

研 究 助 成 業 績 報 告 集

2022 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、化学、生化学及び生命科学の分野の研究の中で、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 2012 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	03-5298-8161

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
評議員	古俣徳康
代表理事	大倉一郎
理 事	加藤信子
理 事	小柳典子
理 事	西口 徹
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	元 株式会社ブリヂストン 主席フェロー 元 学校法人 日本女子大学 評議員
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

2022 年度

[2022 年 4 月 1 日～ 2023 年 3 月 31 日]

公益財団法人 小柳財団

目 次

1	サルコペニアモデルの確立による老化メカニズムの解明 6 研究者▶ 広島大学 大学院 医系科学研究科免疫学 北嶋 康雄
2	ハダカデバネズミ特有の超高分子ヒアルロン酸が皮膚の老化に及ぼす影響の解析 8 研究者▶ 大阪市立大学 医学研究科 病態生理学 高杉 征樹
3	幹細胞不均一性に着眼した皮膚エイジングメカニズムの全容解明 10 研究者▶ 熊本大学 国際先端医学研究機構 佐田 亜衣子
4	GcvB small RNA を介したジペプチドによるアミノ酸代謝調節機構 12 研究者▶ 東京工業大学 生命理工学院 和地 正明
5	脂肪肝進行と肝組織修復・再生における特殊脂肪酸の意義 14 研究者▶ 岡山大学病院 腎臓・糖尿病・内科内分泌科 中司 敦子
6	ヒト軟骨内骨化における遺伝子制御ネットワークの理解 16 研究者▶ 大阪大学 大庭 伸介
7	造血幹細胞の老化制御技術の開発 18 研究者▶ 九州大学 大学院医学研究院 幹細胞再生修復医学分野 細川 健太郎
8	構造生物学的手法と計算化学の融合による CYP 代謝メカニズムの解明 20 研究者▶ CBI 研究機構 量子構造生命科学研究所 近藤 史郎
9	真菌検出に利用するための競合的評価を可能にする糖鎖プローブの合成 22 研究者▶ 名古屋工業大学 宮川 淳
10	トリプルネガティブ乳がんの化学療法に向けた三位一体型ミニ核酸医薬の開発 24 研究者▶ 東京大学 大学院工学系研究科 森廣 邦彦
11	中性子溶液散乱と計算機シミュレーションの融合によるマルチドメインタンパク質のドメイン運動の同定 26 研究者▶ 京都大学 複合原子力科学研究所 井上 倫太郎
12	α-結合型 GlcNAc の合成と多価化に関する合成研究 28 研究者▶ 埼玉大学 大学院 理工学研究科 松岡 浩司
13	哺乳類ミトコンドリアにおける翻訳開始機構の解明 30 研究者▶ 東京大学 大学院新領域創成科学研究科 富田 野乃

14	尿毒素による色素沈着と鉄結合性糖タンパク質ラクトフェリンの色素沈着予防効果の評価 32 研究者▶ 東北大学 薬学研究科 臨床薬学分野 佐藤 恵美子
15	造血器腫瘍に対する新規核酸医薬治療法の開発 34 研究者▶ 国立がん研究センター 研究所がん RNA 研究ユニット 吉見 昭秀
16	皮膚がん予防法確立に向けた新規変異評価システムを駆使した突然変異誘発機構の解明 36 研究者▶ 広島大学 大学院総合生命科学研究科 津田 雅貴
17	ACE2 発現に注目した腸内環境改善による新型コロナウイルス感染に伴う重症化予防の検討 38 研究者▶ 大分大学 医学部内分泌代謝・膠原病・腎臓内科学講座 後藤 孔郎
18	アレルギー疾患を阻害しうるタンパク質の合理的設計 40 研究者▶ 東京大学 大学院総合文化研究科 広域科学専攻 新井 宗仁
19	新型コロナウイルス感染の重篤化に繋がる vWF が流れにより構造変化する機構の解明 42 研究者▶ 京都大学 大学院農学研究科 菅瀬 謙治
20	臓器・血管におけるオートファジー・リソソーム経路由来の臓器連携機構の解明 44 研究者▶ 帝京大学 医学部 内科学講座 宇野 健司
21	子宮体がんに対する妊孕性温存療法の個別化医療の実現 46 研究者▶ 愛知県がんセンター 腫瘍免疫応答研究分野 井上 聡
22	ハーブ由来成分による炭化水素受容体活性化を介した皮膚炎の治療法開発に向けた研究 48 研究者▶ 京都大学 大学院生命科学研究科 西野 勝俊
23	新規脂肪細胞サブセットを介した細胞癌化および癌悪性化の制御機構解明 50 研究者▶ 北海道大学 大学院理学研究院 鎌田 瑠泉
24	ライフステージ中期に生殖能を喪失する分子基盤の解明 52 研究者▶ 東京大学 大学院薬学系研究科 福山 征光
25	Interleukin-11 産生大腸がん間質線維芽細胞を介した大腸がん形成機構の解明 54 研究者▶ 東邦大学 医学部生化学講座病態生化学分野 仁科 隆史
26	ストレス環境下でのがん細胞生存戦略の解明を可能とする単糖を基盤とした バイオプローブの創製 56 研究者▶ 神戸薬科大学 薬化学研究室 奥田 健介
27	ストレス時の情動・自律神経反応の性差と性周期の影響 58 研究者▶ 人間総合科学大学 大学院人間総合科学研究科・心身健康科学専攻 鍵谷 方子
28	肝線維化に対する新しい治療戦略としての分泌経路の解析 60 研究者▶ 秋田大学 大学院医学系研究科 前田 深春
29	腎臓病早期診断マーカーの探索 62 研究者▶ 鳥取大学 農学部附属動物医療センター 伊藤 典彦
30	鞭毛繊毛の構築に必須なチューブリン供給システムの解明 64 研究者▶ 山梨大学 大学院 総合研究部 医学域 解剖学講座 構造生物学教室 久保 智広

31	病的線維化を消去して若返りを実現する新規遺伝子・細胞治療の開発..... 66 研究者▶ 東京大学 医学部附属病院 循環器内科 東邦 康智
32	血管内皮を標的とした革新的脳卒中治療法の開発..... 68 研究者▶ 国立循環器病研究センター 脳神経内科 服部 頼都
33	多種呈味成分の同時判別を可能とするポリチオフェン誘導体を用いた人工舌の創製 70 研究者▶ 東京大学 生産技術研究所 物質・環境系部門 南 豪

研究テーマ

サルコペニアモデルの確立による 老化メカニズムの解明

研究者

広島大学 大学院 医系科学研究科免疫学 北嶋 康雄 (キタジマ ヤスオ)

①研究の背景及び目的

日本は未体験の超高齢社会に突入している。ますます進行する超高齢社会においてサルコペニア（加齢に伴う骨格筋萎縮）に伴う運動機能低下が多く、要介護者を生み、社会問題化が加速することは必至である。2017年に60歳以上の日本人を対象とした調査では、サルコペニアの推定有病者は370万人にのぼり、毎年105万人の高齢者が新しくサルコペニアに罹患していると発表された。そのような背景の元、サルコペニアに関して未だ確固たる解決策には至っていない。

一般的に、骨格筋量はタンパク質の合成と分解のバランスで決定されと考えられおり、遺伝子改変マウスなどにより様々な研究が推進されている。申請者は、これまでに骨格筋機能や骨格筋量を調節する機構について、タンパク分解系の主役であるプロテアソーム系の機能不全マウスを作出し、骨格筋量維持にかかわることを証明してきた (*Front Cell Dev Biol.* 2020; *Stem Cell Reports.* 2018; *J Cell Sci.* 2014)。これまでに、骨格筋では加齢によりプロテアソーム活性が低下することが報告されており、申請者は、骨格筋でのプロテアソーム機能（タンパク分解系）の低下のモデルを作出することができれば、サルコペニア研究が飛躍的に進むと考えた。

上記の考えの元、これまでに申請者は骨格筋特異的なプロテアソーム機能不全 (KO) マウスを作出し、KO マウスでは、有意なプロテアソーム活性の低下および、筋成長不全を示した。しかし、このマウスでは、発生・発育段階からのプロテアソーム機能不全になるため、そもそも個体の成長が阻害され、加齢とともに症状がでるサルコペニアモデルとは異なると考えられた。そこで、テトラサイクリン遺伝子発現調節システムを用いて、実験者の任意のタイミングで時期特異的に遺伝子改変を起こせるモデルが作出できれば、サルコペニアモデルになると考え、本研究を計画した。本研究の目的は、任意の時期に骨格筋特異的にプロテアソーム機能不全を起こすことのできるマウスを作出し、筋量調節機構について明らかにすることである。

②研究方法

誘導型の骨格筋特異的なプロテアソーム機能不全マウスを用いて、若齢マウス (8-12 週齢) を対象にドキシサイクリンを飲ませることにより遺伝子欠損を誘導した。本研究の目的達成のために、下記の研究計画 1-3 を立てた。

(1) 体重、骨格筋重量、握力の評価

加齢によりプロテアソーム（タンパク分解系）機能が低下することが、骨格筋や他の臓器で報告されている。そこで、申請者はテトラサイクリン遺伝子発現誘導系の技術を用いて、誘導型の骨格筋特異的なプロテアソーム機能不全 (mKO) マウスの作出を計画した。mKO マウスおよびコントロールマウスの骨格筋を単離し、RNA 抽出を行い、ターゲット遺伝子の欠損効率を調べる。また、mKO マウスとコントロールマウスの比較により、体重、筋重量（速筋主体の腓腹筋、前脛骨筋および遅筋主体のひらめ筋）、また握力を評価する。

(2) 筋横断面の組織学的な評価

mKO マウスおよびコントロールマウスの骨格筋を単離し、凍結サンプルを作製する。その後、凍結サンプルから筋切片を作製し、筋線維の Type2a、2b 抗体を用いて免疫染色を行う。それらの染色後に筋線維 Type ごとの筋横断面積を定量する。

(3) タンパク質分解系の評価

サルコペニア症状に関連して、骨格筋では加齢によりプロテアソーム活性が低下することが報告されており、タンパク質分解系の機能低下が示唆されている。そこで、本モデルにおいてプロテアソーム系の活性の検証、またユビキチン-プロテアソーム系およびオートファジー-リソソーム系のタンパク質発現をウェスタンブロットにより調べる。

③研究成果

(1) 体重、骨格筋量、筋機能の評価

mKO マウスの骨格筋（前脛骨筋、腓腹筋）を対象にプロテアソーム構成遺伝子（Rpt3）の遺伝子発現を調べたところ、コントロールに比べて 90% 以上有意に抑制されていた。また、他のプロテアソーム構成遺伝子に関しては、mKO マウスにおいて上記とは逆に増加している遺伝子も存在し、代償的な影響が考えられた。

体重に関しては、mKO マウスとコントロールマウスの間に有意な差は認めなかった。前脛骨筋および腓腹筋の筋重量に関しては、mKO マウスはコントロールマウスに比べて有意に減少していた。一方で、ひらめ筋に関しては、両者に差は認めなかった。つまり速筋線維主体の骨格筋では筋萎縮を呈し、遅筋線維主体の骨格筋では筋萎縮が認められなかった。これはサルコペニアの現象と一致しており、今後の更なる解析が必要である。また、筋機能評価として握力を調べたところ、mKO マウスはコントロールマウスに比べて有意に減少していた。

(2) 筋横断面の組織学的な評価

mKO マウスおよびコントロールマウスの筋横断面を用いて免疫染色を行った。mKO マウスにおいて、コントロールマウスと比較して、筋線維 Type2a、2b、2x いずれにおいても有意に筋横断面積が筋萎縮していた。また、HE 染色により筋横断面を観察したところ、mKO マウスのみに壊死した細胞や炎症細胞が確認された。これにより、骨格筋プロテアソーム機能不全マウスでは、恒常的な筋の維持にプロテアソーム系が関与していることを示唆した。また、筋損傷再生時の筋細胞や炎症細胞の関与なども今後の検討課題である。

(3) タンパク質分解系の評価

プロテアソーム活性の検討に関しては、予想に反して、mKO マウスがコントロールマウスと比較して活性の増加を呈した。上記(1)にも記述したように、mKO マウスの骨格筋ではコントロールマウスと比較してターゲット遺伝子 Rpt3 は有意に減少していたが、他のプロテアソームコンポーネントの遺伝子発現は増加していた。そのため、mKO マウスでのプロテアソーム活性の増加は、プロテアソームコンポーネントの代償的な活性化によるものである可能性が考えられた。また、mKO マウスにおいて、ユビキチン化タンパク質の蓄積も確認できたため、タンパク質分解が機能不全になっていることを示した。さらに、mKO マウスの骨格筋では、コントロールマウスと比較して、オートファジー関連の LC3 や p62 のタンパク質蓄積も起こっていた。今後は老化マウスとの比較や運動モデルでの検証を進めることが課題である。上記研究成果の一部は、国際科学雑誌 Cells (2022 May 26; 11 (11): 1754) に掲載され、Funding に本財団の助成を受けた旨を記載させていただいた。

研究テーマ

ハダカデバネズミ特有の超高分子ヒアルロン酸が皮膚の老化に及ぼす影響の解析

研究者

大阪市立大学 医学研究科 病態生理学 高杉 征樹 (タカスギ マサキ)

ハダカデバネズミはマウスと同程度の体重を有するげっ歯類でありながら発がん及び老化に対し驚異的な耐性を示す近年注目のモデル動物である。その長寿を支える分子機構として、過去にロチェスター大学の Vera Gorbunova 教授らによりハダカデバネズミが産生するヒアルロン酸の分子量が他の種に比べて大きく、その超高分子ヒアルロン酸がハダカデバネズミの発がん耐性に重要な役割を果たす事が報告されている (Tian et al., Nature, 2013)。我々はハダカデバネズミの超高分子ヒアルロン酸が加齢性疾患の一つである変形性関節症 (Taguchi et al., Aging Cell, 2020) を抑制する事や、酸化ストレスや DNA 傷害に対する細胞の抵抗性を向上させる事を見出しており (Takasugi et al., Nat Commun, 2020) 超高分子ヒアルロン酸をヒトの健康長寿に応用できる可能性を示している。これを実現するため、超高分子ヒアルロン酸を生体内で人為的に作出した場合にどのような効果が認められるかをまずはマウスで検証する事を目指している。

今年度は、まず初めに超高分子ヒアルロン酸がより小さいヒアルロン酸と具体的にどのように異なる作用を示すのかを培養細胞を用いて解析した。ポリマー長依存的なヒアルロン酸の生理作用を包括的に理解するため、50 kDa 前後の低分子ヒアルロン酸、100-500 kDa 前後の中分子ヒアルロン酸、1,000-4,000 kDa 前後の高分子ヒアルロン酸、そして 6,000 kDa 以上の超高分子ヒアルロン酸を用意した。次にコントロール、及びヒアルロン酸受容体 CD44 を過剰発現させたヒト正常線維芽細胞 IMR90 に対し、これらのヒアルロン酸を生理的な濃度 (20 µg/ml) で処理し、6 時間後に細胞を回収して RNA-Seq により遺伝子発現プロファイルを解析した。結果、CD44 の過剰発現は 100 個程度の遺伝子の発現を変化させ、さらに同様な遺伝子発現変化が程度は比較的小さいながらもコントロール細胞に対する低・中・高分子ヒアルロン酸の処理によっても誘導される事が明らかになった。中・高分子ヒアルロン酸による CD44 依存的遺伝子発現変化の誘導の程度には差がなかったものの、低分子ヒアルロン酸による影響は中・高分子ヒアルロン酸よりも小さかった。興味深い事に、CD44 を過剰発現した細胞では低・中・高分子ヒアルロン酸の作用は大きく減弱するか消失し、ヒアルロン酸を加えない状態であっても過剰の CD44 発現により CD44 シグナルが飽和しうることが示された。超高分子ヒアルロン酸は低・中・高分子ヒアルロン酸のいずれとも全く異なり、CD44 シグナルを負に制御し、その作用は CD44 を過剰発現した状態で一層強く認められた。超高分子ヒアルロン酸は他のヒアルロン酸と比較し作用が強く、CD44 シグナルの下流で制御される遺伝子とは別の多くの遺伝子が超高分子ヒアルロン酸による影響を受ける事が明らかになった。このような一見 CD44 非依存的である超高分子ヒアルロン酸のターゲット遺伝子のうち、抑制を受ける遺伝子の中には有意に p53 のターゲット遺伝子が濃縮されていた。一方で申請者は既に、超高分子ヒアルロン酸が CD44 依存的に p53 のターゲット遺伝子を抑制する事を報告しており (Takasugi et al., 2020, Nat Commun)、したがって超高分子ヒアルロン酸の特異かつ強い作用は CD44 を介した細胞への結合を必要とするものの、必ずしも CD44 シグナルを介していない可能性が考えられる。

次に、生体内で超高分子ヒアルロン酸を創出させた際に、その代謝物として生じる中・小分子ヒアルロン酸が生体内で為害性を発揮しないかについても検討を行った。内容物を一定の速度で放出する浸透圧ポ

ンプを用い、中分子ヒアルロン酸を持続的に投与する方法を開発し一週間に渡り血中ヒアルロン酸レベルを増加させる事に成功し、血中ヒアルロン酸の主な流入先である肝臓でもヒアルロン酸レベルの増加を認めた。ヒアルロン酸の主要な流入先とされる肝臓、腎臓、及び脾臓でRNA-Seqを行い血中の中分子ヒアルロン酸による影響を調べたところ、個体差を超えるような遺伝子発現変化は検出されず、したがって生体内で高分子及び超高分子ヒアルロン酸を創出する際に副次的に生じる中分子ヒアルロン酸の有害性はないか、あっても極めて小さい事が示唆され、生体内で超高分子ヒアルロン酸を増加させた際に副産物的に生じる中分子ヒアルロン酸の危険性は小さい事が強く示唆された。

研究テーマ

幹細胞不均一性に着眼した皮膚エイジングメカニズムの全容解明

研究者

熊本大学 国際先端医学研究機構 佐田 亜衣子 (サダ アイコ)

①研究の背景および目的

加齢に伴い、DNA 損傷、エピゲノム変化、代謝やプロテオスタシスの異常等が、単独または複合的に起こり、組織の機能低下や疾患発症の原因となることが明らかにされつつある。しかし、老化に関する知見の多くは、特定の臓器や分子に着目した個別研究であり、老化プロセスを統合的に理解し、議論するための基盤が不足している。

身体の最も表面に位置する皮膚は、物理的刺激、感染、紫外線や温度など、外界からの影響を常に受けながらも柔軟に応答する力を持った再生能力の高い組織の一つである。一方、高齢者の皮膚は菲薄化・脆弱化し、外的刺激の影響を受けやすくなる。加齢とともに皮膚の創傷治癒が遅延し、がんのリスクも増加する。近年、加齢に伴う皮膚の機能低下の一因として、分化細胞の供給源である皮膚幹細胞の機能低下(幹細胞の老化)が提唱されているが、詳細なメカニズムは明らかになっていない。

従来の幹細胞モデルでは、組織幹細胞は分裂頻度を低くすることで、分裂に伴うストレスや老化を回避していると考えられてきた。そうした中で、代表者らはこれまでに、マウス表皮では分裂頻度の低い細胞だけでなく、活発に分裂する細胞も幹細胞として働くことを見出した。しかし、表皮幹細胞の分裂頻度の違いにより老化のスピードが異なるのか、どのような因子がその制御に関わるのかは不明であった。

②研究成果

加齢に伴い、表皮幹細胞で発現が変化する遺伝子群の中から皮膚における機能が未知であった細胞外マトリクス fibulin-7 に着目した。Fibulin-7 を欠損したマウスでは、分裂頻度の高い表皮幹細胞クローンの減少が促進するとともに、創傷治癒が遅延するなど、老化皮膚様の表現型を示すことが分かった。Fibulin-7 が長期的に表皮幹細胞を維持する仕組みを理解するため、fibulin-7 欠損マウスの皮膚から単離した表皮幹細胞を用いて、遺伝子発現変化を調べた。その結果、fibulin-7 欠損マウスでは、抗原提示、サイトカイン産生など炎症関連遺伝子群の発現が上昇していた。以前の報告で、皮膚の炎症反応の一部として、表皮幹細胞の性質を規定する遺伝子群の発現異常が報告されていた。これらのマーカー遺伝子を解析すると、高齢マウスで見られる特徴的な分子変化である表皮分化マーカーの増強などが、fibulin-7 欠損マウスでは1歳齢の段階で既に現れていた。以上の結果から、fibulin-7 欠損マウスでは、分子レベルでも表皮幹細胞の老化表現型が加速している可能性が示唆された。

Fibulin-7 の生化学的な機能を明らかにするために、fibulin-7 と結合するタンパク質をアフィニティークロマトグラフィーと質量分析により同定したところ、基底膜構造タンパク質、増殖調整因子、マトリセルラータンパク質、マトリクス分解酵素が含まれていた。Fibulin-7 は基底膜構造タンパク質である Collagen IV などと相互作用を示し、fibulin-7 欠損マウスでは基底膜の不規則な肥厚パターンや発現異常が生じていた。これらの結果から、fibulin-7 は細胞外マトリクスタンパク質との物理的な相互作用を通じて、表皮幹細胞の微小環境を維持していることが分かった。

最後に、表皮幹細胞の培養細胞を用い、fibulin-7 を過剰発現させ、表皮幹細胞に保護的な作用を及ぼす

可能性について検討した。Fibulin-7 を過剰発現した表皮幹細胞は未分化かつ低分裂状態で維持されることが示された。さらに、老化した皮膚の微小環境を模倣するため、低血清または炎症様ストレス環境下での影響を調べたところ、fibulin-7 はいずれの条件においても、表皮幹細胞の増殖を低く維持することが明らかになった。以上、fibulin-7 は表皮幹細胞能力を長期的に維持する抗老化マトリクスとして働く可能性が示唆された。今後、本研究において同定された fibulin-7 やその相互作用因子を標的とすることで、皮膚の慢性炎症や創傷治癒不全、加齢性皮膚疾患の治療へと繋がる可能性がある。

発表論文： Raja et al., EMBO Rep. 23 (12) : e55478, 2022 (代表者が責任著者)

研究テーマ

GcvB small RNA を介したジペプチドによるアミノ酸代謝調節機構

研究者

東京工業大学 生命理工学院 和地 正明 (ワチ マサアキ)

①研究の背景及び目的

ジペプチドは単体アミノ酸にはない様々な物理的、化学的、生物学的な特性を有することから、医薬、食品、化粧品などの分野で大きな注目を集めている。これまでジペプチドの生産法としては、天然物からの抽出法や化学合成法、酵素法などが一般的であったが、生成効率の低さや副産物の生成、高コストなどが問題となっていた。そこでこれらの問題点を解決するべく、微生物を用いた発酵によるジペプチド生産法が開発された。*Bacillus* 属細菌から見出された遊離アミノ酸同士を α 位で結合させる酵素 L-amino acid α -ligase (LAL) を大腸菌で発現させることによって、グルコースとアンモニアを原料として安価で高効率なジペプチド生産が可能となった。生産菌育種の過程で、いったん生産したジペプチドが再分解されないようにペプチダーゼをコードする *pepA*、*pepB*、*pepD*、*pepN* の 4 重欠損株 (Δ peps 株) が構築された。LAL を発現させた Δ peps 株は著量のジペプチドを培地中に蓄積したが、生育が顕著に悪化する現象が認められた。生育阻害は、カザミノ酸 (アミノ酸混合物) の添加によって解除されたが、いずれのアミノ酸の単体では解除できなかったことから、ジペプチドの蓄積により複数のアミノ酸の生合成系が阻害されている可能性が考えられた。さらに、生育阻害に関与する遺伝的因子を探索したところ、small RNA の一種 GcvB の欠損によって生育阻害が解除されることが見出された。GcvB はグリシンの代謝に関与するグリシン開裂酵素 (Glycine Cleavage Enzyme) の発現制御系の small RNA として見出されたものである。網羅的な転写解析により GcvB の制御下には、複数のアミノ酸の生合成酵素や取り込み輸送体の遺伝子があることが報告されているが、なぜグリシンと関係のないアミノ酸代謝系がその制御下にあるのかは謎であった。そこで本研究では、ジペプチドによるアミノ酸代謝調節機構を解明することを目的とした。

②研究方法

異なる手法によって得られたトランスクリプトーム解析データから GcvB の標的遺伝子の候補を抽出した。候補遺伝子についてレポーターアッセイにより GcvB の有無により発現量が変化するかを検定した。

③研究成果

GcvB sRNA の標的遺伝子の同定を目的として、これまでに異なる 3 種の手法によるトランスクリプトーム解析が報告されている [RIL-seq (RNA interaction by ligation and sequencing) (Melamed et al., 2016, 2020) CLASH (UV cross-linking, ligation, and sequencing of hybrids) (Iosub et al., 2020)、MAPS (MS2-affinity purification coupled with RNA sequencing) (Lalaouna et al., 2019)]。これらのデータから複数の手法によって共通して抽出されている遺伝子を候補遺伝子として選択した。その中で特にアミノ酸代謝にかかわる遺伝子について GcvB の有無による発現量の変化を測定した。

グルタミン酸の生合成に関わる *gdhA* 遺伝子の発現は GcvB の発現によって抑制された。さらに GcvB sRNA 内の R1 領域および R3 領域を欠失させるとその抑制効果は消失した。したがって GcvB sRNA は R1 領域および R3 領域を介して *gdhA* mRNA と相補鎖を形成し、その発現を抑制していることが示された。

	M9	Ala-Gln	Ala-Gln +casamino acids	Ala-Gln +Gly,Val,Leu,Ile, Arg,Glu
JM101				
$\Delta peps$				

図1 ジペプチド Ala-Gln による生育阻害とアミノ酸添加による解除

M9 グルコース最少寒天培地で親株 JM101 とペプチダーゼ欠損株 $\Delta peps$ を培養した。

Ala-Gln: Ala-Gln (0.2 mM) 添加、+casamino acids: カザミノ酸 (1 g/L) 添加、+Gly, Val, Leu, Ile, Arg, Glu: 6 種のアミノ酸 (各 0.1 g/L) 添加

同様に、分岐鎖アミノ酸の生合成に関わる *ilvLXGMEDA* オペロンやジペプチド排出担体をコードする *ydeE* 遺伝子等が GcvB sRNA の標的遺伝子であることが明らかとなった。

次に、これらの遺伝子がジペプチドによる $\Delta peps$ 株の生育阻害に関与しているかを調べた。ジペプチド Ala-Gln を添加した M9 培地に同時にグルタミン酸と分岐鎖アミノ酸ロイシン、バリン、イソロイシン (及びグリシン、アルギニン) を添加したところ、生育阻害が緩和された (図1)。また、*ydeE* 遺伝子をプラスミドから強制発現させることによっても生育阻害が解除された。これらのことから、以下のようなモデルを提唱した。 $\Delta peps$ 株ではジペプチドの添加により GcvB の発現が誘導され、*ydeE* 遺伝子の発現が抑制されるため、細胞内に過剰のジペプチドが蓄積する。さらに GcvB によって *gdhA* 遺伝子および *ilvLXGMEDA* オペロンが抑制されることによりグルタミン酸および分岐鎖アミノ酸の欠乏が引き起こされ、これによって増殖が阻害される。

本研究によりジペプチドによる増殖阻害のメカニズムの一端が明らかとなった。今後、ジペプチドが GcvB の発現を誘導するメカニズムを解明する必要がある。ジペプチド生産菌に *ydheE* を過剰発現させることにより、生育阻害の解除やジペプチド排出の促進が期待できる。

研究テーマ

脂肪肝進行と肝組織修復・再生における特殊脂肪酸の意義

研究者

岡山大学病院 腎臓・糖尿病・内分泌内科 中司 敦子 (ナカツカ アツコ)

①研究の背景および目標

生体に微量に存在するミード酸 (20:3n9) の血中濃度の上昇は、必須脂肪酸欠乏を反映する臨床的指標とされている。しかし、ミード酸の生理的作用や病態における意義は殆ど解明されていない。

