を探索した。

【結果】 暗所下での加熱条件や、波長の短い紫外光を用いた場合、反応が進行しないまたは複雑化する結果となった。これは、キノリン骨格自体も活性化されてしまうため、望まない副反応が起きてしまったのだと考えられる。そこで、より温和な条件である可視光によってSi-B結合を選択的に光励起できないか検討した結果、青色光を用いると円滑に反応が進行することを見出した。基質一般性を調べた結果、20を超える基質に適用可能であり、幅広い2-アルキル-3-シリル-4-ボリル-1,2,3,4-テトラヒドロキノリンの合成を可能にした。さらに、合成した2-アルキル-3-シリル-4-ボリル-1,2,3,4-テトラヒドロキノリンのホウ素官能基やケイ素官能基を変換することで、本分子が医薬品探索における合成プラットフォームとして利用できるか検討を行った。その結果、水酸基やエーテル、アルキル基などの幅広い官能基へと変換可能であることを見出し、多様な1,2,3,4-テトラヒドロキノリンを簡便かつ網羅的に合成できるプラットフォームとなることが確認された。今後、本反応を利用することで、医薬品の探索研究が大きく加速化されることを期待する。

2次元化合物キノリンからの脱芳香族的なカルボーシリルホウ素化反応による3次元化合物の合成

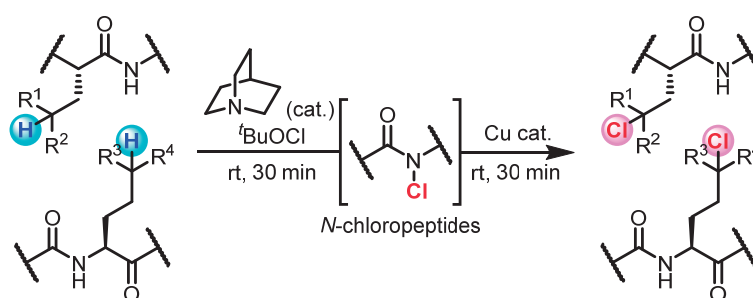


【目的】 ペプチドは中分子創薬における一大モダリティとして近年大きな注目を集めており、ペプチド化合物の多彩な誘導体を供給できる化学合成法の実現は重要な研究課題である。その中でも、構築済みのペプチド鎖に対する直接的な化学変換が実現されれば、既に手元にある親化合物を基に迅速な誘導体供給が可能となるため、比較的制御しやすい高反応性官能基を有するアミノ酸側鎖の変換を中心に最近精力的に取り組まれてきた。一方で、脂肪鎖で構成される疎水性ペプチド側鎖は反応のための足掛かりに乏しく、そのような側鎖を標的とする化学修飾法は未だ限られているのが現状である。このような背景の下、筆者らはアミノ酸残基の種類に依らないペプチド化合物の化学修飾法の実現を目指して研究に着手し、ペプチドの *N*-クロロ化を経由する手法を考案した。第二級アミドはペプチド化合物において主鎖を構成する主要な官能基と言えるが、その低い反応性のために、これまで有力な反応点としてはあまりみなされていなかった。一方で筆者らは、ペプチド主鎖を構成するアミドでも温和な条件下円滑に反応する触媒的 *N*-クロロ化条件を新たに見出しており、生じた *N*-クロロペプチドの高い反応性を利用した側鎖 C-H 官能基化法の実現を目指し、研究に着手した。

【方法】 *N*-クロロ化されたペプチドを用いて、銅触媒を用いた反応条件を中心に種々検討し、ペプチド側鎖 C-H 結合が円滑にクロロ化される条件を探索した。また、様々なアミノ酸残基を有するジペプチドに対する反応を検討し、本 C-H クロロ化の適用範囲を調査した。加えて、本法で合成された側鎖クロロ化ペプチドの誘導体化を行い、ペプチド化合物合成におけるビルディングブロックとしての有用性を検証した。

【結果】 簡便に調製可能な *N*-クロロペプチドを触媒量のヨウ化銅と 4,7-ジフェニル-1,10-フェナントロリン、1 当量のアスコルビン酸ナトリウム存在下、1,2-ジクロロエタン中室温で攪拌することで、 γ 位もしくは δ 位が位置特異的にクロロ化されたペプチド 2 が高収率で得られることを見出した。本法は第一級、第二級、第三級を問わず、様々なペプチド側鎖の C (sp^3) -H 結合のクロロ化に利用可能で、極性官能基や電子豊富な芳香環を含むペプチドでも円滑に反応が進行した。また、得られた側鎖クロロ化ペプチドは N 末端、C 末端ともに脱保護可能で、C-Cl 結合を損なうことなくペプチド伸長が可能であった。一方で、適切な反応条件に付すことで C-Cl 結合の求核置換反応は良好に進行し、様々な有用置換基に変換可能であることも示された。

N-クロロペプチドを経由するペプチド側鎖の γ 、 δ 位選択的 C-H クロロ化



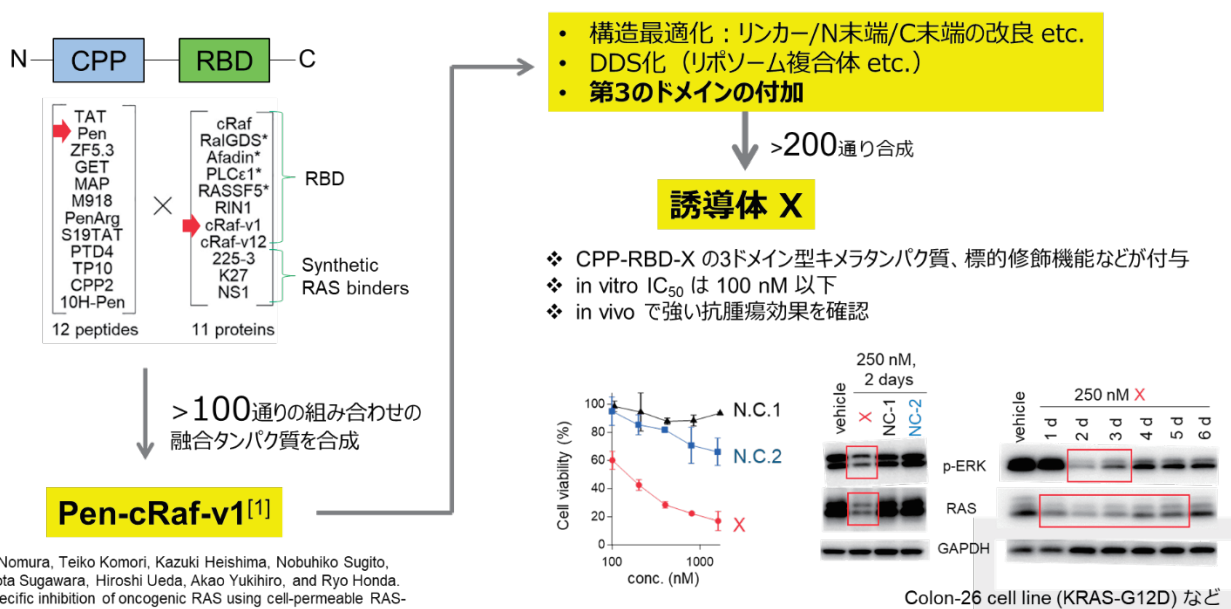
112 KRASを標的とする細胞膜透過性タンパク質の開発 本田 諒

【目的】 KRAS は約 30%のがんで活性型に変異しているため、KRAS を標的とする分子標的薬は革新的な抗がん剤となることが期待されている。2021 年には G12C 変異型 KRAS を阻害する sotorasib が FDA で認可され大きな注目を集めたが、非 G12C 変異型の KRAS にはいまだ有効な阻害剤はないのが現状である。本研究ではキメラ型の細胞膜透過性タンパク質に着目することで、非 G12C 変異型 KRAS 阻害剤が開発できないかを検討した。具体的には、複数のタンパク質のドメインの組み合わせを検討し、できたキメラタンパク質の細胞内へのデリバリー方法を検討することで、新規 KRAS 阻害剤の開発を試みた。

【方法】 これまでの著者らの研究において、RAS 結合ドメイン (RAS-binding domain : RBD) と細胞膜透過性ペプチド (Cell-permeable peptide : CPP) が融合した新規 KRAS 阻害剤 Pen-cRaf-v1 を見出している。本研究では Pen-cRaf-v1 をリードとし、構造最適化、Drug Delivery system (DDS) 化、第 3 のドメインの付加の 3 系統での合成展開を試みた。200 個以上の候補タンパク質を遺伝子組換え大腸菌を用いて合成し、細胞モデルでスクリーニングを実施し、活性を示した誘導体は syngeneic mouse model で評価した。

【結果】 合成展開の結果得られた誘導体 X は、細胞モデルでは IC₅₀ が 100 nM 以下で、RAS シグナル依存的な細胞死を誘導した。リードとなる Pen-cRaf-v1 と比較すると活性は 100 倍近く向上した。マウスモデルでも活性が認められ、投与期間中は腫瘍の成長を完全に抑制した。副作用に関しては、体重減少は認められなかったが、1~2 週間の連日投与直後にショック様の症状が認められた。マウスモデルにおいて分子生物学的な効果としては RAS の修飾と RAS シグナル経路の抑制が認められたが、組織形態学的には炎症性サイトカインの関与を想起させる急速な出血性壊死の発現が認められた。

新規 RAS 阻害剤 Pen-cRaf-v1 と誘導体 X の開発過程



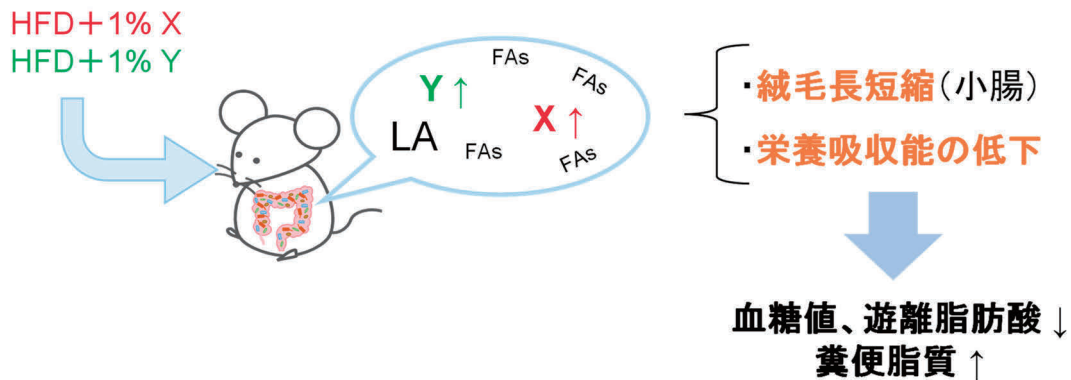
[1] Nomura, Teiko Komori, Kazuki Heishima, Nobuhiko Sugito, Ryota Sugawara, Hiroshi Ueda, Akao Yukihiro, and Ryo Honda. "Specific inhibition of oncogenic RAS using cell-permeable RAS-binding domains." *Cell Chemical Biology* 28, no. 11 (2021): 1581-1589.

【目的】 近年の食の欧米化に伴う食用油の摂取バランスの破綻が生体のエネルギー代謝破綻と腸内細菌へ影響を及ぼすことが示唆されており、これまでの検討で食用油を構成する長鎖脂肪酸を基質とした腸内細菌代謝物群が脂肪酸受容体に対して高い親和性を示す結果、腸内分泌系を介した抗肥満作用を示すことを明らかにした (Miyamoto et al., Nature commun. 2019)。その過程で、生体における肥満症状と負に相関を示す特定の腸内細菌代謝物群を明らかにしている。これらは、構造上では非常に類似しているにも関わらず、既存の脂肪酸受容体に対して全く活性を示さずに、生体内においては非常に高濃度に存在していることから、肥満症状を悪化させる因子、もしくは肥満に関与する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、肥満症状と負に相関する新規の腸内細菌代謝物群の生理的意義を明らかにすることを目的とする。

【方法】 7週齢の C57BL/6J オスマウスに、新規代謝脂肪酸 (X もしくは Y) を高脂肪食に含有させた試験食を1ヶ月間負荷した。負荷期間終了後、肥満症状、血液生化学変化や小腸における病理解析を検討した。

【結果】 新規代謝脂肪酸を負荷した群は、高脂肪食負荷群と比較して体重や組織重量に顕著な影響を及ぼさなかった一方、血糖値や血中遊離脂肪酸などが低値を示した。さらに、小腸における病理解析を検討した結果、高脂肪食負荷群と比較して新規代謝脂肪酸負荷群は絨毛の短縮に伴う糞便中 TGs の増加が観察された。

新規代謝脂肪酸の生体へ及ぼす影響

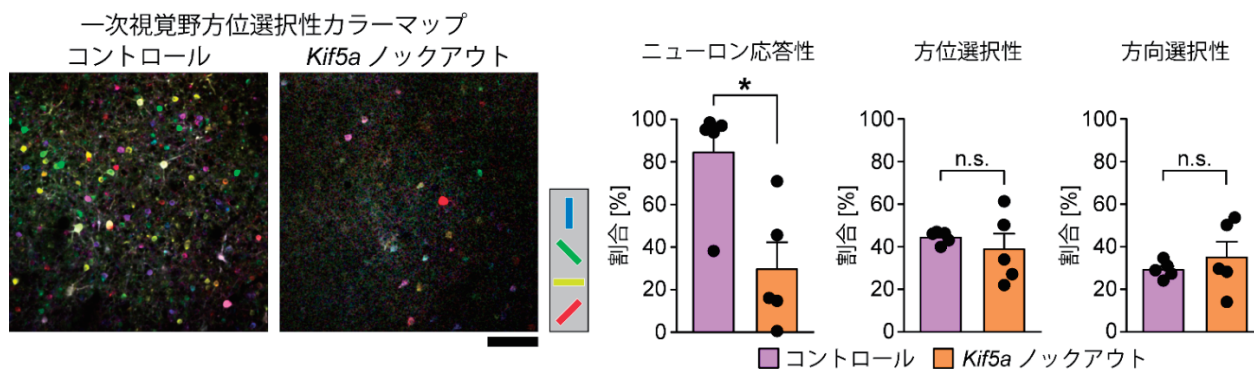


【目的】 神経細胞から分岐し伸びる樹状突起は、ひとつの構造体として数百から数千にもものぼる他の軸索終末からのシナプス伝達を受け取り、複数のポストシナプス構造やタンパク質組成を変化させることで認知・情動・感覚情報処理などの高次的機能を支える役割を担っていることが知られている。このように樹状突起は多数のシナプス伝達を受け取ることで神経回路における情報のハブとしての役割を担っているとされているが、情報処理に際しての突起内における詳細な分子メカニズムについてはいまだ不明な部分が多い。そこで本研究では、樹状突起内においてシナプス伝達に重要なグルタミン酸受容体を輸送するキネシン分子モーター-KIF5A に着目して、マウス視覚野内に存在する樹状突起内の分子メカニズムの詳細を解明するため、主に二光子顕微鏡を用いた Ca^{2+} イメージングによって解析を行った。マウス視覚野には生後 21 日から 35 日までの間に、臨界期と呼ばれる神経可塑性が一過的に高まる時期が存在するが、その期間中の分子モーターによる視覚野ニューロンの可塑性への寄与を解析することで、視覚機能の正常な発達の基盤となる分子メカニズムをより正確に理解できると同時に、成熟した脳における視覚機能発達障害の治療法創出に貢献することができると考えられる。

【方法】 Kif5a-flox マウスと Ca^{2+} イメージングによく用いられる Thy1-GCaMP6s 導入マウスを掛け合わせることでダブルノックインマウスコロニーを形成し、臨界期開始直前の視覚野に Cre 発現アデノ随伴ウイルスを微量注入した。微量注入から 10 日ほど経過した視覚野における分子モーター-KIF5A とその積み荷とされるグルタミン酸受容体についてのタンパク質発現量解析と Ca^{2+} イメージングによる神経活動パターン解析を行った。

【結果】 まず、Cre 発現アデノ随伴ウイルスを微量注入したダブルノックインマウスについてイムノブロッティングによるタンパク質発現量解析を行ったところ、Cre-loxP システムによりマウス視覚野内において KIF5A は著しくその発現量を落としていた。また、輸送タンパク質である KIF5A の積み荷とされるグルタミン酸受容体 GluR1 についても同様にその発現量を落としていた。一方で、KIF5A と同じ kinesin-1 というグループに含まれる KIF5B と、GluR1 とは違う別のサブユニットである GluR2 についてはその発現量に変化は見られなかった。また、神経活動が起こった際に蛍光を発するタンパク質 (GCaMP6s) を用いることで発現量解析と同様に Cre 発現アデノ随伴ウイルスを微量注入したマウスの Ca^{2+} イメージングを行ったところ、ウイルスを注入されたマウスは視覚刺激に対する応答性を減弱させていることがわかった。一方で、観察した視覚野内神経細胞の各活動パターンを詳細に解析したところ、ウイルスを注入されたマウスでも方位選択性あるいは方向選択性を有した神経細胞の数は変化がなかった。これらのことから、分子モーター-KIF5A は樹状突起内において積み荷であるグルタミン酸受容体 GluR1 の発現量を維持する役割を担っており、KIF5A が無くなってしまうと受容体分配が滞ることで視覚機能においては視覚刺激に対する応答性が弱まってしまうことが判明した。

アデノ随伴ウイルスを用いた一次視覚野特異的な *Kif5a* 遺伝子ノックアウトによるニューロン応答性の変化

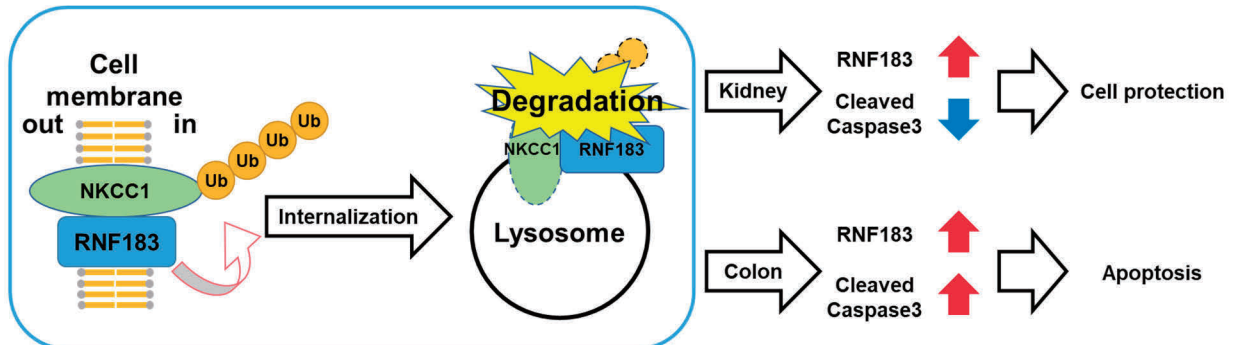


【目的】 炎症性腸疾患（IBD : inflammatory bowel disease）は発症機序が解明されていない難病である。本研究で着目しているユビキチンリガーゼ RNF183 は、腎臓特異的発現を示し、高浸透圧ストレスにより発現誘導されるユニークなユビキチンリガーゼである。IBD 患者の大腸において、本来大腸に発現していない RNF183 の発現が異常に亢進しているということが報告されたため、この大腸での RNF183 の異常発現と IBD の関連性に着目し、高浸透圧ストレスの観点から IBD 発症機序の解明を目指す。また、ゲノム編集技術を駆使した新たなユビキチンリガーゼ研究のモデルの構築にも挑戦する。

【方法】 これまでに RNF183 を過剰発現させた HEK293 細胞を用いて RNF183 の基質タンパク質として同定してきた NKCC1 について、内在性 Rnf183 の発現が確認できている mIMCD 細胞や大腸由来細胞である CaCo2 細胞において検証を行った。また、組織レベルでのユビキチンリガーゼの基質タンパク質の同定法を確立するため、Rnf183 にビオチンリガーゼ BioID2 を融合した BioID2 ノックインマウスの作製を行った。

【結果】 HEK293 細胞を用いた過剰発現系での結果と同様に、mIMCD 細胞、CaCo2 細胞においても RNF183 が NKCC1 を基質タンパク質として認識し、分解を促進することが分かった。また、これまでの研究で、mIMCD 細胞において、*Rnf183* をノックダウンし、高浸透圧条件下で培養したところ、活性型カスパーゼ 3 の増加がみられていたが、本来 RNF183 を発現していない HEK293 細胞においては逆の結果が得られた。これより、IBD 患者の大腸において、RNF183 が異常発現することで活性型カスパーゼ 3 が増加している可能性が示唆された。

RNF183 は NKCC1 のリソソーム分解を促進する



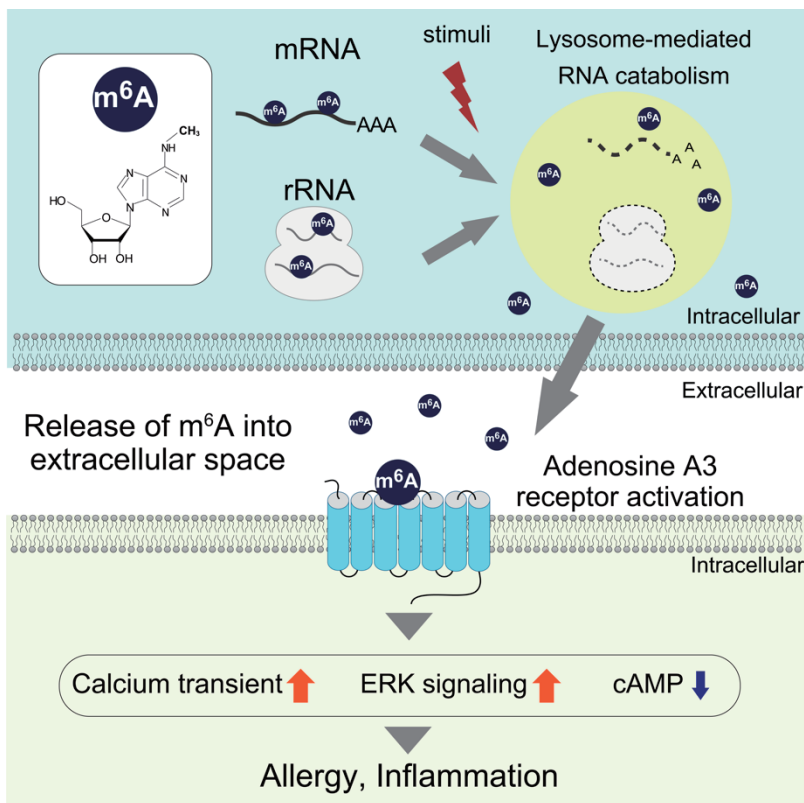
116	RNA修飾の代謝に着目した生体シグナル制御機構の解明	小川 亜希子
-----	----------------------------	--------

【目的】 生体内の液性因子のうち、核酸型液性因子はアデノシンや ATP に集約されており、他の液性因子と比べて多様性が極端に乏しい。近年、RNA には 150 種にも及ぶ多彩な化学修飾が存在することが発見された。RNA 修飾は転写後の遺伝子発現制御を担い、修飾異常が疾患発症原因となることが明らかになりつつあるが、分解後にどのように振る舞い、細胞機能に影響を与えるか不明であった。そこで本研究では RNA 修飾由来の液性因子（修飾ヌクレオシド）の生体内の分布と生理的意義を明らかにすることを目的とした。

【方法】 質量分析により生体中に含まれる RNA 修飾由来の液性因子である修飾ヌクレオシドの分布を網羅的に解析した。次に生体内に存在する修飾ヌクレオシドの受容体スクリーニングを行い、受容体活性化能を検出した。受容体活性化能が検出された修飾ヌクレオシドについて、*in silico* ドッキングモデルで構造解析を行った。受容体下流のシグナル伝達をウエスタンブロットや細胞内カルシウムイメージング法で調べ、細胞モデルと動物モデルでその生理的意義・病的意義を検証した。

【結果】 測定したヌクレオシドの中で、ヒト血清中の 49%、眼房水中の 20%、尿中の 97% が修飾ヌクレオシドであった。ヒト生体内に存在する修飾ヌクレオシドを *shedding* 法で受容体スクリーニングを行った結果、m6A (N6-methyladenosine) がアデノシン A3 受容体に特異的に結合していた。結合能の強さは未修飾アデノシンの約 10 倍も強力であった (m6A : $EC_{50} = 9.8 \text{ nM}$ 、アデノシン : $ED_{50} = 91 \text{ nM}$)。構造解析により、m6A の特異性に関わるアミノ酸残基を同定した。m6A は ERK のリン酸化と細胞内カルシウム濃度上昇を引き起こし、これらのシグナル伝達経路がアデノシン A3 受容体依存的であることを阻害剤投与により確認した。肥満細胞を用いた脱顆粒反応試験と、マウスの PCA (passive cutaneous anaphylaxis) モデルの双方で m6A はアレルギー反応を惹起し、さらにマウスへの m6A 投与により、IL6 や MCP-1 といった炎症性サイトカイン・ケモカインが上昇していた。

RNA 修飾代謝物は新たな液性因子である

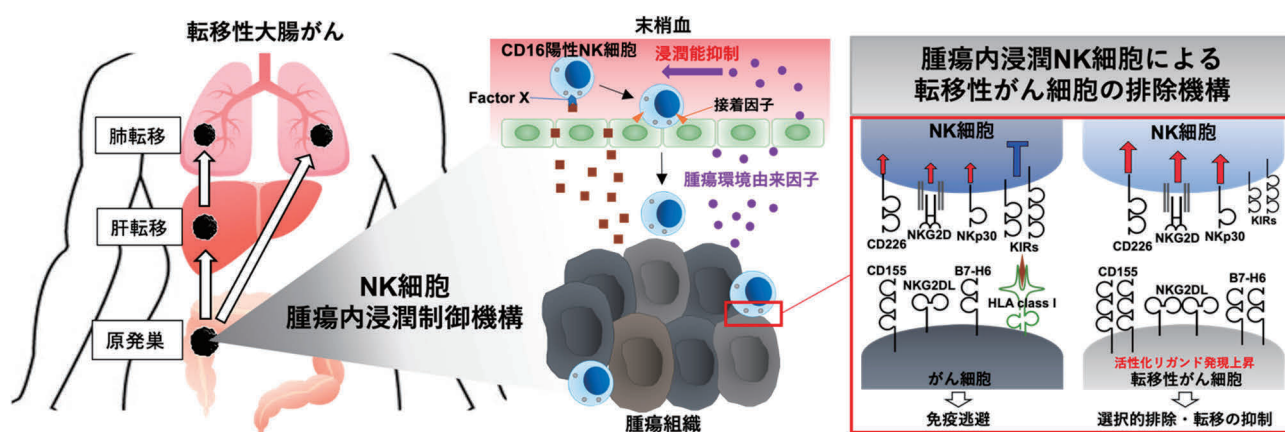


【目的】 大腸がんは肺や肝臓に転移しやすく、両臓器に転移が認められる場合、5年生存率は12.7%と予後不良である。近年、抗腫瘍免疫応答を再活性化する免疫チェックポイント阻害剤により、一部の患者において予後を改善する結果が得られているものの、未だ大多数で効果が認められず、新規治療戦略の提案が急務である。我々は、転移性がん細胞の排除を担うとされるNK細胞に着目している。前立腺がんやメラノーマにおいて、NK細胞が転移を抑制することが示唆されている。しかしながら、NK細胞はMHCクラスIをリガンドとする抑制性受容体を発現するため、MHCクラスI陽性の固形がんにおけるNK細胞浸潤の重要性については不明な点も多い。さらに、網羅的解析技術の進歩とメタ分析により、乳がんや大腸がんなど一部の固形がんにおいて、NK細胞の浸潤が多い患者で有意に死亡率が低下することが報告されたが、NK細胞浸潤を制御するメカニズムについても同様に明らかになっていない。そこで、本研究では、転移性大腸がん患者検体を用いた、原発巣浸潤NK細胞の機能解析及び腫瘍内浸潤メカニズムの解明により、大腸がんの転移を抑制する新規治療法の樹立を目的とする。

【方法】 原発巣の病理組織標本FFPEを用いた多重免疫染色により、NK細胞を始めとした腫瘍内浸潤免疫細胞の局在及び機能を解析した。同時に、NK細胞ががん細胞を排除する際に必要とする活性化受容体のリガンド(NKG2DL、CD155、B7-H6など)の発現についても検証した。同一患者由来の原発巣浸潤免疫細胞と末梢血単核細胞のフローサイトメトリー解析により、NK細胞サブセットの機能解析、浸潤を制御すると予想されるケモカインレセプター及び接着因子の発現を解析し、NK細胞浸潤と相関する因子を探索した。NK細胞の浸潤能について、トランズウェルやフローサイトメトリー法により評価した。さらに、NK細胞の浸潤能を制御する因子の網羅的探索のため、血漿プロテオーム解析を行った。

【結果】 FFPEを用いた多重免疫染色では、転移のない患者に比べて、転移のある患者では、NK細胞浸潤が少なかった。さらに活性化リガンドであるB7-H6の発現レベルとNK細胞浸潤には負の相関があることが明らかになり、B7-H6陽性のがん細胞を優先的に排除している可能性が示唆された。フローサイトメトリー解析では、原発巣浸潤NK細胞が少ない患者では、末梢血NK細胞のケモカインレセプターXの発現が低下していることがわかった。さらに、その患者集団の血漿を、健常者末梢血NK細胞に処置すると、Factor Xの発現が低下した。数種類の大腸がん細胞株の培養上清を用いた同様の実験系においても同様に、NK細胞のFactor Xの発現を低下させる細胞株が同定された。患者血漿プロテオーム解析を行い、24種類のタンパク質が同定されたが、NK細胞の浸潤を制御する因子の特定には至っておらず、解析中である。

本研究の概略図

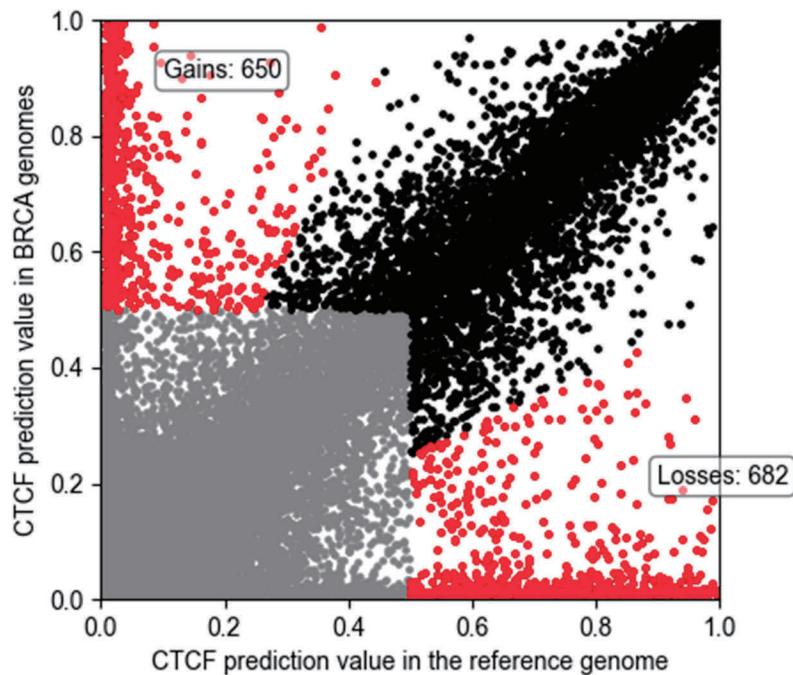


【目的】 がんはゲノムの変異を要因とする病気であり、がんの予防、診断、治療方針の決定のためには、個々人のゲノム配列を理解することが重要である。本研究では、現在理解の進んでいない非コード領域のゲノム配列変異とがんの関係について着目し、深層学習を用いた非コードゲノム配列の解析により、がん化における新規ドライバー変異を探索するアルゴリズムの開発を行うことを目的とした。

【方法】 本研究では、独自開発したゲノム配列を読み込む専用の畳み込みニューラルネットワーク (FRSS) を応用して、癌ゲノムの非コード領域の体細胞変異が、エピジェネティックシグナルに及ぼす影響を予測する方法を検討した。癌ゲノムとしては、TCGA の 1,072 の乳がんゲノムについて、small nucleotide variants (SNVs) の情報を利用した。まず、テスト段階として、畳み込みニューラルネットワークモデルをマウスの複数の正常組織、細胞株における CCCTC 結合因子 (CTCF) の ChIP-seq シグナルを用いて訓練した。癌細胞における SNVs の情報をゲノム配列に変換し、訓練したモデルを用いて、体細胞変異が入った癌ゲノムとコントロールとして体細胞変異が入っていないレファレンスゲノムに対して、CTCF 結合領域の予測を行い、予測結果を比較した。

【結果】 まず、テクニカルな側面として、レファレンスゲノムと癌ゲノムにおける結合予測を比較する上で、小さい DNA 欠損や挿入に起因するゲノム座標のズレが、比較を困難にすることが分かった。この問題に対応するために、現在、全ゲノム配列アラインメントによってゲノム座標の補正を行っているが、より精度の高い座標補正方法が今後の課題であることがわかった。しかしながら、現在の手法から、体細胞変異に起因した、650 箇所の CTCF 結合領域の獲得と 682 箇所の欠失を予測することが出来た (下記の図、赤い部分)。今後は、CTCF のみならず、エピジェネティック因子の変化を網羅的に予測し、実験的な検証およびがん化における意義について、検討して行く予定である。

がんゲノムにおける CTCF 結合領域の獲得と欠損の予測結果

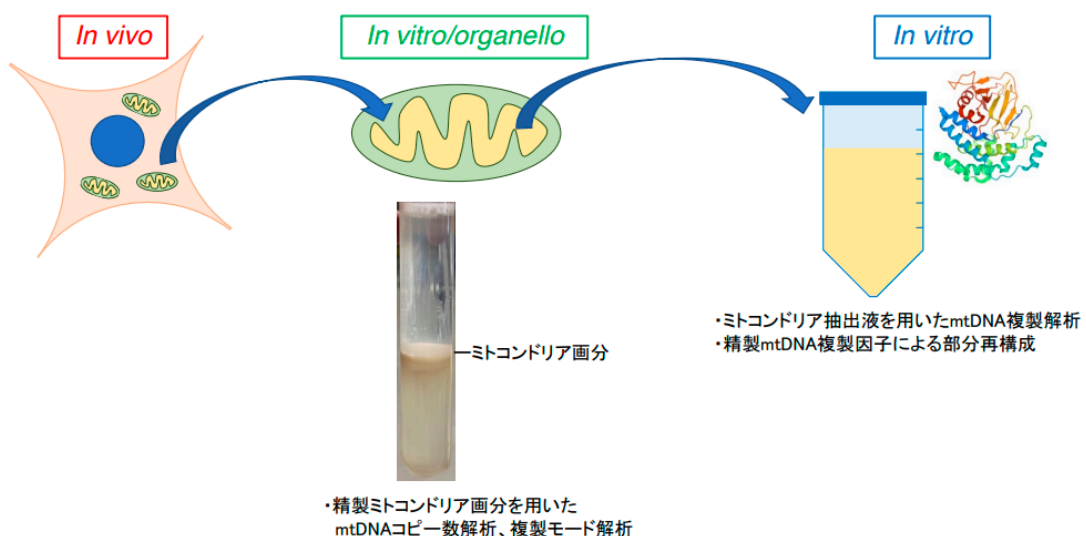


【目的】真核生物において、ミトコンドリアは細胞活動に必要なエネルギーである ATP の産生を担う細胞内小器官である。ミトコンドリア独自のゲノム mtDNA は 1 細胞当たり数千コピー存在し、ATP 産生に必須の電子伝達系の酵素群を発現する。従って mtDNA のコピー数や遺伝情報の安定維持は健康な生命活動において重要である。mtDNA 複製は核 DNA 複製装置と異なる制御されるが、mtDNA コピー数と遺伝情報の維持やラギング鎖共役型複製の分子機構など未解明な点が多い。さらに、mtDNA 複製制御の破綻は mtDNA の大規模欠損を誘導し、細胞のエネルギー産生の阻害、ひいてはミトコンドリア病を含む種々の疾患が誘発される。しかしながら mtDNA 欠損を回避するための分子機構は未解明である。本研究では、ミトコンドリア粗抽出液や精製ミトコンドリア画分を用いた新たな試験管内解析系を構築することで、mtDNA 複製やコピー数の制御機構を解明することを目的とする。

【方法】第一に、過去の報告に倣ってスクロースグラジエント法により高純度のミトコンドリア画分を精製し、界面活性剤 Triton X-100 で処理することで *X. laevis* 卵由来ミトコンドリア粗抽出液を調製した。第二に、このミトコンドリア抽出液と全長 *X. laevis* mtDNA を含む DNA を反応させ、DNA 合成活性を解析する試験管内解析系を試行した。さらに並行して、精製ミトコンドリア画分を用いた試験管内でのミトコンドリア内 mtDNA コピー数解析についても定量 PCR 法を応用することで検討した。

【結果】第一に、*X. laevis* 卵由来ミトコンドリア画分を材料とし試験管内での mtDNA 複製再構成系の確立を試みた。現在までに私は、過去の報告に倣い *X. laevis* 卵由来ミトコンドリア画分の調製、および粗抽出液の調製に成功した（九州大学の高橋達郎教授との共同研究）。次にミトコンドリア抽出液が試験管内で複製活性を有するか解析したところ、ネガティブコントロールではほとんど複製活性を示さなかったのに対し、mtDNA を含む DNA を用いた実験ではミトコンドリア抽出液の添加量に応じて複製活性を示した。一方で、別の実験では部位非特異的な複製開始である可能性が示唆されており、今後もさらなる条件検討を重ねることで複製開始の部位特異性を向上させる必要がある。第二に、精製ミトコンドリア画分を用いた試験管内でのミトコンドリア内 mtDNA コピー数解析系を新たに構築することに成功した。今後はこれらの新規解析系を基盤として mtDNA 複製やコピー数維持に関する研究がさらに発展することが期待される。

ミトコンドリアゲノム複製を解析するための新たな試験管内解析手法の開発

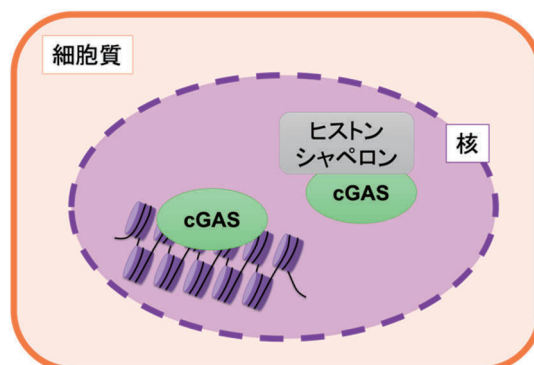


【目的】 生物は、ウイルスなどの外来 DNA に対する防衛機構を備えている。脊椎生物においてその機構の中心的な役割を果たすのが自然免疫である cGAS (cyclic GMP-AMP synthase) -STING (stimulator of interferon genes) 経路である。この経路では、cGAS が外来 DNA に結合して活性化し、環状ジヌクレオチド cGAMP を合成する。そして、STING が cGAMP を認識してその後続く経路を活性化し、最終的にインターフェロンを産生して炎症反応を引き起こす。cGAS-STING 経路は、自己免疫疾患、がん、脳炎など非常に広範な疾病の原因となることが日進月歩で解明されており、その制御機構の解明が期待されている。これまで cGAS は細胞質因子として考えられてきたが、最近になって細胞核内でゲノム DNA と一緒に存在することが報告された。本研究では、核内に存在する cGAS とクロマチンとの相互作用とその機能の解明を目的とする。核内における cGAS の制御機構はまだ不明な点が多いだけでなく、cGAS がこれまで予期されていなかった新たな機能を持つ可能性がある。特に、先行研究区から、cGAS は核内因子との相互作用によってクロマチンを制御、またはクロマチンによって制御されているという、クロストークが存在する可能性が考えられた。そこで、クロマチンと cGAS のクロストークとその意義を解明するために、細胞核内の cGAS の相互作用因子を探索した。

【方法】 細胞の核内での cGAS の相互作用因子を探索するため、まず、タグを融合した全長のヒト cGAS タンパク質と細胞の核抽出液を調製した。ヒト cGAS タンパク質を大腸菌にて発現させ、アフィニティクロマトグラフィーによって精製した。また、HeLa 細胞の核から、クロマチン結合タンパク質を抽出した。そして、タグを利用して cGAS ビーズを作製し、核抽出液から cGAS 結合因子を精製した。得られた cGAS 結合タンパク質について、質量分析によってタンパク同定を行った。

【結果】 cGAS 相互作用因子を同定するために、MBP タグ融合の全長のヒト cGAS の精製系を確立した。また、HeLa 細胞の核抽出液を調製した。cGAS を固定した cGAS ビーズを核抽出液と混合し、cGAS をプルダウンすることで cGAS の相互作用因子を精製した結果、cGAS に特異的に結合するタンパク質が観察された。これらの結合因子について、LC-MS によりタンパク質同定を行い、cGAS に特異的に結合した因子を解析した。その結果、ミトコンドリアタンパク質 C1QBP や、リボソームを構成するタンパク質 60S acidic ribosomal protein P2、ヌクレオソームを形成するヒストンタンパク質 H2A、H2B、H4 などの、cGAS に結合する因子として知られている既知の因子を同定した。興味深いことに、これらの因子に加えて、Anp32e、FACT 複合体 (SPT6 および SSRP1)、Nap1L4、SET、Nucleolin、Nucleophosmin などのヒストンシャペロンが複数同定された。本結果から、ヒストンシャペロンが cGAS 相互作用因子であることが示唆された。既知の cGAS 相互作用因子の C1QBP がヒストンシャペロンであり、cGAS の負の制御因子であるという先行研究の知見を踏まえると、核内ではヒストンシャペロンが cGAS を負に制御することが考えられる。核内にはゲノム DNA が存在するため、cGAS は抑制されていなければならないことを考えると、核内ではヒストンシャペロンによって cGAS のゲノム DNA に対する応答を抑制されている可能性が考えられた。

本研究により示唆された細胞核内での cGAS の相互作用因子の概念図

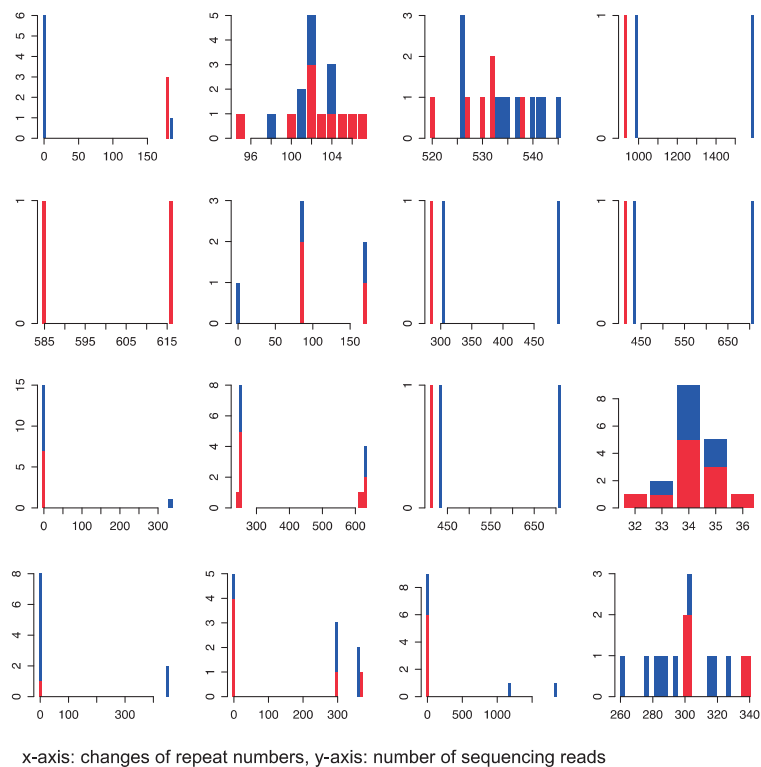


【目的】多系統萎縮症 (multiple system atrophy : MSA) はパーキンソン症状、小脳症状、自律神経障害をきたす神経疾患の一種である。類縁疾患のパーキンソン病と比較して MSA のパーキンソン症状は薬剤の効果が乏しく、その予後は不良であるため、原因の究明および治療法の開発は強く望まれている。MSA はほとんどが孤発性とされ、家族性 MSA の報告はごくわずかのみであり、これまで MSA の明らかな原因遺伝子は同定されていない。本研究では MSA の病態の究明のために原因遺伝子同定を目指す。

【方法】対象は MSA 患者 3 名、家系内健常者 3 名。ナノポア社のロングリードシーケンサー (PromethION) による全ゲノム解析を行った。データ解析は既に構築済みのパイプライン (マッピング : LAST、リピート伸長の解析 : tandem-genotypes、構造バリエーションの解析 : svim、dnarrange、sniffles) を用いた。当施設が保有する検体およびオープンデータベースから入手した健常人データを正常多型を除外するのに用いた。候補領域内に発症者に共通して認められ、家系内外の健常者には無いバリエーションを抽出した。

【結果】健常対照者は有しておらず、MSA 患者のみに認められるリピート伸長変異を同定した (図)。患者のみに認められた構造バリエーションは無かった。今後は、同定したリピート伸長のスクリーニングを行う予定である。

患者で同定されたりピート伸長バリエーション

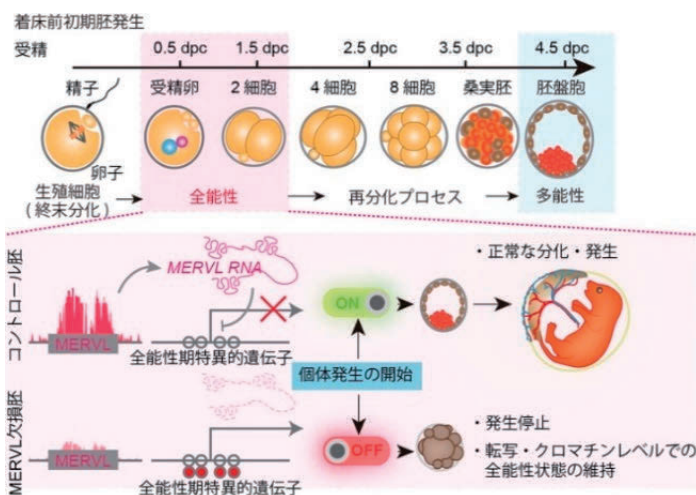


【目的】全能性とは、あるひとつの細胞がいかなる細胞種へも分化でき、自律的に個体を形成できる能力であり、哺乳動物においては、受精卵のみが全能性を発揮できる唯一の細胞である。興味深いことに、生物進化の過程で宿主ゲノムに感染し組み込まれた内在性レトロウイルス（Endogenous Retroviruses : ERVs）の一種である MERVL が、全能性期特異的に一過的に発現する。本研究では、ゲノム中に散在する ERVs を含む転移因子を高効率に標的とする多コピー遺伝子解析技術を開発し、全能性期および再分化プロセスにおける MERVL の機能的役割を明らかにすることを目的とした。

【方法】MERVL をターゲティングするアンチセンスオリゴ核酸（ASOs）ならびに siRNA を *in silico* ならびに *in vitro* システムを用いて同定し、最もノックダウン（KD）効率の高い各オリゴ核酸をマウス受精卵へ顕微注入することで MERVL 欠損胚を作製した。MERVL 依存的な全能性制御ならびに個体発生制御機構を明らかにするため、MERVL-KD 胚におけるトランスクリプトームおよびエピゲノム解析を実施した。

【結果】ASOs による MERVL-KD 胚では、初期発生過程において細胞分化やゲノム安定性の維持に異常が観られ、胚盤胞期より以前に胚性致死を呈することが明らかになった。さらに RNA-seq および ATAC-seq による統合的オミクス解析を通じて、MERVL-KD 胚では、本来厳密に制御を受けているはずの全能性期特異的遺伝子の発現やその転写開始点近傍のオープンクロマチン状態が発生の進行を経ても異所的に維持され続けていることが明らかになった。従って、ゲノム中に散在する MERVL の発現は、全能性獲得後の細胞分化ならびに個体発生の開始に必須であることが結論付けられた（図）。興味深いことに、同様の KD 実験を ASOs の代わりに siRNA を使用して行ったところ、ASOs で観られたような胚発生の異常は生じなかった。また、MERVL のトランス作用性 RNA のみを MERVL 欠損胚に外部から誘導しても、胚発生障害はレスキューされなかった。これらのことは、全能性期における MERVL の本質的な機能はウイルス粒子をコードするタンパク質や核内に遊離しているトランス作用性 RNA ではなく、MERVL 遺伝子座における転写自体もしくはそれに伴うクロマチン変化といったシス作用性因子により担保されていることが強く示唆された。実際、MERVL 遺伝子座のシス作用性を dCas9-KRAB-MeCP2 融合タンパク質を用いた CRISPRi により抑制すると、ASOs による MERVL 欠損胚と同様に、胚発生異常や異所的な全能性期特異的遺伝子の発現が観察された。加えて、MERVL 転写欠損下における転写とクロマチン状態をゲノム広範囲に評価した結果、MERVL 遺伝子座を中心とした近傍 50 kb までの転写やクロマチンアクセシビリティが、MERVL 欠損胚で減退していることを明らかにし、宿主細胞の再分化プロセスにおいて生じる大規模なクロマチン再構築に MERVL のシス作用性が必須であることを示した。

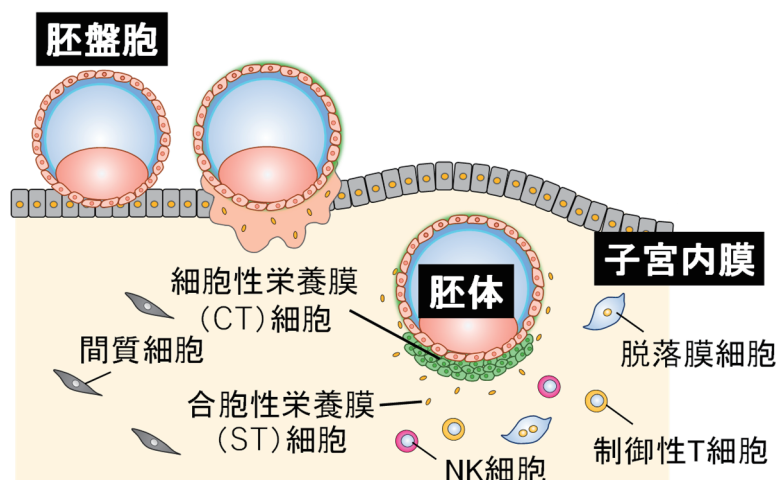
MERVL 依存的なクロマチン再構築による分化制御機構



【目的】近年の生活や労働環境の変化は、晩婚化や初産の高齢化をもたらし、体外受精や顕微授精などの生殖補助医療（ART）を選択する不妊治療患者数は年々増加の一途を辿っている。しかし、ART の成功率は、20%程度と頭打ち状態にあり、ART 不成功例の主原因として、着床機能不全が指摘されている。本研究では、胎児・母体由来の複数の幹細胞を組み合わせた *in vitro* 着床モデル（Assembloid）を創成し、胚の着床・発生機序について理解を深め、新規の不妊治療法の開発や創薬応用に役立てることを目的とした。

【方法および結果】1. ナイーブ型 ES 細胞よりブラストイドの作製：ナイーブ型 ES 細胞よりマイクロウェルを用いて培養条件（細胞数、播種時期、培地・添加因子成分）をこれまでの報告を基に検討し、ヒト胚盤胞様構造物（ブラストイド）の作製に成功した。2. 子宮内膜オルガノイドの作製：子宮内膜上皮オルガノイドは、既報を基に樹立した。複数ドナー由来の手術摘出後のヒト子宮組織（倫理承認済）より 10 ロット以上の子宮内膜上皮オルガノイドを樹立した。また、同時に子宮内膜間質細胞を単離した。次に、子宮内膜上皮および間質細胞をゲル内で混合培養し、エストロゲンおよびプロゲステロン添加による応答能（子宮内膜（腺）上皮：PAEP、PR、脱落膜化マーカー：PRL、IGFBP1 等）を確認した。またヒトと同様に、マウス（ICR）においても、子宮内膜上皮オルガノイドの樹立と間質細胞の単離を行った。また、両者の混合によるマウス三次元子宮内膜モデルも確立した。3. 遺伝子発現解析：子宮内膜モデルについて、単一核解析によりシングルセルレベルでの遺伝子発現解析を行った。混合した細胞の子宮内膜上皮・間質、内皮細胞についてそれぞれ検出し、特に上皮細胞には腺細胞や繊毛細胞、増殖性の細胞など多様な細胞集団が含まれていることがわかった。この子宮内膜オルガノイドに、疾患モデルを活用し、母体 - 胎盤間のシグナル伝達経路などの解析に応用できる。4. 胚着床オルガノイドモデルの作製：ブラストイドと子宮内膜オルガノイドモデルを共培養し、胚の着床状態を観察できるオルガノイドモデルを作製することに成功した。興味深いことに、浮遊培養下で両者を共培養すると、ブラストイドが子宮内膜モデル内に埋没していく様子が観察された。切片を詳細に解析すると、ブラストイドが ICM 側から付着し、子宮内膜上皮のバリアが破られているのを確認した。また、シンシチウムの浸潤には、子宮内膜間質細胞の細胞融合が関与していることを明らかにした。このような生体を反映したこれまでにない着床モデルの作製により、これまでブラックボックスであった着床の分子機構の一端が明らかとなった。

胚着床オルガノイドモデルの作製

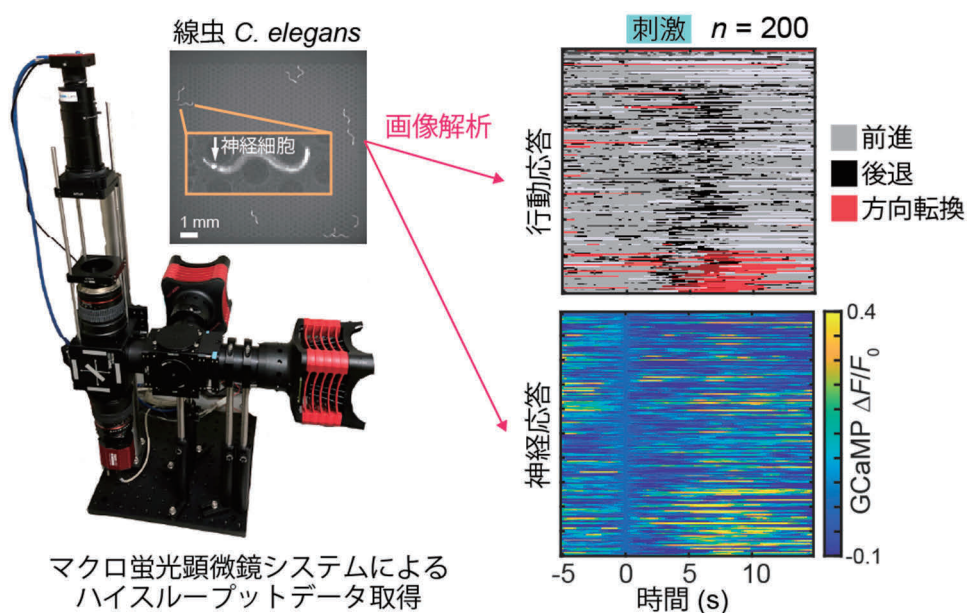


【目的】 自閉スペクトラム症 (Autism Spectrum Disorder : ASD) では、症例の 9 割で感覚機能の異常が報告されている。この感覚障害の原因として、ASD では感覚刺激に対する神経応答のばらつき (変動性) が昂進し、外界の感覚刺激を正しく受容できないためではないかという仮説が提唱されている。しかし、そもそもなぜ神経変動性が生じるのかという基礎的な神経メカニズムは未だ不明である。神経応答の変動性は確率的現象であり、その解析には多数の神経応答データが必要となる。このような多数のデータを必要とする解析には、体が小さくイメージングが容易なモデル生物の線虫 *C. elegans* が適する。線虫は、様々な ASD 関連遺伝子の変異株が存在し、高速フェノタイプ解析が可能であるという利点もある。本研究では、独自のマクロ蛍光顕微鏡システムを用いて、線虫に感覚刺激を与えた際の神経応答データをハイスループットに取得し、神経応答変動性の源となる神経回路の同定を目指した。

