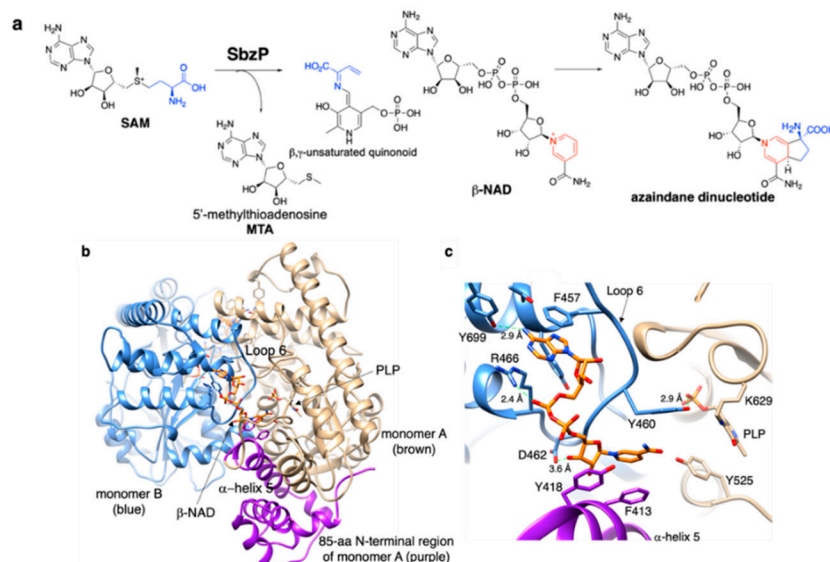


【目的】 NAD は生体内での補酵素として広く用いられている。それ以外に、NAD は寿命延伸に関わる Sirtuin や、ゲノム修復に関わる poly ADP-ribose polymerase など重要な生理作用に関わるタンパク質の基質となるなど、多様な生理学的機能を担うことが知られている。筆者は、抗腫瘍アザインダン天然物 *altemicidin* 合成中、NAD が生合成反応の基質となる現象を初めて報告し、その新たな役割を示した (図 a)。本合成系は NAD のニコチンアミド部が PLP 酵素 (SbzP) によって求核攻撃を受け C3、C2 単位間に二回の C-C 結合形成を経て、修飾される。このニコチンアミド部はさらに修飾を受け、リン酸結合が加水分解されることによって、NMN 様構造が形成され、さらに多段階修飾されることで、最終産物が生成される。生体内や化学修飾において、C-C 結合形成による NAD アナログの合成例は存在せず、本合成系は既存の分子とは全く異なる骨格の構造を作り出すことが可能である。そこで、SbzP の構造解析を行い、それを基盤に非天然型基質と組み合わせることで、特異的なニコチンアミド修飾型の NAD 化合物生合成を合成し、生体機構を制御する特異な生理活性化合物を創出することを目的とした。

【方法】 SbzP の安定ホモログ PseP を用いて、クライオ電子顕微鏡解析を行った。クライオ電子顕微鏡構造より、SbzP の基質酵素複合体構造を取得し、NAD の結合部位を同定した。そこに変異導入し、反応生成物の同定、SPR 解析、サーマルシフトアッセイを行い、その NAD 結合活性を評価した。SAM を酵素構造にドッキングし、結合部位に変異を加え、SAM から合成される MTA の検出、ストップフロー解析を行うことによって、SAM の結合能を評価した。

【結果】 SbzP ホモログ PseP の基質認識機構解明のため、クライオ電子顕微鏡解析を進め、NAD 結合構造を 2.6Å の分解能で取得した (図 b)。その結果、NAD のアデニンが monomer B の F457、R466 によって、二リン酸が R466 によって、ニコチンアミドリボシドが monomer A の Y413、Y418 と monomer B の D462 と Loop 6 によって保持されることを明らかにした (図 c)。また、それぞれのアミノ酸残基に変異導入を行ったところ、F413A、Y418A、F457A、R466A、Y699A のいずれも 80% 以上のアザインダンジヌクレオチド生成の減少が見られ、それぞれの基質保持における重要性が示された。その一方で、アデニン、リン酸の保持に関わるアミノ酸変異体 F457A、R466A、Y699A は SAM の γ -脱離によって生成する methylthioadenosine (MTA) の生産量が大きく減少した (>64%)。その一方、F413A、Y418A では 105%、67% とそれぞれ活性上昇、中程度の減少に止まった。このデータより、それぞれ SAM 認識における異なる役割が示唆された。

NAD、SAM を受け入れ新規骨格を合成する生合成酵素のクライオ電子顕微鏡解析



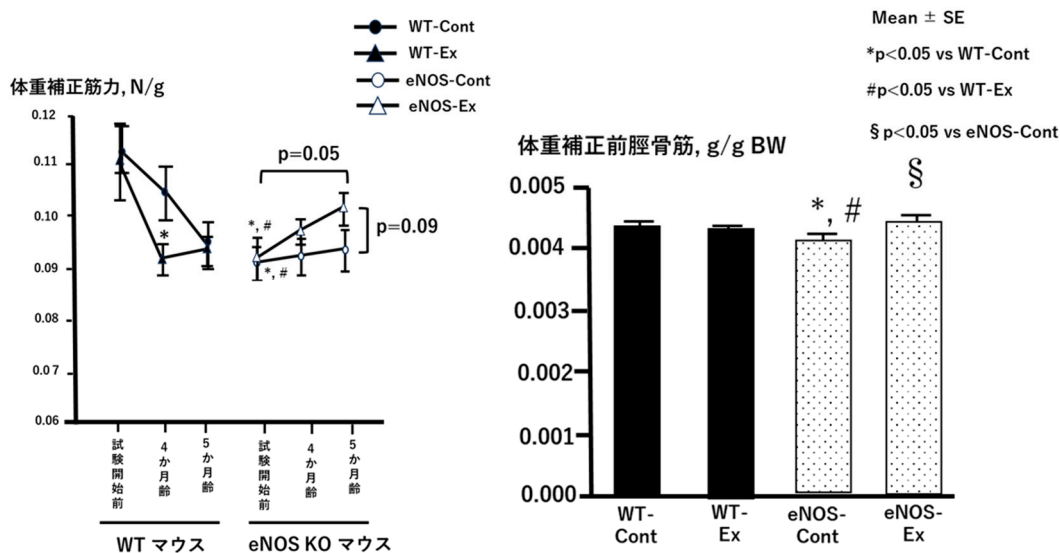
2 運動による骨格筋の新たな毛細血管新生機序の解明 池森 敦子

【目的】 高齢化社会を背景に、平均寿命と健康寿命のギャップを埋めるため、健康寿命を延伸する対策が求められている。中でも重要な課題が、骨格筋量の減少および筋力低下を認めるサルコペニアを抑制することである。サルコペニアの抑制には、習慣的走運動による骨格筋の量と質の維持が有効であるが、様々な慢性疾患を有する高齢者では、有効な運動量を確保できないのが現状であり、運動効果を補うサルコペニア進行抑制法の確立が急務である。私たちは、サルコペニアを高頻度で発症する2型糖尿病に着目し、習慣的走運動が骨格筋の萎縮や筋力低下を抑制する機序を検討してきた。その結果、2型糖尿病の骨格筋では、筋内の毛細血管が減少し、内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) が低下しているが、運動により骨格筋萎縮が軽減され、筋力が増加した。また、そのような骨格筋では、毛細血管が増加し、eNOS の発現が有意に増加する結果を得た。この結果は、運動による毛細血管の増加は、骨格筋の量と質の維持に重要である可能性を示している。一方で、血管内皮機能が低下する動脈硬化を有する高齢者において、運動の骨格筋への影響は十分検討されていない。そこで、骨格筋内の血流減少、身体機能および骨格筋量の低下が報告されている eNOS 欠損マウスを使用し、習慣的走運動による骨格筋への影響について検討した。

【方法】 3 か月齢 (14 週齢) の eNOS 欠損オスマウス (C57/B6J を背景に有する、eNOS Ko マウス、合計 15 匹) および野生型オスマウス (C57/B6J, WT マウス、合計 13 匹) をそれぞれ、2 群 {非運動群 (eNOS-Cont 8 匹、WT-Cont 6 匹)、運動群 (eNOS-Ex 7 匹、WT-Ex 7 匹)} に分けた。習慣的走運動は、トレッドミル装置を使用し週 5 日、25 m/分、傾斜 5 度、60 分間で 8 週間実施した。4 週間おきに、体重、餌摂取量、血圧、筋力、身体活動量、採尿を行い、運動開始 8 週間後に後肢筋を摘出し、腓腹筋、前脛骨筋、ヒラメ筋、長趾伸筋、足底筋の筋重量を測定した。

【結果】 既報のとおり、eNOS Ko マウスでは、血圧が WT マウスよりも有意に高値であり、体重補正筋力は、試験開始時では、WT マウスよりも有意に低値であった。一方で、当初の予想に反し、eNOS Ko マウスでは、習慣的走運動により体重補正筋力が増加する傾向を示し、身体活動量が週齢に従い増加し、その程度は、WT マウスと比較し有意差を認めなかった。また、習慣的走運動により、WT マウスでは骨格筋重量が増加しなかったが、eNOS Ko マウスでは前脛骨筋の筋重量が有意に増加した。さらに毛細血管血流量は、両マウスで同程度であった。これらの結果は、習慣的走運動が、血管内皮機能非依存的に骨格筋へ好影響を及ぼすことを示しており、今後さらにその分子メカニズムを詳細に明らかにしていく。

eNOS 欠損マウスにおける習慣的走運動の骨格筋への影響



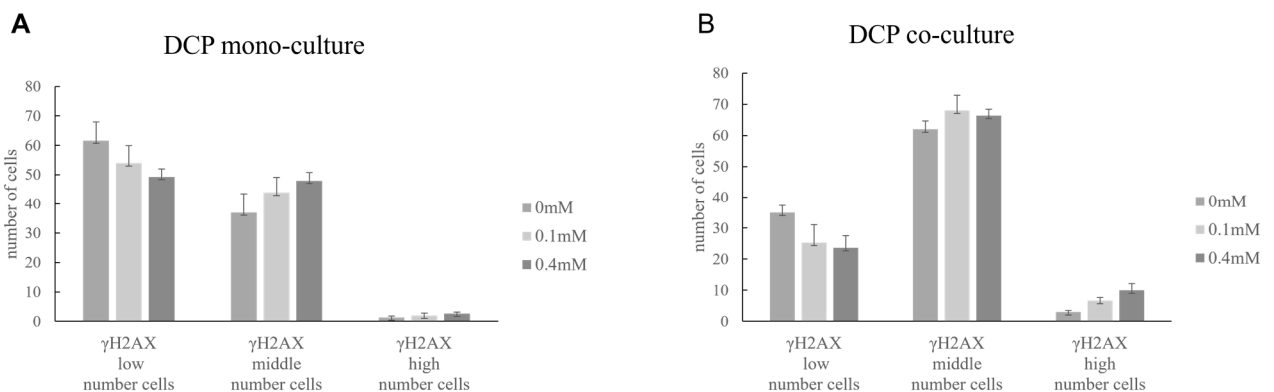
3 免疫細胞が介在する職業性胆管がん誘導シグナルの解明

市原 学

【目的】 2013年、大阪におけるオフセット校正印刷工場において、20代の若年者を含む多数の労働者が胆管がんに罹患していることが報告された。労働者は共通して有機溶剤 1,2-ジクロロプロパン (1,2-DCP) に曝露されていた。本研究では 1,2-DCP による胆管がん誘導における免疫細胞の役割、DNA 障害を誘導するシグナルを解明する。

【方法】 ヒト胆管細胞株 MMNK-1 細胞の単培養、および MMNK-1 細胞とヒト THP-1 単球由来マクロファージとの共培養を用いた。1,2-DCP および比較のために同じ濃度の DCP、TCP 曝露群も作製した。胆管細胞の DNA 損傷度合の評価ため DNA 二重鎖切断マーカー γ -H2AX 陽性 Foci、 γ -H2AX 汎核陽性細胞の数も数えた。動物実験では TNF α ノックアウト (TNF α -KO) マウスおよび野生型マウスをそれぞれ無作為に 4 群に分け、1,2-DCP に 0、125、250、500 mg/kg 体重、1 日 1 回、週 5 日、13 週間、強制経口投与した。曝露終了後、肝臓切片を作製し、HE、鉄染色および免疫組織化学による病理組織学的検索を行った。

【結果】 MTS アッセイの結果、1,2-DCP を曝露した共培養胆管細胞では対照群と比較すると各濃度において細胞生存率が増加していたのに対し、0.8 mM の 1,2,3-TCP を曝露した共培養で細胞生存率が減少していた。DCM では単培養、共培養ともに変化を確認できなかった。 γ -H2AX 陽性 Foci 数では、0.4 mM の 1,2-DCP、DCM、1,2,3-TCP を曝露した共培養胆管細胞で Foci 高度発現細胞が対照群と比較すると顕著に増加していた。Foci 高度発現細胞における重回帰分析の結果では、有意な交互性を確認できた。 γ -H2AX 汎核陽性細胞の発現数では 1,2-DCP を曝露した共培養胆管細胞で γ -H2AX 汎核陽性細胞が濃度依存的に減少していたが、他の物質では確認できなかった。動物実験では野生型マウスにおいては 500 mg/kg 投与群において一時的な体重減少がみられたが、TNF α -KO マウスにおいては影響が抑えられた。肝重量は Wild-type と TNF α ^{-/-} どちらにおいても増加が見られた。野生型、TNF α -KO マウス共に Ki67 陽性肝細胞数が 1,2-DCP 投与量依存的な増加を示した。Wild-type、TNF α ^{-/-} 共に γ -H2AX 陽性肝細胞数が 1,2-DCP 投与量依存的な増加を示した。ベルリンブルー染色を行うと 1,2-DCP を曝露したグループでは、組織障害部位だけでなく、通常に見える細胞にも微弱な鉄陽性の反応が見られた。

MMNK-1 胆管細胞の 1,2-ジクロロプロパン曝露後の γ -H2AX 陽性 foci 頻度別細胞率

4 ビタミンC欠乏による精子エピゲノム異常とその遺伝性

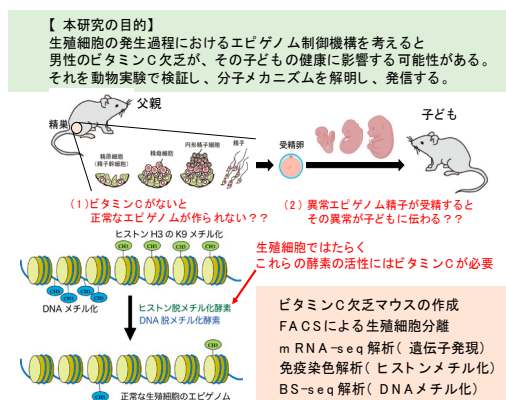
一柳 健司

【目的】 ビタミン C (アスコルビン酸) は霊長類では生合成することができない必須の栄養素で、ビタミン C が欠乏すると、疲労や筋肉低下に始まり、さらに長期間欠乏状態が続くと壊血病を引き起こし死亡する。このように、ビタミン C は本人の健康維持に必須であるが、ビタミン C 欠乏が次世代に影響を与える可能性はあまり意識されていない。本研究の目的は、父親のビタミン C 摂取が不足することにより、その後生まれてくる子供に影響があるかどうか、あるとすれば、どのような作用機構によるのかを理解することである。細胞における遺伝子発現はエピジェネティックな機構によって制御されており、その機構には DNA メチル化やヒストン・タンパク質のメチル化に関わることが知られている。これらの修飾は動的であり、メチル化酵素と脱メチル化酵素のバランスによって絶妙にコントロールされているが、脱メチル化酵素は活性にビタミン C を必要とする。培養細胞レベルではビタミン C の過剰投与によって脱メチル化反応が亢進し、欠乏させると脱メチル化反応が減弱する（結果的に DNA やヒストンのメチル化が増える）ことが知られている。オスの生殖細胞の発生過程でも多くの DNA 脱メチル化反応とヒストン脱メチル化反応が行われており、ビタミン C がないと正常なエピジェネティック修飾（総体としてエピゲノムという）を持つ精子が形成されないと考えられる。そのような異常なエピゲノムを持つ精子から生まれた子供の発生が異常になる、あるいは、健康を維持できない可能性を明らかにすることは、エピゲノムの遺伝性という生命科学の観点からも、親世代の健康管理による子供世代の健康増進という公衆医療の観点からも重要である。

【方法】 ヒトと異なり、マウスはビタミン C を合成する能力を持つので、ビタミン C 合成経路の酵素の一つをコードする SMP30 遺伝子をノックアウトしたマウス (SMP30-KO) を用いて、ビタミン C を含まない餌を与え、1.5 g/L のビタミン C を含む水あるいは含まない水を与えることでビタミン C 供与群と欠乏群のマウスを作成した。3 ヶ月間ビタミン C を欠乏させたのち、精巣から各ステージの生殖細胞を回収し、mRNA-seq、免疫染色、BS-seq を行った。

【結果】 ビタミン C が欠乏しても顕微鏡像やフローサイトメトリーで見る限りは生殖細胞の発生に大きな影響を与えているようには見えなかった。しかし、トランスクリプトームにおいては、どの発生ステージでも数百の遺伝子の発現が変化しており、発現変動遺伝子のリストから、発生がやや遅れていることが示唆された。また、免疫染色の解析から、パキテン期精母細胞においてヒストン脱メチル化酵素によって H3K9me2 の修飾は、ビタミン C 欠乏群でも健常と同じく激減するが、円形精子細胞において H3K9me2 の低い状態が維持されていないことが明らかとなった。さらに精子 DNA を BS-seq で解析したところ、約 3,000 のゲノム領域で高メチル化がみられ、特に CpG アイランドで顕著であった。このことは、精子形成過程において Tet タンパク質群による DNA 脱メチル化反応が起きており、ビタミン C 欠乏によって、脱メチル化反応が不全になっていることが示唆される。今後、このような生殖細胞のエピゲノム異常が子供に伝わるかどうか、また表現型に影響を与えるかどうかについて、引き続き研究を進めていきたい。

研究の概略図：父親のビタミン C 欠乏による生殖細胞や次世代への影響を明らかにする



5 骨格筋糖化に着目した老化メカニズムの解明

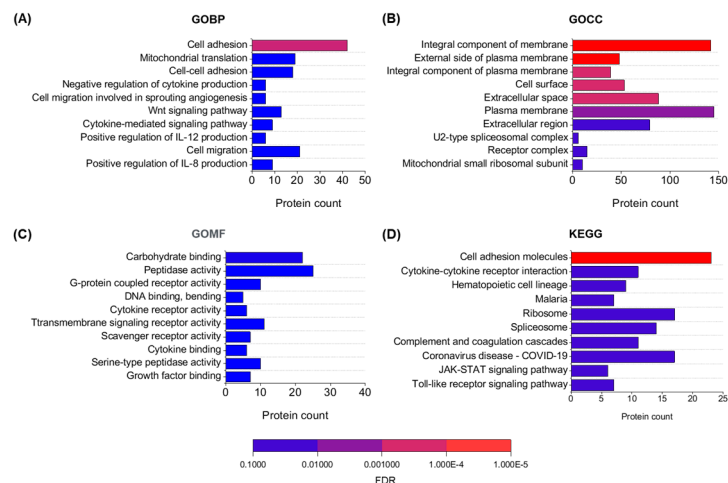
江川 達郎

【目的】 骨格筋機能の低下は、免疫系、血管系、脳を含む各臓器の機能低下を招き、個体老化を促進する。そのため、骨格筋をターゲットとした個体老化抑制策の構築は、健康寿命延伸の観点から極めて重要である。近年、老化をもたらす生体ストレスとして「糖化ストレス」が注目されている。糖化ストレスは、酸化ストレスや小胞体ストレスと悪循環を形成し、個体老化を促進することが明らかになっている。本研究では、糖化ストレスが骨格筋の機能低下を通じて個体老化を誘導する可能性を明らかにするために、1) 糖化ストレスが筋細胞膜に与える影響、2) 糖化ストレスが筋再生に与える影響、3) 糖化ストレスが骨格筋マイオカイン発現に与える影響の3点に着目して研究を行った。

【方法】 1) C57BL/6NCr マウスに対して、グリセルアルデヒド由来の advanced glycation-end products (AGEs 0.5 mg/g) を 1 日 1 回、1 週間にわたり腹腔内投与した。コントロール群には牛血清アルブミンを同量投与した。これらのマウスに対し、協働筋腱切除法により足底筋に過負荷を誘導し、過負荷開始 1 週間後に足底筋を摘出し解析を行った。2) 1 と同様の処置により糖化ストレスを誘導したマウスおよびコントロールマウスを用い、前脛骨筋に cardiotoxin を注入して筋損傷を誘導し、損傷 1 週間後の筋再生状態を両群で比較検討した。3) C57BL/6NCr マウスに対して、メチルグリオキサールを 1% 含む飲水を 1 か月間自由摂取させた。メチルグリオキサールを含まない飲水で飼育したマウスをコントロール群とした。投与開始 1 か月後に足底筋を摘出し、サイトカインならびにケモカインの発現状態を抗体アレイにより比較測定した。

【結果】 1) コントロール群では過負荷により正常な筋肥大が誘導されたが、AGEs 投与群の一部のマウスでは筋細胞の崩壊が観察された。またプロテオーム解析では、4,659 個のタンパク質が検出され、クラスター分析により AGEs 投与の影響が認められた 436 個のタンパク質を抽出した。Gene ontology 解析の結果、これらのタンパク質には、細胞膜構成に関連するタンパク質が多く含まれていることが明らかになった。2) ヘマトキシリン-エオジン染色による筋線維あたりの中心核数の検討では、AGEs 投与群はコントロール群と比較して低値であった。また、免疫組織染色により、再生期に現れる胚性ミオシン重鎖発現を定量化したところ、AGEs 投与群ではコントロール群と比較して低値であった。3) 抗体アレイの結果、メチルグリオキサール投与群では検出された 111 個のタンパク質中、91 個が増加、20 個が減少した。PLS-VIP 解析では、Reg3G や CCL5、PD-ECGF などの分泌タンパク質の変動が顕著であった。ウエスタンブロット解析により DNase2 タンパク質発現の低下が認められた。以上の結果は、糖化ストレスが骨格筋脆弱化ならびに再生能の低下を招くこと、また炎症性の生理活性物質の産生分泌を介して、全身性の機能低下を惹起する可能性を示唆している。

糖化ストレスは筋細胞膜構成タンパク質の発現に影響を与える

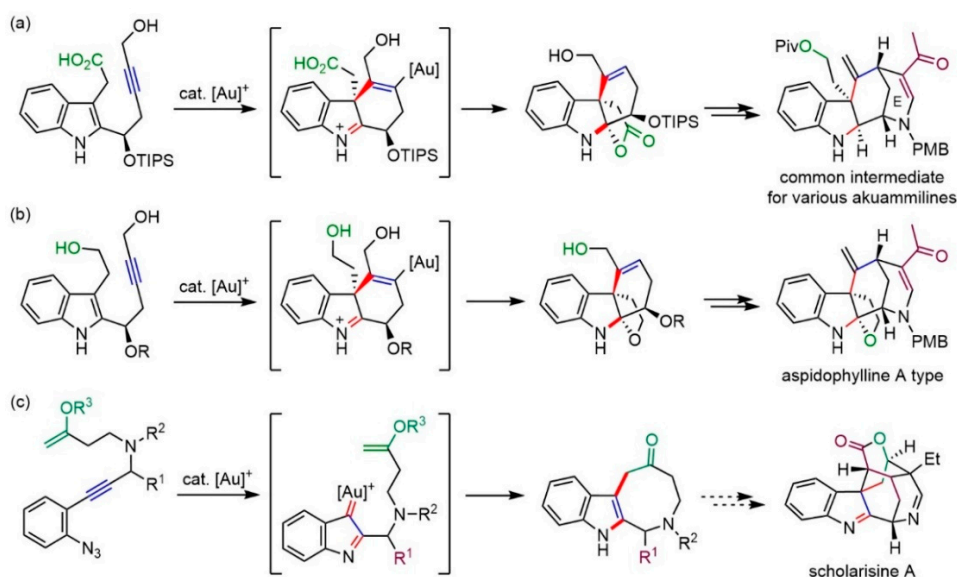


【目的】 近年の創薬研究において、高い sp^3 性を有する天然物誘導体が再評価されている。中でもアルカロイド誘導体は、酵素や受容体などとの水素結合や疎水結合が適度に期待できるとともに、医薬品周辺に未開拓のケミカルスペースを有するため、医薬品シーズとしての期待が大きい。しかしながら、複雑な骨格を有する天然物の誘導化の難しさが、天然物創薬における大きな課題となっている。一方、現在の創薬研究は新モダリティへの展開が盛んに行われている。ペプチドや核酸をはじめとする中分子や、生体高分子を利用するバイオ医薬品に関する多く創薬成功事例が報告されているが、利用できる分子種に大きな偏りがあることが現在の中分子創薬の問題点であると考えられる。そこで我々は、複雑な天然物骨格を効率的に構築する合成法の開発と、中分子化によるライブラリー構築法の開発によって、現代の創薬研究の課題を解決する糸口を得ることを目的として、本研究に着手した。

【方法】 本研究では、アクアミリンアルカロイドの多様性指向型合成法およびアゾシン縮環型インドール骨格構築法の開発と、中分子化法の検討を行った。最初に、我々が最近開発した四環性インドレニン構築法および α -イミノ金カルベンの生成を基盤とするアリール化反応を基盤として、金触媒を用いた連続環化反応によるアクアミリンアルカロイド型骨格の構築を検討した。さらに、クリックケミストリーによるハイブリッド化を基盤とする中分子型アルカロイドライブラリーを構築するための基礎的研究として、様々なアルキニル化ペプチドを合成し、入手容易な天然物や医薬品の官能基導入とハイブリッド化を実施した。

【結果】 カルボン酸部位を有するアルキニルインドールに対して金触媒を作用させたところ、目的の連続環化反応が立体選択的に進行し、四環性インドリンが良好な収率で得られることを見出した (図 a)。引き続き、得られた生成物中のラクトン部を利用することで、様々なアクアミリンアルカロイドに誘導しうる中間体に誘導した。一方、求核部位として一級水酸基を有するアルキニルインドールを用いると、THF 縮環部を有する四環性インドリンを立体選択的に生成した (図 b)。本化合物は、アスピドフィリン A 型の構造を有する五環性インドールに誘導することができた。さらに、アジドアルキンの連続環化反応によって、アゾシン縮環インドールが得られることを見出した (図 c)。中分子化法の開発においては、抗ウイルス活性を持つことが知られている短鎖ペプチドと低分子化合物のハイブリッド化を行い、有望な抗ウイルス活性を有する化合物を含むハイブリッド化合物の混合物を得た。

アクアミリンアルカロイドの合成と中分子化に資する金触媒連続環化反応



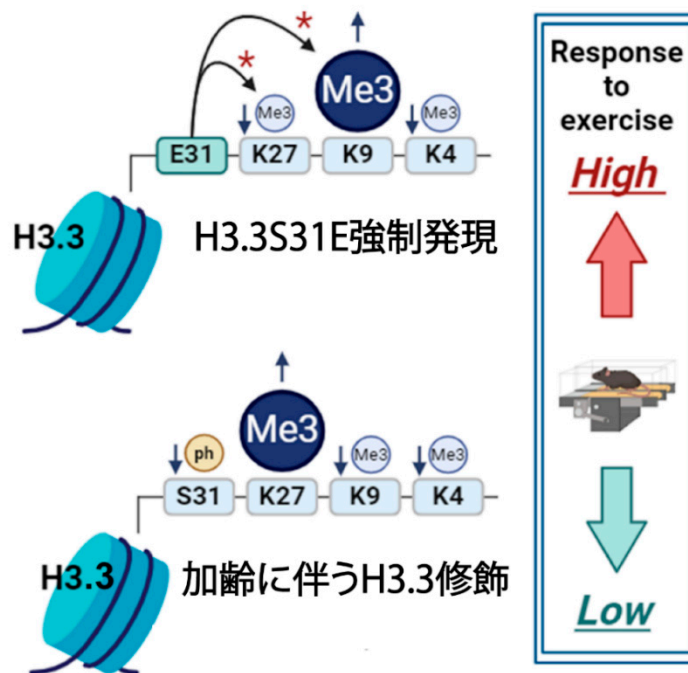
7	骨格筋におけるヒストンバリエントH3.3の機能解明	河野 史倫
---	---------------------------	-------

【目的】 エピジェネティクスは、ヒストンや DNA への化学修飾が遺伝子構造を変化させることで遺伝子を転写制御する仕組みである。ヌクレオソームを形成するコアヒストンのひとつであるヒストン H3 には、カノニカルな H3.1 および H3.2、ノンカノニカルな H3.3 のバリエントが知られており、出生後の臓器では加齢に伴い H3.1/3.2 から H3.3 に置き換わることが知られている。骨格筋においても加齢に伴い H3.3 の蓄積が起こるが、その役割は不明である。そこで本研究は、H3.3 特有の化学修飾である H3.3S31ph の加齢変化ならびにその機能を明らかにすることを目的として実施した。

【方法】 C57BL/6J 雄マウスを用いて一連の実験を実施した。加齢に伴う変化を調べるために、8 週齢と 75 週齢の前脛骨筋において H3.3S31ph 発現を比較した。骨格筋特異的にリン酸化模倣 H3.3S31E を発現するウイルスベクターを作製し、30 週齢時に前脛骨筋へ注入した。40 週齢時および 50 週齢時に、骨格筋の運動応答機能を評価するため、トレッドミルを用いた急性走運動テストを実施した。前脛骨筋のサンプリングは運動終了 2 時間後に行った。これらの筋サンプルを用いて、ウェスタンブロットによるヒストン発現解析および運動応答性遺伝子群を対象として遺伝子発現解析を実施した。

【結果】 H3.3S31ph 発現は、8 週齢に比べ 75 週齢で有意に減少した。ウイルスベクターを注入した筋では、50 週齢時に H3.3 自体の有意な発現増加が認められた。H3.3 発現増加に伴い H3.3S31ph、H3K4me3、H3K9me3、H3K27me3 いずれの化学修飾も増加したが、H3.3S31E 強制発現では H3K9me3 の有意な増加、H3K4me3 ならびに H3K27me3 の有意な低下が認められた。運動応答性遺伝子の発現量は、安静状態において H3.3S31E を強制発現した筋で有意に低下したものの、急性運動に対する応答性は空ベクターを注入した筋に比べ増大する傾向であった。加齢に伴い増加する H3.3 では、S31 リン酸化の低下に起因し H3K9me3 低下・H3K27me3 増加することが明らかとなった。

加齢に伴う骨格筋ヒストン H3.3 特有のヒストン修飾と S31 リン酸化の関係



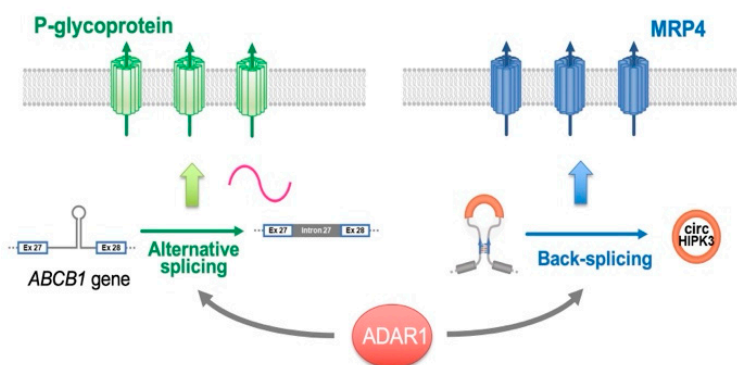
8	RNA編集の時刻変動を基軸にした時間薬物療法	小柳 悟
---	------------------------	------

【目的】 薬物の吸収・分布・代謝・排泄に関わるトランスポーターやチトクローム P450 (CYPs) などの活性には大きな個人差が認められ、薬物治療の最適化における妨げのひとつになっている。過去 30 年近くにわたり、これら分子の DNA シーケンス解析を中心に様々な検討が行われてきたが、その個人差の原因は十分に解明されていない。一方、我々は生体機能の 24 時間周期の変動を制御する「時計遺伝子」によって、トランスポーターや CYPs、受容体など「薬効関連分子」の発現に時刻変動が引き起こされることを見出し、薬物の効果や体内動態が同一個体内でも時刻によって変容することを明らかにしてきた。また、最近の研究で RNA 編集酵素 (ADAR) が DNA の変化をとまわずに RNA の配列を時刻依存的に書き換え、薬効関連分子の発現・機能に概日リズムを引き起こすことを見出している。本研究では ADAR による RNA 編集を基軸に、薬物の効果・体内動態に時刻による変動が生じる機序について検討を行った。

【方法】 実験には自由摂食・摂水、明暗周期条件下 (明期 7:00~19:00) で飼育した ICR 雄性マウスおよび同様の環境下で飼育した雄カニクイザルを用いた。また、培養ヒト腎近位尿細管上皮細胞 (RPTECs) に ADAR1 に対する shRNA を発現するレンチウイルスを感染させることで、ADAR1-knockdown (KD) RPTECs を作製した。概日時計機構の同調実験では、RPTECs を 100 nM dexamethasone に 2 時間曝露し、時計遺伝子の発現リズムを指標にモデルの妥当性を確認した。各動物組織および培養細胞から調製したサンプルを対象に、mRNA 発現量は RT-PCR 法、タンパク質発現量は Western blotting 法で測定した。また、サンガー法でシーケンス解析し、RNA 編集の有無を確認した。

【結果】 マウス、カニクイザルに腎臓および概日時計機構を再構築した RPTECs においても ADAR1 の発現は有意な 24 時間周期の変動を示し、本酵素の発現リズムに応じて特定の遺伝子の RNA 上のアデノシンは時刻依存的にイノシンへと変換されていた。ADAR1-KD の RPTECs を対象に本酵素の有無によって発現が制御をうける薬物輸送トランスポーターの探索を行った。その結果、P 糖タンパク質 (P-gp) をコードするヒト *ABCB1* mRNA の発現低下および Multidrug Resistance Protein-4 (MRP4) をコードするヒト *ABCC4* mRNA の発現上昇が観察された。この原因について解析したところ、ADAR1 は P-gp をコードする *ABCB1* 遺伝子のイントロン 27 のスプライシング効率を時刻依存的に変容させ、その発現と薬物輸送活性に概日リズムを引き起こしていることが明らかになった。また、ADAR1 は *HIPK3* 遺伝子におけるバックスプライシングにも影響を及ぼし、環状 RNA である circHIPK3 の産生制御を介して MRP4 の翻訳および発現量に個体差が生じることが示唆された。概日時計機構を再構築した RPTECs において P-gp の発現は ADAR1 のリズムによって時刻依存的に変動したが、同細胞で MRP4 の発現には概日リズムが認められなかった。これは ADAR1 による MRP4 の発現制御を仲介する環状 RNA が細胞内で安定的に存在するためだと考えられた。これらの結果は、腎臓からの薬物排泄における投薬時刻の違いや個人差についての新たなメカニズムを示唆するものであり、ADAR1 は時計遺伝子とは異なる機構で薬効の効果や体内動態に関わる分子の発現や概日リズムを制御していることが明らかになった。

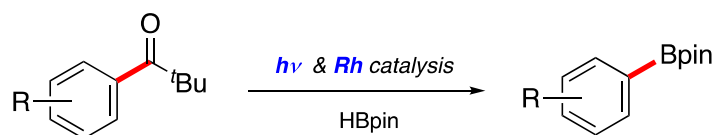
RNA 編集酵素 (ADAR1) による近位尿細管における薬物排泄トランスポーターの発現制御



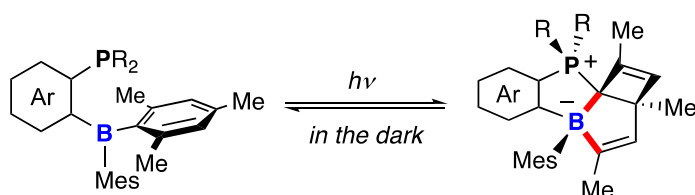
【目的】 有機分子の基本骨格を成す炭素-炭素結合を直接的に開裂・再構築・官能基化する分子変換反応の開発は、高反応性官能基を足がかりとした既存の分子合成戦略を刷新し、高度に官能基化された低分子医薬品の短工程合成の実現につながるものとして重要である。しかし一般に、安定な炭素-炭素結合を切断・変換することは極めて困難であり、これまでの報告例の多くは高歪み化合物の反応などに限られていた。本研究課題では、光エネルギーと遷移金属触媒や有機典型元素との協働作用を利用することで、歪みを持たないケトンやベンゼン環の炭素-炭素結合を切断し変換する新反応の開発を目的として研究に取り組んだ。

【方法および結果】 全ての反応は、グローブボックスあるいはシュレンクテクニックを用いてアルゴン雰囲気下で行った。光照射は LED 照射装置を用い、その間の反応温度は外部開放型恒温水循環装置を用いて一定に保って行った。得られた生成物は NMR、質量分析、X 線結晶構造解析によって構造を確定した。種々検討した結果、ピバロフェノン誘導体とピナコールボラン (HBpin) に対して、365 nm の光照射かつ加熱条件下でロジウム触媒を作用させると、アリールボロン酸エステルが良好な収率で得られることを見出した。これは、単純ケトンのアシル基炭素-炭素 σ 結合を直接的に切断して分子間アリール化を実現した初の例となった。本反応には光照射とロジウム触媒の両方が必須であり、いずれかが欠けるとホウ素化体は得られなかった。いくつかの反応機構解析実験から、直接光励起されたケトンが炭素-炭素結合の均等開裂 (Norrish I 型反応) を起こすことでアシルラジカルが生じ、これがロジウム触媒により脱カルボニル/ホウ素化されることを明らかとした。ケトンのアシル基炭素-炭素結合を切断する炭素-炭素 σ 結合変換反応の開発は、不活性結合活性化や新たな有用ビルディングブロック開発の観点から注目を集めているものの、不活性な炭素-炭素 σ 結合を切断するには高歪み化合物や配向性官能基を用いる必要があり、単純ケトンを用いた有用反応の例はほとんどなかった。本反応は、古典的な有機光反応である Norrish I 型反応と遷移金属触媒反応を融合した新しい反応制御法であり、炭素-炭素 σ 結合変換反応を実現するための新手法を確立することができた。また、リンとホウ素が 1,2-ナフチレンで連結された ambiphilic ホスフィン-ボランに対し、重ベンゼン溶媒中 6°C で 365 nm の光を照射すると、2-ボラビシクロ[3.2.0]ヘプタジエン骨格を有するホスホニウム-ボラートが定量的に得られることを見出した。この構造は単結晶 X 線構造解析により明らかとした。また驚くべきことに、生じたホスホニウム-ボラートを暗所下室温で 2 日間静置しておくと、元の ambiphilic ホスフィン-ボランが定量的に再生することも明らかとした。本反応は、ホウ素上のメシチル基が炭素-炭素結合の開裂を伴い脱芳香族化した“ホウ素による芳香環分解反応”であり、典型元素による不活性結合切断の新しい反応様式を示すことができた。

今回開発することに成功した炭素-炭素結合変換反応



Intermolecular arylation using ketones via C-C σ -bond cleavage



Reversible boron-insertion into aromatic C-C bonds

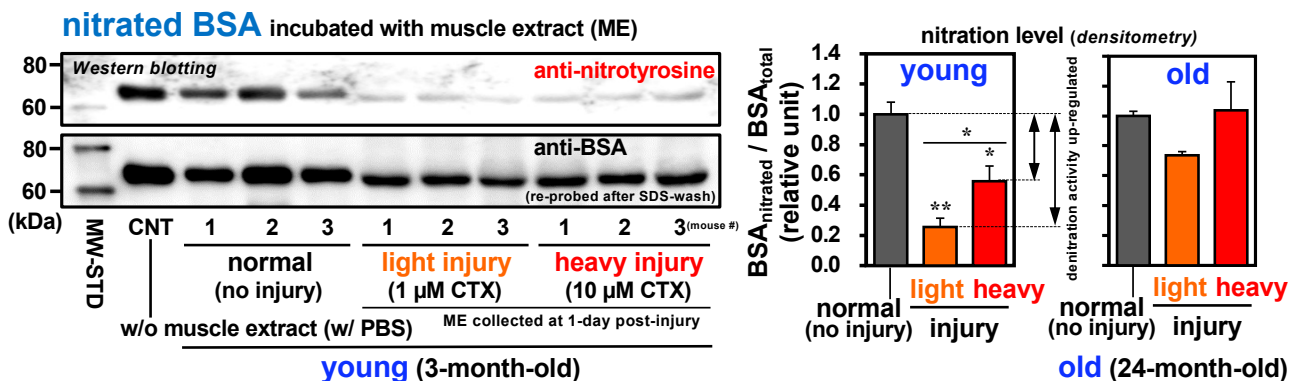
10 脱ニトロ化酵素遺伝子の同定と栄養機能的発現誘導 辰巳 隆一

【目的】 代表者はこれまでに、筋幹細胞活性化因子 HGF（肝細胞増殖因子）のチロシン残基（Y）198、250 がニトロ化されると細胞膜受容体 c-met に対する親和性を失う（不活化）こと、即ち、筋幹細胞（衛星細胞）の活性化とそれに続く増殖が抑制されることを見出し、この現象が加齢性筋萎縮・再生不全の新奇主要因であることを提起した（Elgaabari *et al.*, *Aging Cell*, 2024; <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/acel.14117>）。ニトロ化・不活化した HGF からニトロ基を除去（脱ニトロ化）できれば、HGF は生理活性を取り戻し筋本来のホメオスタシスは回復すると考えられる（筋の“若返り（リセット）”による健康寿命の延伸）。HGF の脱ニトロ化は加齢性筋萎縮・再生不全（フレイルやサルコペニアを含めて）を予防・治療するはじめての戦略となると期待されるが、脱ニトロ化酵素の存在や遺伝子（群）は未同定である。そこで本研究ではまず、脱ニトロ化酵素活性が筋組織で発現しているかどうかを調べた後、関連遺伝子（群）の同定および栄養機能的発現誘導・充進を目指して実験を行った。

【方法】 マウス後肢下腿部筋の凍結粉碎試料の PBS 抽出液をニトロ化 HGF およびニトロ化 BSA に添加し、抗ニトロチロシン抗体と抗 HGF/BSA 抗体を用いたウェスタンブロッティング（WB）、c-met 結合アッセイ（サンドイッチ ELISA 様アッセイ）、および *in vitro* 筋幹細胞活性化アッセイにより脱ニトロ化活性を可視化した。また、酵母菌などの原核生物種の報告事例から類似活性をもつ遺伝子群を抽出し、これらをリファレンスとして大規模高速演算を核とする *in silico* hybridization 法により関連酵素群を網羅的に検索した。

【結果】 若齢マウス（3 ヶ月齢）の骨格筋の PBS 抽出液をニトロ化 HGF およびニトロ化 BSA に添加すると、添加量依存的にニトロチロシン残基の脱ニトロ化反応が起こり、c-met 結合能および衛星細胞を活性化する生理活性が蘇ることを確認した。この脱ニトロ化活性の特性を調べたところ、1) 筋抽出液を加熱処理すると脱ニトロ化活性が消失すること、2) 分画分子量約 1 万の限外濾過膜を用いて低分子画分を十分に除去しても活性は維持されること、3) カルディオトキシン（CTX）の筋肉内注射により筋損傷を誘導すると筋抽出液の脱ニトロ化酵素活性が大きく増加するのに対し、老齢マウス（24 ヶ月齢）では顕著な増加は認められないこと、4) 筋損傷後 7 日目に比べて 1 日目の筋抽出液に高い活性があることなどがわかった。これらの実験結果から脱ニトロ化酵素が筋組織内に実在すると考えられ、その遺伝子を網羅的に検索した。50 を超える候補遺伝子が検索され絞り込み作業が困難となった。リファレンスの数を更に増やして再度実施することや、別の網羅的解析手法の導入が必要であると考えられた。このため、脱ニトロ化酵素発現を誘導・促進する食品成分の検索は実施できなかったが、*in vitro* で HGF のニトロ化抑制活性を持つ 2 つの機能性成分（単一化合物）を見出した。マウスに対する飲水投与実験を行い 1 つの化合物に明確な効果を認めたことから、食品機能的に HGF のニトロ化・不活化を抑制し加齢性筋萎縮・再生不全の進行を抑制できると期待された。

筋抽出液の脱ニトロ化活性の比較（Young vs. Old マウス、抗ニトロチロシン抗体による ECL-WB 像）

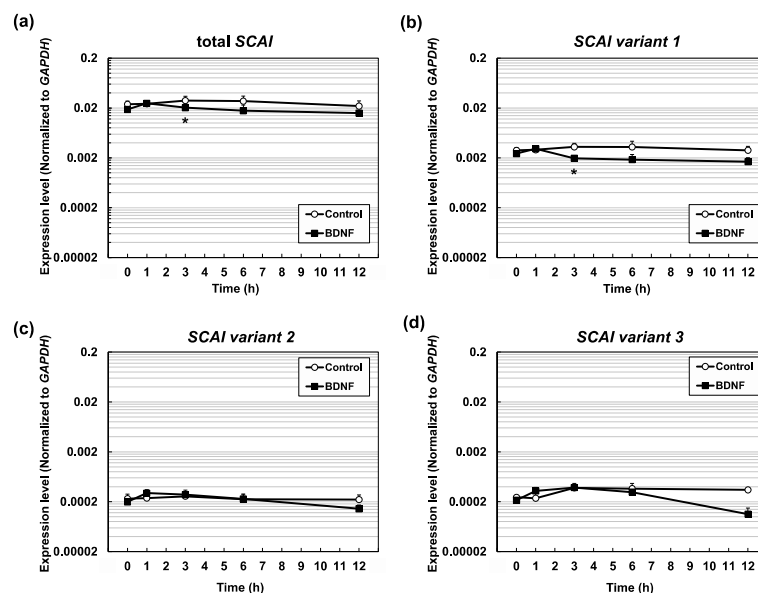


【目的】 超高齢社会である我が国の喫緊の課題は、高齢者の QOL などを包括した健康寿命の延伸である。とりわけ脳機能改善を図ることは、認知症患者の QOL のみならず介護の負担軽減においても極めて重要であり、記憶力改善を狙った創薬基盤となる生命現象の本質的な理解と応用が望まれている。この数十年の研究により、転写因子である血清応答因子 SRF は、転写因子をコードする遺伝子群や神経ネットワーク形成やシナプス伝達の調節などに重要な分子をコードする遺伝子群を制御しており、記憶形成並びに老齢マウスの記憶改善に効果があることが明らかになった。SRF は単独では転写を制御できず、SRF コファクターと呼ばれる分子と結合して転写を活性化する。SRF コファクターには、MRTF やそれに結合して転写を抑制する SCAI が知られているが、神経細胞において、それらを制御するリガンドや細胞内情報伝達系の全容解明には至っていない。我々は、SRF 標的遺伝子であり、シナプス機能をコントロールする Arc が脳由来神経栄養因子 BDNF によって活性化される際に MRTF が関与することを明らかにしている。以上のことから、MRTF や SCAI が BDNF シグナルの受け手となること、「神経活動-BDNF-MRTF-SRF」スイッチの解明が記憶改善の戦略となると考えた。本研究は、「神経活動-BDNF-MRTF-SRF」のカスケードの解明を行った。

【方法】 大脳皮質ニューロン初代培養系を調製し、BDNF を添加することで刺激を行い、SCAI mRNA の発現について調べるため、定量 PCR を行った。SCAI は、3 種類のバリエーションが存在しているため、それらを選択的に増幅可能なプライマーを用い、当該バリエーションの発現を全て調べた。また、発現変化をもたらすシグナル伝達経路を明らかにするため、キナーゼ阻害剤を前処理して、定量 PCR を行った。MRTF のタンパク質修飾を調べるため、ウェスタンブロット法を用いた。さらに「BDNF-MRTF-SRF」活性化を模倣するような天然物のスクリーニング系の確立を目指した。

【結果】 BDNF により、SCAI mRNA の発現が減少することが明らかとなり、そのシグナル伝達系として、ERK/MAP キナーゼが関与することを示した。また、BDNF により MRTFB がリン酸化され、そのリン酸化経路にも ERK/MAP キナーゼが関与することを示した。また、候補リン酸化部位を変異により非リン酸化させると、SRF 介在性遺伝子発現が減少する傾向を認めた。以上のことから、BDNF が SRF 転写因子複合体の構成要素やタンパク質修飾に変化をもたらす、SRF 標的遺伝子群の発現を調節して、脳の機能発現を行っていることが考えられた。

BDNF による SCAI バリエーションの発現抑制 (Ihara et al. Genes to Cells 2024 より引用)

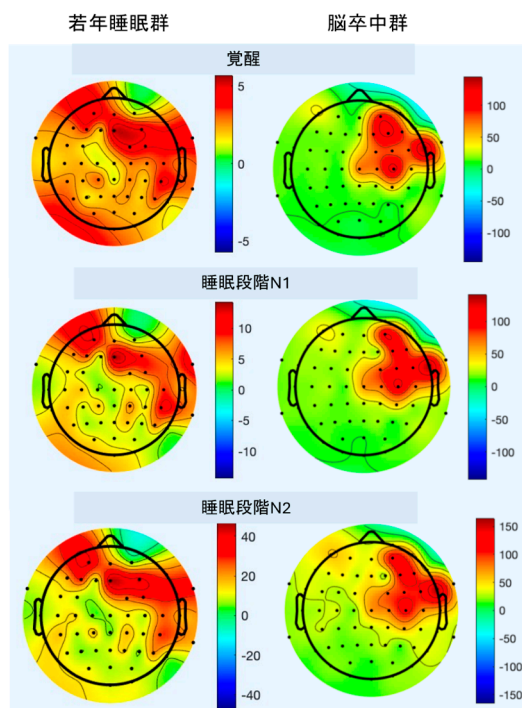


【目的】脳卒中は運動障害の要因となる主要な疾患の一つであり、脳卒中の発症後における身体機能の回復と日常生活への再適応が重要な課題となっている。近年、健常者の技能学習において睡眠が重要な役割を果たすことが示されている。研究代表者は、技能の飛躍的な向上には、訓練中に生じる脳の可塑性だけでなく、訓練後の睡眠中に生じる脳の可塑性が不可欠であることを、視覚学習において報告した。本研究では、脳卒中患者の技能学習における睡眠の役割を解明することを目的とした。

【方法】実験参加者は、若年睡眠群 6 名、若年覚醒群 5 名、中年睡眠群 5 名、脳卒中群 2 名の合計 18 名であった。運動技能の学習課題には Hand tapping task を用いた。本実験セッションでは、90 分間の仮眠セッションの前後で Hand tapping task を実施した。仮眠セッションは午後の早い時間に開始した。仮眠セッションでは睡眠ポリグラフを計測した。若年覚醒群では 90 分間の休憩をはさんで Hand tapping task を実施した。

【結果】Hand tapping task における訓練後および睡眠後のパフォーマンスの変化を群間で比較した結果、いずれの群も訓練後には反応時間、正当反応数ともに大幅な向上がみられた。仮眠後には、若年睡眠群、脳卒中群ともに反応時間と正当反応数に向上がみられたが、若年覚醒群および中年睡眠群では睡眠後に反応時間いずれにもほとんど変化はみられなかった。年齢や症状に限らず訓練効果は生じるが、睡眠の効果には年齢の影響があり、中年期では睡眠依存性の運動技能学習は向上しにくくなることが示唆される。脳卒中患者では、睡眠後のパフォーマンス向上がみられることから、むしろ睡眠のプロセスにより行動的に変化しやすい特性であることも示唆された。睡眠変数を検討した結果、脳卒中群では他の 2 群と比較して著しく睡眠の質が低いことが分かった。デルタパワーの頭皮上分布を調べた結果、脳卒中群に関しては覚醒中からすでに Affected area を中心として強いデルタパワーの左右差が生じていた。これは病的デルタ波を反映していると考えられる。徐波および睡眠紡錘波の密度にも脳卒中患者では強いアシメトリーが確認された。脳卒中患者の技能獲得における睡眠の役割を明らかにする上では、病的デルタ波、徐波、そして睡眠紡錘波を複合的に調べる必要がある。

健常者・脳卒中患者における覚醒・睡眠中のデルタパワーの頭皮上分布

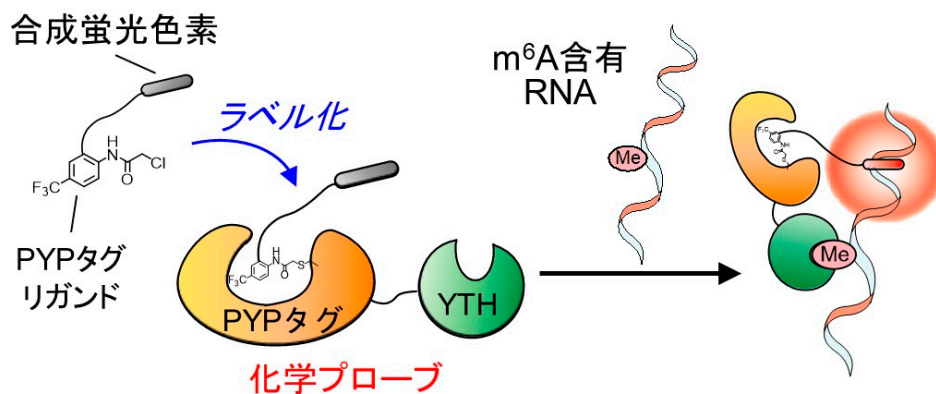


【目的】 近年、RNA 修飾のうち、*N*6 位がメチル化されたアデノシン (m^6A) が RNA の動態や安定性に影響し、翻訳やシグナル伝達を制御することが報告された。そのメチル化レベルの異常は、癌や生活習慣病などの種々の疾病に関与することが明らかになりつつある。一方、癌細胞では、癌種の違いにより、 m^6A メチル化が亢進される場合もあれば抑制される場合もあり、 m^6A 含有 RNA がいかんして癌化に関わっているかは、未だ不明な点が多い。このため、 m^6A 含有 RNA の簡便かつ精密な検出技術の開発は、 m^6A 含有 RNA の関わる生命現象の解明と疾病の診断や創薬において、極めて重要な課題となっている。そこで、本研究では、この問題を解決するために、化学原理を精査して分子設計することで、 m^6A 含有 RNA に結合すると蛍光強度が上昇する「化学プローブ」を開発し、このプローブの *in vitro* における蛍光特性を評価するとともに、生細胞イメージングを行う。

【方法】 目的とする化学プローブは、次の 3 つの部位から構成されるように設計した。1 つは m^6A に結合する YTHDF2 由来の YTH ドメインであり、もう 1 つは RNA と相互作用し蛍光強度を上昇させる合成核酸結合色素であり、最後の 1 つはタグタンパク質 PYP である。我々は、PYP タグとそのリガンドを利用して標的タンパク質に合成色素を特異的に導入するタンパク質ラベル化法を開発してきた。本研究では、このラベル化法を利用して YTH ドメインに PYP タグを介して合成核酸結合色素を導入し、*in vitro* および細胞内で化学プローブを構築した。化学プローブの RNA 結合特性や蛍光特性を調べ、細胞内構築を行った後、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

【結果】 PYP タグリガンドと合成核酸結合色素を連結したラベル化分子を YTH と PYP タグ変異体の融合タンパク質 YTH-PYP 変異体とインキュベートしゲル電気泳動法にて解析したところ、YTH-PYP 変異体に色素が導入されることが確認され、*in vitro* にて化学プローブが構築できることが分かった。この化学プローブと m^6A 含有 RNA をインキュベートして、蛍光強度を測定したところ蛍光強度の上昇が見られた。一方、 m^6A 非含有 RNA と反応させたときも、同程度に蛍光強度が上昇した。そこで、YTH および PYP に変異を導入し最適化すると、 m^6A 非含有 RNA 反応時の蛍光強度が低下することが示された。次に、YTH-PYP 変異体を細胞で発現させ、ラベル化分子を添加しインキュベートしたところ、細胞内から蛍光が観測され、細胞内においても化学プローブを構築できることが示された。さらには、その蛍光が RNA に由来することが分かった。以上の研究により、本研究では、タンパク質と合成色素からなる新しいタイプの化学プローブを細胞内で構築し、RNA を可視化することが可能となった。

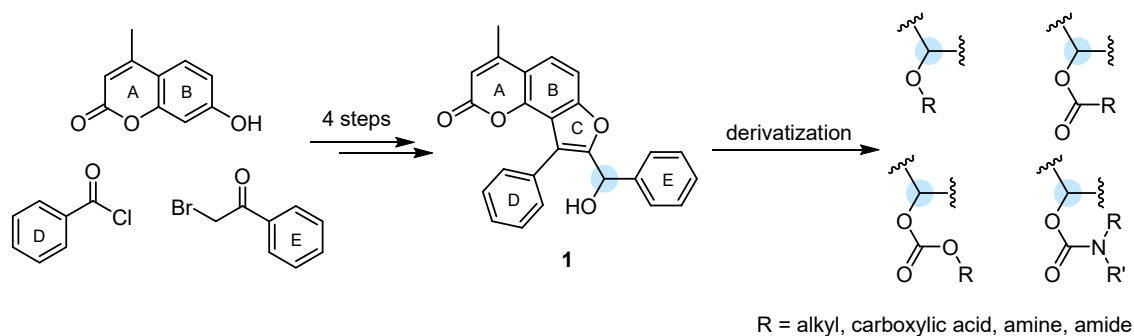
化学プローブのメチル化 RNA 検出原理



【目的】 ジヒドロオロト酸脱水素酵素 (DHODH) は、*de novo* ピリミジン生合成に関わる酵素であり、抗がん剤や免疫抑制剤などの開発のターゲットとして近年注目を集めている。これまでに、約 20,000 種の天然物および非天然物を含む化合物ライブラリー (RIKEN NPDepo) を使った一連のスクリーニングを行うことで、強力な DHODH 阻害活性 (IC_{50} 3.9 nM) を示す化合物 **1** を新たに見出すことに成功した。植物代謝産物に見られるようなフロクマリン構造を含む **1** は既知化合物であったが、DHODH 阻害活性に関する報告例は無く、我々は、**1** をシードとして新規な DHODH 阻害剤の開発が可能と期待した。しかしながら、細胞系やマウスを用いた *in vivo* での実験において化合物 **1** が溶解性や代謝安定性などに問題を抱えていることが明らかになった。そこで本研究では、化合物 **1** の薬物動態の改善を目的として、類縁体合成と生物活性評価による構造最適化を検討することとした。

【方法】 化合物 **1** とヒトの DHODH との共結晶構造を解析したところ、基質・酵素結合部位において、化合物 **1** の二級水酸基の水素結合形成が阻害活性に寄与していることが示唆された。そこで今回、**1** の二級水酸基を足掛かりとして側鎖を導入した類縁体をいくつか合成し、それぞれについて構造活性相関を調べることにした。

【結果】 はじめに二級水酸基と側鎖との結合様式が異なる類縁体を合成し、それらの *in vitro* での DHODH 阻害活性試験を行ったところ、アルキルエーテル体やアルキルエステル体は全く阻害活性を示さなかった。一方で、炭酸エステル体やカルバミン酸エステル体は IC_{50} 数十～数百 nM で阻害活性を示すことがわかった。これらに対し、細胞毒性を指標とした活性評価では、いくつかの類縁体が *in vitro* よりも低濃度で活性を示すことが明らかとなった。以上のことは、化合物 **1** の薬物動態改善の方針の **1** つとして、二級水酸基を足掛かりとしたプロドラッグ化が有効であることを支持する結果である。現在、さらなる構造最適化を検討中である。

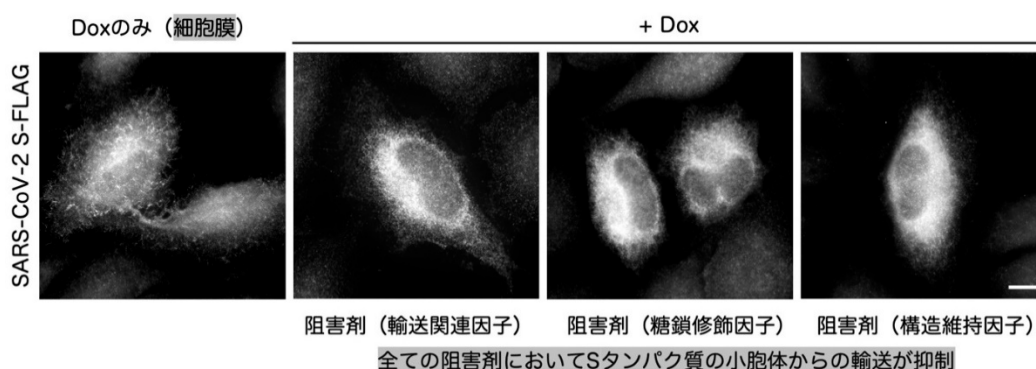
化合物 **1** の化学構造と合成ルート

【目的】新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) を含む全てのウイルスは、自身のタンパク質の合成やウイルス粒子の形成といった自己複製の全てのプロセスを宿主細胞の機能に依存している。SARS-CoV-2 は、4 個の構造タンパク質と 22 個の非構造タンパク質をコードする遺伝子を保有していると推測されており、ウイルス粒子の形成において、構造タンパク質である『spike (S) /membrane (M) /envelope (E)』の 3 つのタンパク質が中心的な役割を担っている。そして、宿主細胞内で合成された S/M/E タンパク質が小胞体から目的地へと適切に輸送されることがウイルス粒子形成に必須となる。それゆえ、これらタンパク質の宿主細胞内での挙動 (どの輸送経路で目的地へと輸送され、その過程でどの宿主因子を利用するか) を明らかにすることは、宿主細胞内における SARS-CoV-2 ウイルス粒子形成機構の理解に役立つことが期待される。なお、興味深いことに細胞内で一過的に発現させた各タンパク質は「全て」異なる局在を示す (S タンパク質: 細胞膜様局在、M タンパク質: ゴルジ体様局在、E タンパク質: 核近傍凝集様局在) ことから、各々のタンパク質は『異なる輸送機構』を介して目的地へと運搬されていると考えられる。

【方法】細胞内を輸送されるタンパク質を一過的に発現させた場合、解析時には発現させたタンパク質は既に目的地へと到達していることから、本手法では発現させたタンパク質が目的地へと移行する課程をモニターすることは不可能となる。そこで、SARS-CoV-2 S/M/E タンパク質の発現を薬剤によって誘導することにより、小胞体に留めるシステムを構築し、小胞体に留めた当該タンパク質を同調的に小胞体から目的地へと輸送させる系を樹立した。更に、目的地へと輸送される際に結合する宿主因子の網羅的探索を行った。

【結果】これまで、FLAG タグを融合させた S/M タンパク質の発現を抗生物質であるドキシサイクリン (Dox) によって誘導できるシステムを樹立し、Dox と共にブレフェルジン A (BFA: 小胞体からのタンパク質輸送を阻害する薬剤) を添加することで、発現させたタンパク質を小胞体に留めることに成功した。BFA の薬効は可逆的であることから、培地中から BFA を除去すると、その薬効が消失し小胞体からの輸送が回復することが知られている。そこで、Dox と BFA 処理により小胞体に留めておいた S/M タンパク質の挙動が BFA 除去によりどのような変化を示すかを確認したところ、BFA 除去後、時間経過に応じた局在変化を介して目的地へと輸送されることを明らかにした。更には、局在を変化させる過程において結合する宿主因子の網羅的探索を行ったところ、S タンパク質においては、「細胞内輸送制御」に関連したタンパク質のみならず、「糖鎖修飾」や「構造維持」に関連した複数のタンパク質が同定された。また、本解析によって S タンパク質との結合が示唆された宿主因子の阻害剤が S タンパク質の細胞内輸送を抑制する可能性を示す結果も得た。一方、M タンパク質に関しては、細胞内の様々な輸送経路 (小胞体とゴルジ体間の輸送・ゴルジ体層板間の輸送・ゴルジ体以降の複数経路の輸送) を制御する因子が多数同定された。

S タンパク質と結合する宿主因子の阻害が S タンパク質の輸送に及ぼす影響



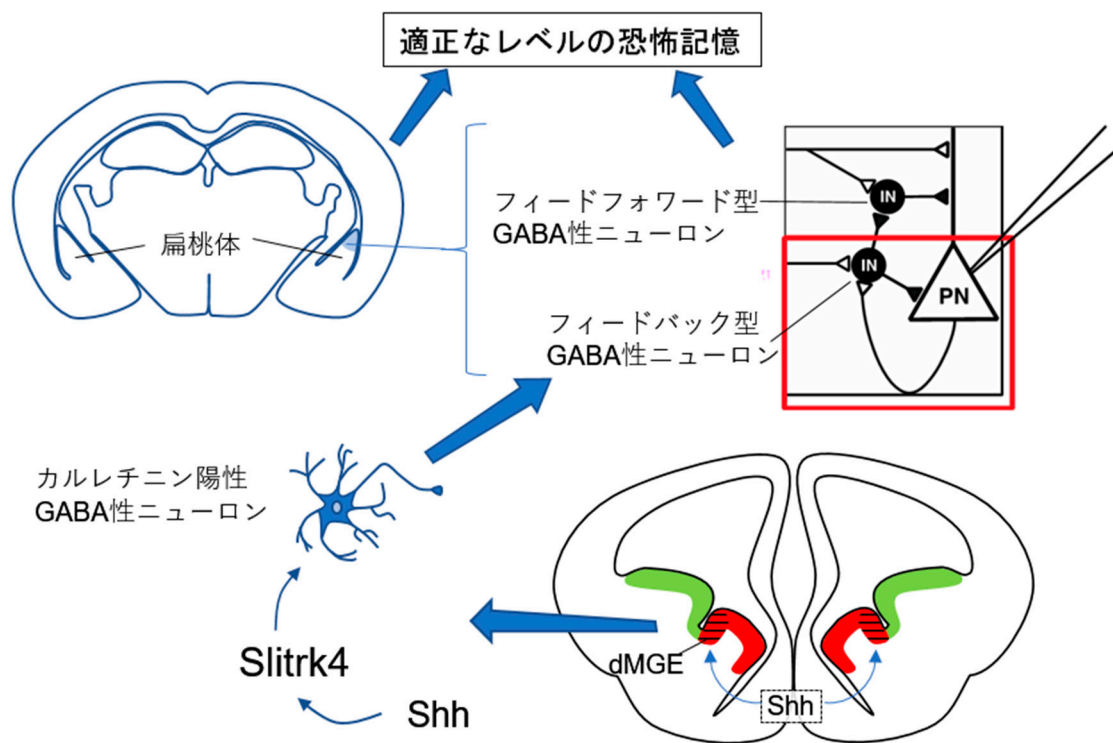
16	Slitrkによるモノアミン神経系制御の病態生理学的意義	有賀 純
----	------------------------------	------

【目的】 6種類のLRR (Leucine-Rich Repeat) 膜貫通タンパク質よりなる Slitrk ファミリーは中枢神経系の神経突起の伸展制御、シナプス形成およびシナプス機能維持において重要な役割を持つことが知られている。最近、我々は Slitrk ファミリータンパク質がモノアミン性ニューロンを含む神経系の発達制御を行う可能性を見出した。今回は Slitrk ファミリーの1つである Slitrk4 を欠損するマウスについて、神経発達の異常という観点から解析を行うことにした。

【方法】 独自に作製した *Slitrk4* 欠損マウスに対して、恐怖条件付け実験を含む系統的行動解析、扁桃体スライスを用いた電気生理学的解析、免疫染色解析、定量的PCRや *in situ* ハイブリダイゼーションによる分子マーカー解析などを行った。野生型および *Slitrk4* 欠損型のES細胞からGABA性ニューロンを誘導して、カルレチニンやソマトスタチンなどのGABA性ニューロンサブタイプマーカータンパク質のウェスタンブロットによる定量解析を行った。

【結果】 *Slitrk4* 欠損マウスでは恐怖記憶の獲得能、扁桃体のシナプス可塑性が増強していることが明らかになった。扁桃体のフィードバック制御を行うGABA性ニューロンのサブタイプの発生不全が生じており、このことが恐怖記憶の関連した行動異常の背景にあるものと考えられた。ES細胞から *in vitro* で神経分化を起こさせる実験系で、ソニックヘッジホッグシグナルを強める試薬を作用させたところ、Slitrk4を持つ細胞と持たない細胞の間では産み出されたGABA性ニューロンの種類が異なっていた。以上の結果から、*Slitrk4* 欠損マウスではフィードバックニューロンの発生不全のため、扁桃体のシナプスの可塑性が変化し、恐怖記憶が強く形成されるようになるものと考えられた。近年、心的外傷後ストレス障害 (PTSD) 患者でSLITRK4の発現に変化があるという報告があり、本研究の研究成果はPTSDの病態の理解や治療法の改善に貢献するものと期待された。

Slitrk4はフィードバックニューロンの発生制御を通じて適正なレベルの恐怖記憶の成り立ちに寄与する

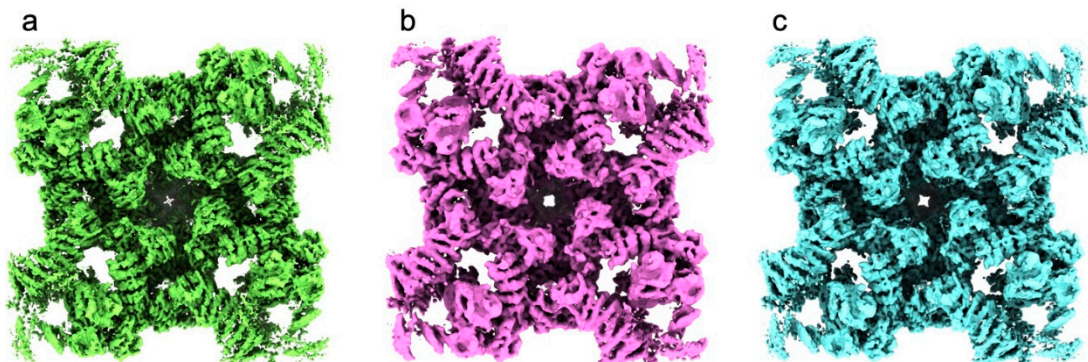


【目的】 2型リアノジン受容体 (RyR2) は、心筋の筋小胞体に局在する超巨大な小胞体 Ca^{2+} チャネルである (総分子量 2.2MDa)。活動電位によって細胞外から細胞質へ流入した Ca^{2+} が RyR2 に結合することで RyR2 が開口し、筋小胞体に蓄えられた Ca^{2+} が瞬時に細胞質内へ大量に放出され心筋の収縮が起こる。RyR2 の遺伝子変異は 300 箇所以上報告されており、致命的な不整脈疾患としても知られるカテコラミン誘発多形心室頻脈 (CPVT) 等の原因としても知られているため、RyR2 は不整脈疾患の標的分子としても注目を集めている。我々は長年 RyR の機能・構造解析に取り組み、2022 年についてクライオ電子顕微鏡法 (cryo-EM) による「閉じた状態 (Ca^{2+} 無し)」と「開いた状態 (Ca^{2+} 有り)」の構造の高分解能での構造解析に成功した。徹底的な機能解析実験を組み合わせることで、RyR2 の Ca^{2+} 結合による開口機構を原子レベルで明らかにすることに世界で初めて成功した。更に Ca^{2+} が結合してもチャネルが開口できない「機能欠失型の変異体」の構造解析も行うことで、変異がチャネル開口に及ぼす機構の解明に大きく前進した。その一方で「機能亢進型の変異体」が機能を亢進する機構については不明点が多く、その高分解能での構造情報が期待されていたので、これを本研究の最終目標とした。

【方法】 我々がこれまでに培ってきた HEK293 細胞による大量発現・精製系を用いて機能亢進型変異を持つ RyR2 の試料調製を行った。大量生産は樹立した RyR2 を大量発現する細胞株を 150 mm の細胞培養ディッシュ 60 枚で定期的に培養を行った。細胞を回収しミクロソームを単離後、変異 RyR2 を界面活性剤で可溶化し、RyR2 に特異的に結合する FKBP12.6 を利用したアフィニティークロマトグラフィーにより精製を行った。精製標品は濃縮し、EGTA または CaCl_2 を加えることでチャネルを閉状態または開状態に固定した。その後液体エタンで急速凍結し、クライオ電顕による movie の撮影を行った。撮影した movie の解析を行い、3 次元再構成を行い、得られた密度マップをもとに原子モデルを構築し、構造精密化を行うことで最終構造を得た。

【結果】 膜貫通ヘリックス S4 上部に位置する F4749A と Ca^{2+} の結合に関与する CTD に位置する F4888A と変異箇所異なる 2 種類の機能亢進変異体の発現・精製に成功した。濃縮した精製標品をクライオ電顕で観察し、F4749A 変異体については EGTA 存在下で 5,085 枚、 Ca^{2+} 存在下で 4,680 枚を、F4888A では EGTA 存在下で 5,238 枚、 Ca^{2+} 存在下で 2,007 枚の movie の撮影を行った。解析プログラム CryoSPARC を用いて、分解能が 3~4Å とアミノ酸側鎖を十分解像可能な分解能での 3 次元密度マップを再構築することに成功した。得られた密度マップをもとに原子モデルを構築し、構造精密化を行った。

クライオ電顕で解析された RyR2 機能亢進変異体の密度マップ



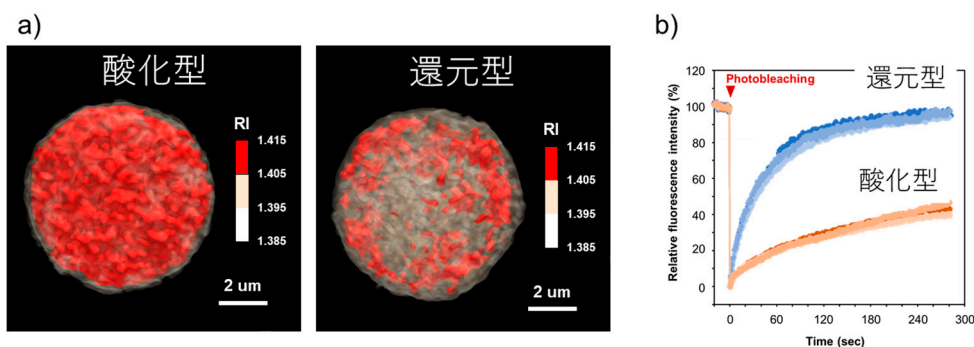
18 酸化ストレスにตอบสนองする小胞体内液液相分離形成の理解	奥村 正樹
--	--------------

【目的】 我々は小胞体内に存在する酵素・シャペロン群である Protein Disulfide Isomerase (PDI) ファミリーによるタンパク質品質管理機構の解明に取り組み、小胞体内における複雑かつ精巧なタンパク質品質管理ネットワークを提示した。さらに、20種類以上もの PDI ファミリーの中から相分離する酸化還元酵素・シャペロン P5 を発見し、小胞体内タンパク質品質管理顆粒であることを突き止めた。さらに、準備研究から過酸化水素依存的に P5 の相分離が惹起された。そこで本研究では、これまで我々が発見した小胞体内顆粒研究において、小胞体内顆粒形成に関わる活性酸素種 (ROS) や活性窒素種 (RNS) の特定に取り組み、酸化還元依存的相分離の理解に繋げることを目的とした。さらに、酸化ストレスによる顆粒への影響を見積るだけでなく、顆粒形成因子である P5 の酵素機能回復や活性亢進を目的とした低分子化合物の開発を進めることも目的とした。

【方法】 酸化還元による P5 の相分離の機序の理解について、屈折率および蛍光を装備するホログラフィック顕微鏡による相分離内部の分子 packing 評価、またラマン分光による相分離内部の評価、NMR による相分離内部の分子構造解析を行った。さらに、各種 ROS/RNS による相分離への影響も調べた。小胞体内相分離因子 P5 の機能評価は、基質としてプロインスリンの酸化的フォールディング触媒能を逆相 HPLC および MALDI-TOF/MS で評価した。さらに、細胞を用い、カルシウムポンプの阻害剤である thapsigargin (TG) によるカルシウム枯渇からの回復時、内在性 P5 の foci 形成を顕微鏡下で可視化した。また試験管内検索に基づき特定した ROS/RNS を小胞体内で過剰に発生させることで、小胞体内顆粒形成を位相差顕微鏡で検証した。さらに、ストレス顆粒形成による P5 の酵素機能回復や活性亢進剤の薬剤開発として、その触媒活性部位であるチオール官能基の反応性を上昇させる新規酸化還元低分子 N-メチル化ピリジニルメタンチオール (pMePySH) を用いた。pMePySH 存在下で、P5 による酸化的フォールディング触媒能を逆相 HPLC および MALDI-TOF/MS で評価した。基質として牛膝臓トリプシン阻害酵素とプロインスリンを採用した。

【結果】 P5 は酸化還元状態に応じて、内部の packing 状態が違い、酸化型の方がより密に packing されることがわかった。それにより、酸化型の方が還元型よりも流動性が低いことがわかった。NMR による構造解析の結果、P5 相分離における酸化還元状態における構造変化を捉えることに成功し、相分離駆動に不可欠な領域の特定にも至った。P5 顆粒の機能の理解に関して、試験管内の実験において本顆粒が酸化的フォールディングを触媒するスーパーエンハンサーとしての化学触媒反応場であることを突き止めた。細胞内検証において、U2OS 細胞を用いて、細胞内 foci を可視化することが出来、現在論文投稿中である。また、試験管内実験の結果から、過酸化水素と一酸化窒素は液滴内部の packing 状態を密に上昇させることがわかり、化学修飾部位を特定し、その構造変化を追うことが出来た。過酸化により生じた顆粒は、基質取込量が減った。これは基質取込量の capacity の低下を意味しており、酸化ストレスによってタンパク質品質管理顆粒から機能破綻したストレス顆粒へと変化することを示唆した。さらに、P5 酵素の酸化還元触媒モチーフを介した活性亢進調節に成功した。今後の P5 のストレス顆粒に関わる疾患に対峙する創薬への応用が考えられる。

小胞体局在因子による相分離が酸化還元によって制御されている

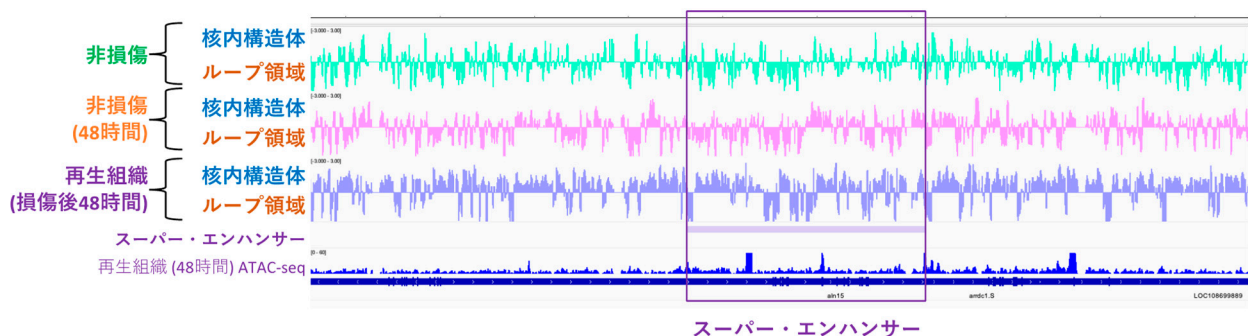


【目的】 これまでに我々は、腎組織の再生メカニズムの解明を目的として網羅的オープンクロマチン解析 (ATAC-seq) とエピゲノム解析 (ChiP-seq) を行い、クロマチンが閉じた状態から再生を開始させるためには、Kruppel-like factors (KLF) ファミリーの属する KLF15 とその標的遺伝子のアドレナリン受容体が鍵であること、アドレナリン受容体の作動薬を損傷後の腎組織に作用させると再生が促進されることを発見した (Suzuki N., PNAS, 2022)。この研究では標的遺伝子として、Sin3A Associated Protein 25 (SAP25) や H1.5 linker histone (h1-5) など、エピゲノム制御に関わる遺伝子が含まれることも示している。なかでも SAP25 は、抑制型クロマチン構造を形成する転写因子 Sin3A と直接結合するだけでなく、ストレスシグナル依存的に KLF 型の転写因子と共に核内構造体のひとつ promyelocytic leukemia protein (PML) 核内ボディに局在することが知られている。PML ボディは、抗ウイルス応答、DNA ダメージ応答、アポトーシス、老化などの細胞ストレスを感知し遺伝子の発現を制御する足場として働くことが知られており、近年は液-液相分離で形成されるメンブレンレス核オルガネラの1つであることが指摘されている。これら状況を鑑みるに我々が発見した、クロマチンオープニング因子 KLF やその標的遺伝子である SAP25 は、組織損傷によるストレスシグナルにより損傷応答・再生エンハンサーに結合するとともに、PML ボディなど液-液相分離で形成される核内構造体を介して、組織再生へと導く可能性を示唆するものである。しかしながら、組織再生における核内構造体の役割や損傷応答・再生エンハンサーが集積する意義については明らかになっていない。そこで本研究課題では、我々が発見した再生促進遺伝子 KLF15 の標的遺伝子 SAP25・Sin3a 複合体を起点として、損傷シグナルから、再生可否の決定、再生へと導くまでの再生初期段階における PML ボディを含む核内構造体の役割の解明を目的として行った。

【方法】 腎組織再生においていずれのゲノム領域が核構造体集積するのか明らかにするために、High-salt-recovered-sequence (HRS-seq/nuclear body-associated genomic sequences) を行った。腎組織の再生を生体イメージングできる Xla.Tg (Xtr.pax8:EGFP) トランスジェニック系統を用いて、損傷を与える前の近位尿管領域の組織、再生中の組織、損傷を与えずに 48 時間培養した組織をそれぞれ採取した。また、損傷ストレス・再生特異的なスプライシングバリエーションならびにイントロン残留型前駆体 mRNA の同定を目的として、ロングリード RNA-sequence (ISO-seq) を行った。

【結果】 HRS-seq の解析により、損傷ストレス・再生特異的に核構造体集積するゲノム領域を同定した。さらにスーパー・エンハンサー領域との比較を行ったところ、スーパー・エンハンサー領域のなかでも特定の領域が核内構造体集積する傾向があることがわかった。また、ISO-seq の解析により、損傷ストレス・再生依存的なスプライシングバリエーション、イントロン残留型 mRNA 前駆体と予想される転写産物が認められた。

損傷ストレス・再生依存的に核内構造体集積するゲノム領域の同定

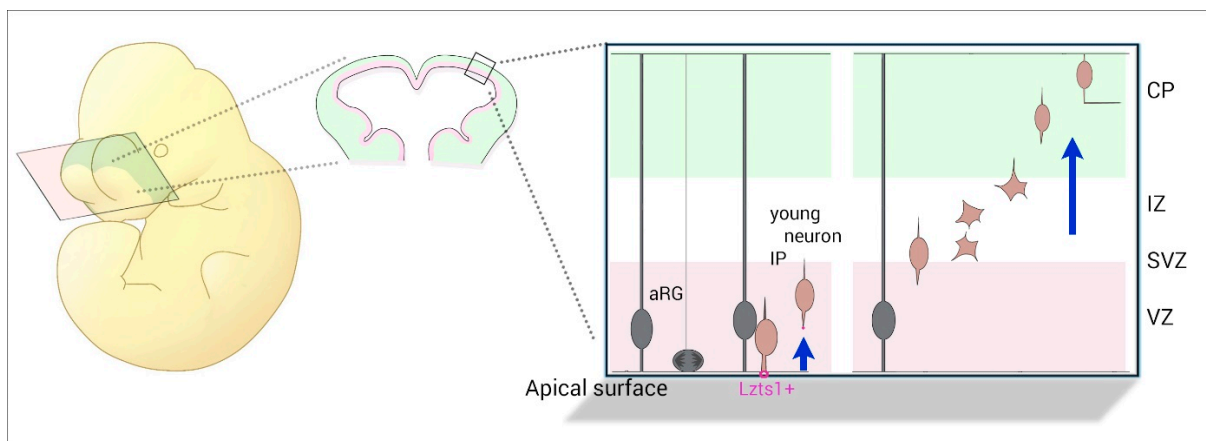


【目的】 生物種に応じた多様な組織形態を示す脳も、もとは一層の神経上皮から生じる。脳室面側で未分化な神経前駆細胞（放射状グリア：radial glia あるいは apical radial glia：aRG）の分裂により誕生したニューロン系分化細胞（young neuron と中間前駆細胞 IP）は、脳室面にある上皮細胞の頂端側の細胞接着構造から離脱し、脳表面側へと向けた移動を開始する。微小管関連分子 Lzts1（Leucine zipper tumor suppressor 1）は分化細胞の apical 側アドヘレンス・ジャンクションに局在しこの細胞離脱に際して実行役分子として働く。Lzts1 による細胞離脱は上皮間葉転換（EMT）の一種とも捉えることができるが、同様のメカニズムは、脳の発生だけでなく、他の組織・器官の発生過程で観察される EMT も制御している可能性がある。Lzts1 の作用、例えばアクトミオシン系の活性化は線維芽細胞株（NIH3T3）でも確認されることから、少なくとも一部の Lzts1 の下流の分子機構には普遍性があることが示唆される。そこで本研究では、幼若ニューロンの離脱と同様の機構が、細胞移動、あるいは、EMT として知られる他組織における類似の現象にも関与しているのかを明らかにするため、発生過程でどのような細胞が Lzts1 を発現しているのかを検討した。また、Lzts1 が細胞離脱だけでなく細胞移動の制御にも関わっているかを大脳皮質ニューロンの移動に注目して評価した。さらに Lzts1 の細胞離脱・細胞移動での細胞内分子機構を明らかにするためにヒト培養細胞株を用いた実験モデルの樹立を試みた。

【方法】 胎生中期マウスを用いて器官形成時における各組織における Lzts1 発現・局在を免疫組織学的に評価した。また発生時期の脳については子宮内エレクトロポレーション法を用いた *de novo* ゲノム編集を介した Lzts1 ノックアウトによる Loss-of-function 型の機能実験を行い、Lzts1 ノックアウトが大脳皮質ニューロンの移動と配置に与える影響を評価した。さらにヒト由来各種細胞株を使用して蛍光タンパク融合型 Lzts1 の発現誘導と内在性の Lzts1 局在を検討した。

【結果】 器官形成時における各組織における Lzts1 発現・局在を免疫組織学的な手法により評価し、腸管壁の筋層内を移動中の腸管神経系前駆細胞など、中枢神経系以外の一部組織でも Lzts1 が発現していることを見出した。また発生時期の脳では、Lzts1 が幼若ニューロン分化細胞の離脱を制御しているだけでなく、離脱後の正確なニューロン配置の制御においても必要であることを確認した。あわせて、Lzts1 による特徴的な細胞離脱および移動をもたらす細胞内分子機構について検証するためのヒト由来細胞株実験モデルを確立した。これにより、今後これらの実験モデルを使用して、Lzts1 の発現変化が細胞骨格および接着状態の動態に及ぼす影響と器官形成におけるその機能を評価することが可能となった。

Lzts1 は神経上皮構造から分化細胞が離脱する際の実行役分子である



21 子宮体癌の免疫回避に関わるゲノム異常の探索

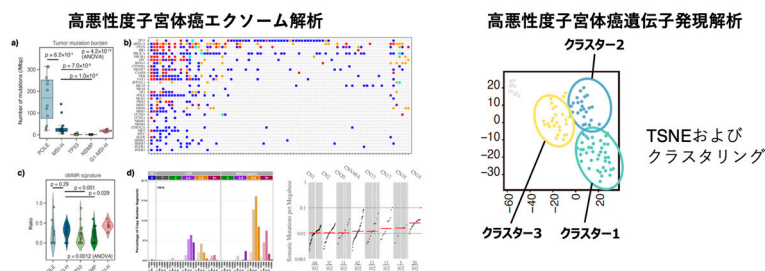
河津 正人

【目的】 近年、免疫チェックポイント阻害剤のがん治療における有用性が着目されており、とくにマイクロサテライト不安定性の高い (MSI-H) 腫瘍で効果的である。しかし、免疫チェックポイント阻害剤が有効でない症例もあり、その耐性機序に応じて必要な薬剤と組み合わせるなどの対策が必要である。MSI-H 腫瘍は様々ながん種に見られ、特に大腸癌と子宮体癌で頻度が高いが、同じ MSI-H 腫瘍でも、臓器によって抗腫瘍免疫の状態が異なり、臓器やがんの組織型に応じた治療戦略を考える必要がある。したがって、抗腫瘍免疫応答性を規定する因子の同定や、臓器や組織型による違いの分子的機構の解明は、がん種やその組織型に応じて最適化された治療法開発につながることを期待される。子宮体癌の発生率は近年増加しており、若年層でも増加傾向が見られる。従来、エストロゲン依存性であるタイプ I と非依存性であるタイプ II に分類されてきたが、近年はゲノム解析の結果に基づいて、4 つの異なるゲノムサブタイプに分類して理解されるようになった。しかし、これらのゲノムサブタイプと子宮体癌の組織学的分類との関連については、まだ理解が十分に進んでいない。これらのゲノム異常のがん発生過程における役割や、免疫応答性や特徴的な組織形態との正確な関連は未解明である。ゲノム異常と組織学的分類と免疫応答性の相互の関連を解明するために、特に高悪性度子宮体癌に焦点を当てたゲノム解析を実施した。

【方法】 非類内膜癌および Grade 3 類内膜癌 (EMG3) を含む、タイプ II に分類される 81 個の高悪性度子宮体癌を対象とした。組織診断は、ゲノム解析の結果を知らされていない病理医により判定された。ゲノム異常を検出するためにエクソーム配列解析を行い、変異検出の後に、変異シグネチャー解析、染色体コピー数解析、および染色体コピー数シグネチャー解析を行った。エクソーム解析の結果に基づき「ゲノム」サブタイプを判定した。また、網羅的遺伝子発現解析を行い、細胞表現型の解析を行い、CD8 陽性細胞の免疫染色およびその計測により、抗腫瘍免疫状態を評価した。

【結果】 ゲノム異常に基づくサブタイプ分類によって、*POLE* 変異により高度に変異が蓄積する「POLE 型」が 12 例、マイクロサテライト不安定性の高い「MSI-H 型」が 12 例、*TP53* 変異により染色体コピー数異常が顕著に見られる「TP53 型」が 35 例、これらの特徴を持たない「特定の分子プロファイルを持たない型」(NSMP 型) が 20 例同定された。ゲノム分類は必ずしも組織型や免疫応答性との対応が明確でなかったため、遺伝子発現プロファイルに基づいたクラスター分類を行い、3 つの腫瘍クラスターを同定した。クラスター 1 においては、免疫応答性に関わるシグナル伝達系の活性化が見られ、一方クラスター 2 には「MSI-H 型」が多く含まれ腫瘍抗原が多くなっていた。腫瘍抗原量と免疫応答性に関わるシグナル伝達系の活性が一致していない点が、大腸癌との大きな相違点であると考えられた。

本研究の概要



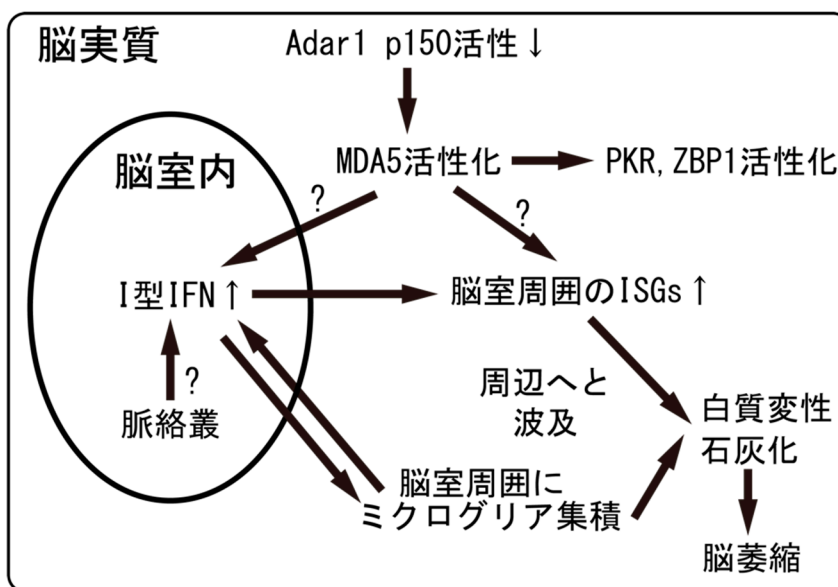
MSI-H子宮体癌とMSI-H大腸癌の違いについての仮説

	ミスマッチ修復	免疫チェックポイント阻害剤	ネオ抗原	免疫応答反応
大腸癌	ミスマッチ修復障害	◎	多い	高い
	ミスマッチ修復正常	×	少ない	低い
子宮体癌	ミスマッチ修復障害	○	多い	低い
	ミスマッチ修復正常	△	少ない	高い

【目的】 2本鎖RNA中のアデノシンをイノシンへと置換するRNA編集は、自己2本鎖RNAが異物と誤認されることを回避するために必須のマーキングである。哺乳類において、このRNA編集を触媒している酵素がADAR1 p150である。ADAR1 p150欠損マウスにおいては、2本鎖RNAセンサー分子であるMDA5が活性化し、I型インターフェロン（IFN）の過剰産生などを伴って胎生致死を呈する。一方、*ADAR1*の遺伝子変異は、エカルディ・グティエール症候群（AGS）と呼ばれるI型IFNの過剰産生と脳症を主症状とする自己免疫性脳症の原因の一つとして同定されている。白質変性、頭蓋内石灰化、脳萎縮、脳室拡大などを伴って精神遅滞や運動発達障害を呈し、多くは10歳未満で亡くなる。しかし、AGSで脳症に至る機構は不明であり、他のAGS原因遺伝子を含めて、これまで脳症を再現するモデルがないことが病態解明の障壁となってきた。我々は、ADAR1 p150のZαドメインにW197A点変異を挿入（KI）することで、マウスにAGS様脳症を再現できることを明らかにした（Nakahama et al, *Immunity*, 2021）。本マウスではADAR1 p150のRNA編集活性が低下しており、MDA5を同時欠損させると脳症が顕著に改善することも見いだした。しかし、本病態の形成メカニズムやMDA5活性化以降の分子メカニズムは不明である。そこで本研究では、*Adar1* (W197A) KIマウスに認められる脳症を詳細に解析し、MDA5の活性化により発現上昇するPKRやZBP1を同時欠損させて脳症への影響を評価することで、AGS様脳症の発症機構を解明することを目的として実施した。

【方法および結果】 *Adar1* (W197A) KIマウスを長期間観察し、最長7ヶ月まで生存できることを見いだした。6ヶ月齢で病理解析を行ったところ、著明な白質変性と脳室拡大を認めた。脳実質内の石灰化も検出された。脳室においては、脈絡叢と上皮細胞が脱落と再生を繰り返しており、ミクログリアの集積を認めた。RNA-seq解析をすると、IFN誘導遺伝子群（ISGs）の著明な発現上昇が認められたが、空間トランスクリプトーム解析を行うと、特に脳室周囲で顕著であることが分かった。これらの結果は、脳室内でI型IFNの過剰産生が生じていることを示唆しているものと考えられた。次に、*Adar1* (W197A) マウスとPKRまたはZBP1欠損マウスを交配したところ、生存率や成長障害が著明に改善し、MDA5欠損マウスと交配した場合と同程度に回復した。しかし、病理解析を行ったところ脳症は全く改善しておらず、ISGsも発現が上昇したままであることが判明した。これらの結果からは、PKRやZBP1は脳症形成には直接関与しておらず、生存率や成長障害の改善は脳症以外に要因があると考察された。

ADAR1 p150の活性低下によるAGS様脳症発症機構

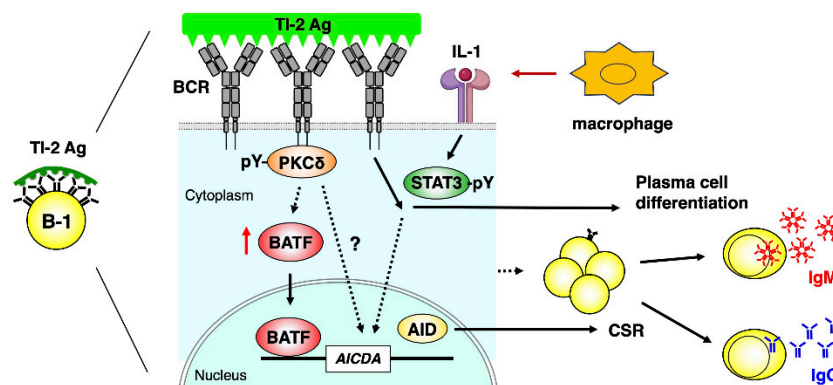


【目的】肺炎球菌やサルモネラ菌に対する液性免疫応答は主にT細胞非依存性2型(TI-2)応答であり、その感染防御に重要である。TI-2応答は莢膜多糖体のような多価抗原によるB細胞受容体(BCR)の高度な架橋により引き起こされるとされていたが、私たちが確立した*in vitro*のTI-2応答系により、TI-2抗原に加えてIL-1の共刺激が抗体産生に必要であることを見出した。また、TI-2応答において抗原刺激によりリン酸化されるPKC δ がBTFを介してAIDの発現、クラススイッチ組換え(CSR)、IgG産生を誘導することを明らかにした。しかし、AIDの十分な発現にはBTF以外の因子が関与することも分かった。AIDの発現およびCSRの誘導にはIL-1の共刺激が必要であったため、この共刺激シグナルの作用機序の解明を目的として研究を行った。

【方法】TI-2応答においてB細胞上のIL-1受容体やSTAT3が必要かどうかを検証するために、IL-1RAcP欠損マウスおよびB細胞特異的STAT3欠損マウス(CD19^{Cre/+}STAT3^{f/f})の解析を行った。また、それらの腹腔B細胞あるいは脾臓辺縁帯B細胞を、卵白アルブミン特異的BCRのみ有するHy10マウスあるいはB細胞を欠損する μ MTマウスに移入した後、NP-Ficollを腹腔あるいは静脈より免疫し、その後、経時的に採血してNP特異的IgMおよびIgGをELISA法により測定した。*In vitro*の実験系では、主にNP特異的BCRのみを発現する*B1-8-ki Igk*^{-/-}マウスの脾臓または腹腔のB細胞を用い、NP-Ficoll単独あるいはNP-Ficollに腹腔マクロファージやIL-1 α を追加して培養した後、シグナル伝達分子についてはウェスタンブロット法により解析し、抗体産生については上清中のIgM・IgGをELISAで測定し、B細胞の増殖・分化については予めCell Trace Violetで染色しておいたB細胞を培養後に各種抗体で染色しフローサイトメトリーで解析した。腹腔内あるいは培養後のマクロファージにおけるIL-1の産生についてはフローサイトメトリーにより調べた。

【結果】IL-1Rを構成するIL-1RAcPを欠損するマウスの腹腔B細胞を移入したマウスにNP-Ficollを腹腔免疫した結果、NP特異的IgMおよびIgGが産生されなかった。また、IL-1RAcP欠損辺縁帯B細胞を移入したマウスにNP-Ficollを経静脈的に免疫した場合はIgG産生のみ有意に低下した。以上より、B-1細胞あるいは辺縁帯B細胞がIL-1の刺激を受けることがそれぞれの*in vivo*でのTI-2応答に重要であることが分かった。また、TI-2応答において腹腔マクロファージがIL-1 α /IL-1 β の供給源であり、腹腔マクロファージを除去するとNP-Ficoll腹腔免疫による抗体産生が強く抑制された。さらに、TI-2抗原にIL-1を加えてB細胞を刺激するとSTAT3のチロシンリン酸化が選択的に誘導され、その阻害剤により形質細胞分化と抗体産生が抑制された。STAT3を欠損する腹腔B細胞あるいは辺縁帯B細胞はそれぞれ移入先のマウスにおいてNP-Ficoll免疫による抗体産生が障害されていた。以上の結果より、TI-2応答において腹腔B-1細胞のIgM・IgG産生と脾臓辺縁帯B細胞のIgG産生にはIL-1による共刺激とそれにより活性化されるSTAT3が必要であることが明らかになった。