糖尿病患者で脂肪肝を合併する症例 (FL+) と合併しない症例 (FL-) の血中脂肪酸 24 分画を比較し、FL (-) と比べて FL (+) で有意差がある脂肪酸 13 種類を同定した。その中に、生体内に微量に存在する 20:3 脂肪酸であるミード酸 (20:3n9) とジホモ γ リノレン酸 (20:3n6) が存在した。

また我々は、肥満 2 型糖尿病のインスリン標的臓器で発現が亢進する遺伝子のひとつとして、ホスファチジルエタノラミン N メチルトランスフェラーゼ (Pemt) を同定し、解析を続けている。Pemt は肝臓におけるホスファチジルコリンの合成酵素であるが、Pemt 欠損マウスは高脂肪高蔗糖 (HFHS) 食による肥満が抑制される一方で、著しい脂肪肝・脂肪肝炎を呈することを示し、その分子機序を解明した (Nakatsuka A. Sci Rep. 2016)。さらに観察すると、興味深いことに、Pemt 欠損マウスは脂肪肝炎が進行するものの、著しい肝再生能を有し、長期間観察すると、HFHS 飼育 Pemt 欠損マウスの一部に胆管癌を認めた。そして、HFHS 飼育 Pemt 欠損マウスの肝臓に蓄積する脂質に注目してリピドーム解析を行うと、20:3 脂肪酸を含有するホスファチジルエタノラミンが著増していた。本研究では、20:3 脂肪酸の一つであるミード酸 (20:3n9) に着目して、2 型糖尿病や脂肪肝における意義を明らかにすることを目的とした。

②研究方法と成果

(1) ミード酸の脂肪酸毒性・炎症に対する抑制作用について

1) 飽和脂肪酸であるパルミチン酸は、細胞障害を来す代表的な脂肪酸であるが、n9 系ミード酸の肝細胞に対する作用は未知である。培養肝細胞 (H4-II-E-C3 細胞) に 500 μ M パルミチン酸を添加すると p65NF- κ B および JN の K リン酸化が亢進するが、ミード酸はこれを抑制した。またパルミチン酸による Bax 発現亢進をミード酸は抑制した。

2) 培養肝細胞 (HeG2 細胞、H4-II-E-C3 細胞) にミード酸を加えて培養し、脂肪酸合成や β 酸化など脂肪酸代謝に関連する分子の発現を検討した。

- ・ H4-II-E-C3 細胞にミード酸を 0, 10, 100 μ M の濃度を変えて添加し 24 時間培養し、ウェスタンブロットでは Fatty Acid Synthesis (FAS), acetyl-CoA carboxylase (ACC) の発現が亢進し、Stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1) の発現低下を認めた。HepG2 細胞では CPT1A 発現の亢進も認めた。
- ・ またパルミチン酸添加による AMPK リン酸化の低下を、ミード酸は回復させた。
- ・ HepG2 細胞を用いて Oil Red O 染色を行うと、パルミチン酸添加による脂肪滴の増大は軽度であったが、ミード酸を 100 μ M で添加すると脂肪滴の有意な増大が観察された。

(2) 星細胞活性化と核内受容体発現について

肝組織の線維化には星細胞の活性化が寄与するが、星細胞には PPAR δ が発現していることが知られている。

まず PPAR α , β/δ , γ の発現ベクターを用いたルシフェラーゼアッセイを行い、ミード酸による転写活性化を検討した。10 μ M ミード酸は PPAR γ < α < β/δ の転写活性化を促進し、50 μ M ミード酸では

$\gamma < \alpha = \beta / \delta$, すなわち α の転写活性化も強く促進された。

培養星細胞株 (LI90) を用いて、星細胞活性化や線維化、増殖に対するミード酸の作用を検討した。10 ng/ml LPS また、1 μ M leukotriene B4 (LTB4) の添加により α -smooth muscle actin (α -SMA) 発現が亢進し、ミード酸 50 μ M を添加すると抑制された。また LI90 細胞にミード酸を添加して、Proliferation Assay (MTS) を行ったところ、10 μ M ミード酸では抑制されなかったが、25 μ M 以上において有意に増殖が抑制された。また、LPS 添加培地で培養した LI90 細胞においては、25 μ M では抑制されず、100 μ M ミード酸により LI90 細胞の増殖が抑制された。

(3) 肝細胞の未分化能獲得/未分化能維持におけるミード酸の作用について

肝障害時には肝前駆細胞が増殖して肝細胞に分化する経路と、成熟肝細胞が肥大・分裂する機序が存在するが、肝修復・再生に対する前者の役割は大きい。本研究では、肝前駆細胞の未分化能を維持した増殖にミード酸が関わるという仮説について検討した。

1) ミード酸による cyclin D1 発現亢進について

先行研究で Pemt 欠損による肝細胞の cyclin D1 発現亢進を報告した。

本研究において、H4-II-E-C3 細胞にミード酸を添加すると cyclin D1 の発現が亢進し、また Proliferation Assay (MTS) ではミード酸による培養肝細胞の増殖促進が認められた。

既報では cyclinD1 と hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4 α) は、yin and yang の関係である。HepG2 細胞に HNF4 α を発現させ、レポータープラスミドを用いたルシフェラーゼアッセイを行うと、0, 10, 25 μ M ミード酸の添加により HNF4 α の転写活性化が抑制された。また HNF4 α と liver X receptor (LXR) は相互作用して互いに肝細胞分化を抑制すると報告されている。ルシフェラーゼアッセイにおいてミード酸は LXR の転写活性化も抑制した。

2) 肝細胞の未分化能に対するミード酸の作用について

H4-II-E-C3 細胞では EpCAM 発現を検出できなかった。HepG2 細胞にミード酸を添加し、ウェスタンブロットで幹細胞マーカーである Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) や Nanog の発現の増加を認めた。

本研究の背景となった Pemt 欠損マウスを高脂肪高蔗糖食で飼育した 25 週齢マウスの肝組織の免疫組織染色では EpCAM 陽性の小型肝細胞が出現し、また肝組織を用いたウェスタンブロットでは EpCAM 発現の増加を認めた。

③考察

肝臓に中性脂肪が蓄積する病態が脂肪肝であるが、中性脂肪の蓄積自体が悪いわけではないとされている。すなわち、遊離脂肪酸の中でも飽和脂肪酸が細胞障害性を示すため、この有害な脂肪酸を中性脂肪として脂肪滴に閉じ込め、細胞を保護するという意味が知られるようになった。ミード酸により脂肪滴が増大し、またパルミチン酸による JNK や p65NFkB リン酸化など炎症経路の活性化が抑制され、さらに AMPK 活性化の抑制が回復したことから、ミード酸は飽和脂肪酸による肝細胞障害を軽減すると考えられた。また肝線維化の起点となる星細胞の増殖を抑制したことから、脂肪肝から脂肪肝炎・肝硬変への進展を抑制する可能性が示唆された。

Pemt 欠損マウスの肝臓は高脂肪食による脂肪肝・脂肪肝炎を呈するものの、著しい再生能亢進が特徴であり、未分化肝細胞の出現が示唆された。この際に 20:3 脂肪酸の増加が認められ、近年、環境ストレス条件下での細胞生存のための経路として脂肪酸酸化の重要性が注目されていることから、20:3 脂肪酸が炎症制御や組織再生に寄与する可能性を考えた。本研究では n9 系 20:3(ミード酸)について検討を行ったが、ミード酸は肝細胞の未分化能を示す EpCAM の発現を亢進させ、また cyclin D1 発現および細胞増殖を亢進させた。またミード酸が核内受容体にも作用し、肝細胞の分化や増殖に関与する可能性が示唆された。さらに検討をすすめていく予定である。また 20:3n6(ジホモ γ リノレン酸)についても本研究とは別に検討を行っており、脂肪肝進行と肝組織修復・再生における特殊脂肪酸の役割について明らかにし、臨床応用に結び付けたい。

研究テーマ

ヒト軟骨内骨化における遺伝子制御ネットワークの理解

研究者

大阪大学 大庭 伸介 (オオバ シンスケ)

①研究の背景および目的

骨格組織は、胎生期において軟骨内骨化あるいは膜内骨化により形成される。四肢・体幹の骨格組織を形成する軟骨内骨化の初期に、凝集した間葉系細胞から骨軟骨前駆細胞が生じる。骨軟骨前駆細胞は、骨形成を担う骨芽細胞と軟骨形成を担う軟骨細胞へと運命が分かれる。一連の過程の根幹にあるのは遺伝子の発現であると考えられる。骨・軟骨分化決定の分子機構についてはマウス等のモデル動物において知見が蓄積してきたが、ヒトにおけるそれらの妥当性と分子メカニズムについては検証されていない。さらに、Waddington が提唱したエピジェネティックランドスケープの観点で骨・軟骨分化決定機構を考えたとき、分化を規定するランドスケープの裏打ち構造の全容は不明なままである。そこで本研究では、多能性幹細胞を用いて、ヒトの軟骨内骨化過程を追跡可能なシステムを新たに開発し、次世代シーケンサーを用いた単一細胞遺伝子発現・エピゲノム解析 (single-cell RNA-seq・single-cell ATAC-seq) と組み合わせることを計画した。ヒトの軟骨内骨化過程における細胞系譜を追跡しながら、各段階の遺伝子発現プロファイルとオープンクロマチン領域を単一細胞レベルで明らかにし、骨・軟骨分化決定における遺伝子発現制御機構を理解することを目指した。

②研究方法および③研究成果

1. ヒト多能性幹細胞による軟骨内骨化誘導系の開発

ヒト多能性幹細胞から沿軸中胚葉を経て軟骨内骨化を再現する手法 (軟骨内骨化再現系) の開発に取り組んだ。基礎培地、培養期間、および各種シグナル活性を調節する低分子化合物の濃度や処理時間を最適化した結果、Wnt、Hh、TGF- β 、BMP シグナルの活性を調節する化合物を段階的に用いることで、5 日間でヒト多能性幹細胞 (ES 細胞・iPS 細胞) から原始線条、沿軸中胚葉、体節を経て椎板を誘導する条件を見出した。さらに、誘導した椎板細胞を免疫不全マウスの腎被膜下に移植したところ、移植後 2 カ月頃より、マイクロ CT 上で X 線透過性の構造物を認め、経時的にサイズが増大した。移植後の各段階における組織学的解析から、誘導された組織は発生段階の長管骨 (軟骨内骨化) に類似した組織であることが明らかとなった。具体的には、主要な軟骨基質である II 型コラーゲンや軟骨関連転写因子である Sox9 を発現する未熟な軟骨細胞と X 型コラーゲンを発現する肥大軟骨細胞が分化段階に沿って整然と配列し、肥大軟骨細胞周囲より骨組織への置換と血管の侵入を認めた。移植後時間が経つと共に、骨組織への置換が進み、血球系の細胞を含む骨髓様組織が形成された。ヒト抗核抗体を用いた免疫染色では、骨芽細胞・軟骨細胞を含む骨格系細胞においてのみ陽性像を認めた。以上より、ヒト多能性幹細胞から軟骨内骨化を再現する手法の開発に成功したと考えられた。本手法に関しては特許出願に至った (PCT/JP2022/011216 大庭伸介ほか 3 名「椎板細胞の製造方法および該椎板細胞の利用」)。

2. ヒト多能性幹細胞による軟骨内骨化誘導の各段階における single-cell (sc) RNA-seq・scATAC-seq

1. で確立した軟骨内骨化誘導系において、分化誘導前 (多能性幹細胞)、椎板細胞誘導時、軟骨内骨化初期 (腎被膜下移植後 7 週)、軟骨内骨化後期 (腎被膜下移植後 19 週) の scRNA-seq データを取得し、遺

伝子発現パターンをもとにクラスタリングを行った。多能性関連遺伝子である NANOG を発現する細胞は分化誘導前にもみ存在し、椎板関連遺伝子である PAX1, PAX9 等を発現する細胞は椎板細胞誘導時に出現した。椎板細胞集団はさらに細かくクラスタリングされるものの、半分以上の細胞で椎板関連遺伝子を発現していた。RNA velocity 解析による細胞遷移予測を行うと、体節関連遺伝子は発現減少に向かう一方、椎板関連遺伝子は発現上昇を示したことから、椎板細胞集団では椎板の形質を獲得する方向に進んでいると考えられた。次に、軟骨内骨化初期と後期の scRNA-seq データを統合的に解析した。その結果、軟骨内骨化構造体は、①未分化な前駆細胞様集団、②各分化段階の軟骨細胞系列、③各分化段階の骨芽細胞系列、④血液・血管系細胞集団から構成されることが明らかとなった。①～③はヒト細胞であり、④はマウス細胞であったことから、異種由来の細胞群が協調して骨・骨髄環境を構築していると考えられた。また、軟骨内骨化初期のサンプルには①および②が多く、後期のサンプルには③の割合が増加すること、さらに④のほとんどを後期でのみ認めたことから、本再現系は生理的な軟骨内骨化過程（軟骨形成に続く骨への置換と骨髄形成）を反映するものと考えられた。ヒト胎児から取得された公共データとの統合的解析から、ヒト多能性幹細胞由来の軟骨内骨化構造体がヒト胎児期の骨発生過程を部分的に再現していることも示唆された。続いて、軟骨内骨化後期のサンプル（腎被膜下移植後 20 週）に対して、single-cell multiome として scRNA-seq および scATAC-seq を行った。scRNA-seq から得られる遺伝子発現プロファイルと scATAC-seq から得られるオープンクロマチンプロファイルを統合的に解析した結果、10 種の細胞集団にクラスタリングされた。

3. ヒトの骨・軟骨運命決定期における系譜予測・遺伝子制御ネットワーク解析

2. の single-cell multiome データにおいて系譜予測を行うと、未分化な細胞集団から骨芽細胞および軟骨細胞それぞれに進む経路が予測された。また、各細胞集団におけるオープンクロマチン領域と遺伝子発現の関係を確認したところ、各細胞種に特異的なオープンクロマチンと遺伝子発現の相関性が確認された。遺伝子制御ネットワークを予測するため、オープンクロマチン領域における各転写因子のモチーフ解析を行い、さらに各転写因子の遺伝子発現とモチーフの集積状態を統合的に解析した。その結果、細胞種ごとに異なる転写因子群が活性化するモデルが構築された。このモデルは、ヒト軟骨内骨化における遺伝子制御ネットワークの一端を示すと考えられた。

以上のように、ヒト軟骨内骨化において複数の転写因子群が形成する遺伝子制御ネットワークが予測された。

一連の single-cell 解析のデータは公共データベースに登録されていることから、本研究はヒトの骨発生を理解するための貴重なリソースを提供すると考えられた。

研究テーマ

造血幹細胞の老化制御技術の開発

研究者 九州大学 大学院医学研究院 幹細胞再生修復医学分野 細川 健太郎 (ホソカワ ケンタロウ)

【研究の背景】

脊椎動物のテロメアの安定性を維持することは細胞の生存に関わる重大な問題であるが、一方で代謝の恒常性に対しても影響を与えることが明らかになってきている。これまでに我々はテロメア結合因子シェルタリンのひとつ Pot1a の機能について解析を進め、Pot1a が造血幹細胞 (HSC) におけるテロメア DNA の損傷応答の抑制と、エネルギー代謝調節に関与することを見出した。また近年、核-ミトコンドリア間のクロストークを制御する分子が明らかになってきているが、このような二重標的分子は、結合パートナーの発現状況や酸化ストレス等に応答して核およびミトコンドリアゲノムの安定性の維持に関与することが知られる。シェルタリン因子 Tin2 はテロメアの保護に加え、ミトコンドリアの代謝調節にも関与し、核移行パートナー Tpp1-Pot1a によって細胞内局在が制御されることが報告されている。

【目的】

シェルタリン因子の細胞内局在変化が HSC の自己複製能に与える影響はまだ明らかになっていない。そこで本研究では、テロメア結合因子が代謝を調節しながら、どのように造血幹細胞の自己複製能を制御するかを明らかにすることを目的とし、特に Pot1 の核移行パートナーである Tin2 に焦点を当て研究を進行した。

【方法および成果】

1. シェルタリン因子の HSC の代謝制御に対する機能の解析

マウスの造血細胞において、Pot1a、Tpp1、および Tin2 の発現を qPCR によって定量し、HSC が高発現を示すことを明らかにした。加齢や培養によって、Pot1a と Tpp1 の発現が低下する一方、Tin2 の発現は上昇することがわかった。培養後には、Tin2 がミトコンドリアに移行することが観察された。

Tin2 の局在は、Tin2 に結合する Tpp1 によって制御されることが報告されている。即ち、結合する場合、ミトコンドリア移行シグナル配列 (MTS) が被覆されて Tin2 は核へと移行し、結合しない場合は露出した MTS が機能して Tin2 はミトコンドリアへと移行する。ミトコンドリアに優先的に移行する Tin2 変異体を作成してマウス HSC に導入後移植した結果、Tin2 変異体導入 HSC を移植したマウスでは、HSC の自己複製能が低下することが示された。この原因としては、ミトコンドリアに Tin2 が蓄積した HSC における活性酸素種 (ROS) の亢進が考えられた。

ミトコンドリアにおける Tin2 の蓄積が HSC の機能を低下させることが示された結果を受け、次に MTS を被覆してミトコンドリアへの移行に対して拮抗的に作用する Tpp1 を外因性に供給することで HSC の維持を促進できるのではないかと考えた。マウス Tpp1 遺伝子を HSC に導入した結果、HSC の割合および数が対照群と比較して多くなった。また、Tpp1 導入による Tin2 のミトコンドリア移行阻害が HSC の機能維持に与える影響を調べるため、骨髄移植実験を行い、移植後の骨髄解析において Tpp1 導入群で HSC の割合の有意な増加を認めた。

2. Pot1 および Acd の直接導入による HSC の機能回復効果の解析

本研究では、HSC における Pot1a の機能を解析するために、Pot1a を造血幹前駆細胞特異的に欠損する Tg マウスを作成し、解析を行った。その結果、Pot1a を欠損した HSC では、全骨髓細胞に占める HSC の割合が減少し、G0 期にある HSC の割合が減少することが確認された。また、Pot1a を欠損した HSC で細胞周期の亢進が示唆され、エネルギー代謝にも影響があることがわかった。具体的には、ATP 産生量、ミトコンドリア膜電位、ROS の産生量がすべて増加傾向を示した。トランスクリプトームの面からこれらを検証するために Pot1a 欠損 HSC の RNA-seq 解析を行ったところ、欠損群では DNA 損傷シグナルや炎症応答、それに続く分化誘導が起きており、前述の代謝の変化はこの分化誘導による影響が考えられた。

一方、以前の我々の研究によって、Pot1a の過剰発現および膜透過型 mPOT1a タンパク質の培養液中への添加が HSC の維持に働き、骨髓再構築能を向上させることが報告されている (Hosokawa et al., 2017)。分裂を介して HSC の機能が損なわれる老化促進モデルとして、HSC の ex vivo 培養を行った。ここでは、mPOT1a タンパク質に加え、mTpp1 を培養液中に添加して培養した結果、対照群と比較して HSC の割合が顕著に増加することが明らかになった。一方ヒト HSC でも同様の機能を補助できるのかを明らかにするため、膜透過型 hPOT1 および hTPP1 の組換えタンパク質を用いて培養したところ、LT-HSC の割合が増加することが確認された。さらに、コロニー形成実験においても、hPOT1 と hTPP1 の添加によって、HPP-CFC および CFU-Mix の割合が増加することが分かった。培養環境のような過酷な老化促進モデルにおいてもこれらのタンパク質を導入することで HSC の機能が維持されることから、今後は生体におけるこれらの分子群の機能評価を行っていく予定である。

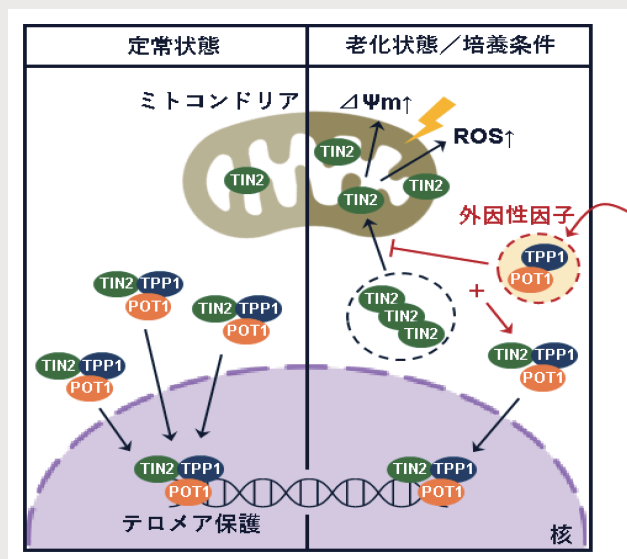


図 本研究成果のイメージ図

定常状態では Pot1-Tpp1-Tin2 の発現バランスがとれているため、過剰な Tin2 が生じず、ミトコンドリアへの流入量は少ない。一方で老化状態や培養環境下では、Pot1, Tpp1 の発現が低下してしまうため、相対的に Tin2 の発現量が多くなり、ミトコンドリアへの流入量が増えることでエネルギー代謝の亢進、ROS の産生量の増加が引き起こされるため、HSC の保護を障害していることが考えられた。

研究テーマ

構造生物学的手法と計算化学の融合による CYP 代謝メカニズムの解明

研究者

CBI 研究機構 量子構造生命科学研究所 近藤 史郎 (コンドウ シロウ)

①研究の背景および目的

ビタミン D は、日光を浴びることによって皮膚で合成される。効能としては骨形成に大きくかかわっていることはビタミン D の不足によるクル病の発生等により明らかである、近年、骨領域だけではなく、免疫系や、神経系への関与も着目されており、ビタミン D の研究論文数をみても、ここ 20 年間で 5 倍に増加している。ビタミン D が不足すると副甲状腺ホルモンが増加し、血管の石灰化を進めることも知られている。活性型ビタミン D₃ を代謝し、不活化する代謝酵素としてよく知られているのは CYP24A1 であるが、この酵素に対し代謝抵抗性があり、活性型 VD₃ と同様な活性をもつ分子を Structure Based Drug Design (SBDD) を可能にするために本研究を開始した。多くの製薬企業では、CYP 阻害等の有害懸念事象が生じた場合は、そもそものスキナホルドを変えた分子を用いるなどして、メドケム的に課題を解決することがほとんどである。その原因はヘモグロビンの鉄に対する配位情報において水素原子を含む正確なジオメトリーの実験的な裏付けが少ないことにある。もし、これらの正確な情報が得られれば、メドケムの実験前に、課題を克服した化合物を SBDD 的に化合物デザインできるはずである。これを実現するために、CYP を干渉する化合物との複合体結晶化を実施し、X 線結晶解析を実施する。また、結晶を大型化することで、中性子線回折も試みて、水素を含む正確な配位情報を取得する。合わせて、単粒子 Cryo-EM では、MW=45,000 の CYP 分子は、安定に構造を取得するには大きなチャレンジといえるが、電子線は中性子と同様、X 線に比して、水素原子の寄与が大きいので見える可能性が大きく、これが成功すれば、このような小さな金属タンパク質への適応が可能となり、インパクトが非常に大きいため、手法の確立から実施し、世界初の試みとして挑戦する。また、生理学的条件下における化合物の有無での CYP 分子の構造変化の妥当性を保証するために、溶液中での SAXS, SANS を用いた溶液構造取得も同時に実施する。溶液構造 SANS では CYP 分子の完全重水素化の条件検討が必要であり、これにて得られた D 化されたタンパク質を用いて中性子回折用のタンパク質として流用が可能という利点もある。また、ウェット実験で取得できた PDB をもとに、量子化学計算を実施し、生物学的活性と相互作用エネルギーの総和に関連性があるかどうかを検証する。量子化学計算においても、鉄を含むタンパク質での技術基盤の構築は望まれており、CYP を例として実施することは今まで不可能だった金属タンパク質への量子化学計算を用いた SBDD への道を開拓する。

②研究方法

活性型ビタミン D₃ の不活化に主にかかわる CYP24A1 は不安定であることから、比較的結晶化の容易、かつ VD₃ 水酸化する機能を保有する放線菌由来 CYP105A1R84A を用いて、まずはこれらを阻害する既存の薬剤との複合体結晶構造を取得し、その構造をもとにした量子化学計算を実施し、総相互作用が生物学活性値と相関するかを検証した。実験は、構造生物学、計算化学、薬理学、合成化学の分野に及び、我々の研究所下の CYP 研究会のメンバーと検討を実施した。構造生物学の手法として、既存薬剤(ミコナゾール、ケトコナゾール、VID400)と CYP105A1 との複合体結晶を作成し、X 線結晶解析を実施して正確な

構造を取得した。なお市販の化合物はラセミ体であり、R 体と S 体が共存した場合は、R 体、S 体をそれぞれ不斉合成したのち、それぞれの複合体結晶を別々に作成し、解析した。本構造をもとに、ABINIT MPII を用いた FragmentMolecular Orbital (FMO) でリガンドに対する各アミノ酸との相互作用エネルギーを計算し、相互作用の総エネルギー値 (Total IFEE) を算出する。あわせて、CYP105A1 に対する生物活性値も同時比較する。上記と平行して、単粒子 Cryo-EM および溶液中での構造を求めるために SAXS も試みる。

③研究成果

ビタミン D 水酸化活性を有する放線菌由来 CYP105A1R84A の変異体とミコナゾール (市販品ラセミ体)、ケトコナゾール (市販品ラセミ体)、VID400 (市販品ラセミ体)、VID400 の R 体、S 体 (当研究所 CYP 研究会メンバーである帝京大薬学部橘高研究室川越らによる不斉合成化合物) の計 5 化合物の複合体の結晶化およびそれぞれ X 線データ収集 & 解析を実施した。X 線データ収集はいずれも、当研究所の CYP 研究会メンバーである QST 平野らによって高エネ研で実施し、その分解能は 1.8Å であった。

i) ミコナゾール複合体

市販品のミコナゾールは、R 体 S 体の混合物であるラセミ体である。結晶解析の結果、S 体のみがヘムに直接結合し、しかも二つの異なるコンフォメーションをとっていることが判明した。

ii) ケトコナゾール複合体

市販品のケトコナゾールは、二か所の不斉炭素を持ち、4 種類のラセミ体が入っている。

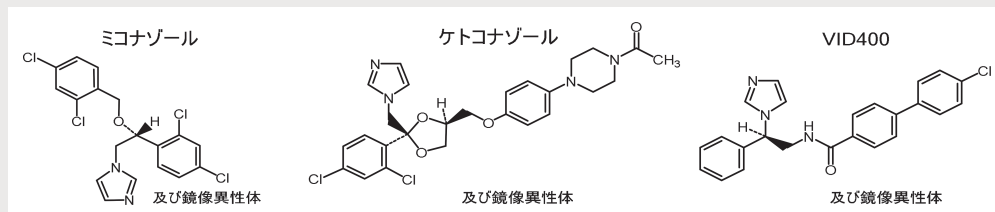
複合体結晶解析の結果、4 種類の構造のうち、一種類の化合物のみが選択的に結合していることが判明した。

iii) VID400 複合体

市販品の VID400 も、ラセミ体である。結晶中では、上記化合物と異なり、R 体、S 体がどちらも結合しているのが見られた。そこで、ラセミ体より R 体、S 体を不斉カラムにて分離を試みたが、うまく分離できなかったため、それぞれを単独に不斉合成し、活性値も測定するとともに複合体結晶取得を試みた。

S 体、R 体とも生物活性を測定したところほぼ同等活性であったので、R 体、S 体が混入したものと推察される。結合様式も S 体、R 体とも同様であり、ほぼ差がみられなかった。

これらの成果は、9/25-29 まで静岡で開催される第 23 回シトクロム P450 国際会議にて、CYP 研究会企画によるシンポジウム「骨領域からその先へ：新規ビタミン D 誘導体の開発とビタミン D 水酸化酵素の応用」において、発表予定である。また、これらの 3 次元座標をもとに、CYP 研究会メンバーの豊橋科技大栗田研究室で計算実施中であり、これらの結果も加えてそれぞれの化合物と CYP105A1 阻害活性と、相互作用エネルギーの関連について速やかな論文投稿を予定している。



