

日本応用酵素協会誌

No.60

2025

総 説

- チロシンキナーゼアダプター蛋白“3BP2”を取り巻くシグナルネットワーク…………… 1
松本 佳則
- 安息香酸誘導体を基質とするアデニル化酵素のエンジニアリング…………… 9
石川 文洋
- ドライバー遺伝子変異チロシンキナーゼの細胞内局在異常とがんシグナル発信…………… 19
小幡 裕希, 椎名 勇, 西田 俊朗

酵素情報

- 顆粒小胞膜上のCD38：膜トポロジーが明かすオキシトシン分泌制御の酵素機構…………… 27
坂本 浩隆
- 抗体遺伝子の変異酵素とその応用…………… 30
金山 直樹
- 哺乳類の生殖制御メカニズム—精子成熟におけるプロテオリシスの役割…………… 32
浄住 大慈

2025年度 研究報告

- 酵素の応用研究および生命科学に関する研究助成…………… 34
- The Medical Frontier Conferenceに関する研究助成(TMFC)…………… 73
- Cardiovascular Innovative Conference に関する研究助成(CVIC)…………… 116
- Front Runner of Future Diabetes Research に関する研究助成(FFDR)…………… 149
- Innovative Research Group of Gastroenterology に関する研究助成(IRGG)…………… 180

公益財団法人 日本応用酵素協会

理事長	小林 義広	
専務理事	奥野 直樹	
理事	小川 佳宏 小室 一成 塩見美喜子 谷藤 道久	門脇 孝 佐藤 文彦 福井 清 渡辺 守
監事	西村 強	村上 誠一
評議員	大内 章子 小林 敏男 土井 敏秀 濱岡 純治 渡邊 明	川北 英隆 田邊 良輔 縄野 雅夫 棕本 友子

総 説

チロシンキナーゼアダプター蛋白“3BP2”を取り巻くシグナルネットワーク

松 本 佳 則

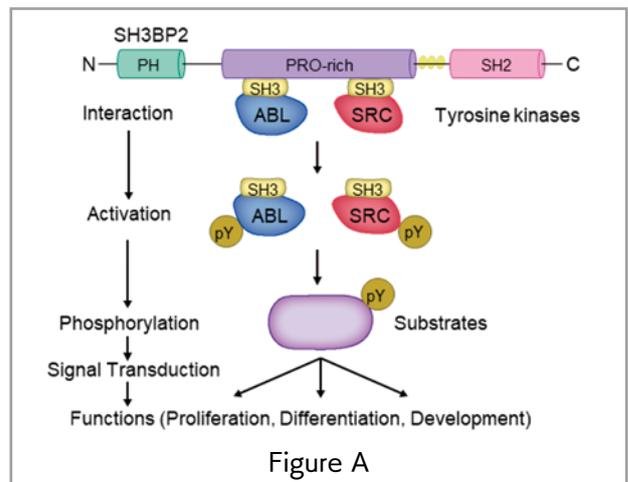
はじめに

ポリ ADP リボース (poly (ADP-ribose) , PAR) による翻訳後修飾である PARsylation は, DNA 損傷応答やクロマチン構造制御において中心的な役割を果たすことが古くから知られてきた. 一方で, 近年の研究により, PARP5a および PARP5b, すなわち Tankyrase (タンキラーゼ) 1/2 が, 核内のみならず細胞質においても多様な基質タンパク質を PARsylation し, その後 E3 ユビキチンリガーゼ ring finger protein 146 (RNF146) によるユビキチン化とプロテアソーム分解を誘導することが明らかとなった. Tankyrase 依存性 PARsylation を介したユビキチン化は, がん, 骨代謝, エネルギー代謝, 自然免疫, 神経変性など, 生命現象の広範な領域に影響を及ぼしている. これらの知見の出発点となったのが, まれな遺伝性炎症性骨疾患である Cherubism の研究である. Cherubism の原因遺伝子として同定された SH3-domain binding protein 2 (SH3BP2, 3BP2) は, Tankyrase の代表的な分解基質であり, その制御破綻が疾患の本態であることが示された. 筆者の総説 (1) 「PARsylation-mediated ubiquitylation: lessons from rare hereditary disease Cherubism (Trends in Molecular Medicine. 29(5):390-405, 2023)」では, Tankyrase-RNF146-3BP2 経路の分子機構と, 生体内での多彩な役割を詳述しており, その内容をここに記載する.

1. 3BP2 研究の歴史

3BP2 はもともと Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1 (ABL) キナーゼの SH3 ドメイン結合タンパク質として同定されたアダプター分子であり, N 末端の pleckstrin homology (PH) ドメイン,

中央のプロリンリッチ (PR) 領域, C 末端の SRC-homology 2 (SH2) ドメインから構成される. PR 領域は ABL や SRC などの非受容体型チロシンキナーゼの SH3 ドメインに結合し, これらキナーゼの自己抑制構造を解除して活性化する. 活性化された ABL や SRC は, VAV, SYK, PLC γ などの下流標的をリン酸化し, 増殖, 分化, 細胞移動といった多様な機能を制御する (Figure A). 3BP2 が持つ PH ドメインは膜リン脂質と結合し, シグナル複合体を細胞膜近傍にリクルートする役割を担うと考えられている.



2. 3BP2はABL活性化を通して骨芽細胞分化を促進する

3BP2 の生理的機能を明らかにするため, *Sh3bp2* 欠損マウスが作製され, その解析から 3BP2 が骨芽細胞と破骨細胞の双方に必須であることが示された. *Sh3bp2*^{-/-} マウスでは骨形成が障害され, 骨量低下を呈する. 筆者らは, 3BP2 が ABL キナーゼの活性化を介して, 骨芽細胞系のマスター転写因子である RUNX2 と転写共役因子 TAZ からなる複合体を安定化させることを明らかにした. ABL の活性化は RUNX2-TAZ 複合体の形成と機能発現に必要であり, 3BP2 欠損では

ABL 活性が低下し、骨芽細胞への分化が阻害される。興味深いことに、TAZ は TEAD 転写因子と複合体を形成することで骨芽細胞前駆細胞の増殖を促進し、一方で RUNX2 と結合すると骨芽細胞への分化を駆動する。したがって、3BP2-ABL-RUNX2-TAZ 経路は、骨芽細胞の「増殖」と「分化」の両方を統合的に制御するハブとして機能している (Figure B)。この知見は、筆者らが報告した JCI 論文²⁾において、ABL と TAZ が互いを安定化させる相互依存的な仕組みとして詳細に示されている。

3. 3BP2 研究とケルビズム³⁾

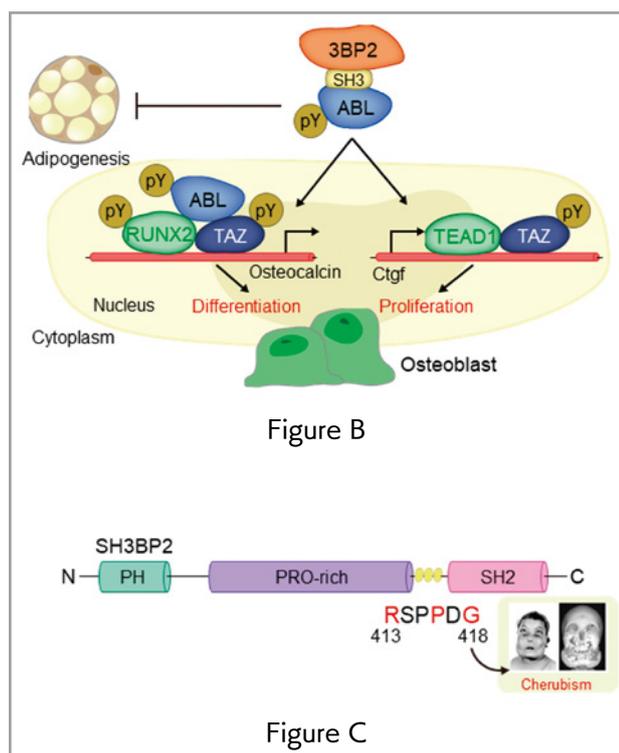
一方で、3BP2 は破骨細胞形成においても重要な役割を果たす。マクロファージ由来の前駆細胞を RANK ligand (RANKL) と M-CSF 存在下で培養すると、通常は多核の破骨細胞が形成されるが、3BP2 欠損細胞では細胞融合が進行せず、骨吸収能を持つ成熟破骨細胞が得られない。これは、3BP2 が SRC の活性化に必須であり、インテグリンやオステオポンチン刺激に対する SRC リン酸化が起こらないためである。SRC シグナルは細胞骨格再構築と鋸歯状縁形成に不可欠であり、3BP2 の欠損は破骨細胞の接着、極性形成、骨吸収窩の形成を障害する。したがって 3BP2 は、骨芽細胞の分化促進と破骨細胞の成熟誘導という、一見相反する骨代

謝プロセスの両方を支えるアダプター分子である。

Cherubism は 1950 年に Jones らによって報告された常染色体優性疾患で、幼児期に顎骨や頬骨に嚢胞状骨病変が出現し、顔貌が天使 (Cherub) のようにみえることから命名された。臨床的には、上下顎骨の膨隆による顔貌変化、歯の萌出障害や偏位、歯根吸収、歯周病を認める一方で、四肢や体幹骨の病変はほとんど見られない。また、病変は思春期以降徐々に退縮し、骨梁の再構築が進むという特徴的な自然経過をたどる。組織学的には、線維性組織の増生とともに、多核の破骨細胞様巨細胞が散在し、炎症細胞浸潤が認められる。遺伝学的解析により、Cherubism 患者の約 8 割で SH3BP2 遺伝子のミスセンス変異が同定されており、そのほとんどはエクソン 9 に位置する六残基モチーフ RSPPDG(Arg-Ser-Pro-Pro-Asp-Gly) 内、あるいはその近傍に集中している。代表的な変異は Arg415, Pro418, Gly420 の置換であり、とくに Pro418 の Leu, Arg, His への置換が高頻度に報告されている (Figure C)。

4. Tankyrase の発見とケルビズムの病態説明⁴⁾

Cherubism 変異をもつ 3BP2 がどのようにして病的な骨破壊を引き起こすのかを理解する上で、Tankyrase による 3BP2 分解制御の発見は決定的であった。イーストツーハイブリッド解析により、3BP2 の結合相手として PARP ファミリーの一員である tankyrase 2 (TNKS2) が同定され、さらに tankyrase 1 (TNKS1) も 3BP2 と結合することがわかった。Tankyrase は N 末端にアンキリンリピートクラスター (ARC1~5)、中央に sterile-alpha motif (SAM) ドメイン、C 末端に PARP 触媒ドメインを持つ構造をしており、ARC ドメインが基質認識に関与する (Figure D)。構造解析により、ARC1, 2, 4, 5 が類似した基質結合ポケットを持ち、最適認識配列 REAGDGEE と結合することが明らかになった。3BP2 の RSPPDG 配列はこのモチーフと高い相同性を示し、とくに ARC4 と親和性高く結合する。Tankyrase は NAD⁺ を基質として基質タンパク質を PARsylation し、その PAR 鎖が RNF146 の WWE ドメインによって認識される。RNF146 は PAR との結合によって RING ドメインが立体構造変化を起こし、K48 ユビキチン鎖の付加活性が著明に亢進する。こうして PARsylation を受



けた 3BP2 はユビキチン化され、プロテアソームにより分解される (Figure E).

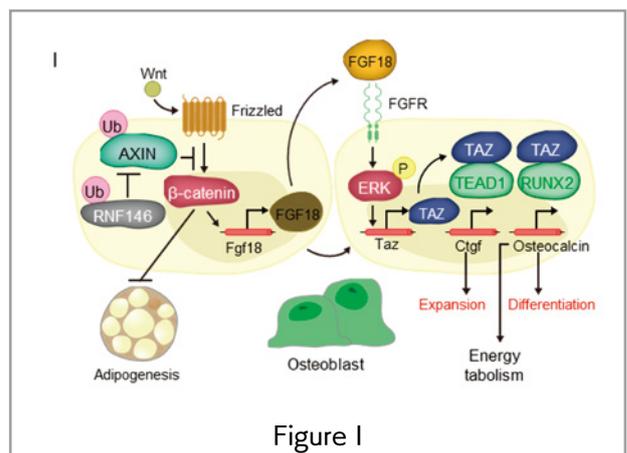
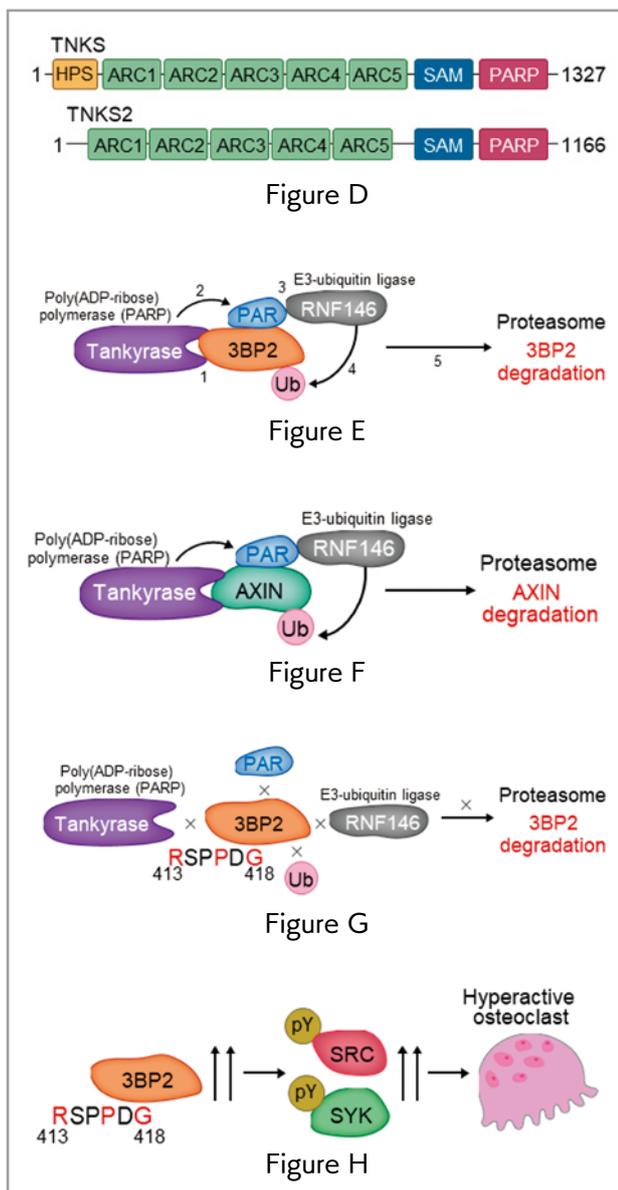
興味深いことに、RNF146 自身も Tankyrase 結合モチーフを複数有しており、Tankyrase による PARsylation と自身の RING 活性によるユビキチン化を受ける。また Tankyrase も RNF146 の基質であり、両者は互いに分解し合う大きな分解複合体を形成する。この複合体は、3BP2 や Wnt 抑制因子 AXIN など複数の基質を同時に巻き込みながら、タンパク質量を精緻に調節している (Figure F).

Cherubism 変異は、この Tankyrase-RNF146-3BP2 分解経路を選択的に破綻させる。RSPPDG モチーフ内のアミノ酸置換により、3BP2 は Tankyrase の ARC ドメインと結合できなくなり、PARsylation もユビキチン化も受けなくなる。結果として、Cherubism 変異 3BP2

は細胞内で過剰に安定化し、ABL や SRC などのチロシンキナーゼとその下流因子 VAV や SYK の活性化を恒常的に増強する。その帰結として、マクロファージ系細胞では RANKL 刺激に対する破骨細胞分化が過剰に促進され、高度な骨吸収と炎症性サイトカイン産生が引き起こされる (Figure G, H)。Cherubism ノックインマウスにおいては、P416R 変異のホモ接合体が全身性炎症と高度の骨粗鬆症を呈し、TNF α の上昇と破骨細胞活性亢進が観察されることから、3BP2 は炎症性サイトカイン産生と骨吸収の両方をチェックポイントとして制御していることが示された。

5. Tankyrase-RNF146 Axis と骨代謝・エネルギー代謝制御機構⁵⁾

Tankyrase-RNF146-3BP2 経路は、骨代謝だけでなく、エネルギー代謝や免疫応答にも深く関与している。筆者らは、RNF146 を骨芽細胞系において特異的に欠損させたマウスを用いて、RNF146 が Wnt/ β -catenin と Hippo 経路を介して骨形成と全身代謝を統合的に制御することを明らかにした。RNF146 欠損骨芽細胞では、Tankyrase 基質である AXIN1 が分解されずに蓄積し、 β -catenin シグナルが抑制される。その結果、骨形成因子 FGF18 の発現が低下し、ERK-TAZ 経路が十分に活性化されない。TAZ は RUNX2 および TEAD と複合体を形成して、それぞれ骨芽細胞の分化と増殖を制御するため、TAZ の発現低下は骨芽細胞数の減少と分化障害を招く。実際に RNF146 欠損マウスでは、頭蓋骨縫合の閉鎖不全や低身長といった、ヒトの cleidocranial dysplasia を想起させる表現型が観察されている (Figure I)。



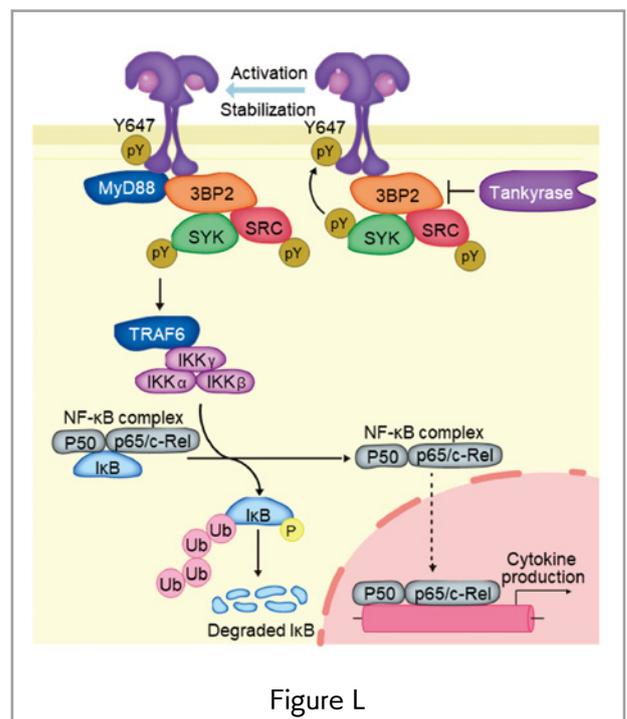
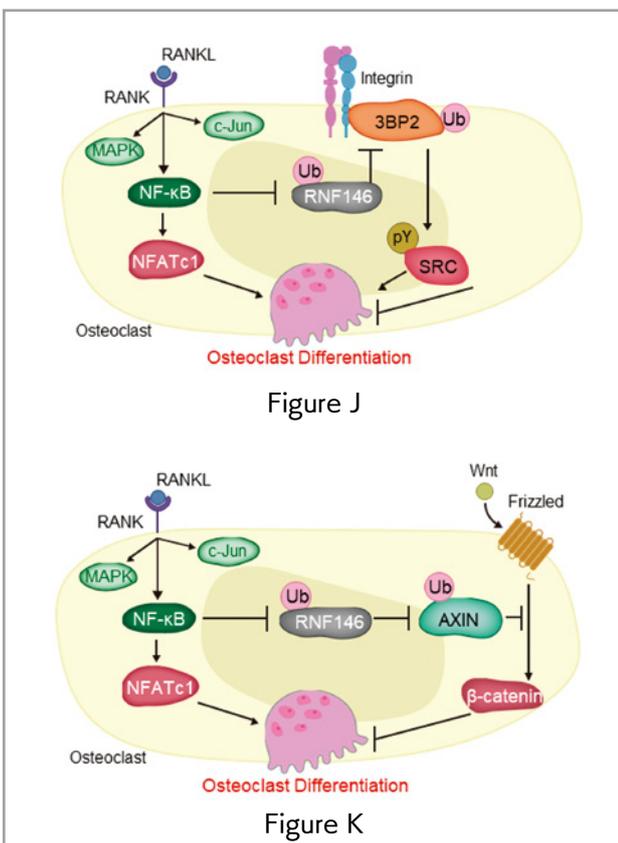
さらに、RNF146 欠損骨芽細胞では骨髄中の脂肪細胞が増加し、骨髄脂肪化が進行する。これは、 β -catenin シグナル低下により間葉系前駆細胞の運命決定が骨芽細胞よりも脂肪細胞へ傾くためである。骨芽細胞由来ホルモンであるオステオカルシンの分泌も低下し、その結果として膵 β 細胞の分化とインスリン分泌が障害され、耐糖能異常が生じる。骨芽細胞特異的 RNF146 欠損マウスで認められる骨形成不全、骨髄脂肪化、糖代謝異常は、骨が内分泌臓器として全身エネルギー代謝を制御するという概念を、Tankyrase-RNF146-AXIN-TAZ 経路の観点から裏づけるものである。筆者らの JCI 論文では、この骨-膵連関の分子基盤が詳細に検討されている。

破骨細胞側では、筆者らは RNF146 をミエロイド系で特異的に欠損させたマウスを用いて、RANKL シグナルが RNF146 発現を NF- κ B 依存的に抑制することを報告した。RANKL 刺激により RNF146 の転写が抑制されると、3BP2 と AXIN1 が安定化し、SRC と SYK の活性化が増強される。AXIN1 の蓄積は β -catenin シグナルを抑制し、結果として破骨細胞分化を促進する。RNF146 欠損マウスは骨量低下と破骨細胞数の増加を呈し、RANKL-NF- κ B-RNF146-3BP2/AXIN 軸

が破骨細胞形成の重要な制御点であることが示された (Figure J, K⁶)。

6. チロシンリン酸化が自然免疫を制御する⁷⁾

Tankyrase-3BP2 経路は自然免疫系にも深く関わる。Cherubism ノックインマウスでは、TLR リガンド刺激に対してマクロファージからの TNF α や IL6 産生が著明に亢進しており、3BP2 シグナルが TLR シグナル伝達の増幅器として働くことが示唆されていた。近年筆者らは、Tankyrase1/2 をミエロイド系で欠損させたマウスが、腸管・皮膚・肝臓を中心とする重度の自己炎症と炎症性腸疾患様病変を呈し、TLR2 リガンド刺激に対して過剰なサイトカイン産生を示すことを明らかにした。分子メカニズムの解析から、Tankyrase 欠損により 3BP2 が蓄積し、SRC および SYK が持続的に活性化することで、TLR2 の TIR ドメインに存在する制御チロシン残基 Tyr647 のリン酸化が増強され、MyD88-TRAF6- IKK 複合体の活性化と $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ の分解が促進されることがわかった (Figure L)。その結果、NF- κ B が核内に移行し、IL6 や TNF α など炎症性サイトカインの転写が亢進する。すなわち Tankyrase は、3BP2 の分解を介して TLR2 シグナルの閾値を制御し、常在細菌や病原体に対する炎症反応が過度にならないようにブレーキをかける役割を果たしている。Tankyrase



阻害薬の開発が進む中で、こうした自己炎症のリスクは重要な安全性懸念として認識される必要がある。

7. 獲得免疫制御機構における 3BP2 の機能

3BP2 は自然免疫だけでなく、獲得免疫にも関与する。B 細胞では、CD19 のチロシンリン酸化部位に 3BP2 の SH2 ドメインが結合し、SYK の活性化と NFAT の誘導に寄与する。3BP2 欠損 B 細胞では B 細胞受容体 (BCR) 刺激に対する増殖と生存が低下し、胸腺非依存性抗原に対する Ig 応答が障害される。T 細胞においても 3BP2 は T 細胞受容体 (TCR) シグナル複合体の一部として LCK, ZAP-70, LAT, PLC γ 1, Grb2 などと結合し、抗原提示細胞との短時間の接触後にも持続的なシグナル伝達を可能にする。CD8 陽性 T 細胞では、初期抗原刺激から時間をかけて誘導される 3BP2 の発現が、エフェクターおよびメモリー T 細胞への分化を支える第二波の TCR 様シグナルとして機能することが報告されている。これらの結果は、3BP2 が自然免疫と獲得免疫の両方において、シグナルの「増幅器」として働くことを示している。

8. ケルビズム以外のヒト疾患の病態形成に関わる Tankyrase-RNF146 AXIS の役割

Tankyrase は 3BP2 以外にも多くの基質を持ち、その多くが腫瘍抑制因子やシグナル制御因子として機能する。Wnt/ β -catenin シグナルを負に制御する AXIN1/2, AKT シグナルを抑制する PTEN, Hippo 経路の足場タンパク質で YAP を細胞質に封じ込める angiomin (AMOT) ファミリー, エネルギー代謝のセンサーである AMPK を活性化する LKB1 など、いずれも Tankyrase-RNF146 依存的に PARsylation とユビキチン化を受ける。Tankyrase 阻害薬は、AXIN の安定化を通じて β -catenin シグナルを抑制し、一部の犬大腸がんモデルで腫瘍増殖を抑えることが報告されているが、APC や AXIN, β -catenin 自身に変異を持つ腫瘍では効果が期待しにくい。また、Tankyrase 阻害は PTEN や AMOT, LKB1 の分解を抑制し、AKT や YAP の活性化を間接的に抑える可能性がある一方で、ミエロイド系における自己炎症や骨代謝異常などの副作用が懸念される。現在までに Tankyrase 阻害薬の臨

床試験は行われておらず、今後は基質選択性を高めた阻害薬や、ARC ドメインと基質の相互作用を選択的に阻害するペプチド様分子など、より精緻な介入法の開発が求められる。

Tankyrase は神経系にも発現しており、TDP-43 を中心とした神経変性とも関連する。TDP-43 は ALS や前頭側頭葉変性症で細胞質封入体として蓄積する RNA 結合タンパク質であり、その N 末端には PAR 結合モチーフが存在する。PAR との結合は TDP-43 の液-液相分離とストレス顆粒への局在に必要であり、Tankyrase 阻害は TDP-43 の細胞質局在と神経毒性を軽減することが示されている。Tankyrase の神経系における役割はまだ十分解明されていないが、PARsylation と液-液相分離の関係は、神経変性疾患の新たな治療標的として注目される。

PARP ファミリー全体を俯瞰すると、少なくとも 18 種類の酵素が同定されており、その多くは核内に局在して DNA 損傷応答や転写制御に関わっている。PARP1 と PARP2 は一本鎖切断の検知と修復に不可欠であり、ホモログス組換え欠損腫瘍に対する PARP1 阻害薬の「合成致死」療法はすでに臨床実装されている。一方で、PARP5a/5b である Tankyrase1/2 は、テロメア結合タンパク質 TRF1/TERF1 の分解によるテロメア長制御や、有糸分裂紡錘体の制御を担うとともに、細胞質において多様な基質の PARsylation を介してユビキチン化と分解を誘導するという、核内 PARP とは異なる役割を持つ。このように、PARsylation は単一の機能に特化した修飾ではなく、細胞内の局在や基質の違いに応じて多彩な生理機能を発揮する「多機能な酵素活性」であると理解されつつある。

Cherubism に関する臨床的な視点からは、遺伝学的診断と表現型の多様性が重要である。現在までの報告では、典型的な顎顔面骨病変を呈する患者の約 80% で SH3BP2 エクソン 9 のミスセンス変異が同定されるが、残る 20% では原因遺伝子が未同定であり、3BP2 シグナルを構成する Tankyrase1/2 や RNF146 など他の分子の変異が候補として挙げられている。また、同じ変異を持つ家系内でも重症度や発症年齢にはばらつきがあり、環境因子や微生物叢、免疫応答の個体差が病態に影響している可能性がある。実際、Cherubism アレ

ルヘテロ接合体マウスでは、口腔内細菌や腸内細菌由来のTLRリガンドに対する応答が野生型よりも増幅され、軽微な感染刺激が骨破壊の増悪や自己炎症を引き起こすことが示されている。こうした所見は、希少疾患の理解が、より一般的な炎症性骨疾患や自己炎症性疾患の病態解明にも直結することを物語っている。

3BP2-SYK経路は、代謝性肝疾患においても中心的な役割を果たす。脂肪肝炎モデルマウスを用いた解析では、高脂肪食あるいはメチオニン・コリン欠乏食負荷により肝臓に脂肪滴の蓄積、マクロファージや好中球の浸潤、線維化が進行する過程で、肝実質細胞および免疫細胞における3BP2とSYKの発現レベルが疾患重症度と良好な相関を示すことが報告されている。3BP2欠損やミエロイド系SYK欠損は肝炎と線維化を顕著に抑制し、一方でCherubism変異を持つマウスでは肝障害が増悪した。SYK阻害薬や3BP2シグナルの遮断が非アルコール性脂肪性肝炎の新規治療戦略となる可能性が示唆されており、Tankyrase-3BP2軸は肝臓における炎症・代謝・線維化のクロストークをつなぐ鍵分子であると考えられる。

ウイルス感染に対するI型インターフェロン応答の制御にも、TankyraseとRNF146が関わることを示されている。ミトコンドリア外膜に局在するVISA/MAVSは、RIG-I様受容体がウイルスRNAを認識した際にシグナルプラットフォームとして機能し、IRF3やNF- κ Bを活性化してIFN- β や炎症性サイトカインの転写を誘導する。最近の研究により、VISAがTankyraseの結合モチーフRNP DGGを有し、TankyraseによるPARsylationを受けることでRNF146に認識され、ユビキチン化と分解を受けることが明らかとなった。Tankyraseを遺伝学的あるいは薬理的に阻害すると、VISAの安定性が増し、ウイルス感染に伴うIFN応答が増強され、ウイルス負荷が減少する。このことは、Tankyraseが過剰なインターフェロン応答を抑える「バッファー」として働く一方で、その阻害が抗ウイルス防御を高める両刃の剣であることを示している。

Tankyrase基質の網羅的探索は、質量分析を用いたプロテオミクスにより大きく進展した。Tankyrase阻害薬投与あるいはTankyraseノックアウト細胞のタンパク質発現プロファイルを解析すると、AXIN、

3BP2、RNF146、PTEN、SOX9、PARP1、Rab11のGEFであるSH3BP5/SH3BP5L、VISAなど、多数の候補基質が同定される。中でもSOX9は軟骨分化のマスタートランスクリプション因子であり、そのPARsylationと分解制御が変形性関節症モデルにおける軟骨保護に関わることが示されている。また、DrosophilaではTankyraseがJNKをK63結合型ユビキチン化により活性化し、ストレス耐性や寿命延長に寄与することも報告されている。これらの知見は、Tankyrase-RNF146経路が、骨・免疫のみならず、軟骨、上皮の形態形成、ストレス応答など極めて多岐にわたる組織と機能に影響していることを示している。

一方で、Tankyrase自身も上流の調節を受けている。GDP-mannose 4,6-dehydratase (GMD)は細胞質でTankyrase1と結合し、そのPARP活性を抑制する。Wnt阻害物質として同定されたWIKI4はTankyrase2の酵素活性を直接阻害し、AXINの分解を抑制する。前立腺関連抗原PAGE4は前立腺間質線維芽細胞に選択的に発現し、AXIN1と競合的にTankyraseに結合することで、組織特異的にWnt/ β -cateninシグナルを抑制する。また、ユビキチン特異的プロテアーゼUSP34はAXINのユビキチン鎖を除去し、Tankyrase-RNF146による分解からAXINを保護する。これらの調節因子は、Tankyrase活性が細胞種や組織、発生段階に応じて精密に制御されていることを示しており、今後、酵素活性そのものに加えて「Tankyrase活性の制御ネットワーク」を標的とした創薬戦略が重要になると考えられる。

臨床の観点からは、Cherubism患者における全身骨密度や免疫異常の実態解明も重要である。マウスモデルではCherubism変異が全身性の骨粗鬆症や自己炎症を引き起こすことが示されているが、ヒト患者では顎顔面骨以外の骨病変や全身性自己免疫疾患の合併は必ずしも一般的ではない。その理由として、骨リモデリング速度や骨芽細胞・破骨細胞の比率、局所の炎症環境、常在細菌叢など、顎顔面骨特有の因子が影響している可能性がある。さらに、小児期から思春期にかけての骨成長とホルモン環境の変化が、Cherubism病変の自然寛解に関与していると推測されるが、その分子基盤は不明である。Tankyrase-3BP2経路の時空間的な活

性変動を可視化する技術や、ヒトの顎骨特異的な単一細胞トランスクリプトーム解析などが今後の鍵となるだろう。

このように、Tankyrase–RNF146–3BP2 経路は、単一のシグナル経路というよりも、複数の酵素反応とユビキチン・プロテアソーム系が織りなす「酵素ネットワーク」として捉えるべき存在である。今後、Tankyrase のフィラメント形成と活性化を制御する上流シグナル、3BP2 や AXIN, VISA, TDP-43 など多数の基質間での基質選択性の原理、そして PAR 鎖の構造とユビキチン鎖の種類がどのようにシグナル出力の質を規定するのか、といった疑問に答えていくことが求められる。希少疾患 Cherubism から始まった PARsylation 研究は、酵素学、免疫学、骨代謝学、腫瘍学、神経科学をまたいだ学際的な研究領域へと発展しており、その中心にある Tankyrase–RNF146–3BP2 AXIS は、今後多くの「教訓 (lessons)」を我々に与え続けると期待する。

さいごに

希少疾患を手がかりに、酵素活性とユビキチン化、シグナル伝達が織りなす精緻なネットワークを解きほぐし、PARsylation を介したユビキチン化という視点から生命現象を捉え直すことで、これまで見過ごされてきた制御層が次々と浮かび上がりつつある。Tankyrase–RNF146–3BP2 AXIS に関する現在までの成果と未解決の問いを俯瞰するとき、Cherubism というまれな疾患から学んだ「教訓」は、今後の酵素研究、免疫研究、骨代謝研究、そして創薬研究において、長く生き続ける知的遺産となるだろう。

参考文献

- (1) Matsumoto Y et al. Trends Mol Med. 29(5):390-405, 2023
- (2) Matsumoto Y et al. J Clin Invest. 126(12):4482-4496, 2016
- (3) Ueki Y et al. Nat Genet. 28(2):125-126, 2001.
- (4) Levaot N, Rottapel R et al. Cell. 147(6):1324-1339, 2011
- (5) Matsumoto Y et al. J Clin Invest. 127(7):2612-2625, 2017

- (6) Matsumoto Y et al. J Clin Invest. 127(4):1303-1315, 2017
- (7) Matsumoto Y et al. J Clin Invest. 132(7):e140869, 2022

総 説

安息香酸誘導体を基質とするアデニル化酵素の エンジニアリング

石 川 文 洋

1. はじめに

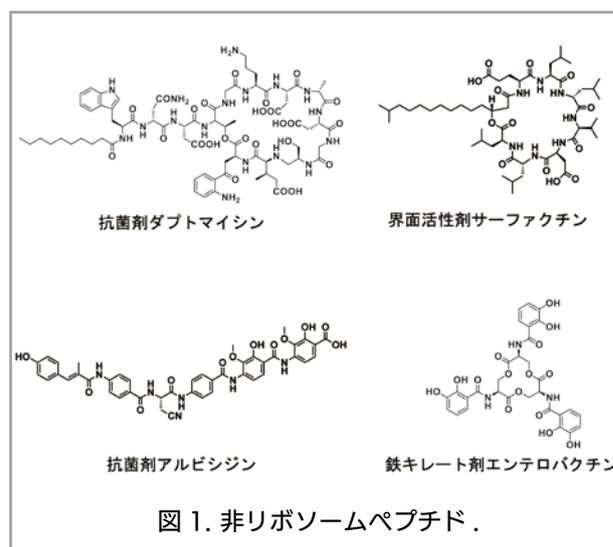
資源の枯渇が懸念される現代において、医薬品候補化合物として天然物の構造多様性を拡充することは極めて重要である。穏和な条件下で目的の反応を進行させることが可能な酵素合成法は、グリーンケミストリーの観点から有望な手法として注目されている。近年、ペプチド天然物の多様性拡充を目的として、生合成遺伝子および生合成酵素の応用研究が活発に展開されている。これにより、微生物を宿主とした生合成遺伝子クラスターの異種発現・物質生産に加え、生合成システムの反応機構の解明が進展している。さらに、生合成経路の人工的改変や生合成酵素のエンジニアリングを通じて、非天然型化合物の合成へと研究が発展しつつある^{1,2)}。実際、ペプチド天然物の生合成に関する環化酵素を生体触媒として応用する試みが進められており、その有用性が立証されつつある³⁾。

本総説では、筆者らの研究成果を含め、ペプチド天然物の構造多様性を創出するアデニル化酵素 (adenylation, A) ドメイン、なかでも安息香酸誘導体に対して基質特異性を示す A ドメインのエンジニアリングに関する研究動向と、それを利用した非天然型ペプチド化合物の酵素合成について概説する。

2. 非リボソームペプチド合成酵素とアデニル化酵素

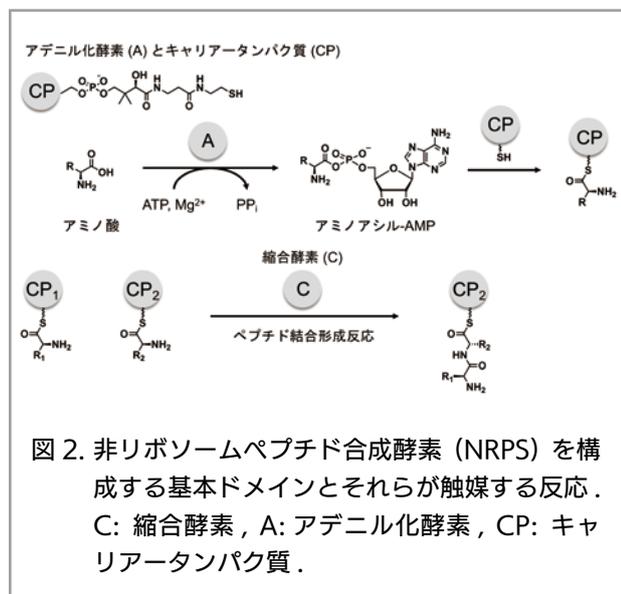
ダプトマイシン、サーファクチン、エンテロバクチン、アルビシジンに代表されるペプチド天然物は、非リボソームペプチド (nonribosomal peptide, NRP) と総称され、非リボソームペプチド合成酵素 (nonribosomal peptide synthetase, NRPS) によって生合成される (図 1)⁴⁾。NRP 生合成では、タンパク質構成アミノ酸に加えて、500 種類以上の非タンパク質構成アミノ酸、安息香酸誘導

体、 α -ケト酸、 α -ヒドロキシ酸などがビルディングブロックとして利用され、多様なペプチド骨格が構築される^{5,6)}。NRPS システムは基質の選別と縮合反応を反復しながら、ペプチド鎖を伸長する (図 2)⁴⁾。A ドメインは基質を選別し、ATP と Mg^{2+} を用いてアミノアシル-AMP へ活性化する (図 2)。続いて、アミノアシル-AMP はキャリアタンパク質 (carrier protein, CP) ドメインへチオエステル結合を介して受け渡される (図 2)。その後、CP ドメインに受け渡された基質は、縮合酵素 (condensation, C) ドメインによるペプチド結合形成反応を経てペプチド骨格に導入される (図 2)。すなわち、A ドメインは、ペプチド骨格へ導入される基質を選別し、アデニル化反応を触媒することから、“gatekeeper”としての役割を担っている。



A ドメインの基質認識部位には、基質選別性を規定するおよそ 10 残基の「NRPS code」が存在する^{7,8,9)}。NRPS code は遺伝子クラスターの機能予測向上のため各種アルゴリズムやウェブツールに導入されてきた¹⁰⁾。もっとも、これらの *in silico* 予測は、計算手法の改良

および既存知見の拡充のため、生化学的実証によって裏づけられる必要がある。一方で、このような配列情報に基づく解析により、新規に発見された、または機能が未解明の A ドメインにおける基質選択性を一次アミノ酸配列のアラインメントから予測することが可能となっている¹⁰⁾。この NRPS code は、L- α -アミノ酸を活性化する典型的な細菌由来 A ドメインにおいて、最も高い予測精度を示すものとして広く用いられてきた。真菌由来 A ドメインにおいても同様の 10 残基が認められるものの、その予測精度は低いことが報告されている¹¹⁾。実際、近年の真菌由来 A ドメインの系統解析においても、NRPS code の重要性が再確認された一方で、真菌の NRPS code は細菌でよく研究されている既知の例から大きく逸脱することが明らかとなっている¹²⁾。したがって、細菌由来の A ドメインと同等の精度で基質選択性を予測するためには、真菌由来 A ドメインの NRPS code に対する部位特異的変異導入および生化学的解析による実証が依然として不可欠である。また、生化学的解析を通じて多様な A ドメインの基質許容性を明らかにするとともに、エンジニアリングによって NRPS code を拡張することも重要である。



3. 2,3-ジヒドロキシ安息香酸を基質とする A ドメイン EntE の基質許容性の拡張

A ドメインはペプチド骨格に導入される基質を決定する“gatekeeper”として機能することから、NRPS エンジニアリングにおける標的ドメインとされている^{1,2)}。

NRPS を利用した非天然型ペプチドの合成手法のうち、最も広く用いられているのは A ドメインのドメインスワッピング法 (A ドメインを異なる基質選択性をもつ A' ドメインに置換する手法) であるが、この方法では A' ドメインと CP ドメインとのタンパク質間相互作用の破綻により、目的化合物の収量が低下する、あるいは生成が完全に失われる場合が多い。これを回避するため、活性部位への合理的変異導入¹³⁾、進化分子工学^{14,15)}、スワッピング部位の最適化などにより¹⁶⁻¹⁸⁾、基質特異性を制御して非天然型ペプチドを得る試みが数多く報告されている。一方、これらの研究の多くは L- α -アミノ酸基質を活性化する典型的な A ドメインに限定されている。実際、安息香酸誘導体を基質とする A ドメインのエンジニアリングは依然少数で^{19,20)}、これまでの二例はいずれも 2,3-ジヒドロキシ安息香酸 (DHB) からアントラニル酸 (Ant) への特異性変換にとどまる。さらに、これら変異体を用いた非天然型安息香酸誘導体含有ペプチドの合成に関する検討は、未報告である。

エンテロバクチンは、EntE, EntB, EntF により生合成される (図 3A)²¹⁾。A ドメイン EntE は DHB をアデニル化し、EntB に DHB が受け渡される。EntF は C, A, T およびチオエステラーゼ (TE) ドメインから構成される NRPS モジュールである。A ドメインが L-Ser をアデニル化後、L-Ser が CP ドメインに受け渡され、C ドメインが EntB 上の DHB と CP ドメイン上の L-Ser とのペプチド結合形成 (DHB-L-セリンの生成) を触媒する。その後、TE ドメインが三量体化した DHB-L-Ser の環化反応を触媒し、エンテロバクチンが生合成される。

筆者らは EntE の厳密な基質特異性を緩和し、多様な安息香酸誘導体を基質として許容する変異体の創製を目指した²²⁾。DhbE-DHB 複合体の結晶構造をもとに EntE 活性部位を予測した (図 4A)。EntE の DHB 認識は (1) Asn235 および Ser240 と DHB の水酸基との水素結合、(2) Tyr236 と芳香環との π - π スタッキング相互作用によって特徴づけられる。ベンゼン環を共通認識部位とし、置換基を水素結合などで識別するという点で、安息香酸誘導体基質の認識原理は共通していると考えられる。したがって、ベンゼン環認識部位を保持しつつ、置換基周辺空間を拡張すれば、多様な安

息香酸誘導体を許容する活性部位を設計できると予測した。そこで、Asn235 をさまざまなアミノ酸に置換した変異体を作製し、DHB およびサリチル酸 (Sal) を基質として酵素速度論解析を行った。その結果、EntE Asn235Gly および Asn235Ser 変異体は DHB および Sal に対する K_m 値を保持していることが明らかとなった。このことから、EntE Asn235Gly や Asn235Ser 変異体は、ベンゼン環を共通認識部位としつつ、置換基認識部位を拡張した活性部位を有すると考えられる。

次に、置換様式の異なる 22 種類の安息香酸誘導体を基質として、EntE Asn235Gly 変異体の酵素活性を評価した (図 4B)²²⁾。その結果、EntE Asn235Gly 変異体は 16 種類におよぶ多様な安息香酸誘導体を基質として許容した。酵素反応速度論解析の結果、野生型 EntE に比べて、3-エチニル安息香酸、3-フルオロ安息香酸、3-クロロ安息香酸、3-ブロモ安息香酸、3-ヨード安息香酸、2-フルオロ安息香酸、2-クロロ安息香酸に対する特異性が、それぞれ 30, 10, 3.8, 14, 72, 8.3, 203 倍向上した。さらに、

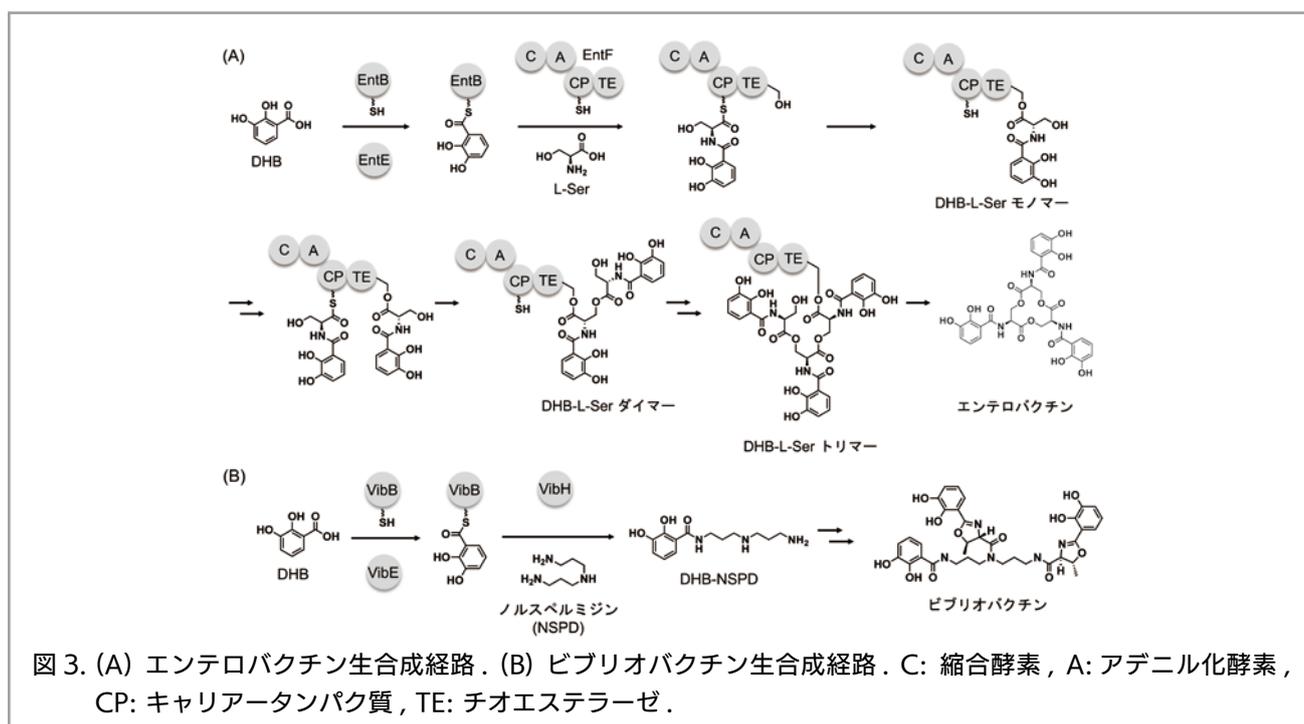


図 3. (A) エンテロバクチン合成経路. (B) ビブリオバクチン合成経路. C: 縮合酵素, A: アデニル化酵素, CP: キャリアータンパク質, TE: チオエステラーゼ.

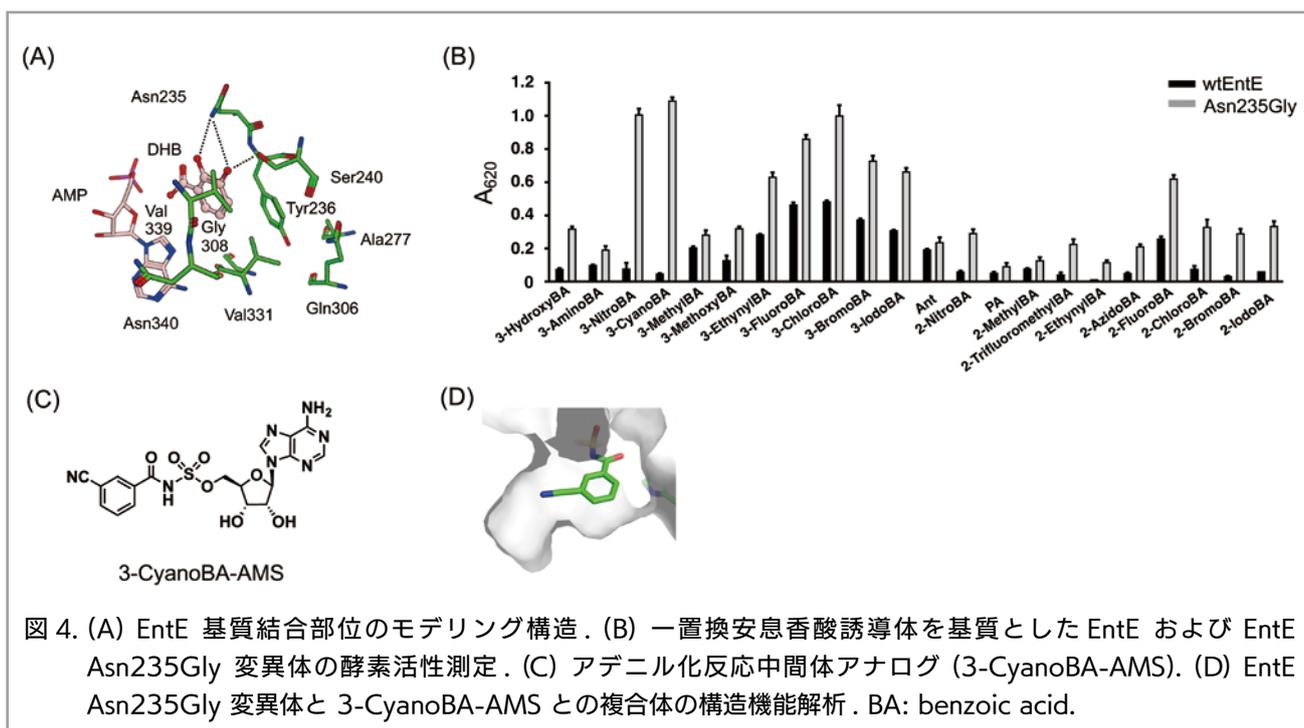


図 4. (A) EntE 基質結合部位のモデリング構造. (B) 一置換安息香酸誘導体を基質とした EntE および EntE Asn235Gly 変異体の酵素活性測定. (C) アデニル化反応中間体アナログ (3-CyanoBA-AMS). (D) EntE Asn235Gly 変異体と 3-CyanoBA-AMS との複合体の構造機能解析. BA: benzoic acid.

野生型 EntE ではアデニル化できない 3- ニトロ安息香酸, 3- シアノ安息香酸, 2- ニトロ安息香酸, 2- ブロモ安息香酸, 2- ヨード安息香酸も, EntE Asn235Gly 変異体はアデニル化活性を示した.

EntE Asn235Gly の寛容な基質特異性の構造的基盤を明らかにするため, アデニル化反応中間体アナログとの複合体の構造機能解析を実施した (図 4C)²²⁾. 具体的には, 3- シアノ安息香酸 (図 4C) および 2- ニトロ安息香酸とスルファモイルアデノシン (AMS) を縮合した化合物を合成し, これらの阻害剤との複合体について構造機能解析を行った (図 4D). その結果, EntE Asn235Gly の基質結合部位はベンゼン環を共通の認識要素としつつ, 2 位および 3 位近傍に嵩高い官能基を許容し得る広い空間を有することが明らかとなった (図 4D).

さらに, 2 位および 3 位に多様な置換基を有する二置換安息香酸誘導体や 2 位や 3 位にプロパルギルオキシ基を導入した一置換安息香酸誘導体など, 31 種類のより嵩高い基質を用いて酵素活性を評価した (図 5AB)²³⁾. その結果, 野生型 EntE は 2,3- ジフルオロ安息香酸, 3- フルオロ -2- ヒドロキシ安息香酸, 3- クロロ -2- フルオロ安息香酸および 3- クロロ -2- ヒドロキシ安息香酸の計 4 種類のみを基質として認識した. 一方, EntE

Asn235Gly 変異体は計 21 種類におよぶ多様な置換様式の安息香酸誘導体を基質として許容することが明らかとなった. 特に, EntE Asn235Gly 変異体は 2 位にフルオロ, クロロ, ブロモ, ヨード, メチル, メトキシ, あるいはニトロ基を有する基質を幅広く許容した. さらに, 3 位にシアノ基や極めて嵩高いプロパルギルオキシ基を有する基質についても許容性を示した (図 5B).

4. NRPS code スワッピングによる 2,3- ジヒドロキシ安息香酸を基質とする A ドメイン EntE のエンジニアリング

NRPS において, A ドメインはペプチド骨格へ導入されるアミノ酸を規定する. そのため, A ドメインのアミノ酸選択性を制御することができれば, 多様な天然物誘導体の生合成へと展開可能である. しかし A ドメインは長い進化的過程を経て高度に洗練された酵素であるため, エンジニアリングは一般に困難であるのが現状である. 実際, EntE Asn235Gly 変異体は 37 種類に及ぶ多様な置換様式の安息香酸誘導体を基質として許容するものの, 触媒効率は野生型 EntE の DHB に対する酵素活性に比べ低い²²⁾.

A ドメインの構造と機能に関する体系的研究により,

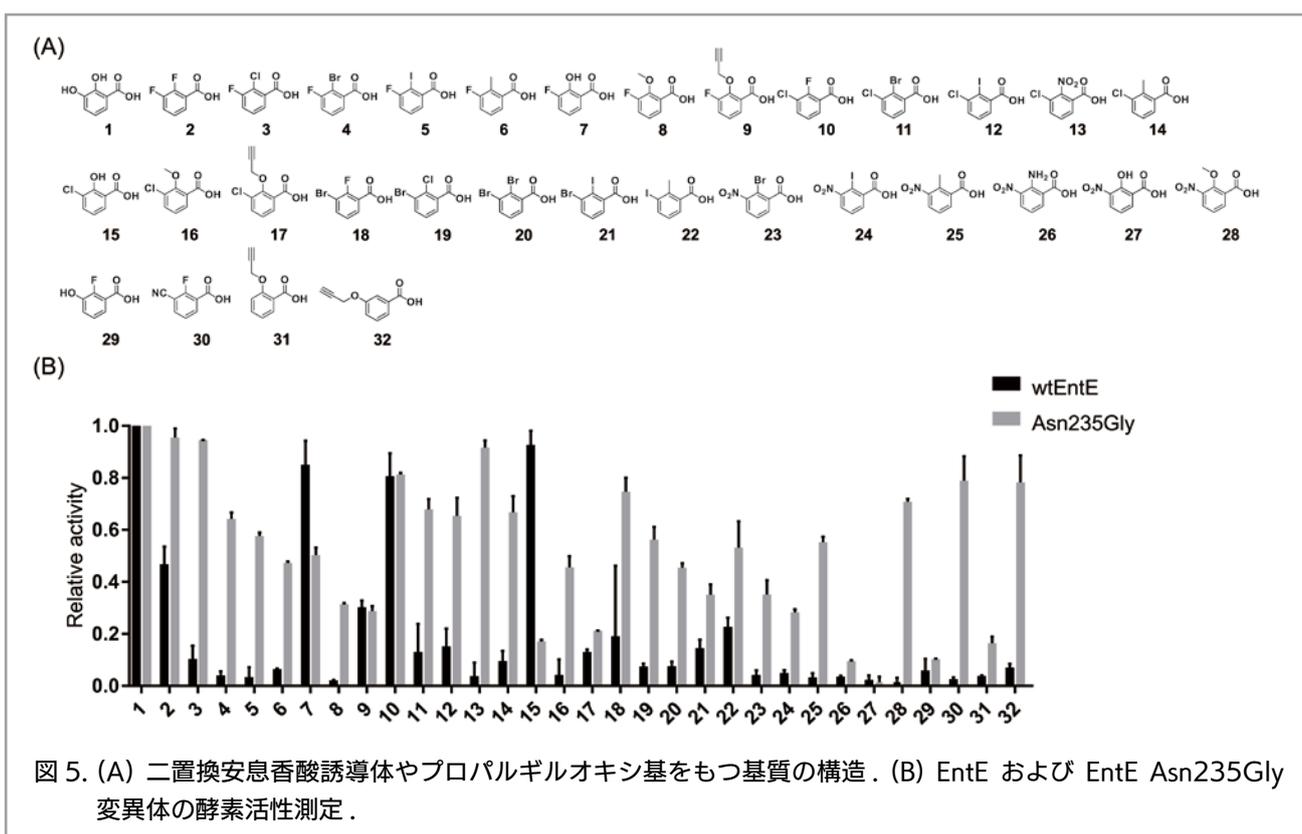


図 5. (A) 二置換安息香酸誘導体やプロパルギルオキシ基をもつ基質の構造. (B) EntE および EntE Asn235Gly 変異体の酵素活性測定.

そのアミノ酸選択性は活性部位を形成する 10 アミノ酸残基からなる「NRPS code」によって規定されることが明らかとなった⁷⁻⁹⁾。すなわち、目的とするアミノ酸を基質とする A ドメインの NRPS code を、標的とする A ドメインの活性部位へ導入することで、選択性の合理的変換が可能と考えられる。

そこで、DHB を基質とする A ドメイン EntE の NRPS code を、Sal を基質とする A ドメインの NRPS code に置換した EntE 変異体 (Tyr236Phe/Ser240Cys, Tyr236Phe/Ser240Cys/Val339Ile/Asn340Cys) を作製した (図 4A)²⁴⁾。特に、EntE Tyr236Phe/Ser240Cys/Val339Ile/Asn340Cys 変異体は、Sal を基質とする A ドメインの NRPS code を包括的に置換した変異体である。

次に、DHB および Sal を基質として酵素反応速度論解析を行った²⁴⁾。その結果、EntE Tyr236Phe/Ser240Cys/Val339Ile/Asn340Cys 変異体の Sal に対する触媒効率 (k_{cat}/K_m) は、 $4883 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であり、DHB に対する触媒効率は低下したため、Sal への基質特異性が野生型に比して約 45 倍向上していたことが明らかとなった。さらに、その Sal に対する触媒効率は、Sal を基質とするアデニル化酵素 MbtA ($k_{cat}/K_m = 15167 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) と比較できる活性であった。

以上の結果より、既存の NRPS code を活用することで、A ドメインの基質特異性を効率的に改変し得ることが示唆された。

5. 非天然型ペプチドの酵素合成

A ドメイン変異体が物質生産に応用可能か評価することは極めて重要である。In vitro で再構成可能な

エンテロバクチンおよびビブリオバクチン生合成系 (図 3AB) に EntE 変異体 (Asn235Gly, Tyr236Phe/Ser240Cys および Tyr236Phe/Ser240Cys/Val339Ile/Asn340Cys) を導入し、非天然型ペプチドの生合成を検証した。ビブリオバクチン生合成においては、DHB 選択的 A ドメイン VibE, VibB, VibH に DHB とノルスペルミジン (NSPD) を添加することで、DHB-NSPD 縮合体が生成する (図 3B)²⁵⁾。さらに、DHB-NSPD 生合成においては、VibB および NSPD が、それぞれ EntB および n-オクチルアミンに代替可能である²⁶⁾。

そこで、EntE Asn235Gly 変異体、EntB および VibH に 3-ブromo-2-フルオロ安息香酸および n-オクチルアミンを添加し、3-ブromo-2-フルオロ安息香酸-n-オクチルアミン縮合生成物の生成を HPLC により評価した²³⁾。その結果、当該縮合生成物の生成が確認され、変換率は 60% に達した (図 6A)。このことから、VibH の DHB 認識部位は 2,3-二置換安息香酸誘導体に対して一定の基質許容性を有することが示唆された。

続いて、Sal および 3-ヒドロキシ安息香酸 (3-HBA) を含有するエンテロバクチン誘導体の合成を評価するため、EntE Tyr236Phe/Ser240Cys/Val339Ile/Asn340Cys 変異体-EntB-EntF および EntE Tyr236Phe/Ser240Cys 変異体-EntB-EntF を構築した²³⁾。その結果、前者の系では DHB の代替として Sal が取り込まれ、Sal-Ser の単量体・二量体・三量体が生成された (図 6B)。また、後者の系においても DHB の代替として 3-HBA を用いることで、3-HBA-Ser の単量体・二量体・三量体が生成された (図 6B)。

なお、EntF の TE ドメインは、Sal-Ser および 3-HBA

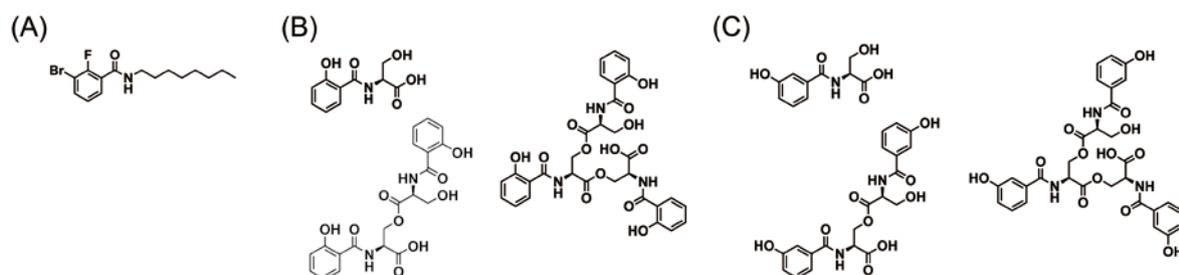


図 6. 非天然型ペプチドの酵素合成. (A) EntE Asn235Gly-EntB-VibH 系による酵素反応生成物. (B) EntE Tyr236Phe/Ser240Cys/Val339Ile/Asn340Cys 変異体-EntB-EntF 系による酵素反応生成物. (C) EntE Tyr236Phe/Ser240Cys 変異体-EntB-EntF 系による酵素反応生成物.

-Ser 三量体に対する環化反応を触媒できなかった。この結果は、TE ドメインによる基質認識において、芳香環 2 位および 3 位の水酸基の存在が重要であることを示唆している。あるいは、Sal-Ser および 3-HBA-Ser 三量体の生成量が低いため、環化生成物が検出限界以下であった可能性も考えられる。

6. 2,3-ジヒドロキシ安息香酸を基質とする A ドメインのエンジニアリング

Yin および Aldrich らは、バシリバクチン生合成に関与する DHB に基質特異性を示す A ドメイン DhbE の基質特異性を、酵母細胞表面ディスプレイ法を用いて改変する手法を報告している¹⁹⁾。著者らは DhbE に対して数百万規模の変異体ライブラリーを構築し、アデニル化反応中間体を模倣した合成分子プローブを利用することで、安息香酸誘導体基質に対して高い親和性を示す変異体を効率的に選抜した。具体的には、非天然型基質として 3-HBA および Ant を選択し、これらを結合した合成分子プローブに対する酵母表面提示変異体の結合能をフローサイトメトリー (FACS) によりスクリーニングした。その結果、いずれの変異体群においても、基質認識部位近傍の His234 が特異性変換における鍵残基であることが判明した。3-HBA 認識変異体 KZ4 は、3-HBA に対して野生型 DhbE と比較して約 11 倍の触媒効率 (k_{cat}/K_m) を示した。同様に、Ant 認識変異体 KZ12 では、非天然型基質に対する k_{cat}/K_m が 6 倍向上し、約 200 倍の基質特異性の変換が達成された。

Wencewicz および Gulick らは、*Acinetobacter baumannii* におけるフィムスバクチン生合成系に着目し、A ドメイン FbsH の基質認識機構および基質特異性拡張の可能性について体系的解析を行っている²⁷⁾。構造機能解析により、FbsH の基質結合部位において Asn246 および Ser251 が DHB の水酸基と水素結合を形成し、さらに Phe247, Val340, Val348, Phe350 がベンゼン環を疎水的に固定することが明らかとなった。特に、ベンゼン環 C4 位周辺には強い立体的制約が存在し、この部位に置換基を有する基質は野生型 FbsH ではほとんど許容されないことが示唆された。この知見に基づき、著者らは基質結合部位底部の Phe350 の側

鎖が C4 置換基受容の主要な立体障害因子であると推定し、同残基を Ala に置換することで局所空間を拡張する戦略を採用した。その結果、FbsH F350A 変異体は 4-アミノ安息香酸、4-メチル安息香酸など C4 置換基を有する複数の安息香酸誘導体に対して、最大約 50 倍の触媒効率向上を示した。さらに、著者らは *in vitro* においてフィムスバクチン生合成系の一部を再構成し、FbsH 変異体が導入した非天然型中間体が、下流の C ドメインおよび環化ドメインを経て、最終的にフィムスバクチン類縁体へと変換されるかを検証した。その結果、複数の非天然型基質が生合成系に導入されることが確認され、NRPS が一定の基質許容性を持つことが示された。

Gulick らは、アシネトバクチン生合成の開始反応を担う DHB を特異的に活性化する A ドメイン BasE に着目し、その基質認識機構および基質許容性拡張の可能性について、構造機能解析および酵素反応速度論に基づく体系的解析を行っている²⁸⁾。BasE の基質結合部位の空間的制約を拡張するため、基質結合部位底部を形成する Val336, Y346, F243 を小さいアミノ酸に置換する合理的変異導入を行った。その結果、4-フルオロサリチル酸、4-メチルサリチル酸、4-アジドサリチル酸といった C4 位に置換基を有する非天然型基質に対して、野生型酵素を大きく上回る触媒効率を示した。特に V336A/S247C 変異体では、4-メチルサリチル酸に対する触媒効率が、野生型 BasE の DHB に対する値と同程度に達した。また、変異体と基質との複合体の構造解析により、基質結合部位の拡張が実際に C4 置換基を収容する物理的空間を形成していることが確認された。

7. 5-メチルオルセリン酸を基質とする A ドメインのエンジニアリング

Zhao らは、*Aspergillus terreus* に由来する NRPS 様タンパク質 ATEG_03630 に着目し、その A ドメインの基質特異性およびエンジニアリングを報告している²⁰⁾。一方、ATEG_03630 は A, CP, 還元 (R) ドメインが単一ポリペプチド中に連結した比較的単純な NRPS 様タンパク質であり、5-メチルオルセリン酸 (5-MOA) のアデニル化と CP ドメインへの転移に続いて、R ドメ

インによりアルデヒド体へと変換する。まず、5-MOA を含む 20 種類の安息香酸誘導体を用いて基質特異性を評価した。その結果、ベンゼン環 4 位のヒドロキシ基が水素結合ドナーとして基質認識に必須である一方、2 位ヒドロキシ基は特異性に寄与しないことが明らかとなった。さらに、5 位のメチル基は疎水的相互作用を介して選択性を高める要因となることが示された。これらの結果は、従来の DHB 選択的 A ドメインとは異なる基質認識様式を持つことを示している。次に、アントラニル酸を標的基質とし、配列比較に基づき「NRPS code」を同定した上で部位特異的変異導入を行った。その結果、H358A 変異体は野生型に比べてアントラニル酸に対する触媒効率 (k_{cat}/K_m) が 11 倍向上し、相対特異性は 26 倍増加した。さらに、複数変異を導入した変異体では、天然基質 5-MOA に対する活性を大きく低下させることで、40–47 倍の基質特異性の変換が達成された。最後に、ATEG_03630 によるアルデヒド生成と、その後のヒドロキシルアミン付加反応を連結したワンポット化学酵素合成により、4-ヒドロキシ安息香酸から対応するアルドキシムを高収率 (~98%) で得ることに成功した。

8. 3-ヒドロキシアントラニル酸を基質とする A ドメインのエンジニアリング

腸内細菌 *Klebsiella oxytoca* が産生する細胞毒性天然物ティリマイシンは、強い DNA アルキル化活性を示す一方、その作用強度ゆえに毒性制御や薬理特性の最適化が課題となってきた。ティリマイシンの生合成は、安息香酸誘導体を導入する A ドメイン NpsA を起点とする NRPS により進行し、複数の縮合および修飾反応を経て合成される²⁹⁾。このうち NpsA は 3-ヒドロキシ Ant を活性化し、ThdA へ転移させることで生合成の初発段階を規定する。したがって、NpsA の基質特異性を再設計することは、ティリマイシン生合成経路全体における構造多様性拡張の出発点となり、構造展開に向けた重要な戦略である。

Gulick らは、まず NpsA の基質特異性を規定する「NRPS code」を同定した²⁹⁾。さらに、NpsA の基質結合部位に存在する疎水性残基および水素結合ネットワークを精密に再設計し、3-ヒドロキシ Ant に加えて、

Ant, 4-ヒドロキシ Ant, 5-ヒドロキシ Ant, 5-フルオロ Ant といった多様な安息香酸誘導体を許容可能な NpsA 変異体を構築した²⁹⁾。NpsA の基質特異性改変に加えて、下流の L-プロリンに基質特異性を示す A ドメインの基質許容性の改変を組み合わせた結果、ティリマイシン誘導体を生合成的に生成することが可能となった²⁹⁾。これらの化合物については天然物ティリマイシンと異なる細胞毒性プロファイルが確認された。特に、細胞毒性の低減と細胞選択性の向上を同時に達成した誘導体は抗腫瘍剤候補として有望である。

9. まとめ

本総説では、安息香酸誘導体を基質とする A ドメインの基質特異性改変に関する近年の研究を概説した。A ドメインは NRPS における「gatekeeper」として、ペプチド骨格に導入される基質を厳密に選択する。したがって、その基質特異性を合理的に制御することは、非天然型ペプチドや新規生理活性化合物の創製に直結する重要な戦略である。

筆者らは EntE の構造基盤に基づく活性部位への変異導入により、従来は基質として認識されなかった多様な安息香酸誘導体を許容する変異体を創出した。さらに、NRPS code スワッピングにより、安息香酸誘導体を基質とする A ドメインの基質特異性を効率的に改変できることを示した。加えて、得られた変異体を用いて非天然型ペプチドの酵素合成を実証した。

他グループによる DhbE, FbsH, BasE, NpsA などの系統的解析から、A ドメインにおける基質結合様式の詳細が明らかにされ、部位特異的変異導入やライブラリースクリーニングにより基質特異性を精密に設計できることが示された。これらの研究は、安息香酸誘導体基質結合部位の空間的拡張を通じて、機能的拡張が可能であることを示唆している。

今後は、得られた変異体を *in vitro* および *in vivo* の物質生産系に応用し、非天然型安息香酸誘導体を含む新規ペプチドの創製へ展開することが期待される。また、構造情報と機械学習を融合した基質予測アルゴリズムの発展により、A ドメインの基質特異性の設計はさらに高精度化すると考えられる。これらの知見が、微生物由来ペプチド天然物の化学的多様性を拡張し、創薬

や機能性分子創出に資する新たな酵素工学基盤の構築へとつながると期待される。

参考文献

1. Winn, M. *et al.* Recent advances in engineering nonribosomal peptide assembly lines. *Nat. Prod. Rep.* **33**, 317–347 (2016).
2. Zhang, L., Wang, C., Chen, K. *et al.* Engineering the biosynthesis of fungal nonribosomal peptides. *Nat. Prod. Rep.* **40**, 62–88 (2023).
3. Matsuda, K. & Wakimoto, T. Penicillin-binding protein-type thioesterases: An emerging family of non-ribosomal peptide cyclases with biocatalytic potentials. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **80**, 102465 (2024).
4. Hur, G. H., Vickery, C. R. & Burkart, M. D. Explorations of catalytic domains in non-ribosomal peptide synthetase enzymology. *Nat. Prod. Rep.* **29**, 1074–1098 (2012).
5. Walsh, C. T., O’Brien, R. V. & Khosla, C. Nonproteinogenic amino acid building blocks for nonribosomal peptide and hybrid polyketide scaffolds. *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 7098–7124 (2013).
6. Heard, S. C. & Winter, J. M. Structural, biochemical and bioinformatic analyses of nonribosomal peptide synthetase adenylation domains. *Nat. Prod. Rep.* **41**, 1180–1205 (2024).
7. Stachelhaus, T., Mootz, H. D. & Marahiel, M. A. The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Biol.* **6**, 493–505 (1999).
8. Challis, G. L., Ravel, J. & Townsend, C. A. Predictive, structure-based model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains. *Chem. Biol.* **7**, 211–224 (2000).
9. Kudo, F., Miyanaga, A. & Eguchi, T. Structural basis of the nonribosomal codes for nonproteinogenic amino acid selective adenylation enzymes in the biosynthesis of natural products. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **46**, 515–536 (2019).
10. Blin, K. *et al.* antiSMASH 8.0: extended gene cluster detection capabilities and analyses of chemistry, enzymology, and regulation. *Nucleic Acids Res.* **53**, W32–W38 (2025).
11. Heard, S. & Winter, J. Structure-guided investigation of fungal adenylation domain substrate selectivity. *ChemRxiv* (2023). doi:10.26434/chemrxiv-2023-c24qz.
12. Noriler, S. *et al.* Evolutionary relationships of adenylation domains in fungi. *Genomics* **114**, 110525 (2022).
13. Kries, H. *et al.* Reprogramming nonribosomal peptide synthetases for “clickable” amino acids. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 10147–10150 (2014).
14. Niquille, D. L. *et al.* Nonribosomal biosynthesis of backbone-modified peptides. *Nat. Chem.* **10**, 282–287 (2018).
15. Camus, A. *et al.* Reprogramming nonribosomal peptide synthetases for site-specific insertion of α -hydroxy acids. *J. Am. Chem. Soc.* **144**, 17567–17575 (2022).
16. Bozhüyük, K. A. J. *et al.* De novo design and engineering of non-ribosomal peptide synthetases. *Nat. Chem.* **10**, 275–281 (2018).
17. Bozhüyük, K. A. J. *et al.* Modification and de novo design of non-ribosomal peptide synthetases using specific assembly points within condensation domains. *Nat. Chem.* **11**, 653–661 (2019).
18. Calcott, M. J., Owen, J. G. & Ackerley, D. F. Efficient rational modification of non-ribosomal peptides by adenylation domain substitution. *Nat. Commun.* **11**, 4554 (2020).
19. Zhang, K. *et al.* Engineering the substrate specificity of the DhbE adenylation domain by yeast cell surface display. *Chem. Biol.* **20**, 92–101 (2013).