【方法】 線虫の行動と神経応答を観察しながら感覚刺激の制御を行うため、光リソグラフィ法によりシリコンウェハ上に鋳型を作製し、ポリジメチルシロキサン (PDMS) シリコン樹脂を流し込んでマイクロ流体デバイスを作製した。野生型の線虫株として N2 を、ASD 関連遺伝子変異株として *nlg-1*、*chd-7* を用いた。神経応答の取得や、シナプス伝達の抑制のため、DNA マイクロインジェクション法により、 Ca^{2+} センサー GCaMP6f または開口放出を阻害するタンパク質 TeTx を各神経細胞に発現させた株を作製した。マクロ蛍光顕微鏡下で、マイクロ流体デバイス中の線虫に感覚刺激を与え、神経応答および行動応答を取得した。データの解析は、MATLAB の自作スクリプトによって行った。

【結果】 浸透圧刺激と匂い刺激を同時に与え、感覚統合が正しく行われるか試したところ、野生型では、匂い刺激存在下で浸透圧刺激に対する方向転換応答の割合が低下した。一方、ASD 関連遺伝子変異株では、匂い刺激の有無が浸透圧刺激に対する方向転換応答の割合に影響を与えなかった。続いて、浸透圧刺激を受容する感覚神経 ASH と、方向転換を制御する介在神経 AIB の神経応答を取得したところ、ASH の応答変動性は低いのに対し、AIB の応答変動性は高いことを見いだした。AIB の応答変動性を制御する神経経路の同定のため、AIB に接続する介在神経からのシナプス伝達を抑制した線虫株を作製し、AIB の応答を取得したところ、AIB の活動を抑制する介在神経 AIA および AIB の活動を活性化する介在神経 RIM を見出した。

ハイスループット神経応答記録による神経応答変動性の解析

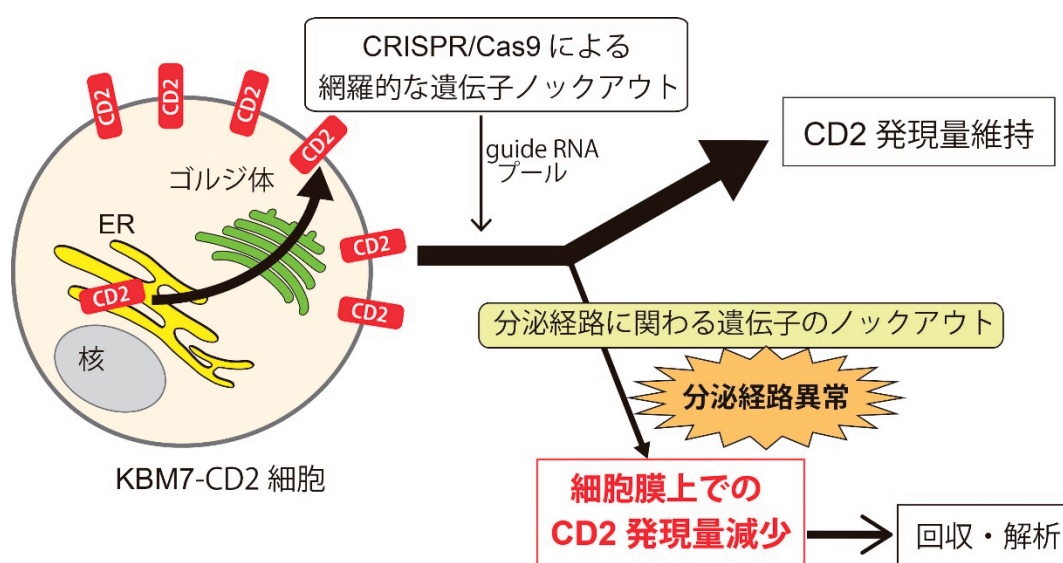


【目的】骨髄系細胞におけるタンパク質分泌経路において重要な機能をもつ新規分子を探索する。さらに、タンパク質分泌経路の破綻が発症機序に関与することが示唆されている、重症先天性好中球減少症 (SCN) の新たな責任遺伝子を同定することを目的とする。

【方法】本研究では、骨髄系細胞において分泌経路に着目したノックアウトスクリーニングを行うこととした。骨髄系細胞においてタンパク質分泌経路に関わる分子群を網羅的に解析するため、慢性骨髄性白血病細胞株である KBM7 細胞において、CD2 をレポーターとする分泌経路の新規モニターシステムを構築した。CD2 発現強度の減弱が分泌経路の機能障害を反映することは、小胞体ストレス誘導剤の添加および初期分泌経路に関与する分子のノックダウンを行って確認した。CRISPR ノックアウトスクリーニングではゲノムワイドの single-guide RNA (sgRNA) ライブラリを用いて遺伝子を網羅的にノックアウトし、分泌経路に障害を引き起こした細胞群を回収して次世代シーケンスにより解析した。さらに、スクリーニングで得られた遺伝子についてタンパク質分泌経路における役割を調べるために、KBM7 細胞に CD2-ERHook を導入して可逆的タンパク質繫留 (RUSH : Retention using selective hooks) システムを構築した。候補遺伝子の個別のノックアウト細胞を作製して RUSH システムにより、タンパク質分泌経路のどの部分で機能するのかを調べた。

【結果】KBM7 細胞におけるノックアウトスクリーニングの結果、CD2 自身も含めて 325 遺伝子がヒットした。このうち、膜タンパク質であり小胞体およびゴルジ体に発現することが知られている分子に特に注目していくつかの遺伝子について個別のノックアウト株を作製し、同様のシステムにより、CD2 分子の細胞膜発現の減弱を確認した。さらに、RUSH システムの利用により、グリコシル-キシロシルトランスフェラーゼでありゴルジ体においてタンパク質の糖鎖修飾に関与する *LARGE2* 遺伝子のノックアウト細胞において、タンパク質輸送がゴルジ体で停止することが明らかとなった。*LARGE2* 分子の強制発現による再構成実験において、タンパク質分泌経路が部分的ながら回復することも確認した。*LARGE2* のノックアウト細胞において、薬剤誘導によるゴルジ体ストレス応答が亢進したことから、*LARGE2* はゴルジ体ストレスを制御することにより、正常なタンパク質分泌経路の維持に寄与することが示唆された。

ノックアウトスクリーニングの概念図



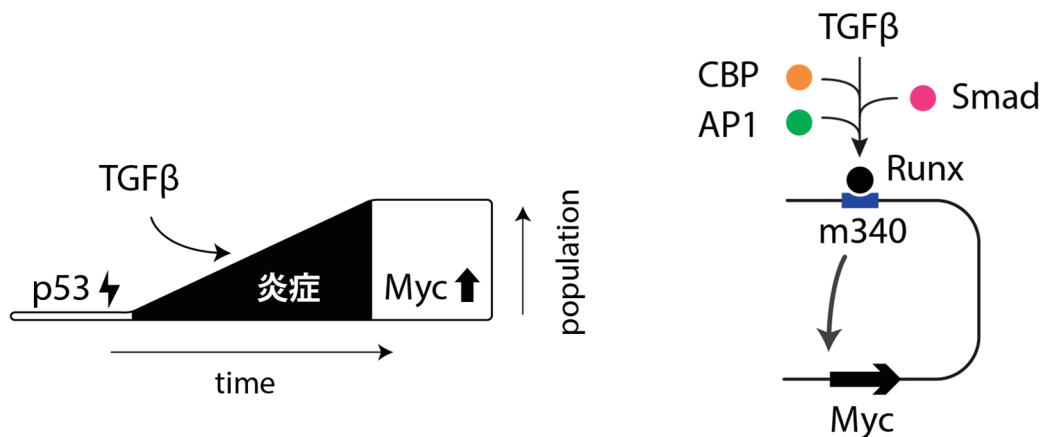
126	p53破綻と炎症の連動は、発がんの起点となる	伊達 悠貴
-----	-------------------------------	-------

【目的】 腫瘍は、ゲノム・エピゲノム異常と環境刺激の相互作用によって発症する。がん抑制遺伝子 *p53* の遺伝子異常と、がん遺伝子 *Myc* の過剰発現は、大半のヒトがんの発症・悪性化過程に関わる、代表的なゲノム・エピゲノム異常である。同様に、組織障害が引き起こす炎症性のエピゲノム変化も、発がん性の重要な環境刺激である。しかし、*p53* 破綻と炎症刺激が連動して発がんにいたる分子機序は不明な点が多い。私たちはこれまで、*p53* 破綻性の骨肉腫モデルマウス（通称 OS マウス）を用いて骨肉腫の発症機序を解析してきた。その結果、*p53* の遺伝子異常が、がん微小環境に由来する炎症刺激を介して、発がんに必要な *Myc* の過剰発現をもたらすことが示唆されていた。そこで本研究では、骨肉腫の発症機序が、*p53* 破綻と炎症の連動がもたらす *Myc* 過剰発現であることを生体レベルで示し、その分子機序を精査する。

【方法】 生体マウスの骨髄微小環境における炎症刺激をモデル化するために、トレッドミルによる過運動を取り入れた。腫瘍が触知できる前の OS マウスに対して過運動を課し、発がん傾向を観察した。過運動群における血清タンパク量の変化を調べ、発がんを促進する炎症刺激として TGFβ を特定した。TGFβ の発がん性を生体レベルで評価し、TGFβ が *Myc* を過剰発現する機序を分子レベルで解析した。

【結果】 OS マウスに過運動を課したところ、発がんが早まって短命化する傾向が得られた。このことから、*p53* 破綻と炎症刺激が連動することで、発がんが加速することが示唆された。過運動によって OS マウスの血清 TGFβ 量が増加した。OS マウスにおいて TGFβ シグナルを減弱させると、発がんの抑制効果が見られた。TGFβ 反応性の *Myc* エンハンサとして、「m340」を特定した。以上より、骨肉腫の発症機序が、*p53* 破綻と、TGFβ を主体とする炎症刺激の連動であることが示唆された。

*p53*破綻と炎症刺激の連動によって骨肉腫が発症する

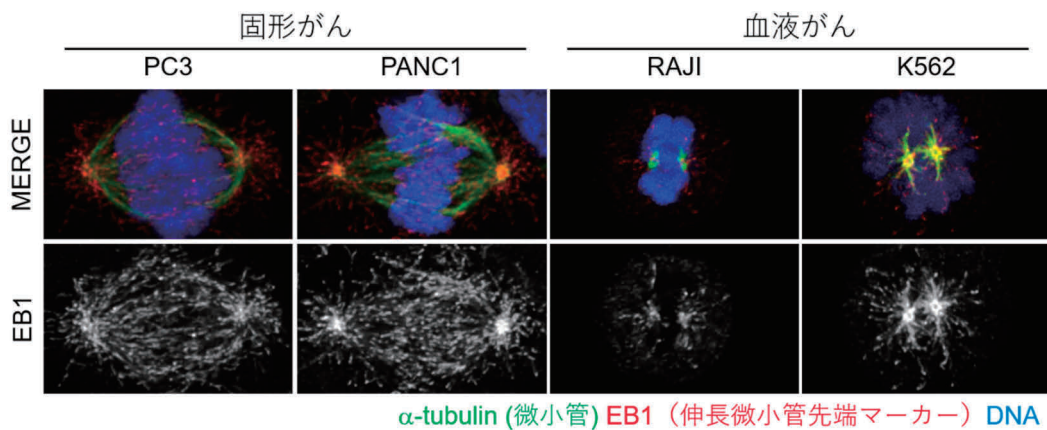


【目的】 血球細胞の分化過程で生じる染色体分配エラーが血液がんの発症や予後不良に繋がる可能性が示唆されている。しかし、血液がんの分裂システムはよく理解されていない。血液がんの分裂システムの理解は、血液がんの発症機構の理解や治療薬開発に繋がる可能性がある。これまでに我々は血液がんでは短い脆弱な紡錘体が形成されることを見出した（下図）。そのため、血液がん細胞は何らかの分裂期のシステムが脆弱な可能性がある。上記の背景の基、本研究では血液がん細胞の細胞分裂システムの理解を目的とする。中心体の詳細な顕微鏡観察と、DepMap に登録された CRISPR/Cas9 ゲノムワイドスクリーニングのデータを活用した情報解析を行う。それにより、血液がん細胞の分裂システムの特徴を理解する。また血液がんの分裂様式の解析において有効なライブセルイメージングの手法を開発する。以上のアプローチにより、血液がんの細胞分裂の特殊性・脆弱性を標的とする創薬基盤の確立を目指す。

【方法】 分裂期における中心体の詳細な顕微鏡観察と、DepMap に収容された CRISPR/Cas9 ゲノムワイドスクリーニングのデータを活用した情報解析を行った。また血液がんの分裂様式の解析において有効なライブセルイメージングの手法を開発した。

【結果】 血液がん細胞は分裂期中心体への中心体マトリクスの集積が脆弱であった。そのため、血液がんは中心体の微小管形成能が低い可能性が示唆された。また DepMap を活用した、網羅的ながん細胞比較解析により、染色体異数性を示す血液がんは動原体-微小管結合や姉妹染色体接着に脆弱性が生じている可能性を見出した。さらに、マイクロウェルを応用することで、血液がんの観察に適したイメージングシステムの開発に成功した。本研究成果は、血液がんの分裂機構の理解に寄与し、新たな創薬につながるものである。

血液がんの脆弱な紡錘体

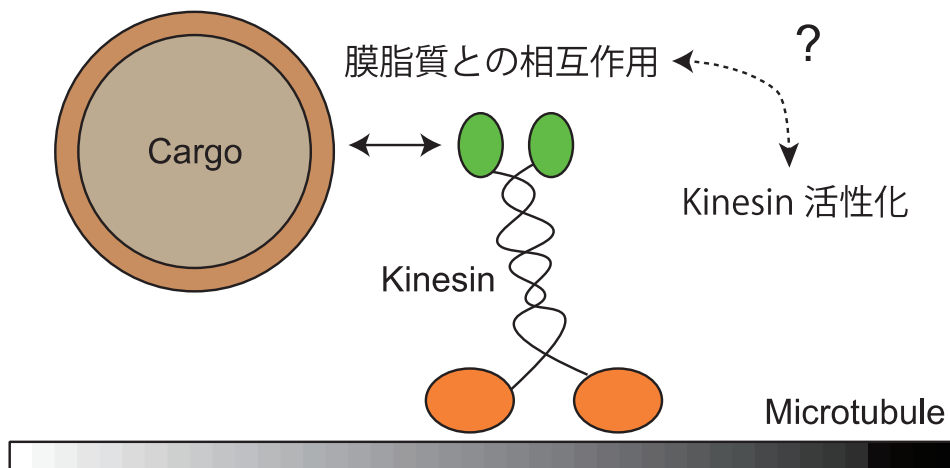


【目的】 モータータンパク質の一つであるキネシンは細胞内において微小管プラス端方向すなわち順行性の積み荷（カーゴ）輸送に携わる。キネシンは直接あるいはアダプタータンパク質を介して間接的にカーゴ膜と相互作用することが知られている。脂質膜との相互作用がキネシンの運動活性にどのような役割を果たすのかはこれまで明らかにされていない。当研究ではキネシンスーパーファミリーのうち神経特異的に発現しシナプス小胞輸送に携わることが知られている KIF1A に着目した。KIF1A と膜脂質との相互作用がどのように調節されているか、またその相互作用とモーター活性の関係性を明らかにするため精製 KIF1A タンパク質を用いた生化学的な解析を行った。

【方法】 ヒト KIF1A 全長タンパク質を精製し解析に用いた。C 末端に蛍光タンパク質である mScarlet、またアフィニティー精製のための Strep II タグを付加した KIF1A を Bac to Bac システムを用いて昆虫細胞 (Sf9 細胞) で発現した。細胞を可溶化後 Strep II によるアフィニティー精製を行った。得られたタンパク質を用いてゲル濾過クロマトグラフィー、SDS-PAGE を行った。また KIF1A タンパク質の分子会合状態を明らかにするため Mass Photometry 法による解析を行った。

【結果】 野生型 KIF1A は小胞膜と殆ど相互作用しない一方、モータードメインを欠損した変異体である KIF1A Δ MD は小胞膜と相互作用することがこれまでに報告されてきた。今回の解析により野生型 KIF1A が単量体と二量体の平衡状態であること、野生型 KIF1A と異なり KIF1A Δ MD は安定な二量体を形成することが明らかとなった。二量体形成は KIF1A の微小管上の運動においても重要である。一連の結果から、膜脂質がカーゴ膜上への活性型 KIF1A の選択的リクルートに働くことが示唆された。

カーゴ膜との相互作用とモーター活性の制御

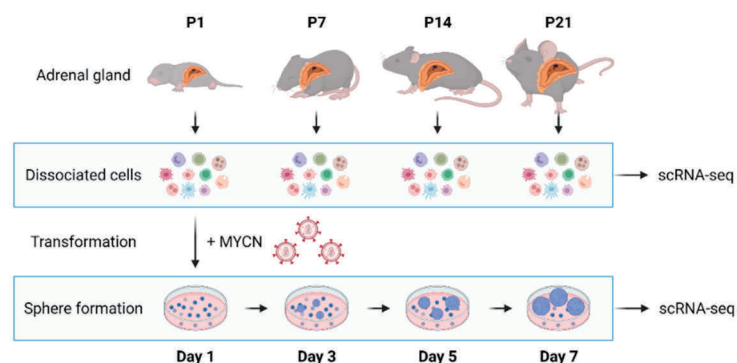


【目的】小児がんの一つである神経芽腫はほとんどが5歳未満の幼児～小児期で発症し、発症時年齢とゲノム異常の相関も明らかにされており、その発症には体の発達と関係した時期特異性が存在している。本研究では、*in vitro* 神経芽腫発生モデル、副腎組織と *in vitro* で培養した細胞を対象にシングルセル遺伝子発現解析を行い、神経芽腫発生の時期特異性に寄与する候補遺伝子の同定を目的とし、より詳細な発生機構の解明に基づいた新規治療標的となり得る遺伝子（シーズ）の探索研究へと発展させる基盤作りに挑んだ。

【方法】野生型マウスの副腎組織を酵素処理で単細胞化し、神経芽腫のがん遺伝子である *MYCN* をレンチウイルスで発現させスフェア形成を評価した。マウス副腎組織（生後1日、7日、14日、21日齢）および生後1日齢マウス副腎由来細胞へ *MYCN* を強制発現させた初代培養細胞（培養1日、3日、5日、7日後）を対象にシングルセル遺伝子発現解析を行った。また、ウェスタンブロッティングと免疫染色によりシングルセル解析の結果を検証した。

【結果】生後1日の副腎組織由来細胞を培養し、レンチウイルスを用いて神経芽腫のがん遺伝子である *MYCN* を過剰発現させると、増殖性のスフェアが形成された。一方で、1週齢以降の副腎組織由来細胞へ同様に *MYCN* を導入した結果、週齢を重ねるにつれ形成するスフェアが著しく減少した。すなわち、生後0日の副腎組織には *MYCN* によってがん化する細胞タイプが存在し、神経芽腫の時期特異性を担う遺伝子が発現していることを強く示唆している。次に、マウス副腎組織（生後1日、7日、14日、21日齢）および生後1日齢マウス副腎由来細胞へ *MYCN* を強制発現させた初代培養細胞（培養1日、3日、5日、7日後）を対象にシングルセル遺伝子発現解析を行った（図）。クラスタリング解析とマーカー遺伝子の発現から、髄質細胞、シュワン前駆細胞など組織中に存在する細胞に加え、培養に伴い増殖してくる細胞群（「Sphere?」と定義）を推定した。興味深いことに、「Sphere?」クラスターは典型的な神経芽腫マーカーであるアドレナリン作動性神経関連遺伝子 (ADRN marker) の発現は見られ、間葉系遺伝子 (MES marker) の発現が高かった。ウェスタンブロッティングと免疫染色で検証した結果、*MYCN* で形質転換したスフェアは ADRN マーカーの発現が顕著であり、MES マーカーの発現は認められなかった。すなわち、シングルセル遺伝子発現解析で推定した「Sphere?」という細胞クラスターは *MYCN* により形質転換した神経芽腫のスフェアではなく、培養で増殖するその他の細胞タイプ（線維芽細胞が有力）である可能性を強く示唆している。当初の予想に反して、シングルセル遺伝子発現解析でスフェアの細胞クラスターを同定できなかった。今回、培養サンプルは浮遊して増えるスフェアに加え、培養ディッシュに張り付いて増える細胞もまとめて解析に供した。おそらく、張り付いて増殖する線維芽細胞の細胞割合がかなり多くなり、スフェア細胞が解析されなかった可能性が高いと考えられる。スフェア細胞だけを回収し再度シングルセル遺伝子発現解析データの取得を行ったため、今後新しく取得したデータと統合し、再度解析を進め、副腎組織中に存在するどの細胞タイプが実際にスフェア形成に寄与しているか明らかにする。

マウス副腎組織及び *MYCN* で形質転換した細胞のシングルセル遺伝子発現解析



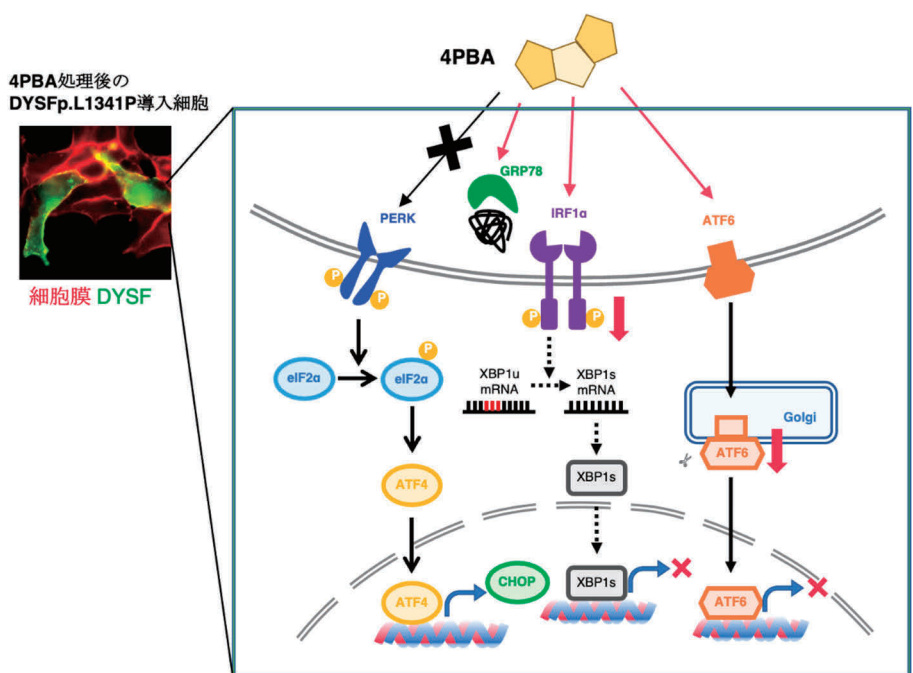
130 タンパク質品質管理機構を制御する筋萎縮治療法の開発	富永 香菜
--------------------------------------	--------------

【目的】 筋ジストロフィーは著しい筋力低下により生活に困難が生じる希少遺伝性疾患である。我々はこれまで主に筋細胞膜の維持や修復に関わる **Dysferlin (DYSF)** に遺伝子変異があるタイプの筋ジストロフィー (ジスフェルリノパチー: **Dysferlinopathy**) について研究を行ってきた。ジスフェルリノパチー患者では、変異によって **DYSF** タンパクの構造異常をおこし、細胞内でのタンパク質の過剰な凝集や分解が生じている。我々は、独自に開発した *in vitro* アッセイを利用して、新規の病的ミスセンス変異を見出し、それら変異の一部について、ケミカルシャペロンである **4-Phenylbutyric acid (4PBA)** が効果的であることを確認した。そこで、本研究では、**4PBA** がミスセンス変異をもつ **DYSF** の膜移行を亢進するメカニズムを明らかにし、より効果的で安全な化合物を発見することすることを目的とした。

【方法】 本研究で使用する **DYSF-T2A-DsRED** 発現ベクターを構築した。**DYSF** の細胞膜上発現量と細胞内を評価するために、元来 **DYSF** の発現がないヒト胎児腎細胞 **HEK293T** に各ベクターを導入して一過性に発現させ、抗 **2A-peptide** 抗体および **Alexa Fluor® 647** 標識抗体を用いてフローサイトメトリーおよび蛍光免疫染色を実施した。また、**DYSF WT** および病的ミスセンス変異ベクターを導入した **HEK293T** 細胞に **0.15 vol/vol%** **DMSO** (コントロール) および **1mM 4PBA** を添加し、**24~48** 時間インキュベーションした。処理時間終了後、**DsRED** 陽性細胞をフローサイトメトリーにて回収し、ウエスタンブロッティングにて小胞体ストレス関連タンパク質を確認した。

【結果】 病的ミスセンス変異をもつ **DYSF** を導入した細胞について、フローサイトメトリーおよび免疫染色にて細胞膜上の **DYSF** 発現量を観察したところ、**4PBA** 処理により細胞膜上への **DYSF** 発現が亢進されることを確認した。**DYSF** 病的ミスセンス変異に対する **4PBA** の作用機序について小胞体ストレス応答関連タンパク質についてウエスタンブロッティングにて確認したところ、小胞体シャペロン誘導因子 **GRP78** や小胞体ストレスセンサー **ATF6**、**IRE1** に対しては抑制されるが、小胞体ストレスセンサー **PERK** シグナルについては効果がみられないことがわかった。

ジスフェルリノパチーモデルにおける **4PBA** の小胞体ストレス応答機構への影響

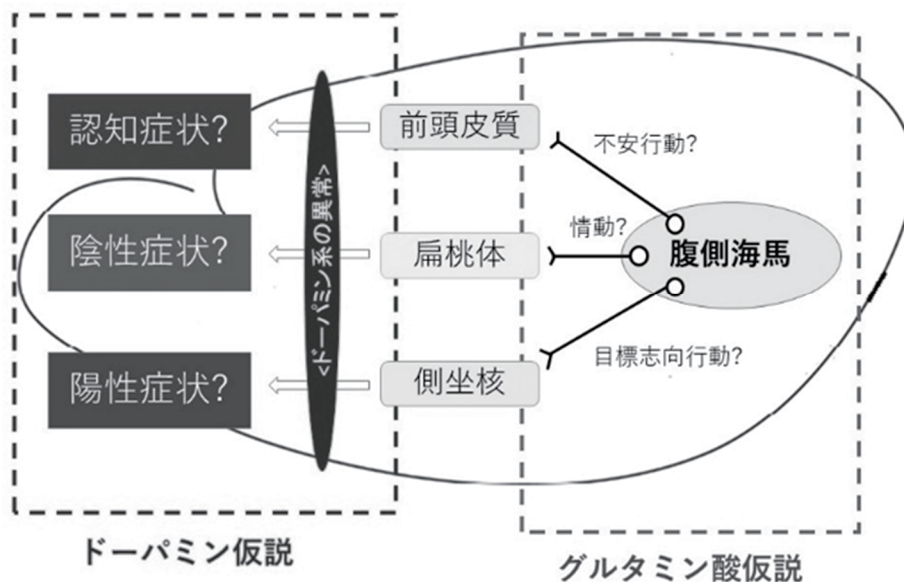


【目的】 統合失調症について、多くの人は「幻覚や妄想を生じる」と言うような断片的な知識を持っていてもその病気としての正確なイメージは曖昧なのではないだろうか。その曖昧さの原因は、「統合失調症の症状は患者ごとに大きく異なり多種多様である」ことにあるだろう。この多様さは統合失調症の機序の解明を困難にしており、そのため現在でも効果的な治療法が確立されているとは言い難い。しかし、逆にこの症状の多様さを生む原因を突き止めることが出来たならば、統合失調症の克服に向けた大きな一歩となる。このような統合失調症の多様性を解明するためには、実際に脳の多様な情報処理を担っている「神経サーキット」に着目してのアプローチが不可欠となる。統合失調症発症に関与すると考えられているのが腹側海馬を起点とする複数の神経サーキットである。本研究では、統合失調症の多様な症状の原因となる神経サーキットとその活動の異常を解明するための手段としての光遺伝学的操作の有効性について検証した。

【方法】 統合失調症の原因の候補とされている神経サーキットの1つとして「腹側経路 → 前頭皮質」の経路が考えられている（下図）。実験1として、この経路の活動を特異的に光刺激することによって、動物の行動が変化し統合失調症のような行動異常が現れるかどうかを検証した。その第1段階として、注目する経路の終着点である前頭皮質のみを刺激する実験を実施した。また並行して、統合失調症モデル動物では実際に生体内でどのようなサーキットの活動の変化が発生しているのかどうかを電気生理学的手法によって記録・解析し、実験1で用いた光操作によるアプローチの妥当性を検証した（実験2）。

【結果】 実験1においては、前頭皮質の光遺伝学的操作を実施した個体とコントロール個体とでその行動の変化に違いがあるとする予備データが得られた。これは慢性的な光操作によって動物の行動を変化させることで異常を起こしている神経ネットワークが、明らかに新たなモデル動物を作製し研究に利用できることを示唆する結果であった。また実験2においては、統合失調症モデル動物の作製に用いられるフェンサイクリジン（PCP）の投与による前頭皮質神経細胞への影響は様ではないことが示された。これは実験1のような特定の脳部位の神経細胞を一樣に光操作するだけでは病態の再現にそのまま繋がらないであろうことを示している。また PCP 投与による腹側海馬の局所脳波のダイナミクスの変化は、腹側海馬を起点としたサーキット特異的な操作が今後の研究においても有用であることを示す結果であった。本研究で有用性が示された操作手段を神経ネットワーク特異的に使用することは、今後の精神疾患メカニズム解明において有用なツールになりうると考えられる。

本研究の仮説の模式図

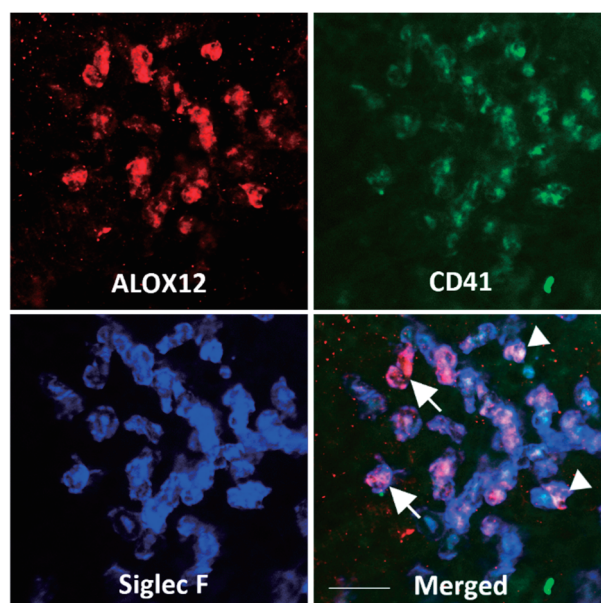


【目的】 アレルギー性鼻炎は、花粉やハウスダストなどの環境抗原が原因で鼻腔内にアレルギー性炎症が生じる疾患である。即時相炎症反応とその数時間後に引き起こされる遅発相炎症反応により病態が進行する。特に、遅発相の増強・遷延化が病態の重症化に大きく寄与する。脂質メディエーターは、免疫細胞を連鎖的に活性化して増幅し、炎症の極性やその強度を規定する役割をもつ。アレルギー性鼻炎においては主にマスト細胞から産生されるプロスタグランジン D_2 やロイコトリエン C_4 が血管透過性の亢進や好酸球浸潤を誘発して病態の悪化に寄与することはよく知られている。近年、遅発相の鼻粘膜に浸潤するマスト細胞以外の免疫細胞も脂質メディエーターを産生することが明らかになってきた。実際、それらの免疫細胞に由来する脂質メディエーターの代謝物がアレルギー性鼻炎患者の鼻汁や尿中で検出されることが報告されている。しかし、遅発相を機能的に促進するメディエーターの種類と役割は未だ不明である。本研究は、遅発相で病態を進行させる脂質メディエーターを特定してその役割を検討することを目的とした。

【方法】 卵白由来アルブミンを腹腔内投与および経鼻投与することでアレルギー性鼻炎モデルマウスを作製した。鼻炎モデルマウスの鼻粘膜組織を用いて鼻粘膜に浸潤する好酸球およびT細胞、粘液の過剰分泌などの遅発相反応を評価した。また、所属リンパ節における2型T細胞(Th2)分化程度をフローサイトメトリーにて検討した。一部の検討では12-ヒドロキシエイコサテトラ酸(12-HETE)合成酵素(ALOX12)の阻害薬(40 mg/kg)および抗CD41抗体(1 mg/kg)を腹腔内投与した。

【結果】 遅発相症状を発症したアレルギー性鼻炎モデルマウスの鼻腔洗浄液中では12-HETEの濃度が著しく上昇していた。ALOX12の阻害は、遅発相反応をほぼ完全に抑制した。ここに12-HETEを経鼻投与すると遅発相反応の抑制がほぼ完全に解除された。加えて、アレルギー性鼻炎の増悪と維持を担う所属リンパ節におけるTh2分化もALOX12阻害薬により抑制され、その抑制は12-HETEの経鼻投与により解除された。遅発相の鼻粘膜では、好酸球もしくは血小板がALOX12を発現していた(下図)。最後に、血小板数を減少させた状態で遅発相反応を検討したところ、好酸球およびT細胞の鼻粘膜浸潤が抑制された。以上の結果から、アレルギー性鼻炎の遅発相では好酸球もしくは血小板から産生された12-HETEが鼻粘膜への免疫細胞浸潤や粘液の過剰分泌、さらには所属リンパ節におけるTh2分化を促進することで炎症反応を増悪していることが示唆された。

鼻粘膜におけるALOX12発現



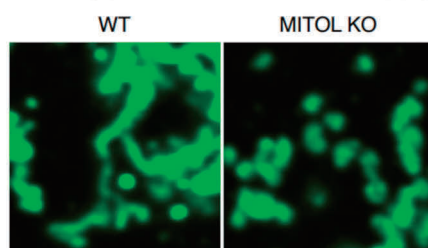
【目的】 ミトコンドリアは細胞内のエネルギー産生、脂質産生、細胞死の制御などシグナル伝達の間としても機能するオルガネラである。ミトコンドリアは臓器や細胞によって形態が異なり、その役割も異なっている。ミトコンドリア形態はミトコンドリアの機能と密接な関係があり、ミトコンドリア形態制御機構の破綻はミトコンドリア機能だけでなく、細胞分化に影響を与えることが知られている。正常なミトコンドリアの働きが個体発生に重要であることは明らかであるが、その詳細な分子メカニズムは未解明な部分が多い。MITOL はミトコンドリア外膜に4回膜貫通型のユビキチンリガーゼであり、ミトコンドリアの形態制御、ミトコンドリアと小胞体の接着機構の制御、細胞死の制御などさまざまな役割を担うことが明らかとされている。MITOL を全身で欠損させたマウスが胎生致死であることが報告されているが、発生や細胞の分化における MITOL の役割は未解明な部分が多く残されている。本研究では、発生における MITOL の役割の解明を目指し研究を行った。

【方法】 MITOL knockout (KO) 16HBE14o-細胞を作製した。16HBE14o-細胞を気管支細胞様の細胞へ分化誘導を行い、経上皮電気抵抗 (Trans epithelial Electric Resistance : TER) の測定、定量的 RT-PCR を行い、細胞の分化状態を比較した。

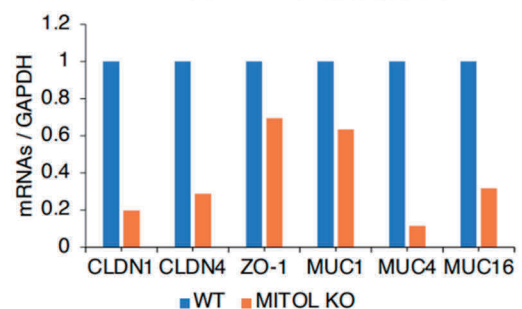
【結果】 ヒト気管支上皮細胞由来の 16HBE14o-細胞は、タイトジャンクションの形成などの正常な気管支細胞への分化能を保持した細胞である。MITOL の欠損が 16HBE14o-細胞の分化能に与える影響を確認するために、細胞をトランスウェル上に播種し、細胞の分化誘導を行った。16HBE14o-細胞は分化誘導が進むとタイトジャンクションを形成し、管腔側と基底膜側との間でイオンの透過が制限されるため TER が生じる。野生型の 16HBE14o-細胞と比較して MITOL 欠損細胞では TER の減少、タイトジャンクションに関わる CLDN1、CLDN4、Occludin、ZO-1 の mRNA 量の減少が認められた。気管支上皮細胞は粘液を分泌し、粘液は気管支に入ってきた異物を補足し、異物の排除を助けている。MITOL 欠損細胞では MUC1、MUC4、MUC16 の mRNA 量の減少が認められた。MITOL の欠損はタイトジャンクションの形成や粘液分泌の低下が認められたことから、気管支上皮細胞への分化に異常を引き起こすことが示唆された。MITOL を欠損した 16HBE14o-細胞のミトコンドリアの形態を観察すると、小さな分裂状態のミトコンドリアを持つ細胞の増加が認められた。MITOL 欠損細胞ではミトコンドリア外膜上の Drp1 受容体である Mid49 の蓄積が認められたことから、Drp1 がミトコンドリアにリクルートされることによりミトコンドリアの分裂を亢進させることが示唆された。今後、Mid49 蓄積によるミトコンドリアの分裂と気管支上皮細胞の分化の関連を解明、およびヒト人口疑似胚であるガストロイドを用いて、発生における MITOL の役割を解明したい。

MITOL 欠損はミトコンドリア形態異常と細胞分化異常を引き起こす

MITOL 欠損によるミトコンドリア断片化



MITOL 欠損による細胞分化異常

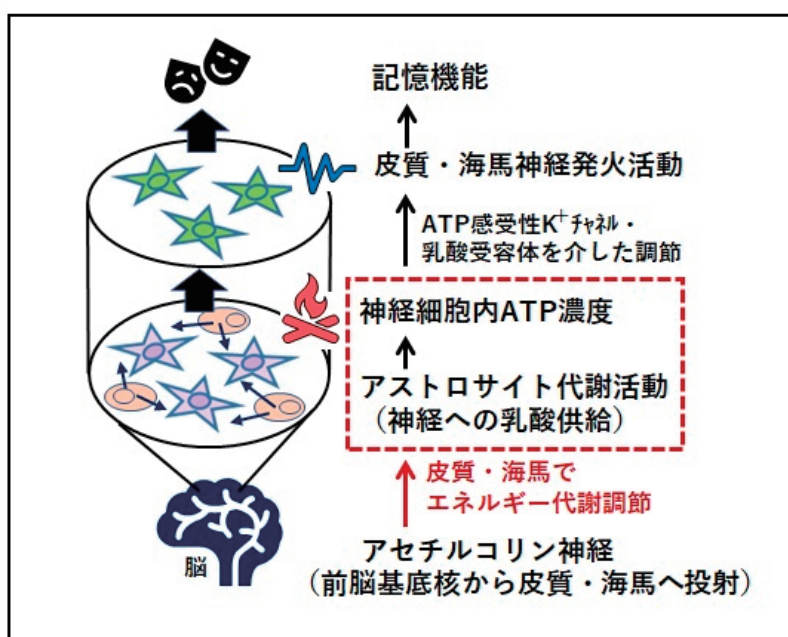


【目的】 アセチルコリン神経変性による脳内アセチルコリン減少は、アルツハイマー型認知症における記憶障害の中核病態として知られる。本研究の目的は、神経伝達物質の一つであるアセチルコリンが新たに脳のエネルギー代謝調節機能を持つことを示し、アルツハイマー型認知症においてアセチルコリン欠乏による脳代謝異常が記憶障害を引き起こしているという病態仮説を検証することである。

【方法】 前脳基底核アセチルコリン神経に興奮性光感受性チャネルを発現させた遺伝子改変マウスに、皮質・海馬のアストロサイト（脳代謝調節に関わるグリア細胞の一種）の細胞内カルシウムと興奮性神経の細胞内 ATP（エネルギー分子）の濃度変化をそれぞれ感知する蛍光センサー（GFAP-GCamp と Thy1-ATeam）を発現させ、アセチルコリン神経の光活性化に伴う皮質・海馬のアストロサイトと興奮性神経の活動応答・代謝変動を、ファイバフォトメトリーを用いて計測した。また、化学遺伝学手法（DREADD システム）により前脳基底核アセチルコリン神経活動を選択的に抑制したマウスに空間記憶試験を実施するとともに、記憶試験中の海馬アストロサイト細胞内カルシウム活動をファイバフォトメトリーにより計測した。

【結果】 前脳基底核アセチルコリン神経の光活性化により皮質・海馬のアストロサイト活性化がみられたが、皮質神経の細胞内 ATP 濃度は明らかな変化を示さなかった。この結果は、アセチルコリン神経の持つ脳代謝調節機能は、我々が最近報告したセロトニン神経の脳代謝調節機能とは異なることを示す。現在、アセチルコリン神経の光活性化に伴うアストロサイトから神経への乳酸（エネルギー中間体）供給活動の評価計測を行うため準備中である。次に、アセチルコリン神経抑制マウスに空間記憶試験を行ったところ有意な記憶低下を示した。当マウスがアルツハイマー型認知症のモデル動物であることを証明するため、アルツハイマー型認知症の治療薬であるコリンエステラーゼ阻害薬による記憶回復を現在検証中である。またこのアセチルコリン神経抑制マウスは、記憶低下と同時に海馬のアストロサイト活動の低下傾向を示した。本研究はアセチルコリン神経の新たな機能解明と、アセチルコリン神経変性により生じる記憶障害の中間病態として、アストロサイト活動を含めた脳代謝活動に異常が生じているという新たな病態仮説の検証に向け、引き続き実験を進める予定である。

本研究の全体構想—アセチルコリン神経の脳代謝調節機能とアルツハイマー型認知症への病態関与の解明

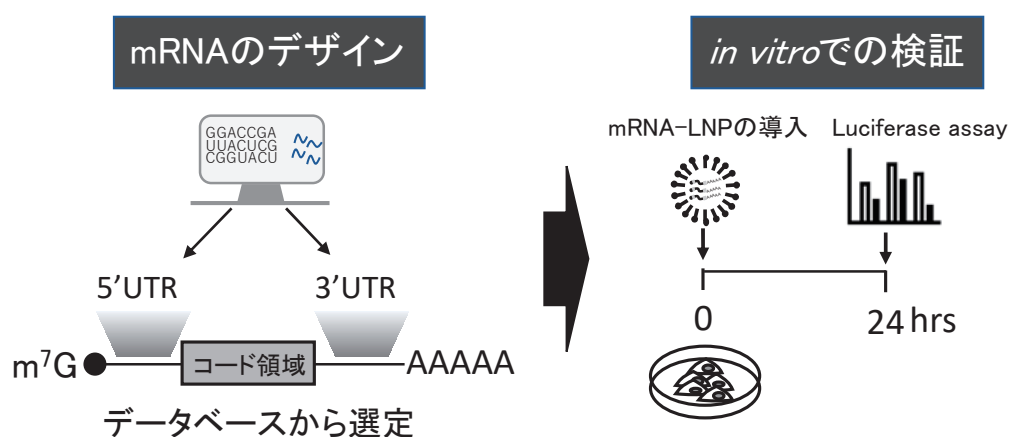


【目的】 DNA や mRNA などといった核酸を細胞に導入し、目的タンパク質を発現させる手法は 1990 年に登場し、遺伝子導入に核酸を用いるという概念が生まれた。当初、mRNA は細胞内において不安定であり、その発現が一過性のものであることから、DNA を用いた遺伝子導入法が主流となった。しかし DNA を用いた遺伝子導入には宿主ゲノムへの DNA 挿入による遺伝子変異および癌化の危険性が伴うという問題が浮上してきた。そこで近年、DNA を用いる方法に代わって細胞外で人工的に合成した mRNA を用いる方法が注目を集め、mRNA 医薬や mRNA ワクチンとして使用されている。他方、mRNA は副反応発現等の問題があるため、いかに細胞内での mRNA のタンパク質発現を効率化し、投与量を減らすことができるかが課題である。以上の背景を踏まえて、本研究では mRNA ワクチンの発現効率化を介して、より有効で安全なワクチン開発基盤の構築を目的とした。この目的を達成するために、まずは mRNA ワクチンに最適な非翻訳領域 (UTR) を選定した。その後、培養細胞株を用いた *in vitro* 実験により、選択した UTR を搭載した mRNA ワクチンの発現量を検証した。

【方法】 まず初めに、mRNA ワクチンが実際に導入されタンパク質を発現する骨格筋細胞において、翻訳効率の高い遺伝子を選定するため、公共データベースにアップロードされているデータを用いた。具体的には、ヒト骨格筋細胞と HeLa 細胞を用いた Ribosome profiling のデータを用い、各遺伝子の翻訳効率を算出した。選定した遺伝子の UTR を搭載した Luciferase mRNA を *in vitro* 合成した。これら合成した mRNA を HEK293A 細胞または C2CL12 細胞に導入し、翻訳効率を測定した。

【結果】 Ribosome profiling のデータベースに登録されているものの中から、ヒト骨格筋細胞および HeLa 細胞を用いたデータを使用し、すべての遺伝子の翻訳効率をそれぞれ算出した結果、骨格筋細胞で特異的に翻訳効率の高い遺伝子を同定した。得られた遺伝子の 5'UTR、3'UTR の両方を搭載する mRNA、片方ずつを搭載する mRNA を *in vitro* 合成し、HEK293A 細胞および C2C12 細胞に導入し、Luciferase の発光量を測定した結果、高い発現を示す UTR を複数種同定した。今後、*in vitro* 実験より選定した UTR 候補について、マウスを用いた *in vivo* イメージングによる二次スクリーニングを行う予定である。

実験の概略図

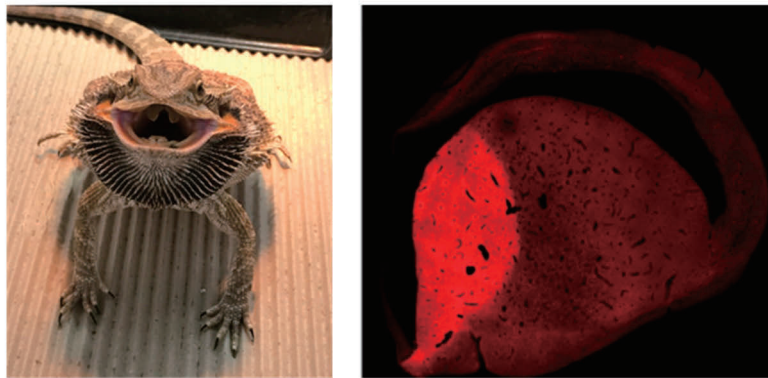


【目的】本研究の目的は睡眠・覚醒における「前障 (claustrum)」の役割解明である。哺乳類の脳領域である前障は全ての大脳皮質領野と相互投射を有していることから意識や記憶、感覚情報の統合など、高次な機能を担う脳領域であると推測されている。多くの脳疾患に関与しているとの報告もある。しかしながらその機能は謎に包まれたままである。その理由の一つに、前障の薄いシート状の構造のために、電気生理学的な記録が難しいことが挙げられる。研究代表者らはオーストラリアドラゴン (*Pogona vitticeps*) の脳において前障を発見した (Norimoto et al., Nature, 2020)。ドラゴンの前障は遺伝子発現、神経接続パターンともに哺乳類の前障に酷似していた。大きな違いはその形状である。ドラゴンの前障は楕円形で厚みのある構造をしており、神経活動の記録を行いやすい。この利点を生かすことで、哺乳類に先駆けて前障の役割を明らかにできる可能性が高い。そこで本研究では、睡眠・覚醒時における前障の神経活動を観察・解析し、その役割を明らかにすることを目指した。

【方法】*ex vivo* 脳標本を作製し、薬理学的手法で睡眠・覚醒様状態を再現した。その際の神経活動を観察することで、前障の睡眠・覚醒時脳波における必要性を検証した。

【結果】前障から自発的に徐波を発生する *ex vivo* 標本に、覚醒誘導作用があることが知られるセロトニン (5-HT) を還流適用したところ、覚醒様の脳波を観察することに成功した。この覚醒様脳波は前障よりもはるか後側にある脳領域である、後背側脳室隆起 (pDVR) から発生し、前障へと伝播しているように見えた。そこで、pDVR のみからなる小さな切片を作製し、この欠片にセロトニンを適用したところ、覚醒様脳波が観察された。つまり、セロトニン誘導脳波の発生源が後背側 DVR であることが明らかになった。

ドラゴン (*Pogona vitticeps*) とその前障 (右)

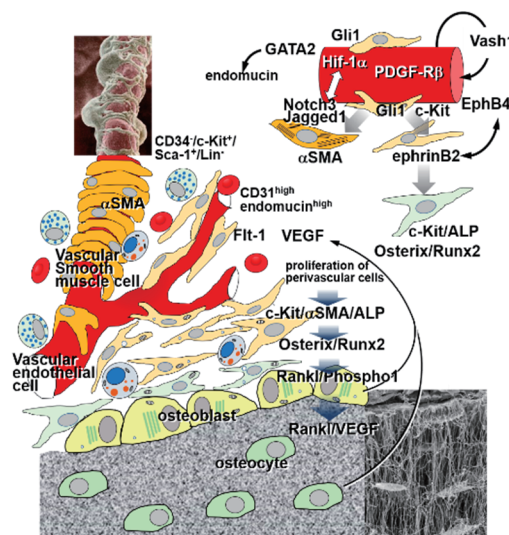


【目的】本研究は、微小環境変化によって、組織が形態的・機能的に異なる別の組織に転換する現象（組織転換）が生じ得るのか、また、その細胞・組織間メカニズムを明らかにすることを目的とした。本目的に対する解析部位として、血管および骨組織に注目し、1) 骨から血管への転換：環境変化（副甲状腺ホルモン投与）によって骨形成を行う骨芽細胞が血管系の細胞へと転換しうるか、2) 血管から骨への転換：骨とは離れた動脈の細胞が成熟した骨芽細胞になり骨基質形成を行うとともに骨の細胞群を誘導するなど、血管が骨組織に転換してしまう「血管骨化」が起こりえるか、また、その誘導メカニズム解明を中心に動物モデルを用いた解析を遂行した。

【方法】1. 「骨から血管系への転換」の解析：骨組織に存在する骨芽細胞が、骨組織内の血管系を構成する血管内皮細胞・周皮細胞・平滑筋細胞に転換しうるか明らかにするため、野生型マウス（C57BL/6J）、ならびに、Gli1 陽性未分化間葉系幹細胞の子孫細胞追跡が可能な Gli1-CreErt2;Rosa26-tdTomato マウスに副甲状腺ホルモン（parathyroid hormone：PTH）を投与し、大腿骨および脛骨における組織学的解析や遺伝子発現解析を行った。2. 「血管から骨への転換」の解析：大動脈が骨組織に転換する現象とそのメカニズムを明らかにするため、高リン・高カルシウム血症を呈する *klotho* 遺伝子変異 (*kl/kl*) マウス大動脈の組織学的解析および遺伝子発現解析を行った。

【結果】1. 「骨から血管への転換」の解析：PTH を投与したマウスの骨組織では、c-kit 陽性/ α SMA 陽性を示す間葉系細胞が増加しており、これらの間葉系細胞の一部は骨芽細胞のマーカーである alkaline phosphatase 陽性を示していた。一方、 α SMA 陽性血管平滑筋細胞の増加も認められた。Gli1-CreErt2;Rosa26-tdTomato マウスを用いた解析から、PTH 投与で Gli1 陽性間葉系細胞およびその子孫細胞が増加すること、Gli1 陽性細胞は骨芽細胞・骨細胞だけでなく血管平滑筋細胞にも分化する可能性が推測された。このことは、成熟骨組織の血管系の細胞は、一部骨芽細胞系細胞と由来を同一とする間葉系幹細胞から分化することを示唆しており、今後は、骨芽細胞から血管系の細胞へ直接転換する可能性について解析を進めてゆきたい。2. 「血管から骨への転換」の解析：*kl/kl* マウスの大動脈では、中膜に骨基質蛋白を沈着させた石灰化基質が認められた。また、*kl/kl* マウスの血管平滑筋細胞は、骨芽細胞様の細胞へと変化しており、骨基質と同様に基質小胞様構造物を介した生物学的な石灰化を生じさせていた。同部位では、骨芽細胞や骨芽細胞分化関連因子の遺伝子発現が上昇しており、石灰化基質に埋め込まれた骨細胞様細胞や破骨細胞様細胞も認められたことから、大動脈が単純に石灰化を受けるのみならず、機能的な骨組織が形成される血管骨化が生じている可能性が推測された。現在、血管平滑筋細胞から骨芽細胞様細胞への転換を誘導する候補因子をいくつか絞り込んでおり、これら誘導因子による血管-骨転換について検索を進めている。

骨組織における骨芽細胞・血管・間葉系細胞の相互作用

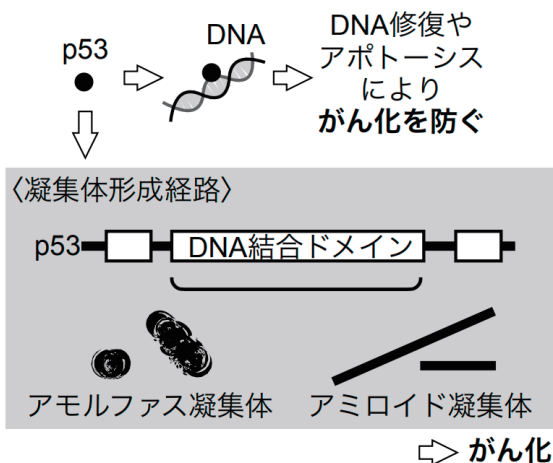


【目的】 がん抑制タンパク質 p53 は、DNA が損傷した際に DNA 修復を誘導し、修復が困難であればアポトーシスを誘導することで細胞のがん化を防ぐという機能を有しており、「細胞の番人」と呼ばれている (図)。がんの約半数で p53 の機能喪失が見られ、p53 の機能を保持することはがん治療・予防の観点から非常に重要であるが、p53 をターゲットとした治療法の確立が難航している。p53 は、転写活性化ドメイン、DNA 結合ドメイン、四量体化ドメインからなるが、p53 の DNA 結合ドメインは凝集することが報告されており (図)、さらにホットスポット変異の導入により凝集性が高くなることも報告されている。このことから機能を有する p53 が、すでに形成された凝集体に取り込まれることで p53 の機能が喪失し、がん化する説が提唱されている。一方で、凝集体としては“アモルファス (不定形な) 凝集体”や“アミロイド凝集体”など複数の形態の混合状態であることがわかっているものの、凝集体の形状が不均一であるため解析は進んでいないのが現状である。本研究では独自に発見した、p53 のアミロイド凝集体形成法により調製した p53 アミロイド凝集体の詳細な分析を行い、これまではアモルファス凝集体とアミロイド凝集体が同時に生成するために困難であった p53 アミロイド凝集体の分析を可能にすることである。これにより、がんにおける p53 アミロイド凝集体の関連が明らかとなる。

【方法】 野生型 p53-DNA 結合ドメイン (p53-DBD) タンパク質は GST 融合型として大腸菌発現系にて作製、精製し調製した。試験管系での p53-DBD のアモルファス凝集体およびアミロイド凝集体は、蛍光色素 8-(phenylamino)-1-naphthalenesulfonic acid (ANS) および Thioflavin T (ThT) にてモニタリングした。また、SK-BR-3 細胞の p53 を、市販の p53 抗体 Pab240、DO-1、および自作 p53 アミロイド認識ポリクローナル抗体にて蛍光細胞免疫染色した。さらに、¹⁵N 標識 p53-DBD 溶液の ¹H-¹⁵N HSQC スペクトルを 900 MHz NMR 分光器 (Avance III, Bruker, Karlsruhe, Germany)・三重共鳴クライオプローブで取得した。