第 23 回シトクロム P450 国際会議 : <https://www.pssj.jp/related/2022/12/12/iccp450-jssx.htm>

研究テーマ

真菌検出に利用するための競合的評価を可能にする糖鎖プローブの合成

研究者

名古屋工業大学 宮川 淳（ミヤガワ アツシ）

①研究の背景および目的

近年、医療の高度化や患者の高齢化に伴い、易感染宿主が増加し、深在性真菌感染症から病状が悪化して敗血症を引き起こすなど、大きな問題となっている。そこで本研究では真菌の細胞壁 β -1,3-グルカンの加水分解酵素である β -1,3-グルカナーゼに注目した。この酵素は、ヒトがもたない酵素であるため、感染を検出する対象とすることは有効である。しかし、酵素の抗体を用いた検出では、それぞれの菌に対応した酵素の抗体を揃えて、検出に使用する必要となるため、本研究では β -1,3-グルカナーゼが β -1,3-グルカンを加水分解する活性を検出できる糖鎖プローブを合成する。 β -1,3-グルカンの部分構造であるオリゴ糖を化学合成し、オリゴ糖ライブラリーを構築する。その後、蛍光基を導入して、酵素反応を微量で検出できる分子を合成し、これを用いて真菌を検出することを目的とした。

②研究の方法と成果

現在、研究に用いられている多糖 β -1,3-グルカンは、天然由来の混合物のため、構造均一なものではない。また分岐鎖を有する β -1,3-グルカンオリゴ糖も市販されていない。そのため、 β -1,3-グルカナーゼの基質特異性を解明するためには、有機合成化学的手法を用いて構造明確な β -1,3-グルカンオリゴ糖を合成する必要がある。計画としてグルコースを1残基ずつ連結し、直鎖3糖を合成した後、分岐鎖を導入することとした。まず、グルコースの1位に安定な保護基である p-メトキシフェニル基を導入した後、4,6位をベンジリデン基による保護を行い、反応性を高めるために3位をシリル基で選択的に保護した。続いて、2位には立体選択的な糖連結反応を可能にするアセチル基を導入した。この誘導体のベンジリデン保護基を選択的に開裂し、4位にベンジル基、6位を水酸基へ変換して、この6位の水酸基に分岐鎖を導入するため、選択的脱保護可能なクロロアセチル基を導入した。分岐を導入に使用しないものは、アセチル基を導入した。次に3位に導入したシリル基を選択的に脱保護を行い、糖受容体へ変換した。また別途、1位の p-メトキシフェニル基を脱保護した後、イミデート化を行って糖供与体へ変換した。これら糖受容体と糖供与体を用いて、糖連結反応を行い、2糖を得た。同様に2糖を糖受容体へ変換し、単糖の糖供与体と糖連結反応を行い、3糖を構築した。3糖は異なる位置のグルコースにクロロアセチル基を有する構造のため、分岐鎖の位置が異なる4糖および5糖が合成できる。また分岐鎖用の単糖および2糖は、先ほど合成した6位水酸基がフリーの単糖を利用して、アセチル基のみで保護されたグルコースの1位をイミデート化して活性化した糖供与体と糖連結反応を行い分岐鎖2糖を合成した。この2糖の1位を活性化して、糖供与体へ変換し、分岐鎖2糖を導入するための糖供与体とした。また分岐鎖1糖を導入するための糖供与体としては、先に合成したアセチル基のみをもつ糖供与体を用いた。それぞれのフリーの水酸基の位置が異なる3糖受容体に対して、分岐鎖1糖および2糖用の糖供与体を用いて、糖連結反応を行い分岐鎖位置および分岐鎖長の異なる β -1,3-グルカンオリゴ糖誘導体を合成した。最後に、導入した保護基であるシリル基、ベンジル基を脱保護した後、全ての水酸基の保護基をアセチル基に変換した。そして、1位の p-メトキシフェニル基を脱保護して活性化基であるイミデートを導入した。オリゴ糖の1

位にアルキルアミノ基を導入して、そこへ検出に用いる蛍光基を結合することとした。そのため、アミノアルキルアルコールのアミノ基を Fmoc 保護して、糖との連結反応に利用した。イミデートである糖供与体と、アミノアルキルアルコールの連結反応を行い、アミノ基をもつオリゴ糖誘導体を準備することができた。水酸基を保護しているアセチル基と、アミノ基を保護している Fmoc 基を同時に脱保護を行い、続いて蛍光基の導入した。7 種類の分岐鎖位置および分岐鎖長の異なる β グルカンオリゴ糖ライブラリーに対して、それぞれ異なる蛍光基を導入して同時に検出ができるようにした。HPLC を用いて、各オリゴ糖誘導体の保持時間と検出の確認を行い、全て微量での検出が可能であることがわかった。さらに 7 種類の誘導体を一緒に混ぜて分析を行うために、保有している HPLC の蛍光検出は 2 波長同時に可能であるので励起波長を変えて、誘導体を 2 つずつ、4 回に分けて分析を行った結果、わずかな励起波長が重なったため、2 種類以上が検出されることもあったが、保持時間が異なり、ピークが分離できおり、同時検出が可能であることがわかった。今後は、酵素による加水分解反応を行い、各分解物を分離して検出可能であるか検討を行い、迅速な検出を可能にして、複雑に基質が存在する系での解析を行っていく。その後、酵素による違いを明らかにして、真菌の新しい検出方法を作り出す。

研究テーマ

トリプルネガティブ乳がんの化学療法に向けた三位一体型ミニ核酸医薬の開発

研究者

東京大学 大学院工学系研究科 森廣 邦彦（モリヒロ クニヒコ）

①研究の背景及び目的

悪性新生物（がん）は長年日本人の死因の第一位であり、効果的な抗腫瘍薬の開発が急務である。中でもトリプルネガティブ乳がん（以降 TNBC と表記）は、他タイプの乳がんの治療標的となり得るエストロゲン受容体、プロゲステロン受容体および HER2 受容体の全てが欠如していることから、高い再発率と再発後の急速な進行を示す予後不良の難治性がんである。TNBC は乳がん全体の 15-20% を占めるとされるが、適用可能な治療薬が非常に限定されているのが現状であり、標準治療の確立が強く望まれている。異なる作用機序をもつ複数の薬剤を混合して用いるカクテル療法はその候補の 1 つであるが、薬物動態の複雑化や投与量の厳密な制御が困難なことから生じる予期せぬ毒性（副作用）などが懸念されている。

ヌクレオシド製剤はがんの化学療法に最も用いられてきた抗腫瘍薬の 1 種であり、単剤もしくは他の薬剤とのカクテル剤として投与されている。ヌクレオシド製剤は細胞内でリン酸化酵素によってモノリン酸体に変換されることで薬効を発揮するが、多くのがん細胞ではこの変換が律速段階であり、またリン酸化酵素の活性低下が薬剤耐性の原因であることが明らかになっている。この薬効の低さは投与量の増加につながり、望まない副作用による患者さんの QOL の低下や治療の中止を招いてしまう。この問題点を解決すべく、新しい抗腫瘍薬のプラットフォームとして近年、ヌクレオシド製剤をオリゴマー化したミニ核酸医薬が注目を集めている。例えば、実際に臨床現場で用いられているヌクレオシド製剤である Floxuridine が 10 残基連なったミニ核酸医薬 F10 は、Floxuridine 単体と比較して数十倍の抗がん活性をもつことが報告されている。この強力な抗がん活性は F10 が細胞内移行後に酵素分解を受け、Floxuridine の活性体であるモノリン酸体が直接放出されることで発揮される。

本研究では TNBC の効果的な化学療法を目指し、さまざまな作用機序をもつヌクレオシド製剤を 1 つのプラットフォームに集積させた、革新的な三位一体型ミニ核酸医薬の開発を実施する。三位一体型ミニ核酸医薬の具体的な構造は、チミジル酸合成酵素を阻害する Trifluridine、リボヌクレオチド還元酵素を阻害する Gemcitabine および DNA メチル基転移酵素を阻害する Decitabine がリン酸ジエステル結合で連なったオリゴヌクレオチド分子である。本ミニ核酸医薬は酵素分解によって作用機序の異なる薬剤活性体（モノリン酸体）を同一の分子から効率よく放出できるため、従来のカクテル療法と比較してシンプルかつ高活性な多剤併用療法の実現が期待できる。これまでに TNBC の治療においてそれぞれの作用機序が有効であることが示唆されているが、これらのがん細胞内で同時に活性化することで相乗的な抗がん活性を実現する。また、各ヌクレオチドの搭載割合を自在に調整することができるため、がんの種類や遺伝子発現パターン情報に従ったオーダーメイド医療への展開も期待できる。

②研究方法

本研究では下記の項目を実施し、Trifluridine と Gemcitabine、Decitabine の 3 種類のヌクレオシド製剤を搭載したミニ核酸医薬の開発を達成する。

(1) 3 種のヌクレオシド製剤アミダイトブロックの化学合成

オリゴヌクレオチドの合成に必要なそれぞれのアミダイトブロックを化学合成する。過去の報告に従い、

市販の各ヌクレオシドから数工程を経て目的物へと誘導し、NMR およびマスペクトロメトリーによって構造を同定する。

(2) ミニ核酸医薬の化学合成

(1)で合成した各種アミダイトブロックを用い、DNA 自動合成機によってミニ核酸医薬を化学合成する。それぞれのヌクレオシド製剤の数や場所を様々に変えた複数のオリゴヌクレオチドを合成し、その後の評価に用いる。目的物は高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によって精製し、MALDI-TOF マスペクトロメトリーによって構造を同定する。

(3) ミニ核酸医薬の細胞培養系における薬効評価

(2)で合成した各種ミニ核酸医薬の抗腫瘍効果を様々なヒト TNBC 細胞(MDA-MB-231 や MDA-MB-453 など)を用いて評価する。まずは網羅的に細胞増殖抑制試験を実施し、効果的にがん細胞死を誘導できる配列を選抜する。また、それぞれのヌクレオシド製剤の標的分子が効果的に阻害されていることを確認するために、ウェスタンブロットによってチミジル酸合成酵素やリボヌクレオチド還元酵素の発現量を定量する。

(4) ミニ核酸医薬のマウスにおける薬効評価

(3)で優れた薬効を示したミニ核酸医薬について、マウス個体内に生着させた腫瘍に対する抗がん活性を評価する。免疫不全ヌードマウスに MDA-MB-231 細胞を生着させ、ミニ核酸医薬を尾静脈もしくは腹腔内投与によって個体内に導入する。腫瘍の大きさと体重を経時的に測定することで抗腫瘍効果と副作用を簡便に評価する。ポジティブコントロールとしてパクリタキセルやカルボプラチンなどの実際に TNBC 治療に使用されている低分子薬剤を、ネガティブコントロールとして天然の DNA を用いる。オリゴヌクレオチドは肝毒性を誘発しやすいことが分かっているため、血中の肝毒性マーカーである ALT および AST を定量することでミニ核酸医薬の安全性を精査する。さらに TNBC は転移しやすい特徴をもつため、解剖後に各臓器を取り出して転移の有無についても調べる。

③研究成果

まずは Trifluridine と Gemcitabine、Decitabine のアミダイトブロックを化学合成した。Trifluridine と Gemcitabine については問題なく合成が完了したものの、Decitabine については化学的不安定性のため目的物を得ることができなかった。現在、Decitabine と同じ作用機序をもつ別のヌクレオシドアナログのアミダイトブロックを合成中である。

次に、Floxuridine、Trifluridine 及び Gemcitabine のみからなる 10 量体のミニ核酸医薬を化学合成した。合成は定法に従ったホスホロアミダイト法により首尾よく進行した。また、Floxuridine と Gemcitabine の両方を搭載したミニ核酸医薬についても合成に成功した。

合成した各種ミニ核酸医薬の抗がん効果を、TNBC 細胞の 1 種である MDA-MB231 細胞を用いて評価した。ミニ核酸医薬を添加一定時間後に細胞増殖試験を行った結果、単剤のみからなるミニ核酸医薬と比較して、多剤からなるミニ核酸医薬の方が強い細胞毒性を示すことが分かり、本戦略の有用性が示された。また、各ミニ核酸医薬が形成する高次構造についても CD スペクトル測定によって詳細に調べ、その形成強度によって薬効が大きく変化することも見出した。現在はミニ核酸医薬に搭載する各ヌクレオチドの比率や場所を様々に変化させたオリゴヌクレオチドを化学合成しており、今後はこれらを同様に評価することで最適なミニ核酸医薬を選抜する計画である。

最後に、動物個体中の腫瘍に対しての効果調べるため、MDA-MB-231 細胞を移植した担がんマウスモデルを作製した。MDA-MB-231 は最も広く用いられている TNBC 細胞であり、本マウスモデルを用いることでより実践的な創薬研究を進めることができると期待される。購入した免疫不全マウスの後背部に MDA-MB-231 細胞を導入し、一定期間経過後に生着を確認した。現在は本モデルマウスに対して各種ミニ核酸医薬を投与し、薬効評価を行うと同時に副作用解析についても準備を進めている。

研究テーマ

中性子溶液散乱と計算機シミュレーションの融合によるマルチドメインタンパク質のドメイン運動の同定

研究者

京都大学 複合原子力科学研究所 井上 倫太郎 (イノウエ リンタロウ)

①研究の背景及び目的

ヒトをはじめとする高等真核生物由来のタンパク質の大半は、複数のドメインから形成されるマルチドメインタンパク質 (MDP) である。計算機シミュレーションや理論的予測により、共同的なドメイン運動が MDP の機能に深く関与していると予測されている。しかしながら、現状では MDP のドメイン運動を直接観測する測定手法、解析手法、更には機能に直接関与すると考えられる特定のドメインのみを観測する手法が未だ確立していない。即ち、これらの測定及び解析上の問題の解決が、MDP のドメイン運動の同定、更にはその運動と機能の相関の解明に必須である。本研究では、特に3つのユビキチン (Ub) が直鎖状に連結した直鎖状トリユビキチン (Tri-Ub) に注目し、中性子溶液散乱及び全原子動力学シミュレーションの融合で上記の問題解決に取り組んだ。

②研究方法

最初に、中性子溶液散乱から出来る限り高品質な実験データを取得するため、Tri-Ub の精製及び培養条件の最適化を行った。最適化後の Tri-Ub に対して溶液中での構造を明らかにするため小角 X 線散乱 (SAXS) 測定を行った。次に、この Tri-Ub の溶液中でのドメイン運動を実測するために中性子スピンエコー (NSE) 測定を行った。更に、Tri-Ub のどのドメインが主にドメイン運動に寄与しているかを同定するために、注目するドメインの選択的計測をセグメント重水素 Tri-Ub の小角中性子散乱 (SANS) 測定により試みた。このセグメント重水素 Tri-Ub とはドメイン毎の重水素化率を制御した Tri-Ub であり、特に一つのドメインのみを75%重水素化 (残りの二つのドメインは軽水素化ドメイン) として調製した。本研究では、75%重水素化ドメインを導入する位置を変えた三種のセグメント重水素 Tri-Ub を作成し、SANS 測定はオーストラリア原子力科学技術機構で実施した。加えて、溶液散乱から観測された構造及びダイナミクスを定量的に解析するために、核磁気共鳴 (NMR) から予測された Tri-Ub の三状態 (state A, B, C、図 1 (a) 参照) を初期構造として all-atom MD を行った。

③研究成果

精製条件の最適化により凝集物の寄与が極めて低い Tri-Ub の調整が可能となり、その結果観測された SAXS プロファイルを図 1 (b) に示す。最初に、各個別の状態のみのアンサンブル平均曲線で SAXS プロファイルの再現を試みたが、何れの状態でも単一では実験値との一致度 (χ^2) が5以上となり十分には再現出来なかった。このことは、NMR 測定からも既に確認されており異なる手法からも同様の物理的描像を支持したと言える。そこで、次のアプ

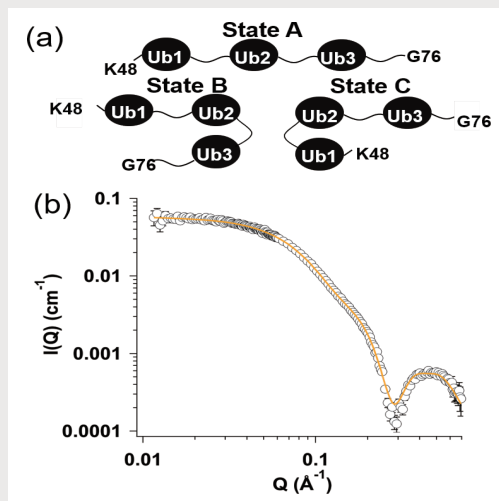


図 1 (a) Tri-Ub の三つの状態の概略図。(b) Tri-Ub の SAXS プロファイル (黒丸)、三つの状態を初期状態とした All-atom MD から算出されたアンサンブル平均曲線を適切な比率で混合し、算出した曲線 (実線)。

ローチとして各状態から得られたアンサンブル平均を用いて、SAXS プロファイルを最も良く再現する 3 状態の混合比を算出した。その結果、stateA, B, C を 0.19, 0.54, 0.27 の比率を用いることで、 $\chi^2=1.94$ という極めて良い一致度で SAXS プロファイルの再現に成功した。All-atom MD と SAXS により Tri-Ub の溶液構造を解明できたので、NSE により Tri-Ub のダイナミクス測定を行った。NSE からは、散乱強度の時間相関関数に対応する中間散乱関数 ($I(Q, t)/I(Q, 0)$) が観測される (図 2 (a))。この中間散乱関数に対して、単一指数関数で fit することで拡散定数の Q (空間) 依存性である $D(Q)$ を得た。 $D(Q)$ は、近似的に並進拡散、回転拡散及びドメイン運動の三つのダイナミクスの線形結合により記述できる。並進拡散係数に関しては、予め動的散乱測定で実測した値を用いた。図 2 (b) に $D(Q)$ から並進拡散係数 (D_t) の寄与を除いた $D(Q) - D_t$ を示すが、明確な余剰ダイナミクス、回転拡散及びドメイン運動が実験的にアクセスした時空間で検出出来たことを示している。そこでこの $D(Q) - D_t$ をより詳細に解析するため、各状態から得られた all-atom MD の trajectory から中間散乱関数を計算し、単一指数関数で fit することで実験データと直接比較可能な $D(Q) - D_t$ を求めた。更に、SAXS プロファイルから見積もられた各状態の最適な混合比より、 $D(Q) - D_t$ (図 2 (b) 黄色実線) を求めたところ、実測 $D(Q) - D_t$ を十分に再現できた。加えて、数値計算より求められた $D(Q) - D_t$ からドメイン運動由来の $D(Q)$ を評価した。その結果、測定時間空間スケール内においてドメイン運動由来の $D(Q)$ が測定時空間内で $D(Q) - D_t$ に対して顕著な寄与があることが確認された。現在、ドメイン運動由来の trajectory に対して主成分“分析により、各状態で支配的なドメイン運動を同定する解析を進め”ている。以上より、SAXS、NSE 及び All-atom MD を併用することで Tri-Ub の溶液中の構造及びドメイン運動の実測及び解析に成功したが、両測定手法ではすべてのドメインが等価に観測され

るため特に state B の混合比率が state C よりも高いことを示す今回の解析結果に対して疑問の余地がある。そこで、75%重水素化ドメインを挿入する位置を変化させた三種類のセグメント重水素化 Tri-Ub の SANS 測定を行った。ここで重要な点は、SANS においては重水中で 75%重水素化ドメインは散乱的に不可視化されるため、残り二つの軽水素化ドメインからのみの散乱情報のみが得られる。図 3 に SANS プロファイルを示すが、75%重水素化ドメインが挿入される部位が異なることで散乱プロファイルが異なることが実験的に確認された。この得られた散乱プロファイルに対して SAXS から算出された各状態の混合比を用いて算出した散乱プロファイルを示すが (図 3 実線)、実測の SANS プロファイルの再現に成功した。つまり、SAXS、NSE の結果を解釈できる解析で SANS プロファイルも矛盾なく説明できることを強く保証している。

以上より、SAXS、NSE、SANS 及び All-atom MD を併用から MDP のドメイン運動の実測、解析、更に特定のドメインの識別が可能となった。今回確立した溶液構造・ダイナミクスを統合的に解析する手法の確立により、より複雑な MDP のドメイン運動の解析が可能となり、より生物学的に意義のある機能と強く関連するダイナミクスの同定が可能になる。

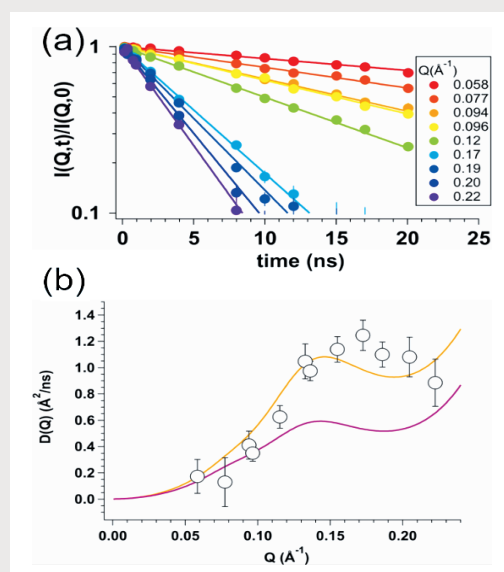


図 2 (a) Tri-Ub の中間散乱関数。(b) NSE から実測された $D(Q - D_t)$ (黒丸)、MD から算出された $D(Q) - D_t$ (黄色実線)、MD から算出されたドメイン運動由来の $D(Q) - D_t$ (ピンク実線)。

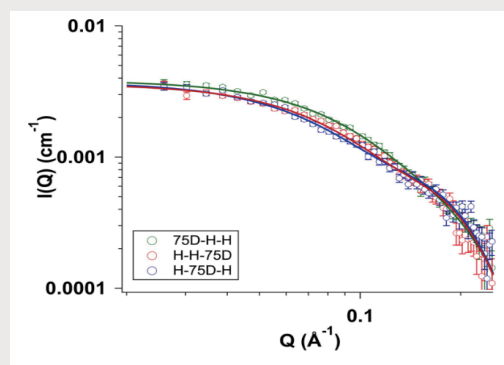


図 3 75D-H-H (緑 丸)、H-H-75D (赤 丸)、H-75D-H (青 丸) Tri-Ub からの SANS プロファイル。実線は、SAXS から決定された各状態の混合比より算出した散乱プロファイル (実線)。

研究テーマ

α -結合型 GlcNAc の合成と多価化に関する合成研究

研究者

埼玉大学 大学院 理工学研究科 松岡 浩司 (マツオカ コウジ)

①研究の背景及び目的

糖タンパク質糖鎖として重要な *N*-アセチル-*D*-グルコサミン (GlcNAc) は、モデルタンパク質として利用されるレクチンであるコムギ胚芽凝集素 (WGA) と結合することが知られている (Biochem. Biophys. Res. Commun. 55: 1340-46, 1973)。我々は、図 1 に示す高分子基質を用いて、糖-レクチン相互作用解析を実施してきた (J. Mol. Struct. 1217: #128404, 2020)。特に血清型糖タンパク質糖鎖構造に対応する β -グリコシドを利用し、糖鎖クラスター効果の発現により、高い親和性の創出に成功している。また、糖鎖高分子を用いることにより、糖鎖間距離の制御が可能となり、図 2 に示のように親和性の最も高い糖鎖間距離の推定が可能となってきた。一方、Schwefel らの報告では、 α -グリコシドを用いた多価型基質が β -グリコシドを用いた多価型基質より高い親和性を示すとされている (J. Am. Chem. Soc. 102: 555-578, 2010)。そこで、本研究においては、これまでに実施例のない α -グリコシドを用いた高分子型の多価型基質合成と機能評価を目的とした。

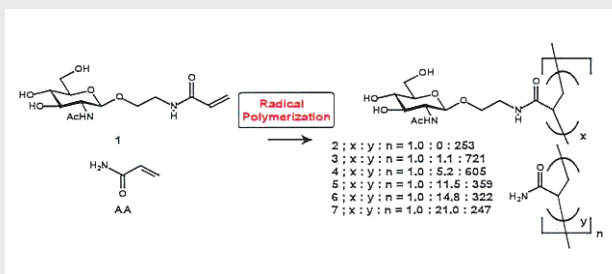


図 1 GlcNAc ポリマーの構築例

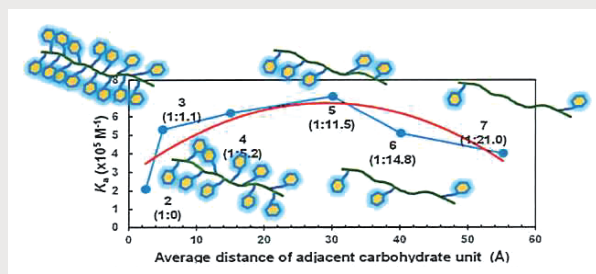


図 2 糖鎖ポリマーによる構造活性相関

②研究方法

I) α -グリコシド型モノマーの合成 (図 3)

GlcNAc を原料として、Fischer 法によりクロロエタノールと反応させ、 α -グリコシドへと誘導した。Fischer 法は鎖長の長いアルコールへの適用も可能であった。続いて、アジド置換、水添によるアジドの還元、さらに誘導されるアミノ基へのアクリロイル化を行うことにより、目的化合物の合成を達成した。

II) α -グリコシド型ポリマーへの誘導 (図 4)

α -グリコシド型モノマーをラジカル重合により糖鎖ポリマーへと変換し、水溶性高分子を得た。

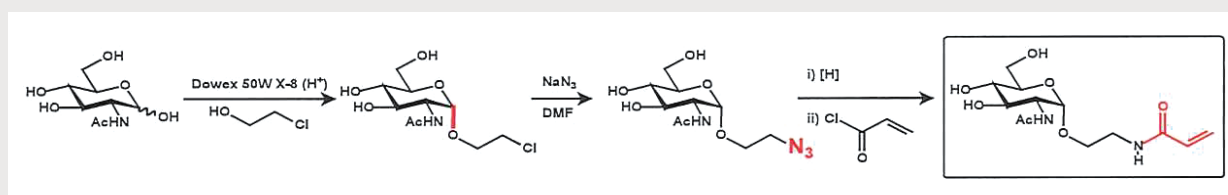


図 3 α -GlcNAc モノマーの構築例

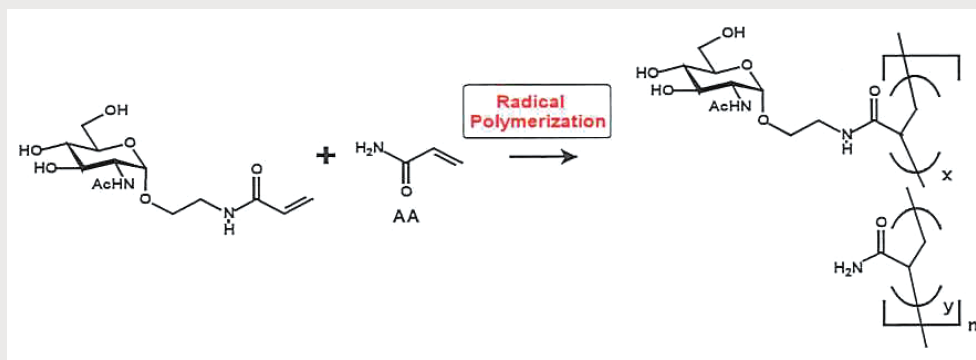


図4 α -GlcNAc ポリマーの構築例

III) α -グリコシド型ポリマーの機能評価

合成した α -グリコシド型ポリマーと WGA との相互作用を蛍光法により検討し、既知の β -グリコシド型ポリマーとの比較を行った。その結果より α -グリコシドへの変換による活性相関を検証した。