20. Wang, M. & Zhao, H. Characterization and engineering of the adenylation domain of a NRPS-like protein: A potential biocatalyst for aldehyde generation. *ACS Catal.* **4**, 1219–1225 (2014).
21. Gehring, A. M., Mori, I. & Walsh, C. T. Reconstitution and characterization of the *Escherichia coli* enterobactin synthetase from EntB, EntE, and EntF. *Biochemistry* **37**, 2648–2659 (1998).
22. Ishikawa, F. *et al.* An engineered aryl acid adenylation domain with an enlarged substrate binding pocket. *Angew. Chem. Int. Ed.* **58**, 6906–6910 (2019).
23. Ishikawa, F. *et al.* Biosynthetic incorporation of non-native aryl acid building blocks into peptide products using engineered adenylation domains. *ACS Chem. Biol.* **19**, 2569–2579 (2024).
24. Ishikawa, F. *et al.* Precise probing of residue roles by NRPS code swapping: mutation, enzymatic characterization, modeling, and substrate promiscuity of aryl acid adenylation domains. *Biochemistry* **59**, 351–363 (2020).
25. Keating, T. A., Marshall, C. G. & Walsh, C. T. Reconstitution and characterization of the *Vibrio cholerae* vibriobactin synthetase from VibB, VibE, VibF, and VibH. *Biochemistry* **39**, 15522–15530 (2000).
26. Keating, T. A., Marshall, C. G. & Walsh, C. T. Vibriobactin biosynthesis in *Vibrio cholerae*: VibH is an amide synthase homologous to nonribosomal peptide synthetase condensation domains. *Biochemistry* **39**, 15513–15521 (2000).
27. Ahmed, S. F. *et al.* Expanding the substrate selectivity of the fimsbactin biosynthetic adenylation domain, FbsH. *ACS Chem. Biol.* **19**, 2451–2461 (2024).
28. Ahmed, S. F. & Gulick, A. M. The structural basis of substrate selectivity of the acinetobactin biosynthetic adenylation domain, BasE. *J. Biol. Chem.* **301**, 108413 (2025).
29. MacDonald, M. R., Hasselbeck, J. & Gulick, A. M. Protein engineering of biosynthetic enzymes unlocks libraries of bioactive tilimycin analogs. *ACS Catal.* **15**, 17801–17814 (2025).

総 説

ドライバー遺伝子変異チロシンキナーゼの細胞内局在異常とがんシグナル発信

小 幡 裕 希¹, 椎 名 勇², 西 田 俊 朗^{1,3}

概説

これまでに、我々は、受容体型チロシンリン酸化酵素 (Receptor Tyrosine Kinase, RTK) である KIT について、正常型が主に細胞膜に局在して役割を果たすのに対し、変異型は特定のオルガネラに異常に局在してがんシグナルを発信することを見出した。以下にそのハイライトを記載する。

- (i) 血液系がん (マスト細胞腫・マスト細胞白血病, 急性骨髄性白血病等) において, KIT 変異体は, エンドソーム-リソソーム系小器官に局在異常を呈し, オルガネラからシグナル発信する。
- (ii) 消化管間質細胞腫の KIT 変異体は, ゴルジ領域に停留し, そこからシグナル発信する。
- (iii) 我々が検討した限りは, がん原性 RTK の活性化は小胞体-ゴルジ体 (初期分泌オルガネラ) やエンドソーム系に認められ, 細胞種や RTK 分子種によってシグナルプラットフォームが異なる。

がんシグナルプラットフォームの理解は, 局在コントロールを機序とした新たなチロシンリン酸化シグナル阻害方法の開発に繋がっており, 本総説ではそれらの研究について解説したい。

1. はじめに

RTK ファミリーは, 55 種のメンバーから構成され, 細胞膜において, それぞれに対する細胞外リガンドが結合すると二量体化して活性化する (幾つかではあるが, リガンド結合前の不活化状態で二量体化している RTK も存在する)¹⁾。リガンド結合によって細胞質側のチロシンキナーゼ活性が亢進し, RTK 自身のチロシン残基をリン酸化し, そこにシグナル分子がリクルートされ, 次々と下流経路 (MEK-ERK 経路, PI3 キナーゼ-AKT

経路, STAT 転写因子等) が活性化して細胞増殖・分化が誘導される。膜貫通蛋白質である RTK は, 新規合成後, 小胞体 (Endoplasmic Reticulum, ER) からゴルジ体を經由し, 分泌経路を通過して細胞膜に至る。細胞膜でリガンドによって活性化された後は, 脱リン酸化酵素によって不活化されたり, エンドサイトーシス後にリソソームで分解されたりすること等によって, RTK シグナルは終結する。

細胞増殖・生存における RTK の役割から, その遺伝子の増幅や恒常的活性化変異は宿主細胞を無限増殖に導くと予想され, 実際に, RTK メンバーのうち半数以上はがん発症との関連が示唆されている。RTK の恒常的活性化については, がん細胞の無限増殖と因果が明らかかなものに対しては, その理解に基づき, チロシンキナーゼインヒビター (Tyrosine Kinase Inhibitor, TKI, 分子標的治療薬の 1 カテゴリー) が開発されて臨床応用されており, それらが適用となる患者の予後は有意に改善されている。

2. KITチロシンキナーゼについて

幹細胞因子 (Stem Cell Factor, SCF) をリガンドとする RTK である KIT の遺伝子名は, ネコ肉腫ウイルスから発見された経緯から, 子猫を表す kitten が由来であるとされている²⁾。KIT の機能喪失変異を有するマウスは, 免疫のマスト細胞, 消化管蠕動運動を担うカハール介在細胞, 色素細胞 (メラノサイト), 赤芽球の減少または欠損を呈し, 即ち, それら細胞の増殖または前駆細胞からの分化において, KIT が重要な役割を果たすことが明らかになっている。逆に, SCF 非依存的な活性化をもたらす KIT の変異は, ほぼ全ての成人のマスト細胞のがんや, 約 85% の消化管間質細胞腫

¹国立がん研究センター研究所, ²東京理科大学理学部, ³JCHO大阪病院

(Gastrointestinal Stromal Tumor: GIST), 一部の急性骨髄性白血病 (Acute Myelogenous Leukemia: AML), メラノーマ等で認められ, これらががんのドライバー遺伝子変異として知られている. *KIT* の機能獲得変異は, 細胞外ドメイン, 膜近傍ドメイン (細胞質側), キナーゼドメインに認められ, いずれも SCF 非存在下でも恒常的に細胞増殖・生存シグナルを発信させる異常である (図 1A). 手術不能や再発ケースの進行性 GIST に対する有効な治療法は無かったが, 1998 年に *KIT* がドライバー遺伝子であることが報告されると, *KIT* インヒビターであるメシル酸イマチニブ (製品名, グリベック®, ノバルティスファーマ) の治療薬としての臨床開発が進められ, それにより有意且つ顕著に GIST 患者予後が改善されている³⁾. 一方で, はじめからグリベック耐性の *KIT* 変異体を有するケースや, TKI 投与後に *KIT* 遺伝子に抵抗型追加変異が生じる「獲得耐性」が明らかになり, 分子標的治療法の改善の余地は大きく残されている. 他がんの RTK に対する分子標的治療においても, 似た課題が生じている. 治療標的として明

確なものにもかかわらず, TKI 抵抗型はもちろんのこと, 感受性であっても, RTK 変異体が, がん細胞内で「いつ・どこで・どのようにおるさをしているのか」についてはブラックボックスに包まれてきた. 我々是对戦相手のことを十分に理解せずに戦っている状況にあると言えるのかもしれない.

3. マスト細胞腫における *KIT* 変異体の局在異常

RTK 変異体の細胞膜レベルが低く, 細胞内に集積していることは, 以前から示唆されていたが, その詳細については手付かずであった. 筆者が所属していた研究室では, マウス脾臓から *KIT* 変異 (*D814Y* 置換, ヒトにおける *D816Y*, グリベック耐性, 図 1A) を有するマスト細胞腫瘍株が樹立されており, その細胞の *KIT* を抗体で免疫蛍光染色する機会を得た. 非常に興味深いことに, *KIT* は特徴的な斑点状オルガネラに局在していた (図 1B). 検討の結果, そこはエンドソーム-リソソーム (Endosome-Lysosome, EL) であり, この局在異常の発見を契機に明らかにしたことを記載する (以

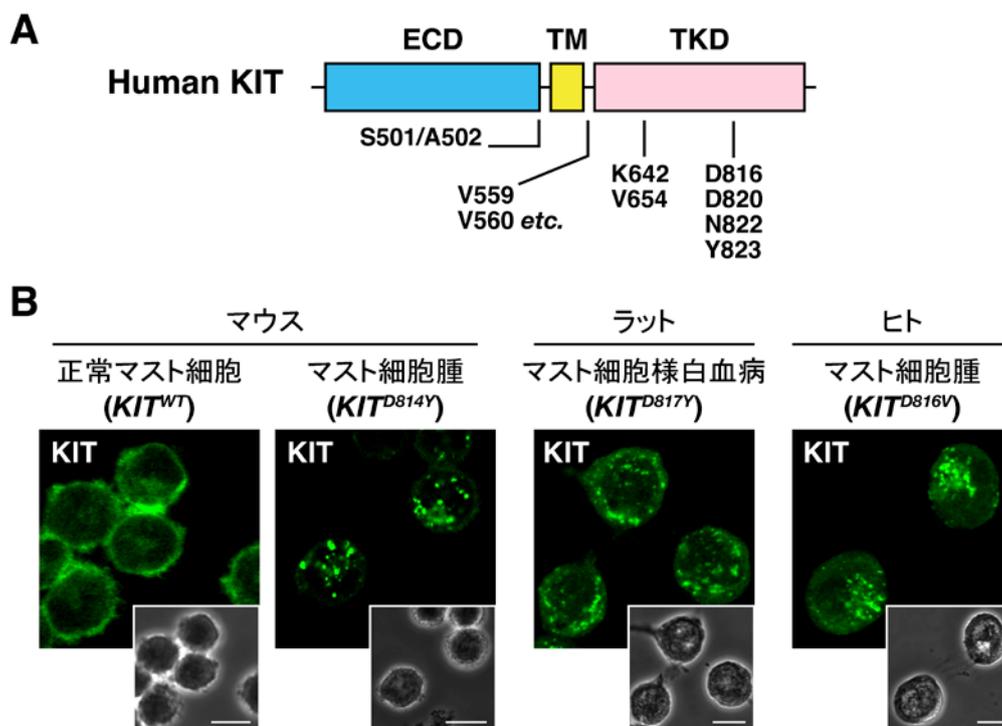


図 1. マスト細胞腫瘍株における *KIT* 変異体の細胞内局在.

(A) ヒトの *KIT* の構造模式図. アミノ末端側から, 細胞外ドメイン (ECD), 膜貫通ドメイン (TM), チロシンキナーゼドメイン (TKD) を示す. 恒常的活性化に導く主な変異位置を図示した. (B) マウス, ラット, ヒトのマスト細胞株における *KIT* の細胞内局在. 正常マスト細胞の正常 *KIT* は細胞膜に認められるが, マスト細胞腫の *KIT* 変異体は斑点状のオルガネラへの局在異常を呈する. スケールバーは 10 μ m を示す.

下, 単に KIT と記載したものは変異体を表す).

- ラットやヒトのマスト細胞腫瘍株でも KIT は EL に局在する (図 1B).
- KIT は, 新規合成後, 分泌経路にしたがって細胞膜へ移行し, 直ちに自身のキナーゼ活性に依存したエンドサイトーシスを受け, 低ユビキチン化状態で EL に停留する.
- KIT は, EL で PI3 キナーゼ-AKT (PI3K-AKT) 経路を活性化する.

この他, マスト細胞腫の STAT5 は ER における新規合成直後の KIT によって活性化されることも明らかにしている^{4,5)}. 即ち, 正常マスト細胞の野生型 KIT と異なり, マスト細胞腫の KIT 変異体は, オルガネラに異常局在し, そこから無限細胞増殖シグナルを発信することが示唆される (図 2A 左). この発見は「(1) 他のがんでも KIT は EL に集積するのか」, 「(2) 局在異常の原因となる分子機構は何か」, 「(3) 他 RTK もオルガネ

ラに認められるのか」, 「(4) 局在異常の理解に基づいた新規 RTK 阻害方法の開発は可能か」等の重要な疑問を次々に生じさせるものになった.

4. GIST における KIT 変異体のゴルジ領域からのがんシグナル発信

前項の成果公開により, GIST の研究に波及展開し, 患者から樹立された GIST 細胞や, 腫瘍切片における KIT の局在を解析する機会に恵まれた. 非常に興味深いことに, マスト細胞腫での結果と異なり, GIST における KIT は核近傍領域に特徴的な局在を示し, その領域はゴルジ/trans-Golgi (TGN) マーカーと良く一致した (図 2B). さらに, 活性化の指標である KIT の自己リン酸化部位に対する抗体 (抗 pKIT 抗体) で染色すると, ゴルジ/TGN エリアが有意に染まることから, GIST の KIT のシグナルプラットフォームはゴルジ/TGN であることが強く示唆される (図 2B 右). 重要なことに, 複

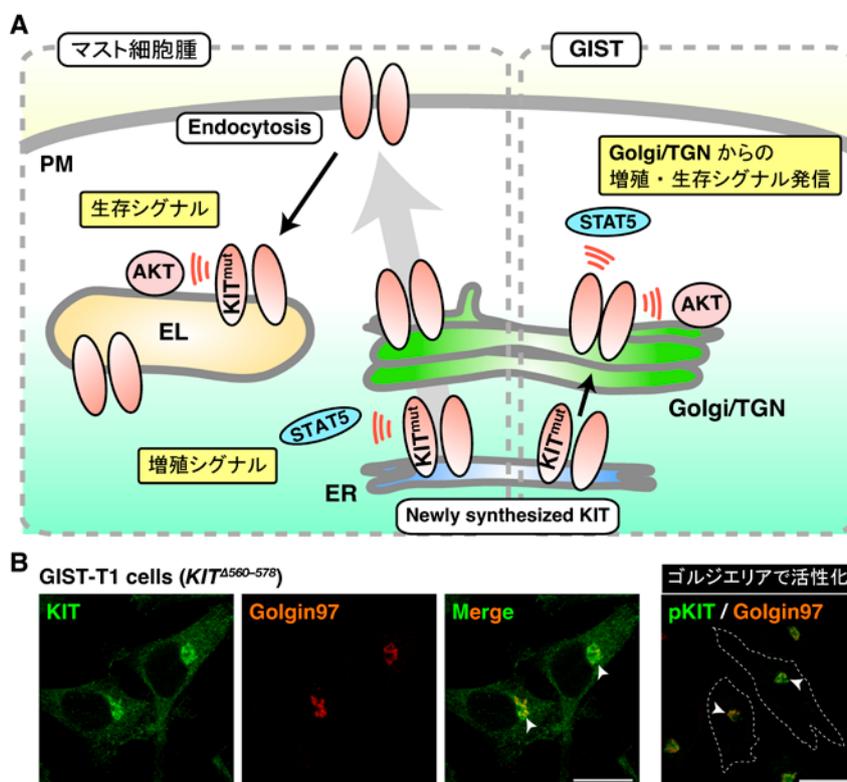


図 2. マスト細胞腫と GIST における KIT 変異体のシグナルの場の違い.

(A) KIT 変異体は, マスト細胞腫ではエンドソーム-リソソーム (EL) でシグナル発信するのに対し, GIST ではゴルジ/TGN をシグナルプラットフォームとする. (B) KIT 変異を有する GIST 細胞では, KIT およびリン酸化 KIT (pKIT) がゴルジマーカー (golgin97) と近い位置に認められる. スケールバーは 20 μm を示す.

PM, plasma membrane; EL, endosome-lysosome; ER, endoplasmic reticulum; TGN, trans-Golgi network.

数の GIST 細胞や臨床検体における検討結果から、ゴルジ/TGN での活性化は、グリベック感受性/耐性変異には左右されないことが確認され、また、マスト細胞腫タイプの KIT 変異体を GIST に発現させても認められる。即ち、KIT 変異体の局在オルガネラは、変異の位置よりも細胞種のコテキストに依存することが強く示唆される。ゴルジ/TGN の KIT は、ER で新規合成された後の初期分泌の過程で停留したものであり、さらに、その停留は自身のチロシンキナーゼ活性に依存している。KIT のエフェクターである PI3K-AKT 経路や MEK-ERK 経路、STAT5 の活性化は、KIT のゴルジ/TGN への移行・局在をブロックすると維持することができず、一方、ゴルジ/TGN からの排出機構を抑制した際には維持される。これらの結果は、GIST の KIT 変異体は、初期分泌の過程でゴルジ/TGN に停留し、そこでの下流分子活性化を介して細胞を無限増殖に導いていることの証左である (図 2A 右)⁶⁾。少なくとも GIST 細胞の ER では KIT に対するチロシン脱リン酸化酵素が優勢であることを示唆するデータを得ており、ゴルジ/TGN はそのような抑制因子が少なく、シグナル伝達に有利な膜環境なのかもしれない。同じ KIT 変異体であっても、マスト細胞

腫と GIST のように、がん種が異なると局在するオルガネラおよびシグナルプラットフォームが異なることは、我々にとって新たな気づきとなった。

5. 他がんにおける RTK の細胞内局在

我々が実際に実験して検討した限りは、KIT 以外のがん原性 RTK の細胞内局在は、野生型のそれと明確に異なることを示すデータを得ている。また、他グループからも同様の報告が続いている⁷⁾。以下と表 1 および図 3 に、我々の研究成果と他の研究グループの知見を併せて紹介したい。

5-1.

AML の FLT3: AML の約 30% のケースで FLT3 の膜貫通領域近傍 (細胞質側) をコードする領域が重複しており (internal tandem duplication: ITD), これが原因で FLT3 が恒常的に活性化する。AML 細胞の FLT3-ITD は、ゴルジ/TGN に停留しており、これは野生型 FLT3 と明確に異なる局在である (図 3A)。FLT3-ITD 依存的な ERK, AKT 活性化はゴルジ/TGN で起きており、STAT5 は ER の新規合成直後の FLT3-ITD によ

表 1. がん原性 RTK の細胞内局在.

がん原性 RTK*	がん細胞	停留オルガネラ
KIT	マスト細胞腫・マスト細胞白血病	EL
	GIST	Golgi/TGN
	AML	EL**
PDGFRA	GIST	Golgi/TGN
	HGG	
FLT3	AML	ER, Golgi/TGN
MET	肝細胞がん	Golgi/TGN
IGF-1R	乳がん	Golgi/TGN (リガンド結合後)
FGFR3	多発性骨髄腫	ER, Golgi/TGN
ALK	神経芽腫	ER, Golgi/TGN
TRKA	神経芽腫	ER, Golgi?
RET	MEN 2B	ER
EGFR	肺腺がん	Endosome

AML, acute myelogenous leukemia; EL, endosome-lysosome; ER, endoplasmic reticulum; GIST, gastrointestinal stromal tumor; HGG, high-grade glioma; MEN 2B, multiple endocrine neoplasia type 2B; TGN, *trans*-Golgi network.

* 他のタンパク質との融合ケースではなく、膜貫通ドメインを保持したがん原性 RTK.

**AML の KIT 変異体は EL 局在を呈するが、シグナル発信はゴルジ/TGN で開始する。

て活性化されることが示唆されている^{8,9)}。

5-2.

肺腺がんの EGFR: アジア人女性・非喫煙者の肺腺がん患者のうち、約 40% に EGFR の変異が認められる。肺がん細胞では、EGFR 変異体の特徴的なエンドソームへの局在が認められることが報告されている (図 3B)^{10,11)}。野生型 EGFR が EGF で刺激された際は、内在化後にエンドソームでシグナル伝達することが報告されており、変異型はリガンド非依存的に同様の経路で移動していると考えられる。変異 EGFR シグナルの持続には、細胞膜とエンドソーム間の循環が寄与すると予想されるが、詳細は不明である。

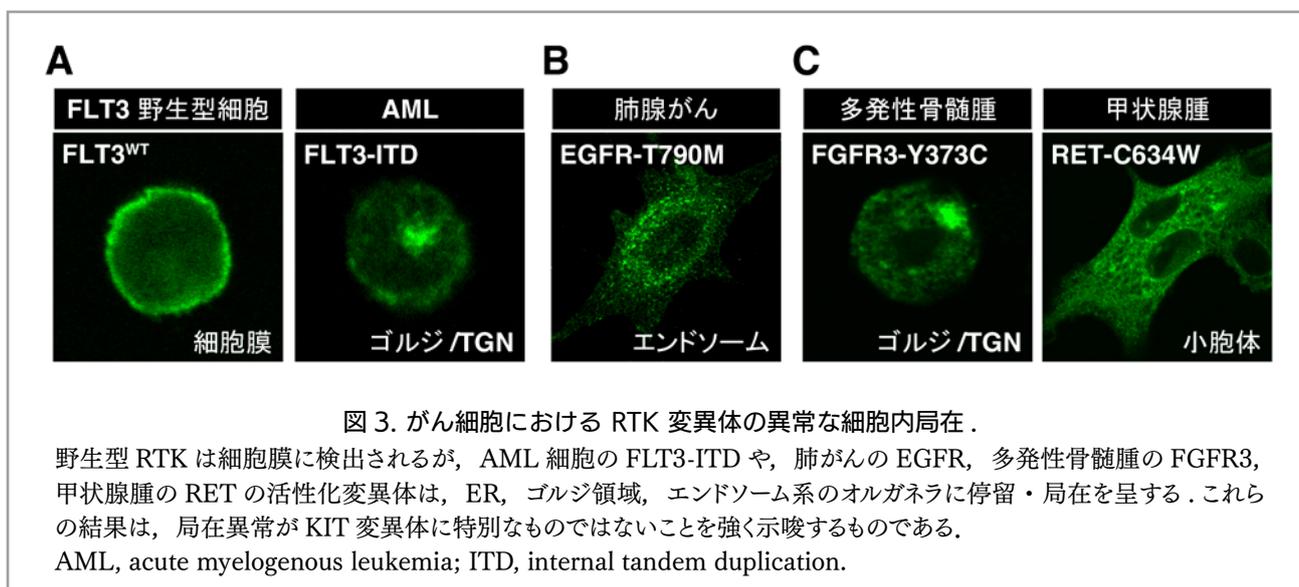
5-3.

小児神経芽腫の ALK, 多発性内分泌腫瘍 2 型の RET, 多発性骨髄腫の FGFR3: ER やゴルジ/TGN への局在が報告されている (図 3C)¹²⁻¹⁴⁾。無限細胞増殖シグナル発信におけるオルガネラ局在の意義については、現段階では不明である。

RTK 変異体の局在部位は、主に ER, ゴルジ/TGN, またはエンドソーム系に分類されるようであり (表 1), さらに、それがチロシンキナーゼ活性に依存していることを示唆するデータが蓄積されている。局在異常は確認されているものの、RTK シグナルにおけるその意義が明確にされていないケースがほとんどであり、今後の解明が待たれる。

6. RTK 変異体のゴルジ/TGN 停留機構 ~ GIST の KIT を例に~

RTK 変異体のゴルジ/TGN 停留の原因メカニズムに関しては、近年、GIST の KIT について、我々を含め他グループからも幾つかの成果発表があった。我々は、GIST の KIT のゴルジ/TGN 局在の変化をリードアウトとした化合物スクリーニングを試み、プロテインキナーゼ D2 (Protein Kinase D2, PKD2) の関与を示すデータを得た。即ち、PKD2 活性化が GIST の KIT のゴルジ/TGN 停留の原因分子であることが示唆された。PKD インヒビターを処理すると、ゴルジ/TGN の KIT は有意に減少する (図 4A)。元々、PKD2 は TGN からのタンパク質輸送のキー分子として知られ、GIST の KIT のゴルジ/TGN 停留の原因となる事実は、PKD2 の生理機能とは逆の作用を呈しており、興味深い。ゴルジ/TGN の KIT 変異体は、PKD2 を活性化しており、この結果は、KIT が自身のチロシンキナーゼ活性に依存して停留することをよく説明するものである。詳細は割愛するが、KIT-PKD2 のエフェクターは、PI4 キナーゼ III β , ホスホリパーゼ D2 であることが明らかになっている^{15,16)}。本来は活性を持たない部位で KIT が活性化してしまい、不完全且つ過剰に動員された分子群が KIT をスタックさせると予想している、重要なことに、PKD 阻害によって KIT をゴルジ/TGN からリリースすると、無限細胞増殖シグナル発信が抑制され、さらに、この方法であれば TKI 耐性型 KIT のシグナルも抑制で



への感受性/耐性に左右されないシグナル阻害方法として期待されるが、BFAは生体適合性が良くなく、抗がん剤としての開発は進まなかった。一方、東京理科大学では、動物実験に適用可能なARFブロッカーである2-Methylcoprophilinamide (M-COPA)の合成に成功しており、共同研究によって、新たな分子標的薬としての開発を進めている。In vitroにおける概念実証・メカニズム実証研究をおこなったところ、M-COPAは、少なくともARF1, ARF4, ARF5のメンバーを同時に阻害することで、KITのERからゴルジ体への輸送をブロックし、チロシンリン酸化シグナルを抑制することが明らかになった^{19,20}。M-COPAは、GISTのKITに対してだけではなく、他がんのRTK変異体をERに留めることで、無限細胞増殖シグナルを阻害することが確認されている(図5)^{9,20}。In vivoの動物実験も進行しており、細胞内輸送ブロックを機序としたファーストインクラス治療薬の開発を目指した検討にも注目が集まる。

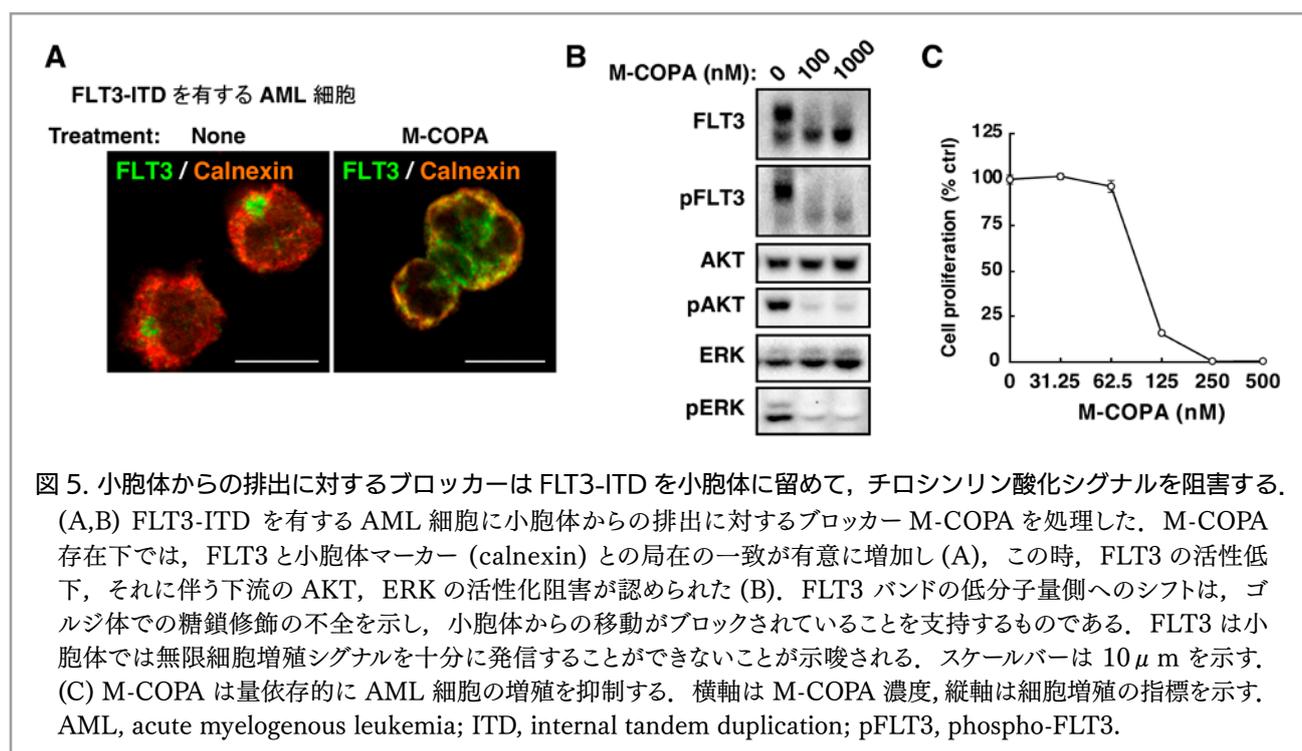
8. 終わりに

マスト細胞腫瘍株におけるKITがオルガネラに集積していることの発見を契機に、局在異常という点では、他がん種のRTK変異体においても普遍的な現象であることを示唆するデータが蓄積されている。一方で、同

じRTKであっても、がん種が異なるとシグナルプラットフォームが異なることや^{4,6}、それぞれのRTKのオルガネラ停留の原因マシナリーが異なることが示唆されることから¹⁵、各々のがん種・RTKの組み合わせにおける丁寧な解析が肝要であると考えられる。本グループによって実施した局在変化をリードアウトとした化合物スクリーニングは、オルガネラ停留機構の解明に対し有用であると考えており、化合物のサンプルサイズを増やし、GIST以外のがんにも適用予定である。今後、がんシグナルの場の理解が、既存の分子標的薬の作用の理解や、局在コントロールを機序とした新たな治療薬開発に資するものになると期待される。

9. 謝辞

本総説で紹介した筆者らがおこなった研究は、多くの共同研究者のサポートによって進めることができました。この場をお借りして、深く御礼申し上げます。KITのゴルジ/TGN停留機構の研究と、細胞内輸送ブロッカーM-COPAの概念実証研究・メカニズム実証研究は、日本応用酵素協会様の研究助成(2021年度, 2023年度)によって円滑に遂行することができました。厚く御礼申し上げます。



10. References

- 1) Lemmon, M.A. & Schlessinger, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, **141**, 1117–1134 (2010).
- 2) Lennartsson, R. & Rönnstrand, L. Stem cell factor receptor/c-Kit: from basic science to clinical implications. *Physiol. Rev.* **92**, 1619–1649 (2012).
- 3) Blay, J.Y., Kang, Y.K., Nishida, T. & von Mehren, M. Gastrointestinal stromal tumours. *Nat. Rev. Dis. Primers*, **18**, 22 (2021).
- 4) Obata, Y. *et al.* Oncogenic Kit signals on endolysosomes and endoplasmic reticulum are essential for neoplastic mast cell proliferation. *Nat. Commun.* **5**, 5715 (2014).
- 5) Hara, Y. *et al.* M-COPA suppresses endolysosomal Kit-Akt oncogenic signalling through inhibiting the secretory pathway in neoplastic mast cells. *PLoS One*, **12**, e0175514 (2017).
- 6) Obata, Y. *et al.* Oncogenic signaling by Kit tyrosine kinase occurs selectively on the Golgi apparatus in gastrointestinal stromal tumors. *Oncogene*, **36**, 3661–3672 (2017).
- 7) Schmidt-Arras, D. & Böhmer, F.D. Mislocalisation of activated receptor tyrosine kinases - challenges for cancer therapy. *Trends Mol. Med.* **26**, 833–847 (2020).
- 8) Choudhary, C. *et al.* Mislocalized activation of oncogenic RTKs switches downstream signaling outcomes. *Mol. Cell*, **36**, 326–339 (2009).
- 9) Yamawaki, K. *et al.* FLT3-ITD transduces autonomous growth signals during its biosynthetic trafficking in acute myelogenous leukemia cells. *Sci. Rep.* **11**, 22678 (2021).
- 10) Chung, B. *et al.* Aberrant trafficking of NSCLC-associated EGFR mutants through the endocytic recycling pathway promotes interaction with Src. *BMC Cell Biol.* **10**, 84 (2009).
- 11) Ménard, L., Floc'h, N., Martin, M.J. & Cross, D.A.E. Reactivation of Mutant-EGFR Degradation through Clathrin Inhibition Overcomes Resistance to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors. *Cancer Res.* **78**, 3267–3279 (2018).
- 12) Okubo, J. *et al.* Aberrant activation of ALK kinase by a novel truncated form ALK protein in neuroblastoma. *Oncogene*, **31**, 4667–4676 (2012).
- 13) Runeberg-Roos, P., Virtanen, H. & Saarma, M. RET(MEN 2B) is active in the endoplasmic reticulum before reaching the cell surface. *Oncogene*, **26**, 7909–7915 (2007).
- 14) Ronchetti, D. *et al.* Deregulated FGFR3 mutants in multiple myeloma cell lines with t(4;14): comparative analysis of Y373C, K650E and the novel G384D mutations. *Oncogene*, **20**, 3553–3562 (2001).
- 15) Obata, Y. *et al.* Golgi retention and oncogenic KIT signaling via PLC γ 2-PKD2-PI4KIII β activation in gastrointestinal stromal tumor cells. *Cell Rep.* **42**, 113035 (2023).
- 16) Obata, Y., Natsume, M., Shiina, I., Takahashi, T. & Nishida, T. Golgi retention of KIT in gastrointestinal stromal tumour cells is phospholipase D activity-dependent. *Sci. Rep.* **15**, 28778 (2025).
- 17) Kim W.K. *et al.* Sustained Mutant KIT Activation in the Golgi Complex Is Mediated by PKC- θ in Gastrointestinal Stromal Tumors. *Clin. Cancer Res.* **23**, 845–856 (2017).
- 18) Obata, Y. *et al.* Oncogenic Kit signalling on the Golgi is suppressed by blocking secretory trafficking with M-COPA in GISTs. *Cancer Lett.* **415**, 1–10 (2018).
- 19) Obata, Y. *et al.* N822K- or V560G-mutated KIT activation occurs preferentially in lipid rafts of the Golgi apparatus in leukemia cells. *Cell Commun. & Signal.* **17**, 114 (2019).
- 20) Natsume, M. *et al.* Brefeldin A and M-COPA block the export of RTKs from the endoplasmic reticulum via simultaneous inactivation of ARF1, ARF4, and ARF5. *J. Biol. Chem.* **300**, 107327 (2024).

顆粒小胞膜上の CD38：膜トポロジーが明かす オキシトシン分泌制御の酵素機構

坂本 浩 隆

はじめに

酵素の機能を理解する上で、その細胞内局在と膜トポロジーは極めて重要である。特に膜結合型酵素では、活性部位が膜のどちら側を向いているかによって、基質へのアクセス性や生成物の作用部位が決定される。本稿では、神経ペプチドである「オキシトシン」の分泌制御に関わる膜結合型酵素 CD38 を取り上げ、その膜トポロジーと酵素活性の関係から明らかになった新たな分泌制御機構について紹介する。

愛情ホルモン「オキシトシン」分泌における CD38 の役割

CD38 はニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD⁺) を基質としてサイクリック ADP リボース (cADPR) を生成する ADP リボシルシクラーゼ活性をもつ 1 回膜貫通型タンパク質であり、主に細胞膜に存在することが知られている¹⁻³⁾。cADPR は細胞内 Ca²⁺ 動員を引き起こすセカンドメッセンジャーとして機能し、さまざまな細胞応答を制御する⁴⁻⁷⁾。興味深いことに、CD38 遺伝子欠損マウスでは愛情ホルモンとして知られるオキシトシン^{8,9)}の分泌が特異的に障害され、母性行動の著しい減弱が観察される¹⁰⁾。これらの知見から、CD38 はオキシトシン分泌の鍵酵素であると考えられてきたが、その詳細な分子機構、特に CD38 が細胞内のどこでどのように機能しているかは不明であった。

オキシトシンニューロンにおける CD38 の局在：顆粒小胞という予想外の発現部位

ウェスタンブロット法により CD38 抗体の特異性を確認した後、ラット脳で蛍光免疫染色を行った。その結果、視床下部のオキシトシンニューロンに CD38 が発

現することを明らかにした。免疫電子顕微鏡解析によりオキシトシン軸索の終末領域である下垂体後葉を詳細に解析したところ、CD38 がオキシトシン顆粒小胞に発現していた (図 1)。この発見は、CD38 が単に形質膜で機能するのではなく、分泌顆粒という特殊な細胞内小器官においても機能することを示唆する重要な知見である。本研究ではさらに、限外濾過法により下垂体後葉から顆粒小胞画分を調整し、顆粒小胞の画分を行った。オキシトシン小胞は高密度画分 (neurosecretory granule; NSG 画分) に効率的に濃縮され、フロースルー画分にはほとんど含まれなかった。ウェスタンブロット解析により NSG 画分に CD38 陽性バンドを検出し、さらに免疫電子顕微鏡解析で顆粒小胞膜上に CD38 の免疫陽性反応が観察されたことから、CD38 がオキシトシン顆粒小胞に局在していることが明らかにした。

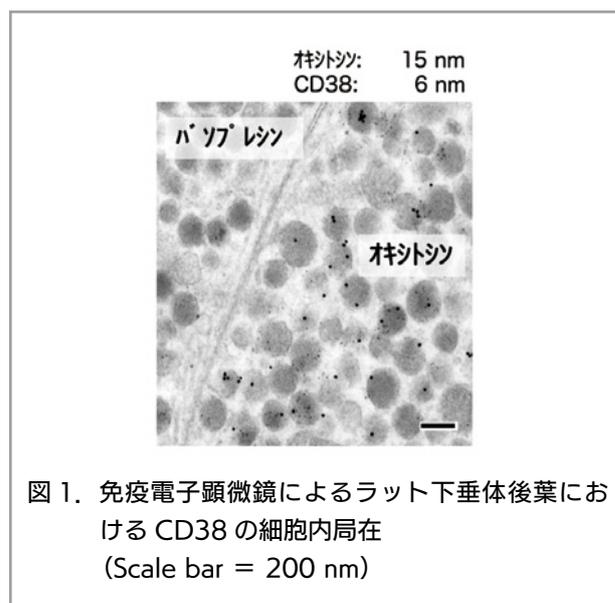


図 1. 免疫電子顕微鏡によるラット下垂体後葉における CD38 の細胞内局在 (Scale bar = 200 nm)

膜トポロジーの解明：酵素活性部位は細胞質側を向く

CD38は細胞膜1回貫通型の膜タンパク質である。顆粒小胞膜上のCD38がどのような膜トポロジーをとるかを明らかにすることは、その酵素機能を理解する上で必須である。CD38のC末端側に酵素活性ドメインが存在することから、このドメインが小胞の内側(内腔側)と外側(細胞質側)のどちらを向いているかによって、 NAD^+ へのアクセス性とcADPRの作用部位が全く異なることになる。この問題を解決するため、界面活性剤処理の有無による標識パターンの違いを、顆粒小胞画分を用いた免疫電子顕微鏡法により検討した。界面活性剤を使用しない条件では膜構造が保たれるため、小胞外側に露出したエピトープのみが標識される。一方、界面活性剤処理により小胞膜を部分的に破壊すると、小胞内腔側のN末端エピトープへの抗体アクセスが可能となり、標識数が増加した(図2)。これらの結果は、オキシトシン顆粒小胞膜上のCD38がC末端を小胞外側(細胞質側)に向ける膜トポロジーをとることを示している。

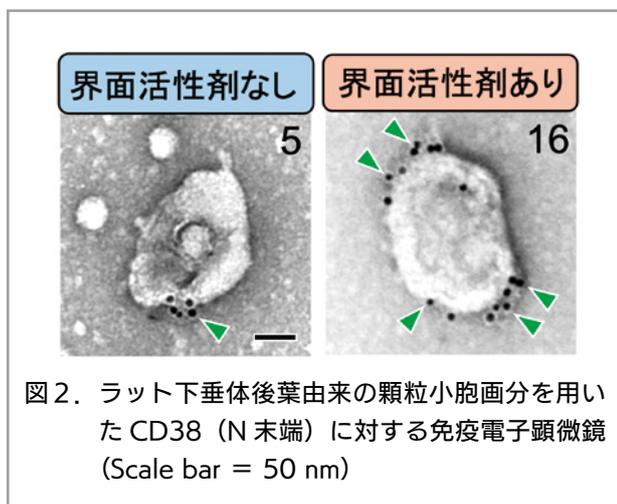


図2. ラット下垂体後葉由来の顆粒小胞画分を用いたCD38(N末端)に対する免疫電子顕微鏡 (Scale bar = 50 nm)

インタクト顆粒小胞でのサイクレス活性：機能的膜トポロジーの証明

この膜トポロジーの機能的意義を検証するため、ラット下垂体後葉から調製した顆粒小胞画分を用いてCD38のサイクレス酵素活性を測定した。基質には NAD^+ の蛍光類縁体であるニコチンアミドグアニンジヌクレオチド(NGD)を用い、生成物であるcGDPRの蛍光強度を経時的に測定した¹¹⁾。その結果、顆粒小胞画分

において有意なサイクレス活性が検出された一方、小胞画分精製時のろ液(フィルター通過画分)では活性が認められなかった(図3)。これは極めて重要な発見である。なぜなら、膜構造が保持されたインタクトな顆粒小胞において、小胞外側に露出した基質結合部位がNGDにアクセス可能であり、実際に酵素反応が進行したことを示すからである。この結果は、免疫電子顕微鏡で明らかになった膜トポロジーと一致し、CD38が酵素活性を担うC末端ドメインを小胞外側(細胞質側)に向けた配置で機能することを生化学的に実証している。

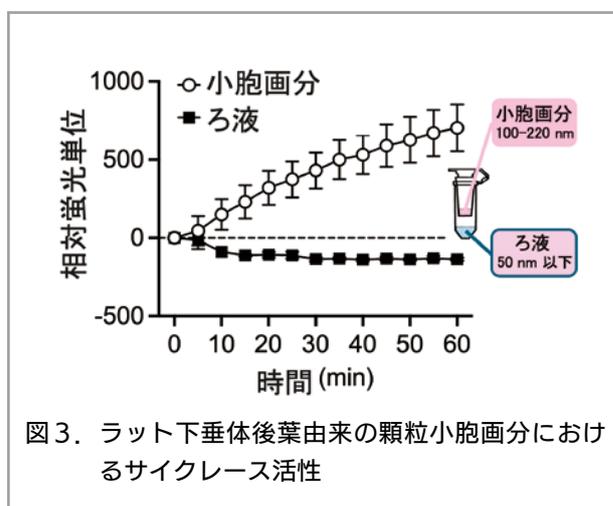


図3. ラット下垂体後葉由来の顆粒小胞画分におけるサイクレス活性

酵素の膜トポロジーからみえてくる分泌制御の新機構

本研究により明らかになったCD38の膜トポロジーは、オキシトシン分泌制御の分子機構に新たな視点をもたらす。CD38は顆粒小胞膜上で細胞質側に NAD^+ を基質として取り込み、cADPRを細胞質に放出すると考えられる。cADPRは顆粒小胞近傍の小胞体から Ca^{2+} を動員し、局所的な Ca^{2+} 濃度上昇を引き起こす^{6,7)}。この局所的な Ca^{2+} シグナルが顆粒小胞と形質膜の融合を促進し、オキシトシンの開口分泌を誘発すると考えられる。興味深いことに、免疫細胞でCD38は形質膜上で酵素活性部位を細胞外に向けた膜配置をとることが知られている(Type II CD38:C末端側が細胞外側)^{1,2)}。顆粒小胞膜上のCD38は、脂質二重膜を基準にすると免疫細胞と同様に活性部位を膜の外側に向けているが、細胞全体でみると活性部位の位置関係は正反対で、酵素活性部位を細胞質側に向けていることになる(Type

III CD38 : C 末端側が細胞質側)¹²⁾. Type II CD38 と Type III CD38 は同じ CD38 遺伝子から転写・翻訳される同一タンパク質であり, 遺伝子レベルでは同一である. このような膜挿入方向の違いは, N 末端側のアミノ酸配列の正電荷数, 翻訳中に受けるリン酸化修飾やシャペロンとの結合, 小胞体膜の脂質組成などの要因により精密に制御されると考えられる¹²⁾. この配置の違いは, 形質膜 CD38 が細胞外の NAD⁺ を利用するのに対し, 顆粒小胞膜 CD38 が細胞質の NAD⁺ を利用するという機能的差異をもたらす¹²⁾. 同一の酵素が異なる膜系で逆向きの膜トポロジーをとることで, それぞれの場所に適した異なる生理機能を発揮する CD38 の巧妙な局在化戦略といえよう.

おわりに

本研究は, 膜結合型酵素の機能を理解する上で, その細胞内局在と膜トポロジーの解明がいかに重要であるかを示している. CD38 という ADP リボシルシクラーゼが顆粒小胞膜上に存在し, 酵素活性部位を細胞質側に向けることで, 局所的なセカンドメッセンジャー産生と Ca²⁺ 動員を実現し, 神経ペプチド分泌を制御するという精緻な機構が明らかになった. 今後, 他の分泌系でも同様の酵素局在機構が発見される可能性があり, 酵素の細胞内局在という観点から分泌現象を再考する必要があるだろう.

謝辞

本研究の実施にあたり, ご支援を賜った公益財団法人 日本応用酵素協会に深く感謝申し上げます. また, 本研究の遂行にご協力頂いた, 英国オックスフォード大学の Antony Galione 教授, および John F. Morris 教授に深謝申し上げます. 本研究の一部は, 岡山大学 研究拠点形成支援事業「拠点形成加速型」の一環として実施された.

参考文献

1. Jackson, D.G., and Bell, J.I.: Isolation of a cDNA encoding the human CD38 (T10) molecule, a cell surface glycoprotein with an unusual discontinuous pattern of expression during lymphocyte differentiation, *J Immunol* 144, 2811-2815, (1990).

2. Malavasi, F., et al.: Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology, *Physiol Rev* 88, 841-886, (2008).
3. Higashida, H.: Somato-axodendritic release of oxytocin into the brain due to calcium amplification is essential for social memory, *J Physiol Sci* 66, 275-282, (2016).
4. Lee, H.C.: Cyclic ADP-ribose and nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) as messengers for calcium mobilization, *J Biol Chem* 287, 31633-31640, (2012).
5. Okamoto, H.: The CD38-cyclic ADP-ribose signaling system in insulin secretion, *Mol Cell Biochem* 193, 115-118, (1999).
6. Galione, A.: Cyclic ADP-ribose: a new way to control calcium, *Science* 259, 325-326, (1993).
7. Galione, A., and White, A.: Ca²⁺ release induced by cyclic ADP-ribose, *Trends Cell Biol* 4, 431-436, (1994).
8. Walum, H., and Young, L.J.: The neural mechanisms and circuitry of the pair bond, *Nat Rev Neurosci* 19, 643-654, (2018).
9. Froemke, R.C., and Young, L.J.: Oxytocin, Neural Plasticity, and Social Behavior, *Annu Rev Neurosci* 44, 359-381, (2021).
10. Jin, D., et al.: CD38 is critical for social behaviour by regulating oxytocin secretion, *Nature* 446, 41-45, (2007).
11. de Oliveira, G.C., et al.: Measuring CD38 hydrolase and cyclase activities: 1,N(6)-ethenonicotinamide adenine dinucleotide (epsilon-NAD) and nicotinamide guanine dinucleotide (NGD) fluorescence-based methods, *Bio Protoc* 8, (2018).
12. Lee, H.C., and Zhao, Y.J.: Resolving the topological enigma in Ca²⁺ signaling by cyclic ADP-ribose and NAADP, *J Biol Chem* 294, 19831-19843, (2019).

抗体遺伝子の変異酵素とその応用

金山直樹

はじめに

Bリンパ球から産生される抗体は、免疫応答においては主要な液性の生体防御因子である。その標的抗原への特異的結合能力を利用して、試薬をはじめ診断薬、特定の疾病への治療薬として応用が進んでいる。抗体特有の現象として、免疫応答の時間経過とともに抗原に対する親和性が向上していく「親和性成熟」と呼ばれるプロセスがある。このプロセスは、リンパ組織内の胚中心という微小環境においてランダムに起こる変異によって生じた変異抗体ライブラリーから親和性の向上したクローンが選抜される、一種の進化的過程である。この過程で導入される抗体可変部への変異は、自然界での突然変異の100万倍の頻度で起こり、体細胞高頻度突然変異 (somatic hypermutation, SHM) と呼ばれる活性化Bリンパ球特有の現象として知られている¹⁾。SHMは、2000年に京都大学の本庶博士らのグループによって報告された活性化誘導型シチジンデアミナーゼ(activation-induced cytidine deaminase, AID)によって開始される²⁾。本稿では、自然界に存在するゲノム編集酵素の一つとしてみなされるAIDについて、生体内での制御やその酵素として応用に関わる話題を取り上げる。

高頻度突然変異に関わるゲノム編集酵素

AIDは、抗体可変部におけるSHMのみならず、抗体定常部の交換反応であるクラススイッチ組み換えにも必須の因子である。当初は、RNA編集酵素との類似性からこの酵素によるRNA編集が高頻度突然変異に関わると考えられたが、その後の研究によって、AIDは転写に伴って露出した一本鎖DNA(ssDNA)のデオキシシチジン(dC)をデオキシウリジン(dU)に脱アミノ化

して変異を開始することが明らかになった³⁾。生成したdUは複製されるとC→T変異として固定される一方、ミスマッチ修復やdUの塩基除去修復の過程でエラブロンDNAポリメラーゼが関与することにより、多様な変異が周辺配列へと導入される。

高頻度突然変異の制御機構

活性化されたBリンパ球において、AIDが高い特異性を持って抗体可変部にSHMを引き起こすためには、遺伝子発現、細胞内局在性、翻訳後修飾、分解など多段階の厳密な制御が必要である³⁾。AIDの異所的な発現および作用は、遺伝子の変異を原因とする疾病の発生病因となることも示唆されている。しかし、AIDの特異性は、変異導入のホットスポットである3塩基配列WRCモチーフでは説明できず、抗体遺伝子座特有のクロマチン環境と転写制御が大きく関与する。抗体遺伝子座では、離れて存在する複数のエンハンサーが集積してスーパーエンハンサー(SE)を形成し、高い転写活性とRNA polymerase IIの伸長停滞を引き起こすことでAID基質となるssDNAが転写に依存して露出する^{4,5)}。さらに、転写に依存して生成したssDNA上には、topoisomerase I (TOP1)の機能低下によりDNAの非典型構造(RループやG四重鎖)が生成し、これがAIDの基質形成に重要な働きをしていると考えられている⁶⁾。TOP1に結合して互いに活性を制御していることが知られているserine/arginine-rich splicing factor I (SRSF1)のような転写関連因子もAIDの基質形成に関与しており^{7,8)}、複数の因子が協調して抗体遺伝子特異的な変異導入を制御している。

ゲノム編集酵素としての応用

AIDはその脱アミノ化活性からゲノム編集酵素と位置付けられる。AIDそのものは転写された抗体遺伝子座に標的化されるため、他の遺伝子座へ人工的にAIDを作用させることは困難であったが、ゲノム編集技術の一つであるCRISPR/Casシステムと誘導することによりAIDを特異的に標的部位にリクルートし、特定塩基の変換を行う塩基編集技術(CRISPR base editor)が開発された^{9,10}。初期のbase editorは、DNA切断活性を欠失させたdCas9や一本鎖切断のみ限定したニッカーゼ(nCas9)にAIDを結合させたもので(AID-BE)、C→T(U)変換を誘導したが、塩基編集範囲が広く、C→T(U)変換以外の副変換の発生やoff-targetでの塩基編集の課題があり、狙い通りの塩基編集が難しいことがあった。その後、AIDと同じファミリーのAPOBEC酵素(Apolipoprotein B mRNA Editing Enzyme, Catalytic Polypeptide-like; APOBEC1, APOBEC3A)を用いることで狭い編集領域で特異的なC→T変換が可能になった¹¹。これらはシトシンを標的とすることからCytosine Base Editor (CBE)と呼ばれるが、さらに、TadA (Transfer-messenger RNA-encoded adenosine deaminase)を利用したA→G変換を行うAdenine Base Editor (ABE)が開発され¹²、AID研究に基づく酵素工学が塩基編集技術の発展に結びついている。

今後の展開

抗体遺伝子の変異導入機構に関する研究により、AIDの認識配列、クロマチン構造との関係、DNA修復経路の選択性に関する知見が蓄積してきている。これらの分子機構を統合的に理解することで、AIDの局在性、標的への滞在時間、各種DNA修復経路の選択を人工的に操作し、変異頻度、変異パターン、標的特異性を自在にデザインできる次世代ゲノム編集技術へと発展することが期待される。治療応用では、免疫疾患モデルや抗体工学、がん治療への応用が注目されている。

参考文献

1. Di Noia JM, Neuberger MS. Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Nat Rev Immunol.* 7:441–457 (2007)
2. Muramatsu M, et al. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID). *Cell.* 102:553–563 (2000)
3. Pavri R, Nussenzweig MC. AID targeting in antibody diversification. *Nat Rev Immunol.* 11:21–32 (2011)
4. Whyte WA, et al. Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes. *Cell.* 153:307–319 (2013)
5. Zhang X, et al. AID targeting is associated with multiple enhancer regions and transcriptional activity. *Nat Immunol.* 15: 247–256 (2014)
6. Kobayashi M, et al. Decrease in topoisomerase I is responsible for activation-induced cytidine deaminase (AID)-dependent somatic hypermutation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 108:19305-19310 (2011)
7. Kanehiro Y, et al. Activation-induced cytidine deaminase (AID)-dependent somatic hypermutation requires a splice isoform of the serine/arginine-rich (SR) protein SRSF1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 109:1216-1221 (2012)
8. Kumer S, et al. Splicing regulator SRSF1-3 that controls somatic hypermutation of IgV genes interacts with topoisomerase 1 and AID. *Mol Immunol.* 116:63-72 (2019)
9. Komor AC, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature.* 533:420–424 (2016)
10. Nishida K, et al. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems *Science* 353: aaf8729 (2016)
11. Gehrke JM, An APOBEC3A-Cas9 base editor with minimized bystander and off-target activities. *Nature Biotech.* 36:977-982 (2018)
12. Gaudelli NM, et al. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature.* 551:464–471 (2017)

哺乳類の生殖制御メカニズム—精子成熟におけるプロテオリシスの役割

浄住大慈^{1,2}

はじめに：精子成熟とプロテオリシス

生殖の制御は、種の保存から現代社会における家族計画に至るまで、人類にとって普遍的かつ重要な課題である。近年の分子生物学的アプローチにより、長らく神秘のベールに包まれていた受精のプロセスも、その分子の実体が明らかになりつつある。哺乳類の精子は、精巣で作られた直後の段階では受精能力を持たず、「成熟」というプロセスを経て初めて卵子と出会い、融合する能力を獲得する。精子は転写・翻訳といった遺伝子発現活動をほぼ停止した細胞であるため、この成熟過程における機能変化は、主に翻訳後修飾によって制御されていると考えられる。本稿では、この精子成熟過程におけるプロテオリシスの関与に焦点を当て、筆者らの近年の知見を中心に概説する。

精子成熟を制御するシグナル伝達「ルミクリン」

精巣で形成された直後の精子は、形態こそ完成しているものの、運動能や受精能を持たない未熟な状態である。精子は精巣を出た後、「精巣上体」という細長い管状組織を約2週間かけて通過する間に、管腔内の微小環境に曝露され、運動能や卵子透明帯への結合能を獲得する(図1)。長年不明であったこの精子成熟の制御機構について、筆者らは精巣から精巣上体への管腔連絡を介したシグナル伝達システム「ルミクリン(lumicrine)」を解明した^{1,2)}。具体的には、精巣から分泌されたNELL2などのリガンドタンパク質が精巣上体へと移行し、そこに発現する受容体ROS1に結合することでMAPキナーゼ経路を活性化し、成熟に必要な因子の発現が誘導される。実際、NELL2やROS1の欠損マウスでは、精子が精巣上体を通過しても成熟しないため、雄性不妊となる。

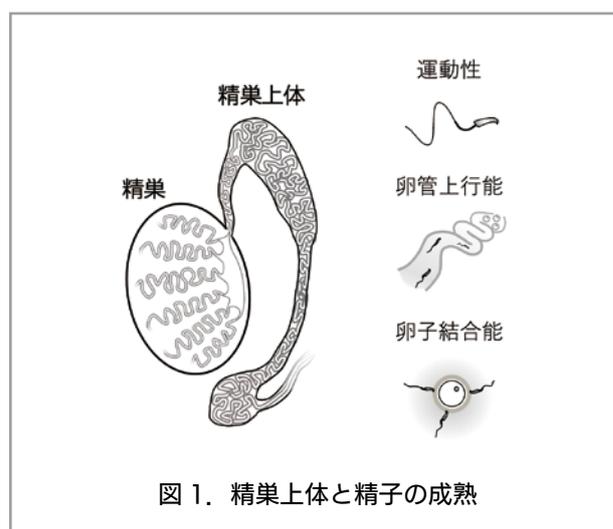


図1. 精巣上体と精子の成熟

精子成熟におけるプロテオリシスの役割

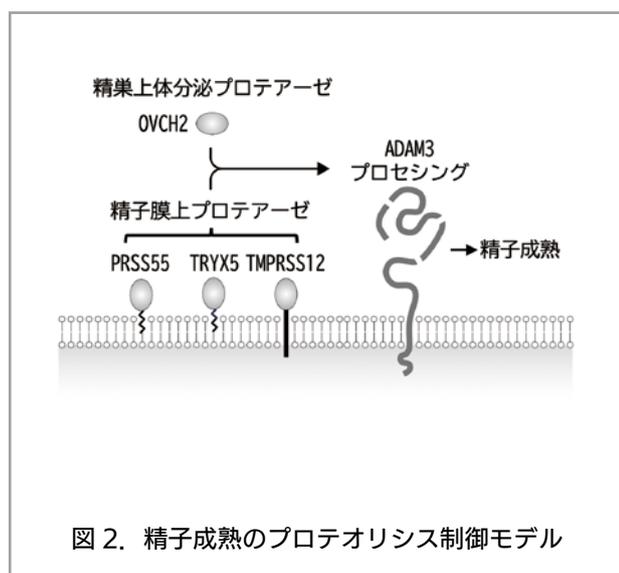
精子の成熟に伴って、精子表面のタンパク質のプロテオリシスが生じることが知られていた。そこで、「ルミクリンシグナルの制御下で誘導されるプロテアーゼが精子成熟に関与する」との仮説のもとに筆者らが同定したのが、分泌型セリンプロテアーゼOVCH2である¹⁾。OVCH2はルミクリン依存的に精巣上体の管腔上皮細胞に発現しており、管腔内へと分泌されたのち、精子表面のタンパク質をプロセッシングすることでその性質を変化させると考えられている。OVCH2のノックアウトマウスもやはり精子成熟不全で不妊となる。

一方近年、OVCH2以外にも精子成熟に不可欠なセリンプロテアーゼ群が次々と同定されている。例えば、GPIアンカー型セリンプロテアーゼであるPRSS55は精子表面に局在し、その欠損もまた精子成熟不全および雄性不妊を引き起こす³⁾。同様にGPIアンカー型プロテアーゼTRYX5や、膜型プロテアーゼTMPRSS12も精子に特異的に発現しており、それらの欠損もまた精子成熟不全による不妊を引き起こす^{4,5)}。精子成熟の

1, 立命館大学総合科学技術研究機構 2, 一般社団法人生殖制御医学研究所

場である精巣上体管腔内では、精巣上体管腔上皮からの分泌型プロテアーゼと精子細胞表面上の膜アンカー型プロテアーゼを含む複数の酵素がカスケードやネットワークを形成し、精子成熟を司る責任基質を標的とすることで、精巧かつ段階的な成熟プロセスを制御していると考えられる。

これら酵素群の重要な標的として注目されているのが、精子表面に存在する ADAM ファミリータンパク質である。その一つである精子膜タンパク質 ADAM3 は、分子機能は不明ながら精子の成熟には不可欠である⁶⁾。精巣では ADAM3 は前駆体として存在するが、精巣上体を通途中に何らかのプロテアーゼによる作用を受け、プロセス型へと構造変化する。興味深いことに、OVCH2 欠損マウスだけでなく、PRSS55 や TMPRSS12 などの欠損マウスにおいてもこの ADAM3 の切断不全が認められることから、複数のプロテアーゼが連携して ADAM3 のプロセッシングを制御し、精子を機能的な成熟に導いていることが示唆される (図 2)。



将来展望：酵素を標的とした生殖制御

以上、簡単ながらプロテオリシスの精子成熟の関与について述べた。精子成熟におけるプロテオリシスの重要性が明らかになったことで、新たな生殖医療や創薬の可能性が拓けてきた。一つは、男性不妊の診断・治療への応用である。精液中に含まれる特定のプロテアーゼ活性や、精子表面抗原の切断状態を解析することで、精子の質や成熟度を診断できる可能性がある。もう一

つは、非ホルモン性の男性避妊薬開発である。現在、男性用避妊薬の選択肢は限られているが、精子成熟に特異的なプロテアーゼを阻害する薬剤は、精子形成そのものや内分泌系には影響を与えず、精子の機能のみを可逆的に停止させる理想的な避妊薬の標的となり得る⁷⁾。今後、プロテオリシスの分子基盤の解明が進むことで、酵素学的なアプローチによる安全で効果的な生殖制御技術が確立されることが期待される。

参考文献

1. Kiyozumi, D. et al.: NELL2-mediated lumicrine signaling through OVCH2 is required for male fertility, *Science*, **368**, 1132-1135 (2020).
2. Kiyozumi, D. et al.: A small secreted protein NICOL regulates lumicrine-mediated sperm maturation and male fertility, *Nat. Commun.*, **14**, 2354 (2023).
3. Shang, X. et al.: Serine protease PRSS55 is crucial for male mouse fertility via affecting sperm migration and sperm-egg binding, *Cell. Mol. Life Sci.*, **75**, 4371-4384 (2018).
4. Zhang, H. et al.: Male fertility in *Mus musculus* requires the activity of TRYX5 in sperm migration into the oviduct, *J. Cell. Physiol.*, **235**, 6058-6072 (2020).
5. Larasati, T. et al.: Tmprss12 is required for sperm motility and uterotubal junction migration in mice, *Biol. Reprod.*, **103**, 254-263 (2020).
6. Yamaguchi, R. et al.: Disruption of ADAM3 impairs the migration of sperm into oviduct in mouse, *Biol. Reprod.*, **81**, 142-146 (2009).
7. Kiyozumi D, Ikawa M. Proteolysis in Reproduction: Lessons From Gene-Modified Organism Studies. *Front Endocrinol (Lausanne)*. **13**:876370 (2022).