【結果】 ANS の蛍光によりアモルファス凝集体を、ThT の蛍光によりアミロイド凝集体をモニターした。p53-DBD に試薬 A を添加することでアモルファス凝集体の形成が大幅に抑制されると同時にアミロイド凝集体の形成が大幅に促進されることを発見した。p53-DBD が形成するアミロイド凝集体をさらに詳細に分析するために、p53-DBD を認識可能なポリクローナル抗体を作出し、p53 の変異を有する培養がん細胞 SK-BR-3 細胞にて蛍光顕微鏡観察を行った。その結果、市販抗体では見られない、細胞質に顆粒様の凝集体が確認できた。加えて、p53-DBD と試薬 A が直接相互作用するか確認するために、精製した ¹⁵N 標識 p53-DBD タンパク質溶液の ¹H-¹⁵N HSQC スペクトルを、試薬 A の添加前後で取得した。¹H-¹⁵N HSQC スペクトルを比較したところ、多くのピークの変化が確認でき、試薬 A と p53-DBD の直接的な作用が示唆された。

p53の凝集体形成によるがん化メカニズムの概念図



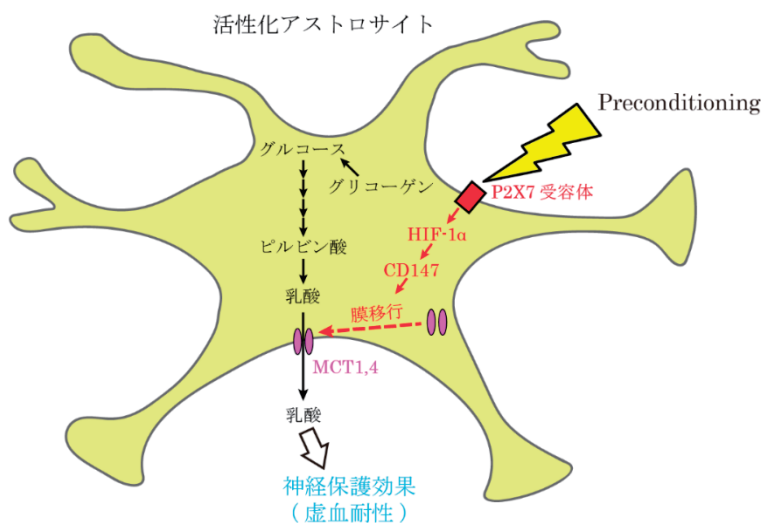
140 脳虚血耐性における乳酸の役割の解明	平山 友里
-----------------------	-------

【目的】 虚血耐性とは、先行して非侵襲的な短時間虚血（preconditioning : PC）を経験することにより、その後の侵襲的な長時間虚血に対する抵抗性を獲得する現象である。我々はこれまでに、グリア細胞の一種であるアストロサイトが PC によって活性化し、ATP 受容体である P2X7 受容体を発現亢進することで脳虚血耐性を誘導することを明らかにしてきた（アストロサイト依存的脳虚血耐性）。しかし、P2X7 受容体の下流のメカニズムについては不明であった。そこで我々は、このメカニズムの解明のために予備実験を行ったところ、アストロサイトから P2X7 受容体依存的に放出される「乳酸」が虚血耐性に関与することを示唆する結果が得られた。本研究は、「脳虚血耐性による保護作用はアストロサイト P2X7 受容体依存的な乳酸放出により誘導される」との仮説を提唱し、マウス一過性脳虚血モデルを用いてその仮説の検証及び乳酸放出制御機構を明らかにすることで、新しい脳卒中治療戦略の開発につなげることを目的とした。

【方法】 *In vivo* 実験では、既に作製済みである全身性 P2X7 受容体欠損（P2X7-KO）マウスと野生型（WT）マウスを用いた。一過性脳虚血モデルは中大脳動脈閉塞（MCAO）の手技にて作製し、短時間虚血（PC）は 15 分間 MCAO、長時間虚血は 1 時間 MCAO を使用して脳虚血耐性モデルを作製した。脳虚血時の細胞外乳酸濃度は *in vivo* マイクロダイアリシス法を用いて測定した。乳酸輸送担体等の局在は免疫組織化学による二重染色にて確認した。*In vitro* 実験では、アストロサイト初代培養系を用い、P2X7 受容体依存的な乳酸放出のメカニズムを解析した。

【結果】 MCAO の手技にて一過性脳虚血モデルを作製し、1 時間 MCAO 中の細胞外乳酸濃度を測定したところ、PC を予め負荷したマウスは PC なしのマウスと比較して有意に細胞外乳酸濃度が上昇していたが、その現象は P2X7-KO マウスでは見られなかった。また、乳酸の脳室内投与は 1 時間 MCAO により惹起される脳梗塞体積を顕著に縮小させることもわかった。PC 後の活性化アストロサイトでは、乳酸放出に関与する輸送体 MCT1、MCT4、それら輸送体のシャペロンである CD147 の発現が増加していた。アストロサイト初代培養系を用いた *in vitro* 実験により、P2X7 受容体活性化は CD147 発現を亢進し、MCT1 と MCT4 の膜発現を CD147 依存的に促進することが明らかとなった。さらに、PC による 1 時間 MCAO 中の細胞外乳酸濃度上昇は CD147 中和抗体の投与により抑制され、虚血耐性効果も見られなかった。従って本研究により、アストロサイトは P2X7 受容体依存的な乳酸放出により虚血耐性を誘導することが示唆された。

アストロサイト依存的脳虚血耐性の作用機序

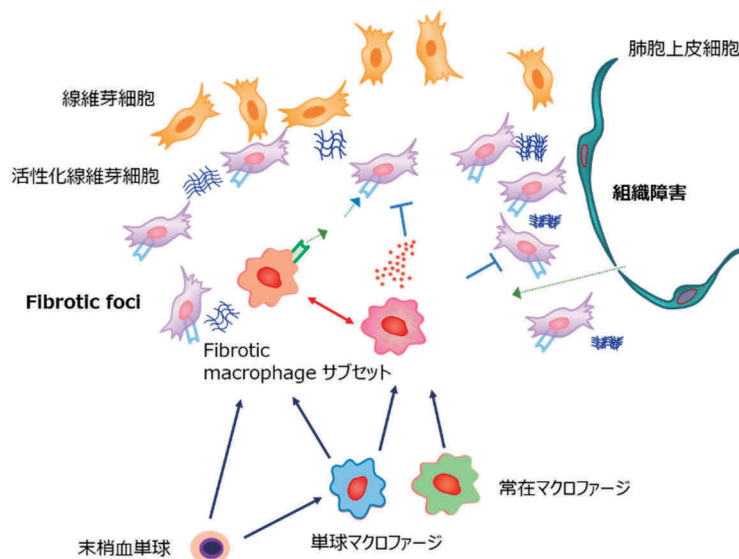


【目的】特発性肺線維症 (IPF) は、予後不良の指定難病であり、現時点においても根本的な治療薬は開発されていない。我々はマウス肺線維症モデルにおいて線維化の進行とともに患部に集まるある特定の単球が線維症の発症に関与していることを解明し、特徴的な 2 核様の核型から Segregated atypical monocyte (SatM) と名前を付けて報告した (Nature 2017)。続いて、我々は線維化の発症時には非免疫系細胞の細胞死が起こり始めること、またその死にゆく細胞から CXCL12 が発現され、線維化の起点となるマクロファージである SatM が患部に集積することを明らかにし、免疫細胞と非免疫細胞の相互作用が線維症発症の鍵であることを見出した。さらに、線維化期に誘導される RBM7 という遺伝子が、NEAT1 という long non-coding RNA の分解を介して線維症の発症に関与していることを解明した (Immunity 2020)。先行研究により見出された免疫細胞・非免疫細胞の相互連関による線維症発症過程を検討することで、線維症の発症過程の包括的な理解を目指す。

【方法】線維化病変の新規病態解明を肺線維症患者検体のシングルセル RNA-seq 解析および空間的遺伝子発現解析により検討した。

【結果】間質性肺炎患者の肺組織、気管支肺胞洗浄液、末梢血のシングルセル RNA-seq 解析および空間的遺伝子発現解析を行い、線維化の病勢と顕著な相関を示す Fibrotic macrophage の population を同定することが出来たとともに、複数の異なった免疫細胞サブセットが線維化の進行と関連していることを見出した。さらには、肺組織、末梢血のシングルセル RNA-seq 解析との統合解析を行い、遺伝子発現パターンの類似性から細胞を擬似時間軸で並べ細胞の分化経路を調べる RNA velocity を用いた trajectory 解析を行ったところ、異なった単球サブセットが線維化と関連する多様なマクロファージサブセットを形成することがわかった。加えて、空間的遺伝子発現解析との統合解析により線維化促進性のサブセットは進展した線維化病変内で集積して foci を形成しており、周囲の線維芽細胞と緻密な代謝連関を形成し線維化病変の維持・進展を行っていることがわかった。進展した線維化肺は荒廃した終末期の病像ととらえられてきたが、線維芽細胞活性化を維持し線維化を進展させる活発な免疫応答があることが示された。免疫細胞・非免疫細胞の相互連関ネットワークによる線維化制御メカニズムを検討することで、進展した線維化肺も治療可能な分子が同定可能と考えられた。

多様な細胞群の相互作用による疾患の発症・進展の時間空間的なダイナミズムの解明



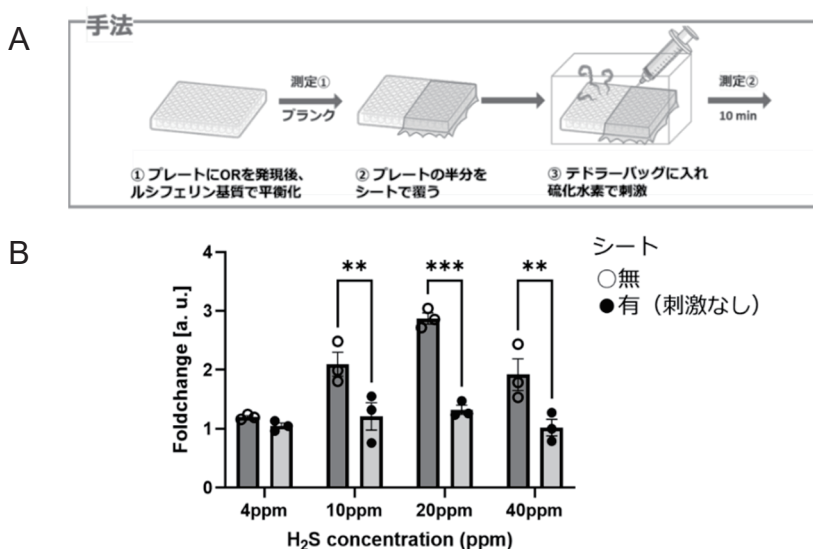
Fibrotic macrophageの相補的な代謝連関がFibrotic lung fibroblastを活性化する

【目的】 硫化水素 (H₂S) は、揮発性硫黄化合物であり悪臭防止法において特定悪臭化合物に指定される。硫化水素は嗅覚閾値が低く、しばしばその悪臭が問題となる。一方で、硫化水素は生体内でも存在し、L-システインもしくはD-システインを基質に cystathionine-lyase (CSE) などの酵素反応によって生合成されることが分かっている。硫化水素は生体内において、神経伝達や血管緊張性、炎症の調節などに作用し、細胞の酸化ストレスからの保護や生体内におけるエネルギーの産生などの役割を担っている。これらの生理活性をもつことから、硫化水素は一酸化炭素 (CO) や一酸化窒素 (NO) に次ぐ第3のガス状の生理活性シグナル伝達分子であると言われている。乳がん細胞において嗅覚受容体 OR2T6 が選択的に発現しており、がん細胞増殖と OR2T6 の発現量に相関関係があることが報告されている。しかし、OR2T6 が受容するアゴニストについてはこれまで明らかになっていなかった。著者は、独自の嗅覚受容体解析技術により、OR2T6 が硫化水素応答受容体であることを同定した。そこで、本研究では乳がん細胞の OR2T6 を介した硫化水素応答性の検証と、その意義について解析することを目的とした。

【方法】 ヒト乳がん細胞 MCF-7 を対象に、OR2T6 のタンパク質発現の有無の確認のため、ウェスタンブロットを行った。硫化水素ガス刺激で OR2T6 の活性化を介した cAMP 産生が起きるかどうか確認するために、気相刺激 Glosensor アッセイ法によって解析した。また、硫化水素刺激における MCF-7 細胞内の遺伝子発現変化を調べるために RNA-Seq 解析を行った。

【結果】 ヒト乳がん細胞 MCF-7 における OR2T6 のタンパク質発現を確認した。気相刺激 Glosensor アッセイによって、MCF-7 細胞が硫化水素気相濃度依存的に cAMP を産生することを確認した。OR2T6 を過剰発現させた場合に、MCF-7 の硫化水素応答性が向上し、OR2T6 のアンタゴニストを添加すると硫化水素応答が抑制された。硫化水素刺激に伴う遺伝子発現変化を調べたところ、硫化水素刺激なしのコントロール、30 分間刺激、120 分間刺激でそれぞれ、がん原遺伝子 FOS の著しい遺伝子発現増加が確認された。このことから、OR2T6 を介した硫化水素応答により、MCF-7 細胞内で FOS の遺伝子発現が誘導されることが示唆された。

気相刺激 Glosensor アッセイを用いた MCF-7 細胞の硫化濃度依存的応答解析

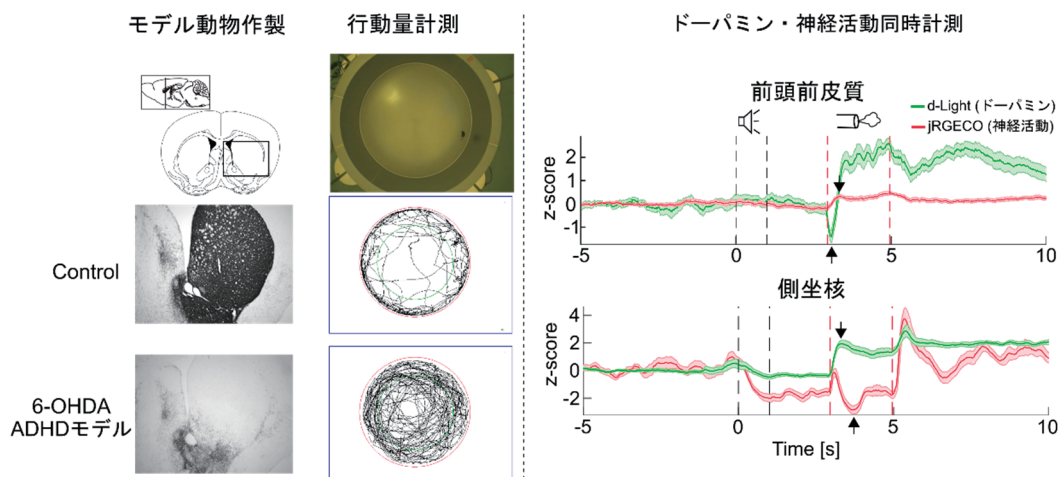


【目的】 本研究の目的は、注意欠陥多動性障害（ADHD）モデル動物を対象に、前頭前皮質の神経動態を解明することである。ADHD とは不注意、多動、衝動性の行動がある神経発達性精神障害であり、小児の 5~8%が罹患する。この症状が起因となり、ADHD の 2 次的障害である社会的な差別やいじめなどが生じるため、ADHD の生物学的原因の究明や ADHD を診断するための予測アルゴリズムの生成は、治療薬の創出や早期的な療育法の提案などに非常に重要である。これまでは、PET や fMRI を用いた ADHD 患者の脳構造や脳活動を計測した研究が多い。しかし、計測機器の分解能や環境の制限などにより、①前頭前皮質のドーパミン濃度が上昇することにより、行動と神経活動がどのように変化するのか？さらに②その神経活動変化により、なぜ症状が改善するのかについては、未だに不明なままである。本研究では、行動・ドーパミン・神経活動を同時計測する実験環境を構築し、ADHD モデルマウスに適用することで、ADHD における前頭前皮質の神経動態を解明することを目指した。

【方法】 実験 1. ADHD モデルマウスの作製と行動評価：実験 1 では、マウス幼獣の脳室に 6-OHDA（ドーパミン神経を変性させる薬品）を注入し、ADHD モデルマウスを作製した。この個体と正常の個体を円形のオープンフィールドに 10 分間入れ、行動量を測定した。実験 2. 側坐核および前頭前皮質のドーパミン濃度・神経活動の同時計測：実験 2 では、3 か月齢の C57BL/6J マウスを用いて、前頭前皮質および側坐核にアデノ随伴ウイルス（AAV）を用いて、d-Light（ドーパミンセンサ、緑）と jRGECO（カルシウムセンサ、赤）を細胞に発現させた。注入部位上部 200 μm に、光ファイバーの先端が来るようにカニューレを挿入し、光学計測できるように留置した。この個体に対し、8 kHz の音刺激と Air puff 刺激による恐怖条件づけを行い、その行動中に 520 nm（緑）と 610 nm（赤）の蛍光を計測し、ドーパミンと神経活動の同時計測を行った。

【結果】 幼獣の脳室に 6-OHDA を注入した個体と Control 個体を比較すると、側坐核、内側被蓋野において、チロシンヒドロキシラーゼ（TH、ドーパミンを産出する酵素）陽性細胞の脱落が観測された（図左）。さらに、オープンフィールドによる行動量を計測した結果、Control 個体と比較して 6-OHDA 個体では、円の縁の他に、円の中心などにも移動する行動が観測された。また、一つの場所にとどまる行動が少なく、常に動いている行動が観測された（図中央）。AAV ウイルスを用いて d-Light と jRGECO を前頭前皮質と側坐核に発現させ、行動中の被験体からドーパミン濃度変化と神経活動を記録した（図右）。前頭前皮質において、音の提示では d-Light および jRGECO では傾向に変化は観測されなかった。一方、嫌悪刺激提示に対して、d-Light の蛍光変化量は減少し、jRGECO の蛍光はわずかに増加した。また、側坐核においては、音の提示開始時に d-Light および jRGECO の蛍光が減少し、Air puff 提示では、d-Light の蛍光変化量は増加し、jRGECO の蛍光は減少した。

本研究で得られた結果

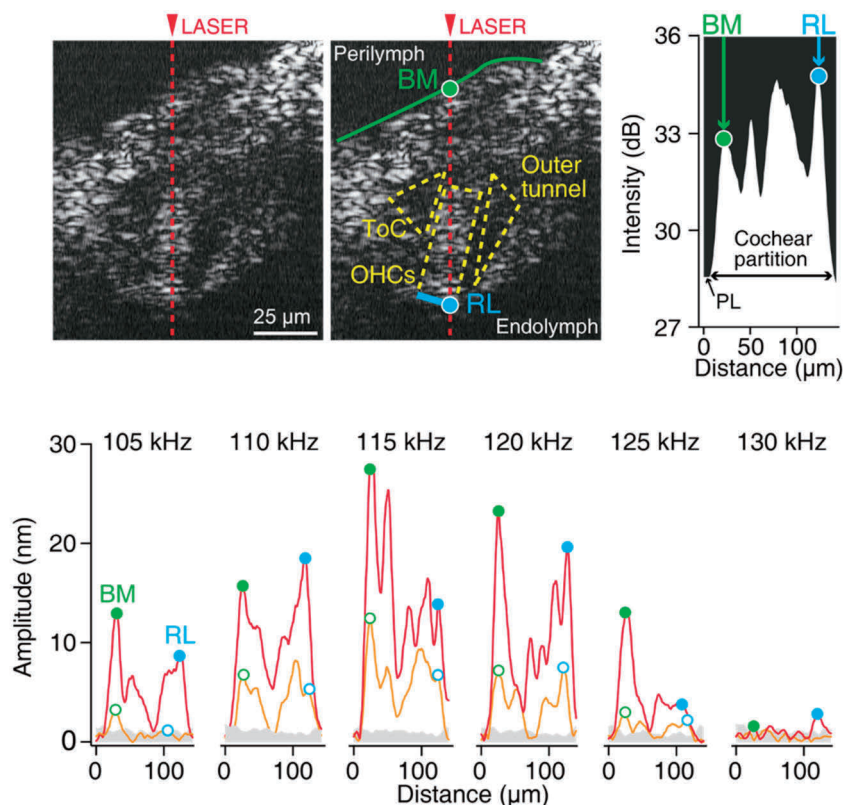


【目的】 超高齢化社会を迎える我が国で益々増加している難聴は、患者数が1,000万人を超え、他の感覚疾患や脳卒中の罹患者より段違いに多い。しかし、難聴病因の大部分は不明のため、治療薬や治療法には、30年以上もの間、殆ど進歩がなく、その開発は喫緊の課題である。原因不明の難聴の多くは蝸牛の異常に起因する。従って、蝸牛の音受容・応答の仕組みを解くことは、聴覚の成立機構の理解のみならず難聴の克服に必須である。本計画では当初難聴モデル動物を作製し、難聴モデルにおける微小振動を解析することを目的としていた。しかしながら予備実験の過程で、蝸牛内で非可聴域超音波を受容する領域を世界で初めて発見することができたため、独自の高性能光干渉断層撮影 (OCT) 装置を駆使し、超音波刺激による微小振動を解析することで蝸牛において非可聴域超音波を受容する有毛細胞の局在を実証することを目的とした。

【方法】 全身麻酔をかけたモルモット蝸牛を対象に、独自の高分解能 OCT 装置を用いて hook region と呼ばれる領域において感覚上皮帯の *in vivo* イメージングと微小振動解析を行った。

【結果】 Hook region における外有毛細胞の *in vivo* イメージングに成功した。さらに微小振動解析の結果、hook region の感覚上皮帯において外有毛細胞や基底板が 115 kHz で最も大きな振幅を示すことが確認され、それ以外の周波数では振幅は大きく減弱した。すなわち、非可聴域超音波に対して、最も大きく振動が惹起される感覚上皮帯が、hook region にあることが世界で初めて明らかになった。これらの成果は、従来謎とされてきた超音波聴覚のメカニズム解明に繋がるのみならず、超音波聴覚に着目した新たな難聴検査機器の創出など、臨床医学への橋渡し研究へ発展できると期待される。本研究で得られた成果を基盤として、今後超音波聴覚と加齢性難聴や騒音性難聴など様々な難聴との関係を調べることで、難聴の新規病態解明や新規治療戦略の提唱にも寄与していく。

蝸牛 Hook region における感覚上皮帯の断層撮影像と周波数別の微小振動動態

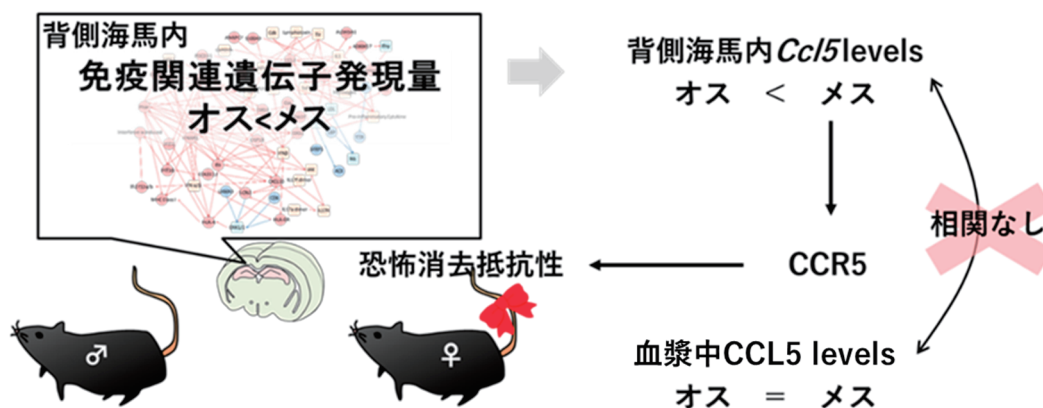


【目的】 恐怖記憶は生存に必須な記憶であるが、忘れられない強固な恐怖記憶は時として心的外傷後ストレス障害 (PTSD) などの恐怖関連疾患に結びつく。現在の PTSD 治療薬は極めて限定的で、日本や米国で承認されている薬物はセロトニン選択的再取り込み阻害薬 (SSRI) であるセルトラリンとパロキセチンのみである。SSRI は効果発現までに 2 週間以上要することや治療抵抗性の患者が約 30% 存在するため、SSRI 以外の分子を標的とした新規治療薬の開発が切望されている。現在、恐怖関連疾患に対する新規治療薬の標的分子の探索は、恐怖関連疾患の治療理論モデルである恐怖消去課題を用いて精力的に行われている。我々は、これまでに恐怖関連疾患の有病率が男性に比べて女性で約 2 倍高いことに注目し、恐怖消去の性差とその分子機構の解明に向けて研究を行ってきた。その成果として、雌マウスは雄マウスに比べて恐怖消去課題抵抗性を示すことを見出した。さらに、『雌マウスは雄マウスに比べて背側海馬内 CCL5-CCR5 経路が活性化しており、それが原因で恐怖消去抵抗性を示す』という仮説を得た。そこで、本研究は我々の仮説を検証するとともに、CCL5-CCR5 を標的とした新規治療方策 (新規治療薬と分子マーカー) の可能性を探ることを目的とした。

【方法】 1. 恐怖消去の性差に対する背側海馬内 CCL5-CCR5 の関与の検討：雌雄の C57BL/6J マウスをフットショックが流れる箱に入れ、フットショック (0.75 mA, 2 秒間) を 3 回与え、恐怖条件づけを行った。翌日、雌マウスに対しては CCR5 拮抗薬であるマラビロク (0.5 or 1 μ g/site) を、雄マウスに対しては recombinant CCL5 (10 or 20 ng/site) を背側海馬へ投与した。投与の 30 分後に恐怖消去として、フットショックを受けた箱へマウスを 20 分間入れた。この薬物投与と恐怖消去の組み合わせを合計 5 日間実施した。その後、薬物投与部の確認用に 0.5% エオジンを背側海馬に投与し、抜脳した。摘出した脳を 40 μ m の切片とし、エオジンによる染色範囲から、薬物投与部を同定した。恐怖条件づけ時及び恐怖消去時に示したすくみ反応 (% freezing) を恐怖記憶の指標として解析した。2. 腹腔内 CCR5 拮抗薬投与による雌雄の恐怖消去促進効果の検討：薬物投与方法を腹腔内投与に変更したことを除いて、実験 1 と同様の方法で恐怖消去課題を行い、薬物効果を解析した。なお、マラビロクの投与濃度は 20 mg/kg とした。3. 恐怖消去後の雌雄の背側海馬内と血漿中 CCL5 量の相関解析：恐怖消去後の生体内 CCL5 濃度の解析として、実験 1 と同じ方法で 5 日間の恐怖消去を行い、最後の恐怖消去の 1 時間後に背側海馬と血漿を採取した。背側海馬内 *Ccl5* mRNA 量は real time RT-PCR 法を、血漿中 CCL5 量は ELISA 法を用いて解析した。

【結果】 マラビロク (1 μ g/site) を投与することで雌マウスの恐怖消去時の % freezing が低下し、恐怖消去が促進した。一方、今回の濃度の recombinant CCL5 を投与しても雄マウスの恐怖消去時の % freezing は影響を受けなかった。背側海馬内投与と異なり、マラビロク (20 mg/kg) の腹腔内投与では、雌マウスの恐怖消去時の % freezing が増加し、恐怖消去が抑制された。背側海馬内 *Ccl5* mRNA 量と血漿中 CCL5 量の間に相関はなかった。

研究成果に基づく恐怖消去の性差を担う分子機構の仮説



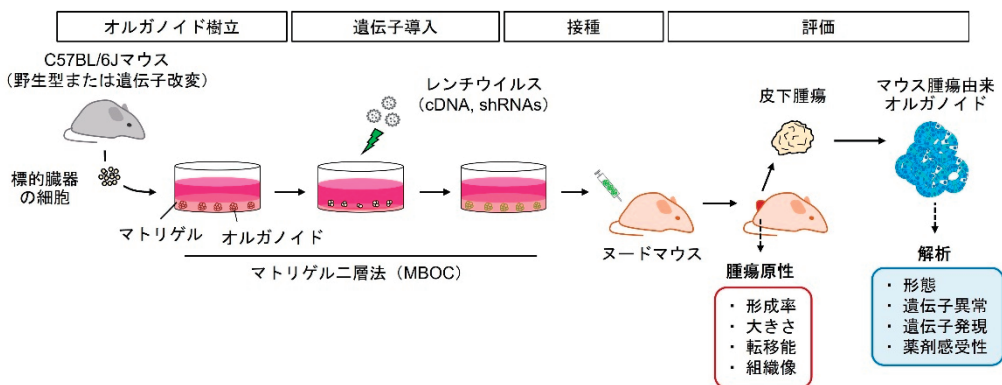
146 Ex vivo発がんモデルを駆使した子宮体がんの本態解明	丸 喜明
---	------

【目的】 がんは基本的に遺伝子異常の病気であり、近年の網羅的解析技術の発達により、がん特異的な異常が多数同定されている。こうした遺伝子異常のうち、実際に発がんに寄与しているものが何かに関する検証については個体レベルでの病態の再現により行うことが従来一般的であった。当研究グループでは遺伝子改変マウス（GEM）を代替・補完するために、遺伝子改変したマウス由来オルガノイド（OR）をヌードマウス皮下に接種して腫瘍原性を評価する『ハイブリッド型発がんモデル』の開発を進めてきた。本手法では各がん腫で高頻度のゲノム異常やシグナル経路の異常を再構成することで、多段階発がん過程を再現可能であり、基本的に GEM の結果と同等の結果が得られる。子宮内膜 OR（EmOR）では変異型 *Kras* と *Cdkn2a* 発現抑制あるいは *Trp53* 欠失を組み合わせることで高率に癌肉腫が誘導可能であることを見出したが、過去の GEM での結果と異なり腺癌の誘導には成功していなかった。一方、EmOR の長期間培養後に同様の実験を行ったところ、偶然にも転移性腺癌が誘導された。その後、腫瘍由来 OR や皮下接種前の遺伝子改変 OR を詳細に解析したところ、*Tgfbr2* の段階的なコピー数変化が確認された。そこで本研究では *Tgfbr2* に着目し、EmOR を用いたハイブリッド型発がんモデルを駆使して変異型 *Kras* と *Tgfbr2* 欠失に関連した発がん転移促進的な遺伝的相互作用および分子機構を解明することを目的に実験を行った。

【方法】 3 種類の GEM (*Kras^{LSL-G12D/+}*, *Kras^{LSL-G12D/+}; Tgfbr2^{lox/lox}*, *Kras^{LSL-G12D/+}; Tgfbr2^{lox/+}*) から EmOR を作製し、レンチウイルスを用いて *Cre* や *shRNA* を導入することで *in vitro* で遺伝子改変を行った。その後、遺伝子改変 OR をヌードマウス皮下に接種し腫瘍原性を評価した。皮下腫瘍が確認された場合は、病理組織学的解析を行うとともに、腫瘍の一部から OR を樹立し、ゲノム PCR やウェスタンブロッティングを実施し、皮下接種前 OR と比較した。

【結果】 EmOR に変異型 *Kras* と *Tgfbr2* 両アレル欠失を組み合わせると、ヌードマウス皮下で扁平上皮への分化を伴う腺癌が誘導されたが転移は確認されなかった。そこで *Cdkn2a* あるいは *Pten* 発現抑制をさらに追加したところ、*Cdkn2a* 発現抑制では肉腫成分のない転移性癌がほぼ全例で誘導されたが、*Pten* の方は転移誘導はごく一部に限られた。変異型 *Kras* と *Tgfbr2* 片側アレル欠失の組み合わせでは腫瘍化に不十分であったが、さらに *Cdkn2a* あるいは *Pten* 発現抑制を追加したところ、それぞれ主に癌肉腫と癌が誘導され、一部では転移も確認された。また、樹立した腫瘍由来オルガノイドでは野生型 *Tgfbr2* アレルが高頻度に欠失していた。以上のように、本研究では *Tgfbr2*, *Cdkn2a* および *Pten* が変異型 *Kras* を発現した子宮内膜細胞の発がん転移において重要な役割を担っていることが明らかとなった。

オルガノイドを用いたハイブリッド型発がんモデル

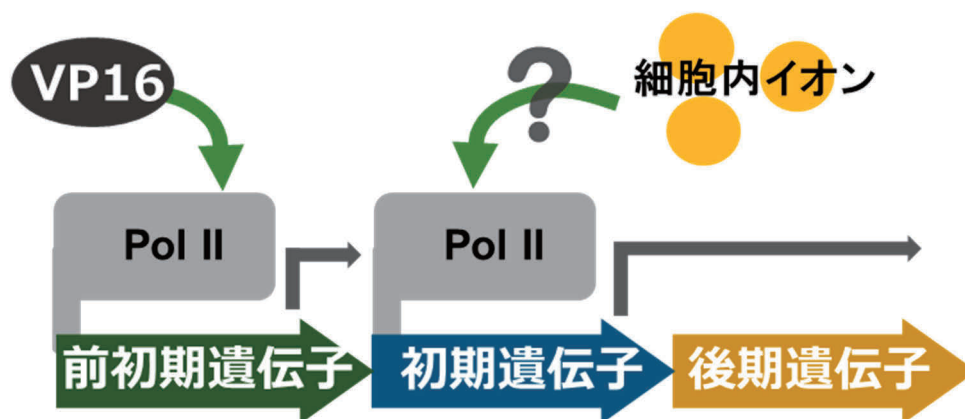


【目的】単純ヘルペスウイルス (HSV : herpes simplex virus) は代表的な DNA ウイルスであり、ヒトに脳炎、性器ヘルペス、皮膚疾患、眼疾患など、多様な病態を引き起こす。HSV の特徴は、一度感染するとヒトの神経に潜伏し、再活性化を繰り返すことによって終生に渡りヒトに疾患を引き起こすことである。HSV は宿主細胞に侵入後、核内において宿主の RNA polymerase II 依存的に前初期遺伝子、初期遺伝子、後期遺伝子という 3 種の遺伝子群をカスケード状に発現する。前初期遺伝子の発現は HSV のウイルス粒子中に含まれる VP16 が前初期遺伝子群のプロモーターに結合し、活性化することによって引き起こされることが知られているが、前初期遺伝子から初期遺伝子、及び後期遺伝子へ発現が移行するメカニズム (遺伝子発現移行機構) については不明な点が多い。本研究は、HSV の遺伝子発現移行における細胞内イオンの役割を明らかにすることを目的とした。

【方法】HSV の遺伝子発現移行に本研究で着目した細胞内イオンが必要かどうかを確かめる為に、HSV 感染細胞を細胞内イオンキレーター (CX) で処理し、ウイルスの前初期、初期、及び後期遺伝子の発現量を qPCR 法により解析した。また CRISPR-Cas9 を用いて細胞内イオン結合蛋白質 (IBP1) の低発現 HeLa 細胞 (Hela/IBP1_{low}) を作製し、野生型 HeLa 細胞 (HeLa/WT)、及び Hela/IBP1_{low} に HSV-1 を感染後、初期、後期遺伝子の発現量を qPCR 法によって解析した。

【結果】CX は前初期、初期、後期遺伝子の発現量を低下させたが、前初期遺伝子と比較して初期、及び後期遺伝子でその効果が大きかった。また、HSV-1 感染時、ウイルス前初期遺伝子の mRNA 量は野生型 HeLa 細胞と比較して HeLa/IBP1_{low} で有意な低下が認められなかったのに対し、初期、及び後期遺伝子の mRNA 量は Hela/IBP1_{low} で有意に低かった。従って、本研究で着目した細胞内イオン、及び IBP は HSV の遺伝子発現移行を正に制御することが示唆された。

HSV の遺伝子発現



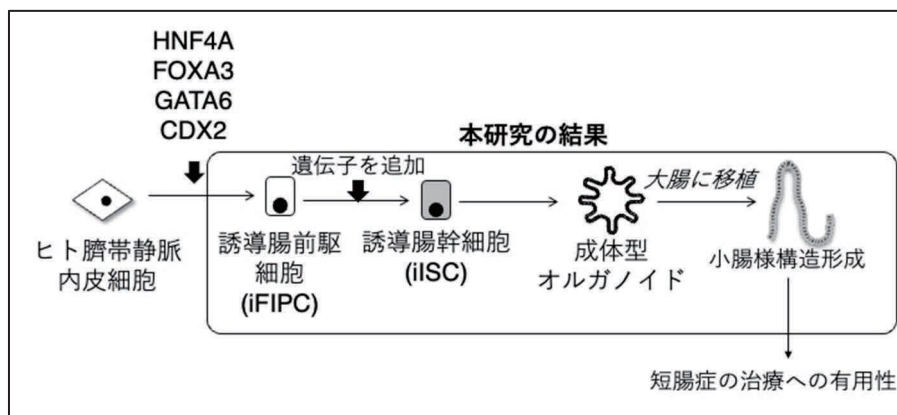
148 直接誘導法による移植応用可能な誘導腸幹細胞の作製	三浦 静
------------------------------	------

【目的】2017年に筆者らは、細胞を未分化な状態を経ずに目的の細胞へと分化転換させるダイレクトリプログラミング法を利用して、マウス胎仔由来線維芽細胞に4つの転写因子 (*Hnf4a*, *Foxa3*, *Gata6*, *Cdx2*) を組み合わせて導入することで胎仔腸由来の腸前駆細胞 (FIPC) と同様の性質を持つ誘導腸前駆細胞 (iFIPC) の作製に成功した (Miura and Suzuki., *Cell Stem Cell*, 2017)。iFIPC は FIPC と同様に球状の胎仔型オルガノイドを形成して腸幹細胞 (ISC) の性質をもつ誘導腸幹細胞 (iISC) へと成長し、陰窩-絨毛構造を有する成体型オルガノイドを形成した。また、iISC は、生体内と同様に4種類の腸上皮細胞に分化することが可能であり、自己複製能も有していた。さらに、これらのオルガノイドを大腸炎モデルマウスに移植すると、胎仔型オルガノイドは大腸上皮組織を再構築し、成体型オルガノイドは小腸上皮組織を再構築することができた。ヒトの細胞においてもヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) に4つの転写因子を導入することで、ヒト iFIPC へとリプログラミングし、ヒト胎児型オルガノイドが形成された。ヒト胎児型オルガノイドは、大腸炎モデルマウスの大腸中でヒト大腸組織を再構築できた。このことから、ヒト iFIPC は、医療応用への利用が期待される細胞である。しかし、実際に医療応用可能な細胞であるかは未だ明らかになっていないという点や、ヒト iFIPC への誘導は可能となったが、マウス iFIPC とは異なり、iISC へと成長させる方法が確立されていないという問題が残されている。そこで本研究では、短腸症への移植に有用な細胞を作製すべく、ヒト iFIPC を iISC へと成長させ、大腸中でヒト小腸組織を構築させることを目的とする。生体由来の細胞を用いる場合、患者の小腸から採取する必要があるため、侵襲性の問題や患者の体への負担が考えられるが、ヒト iISC を患者由来の細胞から作製できるようになれば、低侵襲な方法で大量に細胞の作製が可能であり、細胞移植の新たなソースとして移植医療に貢献できる。

【方法】1. ヒト iFIPC を iISC へと成長させる方法の探索：まず、腸の分化に重要な転写因子に関する情報を収集し、それらをヒト iFIPC に強制発現した。その後、ヒト iFIPC を長期間培養し、形態や遺伝子発現が成体型オルガノイドと類似しているかを解析した。2. ヒト iISC 由来成体型オルガノイドの大腸移植：上記実験で成体型オルガノイドを作製できたため、免疫不全大腸炎モデルマウスの大腸への移植を行い、小腸組織を構築するかを解析した。生着の有無については、ヒトの細胞特異的に反応する CK8/18 抗体を用いた。また、小腸様構造形成の有無については、小腸のマーカーである Sucrase-isomaltase や Lysozyme の免疫染色、HE 染色による組織学的解析を行った。

【結果】腸の分化に重要な転写因子をヒト iFIPC に強制発現すると、陰窩-絨毛様構造を有するオルガノイドが形成された。この成体型オルガノイドは腸幹細胞や分化した細胞を含んでおり、長期間培養することができた。また、このオルガノイドを大腸炎モデルマウスに移植すると、小腸組織を構築することが明らかになった。

本研究の概要

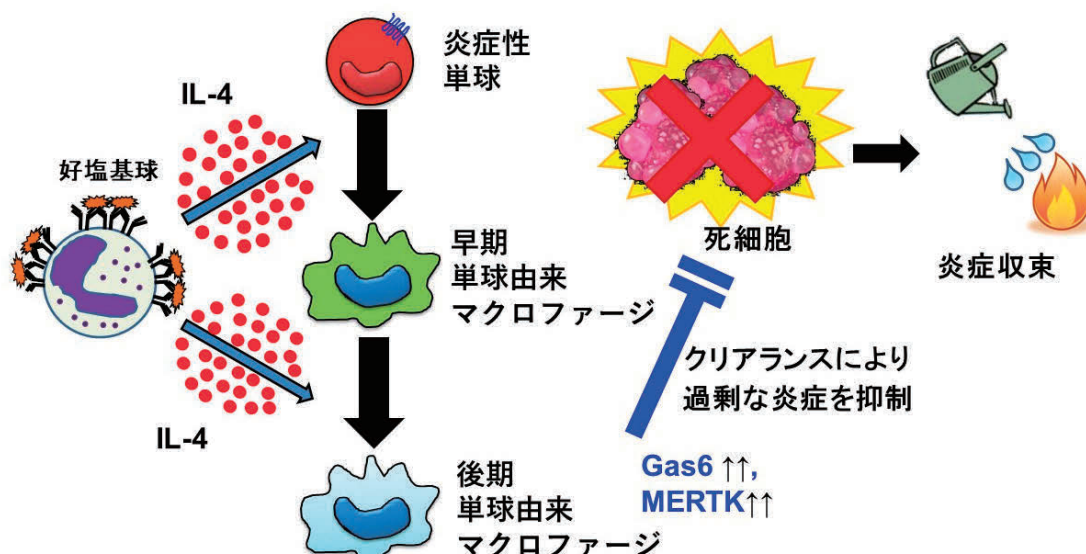


【目的】 我が国において、アレルギー疾患の罹患者はおおよそ3人に1人と数多く、根本的治療法の開発は喫緊の課題である。本課題の解決のため筆者らは以前、IgE依存性慢性皮膚アレルギー炎症モデル (IgE-dependent chronic allergic inflammation : IgE-CAI) を樹立した。この皮膚アレルギー炎症を誘導する責任細胞を検索した結果、希少な顆粒球の一種である好塩基球が慢性アレルギー炎症の誘導に重要な役割を果たしていることを解明した。本モデルでは、誘導後3日ほどで著明な皮膚腫脹と炎症細胞浸潤をきたすが、誘導後1週間ほど経過すると皮膚の腫脹や炎症細胞浸潤は収束する。このアレルギー炎症収束のメカニズムを検索したところ、好塩基球由来の IL-4 が炎症性単球に作用することで炎症抑制型の M2 マクロファージを誘導し、炎症を終息させることを明らかにした (Immunity 2013)。以上より好塩基球によって誘導された M2 マクロファージはアレルギー炎症の抑制に重要な役割を果たす。炎症性単球の皮膚への浸潤が障害されている CCR2 欠損マウスでは、M2 マクロファージが誘導できず、IgE-CAI が悪化することが明らかになっている。しかしながら、この M2 マクロファージがどのようにして炎症抑制機能を果たしているのかはほとんどわかっていなかった。そこで本研究では、1細胞 RNA シーケンス解析を活用することで解明し、好塩基球-M2 マクロファージのネットワークによるアレルギー炎症収束機構を解明することを目的とする。

【方法】 本研究では、野生型マウスと CCR2 欠損マウスそれぞれに IgE-CAI を誘導し、炎症ピーク時 (3日目) と炎症収束時 (5日目) の皮膚炎症局所を1細胞 RNA シーケンス解析に供した。さらに、得られたトランスクリプトームデータから、単球-マクロファージ系列の細胞クラスターを詳細に解析し、RNA 速度解析や擬似時間軸解析を行った。さらに、野生型マウスに IgE-CAI を誘導し、経時的にフローサイトメトリー解析を行った。

【結果】 炎症性単球が皮膚に浸潤できない CCR2 欠損マウスでは、耳介皮膚炎症の増悪・遷延化が認められたが、野生型マウス由来単球を移入すると炎症が改善した。このことから単球由来マクロファージが皮膚炎症抑制に重要であると考えられた。1細胞解析やフローサイトメトリー解析の結果から、単球由来マクロファージには炎症ピーク時に存在する早期 M2 と炎症収束時に存在する後期 M2 が存在し、炎症性単球は早期 M2 を経て後期 M2 へと分化することが明らかになった。さらに後期 M2 は、早期 M2 と比較して GAS6 や MERTK を高発現し、高い死細胞貪食能を持っている。MERTK 阻害薬の投与により IgE-CAI は増悪することから、炎症性単球から早期 M2 を経て後期 M2 へと分化し、後期 M2 が速やかに死細胞をクリアランスすることで IgE-CAI を収束に導くことが示唆された。

炎症性単球は死細胞貪食能の高い後期 M2 マクロファージへと段階的に分化し、アレルギー炎症を抑制する



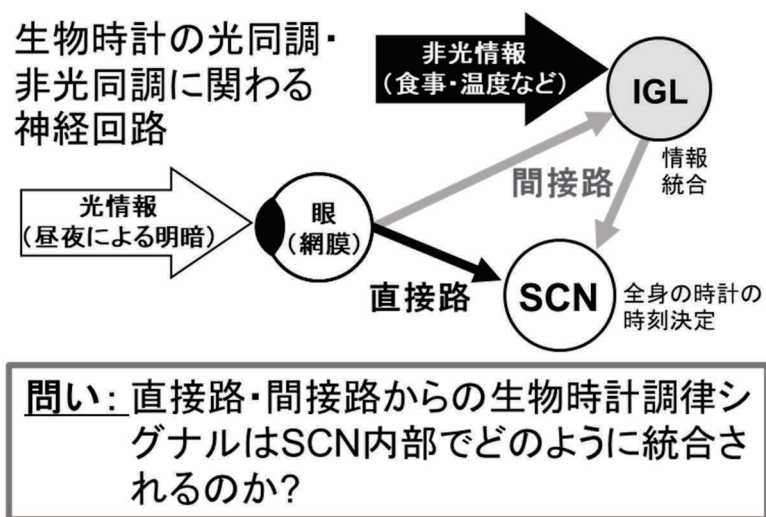
150 神経回路選別技術の新規開発に基づく「目覚め」の解明	三宅 崇仁
-------------------------------	-------

【目的】 生物時計は地球の自転に伴う昼夜の規則正しい環境変動に体内の代謝応答などを同調させる、生命にとって最も根源的な「時間」の仕組みである。生物時計の中核は視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus : SCN) にあり、外部環境変化 (光明暗情報) が眼 (網膜) を介して SCN を刺激することにより、SCN やその支配下にある全身の時計を調律する。生物時計を調律する神経回路には、網膜から直接 SCN へ投射するものと (直接路)、網膜から膝状体間葉 (intergeniculate leaflet : IGL) を経由して SCN へ投射するものがある (間接路) (下図)。これまで、直接路は光情報を基とした SCN 時計の調律 (光同調) に重要であり、間接路は IGL で光情報と光以外の情報 (食事・温度等) を統合し SCN 時計を調律する (非光同調) と示されてきた。しかし、全身の生物時計の時刻を決定する SCN 時計の調律に関わるこの 2 種類の神経回路が、SCN 内部で最終的にどのように統合されるのかは今でもわかっていない。本研究では、この SCN における複雑な時刻調律機構の一端を明らかにすることを目的に、新規遺伝学的ツールの開発を行った。

【方法】 本研究課題では、脳に対する光の影響を調べることから、従来用いられてきた光遺伝学的手法を用いることはできないため、本研究では、①化学遺伝学的に神経活動を操作する新技術の開発、および②シナプス局所へのタンパク質輸送最適化を、細胞評価系 (Tango assay・GloSensor assay・Fura-2 イメージング) と動物個体を用いて行った。

【結果】 本研究において開発した約 350 アミノ酸の小型 DREADD (G_iまたは G_q-coupling) は、人工リガンド依存的な β-アレスチン集積・cAMP または Ca²⁺シグナリングを示した。この新 DREADD をマウス脳内に AAV を用いて導入し、マウス行動・体温を、人工リガンドを用いて人為的に操作することに成功した。次に、複雑な回路を検証するため、膜タンパク質をシナプス局所に移行させる配列の探索を行った。その結果、シナプス局在タンパク質の細胞内ドメインを別の膜タンパク質に付与することで、膜タンパク質をシナプス前・後膜それぞれに輸送できることがわかった。

本研究課題の背景 および 解決したい問い

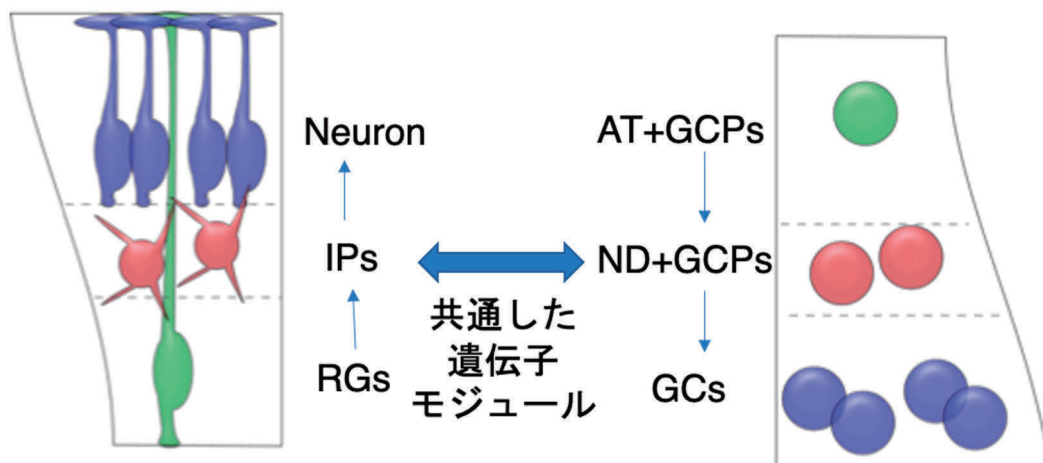


【目的】 脳は、進化の過程で複雑化・大型化した組織であり、その結果、高次機能などの能力の獲得につながったと考えられている。例えばヒトの場合、大脳皮質が著しく拡大したことが、特徴的な高次機能の獲得に寄与したと考えられている。しかしながら、複雑で拡大した脳がどのような分子メカニズムによって形成されたのかに関しては、未だに不明である。この問題を解決することは、生物進化の過程で高次機能がどのように獲得され、脳の多様性がどのように獲得されるのかという謎を解明する上で極めて重要である。これまでの研究から、中間型神経前駆細胞 (Intermediate progenitor) の増加及び、中間型神経前駆細胞を経由した神経細胞の産生 (Indirect neurogenesis) が、進化的な脳の複雑化・大型化に寄与したと考えられている。しかしながら、どのような分子メカニズムによって、関節的神経細胞産生機構が制御されているかは不明である。

【方法】 これまでに我々のグループが、小脳にも間接的な神経細胞産生機構が存在することを世界で初めて明らかにしたことで、間接的な神経細胞産生が、進化的な大脳皮質の拡大だけではなく、小脳においても用いられていることを示しており、進化的な脳拡大の共通原理であることを示唆した。そこで、大脳皮質・小脳皮質という二つの脳領域を、齧歯類・霊長類という異なる生物種間で横断的に比較解析することにより、進化過程で獲得した脳拡大の共通原理である間接的な神経細胞産生機構を制御する分子メカニズムを明らかにすることを目的とし、本研究を実施した。

【結果】 まず、我々が齧歯類において見出した関節的神経細胞産生機構がヒトにおいても存在していることが single cell RNAseq 解析によって示唆され、大脳皮質の中間型神経前駆細胞との類似性も見出した。さらに、遺伝子モジュール解析によって、関節的神経細胞産生機構に関与する可能性のある一連の遺伝子群の同定に成功した。本研究によって、進化的に獲得した神経細胞産生機構の新たな分子メカニズムの一端を示すことができたため、今後生体内におけるさらなる検証によって、関節的神経細胞産生機構の分子メカニズムが解明されることが期待される。

中枢神経系に共通する神経細胞産生機構とその分子基盤

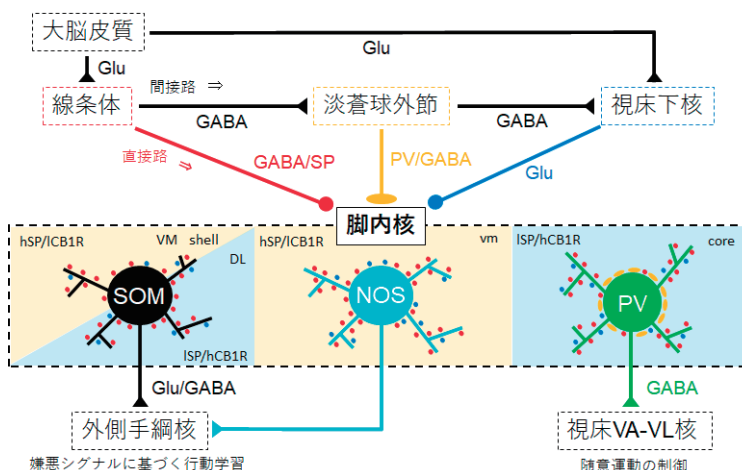


【目的】 脚内核は、大脳基底核の出力核の一つであり、線条体や淡蒼球外節、視床下核から主な入力を受ける領域である。大脳基底核の機能は直接路および間接路に集約される神経回路の概念に基づいて理解されるが、実際に大脳基底核を構成する個々の神経核の内部構造を均一な領域として定めることは困難であり、基底核の機能を正確に理解するためには多くの解決すべき形態学的な疑問が残っている。本研究では、基底核の出力部として他の基底核の構成核から多くの入力を受ける脚内核に焦点を当て、その詳細な内部構造を明らかにする。具体的には、脚内核が線条体、淡蒼球外節、視床下核からどのような入力を受けているのかをトレーサー注入や免疫組織化学を用いて形態学的に解析する。

【方法】 C57BL/6J マウスの脳を用いて多重免疫染色を適応して作製した標本を共焦点レーザー顕微鏡にて観察し、画像の取得後に画像解析ソフトを用いて脚内核内部における軸索終末やニューロンの局在について解析した。さらに、線条体の亜区域に順行性トレーサーを注入し、脚内核で標識されたトレーサー陽性軸索終末の局在を解析した。また、脚内核における Cannabinoid type-1 receptor (CB1R) の細胞内局在について電子顕微鏡を用いて調査した。ここで得られた形態学的所見と既知の遺伝学的データを比較し、脚内核の詳細な内部構造の解明を行った。

【結果】 脚内核は、線条体由来する二種類の軸索終末 (substance P を強発現するタイプと CB1R を強発現するタイプ) の局在に基づいて、吻側部の腹内側部 (VM) / 背外側部 (DL) および尾側部の core と shell の4つの亜区域に区分できた。しかも脚内核を構成する3種類のニューロンはこの4つの亜区域に限局的に分布していた。すなわち、Somatostatin (SOM) 陽性ニューロンは脚内核の VM や DL、shell に分布しており、Nitric oxide synthase (NOS) 陽性ニューロンは VM に限局したのに対し、Parvalbumin (PV) 陽性ニューロンは core に密集していた。また、線条体亜区域への順行性トレーサー注入により、線条体において一次の運動野/感覚野からの入力を受ける領域に存在するニューロンは脚内核吻側部の DL/尾側部の core へ投射していた一方、前辺縁皮質や眼窩前頭皮質から入力を受ける領域に位置する線条体ニューロンは、VM および shell に投射していることを見出した。脚内核における CB1R の細胞内局在については、電子顕微鏡を用いた観察により軸索終末だけでなく preterminal axons と呼ばれる部位に特に多く存在することを明らかにした。脚内核に収束する軸索終末の解析については、SOM および NOS 陽性ニューロンが線条体からの入力を強く受けているのに対し、PV 陽性ニューロンだけが淡蒼球外節からの入力を選択的に受けていることがわかった。本研究で見出した形態学的所見と遺伝学的データは、おおよそ良い一致を示したが、PV 陽性ニューロンに関する所見のみ正反対の結果が認められた。

脚内核に収束する神経回路の概念図



153 犬の遺伝性疾患に対するゲノム編集治療法の開発

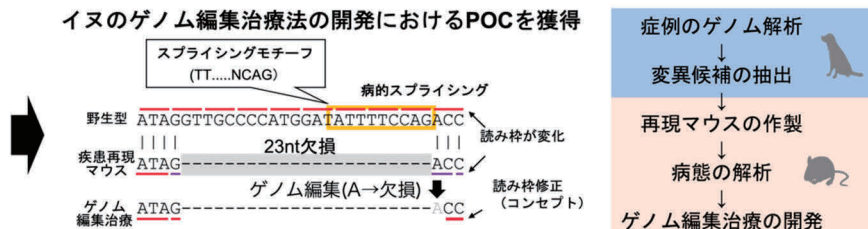
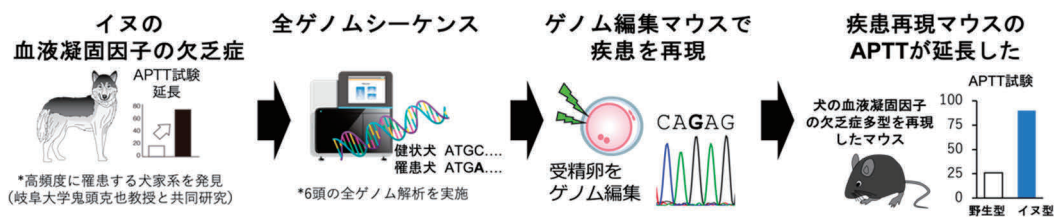
宮脇 慎吾