③研究成果

- 末端に置換基を含むアルコールとのグリコシル化反応により、収率は低いものの一段階で α -グリコシドの合成に成功した。
- 得られた α -グリコシドを化学修飾することにより、水溶性のモノマーへと誘導する経路を確立した。
- α -グリコシド型モノマーと糖鎖間の距離を制御するためにアクリルアミドを共重合させることにより、糖鎖密度の異なる 6 種類の α -グリコシド型ポリマーを合成した。
- 得られたポリマーと WGA との親和定数を求める手法の一例を図 5 に記載する。

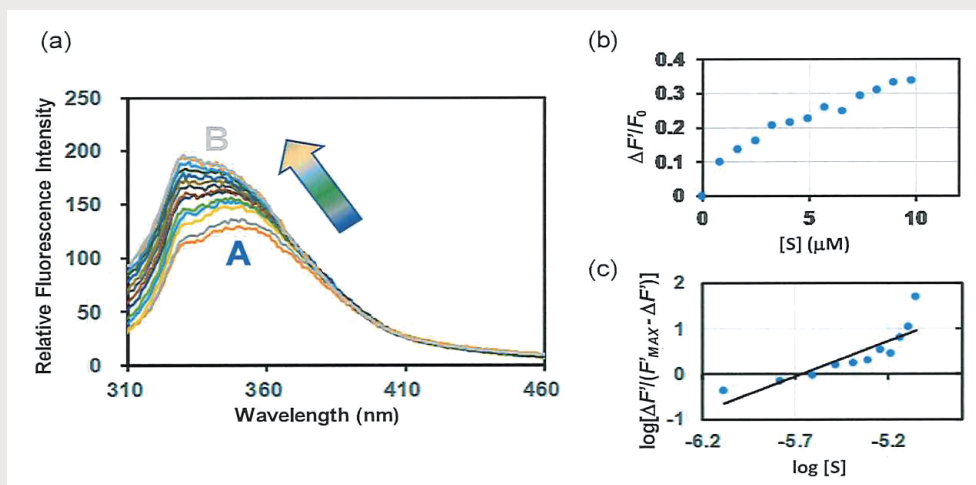


図5 ホモポリマーと WGA との評価例 (a) ポリマー溶液を加えた際の WGA の蛍光スペクトル変化、(b) 基質濃度に対する蛍光強度変化量、(c) Hill プロットによる解析

この手法により、合成した糖鎖密度の異なる α -グリコシド型ポリマー 6 種類と WGA との結合親和定数 (K_a) を算出し、 $2.85 \times 10^5 \sim 7.80 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ の値を得た。

今後は、本手法を拡張し、がん関連糖鎖等へ展開したいと考えている。

本研究を推進するにあたり、貴重な御援助を賜りました公益財団法人 小柳財団ならびに関係者の方々に厚く御礼申し上げます。

研究テーマ

哺乳類ミトコンドリアにおける翻訳開始機構の解明

研究者

東京大学 大学院新領域創成科学研究科 富田 野乃（トミタ ノノ）

成果の概要

哺乳類のミトコンドリアタンパク質合成系は、酸化的リン酸化複合体の13種類のサブユニットを合成する。ミトコンドリアの翻訳開始は、リーダーレス mRNA (lmRNA) と非 AUG 開始コドンの使用という特徴があるが、その分子機構や IF-3mt の役割は不明である。本研究では、in vitro 転写 tRNA と天然ミトコンドリア tRNA を用いて、lmRNA の翻訳開始過程を再構築し、以下を示した。i) IF-3mt は、開始 tRNA のアンチコドンシステムの 3GC ペア、及び、アンチコドンと AUG 開始コドンの塩基対、を識別して校正機能を果たし、lmRNA の翻訳開始を促進する。ii) IF-3mt の末端伸長領域は、mt-tRNAMet のアンチコドン 1 文字目の f5C 修飾と協働的に、AUA 開始コドンからの翻訳開始を促進する。iii) 反応系から IF-3mt を欠失させると、AUG と非 AUG の開始コドンからの開始の比率が変化する。これらは、IF-3mt が lmRNA の AUG 及び非 AUG 開始コドンからの開始と、哺乳類ミトコンドリアにおける酸化的リン酸化複合体サブユニットの協調的な遺伝子発現に重要であることを示唆している。

展望

最近、Rorbach らは、lmRNA と開始 tRNA のミトコンドリアリボソーム（ミトリボソーム）への結合を in vitro で解析し、哺乳類ミトコンドリアにおける翻訳開始機構のモデルとして、IF-2mt、開始 tRNA、lmRNA が 55S ミトリボソームに直接結合し、IF-3mt なしに開始複合体が形成されると提案している (Remes, 2023)。本研究では、再構築型哺乳類ミトコンドリア翻訳系を利用し、IF-3mt が翻訳開始過程において校正機能を果たし lmRNA の翻訳を促進すること、非 AUG 開始コドンからの翻訳開始に重要であることを明らかにした (Fig. 1, 2)。これは、IF-3mt が関与する開始複合体形成経路が存在することを明確に示している。また、IF-3mt を反応から欠失させると、AUG と非 AUG の開始コドンからの翻訳産物間の比率が変化するが (Fig. 2)、これは IF-3mtKO 細胞株においてミトコンドリア酸化的リン酸化複合体サブユニットの量比が変化する報告とも一致しており、生体における IF-3mt の校正機能の重要性を示唆している。今後、ミトコンドリア lmRNA の開始複合体形成経路や IF-3mt の校正機能の分子基盤について、生化学的解析および構造解析が待たれる。ミトコンドリアの翻訳開始の異常は Leigh 脳症やパーキンソン病の原因となることが知られており、本研究の成果はヒト疾患の発症機構の解明等の医療応用に結びつくと期待される。

研究発表

Muhoon Lee, Nono Takeuchi-Tomita Reconstitution of mammalian mitochondrial translation system capable of long polypeptide synthesis. 2023, Methods in Molecular Biology, in press.

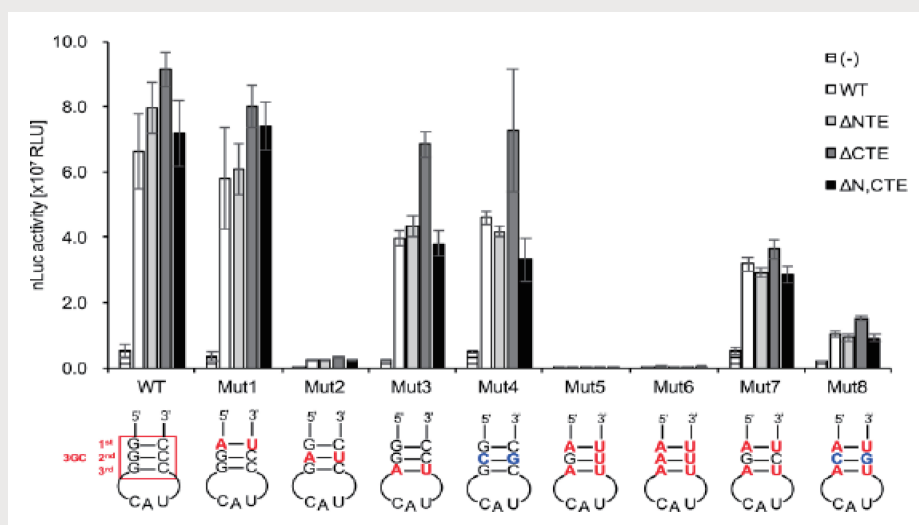


Fig. 1 Discrimination of the 3GC pairs in the anticodon stem of the initiator tRNA by IF-3mt.

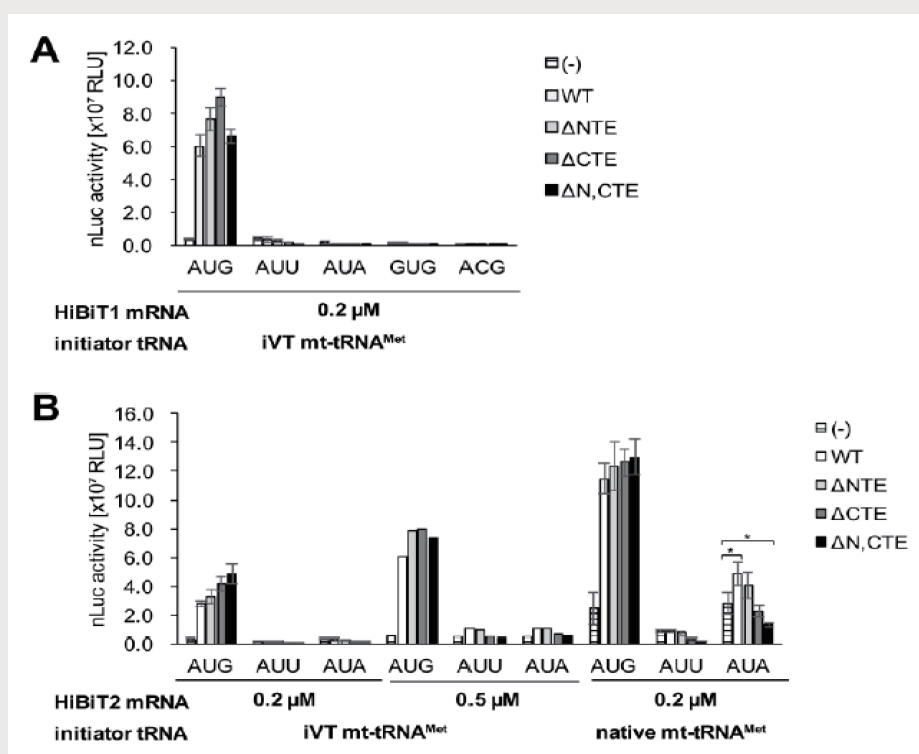


Fig. 2 Discrimination of start codons by IF-3mt. HiBiT1/2 mRNA with the indicated start codon was translated using the IF-3mt variant and the specified initiator tRNA.

研究テーマ

尿毒素による色素沈着と鉄結合性糖タンパク質ラクトフェリンの色素沈着予防効果の評価

研究者

東北大学 薬学研究科 臨床薬学分野 佐藤 恵美子 (サトウ エミコ)

①研究背景・目的

ヒトの体内では蓄積した老廃物は腎臓によって体外に尿として排泄されるが、腎機能が低下して尿排泄ができなくなると、体内に老廃物が蓄積し様々な臓器に悪影響を及ぼす。この老廃物には色素沈着や掻痒に関わるものも含まれており、血液透析治療を受けている末期腎不全患者では、色素沈着や掻痒の皮膚症状が一般的に認められる。特に若い患者では皮膚の色素沈着など美容的合併症に悩んでいる人が多いが、その予防・改善法はない。通常、皮膚でシミができる過程では、紫外線や女性ホルモンなどの刺激物質がケラチノサイトを刺激し、そのことによりメラノサイト活性化因子であるプラスミンがメラノサイトを活性化させ、チロシンがチロシナーゼによりメラニンとなり、メラニンがケラチノサイトに蓄積し沈着する。これまでの報告からメラノーマの患者の尿中には尿毒素であるインドキシル硫酸の排泄量が多いことが報告されており (Valko-Rokytskova et al., Medicine, 2019)、腎機能が低下することで体内に蓄積する尿毒素のメラニン形成への関与が示唆される。インドキシル硫酸はメラニンと同様に、トリプトファンの代謝物であり、トリプトファンが腸内細菌によりインドールとなり、インドールが肝臓で硫酸抱合されることで合成される。さらに慢性腎臓病 (CKD) 患者では、掻痒症の重症度と血中の尿毒素 p-クレシル硫酸の濃度に相関が認められることが報告されている (Wang C et al., Dermatology, 2016)。尿毒素は正常な腎臓の場合は尿中へ中へ排泄されるが、腎機能が低下することで体内に蓄積する。これまでの我々の腎不全モデルマウスを用いた研究から、腎機能が低下した状態で尿毒素は血液循環のみならず、脳・筋・腎など全身臓器に蓄積することを明らかにしており (Sato E et al., Toxins, 2018)、皮膚への蓄積も考えられる。しかしながら、皮膚への尿毒素の蓄積についてはこれまでに報告されていない。そこで本研究では、尿毒素と色素沈着や掻痒の関係に着目し、尿毒素が皮膚や角化細胞に及ぼす影響について明らかにすることを目的とした。これに加え、尿毒素による色素沈着や掻痒に対する予防・治療法の確立を目指し、鉄結合性糖タンパク質ラクトフェリンの効果についても評価した。

②研究方法

本研究では (I) 腎不全マウスを対象とした in vivo 実験と (II) ヒト表皮角化細胞株 HaCaT を用いた in vitro 実験を行った。

(I) 腎不全マウスを対象とした in vivo 実験

8 週齢のオス C57BL/6J マウスに 0.2% アデニン含有の MF 食を 6 週間投与し、アデニン誘発腎不全マウスを作製した (RF 群)。コントロール群 (Cont 群) には、MF 食を 6 週間投与した。また RF 群に 2% ラクトフェリン水溶液を飲水で 4 週間投与した群を RF+Lf 群とした。実験スケジュールを図 1 に示した。それぞれの群のマウスは、解剖時に採血を行い、その後生理食塩水で全身を灌流し、皮膚を採取した。

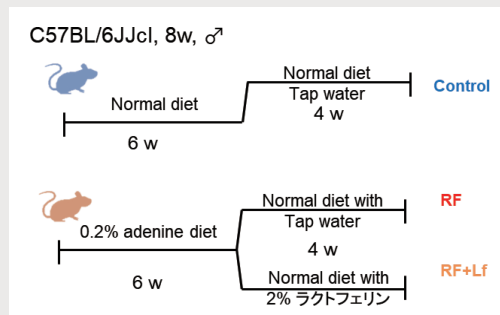


図 1 動物実験のスケジュール

血中および皮膚中の尿毒素量は、LC-MSにて測定を行った。

(II) ヒト表皮細胞株 HaCaT を用いた in vitro 実験

表皮を校正する角化細胞は掻痒シグナルの起点となることから、本研究では、ヒト表皮角化細胞株 HaCaT 細胞を用いた。

掻痒のシグナルには、芳香族炭化水素受容体のアリール炭化水素受容体 (AhR) を介した経路が報告されていることから、尿毒素による HaCaT 細胞での AhR シグナル誘導について検討した。HaCaT 細胞に 5 種類の尿毒素を暴露し、AhR の下流遺伝子である CYP1A1 の発現について RT-PCR にて評価した。

③研究成果

(I) 腎不全マウスを対象とした in vivo 実験

血中と皮膚中の尿毒素を LC-MS で測定した結果、皮膚への尿毒素の蓄積を確認した。尿毒素の皮膚への蓄積の結果を下図に示した。代表的尿毒素 Uremic toxin1 は腎不全時には血中および皮膚中に蓄積していた。またその皮膚への蓄積量は血中濃度依存的に蓄積していた。また、ラクトフェリン投与群では、血中尿毒素 Uremictoxin1 は有意に低下していたが、皮膚中の尿毒素の蓄積は低下しなかった (図 2)。

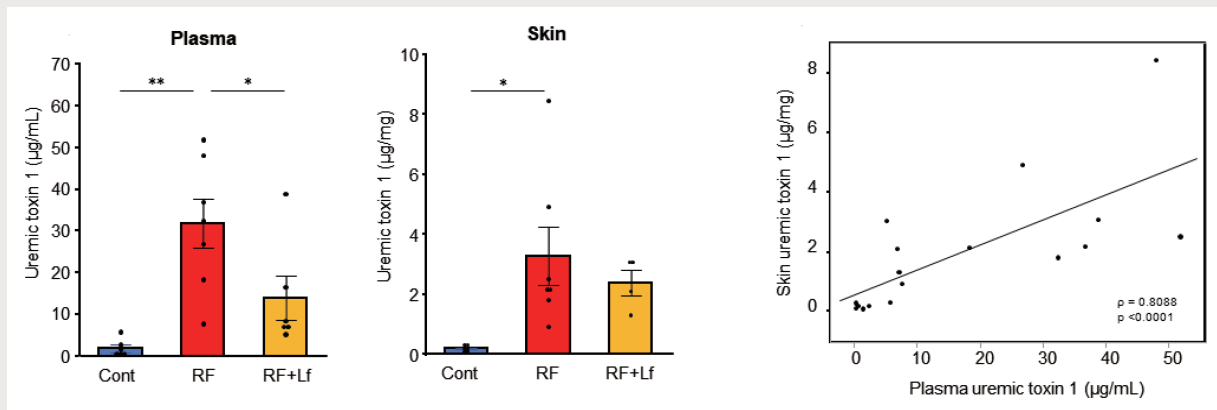


図 2 血中および皮膚中の尿毒素量と、その相関グラフ

(II) ヒト表皮細胞株 HaCaT を用いた in vitro 実験

(I) の in vivo 実験から、腎不全時に皮膚にも尿毒素が蓄積することが明らかとなった。そこで、HaCaT 細胞を尿毒素で暴露した際の AhR 活性化を、AhR の下流遺伝子である CYP1A1 の遺伝子発現で評価した。5 種類の尿毒素 (UT1~UT5) を HaCaT 細胞に暴露し、24 時間後の Cyp1a1 の遺伝子発現を評価した結果、5 種類すべての尿毒素によって Cyp1a1 の発現が Control と比較して、有意に上昇した。

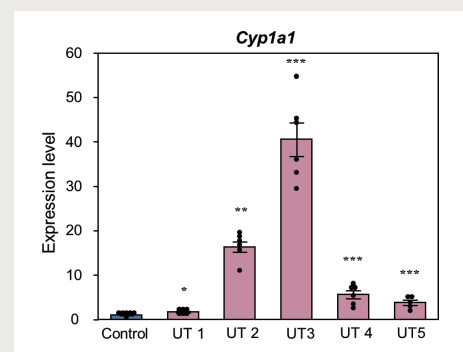


図 3 HaCaT 細胞における Cyp1a1 の発現

④考察と今後の展望

これまでに、腎不全マウスの全身臓器に尿毒素が蓄積することを明らかにしてきたが、今回、腎不全マウスの皮膚に尿毒素が蓄積することを初めて明らかにした。さらに、尿毒素が角化細胞における AhR の活性化に寄与することも初めて明らかにした。これらの結果から、腎不全状態では血中に蓄積した尿毒素が皮膚にも蓄積し、掻痒症状や色素沈着の発症に寄与することが示唆された。今後、尿毒素による掻痒のメカニズムを解明する。さらに尿毒素による色素沈着についてもメラノーマ由来細胞株を使用し研究をすすめていく。本研究をさらに進めることで「人間の美容と健康」に対して、大きな貢献が期待できる。

研究テーマ

造血器腫瘍に対する新規核酸医薬治療法の開発

研究者 国立がん研究センター 研究所がん RNA 研究ユニット 吉見 昭秀 (ヨシミ アキヒデ)

①研究の背景及び目的

申請者は留学して以来、SF 変異ががんを引き起こすメカニズムと治療標的化について研究してきた (Yoshimi A et al. Nature 2019 など)。これらの研究により SF 変異による白血病発症機構の一端が解明されたが、SF 変異はグローバルな mis-splicing を誘導する (同時に 500-1,500 の mis-splicing event を生じる) ことから、一つの SF 変異の下流で真に病態形成に重要な mis-splicing event を同定することは非常に困難である。これまでの当該分野の研究では、中でも重要な mis-splicing event を 1-2 個同定して生物学的・細胞生物学的にその重要性を検証した研究がほとんどであり、同様の研究手法を複数の mis-splicing event に応用するには指数関数的に労力・コスト・時間がかかる。さらに、申請者らは SF 変異による splicing 異常は臓器特異的・遺伝子変異アレル特異的に誘導されることを明らかにした (Liu Z*, Yoshimi A*, #et al. Cancer Discov. 2020)。

すなわち SF 変異の下流で真に病態形成に重要な mis-splicing event は組織・臓器ごとに異なる可能性が高く、このことは臓器・腫瘍によって SF 変異の頻度が大きく異なることにも裏打ちされる。つまり従来の手法では SF 変異の下流にある真に重要な mis-splicing event を複数同定することはほぼ不可能である。

そこで、本提案では、複数の mis-splicing を修正する Antisense Oligonucleotide (ASO) の組み合わせを用いて SF 変異陽性がんの治療効果のあるパネルを先に同定し、同定した ASO パネルを即 SF 変異陽性がんの治療に応用すると同時に、パネルに含まれる ASO の組み合わせを検証することによって、SF 変異陽性がんの病態形成に真に重要な mis-splicing event を逆行的に同定し、病態解明への活用および ASO パネルの最適化を行うことを目的とした。上記の基礎的研究および前臨床試験を通じて、世界で毎年 40-60 万人が罹患する SF 変異がんに対する新規治療法を開発し、治療成績を向上させることを将来的な目標とした。

②研究方法

本研究は、次の 3 STEP に分けて遂行した。

(1) ASO パネルに含める mis-splicing event の選定

Δ PSI (スプライシング変化の強さを示す一つの指標) の絶対値やそれぞれの mis-splicing gene の生物学的影響の可能性を加味して、ASO パネルに含める 13 個の event (Gene A ~ M) を選定し、独自のプログラムを用いて ASO をデザインし合成した。

(2) 各 ASO の mis-splicing 修正効果の確認

ASO パネルの mis-splicing 修正効果を確認する前に、まずは個々にデザインした ASO がそれぞれ標的とする mis-splicing event を修正可能か、SRSF2 変異を endogenous に発現する白血病細胞株で確認した。評価したところ、約半数の 6 つの mis-splicing event について目的とする修正が可能であった。一方、残りの 7 つの mis-splicing event については複数の ASO をデザインしたが、そのほとんどは修正が困難で

あった。

(3) ASO パネルの mis-splicing 修正効果の評価

(2) の検討で有望であった ASO を順次組み合わせて 4 種類の混合 ASO による mis-splicing event 修正効果まで SRSF2 変異を endogenous に発現する白血病細胞株で確認したところ、それぞれ約 4 分の 1 の ASO 濃度で使用したにもかかわらず、同時修正効果が確認された。

③研究成果

本検討により、我々が保有する独自の ASO デザインプログラムが約半数の mis-splicing で効率よく修正効果を示すこと、また効率よく ASO が細胞内に導入され、通常よりも低濃度であっても mis-splicing event を修正可能なこと、さらに 4 種類まで混合した ASO パネルを用いても同時に 4 つの mis-splicing event を修正可能なことが示された。すなわち、今後の ASO パネルの開発に向けた基礎的な検討が予想以上に進捗したと考えられる。

今後は、より効率の良い ASO パネルの組み合わせを検討した後に、ASO パネルの前臨床試験に進む。具体的には、治療効果判定のために、より臨床予測性の高い患者由来細胞を用いた異種移植 (PDX) モデルを活用し、SRSF2 変異を持つ白血病患者細胞を NSGS マウスに骨髄内輸注し (Yoshimi A et al. Blood 2017)、末梢血を flow cytometry で解析して生着を確認した後に、ASO パネルにより治療を行い、治療効果を判定する。同様に SF 変異のない AML 患者細胞を用いた PDX モデルにおいても ASO パネルの効果を観察する。ASO パネルで加療後のマウスから human CD45 陽性細胞を FACS-sorting して、目的の mis-splicing event の修正ができているのかを確認する。

さらに、ASO パネルが有望であれば、実用化を兼ねて、構成する ASO を減らせないか検討すると同時に、絞り込まれた mis-splicing event の発がん誘導性について検討した。また、他の SF 変異を有する発がんモデルや固形腫瘍モデルにおいても同様に ASO パネルの治療効果について評価し、有望であれば ASO パネルの最適化や各癌種における病態解析へ活用する。

本研究により、ASO パネルの良好な mis-splicing event 修正効果が示された。今後臨床応用に向けて ASO パネルの最適化と前臨床試験の実施を目標に引き続き検討を重ねる。

研究テーマ

皮膚がん予防法確立に向けた新規変異評価システムを駆使した突然変異誘発機構の解明

研究者

広島大学 大学院総合生命科学研究科 津田 雅貴 (ツダ マサタカ)

①研究の背景及び目的

紫外線はDNAに突然変異を引き起こしうる。突然変異は発がんの発生につながる。紫外線は波長により、短波長(UVC: 190-280 nm)、中波長(UVB: 280-320 nm)、長波長(UVA: 320-400 nm)に分類される。多くの研究者が、エネルギーが高いUVCを用いて突然変異誘発機構を調べてきた。しかし、UVCは、オゾン層や大気に吸収され地上に到達しないので、人体に突然変異を引き起こす因子とは考えにくい。一方、UVAは、ほとんどのエネルギーが地表に到達している。UVAは、透過力が大きく、ほとんどが表皮を通過し、真皮もしくは皮下組織まで到達する。しかし、UVAはエネルギーが弱いという理由から、突然変異に関して解析されてこなかった。ところが、近年、UVAが突然変異を誘発することが示された。その原因は、UVAが活性酸素種やラジカルを生成し、7,8-dihydro-8-oxyguanine (8-oxoG)というDNA損傷を引き起こすからだと推定されている。本研究の目的は、新規変異評価システム(piggyBlockシステム)を用いて、8-oxoG損傷箇所の突然変異発生を引き起こすDNA合成酵素やその制御分子を見つけ出すことである。

最近、UVCによって生成するシクロブタン型ピリミジンダイマー(CPD)というDNA損傷箇所で、PDIP38というタンパク分子が変異を促進することを、新規変異評価システム(piggyBlockシステム)とヒトゲノム編集細胞を用いて、明らかになった。piggyBlockシステムは、これまで使われていた変異評価手法と異なり、人工的に合成したDNA損傷をゲノムDNAに挿入し、ゲノム上で起こる変異の頻度(変異率)とどのような変異が起きるかを直接調べる手法である。piggyBlockを用いれば、UVAによって生成するDNA損傷箇所の突然変異誘発分子を見つけることが可能である。本研究では、コントロールとして、CPD損傷入りpiggyBlockも解析を行う。

②研究の方法

CPDが結合したpiggyBlockプラスミド10 ngと1 µgのTransposase発現プラスミドを同時にNEONトランスフェクションでPOL η 遺伝子欠損細胞およびPDIP38遺伝子欠損細胞に導入しに遺伝子導入した。96 well plateに細胞を播き、トランスフェクション30時間後にピューロマイシンで、BPDG損傷がゲノムにインテグレーションされた細胞のみをセクションした。10日後、ピューロマイシン耐性コロニーからゲノムDNAを抽出し、シーケンスした。

③研究成果

CPD損傷入りpiggyBlockプラスミドをPOL η /RAD18遺伝子欠損細胞に遺伝子導入し、ピューロマイシン耐性クローンを獲得した。これらのクローンは、CPD損傷が挿入された親細胞のワトソン鎖およびクリック鎖のどちらかを受け継ぎ、クローン内でモザイク状となる。従って、このアッセイにおいて、エラーフリーのテンプレートスイッチか損傷乗り越えによる複製ブロックの解除は、区別することができる。TLSが起きるとApA(正確なTLS)か他の塩基が挿入(不正確なTLS、突然変異)され、ダブルピークと

して検出される。テンプレートスイッチによる解除では、CPD 損傷箇所では GpC が挿入され、シーケンス解析では GC のシングルピークとして検出される。この原理に基づいて、TLS とテンプレートスイッチの発生頻度を調べた。Pol η の遺伝子欠損により、TLS の頻度は、4.7% から 11.6% に増加した。突然変異の正体である、不正確な TLS の頻度は、0% から 3.6% に増加した。一方、RAD18 遺伝子の欠損により、TLS の頻度および不正確な TLS の頻度は野生型と同じであった。POL η /RAD18 遺伝子欠損細胞は、TLS の頻度は POL η 遺伝子欠損細胞とほぼ同じであったが、不正確な TLS (突然変異) は 5.8% に上昇した。従って、RAD18 は、POL η が存在しない状況では、正確な TLS を促進する。

POL η は CPD 損傷箇所における正確な損傷乗り越えを行う。これは、今回行った実験結果とも一致する。野生型細胞に RAD18 遺伝子を欠損させた場合、この損傷乗り越えの頻度および変異スペクトラムに変化は見られていない。しかし、POL η 遺伝子に RAD18 遺伝子を欠損させた場合、不正確な TLS (突然変異) は上昇した。本研究結果から、POL η は RAD18 の有無に関わらず、紫外線損傷箇所の TLS には影響を与えないことが分かった。

