

# 研 究 助 成 業 績 報 告 集

2020 年度

公益財団法人 小柳財団

## 創立者あいさつ



人間の健康と美を促進する研究活動  
を支援し、より良い社会環境を  
実現するために

公益財団法人 小柳財団  
設立代表者 小柳 昌之

生命科学の健全な発展に寄与し、技術革新と人間重視の両面からより良い社会環境の実現に貢献したいと願っています。

昨今、日本の経済・社会・文化の持続的な発展のために、研究開発の重要性が再認識されています。研究開発のために様々な形の公的施策や、公益法人等により支援措置が取られ、また民間企業においても共同研究などの様々な改善や工夫が行われています。

既成の概念にとらわれず広い視野と新たな発想を持って、農林水産分野、食品分野、生物学分野において、既に存在する課題はもとより未来を見据えた潜在的な課題に取り組む基礎研究活動を応援することを目的として、公益財団法人小柳財団を設立いたしました。



財団概要	
財団名	公益財団法人 小柳財団
代表理事	大倉一郎
設立	設立 平成 24 年 11 月 1 日
所在地	〒 101-0041 東京都千代田区神田須田町 1-24
TEL	03-5296-6299
FAX	03-5296-6259

役員一覧	
評議員	知野秀雄
評議員	石川和則
評議員	岩崎泰一
代表理事	大倉一郎
理 事	加藤信子
理 事	小柳典子
監 事	宮崎一成

研究助成選考委員名簿		
財団役職	氏 名	経 歴
選考委員長	小澤 俊彦	日本薬科大学 客員教授 放射線医学総合研究所名誉研究員
選考委員	大倉 一郎	東京工業大学 名誉教授 (元東京工業大学副学長)
選考委員	加藤 信子	学校法人 日本女子大学 評議員 国立研究開発法人 科学技術振興機構 NeTEP 評価委員
選考委員	上村 みどり	帝人ファーマ株式会社 生物医学総合研究所創薬薬学研究所 上席研究員
選考委員	畑中 研一	東京大学 生産技術研究所 教授
選考委員	三原 久和	東京工業大学 生命理工学院 教授

# 研究助成業績報告書

2020 年度

[2020 年 4 月 1 日～ 2021 年 9 月 30 日]

公益財団法人 小柳財団

## 目 次

1	イシクラゲが含有するアンチエイジング物質の同定と物性評価 ..... 6 研究者 ▶ 名城大学 景山 伯春
2	核酸光編集技術の開発 ..... 8 研究者 ▶ 東京工業大学・生命理工学院 湯浅 英哉
3	運動による抗うつ効果の分子メカニズムに着眼したうつ病の新規治療薬開発のための基礎研究 ..... 10 研究者 ▶ 大阪大学大学院医学系研究科 近藤 誠
4	カロテノイドのシス型構造固定化技術の開発 ..... 12 研究者 ▶ 名城大学 本田 真己
5	肥満に伴う腸管バリアの破綻とサルコペニア発症リスクの解析 ..... 14 研究者 ▶ 大分大学医学部 後藤 孔郎
6	GTP センサー PI5P4K $\beta$ の膜結合型構造の立体構造解析 ..... 16 研究者 ▶ 大学共同利用機関法人 高エネルギー加速器研究機構 千田 俊哉
7	活性酸素種生成不全ラットから解き明かす活性酸素種の新規生体機能 ..... 18 研究者 ▶ 信州大学 森 政之
8	新しい食品保存料の開発を目指した放線菌由来新規抗菌ペプチドの探索 ..... 21 研究者 ▶ 静岡大学大学院農学領域 小谷 真也
9	乾癬における腸管機能の関わりと食物繊維による改善作用 ..... 23 研究者 ▶ 広島大学大学院統合生命科学研究科 鈴木 卓弥
10	マイクロ RNA を介したウイルス感染細胞の細胞死誘導機構の解明とその制御 ..... 25 研究者 ▶ 埼玉大学 高橋 朋子
11	常圧下での二酸化炭素の触媒的活性化に基づく機能性化合物の簡便合成 ..... 26 研究者 ▶ 大阪市立大学 森内 敏之
12	D 型乳酸アシドーシスを来す短腸症候群患者の腸内フローラの解析と D 型乳酸非産生株の樹立 ..... 28 ～効率的なプロバイオティクスを目指して～ 研究者 ▶ 東北大学 中村 恵美
13	食事由来低分子が脳卒中の予後に及ぼす効果の検証 ..... 30 研究者 ▶ 熊本大学大学院生命科学研究部(薬学系) 香月 博志
14	父親の糖尿病状態が子に与えるエピジェネティックな変化の解明 ..... 32 研究者 ▶ 名古屋大学 一柳 健司
15	光線力学療法を応用した <i>Listeria monocytogenes</i> 制御に関する研究 ..... 34 研究者 ▶ 東京医療保健大学 松村 有里子
16	新規ミトコンドリア活性化機構を介する健康長寿の実現 ..... 36 研究者 ▶ 東京理科大学 樋上 賀一

17	ヒスチジン摂取によるヒスタミン神経系の活性化と健康的脳機能の向上 ..... 37 研究者▶ 東北大学 谷内 一彦
18	マウス体毛の周期的形態変化を生み出す細胞動態の解明 ..... 39 研究者▶ 国立研究開発法人理化学研究所 武尾 真
19	「代謝で免疫を制御する」：Th17/Treg バランスをコントロールする機能性脂質の探索 ..... 40 研究者▶ 公益財団法人かずさ DNA 研究所 遠藤 裕介
20	腸内シュウ酸分解菌によるシュウ酸吸収の分子メカニズムの解明 ..... 42 研究者▶ 岡山大学学術研究院医歯薬学域 山下 敦子
21	光応答性薬剤による細胞治療法の確立 ..... 44 研究者▶ 北海道大学 電子科学研究所 松尾 和哉
22	病気の診断に用いるアミノ酸計測用バイオセンサーの高感度化に関する研究 ..... 46 研究者▶ 広島市立大学 釘宮 章光
23	「可視化 I 型コラーゲン」を利用した、三次元培養細胞モデルによる in vitro コラーゲン評価系の開発 ..... 48 研究者▶ 東京工業大学 田中 利明
24	皮膚の新陳代謝を活発にするコラーゲン様化合物の合成 ..... 50 研究者▶ 芝浦工業大学 須原 義智
25	皮膚疾患に対する善玉菌移植療法の開発を目指した、乾癬発症における ‘善玉・悪玉’細菌叢の同定と評価 ..... 52 研究者▶ 関西医科大学 村山 正承
26	高齢時の皮膚に存在する新たなホルモン作用機序に基づく、 「高齢者皮膚の健康と美」の維持・回復を目指した研究 ..... 53 研究者▶ 昭和大学 原口 省吾
27	男性ホルモン補充療法による血管に対するアンチエイジング効果のマルチオミクス解析 ..... 54 研究者▶ 名古屋市立大学大学院 医学研究科 片岡 智哉
28	新規の NAD <sup>+</sup> 制御因子同定とサルコペニア予防への応用 ..... 56 研究者▶ 東京大学医学部附属病院 五十嵐 正樹
29	骨芽細胞分化における転写共因子 Vgll3 の役割 ..... 58 研究者▶ 岡山大学 池亀 美華
30	歯科ホワイトニングで利用可能な生体分子由来の過酸化水素徐放剤 ..... 60 研究者▶ 大阪市立大学 田部 博康
31	新規細胞膜透過ペプチドを利用したエクソソームノックダウン法の開発 ..... 62 研究者▶ 鳥取大学 岩崎 崇
32	STING を介した I 型インターフェロン応答のリソソームによる収束機構の解明 ..... 65 研究者▶ 東北大学 向井 康治朗
33	細胞外トランスグルタミナーゼ 2 の骨格筋と脂肪組織における多面的機能の解明 ..... 67 研究者▶ 大阪府立大学大学院 山地 亮一
34	分子レベルの局所的酸素濃度測定技術の確立 ..... 69 研究者▶ 大阪市立大学 杉崎 満
35	食餌性オリゴペプチドの存在意義の本質的理解と生活習慣病予防との関連性の解明 ..... 71 研究者▶ 岐阜大学 長岡 利

## 研究テーマ

# イシクラゲが含有するアンチエイジング物質の同定と物性評価

## 研究者

名城大学 景山 伯春（かげやま はくと）

### ①研究の背景及び目的

本研究の目的は、「イシクラゲが細胞内に蓄積する有用物質を単離し、その物性を評価することで天然アンチエイジング物質としての利用可能性を追求すること」である。

イシクラゲは世界各地の土壌に生育する陸棲シアノバクテリアの一種で、食用にもなる。イシクラゲは、自然環境下において強い UV 照射や乾燥など多様な環境ストレスに晒されている。環境ストレスから細胞を保護する為に、イシクラゲはマイコスポリン様アミノ酸 (Mycosporine-like Amino Acid, 以下 MAA とする) を生合成することが知られている。MAA は、藻類やシアノバクテリアが生合成する水溶性の低分子化合物である。高い UV 吸収能を有し、また抗酸化活性などの有用生理活性を示すことから、MAA は化粧品分野や医薬品分野での応用展開が期待されている。イシクラゲには多数の未同定 MAA 種が存在している可能性が高い。本研究では、イシクラゲ *Nostoc commune* から MAA 類化合物を採取し、その単離精製、化学的同定及びアンチエイジングに関わる活性評価を行った。

### ②研究方法

イシクラゲは、愛知県美浜町の山王川河口付近で採取した。その後、採取したイシクラゲのコロニーは実験室内で連続明条件下で 30℃ に保って培養した。採取したイシクラゲ株の遺伝子型については、16S rRNA 遺伝子の塩基配列を解析することによって確認した。野外より採取した「野外コロニー」および実験室で培養した「実験室コロニー」を用いて水抽出液を調製し、抗酸化活性、全フェノール含量、全フラボノイド含量およびフィコビリ蛋白質含量の定量を行うと共に MAA の存在を HPLC 分析によって確認した。検出された 2 種類の MAA については単離精製を行った後に吸収スペクトル解析および LC-MS 解析による分子量の推定を行った。さらに、精製 MAA が有する抗酸化活性およびリゾチームの糖化反応への阻害効果について調査した。

### ③研究成果

#### 【採取したイシクラゲの遺伝子型】

16S rRNA 遺伝子の塩基配列より、本研究で採取したイシクラゲの遺伝子型が新規のものであることが明らかになった。*Nostoc commune* strain Mihama 1 としてデータベースに登録した (GenBank number MN725779)。

#### 【イシクラゲの水抽出液の抗酸化活性、全フェノール含量、全フラボノイド含量およびフィコビリ蛋白質含量】

「野外コロニー」および「実験室コロニー」の水抽出液を用いて ABTS assay によって抗酸化活性を測定したところ、野外由来の抽出液が顕著に活性が高かった。また、抗酸化活性を示す生体物質としてフェノール類、フラボノイド化合物およびフィコビリ蛋白質の含量を定量したところ、同じく野外由来抽出液の含有量が高かった。これらの結果から、野外の環境ストレスが抗酸化物質の生合成を促進していることが示唆された。

### 【イシクラゲが含有する MAA とそのアンチエイジング活性】

本研究で用いた野外由来抽出液中に 2 種類の MAA が検出され、それぞれ RT7 および RT12 と名付けた。これらの吸収極大は共に 334 nm で、分子量は 464 (RT7), 478 (RT12) と推定された。これらの MAA の抗酸化活性を評価したところ、RT7 は活性が検出されたが、RT12 については検出されなかった。RT7 の存在が野外由来抽出液の高い抗酸化活性に影響している可能性が考えられた。一方、糖化反応阻害については RT7, RT12 共に活性を示したが、RT12 よりも RT7 が高い活性を示した。

### 【結論】

本研究では、食用にすることを考慮して、イシクラゲより水抽出液を調製して抗酸化活性を評価した。実験室由来の抽出液と比較して野外由来の抽出液が顕著に活性が高いことから、生育環境によって効能が異なることが示唆された。また、野外由来抽出液に含まれる MAA においては、抗糖化活性が検出された。抗糖化活性は、抗酸化活性と共にアンチエイジングに関与する生理活性である為、本研究の結果はイシクラゲの機能性食品として応用展開の可能性を示すものとなった。

### 【発表論文】

題：Antioxidative and Antiglycative Properties of Mycosporine-Like Amino Acids-Containing Aqueous Extracts Derived from Edible Terrestrial Cyanobacteria

著者：Chananwat KORTEERAKUL, Masaki HONDA, Siripat NGOENNET, Takashi HIBINO, Rungaroon WADITEE-SIRISATTHA, Hakuto KAGEYAMA

雑誌名：Journal of Nutritional Science and Vitaminology

巻：66

号：4

頁：339-346

発表年：2020

## 研究テーマ

# 核酸光編集技術の開発

## 研究者

東京工業大学・生命理工学院 湯浅 英哉 (ゆあさ ひでや)

### ①研究の背景と課題、目標

本研究では、癌治療法を目指した RNA ノックダウンの安全性や薬価の課題を克服し得る方法として、核酸光編集により特定タンパク質機能の ON/OFF を適時に操作する新技術の開拓を目指した。申請者が開発した光増感剤であるニトロピフェニル誘導体 (NBP) はサイズが小さく (Chem. Asian J. 2019, 14, 2067)、核酸二重鎖の狭い溝に収まる。そこで、この NBP をオリゴ核酸に導入した複合体 (NBP-oligoDNA および NBP-oligoRNA) を合成し、標的 DNA・RNA に作用させ特定の位置のグアニン (G) を光酸化してオキソグアニン (G') とすることで、DNA の光点変異と RNA の光ノックダウンを惹起する方法を開発した。最終的には、癌化により発現が亢進するグルコース輸送体 (GLUT) の発現を阻害することにより癌細胞を死滅させることが狙いである。

### ②手法と結果

NBP-oligoDNA (5'-TTOOU \* OOOOOOOTTTTTTTTTTTTTT-3', U \* は NBP 結合、O の 8 個は T で 1 個は C) 9 種類とその相補鎖 (3'-AAQQAQQQQQQA AAAAAAAAAAAAAA-5', Q のうち 8 個は A で 1 個は G) を合成した。G の位置は、Q の 3' 末端側から G (-2)、G (-1)、G (+1)、G (+2) … G (+7) とする。これらの DNA 二重鎖に光照射し G を酸化後、DNA の酵素分解、HPLC による G の残存率から酸化の進行を評価した。G (-2) から G (+7) までの残存率は、85%、114%、89%、93%、101%、79%、36%、33%、32% となり、G (+5) から G (+7) が特に酸化されやすいことがわかった。また、G (+5) については電気泳動によって DNA の切断位置が確認された。NBP の代わりにアセチルピフェニル誘導体 (KBP) を増感剤に用いても DNA 中 G の光酸化が進行することを確認した。ただし、KBP は一電子酸化機構が主であり、化学選択性や毒性に課題がある。NBP を用いた光酸化は主にマイルドな一重項酸化によるものであることがスカベンジャー実験で確認された。同様の光酸化反応は RNA 二重鎖でも検討した (上記 NBP-oligoDNA の T を U に置換した RNA を合成)。その結果、G (-1)、G (+1)、G (+2)、G (+3) で G 残存率が 36% ~ 48% となり、選択性が顕著ではなかった。いっぽう、RNA を生体に投与する場合は酵素耐性のためにリン酸エステル類似構造としてホスホロチオエートを用いるのが一般的である。この場合、硫黄原子が酸化されることにより G の光酸化効率が低下する恐れがある。そこで上記 RNA をホスホロチオエートに置換した BP-oligoRNA を用いて RNA の光酸化を行ったところ、やはり光酸化率が低下した (G 残存率 92%)。NBP 結合部位近くのヌクレオチドは通常のリン酸エステルでつなぐ必要性が明らかとなった。以上の結果を踏まえ、グルコース輸送体 (GLUT1) の RNA 配列の一部 (3'-GGUACCGUCGCGACG-5') を標的とする NBP-oligoRNA である、5'-CCAU \* IICAICICU \* IC-3' を合成した。RNA 骨格の核酸は全て 2'-OMe を持つリボースとし、自己酸化を防ぐために G の代わりにイノシン (I) を使用した。NBP を 2 か所の U に導入し (U \*)、自己酸化を防ぐためにホスホロチオエートは用いなかった。合成した NBP-oligoRNA を前立腺がん細胞株 PC3 に投与し、光照射 (365 nm LED) を行い 1 日培養した後、細胞から全タンパク質を抽出しウェスタンブロッティングを行うことにより、GLUT1 が 100% 消失つまりノックダ



ウンされていることを確認した。今後、この手法により生じる断片化した RNA のシーケンス解析および GLUT1 以外に新に生成するタンパク質の解析を行う。

### ③結論と展望

NBP-oligoRNA を用いた GLUT1 の光ノックダウンが in vitro で有効であることが判明した。また、NBP-oligoDNA と NBP-oligoRNA による相補鎖の光酸化の位置選択性について有用な知見が得られた。光ノックダウンの癌治療への応用に一歩近づく結果となった。今後、マウス実験により本光ノックダウンの in vivo での有用性を検証していく予定である。また、フェムト秒パルスレーザーを用いた近赤外光の二光子励起により、深部がんへの当光ノックダウンの有効性についても検証を加えていく。

## 研究テーマ

# 運動による抗うつ効果の分子メカニズムに着眼したうつ病の新規治療薬開発のための基礎研究

## 研究者

大阪大学大学院医学系研究科 近藤 誠（こんどう まこと）

### ①研究の背景及び目的

WHO の報告によれば、うつ病患者は世界で推計 3 億人を超えており、うつ病はわれわれにとって身近な精神疾患である。現在、うつ病治療には選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (Selective serotonin reuptake inhibitor: SSRI) を主とする抗うつ薬が用いられているが、既存の抗うつ薬が奏功しない、いわゆる治療抵抗性うつ病の患者が多く存在し、大きな問題となっている。従って、うつ病に対する新規治療薬の開発が求められている。

運動には抗うつ効果がある。近年我々は、運動による海馬神経新生の増加や抗うつ効果にセロトニン 3 型受容体 (5HT3R) が必須の役割を果たしていることを見出した。本研究では、運動による抗うつ効果に着目し、5HT3R を介する海馬神経新生および抗うつ効果の分子メカニズムの解析により、うつ病の新規治療薬開発を目指す。

### ②研究方法

マウスを用いた行動薬理学的解析、海馬神経新生の組織学的解析、脳マイクロダイアリシス解析を行った。

### ③研究成果

5HT3R アゴニストを野生型マウスに投与すると、抗うつ効果を認めた。野生型マウスに Fluoxetine を投与すると、濃度依存的に抗うつ効果が得られた。また、5HT3RKO マウスにおいても、Fluoxetine により野生型マウスと同程度の抗うつ効果が得られた。野生型マウスに Fluoxetine と 5HT3R アゴニストを同時に投与すると、より強い抗うつ効果が得られ、5HT3R アゴニストは Fluoxetine と異なるメカニズムであることが示唆された。

抗うつ効果の発現には、海馬神経新生が重要と考えられている。そこで、5HT3R アゴニストが海馬神経新生に与える影響を検討した。野生型マウスでは、3 日間のアゴニスト投与により、海馬歯状回における分裂細胞や神経前駆細胞の増加が見られた。一方、Fluoxetine では、野生型マウスにおいて 3 週間の慢性投与により分裂細胞や神経前駆細胞の増加が見られた。また、5HT3RKO マウスにおいても同程度の増加が見られた。さらに、野生型マウスに Fluoxetine とアゴニストを同時投与すると、より多くの分裂細胞や神経前駆細胞の増加が見られ、5HT3R アゴニストは Fluoxetine と異なるメカニズムで海馬神経新生を増加させることが示唆された。

次に、5HT3R レポーターマウスの海馬の形態学的解析により、5HT3R は海馬歯状回の顆粒細胞下帯に多く発現しており、神経栄養因子の IGF1 (insulin-like growth factor 1) と同一神経細胞に発現していることを明らかにした。さらに、in vivo マイクロダイアリシス法を用いて、海馬における IGF1 放出を解析した結果、野生型マウスに 5HT3R アゴニストを投与すると、海馬の IGF1 濃度は増加したが、血清 IGF1 濃度は変化しなかった。一方、野生型マウスに Fluoxetine を投与しても海馬の細胞外液中 IGF1 濃度に変

化はなかった。以上より、5HT3R アゴニストは海馬の IGF1 放出を促進することが示唆された。

続いて、5HT3R を介する海馬の IGF1 放出と海馬神経新生の関連について形態学的に検討を行った。野生型マウスにアゴニストを投与すると、海馬歯状回における神経新生が増加するが、IGF1 受容体アンタゴニストを海馬内に投与すると、増加は抑制された。すなわち、5HT3R を介する海馬神経新生の増加は、海馬で放出された IGF1 を介するシグナル経路によることが示唆された。

今後は、本研究成果を重要な基盤とし、新たなうつ病モデルを用いた検討を行うことで、5HT3R を介するメカニズムのさらなる解明を進めていくとともに、運動の抗うつメカニズムに基づいた新たなうつ病治療薬の開発を目指し発展させていきたい。

## 研究テーマ

# カロテノイドのシス型構造固定化技術の開発

## 研究者

名城大学 本田 真己 (ほんだ まさき)

### ①研究の背景及び目的

カロテノイドは分子内に多くの共役二重結合を有し、天然では二重結合が全てトランス体のオールトランス型として存在している。一方、動物体内や一部の加工食品においては、二重結合の一部がシス異性化したシス型カロテノイドが豊富に存在しており、近年の研究でオールトランス型よりシス型カロテノイドの方が、体内吸収性および機能性(抗酸化作用、抗癌作用など)が優れていることが報告されている。一例として、トマトに豊富に含まれるリコピンは、シス型の方がオールトランス型より8倍以上体内吸収性が高いことが、ヒト試験において実証されている(Cooperstone et al., Nutr. Food Res., 2015)。加えて、アスタキサンチンはオールトランス型と比べてシス型の方が高い抗酸化作用を示し、抗炎症作用やアンチエイジング効果も高いことが報告されている(Yang et al., J. Agric. Food Chem, 2019)。このように、シス型カロテノイドの機能優位性が近年報告されたことから、オールトランス型からシス型カロテノイドへの効率的な変換技術の開発が盛んに検討されるようになった。我々も、熱や光を用いた効率的な異性化技術を開発した(Honda et al., Molecules, 2019)。しかし、現時点シス型カロテノイドを訴求した製品は上市されていない。これは、シス型カロテノイドの保管安定性が低いためであると考えられる。すなわち、シス型カロテノイドは保管中に変換前の構造(オールトランス型)に戻ってしまうため、品質(シス型比率)を保持できないことが、シス型カロテノイド製品の上市を妨げる主要因となっている(Murakami et al., Food Chem., 2018)。一方、動物体内や一部の加工食品において、シス型カロテノイドは安定的に存在していることから、それらの系においては何らかの要因によりシス型構造が固定化(安定化)されていることが推察される。

以上より、本研究では、動物体内や一部の加工食品においてシス型カロテノイドが安定的に存在している事実を参考に、シス型カロテノイド構造の固定化技術の開発を目指す。

### ②研究方法

#### i) 可食性油脂によるシス型アスタキサンチンの安定化

シス型比率を高めたアスタキサンチン(約80%)を計24種類の可食性の油脂(シソ油、アマニ油、グリーンナッツ油、ヘンプシード油、グレープシード油、ダイズ油、コーン油、ゴマ油、焙煎ゴマ油、マスタード油、ナタネ油、アルガン油、コメ油、ピーナッツ油、ベニバナ油、オリーブ油、マカダミアナッツ油、ヒマワリ油、パーム油、ココナッツ油、ツナ油、サケ肝油、牛脂、ラード)にそれぞれ懸濁し、30℃で6週間保管後のシス型比率の変化を調査した。

#### ii) 添加物によるシス型アスタキサンチンの安定化

シス型比率を高めたアスタキサンチン(約80%)の油脂懸濁液に、抗酸化剤などの計22種類の添加剤( $\alpha$ -トコフェロール、BHA、BHT、没食子酸プロピル、アスコルビン酸、クルクミン、レスベラトロール、コエンザイム Q10、 $\beta$ -カロテン、アリルイソチオシアネート、スルフォラファン、ジアリルジスルフィド、ジアリルトリスルフィド、EDTA、クエン酸、サポニン、メタリン酸ナトリウム、酢酸カル

シウム水酸化マグネシウム、ヨウ素、塩化鉄Ⅲ、塩化銅Ⅱ)を加えて、30℃で6週間保管後のシス型比率の変化を調査した。

### ③研究成果

#### i) 可食性油脂によるシス型アスタキサンチンの安定化

6週間の保管により、すべての油脂においてアスタキサンチンのシス型比率は減少したが、ダイズ油やヒマワリ油、コメ油などの特定の油脂を懸濁媒体に用いることにより、その減少を有意に抑制できることを明らかにした(図1)。

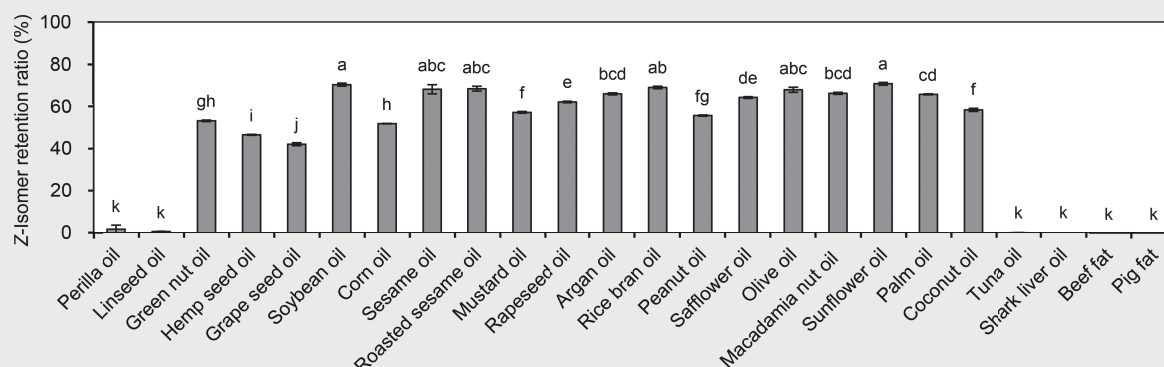


図1 懸濁媒体(可食性油脂)の種類がシス型アスタキサンチンの安定性に及ぼす影響(30℃、6週間)

#### ii) 添加物によるシス型アスタキサンチンの安定化

6週間の保管により、すべての油脂においてアスタキサンチンのシス型比率は減少したが、 $\alpha$ -トコフェロールやアスコルビン酸などの特定の抗酸化剤の添加により、その減少を有意に抑制できることを明らかにした(図2)。