T細胞非依存性抗原とIL-1によるクラススイッチと抗体産生の誘導



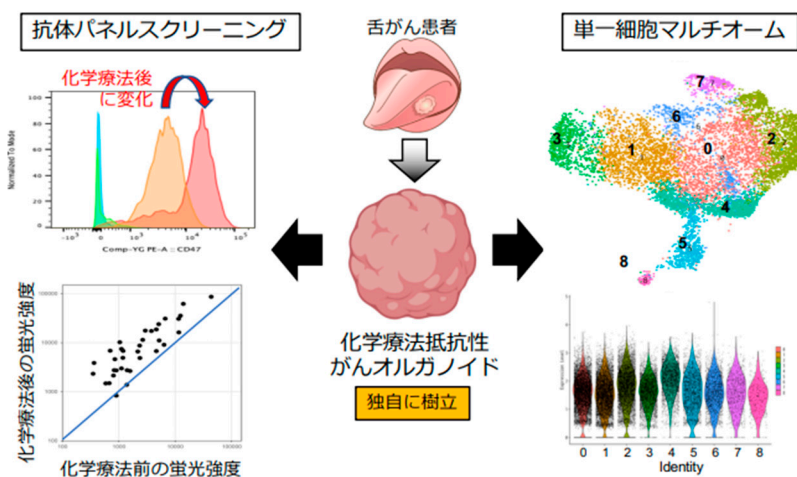
24 ヒト癌オルガノイドを用いた化学療法耐性癌幹細胞同定	佐藤 卓
-------------------------------------	-------------

【目的】 化学療法剤を用いた癌の臨床治療では、化学療法剤耐性のわずかな癌細胞が微小残存病変として生き残り、これらが原因となって癌が再発することが大きな課題である。したがって、この残存癌細胞が生じる分子基盤を解明し、それらを駆逐する手法を確立することができれば、多くの癌患者の救命に繋がる。化学療法剤の致死的ストレス下において癌細胞が生き延びる現象は「パーシスタンス」と呼ばれる。同現象は、化学療法剤に晒された癌細胞のうちのごく一部が偶発的、かつ一過的に抗癌剤耐性の性質を獲得する現象と理解されているが、現時点では、化学療法剤によって誘導されるパーシスタンスの分子基盤は不明である。最近、腫瘍内、さらに患者間の癌の不均一性を *in vitro* に再現しうる新たな非臨床ヒト癌モデルとして、「患者由来癌オルガノイド」の有用性が多くの癌種で示されている。我々もこれまでに、独自に確立した手法を用い、舌癌の患者腫瘍組織に由来する癌オルガノイド株を樹立している(論文投稿中)。興味深いことに、樹立した患者ごとの癌オルガノイド株は、化学療法剤に対する感受性が極めて多様であり、化学療法剤存在下で生き延びる癌細胞を、特に多く含むオルガノイド株を複数得ている。本研究では、パーシスタンス誘導の分子基盤解明を目指し、化学療法剤抵抗性のヒト扁平上皮癌オルガノイドモデルの解析から、パーシスタンスを担う細胞集団を同定する。

【方法】 本研究では、まず多様なヒト細胞表面抗原に対する抗体パネルを用い、化学療法剤抵抗性癌オルガノイド株に発現する細胞表面抗原、およびそれらの中で、化学療法剤処理後に生存するパーシスターに特徴的に濃縮される細胞表面抗原を探索した。一方、1細胞マルチオーム解析を実施し、癌オルガノイド中の化学療法剤抵抗性細胞集団の同定を試みた。

【結果】 すでに取得済みの癌オルガノイドの遺伝子発現データを参考に、実際にオルガノイドで発現されている可能性の高い細胞表面抗原を抗体パネルの中から選択した。それらの抗体を用い、化学療法剤耐性癌オルガノイドを構成する癌細胞のフローサイトメーター解析を行った。その結果、同オルガノイドの癌細胞に定常的に発現される分子および、それらの中で、化学療法剤処理後の細胞で発現亢進する複数の分子を見出した。しかしながら、いずれの抗体の染色でもオルガノイドを構成する癌細胞はほぼ均一に染色されており、特定の細胞集団を分画化できるような染色パターンは得られなかった。一方、単一細胞マルチオーム解析を実施し、パーシスタンスに関わることが予想される癌幹細胞集団の同定を試みたが、既知の癌幹細胞マーカー遺伝子を発現する特定の細胞クラスターを見いだすことはできなかった。現在、タイムラプスイメージングも合わせて用いることで、パーシスターに特徴的な「細胞表面分子の経時的発現変化」から同細胞を特定可能か検討中である。

患者由来癌オルガノイドを用いる化学療法剤パーシスター癌幹細胞の同定

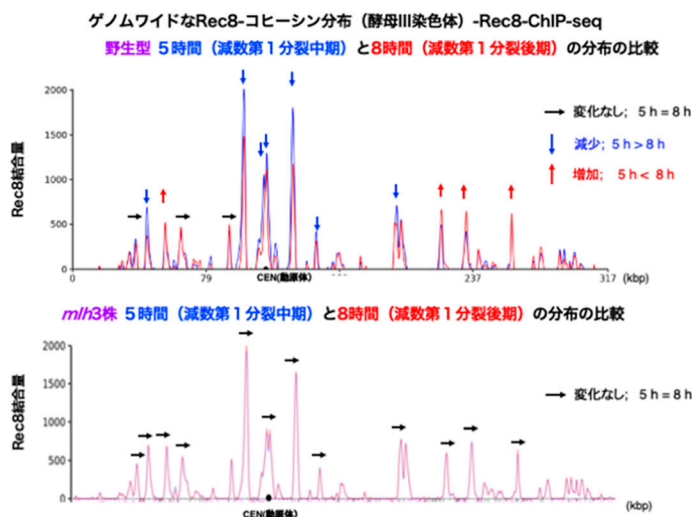


【目的】 生殖幹細胞から配偶子を生み出す減数分裂は特異的な染色体構造を形成することで、相同組換えなどの DNA 反応を制御する。減数分裂期の組換えはゲノムの多様性を生み出すばかりでなく、相同染色体の交換を促し、染色体間に物理的な結合（キアズマ）を作ることで減数第 1 分裂期の相同染色体の分配に必須になる。減数分裂期組換えは、染色体構造を介して、姉妹染色体ではなく、空間的に離れた相同染色体を組換えのパートナーとして選択し、キアズマになる交叉型組換え体の形成経路を選ぶ。染色体構造の基盤となるコヒーシンとして、減数分裂期では体細胞分裂期と異なるコヒーシン複合体（Rec8 コヒーシン）が働くことで、減数分裂期の特異性が生まれる。減数分裂期の染色体軸構造の構成要素になる Rec8 コヒーシンは、組換えのパートナーとして姉妹染色体ではなく、空間的に離れた相同染色体を選ぶ制御にも関わることが知られている。一方、どのような仕組みで Rec8 コヒーシンが染色体軸ループ構造形成や組換え反応を制御するのか、と云った減数分裂期の Rec8 コヒーシンの機能に関しては、その動態を含めて、完全には理解されていない。減数分裂期の染色体分配を含めた多くの反応に必須であるために、これまでコヒーシンは動原体・腕部に結合後は、非常に安定に結合すると考えられて来た。実際にヒト卵子ではその結合は数十年に渡ると言われている。一方、我々の研究 (Challa et al. PLoS Genetics, 2019) から、酵母の減数第 1 分裂中期の後半に減数分裂期特異的 Rec8 コヒーシンの約半分がセパレーズによる切断“非”依存的に染色体から解離することを明らかに出来た。この結果は、Rec8 コヒーシンが、減数分裂期中期ではより動的な挙動を取ることを示している。さらに、解離する Rec8 は約半分であることから、解離を保護する仕組みが局所的に存在することも示唆されている。

【方法】 減数分裂中期の Rec8 コヒーシンの染色体上の領域特異的な動態解析のため、免疫沈降-DNA シークエンス (ChIP-seq) によって、出芽酵母の減数分裂期細胞の Rec8 コヒーシンのゲノムワイドな結合分布を解析した。さらに、コヒーシンの切断非依存性の解離に対する減数分裂期の相同組換えの役割を知るために、減数分裂期組換えの開始反応に必要な SPO11 や組換え中間体の解離に必須の MLH3 の欠損株を用いて、ChIP-seq 方法で Rec8 の染色体上での分布も合わせて解析した。

【結果】 染色体の領域毎に Rec8 の動態が異なることを見出した。Rec8 コヒーシンが解離する領域、保持される領域に加え、その結合が増加する領域が存在した (未発表)。この結果から Rec8 コヒーシンは減数分裂期では非常にダイナミックな動態変化を示し、領域特異的に解離や保護と言った制御を受けるばかりでなく、積極的にコヒーシンを再結合させると言う高度な制御を受けることが分かった。

酵母第三染色体上のRec8の分布



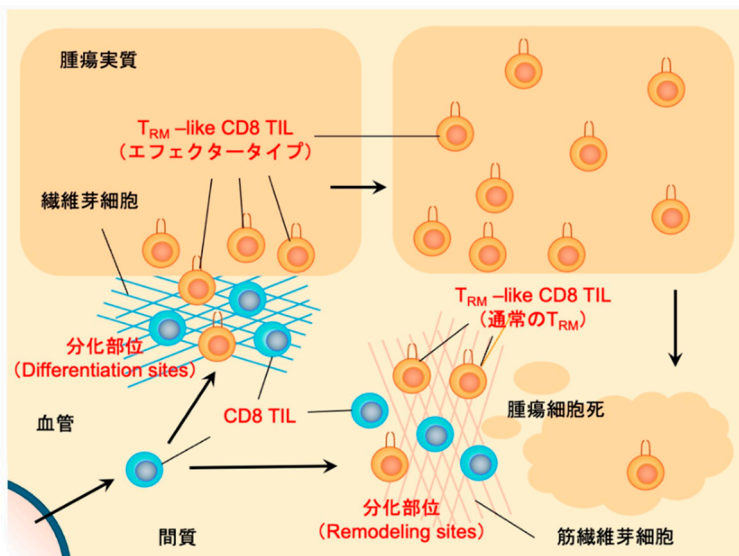
<p>26 腫瘍内高浸潤型CD8T細胞分化機構の解明</p>	<p>高村 史記</p>
--------------------------------	--------------

【目的】 粘膜上皮に定着し、感染防御に重要な役割を果たす組織滞在型メモリー (T_{RM}) と極めて類似した特徴を持つ細胞集団、T_{RM} 様腫瘍内 CD8T リンパ球 (T_{RM}-like CD8 TIL) は高い抗腫瘍活性を示すと共に、免疫チェックポイント阻害 (ICB) 療法への反応性も高い。しかしながら、一般的ながん細胞のマウス皮下移植モデルでは T_{RM}-like CD8 TIL は誘導されないため、その分化機構は未だ不明である。本研究では、ヒト頭頸部がん組織を用いて T_{RM}-like CD8 TIL の分化部位を特定し、その分化機構を解析することを目的とした。

【方法】 本研究ではヒト頭頸部がん患者より採取したがん組織切片を用いて、多重免疫染色にて T_{RM}-like CD8 TIL の分化部位を探索した。また、該当部位に関して空間トランスクリプトームによる T_{RM}-like CD8 TIL の性状解析を実施した。

【結果】 CD103 陰性の CD8 TIL と、CD103 陽性の T_{RM}-like CD8 TIL の局在を比較したところ、間質にはこの両者とも存在したが、腫瘍実質内部に浸潤していたのは大部分が T_{RM}-like CD8 TIL であり、CD8 TIL はほとんど見られなかった。このことより、T_{RM}-like CD8 TIL が優れた腫瘍内部への浸潤能を持つこと、そして、T_{RM}-like CD8 TIL は腫瘍実質内部に浸潤する以前、即ち、間質にて T_{RM} 様の上皮細胞結合能を獲得 (T_{RM}-like CD8 TIL 分化) していると考えられた。この仮説のもと、我々は、抗腫瘍免疫が活発に誘導されている部位の腫瘍と間質の境界部に CD8 TIL と T_{RM}-like CD8 TIL が共局在している領域を発見し、この部位を Differentiation site (DS) と命名した。また、がん細胞が壊死した後の修復巣にも同様の共局在が確認された。この部位は DS とは異なり、組織修復の指標でもある筋線維芽細胞が豊富に存在していたことより Remodeling side (RS) と命名した。DS 及び RS の形態学的な特徴より、DS に存在する T_{RM}-like CD8 TIL はこれから腫瘍細胞を攻撃するエフェクタータイプ、RS の T_{RM}-like CD8 TIL は死滅した腫瘍組織の修復巣に定着したメモリータイプの細胞集団であると考えられた。空間トランスクリプトームにて両者の遺伝子発現を比較したところ、DS の T_{RM}-like CD8 TIL は RS のものより強い活性化型を示した。我々は過去に感染排除後に形成される組織修復巣が T_{RM} 分化部位であることを突き止めていることより、RS の T_{RM}-like CD8 TIL は通常の T_{RM} であり、腫瘍細胞を攻撃する DS の T_{RM}-like CD8 TI とは別物である可能性が高い。従って、各々の T_{RM}-like CD8 TIL 分化機構を解析するには、腫瘍組織から分離された CD8T 細胞を一緒くたに解析するのではなく、各部位にて引き起こされるイベントを別々に解析しなくてはならないことを意味する。今後はさらに解析を進め、各局所における T_{RM}-like CD8 TIL 誘導機構を解明し、新規免疫療法開発に繋げたい。

異なる性質の分化部位にて、異なるタイプの T_{RM}-like CD8 TIL が分化する



【目的】動物はいかにして記憶を貯蔵するのだろうか？海馬記憶には、グルタミン酸シナプスに代表される興奮性シナプスの可塑的な変化、すなわちシナプス可塑性が重要である。興奮性シナプス活動に重要な AMPA 受容体のうち、GluA1 を含む複合体は神経活動依存的にシナプス移行するが、GluA2/3 は神経活動非依存的に・恒常的にシナプス移行する。我々はこれまでに、独自の AMPA 受容体光不活化技術・CALI 法 (chromophore-assisted light inactivation) を *in vivo* で駆使し、記憶の獲得には学習に伴いシナプス移行した GluA1 ホモマーが重要なことを見出した。さらに我々は最近、GluA2/3 に対する CALI 法の開発にも成功し、GluA2/3 は記憶の獲得ではなく記憶の貯蔵に特異的に機能することも発見した (Jitsuki S et al. 投稿準備中)。一方で前述の通り GluA2/3 は、神経活動非依存的・恒常的にシナプス移行を繰り返すため、従来は学習記憶には無関係な静的な分子と考えられていた。従って、こうした特徴を持つ GluA2/3 が、記憶貯蔵分子として機能するメカニズムは大きな謎である (図)。それに対して我々は、記憶貯蔵期に特異的な翻訳後修飾が GluA2/3 分子に生じることで GluA2/3 複合体のイオンチャネル特性が変化し、記憶貯蔵分子に変換されるとの仮説を立てた。我々はその解明を目指し、GluA2/3 を精製後にプロテオーム解析を行い、記憶貯蔵期に特異的に起こる翻訳後修飾の同定を計画した。そのためにはまず、GluA1/1 と GluA2/3 が記憶後どういった時期に特異的に機能するか、詳細な時間枠を特定する必要がある。

【方法】まず NMDA 電流を陰性対象にした電気生理学的解析や GluA3 ノックダウン細胞における電気生理学的解析を行い、GluA2/3 CALI 法の分子特異性について技術評価を行った。次に *in vivo* において学習後の様々なタイミングで GluA1/1 と GluA2/3 を CALI で不活化し、記憶テストにより記憶の消去を解析することで、GluA2/3 が記憶を担う時間枠の同定を行った。さらに *in vivo* CALI 後の脳スライスで、電気生理学的解析を行い、シナプス発現を確認した。

【結果】電気生理学的解析により、GluA3 抗体を用いた CALI 法は GluA2/3 特異的に不活性化することを明らかにした。さらに *in vivo* で CALI を行ったところ、GluA1/1 は学習後 2 時間まで記憶をコードし、GluA2/3 が学習後 4 時間以降から記憶をコードすることを見出した。即ちこの結果は記憶を担う AMPA 受容体は学習後 2~4 時間の間にシフトすることを意味する。また学習後 1 時間と 24 時間で *in vivo* CALI 後に海馬急性スライスを作製し、電気生理学的解析をしたところ、両時間ともに CALI による AMPA/NMDA の低下が認められた。これは、学習後 1 時間でも 24 時間でも GluA2/3 はシナプスに発現するが、記憶をコードするのは 24 時間だけということを示す。すなわち学習後 24 時間では GluA2/3 の分子特性が変化していることを発見した。

学習前後の AMPA 受容体動態



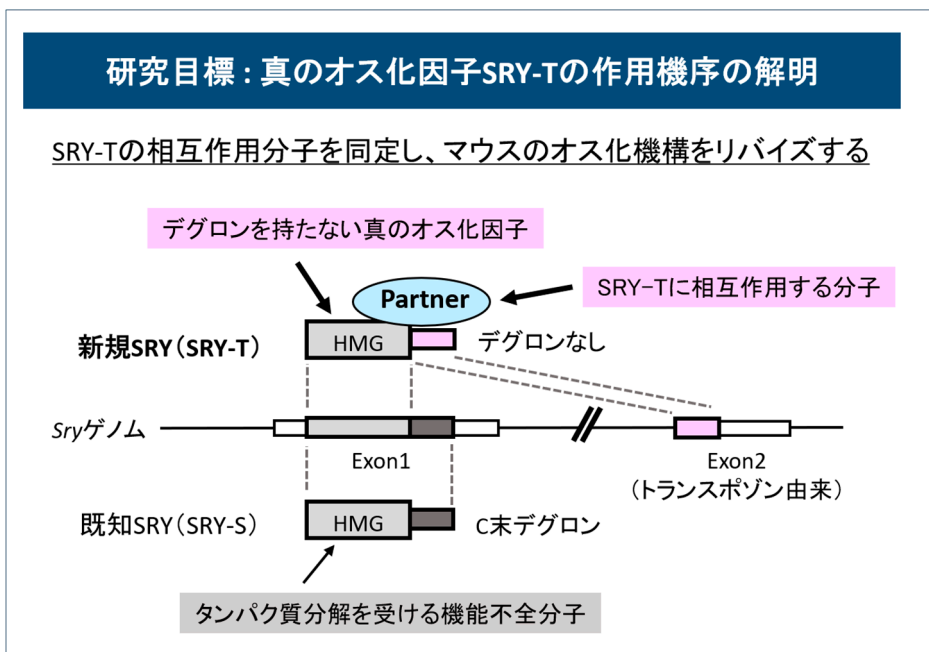
28 ほ乳類のオス化の分子メカニズムの解明	立花 誠
--------------------------	------

【目的】 2020年に私たちは、それまで単一エクソンと考えられてきたマウス性決定遺伝子 *Sry* の遺伝子座に「隠れたエクソン」が存在すること、さらにそのエクソンが、これまで未同定だった真の性決定因子 **SRY-T** タンパク質の C 末端をコードすることを明らかにした。またこの研究により、既知の性決定因子 **SRY-S** がタンパク質分解を受ける機能不全分子であることも分かった。これらの私たちの研究成果は、これまで **SRY-S** をもとに構築されてきたマウスのオス化の分子機構も見直しを促すものであった。すなわち、真の性決定因子 **SRY-T** を材料にしてマウスのオス化機構を再構築する必要があった。本研究では、**SRY-T** と協調して働くパートナー分子を同定することで、ほ乳類オス化カスケードのスイッチングの分子機構の実体を明らかにする。

【方法】 TurboID と呼ばれる変異型ビオチン化酵素を用い、細胞内で **SRY-T** タンパク質に近接して存在するタンパク質を網羅的に同定する。それら **SRY-T** 相互作用タンパク質のうちで、胎仔期のマウス生殖腺において性決定を実行する細胞（プレセルトリ細胞）で発現が特異的に高い分子を選抜し、**SRY-T** の相互作用分子の候補とする。得られた候補分子について変異体マウスを作製し、生殖腺の性分化の表現型解析を行う。

【結果】 **SRY-T** の相互作用分子の候補として、**BAHCC1** タンパク質を同定した。**BAHCC1** タンパク質は TurboID-**SRY-T** 融合タンパク質によってビオチン化されること、*Bahcc1* 転写産物はプレセルトリ細胞特異的に高く発現していることを見出した。遺伝学的な解析により、*Bahcc1* を欠損した XY マウスはオスに分化することが分かった。

本研究の概要：真の性決定因子 **SRY-T** の相互作用分子を同定し、マウスのオス化機構を理解する

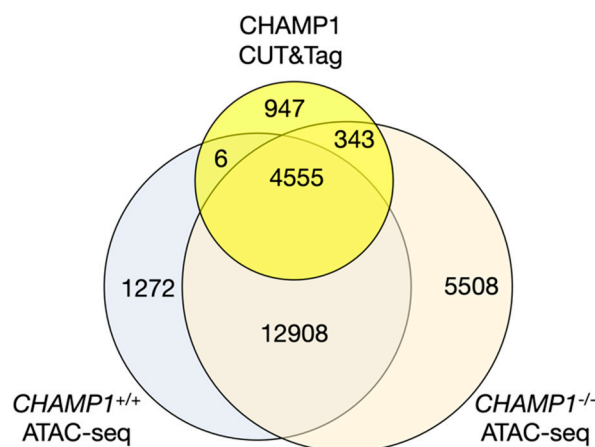


【目的】本研究では、我々が同定した知的障害関連分子 CHAMP1 (Chromosome alignment-maintaining phosphoprotein 1) による遺伝子発現制御機構について明らかにし、*CHAMP1* 遺伝子の変異が知的障害を引き起こすしくみを解明することを目的とする。CHAMP1 は、細胞分裂期における染色体分配に関与する分子として同定され、その後 DNA2 本鎖切断の相同組換えによる修復や、細胞の生存など多彩な機能を果たしていることが明らかになってきているが、その変異がどのようにして知的障害を引き起こすのかについてはよくわかっていない。我々は CHAMP1 がエンハンサー・プロモーター領域に高頻度に局在することを見出しており、本研究では CHAMP1 が遺伝子発現制御に関与し、CHAMP1 の変異によってその制御が破綻することが知的障害を引き起こす可能性について検証する。

【方法】1. *CHAMP1* ノックアウトによる遺伝子発現の変化の検討: *CHAMP1* ノックアウトマウスの胎児脳における遺伝子発現を RNA-seq により調べた。*CHAMP1* ホモノックアウトマウスは生後数日で死亡するため、成体脳についてはヘテロノックアウトマウスで解析を行った。発現が変動した遺伝子について、どのような機能を持った遺伝子が多いかを検討すると共に、CHAMP1 のゲノム上でのピークとの関連を調べた。2. *CHAMP1* ノックアウトによるクロマチン構造の変化の検討: *CHAMP1* ノックアウトマウスの胎児脳におけるクロマチン構造変化を、ATAC-seq を行って調べ、どのような機能を持った遺伝子領域でクロマチン構造変化が見られるかを検討すると共に、クロマチン構造変化が見られた領域と CHAMP1 のピークおよび 1. の発現変動遺伝子との関連を検討した。

【結果】1. *CHAMP1* ノックアウトによる遺伝子発現の変化の検討: RNA-seq の結果、*CHAMP1* ノックアウトマウスの胎児脳では、神経伝達物質輸送・神経発達障害に関連する遺伝子の発現が低下していることがわかった。また *CHAMP1* ヘテロノックアウトマウスの成体脳でも同様の傾向が見られた。また *CHAMP1* ノックアウトマウスの胎児脳で発現が変動していた一部の遺伝子領域には、CUT&Tag 法で検出された CHAMP1、POGZ のピークが存在することがわかった。2. *CHAMP1* ノックアウトによるクロマチン構造の変化の検討: *CHAMP1* ノックアウトマウスの胎児脳におけるクロマチン構造変化を、ATAC-seq を行って調べたところ、*CHAMP1* ノックアウトマウスで消失あるいは出現するピークは、シナプスや神経発達に関連する遺伝子領域上に多く存在していた。また、CUT&Tag 法で検出された CHAMP1 のピークの多くは ATAC-seq のピークと一致しており (図)、精神障害に関連する遺伝子領域に多く存在していることがわかった。

マウス胎児脳における CHAMP1 CUT&Tag のピークと *CHAMP1*^{+/+}、*CHAMP1*^{-/-}での ATAC-seq ピークの比較



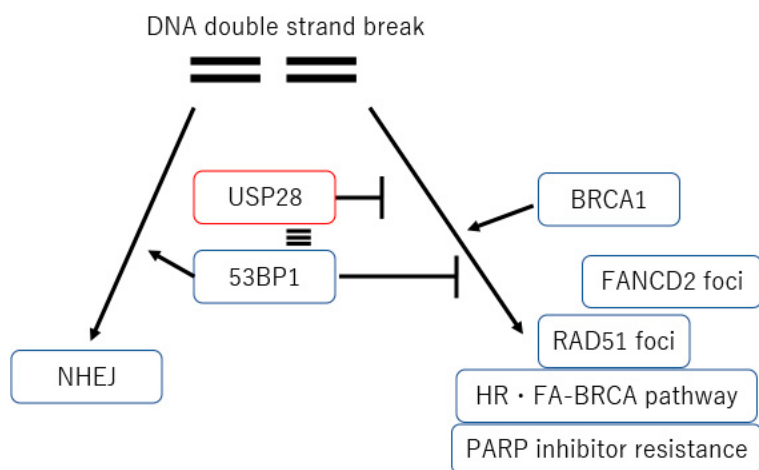
30	USP28によるファンconi貧血BRCA経路の制御機序	谷口 俊恭
----	------------------------------	-------

【目的】 ファンconi貧血 BRCA 経路 (FA-BRCA pathway) および相同組換え (homologous recombination : HR) はがんの発症の抑制にも、抗がん剤感受性・耐性にも関わる重要な DNA 修復経路である。我々は脱ユビキチン化酵素である USP28 がこれらの DNA 修復経路を制御すると仮説した。本研究はこの仮説を検証し、USP28 による FA-BRCA pathway および HR の制御機序を明らかにすることを目的としている。

【方法】 1. ヒト由来の培養細胞 (U2OS 細胞, HeLa 細胞, MCF-7 細胞など) において USP28 および 53BP1 を siRNA またはゲノム編集を用いて発現低下・欠損・変異させた細胞を用いた。これらの細胞に USP28 の様々な変異体を発現させて、それぞれの機能を調べた。放射線による DNA 損傷後の RAD51 foci 形成、FANCD2 foci 形成を評価した。また、DR-GFP reporter を用いて相同組換え (homologous recombination : HR)、EJ5-GFP reporter を用いて非相同末端連結 (non-homologous endjoining : NHEJ) への影響を調べた。2. TCGA の卵巣がん登録症例 (TCGA_OV) のデータを用いて USP28 mRNA 発現の高低による予後の違いを評価した。

【結果】 USP28 は FANCD2、RAD51 の DNA 損傷部位への集積を負に制御し、HR も負に制御する一方で、NHEJ へは影響を与えなかった。BRCA1 欠損細胞は HR が低下しており PARP 阻害薬高感受性を呈するが、BRCA1 欠損細胞でさらに USP28 も抑制すると HR が回復し PARP 阻害薬に耐性になった。また、卵巣がんにおいて USP28 mRNA 低発現群は高発現群に比べて予後が悪かった。USP28 は 53BP1 と相互作用することが知られていたが、USP28 と 53BP1 の相互作用に必要とされる 53BP1 の BRCT ドメインは USP28 による HR の抑制には重要ではなかった。USP28 には exon 19 にコードされている 32 amino acids (aa) からなる領域を alternative splicing のために欠く short form と、完全長の long form が存在するが、この 32 aa が USP28 による HR の抑制に必要であることがわかった。一方、USP28 の脱ユビキチン化酵素活性は HR の抑制には不必要であった。これらの結果から、USP28 が HR および FA-BRCA pathway を負に制御すること (概念図参照) が確認され、その機序の一端が明らかになった。

概念図 USP28 は相同組換えと FA-BRCA pathway を負に制御する

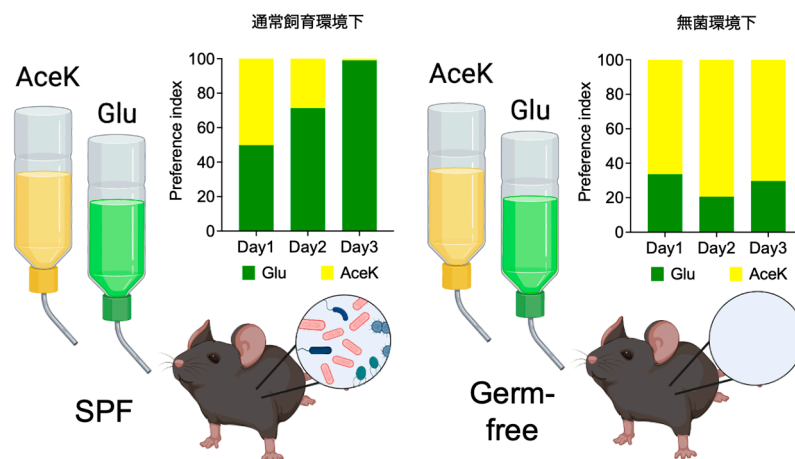


【目的】 本研究の目的は、食嗜好に関わる腸内細菌を探索し、これら腸内細菌を操作することで食事性肥満症および糖尿病疾患の病態制御を試みることである。本邦において、肥満を背景とした糖尿病の有病率が増加し続けている。この肥満の増加要因として、食習慣の変化と運動不足が指摘されている。特に日本人の食生活は日々変化しており、近年では、日本人は魚・野菜を中心とした栄養的にバランスが取れた和食よりも脂質・糖質を多く含む主食副食一体型料理を好むようになってきている。食嗜好は五感（主に味覚・視覚・嗅覚）によって決まると考えがちではあるが、実際には、腸の栄養感覚（つまり gut-feeling）が食嗜好形成に依存すると近年示唆されている。一方、我々は、この gut-feeling が腸内細菌の有無によって大きく変遷する事実を新たに見出した。そこで、本研究では、腸内細菌による宿主の食嗜好形成機序を解明し、糖尿病の治療を目的とした特定腸内細菌による食嗜好制御法の開発を進める。

【方法】 甘味度を調整したグルコース（糖）と人工甘味料（アセスルファム：AceK）を充填したボトルを自由飲水のマウスに与え、各ボトルの飲水量もしくはリック数を3日間計測した。

【結果】 通常飼育（SPF）環境下のマウスは、開始1日目までは糖と AceK を同比率で選択するが、以降は徐々に糖の選択を強めていく。この条件下で3日間飼育すると、マウスは糖をエネルギー源として認識し、糖のみを選択するようになる。一方で、抗生剤（Abx）により腸内細菌叢が攪乱されたマウスは、SPF マウスとは異なり糖嗜好を示さなかった。無菌マウス（germ free：GF）も、腸管除菌マウスと同様に糖嗜好を示さなかった。GF に SPF 便を移植して作製された ExGF マウスは糖嗜好を示すことから、腸内細菌が宿主の糖嗜好形成に重要な役割を果たすことが示唆された。

腸内細菌は、宿主の糖嗜好を制御する



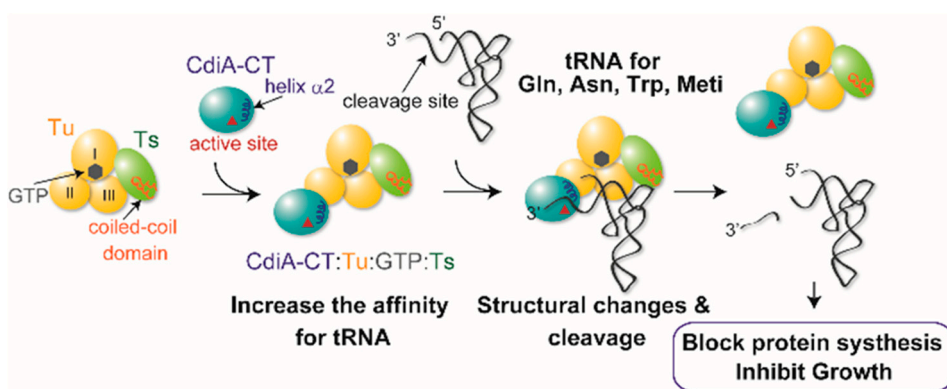
32 病原性細菌の有する接触性増殖阻害蛋白質の制御機構	富田 耕造
-----------------------------	-------

【目的】 接触性増殖阻害 (Contact-dependent growth inhibition : CDI) は腸管出血性大腸菌をはじめ、多くの病原性細菌に広く見いだされ、病原性細菌の優先的かつ爆発的な増殖に関与している。病原性細菌の有する接触性増殖阻害効果は、隣接する非同族細菌内へ接触性増殖阻害蛋白質 (CdiA 蛋白質) を挿入し、それによって隣接する細菌の増殖を阻害し、殺傷することによって生じる。最近、腸管出血性大腸菌 NC101 株、EC869 株、肺炎桿菌 *Klebsiella pneumoniae* 342 株由来の CdiA 蛋白質が、tRNA のアクセプター 3' 領域を切断する tRNase 活性を持ち、その活性には翻訳伸長因子 EF·Tu、EF·Ts と GTP が必要であることが報告された。本研究では、これらの病原性細菌由来の CdiA 蛋白質が翻訳伸長因子によって活性化され、特定の tRNA を認識し、切断する分子機構を明らかにすることを旨とした。

【方法】 腸管出血性大腸菌 EC869 株、NC101 株の CdiA 蛋白質は大腸菌内の翻訳伸長因子 EF·Tu、EF·Ts によって活性化されることがわかっているが、その分子機構も明らかにされていない。今回、翻訳伸長因子である EF·Tu、EF·Ts によって GTP 存在下で活性化され、tRNA^{Asn} のアクセプター領域を切断する腸管出血性大腸菌 EC869 株由来の CdiA^{EC869} 蛋白質が翻訳伸長因子によって活性化される分子機構を、生化学的、遺伝学的、構造生物学的手法を用いて解析した。

【結果】 一連の生化学解析、X 線結晶構造解析を通して、翻訳伸長因子 Tu、Ts によって GTP 存在下で促進される CdiA 蛋白質による tRNA 切断反応は、CdiA·Tu·GTP·Ts:tRNA (あるいはアミノアシル tRNA: aa-tRNA) 複合体を介して進行することが明らかになった。まず、隣接する大腸菌から送り込まれた CdiA 蛋白質は、Tu·GTP·Ts 三者複合体中の Tu のドメイン II にリクルートされ、CdiA·Tu·GTP·Ts 四者複合体を形成する。次に、基質であるアミノアシル-tRNA (または tRNA) が CdiA·Tu·GTP·Ts によって認識され、CdiA·Tu·GTP·Ts:aa-tRNA (または tRNA) 5 者複合体が形成される。この複合体中の Ts は tRNA 分子の複合体への親和性を高めるとともに、tRNA の 3' 末端領域および CdiA の構造変化を誘発し、結果として CdiA による tRNA 切断触媒反応を促進する。CdiA による tRNA の切断により、蛋白質合成は阻害され、最終的に細菌の増殖が抑制される。したがって、Tu·Ts 複合体は接触性増殖阻害プロセスにおいて、CdiA による tRNA の切断を促進する「反応の足場 (Reaction Scaffold)」として働き、翻訳伸長因子が蛋白質合成過程での役割とは別のこれまで知られていなかった新たな機能を有していることが明らかになった。

翻訳伸長因子による接触性増殖阻害蛋白質の活性化機構

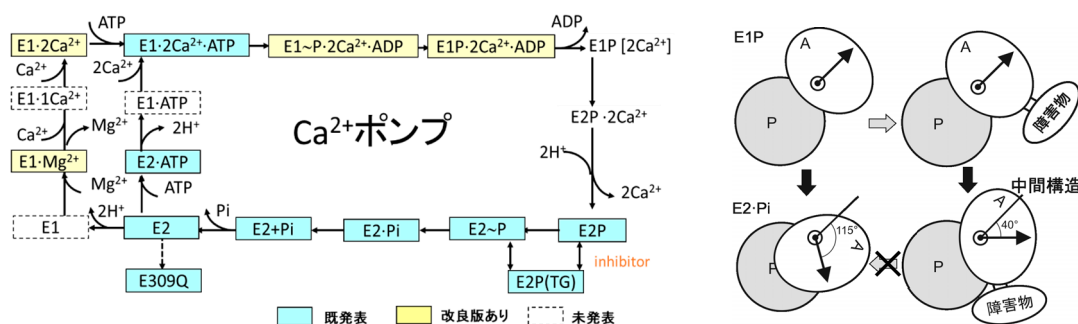


【目的】代表的イオンポンプである筋小胞体 Ca^{2+} ポンプに関し、X線結晶解析によって15の反応中間体の原子構造を決定した。その結果、作動機構の大略は理解できるようになったが、最重要ともいえる「膜内に結合したイオンを放出する過程」($\text{E1P} \cdot \text{ADP} \cdot 2\text{Ca}^{2+} \rightarrow \text{E2P}$) に関してはよくわからないままである。この過程における構造変化は非常に大きく、且つ幾つもの場所で起こるため、何が原因で何が結果かも判然としない。この問題の解決には「人工的反応中間体を創出する」しかないと考えた。この過程では、3つある細胞質ドメインの大規模な再配置が起こるが、特に重要なのはAドメインの 90° に及ぶ回転である。それを途中で止めたい。そのために、ポンプ蛋白質に立体障害となる「コブ」を導入する。コブの大きさを変えれば、系統的に幾つもの人工的反応中間体を生み出せるはずである。その構造を決定することによって「イオンポンプ作動機構の原子構造に基づく理解」の完成を目指す。

【方法】要件としては、導入するコブによってATPによるリン酸化は阻害されないことが必須である。従って、コブの導入場所としてはAドメインのどこかでありE1P状態で溶媒に露出している必要がある。一方でE2P状態の成立は阻止されなければならないから、E1PとE2Pで構造が変わらない「硬い」領域との接触面の近くにコブをつくるべきである。そうすると、導入部位は限定され、Pドメインと接触するAドメインの領域ということになる。コブとしては側鎖レベルから二次構造要素等広く考えられるが、まずは点変異体から始める。その設計には急速に進歩しているフォールディングソフトウェアを、構造の安定性の評価には分子動力学計算が利用できよう。実験的には蛋白質分解酵素による部分分解が有効であることを経験している。高等動物の大型膜蛋白質ではあるが、変異体の生産・X線結晶解析技術は既に確立済みである。本研究では、まずクライオ電顕による単粒子解析によって構造を検討することにした。

【結果】現時点で4つの変異体を大量生産し、そのうち2つについてはクライオ電顕による予備的検討を終えた段階にある。作製した変異体は、E2P状態でPドメインとの接触面に位置するAドメインの一残基と二残基に変異を入れたものに加え、Rosettaソフトウェアを利用してヘリックスを導入したもの、AドメインにあるすべてのP型ATPaseで保存されているTGESループを伸ばしたもの、の4つである。4つめの「TGESループを伸ばしたもの」が系統的に大きさを変えられることから有望と考え、分子動力学計算による安定性評価でも優れていた。しかし、蛋白質分解酵素による部分分解では、精製前の膜標品で既に分解産物が認められ、この変異体は正しくfoldしていないだろうという結論になった。分子動力学計算で検討できるのはあくまでも作製した原子モデルの安定性であり、発現蛋白質がその構造をとるかは別問題であるとはいえ、この結果は驚きであった。また、構造解析の手法としては、クライオ電顕による単粒子解析を予定していたが、ここでも問題が生じた。 Ca^{2+} ポンプとは同族の Na^+ ポンプ(Na^+ , K^+ -ATPase)に関して実績を積み上げており、特段の問題はあるまいと考えていた。ところが、 Na^+ ポンプと同様の条件で電顕試料を作製した場合、 Ca^{2+} ポンプは単量体から三量体のゆるい集合体を作るため、高分解能での解析が著しく困難であることが判明した。このように、2つのステップで予想外の困難に直面したため、研究の完成にはまだ時間を要することになった。

Ca^{2+} ポンプの反応サイクルと障害物の導入による人工的反応中間体の創生



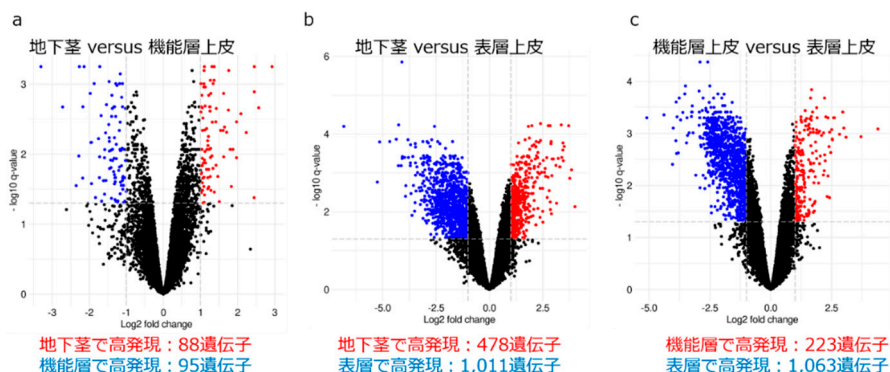
<p>34 子宮内膜における変異クローンの空間的増殖誘導因子</p>	<p>中岡 博史</p>
---	---------------------

【目的】我々は、正常子宮内膜において、がん関連遺伝子変異を有する細胞クローンが組織という三次元空間において蓄積・増殖するメカニズムの解明に取り組んできた。子宮内膜組織における最小の機能単位である腺管を単離し、次世代シーケンサーを用いたゲノム解析を行い、同一の変異クローンに由来する上皮細胞が子宮内膜の広範な領域を占有していることを明らかにした。また、子宮内膜における変異クローンの増殖メカニズムを明らかにするため、三次元イメージング解析を行い、子宮内膜基底層付近に網目状構造（地下茎構造）が存在することを明らかにした。さらに、地下茎構造を共有する腺管が同一祖先の細胞クローンに由来することを示し、子宮内膜組織における上皮細胞の空間的増殖メカニズムに地下茎構造が関与していることを実証した。地下茎構造は月経時に維持され、地下茎構造を起点として機能層が再生されるため、子宮内膜上皮の幹細胞・前駆細胞のニッチとして組織の機能維持に重要な役割を果たしていると考えられる。一方、がん関連遺伝子に変異を有するクローンが地下茎構造を介して異常に増殖すると子宮内膜関連疾患の発症リスクにつながる。地下茎構造の存在は諸刃の剣と言える。地下茎構造は発見から間もなく、研究は黎明期にある。今後、地下茎構造の形成や進展に関するメカニズムについて理解を進める必要がある。本研究では、地下茎構造を介した変異クローン増殖にはホルモン-上皮-間質の相互作用によって特殊な微小環境の形成が関与しているという仮説に基づき、正常子宮内膜における変異クローンの増殖を誘導する上皮-間質相互作用同定を試みる。

【方法】地下茎構造を介した変異クローンの増殖を誘導する上皮-間質の相互作用を同定するための第一歩として、正常子宮内膜における層別トランスクリプトーム解析を行い、地下茎構造を構成する上皮細胞の機能的特徴を精査した。生殖年齢にある10例の女性から提供を受けた子宮内膜について、組織形態的に病変が認められないことを確認した上で研究に用いた。子宮全摘手術によって採取した子宮内膜組織を基底層（地下茎構造）、子宮内腔を被覆する表層、その中間に位置する機能層に層別化し、上皮細胞および間質細胞を選択的に採取し、RNA シーケンシングによるトランスクリプトーム解析を行った。

【結果】遺伝子発現プロファイルに対して主成分分析を行ったところ、同じ上皮細胞でも採取した層に応じて遺伝子発現パターンが異なることが分かった。まず、表層上皮は機能層上皮および基底層の地下茎構造を構成する上皮とは異なるクラスターを形成し、遺伝子発現パターンに顕著な差異があることが分かった。一方、機能層と基底層は連続した上皮組織であるため全体的に類似した遺伝子発現パターンを示すものの、両者の間で発現量に統計学的に有意な差異が認められる遺伝子群が検出された。興味深いことに、子宮内膜上皮の幹細胞/前駆細胞マーカーと考えられているSOX9やAXIN2が基底層の地下茎構造を構成する上皮において高発現していた。さらに、他の組織において上皮幹細胞/前駆細胞マーカーとして報告されている複数の遺伝子が高発現しており、新たな子宮内膜上皮の幹細胞/前駆細胞マーカーの候補となる遺伝子を同定することができた。また、Wnt シグナル伝達経路に属する遺伝子群についても基底層上皮において発現量が有意に高かった。この結果から、子宮内膜基底層に存在する地下茎構造が幹細胞や前駆細胞のニッチとして機能しており、月経周期に応じた子宮内膜の組織再生に寄与していることが示唆された。

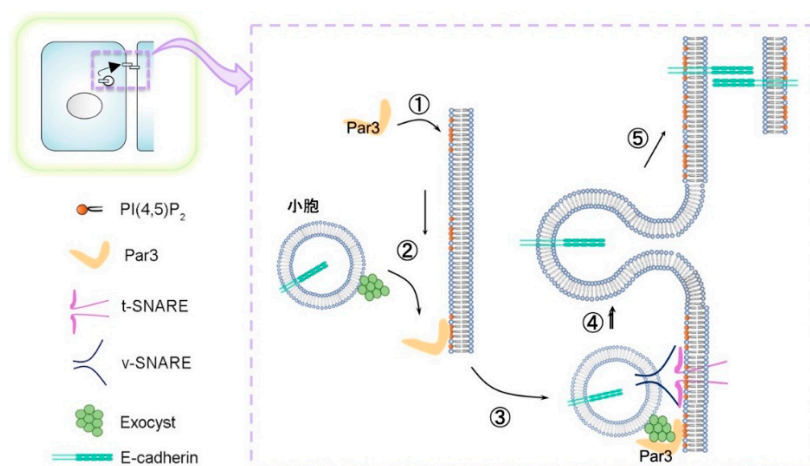
子宮内膜層別トランスクリプトーム解析



【目的】 上皮間葉転換は、上皮細胞が固有の特徴（上皮細胞特性）を失い、間葉細胞の性質を示す現象である。上皮間葉転換は、上皮細胞から発生した癌細胞が、運動性の高い間葉細胞の表現型を獲得し、浸潤・転移することに寄与する。また、臓器管腔の内面を覆う上皮細胞が上皮間葉転換により筋線維芽細胞へ変化し、過剰な細胞外基質を産生することや、上皮間葉転換を起こした細胞が組織常在性の線維芽細胞を活性化することは臓器の線維化につながる。以上のように上皮間葉転換は浸潤癌や臓器線維症の発症や悪化に関わるため、上皮間葉転換の分子機序を理解し、その制御を行うことは、浸潤癌や臓器線維症に対する治療戦略の開発に繋がる重要な課題である。これまでに、上皮間葉転換の制御におけるタンパク質の役割については多くの知見が蓄積されている。一方で、上皮間葉転換の制御において細胞膜脂質の果たす役割についての知見は乏しい。我々は、細胞膜脂質であるホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 (PI(4,5)P₂) が上皮細胞特性や上皮間葉転換を制御することを示唆する知見を得ていた。そこで、PI(4,5)P₂ が上皮細胞特性を制御する機構を解明するとともに、PI(4,5)P₂ やその下流シグナル、PI(4,5)P₂ 分解酵素を標的とした上皮間葉転換阻害の可能性を探り、上皮間葉転換関連疾患の抑制へと繋がる基盤的知見を得ることを本研究の目的とした。

【方法】 上皮細胞内において PI(4,5)P₂ に近接するタンパク質の網羅的な探索を、PI(4,5)P₂ に特異的に結合する PLC δ 1 の PH ドメインと近接依存性ビオチン標識法を用いて実施した。また、PI(4,5)P₂ の 5 位のリン酸基を脱リン酸化するホスファターゼである INPP5E の酵素活性ドメインに形質膜標的化 Lyn ミリスチル化配列と GFP を付加したもの (Lyn-INPP5E-GFP) をヒト表皮細胞株に安定発現させることにより形質膜の PI(4,5)P₂ を減少させ、免疫蛍光染色による PARD3 の検出を行った。さらに、ヒト骨肉腫細胞株に GFP と融合させた PI(4,5)P₂ 合成酵素 PIP5K を安定発現させることにより形質膜の PI(4,5)P₂ を増加させ PARD3 の検出を行った。PARD3 の exocyst 結合領域を形質膜に安定的に発現するヒト表皮細胞株を作製し、その細胞に Lyn-INPP5E-GFP を発現させ、免疫蛍光染色による細胞間接着タンパク質の検出も行った。

【結果】 PI(4,5)P₂ が上皮特性を調節するメカニズムを明らかにするために、上皮細胞内において PI(4,5)P₂ に近接するタンパク質の網羅的な探索を実施したところ、上皮細胞の特徴である細胞間接着に関連するタンパク質が多く同定されてきた。またエキソサイトーシス制御に関わるタンパク質も得られてきた。PI(4,5)P₂ による上皮細胞特性制御機構を解明するにあたり、PI(4,5)P₂ 結合タンパク質である PARD3 に着目し解析を行ったところ、PI(4,5)P₂ は形質膜の PARD3 の量を制御することが強く示唆された。また、PARD3 の exocyst 結合領域を形質膜に発現させることにより、PI(4,5)P₂ の減少による上皮細胞特性の喪失を抑制できることが示唆された。

PI(4,5)P₂ による上皮細胞特性制御機構の仮説モデル

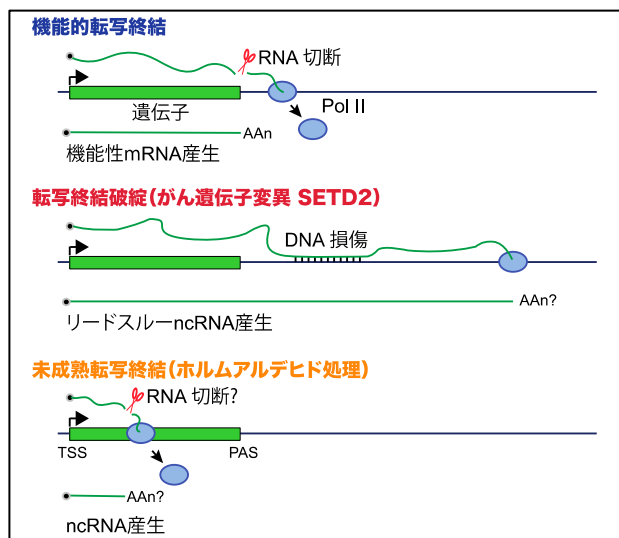
36 非コードRNA異常産生を防ぐ転写終結機構の解明	野島 孝之
----------------------------	-------

【目的】 ゲノムのダークマターと呼ばれる非コード RNA (noncoding RNA : ncRNA) の発見から現在まで、機能が明らかでない ncRNA はほんの一握りである。最近その中で、哺乳類細胞ががん化した場合や特定のストレス下に置かれた場合において、RNA 転写の終結が破綻し、遺伝子間領域でリードスルー転写産物と呼ばれる ncRNA が産生されることがわかってきた (下図)。しかしながら、哺乳類細胞の転写終結は複雑であり、未だにその制御機構には不明な点が多い。そこで本研究では、がん破綻している転写終結機構を明らかにすることを目的とする。また、化学物質等によって誘導される未成熟転写終結 (遺伝子イントロン内で転写が終結すること) の制御機構も明らかにしようとしている (下図)。さらには、がんや細胞ストレスによって誘導される ncRNA を網羅的に同定することで、将来的に人工 ncRNA やそれに由来するペプチドを利用したり、ncRNA を標的とした新たな治療アプローチの開拓を目指す。

【方法】 本研究では、がん細胞や化学物質処理した細胞の転写プログラムを、独自に開発した新生 RNA シークエンス技術 POINT (Polymerase-Intact Nascent Transcript) 法にて解析し、転写終結に注目した研究を行った。まず、TCGA に収録されたがん転写産物の解析により、大腸がん高発現している遺伝子として *NELF* (Negative elongation factor) に注目した。次に、共同研究者 (Ali Shilatifard 研究室) から分与された、オーキシシン依存的 *NELF* タンパク質分解誘導大腸がん細胞 (HCT116 *NELF*-C-AID) を用いて、POINT 法解析を行った。さらには、がん頻りに変異しているヒストンメチル基転移酵素遺伝子 *SETD2* に注目し、そのタンパク質発現や活性を失った細胞を用いたり、化学物質処理 (DNA 架橋剤) による転写プログラムの影響も POINT-seq 法解析した。それらのシークエンスデータは、バイオインフォマティクスにより統計学的に解析した。

【結果】 本研究では、公共がん RNA-seq データを再解析し、がんにおける転写関連因子の RNA 発現を調べた。その結果、転写伸長因子として知られている *NELF* の転写産物が大腸がん有意に高発現していることが明らかになった。さらに、*NELF* 発現抑制時に転写終結破綻が起きていること、その破綻が DNA 複製開始反応の抑制、それに伴う細胞周期の停止が引き起こされることが明らかになった (プレプリント Nakayama et al., *BioRxiv*2024)。また、クロマチン環境変化がどのように転写へ影響するのかも調べた。本研究では、複数のがん機能で失っている *SETD2* に注目し、転写における機能解析を行った。その結果、*SETD2* ノックアウト (KO) 細胞やメチル基転移活性を失った腎臓がん患者由来細胞では、転写終結の破綻が起きていることが明らかになった (論文投稿準備中)。本研究ではさらに、DNA 架橋剤によって、未成熟転写終結が誘導されることを見出した。これは、以前報告したスプライシング阻害剤によって誘導される未成熟転写終結機構とは異なるもので、今後の研究展開が期待される。

転写終結破綻と未成熟転写終結から生じる ncRNA

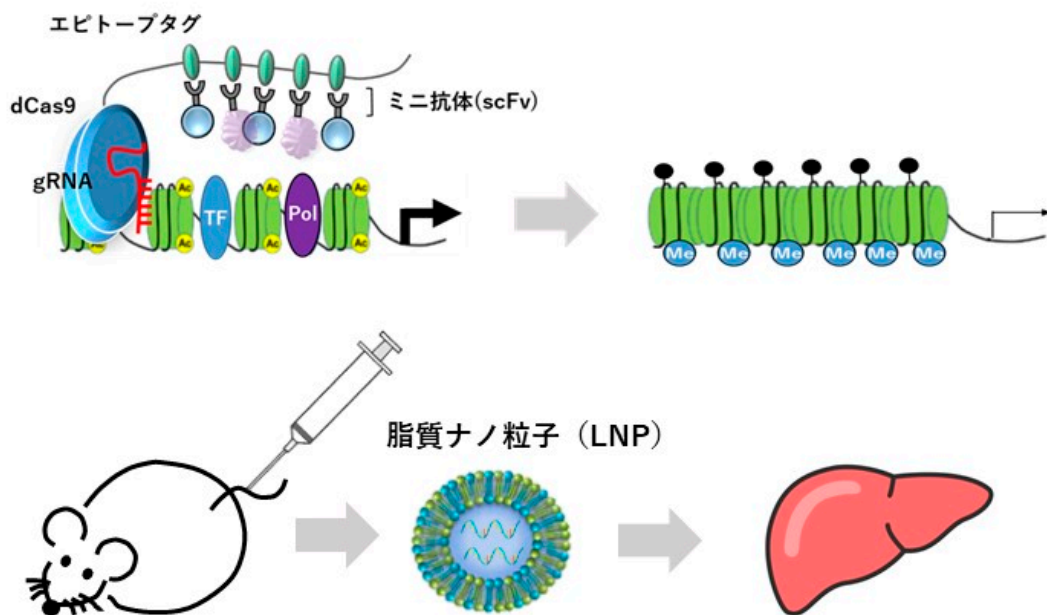


【目的】ゲノム編集治療はオフターゲット効果による予期せぬ遺伝子変異が大きな問題であり実用化の大きな壁となっている。それに対しエピゲノム編集は遺伝情報を操作せずにそのスイッチを操作するため安全である。本研究ではエピゲノム編集システムを mRNA ワクチンで使用され安全な mRNA 封入脂質ナノ粒子によりデリバリーする家族性高コレステロール血症の新たな治療法を開発する。

【方法】dCas9-SunTag システムを用いて標的遺伝子の発現抑制を検討した。すなわち細胞に (a) KRAB 単独 : dCas9-SunTag、ガイド RNA、scFv-KRAB、(b) Dnmt 単独 : dCas9-SunTag、ガイド RNA、scFv-Dnmt、(c) KRAB + Dnmt : dCas9-SunTag、ガイド RNA、scFv-KRAB、scFv-Dnmt を導入して遺伝子発現の抑制を検討した。また脂質ナノ粒子による mRNA の肝臓へのデリバリーについても検討した。

【結果】(a) KRAB 単独、(b) Dnmt 単独と比較して (c) KRAB+Dnmt の両方を標的にリクルートすると相乗的に発現を抑制することができた。その抑制効果の強さは (c) KRAB+Dnmt、(a) KRAB 単独、(b) Dnmt 単独の順であった。またマイクロ流体装置を使用すると脂質と mRNA を最適な条件で混合することにより再現よく均一な直径 80 nm の脂質ナノ粒子を作製することができ、肝臓へのデリバリーは効率がよいことが分かった。

エピゲノム編集システムと脂質ナノ粒子による肝臓へのデリバリー



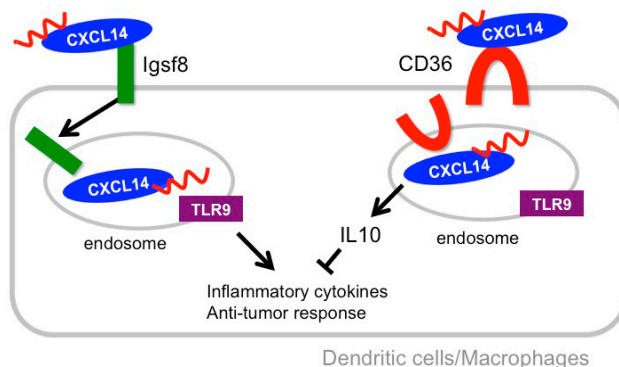
38	CXCL14が認識する警告物質の同定と受容体の機能解明	原 孝彦
----	-----------------------------	------

【目的】 ケモカイン CXCL14 は、非メチル化 CpG の連続配列を持つ DNA (CpG DNA) と複合体を形成することで細胞内取り込みと Toll-like receptor 9 (TLR9) 経路の活性化を促進する。我々は最近、膜タンパク質 Igsf8 が CpG DNA-CXCL14 の細胞内取り込み受容体として働いていることを発見した。さらに、脂質の取込み受容体である CD36 も CpG DNA-CXCL14 に結合するが、CD36 は TLR9 経路を抑制する働きを担っていることが判明した。本研究では、CXCL14 が認識する DNA の特異性を検証するとともに、自然免疫反応における Igsf8 と CD36 の生理的役割を解明することを目指した。

【方法】 DNA-CXCL14 との結合能、細胞内取り込み能、サイトカイン誘導能の解析には、ヒト胎児腎臓由来 293T 細胞株、マウスマクロファージ由来 RAW264.7 細胞株、そして C57BL/6N マウスの骨髄から取り出して分化誘導させた Bone marrow-derived macrophage (BMDM) を用いた。動物実験には、CRISPR-Cas9 システムを利用して作出した *Igsf8*-KO マウスと外部から購入した *CD36*-KO マウスを用いた。FACS や Enzyme-linked immunosorbent assay 等の実験方法の詳細は、先行論文に記載した。統計解析には Prism 8 software (GraphPad) を使い、Two-way ANOVA による分散解析後、コントロール群に対する Dunnett's multiple comparison によって統計的有意差を検定した。

【結果】 CXCL14 が非メチル化 CpG DNA だけでなく、cGAS/STING 経路のリガンドである double strand DNA (dsDNA) にも結合するかどうかを調べた。dsDNA の代表として Interferon stimulatory DNA (ISD) を Cy3-標識して、結合と取り込み実験を行った。293T 細胞に *Igsf8* あるいは類縁の *Igsf* を発現させ、CXCL14 有る無し条件下で結合実験を行った結果、CXCL14 存在下では、ISD は *Igsf8*、*Igsf3*、*Rage* タンパク質と強く結合した。また、Cy3-ISD の細胞内取り込みは、CXCL14 存在下でのみ有意に上昇した。ワクチンアジュバントとして使用されている Alum は、自己 dsDNA を介した免疫反応に関与していることが示唆されている。そこで、Alum の CXCL14 および ISD に対する結合能を調べた。Alum は ISD に直接結合したが、CXCL14 存在下では ISD との結合が増強されることが判明した。さらに、BMDM を Alum、CXCL14、ISD で同時に刺激した場合だけ、*IFN-β* の分泌量が有意に増加した。マウスの免疫実験では、Alum は SARS-Co-V2 Spike タンパク質に対する IgG1 抗体価を上昇させたが、*Igsf8*-KO マウスではこの抗体価上昇は起こらなかった。したがって、Alum/CXCL14/dsDNA 複合体は、*Igsf8* と結合して細胞内へ取り込まれ、*IFN-β* 分泌経路を活性化している可能性が示唆された。最後に同系メラノーマ移植マウスモデルを用いて、WT マウスと *CD36*-KO マウス腫瘍の遺伝子発現比較を行った。その結果、炎症抑制サイトカインをコードする *Il-10* mRNA の発現レベルが、*CD36*-KO マウスの腫瘍では有意に低下していた。この実験結果は、CD36 は IL-10 の分泌誘導を介して、CpG ODN-CXCL14 刺激による TLR9 経路の活性化 (=抗がん免疫) を負に制御している可能性を示唆している。

Igsf8 と CD36 を介して調節される CpG DNA-CXCL14 による自然免疫応答 (総括図)

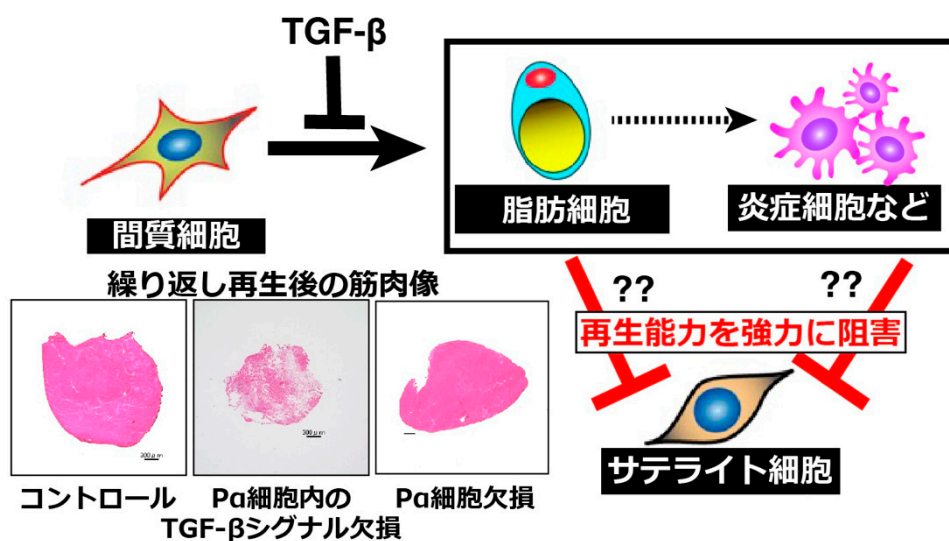


【目的】骨格筋にはサテライト細胞と呼ばれる幹細胞が存在し、骨格筋の再生能力を保証している。この再生過程で、サテライト細胞は自身の数を維持する（自己複製）能力があるため、繰り返しの損傷に対しても何度でも再生することができる。一方で、遺伝性筋疾患である筋ジストロフィーでは、欠損遺伝子に起因する慢性的な筋変性が再生能力を上回ることで、脂肪化・線維化を伴う進行性の病態を示すと考えられている。しかし、どのようなメカニズムによりサテライト細胞による再生能力が低下するのかについては分かっていない。本研究では、「なぜ本来優れた再生能力があるにもかかわらず、筋ジストロフィーでは筋再生能力が低下していくのか」について、独自のモデル動物を用いて明らかにし、遺伝子筋疾患治療法開発を目指した基礎研究を行う。

【方法】我々は間葉系前駆細胞（Pa細胞）特異的にTGF- β シグナルの受容体であるTgfr2を欠損させた結果（cKO: *Pdgfra^{CreERT2}::Tgfr2^{flx/flx}*）、繰り返しの筋再生がほとんど起きず、脂肪細胞が蓄積することを観察していた。そこで、まず脂肪細胞由来因子が、サテライト細胞の増殖を抑制しているかについて検討を行った。さらに、脂肪細胞分化のマスターレギュレーターである Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ (PPAR γ) のアンタゴニストとであるGW9662を我々が樹立した重篤な筋ジストロフィーモデルマウスに投与することで、脂肪細胞の出現が筋ジストロフィー病態に与える影響を組織学的に検討した。また、どの時期からコントロール群とcKOの再生像に違いが出てくるのかを明らかにするために、筋損傷後のサンプルを回収し、real-time PCRにより各種筋再生マーカーの発現を検討した。

【結果】脂肪細胞由来の培養上清を用いた検討を行ったところ、予想と異なり脂肪細胞由来の因子はサテライト細胞の増殖を促進していた。更に、GW9662を2ヶ月間毎日投与した群においても、筋重量、筋力、組織学的な解析において顕著な改善は認められなかった。これらの*in vitro*および*in vivo*の結果より、脂肪細胞から分泌される因子が再生阻害因子でないことが明らかとなった。そこで、筋再生過程でどの時期から異常がでるのかについて検討を行ったところ、再生7日目に、脂肪細胞マーカーであるPerilipinの発現増加がみられ、また筋再生過程で一過性に増加するColla1の発現にもコントロール群とcKO群で違いが認められた。

間質細胞特異的なTgfr2欠損でみられる繰り返しの再生異常



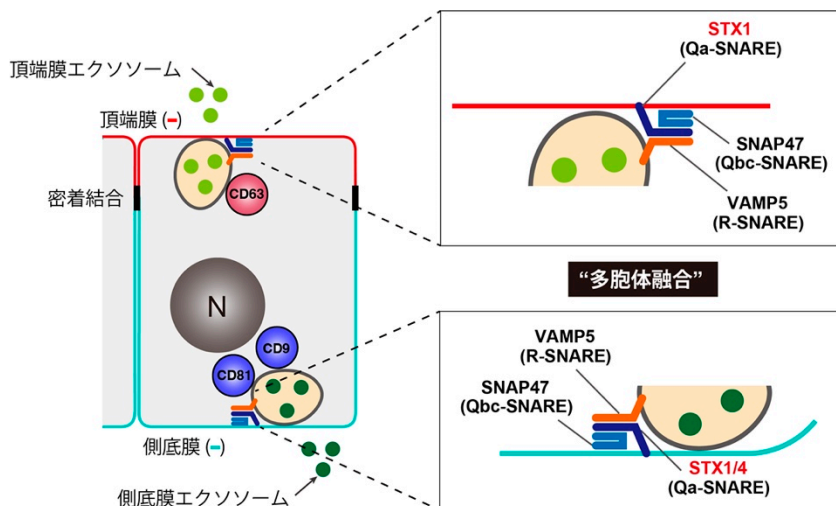
40 上皮細胞におけるエクソソームの極性分泌機構の解明	福田 光則
------------------------------------	--------------

【目的】 上皮細胞は密着結合を挟んで2種類の細胞膜（頂端膜と側底膜）を持ち、それぞれの膜から異なるタイプのエクソソーム、すなわち CD63 を豊富に含む頂端膜エクソソームと CD9 や CD81 を豊富に含む側底膜エクソソームを分泌している。これまでの私達の研究で、これら2種類のエクソソームの基となる多胞体の形成・輸送機構は全く異なることが明らかになっている。細胞膜まで輸送された多胞体は、最終的に頂端膜や側底膜と融合することで、エクソソームの分泌が起こるが、この最終ステップの分子基盤はこれまで謎に包まれていた。そこで本研究では、膜融合の普遍的制御因子である SNARE 複合体に着目し、SNARE 複合体を介した頂端膜・側底膜エクソソームの分泌機構を明らかにすることで、上皮細胞におけるエクソソームの極性分泌の分子機構の全容解明を目指した。

【方法】 本研究ではまず、哺乳動物に存在する約40種類のSNARE蛋白質を対象に、多胞体に局在するもの(R-SNARE)を免疫染色法により網羅的に探索した。次に、得られた候補R-SNAREと複合体を形成可能なQa/Qbc-SNAREを共免疫沈降法により同定した。最後に、候補R/Q-SNARE蛋白質を特異的なsiRNAを用いてMDCK細胞（上皮細胞モデル）でノックダウンし、頂端膜・側底膜エクソソーム分泌への効果を検証した。

【結果】 ヒトやマウスに存在する全てのSNARE蛋白質を対象とした網羅的な局在スクリーニングの結果、7種類のSNARE蛋白質がMDCK細胞でCD63陽性の多胞体に局在することが明らかになった。これらの候補の中で、極性を持たないHeLa細胞でもCD63陽性の多胞体に局在するものをさらに探索したところ、R-SNAREのVAMP5が両者に共通して多胞体に最も良く局在することを見出した。次に、免疫沈降法を用いた網羅的な結合実験により、VAMP5と対をなすQbc-SNAREとしてSNAP47を、Qa-SNAREとしてシンタキシン1A/1B/4(STX1/4)の3種類を同定することに成功した。Qa-SNAREのSTX1/4のMDCK細胞での細胞内局在を検討したところ、STX1は頂端膜・側底膜の両方の細胞膜に、STX4は側底膜にのみ分布することが明らかになった。この分布と一致して、STX1欠損細胞ではVAMP5やSNAP47の欠損細胞と同じく、頂端膜・側底膜エクソソームの両方の分泌が阻害されていたが、STX4欠損細胞では側底膜エクソソームの分泌のみが選択的に阻害されていた。興味深いことに、これらのSNARE蛋白質はHeLa細胞にも発現しており、ノックダウンによりエクソソーム分泌が顕著に阻害されることが明らかになった。また、STX1とSTX4の同時欠損HeLa細胞では、エクソソーム分泌阻害に対する相加的な効果も観察されたことから、両者が独立に機能している可能性が強く示唆された。すなわち、SNARE複合体によるエクソソーム分泌の制御機構も複数存在することから、極性の有無に関わらず、多胞体の融合レベルでも多様なエクソソームの産生（異質性）に貢献しているものと考えられた（Cell Struct Funct., 2023）。

SNARE複合体を介するエクソソームの極性分泌機構のモデル

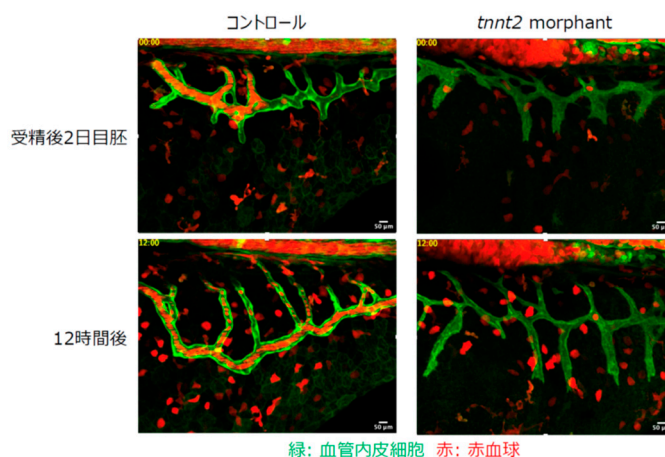


【目的】血管新生とは、既存の血管から血管枝が出芽し新たな血管網を構築する現象であり、生体恒常性の維持に寄与する一方、がんや糖尿病網膜症などの様々な疾患の病態と密接に関連している。生体組織が損傷を受けると、血管新生が誘導され、損傷組織を修復する。しかし、糖尿病性潰瘍など創傷治癒の遅延が関連する疾患では、血管新生の誘導が正常に起こらず組織修復が遅延する。また、がんなど病的な血管新生が誘導される疾患では、無秩序で未熟な異常血管が形成され、これら疾患の病態を悪化させる。我々はこれまで、ゼブラフィッシュ成魚の皮膚創傷治癒における血管新生の蛍光生体イメージングから、「創傷の際の血管新生では、血流に対して下流側の損傷血管は上流側の損傷血管に向かって一方向性に伸長し血管を再生するのに対し、上流側の損傷血管は血流に起因する内腔圧によりほとんど伸長しない」という、ライブイメージングでしか知りえない現象を発見した。その機構として、血流に起因する内腔圧は、上流側の損傷血管を拡張し、内皮細胞に伸展刺激を負荷することで、細胞遊走の原動力となるアクチン重合を抑制し、血管伸長を阻害していること、さらに伸展刺激のメカノセンサーとして BAR (Bin/Amphiphysin/Rvs) ドメイン含有タンパク質 TOCA1 が関与することを明らかにした。即ち、下流側の損傷血管では、TOCA1 が内皮細胞の先端端膜に結合し、アクチン重合依存的に膜突起を形成することで、内皮細胞遊走と血管伸長を促進しているのに対し、内腔圧が負荷された上流側の損傷血管では、伸展刺激により内皮細胞の膜張力が上昇し、それにより TOCA1 が先端端膜に結合できず、内皮細胞遊走・血管伸長が阻害されることを示した。これにより内腔圧による血管新生の新たな制御機構が明らかになった。本研究では、血流に起因する内腔圧が血管伸長を制限する機構の生理的な意義や病的血管新生との関連性について検討するとともに、創傷時血管新生において、下流側の損傷血管が、上流側の損傷血管に向かって一方向性に伸長する機構について解析を行った。

【方法】血管内皮細胞や赤血球が蛍光タンパク質で標識されたゼブラフィッシュを用いて、腸・肝臓・脾臓の臓器血管の起源となる subintestinal vein (SIV) の形成プロセスを蛍光ライブイメージングにより解析した。その際、SIV リモデリングにおける血流の役割を解析するため、トリカインや BDM などの薬剤処理や *tnnt2* のノックダウンにより血流を停止させた。創傷治癒過程の血管新生におけるペリサイトの役割を明らかにするため、ニトロ還元酵素/メトロニダゾールシステムを利用してペリサイトをコンディショナルに除去可能なゼブラフィッシュを樹立し、ペリサイト存在下及び非存在下における、創傷治癒に伴う血管新生を蛍光ライブイメージングにより解析した。

【結果】本研究により、血流に起因する内腔圧は、血管枝の退縮を誘導することで、SIV 形成時の血管リモデリングを惹起し、機能的な SIV 形成に寄与していることが示された。また、創傷時血管新生において、血流に対して下流側の損傷血管は、一方向性に伸長し上流損傷血管と吻合することで損傷血管を修復すること、また、この下流損傷血管の一方向性の伸長にはペリサイトが関与することを明らかにした。

血流に起因する内腔圧は腸血管 (SIV) のリモデリングを誘導する



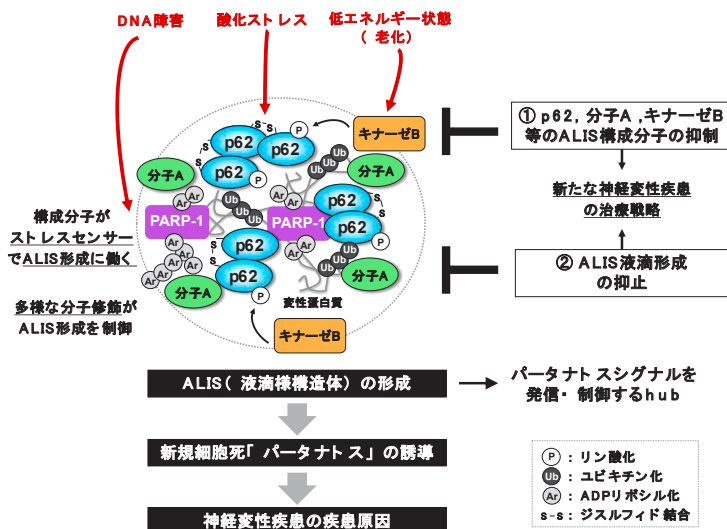
42 新規細胞死パータナトスの制御による神経変性疾患治療 松沢 厚

【目的】 神経変性疾患などの病因として近年注目される「パータナトス」は、酸化ストレスやDNA 障害、老化で誘導される。パータナトスは多様機能酵素 PARP-1 による翻訳後修飾体ポリ ADP リボース (PAR) の合成がトリガーとなり誘導されるため、PARP-1 が神経変性疾患の治療標的と考えられるが、DNA 修復・複製に不可欠であり、その阻害で重篤な副作用が生じることから、それ以外にパータナトスを抑制できる、適切な治療標的の発見が、神経変性疾患の治療戦略開発に重要である。しかし、その誘導メカニズムは良く分かっていない。最近我々は、パータナトス誘導に“ALIS” (aggresome-like induced structures) という液滴様の新たな構造体が重要であることを見出した。本研究では、ALIS 形成に関わる構成分子の作用機序、および ALIS によるパータナトス誘導メカニズムを解明し、パータナトスの抑制による、神経変性疾患の画期的な治療戦略の鍵となる新たな創薬ターゲットの発見を目的とする (図)。

【方法】 1. ALIS によるパータナトス誘導メカニズムの解析：ALIS の液滴形成の定量系を確立して、ALIS 形成とパータナトス誘導に必須の分子群について ALIS 形成に対する機能を詳細に解析し、パータナトス抑制の標的分子としての可能性を検討した。2. 神経変性疾患の原因であるパータナトスを抑制する標的としての ALIS の妥当性の検証：パータナトス誘導に必須である ALIS の形成が神経変性疾患の神経細胞死に重要であるかを確認するため、ALIS 形成を阻害することによって神経細胞死が抑制されるか否か検証を行った。3. 神経変性疾患の治療戦略の鍵となる創薬化合物の開発：神経変性疾患の治療戦略としてパータナトス抑制を可能とする創薬化合物の開発にも着手した。4. パータナトスと他の疾患との関連性の追求：パータナトスと他の疾患との関連性も明確にし、パータナトス抑制剤の重要性を追求した。

【結果】 1. ALIS 構成分子が多様なストレスを感知して ALIS 形成を誘導する仕組みの解明は重要である。我々は、DNA 障害のセンサー分子 PARP-1 に加えて、酸化ストレスとエネルギー代謝低下 (老化) のセンサー分子として、多機能分子 p62 と低エネルギー感受性キナーゼ B を同定し、酸化ストレスによる p62 同士のシステイン残基のジスルフィド化が ALIS 形成とパータナトス誘導に不可欠であること、また p62 の類似分子 A が p62 分解を抑制できることなど、ALIS 形成の詳細なメカニズムを明らかにした。2. 神経変性疾患で起こる神経細胞死が、ALIS 形成を阻害することによって抑制されることが明らかとなり、ALIS 形成自体の制御や ALIS 形成に関わる分子が、神経変性疾患の治療標的として重要であることが実証できた。3. 我々が独自に同定した幾つかの ALIS 形成阻害剤、および超硫黄分子がパータナトスを強く抑制することを見出し、神経変性疾患の治療戦略としての ALIS 制御の重要性を確認した。4. パータナトス形成に関わる ALIS などの液滴様構造体が、神経変性疾患以外に、癌などの多様な疾患の制御にも関わることを実証した。

新規細胞死パータナトス抑制による神経変性疾患の治療戦略

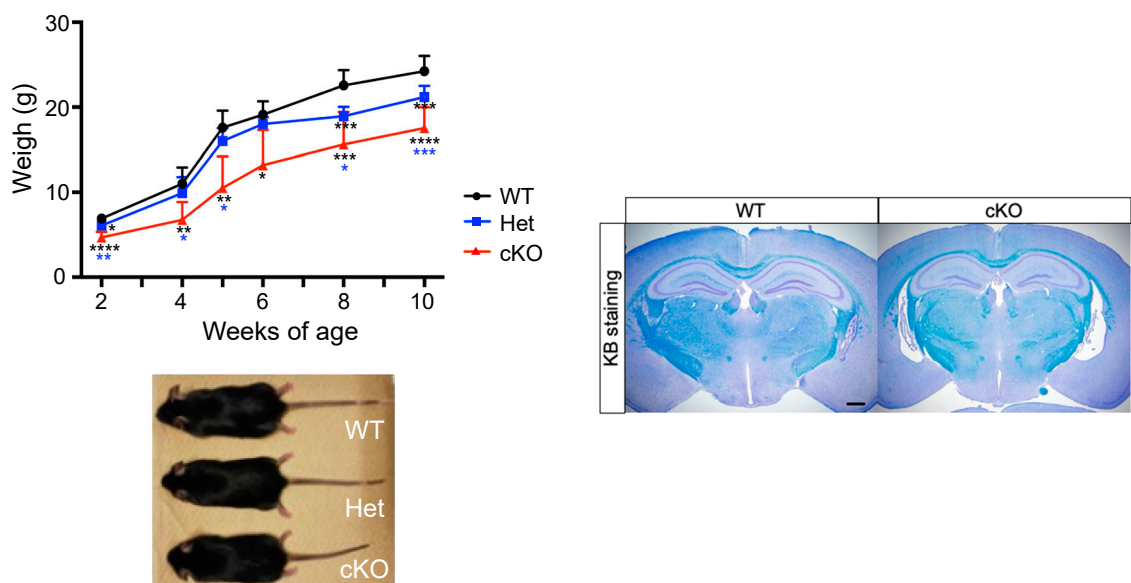


【目的】 High-mobility group box 1 (HMGB1) は細胞の核内に主に発現するタンパクであるが、炎症性刺激時、または細胞死に際して核内から細胞外に放出され、それが炎症応答を誘導し、敗血症や免疫疾患等の病態を増悪することが知られている。このように細胞外に放出された HMGB1 の機能について関心が持たれているが、細胞内の HMGB1 の機能については未だ不明な点が多い。HMGB1 を全身性に欠失させたマウスは生後すぐに低血糖の症状を呈して致死となることが知られており、発生初期において重要な機能を担っていることが推測される。これまでの我々の解析から、HMGB1 を神経幹細胞特異的に欠失させたマウスは産仔が得られにくいという知見が得られている。そこで本研究において、HMGB1 の神経幹細胞、および脳の発達における役割について解明する。

【方法】 これまでの報告から、HMGB1 を全身性に欠損させたノックアウトマウスは生後に致死となることが知られている。そこで我々は神経発生における HMGB1 の役割について解析すべく、HMGB1 のコンディショナルノックアウトマウスを作製し、脳の組織学的解析やマウスの行動解析を行った。

【結果】 *Hmgb1* flox マウスを *Nestin1-Cre* マウスと交配させたところ、得られる産仔数が大きく減弱した。HMGB1 は神経系細胞など、*Nestin1* を発現する細胞集団において、マウス発生初期に大事な役割を果たしている可能性があることが判明した。一方、出生直前での個体数はコントロールマウスと差異はなかった。また、胎児期の脳組織について検討を行ったが大きな異常は認められなかった。少ないながらも得られた *Hmgb1*^{flox/flox} *Nestin1-Cre*⁺ マウスについては、体重や個体の大きさが減弱し、また小脳が小さく、脳梁の厚みが薄化していることがわかった（下図）。*Hmgb1*^{flox/flox} *Nestin1-Cre*⁺ マウスは過活動や記憶障害を呈することもわかった。これらのことから、HMGB1 は脳の発生において、特に出生後の脳の発達に重要な役割を果たしていることが示唆された。

Hmgb1^{flox/flox} *Nestin1-Cre*⁺ マウス (cKO) は体躯が小さく、小脳や脳梁の発達に異常を示す

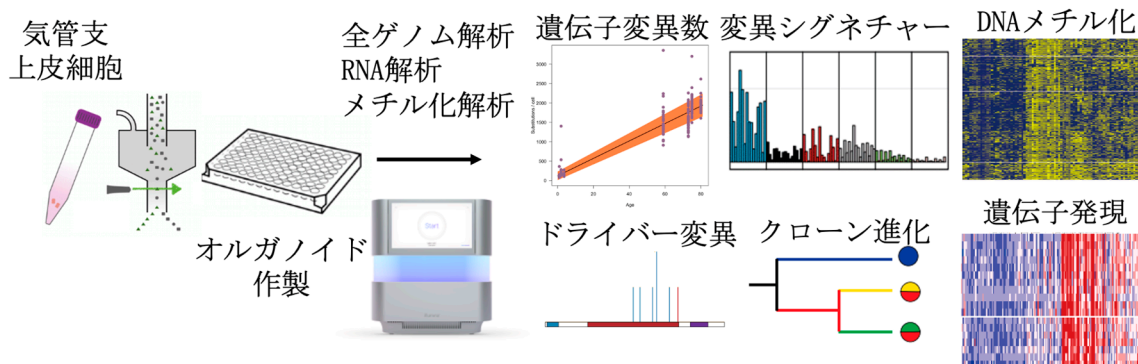


【目的】日本人で最も多い肺がんは腺がんであり、肺腺がんは末梢気管支に発症することが多いが、正常末梢気管支上皮細胞あるいは肺胞上皮細胞においてどのような遺伝子異常が生じているかは明らかではない。禁煙率の低下により非喫煙者、特に女性の非喫煙者に生じる肺腺がんの占める割合が高くなっているが、非喫煙者の正常末梢気管支上皮細胞で加齢や環境因子などの原因によりどのような遺伝子異常が起こり、肺がん発症につながっているか、その結果なぜ女性に多くがんを発症するのか、がんの発生につながるクローンの拡大が起こっているのかについて理解が不十分である。本研究では、我々がこれまでの研究で取り組んできた肺の正常組織、特に過去の研究で解析されていない肺腺がんの発症する末梢肺の正常組織について、正常細胞に加齢や環境因子により遺伝子異常が蓄積し、さらに獲得された遺伝子異常により多様性の獲得やクローン拡大をきたす過程を明らかにするため、ゲノム解析などのオミックス解析を行い、日本人における肺がん発症の遺伝学的基盤を明らかにすることを目的とする。

【方法】非喫煙者肺がん、多発肺がんおよび間質性肺炎などに合併した肺がん症例の手術検体から正常肺組織を採取し、正常末梢気管支上皮、肺胞上皮における幹細胞である基底細胞および2型肺胞上皮細胞由来の単一細胞由来オルガノイドを作製し、ゲノム解析、発現解析、DNAメチル化解析などのオミックス解析を行い、蓄積する遺伝子異常およびそれに伴う表現型の変化を解析する。同定された遺伝子異常から遺伝子変異量やシグネチャーの解析を行い、非喫煙者の肺がんや多発肺がんの原因、炎症とがんの関係を明らかにする（下図）。さらに、正常細胞と肺がん細胞の違い、クローン進化の過程を明らかにするため、同一症例から発症した肺がん検体についても解析を行う。

【結果】これまでに非喫煙者5名を含む13人の国立がん研究センター中央病院において肺がん疑いで手術を受けた症例から正常な中枢あるいは末梢の気管支上皮細胞由来のオルガノイド作製を行った。その結果、十分な数のオルガノイドが作製できなかった6例を除いた7例から合計184個のオルガノイドが樹立された。7症例の背景疾患の内訳は肺腺がん（5例）、肺大細胞がん（1例）、炎症性病変（1例）であり、このうち4例が非喫煙者、3例が喫煙者であった。樹立されたオルガノイドのうち142検体について全ゲノム解析を行った（症例あたり10~32個）。また、オルガノイドを解析可能であった7症例のうち、4症例については同一症例の肺がん検体についても全ゲノム解析を行った。同一症例内では末梢肺では喫煙に起因する遺伝子異常が少なく、肺腺がんでは喫煙との関連が比較的弱いことと関連していると考えられた。また、同一症例でも正常気管支上皮細胞と肺がんでは変異シグネチャーのパターンが異なり、クローン進化の過程で変異蓄積プロセスが変化していることが示唆された。今後、さらにオミックス解析を進めて、肺がん発症におけるクローン進化の過程の解明を目指す。

単一細胞由来検体を用いたオミックス解析

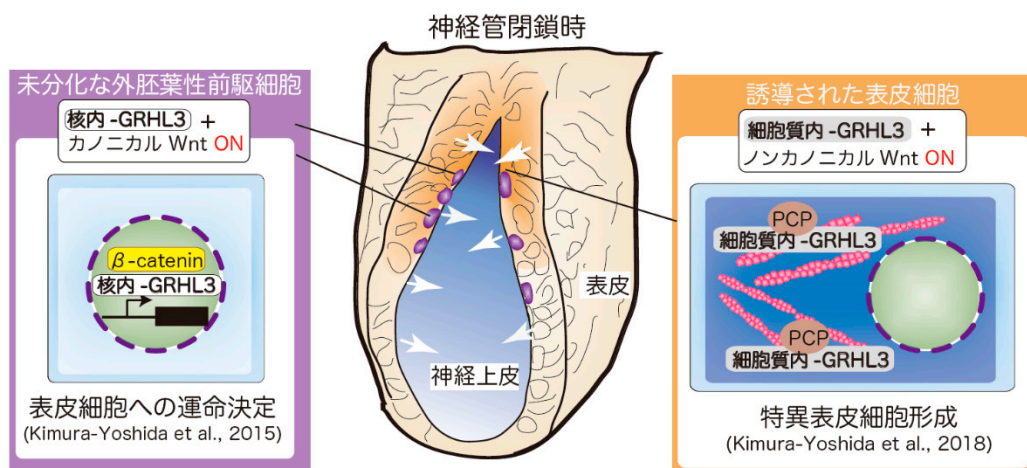


【目的】我々は神経管閉鎖時における表皮形成には2つの重要なプロセスからなることを提唱してきた。1つ目は「未分化外胚葉細胞から表皮細胞へ運命決定される」過程、2つ目は「特異な表皮細胞を作り出す」過程である。本課題では、これら2つの過程をスムーズにスイッチさせる分子システムを明らかにすることを目指している。これまでの研究成果から、表皮形成のマスター因子として働くGrainyhead-like 3 (GRHL3) タンパク質は、表皮細胞への運命決定時には核内に局在し転写因子としてカノニカルWnt経路と作用し、その後誘導された表皮細胞では、GRHL3因子は細胞質内へと局在を移しノンカノニカルWnt経路 (PCP経路) と共に働くことで細胞骨格に富んだ、強固な表皮細胞、「特異表皮細胞」を形成する (Kimura-Yoshida et al., 2018)。しかしGRHL3タンパク質の精密な核-細胞質の局在制御に関しては、全く不明であった。そこで、これらの知見を基盤に Grhl3因子の核から細胞質への移行に、どのような分子が関与しているのかを解明することを試みた。つまり本課題を遂行することで、細胞分化から形態形成へ移行する際に、異なるシグナル経路をスイッチングさせ、スムーズに連動させる分子機序を解明できると考えており、新しい分子メカニズムを明らかにできると期待している。

【方法】培養細胞内で GRHL3 因子と直接結合する因子を網羅的に同定した。得られた候補因子を幾つか絞って組織内における発現解析を行った。発現解析の結果から GRHL3 因子同様、表皮で発現の認められた因子に対して、CRISPR/Cas9 システムを用いて遺伝子欠損マウスを作製した。表現型解析では主に顕在性二分脊椎の発症の有無を検証した。さらにこれら作製した変異マウスと *Grhl3* 遺伝子変異マウスを交配させダブル変異マウスを作製し、その表現型解析を行った。最終的には canonical Wnt 経路や PCP 経路との関わりを検証した。

【結果】GRHL3 因子と直接結合する因子として、脱ユビキチン化酵素の一つである *ubiquitin specific peptidase 39* (*Usp39*) と、核移行に関わる新規の因子が得られた。ダブル変異のマウス作製、さらにそれら表現型解析等によって、USP39 因子は GRHL3 の細胞質局在を制御し、発生期の様々な器官において PCP 経路の活性化に作用していることが示唆された。また新規に同定した核内局在制御因子は、Grhl3 因子とのダブル変異マウスの表現型では脳突出の表現型が高頻度に見られた。以上の結果から、Grhl3 因子の表皮形成過程における核-細胞質内局在は、これらの因子によって制御されており、この制御により表皮形成の Wnt 経路のスイッチがスムーズに連動している可能性が強く示唆された。

神経管閉鎖時の表皮形成における GRHL3 因子の 2 つの働き



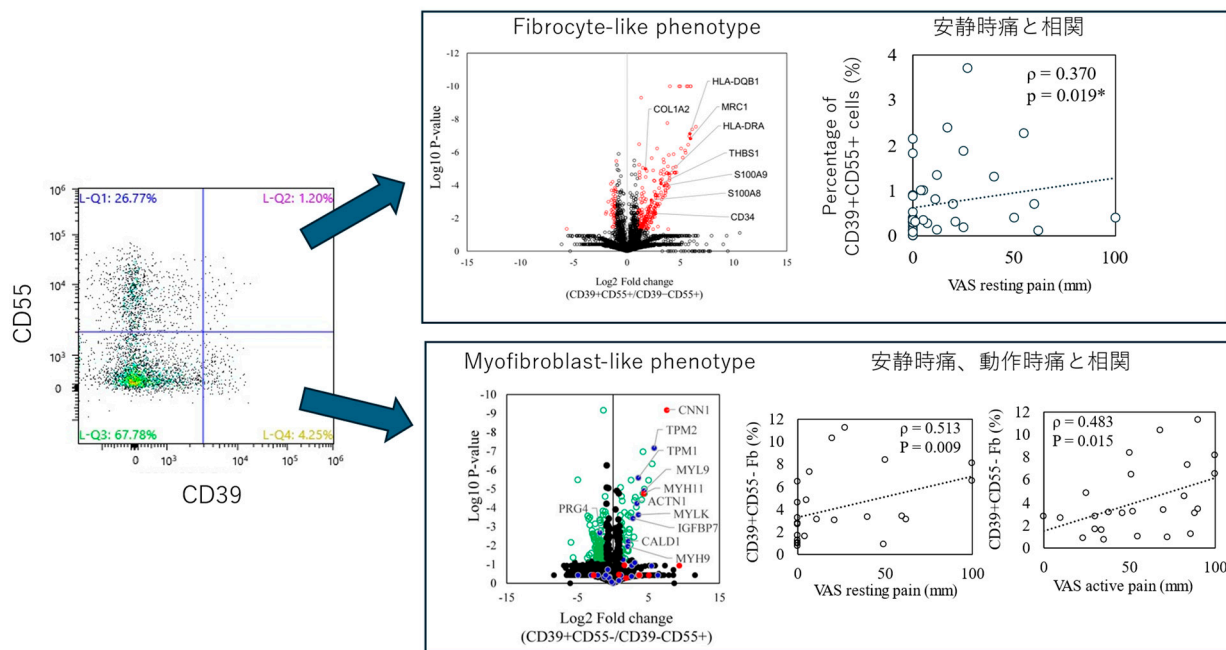
46 変形性関節症疼痛特異的線維芽細胞の同定と機能解析 内田 健太郎

【目的】 変形性関節症 (osteoarthritis : OA) は関節軟骨の変性に伴う関節内慢性炎症・疼痛疾患で、その数は本邦 2,400 万人にのぼる。しかし、OA の疼痛メカニズムは十分に明らかになっていない。近年の滑膜組織のシングルセル解析から、滑膜組織には種々の線維芽細胞サブセットが存在することが明らかになってきた。しかし、疼痛に関与する線維芽細胞サブセットの同定には至っていない。本研究ではオミクス解析による線維芽細胞サブセットの表現型解析と疼痛関連線維芽細胞サブセットの同定を行った。

【方法】 人工関節置換術を施行した Kellgren-Lawrence (KL) grades 3~4 の変形性膝関節症患者から滑膜組織を採取した。酵素処理後、有核細胞を採取した。セルソーターを用いて線維芽細胞分画 Fb (CD31⁻CD45⁻CD90⁺) における CD39⁻CD55⁻、CD39⁻CD55⁺、CD39⁺CD55⁻、CD39⁺CD55⁺ Fb を分離した。分離後、RNA-Seq によるトランスクリプトーム解析と LC-MS によるプロテオーム解析を行った。また、各サブセットの割合と関節裂隙幅、安静時、活動時疼痛スコアとの相関を検討した。

【結果】 CD39⁻CD55⁺ Fb は PRG4 mRNA およびタンパク質を高発現しており、滑膜表層細胞の表現型を示した。OA 疼痛との関連性は認められなかった。CD39⁺CD55⁻ Fb は CNN1、MYH11 などの筋線維芽細胞 (Myofibroblast) 関連遺伝子およびタンパク質を高発現していた。滑膜組織における CD39⁺CD55⁻ Fb の割合は安静時および動作時の疼痛スコアと正の相関を示した。CD39⁺CD55⁺ Fb は HLA-DRA、S100A8、S100A9 など Fibrocyte マーカーを発現していた。その割合は安静時疼痛スコアと相関した。本研究結果から CD39⁺CD55⁻ Fb、CD39⁺CD55⁺ Fb は OA 疼痛サブセットである可能性が示唆された。

変形性関節症疼痛特異的線維芽細胞の同定

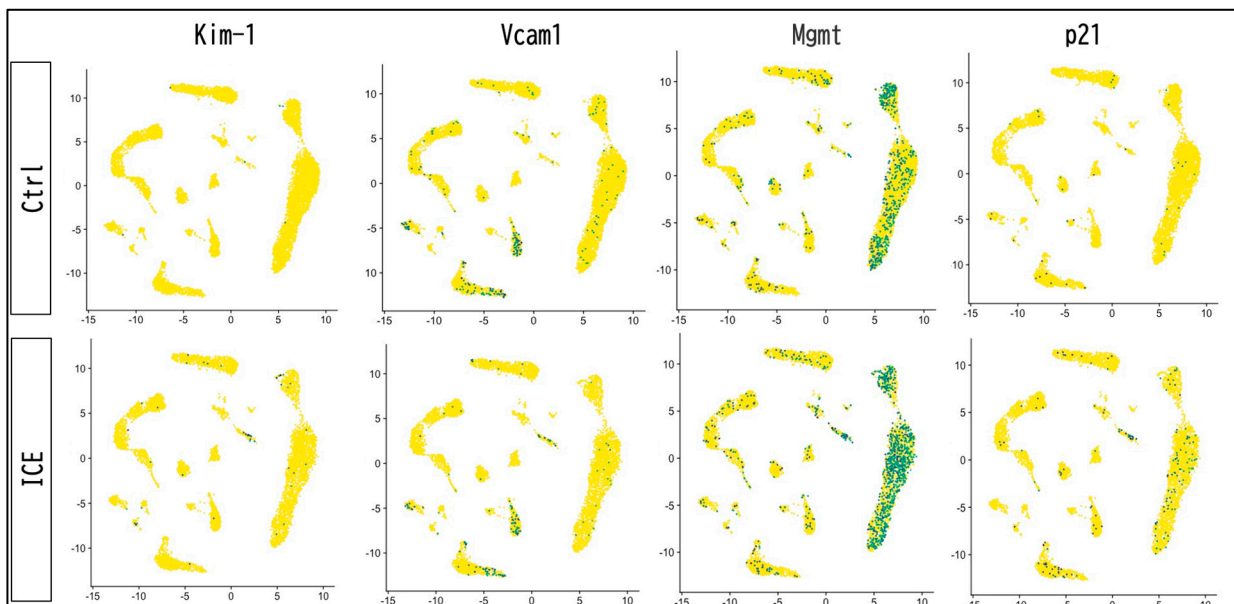


【目的】世界的な高齢化に伴い、慢性腎臓病（CKD）の患者数が増加している。特に、高齢化が進む日本では、透析開始時の平均年齢が1985年の54.41歳から2020年には70.88歳へと上昇しており高齢化の影響は大きい。加齢だけでも腎機能が低下することが知られているが、高齢者は急性腎障害からの回復も遅く、さらに回復したとしても慢性腎臓病への移行（AKI to CKD transition）が多い。この臨床的事実は、加齢により増加する老化細胞の増加と腎機能の低下が関連している可能性を示唆しており、細胞老化の制御がCKD治療の鍵となりうることを示している。我々はAKI to CKD transitionにDNA損傷応答機構の破綻と加速する細胞老化が関与することをこれまでに明らかにしており、本研究では一過性の内因性DNA損傷が腎構成細胞の老化に与える影響を解明するべく、新規モデルマウス（ICEマウス、Hayano M, et al. Cell. 2023;186(2):305-326.e27）を用いて探索的研究を行った。

【方法】I-PpoI^{STOP/+}マウスとCre^{ERT2/+}マウスの交配によりICEマウスを作製した。このマウスにタモキシフェンを投与すると、エンドヌクレースであるI-PpoIがマウスDNAを切断することができる。生後10~12週のマウスにタモキシフェン投与を行い、DNA損傷を誘導した。タモキシフェン投与は4週間行い、14ヶ月齢まで飼育した後に屠殺した。腎組織を用いて組織学的評価、Single-nucleus RNA seqによる網羅的解析を行った。