酵素の応用研究および生命科学に関する研究助成

原核生物のタンパク質品質管理機構に關与する ClpP を利用した細胞内タンパク質の人為的分解制御

石川 文 洋

(近畿大学薬学部)

【目的】

微生物においてもユビキチン-プロテアソーム類似システムであるタンパク質分解システムが報告されている¹⁾。微生物のタンパク質分解システムは、ATPase (6量体×2) およびタンパク質分解酵素 (ClpP, 14量体) により形成される。放線菌から単離されたアシルデブシペプチド類 (e.g. ADEP1) は、タンパク質分解複合体 ATPase-ClpP の誤作動を誘導することにより、さまざまな病原細菌に対して抗菌活性を示すことが報告されている²⁾。ADEP1 の作用機序は、以下の三点に基づく³⁾とされる。1) ClpP への結合による ATPase-ClpP タンパク質間相互作用の阻害、2) ADEP1-ClpP 複合体による細胞分裂に必須のタンパク質 FtsZ の分解、3) それに伴う抗菌活性の発現。この特異な作用機序に基づき、多様な類縁体の合成と構造活性相関研究が行われている³⁾。また、現在までに、FtsZ は細胞生物学的および生化学的に実証された ADEP1-ClpP 複合体の唯一の基質タンパク質である。一方、構造生物学的観点から見ると、*Bacillus subtilis* ClpP は、単独では単量体として存在しており、ADEP1 が結合することで速やかに 14 量体を形成する。このような ClpP の動態への影響が単独でのタンパク質分解活性を生じさせると考えられている。しかし、ADEP1 類が誘導する ClpP の構造ダイナミクスとタンパク質分解活性との関係は未解明であり、この関係を解明することは、創薬開発のみならず、ClpP の機能を人為的に制御するうえでも重要である。そこで本研究では、以下の 2 つを具体的な目的として研究を展開する：1) ADEP1-ClpP 複合体の新規基質タンパ

ク質の同定；2) 高速原子間力顕微鏡 (HS-AFM) による 14 量体形成機構の解明。これにより、ADEP1-ClpP 複合体における基質タンパク質の多様性を拡充するとともに、ClpP の 14 量体形成機構を解明し、その動作原理を明らかにすることを目指す。

【方法】

1) ADEP1-ClpP 複合体の基質認識機構およびタンパク質分解機構の解明を目的として、同複合体の基質タンパク質を拡充する。我々の研究グループはこれまでに、ADEP1-ClpP 複合体の基質タンパク質候補として、サーファクチン合成に關与する非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS) である SrfAA および SrfAB を同定している。そこで、*B. subtilis* (野生株) や *clpP* 遺伝子破壊株を ADEP1 で処理し、ライセートを作製後、我々の研究グループで開発した NRPS 標識化剤でラベル化し、基質タンパク質の同定・評価を行った。

2) ADEP1 が *BsClpP* の 14 量体形成過程および動態に及ぼす影響を明らかにするため、HS-AFM を用いた ADEP1-ClpP 複合体の一分子動態計測を実施した。

【結果】

1) ADEP1-ClpP 複合体の新規基質タンパク質の同定⁴⁾
B. subtilis (野生型) および *clpP* 遺伝子破壊株を $2 \times \text{MIC} = 2.5 \mu\text{g/mL}$ の ADEP1 存在下、0-5 時間 37 °C で培養した。続いて、各時間で集菌し、ライセートを調整後、NRPS 標識化剤で SrfAA および SrfAB のラベル化を行った。その結果、*B. subtilis* (野生型) では、SrfAA および SrfAB の存在量は時間経過とともに減少した (図 1A)。一方、*clpP* 遺伝子破壊株では、SrfAA および SrfAB の存在量はほとんど変化しなかった (図 1B)。このことから、*B. subtilis* において、SrfAA および SrfAB は ADEP1-ClpP の基質タンパク質として分解されることが判明した。

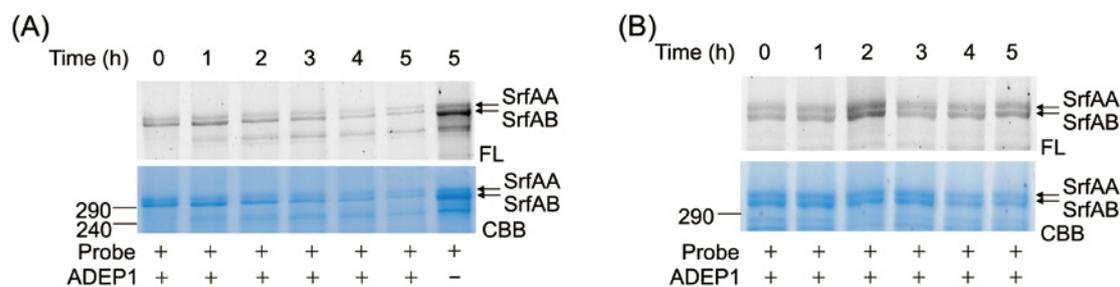


図1. (A) ADEP1 処理による SrfAA および SrfAB の分解過程 (*B. subtilis* (野生型)).
(B) ADEP1 処理による SrfAA および SrfAB の分解過程 (*clpP* 遺伝子破壊株).

2) HS-AFM による 14 量体形成機構⁵⁾

マイカ基板に *B. subtilis* ClpP を吸着させ、ADEP1 を添加し、HS-AFM で観察した。その結果 *B. subtilis* ClpP の 14 量体形成過程には、単量体から 4~5 量体、4~5 量体から 7 量体 (リング構造)、7 量体 (リング構造) から 14 量体へと至る 3 段階の過程が存在することが明らかになった (図 2)。

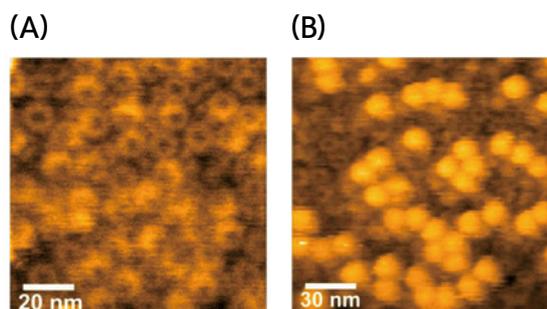


図2. (A) *BsClpP* (2.7 μ M) 単独.
(B) *BsClpP* (2.7 μ M) と ADEP1 の混合物 (ClpP : ADEP1 = 1:2).

【考察】

ADEP1-ClpP 複合体の新規基質タンパク質として、サーファクタン生合成に関わる二つの NRPS である SrfAA および SrfAB を同定した。さらに、HS-AFM 解析により、ADEP1-ClpP 複合体の 14 量体形成過程における構造ダイナミクスを明らかにした。今後は、さまざまな ADEP1 類が誘導する ClpP のタンパク質分解活性と構造ダイナミクスとの相関を解明し、ClpP の作動原理を明らかにする。

最後になりますが、本研究を支援して頂いた公益財団法人日本応用酵素協会に深謝致します。

【文献】

1. Trentini, D. B., Suskiewicz, M. J., Heuck, A., Kurzbauer, R., Deszcz, L., Mechtler, K., Clausen, T.: Arginine phosphorylation marks proteins for degradation by a ClpP protease, *Nature*, 539, 48 (2016).
2. Brötz-Oesterhelt *et al.*: Dysregulation of bacterial proteolytic machinery by a new class of antibiotics, *Nat. Med.*, 11, 1082 (2005).
3. Zhang, T., Wu, W., Zhao, Y., Ding, Z., Wei, B., Yang, T., Li, J., Wang, P., Lan, L., Gan, J., Yang, C.-G.: Structure-guided development of ClpP agonists with potent therapeutic activities against *Staphylococcus aureus* infection, *J. Med. Chem.*, 68, 1810 (2025).
4. Ishikawa, F., Takahashi, K., Takaya, A., Tanabe, G., Homma, M., Uchihashi, T.: Dynamic oligomerization processes of *Bacillus subtilis* ClpP protease induced by ADEP1 studied with high-speed atomic force microscopy, *ACS Omega*, 10, 7381 (2025).
5. Ishikawa, F., Uchida, C., Ohnishi, R., Imai, T., Tanabe, G.: Degradation of nonribosomal peptide synthetases SrfAA and SrfAB by acyldepsipeptide-activated ClpP, *ChemBioChem*, e2500135 (2025).

真珠バイオミネラリゼーションに関わる酵素の機能
 解明と新規 CO₂ 固定法への応用

小川 智久

(東北大学大学院農学研究科 酵素化学分野)

【目的】

生物が創り出す有機－無機ナノ構造体のバイオミネラルは、例えば真珠貝がマトリックスタンパク質やキチンにより、カルサイトとアラゴナイトを巧みに作り分ける様に厳密に制御されている。真珠バイオミネラリゼーションの分子機構については、近年マトリックスタンパク質の単離、構造・機能解析のほか、アコヤガイなど真珠貝のゲノム解析やトランスクリプトーム解析などが進められており、真珠バイオミネラリゼーションに関わるタンパク質の個々の特性や機能は明らかになりつつある。しかしながら、どのようにマトリックスタンパク質複合体が形成されて、機能的な硬組織が作り出されているのか、その分子メカニズムはほとんど明らかになっていない。これまで我々はマベガイ (*Pteria penguin*) 真珠バイオミネラリゼーションに関わる外套膜分泌液由来のマトリックスタンパク質および酵素の構造と機能に関する研究、例えば、4種のジャカリン関連レクチンは、それぞれが炭酸カルシウム結

晶成長抑制や糖鎖存在下での促進、結晶粒界面の制御など全く異なるバイオミネラリゼーション機能を持つこと、またADPリボシルトランスフェラーゼが真珠光沢に関わる結晶配向性の制御に関わることを明らかにしてきた(図1) (*Int.J.Mol.Sci.* **22**, 1081 (2021); *Int.J.Mol.Sci.* **20**, 4629 (2019); *C & I Commun* **40**, 27 (2015); *PLoS ONE* **9**, e112326 (2014); *Mol. Divers.* **10**, 607 (2006); *Mat.Trans.* **45**, 999 (2004); 特願 2004-305646号; 特願 2005-140446号; 特願 2012-048082号など)。

本研究は、これらのマベガイ真珠バイオミネラリゼーションに関わる有機－無機複合体中のマトリックスタンパク質および酵素を、生きた試験管である酵母発現系に再構築し、人工酵母の時空間での発現を制御することで、複雑な機能的ナノ構造体の構築原理を明らかにすることを目的とする。

【方法】

マベガイ真珠マトリックスタンパク質の主要成分であるジャカリン様レクチンPPL2A, PPL4, PPL2BおよびPPL3とADPリボシルトランスフェラーゼART26P-1およびART26P-2遺伝子とカーボニックアンヒドラーゼCA2をpBEVYベクター(栄養要求性マーカーがそれぞれUra, Leu, TrpであるプラスミドベクターのpBEVY-U, pBEVY-L, pBEVY-Tで6種

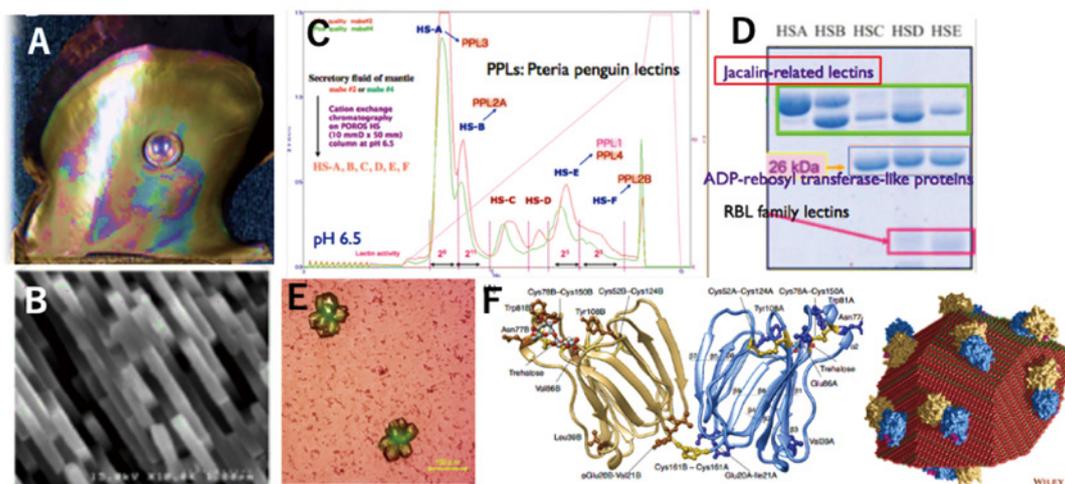
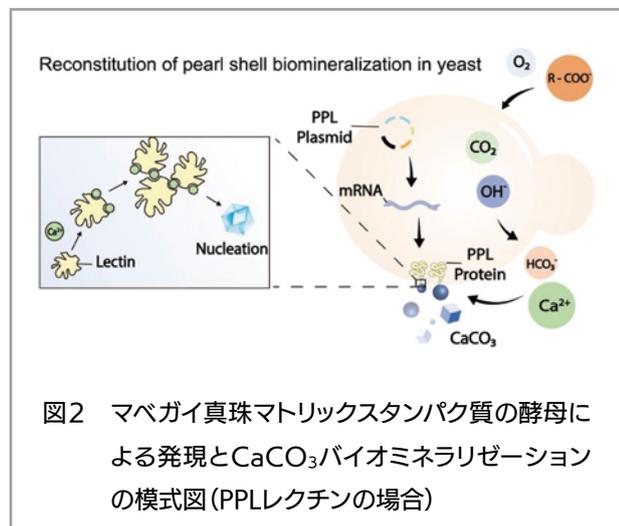


図1 マベガイ真珠バイオミネラリゼーション
 貝殻全体像(A)と真珠層断面のSEM像(B), 外套膜由来真珠マトリックスタンパク質の
 陽イオンクロマトグラム(C)とSDS-PAGEプロファイル(D), PPL2Aの機能(E)とPPL3の立体構造

類の同時発現が可能)を用いて酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) での発現システムを構築した (図 2)。さまざまな組み合わせでの発現により生成した CaCO_3 ナノ結晶の構造を SEM および XRD、顕微ラマン分光により解析した。



【結果・考察】

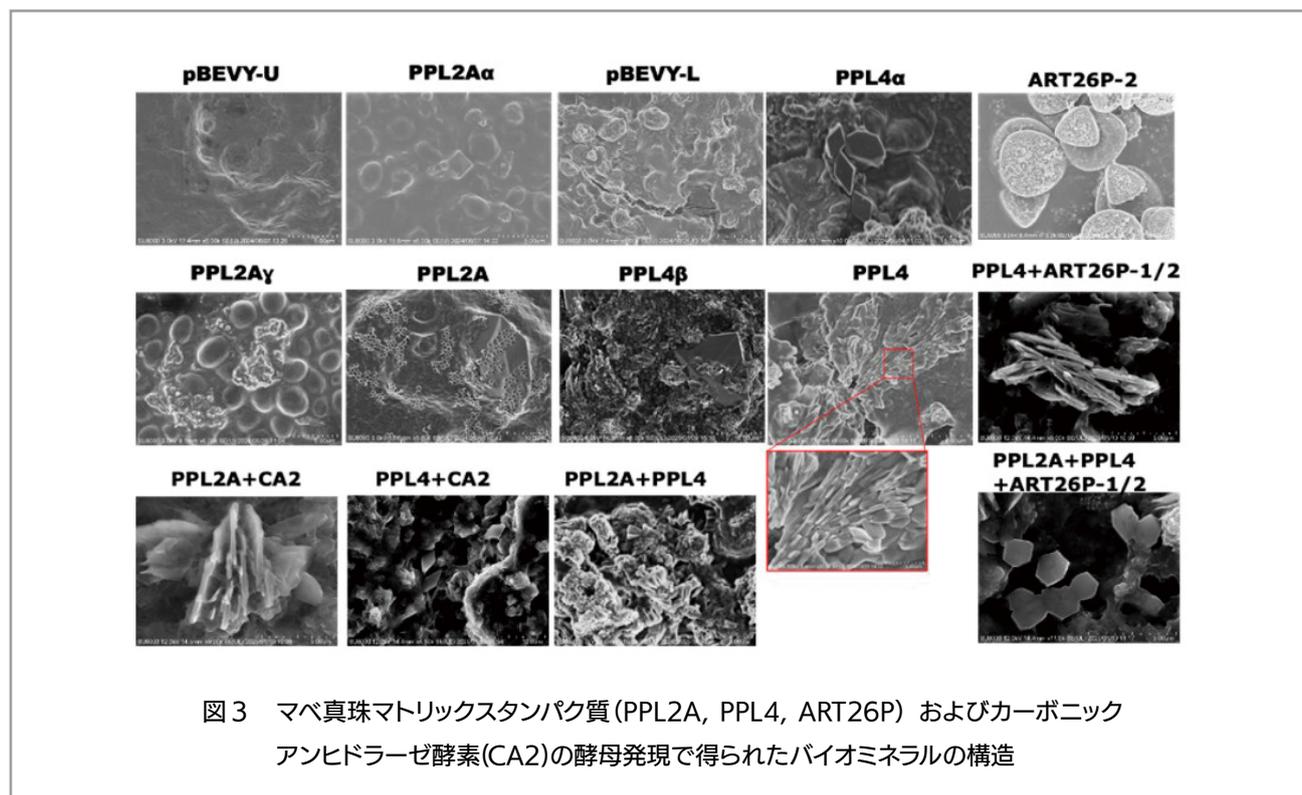
真珠バイオミネラリゼーションに関わる酵素・タンパク質を酵母により発現させたところ、ユニークな微細構造をもつバイオミネラルの生成に成功した (図 2)。 α -および γ -サブユニットからなるヘテロ二量体レクチン PPL2A は、明確な結晶面を有する安定な方解石の

形成を促進した。これは PPL2A が結晶配向と安定化に関与することを示唆している。一方、ART26P-1 は酵母の増殖と炭酸カルシウム形成の両方を抑制した。興味深いことに、ジャカリン様レクチン PPL4 ($\alpha + \beta$) や PPL2A と炭酸脱水素酵素 CA2, あるいは PPL4 と ART26P などを共発現した酵母では、天然アラゴナイト真珠層に類似した多層構造を生成し、また ART26P-2 の単独での発現や 3 種類 (PPL2A+ PPL4+ ART26P) を同時に発現したのもでも真珠層結晶に似たユニークな形状を示すことが明らかになった (図 3) (特願 2025-22177 号)。

これらの知見は、バイオミネラリゼーションにおける PPL レクチンや ADP リボシルトランスフェラーゼなどマベ真珠マトリックスタンパク質の構造・機能に関する新たな知見を示すとともに、タンパク質・酵素が媒介する結晶成長メカニズムの解明に向けた制御可能なプラットフォームとして酵母の有用性を示した。

【文献等】

[1] 特願 2025-022177 号 何楠, 二井勇人, 小川智久「酵母による真珠アラゴナイト様多層ナノ構造の製造方法」, 東北大学, 2025 年 2 月 14 日



ドライバー遺伝子チロシンキナーゼ MET はゴルジ/TGN でがんシグナルを発信するか？

～胃がん・肺がん・肝がんでの時空間的解析と新たな阻害戦術の基盤的開発～

小幡 裕希

(国立がん研究センター研究所・がん細胞内トラフィック研究ユニット)

【背景・目的】

全本研究グループは、血液がんや消化管肉腫のレセプターチロシンキナーゼ (RTK: KIT, PDGFRA, FLT3 等) の恒常的活性化変異体が、エンドソーム・リソソームやゴルジ/trans-Golgi network (TGN) 等に異常局在・停留し、オルガネラから無限細胞増殖シグナルを発信することを報告した^{1,2)}。正常 RTK のリガンド依存的なシグナル発信の起点が細胞膜であることに対し、オルガネラ停留とそこで起きるがんシグナルは、変異型に特異的なものである。現在、肺がんや胃がん等のメジャーな上皮性がんにおいて、増幅によって自己活性化してしまっている MET RTK が、オルガネラをシグナルプラットフォームとするのか、そうだとすればそれがどこなのか/何が原因なのか、それらの理解に基づいた新たなチロシンリン酸化シグナル阻害方法の開発は可能かどうか等の疑問が生じており、本研究課題ではそれらに答える研究を計画した。

【結果】

本課題では、MET 増幅が確認されている複数の肺がん/胃がん細胞株における内在性レベルの解析を試みた (肝がんについては検討中)。はじめに、胃がん細胞の増幅 MET を免疫蛍光染色し、共焦点顕微鏡で局在解析した。その結果、大部分の MET が細胞膜に局在していたものの、核近傍領域への分布も見られた。各種オルガネラマーカーで共染色すると、その核近傍領域が、ゴルジ/TGN であることが明らかになった。MET 活性化の指標である自己リン酸化を認識する抗体で染色すると、特徴的なゴルジ/TGN への分布が観察された (図 1)。肺がんの増幅 MET についても似た結果を得ており、即ち、がん細胞においてリガンド非依存的に活性化している MET は、初期分泌の過程でゴルジ/TGN に停留し、シグナル発信を開始することが示唆された。

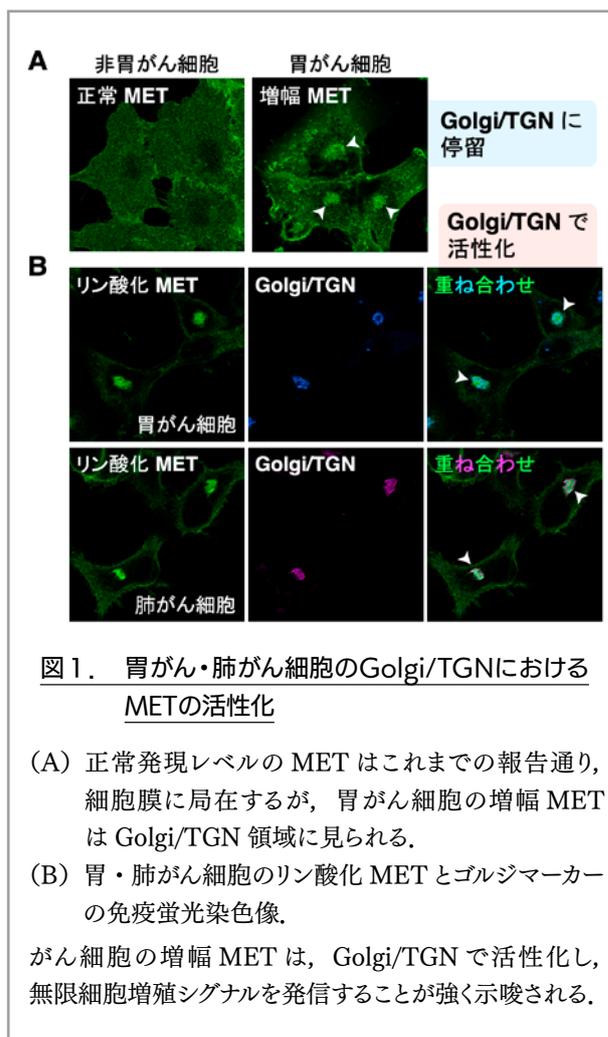


図 1. 胃がん・肺がん細胞のGolgi/TGNにおけるMETの活性化

- (A) 正常発現レベルの MET はこれまでの報告通り、細胞膜に局在するが、胃がん細胞の増幅 MET は Golgi/TGN 領域に見られる。
(B) 胃・肺がん細胞のリン酸化 MET とゴルジマーカーの免疫蛍光染色像。

がん細胞の増幅 MET は、Golgi/TGN で活性化し、無限細胞増殖シグナルを発信することが強く示唆される。

次に、ゴルジ/TGN から細胞膜への排出を抑制するモネンシンを細胞に処理した時の MET シグナルについて検討した。肺がん細胞をモネンシン処理して、活性化 MET をゴルジ/TGN に停留させて細胞膜への移行を減少させた時、図 2A に示すように、MET シグナル (下流の ERK, AKT の活性化) は維持された。即ち、増幅ケースの MET がチロシンリン酸化シグナルを発信するためには、その細胞膜への移行は必須ではなく、新規合成後、ゴルジ/TGN に至ることで十分であることが示唆される。興味深いことに、新規合成された MET の小胞体からゴルジ体への輸送をプレフェルジン A (BFA) や 2-Methylcoprophilinamide (M-COPA) でブロックすると、MET シグナルは顕著に不活性化され、下流の ERK, AKT の活性化が抑制された (図 2A)。胃がん細胞の MET についても同様の結果を得ており、即ち、MET は、新規合成直後の小胞体では、自己リン酸化することができず、下流シグナルを活性化することもできないことが明らかとなった。

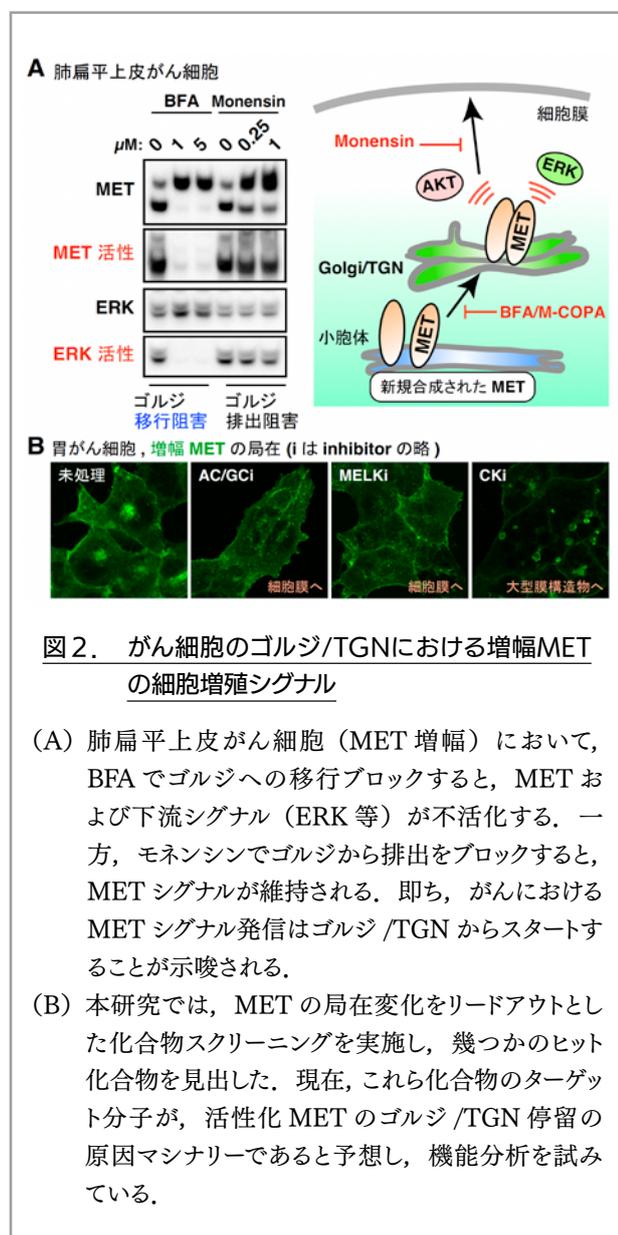
さらに、活性化したMETが、どのようにゴルジ/TGNに留まって無限細胞増殖シグナルを発信するのかについて検討した。予備検討では、METは自身のチロシンキナーゼ活性に依存してゴルジ/TGNに停留することを示唆するデータが得られているので、MET下流で活性化され、停留の原因となるタンパク質の同定を試みた。数百化合物を胃癌細胞に処理し、METの局在変化をリードアウトとしたスクリーニングを実施した結果、幾つかのヒット化合物を見出した(図2B)。現在、それらのターゲットタンパク質が、活性化METのゴルジ/TGN停留の原因マシナリーであると予想し、ロックダウンやタンパク質間相互作用の解析を準備している。

【考察・展望】

本研究では、肺がんや胃がんのようなメジャーがんの無限細胞増殖の原因の一つである増幅METが、初期分泌の過程でゴルジ/TGNで活性化し、そこをチロシンリン酸化シグナルのプラットフォームとすることが明らかになった。肝がんについては、今後の検討課題である。野生型であっても、発現レベルが高いと、細胞膜以外の部位で活性化し、がんシグナルを発信することが示唆された。この理解に基づき、METを小胞体に留め、ゴルジ体に移行させないようなブロッカーが、がんシグナルの抑制において有望であると考えている。また、本課題で実施したスクリーニングによって、活性化METのゴルジ/TGN停留の原因マシナリーの理解を期待でき、「局在コントロールを介したチロシンリン酸化シグナルの調節方法」の基盤的開発を計画している。増幅することでリガンド非依存的に活性化するRTKは、MET以外に複数あり、それらのシグナルプラットフォームがMETと一致するのか異なるのか、異なるならば、何が原因なのか、次々と疑問を生じている。今後、METの局在機序とシグナル発信の関係の理解を深めると共に、他RTKの研究にも波及的展開をしていきたい。

【関連文献】

- (1) Obata Y & Nishida T. Golgi Retention and Oncogenic Signaling of KIT Tyrosine Kinase in Gastrointestinal Stromal Tumor. *Springer series of Subcellular Biochemistry*, Chapter 16, “The Golgi Network”, *In press*.
- (2) Obata Y, Natsume M, Shiina I, Takahashi T & Nishida T. Golgi retention of KIT in gastrointestinal stromal tumour cells is phospholipase D activity-dependent. *Scientific Reports*, 15, 28778 (2025)
- (3) Ichikawa S, Okamoto T, Yunokihara R, Murata T, Shiina I, Nishida T & Obata Y. Amplified MET RTK Causes Oncogenic Signaling on the Early Secretory Compartments in Gastric/Lung Cancer Cells. *In preparation*.



合成化学では不可能な炭素－炭素単結合から三重結合への変換を酵素が触媒する機構の解明

甲 斐 建 次

(大阪公立大学大学院農学研究科生命機能化学専攻)

【目的】

細菌ポリイン類は末端から共役した $C \equiv C$ を持つため、高い生物活性を有する。しかし、化学的な不安定性が原因で研究の進展が遅れてきた。細菌ポリイン類の原料は、C16かC18の脂肪酸である。それらがACP(acyl carrier protein)に結合した中間体に対し、不飽和化酵素(acetylenase/desaturase)が連続的に作用することで、ポリイン部が形成されると予想されている。しかし、その詳細な機構は生化学的には明らかになっていない。本研究では、collimonin類のポリイン部の形成機構を明らかにし、発展・応用研究に向けた基盤技術を確立させる。具体的には、ポリイン形成がどのような酵素によって、どのような順番で行われているのかを、化学・生化学的に明らかにする。

【方法】

col 遺伝子クラスター内の遺伝子を全て連続してPCRにてクローニングを行い、pET系ベクターに挿入した。この組換えベクターをBL21(DE3)に導入し、どの遺伝子が*E. coli*内で正常に機能するのかを確認した。次に、発現酵素を使ったin vitroでの変換系の構築を進めた。ACPをコードする*colD*はHisタグ融合タンパク質として発現することで、ACP型の生合成中間体をNiカラムで効率良く回収・精製できるようにした。SDS-PAGEで発現量が少ないことが分かったタンパク質については、コドン最適化を実施して、人工合成遺伝子へと置き換えた。

【結果と考察】

Collimonin生合成に関与する*col*遺伝子をpET系ベクターに組み込み、*E. coli* BL21(DE3)を宿主として発現・機能させることを検証した。全長遺伝子の導入は困難であったため、*colABCDEFGHI*をpET-21a(+)へ組み込み発現させた。その結果、作製した組換え株はene-triyne部を持つ中間体CBI-1の生産能を獲得した。PPTaseを共発現させると、その生産量は約3倍に増加した。これにより、

大腸菌内でポリイン部の形成に関わる酵素群が機能することが確認された。ポリイン部の形成はACPに結合した状態で進むため、ACPをHisタグ融合タンパク質として用いることで、Niアフィニティーカラムを用いた中間体の効率的な回収・精製系を構築した。また、ACPとそれに付加した前駆体脂肪酸をHPLCおよびLC/MSで検出することにも成功した。

酵素の生産量増大法に関する研究

加 藤 晃 代

(名古屋大学大学院生命農学研究科)

【目的】

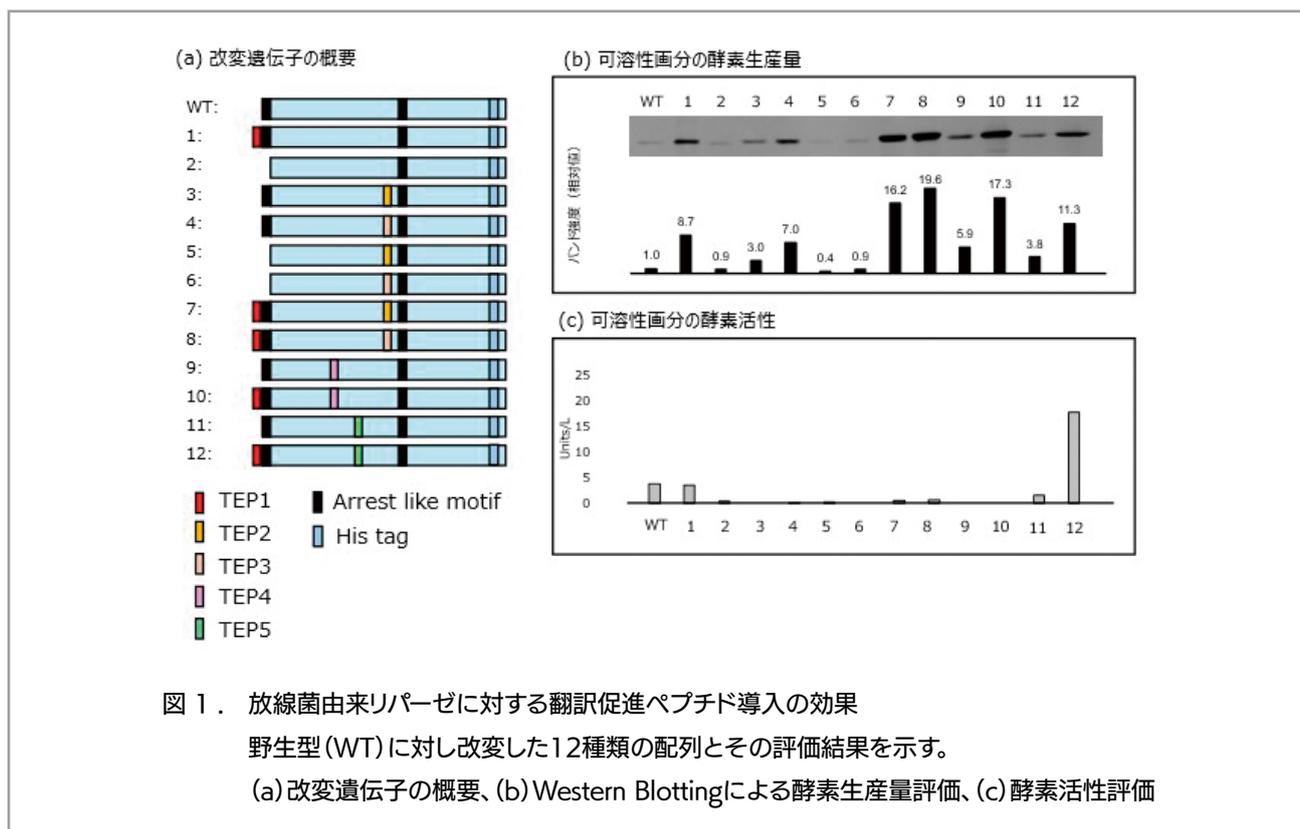
バイオ研究・産業において、所望の機能を有する酵素をいかに安く大量に生産できるかは、最も重要なポイントの一つである。しかしながら、強力なプロモーターやコドン最適化、様々な宿主－ベクター系を用いても、なぜか生産性の低いタンパク質が存在し、その原因は未だ明確には分かっていない。そのため、タンパク質生産量向上のためには、経験・運・根性任せの試行錯誤が必要であり、科学的に制御できているとは言い難い。そこで、本研究では、申請者がこれまでに見出してきた複数の翻訳促進ペプチド情報を利用し、生産性の低い酵素の生産量増大技術を開発することを目的とした。

【方法】

大腸菌発現系において、明確な原因は不明であるが翻訳効率がボトルネックで全くあるいは殆ど生産できない可能性のある酵素遺伝子を対象とし、既に申請者が複数見出している様々な翻訳促進ペプチド(Translation-Enhancing Peptide: TEPと称する[1])の効果を検討した。具体的には、既に低い生産性が確認できており活性測定法が確立されている酵素として、放線菌由来のリパーゼ(構造情報あり)および糖質加水分解酵素遺伝子(構造情報なし)を取り上げ、研究を遂行した。また、産業上重要な*Bacillus*属や酵母におけるTEPの利用技術開発を試みた。

【結果】

1. リパーゼ遺伝子を用いた検討



大腸菌発現系において生産性の低かった放線菌由来リパーゼ遺伝子を対象とし、過去に申請者が見出していた TEP の一種である SKIK ペプチドの他、その後の検討で新規に得られた複数の TEP の導入による生産量増大を試みた。当該酵素に関しては、すでに X 線構造解析により構造が解明されており、活性中心も分かっていたため、N 末端だけでなく酵素の内部から表面に至るまで、いくつかの領域に TEP を導入し、生産性と活性に与える影響を調べた。まず、大腸菌無細胞タンパク質合成系を用いた事前検討において、翻訳を停滞させる可能性が考えられるアレスト様モチーフ上流への TEP 導入が酵素生産量増大に効果的であることが示された。そこで、大腸菌生細胞 BL21(DE3) を用いた誘導発現における可溶性タンパク質としての生産量に与える影響を検討した。その結果、アレスト様モチーフを2箇所有する本酵素配列において、当該配列の削除よりも N 末端への TEP 導入がその生産性増大に大きく寄与することが示された (図 1, サンプル WT, 1 および 2)。また、N 末端に加え内部に TEP を導入した配列において、単独導入のものよりも生産量増大効果が大きいことが示された (図 1, サンプル 7, 8, 12 など)。一方、可溶性画分を用い酵素活性を評価したところ、内部に

TEP を導入した複数のサンプルにおいて、活性低下が認められたが、12 のように可溶性における生産性増大および活性維持を両立可能な変異体も認められた。変異体の予測モデル構造解析および MD シミュレーションの結果、活性が消失した変異体は、TEP 導入領域が活性中心の構造および酵素そのものの安定性に悪影響であることを説明することができた。一方、同様の解析により、変異体 12 は TEP 導入領域が酵素表面であり活性および酵素の安定性に影響を与えないことが示唆された。

2. 糖質加水分解酵素を用いた検討

大腸菌における生産性が低く、機能評価が困難であった機能未知糖質加水分解酵素様遺伝子を用い、TEP 導入効果の検討と評価を行った。ここでは、放線菌や乳酸菌からクローニングされた 10 種類以上の酵素遺伝子を用い、N 末端への TEP 導入による可溶性生産量増大を試みた。その結果、全ての酵素の生産量を増大させることは困難であったが、元来全く生産できなかった放線菌由来の酵素遺伝子において、TEP 導入による可溶性タンパク質としての生産量増大効果が顕著であることが示された (図 2)。これにより、精製および機能評価を進めることが可能となった。

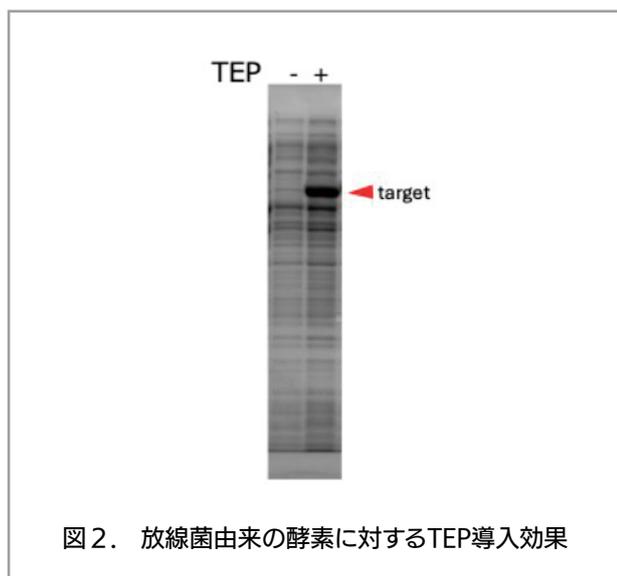


図2. 放線菌由来の酵素に対するTEP導入効果

3. *Bacillus* 属や酵母における TEP の利用技術開発

Bacillus 属や酵母は研究および産業的な酵素生産宿主として重要であるが、生産性の低さが問題となるケースがある。そこで、申請者が大腸菌にて開発してきた TEP が適用可能かおよびそれぞれの宿主における TEP の探索・同定を行った。その結果、翻訳を促進しタンパク質生産量を増大しうる複数の TEP 候補を見出した。

【考察】

本研究では、強力なプロモーターで転写量を増大させてもなぜか大腸菌における生産性の低い酵素または抗体遺伝子を対象とし、N 末端だけでなく、内部配列に対する TEP 導入を検討し、「タンパク質の機能を維持したまま、生産量を増大させる技術」の開発を目指した。まずリパーゼを用いた検討から、N 末端だけでなく複数箇所への TEP 導入により、可溶性としてのタンパク質生産量を増大できることが示された。今回は、構造情報が明らかとなっている酵素を対象としたが、アミノ酸の二次配列情報および AlphaFold のような構造予測ツールと活性部位予測ツールで出力された三次元構造情報を活用することにより、機能未知な酵素の活性を維持したまま生産量を増大するためのより効果的な TEP 導入位置を絞り込めるものと考えられる。

また、複数の糖質関連酵素遺伝子を用いた検証により、遺伝子によって TEP の効果が顕著であるものから低いものまで様々であることが示された。このことから、生産性の低さは翻訳のみが原因でない可能性や、N 末端への TEP 導入のみでは解決できない場合もあるこ

とが明らかとなった。生産量増大のための手段として N 末端への TEP 導入が万能ではない一方で、全く生産されず機能評価が諦められてしまっていたタンパク質の可溶性生産量を増大可能とできたことは、タンパク質の機能解析を加速する上で意義があるものと考えられる。今後、検証した酵素遺伝子の配列と TEP の効果を統計的に解析することにより、未だ未解明な生産性に影響する何らかの要因を見出し、さらなる技術改良に繋げていきたい。また、本報告書では詳述しなかったが、大腸菌以外の生物種における TEP を探索し、その存在可能性が示された。今後、本研究で得られた知見を、様々な宿主におけるタンパク質生産の効率化技術開発に応用していきたいと考えている。

【文献】

- [1] Ojima-Kato, T., Yokoyama, G., Nakano, H., Hamada, M. & Motono, C. Screening and machine-learning assisted prediction of translation-enhancing peptides reducing ribosomal stalling in *Escherichia coli*. bioRxiv, doi.org/10.1101/2025.07.17.665026 (2025)

スプライシング因子による DNA 編集酵素の活性調節機構の解明

金山直樹

(岡山大学)

【目的】

抗体遺伝子の体細胞高頻度突然変異には DNA 編集酵素 Activation induced cytidine deaminase (AID) が必須である。我々は、DNA 編集酵素 AID の活性発現およびそれによる高頻度突然変異の誘導に必須な因子の一つとして、スプライシング因子 Serine/arginine-rich splicing factor 1 (SRSF1) のアイソフォーム SRSF1-3 が必須であることを見出している。SRSF1-3 は抗体遺伝子に集積し、AID と結合して AID の核内への蓄積や AID の活性制御に関与する。本研究は、スプライシング因子 SRSF1-3 による、DNA 編集酵素 AID の DNA 編集活性の調節機構およびその抗体遺伝子特異性を決定する機構を明らかにすることを目的とする。

【方法と結果】

(1) 体細胞高頻度変異における SRSF1-3 の機能部位の

同定 -1

SRSF1 と SRSF 1-3 の N 末領域にある 2 つの RNA 結合領域は、単独で AID やトポイソメラーゼ I と結合することをこれまでに示してきた。これら、単独で結合活性を示す領域に変異誘導能があるあるかどうかを評価したところ、二つのどちらの RNA 結合領域も変異誘導能力を有した。

(2) 体細胞高頻度変異における SRSF1-3 の機能部位の

同定 -2

SRSF1 の 2 つの RNA 結合領域の連結部位に存在するアルギニン残基は、メチル化を受けることによって SRSF1 のスプライシング活性を活性化することが知られている。この部分に変異誘導に関連があるかどうか、今回、メチル化の責任酵素の一つである PRMT5 の阻害剤を用いて評価したところ、阻害剤の添加は、変異全体を低下させる傾向が見られた。

【考察】

SRSF1 の N 末側領域にある 2 つの RNA 結合領域は、単独でも変異誘導能力があった。これは、これらの領域が単独でも AID やトポイソメラーゼ I と結合することと関連があるかもしれない。アルギニンメチル化の阻害が、そのようにして変異を低下させているかは不明であるが、SRSF1 の責任残基の変異体を用いることによってメチル化の変異体への影響を明らかにできると考えられる。

同一の天然リパーゼを用いて R 体と S 体の両エナンチオマーを作り分ける

鹿又 喬 平

(大阪大学 大学院薬学研究科)

【目的】

医薬品の多くはキラルであり、それらを高い光学純度で合成する手法の開発に酵素は不可欠である。筆者はこれまで、リパーゼを有機溶媒中で用いるアルコールのエステル化と、未反応のエナンチオマーの硫酸によるラセミ化を同一容器で組み合わせ、ラセミ体アルコールを収束的に R 体エステルに変換する反応を開発した(図 1a)¹⁾。酵素は硫酸により変性するが、ナノ粒子の乳化作用により形成される Pickering エマルジョン中で、両者が同時に機能する反応を実現した。しかし天然のリパーゼは R 体選択的であり、S 体生成物が得られない。本研究では、Pickering エマルジョン中でリパーゼによるエステルの加水分解を含む 3 つの反応を集積し、ラセミ体エステルの S 体収束反応を開発した。

【結果・考察】

リパーゼ CAL-B の溶液と 50 mM H₂SO₄ それぞれの Pickering エマルジョンを調製して 1:1 で混合し、有機相にエステル(±)-3a と 10 当量の 4 を加え、35 °C で 24 時間反応を行った。その結果、(S)-3a が収率 89%、光学純度 88% ee で得られ、図 1b に示す CAL-B による(±)-3 の R 体選択的な加水分解、生じた(R)-1 の

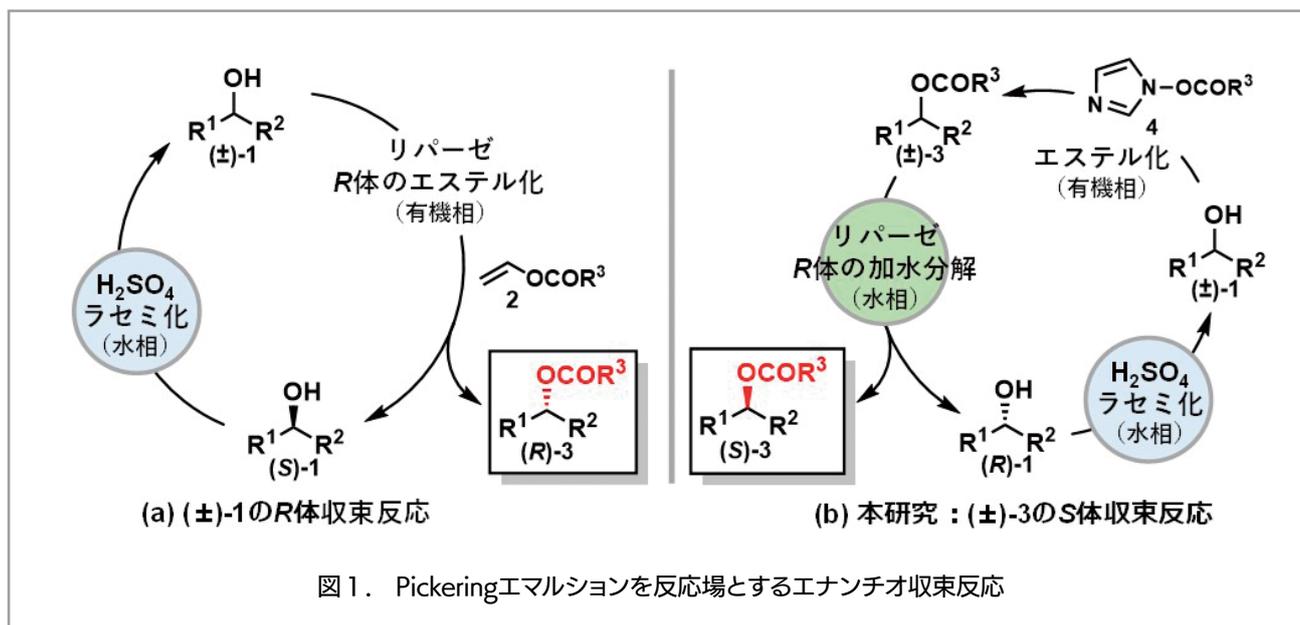
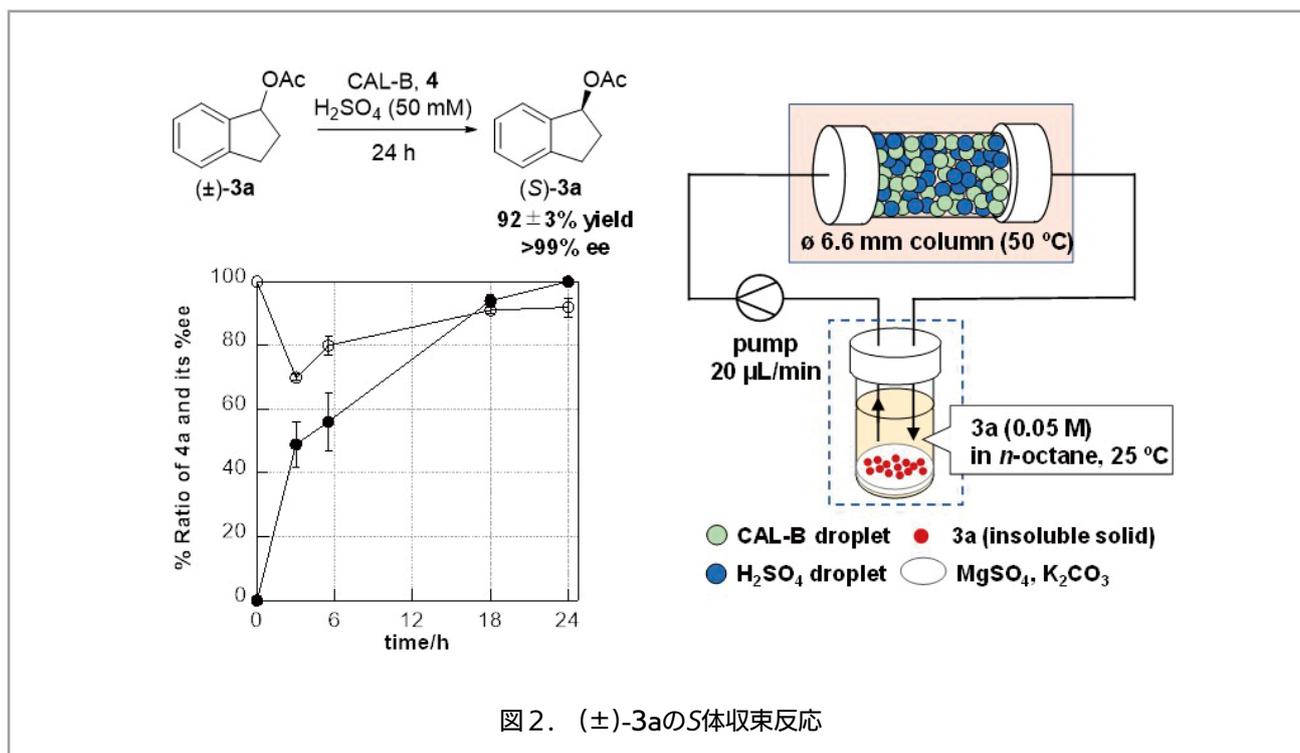


図 1. Pickeringエマルジョンを反応場とするエナンチオ収束反応



硫酸相でのラセミ化, (±)-1 の有機相でのエステル化が一つの容器内で同時進行することが実証された。しかし CAL-B 本来の選択性を考慮すると 88% ee は不十分で, (R)-1 から (R)-3 を与えるエステル化が進行して (S)-3 への収束が妨げられたと考えた。

そこで3つの反応を順次進行させるため, 循環フロー系での反応を検討した (図 2)。二種のエマルジョンをカラムに充填し, バイアルに 4 を加えて, 両者の間で 3a の溶液を循環させた。これにより, カラム内で (±)-3a の加水分解と (R)-1a のラセミ化が完全に進行した後, (±)-1a が (S)-3a と共にバイアルに入りエステル化され, 3つの反応が所望の順に進行すると考えた。検討の結果, 3a の光学純度が漸的に上昇し, 24 時間で (S)-3a が収率 92%, >99% ee で得られた。本手法は, 様々な置換基を有する第二級アルコール由来のラセミ体エステルに適用可能であった²⁾。またリパーゼの反応では, 立体障害の大きな第三級アルコールの変換は困難であるが, 筆者は本研究で第三級アルコールについても図 1a に示す R 体収束反応に成功した³⁾。今後は第三級アルコールの S 体収束の変換を開発していく。

【文献】

1. K. Kanomata et al: Lipase/H₂SO₄-cocatalyzed dynamic kinetic resolution of alcohols in Pickering

emulsion, *ChemCatChem*, 15, e202300878 (2023).

2. K. Kanomata et al: (S)-Convergent deracemization of racemic esters with (R)-selective lipase: Pickering emulsion strategy for enantiodivergent synthesis using native enzyme, *ACS Catal.*, 15, 6565–6571 (2025).
3. K. Kanomata et al: Biphasic lipase/H₂SO₄ dual catalysis for dynamic kinetic resolution of *tert*-alcohols, *Green Chem.*, 27, 9672-9678 (2025)

カルシニューリンにおける基質特異性の分子機構と創薬応用

神 沼 修

(広島大学原爆放射線医科学研究所・疾患モデル解析研究分野)

【目的】

転写因子 Nuclear factor of activated T cells (NFAT) は, 脱リン酸化酵素カルシニューリン (Calcineurin : CN) によって脱リン酸化され, 多くの機能遺伝子の発現を制御する。本研究は, CN の NFAT に対する基質特異性のメカニズム解明を目的とした。

【方法】

NFATにおける新たなCN結合領域として同定したペプチド(p8)を¹⁾を、新たにみいだした膜透過成ペプチドを付与して(新膜透過性p8)ヒトT細胞に導入し、サイトカイン発現に与える影響を検討した。既知のCN結合ペプチドVIVITおよびPep3との活性比較を行った。感作マウスの抗原誘発アレルギー性気道炎症モデルを用い²⁾、膜透過性p8、VIVITおよびPep3の効果を検討した。

【結果】

新たな膜透過性ペプチドを付与したp8は、ヒトT細胞における一部のサイトカイン発現を選択的に抑制し、その作用パターンはVIVITやPep3と異なることが明らかになった。感作マウスの抗原誘発アレルギー性気道炎症モデルに対する各膜透過成ペプチドの効果は検討中である。

【考察】

研究を継続し、p8の効果をin vivoでも明らかにし、他の膜透過成ペプチドとの差別化をはかる。

【文献】

1. Kitamura, N., Shindo, M., Ohtsuka, J., Nakamura, A., Tanokura, M., Hiroi, T. & Kaminuma O.: Identification of novel interacting regions involving calcineurin and nuclear factor of activated T cells, *FASEB J.*, 34, 3197-3208 (2020).
2. Hayashi K, Saeki M, Miura K, Yamasaki N, Matsuda M, Shimora H, Nabe T, Shimizu Y, Fujita T, Endou H, Kaminuma O.: JPH203, a LAT1 inhibitor, alleviates steroid-resistant murine airway inflammation mediated by Th17 cells, *Allergy*, 78, 2780-2783 (2023).

ビタミンB1、B2、B6の吸収に機能するリン酸エステル体加水分解酵素の同定

神戸大 朋

(京都大学大学院生命科学研究所)

【目的】

ビタミンB1やB2、B6などのビタミンB群(以下Bビタミン)の細胞内への取り込みに関しては、不明な点が多い。Bビタミンはリン酸エステル体が活性体となるが(B1はチアミンニリン酸(TDP)、B2はフラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)、B6はピリドキサル5リン酸(PLP))、これらリン酸エステル体は細胞膜をほとんど通過できないため、膜通過の前にリン酸基が加水分解で除去される必要がある。リン酸基の除去に関与する細胞外酵素は、ビタミンの体内取り込みに重要な役割を果たすと考えられるが、この反応に関与する酵素についてはほとんど情報がなかった。本研究では、未解明のBビタミンリン酸エステル体の加水分解酵素に関する解析を進めた。

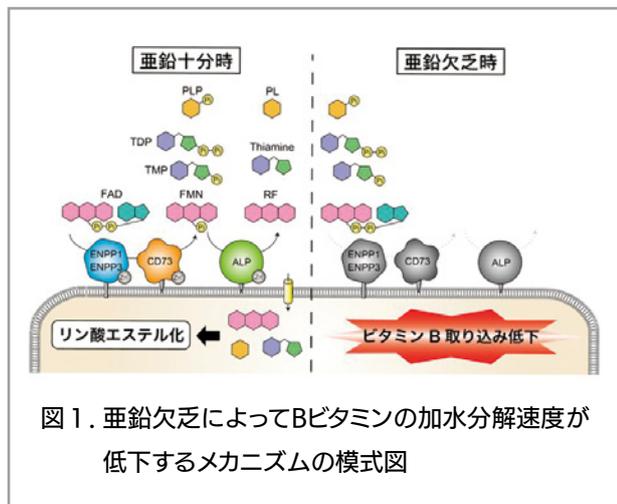
【方法】

リン酸エステル体の加水分解に関与する可能性のある細胞外酵素を培養細胞に一過的に発現させた。調製した細胞抽出液と基質であるTDP、FAD、PLPを反応させ、反応後、各基質と生成物の量をHPLCにて定量した。また、各Bビタミンを加水分解する酵素を発現する細胞を通常あるいは亜鉛欠乏の状態にて培養した後、細胞抽出液のリン酸エステル体の加水分解の活性の変化について解析した。亜鉛十分食あるいは亜鉛欠乏食で飼育したラット血清における加水分解活性についても同様に測定した。

【結果】

リン酸エステル体の加水分解に関わると予想した15種の酵素を細胞に導入し、解析した結果、ALP、CD73、ENPP1、ENPP3の4つの亜鉛酵素が、それぞれのリン酸エステル体の加水分解に機能することが判明した(図1)。これら4つの酵素の活性が亜鉛欠乏に応じて鋭敏に低下することを明らかにしていたため、通常あるいは亜鉛欠乏状態で培養した培養細胞から調製した抽出液、さらに、通常食あるいは亜鉛欠乏食で

飼育したラットの血清を使用して解析した結果、亜鉛欠乏によって、各酵素の加水分解活性が大きく減少することを明らかにした。



【考察】

亜鉛栄養状態を適切に保つことが、B ビタミンの代謝において重要であることが判明した¹⁾。

【文献】

1. Yuasa, H., *et al.*: Rate of hydrolysis of the phosphate esters of B vitamins is reduced by zinc deficiency: in vitro and in vivo, *FASEB J.*, 38, e70025 (2024)

プロテオリシスを介した精子成熟メカニズムの
解明

浄 住 大 慈

(立命館大学総合科学技術研究機構)

【目的】

哺乳動物の精子は精巣で形成されるが、直後には受精能を持たず、精巣上体での成熟過程を経て初めて受精能力を獲得する。この精子成熟においてはプロテオリシスが中心的な役割を果たすが、その分子実体や作用機序については未解明な点が多い。申請者はこれまでの研究により、精子表面タンパク質のプロテオリシスがルミクリンシグナルに依存して制御され、その過程が精子成熟に必須であることを明らかにしてきた¹⁻⁴⁾。しかし、プロテアーゼがどの分子を切断し、いかにして精子に受精能力を付与するのかが不明である。本研

究は、プロテオリシスによる精子表面基質の変化を同定・解析し、精子成熟の分子機構を明らかにすることを目的とした。

【方法】

予備研究で同定した候補分子 SSP-1, SSP-2, SSP-3 に着目し、これらのプロセス型分子の精製を試みた。野生型マウスの精巣上体尾部から精子を回収し、非イオン性界面活性剤を含む非変性条件下で膜タンパク質を含む可溶性タンパク質を抽出した。このタンパク質抽出液から余剰な界面活性剤を除去したのち、イオン交換クロマトグラフィーによって分画した。得られた画分をゲル電気泳動で解析し、SSP-1, SSP-2, SSP-3 に対する特異抗体を用いたイムノプロットによって、目的画分を同定した。

【結果】

SSP-1, SSP-2, SSP-3 に対する特異抗体を用いたイムノプロットにより、クロマトグラフィー分画からそれぞれの分子を検出したところ、当初は単一のプロセシング産物と考えられていたこれらの分子が、実際には異なる分子量をもつ複数の産物の混合物であることが判明した。そのため、SSP-1, SSP-2, SSP-3 の単一の精製物を得て、さらなる分子機能解析に供することは困難となった。

【考察】

本研究では、精子表面分子 SSP-1, SSP-2, SSP-3 を精製し、その分子実体を明らかにすることを目指したが、解析の結果、これらは均一な単一産物ではなく、異なる分子量をもつ複数のプロセシング産物の混合物であることが示された。この知見は、精子表面分子のプロセシングが一義的かつ厳密に制御されているのではなく、基質認識が必ずしも厳密でない酵素反応で進行している可能性を示す。このような基質認識の曖昧さは、精子成熟において多様な分子修飾を許容し、精子成熟制御機構の柔軟性に寄与している可能性がある。今後は、このヘテロなプロセシング産物が精子成熟および受精能にどのように関与するかを明らかにすることが課題である。

【文献】

1. Kiyozumi D, Noda T, Yamaguchi R, Tobita T, Matsumura T, Shimada K, Kodani M, Kohda T,

- Fujihara Y, Ozawa M, Yu Z, Miklossy G, Bohren KM, Horie M, Okabe M, Matzuk MM, Ikawa M. NELL2-mediated lumicrine signaling through OVCH2 is required for male fertility. *Science*. 2020 Jun 5;368(6495):1132-1135.
2. Kiyozumi D, Shimada K, Chalick M, Emori C, Kodani M, Oura S, Noda T, Endo T, Matzuk MM, Wreschner DH, Ikawa M. A small secreted protein NICOL regulates lumicrine-mediated sperm maturation and male fertility. *Nat Commun*. 2023 Apr 24;14(1):2354.
3. Kiyozumi D, Ikawa M. Proteolysis in Reproduction: Lessons From Gene-Modified Organism Studies. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022 May 4;13:876370. Review.
4. Kiyozumi D. Lumicrine signaling: Extracellular regulation of sperm maturation in the male reproductive tract lumen. *Genes Cells*. 2023 Nov;28(11):757-763. Review.

硫化水素合成酵素による呼吸中枢の神経回路機能調節

小金澤 禎史

(筑波大学医学医療系神経生理学)

【目的】

硫化水素は腐った卵や温泉などから発生する特徴的な刺激臭を伴った生体にとって有毒なガスとして有名である。しかしながら、近年、硫化水素は生体内でも合成されており、この生体ガスとしての硫化水素は、細胞保護作用、血管運動調節作用など様々な生理機能を有していることが明らかになってきた。特に、脳ではシナプス伝達調節などを介して、脳機能の調節に役立っているものと考えられている。本研究では、呼吸運動に着目し、脳内の硫化水素が中枢神経系による呼吸運動の形成と調節に果たす役割を明らかにすることを目的とした。

【方法】

実験には、ラットの経血管灌流標本を用い、横隔神

経と迷走神経より中枢性の呼吸出力を記録した。延髄呼吸中枢の神経細胞活動の記録においては、高密度多点電極を用いることにより、多神経細胞活動の同時記録を行った。硫化水素合成酵素である cystathionine β -synthase (CBS) 抑制薬の投与は、灌流液中への添加により実施した。

【結果】

延髄呼吸中枢の神経細胞活動を高密度多点電極により記録し、神経細胞活動のクラスタリングによるスパイクソーティングを行うことにより、同一実験において数十個の呼吸中枢神経細胞活動が同時に記録された。また、記録された呼吸中枢神経細胞活動に対して、呼吸出力より判断される呼吸相に応じた活動変動に基づく主成分分析を行うことにより、呼吸中枢神経細胞群の周期的な活動変動の特徴を主成分座標上および脳座標上に表現することが可能となった。さらに、CBS 抑制薬の投与による呼吸出力の経時的な変化に伴って、これら主成分座標軸上および脳座標軸上に表現された呼吸中枢神経細胞群の特徴が経時的に変動することが確認された。

【考察】

以上の結果から、CBS を介した脳内硫化水素の合成変動に伴う呼吸中枢神経回路の時空間的な特徴の変動を、多神経細胞同時記録およびその数理解析により明らかにすることが可能であることが示された。

【文献】

- 1) Okazaki, M., Matsumoto, M. & Koganezawa, T.: Hydrogen sulfide production in the medullary respiratory center modulates the neural circuit for respiratory pattern and rhythm generations. *Sci. Rep.*, 13, 20046 (2023)
- 2) 岡崎実那子、小金澤禎史: 脳内の硫化水素は正常な呼吸の維持に必須、*医学のあゆみ*, 279(12,13), 1183-1184 (2021)
- 3) Okazaki, M., Uozu, S., Sato, Y., Matsumoto, M., & Koganezawa, T.: Endogenous hydrogen sulfide maintains eupnea in an in situ arterially perfused preparation of rats. *Commun. Biol.*, 3(1), 58 (2020)

活動電位非依存的にオキシトシン分泌を促す鍵分子：CD38 の細胞内局在と ADP リボシルシクラーゼ活性との機能連関

坂本 浩隆

(岡山大学・環境生命自然科学学域 (理))

【目的】

CD38 ノックアウトマウスではオキシトシン分泌が低下することから (Jin et al., Nature, 2007), CD38 がオキシトシン放出の鍵分子であることが示唆されている。また、最近我々は活動電位非依存的なオキシトシン分泌の存在を報告している (Oti et al., Curr. Biol., 2021; Martucci et al., PNAS, 2023)。我々はこれまでに、CD38 がオキシトシン顆粒小胞膜上に存在することを見出している (未発表)。しかし、1 回膜貫通型の CD38 がどのような膜トポロジーで配置され、酵素活性部位 (C 末端) がどちら側に向いているかは不明である。そこで本研究では、CD38 の膜トポロジー解析により、CD38 の酵素活性とオキシトシン分泌活性との機能連関を明らかにすることを旨とする。

【方法】

以下の二つの研究アプローチを行った。

1. 免疫電子顕微鏡 (電顕) による顆粒小胞標識 (N 末端抗体)

ラットの下垂体後葉から顆粒小胞画分を調製し、ニッケルグリッドに吸着させた。CD38 N 末端抗体 (1:50) による免疫標識後、金粒子標識二次抗体 (1:50) で可視化した。界面活性剤処理群では 0.2% Tween 20 で前処理を行った。透過型電顕で観察し、各小胞の金粒子数を計数した。

2. 小胞画分でのシクラーゼ活性解析

下垂体後葉の小胞画分 20 μ l に PBS + protease inhibitor cocktail を 19 μ l, 蒸留水を 10 μ l 加えた。96-well プレートに移し、50 mM NGD (最終濃度 1 mM) を添加後、37°C で 60 分間反応させた。cGDPR 蛍光強度を蛍光プレートリーダーで測定した (励起 300 nm, 検出 410 nm)。

【結果】

1. CD38 N 末端抗体による免疫電子顕微鏡解析

界面活性剤処理により金粒子標識数が有意に増加した。これは界面活性剤による膜破壊で N 末端エピトープへのアクセスが向上したためと考えられ、CD38 の N 末端が小胞膜内側に位置することが示された。この結果から、CD38 は C 末端を小胞外側 (細胞質側) に向ける膜トポロジーを有することが明らかとなった (図 1)。

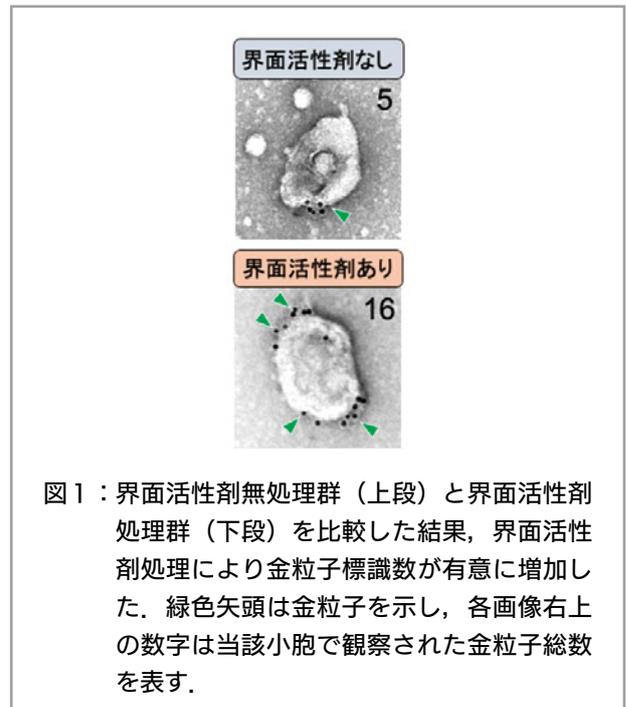


図 1：界面活性剤無処理群 (上段) と界面活性剤処理群 (下段) を比較した結果、界面活性剤処理により金粒子標識数が有意に増加した。緑色矢頭は金粒子を示し、各画像右上の数字は当該小胞で観察された金粒子総数を表す。

2. 小胞画分におけるサイクレス活性測定結果

下垂体後葉小胞画分においてサイクレス活性が検出された。小胞画分精製時のろ液では活性は認められなかった。インタクトな顆粒小胞においてサイクレス活性が確認されたことから、CD38 の酵素活性部位 (C 末端) が小胞外側に配置されていることが示された (図 2)。

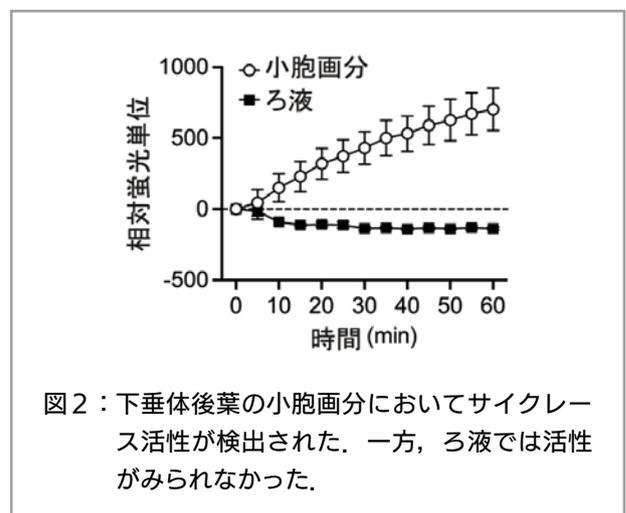


図 2：下垂体後葉の小胞画分においてサイクレス活性が検出された。一方、ろ液では活性がみられなかった。

【考察】

本研究により、オキシトシン顆粒小胞膜上のCD38は、酵素活性を有するC末端を小胞外側（細胞質側）に配置する膜トポロジーを有することが明らかとなった。この配置は、CD38が細胞質側でADPリボシルシクラーゼ活性を発揮し、セカンドメッセンジャーであるcADPリボースを合成することを可能にする。cADPリボースは細胞内Ca²⁺濃度の上昇を誘導し、開口分泌を促進することが知られている。従って、顆粒小胞膜上のCD38は、局所的なcADPリボース合成により細胞質Ca²⁺濃度を調節し、活動電位に依存しないオキシトシン放出を制御する分子機構の中核を担っていると考えられる。この発見は、従来のシナプス伝達に加えて、樹状突起からの非シナプス性オキシトシン分泌という新たな神経伝達様式の分子基盤を明らかにするものである。

【文献】

Jin, D., Liu, H.X., Hirai, H., Torashima, T., Nagai, T., Lopatina, O., Shnayder, N.A., Yamada, K., Noda, M., Seike, T., Fujita, K., Takasawa, S., Yokoyama, S., Koizumi, K., Shiraishi, Y., Tanaka, S., Hashii, M., Yoshihara, T., Higashida, K., Islam, M.S., Yamada, N., Hayashi, K., Noguchi, N., Kato, I., Okamoto, H., Matsushima, A., Salmina, A., Munesue, T., Shimizu, N., Mochida, S., Asano, M. & Higashida, H.: CD38 is critical for social behavior by regulating oxytocin secretion, *Nature*, **446**(7131), 41-45 (2007).