研究テーマ

ACE2 発現に注目した腸内環境改善による新型コロナウイルス感染に伴う重症化予防の検討

研究者 大分大学 医学部内分泌代謝・膠原病・腎臓内科学講座 後藤 孔郎 (ゴトウ コウロウ)

①研究の背景と課題、目標

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) のヒト感染 (COVID-19) が猛威を振っており、社会的・経済的に大きな打撃を与えている。SARS-CoV-2 の感染には、アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 2 が不可欠な受容体であることが明らかになっている。事実、肺組織には多くの ACE2 が発現しており、このことが肺炎の重症化に大きく関与している。また、COVID-19 は下痢といった消化器症状をもたらすことが知られているが、これには小腸に存在する ACE2 が関与していることが推測されている。小腸の上皮細胞では ACE2 はアミノ酸トランスポーターと共局在しており、さらに ACE2 による消化管のアミノ酸吸収制御は、抗菌ペプチド産生などを介した腸内細菌叢の恒常性維持に重要であり、マウスモデルの炎症性腸炎に対して ACE2 が防御的作用をもつことが解明されている。

一方、加齢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、加齢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、上記のエンドトキシンが腸管腔から門脈へと放出され、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。さらにエンドトキシンが肺に到達すると、肺障害の原因となることが知られている。COVID-19 により重症化する要因として、糖尿病や肥満が考えられている。COVID-19 重症化と血中 ACE2 濃度との関連を検討したところ、高度肥満や血糖コントロールの悪化がみられるほど血中 ACE2 濃度が増加しており、多臓器からの ACE2 発現の増加によるものではないかと報告されている。しかしながら、加齢において肺で ACE2 発現が増加しているかについては不明である。

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。本研究の目的は、①老化モデル動物で肺内で ACE2 発現が増加するか、②腸内環境改善作用を有するレジスタントスターチの摂取によって肺内での ACE2 発現増加や SARS-CoV-2 の臓器内感染が改善するか、③レジスタントスターチの摂取によって血中エンドトキシンが低下するかを検討する。

②研究計画

A) モデル動物の作製：

若い野性雄マウス (2 ヶ月：ヒトで換算すると 20 歳台に相当、YOUNG) 群と老化モデルの雄マウス (12 ヶ月：ヒトで換算すると 70 歳台に相当、OLD) 群に分ける。また各群を RS 群 (通常餌に 10% RS を添加) とコントロール群 (10% RS を添加しない) に分ける。したがって、YOUNG+コントロール群、YOUNG+RS 群、OLD+コントロール群、OLD+RS 群の 4 群を作成し、1 ヶ月飼育する。具体的な評価項目を以下に示す。

70 歳台に相当、OLD) 群に分ける。また各群を RS 群 (通常餌に 10% RS を添加) とコントロール群 (10% RS を添加しない) に分けしない) に分ける。したがって、YOUNG+コントロール群、YOUNG+RS 群、OLD+コントロール群、高脂肪食+RS 群の 4 群を作成し、1 ヶ月飼育する。具体的な評価項目を以下に示す。

B) 肺におけるの評価：

1) 肺の ACE2 発現を評価する。

2) 末梢血の ACE2 濃度を評価する。

3) ACE2 自体には抗炎症性作用があるため、肺および小腸内での炎症性サイトカインである tumor-necrotizing factor (TNF)-alpha 発現を評価する。

4) 血中のエンドトキシンの 1 つである lipopolysaccharide (LPS) の血中濃度を測定する。

C) SARS-CoV-2 のリコンビナント S タンパク (Rp) の全身投与による肺への分布に関する評価：

SARS-CoV-2 には、ウイルス粒子表面に王冠様突起 (Spike) タンパク質 (S タンパク) が存在し、この S タンパクが受容体である ACE2 に結合してウイルスの RNA ゲノムが細胞内に侵入することで細胞内に感染する。このような ACE2 の S タンパクに対する親和性は SARS-Cov-2 では極めて高いことが報告されている。したがって、肺内での ACE2 発現を抑制させれば、少なくとも肺からの SARS-CoV-2 感染を軽減させることが可能である。SARS-CoV-2 のリコンビナント S タンパク (Rp) を SARS-CoV-2 に見立てて、Rp の全身投与によって Rp が肺内に分布すれば、SARS-CoV-2 が肺に感染していることと考える。上記 4 群に対して、Rp (10μg) を腹腔内投与し、肺を採取する。

1) 肺における Rp の含有量を定量する。

③研究の結果

【肺および小腸における評価】

OLD で肺内 ACE2 発現および血中 ACE2 濃度が増加したが、RS の投与により有意に抑制された。また、OLD で肺内および小腸での TNF-alpha 発現が増加したが、RS によっていずれも有意に TNF-alpha 発現が抑制された。さらに、OLD では血中 LPS 濃度が有意に増加したが、RS によって低下した。

【肺および小腸における評価】

腹腔内投与された新型コロナウイルスのリコンビナント S タンパク (Rp) は、OLD における侵入が有意に増加したが、Rs を投与すると有意に低下した。

④研究の考察

加齢は COVID-19 重症化の危険因子であるとされているが、そのメカニズムについては不明な点が多い。本研究により、加齢は肺内 ACE2 発現が増加し、それに伴い SARS-CoV-2 のリコンビナントのリコンビナント S タンパク (Rp) の肺内への侵入も有意に増加したことが認められた。このような Rp 侵入の増加は肺内 ACE2 発現の増加によるものと推測される。さらに、加齢による肺内 ACE2 発現の亢進には、血中 LPS 濃度の増加が関与しているのではないかと推測される。LPS は炎症惹起物質であり、腸管腔内から外へと漏出した LPS は、体循環を介して肺内に到達し炎症性変化をもたらすことはよく知られている。一方、ACE2 は抗炎症性作用を有していることから、LPS による炎症性変化に対して代償性に増加することが推測される。また、in vitro において LPS は IL-6 を介して ACE2 promotor を刺激することが報告されている。以上より、血中 LPS 濃度の増加が Rp の肺内への侵入を促進させたと考えられた。さらに、血中 LPS 濃度には腸管内の炎症性変化が深く関与している。腸管内炎症性変化は、腸管バリア機能を低下させることで腸管内の LPS が腸管外へと漏出しやすくなる。本研究においても、加齢では小腸内炎症性変化が亢進していることから、このような炎症によって血中 LPS 濃度が増加したものと推測される。これに対して、レジスタントスターチ (RS) を摂取させると、小腸内炎症性変化が抑制されたのみならず血中 LPS 濃度も有意に低下した。さらに、肺内 ACE2 発現も低下し Rp の肺内への侵入も抑制された。

本研究の結果より、加齢による COVID-19 重症化には、腸内環境の悪化が関与していることが示唆された。高齢者のみならず若年者でも腸内環境を改善し、肺内 ACE2 発現をある程度抑制させることが、COVID-19 重症化予防に有効である可能性が推測される。したがって、日常の食生活から腸内環境を整え、臓器内の ACE2 発現を抑制しておくことは、予防医学の観点からかなり重要であると思われる。あらためてレジスタントスターチの積極的な摂取といった食生活の重要性が注目されることが期待される。

研究テーマ

アレルギー疾患を阻害しうるタンパク質の合理的設計

研究者

東京大学 大学院総合文化研究科 広域科学専攻 新井 宗仁（アライ ムネヒト）

①研究の背景及び目的

ヒトの体内におけるタンパク質間相互作用 (protein-protein interactions, PPI) は、免疫やシグナル伝達など様々な機能を持つが、疾患にも関わっている。アレルギー性喘息やアトピー性皮膚炎などに関わる PPI として、インターロイキン 33 (IL-33) による PPI がある。上皮細胞が損傷を受けて IL-33 が放出されると、IL-33 は 2 型自然リンパ球 (ILC2) の表面にある ST2 受容体と結合する (図)。さらに IL-33/ST2 複合体がインターロイキン 1 受容体補助タンパク質 (IL-1RAcP) と結合すると、ILC2 が IL-5 や IL-13 などのサイトカインを放出して、アレルギー反応が引き起こされる。それゆえ、IL-33/ST2/IL-1RAcP 三者複合体の形成を阻害するタンパク質を開発できれば、アレルギー性疾患の治療薬の開発につながると期待されている。

現在、PPI 阻害薬を開発する際には、ターゲットと強く結合するタンパク質のハイスループット・スクリーニングを行うことが多い。しかしこの方法では大量の実験が必要となり、時間とコストがかかるという問題がある。これに対し、理論的に PPI 阻害薬を設計できれば、治療薬開発におけるブレイクスルーとなりうる。我々はこれまで、タンパク質を理論的に設計できるソフトウェア Rosetta を用いて、PPI 阻害タンパク質の合理的設計に取り組んできた。そこで本研究では、Rosetta ソフトウェア等の理論的手法を用いて、アレルギー疾患に関わる IL-33/ST2/IL-1RAcP 三者複合体の形成を阻害する小型タンパク質を合理的に設計することを目標とした。

②研究方法

本研究では、IL-33/ST2/IL-1RAcP 三者複合体の形成を阻害するために、野生型 IL-33 をテンプレートとして、次の 2 段階で阻害タンパク質の設計を行った：

- (1) 野生型 IL-33 よりも強く ST2 と結合できる IL-33 変異体の設計
- (2) IL-1RAcP との結合を弱める IL-33 変異体の設計

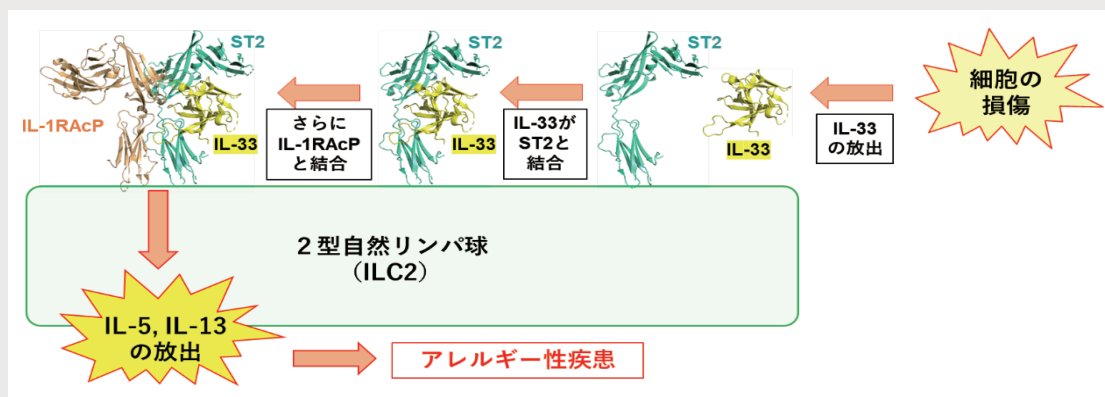


図 IL-33 が関与するアレルギー性疾患の発症経路

これらの変異を導入した新規タンパク質は、野生型 IL-33 が ST2 と結合するよりも前に ST2 と結合するが、IL-1RAcP とは結合できないために、アレルギーを抑制できると期待される。

IL-33 変異体の設計は、タンパク質設計用ソフトウェア Rosetta を使用して次の手順で行った：

- (1) 初期構造の最適化 (X 線結晶構造やモデリング構造のエネルギー最小化計算)
- (2) 網羅的な 1 アミノ酸置換変異の導入 (数千種類以上の変異体についての結合エネルギー計算)
- (3) Rosetta のスコアに基づき、有用と期待される IL-33 変異体を選抜

これらの計算には東京大学物性研究所のスーパーコンピュータを使用した。

設計した IL-33 変異体は、遺伝子組換え実験によって野生型 IL-33 遺伝子に変異を導入し、大腸菌で大量発現させた後、高純度に精製した。また、ST2 と IL-1RAcP タンパク質は、昆虫細胞を用いて発現させた後、高純度精製した。PPI の強さ (解離定数 K_d) は、蛍光異方性と表面プラズモン共鳴 (SPR) を用いて測定した。

③研究成果

まず、Rosetta ソフトウェアを用いて、ST2 と強く結合しうる IL-33 変異体を設計し、Rosetta によるスコアが高いものから順に 9 種類の 1 アミノ酸置換変異体を選出した。また、それらの変異を多重に導入した変異体等も設計した。これらの変異体のタンパク質を実際に作製し、実験により、ST2 タンパク質との結合の強さを蛍光異方性と SPR で測定した。その結果、野生型 IL-33 よりも 2 倍以上強く ST2 と結合する IL-33 変異体を得ることができた。理論的にモデリングした構造を確認したところ、IL-33 へのアミノ酸置換導入によって ST2 との静電相互作用が強化されたために結合能が向上したことが示唆された。

次に、IL-33/ST2 複合体と IL-1RAcP との結合を弱めるような変異体を、Rosetta を用いて設計した。設計した IL-33 変異体を作製して実験を行った結果、変異を導入することによって、IL-33/ST2 複合体と IL-1RAcP との結合を野生型よりも約 2 倍低下させることができた。

以上のことから、Rosetta ソフトウェアを用いた理論的な方法により、アレルギー疾患を阻害しうるタンパク質を合理的に設計できることが示された。今後は、さらに多重のアミノ酸置換変異を導入することで、より効果的な IL-33 変異体を設計していきたいと考えている。

Rosetta ソフトウェアが出力するスコアは必ずしも実験結果と相関しないことが問題となっているが、本研究では、Rosetta 計算を行う際に独自の工夫を施したため、少数の変異体を作製して実験するだけで効果的な変異体を見出すことができた。我々の手法は今後、様々な疾患を阻害するタンパク質を理論的・効率的に設計するうえで有用と期待される。

なお、本研究の成果の一部は、次の学会で発表した。

寺西美月、佐藤那音、季高駿士、佐野美桜、林勇樹、新井宗仁
(東大・総合文化・生命環境)

「Rational design of proteins that can inhibit allergic diseases」

第 60 回日本生物物理学会年会、2022 年 9 月 29 日、函館アリーナ (北海道函館市)

研究テーマ

新型コロナウイルス感染の重篤化に繋がる vWF が流れにより構造変化する機構の解明

研究者

京都大学 大学院農学研究科 菅瀬 謙治（スガセ ケンジ）

①研究の背景及び目的

生体内の血流は物質を運搬するだけでなくタンパク質の構造にも影響を及ぼす。新型コロナウイルスの感染では、vWF と呼ばれるタンパク質が血流によってアンフォールドし、血小板とともに凝集する。これが血栓となることで重症化に至る [Wool, Pathology 2021]。重症化率が血液型で異なることや [Ward, Blood 2020]、人工心臓を装着している人は出血が止まりにくいことも [Chan, Artif Organs 2015]、この流れと vWF の仕業である。他にも、私たち日本人の健康寿命を脅かす心筋梗塞や脳梗塞といった血栓症の発症にも vWF は関わる。申請者は、この流れにより vWF が構造変化するメカニズムを今まさに解明すべき研究対象として捉え、一昨年からこのメカニズム解明に取り組んでいる。この研究でもっとも重要な技術的課題は、流れによって変化する vWF の立体構造をいかに解析するかということである。vWF の構造変化の解析は“分子レベル”ではすでに実施されており [Schneider, PNAS 2007]、どれくらいの流れの力で vWF の立体構造がほどけるのかは明らかにされたが、どのようにほどけるのかについては未だ明らかでない (図 1)。そのため、vWF の構造変化のメカニズムを解明するためには、より詳細な、すなわち“原子レベル”の解析が求められる。しかし、従来の分析装置では流れの中のタンパク質の振る舞いを原子レベルで解析することは非常に困難または不可能である。

このような背景のもと申請者は、試料に流れを発生させながら NMR 測定ができる高感度 Rheo-NMR 装置を開発した [Morimoto, Anal Chem 2017]。(図 2) この装置では NMR 管にガラス棒を挿入し、NMR 管だけを回転させることによって流れを発生させる。本研究では、この Rheo-NMR を用いて流れにより vWF が構造変化するメカニズムを原子レベルで明らかにすることを目的とした。

②研究方法

・試料調製

vWF は巨大なタンパク質であるが、流れによって構造変化するのは A2 ドメインである。vWF の A2 ドメイン (以下 vWF) の調製は、過去の研究では動物細胞を用いた調製方法しか報告されていなかった。動物細胞ではタンパク質の NMR 測定で必須な安定同位体標識試料を調製するのが非常に困難 (高価) である。そこで、本研究では、まず vWF に連結するタンパク質タグや遺伝子配列を最適化し、大腸菌を用いた安定同位体標識 vWF の試料調製法を確立した。

・Rheo-NMR 実験

調製した ^{15}N 標識試料を用いて、Rheo-NMR の流れによる vWF の変化を解析した。回転周波数

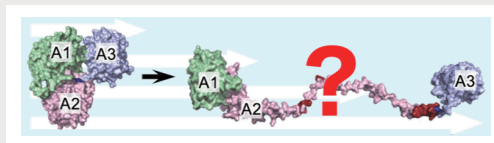


図 1 流れによる vWF の構造変化

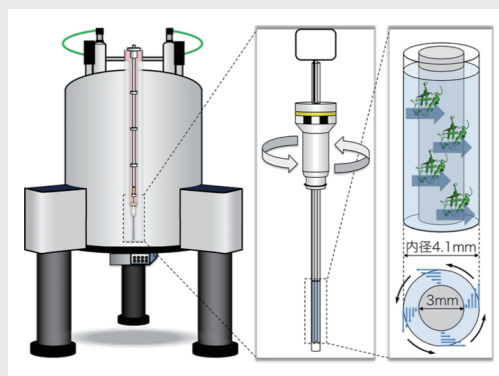


図 2 高感度 Rheo-NMR 装置

20 Hz で vWF 溶液に流れを与えながら二次元 ^1H - ^{15}N 相関スペクトルを連続測定することによって、vWF の NMR シグナルの経時変化をリアルタイムにモニターした。得られたシグナル強度の経時変化プロファイルを指数関数によってフィッティングし、アミノ酸残基ごとの速度定数を決定した。

③研究成果

・試料調製

タンパク質の可溶性を上げる GST タグを用いることによって、大腸菌タンパク質発現系で vWF を発現することに成功した。

・Rheo-NMR 実験

回転周波数 20 Hz (剪断速度 290–540 s^{-1}) で vWF 溶液に流れを与えながら二次元 ^1H - ^{15}N 相関スペクトルを連続測定したところ、時間とともに NMR シグナルが減衰した (図 3)。測定後の試料には沈殿が見られた。この沈殿は、流れによって vWF の構造がアンフォールドし、露出した疎水性面を介して vWF が凝集したため生じたと考えられる。

この流れによる NMR シグナル変化を定量的に解析したところ、部位によって減衰速度が異なっていた (図 4)。vWF は血流によって構造がアンフォールドし、構造中心部に位置するアミノ酸配列 ($\cdots\text{NLVYM}\cdots$) 内の Y と M の間のペプチド結合がプロテアーゼ ADAMTS13 によって切断されることが知られているが (図 4 黒球)、今回の解析で減衰速度が速い部位は切断箇所から離れた α ヘリックスに集中していた (図 4 赤)。一方、減衰速度が遅い部位は切断箇所の近くに位置していた (図 4 青)。vWF は流れによって凝集したため、減衰速度は vWF がアンフォールドする速度に依存していると示唆される。したがって、流れによって vWF は切断箇所から遠い部位から構造がほどかれることが本研究で得られた Rheo-NMR データによって示された。

④考察

Rheo-NMR を用いたタンパク質の研究は申請者が独自に開始したもので、解析例は主にタンパク質のアミロイド線維化に限られていた [Morimoto, Anal Chem 2017; Iwakawa, Int J Mol Sci 2017; Iwakawa, J Am Chem Soc 2017]。一方、本研究では、Rheo-NMR を用いると流れの中で変化する vWF を、アミノ酸残基特異的に定量解析できることを示せた。すなわち、このことは Rheo-NMR 研究の新しい幕開けと言える。解析対象の vWF は血流によって凝集して血栓を作ったり、ADAMTS13 によって分解されたりする。これらの現象は、新型コロナウイルスの重症化や脳梗塞などの血栓症や血が固まりにくい血友病と関わる。また、vWF は塩濃度や酸化還元状態の違いによってもその構造安定性が変化することが分かっている。すなわち、vWF は血液の流れだけでなく、血中の塩濃度や酸化還元状態を検知するセンサーとして働いていることが示唆される。ゆえに、今後の研究では、流れの中における ADAMTS13 による vWF の分解機構の解明、血友病の原因となる vWF 変異体を用いた解析、および塩濃度や酸化還元状態を変化させた同様な解析などについて取り組み、このような研究を通じて人々の健康増進に貢献していく所存である。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大なご助演を賜りました公益財団法人小柳財団に厚く御礼申し上げます。

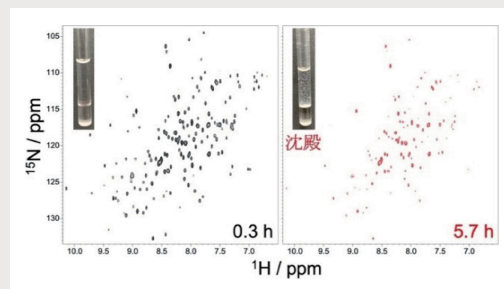


図 3 流れによる vWF の NMR スペクトルの変化

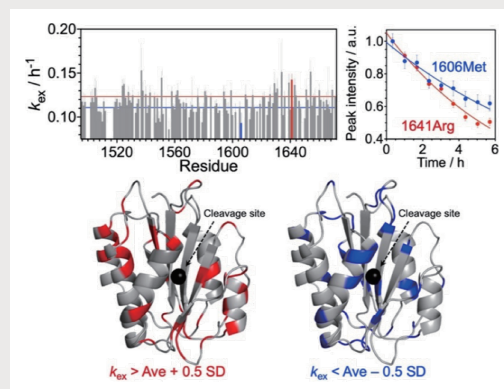


図 4 流れによる vWF の NMR シグナル減衰速度解析

研究テーマ

臓器・血管におけるオートファジー・リソソーム経路由来の臓器連携機構の解明

研究者

帝京大学 医学部 内科学講座 宇野 健司 (ウノ ケンジ)

【目的】

本研究では、肝臓と血管に着目し、オートファジー・リソソーム経路を制御することで、肝臓からは神経系、血管系を介して個体レベルでいかに栄養素代謝と関わり、糖代謝を制御するのかを解明する。特に、リソソーム生合成のマスターレギュレーター転写因子 transcription factor EB (Tfeb) に着目する。肝臓でのみ欠損すると脂肪肝増悪を来す一方、後天的に戻すと肝臓のみならず脂肪組織への遠隔作用を来すことが示唆される (NatCell Biol 15, 647-58, 2013)。これは、肝臓オートファジー・リソソーム経路を介して、個体の代謝調節に働く新規の臓器連携機構が存在する可能性を推測させる。また、血管内皮特異的 Tfeb 欠損マウスでは骨格筋や脂肪組織でのインスリンシグナルが減弱し、過剰発現マウスではこれら臓器でのインスリンシグナルが増強しており (ATVB41: 783-795, 2021)、血管オートファジー・リソソーム経路を介して臓器連携機構が働くことが示唆される。これらの既報では、欠損や過剰発現は先天的であり、本研究では、後天的に制御するモデルマウスを構築し解析する。

【方法】

遺伝子組換え手法を用いてアデノウイルスや、遺伝子組み換えマウスを作製し解析する in Vivo 研究と、CRISPR/CAS9 ゲノム編集システムを用いて、新しい変異細胞株を樹立し解析する in Vitro 研究を行う。

【結果】

(1) モデルマウスを用いた研究

Tfeb アデノウイルスを用いて、肝臓への遺伝子導入モデルマウス (Tfeb マウス) 構築を行い、肝臓への Tfeb の過剰発現は qPCR で確認している。野生型マウス肝臓へ Tfeb を過剰発現すると、肝糖新生に関わる律速酵素 Pepck の発現低下と血糖への作用を認め、肝糖新生に与える新たな機序が示唆された。今後も、詳細な解析を継続する。また、共同研究機関との協力にて、CRISPR/CAS9 ゲノム編集技術を用いて Tfeb flox/flox マウス作製を推進した。欠損すべき目的 Exon を選定し、その両端に loxP 配列 (34 塩基) を挿入するように single strand ODN を設計した。この ssODN、および crRNA、tracrRNA、CAS9 ヌクレアーゼ蛋白を同時にマウス胚へ注入し、胚内にてゲノム編集を行った。その後、得られた産仔マウス尾からゲノムを抽出し genome PCR を行い、対照 C57BL/6 マウスに比べ、loxP 配列の 34 塩基分の上昇バンドを確認した。こうして得られた候補マウスの尾ゲノムに対して、シーケンス解析を行い、設計通り目的 Exon の両端に loxP 配列が確実に挿入されていることを確認し、必要な個体を選定した。以上の検討から、ゲノム編集を用いて、ゲノムに loxP 配列が挿入されたマウス (Tfeb flox/flox マウス) が得られた。そして、Tamoxifen 誘導性の肝臓 (Albumin プロモーター) および血管内皮 (Cadherin5 プロモーター) 特異的な Cre recombinase 発現マウスを凍結杯から作製した。Cre マウスと Tfeb flox/flox マウスを交配し、肝臓および血管内皮特異的 Tamoxifen 誘導性 Tfeb 遺伝子欠損モデルマウス構築を行い、ともに Cre/wt; Tfeb flox/flox マウスを獲得している。特に、肝臓に関しては、Tamoxifen 誘導性に Cre/loxP システムを発動

させ、Tfeb 遺伝子の約 30% 程度のノックダウンを確認しており、個体の糖代謝の詳細な解析含め、今後
も表現型解析を継続する。

(2) ヒト肝細胞株を用いた研究

組換えアデノウイルス（過剰発現 Tfeb アデノ）、RNAi アデノウイルスを用いて、ヒト肝細胞（HuH7
hepatocytes）へ遺伝子導入を行った。過剰発現した Tfeb は、RNAi アデノウイルスを用いることで、その
Tfeb 発現は抑制された。過剰発現細胞では、糖新生に関わる律速酵素である PEPCK の発現が有意に低下
しており、ヒト肝細胞株においても Tfeb の制御が肝糖新生を調節する可能性が示唆された。また、過剰
発現細胞を用いたマイクロアレイによる網羅的解析を施行し、発現変化が見られた遺伝子群から候補遺伝
子の絞り込みを今後継続予定である。

さらに、CRISPR/CAS9 ゲノム編集技術を用いたヒト肝細胞株での遺伝子操作的手法を構築し、Tfeb
遺伝子変異ヒト肝細胞株（HuH7 hepatocytes）、ホモ DNA 配列破壊細胞株、ヘテロ DNA 配列破壊細胞株
を樹立できた。今後、この CRISPR/CAS9 による変異細胞株を基に、マイクロアイによる網羅的解析を
継続していく予定である。

研究テーマ

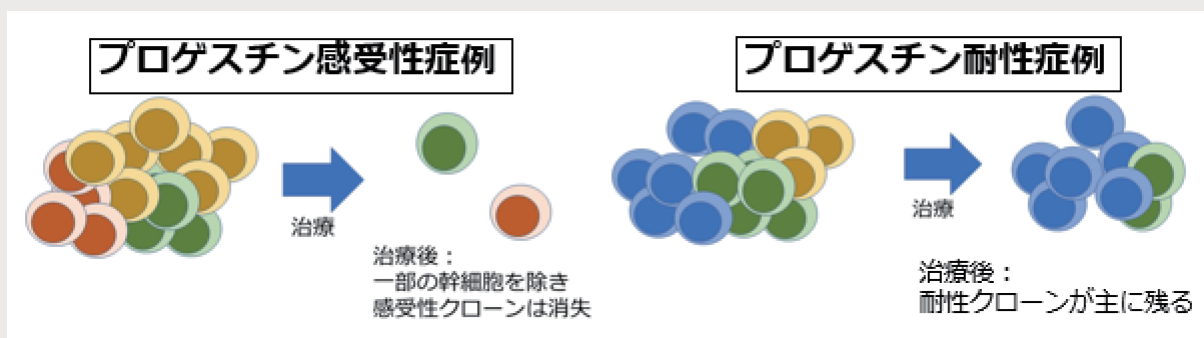
子宮体がんに対する妊孕性温存療法の個別化医療の実現

研究者

愛知県がんセンター 腫瘍免疫応答研究分野 井上 聡 (イノウエ サトシ)