【目的】 多くのイヌの遺伝性疾患において原因遺伝子が不明であるため、根本的な治療法はない。著者は、近年急速に進歩している CRISPR/Cas9 をはじめとするゲノム編集技術を用いて、ゲノムレベルでイヌの遺伝性疾患をゲノム編集マウスで再現することにより、遺伝子多型が生体に与える影響をゲノム編集マウスにより評価してきた。本研究では、イヌの遺伝性疾患を再現したゲノム編集マウスを利用して、ゲノム編集によるイヌの疾患の遺伝子治療法を開発することを目的とする。これによって、現在治療法のないイヌの遺伝性疾患の治療につながると考える。

【方法】 本研究では、イヌの先天性血液凝固疾患を対象として、その原因遺伝子の特定から、遺伝子治療法の確立までを実施した。具体的には、罹患犬から原因遺伝子の特定、CRISPR/Cas9 を用いた原因遺伝子を再現するマウスの作製、活性化部分トロンボプラスチン時間 (Activated Partial Thromboplastin Time : APTT) 試験による再現マウスの血液学的臨床検査、肝臓の RT-PCR による再現マウスの分子生物学的表現型解析、病的スプライシングを補完する遺伝子治療のための先天性遺伝子変異の導入実験を実施した。

【結果】 はじめに、血液凝固異常症を呈する犬の家系を同定し、全ゲノム解析によりその原因遺伝子変異の候補を抽出した。抽出した候補には、遺伝子のイントロンのスプライシング部位に生じた一塩基多型が存在した。次に、抽出した変異をゲノム編集により再現したマウスの作製に成功し、そのマウスの血液凝固検査により、イヌの症例と同様に、再現マウスの血液凝固試験の結果が延長することを見出した。疾患再現マウスの肝臓をサンプリングし、RT-PCR による遺伝子発現解析を実施したところ、病的なスプライシング変化が生じていることが明らかになった。最後に、病的なスプライシングにより生じたフレームシフトをインフレームにする変異を新たに導入したマウスを作製した。現在、このマウスで表現型がレスキューされているかを検証しているところである。今後、インフレーム変異の導入により血液凝固の異常がレスキューできた場合には、AAV などを使った後天的なゲノム編集により遺伝子治療が可能かを検証し、将来的にはイヌの症例において、実験的な遺伝子治療を実施する予定である。

ゲノム編集によるイヌの遺伝性疾患の原因遺伝子の同定と遺伝子治療法の開発



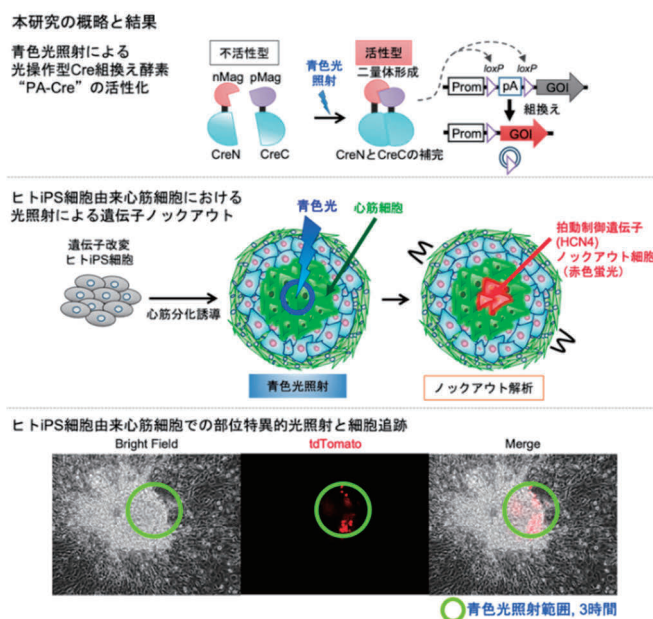
154 光操作によるiPS細胞由来心臓不整脈モデルの確立 森川 久未

【目的】 ヒト iPS 細胞を用いたオルガノイド形成の報告が相次ぎ、*in vitro* で各種臓器形成、あるいは分化誘導した組織細胞を使ったヒト生理機能解析などが広く行われるようになってきている。一方、*Cre-loxP* 遺伝子組換えシステムは、DNA 組換え酵素 Cre が loxP 配列を認識し、遺伝子の部位特異的組換えを起こす反応である。近年、青色光照射でスイッチがオンになる光受容体と Cre 酵素との融合体（Photoactivatable Cre : PA-Cre）が開発され、青色光照射時にのみ Cre 組換え酵素を活性化することができるようになった。従って、PA-Cre を使用することで、光によりオルガネラレベルで時空間（時間と場所）自在に遺伝子組換えの制御が可能である。ヒト心臓の拍動は、右心房上部に局在するペースメーカー細胞によって司られ、特異的に発現する HCN4 イオンチャネルが制御する。この細胞の障害は、加齢性の徐脈性不整脈の発症に繋がるが、そのメカニズムの詳細は不明である。そこで本研究では、ヒト心臓を模した心臓オルガノイドを作製し、PA-Cre による光操作技術により、局在するペースメーカー細胞の一部において、心拍制御遺伝子 *HCN4* をノックアウトし、徐脈性不整脈の再現と病態解析を目的とした。

【方法】 1. PA-Cre 発現 iPS 細胞株の樹立と細胞系譜追跡 : PA-Cre を恒常発現する piggy BAC ベクターを hiPS 細胞（409B2 株）へ遺伝子導入し、計 33 株を樹立した。青色光照射を行い、照射時の組換え効率が最も高く、レポーターの赤色蛍光タンパク質を恒常的に発現する iPS 細胞株（PA-Cre_iPS 細胞株）をスクリーニングにより選別した。2. flox-*HCN4*_iPS 細胞株の樹立と青色光照射による遺伝子ノックアウト : PA-Cre_iPS 細胞株において、*HCN4* 遺伝子のエクソン 2 の両側に loxP 変異配列を導入した細胞株（PA-Cre/flox-*HCN4*_iPS 細胞株）を樹立した。心筋分化誘導後青色光照射し、赤色蛍光の発現を蛍光顕微鏡で観察するとともに、ゲノム PCR により *HCN4* 遺伝子ノックアウトを調べた。

【結果】 PA-Cre を恒常発現するヒト iPS 細胞株の樹立に成功した。この PA-Cre_iPS 細胞株では、①青色光照射時にのみ、PA-Cre が活性化され、PA-Cre による *Cre-loxP* 組換えにより、②レポーターの赤色蛍光タンパク質の発現が、恒常的に誘導され、組換え細胞の追跡が可能となった。さらに、この PA-Cre_iPS 細胞株を用いて、*HCN4* 遺伝子の片遺伝子座を flox 化した PA-Cre/flox-*HCN4*_iPS 細胞株を樹立し、③青色光照射時にのみ遺伝子の *HCN4* ノックアウトが起こることを確認した。

本研究の概略とヒト iPS 細胞株における青色光照射による *Cre-loxP* 組換えの誘導

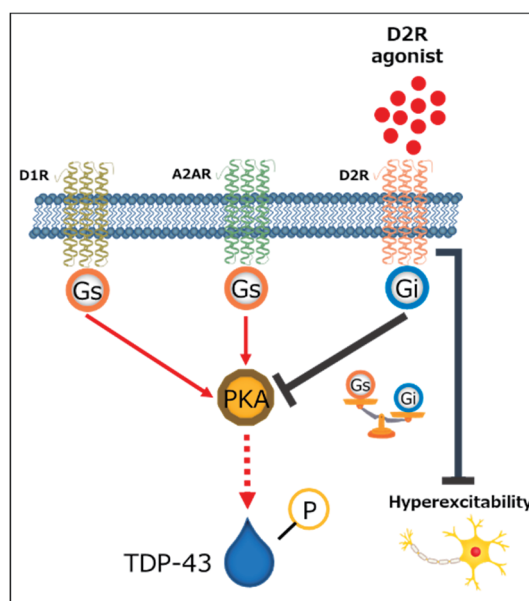


【目的】 ドパミン D2 受容体 (D2R) は、G タンパク質と共役して細胞の興奮性を抑制し、ドパミン D1 受容体 (D1R) は、G タンパク質と共役して興奮性を高めることが知られている。共同研究者である貝淵らは、独自に開発した高感度かつ網羅的な方法を用いて、D1R を発現する神経細胞に存在する PKA のリン酸化基質を 100 種類以上同定し、PKA はリン酸化 Rasgrp2 を介して Rap1-MAP キナーゼシグナルを活性化し、報酬関連行動を惹起することを明らかにした。ALS の脊髄運動ニューロンでは、神経の過剰興奮による細胞毒性が示され、D2R 刺激により神経過剰興奮が抑制されることが明らかにされている。また、我々は、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 患者に対して、D2R アゴニストであるロピニロールが有効である可能性を、*in vitro* および臨床的に示した。以上から、本研究では“ヒト運動ニューロンにおける D2R の役割”に着目し、“ALS 病態”、“ロピニロールの作用メカニズム”、そして“Gs/Gi バランス”の観点から明らかにすることを目的とする。

【方法】 本研究はヘルシンキ宣言に基づき実施され、慶應義塾大学医学部倫理委員会の承認を得て実施された (承認番号: 20080016、20160273)。本研究課題において新たに迅速かつ高効率な脊髄運動ニューロン分化誘導法を開発し、健常者由来 iPS 細胞からゲノム編集技術を用いて作製した *TARDBP* 変異 iPS 細胞 (isogenic cell lines、heterozygous あるいは homozygous mutation) と parent cell line から、運動ニューロンに分化誘導を行った。ドパミン D1 受容体遺伝子 (*DRD1*)、ドパミン D2 受容体遺伝子 (*DRD2*) およびアデノシン A2A 受容体遺伝子 (*ADORA2A*) の発現確認のために RT-qPCR を、D2R の発現確認のために免疫細胞化学染色を実施した。また、リン酸化カスケード解析のために、イムノブロットおよび各種リン酸化モチーフ抗体 (PKA、PKC、MAPK/CDK、ATM/ATR、Akt、AMPK、CK2) を使用した。

【結果】 高純度なヒト脊髄運動ニューロンを迅速かつ効率的に分化誘導する方法を確立し、いずれの iPS 細胞からも安定して脊髄運動ニューロンへと分化誘導することに成功した。ヒト脊髄運動ニューロンにおいては、*DRD1* や *ADORA2A* が発現しており、特に *DRD2* (D2R) の発現が顕著であることが分かった。さらに、*DRD5* も高発現しており、Gs シグナルについては、D1R よりも D5R がシグナル入力を担っている可能性が示唆された。また、作製した全てのヒト脊髄運動ニューロンにおいて、Gs/Gi 下流のリン酸化シグナル伝達活性が明確に検出され、ALS 運動ニューロンにおける D2R 介在性 Gs/Gi リバランスを検討する上で適切なモデルであることが示された。

ドパミン/アデノシン受容体刺激を介した Gs/Gi カスケードが運動ニューロン変性に与える影響 (概念図)

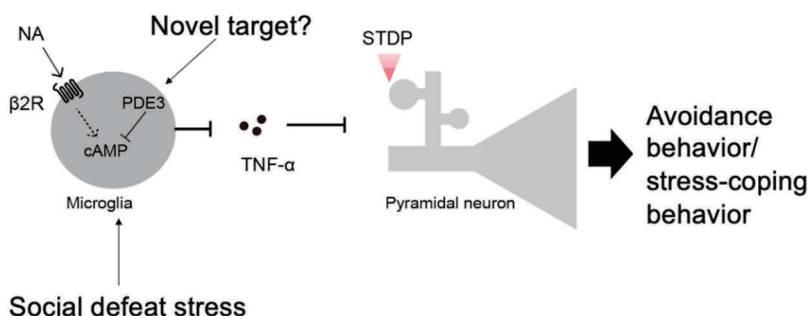


【目的】 成体マウスの大脳新皮質では、学習時に活動依存的に樹状突起スパインが増大する構造的な可塑性を示すことが *in vivo* 観察研究で多く報告されてきた。構造的な可塑性は機能的な可塑性と連関することが知られており、スパイン増大は長期的なシナプス伝達効率を構造的に保持することから記憶の主座であることが長らく考えられてきた。海馬の脳スライスを用いて多くの研究でこのスパイン増大のシナプス細胞レベルの探索がなされてきた。しかし、新皮質において活動依存的なスパインの頭部増大をもたらす正確なシグナル伝達経路は不明なままである。そこで新皮質でスパイン頭部増大を誘発し、シグナル路の探索を行うことを目的とした。

【方法】 内側前頭葉を含むマウス脳急性スライスを作製し、第5層錐体ニューロンからパッチクランプ・全細胞記録を行った。この際、蛍光試薬を灌流させることでスパインの可視化を行い、2光子励起顕微鏡で観察した。観察とは異なる2光子励起によりグルタミン酸の2光子アンケーシングを単一スパインで行った。このスパインのグルタミン酸刺激と電極からの活動電位を組み合わせるスパイクタイミング依存的可塑性 (STDP) プロトコルを用いて、単一スパインにおけるスパイン頭部増大の誘発を行った。薬理や遺伝学、アデノ随伴ウイルスなどを用いてスパイン増大に必要なシグナル伝達経路を調査した。

【結果】 STDP 刺激により、幼若マウス (P16~21) ではスパイン頭部増大が見られたが、成体マウス (P35~45) では見られなかった。しかし、ミクログリアを薬理的に除去すると、成体マウスでもスパイン頭部増大が認められた。この結果は、ミクログリアによる活動依存的なスパイン形態可塑性制御機序には年齢依存性があり、幼若期では可塑性を邪魔しないが、成体内側前頭前皮質 (mPFC) において、ミクログリアがスパインの可塑性を抑制していることを示唆した。ノルアドレナリン (NA) は mPFC の学習を制御すること、さらにミクログリアは NA 感受性の Gs 共役型 $\beta 2$ アドレナリン受容体を発現しており、下流では cAMP シグナルが活性化されることが知られている。薬理的手法により NA が $\beta 1$ アドレナリン受容体依存的ではなく $\beta 2$ アドレナリン受容体依存的にスパイン可塑性を促進することを見いだした。さらに、ミクログリア特異的なホスホジエステラーゼ 3 の薬理的阻害は NA 非存在下でスパイン可塑性を誘導した。一方、ミクログリアを標的に cAMP シグナル伝達を化学的に阻害すると、NA 依存的なスパイン可塑性はブロックされることがわかった。次にミクログリアがスパインを抑制する下流機序を探索した。*in vivo* イメージング研究ではミクログリアは物理的な接触によりスパイン機能を抑制していると考えられてきた。ミクログリアの形態イメージングでは、STDP 刺激で刺激されたスパインにミクログリアが新たに接触することはなく、そのような効果を示唆する以前の研究とは矛盾することが分かった。一方、ミクログリアが液性因子によりスパインを抑制する可能性を薬理的に検証したところ、ミクログリア関連の TNF- α シグナルは、NA の下流でスパイン可塑性を抑制することがわかった。社会的敗北ストレスを与えたストレス感受性群のマウスでは NA 依存的な可塑性誘発が阻害された。しかしホスホジエステラーゼ 3 の阻害により改善したことからミクログリアの関与が考えられた。これらの結果は、若年成体マウスにおいて、NA がミクログリア-cAMP 経路を介して活動依存的なスパイン増大を間接的に脱抑制していることを示した。

前頭葉スパイン頭部増大を制御する新規シグナル路

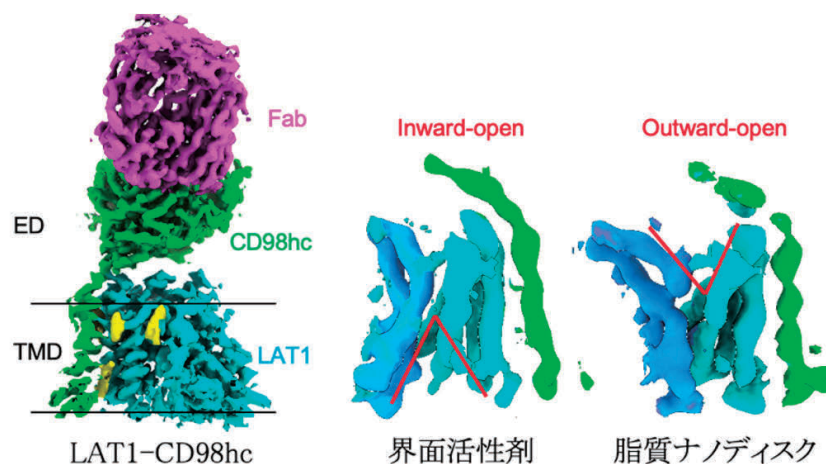


【目的】ヘテロ二量体型アミノ酸輸送体 (HATs) は、ジスルフィド結合によってつながった軽鎖 (SLC7) と重鎖 (SLC3) という 2 つのサブユニットからなる輸送体である。ヒトは 8 種類の HAT サブタイプを持ち、それぞれが異なる生理機能と基質特異性を持つ。例えば、L 型アミノ酸輸送体として知られる LAT1 - CD98hc はロイシンの輸送を通じてがん細胞の増殖に関わることから、抗がん剤の新規標的として注目されている。また腎臓尿細管の微絨毛に局在する b0,+AT-rBAT は、シスチン尿症と呼ばれる遺伝疾患の原因タンパク質である。筆者らは、HATs の分子機構を明らかにするため、LAT1 - CD98hc の構造をクライオ電子顕微鏡により初めて決定した [Lee et al., Nat Struct Mol Biol, 2019]。本研究では、これまでの研究結果に基づき、LAT1 - CD98hc の立体構造を限りなく生理的環境に近い脂質条件下で可視化することで、その薬物認識機構を解明することを目指す。そのために、1. LAT1 - CD98hc を脂質ナノディスクやリポソームに再構成し、クライオ電子顕微鏡による単粒子解析を行う。また、2. この状態で種々の阻害剤を添加することで、阻害剤結合型の構造を決定し、認識機構を解明する。

【方法】構造解析に供するタンパク質試料を得るため、HEK293 浮遊細胞に改変型バキュロウイルスを共感染し、LAT1 - CD98hc 複合体を細胞内で発現させた。膜画分を界面活性剤によって可溶化し、それぞれのサブユニットに融合したアフィニティタグを用いてタンデム精製を行い、タンパク質試料を得た。これを、リン脂質とスキャフォールドタンパク質からなる脂質二重膜微小環境であるナノディスクに再構成し、Vitrobot によって瞬間冷却することで、クライオグリッドを作製した。300 kV の最新型電子顕微鏡 Titan Krios G4 を用いて高分解能データを撮像し、これを RELION および cryoSPARC のソフトウェアを用いて解析することで三次元再構成像を得た。

【結果】ナノディスクに再構成した LAT1 は、Inward-open 構造とは逆の Outward-open 構造をとっていた (図)。この結果は、膜輸送体には生理的条件に近い脂質二重膜下でしか捉えられない構造があることを強く示唆した。そこで、試料条件をさらに最適化し、各種阻害剤、基質との構造解析を進めた。無収差イメージシフト法 (AF-IS) を利用した高速データ収集によって、それぞれ 5,000~20,000 程度のデータを撮像した。これまでに、4.0 Å を切る分解能で、LAT1 に関しては 8 つの構造を決定することに成功している。構造解析と並行して、LAT1 に特異的に結合するバインダーの取得とスクリーニングを進めた。LAT1 の構造解析の成功を受けて、LAT1 とパラログである LAT2 についても構造解析を進めた。結果、アポ型、阻害剤結合型、および基質結合型の構造を決定した。これにより、L 型アミノ酸輸送体を阻害する様々な阻害剤の結合様式が明らかとなった。

LAT1 の全体構造と脂質環境における構造変化

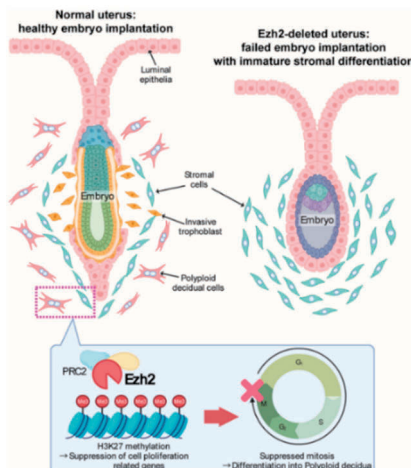


【目的】 女性の社会進出に伴い、体外受精などの高度生殖医療の需要はますます高まっている。本邦においては出生児の約 14 人に 1 人が高度生殖医療により誕生している（2019 年日本産婦人科学会統計）。一方で、良好胚を選別し移植したとしても妊娠しない着床障害が問題となっており、生殖補助医療による妊娠成功率は未だに約 30% で頭打ちしている。着床障害はこれまで診断・治療法が全く提案されておらず、その要因として、正常な胚着床を担保する子宮側の制御メカニズムが未だブラックボックスであることが挙げられる。着床障害の原因が不明であるがために胚移植をさらに継続するしかない患者が多く存在しており、着床の機序解明や新しい診断・治療法の開発を目指した基礎研究が喫緊の課題となっている。着床は複数のステップからなる複雑な過程である。子宮内に到達した胚（受精卵）は適切な着床位置を決定すると、子宮内膜上皮へ接着する。更に強く子宮内膜に定着し胎盤形成を行うため、上皮への接着後、胚は子宮内膜間質へ浸潤（胚浸潤）する。胚接着部位周辺では通常、間質細胞が上皮細胞様に分化し、強固な複層（脱落膜）を成す。上皮の間をくぐり抜けた胚栄養膜は脱落膜に接触しながら、更に浸潤していく。本研究では以前の研究で、脱落膜の形成不全を示すマウス子宮では胚浸潤及びその後の妊娠維持が異常になることを見出している。このことは、胚接着部位周辺に形成される脱落膜が胚浸潤に必須であることを示唆している。本研究では、脱落膜が胚浸潤を促すメカニズム解明を目的として解析を行うこととした。

【方法】 妊娠転帰の判明しているヒト着床期子宮内膜について RNA-seq 解析を行い、妊娠成立群と着床異常群とで発現に差の見られる遺伝子を探索した。発現量及びエンリッチメント解析の結果から、特に重要と考えられた核内因子 Ezh2 について、機能解析のため子宮特異的 KO マウスを解析した。KO マウスは妊孕能の確認と組織形態学的解析を行うと共に、胚浸潤期の子宮内膜を回収し、ChIP-seq、RNA-seq による下流シグナル経路の探索を行った。

【結果】 ヒト着床期子宮内膜における RNA-seq 解析の結果、着床障害群では核内因子 Ezh2 の発現低下が生じていた。Ezh2 はヒストン H3 リシン残基のメチル化（H3K27me3）を介して遺伝子発現抑制に関わる分子であるが、着床障害群では Ezh2 の標的遺伝子群の発現上昇を認め、Ezh2 の発現・機能低下が示唆された。Ezh2 の着床期子宮における解析のため、子宮特異的 KO マウスを作製・解析した。その結果、このマウスは顕著な産仔数の減少が生じており、その原因として脱落膜形成及び胚浸潤に異常が起きていることを見出した。更に、胚浸潤期の子宮内膜について、RNA-seq 及び H3K27me3 に対する ChIP-seq 解析を行った。その結果、Ezh2 は H3K27me3 修飾を介して細胞周期遺伝子の発現を負に制御し、間質細胞が脱落膜細胞へと分化することを促進していることが明らかとなった。

Ezh2 による着床期子宮内膜の機能制御機構

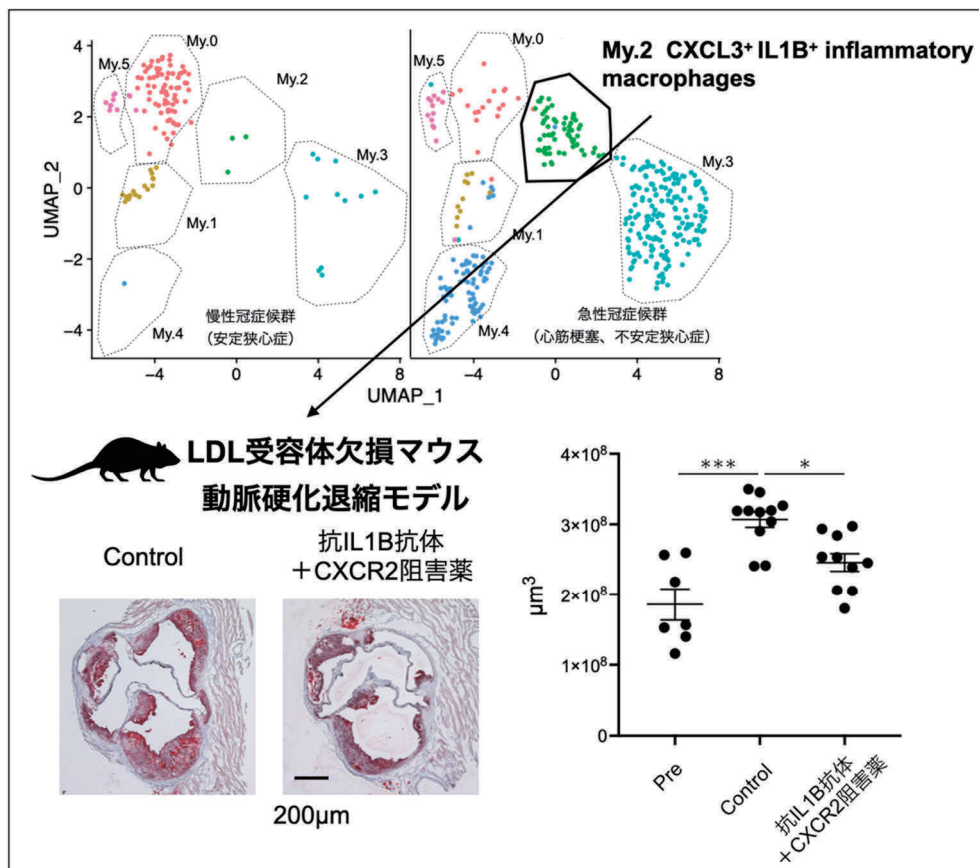


【目的】 突然発症する心筋梗塞を含む急性冠症候群（ACS）における致死率は高く、その予防は極めて重要である。プラークの不安定性をターゲットにした治療法の開発が望まれている。冠動脈粥腫切除術（directional coronary atherectomy : DCA）で得られる慢性冠症候群（安定狭心症）患者のプラークと急性冠症候群患者のプラークをシングルセル RNA シークエンス（scRNAseq）で比較し、それぞれの細胞集団における、ACS プラークの特徴を明確に捉えることを第一の目標にした。そして、ヒトのデータだけでは、その因果関係が証明できないため、動脈硬化モデルマウスを用いて、ACS 特異的に認められる細胞集団をターゲットにした治療介入を模索し、最終的には新たな治療法の開発へと結びつけることを目標としている。

【方法】 動脈硬化退縮モデル（LDL 受容体ノックアウトモデルに高脂肪高コレステロール食を負荷して動脈硬化を強く誘導した後に、普通食に戻すモデル）を用いて、プラークの安定化、退縮を評価した。抗 IL1B 抗体、CXCR2 阻害薬、抗 CD40LG を用いたプラークの安定化また退縮効果をこのマウスモデルを用いて判定した。早期短期間での治療を想定して、普通食に戻して、Day1、4、7 日目に high dose を投与し、4 週間後に動脈硬化を評価するプロトコールとした。

【結果】 CXCL3⁺IL1B⁺ inflammatory M ϕ の function をキャンセルするために抗 IL1B 抗体と CXCR2 阻害薬の 2 剤を同時に投与すると、動脈硬化の進展を食い止めることができる可能性を示すことができた。実際の冠動脈プラークから得たデータを基に仮説を組み立てているため、マウスでの研究の結果はそのままヒトのデータの解釈につながり、臨床的意義は大きい。炎症性マクロファージ誘導機構を明らかにする計画を進めていく。

ヒト冠動脈症候群で認めた炎症性マクロファージをターゲットした治療法開発



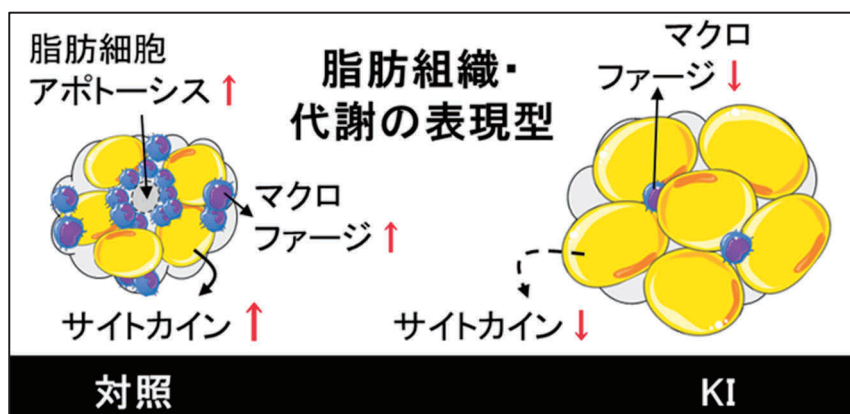
160 脂肪細胞の微小管捕捉因子を介した糖脂質代謝制御	大熊 英之
-----------------------------	-------

【目的】これまで、遺伝子工学的手法により臓器選択的なインスリン (Ins) 作用の制御が試みられてきた。特に、肝臓よりも脂肪細胞優位に Ins 作用を高めることにより、肝臓への脂肪蓄積を促進することなく肥満に伴う糖脂質代謝異常の改善に寄与する可能性が報告されている。著者らは、発現データベースを用いた比較より、肝臓や骨格筋には低発現であるが脂肪組織において発現が顕著である pleckstrin homology-like domain family B member 1 (PHLDB1) に着目した。微小管捕捉因子として知られる PHLDB1 は、微小管の位置決定に関与する一方、Ins 依存的に Ins シグナル活性を増幅する因子でもある。本研究課題では、個体レベルでの PHLDB1 の制御が糖脂質代謝に及ぼす影響を、脂肪組織とその他の臓器における Ins 作用の差異の観点から明らかにすることを目的とする。

【方法】1) PHLDB1 の臓器発現パターンおよび肥満における発現変化の検討：野生型マウスにおいて PHLDB1 蛋白の各臓器における発現分布を解析した。また、高脂肪食誘導性肥満マウスの脂肪組織における PHLDB1 の蛋白発現レベルを非肥満対照マウスと比較した。2) PHLDB1 遺伝子改変マウスの解析：連携研究者より以下の PHLDB1 遺伝子改変マウスの分与を受け、解析を行った。①R26-TagRFP-T-PHLDB1 マウス (ROSA26 遺伝子座へ全身性に PHLDB1 をノックインしたマウス) および②Adipoq-Cre: R26R-TagRFP-T-PHLDB1 マウス (脂肪細胞特異的 PHLDB1 ノックインマウス)。これらのマウスを、対照マウスとともに高脂肪食により飼育し、耐糖能 (ブドウ糖および Ins 負荷試験等)、血清糖脂質パラメータの解析に加えて、脂肪細胞の組織学的解析、遺伝子発現解析、Ins シグナル解析等を施行した。

【結果】1) 野生型マウスにおける PHLDB1 発現分布・及びその制御：野生型マウスにおいて、PHLDB1 は白色・褐色脂肪組織に高発現し、骨格筋・肝臓では低発現であった。高脂肪食給餌野生型マウスは、対照の非肥満マウスと比較して脂肪組織の PHLDB1 発現が低下していた。肥満マウスの脂肪組織で惹起されるとされる小胞体ストレス・低酸素を 3T3-L1 脂肪細胞に誘導すると PHLDB1 の発現が有意に抑制された。2) 全身 PHLDB1 ノックイン (KI) マウス・脂肪細胞特異的 PHLDB1 KI マウスの解析：高脂肪食給餌全身 KI マウスは、対照マウスと比較して体重非依存的に耐糖能および Ins 抵抗性が改善し、血中遊離脂肪酸の低下、脂肪組織重量・脂肪細胞面積の増加、脂肪組織の炎症関連遺伝子の発現低下を認め、脂肪組織における Ins 依存的 Akt リン酸化の亢進および肝臓脂肪蓄積の減少を認めた。さらに、脂肪細胞特異的 PHLDB1 KI マウスを作製し、高脂肪食を給餌すると、対照マウスと比較した表現型は全身 KI マウスと同様であった。これら 2 種類の PHLDB1 KI マウスで認めた、脂肪組織炎症の軽減を伴った脂肪細胞の肥大化は、“Healthy adipose expansion”と称されている。本研究結果より、肥満個体において PHLDB1 発現を増強することにより、Healthy adipose expansion が誘導され、肥満関連代謝障害の改善につながることを示唆された。

高脂肪食負荷 PHLDB1 ノックインマウスの脂肪組織の表現型

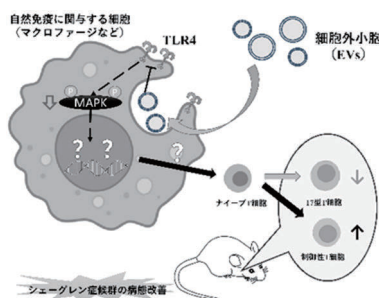


【目的】シェーグレン症候群 (SS) はドライマウスやドライアイを主症状とするため、歯科を初診で来院することも多い。SS の病因・病態についてはいまだ不明な点が多く、治療も対症療法に終始せざるを得ないのが現状である。我々の過去の研究から肝細胞増殖因子 (HGF) やトランスフォーミング因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) が多く含まれている歯髄幹細胞からのエクソソーム (EVs) が SS の病態改善に寄与していることを突き止めた。しかし、歯髄幹細胞 (DPSCs) の状態によってはその効果がでないこともしばしばある。そこで、本研究では、HGF や TGF- $\beta 1$ を多く産生している DPSCs を iPS 細胞化し、それから安定した EVs が取り出せないかと考えて本研究に至った。iPS 細胞化させた後、それらを SS モデルマウスに投与し、治療効果があることの確認とそのメカニズムの解明を行うことを本研究の目的とする。

【方法】まず、*in vitro* において別ロットのヒト歯髄幹細胞から山中らの方法を使って iPS 細胞の作製を行った。樹立した iPS 細胞の特性を調べるために、未分化マーカーである Oct3/4 および SSEA-4 で蛍光免疫組織学的染色を行った。その後、それら細胞の培養上清を採取し、そこに含まれている HGF や TGF- $\beta 1$ の濃度を ELISA を用いて調べた。HGF や TGF- $\beta 1$ の濃度が高い iPS 細胞と HGF や TGF- $\beta 1$ の濃度が低い iPS 細胞からそれぞれ超遠心法を使って EVs を回収した。回収した EVs の表面抗原をウエスタンブロット法を使って確認し、形態をクライオ透過型電子顕微鏡 (Cryo-TEM) を使って確認した。また、それぞれの EVs に含まれているマイクロ RNA を網羅的に調べるためにマイクロ RNA アレイを行った。次に *in vivo* において、SS モデルマウスの尾静脈から EVs を $300 \mu\text{g/ml}$ で 1 回 ($100 \mu\text{l}$ の PBS に懸濁) 投与した。4 週後に唾液腺・脾臓における H-E 染色、qPCR、ウエスタンブロットを使って評価した。

【結果】樹立した 3 種類の iPS 細胞は、それぞれ未分化性を保持していた。それらの培養上清の HGF や TGF- $\beta 1$ の濃度を ELISA で調べたところ、濃度に違いがあった。そこで、HGF や TGF- $\beta 1$ の濃度が高い iPS 細胞およびそれらが低い iPS 細胞からそれぞれ、EVs を採取しその特性や形状を調べた。表面抗原は、ウエスタンブロットから CD9、CD81 を有しており、Cryo-TEM から大きさは約 200 nm 前後で、二重膜に包まれた構造をしていることが分かった。それらを SS モデルマウスに投与したところ、HGF や TGF- $\beta 1$ の濃度が高い iPS 細胞からの EVs 投与群において、唾液腺組織における炎症性細胞浸潤が有意に減少し、唾液量の増加、抗 SS-A 抗体・抗 SS-B 抗体の低下を認めた。それらの EVs の差異をマイクロ RNA アレイで網羅的に検索したところ、HGF や TGF- $\beta 1$ の濃度が高い iPS 細胞からの EVs には let-7 family がより多く含まれていることが分かった。そこで、相互に関連すると言われている Toll-like receptor (TLR) の発現を qPCR で調べると、TLR4 の発現低下を認めた。その下流のシグナル経路である MAPK に着目し、マウスマクロファージの培養上清のサイトカイン濃度やマウス脾臓組織のウエスタンブロットを行うと、EVs 投与群において、抗炎症サイトカイン濃度が高くなっており、ウエスタンブロットでは TLR4 および p-MAPK の発現低下を認めた。よって、EVs 中の let-7 family が TLR4 の発現を抑制し、その結果として MAPK を介した炎症性サイトカイン産生抑制に関与している可能性が示唆された。

本実験のアブストラクト



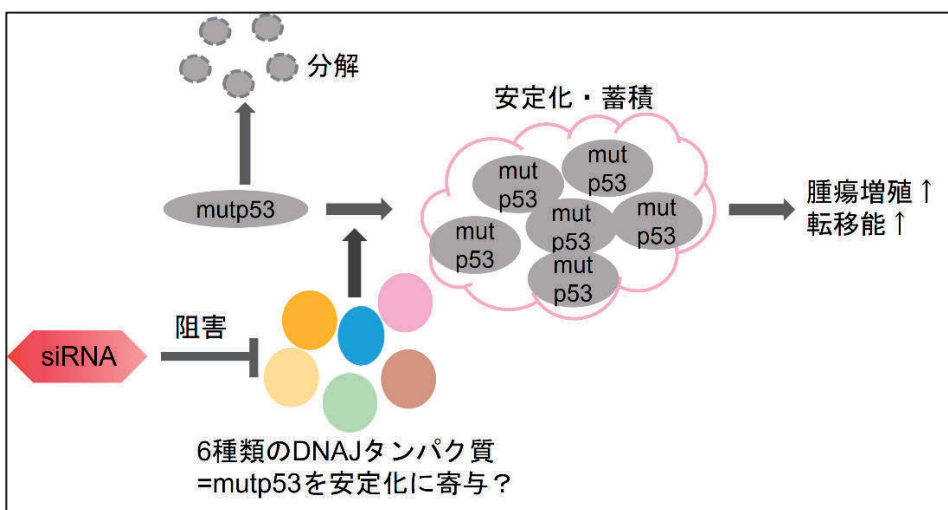
162 DNAJタンパク質による変異p53安定化機構の解明	戒田 篤志
----------------------------------	-------

【目的】 頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）では、p53 の変異発生頻度は半数以上と非常に高く、予後不良との密接な関連があることが知られている。私が所属していた研究室では、HSP40 ファミリーのメンバーである DNAJA1 が、構造変異型 p53 と結合し安定化させることで、変異 p53（mutp53）の分解を抑制し、癌の転移を促進することを明らかにした。しかしながら、HSP40 ファミリーには J-domain を主体とした共通構造を有する 50 種類ほどのサブタイプ（DNAJ タンパク質）が存在し、DNAJA1 以外のどの DNAJ タンパク質が mutp53 の安定化およびその蓄積に関与しているかは明らかにされていない。そこで、本研究では、HNSCC 細胞株を用い、mutp53 を安定化する DNAJ タンパク質の有無について検討した。また、新たなスクリーニング手法の構築のため、mutp53 レポーターシステムの樹立を試みた。

【方法】 細胞株は、ヒト HNSCC 細胞株であり、p53^{C176F} を有する HN31 細胞を用いた。各 DNAJ タンパク質に対する siRNA を 2 種類ずつ設計し、siRNA ライブラリーを作製した。リポフェクション法による siRNA 処理後、蛍光免疫染色により p53 を染色し、ハイスループット顕微鏡システムを用い、検出および解析を行った。また、mutp53 レポーターシステムとして、ヒト HNSCC でよく観られる変異型である p53^{R175H} を緑色蛍光タンパク質である AcGFP と融合したベクターを新規に構築し、p53 をノックアウトした HN31 細胞に導入、その有用性について検討した。

【結果】 siRNA ライブラリーを用いたスクリーニングにより、6 種類の DNAJ タンパク質に対する siRNA において p53 発現レベルを 30% 以上抑制することが示された。また、新規に構築した mutp53 レポーターシステムを導入した細胞において、p53 が緑色蛍光として観察されること、p53 タンパク質が発現していることが示されたとともに、細胞遊走能およびコロニー形成能が上昇することを見出した。今後は、本研究にて抽出された mutp53 の安定化に寄与し得る DNAJ タンパク質について検証を進めていくとともに、新たに開発されたレポーターシステムを活用し、変異パターンに応じて安定化に寄与し得る DNAJ タンパク質に違いがあるか検討していく予定である。

変異 p53 の安定化および蓄積に寄与しうる DNAJ タンパク質の同定

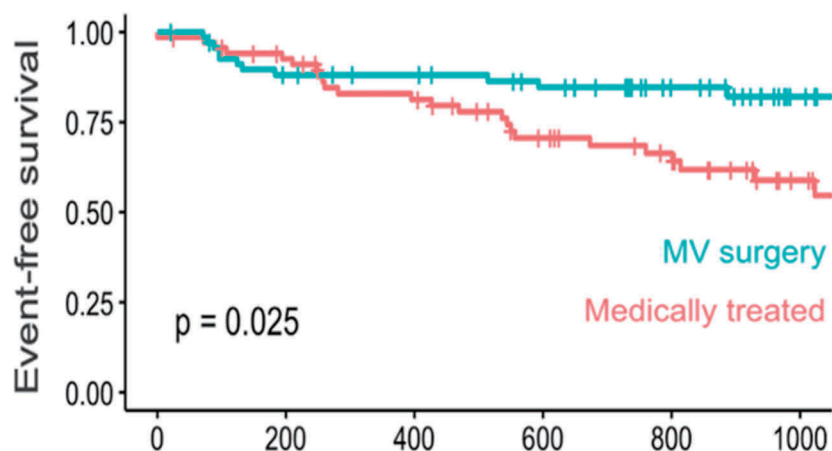


【目的】 心房性僧帽弁逆流 (AFMR) に対する外科的介入の有効性は詳しく調査されていないため、現在のガイドラインに強い推奨はない。本研究 (心房性機能性僧帽弁逆流の疫学および治療の意義に関する多施設後方視的観察研究: REVEAL-AFMR) では、有意な AFMR を有する患者の有病率と、僧帽弁 (MV) 手術が予後に与える影響を調査することを目的とした。

【方法】 日本の 26 のセンターを含む多施設後ろ向き観察研究を行った。心エコー図のデータを後ろ向きに収集し、中等度以上の機能性僧帽弁逆流のうち、弁に退行性弁の変化がなく、左室 (LV) の機能が保たれ、左心房が拡大しているものを AFMR と定義した。僧帽弁手術を行った患者において、手術直前の患者情報を収集し、心不全の入院または全因死亡で定義された一次エンドポイントの頻度について追跡され、内科的に管理された患者と比較した。

【結果】 心エコー図を行った 177,235 人の患者の中で、中度または重度の MR は 8,867 人の患者で観察され、そのうち 1,007 人の患者が AFMR であった。これらの症例は平均年齢 78 ± 10 歳、女性が 56%、心房細動の有病率が 89% であった。内科的治療で管理された AFMR の患者と比べて、僧帽弁手術を受けた患者 ($n=113$: 僧帽弁形成術が 61%、僧帽弁置換術が 39%) は若く、EuroSCORE II は同等だったが、MR がより重度で、LV と左心房が大きく、症状がより多く、心不全入院の既往がより高かった。中央値の追跡期間は 1,040 (717~1,172) 日で、189 人 (18.8%) の患者が死亡し、286 人 (28.4%) が主要合併症を経験した。多変量解析では、AFMR のための僧帽弁手術は医学的治療と比較して良好な結果と関連していた (ハザード比: 0.44 [0.26~0.74]、 $p=0.002$)。168 人のマッチング患者で不死時間バイアスを考慮した傾向スコアマッチング解析は同様の結果を示した (ハザード比: 0.47 [0.24~0.93]、 $p=0.029$)。サブグループ解析は、重度の AFMR を持つ患者に対する僧帽弁手術の影響は、中度または中度から重度の AFMR を持つ患者よりも大きかったと示唆した。このように、REVEAL-AFMR では、日本における中度または重度の AFMR を持つ患者は年配で、イベント発生率が高いなどのこの疾患における基本的な情報が多く得られた。また、僧帽弁手術が予後を改善する可能性が示唆され、今まで治療法の定まっていなかったこの疾患に関して、治療の方針を考える上で重要なデータを示すことができた。

マッチングを行った上で内科治療群と僧帽弁手術群におけるイベント発生率

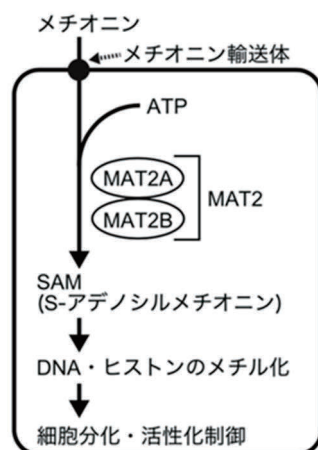


【目的】 自己免疫疾患は自己の組織に対して異常な免疫がおきることによって発症する。そこには、異常な B 細胞による自己抗体の産生が深く関わる。しかし、なぜ異常 B 細胞ができるのか、異常 B 細胞を抑制するにはどうすれば良いのか、いまだに不明な点が多い。自己免疫疾患の発症には遺伝的要因と環境的要因が関与する。近年の網羅的ゲノム解析により、遺伝的要因の解明が進んだが、遺伝的要因の理解だけでは発症の予測も治療も難しいことがわかってきた。環境的要因が自己免疫疾患の発症にどう関わるのか、その理解が必要である。環境的要因は最終的には DNA やヒストンのエピゲノム修飾を変化させ、遺伝子発現を攪乱することで B 細胞の機能異常を引き起こしている可能性がある。しかし、B 細胞の分化や活性化でのエピゲノム修飾の意義、そこへの環境因子の関与には不明な点が多い。研究代表者らは、環境的要因のなかでも DNA やヒストンのメチル化修飾に直接関わるメチオニン代謝に注目している。すなわち、メチオニンは酵素 MAT2 (Methionine Adenosyl Transferase 2, MAT2A と MAT2B の複合体) により S-アデノシルメチオニン (SAM) に代謝されるが、SAM は DNA やヒストンのメチル化に必要なメチル基供与体であるため、メチオニン代謝が B 細胞の分化・活性化の制御に直接関わっている可能性がある (下図)。しかし、B 細胞の分化や活性化に SAM の量的変動がどう関わるか、不明な点が多い。そこで本研究では B 細胞造血におけるメチオニン代謝の意義を明らかにする。

【方法】 B 細胞の各分化段階での SAM 合成の重要性を解明するために、野生型マウスから各分化段階の B 細胞を分取し、SAM 合成酵素 MAT2A の発現量を解析した。さらに、野生型マウスの B 細胞の造血で、“どの段階で” “なぜ” SAM が必要か、その生体内での役割を解明する為に、B 細胞特異的に SAM 合成酵素を欠損させたマウスを作製し、その表現型の解析を行った。分化障害の認められる前後の細胞集団を野生型マウスおよび B 細胞特異的 SAM 合成酵素欠損マウスから分取し、網羅的遺伝子発現解析を行った。あわせて、SAM の量的変動が B 細胞造血に与える影響を経時的に明らかにすべく、薬剤誘導型の造血細胞特異的 SAM 合成酵素欠損マウスを作製し、表現型の解析を実施した。

【結果】 MAT2A の発現誘導は B 細胞分化の初期に認められ、その後徐々に低下していた。これと一致して、B 細胞特異的 SAM 合成酵素欠損マウスでは B 細胞の初期分化が障害されることが明らかとなった。同様に、薬剤誘導型の造血細胞特異的 SAM 合成酵素欠損マウスにおいても、欠損誘導後早期に B 細胞の造血障害が起きることが明らかとなった。これらのことから、少なくとも B 細胞の初期分化においては細胞自律的な SAM 合成が必要であり、短期的な SAM 合成障害であっても造血障害の原因となりうることを明らかとなった。網羅的遺伝子解析では、大変興味深いことに、B 細胞の多様な抗体産生に必要な遺伝子再構成が障害されていることを示唆する所見を得た。B 細胞造血におけるメチオニン代謝の意義のさらなる解明が、B 細胞異常の関与するさまざまな疾患の理解・克服につながるものと期待される。

メチオニン代謝による細胞分化・活性化制御モデル

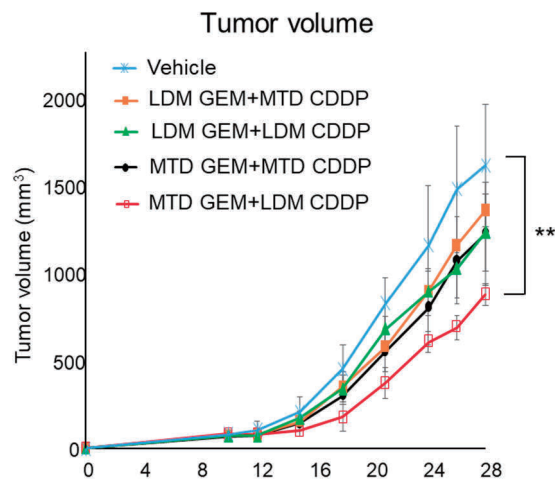


【目的】 腫瘍血管を構成する腫瘍血管内皮細胞はがんの進展や転移に重要な役割を担っていることが知られており、様々な異常性をもつことが明らかとなってきた。腫瘍血管内皮細胞は、がん組織内のわずか数パーセントの細胞集団であるが、その役割から抗癌剤治療後も残存すると再発・転移の要因となりうるため、腫瘍血管自体の薬剤耐性も無視することはできない。これまで、腫瘍血管内皮細胞が、正常組織の血管内皮細胞と比較して様々な違いがあることが解明されてきており、そのひとつにABCトランスポーターの一つABCB1（多剤耐性遺伝子*MDR1*によりコード）の発現亢進がある。ABCトランスポーターは細胞内の薬剤排出に関わる細胞膜輸送型タンパクである。腫瘍血管内皮細胞はABCB1を介して抗癌剤を細胞外に排出することで耐性を示す。我々は尿路上皮癌の臨床検体を用いた研究で、抗癌剤治療によってABCB1高発現の腫瘍血管内皮細胞が増加し、予後不良の原因となることを見出している。さらに、そのABCB1発現亢進メカニズムとして、炎症性サイトカインであるIL-8が関与していることを解明している。本研究では薬物治療時の炎症性変化を抑制することで、腫瘍血管内皮細胞の異常性獲得を防ぎ、長期間奏効する尿路上皮癌の新規治療法の開発を目指した。

【方法】 尿路上皮癌のゼノグラフトモデルを用いて、標準化学療法として行われるゲムシタビンまたはシスプラチンを低容量維持による投与方法で腫瘍の炎症性変化が抑制されたか、また腫瘍血管の異常性亢進が改善されたかを主に免疫組織学的に検証した。さらに、その治療法により治療効果の改善がみられたかを検証した。

【結果】 シスプラチンの低容量維持投与を行うことで、腫瘍組織内の炎症性サイトカイン発現や免疫抑制性細胞の動員が抑制されるなど、腫瘍組織内の炎症性変化が抑制されることが示された。また、シスプラチンの最大投与量でみられていた腫瘍血管密度の増大が、低容量維持投与ではキャンセルされかつ、周囲細胞でおおわれた血管の増加がみられ、腫瘍血管の正常化がもたらされていた。それに伴いシスプラチンの低容量維持投与により、腫瘍増殖が抑制され、骨転移の減少がみられ治療効果が改善することが証明された。

尿路上皮癌ゼノグラフトモデルにおける腫瘍増殖曲線



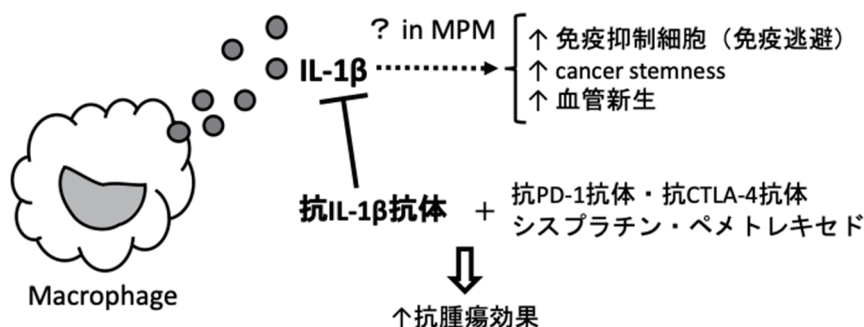
【目的】近年、多くの悪性腫瘍で免疫チェックポイント阻害剤の有効性が報告され、免疫療法が日常の癌診療に使用されるようになった。一方、腫瘍関連マクロファージ (TAMs) は、様々な癌種において悪性度に関与しており、これを標的とした治療の有効性が前臨床モデルを用いた研究で報告されているが、一般臨床への応用には未だ至っていない。IL-1 β は主に単球・マクロファージにより産生される。悪性腫瘍においてIL-1 β は腫瘍侵襲性・血管新生の促進や免疫抑制細胞の動員に関与していることが報告されているが、MPM進展におけるIL-1 β の意義・役割は不明である。本研究の目的は、マウスMPM同所性腫瘍モデルを用いて、MPMにおけるIL-1 β の意義を明らかにし、IL-1 β を標的とした、MPMの新たな免疫療法、あるいは既存治療と組み合わせた新規集学的治療を開発することである。本研究によって、IL-1 β のMPM進展における役割が明らかとなり、極めて予後不良なMPMの予後改善につながることを期待される。

【方法】本研究では、前臨床マウスMPM同所性腫瘍モデルとして、Balb/cマウスにAB12 (Balb/cマウスにアスベストを暴露させて作製した中皮腫細胞株)を胸腔内投与した同種同所性腫瘍マウスモデルを使用した。

1. 同所性中皮腫マウスモデルの作製: Balb/cマウスに 0.5×10^6 cells/ $200 \mu\text{l}$ のAB12を右胸腔内投与し、腫瘍生着・生存を観察した。2. 腫瘍内免疫微小環境の解析: 同所性中皮腫マウスモデルの、腫瘍投与前・投与後3、7、10、14日目の胸水 (あるいは胸腔内洗浄液)を回収し、マクロファージ、Tリンパ球 (CD3、CD4、CD8、regulatory T cell) など各種免疫細胞の動態をFlow cytometryにて解析した。3. 腫瘍内微小環境のIL-1 β 濃度の測定: 同所性中皮腫マウスモデルの、腫瘍投与後10日目の胸水を回収し、ELISAでIL-1 β 濃度を測定した。

【結果】1. 同所性中皮腫マウスモデルの作製: 本方法で作製した同所性中皮腫マウスモデルは、ヒト中皮腫と同様に、胸腔内にびまん性に腫瘍を認めた。しかし、生存期間中央値は約55日であり、これまでの先行研究と比較して長く、細胞培養・腫瘍投与などの条件を検討し、これまでの先行研究に近いエンドポイントとなるモデルを作製した。2. 腫瘍内免疫微小環境の解析: 腫瘍進展に伴って、胸水中に、マクロファージ、CD8陽性Tリンパ球、制御性T細胞が増加していた。特に、マクロファージに関しては、2つの胸腔内マクロファージのsubset (F4/80^{low} Small pleural macrophages (SPM) と F4/80^{high} Large pleural macrophages (LPM))があることがわかった。F4/80^{low} SPMは、腫瘍進展の早期に著しく増加し、腫瘍進展に伴ってM2マクロファージ (腫瘍免疫抑制性、すなわち腫瘍増殖に促進的に作用する)のマーカーであるCD206の発現が高くなった。3. 腫瘍内微小環境のIL-1 β 濃度の測定: ELISAで胸水中のIL-1 β 濃度を測定したが、測定不能であった。原因として、胸水量が少なく希釈したうえでELISAを行ったためと考え、現在条件設定などを行っているところである。

本研究計画の概略



167 体液性因子を介したアルドステロン過剰分泌機構の解明

小林 洋輝

【目的】本研究では①原発性アルドステロン症 (PA) 患者の血液検体を用いて、網羅的蛋白の測定を行い PA の一病型である特発性アルドステロン症 (IHA) に特徴的な血中蛋白を同定し、②同定した蛋白について Pathway 解析、ヒト副腎皮質細胞を用いた機能解析を行い IHA の病態を明らかにすることを目的とした。以上から IHA の治療標的、診断バイオマーカーを同定することが最終目標である。