Martucci, L.L., Launay, J.M., Kawakami, N., Sicard, C., Desvignes, N., Dakouane-Giudicelli, M., Spix, B., Têtu, M., Gilmaire, F.O., Paulcan, S., Callebert, J., Vaillend, C., Bracher, F., Grimm, C., Fossier, P., de la Porte, S., Sakamoto, H., Morris, J., Galione, A., Granon, S. & Cancela, J.M.: Endolysosomal TPCs regulate social behavior by controlling oxytocin secretion, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **120**(7):e2213682120 (2023).

Oti, T., Satoh, K., Uta, D., Nagafuchi, J., Tateishi, S., Ueda, R., Takanami, K., Young, L.J., Galione, A., Morris, J.F., Sakamoto, T. & Sakamoto, H.: Oxytocin influences male sexual activity via non-synaptic axonal release in the spinal cord, *Curr. Biol.*,

31(1):103-114 (2021).

中性脂肪合成関連酵素による白色脂肪細胞・骨髄脂肪細胞の制御機構の解明

佐久間 一基

(千葉大学大学院医学研究院分子病態解析学)

【目的】

全身性先天性脂肪萎縮症は、脂肪組織の減少・消失の進行とともに、様々な代謝異常を高率に合併する疾患である。レプチン補充治療が、合併する代謝異常の改善に対して有効性が証明されている。しかし、脂肪萎縮に対する根本的治療法はないため、脂肪萎縮をきたすメカニズムに基づく治療薬の開発が求められている。本研究では、先天性全身性脂肪萎縮症の原因遺伝子である1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase 2 (AGPAT2)による白色脂肪細胞・骨髄脂肪細胞の制御機構の検証を目的とした。

【方法・結果】

1. Agpat2ノックダウンラットにおける脂肪組織のリゾホスファチジン酸プロファイルと病理組織学的検討

Agpat2標的 antisense oligonucleotide(ASO)により、ラットの脂肪組織でAGPAT2のタンパク発現は40%低下することを確認した。AGPAT2の基質であるリゾホスファチジン酸が脂肪組織で蓄積した。病理組織学的検討で、CD68陽性細胞数(活性化マクロファージ)の増加を脂肪組織で認めた。脂肪細胞のサイズの縮小を認めた。

2. ミトコンドリア脱共役剤投与下の Agpat2ノックダウンラットにおける脂肪組織のリゾホスファチジン酸プロファイルと病理組織学的検討

ミトコンドリア脱共役剤投与で Agpat2ノックダウンラットにおける脂肪組織のリゾホスファチジン酸の蓄積が抑制された。病理組織学的検討で、CD68陽性細胞数(活性化マクロファージ)の低下を認めた。脂肪細胞のサイズの拡大を認めた。

3. Agpat2ノックダウンラットにおける骨髄脂肪細胞の評価

Agpat2 ASOを用いたAGPAT2ノックダウンラット

における骨髄の病理組織学的検討で、骨髄脂肪滴の減少、CD68 陽性細胞数の増加を認めた。加えて、遺伝子発現解析でアディポネクチンの発現低下を認めた。

【考察】

AGPAT2 欠損では、白色脂肪組織のリゾホスファチジン酸が蓄積する。蓄積したリゾホスファチジン酸は、白色脂肪組織の炎症と脂肪萎縮を惹起する。AGPAT2 欠損による脂肪萎縮は骨髄脂肪細胞でも生じており、先天性全身性脂肪萎縮症の骨合併症の病態に関与している可能性が示された。

【文献】

Sakuma I, Gaspar RC, Luukkonen PK, Kahn M, Zhang D, Murray S, Zhang X, Golla JP, Vatner DF, Samuel VT, Petersen KF, Shulman GI. Lysophosphatidic acid triggers inflammation in liver and white adipose tissue in rat models of 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase 2 deficiency and overnutrition *Proc Natl Acad Sci U S A* 2023 120 (52): e2312666120.

核内脂質代謝酵素による「リピッド・ジェネティクス」の解明

高杉 展正

(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 薬効解析学)

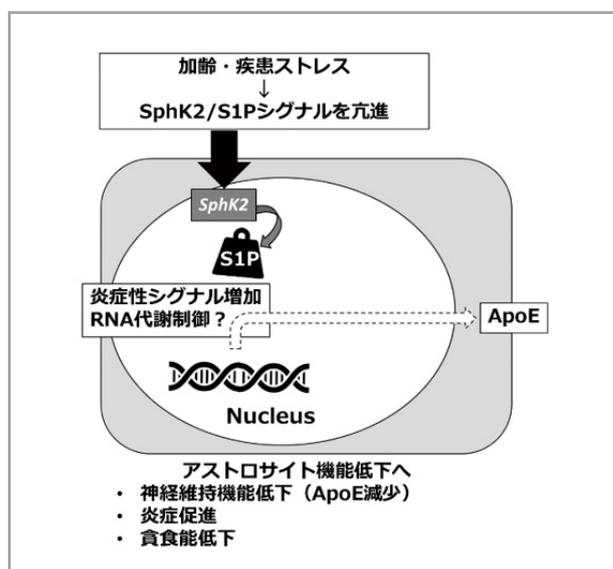
【目的】

アルツハイマー病 (AD) 患者のアストロサイトでは、最大の遺伝的リスク因子である ApoE が発現低下するなど、病態特異的な細胞の機能異常が起こる。その原因として遺伝子配列の変異によらない「エピジェネティック」変化が注目されている。

我々は遺伝子を取り巻く環境要因に着目し、炎症時に増加する核内脂質スフィンゴシン-1-リン酸 (S1P)、およびその産生酵素スフィンゴシンキナーゼ2 (SphK2) の機能に注目している。これまでに SphK2 の酵素活性が AD で上昇し¹⁾、アストロサイトにおいて発現を負に調節していること²⁾を見出している。本研究では、核内脂質とその産生酵素による転写制御機構の解明を目指した。

【方法・結果】

S1P は安定性が低く、その関連因子は SphK2 近傍にあると仮説し、SphK2 とビオチン付加酵素を融合し、その近傍タンパク質をビオチン化し、核画分のビオチン化タンパク質を精製し、網羅的な同定を行った。得られた候補因子は、Gene Ontology 解析により炎症や RNA 代謝に関わるものが多く、特に後者は新規の制御機能の存在を示唆している。両カテゴリーの候補因子は、免疫沈降法により SphK2 と結合しているかを検証し、RNAi 法による ApoE 発現への寄与を解析した。そして SphK2/S1P シグナルにより制御されうる因子やシグナル系を複数同定した。



【考察】

本研究成果は、核内脂質により制御される未知のエピジェネティクス制御機構が存在し、AD における神経維持から炎症性促進へのアストロサイトの機能 Switch に関与している可能性を示している。本シグナルの RNA 代謝への関りと、その ApoE の発現制御メカニズムについて解析を進行中である。

【文献】

1. Takasugi N et al., BACE1 activity is modulated by cell-associated sphingosine-1-phosphate. *J Neurosci.* 31(18):6850-7. 2011
2. Komai M, et al., Nuclear SphK2/S1P signaling is a key regulator of ApoE production and Aβ uptake in astrocytes. *J Lipid Res.* 65(3):100510. 2024

植物における細胞膜 H⁺-ATPase の活性制御機構の解明

武宮 淳史

(山口大学大学院創成科学研究科)

【目的】

フォトリポピンは植物に特有の青色光受容体キナーゼであり、BLUS1 のリン酸化を介して細胞膜 H⁺-ATPase を活性化し、気孔開口の駆動力を形成する。我々は最近、H⁺-ATPase の光活性化には、自己阻害領域に存在する 2 カ所の Thr 残基のリン酸化が必須であることを明らかにした。しかし、フォトリポピンが H⁺-ATPase のリン酸化を誘導するシグナル伝達機構については、未解明な点が多い。本研究では、このシグナル伝達に関する重要因子の同定を目的として、サーマルイメージングにより単離されたシロイヌナズナ突然変異体の機能解析を行った。

【方法】

気孔開口の評価には、赤外線サーモグラフィを用いた葉温測定を行った。H⁺-ATPase の活性化解析では、青色光に応答した H⁺ 放出および H⁺-ATPase のリン酸化を解析した。

【結果】

赤外線サーモグラフィにより青色光に応答した気孔開口を測定した結果、本変異体では気孔開口が顕著に阻害されることが分かった。さらにこの変異体では、青色光に応答した H⁺ 放出および H⁺-ATPase のリン酸化が阻害されており、fusococcin に応答した H⁺-ATPase のリン酸化も阻害されていることが分かった。一方で、青色光によるフォトリポピンの自己リン酸化および BLUS1 のリン酸化は正常に起こることが分かった。

【考察】

以上の結果から、この変異体では、BLUS1 から H⁺-ATPase の活性化に至るシグナル伝達が阻害されていることが示唆される。さらに、fusococcin による H⁺-ATPase のリン酸化も阻害されていたことから、H⁺-ATPase のリン酸化過程が特異的に阻害されている可能性が高い。

【文献】

Fuji, S., Yamauchi, S., Sugiyama, N., Kohchi, T., Nishihama, R., Shimazaki, K. & Takemiya, A. : Light-induced stomatal opening requires phosphorylation of the C-terminal autoinhibitory domain of plasma membrane H⁺-ATPase, *Nature Commun.* 15, 1195 (2024)

カルシウム依存性タンパク質リン酸化酵素の活性異常に起因する新たな知的発達症病態の解明

竹本 さやか

(名古屋大学環境医学研究所)

【目的】

シナプス伝達や神経活動によって流入するカルシウムにより活性化される分子経路は記憶や学習を代表とする柔軟な脳機能発揮において不可欠な分子基盤を担う。近年、本経路を構成する遺伝子群のゲノムバリエーションが神経発達症群（自閉スペクトラム症、注意欠如・多動症、知的発達症など）のリスクとなることが判明し、その重要性が再認識されつつある。本研究では、患者より同定されたカルシウム依存性タンパク質リン酸化酵素 (CaMKII) の *de novo* バリエーション¹⁾ を有する新たな病態モデルマウスを作出し、神経発達症群の病態機序の一端を解明すること目的とした。

【方法】

独自に開発し行動解析などを終えた病態モデルマウス (*Camk2a-p.P212L-het*) を対象に以下の研究を実施した。

(1) シナプス病態の解明：CaMKII が豊富に存在するシナプス (スパイン) の形態異常を病態モデルマウスにおいて検討した。更に、CaMKII の担う学習・記憶の細胞基盤であるシナプス可塑性モデルとして LTP (long-term potentiation) の変化を検討した。電気生理解析は、共同研究者である渡部 (東京慈恵会医科大学) との共同で実施した。

(2) 治療実験：シナプスにおける過剰な CaMKII の過剰な活性の活性が病態の基盤であるという仮説に基づき、神経細胞へのカルシウム流入を抑制する薬剤により行動表現型の回復が可能であるか行動解析により検

証した。

【結果】

(1) スパインの形態を詳細に調べた結果、モデルマウスの海馬ではスパインの大きさが拡大していることが判明した。また、海馬におけるシナプス可塑性として LTP の変化を検討したところ、モデルマウスの海馬では、通常 LTP が誘導されない低頻度の刺激により LTP が確認され、シナプス可塑性が生じやすくなっていることを見出した²⁾。

(2) 治療実験については、一部の行動表現型への効果を見出し、検討を進めている。

【考察】

CaMKII は学習と記憶を制御する重要なリン酸化酵素であり、知的発達症に関連する他のタンパク質の機能を媒介する重要な因子でもある。今後、本研究で確立したモデルマウスにより、知的発達症に関するメカニズムの理解が一層進むことが期待される。

【文献】

1. Fujii, H., Kidokoro, H., Kondo, Y., Kawaguchi, M., Horigane, S. I., Natsume, J., Takemoto-Kimura, S., Bito, H. : Förster resonance energy transfer-based kinase mutation phenotyping reveals an aberrant facilitation of Ca²⁺/calmodulin-dependent CaMKII α activity in de novo mutations related to intellectual disability, *Frontiers in molecular neuroscience*, 15, 970031. (2022).
2. Pan, M., Liu, P. W., Ozawa, Y., Arima-Yoshida, F., Dong, G., Sawahata, M., Mori, D., Nagase, M., Fujii, H., Ueda, S., Yabuuchi, Y., Liu, X., Narita, H., Konno, A., Hirai, H., Ozaki, N., Yamada, K., Kidokoro, H., Bito, H., Mizoguchi, H., Watabe, A.M., Horigane, S., Takemoto-Kimura, S. : A hyper-activatable CAMK2A variant associated with intellectual disability causes exaggerated long-term potentiation and learning impairments, *Translational psychiatry*, 15(1), 95. (2025).

上皮成長因子の O-GlcNAc 修飾の癌細胞増殖における機能解析

田 島 優 子

(名古屋大学大学院 医学系研究科 分子細胞化学分野)

【目的】

糖鎖修飾はタンパク質の翻訳後修飾の一つで、立体構造の構築や機能に重要である。私が所属する研究室では、以前に NOTCH 受容体に O-GlcNAc 修飾を発見して、O-GlcNAc 転移酵素 EOGT (EGF domain-specific O-linked N-acetylglucosamine transferase) を同定した^{1, 2)}。EOGT 欠損マウスは大きな表現型を示さず、細胞外 O-GlcNAc 修飾の機能は未だに不明な点が多い。

私は、EOGT の基質になるタンパク質として、細胞増殖に働く上皮成長因子 (EGF) ファミリーに着目した。EGF ファミリーは、小胞体で膜貫通前駆体として合成後に切断されて分泌型となり、EGF 受容体に結合して EGFR/ErbB1 シグナル伝達を経て細胞増殖を促進する。EGF ファミリーの中で、Epigen, Epiregulin および Neuregulin の各々に、EOGT による O-GlcNAc 付加の共通アミノ酸配列³⁾を見出した。興味深いことに、培養細胞を用いた網羅的遺伝子破壊解析 (DepMap) のデータベース検索より、Epigen と EOGT は共通して、乳がん細胞の生存に高い依存性を示すことがわかった。一方で、従来、EOGT の基質として知られている NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3 は乳がん細胞の生存に明確な依存性を示さなかった。従って、乳がん細胞で、EOGT は NOTCH シグナル非依存的な分子機構を通じて細胞生存に寄与すること、その候補として、Epigen を介した EGFR シグナル経路が考えられた。

本研究の目的は、上皮成長因子が EOGT によって O-GlcNAc 修飾を受けることを検証し、O-GlcNAc 修飾の癌細胞の増殖における機能を明らかにすることである。

【方法】

1. 合成ペプチド Epiregulin, Epigen, Neuregulin への EOGT による O-GlcNAc 付加の検討

EOGT を human embryonic kidney (HEK) 293T 細胞に過剰発現させて、精製した。この EOGT と、分泌

型 Epiregulin(約 60 アミノ酸), Epigen(約 100 アミノ酸) 又は Neuregulin(約 180 アミノ酸) の合成ペプチド [ペプチド研究所], および UDP-GlcNAc を 37°C で約 18 時間, 反応させた。その後, 質量分析法 (MALDI-TOF MS 解析) によって, O-GlcNAc の有無を検出した。

2. Epiregulin の O-GlcNAc 修飾の有無による細胞増殖への影響の検討

HEK293T 細胞を 96-well plate に播種し, その翌日から 18 時間, 無血清培地で培養した。そして, リコンビナント EGF, 合成ペプチドの分泌型 Epiregulin または Epiregulin O-GlcNAc 付加体を培地に加えて, 3 日間培養した。24 時間ごとに, Cell counting kit-8 [DOJINDO] を用いて, 細胞増殖を測定した。

3. 細胞に発現させた Epiregulin の O-GlcNAc 修飾構造の同定

以前に本研究室で樹立した EOGT 欠損 HEK293T 細胞に, 分泌型 Epiregulin-MycHis₆ と EOGT を過剰発現させて, 培地中の Epiregulin-MycHis₆ を Ni-NTA Agarose を用いて精製した。その後, ポリアクリルアミド電気泳動法で分離し, GelCode™ Blue [Thermo Fisher scientific] 染色後, Epiregulin-MycHis₆ のバンドをゲルから切り出した。トリプシン処理してペプチドを抽出し, 質量分析法 (LC-MS/MS) で分析した。得られたデータを Byonic software [Protein Metrics] を用いて解析し, 糖鎖修飾の構造を同定した。

4. EOGT と基質複合体の結晶構造の同定の試み

EOGT の基質認識機構を理解するために, EOGT と基質との複合体の結晶構造の解明を試みた。HEK293T 細胞から精製した EOGT を, ドナー基質 UDP または UDP-GlcNAc, およびアクセプター基質 dEGF20 と反応させて結晶化を試みた。本実験は, 長江雅倫先生 (大阪大学) のご協力のもと行った。

【結果】

1. 合成ペプチド Epiregulin, Epigen, Neuregulin への EOGT による O-GlcNAc 付加の検討

Epiregulin に, O-GlcNAc 付加を検出した。一方, Epigen と Neuregulin では, O-GlcNAc 付加体は検出されなかった。よって, Epiregulin は, *in vitro* 反応で, EOGT によって, O-GlcNAc が付加されることがわかった。また, Epiregulin, Epigen および Neuregulin で,

単体だけでなく, 二量体, 三量体も検出された。

2. Epiregulin の O-GlcNAc 修飾の有無による細胞増殖への影響の検討

Epiregulin の O-GlcNAc 付加体に生理的な役割があるかを検討するために, Epiregulin の O-GlcNAc の有無が HEK293T 細胞の増殖に影響するかを検討した。Epiregulin は, 細胞増殖に働く EGF ファミリーの一つで, EGF 受容体に結合して EGFR/ErbB1 シグナル伝達を経て細胞増殖を促進する。細胞増殖を検討した結果, Epiregulin は, EGF と同様に細胞増殖を促進した。一方で, Epiregulin O-GlcNAc 付加体の添加では, 細胞増殖が抑制された。よって, Epiregulin の O-GlcNAc 修飾は, Epiregulin の細胞増殖促進作用を阻害する効果があることがわかった。

3. 細胞に発現させた Epiregulin の O-GlcNAc 修飾構造の同定

Epiregulin を細胞に発現させて, さらに EOGT の過剰発現で O-GlcNAc 修飾を受けることを確認した。EOGT の過剰発現の有無で, ポリアクリルアミド電気泳動での Epiregulin の移動距離に差異を生じた。EOGT を過剰発現させた場合は移動距離が少し減少した。さらに, Epiregulin を精製して質量分析を行い, 糖鎖修飾構造を同定した。O-GlcNAc は, ガラクトース (Gal) とシアル酸 (Sia) で伸長されて, O-GlcNAc, O-GlcNAc-Gal, O-GlcNAc-Gal-Sia の 3 種類の構造が存在することが明らかになった。

4. EOGT と基質複合体の結晶構造の同定の試み

EOGT と UDP の複合体の結晶を検出することに成功したが, アクセプター基質を含む 3 つの複合体の検出は成功しなかった。得られた EOGT-UDP 複合体の結晶構造を詳細に解析し, EOGT が UDP を認識する分子機構を明らかにした。

【考察】

Epiregulin は EOGT によって O-GlcNAc 修飾を受けるが, Epigen と Neuregulin は, EOGT の O-GlcNAc 付加配列が存在しながら, EOGT による修飾を受けなかった。その理由は, 現在不明である。EOGT は正しく折り畳まれた EGF ドメインを認識するので⁴⁾, 本実験で使用した Epigen と Neuregulin の立体構造が不完全だった可能性がある。今後, 細胞に Epigen と

Neuregulin を発現させて、修飾の有無の再検討を行う。また、これらの基質認識の違いを理解するためにも、アクセプター基質を含む結晶構造の解明を進める。

Epiregulin O-GlcNAc 付加体は細胞増殖を抑制したことから、細胞外 O-GlcNAc 修飾が EGF 受容体との結合を阻害すると考えられる。この作用機序は、今後さらに詳細を明らかにする。

これまで EOGT の基質として、細胞の運命や増殖を決定する NOTCH シグナル経路で働く NOTCH 受容体が主に研究されてきた。本研究結果から、EOGT は、細胞増殖シグナルの一つである EGFR/ErbB1 シグナル経路に関与することが明らかになった。

【文献】

- 1) Sakaidani, Y., Nomura, T., Matsuura, A., Ito, M., Suzuki, E., Murakami, K., Nadano, D., Matsuda, T., Furukawa, K. & Okajima, T. (2011) O-linked-N-acetylglucosamine on extracellular protein domains mediates epithelial cell-matrix interactions. *Nat Commun.* **2** 583 (2011).
- 2) Sakaidani, Y., Ichianagi, N., Saito, C., Nomura, T., Ito, M., Nishio, Y., Nadano, D., Matsuda, T., Furukawa, K., Okajima, T. O-linked-N-acetylglucosamine modification of mammalian Notch receptors by an atypical O-GlcNAc transferase Eogt1. *Biochem. Biophys. Res Commun.* **419** 14-19 (2012).
- 3) Tsukamoto, Y. & Okajima, T. O-GlcNAc glycans in the mammalian extracellular environment. *Carbohydr Res.* **549**, 109378 (2025).
- 4) *Ogawa, M., *Tashima, Y., Sakaguchi, Y., Takeuchi, H., Okajima, T. Contribution of extracellular O-GlcNAc to the stability of folded epidermal growth factor-like domains and Notch1 trafficking. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* **526**, 184-190 (2020). *Equally contributed.

KRAS/MAPK シグナル遮断への膵がんの獲得耐性の SRC family kinase 標的化による克服

田中啓祥

(岡山大学 学術研究院医歯薬学域、薬学部)

【背景・目的】

膵がん患者の9割以上において、がん遺伝子 KRAS の活性化変異 (KRAS^{mut}) が認められる。その下流では、mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路 RAF/MEK/ERK の活性化が、病態進展に特に重要とされる。しかし KRAS^{mut} 経路に強く依存する膵がんでも、MAPK 遮断は、獲得耐性出現のため臨床的には無効だった。そこで、本研究では、筆者らが KRAS/MAPK シグナル遮断による発現誘導を見出した SRC family kinase X に着目し、X 阻害剤併用により KRAS/MAPK シグナル遮断に対する獲得耐性の出現を抑制できるか検証することとした。

【方法】

検討1) KRAS/MAPK 遮断 + X 阻害剤の併用効果の検証

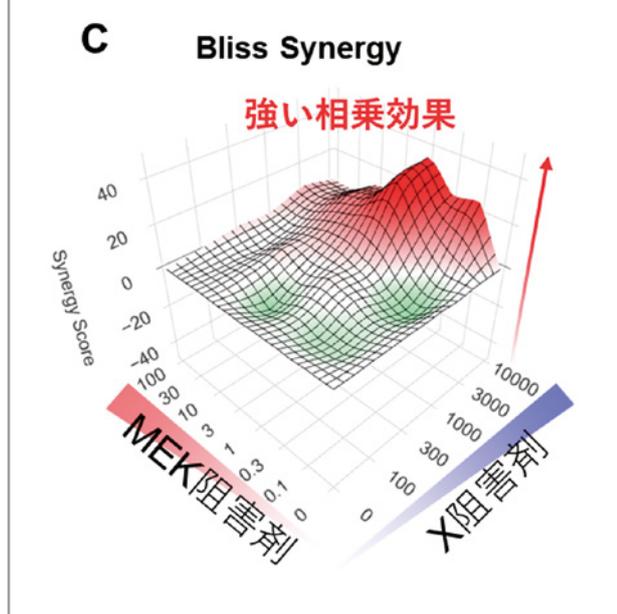
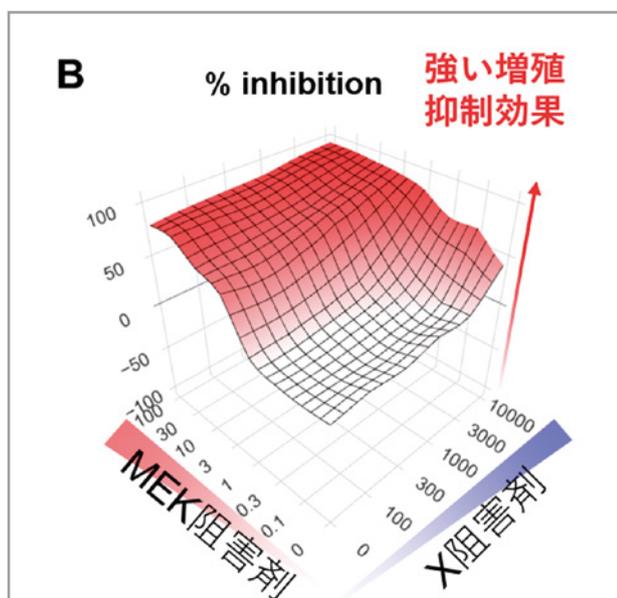
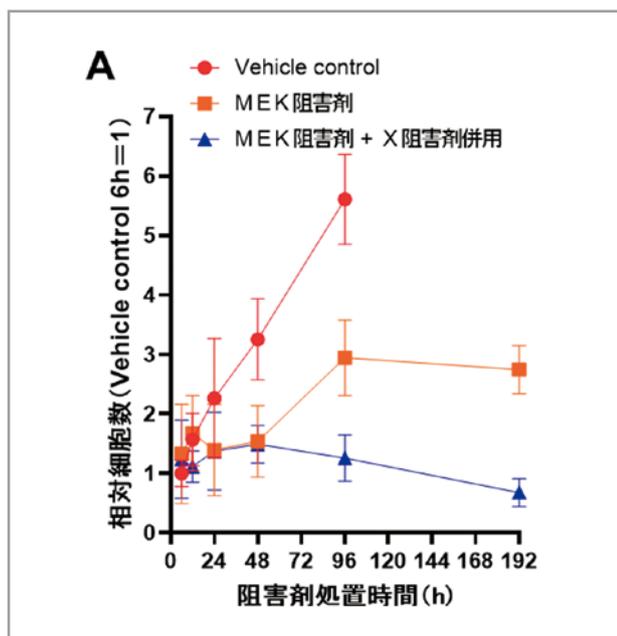
検証: Vehicle control, MEK 阻害剤のみ, MEK 阻害剤 + X 阻害剤併用の3条件下で、培地への BrdU の持続添加により細胞数と BrdU 陽性率をタイムコースで追跡した。さらに、分化度や遺伝子変異プロファイルの異なる5種類のヒト膵がん細胞株に対し、MEK 阻害剤と X 阻害剤をそれぞれ各種濃度で組み合わせて処置し、増殖に与える影響と、併用による相乗効果の有無を検証した。

検討2) 長期 time-to-progression アッセイ

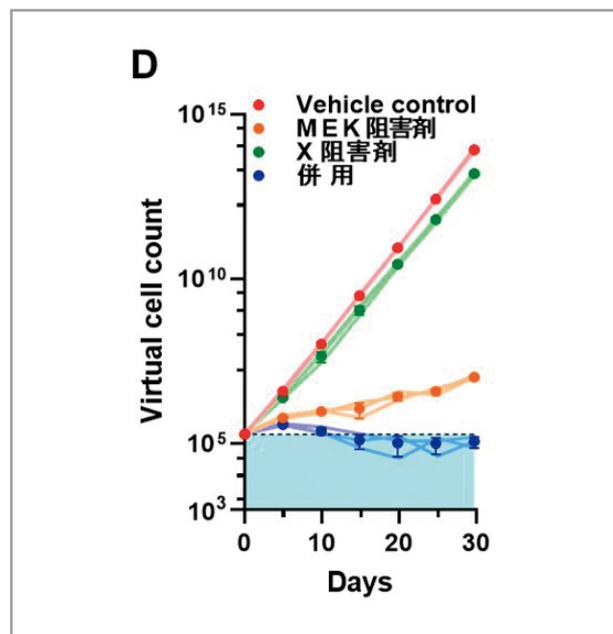
アッセイ: 膵がん細胞株を vehicle control, KRAS/MAPK シグナル阻害剤単独, X 阻害剤単独, 併用の4条件下で、長期的に連続継代し、膵がん細胞に対する増殖抑制効果を比較した。

【結果】

結果1) 投与開始 48 h 時点までにおいて併用効果は明らかではなかったが、96 h 時点では有意な BrdU 陽性率の抑制と細胞数減少が認められた (図 A)。こうした併用効果は、検証した全膵がん細胞株において、広い濃度域において相乗的であった (図 B, C)。



結果 2) 連続継代 30 日時点において、併用療法のみ膀胱がん細胞の増殖を抑制し続けた (図 D)。



【考察】

SRC family kinase X の単独の阻害では膀胱がん細胞増殖の抑制効果は弱く、KRAS/MAPK 遮断条件時に感受性が出現する。KRAS/MAPK 遮断との併用は広い濃度域で相乗的な増殖抑制効果を示し、獲得耐性の出現を抑制できることが示唆された。MEK 阻害剤単独では生き延びる膀胱がん細胞に対し細胞死を誘導していることが示唆され (図 A)、詳細な作用機序の解明に今後取り組む。

様々なウイルスに最適なレポータータンパク質の開発

田村 友和

(九州大学 大学院医学研究院)

【目的】

ウイルス学の研究では、レポータータンパク質遺伝子を搭載した組換えウイルスが作製され、モデル動物での感染動態あるいはウイルス感染の診断に応用されてきた。しかし、現状レポーターを搭載した組換えウイルスの作製は汎用化されていない。本研究ではウイルス遺伝子の GC 含量の違いに着目し、全てのウイルスに対して効率よく機能を発揮するレポータータンパ

ク質を開発するために企図された。

【方法】

まず、野生型では GC 含量が 53% である NanoLuc (Nluc) レポーター遺伝子のそれを 34% 及び 64% へ同義置換により改変した。その後、プロモーターアッセイにて哺乳動物でのタンパク発現を解析した。次に、新型コロナウイルス（低 GC 含量：38%）、日本脳炎ウイルス（中 GC 含量：53%）、C 型肝炎ウイルス（高 GC 含量：58%）の各ゲノムに搭載し、組換えウイルスを作製した。各種感受性培養細胞での複製能及びルシフェラーゼ活性を評価した。さらに、挿入した Nluc レポーター遺伝子の安定性を評価するために 10 回連続継代し、遺伝子解析に供した。

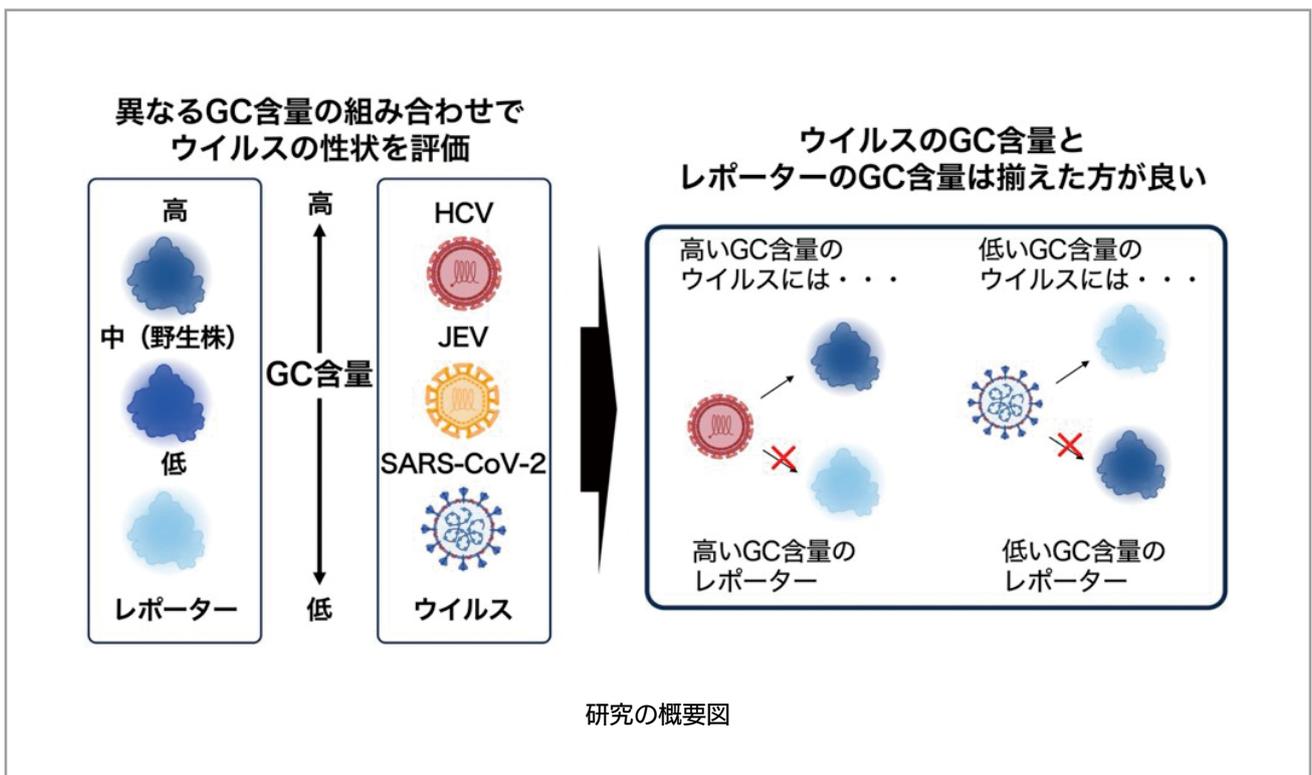
【結果】

本研究で同義置換により遺伝子改変した Nluc の哺乳動物における翻訳効率には有意に変化しなかった。また、各種 Nluc を搭載した組換えウイルスの増殖性は GC 含量の違いに関わらず、有意な差を認めなかった。GC 含量が新型コロナウイルス遺伝子と不一致の Nluc 遺伝子を搭載した組換えウイルスでは、継代により Nluc 領域に欠失を認めた。各種 Nluc を搭載した組換え C 型肝炎ウイルスは、継代による遺伝子欠損は認めなかったものの、ウイルスの遺伝子の GC 含量に不一致な Nluc は、

継代ごとにウイルスに一致するような変異が蓄積されていることがわかった。一方、組換え日本脳炎ウイルスでは、Nluc 遺伝子の GC 含量に依存した顕著な遺伝子変化を認めなかった。

【考察】

ウイルスゲノムの GC 含量とレポーター遺伝子の GC 含量の不一致は、ウイルス遺伝子の安定性に不具合が生じ、元来のウイルス遺伝子のそれに一致するように適応することが各種組換えウイルスと連続継代実験と遺伝子解析によりわかった。すなわち、ウイルス遺伝子とレポーター遺伝子の GC 含量を一致させることが、レポーターウイルスとしての機能を十分に発揮させるために必要であることがわかった。



酵素の安定発現を実現させる酵素間「協奏」作用の解析

茶 谷 悠 平

(岡山大学 学術研究院 環境生命自然科学学域 (理))

【背景】

細胞は多種多様な配列、活性を持つタンパク質を活用し、生命活動を行っている。しかしそのタンパク質を合成する分子機械リボソームは決して万能ではなく、ある種の配列の合成に困難が伴っていることが明らかとなりつつある^{1,2)}。一方、そのような「難合成配列」の合成を促進するよう、さまざまな翻訳促進因子がリボソームに作用し、タンパク質合成機能を拡張していることも示されつつある³⁾。本研究では、そうした翻訳促進因子の解析途上で明らかとなった、因子間の協奏的作用の作動原理について、遺伝学、構造生物学的観点から原理の解明を試みた。

【結果】

1. 翻訳促進因子間の協奏に必要な機能ドメインの特定

翻訳促進因子が機能するにあたり、どの機能ドメインが協奏作用に重要かを明らかにする目的で、種々のドメイン欠損変異体を作成した。それぞれの変異体からタンパク質を発現、精製し、その活性を無細胞翻訳系 PURE system⁴⁾を用いた実験系で評価した。その結果、難合成配列によって構造異常が発生した箇所に作用する部位を欠損していると、上記の協奏効果が失われることが明らかとなった。また、作用後の構造変化に重要と目される残基に変異を導入した場合も、同様に活性が失われた。以上より、翻訳促進因子は異常が発生した箇所に直接的に作用し、その後続いて発生する構造変化によって難合成アミノ酸配列の合成を促進していると予想される。

2. 相互作用部位の網羅的変異解析

翻訳促進因子と異常発生箇所との相互作用が重要であるかを確認する目的で、当該ドメインの各アミノ酸残基に網羅的にアラニン置換変異を導入し、個々の変異体の活性を評価した。結果、活性に影響する残基を複数特定するに至った。今後、当該部位と構造情報との照合を進め、協奏作用の分子機構の詳細について、

さらに検討を進めていく。

【結論】

本研究より、翻訳促進因子の協奏による難合成アミノ酸配列の合成促進メカニズムの一端が明らかにされた。ただし、現在の天然型配列では、その合成促進効果にはある程度の限界が存在することも示唆されつつある。この点を解消することは、難合成アミノ酸配列に関するさまざまな問題の解決につながるものと期待している。

【参考文献】

1. Chiba, S., Fujiwara, K., Chadani, Y. & Taguchi, H. Nascent chain-mediated translation regulation in bacteria: translation arrest and intrinsic ribosome destabilization. *J. Biochem.* **173**, 227–236 (2023).
2. Ando, Y. *et al.* A mini-hairpin shaped nascent peptide blocks translation termination by a distinct mechanism. *Nat. Commun.* **16**, 2323 (2025).
3. Chadani, Y. *et al.* The ABCF proteins in *Escherichia coli* individually cope with ‘hard-to-translate’ nascent peptide sequences. *Nucleic Acids Res.* **52**, 5825–5840 (2024).
4. Shimizu, Y. *et al.* Cell-free translation reconstituted with purified components. *Nat. Biotechnol.* **19**, 751–755 (2001).

硫黄資化に関わるチオ硫酸イオン分解酵素の解析

塚 崎 智 也

(奈良先端科学技術大学院大学)

【目的】

細菌は外界から硫黄化合物を取り込み、システインを合成して利用することができる。近年、膜タンパク質 YeeE がチオ硫酸イオンの取り込み、細胞質酵素 YeeD がその分解に関与することが明らかとなってきた。本研究では、YeeD がどのようにチオ硫酸イオンを分解するのかに焦点を当て、活性部位であるシステイン残基や周辺アミノ酸の役割を明らかにすることを目的とした。

【方法】

大腸菌の YeeD 欠損株を用い、YeeD およびその変異体を発現させ、チオ硫酸イオンを唯一の硫黄源とした培地で生育相補活性を評価した。変異体は、活性部位のシステイン残基やその近傍のアミノ酸をアラニンに置換したものをを用いた。また、精製した YeeD を異なる条件下で基質と反応させ、質量分析により活性部位システインの修飾状態を解析した。さらに、YeeD の立体構造を明らかにするため、結晶化構造解析にも取り組んだ。

【結果】

活性部位のシステインをアラニンに置換するとチオ硫酸利用能が失われ、生育相補活性が消失した。このシステインは特徴的なシステインプロリンモチーフに含まれるが、隣接するプロリン残基は必須ではないことが示された。一方で、YeeE との相互作用面に存在するアミノ酸残基が機能維持に重要であることが明らかになった。質量分析の結果、活性部位のシステインは複数の酸化状態を取り得ることが確認され、通常のシステインよりも高い反応性を有することが示唆された。

【考察】

以上の結果から、YeeE がチオ硫酸イオンを取り込むだけでは不十分であり、細胞質側で YeeD がチオ硫酸イオンを分解する仕組みが必要であるとの結論に至った。特に YeeE との結合が正しく形成され、YeeD の活性部位が決まったところに位置することで、効率よくチオ硫酸イオンを細胞が利用可能な形に還元できると考えられる。本研究は、細菌がどのように硫黄を資化するかの分子メカニズムを理解する新しい手がかりを与えるものであり、今後の代謝工学や抗菌剤開発にもつながる可能性がある。

【文献】

Ikei, M. et al. : YeeD is an essential partner for YeeE-mediated thiosulfate uptake in bacteria and regulates thiosulfate ion decomposition, PLoS Biol., 22; e3002601 (2024).

プロリン異性化酵素による脂質蓄積能制御機構の解明と異所性脂肪の治療法開発

中津 祐介

(広島大学)

【目的】

我々は、以前にプロリン異性化酵素 Pin1 の脂肪細胞での発現が肥満時には増加すること、脂肪細胞特異的 Pin1 KO マウスは高脂肪食負荷による肥満や脂肪肝に対して抵抗性を示すことを報告した (Cell Rep., 2019; Metabolism 2021)。そこで、さらに解析を進めたところ、Pin1 KO マウスの内臓脂肪は脂肪滴の大きさは変わらないが、組織重量当たりのトリグリセリド (TG) 含量が WT マウスの内臓脂肪と比べて高く、アディポネクチンの発現量も高かった。すなわち、Pin1 は脂肪細胞のサイズ非依存的に脂質蓄積能や機能を制御する因子であると考えられた。

そこで、本研究では、肥満時に脂肪細胞の機能が低下する機序の解明と Pin1 による脂肪細胞機能制御について検討する。

【方法及び結果】

(1) 肥満時の脂肪細胞機能低下の機序の解明

3T3-L1 細胞に非致死的な濃度のフェロトシス誘導剤 Erastin を添加すると、アディポネクチンの発現量は顕著に低下した。一方で、TG 含量に関しては顕著な影響は認められなかった。

(2) Pin1 による脂肪細胞機能制御の検討

まず、Pin1 が脂質蓄積能を制御する機序について検討を行った。脂肪酸合成に関する遺伝子の発現変動について検討したところ、SCD1 の発現量が KO マウスの脂肪組織で顕著に増加していた。そこで、SCD1 を発現制御するメカニズムについて検討したところ、Pin1 は転写因子 SREBP1 に結合することを見出した。また、Pin1 は脂肪滴を形成するペリリピンとも結合したが、ペリリピンの発現量は WT と KO で明確な差はなかった。

【考察】

一価不飽和脂肪酸を合成する SCD1 は、脂肪の流動性を高めることで質の高い脂肪滴形成に寄与すること

が報告されている。これらのことを考え合わせると過栄養で発現が上昇した Pin1 は、SCD1 の発現を抑制し、結果的に質の悪い脂肪滴を作り出していると考えられた。一方、ACC や FASN の発現量は変化しなかったことから、Pin1 は SREBP1 以外の転写因子と結合し機能制御している可能性も考えられた。また、Pin1 によるペリリピン機能制御についても今後検討が必要である。

一方、アディポネクチン発現低下の原因として非致死的なフェロトーシスが関与している可能性が考えられた。今後、Pin1 とフェロトーシスとの関係についても検討していく。

新奇セラミド代謝酵素の発見と生理機能解析

中村 浩之

(千葉大学大学院薬学研究院)

【目的】

セラミドはスフィンゴ脂質の中心に位置する脂質であり、様々な代謝酵素により代謝される(図1)。セラミド代謝酵素の1つであるセラミドキナーゼ(CERK)はセラミドをリン酸化してセラミド-1-リン酸(C1P)を生成する酵素である。また、中村は最近、ジアシルグリセロールζ(DGK ζ)がセラミドをリン酸化してC1Pを生成することを明らかにした¹⁾。しかし、CERK及びDGK ζを欠損させた細胞においてもC1Pが5割程度しか減少しないことから、これら酵素に依存しないC1P産生酵素の存在が強く示唆されている。さらに、中村は細胞ホモジネートを特定のバッファー条件下で反応させるとCERK/DGK ζに依存しない酵素によってC1Pが産生されることを見出した。そこで本研究では、この新奇C1P産生酵素を同定し、その生理機能を解析することで、これまで不明瞭であったC1Pの生成経路および生理機能の全貌を解明することを目的とした。

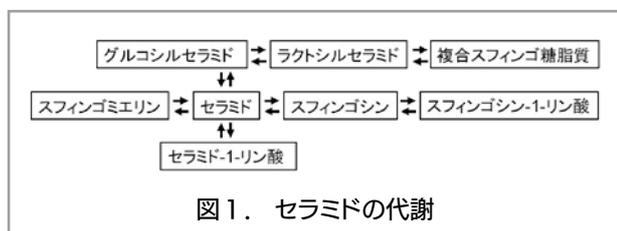


図1. セラミドの代謝

【方法】

新奇 CERK の活性は、細胞またはマウス脳のホモジネートを基質セラミドおよび ATP を含む適切なバッファー条件下で反応させ、生成された C1P を LC-MS/MS により定量することで評価した。なお、プロテオミクス解析は「かずさ DNA 研究所」に委託して実施した。

【結果】

様々なヒト細胞株において新奇 CERK 活性を測定した結果、活性が高い細胞と著しく低い細胞が存在することを見出した。さらに、マウス各組織における活性を測定したところ、大脳において特に高い活性が認められた。そこで、これらの細胞株およびマウス大脳を用いて各種カラムクロマトグラフィーによる分画を行い、活性の高いフラクションを得ることに成功した。このフラクションに対してプロテオミクス解析を実施した結果、複数の候補分子が同定され、現在これら酵素の機能検証を進めている。

【考察】

今後、本研究で得られた複数の候補分子の中から新奇 CERK を同定することで、C1P 産生経路の全貌解明につながり、さらには C1P の生理機能解析が飛躍的に進展することが期待される。

【文献】

1) Yamazaki, A., Kawashima, A., Honda, T., Kohama, T., Murakami, C., Sakane, F., Murayama, T. & Nakamura, H.: Identification and characterization of diacylglycerol kinaseζ as a novel enzyme producing ceramide-1-phosphate, *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell. Biol. Lipids*, 1868, 159307 (2023).

血清 N 結合型糖鎖プロファイル分析による乾癬の新規バイオマーカーの探索

西村 健太郎

(福井大学)

【背景・目的】

乾癬は、免疫学的異常を背景として、皮膚症状のみならず関節炎や爪病変など多彩な表現型を示す炎症性

皮膚疾患である。近年、分子標的薬や生物学的製剤など治療面の進歩により高い治療効果を期待できる選択肢が増えた一方で、病勢をよく反映する特異的バイオマーカーは十分に確立されていない。

糖鎖は細胞やタンパク質の表面に存在する分子であり、構成する分枝鎖および単糖の組み合わせによる構造の多様性と特異性から、多彩な機能を担っている。近年様々な炎症性疾患の発症・進展における糖鎖修飾異常の関与が指摘され、治療標的ならびにバイオマーカーとしての可能性が注目されている。

申請者らは以前より民間企業と共同し、N結合型糖鎖のプロファイルと慢性皮膚疾患の関連について検討を進めてきた。本研究では特定の血清中N結合型糖鎖プロファイルが乾癬の病勢に対するバイオマーカーとして利用できる可能性を検討した。

【方法】

(1) 血清N型糖鎖プロファイル分析

福井大学医学部附属病院皮膚科に通院中の患者（乾癬45人・アトピー性皮膚炎12人）、健常ボランティア（19人）より採取した血清を材料として用いた。血清中N結合型糖鎖を切断酵素により切り出し、蛍光標識した後、高速液体クロマトグラフィーで分析し、ジシアロ型糖鎖とフコシル化アシアロ型糖鎖の蛍光強度をそれぞれ測定した。

(2) 統計解析

乾癬患者群・アトピー性皮膚炎患者群・健常人群のサンプルにおいて、ジシアロ型糖鎖とフコシル化アシアロ型糖鎖の蛍光強度の比を計算した。

各疾患群・健常群の蛍光強度比をKruskal-Wallis検定、Steel-Dwass検定を用いて群間比較した。また、乾癬患者群において、皮膚症状の重症度であるPASIスコアと蛍光強度比との相関をSpearmanの順位相関係数を用いて検討した。治療前後の血清を採取できた患者においては、治療前後の両者の変化量についても同様に相関を検討した。さらに、関節症状の有無や基礎疾患を含めた患者背景と蛍光強度比の相関についても検討した。

【結果】

乾癬患者群では、健常人群と比較して蛍光強度比が有意に高値を示した ($p < 0.001$)。一方、アトピー性皮

膚炎患者群・健常人群間では有意差がみられなかった。

乾癬患者群において、皮膚症状の重症度と蛍光強度比の間には有意な正相関を認め（相関係数0.485 $p < 0.001$ ）、両者の変化量の間にも有意な正相関を認めた（相関係数0.467 $p < 0.001$ ）。関節症状との相関は明らかにはみられず、基礎疾患を含めた患者背景との相関もみられなかった。

【考察】

本研究の結果から、血清N結合型糖鎖は乾癬において皮膚症状の重症度や治療反応性を鋭敏に反映し、同疾患のmanagementにおいて有用な新規バイオマーカーとなる可能性が示唆された。しかし、本研究は単施設における比較的少数例を対象とした後向き検討であるためバイアスが潜在する可能性は否定できず、今後より多くの症例を対象とした前向き研究が望まれる。

独自の海洋メタゲノムから発見した小型CRISPR-Casエフェクターの機能構造解析とゲノム編集への利用

沼田 倫 征

(九州大学大学院農学研究院)

【目的】

CRISPR-Cas系は様々な生物種において利用可能なゲノム編集ツールとして大きな注目を集めており、生命科学に革命を起こしつつある。一方で、ゲノム上の予期しない場所の遺伝情報をランダムに書き換えてしまうオフターゲット効果も確認されており、ゲノムを人為的に改変する上での大きな支障となっている。今後、CRISPR-Cas系をさらに有益な分子ツールとして多方面において利活用するためには、オフターゲット効果を抑制する技術の開発、既存のゲノム編集技術の改善、さらには大規模な塩基配列の挿入や欠失を可能にする新たなゲノム編集技術の開発が不可欠である。これを実現するためには、CRISPR-Cas系の作動原理を詳細に理解することが不可欠であると同時に、新たな分子特性をもったCRISPR-Cas因子の発見と開発が強く求められる。自然界において、CRISPR-Cas系は原核生物における獲得免疫に重要な役割を果たしてい

る。Cas タンパク質が crRNA と結合してエフェクターを形成し、このエフェクターが crRNA の塩基配列と相同なウイルス核酸を配列特異的に認識して分解する。この配列特異的な DNA 切断活性を利用してゲノム編集技術が開発されており、現在、Cas タンパク質の一種である Cas9 を用いたゲノム編集が主流となっている。本研究では、環境メタゲノムからの新規な Cas 候補遺伝子を発掘するとともに、新たな Cas タンパク質の機能構造解析を実施し、その分子特性を利用したゲノム編集技術の開発を目的としている。

【方法】

海水サンプルを濾過してバクテリア画分を分画した。得られたサンプルから DNA を抽出しメタゲノムを調製した。次世代シーケンサー (NGS) を用いて塩基配列を決定し、配列解析によって独自のメタゲノムデータベースを構築した。得られたデータベースを解析し、これまでに報告されている Cas9 や Cas12 と配列相同性の低い Cas タンパク質を検索した。四種類の小型 Cas12 (Cas12.1 ~ Cas12.4) をコードする遺伝子を選抜した。Cas12.1 ~ Cas12.4 およびその周辺の DNA 領域をそれぞれ PCR により増幅して発現ベクターにクローニングした。このプラスミドを用いて大腸菌 BL21(DE3)CodonPlus RIL 株を形質転換し、大腸菌内において Cas12 タンパク質を産生した。超音波破碎によって大腸菌から目的タンパク質を抽出し、各種クロマトグラフィーを用いて Cas12 タンパク質を精製した。精製した Cas12 に結合していた RNA を NGS により解析した。また、精製した Cas12 エフェクターの二本鎖 DNA 切断活性を調べるとともに、PAM 配列を次世代シーケンサーにより決定した。さらに、標的 DNA と結合した Cas12 エフェクターの立体構造をクライオ電子顕微鏡単粒子解析により決定した。

【結果】

海洋メタゲノムデータを解析した結果、これまでに報告されている Cas12 と配列相同性が低く、かつ分子量の小さな Cas12 タンパク質をコードすると推定される遺伝子を四種類同定した (Cas12.1 ~ Cas12.4)。これら Cas12.1 ~ Cas12.4 の遺伝子を含む周辺 DNA 配列を大腸菌発現ベクターにクローニングして、大腸菌内でタンパク質を産生させた。大腸菌細胞を破碎後、ア

フィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて Cas12.1 および Cas12.2 を精製した。精製した Cas12.1 と Cas12.2 は核酸を含んでいた。核酸を抽出して分析した結果、結合していた核酸は RNA であることが明らかになった。RNA-seq により配列を決定したところ、この核酸は、各 *cas12* 遺伝子の周辺領域にコードされている crRNA であることが明らかとなった。Cas12.1 と Cas12.2 は、crRNA のスペーサーに対応するプロトスペーサーをもった標的 DNA プラスミドを特異的に切断した。また、NGS を利用して、これら新規な Cas12 が C に富む PAM 配列を認識することが明らかとなった。さらに、クライオ電子顕微鏡単粒子解析により、標的 DNA と結合した Cas12.1 と Cas12.2 エフェクターの立体構造を決定した。立体構造を観察した結果、これらエフェクターが標的 DNA の PAM 配列を特異的に認識する仕組みが分かるとともに、標的 DNA との結合に伴って、構造変化し DNA を切断する仕組みが明らかとなった。

【考察】

海洋に由来する環境メタゲノムから、既存の Cas12 とは配列相同性の低い Cas12 をコードする四種類の遺伝子を同定した。これらのうち、Cas12.1 と Cas12.2 について crRNA と結合したタンパク質サンプルを調製し、それらが認識する PAM を決定したところ、C に富む PAM 配列を選好することが明らかとなった。これは、既知の Cas12 の多くが T に富む PAM 配列を認識する特徴と異なっていた。したがって、本研究で同定した新規な Cas12 を利用することで、PAM のレパートリーを増やすことができる。つまり、本研究で同定した Cas12 を含む多様な Cas を利用することによって、ゲノム編集の標的部位が拡張できることを意味する。クライオ電子顕微鏡単粒子解析により、Cas12.1 と Cas12.2 の立体構造を決定し、標的との結合によって Cas12 自体の構造が変化することが分かった。今後、変異体解析を含め、さらに詳細な解析を行うことで、Cas12.1 および Cas12.2 の作用機序が明らかとなり、ゲノム編集をはじめ他の用途に利用できる Cas12 の開発が期待される。

脂肪酸代謝酵素 HSD17B4 が乳がんの抗 HER2 薬感受性に関与する機構の解明

服部 奈緒子

(群馬大学 生体調節研究所 代謝システム制御分野)

【研究目的と意義】

本研究の目的は、ペルオキシソームに局在して極長鎖脂肪酸のβ酸化に関わる酵素である HSD17B4 (Type 4, 17β-hydroxysteroid dehydrogenase) が、HER2 陽性乳がんの抗 HER2 薬感受性に関わる仕組みを明らかにすることである。

申請者らはこれまでに、HER2 陽性乳がんの体細胞変異・遺伝子発現・DNA メチル化の 3 層オミクス解析から、抗 HER2 薬感受性を予測するマーカーとして *HSD17B4* 遺伝子プロモーターの DNA 高メチル化を同定、*HSD17B4* の発現は DNA メチル化によって抑制されることも見出した¹⁾。また、抗 HER2 薬感受性に関わる機構のひとつとして、HSD17B4 発現消失した細胞では Akt 活性化と解糖系依存度の上昇が生じ、その経路を遮断する抗 HER2 薬に対して脆弱になっていることを見出した²⁾。さらに、脂肪酸解析から HSD17B4 発現消失により生体膜脂質二重膜の構成要素である多価不飽和脂肪酸 (PUFA) が減少すること、メタボロームとトランスクリプトームから glycerol-3-phosphate (G3P) と dihydroxyacetone phosphate (DHAP) 比が減少、acyl-CoA ligase をコードする SLC27A2 の発現低下を見出した。原子間力顕微鏡を用いて、HSD17B4 ノックアウト細胞の細胞膜の柔軟性上昇も発見した。つまり、HSD17B4 発現消失によって、エーテル型リン脂質合成経路が低下し、細胞膜組成が変化している可能性が得られた。

そこで本研究では、脂肪酸代謝酵素 HSD17B4 が、乳がんの抗 HER2 薬感受性に関わる機構を明らかにするために、(i) HSD17B4 発現消失による細胞膜リン脂質組成の変化の同定、および (ii) 細胞膜組成と抗 HER2 薬感受性との関係の解明を行った。

【研究成果】

項目 1: HSD17B4 発現消失による細胞膜リン脂質組成の変化の同定

(1) HSD17B4 発現消失による網羅的なリン脂質組成の変化

HSD17B4 発現消失で変化する細胞膜リン脂質を同定するために、HER2 陽性乳がん細胞 2 株 (BT-474, SK-BR-3) の *HSD17B4* ノックアウトおよびコントロール細胞を用いて LC-MS/MS を行った。630 個のリン脂質を解析することができた。全リン脂質の値を用いた principle component analysis (PCA) から、まずは細胞株の違いによって分かれたが、次に *HSD17B4* ノックアウトおよびコントロールによって分かれた (図 1)。つまり、HSD17B4 発現消失によって細胞中のリン脂質全体に変化が生じていることが明らかとなった。

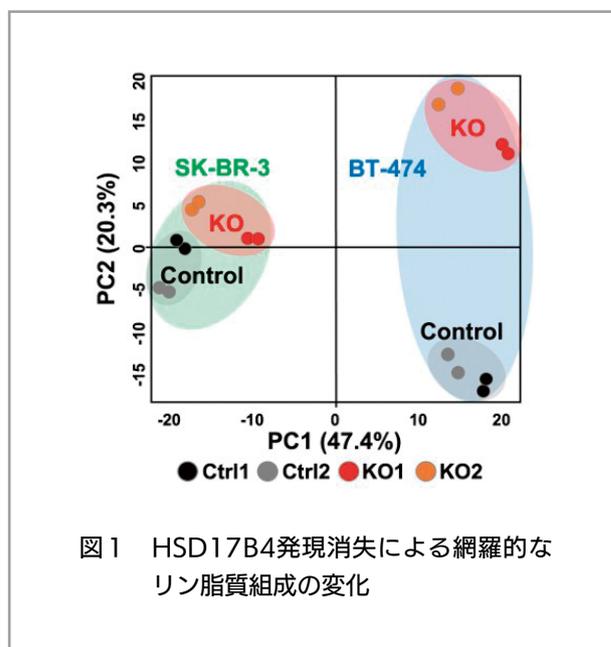


図 1 HSD17B4発現消失による網羅的なリン脂質組成の変化

(2) HSD17B4 発現消失による DHA 含有リン脂質の減少

本助成を受ける前に行った脂肪酸解析結果から、HSD17B4 発現消失によってドコサヘキサエン酸 (DHA) を含む多価不飽和脂肪酸が減少することが示されていた。そこでまず、DHA を含むリン脂質に着目したところ、phosphatidylcholine (PC) も phosphatidylethanolamine (PE) も、*HSD17B4* ノックアウト細胞で劇的に減少していた (図 2)。特に、エーテル型 DHA 含有 PE は、コントロール細胞で量が多く、ノックアウト細胞における顕著な減少が観察された。

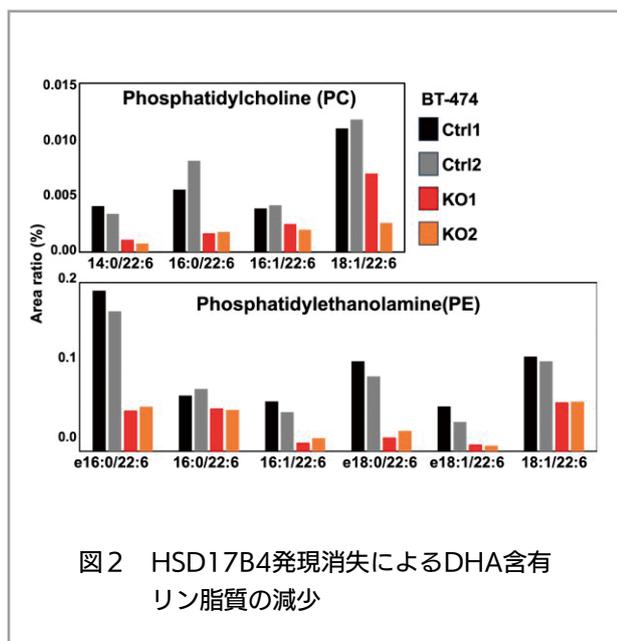


図2 HSD17B4発現消失によるDHA含有リン脂質の減少

項目2: 細胞膜組成と抗HER2薬感受性との関係の解明

(1) 抗HER2薬感受性増強効果を有する脂肪酸の同定

項目1の結果から、HSD17B4ノックアウト細胞では、DHA含有リン脂質が劇的に減少していたことから、抗HER2薬感受性におけるDHAの影響を解析した。BT-474のHSD17B4ノックアウトおよびコントロール細胞にBSA-conjugated DHA (100 μM) と lapatinib (0.03, 0.1, 0.3 μM) を添加し、24時間から56時間までの細胞生存率を、real-time Glo reagentを用いて測定した。その結果、薬剤添加後48時間でノックアウト細胞のlapatinibへの優位な感受性増強が確認された。一方で、DHA添加ノックアウト細胞では、その感受性増

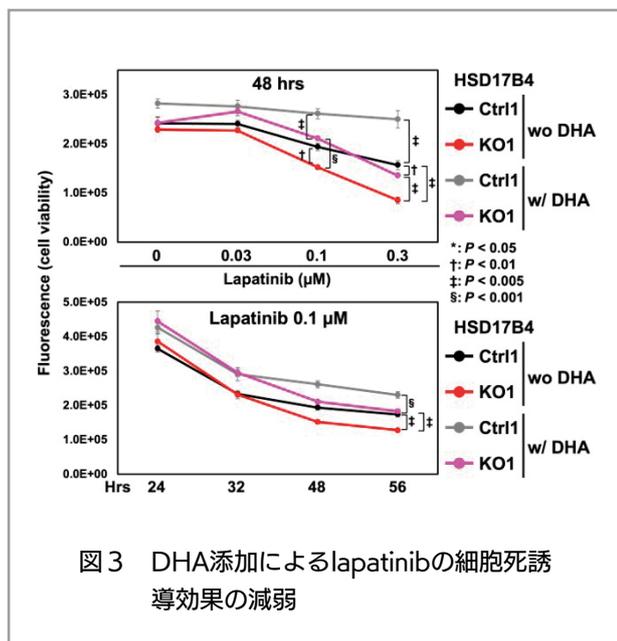


図3 DHA添加によるlapatinibの細胞死誘導効果の減弱

強がキャンセルされ、コントロール細胞と同程度となった(図3)。継時的な解析から、時間に伴って、どの細胞も生存率が低下するが、56時間でもDHA添加ノックアウト細胞はコントロールと同程度の生存率であった(図3)。DHA添加の効果はコントロール細胞でも顕著に現れた。この結果から、細胞内DHA濃度の上昇は、lapatinibの細胞死誘導効果を減弱させることが明らかとなった。

【要約と考察】

HSD17B4発現消失によってペルオキシソームでの極長鎖脂肪酸β酸化に異常が生じると、多価不飽和脂肪酸が減少する。また、アルキルDHAPが小胞体に供給されず、DHA含有リン脂質の合成が低下する。これらの変化によって、細胞膜特性の変化が誘導されることが推測される。つまり、HSD17B4は、脂肪酸の代謝を介して、細胞膜組成を変えることで、抗HER2薬感受性を制御していると考えられる(図4)。

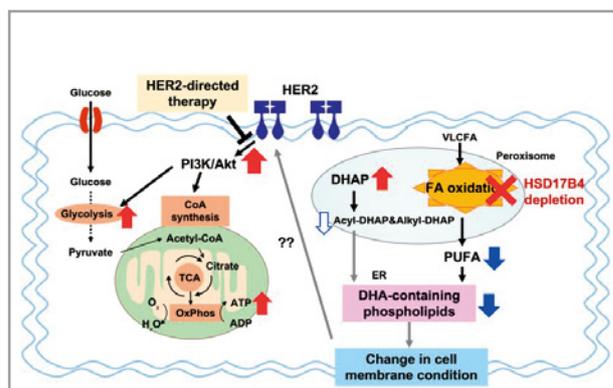


図4 脂肪酸代謝酵素HSD17B4が乳がんの抗HER2薬感受性に関する機構

【今後の計画】

(1) 1分子イメージングによるHER2受容体の局在の変化の解析

HER2局在を直接観察するために、全反射蛍光顕微鏡によるlive-cell 1分子イメージングを行う。具体的には、HSD17B4ノックアウトおよびコントロール細胞にHER2-Halo-tag融合タンパク質を発現させ、HaloTag TMR ligandを添加し、live-cell imagingを行う。また、ニシン酸とドコサヘキサエン酸を添加し、HER2局在の変化を検討する。

【準備状況】1分子イメージングに関して、予備実験としてMCF7細胞にHER2-Halo-tag融合タンパク質を発現させ、共焦点顕微鏡によってlive-cell imagingが可能なることを確認している。

(2) HER2 下流シグナルの変化の解析

生体膜組成によるHER2下流シグナルへの直接作用を証明するために、ニシン酸とドコサヘキサエン酸を添加し、PI3K/Aktパスウェイとlapatinib感受性を解析する。in vitroで結果が得られた場合は、コントロール細胞をヌードマウスに移植したxenograftモデルを用いて、通常食餌もしくはニシン酸含有食餌を与えた条件下でlapatinibを投与し、in vivo抗腫瘍効果を解析する。最後に、抗体医薬品の作用機序のひとつであるAntibody Dependent Cellular Cytotoxicity (抗体依存性細胞傷害: ADCC)活性に対する影響への解析も行う。

【準備状況】ADCC活性に関して、BT-474細胞のGFP-luciferase発現細胞を樹立済みである。

【参考文献】

1. Yamashita S, Hattori N 他 12 名 . Multi-omics analyses identify HSD17B4 methylation-silencing as a predictive and response marker of HER2-positive breast cancer to HER2-directed therapy. *Sci Rep*, 10:15530, 2020.
2. Arai N, Hattori N 他 9 名 . HSD17B4 methylation enhances glucose dependence of BT-474 breast cancer cells and increases lapatinib sensitivity. *Breast Cancer Res Treat*, 201:317-328, 2023.

WRN を介した M 期テロメア脱保護制御機構の解明

林 真理

(京都大学大学院医学研究科 先端・国際医学講座 IFOM-KU 国際共同ラボ)

【目的】

ヒト細胞の細胞周期を有糸分裂 (M) 期に停止すると、テロメアの保護機構が失われ (M 期テロメア脱保護)、テロメア末端が DNA 傷害として認識される^{1,2,3)}。我々は、RECQ ファミリー因子 WRN が Coiled-Coil ドメイン (168-333) を介して M 期テロメア脱保護を抑制すること

を発見した⁴⁾。そこで本研究では、その分子メカニズムの解明を目指した。

【仮説】

WRN は、M 期テロメア脱保護を促進する因子と結合することで、当該因子の機能を抑制する。

【方法】

M 期テロメア脱保護の抑制能をもつ WRN の断片 WRN168-333 と結合する可能性のある因子を絞り込むため、AlphaFold に基づく In Silico 解析を行った。その結果、WRN168-333 が BLM ヘリケースの二量体化に関与する Patch ドメイン (362-414)⁵⁾ と相互作用する可能性が示唆された。そこで、BLM Patch ドメインの変異体を作成し、WRN による脱保護抑制への影響を解析した。

【結果】

BLM の Patch 変異体は、M 期テロメア脱保護を促進する機能を不完全ながら保持していることがわかった。さらに WRN168-333 を過剰発現したところ、野生型の BLM 発現細胞では M 期テロメア脱保護が完全に抑制されたのに対し、BLM Patch 変異体を発現した細胞では、このような抑制は見られなかった。

【考察】

我々は BLM が M 期脱保護を促進することを発見していたが、WRN は Coiled-coil ドメインを介して BLM Patch ドメインと結合し、直接その機能を抑制するという興味深い制御機構の存在が示唆された。

【文献】

- [1] MT Hayashi, *et al.*, *NSMB*, 2012;
- [2] AJ Cesare, *et al.*, *Mol Cell*, 2013;
- [3] MT Hayashi, *et al.*, *Nature*, 2015;
- [4] D Romero-Zamora and MT Hayashi, *Sci Rep*, 2023);
- [5] C Hodoson, *et al.*, *PNAS*, 2022.