①研究の背景・目的

生活様式の欧米化に伴う子宮体がん患者の増加に伴い、生殖年齢の罹患者も増加傾向にある。一般的に子宮体がんは予後良好ではあるが、挙児願望により子宮温存を希望する場合、標準治療である子宮摘出は選択できず、高用量プロゲスチン療法が唯一の選択肢となる。しかしながら、約半数の症例において、治療抵抗性並びに再発が認められるため、子宮摘出を強いられ、多くの女性の人生設計や生活の質の低下等、深刻な影響を及ぼしている。現状では、治療感受性の高い症例を選択する上で、明確な基準はなく、臨床現場では判断に苦慮しているのである。治療耐性症例では、病変部のプロゲステロン受容体 (PR) の発現低下が注目されているが、ゲノムレベルでの知見は乏しく、臨床応用できるバイオマーカーは未だ存在しない。挙児願望の実現や健康な人生の実現に向けて、基礎研究のブレイクスルーを端緒とした予防法、個別化至適診断・治療法の確立は、多くの女性の切実な願いである。本研究ではゲノム解析と臨床病理所見との統合解析に基づいた、子宮体がん妊孕性温存の至適診断・治療法の確立、及び子宮体がん予防法の確立に向けた分子基盤を構築することを目的とした。



図表 1 本研究計画の概要

②研究方法

1) 本邦最大の妊孕性手術子宮検体バンク：臨床病理所見とゲノム異常の統合解析

高用量プロゲスチン療法施行の臨床施設が限定されること、治療により縮小した微小な検体を対象とすることがゲノム解析の障害であった。既に高用量プロゲスチン療法の治療成績を含む臨床病理所見と紐づいた48症例からなる妊孕性治療子宮検体バンクを確立した(図表1参照)。

2) 経時的(治療前後)ゲノム・エピゲノム解析：層別化バイオマーカーの同定

既に18症例のプロゲスチン療法実施症例の検体を用いて、治療前、治療中、治療後、と経時的な全エクソン配列決定(WES)解析を行った(図表1)。我々は子宮内膜組織におけるKRAS変異が、DNAメチル化を介したPR発現抑制により、プロゲスチン療法抵抗性を示すことを報告している。本研究においても、KRAS変異検体におけるPR遺伝子のDNAメチル化レベル(Bisulfite sequencing)や発現量(免疫組織化学)を解析した。妊孕性治療の治療転帰を含めた臨床情報との相関性を検討する。

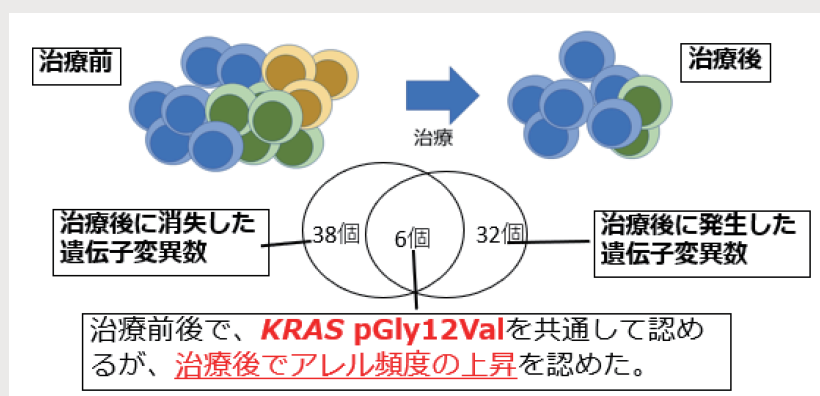
3) 空間的 (腫瘍部・非腫瘍部) ゲノム・エピゲノム解析と臨床病理情報との統合解析：予防法の確立基盤の構築

申請者は、子宮体がんの発生母地である正常子宮内膜ゲノム解析を行い、妊娠・出産歴と *KRAS* 遺伝子変異の相関性を世界に先駆けて報告した (Inoue S et al *Cell Death Dis* 2020)。そこで治療抵抗性症例の腫瘍部のみならず、正常子宮内膜に対するゲノム解析も行い、治療抵抗性症例における正常子宮内膜ゲノム異常の実態を明らかにする。また、子宮体がんリスク因子やホルモン治療奏効率等の臨床情報と正常子宮内膜ゲノム異常との相関性解析を行う計画である。以上の相関性解析から、ホルモン治療抵抗性を示す子宮体がん発症予防法実現に向けた分子基盤の構築を目指す。

③研究成果

1) 経時的 (治療前後) ゲノム・エピゲノム解析：層別化バイオマーカーの同定

18 症例に対する経時的ゲノム解析を行った結果、11 症例において治療後 (抵抗性) 検体において、子宮体がんにおいて好発する発がん遺伝子である *KRAS* や *PIK3CA* 変異を有するクローンの増加が認められ、これらの遺伝子変異が抵抗性バイオマーカーの候補である可能性が示唆された (図表 2)。*KRAS* 変異検体における PR 遺伝子の DNA メチル化レベルや発現量を解析したところ、統計上の有意性は認められていないが、相関性が示唆された。今後、コホートサイズを広げることにより、妊孕性治療の治療転帰を含めた臨床情報との相関性を検討することで、*KRAS* 変異解析や PR に対する免疫組織化学的解析の層別化マーカーとしての有用性を検証する。さらに、ゲノム解析をコホート全体 (残り約 30 症例) に拡大することで、新規バイオマーカーの同定も試みる。



図表 2 プロゲスチン療法前後のゲノム解析例

2) 空間的 (腫瘍部・非腫瘍部) ゲノム・エピゲノム解析と臨床病理情報との統合解析：予防法の確立基盤の構築

ホルモン治療抵抗性症例の腫瘍部のみならず、発生母地である正常子宮内膜に対するゲノム解析も行った。その結果、治療抵抗性症例において、*KRAS* や *PIK3CA* 変異を含めた正常子宮内膜ゲノム異常を有するクローン性増殖が検出された。今後、子宮体がんリスク因子やホルモン治療奏効率等の臨床情報と正常子宮内膜ゲノム異常との相関性解析を行う計画である。以上の相関性解析から、ホルモン治療抵抗性を示す子宮体がん発症予防法実現に向けた分子基盤の構築を目指す。

研究テーマ

ハーブ由来成分による炭化水素受容体活性化を介した皮膚炎の治療法開発に向けた研究

研究者

京都大学 大学院生命科学研究科 西野 勝俊 (ニシノ カツトシ)

①研究の背景及び目的

現在の日本において、アトピー性皮膚炎は、最も知られている皮膚炎であり、その患者数は約 50 万人とも言われている。また、別の皮膚炎である乾癬の患者数も同数程度いる。そこで申請者は、これら皮膚炎の新たな治療法開発を目的に、薬用、かつ食用ハーブであり、アロマオイルの原料でもあるセージから単離したジテルペンが、炭化水素受容体 (AhR) の活性化を介して、上記皮膚炎の症状緩和効果をもつことを立証することにした。アトピー性皮膚炎や乾癬はその原因として、皮膚バリア機能の破綻、免疫の暴走による自己免疫、および酸化ストレスが挙げられている。これら皮膚炎の治療薬として、ステロイドが有名であるが、ステロイドは免疫全般を抑制するため、易感染状態になりやすいなど、その使用には注意が必要である。これとは別に、炎症性サイトカイン分泌を抑制する抗体製剤を用いた治療法もあるが、とても高価である。このような背景の中、2017 年に昆虫病原性線虫が作るタピナロフが、AhR を介して、皮膚バリア機能に重要なタイトジャンクション (TJ) タンパクの mRNA 発現を上げ、炎症性サイトカインである IL-17 の mRNA 発現を下げることで報告された。最近、申請者は、セージから AhR リガンドとして、新奇を 1 つ含む、7 つのジテルペンを報告した。AhR リガンドとして、ダイオキシシンやトリプトファン代謝物が有名だが、ジテルペン類が AhR リガンド活性を有することは、ほとんど知られていない。現在、単離ジテルペンに、免疫細胞である T 細胞の分化制御機能や TJ 構造をもつ腸管でのバリア機能修復効果を見出している。更に、単離ジテルペンによる皮膚バリアの機能修復や酸化ストレス軽減効果を立証し、セージ由来成分によるアトピー性皮膚炎、および乾癬の症状緩和効果を明らかにすることで、ジテルペンを活用した、上記皮膚炎の症状が緩和できる新たな方法の提案を目的として、本研究を行なった。

②研究方法

単離ジテルペン、およびこれらジテルペンと類似の構造をもち、セージに多く含まれるカルノシン酸やその類縁体であるピシフェリン酸を被験物質として、以下の実験を行った。カルノシン酸およびピシフェリン酸が、AhR リガンド活性を示すことは確認済みである。各実験において AhR の関与を明らかにするため、AhR アンタゴストである CH-223191 を用いた。

a) TJ タンパク質発現増強効果

ウェルプレートで 3 日間培養した HaCaT 細胞に、被験物質を 10 および 30 μM で添加し、さらに 2 日間培養した。その後、HaCaT 細胞から得られた細胞溶解物中の Involucrin、Filaggrin や Loricrin などの TJ タンパク質、およびそれらの転写因子である OVOL1 の発現量を western blotting により調べた。

b) TJ タンパク質発現抑制修復効果

a) と同じ方法で 3 日間培養した HaCaT 細胞に、TNF- α 10 ng/ml と IFN- γ 10 ng/ml、およびカルノシン酸やピシフェリン酸 10 および 30 μM を添加し、さらに 2 日間培養した。その後、HaCaT 細胞から得られた細胞溶解物中の Involucrin と、Filaggrin や Loricrin などの TJ タンパク質、およびそれらの転写因子である OVOL1 の発現量を western blotting により調べた。

c) 酸化ストレス軽減効果

皮膚は、紫外線を浴びることにより、活性酸素種 (ROS) が産生されることで、酸化ストレスを受ける。酸化ストレスは、皮膚炎が生じる原因の1つであり、その酸化ストレスの軽減に関わる酵素として、Nqo1 が存在する。この Nqo1 の活性化因子は Nrf2 であるが、AhR の活性化が、この Nrf2 を活性化することが報告されている。そこで、上記 a) と同じ方法で、被験物質が Nqo1 や Nrf2 の発現を増加させるか、western blotting を用いて調べた。

③研究成果

a) TJ タンパク質発現増強効果

7つのジテルペンと、カルノシン酸およびピシフェリン酸は、Involucrin、Filaggrin、Loricrin および OVOL1 の発現を増加させ、その増強効果は、濃度が高いほど強かった。そこで、被験物質 30 μ M と CH-223191 1 μ M を共添加すると、被験物質による発現増加効果が認められなかった。

b) TJ タンパク質発現抑制回復効果

TNF- α 10 ng/ml と IFN- γ 10 ng/ml のみを添加した場合、Involucrin、Filaggrin、Loricrin および OVOL1 の発現が抑制されたが、被験物質を共添加すると、それらタンパク質の発現量が回復した。そして、この被験物質による回復効果は、CH-223191 1 μ M を添加することで消失した。

c) 酸化ストレス軽減効果

単離ジテルペンと、カルノシン酸およびピシフェリン酸は、Nrf2 および Nqo1 の発現を増加させ、その増強効果は、濃度が高いほど強かった。そこで、被験物質 30 μ M と CH-223191 1 μ M を共添加すると、被験物質による発現増加効果が認められなかった。

本研究は皮膚炎治療の新たなターゲットとして選んだ AhR に注目し、欧州では古くから薬用植物として知られているセージから単離したジテルペンや、その類縁化合物であるカルノシン酸とピシフェリン酸による皮膚バリア関連タンパク質の発現向上、および炎症性サイトカインによる TJ 関連タンパク質の発現抑制に対する回復効果、および酸化ストレス軽減効果を調べた。その結果、調べた化合物全てで、TJ 関連タンパク質や酸化ストレス軽減に関わるタンパク質の発現を増加、および炎症性サイトカインによる発現抑制の回復が認められた。セージは、日本でもアロマオイルとして有名で、その他にも料理やハーブティーなどと、身近な植物である。よって、本研究結果は、ジテルペンの皮膚炎治療薬への応用だけではなく、セージのアロマオイルとして親しまれるを皮膚に塗ることによる、より直接的な皮膚バリア機能向上効果や、セージを食品として日常的に摂取することによる内面からの免疫制御による効果も期待できる。

研究テーマ

新規脂肪細胞サブセットを介した細胞癌化および癌悪性化の制御機構解明

研究者

北海道大学 大学院理学研究院 鎌田 瑠泉（カマダ ルイ）

癌は日本人の死因の第一位を占め、大きな社会問題となっている。肥満は、白色脂肪細胞の肥大と細胞数の増加により引き起こされ、癌の発生における主要な危険因子である。脂肪細胞はエネルギーの貯蔵と放出を行う白色脂肪細胞、熱産生の機能を有する褐色脂肪細胞、ベージュ脂肪細胞に分類され、全身のエネルギー恒常性の維持や代謝調節において極めて重要な役割を担う（図1）。顔面液質において、白色脂肪細胞がベージュ脂肪細胞に変化する現象が見られるが、そのメカニズムおよび癌に対するベージュ脂肪細胞の機能は不明である。脂肪細胞はホルモンの分泌により生体内の炎症に関与し、癌や免疫応答における新規機能に大きな注目が集まっている。癌や免疫を理解し、癌の原因解明および新規治療法の開発のため、脂肪細胞の機能制御機構および脂肪細胞が癌細胞・免疫細胞に及ぼす影響を明らかにすることが必須である。

癌抑制タンパク質 p53 誘導性ホスファターゼ PPM1D は、種々の癌においてその過剰発現が見られる癌原遺伝子産物である。その一方で、PPM1D は免疫応答や細胞代謝など様々な機能に関与することが明らかとなっている。我々はこれまでに、PPM1D が好中球および白色脂肪細胞の分化を負に制御しており、PPM1D 阻害によりそれら細胞分化が誘導されることを報告している。本研究の目的は、『PPM1D ホスファターゼによる脂肪細胞を介した細胞癌化および悪性化の制御機構解明』である。

我々は、PPM1D のホスファターゼ活性を特異的に阻害する阻害剤 SL-176 を開発している（図2）。これまで、PPM1D 阻害剤を前駆脂肪細胞 3T3-L1 細胞に投与し、白色脂肪細胞へと分化誘導した結果、PPM1D 阻害剤により細胞分化が著しく抑制されることを明らかとしている。

本研究は、脂肪細胞分化およびエネルギーを貯蔵し、エネルギー代謝において重要な機能を持つ細胞内小器官である脂肪滴の形成における PPM1D の機能解明を実施した。前駆脂肪細胞 3T3-L1 細胞における PPM1D ノックダウンにより、白色脂肪細胞の分化が抑制されることが示された。さらに、白色脂肪細胞の分化過程前期、中期、後期における PPM1D 阻害の効果を解析した結果、分化の前期における PPM1D 阻害が脂肪細胞分化を著しく抑制することを見出した。さらに、分化した成熟白色脂肪細胞における

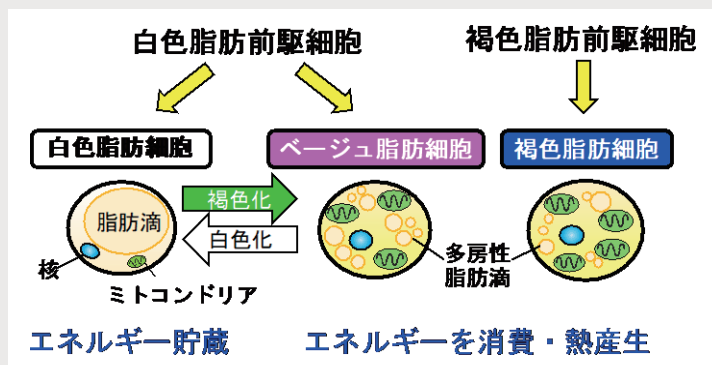


図1 脂肪細胞のサブタイプと機能

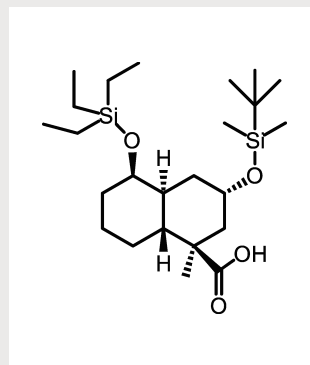


図2 PPM1D 阻害剤 SL-176

PPM1D の機能を明らかにするため、白色脂肪細胞に分化誘導した 3T3-L1 細胞に PPM1D 阻害剤 SL-176 を投与し、形成された脂肪滴量およびサイズを解析した。その結果、脂肪滴のサイズが著しく減少することが明らかとなった。さらに、PPM1D が脂肪滴の表面に局在するタンパク質 Perilipin1 の Ser511 を脱リン酸化することを見出した。本研究により、PPM1D が脂肪細胞の分化のみならず、Perilipin1 Ser511 の脱リン酸化を介して脂肪滴形成が制御されていることを初めて示した。

本研究で得られた脂肪細胞における PPM1D の機能解明に関する成果は、国際誌 Int. J. Mol. Sci. にて発表した。

「Lipid Droplet Formation is Regulated by Ser/Thr Phosphatase PPM1D via Dephosphorylation of Perilipin 1」
Kamada R., Uno S., Kimura, N., Yoshimura F., Tanino K., Sakaguchi K. Int. J. Mol. Sci., 査読有, Vol. 23, No. 19, 2022, 12046

また、国内外の会議において本研究で得られた成果を発表した。

【国際会議】

- ① Rui Kamada, Tatsuya Kodama, Shoma Kura, Fuki Kudoh, Kei Kawamura, Shuji Shigenobu, Kazuyasu Sakaguchi,
「Ser/Thr phosphatase PPM1D regulates differentiation and subset polarization of neutrophils」
36th European Peptide Symposium/12th International Peptide Symposium
- ② Rui Kamada, 招待講演
「ROLE OF SER/THR PHOSPHATASE PPM1D IN THE REGULATION OF NEUTROPHIL SUBSET POLARIZATION」
The Protein Phosphatase Conference (FASEB)

【国内会議】

- ① Rui Kamada, 招待講演
「Ser/Thr ホスファターゼ PPM1D によるスプライシングを介した好中球機能制御」
The 8th International Life-Science Symposium polarization of neutrophils」
36th European Peptide Symposium/12th International Peptide Symposium
- ② 鎌田瑠泉、工藤風樹、児玉達哉、蔵翔磨、重信秀治、坂口和靖
「Ser/Thr ホスファターゼ PPM1D によるスプライシングを介した好中球機能制御」
第 95 回日本生化学会大会

本研究は、近年新たな癌治療法として注目を集める癌免疫や癌の悪性化や悪液質など、癌の治療において極めて重要な因子と密接に関わる脂肪細胞のサブタイプに着目した提案である。本研究は、既存の免疫チェックポイント阻害剤による癌免疫療法では治療の難しい悪性腫瘍に対する、全く新しい治療法開発へとつながることが強く期待される。

さらに、肥満は人の美を考える上で、避けては通れない因子であり、美しく健康であるためには、脂肪細胞の性質を理解し、その量を適切にコントロールすることが必要である。本研究により、エネルギーの貯蔵を担う白色脂肪細胞と、熱産生およびエネルギーを消費する褐色脂肪細胞、ベージュ脂肪細胞の分化と機能制御機構が明らかとなり、新たな肥満治療法開発への展開が強く期待される。

研究テーマ

ライフステージ中期に生殖能を喪失する分子基盤の解明

研究者

東京大学 大学院薬学系研究科 福山 征光（フクヤマ マサミツ）

①研究の背景および目的

女性の社会進出の増加と晩婚化の加速により、高齢出産の社会的関心が高まっている。その一方で、女性は35歳を過ぎると、卵子の数と質が急激に低下し、そのことが妊娠率の低下や流産率の上昇といった出産リスクの原因となることが懸念されている。この問題を生物学的観点から眺めると、動物の寿命と生殖可能期間の関係に多様性が認められることに密接に関連している。ヒトに比較的近縁なチンパンジーも含めた多くの動物種は、一般的には比較的寿命の後期まで生殖能力を維持し続ける。一方で、ヒトやシャチのメスは、生殖能力を失っても比較的長期にわたり生き続ける。しかしながら、このように動物の寿命と生殖可能期間の関係にこのような可塑性を与え多様性を生み出す分子基盤に関しては不明な点が多く残されている。そこで本研究では、ヒトと同様ライフステージの中期に生殖能力を失う線虫に着目し、申請者らが独自に単離した生殖可能期間の顕著な延長を示す変異体の原因遺伝子の決定と、その機能の解析をおこなうことで、生殖可能期間を規定する分子遺伝学的基盤の解明を目指す。

②研究方法

1：生殖寿命延長を示す変異体の責任遺伝子の同定

アウトクロスを数回繰り返した後、次世代シーケンスによりゲノム配列を決定した。野生型線虫に、変異体で認められるアミノ酸置換変異をCrispr/Cas9システムにより別々に導入し、生殖寿命の延長を示すか否か検討した。また、すでに欠失変異体などが作出されている場合は、生殖寿命の延長を示すか検討した。

2：責任遺伝子の発現パターン解析

Crispr/Cas9システムによりゲノム上の責任遺伝子にvenus遺伝子を融合させ、その融合タンパク質の各発現段階における発現パターンを蛍光顕微鏡下で調べ、どの細胞が責任遺伝子を発現するか決定した。

3：既知の生殖寿命に関与する変異体群との表現型比較や遺伝学的相互作用

インスリン/IGFシグナリング(IIS)経路やTGF- β 経路の変異体が生殖寿命延長を示すことがこれまでに報告されている(Luo, Cell 2010)。IIS経路の変異体群は個体寿命の延長や高温での休眠への侵入などの表現型を示す。それに対してTGF- β 経路の変異体は、顕著に短い体長を示す。我々の単離した変異体がこれらの表現型を示すか否か、また、我々が単離した変異体とIIS経路やTGF- β 経路の変異体の二重変異体を作成し遺伝学的相互作用を評価した。

③研究成果

1：生殖寿命延長を示す変異体の責任遺伝子の同定

我々の単離した変異体は個体は生殖寿命の延長を示すが、個体寿命の延長は示さない(図1)。2系統のうちYB4781の責任遺伝子の同定に成功し、解析を進めたので以下に報告する。

YB4780変異体の責任遺伝子は、ギャップ結合蛋白質をコードするinx-20であった(図2)。inx-20(ok681)欠失変異体も生殖寿命延長を示すことから、YB4780変異体はinx-20の機能減弱型変異体であることが示唆された。

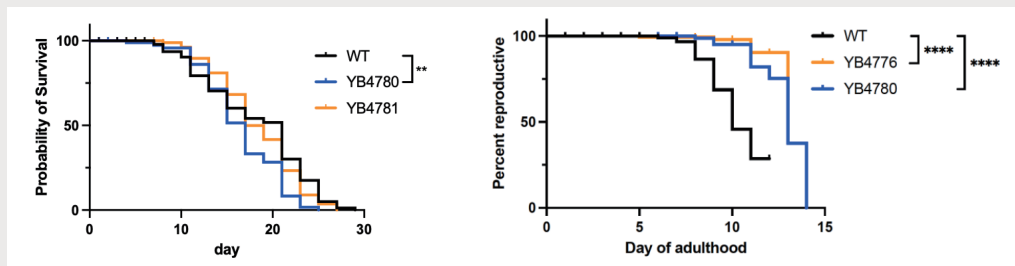


図1 YB4776 と YB4780 変異体は生殖寿命の延長を示すが個体寿命の延長は示さない
野生型と変異体の個体寿命(左)と生殖寿命(右)を示す。

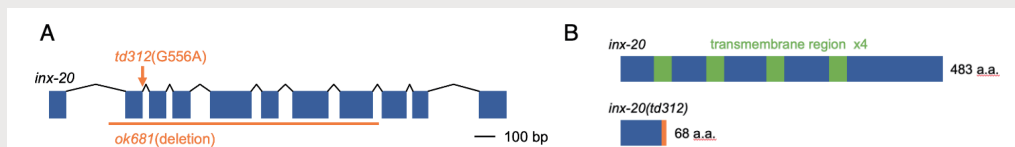


図2 YB4780 変異体の責任遺伝子は *inx-20* である

A YB4780 変異体のゲノムでは *inx-20* 遺伝子のスプラシング部位に塩基置換変異 (*td312*) が見出された。
B 野生型 INX-20 タンパク質と、YB4780 変異体で産生されると予測される変異型 INX-20 タンパク質。

2: 責任遺伝子の発現パターン解析

INX-20::VENUS 融合タンパク質は、胚発生の後期から成虫まで消化管の vpi と vir という細胞で発現していることが見出された(図3)。その一方で生殖細胞ではシグナルを検出することができなかった。このことから、*inx-20* 遺伝子は生殖細胞内でなく消化管から細胞非自律的に生殖寿命の長さを規定することが示唆された。

3: 既知の生殖寿命に関与する変異体群との表現型比較や遺伝学的相互作用

inx-20 変異体は IIS 経路の変異体のように個体寿命の延長や高温での休眠への侵入などの表現型を示さないことから、*inx-20* 遺伝子は IIS 経路とは異なる遺伝学的経路で機能することが示唆された。一方で TGF- β 経路の変異体群では、*inx-20* 変異体と同様に、個体寿命の延長はみられない。そこで、TGF- β 経路の SMAD のオルソログをコードする *sma-2* と *inx-20* の遺伝学的相互作用解析をおこなった。生殖寿命の長さのみならず、体長についても *inx-20*; *sma-2* 二重変異体は両者の単独変異体の表現型よりシビアな表現型を示すことから(図4)、*inx-20* 遺伝子は TGF- β 経路とは異なる遺伝学的経路で機能することが示唆された。

以上の結果より、我々の同定した *inx-20* 遺伝子は、これまでに報告されたものとは異なるメカニズムを介して生殖寿命延長に寄与していることが示唆された。今後 *inx-20* 遺伝子が生殖寿命に作用する詳細なメカニズムを調べることで、生殖機能の老化進行機序に関する理解を深めることに貢献できることを期待している。

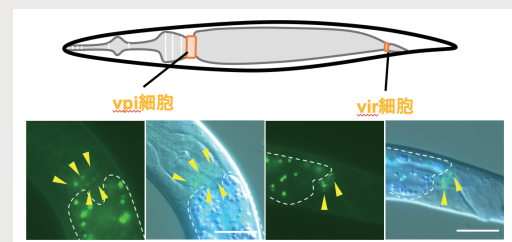


図3 INX-20 タンパク質は消化管の M 浪屈細胞と n 漬り胞でのみ発現が認められた線虫の模式図(上)と INX-20::VENUS タンパク質の蛍光写真(下)を示す。白い点線で囲まれた領域は腸細胞を示し、INX-20::VENUS タンパク質でなく自家蛍光シグナルを発している。