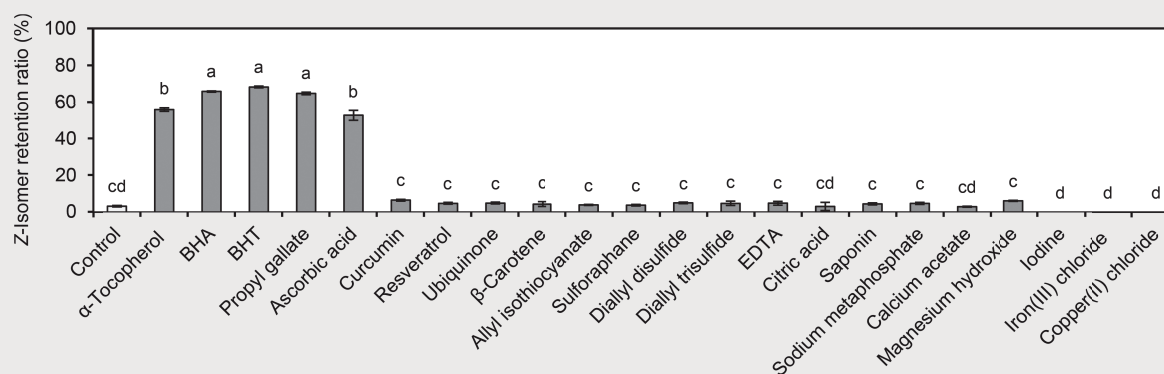


図2 添加剤の種類がシス型アスタキサンチンの安定性に及ぼす影響(30℃、6週間)

※上記研究成果は国際科学雑誌(Honda et al., Food Chem. 352, 129371, 2021)に掲載された(論文の謝辞に、本財団の助成を受けた旨の記載有り)。

## 研究テーマ

# 肥満に伴う腸管バリアの破綻とサルコペニア発症リスクの解析

## 研究者

大分大学医学部 後藤 孔郎（ごとう こうろう）

### ①研究の背景と目標

加齢性筋肉減弱症（サルコペニア）は、寝たきりや要介護状態につながる転倒の要因の1つであり、その成因解明や予防法の確立が注目されている。一方、肥満は肝臓や腎臓などの多臓器に炎症性変化をもたらすことが知られており、腸や骨格筋にも同様な炎症性変化をもたらすことが推測される。実際、肥満とサルコペニアを合併した肥満サルコペニアでは、骨格筋の炎症性変化がみられる。また、高脂肪餌負荷した動物の骨格筋では、骨格筋重量の減少のみならず、骨格筋内での有意な炎症性細胞の浸潤およびTNF- $\alpha$ の発現増加が認められている。またサルコペニアの特徴として速筋線維の萎縮があるが、高脂肪餌負荷では速筋線維の肥大誘導をもたらすIL-15の発現が低下することも報告されている。加齢では遅筋線維は維持されるが、速筋線維が減少することが明らかであり、上記の動物実験の結果と矛盾しない。したがって、骨格筋内での炎症性変化がIL-15発現を低下させ、速筋線維が減少しサルコペニアを発症させているということが推測されている。

一方、肥満は腸内細菌叢を悪化させ、いわゆる“悪玉菌”から炎症惹起物質であるエンドトキシンが合成される。また、肥満に伴う小腸内での炎症性変化によって腸管バリアが破綻し、へと放出され、体循環を介して全身に炎症性病変をもたらすと考えられている。これまで申請者は、大豆の摂取が肥満による腸内環境の改善のみならず、脳内での炎症性変化をも改善させることを明らかにしている。

近年、デンプンの一部は消化されずに下部消化管に運ばれることが明らかになり、レジスタントスターチ（酵素抵抗性デンプン、RS）といわれている。RSは腸内環境改善効果や炎症性腸疾患予防効果などが報告されている。今回、肥満モデル動物にみられる骨格筋炎症性変化が、腸内環境改善作用をもつRSの摂取によって改善するか検討する。本研究の目的は、「RSの摂取によって肥満に伴う腸内細菌叢悪化もしくは腸管バリア破綻の改善が、サルコペニア発症予防に有効である」、ということを明らかにすることである。

### ②研究計画

雄ラットに通常食または高脂肪食を2ヶ月摂取させ、通常食群と高脂肪食群に分ける。また各群をRS群（通常食および高脂肪食に10%RSを添加）とコントロール（10%RSを添加しない）群に分ける。したがって、通常食+コントロール群、通常食+RS群、高脂肪食+コントロール群、高脂肪食+RS群の4群を作成する。

#### [1] 小腸内の炎症性変化に関する評価：

- 1) 末梢血のLPS濃度を測定する。
- 2) 小腸内の炎症性サイトカインであるTNF- $\alpha$ 発現を評価する。
- 3) 小腸内における炎症性マクロファージ（M1）浸潤を組織学的に評価する。
- 4) 小腸内における腸管バリア機能としてZO-1タンパク質発現を組織学的に評価する。

#### [2] 骨格筋内の炎症性変化に関する評価：

- 1) 骨格筋（大腿筋）を用いて、TNF- $\alpha$ 発現を評価する。



- 2) 骨格筋から分泌する IL-15 発現を評価する。
- 3) 骨格筋の速筋線維の萎縮を評価するため、速筋に特異的なタンパク質である fast-myosin を用いた免疫組織染色を施行する。

### ③研究の結果

#### [1] 小腸内の炎症性変化に関する評価：

- 1) 高脂肪食投与によって血中 LPS 濃度が増加した。このような変化は RS の投与によって抑制された。
- 2) 高脂肪食投与によって小腸内 TNF-alpha 発現が亢進したが、RS を投与すると有意に抑制された。
- 3) TNF-alpha 発現と同様に、高脂肪食は小腸内の炎症性マクロファージの浸潤を促進させるが、RS を投与すると炎症性マクロファージの浸潤が軽減されるのを認めた。
- 4) 高脂肪食は小腸のバリア機能を低下させるが、RS の投与によってその低下は軽減された。

#### [2] 骨格筋内の炎症性変化に関する評価：

- 1) 高脂肪食投与によって骨格筋内の TNF-alpha 発現が増加したが、このような変化は RS の投与によって抑制された。
- 2) 高脂肪食投与によって速筋繊維の増大に必要な IL-15 の骨格筋内発現が低下したが、RS を投与するとそのような変化は有意に抑制された。
- 3) 高脂肪食投与は速筋繊維を萎縮させたが、RS を摂取させるとそのような萎縮性変化は軽減された。

### ④研究の考察

肥満はインスリン抵抗性を基盤としたメタボリック症候群の基盤となる状態である。サルコペニアと肥満の合併を表す肥満サルコペニアは単なる病態の組合せではなく、代謝異常や機能障害がより強く認められる。また、肥満は全身の軽度慢性炎症性疾患とされており、事実、脂肪組織では TNF-alpha、IL-1 $\beta$  などの炎症性サイトカインが生成され、筋萎縮やサルコペニアの進行につながると推測されている。このようなインスリン抵抗性や炎症とサルコペニアを結びつける機序として、酸化ストレスが考えられている。近年、サルコペニアに対するマイオカインの意義が注目されている。骨格筋は運動器としての役割のほか、生理活性物質を分泌する内分泌臓器としての役割をも果たすことが近年報告されている。「マイオカイン」と名づけられたこれらの物質には IL-6、IL-8、IL-15、などが知られている。さらに、このようなマイオカイン発現の低下が速筋繊維の萎縮をもたらし、肥満サルコペニア発症に大きく関与すると考えられている。近年、肥満と腸内環境との関連が重要視されている。肥満による腸管側の変化として腸管バリア機能の低下による腸管透過性の亢進があげられる。動物性脂肪を持続的・多量に摂取したヒトやマウスの腸内フローラは大きく変容し、消化管の炎症、獲得免疫系細胞、自然免疫系細胞の機能異常を誘発して消化管粘膜にバリア機能障害を引き起こす。消化管粘膜の透過性亢進によってリポ多糖 (LPS) などの血中エンドトキシン濃度が上昇し、循環血中に増加したエンドトキシンは全身の臓器に慢性的炎症を引き起こし、インスリン抵抗性や肥満症の誘因となる。消化管粘膜バリア機能障害は、糖尿病や肥満症などの代謝性疾患、クローン病や過敏性腸症候群、線維筋痛症などの慢性疼痛性疾患、認知機能障害、社会行動的異常など、多彩な疾患の誘発・増悪因子として注目されている。

本研究では、肥満による小腸内炎症性変化や腸管バリアの破綻に伴い腸管外に漏出した LPS が骨格筋内で炎症性変化をもたらし、さらに骨格筋から分泌される IL-15 といったマイオカイン発現が低下することで速筋繊維が萎縮したことが推測される。これに対して RS は、腸管内炎症性変化を抑制させ腸管バリア機能保護作用を発揮することが明らかになった。さらに、このような変化が骨格筋での炎症性変化を抑制し、IL-15 といったマイオカイン発現を促進させ速筋繊維の増大をもたらしたと示唆される。

## 研究テーマ

# GTP センサー PI5P4K $\beta$ の膜結合型構造の立体構造解析

## 研究者

大学共同利用機関法人 高エネルギー加速器研究機構 千田 俊哉（せんだ としや）

本研究では、我々が独自の研究により見出した細胞内 GTP センサーである脂質キナーゼ PI5P4K $\beta$  の膜上での触媒反応に関する構造情報を取得し、PI5P4K $\beta$  による GTP センシング機構の分子基盤を確立することを目的とした。これまでの我々の研究によると、PI5P4K $\beta$  などの脂質キナーゼは水溶液中では基質である脂質と、それがリン酸化される水溶性のヘッドグループ部分であっても、複合体を作ることはできなかった。生化学的に PI5P4K $\beta$  の触媒反応には膜環境が必要であることがわかっている。そこでナノディスクを使って PI5P4K $\beta$  に膜環境を提供することで、膜環境下で PI5P4K $\beta$  と基質である PI5P の複合体を作製し、その高分解能構造を決定することを構想した。

そこでまず最初に、脂質に PI5P を含むナノディスクと PI5P4K $\beta$  との複合体の作製を試みた。PI5P4K $\beta$  の分子の大きさを考慮し 10 nm 程度のナノディスクを作成することを考え、ナノディスクの大きさを決定する Membrane Scaffold Protein (MSP) は MSP1 を用いた。また、ナノディスクを構成する膜成分としては、様々な選択肢があったが、PI5P が局在している細胞膜内葉の主要な構成脂質であるという理由から 1-パルミトイル-2-オレオイルホスファチジルセリン (POPS) を用いた。このような条件のもと、定法に従って PI5P を含まないナノディスクを作製した。作製したナノディスクを負染色により電子顕微鏡で観察することで、その性状を評価した。その結果、分散した単一の粒子としてナノディスクが観察された(図 1)。撮影した画像から二次元平均化したところ、10 nm 程度の直径の円盤状のナノディスク粒子が確認された(図 2)。この大きさは、用いた MSP から作製されると考えられるナノディスクの直径とほぼ一致する値であった。

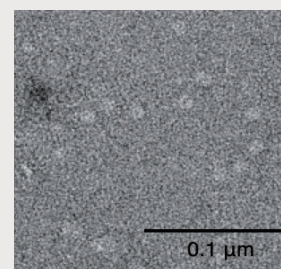


図 1 ナノディスクの負染色像

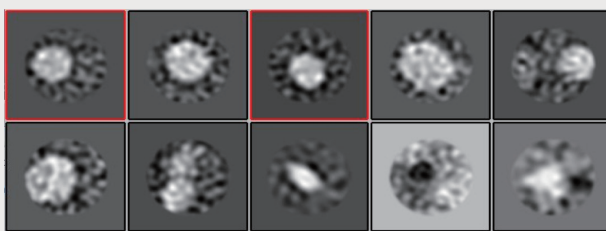


図 2 ナノディスクの二次元平均像

クライオ電顕技術により立体構造解析を行うために必須である単分散したナノディスクの取得に成功したため、次に、PI5P を含んだナノディスクを作製して PI5P4K $\beta$  と複合体を形成するかをゲル濾過クロマトグラフィーにより検討した。この PI5P ナノディスク-PI5P4K $\beta$  複合体は、まず、PI5P を含まないナノディスクを作製して、それと PI5P を混和することでナノディスクに PI5P を取り込ませ、さらにそこへ GTP アナログを結合させた PI5P4K $\beta$  を混和することで複合体を形成させる

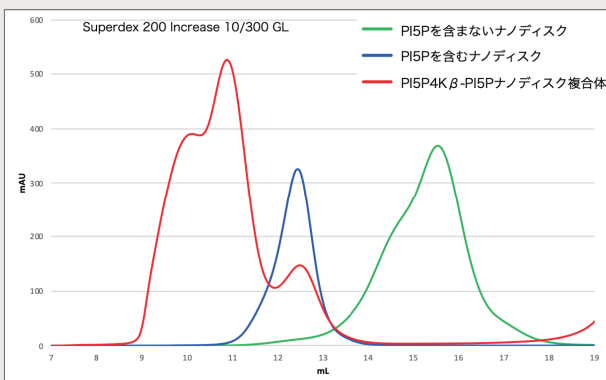


図 3 PI5P4K $\beta$ -PI5P ナノディスク複合体のゲル濾過クロマトグラム

という手法で作製した。ゲル濾過クロマトグラフィーの結果、ナノディスク単体の場合と比較して高分子画分に溶出ピークが検出されたことから(図3)、ナノディスク-PI5P4K $\beta$ 複合体が形成されたと考えられた。

そこでクライオ電子顕微鏡を用いて、このゲル濾過クロマトグラフィーのナノディスク-PI5P4K $\beta$ 複合体の溶出画分を観察した。一部、粒状のものが見られる視野もあったが(図4)、グリッドの多くの部分は厚い氷ができたために粒子が見えなかった。今後は単粒子解析に適したグリッドの作製方法を検討する必要がある。ただし、今回用いたクライオ電顕は200 kVの加速電圧を持つものであったため、厚い氷のサンプルでも観察が可能な300 kVの加速電圧を持つクライオ電顕での測定も試す必要があると思われた。また、それと並行して、PI5P ナノディスクとPI5P4K $\beta$ との複合体の親和性測定を表面プラズモン共鳴の装置を利用して測定する系を立ち上げて、より安定性の高い試料の取得を目指す。

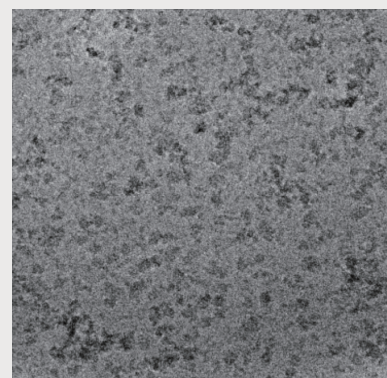


図4 PI5P4K $\beta$ -PI5P ナノディスク複合体のクライオ電子顕微鏡像

本研究の結果、ナノディスク上にPI5P4K $\beta$ -PI5P複合体を作製することに成功した。脂質キナーゼの膜上での基質との相互作用様式は、これまで一切明らかになっておらず、脂質キナーゼに対する創薬研究やシグナル経路研究のツール開発において、乗り越えるべき大きな課題の一つになっている。従って、本研究成果は脂質キナーゼの立体構造解析に供する試料を取得する手法を確立したという点で大きな意義を持つと考えられる。



## 研究テーマ

# 活性酸素種生成不全ラットから解き明かす活性酸素種の新規生体機能

## 研究者

信州大学 森 政之（もり まさゆき）

### ①研究の背景および目的

活性酸素種は、細胞の代謝やミトコンドリアでの ATP 産生過程などにおいて酸素分子が不対電子を捕獲することによって生じるもので、スーパーオキシド、ヒドロキシルラジカル、過酸化水素、一重項酸素を含む。活性酸素種は反応性が高く、細胞の核酸、タンパク質、脂質などの生体分子を傷害する。そのため、癌や生活習慣病などのさまざまな疾患や老化の原因となる“悪玉分子”と考えられている。一方、生物は活性酸素種を積極的に産生するシステムを有し、それを様々な細胞・生体機能に利用していることが分かりつつある。しかしながら、活性酸素種の生理的機能については、未だ不明な点が多く、生物学における解明課題の一つとなっている。

ヒトを含む生物が有する代表的な活性酸素産生システムの一つが NADPH オキシダーゼ複合体である（図 1）。NADPH オキシダーゼ複合体は NADPH 由来の電子を輸送し酸素分子と反応させて活性酸素種を産生する。NADPH オキシダーゼ複合体には、活性酸素種産生活性の本体として NOX1, NOX2, NOX3, NOX4 のいずれかのタンパク質を含む 4 種類がある。これらは異なる組織において発現され、活性酸素種を産生してそれぞれの組織の機能に寄与していると想定されているが、その詳細は良く分かっていない。これらの 4 種の NADPH オキシダーゼ複合体による活性酸素種産生には、NOX タンパク質が cytochrome b-245, alpha polypeptide (以下 CYBA) タンパク質と細胞膜上、または細胞小器官の膜上で 2 量体を形成することが必須であることが分かっている。

MES 系ラットは、以下の 4 種の病態を遺伝性形質として自然発症するラット系統である。(I) 好酸球增多症：白血球の一種である好酸球の末梢血中レベルが  $500/\mu\text{l}$  以上に異常増加した状態。(II) 腸内腐敗：腸内細菌叢が有害菌優位な状態に陥り、有害菌によって生成されるアンモニアやインドールなど腸内腐敗産物が腸内で増加した状態。(III) バランス異常：歩行や運動時に体が傾くと姿勢を立て直すことができずに容易に転倒する。(IV) 体脂肪蓄積不全：内臓脂肪が貯まらない。本研究者は、これらの遺伝性病態の根本的原因が、CYBA タンパク質をコードする Cyba 遺伝子の機能喪失変異であることを明らかとした。この変異により MES 系ラットは CYBA をパートナーとして必要とする 4 種類の NADPH オキシダーゼの活性酸素産生活性を全て失っているために多彩な病態を発症することが分かった。このことは逆に、正常個体においては NADPH オキシダーゼによって産生される活性酸素種が、骨髄、腸、内耳、脂肪組織において未知の生理機能を有することを示唆する。そこで、MES 系ラットを用いて活性酸素種の生理機能を解明する研究を行なった。

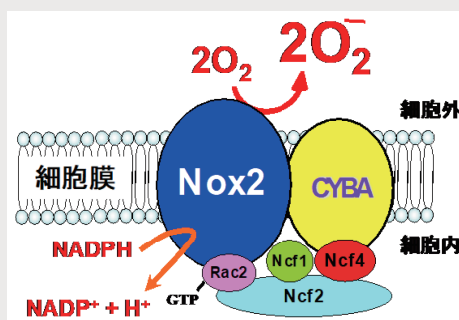


図 1 NADPH オキシダーゼ複合体の基本構造。CYBA のパートナーとしては Nox2 の他に Nox1, Nox4 があり、それらと機能する際には細胞内のアダプター因子も異なるものが使用される。

## ②研究方法

### (1) 好酸球増多症発症に関与する NADPH オキシダーゼの同定

好酸球が産生される骨髄では NOX1, NOX2, NOX4 の 3 種類の NADPH オキシダーゼが発現されている。このうちのどの分子種が好酸球発生制御に関与するのかを明らかにするために、CRISPR/Cas9 法により、Nox1, Nox2, Nox4 の各遺伝子のノックアウトラット (F344/N-Nox1em, F344/N-Nox2em, F344/N-Nox4em) を作製した。16 週齢で末梢血中の好酸球レベルを自動血球計測器を用いて測定した。

### (2) 腸内細菌の好酸球増多症発症への関与の検証

MES 系ラットにおいては好酸球増多症発症と連関して腸間膜リンパ節の腫大が認められることから、腸内細菌叢の増大や変化がそれらの発症に関与している可能性が疑われる。そこで MES 系ラット (雄 3 匹 + 雌 4 匹) に生後 3 週齢での離乳直後より飲水中に抗生物質であるアンピシリン (1 g/L) + メトロニダゾール (1 g/L) + カナマイシン (1 g/L) + バンコマイシン (0.5 g/L) を添加して投与し、腸内常在菌を抑制した。7, 9, 10 週齢で末梢血好酸球数を計測した。10 週齢で安楽死させ、腸間膜リンパ節の腫大の有無を調査した。

### (3) NOX4 NADPH オキシダーゼによる脂肪細胞の分化/脂肪蓄積の制御の検証

脂肪細胞の分化/脂肪蓄積はインスリンシグナル伝達系により制御される。その過程への活性酸素種の関与を検証するために、3T3-L1 培養細胞に M3-isobutyl-1-methylxanthine、デキサメタゾン、インシュリンを添加して脂肪細胞への分化、および脂肪蓄積を誘導する過程で、同時に Nox4 に対する short interfering RNA (siNOX4) を発現させ、その活性を抑制した。4 日後に oil red O で細胞中の脂肪を染色して、脂肪蓄積程度を評価した。さらに、細胞を溶解して SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動し、特異的な抗体を用いたウェスタンブロット解析により、糖の取り込みから脂質への変換と蓄積のためのシグナル伝達経路の変化としてインスリン受容体のチロシンリン酸化レベル、リン酸化 Akt タンパク質のレベルを測定した。

## ③研究成果

### (1) 好酸球増多症発症に関与する NADPH オキシダーゼの同定

3 種のノックアウトラットのうち、F344/N-Nox1em, と F344/N-Nox4em には雌雄ともに好酸球増多症は認められなかった。交配により作製された Nox1 と Nox4 のダブルノックアウトラットにも好酸球増多症は認められなかったことから、これらの NADPH オキシダーゼの活性欠損が好酸球増多症の原因である可能性は棄却された。一方、F344/N-Nox2em においては、雄 11 匹中には好酸球増多症が認められなかったが、雌 12 匹中の 2 個体には好酸球増多症が認められた。以上の結果より、NOX2 NADPH オキシダーゼの欠損が好酸球増多症の原因であることが示唆された。しかしながら、雄が好酸球増多症を発症せず、雌の、しかも一部の個体のみにしか好酸球増多症が認められなかった原因は不明である。それには性ホルモン、Cyba 以外の遺伝子の MES と F344/N ラット系統による違い (遺伝的背景) などの関与が疑われるが、今後の検討課題として残された。

### (2) 腸内細菌の好酸球増多症発症への関与の検証

抗生物質の投与により腸内細菌数が抑制された MES 系ラットにおいても、9 週齢で既に非投与群と同様の末梢血中での好酸球増多が生じていた。10 週齢で剖検した際には腸間膜リンパ節も腫大していた。この結果より、腸内細菌は MES 系ラットにおける好酸球増多の発症には関与しておらず、好酸球増多は活性酸素種産生不全により骨髄前駆細胞の自律的反応として生じていることが示唆された。

### (3) NOX4 NADPH オキシダーゼによる脂肪細胞の分化/脂肪蓄積の制御の検証

siNOX4 処理された 3T3-L1 細胞においては、脂肪細胞への分化と脂肪蓄積が有意に抑制されていた (図 2)。この結果から、NOX4 NADPH オキシダーゼが脂肪細胞の分化/脂肪蓄積に寄与していることが

分かった。また、細胞膜上のインスリン受容体のチロシンリン酸化レベル、およびリン酸化 Akt タンパク質のレベルはコントロール siRNA 処理された細胞と比較して約 50%程度に低下しており、インスリンシグナル伝達が低下していることが示唆された。以上の結果より、MES 系ラットの体脂肪蓄積不全は NOX 4NADPH オキシダーゼ活性の欠損に起因することが示唆された。活性酸素種がインスリンシグナル伝達系を増強する機序の解明や関与する分子種の同定が今後の課題である。

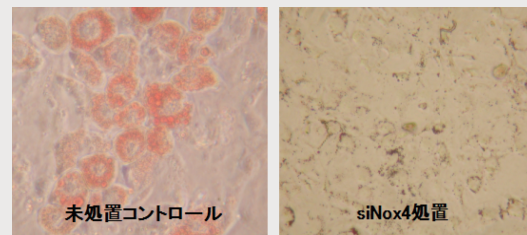


図 2 脂肪細胞への分化/脂肪蓄積を誘惑された 3T3-L1 細胞。脂肪は赤く染色されている。siNox4 処置細胞 (右パネル) では脂肪蓄積が阻害されていることが分かる。



## 研究テーマ

# 新しい食品保存料の開発を目指した放線菌由来新規抗菌ペプチドの探索

## 研究者

静岡大学大学院農学領域 小谷 真也（こだに しんや）

### ① 研究の背景

本研究の目的は、食品保存料としての応用を視野に入れた放線菌からの新しい抗菌ペプチドの探索である。食品添加料として用いられている Nisin はペプチド性抗菌物質であり、熱やプロテアーゼによる分解を受けにくく、食品の風味や味に影響を及ぼさないことから食品保存料として適している。現在、従来の食品保存料の代替として注目されており、乳酸菌由来の抗菌ペプチド Nisin が日本でも認可され利用されている。一方、nisin の長期的かつ過度な使用によって耐性菌が出現することが予想される。実際に食中毒細菌のなかには耐性株が安易に出現することが実験的に証明されており、耐性菌出現は時間の問題と言える。以上のことから、新しい抗菌ペプチドの開発は食品衛生学において重要な課題の一つとなっている。乳酸菌に比べ放線菌の抗菌ペプチドはこれまで研究例が少なく、探索源としては非常に有望である。そこで、放線菌から新しい抗菌ペプチドの発見を目指し、ペプチドの探索を行った。その結果、放線菌から新規ペプチドを得ることに成功したのでここに報告する。

### ② 研究方法

新たに分離した放線菌を含め、研究室において保持している放線菌を培養後、菌体を有機溶媒メタノールで抽出後、ODS を用いたダイオードアレイ付属 HPLC による分析を行い、新たなペプチドの生産確認試験を行った。生産の見られた放線菌に関しては ISP2 寒天培地を用いて大量培養し抽出用の菌体を得た。ダイオードアレイで見出したペプチドとみられる化合物に関して ESI-MS 分析を行い、分子量の推定を行った。得られたペプチドに関しては NMR および MS/MS を用いた化学構造の決定を行った。また、ペプチドを生産した放線菌 CWH03 株に関して、DNA シーケンサー MiSeq を用いた全ゲノム解析を行った。得られたゲノム配列は、データベースに登録を行った。

### ③ 研究成果

沖縄の海底土壌から分離した *Streptomyces spongiicola* 531S 株および *Streptomyces* sp. CWH03 株において、顕著なペプチドの生産が認められた。そこで *Streptomyces* sp. CWH03 株を ISP2 寒天培地上で大量培養後、菌体をメタノールで抽出した。抽出物を濃縮後、HPLC で分取することで新規アゾール含有ペプチドである spongiicolazole A および B を単離することに成功した。その化学構造は、MS/MS および NMR 分析を組み合わせることで決定した。その結果、spongiicolazole A および B は直鎖アゾール含有ペプチドであった。この二つのペプチドは *Streptomyces spongiicola* 531S 株 および *Streptomyces* sp. CWH03 株の二株において生産が見られた。531S 株の全ゲノムに関しては、すでに決定されていたが、*Streptomyces* sp. CWH03 株に関しては、未決定であったため、全ゲノム配列の解析を行った。その結果、spongiicolazole A および B の生合成遺伝子クラスターを発見した。その生合成は、リボソーム翻訳系翻訳後修飾ペプチドタイプの生合成システムであった。また、データベース上のゲノム情報を調べたところ、類似した遺伝子クラスターが海洋性放線菌のゲノムに多数分布していることが明らかとなった。spongiicolazole A および B は多数のアゾール環を含むため、抗菌活性が期待されたが、5 種類の細菌に対する抗菌活性試験を行ったところ、抗菌活性は見出されなかった。今後、細菌を増やし活性試験を行っていく予定である。本研究成果をとりまとめ下記の国際学術誌 *Applied Microbiology and Biotechnology* において発表を行った。

Isolation and structure determination of new linear azole-containing peptides spongiicolazolicins A and B from *Streptomyces* sp. CWH03.

Suzuki M, Komaki H, Kaweewan I, Dohra H, Hemmi H, Nakagawa H, Yamamura H, Hayakawa M, Kodani S\* (\*責任著者)

*Applied Microbiology and Biotechnology* 2021 Jan;105(1):93-104.