【方法】1. Discovery cohort における蛋白の測定、解析: 所属施設を受診し、副腎静脈サンプリング、臨床所見、病理所見から診断されたアルドステロン産生腺腫 (APA) 40 人、IHA40 人、本態性高血圧 (EH) 患者 40 人を対象に、保存血清 100 μ l を用いた網羅的蛋白測定 (SomaScan platform を用いた蛋白測定) を行い、①IHA 群に特徴的な蛋白群を明らかにした。また②候補蛋白の発現量と PAC、及び 3 次元画像解析システムで計測した内臓脂肪量との相関解析を行った。統計処理には、SAS 9.4 を用いた。2. Pathway 解析、媒介解析による候補蛋白の統合解析: 同定された蛋白群については、DAVID を用いた KEGG 解析を行い、IHA の病態に重要な Pathway を明らかにした。また媒介解析による因果解析を行い、内臓脂肪量と PAC の関連性について同定した候補蛋白がどの程度媒介するのかを明らかにした。

【結果】本研究で PA 患者の血液検体を用いて、網羅的に蛋白の測定を行い IHA に特徴的な血中蛋白プロファイルを同定した。同定した蛋白のうちの複数で内臓脂肪量と PAC との優位な相関関係を認め、IHA の発症に寄与している可能性が示唆された。

Fold change analysis の結果 (上位 5 つのタンパクの結果を提示)

蛋白	APA vs IHA (Fold change analysis)				PA vs EH (Fold change analysis)			
	APA (Median)	IHA (Median)	FC	P	EH (Median)	PA (Median)	FC	P
蛋白 A	484	594	1.23	1.30E-05	434	539	1.24	5.60E-07
蛋白 B	1270	1529	1.20	1.70E-04	1123	1353	1.20	2.10E-05
蛋白 C	711	804	1.13	3.10E-04	658	757	1.15	3.90E-04
蛋白 D	1375	1507	1.10	4.60E-04	1278	1462	1.14	7.10E-07
蛋白 E	538	602	1.12	4.60E-04	492	563	1.14	1.50E-05

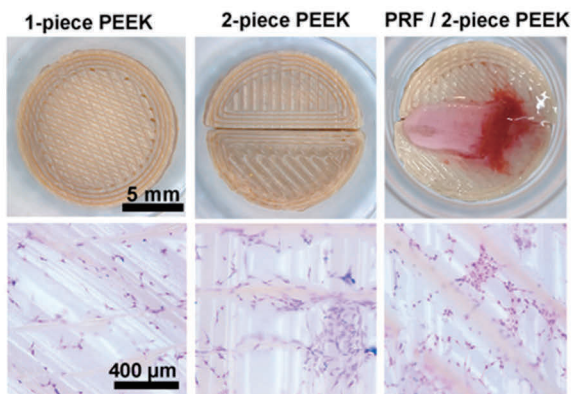
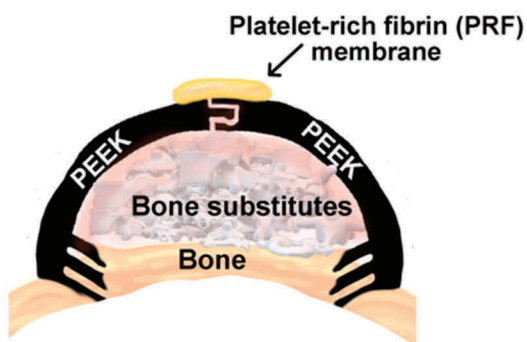
【目的】 口腔外科領域において、顎骨腫瘍切除後等の顎骨骨欠損や萎縮顎骨に対する骨再建には、チタン製のフレームと自家骨や人工骨を使用する手法がある。しかし、チタンの造形付与には一定の限界がある。近年、ポリエーテルエーテルケトン樹脂 (PEEK) の医療応用が注目されているが、3D プリントによる造形が可能な PEEK 材料を用いることで、既存のチタンフレームに代わる再建フレーム材料が開発できるのではないかと考えた。さらに、2ピースの PEEK フレームを設計することにより、顎骨への適合を向上させ、自由に形態を付与することにより骨補填材料を充填しやすい構造を設計できる可能性があると考えた。また、2ピース PEEK フレームの境界部のシーリングに関しては、barrier membrane の代替材料として Platelet-rich fibrin (PRF) メンブレンが使用できるのではないかと考えた。PRF は自己血由来の組織再生材料であり、簡便に加工が可能である利点がある。そこで、本研究では、3D プリント技術を用いてカスタムメイドした PEEK フレームを開発し、骨再建の材料としての可能性を検索することを目的とし、まず、PEEK 製のディスクを設計、作製、さらに PRF メンブレンを組み合わせ、それらの材料の特性、細胞活性について検討することとした。

【方法】 PEEK フィラメントは 3D プリンターを用いてディスク状の PEEK 材料を造形し、アニーリング処理を行った。作製した材料は、実体顕微鏡、走査型電子顕微鏡を用いて表面性状を観察した。細胞実験では 1) 細胞培養プラスチックディスク、2) 1 ピース PEEK ディスク、3) 2 ピース PEEK ディスク、4) PRF/2 ピース PEEK ディスクの 4 群について、それぞれの材料上でマウス骨芽細胞様細胞 (MC3T3E-1 細胞) を播種・培養し、細胞接着能、細胞増殖能、骨芽細胞分化能についてアッセイを行い、比較検討した。

【結果】 実験に使用した PEEK 材料は、フィラメントの溶解積層方式による加工のため、規則的な凹凸を伴う積層痕を有する表面性状を有していた。細胞アッセイでは、PEEK ディスク材料上に接着した伸長した細胞が観察され、優れた細胞生存能が示唆された。また、PRF メンブレン自体は優れた生体適合性を有するのは既知であるが、PEEK ディスクと組み合わせると、細胞増殖能は、PEEK ディスク単独群に比較し、やや低下した。MC3T3E-1 細胞によるアルカリフォスファターゼ (ALP) アッセイでは、PEEK ディスク上で、骨芽細胞分化が促進する可能性が示された。しかし、PEEK ディスクと PRF メンブレンを組み合わせた群では、ALP 活性が低下していた。今後は、2 ピース PEEK 材料について、現実的な骨再建材料としての有用性を検討するために、*in vivo* 実験による生体反応を検証する必要があると示唆された。

2 ピース PEEK フレーム実現のための *in vitro* 細胞アッセイ

2-piece PEEK frame sealed with PRF

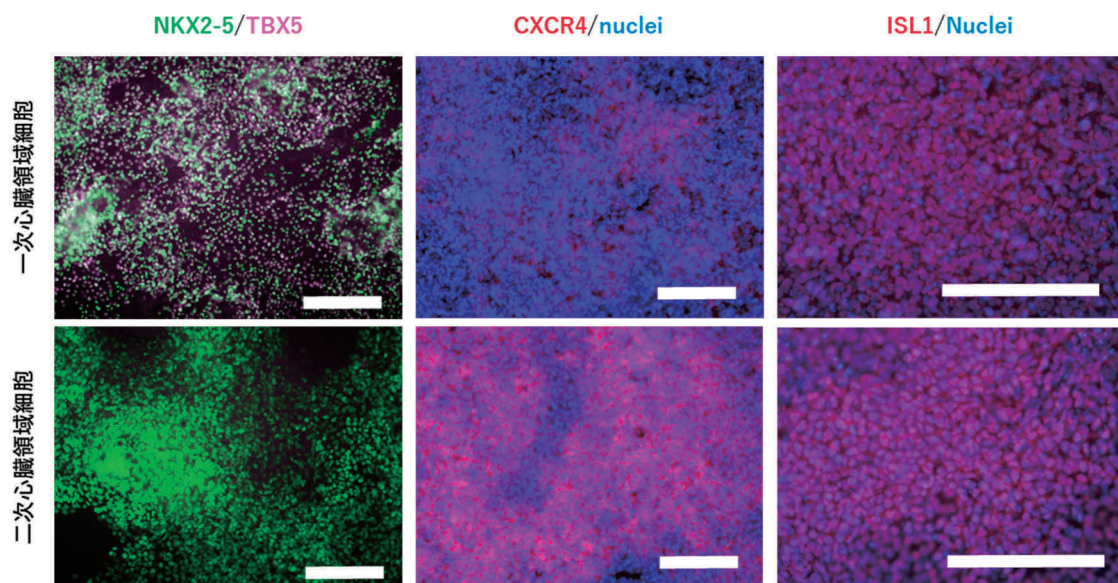


【目的】心筋細胞に効率よく分化するヒト ES/iPS 細胞由来心臓前駆細胞は、心不全治療のツールとして期待される。胎生期に心臓前駆細胞によって形成される心臓予定領域に、一次心臓領域と二次心臓領域がある。一次心臓領域細胞が原始心臓構造を形成し、その後、二次心臓領域細胞が原始心臓構造に向かって遊走し、心臓の伸長に寄与する。一般的に、二次心臓領域細胞は、増殖能および遊走能が高い前駆細胞であることが知られており、移植による心不全抑制効果が期待される。そこで、移植細胞のソースとして、ヒト iPS 細胞から一次心臓領域細胞および二次心臓領域細胞の誘導を試みた。加えて、異なる種類の細胞移植の生着を、非侵襲的に定量比較できるシステムの準備を行った。

【方法】Lian たちが報告した GSK3 阻害剤と Wnt 阻害剤を用いた心筋細胞分化誘導法である GiWi プロトコール (Proc Natl Acad Sci U S A. 2012) をベースとした心筋分化誘導法を用いて、ヒト iPS 細胞から一次心臓領域と二次心臓領域を誘導した。そしてこれらの心臓予定領域細胞に含まれる未分化細胞を Brequinar 添加によって除去した。また、移植後の生着を非侵襲的に定量的に評価するために、核医学イメージングで検出可能な機能付加ヒト iPS 細胞株を作製した。

【結果】GiWi プロトコールでは、一次心臓領域細胞に相当する NKX2-5⁺/TBX5⁺心筋前駆細胞が主に誘導されることがわかった。次に、GSK3 阻害剤にインスリンあるいは BMP 阻害剤を添加すると、二次心臓領域細胞に相当する NKX2-5⁺/TBX5⁻心筋前駆細胞が主に誘導された。複数のヒト iPS 細胞株でこの方法の再現性を確認した。誘導された一次心臓領域細胞には、未分化マーカーである NANOG⁺細胞の混入を認めなかったが、二次心臓領域細胞には、NANOG⁺細胞の混入を認めた。そこで Al-Akashi らが iPS 細胞由来間葉系幹細胞から未分化細胞を除去するのに使用した Brequinar (Front Cell Dev Biol. 2023) を添加することで NANOG⁺細胞を除去できることがわかった。移植後の細胞生着を SPECT で定量的に経時的に評価するために、ナトリウム・ヨード共輸送体を恒常的に発現するヒト iPS 細胞を作製した。この共輸送体によって、細胞が ¹²⁵I、¹⁸F-tetrafluoroborate、^{99m}TcO₄⁻といった放射性トレーサを取り込むことができ、SPECT で検出することができた。今後はこの細胞株を用いて一次心臓領域細胞および二次心臓領域細胞を誘導し、心不全モデルラットに移植する予定である。

ヒト iPS 細胞由来一次心臓領域細胞および二次心臓領域細胞



Bar = 200 μm.

170 “心電図を診る目”をもつ人工知能モデルの開発	遠山 岳詩
----------------------------	-------

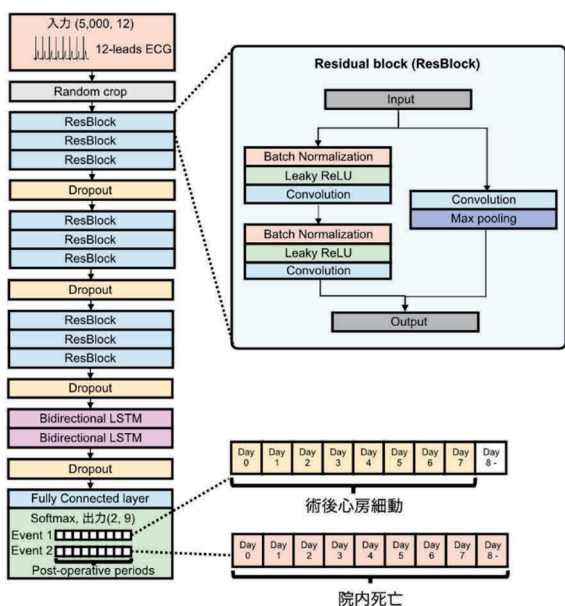
【目的】 近年、人工知能の技術革新はめざましく、心電図検査においても Deep learning の技術を応用した研究が盛んに行われている。大量のデータを用いて診断や予測を行う Deep learning モデルは、通常、数百万～数千万の大量のデータを必要とすることから、開発対象が限定され、大量にデータを準備することが困難な疾患・病態は Deep learning 研究の対象にならない。そのような課題に対して、心電図情報を圧縮する Deep learning の基礎となる“心電図を見る目”を持つモデルを構築・活用することで、少数データでの Deep learning モデルの開発に繋げることが可能となる。そこで、今回は術後に発症する心房細動（POAF）を研究対象として、“心電図を見る目”を活用した Deep learning モデルを構築することを目的とした。POAF は、入院期間の延長、発作性心房細動の発症、後期脳梗塞のリスクを高めることが知られており、POAF のスクリーニングモデルを開発することは臨床的に重要である。

【方法】 本研究では、九州大学病院にて外科的手術を受けた 18 歳以上の心房細動のない被験者 27,564 人を対象として、手術の 30 日前までに記録された非心房細動の心電図データ 43,980 件を解析した。院内死亡と早期退院による打ち切りや競合リスクを考慮し、Time-to-event 解析を扱うことができる深層学習モデルを構築した。本モデルは、事前に年齢・性別等を予測させる課題を与えた Deep learning モデル（心電図を見る目に相当）を構築し、それを Fine tuning することで、モデルの精度向上を図った。開発したモデルの性能は、時間依存性の評価指標を用いて評価した。

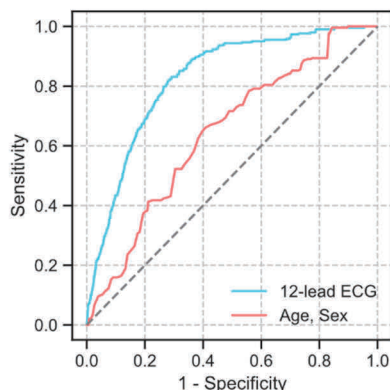
【結果】 内部検証データセットにおける POAF の発生率は 3.6%であった。構築したモデルの POAF 予測精度は、時間依存性 c 統計量で 0.83（95%信頼区間：0.80～0.85）であった。また、感度 79.9%、特異度 73.5%、陽性的中率 10.2%、陰性的中率 99.0%を達成した。顕著性マップによる解析では、特に aVF、V1、V2、V5、V6 の P 波と ST 領域に着目していることが明らかとなった。術前心電図を用いた深層学習モデルは、比較的小規模のデータベースをもとに構築されたものであるが、高い陰性的中率を持ち、術後に適切な心電図モニタリングが必要となるハイリスクの POAF 患者を特定するための実用的なモデルとなり得る。

術後心房細動のハイリスク患者をスクリーニングするための Deep learning モデル

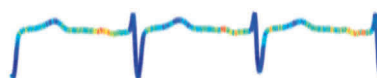
Deep learningモデル



モデルの予測精度



予測モデルの可視化



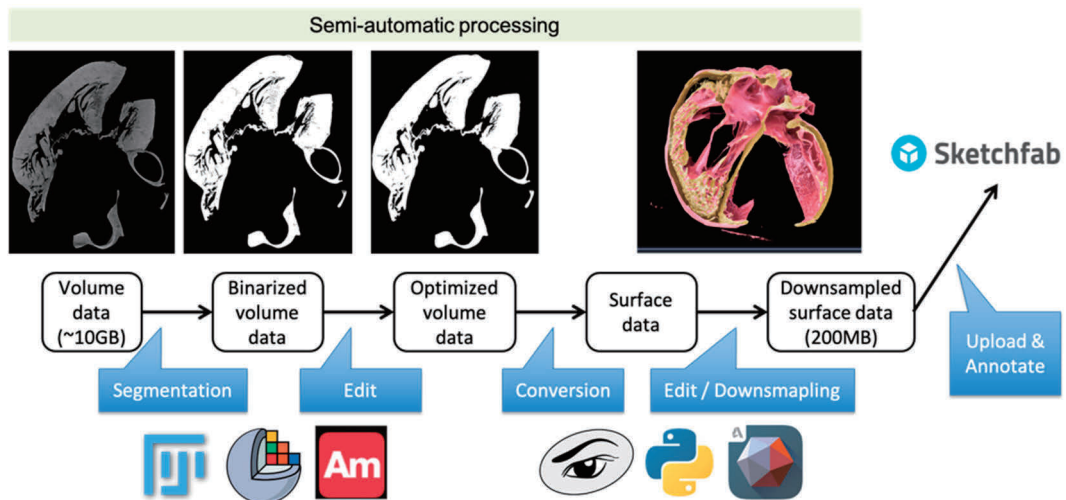
【目的】 先天性心疾患やその解剖学・病理学に関する臨床・教育・研究において、先天性心疾患患者の剖検で得られた心臓標本は不可欠である。しかし、最近ではそのような標本はほとんど手に入らず、過去に得られた標本は劣化が避けられない。本研究は、ボストン小児病院の The Cardiac Registry に保管されているワックス浸潤心臓標本を、マイクロ CT を用いた高解像度三次元デジタルデータとしてアーカイブし、先天性心疾患のオンライン三次元アトラスを開発することを目的とする。

【方法】 ボストン小児病院の The Cardiac Registry に保管されているヒトのワックス浸潤心臓標本を対象とした。ワックスが広範囲に残存しているものや、損傷しているものは除外した。ハーバード大学 Center for Nanoscale Systems のマイクロ CT (X-Tek HMXST225, Nikon Metrology Inc.) で標本をスキャンし、三次元データ処理を施して三次元モデルを作成した。得られたモデルはダウンサンプリングした上でインターネット上にアップロードし、オンライン三次元アトラスとして公開した。

【結果】 1973 年から 2002 年の間に得られた日齢 1~52 歳の患者の心臓標本 53 標本を対象とした。診断は、両大血管右室起始症 (9 例)、心室中隔欠損症 (6 例)、完全型房室中隔欠損症 (5 例) などであった。9 例 (17%) は術後の標本であった。マイクロ CT の解像度は 25~119 マイクロメートルであった。三次元モデルは Sketchfab にアップロードし、解剖学的構造にラベル付けを行った。アトラスは次の URL で公開した。

<https://www.sketchfab.com/heartmodels/collections>

研究全体像

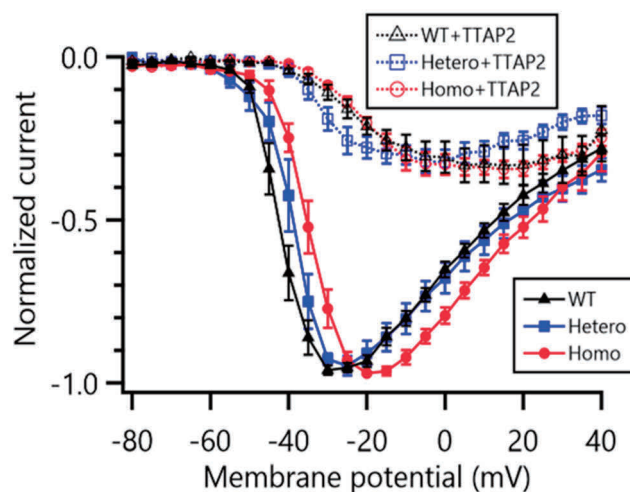


【目的】我々は、研究対象としてきた脊髄小脳失調症 (SCA) 家系において電位依存性 T 型カルシウムチャネルの一種である Cav3.1 をコードする CACNA1G のバリエント (c.5144G>A p.Arg1715His) を責任遺伝子として独自に同定し、2015 年の海外からの報告を以て、この疾患は SCA42 と命名された。SCA42 は緩徐進行性の小脳性運動失調を主症状とし、小脳萎縮、プルキンエ細胞の脱落をきたす神経変性疾患である。我々は SCA42 の分子病態を解明するモデル動物を作製するため、ゲノム編集技術を用いて *Cacna1g* R1723H KI マウス (c.5168G>Ap.Arg1723His) を新規に作製・解析し、世界に先駆けて 2019 年に報告した。このモデルは、点変異の導入により、患者と同様の緩徐進行性の失調症状、小脳プルキンエ細胞変性をきたすことを証明し、疾患モデルとしての有用性を明らかにした。しかしながら、神経変性に至るメカニズムについては未解明であり、治療法開発へ向けた SCA42 の病態解明には解決すべき数多くの課題がある。本研究では、新規に確立した SCA42 モデルマウス (*Cacna1g*_R1723H_KI マウス) を、分子生物学的、病理学および電気生理学的手法を駆使しさらに多面的に解析することで、カルシウムチャネルパッチとしての神経変性の病態を解明し、病態に基づく根本治療開発へ繋げることを目的とした。

【方法】具体的には、①50 週齢のモデルマウスの小脳から RNA を抽出し、RNA シークエンスによる発現変動遺伝子解析、②T 型 Ca チャネルが発現しているプルキンエ細胞をターゲットに *in vivo* 系での神経細胞ネットワークを温存した状態での電気生理学的解析、③T 型 Ca チャネル修飾薬 (X) をモデルマウスに投与し、Rotarod test および foot print test による行動解析および小脳プルキンエ細胞変性過程についての病理学的解析、④CACNA1G バリエントを導入した培養細胞に対する (X) の電流電圧曲線に対する効果の検証を行うことで、SCA42 の病態解明・治療法開発を試みた。

【結果】①RNA シークエンスで網羅的に解析されたデータから発現変動遺伝子を検出し、バイオマーカーとなりうる分子を同定した。Pathway 解析ではヘテロ、ホモともに共通して低下している経路を見いだした。②*In vivo* 実験でのターゲットであるプルキンエ細胞の同定を確実にするために、L7 プロモーターを用いた Cre-LoxP システムを用いて、プルキンエ細胞特異的に光感受性イオンチャネルであるチャンネルロドプシン 2 (ChR2) を発現するトランスジェニックマウスとの交配を行った。③行動解析では 36 週以降では (X) の投与によりヘテロマウスで有意に Rotarod test での改善を認めた。病理学的解析では、50 週齢のマウス小脳切片において (X) 投与群でヘテロマウスのプルキンエ細胞脱落が有意に抑制された。④培養細胞 (HEK293T) にヒト SCA42 バリエント (R1715H) を transfection し、(X) 投与を行ったが、電流電圧曲線のシフトの改善は認めなかった。

若齢マウス小脳スライスのパッチクランプ法による電流電圧曲線

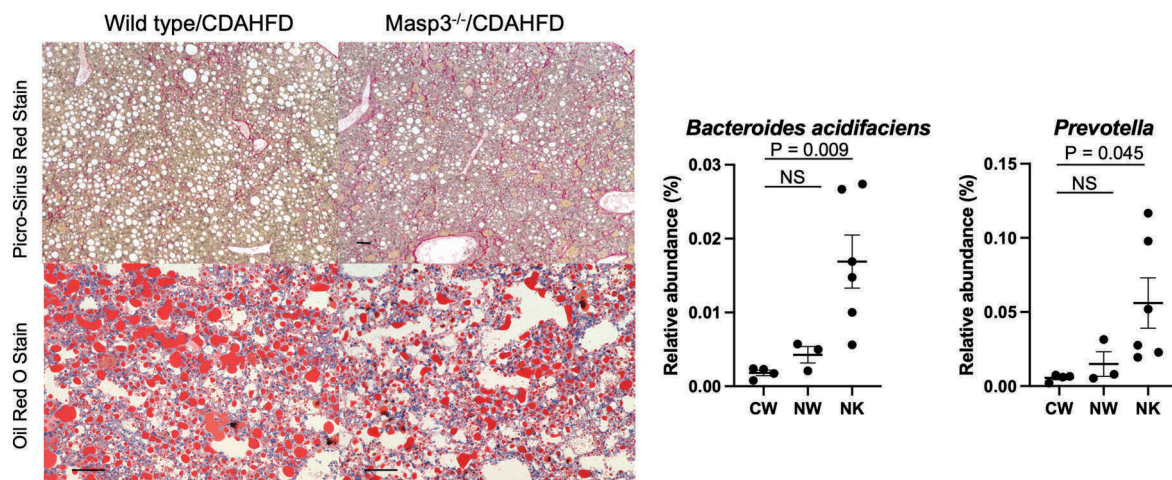


【目的】 非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) は肝硬変へ進行しうる慢性肝疾患であるが有効な治療方法がいまだなく進行の抑制が困難であることから病態解明と新規治療法が必要とされている。NAFLD では腸管と肝臓の病態が相互に影響する腸肝軸 (Gut-liver axis) が病態形成に影響している。NAFLD では腸内細菌叢の異常を来し肝臓の炎症と線維化へ悪影響を及ぼしている。補体は病原体や死細胞の排除により生体の恒常性を維持する役割を担っている自然免疫因子であり、補体活性化経路における第二経路は補体活性化の中心的な役割を果たしている。過剰な補体活性化は様々な疾患に影響しているが、NAFLD の病態にも補体活性化が影響していることが報告されている。Mannose-binding lectin-associated serine protease-3 (MASP-3) は補体第二経路の活性化に重要なセリンプロテアーゼであるが NAFLD における腸肝軸と補体 MASP-3 の関連は未解明である。

【方法】 *MASP-3* 欠損 C57BL/6 マウス (*MASP-3* 欠損マウス) を CRISPR/Cas9 システムにより作製した。超高脂肪コリン欠乏メチオニン減量飼料 (CDAHFD) 飼料を 24 週間投与することで NAFLD モデルマウスを作製した。NAFLD モデルマウスの表現型を野生型マウスと *MASP-3* 欠損マウスで比較した。肝組織の Picro-Sirius Red 染色で肝線維化を評価した。肝組織の脂肪沈着を Oil red O 染色により評価した。盲腸内容物の DNA を用いたアンプリコンシーケンス解析により腸内細菌叢を解析した。

【結果】 CDAHFD 飼料を投与した野生型 NAFLD モデルマウスでは肝線維化が認められたが、*MASP-3* 欠損 NAFLD モデルマウスでは野生型 NAFLD モデルマウスに比べてより高度の肝線維化が認められた。*MASP-3* 欠損 NAFLD モデルマウスで肝脂肪沈着の増加を認めたが、野生型 NAFLD モデルマウスに比べると脂肪沈着は軽度であった。次にマウスの盲腸内容物を採取し腸内細菌叢を 16S rDNA 部分塩基配列を標的として解析した。*MASP-3* 欠損 NAFLD モデルマウスでは α 多様性の変化量が低下し、 β 多様性は similarity が低下していた。さらに *MASP-3* 欠損 NAFLD モデルマウスでは *Bacteroides acidifaciens* および *Prevotella* の relative abundance の上昇が認められた。本研究では、*MASP-3* 欠損により NAFLD モデルマウスの肝線維化は増悪している一方で、肝脂肪沈着は軽減しており、さらに腸内細菌叢は NAFLD に対して保護的な環境へ変化している可能性があると考えられた。*MASP-3* 欠損による NAFLD の肝線維化増悪のメカニズムの解明は MASP-3 に着目したヒトの NAFLD の疾患診断や新たな治療法の創出に寄与できる可能性があると考えられた。

非アルコール性脂肪肝疾患モデルマウスにおける MASP-3 の影響

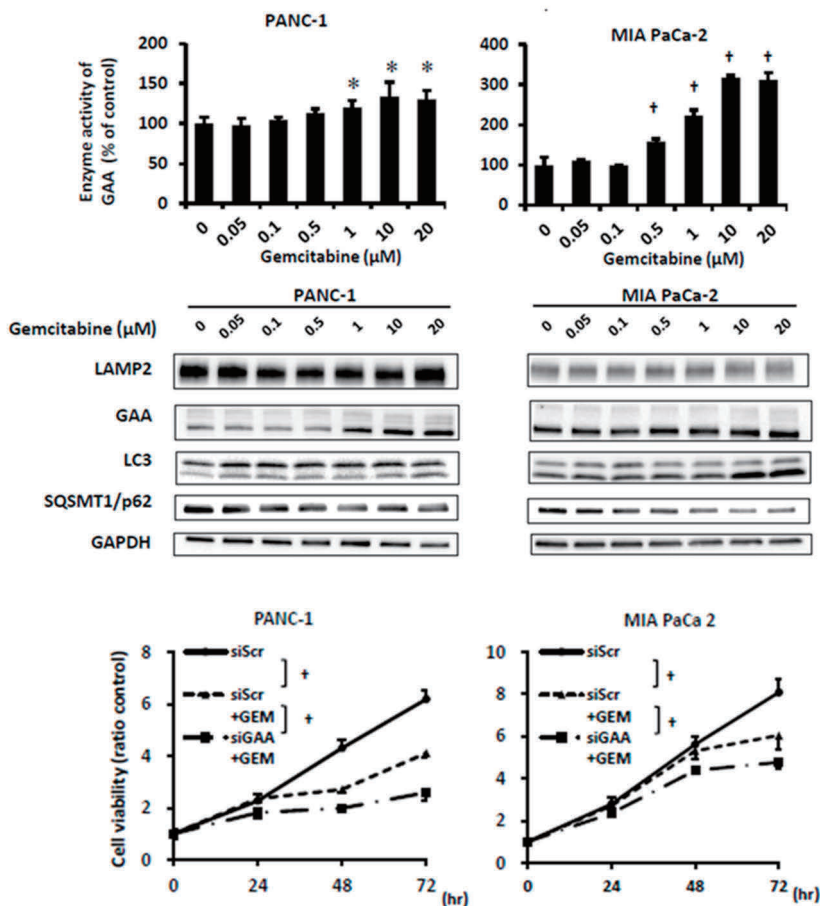


【目的】 膵癌は最も予後不良な克服すべき最重要疾患である。切除不能例に対し集学的治療を行っても種々の機序による抗癌剤耐性によりその効果は限定的である。本研究では膵癌の抗癌剤耐性の機序としてのオートファジーとその本体であるライソゾームに着目し、その役割を明らかにするとともに、膵癌微小環境における腸内細菌の分子メカニズムへの影響を明らかにすることを目的とする。

【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、電子顕微鏡およびミトコンドリア機能評価でミトコンドリアおよびライソゾーム酵素の発現を確認した。マイクロアレイ解析でオートファジー、ライソゾーム関連遺伝子の発現変化を解析し、GEM 投与により変化するターゲット遺伝子の選定を行った。また Western blotting にてオートファジー、ライソゾーム酵素の発現量を評価した。選定された酸性 α グルコシダーゼ (GAA) の発現を siRNA を用いて抑制し、GEM の抗腫瘍効果の変化およびアポトーシス関連シグナル誘導の評価を行った。

【結果】 GEM 投与により膵癌細胞のミトコンドリアの膨化およびライソゾーム酵素の発現上昇を認めた。マイクロアレイ解析ではオートファジーおよびライソゾーム酵素の発現上昇を認めた。GEM 投与により GAA 酵素活性は濃度依存的に上昇し、オートファジー/ライソゾーム経路の活性を認めた。GAA 遺伝子の抑制により GEM による抗腫瘍効果が増強された。ライソゾーム酵素発現抑制によりオートファジー機構を介した抗癌剤耐性が制御され、抗癌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と考えられた。

膵癌における抗癌剤耐性におけるオートファジー/ライソゾーム酵素の制御

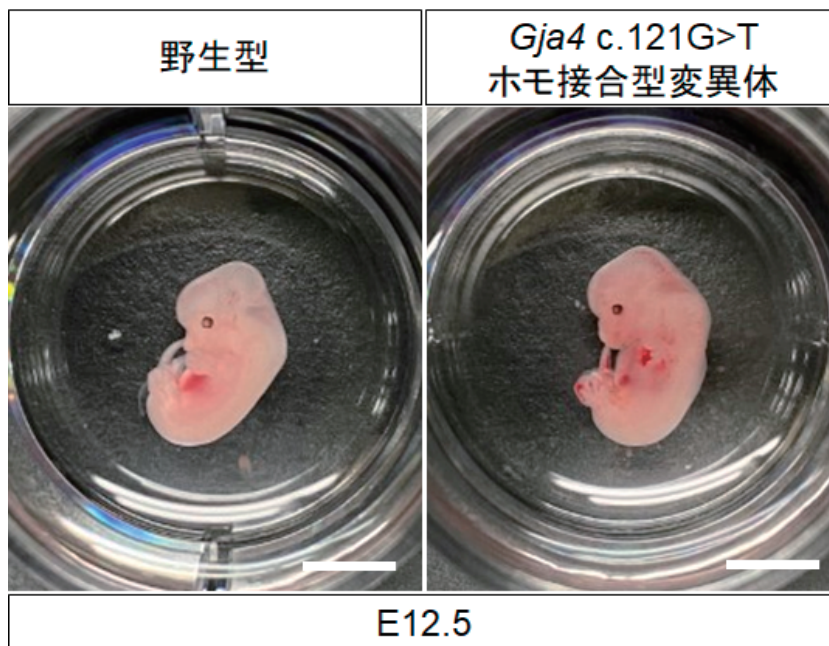


【目的】 血管奇形は異常血管の集簇を特徴とする疾患である。全身の各臓器の機能障害の原因となり、病態解明および新規治療開発が求められている。我々は先行研究において、ギャップ結合タンパク質の一種である GJA4 の変異 *GJA4*c.121G>T (p.Gly41Cys) が眼窩内海綿状血管奇形において高頻度 (25/26 例 [96.2%]) に認められることを同定した。本研究では、動物実験や血管内皮細胞株を用いた細胞実験を行うことでギャップ結合タンパク質機能異常により血管奇形形成に至るメカニズムを解明することを目的とした。

【方法】 動物実験として、マウス受精卵に対する CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集を行い、*Gja4*c.121G>T ノックインマウスを作製した。野生型、ヘテロ接合型変異体、ホモ接合型変異体について表現型を比較した。細胞実験として、レトロウイルスベクターにより野生型および変異型 *GJA4* を導入したヒト臍帯静脈内皮細胞株 (human umbilical vein endothelial cells : HUVEC) を作製し、血管奇形の病態への関与が報告されている内皮間葉転換 (Endothelial-to-Mesenchymal Transition : EndMT) 関連遺伝子発現を評価した。

【結果】 遺伝子変異ノックインマウスについて、ヘテロ接合型変異体同士の交配においてホモ接合型変異体の産子が認められず、胎生致死が疑われた。妊娠マウスの帝王切開を行い、胎児を評価したところ、E9.5 では明らかな表現型は認められなかったが、E12.5 には全身皮膚が赤色調になり、一部の皮膚に異常拡張血管を疑う所見が認められた。E14.5 の胎児は既に死亡していた。この結果から、マウスにおいて *Gja4* c.121G>T が有害であることが明らかになった。また、HUVEC を用いた実験については、変異型 *GJA4* 導入 HUVEC において、野生型やコントロールと比較し、血管内皮細胞マーカー *PECAM1* の発現が低下し、EndMT 誘導転写因子 (*KLF4*, *SNAI1*, *ZEB1*, *ZEB2*) の発現が上昇する傾向が認められ、*GJA4*c.121G>T が EndMT を誘導することで血管奇形の病態に寄与する可能性が示唆された。現在、より詳細な動物および細胞実験を行っており、これによりギャップ結合タンパク質異常により血管奇形形成にいたる詳細なメカニズムを明らかにすることを目指している。さらに、病態の詳細な理解が新規治療法開発にまでつながることが期待される。

*Gja4*c.121G>T ノックインマウス胎児の外観

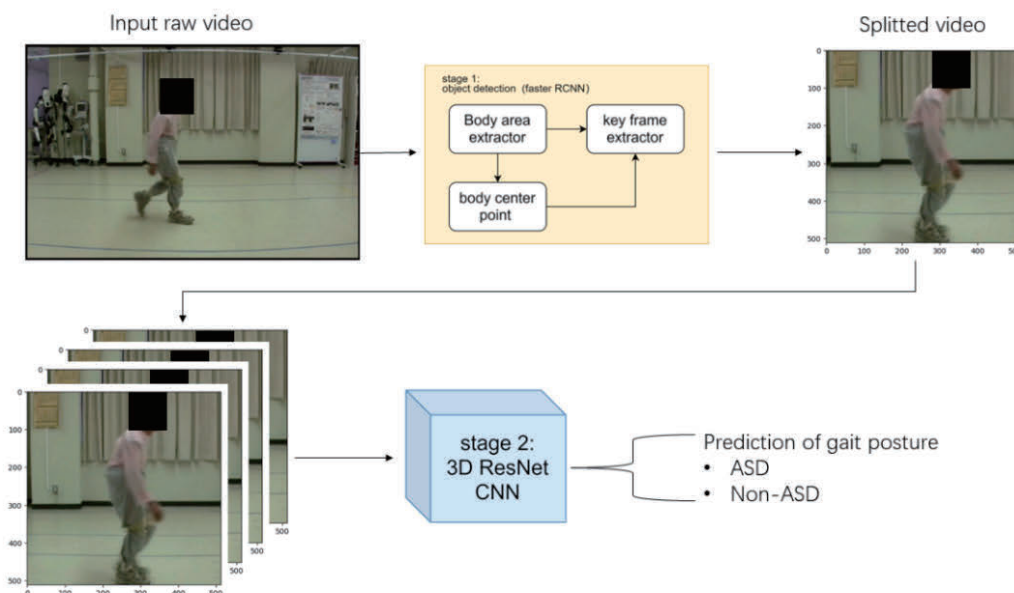


【目的】 過去の研究より慢性腰痛を有する成人脊柱変形患者の歩行動作を評価することは、臨床的に有用な情報が得られる。しかし、三次元動作解析は機器が高価であることから、一般的な検査とするのは困難であり、歩行動作評価をより一般的に行えるように、本研究では、深層学習を用いた歩行動作評価により慢性腰痛症の病態診断を試みることを目的とした。

【方法】 整形外科専門医が、成人脊柱変形 (ASD)、腰部脊柱管狭窄症 (LCS)、首下がり症候群 (DHS)、変形性股関節症 (HipOA) の4種類の疾患の診断のラベリングを行い、本研究では入院中に得られた患者の歩行動画より、短時間で入力動画から正確に疾患を分類できるシステムの構築を目指した。まずは、ASD と non-ASD の2つのクラスに分類するために、2段階の解析手法を用いた。第1段階では、物体検出と姿勢推定法を用いて、患者の位置を特定し、患者がいる領域を抽出した。患者の歩行姿勢の動きは、ビデオフレーム全体の小さな領域を占めるため、また、患者の中には、転倒防止のために医師の付き添い歩きの必要があり、分類精度の悪化に繋がり得るため、これらの手法を行った。この手法では、患者のおおよその位置を特定し、患者の体幹に関する重要な特徴を含むフレームを確保可能であった。続いて、第2段階では、3次元 CNN ネットワークを用いて、抽出したフレームから空間的・時間的情報 (動的運動) を取得し、患者の歩行姿勢から ASD と non-ASD を識別した。

【結果】 我々が収集した 81 症例のビデオデータセットについて、CNN が RGB 動画において ASD と non-ASD を区別できるかを検証した結果、1 秒 8 フレームの動画から整形外科専門医のラベリングと比べて 75.53% の診断精度という比較的信頼できる結果を示した。

システム構成図

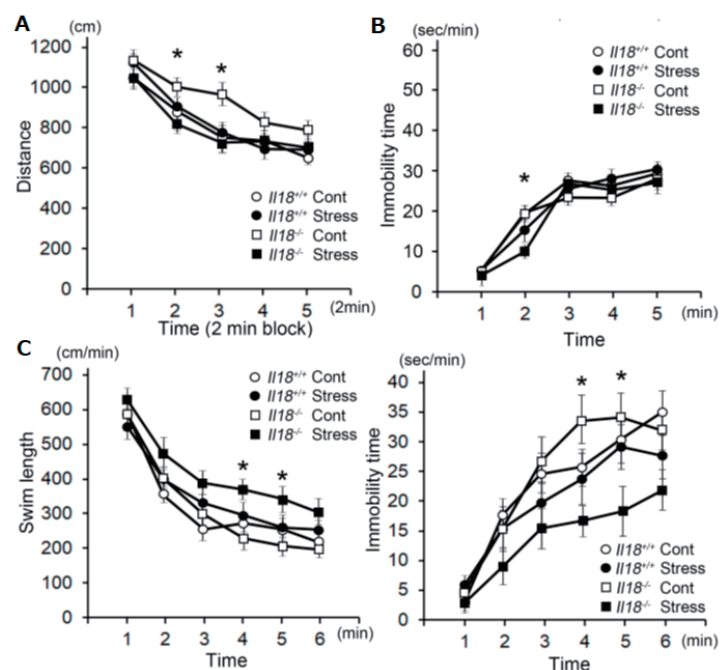


【目的】 免疫と精神疾患の関わりについては、以前より指摘されている。例えば、うつ病患者では血中の IL6 や Tnf α の上昇がメタ解析からも明らかとなっている。しかし、免疫と精神疾患の直接的な関わり、その機序については依然として明らかとなっていない。近年、末梢炎症が何らかの経路を経て、中枢へ炎症が波及されることが指摘されている。例えば、うつ病患者において、環境素因であるストレスが引き金となり、末梢炎症が惹起され、それが中枢神経に波及しうつ病が発症する可能性である。血液脳関門の一時的な破綻、血液脳関門を透過する物質による伝達など様々な仮説が提唱されているが、機序については不明である。我々は炎症性サイトカインであるインターロイキン 18 (IL18) の欠損下では海馬機能不全となり、うつ病様行動変化を呈することを発見した。また前頭前野において中枢神経細胞に IL18 が発現していることが明らかになっている。しかしながら、IL18 を含めたインフラマソームと末梢炎症が脳内炎症、精神疾患を発症する機序については明らかとなっていない。そこで本研究は、炎症の初期に反応するインフラマソームに着目し、インフラマソームを構成する IL18 に着目し、末梢炎症、及びストレス起因性による脳内炎症へ波及する機序の解明を目的とした。

【方法】 野生型、および IL18 欠損マウスの雄を使用し、以下の処置を行った。インフラマソームのストレスへの影響を見るために、これらのマウスに 6 時間の急性ストレス処置 (拘束処置) を付与し、18 時間後に行動学的変化、海馬におけるサイトカイン発現差、ミクログリア、アストロサイトの細胞数や形態などを観察した。さらにストレス負荷によるコルチコステロンの変化や海馬におけるグルココルチコイド受容体変化を観察した。

【結果】 IL18 欠損マウスにおいて急性ストレス後、強制水泳試験、尾懸垂試験において、活動量の増加がみられ、不安様行動変化が観察された。IL18 欠損マウスにストレスを負荷した群では海馬において *IL1 β* 、*IL6*、*Tnfa* の発現の上昇が観察され、さらにミクログリアの増加、活性型への形態変化、アストロサイトの増加も観察された。これらの変化は野生型マウスでは観察されなかった。急性ストレス負荷にて、血清コルチコステロンの上昇を認めたが、IL18 欠損マウスは野生型に比べさらなる上昇を認めた。さらに IL18 欠損マウスでは、グルココルチコイド受容体のリン酸化が有意に上昇していた。

IL18 欠損マウスは、ストレス負荷で不安様行動変化が観察された。



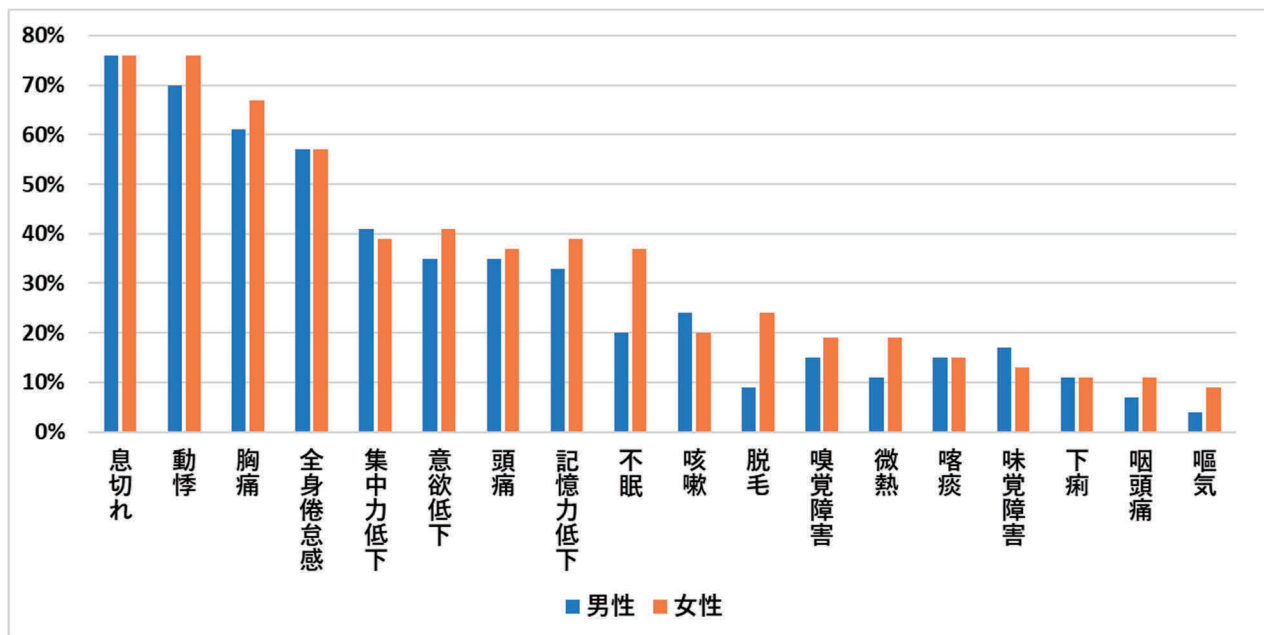
178 AIを活用したCOVID-19関連心臓後遺症の包括的画像評価	相川 忠夫
------------------------------------	-------

【目的】 新型コロナウイルス感染症（COVID-19）が軽快した後も持続する息切れや全身倦怠感などのいわゆる後遺症（コロナ後遺症）に悩む患者が増加しているが、その包括的診断評価法は確立されていない。CT に造影剤を用いると肺炎や冠動脈疾患のほか心筋障害など、全身を一度に評価できる利点がある。本研究は、心臓関連のコロナ後遺症が疑われる患者を対象に、CT を用いた心筋障害評価法の有用性について検証することを目的とした。

【方法】 鼻咽頭スワブもしくは唾液検体による COVID-19 PCR 検査で陽性と診断され、自宅や病院での療養終了後も持続する胸痛、息切れ、動悸など何らかの胸部症状があつて病院を受診し、冠動脈 CT を含む全身の造影 CT が予定された 18 歳以上の患者を前向きに登録した。全ての研究参加者は、研究登録時に冠動脈 CT と全身 CT の撮像に追加して、造影剤投与 6 分間後に心電図同期下で心臓遅延造影像を撮像した。CT 画像の視覚的評価は米国心臓協会（AHA）左室 17 セグメント毎に行い、いずれかのセグメントで遅延造影の壁深達度 26% 以上を有する場合に Substantial MDE 群（心筋障害あり）とし、遅延造影なしもしくは遅延造影の壁深達度 25% 以下であれば No or slight MDE 群とした。

【結果】 108 名の研究参加者のうち、実際に CT を撮像した 100 名を解析対象とした。研究参加者の年齢の平均 42±14 歳（範囲 18～80 歳）で、54 名（54%）が女性であった。COVID-19 のために入院療養を必要としたのは 41 名（41%）で、そのうち 15 名（15%）が酸素投与を受け、1 名（1%）が COVID-19 感染に伴う人工呼吸器管理を受けていた。外来受診時の症状で最も多いのが息切れ（76%）で、次に動悸（73%）、胸痛（64%）、全身倦怠感（57%）であった。心機能について、4 名（4%）が心エコーで左室駆出率 55% 未満に低下していた。後遺症外来受診時における自覚症状に有意な男女差はみられなかった（図 1）。COVID-19 の陽性判定を受けた日から CT 撮像日までの間隔は、中央値で 87 日（四分位範囲 51～177 日）であった。100 名のうちで現時点までに 89 名の CT 評価が終了しているが、全例で遅延造影の有無を評価可能であり、38 名（43%）が Substantial MDE 群に分類された。AHA 左室 17 セグメントのうち、遅延造影陽性像は心基部～心中部の下壁～下側壁で多く認められた。Substantial MDE 群では No or slight MDE 群と比較して、年齢・性別や既往歴、外来受診時の胸部症状の頻度に有意差はなかった。

後遺症外来受診時における自覚症状の男女差

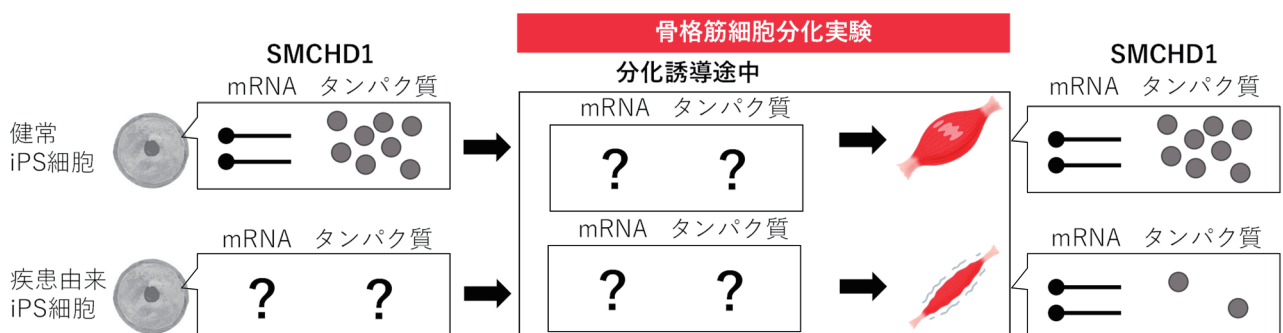


【目的】 遺伝子の発現は、ゲノムから mRNA が転写され、転写された mRNA からタンパク質が翻訳される。一方で、その量的な関係 (mRNA の量とタンパク質の量) は必ずしも相関しないことが知られている。これまでに、ヒト人工多能性幹細胞 (iPSC) と分化した三胚葉の細胞群の比較を行い、mRNA 量とタンパク量が独立して制御される遺伝子群が特に多能性幹細胞特異的に存在することを明らかにした。これら遺伝子群の中に、特に希少疾患に関わる遺伝子群が濃縮されていた。そのうちの 하나가 2 型顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー (FSHD) の原因遺伝子として知られている SMCHD1 遺伝子である。FSHD は遺伝性の進行性筋ジストロフィーであり、骨格筋細胞を減少させる効果を持つ DUX4 遺伝子の異常発現が原因と考えられ、その異常発現の原因遺伝子として SMCHD1 が知られている。SMCHD1 はエピジェネティックなクロマチン制御因子であり、健常細胞では DUX4 の上流塩基配列を高度にメチル化する役割を担っているが、FSHD の疾患細胞では SMCHD1 遺伝子の量低下による DNA 低メチル化を伴うクロマチン構造の変化により、DUX4 遺伝子が発現してしまう。近年、FSHD 患者由来の疾患 iPS 細胞が樹立され、疾患 iPS 細胞から分化させた骨格筋細胞は特に酸化ストレスに弱くなることで DUX4 が増加し、骨格筋に悪影響を与えているということが示唆された。疾患 iPS 細胞での骨格筋分化後には SMCHD1 遺伝子自体の量も減少していたことから、SMCHD1 遺伝子の量的な制御は疾患発症に重要であるが、その量制御機構の詳細は明らかになっていない。本研究では、SMCHD1 遺伝子に着目し、多能性幹細胞特異的にタンパク量が制御されている機構および疾患発症における量制御機構の役割解明を目指す。

【方法】 すでに樹立された FSHD 疾患 iPS 細胞と、疾患 iPS 細胞から遺伝子変異箇所を修復した Isogenic 細胞を用いて骨格筋を分化誘導し、iPS 細胞状態から分化誘導後 10 日まで 7 点で細胞を回収した。細胞は RNA 解析用とタンパク質解析用の二種類に分け、RNA 解析用試料は RNA-seq による遺伝子発現解析を行い、タンパク質解析用試料は WES (Simple Western 社製の自動ウェスタンブロットング機器) および質量分析法によるプロテオーム解析を行った。

【結果】 骨格筋分化誘導過程の細胞を用いて質量分析法によるプロテオーム解析を行ったところ、すべての細胞試料から約 1 万タンパク質が同定・定量された。SMCHD1 タンパク質も同定・定量されており、iPS 細胞の状態からすでに Isogenic 細胞と比較して疾患由来細胞では SMCHD1 タンパク量は約半量であることが分かった。骨格筋細胞の分化誘導途中で SMCHD1 と同様の挙動を示す遺伝子群をクラスター解析により抽出した結果、158 種類の遺伝子群が抽出された。量的変動が一致している遺伝子群は細胞内で相互作用していると考えられ、今後はこれらの細胞内機能の解明を目指す。

本研究で明らかにする、SMCHD1 遺伝子のタンパク量制御機構解明の概略図



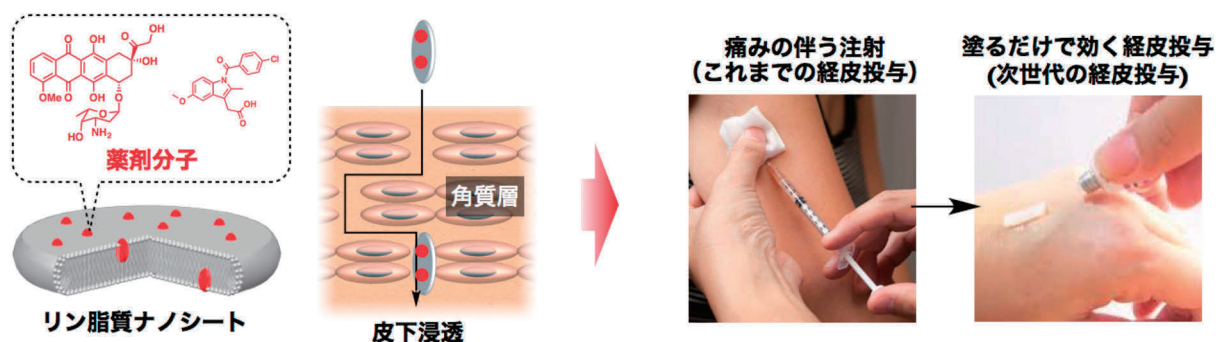
<p>180 リン脂質ナノシートを利用した塗るだけの経皮製剤</p>	<p>内田 紀之</p>
---------------------------------------	--------------

【目的】 経皮薬物送達システムは皮膚組織に薬剤を浸透させることで体内に薬剤を送達する手法であり、簡便な投与方法であることから、従来の経口投与や血中投与の代替法として有望視されている投与方法である。これまで我々は従来の球状とは異なり、ナノシート、状を持つリン脂質集合体に着目し、その材料設計および応用を進めてきた。その中で、最近市販のアニオン性リン脂質がナノシート状の集合体を形成し、それが高い皮下浸透性を示すことを偶然発見した。本研究課題においてはリン脂質ナノシートの設計指針の確立、及び応用を目的とする。

【方法】 リン脂質ナノシートに薬剤分子を混合し、超音波処理を行うことで、リン脂質ナノシート内への分子の封入を試みた。また、それを経皮投与することで、材料の皮下浸透性を評価した。

【結果】 リン脂質ナノシートにレスベラトロールやピセイド、タキソールをモデル分子として上記の封入法を試みたところ、効果的にリン脂質内部に封入されることが明らかになった。また、それをラットの経皮に投与したところ、効果的な皮下浸透効果を示すことが明らかにされた。