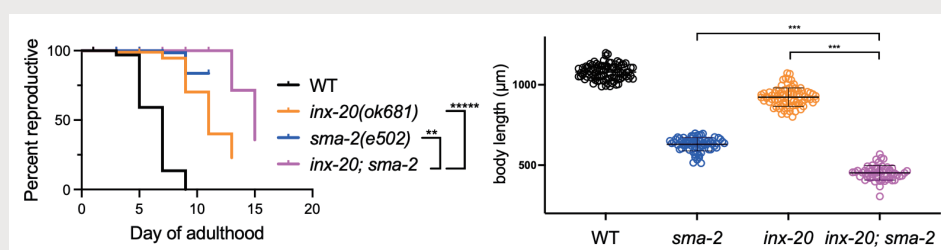


図4 *inx-20* と TGF- β 経路遺伝子 *sma-2* との遺伝学的相互作用
生殖寿命(左)と体長(右)を示す。

研究テーマ

Interleukin-11 産生大腸がん間質線維芽細胞を介した大腸がん形成機構の解明

研究者

東邦大学 医学部生化学講座病態生化学分野 仁科 隆史（ニシナ タカシ）

【目的】

大腸がんの形成過程において、がん細胞の周囲に存在する間葉系組織の重要性が示唆されている。そのため、がん細胞だけでなく、がん細胞周囲の細胞の特徴や役割を明らかにし、これらの細胞を介したシグナルネットワーク機構を明らかにすることが治療戦略を考える上で重要である。我々は、サイトカインのひとつである IL-11 のレポーターマウスを樹立し解析を行った結果、がん周囲に存在する線維芽細胞より IL-11 が産生され、腫瘍形成を促進していることを見出した。しかしながら、がん関連間質線維芽細胞が、IL-11 以外にどのような機構、過程を経て腫瘍形成を制御しているか依然不明な点が多い。本研究において我々は、IL-11 を産生するがん関連線維芽細胞の特性を明らかにするために新規に樹立した IL-11 産生細胞を時期特異的に蛍光蛋白質によって標識できるマウスを用いて炎症誘発性大腸がんモデルを作製した。これを解析することで IL-11 産生細胞がどのような細胞なのか、またその経時的变化を明らかにした。さらに、発がん過程初期の大腸炎時における IL-11 の役割ならびに IL-11 産生誘導機構について解析を行った。

【結果】

時期特異的に蛍光蛋白質によって標識できるマウスを用いて炎症誘発性大腸がんモデルを作製し解析を行った。その解析の結果、がん形成前の大腸炎時に出現する IL-11 産生細胞を時期特異的に標識したところ、IL-11 産生細胞は粘膜修復後の標識後 10 日目の異形成部（炎症により異型を示す上皮）に存在した。さらに、炎症を経るにつれて異形成部でその数が増加した。また、がん形成後はがん細胞周囲に多くの IL-11 産生細胞が観察された。すなわち、炎症初期に存在した IL-11 産生線維芽細胞は、がん形成後もその周囲に存在し続けることが明らかとなった。これらの細胞では、過去の研究からがん関連線維芽細胞のマーカー分子として知られている alpha-Smooth muscle Actin の発現が認められなかったことから、過去に報告された線維芽細胞とは異なった性質をもつ線維芽細胞であると考えられる。現在、時期特異的な IL-11 産生線維芽細胞の役割を明らかにするために、発がん過程各時期の IL-11 産生線維芽細胞を分取し網羅的な遺伝子発現解析を行っている。さらに、がん形成前の大腸炎時において、IL-11 の役割の解析を IL-11 受容体遺伝子欠損マウス、および IL-11 遺伝子欠損マウスを用いて解析を行った。その結果、IL-11 受容体遺伝子欠損マウス、および IL-11 遺伝子欠損マウスにおいては、大腸炎誘導に伴う体重減少がより増悪し、粘膜固有層に浸潤する免疫細胞である好中球も増加することを見出した。さらに、IL-11 受容体遺伝子欠損マウス、および IL-11 遺伝子欠損マウスにおいては、大腸炎に伴う上細胞の細胞死が対照群と比較してさらに亢進することを見出した。すなわち、大腸炎に伴って線維芽細胞より産生される IL-11 は、大腸炎減弱に寄与しており、細胞死抑制など上皮細胞保護に働いていることを見出した。

さらに、IL-11 産生機構を解析したところ、大腸炎に伴って誘導される IL-11 は、免疫細胞の一種である T 細胞や B 細胞などの存在の有無によって、その産生に差は認められないが、大腸炎時にミエロイド系細胞が存在しないと IL-11 産生が減少することを見出した。過去の研究より我々は、IL-11 産生が酸化

ストレスによって促進されることを見出していた。そこで、ミエロイド系細胞と酸化ストレスの関連性を解析したところ、ミニロイド系細胞が存在しないと酸化ストレスが減弱することを見出した。さらに、酸化ストレスによって活性化される細胞内シグナル伝達経路の一つである MAPK 経路 (ERK) の活性化もミエロイド系細胞が存在しないと、減少することを見出した。すなわち、ミエロイド系細胞より誘導される酸化ストレスは IL-11 産生を介して大腸炎減弱に寄与していることが明らかとなった (Nishina et al., iScience, 2023)。

本研究から、IL-11 産生線維芽細胞は、他の細胞との相互作用によってその働きが制御されていることを見出した。よって、大腸の恒常性ならびに大腸がんの形成機構の理解のために、IL-11 産生線維芽細胞を介した細胞間ネットワーク機構を明らかにすることは、重要であると考えられる。

(成果論文)

1. Nishina, T. et al. Interleukin 11 confers resistance to dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. iScience 26, 105934 (2023).

研究テーマ

ストレス環境下でのがん細胞生存戦略の解明を可能とする単糖を基盤としたバイオプローブの創製

研究者

神戸薬科大学 薬化学研究室 奥田 健介 (オクダ ケンスケ)

①研究の背景及び目的

近年のがん罹患率の上昇と患者の高齢化に伴い、予後の改善や再発予防を考慮した治療戦略が強く求められている。がん細胞周辺には低栄養、低酸素などを特徴とした“がん微小環境”と呼ばれる領域が存在し、この環境下で亢進している小胞体ストレスなど様々な劣悪な状況に適応してがんは多様な生存戦略を確立しており、治療抵抗性、転移・浸潤能、血管新生誘導能などを獲得する。その一方、これらががんの特徴的な環境応答は腫瘍の種類によらず固形腫瘍に普遍的であるため、副作用の少ないがん治療の魅力的な標的と考えられている。

申請者等はこれまでの研究で、栄養飢餓耐性を有するヒトすい臓がん細胞 PANC-1 に対して強力な栄養飢餓耐性解除能を有する天然物として知られる (–)-uvaridacol L (1, Fig. 1) のラセミ体全合成を世界に先駆けて達成している (Org Lett 2021, 23, 4083)。また 1 が持つ水酸基の立体化学が β -D-グルコースと類似していることに着目し、1 と同様の置換様式を有するグルコース類縁体 β -1,3,6-O-tribenzoyl-D-glucose (2, Fig. 1) を α -D-glucopyranose (3) より 2 工程にて合成し、PANC-1 に対する低栄養選択毒性を評価したところ、2 が 1 と比べてやや劣るものの同様な栄養飢餓耐性解除能を有することを見出した。1 は入手困難な天然物であり、その化学合成も市販の myo-inositol より 7 工程を要する一方で、2 は安価な D-グルコースからわずか 2 工程にて容易に得られ、その構造活性相関研究も 1 よりも容易である。しかし、D-グルコースをはじめとする糖類は多くの水酸基を持つため、通常は適切な保護基を選択し修飾を行う必要があり、工程数の増加を招く。本研究ではグルコースをはじめとする単糖の自在修飾法の確立を行う合成化学を基盤としたケミカルバイオロジーの手法によるアプローチにより、がんをはじめストレス応答系に関わる種々様々な疾病 (神経変性疾患、代謝性疾患など) の創薬標的の同定を目標に研究を開始して、D-グルコースの 5 つの水酸基を適切に見分けて自在に修飾する手法の確立を目指した研究を行い、現在その足がかりを得た段階にある。その一方、単純かつ容易に得られる 2 の持つ栄養飢餓耐性解除能に着目し、1 と対比させた観点からの 2 の構造活性相関を評価することにより、栄養飢餓耐性解除能に関わるファーマコフォアを同定して低栄養環境を標的とするバイオプローブの創製をめざした研究を行ったところ一定の成果を得たので、以下に詳述する。

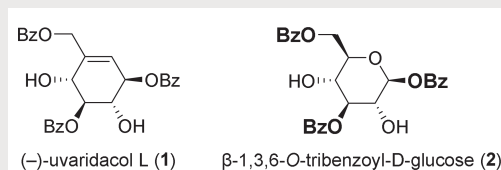
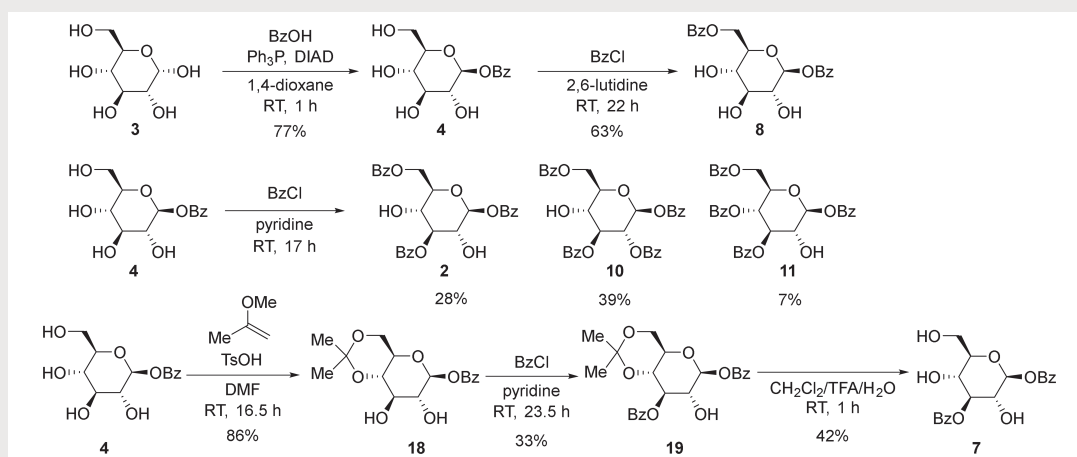


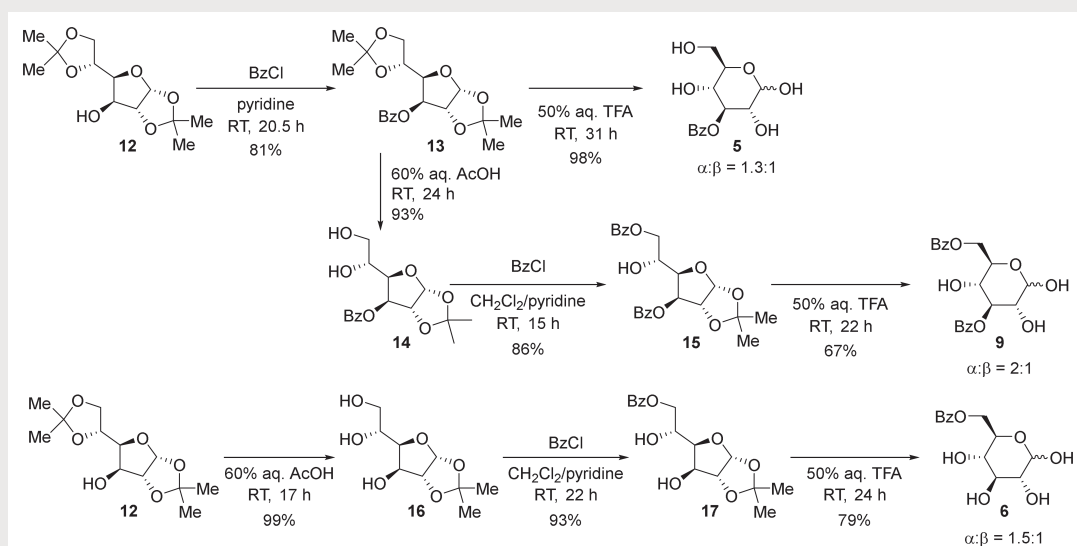
Fig. 1 (–)-uvaridacol L (1) および β -1,3,6-O-tribenzoyl-D-glucose (2) の構造。

②研究方法

1 の持つ 3 つのベンゾイルエステルと 2 つの水酸基の相対的な立体配置からファーマコフォアを抽出するべく、前節で挙げた 2 を中心として過少ベンゾイル化誘導体である 4-9 並びに過剰ベンゾイル化誘導体である 10 および 11 の設計を行った。続いて α -D-glucopyranose (3) および 1,2,5,6-di-O-isopropylidene- α -D-glucofuranose (12) から出発し、保護基を駆使して標的化合物の合成を行った (次ページ、Scheme 1 および 2)。得られたこれらベンゾイル化グルコース誘導体による固形腫瘍固有の低栄養環境下に適応したがんの栄養飢餓耐性解除能の評価を行うべく、PANC-1 に対して WST-8 assay を用いて低栄養選択毒



Scheme 1 α -D-glucopyranose (3) より出発するベンゾイル化 D-グルコース (2,4,7,8,10 および 11) の合成。



Scheme 2 1,2,5,6-di-O-isopropylidene- α -D-glucofuranose (12) より出発するベンゾイル化 D-グルコース (5,6 および 9) の合成。

性の評価を行った。通常培地としては、10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) を用いた。また、低栄養培地としては DMEM 中の成分の中でビタミンとミネラルのみを含む栄養飢餓培地 (NDM) を用いた。アッセイの手順としては、24 時間通常培地にて前培養後に培地交換を行い、各誘導体をそれぞれの培地で 24 時間暴露した状態で培養後に WST-8 キット溶液を 10% 含む通常培地を等量添加して再度培養後、450 nm および 650 nm の吸光度を測定して低栄養選択毒性を評価した。

③研究成果

モノベンゾイル化体 (4-6) はいずれの培地でも最高 1 mM まで毒性を示さなかった。次いで、ジベンゾイル化体 (7-9) では NDM における低栄養選択毒性がみられたもの、その PC50 (50% preferential cytotoxicity) 値は 342-369 μM と高く、活性は弱いものであった。(一)-uvaridacol L (1) と同様の置換形式を有するトリベンゾイル化体 (2) の PC50 値は 30.2 μM であり、1 の PC50 値 (14.2 μM) にはやや及ばないもののジベンゾイル化体に比べて活性は 1 桁向上している。その一方、テトラベンゾイル化体 (10 および 11) はいずれも最高 500 μM (通常培地) および最高 100 μM (NDM) まで毒性を示さなかった。これらの結果より、1 並びに 2 の持つ 3 つのベンゾイルエステルと 2 つの水酸基の相対的な立体配置関係のすべてがファーマコフォアであることが示唆された。

研究テーマ

ストレス時の情動・自律神経反応の性差と性周期の影響

研究者 人間総合科学大学 大学院人間総合科学研究科・心身健康科学専攻 鍵谷 方子（カギタニ フサコ）

①研究の背景及び目的

複雑な現代社会において、人々のストレスは多種多様である。ストレス時には、不安や不快などの情動が生じるとともに、自律神経系や内分泌系、免疫系の協調的制御機構による適応反応が起こる。例えばストレス時には交感神経系の強い亢進がいち早く起こり、心機能亢進、消化管機能抑制、精神性発汗、瞳孔散大など、Fight（闘争）やFlight（逃走）に都合のよい態勢が作られることは周知の事実である。一方、ストレス反応に性差がみられることも近年注目されているが、人を対象とした研究、とくにストレス反応の背景にある自律神経系・内分泌系・免疫系調節に関する女性を対象とした研究はまだ十分とは言えない。さらに、近年重要性が高まっている未病段階でのケアやウェルビーイング向上に視点を向けた研究も十分ではない。そこで、本研究では、軽微なストレス刺激に対する自律神経系が関与するストレス反応に着目し、性周期の影響を明らかにすることを目的とし、今後の性差研究への展開の基礎研究として位置づけた。

性周期の時期によって環境からの刺激やストレスに対する感受性が異なることを示す知見が散見される。そのため、本研究では軽微なストレス刺激として、刺激に対する反応性だけでなく感受性の検討も定量的に可能な温度刺激を用いることとした。さらに温度刺激は、温度帯によってポジティブとネガティブの両面の感情喚起が期待できるため、心理的反応の検討にも展開しやすいと考えた。また、性周期に伴う心理的・身体的変化は女性ホルモン分泌の周期的変化によってもたらされるところが大きい。自律神経活動も影響を受けることが動物実験を中心に調べられている。そこで本研究では刺激時の反応だけでなく、各時期の安静時の自律神経活動状態についても座位条件と立位条件において評価し、刺激に対する感受性や反応性との関連を検討することとした。

本報告書では、解析が完了した安静時における検討と温度刺激に対する感受性の検討について報告する。

②研究方法

本研究は、研究の趣旨と倫理的配慮について口頭と文書を用いて研究説明を行い十分な理解を得た上で書面による同意を得た、安定な性周期を有する健康な成人女性5名（30歳～40歳）を対象に実施した。喫煙歴がなく、妊娠中でないこと、内分泌系や自律神経系の服薬が無いこと、実験日当日は、健康状態、寝不足でないこと、食事から2時間以上経過していること、鎮痛薬などの服用が無いこと、排尿を済ませていること等を確認した。実験はクロスオーバーデザインとし、全ての対象者に対して1週間程度の間隔をあけて2回実施した。本研究は、ヘルシンキ宣言にのっとり、人間総合科学大学倫理審査委員会の承認（第687号）を得て実施された。

実験は、室温22℃～24℃、湿度26-46%の静かな環境を確保できる部屋で行った。対象者の性周期は、カレンダー法および唾液中性ホルモン濃度測定により確認した。各対象者の2回の実験は自律神経系の日内周期を考慮して同時時間帯に実施するように考慮した。生理指標として、心拍数を3点誘導式心電図ベッドサイドモニター、血圧を非観血式連続血圧計、精神的反応を反映しやすい指尖部の皮膚局所血流をレーザードップラー血流測定装置を用いて連続的に測定・記録した。冷覚・温覚・冷痛覚・熱痛覚の閾値測定、

および温度刺激(冷覚・温覚)を温覚・冷覚・痛み計測装置を用いて行った。質問紙を用いた調査は、実験日の心理的状态を気分プロフィール検査(POMS2 日本語版)を用いて実験前に確認し、温度刺激(冷覚・温覚刺激)に対する心理的反応を基本感情温度刺激直後に基本感情と快不快・覚醒度についてNRS(Numerical Rating Scale: 数値的評価スケール)を用いた聴取によって評価した。また、性周期に伴う身体的・精神的不定愁訴の評価を月経随伴症状日本語版を用いて行い、月経随伴症状の程度を確認した。実験日に疼痛症状等の月経随伴症状を有する対象者はいなかった。

③研究成果

最初に安静時の心拍数および血圧と自律神経活動指標に対する体位および性周期の影響を検討した。立位条件と座位条件(約140度のリクライニングチェアにおける背面密着座位)のそれぞれにおいて、十分な安静をとり心拍数等の生理指標が安定した後の3分間の心拍数・血圧の平均値を求め、実験条件ごとに比較した。心拍数は卵胞期(4例)と黄体期(6例)ともに、座位条件に比べ立位条件において全例で高値であり、増加の程度は10-25 bpmであった。両期を比較すると、ベースの値および増加の程度には有意な違いは認められなかった。拡張期血圧も両期とも同様に立位で高値であったが、昇圧の程度については、黄体期において軽微な例がみられたが(6例中4例)。両期を比較すると、ベース値が卵胞期に比べ黄体期で低い傾向が認められた。また立位条件での拡張期血圧は卵胞期に比べ黄体期で分散が大きい傾向があった。一方、収縮期血圧においては、座位条件より立位条件において有意に高値であったが、個々の例をみると、減少した例が3例みとめられ、黄体期と異なり必ずしも上昇しないことが観察された。また立位条件、座位条件ともベース値に両期の違いはなかった。以上の結果から血圧調節機構において心臓調節よりも末梢血管抵抗の調節系に性周期の影響が出現しやすい可能性が考えられた。

安静時の自律神経活動指標は心拍変動スペクトル解析により算出した。評価項目は、副交感神経活動を反映する指標である高周波成分(HF)、交感神経活動を反映する指標とされる低周波成分(LH)をHFで除した値(LF/HF)および各指標の標準化値であるHFnu(normalized unit)、LFnuとした。比較検討の結果、立位による交感神経活動指標値の増加と副交感神経活動指標値の低下は卵胞期と黄体期ともに認められ、両期間に違いはみられなかった。一方、超低周波成分(VLF)において、卵胞期に比べ黄体期で有意に低値である特徴が認められた。VLFは圧受容器反射感受性等の血圧調節に関わる可能性が示唆されているが、まだ指標としての確立が十分ではないため、この結果について今後解析手法の検討も含め詳細な解析に着手する必要がある。

次に温度感受性について体位および性周期の影響を検討した。温覚、冷覚、熱痛覚、冷痛覚の閾値測定においては、前腕内側部に装着した10 mm角の温度刺激プローブによって局所皮膚温を基準温に順化してから昇温および降温させた。卵胞期と黄体期とで比較した結果、黄体期において温覚感受性が有意に上昇していた。次に各期において、座位条件に対して立位条件での温度感受性を比較すると、黄体期においては温覚、冷覚、熱痛覚、冷痛覚のいずれの感受性も立位条件で上昇する例と低下する例とが同数程度みられ一定の方向性が認められなかった。一方、卵胞期においては、座位条件より立位条件において温覚、冷覚、冷痛覚の感受性が上昇することが3/4例でみとめられた。前述の結果で示した体位変換および性周期によってみとめられた交感神経および副交感神経活動状態の違いとこれら温度感覚・熱冷痛覚感受性の違いとの関連性は今後分析する予定である。

研究テーマ

肝線維化に対する新しい治療戦略としての分泌経路の解析

研究者

秋田大学 大学院医学系研究科 前田 深春（マエダ ミハル）

【研究の背景および目的】

肝線維化はアルコール、肥満、薬剤等により肝臓が障害を受け、損傷部に結合組織が異常に蓄積した病態である。肝線維化は、肝不全や肝癌へと進展するが、一度線維化した組織を正常化させることは難しいと考えられてきた。しかし近年、新規肝炎ウイルス薬の登場によって、ウイルス性肝炎で見られる線維化に改善が見られたことから、肝線維化は治療可能であることが証明されつつある。よって肝線維化治療薬の開発が強く望まれるが、現時点で線維化を直接抑制する薬剤は存在しない。

線維化において肝星細胞は重要である。肝星細胞は通常ビタミンA貯蔵細胞であるが、肝線維化時には炎症性サイトカインによって活性化し、筋線維芽細胞様に分化することでI型コラーゲンを大量に分泌するようになる。これが線維化の主な要因となる。先行知見より、肝星細胞内において小胞体やゴルジ体などの分泌関連オルガネラが線維化時に肥大化することが報告されている。

研究代表者はこれまで、小胞体上の膜タンパク質TANGO1について、その性状と機能を解析してきた(Maeda et al., MBC, 2016)。TANGO1は以前よりコラーゲンの分泌に重要な役割を示すことが知られており(Saito and Maeda, JB, 2019)、研究代表者は新たにTANGO1がSec16と結合すること(Maeda et al., JCB, 2017)、両者の結合は小胞体上の分泌タンパク質出芽領域であるER exit siteの形成を介して、小胞体からのタンパク質輸送を制御することを明らかにしてきた(Maeda et al., Sci. Rep., 2019; Maeda et al., Dev. Cell, 2020)。線維化時のコラーゲンもTANGO1/Sec16が制御するシステムによって小胞体から分泌され、実際にTANGO1は線維化時の肝臓において重要な役割を示すことが示されている(Maiers et al., Hepatology, 2017)。しかし、肝星細胞の分泌経路の変化に着目した研究はほとんど行われていなかった。

そこで本研究ではTANGO1およびSec16の新規周辺因子を探索し、肝星細胞における分泌制御の新しいメカニズムの解明および新規線維化治療薬の開発を目的として解析を実施した。

【研究方法】

- ① Sec16の新規周辺因子探索を目的としたマスマスプロトメトリー解析を行った。
- ② ①で単離された脱リン酸化酵素PTPN1に関して、Sec16との結合を検証した。またPTPN1発現抑制時の表現型を共焦点顕微鏡で観察した。

【研究結果】

- ① Sec16の免疫沈降サンプルについてLC-MS/MSによるマスマスプロトメトリー解析を実施した。その結果、3000個以上の相互作用因子候補が単離された。この中からより確度の高い候補因子を絞り込むために、TANGO1STurboID安定発現株を利用した近位標識法による解析結果や、既存の相互作用因子のデータベース等も重ね合わせることで、より精度の高い解析を目指した。その結果、重ね合わせのスコアが高い最終候補因子として132個の候補因子を絞り込んだ。この中には、既に相互作用が報告されているSec23aやSec13、TANGO1も含まれた。さらに、132個の候補因子の局在や機能から、最終的に

Sec16 の新たな修飾因子候補として PTPN1 を単離した。

② PTPN1 は小胞体に局在するチロシンホスファターゼである。HEK293T 細胞に両者を過剰発現させた際に Sec16 と PTPN1 が共沈降したことから、PTPN1 は Sec16 と結合親和性が高いことが明らかになった。さらに、PTPN1 の substrate-trapping mutant である D181A 変異体は Sec16 の 1101-1820 アミノ酸との結合親和性が強いことがわかった。この結果は、PTPN1 が Sec16 をホスファターゼの基質として認識することを示している。さらに PTPN1 の発現抑制時の表現型を観察した結果、Sec16 の局在の拡散が認められた。このことから、PTPN1 は Sec16 のチロシン脱リン酸化を介して Sec16 の局在や機能を制御していることが明らかになった。

PTPN1 はこれまで肥満や糖尿病、脂質異常症、動脈硬化などの生活習慣病に深く関連する因子として報告されてきた (Ma et al., Mol Cell Biochem., 2011; Tsou and Bence, J Obes., 2012)。さらに、PTPN1 は ATF6 や IRE1 の下流において、小胞体ストレス時に発現誘導されることも知られている (Vieria eet al., Front Aging Neurosci., 2017)。肝線維化は生活習慣病と密接に関係すること、肝線維化時にはコラーゲンの過剰分泌による小胞体ストレスが生じることから、PTPN1 は線維化時の肝星細胞においても重要な役割を果たす可能性が高いと考えられる。今後さらなる解析を行うことで、肝星細胞における PTPN1/Sec16 の新たな分泌制御機構の解明を目指したい。

また、研究代表者の所属研究室では、同じく小胞体からゴルジ体への分泌に関連する Sec23A および Sec24D が、肝星細胞活性化時に発現上昇すること、これらは転写因子 CREB3L2 によって誘導されること、Sec23A および Sec24D を発現抑制することで肝星細胞の活性化とコラーゲン分泌を抑制できることを明らかにしてきた (Tomoishiet al., Sci. Rep., 2017)。Sec23A は Sec16 の相互作用因子であり、両者は線維化時において協調して機能する可能性が考えられる。今後は Sec23A の周辺因子に関しても解析を実施することで、より包括的な線維化時の分泌メカニズムの解明に繋げたい。

研究テーマ

腎臓病早期診断マーカーの探索

研究者

鳥取大学 農学部附属動物医療センター 伊藤 典彦（イトウ ノリヒコ）

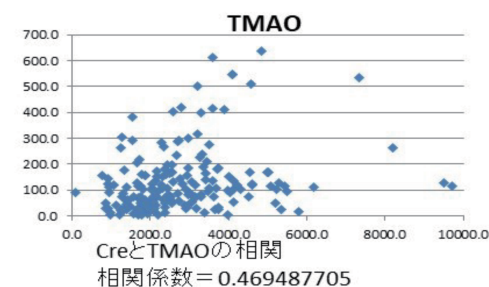
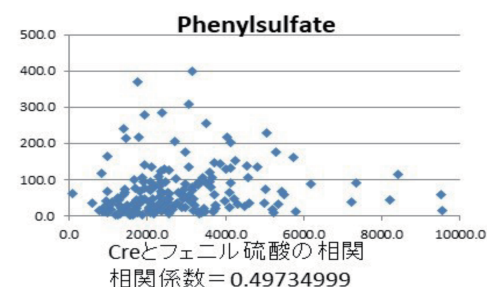
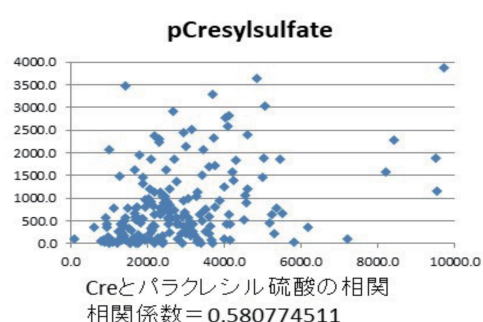
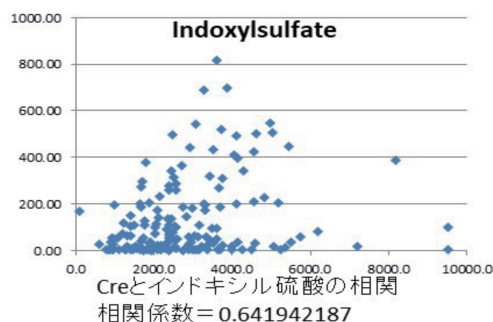
【背景】