【結果】PAS染色およびマッソン染色による形態学的な評価ではコントロール群に比較して著明な差は認めなかった。Single-nucleus RNA seqにより、一過性のDNA損傷の影響は近位尿細管に強く出ることが明らかとなった。ICEマウスでは、修復不全のマーカであるKim-1やVcam1を発現する近位尿細管の増加が認められた。さらに、ICEマウスでは近位尿細管でp21の発現が上昇し、DNA修復遺伝子Mgmt（O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase）の発現上昇が示され、これらの細胞におけるゲノムDNAの不安定性と進行する細胞老化が示唆された。

尿細管不全修復、DNA損傷および細胞老化関連遺伝子発現レベルのUMAP



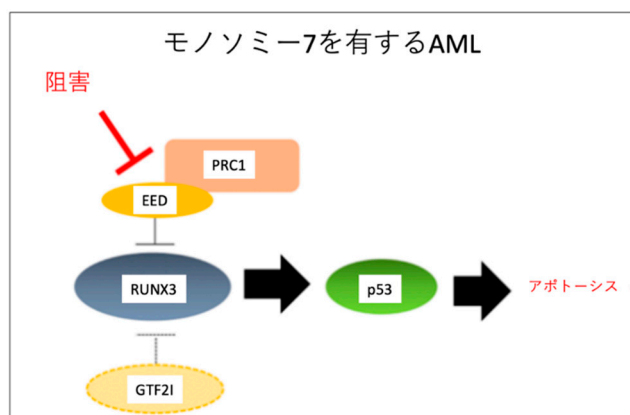
<p>48 7番染色体欠失を有する白血病特異的な治療標的の探索</p>	<p>黒川 峰夫</p>
--	--------------

【目的】 難治性造血器腫瘍の治療開発を推進するためには、網羅的解析技術により遺伝子異常を同定することに加え、エピジェネティクス、代謝、骨髓造血環境など、難治性病態を形成する異常の相互作用を、*in vitro*、*in vivo*の適切なモデルを活用して明らかにし、治療標的化する必要がある。その中でも7番染色体欠失（モノソミー7）を有する急性骨髄性白血病（AML）は極めて難治性であり、その治療標的の同定と制御は重要な課題である。本研究において我々は、7番染色体上の遺伝子やその欠失により変動する経路を治療標的化するために、モノソミー7を有するAMLのモデルを用いて、7番染色体上の遺伝子に対して網羅的に干渉することで責任遺伝子を同定することを目的とした。

【方法】 これまでの研究において我々は、7番染色体欠失によりエピゲノム異常が生じることに着目し、7番染色体を有するAML細胞株を用いてヒストン修飾に関連する遺伝子に対するsiRNAライブラリーによるドロップアウトスクリーニングを行い、結果として鍵遺伝子 *EED* を同定している。さらに、7番染色体欠失を持たないAML細胞株を用いた7番染色体上のエピゲノム関連遺伝子のsiRNAライブラリーによるドロップアウトスクリーニングの結果と精緻に照合することで、モノソミー7を有するAMLでは、7番染色体上に存在する *GTF2I* 遺伝子の発現量の低下により *EED* のノックダウンに対する選択的な脆弱性を獲得したことを明らかにした。本研究ではなぜ *GTF2I* 遺伝子の発現量の低下により *EED* のノックダウンに対する選択的な脆弱性を獲得するのか、その分子メカニズムを明らかにし、治療標的化するために、網羅的遺伝子発現解析、選択的遺伝子ノックダウンやAMLモデルを駆使して検証した。加えてヒト細胞を用いた検証を実行するため、モノソミー7染色体異常を有するAML患者の骨髓細胞よりiPS細胞の樹立を試みた。

【結果】 AML細胞において *EED* 遺伝子または *GTF2I* 遺伝子を選択的にノックダウンすることで生じる遺伝子変化をRNA-seq法により網羅的に検証したところ、両者に共通する標的遺伝子候補として *RUNX3* が同定された。さらに、選択的遺伝子ノックダウン法を用いた実験結果から、モノソミー7を有するAMLでは、7番染色体上に存在する *GTF2I* 遺伝子の発現量の低下により *EED* をノックダウンすると *RUNX3* の発現が誘導され、引き続いて *RUNX3* の既知の下流遺伝子標的である *TP53* 経路を活性化することで細胞死を誘導していることが明らかになった。また、モノソミー7染色体異常を有するAML患者の骨髓細胞を用いたiPS細胞の樹立においては、東京大学医学部附属病院を受診したモノソミー7染色体異常を有するAML患者から1ヶ月に1~2例程度の頻度で検体を採取し、モノソミー7AML-iPS細胞を複数系統樹立した。一部の細胞株について血球へ分化誘導を行い、フローサイトメトリー検査によって造血幹・前駆細胞マーカーを発現していることを確認した。7番染色体欠失固有の分子生物学的な脆弱性の理解に基づいた新規標的治療の開発は、患者の生存期間の延長およびQOLの向上に加え医療産業に絶大なインパクトを与え、医学の発展に大きく寄与すると考えられる。

モノソミー7染色体異常を有するAML細胞における治療標的：*EED*遺伝子

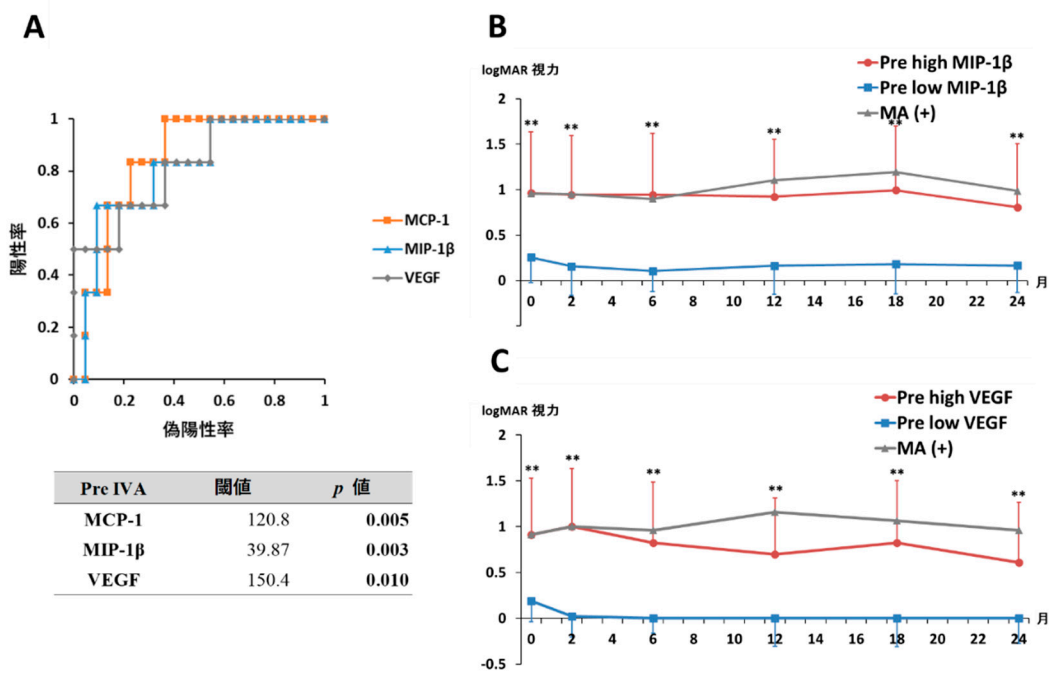


【目的】 加齢黄斑変性 (AMD) は本邦における中途失明原因の第 4 位の疾患である。AMD は滲出型と萎縮型に分類され、抗血管内皮増殖因子 (VEGF) 抗体の硝子体内投与は滲出型 AMD の第一選択治療法となっている。一方、同治療中に発症する黄斑萎縮 (MA) は失明に至る重篤な合併症であるが有効となる治療法が現在までなく、その解決は喫緊の課題となっている。本研究では、繰り返し採取可能であり眼内免疫環境を反映する前房水をバイオマーカーとして用い、抗 VEGF 抗体療法中の滲出型 AMD 眼に発症する MA に関与する制御因子を同定することを目的とした。

【方法】 本研究は、未治療滲出型 AMD 患者 28 眼 28 例を対象とした前向き観察研究である。MA は HARBOR study において定義された直径 ≥ 250 μm となる黄斑部の網膜萎縮とした。滲出型 AMD 眼に対し、抗 VEGF 抗体の一種であるアフリベルセプトの硝子体内投与 (IVA) を導入期 (3 ヶ月間) では一ヶ月毎に実施し、事後、随時投与法 (PRN 法) にて IVA を行い、2 年間の治療観察を行った。前房水は IVA 初回前 (Pre) および 3 回目前 (Post) に採取し、前房水中に含まれる 27 種類のサイトカインを網羅的に測定した。前房水中サイトカインが滲出型 AMD 眼における MA 発症を予測するバイオマーカーとなるのかを ROC 解析および Kaplan-Meier 法を用いて評価した。また、バイオマーカー陽性 (高値) 群および陰性 (低値) 群間の経過観察時における視力差を Wilcoxon 順位和検定にて、バイオマーカー陽性群と MA 発症群間の視力推移の類似性について折れ線グラフを用いて評価した。

【結果】 2 年間の IVA 治療中に MA を発症した滲出型 AMD 眼は、6 眼 (21.4%) であった。(A) ROC 解析および Kaplan-Meier 法にて検出された MA 発生の有意な予測因子は、Pre-MCP-1、-MIP-1 β 、-VEGF-A であった。(B) Pre MIP-1 β 高値群および (C) Pre VEGF-A 高値群における視力は各低値群と比較して、すべての観察時点において有意に不良であり、また各高値群の視力推移は MA (+) 群と類似していた。本研究結果から、抗 VEGF 抗体療法前の前房水中 MIP-1 β および VEGF-A 値が、滲出型 AMD 眼における MA 発症を予測する有望なバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

前房水中サイトカイン値による抗 VEGF 抗体療法中の滲出型加齢黄斑変性眼における黄斑萎縮の発症予測



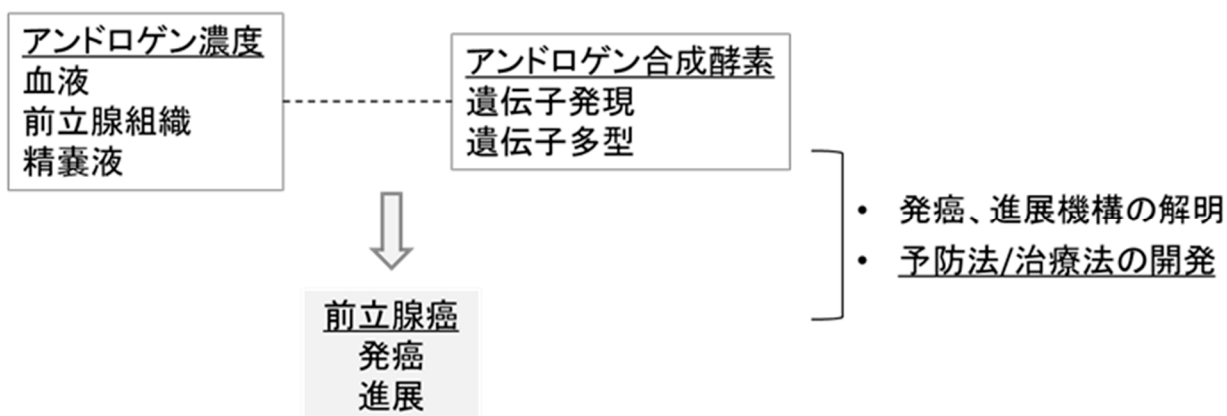
50	前立腺癌での新規アンドロゲンと代謝遺伝子の統合解析	塩田 真己
----	---------------------------	-------

【目的】 前立腺癌は、その発生臓器である前立腺と同様アンドロゲンに依存性を有するといった特徴があり、前立腺癌の発癌過程において、アンドロゲンが重要な役割を果たしていると考えられている。前立腺癌とアンドロゲンの関係について、血液中での古典的アンドロゲンについて多くの研究が行われてきたが、相反する報告が多く統一した見解は得られていない。前立腺や前立腺癌は血液中のアンドロゲンを細胞内に取りこみ、細胞内により活性の高いアンドロゲンに変換することで必要なアンドロゲンを得ており、前立腺癌とアンドロゲン環境の関係についての研究では、前立腺組織や腫瘍組織でのアンドロゲン濃度の解析が重要と考えられる。近年、新規アンドロゲンである 11-酸化アンドロゲンがヒトにおいても重要なはたらきを有していることが注目されている。11-酸化アンドロゲンは、下図のような合成経路を経て前立腺組織内で合成されると考えられている。そのため、前立腺癌の発癌や進展において、11-酸化アンドロゲンが重要なはたらきを果たしている可能性が示唆されるが、これまでほとんど解析されていない。また、11-酸化アンドロゲン濃度とアンドロゲン代謝に関する遺伝子発現や遺伝子多型との関連についても解析されていない。そこで、我々は、血中、前立腺および精囊液での 11-酸化アンドロゲンを含むアンドロゲンの濃度を解析し、前立腺組織でのアンドロゲン代謝に関する遺伝子発現とゲノム DNA を用いてアンドロゲン代謝に関する遺伝子多型を解析することで、前立腺癌の癌化や進展におけるアンドロゲンとアンドロゲン代謝遺伝子の意義を統合的に明らかにすることを目的に本研究を行う。

【方法】 前立腺癌に対して前立腺全摘除術を施行した症例および対象群として前立腺癌以外の疾患で前立腺を含む摘出手術を施行した症例から精囊液を採取し、ELISA 法にてテストステロン濃度を測定した。前立腺癌および前立腺癌以外の疾患、T 病期、グリソングループ分類により、精囊液テストステロン値の差について Wilcoxon's rank sum 検定で検討した。

【結果】 前立腺癌 149 症例、前立腺癌以外の疾患 26 症例で検討を行った。前立腺癌症例（中央値 1.94 ng/ml）では前立腺癌以外の疾患（中央値 1.45 ng/ml）に比べ、精囊液テストステロン値が有意に高値であった ($p=0.001$)。しかし、T 病期やグリソングループ分類による精囊液テストステロン値の差は認めなかった。

研究の全体像

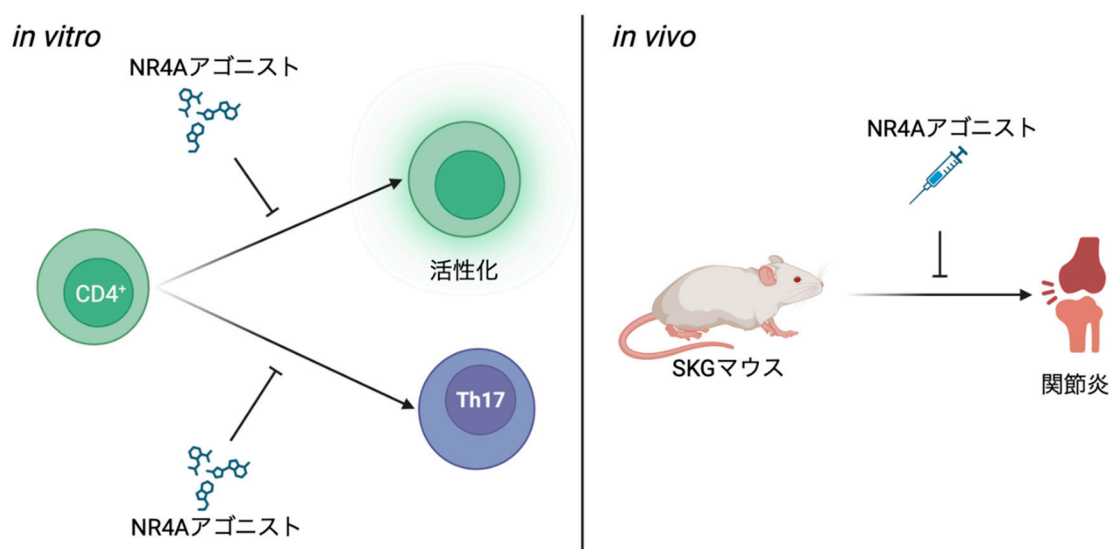


【目的】 関節リウマチは、慢性の関節炎およびそれに続く関節破壊によって、日常生活動作や生活の質を障害する自己免疫疾患である。関節リウマチの治療は、サイトカインなどを標的とした生物学的製剤や、分子標的抗リウマチ薬の臨床応用によって大きく進歩した。しかしながら、それらの治療では副作用として外来抗原に対する免疫応答も抑制してしまうことが課題である。核内受容体 NR4A ファミリーは、リンパ球では抗原刺激によって発現が誘導される初期応答遺伝子の一つであり、転写因子として機能する。B 細胞、T 細胞免疫寛容の制御に重要な役割を果たすことが明らかとなっている。本研究の目的は、NUR77 (*Nr4a1*) を標的として自己反応性リンパ球を特異的に制御する、関節リウマチ治療への臨床応用を検討する基盤を創出することである。

【方法】 NR4A 低分子アゴニストのマウス CD4⁺T 細胞への作用を検証するため、*in vitro* で T 細胞の活性化を抑制できるかどうかを調べた。WT マウスの CD4⁺T 細胞を *in vitro* で抗 CD3/28 抗体で刺激する際に、NR4A 低分子アゴニストを添加し、活性化マーカーの発現をフローサイトメトリーで評価した。また、遺伝子発現の変化を RNA シーケンス解析によって評価した。次に、SKG マウス関節炎モデルに対して NR4A 低分子アゴニストを投与し、経時的に関節炎スコアを評価した。NR4A 低分子アゴニストを投与した SKG マウスの脾臓 CD4⁺T 細胞をフローサイトメトリーで解析した。また、マウス滑膜中の免疫細胞をフローサイトメトリーで解析した。

【結果】 NR4A アゴニストを加えることで、マウス CD4⁺T 細胞の *in vitro* での活性化マーカーの発現が低下した。NR4A アゴニストによって、炎症に関連するサイトカインなどの遺伝子発現が抑制された。さらに、*in vitro* での Th17 分化に対する影響を調べたところ、NR4A 低分子アゴニストによって Th17 分化が阻害されることが示された。次に、NR4A 低分子アゴニストによって SKG マウス関節炎の程度が抑制されることが示された。NR4A アゴニストを投与した SKG マウスの脾臓では、コントロールのマウスと比較してエフェクター T 細胞、特に Th17 細胞が減少していた。NR4A 低分子アゴニストを投与したマウスではコントロールと比較して滑膜中の Th17 細胞の割合が減少していた。以上の結果から、NR4A が関節リウマチなどの関節炎、あるいは Th17 細胞依存性の自己免疫病態の治療標的となりうることを示唆された。NR4A を標的とした治療の開発に向けて、今後、自己免疫病態における NR4A の役割について更なる解明が望まれる。

NR4A アゴニストによる T 細胞活性化抑制と、SKG マウス関節炎の制御



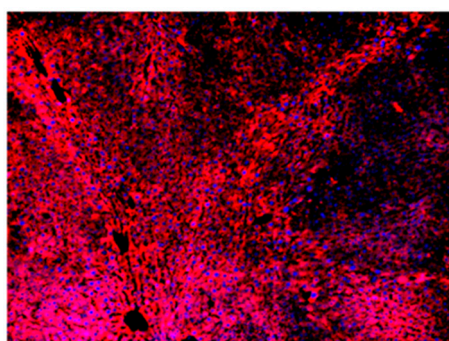
(Created with BioRender.com)

【目的】 肝硬変の終末期である非代償性肝硬変の唯一の治療法は肝移植であるが本邦では脳死ドナーが不足しており健康なドナーから肝臓の一部を切離し供与する生体肝移植が主に行われている。生体ドナーへの侵襲は可能な限り小さくする必要があり、ドナーへのリスクを低減するには可能な限り摘出する肝臓を小さくすることが望ましいが、ドナーから摘出される肝臓（グラフト）が小さくなると肝臓の移植を受けるレシピエントは肝不全をきたし、生存率が低下する。肝臓の質的指標としてはドナーの年齢の他に我々は LRRN2 の遺伝子発現を測定することで術後肝不全の発症を予測できることを報告してきたが現時点で LRRN2 の評価には肝生検を必要とする。肝生検は出血等のリスクを伴う侵襲的な検査である。ドナーの安全性を担保した非侵襲的なグラフトの質的評価方法が求められるため、我々は末梢血単核球（PBMC）に着目した。PBMC を用いてヒト肝臓の生物学的老化やグラフトの質を安全に予測する研究を立案し、さらに治療として iPS 由来 Hepatocyte の移植を検討し、iPS 由来肝細胞を肝不全マウスモデルに投与し生着・機能することを確認した。事前にグラフト機能を予測することができれば、質が悪く、移植後肝不全を起こす可能性が高い症例では事前に患者由来の iPS 細胞から肝細胞を誘導し、肝不全時には投与し肝不全による死亡を予防できる。本研究は生体肝移植において予測から治療までを網羅する非常に重要な研究となりえる。

【方法】 1. PBMC を用いたグラフト不全予測遺伝子の絞り込みに向けた PBMC 収集方法の確立：生体肝移植ドナー患者より術前に採血を施行し PBMC を生成した。従来方法では採取された PBMC の生存率は約 30% と不良であり、新規 PBMC 生成方法を確立し生存率向上を測った。2. ヒト iPS 由来星細胞（i-Stes）を用いたヒト iPS 由来肝細胞（i-Heps）の増殖：ヒト iPS 細胞より i-Stes と i-Heps を分化誘導した。i-Stes とヒト星細胞細胞株 LX-2 から収集した上清を i-Heps に投与し、i-Heps への増殖の影響を検討した。3. 肝不全モデルラットを用いた i-Heps の治療応用：免疫不全ラットに対し 70% 肝切除を施行し肝不全モデルラットを作製した。肝不全モデルラットに対し経門脈的に i-Heps を投与した。投与後 2・4・8 週目に血液検査を施行しラット血清中のヒトアルブミン濃度を測定した。移植後 90 日目に肝臓をラットより摘出し、ラット肝での i-Heps の生着を確認した。

【結果】 1. PBMC を用いたグラフト不全予測遺伝子の絞り込み：ドナー患者の術前血液を採取し、PBMC を採取する、従来の PBMC 採取の方法では収集細胞の生存率が約 30% ほどであったが、新規採取方法を確立し収集細胞生存率を約 80% にまで引き上げた。2. ヒト iPS 由来星細胞（i-Stes）を用いたヒト iPS 由来肝細胞（i-Heps）の増殖：i-Stes の上清は LX-2 の上清と比較して有意に i-Heps の増殖を促した。3. 肝不全モデルラットを用いた iPS 由来肝細胞の治療応用：i-Heps 投与後施行したラットの血液検査ではいずれの観察期間においてもヒトアルブミンの発現を認め、移植された i-Heps が機能していることを示唆していた。術後 90 日目に i-Heps 移植ラットの肝臓を摘出しヒトアルブミンの発現を蛍光免疫染色で染色しラット肝にヒトアルブミンが発現していることを確認した。

免疫不全ラットへのヒト iPS 由来肝細胞移植

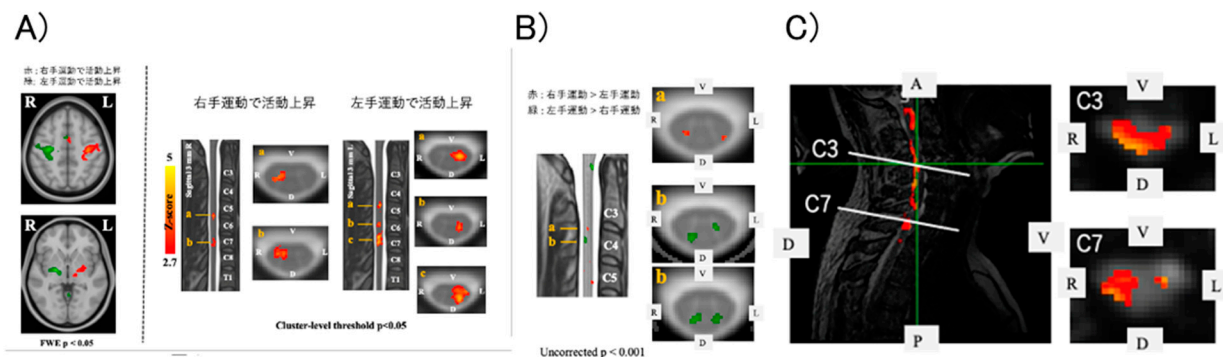


【目的】 高等霊長類は手指巧緻運動の獲得とともに、運動指令を大脳運動野から脊髄運動ニューロンに直に伝える脳脊髄運動伝導路を発達させた。この経路を皮質脊髄路と呼ぶ。サルの研究から皮質脊髄路とは別の運動伝導路も併せて動員されることが分かった。この経路は間接運動伝導路と呼ばれ、大脳運動野の運動指令が脳幹や脊髄上位頸髄（頸髄レベル C3-C5）の神経核を経て脊髄運動ニューロンに到達する。ヒトではこの経路が同定されていない。本研究では、ヒト間接運動伝導路を同定する MRI 画像技術の開発を行った。

【方法】 2 つの実験系を用いて間接運動伝導路の同定を進めた。方法 1：運動課題で動員される神経核の観察) 手指運動課題を片手で行わせると、利き手と非利き手の両方で皮質脊髄路が動員される。非利き手の運動ではそれに加えて間接運動伝導路が参加する証拠を掴んでいる。右手運動と比べて左手運動で脳幹、脊髄の神経核が活動するとの仮説に基づき、脳幹脊髄の神経活動探索技術を開発した。これによりヒト間接運動伝導路に含まれる脊髄、脳幹の神経核同定に向けた参考資料とした。方法 2：大脳運動野との電気生理学的疎通の検証) 方法 1 で同定した脳幹や脊髄の神経活動を関心領域に設定した。大脳運動野のシグナルが上位頸髄に到達するのかを電気生理学的に調べた。刺激で脳幹もしくは脊髄の神経核の神経活動が誘発されるのかを観察した。方法 1 で得た情報と組み合わせ、ヒト間接運動伝導路の経路同定を進めた。

【結果】 結果 1：右利き健常者を用いて利き手（右手）と比較して非利き手（左手）の運動における大脳、脳幹、脊髄の神経活動を比較した（N=30）。手指筋肉に神経入力する下部頸髄および大脳運動野の神経活動に関心を絞って報告済みである。その結果は再現された（下図 A）。今回、新たに脳幹と上部頸髄の神経活動を関心に据えた。右手、左手ともに上部頸髄の神経活動を認めた（下図 B）。右手運動に比べて左手運動で活動が高かった。間接運動伝導路の中継神経核として脳幹中脳～橋の赤核、網様体核を想定していた。当該部位の活動を個人レベルで観察しているが群解析で検定を保留している。脳幹下部背側部の活動は確定した。この部位は解剖学的アトラスの参照により楔状束核近傍の副楔状束核と結論した。筋出力に伴う求心性経路を反映していると解釈した（下図 A）。結果 2：一次運動野に対して経頭蓋磁気脳刺激で単発刺激を行い、脳幹、脊髄の誘発神経活動を観察した（N=5）。結果 1 の情報から上位頸髄の誘発活動に着目した。データサンプル数が被験者一名ずつの解析で上位頸髄の活動を確証した（下図 C、C3 髄節レベルの結果参照）。大脳運動野からシナプスを介して上位頸髄神経回路と結合があるとの仮説を支持する結果であった。

結果概要図



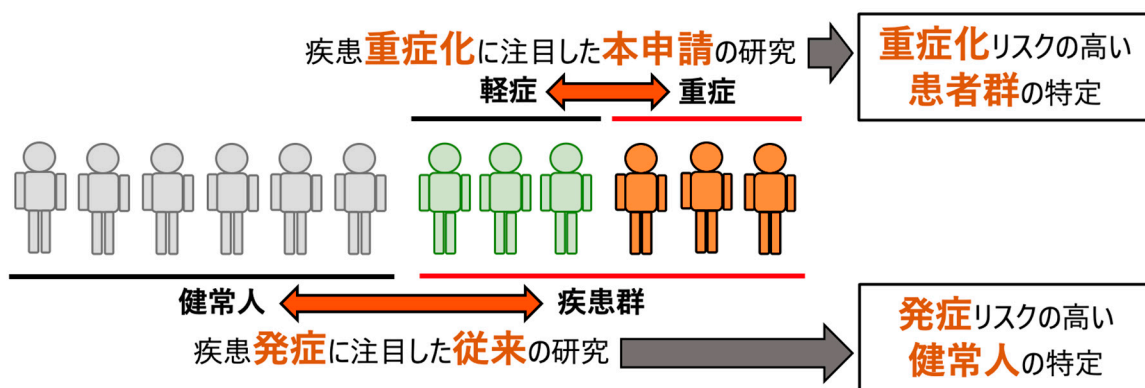
54 ゲノム情報を用いた疾患重症化の予測手法の開発	石垣 和慶
----------------------------------	-------

【目的】 大多数の疾患の病態形成にはゲノムに内在する遺伝的素因（ゲノム因子）が強く関与する。そのため、個々の患者のゲノム情報を効率的に活用することで医療の質を改善できるという期待が世界的に高まっている。近年の大規模ゲノム研究は患者と健常人のゲノム情報を比較することで疾患発症に関与するゲノム因子を多数同定してきた。そして、これらのゲノム因子にもとづいて発症リスクの高い健常人を特定できることが示されている。しかし、臨床現場では既に発症した患者の診療が一般的であるため、発症リスクの予測の有用性は限定的である。むしろ、“発症”ではなく“重症化”リスクを予測することが医学的・社会的なニーズであり、重要な問いである。発症と重症化には異なる生物学的メカニズムが関与するため、重症化に関わるゲノム因子は重症と軽症の患者の比較によって初めて探索できるが、現状そのような研究は極めて稀である。本研究では、重症化の予測が臨床的に重要課題である全身性エリテマトーデス（SLE）を対象として、重症化に関わるゲノム因子の探索と、その因子にもとづく重症化の予測アルゴリズムを開発することを目指した。

【方法】 1. 正準相関分析を応用して、SLE の症例“間”の違いを網羅的に反映した transcriptome と、転写因子による遺伝子発現制御機構（TF-gene regulatory network : TF-GRN）とを有機的に統合する新しい解析手法を開発した。この解析手法を SLE の大規模ゲノム解析結果との統合解析に適応した。2. 最新の単細胞解析である CITE-seq の条件検討を行った。健常人の末梢血免疫細胞を用いて CITE-seq のパイロット実験を行った。3. イルミナ社のマイクロアレイを用いて LUNA コホートの SLE 症例の遺伝子型判定を行った。

【結果】 1. SLE の症例間の不均一性と関連するゲノム領域を同定し、その領域に SLE のリスク多型が集積していることを見出した。この結果から SLE の重症化に関わるゲノム因子の推定が可能となった。今後、これらのゲノム因子にもとづく重症化の予測アルゴリズムの開発を計画している。2. CITE-seq の各種実験条件が最適化され、末梢血の免疫細胞を高い解像度で評価できることを確認した。今後、CITE-seq を用いて SLE 患者の末梢血免疫細胞を対象とした高い解像度の transcriptome 情報を回収し、1. で開発した新しい解析手法に応用する計画である。3. アレル頻度情報などが適切であることを確認し、データの QC が完了した。今後、1. で開発する新しい予測アルゴリズムを適応し、臨床情報との関連を評価する計画である。

本研究構想の目標の概念図

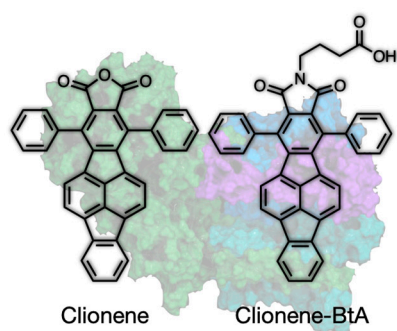


【目的】 ナノカーボン類は材料科学に革命をもたらしたが、「カーボン＝材料」という固定観念のためバイオ分野への展開はあまりなされていない。本研究の目的は、従来の生体機能分子にはないナノカーボンの特徴を活かした分子設計によって創薬分野に革新をもたらす生物活性分子ナノカーボンを創製することである。これまで、創薬のための経験則として、生物活性分子らしさの基準（リピンスキーの法則）が提唱されてきた。各製薬会社の研究によってリピンスキーの法則に基づく化合物集合体（ケミカルスペース）からの医薬品はほぼ探索し尽くされており、新規医薬品の発見は世界的にも困難な状況にある。ナノカーボンは、リピンスキーの法則から大きく外れた分子の特性を備えているため、本研究の成功は従来のケミカルスペースを大きく拡張することを意味しており、新たな探索領域に基づく創薬研究分野の新潮流が生まれると期待される。

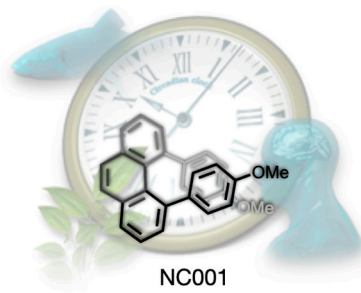
【方法】 本研究では主にタンパク質間相互作用、免疫シグナル、体内時計、抗がん作用、バイオフィーム形成を制御する分子ナノカーボンの創製を行った。いずれも既にヒット分子を見出しており、本研究では高活性・選択性分子の開発、制御機構の解明、創薬への応用を行った。

【結果】 タンパク質間相互作用（protein-protein interaction : PPI）は生体内の数多の生命現象に関わっており、創薬開発における有力なターゲットとして注目を集めている。タンパク質間相互作用制御のための新しい分子として、最近、クリオネの形をした分子ナノカーボン「クリオネン」を見出している。クリオネンの構造活性相関研究を行うため、合計 7 種類のクリオネン誘導体を合成し、独自に開発したカイコ PND/PND-2 PPI に対する阻害活性の定量評価系 NanoBiT システムで活性を評価した。その結果、クリオネンの無水フタル骨格にブチル酪酸（Butyric acid）を導入したクリオネン誘導体（Clionene-BtA）が、クリオネンに匹敵する生物活性をもつことが明らかになった。生物時計は、地球の自転に伴う環境変化に適応するために生物が獲得した生理システムであり、昼夜の変化に対応した約 24 時間周期の概日リズムや四季の変化に対応した約 1 年周期の概年リズムを制御している。生物時計機構を解明し、自在な人工制御が可能となれば様々な疾患の克服に役立つだけでなく、食糧増産につながる動植物の生産性の向上が期待できる。最近 NC001 という我々が合成したナノカーボン分子に哺乳細胞の概日リズムを長周期化する活性があることを発見した。そこで NC001 誘導体ライブラリーの構築と活性評価を行い、構造と活性との相関関係を見出した。微生物が固相表面に形成する集合体であるバイオフィームは、細菌が外的要因から身を守るために形成するものだが、感染症や様々な疾患の原因とされており、特に医療現場や生態系における一大問題となっている。これまで、バイオフィームの化学的、生物的、物理的除去法が開発されてきたが、バイオフィームのみを選択的に阻害できる非殺菌剤の開発が強く望まれている。今回、738 種の分子を用いたバイオフィーム形成阻害試験を実施した結果、30%以上の阻害を示した分子を 13 種見出した。さらに、これら 13 種の分子のバイオフィーム破壊能を検証したところ、[6]CPP の誘導体である F₁₂[6]CPP が他の分子に比べ活性が高いことを見出した。

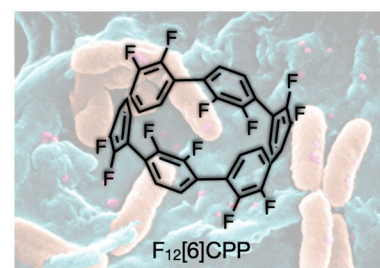
研究の概要



PPI制御・免疫シグナル制御



体内時計制御



バイオフィーム形成制御

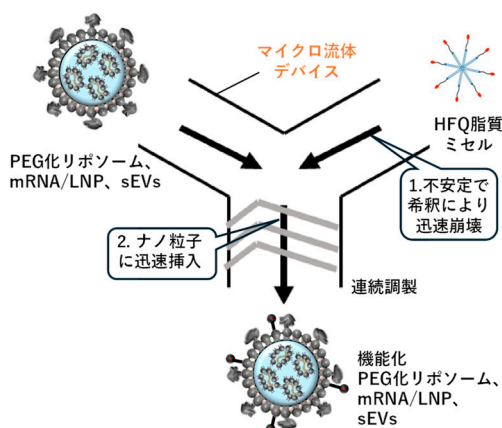
56	新規機能性分子修飾核酸封入脂質ナノ粒子の開発と応用	川上 茂
----	---------------------------	------

【目的】 mRNA 封入脂質ナノ粒子 (LNP) は mRNA ワクチンとして実用化されたが、*in vitro* 発現能を生かしたデザイナー細胞創出、様々な細胞を標的とした治療薬としても期待されている。本研究では、配向性を制御した標的指向型 mRNA/LNP 製剤ならびにその大量調製法の開発を目的として、(i) 細胞膜への結合を高める新規 (EK)₄-KK-HFQ (High Functionality and Quality : 高機能・高品質) 脂質の開発、(ii) (EK)₄-KK-HFQ 脂質修飾 mRNA/LNP の迅速後修飾・マイクロ流体法による調製法の開発、(iii) 配向性を制御した抗体修飾 mRNA/LNP 開発に向けた Fc 領域 (FcR) 結合性ペプチドおよびクリック反応結合が可能な Alkyne 基-HFQ 脂質の開発、(iv) ゲノム編集ツールを搭載した mRNA/LNP 製剤の開発を行った。

【方法】 mRNA/LNP はマイクロ流体デバイスを用いて調製した。発現を評価するためにホタルルシフェラーゼをコードした mRNA を用いた。各 HFQ 脂質は固相合成法により合成し、HPLC で精製を行った。評価方法としては、各 HFQ 脂質修飾が及ぼす物理化学的性質および品質への影響を明らかにした。また、細胞結合に影響を与える機能性分子修飾の効果については、細胞結合や細胞内化機構の解析を行った。mRNA/LNP の発現への影響については、ルシフェラーゼ活性の評価を行った。マイクロ流体・後修飾法については、マイクロ流路の2つの流路のうち、PEG 化リポソーム、mRNA/LNP、小型細胞外小胞 (sEVs) を片方の流路に HFQ 脂質をもう片側の流路にセットし、迅速混合を利用した新たなフロー調製を行い、物理化学的性質、品質、細胞結合性に与える影響を解析した。

【結果】 (i) 細胞膜への結合を高める新規 (EK)₄-KK-HFQ 脂質の開発に関しては、様々な誘導体を合成して、ペプチド配列が細胞結合性に与える影響を明らかにした。また、(EK)₄-KK-HFQ 脂質は PEG 化リポソームや mRNA/LNP の物理化学的性質や品質に大きく影響を与えることなく (EK)₄-KK 修飾を施すことが可能であり、それぞれの細胞結合性を有意にあげることができた。(EK)₄-KK-HFQ 脂質で修飾した mRNA/LNP は、電荷的に安全とされるほぼ中性の電荷を保ちながらも、A549 細胞、DC2.4 細胞、C2C12 細胞において 85~300 倍という発現を大幅に上げることができ、今後のデザイナー細胞樹立において有益なツールとなり得ることが示された。(ii) (EK)₄-KK-HFQ 脂質修飾 mRNA/LNP の迅速後修飾・マイクロ流体法による調製法の開発に関しては、本法を用いて PEG 化リポソーム、mRNA、sEVs の (EK)₄-KK-HFQ 脂質による機能化ができることを証明した。(iii) 配向性を制御した抗体修飾 mRNA/LNP 開発に向けた Fc 領域 (FcR) 結合性ペプチドおよびクリック反応結合が可能な Alkyne 基-HFQ 脂質の開発については、各々の HFQ 脂質を用いて、新たな配向性を制御した抗体修飾 mRNA/LNP の開発を行うことに成功した。(iv) ゲノム編集ツールを搭載した mRNA/LNP 製剤の開発については、Cas9 mRNA およびがん抑制遺伝子 PTEN を認識する sgRNA の設計・合成に成功した。今後は、各 HFQ 脂質修飾 LNP に内封してゲノム編集薬としての研究を行う。

PEG 化リポソーム、mRNA/LNP、sEVs のマイクロ流体・迅速後修飾法

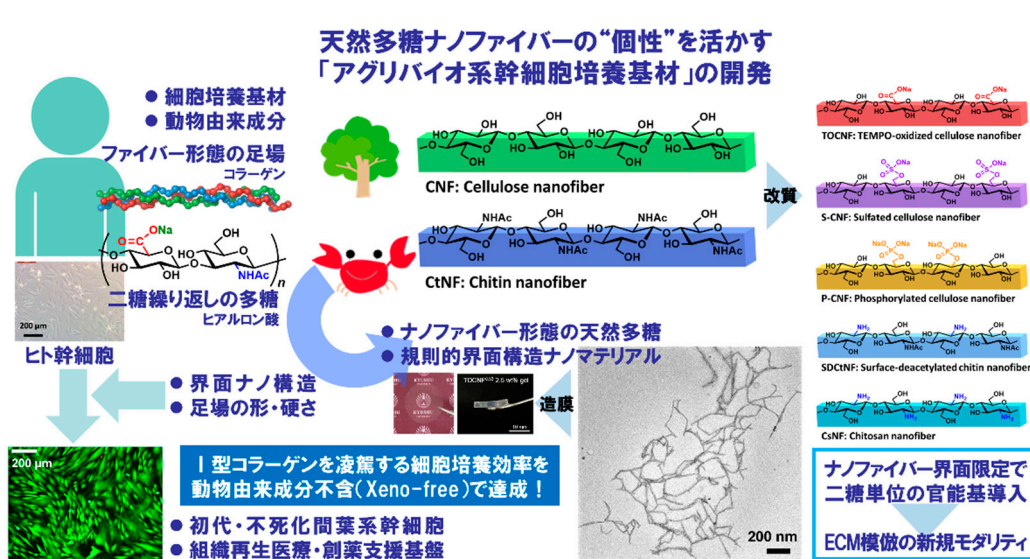


【目的】 豊富で再生可能なバイオマスである森林資源のセルロースや海産物のキチンは、ともに人工合成不可能なβ-1,4グリコシド結合の伸びきり鎖結晶からなるナノファイバー形状を特徴とする構造多糖であり、結晶構造の精密性を保持したまま、界面物性や化学特性を制御できる。本研究では、天然多糖の個性である「しなやかな硬さを持つナノ繊維形状（物理的特性）」と「制御可能な糖鎖界面（化学的特性）」が、生体内で細胞を取り囲む細胞外マトリックス（Extracellular matrix : ECM）の特徴を備える点に着目し、天然多糖のナノ構造が鍵を握る生体ECMの機能模倣のコンセプトで、再生医療・創薬支援基盤に有用な幹細胞制御培養基材の開発を試みた。

【方法】 バイオイナートなセルロースナノファイバー（Cellulose nanofiber : CNF）やキチンナノファイバー（Chitin nanofiber : CtNF）に対して、表面カルボキシ化・表面硫酸エステル化・表面リン酸化・脱アセチル化などの化学修飾を施した。所定濃度の水分散液をガラス基材や細胞培養用ポリスチレン（Tissue culture polystyrene : TCPS）基材に塗布、あるいはCa²⁺イオン架橋によりゲル化し、各種細胞培養基材を作製した。ヒト骨髄由来不死化間葉系幹細胞（Human mesenchymal stem cell : hMSC; UE6E7T11）や初代hMSCを播種し、通常培地や血清フリー条件で培養した。生細胞数・生死細胞染色・遺伝子発現挙動解析・各種バイオアッセイを実施し、構造多糖を生体材料とするヒト幹細胞の培養挙動を検討した。

【結果】 CNFやCtNFには細胞接着性がないにもかかわらず、適切な表面官能基化によって、線維芽細胞・筋芽細胞・肝細胞・骨芽細胞様細胞・ヒト間葉系幹細胞を培養可能なバイオマテリアルの開発に成功した。特に、無血清培地を用いて初代hMSCを培養した場合、TCPS基材やCNF基材にはhMSCは接着せず、細胞同士が凝集したスフェロイド形態を示したのに対して、CNF表面にカルボキシ基や硫酸基を適量導入（0.5~1.5 mmol/g）することで、細胞接着・増殖性が著しく向上した。hMSCは多分化能を保持しており、軟骨細胞・脂肪細胞・骨芽細胞に分化できた。さらに、表面カルボキシ化CNFのゲル化により表面弾性率を制御した基材では、hMSCは硬さに応じた遺伝子発現挙動の変化を示し、3~4 kPaの柔らかいゲル基材においては未分化維持に関与する*Nestin*遺伝子の発現量が有意に上昇した。一方で、CNF表面にランダムにカルボキシメチル基を導入してもこの効果は得られず、ECM様の規則的なウロン酸繰り返し構造の重要性が示唆された。構造多糖が細胞機能に直接働きかける新規バイオアダプティブ基材としての医療応用に期待がもたれる。

構造多糖ナノファイバーを用いる幹細胞制御培養基材の開発戦略

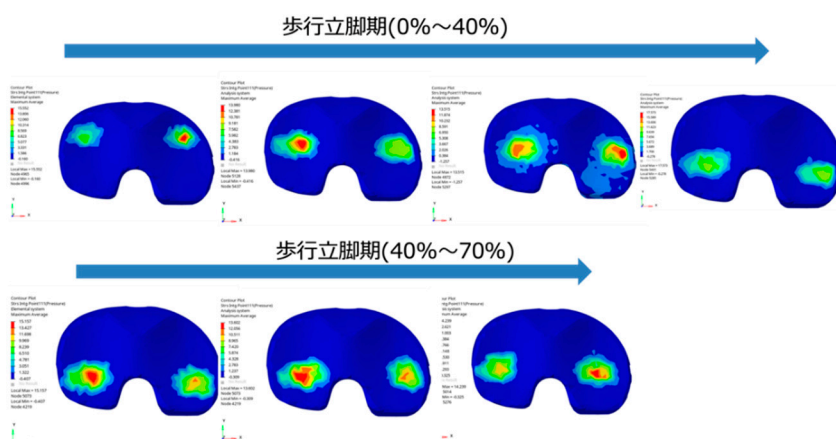


【目的】 重度の変形性膝関節症に対しては人工膝関節置換術が行われる。しかしながら、人工膝関節置換術で用いられた人工膝関節の約 5% が力学的要因によって 5 年以内に再置換されている。このため、人工膝関節の滑りや摩擦・摩耗などの性能を評価することは、人工膝関節の緩みなどの故障原因の解明に非常に重要である。この評価方法の一つに、ヒトの筋骨化句構造を再現した歩行ロボットの利用が考えられる。筋に模したワイヤで動作時の筋張力を再現することで、ヒトの日常動作を再現できる。また、歩行ロボットであるため、関節動態の計測を遮蔽するものは少なく、内蔵した荷重センサから関節負荷を直接計測することも可能である。そこで本研究では、二脚歩行ロボットを用いて、人工膝関節の力学負荷の解析を試みた。

【方法】 開発中の二脚歩行ロボットを用いて、日常動作を行わせた。二脚歩行ロボットは、平均的日本人の骨格寸法に基づいて形状を設計した。下肢人工関節の評価と制御の複雑さ回避のために、骨盤と左右大腿、脛骨、足部により構成した。骨格部はアルミパイプを用いて構成し、身体節の重心と慣性モーメントが一致するように重りで調整した。股関節と膝関節直上に 6 分力計を取り付け、動作時の 3 分力と 3 モーメントを取得することができるようにした。また、ヒトの解剖学的構造を参考に、片脚で 9 筋をワイヤを用いて再現した。筋の停止部中心にワイヤ取り付け部を設け、経路位置や起始にプーリーを設けることで筋走向を実現した。なお、ワイヤの停止部には張力センサを取り付け、伝達された筋張力を取得できるようにした。筋張力は、線形ばねとモータによって生成し、力制御を長さ制御に置き換えることで実現した。なお、動作時の筋張力は、筋骨格解析ソフト OpenSim を用いた。運動時の大腿骨および脛骨の相対位置と姿勢から、人工膝関節の大腿骨コンポーネントと脛骨インサートの相対位置と姿勢を求めた。これを入力条件として、有限要素解析を行った。またこの際、6 分力計から得られた力とモーメントも加えた。解析には、陽解析ソルバーである Radioss (Altair 社) を用いて行った。特に本稿では、歩行時の結果について評価を示す。

【結果】 二脚歩行ロボットは、健常成人と同様の歩行を行った。このため、踵接地から爪先離地までの歩行立脚期間を 100% とし、10% ごとにおける解析を行った。踵接地時の 0% では、膝関節は伸展位にあるため、応力集中部位は脛骨のやや前方であった。立脚中期にかけて膝が屈曲するに伴い応力集中部位が後方に移動し、再度、前方に移動した。立脚後期では、膝関節が再度屈曲するに伴って応力集中部位が後方に移動した。これは、既報の結果とも一致する。また、有限要素解析によって得られた最大応力値についても、簡略化した条件での既報結果と概ね一致していた。このことから、歩行ロボットの運動だけでなく、負荷した筋張力やその結果生じる関節動態も妥当なものと考えられる。本解析の結果、条件によっては有限要素計算が十分に収束しないことも確認された。しかし、むき出しの人工関節を用いて計測を行えることから、高精度な解析が可能であった。また、本歩行ロボットを用いて人工関節の動力学情報を取得することで、定量的な評価が可能となることが明らかとなった。

脛骨インサートの応力分布の移動の様子

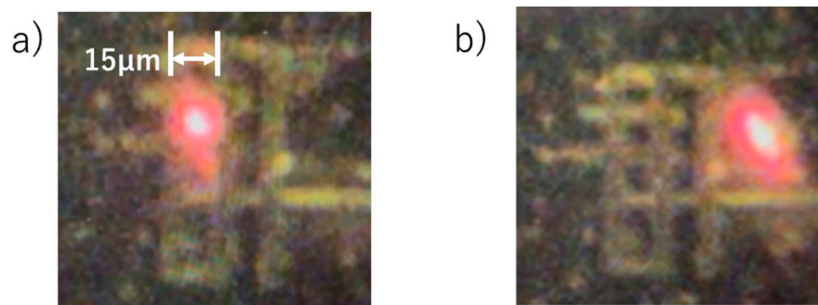


【目的】 日本を含め世界中で高齢化社会に移行しつつあり、超高齢化社会が抱える問題の解決が早急に求められている。特に認知症の予防や早期発見による医療負担の軽減は重要課題となってくる。そこで、脳細胞の軸索から発生する脳磁場を高空間分解能で測定し、脳細胞の状態の変化をとらえて認知症などの疾病の早期発見を目的として、高空間分解能微小磁場測定素子の開発を行う。測定素子の材料には脳磁図と同等の感度を持つダイヤモンド窒素-空孔センター（以下：NV センター）を用いることで、その特性によって常温での磁場測定が可能となるため、ウェアラブルでのその場観測が実現できる。脳磁場をウェアラブルで測定するためには、1. ピコテスラの微弱磁場を常温で測定できること、2. 空間分解能が細胞の大きさよりも高いこと、3. その場観測が可能であること、4. 非侵襲であること、5. 常温で測定できることの 5 つの要件を満たす素子の開発が必須である。本研究においては基礎となるダイヤモンド NV センターからの赤色発光の強度を上昇させるとともに、空間分解能を大幅に上昇できるユニークな縦型導波路構造を実現し、ダイヤモンド NV センターの高空間分解能・高感度化を目指した。

【方法】 ダイヤモンド NV センターの感度を上げるために以下の方法を新たに開発、実行した。1. ダイヤモンド NV センターの高感度化：フェムトレーザーの照射強度と照射時間をコントロールし、熱処理を行わずにダイヤモンドの任意の領域に NV センターの数を増加させる方法を開発した。2. 縦型導波路構造の作製：ダイヤモンド基板の厚みを導波路の長さとして、ダイヤモンドの表面からレーザー照射を行い、表面から裏面まで一度に改質する方法を開発し、ダイヤモンド内に縦型導波路を作製した。3. 神経や細胞と同程度の大きさの導波路を形成しその大きさの空間分解能を達成する。上記 1 および 2 を駆使して高空間分解能高品質 NV センターを作製し、波長 532 nm の励起光を照射して NV センターから赤色を発光させ、その赤色光を導波路内に閉じ込めることに成功した。

【結果】 フェムト秒レーザーを用いて、ダイヤモンド内の任意の領域に NV センターの数を増加させることに成功した。また、レーザーを用いてダイヤモンドの表面から裏面まで貫通した改質を行うことにより、微小磁場測定のための縦型導波路の作製に成功した。導波路のサイズは $10\ \mu\text{m}$ 四方以上の任意の大きさが作製可能で、アレー状に配列することができる。下図 a は $15\ \mu\text{m}$ 四方の導波路内に閉じ込められる赤色発光を示す。同じ励起光で導波路外を照射した場合、b のように広がるのが分かる。赤色の中心に白く見えているのは NV センターからの発光が飽和している状態である。細胞の軸索からの磁場をとらえる際に a のほうが、空間分解能が高くなり有効である。

15 μm の導波路内に閉じ込められる NV センターからの赤色発光



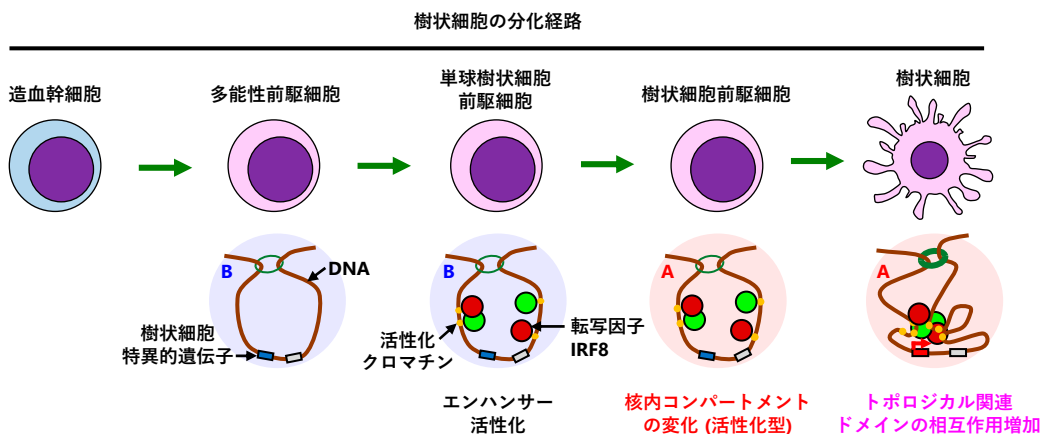
【目的】 古典的樹状細胞 (dendritic cell : DC) は免疫応答に必須である。DC は造血幹細胞から単球・DC 前駆細胞 (monocyte-DC progenitor : MDP) や DC 共通前駆細胞 (common DC progenitor : CDP) などの中間前駆細胞を介して分化する。感染の際には DC は活性化し、サイトカイン遺伝子群を含む宿主防御関連遺伝子を急速に発現し、他の免疫細胞を活性化する。さらに DC は感染組織からリンパ節へと遊走し、ナイーブ T 細胞に抗原提示をすることで免疫記憶を誘導する。DC 分化が抑制されると、病原体に感染しやすくなり、がん細胞の排除を十分に行うことができなくなる。そのため、DC が生体内においてどのように分化産生されるのかを理解することは極めて重要である。

ヒトの細胞 1 個に含まれる DNA を繋ぎ合わせると約 2 m もの長さになる。この極めて長い分子は 5 から 10 μm ほどの小さな核内に収納され、様々な大きさ・形状をもつクロマチン高次構造を形成する。しかし、これらクロマチン高次構造の形成の仕組みやその機能については不明な点が多く残されている。最近の次世代シーケンス技術の発展により、Hi-C 法 (染色体立体配座捕捉法) などによって細胞核内のクロマチン高次構造を全ゲノム規模で解析できるようになった。核内コンパートメントやトポロジカル関連ドメイン (topologically associating domain : TAD) を含むクロマチン構造は、遺伝子発現制御に関与する可能性が指摘されている。しかし、DC の分化と活性化におけるクロマチン高次構造の変化は未知のままであった。本研究では、DC 前駆細胞と DC 亜集団において Hi-C を行い、DC 分化過程におけるクロマチン構造変化と DC 特異的遺伝子発現との関連について解析を行った。

【方法】 マウスの骨髄及び脾臓から多能性前駆細胞、MDP、CDP、DC 亜集団を磁気ビーズ及びフローサイトメーターにより分離し Hi-C、RNA-seq、ChIP-seq 等の次世代シーケンス解析を行った。また、*Tbxoplasma gondii* をマウスに感染し、脾臓から DC を分離した。バイオインフォマティクス解析には Bowtie2、Homer、Juicer 等のツールを用いた。

【結果】 DC の分化過程において、エンハンサー領域の活性化は MDP の段階で誘導された。その後、CDP の段階で DC 遺伝子座が不活性化型の核内コンパートメントから活性化型のコンパートメントへと変化し、その後 TAD 内相互作用とループ形成が増加した。さらに DC の分化に必須の転写因子である IRF8 が DC 前駆細胞のエンハンサー活性化と活性化型コンパートメントへの変化を誘導し、DC 特異的遺伝子の発現へと繋げることがわかった (下図)。*T. gondii* 感染モデルにおいて、宿主防御関連遺伝子座のクロマチン構造は、刺激されていない DC においてあらかじめ確立されていることがわかった。このことは、感染前にクロマチン高次構造が形成されていることが、病原体に対する迅速な応答に寄与している可能性を示している。以上の結果から、クロマチン高次構造の再編成は、DC 特異的な遺伝子発現や免疫機能の確立と密接に関係していることが示唆された。

樹状細胞分化に伴うクロマチン高次構造の変化

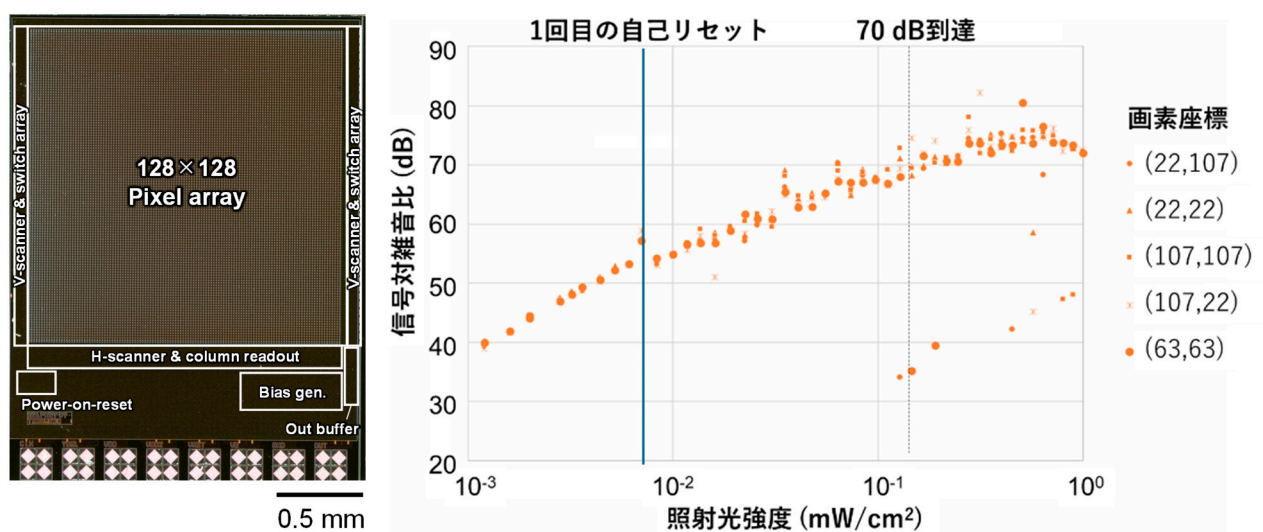


【目的】脳機能イメージングにおいて脳活動に伴う血量変化の計測や電位感受性色素を用いた神経活動計測では、信号変化量が微弱であり高い信号対雑音比（Signal-to-Noise Ratio : SNR）が要求される。これに対し、我々は画素寸法が小さく、脳表に搭載可能な小型の自己リセット画素搭載イメージセンサを用いて高い信号対雑音比を実現することを提案した。この手法では、画素が飽和する前にリセットをする回路を画素内に搭載し、画素飽和を回避する。従来の自己リセット型イメージセンサの課題として、線形性の低さと自己リセット回数の境界での信号対雑音比の低下があった。本研究では、画素構造を見直して画素出力の線形性を改善するとともに、2回読み出しを可能とした自己リセット型イメージセンサを試作し、撮像領域全体で0.1%の変化を検出可能とすることを目的とした。

【方法】CMOS（Complementary Metal Oxide Semiconductor：相補型金属酸化膜半導体）イメージセンサの特徴として、画素信号を異なるタイミングで複数回読み出すことができる非破壊読み出しがある。この特徴を用いて、同一画素をわずかに異なる露光時間で2回読み出す。自己リセットイメージセンサの場合は、得られる2枚の画像では自己リセット境界が異なる画像となる。本研究では、これを実現可能な小型の自己リセット型イメージセンサを設計・試作した。イメージセンサの画素寸法は $15\mu\text{m}$ 角、画素数は 128×128 である。全体の寸法 $2.07\text{mm}\times 2.75\text{mm}$ であり、マウス等の頭部にも搭載できる大きさとなっている。個々の画素の特性を評価するため、信号対雑音比の照射光強度に対する変化を計測した。また、試作したイメージセンサを用いて、撮像実験を行った。実際に得られた露光時間の異なる2枚の画像を組み合わせ、自己リセット境界付近の不正確な値を除外した合成画像を生成することで、撮像範囲全体で雑音成分の少ない画像の生成を試みた。

【結果】試作したイメージセンサの特性を評価し、2回読み出しにより露光時間の異なる2枚の画像が得られることを実証した。画素の特性評価では、撮像領域の中央および4角付近のいずれにおいても高い信号対雑音比を達成できることを確認し、先の画像合成と組み合わせることによって撮像領域全体で0.1%の微弱な変化を検出できる性能があることを実証した。また、得られた2枚の画像を合成することによって、自己リセット境界付近の雑音の大きい領域を排除する手法を開発した。これを用いることで、画像全体で高い信号対雑音比の出力が得られる見通しを得た。

試作イメージセンサの外観と信号対雑音比測定結果

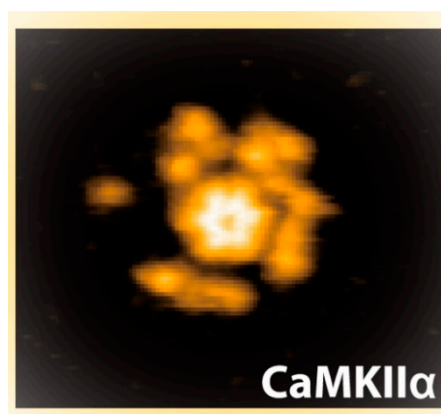


【目的】 脳の高次機能である、記憶の形成・忘却の詳細な分子作動メカニズムの解明は、人として幸福に人生を全うすることを助け、人類の健康寿命の延伸に大きく貢献できると考えられる。これまでの研究から、記憶・学習の細胞基盤はシナプスの長期増強 (Long term potentiation : LTP) と長期抑圧 (Long term depression : LTD) にあると考えられ、これら LTP や LTD の誘導には、カルシウム/カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ II (CaMKII) が重要な役割を果たすことが報告されてきた。CaMKII はキナーゼであると同時に、基質タンパク質としてもはたらき (自己リン酸化)、CaMKII の分子内にある 2 つのリン酸化サイト Thr286 と Thr305/Thr306 のリン酸化状態に依存して、LTP と LTD の誘導を区別する可能性が示唆されている。しかしながら、CaMKII の異なる部位へのリン酸化が、異なる生理機能 (LTP は記憶形成、LTD は記憶忘却) をどのように生み出すことができるのか、その詳細な分子作動メカニズムは広く不明であった。本研究では、高速原子間力顕微鏡 (高速 AFM) を CaMKII に適用し、それぞれのリン酸化状態にある CaMKII の 1 分子イメージングを試み、そのナノメートルスケールのダイナミクスから、記憶をタンパク質のリン酸化による構造変化で説明することを目的とする。

【方法】 CaMKII 試料は HEK293 細胞に過剰発現し、2 種類のタグによって精製した。観察バッファー中に、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ と ATP を加え、Thr286 のリン酸化 (pT286) 反応を起こし、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}+\text{pT286}$ 状態の CaMKII の高速 AFM 観察を行った。また、Thr305/Thr306 のリン酸化 (pT305/pT306) は、pT286 の後、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ の解離により生じるため、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}+\text{pT286}$ 状態の CaMKII に EGTA を加え CaM を解離させることで、pT286+pT305/pT306 状態の CaMKII の高速 AFM 観察を行った。さらに、Thr286 と Thr305/Thr306 のリン酸化サイトをそれぞれ欠損させた T286A および T305A/T306V 部位特異的変異体にも高速 AFM 観察を適用した。

【結果】 野生型 CaMKII の高速 AFM 観察から、CaMKII はハブドメインを介した 12 量体を形成することが分かった (図)。また、ハブ集合体には顕著な動きは観察されなかったが、各サブユニットのキナーゼドメインは、ハブ集合体の周辺を自由に動き回ることが分かり、この運動は $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ の結合 (CaMKII の活性化) に重要であることを見出した。次に、Thr286 がリン酸化した状態 ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}+\text{pT286}$) では、キナーゼドメインの運動性は上昇するが、Thr305/Thr306 もリン酸化した状態 (pT286+pT305/306) では、隣接するキナーゼドメイン同士が集合したキナーゼドメイン集合体や、ハブ集合体から遠く離れ、より活発に動くキナーゼドメインが形成することが分かった。さらに、T286A や T305A/T306V 変異体の高速 AFM 観察より、全ての部位がリン酸化されることにより、キナーゼドメイン集合体が形成されることが分かった。また、生化学実験により、各実験条件での CaMKII のリン酸化、キナーゼ活性、脱リン酸化酵素に対する耐性も明らかにした。これら生化学実験の結果と、高速 AFM による 1 分子イメージングの結果を統合し、12 量体内のキナーゼドメインのリン酸化による構造変化が、LTP や LTD といった機能の違いを生じる分子作動機構モデルを提唱した [S. Tsujioka *et al.* *Sci. Adv.* 9, eadh 1069 (2023)]。

高速原子間力顕微鏡により捉えた CaMKII のナノ動態

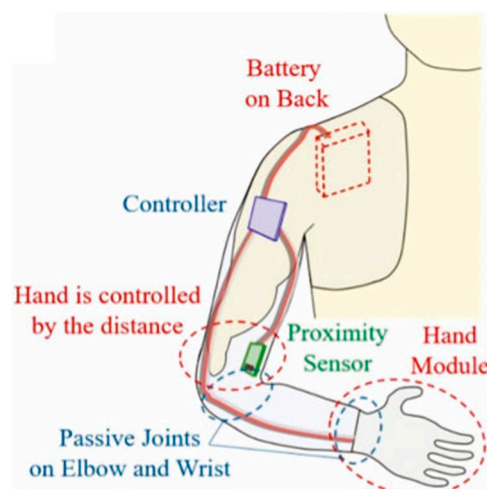


【目的】 先天性な欠損の場合、もともと手関節や手指を動かした経験はなく、末梢までは神経が通っていたというわけではない。そのためもともと手関節や手指に走っていた神経を神経移行させて断端の筋に手指の動きを担わせることは現実的ではない。でもやはり可能な限り自分が手指を動かすと指令を加えたときに義手の手指を動かせるようにしたい。それらの問題を解決すべく 1. AI 技術を搭載した筋電義手、2. 特殊形成不全に対応した位置センサ搭載電動義手の 2 点に絞り開発を進めた。

【方法】 1. AI 技術を搭載した筋電義手：先天性手指形成不全患者の手関節屈伸、手指屈伸における超音波診断装置による筋収縮所見を確認し、さらに手関節 3 動作（安静・掌屈・背屈）を行い、それぞれの肢位で手指 3 動作（安静・握り[手指屈曲]・開き[手指伸展]）を行う計 9 動作を、表面筋電位をとり筋収縮の位置と筋収縮の強さをプロットして、各々の動作が独立して筋電信号を取得できるか確認した。2. 特殊形成不全に対応した位置センサ搭載電動義手：特殊形成不全の一形態であるフォコモリア患者の手指屈伸動作を利用した位置センサ搭載電動義手を開発し、その使用状況を確認した。

【結果】 1. AI 技術を搭載した筋電義手：超音波診断装置により、手関節の屈曲と手指屈曲では別の筋における収縮が確認され、生下時より手指の屈伸を行ってこなかった当該患者でも別の筋が働くことが理解できた。計 9 動作を表面筋電位をとり筋収縮の位置と筋収縮の強さをプロットしたところ、各々独立した筋収縮力、筋電の位置を確認した。さらに、AI 技術を搭載した筋電義手を開発し、実際に手関節の肢位によらず義手の手指の屈伸運動が可能であることを確認した。2. 特殊形成不全に対応した位置センサ搭載電動義手：この電動義手は下の図に示すようにソケット、受動アーム、ロボットハンド、コントローラ、近接センサ、バッテリーで構成され、その重量はソケットを含めて 480 g となった。患者が直接接触することなく、残存する指を動かすだけで作動可能となったため、乳幼児や小児でも容易に理解することができる義手となった。初めて義手を装着したとき、残存指を動かすことに抵抗されたため、ソケットのセンサーの周囲に大きな穴を開け、介助を受けながら義手の操作をマスターするように促したところ、一度メカニズムを理解すると、義手で物を掴んだり、義手でお菓子の袋を持ち健側の手で口に運んだり、両手での協調動作を促すことがこれにより可能となった。

今回開発した手指屈伸動作を利用した位置センサ搭載電動義手



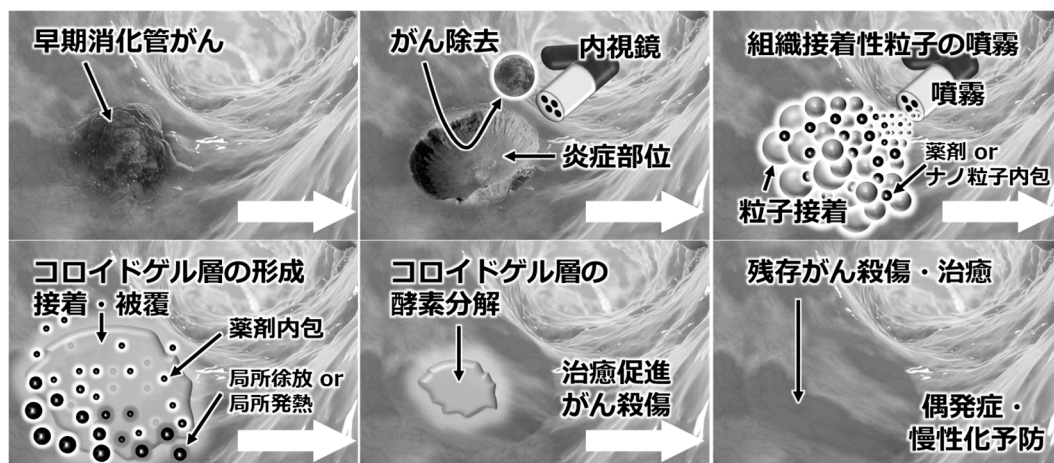
(J Hand Surg Eur Vol. 2024 Mar;49 (3) :375-6 より引用)

【目的】 早期消化管がん治療に用いられる内視鏡的粘膜下層剥離術 (ESD) は、食道、胃、大腸などの消化管の粘膜層に生じた早期消化管がんを内視鏡によって除去する手技であり、我が国が世界をリードしている。ESD は低侵襲で効果的に早期がんを除去できる長所があるものの、がん除去部 (粘膜下層剥離部) の治癒制御技術と残存がんの局所治療技術が十分に確立されていないため、狭窄や穿孔等の偶発症、あるいはがんの再発が一定の頻度で生じる。そのため、がん除去後の炎症部位を局所的に接着・被覆して治癒を促進すると共に、薬剤 (磁性ナノ材料、抗がん剤) の局所的な徐放や発熱により残存がんを殺傷する生体材料の開発が求められている。そこで本課題では、疎水化タラゼラチンを粒子化し、薬剤 (磁性ナノ材料、抗がん剤) と複合化することにより残存がんの体内局所的殺傷を可能にする生体材料を開発し、ブタ大腸組織に対する接着性試験およびマウス担がんモデルを用いたがん殺傷効果について検証した。

【方法】 疎水基として炭素数 10 個のデシル基を導入したデシル基導入タラゼラチン (C10-ApGltN) を合成した。得られた C10-ApGltN の水溶液にエタノールを添加することでコアセルベーション溶液を調製し、凍結乾燥・熱架橋を行うことで組織接着性粒子を得た。調製した組織接着性粒子と薬剤を物理的に混合した複合粉体を調製し、生理食塩水で水和させることにより薬剤が内包されたコロイドゲルを調製した。薬剤には、磁性酸化鉄ナノ粒子を用いた。また、得られたコロイドゲルの大腸粘膜下層剥離組織に対する接着性を評価した。また、組織接着性粒子/磁性ナノ粒子コロイドゲルの *in vivo* 磁場印加発熱によるがん殺傷効果をヒト結腸由来担がんモデルマウスを用いて評価した。

【結果】 組織接着性粒子 (疎水化粒子) および磁性酸化鉄ナノ粒子 (磁性ナノ粒子) の複合粉体を用いてブタ胃粘膜下組織に対する接着強度を測定した結果、疎水化粒子単独と磁性ナノ粒子含有疎水化粒子では組織間に粘性の接着層 (コロイドゲル層) が形成され高い接着強度が得られたが、未修飾粒子と磁性ナノ粒子含有未修飾粒子では接着層は形成されず接着性はほとんど認められなかった。さらに、磁性ナノ粒子含有疎水化粒子は、磁性ナノ粒子の混合割合が高くなるにつれて組織接着強度も増加した。得られた磁性ナノ粒子含有疎水化粒子複合粉体の *in vivo* での大腸がん細胞に対するがん殺傷効果は、ヒト結腸由来担がんモデルマウスを用いて評価した。交流磁場印加後、磁性ナノ粒子含有疎水化粒子コロイドゲルを埋め込んだ部分の色がサーモグラフィ画像で緑から赤に変化したことから、磁性ナノ粒子が適用部位で局所的に発熱していることが明らかとなった。担がんモデルに対し磁性ナノ粒子含有疎水化粒子複合粉体を用いて交流磁場を印加した群は、適用後においてがん体積の増加抑制効果が認められたことから、磁性ナノ粒子含有疎水化粒子複合粉体と交流磁場を用いた局所発熱効果により、*in vivo* でがん組織を効果的に死滅できることが明らかとなった。

本研究の概念図

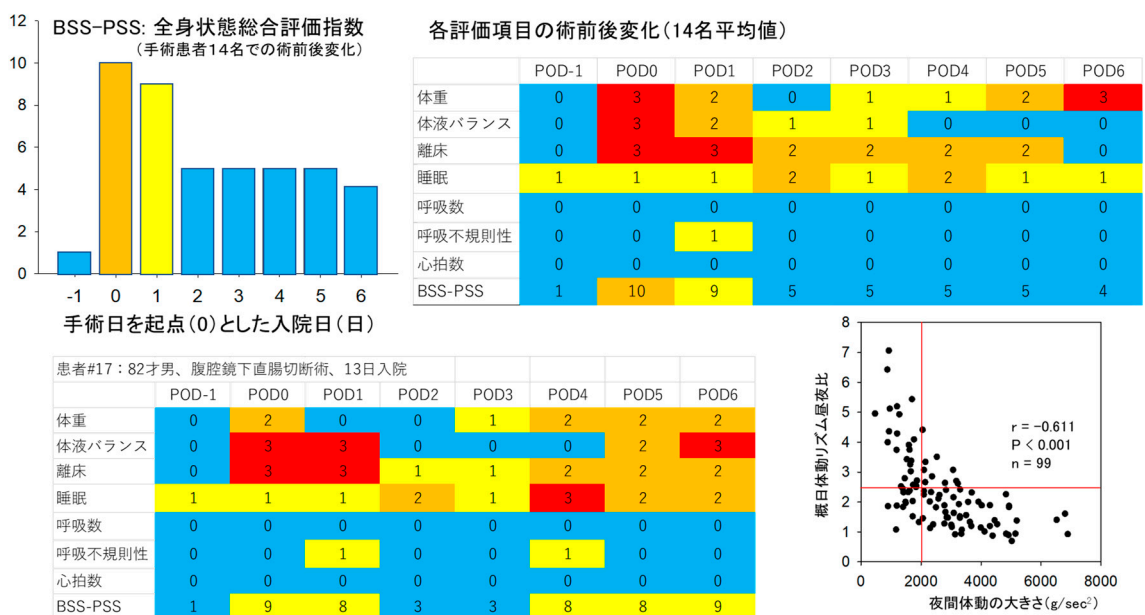


【目的】 呼吸器疾患は病状が進行した際に低酸素血症や高炭酸ガス血症を呈するが、低酸素血症や高炭酸ガス血症は呼吸中枢を刺激し、特に頻呼吸は、臨床所見の悪化を反映し、心停止やICUへの入室を予測するのに有用であると報告されている。しかし、一般病棟においては主に看護師や主治医による日中の呼吸状態ワンポイント評価に留まっており、その測定は正確ではない。本研究は、ベッド脚下4点に設置した荷重計による非接触連続的生体情報モニタ（ベッドセンサ：BSS）を用いて、入院中の病状変化をより適切に把握可能な病状評価スコアを構築し、その臨床的有用性を検証することを目的とした。本報告書においては、多様な呼吸状態や全身状態の変化を示した外科手術患者の先行研究データを用いて、病状評価アルゴリズムを構築した研究結果を報告する。

【方法】 ベッドセンサ測定可能パラメータから、8つの項目（体重変化、体液バランス、離床、睡眠、睡眠時呼吸異常、呼吸数、呼吸不規則性、心拍数）をそれぞれスコア評価し、総合スコアを全身状態の総合評価指数（BSS-PSS）として活用する方法を考案した。研究期間内に呼吸器内科病棟での前向き研究開始準備を進めるとともに、14名の手術患者での先行研究データを用いてその妥当性を検証した。

【結果】 図に示すように、BSS-PSSは、手術当日に介入検討レベルの10点まで増加し、術後6日目までには4点まで改善する典型的な術後経過をよく反映した。8つの評価項目の術後推移は、スコアを色分けする表現方法を用いることで個別に把握が容易となった（右上）。呼吸や心拍などのバイタルが平均して生理学的範囲内に維持された一方、特に手術直後の体重増加や長時間臥床、さらに術後6日目には3%以上の体重減少となってしまうことを明確に表現できた。この表現方法は、個々の患者の経過を評価する際にも有用で、高齢患者（左下）では、術後睡眠障害と離床遅延が術後6日目でも改善せず、リハビリ強化や離床促進の必要性が認識できた。概日リズム維持はせん妄予防に重要であるが、日中と夜間の体動比で概日リズム評価が可能と考えられた。呼吸数や心拍数は1日の中央値では正常範囲内と判断されたが、中央値が19回/分であった症例もあり、リアルタイム測定値を用いた評価方法が急変の早期検出には必要であることが示唆された。先行研究データからは、ベッドセンサが入院中の全身状態変化と治療介入の必要な臨床症状を的確に抽出できることが確認できたが、本試験である呼吸器内科病棟患者での探索的前向き研究を実施し、リアルタイム活用も含めたベッドセンサ活用戦略の構築とその有用性の検討が必要である。

ベッドセンサ（BSS）による入院患者の全身状態変化分析結果：手術患者の場合

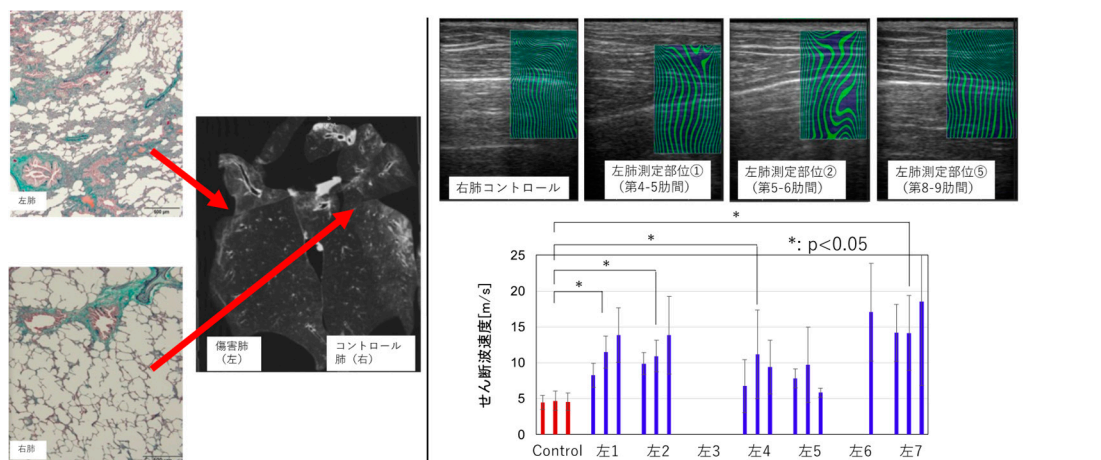


【目的】 Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) とは心不全・腎不全を除外した肺水腫をきたす症候群である。低酸素血症、高二酸化炭素血症を呈し、重症例では死亡率 40%近くになる。治療のために使用される人工呼吸器により、さらなる肺障害を引き起こすことが昨今明らかになり、最重症例では体外式膜型人工肺：Extracorporeal Membrane Oxygenation (ECMO) を用いて、自己肺休めながらの治療戦略が確立されてきた。しかし ECMO は治療法ではなく対症療法であるため、ECMO 導入の条件は、肺の可塑性があることである。肺の可塑性、つまり肺の線維化の評価は、一般的には CT を用いるため移動とマンパワーを要する。一方、ベッドサイドで簡便かつ経時的、非侵襲的に行える検査方法として超音波検査があり、我々は超音波のアーチファクトを用いて、肺実質の弾性を計測する方法 (B ラインエラストグラフィ法) を開発した。本研究では医工学連携にて、本法の有用性を基礎研究・臨床観察を介して検証することを目的とする。

【方法】 研究戦略としては、①機器開発、②実験動物を用いた基礎実験、③人を対象とした臨床試験、の順に進めることを予定し、今回は②実験動物を用いた基礎実験を行った。急性期の肺線維化モデルと慢性期の肺線維化モデルを作製し、B ラインエラストグラフィ法にて評価後、CT 所見、病理所見にて肺の線維化の評価を行った。急性期の肺線維化モデルと慢性期の肺線維化モデルを作製し、B ラインエラストグラフィ法にて評価後、CT 所見、病理所見でも線維化の評価を行った。急性期ヤギ肺線維化モデルでは、麻酔導入後、ECMO (下静脈脱血、右房送血) を導入し呼吸状態を担保した上で、0.9%生理食塩水で全肺胞洗浄し、その後侵襲的換気を 24 時間維持し、急性期のヤギ肺線維化モデルを作製した (n=3)。慢性期ヤギ肺線維化モデルでは、麻酔導入後、気管支鏡を用いて、左主気管支にブレオマイシン 15 mg を撒布した。その後覚醒させ、抜管した。同様の操作を 2 週間後にも行い、慢性期ヤギ肺線維化モデルを作製した (n=3)。

【結果】 急性期ヤギ肺線維化モデルにおいては、病理所見の結果から、肺の線維化には至っておらず、B ラインエラストグラフィ法による計測でも、コントロールとせん断波速度に有意差は認めなかった。一方、慢性期ヤギ肺線維化モデルでは、CT 所見、病理所見にて肺の線維化の所見を認め、B ラインエラストグラフィ法にてコントロールとせん断波速度に有意差を認めた。また急性期、慢性期モデルともに B ラインエラストグラフィの実施において、肺胞出血等の有害事象は認められなかった。今後は人を対象とした臨床研究を目指し、B ラインエラストグラフィ法という新しい肺の評価方法を確立していく。

慢性期の肺線維化モデルの所見と測定結果



CT 所見と病理所見

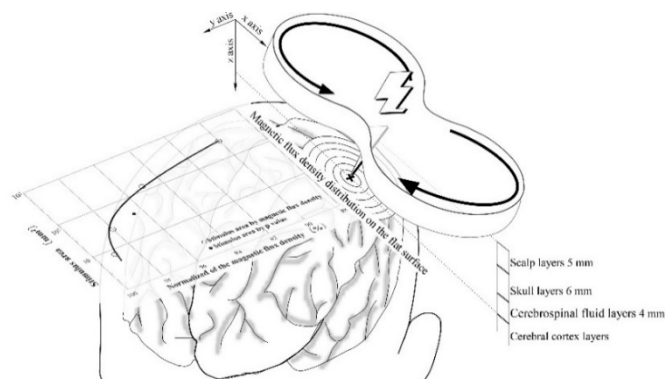
B ラインエラストグラフィ法によるせん断波速度測定結果

【目的】 大脳皮質へ非侵襲的かつ直接的に刺激する方法として電気刺激や磁気刺激がある。電気刺激法は広範囲な刺激に優れ、磁気刺激法は刺激コイルの種類によって広範囲な刺激だけでなく深部または局所への刺激も可能である。そのため経頭蓋磁気刺激 (Transcranial magnetic stimulation : TMS) は脳機能研究や脳・神経系をはじめとした臨床で広く利用されるようになった。経頭蓋磁気刺激の局所性は上野らによって開発された 8 の字型コイルで実現しているが、磁気刺激分解能を評価した報告は著しく少ない。刺激分解能の評価は、ヒトに対する磁気刺激の安全性と有効性の向上を図り、有害事象の低減につながる重要な基礎研究である。刺激分解能の評価法には、コンピュータシミュレーションの計算法と頭部モデルを活用した計測法がある。主流はコンピュータシミュレーションであるが、精度評価のために頭部モデルを利用した計測解析も必須となる。しかしながら計測には、ノイズ対策を含め高度な技術が要求されることから研究の発展を難しくしている。そこで本研究は、簡易的な計測装置を利用して経頭蓋磁気刺激の刺激分解能評価を実現し、経頭蓋磁気刺激装置の磁気エネルギー動態を明らかにすることを目的とした。

【方法】 本研究は簡易型磁束密度計測装置を構築し、「磁束密度計測時に問題となるバックグラウンドノイズ (以下、ノイズ) の特性を明らかにする」、「刺激コイル上の磁束密度分布を評価する」の 2 テーマを掲げて実験を実施した。簡易型磁束密度計測装置は、センサ部 (センサコイル)、導出部 (ツイスト・導出ケーブル)、計測部 (積分回路・バッファアンプ) で構成した。計測で問題となるノイズは、おもに導出部で発生すると予測されるため、導出部と計測部のみで構成したノイズ検出用の簡易型磁束密度計測装置を準備した。なお、経頭蓋磁気刺激装置は大脳皮質を刺激対象としているため、刺激コイル上 15 mm (頭皮-皮質間距離相当) の位置 (標的部位) 上の磁束密度を計測・評価した。

【結果】 刺激コイル中心から長軸方向に ± 40 mm の位置 (構造上、磁束密度 0 mT) で測定したところ、約 60 mT (TMS 出力値 75%) の磁束密度を検出し、本実験ではこの値をノイズと推定した。また、計測されたノイズの値は、同一平面上において一様である可能性を示唆した。これらノイズの特徴を考慮して、経頭蓋磁気刺激装置は、標的部位に対して約 170 mT (TMS 出力値 63%時) を与えると推定した。さらに、標的部位の磁束密度と比較して有意差が確認できない範囲を刺激分解能とすると、刺激分解能は標的部位から約 $\pm 2\sim 5$ mm の範囲 (刺激面積約 40 mm^2)、磁束密度値では最高値より約 3~4%減少した部分に相当していた。磁束密度分布の広がり、標的部位の磁束密度と比較して 1%減少する範囲を含めると約 7 mm^2 、5%減少する範囲を含めると 130 mm^2 、10%まで減少した範囲を含めると約 280 mm^2 であった。本実験の結果から得られた磁束密度分布の面積算出モデルを利用すると標的部位の磁束密度から 20%減少する範囲は約 600 mm^2 と推定された。これらの結果は、本研究で構築した簡易型磁束密度計測装置が経頭蓋磁気刺激装置の刺激分解能の評価に活用できることを示唆した。ただし、この研究で得られた磁束密度分布は、刺激コイル上 15 mm の中心点における接平面であり、曲面を有する大脳皮質に対してそのまま適用することはできない。そこで、今後は頭部・脳モデル上での計測を実施する。

解析された刺激分解能より推定される磁束密度分布変化のイメージ図



68 機械刺激の深化 -細胞集団への適応-	袴田 昌高
--------------------------	-------

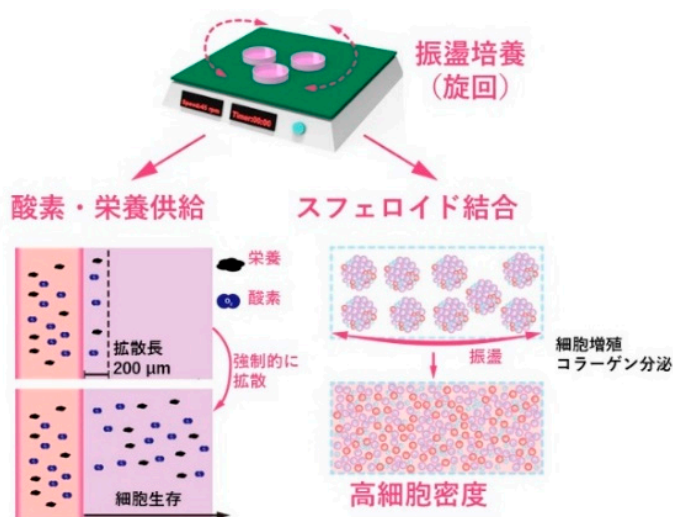
【目的】 高細胞密度かつ階層的血管網 (hierarchical vascular networks : HVN) を持つミリメートルサイズの 3D 組織を開発するために、著者らはスフェロイドの集団に振盪 (周期的機械的刺激) を与えて高細胞密度組織の自己組織化を促進することを着想した。振盪は機械的な刺激のほかにも、酸素・栄養の供給を促進する効果がある。その他の工夫として、血管の形成・安定化・成熟に関連する周皮細胞を取り入れ、また容器作製に 3D バイオプリンティングも援用することとした。

【方法】 スフェロイドは、マイクロウェルのプレートまたはディッシュを用いて作製した 3 種の細胞を組み合わせたスフェロイド (以降、3 細胞スフェロイドと称する) の場合、正常ヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF)、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC)、ヒト肝星状細胞 (HSC) を 10 : 1 : 0、10 : 1 : 1、10 : 1 : 10 の細胞比で混合した。混合細胞を 200 細胞/マイクロウェルで播種し、3~5 日間の前培養を行った。作製したスフェロイドはすべて、EBM-2 (CC-3162) を用い、37℃、5%CO₂ 下の加湿雰囲気中で保管した。

また、バイオプリント用のバイオインクは、GelMA 粉末を、光重合開始剤であるフェニル (2,4,6-トリメチルベンゾイル) ホスフィン酸リチウム (LAP) を含む 10 mL の DPBS に溶解し、適切な温度条件で使用した。また、犠牲バイオインク (プルロニック) を 4℃で印刷し、CAD モデルに基づいた 3D 構造体を作製した。この構造体を液体 GelMA の入った容器に移し、GelMA を波長 405 nm の光で 1 分間架橋した。最後に温度を 4℃に下げてプルロニック構造体を除去し、GelMA 容器とした。容器は DPBS 中、4℃で最低でも 1 週間保存した後、チャンバーにスフェロイドを充填して高細胞密度前駆体とした。この前駆体を 45 rpm で 2 週間振盪培養し、高細胞密度組織を作製した。試料は各種顕微鏡観察・遺伝子発現分析に供した。

【結果】 高細胞密度前駆体を振盪培養にかけた結果、試料を構成するスフェロイド間の結合が強化され、組織をピンセットでつまみ上げ、崩れることなく何度もつまむことができ、同時に高細胞密度 (>10⁸ 細胞/cm³、生体内の臓器の細胞密度とほぼ同等) が達成された。スフェロイド同士の融合が各種観察により確認され、かつ、高密度細胞組織の中心にプルロニック犠牲材構造体から作製された人工的なマクロ流路 (=擬似人工動脈) が明瞭に観察された。また、毛細血管はこの擬似人工動脈と吻合していた。薄切試料の α 平滑筋アクチン (αSMA) の免疫染色後の観察から、活性化した HSC が管腔構造の周囲に偏在し、成熟した HVN の迅速な形成を支えていることが示唆された。さらに、蛍光ビーズを含む培地を流した試料の蛍光顕微鏡観察により、培地は組織中央の擬似人工動脈から組織内の毛細血管へと流れていること、毛細血管が擬似人工動脈とつながっていること、毛細血管と蛍光ビーズが同じ場所にあることが確認された。

機械刺激 (振盪培養) によるミリメートルサイズの 3D 組織創製

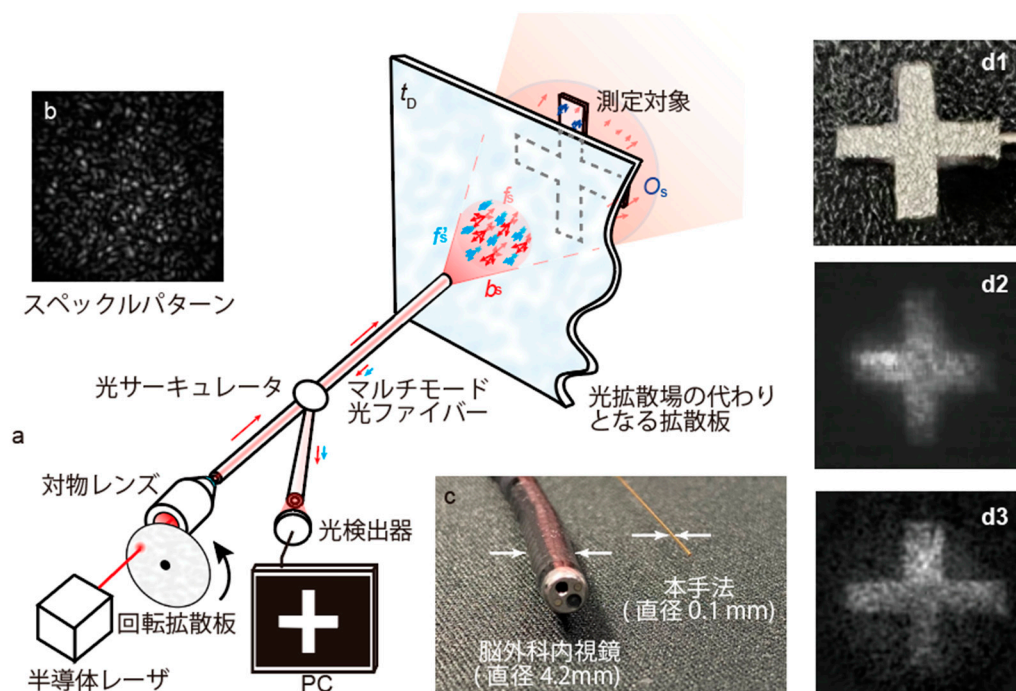


【目的】 日本人の死因は、悪性腫瘍（第1位）、心臓（第2位）および脳血管（第4位）の疾患が極めて多い。このなかの第2位と第4位の心筋梗塞、脳梗塞は微小血管がつまることによって引き起こされる。一方、第1位の悪性腫瘍（がん）の転移は幼弱な血管に由来するとの報告 [J. Clin. Invest. 132, e153626 (2022)] があり、血管内のイメージングは重要な技術である。光コヒーレンストモグラフィー（OCT）や超音波内視鏡（IVUS）は、現在の医療を支える基盤技術であるが、カラー化や分光分析できず、病片をその場で特定できない。血管内視鏡（直径 0.9 mm）はカラー化できるが、これ以上の細径化と高分解能化は現行技術では困難である。血管内撮影には血液を除去するためフラッシュに生理食塩水を用いるが、患者負担が非常に大きい。本研究では「血管内部を透視診断する」新たな内視鏡技術を開発することを目的とする。具体的には、(a) 構造光制御と光相関計算から直径 0.1 mm の 1 本の光ファイバーによるイメージング技術を確立し、(b) 血液（光散乱場）のある血管内の病変部の特定・分析技術に展開することをめざした。

【方法】 単一の光ファイバーで光拡散場の中にある物体をイメージングするために、ゴーストイメージングと呼ばれるイメージング技術を導入した。ゴーストイメージング法は、あらかじめ座標が登録された光（スペックルパターン）と、その光が物体を照らした散乱光の信号強度の相関関係から測定対象物体をイメージングする技術である。下図 a に示したような光学系を作製し、すりガラス状の拡散板を回転させることでレーザーの干渉性の高さから発生する模様として知られるスペックルパターン（下図 b）を制御した。3 万枚のスペックルパターンを CMOS カメラで事前に記録し、同じスペックルパターンを測定対象に照射した。測定対象の散乱光は、光ファイバーを介して記録した。

【結果】 下図 c は従来の脳神経外科で使用される光ファイバーバンドル内視鏡と本研究との比較の一例である。今回開発された内視鏡は極めて細い。下図 d1 は測定対象で、下図 d2 は従来のバンドル型内視鏡で撮像された測定対象の画像である。下図 d3 は我々の方法で撮像された画像で、従来の内視鏡と比較してもエッジが鮮明になっている。このように光ファイバー先端から 10 mm の位置にある測定対象を 1 本の光ファイバー（光ファイバーの全長 2 m）でイメージングすることに成功した。

研究方法とイメージングの結果

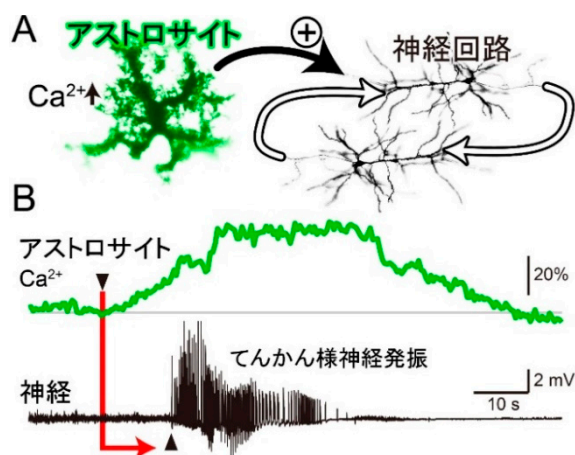


【目的】 本研究の目的は、脳内グリア細胞の機能操作法を確立すれば、生来の脳機能以上の性能を持つ拡張知能を実験動物に実装することができるかどうかを明らかにすることであった。学習や記憶は、神経細胞間のシナプス伝達の可塑性によって成立するが、可塑的变化が起こりやすい状態、起こりにくい状態を制御する機構を「メタ可塑性」と呼ぶ。近年、メタ可塑性を制御するのは、神経細胞とは異なるグリア細胞であることが示唆されてきた。脳深部直流電気刺激 (DB-DCS) によって、グリア細胞の機能を効果的に賦活化し、ピンポイントに脳機能を一過性に増強させた拡張知能が実現できれば、最適化された適応行動を引き出す方法が編み出せる可能性がある。そこで、本研究では、まず、てんかん脳病態の解析と制御に取り組むことにした。てんかんでは、脳神経活動の発振現象や全身の痙攣発作などが生じる。これまで、当研究室では、繰り返しのてんかん様神経発振にともない、脳内で可塑的な変化が生じて、抗てんかん作用が発揮される場合があることを見出してきた。この抗てんかん作用はグリア細胞から放出された抑制性伝達物質のアデノシンによるものであった。そこで、グリア細胞の持つ抗てんかん作用を引き出すために、脳深部グリア直流刺激が使えるかどうかを調べることにした。てんかんのような極端環境では、グリア細胞機能が前面に引き出されるので、その機能を理解しやすいと考えた。てんかん病態下で発見されたグリア細胞機能を解析することで、他の脳病態の制御や拡張知能を実現するのに応用する方法が検討できる可能性がある。

【方法】 本研究では、マウスの両側海馬近傍に留置したプラチナ製電極を使って脳深部を直流刺激することで、脳内グリア細胞活動を効果的に賦活化する技術を開発した。脳深部電気刺激 (DBS) 自体はパーキンソン病治療で既の実施されているが、「直流」の電流刺激をすることで、メタ可塑性制御を担うグリア細胞の効果的賦活化を試みた。