## 研究テーマ

# 乾癬における腸管機能の関わりと食物繊維による改善作用

## 研究者

広島大学大学院統合生命科学研究科 鈴木 卓弥 (すずき たくや)

### 研究背景・目的

乾癬は、皮膚組織の免疫異常を基盤とした慢性皮膚疾患である。代表的な症状として、皮膚が赤くなる「紅斑」、皮膚が盛り上がる「肥厚」、皮膚にフケのようなものが付着して剥がれ落ちる「鱗屑」が挙げられる。その罹患率は全世界の人口の約3%にのぼると推定されているが、いまだ完治させることは難しい疾患である。また乾癬は、外見への影響が大きいと、患者は身体的苦痛だけでなく、精神的苦痛が大きいことも大きな問題であり、効果的な予防手段の開発は急務である。乾癬の発症要因は十分には明らかにされていないが、近年の研究により、腸内細菌叢をもたない無菌マウスでは乾癬症状が重症化することなどが報告され、乾癬の発症に腸管機能や腸内細菌叢が関わる可能性が提案されている。そこで本研究は、乾癬における腸管機能と腸内細菌叢(特にその代謝物)の関わりを理解し、食物繊維による乾癬の予防的役割を探索することとした。

### 研究方法・結果

#### (1) 乾癬に関わる腸管機能の損傷の分子基盤の解明

マウス(Balb/c、メス、7週齢)の背部皮膚にイミキモドクリームと塗布し(5日間、50 mg/日)、乾癬モデルマウスを作成した。マウスの結腸組織を採取して総RNAを精製し、RNAシーケンスによるトランスクリプトーム解析を実施した。正常マウスと比較して、乾癬モデルマウスの結腸では、741の遺伝子が2倍以上上昇していた。この2倍以上上昇した遺伝子リストをもちいて、Metascapeによるエンリッチメント解析を実施した。その結果、乾癬によって活性化されたパスウェイの1つとして、「GO:0006954: inflammatory response (炎症応答)」が検出された。さらに乾癬マウスの糞中の細菌叢のメタゲノム解析を実施したところ、乾癬マウスで細菌叢の多様性(Chao1、Shannon インデックス)の低下が認められ、さらに属レベルでも複数の細菌の変化が確認された。そのなかで興味深い変化として、Akkermansia 属の低下、Staphylococcus 属と Streptococcus 属の上昇があった。これらの結果から、乾癬モデルマウスでは、腸管の炎症と併せて、腸内細菌叢の変化が起きることが確認された。

#### (2) 食物繊維による乾癬の予防的役割の探索

マウス(Balb/c、メス、7週齢)に物理化学的性質の異なる食物繊維3種類(グァーガム、グァーガム部分加水分解物、サイリウム、各5%)をそれぞれ添加した飼料を20日間摂取させた。14日目から背部皮膚にイミキモドクリームを塗布し(5日間、50 mg/日)、乾癬を誘導した。イミキモドクリームの塗布を開始後、乾癬症状(皮膚の鱗屑、紅斑、肥厚化)を毎日観察して評価した(乾癬病態スコア)。その結果、イミキモドクリームの塗布により、経日的に病態スコアが上昇したが、グァーガムとサイリウムの摂取により、有意に低値を示し、乾癬症状の軽減が確認された。皮膚組織から総RNAを抽出して、定量RT-PCR法により各種遺伝子発現を解析したところ、イミキモドの塗布により、乾癬の病態に深く関わる、インターロイキン(IL)-22やIL-17が顕著に上昇したが、サイリウムとグァーガムの摂取により低値または低値傾向を示した。さらにイミキモドの塗布により、マクロファージのマーカー遺伝子であるF4/80

が結腸組織で上昇したが、サイリウムとグァーガムの摂取により低値傾向を示した。食物繊維の中でサイリウムによる効果が最も顕著であったので、糞中の胆汁酸濃度を質量分析計を用いて解析したところ、サイリウムの摂取により、コール酸とタウロコール酸の上昇、 $\omega$  ミュリコール酸とデオキシコール酸の低下が確認された。

### (3) 胆汁酸による炎症性サイトカイン発現への影響

マウス (Balb/c、メス、7 週齢) から脾臓を採取し、脾細胞を調製した。(2) で変化が認められた胆汁酸を作用させ、乾癬の発症に重要な役割をもつ IL-17 発現を ELISA 法により測定した。結果として、デオキシコール酸が IL-17 産生を抑制したが、サイリウムによる乾癬軽減作用との関連性は見いだせなかった。

### 考察・まとめ

本研究では、乾癬の病態における腸管機能の役割を探索しながら、食物繊維による感染の予防手段の開発を目指した。乾癬マウスでは、腸管の炎症状態と腸内細菌プロファイルの変化が確認された。食物繊維は、腸内細菌叢を改善したり、腸管機能に有用な影響をもつ代表的な食品成分である。そのなかでグァーガムとサイリウムが乾癬症状を軽減することが示されたが、腸内細菌がその代謝に関わる胆汁酸と食物繊維による効果の具体的なつながりは見いだせなかった。乾癬における皮膚—腸管とのつながり、食品成分による制御を明らかにするためにはさらなる研究が必要である。



## 研究テーマ

# マイクロ RNA を介したウイルス感染細胞の細胞死誘導機構の解明とその制御

## 研究者

埼玉大学 高橋 朋子 (たかはし ともこ)

### ①研究の背景及び目的

ヒトの細胞にウイルスが感染すると、“免疫”によりウイルスが排除される機構が働く。一方で、感染細胞が細胞死を誘導し、感染拡大を防ぐ機構も知られているが、その詳細は不明である。LGP2 は、細胞内に侵入したウイルスを外来 RNA として感知する“細胞内ウイルスセンサータンパク質”のひとつである。そのため、ウイルスに対する初期応答として重要な“自然免疫”において機能すると想定されてきたが、詳細な機能は長い間不明であった。

我々は、LGP2 が、マイクロ RNA を介して遺伝子の発現を制御する“RNA サイレンシングの制御因子”であることを見出し報告した (Takahashi et al. 2018 Nucleic Acids Res., Takahashi et al. 2018 Genes)。

さらに、LGP2 がマイクロ RNA を介して制御する遺伝子として、プログラム細胞死 (アポトーシス) に関与する遺伝子群に着目した解析を行い、ウイルス感染細胞において LGP2 が特定のマイクロ RNA の制御を介して、細胞死を誘導することを明らかにした (Takahashi et al. 2020 Nucleic Acids Res.)

加えて、ウイルス感染により LGP2 は約 900 倍発現量が増加することからも、その機能の重要性が示唆される。

本研究では、ウイルス感染細胞において LGP2 により制御されるマイクロ RNA の中でも特に重要な、ウイルス感染細胞の細胞死を決定する“マーカー”となるマイクロ RNA とその標的遺伝子を同定し、その作用メカニズムを解明することを目指した。マイクロ RNA のデータベース miRBase (Release 22) によると、ヒトのゲノムには約 2,000 のマイクロ RNA がコードされている。LGP2 は TRBP というマイクロ RNA の成熟化を促進する因子の機能を阻害することで RNA サイレンシングを制御する。そのため、LGP2 が制御するマイクロ RNA は TRBP と結合していたマイクロ RNA を免疫沈降法により回収し、網羅的に RNA シークエンス解析することで同定した。現在その成果をもとに、LGP2 が制御するマイクロ RNA を既に 40 に絞っており、さらにその中でも特に miR-106b に着目して解析を行っている。マイクロ RNA の標的予測は必ずしも正確ではないが、配列相補性や進化的保存度、RNA の二次構造などをもとに予測することができる。miR-106b が標的とする可能性のある遺伝子は数百あるが、その中でも配列相補性を用いた標的予測によると、miR-106b は細胞死に関与するイニシエーターカスパーゼとエフェクターカスパーゼを網羅的に標的としており、炎症性カスパーゼは標的としていない。また PTEN や MAPK など細胞増殖や生存に強く関与する遺伝子の 3'UTR にも標的と予測されるサイトがある。これまでの研究ですでに、ヒト野生型、LGP2 または TRBP ノックアウト細胞 (CRISPR/Cas9 システムにより樹立) に、センダイウイルスを感染させ、マイクロアレイ解析を行った。このウイルス感染細胞の遺伝子発現プロファイルをもとに、ウイルス感染細胞における標的遺伝子の mRNA 量の定量 RT-PCR による測定や、ウェスタンブロットによるタンパク質の検出によりウイルス感染細胞において LGP2 が制御する重要なマイクロ RNA (特に miR-106b) とその標的遺伝子 (例えばカスパーゼ) の制御ネットワークの解明を行っている。

研究テーマ

# 常圧下での二酸化炭素の触媒的活性化に基づく機能性化合物の簡便合成

研究者

大阪市立大学 森内 敏之 (もりうち としゆき)

近年、希少金属を用いない効率的な触媒反応の開発が望まれている。微量必須元素の一つと考えられている前周期遷移金属バナジウムは生物環境に広く分布しており、クラーク数が高く安価に入手できる金属であり、高いルイス酸性と酸素親和性を有している。一方、二酸化炭素の削減は、国連の掲げる世界を変革するための「持続可能な開発目標」の一つである。二酸化炭素を地球環境に対する脅威と考えるのではなく、貴重な資源として活用することができれば、二酸化炭素の削減のみならず化石燃料消費の削減にも繋がると考えられる。そのため、化学関連分野において、二酸化炭素を高付加価値な化学品に変換する触媒の開発は、持続可能な低炭素および炭素循環型社会の実現のための重要な研究課題の一つである本研究では、バナジウムが繰り出すルイス酸性と酸素親和性を最大限に活用し、二酸化炭素の常圧下での触媒的活性化を行い、人々の健康・美を支える医薬品中間体である尿素誘導体の簡便合成法の開発を目指して研究を展開した。

本研究課題において、オキソバナジウム触媒を用いた二酸化炭素活性化の触媒反応について検討を行った。触媒としてオキソバナジウム(V) トリイソプロポキシド ( $\text{VO}(\text{O}^i\text{Pr})_3$ )、塩基として  $N,N'$ -ジイソプロピルエチルアミン ( $^i\text{Pr}_2\text{EtN}$ ) を基質に対してそれぞれ 20 mol% 用い、脱水剤としてモレキュラーシーブ 3A (MS3A) 存在下、風船雰囲気下での二酸化炭素と 2-フェニルエチルアミン (**1a**) の反応を行ったところ、対応する尿素誘導体 **2a** が NMR 収率 45% で得られた (Table 1, Entry 1)。モレキュラーシーブ 3A の添加量を増やすと収率の向上が見られ (Entries 1-4)、モレキュラーシーブ 3A の添加量は 2.0 g が最適であると判断した。本触媒システムは濃度にも依存しており、2-フェニルエチルアミン (**1a**) を 0.30 mmol、 $N,N$ -ジメチルアセトアミド (DMA) 溶媒を 2.0 mL、モレキュラーシーブ 3A を 2.0 g 用いた場合、91% の収率で尿素誘導体 **2a** が得られることが明らかとなった (Entry 5)。さらに、触媒量の低減について検討を

**Table 1** The oxovanadium(V)-catalyzed urea formation from 2-phenylethylamine and carbon dioxide.<sup>[a]</sup>

Entry	2-Phenylethylamine (mmol)	MS3A (g)	$\text{VO}(\text{O}^i\text{Pr})_3$ (mol%)	NMR yield <sup>[b]</sup> (%)
1	0.60	0.4	20	45
2	0.60	1.2	20	69
3	0.60	2.0	20	81
4	0.60	3.0	20	81
5	0.30	2.0	20	91
6 <sup>[c]</sup>	0.15	2.0	8	93

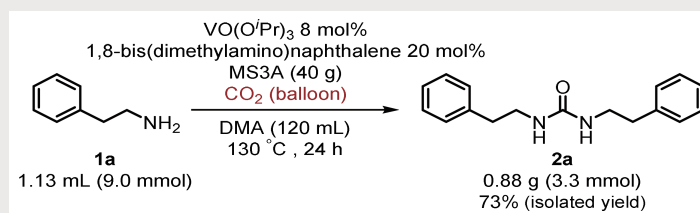
[a] Reaction conditions: 2-phenylethylamine,  $\text{VO}(\text{O}^i\text{Pr})_3$ , 20 mol%  $^i\text{Pr}_2\text{EtN}$ , 2.0 mL DMA, under carbon dioxide (balloon). [b] NMR yield (%) = [product (mmol)  $\times$  2 / substrate (mmol)]  $\times$  100. [c] The reaction was performed for 12 h.



**Table 2** Substrate scope of amines in the catalytic synthesis of urea derivatives.<sup>[a]</sup>

$\text{R}^1\text{R}^2\text{NH} \xrightarrow[\text{DMA, 130 } ^\circ\text{C, 15 h}]{\text{VO(O}^i\text{Pr)}_3 \text{ 8 mol\%}, \text{ } ^i\text{Pr}_2\text{EtN 20 mol\%}, \text{ MS3A (2.0 g)}, \text{ CO}_2 \text{ (balloon)}} \text{R}^1\text{R}^2\text{N}-\text{C(=O)}-\text{NR}^1\text{R}^2$					
Entry	Product	NMR yield (%) <sup>[b]</sup>	Entry	Product	NMR yield (%) <sup>[b]</sup>
1		85	5		81
2		89	6		78 <sup>[c]</sup>
3		60	7		37 <sup>[d]</sup>
4		89	8		0

[a] Reaction conditions: 0.15 mmol of substrate, 8 mol% VO(O<sup>i</sup>Pr)<sub>3</sub>, 20 mol% <sup>i</sup>Pr<sub>2</sub>EtN, 2.0 mL DMA, under carbon dioxide (balloon).  
 [b] NMR yield (%) = [product (mmol) x 2 / substrate (mmol)] x 100. [c] Reaction time was 24 h. [d] 15 mol% VO(O<sup>i</sup>Pr)<sub>3</sub> was used.



**Scheme 1** Gram-scale catalytic reaction of 2-phenylethylamine with carbon dioxide by using VO(O<sup>i</sup>Pr)<sub>3</sub> catalyst.

行ったところ、バナジウム触媒 8 mol% の条件においても、濃度をさらに下げて反応時間を 12 時間で行うことにより反応が効率的に進行し、尿素誘導体 **2a** が 93% の収率で生成した (Entry 6)。

次に、本触媒システムの基質汎用性について検討を行った。脂肪族第一級アミンを基質に用いて二酸化炭素との反応を行ったところ、対応する尿素誘導体が良好な収率で得られた (Table 2, Entries 1-6)。興味深いことに、キラルアミンである (*S*)-(−)-1-フェニルエチルアミンを基質に用いた場合、キラリティーを保持したまま対応する尿素誘導体に変換されることが明らかになった (Entry 3)。芳香族アミンである *p*-アニシジンを基質に用いた場合にも触媒反応は進行し、対応する尿素誘導体 **2h** が 37% の収率で得られた (Entry 7) 一方、第二級アミンであるジブチルアミンを用いた場合には反応は進行しなかった (Entry 8)。

2-フェニルエチルアミン (**1a**) を基質に用いたグラムスケールの触媒反応も効率的に進行し、単離収率 73% で尿素誘導体 **2a** を得ることに成功した (Scheme 1)。

本研究成果は国際雑誌に掲載された (*RSC Adv.* 2021, 11, 27121.)。今後、本触媒システムを応用して、非対称尿素誘導体の合成を行う。さらに、補足剤として機能するアルコールを溶媒に用いることにより、触媒的ウレタン誘導体合成についても検討を行う予定である。

## 研究テーマ

# D 型乳酸アシドーシスを来す短腸症候群患者の腸内フローラの解析と D 型乳酸非産生株の樹立 ～効率的なプロバイオティクスを目指して～

## 研究者

東北大学 中村 恵美 (なかむら めぐみ)

### 【背景】

短腸症候群は経腸的に十分な栄養を吸収できないものの、腸管を使用していわゆるリハビリを行わないと、成長障害を来したり、腸管不全関連肝機能障害を発症したりして死に至ることもある。ところが、経腸栄養を進めていくと、消化吸收しきれなかった炭水化物が大腸に流れ込むことで、D 型乳酸アシドーシスという合併症を来すことがある。これは非特異的な中枢神経症状を来し、日常生活に支障を来す。乳酸菌やビフィズス菌といったプロバイオティクスの中には腸ムチン糖鎖に高い付着性を示し、定着しやすいものが存在する。この特性をもつプロバイオティクスのうち、D 型乳酸を産生しないものが特定できれば、D 型乳酸産生菌を排除し、D 型乳酸アシドーシスを発症せずに経腸栄養を進めることができる可能性がある。これを治療法として構築するためには、短腸症候群患者の様々な状態での腸内フローラを検索することが一つ重要な手掛かりとなる。

### 【目的】

短腸症候群の合併症である D 型乳酸アシドーシス発症を予防するために、短腸症候群の腸内フローラを解析し、D 型乳酸産生菌を排除し得る高定着性プロバイオティクス候補を選抜する。

### 【方法】

本研究は「人を対象とした医学系の研究および臨床応用」として東北大学大学院医学系研究科の倫理承認を得て実施した。

定期通院している短腸症候群 12 名のうち、研究参加の同意が得られた患者 10 名を対象とした。

#### 1. 腸内フローラ解析

外来受診日に便を採取した。

平常時における腸内フローラとして、16S rRNA 遺伝子によるメタゲノム解析を実施した。

解析は外部検査機関(コスモ・バイオ株式会社、東京)へ委託した。

#### 2. 血中 D 型乳酸の測定

D 型乳酸アシドーシスの確定診断は血中 D 型乳酸値の測定によるが、現在、血中 D 型乳酸値の測定は保険収載されておらず、保険診療外であっても行われていない。そのため D-/L-LACTEC ACID ASSAY KIT (Megazyme International Ireland Ltd, Ireland) を購入して測定した。

平常時の血中 D 型乳酸値として、通常外来で行われる採血に加えて 1.5 ml 程度の採血を行い、測定した。

### 【結果】

定期通院している短腸症候群 15 名のうち、同意を得られた患者は 11 名であった。

## 1. 腸内フローラ解析

同意を得られた患者 11 名の平常時の糞便が採取された。

現在、検査結果待ちの状態である。

結果が揃い次第、候補菌の検討を進める。

## 2. 血中 D 型乳酸の測定

同意を得られた患者 11 名の平常時の採血が行われた。解析が終了した 7 名の血中 D 型乳酸値は 0.00 ～ 0.75 mmol/L (中央値 0.05 mmol/L) で、D 型乳酸アシドーシスの診断基準 3 mmol/L 以上を示したものはいなかった。期間中、対象患者 3 名で計 4 回、加療を必要とする D 型乳酸アシドーシスを疑う症状が認められたが、発症時血中 D 型乳酸値を測定することはできなかった。

### 【今後の予定】

- ・腸内フローラ解析の結果をもとに、血中 D 型乳酸値と比較し、傾向を分析する。
- ・D 型乳酸アシドーシスを疑う症状を呈した際の血中 D 型乳酸値測定を追加して行う。D 型乳酸アシドーシスと診断されれば、再度糞便を採取し、腸内フローラ解析を行い、追加検討する。
- ・最終的な成果は、小柳財団の助成で行われた研究として論文にして報告する。

尚、本研究の成果を踏まえ、令和 3 年度～令和 6 年度の期間に科学研究費基盤研究 (C) として、引き続き以下の検討を東北大学小児外科 (研究代表者：安藤亮) にて行う。

1. 腸ムチン糖鎖への付着性を、BIACORE システムを用いて定量する。
2. 短腸モデルラットを用いて高定着性プロバイオティクス投与により D 型乳酸アシドーシスを予防し得るか検討する。

## 研究テーマ

# 食事由来低分子が脳卒中の予後に及ぼす効果の検証

## 研究者

熊本大学大学院生命科学研究部（薬学系） 香月 博志（かつき ひろし）

### ①研究の背景及び目的

脳血管疾患は本邦の死因の第4位に位置し、また発症後に生存できた場合においても重篤な後遺症が残る率の高い疾患群である。なかでも、脳実質内での脳血管の破綻を引き金とする脳出血は、高血圧治療の進歩に伴って1970年代以降は患者数が減少してきたが、人口の高齢化とともに患者数は下げ止まり～増加傾向に転じており、適切な医療介入法の確立が望まれている。しかし現状においては、降圧薬の点滴静注を除いて、脳出血に対して推奨される薬物療法の選択肢は存在しない。そのため、治療薬の開発に向けた努力が必要であると同時に、非薬物療法の一層の充実化も急務である。非薬物療法については、理学・作業療法に基づくリハビリテーションが一定の効果をもたらす一方で、長期的な予後改善を見据えた食事・栄養管理も重要と考えられる。しかし、従来の栄養管理は生命維持に直結する熱量補給や体液平衡維持を主眼としており、脳組織病理の積極的な改善を意識した検討はほとんど行われていない。

脳内のマクロファージ様細胞であるミクログリアは、健常時・病態時の脳組織の恒常性の制御において重要な役割を担っている。また脳卒中時には、末梢血から脳内に浸潤する好中球、単球/マクロファージ、Tリンパ球等の血球成分も炎症応答に関与し、脳組織の損傷・修復過程を左右する。炎症応答は組織損傷拡大と組織修復促進という二面性を持っており、特定の遺伝子群の発現のON/OFFによるマクロファージ・ミクログリアの表現型の遷移や、好中球・Tリンパ球の分化調節の動向などによって脳組織の病理像は大きく変化しうる。これらのことを踏まえて研究代表者は、食事に由来する成分あるいはその代謝物の脳内炎症制御作用を活用して脳卒中の予後改善をもたらすことを企図した「脳卒中栄養学」の概念の確立を目指している。本研究課題では、食事由来の低分子量化合物（特に脂溶性ビタミン類）に焦点を当て、それらがリガンド依存性転写因子の活性に影響を及ぼすことなどによって脳内炎症応答に関わる細胞群の分化や機能発現を制御し、脳出血病態の改善に寄与する可能性を明らかにすることを目指した。

### ②研究方法

1) マウス in vivo 脳出血モデル：8～10週齢雄性ICRマウスの線条体内にコラゲナーゼ(0.035 U)を投与して脳出血を誘発した。ビタミンA（レチノール パルミチン酸エステル；25 mg/kg）あるいはビタミンD3（コレカルシフェロール；0.1 mg/kg）を出血誘発3時間後から24時間間隔で計3回経口投与し、出血6～72時間後におけるマウスの運動機能障害の程度をビーム歩行試験および四肢の反射試験により評価した。また、出血誘発3日後の脳組織の凍結切片を作成して神経細胞、アストロサイト、ミクログリアのマーカーに対する免疫組織化学的検討を行った。

2) ラット培養脳組織切片：新生仔ラット脳より作成した大脳皮質-線条体冠状切片を多孔質膜上で培養維持した後、血中プロテアーゼであるトロンビン(100 U/ml)を72時間処置した。ビタミンA/レチノイド関連の被験化合物およびシグナル伝達阻害薬は、トロンビン処置の24時間前に処置し、トロンビン処置開始72時間後にpropidium iodide染色により細胞死・組織傷害の程度を定量評価した。また、トロンビン処置開始48時間後の組織切片を用いて、蛍光免疫組織化学によりミクログリアの分布と活性化状態、NF- $\kappa$ Bの核内移行の程度についての評価も行った。



### ③研究成果

1) 脳出血病態に対する脂溶性ビタミン補給の効果：研究代表者はこれまでに、レチノイン酸受容体 (RAR) 作動薬がマウス脳出血モデルにおいて治療効果をもたらすこと (J Neurosci Res. 92: 1024-1034 他) や活性型ビタミン D3 がミクログリア系 BV-2 細胞の炎症性サイトカイン産生を抑制すること (Neurochem Res. 41: 2848-2858, 2016) などを報告している。そこで本研究では、レチノイン酸と活性型ビタミン D3 それぞれの前駆体であるビタミン A およびビタミン D3 を連日強化補給した時の効果について、マウス脳出血モデルを用いて検討した。各ビタミンの投与量は末梢組織での効果を評価した既報を参考にし、ビタミン A は通常摂餌での摂取量の約 20 倍、ビタミン D3 は同約 10 倍とした。2 種類の運動機能評価試験において、ビタミン D3 強化補給群の障害レベルは対照群とほぼ同等であった一方、ビタミン A 強化補給群では対照群と比較して有意な運動機能の改善が認められた (図 1)。また、出血誘発 3 日後の脳組織の病理像を比較した結果、ビタミン A 強化補給は血腫周縁部のミクログリアおよびアストロサイトの活性化に影響を与えなかったものの、血腫中心部の生存神経細胞数を有意に増加させることが明らかになった。ビタミン D3 強化補給は脳組織病理像に対して有意な効果を示さなかった。

2) 培養脳組織切片におけるビタミン A 関連化合物の効果：トロンピンは、脳出血後の脳組織の損傷や炎症応答を惹起する重要な因子として知られている。上記の *in vivo* での結果を踏まえ、ビタミン A 関連化合物の脳組織保護効果を解析する目的で培養脳組織切片を用いた検討を行った。新生仔ラット脳より作成した大脳皮質 - 線条体の培養組織切片にトロンピンを処置すると、大脳皮質領域における細胞死と線条体領域の著明な萎縮が誘導された。これらの病理変化は、RAR の内因性リガンドである全トランスレチノイン酸 (10-20  $\mu\text{M}$ ) およびその前駆体であるビタミン A (レチノール; 20-50  $\mu\text{M}$ ) によって抑制された (図 2)。同様の効果は、RAR $\alpha/\beta$  の合成アゴニストである Am80 (1  $\mu\text{M}$ ) によっても得られた。細胞・組織保護作用の機序についてさらに解析を進めたところ、Am80 の大脳皮質細胞死抑制効果は脳由来神経栄養因子の受容体である TrkB や複数のセリンスレオニンキナーゼを広く阻害する K252a (3  $\mu\text{M}$ ) によって消失した。一方、NF- $\kappa\text{B}$  阻害薬である Bay11-7082 (10  $\mu\text{M}$ ) はトロンピンにより誘発される線条体領域の萎縮を抑制したが、大脳皮質神経細胞死には影響を及ぼさなかった。また、トロンピン処置後に見られる線条体領域のミクログリアの活性化およびミクログリアにおける NF- $\kappa\text{B}$  の核内移行は、Am80 および Bay11-7082 によって抑制された。これらの結果は、ビタミン A 関連化合物が脳部位毎に異なる作用機序を介して組織保護効果を発揮することを示唆している。

以上、本研究では脂溶性ビタミン類に焦点を当てた検討を進めた結果、ビタミン A の強化補給が脳出血病態の改善効果をもたらし得ることを新たに見出した。ビタミン A は体内ではレチノイン酸に変換されることから、観察されたビタミン A の効果には RAR シグナルが関与することが推定される。詳細な作用のプロファイルについては、*in vivo* および *in vitro* の実験系を用いて今後さらに検討を進める計画である。

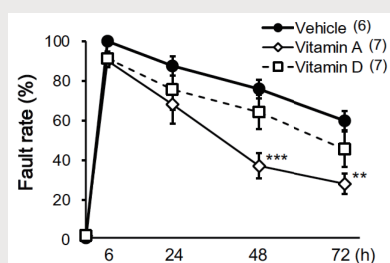


図 1 脳出血に伴う運動機能障害に対するビタミン A およびビタミン D<sub>3</sub> の効果。グラフはビーム歩行試験における後肢の踏み外し率を示す。\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs. vehicle (two-way ANOVA followed by Bonferroni test)。