リン脂質ナノシートを利用した経皮製剤の設計

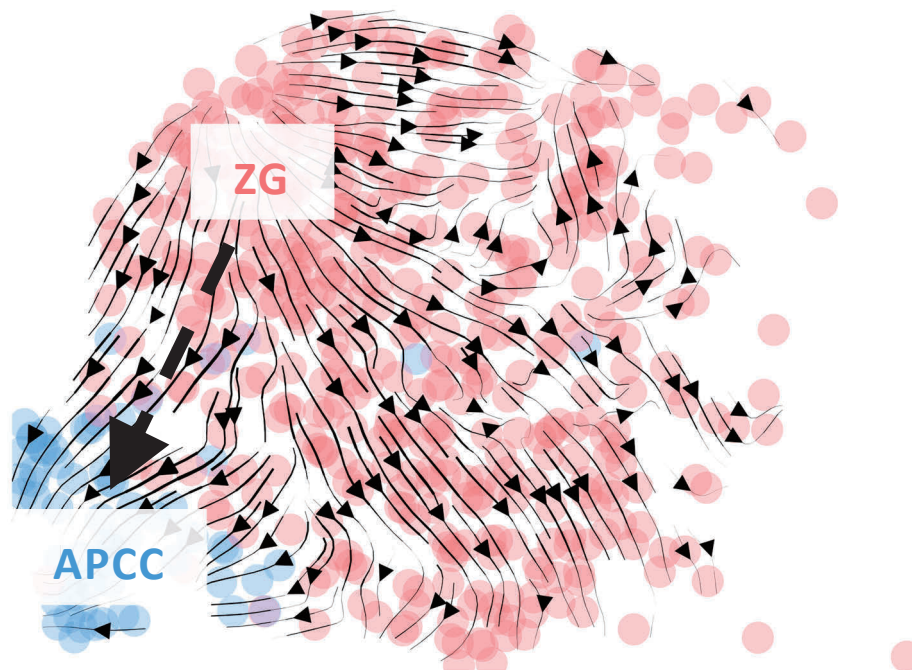


【目的】 副腎皮質は、球状層 (ZG)、束状層 (ZF)、および網状層から構成される。アルドステロン生合成酵素 (CYP11B2) の発現が高いアルドステロン産生細胞クラスター (APCC) は、成人の副腎で一般的に見られ、アルドステロン産生腺腫 (APA) でも検出される体細胞変異を有している。原発性アルドステロン症は、主に APA や特発性高アルドステロン症 (IHA) によって引き起こされる。我々は、APCC が IHA を引き起こし、APA の前駆体であると推定しているが、APCC の遺伝子発現特性や特にその発生については明らかでない。本研究では、APCC のトランスクリプトームを単一細胞レベルで解析し、発生の軌跡を推察することで、APA の腫瘍化機構を明らかにすることを目的とした。

【方法】 2名の成人から副腎サンプルを取得し、シングルセル RNA シーケンシング (scRNA-seq) を実施した。

【結果】 2,928 個の副腎細胞の scRNA-seq データを取得し、教師なしクラスタリングとマーカー遺伝子の発現に基づいて 1,765 個の副腎皮質細胞を同定した。副腎皮質細胞は 6 つのクラスターに分類され、そのうち 3 つのクラスター (923 細胞) は APCC/ZG 細胞で構成されていた。さらにサブクラスタリングにより、APCC/ZG 細胞は 3 つのクラスター (クラスター C1、C2、C3) に分類され、最終的に APCC クラスター (C3) と ZG クラスター (C1) が確認された。クラスター C2 は、ZG から ZF への遷移細胞と考えられた。RNA 速度解析により、ZG クラスター C1 から APCC クラスター C3 への発生方向が推定された。さらに、scRNA-seq により、多くの CYP11B2 陽性細胞が、コルチゾールの生産には必須だがアルドステロン産生には必須でない CYP11B1 および CYP17A1 陽性であることが明らかとなり、ZG が可塑性を有することが示唆された。本結果は APCC の遺伝子発現特性を 1 細胞単位で明らかにし、一部の ZG 細胞が APCC へと変化することが示された。

RNA velocity 解析

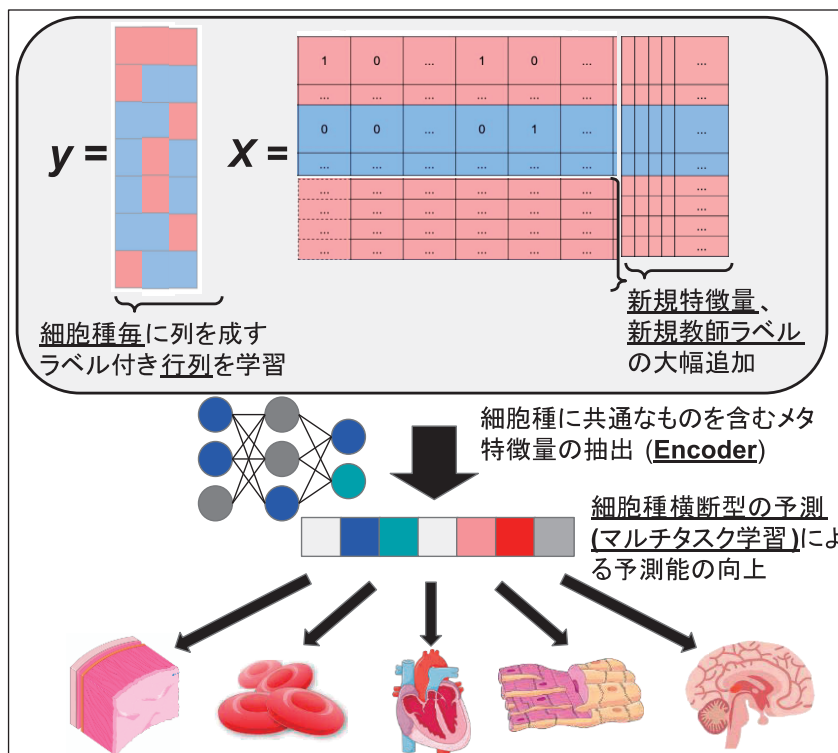


【目的】 本研究では、従来手法では解釈が難しいヒトゲノムの非コード領域に存在する変異を、近傍遺伝子の細胞種特異的発現制御という文脈で包括的に理解し、その応用として人種間での遺伝子発現機構の違いや形質への影響を解き明かすことを目的とする。

【方法】 ヒト 49 組織において遺伝子発現情報 (RNA-seq) とゲノム情報 (Whole Genome Sequence) を網羅的にカタログした公開データベースである GTEx に対して fine-mapping を適用した研究者の先行研究 (Wang, Q.S. et al, Nat Commun 2021) の結果を利用し、fine-map された遺伝子発現制御変異 (eQTL) を教師データとして用いた。また、特徴量として、Transformer を利用しゲノム変異が周辺エピゲノムに与える影響を予測したスコア (Enformer) 等を用いた。学習器として、複数のタスク (例、人画像の性別を予測するタスクと、年齢を予測するタスク) を同時に処理することでその共通点を学び学習精度を上げるマルチタスク深層学習を用いることで、サンプル数の少ない組織や細胞種においても類似の組織から情報を学習することで高い予測精度を得ることを目指した。また、欧米での eQTL データを用い構築したスコア体系を日本人 eQTL データに適用することで、遺伝子発現制御予測スコアの適用範囲に関して評価した。

【結果】 以下の工夫により、従来研究と比較し制御変異の予測精度の向上が達成されることが明らかになった。
 1. マルチタスク深層学習の利用：特にサンプル数の少ない脳や腎臓組織における精度向上に寄与した。
 2. より多くの訓練データを連続的に扱える方向へのロス関数の改良：従来の二値的な分類に加え、ラベリングの誤差を考慮した連続的なロス関数の定義により、精度の向上が達成された。
 3. 新規特徴量 (Enformer)：主成分分析と組み合わせることで、計算コストを抑えつつ精度の向上が可能となった。同時に、新規に構築した予測器を評価可能とする、日本人集団における fine-mapped eQTL データベースを構築した (Wang, Q.S. et al, Nat Commun 2022)。該当日本人 eQTL データを利用し、予測器の予測能を評価することで、集団の遺伝的背景を超えて、機能ゲノムスペースで高い予測能を達成可能であることが示された。

本研究の概念図

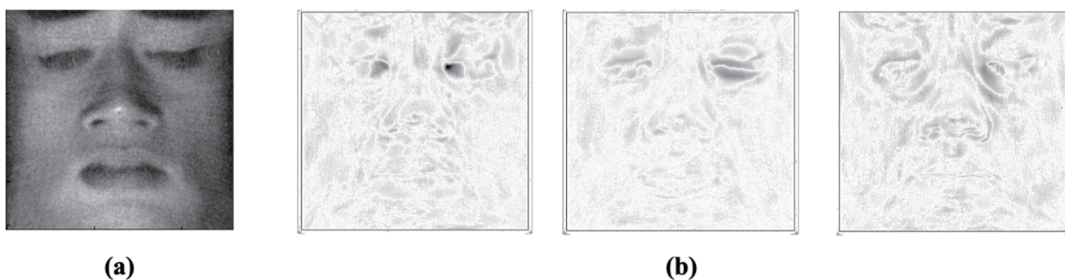


【目的】 日常的な血圧モニタリングは高血圧症の早期発見や予防において重要である。既存の血圧計測方法では、専用の機器に付随する計測用カフを装着する必要がある、計測にある程度の時間を要することが問題点であった。著者らは、遠隔バイタルサイン計測技術にて多用されている顔面脈波が得られる顔面可視画像、顔面血流により変動しうる顔面皮膚温の空間情報である顔面熱画像、近赤外帯域で計測した顔面近赤外画像の空間特徴量に基づく遠隔血圧推定に着想した。特に可視帯域と赤外帯域の中間に属する近赤外波長帯域は「生体の窓」と呼ばれるように、生体透過性の高い波長帯域であることが知られている。その帯域では、光の波長により生体に対する深達度が増加し、近赤外帯域にて撮影した顔面近赤外画像の利用により、皮膚の色相の空間的情報を立体的に捉えることが可能となる。光の波長により生体に対する深達度が増加することを考慮すると、遠隔血圧センシングに適した波長帯域が存在し、その波長帯域を特定することができれば血圧推定精度の向上が期待できる。本研究では、可視・近赤外帯域における多波長分光計測にて得た顔画像（多波長分光顔画像）の空間特徴量に基づく遠隔血圧センシングに適した波長帯域の特定を目的とする。具体的には、(1) 顔面可視画像に基づく高血圧検出、(2) 顔面近赤外画像に基づく安静時血圧推定、(3) 顔面熱画像に基づく安静時血圧推定の3研究を実施した。

【方法】 (1) では、意図的に血圧を変動させた状態で顔面可視画像と参照血圧値を計測する実験を実施した。計測した顔面可視画像における皮膚色相差分を計算することで顔面可視画像の空間相対的特徴を求め、その情報に対し非線形モデルを適用することで高血圧検出モデルを構築した。(2) では、760~1,100 nm および1,050~1,650 nm の波長帯域で計測した顔面近赤外画像に対しブラインド信号源分離アルゴリズムの1つである独立成分分析と線形回帰モデルを適用することで、顔面近赤外画像の空間特徴量に基づく安静時血圧推定を行った。(3) では、数週間にわたり被験者の顔面熱画像および安静時の平均血圧値を計測し、顔面熱画像から安静時血圧を推定するモデルを構築した。

【結果】 (1) では、顔面可視画像の空間相対的特徴を利用することで高血圧状態をおよそ70%の精度で検出することができた。さらに、主要血管が走行する鼻側部において高血圧に関連する空間相対的特徴が表出した。(2) では、波長が760~1100 nm における顔面近赤外画像から得られた安静時血圧に関連した空間特徴量に基づく安静時血圧推定精度が高かった。(3) では、8~10 mmHg の誤差で安静時血圧を推定することはできたが、推定値がほぼ一定になるなどの問題もあった。

標準顔面近赤外画像 (a) と安静時血圧に関連した空間特徴量 (b)



【目的】本研究の目的は、子宮体がんの脈管侵襲予測モデルの作成および検証を行い、対応する組織の組織染色画像より得られる血管内皮細胞およびがん上皮細胞の形態から Radiomics 特徴量として表現される予測因子と組織学情報との関連を評価することで、脈管侵襲予測に寄与するがん微小環境構造内の特徴を解明することである。

【方法】子宮体がんの脈管侵襲予測モデル構築は、2014年から2020年に広島大学病院にて子宮体がん摘出手術を受けた153症例を対象として行った。さらに、2021年から2022年に広島大学病院にて子宮体がん摘出手術を受けた32症例を対象として予測モデルの検証(テスト)を行った。モデル検証を行った患者のうち、組織染色画像では腫瘍が抽出でき、さらに染色に成功した13症例で組織学的血管解析および視覚評価を行った。Radiomics解析よりT1、T2それぞれで8,175個の特徴量を抽出し、次元削減後にSupport vector machine法を用いて脈管侵襲あり、なしを分類するモデルを構築した。組織免疫染色画像による腫瘍内血管特徴の定量的および視覚評価では、血管構造の組織形態を特異的および三次元的に抽出するために組織免疫染色を用いた。CUBIC(東京化成工業株式会社)を用いてがん組織の透明化を行い、血管内皮細胞とがん上皮細胞を免疫染色した。作製したサンプルは、共焦点レーザー顕微鏡(カールツァイス・LSM700)を使用し組織免疫染色画像撮影を行なった。視覚評価項目では、連続性や血管径、分岐点間の長さ、血管描出の鮮鋭度、画像全体に対する血管の分布を比較評価した。定量評価では、総分岐点数/血管面積、総血管長/血管面積、総終結点数/血管面積を評価した。

【結果】Radiomics解析及び機械学習における脈管侵襲予測モデルの結果を表に示す。検証結果は、SMOTEなしの場合で精度、感度、特異度はそれぞれ83.3%、51.8%、99.3%であり、平均AUCは91.6%であった。SMOTEありの場合は精度、感度、特異度はそれぞれ86.1%、83.2%、89.0%であり、平均AUCは92.1%であった。SMOTEなしの場合、感度と特異度で大きな差が生じていたが、SMOTEを使用することで感度と特異度の偏りは大きく改善し、さらに精度も改善した。脈管侵襲有りとなしとの組織免疫染色画像で描出が良好なものに対して比較評価を行った。視覚評価では、脈管侵襲が有りの腫瘍内血管は脈管侵襲無しと比較して、血管描出が不鮮鋭であり、血管の分布が不均一な傾向を示した。脈管侵襲有りの血管特徴は、有意差は無いものの脈管侵襲無しと比較して血管面積あたりの分岐点数、終結点および血管長の値が大きくなった。この結果は、細く短い血管が高密度で細かく分岐し、不均一な分布で存在する傾向を示し、視覚評価の結果と一致した。以上の結果は、過去の文献にて示された腫瘍内血管新生の形態特徴と一致した傾向が見られた。子宮体癌脈管侵襲予測モデルでは、SMOTEを用いることにより予測精度はテストデータセットにおいて予測精度、AUCはそれぞれ86.1%、0.92となり、Sangらの研究で構築した予測モデルを10%程度改善した。組織免疫染色画像評価より、脈管侵襲症例での均質性の向上は、腫瘍内血管新生の活発化により領域内血管が増加するものによることが示唆された。本研究では、SMOTEの使用により子宮体がんにおける脈管侵襲予測モデルの予測精度および感度を改善し、予測モデルの有用性が示唆された。さらに、免疫染色により得られた腫瘍内血管の傾向から、予測因子が示す均質性の指標が腫瘍内血管の特徴に起因することが示唆された。

脈管侵襲予測モデルテストデータの結果

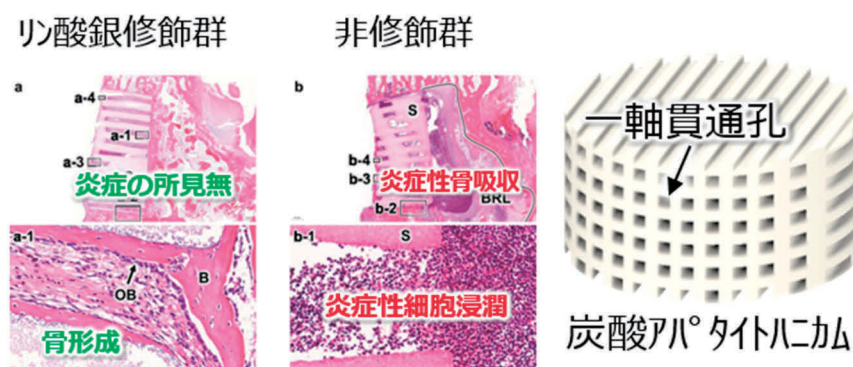
	SMOTEなし	SMOTEあり
精度	83.3%	86.1%
感度	51.8%	83.2%
特異度	99.3%	89.0%
AUC	0.92	0.92

【目的】化膿性骨髄炎は骨組織内部に細菌が侵入することで惹起される感染症であり、造血機能の損失と周辺骨組織の破壊を伴う深刻な炎症反応を示す。現在の骨髄炎治療では、抗生物質投与による保存治療が積極的に行われているが、重篤化すると外科手術が必要となる。この場合、感染部位の搔爬、洗浄、死腔管理が必要となり、死腔管理では骨の除去量に応じてリン酸カルシウムを主成分とする骨補填材が使用されている。しかしながら、骨補填材を構成するリン酸カルシウムは、感染に対して抵抗性を示さないため、骨形成の足場となると同時に細菌のバイオフィーム形成の足場としても機能してしまう。このため、骨髄炎治療で用いられる骨補填材においては、感染に対して抵抗性を示す材料が、骨組織再生と骨髄特有の微小環境形成とを同時達成することが理想的である。本研究では、優れた骨再生能を示す炭酸アパタイトハニカムに着目し、その表面をリン酸銀修飾することで骨髄炎治療への応用可能性を検討した。

【方法】押出成形によって炭酸カルシウムおよび有機バインダーからなるハニカムグリーンボディを作製し、加熱・リン酸化によって炭酸アパタイトハニカムを作製した。炭酸アパタイトハニカムを硝酸銀溶液に浸漬し、表面をリン酸銀修飾した。作製した材料は、材料学的手法によって構造・組成を詳細に分析した。さらに、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌を用いた *in vitro* 抗菌性評価、MC3T3-E1 細胞を用いた *in vitro* 骨形成評価を行った。またメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の菌液に浸漬した試料をウサギ大腿骨内側上顆に2週間埋植し、病理学的解析によってリン酸銀修飾炭酸アパタイトハニカムの骨組織再生能と感染予防能を検討した。

【結果】炭酸アパタイトハニカムを硝酸銀溶液に浸漬すると、その表面にリン酸銀を修飾することができた。さらに至適量のリン酸銀修飾は、材料の機械的性質に悪影響を及ぼさなかった。非修飾群ではメチシリン耐性黄色ブドウ球菌が検出された一方で、リン酸銀修飾群ではメチシリン耐性黄色ブドウ球菌が検出されず、優れた抗菌効果を示した。さらにリン酸銀修飾群は MC3T3-E1 細胞に細胞毒性を示すことなく、非修飾群と同等の増殖・酵素活性・石灰化挙動を示すことが明らかとなった。*in vivo* 試験の結果より、非修飾群では、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌による感染によって、試料埋植部位近傍に炎症性細胞浸潤、炎症性骨吸収および腐骨が確認された。一方、リン酸銀修飾群では炎症の所見は見受けられず、ハニカム構造の一軸貫通孔内部で骨形成が確認された。以上の結果より、リン酸銀修飾炭酸アパタイトハニカムは骨組織再生と感染予防とを同時に達成した。

炭酸アパタイトハニカムへのリン酸銀修飾により感染予防・骨組織再生を同時達成

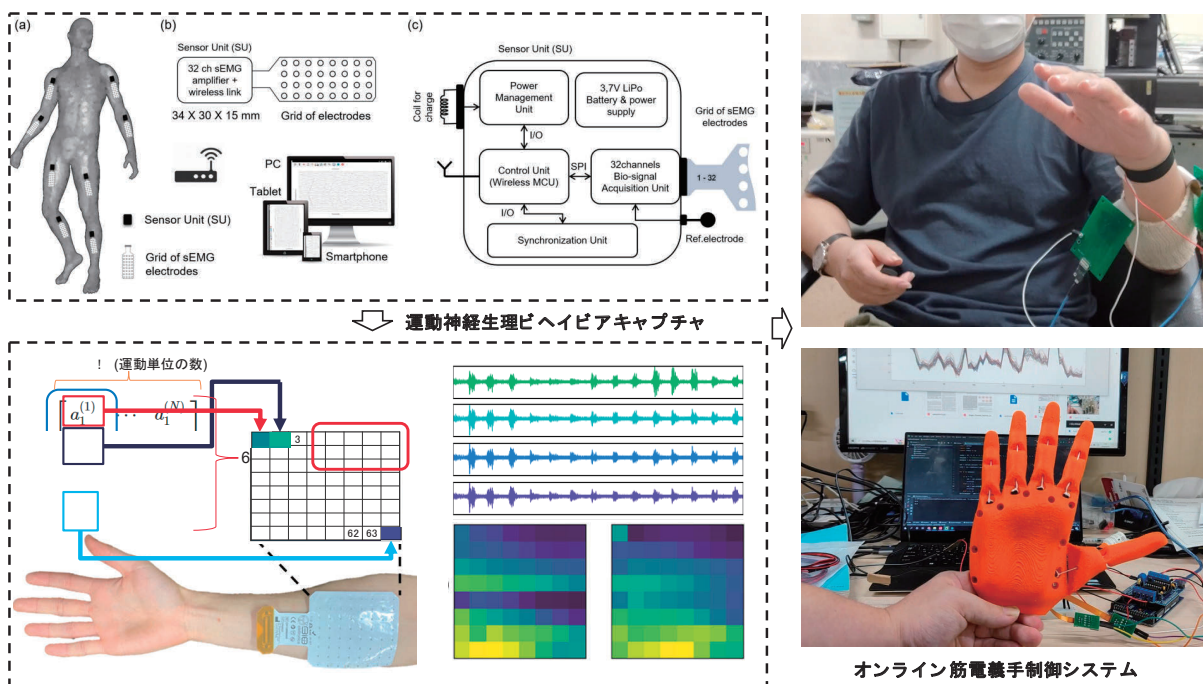


【目的】 ヒトの身体運動の科学的基盤としてニューロメカニクスを解明する為、着ているだけで体の運動、筋活動及び神経活動の情報を融合し、低侵襲、低価格、高精度、汎用性が高い運動神経生理ビヘイビアキャプチャシステムを開発することである。筆者がこれまでに開発したヒト計測技術を発展、統合させ、上記システムを完成させる。また、上肢身体欠損患者むけに現在使用されている義手は簡易な制御手法によりロバスト性を保障しており、複雑な動作ができない。従来手法では筋電 (EMG) データに対して数値的な前処理を行い、高度な機械学習などを利用するもので、学習のためのコスト・ロバスト性・汎用性において限界がある。開発した運動神経生理ビヘイビアキャプチャを利用し、筋電義手の高自由度化及び高機能化に貢献するものとする。

【方法】 まず、下図に示した慣性センサと深度カメラのセンサフュージョン技術に基づき、低価格・高精度・広範囲なモーションキャプチャシステムを構築した。また、人の筋活動と神経活動を測定する為、高密度筋電電極を用いてジュラーアーキテクチャを備えた筋電測定するセンサユニットを開発した。各センサユニットは、ボディセンサーネットワークのノードとして、さまざまな筋肉からの同期信を号取得することが出来た。また、高密度筋電信号を計測し、機械学習を通じて対応する筋肉の神経スパイクトレインと運動単位活動を取得することが実現した。上肢身体欠損患者のため、センサ融合による運動神経生理ビヘイビアキャプチャを利用し、前腕筋群の運動神経情報抽出に基づく指の独立動作可能な筋電義手制御手法を開発した。

【結果】 本研究はヒトの身体運動の制御メカニズムを解明する為、ニューロメカニクスに必要な共通の計測基盤技術を開発した。また、上肢身体欠損患者のため、開発したキャプチャを利用する上で、手指の独立及び協調の屈曲動作について神経活動情報の抽出を行い、その妥当性を検証した。解析によってそれぞれに共通の運動単位がみられたことから、独立運動の運動単位の活動を複数組み合わせることで、協調運動の筋活動を表現することが示された。また、混合行列から得られた活性化の様子は解剖学的な事実を反映しており、複雑な手指の筋の構造の理解に貢献する可能性が示唆された。また、オンライン筋電義手制御システムによってリアルタイムでも高精度な動作分類が可能であることを示した。

開発した運動神経生理ビヘイビアキャプチャシステム

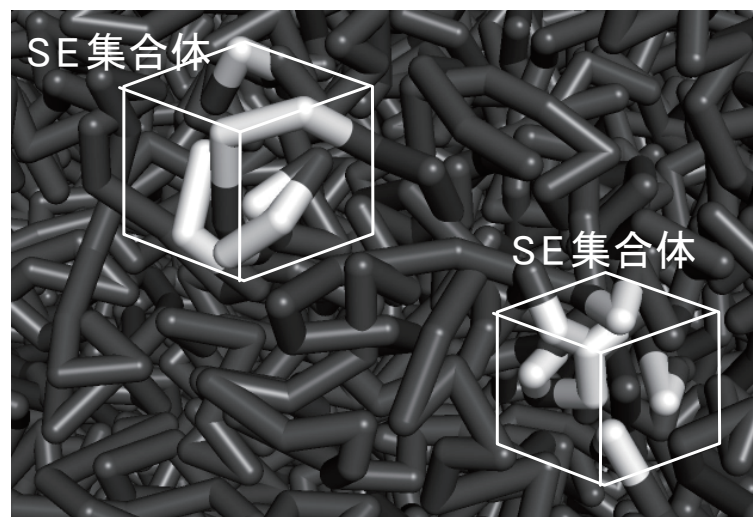


【目的】近年、遺伝子発現制御において、クロマチンの空間的な制御が重要であることが次々と明らかになった。スーパーエンハンサーを含む「転写ファクトリー」は相分離し、核内ボディとして複数の集合体として核内に点在することが示された。しかし、それぞれの核内集合体にどのゲノム領域が集合しているのか、いかなる制御があるのか、については網羅的に調べる手法がなく、理解が進んでいなかった。そこで本研究は一細胞 Hi-C によって得られるコンタクト情報からゲノムの三次元空間マップを作成する独自の手法を用いて、そしてこれにエピゲノム情報を重ねることでスーパーエンハンサーをはじめとする個々の核内集合体の特徴の分類が可能であることを示す解析基盤の構築を目指した。

【方法】本研究では公共データベースで登録されている GM12878 細胞 (Lymphoblastoid cell line : ヒトリンパ芽球様細胞株) の一細胞 Hi-C のコンタクトデータを三次元染色体構造の再構築に用いた。再構築した三次元染色体構造に対して ENCODE プロジェクトで収集された GM12878 細胞の各種ヒストン修飾 (H3K27m3、H3K4me3、H3K36me3、H3K27ac、H3K9me3) の情報から分類した特徴情報を照らし合わせることでスーパーエンハンサーをはじめとする個々の核内集合体の実現性の実証を目指した。

【結果】GM12878 細胞の一細胞 Hi-C (No.06) のコンタクト情報から再構築した染色体構造は球体の形状を示し、三次元構造の構築を行うことができた。また、GM12878 細胞の各種ヒストン修飾を分類することによって、それぞれ転写活性化領域やヘテロクロマチンなどの詳細の分類ができた。この分類を再構築した三次元染色体構造に対して対応づけると、それぞれのクラスターは比較的集合している傾向にあり、またそれぞれのクラスターごとに密に集合している様な領域も見られた。これにより、三次元構築した染色体構造に対して、エピゲノム情報を対応づけることで、空間的な分類ができる可能性は見出した。今後、GM12878 細胞を含め、他のがん細胞種でも一細胞 Hi-C を実施し、自身で取得したデータを用いて、がん特異的な SE 集合体の探索を決定し、モチーフ解析を行うことで上流因子を同定していく予定である。

スーパーエンハンサー (SE) 集合体や核内集合体の決定手法の開発

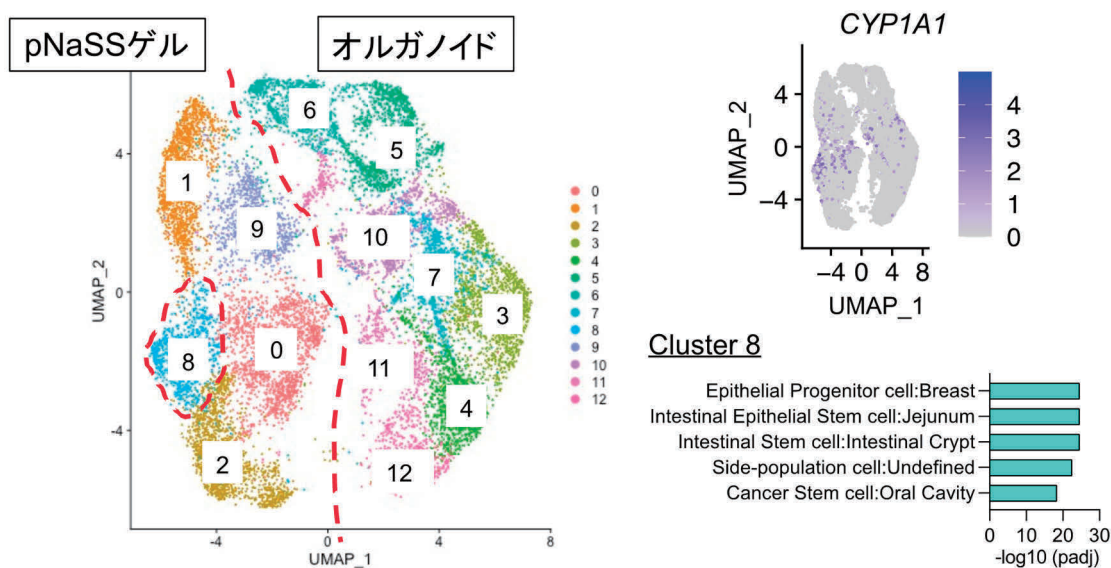


【目的】 乳がんは内分泌療法や分子標的治療等の標準治療が確立され、治療成績は向上しているものの、一部の患者で認められる再発および転移性乳がんについては未だに難治性である。これらの原因には薬剤抵抗性を示す「がん幹細胞」の存在が着目されており、治療抵抗性や晩期再発に関与する可能性が報告されている。しかし、がん幹細胞はがん組織内に極めて僅かしか存在しないため、性状解析のための必要細胞数の確保が困難であり、実際のがん患者組織内に存在するがん幹細胞の生物学的特性や病的意義については十分に解明されていない。本研究では、乳がん患者検体内に潜むがん幹細胞様集団の性質解析および治療標的候補分子の同定を目的とした。

【方法】 我々が以前に開発したハイドロゲル (poly- (sodium p-styrene sulfonate) (pNaSS)) によるがん幹細胞誘導法を用いて、乳がん患者検体から樹立したオルガノイド 6 例を pNaSS ゲルおよびオルガノイド条件下で培養した。Bulk RNA-seq 解析により、pNaSS ゲル培養細胞にて発現上昇した遺伝子群を用いて、従来報告されているがん幹細胞関連分子や脱分化に関与する遺伝子セットの変動について解析した。また、患者検体由来オルガノイド 1 例を用いたシングルセル RNA-seq 解析にて pNaSS ゲル上での経時的な遺伝子発現変動をオルガノイド培養条件と比較し、特異的な変動を示す細胞集団の遺伝子群の特徴をエンリッチメント解析により検討した。

【結果】 pNaSS ゲル上で培養した乳がん患者検体由来オルガノイドでは、薬剤代謝関連分子かつがん幹細胞との関連が報告されている *ALDH1A3* や *CYPIA1* 等の遺伝子発現が亢進し、乳腺前駆細胞や薬剤代謝に関与する遺伝子セットが共通して検出される一方、シグナル伝達関連遺伝子セットの変動は患者検体間で異なっていた。シングルセル RNA-seq 解析より、pNaSS ゲルおよびオルガノイド条件下で培養した細胞集団は異なる分布を示した。pNaSS ゲル培養細胞クラスターの中でも、特に *CYPIA1* を発現する集団においては乳腺前駆細胞や薬剤代謝に関与する遺伝子セットが検出される傾向にあった。以上より、乳がん患者検体より pNaSS ゲルで誘導した幹細胞様集団は患者検体間で多様なシグナル伝達系を利用する一方で *CYPIA1* の発現は共通しており、*CYPIA1* 発現細胞集団が乳がん幹細胞特異的であることが示唆された。

pNaSS ゲル培養乳がん細胞内の特異的な集団における *CYPIA1* 発現および遺伝子セット

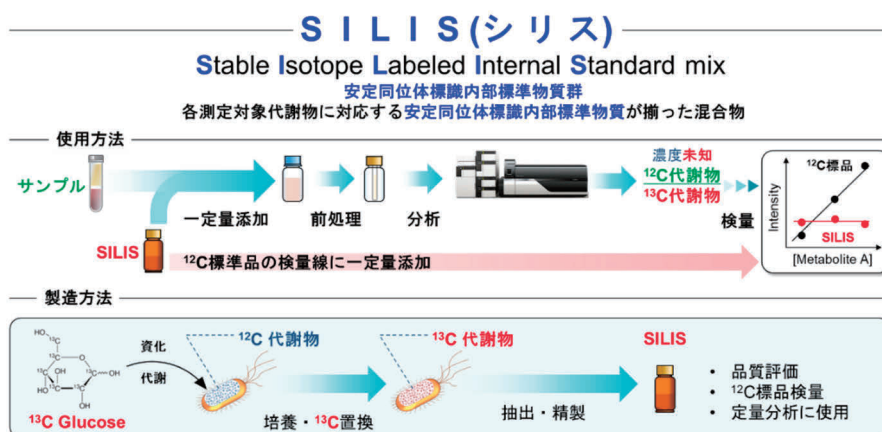


【目的】メタボロミクスは、生体内の代謝物の網羅的解析を旨とし、ライフサイエンスの様々な分野においてその活用が進んでいる。メタボロミクス分野では、各種クロマトグラフィー質量分析計が第一義的手法として採用されているが、各代謝物の絶対定量は殆ど実施されていない。その原因は、生体サンプル由来の夾雑物が測定対象化合物のイオン化効率に影響を与える「マトリックス効果」が質量分析部において生じ、定量性が損なわれるためである。この問題を解決する策として「安定同位体希釈法 (Stable Isotope Dilution Method : SIDM)」が考案されているが、非常に高価な安定同位体異性体標品が必要であるため、代謝物の包括的解析を旨とするメタボロミクスにとって、SIDM は定量性・網羅性担保に要するコストと労力に見合わない非現実的な手法に留まっている。本研究では、比較的安価な $U\text{-}^{13}\text{C}_6\text{-Glucose}$ を原料に、遺伝子組換え大腸菌にヒト由来代謝物を合成させることで、ヒト検体に適応可能な安定同位体標識化内部標準品群 (Stable Isotope Labeled Internal Standard mixture : SILIS) の調製法 (SILIS バイオプロダクション法) を確立し、SILIS を用いたヒト定量メタボロミクスの可能性を探求した。これにより、大規模コホート研究や国際協力研究、トランスオミクス研究など、バッチ間でのデータ統合や長期的・継続的な蓄積が必要な医学分野・ライフサイエンス分野に寄与する次世代定量メタボロミクスの実現を目指す。

【方法】米国 NIST が提供するヒト血漿リファレンスサンプルである SRM1950 と大腸菌 BW25113 株に含まれる代謝物をワイドターゲット・メタボローム解析に供し、ヒト血漿に含まれるが大腸菌には内在的に含まれない代謝物を明らかにした。そのうち、ヒトの疾患バイオマーカーとその候補である 27 種の代謝物を選定し、大腸菌によって合成させるための代謝改変ターゲットとした。これら標的代謝物の合成に必要な酵素遺伝子を選定し、大腸菌にプラスミドによる形質転換によって導入し、代謝改変大腸菌株群を構築した。構築した代謝改変大腸菌株を $U\text{-}^{13}\text{C}_6\text{-Glucose}$ を単一炭素源とする最小培地で培養することで、大腸菌内の代謝物を ^{13}C 標識した。得られた ^{13}C 標識大腸菌体から代謝物を精製し、SILIS を調製した。調製した SILIS を用いて SRM1950 の定量メタボローム解析を実施した。

【結果】代謝改変大腸菌のメタボローム解析の結果、選定した 27 種のターゲット代謝物 (ヒト血漿代謝物) の内、7 種の代謝物の合成に成功した。これらいずれのターゲット代謝物に関しても良好な ^{13}C 標識化率を担保できており、高品質な SILIS の調製に成功したことが確認された。取得した SILIS を用いて SRM1950 の定量メタボローム解析を実施した結果、NIST から提供された各種アミノ酸の定量値 (認証値) と SILIS を用いた定量結果は同等の値を示した。また、代謝改変によって新たに大腸菌で *de novo* 合成させた L-Kynurenine について、初めて SRM1950 中の定量値を明らかにした。これらの結果から、SILIS バイオプロダクション法と得られた SILIS を用いた定量メタボローム解析の有用性を示した。

SILIS のバイオプロダクション法によるヒト定量メタボロミクスの実現



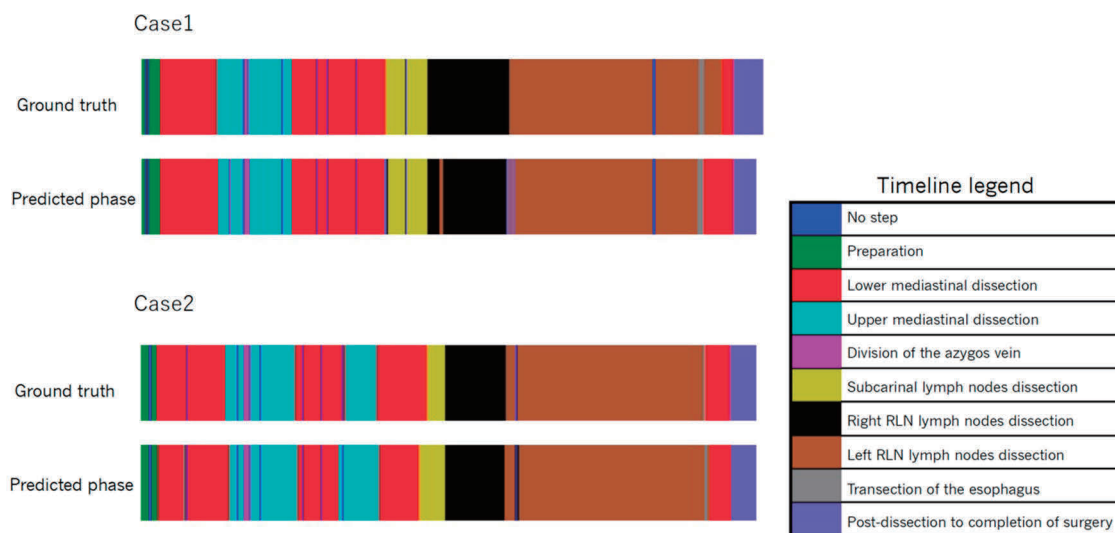
190 人工知能を用いた食道癌手術支援システムの開発	竹内 優志
----------------------------	-------

【目的】 本研究は、ロボット手術動画の解析により、ロボット支援下食道切除術（RAMIE）の人工知能（AI）ベースの自動手術工程認識システムを確立することを目的とした。

【方法】 本研究では、RAMIE を実施した 31 名の患者を登録した。動画を以下の 9 つの手術工程 (1) 準備、(2) 下縦隔郭清、(3) 上縦隔郭清、(4) 奇静脈切離、(5) 気管分岐部郭清、(6) 右反回神経周囲リンパ節郭清、(7) 左反回神経周囲リンパ節郭清、(8) 食道切除、(9) 切除後～手術完了の 9 つに注釈し、自動認識のための AI を訓練した。追加フェーズ（「No step」）は、胸腔からカメラを抜去した際のビデオシーケンスを示すために使用した。

【結果】 本モデルの性能を評価するために 4-fold クロスバリデーションを適用した。AI の精度は 84% と高精度で予測が可能だった。

手術工程認識のタイムライン可視化の例
(上段：正解例。下段：AI による予測例)

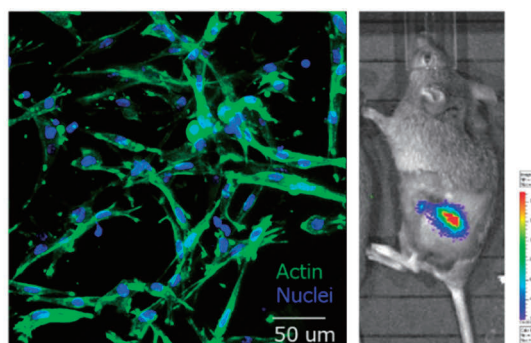


【目的】 再生医療とは、機能不全に陥った臓器を患者自身の細胞を移植することで再生する治療法であり、慢性的なドナー不足に陥っている臓器移植に代わる革新的な治療法として注目されている。一方で、現状の細胞移植の多くが、細胞懸濁液を注入する細胞移植であり、送達効率が非常に低い。本研究では、超分子からなるインジェクタブルゲル（超分子インジェクタブルゲル）を開発し、細胞移植時の生着率と治癒効果を飛躍的に向上させるための基盤技術を確立することを目的とした。損傷した組織に対して、細胞単独ではなく、超分子インジェクタブルゲルを用いて細胞を送達することで生着率を向上させる。ブタ腱由来ゼラチンにウレイドピリミジノン（UPy）基を修飾した UPy ゼラチンを合成し、超分子ゲルを形成させることで、チキソトロピー性を有し、1液型でインジェクションが可能なゲルを開発する。

【方法】 ブタ腱由来ゼラチンに対して、末端にイソシアネート基を有する UPy 基を化学修飾することで、UPy ゼラチンを合成した。また、UPy ゼラチンをリン酸緩衝食塩水に溶解し、粘弾特性をレオメーターで評価した。細胞試験として、マウス筋芽細胞を 37°C でピペッティングすることで、超分子インジェクタブルゲル中に内包し、タイムラプス観察および蛍光顕微鏡観察を行うことで細胞適合性と細胞接着性の評価を行った。さらに、マウス皮下への埋植試験により分解性を評価し、筋組織損傷モデルへの移植試験によって細胞の生着を評価した。

【結果】 粘弾性試験の結果より、超分子インジェクタブルゲルは、チキソトロピー性を有していることが示された。実際、ゲルのインジェクタビリティを評価したところ、ゲルは 37°C で 80% 以上のインジェクタビリティを有することが示された。超分子的に架橋された本ゲルは、体温でインジェクション可能であり、細胞移植のための送達キャリアとして使用できると期待される。また、本ゲルは、水中安定性・細胞接着性・生分解性を有しており、マウス筋欠損モデルに筋芽細胞を移植した際には、筋芽細胞が欠損部に生着し、組織内で増殖することが分かった。この結果は、ゲルが生体内の環境で細胞の接着や増殖のための足場として機能することを示している。本ハイドロゲルは、細胞だけでなく薬剤の局所デリバリー担体として、組織工学や再生医療の発展に貢献すると期待される。本成果は、*Biomed Mater.* 2022, 18, 015012 に報告された。

本研究で開発する超分子インジェクタブルゲルのイメージ



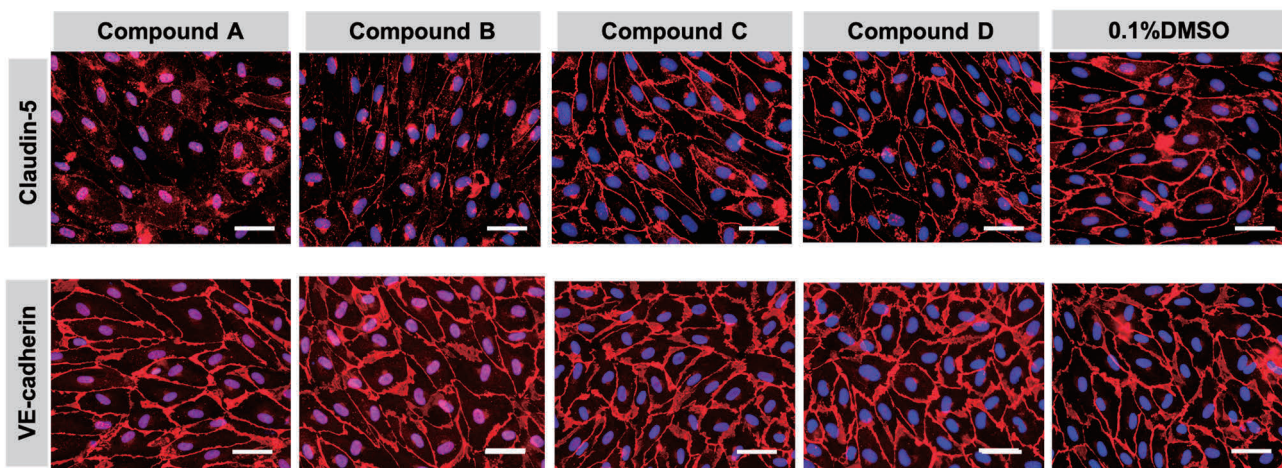
192 多発性硬化症患者血液脳関門破綻の遺伝的素因の解明	西原 秀昭
------------------------------	-------

【目的】 多発性硬化症 (multiple sclerosis : MS) の既存研究は動物モデルもしくは患者免疫細胞を用いていた。これらは免疫細胞を標的とした治療を開発してきたが、進行期には効果がないことと感染症の副作用が問題である。近年 MS の疾患感受性遺伝子が内皮細胞に局在していると指摘されており、血液脳関門 (blood-brain barrier : BBB) 構成内皮細胞は新規の治療標的を発見する興味深い候補である。ただし、患者 BBB サンプルのアクセスが困難であるために BBB の研究は進んでいない。筆者は近年、独自に開発した分化誘導方法で MS 患者由来 iPS 細胞から BBB モデルを作製することで、MS 剖検脳でみられる BBB 異常を *in vitro* に再現でき、病態解明・新規治療法開発に使用できることを示した。本研究では、MS 患者に存在する遺伝的な BBB 破綻素因の候補遺伝子を同定し、その機能解析を行うことを目的とする。

【方法】 再発寛解型 MS 患者 4 例と健常人 3 例から作製した iPS 細胞 (MS 患者 7 株、健常人 6 株) を筆者が独自に開発した方法で BBB 構成内皮細胞に分化誘導した。BBB 構成内皮細胞から RNA を採取し、RNA-seq 解析を施行した。発現変動遺伝子を用いた reactome pathway 解析を行い、MS での BBB 破綻に関係する分子機構を検索した。同定した候補遺伝子 X に対して小分子を用いた阻害実験を行うことで、健常人由来 BBB 構成内皮細胞に MS 類似の BBB 破綻が再現されるかを検討した。

【結果】 健常人と MS 患者由来の BBB 構成内皮細胞を比較し、炎症性サイトカインの存在しない条件下で 400 を超える発現変動遺伝子を同定した。発現変動遺伝子を基にした reactome pathway 解析の結果と、それぞれの候補遺伝子の分子機能、生物学的プロセス、細胞内局在を検討し、BBB の発達や維持に関与する候補を複数同定した。健常人由来 BBB 構成内皮細胞の候補 X 機能を小分子により阻害することで、tight junction 構成蛋白質である claudin-5 の発現が低下し、小分子の透過性が亢進すること、つまり既報 [Brain, 2022. 145(12): p. 4334-4348] で報告した MS 同様の BBB 破綻が再現できることを示した。

MS 患者由来 BBB 構成内皮細胞から同定した候補 X による BBB 破綻

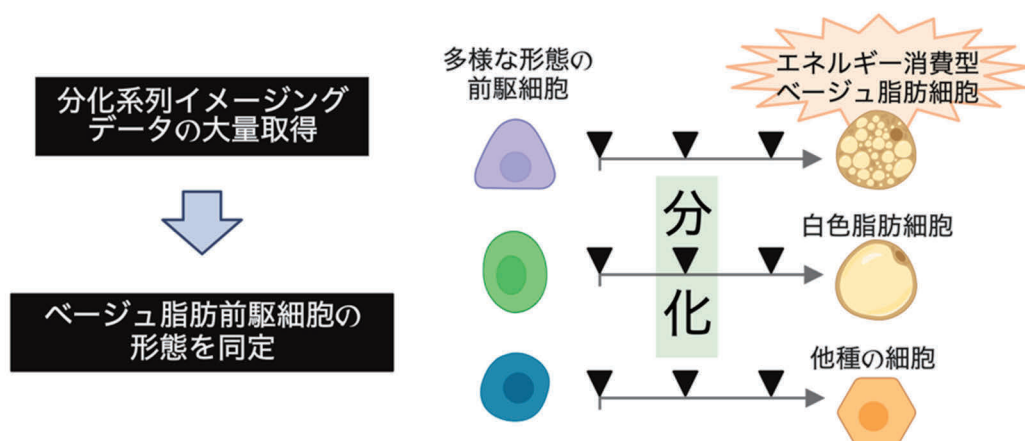


【目的】 世界には 10 億人以上の肥満患者がいると報告されているにも関わらず、広範に適用可能な治療法は依然存在しない。一つの有望な戦略は、熱産生によってエネルギーを消費する細胞であるベージュ脂肪細胞を増加させるというものであるが、治療法としての確立には至っていない。大きな課題の一つは、脂肪組織内の多様な前駆細胞集団の中で、ベージュ脂肪細胞の前駆細胞の同定・単離が達成されていないことであると考えられる。組織の前駆細胞集団には、エネルギー消費能が低い白色脂肪細胞への指向性が高い前駆細胞なども含まれていると考えられるが、ベージュ脂肪細胞への分化指向性の高い前駆細胞を選別する手段が確立していない。そこで本研究では、ベージュ脂肪細胞の前駆細胞を形態学的に同定し、選別可能にすることで、新たな抗肥満戦略構築のための技術基盤を確立することを目標とした。

【方法】 本目的を達成するべく、1 細胞・1 クローン脂肪細胞分化追跡系の構築を進めた。具体的には、以下の 3 つの方法論を用いることで、系の確立を目指した。1. 脂肪細胞 1 細胞分化誘導系の開発：脂肪前駆細胞をハイドロゲル内に空間的に分散させ、個々の細胞を三次元培養し、脂肪細胞へと分化誘導可能な条件を検討した。2. 1 細胞経時計測系の開発・概念実証：高速・大量調製が可能な、マイクロ液滴（油中水滴）を用いて、個々の細胞を経時計測する系の構築を試みた。3. 脂肪前駆細胞スフェロイドのための、シェル内培養系の構築：1 細胞培養系よりも分化効率の上昇が見込まれる脂肪前駆細胞スフェロイド系を経時計測するため、各スフェロイドを独立に培養可能な、ハイドロゲルを用いたシェル型培養ユニットの構築を試みた。

【結果】 1. 脂肪細胞 1 細胞分化誘導系の開発：各種ハイドロゲルの中でも、特にコラーゲンゲル内で、一定割合の脂肪前駆細胞が分化することが明らかとなった。2. 1 細胞経時計測系の開発・概念実証：マイクロ液滴内で細胞を培養する系の構築に成功し、マイクロ液滴の物理的位置を固定することが可能なマイクロデバイスを開発することで、1 細胞経時計測を達成した。3. 脂肪前駆細胞スフェロイドのための、シェル内培養系の構築：アルギン酸とアガロースという、異なる性質をもったハイドロゲルを組み合わせることで、1 クローンスフェロイドを培養可能な、シェル型培養ユニットの構築に成功した。

本研究の概要

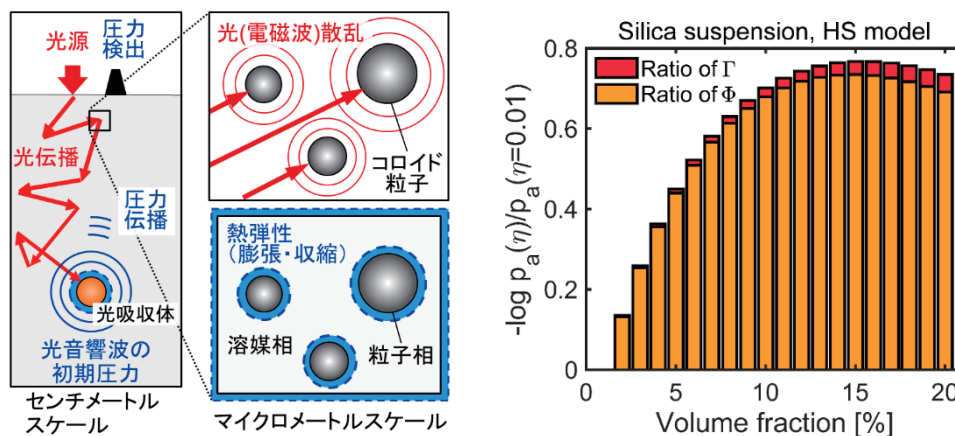


【目的】 定量的光音響トモグラフィは、光音響波の初期圧力から光吸収係数を分離・算出し、定量イメージングを目指す技術である。定量的光音響トモグラフィによる甲状腺がん検出が期待されているが、未だ実現されていない。理由として、「ヒト頸部において光や光音響波の圧力は複雑に伝播するため、光吸収係数を分離することが困難である」ことが考えられる。頸部は甲状腺、気管、筋肉などで構成される。光は気管以外の頸部内部器官によって強く前方に散乱される。一方で、甲状腺近傍に位置する気管は空洞領域であり、気管境界面において光は反射・屈折し、光音響波も反射する。甲状腺癌から発生した光音響波は気管周辺から発生した波と複雑に重なり、頸部表面で検出される。よって、定量的光音響トモグラフィによって甲状腺癌を検出するためには、頸部における光と光音響波の伝播を定量的に評価することが必要である。また、定量的光音響トモグラフィを確立するためには、光散乱が光音響波の初期圧力に及ぼす影響を詳細に明らかにすることが基礎研究として極めて重要である。本研究の目的は次の2つである。(1) 定量的光音響トモグラフィによる甲状腺癌検出システムの確立に向けて、ヒト頸部における光と光音響波の伝播を明らかにすることである。(2) 生体模擬試料として広く使用される、コロイド溶液に対して、光散乱が及ぼす初期圧力への影響を定量的に明らかにすることである。ヒト頸部のような生体は非常に複雑な媒体で個体差も大きいため、初期圧力の発生機構を明らかにするためには、再現性の高い生体模擬試料を用いた基礎研究が重要である。

【方法】 目的(1)の達成のため、光伝播を記述する輻射(ふくしゃ)輸送論と圧力伝播を記述する光音響波動方程式より、2次元ヒト頸部モデルや3次元立方体の散乱媒体に対して計算した。特に、光伝播を厳密に記述するが計算負荷の高い輻射輸送方程式と、拡散近似より計算負荷の低い光拡散方程式の結果を比較した。目的(2)の達成のため、コロイド溶液の光散乱特性、熱弾性特性、光伝播をマルチスケールの観点より、電磁波理論、輻射輸送論、統計物理学を融合させることによりモデル化した(下図左)。コロイド粒子の体積分率を変化させ、初期圧力への影響を数値解析した。

【結果】 目的(1)については、ヒト頸部モデルや立方体媒体において、輻射輸送方程式と光拡散方程式の計算結果を比較した。媒体内部における空洞領域や境界面で生じる光の反射・屈折による光伝播の影響は限定的であり、両光伝播モデルにおける圧力伝播の差異は小さいことを明らかにした。目的(2)について、熱弾性特性以外の特性に対して、コロイド粒子群の相互作用が強く影響を及ぼしていることを明らかにした。下図右に、シリカ溶液内部にある吸収体から発生する初期圧力の体積分率依存性を示す。熱弾性による寄与 Γ と光散乱・光伝播による寄与 Φ を区別している。この図より、初期圧力において、熱弾性特性による影響は限定的であり、初期圧力の90%以上が、光散乱・光伝播による寄与であることを明らかにした。この結果より、熱弾性のモデル化に比べて、光散乱のモデル化が重要であることが示唆された。

光音響の初期圧力モデリングと光散乱・熱弾性による寄与の解析

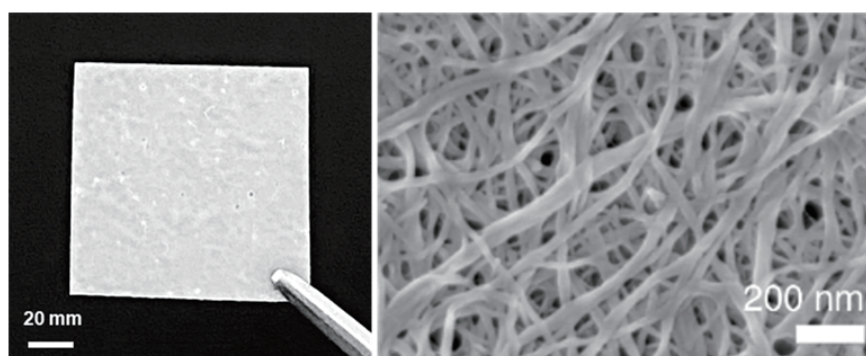


【目的】 本研究は、エクソソームを始めとした細胞外小胞 (Extracellular Vesicle : EV) を対象とし、従来の技術では EV の回収が困難であった極めて微量な体液から、特殊なマテリアルシート (EV シート) を用いて回収・解析する新たな手法を開発することを目的とする。EV が生理活性をもった分子を搭載し細胞間を水平移動することで、細胞間相互作用に関与することが 2007 年に報告されて以降、急速に研究が進み、現在では世界各地で EV の基礎的研究からトランスレーショナル研究まで盛んにおこなわれている。我々は、EV シートという新しいマテリアルを用いてわずか $10\mu\text{L}$ の血清から、EV シートは効率的に EV を回収できる新たなツールを開発した。さらに、湿潤した臓器、とりわけ腹水からの回収も可能である。EV シートは、これまで単一の体液とされていた腹水 EV を、より解像度高く、位置情報という新しい観点からの Heterogeneity 解析を行えるという点において革新的手法である。本研究では、この生体内における体液の不均一性を、EV シートを用いることで明らかにし、がんの進展度に応じた挙動を体液が起こし得るのか、またその変化は癌悪性化においてどのような意義をもつか、さらにはその変化を標的として治療戦略の提唱を目指す。