【結果】 実験動物のマウスを用いて、脳の中の海馬に光ファイバーを埋め込み、グリア細胞の中でもアストロサイトの活動を光計測した。脳内に金属の銅を人工的に埋め込むと炎症反応が生じ、てんかん様の神経発振現象が、1日に数回、散発的に生じるようになることが知られている。そこで、銅留置による神経過活動を調べたところ、神経発振に 20 秒程度も先立ち、アストロサイトの活動が始まること示された。さらに、アストロサイトの活動を DB-DCS によって電氣的に刺激すると、当初は、アストロサイトの持つ抗てんかん作用が引き出されることを期待したが、逆に、てんかん様神経発振が引き起こされることが示された。また、アストロサイトの代謝機能を薬で阻害する方法などを組み合わせることで、アストロサイトこそが、てんかん病態において、脳神経活動を強力に誘導していることが示された。てんかんは、異常な状態であるものの、ある意味、脳の可塑性機能が最大限に亢進した状態であるとも言える。したがって、てんかん病態時にアストロサイトによって引き起こされる神経活動の誘導作用を、DB-DCS 等によって制御することができれば、認知症等の神経可塑性が低下した病態を治療するのに適用できる可能性が示唆された。

脳内アストロサイトによる神経回路ハイパードライブ機能

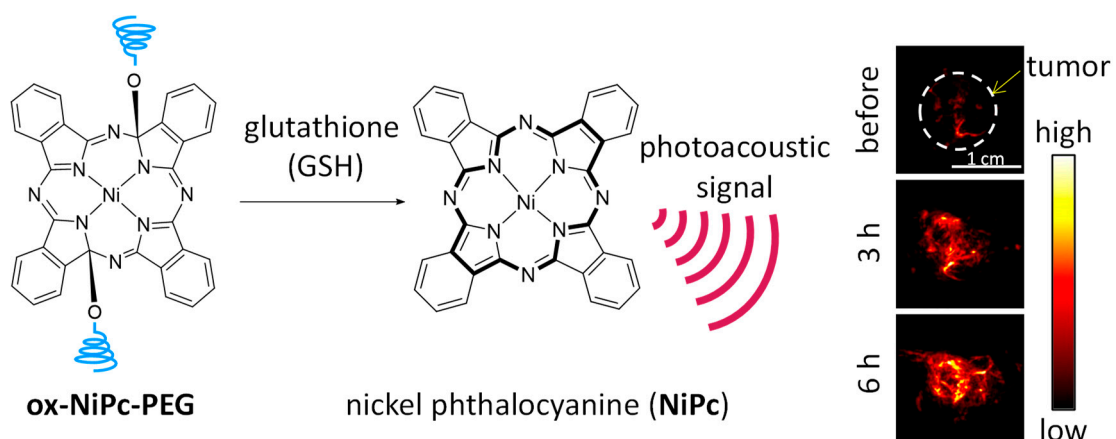


【目的】 高い空間分解能をもつ低侵襲な撮像法である光音響イメージングに利用できる造影剤として、近赤外パルスレーザー光を高効率に吸収し、無輻射失活過程を経て励起エネルギーを消費する光増感分子が適する。造影剤に適した光増感分子としてメタロフタロシアニン (MPc) が近年活発に研究されているが、腫瘍部位で信号を発するようになる turn-on 型造影剤は未開拓であった。そこで、本研究では MPc の 18 パイ電子系を酸化的に化学修飾した酸化型メタロフタロシアニン (ox-MPc) に注目し、血中や正常組織において光音響信号を全く発さないが、目的とする腫瘍組織において信号を発するようになる turn-on 型造影剤の開発を目指した。

【方法】 ox-NiPc-PEG はフタロニトリル、酢酸ニッケルなどから 2 段階で合成した。リン酸緩衝液中で ox-NiPc-PEG がん細胞内で過剰発現することが知られるグルタチオン (GSH) を作用させ、対応する NiPc の生成を追跡した。NiPc は質量分析、赤外吸収分光法、元素分析により同定した。反応とともに生成する NiPc に由来する光音響信号強度は光音響イメージング装置を用いて測定した。ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞 A549 細胞の内因性 GSH との反応についても同様に調査した。A549 を移植したマウスの腫瘍部位に ox-NiPc-PEG を直接投与し、光音響信号強度の経時変化を調査した。

【結果】 ox-NiPc-PEG と GSH を反応させたところ、NiPc がほぼ定量的に得られた。ox-NiPc-PEG と NiPc の紫外-可視吸収スペクトルから、ox-NiPc-PEG は生体透過性の高い近赤外領域に吸収を持たないが、NiPc は強い吸収を示すことがわかった。ox-NiPc-PEG を GSH が過剰発現する A549 細胞に作用させたところ強い光音響信号が観測された。一方、GSH の発現量が低いヒト胎児腎細胞 HEK293 では光音響信号強度はあまり変化しなかった。右脚に A549 を移植した担癌マウスに対して ox-NiPc-PEG を腫瘍に直接投与し、腫瘍における光音響信号強度の変化を測定した。投与前の像では、マウスの血液に含まれるヘモグロビンに由来すると考えられる光音響信号が血管様にバックグラウンドシグナルとして観測された。ox-NiPc-PEG を注射する前の光音響信号強度と比較すると、注射後 6 時間まで有意に光音響信号強度が増大した。これらを踏まえ、ox-NiPc-PEG は生体内で GSH が過剰発現するがん細胞を可視化する光音響イメージング用造影剤として利用できることが示された。

turn-on 型光音響造影剤 ox-NiPc-PEG およびこれを用いる光音響イメージング



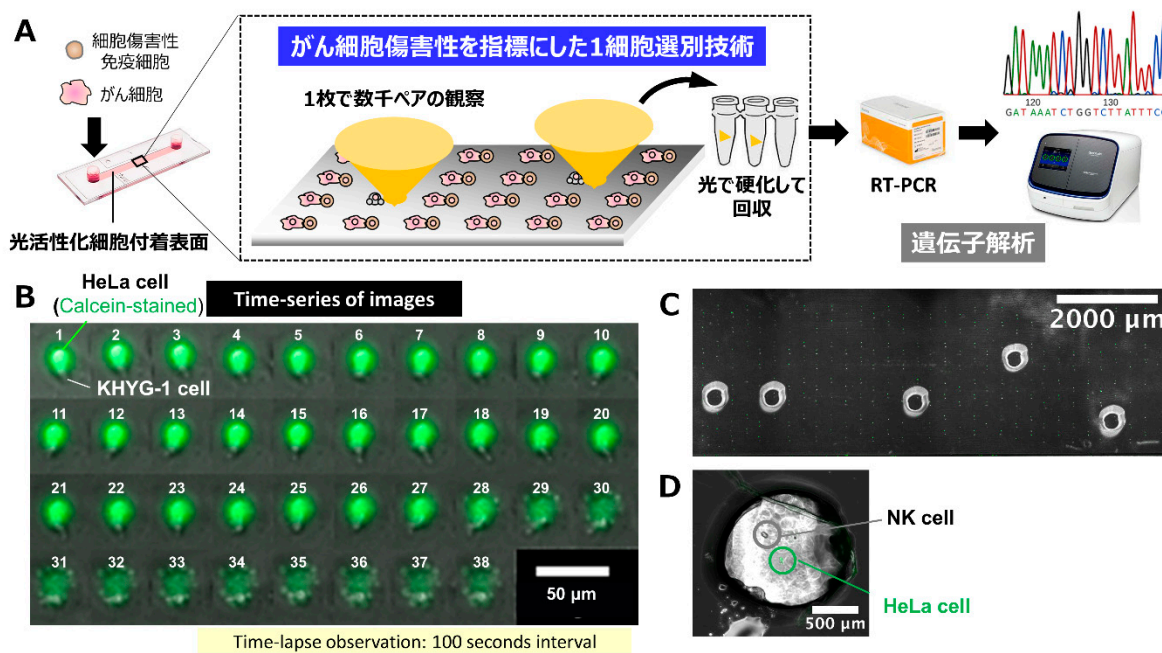
72 細胞傷害性を指標とした1細胞選別技術の開発	山口 哲志
--------------------------	-------

【目的】 免疫システムを利用してがんを殺傷する「がん免疫療法」は、次世代のがん治療法として期待されている。近年、一般的ながん抗原を認識する受容体を発現させた遺伝子改変 T 細胞が、がん細胞を選択的に認識して殺傷できる治療用細胞として実用化されている。しかし、患者ごとに治療効果が異なり、治癒率は低いのが現状である。そこで、患者ごとに個別に最適な治療用細胞を用意する必要があるが、がん細胞傷害性の高い治療用細胞を探索する時間とコストが大きな問題となっている。そこで、本研究では、細胞傷害性の免疫細胞とがん細胞の相互作用を大規模に1細胞観察した後、がん細胞傷害性の高い免疫細胞を迅速簡便に選別し、その遺伝子発現を1細胞解析する技術を開発することを目的とした研究を行った。

【方法】 ガラス基板にビトロネクチンをコーティングした後、我々が開発した独自の光活性化型細胞附着剤（光活性化 PEG 脂質）を修飾した。マスクレス露光装置を用いて、基板表面に1細胞サイズの光を照射した後、ヒトのナチュラルキラー（NK）細胞株である KHYG-1 細胞を播種し、1つずつ並べた。次に、同様の方法で、ヒト子宮頸がん細胞株である HeLa 細胞を KHYG-1 細胞の隣に配置した後、培養環境下で顕微鏡観察を行った。HeLa 細胞は予め Calcein-AM で蛍光染色しておき、KHYG-1 細胞との相互作用によって細胞傷害を受け、蛍光を失う様子を観察した。さらに、顕微鏡観察後、流路内に光応答性のゲル化剤を導入し、回収したい細胞のみに光を照射してゲルで固めてピンセットで回収した（図 A）。

【結果】 がん細胞傷害性の大規模 1細胞解析のモデル実験として、マイクロ流路の底面基板に上記の方法で KHYG-1 細胞と HeLa 細胞のペアを数千個並べ、蛍光顕微鏡で両者の相互作用を観察した。その結果、KHYG-1 細胞が HeLa 細胞を殺傷する様子を観察することができた（図 B）。観察後、観察結果を指標にして選別した細胞ペアに対して、対物レンズを通してくさび型の光を照射し、細胞ペアを一つだけゲルで固める条件の検討を行った。光の波長や強度といった照射条件、ゲル化剤の種類や濃度、細胞を配置する際の間隔などを最適化したところ、ピンセットで回収するのに十分なサイズのゲルで固めることに成功し（図 C）、選択的に回収することができた（図 D）。現在、この方法で回収した細胞の遺伝子配列を解読する実験を進めている。

免疫細胞によるがん細胞傷害性を指標に細胞を選択的に回収するワークフローと実験結果

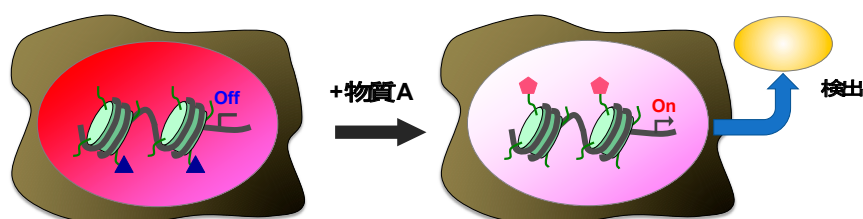


【目的】がん細胞には正常細胞に無いゲノム異常が認められるが、それ以上の数のエピゲノム異常が認められる。特に小児固形腫瘍の多くはドライバー変異に乏しく、エピゲノム異常が密接に病態と関連する。実際に DNA メチル化酵素の阻害剤やヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤が治療薬として認可されている。そのため、エピゲノムを変化させる物質は、がんを含む各種疾患の予防や治療のシード化合物になり得ると考えられる。しかしその探索として特定のエピゲノム関連酵素を標的に阻害剤のハイスループットスクリーニングが行われているが有用な探索方法は無いといえる。そこで本研究では、最近充実してきたエピゲノムの大規模情報に注目した。公的データベースを含む各種エピゲノムのデータ入手、バイオインフォマティクス的手法を用いてスクリーニングに適する標的遺伝子と細胞株の組み合わせを同定、標的遺伝子のエピゲノムが変化したときの産物を検出できるようにすることで、細胞ベースでエピゲノムの変化異常を誘発する物質を高感度に検出する系 (図) を新たに構築することを目的とした。

【方法】細胞株とその処理 LoVo, CW-2, HCT116, DLD-1, HT-29, Caco-2, HepG2, HuH-7, Jhh4, HLF, A172, T98G, No11, KALS-1, EN の各細胞株は、理化学研究所細胞材料開発室、JCRB 細胞バンク、東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センター・細胞バンクから分与を受けた。一部の細胞株は酪酸ナトリウム、プロピオン酸ナトリウム、バルプロ酸ナトリウム各 20 mM を含む培地で 24 時間培養した。データベース解析 各がん種の細胞株の DNA メチル化については、GEO の GSE68379 における HM450K で解析したデータを用いた。変異については、COSMIC の Cell Lines Project のデータを用いた。RNA-seq 解析 Stranded RNA-seq は、Novogene 社において、NEBNext UltraII Directional RNA Library Prep Kit を用いてライブラリを合成、MGI DNBSEQ-T7 を用いてシーケンシングすることによって行った。配列の QC は Fastp、マッピングは Star を用いて行い、RSEM を用いて TPM を計算することによって各遺伝子の定量を行った。

【結果】1. 網羅的ゲノム解析結果の活用による細胞の選定：DNA メチル化酵素にゲノム異常が無く、脱メチル化酵素 TET1~3 の全てが変異で不活化している細胞株を探索した結果、子宮内膜癌細胞株 EN 1 個のみが該当することを見出した。全ゲノム中 48 万 5 千箇所の CpG のメチル化レベルの平均値は EN で 0.604 と最も高い値を示すことが明らかになった。以上の結果は、EN 細胞株は DNA メチル化異常が起きやすく、メチル化異常のスクリーニングに適していることを示している。EN 細胞株を既知の DNA メチル化誘導因子で処理し、DNA メチル化誘導の起きやすい遺伝子を同定すると共に、エピゲノム変化と並行して起きるスクリーニングにおける検出に適した変化の同定を試みている。2. 短鎖脂肪酸によるエピゲノム変化の誘導：大腸がん細胞株を酪酸およびプロピオン酸と、バルプロ酸を用いて CW-2 と Caco-2 を処理し、遺伝子発現変化を RNA-seq により解析した結果、特にポリアミンの代謝に関連する遺伝子 (*ODCI*, *SAT1*) の大幅な発現変化が認められた。ポリアミンの物質量を HPLC-MS により解析する試みを進めている。その一方で、プロピオン酸にのみ重要ながん関連遺伝子を含む多くの遺伝子についてスプライシング異常を認めた。以上、本研究の目的であるエピゲノムの変化異常を誘発する物質を高感度に検出する系を新たに構築することは期間内に完了できなかったが、多くの興味深い知見を得ることができた。今後も研究を継続し、初期目的の達成を目指す。

本研究における細胞系スクリーニングシステムの模式図



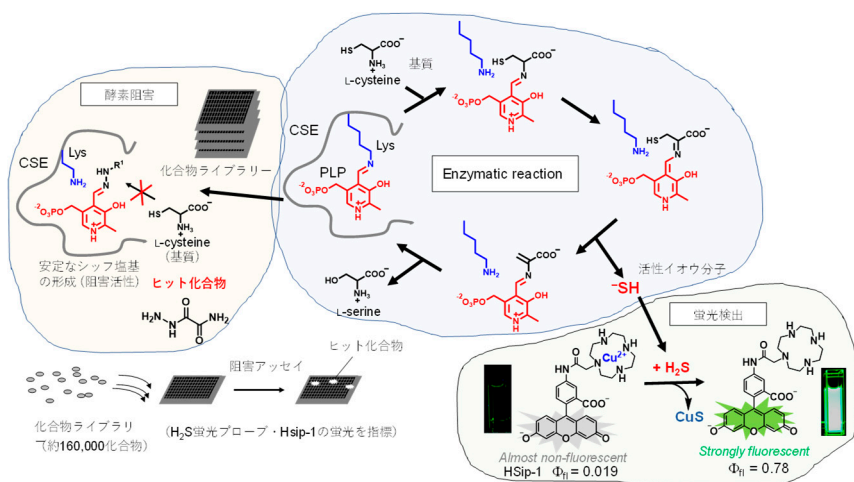
74 蛍光プローブの開発を基盤とした酵素阻害剤の探索研究 花岡 健二郎

【目的】 活性硫黄分子種とは、生体内に存在する反応性の高い含硫黄分子である。腐卵臭を持つガスである硫化水素 (H_2S) は代表的な活性硫黄分子種として、血管拡張や炎症、血管新生、抗酸化作用等に関与するガス状シグナル伝達物質として着目されてきた。さらに近年では、0 価の硫黄原子である sulfane sulfur が、シグナル伝達やレドックス制御において重要な生理機能に関与することが報告されている。Sulfane sulfur は生体内で polysulfide ($-S-S_n-S-$) 構造や persulfide ($-S-SH$) 構造で存在し、他の硫黄原子に可逆的に結合する。これらの活性硫黄分子種は、生体内で酵素依存的に産生される。現在までに cystathionine γ -lyase (CSE)、cystathionine β -synthase (CBS)、3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3MST)、cysteinyl t-RNA synthetases (CARSS) が産生酵素として報告されている。活性硫黄分子種の産生において各酵素は関わり合っており、それぞれの酵素が活性硫黄分子産生においてどのような役割を担っているか十分に明らかにされていない。そこで本研究において、ケミカルツールの一つとして、CSE の選択的な阻害剤の開発を行った。

【方法】 CSE 阻害剤のハイスループットスクリーニング (HTS) のために、独自に我々が開発した H_2S 選択的蛍光プローブ (HSip-1) を用いてアッセイ系を構築した。本アッセイ系を用いて、東京大学創薬機構が所有する約 16 万化合物に対してスクリーニングを行った。さらに得られたヒット化合物について、CSE 選択性の評価や X 線結晶構造解析、SPR 測定、誘導体合成を通して、得られた CSE 阻害剤の機能評価や阻害機構について考察を行った。

【結果】 本アッセイ系を用いて、東京大学創薬機構が所有する約 16 万化合物に対して、スクリーニングを行った結果、CSE の活性を阻害する化合物として、oxamic hydrazide を得ることに成功した。得られた化合物は、CBS や 3MST といった他の活性硫黄分子を産生する酵素には阻害活性を示さず、CSE に高い選択性を示した。また、得られた化合物を生細胞へと応用したところ、生細胞における H_2S 産生に対しても阻害活性を示すことが分かった。さらに、X 線結晶構造解析の結果、oxamic hydrazide のヒドラジノ基は、PLP とシッフ塩基を形成していることが分かった。誘導体の中で、oxamic hydrazide が最も高い CSE 選択性を示したことについて、X 線結晶構造解析のデータをもとに、分子動力学 (MD) シミュレーションを行ったところ、これら化合物におけるジケトン部位のシス-トランス互変異性による立体反発が重要であると予想された。また、oxamic hydrazide の阻害形式の精査のために SPR 測定を行ったところ、oxamic hydrazide は不可逆的に CSE と共有結合を形成していることが明らかとなった。本研究で開発された CSE 阻害剤は、今後、レドックスバイオロジーの分野で活用されていくことが期待される。

H_2S を検出する蛍光プローブを用いた CSE 阻害剤のハイスループットスクリーニング

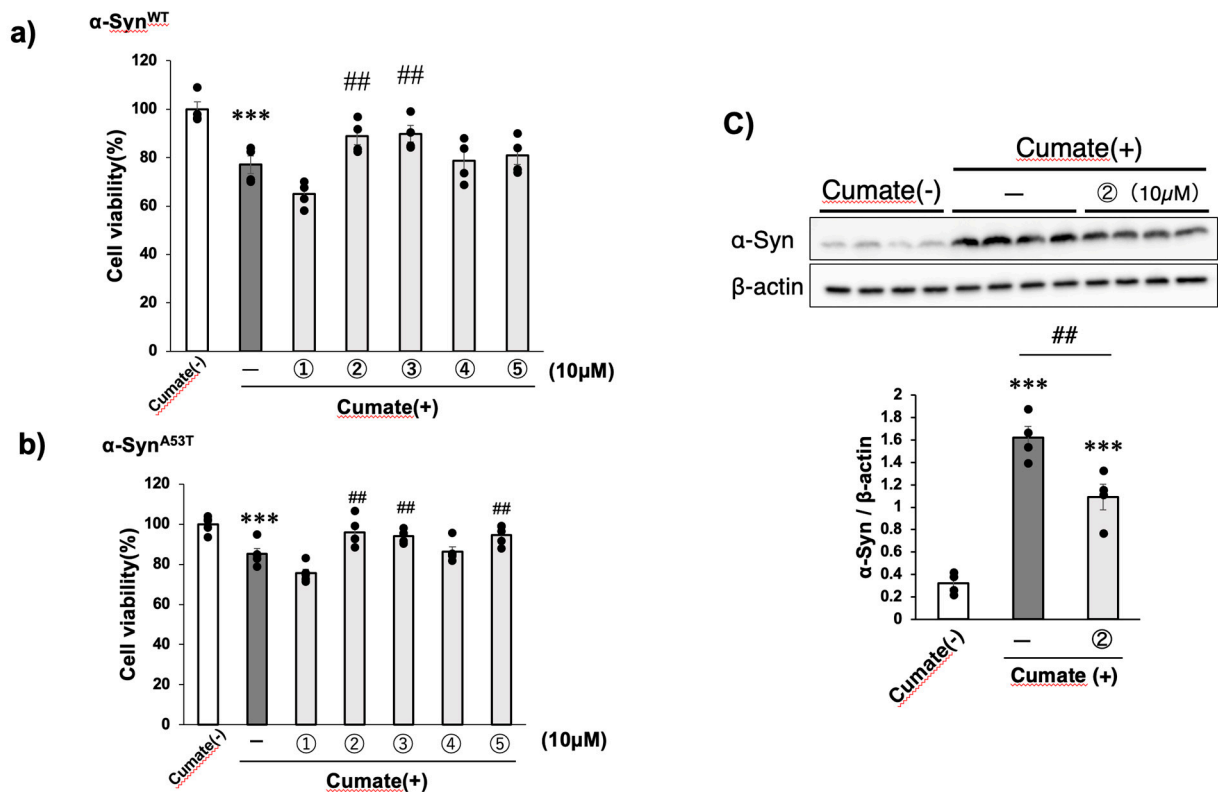


【目的】 現状、VPS35-VPS29 を標的にしたタンパク質-タンパク質相互作用の安定化に関わる低分子化合物 (VPS35-VPS29 制御化合物) は、神経変性疾患においては実用化されていない。新たな低分子化合物が真の創薬シーズになるためには、いかに病態に基づく標的候補と特異的に相互作用をするか、その標的候補に対してのスクリーニングを短時間、低コストで実施するかなどにその成否が関わってくる。筆者は、生物学的解析に計算科学と物理化学を融合させた次世代型創薬サイクルを活用し、新たな VPS35-VPS29 制御化合物を創出することを目的とした。

【方法】 理化学研究所で構築されている一億以上の市販化合物ライブラリから VPS35-VPS29 の予測結合ポケットをもとに、*in silico* スクリーニングを実施した。野生型 α -synuclein および変異型 α -synuclein をそれぞれ導入した N2a 細胞を用いて結合スコアの上位の候補化合物の効果について検討した。

【結果】 結合スコアの高い化合物リストを作製し、この中から結合スコアの上位でかつ、購入可能な化合物 5 つを入手して、 α -synuclein 誘発の細胞死に関して検討を行った。そのなかで、候補化合物②が野生型および変異型の α -synuclein 誘発の細胞死に関して保護効果を認めた。また、 α -synuclein を有意に低下させた。さらに VPS35 に相互作用する可能性を得た。これらの結果は、レトロマーを標的にした新たな神経変性疾患の治療薬開発に繋がっていくことが期待される。

α -Synuclein 毒性に対する候補化合物の保護効果

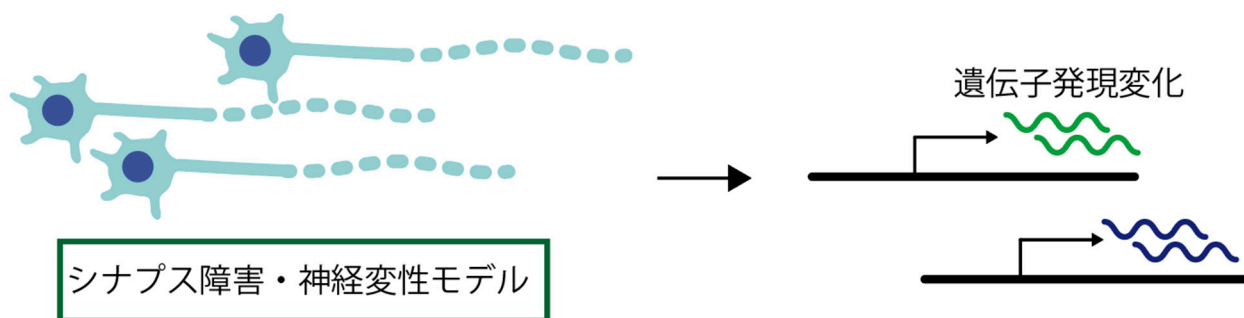


【目的】 ヒトを含む哺乳類において、中枢神経の軸索再生が困難である理由として、中枢神経を取り巻く環境が再生に適していないこと、中枢神経自体の軸索再生能力が弱いことが上げられる。これまでに、神経細胞を取り巻く環境を変化させることで、軸索が再伸長することが示されている。具体的には、中枢神経に存在するグリア細胞であるオリゴデンドロサイトにより、軸索の再生が抑制されている可能性が報告されている。オリゴデンドロサイトの細胞膜は、神経軸索に渦巻き状に何層にも巻き付き、ミエリンと呼ばれる構造を形成する。軸索が損傷された後にも、ミエリンは debris として残存し、この中には、複数の軸索再生阻害因子が含まれる。中枢神経障害からの機能回復には神経回路の再建が不可欠であり、それを実現する手法の開発が強く求められている。

【方法】 これまでに、中枢神経損傷から神経回路修復までの一連の過程を制御するシグナルの解明を目指し、研究を進めてきた。外傷性脳損傷、脊髄損傷、視神経損傷、アルツハイマー病、パーキンソン病、など様々な中枢神経障害モデル動物や細胞を用いて、分子、細胞、組織、行動、など、多角的な解析手法により神経変性のメカニズムの解明に取り組んできた。再生阻害に関わる因子の発現を抑制する手法が、神経回路の修復力を高め、神経症状を改善することを見出してきた。次世代シーケンサーの技術革新や普及により、中枢神経損傷から神経回路修復までの一連の過程では、さまざまな遺伝子の発現が変動するとともに、それを制御するゲノム・エピゲノム状態の変化を捉えることが可能になってきた。私たちは、神経変性に関わるメカニズムを明らかにするため、中枢神経障害モデルを用いて、ゲノムワイドな遺伝子発現変化を解析した。

【結果】 本研究では、神経様細胞に分化誘導したヒト神経芽細胞腫細胞株 SK-N-SH を用いて、A β ペプチドによる遺伝子発現変化を検証した。その結果、炎症反応に関連する遺伝子群の発現が誘導されることがわかった。本研究成果を基盤として、軸索変性に関わる分子メカニズムの全体像を解明することで、神経変性の克服へ展開することを目指す。

シナプス障害・神経変性モデルにおける遺伝子発現変化

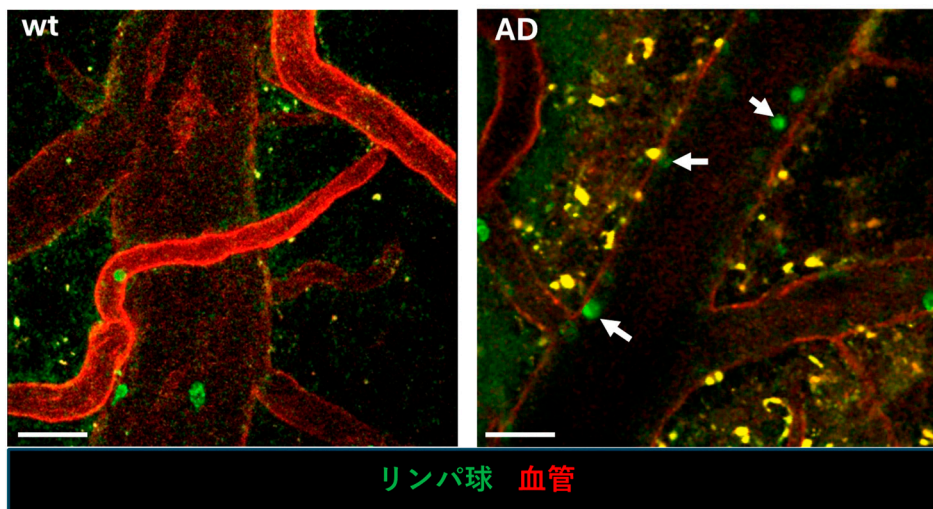


【目的】 生体内において様々な細胞がそれぞれ適切な場所に適切なタイミングで遊走する事が非常に重要である。この細胞遊走ネットワークは時空間的に緻密にコントロールされているが、何らかの原因で破綻すると免疫細胞が組織へ異常遊走し、慢性炎症性疾患を発症する。近年、神経変性疾患であるアルツハイマー病 (AD) でも、その破綻が病態に関与している事が示唆されているが、その機序は全く不明である。本研究では *in vivo* イメージング技術を用いて AD における脳内の細胞遊走ネットワークを解明し、それらを標的とした新規治療法開発の基盤を構築する事を目的としている。

【方法】 AD モデルマウスから脳を採取し、qPCR を用いてケモカイン発現を包括的に解析した。また、免疫染色にてアミロイドβ沈着部位と免疫細胞、及びケモカイン発現の局在に相関性があるか、解析した。最後に、*in vivo* イメージングを AD モデルマウス脳へ適用し、脳内における免疫細胞の動態をリアルタイム解析した。

【結果】 AD モデルマウス脳ではケモカイン *CCL2*, *CCL5*, *CCL8*, *CXCL10*, *CXCL13* mRNA の発現が亢進していた。AD モデルマウス脳内で *CCL2*, *CCL8* の発現はアミロイドβ沈着部位と一致していた。さらに、アミロイドβ沈着部位周辺には *CD45*^{+*Iba-1*⁺ミクログリア及び *GFAP*⁺アストログリアの異常集簇が観察された。*in vivo* イメージングでは AD モデルマウス脳内では無数のリンパ球が *arrest* 及び *crawling* している様子が観察された。以上から、AD 病態の根底に細胞遊走ネットワークの破綻が存在する事が明らかになった。}

in vivo イメージングで捉えた AD モデルマウス脳における細胞動態



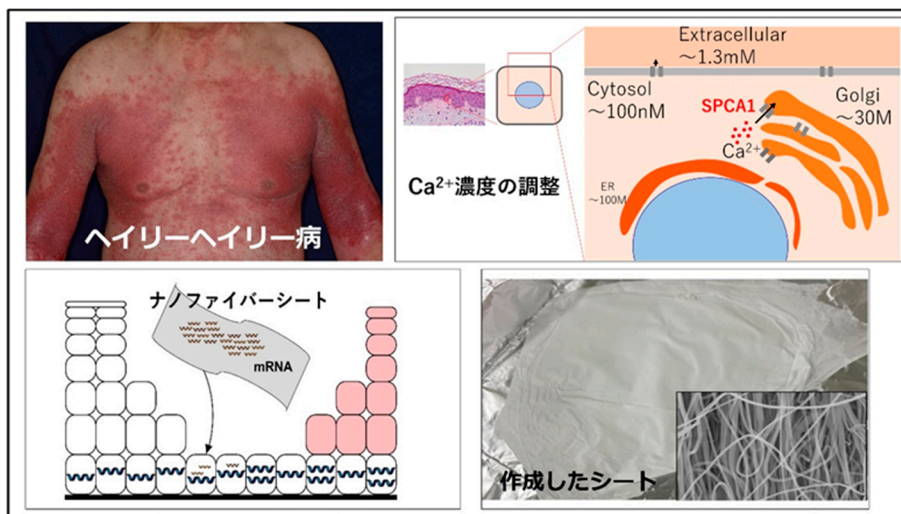
78 皮膚疾患に対する局所遺伝子治療の開発	岩田 浩明
-----------------------	-------

【目的】 皮膚は生命維持における最も重要な物理的バリアの一つである。バリア機能により微生物、熱、光などの体内への侵入を防御しているが、視点を変えると問題点にもなる。皮膚疾患の治療には、内服・注射薬とは異なり外用剤という最も簡便かつ有用な治療法がある。しかし、外用剤治療は皮膚バリアを通過しないと目的の細胞あるいは分子に到達することはできない。正常なバリア機能を破壊せず、一方で薬剤は通過させるという相反することを両立させることが求められる。我々は、最近貼付型マイクロニードルワクチンの開発研究を行った。針長 1 mm にも満たないマイクロニードルは皮内で溶解してワクチンが皮膚に浸透する。そのため注射針を用いることなくワクチン接種が可能である。現在有効な治療法がない遺伝性皮膚疾患であるヘイリーヘイリー病(図)に対してマイクロニードルによる局所遺伝子治療を提案した(図)。本疾患を選んだ理由として、1. タンパク不足が原因と病態が単純であり、治療ゴールはタンパクの増加である。2. 皮膚にびらんが生じるため、皮膚バリアが最初から破綻した状態である。3. 皮膚のみの症状であり、全身治療の必要性がないという三つの理由が挙げられる。

【方法】 1. 不死化ケラチノサイト (HaCaT 細胞) に対して、CRISPR-Cas9 システムを用いて遺伝子編集を行い、*ATP2C1* 変異細胞 (ノックアウト KO と発現低下細胞) の作製を行った。2. TriLink BioTechnologies 社の mRNA 合成サービスを利用するため、既知の *ATP2C1* mRNA (NM_001199179.3) を合成遺伝子にて作製することとした。T7 プロモーターを有する pET22 vector などに制限酵素サイトで導入し、それをもとに mRNA 合成を行う。この際、*ATP2C1* の上流に GFP あるいは His タグを付して、タンパク発現した細胞を内因性タンパクと区別できるようにした。3. 合成 mRNA は、RNase フリーの環境下で作製されたものに関しては、通常、我々が細胞などから抽出する RNA に比べはるかに安定性が高いことは知られている。より安定性を高めるため化学修飾あるいは分解酵素の阻害遺伝子の導入を計画した。溶解型マイクロニードルワクチン作製が技術的に困難であったため、溶解型ナノファイバーシートに mRNA を混和して固形化した状態を作製した(図)。

【結果】 1. レンチウイルスベクターにより恒常的に Cas9 を発現する HaCaT 細胞を作製した (Cas9-HaCaT 細胞)。*ATP2C1* 遺伝子を切断するためのガイド RNA を作製して、トランスフェクションを行い限界希釈法により単一細胞クローン樹立を試みた。しかし、複数回行っても単一細胞では死滅したため、*ATP2C1* のノックダウンを行い、80%以上の低下を認めた。2. His タグをつけた *ATP2C1* 遺伝子を pET22 (+) ベクターの T7 プロモーター下流に導入したベクターが完成した。3. EGFP mRNA を含んだナノファイバーシートを作製して、長期安定性試験を実施している。2024 年 1 月で 6 カ月経過するが -30°C 保管で mRNA の総量の変化はほぼないことを確認した。

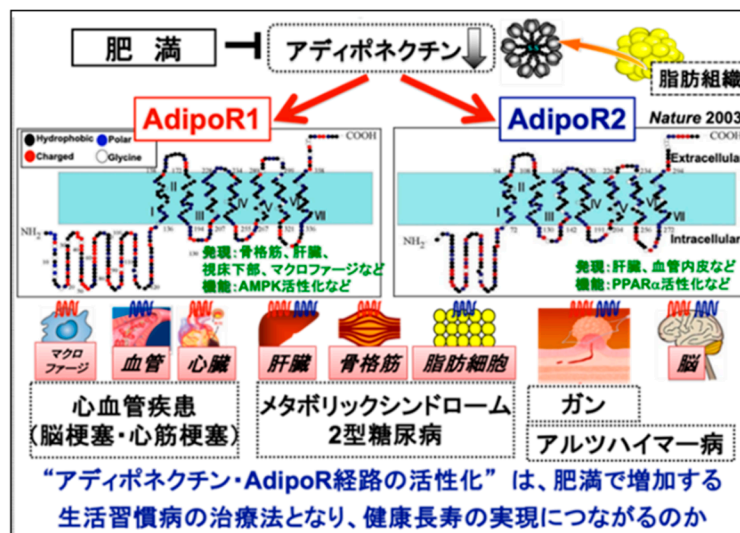
ヘイリーヘイリー病の臨床と病態、研究計画のイメージと作製したナノファイバーシート



【目的】本研究課題では、①各種遺伝子改変動物を用いたアディポネクチンの受容体 1 (AdipoR1) / AdipoR1 結合タンパク質 (AR1BP) の生理的・病態生理的意義の解明、②ヒト型 AdipoR マウスを用いた AdipoR 活性化低分子化合物および抗体の最適化を計画の 2 つの柱として、糖尿病・Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD) 治療薬創製に向けた肝臓における新規シグナル伝達経路の解明を目指した。

【方法および結果】1. 各種遺伝子改変動物を用いた AdipoR1/AR1BP の生理的・病態生理的意義の解明：肥満・2 型糖尿病および MASLD モデルマウスの肝臓において AR1BP の発現が mRNA レベル、タンパクレベルで低下していることが確かめられた。また siRNA を用い、肝臓の AR1BP をノックダウンすると、アディポネクチンによる肝臓での AdipoR1/AMP-activated protein kinase (AMPK) の活性化は低下し、アディポネクチン/AdipoR1 による糖新生の抑制および脂肪酸燃焼効果が消失したことから、AR1BP は肝臓におけるアディポネクチン/AdipoR1 経路の鍵分子であることが明らかになった。肝細胞特異的 *AdipoR1* 欠損マウスは、肝臓において AMPK の活性化が低下し、糖新生関連遺伝子の発現が上昇し、耐糖能障害およびインスリン抵抗性を認め、グルコースクランプ試験においては、糖産生が亢進していることが分かった。そのメカニズムとして、AdipoR1 シグナルがグルカゴンシグナルの一部を直接的に抑制することが明らかとなり糖新生が抑えられることが分かった。また肝細胞特異的 *AdipoR2* 欠損マウスは、肝臓において peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) シグナルが低下し、酸化ストレス消去系遺伝子、脂肪酸燃焼関連遺伝子の発現が低下し、肝臓における中性脂質含量が増加し、インスリン抵抗性が認められた。また AdipoR 活性化低分子化合物 (AdipoRon) は肝臓において AdipoR1/AMPK 経路および AdipoR2/PPAR α 経路を活性化し、肝臓における糖新生を抑制するだけでなく、MASLD も改善することを明らかにした。2. ヒト型 AdipoR マウスを用いた AdipoRon および AdipoR 活性化抗体 (AdipoRaMab) の最適化：AdipoRaMab を週 1 回、4 週間、高脂肪食を負荷した肥満・2 型糖尿病モデルマウスに投与した結果、高脂肪食によるインスリン抵抗性が改善することが明らかになった。一方で *AdipoR1*・*R2* ダブル欠損マウスでは、その改善効果がなかったことから、AdipoRaMab によるインスリン抵抗性改善作用は AdipoR を介していることが確かめられた。次に MASLD モデルマウスに AdipoRaMab を投与したところ、肝臓における PPAR α シグナルを活性化し、炎症性サイトカイン、また線維化関連遺伝子の発現を抑制し、MASLD の病態改善効果を有することが明らかになった。さらにヒト型 AdipoR マウスでも AdipoRon および AdipoRaMab は抗糖尿病、抗 MASLD 効果を発揮したことより、現在得られている低分子化合物および抗体は生体内においてヒト AdipoR を介して作用することが確かめられた。

アディポネクチン受容体 (AdipoR) は疾患治療の鍵分子である



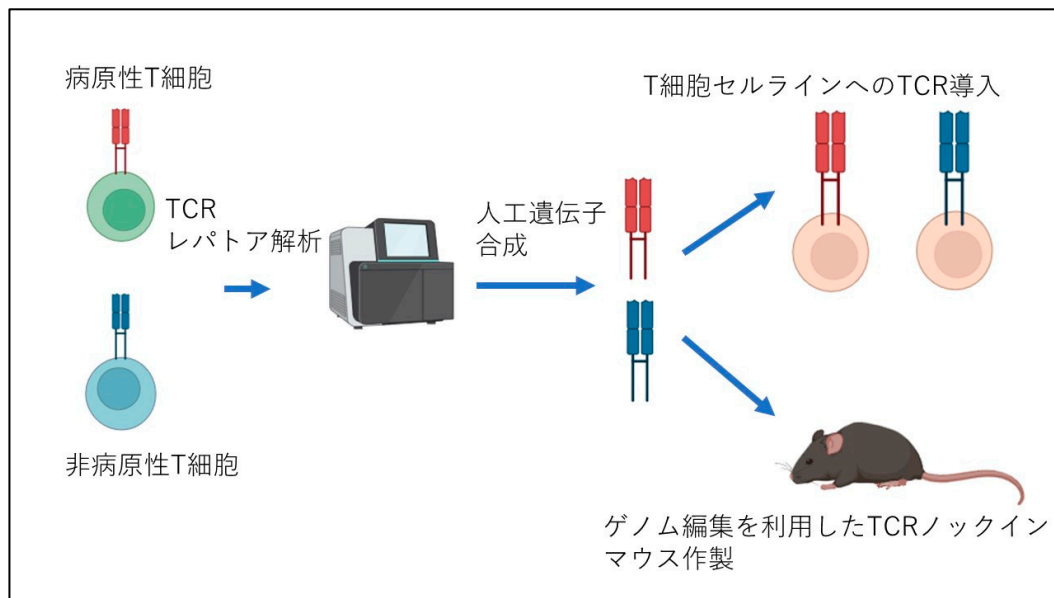
80	自己抗原特異的TCRを発現する水疱症モデル動物の樹立	氏家 英之
----	----------------------------	-------

【目的】 水疱性類天疱瘡 (BP) は、表皮基底膜部の構成タンパクである 17 型コラーゲン (COL17、BP180) に対する自己抗体により発症する最も頻度の高い自己免疫性水疱症で、厚生労働省の指定難病となっている。過去の研究により、BP の自己抗体産生には自己反応性 T 細胞の働きが重要と考えられているが、COL17 反応性 T 細胞の病原性は未だ明らかになっていない。我々は最近、マウスに COL17 タンパクで免疫し、そのマウスのリンパ球を *in vitro* で刺激することで 5 株の COL17 反応性 T 細胞株の樹立に成功した。T 細胞株の病原性を評価したところ、3 つの株で病原性がみられ、2 つの株で病原性が見られなかった。本研究の目的は、我々が樹立した COL17 反応性 T 細胞株の T 細胞受容体 (TCR) の遺伝子配列を明らかにし、その配列を持つノックインマウスを作製することで新規 BP マウスモデルを樹立することである。

【方法】 病原性 T 細胞と非病原性 T 細胞のそれぞれから Total RNA を抽出し、RNAseq で TCR レパトア解析を行った。この TCR 配列を参考に人工遺伝子合成で TCR をデザインした。このデザインした TCR を、レトロウイルスを用いて、T 細胞セルラインに導入し、TCR の発現確認をフローサイトメトリーで行った。このセルラインを COL17 タンパクで刺激し、活性化の有無に対してフローサイトメトリーとサイミジン取り込み試験を行った。セルラインに導入した TCR の配列の一部をサンガーシーケンスで確認した。TCR ノックインマウスを作製するために人工遺伝子で病原性 T 細胞と非病原性 T 細胞の配列を作製し、ゲノム編集でマウス受精卵に導入した。導入確認は PCR での Genotyping で行った。

【結果】 病原性 T 細胞と非病原性 T 細胞の TCR レパトア解析で TCR の配列を同定した。この TCR 配列を人工遺伝子合成で作製し、レトロウイルスを用いて、T 細胞セルラインに導入しフローサイトメトリーで TCR の発現を確認した。このセルラインを COL17 タンパクで刺激し、活性化の有無に対してフローサイトメトリーとサイミジン取り込み試験で評価したが T 細胞の有意な活性化は確認できなかった。セルラインに導入した TCR の配列の一部をサンガーシーケンスで確認したところ、変異が入っていることが確認された。TCR ノックインマウスを作製するために人工遺伝子合成で病原性 T 細胞と非病原性 T 細胞の配列を作製した。ゲノム編集でマウス受精卵に導入し FO を得た。導入確認は PCR での Genotyping で行い、多数のマウスにおいてゲノム編集で TCR がノックインされていることを確認した。

T 細胞セルラインへの TCR 導入と TCR ノックインマウスの作製

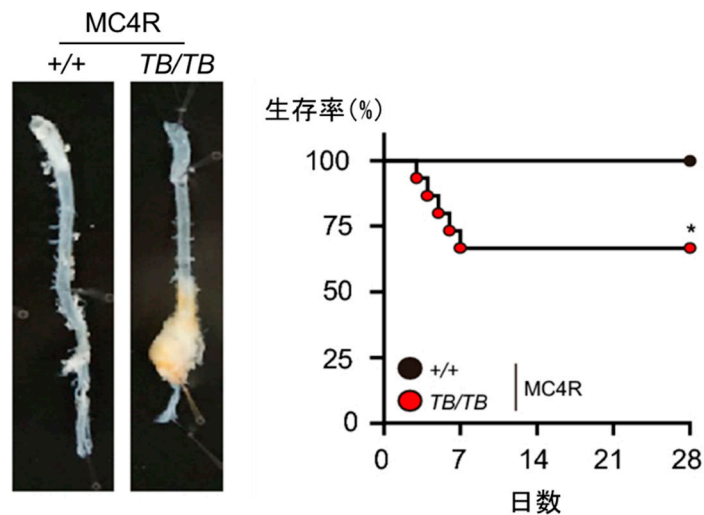


【目的】肥満は腹部大動脈瘤（AAA）の独立した危険因子である。メラノコルチン4型受容体（MC4R）は視床下部においてレプチンによる食欲抑制シグナルを仲介する。遺伝子の変異は、単一遺伝子変異に起因する肥満として最も高頻度である。本研究では、MC4Rと血管疾患の関連を主に基礎的手法により検討した。

【方法】MC4R欠損マウスとして、loxP配列にspanされた転写阻止（transcriptional blocking : TB）配列を *Mc4r* の ATG 部位の上流に挿入して *Mc4r* の発現を阻害するマウス（MC4R^{TB/TB}マウス）を用いた。AAAはangiotensin II（Ang II）を浸透圧ポンプで持続皮下投与にて誘導した。

【結果】MC4R^{TB/TB}マウスは野生型（MC4R^{+/+}）マウスと比較して肥満を呈し、Ang IIによるAAAが促進し、生存率も減少した。MC4R^{TB/TB}マウスは血中レプチン濃度が上昇しており、血管平滑筋細胞においてレプチンはPI3キナーゼを介してosteopontinの遺伝子発現を誘導した。MC4R^{TB/TB}マウスにosteopontinの受容体CD44に対する中和抗体を投与するとAng IIによるAAAが部分的に抑制された。一方、ApoE欠損マウスにおいて大動脈粥状硬化巣のマクロファージ（CD68陽性細胞）にはMC4R蛋白が発現していた。骨髄系細胞にCreを発現するLysozyme-M CreマウスとMC4R^{TB/TB}マウスの交配により骨髄系細胞特異的MC4R発現回復マウスを作製すると、同マウスにおいてAng IIによるAAAが抑制された。骨髄系細胞特異的MC4R発現回復マウス由来マクロファージはMC4Rの内因性リガンド α -MSHによる細胞内cAMPの産生が認められ、 α -MSHの前処置によりLPSによるプロテインキナーゼAおよびNF- κ Bの活性化が減弱した。 α -MSHの慢性投与により、骨髄系細胞特異的MC4R発現回復マウスにおいてはAng IIによるAAAが抑制されたが、MC4R^{TB/TB}マウスでは抑制が認められなかった。2型糖尿病患者由来の培養単球において、MC4R遺伝子発現量と血漿 α -MSH濃度には有意な負の相関が認められた。

MC4R^{TB/TB}マウスと野生型（MC4R^{+/+}）マウスにおけるAng II誘導性AAAの発現と生存率

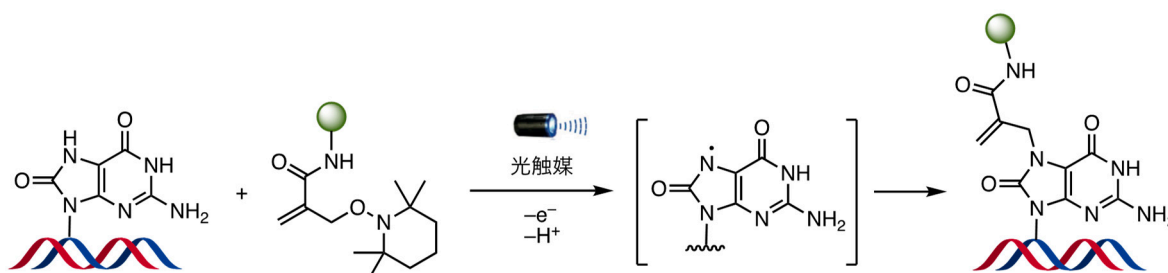


【目的】 DNA/RNA は、アデニン (A)、シトシン (C)、グアニン (G)、チミン (T)、ウラシル (U) といった核酸塩基を有するが、生体内の核酸には、それらの塩基が修飾や損傷を受けた非標準な構造を有するものが多数存在する。例えば、最も発生頻度が高い酸化損傷塩基である 8-オキソグアニン (8-oxo-G) は、G が代謝過程で発生する活性酸素種 (ROS) と反応することで生成する。8-oxo-G は複製時に変異を惹起し、細胞死や突然変異を誘発するため、生体にはこの損傷を元に戻す修復機構が備わっている。しかし、核やミトコンドリアに 8-oxo-G が蓄積すると、老化やがん、神経変性などの原因となる。8-oxo-G の疾患との関連や、生体内での役割を調べるために、これまでに様々な 8-oxo-G の検出法が開発されている。しかし、抗体や DNA 修復酵素を利用した既存法では、低い基質特異性や、配列や二次構造などの周辺環境の影響を受けるといった問題がある。これらの問題の解決策として筆者は、抗体・酵素のような巨大分子による 8-oxo-G の構造認識に頼るのではなく、8-oxo-G が持つ固有な反応性を目掛けた選択的修飾法を利用することを着想した。そこで、DNA 上での 8-oxo-G の発生位置を特定するシーケンシングへの応用を目的に、8-oxo-G 選択的な化学修飾法の開発に着手した。

【方法】 8-oxo-G は他の核酸塩基に類似した官能基や環構造を持つが、標準的な核酸塩基の中で最も酸化されやすい G よりも、さらに低い酸化電位を持つことが知られている (G : +1.29 V、8-oxo-G : +0.74 V vs NHE)。この酸化されやすい化学的性質を利用して、光レドックス触媒による一電子酸化を経由した 8-oxo-G の選択的な化学修飾を検討した。具体的には、8-oxo-G の一電子酸化と脱プロトン化によって生成する窒素ラジカル中間体をアルケンで捕捉するというアプローチを検討した。

【結果】 モデル基質として 8-oxo-G を有するジヌクレオチドを化学合成し、光反応の反応条件を検討した。その結果、窒素ラジカル中間体と反応するアルケンとしてアリル TEMPO を用いた際に、目的物の生成を LC/MS によって確認した (収率 < 26%)。

光レドックス触媒を用いた DNA 中の 8-oxo-G の化学修飾

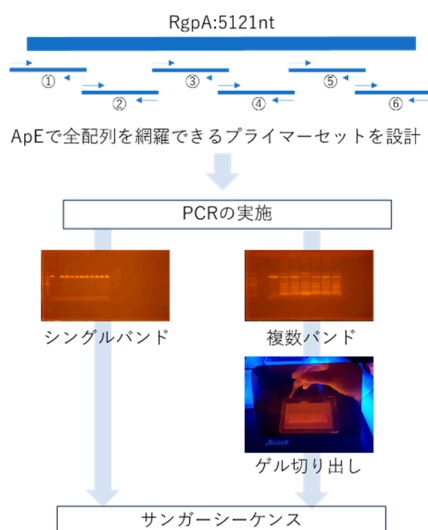


【目的】妊婦が歯周病に罹患していると、歯周病菌が子宮内の炎症性サイトカイン濃度を上昇させ、早産や低体重児出生を誘発する危険性が高まることが分かっている。歯周病ケアを基盤とした早産・低体重児出生の予防策を講じるためには、歯周病と妊娠を取り巻く実態を明らかにする必要がある。これまで報告されてきた研究では、歯周ポケットの深さや出血指数などの指標を用いて歯周病の“進行度”を評価することが主流であった。しかし、妊婦の歯周病罹患やその重症度が早産や低体重児出生の発生と有意に関連していない研究結果が散見されることも報告されている。そこで、早産・低体重児出生予防を目的とした口腔ケアの効果的な介入方法を見出すためには、異なる視点から歯周病と妊娠異常との関連性を探る必要がある。中国やルワンダでは、歯周病の原因であり同時に妊娠異常を誘発する根源でもある“歯周病菌”に着目し、妊婦口腔内の歯周病菌量が出産時の妊娠週数や出生児体重にもたらす量的影響の分析に取り組みられてきた。しかしながら、歯周病菌の病原遺伝子の遺伝子型が妊娠結果にもたらす質的影響はこれまで評価されてこなかった。本研究では歯周病菌の病原遺伝子に着目し、その塩基配列から遺伝子型分類を行う。重度歯周病との関連が深い *Porphyromonas gingivalis* において、どの遺伝子型がより早産や低体重児出生を誘発するリスクが高いのか明らかにし、歯周病菌の『高リスク型』を探索することを目的とした。

【方法】妊婦 153 名の唾液検体のうち、出産後の追跡調査データ（妊娠週数、出生時体重）が得られており、*Porphyromonas gingivalis* が検出された 94 名の検体を本研究での最終対象者とした。3つの病原性遺伝子 (*RgpA*, *RgpB*, *Kgp*) の全配列を決定するため、それぞれの遺伝子領域を分割してシーケンス解析が可能なプライマーセットを ApE A plasmid editor を用いて設計した。実際に各配列領域の増幅を目的とした PCR を行い、目的のバンドの切り出しや PCR 産物精製を経てサンガーシーケンスを両側から行った。

【結果】*RgpA* 遺伝子領域 (5,121 nt) を 6 分割、*RgpB* 遺伝子領域を 3 分割 (2,211 nt)、*Kgp* 遺伝子領域 (5,172 nt) を 6 分割して全配列をカバーするプライマーセットを設計した。それぞれのプライマーセットによる PCR で Positive Control (ATCC 株) で目的のバンドサイズが確認され、Negative Control (RNase free water) でもすべて陰性となった。この検出系を用いてサンプルの PCR を行ったが、*RgpA* で 1 プライマーセット、*RgpB* で 1 プライマーセット、*Kgp* で 2 プライマーセットにおける PCR 産物の電気泳動で、複数のバンドが確認された。サンプル中には様々な細菌が含まれていることから、*P. gingivalis* に非特異的な PCR 産物が生じている可能性があった。そこで、ゲルから目的のバンドサイズを切り出して DNA を抽出し、サンガーシーケンスを行って配列データを取得した。PCR 条件の検討やゲルの切り出し等に時間を要し、本助成期間中には配列データを取得する段階まで終了した。

プライマーの設計と PCR 産物生成及びサンガーシーケンスの流れ



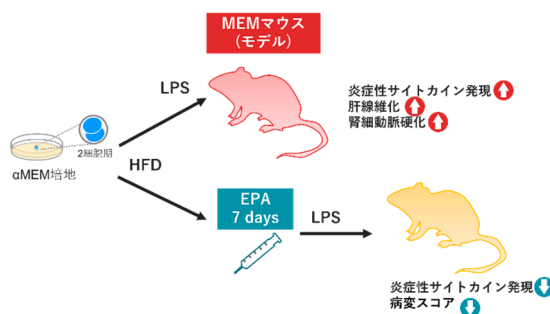
84 代謝-感染性炎症モデル構築およびEPA病態抑制効果検討	石山 詩織
--------------------------------	-------

【目的】 COVID-19 感染時において、基礎疾患患者は重症化リスクや致死率が高いことは、過剰な炎症反応が原因であると考えられている。中でも、2 型糖尿病患者は血中の炎症性サイトカインの発現が増大しており (Osonoi T. et al., *Metabolism*. 2010)、線維化を伴う肝疾患 (脂肪肝炎) や腎疾患 (糸球体硬化症) 発症時には、臓器の好中球やマクロファージの浸潤が観察される (de Lira Silva NS. et al., *Inflammation*. 2019) ことが報告されている。しかし、基礎疾患と感染による過剰な炎症反応のメカニズムやその予防・治療研究は未だ不明である。このような背景の中、これまで、胚環境操作と生後の高脂肪食負荷により 2 型糖尿病を発症する新規モデル (以下 MEM マウス; 特許第 7169509 号) は、生後の高脂肪食摂取により炎症性サイトカインを高発現し、2 型糖尿病および炎症性合併症 (脂肪肝炎、腎症) を発症し、これらの病態は食品因子 (大麦) によって改善可能であることを示してきた (Ishiyama S. et al., *Biosci Biotechnol Biochem*. 2021, Ishiyama S. et al., *Biochem Biophys Res Commun*. 2021, Ishiyama S. et al., *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021)。本研究は、コロナ禍において、COVID-19 罹患時に、過剰に慢性的な炎症反応が生じ生活習慣病が重症化するメカニズムの解明を胚環境操作-新規糖尿病自然発症動物モデルである MEM マウスを用いて、その分子機構の解明および、プロスタグランジン E2 やロイコトリエン経路等の抑制効果が期待されるエイコサペンタエン酸 (EPA) の摂取により、炎症性サイトカインの過剰分泌や好中球・マクロファージの浸潤が抑制され病態悪化が抑制される機構を明らかにするものである。

【方法】 1. 胚発生初期である 2 細胞期の ICR マウス胚を採卵し、 α MEM 培地 (対照: KSOM 培地) へ 48 時間体外培養した後に仮親 ICR マウスの子宮に戻し産仔マウスに 3~4 ヶ月高脂肪食を与えて 2 型糖尿病の自然発症モデル MEM マウスを作出した。このモデルマウスに炎症惹起物質リポ多糖 (LPS: グラム陰性菌の細胞外膜の菌体内毒素) を腹腔内投与 (1.25 mg/kg BW) し、投与後 6、24、48 時間にて尾静脈および断頭採血および、48 時間後には臓器を採取した。2. 上記のように胚操作により作製した MEM マウスに、EPA 群には 5% アラビアゴム溶液に 1,000 mg/kg BW の EPA を加えた溶液、対照 KSOM マウスおよび MEM マウス対照群には 5% アラビアゴム溶液を毎日経口投与した。その後、LPS を 1. と同濃度で腹腔内投与し、1. と同様にサンプルを採取した。

【結果】 1. MEM マウスへの LPS 投与群では、対照 KSOM マウスへの LPS 投与群と比較して、血中 IL1B や MCP1 などの炎症性サイトカイン発現の増大や肝障害 (肝臓の線維化面積の増大)、腎障害 (腎臓細動脈硬化病変率の増大) が確認され、臓器障害を伴ってサイトカインストームを発症する動物モデルになることを確認した。また、肝臓においては、線維化を誘導する Ly6Chi/Ly6Ghi マクロファージの浸潤率が、LPS 投与の対照マウスより増大した。2. MEM マウスへ EPA を投与した後に LPS を投与すると、LPS 投与後 6 時間、24 時間では病変が EPA 非投与 MEM マウスと同等レベルで見られたが、48 時間では病変率が低下し、病態が回復していることが示された。また、末梢血の炎症性サイトカインである *s100a10* 遺伝子発現が EPA 非投与群と比較して低減することが観察された。肝臓では炎症性サイトカイン *Il1b*, *Il18*, *s100a10* 遺伝子発現や ROS 産生関連遺伝子 *Nox4*, *p22phox* 発現が抑制され、ROS 除去関連遺伝子 *Mpo*, *Cat* 発現が増大したことが明らかになった。

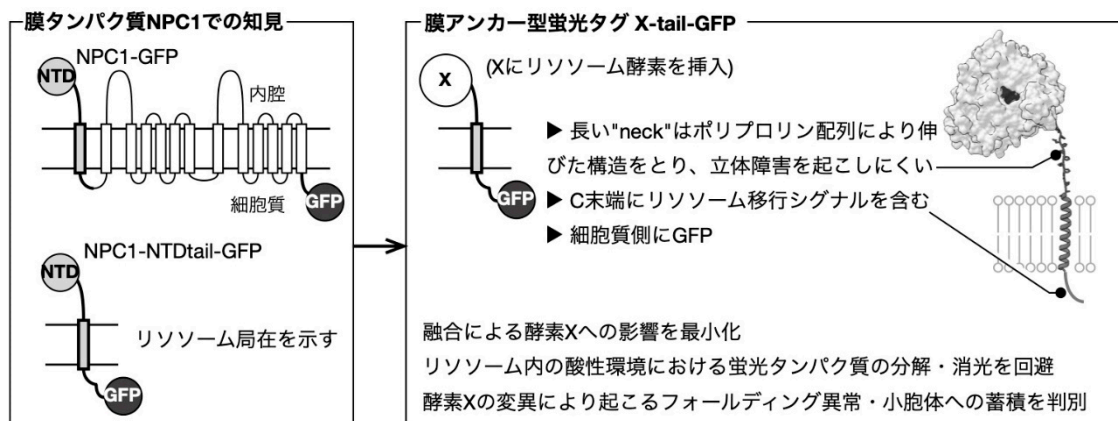
EPA 投与による糖尿病-感染性 MEM マウス炎症性サイトカイン発現の抑制



【目的】 ムコ多糖症VI型は、リソソーム病の一種であり、硫酸化多糖の分解に必要なアシルサルファターゼ B (ARSB) の変異により起こる希少難病である。多数の変異が知られているが、その多くは ARSB タンパク質のフォールディングや安定性に異常があると考えられている。そのような変異体は、フォールディングの場合である小胞体において品質管理機構により認識され、リソソームへの輸送は許されずに分解され、結果としてリソソームにおける硫酸化多糖の分解が滞る。このようなフォールディング異常に起因する疾患に対して、フォールディングを促進する薬理的シャペロンが治療法として期待されている。薬理的シャペロンとは、リガンドとして小胞体の変異体タンパク質に結合し、その構造を正常に近い形に安定化することで、品質管理機構の通過を促す化合物であり、部分的に機能を保った変異体タンパク質のリソソームへの輸送を助け、変異による機能低下を緩和することができる。ゴーシェ病など一部の疾患では、薬として実用化されているが、ムコ多糖症VI型では薬理的シャペロンは見つかっていない。筆者等はムコ多糖症VI型に対する薬理的シャペロンの探索を行っているが、その中で ARSB の細胞内局在を簡便に可視化できないことに課題を感じていた。フォールディング異常を起こしたリソソームタンパク質は小胞体に溜まることから、変異体が小胞体に留まっているか、リソソームに届いたかを可視化することは、薬理的シャペロンの評価に有用であり、筆者等は膜タンパク質 Niemann Pick type C1 (NPC1) において局在を指標として薬理的シャペロンを見出すことに成功している。このような局在を指標とする探索方法は、膜タンパク質では有効に用いられているが、ARSB を含めたリソソーム酵素では成功例がほとんどない。本研究では、ARSB の可視化が困難な理由として、(1) リソソーム移行シグナルが弱いこと、(2) 蛍光タンパク質をリソソーム内腔側に配置することの難しさ、を想定し、図に示すように NPC1 の部分構造を用いて擬似的に膜タンパク質化することで解決することを試みた。

【方法および結果】 NPC1 は N 末端ドメイン (NTD) と第一膜貫通領域、そして C 末端尾部だけでも明確なリソソーム局在を示すことから、N 末端ドメインを ARSB に置換することで、ARSB を膜に係留するタグとして利用した。これにより、蛍光タンパク質 GFP は、酸性条件で消光・分解されるリソソーム内ではなく、膜を隔てて細胞質側に配置することができた。融合タンパク質としても ARSB の酵素活性は維持されることは確認できたものの、細胞内局在は小胞体局在であった。小胞体局在を起こす可能性として、ARSB の sulfatase modifying factor 1 (SUMF1) による翻訳後修飾が不十分な可能性や、ARSB に含まれていた一塩基置換の影響、シグナルペプチド配列の影響等を検討したものの、依然として小胞体局在のままであった。エピトープタグとして FLAG タグのみを導入した ARSB においてもリソソーム局在は見られなかったことから、フォールディング効率が低いなど、ARSB 配列自体に小胞体に保持されやすい性質がある可能性が疑われる。局在の可視化法としては、他のリソソームタンパク質での検証が必要と考えられる。

リソソーム酵素を膜に係留する蛍光タンパク質タグのデザイン

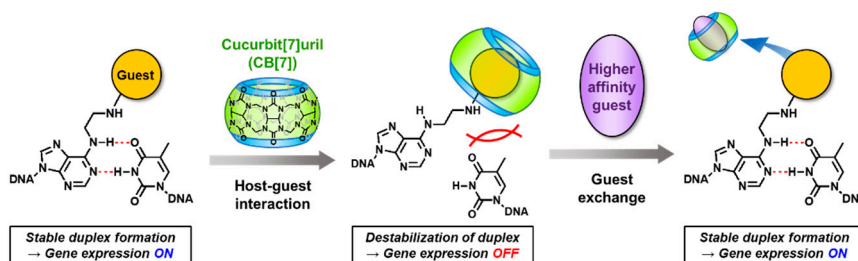


【目的】 近年、人工的に合成した長鎖 DNA を用いる合成生物学が遺伝子発現の基礎及び応用研究に大きな潮流を生み出している。これら人工遺伝子を用いる研究において、遺伝子発現をオンデマンドに調節できる技術は、強力なツールとなり得る。本研究では、人工遺伝子の発現を調節するための新たな方法論の創出を目的として、「特異かつ可逆的な複合体形成を駆動力とする塩基対スイッチ」の開発を目指した。具体的には、核酸塩基に対して本来の機能を損なわないように置換基を導入し、その置換基を足場として DNA 上で可逆的な複合体を形成することを考えた。複合体形成にもとづいて塩基対形成を可逆制御できれば、転写の開始に必要なタンパク質と DNA の相互作用を双方向に調節するための基盤技術になり得る。また、生体適合性の複合体形成分子を用いることで、従来困難であった生体深部での発現調節も可能になると期待した。

【方法】 DNA 上における可逆的な複合体形成を駆動力とする塩基対スイッチを開発するにあたり、ククルビットウリル (CB[7]) とアダマンタンのホスト-ゲスト相互作用に着目した。本相互作用は、生理的条件下で非常に高い親和性を示すほか、CB[7]に結合性を示す別のゲスト分子の存在下ではゲスト交換反応が進行する。このような CB[7]のユニークな結合特性に加え、分子サイズが複合体形成前後で大きく変化する特徴に発想を得て、ホスト-ゲスト相互作用を駆動力として塩基対形成能を変化させるゲスト修飾アデノシン (Guest_{dA}) を設計した。これら Guest_{dA} と CB[7]のホスト-ゲスト相互作用に基づく二重鎖形成の可逆制御、ならびに T7 RNA ポリメラーゼによる転写反応の可逆調節を検証することで、設計概念の実証を目指した。

【結果】 まず、アダマンタンを導入した種々の Guest_{dA} を組み込んだ DNA を合成し、塩基選択性を UV 融解温度 (T_m) 測定により評価した。その結果、C2 リンカーを持つ Am₂dA が、天然の dA と同等の T_m 値を示すことを確認した。次に、ホスト-ゲスト相互作用による二重鎖形成の可逆制御を検証した。Am₂dA を組み込んだ二重鎖 DNA に CB[7]およびゲスト交換用分子 Ad^{E_{da}}を交互に添加し、 T_m 測定を行った。その結果、CB[7]-ゲスト複合体の形成と解離によって、二重鎖 DNA の解離と再形成を制御できることを確認した。さらに、ゲスト分子をノルアダマンタンならびにビスクロオクタンに替えた Nad_{dA} と Bic_{dA} を設計・評価したところ、ゲスト交換反応の速度をチューニングできることを見出した。次に、T7 プロモーター配列に Nad_{dA} を導入した DNA を用いて、転写の可逆制御を検証した。転写実験では、蛍光性アプタマーをコードした 100 bps の DNA (SqDNA) を用い、転写活性を蛍光測定によって定量的に評価した。初めに、T7 プロモーター中の A を 1 か所ずつ Nad_{dA} に置き換えた SqDNA を合成し、転写活性を評価した。その結果、CB[7]の非存在下では、一部の配列を除き、すべての配列で Squash アプタマーの生成に基づく蛍光シグナルが確認された。一方、CB[7]添加時には、これらの配列の転写活性が低下した。特に、Nad_{dA} を T7 プロモーターの AT rich 領域に組み込んだ配列において、CB[7]あり・なしの条件間で有意な差が見られた。そこで、AT rich 領域に Nad_{dA} を二か所修飾した SqDNA を設計し、CB[7]および Ad^{E_{da}}の添加に基づく転写制御を検証した。その結果、CB[7]の添加によって転写活性がほぼ完全に抑制された。さらに、CB[7]添加後の SqDNA-8 に対して Ad^{E_{da}}を加えたところ、転写活性が添加前と同じレベルにまで回復した。これらの結果より、Guest_{dA} を用いることで、転写活性を可逆制御できることを明らかにした。今後は、細胞レベルにおける遺伝子発現制御へと展開していきたいと考えている。

ホスト-ゲスト相互作用を介して塩基対の形成と解離を制御するアデノシン誘導体 (Guest_{dA}) の設計概念

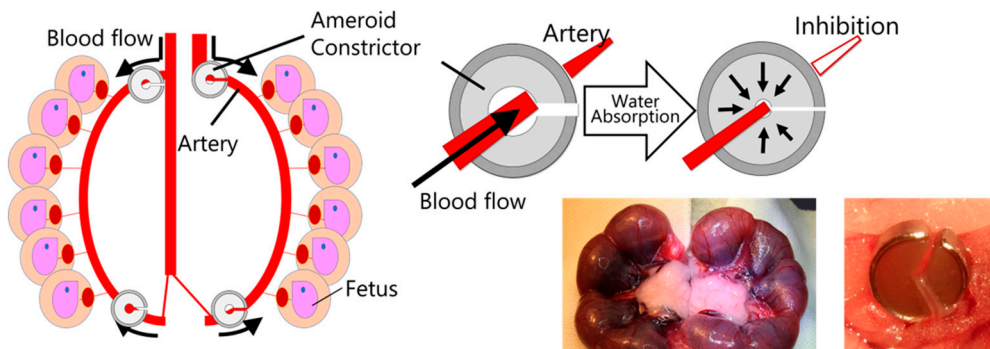


【目的】 現在、自閉スペクトラム症などの神経発達症を持つ小児の増加が、国際的な問題となっている。そのリスク因子として、母胎内で成育が停滞し、低出生体重を引き起こす胎児発育不全 (FGR) が注目されている。FGR は主に胎児への血流不全によって引き起こされ、その血流不全に由来する低酸素や低栄養などの慢性的な病態が脳発達に悪影響を及ぼすと考えられている。しかし、現在の診断技術では、各 FGR 児に生じる微細な脳の異常を捉え、脳発達異常を早期に予測・診断できない。ゆえに、神経可塑性が高く、治療への反応をより期待し得る新生児期の早い段階で治療介入できないことが新生児医療の重要な課題となっている。FGR に伴う神経発達症の早期診断の実現に向け、神経学的予後の早期予測を可能とする指標が求められる。そこで、研究ではそのバイオマーカー候補分子の同定を目的に行った。

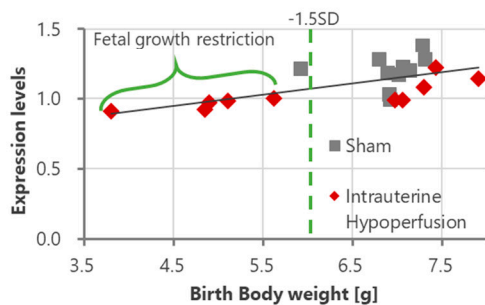
【方法】 軽度の慢性的な子宮内血流不全を模倣する新奇 FGR モデルを使用し、そのモデル動物の新生仔期に脳脊髄液中タンパク質プロファイルを取得した。そのプロファイルを統計学的に解析し、バイオマーカー候補分子を探索した。

【結果】 OX-2 membrane glycoprotein (CD200)、Alpha-2-macroglobulin (A2m)、Polyubiquitin-B (Ubb)、Neuroserpin (Serpini1)、Ubiquitin thioesterase OTUB1 (Otub1)、ならびに、Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1 (Uba1) が、FGR の表現型の一つである出生体重の低下に相関して、大きい発現変動を示すことが明らかになった。これらの分子は脳で高い発現が確認されており、FGR に伴う脳発達異常を早期に捉えるバイオマーカーとなる可能性が示唆された。本研究で見出された分子を診断指標として臨床応用するため、今後、脳機能との相関や治療反応性などを評価することが求められる。

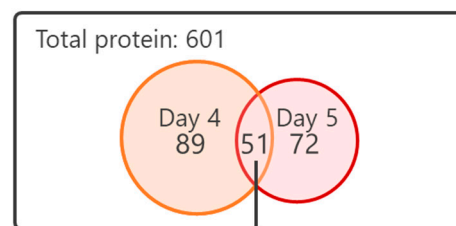
慢性的な子宮内血流不全モデルの作製法とそのモデル動物の新生仔期における脳脊髄液中タンパク質の網羅的解析



1. Acquisition of cerebrospinal fluid protein profile.
2. Derivation of Spearman's correlation coefficient between protein levels and birth body weight.



2. Calculation of p-value and Q-value based on Spearman's correlation coefficient. 212 proteins presented significant differences. Extracted condition: $p < 0.05$, $Q < 0.10$



Biomarker candidates: 6 Proteins

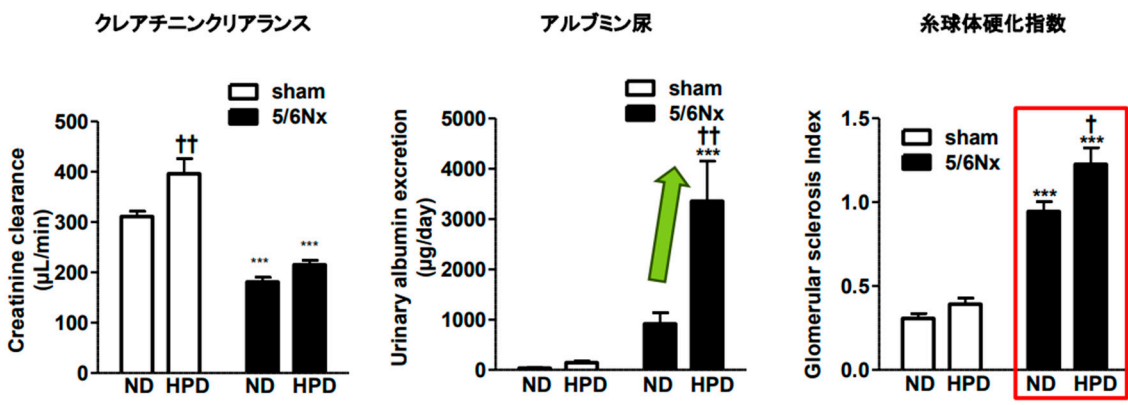
88 六君子湯の筋腎連関を介した腎保護効果の検討	金口 翔
---------------------------------	-------------

【目的】 本研究では、六君子湯が、慢性腎臓病（CKD）病態下において、グレリン系を活性化し、低栄養改善作用、サルコペニア改善作用、腎における抗炎症作用を介し、腎保護作用を発揮するという仮説をたて、サルコペニア合併 CKD モデル動物、グレリン受容体阻害薬、ヒト腎生検組織を用いて、分子レベルでの作用機序を明らかにすることを目的として立案した。そこで、今回、サルコペニア合併 CKD モデル動物におけるグレリン系の発現調節の検討を行うため、CKD モデル動物の作製を行った。

【方法】 129/Sv マウス、10 週齢、雄に対し、5/6 腎臓摘出術を施行し、3 ヶ月間高蛋白食負荷を行い、血圧、腎機能、腎組織学的傷害を評価した。具体的には、129/Sv マウス（雄 8～11 週齢）を用い、①Sham 手術+通常食群（Sham 手術+通常食）、②Sham 手術+高蛋白食負荷群（Sham 手術+高蛋白食飼育群（術後 2 週間後から 12 週間負荷））、③CKD モデル+通常食群（5/6 腎臓摘出術+通常食）、④CKD モデル+高蛋白食飼育群（5/6 腎臓摘出術+高蛋白食飼育（術後 2 週間後から 12 週間負荷））の 4 群を用意した。観察期間中に体重や血圧などの生理学的データを取得し、高蛋白食（または通常食）負荷 12 週間後に解剖を行い、解剖時の標本で腎機能、腎病理所見などを解析した。

【結果】 5/6 腎臓摘出術群では Sham 手術群と比較して、血圧上昇、腎機能低下、糸球体障害と尿細管障害といった組織学的な腎障害を認めた。さらに、高蛋白食負荷をすることで、5/6 腎臓摘出術群の体重増加量の減少、アルブミン尿や糸球体障害の増悪を引き起こすことを報告した。以上より、今回作製した 5/6 腎臓摘出術+高蛋白食飼育モデルは、サルコペニア合併 CKD モデルとなりうる可能性が示唆された。今後、同モデルの骨格筋機能関連指標、骨格筋における関連分子発現解析、サルコペニア関連指標を解析し、六君子湯の治療効果について比較検討する方針である。

5/6 腎臓摘出術および高蛋白食負荷の腎機能への影響



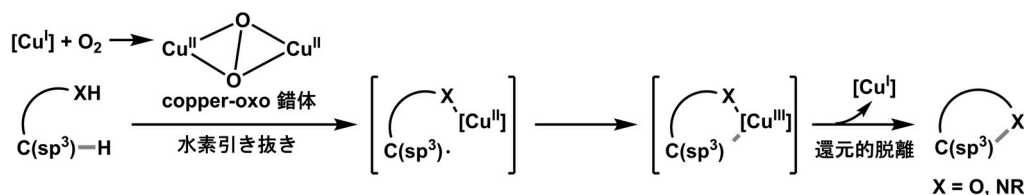
2-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test
 mean ± SEM (n = 4–6 per group).
 *P < 0.05, ***P < 0.001 vs. sham group; †P < 0.05, ††P < 0.01 vs. ND group.
 5/6Nx: 5/6腎臓摘出術, ND: 通常食負荷, HPD: 高蛋白食負荷

【目的】複素環化合物は、その中に含まれるヘテロ原子が生体内タンパク質などの標的分子と水素結合を形成することで親和性が向上するため、多くの医薬品の基本骨格に見られる重要な化合物である。その効率的な合成法として、遷移金属触媒を用いた炭素-水素結合の官能基化反応が挙げられる。本手法は、ハロゲン等の官能基の導入を必要としないため、アトムエコノミー（原子効率）・ステップエコノミー（短工程）に優れており、直截的な分子変換を可能にする。これまでの sp^3 炭素-水素結合官能基化に関する報告のほとんどは、金属や超原子価ヨウ素、過酸化剤等の酸化剤を化学量論以上用いており、安価な試薬を用いた廃棄物を出さない新規化学プロセスの開発が求められている。今回我々は、分子状酸素がこれを満たす酸化剤になり得ると考えた。分子状酸素は、経済性や副生するのが水のみという廃棄物の少なさ、また近年重要視されている環境調和性の観点から、本反応を行うのに理想的な酸化剤であるといえる。しかしながら、分子状酸素はそれ自体では反応性が低く、 sp^3 炭素-水素結合を官能基化できる酸化力を持ち合わせていないのが現状である。そこで我々は、ドーパミンβ-モノオキシゲナーゼやチロシナーゼなどの銅を金属中心として有する酵素が分子状酸素を活性化することで、生体内で copper-oxo 錯体を形成し、 sp^3 炭素-水素結合酸素官能基化反応等が進行することに着目した。本研究でも同様にして銅触媒によって分子状酸素を活性化することができれば、 sp^3 炭素-水素結合の官能基化反応が進行し、複素環骨格構築が可能になると考え、研究に着手した。

【方法】アニリン誘導体の sp^3 炭素-水素結合官能基化によるフェナントリジン骨格構築法の開発を目指し、2'-benzyl-[1,1'-biphenyl]-2-amine をモデル基質とした反応条件最適化（銅触媒、塩基、溶媒、濃度、温度、反応時間など）を行い、基質適用範囲について詳細な検討を行った。さらに、銅触媒と分子状酸素 sp^3 炭素-水素結合官能基化による新たなイソキサゾリン骨格構築法の開発を目指し、(Z)-2,2-dimethyl-1,3-diphenylpropan-1-one oxime をモデル基質とし、詳細な反応条件の検討を行った。

【結果】初めにフェナントリジン合成について、2'-benzyl-[1,1'-biphenyl]-2-amine をモデル基質として用い、反応条件の検討を行った。検討の結果、 Cu_2O 5 mol%、TBAOH (10% in MeOH) 5 mol%、DCE (0.10 M) 溶媒中、80°Cにて酸素バルーンを用いて反応を行うことで、フェナントリジン体が良好な収率で得られることが分かった。続いて、基質適用範囲の検討を行ったところ、ベンゼン環上に様々な電子求引性または電子供与性基を有する基質に対して、適用可能であることが分かった。次に、イソキサゾリン合成法の開発を目指し、研究に着手した。初めに、(Z)-2,2-Dimethyl-1,3-diphenylpropan-1-one oxime をモデル基質とし、反応条件の検討を行った。検討の結果、 $Cu(OAc)_2$ 5 mol%、4-methoxypyridine 20 mol%、DCE 溶媒中、100°C、酸素雰囲気下にて反応を行うと高収率でイソキサゾリンが得られた。続いて本最適条件を用いて基質適用範囲の検討を行った。オキシム側のベンゼン環上の置換基、および、オキシムβ位に隣接するベンゼン環上の置換基についてはその電子状態に関わらず、いずれの基質においても良好に反応が進行した。また、オキシムα位に環状アルキル鎖を有する基質に関しても、高収率で目的物が得られた。さらに、アミドオキシムを基質として本反応条件に付すことにより、オキサジアゾリン骨格も構築可能であった。

分子状酸素を酸化剤とした sp^3 炭素-水素結合官能基化による複素環骨格構築

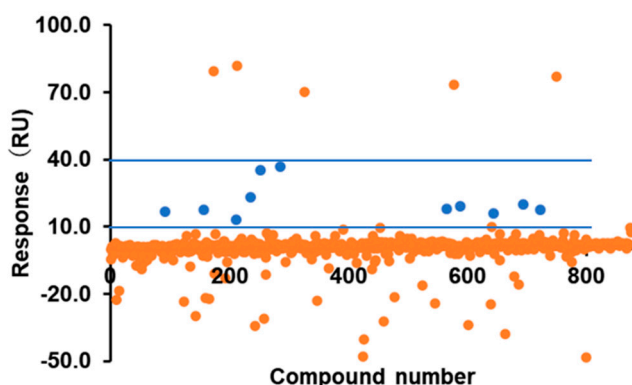


【目的】 癌治療における5年生存率を向上させるには、癌細胞そのものを死滅させるのみならず、癌の浸潤や転移を阻害する医薬品の開発が極めて重要である。本研究では、癌の転移に寄与しているタンパク質のひとつとして、接着因子であるP-カドヘリンを標的とした抗転移作用を示す低分子化合物の開発を目的とする。癌の転移は、P-カドヘリンの細胞外ドメインのホモ二量体化に伴う細胞接着によって引き起こされる。ホモ二量体形成過程において、接着能のない不活性中間体であるXダイマーを経て、接着能を発揮するstrand-swapダイマーを形成する2段階のステップを経ることも分かっている。最近筆者は、この中間体のXダイマーの相互作用界面には、モノマータンパク質には見られない明確なポケットが存在することを見出した。このポケットを標的とすることで、高い親和性で中間体Xダイマーに結合する化合物の取得が期待される。さらに、中間体Xダイマーに安定的に結合する、すなわちXダイマーとの滞留時間が長い化合物を選択することによって、strand-swapダイマーへの遷移を阻害できるのではないかとという着想に至った。本研究はこのような相互作用の速度論に着目した化合物選抜を実施し、その細胞接着への効果を検証するものである。

【方法】 1. 表面プラズモン共鳴法 (SPR) を活用した化合物スクリーニング: 本研究では、P-カドヘリンのホモ二量体化に関わる細胞外ドメインの一部であるEC12 (Extracellular domain 1-2) を大腸菌発現系で調製した。中間体Xダイマーのみを形成し、strand-swapダイマーを形成しない変異型EC12を用いてSPR法による化合物スクリーニングを実施した。2. ヒット化合物の細胞接着阻害能の検証: スクリーニングにより得られた化合物がP-カドヘリンを内在的に発現する細胞の接着に対して影響を与えるかどうかを検証するため、化合物存在下における細胞の増殖能評価を実施した。

【結果】 SPR法による低分子スクリーニングより、中間体であるXダイマーに対して $10^{-5} \sim 10^{-6}$ Mの解離定数 (K_D) で結合する低分子化合物を複数取得することができた (図にスクリーニング結果を示す)。これまでカドヘリンに対するリガンドとして報告されている化合物はいずれもサブmMオーダー (10^{-4} Mオーダー) の弱い親和性であることと比較すると、Xダイマー特有のポケットを標的として高い親和性の化合物をとるという戦略が奏功している可能性が示唆された。また、これらの化合物を用いた細胞増殖試験では、一部の化合物が細胞増殖阻害効果を示した。

SPR スクリーニングにおける各化合物のレスポンス値

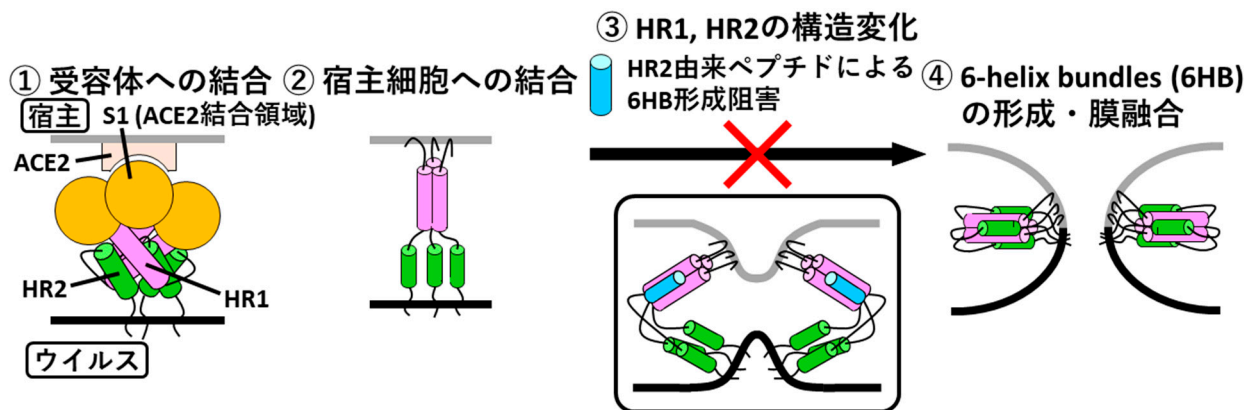


【目的】 2019 年末に発生した新型コロナウイルス感染症 COVID-19 は、2024 年 3 月現在においてもなお感染報告が続いている。2024 年 3 月 10 日現在、COVID-19 の累計感染者数は 7 億 7,000 万人を超え、700 万人以上の死亡者が確認されている。次々と現れる新たな変異株にも対応可能な SARS-CoV-2 に有効な阻害剤の開発は喫緊の課題である。現在までに、メルクやファイザー、塩野義製薬により SARS-CoV-2 に対する経口投与可能な酵素阻害剤が開発されている。一方で、これまでに開発されたモノクローナル中和抗体の点滴剤などは変異株への対応力に課題が残されている。そこで注射剤および点鼻剤として投与可能なペプチド性医薬品が嚥下困難な重症患者などに対する治療法開発の一助になると考え、新規ペプチド性 SARS-CoV-2 阻害剤の創製を試みることにした。

【方法】 本研究ではウイルスの宿主細胞との膜融合に必須の Heptad Repeat (HR) 領域に着目した。膜融合過程において、3 量体の HR1 領域に対し、3 本の HR2 領域が外側から相互作用し 6 量体構造 (6-helix bundle : 6HB) を形成することで膜融合が進行する。この 6HB の形成を阻害することで抗 SARS-CoV-2 活性を発揮する種々の HR2 誘導体ペプチドの合成、活性評価を行った。我々はこれまでに SARS-CoV-2 と同様の膜融合過程を経る human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) の阻害剤開発において HIV-1 の HR2 領域を模したペプチド C34 誘導体が強力な抗 HIV-1 活性を有し、その C 末端側二量体が単量体に比しさらに 100 倍以上の抗 HIV-1 活性を有することを明らかにしている。そこで本研究ではこの二量体化戦略を基に SARS-CoV-2 HR2 ペプチドおよびその二量体の合成、活性評価により新規 SARS-CoV-2 膜融合阻害剤の創製を行った。

【結果】 HIV-1 膜融合阻害剤の開発戦略および標的領域の結晶構造情報を基に種々の HR2 誘導体ペプチド (単量体、C 末端側二量体、N 末端側二量体) を設計、合成した。合成した HR2 ペプチド誘導体のプラークリダクションアッセイによる活性評価の結果、新たにデザインした mutant 1 およびその C 末端側二量体、mutant 2 の C 末端側二量体において抗 SARS-CoV-2 活性の向上を確認した。

SARS-CoV-2 膜融合および阻害剤による膜融合阻害機構の概略



92 腱への伸展刺激で筋萎縮は予防出来るのか？	土屋 吉史
-------------------------	-------

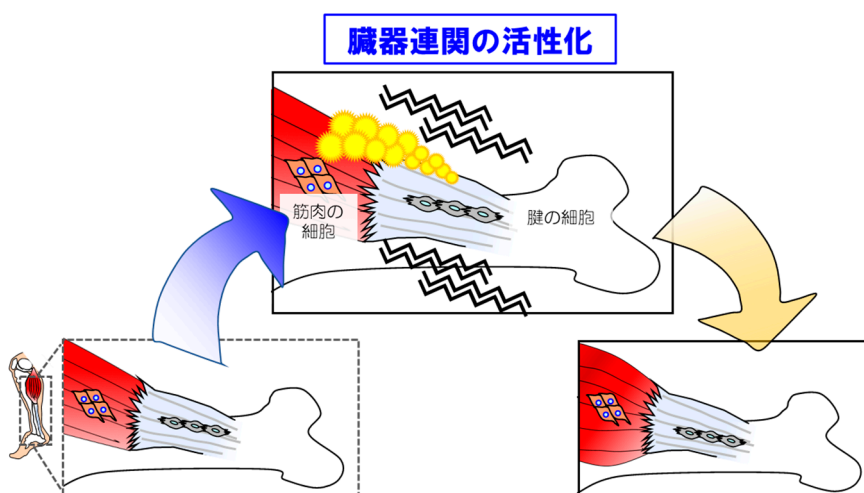
【目的】「健康寿命の長さ」は「骨格筋量」と強く正相関することから、強度の高い運動の実施は骨格筋量を維持するうえで重要である。しかし、これらの取り組みの重要性は理解しながらも、筋量や骨量減少などに悩みを抱える高齢者は強度の高い運動を実施し難く、結局、効果の現れにくい低用量の運動を繰り返さざるを得ない状況に直面している。この現状が物語るようにこれまで様々な治療対策が講じられてきているものの、筋萎縮症の罹患率は未だに高く、決定的な解決には至っていない。そこで本研究ではこの打開策として「腱」に着目した。

「腱」は筋肉や骨等と同じく運動器に属しながらこれまで注目されてこなかった臓器である。しかし近年では、筋や骨量維持に重要な因子の産生や複数の系譜をもつ細胞集団の存在などが報告されるようになってきた。さらにこれまで我々は、腱細胞が筋芽細胞（筋線維の前駆細胞）の筋分化を何らかの因子を介して促進する現象を確認し、腱にも臓器連関特性が存在する可能性を提唱してきた。この知見に基づき、本研究では、腱も筋と同様に伸展刺激を加えることで筋成熟を促し筋量維持に貢献するか否かを検証することとした。

【方法】ヒトの筋および腱から、筋芽細胞および腱細胞をそれぞれ単離・培養した。腱細胞の場合、通常の2次元培養法では細胞に運動を模倣するような伸展刺激を加えることは困難である。そのため本研究では、3次元培養法と伸展刺激法を組み合わせることで、通常の2次元培養より生理的環境に近い状況下で運動を模倣する伸展刺激モデルを作製した。先ず、腱細胞が十分な細胞数まで達した後、腱細胞の3次元のコンストラクト（腱組織様構成物）を作製した。作製したコンストラクトは培地中で伸展刺激を加えた。培地上で力学的伸展張力を①与えない場合（対象：Control）と②与えた場合（Load）の培養上清を回収し、単離した筋芽細胞にそれぞれ添加した。解析は、遺伝子解析及び蛍光免疫染色にて行われた。

【結果】免疫蛍光分析により、核数に両条件間における有意差は観察されなかった。Load 条件は Control 条件に比べ高い筋分化能（成熟能）を示した。一方で、筋分化の指標の一つである Myogenin 陽性細胞数には、条件間で有意な差は見られなかった。これらの結果は、腱コンストラクトの機械的負荷に由来する条件培地が筋芽細胞の融合過程に影響を与えることを示している。

腱の臓器連関を利用した抗筋萎縮戦略

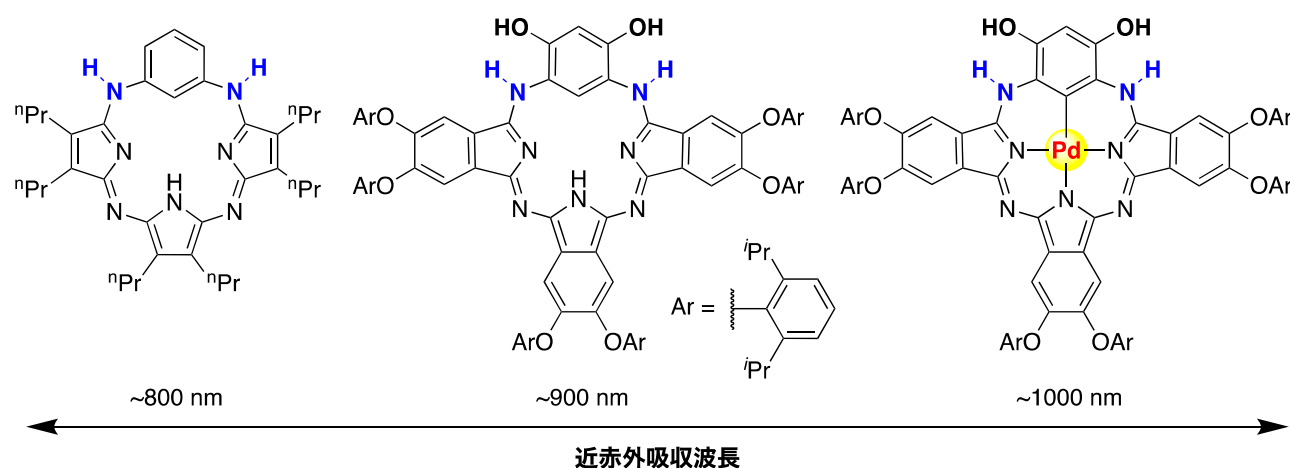


【目的】 紫外・可視領域と赤外領域の間に位置する 700–2000 nm の領域の光は近赤外光と呼ばれ、さまざまな分野で近年注目を集めている。その特徴として、物質・生体透過性が高いことや、紫外・可視光と比較してエネルギーが弱く、生体に低侵襲性であることが挙げられる。これらの利点から近赤外光は、癌の光線力学療法や生体イメージングといった、疾病の予防や治療に資する生命科学分野で応用されている。近赤外光を吸収・放出する有機色素の開発研究は盛んに行われているが、一般に近赤外色素は狭い HOMO-LUMO ギャップを実現しなければならないため安定性に乏しく、近赤外光を効率的に利用できる安定な有機分子は未だ少ない。とりわけ、選択的な分子イメージングなどへの応用を志向した、外部環境に応答して光特性をスイッチング可能な機能性近赤外色素の開発が必要とされている。この点、ポルフィリンやフタロシアニンに代表される 18π 電子系芳香族分子は安定性に優れた近赤外有機色素分子の有力な候補であるが、非常に安定であるため外部刺激の影響を受けにくく、生体イメージング等に望まれる近赤外スイッチング機能性を実現するのは困難である。そこで本研究では、芳香族性・ π 共役系を制御することにより近赤外スイッチングを実現できる新たな金属-芳香族分子系の創出を目指した。

【方法】 1. 酸化還元活性な近赤外ベンジテトラアザポルフィリンの開発：大環状 π 共役系にベンゼンユニットを組み込んだベンジテトラアザポルフィリンを合成し、その反応性、芳香族性および近赤外光特性を詳細に解析した。2. 第二近赤外領域を活用できるパラジウムベンジフタロシアニンの開発：近赤外光の中でも生体透過性の高い第二近赤外光 (NIR-II: 1000–1500 nm) を吸収できる色素の開発を志向し、遷移金属元素であるパラジウムを導入したベンジフタロシアニンを合成し、その物性を評価した。

【結果】 1,3-フェニレンジアミンと 2,5-ジイミノピロールの縮合により 20π 還元型構造を有するベンジテトラアザポルフィリンを合成した。理論・実験による解析からこのベンジテトラアザポルフィリンが弱い 20π 反芳香族性とともにより 800 nm 付近の近赤外領域に比較的強い光吸収を有することを明らかにした。さらに、 20π 還元型構造を酸化することにより近赤外光吸収を持たない 18π 酸化型構造に変換できたことから、ベンジテトラアザポルフィリンが $18\pi/20\pi$ 酸化還元スイッチングの可能な機能性近赤外色素であることを示すことができた。また、ベンジテトラアザポルフィリンと比較して π 共役系が拡張した 20π 還元型ベンジフタロシアニンを合成した。ベンゼンユニットにヒドロキシル基を導入し、さらに骨格中心をパラジウム原子で置換することで、HOMO-LUMO ギャップを狭めることができ、1000–1100 nm の NIR-II 領域まで近赤外光吸収波長を伸長させることに成功した。

近赤外光を吸収する 20π 反芳香族ベンジテトラアザポルフィリン・ベンジフタロシアニンの開発

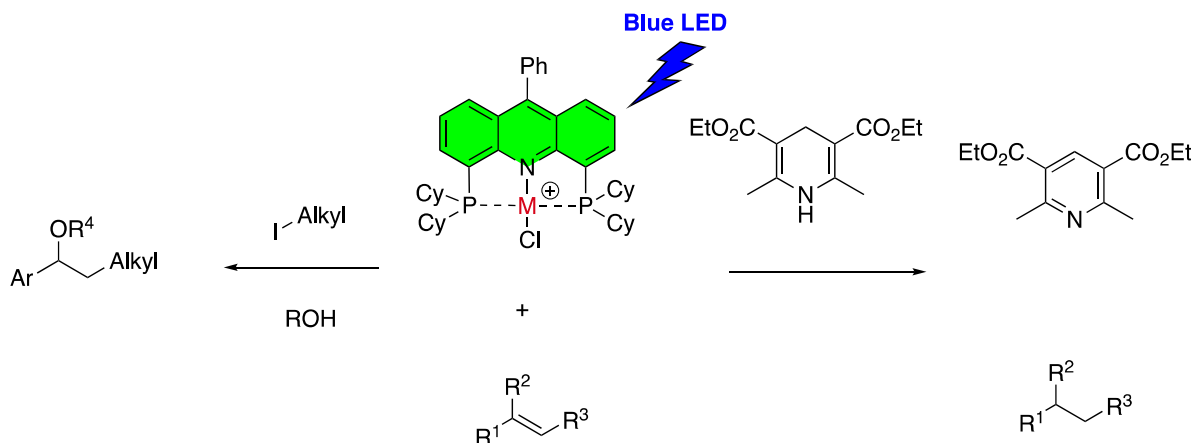


【目的】 化学反応を進行させるには外部からのエネルギーが必要不可欠である。近年は、LED の台頭により可視光 (>400 nm) エネルギーを用いる研究が盛んに行われている。光レドックス触媒をパラジウム等の遷移金属触媒と組み合わせた場合、従来の熱反応とは異なる反応性が観察されることが報告されている。一方で、光レドックス触媒を用いずに、可視光によって直接励起したパラジウム錯体を用いる方法論も報告されている。しかし、これらの光反応に用いられる配位子のほとんどは、従来からの熱反応用に開発された既存の配位子である。遷移金属触媒の発展の歴史は配位子の発展の歴史といっても過言ではなく、いわば車の両輪のような関係にある。しかしながら、報告されている遷移金属触媒光反応においては熱エネルギーによる反応 (2 電子反応) のために開発された既存の配位子を用いるものばかりであり、光反応に最適な配位子や、新たな光機能をもつ配位子の創成は極めて限定的であった。そこで私は、遷移金属触媒光反応に適した配位子を合成することに着想し、アクリジンを含む PNP 型ピンサー配位子を合成し遷移金属触媒との可視光反応に用いることとした。