Dupilumab が菌状息肉症に及ぼす影響についての検討

久本 晃 義

(東京大学大学院)

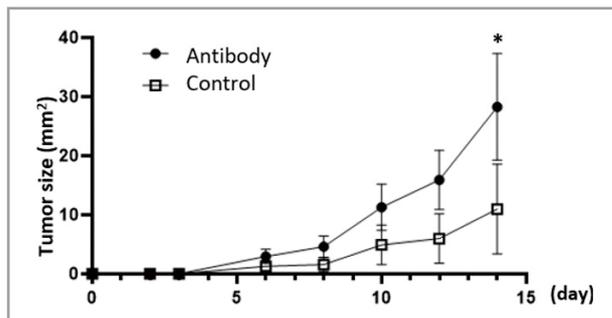
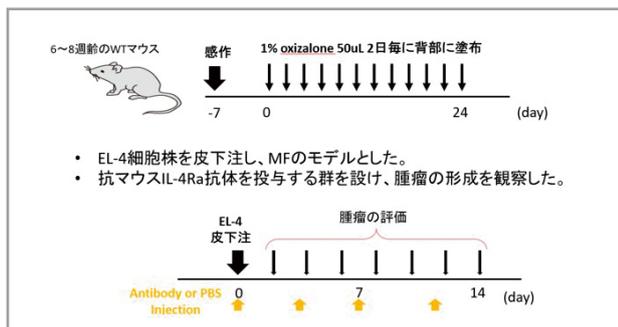
【目的】

Dupilumab がアトピー性皮膚炎 (AD) に対して使用されるようになって以降, AD に対して Dupilumab を使用した患者に皮膚 T 細胞リンパ腫, 特に菌状息肉症, セザリー症候群 (MF/SS) を発症した, という報告が相次いだ. MF/SS は悪性リンパ腫の一種でありつつ AD と同じく IL-4, IL-13 といった 2 型サイトカインの関与が知られており, 皮膚の乾燥, 紅斑や湿疹様病変, 掻痒といった AD でみられるような臨床症状がしばしばみられる. MF/SS においては腫瘍細胞自体が IL-13 を分泌しており, 自身の細胞膜上に存在する IL-13 受容体を介して自己増殖的に働くことが示されている.

Dupilumab は MF/SS に対しても効果が期待されるが, 前述の報告が相次いだことから何らかの他の機序が働いている可能性が考えられる. 本研究では, 周辺環境に注目し, Dupilumab が腫瘍の微小環境に及ぼす影響について考察した.

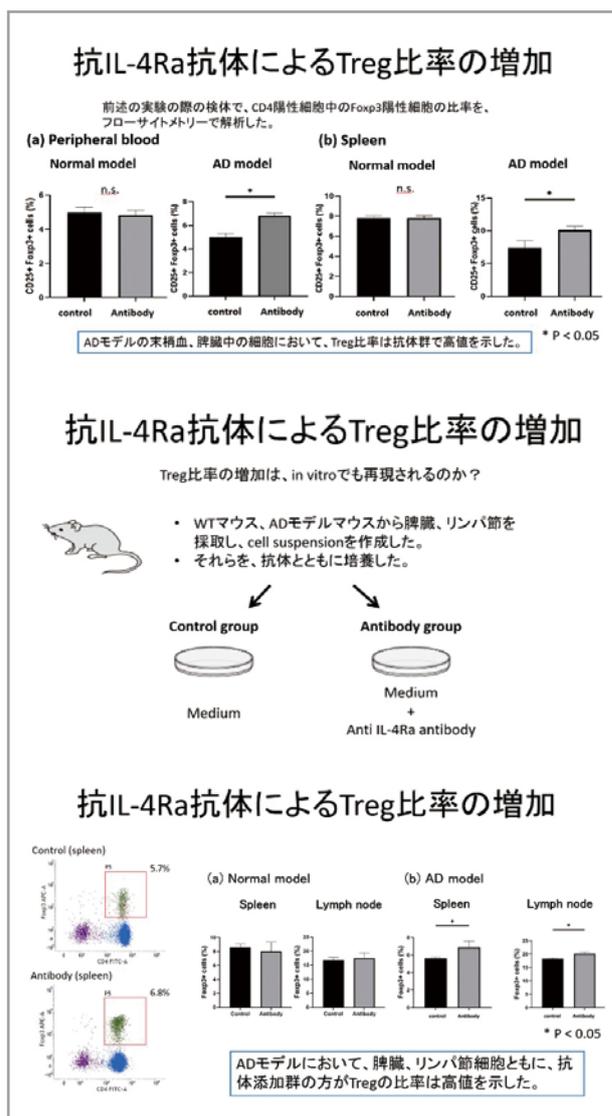
【方法 / 結果】

マウスモデルを用いた実験を行った. オキサゾロンの反復塗布により作成した AD モデルマウスに, マウス T 細胞リンパ腫細胞株である EL-4 を皮下注することで MF の疑似的なモデルとした. 抗マウス IL-4Ra 抗体 (Anti-IL4Ra Ab) を投与することで, MF に Dupilumab を投与することと同様の環境を作成した. その条件下で皮下注した腫瘍の育成速度を測定した結果, 十分な AD 炎症の環境下では, 抗体投与群で腫瘍の育成スピードが促進された.



形成されてきた腫瘍の組織学的な検討により免疫細胞, 特に Foxp3+ cell が腫瘍周囲に多くみられることが判明した. そのため, Anti-IL4Ra Ab 投与により Foxp3+ cell が誘導されるのではないかと仮説をたて, 実験を行った.

上記の AD モデルマウスに Anti-IL4Ra Ab を投与した群では, 投与しなかった群と比較して末梢血単核球中, リンパ節単核球中, 脾臓単核球中, 各々において, CD4+ cell 中の CD25+ Foxp3+ cell の割合が上昇していた.



この結果は、*in vitro*で脾臓細胞、リンパ節細胞を培養した際にも観察され、その培養上清中のIL-10濃度を測定したところ、Anti-IL4Ra Ab存在下で培養した群において、上清中のIL-10濃度は有意に高値であった。以上から、Anti-IL4Ra AbはAD環境において、Foxp3+ cellを誘導しIL-10濃度を上昇させることを示した。

【考察】

これらの結果からは、ADと同じくTh2環境であるMF/SSにおいてDupilumabを使用すると、微小環境に作用し抗腫瘍免疫を緩和させることで腫瘍細胞を増加させる可能性があることを示している。この結果は現在までに報告されている、MF/SSに対して患者によってDupilumabが多様な作用を及ぼすことを説明できる可能性があり、今後のさらなる研究が俟たれる。

異種可溶性発現に関与する特徴の解析と重複変異導入への挑戦

松井大亮

(公立千歳科学技術大学 理工学部 応用化学生物学科)

【目的】

異種発現系における酵素遺伝子の発現では、しばしば封入体が形成され、活性が失われることが大きな障害となる。これは産業利用を含む大量発現における最大のボトルネックの一つとなっている。これまでに、高度好熱菌由来タンパク質414種を大腸菌で発現させ、可溶性および不溶性の発現データを収集し、その配列情報と組み合わせることでおよそ78%の精度で変異部位を予測する「機械学習による変異予測法」を開発してきた。本研究では、この予測法に形式概念分析を適用し、可溶性発現に寄与する特徴を体系的に明らかにすることを目的とした。加えて、従来困難であった重複変異導入法の確立にも挑戦した。

【方法】

形式概念分析を用いて、二次構造やアミノ酸の疎水性度、表面露出度、保存性、配列長といった因子と可溶性発現との関連を網羅的に解析した。予測結果をもとに可溶性発現の確率が高いと示された部位を選定し、

PCRによる部位特異的変異導入を実施した。得られた変異体タンパク質については比色定量法や吸光度測定により活性を評価し、可溶性発現との関係を検証した。さらに、探索アルゴリズムである焼きなまし法を導入することで、複数の変異部位を同時に予測する方法を構築した。

【結果と考察】

可溶性発現の有無を78%の精度で予測できることを確認した。このモデルを基盤として複数の酵素配列を一残基ずつ仮想的に置換し、可溶性発現の確率が高いと推定された部位に変異を導入した結果、実際に高い成功率で可溶性変異体が得られた。またロジスティック回帰分析により、元の残基がGlyやIleであること、疎水性残基から親水性残基への置換を行うこと、さらには α ヘリックス構造に変異を導入することが可溶性発現と正の相関を示す一方で、構造中心からC α 原子までの距離が長い部位やストランドに位置する部位、あるいは変異後の残基がLeu, Arg, Serである場合には可溶性発現に負の影響を与える傾向が明らかとなった。さらに、重複変異導入についても三つの部位を対象とする予測法の確立に成功し、多点変異設計に向けた実験的基盤を構築することができた。本手法は酵素にとどまらず抗体や構造タンパク質にも展開可能であり、医薬、食品、環境といった多様な分野に波及することが期待される。

バイオコハク酸生産の律速酵素を活性化する人工抗体の最適化

松村浩由

(立命館大学 生命科学部)

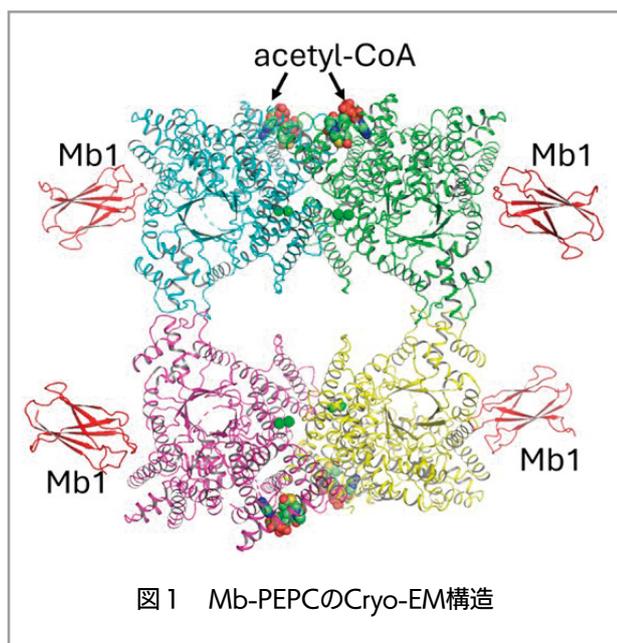
【目的】

本研究は、大腸菌でのバイオコハク酸生産の律速酵素ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC) を活性化する人工抗体を最適化することを目的とする。

PEPCはMg²⁺存在下で、ホスホエノールピルビン酸と炭酸水素イオンから、オキサロ酢酸とリン酸を生じる反応を触媒するアロステリック酵素で、クエン酸回路を円滑化する役割を担う。2018年に、大阪大学清水ら

は大腸菌で PEPC がコハク酸生産を律速することを報告した (Tokuyama, K., et al., 2018). 現在, 世界各国で大腸菌によるバイオコハク酸の生産が数千トンレベルで実施されているため (Li, C., et al., 2021), PEPC を常時活性化することができれば大腸菌によるバイオコハク酸の増産につながることを期待できる。

PEPC は大腸菌内で機能すると, 自身の阻害エフェクターのアスパラギン酸とリンゴ酸が細胞内に蓄積し, それらが PEPC をフィードバック阻害することで, コハク酸産生能を低下させる。そこで申請者らは, PEPC の活性型にのみ結合する人工抗体 (Mb1) を取得した。その Mb1 を PEPC に結合させたところ PEPC のアスパラギン酸感受性が下がること, つまり見かけ上, Mb1 が PEPC を活性化することを見出した。さらに Mb1-PEPC 複合体をクライオ電子顕微鏡 (Cryo-EM) によって構造解析したところ, Mb1 が PEPC の活性型にのみ結合する理由も分かった (図 1)。しかし, Mb1 の PEPC に対する親和性が低いため, 現時点では実用化には適していない。そこで, 本研究では, Mb1-PEPC 複合体の立体構造情報をもとに Mb1 の変異体を作製し, PEPC への親和性を向上させる。別途, 他の条件で Mb を選別することで, PEPC のアスパラギン酸感受性の脱感作を起こす人工抗体を選抜することを目的とした。

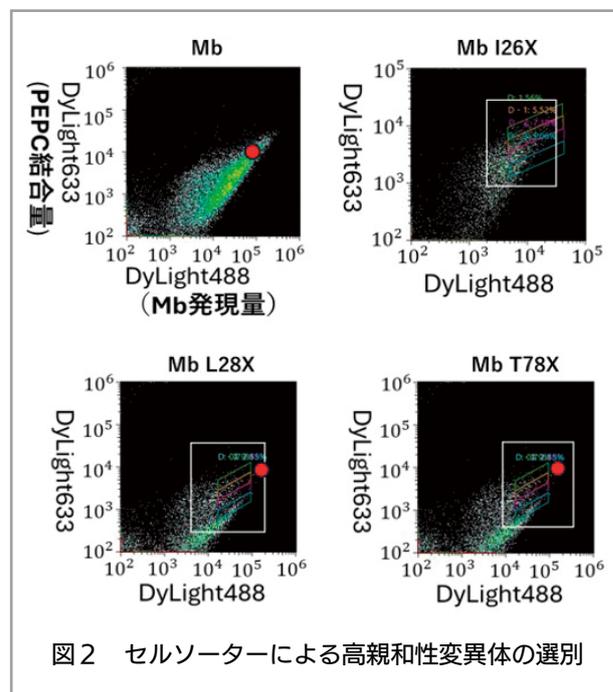


【方法】

1. 図 1 で示した Mb1-PEPC 複合体の立体構造の情報をもとに, PEPC に対する親和性を向上させる Mb1 変異

体を設計した。具体的には, Mb1-PEPC 結合界面に着目して, Mb1 の Ile26, Leu28, Thr78 にランダムにアミノ酸変異を導入した。

2. 設計した Mb を酵母で発現させ, 酵母ディスプレイによって親和性の高い変異体を選別した。ここでは, 申請者らが以前報告したセルソーターを用いた方法を用いた (図 2, Fujita, J., et al., 2023)。セルソーターで蛍光観察を行うにあたって使用した蛍光色素は一次抗体 (V5 tag 抗体) と二次抗体の Goat Anti-Mouse IgG DyLight 488nm, ならびにビオチン化させた PEPC に結合する Neutral Avidin DyLight 633nm を使用した。
3. 選別した変異体を DNA シーケンス解析してアミノ酸の変異導入を確認した。
4. 別途, Mb ライブラリから活性化エフェクターのフルクトース 1,5 ビスリン酸存在化, および不活性化エフェクターの L-アスパラギン酸存在化で PEPC に高い親和性をもつ Mb (それぞれ Mb2, Mb3) を選別し, 活性測定によって評価した。



【結果】

DNA シーケンス解析の結果, 現状では Ile26 には親和性を上げるアミノ酸変異は見られず, Thr78 にはアスパラギン酸, ヒスチジン, アスパラギンと電荷を持つアミノ酸に変異していることがわかった。

また, 新しく選別した Mb2, Mb3 について, Mb2 では,

アスパラギン酸感受性の脱感作が見られたものの Mb1 よりは効果が低く、アセチル CoA による活性化も低くなった。Mb3 では、想定通り、アスパラギン酸感受性が高まることが示された。

【考察】

Mb1-PEPC の Cryo-EM 構造を確認すると、Mb1 の Ile26 は PEPC と強い相互作用を示していることが分かっており、ここにアミノ酸変異が導入されることで親和性が落ちる可能性が示唆された。Mb1 の Thr78 は PEPC との結合界面には存在しているが距離が約 5Å 離れているアミノ酸残基であり、シーケンス解析から変異が導入されていたことから、Thr78 へのアミノ酸変異は有効である可能性が示唆された。今後は Mb1-PEPC の結合界面だけでなく、エラープローン PCR によるランダム変異を行い、さらに親和性向上を目指す。また、今回新たに得られた Mb2, Mb3 について PEPC との複合体の Cryo-EM 構造解析を行うとともに、Mb1-Mb2, Mb1-Mb3 といったタンデム抗体化を試みる予定である。

【文献】

Tokuyama, K., Toya, Y., Horinouchi, T., Furusawa, C., Matsuda, F., Shimizu, H.: Application of adaptive laboratory evolution to overcome a flux limitation in an Escherichia coli production strain, *Biotechnol. Bioeng.*, 115, 1542 (2018).

Li, C., Ong, K. L., Cui, Z., Sang, Z., Li, X., Patria, R. D., Qingsheng, Q., Fickers, P., Yan, J., Lin, C. S. K.: Promising advancement in fermentative succinic acid production by yeast hosts, *J. Hazard. Mat.*, 401, 123414 (2021).

Fujita, J., Amesaka, H., Yoshizawa, T., Hibino, K., Kamimura, N., Kuroda, N., Konishi, T., Kato, Y., Hara, M., Inoue, T., Namba, K., Tanaka, S-i., Matsumura, H.: Structures of a FtsZ single protofilament and a double-helical tube in complex with a monobody, *Nat. Commun.*, 14, 4073 (2023).

酵素活性に着目した骨粗鬆症発症機序の解明と新規治療法の開発

松本佳則

(岡山大学学術研究院医歯薬学域 腎・免疫・内分泌代謝内科学)

【目的】

本邦には 1300 万人以上、また全世界では 2 億人以上の骨粗鬆症患者がおり、患者数は増加傾向である。50 歳以上の日本人女性の 3 割が骨粗鬆症を発症し、骨粗鬆症を合併する 80 歳女性が 10 年間で骨折するリスクは 21% と極めて高い。

申請者はこれまで骨代謝を制御する“酵素 A”が蛋白“B”に結合、修飾するメカニズムに着目して研究を進め、細胞内で A をノックアウト (KO) するマウスを作製した。同マウスは破骨細胞の異常活性化による激しい骨粗鬆症を呈し、A が骨代謝に関与することを遺伝学的に証明した。本研究では酵素 A と蛋白 B に着目して骨粗鬆症の発症機序を明らかにした。

【方法】

本研究では遺伝子改変マウスを作製し、骨量・骨組織解析、更に同マウスから分離した骨髓細胞を用いて破骨細胞に分化させ、破骨細胞分化能や骨吸収能を検討した。

【結果】

① A KO マウスの *in vitro* における破骨細胞解析

骨粗鬆症発症の細胞内メカニズムを解明するため、RANKL で破骨細胞分化させた A KO マクロファージを用いて、TRAP 染色で分化能を、また bone plate を用いて骨吸収能の解析を行った。その結果、A KO マクロファージでは野生型と比較し、破骨細胞分化能、骨吸収能ともに亢進した。更に qPCR で破骨細胞分化マーカーの発現量を検討したが、A KO マクロファージでは TRAP などの mRNA 発現量が増加した。

② A KO マウスの *in vivo* における骨リモデリングの検討

骨リモデリングの関係を *in vivo* で明らかにするため、マウス脛骨を用いた TRAP 染色を行い、破骨細胞を組織学的に検討した。その結果、A KO マウス脛骨では、破骨細胞数が増加し、骨量低下が見られた。

【考察】

本研究では A KO マウスを用いて、骨粗鬆症の病態を遺伝学的かつ分子生物学的に解明した。更に A をターゲットとした創薬開発が骨粗鬆症の改善に寄与すると考える学術的根拠を示した。骨粗鬆症による脆弱性骨折は高齢社会に直面した全世界に共通する社会問題であり、今後本研究成果を発展させて、本邦 1300 万人の骨粗鬆症患者のみならず、国内外に幅広く貢献できる医療シーズを創出したい。

本研究をご支援頂いた日本応用酵素協会の皆様方に心より感謝申し上げます。

**飽和脂肪酸含有ジアシルグリセロール代謝の新基軸
－新奇ホスホリパーゼ C 酵素群の発見－**

村上千明

(愛知県がんセンター研究所 (助成開始時:千葉大学 国際高等研究基幹))

【背景】

ジアシルグリセロール (DG) はプロテインキナーゼ C (PKC) 等を活性化することで細胞応答を促す生理活性脂質である (*Science* **258**, 607, 1991)。PLC は代表的な DG 産生酵素であり、哺乳類では微量なリン脂質のホスファチジルイノシトール (PI) (4,5) ニリン酸 (PIP₂) を基質とする PLC (PIP₂-PLC) の遺伝子群のみが同定されている。生体内の PIP₂ は主に多価不飽和脂肪酸 (PUFA) を含有することから、PIP₂-PLC は PUFA 含有 DG を主に産生する。

哺乳類には、PIP₂-PLC とは異なる、生体膜主成分の PC や PE を基質とする PLC (PC-PLC と PE-PLC) の活性が報告され、当該酵素は主に飽和脂肪酸 (SFA) 含有 DG を選択的に産生する。しかし、PC/PE-PLC は活性発見から半世紀以上経つが、その分子実体 (遺伝子、アミノ酸配列) は不明である。近年、我々は SFA-DG を選択的にリン酸化する DG kinase δ (DGK δ) の免疫沈降物中に PC-PLC 活性が検出されることを発見した。このことに注目し、我々は DGK δ の相互作用タンパク質中から PC-PLC の同定を試みた。複数年度に渡る貴財団の助成によって、6 回膜タンパク質のスフィンゴミエリン合成酵素 (SMS) ファミリー (SMS1,

SMS2, および SMS 関連タンパク質 (SMSr)) が、PC-PLC および PE-PLC 活性を有し、主に SFA 含有 PC と PE に対する選択性を有することを示した¹⁻⁴⁾。

上述の通り、膜結合性 PC/PE-PLC を同定したが、他の研究グループから可溶性画分にも PC-PLC および PE-PLC 活性の検出が報告されていることから、未知の可溶性 PLC の存在が示唆される。

【目的】

膜結合性 PLC (SMS) を指標に、さらに他の可溶性 PC/PE-PLC の同定を目的とした。

【方法】

SMS の触媒部位に注目し、相同性検索によって候補可溶性 PLC を選定した。候補 PLC をクローニングし、Twin-Strep-tag (TS) 融合タンパク質を哺乳類細胞 (HEK293) で発現・精製し、*in vitro* で酵素学的性質を調べた。

【結果】

①候補 PLC の探索：SMS は脂質リン酸ホスファターゼ (LPP) (別名:II 型ホスファチジン酸ホスファターゼ、PAP2) の相同性検索によって発見された。このことから、PAP の触媒部位の相同性検索を実施した。可溶性 PAP の Lipin の触媒部位 (HAD signature motif) を有し、かつ、膜貫通ドメインを持たないタンパク質中から、候補 PLC として PHOSPHO1 (phosphatase orohan-1) を見出した (図 1)。

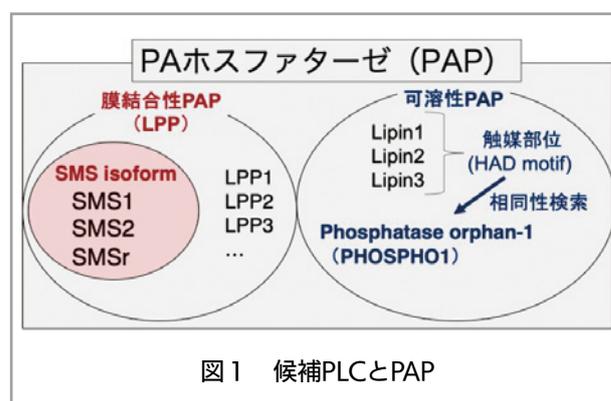


図1 候補PLCとPAP

②精製 PHOSPHO1 は PC-PLC および PE-PLC 活性

を示す：精製 PHOSPHO1 の酵素学的性質を調べた結果、PC と PE のインキュベーション時に DG が産生した。さらに、哺乳類 PC-PLC および PE-PLC に対する阻害効果を示す化合物の D609 の添加によって DG の産生が減少した。さらに、哺乳類細胞株の HEK293 に

PHOSPHO1 を過剰発現させた結果、細胞内に SFA-DG の増加が認められた。以上より、PHOSPHO1 は長年探し求められた PC-/PE-PLC 酵素群の 1 種として、細胞内で主に SFA-DG の産生に関与することが示唆された。

③ PHOSPHO1 も DGK δ と相互作用する：DGK δ が PC-PLC と相互作用するという報告から^{3,4)}、PHOSPHO1 と DGK ($\alpha, \beta, \gamma, \delta, \eta, \epsilon, \iota, \zeta, \theta$, and κ isozyme) との相互作用を解析した。その結果、PHOSPHO1 は DGK δ のみとの相互作用が認められた。SMSr は DGK δ のオリゴマー形成モジュールの sterile α motif (SAMd) を介して相互作用するが^{3,4)}、PHOSPHO1 は DGK δ の SAMd 欠損体と相互作用が認められたことから、PHOSPHO1 は SMSr とは異なる様式で DGK δ と相互作用する。さらに、PHOSPHO1 と DGK δ の細胞内の局在を観察した結果、両者は細胞質内で局在が一部一致することが明らかとなった。以上より、PHOSPHO1 も本研究の開始当初から注目していた DGK δ と相互作用する未知の PLC の一種であることが示された。

【考察】

本年度は SMS を指標に、さらに他の PLC の同定を試みた。その結果、PHOSPHO1 を新規可溶性 PLC として発見した (図 2)⁵⁾。PHOSPHO1 は PC や PE から遊離したリン酸化合物 (ホスホコリン, ホスホエタノールアミン) に対するホスファターゼ活性を有することが報告されている。したがって、PHOSPHO1 は連続した酵素反応を司る多機能酵素であることが示唆された (図 2)。また、PHOSPHO1 が DGK δ と相互作用し、細胞内局在が一部一致することから、両者は機能的に連関して SFA-DG を代謝する未知の DG シグナル伝達経路を形成する可能性がある。

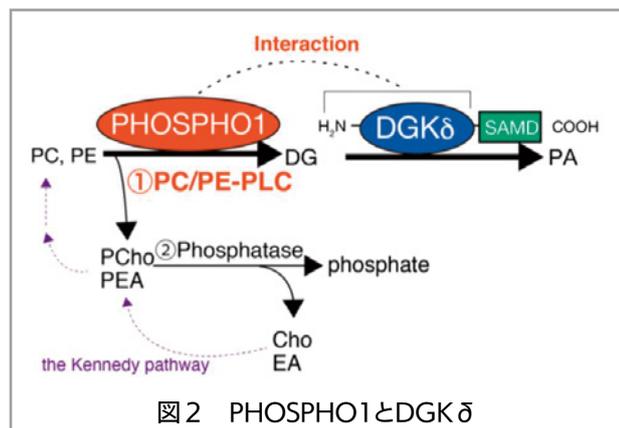


図 2 PHOSPHO1 と DGK δ

酵素研究助成 (2023 年度, 2024 年度) によって行われた一連の研究成果を基に、国際生化学分子生物学連合の管理する **酵素番号に約 40 年ぶりに哺乳類 PLC の 1 種 (PE-PLC; EC 3.1.4.62) が登録された。**

【文献】

1. **C. Murakami** et al. *J. Biol. Chem.* **300**, 107960 (2024)
2. R. Suzuki, **C. Murakami** et al. *FEBS Letters* **597**, 2672–2686 (2023)
3. **C. Murakami**, F. Sakane *J. Biol. Chem.* **296**, 100454 (2021)
4. **村上千明**, Kamila Dilimulati, 角田(熱田)京子, 坂根郁夫: ヒトスフィンゴミエリン合成酵素ファミリーの新たな酵素活性 - 長年分子実体が不明だったホスファチジルコリンおよびホスファチジルエタノールアミン特異的ホスホリパーゼ C である可能性 -, *日本応用酵素協会誌*, **59**, 14 (2025)
5. **C. Murakami** et al. *FEBS Letters* **599**, 1169 (2025)

全身性強皮症における T 細胞代謝を利用した新規治療戦略

吉岡華子

(大阪大学医学系研究科・寄附講座講師)

【研究目的】

T 細胞が全身性強皮症 (systemic sclerosis, SSc) において線維化を促進し¹⁾、血管内皮細胞のアポトーシスを誘導すること²⁾を考慮すると、SSc における T 細胞代謝を明らかにする必要があると考えた。本研究では、SSc 患者と健常者の T 細胞における代謝パラメータの違いを明らかにすること、さらに代謝の違いが T 細胞機能および線維化に及ぼす影響を解明することを目的とした。

【方法】

本研究はヘルシンキ宣言に基づき、大阪大学医学部附属病院倫理委員会の承認を得て実施し、すべての参加者から文書によるインフォームドコンセントを取得した。方法については、それぞれの結果に示した。

【結果】**結果 1：SSc における T 細胞代謝の変化**

まず、フラックスアナライザーを用いて SSc と健常者の T 細胞代謝の違いを解析した。

- ・OXPHOS (酸化的リン酸化)：SSc ではどの項目にも有意な変化は認められなかった (basal OCR: $p=0.4935$, maximal OCR: $p=0.5169$, ATP 関連呼吸: $p=0.2799$, プロトンリーク: $p=0.4359$).

- ・解糖系 (glycolysis)：一方で、SSc の T 細胞では解糖系が有意に亢進していた (ECAR: $p=0.0039$, maximal ECAR: $p=0.0071$).

さらに、解糖ストレス試験により、SSc の T 細胞では解糖能および解糖予備能が健常者に比べて有意に上昇していた (glycolysis: $p=0.0115$, glycolytic capacity: $p=0.0007$, glycolytic reserve: $p=0.0005$, 非解糖酸性化: $p=0.0651$). この傾向は自己抗体の種類、全身治療の有無、疾患期間にかかわらず認められた。

結果 2：グリコリシス関連遺伝子発現の解析

次に、Molecular Signatures Database (MSigDB v2023.1.Hs) に基づき、解糖系関連 72 遺伝子の発現を Paleja ら (2020)³⁾ の bulk RNA-seq データを用いて解析した。SSc では、CD4 および CD8 T 細胞の両方で一部の解糖系関連遺伝子の発現が変動しており、Reactome によるパスウェイ解析の上位 15 位では、SSc の CD4 および CD8 T 細胞が炎症性経路関連遺伝子で有意に亢進していた。

活性化 T 細胞は OXPHOS よりも解糖系を利用することが知られており⁴⁾、これらの結果は SSc の T 細胞が健常者よりも活性化され、炎症性である可能性を示唆した。

結果 3：グリコリシス阻害の機能的影響

DCA (ジクロロ酢酸) を用いて SSc の T 細胞の解糖系を阻害し、その影響をフラックスアナライザーおよびフローサイトメトリーで解析した。

- ・DCA は ECAR を有意に低下させた ($p=0.0312$) が、OCR への影響は一貫しなかった ($p=0.3125$).

- ・DCA 処理により CD4 および CD8 T 細胞における IFN γ および IL-13 産生は低下したが、IL-17A 産生には影響を与えなかった。

さらに、DCA 処理した SSc T 細胞を線維芽細胞と

共培養したところ、線維芽細胞における COL1A1 発現および培養上清中の TGF β 1 レベルは有意に低下した (COL1A1: $p=0.0312$, TGF β 1: $p=0.0312$). 一方、DCA による T 細胞解糖阻害は、血管内皮細胞のアポトーシスには影響を及ぼさなかった ($p>0.9999$).

【考察】

本研究では、SSc における末梢血 T 細胞で解糖系が顕著に亢進していることを示した。特に、急性的に利用可能な解糖能 (glycolytic capacity) と、細胞がエネルギー需要に応答する能力である解糖予備能 (glycolytic reserve) がともに上昇していた。これは、SSc の T 細胞がエネルギー需要にかかわらず OXPHOS ではなく解糖系に依存していることを示唆した。

さらに、in vitro 解析では、解糖系阻害により T 細胞の IFN γ および IL-13 産生、そして線維芽細胞でのコラーゲン産生が抑制されることがわかった。本研究には、フラックス解析に必要な細胞数の制約から、血液中 T 細胞サブセットや皮膚浸潤 T 細胞の代謝を直接評価できないという限界があった。しかし、IFN γ および IL-13 産生が亢進した CD8 T 細胞が真皮線維芽細胞のコラーゲン産生を直接促進するという先行研究¹を踏まえると、SSc における T 細胞解糖系の抑制は治療戦略の一つとなる可能性がある。

【文献】

1. Li G, Larregina AT, Domsic RT, Stolz DB, Medsger TA, Jr., Lafyatis R et al. Skin-Resident Effector Memory CD8(+)/CD28(-) T Cells Exhibit a Profibrotic Phenotype in Patients with Systemic Sclerosis. *J Invest Dermatol* 2017;137:1042-50.
2. Maehara T, Kaneko N, Perugino CA, Mattoo H, Kers J, Allard-Chamard H et al. Cytotoxic CD4+ T lymphocytes may induce endothelial cell apoptosis in systemic sclerosis. *J Clin Invest* 2020;130:2451-64.
3. Paleja B, Low AHL, Kumar P, Saidin S, Lajam A, Nur Hazirah S et al. Systemic Sclerosis Perturbs the Architecture of the Immunome. *Front Immunol* 2020;11:1602.
4. van der Windt GJ, Pearce EL. Metabolic switching and fuel choice during T-cell differentiation and

memory development. Immunol Rev 2012;249:27-42.

ダイナミックな構造変化が駆動する鉄硫黄クラスター生成機構の可視化

和田 啓

(宮崎大学 医学部 医学科)

PAGE において、同様の条件においてのみ SufC バンドは 2 倍の分子量を示すことから、ダイマーを形成していることがわかった。立体構造解析では 40Å 以上離れて対峙した二つの SufC は、ATP 依存的にダイナミックな構造変化を起こし、分子内ダイマーを形成することを証明した。現在、クライオ電子顕微鏡による高分解能解析を進めている。

【背景】

鉄硫黄 (Fe-S) タンパク質は多様にしてかつ生物界に普遍的に分布しており、呼吸、光合成、アミノ酸やビタミン合成、遺伝子制御に至るまで生命活動の根幹に関わる反応を担っている。Fe-S クラスターは単純な構造だが、細胞内では多成分で構成される複雑なマシナリーが生成を担う。その代表ある SUF マシナリーは、オペロンにコードされる六種のタンパク質 (SufABCDSE) から構成されている。これまでの申請者の成果を総合すると、SufB-SufC-SufD コア複合体がこのマシナリーの”心臓部”であり、反応機構解明の鍵は SufC の ATPase 活性にあることを提唱している。

【目的】

本課題では、ATP 依存的なコア複合体のダイナミックな構造変化を可視化し、構造変化により緻密に制御された Fe-S クラスター合成反応機構の全容を解き明かすことを目的としている。

【方法】

人工的な共有結合付加による構造変化のトラップ SufC ダイマーの予測構造を参照に、複合体内 2 回回転軸により近接が予想されたアミノ酸残基 (Tyr86) をシステインに置換し、ATP 存在下 + 酸化剤により S-S 結合による複合体中でのダイマーのロックを試みた。

【結果】

複合体内での SufC サブユニットのダイマーは、Native-PAGE/ウェスタンブロットによりバンドシフトを検出することができた。ATP-Mg に加え、酸化剤が共存したのみに新たにシフトバンドが確認された。ここに還元剤を加えると、バンドは元の位置に戻ったことから、人為的に導入した SufC-Y86C 同士がジスルフィド結合を形成したと考えられた。また、非還元 SDS-

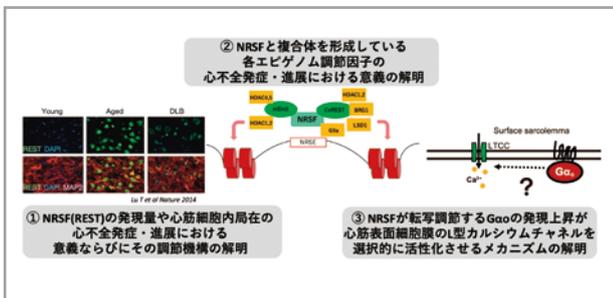
The Medical Frontier Conference に関する研究助成 (TMFC)

転写調節因子・エピゲノム制御因子に着目した心不全の病態解明と新たな心不全治療法の開発

稲住 英明

(東京大学大学院医学系研究科循環器内科学)

【目的】



【方法 / 結果】

①心筋におけるNRSFの発現をウエスタンブロットティングで評価したところ、加齢に伴い心室筋におけるNRSFの発現量が低下していることが明らかになった。

心筋特異的に、タモキシフェン投与により後天的にNRSFの発現を抑制できるNRSFicKOを作成し表現系の評価を行ったところ、ただNRSFの発現を抑制しただけでは明らかな表現系の変化を示さなかった一方で、横行大動脈縮窄による圧負荷を加えるとコントロールと比較した生存率の低下や心機能の低下を示すことが明らかになった。

②心筋特異的に、タモキシフェン投与により後天的にHDAC1/2の発現を抑制できるHDAC1/2 icKOマウスを作成し表現系の評価を行ったところ、オスのHDAC1/2 icKOマウスでは明らかな表現系の変化を示さなかった一方で、メスのHDAC1/2 icKOマウスでは著明な心機能の低下、心拡大、心筋の線維化を示すことが明らかになった。

心臓に対するRNAシーケンスの結果からカルシウムシグナルやイオンチャンネルに関わる遺伝子群の発現が上昇していることがわかり、HDAC1/2と複合

体を形成しているNRSFの転写抑制能の減弱が影響している可能性が示唆された。

またミトコンドリアに関わる遺伝子群の発現低下を認めたことから、ミトコンドリアにフォーカスした実験を進めたところ、メスのHDAC1/2 icKOマウスでは心筋ミトコンドリアの形態異常並びにエネルギー産性能の低下を認めた。現在メスのHDAC1/2 icKOマウスからサンプリングした心臓から抽出した核を用いたATACシーケンス+RNAシーケンスの解析を行っており、表現系悪化の原因となるBRSF以外の転写調節因子を見つけたいと考えている。

③Gαoの心筋特異的過剰発現マウスの心筋細胞で免疫染色での評価を行ったところ、GαoはT管構造にはほとんど存在せず、主に細胞表面膜に限局することが明らかになった。その他の心不全モデルマウス由来心筋細胞での免疫染色を検討したが、発現量が少ない影響か現時点ではうまくいっていない。

またGαoをターゲットとした創薬にもチャレンジしており、モダリティとして核酸医薬を使用して実験を進めている。こちらは心筋症患者から作成したiPS細胞由来分化心筋細胞を用いた検討で、細胞レベルでの不整脈を反映するカルシウム動態異常を改善する結果が得られたため現在論文投稿準備中である。

【考察】

転写制御因子NRSFは発生途上のみならず、成体においても心筋の恒常性維持に寄与していること、また加齢に伴いその発現が減少していることが明らかになり、加齢に伴い心機能が低下しやすくなる原因の一端を担っている可能性が示唆された。

エピゲノム制御因子であるHDAC1/2の心筋恒常性維持における役割の性差が示され、メスにおいてはかなり重要な役割を担っている可能性が示唆された。現在その詳細なメカニズムを明らかにするために実験を進めている。

Gαoの発現上昇に伴い心筋表面細胞膜のL型カルシウムチャンネル電流が選択的に増加するメカニズムとして、Gαo自身の局在の違いが関与している可能性が示唆された。心不全マウスモデルでの免疫細胞染色がうまくいかずさらなるメカニズムの追求はできていないが、ヒト心筋細胞でもGαoが心不全の病態形成に重要な役割をきたしていること、後天的な介入で病態を改善できる可能性があることをヒトiPS細胞由来分化心筋細胞を用いた検討で明らかにできたことから、新規心不全治療法の開発には一歩近づけたものと考えている。

社会経済因子が生活習慣病及び合併症を引き起こす
機序の疫学的説明

井上 浩 輔

(京都大学)

【背景】

近年の研究から、糖尿病治療薬の一つであるGLP-1受容体作動薬は、血糖降下、体重減少、心血管イベント予防に有効であることが示されている。一方、認知症に対する効果については限定的なエビデンスしかなく、いくつかの観察研究では大きなリスク低下が報告されているものの、方法論的な限界により因果的関連は明確ではない。

【目的】

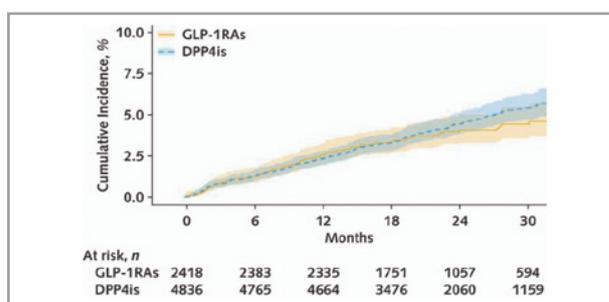
2型糖尿病を有する高齢者において、GLP-1受容体作動薬とDPP4阻害薬を第二選択薬として使用した際の認知症リスクを比較することとした。

【方法】

米国メディケアデータ(2016年1月～2020年12月)に標的試験エミュレーションを応用した。対象は既にメトホルミンを使用している2型糖尿病患者で、ベースラインで認知症を有さず、2017年1月～2018年12月にGLP-1受容体作動薬またはDPP4阻害薬を開始した66歳以上の高齢者とした。また、アウトカムとして認知症の発症は新規診断日の1年前と定義した。傾向スコアによる1対2マッチングを行い、30か月時点でのリスク差およびリスク比を算出した。

【結果】

GLP-1受容体作動薬を開始した2418例とDPP4阻害薬を開始した4836例を解析対象とした。平均年齢は71歳、女性は55%であった。中央値1.9年の追跡期間中、GLP-1受容体作動薬群96例、DPP4阻害薬群217例がアウトカムを発症した。30か月時点のリスク差は-0.93%(95%信頼区間-2.33～0.23)、リスク比は0.83(95%信頼区間0.61～1.05)であった。年齢別では、75歳未満で0.64(95%信頼区間0.46～0.93)、75歳以上で1.22(95%信頼区間0.74～1.66)であった。本研究の主な限界点として、残余交絡(BMI、血糖コントロール、糖尿病罹病期間の情報なし)、アウトカムの誤分類、追跡期間の短さ、が挙げられた。



【結語】

高齢の糖尿病患者において、GLP-1受容体作動薬とDPP4阻害薬使用者の間で認知症発症率に明確な差は認められなかった。一方で、年齢による推定値の違いが示唆された。GLP-1受容体作動薬の認知症に対する因果効果を明らかにするためには、現在進行中のランダム化比較試験の結果が待たれる(追記:2025年11月に製薬会社から発表された内容によると、GLP-1受容体作動薬の一つであるセマグルチドによるアルツハイマー型認知症の発症抑制効果は認められなかった。ただしこの試験は糖尿病患者のみを対象としたものではなく、アルツハイマー型認知症のみをアウトカムとして設定しているため、本研究とは対象集団が一部異なる点に注意が必要である)。

【文献】

Inoue, K., Saliba, D., Gotanda, H., Moin, T., Mangione, C. M., Klonhaus, A. M., & Tsugawa, Y. (2025). Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonists and Incidence of Dementia Among Older Adults With Type 2 Diabetes: A Target Trial Emulation. *Annals of*

Internal Medicine. 178(9):1258-1267. doi: 10.7326/ANNALS-24-02648.

睡眠覚醒に伴って変化する大脳皮質神経活動ダイナミクス

岩崎 加奈子

(スタンフォード大学医学部 Luis de Lecea 研究室)

【目的】

睡眠と覚醒では、大脳皮質のグローバルな神経活動の状態が大きく異なり、両者は脳波の波形に基づいて判別することができる。しかし、領野レベル・神経細胞サブタイプレベルで大脳皮質の神経活動がどのように変化した結果、大脳皮質のグローバルな変化が引き起こされるのかは分かっていない。睡眠中の大脳皮質では、覚醒様の神経活動が局所的に見られることが知られている¹⁾。局所的な覚醒状態が大脳皮質全体に伝播することが、睡眠から覚醒への移行に相当するのかもしれない。また、睡眠時に大脳皮質の神経細胞は同期発火し、集団としてアップステートとダウンステートを繰り返すが、これに同調しない神経細胞サブタイプも見いだされている²⁾。このようなごく一部の領域・神経細胞サブタイプの活動が、睡眠覚醒の切り替えや維持に重要な役割を果たしている可能性がある。本研究では、ボルテージセンサーと広視野観察を組み合わせることで、睡眠と覚醒間の切り替わりに伴う大脳皮質の時空間ダイナミクスをこれまでにない分解能で理解することを目的とする。

【方法】

視覚野、体性感覚野、運動野、後部被殻皮質を含む大脳皮質広域の神経活動を、TEMPO (Transmembrane Electrical Measurement Performed Optically)³⁾を用いて可視化することで目的の達成を目指した。今回は特に、睡眠剥奪後の神経活動を可視化することで、睡眠要求にともなって変化する神経活動ダイナミクスを調べた。実験は主に以下の4つのステップで構成されている。

1. AAVを用いた大脳皮質2/3層(Cux2陽性細胞)への Genetically encoded voltage indicator, ASAP3の発現

2. 複数の領野を観察できる直径7 mmの頭蓋窓の作成
3. 広視野顕微鏡によるボルテージセンサーの観察
4. 睡眠剥奪による大脳皮質のダイナミクスの変化の観察

なお、本研究は、光学観察技術の開発やその生体観察への応用を専門とする Mark J. Schnitzer ラボとの共同研究である。今回の発表で使用するデータに使用されたマウスは同ラボのリサーチスペシャリストである Yanping Zhang により手術が施され、顕微鏡観察のサポートやデータ解析は同研究室の博士課程学生 Vasily Kruzhilin によって行われた。また、睡眠剥奪等の実験は de Lecea 研究室の同僚である Dr. Yanan Zhao と共同で行った。

【結果】

5日間の測定環境への順化を経て、広視野顕微鏡下でマウスに睡眠様行動を誘導することができた。3時間の測定から、覚醒様シグナルと、数秒から数分にわたるノンレム睡眠様シグナルの両方を得ることができた。6時間の睡眠剥奪後には、様々な領野で振幅の大きな徐波が観察された。

【考察】

睡眠剥奪後に観察された振幅の大きな徐波シグナルは、本測定で睡眠及びリバウンド睡眠を捉えられていることを支持する。今後は、脳波やオプトジェネティクスと本イメージング技術を組み合わせることで、脳波と各脳領域の神経活動の比較や、睡眠覚醒に伴う神経活動ダイナミクスのメカニズムの解明を目指す。

【文献】

1. Nobili, L. *et al.* Dissociated wake-like and sleep-like electro-cortical activity during sleep. *Neuroimage* **58**, 612–619 (2011).
2. Valero, M. *et al.* Sleep down state-active ID2/Nkx2.1 interneurons in the neocortex. *Nat. Neurosci.* **24**, 401–411 (2021).
3. Haziza, S. *et al.* Imaging high-frequency voltage dynamics in multiple neuron classes of behaving mammals. *Cell* **188**, 4401-4423.e31 (2025).

細胞内品質管理破綻による組織障害とその治療可能性

江口 智也

(東京大学大学院医学系研究科分子生物学分野)

【背景】

オートファジーは、不要なタンパク質や壊れたオルガネラなどを膜で取り囲みリソソームへと送る細胞内分解経路であり、細胞内品質管理に必須である。オートファジーを欠損させたマウスは神経細胞内に封入体が蓄積し神経機能低下・神経変性を呈することが分かっている。このようなオートファジー障害による品質管理の破綻はヒトの神経変性疾患の病態にも関与すると考えられている。しかし、一度低下した神経細胞の機能や品質が回復可能かは不明でした。そこで我々はオートファジー活性を、可逆的に制御可能なマウスを新たに作成した。

【目的】

今年度はオートファジー抑制時・回復時における神経細胞の形態を詳細に解析するため、電子顕微鏡で解析を行った。

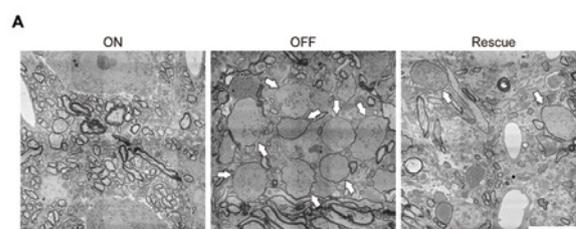
【方法】

生後13~15週齢までオートファジーをONで維持した群(ON群)、その後4週間オートファジーをOFFにした群(OFF群)、4週間のOFFの後さらに4週間ONに戻した群(Rescue群)、の3群についてオスマウスを3匹ずつ用意した。マウスをアルデヒドで還流固定し、脳組織をさらに浸潤固定した。固定した脳をリニアスライサーで薄切し脱水後、樹脂包埋し、さらに薄切した。サンプルを走査型電子顕微鏡で観察した。撮影した画像内の軸索をTruAIを用いて自動抽出し、単位面積当たりの軸索の数を最小フェレー径ごとに定量した。

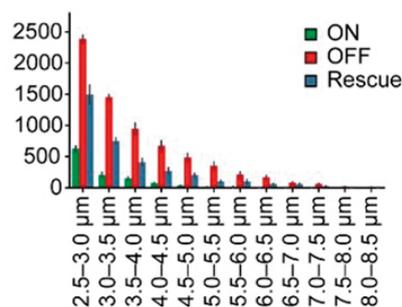
【結果・考察】

オートファジー抑制マウスでは小脳核においてプルキンエ細胞の軸索が肥大化していた。肥大化した軸索の内部には小胞体様の膜構造が蓄積していた。オートファジーをレスキューしたマウスにおいても肥大化した軸索はなお観察されたが、その数はオートファジー抑制後のマウスよりは減少していた。残存する肥大化

軸索内部には依然として小胞体様の膜構造の蓄積が見られた。これまでの解析においてプルキンエ細胞自体の数はレスキュー過程で変化しなかったことから、肥大化軸索はオートファジーのレスキューによって細胞自律的に回復したものと考えられる。



(A) 小脳核の走査型電子顕微鏡像。ON群ではミエリンで囲まれた1-2 μm 径程度の軸索が多数観察された。OFF群では5 μm 径以上に肥大化した軸索が多数観察された(矢印)。Rescue群でも肥大化軸索は観察されたが、その数は現象いていた。スケールバー: 10 μm



(B) 最小フェレー径ごとの軸索数の定量。

シングルセル情報とゲノム情報の統合解析による自己免疫性疾患と感染症の病態解明

枝 廣 龍 哉

(大阪大学 大学院医学系研究科 呼吸器・免疫内科学)

【目的】

本研究の目的は、シングルセル解析とヒトゲノム情報を統合することで、自己免疫性疾患および感染症の病態メカニズムを明らかにすることである。特に免疫細胞の多様性や遺伝的背景が疾患感受性や病態進展にどのように寄与するかを、精緻に解析することを目指した。

【方法】

日本人集団 235 名由来の 150 万超の末梢血単核細胞 (PBMC) を用いたシングルセルデータを中心とし、ヒトゲノムデータ・血漿プロテオームデータ・腸内微生物叢シークエンスデータの多層オミクス情報を有する免疫細胞シングルセルアトラス「OASIS (Osaka Atlas of Immune Cells)」を構築。

【結果】

この OASIS を用いて、各種オミクス情報をシングルセル空間に単一細胞解像度で投影する解析を網羅的に実施。その結果、生殖細胞系列変異（一塩基多型, HLA 多型, ポリジェニックリスクスコア）、体細胞変異（モザイク染色体異常, Y 染色体喪失, ミトコンドリア・ヘテロプラスミー）、腸内微生物叢菌量は、細胞種・細胞状態に応じて免疫細胞プロファイルを単一細胞レベルで動的に制御していることを明らかにした。その解析の一環で、expression Quantitative Trait Loci (eQTL) 解析を行い、様々な自己免疫疾患の疾患感受性遺伝子多型の機能解釈をシングルセル解像度で実施した。

さらに、体細胞変異は、COVID-19 患者において細胞種特異的に集約される傾向を示し、同一個体内にお

いても変異細胞と正常細胞とで異なる免疫プロファイルを示すことを確認した。また、これらの体細胞変異が COVID-19 重症化の一因となる分子メカニズムを世界に先駆けて解明した。

【考察】

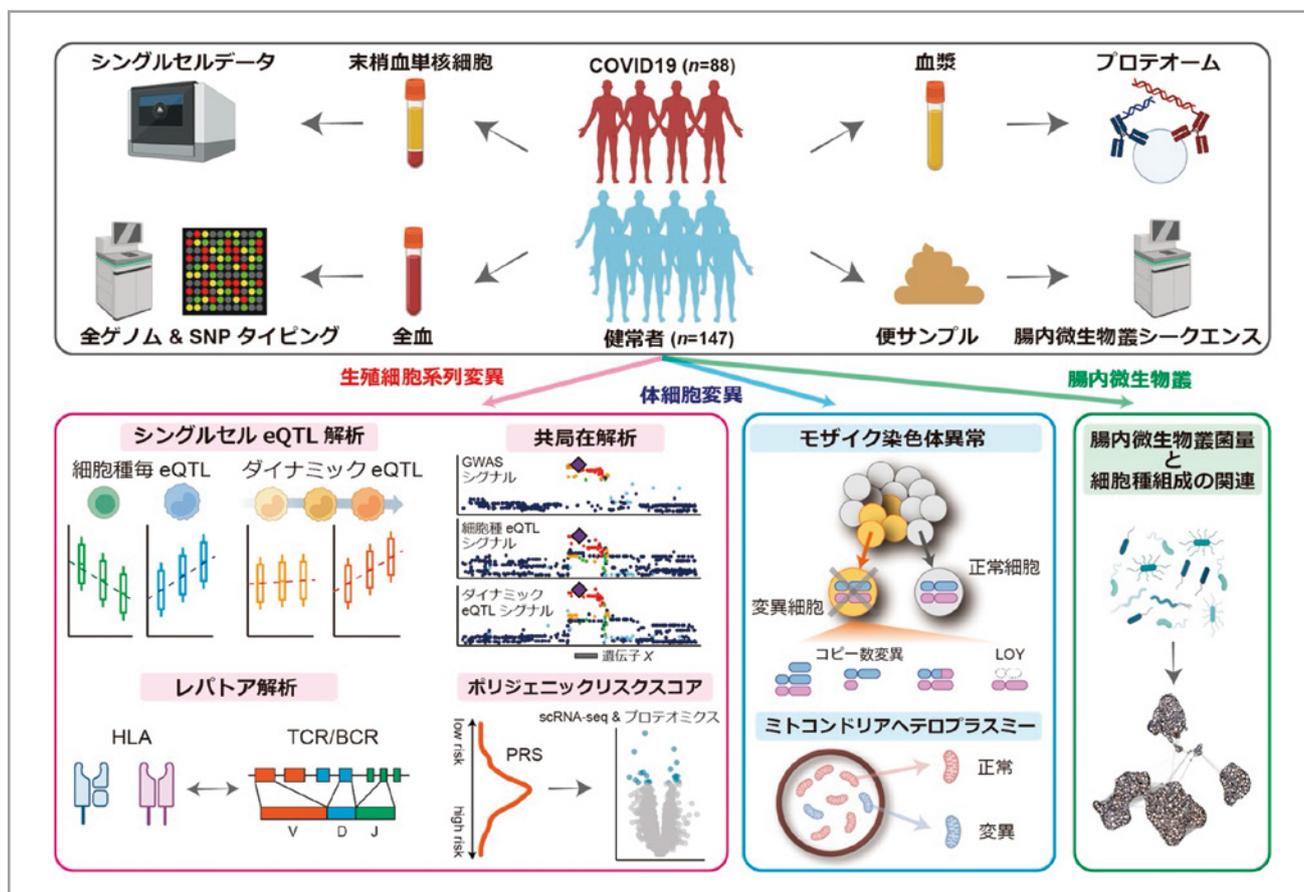
本研究¹⁾により、自己免疫性疾患と感染症の病態解明に向けた「シングルセル情報とゲノム情報の統合解析」の有効性が明確に示された。さらに、多層オミクス情報の「シングルセル空間への投影解析」は、従来のバルクデータでは捉えられなかった細胞型特異的な免疫応答や分子ネットワークの多様性を一細胞レベルで明らかにし、疾患関連分子基盤の新たな理解を可能にした。

【その他の成果】

シングルセル情報とゲノム情報の統合解析を介して、神経免疫疾患における体細胞変異の寄与²⁾、血中 DNA ウイルス叢と自己免疫疾患・COVID-19 の関連³⁾、X 染色体不活化回避の細胞型特異性⁴⁾ など、複数の新発見の報告に共同研究者として貢献した。

【文献】

1. Edahiro R, et al. Deciphering state-dependent immune features from multi-layer omics data at



- single-cell resolution. *Nat Genet* 57, 1905–1921 (2025).
2. Yata T, et al. Contribution of germline and somatic mutations to risk of neuromyelitis optica spectrum disorder. *Cell Genom.* 5:100776 (2025).
 3. Sasa N, et al. Blood DNA virome associates with autoimmune diseases and COVID-19. *Nat Genet.* 57:65-79 (2025).
 4. Tomofuji Y, et al.: Quantification of escape from X chromosome inactivation with single-cell omics data reveals heterogeneity across cell types and tissues. *Cell Genom.* 4:100625 (2024).

抗酸化物質キヌレン酸増加の分子機構とその意義

大橋 一登

(群馬大学生体調節研究所附属拠点研究支援センター)

【背景と目的】

トリプトファン (Trp) は、生体に欠かせないタンパク質構成アミノ酸の一つであるが、過剰な Trp は高 Trp 血症など有害な事象の原因となることが知られている。一方、キヌレン酸 (KA) は Trp 代謝化合物の一つであり、KA の増加は 2 型糖尿病やうつ病で認められ、近年では、炎症によって KA が増加することも報告されている。KA は NMDA 受容体や AHR など細胞内外の受容体に作用するが、上記の病態との因果関係はよく分かっていない。

【結果と考察】

真核細胞のモデル生物である出芽酵母で、KA の細胞内における機能を調べ、KA は過剰な Trp の分解で生じた排泄物の一種と考えられ、過剰な Trp が有害であることが示された (Ohashi *et al.*, *Sci. Rep.*,2017). そして、過剰に Trp を添加することにより、細胞内の KA が増加することも明らかにした。そこで、KA 増加の一因として、Trp の増加に着目し、過剰な Trp による細胞増殖抑制の解析を行った。出芽酵母の非必須遺伝子変異株ライブラリを用いて、高濃度 Trp への耐性に必要な遺伝子を探索したところ、細胞膜や細胞壁へのストレス応答に必要な Cell Wall Integrity (CWI) 経路の MAP

キナーゼカスケード遺伝子欠損株が、高濃度 Trp に感受性を示すことを見出した。これらの結果から、細胞内の Trp の蓄積は細胞表層ストレスへの正常な応答を妨げることが示された (Ohashi *et al.*, *Biosci. Biotech. Biochem.*,2021). 次に、過剰な Trp による遺伝子発現と代謝物の変動をそれぞれ RNA シーケンスとメタボロミクスで解析したところ、Lue 生合成に関わる遺伝子の発現上昇と Leu 前駆体の増加が認められた。そこで、高濃度 Trp に加えて、Trp と同程度の Leu を与えると細胞増殖が回復した。メタボロミクスの結果では細胞内 Leu はほとんど減少していなかったことから、過剰な Trp によって Leu 要求量が増加すると推測された。

以上の結果から、KA 増加の一因である Trp の蓄積は CWI 経路の応答を妨げるとともに、Leu の要求量を増加させることが示された。今後は、これらの現象の分子機構を明らかにしていきたい。

原発性アルドステロン症における病型診断・病態解明に関する基礎及び臨床の双方向性研究

岡本 健太郎

(京都大学 糖尿病・内分泌・栄養内科学)

・ 原発性アルドステロン症 (PA) の循環血中 micro RNA(miRNA) に関する研究

【背景】

PA はアルドステロン産生腺腫 (APA) などによる片側性 PA(UPA) と両側性アルドステロン症 (BHA) という 2 病型に大別され、第一選択の治療法が大きく異なる。病型診断のゴールドスタンダードである副腎静脈サンプリング (AVS) は侵襲性および高コストを伴うため、より低侵襲なバイオマーカーの開発が期待されており、循環血中の miRNA はその候補の一つである。

【目的】

AVS により採取された UPA 患者および BHA 患者の副腎静脈血および下大静脈血における miRNA プロファイルを比較し、UPA に関連すると考えられる miRNA を新たに同定するとともに、その miRNA が UPA の病態生理に果たす潜在的役割に関して検討する。

【方法】

まず、背景因子を一致させた UPA・BHA 各群 5 例ずつの少規模コホートにおいて、qPCR パネルを用いた副腎静脈血中 miRNA の網羅的発現解析を実施する。続いて、候補として見いだされた miRNA に対して、よりサンプルサイズの大きいコホートで検証する。

【結果】

副腎静脈血中の miR-222-3p 発現は UPA において BHA より有意に高値を示し、下大静脈血を用いた検証においても同様であった。また、本 miRNA は、UPA 患者の腫瘍側副腎静脈において非腫瘍側より有意に高値を示した。そこで、miR-222-3p の UPA の病態生理における役割について、APA の手術で得られた副腎皮質細胞を初代培養して検討した。miR-222-3p ミミックのトランスフェクションにより、初代培養副腎皮質細胞の CYP11B2 発現は、統計的に有意ではなかったものの増加傾向を示した。また、細胞増殖能は miR-222-3p ミミックによって有意に増加し、miR-222-3p インヒビターによって有意に抑制された。さらに、miR-222-3p の発現と臨床パラメータとの関連を検討した結果、UPA 群では、アルドステロン産生腫瘍の腫瘍径および生理食塩水負荷後の血漿アルドステロン濃度と有意な正の相関が認められた。

【結論】

循環血中の miR-222-3p は UPA において BHA より比較して有意に高く、PA の病型診断におけるバイオマーカーとなる可能性が示唆される。また、miR-222-3p は副腎皮質細胞の腫瘍性増殖およびアルドステロン自律分泌と関連していると考えられ、PA の病態生理において重要な役割を果たしている可能性が示唆される。

【文献】

Okamoto K, Sone M, Naruse M, et al.: The Significance of High Expression of Circulating miR-222-3p in Patients With Unilateral Primary Aldosteronism, *J Clin Endocrinol Metab.* doi: 10.1210/clinem/dgaf408, (2025).

また、ヒト iPS 細胞を用いた副腎皮質の発生分化に関わる未知の制御因子に関する研究も行っており、現在は皮質細胞誘導系と髄質細胞誘導系との共培養系を確立し、両者の連関について検討を進めている。

独自のシングルセルトランスクリプトーム解析技術による細胞種・疾患特異的分子の探索（超高感度空間トランスクリプトミクス解析技術の開発）

小口 綾貴子

(京都大学)

【目的】

空間トランスクリプトミクスは、細胞の位置情報を保持したまま遺伝子発現を解析できる技術である。近年の技術革新により、一細胞レベルでの解析も可能になりつつあるが、現行技術では一細胞あたりで検出可能な遺伝子数は数百にとどまる。さらに、多くの手法では RNA 分子の一部領域のみに依存しており、生物学的・医学的解釈に必要な十分な構造情報は得られない。

本研究の目的は、従来の 10 倍以上の感度向上を実現し、1,000 超の遺伝子（目標は細胞単離型で達成されている 3,000 遺伝子）由来の RNA 全長情報を、1 細胞単位で空間的に解析可能な革新的プラットフォームを構築することである（図 1）。

【方法】

本研究では、以下の 2 点により従来法の限界を克服することを目指した：

1. 独自のオリゴ配列設計：従来法が基盤上のポリ A 配列に依存して RNA を捕捉していたのに対し、我々はそれに依存しない独自配列を設計した（特許出願中、出願番号：2025-044595, 図 2）。
2. 基盤の大型化とパターンドアレイ化：小型反応スライド（面積約 20 mm²）から、より広い反応領域（>5,000 mm²）を有する大型スライドへと改良した。さらに、配列を高密度かつ規則的に配置できるパターンドアレイ技術を導入した。

加えて、反応の均一性向上を目的に、従来の開放系から密閉チャンバー方式への移行を行うとともに、各種反応条件の最適化を実施した。

【結果】

独自設計のオリゴ配列により、RNA 分子全体にわたる情報が取得可能となり、検出感度の向上が示唆された（図 3, 4）。また、大型パターンドアレイ型基盤に対応する実験プロトコルの確立を完了し、高密度な空

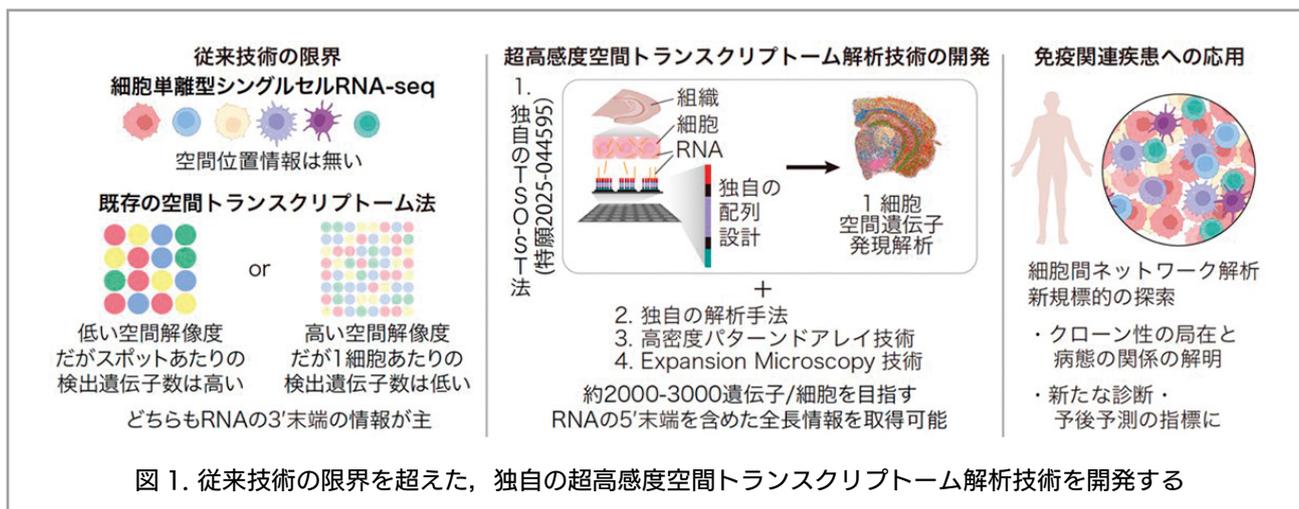
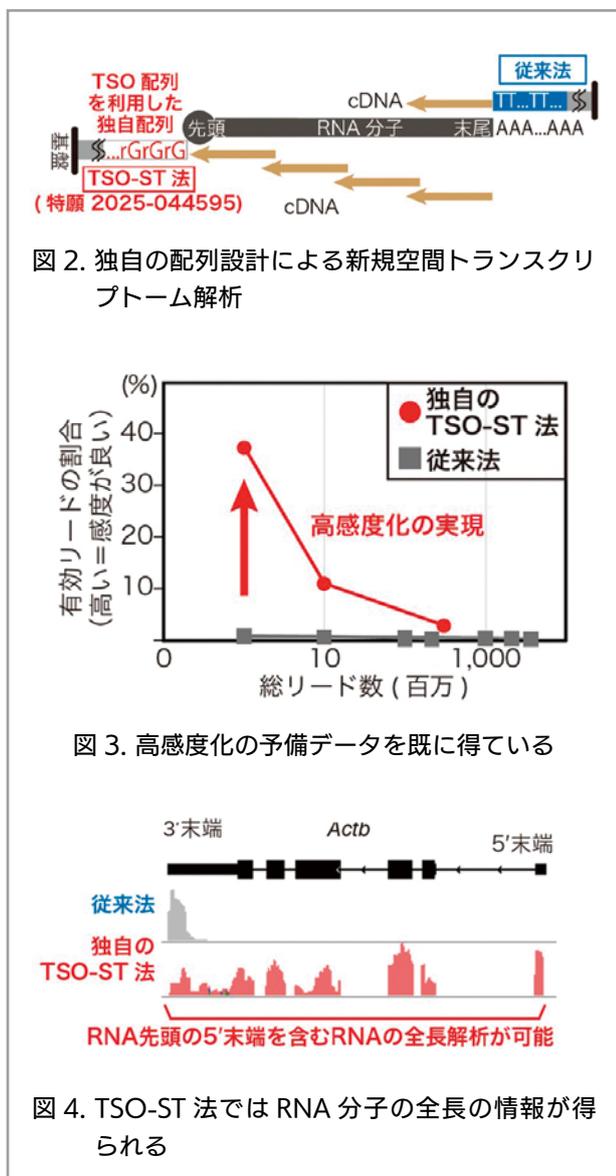


図 1. 従来技術の限界を超えた、独自の超高感度空間トランスクリプトーム解析技術を開発する



間シグナルの取得が可能となった。

【考察】

我々が開発した本手法は、従来の空間トランスクリプトミクスでは取得が困難であった RNA 構造情報を高感

度かつ空間的に取得可能とするものである。今後、組織を物理的に拡張する Expansion Microscopy 法 (Chen et al., Science, 2015) との併用により、さらなる感度向上が期待される。最終的には、従来比で約 10 倍以上の RNA 分子捕捉効率を達成し、疾患組織の高解像度解析に資するプラットフォームとなることを目指す。

加齢に伴う熱産生脂肪減少メカニズムの解明

小栗 靖生

(奈良女子大学 研究院 生活環境科学系)

【目的】

熱産生脂肪細胞 (褐色脂肪細胞, 及び, ベージュ脂肪細胞) は、熱産生を行うことにより、エネルギー消費の増大に寄与する。また熱産生脂肪の発現は年齢と負の相関を示すことが報告されている¹⁾。これらのことから、加齢に伴う熱産生脂肪の減少が、糖尿病や肥満症などの生活習慣病の発症に関与すると示唆される。本研究では、ベージュ脂肪細胞の前駆細胞における増殖機構を明らかにすることを目的とする。これにより、加齢による熱産生脂肪の減少メカニズムの一端を明らかにすると共に、肥満、糖尿病をはじめとする生活習慣病の新たな介入法の開発の端緒とする。

【方法】

マウスの皮下脂肪組織を単離し、コラゲナーゼ, magnetic cell separation (MACS) 法, および, fluorescence-activated cell sorting (FACS) 法を用いることで、ベージュ脂肪前駆細胞を単離し、同細胞の増殖に関わる制御因子

を探索した。加えてRNAシーケンス解析により同細胞の増殖に関わる調節機序を探索した。

【結果】

ページ脂肪前駆細胞の増殖能は、特定の栄養成分や液性因子により調節されることが明らかとなった。また、同細胞の増殖に関わる調節機序の存在が示唆された。

【考察】

ページ脂肪前駆細胞の増殖能は特定の栄養成分や液性因子により制御されることから、これらを標的とした介入は、加齢に伴うページ脂肪細胞の減少を防ぐ有効なツールとなる可能性が考えられる。

【文献】

- 1) Becher, T., Palanisamy, S., Kramer, DJ., Eljalby, M., Marx, SJ., Wibmer, AG., Butler, SD., Jiang, CS., Vaughan, R., Schöder, H., Mark, A., & Cohen, P.: Brown adipose tissue is associated with cardiometabolic health, Nat Med., 27, 58 (2021)

について解析を行った。

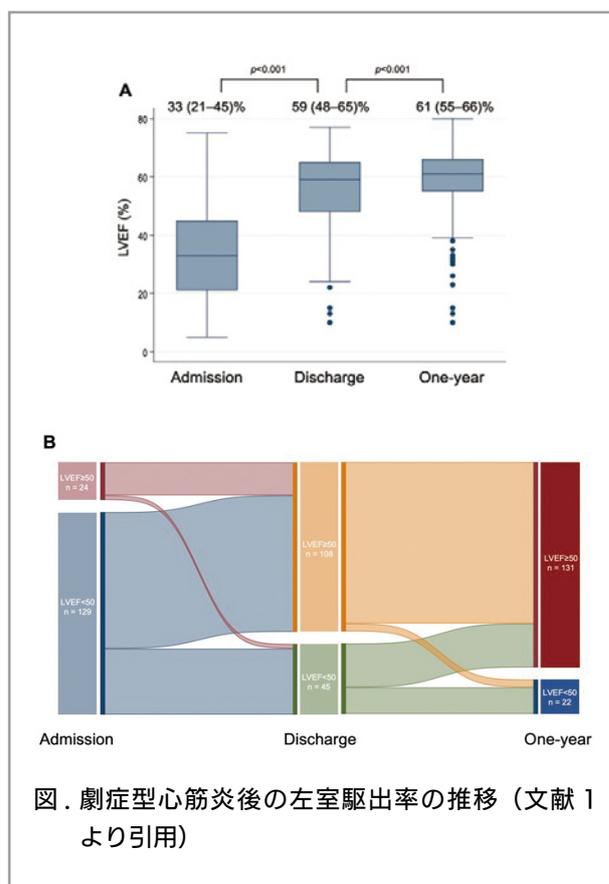


図. 劇症型心筋炎後の左室駆出率の推移 (文献1より引用)

免疫・炎症が関与する希少循環器疾患の病態解明

金岡 幸嗣朗

(国立循環器病研究センター・情報利用促進部)

【目的】

循環器疾患の中でも、心筋炎は比較的稀な疾患である。心筋炎の中では、ウィルスや自己免疫等による心筋の炎症を契機として起こる急性心筋炎が比較的頻度が高い。急性心筋炎は、一般的に、症状や心機能は可逆的であるが、その一部では、炎症の遷延化等により、慢性心筋炎へと移行することが報告されている。一方で、心筋炎は比較的希少であり、十分な患者集積がなく、発症機序や病態解明に至っていない。

【方法】

今回、我が国の235の循環器研修施設から臨床情報等の収集を行った。劇症型心筋炎患者の登録研究(JRFM)のデータを用いて、心筋炎の中でも、特に心筋の炎症が広範に起こる劇症型心筋炎を対象として、慢性期の心筋症様の病態へ移行する頻度、ならびに退院時の左室駆出率と退院後の心血管イベントとの関連

【結果】

JRFMに登録された、生検等で心筋炎の組織学的診断がされた劇症型心筋炎患者(N=344)のうち、院内死亡(N=94)、他院への転院(N=24)、入退院時の心機能の記録がない患者(n=12)を除外し、214症例について解析を行った。症例の年齢の中央値[四分位範囲]は48[35-62]歳で、63人(38%)は女性であった。左室駆出率(中央値[四分位範囲])は、入院時33[21-45]%, 退院時59[48-65]%, 1年後61[55-66]%であった(図)。214例のうち、58例(27%)で退院時の左室駆出率は50%未満であった。退院時の左室駆出率50%未満群では、入院時に洞調律である割合が少なく、来院時左室駆出率が低く、入院中の最大CK-MB値は高かった。左室駆出率の改善は、心筋炎の組織型(リンパ球性, 好酸球性, 巨細胞性)で差はなかった。追跡期間の中央値[四分位範囲]は1,385[508-1,841]日で、退院後3年後の全死亡は、退院時左室駆出率低下群で13%(N=6), 退院時左室駆出率非低下群で2.8%(n=3)であった。逆確率重み付け法を用いた調整後Cox比例

ハザードモデルでは、退院時左室駆出率低下群は、退院時左室駆出率非低下群と比較し、退院後の全死亡と心血管疾患入院が多い結果であった。

【考察】

比較的稀な疾患である劇症型心筋炎を対象として、慢性期の心機能の推移を明らかにした。本研究の結果は、劇症型心筋炎患者の退院後の通院方針等を判断する上で基礎的な情報となると考えられた。

【文献】

1. Kanaoka K, Onoue K, Terasaki S, Nakai M, Iwanaga Y, Miyamoto Y, Saito Y. Changes in Cardiac Function Following Fulminant Myocarditis. *Circ Heart Fail.* 2024 Apr;17(4):e010840. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.123.010840.