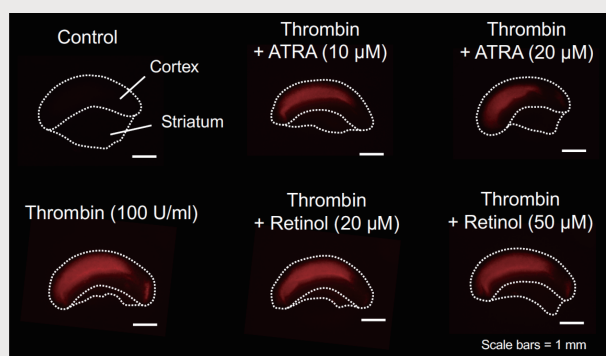


図 2 トロンピンにより誘発されるラット培養脳組織切片の傷害に対する全トランスレチノイン酸 (ATRA) およびレチノールの効果。大脳皮質 (cortex) の傷害は propidium iodide の蛍光強度、線条体 (striatum) の傷害は組織の萎縮の程度によって示される。

## 研究テーマ

# 父親の糖尿病状態が子に与えるエピジェネティックな変化の解明

研究者

名古屋大学 一柳 健司 (いちやなぎ けんじ)

### 【研究背景】

糖尿病(患者数は約300万人)は生活習慣病の中で罹患率第2位の病気であり、インスリン抵抗性の不全などによって血糖値が上がり、神経障害、網膜症、腎症、脳卒中、心筋梗塞などの疾患を併発する。近年、両親が糖尿病などの生活習慣病を罹患することにより、子供の罹患リスクが高まることが報告されている。これは、生活環境による親世代の表現型変化が次世代へ伝達されることを示しており、医学上も進化生物学上も非常に重要な問題だと言える。母親の糖尿病では子供の胎児期の子宮内環境や授乳が影響している可能性が指摘されているが、父親の糖尿病の場合、本来、精子からはゲノム情報(DNA配列)だけが次世代に伝達されると考えられていたので、その作用機序が不明であった。父親糖尿病のモデルマウスを使った実験では、その子供に発育異常が生じたり、生まれてきても耐糖能異常やインスリン抵抗性異常といった糖尿病関連症状を示すようになるが、興味深いことに糖尿病マウスの精子は正常群と比べてDNAメチル化状態が変化している。その中には糖代謝やインスリンシグナリングに関わる遺伝子の領域も含まれるが、これらのDNAメチル化異常が次世代の胎児(着床の頃の初期胚)や生後の膵島細胞でも見られるようになる。このような知見から、糖尿病によって精子DNAのメチル化情報が変化し、その情報が次世代で影響するというエピジェネティック遺伝の可能性が指摘されている。しかし、ごく一部の例外のゲノム領域を除けば、精子DNAのメチル化状態は卵子と受精した後に全体にわたってリセットされるので、「生活習慣病のエピジェネティック遺伝仮説」は混沌としている。

### 【研究結果】

そこで本研究では、ストレプトゾトシンを投与することでオス成獣マウスを高血糖状態にすることで糖尿病モデルを作成し、その精子や子供の解析を行なった。成獣では精原細胞(幹細胞)、精母細胞(減数分裂期)、精子細胞(単数体)の順に発生していき、最終的に成熟精子ができる。精原細胞から生死になるまではおよそ1ヶ月程度である。本研究では高血糖状態にして3ヶ月後、精巣から各発生段階の生殖細胞をFACSで回収し、遺伝子発現状態をmRNA-seqで調べたところ、どの細胞でも健常群と比較して大きな変化はなかった。次に精原細胞、精母細胞、精子からDNAを回収し、ゲノム全体のメチル化状態をBS-seqで解析したところ、それぞれ1000箇所を超える領域でDNAメチル化変化が生じていた。このような領域をDMRと呼ぶが、DMRにはFoxOファミリーの転写因子の結合モチーフが多く含まれていた。FoxOファミリーはインスリンに応答してリン酸化状態が変わり、遺伝子発現を制御することが知られている。次に、同じく3ヶ月間高血糖状態だったオスを正常のメスと交配し産仔を得た。高血糖由来の産仔は発育に影響はなく、絶食時血糖値も正常であったが、成熟後、インスリンを投与した時の応答性が異常になっていた。そこで、産仔の膵島(インスリンを産生する)と肝臓(インスリンに応答して血糖値を調整する)の遺伝子発現をmRNA-seqで解析したところ、膵頭ではインスリン遺伝子の発現低下が、肝臓では糖代謝関連遺伝子の発現上昇が見られた。さらにBS-seqによってDNAメチル化解析をしたところ、7000程の領域でDNAメチル化状態が変化していた。精子と同様、FoxOファミリーの結合配列に多くみ



られ、既知のエンハンサーに多かった。一部は精子 DNA メチル化異常と同じ領域で同じ異常が見られたので、これらは高血糖によって生じた精子 DNA のメチル化異常が子供に伝わり、遺伝子発現に影響し、糖代謝機能に影響を与えていることを示唆している。今後、高血糖マウス由来の胎児を解析し、本当に精子エピゲノムの異常が伝わったのか、一旦消失したのちに現れたのかを解析するとともに、産仔で新たに生まれた DNA メチル化異常領域の原因についても解析を進めたい。

## 研究テーマ

# 光線力学療法を応用した *Listeria monocytogenes* 制御に関する研究

## 研究者

東京医療保健大学 松村 有里子（まつむら ゆりこ）

### ①研究の背景と課題、目標

細菌感染症の治療には、抗菌薬投与が有用である。しかし、近年、抗菌薬が無効な薬剤耐性菌や複数の抗菌薬が無効な多剤耐性菌の増加が世界的な問題となっている。これらの耐性菌に対する新たな抗菌薬が開発・市販化されると、すぐに耐性菌が出現する。そこで抗菌薬の適正使用に加え、耐性菌を生じる可能性の少ない新たな殺菌方法が求められている。

近年、ガンの治療法の一つとして知られている光線力学療法 (Photodynamic Therapy: PDT) を応用した殺菌手法に関する検討が行われている。PDT は、光感受性物質またはその前駆体を投与した後、光照射時に光感受性物質を介して発生する一重項酸素や活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROSs) により腫瘍組織を死滅させる治療法である。歯科領域では、PDT を応用した治療として、光感受性物質にローズベンガルやクリスタルバイオレット等を用いて歯周病原性細菌の殺菌を行う治療がなされている。ガン治療において、ヘム合成過程で生成されるプロトポルフィリン IX (PpIX) が光感受性物質として有用であることに加えて蛍光性を有することから、腫瘍組織の可視化を行う光線力学診断が行われている。PpIX の前駆体である 5-アミノレブリン酸 (5-Aminolevulinic Acid: 5-ALA) の内服剤保険適用されており、5-ALA の生体への安全性も確認されている。

5-ALA の代謝経路は細菌にも存在することから、最近、薬剤耐性菌の一つであるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA) の殺菌に 5-ALA を利用した PDT の検討が行われ始めた。細菌感染において、組織に侵入した細菌は、好中球やマクロファージなどによる食食機構により殺菌除去される。しかし、一部の細胞内寄生菌は食食細胞内殺菌を回避する機構を有し、細胞内で増殖して感染を慢性化させる。また、抗菌薬を投与しても、抗菌薬が細胞内に移行しないと細胞内寄生菌に作用しないため、使用できる抗菌薬も限定される。以上の背景をもとに、細胞内寄生菌の制御に光線力学療法を応用した殺菌手法の適用が期待される。そこで本研究では、代表的な細胞内寄生菌として、食肉や乳製品、野菜などの食品を介して経口的にヒトに感染するリステリア症の原因菌である *Listeria monocytogenes* を対象に、ALA-aPDI の効果について詳細に検討した。

### ②実験方法

使用菌株は *L. monocytogenes* の標準菌株 4 種を用い、細胞にはマクロファージ様細胞である J774-1 細胞と THP-1 細胞を使用した。ダルベッコリン酸緩衝溶液 (Dulbecco's phosphate buffered saline: D-PBS(-)) またはブレインハートインフュージョン (Brain heart infusion: BHI) 培地で約 109 CFU/mL に調整した菌懸濁液 900  $\mu$ L と 5-ALA 水溶液 100  $\mu$ L を混合して一定時間暗所下でプレ培養後、攪拌しながら波長 405 nm の LED 光を一定時間照射し、作用液の一部を BHI 寒天培地で 24 時間培養して生菌数を計測した。5-ALA とプレ培養後の細胞内に *L. monocytogenes* を寄生させた後、波長 405 nm の LED 光を一定時間照射して、細胞内から細菌を取り出し、BHI 寒天培地で 24 時間培養して生菌数を計測した。

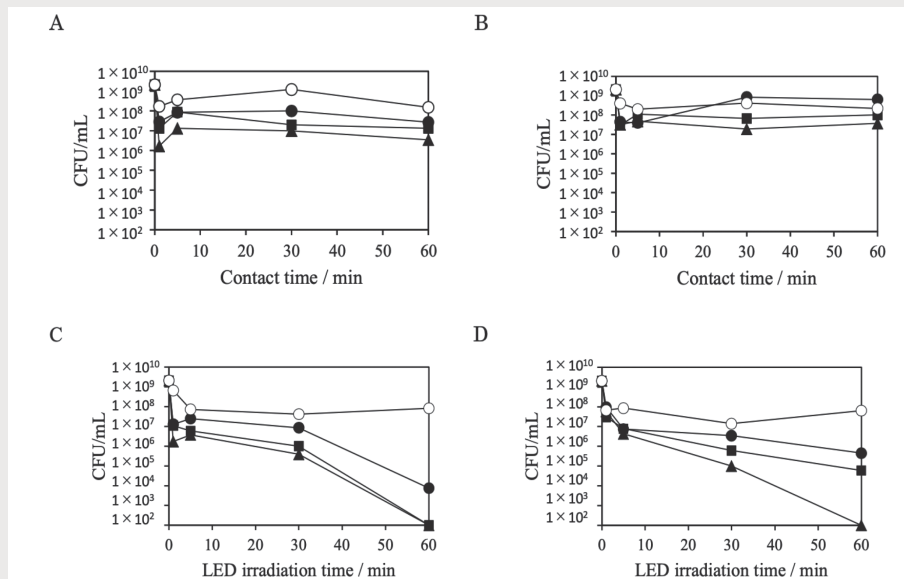


図 細胞内に寄生した *L. monocytogenes* ATCC19112 に対する ALA-aPDI 効果  
A、B：LED 未照射、C、D：LED 照射。A、C：J774-1 細胞、B、D：THP-1 細胞  
5-ALA 濃度：0 mg/mL (○)、0.5 mg/mL (●)、2.5 mg/mL (■)、5.0 mg/mL (▲)。

### ③研究成果

60 分間の光照射で *L. monocytogenes* ATCC19112 と ATCC19113 の生菌数は検出限界値以下となり、*L. monocytogenes* ATCC15313 と ATCC19115 は生菌数の減少が認められた。120 分間の光照射ではいずれの菌株も検出限界値以下となった。5-ALA の塩酸塩を中和すると 30 分の光照射で生菌数の減少が認められはじめた。5-ALA 存在下で *L. monocytogenes* を培養すると、600～650 nm 付近の蛍光強度が増加することから、*L. monocytogenes* 内にポルフィリン化合物が時間依存的に蓄積されることを確認した。細胞内に寄生した *L. monocytogenes* に対する ALA-aPDI 効果は、いずれの細胞を用いても 60 分間の光照射で生菌数は検出限界値以下となった。

### ④結論

5-ALA が *L. monocytogenes* 内で代謝されてポルフィリン化合物を生成することが明らかとなった。また、*L. monocytogenes* の殺菌に ALA-aPDI は有効であり、細胞内に寄生した *L. monocytogenes* の殺菌にも応用可能であることが示唆され、本法が耐性菌を生じにくい新たな殺菌手法となることが期待された。これらの成果は、「人間の健康」に立脚した「美」をみすえて、「美」をそこなう細菌のみを制御することで「人間の健康と美」の恒常的な維持に大きく貢献できると言える。

## 研究テーマ

# 新規ミトコンドリア活性化機構を介する健康長寿の実現

## 研究者

東京理科大学 樋上 賀一（ひがみ よしかず）

研究期間内に以下の点を明らかにした。

- (1) カロリー制限、食餌誘導性肥満、脂肪特異的 MIPEP 欠損マウスの脂肪組織を用いた RNA-seq データを解析することにより、以下の点を明らかにした。
  - 1) 脂肪特異的 MIPEP 欠損マウスと食餌誘導性肥満マウスとも免疫・炎症関連遺伝子発現は増加し、ミトコンドリア関連遺伝子発現は低下し、類似した遺伝子発現プロファイルを示した。特に脂肪特異的 MIPEP 欠損マウスではミトコンドリア関連遺伝子発現の低下は顕著であった。また、ミトカインといわれる遺伝子群の発現は増加したが、ミトコンドリアシャペロンやミトコンドリアプロテアーゼ関連遺伝子発現の増加は見られず、脂肪特異的 MIPEP 欠損マウスでは典型的なミトコンドリアアンフォールデッドプロテイン反応が生じているとは言えなかった。
  - 2) 一方、ごく一部を除き CR マウスと脂肪特異的 MIPEP 欠損マウスは類似した遺伝子発現プロファイルは示さなかった。
  - 3) CR マウスと FKO マウスでは、ミトカインの 1 つである FGF21 の発現がともに増加した。少なくとも CR にともなう FGF21 発現の増加は、レプチン発現の低下にともなう脂肪酸合成関連転写因子 SREBP-1c 発現の増加により誘導された可能性が考えられた。
- (2) Mipep 遺伝子発現制御に関して、Mipep 遺伝子のプロモーター領域をクローニングして、ルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、以下の点を明らかにした。
  - 1) 転写開始点 -200 から +100 に基本転写因子結合領域が存在する可能性が示唆され、候補転写因子が同定された。しかしながら、この領域には CLOCK/BMAL1 タンパク質複合体の結合部位は存在しないようであった。
  - 2) CR に伴う Mipep 遺伝子発現の増加は SREBP-1c 欠損マウスでキャンセルされたが、Mipep 遺伝子発現の基本転写制御には SREBP-1c は直接関わっていないようであった。
- (3) FL-Mipep と  $\Delta$ 15,16-Mipep の過剰発現が脂肪細胞のミトコンドリア機能におよぼす影響を検討したところ、 $\Delta$ 15,16-Mipep では機能が低下している可能性が示唆された。
- (4) スプライシング因子 SRSF1 の過剰発現細胞とノックダウン細胞を用いた解析の結果、SRSF1 は Mipep のスプライシングには関わっていないようである。

## 研究テーマ

# ヒスチジン摂取によるヒスタミン神経系の活性化と健康的脳機能の向上

## 研究者

東北大学 谷内 一彦（やない かずひこ）

ヒスチジンは必須アミノ酸としてタンパク質生合成に欠かせないアミノ酸であるが、ヒスチジン脱炭酸酵素によりヒスタミンへと変換される。そのため、ヒスタミンの前駆物質としても極めて重要であり、我々は以前の研究で低ヒスチジン食が脳内ヒスタミン神経系の抑制をもたらす不安様行動を惹起することをマウスを用いて示した。そこで本研究では実験動物にヒスチジンを追加投与することが、ヒスタミン神経系の活性化及び脳機能の向上につながることを目的として実施した。

まずヒスチジンを経口摂取することにより、血中および脳内のヒスチジン濃度がどの程度増加するのかを検討した。血液中のヒスチジン濃度は1時間後に投与前の5倍程度に上昇したが、3時間後には1.4倍程度であった。しかし脳内のヒスチジン濃度は1時間後に投与前の7倍になり、3時間後でも8倍程度の高い濃度が維持されていることが明らかとなった。従って、ヒスチジンを経口摂取した場合、脳内に十分量のヒスチジンが移行すること、また脳内ヒスチジン濃度が長時間にわたり高い状態が維持されることが示された。

次に脳内に移行したヒスチジンが脳内ヒスタミン生合成の増加につながるのかどうかを検討した。雄性Wistarラットに1.2 g/kgのヒスチジンを経口投与し、30分後から6時間後までの脳内ヒスタミン量を測定した。視床下部および前頭前皮質からホモジェネートを作製しこれらに含まれるヒスタミン濃度をHPLC法を用いて測定した。その結果、視床下部および前頭前皮質の両部位において、投与前と比較して2から3倍程度のヒスタミン増加が30分後から認められた。またヒスタミン増加作用は経口投与後少なくとも6時間継続することが明らかとなった。更にin vivoマイクロダイアリシス法を用いて、細胞外ヒスタミン濃度についても検討を行った。前頭前皮質および前脳基底部の神経細胞群に脱分極刺激を与えて、その際に放出されたヒスタミン量をHPLC法を用いて測定を行った。生理食塩水投与群では脱分極刺激により2-3倍程度のヒスタミン量増加が認められたが、ヒスチジン投与群では4-7倍程度のヒスタミン量増加が確認できた。従って、ヒスチジン摂取が神経細胞からのヒスタミン放出量に大きく影響することが示された。以上のことから、ヒスチジンの経口摂取は、脳内ヒスタミン量の増加をもたらす、ヒスタミン神経系を活性化することが明らかとなった。

次にヒスチジンの経口摂取により、行動変容を起こすことが出来るのかをマウスを用いて検討した。雄性CD2F1マウスを生理食塩水投与群とヒスチジン投与群の2群に分けた。そして記憶能に与える影響を、Y mazeテストを用いて比較検討した。その結果、ヒスチジン投与群の方が有意にY mazeテストにおける交替行動率が増加し、経口ヒスチジン摂取が記憶能の向上に寄与することが明らかとなった。次にこの記憶能の向上がヒスタミン神経系の活性化によるものかどうかを薬理的に検討した。ヒスチジン経口摂取による記憶能向上作用は、ヒスタミン合成酵素阻害薬であるフルオロメチルヒスチジンを脳室内投与することにより消失した。従ってヒスタミン神経細胞に存在するヒスタミン合成酵素によって、脳内ヒスチジンがヒスタミンへと合成されることが、記憶能の向上に必須であることが示された。また神経細胞の活性化指標であるc-fosタンパク質の発現について免疫組織学的染色法を用いて検討した。その結果、前頭前皮質および前脳基底部においてヒスチジンの経口摂取によるc-fos発現量増加が確認できた。両脳部位の活性化が記憶能向上作用に関わる可能性が示された。

以上のことから、経口摂取されたヒスチジンが脳内でヒスタミンへと変換されることで、ヒスタミン神経系の賦活化が生じて、マウスの記憶能を向上させると考えられた。また記憶能の向上に重要な脳部位として前頭前皮質および前脳基底部が考えられた。本研究によりヒスチジン摂取がヒスタミン神経系の活性化及び脳機能向上をもたらすことが示された。



研究テーマ

# マウス体毛の周期的形態変化を生み出す細胞動態の解明

研究者

国立研究開発法人理化学研究所 武尾 真（たけお まこと）

生物の形態形成過程や恒常性の維持過程において、周期的なリズムが重要な役割を果たしている。哺乳類の毛髪は出生後も周期的な成長と退縮を繰り返す（毛周期）、成長期の毛球部において毛母細胞と毛乳頭細胞の相互作用により毛幹が形成される。ヒトやマウスの毛幹は周期的な形態変化（うねり）を示し、加齢に伴ううねりに規則性がなくなることにより毛並みがパサつくことに加え、光の反射・散乱・透過量に影響し、毛髪の光沢＝美しさを減少させる要因となる。マウス体毛の Zigzag 毛は一毛周期の間に必ず3回変曲することにより、一定周期のうねりを示すという形態的特徴を持つが、この周期性を調節しているメカニズムは明らかとなっていない（図 1a）。そこで、本研究では形態変化の不規則性を改善し、毛髪の美しさを根本から取り戻す方法の確立を目指し、マウス zigzag 毛をモデルに、周期的な変曲リズムを作り出すメカニズムを明らかにすることを目的とした。

はじめに、変曲点の特徴を明らかにするために毛幹の形態的解析を行なったところ、変曲点においては毛幹が細く絞り込まれるとともに、ねじれが生じていることが明らかとなった（図 1a）。周期全体にわたる経時的解析から、変曲点は毛包の最下端に位置する毛球部で形成された直後にすでに認められ、各変曲点は3日に一度に形成されると推定された（図 1b）。成体マウスと老齢マウスの比較から、老齢マウスにおいては毛幹ごとの変曲点間距離や変曲角度のばらつきが大きくなることが明らかとなり、変曲パターンの乱れが毛髪の美しさを減少させる一因となることが確かめられた（図 1c）。

毛幹は毛球部において上皮細胞である毛母細胞が、間葉細胞である毛乳頭細胞と相互作用することにより分化、角質化することで形成される。そこで、細胞周期レポーターマウスを用いて、ライブイメージングによる細胞動態およびセルカインेटクス解析を行った。その結果、変曲点形成期において、毛乳頭を中心に、左右非対称な細胞分裂を停止した毛母細胞集団の形成が認められた（図 2a）。この分裂停止毛母集団は毛幹の成長とともに毛包上部へと移動し、毛幹を絞り込むとともにねじれを形成している様子が観察された（図 2b）。この結果は、毛母領域の非対称な分裂停止細胞集団が変曲点形成に重要な役割を果たしていることを示唆している。

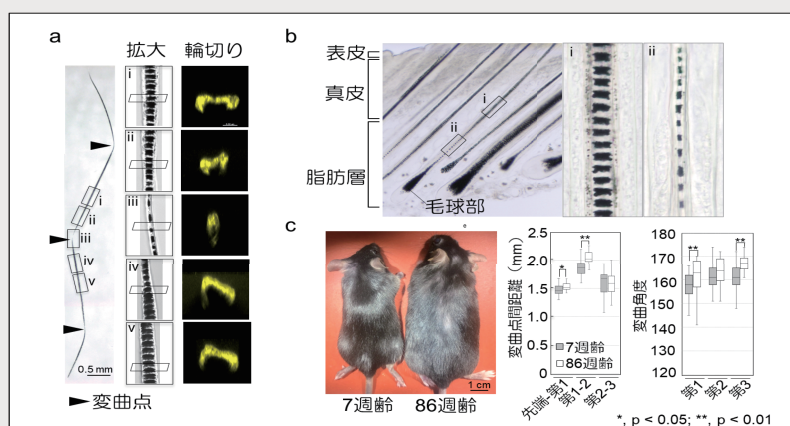


図 1 Zigzag 毛幹の形態的特徴と加齢に伴う変化

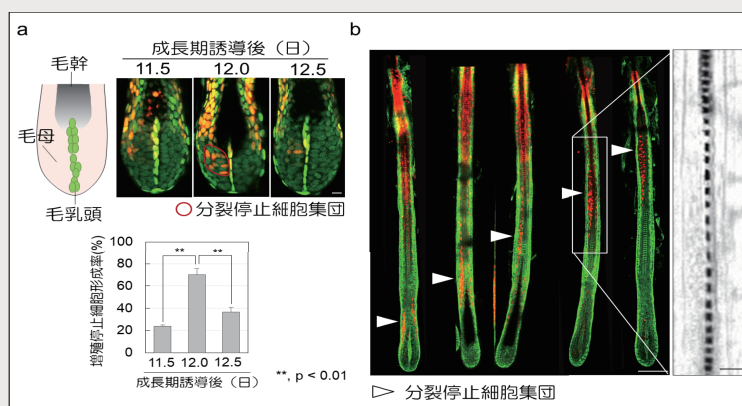


図2 左右非対称な増殖停止毛母細胞集団と変曲点形成

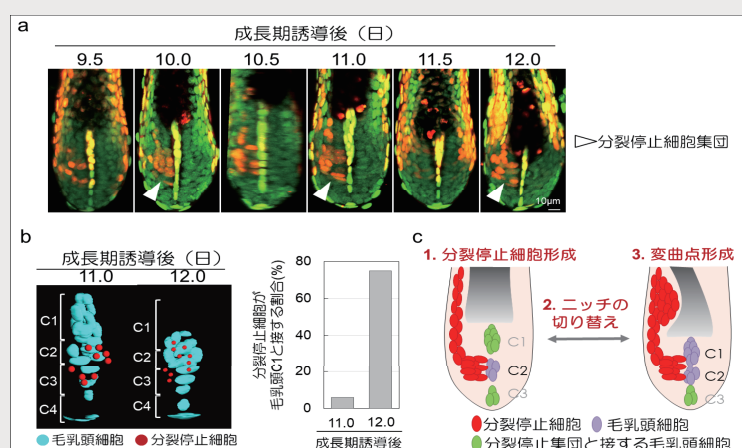


図3 周期的な毛乳頭ニッチの切り替えによる変曲点形成

そこで、分裂停止細胞集団が変曲点形成期特異的に形成されるか明らかにするため、長期間の経時的観察を行ったところ、分裂停止細胞集団は1日に1回形成されることが明らかとなった(図3a)。さらに、一細胞レベルにおける毛母細胞および毛乳頭細胞の時空間的配置解析から、変曲点形成期とそれ以外の時期において、分裂停止毛母細胞集団と接する毛母細胞が異なることが見いだされた(図3b)。先行研究から、毛乳頭細胞は4つのクラスターに分類され、それぞれのクラスターが毛母細胞に対するマイクロニッチとして機能し、毛母の分化運命を制御していることが示されている。これらの事実は、非対称な分裂停止毛母細胞集団の形成と、この集団と相互作用する毛乳頭マイクロニッチの切り替えが、Zigzag毛における周期的な毛幹形態変化の細胞動態メカニズムであることを強く示唆している(図3c)。

周期的な生体リズムは、生物の正常な発生や恒常性の維持過程において重要な役割を果たしており、生体リズムを生み出すメカニズムの解明は、「人間の健康と美」を維持するために非常に重要な課題である。毛髪においては、周期的な形態変化パターンの乱れが加齢に伴う毛髪のパサつきや光沢の低下をもたらし、美しさを減少させる一因と考えられている。現在、髪的美しさを維持、回復するための様々な商品や方法が存在しているが、これらの方法は髪に不足した成分を補う、一時的に髪を形状を変化させるなどの対症的な方法に留まっている。本研究により、毛髪の周期的なパターン変化を生み出す細胞メカニズムの一端が明らかとなり、今後細胞動態メカニズムと変曲点形成の機能的な因果関係を明らかにする必要があるものの、本研究の成果は形態変化の不規則性を改善し、「毛髪的美しさ」を根本から取り戻す方法の確立につながるものと期待される。また、細胞のターンオーバー周期の破綻による癌や老化など、他の生体リズムの破綻によってもたらされる「健康や美」の低下に対する新たな予防、治療法に向けた新たな概念をもたらすものと期待される。

## 研究テーマ

# 「代謝で免疫を制御する」：Th17/Treg バランスをコントロールする機能性脂質の探索

## 研究者

公益財団法人かずさ DNA 研究所 遠藤 裕介（えんどう ゆうすけ）

### ①研究の背景及び目的

近年肥満人口は世界規模で増加の一途をたどっている。日本においても、2011 年の肥満症診断基準の改定では肥満度分類「高度肥満」、肥満関連疾患には「肥満関連腎臓病」を新たに加えるなど、その増加に伴う対応がなされている。肥満関連疾患というと糖尿病や動脈硬化症が注目されがちであるが、自己免疫疾患・喘息といった免疫関連疾患の発症リスクが上昇することも明らかになっている。それゆえ、肥満関連疾患については代謝システム異常だけでなく免疫システムも含めた双方向からの研究が必要とされているが、どのような細胞によって、またいかなる代謝物・脂質を介して免疫システムの破綻がおり、免疫関連疾患のリスクが上昇するかなど、未だ明らかになっていない点が多い。