【方法】 EV シートを用いて、生体内 EV 解析を行った。人の体液、血清、腹水、唾液、尿を対象として、検討を行った。EV シートを用いて補足・回収した EV は、電子顕微鏡撮影、EV タンパク質マーカー検討、ナノ粒子解析装置を用いて解析を行い、EV 関連核酸、主には miRNA を対象とするが、RNA は次世代シーケンサーを用いて解析を行った。対象疾患モデルとして卵巣がんを設定し、マウスでの検討も行った。

【結果】 EV シートによって回収した EV から RNA を抽出し、Small RNA シーケンスを行ったところ、再現性よく miRNA プロファイルが取得できることが確認され、EV に関連しないフリーの miRNA は除去できていることも確認した。マウス微量腹水から回収した EV も解析可能であり、微量腹水中 EV には超早期でもがんのプロファイルを有した EV が確認できた。ヒト腫瘍組織からの回収にも成功し、これまで解析できなかった腫瘍表面のエクソソーム中の分子プロファイルが解析可能となった。現在、生体内からの直接採取による検討を行っている。

微量体液からのエクソソーム回収のためのEVシート



1 cm角EVシートの写真

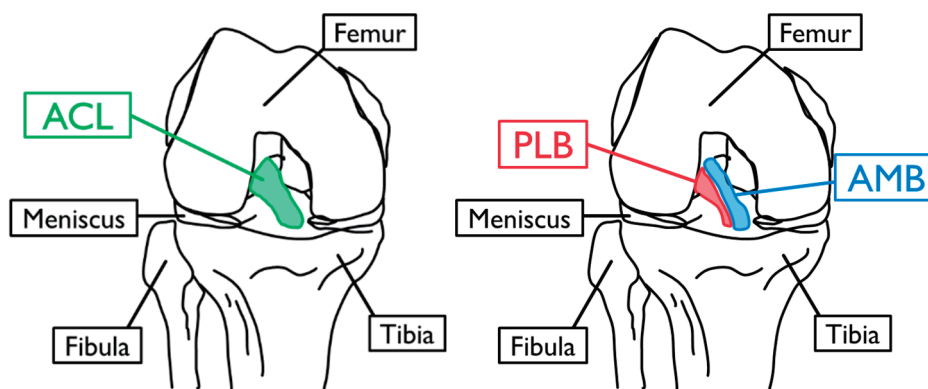
EVシートの繊維 (電顕像)

【目的】 前十字靭帯（ACL）とは膝関節に存在する強度に優れた靭帯であり、膝関節の安定性を保つ役割を担っている。本靭帯は、スポーツなどにおけるジャンプや切り返し動作など、強い負荷が加わった際に損傷や断裂が引き起こされることが知られている。治療においては、自然治癒が難しいことから、多くの場合は新たな靭帯を移植する外科的再建術が適用される。すなわち、グラフト（再建材料）選択においては、ACL が本来持つ生体材料としての強度評価が非常に重要であるといえる。また、ACL は解剖学的に前内側線維束（AMB）と後外側線維束（PLB）に分けられる。過去の研究ではブタやウシなどの ACL を採取してヤング率等を測定した報告があるが、人体の膝関節内における AMB・PLB の膝屈曲角度による張力変化および粘弾性特性の詳細は明らかになっていない。また ACL 再建術における最適なグラフト選択についても議論が続いている。そこで本研究では、人体の膝関節内の計測に特化したトランスデューサを開発し、ヒト解剖体の膝関節内に設置することで、AMB および PLB の膝屈曲角度に対する張力測定を行う。さらに再建手術時において力学的に代替可能な再建材料を明らかにするために、AMB および PLB の粘弾性特性を引張試験により明らかにし、最適なグラフト選択のための力学指標の確立を狙う。

【方法】 実験には、ヒト前十字靭帯の大きさ・形状に合わせた L 字型の楔形トランスデューサを開発し、等方性強度に優れている樹脂材料を出力可能な光造形 3D プリンターを用いて作製した。解剖実習体 1 体を対象とし、楔形トランスデューサによる AMB および PLB の張力測定と引張試験機による粘弾性測定を実施した。張力測定では、膝屈曲角度とトランスデューサに貼付したひずみゲージの出力電圧値の関係を定量化した。粘弾性測定では、引張試験機によって 5%、10%、15% のひずみを与えた際の張力変化を基に、各線維束をばね・ダッシュポット要素からなる 3 要素個体モデルとして表し、弾性率と粘性率の値を明らかにした。

【結果】 開発した楔形トランスデューサによる計測により、各線維束における膝屈曲角度に対する張力を明らかにしたところ、膝屈曲角度が大きくなるに従い、両線維束の張力が増加していることが確認できた。また、全屈曲角度において、AMB の張力が PLB に比べて大きな値を示す結果となった。次に、各線維束に対する応力緩和試験の結果を基とした 3 要素個体モデルのパラメータフィッティングでは、ひずみが大きくなるに従い弾性率および粘性率が増加していることが確認できた。また、全てのパラメータにおいて AMB が PLB に対して高い値を示していることが確認できた。すなわち、材料特性としてばね・ダッシュポットの性質を強く有するのは AMB だと考えられる。本結果を基に、今後測定対象を様々なグラフト材料に拡大し、さらなる検討を重ねる予定である。

膝関節内における前十字靭帯および構成線維束の概要図

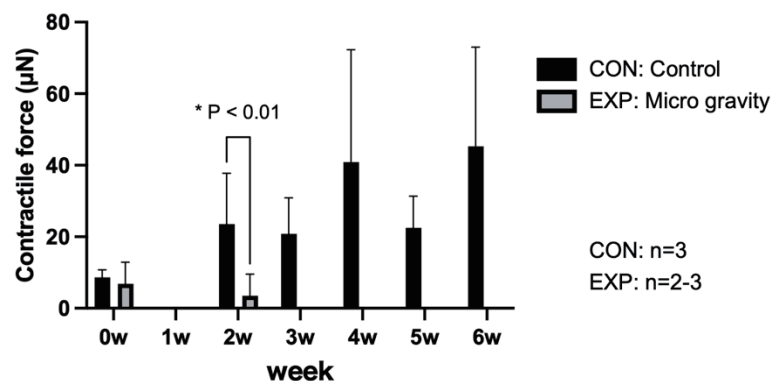


【目的】近年、筋萎縮の予防・改善を目的とした機能性食品や新薬の開発が活発化している。これまでは、動物実験が薬物動態を予測する上で重要な役割を果たしており、人体に対する薬効評価を担ってきた。動物実験は外的要因が多く定量性に劣る面があり、より定量的かつ迅速に薬効評価が行える細胞アッセイツールが求められている。また、倫理的な指摘から動物実験の規模は縮小を余儀なくされており、これまでのような薬効評価プロセスの維持は難しくなっている。本研究テーマでは、著者グループが開発した筋オルガノイドに対して微小重力環境を付与することで擬似的に廃用性筋萎縮を再現し、力学的環境制御に基づく筋疾患モデルとして活用することを目標としている。

【方法】研究者グループが開発した人工骨格筋に対して、クリノスタットを用いて微小重力環境下で培養することで、力学的環境制御に基づく筋疾患モデルが実現可能かを検討した。クリノスタットのフレームに適した人工骨格培養デバイスを開発し、そのデバイスの中で人工骨格筋の培養を行った。細胞培養デバイスは、生分解性プラスチックの一種であるポリ乳酸 (PLA) のフィラメントを用いて 3D プリンタで作製し、ガス透過性があるシリコーンゴムシートで密閉した。このデバイスの中に入れた人工骨格筋を微小重力環境下におき、電気刺激を付与する収縮力測定を行い、収縮力の評価を行うことで疾患モデルとして成立しているかを確認した。

【結果】人工骨格筋を通常培養する群 (CON 群) とクリノスタットに入れて培養する群 (EXP 群) に分けてそれぞれを培養したとき、2 週目には EXP 群の収縮力が大きく減少した。3 週目以降は、CON 群の収縮力が増大傾向を示すのに対し、EXP 群は収縮力が測定できないほど小さかった。以上の結果は、無重力状態による運動機能低下状態を再現でき、力学的環境制御に基づく筋疾患モデルの開発に成功したことを示唆している。しかし、いずれも $n=3$ であることを留意する必要がある。これは、クリノスタット用人工骨格培養デバイスの性能不足に起因した実験回数の不足が原因である。開発したクリノスタット用人工骨格培養デバイスを用いての微小重力環境下での人工骨格筋培養は可能であることは確認できたが、ボルト締結の不備による液体培地の流出や、滅菌の困難さに伴うコンタミネーションの発生など様々な問題点が見つかった。今後は、ボルト締結を必要としない密閉方式を含めユーザビリティの改善を図る計画である。

人工骨格筋が発揮する収縮力の推移



【目的】自殺は10代で急増し、日本では死因の第一位を占めている。特に高校生など10代後半では、それ以前に比べて自殺数が5～6倍に増加するため、その防止策の確立がきわめて重要である。自殺の防止ではリスクの高まった人達に対する周囲の支援（保護を含む）が重要だが、リスクの高まった本人からはなかなか助けを求められないのが実際である。このため、普段から周りにいる者が気づき尋ね、支援の手を差し伸べられる態勢作りが重要である。高校生の自殺防止で、保護者とともにこの役目を期待されるのは日常的に生徒と接する立場にある学校の教員である。ただ教員がその役目を果たせるためには、自殺防止に関する十分な知識と意識が必要である。本研究ではこの目標に向けて、生徒の自殺防止に関する高校教員用の研修プログラムを開発し、その効果を検討した。同時に高校教員の知識と意識の現状を調べ、どのような不足が生徒の自殺防止の妨げとなっているかについて考察した。

【方法】某県の公立高校の教員を対象とした。オリジナルアニメを含むパワーポイントの動画を中心とした研修プログラムを著者らが作成し、同県の教育委員会とともに、教員向け研修を実施した。また研修前、研修直後、および6ヶ月後の三時点で、自殺防止に関する知識と意識（リテラシー）に関する質問紙調査を実施。研修前の回答から、高校教員の自殺防止に関するリテラシーの現状を推測した。また研修直後、6ヶ月後と研修前との比較により、作成した研修プログラムの効果を解析した。解析には、個人と学校を階層としたマルチレベル（ランダム切片）での回帰分析またはロジスティック回帰分析を用いた。

【結果】教員の半数近くは、10代後半の死因の第一位が自殺であること、「死にたい気持ちについて尋ねることは、自殺を促すので避けた方がよい」が正しくないことを理解していなかった。自殺未遂歴がある場合には既遂リスクが高いこともほとんどの教員が認識できていなかった。これらはいずれも、生徒の自殺防止策を進める上で改善すべき問題と考えられる。一方、研修の実施直後は、生徒の自殺防止に関わる知識や意識は有意に向上した（ $p < 0.001$ ）。研修半年後も多くの項目で有意な効果は認められたが、一部の項目では有意な効果は消失しており、効果の維持に向けた工夫の必要性が示唆された。

生徒の自殺予防に関する高校教員の知識：正答率（%）の変化

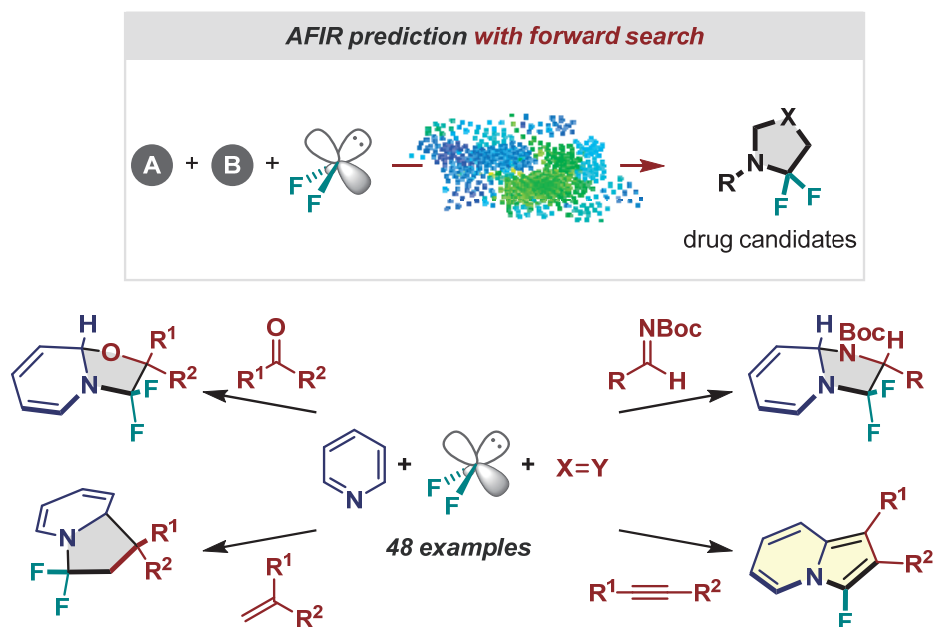
	研修前	直後	6ヶ月後
死にたい気持ちについて尋ねることは、自殺を促すので避けた方がよい（誤）	57.7	87.7	70.2
日本では10代後半の死因の第1位は自殺である（正）	58.7	96.4	82.2
自殺予防では、自傷行為を繰り返している生徒への注意が最も重要である（誤）	54.4	33.6	42.9
死にたい気持ちに関する質問は専門家に任せるべきで、教員が聞くべきではない（誤）	66.2	93.1	81.8
悩みを相談できる相手がいるかいないかで、自殺のリスクが違ってくるわけではない（誤）	78.3	92.8	87.9
自殺未遂歴があってもなくても、自殺予防への注意は同じレベルで向けるべきである（誤）	15.4	44.1	18.8
自殺の計画を話されても「誰にも言わないで」と本人が懇願するならそうすべきだ（誤）	81.5	95.0	88.8
自殺予防は、精神科で治療中の生徒に最大の焦点をあてて行う必要がある（誤）	58.6	63.2	60.9
自殺リスク確認の際、自殺の具体的計画の有無までは聞くべきでない（誤）	38.8	78.7	59.5
自殺の危険が非常に高ければ、本人が納得しなくても入院させる方がよい（正）	38.0	71.3	51.0

【目的】 医薬品や農薬などに必要不可欠な含窒素ヘテロ環構造は生物活性物質を有するものが多く、フッ素原子を導入することで代謝安定性が向上し、体内動態が改善されることが期待される。これまで、様々なフッ素化含窒素ヘテロ環化合物の合成手法が報告されてきたが、窒素原子に隣接する α 位の炭素に2つのフッ素原子を有する N - α,α -ジフルオロ含窒素複素環の構築手法は限られていた。このため、本研究では量子化学計算手法のひとつである反応経路自動探索法 (AFIR 法) を用いて、この骨格を構築するための方法を自動探索し、実際に合成化学実験で具現化する。

【方法】 4種類の不飽和結合を有する化合物 (ホルムアルデヒド、メタンイミン、エチレン、アセチレン) から2つの分子とジフルオロメチレン源としてジフルオロカルベンを全ての基質の組み合わせ (合計 10通り) に対して、AFIR 法を適用した。その結果、遷移状態の構造やその活性化障壁、中間体の構造、および速度定数行列縮約法 (RCMC 法) による計算収率などを内包した反応経路ネットワークが得られた。そのネットワークを解析したところ、ターゲット分子が構築可能な基質の組み合わせが見出されたため、合成化学実験で具現化した。

【結果】 計算によるシミュレーションの結果、メタンイミンとジフルオロカルベンから調製されるアゾメチンイリドと、ホルムアルデヒド、メタンイミン、エチレン、およびアセチレンの不飽和化合物との 1,3-双極子付加環化反応が円滑に進行し、ターゲット化合物の骨格を有する N - α,α -ジフルオロ含窒素ヘテロ環化合物が高い計算収率で得られることを見出した。次に、これらの計算結果をもとにして、実際の実験での具現化を試みた。具現化するにあたり、ピリジンをイミン源として用いて検討を行ったところ、ピリジニウムイリドの脱芳香族化を伴う 1,3-双極子付加環化反応の開発に成功した。

ジフルオロカルベンを用いる新規三成分反応の開発

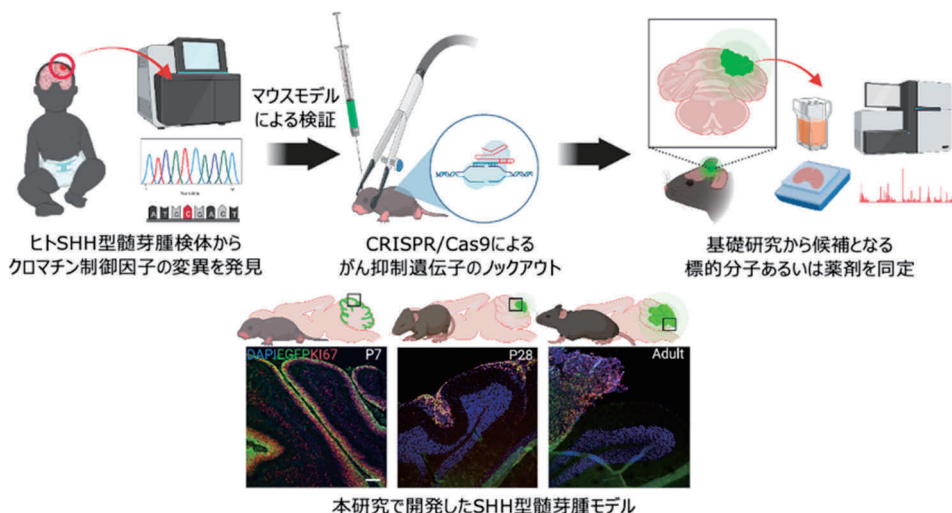


【目的】 脳細胞の増殖と分化は遺伝子プログラムにより厳密に制御されており、遺伝子の突然変異などによるプログラムの破綻は時に脳腫瘍という難治がんを引き起こす。特に小児脳腫瘍は小児がんの中で最も致死率が高く、その効果的な治療法の確立が急務である。本研究で扱うソニックヘッジホッグ (SHH) 型髄芽腫は、髄芽腫全体の約 30% を占め、細胞増殖シグナルとして知られる SHH シグナルが小脳顆粒細胞で異常活性化することが原因で生じるとされる。個別化医療の戦略として SHH 阻害剤は化学療法の第一選択であるが、抵抗性や副作用の問題が無視できず、更なる治療標的の同定による薬剤の併用療法が期待されている。新しい治療標的の探索には SHH 型髄芽腫において高頻度で観察される遺伝子変異の機能解析が手がかりを与える。クロマチン制御因子の機能欠損変異はその代表的なものであり、髄芽腫においてエピジェネティックに制御される分子が発癌に寄与していることが示されつつあるが、生物学的研究から導かれる分子標的薬は未だ存在しない。本研究では、SHH 型髄芽腫の発がんに関わるクロマチン制御因子の機能欠損変異を生体内で評価するスクリーニング系を確立し、新しい発がん機構を見出すとともに、その下流で機能しうる分子を治療標的候補として提案することを目指す (図)。

【方法】 脳腫瘍は周囲の脳細胞と相互作用して増殖・進展するため、個々の遺伝子変異の発がん能を評価するためには腫瘍ができる環境下で遺伝子変異を誘導し、個体レベルで解析することが望ましい。そこで我々は生体内電気穿孔法による遺伝子導入と CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を組み合わせ、腫瘍の起源細胞である小脳顆粒細胞を EGFP で遺伝学的に標識した生後 5 日目の *Atoh1*^{EGFP} マウスの小脳に直接 *Ptch1* sgRNA (sg*Ptch1*) と候補遺伝子の sgRNA、*Cas9* 遺伝子を導入して SHH 髄芽腫の腫瘍形成が加速するかどうかを検証した。

【結果】 まず、我々が今回開発した、生後 5 日目の *Atoh1*^{EGFP} マウスの小脳への生体内電気穿孔法により小脳顆粒細胞において *Ptch1* 遺伝子をノックアウトした場合に SHH 型髄芽腫が誘導されるかどうかを検証した。その結果、生後 28 日目に前がん状態が観察され、最終的に 32% (n=10/31) のマウスで腫瘍形成が認められた。腫瘍の発達過程で GFP を発現する細胞は分裂細胞のマーカーである Ki67 を発現していた。またこれらの腫瘍はヒト SHH 型髄芽腫に特徴的な遺伝子は高いレベルで発現しており、本研究で開発した方法論が、新生仔マウスから SHH 型髄芽腫を生み出すことが可能であることを証明している。さらに、*Ptch1* と同時にヒト SHH 型髄芽腫で変異の報告されたクロマチン制御因子をノックアウトした結果、これまでに報告されていない発がんに影響しうる新しい遺伝子変異が発見された。現在、これらの変異によって生じるがんシグナルの解析を進めている。

本研究のフローチャート



201 肥満と概日時計を相補的に制御する機構の解明	羽鳥 恵
---------------------------	------

【目的】メタボリックシンドロームは、新型コロナウイルス感染症でも実感されたように感染症罹患時の脆弱性、心血管疾患、脳卒中、失明や糖尿病性腎不全といった重篤疾患を招き、結果として死につながる可能性を秘めている。日本の中老年男性の2人に1人がメタボリックシンドロームまたは予備軍とされている。体力や時間、天候の問題、面倒くささから運動不足となる人が相当数存在し、簡便な肥満解消手法の開発が望まれている。食事の内容や量に肥満改善効果があることは古くから研究されている。ところが、摂食量を減らすカロリー制限の実施は困難を伴いコンプライアンスに差が出る。そうした中で私は、量ではなく時間の調整が代謝能改善に極めて有効であろうと仮説を立てた。明期 12 時間/暗期 12 時間の明暗周期下でマウスを飼育し、活動時間帯である暗期の開始直後から 8 時間だけ餌を食べられるようにしたところ、肥満が防止された（時間制限摂食）。そこで、様々な条件の時間制限摂食を、マウスを用いて実施し、概日時計の概念との関わりを明らかにする。また、ヒトの健康への研究成果の将来的な応用を見据えて、霊長類を用いても実施する。

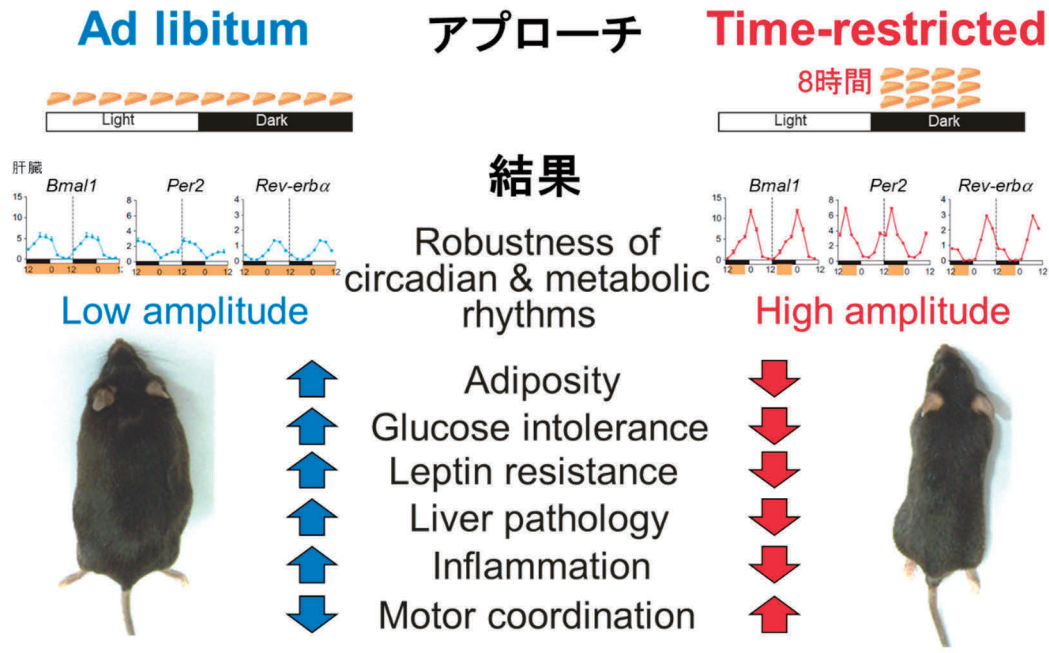
【方法】時間制限摂食に伴って変化する因子群を絞り込むことを目的とし、マウスを用いて様々な時間制限摂食を実施した。自由摂食群も同時に併行して実施した。長期間に渡り定期的に摂食量を計量し、体重測定やグルコース負荷試験などを実施した。さらに採血を行い、肥満や加齢に関する血中マーカーやサイトカイン等の変動を解析した。最終的には全身の臓器を採取し包括的な遺伝子発現パターンを解析した。霊長類に関しては、肥満研究に用いるためのモデル生物としての立ち上げに着手し、時間制限摂食を実施し、生体を殺めることなくサンプルを採取した。

【結果】時間制限摂食という概念は同じであっても一日の中での食事を摂る時間帯の違いに依存して全身の恒常性に与える影響が全く異なることを見出した。

摂食のタイミングの重要性

Time-restricted feeding 時間制限摂食

食事の量は変えずに時間を変えた

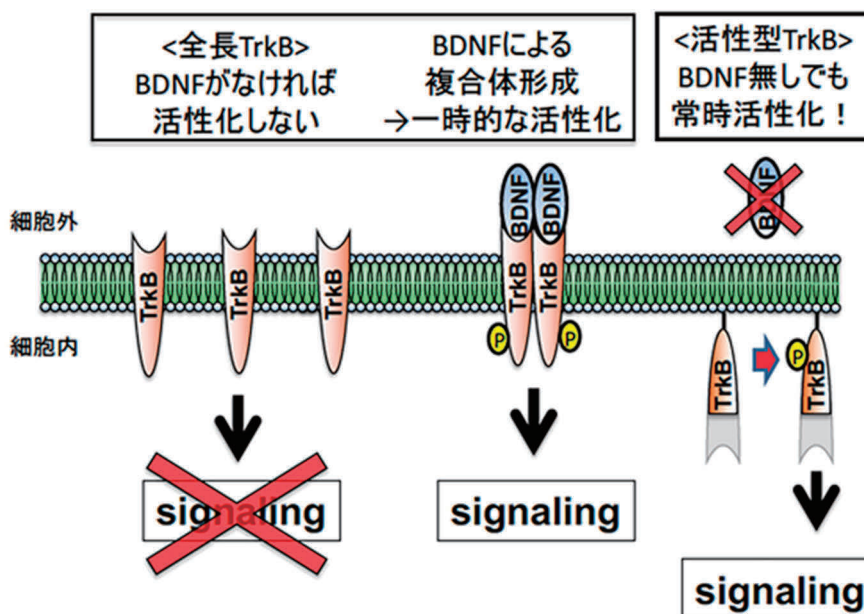


【目的】 我が国における失明原因の多くは網膜と視神経の変性疾患で占められているが、超高齢社会の到来とともに、さらなる失明者数の増加が危惧されている。中でも最大の要因である緑内障は網膜神経節細胞（Retinal ganglion cell : RGC）の細胞体や、その軸索である視神経が変性し、次第に視野が障害される疾患である。緑内障の治療としては眼圧を低下させる点眼薬や手術が一般的であるが、十分に眼圧を降下させても視野障害が進行するケースが一定の割合で観察されることから、全く新しい治療法の開発が求められる状況にある。そこで本研究では複数の疾患モデルを用いて緑内障に対する遺伝子治療実験を行い、その効果を検討した。また RGC に対する保護効果に加えて、一旦変性した視神経軸索が再生する可能性について、視神経外傷の疾患モデルを利用した検討を合わせて行った。

【方法】 脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor : BDNF) の高親和性受容体である Tropomyosin receptor kinase B (TrkB) の細胞内領域のみを細胞膜に強制発現させるアデノ随伴ウイルス (adeno-associated virus : AAV) ベクターを作製した。これを高眼圧緑内障および正常眼圧緑内障の疾患モデルマウスに眼球内投与して、RGC に対する神経保護効果を調べた。また視神経外傷モデルに対しても同じ AAV ベクターを投与し、視神経軸索の再生効果について検討した。

【結果】 今回開発した AAV ベクターは一度だけの眼球内投与により、ligand である BDNF の投与無しに、RGC における細胞内シグナルを活性化することに成功した。また高眼圧緑内障および正常眼圧緑内障のいずれの疾患モデルマウスにおいても RGC 保護効果を促進し、緑内障の進行を抑制した。さらに視神経外傷モデルにおいては視神経軸索の再生効果も確認された。

常時活性化型 TrkB の構造

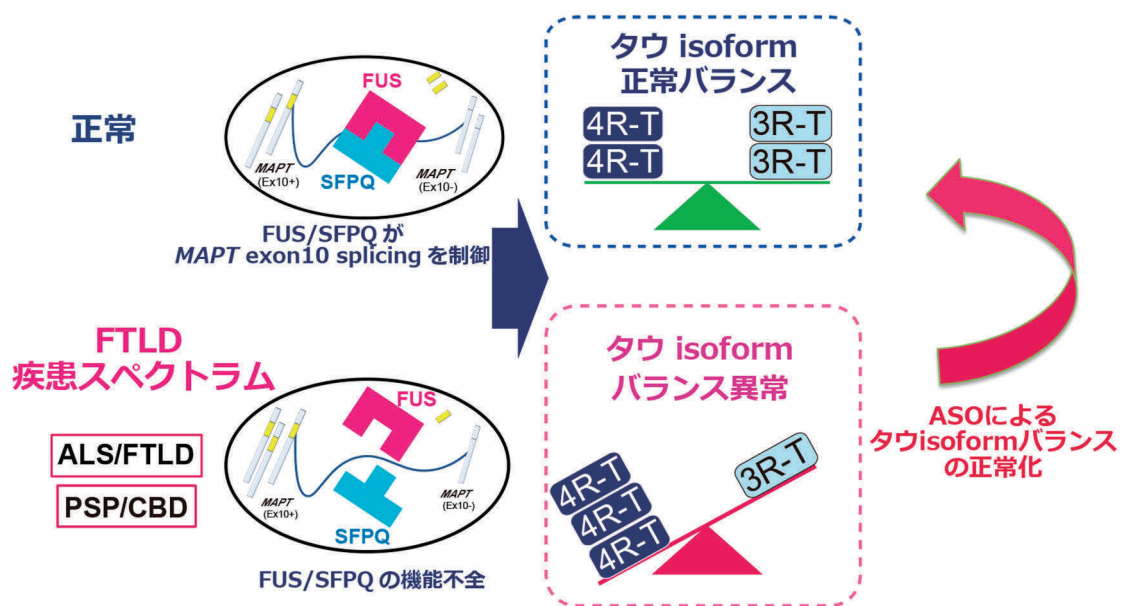


【目的】筋萎縮性側索硬化症（ALS）と前頭側頭葉変性症（FTLD）は、遺伝学的・病理学的に同一の疾患スペクトラムと考えられている。とくに TDP-43、FUS といった RNA 結合タンパク質が家族性症例の原因遺伝子であり、かつ同時に孤発例の重要なマーカーであることから、ALS/FTLD の病態には RNA 代謝が密接に関わると推測されている。筆者はこれまでに、ALS/FTLD に関与する分子である FUS が神経細胞の核内で、同じく RNA 結合タンパク質である SFPQ と高分子複合体を形成し、タウの選択的スプライシングを制御することで神経機能や病態に関与することを明らかにしてきた。またマウスモデルでの解析より増加した 4 リピート（R）タウ（4R-tau）を抑制することで高次脳機能異常が改善することを見出している。本研究提案ではタウの選択的スプライシングを正常化させる新規治療法開発を目的とする。

【方法】4R タウオパチーの疾患修飾薬として、化合物の安定性を特徴とする 2'-O,4'-C-ethylene-bridged nucleic acid (ENA) 修飾を用いたタウ isoform 制御アンチセンスオリゴヌクレオチド (ENA-ASO) の開発を行った。

【結果】ENA-ASO の候補化合物を 43 配列設計・合成し、培養系と *in vivo* でのスクリーニングで、最も効率よくタウ遺伝子 *MAPT* の exon10 を skipping し、かつ転写に与える影響が最小であった NK-18 を選定した。この NK-18 を FTLD マウスモデル（ヒト化タウマウスで FUS 発現を抑制）に髄腔内投与（50 μ g、単回）したところ、投与後 6 週間の時点で 4R-tau 発現量を正常化し、高次脳機能障害を改善させた。

タウアイソフォームのバランス異常を正常化による病態改善

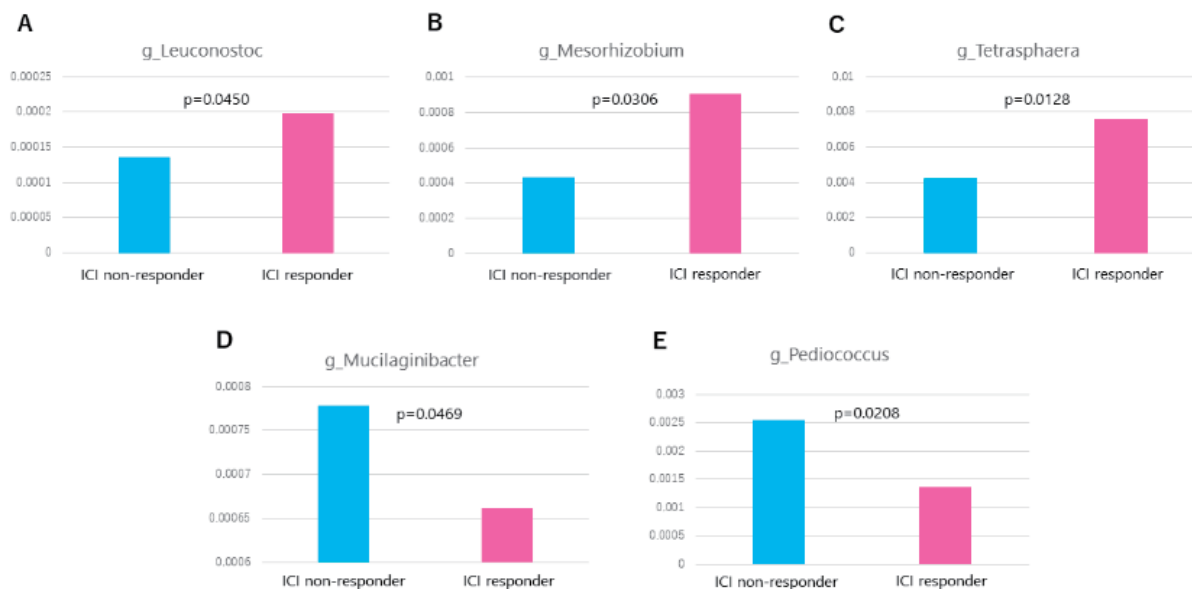


【目的】 近年、全身の各臓器には常在細菌叢が存在しており、各臓器に発生した癌腫瘍内にもこうした常在菌の存在が確認されている。しかしながら、肺癌における肺腫瘍内細菌叢の存在やその機能については詳細な解析は行われていない。本研究の目的は、進行/再発非小細胞肺癌において癌免疫療法を施行した症例を対象として、肺癌内の細菌叢の同定とその機能解析を行い、免疫チェックポイント阻害剤（抗 PD-1 抗体及び抗 PD-L1 抗体）効果との関連性を検索することである。

【方法】 腫瘍内 PD-L1 蛋白発現強陽性 (TPS \geq 50%) を認め、免疫チェックポイント阻害剤 (immune-check point inhibitor : ICI) による癌免疫療法を施行された非小細胞肺癌 32 症例を対象として肺腫瘍内細菌叢をショットガンメタゲノム解析にて明らかにし癌免疫療法奏効との関連を解析した。

【結果】 RECIST criteria (ver. 1.1) にて ICI による効果判定を行ったところ、Complete response (CR) 0 例、partial response (PR) 18 例、stable disease (SD) 4 例、progression disease (PD) 10 例であった。PR 症例を ICI レスポンダー (n=18) と SD 及び PD 症例を ICI 非レスポンダー (n=14) と定義し、以降の解析に用いた。門レベルにおいて 19 種の肺腫瘍内細菌叢を認めた。p_Firmucutes、p_Proteobacteria、p_Actinobacteria、p_Apicomplexa が上位菌種を占めていた。一方、属レベルでは 121 種の肺腫瘍内細菌叢を認めた。属レベルにおいて ICI レスポンダーでは g_Leuconostoc (p=0.0450)、g_Mesorhizobium (p=0.0306)、g_Tetrasphaera (p=0.0128) を有意に多く認めた。一方、ICI 非レスポンダーでは g_Mucilaginibacter (p=0.0469)、g_Pediococcus (p=0.0208) を有意に多く認めた。ICI レスポンダーと ICI 非レスポンダーとの肺腫瘍内細菌叢の機能解析を行ったところ、統計学的有意差 (p<0.05) のある合計 28 機能が明らかとなった。

ICI レスポンダーと ICI 非レスポンダー間における肺癌腫瘍内細菌叢の相違 (属レベル)

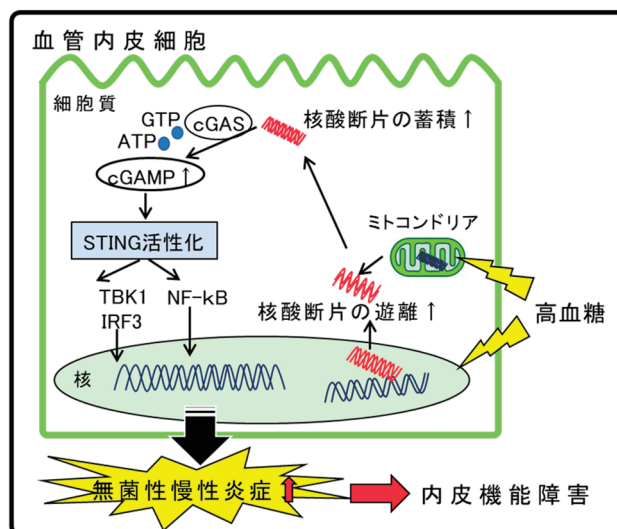


【目的】生活習慣病などによって生じる血管の炎症が動脈硬化の基盤病態である。糖尿病は動脈硬化の最大の危険因子のひとつである。しかし、高血糖が血管における炎症を発症させる機序については十分に検討されたとは言えない。近年、過栄養や老化に伴う核酸障害によって遊離する自己由来の核酸断片が、本来であれば外来微生物由来の核酸断片を認識して生体防御に寄与する核酸受容体を活性化させ、炎症性疾患の発症に関与することが明らかになってきた。そこで本研究の目的は、細胞質内に存在する核酸受容体のひとつである *stimulator of interferon genes* (STING) が糖尿病性の血管内皮障害に関与するかどうかを検討し、糖尿病による血管障害の新規メカニズムとして核酸障害に関連したシグナルの関与を解明し、新規治療標的を探索することである。

【方法】糖尿病は生後8週齢のマウスにストレプトゾシン(STZ)を投与することによって誘導した。野生型(WT)マウスと *STING* 欠損(KO)マウスを用いた。血管における核酸障害は、大動脈における H2AX のリン酸化によって確認した。血管内皮依存性・非依存性の血管弛緩反応は、マウスから摘出した大動脈リング標本を用いて、それぞれアセチルコリンとニトロプルシドに対する反応性から評価した。*STING* アゴニスト(cGAMP)や*STING* アンタゴニスト(C-176)を用いて、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)やWTマウスから摘出した大動脈リング標本を刺激し、*STING* シグナルが血管内皮機能に与える影響を検討した。遺伝子発現は定量的 RT-PCR(qPCR)を、タンパク発現はウエスタンブロッティング法を用いて検討した。

【結果】糖尿病を発症させることで、WTマウスの大動脈における *STING* の発現が増加した。また糖尿病によって、大動脈における H2AX のリン酸化が増加しており、大動脈において核酸障害が生じることが示唆された。WTマウスと *STING*KOマウスはSTZの投与によって、同程度の血糖値の上昇を認め、体重や脂質などの代謝パラメータにも差を認めなかった。両系統ともに糖尿病の発症によって血管内皮依存性血管弛緩反応は悪化した。しかし、*STING*KOマウスの内皮依存性血管弛緩反応は、WTマウスと比べて保たれていた。内皮非依存性の血管弛緩反応には、両系統間で差を認めなかった。また、大動脈における eNOS のリン酸化は *STING*KOマウスでは、WTマウスと比較して保たれていた。*in vitro* 実験において cGAMP は HUVEC における *ICMA-1* や *VCAM-1* などの炎症性物質の発現を有意に増加させたが、C-176 の存在下では、その作用が打ち消された。さらに大動脈リング標本を用いた検討においても、cGAMP は、血管内皮機能を悪化させた。以上から、*STING* シグナルの活性化によって、血管内皮機能が悪化することが確認された。最後に、C-176 の投与を受けた糖尿病マウスにおいては、非治療群と比較して内皮依存性血管弛緩反応が保たれていた。この結果から、*STING* が糖尿病性血管内皮機能障害の治療標的になる可能性が示唆された。

概念図



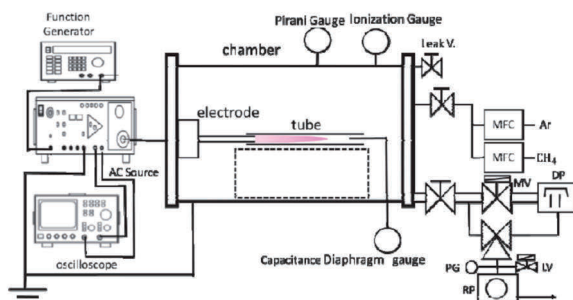
<p>206 DLCによる人工血管開存性の向上の可能性の検討</p>	<p>大澤 晋</p>
---------------------------------------	-------------

【目的】 血管外科では、様々な血管の再建手術を行う。狭窄、閉塞した血管の再建には人工血管や大伏在静脈等の採取可能な自己血管を用いる。しかし、径が 6 mm より小さい人工血管では極端に開存率が落ちる問題がある。そこで我々は、Diamond-Like Carbon (DLC) コーティングで人工血管の開存率を上昇させることができないか？検討を重ねてきた。従来、DLC は高い生体適合性を有することは知られていたものの、樹脂にコーティングできない、管状物質の内腔にコーティングできないという欠点があり、人工血管のコーティング素材としては全く検討もされていなかった。しかし、我々は樹脂チューブ内腔に DLC をコーティングする装置を世界で初めて作製し (Journal of Photopolymer Science and Technology 2018;3:373-377 より)、特許を取得 (特許第 6506787)、DLC コーティングを内腔に施した DLC コーティング延伸ポリテトラフルオロエチレン (PTFE) 人工血管を作製し、実験動物を使用して動脈置換術と動静脈シャント作製術でその機能を検証した。しかしながら、ePTFE の抗血栓性と DLC コーティングの性能は非劣勢を示すに止まり、DLC の機能向上が必要と判断した。DLC はそのほとんどを炭素と水素からなるアモルファスカーボン被膜である。実際の生体膜には、酸素や窒素を含み、カルボキシル基やアンモニウム基を有する。DLC コーティング時に酸素を付加すると、DLC にカルボキシル基を付加することができる。本研究の目的は、酸素付加 DLC コーティング ePTFE 人工血管は従来の DLC に比べてその血液適合性を向上させるのか？人工血管の開存率を向上させるのか？を確認することである。

【方法】 ePTFE 人工血管に酸素付加 DLC コーティングを行う。その成膜条件を最適化して、本研究用の試料を作製する。親水角の確認、DLC コーティング内のカルボキシル基の存在の工学的確認、電子顕微鏡での確認、全血付着試験、血小板付着試験、タンパク付着試験を実施。その後、ヤギを用いた頸動脈置換術を施行し、開存率向上効果を確認する。

【結果】 ePTFE 人工血管 DLC をコーティングする際に、酸素を付加し、カルボキシル基付加 DLC (C-DLC) を ePTFE 人工血管内腔にコーティングすることに成功した。作製した DLC コーティングの存在と、カルボキシル基の導入の成功、成膜の均一性を確認できた。親水角は有意に低下し、人工血管内腔表面の親水性の向上を確認した。血小板付着試験では血小板付着は、通常の ePTFE > 従来の DLC コーティング ePTFE > C-DLC コーティング ePTFE であった。アルブミン吸着は通常の ePTFE < 従来の DLC コーティング ePTFE = C-DLC コーティング ePTFE であり、これらは血液適合性の向上を示唆する所見であった。しかし、全血接触試験では *in vitro* ヒト全血試験で有意な白血球などの有核細胞の付着増加を認め、*in vivo* ラット全血で明確な血栓形成傾向を認めた。Fibrinogen 吸着試験では C-DLC で有意な吸着増加を認め、全血試験の免疫染色では DLC 表面に薄い Fibrin 層が存在しており、Fibrin 付着が親水性上昇、Alb 吸着上昇、血小板付着抑制といった血液適合性向上効果を打ち消しているモノと思われた。残念ながら、動物植込み試験に移ることは意味が無いと考え、DLC へのアンモニア基付加の研究に着手した。カルボキシル基+アンモニア基によって、表面をニュートラルに戻すことで全血付着を抑制し、さらに生体に構造に近づける Biomimic な DLC の開発に着手している。

状物内腔への DLC コーティング装置

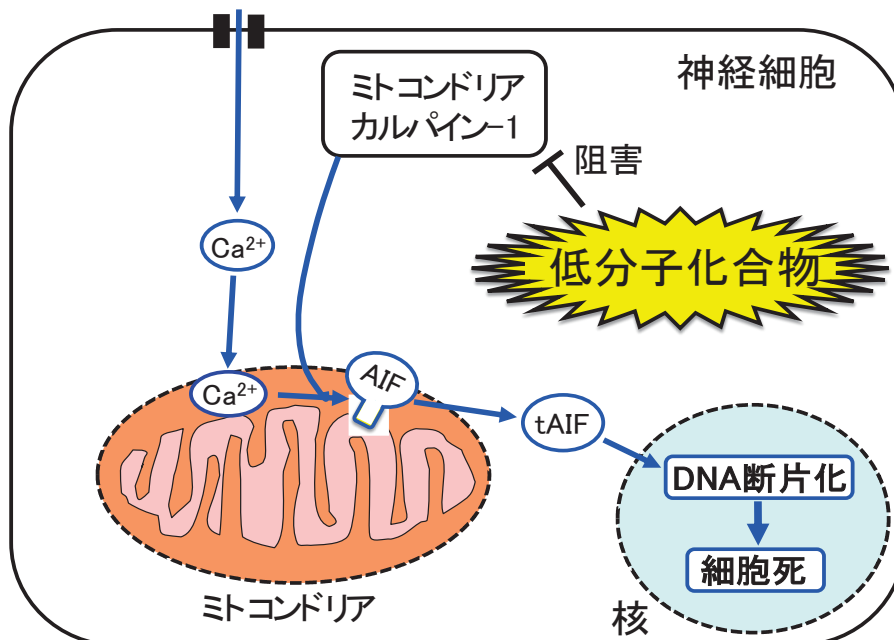


【目的】 人生 100 年時代を迎える日本において、加齢に伴う神経変性疾患に対する治療薬の開発が急がれる。失明原因の第 1 位である緑内障の約 7 割は、眼圧が正常値でも進行することから、正常眼圧緑内障に対する世界初の神経保護療法を開発することを本研究の目的とする。著者らは、網膜の神経細胞死を誘導するミトコンドリアカルパイン-1 を特異的に阻害するペプチドを発見し、点眼による網膜への送達や網膜色素変性モデル動物に対する効果、緑内障モデル動物に対する効果を明らかにした。これらの知見より、ミトコンドリアカルパイン-1 の標的妥当性が実証されたため、本研究では、それを標的とした新たな低分子化合物の探索を行うことを目的とした。

【方法】 本研究では、PDI 阻害剤であるシスタミンならびにシスタミン類縁化合物を候補化合物として薬効を評価した。マウス由来神経細胞 HT22 細胞および正常眼圧緑内障モデルマウスを用いて、各候補化合物の薬理作用を調べた。

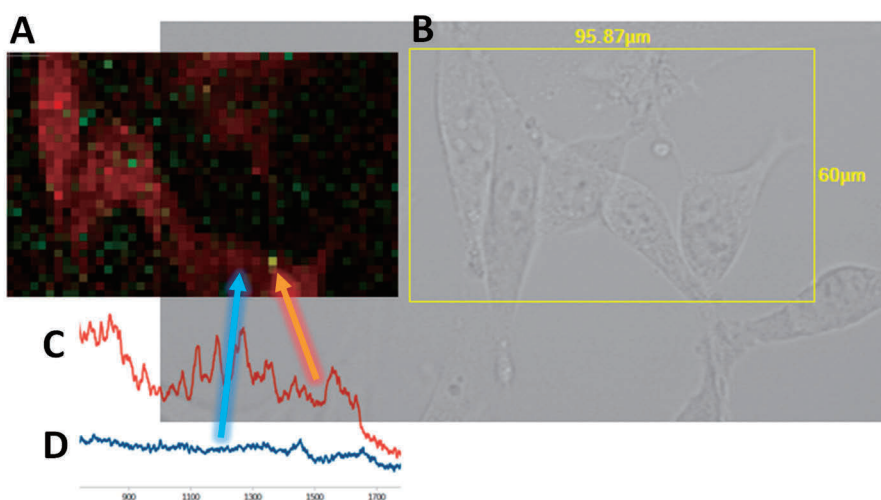
【結果】 HT22 細胞を用いた試験では、シスタミンはカルパイン活性を阻害するだけでなく、細胞死抑制効果を有することが明らかになった。さらに、免疫細胞染色法による HT22 細胞の形態観察を行った結果、シスタミンがグルタミン酸誘導性細胞死を抑制することが示された。次に、NMDA 眼内投与によって作製した緑内障モデルマウスを用いた試験により、網膜神経節細胞死に対するシスタミンの抑制効果を検証した。網膜内網状層の厚さおよび神経節細胞数を計測したところ、シスタミン点眼群で神経節細胞が有意に保護されていることが明らかになった。以上の結果から、シスタミンならびにシスタミン類縁化合物が神経細胞のグルタミン酸誘導性細胞死を抑制することが示されたことから、それらの低分子化合物が正常眼圧緑内障の新たな治療薬となる可能性が見出された。

新規低分子化合物の標的分子



This project is based on the development of new, and extension of existing label-free single-cell analysis methods. There are important trade-offs between sensitivity and invasiveness of single-cell profiling methods available to researchers. The current work aims to develop enhanced classification methods, and evaluate optical spectroscopic techniques for non-invasive and label-free cell profiling, including the use of nanoparticle enhancement to boost the robustness of cell profiling. This report highlights some of the findings of the project that relate to cell discrimination, classification, and dynamics over time, as well as the creation of nanoparticle-enhanced substrates for challenging cell types such as lymphocytes. When conducting single-cell analysis, one feature that stands out is the large amount of inherent biological diversity at the single-cell level. Our laboratory has worked on methods to more accurately characterize cells in terms of their morphology, cellular content, or both, using fully-label free methods. We found that by mapping regions of cell targets, rather than full imaging or single point, we could improve both throughput and classification accuracy. With fully label-free methods, however, especially when using label-free Raman scattering, one limitation is the amount of signal provided, meaning that throughput is still limited compared to label-based methods. An alternative approach is to use nanoparticle enhancement, but the presence of cells on an enhancing substrate can lead to highly random signals, as shown in the figure. One aspect of this project was then to develop spatially averaged nanoparticle-enhanced Raman single-cell analysis.