【方法】 市販の 9-フェニルアクリジンを出発物として用い、ジブromo化、ハロゲンリチウム交換によるメタル化、ホスフィン部分の導入を順次行うことで、リン原子上の置換基がフェニル、イソプロピル、シクロヘキシル、2-フリルの 4 種類のアクリジン含有配位子を合成した。合成した全ての配位子をニッケル、パラジウム、プラチナの塩化物と反応させることで、合計 12 種類の金属錯体を調製した。合成した錯体は全て室温下、安定な固体として得られた。X 線結晶構造解析により、想定通り PNP 型ピンサー配位子として機能していることが明らかとなった。

【結果】 合成した金属錯体は 400 nm 以上の可視光を吸収することが明らかとなった。配位子単体よりも吸収波長が長波長しており、Metal to Ligand Charge Transfer (MLCT) が進行していると考えられた。すなわち、本金属錯体に可視光を照射すると金属中心の価数が変化していると考察でき、可視光反応に用いることができると期待した。そこで、金属錯体を用い、可視光反応の開発を試みた。その結果、青色光照射下、ハンチュエステルの脱水素化反応、オレフィンの水素移動型還元反応、オレフィンのヒドロキシアルキル化反応の開発に成功した。様々な金属錯体においてこれらの反応は進行し、特に、リン原子上の置換基がシクロヘキシルの配位子とプラチナとの組み合わせが最も上記の反応を効率的に進行させた。また、ニッケル錯体を用いることで、可視光照射下、オレフィンへの二酸化炭素の固定化が進行することが明らかとなった。さらなる触媒開発を進めた結果、アクリジンを含む有機触媒が、エーテル酸素原子に隣接する炭素上の C-H 結合を選択的に引き抜き、ラジカル反応を引き起こすことも明らかとなった。

可視光活性型配位子の創成と光反応への応用

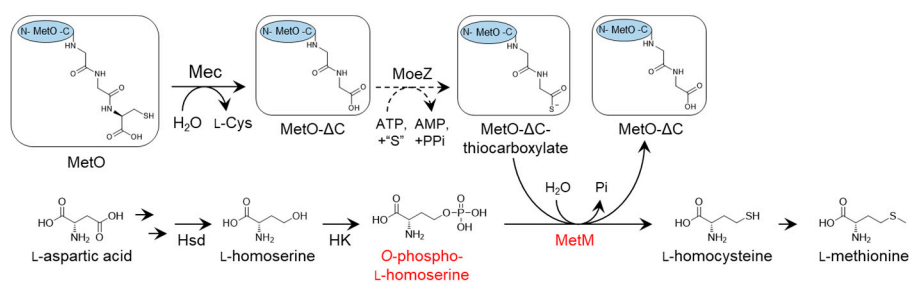


【目的】 メチオニンは生育に必須なアミノ酸の 1 つであり、タンパク質の合成や生体内反応に広く用いられる *S*-adenosyl-L-methionine (SAM) の合成にも使用される。SAM はメチル化反応の基質として多用され、代謝産物の構造多様性の創出に重要な役割を果たしている。それゆえ、メチオニン生合成に関する新たな知見は、メチオニンや SAM、これらを基質として利用する化合物の発酵生産や抗菌剤開発の重要な基盤となる。*Streptomyces* 属放線菌は、土壤中に豊富に存在するグラム陽性の細菌であり、Avermectin, Streptomycin, Altemicidin 等の抗生物質を含む様々な二次代謝産物を生産する産業上重要な菌である。二次代謝産物の生合成において、SAM はメチル基供与体や骨格形成の基質として利用されることから、放線菌におけるメチオニンの生合成研究は多様な二次代謝産物の生産に重要な知見を与えると考えられる。これまでに、多くの *Streptomyces* 属放線菌のゲノムが解読されており、その遺伝子情報を解析すると、一般的なメチオニン生合成に利用される *metA* や *metX* 遺伝子を欠く菌が多く存在していた。抗菌物質である ϵ -poly-L-lysine を生産する放線菌 *Streptomyces albulus* NBRC14147 のゲノム情報の解析により、この菌は *metA* や *metX* 遺伝子だけでなく、植物型やメタン古細菌型の生合成遺伝子も欠くことから、新規なメチオニン生合成経路を有することが期待された。これまでに我々は、*S. albulus* NBRC14147 の遺伝子情報を解析することで、上流に SAM リボスイッチと推測される遺伝子領域を有し、下流に thiamine や L-cysteine などの生合成に関与する Sulfur-carrier protein と機能予測されるタンパク質をコードする遺伝子 (以降 *metO*) を有する遺伝子 (以降 *metM*) を見出し、このクラスターが *Streptomyces* 属に高度に保存されていることを見出した。そこで本研究では、それら遺伝子に着目し、破壊株の栄養要求性確認や組換え酵素・タンパク質を用いて酵素機能の同定を行うことで、放線菌における新規なメチオニン生合成経路の解明を目指した。

【方法】 *S. albulus* NBRC14147 のゲノムを鋳型に PCR を行い、目的断片をクローニングすることで、破壊株作製用と組換え酵素タンパク質発現用のプラスミドを作製した。破壊株作製用のプラスミドを接合伝達法により *S. albulus* に導入し、その後に抗生物質耐性の有無による選別を行い、homoserine dehydrogenase をコードする *hsd* と homoserine kinase をコードする *hk* と *metM* の各種破壊株 (Δhsd , Δhk , $\Delta metM$) を取得した。破壊株の生育試験には最少培地である M9 培地を用いた。組換え酵素の取得は、大腸菌を宿主として用いた。系統樹解析には MEGA11 を用いた。

【結果】 各種破壊株の生育試験の結果、*hsd* だけでなく *hk* と *metM* もメチオニン生合成に必須であることが判明した。組換え酵素・タンパク質を用いた実験から、MetO の C 末端に存在する 90-GGC-92 配列は Mec により C 末端の cysteine 残基が加水分解されること、これにより生じる MetO- Δ C は MetM と相互作用することが明らかにされた。MetM の機能解析により、これが MetO- Δ C のチオカルボン酸化体 (MetO- Δ C-thiocarboxylate) と *O*-phospho-L-homoserine から L-homocysteine を合成する酵素であることを示した。メチオニン生合成において *O*-phospho-L-homoserine を中間体として利用する経路は植物に知られるのみであり、微生物が利用することを初めて明らかにした。MetO- Δ C-thiocarboxylate のアナログを用いた実験結果から、MetM の反応機構を推定した。BLAST 検索とその系統樹解析から、古細菌や細菌の一部も MetM ホモログをコードする遺伝子を有することを示した。

放線菌における新規メチオニン生合成経路

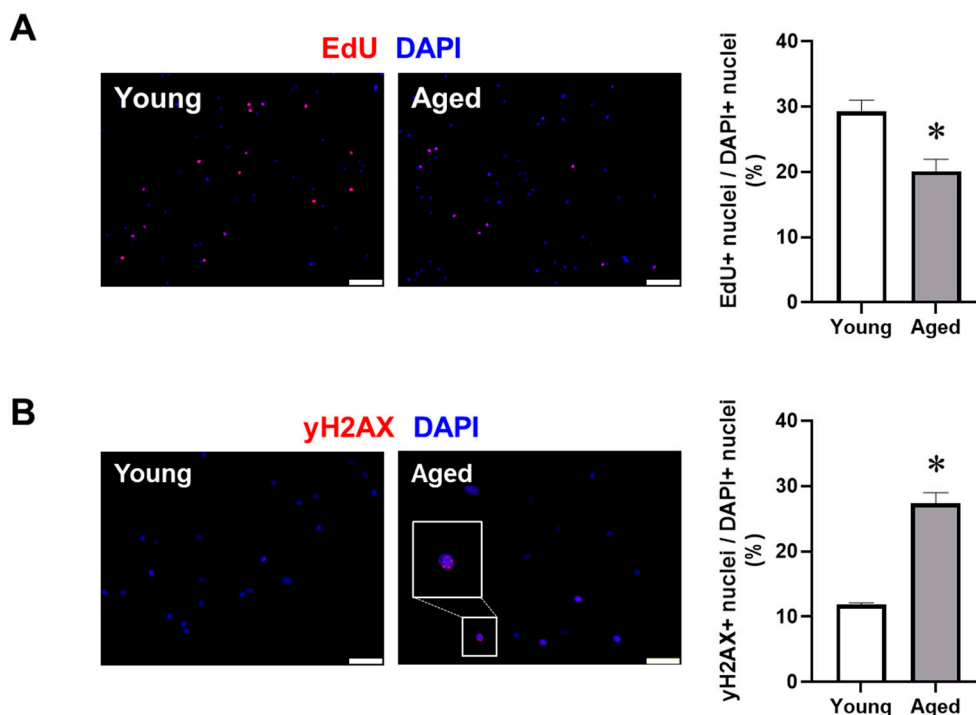


【目的】 加齢に伴う筋量・筋機能の低下（サルコペニア）を引き起こす要因の1つには、骨格筋幹細胞（サテライト細胞）の機能低下が関与することが報告されている。これまでの我々の研究において、細胞極性因子の1つである非典型PKCλ（atypical PKCλ : aPKCλ）遺伝子欠損マウスでは、サテライト細胞が細胞老化様の表現型を呈することを見出した。しかし、加齢に伴うサテライト細胞の機能低下に、aPKCλ 発現低下が関与するかは明らかではない。そこで本研究は、aPKCλ の加齢変化に着目し、加齢に伴うサテライト細胞の機能低下の分子機序を明らかにすることを目的とした。

【方法】 2～3 ヶ月齢の若齢マウスおよび24～28 ヶ月齢の老齢マウスからサテライト細胞を単離・培養し、機能解析を実施した。

【結果】 老齢マウス由来のサテライト細胞では、aPKCλ 発現低下と細胞増殖能の指標である Edu 陽性細胞数の低下、ゲノム不安定性の指標である γH2AX 陽性細胞数の増大が観察された。一方で、レトロウイルスベクターにより aPKCλ 遺伝子を導入すると、これらの細胞老化の表現型は回復した。以上の結果から、aPKCλ はサテライト細胞の老化を抑制する抗細胞老化活性を示す可能性が示唆された。今後は、aPKCλ がサテライト細胞の機能を制御する分子機序をエピゲノム制御の視座から解析する予定である。

加齢に伴うサテライト細胞の機能低下

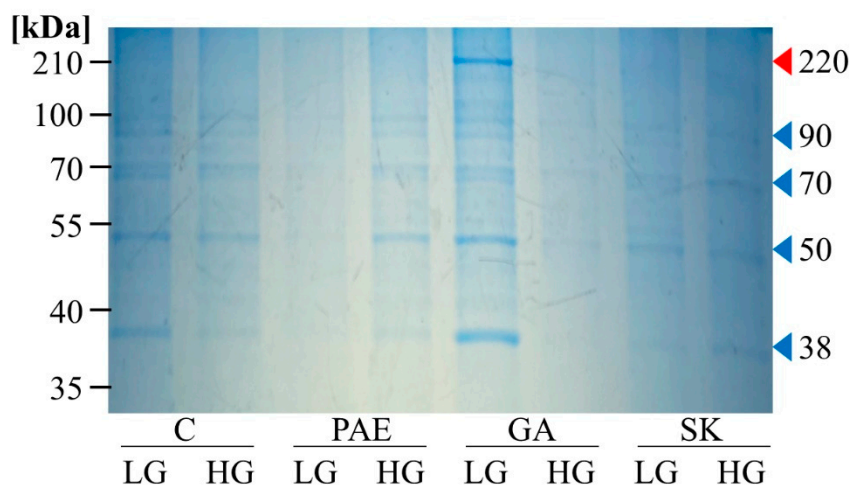


【目的】近年、加齢や生活習慣病に起因する腎機能低下患者が増加傾向にあり、有効かつ副作用の少ない治療薬が求められている。その1つとして芍薬含有漢方薬への期待が高まっている。特に芍薬に含まれるペオニフロリンは、高い抗酸化作用を持ち、過酸化脂質の産生抑制による腎保護効果が期待されている。このような脂質変動は腎機能の維持に重要であると考えられるが、芍薬含有漢方薬の各有効成分が腎臓中の脂質変動を誘導し得るのかは不明である。さらに、芍薬含有漢方薬成分がタンパク質の翻訳後修飾の1つである脂質修飾を変動させる可能性が示唆されているが、詳細は不明である。そこで本研究では、芍薬含有漢方薬である当帰芍薬散、桂枝茯苓丸、芍薬甘草湯の各有効成分単体および混合成分を腎由来細胞へ添加し、変動する脂質の種類や含有量の変化、さらにタンパク質への脂質修飾の発現変化を解析し、腎機能低下患者への治療効果や芍薬含有漢方薬の新規作用機序の解明に繋げることを目的とした。

【方法】ラット尿細管上皮由来 NRK-52E 細胞に対し、グルコース濃度を変化させ、芍薬含有漢方薬成分を単体もしくは混合して添加した。その後、Bligh-Dyer 法にて脂質を抽出し、マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析により測定した。さらに、活性酸素および過酸化脂質の産生量を評価した。また、芍薬含有漢方薬成分と共にパルミチン酸アルキンを添加して培養後、パルミチン酸アルキンが修飾されたタンパク質を回収した。その後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分子量毎に分離し、ゲルを染色した。

【結果】細胞から抽出した脂質試料を解析したところ、それらの試料に特異的なピークが検出され、漢方薬成分添加群毎に増減したことが分かった。グルコース濃度差による m/z 536.5 のピーク検出強度比を比較したところ、高グルコース曝露群において、漢方薬成分未添加群よりも当帰芍薬散成分添加群で約 1.5 倍、桂枝茯苓丸成分添加群で約 6.2 倍に検出強度比が増強したことが分かった。また、活性酸素の発現量は、桂枝茯苓丸添加群において大幅に減少しており、過酸化脂質の産生量も最も抑制されたことが分かった。脂質修飾タンパク質を解析したところ、ペオニフロリン単体添加群では、グルコース濃度の増加に伴って、38、50、70、90 kDa 付近のバンドの染色強度が増強した。一方、グリチルレチン酸単体添加群では、ペオニフロリン単体添加群において染色強度が増強した4つのバンドに加え、200 kDa 付近のバンドの染色強度が減少したことが分かった。

グルコース濃度および漢方薬成分による脂質修飾タンパク質の発現変動



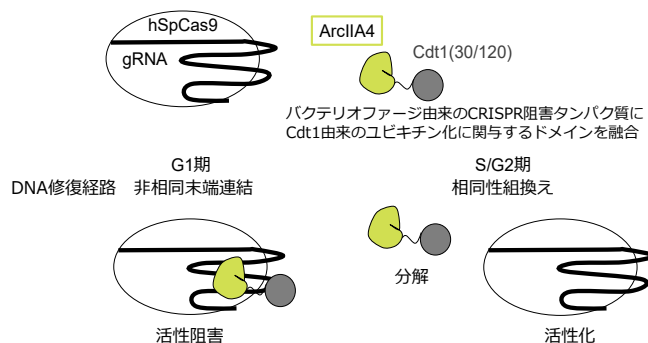
98 相同性組換えを誘導するCas9変異体の取得への挑戦	松本 大亮
------------------------------	-------

【目的】 CRISPR-Cas9 を用いたゲノム編集の方法として、Cas9 による二本鎖切断導入後に、細胞の持つ DNA 修復機構を介して DNA 配列を改変する。この時の修復過程には非相同末端結合 (Nonhomologous End Joining : NHEJ) と相同組換え修復 (Homology Directed Repair : HDR) の 2 つの経路がある。HDR は鋳型 DNA を加えることで修復後に生成する配列を制御でき、より精密なゲノム編集ができる。HDR は細胞周期の S/G2 期に活性が高いことが知られ、NHEJ は細胞周期全体で活性がある。そのため、細胞周期の S/G2 期に DNA 切断を活性化できれば、HDR を介した修復を優先的に引き起こせる。これまでに、細胞周期依存的な Cas9 の活性化による HDR 効率の向上ができることを示した。また、オフターゲット作用も低減できたが、依然として数%のオフターゲット変異が検出された。そこで、これまでに報告されたオフターゲット作用が低い Cas9 変異体に関する網羅的な HDR 効率の評価及び細胞周期依存的な活性化による相乗効果の検討と HDR を引き起こした細胞を回収するスクリーニング系を構築することで HDR を誘発する Cas9 変異体を取得し、HDR を優先的に引き起こすために重要な因子の探索を目的とする。

【方法】 ヒト胎児腎細胞 (HEK293 細胞) を用いて 10 種類の SpCas9 変異体に関して HDR 効率を評価した。鋳型 DNA として制限酵素 HindIII の認識配列を持つ一本鎖オリゴ DNA (ssODN) を用いた。エピソーマルベクター上に各種 Cas9 変異体を搭載し、リポフェクション法にて HEK293 細胞に導入した。ハイグロマイシンによる選抜後に *EMX1* 遺伝子を標的とした sgRNA をコードするプラスミドと ssODN を導入した。ゲノム抽出後に標的配列周辺を PCR で増幅し、PCR 産物を HindIII 処理することで、HDR 効率を算出した。ジフテリア毒素に対する耐性を指標としたスクリーニング系では、野生型 Cas9 と EGFP を自己切断ペプチド (P2A) で連結させた遺伝子をレンチウイルスベクターに乗せて、HEK293 細胞に感染させた。FACS を用いて EGFP 陽性細胞のみ分取した。この細胞をレポーター細胞として条件を最適化した。レポーター細胞に鋳型 DNA のみをエレクトロポレーション法で導入し、鋳型 DNA によるノックインが起こらない DNA 量を検討した。その後、最適な鋳型 DNA 量に固定した際の最適な HBRGF 標的 gRNA の量を検討した。ノックイン効率は鋳型 DNA 上に赤色蛍光タンパク質 (*mCherry*) 遺伝子が組み込まれるような設計をしたため、蛍光顕微鏡観察及びフローサイトメトリーによって *mCherry* 陽性細胞を評価した。

【結果】 10 種類の SpCas9 のうち、3 種類の Cas9 変異体に関して、*EMX1* 遺伝子を標的とした際に HDR 効率が向上することがわかった。また、その中でも SpCas9-HF1 を細胞周期依存的な活性化を行うことで、HDR 効率の向上とオフターゲット作用の低減の両立が可能であることがわかった。スクリーニング系の最適化において、2.5 μg の鋳型 DNA と 1.5 μg の *hHBEGF* 標的 gRNA プラスミドを導入することによって、Cas9 による DNA 二本鎖切断後に HDR を介したノックインが誘発された。エレクトロポレーションによる鋳型 DNA と gRNA の導入から 48 時間後に DT を添加し、細胞死誘導を評価した結果、3 日以上 DT 処理により、HDR 修復後の細胞のみが選抜されることがわかった。さらに、網膜由来の hTERT 不死化細胞株である hTERT RPE-1 細胞を用いてスクリーニングを実施した。その結果、取得された Cas9 変異体において、野生型の Cas9 よりも高い HDR 活性を示した。

細胞周期依存的な CRISPR-Cas9 活性

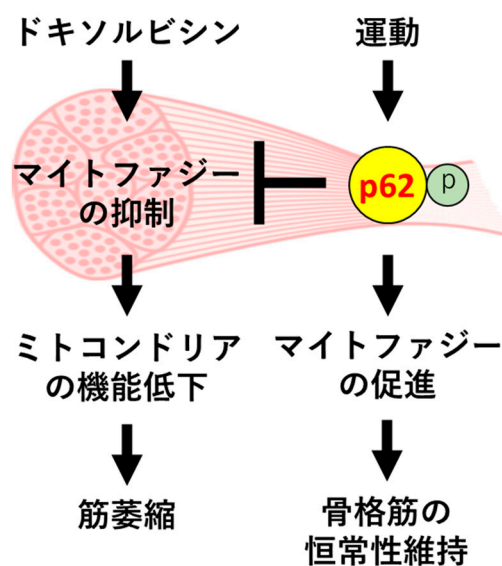


【目的】 運動は、骨格筋のミトコンドリアの量や機能を向上する。ミトコンドリアは、骨格筋の恒常性維持に必要不可欠であることから、運動がミトコンドリアの量や機能を向上するメカニズムを解明することは重要な課題である。著者らは、このメカニズムとしてオートファジー基質である p62/SQSTM1 に着目した。p62 は、LC3 などのタンパクと結合しオートファジーを調節する他、さまざまな因子と相互作用することで細胞内情報伝達経路を制御することが報告されている。これまで我々は、運動が骨格筋の p62 をリン酸化することを報告しているが、運動でリン酸化した p62 はミトコンドリアの品質管理に貢献するかは明らかでない。そこで本研究では、筋特異的に p62 の発現を制御したマウスを用いて骨格筋の p62 がミトコンドリアの恒常性を維持することで骨格筋量の維持に貢献するか検証し、p62 の重要性を立証することを目的とした。

【方法】 実験には、C57BL/6 マウス、筋特異的 p62 欠損マウス (p62skmKO)、筋特異的 p62 発現増強マウス (p62mTg) とそれぞれの野生型同腹子 (WT) を使用した。実験 1 では、雄性 C57BL/6 マウスに 4 週間の自発走行運動を実施し、対照群は通常飼育した。各マウスには、ミトコンドリアの機能が悪化することで筋萎縮を誘導することが報告されているドキシソルビシンを腹腔投与し、5 日後に最大筋力を測定した後に解剖し骨格筋を採取した。実験 2 および 3 では、雄性 p62mKO マウスおよび p62mTg マウスとそれぞれの WT マウスにドキシソルビシンを腹腔投与し、5 日後に最大筋力を測定したのち解剖し骨格筋を採取した。採取した骨格筋を用いてウェスタンブロットにて p62 のリン酸化やマイトファジータンパクの発現を測定し評価した。

【結果】 4 週間の自発走行運動は、ドキシソルビシンによる骨格筋の最大筋力の低下を抑制し、複数の骨格筋量の減少を有意に抑制した。また、ドキシソルビシンは骨格筋の p62 のリン酸化を低下しマイトファジータンパクの発現を低下したが、運動することでこれらのタンパクの発現が有意に回復した。さらに、p62skmKO マウスは WT マウスと比較してドキシソルビシンによる筋萎縮を有意に促進し、p62 のリン酸化が恒常的に誘導している p62mTg マウスは WT マウスと比較してドキシソルビシンによる筋萎縮を有意に抑制した。これらの結果より、運動による骨格筋の p62 のリン酸化は、ドキシソルビシンによるマイトファジー不全を軽減し筋萎縮を抑制するために重要であることが示唆された。

運動によりリン酸化した p62 が筋萎縮を抑制するメカニズム

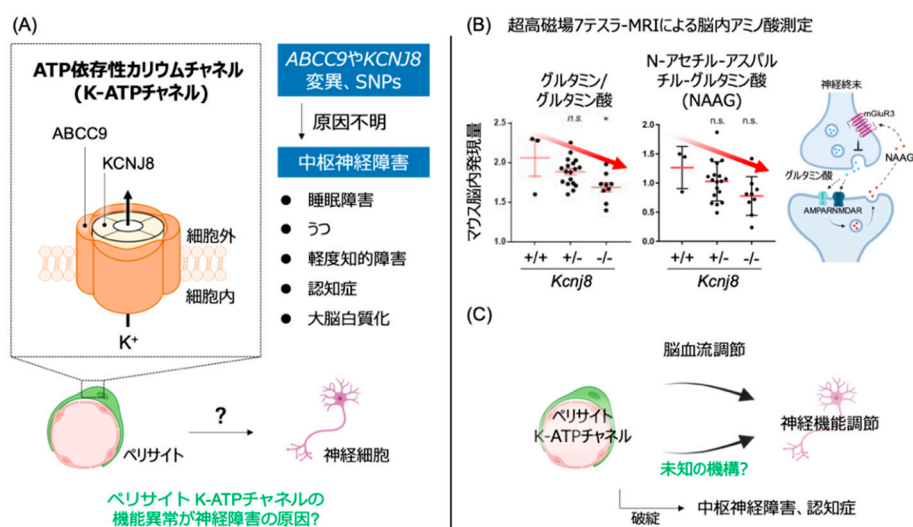


【目的】 脳内では神経・血管・グリア細胞などが、互いに密に連携する神経血管ユニットを形成することで、複雑かつ秩序だった中枢高次機能が発揮される。一方で、毛細血管を被覆するペリサイトの異常が認知症をはじめとした中枢神経疾患の発症・進展に寄与することが示唆されているが、その分子実態はほとんど分かっていない。そこで、私たちはペリサイトによる中枢恒常性維持機構の解明を目指し、マウスを用いた単一細胞 RNA シークエンス解析により、中枢におけるペリサイトの発現遺伝子群の同定を試みてきた (Vanlandewijck ら、Nature 2018)。明らかにしたペリサイト発現遺伝子の中から、ペリサイトへの特異性・発現量・疾患との関連・ペリサイトにおける機能が未知であったことから、KCNJ8 および ABCC9 ヘテロ複合体からなる ATP 依存性カリウムチャネル (K-ATP チャネル) に着目した。本研究ではペリサイト特異的 K-ATP チャネルの機能解析を通して、ペリサイト-神経細胞間の機能的連関の提唱と、中枢恒常性維持機構の理解を深めることを目的とした。

【方法】 *KCNJ8* (KIR6.1) -*ABCC9* (Sur2B) からなる K-ATP チャネルの神経機能に対する影響を検討するために、まず *Kcnj8* 欠損マウスを作製し、生後 30 日齢以降の神経細胞の形態を免疫組織染色法により解析を実施した。次に、*Kcnj8* 欠損マウスの脳内環境の変化の有無を解析するために、血液脳関門・グルコース取り込み・代謝変動などについてそれぞれ解析を行った。さらに、神経細胞活性化に与える影響を検討するために、AAV ウイルスを用いてマウス脳神経細胞にカルシウムセンサーである GCaMP7 を発現させ、非麻酔下において神経細胞内カルシウム変化を観察した。

【結果】 *Kcnj8* 欠損マウスでは神経細胞の形態学的な変化を認めなかった。また、血管機能として、脳恒常性維持に必須である血液脳関門の形成やグルコースの取り込みについても顕著な変化は認めなかった。一方で、神経細胞の活動に重要な役割を担うとされるグルタミン/グルタミン酸や NAAG は *Kcnj8* 欠損マウスでは減少傾向にある可能性が示唆された。さらに、今後の詳細な解析が必要であるものの細胞内カルシウム濃度上昇を指標とした個別の神経細胞の活性化を観察すると、細胞あたりのカルシウム上昇能には変化がないものの、近傍の神経細胞間でのカルシウムパターンではその同調性が損なわれている可能性が示唆された。

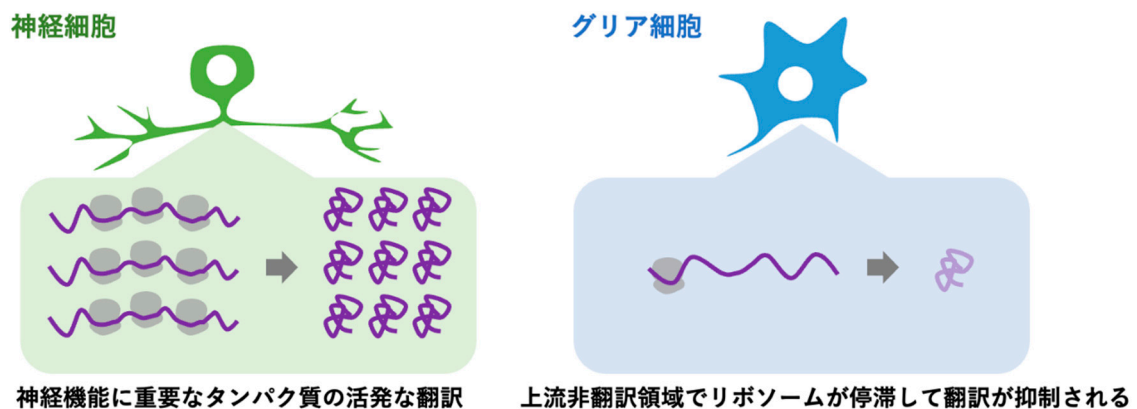
ペリサイト K-ATP チャネル異常による神経機能障害と、その調節機構の作業仮説



【目的】 遺伝子発現は、転写と翻訳の両方の段階で制御を受ける。多様な細胞種から構成される神経系において、転写産物の量は単一細胞レベルで明らかにされている一方、翻訳レベルでの制御は未解明の点が多い。そこで本研究では ショウジョウバエの神経系をモデルに、神経細胞とグリア細胞という大きく異なる二つの細胞種について、どういった翻訳レベルの違いが細胞種間で生じているのか、また、どのようなメカニズムでその違いが生じているのか、明らかにすることを目的とした。

【方法と結果】 神経細胞とグリア細胞の間でタンパク質翻訳を比較するため、細胞種特異的なリボソームプロファイリングを行った。この方法では、特定細胞由来のリボソームを遺伝学的にタグし、リボソームと mRNA の複合体を RNase 処理することで、リボソームに保護された 30 塩基程度の RNA 断片（フットプリント）の配列を次世代シーケンサーによって解読する。同時にトランスクリプトーム解析も行い、mRNA あたりのリボソームの数（翻訳効率）を算出した。翻訳効率は遺伝子によって最大で 100 倍程度異なり、神経細胞とグリア細胞の間で比較すると、同じ遺伝子でも mRNA あたりのリボソームの結合数は細胞種によって数十倍程度異なるものがあることが判明した。特にイオンチャネルや G タンパク質共役受容体、神経ペプチドなど神経機能に関わる遺伝子において、神経細胞ではグリア細胞に比べて翻訳効率が 10 倍程度高かった。これらの遺伝子の配列を調べると、上流非翻訳領域(5' UTR)に開始コドンと終止コドンから構成される短い上流 ORF (Upstream-ORF: uORF) が多数存在していた。興味深いことに、グリア細胞ではこれらの uORF にリボソームが多数集積していた。この配列の翻訳制御における役割を解明するため著者らは、uORF を含む 5' UTR 配列を蛍光タンパク質につないだトランスジェニックレポーターを作製し、神経細胞とグリア細胞で発現させた。その結果、uORF 配列によってグリア細胞特異的な翻訳抑制が生じることを示した。以上本研究により、上流非翻訳領域、特に uORF 配列によって翻訳レベルで細胞種特異的なタンパク質発現が生じることを発見した。

概念図：神経機能に重要な遺伝子は、神経細胞では活発に翻訳される一方、グリア細胞では上流非翻訳領域でリボソームが停滞し、翻訳が抑制される

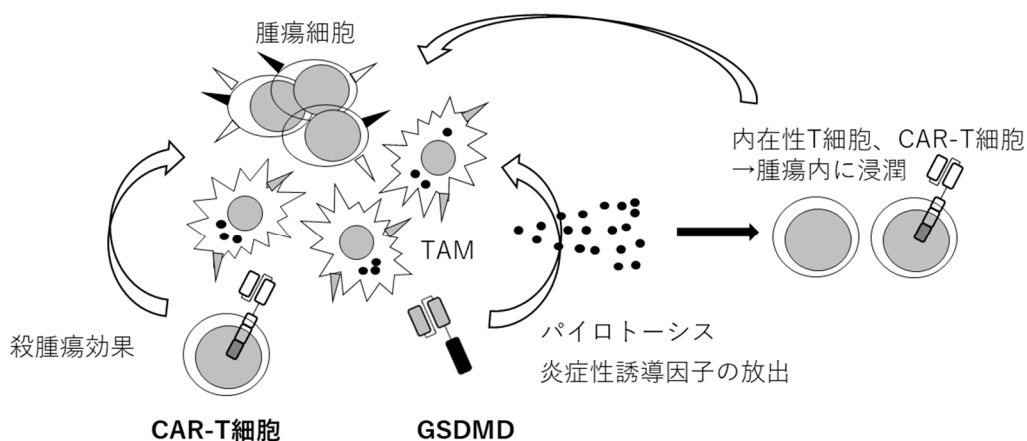


【目的】 PD1/PDL1、CTLA4 を標的とした免疫チェックポイント阻害剤や、CD19、BCMA を標的としたキメラ抗原受容体導入 T 細胞 (CAR-T) 療法などのがん免疫療法の発展により、悪性腫瘍の治療成績は向上してきたが、一部の血液腫瘍を除き、固形腫瘍においては奏効率が低く、再発率も高いのが現状である。持続的な抗腫瘍効果が得られない主な原因の一つとして、腫瘍周囲の免疫抑制性の微小環境が挙げられ、様々な免疫抑制性細胞が腫瘍免疫応答活性を阻害し、有効性を減弱させている。中でも腫瘍関連マクロファージ (tumor-associated macrophage : TAM) は腫瘍内に豊富に存在し、様々なサイトカイン、ケモカイン産生などを通じて免疫抑制環境の誘導のみならず、血管新生、上皮間葉転換、がん幹細胞性の維持、遠隔転移をも司る。そのため、がん免疫療法の効果を高めるには TAM による免疫抑制シグナルの解除が重要であり、これまでに TAM を腫瘍微小環境から排除する手法が広く研究されている。近年、主にマクロファージにおいて、アポトーシスと異なり、ガスダーミン D (GSDMD) という因子を介して炎症性の細胞死を引き起こすパイロトーシスと呼ばれる細胞死のメカニズムが明らかになってきた。細胞内の細菌感染などを契機として炎症性カスパーゼが活性化され、GSDMD が切断されて活性化型が遊離することで、GSDMD が重合して細胞膜に孔を形成する。こうして出来た孔から、細胞が IL-1 や IL-18 などの様々な炎症誘導因子を放出しながら細胞死に陥ることで、周囲の炎症を惹起する。従ってこの生理反応を応用し、TAM にパイロトーシスを誘導することが出来れば、TAM の除去による免疫抑制シグナルの排除に加えて、腫瘍内に炎症を惹起することによって内在性免疫細胞の浸潤を促進し、抗腫瘍活性を増強することが期待でき、CAR-T 療法や免疫チェックポイント阻害剤の効果を高めることが可能となる。ガスダーミンのがん治療への応用に関して、ナノ粒子を用いて腫瘍内にガスダーミンを取り込ませる手法が報告されている。本研究では、より生理的にパイロトーシスを起こしやすく、炎症を惹起しやすい TAM を標的とした戦略を立てる。

【方法】 標的抗原にヒト及びマウスの CD163 を用いる。CD163 抗体と GSDMD の活性化型をリンカーで結合し、TAM に取り込まれた後に活性化型の GSDMD が抗体から遊離するように、抗体との間にフェーリン切断サイトを挿入し、TAM 内のフェーリンによって切断されるように設計し、CD163 を遺伝子導入した細胞株やヒト及びマウスのマクロファージに対する毒性を評価した。

【結果】 LDH assay を行い、パイロトーシスの誘導を評価したが、明らかな効果を認めなかった。GSDMD に変えて緑膿菌由来毒素 (PEA) を用いたところ、CD163 を遺伝子導入したヒト由来細胞株およびマクロファージに対して細胞傷害活性を認めた。

腫瘍関連マクロファージ (TAM) に対する免疫毒素の治療効果の概念図

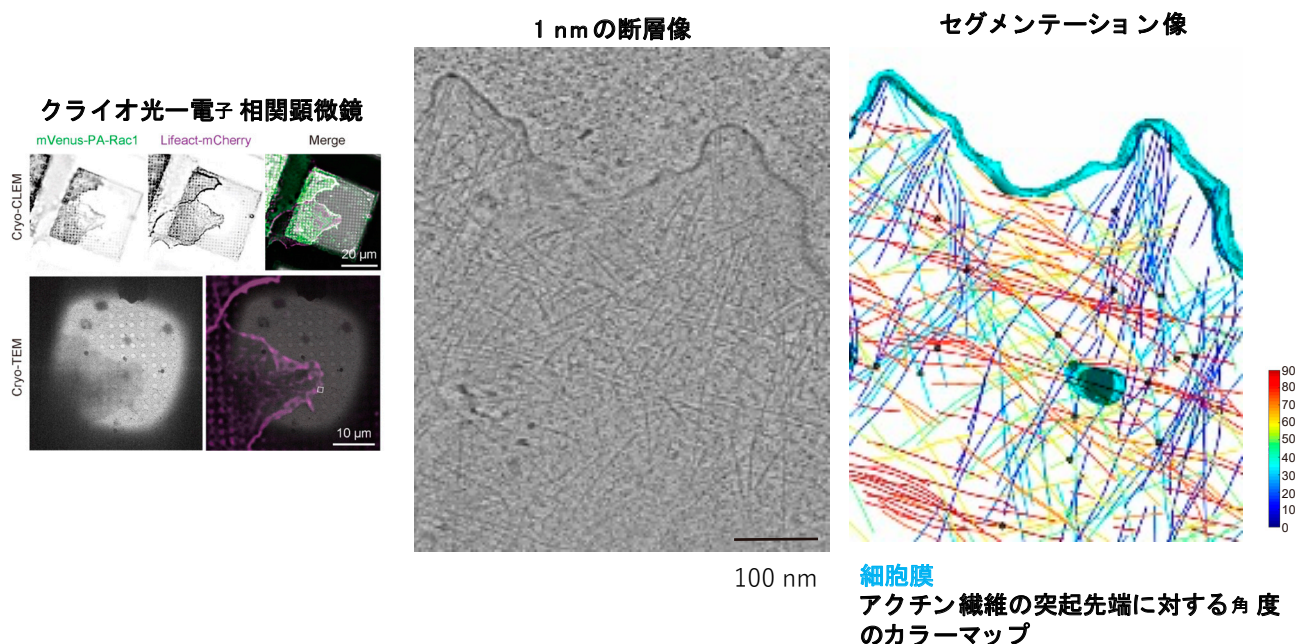


【目的】 葉状仮足は枝分かれしたアクチン細胞骨格からなる扁平に広がった細胞突起であり、血球細胞の遊走、神経軸索ガイダンス、癌の浸潤転移、食食作用など、幅広い生命現象にみられるアメーバ運動・細胞異動の基本構造である。したがって、その形成過程におけるアクチンの重合・分岐の機序や構造を明らかにすることは、細胞生物学的にも病理学的にも非常に重要である。従来、アクチン細胞骨格の微細構造の観察には電子顕微鏡が用いられているが、古典的な電子顕微鏡法では固定・染色が必須であり、アーティファクトが生じる可能性があった。近年のクライオ電子線トモグラフィー法の発展は、細胞内の微細構造を非破壊・無染色で鮮明に観察することを可能にした。さらに、最新の画像解析法と組み合わせることで、細胞内その場でのタンパク質、タンパク質複合体の立体構造解析が推進されている。しかし、これらの技術的基盤は十分に確立されていない。本研究では、葉状仮足のクライオ電子線トモグラフィーを取得し、細胞内におけるアクチン線維の極性の決定や、重合端の構造に着目した構造解析手法を確立することを目的とした。

【方法】 COS-7 細胞をラミニンでコートした電子顕微鏡用のグリッド上で培養し、アクチンマーカー (Lifeact-mCherry) と、Rac1 光スイッチ (mVenus-PA-Rac1) を遺伝子導入した。青色光を 2 分間照射することで、葉状仮足形成を誘導し、急速凍結した。クライオ蛍光顕微鏡により、葉状仮足を同定し、その箇所をクライオ電子顕微鏡で連続傾斜像を撮影した。SIRT (Simultaneous Reconstruction Technique) 法により三次元再構築し、機械学習等で細胞内構造をセグメンテーションした。このセグメンテーション像を参照し、アクチンの枝分かれ部位を同定し、葉状仮足内のアクチンネットワークを解析した。

【結果】 3 細胞から 16 個のトモグラフィー像を取得した。機械学習による細胞膜のセグメンテーションと、テンプレートマッチングによるアクチン繊維、微小管のセグメンテーションを行う方法をそれぞれ確立した。葉状仮足においてアクチン繊維は細胞先端に対して 15° ~ 30° が最も多かったが、突起先端と並行に走行する長いアクチン繊維も多く認められた。アクチン繊維の枝分かれは約 $6\mu\text{m}$ に 1 箇所存在した。突起先端で、細胞膜が大きく突出している箇所では、数本のアクチン繊維が糸状仮足様に束化されていた。しかし、その成長端においても特殊な構造は同定できなかった。一方で、葉状仮足の起点となる細胞の裏打ちのアクチン束の内側には、管状の小胞体と、それに並走する微小管が観察できた。

クライオ電子線トモグラフィーによる葉状仮足内アクチン細胞骨格の可視化



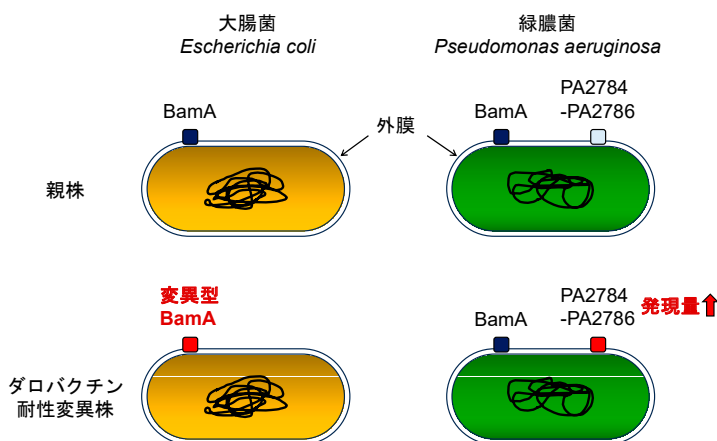
104 細胞外膜標的抗生物質に対する緑膿菌の耐性機構の解明	今井 優
-------------------------------	------

【目的】 近年薬剤耐性菌の出現が社会問題となっており、新しい抗生物質の開発が求められている。これまでに我々は、線虫共生細菌である *Photorhabdus khanii* から、グラム陰性細菌に特異的な活性を示す抗生物質ダロバクチンを発見している。大腸菌 *Escherichia coli* をモデルとした研究から、ダロバクチンが BamA タンパク質（新生外膜タンパク質の折りたたみと挿入に関与）に結合し、同菌を死に至らしめることを明らかにしている。また *bamA* 遺伝子における特定の変異が *E. coli* に対してダロバクチン耐性を付与することも判っている。一方興味深いことに、同じグラム陰性細菌である緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* から自然突然変異法により複数のダロバクチン耐性株を分離し、その変異点を解析したところ、全ての株が機能未知遺伝子 PA2784 の 86 塩基上流のチミンが欠失した変異（PA2784-86del 変異）を有することが明らかとなった。また、タンパク質の局在予測ツール PSORTb V.3.0 による解析から、PA2784 タンパク質が細胞質膜に存在すること、そして同タンパク質が *P. aeruginosa* に固有のものであることが判った。これを背景に本研究では、PA2784-86del 変異が *P. aeruginosa* にダロバクチン耐性を付与するメカニズムの解析を目指した。

【方法】 *E. coli* においては *bamA* 遺伝子における変異がダロバクチン耐性を付与することから、*P. aeruginosa* の PA2784 遺伝子破壊株から自然突然変異法によりダロバクチン耐性株の取得を試み、*P. aeruginosa* において PA2784-86del 変異を介さないダロバクチン耐性機構（*bamA* 変異など）が存在するか否かを検討した。また、*P. aeruginosa* PAO1（親株）、PA2784-86del 変異株および PA2784 遺伝子破壊株の外膜透過性やダロバクチン以外の抗生物質に対する耐性を評価することにより、PA2784-86del 変異により外膜の特性や物質の取り込み能が変化しているか否かを調べた。またこれらに加え、PA2784-86del 変異によるダロバクチン耐性メカニズムの全体像を明らかにするため、RNA シーケンス解析を実施し、ダロバクチン存在下で発現が変動する遺伝子を調べた。

【結果】 本研究では *P. aeruginosa* の PA2784 遺伝子破壊株からダロバクチン耐性株を取得することができなかった。このことから *P. aeruginosa* においては *bamA* 変異を介した耐性獲得は生じず、同菌におけるダロバクチン耐性獲得機構は、PA2784 遺伝子および、同一オペロン上に存在すると考えられている PA2785 遺伝子と PA2786 遺伝子が必要不可欠であることが示唆された。また PA2784-86del 変異株の外膜透過性は親株と同様であることも判明し、PA2784-86del 変異株においては、外膜透過性の低下によりダロバクチン耐性を獲得したわけではないことが明らかとなった。これと一致して PA2784-86del 変異株においては、他抗生物質に対する感受性は変化しておらず、ダロバクチンにのみ耐性を示すことも判った。また RNA シーケンス解析から、ダロバクチン存在下の PA2784-86del 変異株においては、物質の輸送に関与するタンパク質や、細胞壁合成酵素 D-アラニル-D-アラニンリガーゼなどの発現量が大きく変動していることを見出した。

P. aeruginosa における BamA 変異を介さないダロバクチン耐性メカニズム

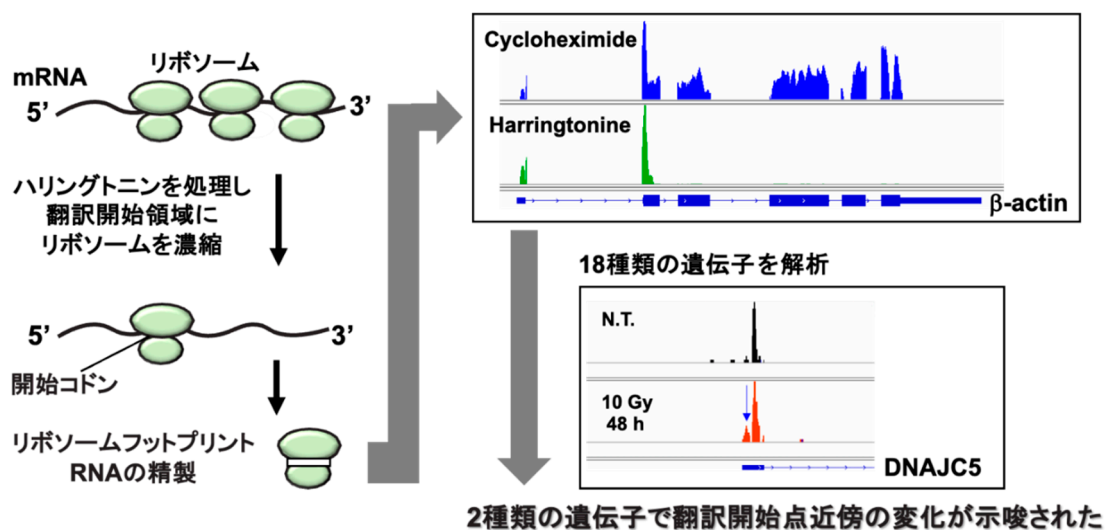


【目的】 免疫チェックポイント阻害剤 (ICI : Immune-checkpoint inhibitor) は様々ながん種に適応されるが、単剤では十分な効果を発揮できないケースが多く存在するため、治療効果を高める方法が模索されている。DNA 損傷を誘導する化学療法剤や放射線治療は免疫応答を促進すると考えられていることから、ICI と化学放射線療法を併用する臨床試験が世界中で行われている。しかしながら、DNA 損傷を誘発してがん細胞を殺傷するはずの放射線治療や化学療法剤が、いかにして抗腫瘍免疫を活性化しているのか、その分子メカニズムはほとんど明らかになっていない。著者の所属する研究グループでは、化学放射線治療が DNA 損傷シグナル依存的に、免疫抑制分子 PD-L1 の発現誘導を引き起こすことを見出し報告している。さらに著者は、放射線や化学療法剤などによって誘発された DNA 損傷が HLA クラス I の提示を促進すること、すなわち腫瘍環境内で免疫活性が高まることを明らかにしている。特に著者は、DNA 損傷後に発生する抗原は、パイオニアラウンド翻訳を介して産生されるという独自の抗原産生モデルを提案している。さらに DNA 損傷依存的にパイオニアラウンド翻訳が促進される mRNA アイソフォームを 20 種類 (18 種類の遺伝子) 同定している。これらの属するパスウェイの遺伝子は、5'UTR から翻訳され得ることが示唆されており、開始コドン AUG に依存しない翻訳が生じている可能性が考えられた。そこで本研究では、DNA 損傷依存的に生じる翻訳開始変化とその分子機構の解明を目指した。

【方法】 X 線非照射および 10 Gy X 線照射 48 時間後のヒト正常網膜色素上皮 (RPE : Retinal Pigment Epithelium) を用いてリボソームプロファイリングを行った。シーケンス生データに対してトリミングや UMI 抽出、マッピング等の処理を行い、ゲノムにマップされたデータを用いて Metagene 解析および IGV による可視化を行った。18 種類の遺伝子について、翻訳開始点近傍を可視化することでマッピングパターンの変化を解析した。

【結果】 Metagene 解析により、フットプリントがコーディング領域 (CDS) 内に存在していること、3 塩基周期性を持つことが確認されたため、リボソームプロファイリングが適切に実施できたと考えられた。また、ハリングトニン処理により翻訳開始点近傍にフットプリントが濃縮されることが確認できた。これら結果は X 線非照射群および照射群で認められた。そこで次に、パイオニアラウンド翻訳が促進された 18 種の遺伝子について、翻訳開始点近傍を解析した。その結果、2 種類の遺伝子 (*CDC73*, *DNAJC5*) でリードの分布パターンが変化することが示唆された。

X 線が翻訳開始点近傍のリボソーム局在に及ぼす影響

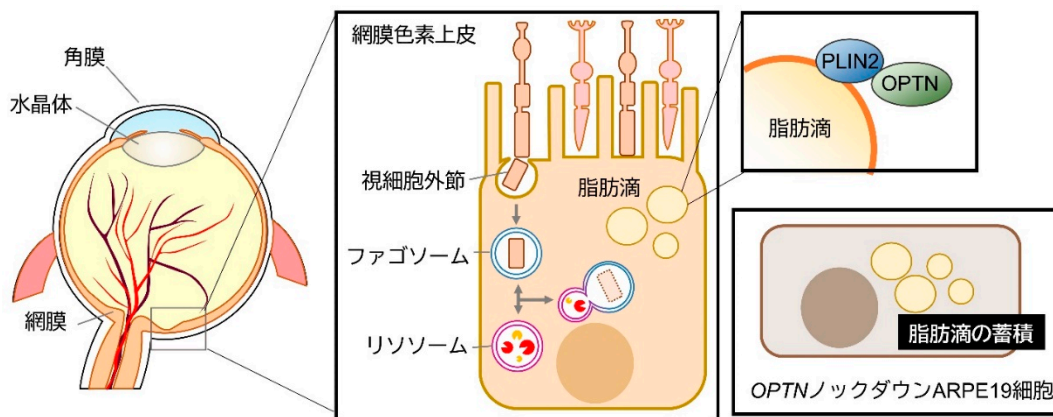


【目的】 加齢黄斑変性は、加齢とともに黄斑の障害が不可逆的に進行し失明に至る網膜変性疾患であり、高齢化に伴う世界的な増加から、高齢者の QOL 維持の大きな課題となっている。加齢に加え、高脂血症や喫煙などが関与する多因子疾患として知られるが、その病態メカニズムについては未だ完全には明らかになっておらず、治療法開発の妨げになっている。網膜色素上皮 (RPE) における脂質成分の蓄積は、加齢黄斑変性の病理学的特徴の一つであり、高齢マウスやモデルマウスにおいても RPE における脂質滴の蓄積が認められることが報告されている。本研究では、RPE における脂質の蓄積の分子基盤の解明を目的に、脂質滴マーカーであるペリリピン 2 (PLIN2) とオートファジー受容体であるオプチニューリン (OPTN) との相互作用に着目し、RPE におけるその役割について調査した。

【方法】 ヒト OPTN およびヒト PLIN2 の蛍光タンパク質タグ付加発現ベクターと、OPTN 遺伝子に対する shRNA (OPTN-sh) による発現抑制ベクターを作製した。ヒト網膜色素上皮細胞由来株である ARPE19 細胞を用い、Neon NxT エレクトロポレーションを用いてこれらのプラスミドベクターの遺伝子導入を行った。脂質滴は Lipi-Green で染色して検出した。マウスの網膜色素上皮への遺伝子導入については妊娠 14.5 日目の Slc:ICR マウスを用い、既報 (Otsu *et al.*, 2019, *J. Neurosci.*; doi: 10.1523/JNEUROSCI.2811-18.2019) に基づいて実施した。動物は生後 21 日に眼球を採取し、固定網膜を免疫染色に供した。画像はオリンパス社の共焦点顕微鏡 FV3000 で取得した。

【結果】 ARPE19 細胞に発現させた PLIN2 と OPTN は空胞様の構造の表面で共局在し、細胞可溶化物を用いた実験によりこれらの共免疫沈降が認められた。shRNA 発現ベクターによる OPTN 遺伝子発現抑制により Lipi-Green により染色される脂肪滴の核近傍における集積が増加した。PLIN2 に pH 感受性緑色蛍光タンパク質 (pHluorin) と赤色蛍光タンパク質 (mCherry) を共に付加したレポーターを ARPE19 細胞で発現させたところ、OPTN の発現を抑制した細胞では pHluorin と mCherry の両方の蛍光 (黄色) による空胞様の典型的な脂質滴構造に加え、mCherry の蛍光 (赤色) のみを示す球状の構造が観察され、PLIN2 がオートリソソームのような酸性小器官に蓄積していることが示唆された。マウスの網膜色素上皮に発現させた OPTN のシグナルは PLIN2 陽性の点状の構造と部分的に重なって観察された。以上の結果から、網膜色素上皮細胞における脂質滴の形態や分解に OPTN が関与しており、OPTN の関わる選択的オートファジーは網膜の脂質代謝に重要な役割を果たしていると考えられる。

網膜色素上皮細胞の脂肪滴上におけるオプチニューリン (OPTN) とペリリピン 2 (PLIN2) の相互作用

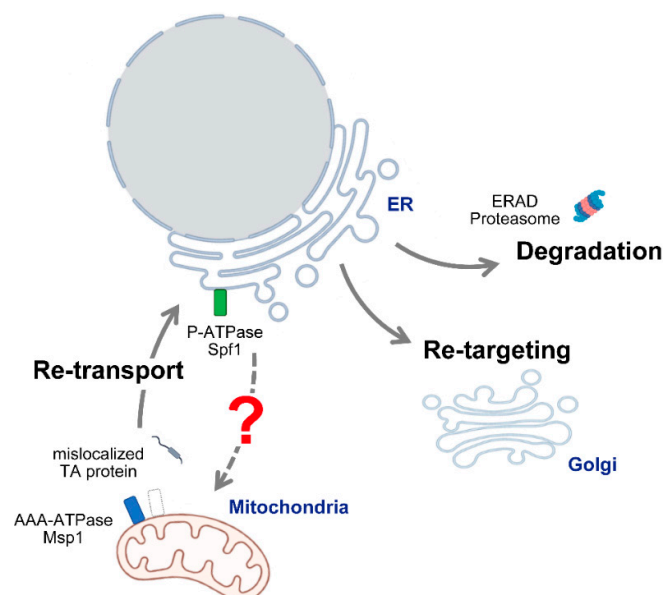


【目的】 細胞内における膜タンパク質のオルガネラ局在は各々に特異的な因子や経路によって厳密に制御され、正しい局在化 (targeting) に失敗した膜タンパク質は速やかに分解されると考えられてきた。しかし近年、膜タンパク質が本来とは異なるオルガネラへと誤局在する現象が数多く報告され、膜タンパク質の局在制御に関わる「新たなシステム」の存在が示唆されている。実際に、これまでの解析からミトコンドリア外膜に存在する AAA-ATPase の Msp1 はミトコンドリアに誤局在した TA (Tail-Anchored) タンパク質を外膜から引き抜き、ER へと再配送することが明らかとなった。一方、ER 膜に存在する P-ATPase の Spf1 も TA タンパク質の引き抜き活性を有し、Spf1 の欠損は本来ミトコンドリアに局在すべき TA タンパク質の ER 誤局在を引き起こすことが知られており、ER においても ATPase を介した「膜タンパク質の再配送機構」が存在することが推測される。本研究は、著者らのグループが見出した ATPase による「膜タンパク質の再配送機構」をもとに、ER に存在する P-ATPase の Spf1 に着目し、ER-ミトコンドリア間における ATPase を介した膜タンパク質の引き抜きによる再配送が膜タンパク質の正しい細胞内分布を実現する「新たな局在制御システム」について探究する。

【方法】 出芽酵母を用いて Spf1 の欠損株および内在性のミトコンドリア外膜タンパク質を蛍光タンパク質の付加によって可視化した株を作製し、蛍光顕微鏡による観察を行うことで、Spf1 の欠損によって ER 誤局在が生じるミトコンドリア外膜タンパク質の探索を行った。また、これまでに著者らのグループが確立した目的タンパク質の選択的誘導発現系を用い、Spf1 による膜からの引き抜きを介した膜タンパク質の再配送について、Spf1 の発現依存的な ER 誤局在タンパク質の局在移行の検証を行った。

【結果】 Spf1 の欠損はミトコンドリア外膜に存在する TA タンパク質だけでなく、N アンカー型膜タンパク質の ER 誤局在をも引き起こし、Spf1 の再発現は ER に誤局在したミトコンドリア外膜タンパク質をミトコンドリアへと再配送することが確認された。これらの知見から、一部のミトコンドリア外膜タンパク質は ER への局在化 (誤局在) を可能とし、ER に誤局在したミトコンドリア外膜タンパク質は Spf1 による引き抜きを介してミトコンドリアへと再配送されることで正しい細胞内分布を実現する新たな局在制御システムが存在することが示唆された。

ER-ミトコンドリア間における ATPase を介した膜タンパク質の再配送機構

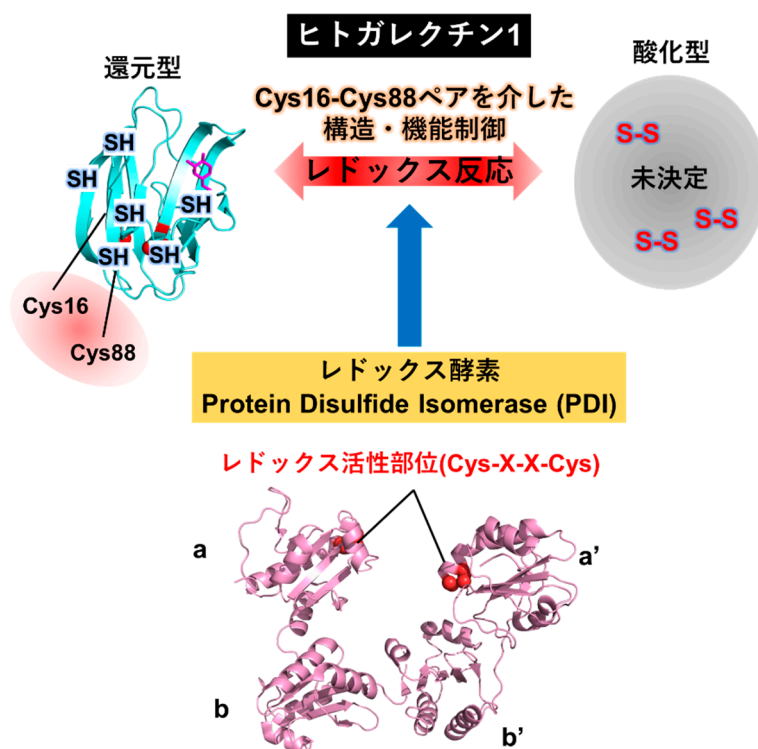


【目的】 ガレクチンは、細胞質で生合成され、細胞外において細胞シグナル伝達、神経保護、血管新生、免疫、細胞分化、細胞増殖、アポトーシスなど様々な生命現象に関与する糖結合性タンパク質であり、哺乳類では 15 種類が同定されている。ヒトガレクチン 1 (hGal-1) はガレクチンファミリーの中で唯一、分子内の 6 つのシステイン残基のレドックス状態に応じた機能変調が示唆されている。システイン残基全てが-SH 状態にある還元型 hGal-1 は、糖結合能を持つことで細胞接着、血管新生などに関与する。一方、6 つのシステイン残基が分子内で 3 本のジスルフィド結合を形成した酸化型 hGal-1 は、糖結合能を失い、神経軸索の再生など全く異なる生理機能に関与する。このように、適切なレドックス制御による hGal-1 の機能変調が生命維持に重要であると考えられるが、hGal-1 のレドックス依存的な分子メカニズムや生体内でどのようにして hGal-1 のレドックスが制御されているのか詳細は不明である。そこで本研究では、hGal-1 のレドックス依存的な分子メカニズム及び、hGal-1 のレドックス制御メカニズムの解明を目的とした。

【方法】 チオール基の選択的ラベル化を利用した非還元 SDS-PAGE 解析による hGal-1 のレドックス反応性評価、赤血球凝集実験による hGal-1 のレドックス依存的な機能評価、溶液 NMR による hGal-1 のレドックス依存的な構造評価、ゲルシフトアッセイによる hGal-1 のレドックス反応触媒評価を行った。

【結果】 hGal-1 のレドックス依存的な分子メカニズムを明らかにするため、各システイン残基のレドックス反応性を検証した結果、Cys16-Cys88 ペアが最も効率良く酸化された。また、このシステインペアは赤血球凝集実験、溶液 NMR によってレドックス依存的な構造及び機能変化に重要であることがわかった。さらに、レドックス酵素である protein disulfide isomerase (PDI) が hGal-1 のレドックス制御因子の一つであることが示唆された。本研究を通じて、細胞外に存在する hGal-1 及び PDI のレドックスを介した作用機序の理解は、細胞外レドックスが関与する生命現象及び疾患の解明のカギとなる知見が期待できる。

レドックス酵素 PDI によるヒトガレクチン 1 のレドックス制御機構

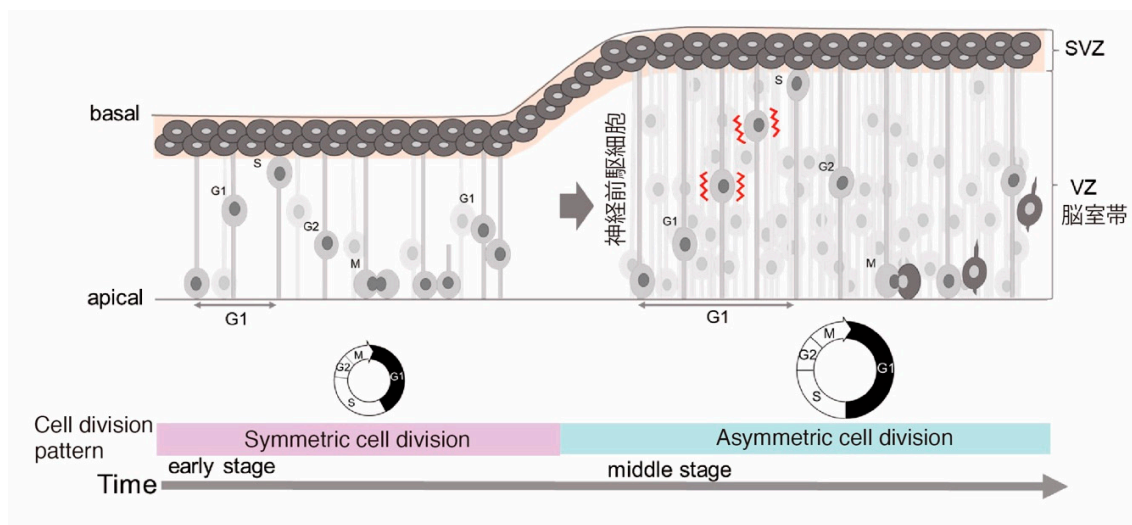


【目的】 発生期の脳において、細胞生産を担う神経前駆細胞は細胞産生のパターンを変化させることで、未分化細胞と分化細胞の比率を調節している。この生産機構の高度な調節により組織内の細胞数と細胞種の割合は担保されているが、これが破綻すると皮質形成異常を誘引してしまうため、生産機構を理解することは疾患の予防や治療応用の道を切り開くと考えられている。近年、細胞周期における G1 期の長さが細胞産生のパターンを変化させることが発見された。組織の成長に伴い G1 期長が進展することは見出されているが、G1 期長を調節する仕組みは未解明のままである。本研究では、細胞周期の進行とシンクロナイズした上皮組織特有の核運動に着目し、神経前駆細胞の動態がもたらす細胞周期長の調節機構の解明を目指した。

【方法】 子宮内電気穿孔法を用いて *Neurog1/2* (*Ngn1/2*) あるいは *Lzts1* を遺伝子導入して、神経前駆細胞の核運動が起きる脳室帯を人為的に薄くした。薄化した脳室帯における神経前駆細胞の細胞周期長の変化を調査するために、EdU と BrdU の時間差ラベリングを行い、免疫組織学的に細胞周期の短縮の有無を解析した。また、同手法と *Tbr2* 抗体染色を併用し、神経前駆細胞より産生された細胞の分化度を算出した。

【結果】 細胞産生パターンの転換が起きる胎生 11 日から 13 日にかけて、脳室帯の肥厚と細胞密度の増加が確認された。また、それに伴い核運動の速度がグラディエントに減衰することも見出された。発生の進行に伴う脳室帯の状況変化は、核運動に費やす時間を変化させる要因の一つである可能性が示唆された。人為的に薄化した脳室帯における細胞周期長の変化を調査した結果、G1 期の有意な短縮が認められた。脳の組織培養を用いた神経前駆細胞のライブ観察から、薄化した脳室帯内の細胞は通常で核運動を行うが、脳室帯が薄いため G1 期に起こる脳室帯下端から上端までの核移動に費やす時間が短縮されることが分かった。これらの結果から、核運動に費やされる時間が G1 期を規定している可能性が示唆された。また、薄化した脳室帯内で産生された細胞の細胞運命を調査した結果、有意に未分化細胞の産生が増加したことが認められた。以上の結果より、神経前駆細胞における核運動の進行が細胞周期の進行へフィードバックされ、最終的に細胞産生パターンに変化をもたらすことが明らかとなった。

発生中の神経前駆細胞における細胞周期長の変化と細胞産生パターン転換の機構

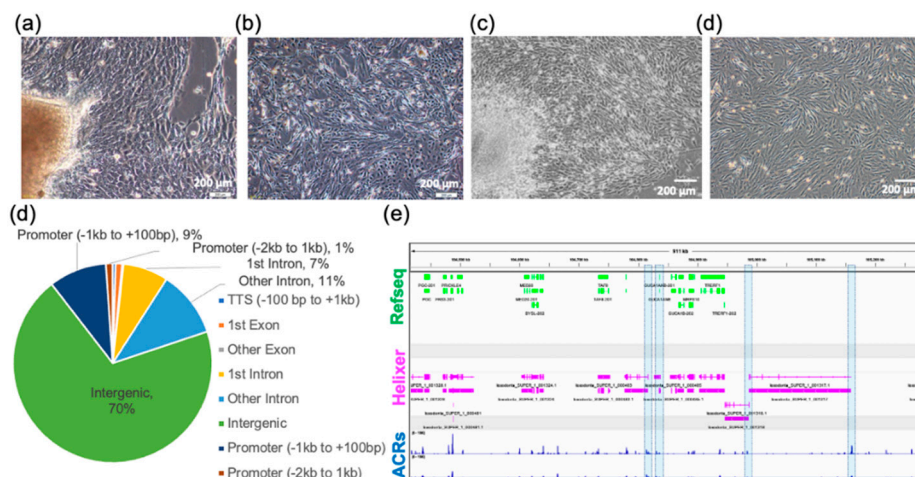


【目的】脊椎動物の個体を構成する細胞数はマウスでは約 300 億個、ゾウでは 3,000 兆個と大きく異なる。一般的に、細胞分裂に伴う DNA 複製回数が多ければ複製エラーは蓄積し、また個体の成長後も、外的ストレスや老化による DNA の変異や損傷の蓄積は増大することから、細胞のがん化は個体の細胞数と正の相関を示すと考えられる。しかし、ゾウ、クジラやサメといった巨大な体躯の（細胞数の多い）生物におけるがん発症率は低く、寿命も長い傾向にある。これは現在の生物学においても未解明の Peto のパラドクス (Peto *et al.*, 1975) として知られている。そこで著者はパラドクスの分子背景の解明を目的とし、体躯の違う生物種間の遺伝情報を精査・比較し、遺伝子の守護神であるがん抑制因子 p53 ファミリーとその周辺因子群の遺伝子重複や特異的スプライシングバリエーションを同定する。同定した遺伝子について培養細胞での強制発現や発現阻害をおこない、細胞老化やアポトーシスの活性化を調べることで、がん抑制機構の原理の解明を目指した。

【方法】本研究では、体躯が大きく寿命が長い脊椎動物として、アフリカサバンナゾウ（以下、アフリカゾウ）、軟骨魚類であるイヌザメ、トラザメの初代繊維芽細胞、及び比較対象とする体が小さく寿命が短い脊椎動物として一般的に研究で用いられる B6 マウスの初代繊維芽細胞を用いることを計画した。まずは、軟骨魚類に属するトラザメ、イヌザメの培養細胞の確立とゲノム情報の整備を、さらに、アフリカゾウの培養細胞の入手、ゲノム情報の整備のため、既存の Ref-seq を新たなゲノムバージョンに対して適応させた。既存の遺伝子モデルには見出されていない新規遺伝子モデルを構築するため、*de novo* 遺伝子モデル予測アルゴリズムである Helixer を用いて、新規遺伝子モデルの予測を実行した。さらに、アフリカゾウの培養細胞の Epigenetic landscape を調べるため、培養細胞を用いて ATAC-seq をおこない、エンハンサーやプロモーターの網羅的解析を行った。また、DNA 損傷時におけるアフリカゾウの培養細胞のエピジェネティック動態を調べるため、アフリカゾウの培養細胞を UV 照射することで DNA 損傷を引き起こし、ATAC-seq を行った。

【結果】トラザメ胚及びイヌザメ胚に由来する初代培養細胞を確立、さらに 6 ヶ月以上も継続培養が可能である条件を確立した (図 a~d)。アフリカゾウの培養細胞は、理化学研究所 CELL BANK から入手、さらにアフリカゾウの高度に整備されたゲノム配列を Earth Biogenome Project から入手した。新たに入手したゲノム情報に対して、既存の遺伝子モデルの再配置と、既存のゲノム DNA の情報には欠失していたと考えられる 80 の重複遺伝子候補を見出した。また、*de novo* 遺伝子モデル予測アルゴリズムを用いて、未同定の遺伝子モデル予測を行ったところ、これまでの遺伝子モデルには存在しなかった 7,619 の未同定遺伝子が見出された。またアフリカゾウの ATAC-seq からは、培養細胞におけるエンハンサーとプロモーターといった基盤となる情報を得ることができた (図 d, e)。

サメ類の培養細胞の確立・アフリカゾウの未同定遺伝子の予測と培養細胞から得られた ACRs

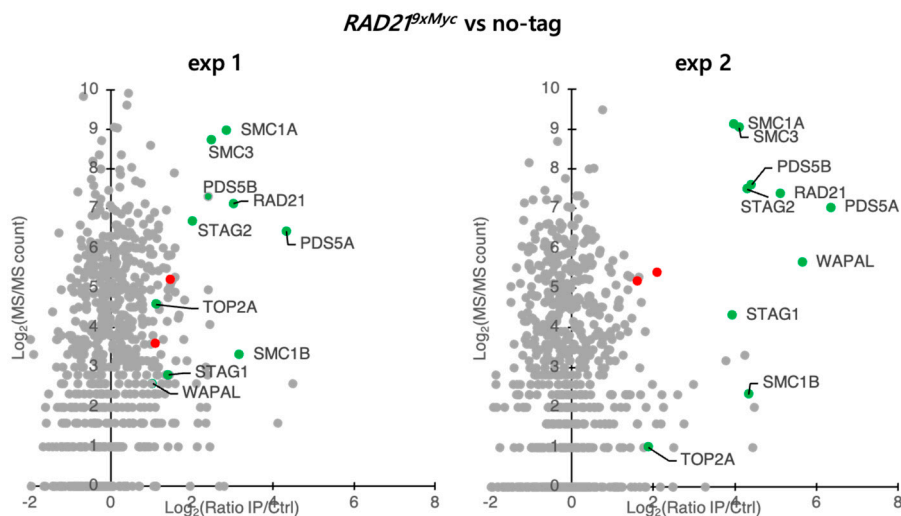


【目的】 ゲノム DNA は「生命の設計図」であり、不正確な情報が次世代へと引き継がれることで細胞死やガン化の原因となる。次世代へ染色体を正確に分配する上で「コヒーシン」と呼ばれるリング状のタンパク質複合体が中心的な役割を果たすことが知られている。コヒーシンは DNA をリング内に束ねる機能（姉妹染色分体間接着、SCC）と、DNA を折りたたむ機能（ループ形成）を持つことが知られている。コヒーシンは挿入因子の働きによって DNA をリング内に包括する一方で、解離因子である WAPL によって DNA から外されるため、コヒーシン-DNA 結合は不安定である。一方で正確な染色体分配の達成にはコヒーシン-DNA 結合の安定化が必要であり、アセチル化酵素 ESCO1/2 がその役目を果たしている。ESCO1/2 はコヒーシンサブユニットの一つである SMC3 をアセチル化することで解離因子 WAPL に対してコヒーシンを抵抗性にすると考えられており、このモデルは酵母から高等真核生物でも広く保存されたメカニズムであると考えられてきた。しかしながら最近の研究により、酵母とでは ESCO1/2 によるコヒーシンの制御が SMC3 のアセチル化に依存しない可能性が示唆された。本研究では、遺伝学とプロテオミクスの融合により ESCO1/2 のアセチル化の新規基質を探索し、ESCO1/2 によるアセチル化を基盤としたゲノム構造制御メカニズムの理解を目指す。

【方法】 *ESCO1/2* を遺伝子編集したニワトリ DT40 細胞と、質量分析計によるプロテオーム解析を組み合わせ *ESCO1/2* の新規基質の同定を試みた。野生型細胞と *ESCO2* 遺伝子変異細胞のリジンを ^{14}N と ^{15}N で安定同位体標識し、抗アセチル化リジン抗体により免疫沈降を実施し、アセチル化されたタンパク質の網羅的比較を行なった。また、*ESCO1/2* のターゲットをコヒーシンに絞って基質を探索するため、コヒーシンのサブユニットである RAD21 に 9xMyc タグを導入した細胞を用いて免疫沈降を行い、相互作用因子の同定を試みた。

【結果】 安定同位体標識を用いた SILAC (Stable Isotope Labeling using Amino Acids in Cell Culture) 法では、6 種類のタンパク質で *ESCO2* 変異依存的なアセチル化の低下が確認されたものの、染色体構造制御への関与が期待できる因子は同定されなかった。また、コヒーシンの新規相互作用因子の探索の結果、コヒーシンサブユニットとともにこれまでにコヒーシンとの相互作用の報告がないクロマチンリモデラー X が同定された。今後クロマチンリモデラー X のコヒーシン制御における役割の調査を進めていく。

コヒーシンの新規相互作用因子としてクロマチンリモデラー X を同定した

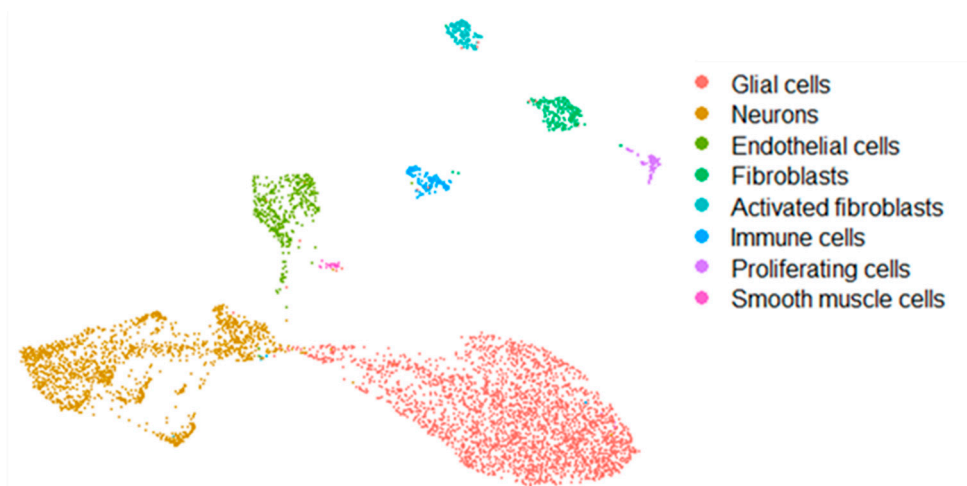


【目的】 自律神経活動は視床下部を中心とする中枢神経ネットワークによって制御される。近年では、中枢性の自律神経調節機構に関して、ストレスや情動、痛みなどといった様々な要因による自律神経の変調メカニズムに関する研究が飛躍的に進んできている。一方で、従来の研究において見逃されている視点の一つに、末梢神経系で構成される末梢神経回路による自律神経調節機構がある。中でも腹腔神経節は、腸管を支配する感覚神経の側枝または腸管神経叢からの投射、神経節内に介在神経が存在するという報告がなされており、末梢神経内に小さな神経回路の存在が示唆されてきた。本研究では、交感神経節を構成する個々の細胞について、次世代シーケンスを用いた snRNA-seq (Single-nucleus RNA-sequence) 法をもちいて、シングルセルレベルで遺伝子プロファイルを明らかにする。また、この網羅的遺伝子解析に加え、摘出した組織サンプルに対し直接的に電気生理学的解析を行うことで、交感神経節内神経回路の仕組みについてもアプローチを行う。これらの発現遺伝子解析と電気生理学的解析を組み合わせることにより、これまで不明であった末梢神経内で行われる交感神経制御基盤の全容を明らかにすることを目的とする。

【方法】 雄性 Sprague-Dawley (SD) ラットの腹腔神経節を用いて snRNA-seq 解析を行った。データの取得には次世代シーケンサーを用いて、ライブラリ調製したサンプルの塩基配列を取得した。得られた生データはクオリティーコントロール後に `seurat` パッケージを用いてクラスター解析を行った。また、電気生理学的解析として、Whole-mount 腹腔神経節標本を用いた Patch-clamp 法を行った。記録には 7 週齢の雄性 SD ラットを用い、腹腔神経節標本の作製を行った。サンプル処理として 0.05% コラゲナーゼと 0.05% Dispase II による 5 分間の酵素処理を行った。pressure-clamp パッチクランプ法を用いてホールセルパッチクランプを行い、voltage-clamp 法と current-clamp 法により神経細胞の機能特性の解析を行った。

【結果】 腹腔神経節を構成する各種細胞の発現プロファイルを明らかにするため snRNA-seq 法を行い、取得したデータについては UMAP にて次元削減を行った。腹腔神経節に局在する個々の細胞をクラスター分類し、マーカー遺伝子でアノテーションした結果、腹腔神経節を構成する細胞は大きくグリア細胞、神経細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞 (resting, activated)、免疫細胞、分裂細胞、血管内皮細胞の 7 種類の細胞群に分類することができた。さらに神経細胞のみで再クラスタリング解析を行うと、遺伝子発現プロファイルが異なる 4 つの群に分類することができた。whole-mount の腹腔神経節標本を用いたパッチクランプ法を行った結果、自発性のシナプス後電位 (sEPSCs) の記録に初めて成功し、アセチルコリンによるシナプス伝達が行われていることを確認することができた。また、各種神経伝達物質への反応性の違いを検討した結果、アセチルコリンではない他の伝達物質も交感神経活動調節に積極的に関わっていることが明らかとなった。

snRNA-seq 法による腹腔神経節構成細胞のメガクラスター解析

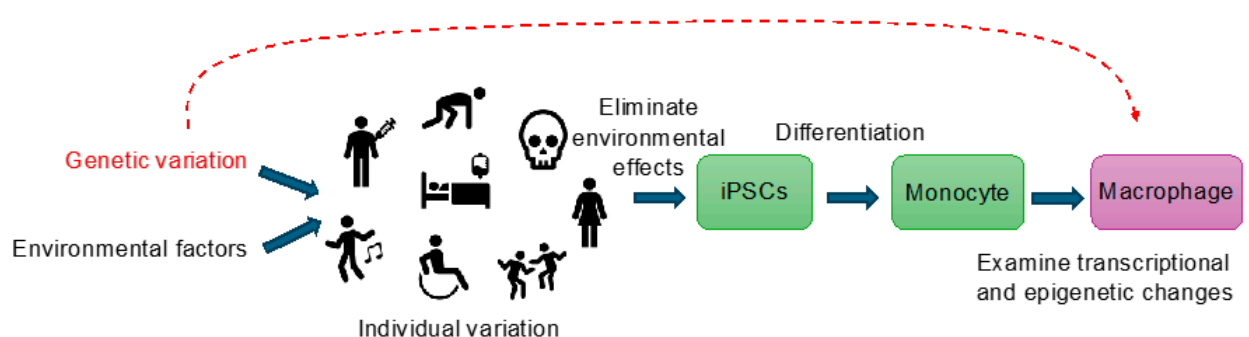


【目的】 本研究では新型コロナウイルス感染症の重症化における遺伝的リスクの作用機序解明を目的とした。昨今のパンデミックで強調されたように感染時の症状には大きな個人差があり、一塩基多型 (SNP) などの遺伝的要因や環境要因が寄与する。ゲノム解析により多くの SNP について疾患発症リスクとの関連が報告されているが、機能検証はほとんど行われていない。その一因として臨床検体の環境要因によるばらつきや採取できる細胞数の制限がある。本研究ではヒト多能性幹細胞 (iPS 細胞) に初期化することで環境要因を排除し、感染時に最前線で働くプレーヤーであるマクロファージに分化させることで SNP の影響を精査することを目指した。また、iPS 細胞の増殖能やゲノム編集しやすい特徴を活かして作用機序解明を行った。SNP 下流のメカニズムを明らかにすることにより、今後遺伝的リスクを克服する介入法開発につながると考えられる。さらに本研究成果により遺伝的リスクの高い個人をゲノムレベルで特定し、今後の個別化医療の基盤構築に貢献することを目標とした。

【方法】 GWAS 解析により新型コロナウイルス感染により入院するケースと相関があると報告されている SNP のうち、マクロファージで発現する遺伝子近傍の SNP 2 種を対象とした。これらリスク SNP を保有するドナー由来 iPS 細胞を収集し、マクロファージに分化させた。マクロファージの表現型は RNA-seq およびエピゲノム修飾の ChIP-seq により行い、SNP ジェノタイプと相関する特徴を調べた。さらに、メカニズム解析を行うため、SNP 領域のエピゲノム修飾や結合する転写因子を ChIP-seq により明らかにした。また、SNP の機能性証明のため、野生型クローンにリスク SNP を導入し、マクロファージに分化させて表現型解析を行った。

【結果】 本研究で対象とした 2 つの SNP のうち 1 つについては iPS 細胞由来マクロファージにおいて近傍遺伝子への発現変動を認めなかったが、もう 1 つの SNP は近傍の複数の遺伝子発現を低下させた。臨床検体を用いた eQTL 解析では通常数百検体必要であるのに対し、iPS 細胞由来マクロファージを用いた eQTL 解析ではわずか各群 5 検体で有意差を得ることができ、本研究アプローチの感度の高さが強調された。次に、iPS 細胞の増殖させやすい特徴を活用して、iPS 細胞由来マクロファージにおける転写エピゲノム制御を ChIP-seq により解析したところ、複数の遺伝子を含む広いゲノム領域においてエンハンサー活性が落ちていることが明らかになった。さらに、リファレンスクローンをゲノム編集してリスク SNP を導入したところ、リスクアレルを持つクローンの表現型とは逆に周辺遺伝子の発現を上昇させた。この結果から linkage disequilibrium ブロック内の SNP の複雑な相互作用とそれぞれの SNP の機能を精査することの重要性が示された。

iPS 細胞を活用した遺伝的要素の評価システム

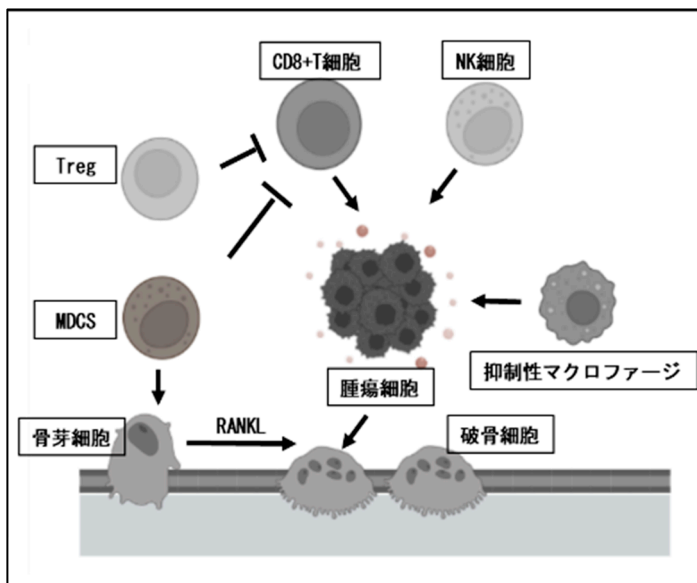


【目的】 骨転移病変固有の免疫応答や代謝産物を含めた微小環境の観点から、がんの進化とそれに伴う病変内もしくは病変間の不均一性を包括的に機能解析し、さらにはがん免疫治療の治療効果との関連を解き明かそうとする報告は限られている。本研究課題では原発巣および骨転移巣を始めとしたその他の転移性病変を比較検討し、転移巣の免疫チェックポイント阻害剤（immune checkpoint inhibitor : ICI）治療抵抗性をもたらす因子をゲノム異常、免疫応答、代謝環境などの観点から明らかにする。これにより、がんゲノム異常に加えて骨転移病変に特異的な免疫応答の詳細を検討することで、環境に応じてがんが持つ免疫逃避機構を打破する機構を明らかにし、新たな患者層別化バイオマーカーや治療標的を見出すための基盤とすることを目的とする。

【方法】 肺癌患者症例の中で骨転移性病変や脳転移性病変と原発性病変を手術した症例の患者検体からDNA/RNA を抽出しシーケンスを実施した。さらにはホルマリン固定パラフィン包埋（formalin fixed paraffin embedded : FFPE）検体を用いて多重免疫染色を実施し、免疫応答を解析した。

【結果】 脳転移病変では神経伝達物質の一部でありグルタミン酸からのシグナルを起点として、抑制性の細胞集団である制御性 T 細胞が活性化し免疫応答を抑制していることが判明した。さらに骨転移性病変における免疫応答に関しては現在検討を進めており、同様に骨転移性病変において制御性 T 細胞が活性化している可能性を想定している。

骨転移病変における抗腫瘍免疫応答の概略図

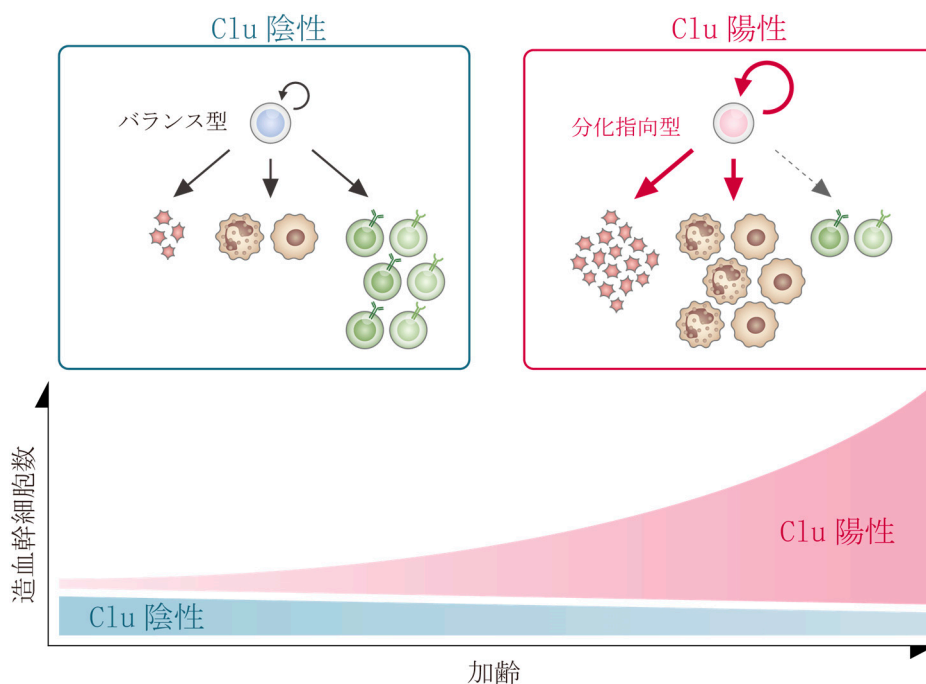


【目的】 血球細胞は骨髄中に存在するごく少数の造血幹細胞（HSC）によって生涯供給される。若齢期の HSC は多様な造血細胞をバランスよく分化供給するが、加齢期の HSC はリンパ球への分化能が低下することで免疫系が減弱し、骨髄球系に分化能が偏ることで造血システムの恒常性が低下する。さらに、このような加齢 HSC の分化指向性は骨髄異形成症候群（MDS : myelodysplastic syndromes）をはじめとした造血器腫瘍の温床となるとされる。これまでに加齢に伴う HSC の機能的な変化の詳細を解明する試みは多くの研究者により行われているものの、その増幅様式は未だ明らかではない。そこで、本研究では若齢と高齢マウスの HSC をシングルセルレベルで比較解析を行うことで、加齢に伴う分化指向型 HSC の増幅様式を明らかにすることを目的とした。

【方法】 若齢（8～10週齢）および高齢（18～20ヶ月齢）マウスから採取したHSCを用いて、single cell RNA-sequence解析を行った。また、single cell RNA-sequence解析結果から加齢HSCにおいて顕著に発現亢進する Clusterin (Clu) に着目し、そのレポーターマウスを用いて加齢HSCにおけるClu陽性とClu陰性の機能的差異を競合移植から検証した。

【結果】 若齢および高齢マウス HSC の single cell RNA-sequence 解析の結果、加齢 HSC は一部若齢 HSC と類似した細胞が含まれるものの、大部分は若齢型と異なる転写発現をすることが明らかとなった。さらに加齢 HSC で顕著な発現変動のあった遺伝子を調べた結果、分子シャペロンである Clu が加齢 HSC において特異的に高発現することが明らかとなった。そこで、Clu-GFP レポーターマウスを導入し、加齢 HSC を Clu 陽性と陰性で比較解析を行った。その結果、加齢 HSC では Clu 陽性型が大半を占めており、その機能はリンパ球産生能が低下するなど幹細胞活性が低下していた。一方、Clu 陰性型は加齢 HSC 中では少数であるものの、若齢 HSC に近い幹細胞活性を示した。以上の結果より、Clu は加齢 HSC を機能的に分類する有望なマーカーであることが明らかとなった。

HSC は加齢に伴い Clu 陽性型が支配的になる

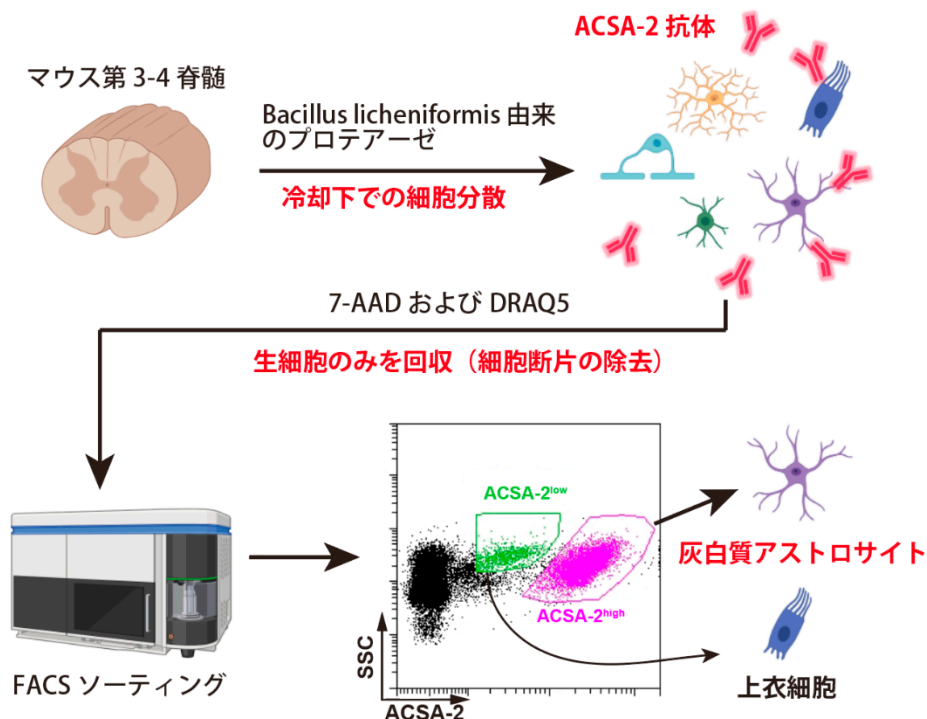


【目的】 脊髄神経細胞では初期応答遺伝子 cFOS などの発現増加が活動性の指標として使用され、免疫組織染色による陽性細胞の同定、あるいはそれを応用した Fos-TRAP 法などを利用することで、特定の時間軸で活動が亢進した神経細胞を同定することが可能である。一方で、脊髄アストロサイトは活動性の指標となる分子が同定されていないため、末梢への刺激時あるいは病態時におけるアストロサイトの時空間的な活動変化を捉えるのは現状難しい。そこで、脊髄アストロサイトの活動性マーカーを探索するにあたり、本研究ではアストロサイトに高発現することが知られている ATPase Na⁺/K⁺-transporting subunit beta 2 (ATP1B2) を認識する astrocyte cell surface antigen-2 (ACSA-2) 抗体を使用し、fluorescent activated cell sorting (FACS) を用いて脊髄アストロサイトを高収率かつ高精度で単離可能な技術の確立を目的として検討を行った。

【方法】 C57BL/6J 雄性マウスを使用し、実験を行った。免疫組織染色は、PBS をかん流後に 4%PFA で固定し、各種抗体を用いて第 4 腰髄の染色を行った。また、脊髄アストロサイトの単離は、マウス第 3/4 腰髄の酵素処理により細胞分散後、ミエリン除去を行い、ACSA-2 抗体と反応させた。FACS を用いて生細胞のみを回収し、mRNA を抽出後に逆転写反応を行い、各種プライマー・プローブを用いて遺伝子発現解析を行った。

【結果】 冷却下でも酵素活性を示す *Bacillus licheniformis* 由来のプロテアーゼを細胞分散に使用することで、組織溶液を加温することなく、脊髄組織より ACSA-2 陽性細胞を単離可能であることを示した。さらに、酵素処理によって生じる可能性がある ACSA-2 陽性アストロサイトの突起断片を取り除く目的で、細胞核を染色する DRAQ5 を用いることで ACSA-2 強陽性および弱陽性細胞の各集団に分離可能であることが分かった。組織染色および qPCR 法を用いた解析により、各集団はそれぞれ脊髄の灰白質アストロサイトおよび中心管に存在する上衣細胞であることが明らかとなった。本研究で確立した手法は、既法よりも高収率かつ高精度なアストロサイト単離を可能としており、今後は本技術を基盤としてシングルセル RNA-seq 解析を行うことで、脊髄アストロサイトの活動性マーカーの同定が期待される。

高収率かつ高精度な脊髄アストロサイト単離法の確立

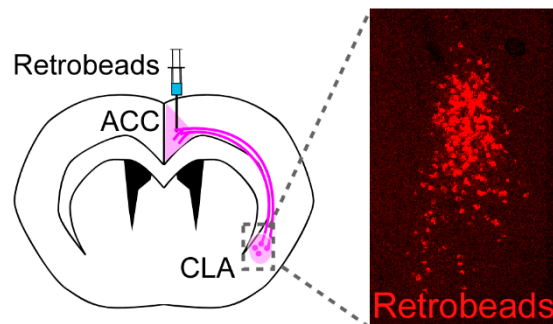


【目的】 痛みは生体の警告系として重要な感覚であるが、過度な痛みや慢性痛は患者の QOL を著しく損なうため、痛みの神経回路基盤の解明による画期的な鎮痛薬の開発が急務の課題である。前帯状皮質 (anterior cingulate cortex : ACC) は痛みの処理や慢性化に関与し、近年、痛み情報処理における ACC 神経の役割が徐々に明らかになっている。しかし、未だ ACC 神経活動制御の神経回路機構の全容は依然として不明な点が多く残されており、特に ACC 活動を抑制的に制御する神経回路メカニズムの詳細とその慢性疼痛時の機能変調については明らかになっていない。そこで、ACC を制御する新たな疼痛制御神経回路の探索を目的とし、逆行性トレーサーにより ACC に投射する神経核を網羅的に解析し、ACC が非常に強い入力を前障 (claustrum : CLA) から受けることを見出した (下図)。CLA は ACC を含む前頭前皮質と相互の投射を持ち、皮質内の局所抑制性神経回路を利用して皮質活動を抑制的に制御し、睡眠と関連する脳波の発生や行動の意思決定に関与する。そこで特定した回路に関して遺伝学的なツールを用いることで、その神経回路の疼痛制御における役割を検討した。

【方法】 ACC 神経がどのような神経核から投射を受けるのかを明らかにするために、ACC に逆行性トレーサー (レトロビーズ) を処置し、逆行性に標識される神経核をコンフォーカル顕微鏡で観察した。上記の実験で見出した CLA→ACC 回路の解析を目的として、ACC に投射する CLA 神経 (CLA[→]ACC 神経) を遺伝学的にラベルする手法の開発を行った。具体的には ACC 神経に逆行性に組換え酵素の Flp を発現させるアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを処置、CLA 神経に Flp 依存的に機能性タンパク質として抑制性人工受容体の PSAM⁴-Gly と興奮性人工受容体の hM3Dq を発現させる AAV ベクターを処置することで CLA[→]ACC 神経特異的に遺伝子導入を行った。このように CLA 神経を標識したマウスを用いて行動学的な解析を実施した。

【結果】 ACC 神経に逆行性トレーサー (レトロビーズ) を処置し、ACC への神経投射を網羅的に解析したところ、ACC は CLA 神経からの強い投射を受けることが明らかとなった。さらに、この神経投射の行動学的な役割を調べるために、方法に記載の AAV ベクターの処置により CLA[→]ACC 神経特異的に抑制性の化学遺伝学的受容体 (PSAM⁴-Gly) を発現させた。CLA[→]ACC 神経特異的な抑制は機械刺激に対する過敏化を引き起こした。一方で、興奮性の人工受容体 (hM3Dq) による CLA 神経の活性化では、予想に反して痛覚過敏が認められた。これらの結果は、CLA→ACC 回路が複雑なメカニズムで ACC 神経活動と疼痛を制御することを示唆しており、活動の亢進と減弱のいずれかもしくは両方の CLA 活動異常が慢性疼痛時の前帯状皮質活動変調メカニズムに関与することが想定される。今後、CLA→ACC 回路の疼痛制御機構の詳細を解明することにより、慢性疼痛時に認められる痛覚過敏や不安症状を軽減する薬物の開発や新たな鎮痛薬の開発に繋がることが示唆される。