15歳以上のネコの80%が慢性腎臓病（CKD）を罹患している。ヒトのCKDでは、進行に伴い透析や腎移植を受けることで一定の生活の質を維持することができる。一方、ネコのCKDでは透析や腎移植が普及していないため、元気食欲を消失・削瘦し死亡する。現在、ネコのCKDの診断には人医療のマーカーである血中のクレアチニン（Cre）、尿素窒素に加えてSDMA等が用いられている。Creは腎臓機能の多くを喪失して、初めて異常値を示す。人工透析や腎移植を持ち合わせていない獣医療では、具合の良し悪しを言葉で伝えることのできないネコ腎臓病の病態を的確に診断し、有効に治療介入しなくてはならない。腎臓病の病態の中心は、血中の尿毒症物質の濃度が上昇することで生じる尿毒症である。病態は、尿毒症物質の濃度が反映していると考えられる。我々は、この尿毒症物質に着目し、ネコのCKDの診断マーカーとしての有用性を検証した。

【材料および方法】

2015年～2023年に鳥取市内の連携病院および、鳥取大学附属動物医療センターで採血したネコの血液2000検体の中から経時的に複数回採血されている個体からの検体を使用した。血液から血漿を分離し、内部標準物質を含有したメタノールで除タンパクした。除タンパク後の上清中のCreと尿毒症物質4種

結果～Creとの相関～



類（インドキシル硫酸、パラクレシル硫酸、フェニル硫酸、TMAO）の濃度を質量分析装置（Q-TOF-MS）で測定し、各尿毒症物質濃度と Cre 濃度を比較検討した。

【結果および考察】

いずれの尿毒症物質濃度も Cre 濃度との正の相関が見られた。尿毒症物質もネコ CKD のマーカーとして期待ができると考えた。Cre 濃度が正常でありながら高い濃度を示す尿毒症物質も存在した。逆に、Cre 濃度が高値でありながら、低い濃度を示す尿毒症物質も存在した。

この度の成果は、人と猫で共有する腎臓病において早期診断、予防、治療薬の開発に活用される。人に寄り添う伴侶動物と、共に質の高い一生を送ることができるようになることが期待される。

研究テーマ

鞭毛纖毛の構築に必須なチューブリン供給システムの解明

研究者

山梨大学 大学院 総合研究部 医学域 解剖学講座 構造生物学教室 久保 智広 (クボ トモヒロ)

■背景

真核生物の鞭毛纖毛は、細胞の運動や生体液の流動、初期発生、生体の維持などに重要な役割を持つ細胞小器官である。本研究は、2本の鞭毛を持つ単細胞緑藻類クラミドモナスを用いて、鞭毛蛋白質の大部分を構成するチューブリンがどのように鞭毛内へ輸送されているかを明らかにすることを目的とした。申請時には脱重合キネシンがチューブリンの鞭毛内への供給にどのように関与しているかを追究する予定であったが、後に行った実験結果に基づき、若干の方向転換を行った。すなわち、 α チューブリンおよび β チューブリンのC末端がチューブリンの鞭毛内供給にどの程度寄与しているかを解明することに注力した。本助成期間中に得られた結果は、細胞内物質輸送や細胞骨格に関する基礎細胞生物学的な研究に大きく貢献し、将来的には纖毛病の予防や治療法の開発につながるものと期待される。

■方法

クラミドモナスは α チューブリン遺伝子と β チューブリンの遺伝子をそれぞれ2つずつしかもたない。そのため、多種類のチューブリン遺伝子を持つ哺乳類と比較して、単一の変異に由来する影響を調べやすいという特徴がある。本研究では、このクラミドモナスの遺伝学的な特徴を利用して、 α チューブリンおよび β チューブリンのC末端がチューブリンの鞭毛内輸送にどのように貢献しているかを、変異株を作製することによって明らかにした。

1) α チューブリンC末端変異株の作製

クラミドモナスは α チューブリン遺伝子として、全く同じアミノ酸配列をコードするTUA1とTUA2の2種類を持つ(Fig. 1A)。私は、CRISPR/Cas9によるゲノム編集を二段階行うことによって、 α チューブリンの445, 447, 449, 450のグルタミン酸残基(Fig. 1B)が鞭毛の機能に与える影響を調べることにした。これらのグルタミン酸残基は翻訳後修飾のサイトとして機能することが知られているアミノ酸残基である。まずは、野生株のTUA2にパロマイシン耐性遺伝子を挿入することによって、TUA2ノックアウト株を作製した。その後、得られたtua2変異株のTUA1遺伝子の3'側の配列に変異を導入し、TUA1(4A)株を作製した(Fig. 1C)。

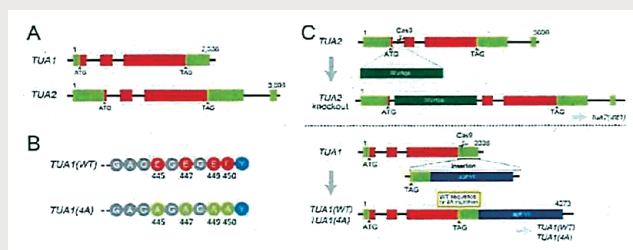


Figure 1 (A) クラミドモナスの α チューブリン遺伝子の構造(TUA1とTUA2)。(B) C末端のグルタミン酸残基のアラニン置換。(C) CRISPR/Cas9を用いたTUA2遺伝子のノックアウトおよびTUA1(4A)株の作製。

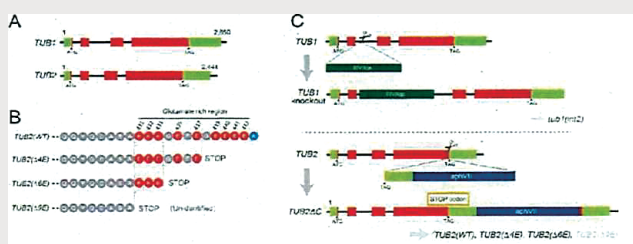


Figure 2 (A) クラミドモナスのチューブリン遺伝子の構造(TUB1とTUB2)。(B) 作製したC末端欠損変異株。(C) CRISPR/Cas9を用いたTUB1遺伝子のノックアウトおよびC末端欠損変異株の作製。

2) β チューブリン C 末端変異株の作製

α チューブリンの場合と同様に、クラミドモナスは β チューブリン遺伝子として、全く同じアミノ酸配列をコードする *TUB1* と *TUB2* の 2 種類を持つ (Fig. 2A) α チューブリンと類似の方法を用いて、 β チューブリンの C 末端欠損を作製した (Fig. 2B, C)。

■結果

1) *TUA1* (4A) 変異株は軸系のチューブリンポリグルタミン酸化が激減する

まず、 α チューブリンの変異株を解析した。ポリグルタミン酸化チューブリン特異的な抗体を用いて、野生株、*tpg1*、コントロールの *TUA1* (WT)、*TUA1* (4A) 株の免疫染色を行った。なお、*tpg1* 株はポリグルタミン酸化酵素の一種、TTLL9 を欠損した変異株である (Kubo et al., 2010)。*TUA1* (4A) は、コントロール、既存の *tpg1* とも比較してホリグルタミン酸化修飾が激減していることが分かった (Figure 3A)。

2) *TUA1* (4A) 変異株は鞭毛の運動性が顕著に低下する

これら 4 種類の株の遊泳速度を比較したところ、*TUA1* (4A) はほとんど遊泳ができないことが分かった (Figure 3B)。さらに、軸系微小管の滑り速度を計測したところ、*TUA1* (4A) 軸系は微小管滑り速度が優位に速くなることが分かった (紙面の都合上、省略)。

3) *TUB2* ($\Delta 6E$) 変異株は短鞭毛の表現型を示し、鞭毛運動できない

次に、 β チューブリンの変異株を解析した。まず、顕著な表現型として、*TUB2* ($\Delta 6E$) は鞭毛が短く鞭毛運動が全く行えないことが分かった。また、脱鞭毛後の鞭毛の再生速度を調べたところ、鞭毛の再生が著しく遅いということも分かった (省略)。

4) *TUB2* ($\Delta 6E$) 変異株は中心対微小管を欠損する

透過型電子顕微鏡を用いて、鞭毛軸系の超薄切片を観察したところ、興味深いことに、*TUB2* ($\Delta 6E$) は中心対微小管が欠損していることが分かった (Figure 4A)。また、単離軸系の Western blot を行ったところ、*TUB2* ($\Delta 6E$) 軸系は CPC1, FAP221, FAP101, KLP1, PF20 FAP7 などの中心対微小管関連蛋白質を欠損していることが分かった。

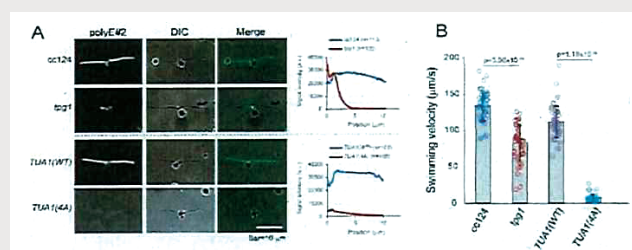


Figure 3 (A) ポリグルタミン酸化チューブリン特異的な抗体による野生株 (cc124) *tpg1*, *TUA1* (WT), *TUA1* (4A) 株の免疫染色。(B) 野生株 (cc124)、*tpg1*/*TUA1* (WT)、*TUA1* (4A) 株の遊泳速度。

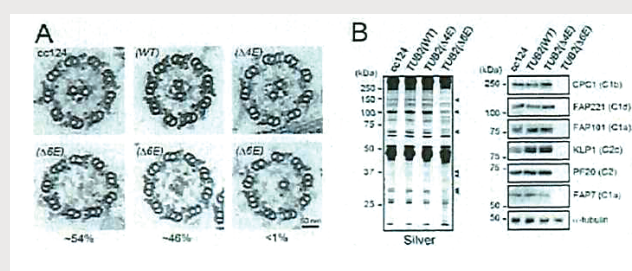


Figure 4 野生株 (cc124)、*TUB2* (WT)、*TUB2* ($\Delta 4A$)、*TUB2* ($\Delta 6E$) 軸系の TEM 観察 (A) と各種中心対微小管関連蛋白質に対する抗体を用いた Western blot (B)。

■議論

本研究により、 β チューブリンの C 末端が欠損すると、鞭毛が短縮することが分かった。このことは、 β チューブリンの C 末端がチューブリンの鞭毛内供給に関わっていることを示唆する重要な結果である。現在、これらのデータを掲載した論文を投稿中である (2023/4/7 現在)。貴財団の助成により本プロジェクトを遂行することが出来た。心より感謝申し上げる。

参考文献

Kubo T, Yanagisawa HA, Yagi T, Hirono M, and Kamiya R. (2010). Curr Biol. 20, 441-445.

研究テーマ

病的線維化を消去して若返りを実現する 新規遺伝子・細胞治療の開発

研究者

東京大学 医学部附属病院 循環器内科 東邦 康智（ヒガシクニ ヤストミ）

①研究の背景及び目的

病的線維化は老化や生活習慣病において臓器横断的に認められる病的変化である。病的線維化は臓器障害を固定化し新たな病的ストレスを誘導することで「人間の健康と美」を脅かす原因となる。よって、病的線維化を消去することが人間の若さ及び活力の維持に重要となる。一方で、線維組織は正常な結合組織を形成しており、生体の恒常性維持に重要である。よって、正常線維組織と病的線維化を見分けることが可能な治療戦略が必要である。

以上の問題を解決するため、本研究では病的線維化を特異的に認識して分解する遺伝子治療・細胞治療の開発を行う。病的線維化は病的実質細胞の近傍に生じることから、線維組織を構成するⅠ型コラーゲンを認識した病的実質細胞のみがマトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）を発現させて線維組織を分解する治療システムを考案した。その実現のため、(A) Ⅰ型コラーゲンを認識し直交性に遺伝子発現を誘導する合成受容体の作成、(B) 病的ストレス感受性合成遺伝子プロモーターの同定、(C) MMP 発現の時間・空間的制御を行う合成遺伝子回路の作成、を行う。疾患モデルとして、高齢化社会において大きな課題となっている「心不全」を使用する。

②研究方法

本研究では、Ⅰ型コラーゲンを認識する合成受容体や病的ストレス感受性合成遺伝子プロモーター等を組み合わせて合成遺伝子回路を作成し、膜型 MMP を用いて病的線維化を特異的に消去する遺伝子治療を開発する。

(A) Ⅰ型コラーゲンを認識し直交性に遺伝子発現を誘導する合成受容体の作成

Ⅰ型コラーゲンを認識する直交型合成受容体を作成するため、Notch 受容体の細胞外ドメインをⅠ型コラーゲン認識構造に、細胞内ドメインを合成転写因子に改変する。Ⅰ型コラーゲンと合成受容体を発現する細胞との間の機械的進展刺激により細胞内ドメインが切断され、合成転写因子が核内へ移行する。この合成転写因子を認識する合成遺伝子プロモーターの下流に目的遺伝子を配置した転写ユニットを組み合わせたことにより、内因性細胞内シグナル伝達経路に干渉しないシグナル伝達システムを構築する。

この受容体は理論上、物理的進展刺激がシグナル伝達に重要となるため、膜貫通ドメインとⅠ型コラーゲン認識構造との連続性が重要である一方で、Ⅰ型コラーゲン認識部位は7個のアミノ酸で構成される小さな構造であることから、標的との物理的接触において間にリンカー配列を入れる必要性も考慮する必要がある。よって、膜貫通ドメインとⅠ型コラーゲン認識配列との間にリンカーを挿入した受容体としていない受容体の両者を作成し、その効率を検証する。

合成転写因子認識遺伝子プロモーターの下流に蛍光蛋白質を配置した転写ユニットを作成し、蛍光蛋白質発現をレポーターとして評価する。Ⅰ型コラーゲンコートした培養プレートでラット由来初代培養心筋細胞（NRVM）を培養し、レポーター転写ユニットと合成受容体発現転写ユニットを導入して検証する。

(B) 病的ストレス感受性合成遺伝子プロモーターの同定

内因性転写因子の結合標的配列構造を元に、各転写因子に対応する合成遺伝子プロモーターを設計する。以上をもとに、合成遺伝子プロモーターライブラリーをレンチウイルスベクター上に作成する。各遺伝子プロモーターの下流には蛍光蛋白質を配置する。同ライブラリーと HL-1 心筋細胞株を用いて、蛍光強度を指標にプール型表現型スクリーニングを行う。酸化ストレス、低酸素ストレス及びカテコラミン・ストレスに高い反応性を示す合成遺伝子プロモーターを同定する。

同定した合成遺伝子プロモーターの活性を、大動脈縮窄術によるマウス心不全モデルを用いて検証する。アデノ随伴ウィルスベクター(AAV)を用いて、各プロモーターの下流にルシフェラーゼを配した転写ユニットをマウスに導入する。生体イメージングによる発光強度を指標に、遺伝子プロモーター活性を時系列で検証する。

(C) MMP 発現の時間・空間的制御を行う合成遺伝子回路の作成

膜型 MMP の過剰発現による I 型コラーゲン分解効果は既に確認しているが、細胞実験における合成遺伝子回路の機能評価としての I 型コラーゲン溶解による実験系構築は難しいことから、研究者が同定した心筋細胞保護的に働く因子 (microRNA) を目的遺伝子として心筋細胞活性を指標に合成遺伝子回路の構築と検証を行う。

心筋細胞特異的遺伝子プロモーター及び (B) で同定する病的ストレス感受性遺伝子プロモーターの下流に、二分割した合成転写因子の一方をそれぞれ配置した転写ユニットを作成する。二分割した合成転写因子にはそれぞれコイルドコイル構造を付与しており、その発現により自然に融合して一つの機能性合成転写因子を構成する。各パーツ単独では転写因子機能は有さない。さらに、合成転写因子認識遺伝子プロモーターの下流に蛍光蛋白質を配置した転写ユニットを作成する。合計 3 つの転写ユニットをそれぞれ別々のレンチウィルスに導入し、合成遺伝子回路をウィルスベクター・カクテルとして HL-1 心筋細胞株に導入する。病的ストレス下における蛍光強度を指標に合成遺伝子回路の挙動を確認する。また、目的遺伝子として心筋細胞保護因子を導入して、機能発現に十分な挙動であるかどうかを確認する。

また、遺伝子治療の臨床応用においては、その安全性が常に問題となる。合成遺伝子回路を用いた遺伝子治療においては、想定外の挙動を示して暴走する可能性がある。その可能性への対応として、外部からのオン・オフ制御を可能にするシステムを組み込む必要がある。その実現のため、合成遺伝子回路に薬物感受性リプレッサーまたはリバースリプレッサーを導入し、薬剤による制御可能な合成遺伝子回路を設計・作成する。

③研究成果

前項の各項目について、下記の成果を得た。その結果、「病的線維化を消去して若返りを実現する新規遺伝子・細胞治療の開発」に必要な基盤技術の構築に成功した。今後、生体内への合成遺伝子回路導入法の最適化を進めていく。

(A) I 型コラーゲンを認識し直交性に遺伝子発現を誘導する合成受容体の作成

作成した合成受容体はどれも I 型コラーゲン認識下で蛍光蛋白質発現につながるシグナル伝達が可能であった。合成受容体の中で、特にリンカーを挿入しない受容体の方が最も高いシグナル伝達効率を示した。

(B) 病的ストレス感受性合成遺伝子プロモーターの同定

酸化ストレス及びカテコラミン・ストレスについては、弱い反応性を示す合成遺伝子プロモーターは検出できたが、高い反応性を示す合成遺伝子プロモーターは抽出できなかった。しかし、低酸素ストレスについては、非常に高い反応性を示す合成遺伝子プロモーターを一つ同定することができた。病的ストレスセンサーはすべてのストレスを感受する必要性はないことから、この合成遺伝子プロモーターを病的ストレス感受性プロモーターとして使用することとした。

生体内での挙動を検証するため、同遺伝子プロモーターを AAV9 によりマウスへ導入し、マウス心不全モデルでの発現の検証を試みた。しかし、心臓特異性等を無視した単純な遺伝子過剰発現系と異なり、より詳細な最適化が必要であり、現在その試みを続けている。

(C) MMP 発現の時間・空間的制御を行う合成遺伝子回路の作成

まず、蛍光蛋白質発現を指標にした合成遺伝子回路の挙動確認を行った。その結果、合成遺伝子回路は低酸素ストレス下においてのみ高い特異性と強度を持って活性化されることが分かった。さらに、ストレス感受性遺伝子プロモーターを有する転写ユニットの下流にリボザイム構造を配置することにより、より高い特異性を実現することに成功した。また、目的遺伝子として心筋細胞保護因子を用いることにより、低酸素ストレス下における心筋細胞保護作用を示すことを確認した。

次に、薬剤による合成遺伝子回路の制御システムを検証した。その結果、エリスロマイシン及びドキシサイクリンによる合成遺伝子回路のオン・オフが可能であった。目的遺伝子として心筋細胞保護因子を導入すると、低酸素ストレス下における心筋細胞保護作用が薬剤の有無によりコントロール可能であった。

研究テーマ

血管内皮を標的とした革新的脳卒中治療法の開発

研究者

国立循環器病研究センター 脳神経内科 服部 頼都 (ハットリ ヨリト)

1. はじめに

無症候性頸動脈狭窄/閉塞症 (CASO) は、実は無症候ではなく血管性認知障害の原因疾患の1つである (Balestrini *et al. Neurology*. 2013)。本疾患の患者数は、30～79歳において、世界で1.5%程度と推定されており (Song *et al. Lancet Glob Health*. 2020)、我が国の患者数は、約130～250万人と推計される。しかし、CASOによるVCIの予防・治療法は現在確立していない。われわれは、頸動脈狭窄症モデルマウスを用いて、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD⁺) 依存性の長寿遺伝子 SIRT1 が、以下の機序を介して認知機能改善に寄与し (Hattori *et al. Stroke*. 2014)、頸動脈閉塞症モデルマウスにおいても、SIRT1 は海馬の遅発性神経細胞死を抑制する (Hattori *et al. Neuroreport*. 2015)、非臨床 POC を取得した。

① SIRT1 は、血管内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) を脱アセチル化して活性化型へ変換した。

② SIRT1 は、eNOS 活性化によって脳血管を拡張し脳血流を改善、認知機能も改善させた。

この結果に基づいて、NAD⁺/SIRT1 経路を活性化するレスベラトロール (Park *et al. Cell*. 2011) が CASO による VCI 患者の eNOS 活性化を介した脳循環改善による認知機能改善へ寄与するかどうかを検討する。

2. 方法

2020年7月から2021年6月に当院を受診した、頸動脈エコーで狭窄部の peak systolic velocity が 130 cm/s 以上を示す中等度以上の無症候性頸部頸動脈狭窄症または閉塞症患者で、レスベラトロール 30 mg/日摂取群 (RES: 市販のレスベラトロールを購入) またはレスベラトロール非摂取群 (Non-RES 血管危険因子のコントロールのみ) に分けて、フォローアップした。6か月以上の間隔をあけて、認知機能検査 (MoCA、ADAS-Cog 13) と ¹⁵O ガス PET を施行して、縦断的に経過観察を行った。本研究は、国立循環器病研究センター研究倫理審査委員会承認されている (承認番号: R20113)。

3. 結果

【患者背景】

Non-RES 群 43 名、RES 群 36 名であった。平均年齢は、それぞれ 76.4 歳、77.0 歳であり、男性割合は、79.1%、75.0%であった。ベースラインの認知機能について、MoCA の平均合計点は、23.6 点、23.7 点であり、ADAS-Cog 13 の平均合計点は、14.6 点、15.8 点であった。この結果より、無症候性 CASO 患者は、実は無症候ではなく、すでに軽度認知障害または軽度認知症の範疇であった。平均の観察期間は、それぞれ 215 ± 59 日、246 ± 83 日であり差は認めなかった。

【レスベラトロールの摂取は認知機能の改善と有意な関連を認めた】

MoCA の視空間認知/遂行機能において、Non-RES 群で -0.23 点、RES 群で 0.36 点の変化を認めた (p=0.020)。また、ADAS-Cog 13 の近時記憶において、それぞれ 0.47 点、-0.89 点の変化を認め (p=0.001)、合計点でも 0.462 点、-1.48 点の変化を認めた (p=0.019)。これらの項目において、レスベラトロールの摂取は、認知機能の改善と有意な関連を認めた。

レスベラトロールの摂取は脳血流量の改善と有意な関連を認めた

^{15}O ガス PET によって脳血流量の変化を検討した。レスベラトロールの摂取は、両側前頭葉（右半球： $p=0.013$ 、左半球： $p=0.031$ ）、左被殻（ $p=0.01$ ）、両側視床（ $p=0.04$ 、 $p=0.01$ ）において脳血流増加と有意な関連を示した。脳酸素代謝量については脳領域全体でレスベラトロール摂取によって改善させる傾向を示した。レスベラトロール摂取と脳酸素摂取率との間には関連を認めなかった。

4. 考察

無症候性 CASO 患者において、レスベラトロールの摂取は、脳血流量改善と認知機能改善に関連することが明らかとなり、レスベラトロール摂取は eNOS 活性化を介した血管性認知障害の新規治療法となりうる。

研究テーマ

多種呈味成分の同時判別を可能とする ポリチオフエン誘導体を用いた人工舌の創製

研究者

東京大学 生産技術研究所 物質・環境系部門 南 豪 (ミナミ ツヨシ)

本研究では、誰でも・どこでも・簡便に測れる分析システムの実現を目指し、ケモセンサアレイデバイスを用いた多成分分析に挑戦した。従来の実サンプル分析は、大型の機器分析装置、専門知識、煩雑な操作を要し、現場における迅速な判断の妨げとなるため、簡便な分析法の開発が望まれている。それに対して、分子認識化学を基軸としたケモセンサは、標的種の認識に基づく化学情報を光学応答として可視化することが出来るため、簡便な分析ツールになり得る。分子認識部位となる天然由来材料は、高選択的検出を達成出来るが、熱的・化学的不安定さが課題となる。他方、人工分子認識材料の場合は化学的耐久性を有するが、高選択性の担保には、緻密な分子設計と高度な合成スキルが障壁となるため社会普及には至っていない。そこで我々は、人工レセプタの低選択性を活かす手法として、アレイ状にセンサを並べた「センサアレイ」の開発を行っている。当該分析システムに多変量解析技術を組み合わせることで、実サンプル中の化学種やその濃度の判別、未知濃度の予測が可能となる。当該センサアレイのプラットフォームをさらにオンサイト分析へと展開する試みとして、固体の支持基板にケモセンサを担持させたアレイデバイスを開発し、小型のカメラを用いた撮影と画像解析を取り入れた情報処理によって、その場分析を指向したセンシングシステムの確立を目指すこととした。本研究では、当該センサデバイスを食品分析へと展開するため、食品の品質管理（添加物や微生物の増殖・代謝の管理）や発酵過程管理のパラメータとなる pH 変化を正確にモニタリングする紙基板型センサアレイを開発した。

本目的に対して、1) オフィスプリンターで作製可能なデバイスの設計・最適化、2) 画像解析と多変量解析を組み合わせたデータ処理法の確立、をマイルストーンとして紙基板型センサアレイデバイスの開発に着手した。固体の支持基板として選定した紙は、その吸収力の高さや毛細管現象による分離能力などの利点からセンサの基体として活用されている。従って、低コスト、使い捨て可能かつ環境に優しい本材料は、オンサイト分析を可能にする優れたセンサ支持体となり得る。本研究では、96 ウェルのマイクロタ イタープレートを設計し市販のワックスプリンターを用いてウェルの隔壁層をパターンニングしたのち、市販の pH 指示薬をインクとしてカートリッジに充填することで、市販のインクジェットプリンターを用いて濾紙のパターンウェル内に印刷をした。本デバイスに 1 ウェルあたり 4 μ L のサンプル量を塗布することで、紙基板上の光学応答変化を得ることが出来る。ここでは、3 種の pH 指示薬をそれぞれのウェルに印刷し、およそ pH 4 から 8 の範囲において pH 変化を分析するセンサを実現した。紙基板センサデバイス上の光学応答パターンの記録には、フラットベッドスキャナーを使用して、デジタル画像を取得した。続いて、画像解析によって紙基板上の光学応答変化をカラーチャネルとして抽出し、パターン認識用のデータマトリックスを作成した。画像解析によって作成されるデータマトリックスは、7 つのカラーチャネル (red, green, blue (RGB))、グレースケール、Y, Cb, Cr) に対応する彩度で構成されており、多次元性の情報が含まれている。当該インセットデータは教師あり学習法の線形判別分析を用いて処理され、pH 4.10 から pH 7.90 の範囲に存在する pH 変化を下 2 桁の精度で判別した。続いて、実サンプルの pH 値を予測するために、機械学習の一種であるサポートベクターマシンを用いて解析を行った結果、未知の pH 値を正確に予測することに成功した。特筆すべき点として、市販の pH 電極を用いて評価した実サンプルの

pH 値と一致し、高い定量性を示すことが明らかとなった。本結果は、Wiley の Analysis & Sensing 誌に採録され、表紙に選定された。

(依頼論文、謝辞記載、doi.org/10.1002/anse.202200097)

公益財団法人 小柳財団