食品由来シグナルによる視床下部の摂食調節ホルモンの感受性変容

金子 賢太郎

(明治大学農学部農芸化学科栄養化学研究室)

【目的】

視床下部の代謝恒常性維持機能は栄養情報を脳に伝えるホルモン（レプチンやインスリンなど）により調節されているが、グルコースや脂肪酸等の食由来栄養成分そのものも視床下部を直接活性化し、その制御に関わる。しかし、過栄養状態では視床下部ホルモン感受性維持機構が破綻することが知られている。本研究では、視床下部ホルモンの制御基盤の解明を目的とした。

【結果と考察】

①視床下部 Rap1 分子を標的としたレプチン抵抗性、インスリン抵抗性、肥満および高血糖の改善戦略

私たちは、低分子量 G タンパク質 Rap1 の活性型が肥満マウスの脳で増加することを発見し、視床下部を含む前脳特異的 Rap1 欠損 (Rap1^{ΔCNS})、AAV-Rap1^{V12} 投与 (Rap1^{V12})、AAV-Cre 依存性 Rap1 欠損 (Rap1^{ΔHYP})、腹内側核 SF-1 特異的 Rap1 欠損 (Rap1^{ΔSF-1})、弓状核 POMC 特異的 Rap1 欠損 (Rap1^{ΔPOMC}) マウスを作製し、レプチン抵抗性やインスリン抵抗性における Rap1 の役

割を解析した。Rap1^{ΔCNS} マウスでは、高脂肪食依存的な体重増加、血糖値異常、レプチン抵抗性が有意に改善されることを明らかにした¹⁾。視床下部 Rap1 活性化の誘導 (Rap1^{V12}) または欠損 (Rap1^{ΔHYP}) では、体重変化を伴わずに高血糖の誘導や血糖値の改善を見出した。そこで腹内側核 SF-1 ニューロン特異的 Rap1 欠損マウス (Rap1^{ΔSF-1}) を作製したところ、体重変化を伴わずに耐糖能やインスリン感受性が向上していることを明らかにした²⁾。最後に私たちは、POMC ニューロン特異的 Tamoxifen 誘導性 Rap1 欠損マウス (Rap1^{ΔPOMC}) を作製したところ、抗肥満効果、抗糖尿病やレプチン感受性の増強効果を示した。さらに、高脂肪食で誘導した肥満糖尿病マウスに Tamoxifen を投与し Rap1 遺伝子の急性欠損マウスを作製したところ、体重の変化とは無関係に急激に血糖値を正常化できることを明らかにした³⁾。以上より、Rap1 が肥満や糖尿病の制御に有用な標的であることを示した。

②腸管ホルモン GIP による視床下部 Rap1 活性化を介したレプチン抵抗性の誘導機構

私たちは腸管由来インクレチンホルモン GIP を腹腔内/脳室内投与したところ、レプチンによる抗肥満効果が阻害されることを明らかにした。さらに GIP による細胞内レプチン抵抗性の誘導が cAMP/EPAC/Rap1 経路の阻害によって消失することを明らかにした。したがって、私たちは肥満によって血中濃度が増加することが知られている GIP が、Rap1 活性化を誘導することでレプチン抵抗性を惹起する新しいメカニズムを解明した⁴⁾。

③あぶらの違いによる視床下部レプチン感受性の変容

ラードと牛脂は脂肪酸組成が類似している一方、グリセロール骨格における脂肪酸の結合位置が異なっている。ラードまたは牛脂を使った特殊脂質食 (45 kcal%fat) による給餌の結果、ラード摂取マウスは牛脂摂取マウスと比較して、体重増加の一部抑制、グルコースバランスの維持、さらに視床下部レプチン感受性の維持に効果があることを明らかにした。重要なことに、通常食飼育と比較して体重差がない脂質カロリー比 30% 条件下でも、ラード摂取マウスは牛脂摂取マウスと比較して視床下部レプチン感受性が高いことも明らかにし、ラードのほうが牛脂と比較してレプチン感

受性を維持しやすいことを明らかにした⁵⁾。

【考察】

本研究は、視床下部 Rap1 や GIP がレプチン抵抗性、肥満、およびグルコース恒常性障害における重要なシグナル伝達分子であること、レプチン感受性が摂取カロリーではなく、あぶらの構造の違いによって制御され得ることを明らかにした。本研究の展開により、脳を標的とした肥満研究、糖尿病研究戦略の新たな道を切り拓く端緒となることを期待する。

- 1) Kaneko K, Xu P, Cordonier EL, Chen SS, Ng A, Xu Y, Morozov A, Fukuda M. Neuronal Rap1 Regulates Energy Balance, Glucose Homeostasis, and Leptin Actions. *Cell Rep.* 16(11):3003-3015 (2016).
- 2) Kaneko K, Lin HY, Fu Y, Saha PK, De la Puente-Gomez AB, Xu Y, Ohinata K, Chen P, Morozov A, Fukuda M. Rap1 in the VMH regulates glucose homeostasis. *JCI Insight.* 6(11):e142545 (2021).
- 3) Kaneko K, Lu W, Xu Y, Morozov A, Fukuda M. The small GTPase Rap1 in POMC neurons regulates leptin actions and glucose metabolism. *Mol Metab.* 95:102117 (2025).
- 4) Kaneko K, Fu Y, Lin HY, Cordonier EL, Mo Q, Gao Y, Yao T, Naylor J, Howard V, Saito K, Xu P, Chen SS, Chen MH, Xu Y, Williams KW, Ravn P, Fukuda M. Gut-derived GIP activates central Rap1 to impair neural leptin sensitivity during overnutrition. *J Clin Invest.* 129(9):3786-3791 (2019).
- 5) Ikeda M, Shiino T, Naruke K, Takahashi N, Kanzaki H, Xu R, Shirozu T, Nakano M, Murae M, Funatsu Y, Kaneko K. Lard intake results in better hypothalamic leptin responsiveness than beef tallow intake during overnutrition. *PLoS One.* 20(7):e0326847 (2025).

がんが個体に悪影響を与えるしくみに関する研究

河 岡 慎 平

(東北大学・京都大学)

がん悪液質はその代表的な「がんによる個体への悪影響」である。临床上は体重の減少で定義されることがほとんどで、実際、筋肉や脂肪の減少が随伴する。筋肉や脂肪、体重が減少しているような状態では個体状態は極めて悪いということがほとんどで、がん悪液質を、単純な末期症状、手遅れ症状とみなす向きは強い。

一方、がん悪液質は今まで考えられていたよりも多面的で複雑な症候群であることもわかってきている。影響を受ける臓器は筋肉や脂肪だけでなく、肝臓や、免疫細胞等にも多様な異常が生じるのだ。我々の研究によって、がん起因する肝臓概日リズムの破綻 (Oncotarget, 2017)、肝臓コレステロール代謝の異常による炎症の進展 (Dis. Model. Mech., 2018)、ニコチンアミド代謝異常と尿素回路の抑制 (Nat. Commun., 2022)、肝臓の空間的遺伝子発現の破綻 (Commun. Biol., 2023)、肝臓における血清アミロイドアルファの意義 (Front. Immunol., 2023)、などが明らかになってきた。また、主に乳がん患者さんに対する解析から、治療中に患者固有のサイトカインの量変動が認められ、これが、治療効果の予測に役立つことを明らかにした (Br. J. Cancer, 2024)。さらに、乳がんの転移がリンパ節の CD169 陽性マクロファージを減少させることもわかった (eBioMedicine, 2024)。これらの成果は古典的な悪液質 (i.e., 体重の減少) とは必ずしも直接的に関わるものではないが、腫瘍免疫の低下などを通してがん治療の効率を低下させたり、個体の生命予後を悪化させるものであり、これらを新しいがん悪液質像の一部に含めていくべきであると考えている (実験医学「がんと全身性代謝変容」(企画: 河岡慎平)。本年度も引き続きこれらの研究を継続した。

上記の研究において、がんによる臓器への影響を明らかにする際に活躍したのが、空間オミクス解析である (Commun. Biol., 2023; eBioMedicine, 2024)。組織構造を保ったまま遺伝子の発現を調べられるメソッドで、現在のがん悪液質研究に欠かせない技術の一つである。

一方で、空間オミクス解析はその実施コストが比較的高く、容易に手の出せる実験ではない。また、実験データの解析・解釈も難しい場合がある。つまり、敷居の高い実験であると言える。

本年度は、京都大学 Alexis Vandenberg 先生が主となって開発が進んでいる空間オミクスデータベース DeepSpaceDB (<https://genomics.virus.kyoto-u.ac.jp/deepspace/db/>) の運用・改善にも取り組んだ。直感的に使いやすいインターフェースを持つデータベースで、すでに 2100 以上のデータが搭載されている。研究室の学生と協力し、このデータベースをどのように使うかをまとめたプロトコル論文を作成、動画映像を使っての説明を付け加えた論文として、JoVE 誌に論文が受理されたところである。

以上、TMFC の多大かつ継続的なご支援によって、がん悪液質という一つの研究分野に、新しい流れの一つを吹き込めたのではないかと考えている。TMFC に関わられているすべての先生方ならびに日本応用酵素協会の皆様に、この場を借りて御礼申し上げたい。またお会いできる機会があることを楽しみにしております。

個体レベルでの糖代謝に関する中枢制御機構の解明

川 名 洋 平

(東北大学病院 SiRIUS 医学イノベーション研究所 医学創生研究部)

【背景・目的】

肥満などのインスリン抵抗性が高まった状態では、代償的に膵β細胞が増殖してインスリン分泌が亢進することにより高血糖が予防される。この代償性β細胞増殖のメカニズムを解明してβ細胞量が減少した糖尿病に活用することで、β細胞増量治療の開発への応用が期待される。以前に私の所属研究室では、肥満において肝臓での ERK 活性化を端緒として、求心性内臓神経、脳、遠心性迷走神経を介して膵島で代償性β細胞増殖が生じること^{1,2)}、遠心性迷走神経の刺激のみでβ細胞増殖を促進できることを示した³⁾。しかし、この肝-膵β細胞間臓器間神経ネットワークにおいて、肝臓からの求心性シグナルを感知した脳から遠心性迷走神経へとシグナルが伝達される脳内経路は不明である。

したがって、脳内で内受容感覚を受容する部位から迷走神経の起始核に至るまでの神経回路を解明する。

【方法】

臓器間神経ネットワーク活性化モデルにおいて活性化している脳領域を明らかにするための実験を行った。c-Fos を発現した細胞においてタモキシフェン存在下で tdTomato の発現を誘導できる Fos-TRAP (tdTomato) マウスを用いた。Fos-TRAP マウスにおいて肝 ERK 経路を活性化した 1 日後にタモキシフェンを投与することにより、Fos を発現している細胞をマーキングした。後日、脳を採取して透明化し、全脳で領域ごとに tdTomato 陽性細胞の数を計測した。

【結果】

肝 ERK 経路活性化マウスにおいて、皮質、中脳辺縁系、視床、視床下部、延髄といった各階層の多数の脳領域において、対照群と比較して陽性細胞数の有意な増加または増加傾向を認めた。

【考察】

臓器間神経ネットワークが活性化した際に、皮質も含め、中脳辺縁系、視床、視床下部、橋、延髄といった幅広い階層の多数の脳領域が活性化していることが示唆された。これらのうち多くの脳領域は、先行研究で内受容感覚部位として挙げられる領域群と共通していた。しかし、臓器間神経ネットワークにおいてこれらの脳領域が担う機能は不明である。今後は、各脳領域で TRAP した神経細胞を AAV を用いて化学遺伝学的に再活性化した際の膵β細胞量の変化や、各脳領域から迷走神経起始核までの神経線維の投射関係をトレーサーを用いて調べる。

【文献】

1. Imai et al.: Regulation of pancreatic beta cell mass by neuronal signals from the liver, *Science*, **322**, 1250 (2008).
2. Yamamoto et al.: Neuronal signals regulate obesity induced β-cell proliferation by FoxM1 dependent mechanism, *Nat. Commun.*, **8**, 1930 (2017).
3. Kawana et al.: Optogenetic stimulation of vagal nerves for enhanced glucose-stimulated insulin secretion and β cell proliferation, *Nat. Biomed. Eng.*, **8**, 808 (2024).

眠気を制御する細胞内分子機構の解明

北園 智弘

(筑波大学 国際統合睡眠医科学研究機構)

【目的】

近年、助成対象者らはセリンスレオニンキナーゼ SIK3 が睡眠圧 (= 眠気) を制御することを明らかにした。さらに、助成対象者は Rho グアニンヌクレオチド交換因子の一種である ARGFEF2 が SIK3 の基質であることを同定した。本年度はこの ARHGEF2, および, ARHGEF2 の主たる標的である低分子量 G タンパク質 RhoA が睡眠圧を制御しているのかを検証した。

【方法】

AAV を用いて, ARHGEF2 や RhoA の恒常的活性型変異体やドミナントネガティブ型変異体, もしくは, これらの分子を標的とした shRNA を脳内で発現させたマウスで睡眠測定を行った。本研究では, 血液脳関門透過型 AAV である AAV.B10 を眼窩静脈叢注入によって導入した。またマウスの睡眠測定は, マウス頭部に小型電極を移植し, 脳波と筋電を測定することで行った。

【結果】

ARHGEF2 の恒常的活性型変異型 ($\Delta 161$) を全脳で発現させたところ, 睡眠圧の指標であるノンレム睡眠時デルタ波密度が増大することを見出した (図 1)。一方で, ARHGEF2 のノックダウンした際には睡眠圧に変化は見られなかった (図 2)。また, ドミナントネガティブ RhoA を全脳で発現させたり, 全脳でノックダウンさせたりした際にも, 睡眠圧には変化は見られなかった (図 3, 4)。

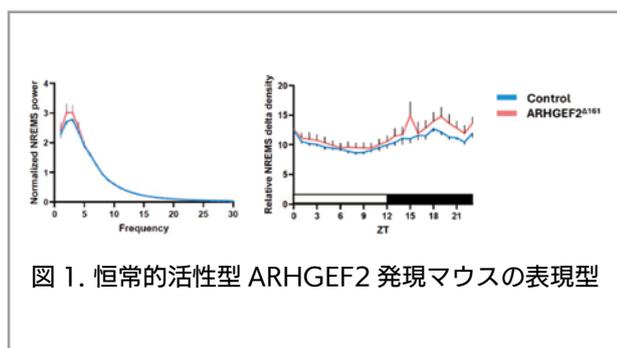


図 1. 恒常的活性型 ARHGEF2 発現マウスの表現型

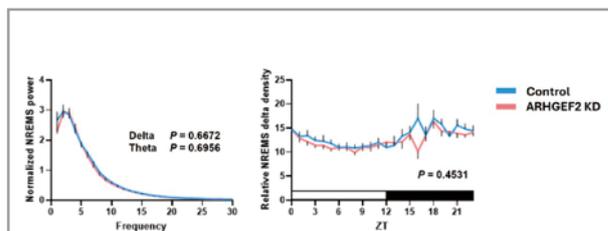


図 2. ARHGEF2 ノックダウンマウスの表現型

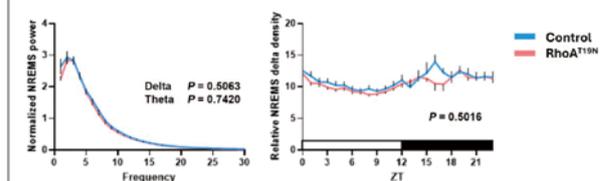


図 3. ドミナントネガティブ RhoA 発現マウスの表現型

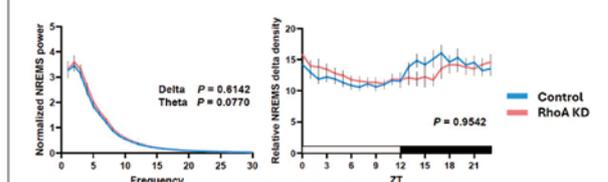


図 4. RhoA ノックダウンマウスの表現型

【考察】

ARHGEF2 の恒常的活性型を発現させたマウスの表現型は, SIK3 の恒常的活性型変異型マウスの表現型と一致している。これは, 助成対象者の先行研究において, SIK3 が ARHGEF2 を, リン酸化を介して活性化していることが生化学的に示されたことと整合性がある。このことから, ARHGEF2 は SIK3 の下流で睡眠圧を制御していると考えられる。一方で, ARHGEF2 のノックダウンでは睡眠圧に変化は見られなかったが, 助成対象者の先行研究において, SIK3 の下流では複数の Rho GTPase の制御因子が機能していることが示唆されたことから, これらの分子が補完的に機能していると推測される。また, 助成対象者の先行研究において, 恒常的活性型 RhoA の全脳発現は睡眠圧を減衰させたが, 今回行った RhoA ノックダウンでは睡眠圧に変化は見られなかった。このことから, 睡眠圧の制御において, 他の Rho GTPase が補完的に機能している可能性が考えられる。

成体神経幹細胞と上衣細胞の系譜選択機構の解明

國屋 敬 章

(東京大学大学院薬学系研究科分子生物学教室)

【目的】

成体神経幹細胞と上衣細胞は成体で環境に応答し、神経新生を行うために重要な神経新生ニッチを形成する細胞である。しかし、成体神経幹細胞と上衣細胞が発生過程でどのように形成されるのか、その細胞系譜の関係は不明であった。これを検討するため、胎生 16.5 日目の大脳基底核原基で分裂抑制した神経幹細胞のみを当研究室で確立した手法により分取することで 1 細胞遺伝子発現解析を行なった。その結果、胎生期の「成体神経幹細胞の起源細胞」と「上衣細胞の起源細胞」を 1 細胞レベルで分離して同定し、さらに、系譜分岐が起こる前の時期である胎生 14.5 日目の神経幹細胞では、BMP シグナルが成体神経幹細胞の運命を促進し、上衣細胞の運命を抑制すること、BMP シグナルの下流で TMEM100 が成体神経幹細胞と上衣細胞の運命分岐に貢献することを明らかにした。また、BMP シグナルとは別の経路で接着関連因子の Cadm2 も成体神経幹細胞と上衣細胞の運命分岐に貢献することを明らかにしていた。しかしながら、この成体神経幹細胞と上衣細胞の運命分岐は一度決定されたら不可逆であるのか、それとも系譜選択には可塑性があり、運命分岐が起きた後であっても系譜選択に介入できるのかは不明であった。この問いを検討するために、本年度の TMFC の予算を用いて以下の実験を行った。

【方法】

本研究目的を検討するため、既に成体神経幹細胞と上衣細胞の胎生期起源細胞が出現し、系譜の分岐が起こった後の胎生 16.5 日目の神経幹細胞で TMEM100 もしくは Cadm2 を過剰発現し、生後約 1 ヶ月齢で成体神経幹細胞として幹細胞性を維持し続けた細胞と上衣細胞へと分化した細胞を解析した。

【結果】

TMEM100 を胎生 16.5 日目に過剰発現した神経幹細胞では、成体神経幹細胞と上衣細胞の割合がコントロールと比べて有意に変化しなかった (図 1m 左パ

ネル)。また、同様の実験を Cadm2 に対して行ったが、こちらも成体神経幹細胞と上衣細胞の割合がコントロールと比べて有意に変化しなかった (図 1, 右パネル)。本研究成果等をまとめて論文投稿中である (Yamaguchi*, Kuniya*, Omiya* et al., bioRxiv., 2024, Neuron リバイス中, *co-first authors)。

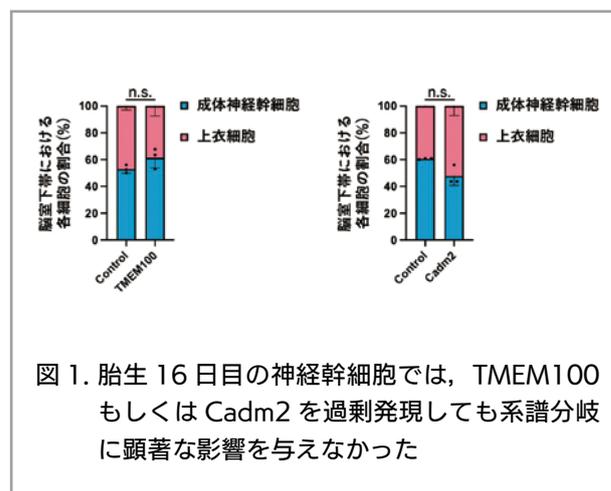


図 1. 胎生 16 日目の神経幹細胞では、TMEM100 もしくは Cadm2 を過剰発現しても系譜分岐に顕著な影響を与えなかった

【考察】

成体神経幹細胞と上衣細胞の胎生期起源細胞は胎生 16.5 日目の時点では検出されたが、少なくとも胎生 13.5 日目の時点では上衣細胞の胎生期起源細胞は検出されなかった。ここから、成体神経幹細胞と上衣細胞の系譜分岐は胎生 13.5 日目から 16.5 日目の間で起きることが予想された。そこで、成体神経幹細胞と上衣細胞の系譜分岐が起こる前の時期である胎生 14.5 日目の神経幹細胞で TMEM100 もしくは Cadm2 を胎生 14.5 日目の神経幹細胞で過剰発現したところ、成体神経幹細胞の割合が増加したことから、運命分岐が成体神経幹細胞の系譜により偏った可能性が示唆された。その一方で、系譜分岐が起こった後の胎生 16.5 日目の神経幹細胞で TMEM100 もしくは Cadm2 を過剰発現しても、成体神経幹細胞と上衣細胞の割合に有意な差が見られなかったことから、運命分岐に顕著な影響を与えなかった可能性が示唆された。ここから、系譜分岐が起こった後の神経幹細胞では可塑性が低く、たとえば TMEM100 や Cadm2 のような成体神経幹細胞で発現量の高い遺伝子を高発現したとしても、運命を転換させることはできなかった可能性が考えられる。しかしながら、成体神経幹細胞の起源細胞が本当に上衣細

胞の系譜に貢献することがないのかは本実験のみでは検証することができない。そこで、さらに成体神経幹細胞と上皮細胞の系譜を詳細に検討するために、成体神経幹細胞の胎生期起源細胞を永続的に蛍光標識する実験系の確立を行っており、成体神経幹細胞と上皮細胞の系譜をより詳細に調べている。

【文献】

1. S. Yamaguchi*, T. Kuniya*, H. Omiya, Y*. Suzuki, M. Seki, H. Ukai, L. Fang, Y. Harada, D. Kawaguchi, Y. Gotoh, Embryonic diversification of adult neural stem cells and ependymal cells, bioRxiv (2024) p. 2024.05.12.593751. (*co-first authors

全身全細胞解析技術を用いた微小炎症制御機構の解明

久保田 晋平

(名古屋大学医学系研究科腫瘍病理学分野・特任講師)

【目的】

多細胞生命システムの恒常性は神経・免疫ネットワークによって維持されている。しかし、その破綻に起因する疾患発症機構の多くは、技術的困難さから未だ解明されていない。加齢やストレスは神経免疫連関の恒常性を破綻させ、様々な慢性炎症性疾患を誘導する。これらの疾患の予防法を開発するため、微小炎症の時空間的多様性を捉え、その背景にある神経免疫連関機構の解明が不可欠である。本研究では、この神経免疫連関の解明を目指し、深部組織における分子イメージングの限界を克服する新たな技術開発に取り組んだ。

【方法】

微小炎症の動態を定量的かつ包括的に解析するため、ライトシート顕微鏡、組織透明化技術、蛍光プローブ開発を組み合わせてきた。しかし従来の抗体を用いた標識法では、試薬の深部浸透性が限られ、臓器全体の高解像度 3D イメージングは困難であった。この問題を解決すべく、本年度はクリックケミストリーを利用した臓器全体の染色法「Click3D」を開発した。これは生体直交性の高いクリック反応を用い、従来法より高い

染色深度を実現する(図1, 2)。分子プローブ投与後、組織を透明化し、蛍光レポーターとのクリック反応で臓器全体を効率的に標識可能にした。

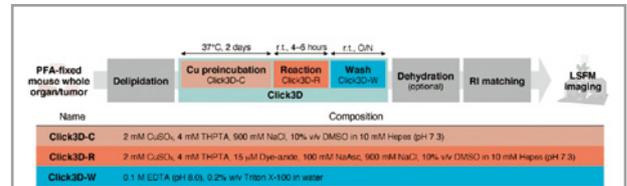
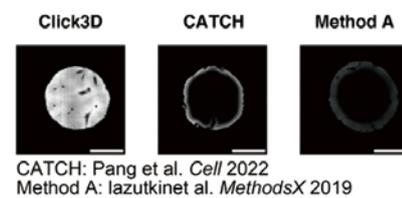


図1. Click3D:Click reaction across deep tissues for whole-organ 3D fluorescence imaging の開発



CATCH: Pang et al. Cell 2022
Method A: lazutkinet al. MethodsX 2019

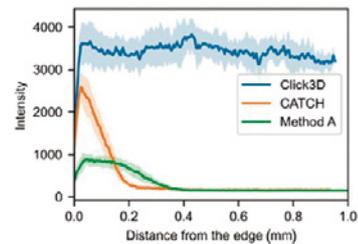


図2. 既存の三次元 Click 反応プロトコルとの比較

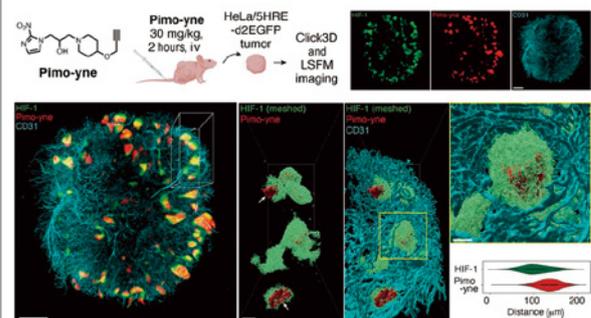


図3. 皮下腫瘍における低酸素環境の可視化

【結果】

開発した Click3D 法を用いて、これまで困難であった臓器全体の分子イメージングに成功した。一例として、腎臓全体における新生 RNA の 3D イメージングに成功した。これにより、腎臓のどの領域で活発に遺伝子発現が行われているかを臓器全体で詳細に可視化することが可能となった。さらに、Click3D 法をがん研究に

も応用し、腫瘍組織全体の低酸素領域のイメージングにも成功した(図3)。低酸素環境はがんの悪性化や治療抵抗性に関わる重要な要素であるが、その不均一な分布を臓器レベルで捉えることはこれまで困難であった。本手法により、腫瘍内部の微小な低酸素領域から全体の分布までを詳細に解析することが可能となり、がんの病態理解に大きく貢献することが期待される。

【考察】

本年度開発したClick3D法は、クリックケミストリーを組織全体の3D蛍光イメージングに最適化した画期的な手法である。これにより、これまで技術的に困難であった深部組織を含む臓器全体の分子イメージングへの道が拓かれた。新生RNAや低酸素状態の可視化に成功したことは、本手法の汎用性の高さを示すものである。今後は、Click3D法を様々な疾患モデルに応用することで、微小炎症をはじめとする多様な生命現象の時空間的ダイナミクスを解明し、新たな治療法や予防法の開発に繋げていきたいと考える。将来的には、様々なクリックプローブを開発・導入することで、多種多様な生体分子を臓器全体で同時に可視化する多重イメージング技術へと発展させていく予定である。

【文献】

1. Yi B, Yatabe H, Sakamoto DM, Tamura I, Saito Y, Yamada N, Ashikaga R, Kuroda M, **Kubota SI**, Tainaka K, Sando S. Imaging Heterogeneous Patterns of Aminopeptidase N Activity in Hierarchical Tissue Structures Through High-Resolution Whole-Organ 3D Mapping. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2025 May 26;64(22):e202504668. doi: 10.1002/anie.202504668.
2. Tamura I, Sakamoto DM, Yi B, Saito Y, Yamada N, Morimoto J, Takakusagi Y, Kuroda M, **Kubota SI**, Yatabe H, Kobayashi M, Harada H, Tainaka K, Sando S. Click3D: Click reaction across deep tissues for whole-organ 3D fluorescence imaging. *Sci Adv*. 2024 Jul 19;10(29):eado8471. doi: 10.1126/sciadv.ado8471.
3. Furukawa R, Kuwatani M, Jiang JJ, Tanaka Y, Hasebe R, Murakami K, Tanaka K, Hirata N, Ohki

I, Takahashi I, Yamasaki T, Shinohara Y, Nozawa S, Hojyo S, **Kubota SI**, Hashimoto S, Hirano S, Sakamoto N, Murakami M. GGT1 is a SNP eQTL gene involved in STAT3 activation and associated with the development of Post-ERCP pancreatitis. *Sci Rep*. 2024 May 28;14(1):12224. doi: 10.1038/s41598-024-60312-2.

4. Naito S, Tanaka H, Jiang JJ, Tarumi M, Hashimoto A, Tanaka Y, Murakami K, **Kubota SI**, Hojyo S, Hashimoto S, Murakami M. DDX6 is involved in the pathogenesis of inflammatory diseases via NF- κ B activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2024 Apr 9;703:149666. doi: 10.1016/j.bbrc.2024.149666.

骨格筋再生を主導する多細胞間相互作用ネットワークの解析

小池博之

(東京科学大学)

【目的】

加齢に伴う筋量の低下はサルコペニアと呼ばれ、高齢化社会において重要な健康問題である。特に外傷後の筋再生不全は二次性サルコペニアの主要な原因であり、その分子機構の解明は予防・治療法の開発に必須である。しかし、筋再生に関与する多様な細胞間相互作用は複雑であり、従来の動物モデルでは十分に解析できない。そこで骨格筋オルガノイドを用いることで、in vivo で起こる現象をin vitro で再現し、細胞社会が織りなす分子機構を解析することが望まれる。本研究では、マクロファージが骨格筋幹細胞の増殖を制御するシグナルを明らかにすることを試みた。

【方法】

骨格筋再生におけるマクロファージと骨格筋幹細胞の相互作用を解析することを目的とし、骨格筋オルガノイドの構築と評価系の確立を行った。また、カルジオトキシンによるマウス骨格筋再生モデルを用いて、シングルセルRNAシーケンス解析を実施し、マクロファージ亜集団の機能解析を行った。さらに、フロー

サイトメトリーによる単離に用いる細胞膜タンパク質の探索を行い、特定の亜集団の機能を検証した。

【結果】

骨格筋幹細胞由来のオルガノイドを構築し、マクロファージと骨格筋幹細胞の相互作用を再現した。オルガノイド内では、マクロファージが骨格筋幹細胞の周囲に集積し、筋線維構造の形成が観察された。CD45陽性細胞の除去により、筋再生が阻害されることが示され、マクロファージの重要性が確認された。

シングルセル RNA シークエンス解析により、マクロファージは8つの亜集団に分類され、その中で mac_1 亜集団が骨格筋幹細胞との強い相互作用を示した。mac_1 は従来の炎症性・抗炎症性マクロファージとは異なる特徴を持ち、Hgf を高発現することが判明した。mac_1 を除去したオルガノイドでは筋線維形成が抑制され、骨格筋幹細胞の増殖も低下した。さらに、Hgf-Met 経路が mac_1 による増殖制御に関与していることが示された。

【考察】

本研究では、新規マクロファージ亜集団 mac_1 とその産生する再生制御因子 Hgf を同定し、骨格筋再生におけるその必須性を示した。マクロファージが骨格筋再生に関与することを示した本研究は、再生促進や治療応用への展開が期待される。一方、オルガノイドが生体内組織と完全には同等ではない可能性もあり、今後さらなる検証が必要である。

【文献】

Koike, H., Sugimura, M., Ouchi, R., Yoshimoto, Y., Manabe, I., Oishi, Y.: Macrophage Subpopulation Promotes Skeletal Muscle Regeneration Through HGF/MET Signaling-Mediated Skeletal Muscle Stem Cell Proliferation, *Aging Cell*, **24**, e70042 (2025).

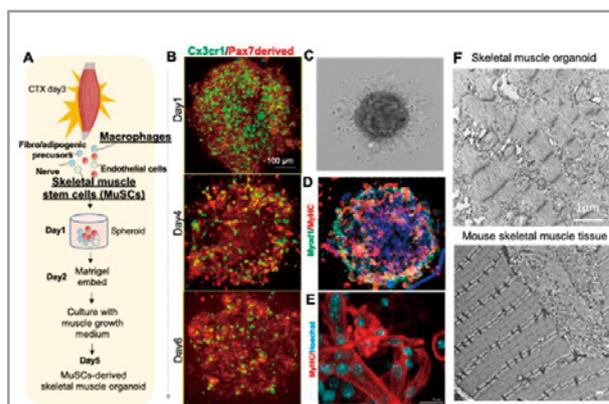


図 1. 骨格筋再生を再現するオルガノイド創出法の確立

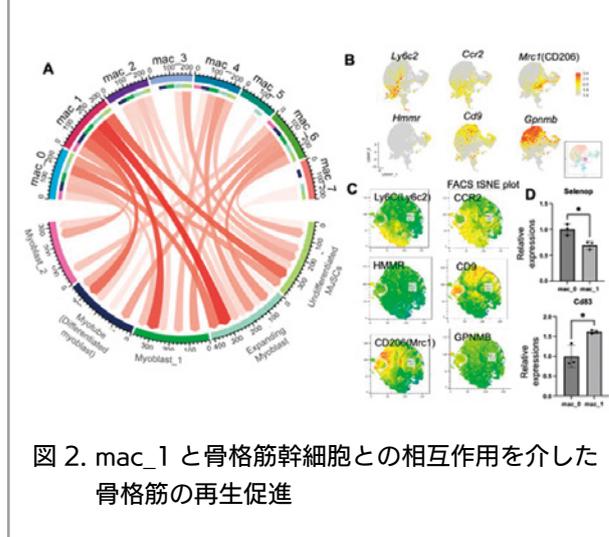


図 2. mac_1 と骨格筋幹細胞との相互作用を介した骨格筋の再生促進

クローン性造血による疾患発症メカニズムの解明

佐伯 龍之介

(京都大学)

【目的】

クローン性造血 (Clonal hematopoiesis, CH) は血液腫瘍の前駆状態であるのみならず、心血管疾患、感染症等の様々な病態の促進に関与することから、近年注目されている。本プロジェクトにおいては、CHによる疾患発症メカニズムの解明等を目指し、現時点では特にCHと新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の重症化リスクの関連性について興味深い知見が得られた。

【方法】

代表者らは、コロナ制圧タスクフォースに由来する COVID-19 コホート (4,731 名) について、末梢血由来 DNA の標的シーケンス解析を実施し、CHに関連する

遺伝子変異を検出した。また、重症化リスクのメカニズム解明のため、2,994例で末梢血のRNAシーケンスを実施した。

【結果】

4,731例の解析の結果、全体の16%において遺伝子変異を同定した。重症例と非重症例の間でこれらの頻度を比較したところ、CHは重症例に有意に濃縮しており(オッズ比:1.28)、CHはリスクの上昇に関与していると考えられた。(図1)しかし、変異の種類による層別化を行うと、最も頻度の高いDNMT3A/TET2の変異(DT変異)はリスクに関与しておらず、それ以外の変異(non-DT変異)のみリスクとの関連が認められた(オッズ比:1.75)。

この結果を受け、non-DT変異によるCOVID-19の重症化メカニズムを明らかにするため、末梢血のRNA-seqの解析を行った。その結果、重症化によって強く上昇していた遺伝子が、非重症のnon-DT変異陽性例においても有意に上昇する傾向が認められ、パスウェイ解析においても重症例で活性化が認められていた複数の炎症関連パスウェイが、non-DT陽性の非重症例でも有意に活性化していた。(図2)これらの傾向は、リスクに関与しなかったDT変異においては全く認められなかった。

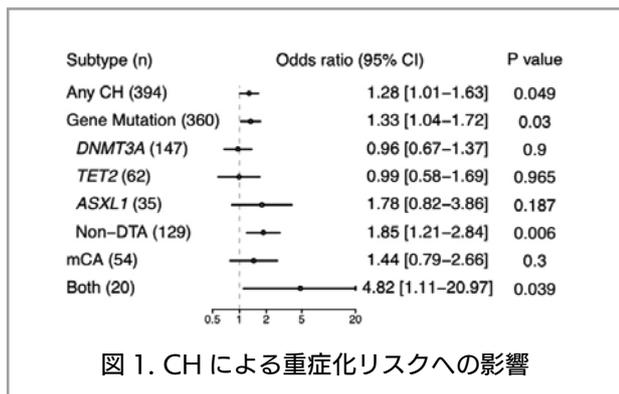


図1. CHによる重症化リスクへの影響

【考察】

これらのことから、臨床的に重症化していない患者でも、non-DT変異がある場合には重症例に類似した炎症性応答が認められ、non-DT変異を有するCHは炎症の増強を通じてCOVID-19の重症化に関与している可能性が示唆された。

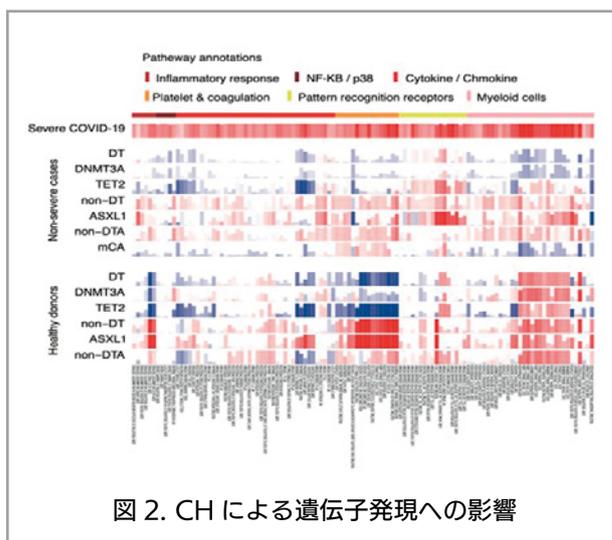


図2. CHによる遺伝子発現への影響

構造 - シグナル相関に基づく GPCR 創薬研究

齊藤 毅

(筑波大学医学医療系 / 国際統合睡眠医科学研究機構 / 高等研究院)

Gタンパク質共役型受容体(GPCR)は、創薬標的として最も有望なタンパク質群の一つであり、現在承認されている医薬品のおよそ30%がGPCRを作用標的としている。近年においても新規のGPCR標的薬が次々と開発、上市されており、GPCR創薬は依然として活発な研究分野である。

近年のGPCR創薬には、主に二つの潮流がある。一つは、未だ薬の標的となっていない約200種類のGPCRに対して親和性・特異性の高い薬物を合成し、新規の適用疾患を探索するアプローチである。我々もこれまでに、1998年に柳沢、櫻井らにより見出されたオレキシン受容体(OX1R, OX2R)を標的とした創薬研究に取り組み、TMFCの支援の下、世界初となる低分子OX2R選択的作動薬、デュアル作動薬、OX1R選択的作動薬を開発し、それぞれがナルコレプシーや疼痛症に有効であることを実証してきた¹⁾。

もう一つの潮流は、確立されたGPCR標的において、副作用を低減した新規薬物を開発するアプローチである。GPCR標的薬は、GPCRの活性化を介して、主に細胞内の3量体Gタンパク質を活性化する経路とβアラレチンを活性化する経路の2つのシグナル経路を調節して薬理作用を発揮する。近年、μオピオイド受容体を始めとする複数のGPCRにおいて、これらの経路

の一方が医薬品の治療効果を、もう一方が副作用の発現に関与する例が示されており、治療効果を担うシグナルを選択的に活性化するバイアスリガンドは、副作用を抑えた新しい治療薬として期待されている。しかしながら、シグナルバイアスをもたらすGPCRの構造的基盤は十分に解明されておらず、バイアスリガンドの合理的な創薬手法も確立されていない。そこで我々は、副作用のために臨床応用が停滞している δ オピオイド受容体(DOR)リガンドに着目し、バイアスリガンドの論理的設計法を実現すべく、構造生物学、分子生物学、創薬化学を組み合わせた新たな創薬プラットフォームの開発を行ってきた。

DORは脳辺縁系に多く発現し、その活性化は鎮痛作用に加えて抑うつ・不安・恐怖といった情動を抑制することから、その作動薬は新たな鎮痛薬、向精神病薬として注目されている。しかし、SNC-80を始めとする古典的DOR作動薬は、治療域において痙攣を誘発することが知られ、臨床使用には至っていない。我々は、モルヒネ様構造(モルヒナン骨格)をベースとした誘導化研究の過程で、キノリン構造を有するKNT-127がSNC80とは異なり、高用量でも痙攣を誘発しないことを見出した。この作用の違いをシグナル伝達の観点で明らかにすべく、NanoLuc Binary Technology(NanoBiT)を用いるアッセイによりDOR活性化に伴うGタンパク質の解離と β アレスチン誘導を評価した結果、SNC80はGタンパク質解離と β アレスチン誘導の両方を活性化する一方、KNT-127は β アレスチン誘導が部分的になるバイアスリガンドであることを明らかにした。

このシグナル伝達の違いを構造的に検討するため、両リガンドのDOR結合様式の比較を実施した。その結果、DORのTM5-TM6-TM7に囲まれたK214^{5,39}、V281^{6,55}、W284^{6,58}、L300^{7,35}から構成される結合ポケット(K-V-W-Lポケット)での相互作用様式に違いがあることが判明した。そこで、この結合ポケットにおける相互作用がシグナルに与える影響を調べるべく、キノリン環を段階的に変換した誘導体を合成し、シグナル解析を実施した^{2,3)}。まず、キノリン環を構成する2つの環を順次除去したところ、いずれのシグナルも大きく減弱し、キノリン環の末端芳香環がK-V-W-Lポケットを占

有することがDOR活性化に重要であることが分かった²⁾。次に、この芳香環を取り囲むK-V-W-L残基に直接干渉するため、置換基(OMe基)を5'-8'位に導入して構造-シグナル相関を解析した結果、7',8'位では活性に大きな違いはみられなかったが、6'位では顕著な活性低下が、5'位ではGタンパク質解離活性の向上と β アレスチン解離活性の抑制という効果が観察された³⁾。さらなる β アレスチン解離活性の減弱を狙い、5'位に様々な脂溶性官能基を導入した結果、イソプロポキシ(OiPr)基を有する誘導体がGタンパク質解離活性を保持しながら β アレスチン解離活性を11%まで減弱させることを見出した。

【文献】

- 1) T. Saitoh, T. Sakurai: *Peptides*, 167, 171051 (2023).
- 2) K Kajino, T Sugai, R Kise, *et al.*: *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 73, 246–256 (2025).
- 3) K Kajino, T Sugai, R Kise, *et al.*: *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 73, 336–348 (2025).

モデル魚類を用いた網膜変性疾患の研究

佐藤 恵太

(岡山大学学術研究院医歯薬学域細胞組織学分野)

【目的】

UV感受性光受容タンパク質Opn5mは、ヒトを含む脊椎動物で保存されている。Opn5mの存在は、ヒトを含む動物が紫外線により生体機能を調節する可能性を示唆し、その解析は未知の光受容機構の解明につながると期待される。また進行した網膜変性疾患では、オプシン遺伝子の異所的導入で視機能を再建する光遺伝学的アプローチが注目されている。特に中枢深部で機能するオプシンは、高感度な光遺伝学ツールとして有望である。本年度は、メダカ下垂体に発現するOpn5mに着目し、その生理機能解明を目的に研究を行った。

【方法】

メダカ下垂体において、蛍光 in situ ハイブリダイゼーションにより opn5m と pomc の発現パターンを解析した。pomc-GCaMP トランスジェニックメダカを用い、

ACTH 細胞および MSH 細胞の光に対する Ca^{2+} 応答を可視化した。opn5m ノックアウト (KO) メダカを作製し、単離下垂体へ光照射後、上清中 MSH 量を定量して野生型 (WT) と比較した。上清での増加が見られた DesAc- α MSH (DesAc- α MSH) に対するメダカ MC1R の応答を GloSensor cAMP アッセイで評価した。

【結果】

メダカ下垂体では opn5m が尾側の pomc 陽性 (MSH) 細胞に局在していた。pomc-GCaMP メダカでは ACTH 細胞が安定した蛍光を示す一方、MSH 細胞は短波長光に対して顕著に蛍光強度を上昇させた。これは光による Ca^{2+} 応答を意味する。単離下垂体への光照射では上清中の DesAc- α MSH が増加し、この反応は opn5m KO で著しく減弱した。DesAc- α MSH は MC1R を活性化し、cAMP 応答を誘導した。

【考察】

ホルモン産生細胞では細胞内 Ca^{2+} 上昇が分泌顆粒の開口放出を促す。MSH は黒色素胞等を刺激するため、メダカは下垂体 MSH 細胞で Opn5m を介して紫外光を検知し MSH を放出、体色を変化させて有害紫外光の透過を低減すると考えられる。短波長光に高感度で Gq 系を活性化して Ca^{2+} 応答を引き起こす Opn5m は、視覚再生を含む光遺伝学的応用への有用なツールとなり得る。

【文献】

Sato K, Ohuchi H. Molecular Property, Manipulation, and Potential Use of Opn5 and Its Homologs. *J Mol Biol.* **436**, 168319, (2024)

Fukuda A, Sato K, Fujimori C, et al. Direct photoreception by pituitary endocrine cells regulates hormone release and pigmentation. *Science.* **387**, 43-48. (2025)

睡眠覚醒サイクルにおける遺伝的な制御と環境的な制御の統合機構に関する研究

史 蕭 逸

(筑波大学国際統合睡眠医科学研究機)

【目的】

睡眠は神経系を有するすべての生物に保存された生理現象である。しかし、我々はまだ、“生物はなぜ眠るのか？”というシンプルな問いに対する統一的な答えを持たない。睡眠研究者は 100 年以上の間、睡眠圧の生物学的実体、すなわち覚醒の間に蓄積し、睡眠を誘導、そして睡眠の間に減弱する因子を同定することで、その問いに答えようとしてきた。今日、リン酸化、シナプス強度、神経細胞の発火特性、脳波の特定周波数帯の強さといった、分子から脳活動に至る空間・時間的に異なるスケールの現象が睡眠圧の生物学的実体として提唱されている (Franken et al., *J. Neurosci.* 2001; Tononi and Cirelli *Neuron* 2014; Tatsuki et al., *Neuron* 2016; Funato et al., *Nature* 2016; Wang et al., *Nature* 2018; Kim et al., *Nature* 2022)。本提案では、異なる階層に跨る睡眠圧の生物学的実体を接続することで睡眠をシステムとして理解することを目指すものである。

【背景】

睡眠圧の全容を理解するためには、リン酸化、シナプス強度、down state、デルタパワーといった、分子から脳活動に至る空間・時間的に異なるスケールの現象を統合して理解することが求められる。特に、申請者らはこれまで、シナプスの増強によって、神経細胞の down state 頻度の増加および delta power の増加を明らかにしてきた。さらに、マウスにおいて、前頭前皮質の興奮性神経細胞におけるシナプス結合強度の増加が NREM 睡眠の増加とデルタ波の増加を誘導することを明らかにした (Sawada et al., 2024)。そこで次に残された課題は、リン酸化とシナプス結合強度調整との接続である。

【方法・結果】

申請者らは、高密度多電極アレイ (MEA) システム上で皮質神経細胞を解離培養し、薬理的・光遺伝学的にシナプス結合強度の増強を誘導する実験系を構築

した。シナプス結合の増強が誘導された際のリン酸化ダイナミクスやリン酸化酵素の局在を質量分析器や蛍光プローブを用いることで解析した。その結果、睡眠に関わることが報告されているリン酸化酵素群の活性・局在・他のタンパク質とのインターアクションといったパラメータがシナプス結合強度と相関していることが示唆された。薬理的にリン酸化を阻害することで、シナプス結合強度の増強が阻害されることも示唆されており、リン酸化酵素—シナプス結合強度制御の相互作用が解明されつつある。さらに睡眠表現型が変化することが知られているリン酸化酵素の変異マウスにおいて、樹状突起スパインのサイズの定量も進めている。

【考察】

シナプス結合強度の制御におけるリン酸化の役割は古くから研究されている。しかし、その詳細な分子機序は依然として議論が続いている。本研究では、記憶の固定化が生じる場である睡眠がどのように、リン酸化によって制御されているのか、そのリン酸化の制御はシナプス結合強度をどのように変化させるのか、問いに答えることで、記憶の分子機序の理解にも貢献することが期待される。

【文献】

1. Franken P, Chollet D, Tafti M. The homeostatic regulation of sleep need is under genetic control. *J Neurosci*. 2001 Apr 15;21(8):2610–21.
2. Tononi G, Cirelli C. Sleep and the price of plasticity: from synaptic and cellular homeostasis to memory consolidation and integration. *Neuron*. 2014 Jan 8;81(1):12–34.
3. Tatsuki F, Sunagawa GA, Shi S, Susaki EA, Yukinaga H, Perrin D, et al. Involvement of Ca(2+)-Dependent Hyperpolarization in Sleep Duration in Mammals. *Neuron*. 2016 Apr 6;90(1):70–85.
4. Funato H, Miyoshi C, Fujiyama T, Kanda T, Sato M, Wang Z, et al. Forward-genetics analysis of sleep in randomly mutagenized mice. *Nature*. 2016 Nov 17;539(7629):378–83.
5. Wang Z, Ma J, Miyoshi C, Li Y, Sato M, Ogawa Y, et al. Quantitative phosphoproteomic analysis

of the molecular substrates of sleep need. *Nature*. 2018 Jun 13;558(7710):435–9.

6. Kim SJ, Hotta-Hirashima N, Asano F, Kitazono T, Iwasaki K, Nakata S, et al. Kinase signalling in excitatory neurons regulates sleep quantity and depth. *Nature*. 2022 Dec 7;612(7940):512–8.
7. Sawada T, Iino Y, Yoshida K, Okazaki H, Nomura S, et al. Prefrontal synaptic regulation of homeostatic sleep pressure revealed via synaptic chemogenetics. *Science*. 2024 Sep 26;385(6716):1459–1465.

ソーシャルディスタンスを制御する神経回路とその分子の探索

征 矢 晋 吾

(筑波大学医学医療系, 国際統合睡眠医科学研究機構)

【目的】

本研究では、ソーシャルディスタンスを制御する神経基盤を探索するためニューロペプチド B/W に注目した。ニューロペプチド B/W はこれまでに痛みの制御、自律神経系の調節などに関わることが知られているが、その生理的役割は不明な点が多い。ニューロペプチド B/W の受容体であるニューロペプチド B/W 1 受容体 (NPBWR 1) は情動応答に重要な役割を果たす扁桃体中心核 (CeA) の GABA 作動性ニューロンにおいて顕著な発現を示し、NPBWR 1 欠損マウスは新奇個体に対して社会的接触時間が非常に長く、執拗な追尾行動を示すことが報告されている (Nagata-Kuroiwa et al., 2011)。

申請者はこれまでに、情動応答の中核である扁桃体中心核 (CeA) において、Gi タンパク質共益型受容体である NPBWR 1 を発現するニューロン (NPBWR 1 ニューロン) の活動が新奇個体との接触によって増加し、薬理遺伝学を用いた NPBWR 1 ニューロンの活性化は新奇個体に対する社会性を亢進させ、抑制すると社会性が低下することを確認した (図 1)。さらに、社会的敗北ストレスによりうつ様状態を示すマウスの NPBWR 1 ニューロンを人為的に活性化することで、

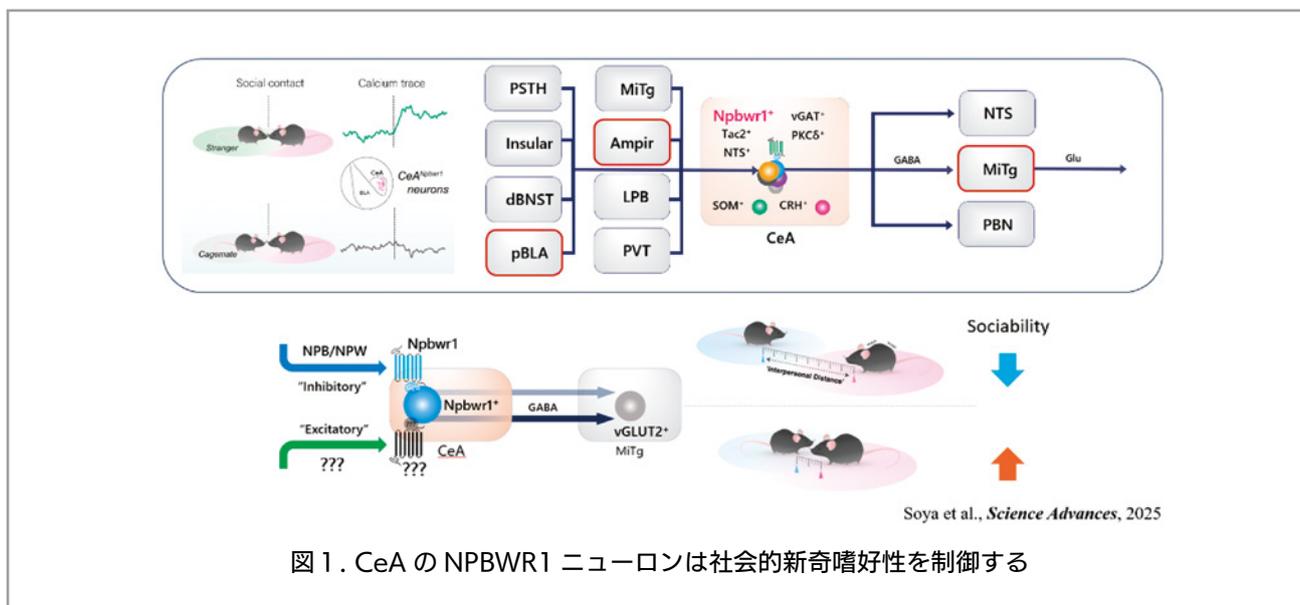


図1. CeAのNPBWR1ニューロンは社会的新奇嗜好性を制御する

社会性を回復させることを見出した。NPBWR1には機能低下型のSNP(Y135F)が確認されており、この変異の有無によって新奇個体に対する社会性が亢進(Y135F回復群)または減弱(正常NPBWR1回復群)することを確かめている(Soya et al., 2025)。これらの結果は、NPBWR1ニューロンが社会的新奇嗜好性を制御することを示し、ヒトNPBWR1遺伝子の遺伝的多型が社会性に関わる性格傾向に関与することが示唆される。

NPB/WはGiタンパク質を介してNPBWR1ニューロンを抑制するため、新奇個体との接触によって増加するNPBWR1ニューロンの活動がどのような分子によって制御されているかは依然として不明である。NPBWR1のリガンドであるNPWを産生し、CeAに投射する背側縫線核(DR)のニューロンはドーパミンを産生する(NPW/DAニューロン)ことが報告されていることから(Motoike et al., 2016)、NPWとドーパミンがNPBWR1ニューロンに拮抗的に作用し、新奇個体とのソーシャルディスタンスを制御する可能性を検証する。

【方法・結果】

CeAのNPBWR1ニューロンがドーパミンにより制御される可能性を検証するため、NPBWR1ニューロンにおける興奮性のドーパミン1型受容体(Drd1)および抑制性のドーパミン2型受容体(Drd2)mRNAの発現パターンを*in situ* hybridizationにより検証した。その結果、NPBWR1はDrd1を共発現する一方で、Drd2はほとんど発現しないことを確認した(図2A)。さ

らに、新奇個体または既知個体との接触時において、NPBWR1ニューロンにおけるドーパミン放出を検証するため、GRAB_{DA}センサー(Fangmiao Sung et al., 2020)を用いたファイバーフォトメトリー法による蛍光イメージングを行った。その結果、新奇個体との接触時にNPBWR1ニューロンにおけるドーパミン放出が増加したが、既知個体との接触時にはそのような現象は観察されなかった(図2B)。

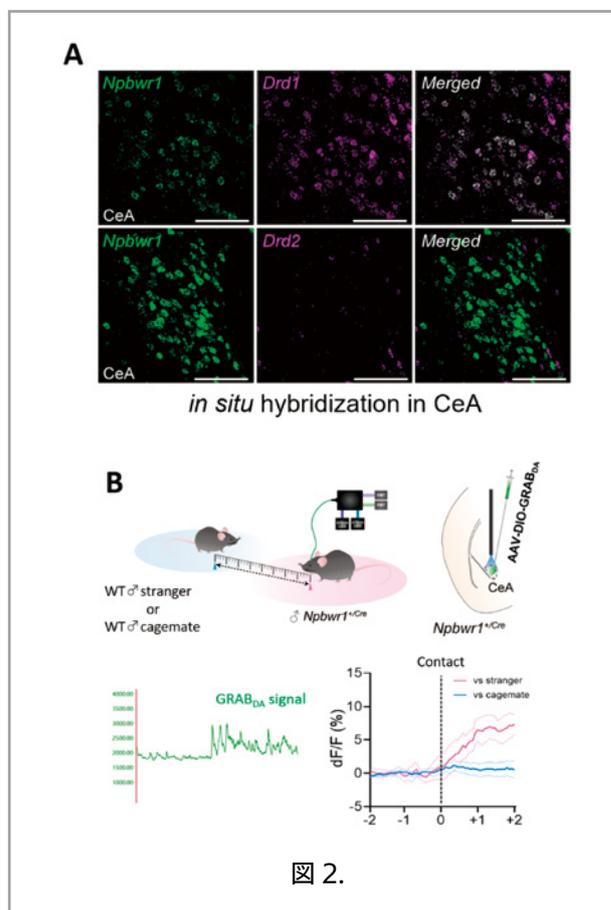


図2.