ACC に逆行性トレーサーを処置した際の CLA での細胞標識

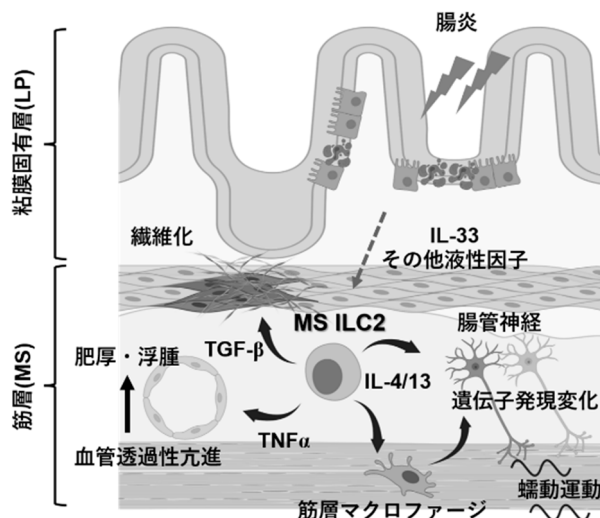


【目的】腸管は上皮、粘膜固有層、粘膜下層、筋層、漿膜といった解剖学的に異なる複数の層から構成され、特に筋層には神経細胞が密集し、蠕動運動、栄養吸収などの生体活動に必須の役割を果たす。2型自然リンパ球（Group 2 innate lymphoid cells : ILC2）は、抗原非特異的に2型サイトカインを多量に産生し、寄生虫の排除やアレルギー性疾患に重要な役割を果たす自然リンパ球である。腸管における ILC2 に関する研究は、粘膜固有層に注目し行われてきた一方で、筋層内にも ILC2 が存在することは知られていなかった。我々は、腸管筋層に ILC2 が存在し（Muscularis ILC2 : MS ILC2）、粘膜固有層 ILC2（Lamina propria ILC2 : LP ILC2）とは異なる表現型や性質を持つ集団であることを明らかにした。MS ILC2 は筋層マクロファージや腸管神経細胞と共局在し、腸管神経制御および蠕動運動制御など腸管の機能に重要な役割を果たすことが示唆されている。そこで本研究では、腸管筋層で独自の機能を持つと期待される MS ILC2 の生体内での存在意義を明らかにするため、炎症性腸疾患における MS ILC2 を介した病態形成機構を明らかにする（概略図）。

【方法】MS ILC2 の炎症性腸疾患の病態形成への寄与を明らかにするために、各種マウスを用いて、デキストラン硫酸ナトリウム（DSS）誘発性腸炎モデルの解析を行った。DSS 誘発性腸炎誘導後のマウスにおいて、体重減少や大腸の長さといった病態変化を測定した。また、MS ILC2 の機能変化を調べるため、コントロール群および DSS 誘発性腸炎群において、MS ILC2 の IL-5、IL-13 および Amphiregulin（AREG）の発現を比較した。さらに、免疫組織化学染色を用いて免疫細胞および非免疫細胞の局在の変化を観察した。MS ILC2 を介した腸管蠕動運動の制御機構を明らかにするために、2型寄生虫である *Nippostrongylus brasiliensis* を各マウスに感染させ、色素入りの餌の腸内移動時間を計測することで蠕動運動の変化を比較した。

【結果】野生型マウスと比較し、ILC2 を含む全リンパ球が欠損した $\gamma_c^{-/-}$ Rag2 $^{-/-}$ マウスおよび、ILC2 活性化因子である IL-33 $^{-/-}$ マウスにおいて、DSS 誘発性腸炎を誘導後の体重減少が顕著に低下し、水を再飲水させることによる体重の回復が見られず、大腸の長さも有意に短縮した。MS ILC2 由来の IL-5、IL-13 および AREG 発現が DSS 誘発性腸炎誘導後に顕著に増加した。さらに、免疫組織化学染色を用いた解析から腸炎誘導後に IL-33 $^{+}$ 細胞が粘膜下層および筋層で増加することが明らかになった。*Nippostrongylus brasiliensis* 感染後の蠕動運動の変化を観察したところ、餌の腸内移動時間が遅延することを見出した。さらに、ILC2 関連サイトカインである IL-25、IL-33、TSLP に対する欠損マウスにおいてこの遅延が回復することを見出し、ILC2 を介した蠕動運動障害への寄与が示唆された。

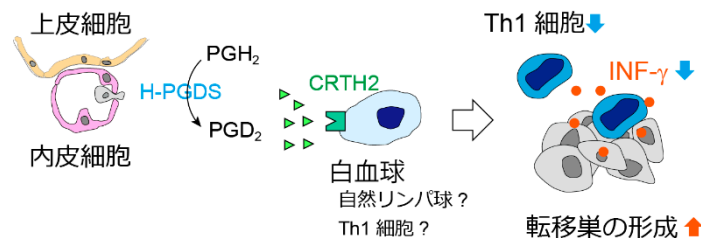
筋層 ILC2 の腸炎における組織特異的機能（仮説）



【目的】 局所で発生したがんは、全身に転移して様々な臓器の機能不全を引き起こす。しかし、転移のメカニズムは未だに不明な点が多く、有効な治療法も存在しない。プロスタグランジン D₂ (PGD₂) は細胞膜のリン脂質に由来するアラキドン酸が酵素による代謝を受けてできる生理活性脂質の一つである。我々は、PGD₂の合成酵素のノックアウト (KO) マウスではがんの転移が抑制されることを発見したが、その詳細はよくわかっていなかった。そこで、本研究ではその機構を詳細に解明するとともに、転移の治療における PGD₂シグナルの阻害薬の有用性を検討することを目的とした。

【方法】 マウスのメラノーマ細胞株である B16 細胞を、PGD₂合成酵素や受容体の KO マウスに尾静脈投与し、14 日後に肺にできたコロニー数を計測することで転移を評価した。また、B16 の尾静脈投与 1、3 日後の肺を回収し、免疫細胞の構成をフローサイトメトリーで、サイトカインの mRNA 発現を qRT-PCR によって測定した。

【結果】 B16 細胞を PGD₂の合成酵素である *hematopoietic PGD synthase (H-PGDS)* 遺伝子 KO マウスに尾静脈投与すると、野生型マウスと比べて転移巣の数が減少した。免疫染色によって H-PGDS はがんを移植したマウスの肺の上皮細胞や血管内皮細胞に発現していることがわかった。また、PGD₂の受容体である *chemoattractant receptor-homologous molecule on Th2 cells (CRTH2)* 受容体遺伝子の KO マウスにおいて、H-PGDS KO マウスと同程度の肺転移の減少が見られた。別のがん細胞株 (Lewis lung carcinoma) を用いた実験でも、H-PGDS KO マウスは転移抑制を示した。次に、野生型マウスに放射線を照射した後に CRTH2 KO マウスの骨髄を移入して、野生型マウスの骨髄を CRTH2KO の骨髄に置換した。このマウスでは B16 の肺転移が抑制されたため、骨髄に由来する免疫細胞に発現している CRTH2 受容体が肺転移を促進することがわかった。B16 投与 1 日後の肺における免疫細胞をフローサイトメトリーで確認したところ、H-PGDSKO および CRTH2 KO マウスの肺では野生型と比べて CD8 陽性 T 細胞の割合が顕著に増加していることがわかった。これらのマウスの肺では、抗がん活性を示すサイトカインである INF γ の発現が増加していることも qRT-PCR によって確認した。INF γ の中和抗体の処置は野生型マウスの肺転移に影響を与えなかったが、CRTH2 KO マウスで見られた肺転移の抑制を解除した。最後に、H-PGDS の阻害薬である HQL-79 や、CRTH2 受容体の阻害薬であるラマトロバンの投与は野生型マウスにおける B16 の肺転移を顕著に抑制した。本研究によって、上皮細胞や内皮細胞の H-PGDS によって産生された PGD₂は、骨髄由来の細胞の CRTH2 受容体を刺激し、CD8 陽性 T 細胞と INF γ の減少を引き起こすことでがんの肺転移を促進することが明らかになった。また、H-PGDS や CRTH2 受容体の阻害薬の処置によって転移が抑制されることも分かった。

PGD₂の転移抑制機構

PGD₂ は抗がん免疫を抑制することで転移を促進する

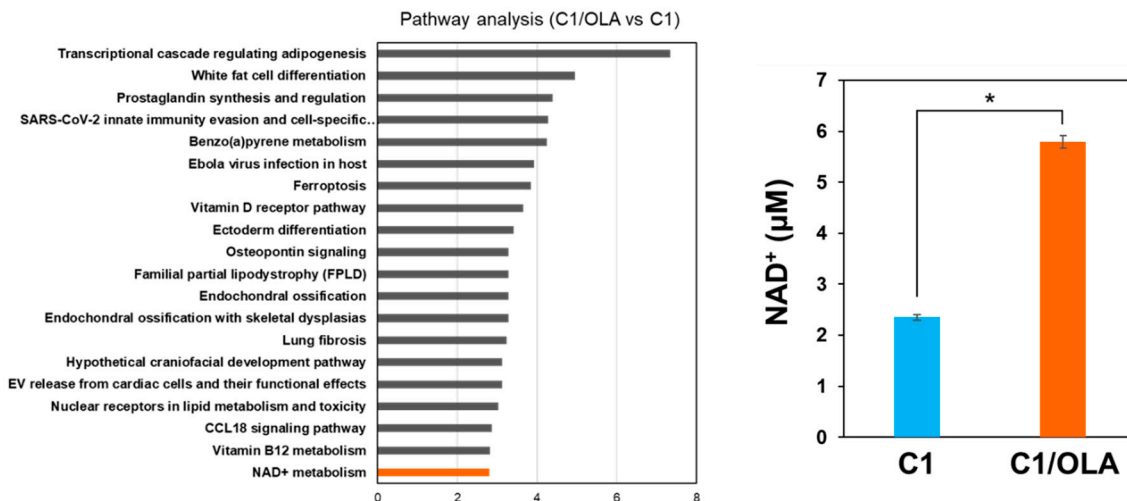
120	Olaparibの新規耐性因子の同定と耐性克服治療法の開発	佐々木 由香
-----	--------------------------------------	--------

【目的】 臨床承認薬 olaparib は、ポリ (ADP-リボース) 合成酵素 (PARP) を標的とした合成致死性抗がん薬として開発され、DNA 修復経路の一つである相同性組換え修復に関わる *BRCA1* または *BRCA2* に変異を有する乳がん、卵巣がん、膵がん等に対して特異的に細胞死を誘導することから、副作用の少ない抗がん薬として期待されている。しかしながら、olaparib の投与による olaparib 耐性の獲得は、現在治療上の大きな問題となっており、早期に olaparib 耐性獲得機構を明らかにし、耐性解消法を確立する必要がある。そこで本研究では、PARP 阻害薬耐性に寄与する新規因子を同定し、その耐性機構を明らかにすることを目的とした。

【方法】 これまでに、膵がん細胞株 MIA PaCa-2 において、CRISPR/Cas9 システムを用いて *BRCA1* ノックアウト (KO) 細胞株 (C1 細胞) を樹立し、C1 細胞株における olaparib の継続的な処理により、olaparib 耐性クローンとして C1/OLA 細胞株を単離した。本研究では、olaparib 処理した C1/OLA 細胞と親株である C1 細胞との比較により、RNA-seq 解析により網羅的な遺伝子発現を解析し、2 倍以上発現上昇が認められた遺伝子について pathway 解析を実施し、olaparib 耐性に寄与する細胞内経路を探索した。さらに、qRT-PCR による mRNA 発現レベルの解析、細胞内 NAD⁺量の測定などにより olaparib 耐性機序の解析を行った。

【結果】 Olaparib 処理した C1/OLA 細胞と C1 細胞において RNA-seq 解析および pathway 解析を行った結果、C1/OLA 細胞において NAD⁺代謝に関わる経路が活性化していることが明らかとなった。C1/OLA 細胞において、NAD⁺の生合成に関わる nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) および nicotinamide nucleotide adenylyltransferase 2 (NMNAT2) の mRNA 発現は有意に上昇しており、さらに細胞内 NAD⁺レベルの上昇が認められた。C1 細胞においてニコチンアミド添加により細胞内 NAD⁺レベルの上昇を誘導した結果、ニコチンアミド存在下において、C1 細胞は PARP 阻害薬である olaparib と talazoparib に対する感受性を有意に低下させた。以上のことから、NAD⁺生合成経路の活性化に伴う細胞内 NAD⁺レベルの上昇が、PARP 阻害薬耐性を獲得する要因の一つになり得ることが示唆された。

NAD⁺生合成経路の活性化は olaparib 耐性を誘導する

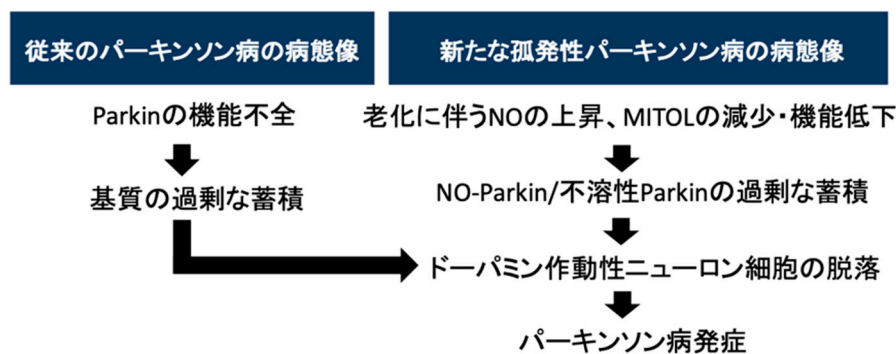


【目的】 パーキンソン病は進行性に黒質ドパミン神経細胞が変性する疾患で、その結果、黒質・線条体におけるドパミンが減少し神経障害が生じる。病態の原因として患者脳の黒質・線条体領域でミトコンドリア機能障害やタンパク質の蓄積がみられることが明らかとなっているが、分子病態については未解明な点が多い。私たちはこれまでに、パーキンソン病原因遺伝子産物 Parkin が細胞死を誘導すること、その抑制系として Parkin を分解する酵素 MITOL を同定し、分子病態の一端を明らかにしてきた。一方、前述とは別に、Parkin が高度に凝集、不溶性化し細胞死を誘導することを新たに見出した。そのため本研究では、パーキンソン病原因遺伝子産物 Parkin の持つ毒性に焦点を当て、新規パーキンソン病病態メカニズムの解明を目指し解析を行った。

【方法】 パーキンソン病患者脳ではミトコンドリア呼吸鎖 I の機能障害が観察される。よって、ミトコンドリア呼吸鎖 I の阻害剤である Rotenone を細胞へ添加することでパーキンソン病モデル細胞を作製できることが知られている。細胞レベルの解析では薬剤処理によるパーキンソン病モデル細胞等を用いて、Parkin 分解酵素 MITOL を軸とし研究計画に取り組んだ。1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) の投与により、7 日間でパーキンソン病のモデルマウスを作出することができる。そのため個体レベルの解析では薬剤誘導性パーキンソン病モデルマウスを用い、生体内での不溶性ニトロシル化 Parkin の毒性および MITOL との関連について明らかにすることとした。

【結果】 今回 MPTP 誘導性のパーキンソン病モデル神経特異的 MITOL 欠損マウスを作製し解析を行ったところ、パーキンソン病モデル MITOL 欠損マウスでは野生型に比べ不溶性 Parkin が顕著に増加し、病態の悪化が認められ、また Parkin の不溶性化は病態発症に先立って起こることが明らかとなった(下図)。細胞系では Parkin 自体に毒性があるという結果も得られた。これらより、Parkin が病態に先立って不溶性化し神経細胞毒性となる可能性が示唆された。現在、国内外を問わずパーキンソン病の病態発症メカニズムの 1 つは Parkin の“loss of function”だと考えられている。事実、細胞を用いた実験において Parkin は多くの基質を分解し、蓄積を防ぐことで細胞毒性を回避することが報告されている。しかし、多くの Parkin 欠損マウスにおける *in vivo* 解析では既存基質の蓄積はおろかパーキンソン病の病態すら見られなかった。過去に筋萎縮性脊索硬化症 (ALS) の病態メカニズムとして、当初の病因遺伝子 SOD1 の機能喪失 (loss of function) が原因という考えではなく、ミスフォールドタンパクとしての異常 (gain of toxic) が原因であることが近年証明され支持されている。よって、機能が正常な変異 Parkin をもつパーキンソン病患者の報告があることなどから、SOD1 の歴史的展開にみられるよう Parkin も同様に“gain of toxic”の可能性があるのでないかと考えられる。

パーキンソン病の新たな考え方



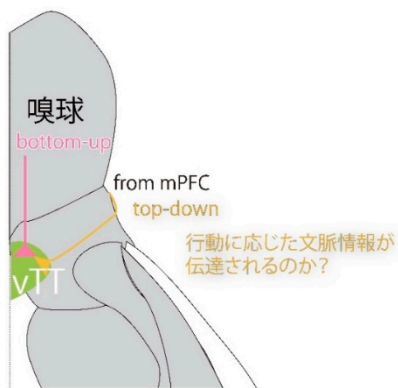
122 感覚情報に意味を持たせる神経メカニズム	塩谷 和基
-------------------------	-------

【目的】 我々は、その時の状況（文脈）に依存して感覚情報を処理し適切な行動を取る。しかし、文脈に応じて感覚情報を正しい行動に結びつける神経メカニズムはいまだ十分解明されていない。そこで私は、シンプルな解剖学的特性を持つ嗅覚系に着目し、特に末梢の感覚器官からの入力と適切な行動に必要な高次領域からの入力の双方を受ける嗅皮質を対象として、感覚-行動を結ぶ神経メカニズムの解明に取り組んだ。これまでの私の研究として、嗅皮質の一亜領域である ventral tenia tecta (vTT) の神経細胞が文脈に依存した動物の行動状態に対して応答することを見出した。そして vTT が高次領域である medial prefrontal cortex (mPFC) から解剖学的な直接入力を受けていることから、vTT で見られる行動状態に対する文脈依存性の応答は、mPFC からの入力を反映したものであるという仮説を立てた。そこで本研究ではこの仮説を検証し、嗅皮質の vTT が高次領域である mPFC から受ける文脈情報の解明と伝達機構を解明することを目的とした。

【方法】 特定波長の光を照射することでオプシンというたんぱく質を発現させた神経細胞の活動を人工的に抑制することができる光遺伝学的手法と単一の神経活動を記録する方法を組み合わせることで、vTT の行動状態の情報が mPFC からもたらされるかどうかを確かめた。具体的な方法として、まず、mPFC の神経細胞に特定波長の光を照射することで発現ニューロンを抑制させるオプシンであるアーキドロブシンをアデノ随伴ウィルスベクターを用いて発現させた。マウスが深静麻酔下で、数本のテロードと光ファイバーを目的の脳部位である vTT に挿入を行い、極小マイクロドライブをマウス頭蓋に安定的に固定させた。マウスが匂いから適切な行動を取るように、匂いと報酬の有無を連合させた嗅覚古典的条件付け課題を行った。1 回の行動課題の中でこれらの匂い刺激をランダムに提示し、匂い刺激と報酬の有無を連合しているのかについて、遅延区間における報酬を予測したマウスの舐め行動を基に判定を行った。こうした嗅覚古典的条件付け課題遂行中に、mPFC→vTT への入力の情報について光遺伝学的手法を用いて人為的に制御し、vTT 神経活動を記録することで mPFC→vTT に行動状態の情報が送られるかどうかを明らかにした。

【結果】 マウスが匂いから適切な行動を取るように、匂いと報酬の有無を連合させた嗅覚古典的条件付け課題の訓練を行った。訓練後、マウスが行動課題遂行中に、mPFC から vTT へと投射する mPFC 神経細胞の軸索を特定のタイミングで光抑制し、その際の vTT の活動を記録することで、mPFC から vTT に行動状態の情報が送られるのかどうかを明らかにした。結果として、これまでの自身の研究で見られたように、嗅覚古典的条件付け課題においても vTT の神経活動は、光抑制を行わない条件では文脈に依存した様々な行動に対して応答する神経細胞が見られた。こうした応答特性を持つ細胞に対して、mPFC から vTT へと投射する mPFC 神経細胞の軸索を光抑制することによって、光抑制を行わない条件に比べて vTT 神経細胞の活動が減ることが明らかとなった。これらの結果から、mPFC から vTT に行動状態の情報が送られていることが明らかとなった。

末梢の嗅球と mPFC からの入力を受ける vTT との関係性



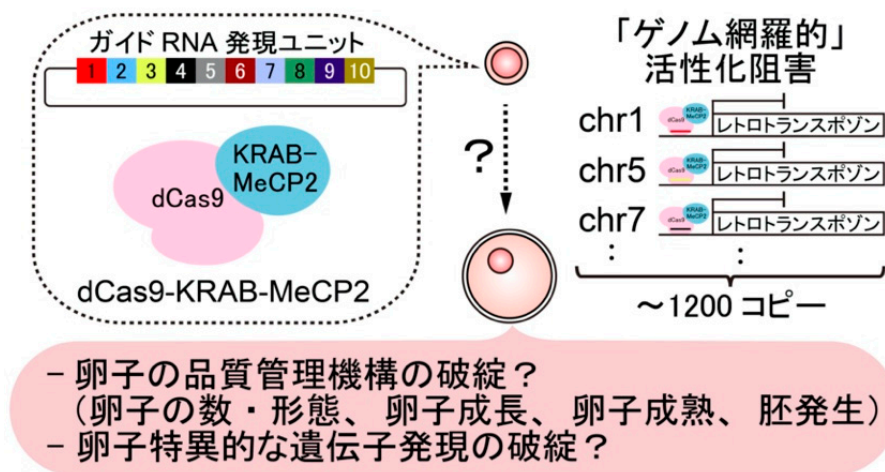
123	卵子におけるレトロトランスポゾン活性化の意義の解明	白根 健次郎
-----	---------------------------	--------

【目的】 哺乳類ゲノムの約半分はトランスポゾン配列で構成されている。その中でもレトロトランスポゾンは転写を介してゲノム中を転移する。したがって、次世代へ遺伝情報を伝える生殖細胞においてはレトロトランスポゾン発現の厳密な抑制が重要である。一方で、興味深いことに、卵母細胞の成長過程では、複数のレトロトランスポゾンコピーから転写が生じるが、卵母細胞におけるその発現は転移以外の役割を担う可能性がある。本研究では、なぜ卵母細胞ではレトロトランスポゾンを発現するのかという問いのもと、これらのゲノム網羅的な活性化阻害を試みる。その卵母細胞発生への影響を解析し、卵母細胞発生においてレトロトランスポゾンが発現する意義の解明を目指す。

【方法】 本研究では転写抑制ドメインを持つが DNA 切断活性をもたない Cas9 (dCas9-KRAB-MeCP2) と複数のガイド RNA により、卵母細胞発生過程において複数のレトロトランスポゾンコピーの活性化を阻害する実験系の構築を目指した。具体的には、胚性幹細胞を起点として誘導された始原生殖細胞様の細胞を胎齢 12.5 日胚由来の卵巣体細胞と凝集培養し、培養膜上で卵母細胞へと分化させる実験系を基盤とした。レトロトランスポゾン発現のゲノム網羅的な活性化阻害の実験に先立ち、卵母細胞レポーターの抑制を目指した予備的な検討を行った。まず、卵母細胞レポーターSTELLA-CFP を標的とする 4 種類のガイド RNA からなるユニットにより、卵母細胞発生過程において薬剤依存的にその抑制が可能かを検証した。次に、卵母細胞の RNA シークエンスのデータから、卵母細胞の発生過程において最も発現コピーの多いレトロトランスポゾンを同定した。これらのレトロトランスポゾンコピーに共通の塩基配列を抽出することで、ゲノム網羅的な活性化阻害のための複数のガイド RNA 候補を得た。最後に、これらを直列に連結したガイド RNA ユニットと dCas9-KRAB-MeCP2 を共に発現する胚性幹細胞を作製し、体外再構築系により卵母細胞へと分化誘導した。

【結果】 卵母細胞レポーター遺伝子の発現の抑制が可能かを検証した結果、4 種類のガイド RNA を直列に連結したガイド RNA ユニートを dCas9-KRAB-MeCP2 と共に発現させることで、卵母細胞において薬剤依存的に卵母細胞レポーター遺伝子の発現を抑制できることを確認した。また、*in silico* 解析により、標的のレトロトランスポゾンコピーの 99% を抑制可能な 10 種類のガイド RNA を選定した。現在は、これらを直列に繋いだガイド RNA ユニットと dCas9-KRAB-MeCP2 を共発現する胚性幹細胞から、同様の方法により体外で構築した卵巣における卵母細胞分化の評価を進めている。

卵母細胞におけるレトロトランスポゾン活性化の意義の解明

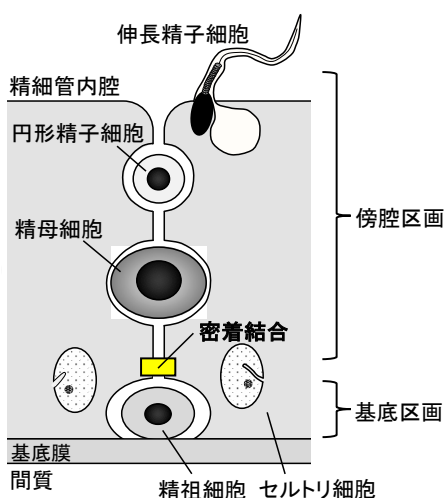


【目的】 哺乳動物の精巣で形成される精子は、次世代の個体発生を担う配偶子である。精子が精子幹細胞から適切に分化するためには、体細胞であるセルトリ細胞の支持機能が必須である。セルトリ細胞は上皮細胞であり、互いに接着することによって密着結合を主要構造とする血液精巣関門を形成する。セルトリ細胞間の密着結合が精子形成において重要な役割を担うことはマウスをモデルとした研究によって示唆されているものの、どのようなメカニズムで精子形成を制御するのかについては未だに明らかにされていない。筆者は、セルトリ細胞間の密着結合の構成分子であるクローディン-11 を欠損させたマウスを用いて解析を行い、クローディン-11 が精細管の基底膜上に存在する分化型精祖細胞の生存・維持に必要であることを見いだした。本研究では、分化型精祖細胞の増殖を促すことが知られている幹細胞因子 (Stem cell factor : SCF) に着目し、分化型精祖細胞の生存・維持がクローディン-11 によって制御される仕組みを理解することを目的とした。

【方法】 本研究では、セルトリ細胞における SCF の局在を免疫組織化学的に検討した。セルトリ細胞が発現する SCF の正確な局在を明らかにするために、抗悪性腫瘍剤であるブスルファン (44 mg/kg) をマウスに投与することによって生殖細胞系列の造精細胞を除去し、精細管にセルトリ細胞のみ存在する精巣を用いて解析を行った。ブスルファン処理した精巣を固定し、作製したパラフィン切片の免疫蛍光染色を行い、セルトリ細胞における SCF の局在を調べた。同様に、ブスルファン処理したクローディン-11 欠損マウスの精巣から作製したパラフィン切片を用いて免疫蛍光染色を行い、クローディン-11 が SCF の局在を制御するかどうかを調べた。さらに、セルトリ細胞だけでなく、極性化した上皮細胞において SCF がどのように局在するかを調べるために、C 末端に HA タグを付加した膜貫通型 SCF (SCF-HA) を安定発現させた培養上皮細胞 (イヌ腎臓上皮由来の MDCK II 細胞) を樹立し、免疫蛍光抗体法により SCF-HA の局在を調べた。

【結果】 ブスルファン処理により造精細胞を除去した精巣切片の免疫蛍光染色を行ったところ、造精細胞非存在下でも、密着結合の構成分子 (ZO1) は基底膜近傍のセルトリ細胞間の接着部位に局在していた。SCF もまた、セルトリ細胞間接着部位に集積していた。さらに、クローディン-11 を欠損したセルトリ細胞では、その SCF の集積が消失することがわかった。また、MDCK II 細胞に安定発現させた SCF-HA は、ラテラル膜に局在していた。以上の結果は、SCF が基底区画 (セルトリ細胞間の密着結合と基底膜によって挟まれた区画) に集積し、その局在がクローディン-11 によって制御されることを示唆する。

哺乳動物における精細管内の模式図

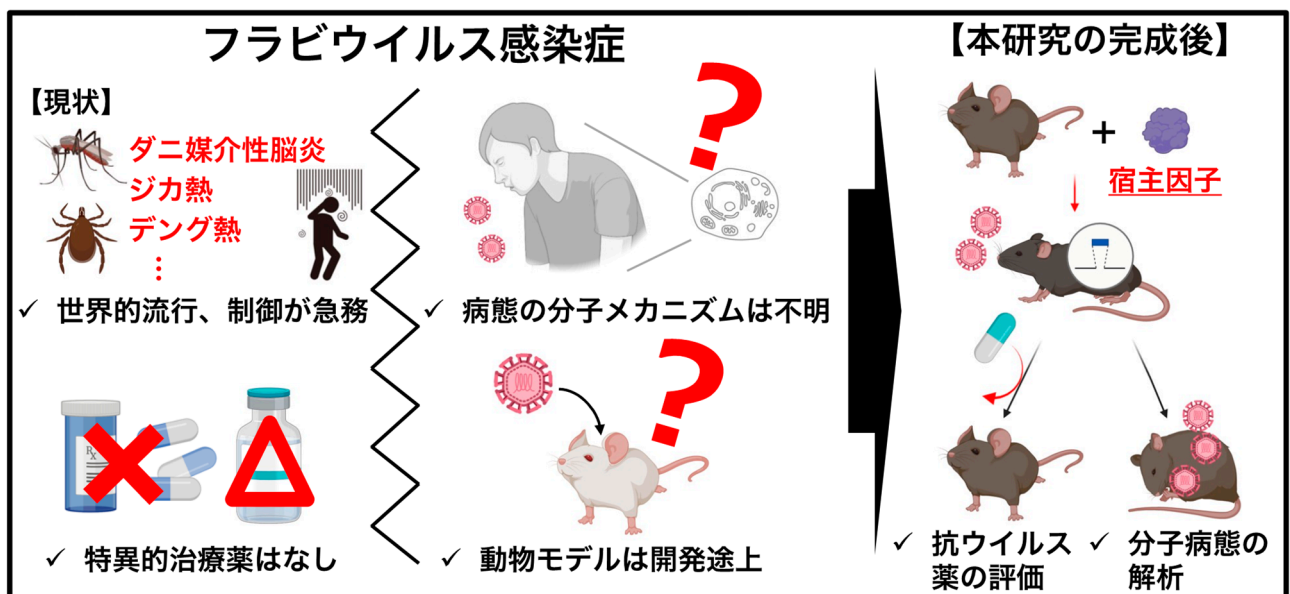


【目的】 フラビウイルスには、日本脳炎ウイルス、デングウイルス、ジカウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルスなどが属する。ジカ熱の世界的流行、デング熱の国内発生、ダニ媒介性脳炎による国内死亡例が報告されていることから、公衆衛生危機管理上重要な疾病の病原体である。現在までに有効な抗ウイルス薬はなく、対症療法しかない。また、ワクチンが実用化されていないフラビウイルス感染症が多数ある。その理由は現行の動物モデルが不十分で、病態の分子メカニズムが不明であるからである。これまでにマウスの自然免疫系の遺伝子に変異していることが、一般的な実験用マウスでの病態解析を困難にさせる一因と考えられている。一方で、自然免疫系の遺伝子を欠損したマウスの培養細胞でのフラビウイルスの増殖性も、ヒトの細胞と比較して著しく劣っていることがこれまでにわかっている。従って、本研究はマウスにおけるフラビウイルスの増殖に関与する新たな宿主因子の同定を目指し、企図された。

【方法】 まず、ウイルス感染細胞を分取し、単離することを可能とする各種フラビウイルスのレポーター遺伝子を搭載した組換えウイルスを作製する。次に、マウスの遺伝子を網羅する cDNA ライブラリーを用いて CRISPR/Cas9 システムを利用した遺伝子転写活性化 (CRISPRa) ライブラリーを構築する。ライブラリーをコードするレンチウイルスを作製し、マウスの培養細胞に感染させることでそれに安定的に発現させる。レポーター搭載フラビウイルスを感染させ、発光するウイルス感染細胞を分取し、単離することで、宿主遺伝子を同定する。さらに同定した宿主因子の機能を解析する。

【結果】 これまでに報告のある様々な種類の色の併せて 9 種類の蛍光タンパク質を各々搭載した組換え日本脳炎ウイルスの作製を試みた。その結果、その全てで自立増殖することができる組換えレポーターウイルスを得ることができた。次にレポーター遺伝子がウイルス遺伝子に安定して維持されるか否かを検証した。その結果、9 種類のうち、2 種類のみウイルスを 5 回連続継代してもレポーター遺伝子が維持されていた。さらに、作製した組換えウイルスをマウスに接種して、その増殖性を解析した。その結果、レポーター遺伝子を搭載した組換えウイルスの増殖性は親株と比較して著しく低下していた。そのため、スプリット型蛍光タンパク質の実験系を取り入れることで、親株と同等に増殖するレポーター遺伝子を搭載したフラビウイルスの作製に成功した。現在、マウスの遺伝子を網羅的に発現する CRISPRa ライブラリーをもとに、蛍光色にてウイルス感染細胞を単離するスクリーニング実験を実施している。

本研究の背景と展開

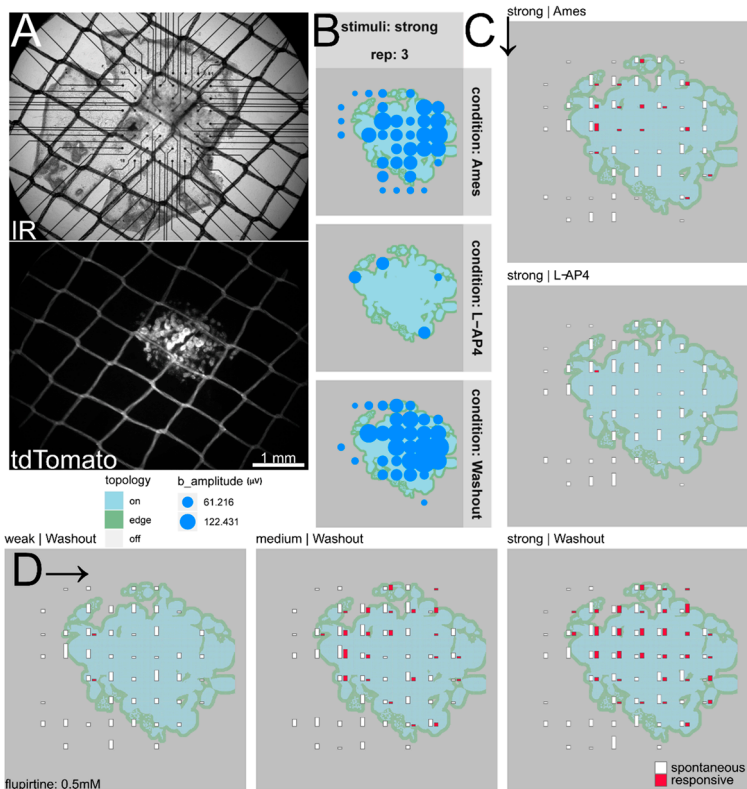


【目的】 中枢神経組織の一部である網膜は大別して 5 種類の神経細胞と 1 種類のグリア細胞から構成されるが、すべては共通の未分化網膜前駆細胞から細胞周期を出て分化成熟し、正確な神経回路を形成することによってはじめて光情報を適切に処理・統合することができる。光を受容する視細胞が障害される黄斑変性症や網膜色素変性症、神経節細胞が減少して視野障害を生じる緑内障などの網膜疾患は重篤な視覚障害や失明につながる。主に遺伝子変異が原因となる視細胞の機能障害・細胞変性に対して、様々な遺伝子治療や細胞移植治療の開発が進んでいる。しかしながら、健全な網膜回路の仕組みは過去数十年の間にほぼ明らかにされているにもかかわらず、視細胞の変性によって残された網膜内層細胞およびその回路がどのように変化するか、またはどのように治療に反応するかはほとんどわかっていない。本研究では、変性網膜における病的異常活動はどのように細胞移植による回路の再構築に関与するかを明らかにすることを目的とした。多電極アレイ記録による機能評価手法の確立とともに、移植網膜の系統的な定量評価を行い、異常活動を抑制する拮抗薬の投与によりマウス網膜の光応答性を比較した。

【方法】 変性マウス網膜に幹細胞由来網膜オルガノイドを移植し、多電極アレイシステムを用いて網膜レベルにおいて光応答性の回復を評価した。さらに変性網膜の病的な異常活動を抑制するために、移植後マウスの飲料水にカリウムチャンネル拮抗薬を投与し、光応答性の回復を比較した。

【結果】 移植網膜に特化した多電極アレイ測定および解析手法を確立した上、適量のカリウムチャンネル拮抗薬フルピルチンの長期投与により、AIIアマクリン細胞由来宿主網膜の異常活動を軽減し、移植視細胞との間のシナプス再形成そして網膜の光応答性の回復を促進する可能性が示唆された。

多電極アレイにおける光反応および移植片トポロジー

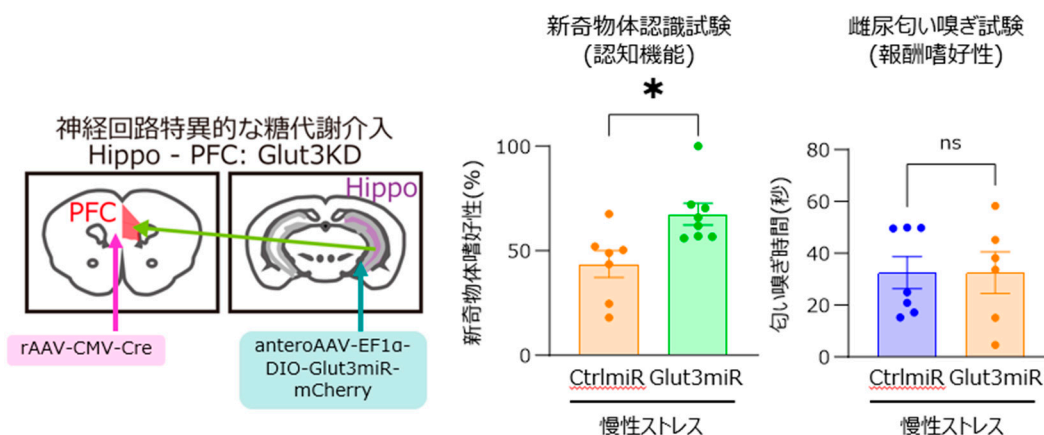


【目的】 社会や環境より受けるストレスはうつ病のリスクとなる。うつ病には脳代謝変容の関与が知られるが、その実態や機序、意義については不明な点が多い。我々はこれまで、マウスの慢性社会挫折ストレスを用いて、ストレスが前頭前皮質を中心とした多様な神経回路や代謝を独立に変化させ認知情動変容を招くことを示唆してきた。そこで本研究では、認知情動変容と関連する前頭前皮質の代謝変容の実態やその神経回路機序を明らかにすることを目的とした。さらに、前頭前皮質の機能変化には脳内や末梢の炎症も重要である。そこで前頭前皮質の代謝変化とミクログリアの活性化との間の因果関係解明や、ストレスによる末梢免疫臓器における炎症病像を担う分子機序解明も目的とした。

【方法】 マウスの社会挫折ストレスを用いて、前頭前皮質に生じる代謝変化を質量分析イメージングにより調べた。さらに、前頭前皮質において糖輸送体の発現抑制を行い、認知情動変容を抑制した上で代謝変化を調べ、認知情動変容や糖代謝変容と関連する代謝プロファイル調べた。並行して、ストレスによるミクログリア活性化に対する神経細胞糖代謝変容の関与を調べた。前頭前皮質と海馬がストレスによる共通した代謝物質変化を示すことに基づき、海馬から前頭前皮質に投射する神経回路特異的に糖輸送体を発現抑制し、認知情動変容への影響を調べた。ストレス後に末梢免疫臓器である骨髄や脾臓を回収し、細胞動態や脂質代謝物プロファイルを調べた。

【結果】 慢性社会挫折ストレスが前頭前皮質において六炭糖一リン酸と NADH/NAD 比の亢進を生じることを見出した。糖輸送体発現抑制により六炭糖一リン酸の亢進は抑制できなかったものの NADH/NAD 比は抑制されたことから、NADH/NAD 比、すなわち還元ストレスが認知情動変容と関連することが分かった。また、糖輸送体発現抑制によりミクログリア活性化が一部抑制され、そのため、ストレスによる代謝変容がミクログリア活性化に寄与することが分かった。海馬から前頭前皮質神経回路における糖輸送体発現抑制はストレスによる認知機能低下を抑制したことから、ストレスによる海馬—前頭前皮質回路における糖代謝変容がストレスによる認知機能低下を招くことが示唆された。このことは、ストレスによる認知情動変容において、特異的神経回路の代謝変化が重要であることを世界に先駆けて示すものである（下図）。さらに、ストレスにより骨髄や脾臓において抗炎症性脂質メディエーターの減少やリンパ球—骨髄性細胞シフトが生じることを見出した。すなわち、内因性抗炎症性脂質メディエーターの減少がストレスによる末梢炎症病像の形成に寄与する可能性が示唆された。以上の知見は、ストレスによる脳代謝リモデリングの実態や機序、意義の解明に資する。

慢性社会ストレスによる認知機能障害は海馬—前頭前皮質神経回路における糖輸送体依存的である



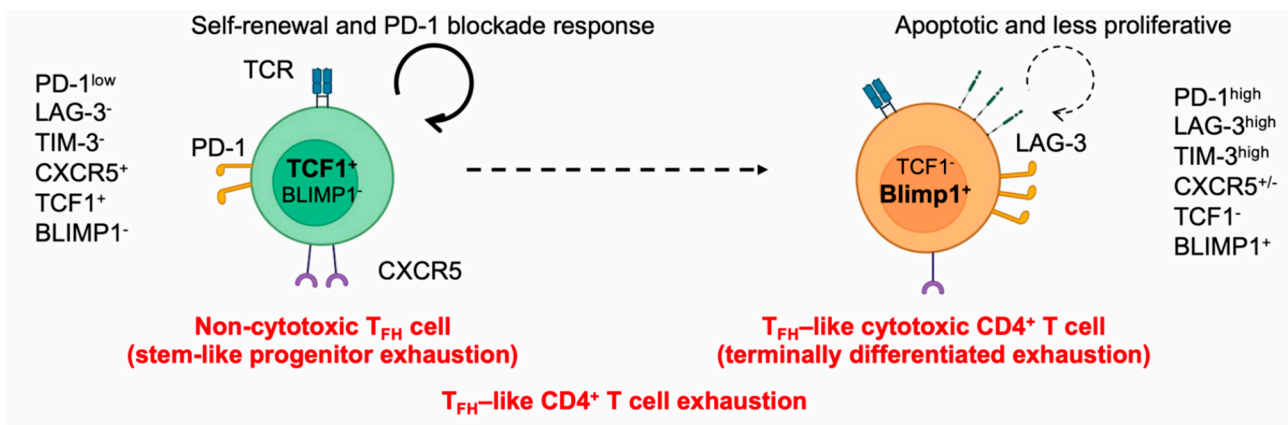
128 悪性リンパ腫での濾胞性ヘルパーT細胞の二面性の解明	長崎 謙慈
-------------------------------	-------

【目的】 がん免疫療法はその有効性が証明され広く臨床応用されているが、その効果は不十分で腫瘍微小環境 (TME) の本態解明が求められている。免疫チェックポイント阻害薬 (ICI) によって引き起こされる抗腫瘍免疫応答の中心は CD8 陽性 T 細胞とされている一方、CD4 陽性 T 細胞に関する報告は少ない。我々は ICI の効果が乏しいとされる悪性リンパ腫の TME では CD4 陽性 T 細胞が細胞傷害性を発揮し、ICI によってそれらが増強されることを見出した。さらに腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) のシングルセルシーケンスから、CD4 陽性濾胞性ヘルパーT細胞 (T_{FH}) の中に、細胞傷害性を有する新規の T_{FH} 様細胞集団の存在を同定した。これらを詳細に解析し、悪性リンパ腫さらには固形がんにおける CD4 陽性 T 細胞の抗腫瘍免疫応答での新しい役割を明らかにするために本研究を行った。

【方法】 メラノーマ患者の抗 PD-1 抗体治療前後の検体を用いて TIL と腫瘍細胞を分離した。TIL はシングルセルシーケンスを行い、個々の細胞の遺伝子発現と T 細胞受容体 (TCR) 配列を同時にシーケンスした。腫瘍細胞は *in vitro* で培養し細胞株として樹立した。シングルセルシーケンスの結果から T_{FH} のなかでも数的上位の TCR 配列を組み込んだウイルスベクターを作製し、T 細胞株 Jurkat 細胞に遺伝子導入した。これらを樹立した同一患者由来の腫瘍細胞株と共に培養し、TCR シグナル強度をルシフェラーゼアッセイを用いて評価して腫瘍と反応する腫瘍特異的 T 細胞を同定した。

【結果】 TIL のシングルセルシーケンスの結果から、T_{FH} の細胞集団の中に細胞傷害性を有する新規の T_{FH} 様細胞集団が存在し、*in vitro* のアッセイでそれらが MHC クラス II 発現腫瘍細胞を直接攻撃する腫瘍特異的な T 細胞であることを見出した。そこで従来から存在する従来型 T_{FH} と新規に同定した細胞傷害性 T_{FH} 様細胞の遺伝子発現を比較すると、従来型 T_{FH} は TCF1 高発現、BLIMP1 低発現である一方、細胞傷害性 T_{FH} 様細胞は TCF1 低発現、BLIMP1 高発現であり、これらは CD8 陽性 T 細胞における progenitor exhaustion および terminally differentiated exhaustion と同様の表現型であった。そこで、これらの遺伝子発現解析の結果を基に TCF1 を強制発現または BLIMP1 を発現抑制した T_{FH} の機能解析を行うと、双方ともグランザイム B の低下を認めたため、実験的にも従来型 T_{FH} と細胞傷害性 T_{FH} 様細胞は CD8 陽性 T 細胞の exhaustion の概念と同様であることが明らかとなった。以上のような T_{FH} の二面性に関して MHC クラス II が一般的に発現している悪性リンパ腫の TME で果たす役割を解明するための実験を進めている。

従来型 T_{FH} と細胞傷害性 T_{FH} 様細胞における疲弊の再定義



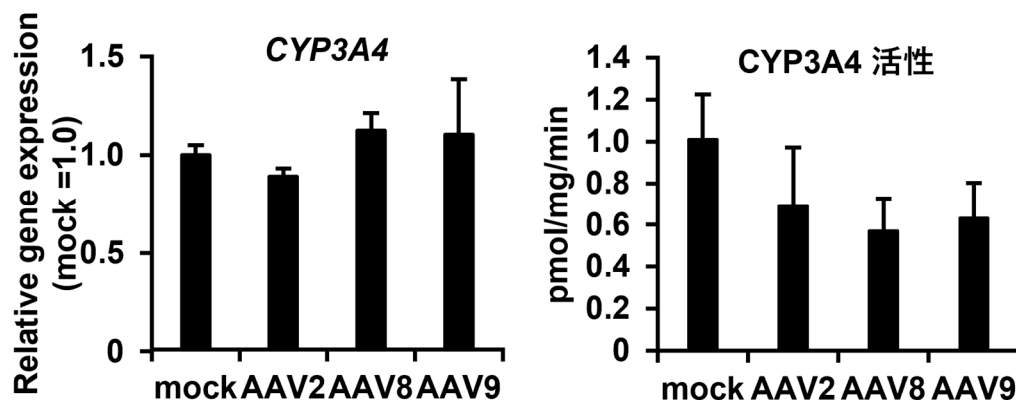
【目的】 アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターは末梢静脈からの投与でも効率的に遺伝子を導入できるため、様々な臓器を標的とした遺伝子治療用ベクターとして有望視されている一方、肝臓に集積することも知られている。そのため、肝障害マーカーなどを指標に安全性試験を行っている。AAV ベクターは、非病原性であると言われていたものの、AAV ベクターを投与された患者によっては、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) が顕著に増加すること、肝炎状態において肝臓のシトクロム P450 (CYP) の発現量が減少することが報告されている。しかしながら、AAV ベクター感染時における肝薬物代謝能の評価は行われていない。本研究では、AAV ベクター感染時における肝細胞の薬物代謝酵素発現量および活性が変動するのか評価する。

【方法】 CYP1A2、2C9、2C19、2D6、3A4、P450 オキシドレダクターゼ (POR)、UDP グルクロン酸転移酵素 (UGT) 1A1 を高発現したゲノム編集 HepG2 細胞に、各 Green Fluorescent Protein (GFP) 発現 AAV ベクターを 1.0×10^5 vg/cell で感染させた。AAV ベクター感染 4 日後、リアルタイム PCR、薬物代謝実験を実施した。

【結果】 AAV ベクター感染後の肝細胞マーカー発現量を解析した。肝細胞マーカーである α -フェトプロテイン (AFP)、アルブミン (ALB) 発現量は、mock 群と 2、8、9 型 AAV ベクター感染群の間で顕著な変化はなかった。次に、インターフェロンシグナル応答について評価するために、*interferon stimulated gene (ISG) 15*、*ISG56*、ミクソウイルス抵抗性タンパク質 A (*MxA*) 遺伝子発現量を解析した。ゲノム編集 HepG2 細胞における *ISG15*、*ISG56*、*MxA* 発現量は、2、8、9 型 AAV ベクター感染による変化はなかった。

次に、AAV ベクター感染後のゲノム編集 HepG2 細胞における薬物代謝酵素発現量および活性について評価した。臨床で使用されている医薬品代謝に大きな役割を果たす CYP1A2、2C9、2C19、2D6、3A4、UGT1A1 発現量および活性を評価することとした。まずは、CYP1A2、2C9、2C19、2D6、3A4、UGT1A1 発現量を解析した。2、8、9 型 AAV ベクター感染による CYP1A2、2C9、2C19、2D6、3A4、UGT1A1 発現量に顕著な変化はなかった。CYP1A2、2C9、2C19、2D6、UGTs 活性においては、遺伝子発現量の結果と一致して、2、8、9 型 AAV ベクター感染による活性の変化はなかった。一方で、CYP3A4 活性は、2、8、9 型 AAV ベクター感染により、低下傾向を示した。以上の結果より、ゲノム編集 HepG2 細胞において 2、8、9 型 AAV ベクター感染により、CYP1A2、2C9、2C19、2D6、3A4、UGT1A1 発現量に顕著な影響は与えないものの、CYP3A4 活性を阻害する可能性が示唆された。

ゲノム編集 HepG2 細胞における AAV ベクター感染後の CYP3A4 発現量および活性

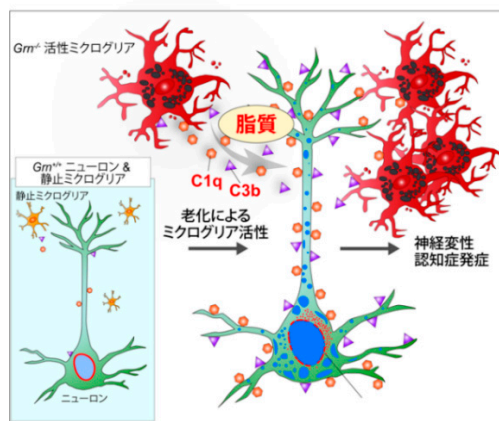


【目的】 認知症をはじめとする神経変性疾患の発症は、老化という過程の中で、脳を取り巻く環境が変わり、ニューロンの生存を脅かす影響を与えることが要因のひとつである。これまでに、若年性認知症の一種である、前頭側頭型認知症モデル・プログラニューリン欠損 ($Grn^{-/-}$) マウスの脳において、加齢に伴いミクログリアのボディーガード機能、すなわち貪食による不要物質除去機能と炎症物質産生機能が過剰に活発化し、攻撃状態となることを明らかにし、そのミクログリアが過剰な補体因子を分泌することでニューロンを攻撃することを見出した。加えて、認知症ミクログリアが補体だけでなく炎症性脂質の過剰分泌を介して神経変性を誘発することを見出した。脂質は認知症を発症させる要因なのだろうか？過剰な脂質摂取や代謝不良が生活習慣病を引き起こし、QOLを損なう実情にある。2007年には脂質代謝不良の状態が脂質異常症・リポドーシスと名付けられ、日本人の4人に1人は脂質異常症と推定されている。認知症の脳でも脂質蓄積、すなわちリポドーシスが起きているという傍証が次々と報告されているものの、どのような機構で認知症における免疫細胞が脂質代謝不良を引き起こすのか、その脂質代謝不良がどのように神経細胞死を誘発するのか、その答えは分かっていない。本研究の目的は、独自に開発したオルガネラ分画技術とマルチオミクスを融合させ、脳に常駐する免疫細胞であるミクログリアの脂質代謝異常が認知症発症に及ぼす影響を提示することである。

【方法】 13ヶ月齢前頭側頭型認知症モデル $Grn^{-/-}$ マウスにおいて脂質代謝異常を示すオルガネラを特定するために、脳を用いてオルガネラ分画を作製し、リポドミクス・プロテオミクス解析を行った。また、免疫組織染色により脂質代謝異常を示す細胞種の特定制を行った。 $Grn^{-/-}$ マウスにおいて、脂質代謝異常が神経変性を誘発する機構を検証するために、ミクログリア-ニューロン共培養システムを開発し、脂質代謝異常を示す $Grn^{-/-}$ ミクログリアが神経変性を誘発することを確認した。

【結果】 $Grn^{-/-}$ マウス脳オルガネラ分画液を作製し、オルガネラ局在とオミクスデータを融合させると、初期エンドソーム、リソソーム、ミトコンドリア、輸送小胞において年齢依存的な脂質蓄積が確認された。また、この脂質蓄積はミクログリアが発端であり、これに続く形式でニューロンでも脂質蓄積が始まった。続いて、 $Grn^{-/-}$ ミクログリアにおける脂質蓄積の起因を観察すると、脂質のエンドソーム-リソソーム輸送システムが崩壊し、脂質代謝異常が起きていることがわかった。またその結果、 $Grn^{-/-}$ ミクログリアは脂肪酸を過剰分泌していた。この $Grn^{-/-}$ ミクログリア由来過剰脂質の放出がニューロンに与える影響を、 $Grn^{-/-}$ ミクログリア-ニューロン共培養システムを用いて解析したところ、 $Grn^{-/-}$ ミクログリアは炎症性酸化リン脂質を介してニューロン細胞死や神経突起分岐減少を引き起こすことが示された。これらの結果から、ミクログリアが老化により様々な炎症性タンパク質だけでなく脂質までも分泌することでニューロンを攻撃し、前頭側頭型認知症を引き起こすことが証明された。

炎症物質を介した老化ミクログリアによる神経変性誘発

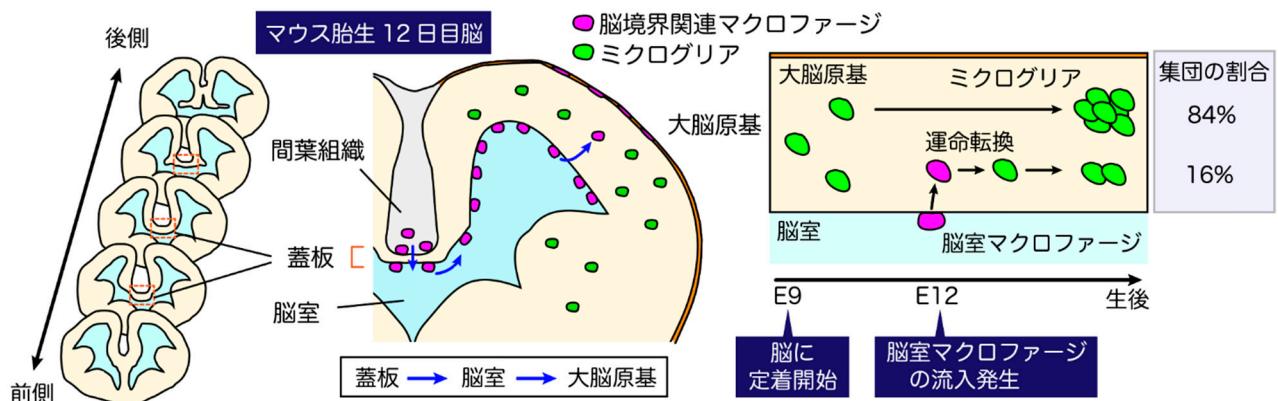


【目的】 脳には、神経細胞の他にも免疫系の細胞であるミクログリアが存在し、脳の機能を支えている。ミクログリアの成体脳におけるミクログリアの機能解明が進んできた一方、近年、胎生期や生後の脳においても神経前駆細胞の分化制御や血管形成・構造維持に関わるなどさまざまな役割を担うことが明らかになりつつある。一方で、近年急速に発展したシングルセル遺伝子発現解析により、ミクログリアには遺伝子発現的にも多様性があることが示されたが、どのようなプロセスを経て多様性を獲得するのかは依然不明である。そこで、ミクログリアがいかに多様性を獲得するのかについて明らかにするため、本研究では特に「ミクログリアが脳実質にたどりつくまでの分布経路あるいは定着時期が性質多様性に関係する可能性」について注目し、その検証とメカニズムを解明することを目的に、調べることにした。

【方法】 中枢神経系には、ミクログリアに加えて、非常によく似た性質を持つ異なる細胞集団である脳境界関連マクロファージが存在する。脳境界関連マクロファージは、脳膜（胎生期での呼称）やその後の髄膜（硬膜、くも膜、軟膜）、脳室、血管周囲スペース、脈絡叢といった血管・間葉組織系と脳実質の境界に位置する細胞集団である。ミクログリアと脳境界関連マクロファージは起源が同じであることが知られており、どちらも卵黄嚢内で形成される血島から生じる **Erythromyeloid progenitor (EMP)** に由来する。しかし、両者の運命選択がいつ・どこでなされるのかについては未解明である。そこで私たちは、マウスの脳スライス培養下ライブイメージング、二光子顕微鏡を用いた胎仔脳 *in vivo* イメージング（胎生早期のマウスに対する観察システムを新たに構築）、マクロファージマーカーのフェイトマッピング、細胞標識・追跡解析等を通じて、胎生早期にミクログリアが脳に定着する際にたどる分布ルートの同定やその細胞動態および分子メカニズムの解析を行った。

【結果】 マウススライス培養ライブイメージングの結果、脳室内腔に存在するマクロファージが胎生 12 日目に高頻度で大脳原基に侵入することを見出した。胎生 13~14 日目ではほとんど侵入が起こらないため、胎生 12 日目が脳室マクロファージの流入が起こりやすく、侵入を許容できる特有の時期であることが示唆された。また、胎仔脳 *in vivo* イメージングでもこの結果を示唆する結果を得ることができた。さらに、細胞標識・追跡解析、フェイトマッピング解析を通じて、大脳原基に侵入した脳室マクロファージが周囲の環境に呼応してミクログリアへと分化することを明らかにした。以上の結果から、ミクログリア・マクロファージの運命決定は脳に移行してから行われることを示唆し、大脳に分布するミクログリアの一部は脳室マクロファージに由来することが明らかとなった。したがって、マウスにおいて脳内のミクログリアは少なくとも二つの異なる定着ルートをたどる細胞集団からなり、胎生 9~10 日目頃にミクログリアの性質を備えて脳に定着を開始する群に加えて、その後遅れて（胎生 12 日目）脳室から流入する群が存在することが分かった。

脳室マクロファージを介したミクログリアの脳定着ルート

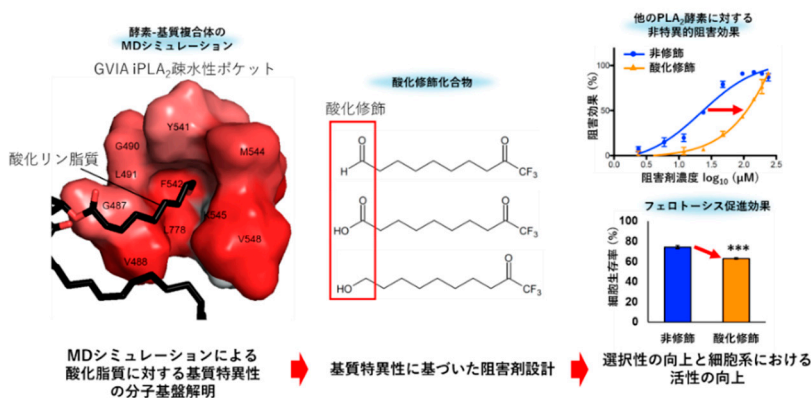


【目的】 Phospholipase A₂ (PLA₂) は、生体膜の主要な構成要素であるリン脂質の *sn*-2 位の脂肪酸を加水分解する酵素群である。中でも、Group VIA calcium-independent PLA₂ (GVIA iPLA₂, iPLA₂ β, PLA2G6, PNPLA9とも呼ばれる) は、神経疾患や癌をはじめとする様々な疾患との関連が報告されている。これまでに、GVIA iPLA₂ が、酸化リン脂質を分解することで、癌細胞を、フェルトーシスと呼ばれる細胞死から保護していることが報告されており、GVIA iPLA₂ 阻害剤のフェルトーシス増強作用が注目されている。これまでの研究において、ヒトの主要な PLA₂ の中でも GVIA iPLA₂ が特定の酸化リン脂質にのみ高い活性を示すことが分かってきている。そこで本研究では、GVIA iPLA₂ の酸化リン脂質に対する特異性の分子基盤を、分子動力学 (MD) シミュレーションによって検証した。また、その特異性を阻害剤開発に応用することで、より効果及び選択性の高い化合物が設計できると考え研究を行った。

【方法】 GVIA iPLA₂ の酸化脂質に対する基質特異性の分子基盤を解明するために、全原子 MD シミュレーションを行った。GVIA iPLA₂ の基質結合領域に種々の酸化脂質を配置し、酵素-基質-脂質二重膜複合モデルを構築した。シミュレーションは NAMD 3.0 ソフトウェアを使用し、310.15 K、1 気圧の条件で CHARMM 36 m 力場を用いて 1 μsec 実施した。さらに、GVIA iPLA₂ の酸化脂質に対する特異性を基に、阻害剤をデザインし、合成した。合成した阻害剤の、種々の PLA₂ に対する阻害効果を、質量分析計を用いた *in vitro* 活性測定系により評価した。また、これらの阻害剤のフェルトーシス促進効果を検証するために、阻害剤とフェルトーシス誘導剤である RSL-3 を共作用させた際のヒト結腸癌細胞由来 HCT116 細胞の細胞生存率を測定した。

【結果】 全原子 MD シミュレーションの結果、GVIA iPLA₂ の酸化リン脂質、特に、酸化切断された脂肪酸を持つリン脂質に対する基質特異性は、GVIA iPLA₂ の基質結合部位の疎水的環境が重要であることが明らかになった。そこで、酸化リン脂質と同様、カルボキシ基、アルデヒド基、ヒドロキシ基を持つ酸化修飾化合物を合成し、GVIA iPLA₂ に対する阻害効果を検証したところ、ヒドロキシ基を持つ化合物が最も高い阻害活性を有することを見出した。そこで、既存の阻害剤をヒドロキシ基によって修飾し、ドッキングシミュレーションにより GVIA iPLA₂ との結合を評価したところ、既存の化合物よりも結合の親和性を示すスコアが向上した。この酸化修飾体を合成し、GVIA iPLA₂ に対する阻害効果を既存のものと比較したものの、阻害効果の向上は認められなかった。一方で、酸化修飾体は既存のものに比べて GVIA iPLA₂ に対する選択性が向上することが明らかとなった。また、培養癌細胞を用いて、これらの阻害剤のフェルトーシス促進効果を検証したところ、酸化修飾体の方がより強くフェルトーシスによる細胞死を促進することが明らかとなった。本研究により、酸化修飾による阻害効果の向上は見られなかったものの、その選択性や細胞系における効果の向上が見られた。本研究は、酵素の基質特異性を応用した阻害剤開発が有効であることを示すものであり、今後修飾条件の検討により、さらなる阻害剤の改良が見込まれる。また本アプローチは、他の様々な酵素への応用が可能である。

本研究の研究アプローチと成果の概要

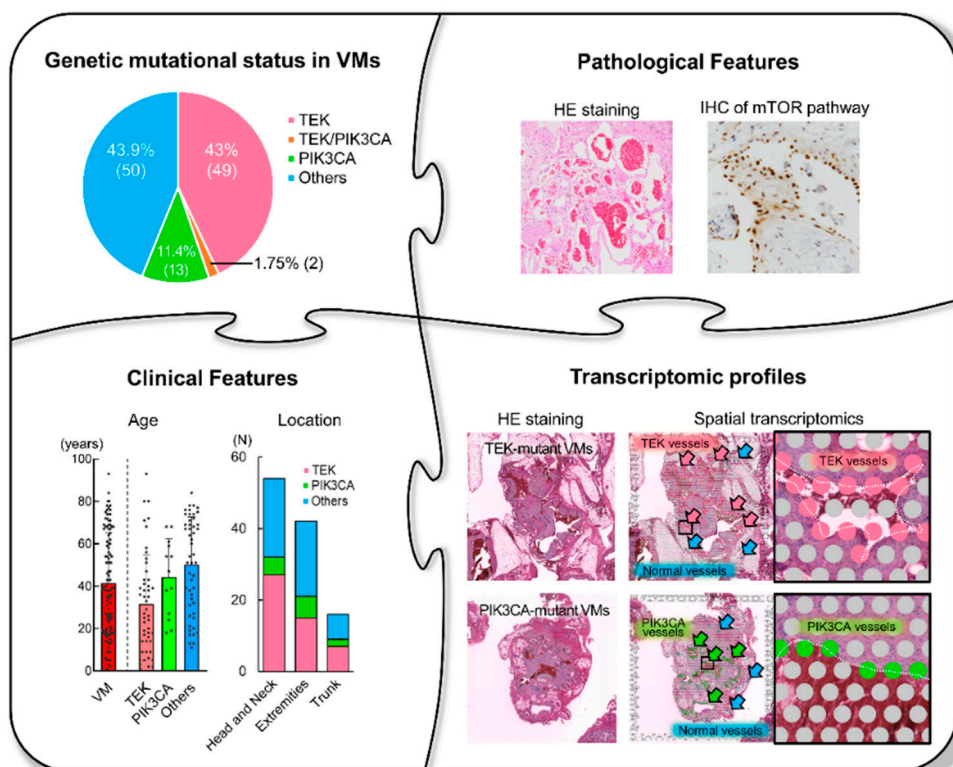


【目的】 静脈奇形は、脈管異常のなかで最も発生頻度が高い疾患であり、原因遺伝子として *TEK* 遺伝子変異あるいは *PIK3CA* 遺伝子変異が検出される。両遺伝子変異ともに *PI3K/AKT* 経路を介して病態発生に関与していると考えられているが、その詳細な分子メカニズムは不明な点が多い。本研究では、静脈奇形における変異遺伝子型と、臨床病理学的特徴、*PI3K/AKT/mTOR* 経路活性化状態、mRNA 発現パターンとの関連性を明らかにすることを目的とした。

【方法】 114 例の静脈奇形患者の病理検体を用いて、次世代シーケンサーにより遺伝子変異を解析した。変異遺伝子型と、臨床病理学的所見、*mTOR* 経路活性化状態の比較を行った。また、空間的トランスクリプトミクス解析により、変異遺伝子型と奇形血管における mRNA 発現パターンの比較を行った。

【結果】 *TEK* 遺伝子変異は 49 例 (43%)、*PIK3CA* 遺伝子変異は 13 例 (11.4%)、*TEK/PIK3CA* 遺伝子変異は 2 例 (1.75%) で検出された。両遺伝子変異が検出されない症例 (other 変異症例) は 50 例 (43.9%) であった。*TEK* 変異症例は、若年患者に多くみられ、皮膚浸潤の頻度が高く、リンパ球の集簇を認めなかった。性別、発生部位、奇形血管の大きさ、血管密度、血管平滑筋の厚さには、変異遺伝子型間で有意差は認められなかった。免疫組織化学的解析の結果、*TEK* 変異症例における活性化型 AKT (p-AKT) の発現は、*PIK3CA* 変異症例や other 変異症例よりも高かった。活性化 *mTOR* (p-mTOR) とその下流エフェクターの発現は、正常血管と比較して、変異遺伝子型に関係なく静脈奇形で高かった。空間トランスクリプトミクス解析の結果、*TEK* 変異を有する静脈奇形では “blood vessel development”、“positive regulation of cell migration”、“extracellular matrix organization” に関連する遺伝子が高発現しており、*TEK/AKT/SP1* 経路の活性化が病態発生に関与していることが示唆された。この経路の詳細な解析は、将来的に静脈奇形 *TEK* 遺伝子変異を標的とした治療薬開発へとつながるものと考えられる。

病理検体を用いた静脈奇形の包括的解析

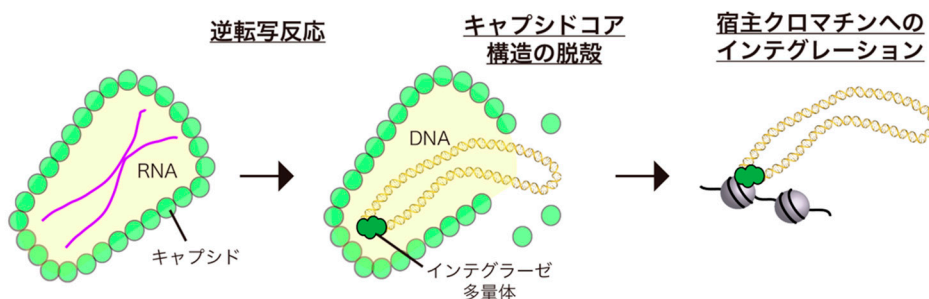


【目的】 本研究の目的は、HIV 感染プロセス—特に、ウイルス膜とヒト細胞膜の融合から始まり、キャプシドコア内のウイルス RNA の逆転写、二本鎖 DNA への変換、さらにウイルス DNA が宿主クロマチンに組み込まれるまでの過程—の分子機構を明らかにすることである。これらの反応は抗 HIV 治療の重要なターゲットであり、その深い理解は新たな治療戦略開発に必須である。しかし、これらの過程は完全には解明されていないため、本研究では細胞生物学的手法、生化学的手法、構造生物学的手法により、HIV 逆転写反応からインテグレーションに至るまでの詳細なメカニズムを解析することを目指した。

【方法】 宿主エピゲノム機構を利用した HIV-1 複製機構の解明のために、HIV-1 のエピゲノム制御因子を Proteomics of isolated chromatin segments (PICh) 法および siRNA スクリーニングにより同定した。さらに、細胞生物学および生化学的手法により、HIV-1 ゲノムに形成されるエピゲノム動態を解析した。また、HIV-1 複製反応、特に逆転写反応を時空間的に解析するために、高効率の無細胞 HIV-1 逆転写反応系の構築を行った。さらに、逆転写反応の場となるキャプシド複合体のクライオ電子顕微鏡解析を実施した。

【結果】 PICh 法および siRNA スクリーニングにより、POLE3 を HIV-1 のエピゲノム制御因子として同定した。また、POLE3 はインテグレーション前の HIV-1 DNA に集積し、そのサイレンシングに機能することで、宿主ゲノムへの HIV-1 DNA の取り込みを担保し、HIV-1 複製を効率的に進行させる因子であることを明らかにした。一方で、HIV-1 の逆転写反応を時空間的に解析するために、高効率の無細胞 HIV-1 逆転写反応系を構築した。また、qPCR 法により、逆転写反応の各ステップにおける産物を検出し、その時間情報を得ることに成功した。さらに、逆転写反応の場となるキャプシド複合体のクライオ電子顕微鏡解析を行い、HIV-1 キャプシド複合体に関する構造解析基盤を構築した。構築した無細胞 HIV-1 逆転写反応系に本構造解析技術を適用することで、逆転写反応中の HIV-1 キャプシド複合体に関する空間情報を取得できることが期待される。

HIV-1 複製メカニズムの解明



—宿主エピゲノム機構を利用したHIV-1複製機構の解明
(細胞生物学的手法、生化学的手法)

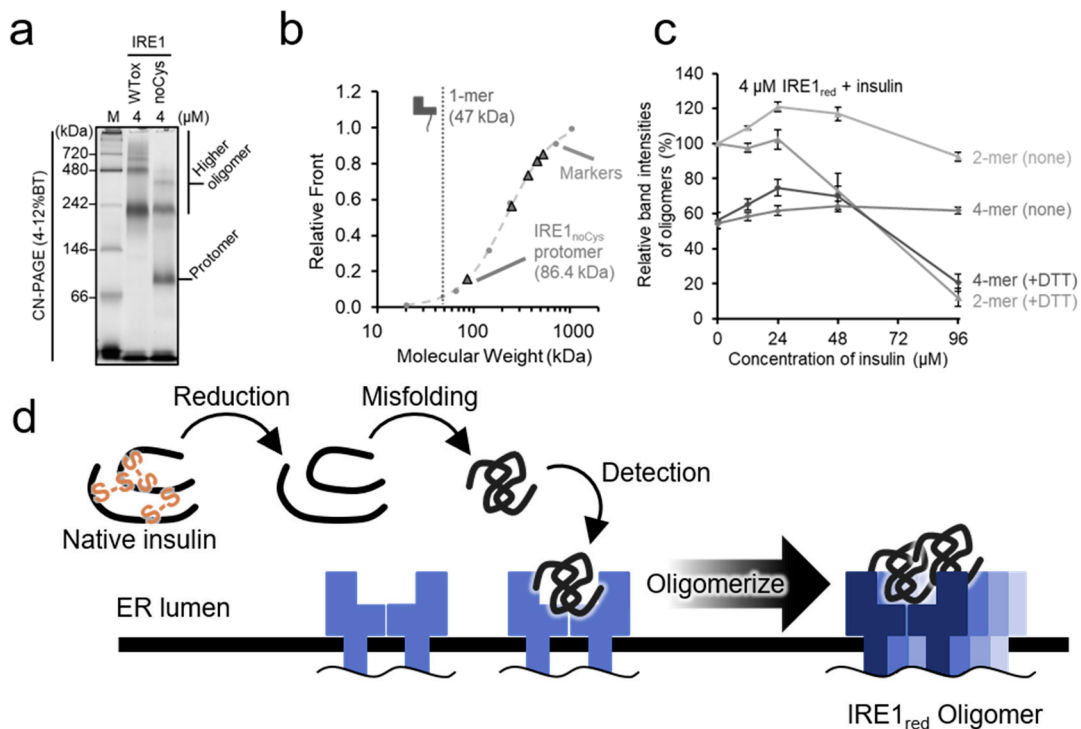
—無細胞HIV-1複製システムによるHIV-1複製の時空間的解明
(構造生物学的手法、生化学的手法)

【目的】 II型糖尿病は、膵臓の細胞（膵島β細胞）の不可逆的な減少によって悪化していくが、糖尿病初期の従来の治療薬であるスルホニルウレア剤などはインスリン生産量を上げるものの、β細胞死を促進する副作用があるため長期的な視点での治療効果は限定的である。糖尿病の根源的治療法開発のためには、β細胞死を制御するメカニズムを分子レベルで解明し、細胞保護および細胞死抑制を両立する薬剤開発の基盤を構築することが急務である。

【方法】 膵島β細胞死を制御するメカニズムを分子レベルで解明し、薬剤開発の基盤を構築するため、本研究では、小胞体ストレスセンサーIRE1の超分子多量体について、1. Clear Native PAGE (CN-PAGE) 法を用いた動態解析、2. 極低濃度域における多量体構造解析、3. 低分子試薬によるIRE1多量体化制御の検討、4. 細胞レベルの細胞保護活性の検討を行った。

【結果】 CN-PAGE法を用いた動態解析により、IRE1内腔ドメインは、直接的に活性酸素やタンパク質凝集体をストレスとして感知し、超分子多量体を形成することが示唆された。極低濃度域における多量体構造解析から、IRE1の二量体化は、自発的に生じており、二量体が構成単位となって、分子間ジスルフィド結合形成やインスリン凝集体形成に応答した超分子多量体形成が起きていることが示唆された。IRE1多量体が含む分子間ジスルフィド結合について、レドックス低分子試薬による影響を検討し、効率よく作用する分子を同定した。レドックス低分子試薬による細胞レベルの細胞保護活性を検討、ストレスの軽減を示唆する結果を得た。これらの結果から、開発したレドックス低分子試薬が、IRE1超分子多量体に含まれる分子間ジスルフィド結合を制御することで、IRE1超分子多量体形成の下流シグナルを調節し、細胞保護に働く可能性を見出した。

IRE1内腔ドメインの会合状態分布の可視化とストレス感知による多量体形成促進

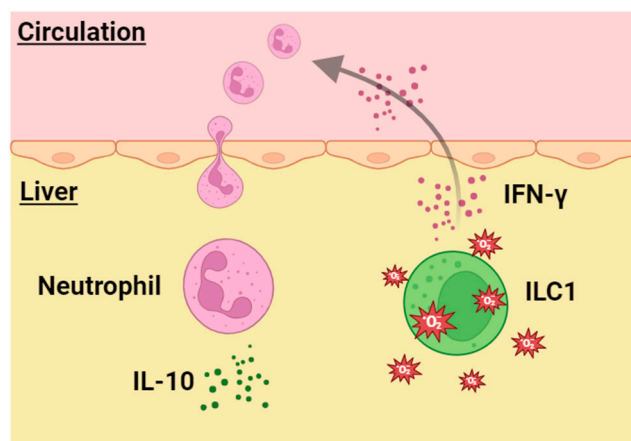


【目的】 1型自然リンパ球 (ILC1) は肝臓に豊富に存在し、インターフェロン- γ (IFN- γ) 産生能を有し、組織修復・保護に働く。近年、ILC1 が酸素ストレス応答を介して IFN- γ を産生することが示唆されている。これらことから、ILC1 は酸素ストレス応答を有し、IFN- γ を産生することで肝保護に働くと推論される。そこで、ILC1 で高発現するグルタミン酸受容体に着目し、免疫細胞遺伝子発現データベース ImmGen にて発現解析を実施したところ、代謝型グルタミン酸受容体 mGluR4 をエンコードする *Grm4* が高発現することを見出した。しかし、詳細な分子制御機構と ILC1 の虚血性障害における役割は明らかとなっていない。そこで本研究では、肝虚血再灌流障害 (IRI) モデルマウスを用いて ILC1 の酸素ストレス応答と病態増悪機構を解明した。

【方法】 1. 肝 IRI 後の血中グルタミン酸濃度及び ILC1 の mGluR4、IFN- γ 発現解析：ナイーブ肝、虚血中及び肝 IRI 1 時間後のマウスから血漿を採取し、血中グルタミン酸濃度を解析する。また、ナイーブ肝 ILC1、虚血中及び肝 IRI 1 時間後の肝 ILC1 の細胞数、mGluR4 及び IFN- γ の発現を FACS 及び qPCR で解析した。2. mGluR4 の二量体形成の解析：代謝型グルタミン酸受容体の大部分は、二量体を形成することで下流のシグナルが活性化される。そこで、ナイーブ肝 ILC1、虚血終了直後及び肝 IRI 1 時間後の ILC1 を純化し、二量体形成をウェスタンブロット法により解析した。3. IFN- γ 依存的炎症性細胞動員数及び肝障害の評価：野生型及び *Ifng*^{-/-}マウスに肝 IRI を惹起し、5 時間後の肝臓における好中球、炎症性単球、クッパー細胞、樹状細胞数を評価した。また、血中 ALT、肝壊死領域を評価した。4. IFN- γ 依存的肝保護因子の同定：抗炎症性サイトカインに着目し、肝 IRI 5 時間後の好中球、炎症性単球、クッパー細胞、樹状細胞の IL-10 の発現を qPCR で解析した。5. IFN- γ を介した IL-10 依存的肝障害の評価：野生型及び *Ifng*^{-/-}マウスに肝 IRI を惹起し、虚血終了直後に IL-10 中和抗体を投与する。肝 IRI 6 時間後の血中 ALT 及び肝壊死領域を評価した。

【結果】 肝 IRI 後の血中グルタミン酸濃度及び ILC1 の mGluR4、IFN- γ 発現解析：ナイーブ肝と比較して、虚血終了直後のグルタミン酸濃度に変化はなかったが、肝 IRI 1 時間後のグルタミン酸濃度は有意に増加した。虚血直後、肝 IRI 1 時間後に mGluR4 陽性 ILC1 は確認されたが、陽性細胞数の割合に変化はなかった。一方、肝 IRI 1 時間後の肝 ILC1 の *Ifng* mRNA 発現量は有意に増加した。肝 IRI 5 時間後の炎症性細胞数を比較したところ、IFN- γ 欠損マウスでは、野生型マウスと比較して好中球及び炎症性単球の細胞数が有意に減少した。また、肝 IRI 5 時間後の炎症性細胞における *Il10* mRNA 発現量を解析したところ、好中球で *Il10* 発現量が有意に増加した。最後に野生型及び IFN- γ 欠損マウスに肝 IRI を惹起し、虚血終了直後に IL-10 中和抗体を投与し肝障害を評価したところ、野生型マウスではコントロール抗体を投与したマウスと比較して、肝障害が増悪した。一方 IFN- γ 欠損マウスでは肝障害に差異はなかった。

肝 IRI における酸素ストレス応答を介した ILC1 の肝保護機構

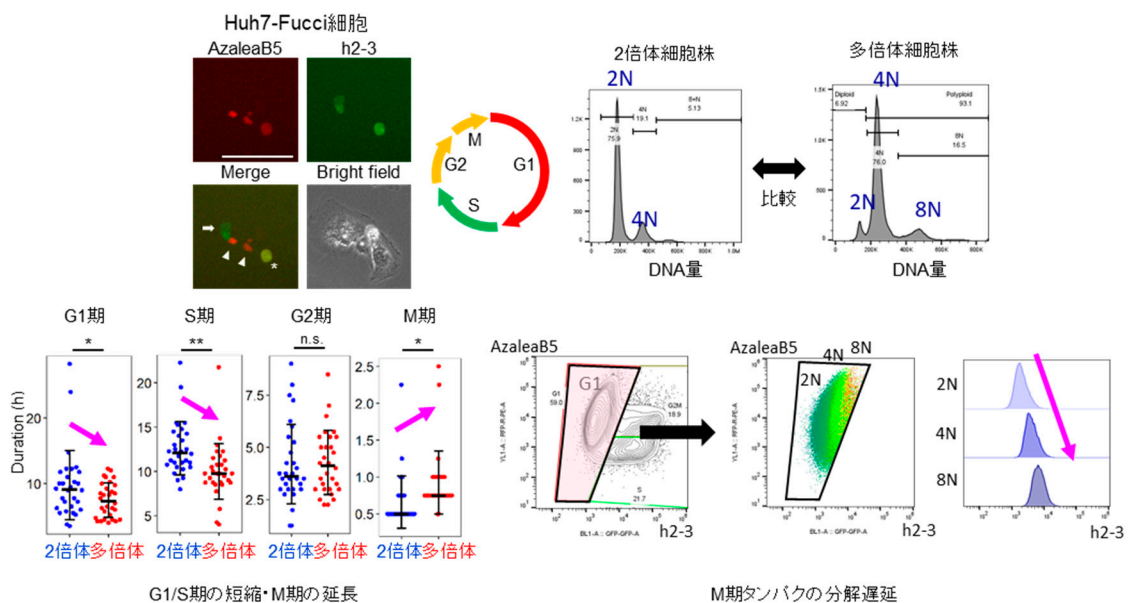


【目的】 がんではゲノムの倍加（多倍体化）がしばしば認められ、多倍体化は染色体不安定性を惹起し、がんのクローン進化と予後不良につながるとされる。このため、ゲノムの多倍体化に着目し、多倍体がん細胞の特に細胞増殖の弱点を標的とした治療を確立することができれば、予後不良な多倍体がん、染色体不安定性を示すがんに特異的な治療戦略となることが期待されるが、未だ多倍体がん、染色体不安定性を示すがんに特異的な治療法は確立されていない。我々は、増殖する多倍体がん細胞では特にUBE2Cという細胞周期進行に関わるユビキチンE2結合タンパク質が高発現していることを先行研究において見出した。そこで本研究では、多倍体がん細胞がその増殖過程においてユビキチン・プロテアソームシステムに何らかの変化を生じている可能性に着目し、同システムを多倍体がんの治療標的とするための基礎的検討として、倍数性の違いに伴う細胞周期の進行とUPS制御の変化について検討することを目的とした。

【方法】 ヒト肝がん細胞株 Huh7 を用いて Fucci を安定的に発現する細胞 Huh7-Fucci を作製した。2倍体細胞または4倍体細胞を主として構成される、異なる倍数性プロファイルを示す細胞株（2倍体株、多倍体株）を樹立し両者をタイムラプス解析することにより、倍数性に伴う細胞周期の進行やタンパク質のユビキチン化分解動態の変化を評価した。また、細胞周期進行過程でのユビキチン化に重要な役割を果たすUBE2Cやそのドミナントネガティブ変異体を発現誘導することにより、UBE2C自体が治療標的となりうるのかどうかについて評価した。

【結果】 複数の Huh7-Fucci 株を作製し、そのG1期細胞の倍数性をフローサイトメトリーにより評価することで、2倍体細胞または4倍体細胞を主として構成する、2倍体細胞株、多倍体細胞株を得た。両者の細胞周期の進行をタイムラプス観察により評価したところ、多倍体細胞株は2倍体細胞株に比べ、細胞周期全体の長さ、およびG1期、S期の時間が有意に短かった。一方、多倍体細胞株はM期において染色体が赤道面に並ぶためにかかる時間が長く、M期全体の長さも2倍体細胞株より優位に長かった。特に多倍体細胞株は、M期終了後のG1期、S期への進行が早く、この移行中におけるGemininの分解をFucciの蛍光タンパクの輝度によりモニターしたところ、倍数性が高い細胞ほどGemininの分解が遅延していることが示唆された。多倍体化することによる、細胞周期中のタンパク質のユビキチン化・分解の遅延が示唆されたため、UBE2Cを過剰発現、あるいはドミナントネガティブ体の発現により阻害することで、多倍体細胞の減少が認められるか検討したが、これらの処理ではHuh7細胞における多倍体細胞の出現は抑止されなかった。

倍数性の違いに伴う細胞周期進行とユビキチン化タンパク分解の変化

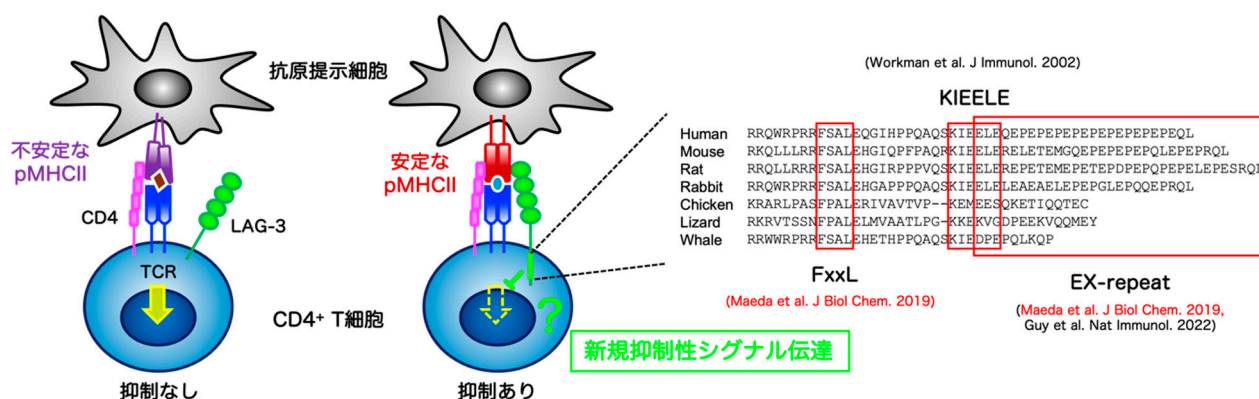


【目的】 LAG-3 (Lymphocyte activation gene-3) は PD-1 と CTLA-4 に次ぐがん免疫療法の有力な標的として期待され、すでにかん治療薬として LAG-3 阻害抗体の臨床応用が始められているが、LAG-3 の免疫抑制の分子機構については多くの謎が残されている。我々はこれまでに、LAG-3 がペプチドと主要組織適合遺伝子複合体クラス II 分子の複合体 (pMHC II) を構造依存的に認識することで T 細胞の活性化を選択的に抑制する、という特徴的な分子機構を明らかにしてきた。さらに、LAG-3 の細胞内領域に抑制能を発揮するのに必須かつ未知のモチーフ (FxxL, EX-repeat) を同定し、抑制性のシグナルを伝達している可能性を見出したが、その作用メカニズムは全く不明であった。そこで本研究では、LAG-3 による新規抑制性シグナル伝達の分子機構を明らかにすることを目的とした。

【方法】 これまでに、免疫補助受容体およびそのリガンドが T 細胞活性化に与える影響を定量的且つ鋭敏に検出可能な共培養実験系を確立している。本研究では、この実験系に「近接依存性標識法」を組み合わせることで、リガンドとの結合あるいは T 細胞活性化依存的に LAG-3 の細胞内領域に会合する分子の同定を試みた。

【結果】 まず、近接したタンパク質の標識を触媒する酵素を細胞内領域に融合した LAG-3 の機能について、共培養実験系を用いて評価したところ、リガンドとの相互作用依存的な抑制機能を維持していることが確認できた。次に、添加する基質濃度、抗原ペプチド濃度および培養時間を検討し、LAG-3 による抑制が強く認められ、かつ融合した酵素によって近接タンパク質が十分に標識される条件を ELISA 法およびウエスタンブロッティングによって決定した。その条件において、酵素融合 LAG-3 によって標識されたタンパク質を質量分析法によって網羅的に解析したところ、LAG-3 自身を含む 673 種類のタンパク質に由来する 891 種類のペプチドを同定した。抗原刺激の有無およびリガンドである pMHC II との結合能を欠く LAG-3-P111A 変異体を用いた解析の結果を比較することで、T 細胞の活性化あるいはリガンドとの結合依存的に LAG-3 細胞内領域に会合する複数の候補分子を得ることに成功した。今後、同定した候補分子について RNA 干渉を用いた遺伝子ノックダウン、または CRISPR/Cas9 法を用いた遺伝子ノックアウトを行い、LAG-3 による抑制に与える影響を確認することで LAG-3 による抑制性シグナル伝達の分子機構を明らかにしていく予定である。

本研究の目的 : LAG-3 を介した新規抑制性シグナル伝達の分子機構の解明

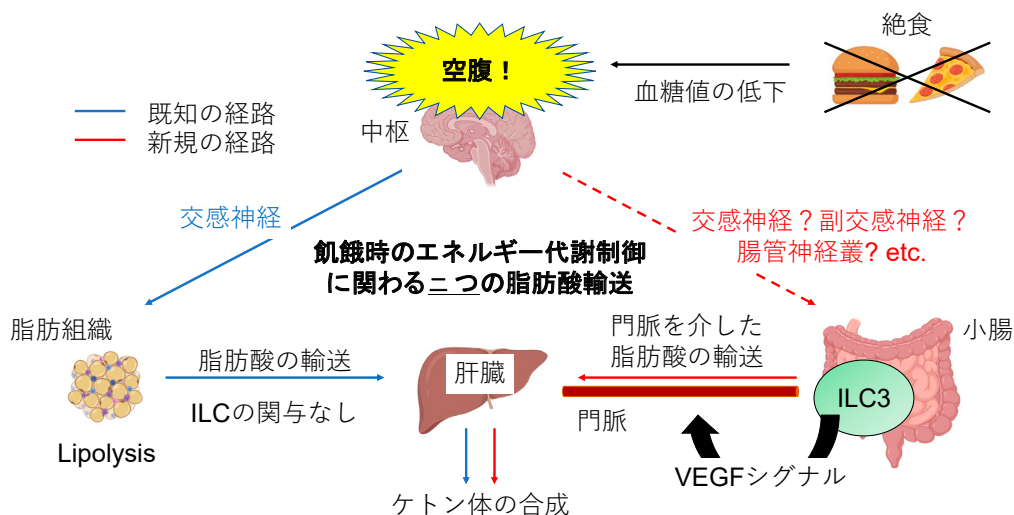


【目的】 飢餓時における代謝系と免疫系の関係を体系的に捉えた研究はほとんど存在しない。したがってこの部分に焦点を当て研究を展開することで、代謝系を適切に制御する上での新たな視点が得られるのではないかと考えた。飢餓状態を実験的に再現する上で絶食試験は有効である。絶食によって体内の糖質レベルが低下すると、肝臓は脂肪酸を基質にケトン体と呼ばれる代謝産物を合成し、末梢のエネルギー源として分配する。予備検討の結果、小腸常在型の免疫細胞である3型自然リンパ球 (ILC3) を欠損したマウスはケトン体の合成能が低く、絶食時の活動量も野生型マウスに比べて有意に少ないことが明らかとなった。そこで本研究はILC3を介したケトン体合成制御機構の全容解明を目指した。

【方法】 絶食前後で C57BL/6N 雄マウスから血液や小腸の細胞を調製し、リポドミクス解析や single cell RNA-sequence 解析を実施することでケトン体合成系における ILC3 の作用点を特定した。

【結果】 絶食時、脂肪組織では lipolysis (脂肪分解) が誘導され、多量の脂肪酸が血流を介して肝臓に輸送される。このことからケトン体の合成は脂肪分解の程度に強く依存すると考えられてきたが、その過程に ILC3 の関与は見出せなかった。小腸で吸収された脂肪酸の一部は門脈を通じて肝臓に直接輸送される。検討の結果、ILC3 はこの経路に作用しケトン体の合成を促進することが明らかとなった。具体的なメカニズムとしては、まず飢餓に応じて活性化した ILC3 が血管透過性促進因子である Vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) を産生する。通常、小腸で吸収された脂肪酸の多くはリンパ管を経由して末梢に運ばれるが、VEGF-A の働きにより小腸の血管透過性が高まると、脂肪酸がリンパ管だけでなく門脈にも流れ込みやすい状況が生まれる。その結果、門脈を通じて脂肪酸が肝臓に活発に輸送され、ケトン体の基質として利用される (下図)。つまり飢餓時には、あらかじめ体内に蓄えていた脂肪酸 (脂肪組織由来の脂肪酸) だけでなく、ILC3 の補助の下、体外から摂取した脂肪酸 (小腸で吸収した脂肪酸) も余すことなくかき集めてケトン体の合成に利用している。絶食に起因したエネルギー不足に速やかに適応するためには、これら二つの経路が同時に機能することが重要だと考えられる。

ILC3 を介した新規ケトン体合成制御機構の概略図



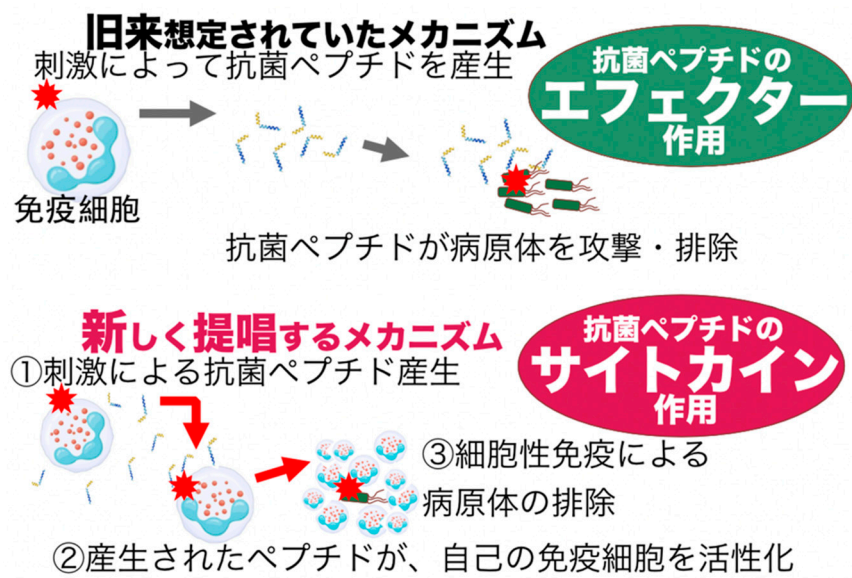
140 自然免疫の作動原理に関する研究	宮下 惇嗣
---------------------	-------

【目的】 自然免疫システムは、無脊椎動物から脊椎動物まで広く保存され、感染防御の第一線を担っている。しかしながら、その駆動・調節原理については不明点が多く残されており、自然免疫システムの異常に起因すると考えられる疾患（炎症性ショックや自己免疫疾患等）の制御も達成できていない。自然免疫システムの研究は、1990年代にショウジョウバエの toll 受容体が、それまで知られていた発生における機能だけでなく感染防御における機能（免疫学的機能）を有していることが報告されたのち、哺乳動物の toll 様受容体も相同因子として同様の免疫学的機能を有していることが提唱されて以後急速に進展した。しかしながら、その過程で未解決となっている疑問も多く残されている。本研究では、1990年代に Lemaitre や Hoffmann（上記のショウジョウバエ toll 受容体の免疫機能の発見者）らによって提唱され、現在でも自然免疫領域における主流のパラダイムとなっている「抗菌ペプチドはエフェクター（＝病原体を攻撃する分子）である」という考え方を転換する根拠となる情報を取得することを試みた。

【方法】 本研究では、モデル動物としてカイコを用いた。カイコにはいくつかの抗菌ペプチドが存在するが、中でも大腸菌死菌などの免疫刺激によって体液中に誘導されるセクロピン B を用いて実験を始めた。本研究で用いた抗菌ペプチドはいずれも Fmoc 固相アミノ酸合成法によって取得された。まずセクロピン B をカイコに前投与し、緑膿菌に対する感染抵抗性の獲得を指標として、当該ペプチドの免疫調節機能を評価した。また、同様の実験を、異種性の抗菌ペプチドを用いて行った。また、FPLC システムを用いたゲル濾過カラムクロマトグラフィーにおいて、セクロピン B の挙動と当該活性（前投与によって、カイコに感染抵抗性を付与する活性）の挙動を比較した。

【結果】 セクロピン B を前投与（緑膿菌接種の 3 時間前）されたカイコは緑膿菌に対する感染抵抗性を示した。セクロピン B の溶解に用いた生理食塩水を前投与（3 時間前）されたカイコは緑膿菌に対する感染抵抗性を示さなかった。また、セクロピン B の投与と同時に緑膿菌を接種されたカイコも、緑膿菌に対する感染抵抗性を示さなかった。また、セクロピン B 以外の異種性の抗菌ペプチドも、カイコに対して同様の活性を示した。FPLC ゲル濾過カラムクロマトグラフィーにおいては、活性のピークとペプチドのピークは 1 フラクション分ずれて現れた。

抗菌ペプチドの生体内における新たな機能の提唱

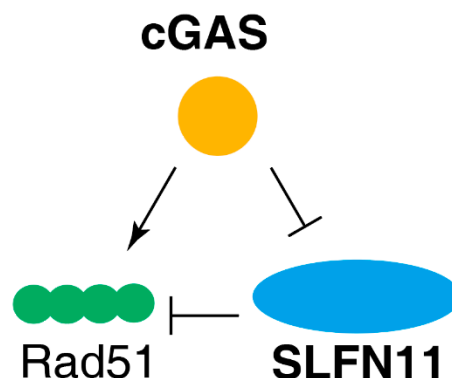


【目的】 SLFN11 は、DNA 損傷と複製ストレス応答への細胞運命決定因子であり、ウイルス感染に対する防護機能をもつ。一方、自然免疫における DNA センサー cGAS は、核内ではクロマチンに結合し、何らかのクロマチン制御を行っていることが想定される。我々は、SLFN11 が cGAS の mRNA 発現に寄与し、cGAS が SLFN11 の複製フォーク不安定化を抑制するなど、SLFN11 と cGAS の密接な機能的関連を見出した。本研究では、cGAS と SLFN11 の機能的相互作用のメカニズムを解析し、両者の生理的かつ本質的な分子機能解明を目的とする。

【方法】 cGAS 遺伝子プロモーターを Luciferase につないだレポーターを作製し、SLFN11 発現の cGAS プロモーター活性に及ぼす影響を確認した。SLFN11 欠損により cGAS 発現が消失したことが HAP1 細胞における特異的な現象の可能性があるため、両因子を発現している細胞株として、肺がん由来細胞株 A549 を用いて、SLFN11^{-/-}細胞を作製し cGAS の発現レベルを調べた。cGAS 発現ベクターやレンチウイルスを用意し、SLFN11^{-/-}HAP1 細胞に発現させた。また、cGAS^{-/-}HAP1 細胞を作製した。これにより、SLFN11 の DNA 複製フォーク保護因子への影響は直接か、cGAS を介する間接的なものかを検証した。iPS 細胞におけるノックアウトとインビトロ造血分化系による機能の検証をつづけた。