本申請では、生体にとって様々な弊害をもたらす高度肥満環境における免疫細胞を、脂質代謝とのクロストークの観点から解析する。これまでのイムノメタボリズム解析で得られた成果（炎症性免疫細胞と脂質代謝との関連性）を基に、制御性・炎症性免疫細胞をコントロールする脂質を同定して「代謝で免疫を制御する」ことを目標として研究を開始した。

### ②研究方法

肥満環境における組織（乾癬：皮膚、糖尿病：脂肪・膵臓および脾臓・末梢血）の Th17 関連細胞（Th17・ILC3・gdT）/Treg バランスについて FACS 解析を用いて経時変化の解析を行った。各種臓器について、その病理像・免疫染色解析（H&E 染色、PAS 染色、およびマッソン・トリクローム染色）、インスリン、クレアチニン、尿糖/タンパク測定を行い、炎症性細胞の浸潤・線維化等の観点から病態重症度を推し量った。また、この高度肥満の重症化群では Treg の顕著な減少が認められていることから、その影響について、Rag2 欠損マウス、Treg depletion 抗体による Treg 除去群によって高度肥満病態への影響、特に Th17 関連免疫細胞および各種臓器の病理像等についても同様に検討を行った。さらに脂質の重要性について評価するべく脂質割合の異なる食餌を用いて高度肥満マウスを作製し、病態への影響を検討した。また、Rorc-cre マウスと脂肪酸合成の律速酵素である ACC1 fl/fl マウスをかけ合わせることで、Th17 関連細胞全ての細胞の機能をコントロールでき、高度肥満重症化の病態改善が認められるか検討を行う。同様に Treg についても ACC1 fl/fl マウスと Foxp3-cre マウスをかけ合わせることで我々が同定した Treg 特異的脂質代謝酵素 Acsbg1 欠損マウスを用いて高度肥満病態への影響について解析を進めた。細胞機能については IL-17A や IL-17F のサイトカイン産生能、および病態誘導能を基に判断した。

### ③研究成果

はじめに高度肥満マウスの免疫細胞プロファイルについて明らかにするべく各臓器における浸潤免疫細胞について FACS 解析を行った。予備的知見で高度肥満により顕著な変化が認められた制御性・炎症性免疫細胞について全身の組織で動態解析を行った。各臓器における Foxp3 の発現、DNA に対する自己抗体、および免疫細胞のサイトカインプロファイルについて検討を行ったところ、高度肥満重症化マウスにおい



て肺や脾臓などの二次リンパ組織だけでなく脂肪組織においても制御性 T 細胞の著しい減少が認められた。また、それに伴い、血中の抗 DNA 抗体価が優位に上昇することが示された。さらに、制御性 T 細胞の減少に反比例するように、自己免疫疾患に重要なサイトカインである IL-17、および好中球の増加、また肺においては好酸球性炎症と関わりの深い IL-5 の産生増加が認められた。

組織炎症について検討を行うべく、各組織の病理像解析を行った。重症化マウスの肝臓においては、空胞変性、マクロファージ用細胞の集積、また壊死巣（赤矢印）が認められるなど強い炎症病態を示すことがわかった（図 1 左）。腎臓においても尿細管変性や尿細管拡張、および糸球体硬化様の変化が認められた（図 1 中）。脂肪組織においてはマクロファージ様細胞の増加、および間質の肥厚が認められ、明らかな線維化症状を呈することが示された（図 1 右）。

これらの病理像や網膜症が起きていることから、重症化マウスでは糖尿病が重症化し、糖尿病性腎症が起きていると考えられた。次に、高度肥満重症化をどの種の免疫細胞が引き起こすのか解析するべく、T/B 細胞が存在しない Rag2 欠損マウスを用いて検討を行った。Rag2 欠損マウスにおいても高脂肪食によって 10 週間までは野生型マウスと同様に体重増加が認められたが、20 週を過ぎた頃から体重が減少し、高度な炎症病態を示す重症化群が多数認められた。最終的に 35 週までには 6 割程度のマウスが高度重症化の症状を示すに至った（最大体重時と比べ体重が 30% 低下した時点で安楽死を行なっている）。Rag2 欠損マウスで重症化群の増加が認められたことから、制御性 T 細胞が高度肥満病態の抑制に重要な役割を担っていることが推測された。また、Rag2 欠損マウスは炎症性 T 細胞集団も欠失しているため、高度肥満重症化の病態には、ILC、および自然免疫系の細胞だけで十分に誘導されることがわかった。現在、より直接的に制御性 T 細胞の作用について検討するべく、制御性 T 細胞のみ除去した状態で高度肥満誘導を試みている。途中段階ではあるが、制御性 T 細胞の除去から一ヶ月程度で体重減少が認められ始めているため、制御性 T 細胞が高度肥満重症化の炎症病態を抑制している可能性が非常に高いことが示されている。また、食餌の脂質含有量の違いによる高度肥満重症化への影響についても検討を行った。これまでの実験では全て脂質含有量 60%（カロリー換算）で行っていたが、それよりも脂質含有量の低い 32% の食餌を用いて比較検討を行ったところ、高度肥満重症化マウスの頻度の低下およびその遅延が認められた（図 2）。

さらに、現在 ACC1x CD4-cre、ACC1x RORg-cre、および Acsbg1 欠損マウスを用いて高度肥満マウスの作製を行っている。Acsbg1 欠損マウスでは一部フェノタイプの改善が認められている。

今回の申請研究により、以下に示す新しい知見が得られた。

- (1) 高度肥満重症化マウスでは全身性の制御性 T 細胞の減少、および炎症誘導能の高いサイトカイン産生免疫細胞（病原性リンパ球）の増加という免疫システムの破綻が起こることが示された。
- (2) 高度肥満重症化マウスは、肝炎や脂肪組織炎症だけでなく、糖尿病が重症化し、糖尿病性腎症が起きていると考えられた。
- (3) Rag2 欠損により、高度な炎症病態を示す重症化群が多数認められた。
- (4) 脂質含有量の違いにより高度肥満重症化マウスの頻度低下、および遅延が認められることが示された。

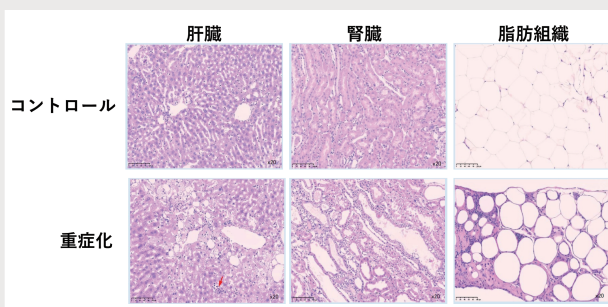


図 1 高度肥満重症化における組織病態

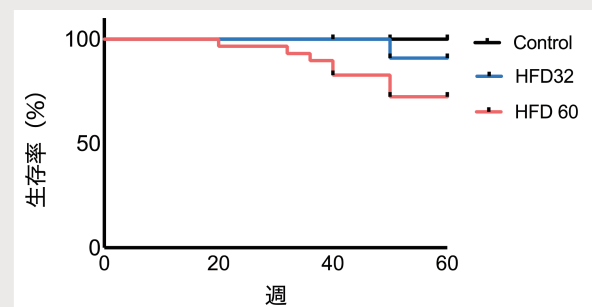


図 2 脂質含有量の違いによる高度肥満病態への影響

## 研究テーマ

# 腸内シュウ酸分解菌によるシュウ酸吸収の分子メカニズムの解明

## 研究者

岡山大学学術研究院医歯薬学域 山下 敦子（やました あつこ）

### 【研究背景と目的】

シュウ酸は、ホウレンソウをはじめとする葉菜類やお茶などに含まれ、体内に摂取された後、消化管から吸収され、主に腎臓・尿路系を介して体外に排出される。このとき、過剰なシュウ酸は、尿路シュウ酸カルシウム結石発症のリスクファクターとなる。一方、消化管内には腸内細菌の1種であるシュウ酸分解菌 *O. formigenes* が存在し、同菌によるシュウ酸吸収・分解が、宿主である私たちの尿路シュウ酸カルシウム結石のリスクを低減させる一助となっている。このシュウ酸吸収は、同菌にとっては、唯一の炭素源獲得と、エネルギー源となる細胞膜を介したプロトン勾配獲得をもたらす。この宿主・共生細菌双方にとって重要なシュウ酸吸収は、菌細胞膜に存在する膜タンパク質であるシュウ酸輸送体 OxIT によって担われているが、その作動機構の詳細は不明であった。その一因として、OxIT に対する簡便な機能解析系が存在しなかったことが挙げられる。

そこで、本研究では、OxIT に対して適用可能な簡便な機能解析系を確立し、この系を用いた変異体解析を実施することで、得られた情報から OxIT の作動機構を明らかにすることを目標として、研究を実施した。

#### (i) 示差走査蛍光分析によるリガンド結合解析の OxIT への適用

示差走査蛍光分析は、これまでもいくつかの膜タンパク質に対する熱安定性解析やリガンド結合解析に利用されてきたことから、OxIT のリガンド結合解析にも適用できる可能性が期待された。そこで、市販の解析試薬である Protein Thermal Shift Dye (Applied Biosystems)、膜タンパク質解析における報告例がある N-[4-(7-diethylamino-4-methyl-3-coumarinyl) phenyl] maleimide (CPM; Alexandrov et al. Structure 2004) または BODIPY FL L-cystine (BFC; Hofmann et al. Anal. Biochem. 2016) を用いて、StepOne (Applied Biosystems) または Mx3000 (Agilent) リアルタイム PCR システム装置を利用した OxIT のシュウ酸結合解析を試みた。その結果、Protein Thermal Shift Dye を用いた場合は、非変性状態におけるバックグラウンドの蛍光強度が高く、OxIT 解析には適用できないことが判明した。一方、CPM および BFC を用いた場合は、OxIT の熱融解曲線は得られたものの、複数のサンプル間での再現性が低かった。これらの結果から、示差走査蛍光分析の OxIT への適用は困難であることがわかった。

#### (ii) 新規輸送機能解析系の確立

岡山大学・須藤雄気教授らは、これまでに種々の微生物から光依存性プロトンポンプを見出しており、これらを利用して、OxIT の輸送による膜電位形成を光依存性プロトン輸送と共役させることで、輸送機能を評価できる新規解析系が構築できると期待された。そこで、OxIT と、内向きプロトンポンプ *Rubricoccus marinus* 由来ゼノロドプシン (XeR; Inoue et al. Phys.Chem. Chem. Phys. 2018) を大腸菌に共発現し、XeR による光依存性プロトン輸送の結果生じる外液の pH 変化を、OxIT によるシュウ酸輸送の前後で測定することで、OxIT の輸送機能が評価できるかを検証した。溶液条件や光照射条件も含めた種々の条件を検討した結果、OxIT によるシュウ酸輸送後の pH 変化は、シュウ酸輸送前の pH 変化とくらべて有意に大きいことを確認し、その変化量を再現性よく検出できる条件を確立した。さらに、pH 変化の



増大量はシュウ酸濃度に依存すること、また、この pH 変化の増大は、OxIT 非存在下や、OxIT の輸送機能が欠失することが報告されている R272A および K355Q 変異を導入した OxIT 発現時には見られないことが確認できた。これらの結果から、確立した系が、OxIT の輸送機能評価系として有効であることを明らかにした。(成果発表 1)

### (iii) OxIT 変異体解析

OxIT について、新たに 8 アミノ酸残基の部位特異的変異を導入し、(ii) で確立した輸送機能解析系を用いて、輸送機能解析を行った。その結果、これまでに報告がなかった部位も含めた 6 アミノ酸残基の変異について、輸送機能の減弱が確認されたことから、これらのアミノ酸残基が OxIT の輸送機能に重要な役割を果たしていることを新たに見出した。(成果発表 2)

### 【研究成果まとめ】

OxIT の輸送機能を評価できる輸送機能解析系を新たに構築した。この系は、輸送体と光依存性プロトンポンプを共発現させた大腸菌生菌を解析に用いるもので、輸送体の可溶化・精製などの過程を経ずに輸送機能評価が可能のため、簡便に解析を行うことができ、変異体なども含めた不安定な輸送体の解析にも適している。この方法は、膜電位形成性輸送を行う輸送体一般に適用可能であり、新たな輸送機能評価法として他の輸送体研究の進展にも貢献できるものである。さらに、本法を用いることで、OxIT の輸送機能に関わるアミノ酸残基を複数見出した。今後他の研究手法による解析も含めさらに研究を進展することで、OxIT のシュウ酸吸収機構の解明が期待できる。

### 【成果発表】

1. Hayashi M, Kojima K, Sudo Y\*, Yamashita A\* “An optogenetic assay method for electrogenic transporters using Escherichia coli co-expressing light-driven proton pump” Prot. Sci. (2021) 30, 2161-2169.
2. Jaunet-Lahary, T. et al. 投稿中。

### 【謝辞】

本研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました公益財団法人小柳財団ならびに関係者のみなさまに、心から感謝申し上げます。本研究は、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・林真弘氏、須藤雄気博士、小島慧一博士との共同研究として実施しました。また、示差走査蛍光分析では、同研究科・安井典久博士、同異分野基礎科学研究所・菅倫寛博士、米倉慎一郎博士のご協力を得て実施しました。本研究にご協力いただいた方々に御礼申し上げます。

## 研究テーマ

# 光応答性薬剤による細胞治療法の確立

## 研究者

北海道大学 電子科学研究所 松尾 和哉 (まつお かずや)

### ①研究の背景及び目的

細胞が行う生命活動の中で最もダイナミックな現象として、細胞分裂がある。遺伝情報を次世代へと正確に系譜するため、S期で染色体を複製し、その染色体を一度赤道面に並べた後、等分配することで、2つの等価な娘細胞を発生させる。したがって、染色体はダイナミックに「動く」構造体であり、この「動き」によって遺伝情報の伝播が達成される。この細胞分裂過程において染色体の動きを制御しているのが、モータータンパク質 CENP-E である。CENP-E は、紡錘体(微小管)に沿って、染色体を輸送し、赤道面上に整列させる。しかし、CENP-E が機能異常を起こすと、染色体は赤道面上に整列せず、紡錘体極付近に観測される。この状態のまま、細胞分裂が進行すると、染色体異常症や細胞が癌化する大きな要因となる。本研究では、光で可逆的に制御できる CENP-E 阻害剤を開発することで、染色体を光で精密に操作する技術を確認することを目指した。この技術により、薬剤と光の融合による革新的な細胞工学・治療法を開拓する。

### ②研究方法

CENP-E 阻害剤である GSK923295 の基本骨格に定量的な光応答性を示すアリルアゾピラゾール誘導体を巧妙に導入することで、cis-trans 光異性化反応に依存して CENP-E 活性を制御できる光制御型 CENP-E 阻害剤 1 をこれまでに開発した(図 1a)。この 1 を駆使することで、CENP-E 阻害に特徴的な染色体の整列異常が観測され、365 nm の紫外光および 510 nm の可視光を照射することで、染色体の動きを光で自在に誘起できた(図 1b)。しかし、1 は、trans 体で CENP-E 阻害剤として機能し、cis 体では機能しないため、光照射する前の「初期状態」で、生体機能を変化させてしまう。初期状態では機能せず、光照射によって初めて機能する光薬理学ツールは、光トリガーで生体機能を精密に操作できるため、理想的であると考えられる。

そこで、trans-active な CENP-E 阻害剤 1 から、構造活性相関研究を基にした合理的分子設計により、cis-active な光制御型 CENP-E 阻害剤 2 を設計した(図 1c)。2 を化学合成し、その特性を吸光度測定、ATPase assay、蛍光イメージングにより検証した。

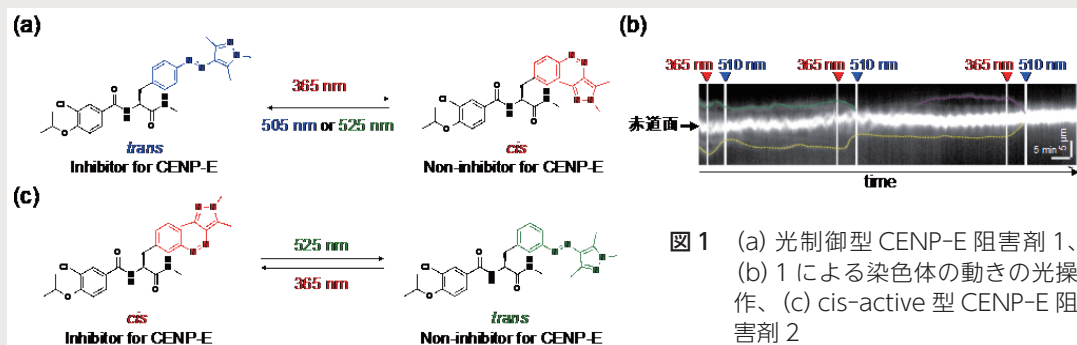


図 1 (a) 光制御型 CENP-E 阻害剤 1、(b) 1 による染色体の動きの光操作、(c) cis-active 型 CENP-E 阻害剤 2

### ③研究成果

2 の光応答性を検討した結果、光照射前には、アリルアゾピラゾール誘導体に特徴的な、よく分離した  $\pi-\pi^*$  遷移および  $n-\pi^*$  遷移が観測された。また、365 nm の光照射時には 95 % の cis 体が確認され、525 nm の光照射では 93 % の trans 体が確認され、このほぼ定量的な cis-trans 光異性化反応は、何度でも繰り返すことができた (図 2)。次に、精製 CENP-E を利用した in vitro ATPase assay を行った (図 3)。CENP-E は ATP を加水分解することで得られる化学的エネルギーを「動き」へと変換できるモータータンパク質である。そのため、2 の存在下、CENP-E の ATPase 活性を測定することで、CENP-E 阻害能を評価した。光照射前および 525 nm の光照射時の trans 体が優先する条件では、50 % 阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) は 100  $\mu$ M 以上であったのに対し、365 nm の光照射によって誘起される cis 体優先条件では、IC<sub>50</sub>=18  $\mu$ M と阻害効果を示した。よって、2 は、cis-active な CENP-E 阻害剤であることが確認できた。

また、CENP-E は、分裂期細胞において複製された染色体を紡錘体極から赤道面へと運搬する役割を持つ。そのため、CENP-E が active な状態では、染色体および CENP-E の局在は赤道面と一致するが、CENP-E が阻害されると、それらの一部は紡錘体極付近に蓄積される。そこで、2 の存在下、HeLa 細胞を用いて、染色体および CENP-E の局在を、免疫染色法により確認した (図 4)。その結果、光照射しない時あるいは 525 nm の光照射時 (trans 体優先条件) には、染色体および CENP-E の局在は赤道面に一致していた。これに対し、365 nm の光照射時 (cis 体優先条件) には、一部の染色体および CENP-E は紡錘体極付近で観察された (図 4 矢印部分)。以上から、2 は細胞でも機能する cis-active な CENP-E 阻害剤であると確認できた。今後は、得られた cis-active な光制御型 CENP-E 阻害剤 2 の阻害能を向上させ、ダイナミックな染色体の動きを精密に操作する方法論を開拓する。

なお、これらの成果は、以下に示す英国王立化学会の Org. Biomol. Chem. 誌に報告した。

K. Matsuo and N. Tamaoki, Org. Biomol. Chem., 19: 6979–6984 (2021).

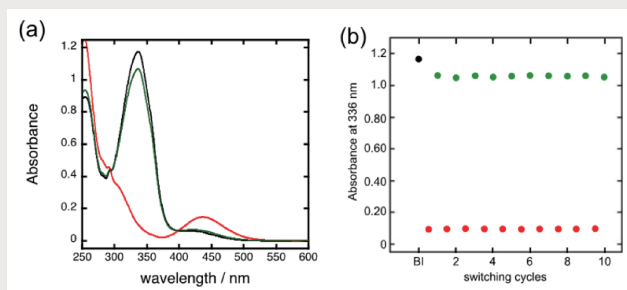


図 2 (a) 2 の吸光度スペクトル (光照射前、365 nm 光照射時、525 nm 光照射時)  
(b) 繰り返し光照射結果

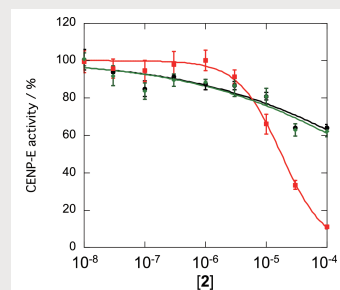


図 3 2 による CENP-E 阻害能 (光照射前、365 nm 光照射時、525 nm 光照射時)

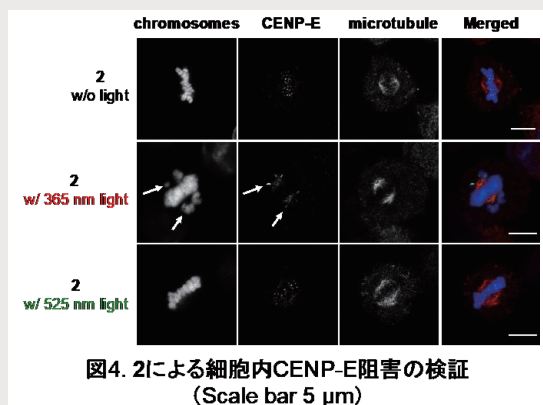


図 4. 2 による細胞内 CENP-E 阻害の検証 (Scale bar 5  $\mu$ m)

図 4 2 による細胞内 CENP-E 阻害の検証 (Scale bar 5  $\mu$ m)

## 研究テーマ

# 病気の診断に用いるアミノ酸計測用バイオセンサーの高感度化に関する研究

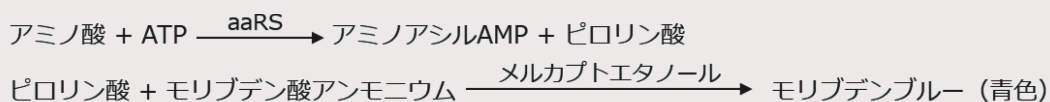
## 研究者

広島市立大学 釘宮 章光 (くぎみや あきみつ)

### ①研究の背景および目的

アミノ酸の分析に関して、医療分野においてはメタボリックシンドロームや肝臓病、糖尿病、各種がんなどの病態において、血液中のアミノ酸濃度のバランスが健常な状態とは異なってくるということが知られている。また、検体の分析を「その場」において行うことは、疾患の早期発見や疾病の病態管理に非常に有効であり、また必要とされている技術である。現在、アミノ酸の濃度は高速液体クロマトグラフ装置のような大型で高価な装置を用いて計測されているが、計測に多大な時間を要し、またクロマトグラフィー用の大量の溶媒が必要であり、その廃液処理や計測技術者の専門性、計測に係る人件費も必要とされる問題がある。

申請者は 20 種類の各アミノ酸識別能を有する酵素であるアミノアシル tRNA 合成酵素 (aaRS) を用いるアミノ酸分析法について提案している。aaRS の酵素反応式は以下の通り、基質アミノ酸とアデノシン三リン酸 (ATP) の存在下でアミノアシル AMP とピロリン酸を生成する。この生成したピロリン酸をモリブデンブルー法による呈色反応により青色の吸光度を計測することでアミノ酸濃度の定量を行うというものである。



本研究では、ヒトのからだの成長や、ヘモグロビン・白血球の産生に関与するアミノ酸の一種であるヒスチジンについて、ヒスチジンの認識材料としてヒスチジル tRNA 合成酵素 (HisRS) を用いて高感度にかつ選択的に計測するため、酵素反応に関わる化合物である ATP と活性化因子として働く塩化マグネシウムの添加量の組み合わせについて検討を行った。そして、その組み合わせの検討の結果をもとに、ヒスチジンを目的分子として定量性と選択性の評価を行った。

### ②研究方法

#### 1. 酵素反応に用いる ATP と塩化マグネシウムの添加量の検討

45.9 μM HisRS、0 および 100 μM ヒスチジン、0, 2, 5, 10, 20, 30, 40 mM ATP および 0, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100 mM 塩化マグネシウムについて全ての組み合わせ (70 通り) を検討するため 200 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) に溶解し、反応溶液のトータルを 160 μL とした。この反応溶液をマイクロチューブ用アルミブロック中で 80°C で 30 分反応させ、5 分間氷冷させた。ろ過フィルター付マイクロプレートにこの反応溶液と 1 M メルカプトエタノールを滴下、その下のマイクロプレートに 2.5% モリブデン酸アンモニウムを滴下し、2 枚のマイクロプレートを重ね合わせ、遠心分離機を用いて 1000 g、4°C で 8 分間遠心させた。遠心中、分子量の大きい酵素はフィルターにトラップされ、フィルター付マイクロプレートに残り、分子量の小さいアミノ酸やピロリン酸、ATP などがフィルターの隙間を通過し、マイクロプレートのモリブデン酸とピロリン酸が反応する。その青色の呈色反応において、マイクロプレートリーダーを



用いて 800 nm における吸光度を計測することで結合能の評価を行った。

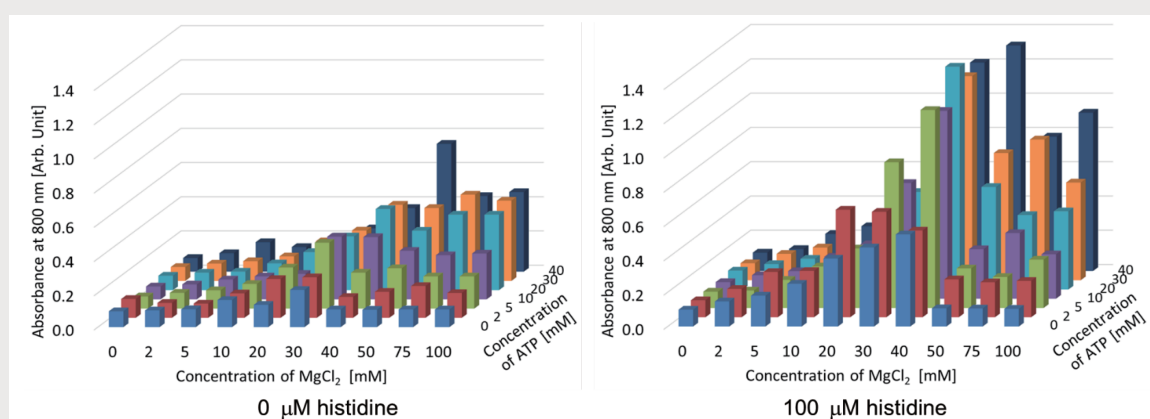
## 2. ヒスチジンの定量性と選択的計測の評価

前項で得られた ATP および塩化マグネシウム濃度をもとに、反応液中のヒスチジン濃度を 0 ～ 200  $\mu\text{M}$  と変化させて定量性の評価を行った。また、20 種類の 100  $\mu\text{M}$  アミノ酸と反応させ、ヒスチジンに対する選択性の評価を行った。

### ③研究成果

#### 1. 酵素反応に用いるアデノシン三リン酸と塩化マグネシウムの添加量の検討

酵素反応に及ぼす ATP と塩化マグネシウムの添加量について検討を行い、マイクロプレートリーダーを用いて 800 nm の吸光度を計測してグラフにしたものを図 2 に示す。その結果、40 mM ATP、50 mM 塩化マグネシウムを添加したときに高い吸光度を示した。