【考察】

本研究の成果により、新奇個体との接触時に高まるNPBWR1ニューロンの神経活動は、CeAに投射するDRのNPW/DAニューロンのドーパミン放出によるものである可能性が示唆された。さらに、その神経メカニズムはDrD1を介することが推察される。今後は、NPBWR1ニューロン特異的にDrD1をノックダウンする実験や、NPBWR1ニューロンの活動(GCaMP6s)と放出されるドーパミン(GRAB_{DA})の2色イメージング実験を行うことにより、ドーパミンを介したNPBWR1ニューロンの制御メカニズムを明らかにする。

【文献】

1. Nagata-Kuroiwa, Ruby, Naoki Furutani, Junko Hara, Mari Hondo, Makoto Ishii, Tomomi Abe, Michihiro Mieda, et al. 2011. “Critical Role of Neuropeptides B/W Receptor 1 Signaling in Social Behavior and Fear Memory.” *PloS One* 6 (2): e16972.
2. Shingo Soya, Koji Toda, Katsuyasu Sakurai, Cherasse Yoan, Yuki C Saito, Manabu Abe, Kenji Sakimura, Takeshi Sakurai: Central amygdala NPBWR1 neurons facilitate social novelty seeking and new social interaction, *Science Advances*, 11, eadn1335, 2025
3. Toshiyuki Motoike, Jeffrey M. Long, Hirokazu Tanaka, Christopher M. Sinton, Amber Skach, S. Clay Williams, Robert E. Hammer, Takeshi Sakurai, and Masashi Yanagisawa: Mesolimbic neuropeptide W coordinates stress responses under novel environments, *PNAS* 113(21)6023-6028, 2016
4. Fangmiao Sun et al. 2020. Next-generation GRABsensors for monitoring dopaminergic activity in vivo. *Nature Method*, 17, 1156-1166

Electron transfer flavoprotein alpha のアセチル化修飾と糖尿病心における脂肪酸β酸化の制御

館 越 勇 輝

(札幌医科大学薬理学講座)

【目的】

糖尿病性心筋症では脂肪酸β酸化(FAO)の活性変容が心機能障害に寄与するとされるが、その分子機構は十分に解明されていない。近年、ミトコンドリアタンパク質のリジンアセチル化修飾が代謝調節に関与することが明らかになっている。本研究では2型糖尿病モデルラット(OLETF)を用い、ミトコンドリアFAO関連タンパク質のアセチル化変化とその機能的意義を解析し、糖尿病性心筋症の新たな治療標的を同定することを目的とした。

【方法】

OLETFおよび対照LETOラット心筋からミトコンドリア画分を抽出し、(1)アセチロミクス解析でアセチル化部位を網羅的同定、(2)プロテオミクス解析で発現変化とアセチル化の関係を評価、(3)免疫沈降・ウエスタンブロットでETFA発現量とアセチル化を比較、(4)H9c2細胞でEtfA遺伝子をDsiRNAによりノックダウンし、細胞増殖・細胞死を評価した。

【結果】

OLETFでは高血糖とMyh7発現上昇を示した。アセチロミクス解析で55箇所のアセチル化上昇が検出され、多くがFAO関連タンパク質であった。特にETFAの3箇所(K69, K75, K126)で顕著な増加を認めた。プロテオミクス解析ではACADVL, ACADM, HADHA, HADHB, ACOT2などで発現増加がみられ、これらの多くはアセチル化上昇と並行していた。一方ETFA発現量は変化せず、免疫沈降でも発現差はないがアセチル化増加が確認された。EtfAノックダウンでは細胞死は変化せず、増殖低下が認められた。

【結論】

糖尿病心ではFAO関連酵素発現が広く上昇する一方、ETFAは発現一定ながら特異的にアセチル化が増加していた。ETFAはFAO初期反応で電子伝達を担いフラックス全体を制御する重要分子であり、その修飾変化

は代謝制御や心機能障害に寄与する可能性がある。今後、分子生物学的・薬理学的手法でETFA アセチル化を制御し、FAO 活性やミトコンドリア機能、さらには心機能への影響を明らかにする予定である。

メタボリックシンドロームにおける心臓組織
URAT1 の機能に関して

田中 祥朗

(東京慈恵会医科大学 内科学講座 循環器内科)

【目的／背景】

高尿酸血症はメタボリックシンドローム、心不全、虚血性心疾患などの心血管代謝疾患と関連することが報告されている。我々は虚血性心疾患患者のカテーテル検査データベースを用いて、高尿酸血症が高血圧、脂質異常症、腎機能、糖尿病などとは独立して左室駆出率と負の相関を示すことを明らかにした¹⁾。この結果からは、①左室駆出率の低下により尿酸値が上昇する可能性、②高尿酸血症自体が左室駆出率を低下させる可能性の2つが考えられた。①については、不全心筋のエネルギー代謝に着目し、不全心筋におけるキサンチンオキシダーゼ活性化と尿酸産生亢進を確認した²⁾。一方②については、細胞外尿酸が心筋細胞や心臓組織に作用するためには、心血管組織に尿酸トランスポーターが存在する必要がある。そこで、まず腎近位尿管で尿酸再吸収を担うURAT1に着目した。URAT1は高インスリン血症を伴うメタボリックシンドロームにおいて発現・活性が亢進し、高尿酸血症を引き起こすことが報告されている。さらに我々は、URAT1が腎臓以外に褐色脂肪、白色脂肪、肝臓にも発現し、メタボリッ

クシンドローム下で炎症や酸化ストレスを惹起して病態形成に寄与することを報告した³⁾。

これらを踏まえ、②の可能性を検証するため心筋細胞および心臓組織におけるURAT1の発現・機能を確認した。その結果、マウスの心臓組織および心筋細胞にURAT1の発現を認めた。さらに、高脂肪食を16～20週間投与したメタボリックシンドロームモデルマウスに対しURAT1選択的阻害薬ドチヌラドを4週間投与したところ、心筋線維化や炎症性サイトカイン上昇が抑制され、心機能改善が認められた(TMFC2023年度研究報告書)。しかし、この作用が心筋細胞、血管内皮細胞、心筋線維芽細胞といった心臓組織構成細胞に対してどのように影響するかは不明である。そこで本研究では、URAT1の心筋細胞・血管内皮細胞・心筋線維芽細胞における機能と、メタボリックシンドローム下での意義を明らかにすることを目的とした。

【方法】

(1) 仔ラット培養心筋細胞, (2) 仔ラット培養心筋線維芽細胞, (3) ヒト臍帯血内皮細胞(HUVEC)を用い、尿酸、飽和脂肪酸、高血糖などの因子によるURAT1発現変化、およびそれらにより誘導される酸化ストレスや細胞死について検討した。

【結果】

まず、尿酸濃度(0, 5, 15 mg/dl)およびドチヌラド(15 μM)の有無で細胞内尿酸濃度を評価したところ、いずれの細胞も高濃度尿酸(15 mg/dl)で1時間培養後に細胞内尿酸濃度が上昇した。培養心筋細胞では5 mg/dlおよび15 mg/dl条件でドチヌラドによる抑制効果を認めた。心筋線維芽細胞では抑制効果は認められず、HUVECでは15 mg/dl条件でドチヌラドによる尿酸濃度低下を認めた(図1)。以上から、心筋細胞および

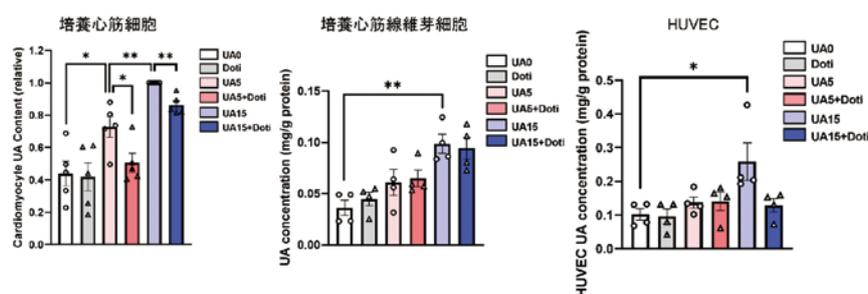


図1. 各細胞における尿酸取り込み能の評価

HUVEC では URAT1 が尿酸トランスポーターとして機能してと考えられた。次に URAT1 発現を増加させる因子を検討した。その結果、尿酸、インスリン、高血糖では変化は認められず、飽和脂肪酸パルミチン酸のみが心筋細胞で URAT1 発現を増加させた。この現象は線維芽細胞や HUVEC では認められなかった (図 2)。さらに、パルミチン酸による心筋細胞傷害の主要経路である MAPK リン酸化は、URAT1 ノックダウンまたはドチヌラド投与により抑制された。同様に、パルミチン酸によるアポトーシスシグナルも両条件で抑制された (図 3a, 3b)。加えて、パルミチン酸誘導性のキサンチンオキシダーゼ由来過酸化水素産生および尿酸産生もドチヌラドで抑制された。炎症性サイトカイン (TNF α , MCP-1, IL-1 β) の上昇も同様にドチヌラドで抑制された。以上より、パルミチン酸は心筋細胞における URAT1 発現の正の調節因子であり、URAT1 阻害によりパルミチン酸誘導性心筋細胞傷害が軽減されることが示唆された⁴⁾。

【考察】

心筋細胞、心筋線維芽細胞、血管内皮細胞において

URAT1 の発現を確認し、特に心筋細胞および血管内皮細胞では URAT1 が尿酸トランスポーターとして機能する可能性を示した。さらに、メタボリックシンドロームの重要因子である飽和脂肪酸により心筋細胞で URAT1 が特異的に増加することを初めて示した。この詳細な分子機構は未解明だが、細胞内外の尿酸濃度調節に関わる URAT1 が心筋細胞に存在し、脂肪組織・肝臓に加えて心臓においても細胞・組織障害に直接関与していることは新たな知見である。今後は、URAT1 発現制御の分子機構解明および臨床データを用いた URAT1 阻害薬の有効性検討を通じ、メタボリックシンドロームや心血管疾患における新たな治療戦略の確立を目指したい。

【文献】

1. Tanaka Y, Nagoshi T, Kawai M, Uno G, Ito S, Yoshii A, et al. Close linkage between serum uric acid and cardiac dysfunction in patients with ischemic heart disease according to covariance structure analysis. *Sci Rep.* 2017;7(1):2519.
2. Tanaka Y, Nagoshi T, Yoshii A, Oi Y, Takahashi

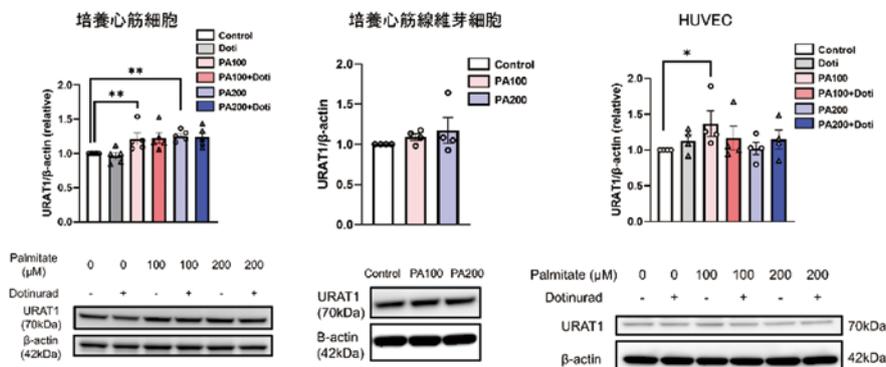


図 2. 各細胞におけるパルミチン酸による URAT1 発現量の変化について

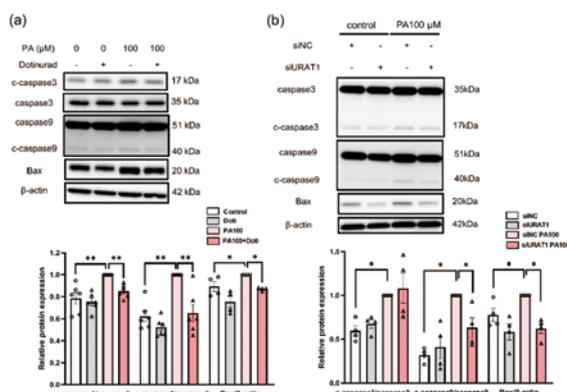


図 3. パルミチン酸心筋細胞傷害に与える URAT1 ノックダウン, URAT1 阻害薬の影響について

H, Kimura H, et al. Xanthine oxidase inhibition attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice. *Free Radic Biol Med.* 2021;162:298-308.

3. Tanaka Y, Nagoshi T, Takahashi H, Oi Y, Yoshii A, Kimura H, et al. URAT1-selective inhibition ameliorates insulin resistance by attenuating diet-induced hepatic steatosis and brown adipose tissue whitening in mice. *Mol Metab.* 2022;55:101411.
4. Tanaka Y, Nagoshi T, Takahashi H, Oi Y, Yasutake R, Yoshii A, et al. URAT1 is expressed in cardiomyocytes and dotinurad attenuates the development of diet-induced metabolic heart disease. *iScience.* 2023;26(9):107730.

ノンターゲットマルチオミクスによる生活習慣病の理解

津川 裕司

(東京農工大学グローバルイノベーション研究院)

【目的】

脂質は細胞膜やシグナル伝達など多様な生命現象に

関与する。一方、脂質構造は複雑であり、二重結合位置や水酸基の位置などの違いによって機能が大きく変化している。しかし従来の質量分析 (MS) 技術や情報解析ソフトウェアでは、脂質構造を分子種レベルで詳細に決定することが難しかった。本研究では、新たに開発したソフトウェア **MS-DIAL 5** と先端的なフラグメンテーション法 (Electron-Activated Dissociation: EAD) や空間リビドミクス手法を組み合わせ、脂質の詳細構造と生体内局在を明らかにする解析基盤の確立を目的とした。

【方法】

まず、脂質標準品化合物を用いて EAD による MS/MS 計測条件の最適化を行った。その後、MS-DIAL 5 に決定木様アルゴリズムを実装し、SN 位 (グリセロ脂質において、脂肪酸がどのグリセロールの OH 基に結合するか)、二重結合位置、水酸基の位置を自動的に判定することを可能とした。さらに、ヒト血漿やマウス脳・眼組織を含む生体試料に適用し、質量分析イメージング (MSI) や細胞培養実験と組み合わせて脂質の局在や代謝経路を生化学的に検証した。

【結果】

ベンチマークデータに対して MS-DIAL 5 の性能評価

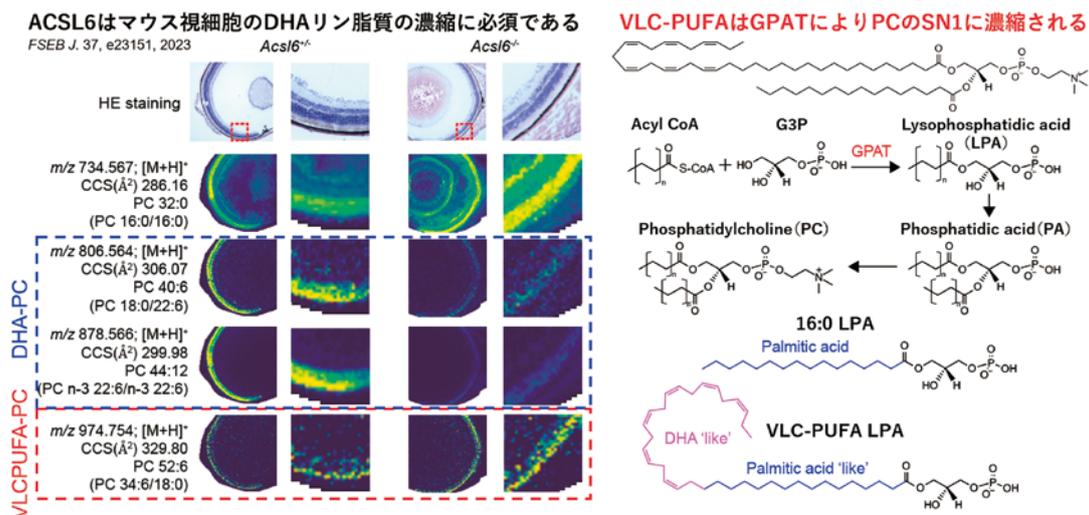


図.

本研究で明らかになった新しい脂質生化学の知見。ACSL6はドコサヘキサエン酸 (DHA) を基質として好む、脂肪酸の CoA 化を担う酵素として知られる。実際に *Acs16* ノックアウトマウスでは DHA-PC の量が減弱する。一方、DHA と同じ不飽和度 (二重結合数が 6) の視細胞に豊富に存在する VLC-PUFA を含有する PC はノックアウトで変化しない (左図)。VLC-PUFA の一部がパルミチン酸様 (PA) の構造をしていることから、PA を基質として好み、かつ SN1 に導入する活性のある GPAT に着目して検証を行った。

を行ったところ、96.4%のスペクトルに対して正確な構造アノテーションを達成し、そのうち78%はSN位や二重結合位置まで特定可能であった。また、マウス網膜に存在する超長鎖多価不飽和脂肪酸(VLC-PUFA)を含むリン脂質を詳細に解析したところ、それらが主にSN1位に取り込まれることを明らかにした。さらに、n-3 VLC-PUFAを添加したHeLa細胞や無細胞タンパク質合成系の実験から、グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ(GPAT)がその取り込みに関与することを実証した(図)。

【考察】

本研究は、脂質構造の微細な差異を網羅的に解析する基盤を構築したことが学術的価値の高い点である。また、眼特異的脂質であるVLC-PUFAリン脂質の合成経路にGPATが関わることを示したことは、網膜の機能や疾患研究に新たな視点を与えるものである。

【文献】

MS-DIAL 5 multimodal mass spectrometry data mining unveils lipidome complexities. *Nature Communications* 15, 9903 (2024).

シェーグレン症候群をモデルとした三次リンパ組織の形成機構の解明

辻 本 考 平

(大阪大学大学院医学研究科呼吸器・免疫内科学)

【目的】

ヒトの免疫系は多種細胞間での高度なネットワークを形成し、精緻にコントロールされている。三次リンパ組織(TLS: tertiary lymphoid structures)は感染症や慢性炎症、がんといった刺激に応答して後天的に形成されるリンパ組織である。TLSは炎症組織の微小環境においてエフェクター細胞の維持や、抗体の親和性成熟や産生をもたらす、局所炎症の制御に重要な役割を果たしていると考えられている。TLSの解析に関する先行研究は遺伝子改変マウスを用いた解析が中心であり、特にヒトにおける形成過程における細胞間の相互作用や必要な因子においてはまだ理解が不十分である。

【方法】

シェーグレン症候群は唾液腺や涙腺などの外分泌腺へのリンパ球浸潤を特徴とする自己免疫疾患である。病理学的には唾液腺の導管周囲に顕著なリンパ球浸潤が見られ腺房細胞の消失が特徴とされる一方で、唾液腺内におけるTLSの形成が疾患の病態に深く関与していると考えられている。今回の研究ではシェーグレン症候群の患者から採取した唾液腺を用いてシングルセルRNAシーケンシング(scRNA-seq)、空間トランスクリプトーム解析、B細胞受容体のレパトア解析を組み合わせることで、その形成メカニズムおよび機能の解析を試みた。

【結果】

罹病期間や超音波で観察される唾液腺の障害度、疾患の重症度など幅広い背景を有するシェーグレン症候群患者の唾液腺を用いてscRNA-seqによる一細胞レベルの遺伝子発現データを取得したところ、腺房細胞や導管細胞などの非免疫細胞およびT細胞、B細胞をはじめとする様々な免疫細胞を同定した。各細胞間で様々な相互作用を認めることが明らかとなった。また、空間トランスクリプトーム解析を用いて近接性に基づいた細胞アトラスを作成した。統合された単一細胞トランスクリプトーム解析により、TLSの成熟に伴う細胞蓄積の動態や細胞間相互作用が明らかとなり、その進行が段階的に進むことが明らかとなった。単一細胞レベルでのB細胞受容体解析により、TLSがB細胞の成熟に寄与している可能性が示唆された。

【考察】

原発性シェーグレン症候群におけるTLSの段階的かつ進行的な成熟過程の一端が明らかとなった。

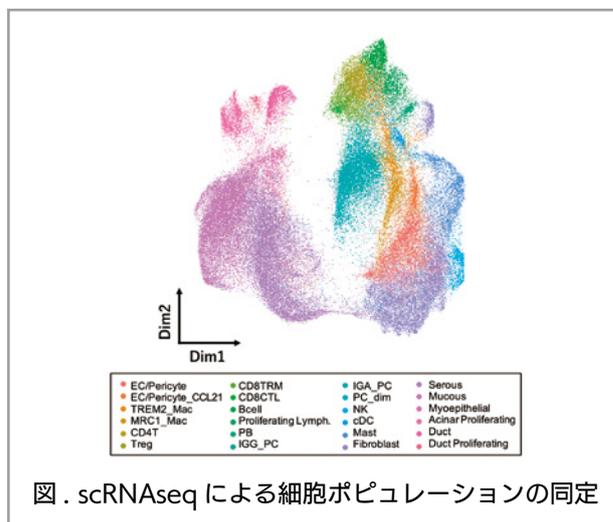


図. scRNAseqによる細胞ポピュレーションの同定

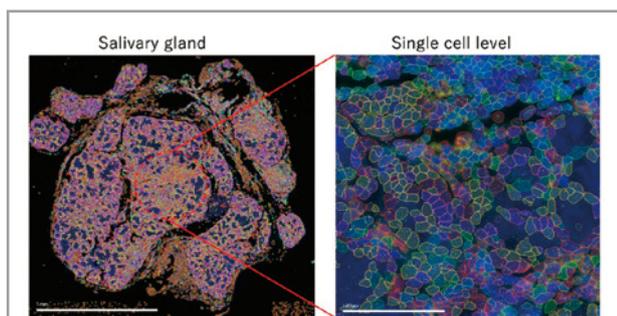


図. 空間トランスクリプトーム解析による遺伝子発現情報の取得

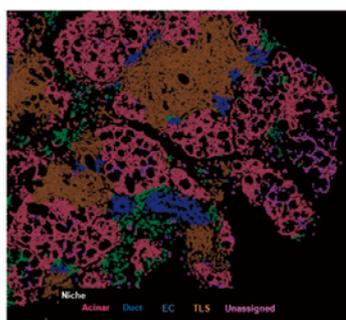


図. 空間トランスクリプトーム解析による細胞環境 (niche) の同定

社会ストレスによる脳組織の超微細な細胞生物学的変化とその機序・役割の解明

永井裕崇

(自治医科大学医学部組織学部門)

【目的】

社会や環境より受けるストレスは抑うつや不安亢進など情動変容を誘発し、うつ病など精神疾患のリスクとなる。うつ病患者やマウスのストレスモデルにおいて前頭前皮質神経細胞の機能形態変化が情動変容に重要である。これまで未発表ながら、慢性ストレスが前頭前皮質シナプスの糖代謝系変容を介して神経細胞の機能構造変化や脳内炎症、認知情動変容を導くことを見出してきた。さらに、神経回路特異的な分子操作により、海馬—前頭前皮質回路における糖代謝変容が認知機能障害に重要であることを見出してきた。これらの知見はストレス病態における回路特異的な糖代謝変容がストレスによる多様な行動変容を招くことを示唆する。しかし、代謝変容が神経細胞の機能変化を生じ

る機序は不明であった。そこで本研究ではリン酸化プロテオーム解析及び責任キナーゼ推定解析を行い、代謝変化と神経細胞の機能変化をつなぐシグナル伝達経路を明らかにすることを目的とした。

【方法】

慢性社会ストレスに供したマウスから前頭前皮質を回収し、定量プロテオーム解析およびリン酸化ペプチドの濃縮によるリン酸化プロテオーム解析を行った。その後 KinasePhos3.0 ソフトウェアを用いて責任キナーゼの推定を行った。

【結果と考察】

慢性ストレスに供した個体はうつ様行動（社会忌避行動）を示す感受性個体と示さない抵抗性個体に分かれる。感受性個体、抵抗性個体のいずれもストレスによる mTOR や GSK3 β の活性低下を示したが、抵抗性個体特異的に AKT1 や SGK1, AMPK の活性亢進を示した。また、AKT1 のリン酸化候補分子として、シナプス強度亢進と関連する分子が抽出された。また、認知情動変容を抑制できる糖代謝正常化を行うことで、抵抗性個体と同様に AKT1 や SGK1 が活性亢進することが分かった。これらの知見は、慢性ストレスが普遍的影響として mTOR や GSK3 β の活性低下を招く一方で、抵抗性個体特異的な AKT1 や SGK1 の活性化が神経機能を強化しうつ様行動を抑制すること、また、糖代謝変容がレジリエンス関連キナーゼの抑制を担うことが示唆された。これらの知見は本年度中に論文投稿予定である。

また、ストレス病態と老化病態の類似性に基づき並行して実施した解析で、加齢がマウス亜系統特異的な行動変容を生じることを明らかにした (J Pharmacol Sci 2025)。すなわち本研究においてはストレス・加齢病態における個体差を担う代謝性機序や遺伝学的背景の影響を明らかにした。

【文献】

Yamada R#, Nagai H#,* , Horikawa I, Qiu W, Zhu Y, Ota K, Furuyashiki T*. C57BL/6J and C57BL/6N mice show distinct aging-associated behavioral alterations. J Pharmacol Sci, 2025, 157, 124-129. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2025.01.002> (#Co-first authors, *Co-corresponding authors)

細胞競合の分子機構の遺伝学的解明

永田 理奈

(京都大学大学院 生命科学研究所)

【目的】

細胞競合とは、組織中の適応度の高い細胞（勝者）が適応度の低い細胞（敗者）に細胞死を誘導して排除する現象であり、がんの制御に重要であることがわかっている。例えば、転写共役因子 Yki/YAP が活性化した細胞は、自身が増殖するだけでなく周りの正常細胞に細胞死を誘導し、細胞競合の勝者となることが知られている。我々はこれまでに、Yki 活性化細胞では Yki のターゲットである miRNA *bantam* を介して TOR シグナルが活性化し、これが周りの正常細胞のオートファジー依存的な細胞死を誘導することで腫瘍を拡大することを見いだした¹⁾。興味深いことに、*bantam* を過剰発現するだけで、周囲の正常細胞に細胞死を誘導して細胞競合を引き起こすことを見いだした。そこで本研究では、*bantam* の標的遺伝子に着目した遺伝学的スクリーニングを行うことで、細胞競合を引き起こす十分条件を見いだすことを目的とした。細胞競合の誘導に必要な最小単位がわかれば、これを人為的に制御する方法論を確立できる可能性があり、新たながん治療への応用が期待される。

【方法】

bantam は miRNA であることから、その標的遺伝子をノックダウンすることで細胞競合に必要な最小単位を同定できると考えた。そこで本研究では、まず *bantam* の標的遺伝子の「大量ノックダウン」を行い、細胞競合が起きる条件を探索した。具体的には、*bantam* の複数の標的遺伝子の shRNA をタンデムに並べたベクターを作製してトランスジェニックフライ系統を樹立し、異なる shRNA セットをもつトランスジェニックフライ同士の掛け合わせと部位特異的 DNA 組み換え技術を組み合わせることで、これら標的遺伝子の shRNA セットを次々とつなぎ合わせていった。これにより、*bantam* の標的候補遺伝子の同時大量ノックダウンを実現した（東京理科大学・近藤周 准教授との共同研究）。

【結果】

スクリーニングの結果、17 遺伝子の同時ノックダウンにより細胞競合が引き起こされることを見いだした。17 遺伝子のノックダウン細胞集団を組織に誘導すると組織を拡大し、周囲の正常細胞に細胞死を誘導して細胞競合の勝者となることがわかった（図）。

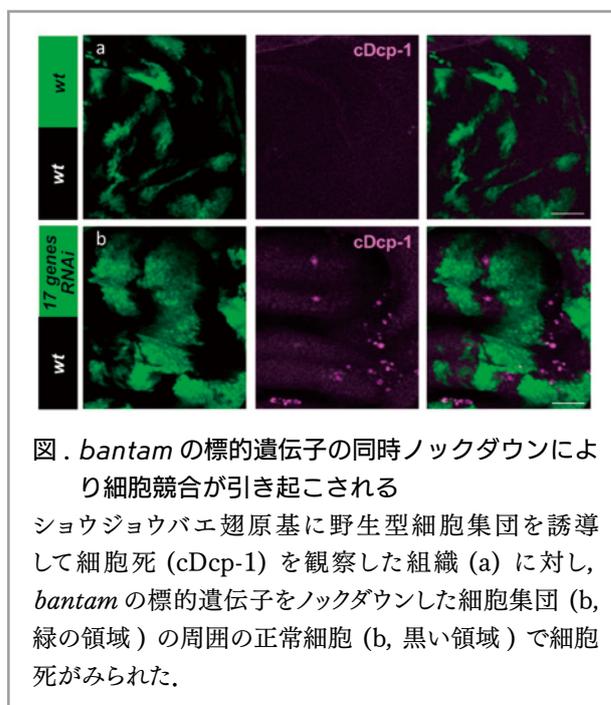


図. *bantam* の標的遺伝子の同時ノックダウンにより細胞競合が引き起こされる

ショウジョウバエ翅原基に野生型細胞集団を誘導して細胞死 (cDcp-1) を観察した組織 (a) に対し、*bantam* の標的遺伝子をノックダウンした細胞集団 (b, 緑の領域) の周囲の正常細胞 (b, 黒い領域) で細胞死がみられた。

【考察】

これまでの自身の研究結果により、*bantam* の標的遺伝子を一つずつノックダウンしても細胞競合は引き起こされなかったことから、*bantam* の下流で細胞競合に必要な因子は複数あることがわかっている。今後はこの 17 遺伝子から shRNA を一つずつ除いていき、細胞競合が起こらなくなる組み合わせを見いだすことで、細胞競合を引き起こす最小単位を明らかにする。

【文献】

- 1) Nagata, R *et al.*, Yorkie drives supercompetition by non-autonomous induction of autophagy via *bantam* microRNA in *Drosophila*. *Current Biology* 32,1064-1076 (2022)

神経ガイダンス因子による神経 - 免疫 - 代謝関連 メカニズムの解明

中西 由光

(大阪大学大学院医学系研究科 呼吸器・免疫内科学)

【目的】

神経 - 免疫 - 代謝関連形成を担う分子の同定および機能解析

【方法】

ヒトにおける精神系形質、代謝系形質に共通する分子として同定したセマフォリン 6D (SEMA6D) の機能解析をマウスモデルで行った。SEMA6D 欠損マウスを用いて行動試験を行い、中枢神経応答を評価した。次に、同マウスを用いて高脂肪食負荷肥満モデルを行い、脂肪組織、肝臓における代謝及び骨髄における造血への SEMA6D の関与を検討した。また、交感神経系の関与を検討するため、SEMA6D 欠損マウスにおいて β 3 アドレナリン受容体 (Adrb3) を欠損させ、高脂肪食負荷肥満モデルを行った。次に Spatial transcriptomics と single nucleus RNA-seq (snRNA-seq) の統合解析を行い、脳内における SEMA6D の機能探索を行った。さらに、in situ hybridization による *Sema6d* 発現評価および質量分析イメージングによる神経伝達物質定量評価を行うとともに、ゴルジ染色による神経細胞樹状突起の形態評価を行った。最後に扁桃体中心核特異的 SEMA6D 欠損マウスを用いて機能評価を行った。

【結果】

SEMA6D 欠損マウスを用いて行動試験を行ったところ、神経細胞の SEMA6D 欠損 (*Sema6d*^{KO-Tau}) により不安様行動の増強を認めた。次に高脂肪食負荷を行ったところ、*Sema6d*^{KO-Tau} マウスでは肥満抵抗性を認めた。また、各種臓器への脂肪沈着が抑制された。高脂肪食はミエロイド系血球の造血を亢進させることが知られているが、*Sema6d*^{KO-Tau} マウスでは高脂肪食負荷下において著明な好中球増加を認めた。さらに、SEMA6D 欠損マウスにおいて Adrb3 を欠損させると肥満抵抗性の改善を認めた。次に SEMA6D シグナルによる情動と自律神経応答の制御機構を探索した。Spatial transcriptomics, snRNA-seq および in situ

hybridization の結果から、扁桃体の抑制性ニューロンが SEMA6D を高発現しており、SEMA6D 欠損による興奮性ニューロンのシナプス機能異常、抑制性ニューロンの GABA シグナル異常が示唆された。実際、ゴルジ染色で SEMA6D 欠損マウスの興奮性ニューロンでは異常スパインの増加を認め、質量分析イメージングで SEMA6D 欠損マウス扁桃体の GABA 産生低下を認めた。最後に、アデノ随伴ウイルスを用いて扁桃体中心核特異的に SEMA6D を欠損させたところ、不安様行動の増強と共に肥満抵抗性を認めた。

【結論】

扁桃体の抑制性ニューロンに発現する SEMA6D はスパイン形成および GABA シグナルの制御を介して情動と自律神経応答を共役させる。

【文献】

Nakanishi Y, Izumi M, Matsushita H, Koyama Y, Diez D, Takamatsu H, et al.: Semaphorin 6D tunes amygdalar circuits for emotional, metabolic, and inflammatory outputs. *Neuron*. 112(17):2955-72.e9 (2024).

ポドサイトレトロトランスポゾンと慢性腎臓病

中道 蘭

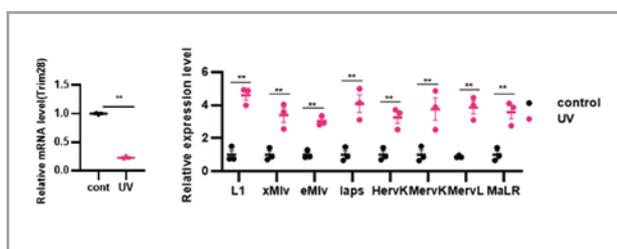
(慶應義塾大学 医学部 内科学教室 腎臓内分泌代謝科)

【目的】

急速な高齢化により増加している慢性腎臓病 (Chronic kidney disease; CKD) は末期腎不全のリスクであるとともに他臓器の老化にとって非常に重要なリスク因子であることが同定された。申請者は DNA 損傷ポドサイトが惹起する自然免疫応答および CD8⁺T 細胞の活性化に関わる全身性の免疫システムへの影響について検討したこれまへの研究成果を基に、DNA 損傷と密接にかかわる内在性レトロトランスポゾン (ERT) に焦点を当てて、内在性レトロトランスポゾン蛋白由来のポドサイト新規自己抗原を同定することで、CD8⁺T 細胞とポドサイトのクロストークのより詳細なメカニズムについて解明し、これに引き続いて起こる T 細胞疲弊を介した他臓器の老化のメカニズム解明をめざす。

【方法】

本研究では培養マウスポドサイトを用いたUV照射によるDNA損傷の誘導によりERTのサイレンシングに必要な因子Trim28の低下に伴うERTの発現上昇を認めたという結果を踏まえ、ポドサイト特異的にTrim28をノックアウトしたマウスを作成し、ポドサイトの新規自己抗原の解明を目指し、さらにポドサイトとCD8⁺T細胞のクロストークが腎臓の免疫微小環境ならびに全身の免疫システムに与える影響を介した全身老化を加速させるメカニズムの解明を目指す。



【結果】

本マウスは6週齢前後より足突起の癒合を伴うアルブミン尿の有意な増加を認め、週齢が進むにつれて増悪を呈した。KOマウスより単離したポドサイトにおいてERTの活性化が認められた。腎臓においてT細胞についてFACSを用いて評価を行ったところCD8⁺T細胞ならびにCD4⁺T細胞においてPD-1陽性の疲弊化形質を示すT細胞の増加を認め、さらに末梢血においても同様の変化を認めた。さらにこれらの変化が他臓器、特に脳に与える影響を検証するために、脳組織における変化を確認したところ、海馬においてcFOS活性の低下を認め、神経活動の低下が認められ、同時にミクログリアの活性化が認められた。

【考察】

ポドサイトDNA損傷により誘導されるTrim28の発現低下によりポドサイトにおいてERTの活性化が認められ、ポドサイトの形態学的変化を伴い、尿蛋白を伴うCKDの進展に寄与する可能性が示唆された。また同時にポドサイトで活性化したERTにより腎臓免疫微小環境のみならず全身のT細胞の疲弊が誘導された。T細胞とミクログリアの関連により脳白質老化が報告されており、今後脳腎連関についてさらに検討を行う予定である。

腸内細菌が腸管運動機能に及ぼす影響とその機序

白 曉 鵬

(九州大学病院肝臓膵臓胆道内科)

【研究背景】

腸内細菌は神経-免疫-筋の階層を介して腸管運動を調節しうることが示唆されてきたが、その実体と可逆性・部位特異性・菌種特異性は十分に整理されていない。本研究では、腸内細菌-TLR（自然免疫）-腸管グリア-VIP/ChAT陽性神経-ACh-平滑筋の連関を小腸（主に空腸）で検証し、治療標的としての妥当性を総括した。

【方法】

SPF、無菌（GF）、単菌ノトバイオート（EC: *E. coli* / LR: *Lactobacillus*）およびMyd88^{-/-}Trif^{-/-}マウスを用い、*in vivo*消化管運動、*ex vivo*平滑筋収縮、筋間神経叢のVIP/ChAT免疫染色、Nanostring解析を実施。さらに、gliotoxinで腸管グリア機能を抑制し、抗菌薬投与や変異株HA107の一過性定着で菌量・活性を操作して可逆性を評価した。

【主要成果】

- 胃排出は群間差なく、一方、小腸トランジットはGFで有意に低下し、EC/LR定着で回復した。平滑筋の基礎収縮は概ね同等だが、神経性制御が菌依存的に増強された。VIPはChAT共局在神経で上昇し、腸内細菌の存在下で強い発現を示した（図1）。
- VIP発現量は小腸運動機能と正相関し、TLR非活性（Myd88^{-/-}Trif^{-/-}）ではGF/SPFいずれの条件でもVIPと運動が低下、自然免疫依存性が裏付けられた（図2）。
- NanostringでGF群S100b低下を認め、gliotoxinでグリア細胞を抑制するとVIPと運動が低下し、グリア細胞介在が実証された。
- HA107をGFに一過性定着させると菌生存期にVIPと運動が維持され、菌死滅後に低下。SPFへの短期抗菌薬でも同様の低下を確認し、経路の可逆性と菌量依存性を示した。
- 臨床面では、（別途取得したヒト標本の所見を踏まえ）空腸VIP低下が腸管運動障害と整合し、基礎

から臨床への接続可能性が示唆された。

6. 以上内容を含め、原著論文 Vasoactive Intestinal Polypeptide Plays a Key Role in the Microbial-Neuroimmune Control of Intestinal Motility. Cell Mol Gastroenterol Hepatol. 2024;17(3):383-398. を作成した。

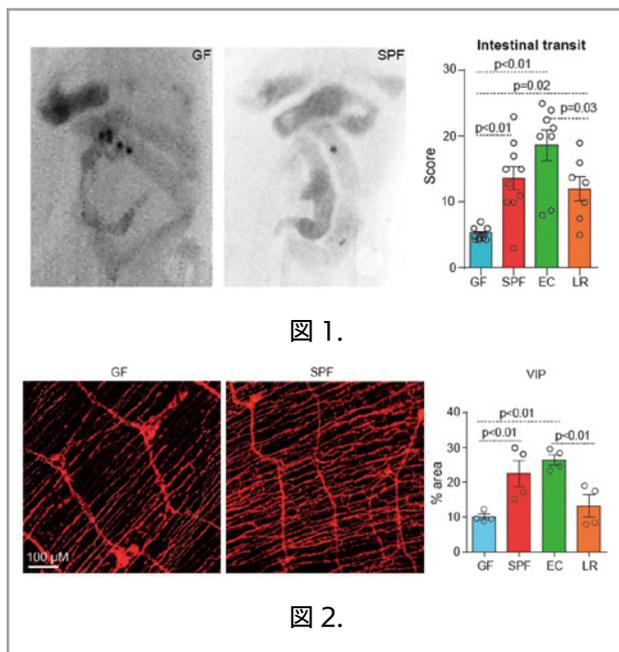


図 1.

図 2.

【総括・意義】

小腸運動は「腸内細菌→TLR（自然免疫）→腸管グリア→VIP/コリン作動性神経→ACh→平滑筋」という軸（図3）で上流から調節される。これは部位（空腸優位）・菌種（EC>LR等）依存的で、かつ可逆的である。したがって、①VIP経路の薬理的賦活化、②菌叢最適化（特定菌株・菌量）の併用が、慢性便秘・下痢、術後機能障害、CIPO様病態に対する新規治療戦略となりうる。加えて、VIPやS100b（グリア細胞マーカー）指標、あるいは菌叢特徴を用いた表現型層別化は、患者選択と効果予測に資する。

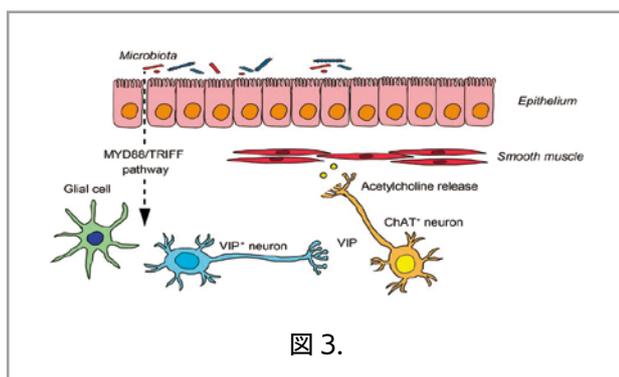


図 3.

【今後の展望】

TLRリガンド/起点菌株の同定、VIP作動薬・グリア標的の前臨床評価、ならびに「VIP・グリア・菌叢」バイオマーカーに基づく早期臨床試験設計を推進する。助成期間（2024/5/1-2025/4/30）に得た成果を核に、過去期間の知見を統合したうえで、総括的報告として提出する。

【文献】

- ① Quigley, E.M., Microflora modulation of motility. J Neurogastroenterol Motil, 17(2): p. 140-7. 2011.
- ② Barбора, W., Gut microbiota-motility interregulation: insights from in vivo, ex vivo and in silico studies. Gut Microbes. 14(1): 1997296. 2022.

多発性骨髄腫の予後不良因子である髄外病変における治療標的の探索

土師 正二郎

(九州大学大学院医学研究院 病態制御内科学分野)

【背景・目的】

多発性骨髄腫（以下骨髄腫）は多くの症例で再発する。骨髄外に病変を形成する髄外再発症例の予後は不良であるが髄外病変の形成機構や治療標的は不明である。

申請者はこれまで、患者の経時的な骨髄検体に対し scRNA-seq 解析を行い希少細胞の挙動を追跡してきた¹⁾。この際、特定の細胞が寛解後再発の度に増加する経過を観察し、寛解時に残存する耐性細胞における治療標的を同定できれば再発が抑制可能であると考えた。

本研究では髄外再発症例の骨髄検体に対し scRNA-seq 解析を行うことで寛解期骨髄に残存する髄外病変の祖先細胞を探索し、治療標的を同定することを目指した。

【方法と結果】

1. 寛解期に残存する細胞集団の同定とその機能解析
髄外病変を形成した患者の骨髄検体に対し scRNA-seq 解析を行った。寛解期に残存する未分化な細胞集団（未分化残存細胞）を同定し、この細胞集団における発現変動遺伝子（DEG）の多くが上皮間葉転換や浸潤に関

連し、また予後不良と相関することが明らかになった。
 2. 未分化残存細胞が一般化可能な集団であることの確認
 骨髄腫患者を対象とした公共 scRNA-seq データ (n=98) を再解析し、未分化残存細胞が骨髄腫患者で広く存在することを確認した。さらに未分化残存細胞に共通する 12 個の DEG (共通 DEG) を同定し、転写因子結合エンリッチメント解析により共通 DEG を制御する転写因子の候補として X を同定した。

3. 未分化残存細胞が髄外病変祖先細胞の候補となることの確認

未分化残存細胞と既報の髄外病変の遺伝子発現パターンが類似していたため、胸水・リンパ節・咽頭髄外再発計 5 例の scRNA-seq データを解析し、髄外病変の大部分を未分化残存細胞様細胞が占めることを見出した。骨髄・胸水髄外病変のペアサンプル scRNA-seq データを統合し擬時系列解析を行ったところ、骨髄中の未分化残存細胞から胸水中の腫瘍細胞へと遷移する可能性が示唆された。

4. 未分化残存細胞における治療標的の同定

DepMap を用いて共通 DEG の中から骨髄腫の生存に依存度が高い遺伝子を選択し、その中から正常細胞での発現が低い Y を選別した。患者骨髄よりソートした骨髄腫細胞に Y 阻害剤を添加し 48 時間後に生存率を解析したところ、未分化残存細胞への殺細胞効果を認めた。

【考察】

本助成により、寛解期に残存し髄外再発に関与する可能性のある未分化残存細胞を同定した。髄外病変祖先細胞における治療標的を同定できれば、予後不良な髄外病変形成を予防する治療法の開発にもつながる可能性があると考えられる。

【文献】

1) Masuda T*, Haji S* (*equally contributed), Nakashima Y, et al. Identification of a drug-response gene in multiple myeloma through longitudinal single-cell transcriptome sequencing. *iScience*. 25(8).2022.

一次繊毛における中枢性摂食受容体の機能解析

濱本明恵

(広島大学大学院統合生命科学研究所)

【目的】

一次繊毛はほぼ全ての細胞に存在するアンテナ状の細胞小器官である。その機能不全は肥満や腎不全、精神疾患等を引き起こし、繊毛長の変化はニューロン形態やシナプス接続に影響を与える。我々は以前、メラニン凝集ホルモン受容体 1 (MCHR1) シグナルを抑制した遺伝子改変マウスにおいて、海馬 CA1 領域の一次繊毛が野生型よりも長く、うつ抵抗性を示すことを報告した。これに基づき、マウス拘束ストレスモデルを用いて「一次繊毛とうつ」の関連解明を目指して研究を行った。

【方法】

C57BL/6J マウスに 1 日あたり 2 時間の拘束ストレスを 3 日 (短期) または 3 週間 (長期) 負荷し、免疫組織染色法で一次繊毛への影響を調べた。うつ様症状は強制水泳試験 (FST) で評価した。

【結果・考察】

短期拘束ストレス: 前頭連合野 (FrA) において、一次繊毛長が 14.3%、繊毛保有率が 27% 減少した。この減少は 2 週間の通常飼育後、対照群と同程度に回復した。FST でうつ様行動は認められなかった。

長期拘束ストレス: 短期と同様に FrA における繊毛短縮や保有率の低下が認められた。一方、FST でうつ様行動を示した。これらの変化は 2 週間の通常飼育後も持続したが、10 週間で回復した。即ち、FrA における持続的な繊毛動態の変化とうつ様行動の間に時間的な相関関係があることが判明した。これは繊毛動態変化とうつ様行動を実験的に関連付けた初の報告である。

繊毛動態と MCH の関連: FrA では約 95% の神経繊毛が MCHR1 陽性であることから、拘束ストレス後の遺伝子発現を解析した結果、FrA において MCH 発現が有意に上昇した。ラット脳スライス培養実験においても、MCH 刺激により繊毛長と保有率が低下した。即ち、ストレスによる MCH 上昇が、FrA における MCHR1 陽性繊毛の短縮と消失を介してうつ発症に関与すると

考えられる。

【文献】

Takahashi, R.[#], Hamamoto, A.[#], Saito, Y., Mizuno, A., & Kobayashi, Y. Correlation between persistent changes in ciliary dynamics in the FrA and depressive-like behavior, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 762, 151767 (2025). ([#]Co-first authors)

近位尿細管 DNA 損傷が惹起する全身性代謝変容の 解明

菱川 彰 人

(慶應義塾大学医学部 腎臓内分泌代謝内科)

【背景】

慢性腎臓病（CKD）は加齢を背景とする主要な疾患であり、心血管疾患や全身性の代謝異常を合併することが生命予後を規定する。腎臓における DNA 損傷蓄積が CKD 進展の基盤となることは示唆されてきたが、腎局所の DNA 損傷が全身の代謝恒常性に及ぼす影響、とりわけ臓器間ネットワークを介した分子機序の全容は不明であった。本研究では、腎近位尿細管上皮細胞(PTEC)に生じた DNA 二本鎖切断が、免疫細胞を介して遠隔臓器の代謝を攪乱するという作業仮説を立て、その検証を試みた。

【方法】

PTEC 特異的に DNA 二本鎖切断を誘導する遺伝子改変マウス (γ GT-Cre, ROSA26-STOP-I-PpoI) を新規に樹立した。このモデルマウスを用い、代謝解析, scRNA-seq, 網羅的 DNA メチル化解析 (RRBS), メタボローム解析を実施した。さらに、培養 PTEC, マクロファージ株, 脂肪細胞株を用いた共培養実験, およびクロドロン酸リポソームを用いた *in vivo* でのマクロファージ除去実験により、細胞間相互作用の機序を解明した。ヒトの関連については、糖尿病性腎症患者の腎生検組織および血液検体を用いて検証した。

【結果】

PTEC 特異的な DNA 二本鎖切断は、腎機能の顕著な低下を伴わずして、体重減少, 脂肪組織量の低下, 耐糖能異常, インスリン抵抗性, 肝脂肪蓄積といった全

身性の代謝異常を惹起した。scRNA-seq 解析により、この表現型の背景に、腎臓, 肝臓, 脂肪組織における *Ly6Chi Ccr2+* 単球由来の *Ccr2hi CD11c+* 炎症性マクロファージの浸潤・集積が関与することを突き止めた。このマクロファージの質的变化の分子基盤として、末梢血単球におけるエピゲノムの改変が重要であった。RRBS 解析の結果、転写因子 KLF9 の結合モチーフを含むゲノム領域の低メチル化が同定され、その下流でパイロトーシスを司る Gasdermin D (GSDMD) 遺伝子の発現が顕著に亢進していた。

作用機序として、DNA 損傷 PTEC から放出される DAMPs がマクロファージを活性化し、活性化マクロファージから分泌される TNF- α 等の炎症性サイトカインが脂肪細胞の分化を抑制することが示された。マクロファージ除去により、本マウスモデルの耐糖能異常は有意に改善した。さらに、ヒト糖尿病性腎症においても、PTEC の DNA 損傷度と腎組織へのマクロファージ浸潤, ならびに末梢血における GSDMD 遺伝子の DNA メチル化レベルとの間に有意な相関を認め、本研究で得られた知見の臨床的妥当性が示唆された。

【考察】

本研究は、腎・近位尿細管を起点とする DNA 損傷が、末梢血単球のエピゲノムを再プログラム化することでその性質を変化させ、遠隔の代謝臓器に炎症性病態を伝播させるという、全く新しい臓器連関の機序を解明した。この「腎臓-血液-代謝臓器」という一連の病態カスケードの発見は、CKD に伴う全身性代謝異常の病態理解を大きく前進させるものである。本成果は、腎臓の老化が全身の老化・代謝異常を加速させるメカニズムの一端を説明するものであり、将来的には、この経路を標的とした治療介入が CKD 患者の生命予後改善に貢献する可能性を示唆している。

【成果発表】

本研究成果は、下記原著論文として国際学術誌に公開された。

- Nishimura ES, Hishikawa A, Nakamichi R, Akashio R, Chikuma S, Hashiguchi A, Yoshimoto N, Hama EY, Maruki T, Itoh W, Yamaguchi S, Yoshino J, Itoh H, Hayashi K. DNA damage in proximal tubules triggers systemic

metabolic dysfunction through epigenetically altered macrophages. Nat Commun. 2025 Apr 28;16(1):3958. doi: 10.1038/s41467-025-59297-x. PMID: 40295524; PMCID: PMC12037803.

概日リズム障害発症メカニズムの理解に向けた睡眠リズム制御機構の解明

平野 有沙

(筑波大学医学医療系)

【目的】

概日時計の中核である視交叉上核 (SCN) は複数の神経ペプチドが発現するヘテロな集団であり、腹側に局在する VIP 産生ニューロンは細胞間同調を担う一方、背側の AVP 産生ニューロンは概日リズムの出力に重要な役割を果たすと考えられている。一方、比較的少数でありながら SCN のほぼ中央に局在するガストリン放出ペプチド (GRP) 産生ニューロンは、光同調への関与が示唆されているもののその役割は長らく不明であった。そこで本研究では、GRP 産生ニューロンに特異的に遺伝子操作するため Grp-iCre マウスを用いて、

GRP 産生ニューロンの入出力を網羅的に明らかにするとともに、光への応答性やニューロンの操作によるマウス行動リズムへの影響を調べた。

【方法】

Grp-iCre マウスとアデノ随伴ウイルスおよび改変型狂犬病ウイルスを用いて、SCN の GRP 産生ニューロンに入出力するニューロンを網羅的に同定した。さらに、GRP 産生ニューロンの光への応答性を調べるため、カルシウムインジケーターである GCaMP6s を発現させ、ファイバフォトメトリ法により自由行動下のマウスから GRP 産生ニューロンの活動を測定した。さらに、興奮性 DREADD (hM3Dq) を用いて GRP 産生ニューロンを人為的に興奮させた時の行動リズム位相への効果を調べた。

【結果】

SCN の GRP 産生ニューロンは視床下部の複数の領域に神経投射していたが、SCN ニューロンが投射していると考えられていた視床下部腹内側核 VMH や弓状核 ARC にはほとんど軸索が観察されなかった。また、GRP 産生ニューロン主に SCN の他のニューロンからの入力を受けることがわかり、SCN 内の神経ネットワークに寄与すると考えられた。さらに、光をマウ

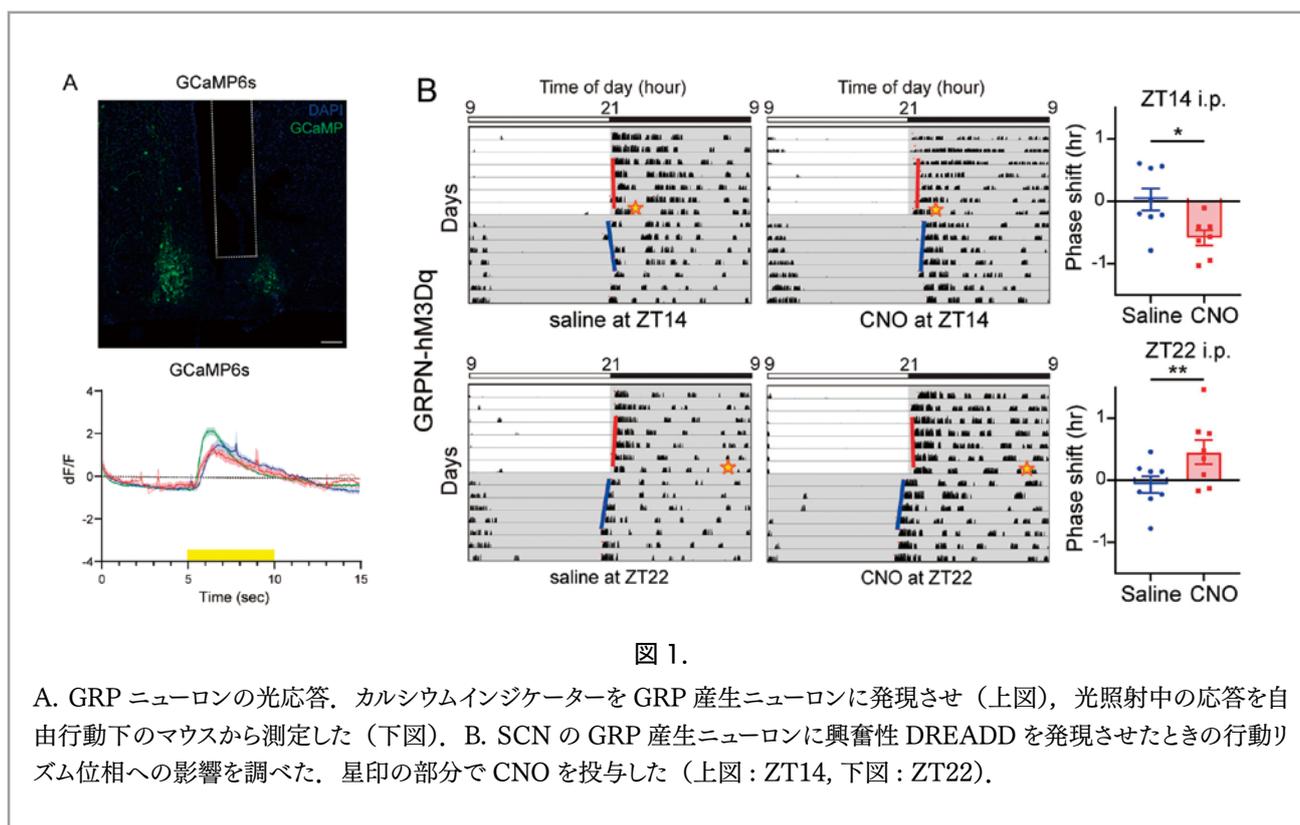


図 1.

A. GRP ニューロンの光応答。カルシウムインジケーターを GRP 産生ニューロンに発現させ (上図)、光照射中の応答を自由行動下のマウスから測定した (下図)。B. SCN の GRP 産生ニューロンに興奮性 DREADD を発現させたときの行動リズム位相への影響を調べた。星印の部分で CNO を投与した (上図: ZT14, 下図: ZT22)。

スに照射したときに GRP 産生ニューロンにおいて急激なカルシウム応答が観察された。DREADD により GRP 産生ニューロンを興奮させたときに興奮の時刻依存的に行動リズム位相が前進、または後退することを見出した。

【考察】

DREADD を用いた神経操作の結果は、光をマウスに照射したときの行動リズムシフトと非常によく似ていた。ファイバフォトメトリ法によるカルシウム応答の結果とあわせると、GRP 産生ニューロンは網膜を介して SCN が光情報を受け取り概日リズム位相をシフトするのに重要な役割を果たすと考えられる。

【文献】

Li R, Inoue R, Mori H, **Hirano A***, Sakurai T*>(*co-corresponding)

Gastrin Releasing Peptide-Producing Neurons in the Hypothalamic Suprachiasmatic Nucleus Convey Photic Information and are Involved in Photic Entrainment. *J. Neurosci.*, 2025, 45, e0065252025. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0065-25.2025.

ヒト副腎皮質腫瘍の発生機構と副腎皮質リモデリング機構の解明

福元多鶴

(九州大学大学院医学研究院 病態制御内科学分野)

【背景】

コルチゾール（糖質コルチコイド）は、副腎皮質束状層から分泌されるステロイドホルモンであり、視床下部 - 下垂体 - 副腎 (HPA) 軸により制御され、体内の恒常性を担っている。下垂体から分泌される副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) が副腎皮質細胞の MC2R 受容体に結合すると、細胞内で PKA 経路が活性化され、コルチゾール合成や細胞増殖・分化が促進される。副腎性クッシング症候群は、副腎皮質細胞において PKA 経路に関連する遺伝子 (*PRKACA*, *GNAS* など) の体細胞変異や生殖細胞変異がおこり、コルチゾール産生腺腫 (cortisol-producing adenoma; CPA) などのコルチゾール産生病変を形成することで発症する。しかし

ながらコルチゾール産生病変の発症機構は十分に解明されていない。副腎性クッシング症候群の標準的な治療は外科的切除であり、薬物療法はコルチゾール合成阻害に限られ、根本的な治療法の開発には、コルチゾール産生病変の発症機構の理解が不可欠である。

原発性色素性結節状副腎皮質病変 (Primary Pigmented Nodular Adrenocortical Disease; PPNAD) は、副腎性クッシング症候群の中でも稀な疾患で、多くは遺伝性多発腫瘍症候群である Carney complex に合併し、17 番染色体長腕 (17q22-24) に位置する *PRKARIA* 遺伝子の不活化型生殖細胞変異によって発症する。副腎皮質内にコルチゾール産生結節が多発し、ときに CPA を合併する特徴的な病態は、コルチゾール産生病変の発症機構を解明する重要なモデルとなる。しかし、PPNAD は病変が極めて小さいため、従来の解析法では細胞レベルでの詳細な解析が困難であった。近年、シングルセル RNA シーケンス (scRNA-seq) や空間トランスクリプトミクス (ST) の進歩により、細胞の多様性や組織内での遺伝子発現分布を詳細に解析できるようになった。最近、我々はこれらの最新技術をヒト副腎に応用し、新規の微小結節性コルチゾール産生病変を同定し、腫瘍発生メカニズムに関する新たな知見を報告している¹⁾。

【目的】

PPNAD をコルチゾール産生病変の発症モデルとし、その発生機構、分子病態の解明を目指す。

【方法】

CPA を合併した PPNAD 症例の副腎検体を用い、病理組織学的解析、ゲノム解析、scRNA-seq 解析、ST 解析を組み合わせた統合解析を実施する。

【結果】

組織学的解析；副腎皮質内に直径 3 mm 未満の複数の色素沈着結節、および、18mm 大の腺腫を認めた。結節、及び腺腫はコルチゾール合成酵素 CYP17A1 陽性であり、コルチゾール合成能を有することを確認、また腺腫を CPA と診断した。結節周囲には免疫細胞浸潤がみられた。結節は CPA と比較し、CYB5A (アンドロゲン合成酵素) 発現が高かった。

遺伝学的解析；結節 19 検体・CPA・周囲皮質の DNA を解析した結果、全てに *PRKARIA* の生殖細胞系列変

異 (c.708+1G>C) を認めた。CPA および 5 個の結節に *PRKARIA* 領域含む第 17 染色体の体細胞欠失、10 個の結節に *PRKARIA* の体細胞変異を同定した。これらの欠失、体細胞変異は各々異なっていた。正常副腎皮質には *PRKARIA* 体細胞欠失・変異はみられず、*PRKARIA* 両アレル不活化は結節と CPA に限られていた。免疫染色でも両者での *PRKARIA* タンパク発現消失を確認した。

トランスクリプトーム解析; scRNA-seq, ST 解析により、CPA 細胞と結節細胞は遺伝子発現パターンで明確に区別可能であった。ssGSEA 解析では、CPA 細胞は細胞増殖に関連する Wnt/ β -カテニン経路等のパスウェイが有意に活性化し、一方、結節細胞は炎症・免疫応答パスウェイの活性が優位であった。擬似時間解析は束状層細胞→結節細胞→CPA 細胞への分化経路を示し、また転写因子解析により *CTNNB1* が CPA への進展を促す主要因子であることが示唆された。結節は、アンドロゲン産生 (CYB5A 高発現)、免疫活性化、細胞老化といった特徴を有しており、それらによる腫瘍抑制作用が示唆された。この腫瘍抑制作用の検証のため、TCGA データを用い、副腎皮質癌 (Adrenocortical carcinoma; ACC) 症例の予後を検討したところ、結節シグネチャー高発現の ACC 症例は予後良好であった。

【考察】

ゲノム解析により、*PRKARIA* 生殖細胞系列変異 (1st hit) に加え、対立遺伝子の欠失または体細胞変異 (2nd hit) を確認し、*PRKARIA* 両アレルの喪失により PKA 経路が恒常的に活性化し、副腎皮質でのステロイド合成と細胞増殖が促進されると考えられた。また、各病変で 2nd hit の部位が異なっており、PPNAD 病変は各々独立した体細胞イベントにより多クローン病変として発生することが示された。

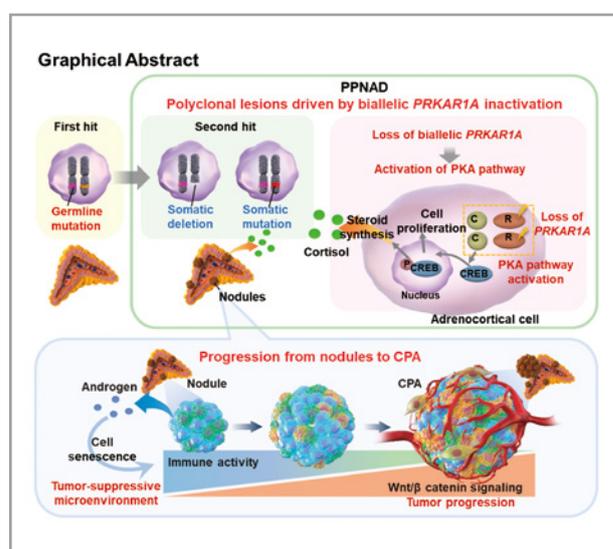
CPA でも結節と同様に *PRKARIA* 両アレル不活化が認められ、ゲノムレベルでは大きな差はみられなかった。トランスクリプトーム解析により、結節から CPA への移行経路が推測され、その過程に Wnt/ β -カテニン経路の活性化が関与することが示唆された。

PPNAD 結節は PKA 経路が活性化しているにもかかわらず 1 cm 未満の小病変にとどまっている。結節はアンドロゲンを産生する網状層様の遺伝子発現や、細胞

老化、免疫応答の活性化を示していた。近年の報告では、網状層の性質やアンドロゲンが腫瘍抑制効果を示すことが報告されており、本研究の TCGA-ACC 解析では結節シグネチャーが高い症例群で予後良好であった。これらにより、結節はアンドロゲンシグナル・炎症・老化を介して腫瘍抑制作用を有する一方、Wnt/ β -カテニン経路活性化による増殖作用が腫瘍 (CPA) への進展に寄与することが示唆された。

【結論】

本研究により、PPNAD 結節は *PRKARIA* 両アレル不活化により複数の独立クローンとして形成され、アンドロゲンシグナル活性化、炎症応答、細胞老化による腫瘍抑制的特徴を示すことが明らかにした。一方、Wnt/ β -カテニン経路活性化による増殖作用が CPA への進展に寄与することが示唆された。これらの知見は、副腎皮質腫瘍の発生における、腫瘍抑制作用と腫瘍増殖作用という多面的な分子進化モデルを提示している。この分子機構の理解は、副腎皮質腫瘍の発症・進展機構の全体像解明に寄与するだけでなく、新たな治療戦略や診断マーカー開発の基盤となることが期待される。



【文献】

1. Fukumoto T, Umakoshi H, Iwahashi N, et al. Steroids-producing nodules: a two-layered adrenocortical nodular structure as a precursor lesion of cortisol-producing adenoma. EBioMedicine.105087(2024).

鉄誘導性フェロトーシスのメカニズム解明

藤田 宏 明

(京都大学 大学院医学研究科)

【目的】

フェロトーシスは鉄により細胞膜リン脂質中の多価不飽和脂肪酸が酸化・傷害されることで惹起される鉄依存性の細胞死であり、がんや虚血性疾患、神経変性疾患との関連から精力的に解析されている。フェロトーシスは鉄による脂質過酸化と、セレンタンパク質 GPX4 などの過酸化脂質抑制系のバランスの乱れによって引き起こされる。これまでのフェロトーシス研究は「フェロ＝鉄」の名称に相反して、鉄の側面からのフェロトーシス研究は行われていなかった。そこで、鉄の側面からフェロトーシスを再解析し、新たな鉄毒性・フェロトーシス制御因子の探索を目指した。

【方法】

上記目的のため鉄添加のみでフェロトーシスを誘導できる新たな系を樹立した。

細胞内の鉄量は鉄センサータンパク質である FBXL5 によって厳密に調節されている。鉄過剰細胞を作成するため、FBXL5 欠損細胞を作成した。FBXL5 欠損細胞は鉄添加によって細胞内の鉄が増加し、細胞死を誘導できた。次に鉄誘導性フェロトーシスの制御因子を探索するべく、CRISPR スクリーニングを行なった。

【結果】

CRISPR スクリーニングの結果、新たなセレンタンパク質合成因子として PRDX6 を同定した。PRDX6 はセレン元素と結合し、セレンタンパク質合成因子へとセレンを運ぶセレン輸送体であることを明らかにした。さらに、他のセレンタンパク質合成因子を探索し、新たな制御因子と考えられる因子 A を同定している。また細胞死促進系としてヘム合成系の重要性を見出した。ヘム合成は毒性の高さからその動態は厳密に制御されていると考えられるが、細胞内のヘム貯蔵・輸送など細胞内動態制御機構は未だ不明である。スクリーニング結果より探索したところ、新たな制御因子と考えられる因子 B も同定している。

【考察】

フェロトーシスはセレン、鉄・ヘム代謝など様々な代謝系によって制御される細胞死であり、本研究で行ったスクリーニングはそれら代謝系の未解明な課題にチャレンジできるものと考えられる。見出した因子の解析を進行し、新たな制御系の解明を目指したい。

腫瘍微小環境に着目したアルドステロン産生副腎腫瘍の分子病態解明

藤田 政 道

(九州大学病院内分泌代謝・糖尿病内科)

【背景と目的】

アルドステロン産生腺腫 (Aldosterone Producing Adenoma; APA) は、原発性アルドステロン症の主要な原因であり、二次性高血圧の代表的な疾患である。APA は多様なステロイドホルモンを産生し、高血圧のみならず糖尿病や骨粗鬆症などの代謝合併症を伴い、コルチゾールの関与が想定されるが、詳細な分子機構は不明である。本研究ではマルチオミクス解析を用いて、APA の多様なステロイドホルモン産生細胞をシングルセルレベルで同定し、腫瘍微小環境との関連を明らかにするとともに、APA のステロイド産生の多様性が椎体骨折に与える影響について検討した。

【方法】

APA 手術検体を用いて、シングルセル RNA-seq 解析、空間トランスクリプトーム解析、網羅的ステロイドミクス解析等のマルチオミクス解析を実施した。また APA 患者と非機能性副腎腫瘍患者の臨床背景を比較し、胸腰椎 X 線による椎体骨折の評価を行った。

【結果】

APA のシングルセル RNA-seq 解析により、腫瘍細胞が4つの異なる細胞集団 (ストレス応答性細胞、アルドステロン産生細胞、コルチゾール産生細胞、間質様細胞) に分かれることを見出した。また APA の腫瘍微小環境では、脂質関連マクロファージ (LAM) が有意に増加しており (図 1)、LAM がコルチゾール産生細胞や間質様細胞と強く相互作用していた。LAM の割合は血中コルチゾール濃度や腫瘍サイズと有意に相関し (図 2)、コルチゾー

ル産生の増加や腫瘍増大との関連が示唆された。

臨床背景の解析では、APA で椎体骨折の頻度が多く、血中ステロイドプロファイルは椎体骨折の有無で明確に区別され、椎体骨折の判別にコルチゾールが最も寄与した。組織ステロイド定量およびイメージング質量分析により腫瘍内のコルチゾール産生を確認した(図3)。さらに組織内のコルチゾール濃度は血中コルチゾールと正に相関した。

瘍細胞との相互作用が APA の多様なステロイド産生や腫瘍増大に関わり、さらに腫瘍由来のコルチゾールが椎体骨折の発症に寄与する可能性が示唆された。

【文献】

Yokomoto-Umakoshi M, Fujita M, Umakoshi H, et al. Multiomics analysis unveils the cellular ecosystem with clinical relevance in aldosterone-producing adenomas with KCNJ5 mutations. Proc Natl Acad Sci U S A. 2025;122(9):e2421489122.

基質選択的な糖新生が全身に与える影響の解明

堀内 嵩弘

(東北大学大学院医学系研究科 糖尿病代謝・内分泌内科学分野)

【背景・目的】

肝臓の糖新生は、筋肉から供給される乳酸や、脂肪からのグリセロールなどの基質からグルコースを産生する機構である。運動時はエネルギー需要の増加に伴い糖新生が亢進するが、個々の基質がどのように使い分けられているかは明らかではなく、各基質を利用した肝糖新生が運動能に与える影響を解明することを目的とした。

【方法】

主要な糖新生基質である乳酸は Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1(PCK1)、グリセロールは Glycerol kinase (GYK) という別々の酵素を介した代謝経路を経てグルコースに変換される。そこで、各肝糖新生を遮断するため、後天的かつ肝臓特異的な GYK(L-GykKO) および PCK1(L-Pck1KO) のノックアウトマウスを作製し、トレッドミルを用いた高強度・低強度走行試験を行なった。

【結果】

L-Pck1KO マウスでは高強度、L-GykKO マウスでは低強度走行の運動能が低下していた。一方、肝臓の細胞質 [NADH]/[NAD⁺] 比の低下を介して、L-Pck1KO マウスではグリセロール、L-GykKO マウスでは乳酸からの糖新生が亢進し、それに合致して L-Pck1KO マウスでは低強度、L-GykKO マウスでは高強度の運動能が亢進していた。さらに、肝臓の細胞質 [NADH]/[NAD⁺]

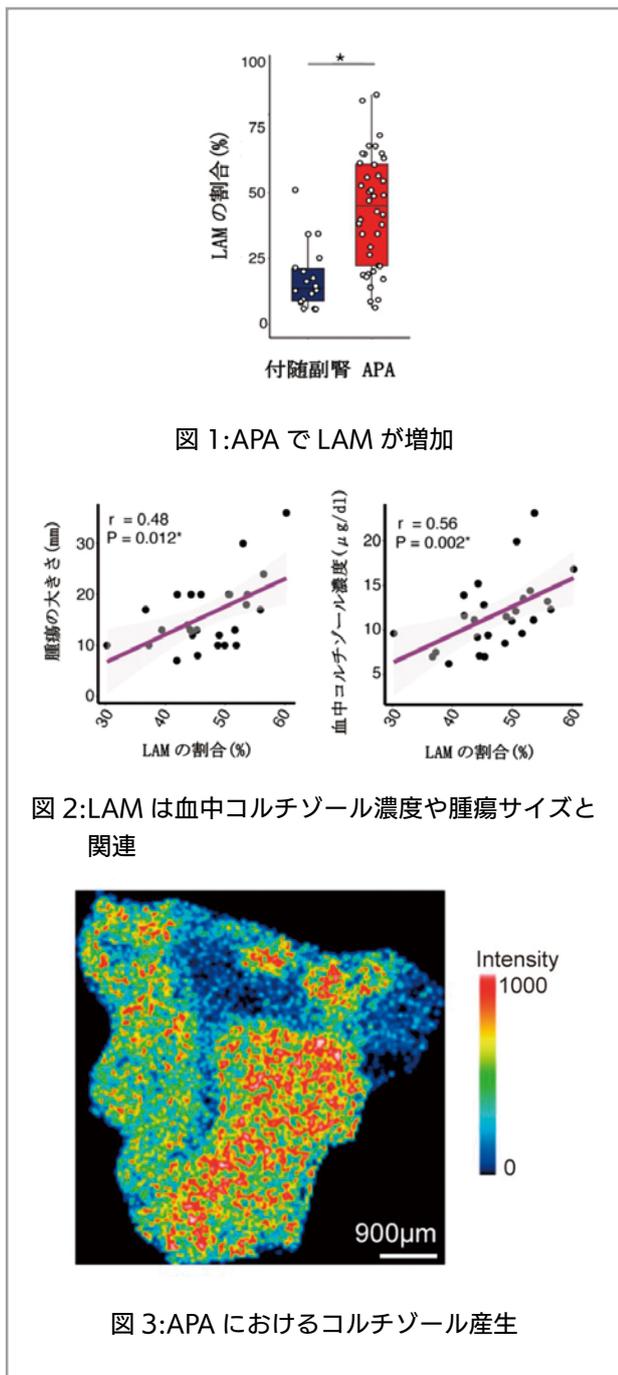


図 1:APA で LAM が増加

図 2:LAM は血中コルチゾール濃度や腫瘍サイズと関連

図 3:APA におけるコルチゾール産生

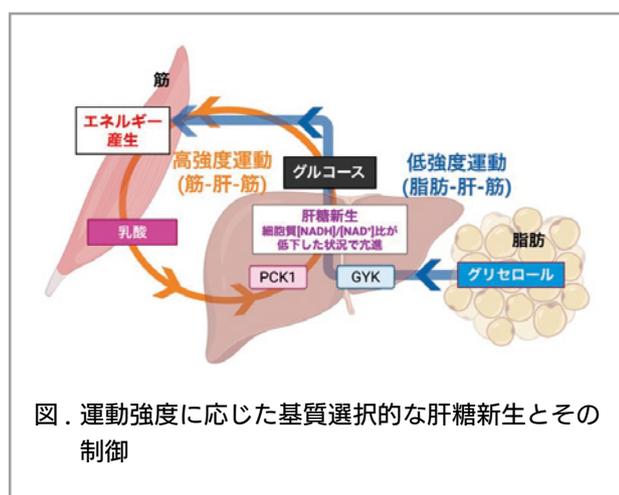
【考察】

本研究により LAM を中心とした腫瘍微小環境と腫

比を低下させるために、細菌由来の酵素である water-forming NADH oxidase from *Lactobacillus brevis* (LbNOX) を肝臓に発現させると、糖新生の亢進を介して、高強度・低強度走行の運動能がともに亢進した。

【考察】

本研究により、高強度運動では乳酸からの糖新生を介した筋-肝-筋のクロストーク、低強度運動ではグリセロールの糖新生を介した脂肪-肝-筋の臓器連関が重要であることを示した。さらに、肝臓の細胞質 [NADH]/[NAD⁺] 比の低下により、糖新生の亢進を介して、運動能が亢進することを報告した¹⁾ (図)。本研究で肝糖新生の制御による筋代謝への影響を示したが、他の臓器への影響も今後解析する。さらに、運動能が低下する病態などでの肝糖新生の役割を検討する。



図．運動強度に応じた基質選択的な肝糖新生とその制御

【文献】

- 1) T Horiuchi, K Kaneko, S Hosaka, *et al.* *Nature Metabolism*. 2025;7(10):1991-2003. doi: 10.1038/s42255-025-01373-z.