【結果】 まず、HAP1-SLFN11^{-/-}細胞を親株にして、Tet-on システムによって SLFN11 を単独発現する細胞、cGAS 単独発現細胞、SLFN11 と cGAS 両方を発現する細胞を作製した。これらの細胞と、HAP1 野生型細胞と HAP-SLFN11^{-/-}細胞を用いた Hydroxyurea (HU) 感受性試験では、SLFN11^{-/-}細胞に SLFN11 や cGAS を発現させた細胞において高い HU 感受性が見られ、SLFN11 と cGAS 両者を発現させると野生型と同等の感受性を戻すことができた。DNA ファイバーアッセイでは、SLFN11^{-/-}細胞において SLFN11 を単独発現させると複製フォーク分解が起こり、cGAS 単独発現細胞でも軽度複製フォーク分解が促進された。しかし、SLFN11 と cGAS の両方の発現細胞では、SLFN11 による複製フォーク分解が cGAS 発現によってキャンセルされていた。これらの結果から、cGAS は単独では複製フォーク分解を促進し、かつ SLFN11 による複製フォーク分解を阻害することが示唆される。一方、複製フォーク安定性と薬剤感受性が完全には相関しないという矛盾が生じた。cGAS の単独発現細胞における薬剤感受性の結果は今後のさらなる検討が必要である。本研究の結果は cGAS が何らかのメカニズムによって SLFN11 による複製フォーク分解に抑制的に働くという関連性を明らかにした。

複製フォーク保護因子をめぐる SLFN11 と cGAS の機能的相互作用



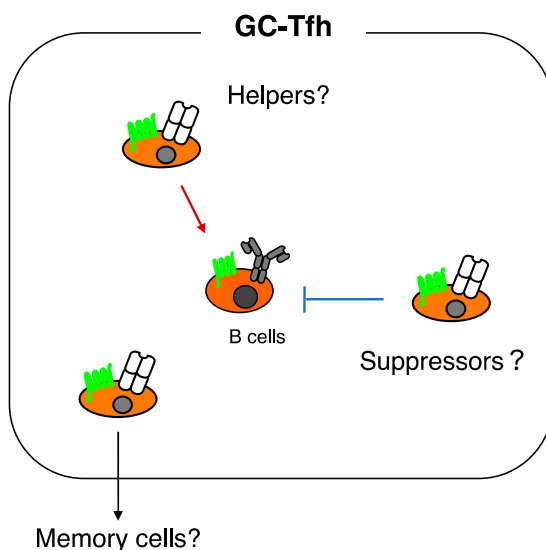
142 濾胞性ヘルパーT細胞の記憶細胞分化の分子基盤の解明	森 大輝
-------------------------------	------

【目的】 免疫応答を活性化する場所であるリンパ節は、感染などが起こり、その抗原がリンパ節に流入すると、一部の活性化した T 細胞が B 細胞領域に進入する。この B 細胞領域に進入した T 細胞は濾胞性 T ヘルパー細胞 (T follicular helper cells : Tfh 細胞) と呼ばれ、その後、胚中心 (Germinal center : GC) と呼ばれる構造に入り、B 細胞の活性化を助け、抗体の親和性成熟や形質細胞分化に重要な役割を果たす。この Tfh 細胞への分化には Bcl6 と呼ばれる転写因子が重要であることなどが明らかとなっているが、Tfh 細胞が胚中心に進入する機序や、胚中心に入った Tfh 細胞 (GC-Tfh 細胞) がどのような運命をたどるのか、その詳細はこれまでにあまり明らかではない。本研究ではこの機序を明らかにすることを目的とし、GC-Tfh 細胞の詳細な遺伝子発現の解析や、GC-Tfh 細胞が記憶細胞へと分化するメカニズムの解明を目指して研究を実施した。

【方法】 Influenza A virus によるマウス感染実験モデルを用いた。また、抗原特異的 T 細胞を解析するために、pMHC-II tetramer を作製し、感染モデルにおける抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞集団の遺伝子発現解析や TCR レパトア解析を行った。GC-Tfh 細胞を解析するために、以前に理化学研究所の岡田峰陽博士の研究室で樹立された S1PR2-Venus knock-in mice を用い、Venus の発現を基に GC-Tfh 細胞の解析及び採取をマルチカラーフローサイトメトリー及びセルソーティングで行った。

【結果】 感染実験モデルから採取した抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞の scRNAseq の結果、Tfh 細胞型、記憶細胞型、Th1 細胞型などの細胞集団が検出できた。また、これらの細胞が発現する TCR クローン解析の結果、TCR レパトアによって Tfh 細胞型に分化しやすいものや Th1 細胞型に分化しやすいものが存在することが明らかとなった。また、GC に局在する T 細胞にも遺伝子発現、TCR クローンの双方において scRNAseq 解析を行った。その結果、GC-Tfh 細胞は特徴的な遺伝子発現プロファイルを持つ幾つかのサブセットに分類できる可能性が明らかとなった。

GC-Tfh 細胞は不均一性があり、幾つかの役割の異なるサブセットに分類できる

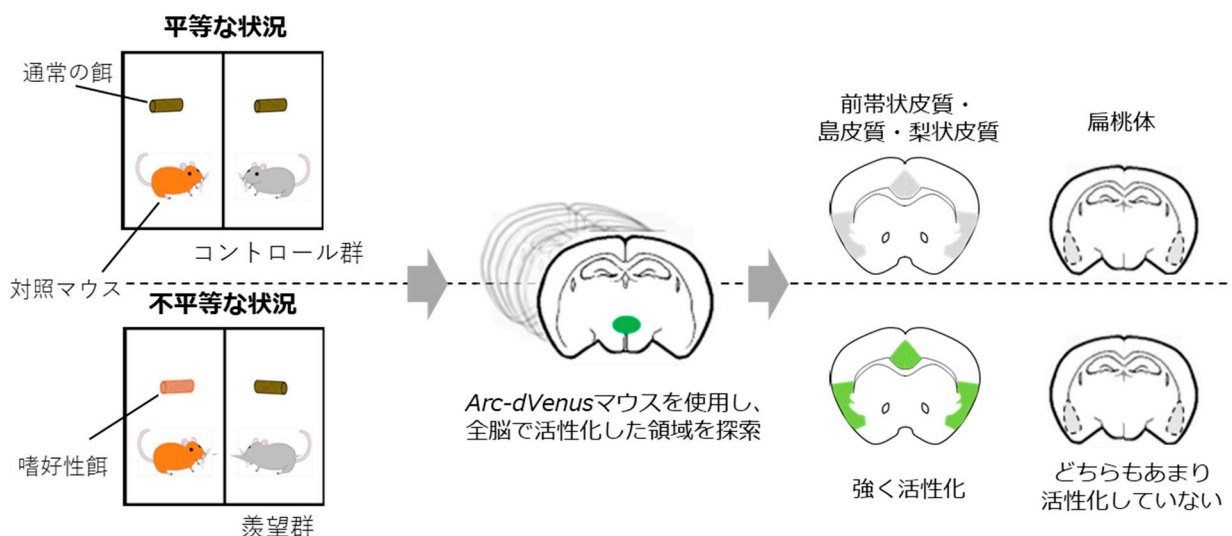


【目的】 他者より不利な不平等な状況に曝露されると、羨望が惹起される。この感情はストレスのような個人的な問題であるだけでなく、いじめや自殺のような社会的問題の原因となりうる。そのため、この感情が発生し行動に影響するメカニズムを解明し、対策することは重要であるが、現状ではそのメカニズムは不明であった。その一因は、マウスのような実験動物で羨望を惹起するパラダイムが確立されておらず、詳細な検討ができなかったことにある。ところが最近、不平等な状況に曝露されたマウスがストレス反応を示すことが示唆された。そこで本研究では、活性化した神経細胞が緑色蛍光タンパク質でラベルされる遺伝子改変マウス (*Arc-dVenus* マウス) を用いて、不平等な状況に曝露されることで活性化する脳領域を明らかにすることにした。

【方法】 本研究では、7~12週齢、雄の *Arc-dVenus* マウスを実験に供した。2匹の *Arc-dVenus* マウスをペアで飼育した。さらに、中央で透明なアクリル板で仕切られ2部屋に分かれているアクリル製の箱を用意し、それぞれのマウスを隣接する部屋に入れた。その後、片方には通常の餌を、もう片方のマウスに通常の餌 (コントロール群) ないしは嗜好性が高い餌を与えた (羨望群)。また、両方のマウスに通常の餌を与えたものを、コントロール群として用意した。当該の状況 (不平等パラダイム) に曝露した 5~6 時間後にマウスをかん流固定し、脳を摘出した。その後、大脳皮質を含む前脳領域 (嗅球、小脳の領域は含まない) から冠状断の組織切片を作製し、そのすべての切片から、共焦点顕微鏡ないしはオールインワン蛍光顕微鏡で Venus 蛍光を観察した。

【結果】 本研究では前脳のほぼすべての領域から切片を作製し、Venus による蛍光を指標に、羨望群で活性化する領域を探索した。その結果、羨望群ではストレス反応との関連が示唆されている前帯状皮質や島皮質、梨状皮質などの領域で、コントロール群と比べて多くの Venus 陽性細胞が観察され、強く活性化することが見出された。一方で、これらの領域と強い連絡を持ち、拘束ストレスや社会的敗北ストレスのような一般的なストレスパラダイムで活性化することが知られる扁桃体は、今回の不平等群で活性化が見られなかった。あわせて考えると、不平等状況下では、扁桃体以外の領域からの入力が原因で、ストレス反応が誘発されていることが示唆されつつある。今後は、不平等ストレス下で特異的に活性化する領域を明らかにすることで、他のストレス要因と区別して、純粋に不平等な状況に曝されることで活性化する領域を明らかにしたい。

本研究の概略

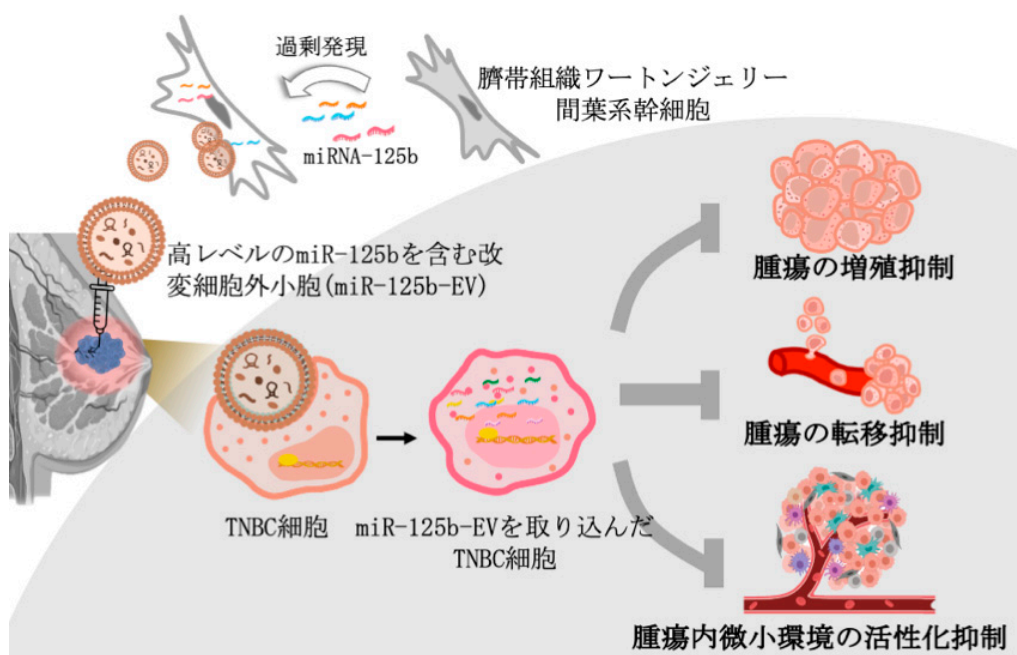


【目的】 トリプルネガティブ乳がん (TNBC) に対する効果的な治療は確立されておらず、そのため TNBC は予後が悪く、死亡率が高い。ほとんどの乳がん治療は癌細胞を直接標的としているが、マーカーの欠如と高い再発率により、TNBC の治療への応用は限られている。TNBC のような進行性のがんの場合、がん細胞を標的とするだけでなく、腫瘍内微小環境の発達を阻害する効果的な方法を見つける必要がある。我々はこれまでの研究で、臍帯のウォートンゼリー (WJ) 部分から単離された間葉系幹細胞 (MSC) に由来する細胞外小胞 (EV) の能力を明らかにした。そこで本研究では、1) ウォートンゼリー-MSC 由来の EV (WJ-EV) により取り込まれた乳がん細胞 (BCC) が腫瘍内微小環境に関与する数種類の細胞に及ぼす影響を明らかにすること、2) TNBC 治療の新たな戦略として、高い抗がん能力を持つ WJ-EV を開発することを目的とした。

【方法】 WJ-EV は、臍帯のウォートンゼリー部分に由来する MSC から分離されたものである。癌関連線維芽細胞および内皮細胞などの腫瘍内微小環境に関与する様々な細胞に対する BCC を取り込んだ WJ-EV の影響を検査した。さらに、重要な miRNA とそれに関連した WJ-EV が BCC の発症を阻害するメカニズムを明らかにした。MSC におけるこの miRNA の過剰発現により、高レベルの重要な miRNA を有する改変 WJ-EV が単離され、BCC を阻害する誘導効果を元の WJ-EV と比較した。

【結果】 WJ-EV を取り込んだ BCC (wBCC) が、TNBC の生体内での発生や転移能力、内皮細胞の血管新生能力、癌関連線維芽細胞の生成を減少させることを示した。注目すべきことに、BCC に対する WJ-EV の阻害効果は、HIF1 α の発現を下方制御する WJ-EV から BCC への miRNA-125b の移動に関係している。さらに、WJ-MSC における miRNA-125b の過剰発現により、高レベルの miRNA-125b を含む改変 WJ-EV を生成した。これらの改変された WJ-EV を BCC が取り込むことにより、BCC の増殖および幹細胞性に対する、より強力な阻害効果がもたらされた。以上のことから我々の研究は、BCC を阻害し、腫瘍内微小環境における細胞クロストークを遮断することで TNBC の進行を阻害する、高い抗がん能力を持つ改変 WJ-EV を miRNA-125b の過剰発現により生成する可能性があることを示唆した。

TNBC の増殖および転移を阻害する「高機能型 WJ-EV」の作製

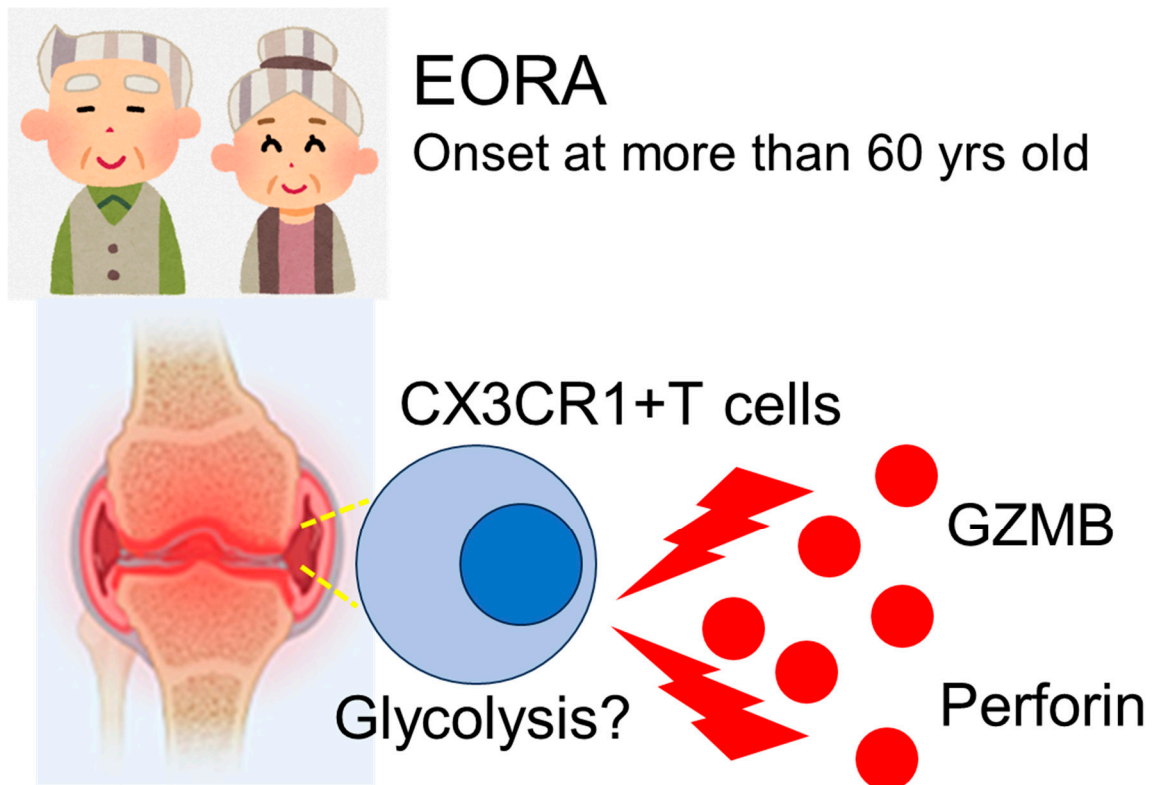


【目的】 関節リウマチ (Rheumatoid Arthritis : RA) は女性に発症頻度が高く、関節の滑膜に炎症を来たす自己免疫疾患である。早期に適切な治療介入がなされなかった場合、関節の破壊による機能障害を来たす。人口の高齢化に伴い、RA も高齢発症例 (elderly-onset RA : EORA) が増加している。EORA は急性発症例が多く、疾患活動性が高く、血中炎症マーカーの高い症例が多いなど特徴的な臨床像を呈する。したがって、EORA とそれ以外の関節リウマチでは免疫学的病態が異なっている可能性がある。近年、細胞障害性 CD4T 細胞が免疫老化に伴い増加していることが報告されている。また、T 細胞の代謝プロセスがその分化や機能に重要な役割を果たしていることが分かっており、各 T 細胞サブセットが特有の代謝プロセスを活性化させている。今回、我々は細胞障害性 CX3CR1⁺T 濾胞ヘルパー様細胞が EORA の病態形成に寄与している可能性とその代謝調節機構に関して検討することを目的とした。

【方法】 RA 患者と健常人 (HC) で末梢血 CX3CR1⁺T 細胞を、フローサイトメトリーを用いて解析した。患者の滑膜炎病変局所の CX3CR1⁺T 細胞の浸潤の有無を、免疫組織化学染色を用いて評価した。T 濾胞ヘルパー細胞の代謝酵素発現を、RNA シークエンシングを用いて網羅的に解析した。

【結果】 RA 患者の末梢血で CX3CR1⁺CD4T 細胞が増加していた。臨床特徴別解析では EORA で non-EORA と比較して CX3CR1⁺CD4T 細胞が増加していた。CX3CR1⁺CD4T 細胞の割合は RA の関節炎の活動性と正に相関した。EORA の滑膜炎局所に CX3CR1⁺CD4T 細胞が浸潤して炎症に寄与していた。T 濾胞ヘルパー細胞では解糖系代謝酵素の発現亢進を認めた。

LORA の滑膜炎に CX3CR1⁺T 細胞が寄与



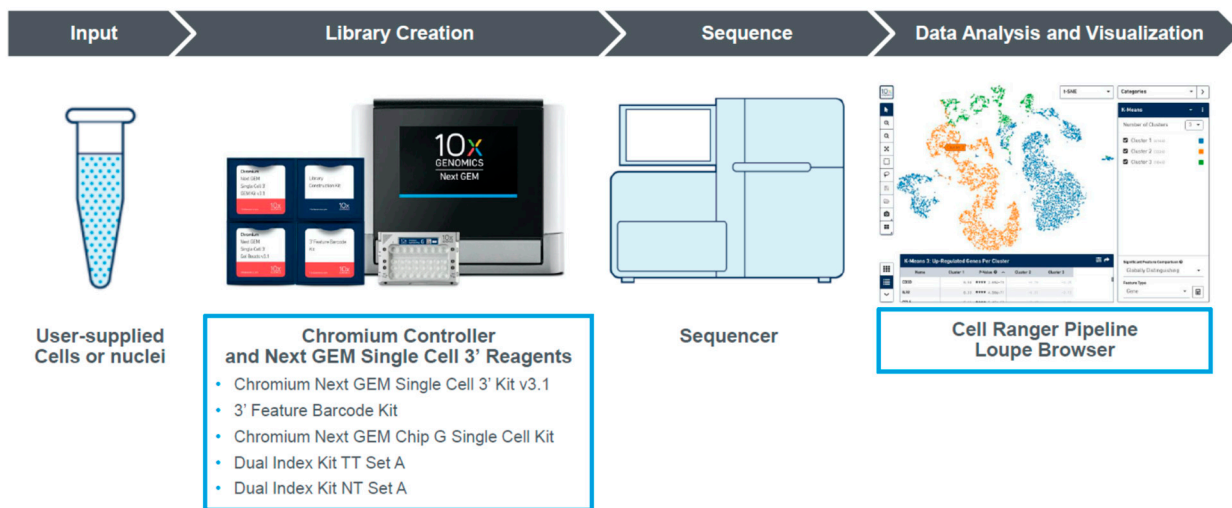
146 単一核トランスクリプトームによる神経・筋病態の解明	伊藤 卓治
-------------------------------	-------

【目的】 運動ニューロン疾患では、運動ニューロンにおける病態のみならず、骨格筋との相互作用が病態に大きく寄与すると考えられている。そのため、神経筋接合部（Neuromuscular junction : NMJ）を介した運動ニューロンと骨格筋の相互作用を詳細に解析できるモデルの開発が求められてきた。しかし、運動ニューロンと骨格筋の相互作用を一つの機能単位（神経筋ユニット）として分子レベルでの解析を行った疾患モデルの報告は乏しいため、分子病態は不明な点が多い。本研究では、ヒト iPS 細胞から誘導した運動ニューロンと骨格筋を共培養することで、神経・筋疾患の分子メカニズムの解明と新たな治療標的の探索につながる機能的神経・筋モデルを構築し、新規病態関連因子探索のための単一核 RNA-seq (snRNA-seq) のシステムを構築する。

【方法】 ヒト iPS 細胞由来神経・筋モデルを用いて、(1) 機能的 NMJ の構築 (2) 病態関連因子の同定を目指した snRNA-seq のシステム構築 (3) 開発したシステムを用いた、運動ニューロン疾患由来 iPS 細胞における、NMJ を標的とした病態解析や治療開発への応用の検証を行った。

【結果】 ヒト iPS 細胞由来運動ニューロンと骨格筋から、核を抽出し、snRNA-seq を行った。Uniform Manifold Approximation and Projection (Umap) diagram を作成し、運動ニューロンと骨格筋のクラスターを同定することができた。また、それぞれの核ポピュレーションにエンリッチされたマーカー遺伝子を Violin plots で示すことができた。現在、構築した snRNA-seq のシステムを応用し、球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) の疾患特異的 iPS 細胞を用いた神経・筋病態関連因子の探索を行っている。

snRNA-seq 解析のワークフロー

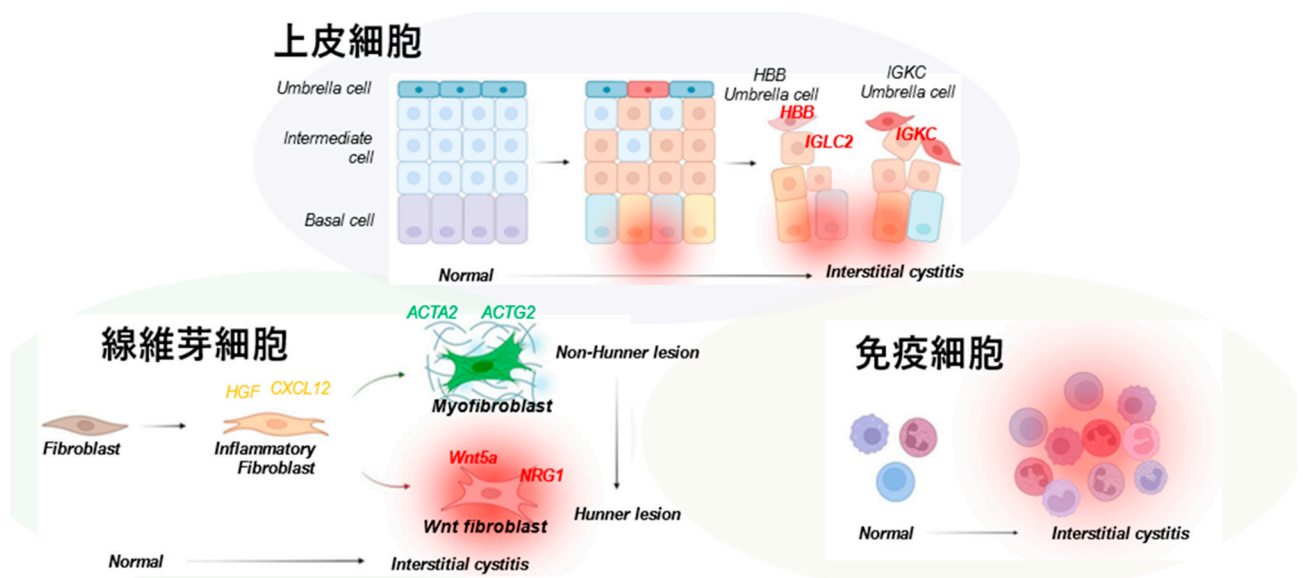


【目的】 間質性膀胱炎は膀胱に非特異的な慢性炎症を認める疾患と定義されているが、明らかな病因は未だ特定されていない。シングルセル RNA sequence (RNA-seq) 解析は、真の一細胞レベルでの発現プロファイルを手入手可能にし、細胞の多様性を一義的に適宜出来ると世界的に注目されている技術である。本研究では上記研究を通して、間質性膀胱炎の病態解明と新規治療標的の同定および、将来的なバイオマーカーの創出につなげることを目的とし、間質性膀胱炎治療に貢献することを目指した。

【方法】 ハンナ型間質性膀胱炎 6 症例（ハンナ病変 6 検体および同一症例の非ハンナ病変 3 検体）と正常膀胱 4 検体を用いて、scRNA-seq 解析を行った。scRNA-seq は 10x Genomics 社の Chromium Next GEM Single Cell3' Kitv3.1 を使用し、NGS ライブラリーを作製した。NGS 解析によって得られた生データを、Cell Ranger を使用し data mapping を行い、Seurat R パッケージを用いて解析を実施した。

【結果】 用いた膀胱検体由来の切片を H&E 染色で確認すると、ハンナ型間質性膀胱炎のみで著名な免疫細胞の浸潤を認め、臨床所見と一致した病理像が得られていることを確認した。計 84,676 細胞の遺伝子発現をプロファイルし、UMAP で可視化したところ、32 種類のクラスターを同定した。その内訳は、NK 細胞や好中球などの 23 種類の免疫細胞クラスター、線維芽細胞や平滑筋細胞などの 5 種類の間質細胞、2 種類の上皮細胞クラスター、また 2 種類の内皮細胞クラスターであった。特に線維芽細胞は inflammatory fibroblast と myofibroblast に分かれて分化していくような分化系譜予測結果が得られた。

疾患を構成する細胞群



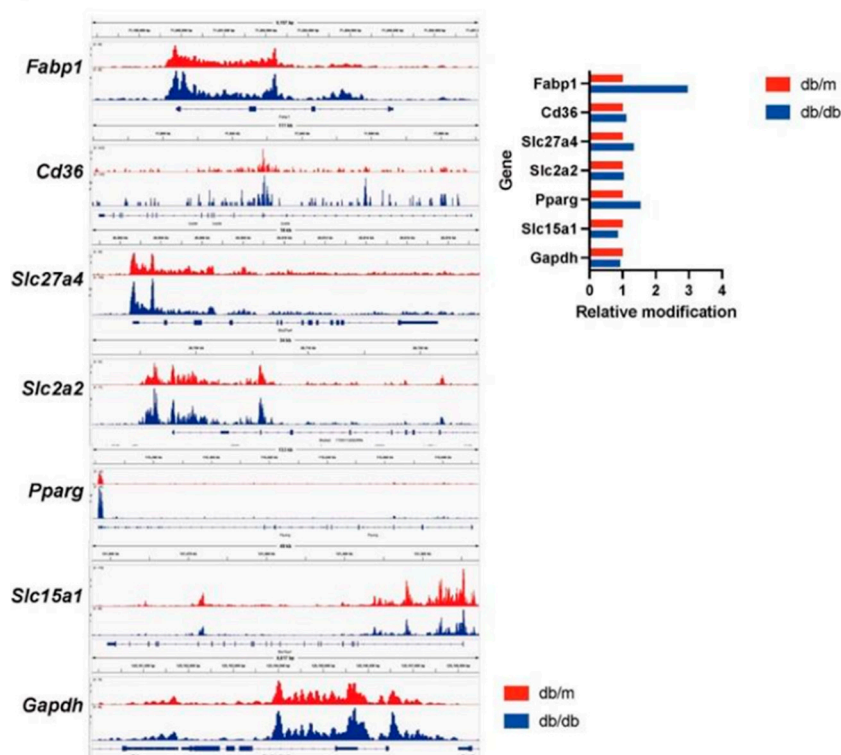
疾患の進展とともに、各細胞で特徴的な分化系譜を示すことが分かった。

【目的】 2 型糖尿病をもつ人は、世界的に増加している。一方超高齢社会を迎えた我が国では、筋肉量と機能の低下が加速する進行性の全身性骨格筋障害であるサルコペニアの有病率が増加しており、サルコペニアは 2 型糖尿病の潜在的な原因であることが報告されている。そのサルコペニアに肥満を伴う病態、「サルコペニア肥満」はサルコペニアよりも予後が悪く、特に高齢者における生活習慣病の重要な病態である。本研究は、サルコペニア肥満と似た病態を呈する 2 型糖尿病モデル肥満マウス (*db/db*) マウスを用いて、統合オミクスによりサルコペニア肥満と 2 型糖尿病の病態基盤を明らかにすることを目的とした。

【方法】 研究では、8 週齢の *db/m* マウスと *db/db* マウスを 8 週間飼育し、次世代シーケンサーを用いた骨格筋と小腸の遺伝子発現、血清のサイトカインアレイ、骨格筋、便、血清中の代謝産物の評価、腸内細菌叢の解析など、さまざまな解析を行った。さらに CUT&Tag 法によって小腸上皮細胞のヒストン修飾を解析した。

【結果】 *db/db* マウスは有意に低い握力と高い内臓脂肪重量を示した。血清サイトカインアレイでは、*db/db* マウスにおいて VEGF-A の相対濃度が高いことが示された。骨格筋中の飽和脂肪酸濃度は有意に高かった。腸内細菌叢の解析では、*db/db* マウスでは Bacteroidetes 門が少なく、Firmicutes 門が多かった。脂質トランスポーターとグルコーストランスポーターのヒストン修飾の統合シグナルは *db/db* マウスで高く、アミノ酸トランスポーターのヒストン修飾の統合シグナルは低かった。

CUT&Tag 法による小腸上皮細胞のヒストン修飾の評価



【目的】 Interleukin (IL) -36 Family は IL-36 Receptor (IL-36R) を介して幅広い免疫・非免疫細胞を活性化し、炎症や発癌を制御することが知られている。IL-36 には、IL-36 α 、IL-36 β 、IL-36 γ の 3 つのサブフォームがある。また、2001 年に新たに発見された IL-38 も IL-36 Family に属する。我々は、動物実験を用いて IL-38 が腫瘍への CD8 陽性リンパ球浸潤を抑制することで、腫瘍の形成を促進することを報告した。一方で、IL-36 Family は好中球やマクロファージなどの自然免疫系の誘導や活性化に関与することが報告されているが、IL-38 と好中球やマクロファージなどの自然免疫系との関係に関する報告はほとんどない。腫瘍関連好中球 (TANs) や腫瘍随伴マクロファージ (TAMs) は抗腫瘍免疫応答を抑制し、腫瘍形成を促進することが知られており、本研究の目的を IL-38 と TANs や TAMs の関連を明らかにすることで、IL-38 の治療応用への可能性を探究することとした。

【方法】 肺腺癌切除症例 209 例を対象に免疫組織化学染色にて IL-38 発現と TANs、TAMs を評価し、TANs 低浸潤と高浸潤、TAMs 低浸潤と高浸潤の症例で臨床病理学的因子及び IL-38 発現との関連を解析した。また、動物実験では IL-38 強制発現肺癌細胞株を用いてマウス皮下腫瘍モデルを作製し、腫瘍内の TANs、TAMs の変化を評価した。

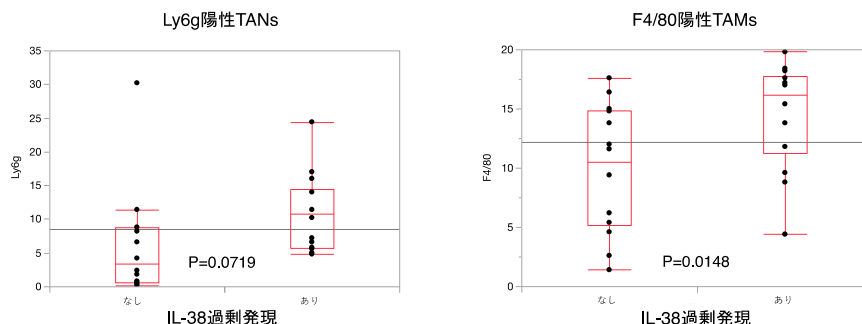
【結果】 肺腺癌切除症例において、TANs 高浸潤の症例では有意に pT2 以上、p N1 以上、pStage II 以上、胸膜浸潤陽性、Micropapillary/Solid predominant の症例が多く、IL-38 高発現の症例も多かった ($p < 0.0001$)。また、TAMs 高浸潤の症例では有意に高齢者、pT2 以上、pStage II 以上、胸膜浸潤陽性、血管侵襲陽性、Micropapillary/Solid predominant の症例が多く、IL-38 高発現の症例も多かった ($p = 0.0081$)。動物実験においても、IL-38 強制発現によって TANs と TAMs の浸潤が増加していた (TANs : 11.0 個/視野対 6.0 個/視野、 $p = 0.0719$; TAMs : 14.6 個/視野対 9.7 個/視野、 $p = 0.0148$)。IL-38 によって TANs、TAMs の浸潤が誘導され、腫瘍形成に関わっている可能性が示された。

IL-38 発現と TANs 及び TAMs との関係

A. 肺腺癌切除症例におけるIL-38発現とCD66b陽性TANs及びCD163陽性TAMsとの関係

		CD66b ⁺ TANs			CD163 ⁺ TAMs		
		Low (n=103)	High (n=106)	p value	Low (n=105)	High (n=104)	p value
IL-38 expression	Low	60 (58.3%)	32 (30.2%)	<0.0001	56 (53.3%)	36 (34.6%)	0.0081
	High	43 (41.7%)	74 (69.8%)		49 (46.7%)	68 (65.4%)	

B. 動物実験モデルにおけるIL-38過剰発現とLy6g陽性TANs及びF4/80陽性TAMsとの関係

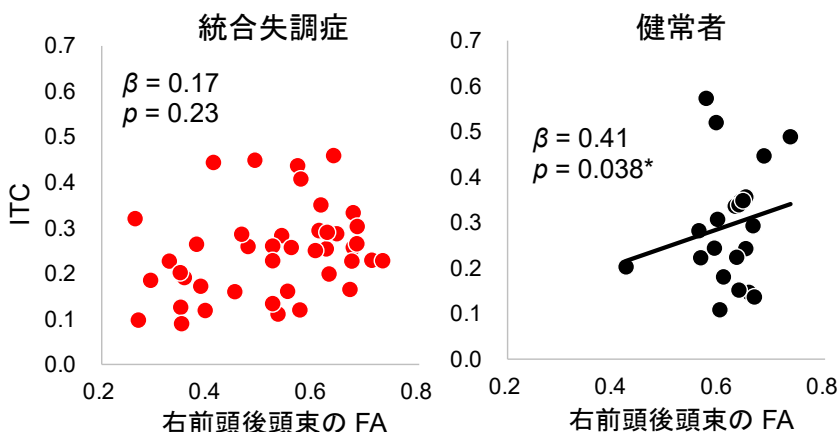


【目的】 ガンマ帯域聴性定常反応は、統合失調症の病態解明に役立つバイオマーカーとなる可能性がある。ガンマ帯域聴性定常反応は、被験者に 40 Hz の聴覚刺激を与えた際に見られる神経生理指標であり、脳波により測定される。これまでの研究では、統合失調症においてガンマ帯域聴性定常反応が低下していることが知られており、さらにその反応の低下が認知機能障害や全般的社会適応レベルの低下と関連することがわかっている。さらにガンマ帯域聴性定常反応は主に大脳の聴覚野に由来することがわかっている一方で、近年の統合失調症および健常群などを対象とした研究では、ガンマ帯域聴性定常反応は大脳右半球において聴覚野を含めたより広範な領域を神経基盤とする可能性が示されている。実際に統合失調症において、右前頭葉、頭頂葉、後頭葉を接続する大脳白質の微小構造に変化があることが先行研究により報告されている。本研究では、統合失調症と健常者において右前頭葉、頭頂葉、後頭葉を広く結ぶ大脳白質の微小構造変化とガンマ帯域聴性定常反応の関連を調べ、ガンマ帯域聴性定常反応の基盤となる神経ネットワークを明らかにすることを目的とした。

【方法】 本研究では、統合失調症 42 名と健常者 22 名を対象に脳波および magnetic resonance imaging (MRI) を測定し、ガンマ帯域聴性定常反応と拡散テンソル画像データを取得した。ガンマ帯域聴性定常反応の指標として inter-trial phase coherence (ITC) を用い、大脳白質統合性の指標として fractional anisotropy (FA) を用いた。ITC は 40 Hz の聴覚刺激に対するガンマ帯域神経振動の位相同期の強さを示す値である。FA は大脳白質の微小構造変化の代表的な指標であり、FA が低いほど神経線維が走る方向への情報伝達の効率が低下していると考えられている。

【結果】 先行研究で見られた統合失調症のガンマ帯域聴性定常反応の低下は本研究においても再現された。さらに統合失調症における右前頭葉、頭頂葉、後頭葉をつなぐ領域である右前頭後頭束において FA の低下についても再現された。そしてガンマ帯域聴性定常反応は、右前頭後頭束の FA と健常者においてのみ有意な正の相関が見られたが、統合失調症では有意な相関は見られなかった。健常者で存在する右前頭後頭束の大脳白質構造とガンマ帯域聴性定常反応の関連が、統合失調症においては病態的な機序により失われている可能性が示された。本研究では統合失調症におけるガンマ帯域聴性定常反応の低下の神経基盤について、詳細な微小白質構造変化の空間情報を提供することができた。ガンマ帯域聴性定常反応は統合失調症の臨床研究において、バイオマーカーとして強力なツールとなり得る。今後、本研究で見出された大脳白質の微小構造変化に注目した研究は、統合失調症の病態の解明に有用な情報をもたらす可能性がある。

ITC と右前頭後頭束の FA との相関

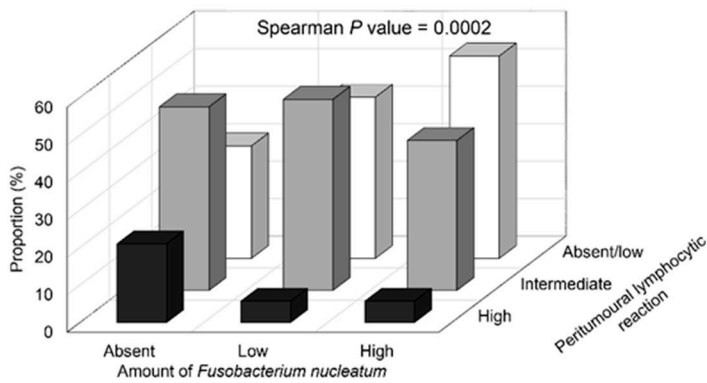


【目的】 腫瘍微小環境内において癌細胞は微生物や免疫細胞と複雑なネットワークを形成していると考えられ、癌研究ではそれらを統合的に解析する事が重要と考えられる。本研究の目的は、当科の消化器癌データベースを対象に、腸内細菌・腫瘍免疫・がん代謝に関する網羅的解析を行い、消化器癌の Precision Medicine を開発する事である。さらに様々な臨床情報・生活情報との統合解析も行う事で、癌治療のみならず癌予防法にも寄与する事を目指す。

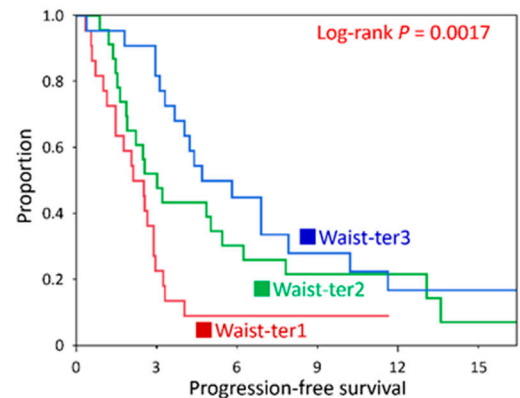
【方法】 1. 食道癌切除例を対象に腸内細菌 (*Fusobacterium nucleatum*)、腫瘍免疫 (腫瘍細胞における CD274 (PD-L1)、PDCD1LG2、IDO1 の発現レベル解析、follicle lymphocytic reaction、peritumoural lymphocytic reaction、stromal lymphocytic reaction、tumor-infiltrating lymphocytes の浸潤程度評価、腫瘍最深部における CD8 陽性細胞数、FOXP3 陽性細胞数、PDCD1 陽性細胞数) の評価を行い、関連解析を行った。2. 免疫チェックポイント阻害剤による治療を施行した切除不能、再発食道癌を対象に、治療前の体組成を Ziostation2 にて評価、様々な血液検査データと共に治療効果予測因子の解析を施行した。

【結果】 1. *Fusobacterium nucleatum* は進行度と有意に相関した。また、peritumoural lymphocytic reaction と有意な逆相関を示した。多変量解析の結果、*Fusobacterium nucleatum* は宿主による免疫応答 peritumoural lymphocytic reaction と有意な逆相関を示し、*Fusobacterium nucleatum* が腫瘍免疫を抑制する可能性が示唆された。2. 免疫チェックポイント阻害剤による治療を施行した食道癌において、治療前の腹囲が大きい症例では治療効果が有意に良好であり、予後も良好だった。以上より、治療前の体組成が免疫応答と関連する可能性が示唆された。

本研究で得られた結果



Kosumi K Br J Cancer 2023



Progression-free survival	Months					
	0	3	6	9	12	15
Waist-ter3	22	20	10	6	4	3
Waist-ter2	23	12	8	4	4	2
Waist-ter1	22	6	2	2	1	1

Kosumi K Ann Surg Oncol 2024

Fusobacterium nucleatum & peritumoural lymphocytic reaction

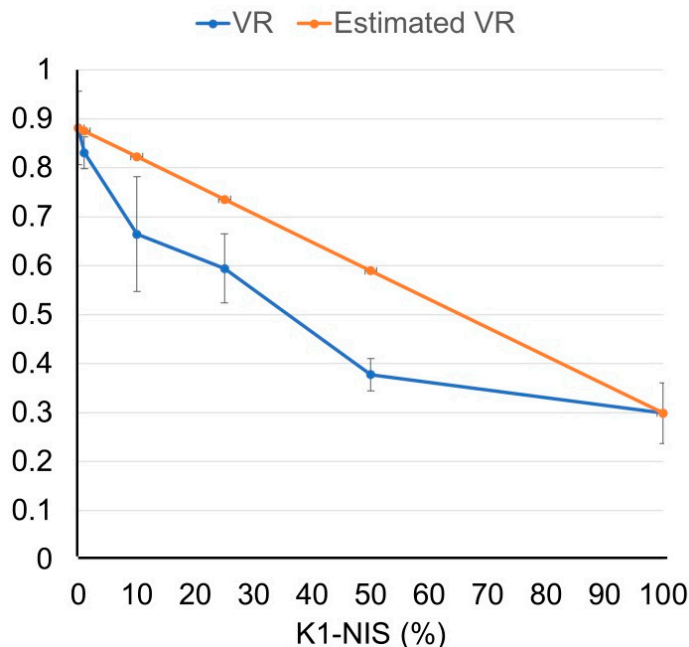
腹囲と治療効果

【目的】放射性核種標識分子を用いた核医学診断・治療 (radiotheranostics) 抵抗性因子遺伝子の網羅的探索のための遺伝子スクリーニングの予備実験として、甲状腺乳頭癌細胞株を用いてクロスファイア効果の確認を行う。その理由は、 β 線によるクロスファイア効果が今回のスクリーニングの系で観測されるかどうかで、スクリーニングによって得られる遺伝子群に「I-131 の取り込み・安定化などに影響を与えるような因子」が理論上包含されるか除外されるかが予想されるからである。また、もしも培養細胞系でクロスファイア効果が見られるような実験系が確立できれば、逆にその効果が減弱するような細胞分布等が確認されればそれすなわち Radiotheranostics の治療抵抗性の原因になりうるからである。したがって、まずクロスファイア効果が培養細胞上で再現される条件はあるかを検証し、もしも検証できれば、そこからその現象が減弱するような腫瘍環境を作成できるかを検討する。

【方法】Sodium Iodide Symporter (NIS) 低発現甲状腺乳頭癌細胞株の K1 から NIS 高発現株 (K1-NIS) を樹立した。まず、クロスファイア効果の確認のため、これらを様々な割合 (K1-NIS 細胞を 0、1、10、25、50、100%含む) で共培養し、I-131 治療時の細胞生存率 (viable cell ratio : VR) を、細胞の割合と各株単独での生存率から推定される細胞生存率 (Estimated VR) と比較した。次に 2 種の条件 (両株が全体に均一に混在、K1-NIS は局所的に等間隔に存在) で共培養し、同様に細胞生存率を比較した。

【結果】共培養での細胞生存率は細胞の割合と各細胞単独での生存率から推定される値より低く、クロスファイア効果が確認できた。NIS 高発現細胞の不均一な分布により I-131 治療効果の低下を確認した。

クロスファイア効果の確認

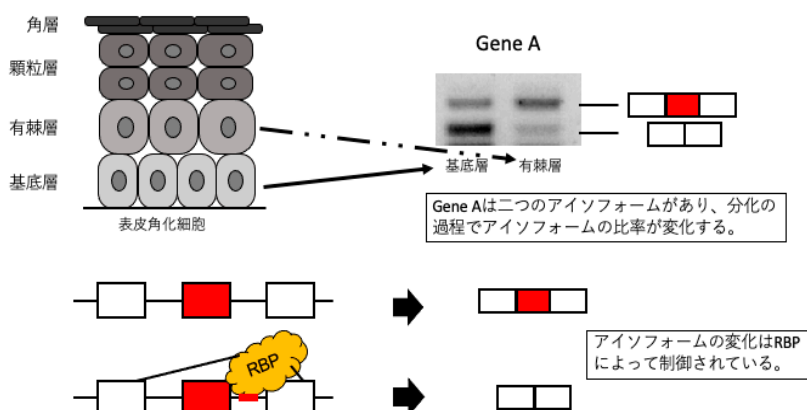


【目的】 mRNA 前駆体 (pre-mRNA) の選択的スプライシングは、単一遺伝子から多様なタンパク質を作り出す機構であり、限られた数の遺伝子からタンパク質発現の多様性を生み出すための最も重要な機構の一つである。複数のエクソンを有する遺伝子の、実に 95%以上が選択的スプライシングによる複数のアイソフォームを有しており、生物学的に非常に重要な役割を果たしていると考えられているが、皮膚組織における選択的スプライシングの役割はほとんどわかっていなかった。皮膚は体表面積の大半を占める人体最大かつ最外層に位置する臓器であり、体外からの刺激から体を守ると共に、体内からの水分喪失を防ぐなどの働きがある。表皮と真皮から構成されており、外層にあたる表皮は表皮角化細胞が基底層から徐々に押し上げられて有棘層、顆粒層、角層へと分化していく。著者らは先行研究において、表皮角化細胞の分化する過程で多くの選択的スプライシングイベントが起きており、それらは RNA binding protein の結合により制御されていることを明らかにしていた。本研究の目的は、選択的スプライシングが表皮角化細胞分化に及ぼす影響を解明すること、また RNA binding protein の関与を明らかにすることである。

【方法】 1. 選択的スプライシングイベントの同定・解析と phenotype の確認：著者は先行研究において、表皮角化細胞の分化の前後における選択的スプライシングに大きな変化のある遺伝子、タンパクの情報をすでに取得しており、それらの validation を行った。またそれぞれのアイソフォームがどのような仕組みで表皮角化細胞の分化を誘導しているか、解析を行った。同定した選択的スプライシングの phenotype の確認にはアイソフォーム特異的ノックダウンを行い、分化に異常が生じるか確認した。ノックダウンには shRNA や siRNA といった RNA 干渉を用い、評価は Realtime PCR 法で行った。また 3 次元培養表皮を作製し、各種染色を行った。2. RNA binding protein の同定とノックダウン実験：著者がすでに取得していた表皮角化細胞の分化に関与していると思われる RNA binding protein のノックダウン実験を行い、選択的スプライシングに変化が出るか、分化異常が生じるか、Realtime PCR 法や 3 次元培養表皮を用いて確認した。

【結果】 1. 選択的スプライシングイベントの同定・解析と phenotype の確認：MAP3K7 遺伝子において、分化の前後で exon12 が skip されていることがわかった。そこでアイソフォーム特異的なノックダウンを行い phenotype の解析を行ったところ、分化異常を生じることがわかった。3 次元培養表皮でも同様に分化異常が生じることがわかった。2. RNA binding protein の同定とノックダウン実験：FUS (RNA binding protein) を対象にノックダウン実験を行ったところ、選択的スプライシングイベントが増加した。また 3 次元培養表皮を作製したところ分化異常を認めた。

選択的スプライシングと RBP



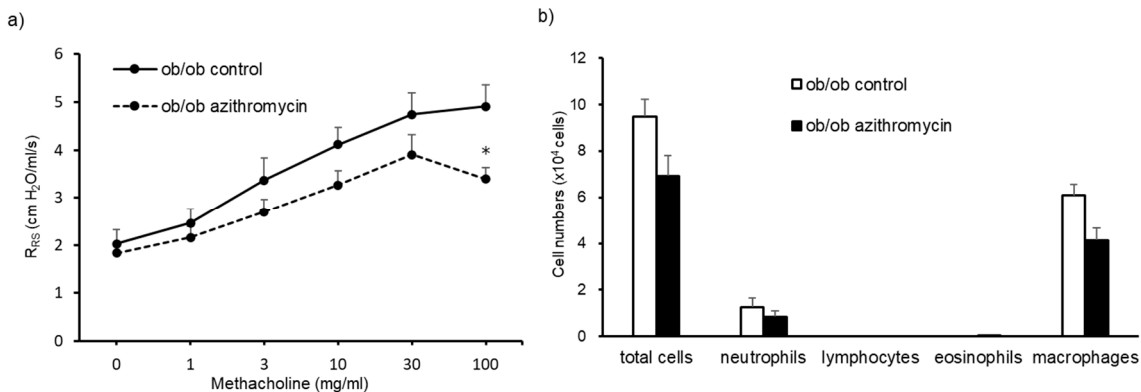
154 酪酸誘導による腸内細菌叢を標的とした肥満喘息の制御	田代 宏樹
-------------------------------	-------

【目的】 肥満は喘息の難治化因子であり、喘息の発症率の増加にも関与するが、増悪メカニズムは明らかではない。肥満による喘息難治化のメカニズムの一つとして腸内細菌叢が注目されている。細菌が食物繊維を代謝し直接産生する酪酸をはじめとした短鎖脂肪酸は腸内細菌叢と遠隔臓器の状態を制御する重要なメッセンジャーの一つとして注目されている。よって、本研究では腸内細菌自体が遠隔臓器の病態、特に気管支喘息増悪を反映する気道過敏性亢進・気道炎症増悪に関与するメカニズムとしては腸内細菌自体が産生する代謝産物である酪酸に注目し研究を行うこととした。

【方法】 BALB/c マウス、C57BL/6J マウス、C57BL/6JHamSlc-ob/ob マウスに無刺激およびオゾン暴露を行い気道過敏性・気管支肺胞洗浄液解析を行った。気管支肺胞洗浄液は細胞数と細胞分画、たんぱく濃度および細胞障害アッセイを行った。アジスロマイシン投与を行い気道過敏性・気道炎症に変化があるか評価を行った。

【結果】 Balb/c マウスにオゾンを暴露すると気道過敏性および気管支肺胞洗浄液中の総細胞数・好中球が有意に増加した。さらに総蛋白濃度および細胞障害活性が有意に上昇し、オゾンは気道上皮障害を誘導し気道過敏性・気道炎症を誘導することが分かった。さらに、肥満マウスである ob/ob マウスは C57BL/6J マウスと比較しオゾンによる気道過敏性の有意な上昇を認めたが、気管支肺胞洗浄液中の細胞数の増加は見られず、むしろ低下することが分かった。ob/ob マウスにアジスロマイシンを投与するとオゾンによる気道過敏性亢進は有意に抑制されたが、気管支肺胞洗浄液には差は見られなかった (下図)。

肥満マウスにおけるアジスロマイシンが気道炎症・気道過敏性に与える影響

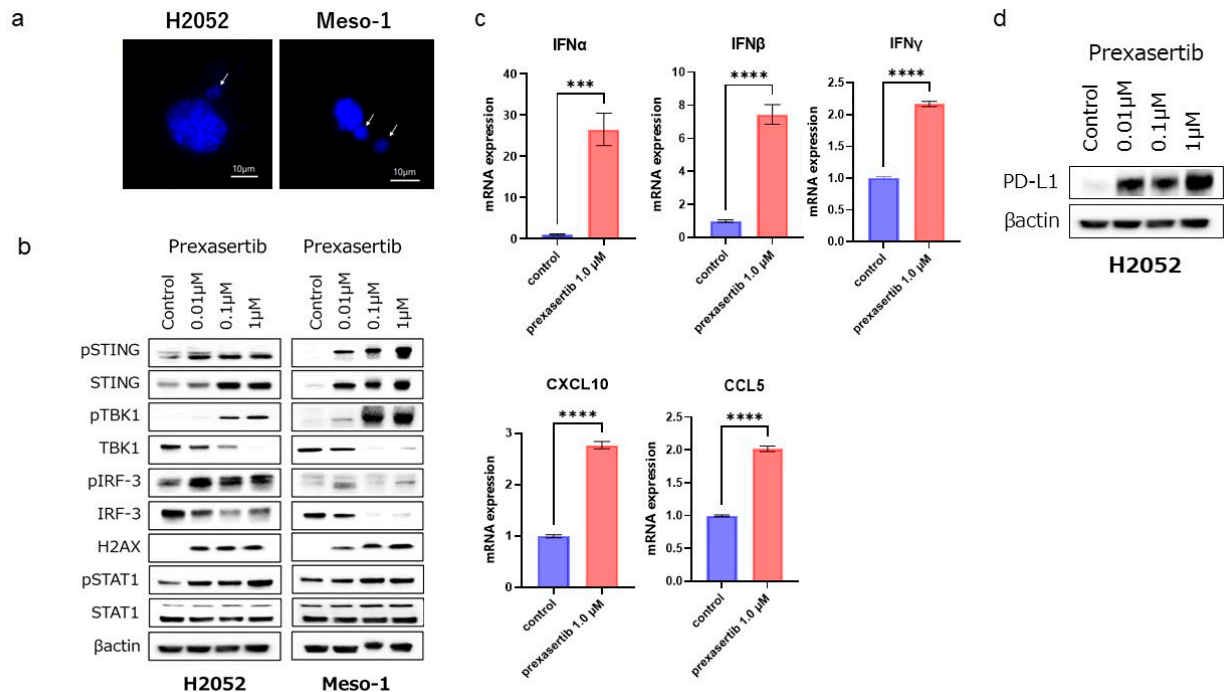


【目的】 胸膜中皮腫は、稀少ながん種の 1 つであり、薬物療法における治療選択肢が非常に少ない。その中で、PD-1 阻害剤と CTLA-4 阻害剤の併用療法や、化学療法と PD-L1 阻害剤の併用療法の一定の治療効果が報告され、がん免疫療法が他のがん種同様期待されているものの、その治療効果は限定的であり、予後延長にさらに寄与する治療法の開発が望まれる。本研究では、がん免疫療法の効果を増強する薬剤として、DNA 修復機構阻害剤に着目し研究を行った。

【方法】 ヒト胸膜中皮腫細胞株である H2052、H2452、Meso-1、Meso-4 を使用した。in vitro の実験として、細胞増殖 assay (MTT assay)、Apoptosis assay (Annexin V、DAPI を用いた flowcytometry 法)、Western blotting 法、real time PCR 法を用いて検討を行った。

【結果】 DNA 修復機構阻害剤である、ATR 阻害剤、ATM 阻害剤、WEE1 阻害剤、CHK1 阻害剤を用いて、MTT assay にて各薬剤の胸膜中皮腫細胞株に対する効果を検討した。その中で、WEE1 阻害剤、CHK1 阻害剤が低濃度で有効性を示すことを発見した。このうち CHK1 阻害剤である Prexasertib は、胸膜中皮腫細胞株に対して、Cisplatin よりも低濃度で強い細胞増殖抑制効果を示し、濃度依存性に Apoptosis を誘導することが確認された。加えて、Prexasertib の投与により STING 経路が活性化され、Type 1 インターフェロンの発現が上昇し、PD-L1 の発現も増加することが示唆された。これらの結果から、Prexasertib ががん免疫賦活を促進し、直接的な抗腫瘍効果だけでなく、がん免疫微小環境にも影響を与えることを示唆された。今後は、in vivo の検討や PD-1 阻害剤との併用効果について検討を進めることとした。

CHK1 阻害剤が胸膜中皮腫細胞のがん免疫微小環境に与える影響



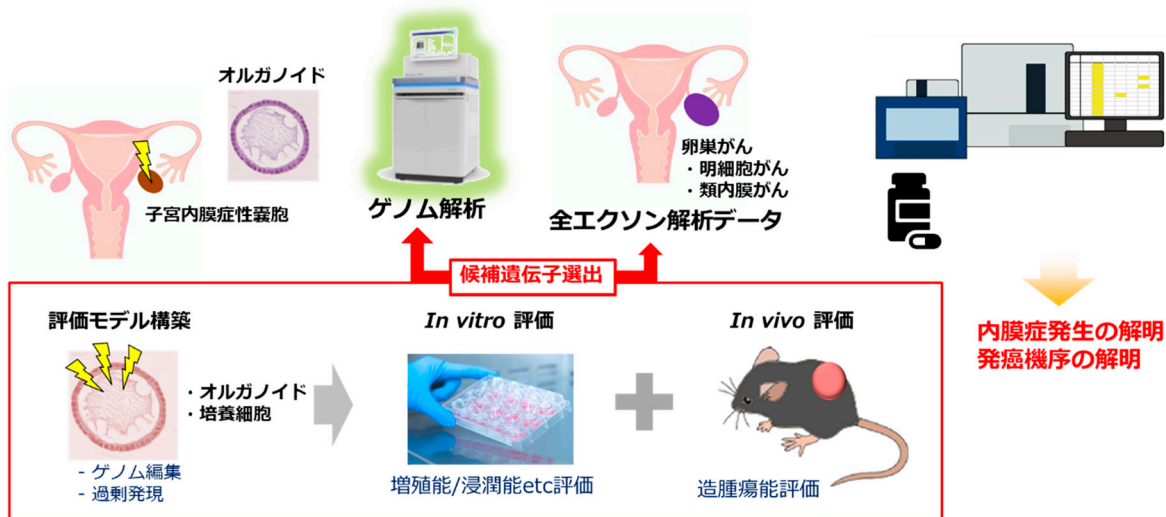
【目的】 子宮内膜症は女性の生活の質を低下させ、不妊症の原因となる疾患である。特に卵巣にできる内膜症性嚢胞は卵巣癌の前駆病変とされている。本研究の目的は、内膜症性嚢胞から発生する卵巣明細胞癌および類内膜癌における発癌機序の解明である。次世代シーケンサーを用いた全エクソン解析およびオルガノイドモデルを活用し、子宮内膜症のがん化に関与する遺伝子変異とその機能的影響を評価する。

【方法】 次世代シーケンサーによる全エクソン解析を用いて、卵巣癌の前駆病変である内膜症上皮細胞におけるがんドライバー遺伝子変異（PIK3CA、KRAS、ARID1A など）を特定した。ドライバー遺伝子変異を有する患者由来の内膜症オルガノイドを作製し、これを用いて *in vitro* 内膜症発癌モデルを構築した。さらに、CRISPR/Cas9 技術を用いてこれらのオルガノイドに遺伝子変異を導入し、細胞機能への影響を評価した。Visium を用いたトランスクリプトーム解析により、内膜症上皮細胞と間質細胞の遺伝子発現特性を明らかにし、新規マーカー遺伝子候補を同定した。

【結果】 全エクソン解析により、内膜症上皮細胞において既にごがんドライバー遺伝子変異（PIK3CA、KRAS、ARID1A など）が認められることが確認された。患者由来の内膜症オルガノイドモデルでは、CRISPR/Cas9 を用いた遺伝子変異導入により、これらの変異が子宮内膜症のがん化に寄与する可能性が示唆された。Visium によるトランスクリプトーム解析の結果、内膜症上皮細胞と間質細胞の遺伝子発現特性が明らかになり、新規マーカー遺伝子候補が同定された。本研究は、子宮内膜症のがん化マーカーの探索および卵巣癌の治療薬開発に貢献するものである。

子宮内膜症性嚢胞の癌化メカニズム解明

遺伝子変異・発現解析から、癌化メカニズムを解明し、
診断バイオマーカー、治療（がん化予防）標的を見出す

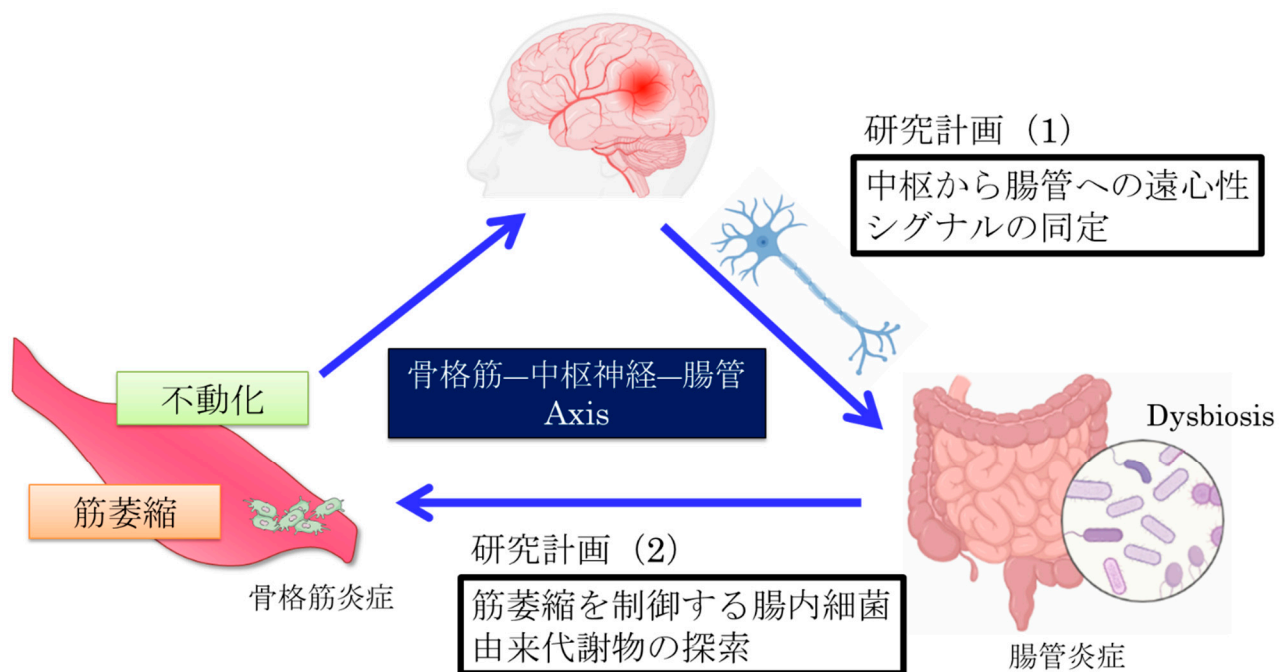


【目的】サルコペニアは加齢による骨格筋量の減少に特徴付けられる病態であり、超高齢社会を迎えた我が国における健康寿命短縮の重要な要因である。加齢性の生理変化に加えて、糖尿病や慢性心不全、慢性腎臓病など様々な併存症がサルコペニアの促進要因であることが知られているが、身体活動低下や不動化もサルコペニアの重要な促進要因である。我々は、不動化性筋萎縮の経時的な病理変化について詳細に検討したところ、ギプス固定による不動化が 10 日程度となると、骨格筋で強い炎症が惹起されることを明らかとした。また、不動化によって腸管炎症が惹起され、腸内細菌叢に顕著な変化が生じることも見出した。これらの結果から、骨格筋の不動化によって何らかのメカニズムで腸内細菌叢の変化 (dysbiosis) が生じ、これが腸管炎症ならびに骨格筋での炎症を引き起こして筋量の減少に繋がるという、過去に全く想定されていなかった臓器連関の存在を想定した。そこで本研究では、不動化性筋萎縮における「筋-脳-腸連関」の役割を明らかとするため、不動化による dysbiosis の発症機構と、dysbiosis が筋萎縮を惹起するメカニズムについての解析を行い、筋萎縮抑制薬の開発に資する新知見を得ることを目的とした。

【方法】不動化における中枢から腸管への遠心性シグナルとして交感神経を想定し、対照またはギプス固定処理を行ったマウスの腸管を回収し、ノルエピネフリン量を測定した。また、カテコラミン合成阻害薬である α -MT (alpha-methyl-p-tyrosine) を用いたノルエピネフリン turnover 法により、不動化では腸管におけるノルエピネフリンの供給量が増加しているか否かを解析した。さらに、腸管炎症および筋萎縮を制御する腸内細菌由来代謝物について、マウス糞便および盲腸内容物を用いて網羅的に解析した。

【結果】 α -MT 投与前後のノルエピネフリン濃度比を各消化管で評価したところ、不動化によって胃や十二指腸では変化がない一方で、小腸や結腸においてノルエピネフリン濃度比が有意に低下した。すなわち、不動化では下部消化管特異的に交感神経が活性化することが明らかとなった。また、特に腸内細菌由来の脂質代謝物を中心に解析したところ、不動化で特徴的な変化が認められる代謝物として“Substance X”を同定した。混餌食による補充実験を行い、不動化における腸管組織および骨格筋への効果について検討したところ、Substance X は不動化による腸管組織および骨格筋での炎症を抑制し、筋萎縮を改善することを見出した。

本研究計画の全体図



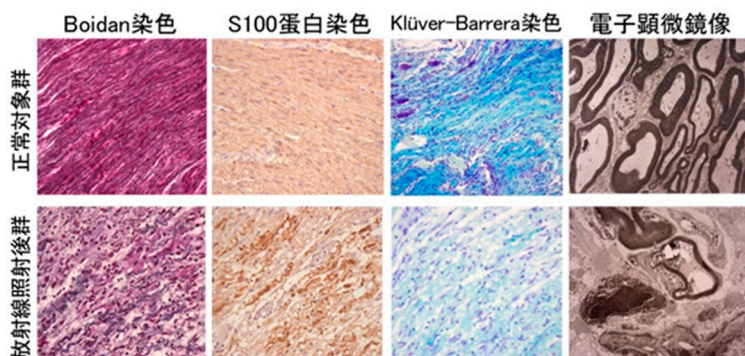
158 放射線治療後の聴神経腫瘍における神経変性機構の解明	松島 健
-------------------------------	------

【目的】 近年、聴神経腫瘍（前庭神経鞘腫）に対する治療成績は大幅に向上し、かつての高い死亡率・合併症率の中の「救命」という目標から、「長期的な腫瘍制御と顔面・聴機能温存の両立」と急速な進歩を遂げてきた。これは外科治療の進歩だけでなく、定位治療の確立・普及が大きく貢献している。近年では、定位放射線治療は小型聴神経腫瘍に対する第一選択治療として確立し、中・大型腫瘍に対しても外科的部分切除と組み合わせた術後定位放射線治療の有用性が検討されている。しかし、新たな問題として、放射線治療後の不応例・再増大例に対し手術介入を余儀なくされた場合、周囲との癒着や術後顔面神経麻痺の増加など再発時の手術の困難さと合併症の危険性が多く報告されてきている。また、放射線照射後の長期経過として、腫瘍制御ができていても関わらず聴機能が徐々に低下することが大きな問題となっている。今回、定位放射線治療後の聴神経腫瘍に対する手術経験を後方視的に検討するとともに、放射線治療後の再発開頭術中に切断せざるを得なかった蝸牛神経を採取し解析することで、放射線照射が蝸牛神経に与える影響を分析する。

【方法】 手術加療を行った定位放射線治療後の聴神経腫瘍 60 例のうち、神経線維腫症 2 型患者を除外した 56 例を後方視的に検討した。年齢は 20～80 歳（平均 50.2 歳）、放射線治療に際してはガンマナイフを用いられたものが 44 例と大半を占めた。これらの症例の放射線治療から手術介入までの期間、術中顔面神経モニタリング値、腫瘍の性状や出血性、周囲との癒着、腫瘍摘出率、術後の顔面・聴神経機能、長期予後などを検討した。さらに、放射線治療歴のみの 28 例と手術歴・放射線治療歴ともに有する 28 例に分類し、同期間に初回治療として手術を行った 182 例を対照群として比較検討を行った。また、術前から聴力を喪失した例のうち 16 例で蝸牛神経を採取し、光学・電子顕微鏡的に検討した。

【結果】 定位放射線治療から平均 46.1 ヶ月後（7～288 ヶ月後）に手術加療を行っており、手術歴も有する群で 3 例に経迷路法を用いたが、そのほか全例で外側後頭下開頭を用いた。術中、特に表面は硬く、出血性は乏しく、神経・脳幹との癒着は強いものが多く、これまでの報告と相違なかった。術中顔面神経モニタリング低値のものを 14 例認め、平均 91.3%（70～100%）の腫瘍摘出を行った。術前顔面神経麻痺のない 39 例のうち 35 例（89.7%）で良好な顔面神経機能を温存でき、術前顔面神経麻痺を認めた 17 例中 3 例で顔面神経機能の改善を認めた。術前有効聴力が残存していた 4 例のうち、有効聴力の温存が達成できたものは 1 例であった。90%未満の摘出にとどめたものが 12 例あったが、フォローアップ期間中（平均 76.4 ヶ月）に追加治療を要したのは 56 例中 3 例（5.4%）のみであった。初回治療群と比較すると、高齢かつ大型、硬く周囲との癒着の強い腫瘍が多く、また術中顔面神経モニタリングが不十分となることも多いため、再発時手術は難しいものとなるが、適切な切除率に留めることにより顔面神経の機能温存が達成されていた。まだ十分な長期成績とは言えないが、過去の報告にあるよう神経機能損傷の危険性を冒して全摘出にこだわるよりも、特に癒着の強い部分は放射線治療効果を有すると考え、亜全摘に留めることにより、神経機能温存と長期的な腫瘍制御の両立が期待できると考えられた。光学・電子顕微鏡的に検討した蝸牛神経においては、髄鞘及び軸索構造の萎縮・減少などの神経変性所見を認めた。

採取した蝸牛神経の光学・電子顕微鏡的所見

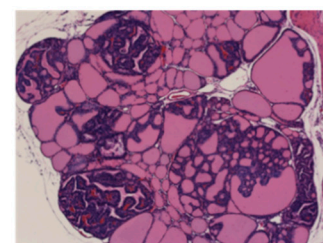
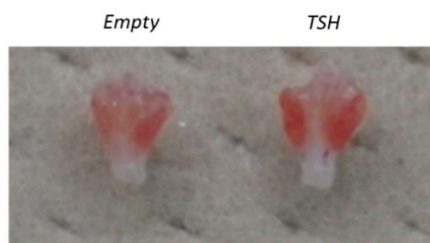
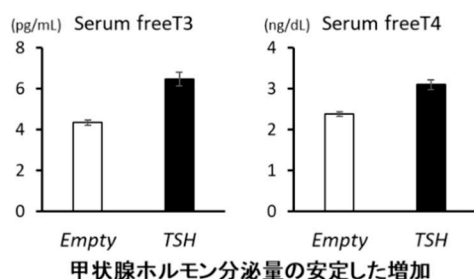


【目的】 甲状腺機能亢進症は、バセドウ病が原因の多くを占め、1,000 人に 1 人と頻度の高い疾患である。しかし、治療は抗甲状腺薬に代表される薬物療法を中心として数十年にわたり大きな変化がなく、無顆粒球症などの重篤な副作用や治療抵抗性といった多くの問題を抱える。本研究は、より安全かつ治療効果の高い新規治療薬というアンメットニーズに応えるべく開始した。甲状腺機能亢進症の病態生理として、甲状腺特異的に発現する甲状腺刺激ホルモン受容体 (TSH 受容体) の活性化が古くから知られているが、下流の分子やホルモン合成系以外の変化については驚くほど未解明である。生体の甲状腺組織を網羅的に解析した報告が非常に少ないだけでなく、甲状腺機能亢進症に対する研究報告は調べる限り見当たらない。我々は研究の推進を可能とするため、TSH 過剰発現処置により甲状腺機能亢進症と甲状腺腫を惹起する独自のモデルマウスを開発した。本研究では、この新規モデルマウスを駆使して、TSH 受容体シグナルを分子レベルで理解することにより、甲状腺機能亢進症に対する新規治療薬を開発するための標的を見出すことを目的とした。

【方法】 甲状腺機能亢進症モデルマウスは、6 週齢雄の C57BL/6J マウスにハイドロダイナミック法を用いて TSH 発現ベクターを導入することにより作出した。このマウスの甲状腺を回収し、RNA シーケンスによるトランスクリプトーム解析を行った。甲状腺に特徴的な遺伝子群の中で、SLC26A4 の遺伝子発現が有意に増加していることを見出したことを受けて、SLC26A4 ノックアウトマウスに TSH 過剰発現処置を行い、その意義を検討した。最後に、濾胞上皮細胞レポーターマウスを、TPO-CreERT2 マウス (Jackson laboratory, No. 026512) と R26GRR マウス (理化学研究所, RBRC04874) を交配することにより作出した。

【結果】 甲状腺機能亢進症モデルマウスでは、血清 TSH 濃度はベクター量依存的に上昇し、血清 fT4、fT3 濃度の上昇に加えて、甲状腺の腫大が肉眼的、顕微鏡的に見られており、モデルとして妥当であることを確認した。TSH 過剰発現による甲状腺トランスクリプトームの変化について、パスウェイ解析や発現変動の大きかった上位遺伝子の観点から精査した。甲状腺に特徴的な遺伝子群の中で、有意な変化は SLC26A4 に限られており、その意義を検討するため、SLC26A4 ノックアウトマウスに TSH 過剰発現処置を行った。意外なことに、このノックアウトマウスは甲状腺機能亢進の誘導に対し、有意なフェノタイプの変化を示さなかった。これまでの検討においては、治療標的獲得に至らなかったが、採取した甲状腺には、濾胞上皮細胞以外に副甲状腺、C 細胞、血管、血球など種々のコンポーネントが含まれ、パスウェイ解析の解釈が困難であったという制限があった。そこで、濾胞上皮細胞特異的に解析を行うべく、濾胞上皮細胞レポーターマウスを作出した。このマウスの甲状腺を酵素処理によりシングルセル化した後、セルソーターにて濾胞上皮細胞を回収することに成功した。

甲状腺機能亢進症モデルマウス



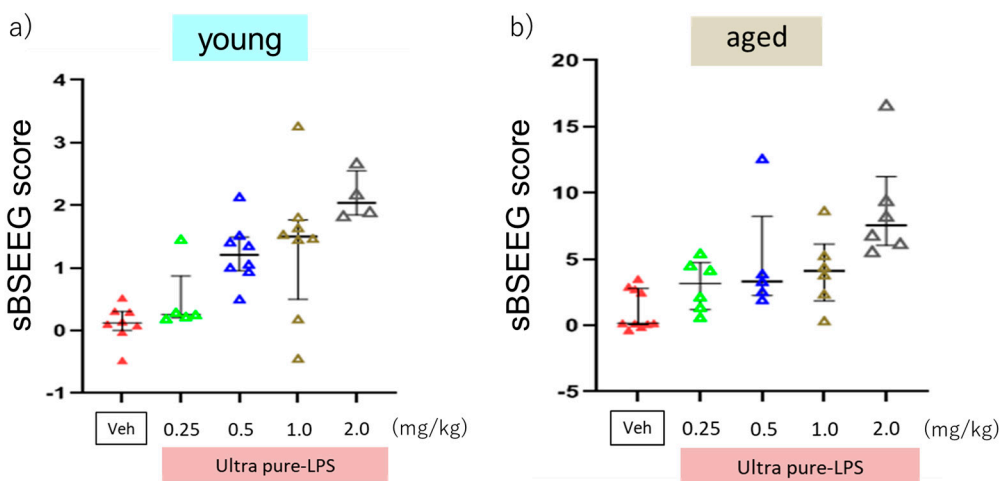
160 BSEEGスコアを用いたせん妄モデル動物の評価系の確立	山梨 豪彦
---------------------------------	-------

【目的】 せん妄は身体因や薬剤を原因として、一過性に認知機能障害、睡眠障害、興奮、幻覚妄想などの症状を呈する症候群である。せん妄の治療法は十分に確立されておらず、せん妄の病態解明および治療法の探索が急務である。そのためにはせん妄モデル動物を用いた研究が必要不可欠であるが、モデル動物のせん妄状態を適切に捉える評価法も同時に必須である。これまでのせん妄モデル動物を用いた研究において認知機能に関連した行動試験が用いられてきたが、行動試験は施設や実施者による不一致が起りやすく、行動試験の結果をヒトの症状にそのまま適応することの妥当性も問われうるため、客観的でヒトへの適応に妥当な検査法が求められる。我々はヒトを対象として小型脳波デバイスで前頭部から得られた脳波を、独自のアルゴリズムにより徐波化の指標を数値化するバイスペクトル脳波 (BSEEG) 法を用いて、それにより得られる BSEEG スコアがせん妄患者の検出や重症度の定量化に有用であることを報告した。さらに我々は、マウスから得られる脳波データを同様のアルゴリズムで BSEEG スコアに変換することが、げっ歯類においてもせん妄状態を検出するために有用である可能性を示した。本研究では BSEEG スコアを評価系としてより確固たるものとして確立することを目的とした。

【方法】 若齢 (2~3 ヶ月) および老齢 (18~19 ヶ月) の野生型 C57Bl/6 マウスを用いた。脳波ヘッドマウント設置手術、脳波記録、Ultrapure-LPS 投与実験の全実験スケジュールを下図に示す。脳波ヘッドマウントはプロトコールに沿ってマウスの頭蓋骨上に設置された。ヘッドマウント装着手術から 2 週間の回復期間の後、脳波記録を行った。脳波測定から 1~2 日目でベースラインの測定を行い、3 日目に Ultrapure-LPS を腹腔内投与した。収集した脳波データを、以前、我々が報告したウェブベースの BSEEG スコア計算機を用いて BSEEG スコアに変換した。群間比較のために、Ultrapure-LPS 投与後の半日の BSEEG スコアの平均値と、脳波測定開始 1 日目 daytime の BSEEG スコアの平均値の差を標準化 BSEEG スコア (sBSEEG スコア) として算出した。

【結果】 若齢マウスにおいて、BSEEG スコアは daytime に高い数値で安定し、夜間には低い数値で不安定になる日内変動を示した。生理食塩水の投与による BSEEG スコアの変化は通常みられないが、Ultrapure-LPS 投与により BSEEG スコアは上昇した。一方で老齢マウスにおいては、若齢マウスと同様の日内変動を示すもの、日内変動を示すが昼夜の BSEEG スコアの動きが逆転しているもの、生理食塩水の投与による BSEEG スコアの上昇がみられるもの、とさまざまであった。若齢マウスと老齢マウスに対する Ultrapure-LPS を様々な量で投与し、投与後の sBSEEG スコアの比較を行ったところ、若齢マウスでは、Ultrapure-LPS の用量依存性に sBSEEG スコアが上昇する傾向が確認された。高齢マウスにおいても Ultrapure-LPS の用量依存性に sBSEEG スコアが上昇する傾向が確認された。さらに sBSEEG スコアの上昇は若齢マウスと比較して大きいことが確認された。

Ultra-pure LPS 投与後の sBSEEG スコア



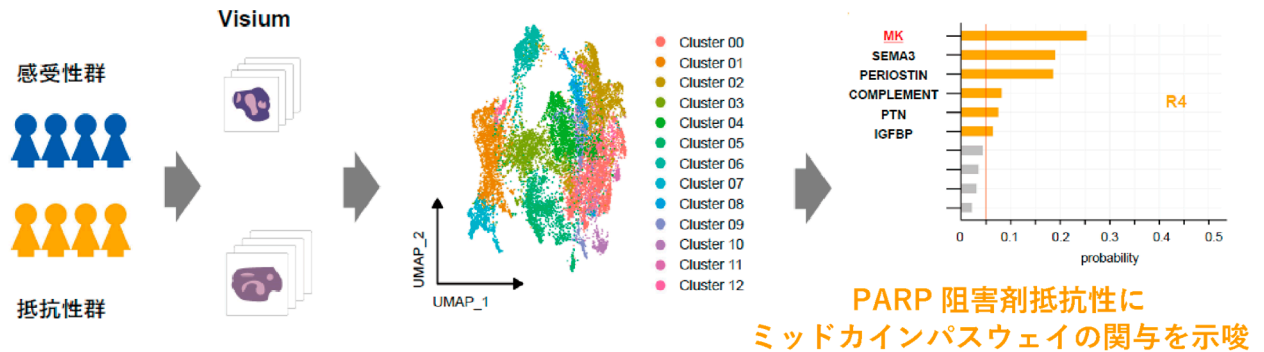
【目的】 卵巣癌は、様々な組織型が知られており、異なる分子生物学的背景および臨床症状を呈する。従って、組織型毎に研究を進める必要があり、希少な組織型では十分に研究は行われていない。また、PARP 阻害剤の臨床応用により卵巣癌治療の転換点を迎えている。PARP 阻害剤により、卵巣癌全体では患者の予後改善が期待されるが、個人レベルで見ると、効果不良症例も経験する。本研究においては、空間的トランスクリプトーム解析に基づいて、PARP 阻害剤抵抗性の高異型度漿液性癌と、成熟奇形腫の悪性転化の病態に迫ることを目的としている。

【方法】 卵巣高異型度漿液性癌 8 症例と卵巣成熟奇形腫の悪性転化 5 例に対して、10X Genomics 社の Visium により空間的トランスクリプトーム解析を行った。卵巣高異型度漿液性癌の解析においては、PARP 阻害剤の奏功例 4 例と非奏功例 4 例で比較を行い、治療抵抗性に関わる因子を検索した。成熟奇形腫の悪性転化においては、癌細胞のみに着目した解析を行い、同定された因子に関して、当研究室で樹立した細胞株を用いて機能解析を行った。

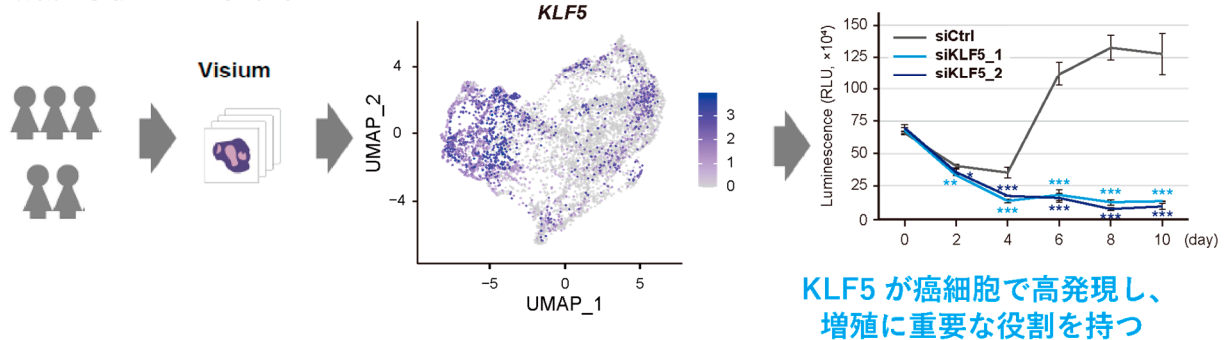
【結果】 高異型度漿液性癌の 8 例のデータを統合し、遺伝子発現をもとにしてクラスターに分類し、癌細胞を多く含むスポットと間質細胞を多く含むスポットを同定した。そして、PARP 阻害剤の関与が示唆される因子として、ミッドカインパスウェイが同定された。成熟奇形腫の悪性転化においては、癌細胞を多く含むスポットの特徴として、KLF5 が発現上昇していることが見いだされた。細胞株を用いた解析においても、KLF5 の発現抑制により、細胞増殖は著明に抑制され、アポトーシスが誘導される結果が得られた。従って、空間的トランスクリプトーム解析により、2 種類の卵巣癌における新たな知見がもたらされた。

空間的トランスクリプトーム解析に基づく病態解明

1. 高異型度漿液性癌



2. 成熟奇形腫の悪性転化



162 若年性骨髄単球性白血病の遺伝子発現制御機構	若松 学
---------------------------	------

【目的】 若年性骨髄単球性白血病 (Juvenile myelomonocytic leukemia : JMML) は、主に 5 歳未満の小児に発生する予後不良な血液悪性腫瘍である。JMML は、本邦で年間約 20 例が発症する非常に稀な小児がんの一病型である。JMML 患者の約 9 割は、細胞の分化や細胞増殖のシグナル伝達に關与する RAS 關連遺伝子 (*PTPN11*, *NRAS*, *KRAS*, *NF1CBL*) に遺伝子変異を認める。一部の JMML 患者では、RAS 経路の遺伝子変異に続いて、*SETBP1* や *JAK3* 遺伝子にセカンドヒット変異を認め、これらの変異を認める患者は化学療法に抵抗性で再発率も高く、特に予後不良である。また、2018 年にゲノムワイドなメチル化解析が大規模に行われた結果、高メチル化プロファイルを認める症例で有意に予後が不良であることが明らかとなった。ゲノムは、様々な構造状態を取ることによって空間的に近い距離にあるゲノム同士が相互に影響し、遺伝子発現の On と Off のスイッチを切り替えて、細胞の機能・分化・恒常性の維持を制御する。最近、次世代シーケンサーによる解析技術の著しい進歩により、遺伝子発現の調節を担う基本単位である Topology associating domain (TAD) を同定し、3 次元的なクロマチン構造解析法 (Hi-C 法) が技術的に可能となった。TADs は、遺伝子発現調節の基本構造単位とし、500 kb から 1 Mb 程度の領域に複数の細胞特異的、あるいは発生時期特異的に働く coding 遺伝子と、その発現調節領域を含む長い DNA 単位が大きな塊を作り、急性白血病でも特徴的な TADs が報告されている。本研究では、Hi-C 法を用いて、JMML における 3 次元クロマチンの構造変化に対して、どの領域に、どのように影響を及ぼすかを検討し、JMML の病態に關連するゲノム領域の同定やクロマチン構造の制御機構を解明することを目的とした。

【方法】 本研究で実施する Hi-C 法では、JMML 患者由来骨髄単核球細胞を死細胞の除去を行った後に、空間的に近接關係にあるゲノム領域を保存したまま抽出するため、ホルムアルデヒドを用いてクロスリンクした。クロスリンクした後に、クロマチンを制限酵素で切断し、切断された DNA 末端にビオチン化ヌクレオチドを取り込み、ライゲーション処理を実施した。脱クロスリンクの後 DNA を精製し、精製 DNA から次世代シーケンサーを用いて解析を行うために、シーケンスライブラリーを調製した。既存のツールを用いて、作成ライブラリーをペアエンドで解析しコントロールデータとして正常健康人の凍結保存細胞を用いた同様の Hi-C 解析を行い、比較した。

【結果】 Hi-C 解析を JMML 患者と健康人で実施し、全体で 2,400 個の TADs を同定した。うち、両者で共通する TADs は、1,485 個で、JMML 患者に特異的な TADs 領域は 399 個であった。次に、public database から急性骨髄性白血病細胞株の Hi-C データを抽出し、本研究の TADs と比較検証した。さらに、得られた領域に含まれる遺伝子の、mRNA 発現レベルとの相關關係を評価し、JMML に認められる TADs 領域、かつ遺伝子発現が有意に亢進している領域を複数同定した。今後は、サンプル数を増やして解析を継続する予定である。

2,400 個の TADs を同定

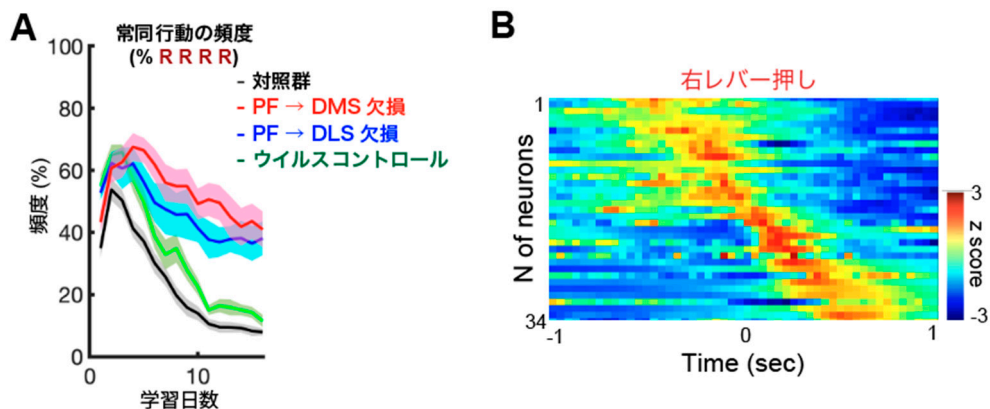


【目的】 レット症候群は自閉症スペクトラム (ASD) に含まれる神経発達障害であり、その根本的治療法は確立されていない。レット症候群における症状の多様さや個人差を考慮すると、特定の行為障害に焦点を絞った“*Domain-specific*”な責任脳回路や分子に関するレット症候群の病態解明研究は必要不可欠である。レット症候群には、自閉症状に加えて運動障害が所見されるが、その中でも常同行動と呼ばれる特定の行動を繰り返す障害が顕著である。疾患の原因遺伝子として *Mecp2* (*Methyl-CpG-Binding protein 2*) が同定されているものの、*Mecp2*の変異が行動障害を引き起こす神経機序は不明な点が多い。将来的な *Mecp2*を標的とした核酸医薬等の開発が望まれるが、そのためには同疾患の特定の行為障害を引き起こす脳回路や神経表象を解明する基礎研究が求められる。我々は最近、独自のマウス行動実験系を用いて、*Mecp2*欠損マウスの常同行動がみられることを見出した。本研究は、この常同行動を定量できる行動実験系を用いて、ウイルスベクターを用いた神経回路選択的な機能欠損により常同行動を引き起こす神経基盤の解明と、マウスが常同行動を示す際の神経活動を可視化、記録・解析できる生体内光学的ライブイメージングを適用することで、レット症候群の行動障害の病態機序の解明に繋げる基礎知見を取得することを目的とした。

【方法】 *Mecp2*欠損マウスでの実験を開始する前に、正常野生型マウスを用いて、常同行動の定量化に最適なオペラント条件付け課題の確立に取り組んだ。C57BL/6J (オス、2ヶ月齢)を用いて、左右のレバーを LLRR の順で押すと報酬が貰える実験系を設定した。我々自身の先行研究に基づき、*Mecp2*欠損マウスにおいて、RRRR の順で右レバー押しに固執する常同行動が確認されていたことから、この常同行動を引き起こす神経基盤として、視床→線条体路に着目し、同回路の機能欠損が常同行動に及ぼす影響を検証した。具体的には、ウイルスベクターを介して Cre 組換え酵素を視床→線条体ニューロンに発現させ、Cre 依存的な神経回路の欠損実験を行った。また、線条体から生体内光学的ライブイメージングを行い、常同行動のような RRRR の順で右レバー押しに固執する行動をマウスが示す際の、線条体神経活動の記録と解析を行った。

【結果】 正常野生型マウスでは、2週間に渡るトレーニングにおいて、LLRR の順でレバーを押す行動シーケンスを獲得できた。一方で、視床→線条体路の欠損では、LLRR の学習に遅延が生じ、RRRR の常同行動のような行動が観察された (下図左)。さらに、RRRR の常同行動のような右レバーへの固執を示すマウスにおいて、右レバーを選択的に表象するニューロン集団が線条体に観察されることがわかった (下図右)。これらの結果は、レット症候群モデルマウスである *Mecp2*欠損マウスにみられる常同行動の責任脳回路として、視床→線条体路が重要な役割を果たしており、その機能不全により線条体に常同行動を神経表象する神経細胞集団が発現し、学習不応が生じることを示唆している。

常同行動の責任脳回路の候補と神経表象

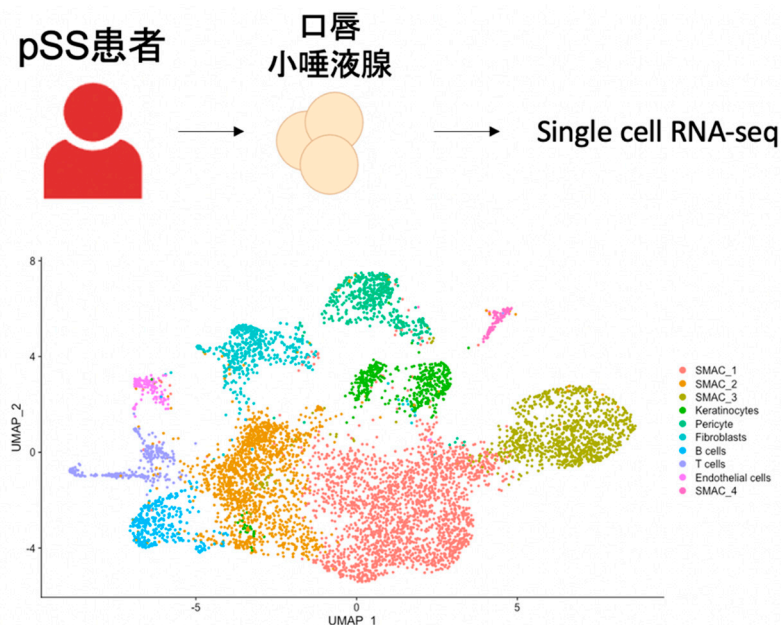


【目的】 シェーグレン症候群 (Sjogren syndrome : SS) は外分泌腺のリンパ球性炎症を特徴とする自己免疫疾患である。以前よりマウスモデルやヒト血液検体などで獲得免疫である T 細胞や B 細胞の病態への関与が報告されている。しかし、実際に SS 患者の炎症病変局所である小唾液腺におけるこれら細胞の役割は不明な点が多い。本研究では SS 患者の口唇小唾液腺を用いて一細胞遺伝子発現解析 (single cell RNA-seq : scRNA-seq) を行い、病変局所における細胞分布を俯瞰的に評価すると共に、特に T 細胞と B 細胞の相互作用を評価し病態解明に繋げることを目的とする。

【方法】 未治療である一次性 SS 患者 4 例を対象とした。全例抗 SS-A 抗体陽性であり、2016 年 ACR/EULAR の SS 分類基準を満たした。口唇小唾液腺を採取後、コラゲナーゼ処理を行い、細胞懸濁液を準備した。10x genomics 社の Chromium Next GEM シングルセル 5' キット v2 for Dual index のキットを用いて scRNA-seq を行った。NovaSeq にてシーケンスを行い、Seurat のソフトウェアを用いてクオリティチェック、データ統合および解析を行った。各クラスターの遺伝子発現を評価すると共に、特に T 細胞および B 細胞に着目して解析を行った。

【結果】 遺伝子発現の違いから合計 10 個のクラスター (T 細胞、B 細胞、周皮細胞、ケラチノサイト、線維芽細胞、内皮細胞、腺房細胞) を検出した。腺房細胞は更に 4 つに分けられ、一部は Profibrotic なマーカーが高発現していた。細胞間コミュニケーションの解析を行ったところ T - B 細胞間だけでなく、他の T 細胞 - 非免疫細胞間の相互シグナルも認められ、ダイナミックな細胞間コミュニケーションによる病態形成が示唆された。現在、本サンプルの TCR-seq (T 細胞受容体シーケンス) を行うと共に、小唾液腺の Spatial Transcriptomics (空間トランスクリプトーム解析) の解析に向けて準備中である。

研究全体像

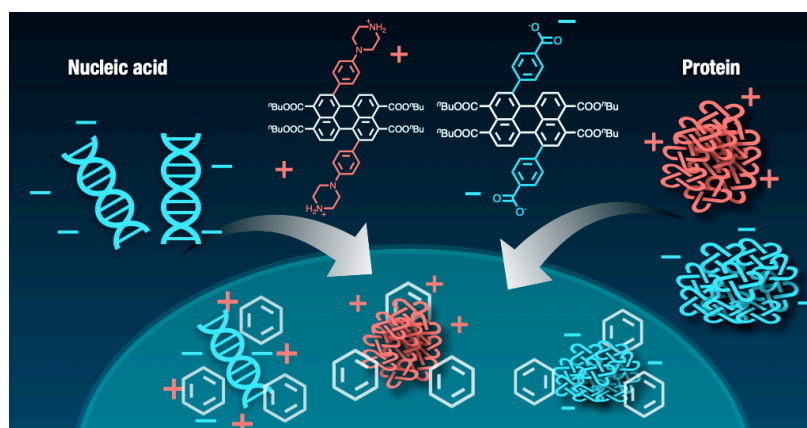


【目的】物質輸送はあらゆる生物分野に関連する基本的な事象である。「何を運ぶか」「どこに運ぶか」によって関連する分野が創薬、植物学、分子生物学、ゲノム編集など多岐にわたるため、新たな輸送法の開発は他分野への大きな進展を期待できる。特に核酸やタンパク質は近年創薬、医学でよく用いられる生体高分子であるが、細胞内において構造安定性に乏しく、プロテアーゼやヌクレアーゼによって分解を受けることでその機能を失ってしまう。それに加え、低分子と比較して製造やライセンスコストが高いため、核酸やタンパク質の機能を最大限に発揮させるには、標的組織の細胞内へと効率的に送り込むことが求められる。ゲノム編集は、医学をはじめとした生命科学のあらゆる分野へ革命をもたらした技術である。ゲノム編集は創薬や医療の分野でも盛んに研究されており、ゲノム編集によって作製された疾患モデル細胞が疾患の発現機構の解明や化合物スクリーニングによる薬剤開発に用いられている。さらに、病気の原因となる遺伝子のノックアウトや欠損遺伝子のノックインのような遺伝子治療を行うことで、難病を根本的に解決できる可能性がある。2020年にCRISPRがノーベル化学賞の受賞対象にもなったように、基礎研究と応用研究の両面で開発が活発化している。ゲノム編集技術の最大の障壁の一つは、ゲノム編集ツールの細胞への導入にあるため、効率的に導入する方法が依然として求められている。

【方法】本研究ではゲノム編集ツールとなりうる核酸やタンパク質、さらに抗体の細胞内輸送を輸送可能な担体分子の開発を行った。さらに見出した分子群のライブラリー構築をおこない、その詳細な化学構造と輸送効率の相関関係を調査した。

【結果】輸送する核酸の種類、輸送箇所にあわせたナノカーボン分子を合成すべく、ナノカーボン分子の精密合成、核酸輸送に関する構造機能相関を試みた。これまでに、アミノ基を導入したペリレン分子KTU059、KTU207およびお椀型分子であるコラニュレンKTU205が哺乳類細胞において核酸の輸送能を有していることをウエスタンブロット解析から見出していた。そのためKTU059、KTU207、KTU205を出発点として、核酸輸送の想定作用機序に基づいた構造機能相関研究を行った。その結果、アミノ基の種類や化合物の脂溶性がDNA輸送において非常に重要な要因であることが示唆された。またタンパク質の等電点を参考に、アニオン性の蛍光タンパク質R-phycoerythrin (R-PE)を標的にカチオン性ペリレン誘導体を用いて輸送実験を行った。バイオイメージングの結果、細胞内にR-PEを確認できた。また、同様にアニオン性の加水分解酵素 β -galactosidase (β -Gal)も細胞内に輸送可能であることを見出し、加えてその生物活性を有していることが示された。さらにアニオン性ペリレン誘導体SMZ034およびSMZ040を新たに合成し、カチオン性タンパク質として抗体を標的とした輸送能の調査を行った。するとバイオイメージングの結果、細胞内への輸送が見出された。またSMZ034をもちいたカチオン性の毒性タンパク質Trypsinの輸送実験をしたところ、輸送剤なしと比べて有意な差で細胞毒性が示された。