## 2. ヒスチジンの定量性と選択的計測の評価

前項の結果をもとに、ATP の濃度を 40 mM、塩化マグネシウムの濃度を 50 mM とし、ヒスチジンの定量性の評価を行ったところ、1 ～ 150  $\mu\text{M}$  ヒスチジンの濃度域に線形関係がみられ、定量可能であることが示された。また、20 種類の 100  $\mu\text{M}$  の各アミノ酸との反応性を評価したところ、ヒスチジンに対して吸光度が 0.6 付近と高い応答を示したのに対し、他の 19 種類のアミノ酸は水を加えたときと同じ程度の低い応答しかみられなかったことから、HisRS がヒスチジンに選択的に結合することを示した。

本研究において、酵素反応に添加する ATP と塩化マグネシウムの濃度について詳細に検討を行い、最適な濃度の化合物を添加することで、これまでは数  $\mu\text{M}$  ～ 100  $\mu\text{M}$  の濃度範囲でしか定量できなかったが、本研究の成果により定量可能な濃度範囲が 1 ～ 150  $\mu\text{M}$  と広がり、かつ低濃度域のヒスチジンの定量も可能にし、本申請研究の目的を達成することができた。またグルタミン酸やリジンなどのアミノ酸についても同様に高感度に定量可能であることを示した。

本研究の最終目標は生体内に存在するアミノ酸をターゲットとしたアミノ酸分析用小型装置を開発し、複数のアミノ酸濃度のパターンによって迅速・簡便・安価に食品の品質管理が可能な装置、さらには家庭や薬局、病院等において健康診断や病気の診断が可能な装置を開発することである。これにより、1 台の分析装置で複数の疾患の同時診断が可能になると考えられる。将来的には本研究で開発されたアミノ酸分析用小型装置を用いることで、医療分野では、現在は様々な疾病についてそれぞれ異なる装置や計測法で診断を行っているものを、本装置により 1 度に複数の疾病を診断することが可能となり、患者の精神的・費用的な負担を大幅に軽減できる。また、数千万人規模での疾患の早期発見や病態の管理に有用であり、患者のみならず健常人の食や医療に対する安心・安全を実現し、向上させることが可能になると考えられる。



## 研究テーマ

# 「可視化 I 型コラーゲン」を利用した、三次元培養細胞モデルによる in vitro コラーゲン評価系の開発

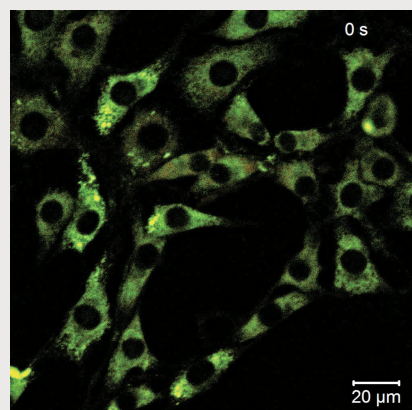
研究者

東京工業大学 田中 利明 (たなか としあき)

現在、コラーゲンには 28 種の型が知られ、中でも I 型は全コラーゲンの 90% 以上を占めて全身の皮膚や骨組織などを形成すること、骨芽細胞の分化能を高めること、分子構造と極性から高い保水性を有して皮膚の潤い、弾力、ハリに深く関与することなどの際だった特徴を有する。加齢によるコラーゲン量の減少はよく知られており、超高齢化社会へと向かう日本では、肌の美容および関節痛など健康の観点からコラーゲンに大きな関心が集まっている。加えて、その量・質的な異常は臓器線維症や関節リウマチなどの膠原病といった厚生省認定難治性疾患の病因となっており医療面からも重要な研究対象である。コラーゲンは、分子生物学的手法の開発以前から膠原線維と呼ばれて長年の研究対象となっているが、その一方、分泌過程やプロセッシング過程といった基礎的な分子レベルの情報が不足している為、コラーゲン量の人為制御は未だ困難のままである。これらの背景から、コラーゲン量を制御する薬や成分が強く求められているが、美容および健康関連分野においては、動物実験を避ける必要から新しい薬や成分の開発が困難になっており、in vivo を反映する in vitro 細胞評価系の開発が急務となっている。研究代表者は、コラーゲン生合成過程を分子レベルで知る為、「コラーゲン可視化システム」を開発し特許出願に至った。この可視化 I 型コラーゲンの単離細胞導入により、コラーゲン生合成過程(合成、輸送およびプロセッシング過程)の分子レベルでのライブイメージング解析が世界で初めて可能になった。本研究では、コラーゲンが特に深く関与する皮膚および骨に着目し、可視化 I 型コラーゲンを導入した皮膚線維芽細胞および骨芽細胞による三次元培養モデルの開発にとりくんだ。

### (1) ヒト皮膚線維芽細胞への可視化 I 型コラーゲンの導入と安定細胞株の樹立

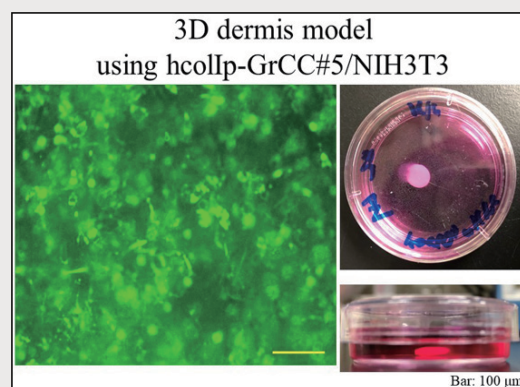
正常ヒト不死化皮膚線維芽細胞として HDR/TERT1 を使用し、可視化 I 型コラーゲン発現ベクターを高効率に導入できる transfection 方法を探した結果、TransfeX、および、Lipofectamine 3000 により、DNA：試薬=1：2 にした場合に 30% 程度の導入効率を得ることができた。(4) で開発した分泌コラーゲン簡易検出法により、DNA 導入後、ゲノム安定に達したと思われる細胞に対して培養液に分泌された可視化コラーゲンを測定したところ、分泌が見られなかった。原因を調べたところ、HDF/TERT1 細胞はコラーゲン発現に対して極めて敏感であり、内在性コラーゲンに加え、可視化 I 型コラーゲンが高発現することにより細胞が選択的に死ぬことがわかった。現在、細胞が死なない低レベルの可視化 I 型コラーゲンを発現している細胞をセルソータにより選別し、株化を進めている。一方、ヒト皮膚線維芽細胞と同時に細胞株化を試みていたマウス皮膚線維芽細胞 NIH3T3 において、可視化 I 型コラーゲンの安定発現株化に成功した(右写真)。このことから、方法論的にヒト線維芽細胞による可視化 I 型コラーゲン安定発現細胞株化が可能であることが示された。正常ヒト不死化皮膚線維芽細胞 HDR/TERT1 による株化が遅れたことから、まずは、マウス皮膚線維芽細胞 NIH3T3 の可視化 I 型コラーゲン株をモデルに用いて以後の検討を実施した。なお、このマウス細



細胞株には、ヒト I 型コラーゲン遺伝子プロモーター制御下にヒト可視化 I 型コラーゲン cDNA をつないだコンストラクトが導入してあり、発現様式およびコラーゲン線維の様子についてはヒトコラーゲンを反映するモデルとなっている。

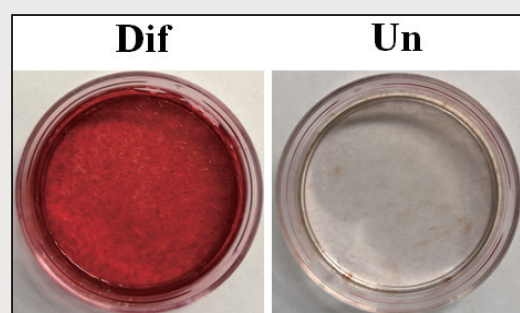
## (2) ヒト三次元培養皮膚細胞モデル評価系の構築

(1) の理由から、ヒトコラーゲン遺伝子と同様の挙動を示す可視化 I 型コラーゲンを導入したマウス線維芽細胞株を使用し、三次元培養皮膚モデル評価系の構築条件の検討を行った。コラーゲンゲルを溶解し、ここに細胞を包埋することで細胞株の多層化を試みた結果、可視化 I 型コラーゲンを安定発現する皮膚真皮モデルの構築に成功した。現在、この上面に皮膚の角化細胞を重層して培養することを試みている。なお、この細胞が細胞外に構築するコラーゲン線維には、コラーゲタンパク質に導入した蛍光タグ (GFP) が入っていることを免疫電子顕微鏡法により確認した。



## (3) ヒト骨芽細胞への可視化 I 型コラーゲン導入と安定細胞株の樹立、および三次元培養モデル評価系の構築

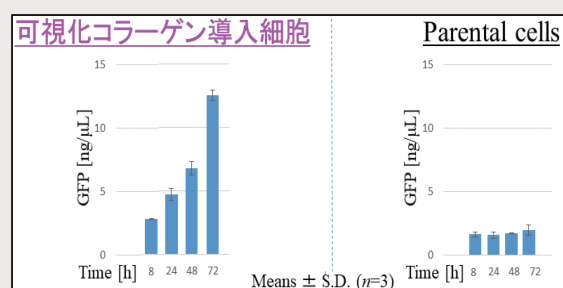
ヒト骨芽細胞に先立ち、マウス骨芽細胞 MC3T3 に可視化 I 型コラーゲンを導入した細胞株樹立に成功したことから、まずはこの細胞をもちいて 3D 培養と骨分化誘導、および、アパタイト蓄積の様子を調べた。樹立してクローン化に成功した細胞株 3 種に対し、骨分化誘導因子有無の下、4 週間の長期培養を行った。骨分化誘導因子としては、 $\beta$ -グリセルフォスフェート、アクチビン、アスコルビン酸を使用した。



骨分化状態を知るため、石灰化の指標となるアリザリンレッド染色を実施したところ、3 種の細胞株全てにおいて、分化誘導時 (Dif) だけアリザリンレッドによる染色がみられた (右)。このことから、この可視化 I 型コラーゲン安定発現骨芽細胞株は骨形成能を有していることがわかった。今後、ヒト骨芽細胞株 MG63 によって同様に株化を進め、可視化 I 型コラーゲンのヒト骨芽細胞株樹立、およびその細胞による三次元培養モデル系を構築に進む。

## (4) 可視化 I 型コラーゲンを用いた、分泌コラーゲン簡易検出法の開発

可視化 I 型コラーゲンを利用してコラーゲン分泌を素早く検出できる方法を開発した。具体的には、可視化 I 型コラーゲンを発現する細胞の培養上清に対して、汎用の蛍光アナライザーによって GFP 蛍光を測定する。条件検討を行った結果、血清および pH 指示薬の入った培養上清であっても、血中レベルと同程度のコラーゲン分泌量を再現性良く検出できるアッセイ法の開発に成功した (右グラフ)。



## 研究テーマ

# 皮膚の新陳代謝を活発にするコラーゲン様化合物の合成

## 研究者

芝浦工業大学 須原 義智（すはら よしとも）

### 【研究の背景・目的】

コラーゲンは腱、軟骨、骨の有機間質、眼の角膜のような結合組織や皮膚に見られる重要なタンパク質であり、再生医療や美容などの分野へ応用するための材料として注目されている。また、左巻きのポリペプチド鎖が寄り集まって右巻きの3本鎖ヘリックス構造をとることで、繊維組織や骨格の構造維持に必要な性質を示すことが知られており、化学的にも興味深い物質である。しかしながら、天然のコラーゲンは $\alpha$ -アミノ酸から形成されているため、体内の加水分解酵素や物理化学的安定性の問題が実用化への大きな障壁となっている。そこで我々はそれらの問題を解決し、皮膚の新陳代謝を活発にする物質へ応用する研究を行なっている。

我々は独自の方法によって、コラーゲンの元々の性質を保持しながら安定に存在できる人工コラーゲンの創製を目指している。本研究では、体内の加水分解酵素に安定なペプチド化合物として、 $\alpha$ -ペプチドに近い特有の堅いコンフォメーションをもつ $\beta$ -ペプチドに着目して、コラーゲンを構成する $\alpha$ -アミノ酸を $\beta$ -アミノ酸に変換した化合物の合成を行う。コラーゲンは、グリシン(Gly)-ヒドロキシプロリン(Hyp)-プロリン(Pro)の基本構造を持っている。既に我々は、Hypを $\beta$ -アミノ酸に変換した人工コラーゲン(Gly- $\beta$ Hyp-Pro)10の合成に成功している(図1)。我々は、このような人工コラーゲンが皮膚に浸透した後、天然コラーゲンより安定に存在できれば、体内で分解されずに長く皮膚の中に留まることができ、コラーゲンとしての効果を発揮できるものと考えている。したがって、シワを減らす効果の持続時間が飛躍的に長くなるとともに、コラーゲン様化合物によって皮膚の新陳代謝を活発にする効果を期待している。

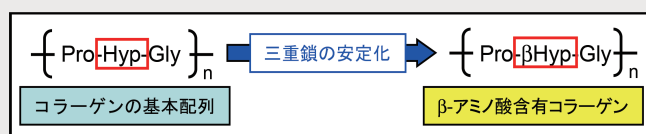


図1  $\beta$ -ヒドロキシプロリンを含む人工コラーゲンの創製

コラーゲンの皮膚に対する作用については、これまでにコラーゲンを経口摂取することで、体内での産生の向上を期待する方法が行われているが、明確な効果は確認されていない。また、わが国では高齢化社会を迎え、高齢者には変形膝関節症を罹患している患者が増えていることから、その治療として用いられるヒアルロン酸コラーゲンペプチドの研究分野にも応用可能である。以上より本研究は、現在世界で行われているコラーゲンに関する「人間の健康と美」について、科学的な視点で考察を与えることに貢献できると考えている。

### 【研究方法】

コラーゲンを構成する Gly-Hyp-Pro のそれぞれの $\alpha$ -アミノ酸を $\beta$ -アミノ酸に変換した人工コラーゲンを構築して天然のコラーゲンとの比較を行った。これら $\beta$ -アミノ酸の中で Gly を $\beta$ -アミノ酸に変換したものは、市販の $\beta$ -アラニン( $\beta$ Ala)が相当する。一方、 $\beta$ -ヒドロキシプロリン( $\beta$ Hyp)や $\beta$ -プロリン( $\beta$ Pro)



は、カルボン酸が環に沿って移動した化合物 1 とカルボン酸側へ一炭素増炭した化合物 2 の 2 種類が考えられる (図 2)。今回は化合物 2 のタイプの  $\beta$ -アミノ酸を合成して、Gly-Hyp-Pro に組み込んだ  $\beta$ -ペプチド化合物による人工コラーゲンの性質を検討した。このとき、 $\beta$ Ala は市販のものを用い、 $\beta$ Hyp と  $\beta$ Pro はそれぞれ Hyp および Pro から合成した。これらを組み込んだ  $\beta$ -ペプチドの具体的な合成方法は以下に示す通りに行った。まず Gly-Hyp-Pro に  $\beta$ Ala、 $\beta$ Hyp、 $\beta$ Pro をそれぞれひとつずつ組み込んだ trimer である  $\beta$ Ala-Hyp-Pro、Gly- $\beta$ Hyp-Pro、Gly-Hyp- $\beta$ Pro を液相合成法によって合成した。次に固相合成法によって trimer を繋げて 30 mer を形成させた。すなわち  $\beta$ Ala もしくは Gly の C-末端をレジンに結合させて反応開始地点とし、ペプチド自動合成装置により  $\beta$ Hyp、Pro を順次カップリングさせた後、それら trimer を順次 9 回カップリングさせて、目的とする 30 mer の ( $\beta$ Ala-Hyp-Pro) 10、(Gly- $\beta$ Hyp-Pro) 10、(Gly-Hyp- $\beta$ Pro) 10 を合成した。最後にレジンから切り離して得られたペプチド鎖を、HPLC で精製して高純度のペプチド鎖を得た (図 3)。

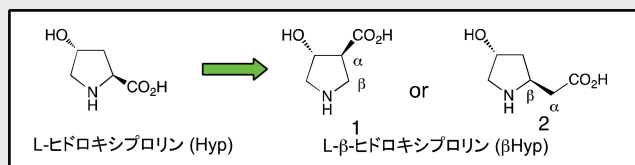


図 2  $\alpha$ -アミノ酸から  $\beta$ -アミノ酸への変換した化合物

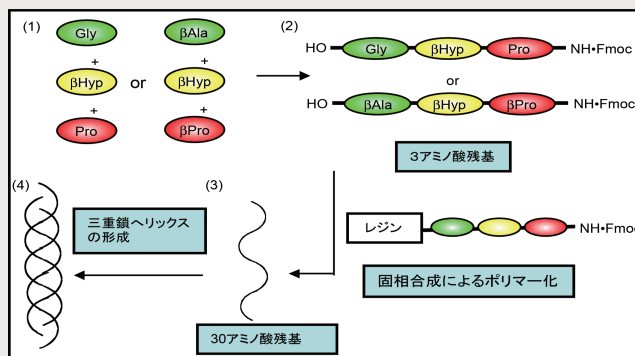


図 3 人工コラーゲン (30 mer) の合成

## 【研究成果】

上記で得られた (Gly- $\beta$ Hyp-Pro) 10 については、ヘリックス構造は有しているものの、三重鎖は形成していないことが CD スペクトルや NMR による解析により確かめられた。興味深いことに、このペプチド鎖は熱安定性が非常に高く、(Gly-Hyp-Pro) 10 の融点が  $58^{\circ}\text{C}$  であるのに対して、 $80^{\circ}\text{C}$  以上でも安定に存在できることがわかった。このことから、 $\beta$ -アミノ酸を含むこのペプチド鎖は、新しい生体材料に応用できる可能性があると考えられた。現在、その他の ( $\beta$ Ala-Hyp-Pro) 10、(Gly-Hyp- $\beta$ Pro) 10 についても熱安定性やコンフォメーションを調べている。

これら 30 mer は得られた量が数 mg と極少量のため、動物実験に用いるには不十分であった。そこで、十分な量が確保できるそれらの trimer を用いて、培養細胞を用いた皮膚への作用を調べることにした。皮膚の新陳代謝は老化と密接な関連があり、皮膚老化は加齢以外にも、紫外線曝露による DNA 損傷を含む様々なストレスが原因となっている。そこで今回合成した trimer が紫外線曝露による DNA 損傷にどのような影響を及ぼすのかを検証した。ヒト正常皮膚角化細胞株 (HaCaT) を培養し、trimer を 24 時間事前処理した後、UVB を  $15 \text{ mJ}/\text{m}^2$  の強度で曝露した。曝露直後の DNA 損傷を dot blot 法を用いて cyclobutanepyrimidine dimers (CPD) を検出ことで評価した。その結果、trimer を事前曝露した角化細胞では、紫外線曝露による DNA 損傷を阻害することが明らかとなった。これらの結果は、紫外線曝露による DNA 損傷の予防に trimer が効果的であり、紫外線曝露による皮膚老化、新陳代謝低下を予防できる可能性が示唆された。現在、各 trimer による効果の違いをはじめとしたさらに詳細な検討を行っている。

## 研究テーマ

# 皮膚疾患に対する善玉菌移植療法の開発を目指した、乾癬発症における‘善玉・悪玉’細菌叢の同定と評価

## 研究者

関西医科大学 村山 正承（むらやま まさのり）

尋常性乾癬（以下、乾癬）は皮膚の紅斑や肥厚、鱗屑・落屑が特徴的な慢性炎症性皮膚疾患である。その特徴的な所見から、身体面だけでなく精神面においても生活の質（quality of life, QOL）が低下することから、解決すべき研究課題の1つである。

補体（complement）は細菌などの感染に対する第一の障壁となる免疫応答である。補体系は細菌もしくは細菌由来成分や自己抗体によって活性化され炎症を誘導する。乾癬患者の皮膚では、補体活性化因子の発現が亢進することが知られる。補体系の中心的な因子である C3 の阻害により乾癬が減弱化されることが報告され（Immunity 2013）、乾癬の治療標的として補体系の阻害が有効的であると考えられた。しかし、補体 C3 欠損マウスを用いてイミキモド誘導乾癬モデルマウスを誘導した結果、興味深いことに、RNA 干渉にて C3 発現を阻害した先行研究とは真逆の表現型、つまり、C3 欠損マウスは乾癬が増悪化することを見出した。この研究結果と同様の表現型も報告され（Int Immunopharmacol. 2020）、これらの表現型の違いは、実験動物施設にて異なる常在細菌叢に依存すると仮説を立てた。つまり、乾癬が増悪化した C3 欠損マウスでは炎症性皮膚疾患を悪性に傾ける“悪玉”の常在細菌叢が補体欠損による宿主防御能の低下により増加した結果であると考えた。そこで、“炎症性皮膚疾患に対する善玉菌移植療法の開発”を見据え、補体により制御される皮膚常在細菌叢の同定および常在細菌の移植による乾癬の予防・治療効果を目指した研究を実施した。

常在細菌叢は同居するマウス間で水平伝搬され均一化することが知られる。そこで、野生型マウスおよび C3 欠損マウスを離乳と同時に同居させる同居群、離乳と同時に遺伝子型毎に異なる飼育ケージに分離した別居群、また同居ながら抗生物質投与により常在細菌叢を排除した細菌排除群の実験群を作製し、C3 欠損における乾癬の重篤化に対する常在細菌叢の影響を検討した。C3 欠損により変化した常在細菌叢が乾癬の重症度に影響を与えると想定していたが、興味深いことに、別居群・同居群のどちらにおいても C3 欠損マウスの乾癬は、野生型マウスに比べ重篤化していた。さらに、4 種類の抗生物質を投与した細菌排除群においても C3 欠損マウスは野生型マウスに比べ乾癬が重篤化することが明らかとなった。

当初の仮説を覆すこの研究結果から、C3 欠損マウスの表現型は常在細菌叢に依存していないことを示唆するものとなった。乾癬を誘導したマウスの組織学的解析を実施した結果、C3 欠損により顕著に表皮が肥厚していることを見出した。表皮は主に分化段階の異なる 4 層の表皮角化細胞から構成される。そこで、表皮角化細胞株を入手し、表皮角化細胞の増殖に対する C3 の影響を検討した。その結果、C3 の活性化産物 C3a の添加により表皮角化細胞の増殖が亢進することがわかった。

本研究より、乾癬発症において補体 C3 は乾癬の重篤化に関係する皮膚の常在細菌叢の制御には関係ないこと、また、表皮角化細胞の増殖を制御することが明らかとなった。4 層ある表皮角化細胞による表皮はそれぞれ異なる生理機能を持つ。それぞれの分化した表皮角化細胞に対する C3 および C3a の生理機能の解明は今後の研究課題である。



## 研究テーマ

# 高齢時の皮膚に存在する新たなホルモン作用機序に基づく、「高齢者皮膚の健康と美」の維持・回復を目指した研究

## 研究者

昭和大学 原口 省吾（はらぐち しょうご）

### ①研究の背景及び目的

男性でも女性でも加齢に伴い精巣あるいは卵巣機能の低下により、血中の性ステロイドレベルが低下することで更年期障害や様々な生理機能の変化が引き起こされる。しかし、ホルモンの最も重要な機能は、体の内部環境を一定に保つこと（恒常性の維持）である。血糖値や血圧の制御、体温の制御など様々なホルモンが体の内部環境を一定に保つために働いている。

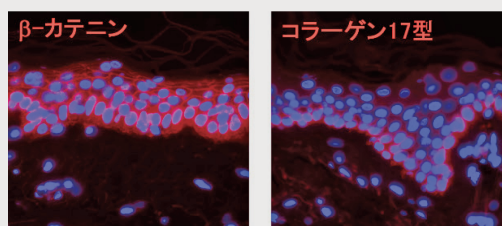
この様に巧妙に体の内部環境を維持しようとするホルモン系は、性腺機能の低下に伴い血中の性ステロイドが減少した場合、どの様に振る舞うであろうか？ 皮膚のステロイド産生系は、血液から供給される性ステロイド量が減少すれば、その減少量を補おうとして亢進すると考えられないだろうか？ この様な疑問から、申請者は加齢時の皮膚ステロイド産生系に着目し、高齢マウスとヒト高齢者皮膚組織を用いた解析を行い、加齢に伴う性腺由来の性ステロイド減少は皮膚ステロイド産生系の亢進を招き、皮膚局所で病的なテストステロンの蓄積を引き起こすことを明らかにした。さらに、この病的な高濃度に蓄積したテストステロンは既知のアンドロゲン受容体ではなく、亜鉛トランスポーターの一つ ZIP9 に作用することを明らかにした。そこで、皮膚において、ZIP9 を介したテストステロン作用を明らかにすることを目的とした。

### ②研究方法

テストステロンが細胞機能へどのような変化を引き起こすのか明らかにするために、ZIP9 発現 HEK293 細胞を作製し、そこへテストステロンを作用させ、トランスクリプトーム解析により発現変動する遺伝子を網羅的に解析した。さらに、発現が変動した遺伝子が、細胞機能にどのような変化をもたらすのかについて細胞生物学的に解析を行った。

### ③研究成果

高濃度テストステロンは、タンパク質の品質管理に関わるシャペロン分子 ERp44 の発現を低下させていた。従って、高濃度テストステロンは細胞のタンパク質品質管理機能を障害することで、細胞の機能低下を招き、高齢時の皮膚の細胞機能を障害することが予測された。そこで、ERp44 によって品質管理をうけるタンパク質をプロテオーム解析により探索した。その結果、毛包幹細胞や表皮幹細胞の微小環境（ニッチ）の形成に関わるコラーゲン 17 型や beta-カテニンが、ERp44 により品質管理を受けていることが示唆された。そこで、コラーゲン 17 型や beta-カテニンを発現させた ZIP9 発現 HEK293 細胞へテストステロンを作用させたところ、コラーゲン 17 型と beta-カテニンの不溶性タンパク質画分への存在量が増加した。従って、高濃度テストステロンは ZIP9 を介してタンパク質品質管理機構を障害し、高齢時の皮膚において細胞機能の低下を引き起こしていると考えられる。



テストステロンはニッチ形成に関わる  $\beta$ -カテニンやコラーゲン 17 型のタンパク質品質管理を障害する。（女性背部皮膚における免疫組織化学染色）

## 研究テーマ

# 男性ホルモン補充療法による血管に対するアンチエイジング効果のマルチオミクス解析

## 研究者

名古屋市立大学大学院 医学研究科 片岡 智哉（かたおか ともや）

近年の研究により男性ホルモンは性分化だけでなく生命維持やアンチエイジングへの重要性が示唆されている。男性ホルモンが低下すると心血管系疾患や認知症の発症リスクが上昇することが報告されている。しかし、男性ホルモンが心血管系組織に及ぼす影響に関しては十分な研究がされておらず、男性ホルモン低下に伴う血管機能障害発症のメカニズムの解明が求められている。そこで本研究では、男性ホルモンが遺伝子制御ネットワークに及ぼす影響および、男性ホルモンによるエピジェネティクスの変動が血管機能に及ぼす影響をマルチオミクス解析により解明することを目的とした。

性成熟が完了した12週齢の雄性Wistar STラットを用い、精巣摘出による去勢手術を行い、対照群としてSham手術のみのSham群を作成した。また、去勢後、testosterone含有チューブを埋め込みテストステロン補充療法を行った去勢+T群も作成した。4週間の観察期間終了後、ラットより採血した血清中のマイクロRNAをマイクロアレイ解析により、網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、miR142およびmiR326の低下が観察された。このmiR142およびmiR326は心血管機能とも関連が報告されている因子である。そこで、このmiR142およびmiR326を去勢ラットに投与してラットの勃起機能に及ぼす影響を検討した。しかし、残念ながら、miR142およびmiR326を投与したラットの勃起機能には変化が見られなかった。そのため、テストステロン低下に伴う心血管機能障害に対しては、miR142およびmiR326とは別の経路による影響がみられることがかんがえられる。