Surface-enhanced Raman scattering image-based spectroscopy showing inherent variability in spectra of adherent MEF cells on 50 nm AuNP/PLL substrate excited by 785 nm

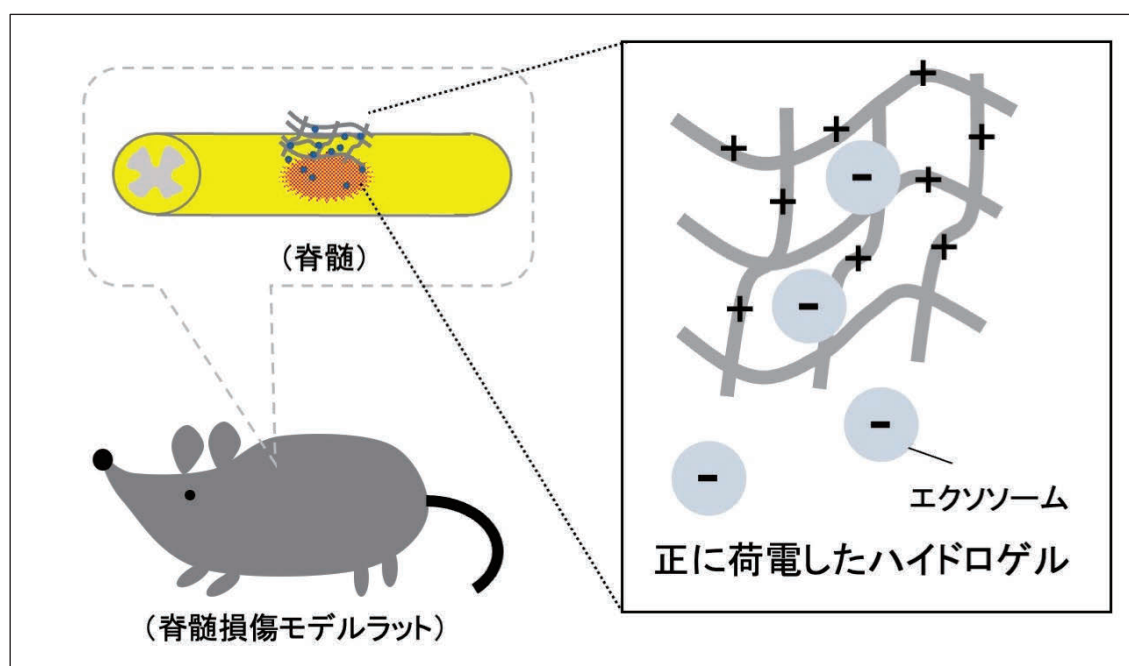


【目的】 生体に存在する間葉系幹細胞は損傷を受けた組織を修復・再生する際の細胞供給源になっていると考えられており、すでに幹細胞を用いた治療が開始されている。近年、これらの組織修復能に幹細胞が分泌するエクソソームが深く関与しており、新たな再生治療のツールとして期待されている。幹細胞由来エクソソームの臨床応用に際して、病変部にエクソソームを長期に留まらせ、効果を持続させるための技術が必要とされている。本研究では、間葉系幹細胞由来エクソソームを用いた新たな治療法の開発を目的に、カチオン化ハイドロゲルを用いたエクソソーム徐放技術を開発し、脊髄損傷げっ歯類モデルを用いてその有効性について評価する。

【方法】 間葉系幹細胞の培養上清から超遠心法を用いてエクソソームを回収し、粒子径の測定およびエクソソームのマーカである TSG101 の検出を行った。次に、等電点 9.0 のゼラチン水溶液にエチレンジアミンを添加し、作製したカチオン化ゼラチンに 160°C で 24、48 または 96 時間の熱架橋を加え、カチオン化ハイドロゲルを作製した。エクソソームをハイドロゲルに含浸させ、コラゲナーゼを用いてゲルを分解することで、ゲルの分解およびエクソソームの徐放能を評価した。また、徐放されたエクソソームの抗炎症効果を評価するために、リポポリサッカライド (LPS) で刺激したマウスミクログリア細胞株 BV-2 を用いて IL-1 β 、TNF- α および IL-6 の mRNA の発現量を評価した。さらに、脊髄損傷モデルラットにエクソソームを浸潤させたハイドロゲルを埋植し、運動機能の変化について評価した。

【結果】 作製したカチオン化ハイドロゲルは全ての架橋条件において白色で多孔性であった。ハイドロゲルは PBS ではほとんど分解されず、コラゲナーゼを添加することで分解された。架橋が弱いゲルほど速く分解され、分解とともにエクソソームが徐放された。また、徐放されたエクソソームは LPS によって刺激された BV-2 の IL-1 β の mRNA 発現量を有意に減少させ、IL-6 の mRNA 発現量においても減少傾向を示した。さらに、エクソソームを浸潤させたハイドロゲルを埋植した脊髄損傷ラットでは、PBS を浸潤させたハイドロゲルを埋植したラットと比較して、有意に運動機能が改善した。

カチオン化ハイドロゲルを用いたエクソソーム徐放技術の開発

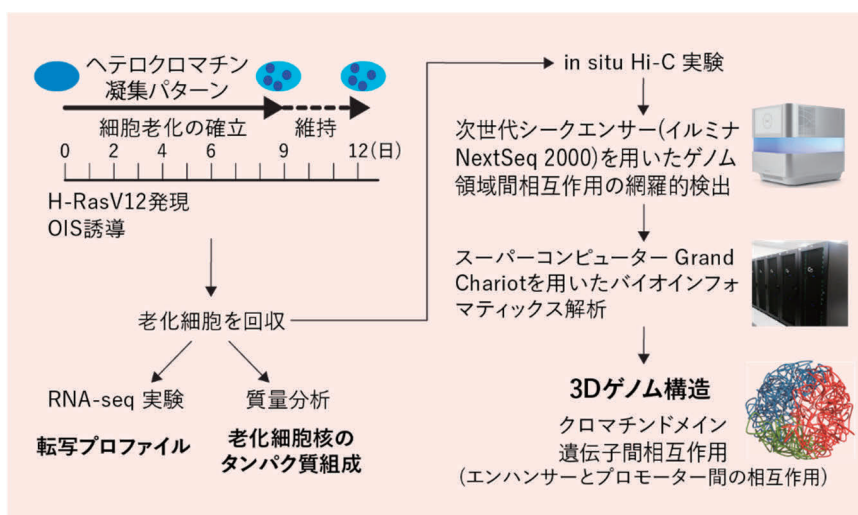


【目的】 細胞老化は、細胞の異常な増殖を防ぐことを通じて、極めて重要ながん抑制メカニズムとして機能している。いったん細胞老化が誘導されると、p53 標的遺伝子や老化関連分泌表現型 (Senescence-Associated Secretory Phenotype : SASP) 因子をコードする遺伝子 (SASP 遺伝子) などのゲノム上に分布する多くの遺伝子の転写が活性化される。これらの細胞老化に関与する遺伝子は、総称して老化遺伝子と呼ばれる。ゲノム広範に分布する老化遺伝子の活性化に加えて、老化細胞では、ゲノムの 3 次元構造 (3D ゲノム構造) の再編成が起こることが知られている。しかし現時点では、老化細胞に形成される 3D ゲノム構造の詳細やその形成機構、および老化細胞に特異的な 3D ゲノム構造と老化遺伝子活性化の関連性は、殆ど理解されていない。これらの問題を解決する足掛かりとして、本研究は、ヒト老化細胞の 3D ゲノム構造と転写プロファイルに加えて、細胞核に含まれるタンパク質組成を決定することを目的に遂行された。

【方法】 ヒト肺組織由来の線維芽細胞 (IMR-90) において、がん遺伝子誘発性老化 (Oncogene-Induced Senescence : OIS) を誘導し、老化細胞の 3D ゲノム構造と転写プロファイルを *in situ* Hi-C と RNA-seq ゲノミクス法を用いて解析した (下図を参照)。また、OIS 誘導後の老化細胞から核を抽出し、質量分析により含まれるタンパク質の変化を定量的に解析した。

【結果】 *in situ* Hi-C 実験によって、老化細胞に形成される 3D ゲノム構造を高解像度で決定することが出来た。その結果を新たなアルゴリズムで解析し、遺伝子のプロモーター領域とエンハンサー領域間の相互作用を網羅的に推定することが出来た。また、RNA-seq 実験によって、老化遺伝子の転写活性化が検出できた。更には、3D ゲノム構造と老化遺伝子の転写活性化の関係性を調べたところ、興味深いことに、遺伝子のプロモーター領域が複数のエンハンサーと相互作用しており、その相互作用の数が転写活性化に寄与していることが推察された。加えて、質量分析により、218 種類のタンパク質が老化細胞の核内で増加しているという興味深い結果も得られた。これらのタンパク質には老化細胞に特異的な 3D ゲノム構造形成に関与していることが推察されるものが含まれていた。

ヒト老化細胞の 3D ゲノム構造、転写プロファイル、核内タンパク質組成の解析

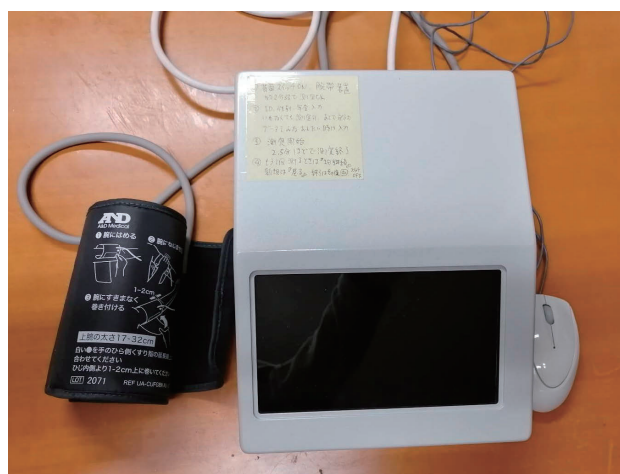


【目的】心筋梗塞や脳梗塞の原因となる動脈硬化は、初期状態であれば生活習慣の見直しによって改善できるため、早期発見が重要である。動脈硬化の早期診断に FMD (Flow Mediated Dilation) 法が用いられている。本法では対象動脈の末梢側を 5 分程度駆血後、開放する。これにより動脈内の血流が増加し、血管内皮細胞に加わる壁せん断応力が上昇することで内皮細胞が分泌する NO 量が增大し血管が拡張する。この血管径の変化率 %FMD を指標として血管内皮機能を評価するものである。%FMD は食事や運動、精神状態など様々な因子に影響を受けるため、一定の環境で繰り返し計測することが望ましいが、血管径測定に超音波画像診断装置を用いるため一般家庭での実施は困難である。そこで我々はカフ式血圧計を応用して血管拡張率を測定する装置を開発している。本装置では、カフで上腕を圧迫し、上腕動脈を細くすることで数 10 秒間壁せん断応力を上昇させる。その後、カフを減圧し静脈圧より少し高い程度の圧力に保つ。ここで血管が拡張するとその分だけ腕も拡張することになるので、カフ圧が若干上昇する。この圧力上昇とカフ内の空気容量から血管拡張量を知ることができる。これにより超音波装置が不要となり、また装置も小型化できるため、一般家庭での使用が可能となる。また、自宅で随時検査できるため、食事や運動、精神状態などの条件を揃えやすくなり、ばらつきの減少が期待できることになる。しかし実際に血管拡張が生じている筈の区間での実際のカフ圧変化は単調増加にはならず、この波形から血管拡張量を推定するのは困難な場合が多かった。そこで本研究では、この手法の精度向上を目指し研究を進めることとした。

【方法】下図のカフ式血管拡張率測定装置を用いた。上腕に巻いたカフを加圧して上腕動脈を駆血後、徐々に減圧することで上腕動脈内腔に高せん断応力を負荷し、そのカフ圧を一定に保ち血管拡張率をカフ圧の変化から推定する装置である。ところがカフ圧変化は単調増加にはならなかった。この原因として、カフの素材の粘弾性特性、腕組織の粘弾性特性を考え、夫々の粘弾性によるカフ圧変化を補正する手法を確立した。そして、ボランティアを対象に、従来の超音波式 FMD 計測とカフ式 FMD 計測を行い、その相関を調べた。

【結果】カフの素材ならびに腕組織の粘弾性を考慮しないで得た従来型カフ式 FMD 値は超音波式 FMD 値と有意な相関を持たなかったが、両者の粘弾性を考慮して求めた改良型カフ式 FMD 値は超音波式 FMD 値と有意な相関を示した。カフならびに腕組織の粘弾性的変形を考慮することで、本装置による FMD 計測の精度向上を図ることができた。

現在試作中の血圧計型動脈硬化度計測装置

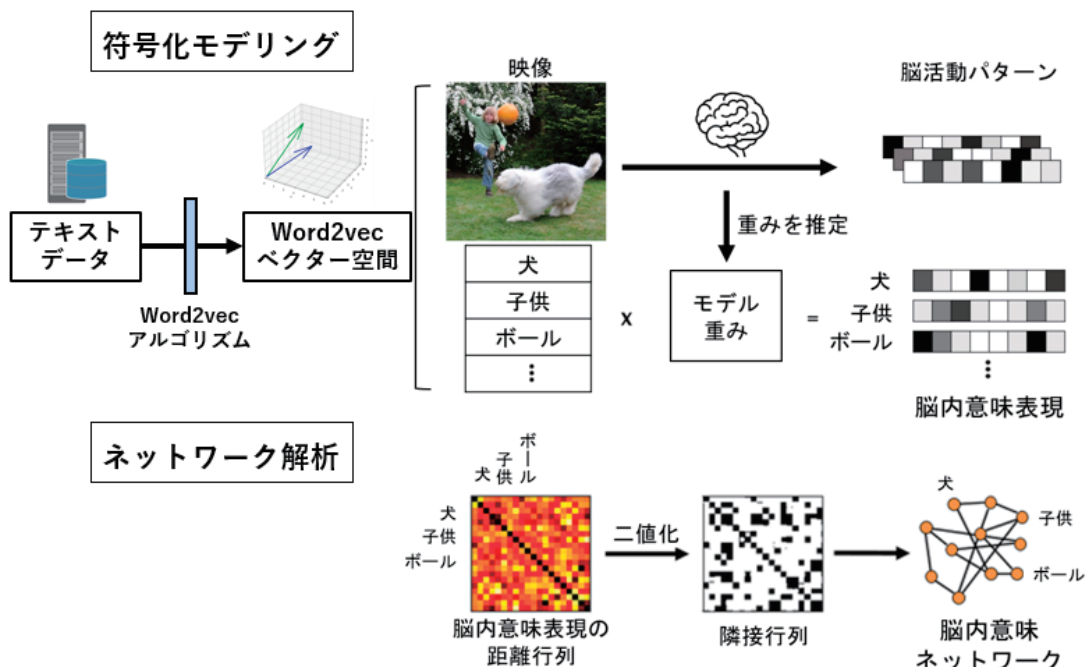


【目的】 統合失調症は妄想などの思考障害を呈する精神疾患であり、なかでも発話内容のまとまりのなさは「連合弛緩」と呼ばれ、重要視されてきた。連合弛緩は意味関係の異常であることがこれまで心理実験により示唆されてきたが、その神経病理は不明であった。本研究では統合失調症における意味関係の異常を脳活動に基づき検討するために、機能的磁気共鳴画像法（fMRI）を用いて脳内意味表象を定量化し、そのネットワーク構造を評価した。

【方法】 統合失調症患者と健常者を対象として、自然動画提示下 fMRI を撮像した。動画情報と脳活動データに自然言語処理アルゴリズム Word2vec とエンコーディング・モデリングを適用し、脳におけるさまざまな意味表象を脳活動パターンとして定量化した。続いて、意味表象間の類似度に基づき構築した脳内意味ネットワークの構造特性を評価した。

【結果】 健常者の脳内意味ネットワークは自然言語と同様に高いスモールワールドネスを示したことから、スモールワールドネスは意味知識に関するネットワークの普遍的性質であることが示唆された。一方、統合失調症の脳内意味ネットワークではスモールワールドネスは減少し、妄想の重症度と負相関していた。また、患者の脳内意味ネットワークは健常者よりも明瞭にカテゴリに区分されていたが、カテゴリ内のネットワーク構造はランダム化していた。本研究により統合失調症の連合弛緩は、脳内において意味ネットワークのランダム化として表れていることが明らかになった。また、本研究の手法は精神疾患患者の主観的体験を患者の発話に依ることなく脳活動から直接評価できる点で、診断、治療の新たな可能性をひらくものと期待される。

脳内意味ネットワーク解析

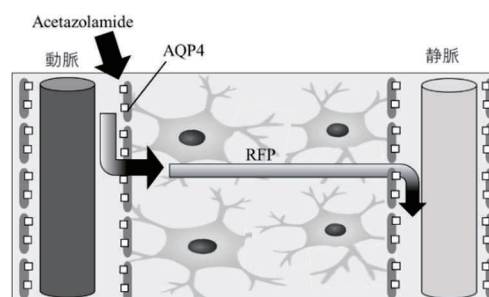


【目的】 超高齢化社会を迎え、アルツハイマー型認知症やパーキンソン病などのアンメットメディカルニーズの高い中枢神経系領域の患者数の増加が大きな社会問題となっている。抗生剤 rifampicin (RFP) は、ドラッグリポジショニングにより認知症に対する新しい治療薬・予防薬開発戦略として期待される。しかしながら、RFP の分子量は約 800 と大きく、RFP の脳への移行が課題の一つである。薬物を脳内へ送達する方法として、近年、鼻腔内投与が注目されており、鼻腔と脳組織、脳脊髄液 (cerebrospinal fluid : CSF) との直接的な繋がりを示唆する実験事実が多く報告されている。さらに、鼻腔内投与による脳内への薬物送達の効率化を目指して、脳細胞外液の循環システムである glymphatic system (GPsys) に注目した。本研究では、基礎的検討として GPsys の脳内動態に対する影響と薬物の物性との関係を明らかにし、GPsys に影響を与えると考えられる acetazolamide (AZA) 併用時の RFP の脳移行性について評価することにより、脳脊髄液の循環を制御することによる新たな脳内薬物送達法を明らかにすることを目的とした (下図)。

【方法】 1. 鼻腔内投与後の脳移行性に対する薬物の物性の影響：モデル薬物として膜透過性の高い antyprine (ANP) および膜透過性の低い ranitidine (RNT) を選択した。マウスに各薬液を腹腔内および鼻腔内投与し、経時的に採血および脳を採取した。採取した脳は嗅球、脳前半部、脳後半部の 3 つの部位に分け、LC/MS により定量を行った。また、microdialysis (MD) 法を用いて、大脳前頭葉部及び脳後方部にプローブを埋設し、大脳前頭部のプローブより薬液を投与後、脳後方のプローブの流出液中の薬物濃度を測定することにより、脳前方から脳後方への薬物移行性を評価した。2. AZA 鼻腔内投与後の脳内における AQP4 発現および CSF 量への影響：マウスに AZA を鼻腔内投与し、5 分後に脳を採取した。RT-PCR 法により脳中の AQP4 の発現を定量し、非投与群と比較した。また、ラットに AZA を鼻腔内投与した後の CSF を大槽穿刺法により採取し、CSF 量を非投与群と比較した。3. AZA 含有 RFP 溶液鼻腔内投与後の脳への移行性評価：マウスに、³H 標識 RFP 溶液あるいは³H 標識 RFP+AZA 溶液を投与し、経時的に採血および脳を採取し、液体シンチレーションカウンターにより測定した。

【結果】 ANP の直接移行率は、嗅球で約 40%、脳前半部、脳後半部では 0% という結果に対し、RNT ではすべての部位で 99% を超えたことから、膜透過性の低い薬物は鼻腔から脳への直接移行の寄与が大きいことが明らかとなった。また、MD 法により、RNT のような膜透過性の低い薬物は脳前方部に投与された薬物の脳内移動は比較的速いことが明らかとなった。次に AZA の影響を評価したところ、鼻腔内投与後の AQP4 発現量は非投与群と比較して、1.5 倍となった。AZA は AQP4 を阻害するという報告もあり、この結果に対してはより詳細に検討する必要がある。CSF 量は、非投与群より AZA 鼻腔内投与群は約 20% 減少することが明らかとなり、この CSF 量の減少に関しては AQP4 の発現量の変化が関与している可能性があると考えられる。最後に脳移行性の評価をしたところ、AZA+RFP 溶液投与群は RFP 溶液投与群と比較して、血漿中濃度が低くなった一方で、脳内濃度は高い値を示した。鼻腔から脳へ直接移行した際に AZA 投与により CSF 量が減少したため、CSF 中で薬物濃度が高まった可能性が示唆された。以上のことから、脳脊髄液循環を制御することにより、RFP の脳移行性を高める可能性が示された。

本研究の概念図

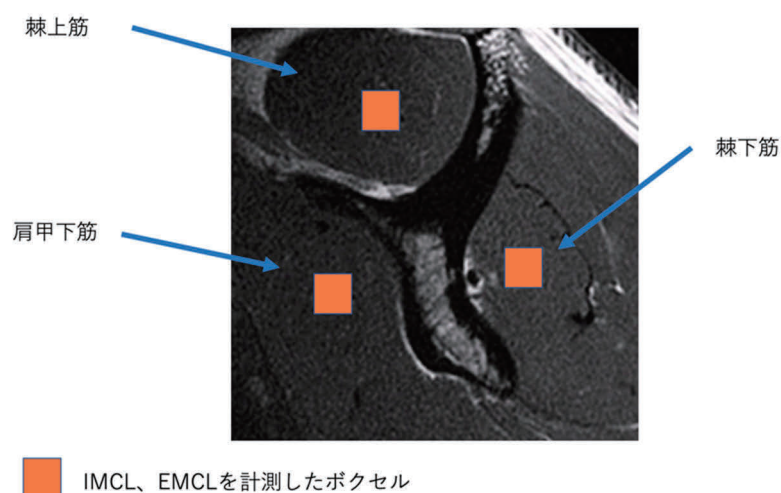


【目的】 肩は人体で最も可動域の大きな関節であり、解剖学的な特徴として関節が骨性に支持されておらず軟部組織によって支持されていることが挙げられる。肩可動域と安定性の両方を担保するものとして最も重要なものは肩腱板構成筋群である。しかし肩腱板は、外傷や加齢などの原因によってしばしば断裂することで機能障害の原因となっている。肩腱板断裂は肩関節障害の原因として最も一般的なものの一つである。50歳以上の男性に多いとされるが、一般検診により得られた知見によると50歳代の13%、60歳代の26%、70歳以上の約50%に肩腱板断裂が起きているとされている。肩腱板断裂が起こると、断裂した腱板構成筋群自体に脂肪浸潤という現象が起こる。腱板構成筋群の脂肪浸潤に関しては過去に複数の研究がなされてきた。しかし過去に行われてきた研究の問題点として、脂肪浸潤の評価をCTやMRIにより行っていることで脂肪量の定量的な測定が出来ないこと、浸潤している脂肪細胞が筋細胞内にあるのか筋細胞外にあるのかを判定することが出来なかったことが挙げられる。現在、主に脳神経系疾患の診断目的に使用されているMRスペクトロスコピーは生体内の代謝産物を非侵襲的に測定し様々な病態解析を行うことができる装置である。しかし腱板構成筋群への応用や腱板断裂に対する治療介入後の脂肪浸潤の変化の測定などは未だ行われていない。我々の研究の目的は①腱板断裂に対する治療介入前後の脂肪変化量を定量化すること②脂肪の局在が分からなかったことを解決することである。

【方法】 非侵襲的評価法を用いて棘上筋・棘下筋・肩甲下筋の細胞内脂肪と細胞外脂肪を評価した。非侵襲的評価法としては手法としてMRスペクトロフィーを用い、医療機械としては3T-MRIを使用した。腱板断裂患者は当院受診者の中から抽出する予定であるが、コントロール群は健常ボランティアの協力のもとに行った。肩に愁訴のない健常ボランティアを対象に、利き手側の肩腱板のMRSスペクトロスコピー撮影を行った（コントロール群目標10例中4例）。

【結果】 以下のシークエンスで健常ボランティア4名に対するMRスペクトロスコピーの撮影を行った（MRI：シーメンス社製Prisma、設定：シークエンスPress、TE 30 ms (270 ms)、TR 2,000 ms、ボクセルサイズ1×1×1 cm）。解析に関してコントロール群全てが収集次第、施行予定である。

MRスペクトロスコピーで計測した箇所を示す

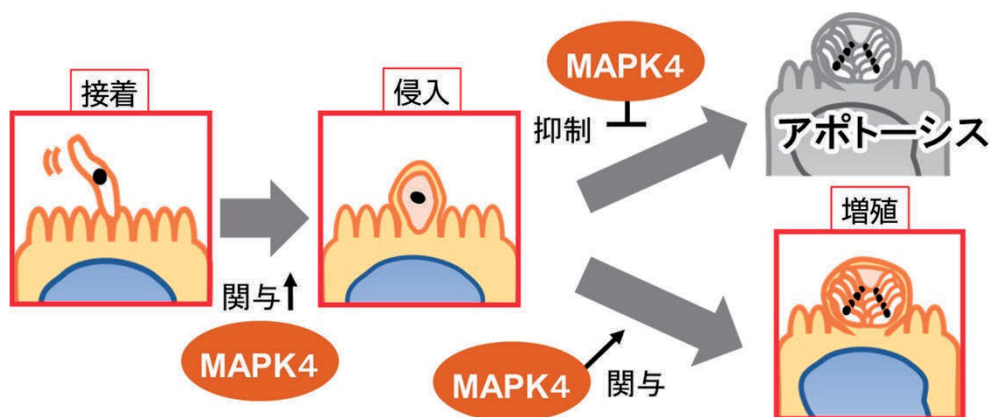


【目的】 *Cryptosporidium parvum* は、ヒトや家畜の腸管上皮細胞に寄生する原虫であり、下痢を主徴とする人獣共通感染症を引き起こす。特に日本では仔ウシの下痢症の一大要因でもあり、国内外において医学・獣医学的に重要な病原体である。しかしながら、未だ有効な予防・治療法は存在せず、新規薬剤開発に向けた研究基盤の構築が喫緊の課題となっている。我々はこれまでに、ヒト腸管上皮癌細胞株 HCT-8 に *C. parvum* を感染させて、HCT-8 細胞中の RNA 発現量の変化を網羅的に解析した。その結果、*C. parvum* の感染時特異的に発現が増加する遺伝子の一つとして、*MAPK4* を見出している。MAP キナーゼは、腸管上皮細胞の自然免疫に重要な因子であることが明らかになっているが、中でも非典型的なリン酸化モチーフを持つ非古典的 MAPK である *MAPK4* は、未だにその機能の多くが明らかとなっておらず、病原体が感染した細胞における *MAPK4* の役割に至っては全く不明である。そこで本研究では、*C. parvum* 感染腸管上皮細胞において宿主細胞の *MAPK4* が果たす役割を明らかにすることを目的とした。

【方法】 CRISPR/Cas9 ゲノム編集法により *MAPK4* を欠損した HCT-8 細胞を作製した。そして、宿主細胞の *MAPK4* が原虫感染に与える影響を評価するため、野生型細胞と *MAPK4* 欠損細胞に *C. parvum* を感染させ、24 時間後の原虫感染量を免疫蛍光染色と qRT-PCR で評価した。次に、原虫の感染制御に重要な自然免疫応答である細胞死に *MAPK4* が与える影響を評価するため、原虫感染時の細胞培養上清中の乳酸脱水素酵素 (LDH) 量と、宿主細胞の Caspase3/7 活性を評価した。また、原虫の各感染ステージに与える影響を評価するため、感染 30 分後の宿主細胞膜への接着量、感染 3 時間後の宿主細胞への侵入量、そして感染 24 時間後の寄生胞内での増殖量を免疫蛍光染色で評価した。さらに、*MAPK4* が持つリン酸化活性の役割を明らかにするため、野生型 HCT-8 細胞に *MAPK4* のドミナントネガティブ変異体を強制発現させ、*MAPK4* の酵素活性を阻害した状態で、感染 24 時間後の原虫感染量を免疫蛍光染色で評価した。

【結果】 *MAPK4* 欠損 HCT-8 細胞の作製に成功した。1) *MAPK4* 欠損細胞への感染 24 時間後の原虫感染量は、野生型細胞と比較して有意に減少した。2) *MAPK4* 欠損細胞では野生型細胞と比較して、原虫感染に伴う宿主細胞死と Caspase3/7 活性が増加した。3) *MAPK4* の有無に関わらず、原虫の宿主細胞膜への接着量に差は見られなかった。4) 原虫の宿主細胞への侵入量と寄生胞内での増殖量は、野生型細胞と比較して *MAPK4* 欠損細胞において有意に減少した。5) *MAPK4* のリン酸化活性を阻害した細胞では、野生型細胞と比較して原虫感染量が有意に減少した。本研究の結果、*C. parvum* が感染した宿主腸管上皮細胞では、宿主の *MAPK4* が原虫感染の成立や維持に重要な役割を果たすことが初めて明らかとなった。この結果は、*MAPK4* は自然免疫応答に重要な因子としてではない、未知の機能の存在を示唆している。

本研究の概念図

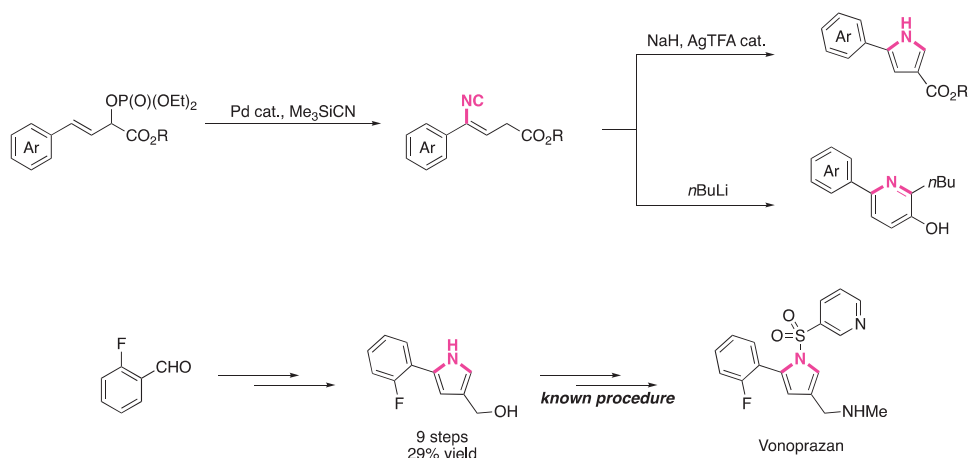


【目的】 ピロール、および、ピリジンは含窒素ヘテロ芳香族化合物であり、医薬品や生理活性物質の中心骨格として広く用いられている。通常、多置換ピロール、および、ピリジンは、それぞれ対応する芳香環の段階的周辺修飾により合成されている。しかし、それはすなわち、多置換ピロールの合成にはピロールを、多置換ピリジンの合成にはピリジンをそれぞれ原料として要することを意味している。医薬品リード化合物の迅速探索のためには、これら、ピロールとピリジンを同一の出発原料から合成する手法の確立が必要不可欠である。そこで、本研究では、官能性ビニルイソニトリルに着目し、多置換ピロールおよび多置換ピリジンの同一出発原料からの構築を目標とする。また、対応する官能性ビニルイソニトリルの効率的供給法の開拓にも挑戦する。

【方法】 我々は 2019 年に、触媒的なアリル位イソシアノ化反応を報告した。この反応は、アリルリン酸エステルを求電子剤とすることで、Pd 触媒存在下、 Me_3SiCN が窒素末端選択的なシアニド源として作用することで、対応するアリルイソニトリルを与えるものであった。本研究では、脱離基となるリン酸エステルの根元に電子求引性のエステル基を導入することで、ビニルイソニトリルを選択的に与える求電子剤をデザインし、実際に反応を行った。得られたビニルイソニトリルにはエステル基が存在するため、そこを足がかりとした変換反応を試みた。具体的には、非求核性塩基を用いることで多置換ピロールを、求核性塩基を加えることで多置換ピリジンの合成を行った。

【結果】 適切に設計されたアリルリン酸エステルを用い、Pd 触媒存在下、求核的イソシアノ化反応を行った。その結果、幅広い基質に対し、良好な収率で目的とするビニルイソニトリルを与える手法の確立に成功した。得られたビニルイソニトリルに対し、非求核性塩基として水素化ナトリウム (NaH)、および、ルイス酸触媒として AgTFA を添加することで THF 中 60°C で速やかにピロール環形成反応が進行し、2,4-二置換ピロールを良好な収率で与えることを見出した。また、求核性塩基である *n*-ブチルリチウムを添加した場合には低収率ながらも対応する 3-ヒドロキシピリジン誘導体を与えることを見出した。特に、前者の反応は、医薬品中間体の合成に実用可能であることを明らかにした。すなわち、2-フルオロベンズアルデヒドを出発物質とすることで、プロトンポンプ阻害薬である Vonoprazan の共通合成中間体を 9 段階、29% の収率で合成することに成功した。この形式全合成では、本研究で開発したビニルイソニトリルの触媒的合成反応とピロール環化反応が鍵段階であった。

ビニルイソニトリルを同一出発物質とする多置換ピロールおよびピリジンの分岐的合成法



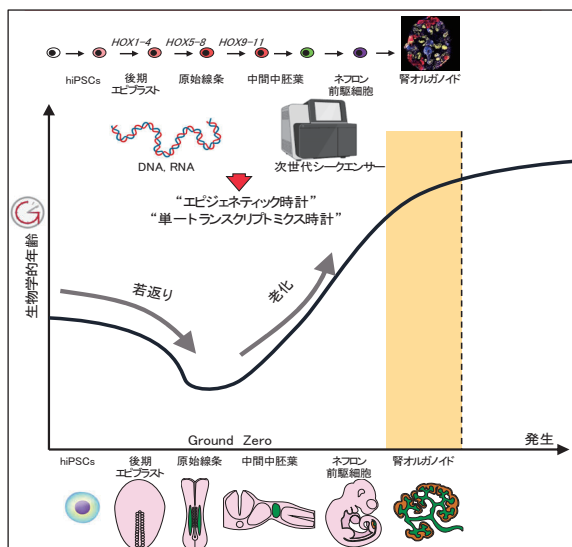
【目的】 近年の技術の進歩により、老化や発生生物学の分野でも機械学習の可能性が引き出されている。今日、老化指標の一つとして加齢時計が提唱された。加齢時計とは、年齢とともに変化するメチル化プロファイルやトランスクリプトームプロファイルに基づき、数学的に導き出された年齢推定法である。特に最近の研究では、初期胚の発生過程における生物学的老化のダイナミクスを追跡し、生物学的年齢が最も低くなるポイント「グランドゼロ」を指摘している。

腎臓の発生は後期エピブラストの細胞が原始線条に移動し、原腸陥入を経て中間中胚葉が形成される。中間中胚葉から尿管芽とネフロン前駆細胞が派生し、後腎（のちの腎臓）をつくる。これまで著者はヒト iPS 細胞から後期エピブラスト、原始線条、中間中胚葉、ネフロン前駆細胞へと単層にて高効率に分化誘導する方法を開発した。この誘導法は世界に先駆けてヒト腎の発生過程を初期から忠実に再現した。著者はヒトの iPS 細胞から胚性腎臓の発生を模倣した分化培養系を用いて、ヒトの胚発生過程における生物学的加齢動態を明らかにした。

【方法】 ヒト iPS 細胞の分化誘導系に加齢時計を適用し、腎の各発生段階のサンプルを分析した。

【結果】 DNA メチル化解析と RNA-seq 解析を行い様々な加齢時計を適用した結果、発生初期の中間中胚葉期で生物学的年齢が最も低くなることが観察され、腎臓の発生における若返りの可能性が示唆された。また主成分分析により、発生過程は加齢と異なる意味を持つ 2 つの過程から構成されている可能性が初めて示唆された。PC1 は発生とともに単調に増加し、PC2 は原始線条期で増加し中胚葉期以降で減少することが明らかになった。さらに興味深いことに、PC1 は初期化のシグネチャーと正の相関を示し、PC2 は負の相関を示した。このことは、PC1 が主に加齢関連遺伝子、PC2 が初期化関連遺伝子である可能性を示している。老化の関連経路の中には、原始線条の段階で活性化され、その後抑制されるものがある。したがって、それらの経路は老化後の若返りを促進する。以上のことから、本研究ではハーバード大学との共同研究にて確立したトランスクリプトミクス時計とヒト iPS 細胞から腎への誘導技術を用いて、ヒト腎の老化の始まりを評価した。その結果、中間中胚葉前後にて生物学的年齢が最小となる「グランドゼロ」が存在することが明らかになった。さらに腎臓の老化におけるエピジェネティック・トランスクリプトミクスな変化に関連する化合物の探索を行うとともに、機械学習を用いた加齢時計とヒト iPS 細胞から腎への誘導技術を用いてヒト腎の発生初期から評価している。本研究はヒト腎の老化の始まりのタイミングを明らかにし、それらの細胞運命を変化させる抗老化薬の開発を行い、慢性腎臓病の新規治療開発に繋がる。

本研究の概要

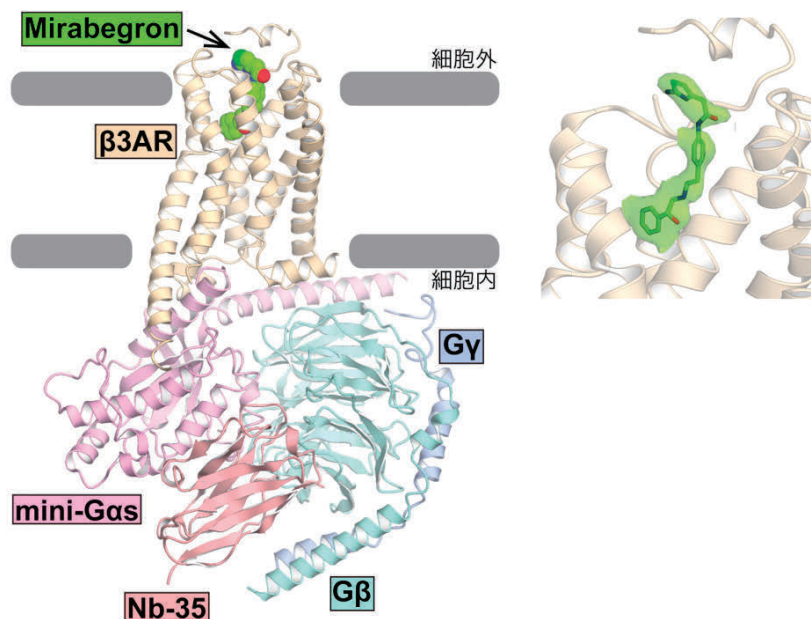


【目的】 アドレナリンは闘争・逃走反応を引き起こすホルモンで、心血管系に大きく作用する。アドレナリンはアドレナリン受容体 (AR) に結合して働く。この受容体は α AR と β AR に分かれ、 β AR はさらに3つのサブタイプがある。これらは心臓や平滑筋など異なる生理的役割を担っている。 β 3AR は脂肪組織の脂肪分解や膀胱の平滑筋の弛緩に関与し、肥満や糖尿病との関連もあるが、種差があるため肥満や糖尿病の治療薬としては承認されていない。しかし、選択的 β 3AR アゴニストは過活動膀胱の治療薬として研究されている。ミラベグロンは過活動膀胱の治療薬として初めて承認された β 3AR アゴニストで、副作用が少ない。ピベグロンも日本で過活動膀胱の治療薬として承認され、過敏性腸症候群の第2相試験中である。しかし、これらの薬剤は臨床用量で β 1AR も刺激するため、心拍数や血圧の上昇を伴う副作用があり、 β 3AR の選択性を向上させる余地がある。最近の β AR の構造解析の進展により、 β AR の薬理学と活性化機構が明らかになっている。しかし、 β 3AR の構造情報がなく、その選択性のメカニズムはほとんど分かっていない。本研究では、ミラベグロンによって活性化された β 3AR とヘテロ三量体Gsタンパク質との複合体のクライオ電子顕微鏡構造を決定し、その結合特性や活性化、選択性の構造的基盤を報告する。こうした構造情報は、新たな治療薬開発に役立つ情報を提供する。

【方法】 クライオ電子顕微鏡法を用いて、ミラベグロン結合型の β 3AR-Gs複合体構造を決定した。

【結果】 β 3AR はクラスA GPCRの典型的な構造を持ち、ミラベグロンは細胞外側の結合ポケットに結合していた。ミラベグロンの結合部位は内在性リガンドが結合するオルソステリックサイトと、細胞外入口付近のエキソサイトの2つの領域に分けることができる。オルソステリックサイトでは、ミラベグロンはAsp3.32 およびAsn7.39 という残基と水素結合を形成し、他の β AR リガンドと同様の結合様式を示していた。一方で、Ser5.42 やSer5.46 との水素結合は観察されず、オルソステリックサイトでのミラベグロンの結合は比較的弱いことが明らかになった。エキソサイトでは、ミラベグロンは細胞外ループ2、3、および膜貫通ヘリックス7といった部分と相互作用していた。これらの相互作用がオルソステリックサイトでの弱い結合を補完し、ミラベグロンが β 3AR に対して高い結合能を示すことが明らかになった。これらの残基は β ARs サブタイプ間で保存性が低く、 β 3AR 選択的なミラベグロンの結合に関与していると考えられる。

β 3AR-Gs タンパク質複合体構造

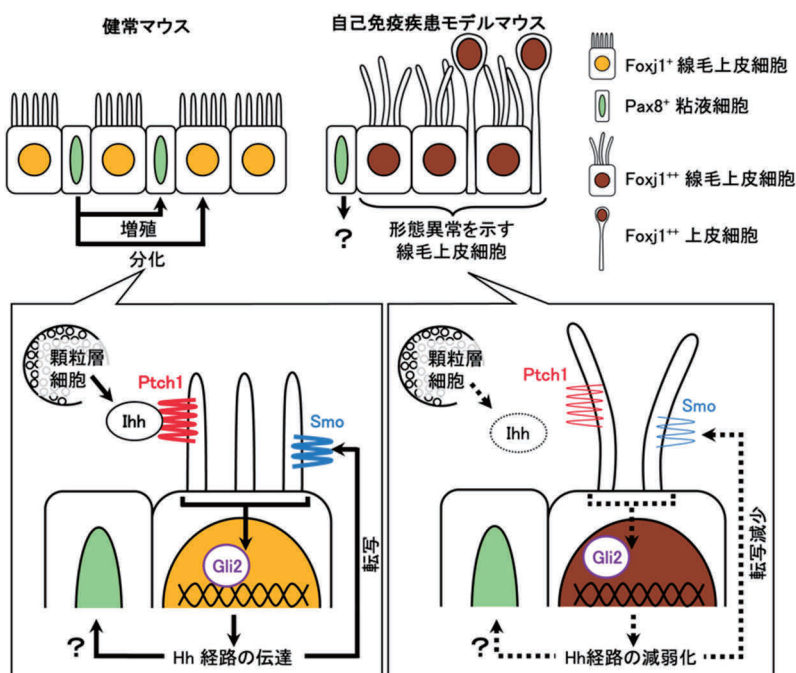


【目的】 雌性生殖器は各々が特有の生殖機能を司り、その機能異常が不妊症に直結する。例えば卵管の卵巣側末端・卵管ロートは、排卵胚を卵管内へ誘導するピックアップ機能を担い、その機能異常・ピックアップ障害は卵管性不妊症の一因となる。しかしその詳細な病態発生機序は不明である。一方我々は、自己免疫疾患モデルマウス *MRL/MpJ-Fas^{lpr/lpr}* (*MRL/lpr*) がピックアップ障害を呈し、その病態には卵管の炎症および線毛上皮の恒常性の破綻が関与することを明らかにした。さらに、卵管ロートのトランスクリプトミクス解析の結果、*MRL/lpr* の卵管ロートでヘッジホッグシグナル伝達経路 (Hh 経路) の減弱化がみられることを発見した。本研究では、*MRL/lpr* の卵管の分子形態学的解析を通し、卵管ロートの形態機能制御における Hh 経路の役割と、その免疫異常との関連を明らかにすることを目的とした。

【方法】 若齢 (3ヶ月齢) および加齢 (6ヶ月齢) のマウスを使用した。健全系統として *C57BL/6N* (*B6*)、卵管ロートの形態異常を呈する自己免疫疾患モデルマウス *MRL/lpr* およびその野生型 *MRL/MpJ* (*MRL/+*) を使用した。卵管ロートを採取し、免疫組織化学、遺伝子発現解析および *in situ* hybridization で Hh 経路の中核分子である *Ptch1*, *Smo*, *Gli1/2/3* およびリガンド (*Shh*, *Dhh*, *Ihh*) の局在・発現を解析した。加えて、卵管上皮の恒常性を制御する *Pax8* と線毛形成を制御する *Foxj1* の局在・発現も解析し、Hh 経路関連分子の発現量との相関性を解析した。

【結果】 全個体で卵管ロートの線毛上に *Ptch1*, *Smo* および *Gli2* が局在した。加齢 *B6* および *MRL/+* では若齢と比べ、Hh 経路関連分子の発現が低下する傾向にあった。加齢 *MRL/lpr* の卵管ロートでは、若齢および他系統と比べ、*Ptch1*, *Smo* および *Gli1* の発現が顕著に低く、*Gli2* の発現が顕著に高かった。加齢 *MRL/lpr* の卵管ロートでは、若齢および他系統と比べ *Pax8* の発現が顕著に低く、*Foxj1* の発現が顕著に高かった。卵管ロートにおいて、若齢の全系統で *Ptch1*, *Smo* および *Gli2* と *Pax8* および *Foxj1* の発現量が正に相関した。一方、*Shh*, *Dhh* および *Ihh* は卵管ロート上皮では検出されず、卵巣の顆粒層細胞で *Ihh* の発現が検出された。以上、マウスの卵管ロートの線毛が Hh 経路を介したシグナル伝達を担い、全身自己免疫異常が Hh 経路の減弱化を通して線毛上皮の恒常性に影響を与える可能性が示唆された。

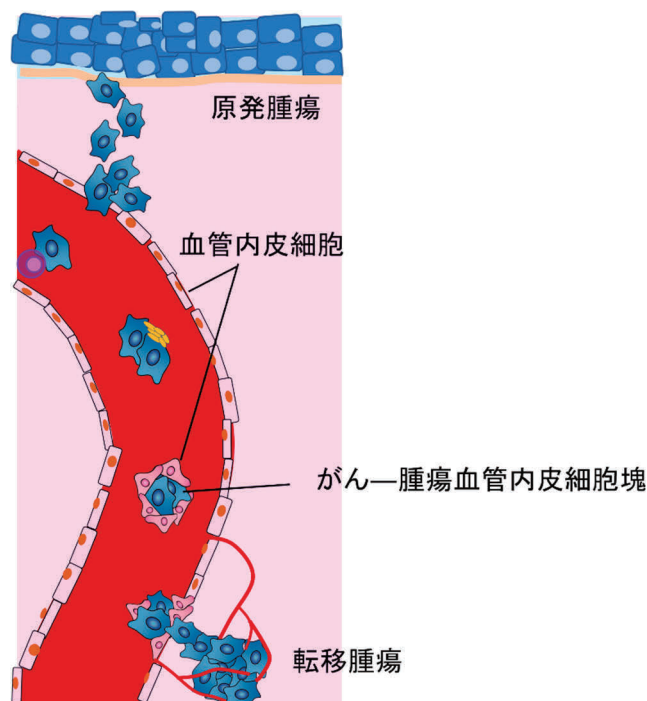
健全マウスと自己免疫疾患モデルマウスにおける卵管ロートの Hh 経路の発現



【目的】 腫瘍血管はがんへの栄養・酸素の供給や、転移の関門としての役割を担っている。我々はこれまで、腫瘍血管を構成する腫瘍血管内皮細胞が様々な異常性を示すことを見出してきた。また、異常性を獲得した腫瘍血管内皮細胞が、がんの転移促進に関与することも報告してきた。近年、血行性転移の際に血管内に侵入したがん細胞は、時にごん細胞同士やその他の間質細胞、血小板などと細胞塊を形成することが知られている。我々はこれまで、腫瘍血管内皮細胞が様々な接着分子や **Angiocrine factor** と呼ばれるサイトカイン等を高く発現することを見出しており、腫瘍血管内皮細胞が接着因子の発現を介してがん細胞と細胞塊を形成し、**Angiocrine factor** などにより循環血流内におけるがん細胞の生存や転移先臓器への接着を促進して、転移をほう助しているのではないかと考えた。本研究では、腫瘍血管内皮細胞ががん細胞と細胞塊を形成することで、血管内侵入したがん細胞の転移形成を促進していると仮説を立て、担癌患者の血液中におけるがん細胞と血管内皮細胞の細胞塊の存在を明らかにするとともに、それらと予後との関連など臨床的意義について分子機構とともに解明することを目的とした。

【方法と結果】 腎癌初期症例の手術摘出組織標本を用いて組織学的に観察したところ、血管腔内に血管内皮細胞で囲まれるがん細胞塊が存在する症例が複数みられた。また、そのような症例では無増悪生存期間が短く、3年以内の再発転移率が高いことが示された。がん細胞塊の形成ががんの悪性化に与える影響について、非接着カルチャープレート上でがん細胞と腫瘍血管内皮細胞を共培養し、がん—腫瘍血管内皮細胞塊を作製し検討した。がん—腫瘍血管内皮細胞塊形成により浸潤能が亢進し、さらにマウス尾静脈注射により、肺転移形成能が高いことが示された。トランスクリプトーム解析により、がん—腫瘍血管内皮細胞塊ががん悪性化に関わる分子機構について検討し、絞り込んだ分子の機能について **siRNA** を用いて検討したところ、分子の発現抑制によりがん—腫瘍血管内皮細胞塊の浸潤能が低下した。これらの腎癌組織における発現と予後との関連についてさらに検討する予定である。

がん—腫瘍血管内皮細胞塊形成によるがんの転移促進

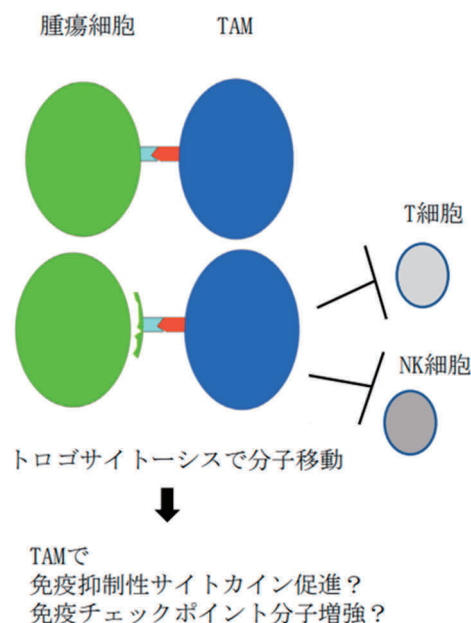


【目的】腫瘍の形成・進展には、腫瘍細胞と微小環境の相互作用が重要である。以前著者はホジキンリンパ腫と腫瘍関連マクロファージ (TAM) の直接接触で、トロゴサイトーシスという細胞同士の直接接触を介した膜移動が生じ、ホジキンリンパ腫の PD-L1/L2 が単球/TAM に受け渡され、この PD-L1/L2 が CD3⁺T 細胞活性の抑制を導いてがん進展に寄与する可能性を示した (図参照)。今回同じ血液がんであり単球/TAM の重要性が示唆されていた多発性骨髄腫と、マクロファージの接触に着目した。In vitro でまずは骨髄腫細胞株とマクロファージを直接接触させ、骨髄腫からマクロファージに移る分子を、RNA-seq や膜蛋白解析を行うことで、mRNA は変化ないが蛋白で上昇した因子に注目することを目的とした。まずそのための条件検討を行った。

【方法】以下の検討を行った。1) 効率よくトロゴサイトーシスが發生する骨髄腫細胞株の同定を試みた。代表的な骨髄腫細胞株である RPMI8226、MM1S、KMS-11、OPM-2 において、公共データベースを用いた RNA 発現解析量解析とパスウェイ解析を行い、トロゴサイトーシスに関与する遺伝子発現が多い細胞株を検討した。2) 蛋白解析を行うためには、腫瘍細胞の蛋白を効率よく回収する系の確立が必要であり、細胞膜に存在する ATP1A1 に注目した。まずは HeLa 細胞において ATP1A1 を過剰発現させ APEX を用いてラベリングすることが可能ならば、今後骨髄腫細胞でも同様の系を用いて膜蛋白回収が可能と考え検討した。3) さらに多発性骨髄腫患者において末梢血の単球の推移と予後の関連を、現在の骨髄腫治療において標準治療である DRd 療法でも重要であることを示せば、治療と単球/TAM の関連が密接にあり本研究の意義が高まると考えられ、DRd 療法を行った当施設における患者と単球の推移についての検討を行った。

【結果】以下の結果を得た。1) RPMI8226 がトロゴサイトーシスに関与の深い「微小管細胞骨格の制御」についての遺伝子発現が多いことが明らかとなり、今後は RPMI8226 を用いることとした。2) Flag-APEX-ATP1A1 を過剰発現させた HeLa 細胞においてバンドが確認でき、今後この系を用いて膜蛋白解析を進めることとした。3) DRd 療法施行前と比べ、施行後単球が減少した際は予後不良となることが明らかとなった。今後本研究を進めていくにあたり、治療による影響、また骨髄腫の抗体薬自身がトロゴサイトーシスを起こすことも知られておりこの影響も加味して、解析を進める必要性が示唆された。

マクロファージへ移った分子の意義を検討する

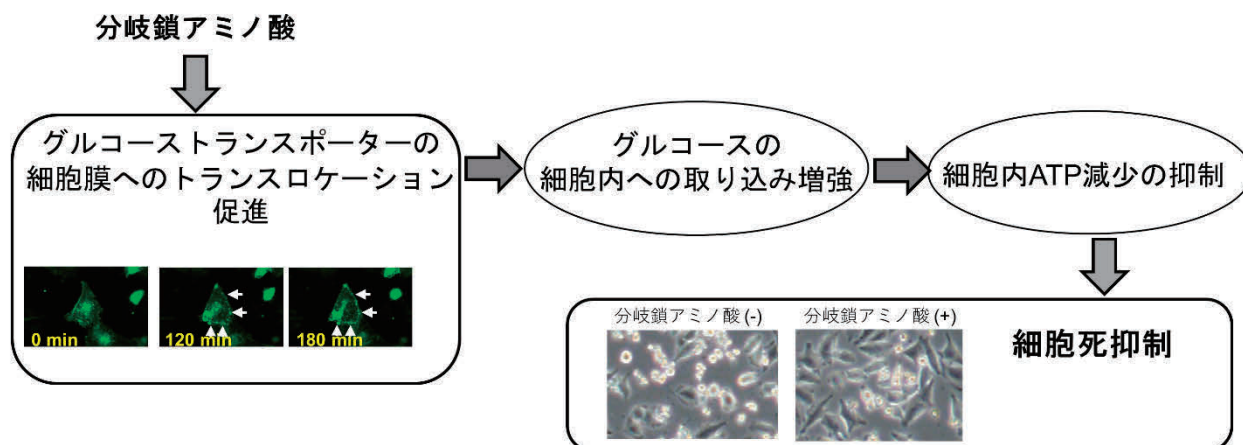


【目的】網膜色素変性は、未だ有効な治療法が確立されていない難病であり、中途失明の主要な原因疾患である。著者らは、現在までに、細胞内のエネルギー（ATP）不足が神経細胞の細胞死を引き起こすとの仮説に基づき検討を行い、細胞内エネルギー源としての分岐鎖アミノ酸に着目し、分岐鎖アミノ酸が小胞体ストレスや電子伝達系阻害ストレス下の培養細胞で、細胞内 ATP 濃度低下を抑制し、細胞死を抑制することを明らかにした。さらに、網膜変性モデルマウスである rd10 や rd12 に対して、分岐鎖アミノ酸が視細胞の変性脱落を抑制し、網膜機能の低下を抑制することを明らかにした。また、著者らは、網膜色素変性患者に対する分岐鎖アミノ酸の視機能低下抑制効果を検討するため、2019 年より医師主導治験を実施した（jRCT2051180072、結果は解析中）。本研究の目的は、分岐鎖アミノ酸による神経細胞保護効果の詳細なメカニズムを解明し、また、網膜色素変性の進行および進行抑制効果を鋭敏にとらえることができるバイオマーカーを開発することで、分岐鎖アミノ酸による網膜色素変性の新規進行抑制治療薬を開発することである。

【方法】アミノ酸飢餓下の HeLa 細胞にロニダミン、heptelidic acid、シコニンによる解糖系の阻害、UK5099 によるクエン酸回路阻害を加え、分岐鎖アミノ酸を添加して細胞内 ATP レベルを測定した。また、アミノ酸飢餓下の HeLa 細胞およびマウス視細胞由来細胞株である 661W 細胞に、蛍光標識された 2-デオキシ-D-グルコース（2-DG）をとりこませ、蛍光量を測定することで、細胞内へのグルコースの取り込みを定量評価した。さらに、Enhanced green fluorescent protein（EGFP）標識したグルコーストランスポーター1 およびグルコーストランスポーター3 を HeLa 細胞および 661W 細胞に強制発現させ、蛍光顕微鏡を用いてグルコーストランスポーターの動態を観察し、分岐鎖アミノ酸によるグルコーストランスポーターのトランスロケーションへの影響を経時的に評価した。また、網膜色素変性の進行を鋭敏にとらえることができるバイオマーカーの開発のため、網膜色素変性患者の視力、視野、光干渉断層計検査の各項目での進行検出感度を比較検討した。

【結果】アミノ酸飢餓下の HeLa 細胞において、ロニダミン、heptelidic acid、シコニンによる解糖系の阻害、および UK5099 の添加によるクエン酸回路の阻害により、細胞内 ATP レベルは有意に低下したが、低下した細胞内 ATP レベルは、分岐鎖アミノ酸添加により回復した。また、分岐鎖アミノ酸投与によって、HeLa 細胞において細胞内へのグルコースの取り込みが有意に増強した。さらに、分岐鎖アミノ酸投与により、HeLa 細胞および 661W 細胞において、グルコーストランスポーターの細胞膜へのトランスロケーションが増強された。網膜色素変性症例での進行検出率は Ellipsoid zone 可視範囲長で最も高かった。また、標準化後の進行速度は、Ellipsoid zone 可視範囲長で最も速く、検査間変動（最小絶対値）は Ellipsoid zone 可視範囲長で最も小さかった。

分岐鎖アミノ酸による細胞内 ATP 減少の抑制と細胞死抑制



223 がんの細胞間不均一性を発見するリードカバレッジ解析 尾崎 遼

【目的】 がんの多くは遺伝的変異により引き起こされるが、これまでバルク RNA-seq (非 1 細胞解像度) を用いた研究から、遺伝子発現量の変動に加え、スプライシング異常や新規転写単位など多様な RNA プロセシングイベントが、浸潤性や転移性といったがんの性質の変化、ステージ判別、予後予測に重要であることが示されている。最近、1 細胞 RNA-seq が、遺伝子発現量に基づいて腫瘍内・腫瘍間不均一性を調べる手段となりつつある。しかし、既存のデータ解析ツールでは遺伝子発現量のみを用いるため、遺伝子発現量に直接現れない異常スプライシングなど RNA レベルの現象が腫瘍や周辺細胞に存在しても見逃してしまうという問題があった。この問題の解決策になるのがリードカバレッジ解析である。リードカバレッジはゲノム上の各領域から転写された RNA 量を表すシグナルの分布であり、多様な RNA プロセシングイベントを反映する。そのため、リードカバレッジを 1 細胞レベルで解析することで、がんの進行や腫瘍不均一性に関連するものの遺伝子発現量解析では見逃される RNA レベルの様々な現象の動態を調べることができる。そこで本研究は、がん 1 細胞 RNA-seq データに対してリードカバレッジ解析を適用する方法論を確立することを目的とした。

【方法】 細胞型や亜型、サンプルの性質を考慮しつつ、がん 1 細胞 RNA-seq データからリードカバレッジが局所的に変動する領域 (ODEGR ; Overlooked Differentially Expressed Gene Regions) を検出する手法 multiODGERfinder を開発した。本手法ではまず各遺伝子座のリードカバレッジ行列に対して非負値行列因子分解を適用し、リードカバレッジの基本パターンを抽出した。次に、細胞集団 (細胞型・細胞亜集団など) 間で、抽出されたリードカバレッジの基本パターンのシグナルの値が変動するかを調べるため、シグナルの値に対して一元配置分散分析を適用した。さらに、一元配置分散分析で有意になった遺伝子座に対し、全ての細胞集団ペアの間でシグナルの値が変動するかを t 検定で確認することで、有意差を示す細胞集団ペアを抽出した。既報のトリプルネガティブ乳がん患者由来の 1 細胞 RNA-seq データを用いて ODEGR を人工的に導入したシミュレーションデータを構築し、multiODGERfinder の精度検証を行った。

【結果】 ODEGR を人工的に導入したシミュレーションデータに multiODGERfinder を適用することで、リードカバレッジが局所的に変動する領域を抽出できるかを検証した。その結果、multiODGERfinder は ODEGR を有する遺伝子座と ODEGR を有しない遺伝子座を判別するタスクにおいて、AUROC が 0.8 以上という高い精度を示した。さらに、複数のトランスクリプト (アイソフォーム) を含む遺伝子座を判別できるかを検証した結果、0.7 以上の AUROC を示した。このことから、multiODGERfinder によるリードカバレッジ解析が、複数の細胞集団を含むがん 1 細胞 RNA-seq データからの ODEGR の発見に寄与できることが示唆された。

1 細胞 RNA-seq データ解析の 2 つの潮流