ナノカーボン分子をもちいた核酸やタンパク質の細胞内輸送

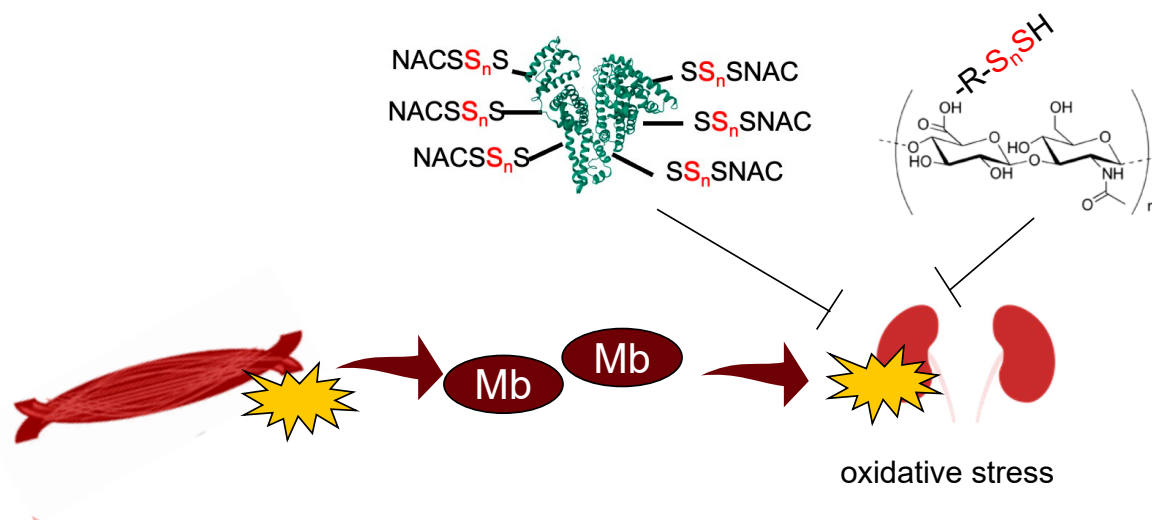


【目的】 酸化ストレス状態では、体内の抗酸化物質が不足し、腎臓や肝臓などの臓器の病気が進行する。最近、超硫黄分子と呼ばれる化合物が注目されており、効率的に酸化ストレスを緩和することが示されている。しかし超硫黄分子は反応性が高く、血中で速く分解されるため、効率的な治療には適切な薬物送達システムが必要である。本研究では、ヒト血清アルブミンやヒアルロン酸を担体として超硫黄分子を送達させることにより、腎臓や肝臓の疾患を治療する新しい薬剤を合成し、評価することを目的とする。

【方法】 血清アルブミンにはチオール基を導入し、超硫黄ドナーと反応させることで超硫黄の付加を試みた。ヒアルロン酸は架橋剤を用いてチオール基を導入後、一酸化窒素により酸化させてさらにスルフィドと反応させることにより超硫黄の付加を試みた。

【結果】 アルブミンおよびヒアルロン酸に超硫黄を付加することに成功した。細胞内に超硫黄を供給し、酸化ストレス除去活性を有することが示された。横紋筋融解症誘発の急性腎障害モデルにおいて、合成した超硫黄ドナーが治療効果を有することを明らかにした。

超硫黄ドナーの抗酸化活性による横紋筋融解症誘発急性腎障害の抑制

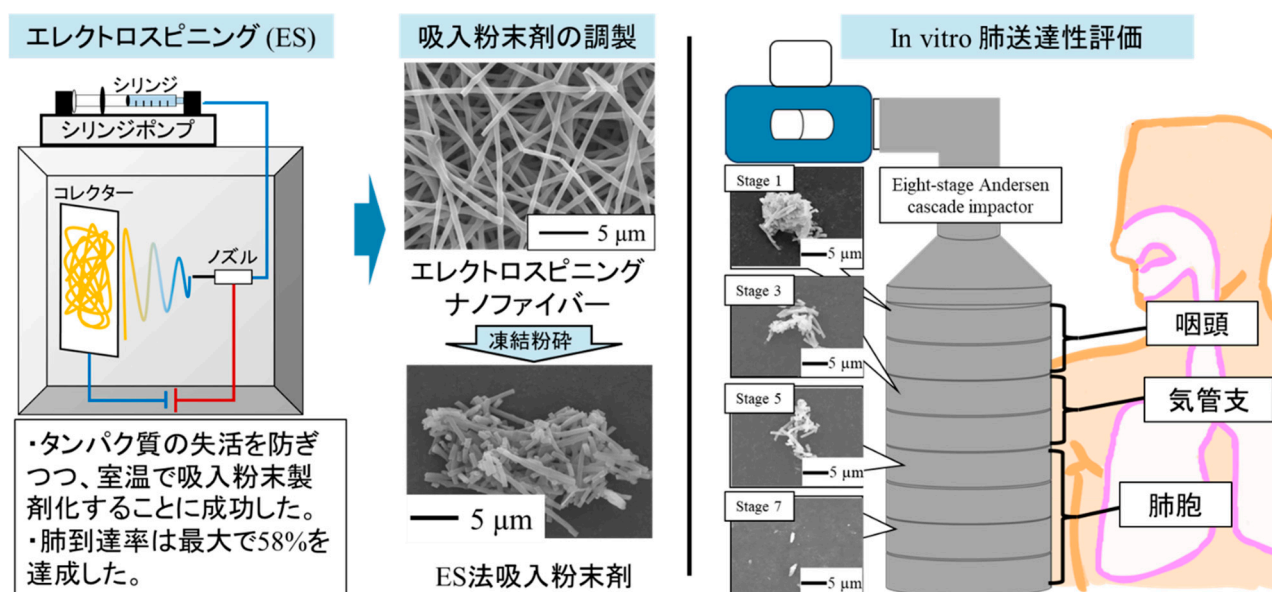


【目的】吸入粉末剤（DPI）は吸入剤開発の第一選択である。粉末粒子が肺深部に到達するには粒子径を約 $1\sim 6\mu\text{m}$ と微細に制御する必要があるが、シングルミクロンの粒子は付着凝集性が高いため吸入デバイスからの放出が難しい。また、既存の DPI 調製法は薬物を粉末固化するために熱を用いる。しかし、熱処理による乾燥は熱に弱い薬物を分解または失活させてしまうため、タンパク医薬を DPI へ応用する際のボトルネックとなっている。本研究では、高分子ポリマー溶液を室温以下でファイバー固化可能なエレクトロスピンニング（ES）法に着目し、薬物含有ファイバーを微粒子化することで、DPI に応用することを目指した。装置のノズルから放出された試料溶液は、コレクターに捕集される過程で溶媒が蒸発するため、熱を必要とせずあらゆる薬物を粉末固化できる。

【方法】ナノファイバーマットの賦形剤としてポリビニルアルコールおよび D(-)-マンニトール（Man）、モデル薬物として α -キモトリプシンを用いた。ES 法を用いてナノファイバーマットを調製し、それを凍結粉碎することにより乾燥粉末を得た。薬物安定性評価として α -キモトリプシンの基質である *p*-ニトロフェニル酢酸を添加し、加水分解物を定量することで ES 法 DPI 製剤化後の α -キモトリプシン活性を評価した。肺送達性評価として、カスケードインパクトターを用いて ES 法 DPI の肺到達率を測定した。

【結果】ナノファイバーマットは直径数百ナノメートルの均一な繊維構造を有していた。Man を添加することで、短い粉碎時間（0.5 分未満）でナノファイバーマットを微細化することに成功した。粉碎時間依存的に α -キモトリプシン活性は低下したものの、短時間で粉碎した ES 法 DPI の α -キモトリプシン活性は、粉末製剤化前と同等の活性を維持していた。対照群である、ネブライザー処理した吸入液剤の α -キモトリプシン活性は 57% まで低下したため、ES 法 DPI のタンパク医薬に対する有用性が示された。さらに、0.5 分未満で粉碎した Man を含む ES 法 DPI は、高い分散性と優れた *in vitro* 肺送達性を示した。*in vitro* 肺送達性評価の結果、Man を含む ES 法 DPI は解砕性の程度によって分級され、15% の Man を含む 0.25 分間粉碎された ES 法 DPI が最も高い肺送達率（58%）を示した。ES 法 DPI 調製技術は、タンパク質を安定かつ効率的に肺へ送達する新規調製技術となる可能性がある。

エレクトロスピンニングファイバーの吸入粉末剤の製剤コンセプトおよびその成果

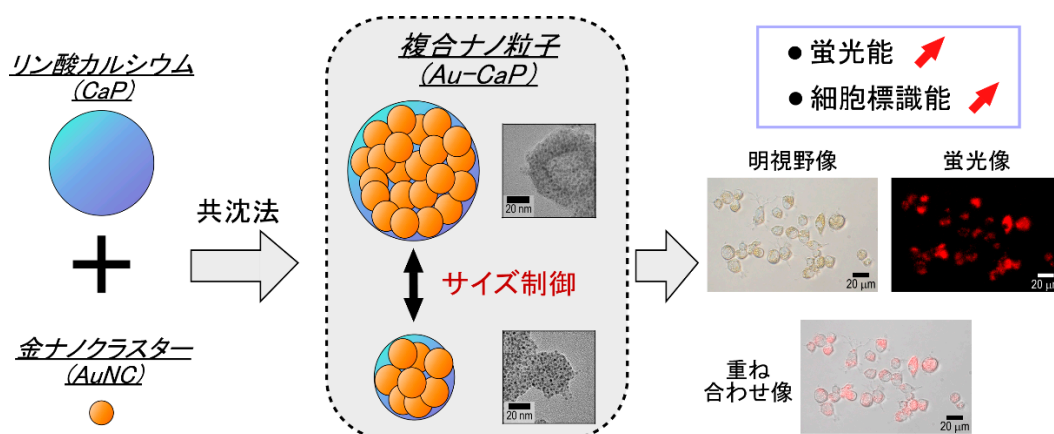


【目的】 近年の細胞加工技術の目覚ましい発展に伴い、難治性疾患等に対する細胞移植療法の研究開発が活発化している。iPS 細胞、免疫細胞、脂肪細胞等を用いた新たな細胞移植療法の開発が加速する中、生体内に移植する細胞の生体内挙動（位置・数）を把握するための、より高機能な追跡剤が必要とされている。シングルナノメートルサイズの金ナノクラスターは、高い X 線吸収能に加えて蛍光能を有するため、体内深部を含む全身観察を可能とする X 線 CT 造影と組織・細胞レベルの高解像顕微鏡観察を得意とする蛍光イメージングの双方に利用可能なバイモーダルイメージング剤として有用である。我々が開発したグルタチオン修飾金ナノクラスター（AuNC）は、高い化学的安定性と腎臓排泄性を併せ示すことから、短期的にも長期的にも生体への悪影響の懸念が少ないと期待されている。しかし、細胞・組織の自家蛍光等に対し、十分な蛍光能とは言えない。加えて、表面エネルギーの極めて高いシングルナノメートルサイズの AuNC を、十分な量で、かつ凝集させることなく細胞内に導入することは容易ではない。そこで本研究では、生体親和性・生体吸収性を併せ示し、細胞への遺伝子導入用キャリアとして実績を持つリン酸カルシウム（CaP）に AuNC を分散担持させた金-リン酸カルシウム複合ナノ粒子（Au - CaP）を作製し、蛍光能と細胞標識能を評価した。

【方法】 共沈法により Au - CaP の作製を試みた。具体的には、種々の濃度の AuNC を含むリン酸カルシウム過飽和溶液（Ca : 5.1 mM、P : 2.6 mM、Au : 0.6、1、2、4、10 mM）を調製し、37°Cで 60 分間静置した後、析出物を洗浄・回収して試料を得た。得られた試料の構造、組成、蛍光強度は、透過電子顕微鏡（TEM）観察、エネルギー分散型 X 線分光法（EDS）、蛍光分光法等により評価した。また、得られた試料（Au : 0.6 mM 条件で作製）ならびに AuNC 単体（比較用）をマウスマクロファージ様細胞にそれぞれ 24 時間暴露した後、細胞の顕微鏡観察により細胞標識能を評価した。

【結果】 TEM 観察の結果、得られた試料はシングルナノメートルサイズの微粒子を高密度に担持した球状粒子であり、EDS 分析において Ca、P、O、Au を含むことが示された。以上より、本共沈法によって CaP のマトリックスに AuNC が担持された Au - CaP が生成したと考えられた。Au - CaP の平均粒子径は、反応液中の金濃度増加に伴い 91 nm から 35 nm に減少した。表面にグルタチオン由来のカルボキシ基やアミノ基を有する AuNC が、CaP の核形成・成長プロセスに関与し、粒子径に影響を与えたと考えられる。蛍光分析の結果、Au - CaP は AuNC 単体の 33~140 倍もの蛍光強度（金元素 1 物質あたりでの蛍光強度 570 nm）を示した。これは凝集励起発光現象（AuNC 間の相互作用や AuNC のブラウン運動制限による動的消光抑制等による発光増強）の発現が主要な要因と推定される。細胞の顕微鏡観察の結果、AuNC 単体ではマクロファージを可視化できなかったのに対し、Au - CaP では明瞭に可視化できた。以上、共沈法により多数の AuNC を高密度に CaP に担持することで、蛍光能と細胞標識能の両者の向上に成功した。

本研究の概要図

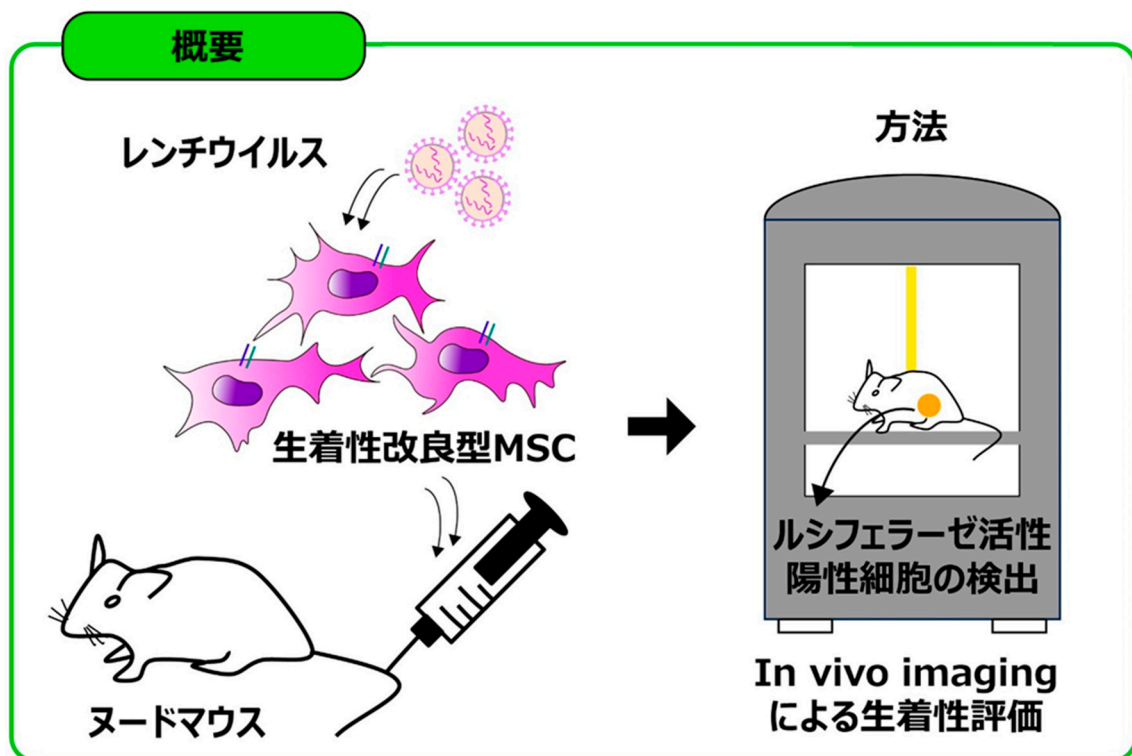


【目的】 これまでに、間葉系幹細胞（MSC）の生体組織への完全な生着および分化は認められていない。そこで我々は、MSCの生体組織への接着性・遊走性を細胞工学的手法に改善することで、MSCの生体内の生着期間を劇的に延長させ、抗炎症作用の持続期間を伸長すると共に、本来有する多分化能を発揮させ、組織再生を誘導することが可能となると考えた。本研究では、細胞接着因子をレンチウイルスベクターによってMSCに発現させ、生着性を改良したMSC（生着能改良型MSC）を開発する事を目的とする。

【方法】 生着性の高い若齢宿主由来のMSCと老齢宿主由来のMSCの遺伝子発現比較をRNA-seqによって行う。その後、生着性の高い若齢宿主由来のMSCで高発現の細胞接着分子に注目し、独自に開発したLuciferaseおよびVenus発現レンチウイルスベクターによって強制発現させる。回収したMSCをマウスに尾静脈注射し、*in vivo*イメージングを行うことで生体内での生着性が亢進したか測定する。

【結果】 RNA-seqの解析結果から、生着性の高い若齢宿主由来のMSCの細胞接着分子は既報の論文の生着性に寄与する分子ではなかった。そのため、人工的にMSCの生着性を亢進させることが知られているhCXCR4および細胞の血管外輸送に機能するhPSGL1をクローニングし、MSCに強制発現させた。しかしながら、MSCはレンチウイルスの感染効率が悪く、十分な発現誘導を行うことができなかった。最終的にはPiggyBac Transposon Vector Systemを導入し遺伝子発現効率を向上させることに成功した。

生着性亢進型MSCの開発



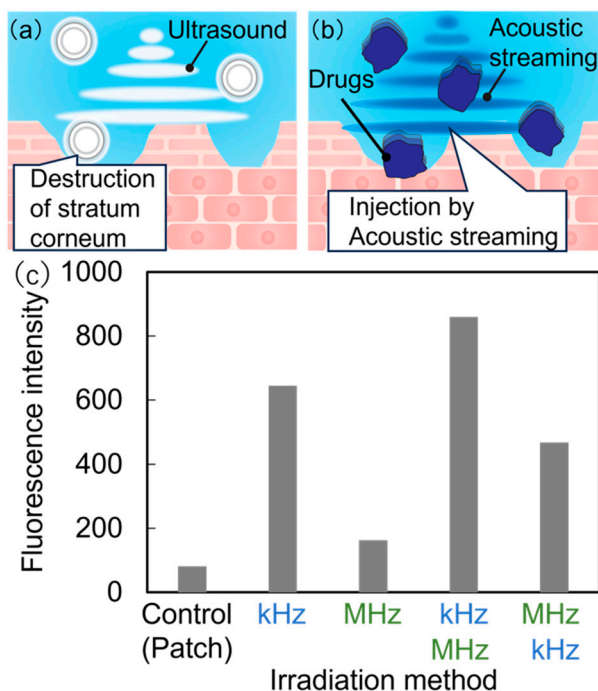
170 超音波の重畳照射による経皮薬剤投与の効率化 倉科 佑太

【目的】 生体高分子薬剤はその特異性から高い薬効と副作用の少ない治療を可能にする薬剤として注目されており、その主な投与方法は注射による投与である。これは生体高分子薬剤の表面特性と分子量の大きさにあり、消化器からの吸収や皮膚の角質層の通過が難しいことから、経口投与や塗布などの経皮投与が困難なためである。このため、生体高分子薬品の投与には、侵襲性の高い注射が用いられている。この侵襲性の高い注射に代わる低侵襲な投与方法の1つとしてニードレスで薬剤を経皮投与可能なソノフォレシスが注目されている。本研究では、生体高分子薬剤の経皮投与を改善し、侵襲の少ない治療方法を提供する。しかし、従来のソノフォレシス技術では、薬剤の安定な投与が難しく、投与量も制限されていた。そこで、超音波照射方法を改良し、生体高分子薬剤の経皮投与効率を向上させることを本研究の目的とした。

【方法】 生体高分子薬剤モデルを使用して、ブタ皮膚に対する音響流の影響を評価した。本研究では、ランジュバン型振動子とピエゾ素子を用いて超音波を照射し、その照射条件を kHz 帯と MHz 帯を種々の組み合わせで順次照射することによる薬剤投与の効率を検証した。なお、薬剤投与量を定性的・定量的に評価するために、蛍光修飾したオボアルブミンを薬剤モデルとして用いて実験を実施した。

【結果】 従来の kHz のみを照射する手法を、本研究のコンセプトである kHz 帯と MHz 帯を両方とも照射する方法と比較することで、その優位性を確かめた。その結果、kHz 帯と MHz 帯の順次照射による薬剤モデルの投与量が、従来の手法よりも効果的に増加することを明らかとした。これにより、生体高分子薬剤の経皮投与効率を向上させるために、超音波照射方法の改良が有効であることが示された。これに加えて、理論計算から MHz 帯の照射距離が長くなるほど音響流の流速が上昇する特徴を用いて、超音波を照射する距離を調節する実験を実施した。その結果、薬剤投与量が増加する結果が得られた。このことから、音響流の付与がソノフォレシスの薬物投与量の向上に寄与することが示唆された。本研究によって、将来的にはより安全で効果的な経皮治療法の開発に貢献することを期待している。

超音波照射による薬剤投与のコンセプトと皮膚に投与された生体高分子の定量評価



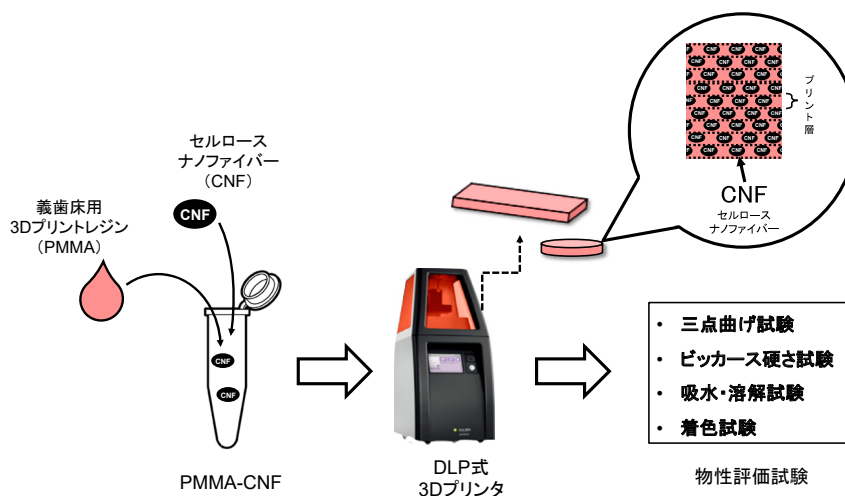
【目的】 近年、デジタル技術による補綴装置の設計・製作が普及し、3D プリント義歯が臨床応用されている。しかし、義歯床用 3D プリントレジンは従来の義歯床用材料と比較して機械的強度が低い。先行研究では、義歯床用 3D プリントレジンにフィラーやガラス繊維などの補強材を添加する方法が考えられたが、このような補強材は高コストかつ、審美性を損ねることから臨床的に好ましくない。さらに、このような補強材を添加した材料はリサイクルができないため持続可能な開発目標 (SDGs) が低く、将来的に規制される可能性がある。

そこで、本研究ではバイオマス材料として自然界で豊富に入手可能なため低コストで、優れた生体適合性を持つセルロースナノファイバー (CNF) に着目した。CNF は、①高強度、②軽量、③高弾性、④低熱膨張性、⑤優れた生体適合性、⑥植物由来の再生型資源、⑦透明性等の特徴を合わせ持つため、先行研究で調査した補強材と比較して優位性が高い。本研究の目的は、義歯床用 3D プリントレジンの機械的物性の改善に対する CNF 添加量の最適化である。

【方法】 CNF をそれぞれ 0 (コントロール)、0.5、1.0、1.5、2.0 wt% の濃度で義歯床用 3D プリントレジンに添加し、攪拌機で混ぜ合わせた後、真空ポンプを用いて脱泡した。試験片は、DLP 式の 3D プリンタを用いて、z 軸に対して 0° の造形方向と 100 μm のプリント層厚でプリントした (n=6)。試験片をプリント後イソプロピルアルコールで洗浄し、後重合を行った。最終研磨を行った後、試験片を 37 \pm 1°C の蒸留水に 24 時間浸漬した。各グループの試験片について、三点曲げ試験、ビッカース硬さ試験、吸水・溶解試験、および着色試験を実施した。統計解析は、得られた曲げ強さ (FS)、弾性率 (FM)、ビッカース硬さ (VH)、吸水量 (W_{sp})、溶解量 (W_{sl})、および色差 (ΔE) の平均値について、Tukey の多重比較検定を行った ($\alpha=0.05$)。

【結果】 FS は CNF を添加した群 (0.5、1.0、1.5、2.0 wt%) とコントロール群の間で有意差が認められ、0.5 wt% が最も高い FS を示した。FM は全群で有意差は認められなかった。VH は 1.0 wt% と 1.5 wt% 群が有意に高い値を示し、1.0 wt% が最も高い VH を示した。 W_{sp} は CNF を添加するにつれて大きくなり、CNF を添加した群 (0.5、1.0、1.5、2.0 wt%) とコントロール群の間で有意差が認められた。 W_{sl} は全群で有意差は認められなかった。 ΔE は CNF を添加するにつれて小さくなり、0 wt% (コントロール) と 0.5 wt% 群が有意に高い ΔE を示した。以上の結果を総合して、限定された条件下ではあるが、義歯床用 3D プリントレジんに 0.5 wt% または 1.0 wt% の CNF を添加することにより機械的物性が向上することが示唆された。

本研究の概念図

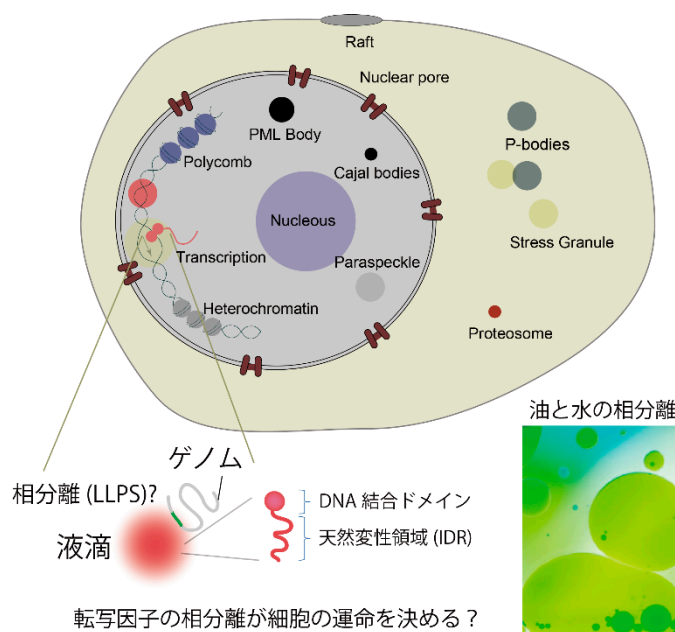


【目的】 2009年に Brangywnne Hyman らが線虫の初期胚でみられる P グラニューールが相分離液滴であることを報告して以来、細胞内の分子は自発的に集まり脂質膜に包まれないオルガネラ（しばしば、「biomolecular condensates」とよばれる）を形成し、細胞内の至るところで重要な役割を果たしていることが明らかになってきている（下図）。この研究の目的は、非膜オルガネラにおける相分離現象の基礎理解を深めるとともに、光技術を用いて転写因子の時空間制御を可能にする新たな技術の開発である。

【方法】 我々は細胞内オルガネラでみられる相分離現象に関する基礎学理の構築に世界をリードする成果を上げてきた（2020, Nat. Cell Biol., 2020 Nat. Comm., 2021 Nature など）。特に、核内の転写因子を時空間操作する光技術を用いて非膜型オルガネラが生成する初期過程のメカニズムを世界で初めて解明した研究（Shimobayashi, et al., Nature, 2021）は、当該分野において国際的に高く評価されている。そこで、本研究ではこのような光技術を応用し、転写を操作する光技術の開発と細胞リプログラミングへの応用に取り組んだ。

【結果】 本研究期間中に PiggyBac システムを用いた巨大 DNA の核内の取り込みや MS2-MCP 技術などを用いることで、転写因子を時空間制御できる光操作システムのプロトタイプを構築することができた。今後、様々なパラメータを変えながら遺伝子発現を計測することで、転写活性化のプロセスを分子数の解像度で明らかにすることができるだろう。

相分離に駆動される細胞内非膜オルガネラ

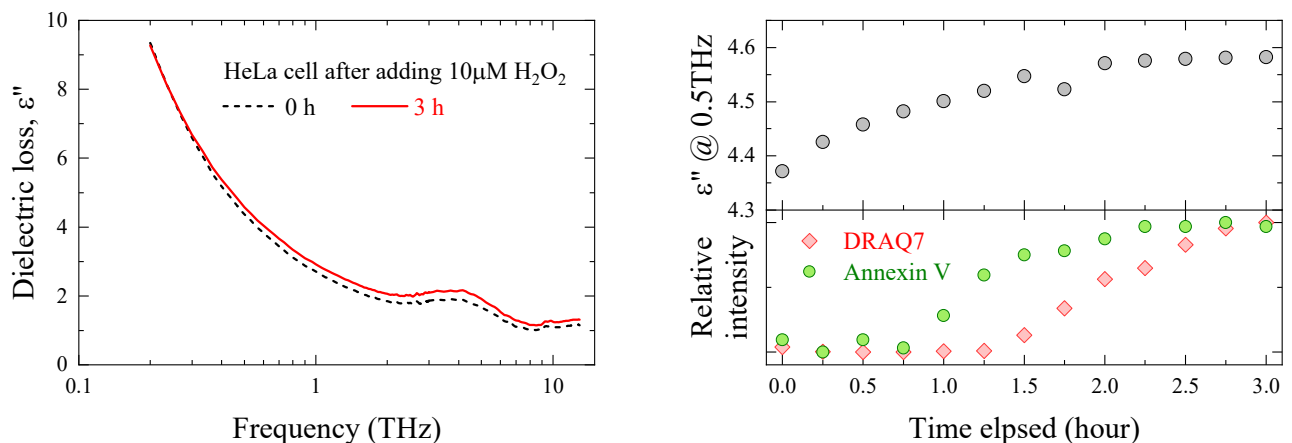


【目的】 水は細胞重量の大半をなす最もメジャーな生体分子であり、我々は核磁気共鳴画像法 (MRI) のような水の状態変化を表す診断技術を経験的に活用している。しかしその一方で、水分子は極めて複雑な物理的性質を示すことから水が分子レベルで果たす生命科学的な役割・機能は未だほとんど明らかになっておらず、細胞内の大半を占める水はいわば謎の“バッファー”に位置付けられているのが現状である。私はこれまでの研究で、テラヘルツ波と呼ばれる2000年代以降に急速に応用開拓が進んできた電磁波帯の分光情報が、細胞内の水分子ダイナミクスを切り拓く技術になり得ることを世界に先駆けて見出し、独自に技術開発を行ってきた。そこで本研究課題では、長時間にわたって安定的にテラヘルツ波分光を実施し、蛍光イメージングと照合してその結果を解釈することで、アポトーシス細胞死の過程で細胞内の水が“いつ”・“どのように”変化しているのかを明らかにすることを旨とする。

【方法】 細胞測定用として独自に開発したテラヘルツ波分光システムを蛍光顕微鏡と組み合わせることで、細胞内の水分子ダイナミクス評価と蛍光イメージングを同時に実施できる測定系に改良した。そしてコンフルエントに接着培養した HeLa 細胞に $10\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ を添加してアポトーシス細胞死を誘導し、Annexin V と DRAQ7 の蛍光イメージングと並行してテラヘルツ波分光を行い、細胞内の水和状態を観測した。

【結果】 今回の実験で得られた、テラヘルツ波領域における HeLa 細胞の誘電損失 ϵ'' (=吸収) スペクトルを左図に示す。細胞死を誘導する直前 (0 h) の誘電損失スペクトルは低周波側に大きい吸収を示し、それに加えて 5 THz 付近にもピークが観察される。これらはともに細胞内の水に由来するスペクトルであり、タンパク質や核酸、リン脂質などの生体分子に由来する吸収ピークは観測されないことから、テラヘルツ波分光では細胞内の水だけが選択的に観測できていることがわかる。ここで $\epsilon''@0.5\text{THz}$ の経時変化を抽出したところ、右上図に示すように細胞内の水はアポトーシス誘導直後からほぼ単調に変化することが見出されたが、この結果はアポトーシス誘導直後から細胞内では水と水の量が連続的に減少し続けるという描像を描いている。一方、細胞内でどのような生理状態の変化が起きているのかを理解するために正立顕微鏡を用いて同一細胞群の蛍光イメージングを同時並行で実施したところ、右下図に示すように Annexin V と DRAQ7 はアポトーシス誘導後に時間遅延を伴って発色することが明らかになった。なお DRAQ7 に対して Annexin V が先行して立ち上がっているが、これは Annexin V はアポトーシス前～中期にみられる細胞膜対称性の喪失をプローブしているのに対し、DRAQ7 は細胞死後期にみられる細胞膜透過性の増加を反映していることに起因する。ここで細胞内の水を表すテラヘルツ波スペクトル ($\epsilon''@0.5\text{THz}$, 右上図) と蛍光強度の経時変化を比較すると、興味深いことに細胞膜の対称性喪失や透過性増大に先立って細胞内では水分子のダイナミクスが変化していることがわかる。この結果は、水の状態が変化 (=水と水の量が減少) することで細胞内の環境がまず変化し、それが“引き金”となってアポトーシス細胞死のプロセスが引き起こされる可能性を示唆するものである。

アポトーシス細胞死における細胞内水分子ダイナミクスと蛍光イメージングの経時変化

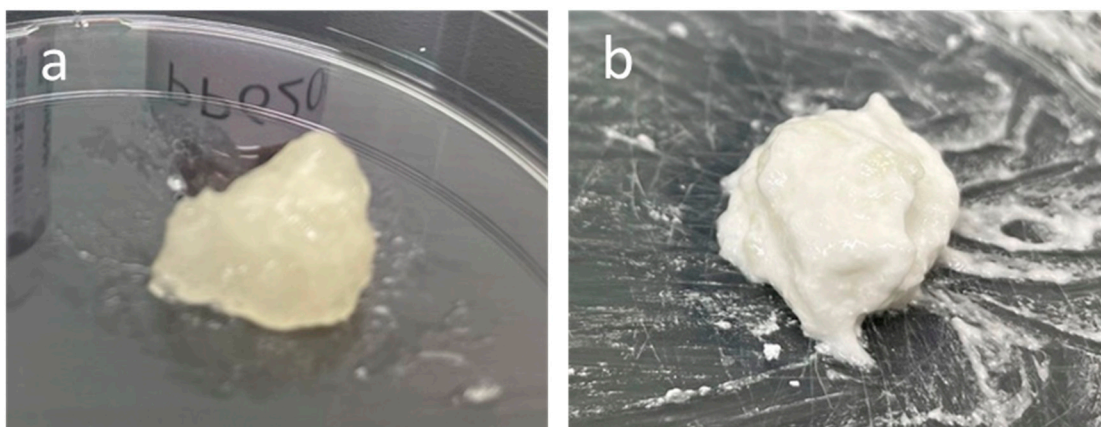


【目的】 口腔インプラントは、人工歯根を顎骨に埋入し、そこに歯を再建することで、咀嚼機能の改善をもたらす。しかし、口腔内の環境下で用いられるインプラントは細菌感染しやすく、インプラント周囲炎に罹患している患者も少なくない。インプラント周囲炎に罹患したインプラントは感染による炎症が消退せず、疼痛、腫脹などの症状が続き、次第に支えとなる顎骨が失われ、摘出が必要になるという予後をたどる。清掃や投薬による消炎を炎症が再発する度に行う対症療法が主流であり、喪失した骨を再生するのは困難である。リン酸カルシウム人工骨を用いて再生する試みも見られるが、既存の顆粒状人工骨は長期残存するため、感染源となり感染を波及させるリスクがある。そこで、吸収を促進させるため、骨増量材を用いて人工骨の量を減少させることを考え、我々は骨増量材としてリン酸プルランに着目した。本研究はインプラント周囲炎の新しい治療法の確立に向けてリン酸化プルランと人工骨の混和物による骨増生効果を評価する。

【方法】 全身麻酔下でビーグル犬の下顎左右側の P3 および P4 を抜歯し、4 週後、それぞれの抜歯部位に頬舌的に 3 mm、近遠心的に 8 mm、深さ 4 mm の骨欠損部を作製した。作製した骨欠損部遠心に歯科用インプラントを埋入し、近心から中央部に残存した骨欠損部には、リン酸化プルランのみ、もしくはリン酸化プルラン+人工骨を埋植した。埋植 8 週後、屠殺し、 μ -CT にて、初期の骨増生を評価した。人工骨には β -TCP を用いた。

【結果】 リン酸化プルランゲルと人工骨を体積比 1:1 で混和すると、パテ状となり、人工骨単体よりも賦形性は向上した (図)。また、 μ -CT 結果より、無埋植群、リン酸化プルランのみ埋植群、リン酸化プルラン+ β -TCP 埋植群の Bone volume/Tissue volume は、それぞれ平均 23.7、25.0、23.3 であった。

リン酸化プルラン (a) とリン酸化プルランと β -TCP 混和物 (b)

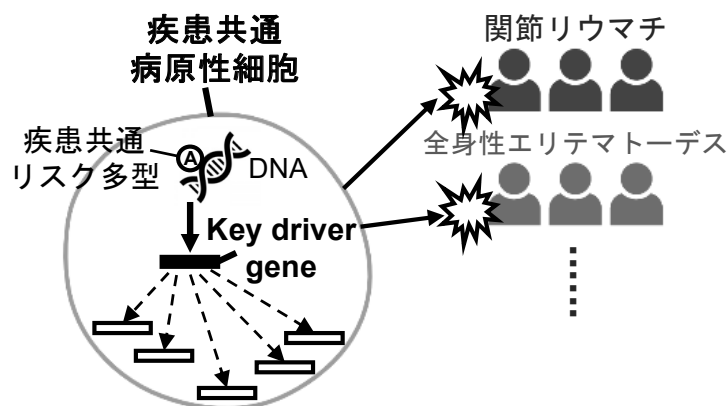


【目的】 免疫疾患は免疫システムが自己の細胞や組織を攻撃する疾患群を指し、代表的疾患に全身性エリテマトーデス (SLE)、関節リウマチ (RA) 等がある。過去のゲノム研究において、免疫疾患のリスク多型の一部は疾患をまたいで共有されることが明らかになり、免疫寛容の破綻に関わる共通の病因が存在することが強く示唆された。しかし過去の bulk 遺伝子発現解析では、共通の病態形成に関わる細胞集団 (疾患共通病原性細胞) を厳密に同定することが困難であった。本研究では、単一細胞レベルで遺伝子発現と細胞表面マーカー蛋白を同時に評価する CITE-seq を複数の免疫疾患の患者末梢血に適用し、最先端のシングルセル解析手法と組み合わせることで、疾患共通病原性細胞を精密に同定し、疾患共通のリスク多型が疾患共通病原性細胞においてどの遺伝子の機能を制御しているのか (key driver gene) を詳細に解明することを目的とする。

【方法】 SLE、RA 患者各 50 例の末梢血免疫細胞を収集し、高精度シングルセル解析 (CITE-seq) を実施した。また上記と並行して、SLE 患者の大規模公共シングルセルデータ (およそ 1,300,000 細胞、SLE 174 例、対照健常人 98 例) の詳細な解析を実施した。

【結果】 SLE 患者の大規模公共シングルセルデータに対して、k 近傍法に基づく細胞集約手法 (Metacell) を用いて、最も類似する 10~20 細胞の遺伝子発現情報を集約することで、シングルセルデータの最大の弱点である「1 細胞あたりの情報量の少なさ」を克服し、末梢血免疫細胞を 91 の詳細な細胞集団に分類することが可能となった。さらに k 近傍グラフを用いた neighborhood abundance analysis を実施することで、91 の細胞集団のうち 32 が健常人に比して SLE 患者で増多し、26 が減少していることが示された。さらに高疾患活動性 SLE と非活動性 SLE 患者群の比較では 22、19 の細胞集団が高疾患活動性 SLE 患者群で増多、減少していることも示された。上記と並行して、今回 SLE、RA 患者各 50 例の末梢血細胞を新たに収集し、高精度シングルセル解析 (CITE-seq) を実施した (データ取得後、解析中)。上記公共データで同定した細胞集団のうち、SLE と RA で共有される病原性細胞を新たに同定し、既存の大規模ゲノムデータとの統合解析を通じて、疾患共通のリスク多型が疾患共通病原性細胞において機能を制御する遺伝子 (key driver gene) の同定とその機能解明を目指す。

疾患共通病原性細胞と key driver gene

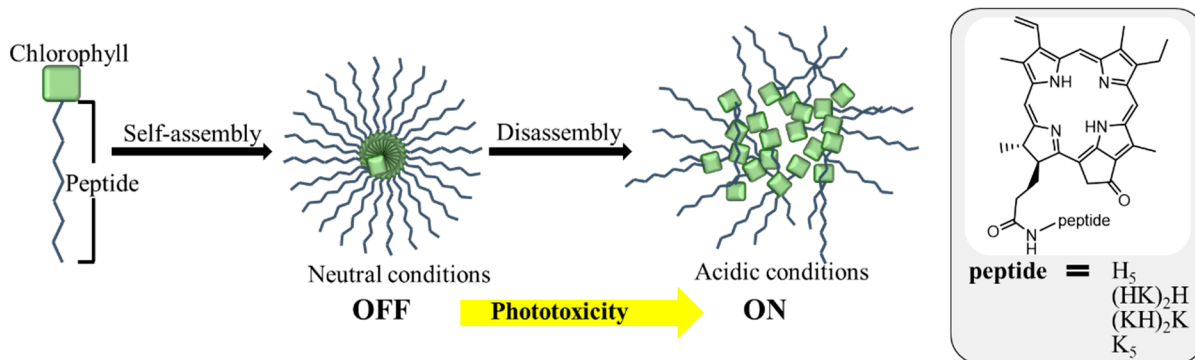


【目的】 光線力学療法 (PDT : Photodynamic therapy) は光増感剤と呼ばれる化学物質を生体内に取り込み、患部に対してレーザー光を照射する治療法であり、抗腫瘍効果が高く、毒性 (副作用) が少ない非侵襲的治療法であることから、近年注目されているガン治療法の 1 つである。しかし、PDT には光過敏症のリスクがあり、光増感剤が体外に排出されるまでは、遮光環境下で生活が必要となる。そこで本研究では、ガン特有の性質である「腫瘍血管の欠陥」と「腫瘍組織の pH 特性」に着目し、腫瘍組織でのみ高い光毒性を示す新規光増感剤として酸応答性ペプチド-クロロフィル複合体の開発を行った。

【方法】 本研究では、ヒスチジン (His, H) とリジン (Lys, K) を含むペプチドとクロロフィルを複合させた化合物を光増感剤として用いた。クロロフィルおよびその誘導体は光増感剤としての機能を有している一方で、凝集すると自己消光によって光毒性が著しく低下するという性質を持っているため、クロロフィル誘導体の凝集・解離を制御することが可能となれば、光増感剤としての光毒性の制御 (OFF・ON) が可能となる。また、凝集体を形成することで 10~200 nm 程度のナノ粒子を形成することが可能であれば、腫瘍組織選択的な蓄積も可能となる。凝集・解離を制御するトリガーとしては、酸応答性ペプチドを用いた。ヒスチジンは酸解離定数 (pKa) が 6.04 であるため、中性条件下ではイミダゾリル基が疎水基として機能し、水溶液中においては疎水性相互作用による凝集性が高くなる。そのため、正常組織のような中性条件下では複合体が凝集し、自己消光による光毒性を軽減する (OFF 状態)。一方で、弱酸性条件下ではイミダゾリル基がプロトン化することで静電反発が起これ、凝集に伴う自己消光が緩和され、光毒性を示すようになる (ON 状態)。このナノ粒子化による腫瘍組織選択的な蓄積と pH 変化による光毒性変化を利用することによって、ガン選択的な光増感剤の開発を行った。

【結果】 ペプチド-クロロフィル複合体として **Chl-(HK)₂H**、**Chl-(KH)₂K**、**Chl-K₅**、**Chl-H₅** を合成し、それぞれの集積体について物性測定を行った。電子顕微鏡を用いて構造観察を行ったところ、**Chl-(HK)₂H** の集積体は腫瘍組織選択的な蓄積が可能なナノ粒子であることが明らかとなった。pH 変化に伴う光毒性評価を、活性酸素蛍光プローブを用いて行ったところ、すべての複合体において酸性条件下の方が、活性酸素量が高くなるという結果となった。腫瘍組織選択的な蓄積と pH 変化による光毒性変化の両方の結果から、最もガン選択的な光増感剤に近い化合物は **Chl-(HK)₂H** であると予想し、HeLa 細胞を用いて暗毒性と光毒性の評価を行った。HeLa 細胞に **Chl-(HK)₂H** をインキュベートし、中性条件下で光照射を行った場合、細胞死はほとんど観察されず、高い細胞生存率を示すという結果となった。一方で、酸性条件下において光照射を行った場合には、細胞死が確認され、中性条件下に比べて細胞生存率の著しい低下が見られた。このことから、**Chl-(HK)₂H** は酸性条件下においてのみ光毒性を示すことが明らかとなり、ガン選択的な光増感剤として機能することが期待できる。

ペプチド-クロロフィル複合体を用いた酸応答性光増感剤

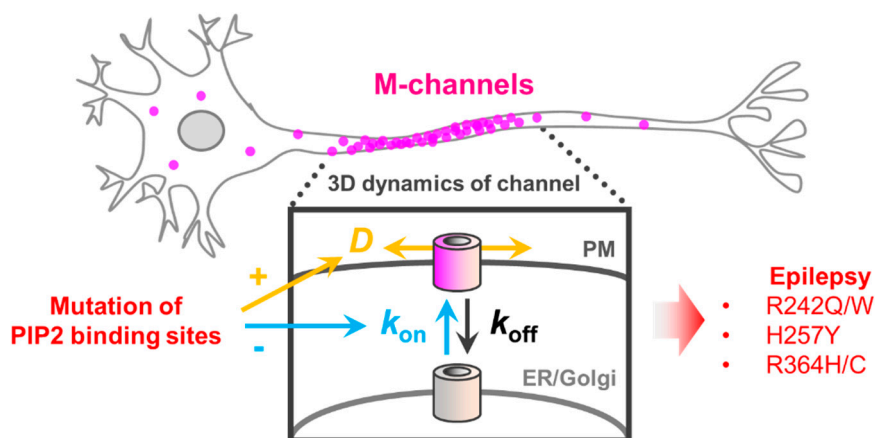


【目的】 電位依存性カリウムチャネルである M チャネル (KCNQ2/3) は神経細胞に発現し、軸索起始部 (Axon Initial Segment : AIS) に局在して活動電位の生成を制御する。M チャネルの制御機構はチャネルの活性制御とトラフィッキング制御に二分できる。前者については、イノシトールリン脂質である PI(4,5)P₂ (以下、PIP₂) が直接的な制御因子として機能することが明らかとなっている。一方、後者についての PIP₂ の関与は未だに良く分かっていない。そこで本研究では、M チャネルの活性制御だけでなく、トラフィッキング制御における PIP₂ の役割を解明することを目指す。

【方法】 本研究では、次に挙げる 2 つの光工学技術を用いて、M チャネルを構成する KCNQ3 の時空間動態の可視化と KCNQ3-PIP₂ 相互作用の光操作を試みた。1. KCNQ3 時空間動態の 1 分子イメージング解析：全反射照明蛍光顕微鏡 (TIRFM) による 1 分子イメージング法を用いて、培養神経において蛍光標識した KCNQ3 の 3 次元的な 1 分子動態を網羅的に定量解析した。2. KCNQ3-PIP₂ 相互作用の光工学的操作：KCNQ3 の PIP₂ 親和性自体を光操作するために、KCNQ3 の PIP₂ 作用部位を構成するリジン残基 (K260) を光感受性ケージドリジン (HCK) に置き換えた。近紫外光 (365 nm) の短時間照射により HCK をアンケージすることで KCNQ3 の PIP₂ 親和性を光操作した。

【結果】 本研究では、まず PIP₂ の結合能力を欠く変異型 KCNQ3 の細胞内局在を調査した。その結果、低 PIP₂ 親和性 KCNQ3 は野生型 KCNQ3 と同様に AIS へと優先的に輸送されるものの、AIS 領域での変異体の表面密度はチャネル活性依存的に有意に減少することが明らかとなった。また、1 分子イメージングを用いた詳細な解析により PIP₂ 結合部位の変異が KCNQ3 の側方拡散とエキソ・エンドサイトーシスの両方のプロセスに影響を与えることが判明した。以上の結果から、KCNQ3-PIP₂ 相互作用がチャネルの活性だけでなく、そのトラフィッキング制御においても直接的な役割を果たすことが示された。さらに本研究では、高い時空間分解能でイオンチャネルと PIP₂ の相互作用を光学的に制御するための「ケージドリジンシステム」を確立した。この手法では、KCNQ3 チャネルの既知の PIP₂ 結合サイトである K260 を HCK に置換した。近紫外光の照射により、実際に KCNQ3 が活性化されることを確認した。このチャネル活性の変化は HCK のアンケージにより、KCNQ3 の PIP₂ 親和性が回復したことに起因すると考えられる。以上の実験により、チャネルの PIP₂ 親和性操作におけるケージドリジンシステムの適用性を実証することに成功した。

AIS における PIP₂ 結合サイトを介した M チャネル空間動態制御の概略図

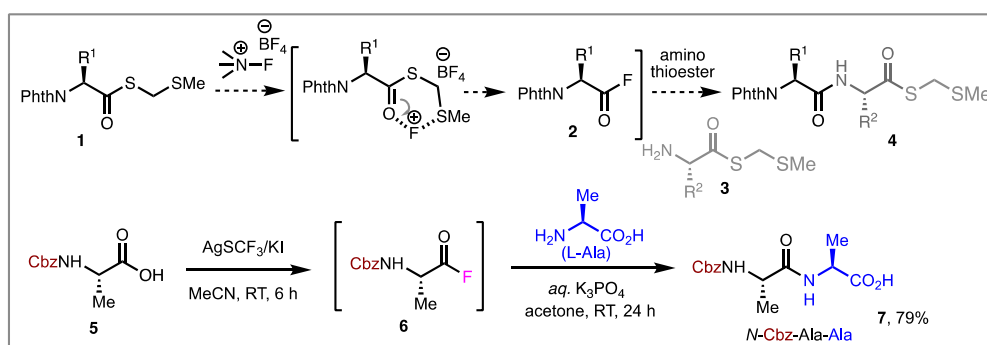


【目的】 近年、中分子医薬品としてのペプチド医薬品が注目を集めている。しかし、従来の手法で合成可能なペプチドは限られており、ペプチド医薬品の更なる発展のためには、簡便かつ効率的な新規ペプチド合成法の開発が必要不可欠である。本研究では、生合成の直截的な手法を人工的に模倣することによって、かさ高いアミノ酸残基との縮合も可能となる、新規かつ効率的なペプチド合成法の開発を目指した。

【方法】 生体内でのペプチド合成は、固相合成法とは異なり、C末端側からアミノ酸残基が伸長される。すなわち、ペプチジルトランスフェラーゼを介して、糖鎖エステルを持つアミノ酸がペプチドの糖鎖エステルに求核攻撃することで、新たなペプチド結合が形成されている。ここでは糖鎖部が酵素によって活性化されていると考えられ、この直截的な手法を人工的に模倣することができれば、かさ高いアミノ酸残基との縮合も可能となるような、新規かつ効率的なペプチド合成法が可能になるであろう。本研究では、エステル残基に潜在的な活性化基を導入したアミノ酸のチオエステルを、適切なフッ素化剤により活性化したのち、フッ化アシル中間体を得て、同じくエステル残基に潜在的な活性化基を持つアミノ酸のチオエステルと反応させることで、新たなペプチドを合成できた。このペプチドは、同様の手法によりさらなる伸長も可能であり、これを繰り返すことで目的とするペプチドを効率良く合成できることになる。また、アミノ酸残基を保護しないアミノ酸そのものを出発として、活性化されたフッ化アシル中間体を得て、これをアミノ酸そのものと反応させることによって、ジペプチドを合成する新たな手法を開発した。

【結果】 1. 最初に、先述したエステルの活性化-ペプチド形成プロセスの実現化を目指した。活性化後の中間体として、フッ化アシルに着目した。エステル部にあらかじめメチルチオメチルチオ基を導入したアミノ酸のチオエステル **1** に対し、フッ素化剤 (Selectfluor、*N*-フルオロビス (フェニルスルホニル) アミン (NFSI)、 $\text{Py}\cdot\text{F}\cdot\text{BF}_4$ など) を反応させることで、カルボニル基の活性化、続くフッ化物イオンの付加とメチルチオメチルチオ基の脱離を経て、相当するフッ化アシル中間体 **2** へと導いた。このフッ化アシル中間体 **2** に、同じくメチルチオメチルチオ基をもつアミノ酸のチオエステル **3** を作用させることで、新たなジペプチド **4** が生成した。続いて、ジペプチド **4** から同様の手法により直接ペプチド鎖の伸長が可能であり、従来法のような脱保護の操作を必要としない直截的なアプローチとなる。2. カルボン酸から直接、フッ化アシル中間体に変換できれば、出発原料を保護することなく、変換反応が可能になる。そこで、市販の反応剤を用いて、カルボン酸から直接、フッ化アシル中間体に変換する手法を開発することとした。市販の各種の反応剤を試してみたところ、トリフルオロメタンチオール銀 (I) とヨウ化カリウムを組み合わせると、各種のカルボン酸を効率よく相当するフッ化アシルに変換できた。この合成手法の有用性は、アミノ酸そのものを使うジペプチドの直截的合成からも明らかである。すなわち、Cbzで保護されたアラニン (*N*-Cbz-Ala) **5** を AgSCF_3/KI で処理し、得られたフッ化アシル中間体 **6** と L-アラニンと反応させることにより、ジペプチドである *N*-Cbz-Ala-Ala **7** を良好な収率で得ることができた。これらの生成物は、さらに同様の反応変換を繰り返すことによりペプチド鎖の伸長を行うことが可能になる。

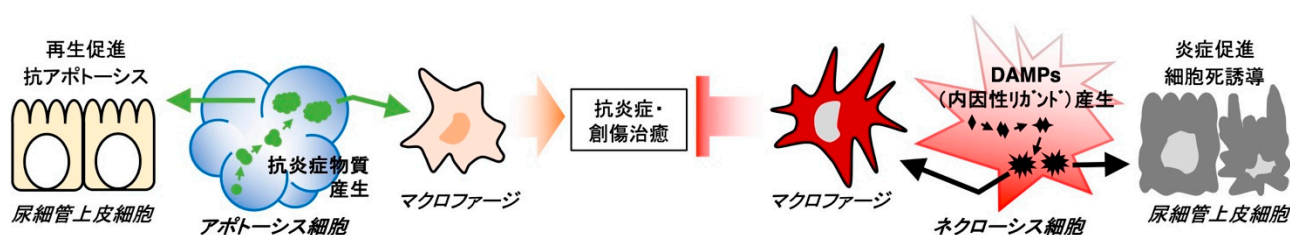
アミノ酸のチオエステル及びアミノ酸からジペプチドへの直截的変換



【目的】近年、死細胞自身が情報の発信源となって多彩な生体応答を誘導することが明らかになり、炎症慢性化における細胞死の意義が注目を集めている。従来、細胞死は、アポトーシスとネクローシスに大別されてきたが、近年、ネクローシスに加え、ネクロプトーシスやフェロトーシスなど、新たな非アポトーシス型のプログラム細胞死の存在やその制御機構が明らかになってきた。最近になって、細胞がアポトーシスに陥る際に、細胞内代謝を変容させて特殊な代謝物を産生し、周囲に働きかけ炎症を収束させることが報告された。即ち、死にゆく細胞は、単に死を受容するのではなく、能動的に活動していることが示唆される。一方、非アポトーシス型細胞死では、細胞死に伴って放出される damage-associated molecular patterns (DAMPs) が周囲の細胞に作用し、様々な病態形成に寄与することが知られているが、DAMPs は単に死細胞から放出されると考えられてきた。我々はこれまでに、結核菌や真菌を認識して感染防御に働く病原体センサーの macrophage-inducible C-type lectin (Mincle) が、内因性リガンドである β -glucosylceramide (β -GlcCer) とコレステロールを認識して、急性腎障害による炎症を遷延化し、慢性腎臓病に至ることを明らかにしてきた。 β -GlcCer は死細胞から放出されると考えられるが、障害腎では β -GlcCer が増加することから、障害を受けた細胞が積極的に β -GlcCer を産生する可能性が示唆される。しかしながら、アポトーシス以外の細胞死様式について細胞内代謝が検討された例はない。そこで、本研究では、障害を受けて死にゆく細胞の細胞内代謝変容に着目し、Mincle 内因性リガンドである β -GlcCer 産生機構を明らかにすることを目的とした。

【方法と結果】1. β -GlcCer 産生機構の解明： β -GlcCer は、セラミドから生合成された後、ラクトシルセラミド (LacCer) に代謝されるが、その量は、合成酵素や糖転移酵素、ATP などで制御されている。そこで、急性腎障害（腎虚血—再灌流障害）における β -GlcCer 蓄積に関与する酵素を明らかにする目的で、虚血-再灌流障害 3 日目の障害腎と対照腎のマイクロアレイデータを用いて、 β -GlcCer 代謝関連酵素の発現変動を検討した。その結果、 β -GlcCer を LacCer に変換する β -1, 4-Galactosyltransferase 5 (B4GalT5) が障害腎で低下することを見出し、本酵素に着目した。虚血-再灌流障害 1 日目～14 日目の障害腎における B4GalT5 の発現を real-time PCR で確認したところ、持続的に発現低下することを見出した。2. β -GlcCer とコレステロールが腎障害に及ぼす影響： β -GlcCer は、通常は細胞内に存在するため、細胞死に伴い細胞外に放出され Mincle を活性化し、炎症遷延化をもたらすと想定される。そこで、実際に、外来性に β -GlcCer を投与すると腎障害が惹起されるかどうかを検討した。即ち、 β -GlcCer 単独、コレステロール単独、 β -GlcCer とコレステロールを含むエマルジョンを野生型マウスと Mincle 欠損マウスの腎皮膜下に投与し、3 日後に腎障害を検討した。その結果、野生型マウスにおいて、 β -GlcCer 単独エマルジョンでは腎障害を起さなかったが、コレステロールと共存することで、Mincle や TNF α などの炎症性サイトカインの発現が著増した。3. 尿細管特異的 B4GalT5 欠損マウスの作出および表現型:1. において、 β -GlcCer 蓄積における B4GalT5 の関与が明らかになったため、尿細管特異的 B4GalT5 欠損マウスを作成した。また、タモキシフェン投与により腎 B4GalT5 発現が著減し、 β -GlcCer が蓄積することを予備的に見出した。

本研究の概念図



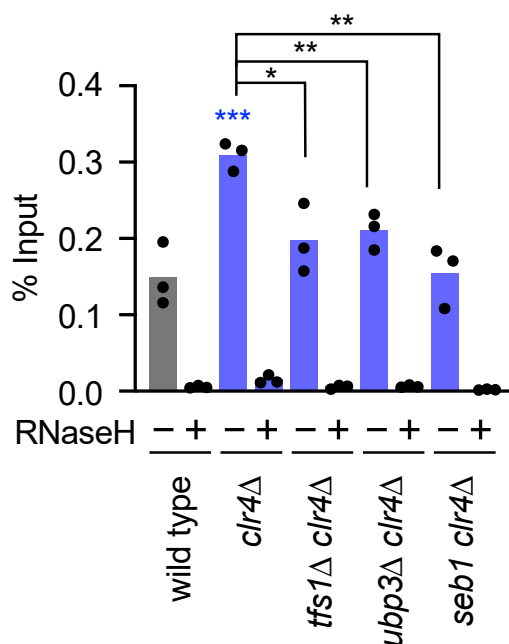
180	セントロメア領域の転写による染色体異常の発生機構	中川 拓郎
-----	--------------------------	-------

【目的】 転座などの染色体異常は、癌や自閉症などの遺伝性疾患の要因となる。染色体は弛緩したユークロマチンと凝縮したヘテロクロマチンの異なるクロマチン構造を形成する。ユークロマチン領域では転写が活発に起きるのに対して、ヘテロクロマチン領域では転写が抑制されている。興味深いことに、DNA 反復配列が存在するセントロメアなどの染色体領域は恒常的にヘテロクロマチン構造を形成する。しかし、タンパク質をコードしないセントロメア領域を転写抑制する生理学的意義は明らかとなっていない。我々は、分裂酵母を用いて、ヘテロクロマチンの染色体異常への影響を解析した。その結果、ヘテロクロマチンによる転写抑制はセントロメア反復配列を「のりしろ」にした染色体異常の発生を阻止することが分かった。本研究では、転写が染色体異常を引き起こす分子メカニズムを解明することを目的に研究を行った。

【方法】 分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* を用いて、転写がセントロメア領域で染色体異常を引き起こすメカニズムについて解析した。DNA-RNA 二本鎖に特異的に結合する S9.6 抗体を用いて DNA-RNA 免疫沈降 (DNA-RNA immunoprecipitation : DRIP) を行い、リアルタイム PCR により回収した DNA-RNA 二本鎖を定量した。3 番染色体由来のエキストラ染色体 ChL をモニターすることで、自然発生的に起きる染色体異常の発生頻度を測定した。フラクチュエーション解析することで、1 細胞分裂あたりに染色体異常が発生する頻度を算出した。様々な遺伝子変異株を用いて、DNA-RNA 二本鎖の形成量と染色体異常の発生頻度を決定した。

【結果】 ヘテロクロマチン構造の形成に必要なヒストンメチル化酵素 Clr4/Suv39 を遺伝子破壊するとセントロメア領域で DNA-RNA 二本鎖が蓄積することが分かった。clr4 破壊株で蓄積する DNA-RNA 二本鎖が染色体異常の原因であるのかを明らかにするために、DNA-RNA 二本鎖特異的 RNA 分解酵素である RNaseH1 を clr4 破壊株で過剰発現した。その結果、RNaseH1 の過剰発現により、DNA-RNA 二本鎖が減少し、染色体異常の発生頻度も低下した。次に、DNA-RNA 二本鎖がどのようにして形成するのかを明らかにするために、様々な転写関連因子の遺伝子変異株を用いて解析した。その結果、セントロメア領域での転写の進行停止を促進する Seb1 と転写の進行再開に関与する Tfs1/TFIIS や Ubp3 が、DNA-RNA 二本鎖の形成 (図) と染色体異常に働くことを明らかにした。

セントロメア領域での DNA-RNA 二本鎖の蓄積

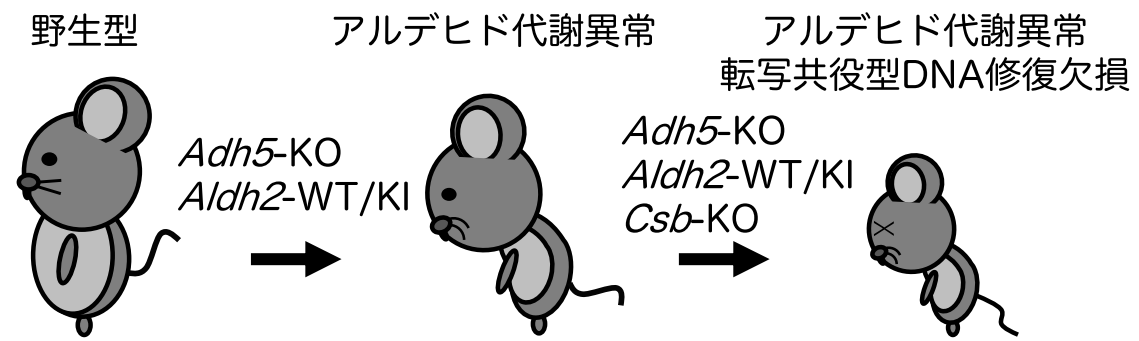


【目的】 生体内では代謝により活性酸素種やアルデヒドなど、様々な高反応性化合物が生成される。これらはゲノム DNA を傷害し、遺伝情報の安定的な伝達や正常な遺伝子の転写を阻害する。よって、生体恒常性を維持するためには、高反応性化合物を無毒化する必要がある、同時に DNA 損傷が生じた際には、これらを除去して、ゲノムの複製や転写を速やかに回復させることが求められる。しかし、多様な DNA 損傷が転写や個体に与える影響については不明瞭な部分が未だ多数残されている。そこで本研究では、アルデヒド代謝異常・DNA 修復欠損マウスを解析することで、過負荷が生じている DNA 修復経路の同定を目指す。

【方法】 アルデヒド代謝異常マウスと転写共役型 DNA 修復欠損マウスを掛け合わせ、その個体表現型を解析した。

【結果】 アルデヒド代謝経路と転写共役型 DNA 修復機構の同時機能欠損マウスは、それぞれの単独欠損マウスと比較して、より重篤な個体表現型を示すことが明らかになった。

転写領域でのアルデヒド由来 DNA 損傷の修復異常と個体影響について



183 AIを用いた深層学習による分娩予後予測モデルの作成

森川 守

【目的】 人工知能（AI）を用いた機械学習により、分娩中のパルトグラムを用いて経膣分娩の成功を予測するモデルの構築を目指した。

【方法】 2016～2021 年までに妊娠 36 週以降に陣痛発来した単胎妊婦を、経膣分娩に至った妊婦（成功群）と経膣分娩を目指したが緊急帝王切開に至った妊婦（不成功群）の 2 群に分けた。2 群間で分娩開始後のパルトグラムデータと妊婦の背景を分析した。また、機械学習を活用した分娩経過予測システムの構築を試みた。

【結果】 除外症例を除き 1,949 名が対象となった。成功群 1,729 名と不成功群 220 名に分けた。経膣分娩成功率は 88.7%だった。子宮口開大度が 4 cm から 10 cm に進行するに伴い、分娩開始後に最終的に 経膣分娩に至った妊婦（成功群）を、より高い感度、特異度、陽性的中率、および受信者動作特性曲線（ROC）の下位面積で予測した。特に 10 cm 開大以降の分娩第 2 期で顕著であった。

分娩開始後に最終的に緊急帝王切開となった妊婦を予測する精度

	子宮口開大度						
	4 cm	5 cm	6 cm	7 cm	8 cm	9 cm	10 cm
Cutoff 値	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500
Average acc.	0.809	0.810	0.815	0.809	0.805	0.808	0.938
感度	0.505	0.514	0.545	0.573	0.614	0.636	0.891
特異度	0.848	0.848	0.850	0.839	0.829	0.829	0.944
PPV	0.297	0.301	0.316	0.311	0.314	0.322	0.671
NPV	0.931	0.932	0.936	0.939	0.944	0.947	0.986
AUC	0.741	0.749	0.770	0.787	0.791	0.801	0.963
95%信頼区間 (high)	0.702	0.710	0.732	0.750	0.754	0.765	0.945
95%信頼区間 (low)	0.779	0.787	0.807	0.824	0.827	0.837	0.980

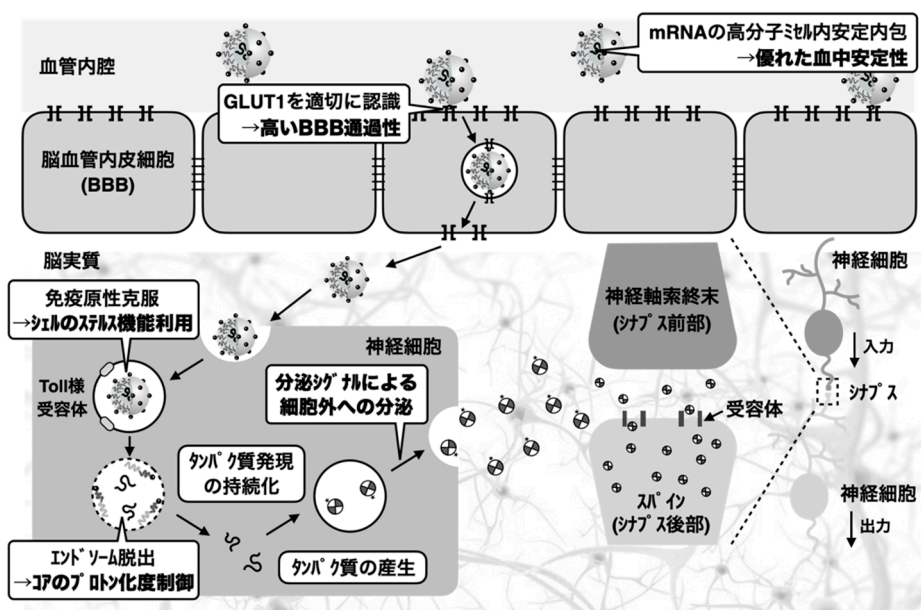
184 脳機能再生を誘起するmRNA搭載高分子ミセルの開発	安楽 泰孝
-------------------------------	-------

【目的】 アルツハイマー病 (AD) 等の中枢神経系 (CNS) 疾患の治療において、神経細胞の突起進展やシナプス形成を促進する脳由来神経栄養因子を用いた「脳機能の再生」が注目を集めている。一方、臨床的観点から現実性の高い「全身投与」によるタンパク質の脳内送達に関しては、血液脳関門 (BBB) と呼ばれる血管内腔から脳実質への物質輸送を著しく制限するバリアの存在により報告例は皆無である。ここでタンパク質の設計図である Messenger RNA (mRNA) は、細胞内で任意のタンパク質を大量にかつ持続的に産生することができる上、ゲノム DNA に変異を与える心配がなく安全性が高い。そのため、mRNA を脳内細胞に送達できれば、タンパク質を大量にかつ持続的に産生することが可能になる。しかし、mRNA を薬物として脳内に送達するためには、医薬品全般に共通した「著しく低い BBB 通過性」の問題に加えて、mRNA が抱える複数の問題「速やかに酵素分解される・細胞室内に侵入できない・免疫原性を有する」を全て克服する必要がある。そこで課題では、「精密設計した BBB 通過型高分子ミセル技術に基づいて、①生体内安定性が著しく低い mRNA を全身投与で脳内に送り届け、②神経細胞内で大量のタンパク質を持続的に産生させることで、脳機能の再生に基づく革新的 AD 治療法を確立すること」を目的とする。

【方法】 アニオン性の mRNA をコアに封入し、BBB を通過するためのリガンドを表層に有する高分子ミセル (mRNA ミセル) を調製するために、カチオン性ブロック共重合体を合成した。mRNA ミセルは基礎物性評価 (動的光散乱測定、透過型電子顕微鏡) に加え、*in vitro* における mRNA の機能評価を行った。その後、マウスに対して、mRNA ミセルを尾静脈 (iv) 投与し機能評価を行った。

【結果】 新規に合成したカチオン性ブロック共重合体と mRNA を任意の割合で混合して調製したナノ粒子は、動的光散乱測定、透過型電子顕微鏡観察より、直径 50~60 nm ほどで単分散性の高い高分子ミセルであることを確認した。また生体内を模倣した環境における安定性を評価したところ、既存の高分子を用いて調製した mRNA ミセルと比べ 20 倍ほど高い安定性を示し、細胞内において所望のタンパク質発現量が 10 倍ほど向上した。*in vitro* 試験により安定性、細胞内タンパク質発現が確認された mRNA ミセルをマウスに iv 投与したところ、mRNA 単体と比べ劇的に高い血中循環性を示した。また mRNA ミセル表面に BBB を通過するためのリガンドを搭載したところ、脳内で高いタンパク質発現を実現することに成功した。

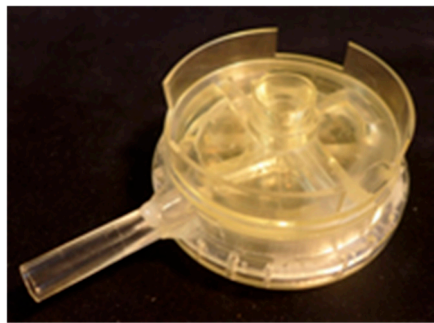
本研究の概要図：脳内でタンパク質を産生する mRNA ミセル



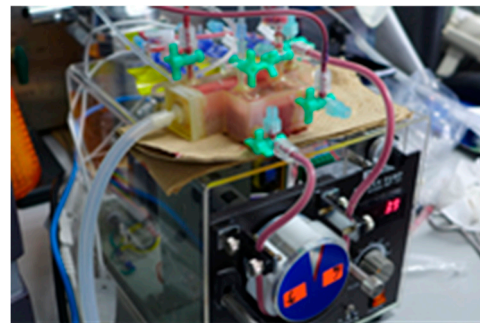
【目的】 本研究では早産児の発達予後を改善するため、「超小型遠心ポンプ」と「人工血液カクテル」を組み合わせ、児に「血液呼吸」を可能にし、妊娠母体の子宮と同様に正常な脳の発達を実現する次世代保育器を開発する。新生児医療が提供できる保育環境はいまだ不十分で、「後遺症なき生存」を実現していない。例えば、現在の人工呼吸器は早産児の未熟な呼吸をサポートするが、圧ダメージを肺に継続して与えるため、早産児の肺機能を低下させる。また、人工保育による低栄養が脳にダメージを与え、将来 ADHD・自閉症等の発達障害を誘導するリスクを高めることも指摘された。そこで、本研究でこの新しいタイプの次世代保育器を開発できれば、母体同様の子宮環境を人工的に提供することが可能となり、早産児の発達過程で高率に発生する肺機能低下および脳機能障害を予防できる。

【方法と結果】 1. 早産児用遠心ポンプの開発：3D プリンター（高温耐性プラスチック、キーエンス社）にて遠心型ポンプを作製し、数値流体解析、模擬循環回路による圧流量特性を評価し、早産児用の超小型遠心ポンプの開発を行った。その過程で、1) 従来の成人用遠心ポンプ（シーケンシャルフローポンプ）を基礎とした早産児用の超小型遠心ポンプは 2 段階昇圧機能を維持できないことが明らかになり、2) 早産児用の超小型遠心ポンプを製作するため、成人用の遠心ポンプの構造自体を変化させ、2 段階昇圧機能を維持する試みを行った。具体的には、流路抵抗が減少するようにポンプ内部構造を変更し、かつ遠心ポンプのインペラ部分の羽枚数を増やした。その結果、2 段階昇圧機能を維持できる早産児用の超小型遠心ポンプのプロトタイプ作製に成功した。2. 人工血液換気ユニットの構築：麻酔下にて雄ラットの背側部皮下に人工心肺である「人工血液換気ユニット」と接続するための頸動静脈カテーテルを挿入し、血液呼吸の慢性実験系を作製した。この慢性実験系にてローラーポンプおよび遠心ポンプで血液循環を維持し、人工血液換気ユニットに組み込んだ膜型人工肺にて血中酸素の段階的制御が可能となった。

早産児用遠心ポンプと人工血液換気ユニット



早産児用遠心ポンプ(プロトタイプ)



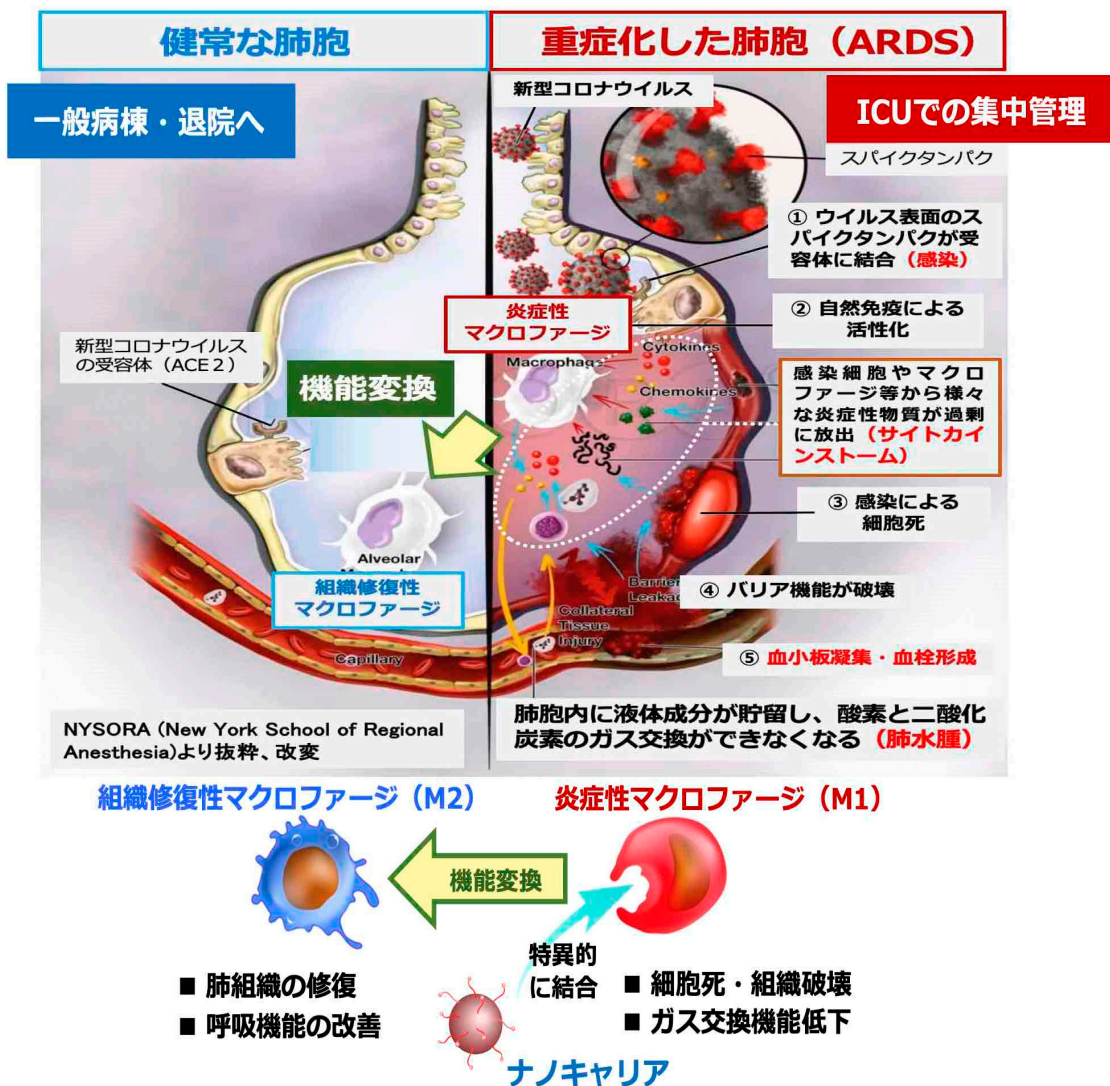
人工血液換気ユニット

【目的】 急性呼吸窮迫症候群（ARDS）は感染症のみならず、誤嚥性肺炎や敗血症をきっかけに発症することも多く、ICUに入室する患者の約10%、人工呼吸器が必要な患者の24%を占める頻度の高い症候群である。にもかかわらず、これまでのところ確固たるエビデンスを有する治療薬はなく、サイトカインストームの司令塔である免疫細胞を制御できる薬剤候補もない。本研究では独自の薬物輸送技術（DDS）によってナノキャリアを合成し、生理活性分子を確実に炎症性マクロファージへ送達、さらにその機能変換を行うことでARDSの治療をめざす。

【方法】 粒径約200 nm以下のナノキャリアを合成し、まずは *in vitro* でその機能を評価した。次にリポサッカライド（LPS）の気管内投与により作製したARDSモデルにナノキャリアを投与し、マクロファージへの集積性とその表現型スイッチング、さらに治療効果について詳細を評価した。

【結果】 新たに開発したナノ医薬を用いることで肺胞マクロファージの過剰な炎症応答を制御し、サイトカインストームの抑制に成功した。

ナノキャリアによる免疫・炎症制御

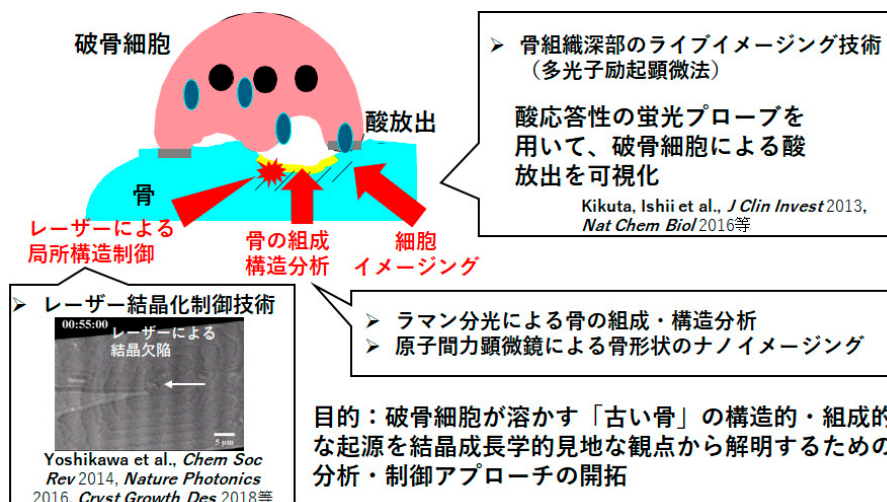


【目的】 本研究の目的は、破骨細胞が溶かすべき「古い骨」の構造的・組成的な起源を、結晶成長学的見地な観点から解明するための分析・制御アプローチの開拓である。骨のリモデリングは、破骨細胞が酸や酵素を放出し、“古い”骨を溶かすことから開始される。その後、骨芽細胞は溶かされた領域に新しい骨を形成し、自ら産生した骨基質に埋まって骨細胞へと分化することで、骨リモデリングのサイクルが進行する。しかし、そもそも破骨細胞が溶かすべき「古い骨」とはどんな構造なのか、骨リモデリングのファーストステップの詳細が未だ謎に包まれている。そこで本研究では、破骨細胞が溶かす骨の組成・構造的起源を結晶工学的な観点から明らかにする手法論を開拓することを目指した。具体的には、酸溶液中での骨の組成や構造を、ラマン分光や原子間力顕微鏡 (AFM) などを用いて系統的に調べるための分析プロトコルを構築した。またこれまで研究代表者の吉川らは、高強度パルスレーザーの物理刺激 (熱・応力など) により分子間引力を制御することで、従来法では得られない特異な構造・形状・サイズの結晶を得る手法論の開発に成功してきた。本研究ではこの独自のレーザー結晶化制御技術も基盤とし、骨の組成や構造を空間手選択的に制御するための新しいレーザー技術の検証にも取り組んだ。

【方法】 マウス由来の頭頂骨および長管骨 (大腿骨、脛骨) を対象として、ラマン分光・AFM などによる骨の組成・構造の分析プロトコルの構築を行った。またそれを活用し、フェムト秒レーザー照射が骨の組成・構造に与える影響を評価し、骨の組成や構造を空間手選択的に制御するための新しいレーザー技術への応用性を検討した。

【結果】 本研究ではまず骨の主成分であるハイドロキシアパタイトとコラーゲンの組成・構造をラマン分光により評価する分析プロトコルを構築した。具体的には各ラマン散乱の様々なピークの位置、半値幅、面積比などを定量指標化し、骨の種類や場所、マウスの月齢・疾病などに対して骨の組成・構造がどのように変化するかを調べるための技術基盤を構築した。また本研究では、酸性溶液への暴露に対する骨の構造変化を AFM によりナノメートルスケールで評価する分析プロトコルを構築することにも成功した。これにより、骨を形成するコラーゲン繊維とハイドロキシアパタイトのナノ結晶の複合体が、ナノメートルスケールでどのように溶解するかに関する知見を得ることに成功した。さらに骨の組成・構造の空間選択的制御に関する成果として、フェムト秒レーザーを用いることで骨の酸溶解性を空間選択的に促進できることを見出した。今後本レーザー制御技術と多光子励起によるライブイメージングと技術とを組み合わせることで、酸溶解性の異なる領域を破骨細胞がどのように認識するのかを解明できることが期待される。以上から、今後骨リモデリングのメカニズム解明を進める上での重要な分析・制御の要素技術群を開発することに成功した。

骨リモデリング研究における新しい分析・制御アプローチ



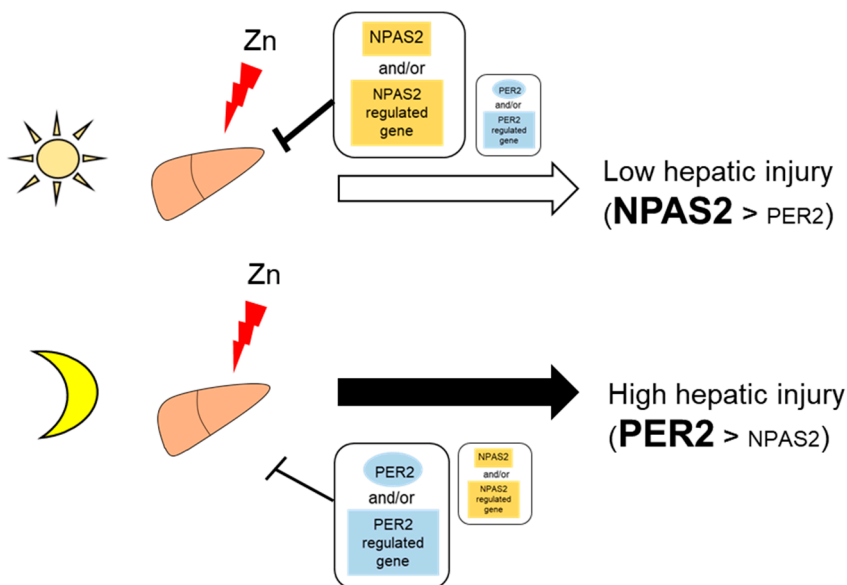
188 感受性時刻差を示す金属毒性に対する時計遺伝子の役割	吉岡 弘毅
-------------------------------	-------

【目的】生物には24時間を1つの周期とした概日リズムが存在し、血圧や体温など生理的条件下においても様々な因子が変動していることが知られている。これまでに私は、毒性学と時間生物学をあわせた「時間毒性学」の研究を展開し、致死を指標とした金属曝露の感受性時刻差を明らかにしてきた。本研究では、代表的な必須微量元素である亜鉛に対する感受性時刻差を示す機序を明らかにすることを目的に検討を行った。

【方法】7週齢のICR系雄性マウスを実験に用いた。10時(ZT2)または22時(ZT14)の2つの時刻に対して、塩化亜鉛(32.3 mg/kg)をそれぞれ腹腔内投与し、3、6、12および24時間後に血液と肝臓を採取して、肝障害マーカー(ALT、AST)および肝臓中の亜鉛量とメタロチオネイン量を測定した。さらに、マウス肝癌由来細胞株Hepa1-6細胞を用いて、硫酸亜鉛(100~500 μM)で24時間処理した際の細胞生存率をAlamarBlueによって評価し、200 μM 亜鉛で処理した際の時計遺伝子の発現レベルを測定するとともに、*Per2*および*Npas2*を過剰発現させた条件下で亜鉛の毒性が変化するかどうか評価した。

【結果】致死毒性試験の結果からZT2(低感受性)とZT14(高感受性)の二時刻を用いたが、ALTおよびASTはZT14の方が高値を示し、致死毒性試験の結果を反映したものになった。その一方で、肝臓中の亜鉛蓄積量、メタロチオネイン量に差は認められなかった。Hepa1-6細胞を用いた実験では、アポトーシスが認められる濃度(200 μM)において、時計遺伝子の*Per2*と*Npas2*が有意に減少した。この二種類の時計遺伝子を過剰発現させると、亜鉛による毒性が軽減された。*Per2*は夜中に発現量が高く、*Npas2*は日中に高い特徴を有する。これらのバランスによって、亜鉛に対する感受性時刻差が認められる可能性が示唆された。

想定される亜鉛による肝障害の感受性時刻差の機序

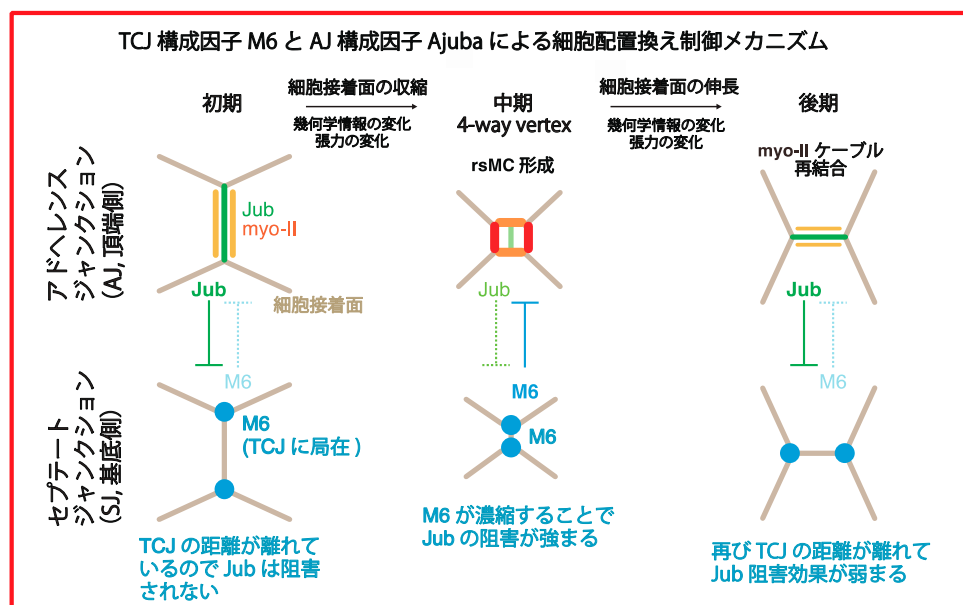


【目的】 組織形態形成の原理を理解する為には、細胞配置換え、細胞数変化、細胞形態変化の三つの素過程の仕組みを詳細に理解する必要がある。これまでに、三つの素過程を制御する各々の分子メカニズムの多くが明らかにされてきた。一方で、近年、これら三つの基幹プロセスが相互に影響し合うことで組織の変形が達成されることが報告されたが、その分子メカニズムの実態は不明である。このメカニズムを明らかにする上で、複数細胞の接着面から構成される頂点様の構造、中でも **Tricellular junction (TCJ)** の形態形成過程における生理機能が興味深い。その理由として、細胞頂点/TCJ において組織の幾何学・力学情報が読み出され、その情報がアクチン細胞骨格制御と細胞増殖シグナルに関与するメカニズムが提唱されたことが挙げられる。本研究提案では、組織形態形成過程における **TCJ** とアクチン制御因子の機能解析を実施し、基幹プロセス間で共通したメカニズムを明らかにすることで、形態形成の基幹プロセスの相互作用を明らかにすることを旨とした。

【方法】 ショウジョウバエ分子遺伝学とライブイメージング技術を駆使し、蛹期の翅の形態形成過程の一つである細胞配置換えに注目して、**TCJ** 構成因子、アクチン細胞骨格制御因子の機能について解析を実施した。さらに、細胞配置換えで明らかとなった **TCJ**、アクチン細胞骨格制御因子の機能について、細胞配置換え以外の基幹プロセスについても解析を行い、その基幹プロセス間の関わりについて解析を試みた。

【結果】 まず、**TCJ** 構成因子である **M6** と、細胞接着面に局在し **Hippo** 経路を介して細胞周期を制御する **Ajuba** が細胞配置換えに伴う細胞接着面の切り替わりを制御することを明らかにした (Ikawa *et al.*, *Curr. Biol.*, 2023)。また、アクチン細胞骨格制御因子である **Coronin-1** が細胞配置換えを制御することも明らかにした (Ikawa *et al.*, *Cell Struct. Funct.*, 2023)。現在、別の形態形成の基幹プロセスである細胞数変化のメカニズムについて解析を実施しており、細胞配置換えに重要な役割を果たすことが明らかとなった **M6** や **Ajuba** が細胞数変化にも関わるとの予備データを得ている。

TCJ 構成因子に注目した形態形成基幹プロセスの相互作用メカニズムの解明に向けた研究



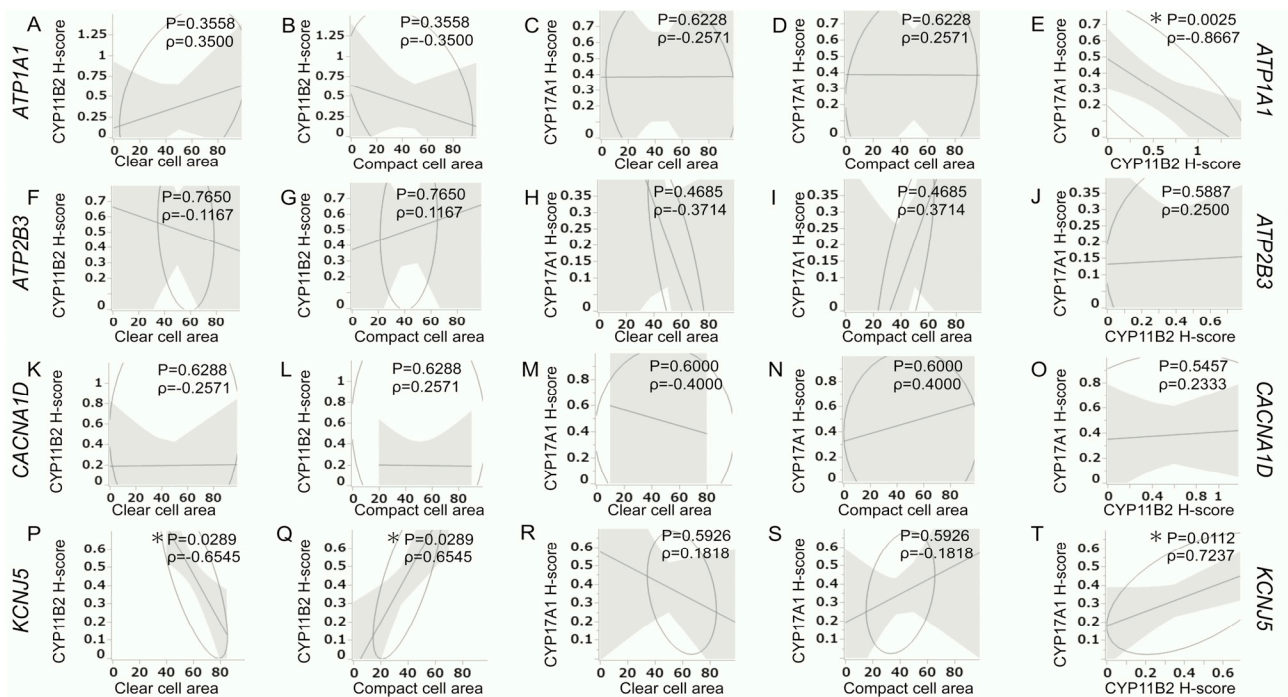
M6 と Ajuba に注目して形態形成基幹プロセス間の相互作用を担う分子基盤の解明

【目的】 原発性アルドステロン症 (PA : primary aldosteronism) は、副腎アルドステロン過剰分泌によって重度の高血圧症状を伴う内分泌疾患で、国内では 400 万人が罹患すると推定され、虚血性心疾患、脳卒中、不整脈、腎臓病のリスクが高まり、生涯 QOL に重大な悪影響をもたらす。PA の病型は手術治療が推奨されるアルドステロン産生腺腫 (APA : aldosterone-producing adenoma) が約 30%を占め、残り約 70%は薬物治療が推奨される。以前より APA については、約 7 割に *KCNJ5*、また約 1 割には *CACNA1D* や *ATP2B3* 等の、各イオンチャンネルにおける体細胞遺伝子変異が知られているが、これら体細胞変異別の病理学的特徴については詳細が明らかでないことが多い。本研究では PA 摘除標本を対象に APA における体細胞遺伝子変異を次世代シーケンサー (NGS) にて解析し、アルドステロン合成調節遺伝子に関わる体細胞変異の病理学的詳細を明らかにすることを目的とする。

【方法】 PA 診断ガイドラインに基づいた診断によって摘出された APA 検体で NGS を実施した結果、体細胞変異が判明した合計 51 検体 (内訳 *KCNJ5*: 11 例、*ATP1A1*: 14 例、*ATP2B3*: 11 例、*CACNA1D*: 15 例) を対象とし、腫瘍内の淡明細胞・緻密細胞の割合やステロイド合成酵素である CYP11B2 と CYP17A1 発現強度 (H-score) を解析した。

【結果】 *KCNJ5* と *ATP2B3* 群では淡明細胞が緻密細胞に対して有意にその割合が多かったが、*ATP1A1* と *CACNA1D* 群では淡明細胞と緻密細胞の分布動態に有意差は一切認められなかった。また、*KCNJ5* 群で CYP11B2 と CYP17A1 の H-score は正相関を示したが、*ATP1A1* 群では逆に有意な負の相関を認めた。APA で最もその頻度が高い *KCNJ5* 遺伝子変異はその他の *ATP1A1*・*ATP2B3*・*CACNA1D* の群と比較して異なる病理学的特徴を呈することが示された。

各副腎皮質腺腫体細胞変異 (APA) における細胞成分とステロイド生成酵素の相関



【目的】 近年注目されている癌免疫療法は、大腸癌においては十分な有効性が確認されておらず、治療抵抗性に関わるメカニズムの解明及び新規治療法の開発が不可欠である。大腸癌を遺伝子パターンに基づき、免疫型 (CMS1)、標準型 (CMS2)、代謝型 (CMS3)、間葉型 (CMS4) に分類する方法が用いられており、の中で最も予後が不良であり大部分が癌免疫療法抵抗性を示すと報告されている間葉型 (CMS4) は、間質、特に癌関連線維芽細胞 (Cancer-associated fibroblast : CAF) の活性化が特徴とされる。新たな CAF の subpopulation として抗原提示能を持つ CAF (Antigen-presenting CAF ; apCAF) が報告され、apCAF は抗原提示を介して T 細胞の自己寛容や制御性 T 細胞への分化を誘導することで抗腫瘍免疫細胞の働きを抑制するメカニズムが提唱されている。apCAF による腫瘍免疫調節メカニズムを明らかにすることは、免疫療法治療抵抗性大腸癌に対する新規治療法の開発につながる可能性があり臨床に極めて有用と考えられる。本研究の目的は apCAF による腫瘍免疫応答調節を介した癌免疫療法治療抵抗性メカニズムの解明及び大腸癌新規治療法の開発に寄与することである。

【方法】 癌関連線維芽細胞が及ぼす癌細胞との相互作用及び腫瘍免疫との関連を解析するため、ヒト大腸癌組織標本を用いた apCAF マーカーとして報告されている HLA-DR 抗体による免疫組織学的染色、ヒト遺伝子発現情報データベースを用いた大腸癌間質における apCAF マーカー発現の解析、apCAF の由来と報告されている中皮細胞における apCAF マーカー発現量の解析及びマウス大腸癌同所移植モデルにおける apCAF 分画割合に関する経時的変化の検討を行った。

【結果】 癌間質部分から分離培養された線維芽細胞において apCAF マーカーは正常部に比較し上昇しており、肝転移巣ではさらに上昇していることが確認された。さらに直腸同所移植腫瘍モデルからフローサイトメトリーで CAF (podoplanin 陽性細胞) を抽出したところ、CAF 全体のうち 26% が apCAF (podoplanin/MHC class II 陽性細胞) であり、肝転移巣では原発巣に比較し高率に apCAF が抽出された。さらにヒト大腸癌患者から樹立された中皮細胞では、線維芽細胞に比較し抗原提示マーカーの発現が上昇しており癌細胞の相互作用によりその発現はさらに上昇した。上記の結果より、線維芽細胞における抗原提示能が腫瘍免疫及び腫瘍進展に関与していることを示唆しており、癌細胞-間質線維芽細胞相互作用が apCAF を介して腫瘍免疫を制御している可能性へとつながり、臨床に極めて重要な事象であると考えられた。

癌関連線維芽細胞が及ぼす腫瘍免疫への影響