一方、ラットより摘出した大動脈を用いて、等尺性張力測定を行い、血管機能を評価したところ、Sham群に比べて去勢群ではAChに対する反応性の低下が観察された。これに対し、Cast+T群ではCast群と比べて変化は見られなかった。Sham+T群ではSham群と比べ、反応性の低下が観察された。SNPに対する反応性を検討したところ、いずれの群においても有意な変化は観察されなかった。これらの結果より、去勢によりテストステロンが低下することで大動脈における血管内皮機能の低下が生じる可能性が示唆された。一方、テストステロン投与によって血管内皮機能には変化が観察されなかった。これは、Sham+T群において血管内皮機能低下が観察されていたことから、本研究におけるテストステロン投与が何らかの副作用をもたらした可能性が考えられた。そこで次に、テストステロンの投与量の評価を行った。

ラットをコントロール群、エンアルモンデポーを6.25 mg/kg/weekの濃度で1週間毎に皮下投与し、4週間投与したT(6.25)群、Tを25 mg/kg/weekの濃度で1週間毎に皮下投与し、4週間投与したT(25)群、Tを100 mg/kg/weekの濃度で1週間毎に皮下投与し、4週間投与したT(100)群の4群を作成した。4週間後、摘出した大動脈を用いた等尺性張力測定により、T(25)群とT(100)群で血管内皮機能の低下が観察された。また、勃起機能評価の結果、これらのラットでは勃起機能の低下が観察された。これらの原因を探索するため、リアルタイムPCR法を用いて因子を探索したところ、eNOSの低下およびiNOSの増加が観察された。これらの結果から、テストステロンが過剰になると、炎症反応を引き起こし、血管内皮障害を引き起こす可能性が示唆された。

さらに本研究では、テストステロンのアンチエイジング効果を明らかにするため、去勢後4週間が経過

した後、テストステロンを投与する実験を追加した。その結果、テストステロンを投与することにより、経時的にラットの勃起機能が改善し、8週間投与することで、有意に改善することが明らかとなった。また、マッソントリクローム染色法を用いた組織学的検討の結果、勃起機能が改善した8週目において有意な改善がみられていることが明らかとなった。また、陰茎海綿体の静脈閉塞機構を評価したところ、同様に8週目で改善がみられることが明らかとなった。さらに、リアルタイム PCR 法を用いて細胞増殖因子の発現変化を観察したところ、VEGF、 $\alpha$ -SMA、ICAM-1 などの因子が増加することで、海綿体構造を改善させる可能性が示唆された。また、海綿体構造と一酸化窒素 (NO) の産生にも関与するカベオラ関連因子の増加も観察された。以上の結果から、テストステロンは心血管組織における増殖因子と NO 産生を介してアンチエイジングに貢献することが示唆された。

## 研究テーマ

# 新規の NAD<sup>+</sup> 制御因子同定とサルコペニア予防への応用

## 研究者

東京大学医学部附属病院 五十嵐 正樹 (いがらし まさき)

### ①研究の背景と目的

AMP キナーゼ (AMPK) は、AMP 上昇により活性化され、様々な基質をリン酸化して機能を発揮するが、その活性化はエネルギー代謝に重要な役割を持ち、糖尿病の創薬標的としても知られる。一方、NAD<sup>+</sup> 依存性脱アセチル化酵素 SIRT1 は NAD<sup>+</sup> の上昇で活性化され、健康長寿に重要な役割を果たす。

カロリー制限により寿命延長、健康増進の効果を認めるが、AMPK や SIRT1 はその効果を媒介することが知られる。報告者は、骨格筋における SIRT1 活性化が、筋ジストロフィーの症状、組織所見、運動耐容能を改善することをマウスモデルにより示した (PLoS Genet. 2014)。SIRT1-PGC1 alpha の活性化が筋のミトコンドリア量を増加させ、筋肉の機能保持に重要な役割をもつ。そして、AMPK と SIRT1 はポジティブフィードバックループを形成し、互いにその活性を増加させることが、筋肉をはじめいくつかの臓器で報告されている。報告者は、腸管上皮幹細胞に AMPK 活性および SIRT1 活性の増幅機構を報告した (Igarashi et. al., Cell. 2016)。SIRT1 は AMPK の活性化酵素 LKB1 を脱アセチル化することによって AMPK の活性を増加させる (Lan F et. al., J. Biol. Chem 2008)。一方で、AMPK は NAD<sup>+</sup> 合成律速酵素 NAMPT の mRNA レベル増加と NAD<sup>+</sup> 濃度上昇を通じて SIRT1 を活性化させる (Fulco M et. al., Dev Cell. 2008)。NAMPT は NAD<sup>+</sup> 量を規定し、その発現上昇は抗加齢効果を認めるが、AMPK による NAMPT mRNA 制御機構は明らかにされていない。

そこで、本研究では、筋肉での AMPK 活性化による NAMPT mRNA 制御メカニズムを解明する。特に AMPK によって制御され、NAMPT mRNA 発現調節領域に結合するような新規の因子を明らかにする。

分化させた C2C12 筋管細胞を用いて、グルコース制限や AMPK 活性化剤 AICAR による刺激実験を行うと、NAD<sup>+</sup> 合成酵素 NAMPT と PGC1-alpha mRNA 発現が 2 倍程度に増加する。次に、転写阻害剤アクチノマイシン D の存在下で C2C12 筋管細胞を AICAR で処理した。アクチノマイシン D 存在下で AMPK 活性化は NAMPT mRNA の転写を上昇させることから、AMPK 活性化は NAMPT mRNA の安定化に関わると考えられた。そこで、AMPK による mRNA 安定化による NAMPT mRNA 制御機構に着目して、新規の NAD<sup>+</sup> 制御因子を明らかにする。一般に mRNA 安定化に関わるといわれる 3'UTR 領域に着目する。

以上の研究により、新規の NAMPT 制御因子が明らかになれば、その因子への介入を通じて、AMPK 活性と SIRT1 活性を同時に効果的に増幅させることが可能になる。そして、カロリー制限の効果を模倣するような加齢におけるサルコペニアの予防法開発へと展開させることが可能になる。

### ②研究方法

C2C12 細胞株を用いて実験を行う。RNA 安定性に関わる領域を同定するために、3'UTR (AU リッチエレメント) に着目して、Nampt mRNA 3'UTR を様々な長さで欠失させたコンストラクトを作成し、pAcGFP ベクターの GFP 遺伝子の後ろに挿入する。これらの GFP 発現ベクターを C2C12 筋管細胞や HEK293 に恒常的に発現させた細胞株を作成する。

この細胞をアクチノマイシン D で処理し、AICAR 処理の有無で、GFP mRNA 発現の検討を行う。

AMPK 活性化による NAMPT mRNA の応答に重要な役割をもつような領域を明らかにする。



### ③研究成果

分化した C2C12 筋管細胞では、AICAR による AMPK 活性化によって NAMPT だけでなく、NAD<sup>+</sup>合成に関わる NMNAT1 mRNA の発現上昇を認めた。一方で、NMNAT2 mRNA、NMNAT3 mRNA や NAD<sup>+</sup>分解に関わるといわれる CD38 mRNA の発現に変化を認めなかった。アクチノマイシン存在下で mRNA 安定性を調べると、NAMPT や NMNAT mRNA 発現は半分以下に低下し、AICAR 処理によって、NAMPT mRNA や NMNAT1 mRNA は完全に回復した。AMPK 活性化は、NAMPT だけでなく NMNAT1 の mRNA 安定化をきたすものと考えられる。本研究では、まず NAD<sup>+</sup>合成律速酵素である NAMPT の制御機構について解析を進める。

一般に、mRNA 安定化に関わる 3'UTR に着目した。NAMPT の 3'UTR は 2838bp であるが、複数の AU リッチエレメントの存在を認める。まず、full length の NAMPT 3'UTR を AcGFP-N1 ベクターの GFP の 3' 端につないだベクターを作成した。そして、それを C2C12 細胞にトランスフェクトし、G418 でセクションをかけ、かつ GFP の蛍光で sorting をおこない、GFP-Nampt 3'UTR 発現 C2C12 細胞を樹立した。一方で、NAMPT 3'UTR を 3' 側から様々な長さで欠失させた配列を GFP 遺伝子の 3' 端につないだベクターを複数作成した。これらも同様に恒常的に発現する細胞を樹立した。

GFP-full length Nampt 3'UTR 発現 C2C12 細胞をアクチノマイシン処理すると、GFP mRNA 発現は 30% 程度減少する。そして、AICAR 0.5 mM、AICAR 2.0 mM で処理すると、GFP mRNA の上昇傾向を認めた。しかし、AICAR の doseresponse は明らかではなく、同じ実験を繰り返すとその再現性は十分ではなかった。特に、アクチノマイシン D 処理後の GFP mRNA 低下が 30% 前後とわずかであり、NAMPT mRNA がアクチノマイシン D 処理で、半分以下に低下するのと対照的であった。C2C12 細胞では、実験系が安定しない可能性を考えた。

安定発現細胞株を作成する際のトランスフェクション効率が C2C12 細胞でかなり低いことから、トランスフェクション効率の良い HEK293 を使用した。同様に、GFP-full length Nampt 3'UTR 発現 HEK293 細胞を樹立した。3'UTR をもたない control の GFP ベクターを安定発現させた HEK293 では、GFP mRNA がアクチノマイシン D 処理でまったく発現が変化しない(図 1)のとは対照的に、GFP-full length Nampt 3'UTR 発現 HEK293 細胞ではアクチノマイシン D 存在下で GFP mRNA 発現を安定して 50% 以上低下させることができた(図 2)。また、アクチノマイシン D 存在下で、0.5 mM AICAR および 2.0 mM AICAR でこれら細胞株の処理を行ったときに、AICAR が用量依存的に GFP mRNA 発現を上昇することが確かめられた。

ようやく、GFP-full length Nampt 3'UTR 発現 HEK293 細胞を樹立し、AICAR による NAMPT mRNA 安定の効果が評価可能であることが立証された。引き続き、NAMPT 3'UTR を 3' 側から様々な長さで欠失させた配列を GFP 遺伝子の 3' 端につないだベクターについても同様に、HEK293 細胞に恒常的に発現した細胞を作成している。以上より、C2C12 細胞で安定した結果が得られなかったが、HEK293 を使用することで、NAMPT 3'UTR の mRNA 安定化に関する役割がより明確となった。安定した実験系が得られたため、NAMPT mRNA 安定化に重要な配列を同定する。

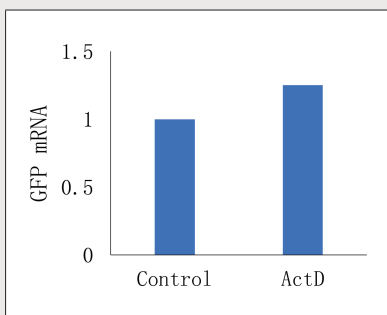


図 1 Control GFP ベクターでの GFP mRNA の ActD への反応

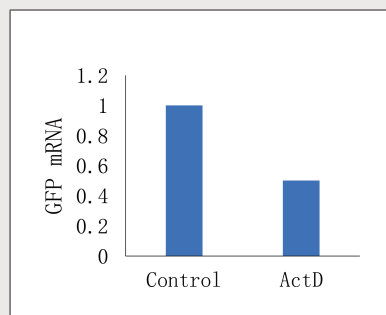


図 2 Nampt3'UTR を GFP 末端につないだ場合の GFP mRNA の ActD への反応

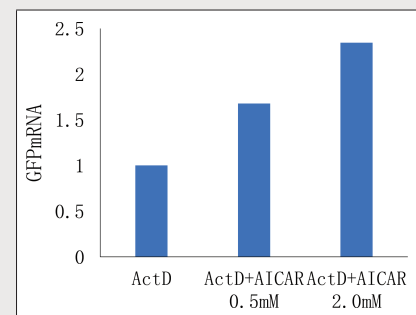


図 3 Nampt 3'UTR を GFP 末端につないだ場合の GFP mRNA の AICAR への反応



## 研究テーマ

# 骨芽細胞分化における転写共因子 Vgll3 の役割

## 研究者

岡山大学 池亀 美華（いけがめ みか）

### ①研究の背景及び目的

我国は超加齢高齢化社会を迎え、加齢や寝たきりに伴う骨減少は、高齢者の生活の質を著しく低下させている。

しかし、骨形成を促進する有効な手段は、完全には確立されておらず、さらなる研究が必要である。

多分化能をもつ未分化間葉系細胞 (MSC) は、加齢に伴い脂肪細胞への分化指向性が高まり、骨を形成する骨芽細胞への分化が相対的に低下する。一方、機械的刺激は MSC の骨芽細胞への分化を促進することが報告されている。そこで、我々は MSC が豊富に存在する若年マウスの頭蓋骨縫合部に機械的刺激を加えて骨芽細胞の分化を促進する実験系を確立し、そのメカニズムについて研究を行ってきた。その結果、機械的刺激は転写調節因子 Vgll3 の発現を有意に促進することを見出した。近年、Vgll3 と骨芽細胞分化との関連について、Vgll3 が脂肪細胞への分化を抑制し、骨芽細胞の分化マーカーの発現を誘導することが報告された (Halperin et. al, J Lipid Res 2013)。

しかし、MSC から骨芽細胞への分化過程における Vgll3 の役割については、未だ不明な点が多い。

本研究の目標は、骨形成促進法の開発・改良のため、Vgll3 による骨芽細胞の分化調節機構を明らかにすることである。

### ②研究方法

#### 1. 骨芽細胞分化における Vgll3 の発現変化を調べる。

骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞を骨芽細胞分化培地にて培養し、骨芽細胞分化を促進する。その過程における骨芽細胞分化関連因子 (Runx2, Osterix, Dlx5) および Vgll3 の遺伝子発現変化について、経時的に調べる。

そのため、分化培地に交換後、1、3、5、10、14、20 日後に、RNA を回収し、リアルタイム PCR によって各遺伝子発現量を検討した。さらに、骨芽細胞の分化マーカーであるアルカリ性ホスファターゼ (ALP) 活性を酵素組織化学的に、Vgll3 の細胞内局在について、免疫細胞化学的に検出した。

#### 2. Vgll3 の発現抑制が骨芽細胞分化に与える影響を調べる。

MC3T3-E1 細胞を使用し、siRNA または shRNA を用いて Vgll3 遺伝子をノックダウンし、Vgll3 の抑制が骨芽細胞分化に及ぼす影響を検討する。以後、siRNA により Vgll3 をノックダウンした細胞を siVgll3, shRNA によるものを shVgll3 とする。分化培地に交換後、5 日目の各細胞から、RNA を抽出し、リアルタイム PCR により骨芽細胞分化関連因子の遺伝子発現変化を、さらに、タンパク質も抽出し、ウェスタンブロット法によりタンパク質発現変化を検討した。

骨芽細胞の最終分化を確認するために、ALP 活性の検出ならびにアリザリンレッドにより石灰化について検討した。

#### 3. Vgll3 の過剰発現が骨芽細胞分化に与える影響ならびに共同する因子を調べる。

MC3T3-E1 細胞において、Vgll3 を過剰発現させ、骨芽細胞分化への影響を検討する。

Vgll3 の全配列を PCR により MC3T3-E1 から得て、シーケンスにより確認する。ウィルスベクターに組み込み、レンチウィルスを用いてトランスフェクションする。

その後、経時的に骨芽細胞分化関連因子の発現変化について、リアルタイム PCR およびウェスタンブロット法によって検討する。さらに、Vgll3 は転写共因子であるため、何か他の転写因子と結合して機能していることが予測される。そこで配列に Flag タグを組み込み、免疫沈降により Vgll3 と結合して機能するタンパク質を検討する。

### ③研究成果

#### 1. 骨芽細胞分化における Vgll3 の発現変化について

骨芽細胞分化過程において、Vgll3 の遺伝子発現は、リアルタイム PCR の結果、比較的早期 (5 ~ 7 日) に発現ピークを迎え、その後は減少した。その発現パターンは骨芽細胞に必須の転写因子である Osterix とにていた。

また、Vgll3 のタンパク質は、免疫細胞化学の結果、5 日ころから細胞質、核に明らかに検出され、10 日にはさらに多くの細胞で核にみとめられるようになった。しかし、20 日にはほとんど検出されなくなった。

ALP 活性染色は、3 ~ 5 日ころから一部の細胞に認められ、10 日にはほとんどすべての細胞に強い染色性が認められた。20 日にはさらに強くなっていた。

以上の結果から、Vgll3 は骨芽細胞分化の比較的早期に、主に核内で機能しているのではないかと考えられた。

#### 2. Vgll3 の発現抑制が骨芽細胞分化に与える影響について

siVgll3, shVgll3 のいずれのノックダウン細胞においても、培養 5 日目では、対象群の細胞に比べて骨芽細胞分化関連因子のうち、Runx2, Osterix, ALP の遺伝子発現は減少していた。タンパク質発現は、さらに Dlx5 についても減少していた。最終分化マーカーである ALP 活性や石灰化についても、Vgll3 ノックダウン細胞では減少していた。

以上の結果から、Vgll3 は骨芽細胞分化に必須の転写因子の発現に不可欠な因子であると考えられた。

#### 3. Vgll3 の過剰発現が骨芽細胞分化に与える影響ならびに共同する因子について

Vgll3 の全配列をウィルスベクターに組み込み、ウィルス粒子を作成し、トランスフェクションを試みたが、配列がうまく組み込まれなかったために、問題点を抽出するとともに、現在他の方法を試しているところである。

現在、1、2 の成果について英語論文を執筆中である。

## 研究テーマ

# 歯科ホワイトニングで利用可能な生体分子由来の過酸化水素徐放剤

## 研究者

大阪市立大学 田部 博康（たべ ひろやす）

### ①研究の背景および目的

本研究は、歯科漂白治療においてホワイトニング剤である過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) が口腔内に一度に放出される課題を解決するため、微量の  $H_2O_2$  を徐々に放出する新材料を合成することを目指す。新材料の成分として、アミノ酸やペプチドに着目した。アミノ酸やペプチドは食品中の蛋白質の分解によって容易に得られる。蛋白質の高次構造が水素結合によって構築されていることから分かる通り、その構成成分であるアミノ酸やペプチドはよい水素結合ドナー・アクセプターであり、 $H_2O_2$  と水素結合を形成する。そこで、本研究では、(1) 様々な量の  $H_2O_2$  を含有する付加物のアミノ酸やペプチドの探索、(2) アミノ酸と  $H_2O_2$  の相互作用の詳細な評価、(3) 付加物を用いた  $H_2O_2$  徐放性能評価を行った。

### ②研究方法（実験手法・実験結果）

#### (1) $H_2O_2$ 付加物を形成するアミノ酸およびペプチドの探索

アミノ酸を高濃度 (50%以上) の  $H_2O_2$  水中に加え一定時間保持すると、付加物の結晶が得られることが報告されている (P. V. Prikhodchenko et al., *CrystEngComm* 2011, 13, 2399)。より低濃度の  $H_2O_2$  水中で付加物を合成すれば、微量の  $H_2O_2$  を徐放する材料になると考えた。そこでまず、希薄  $H_2O_2$  水溶液 (0.5%-30%) でアミノ酸を結晶化させ、付加物を単離することを試みた。アミノ酸として、フェニルアラニンやイソロイシンなどの疎水性アミノ酸や、アスパラギン酸やグルタミン酸といった酸性アミノ酸、アスパラギンやチロシンといった強固な水素結合を形成するアミノ酸を選択した。また、天然で見られる L-アミノ酸に加え、化学合成で得られる DL-アミノ酸 (ラセミ体) も利用した。表 1 に、30%  $H_2O_2$  水中で得られた種々の L- および DL-アミノ酸結晶中に含まれる  $H_2O_2$  量をアミノ酸に対するモル比で示す。その結果、ほとんどの場合で、L-アミノ酸よりも DL-アミノ酸を用いた場合の方が吸着量が多くなった。一方、Phe においては、L-体、DL-体のいずれを用いた場合もおおよそ 1 であった。そこで、20%  $H_2O_2$  水溶液を用いて同様の実験を行ったところ、L-Phe では  $[H_2O_2]/[L-Phe] = 0.80$  であったのに対し、DL-Phe では  $[H_2O_2]/[DL-Phe] < 0.01$  と非常に少なくなった。このように同じ側鎖を持つアミノ酸であっても L-体と DL-体を用いた場合で生成する付加物の安定性が異なることがわかった。

#### (2) アミノ酸と $H_2O_2$ の相互作用の詳細な評価

DL-Phe と L-Phe の  $H_2O_2$  付加物の単結晶 X 線構造解析を行ったところ、いずれも Phe :  $H_2O_2$  = 1 : 1 の付加物となることが分かった。しかし、L-Phe の時のみ、Phe :  $H_2O_2$  :  $H_2O$  = 1 : 1 : 0.5 の割合で水分子が含まれていた (図 1)。水分子は、Phe と  $H_2O_2$  の水素結合ネットワークに参加し、

表 1 種々の L-アミノ酸 (L-AA) および DL-アミノ酸 (DL-AA)- $H_2O_2$  付加物結晶中の  $H_2O_2$  とアミノ酸の物質質量比

Amino acid	$[H_2O_2]/[L-AA]$	$[H_2O_2]/[DL-AA]$	$[H_2O_2]_{DL}/[H_2O_2]_L$
Phe	1.1	1.0	1.1
Asn	$5.0 \times 10^{-2}$	0.73	15
Asp	$3.5 \times 10^{-3}$	$1.3 \times 10^{-2}$	3.7
Glu	$6.7 \times 10^{-3}$	$5 \times 10^{-2}$	7.5
Ala	$1.9 \times 10^{-4}$	$4.9 \times 10^{-3}$	26
Ile	$1.3 \times 10^{-4}$	$9.3 \times 10^{-5}$	0.72
Tyr	$2.6 \times 10^{-4}$	$4.3 \times 10^{-4}$	1.7

L-Phe からなる付加物の構造を安定化させている。このような分子レベルの情報は、付加物中の  $\text{H}_2\text{O}_2$  含有量のみを測定する従来の手法では得られないものであり、顕著な成果であるといえる。

### (3) 付加物を用いた $\text{H}_2\text{O}_2$ 徐放性能評価

アミノ酸およびペプチド- $\text{H}_2\text{O}_2$  付加物の  $\text{H}_2\text{O}_2$  放出量や放出速度をバイアー・ビリガー反応を用いて評価した。バイアー・ビリガー反応は、付加物から放出された  $\text{H}_2\text{O}_2$  が反応剤となる反応である。その結果、アミノ酸- $\text{H}_2\text{O}_2$  付加物を利用した際に、従来の  $\text{H}_2\text{O}_2$  付加物と比較し反応速度の低下がみられた。反応速度が遅い程、付加物の構造が安定であり、 $\text{H}_2\text{O}_2$  徐放材料として適しているといえる。

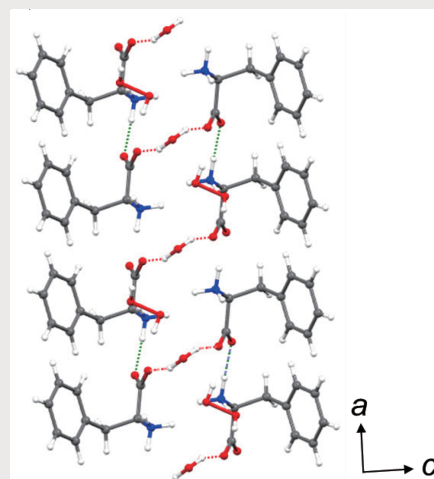


図1 L-フェニルアラニン- $\text{H}_2\text{O}_2$  付加物の結晶構造

### ③研究成果

得られた成果のうち、(1) (2)は英国化学会刊 *CrystEngComm* 誌に査読付き原著論文として掲載された(R. Yamaguchi, R. Tanaka, M. Maetani, H. Tabe, Y. Yamada, “Efficient capturing of hydrogen peroxide in dilute aqueous solution by co-crystallisation with amino acids” *CrystEngComm*, DOI: 10.1039/D1CE00688F)。また、(3)は2021年3月に開催された第101日本化学会春季年会にて発表した(山口涼太・田部博康・山田裕介「水素結合性小分子に結合した過酸化水素の安定性評価」)。なお、査読付き原著論文の謝辞には、小柳財団から助成を受けた旨が記載されている。また、得られた成果の一部は特許出願中である(特願 2020-036881「ペプチド-過酸化水素付加物及びその製造方法」(出願人：公立大学法人大阪))。

新型コロナウイルス感染症拡大の影響を受け、学会がオンライン開催に変更された。また、消耗品の一部を所属大学で配分された若手研究者向け研究費で購入できたことから、旅費・交通費の全額と消耗品費の一部を機械・器具・備品費に充てた。本助成金では、これまで所有していなかった赤外分光光度計のATRユニットを購入した。赤外分光測定之感度と効率が飛躍的に向上したため、原著論文を予定より早く投稿するに至った。



## 研究テーマ

# 新規細胞膜透過ペプチドを利用した エクソソームノックダウン法の開発

研究者

鳥取大学 岩崎 崇 (いわさき たかし)

### 【目的】

現在、エクソソームと疾患は密接に関係していることが明らかになっており、がんをはじめとした幅広い疾患の原因または悪性化因子としてエクソソームは注目されている。このような疾患に関連するエクソソームを、生体内から選択的に除去することができれば、新たな治療戦略の扉を開くことができる。そこで本研究では、血中から特定のエクソソームを選択的に除去する『エクソソームノックダウン法』の開発に挑戦した。本研究では、エクソソームが大きく関与している乳がんに着目した。細胞表面に HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor Type 2) を高発現している HER2 陽性乳がんは生存率をもっとも低いことが知られている。HER2 陽性乳がんに対する治療薬としては、抗体医薬 (抗 HER2 抗体: トラスツズマブ) が使用されているが、近年、乳がん細胞から分泌される HER2 陽性エクソソームが、抗体医薬と結合することでその薬効を中和することや、周囲の乳がん細胞の浸潤・転移を活性化することが報告されている。すなわち、HER2 陽性エクソソームは、乳がんの難治性・悪化に関与している重要な原因物質である。そこで本研究では、HER2 陽性エクソソームを標的としたエクソソームノックダウン法の開発を目指した。

エクソソームノックダウン法を実現するために、我々が独自に開発した細胞膜透過ペプチド『ポリヒスチジン (PolyHis : H16)』を利用した。PolyHis (H16) はヒスチジン 16 残基からなる細胞膜透過ペプチドであり、従来の細胞膜透過ペプチドと比較した際に、高い細胞膜透過性と血中安定性を示す。また、PolyHis (H16) は低分子色素から高分子リポソームまでの幅広い物質を細胞内のリソソームに輸送する能力を有している (図 1)。そこで本研究では、HER2 陽性エクソソームを選択的に除去するエクソソームノックダウン法を開発するために、PolyHis (H16) をリソソーム輸送キャリアーとして利用した。PolyHis (H16) を融合した抗 HER2 抗体を作製し、HER2 陽性エクソソームに対して PolyHis (H16) を選択的に修飾することで、HER2 陽性エクソソームをリソソームで選択的に分解するエクソソームノックダウン法を考案し、実証を試みた (図 2)。

### 【結果・考察】

本研究では、抗 HER2 抗体として抗 HER2 Nanobody を使用した。Nanobody は低分子化された単鎖抗

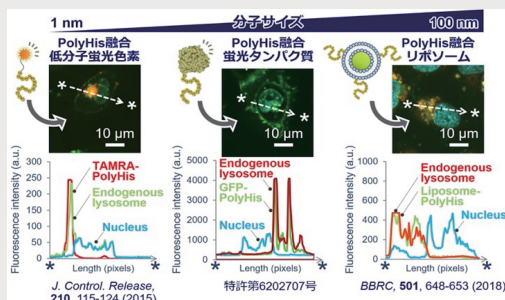


図 1

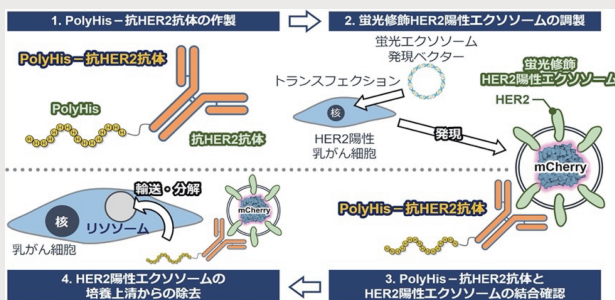


図 2

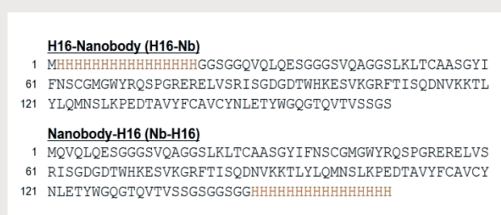


図 3

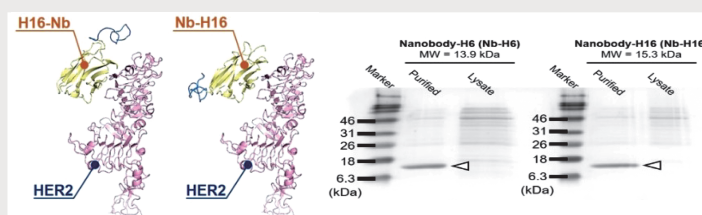


図 4

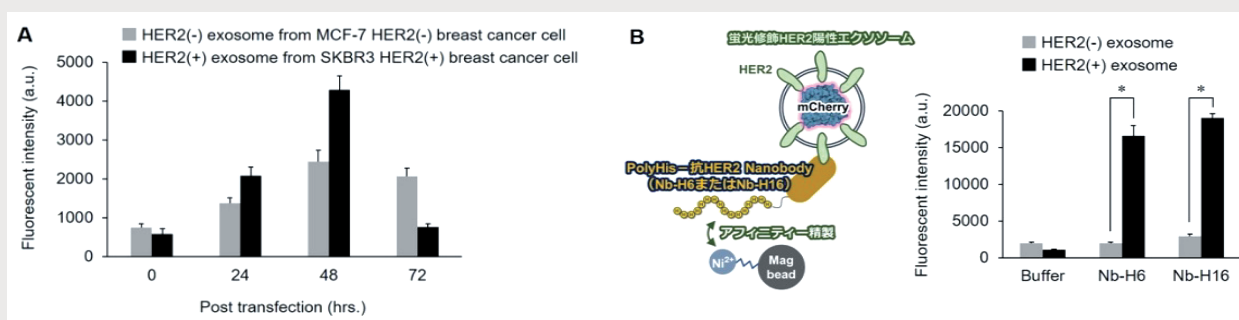


図 5

体であり、従来の IgG 抗体と比べて安定性に優れている。東京工業大学・門之園哲哉博士の協力のもと、分子動力学シミュレーションにより、抗 HER2 Nanobody の HER2 結合能に影響が出ないと推測される PolyHis (H16) 修飾部位を算出した (図 3)。抗 HER2 Nanobody の C 末端に、細胞膜透過性を有する PolyHis (H16) と、Control として細胞膜透過性を有していない PolyHis (H6) をそれぞれ融合した PolyHis-抗 HER2 Nanobody (Nb-H6 および Nb-H16) を設計し、大腸菌 SHuffle® T7 Express lysY 株を用いて発現させた。Ni イオン固定化カラムを用いたアフィニティー精製により、Nb-H6 および Nb-H16 を精製した (図 4)。

次いで、CD9-mCherry 発現プラスミドを HER2 陰性乳がん MCF-7 細胞および HER2 陽性乳がん SKBR3 細胞にトランスフェクションし、培養上清中のエクソソームを経時的に回収した。その結果、トランスフェクションから 48 h 後において、培養上清中の蛍光修飾 HER2 陰性/陽性エクソソームの発現量がともに最大になることが確認された (図 5A)。以降の実験では、プラスミドをトランスフェクションしてから 48 h 後の培養上清を蛍光修飾 HER2 陰性/陽性エクソソーム溶液として使用することに決定した。また、PolyHis-抗 HER2 Nanobody (Nb-H6 および Nb-H16) と結合したエクソソームを、Ni イオン固定化磁気ビーズを用いたアフィニティー精製により回収・定量した。その結果、PolyHis-抗 HER2 Nanobody (Nb-H6 または Nb-H16) 存在下において、蛍光修飾 HER2 陽性エクソソームのみ Ni イオン固定化磁気ビーズに結合し、精製されることが確認された (図 5B)。この結果より、PolyHis-抗 HER2 Nanobody (Nb-H6 または Nb-H16) は蛍光修飾 HER2 陽性エクソソームに選択的に結合することが確認された。

PolyHis-抗 HER2 Nanobody (Nb-H6 および Nb-H16) と蛍光修飾 HER2 陰性/陽性エクソソームの混合液を、HER2 陰性乳がん MCF-7 細胞、HER2 陽性乳がん SKBR3 細胞、そして PolyHis (H16) を効率的に取り込むことが報告されている繊維肉腫 HT1080 細胞の三種の細胞株に添加し、一定時間後に培養上清中の蛍光修飾 HER2 陰性/陽性エクソソーム量を定量することで、PolyHis-抗 HER2 Nanobody による HER2 陽性エクソソームの選択的除去、すなわちエクソソームノックダウン法を評価した。

その結果、PolyHis-抗 HER2 Nanobody (Nb-H6 または Nb-H16) 存在下において、三種の細胞株の培養上清中の蛍光修飾 HER2 陽性エクソソーム量の低下が確認された (図 6)。この現象は、HER2 陽性乳がん SKBR3 細胞のほか、乳がんとは直接関係のない繊維肉腫 HT1080 細胞の培養上清においても顕著に確

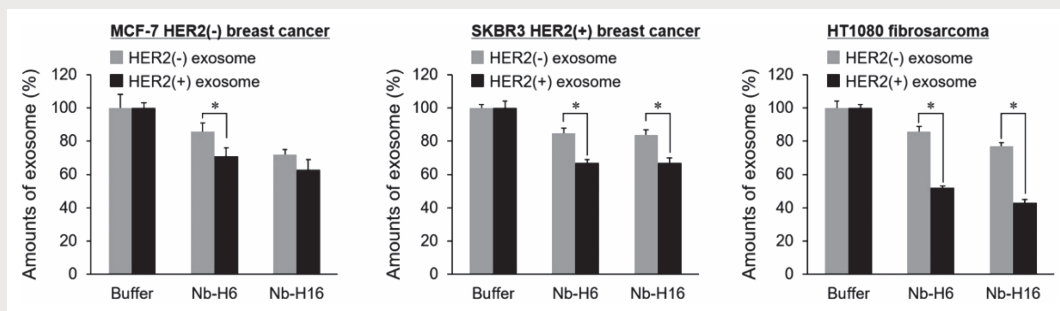


図 6

認された。この結果は、PolyHis-抗 HER2 Nanobody (Nb-H6 または Nb-H16) を利用することで、乳がんとは離れた部位においても HER2 陽性エクソソームを除去できることを意味している。

本研究では、PolyHis-抗 HER2 Nanobody (Nb-H6 および Nb-H16) と HER2 陽性エクソソームの結合、ならびに PolyHis-抗 HER2 Nanobody (Nb-H6 および Nb-H16) を用いた培養上清からの HER2 陽性エクソソームの除去を実証することができた。すなわち、エクソソームノックダウン法の基盤を確立することができたと言える。

研究テーマ

# STING を介した I 型インターフェロン 応答のリソソームによる収束機構の解明

研究者

東北大学 向井 康治朗 (むかい こうじろう)

自然免疫応答シグナルの一つである STING 経路は、ウイルス感染時に細胞質中に露出した DNA に応答して I 型インターフェロン (I 型 IFN) や炎症性サイトカインを誘導するシグナル伝達経路である。最近ではウイルス感染だけでなく老化や腫瘍免疫において自己由来 DNA を介した STING 経路の活性化が重要な役割を果たすことが報告されており注目を浴びている。老化に伴う炎症を抑制するためには STING 経路を阻害する必要がある一方で、腫瘍排除においては STING 経路を活性化するためには STING 経路の活性化/不活性化両面の分子機構を理解することは重要な課題である。

DNA センサータンパク質 cyclic GMP-AMP synthase (cGAS) は細胞質に露出した DNA によって活性化され、cyclic GMP-AMP (cGAMP) を生成することが知られている。cGAMP は小胞体局在の膜貫通タンパク質 STING に直接結合し、その下流で TBK1/IRF3 を介して I 型 IFN が、NF- $\kappa$ B を介して炎症性サイトカインが発現誘導される。我々はこれまでに細胞内での STING 経路の活性化機構を解析し、DNA 刺激に応じて STING が小胞体からゴルジ体に移行してパルミトイル化されることが活性化に必須であることを明らかにした (Nat Commun, 2016, BBRC, 2018, PNAS, 2018)。

さらに最近、リソソームの機能阻害により STING の分解が顕著に抑制されて炎症収束が遅延すること、また、この STING の分解に高等動物ではほとんど報告がないリソソームの動態が関与している可能性を見出した。そこで本研究では、リソソームによる STING シグナルの収束の分子機構を解明することを目的とした。

リソソームが隔離膜を介さずに細胞質性の物質を分解する経路はマイクロオートファジーと呼ばれ、近年研究の進展が著しい隔離膜を介するマクロオートファジーとは異なる現象として知られている。本研究においてこの点を検証し、哺乳動物のマクロオートファジーに必須な遺伝子 ATG5、ATG13、FIP200 の欠損細胞においても野生型細胞と同様に STING が分解されることを見出した。これらの結果から活性化後の STING の分解はマクロオートファジーを介さないことが示唆される。そこで本研究において、超解像度顕微鏡を用いたライブイメージング、及び電子顕微鏡解析を進めたところ、STING の分解がマイクロオートファジーを介する直接的な証拠を得ることができた。次に、STING の分解及びシグナルの収束に関わる遺伝子を同定するために siRNA スクリーニングを行った。その結果、STING のマイクロオートファジー分解に ESCRT 複合体遺伝子が必要であることが明らかとなった。

STING 経路は自然免疫応答経路として同定されたが、DNA 分解酵素欠損/紫外線暴露/ミトコンドリア障害/細胞老化などによる自己由来 DNA の細胞質への漏出によっても STING 経路が活性化し、その下流で産生される過剰な I 型 I 型 IFN や炎症性サイトカインが炎症病態を引き起こすことが報告されてきている (Barber, Nat Rev Immunol, 2015, Chen, Nat Immunol, 2016)。さらに、腫瘍免疫においては、がん細胞由来の DNA が樹状細胞に取り込まれて樹状細胞内の STING が活性化することで CD8+T 細胞によるがん細胞の排除が亢進すること (Woo, Immunity, 2014)、及び免疫チェックポイント阻害剤のみで効果がない腫瘍に STING アゴニストと PD-1 抗体を同時投与することで劇的に寛解することが報告されている (Fu, Sci Transl Med, 2015)。このように STING 経路を介した炎症応答は、老化や腫瘍などの疾患病態に



においても重要な役割を果たすことが示唆されてきている。本研究において見出した STING 経路のミクロオートファジー分解を制御することで、これら老化や癌などの疾患をコントロールできるようになることが期待される。

【本研究の成果として発表した論文】

H. Kemmoku, et al., bioRxiv 2021.04.27.441586 (2021).

K. Mukai et al., Nat Commun 12, 61 (2021).

K. Takahashi et al., Sci Rep 11, 11996 (2021).

## 研究テーマ

# 細胞外トランスグルタミナーゼ 2 の骨格筋と脂肪組織における多面的機能の解明

## 研究者

大阪府立大学大学院 山地 亮一（やまじ りょういち）

### ①研究の背景及び目的の本文

骨格筋は動作や身体保持を担う以外に、糖や脂質の代謝も担う組織である。骨格筋量の低下は介護を必要とする状態を高め、肥満や2型糖尿病のような代謝性疾患に罹患するリスクも高める。骨格筋量は加齢にともない減少し、またデスクワークを主とする座りがちな生活（運動不足）でも容易に減少する。日本人においては20歳から59歳までの全ての年代で慢性的な運動不足になっていることから、骨格筋量の低下が危惧されるのはすべての年代の人が対象となる。骨格筋量を維持・増加することは、減少した運動能力やエネルギー代謝能を回復させるため、骨格筋の健康の改善に有効な食品成分の発見とその生化学的機能の解明は重要な課題である。

抗酸化作用を持つビタミンA前駆体のβ-カロテンは、生体内でレチノイン酸（ATRA、活性型ビタミンA）へと代謝される。ATRAは、転写因子のレチノイン酸受容体（RAR）に結合し、レチノイン酸応答遺伝子の発現を調節することでビタミンA作用を発揮する。米国やイタリア、日本での高齢者を対象とした疫学調査結果は「β-カロテンを含むカロテノイドの血中濃度と高齢者の筋力に相関関係がある」ことを示している。これらの疫学研究結果を踏まえ、申請者はβ-カロテンが抗酸化作用で寝たきりモデルマウスの筋萎縮を抑制し、健康な状態のマウスの筋肥大を促進することを明らかにした。β-カロテン摂取による筋肥大にRARが関与することを見出したが、詳細な分子機構は不明である。近年、骨格筋は骨格筋自身または他の組織に作用する生理活性物質を分泌する組織としても注目されており、運動によって骨格筋から分泌されるタンパク質はマイオカインと呼ばれる。β-カロテンを摂取することで骨格筋から分泌されるタンパク質を探索し、トランスグルタミナーゼ2（TG2）を同定したので、本研究において細胞外TG2の骨格筋と脂肪組織における役割を解明することを目的とする。

### ②実験方法

大腸菌にて作製した組換えTG2存在下でマウス由来C2C12筋管細胞を培養し、細胞を固定後、ミオシン重鎖に対する抗体を使って免疫蛍光染色を行い、ミオシン重鎖が染色された筋管細胞の単径を測定した。TG2によるシグナル伝達経路を評価するために、各種阻害剤の存在下でC2C12筋管細胞をTG2で刺激後、mTORシグナル関連因子の発現レベルをウェスタンブロットで解析した。TG2が作用すると推測される細胞膜受容体に対するsiRNAで処理した筋管細胞でTG2がmTORシグナルを活性化するか評価した。TG2の発現をRARが直接調節するのかを評価するために、TG2遺伝子のプロモーター領域を単離し、RAR応答配列を解析した。さらに運動がTG2の発現に影響するかを評価するため、マウスを自発運動あるいはトレッドミルで強制運動に供し、骨格筋におけるTG2の発現レベルを評価した。TG2の脂肪細胞におよぼす影響を評価するため、TG2存在下でマウス由来3T3-L1脂肪細胞を培養した。

### ③研究成果

C2C12筋管細胞をTG2存在下で培養すると筋管細胞が肥大した。TG2活性を欠失した変異型TG2も

野生型 TG2 と同様に筋管細胞を肥大させ、野生型と変異型の TG2 はどちらもタンパク質合成を促進させた。C2C12 筋管細胞を TG2 で刺激するとタンパク質合成の主要な経路である mTOR シグナル関連因子 (Akt, mTOR, p70S6K) のリン酸化が起こり、TG2 が mTOR シグナルを活性化することが示された。mTOR 阻害剤、PI3K 阻害剤および Src 阻害剤は TG2 による mTOR シグナルの活性化を阻害した。一方、GRP56 の下流のシグナルとして Rho/ROCK シグナルが存在するとの報告があるが、ROCK 阻害剤は TG2 による mTOR シグナルの活性化を阻害しなかった。TG2 と相互作用する受容体として G タンパク質共役受容体の一種である GPR56 と低密度リボタンパク質受容体関連タンパク質の一種である LRP-1 が報告されている。siRNA を用いて GPR56 と LRP-1 発現を筋管細胞においてそれぞれノックダウンしたところ、GPR56 のノックダウンは TG2 による mTOR シグナルの活性化を阻害し、LRP-1 のノックダウンは TG2 による mTOR シグナルの活性化に影響を与えなかった。TG2 による筋管細胞肥大における GPR56 の関与を評価したところ、GPR56 をノックダウンした筋管細胞では TG2 による筋管細胞の肥大が抑制された。これらの結果より、TG2 は GPR56 に作用して、Src を介して mTOR シグナルを活性化し、タンパク質合成を促進することで、筋管細胞の肥大を誘発することが示唆された。

$\beta$ -カロテン摂取による筋肥大に RAR のアイソフォームである RAR $\gamma$  が関与することを見出している。TG2 の発現に直接 RAR $\gamma$  が関与するのかを評価するため、マウス TG2 遺伝子のプロモーター領域を単離し、レポーターアッセイを行った。TG2 遺伝子のプロモーター活性は RAR $\gamma$  に応答し、骨格筋で発現している RAR の別のアイソフォームの RAR $\alpha$  には応答しなかった。さらに単離したプロモーター領域内における RAR 応答配列を同定した。これらの結果より、TG2 の発現は RAR $\gamma$  によって直接制御されることが示された。

GPR56 の発現レベルは運動によって骨格筋において増加する。運動が TG2 の発現に影響するかを評価するため、マウスを自発運動あるいは強制運動に供した後、骨格筋における TG2 の発現レベルを解析した。TG2 発現レベルは自発運動によって影響を受けなかったが、強制運動によって増加した。この強制運動の条件では GPR56 の発現も増加した。運動後の血中における TG2 の有意な上昇は認められなかったが、組換え TG2 を投与した時、ヒラメ筋の重量が増加した。運動後の血中における TG2 の濃度は骨格筋周辺の局所的な濃度を測定する必要があるのかもしれない。これらの結果は、強制運動はリガンドである TG2 と受容体である GPR56 の発現を増加させることを示した。

骨格筋から分泌された TG2 が脂肪細胞に及ぼす影響を評価するために、脂肪前駆細胞を脂肪成熟細胞に分化する過程において TG2 の影響を解析した。TG2 存在下で脂肪細胞の分化は抑制され、細胞内のトリアシルグリセロールの蓄積が低下した。これらの結果より、細胞外 TG2 が脂肪細胞の分化を抑制することが推測された。

## 研究テーマ

# 分子レベルの局所的酸素濃度測定技術の確立

## 研究者

大阪市立大学 杉崎 満 (すぎさき みつる)

### 【緒言】

生体組織内における酸素濃度を正しく見積もることは非常に重要である。例えば、がん細胞周辺の酸素濃度は、正常細胞に比べて低下していることが知られている。一方、ATP の生産の場であるミトコンドリアにおいて酸素分圧の低下が起こると、電子伝達の速度低下に伴うプロトンの輸送速度低下が起こり、結果として ATP の生産速度の低下へと繋がるため、最終的に組織としての機能低下を引き起こすこととなる。このように、酸素濃度は健康と直結しているため、その濃度測定において様々な手法が開発されてきた。細胞内酸素濃度イメージングは、現在までのところその空間分解能がマイクロメートル程度にとどまっている。非常に初期の状態にある低密度のがん細胞や、直径が 0.5 マイクロメートル程度の細胞小器官であるミトコンドリア内の酸素分圧など局所的により詳細な情報を得るためには、新しい観測手法が必要となる。そこで本研究では、分子サイズの空間分解能で酸素濃度を見積もるための新規手法を開発することを目標として設定した。

### 【研究手法】

ポルフィリン誘導体である Pt-OEP (Platinum octaethylporphyrin) はその蛍光強度が酸素濃度に応じて変化することが知られている。これは Pt-OEP の三重項状態が酸素分子の電子状態に近いため、Pt-OEP から酸素分子エネルギー伝達が起こるためと考えられている。本研究では、Pt-OEP を酸素濃度モニターとして採用し、酸素濃度の変化に伴うその局所的な光学応答を、自身が所属研究機関で開発を行った共焦点顕微鏡、および超解像度顕微鏡を用いて調べた。

### 【研究結果】

これまで報告が行われた Pt-OEP の蛍光測定では、そのほとんどがマクロスコピックな手法が用いられてきたため、まずは顕微鏡下における光学応答の基本的な情報を取得した。その過程において、特に酸素濃度応答速度に大きな試料依存性や、また同じ試料においても局所的な違いが存在することが分かってきた。試料の膜厚を系統的に変化させて調査を行ったところ、酸素濃度応答速度は、Pt-OEP 分子を取り囲むマトリックス中における、酸素分子の拡散速度によって決定されることが分かった。例えばマトリックスとして PVA (polyvinyl alcohol) を用いた場合、膜厚が 200 マイクロメートル程度では局所的な蛍光立ち上がり時間は 2 分ほどであるが、これを 100 マイクロメートル以下に薄片化すると 3 秒ほどに短縮化されることが分かった。この結果から、顕微鏡下においても、観測対象とする物質に Pt-OEP をなるべく接近させることにより効率よく酸素濃度変化をモニターすることが可能であることが明らかとなった。また、その応答時間から、Pt-OEP と観測対象物との距離を見積もることが可能であることも分かった。

次に Pt-OEP を用いて、どこまで極限的な空間分解能を得ることができるかを調べた。そのためまずは、

\*1 PVA 中に分散させた Pt-OEP の蛍光ピークはほぼ 650 nm に現れるため、回折限界となる空間分解は 310 nm となる。



PVA 中に低濃度の Pt-OEP を分散させ、単分子に近い状態で共焦点顕微鏡観測を行った。その結果、ほぼ回折限界となる空間分解能 (\*1) で、Pt-OEP の蛍光を明瞭に観測することに成功した。このことはすなわち、Pt-OEP を用いることにより細胞内のミトコンドリアや葉緑体といった細胞小器官近傍の局所的な酸素濃度を観測することが可能であることを意味している。

さらに高い空間分解能を目指して GSD (ground state depletion) と STED (stimulated emission depletion) 型の超解像度顕微鏡法を用いて蛍光顕微鏡観測を試みた。まず、ポンプ光の励起波長を検討したところ一般的に用いられる近紫外光ソーレ帯の励起よりも Qx 帯近傍を励起した方がマトリックス (すなわちバックグラウンド) からの影響が少なくなることが分かった。また、GSD 型のよりも STED 型のほうが信号が明瞭に表れることも分かった。しかしながら STED 型においても、回折限界を超えるほどの十分な空間分解能を得ることはできなかった。

現在のところ、この最大の原因は励起レーザーのパルス幅の設定が不十分であるためと考えている。すなわち、本研究では音響素子を用いて CW (continuous wave) レーザーを擬似的にパルス化し励起光源として用いたため、レーザーによる励起の時間スケールが Pt-OEP の一重項—三重項間の項間交差の時間スケールよりも大きくなりすぎたため、シグナルが埋もれてしまったものと考えている。現在、この問題を解決するために、さらにパルス幅が狭い励起光源を用い、さらには検出にゲートをかけ必要な信号を抽出することにより画像解析を続けている。

## 研究テーマ

# 食餌性オリゴペプチドの存在意義の本質的理解と生活習慣病予防との関連性の解明

## 研究者

岐阜大学 長岡 利 (ながおか さとし)

### (1) 研究背景

食餌性オリゴペプチドは生命活動自体に重要な未知生理機能を有すると考えられるが、詳細は不明である。そこで申請では、食餌性オリゴペプチドの存在意義(生理機能)を科学的に解明するために、ラクトスタチン (IIAEK) と FP を食餌性オリゴペプチドの代表的モデルとして、そのペプチド認識受容機構を分子レベルで解明するための新規技術として、以下(計画 1、2)により、ラクトスタチンを受容する新規ペプチド受容体 (LR: ラクトスタチン受容体) を発見し、発見した LR による革新的脂質代謝改善ペプチド発見などの従来にはない健康維持増進戦略を提案する。脂質代謝に関与する LR を含む「オリゴペプチド受容体は長年の謎」であり、ラクトスタチンによる研究成果を基盤にして、多様なオリゴペプチド受容体を発見する新規基盤技術を創成し、食餌性オリゴペプチドの存在意義を明らかにし、生活習慣病との関連性を解明する。

### (2) 研究方法

ケミカルバイオロジー(特に、クリックケミストリー: 簡単安定な化学結合反応を容易に形成し、分子同士を結合させる技術=受容体とリガンドの結合などに活用可能な技術)を基盤に合成した新規光親和性・蛍光標識ラクトスタチンによる LR 探索・評価。具体的には、我々は実際に、新規光親和性・蛍光標識ラクトスタチンを用いて、ヒト腸モデル細胞である Caco-2 細胞から密度勾配超遠心法により、ペプチドと細胞の初期反応の場である脂質ラフトを単離した。単離した脂質ラフトと新規光親和性・蛍光標識ラクトスタチンを反応させ、反応したタンパク質(受容体候補タンパク質)を MS/MS 解析した結果、複数の LR 候補を得(未発表)。興味深いことに、腸脂質ラフトに存在する腸細胞の分化に重要であり、生体防御(感染防御、炎症制御)、生活習慣病改善(脂質異常症や肥満の改善)と密接に関連する腸アルカリフォスファターゼ (IAP) (PNAS 110, 703-8 (2013)) の発現がラクトスタチンで顕著に増加していた。そこで、ラクトスタチン (IIAEK) と IAP の関連性を詳細に検討するため、ラクトスタチン処理による IAPmRNA (real-time PCR 法)、タンパク質 (western blot 法)、IAP 酵素活性などに対する影響を Caco2 細胞で評価した。

### (3) 研究成果

ヒト腸細胞 Caco-2 細胞からシヨ糖密度勾配超遠心分離法により単離した脂質ラフトを用いて、新規光親和性・蛍光標識ラクトスタチンによる反応生成物の MS 分析により、IIAEK と IAP の相互作用反応生成物が検出された。また、ラットの小腸粘膜タンパク質から単離した細胞膜を用いて、新規光親和性・蛍光標識ラクトスタチンによる反応生成物の MS 分析により、IIAEK と IAP の相互作用反応生成物が検出された。これらの2つの事実から、ラクトスタチンは、小腸の細胞膜に存在する IAP を標的とし、IIAEK の受容体は、IAP である可能性が示唆された。両者に共通する IIAEK 結合配列 GFYLFVEGGR を発見した。

そこで、IAP と IIAEK の関連性をさらに調査した。具体的には、上記のように、Caco-2 細胞から単離した細胞膜の脂質ラフト画分を用いて、IAP 酵素活性を測定した結果、対照群と比較して、ラクトスタチ

ン添加群では、大変驚くべきことに3倍増加した。IIAEK 添加により、IAP の mRNA や western blot によるタンパク質レベルは有意に増加した。

さらに、9 時間培養 Caco-2 細胞に 20 nM IAP siRNA を 48 時間導入後、RNA 回収し、IAP、ABCA1 等の mRNA レベルを測定した。その結果、IAP mRNA レベルは有意に低下し、ABCA1 mRNA レベルも低下した。

以上より、IIAEK は IAP の特異的活性化を介して、コレステロール代謝改善遺伝子 (ABCA1) に影響することを発見した。右図は現在の作業仮説図である。