グルカゴンをツールとしたタンパク質嗜好性制御機構の解明

松居 翔

(京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻栄養化学分野)

【目的】

タンパク質に対する食欲は、エネルギー摂取とは独立して調節されていると考えられているが、その調節

機序は全く解明されていない。すなわち、タンパク質需給を脳へ伝達する代謝性シグナルも、脳内における責任領域も未だ不明である。

近年、膵臓α細胞で合成・分泌されるグルカゴンの主要かつ特異的な生理作用が、アミノ酸代謝の恒常性維持であることが提唱されている。この知見から、グルカゴンがアミノ酸恒常性を維持するためにタンパク質食欲の制御に関与する可能性を着想した。

本研究では、未解明の「タンパク質食欲調節機序」をグルカゴンをツールとして解明することを目的とした。これまでに申請者は、①グルカゴンの腹腔内投与がタンパク質の摂取を抑制すること、②グルカゴンが非必須アミノ酸に対する摂取欲求を抑制すること、③その効果が肝臓特異的グルカゴン受容体欠損マウスでは消失することを明らかにしてきた。これらの知見から、本研究では尿素回路の関与を推定し、同経路に対する介入実験を実施した。

【方法】

実験1. N-アセチルグルタミン酸類似体 (NCG) 投与はタンパク質摂取量を調節するか？

NCGはN-アセチルグルタミン酸の類似体であり、酵素CPS1を活性化する。実験1では、CPS1の活性化による尿素回路の亢進が高タンパク質食の摂取調節に関与するかを検証した。まず、特殊給餌箱に普通食を設置し(食事選択:普通食 vs. 普通食)、野生型マウスを自由摂取条件で3日間順化飼育した。その後、マウスにPBS, 50 mg/kg, 100 mg/kgのNCGを腹腔内投与し、普通食 vs. 高タンパク質食の選択摂取試験を実施した。摂取量は暗期開始後4時間、6時間、24時間で測定した。その結果、NCG投与により容量依存的に高タンパク質食の摂取量が減少することが明らかとなった。

実験2. 尿素はタンパク質摂取量を調節するか？

尿素回路が活性化すると血中尿素濃度が増加する。実験2では、尿素が肝臓からのシグナルとして脳に伝達され、タンパク質摂取を制御している可能性を検証した。実験デザインは実験1と同様に、まず普通食 vs. 普通食で3日間順化飼育を行った。その後、マウスにPBS, 50 mg/kg, 100 mg/kgの尿素を腹腔内投与し、普通食 vs. 高タンパク質食の選択摂取試験を行った。摂取量は暗期開始後4時間、6時間、24時間で測定した。

その結果、尿素投与によるタンパク質摂取量の変化は認められなかった。

【考察】

実験1の結果から、NCGによるCPS1活性化を介した尿素回路の亢進は高タンパク質食の摂取を抑制することが明らかとなった。一方で、実験2で示されたように、尿素そのものを投与しても摂食行動に変化は生じなかった。したがって、単純な尿素濃度上昇ではなく、尿素回路の活性化過程から生じる代謝シグナルが脳に伝達されている可能性が考えられる。この代謝シグナルの伝達経路としては、肝臓から分泌されるホルモン様因子や、肝臓から脳へ情報を伝える迷走神経求心路が関与している可能性がある。特に、肝臓はアミノ酸・尿素代謝の中心であり、その動態が末梢シグナルとして脳に入力されることで、タンパク質摂取欲求を制御していることが示唆される。

TSH受容体シグナルに着目した甲状腺機能亢進症の病態解明

山内 一郎

(京都大学大学院医学研究科 糖尿病・内分泌・栄養内科学)

【背景】

バセドウ病に代表され、ホルモン過剰分泌をきたす甲状腺機能亢進症は、1956年に発売されたチアマゾールが現在も第一選択であるが、その副作用や治療抵抗性の問題から新薬のニーズは大きい。我々は治療標的となる分子経路の同定を目指すにあたり、下垂体由来の甲状腺刺激ホルモン(TSH)を介したシグナルに着目した。甲状腺機能亢進症の病態の根幹がTSH受容体の過剰活性化であることは古くから良く知られている。我々はTSHを後天性に過剰発現させる手法で、甲状腺機能亢進症を確実に惹起する独自のモデルマウスを開発することにより、TSH受容体シグナルの詳細を追究する実験的アプローチを可能とし、以下の解析を行った(文献)。

【方法】

6週齢の雄C57BL/6Jマウスに対して、ヒトTSHを発現するプラスミドベクターをハイドロダイナミック法により導入した(以下TSH過剰発現マウスとする)。

処置後の各時点において甲状腺を採取し、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。

【結果】

TSH過剰発現マウスにおいては、導入したベクター量依存的に血清TSH濃度は上昇し、血清FT4、FT3濃度も比例して上昇しており、甲状腺機能亢進症が惹起されていることを確認した。甲状腺機能亢進症はベクター導入1日後から生じ、4週間後でも持続していた。甲状腺は肉眼的腫大に加え、組織学的に濾胞サイズ増大を認めたが、濾胞上皮細胞の厚さに関しては経時的変化が見られ、1週間後には肥厚、4週間後には菲薄化していた。

TSH過剰発現処置による甲状腺トランスクリプトーム変化を見たところ、甲状腺腫大については、細胞周期、PI3K/Akt経路、Rap1経路、酸化ストレスなどの関与が示唆された。一方で主題である甲状腺機能亢進について、既知の甲状腺関連遺伝子を検討すると、唯一Slc26a4が1週間後、4週間後ともに発現増加を示していた。この結果を受けて、Slc26a4ノックアウトマウスにTSH過剰発現処置を施し、フェノタイプの変化が減弱するか検証したが、甲状腺機能亢進、甲状腺腫大ともに差異は見られなかった。

【考察】

バセドウ病では甲状腺機能亢進症のみならず甲状腺腫大を呈するが、その病態の一端を明らかとした。しかし、モデルマウスにおいて甲状腺機能亢進症が確かに発現したにもかかわらず、既知の甲状腺関連遺伝子の発現変化では説明できなかった。甲状腺機能亢進に関わるTSH受容体下流の分子変化は依然として不明であり、ホルモン合成分泌を担う濾胞上皮細胞を特異的に解析する実験系を構築し、検討を進めている。

【文献】

Yamauchi I, Sugawa T, Hakata T, Yoshizawa A, Kita T, Kishimoto Y, Kimura S, Sakurai A, Kosugi D, Fujita H, Okamoto K, Ueda Y, Fujii T, Taura D, Sakane Y, Yasoda A, Inagaki N. Transcriptomic landscape of hyperthyroidism in mice overexpressing thyroid-stimulating hormone. *iScience*, 28, 111565 (2024).

転写後調節を介した肥満制御機構の解明

吉 永 正 憲

(京都大学 大学院医学研究科 医化学分野)

【目的】

転写後調節機構は、mRNA の分解や翻訳を制御する機構である。筆者はこの機構が炎症や代謝関連遺伝子の発現調節に寄与することを示し、緻密な代謝制御における重要性を明らかにした。このように、未知の転写後調節機構の理解は新たな生体調節機構の理解に結び付くと期待できる。

加えて近年、筆者らは同義コドンの使い分けが遺伝子発現に重要であり、特にコドンの3番目の塩基がAやU(AU3)であると mRNA の分解を促進することを見出した。しかしその背景にある分子機構は全く不明である。そこで本研究ではコドン認識に関与する分子の同定と機能解析を行った。

【方法・結果・考察】

ゲノムワイドな CRISPR スクリーニングの手法により、トランスクリプトームワイドに AU3 コドンを多く有する mRNA を分解誘導する因子として遺伝子 X を同定した。さらに選択的リボソームプロファイリング法およびクライオ電子顕微鏡を用いた解析から、遺伝子 X は AU3 コドンを翻訳中の 80S リボソームの A サイト近傍に結合することで、AU3 コドンを多く有する mRNA の発現を抑制することを見出した。加えて、質量分析法により遺伝子 X を介した mRNA 分解に寄与する RNA 結合タンパク質を同定した。以上より、遺伝子 X を介した同義コドン認識制御が mRNA 分解に重要であることが見出された。今後は代謝制御など生体における同義コドン認識の意義を明らかにしたい。

【文献】

Iguchi E, Yoshinaga M, et al. Epithelial Regnase-1 inhibits colorectal tumor growth by regulating IL-17 signaling via degradation of NFKBIZ mRNA. PNAS. 122, 23, e2500820122 (2025).

Yoshinaga M*, Takeuchi O*. Regulation of inflammatory diseases via the control of mRNA decay. Inflamm Regen. 44, 14 (2024).

Hia F, Yoshinaga M, et al. Codon bias confers stability to human mRNAs. EMBO Rep. e48220. (2019)

炎症性腸疾患に対する新薬開発に向けた制御性 T 細胞による腸管上皮修復機序の解明

吉 松 裕 介

(慶應義塾大学医学部内科学 (消化器))

【目的】

潰瘍性大腸炎 (UC) は、上皮近傍の炎症再生修復がアンバランスとなり修復機構が破綻し炎症が持続することが知られている。免疫を抑制する薬剤が多数開発され使用されているが、既存治療に抵抗性である症例も多数存在する。近年、生薬の一つである青黛が UC の改善に効果を認めることが明らかになり、医師主導治験においても有用であることが示された (Naganuma M, et al. Gastroenterology 2018)。しかし、生薬であることから本邦での医薬品としての承認は難しく、肺高血圧症、肝機能障害を始め副作用事例があり長期の使用は困難であることが判明しているから、この青黛が Aryl hydrocarbon receptor (Ahr) リガンド (Ahr-L) を主成分としていることに着目し、Ahr-L による大腸上皮組織修復メカニズムを解明することによりターゲットを絞った安定的なドラッグを作成することを考えた。

これまでに申請者はマウスモデルを利用し、この Ahr-L の混合物 (Ahr-L 食) が腸炎抑制効果を有しており、作用機序の一つとして、腸管上皮細胞の Ahr シグナルを介した特徴的な遺伝子を発現する腸管内制御性 T 細胞 (regulatory T cells; Tregs) の管腔側への集積が腸炎抑制効果に寄与している可能性があることを見出した。

そこで、申請者はヒト UC 患者の青黛投与前後の血液および大腸粘膜内の免疫細胞についてマウスの大腸と同様の現象が起こっているかを検証し、UC の原因究明、治療薬開発につながることを目的に研究を行っている。

【方法】

臨床試験として、UC 患者に青黛 FC 腸溶錠を投与した前後で、血液検査および大腸内視鏡検査において直

腸粘膜から採取した組織検体の粘膜固有層の生細胞を分取し, single cell RNA sequence を行った (図 1(末梢血), 図 2 (大腸粘膜固有層)).

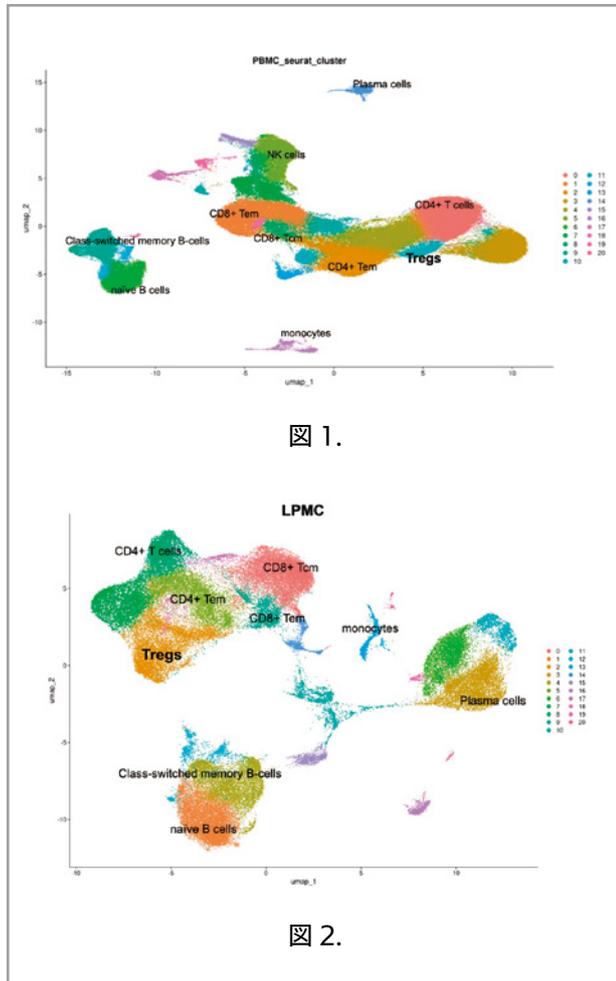


図 1.

図 2.

【結果】

青黛投与前後で UC 患者の末梢血 (PB) においては, マウス同様, Treg のクラスターについて目立った遺伝子の変化は認められなかった. 一方で, 大腸粘膜固有層(LP) においてもマウスで見られた Treg が発現していた特徴的な遺伝子に変化を認めなかった (図 3). また, 有効性で分けて解析を行うと, 寛解群の大腸 LP では, 無効群と比較して, Treg が減少することがわかった (図 4).

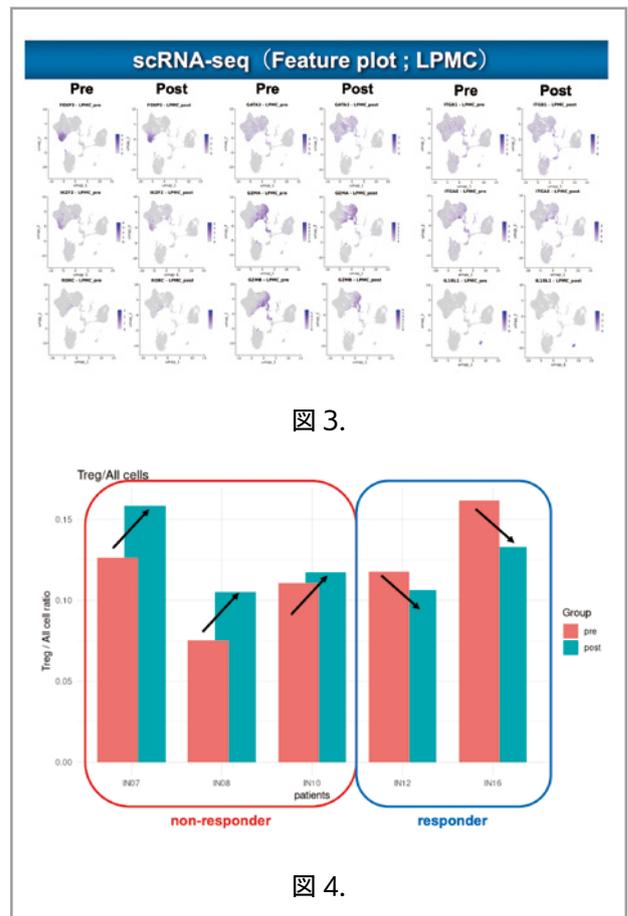


図 3.

図 4.

【考察】

青黛投与前後の Treg の変化はマウスとヒトで異なることが示唆された. 急性腸炎であるマウス腸炎モデルの限界, Treg が大腸にとどまらずに全身性に作用している可能性などは考えられるが, 今後, 他の免疫細胞の解析や, 当初の目的である上皮修復機序を含めてさらなる検証が必要と考えられた.

Cardiovascular Innovative Conference に関する 研究助成 (CVIC)

血管リモデリング進展過程における血管周囲脂肪褐色化の病態生理学的意義の解明

安達 裕助

(東京大学大学院医学系研究科 循環器内科)

【背景と研究目的】

本邦における心筋梗塞、脳卒中、大動脈疾患をはじめとする動脈硬化性疾患の死亡率は、がん全体とほぼ同等の高い水準にある。この状況を打破するためには、動脈硬化の原因となるメカニズムの深い理解が不可欠である。1976年にRossらが提唱した「動脈硬化は血管内皮の傷害を起点として発生する」という傷害反応仮説は、現代の動脈硬化研究の基盤となっているが¹⁾、疾患の完全な克服にはいまだ至っていない。申請者らは、本研究助成のもと、これらの課題解決に向けた取り組みを進めている。

【方法および結果】

1) 血管炎症制御の分子基盤解明

網羅的遺伝子発現解析の結果、血管傷害後の血管周囲脂肪組織 (perivascular adipose tissue: PVAT) において、*Ucp1* をはじめとした褐色脂肪マーカーの遺伝子発現が上昇しており、脂肪の褐色化が起きていることが分かった。褐色化の制御因子である *Prdm16* を脂肪組織特異的にノックアウトしたマウス (*Adipoq* (Adiponectin)-*Cre*^{+/-}; *Prdm16*^{flox/flox}) では、血管傷害後の PVAT の炎症と血管リモデリングが増悪することを見出した。また、低分子干渉 RNA を用いて *Prdm16* を血管周囲組織で局所的にノックダウンした場合も同様に、PVAT の炎症と血管リモデリングが増悪することを確認した。逆に、 β 3 アドレナリン受容体アゴニスト (CL316243) の局所投与によって PVAT の褐色化を促進すると、炎症と血管リモデリングが抑制された。一細胞 RNA-seq により、褐色化し脂肪細胞から分泌される抗炎症アディポカインとしてニューレグリン4 (*Nrg4*) を同定し、

Nrg4 をノックダウンすると、褐色化 PVAT によるマクロファージの炎症型への分極作用が消失することを見出した。

2) 血管疾患の臨床サンプルに基づく研究

動脈硬化性疾患の中でも、急性大動脈解離は緊急性が高く、迅速な診断が求められる。本研究では、基礎的知見の獲得を目的として、動物実験とヒト剖検標本の解析を並行して行った。マウスの大動脈解離モデルは、野生型 C57BL/6J マウスにアンジオテンシン II と β -アミノプロピオニトリルを浸透圧ポンプで投与することで作製した²⁾。併せて、ヒト剖検標本を用いて、大動脈解離患者の血管周囲組織における炎症細胞の分布を詳細に観察した。さらに、急性大動脈解離患者の非造影 CT 画像を用いて、血管炎症を非侵襲的に検出するための機械学習アルゴリズムの開発に取り組んだ。マウスモデルの解析により、大動脈解離時には血管周囲組織に特定の炎症細胞 ($CD45^+$ $CD11b^+$ $F4/80^+$ マクロファージ、特に $CD11c^+$ $CD206^-$ 炎症型マクロファージ) の集積を認めることを血管周囲脂肪の間質血管細胞群 (stromal vascular fraction) を用いた FACS によって確認した。また、ヒト大動脈解離患者の病理組織標本の解析では、解離した血管周囲組織に誘導型一酸化窒素合成酵素陽性の炎症型マクロファージが顕著に集積していることが確認された。加えて、非造影 CT 画像を用いた大動脈の自動識別と血管炎症の可視化技術の開発に成功した (特開 2023-038720)。この技術を用いた解析により、大動脈解離患者では非解離患者と比較して、血管炎症の指標である血管周囲脂肪減衰指数 (fat attenuation index)³⁾ が有意に上昇していることが判明し、急性大動脈解離の新たな診断マーカーとしての可能性が示唆された。

【考察】

これらの研究成果は、動脈血管に内在する炎症制御機構の一端を明らかにし、新たな診断技術の可能性を示すものである。今後は、これらの知見を基盤として、

新たな治療ターゲットの探索と先進的医療技術の開発を推進していく所存である。

【文献】

- 1) Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 340(2):115-26 (1999).
- 2) Hirakata S, Aoki H, Ohno-Urabe S, et al. Genetic deletion of Socs3 in smooth muscle cells ameliorates aortic dissection in mice. *JACC Basic Transl Sci.* 5, 126–144 (2020).
- 3) Antonopoulos AS, Sanna F, Sabharwal N, et al. Detecting human coronary inflammation by imaging perivascular fat. *Sci Transl Med.* 9, eaal2658 (2017).

ペリサイトを標的とした炎症制御を可能とする創薬基盤の構築

安藤 康史

(国立循環器病研究センター研究所・心臓再生制御部)

【目的】

脳梗塞は主要な死因であるとともに要介護リスクが高い疾患であり、その克服が強く望まれている。毛細血管を被覆するペリサイトは血液脳関門維持や血流制御に重要な細胞であるが、脳梗塞急性期における炎症進展や組織障害に対する役割は不明な点が多い。本研究では、虚血に伴う血液脳関門の破綻に対する寄与が予

想されるペリサイト炎症に焦点を当て、ペリサイト炎症制御を可能とする創薬基盤の構築を目的とした。特に、ヒト脳血管由来初代培養ペリサイトを用いたハイスループットスクリーニング (HTS) 系を確立し、炎症制御に資する新規化合物の探索を進めることで、ペリサイトを基盤とした虚血性疾患治療薬の開発に繋がる知見を得ることを目指した。

【結果・考察】

本年度は、96 well プレートに培養したヒト脳血管由来ペリサイトを用いて、炎症応答を指標とした薬剤スクリーニング系を構築した (図 1)。具体的には画像解析装置 Opera Phenix を用いた p65 の核内移行評価を指標とする解析系を導入することにより、ペリサイト炎症応答を高感度かつ再現性高く評価できるハイスループットスクリーニングプラットフォームを確立した。本アッセイ系を用いて、創薬等先端技術支援基盤プラットフォームの支援を受け、大阪大学創薬サイエンス研究支援拠点から提供された LoPac1280 ライブラリー (1280 化合物) を用いた一次スクリーニングを実施した。その結果、これまで炎症との直接的な関連が報告されていない 13 種類の化合物が、LPS 刺激依存的なペリサイト炎症を有意に抑制することが明らかとなった (図 1-3)。一方で、本スクリーニングの過程において、LPS 刺激後の NF-κB 経路の活性化を増強する 21 種類の化合物も同定され、炎症反応が双方向に制御され得る可能性が示された (図 3)。本研究によって、ペリサイト炎症を抑制する新規分子群とその候補経路

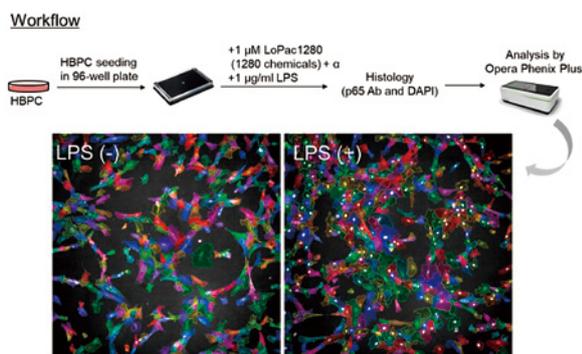


図 1. Opera Phenix を用いた p65 核移行を指標とした化合物スクリーニングの概略図。各細胞と p65 の核移行が促進された細胞の核 (下図、白く標識されたドット) を迅速に検出可能となる HTS プラットフォームを構築した。

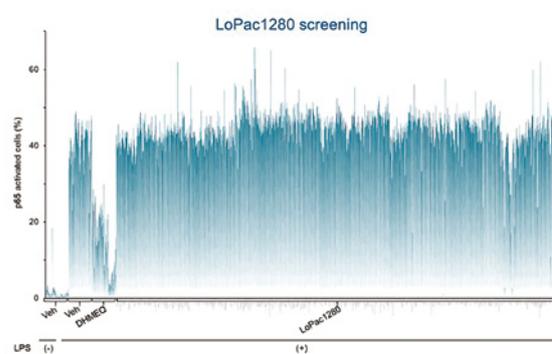


図 2. p65 の核移行割合を指標とした LoPac1280 ライブラリーを用いたスクリーニング結果。Veh, vehicle. DHMEQ, p65 核移行阻害剤。

が提示され、ペリサイトを基盤とする虚血性疾患治療薬開発を加速させる基盤を形成することができた。今後は、得られた候補化合物について、siRNAなどの分子生物学的解析を加えることで標的経路を同定し、ペリサイトを介した脳梗塞急性期炎症制御の新規治療戦略に展開していく予定である。

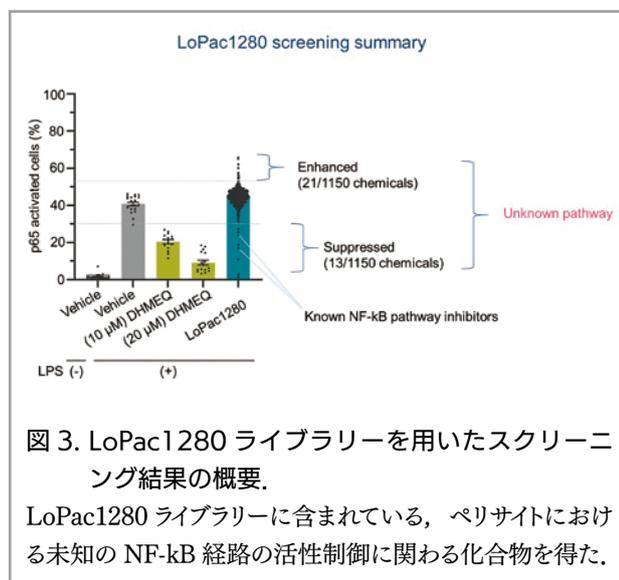


図 3. LoPac1280 ライブラリーを用いたスクリーニング結果の概要。

LoPac1280 ライブラリーに含まれている、ペリサイトにおける未知の NF-κB 経路の活性制御に関わる化合物を得た。

心不全における ERAD によるオルガネラ機能制御機構の解明と新規治療法の開発

池田 宗一郎

(ラトガース大学)

【目的】

心不全患者は増加しており、心不全の病態基盤の解明および新規治療法の開発が必要である。近年、不全心筋においてミトコンドリアと小胞体 (ER) 間のオルガネラ相互作用が細胞機能維持において重要であることが明らかとなってきた。特に、ER ストレス応答において小胞体関連分解 (ER-associated degradation: ERAD) が注目されている。ERAD は ER ストレスや酸化ストレスなどにより活性化され異常タンパク質を小胞体から細胞質へ逆輸送してユビキチン化により分解することで ER ストレスを軽減する極めて重要な機構である。また、homocysteine-responsive ER resident ubiquitin-like domain 1 (HERPUD1) は ERAD の構成因子としてその機能維持に必須であることが知られている。本研究は不全心筋における ERAD および HERPUD1 の

役割を解明することを目的とした。

【方法】

左前下行枝結紮による心筋梗塞モデルマウスを用い、HERPUD1 が心筋リモデリング形成過程において果たす役割を解析した。HERPUD1 のホモ欠損 (homozygous KO) マウスを作成し、心筋梗塞後の機能評価を行った。また *in vitro* では新生仔ラット由来の培養心筋細胞に過酸化水素を投与し、HERPUD1 の発現変化を評価した。RNA 干渉法による HERPUD1 のノックダウン、およびアデノウイルスを用いた過剰発現により、酸化ストレス下での心筋障害における HERPUD1 の役割の機序解析を行い、TUNEL 染色および心筋細胞死の評価を行った。ミトコンドリア機能は Flux analyzer を用いて評価した。

【結果】

心筋梗塞後の心筋において、HERPUD1 タンパクは術後 3 日目に有意に増加し、その後 28 日目にかけてベースラインまで減少した。一方、小胞体ストレス関連遺伝子は梗塞後 28 日目に有意に増加していた。心筋細胞に過酸化水素を投与した場合も同様に HERPUD1 の発現が増加した。

HERPUD1 のノックダウンを用いて機能解析を行った。HERPUD1 のノックダウンは心筋細胞において細胞のユビキチン化タンパク質を減少し HERPUD1 は ERAD を介して細胞機能維持に関与している可能性が示唆された。また、心筋細胞への HERPUD1 ノックダウンは、小胞体ストレスマーカーである PERK の発現を増加させ、ノックダウンは TUNEL 陽性細胞数を増加させ心筋細胞死を促進した。加えて HERPUD1 のノックダウンはミトコンドリア機能を低下した。

心筋リモデリングにおける HERPUD1 の機能を明らかにするために HERPUD1 homozygous KO マウスを作成した。梗塞術後 28 日目の心エコー検査では、HERPUD1 homozygous KO マウスは左室拡張末期径の拡大および左室駆出率の低下が有意に増悪した。非梗塞部心筋の Masson Trichrome 染色による組織学的解析では、HERPUD1 KO マウスにおいて線維化が増加していた。非梗塞部心筋でも同様に、HERPUD1 KO マウスでは PERK 発現および TUNEL 陽性細胞数が増加していた。

【考察】

これらの結果から、HERPUD1は心筋梗塞後に一過性に発現が増加し、ミトコンドリア機能低下や心筋細胞死を抑制することで、心筋リモデリングに対して保護的に作用していることが明らかとなった。内因性のHERPUD1は、酸化ストレス環境下で小胞体ストレスの軽減にのみならず、ミトコンドリア機能の維持を通じて心筋細胞死を抑制している可能性が示唆された。

プラコフィリン2変異による心筋収縮力低下の機序の解明

井上 裕之

(スタンフォード大学 心臓血管研究所)

【背景】

PKP2変異は不整脈原性心筋症(ACM)の主要な原因の一つであり、心筋収縮力の低下を引き起こすとされる。しかし詳細な分子機序は未解明であり、特異的な治療薬も未開発である。

【目的】

iPS細胞由来心筋細胞を用いたPKP2変異による心筋収縮力低下機序の解明および治療薬開発。

【昨年度までの成果】

PKP2ヘテロ変異患者より樹立したアイソジェニックiPS細胞由来心筋細胞を用いて、1) PKP2変異による収縮力障害をモーションベクトル解析により検出し得る2次元収縮モデル、2) デスモゾーム生細胞イメージングモデルを報告した¹⁾。また、ベッカー型筋ジストロフィー女性患者より樹立したアイソジェニックiPS細胞を用いて、3) PLOD3, DMD変異による収縮力、スティフネス評価を行う3次元組織リングモデルを報告した²⁾。さらに、4) ハイスループットイメージングとカルシウム動態イメージングを組み合わせ、個別の心筋細胞ごとにカルシウム動態を解析する手法を報告した³⁾。

【本年度の成果】

1) デスモゾーム生細胞イメージングによるデスモゾーム形成過程の観察

PKP2アイソジェニックiPS細胞に対し、APX100蛍光顕微鏡を用いて、心筋分化誘導過程の経時的変化

を観察した。その結果、iPS細胞では細胞膜上に線状に認められた内在性DSG2が、分化誘導4日目の早期からドット状への局在変化を認め、デスモゾームが形成される過程を経時的に観察することができた(Figure1A,B)。また、分化誘導20日目の心筋細胞において、同一部位を長時間観察することで、細胞膜上のドットの出現や消失、細胞膜上の微細な移動を観察し得た。これらの結果から、本生細胞イメージングモデルでは、デスモゾーム動態を詳細に観察することができることが示された。

さらに、分化誘導28日目の心筋細胞に対して、ハイコンテントイメージング(IN Cell Analyzer)を用いて観察を行った。その結果、変異修復株では細胞膜上の明瞭なドットを、ホモ株では細胞膜のドットは認めず細胞質全体に分布すること、ヘテロ株では細胞膜上の小さなドットと細胞質内の淡いシグナルを認め、前二者の中間様分布となることが示された(Figure2)。

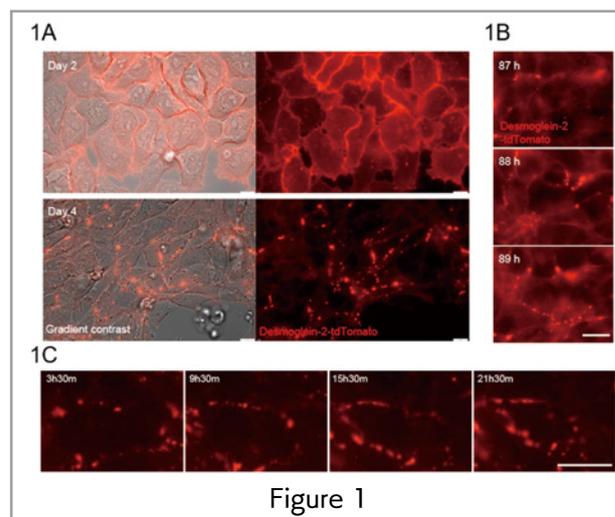


Figure 1

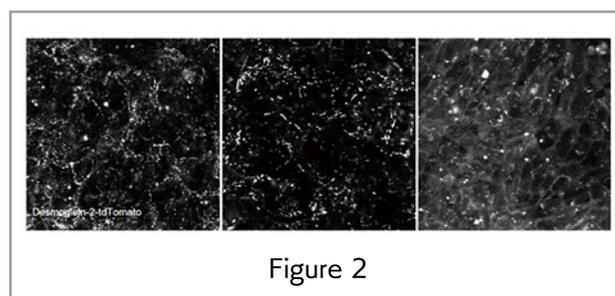


Figure 2

2) tdTomatoの分布をマーカーとした治療薬スクリーニング

過去の文献において、デスモゾーム関連タンパク質を含む経路に作用する低分子化合物が報告されている。同クラスの薬剤を複数種類用い、ヘテロtdTomato-iPS心筋細胞に対する治療を行った後にドット状局在

の変化を判別することで、ドラッグスクリーニングを行った。その結果、化合物 X で他の治療薬に比して有意に修復株様の所見が増加した。現在は、化合物 X が *PKP2* 変異による収縮能低下に対する治療薬候補となり得るか、文献 1 で報告したモーションベクトル解析を用いて収縮能、拡張能への影響を検討中である。モーションベクトル解析により何らかの変化が検出された場合、さらに RNA-sequencing を用いて化合物 X による収縮力改善の機序を探索する予定である。

【考察】

本研究により、*PKP2* 変異に伴うデスモゾーム構造の変化およびその回復過程が生細胞レベルで視覚化・定量化可能であり、高精度で評価可能であることが示された。

また、本解析系を用いた薬剤スクリーニングにより、化合物 X が *PKP2* 変異に起因するデスモゾーム構造異常の修復に寄与する可能性が示唆された。今後、機能的評価を進めることで、化合物 X のドラッグリポジショニングによる治療薬候補としての有効性が明らかになることが期待される。

【文献】

- 1) Inoue H, Nakamura S, Higo S, Shiba M, Kohama Y, Kondo T, Kameda S, Tabata T, Okuno S, Ikeda Y, Li J, Liu L, Yamazaki S, Takeda M, Ito E, Takashima S, Miyagawa S, Sawa Y, Hikoso S, Sakata Y.; Modeling reduced contractility and impaired desmosome assembly due to plakophilin-2 deficiency using isogenic iPS cell-derived cardiomyocytes; Stem Cell Reports, 17(2):337-351(2022)
- 2) Kameda S, Higo S, Shiba M, Kondo T, Li J, Liu L, Tabata T, Inoue H, Okuno S, Ogawa S, Kuramoto Y, Yasutake H, Lee JK, Takashima S, Ikeda Y, Hikoso S, Miyagawa S, Sakata Y.: Modeling Reduced Contractility and Stiffness Using iPSC-Derived Cardiomyocytes Generated from Female Becker Muscular Dystrophy Carrier, JACC: Basic to Translational Science, 8(6):599-613 (2023).
- 3) Tabata T, Masumura Y, Higo S, Kunimatsu

S, Kameda S, Inoue H, Okuno S, Ogawa S, Takashima S, Watanabe M, Miyagawa S, Hikoso S, Sakata Y; Multiplexed measurement of cell type-specific calcium kinetics using high-content image analysis combined with targeted gene disruption: Biochemical and Biophysical Research Communications, 637:40-49(2022).

- 4) Okuno S, Higo S, Kondo T, Shiba M, Kameda S, Inoue H, Tabata T, Ogawa S, Morishita Y, Sun C, Ishino S, Honda T, Miyagawa S, Sakata Y. SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain is internalized and promotes protein ISGylation in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. Scientific Report. 2023;13(1):21397.

睡眠時間断的低酸素モデルを用いた Non-dipper 型血圧発症腎機序の解析

上田 浩平

(国際医療福祉大学医学部生理学)

【背景】

ストレスホルモンである GR リガンドが低カリウム血症を介して高血圧を発症する機序について報告したが²⁾、同時に血圧の概日リズム異常 (Non-dipper) も呈することを本研究会で報告した。Non-dipper は睡眠時無呼吸症候群をベースに高頻度に合併し、強力な心血管病リスク因子であることが知られている。

【目的】

睡眠時間断的低酸素が Non-dipper 型血圧を発症する機序を明らかにする。

【方法】

C57Bl/6 マウスを明暗条件下、明期中に 8 時間 (ZT1-ZT9)、3 分毎に酸素濃度が緩徐に室内気 (21%) から 5% まで低下するケージ内で 2 週間飼育した (睡眠時間断的低酸素 (IH) モデル)。テレメトリを用いて連続的に頸動脈血圧を計測し、明期・暗期に分けて日内変動を解析した。最終日 ZT4 に通常酸素対照群 (NX) と共に IH モデルの腎臓を採取し、超遠心法を用いた

膜分画蛋白と mRNA 発現量を比較した。野生型 IH モデルマウスに 0.05%-NaCl 減塩食, Na⁺-Cl⁻ 共輸送体 (NCC) ノックアウトマウスに Na⁺-K⁺-Cl⁻ 共輸送体 (NKCC2) 阻害薬フロセミド 0.3g/L 飲水を投与した。

【結果】

NX 群マウスの血圧は明期よりも暗期に有意に高かったが, IH 群のマウスでは明期・暗期で血圧に有意差は認められず non-dipper 型血圧を呈した。腎試料膜分画においてリン酸化 NCC と NNKCC2 の発現が有意に増加していた。野生型 IH モデルは減塩食により血圧の日内変動は改善し, NCC ノックアウトマウスの IH モデルでは NKCC2 阻害薬フロセミド投与により同様に血圧の日内変動が改善した。Sgk1, Gilz, Per1/2, および Cry1/2 の遺伝子発現レベルは, IH モデルにおいて有意に増加し, Bmal1 および Clock の遺伝子発現レベルは減少した。

【結論】

睡眠時間断的低酸素により Non-dipper 発症の機序として腎 NCC・NKCC2 活性化の重要性が示唆された¹⁾。また, その活性化機序として GR 関連遺伝子や時計遺伝子の関連が示唆された。

【考察】

今後は IH モデルにおける腎 NCC・NKCC2 の活性化機序の解析をさらに進める。

【業績】

1. Ueda K, Yeerbolati A, Liang L, Ogura S, Takase M, Goda N, Fujita T, Shimosawa T. The nondipping blood pressure pattern induced by chronic intermittent hypoxia and its renal mechanism. *J Hypertens*. 2025 Dec 10. Online ahead of print.
2. Ueda K, Shimosawa T. Regulating distal nephron functions and salt sensitivity. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2024 Oct 1;327(4):F566-F580.
3. Bonnard B, El Moghrabi S, Ueda K, Lattenist L, Soulie M, López-Andrés N, Xhaard C, Shimosawa T, Rossignol P, Jaisser F. NGAL is a Novel Target in Hypertension by Modulating the NCC-Mediated Renal Na Balance. *Hypertension*. 2023 Sep;80(9):1860-1870.

4. Ueda, K., Nishimoto, M., & Hirohama, D. Renal Dysfunction Induced by Kidney-Specific Gene Deletion of Hsd11b2 as a Primary Cause of Salt-Dependent Hypertension. *Hypertension*. 2017 Jul;70(1):111-118.

腸 - 骨髄連関から動脈硬化を制御する
—シングルセル解析で迫る大動脈瘤形成メカニズム—

江本 拓 央

(神戸大学医学部循環器内科)

【背景】

腹部大動脈瘤は無症状で瘤径が大きくなり, 破裂すると半数以上の人が命を落とす疾患である。現在のところ, 外科的な人工血管置換術, もしくは腹部大動脈ステントグラフト内挿術の選択肢しかなく, 5cm 以下の小さい状態で発見されても有効な治療法が存在しない。

申請者はトロント大学 Clinton Robbins 先生のもとに 2017 年から 3 年間留学経験があり, その際に, タバコ大動脈瘤モデルの確立に携わった。腹部大動脈瘤患者の実に 90% が喫煙者であることの実事に着目し, アポリポrotein E 欠損 (ApoE^{-/-}) マウスに高脂肪食を負荷し, タバコの煙に 1 日 2 回暴露させることで, 臨床に近い腹部大動脈瘤モデルマウスの作成に成功した。動脈硬化粥腫と一致して瘤が形成され, 動脈硬化が直接的に瘤の原因になっていることを証明した (図 1)¹⁾。

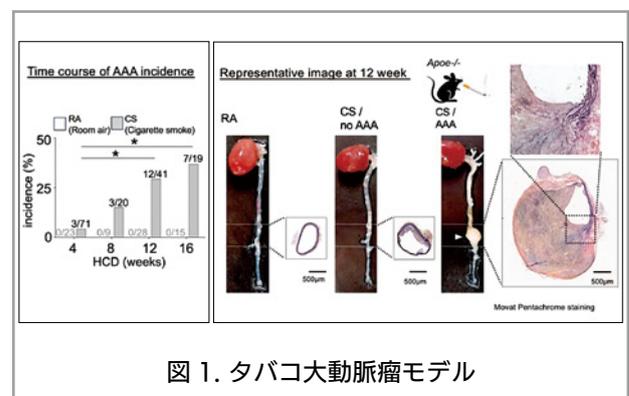


図 1. タバコ大動脈瘤モデル

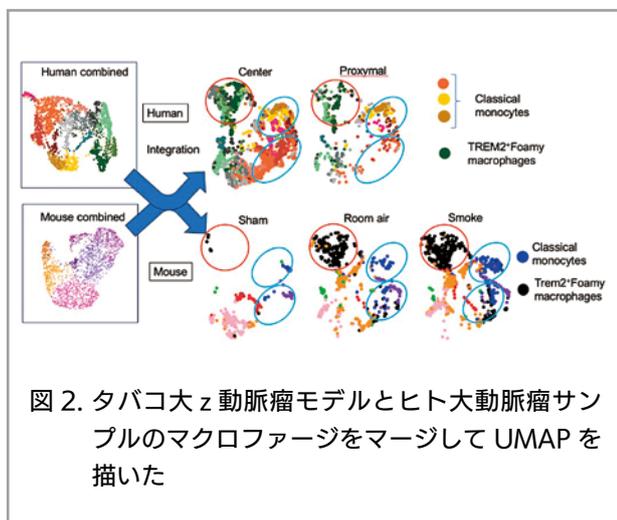
【目的】

上記を踏まえ, 大動脈瘤の免疫細胞のターゲットを考える上で, ヒト大動脈瘤のシングルセル解析を行い,

特にその免疫細胞を中心に解析することで、大動脈瘤における免疫細胞の変化を捉え、その意義を考察し、またその結果の因果関係を上記動物モデルで検証することとした。

【方法、結果】

1) マクロファージや単球に絞って再度解析を行うと、瘤中心部では、単球の浸潤が起こっていることが分かり、マウスとヒトのデータを merge し同一 UMAP 上に表示する手法を用いて解析すると、マウスとヒトでの相同性が確認でき、また foamy type マクロファージが SSP1 や MMP12 の発現が増えており、瘤形成に悪影響を及ぼしているであろうことが推察できた (図2)。さらに foamy type マクロファージのマーカーである TREM2 をノックアウトすると大動脈瘤の形成が抑制された。また、血管内皮のシングル核解析から NO の発現が抑制されていることが分かり、eNOS を欠損させると、マクロファージの集積、大動脈瘤の形成が促進された。TREM2 マクロファージの浸潤は血管内皮障害により引き起こされる¹⁾。



2) 全体の免疫細胞の UMAP を描き、annotation を行うとコントロールにおいてはほとんど認めなかった B 細胞が大動脈瘤断端部、中心部ともに著明に増加していることが分かった。多重免疫細胞を行うと、B 細胞、T 細胞は組織に局在するリンパ状の構造物、Tertiary lymphoid structures (TLS) を形成していると考えられた。この結果は文献2の結果とも一致する。

【考察】

ヒト、マウスともにシングルセル解析をすることで、共通の動脈硬化特異的 TREM2 マクロファージの存在が判明した。このマクロファージが動脈硬化、そして大動脈瘤形成を悪化させる細胞集団であることを明確に証明することができた。さらには、ヒトサンプルのシングルセル解析からは TLS の形成が判明したが、今後その役割を動物実験で明らかにしたい。

【引用文献】

1. Thayaparan D, Emoto T et al. Endothelial dysfunction drives atherosclerotic plaque macrophage-dependent abdominal aortic aneurysm formation. Nat Immunol. 26(5). 706-721. 2025
2. Hosaka I et al. Unraveling Novel Subsets of Lymphocytes Involved in Sac Expansion in the Tertiary Lymphoid Structure Within an Abdominal Aortic Aneurysm. J Am Heart Assoc. 18. 14 (6). 2025

統合オミクス解析による心不全の遺伝的基盤解明と精密医療の実現

円山 信之

(理化学研究所生命医科学研究センター/Broad Institute)

【目的】

心不全 (HF) は年々増加しており、病態解明は喫緊の課題である。過去の心不全ゲノムワイド関連解析 (GWAS) では 47 の疾患感受性座位が同定されたが、これらは主に欧州人で行われており、日本人における情報は少ない。我々は本邦最大となる心不全及びそのサブタイプの GWAS を行った。

【方法】

7,825 名の日本人全ゲノムシーケンスデータを用いて日本人特異的なリファレンスパネルを構築しインピュテーションを行った。全心不全の内、左室駆出率 (LVEF) < 40% を HFrEF (heart failure with reduced ejection fraction), LVEF > 50% を HFpEF (heart failure with preserved ejection fraction), 冠動脈疾患を持たないものを NIHF (non-ischemic HF) と定義した。

【結果】

日本人 GWAS, 民族横断的メタ解析, MTAG(multi-trait analysis of GWAS) の合計で 76 感受性座位 (内 19 が新規感受性座位) が発見された (図 1). ここで, 心筋症遺伝子である *TTN*, *NEBL*, *BAG3* の頻度の高い遺伝的多型が心不全発症に関与していることが判明した. 特に *TTN* (既報告では MTAG でのみ有意) と *NEBL* は過去には報告されていなかった. gnomAD を用いてアレル頻度を比較すると, *TTN* の遺伝的多型は欧州人と東アジア人で異なり, マイナーアレル頻度が高いことが本発見に至ると推察された (図 2a). これらの遺伝的多型について日本人心不全症例の LVEF, 及び UK biobank(UKBB) の健常人での LVEF について検討する

と, *TTN* と *BAG3* については低 LVEF と関連していた (図 2b). 更に心不全症例の中でも *TTN* の遺伝的多型を持っていると心不全死亡が有意に多いことが分かり (図 2c, d), 心不全発症後にもリスク層別化のためにゲノム解析が有用であることが示唆された.

【考察】

日本人 16,251 名の心不全症例及びそのサブタイプの GWAS を行い, 民族横断的解析, MTAG を加えることで 19 の疾患感受性座位が同定出来た. *TTN* は欧州人と日本人でアレル頻度に差があり, *TTN* の遺伝的多型は心不全重症度と関連し, 予後予測因子となることが解明された.

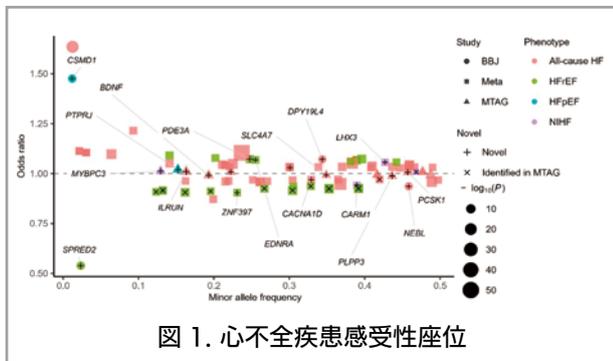


図 1. 心不全疾患感受性座位

シングルセル分子病理解析によるサルコイドーシスの病態解明

片桐 美香子

(東京大学大学院医学系研究科)

【目的】

サルコイドーシスは原因不明の全身性肉芽腫性疾患

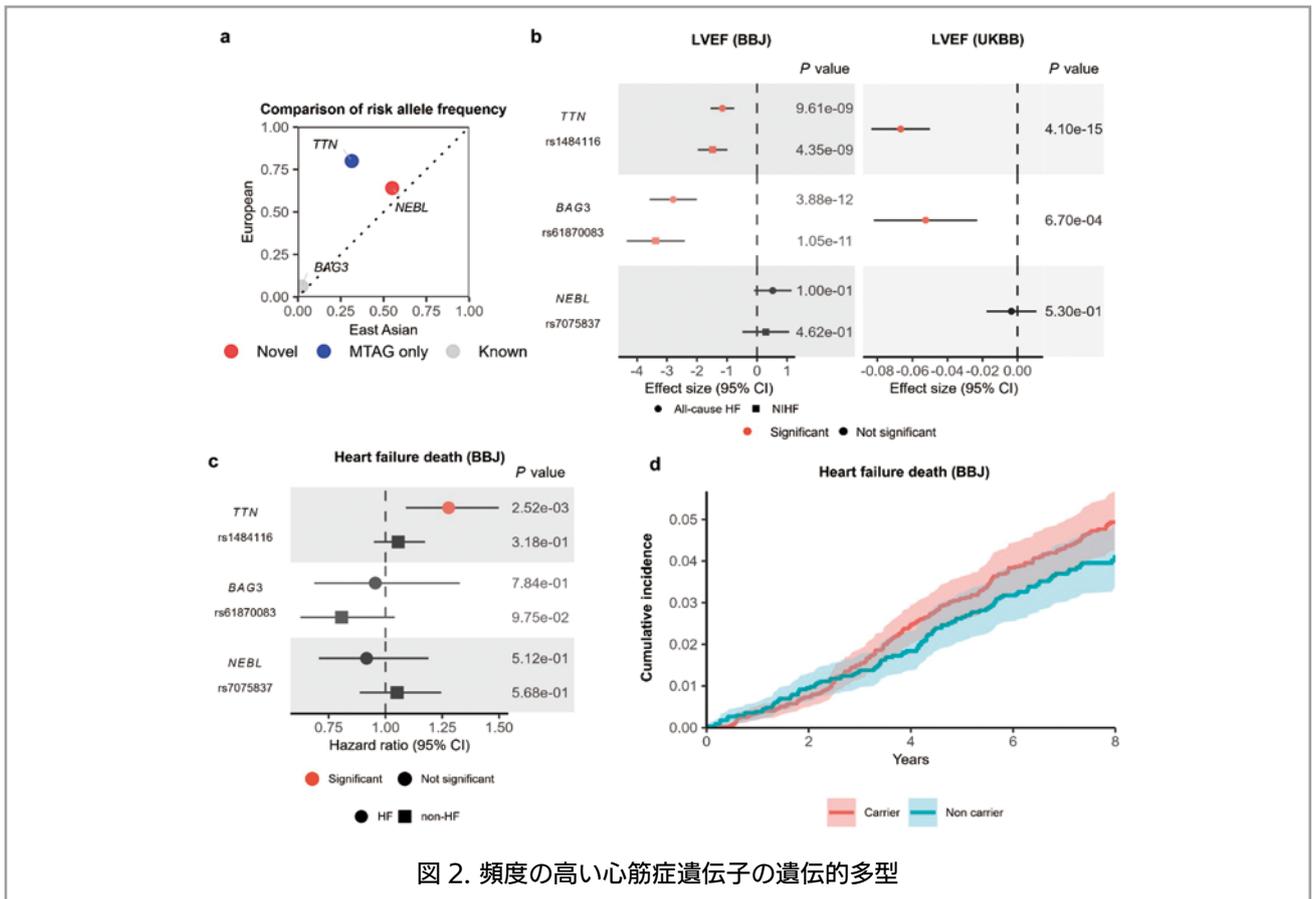


図 2. 頻度の高い心筋症遺伝子の遺伝的多型

であり、難病に指定されている。中でも心臓サルコイドーシス (CS) は、不整脈や心不全を引き起こし、国内におけるサルコイドーシス関連死の約半数を占める。ステロイド治療によって予後の改善が期待されるため、早期診断と治療介入が重要であり、その病態解明が課題となっている。肉芽腫の形成には、マクロファージやT細胞が関与することが報告されているが、その詳細な機序は解明されていない。本研究の目的は、CS患者の末梢血液中単核細胞 (PBMC) を用いたシングルセル解析と、心臓組織を用いた空間トランスクリプトーム/プロテオーム解析を用いて病態を理解し、組織における肉芽腫の形成機序や臓器機能低下の機序を明らかにすることである。

【方法・結果】

CS患者の心臓組織を用いた空間的解析では、3つの異なる手法を用いた。切片上で特定の領域における mRNA の発現を網羅的に検出できる GeoMx Whole Transcriptome Atlas (Bruker) では、コントロール、CS、拡張型心筋症の比較を行った。CSの肉芽腫部分では免疫細胞が複数のサイトカインを強く発現しており、心筋細胞部分では代謝に関連する因子 *PDK4* が増加していた。この肉芽腫におけるサイトカインの発現増加は、10x Visium CytAssist spatial transcriptomics (10x Genomics) でも観察され、サルコイドーシス組織では多様な免疫細胞が活性化して増加していることが分かった。数十種類以上のタンパクマーカーを一細胞レベルで観察可能な CODEX/PhenoCycler-Fusion (Akoya Bioscience) を用いた Multiplex Spatial 解析では、GeoMx や 10x Visium により導き出されたサイトカインを含む 35 種類のタンパク発現の検討を行った。細胞の分布を観察したところ、肉芽腫内にはマクロファージおよびリンパ球が特徴的に局在し、炎症性サイトカインを産生していた。

さらに、患者血液から密度遠心勾配法により PBMC を単離して、10x Chromium(10x Genomics) を用いて single cell RNA/TCR-seq 解析を行った。これまで病態の中心と考えられていた CD4 T細胞ではなく、CD8 T細胞において Naïve 分画の減少と Effector Memory 分画の増加といった細胞集団の変化と細胞活性化、さらに TCR レパトアのクローン増殖を認めた。

【考察】

ヒト心臓組織を用いた詳細な空間的トランスクリプトーム解析により、CSにおける肉芽腫内の免疫細胞の分布と、炎症性サイトカインの発現を明らかにした。組織で認められた免疫細胞の集簇は、強い炎症反応の起点となり、心機能障害や不整脈の発生に関与している可能性が示唆された。

Developmental Origins of Health and Disease としての AT₁ 受容体による腎脈管・血管形成誘導 メカニズムの解明

川岸 裕幸

(国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター薬理部第三室)

【背景】

Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) は、胎生期や新生児期の環境因子が将来の健康リスクに影響するという概念である。近年の疫学研究により、未熟児や低出生体重児では慢性腎臓病 (CKD) のリスクが高いことが報告されている。CKD患者は世界的に増加しており、深刻な社会問題となっていることから、腎臓における DOHaD メカニズムの解明とそれに基づく予防・治療法開発は重要である。アンジオテンシン II は、腎臓の発生や機能維持に重要な働きを有し、細胞膜上のアンジオテンシン 1 型受容体 (AT₁R) を介して、G タンパク質経路および β アレスチン経路を活性化する。しかしながら、両シグナル伝達経路それぞれの腎発生における役割は未解明である。

【目的】

本研究の目的は、新生児マウスの腎発生過程における AT₁R 下流シグナルの特異的役割を明らかにすることである。

【方法】

生後 1 日目から 14 日目まで、雌雄 BALB/c マウスに生理食塩水、G タンパク質と β アレスチンの両経路を抑制するカンデサルタン、G タンパク質経路を抑制し β アレスチン経路を活性化する TRV027 を連日皮下注射した。各群から血清を調製し、腎機能関連パラメーターを評価した。また、腎組織を経時的に採取し、組織染色により腎皮質や髄質の形成、ネフロン数を解析した。

【結果】

カンデサルタン投与により、生後 15 日目までに約 3 割の個体が死亡した。発育不全や腎重量低下、および重度の腎障害の兆候が認められた。病理解析では、小葉間動脈や輸入動脈の血管平滑筋に肥厚が生じ、皮質菲薄化、髄質萎縮が観察された。免疫組織染色により髄質の異形成が確認され、近位尿細管やヘンレ下行脚・上行脚の形成不全が認められた。皮質でも血管内皮や平滑筋様細胞の肥厚が見られた。一方、ネフロン数に顕著な変化はなかった。これらの異常所見は、生理食塩水投与群や TRV027 投与群では認められなかった。

【考察】

AT₁R/β アレスチン経路が腎発生における血管、尿細管の形成・成熟に重要な役割を担うことが示唆された。これらの結果は、AT₁R/β アレスチン経路の特異的な活性化が、新生児期において適切な腎脈管形成を促す可能性を示している。今後、発達段階ごとの分子メカニズム解明により、DOHaD 関連腎疾患の予防・治療法開発につながると期待される。

ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた CRISPR スクリーニングによる心筋特異的 DNA 損傷応答・修復機構の解明

窪田 雅之

(東京大学医学部附属病院 循環器内科)

【目的】

我々はこれまで、心筋細胞における DNA 損傷の蓄積と持続的な DNA 損傷応答 (DDR) の亢進が、心機能破綻および心不全発症に共通する分子基盤となる可能性を報告してきた。しかし、非増殖細胞である心筋細胞において DDR に関与する主要分子の全体像は未解明であり、現時点で DDR 制御を標的とした心不全治療法の開発には至っていない。本研究ではこれまでに、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞 (iPSCM) を用いて DDR 関連 437 遺伝子を対象とした CRISPR ノックダウンスクリーニングを行い、DDR 抑制に寄与する複数の因子を同定し、特に SUMO 化 E3 リガーゼ群が心筋保護に重要であることを見出した。以上より、心筋における

SUMO 化 E3 リガーゼの機能的役割を解明することを目的とし、①心筋における標的基質タンパク群の同定、②心不全モデルマウスを用いた機能的検証、を行った。

【方法】

- ①レンチウイルスベクターにより SUMO 分子を安定発現する iPS 細胞を樹立し、心筋細胞へ分化誘導を行った。心筋細胞からタンパクを回収し、SUMO 化タンパクの精製を行った。
- ②SUMO 化 E3 リガーゼのうち特に分子 X に着目し、MyoAAV ベクターを用いてノックダウンまたは過剰発現マウスを作製した。大動脈縮窄術 (TAC) を施行し、心機能評価および心筋 DNA 損傷解析を行った。

【結果】

- ①SUMO 化タンパク精製に際して抗 SUMO 抗体による共免疫沈降法 (Co-IP) を試みたが効率が低く、Ni-NTA カラム精製 (HisTag タンパクの精製が可能) の方針へ切り替えた。すなわち、改めてレンチウイルスベクターを用いて HisTag-SUMO 発現 iPS 細胞を樹立し、心筋細胞へ分化させた。カラム精製により HisTag-SUMO 化タンパクの効率的な精製が可能となり、今後の網羅的解析に向けた手法を確立した。
- ②TAC マウスモデルでは、コントロールの TAC マウスと比較し、遺伝子 X ノックダウンマウスにおいてより早期からの心機能低下と DNA 損傷増加を認め、過剰発現マウスでは心機能が保持され DNA 損傷は抑制された。

【考察】

本研究により、心筋細胞における SUMO 化タンパク精製手法を確立するとともに、SUMO 化 E3 リガーゼ分子 X が DNA 損傷抑制および心機能維持に寄与することを明らかにした。これらの成果は、分子 X が心不全進展における重要な制御因子であり、新規治療標的となり得ることを示唆している。今後はプロテオーム解析や遺伝子発現解析を含むマルチオミックス解析を進め、分子 X の作用機序を詳細に解明し、心筋保護機構の全体像を明らかにしていく予定である。

一細胞解析と in vivo CRISPR/Cas9 システムの融合による心不全リプログラミング因子スクリーニング

候 聡 志

(東京大学大学院医学系研究科 循環器内科学講座)

【背景と研究目的】

申請者らは研究助成を受け、本年は主に以下の二つの研究内容に取り組み、一定の成果を得た。

【方法及び結果】

(1) Prime editing による先天性心疾患モデルマウスにおける *Nkx2-5* 変異

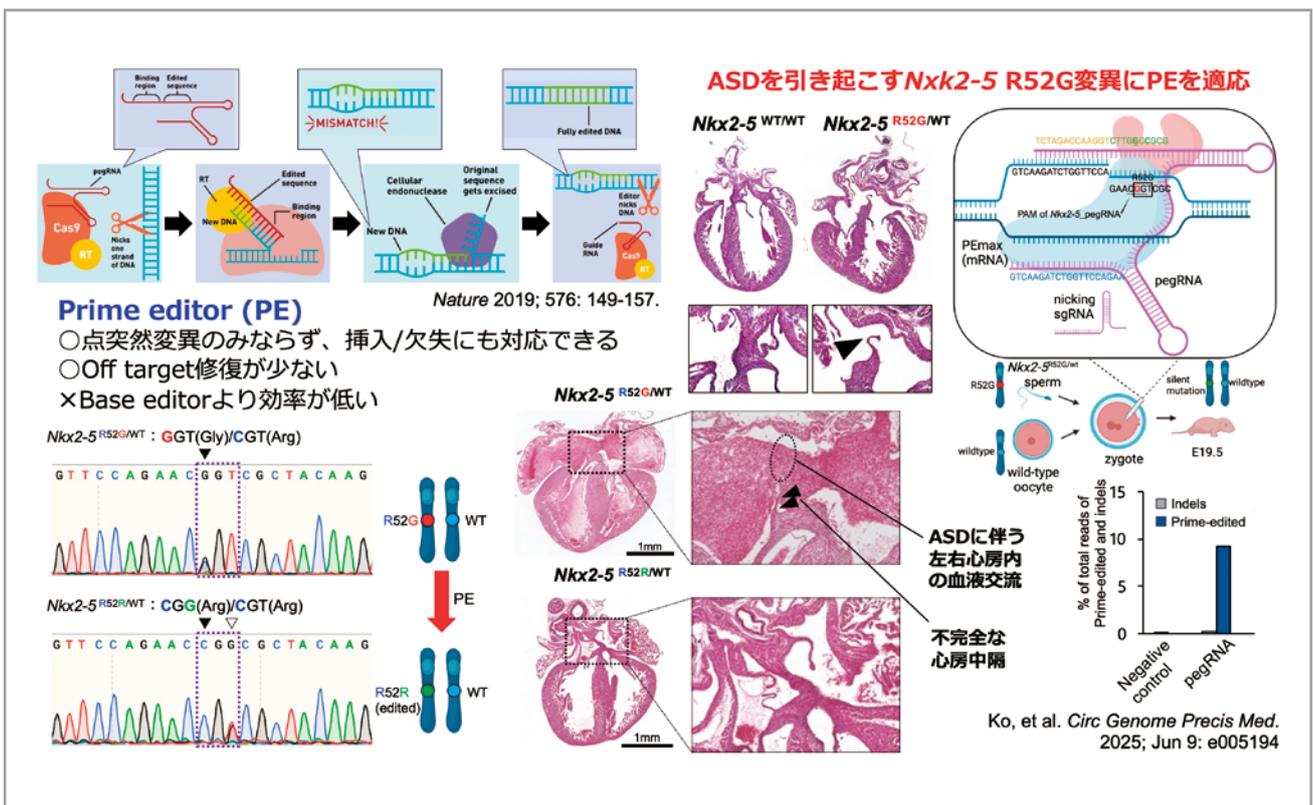
近年では肥大型心筋症や拡張型心筋症については特定の塩基を効率的に変換する Base editing を用いて、モデルマウスの遺伝子変異を修復することで、心不全の表現系を軽減することに成功した報告が相次いだが、Base editing を適応できる変異は限られていることが問題である。これに対して Prime editing (PE) では、逆転写酵素を利用して、より複雑な編集（塩基挿入、欠失、そして自由な塩基変換の組み合わせ）が可能になった。循環器領域での Prime editing を用いた遺伝子治療の報告は前例がないため、*Nkx2.5* 変異による先天性心疾患

モデルマウスに対して実施した。

本研究では心房中隔欠損症 (ASD) の表現系を示す *Nkx2-5* R52G 変異ヘテロ接合体マウスの受精卵に、PE システム (PEmax mRNA, nickng gRNA, pegRNA) を微量注入により導入した。その結果、胚盤胞段階でのアンプリコンシーケンス解析により、9.3% の編集効率であることを確認した。また、編集が成功した5つの胎仔 (E19.5) では、いずれも ASD が認められず、心臓の形態が正常に回復していた。さらに、*Nkx2-5* 変異に伴って発現変動することが知られている遺伝子群の発現プロファイルが、編集成功個体では野生型と同様に是正されていることを確認できた。予測された主要なオフターゲットサイトについては何れもオフターゲット編集は検出されなかった。

(2) 心臓リハビリテーションを模倣する遺伝子治療の開発

本研究ではマウス心筋梗塞モデルを用いて、心臓リハビリテーションを模した運動療法を行った後、シングルセル・マルチオミクス解析により運動療法誘発性の遺伝子発現変化やエピゲノム変化を調べた。運動療法特異的に出現する筋細胞クラスターを同定することに成功し、こうした筋細胞では代謝改善を示唆するミトコンドリア関連の遺伝子発現が活性化していた他、メカノセンサーかつ心保護因子としても知られて



いる遺伝子 F の発現が特異的に上昇していることが判明した。

AAV を用いて遺伝子 F の過剰発現を検証したところ、運動療法同様に心筋梗塞遠隔期のリモデリングを抑制して心保護効果を示したのみならず、心筋細胞の遺伝子発現的にも運動療法時に生じる変化と類似した。一方で、遺伝子 F を心筋細胞特異的にノックダウンすると、たとえばマウスに運動療法を実施したとしても心保護効果は見られなくなった。iPS 心筋細胞を用いた検討から、心筋細胞の伸展刺激そのものが遺伝子 F の発現を増やすことが分かり、運動に伴う心筋細胞への血流・機械刺激の増加が心保護遺伝子 F の発現を増やすと推測された。

【本研究助成により報告した主な論文 5 報】

1. **Ko T**, et al. Correction of the murine model of congenital heart disease associated with the *Nkx2-5* mutation using prime editing. *Circ Genom Precis Med*. 2025 Jun 9: e005194. doi: 10.1161/CIRCGEN.124.005194. Online ahead of print.
2. Inoue S, Dai Z, Oshima T, Nomura S, Hiruma T, Abe R, Fujita K, Katoh M, **Ko T**, et al. Genotype-guided Cardiac Device Intervention in LMNA-related Cardiac Conduction Disorder: The Need for Timely Genetic Testing. *Eur J Heart Fail*. 2025 May 24. doi: 10.1002/ejhf.3695
3. **Ko T**, et al. Gender Differences in Cardiovascular Events among Patients with Sleep Apnoea Syndrome: A Real-World Data Analysis of a Nationwide Epidemiological Dataset. *Eur J Prev Cardiol*. 2025 Jan 28: zwaf029. doi: 10.1093/eurjpc/zwaf029. Online ahead of print.
4. Hiruma T, Inoue S, **Ko T**, et al. PRKAG2 syndrome caused by a novel missense variant mimicked sporadic hypertrophic cardiomyopathy until its progression to burned-out phase. *Circ Heart Fail*. 2024; 17(12): e012047.
5. Hiruma T, Inoue S, Dai Z, Nomura S, Kubo T, Sugiura K, Suzuki A, Kashimura T, Matsushima S, Yamada T, Tobita T, Katoh M, **Ko T**, et al.

Association of Multiple non-HCM related Genetic Variants with Outcomes in Patients with Hypertrophic Cardiomyopathy. *JACC Heart Fail*. 2024; 12(12): 2041-2052.

心不全において骨髄ニッチが心機能低下をもたらす機序解明と新規治療開発

後 藤 耕 策

(京大医学部附属病院 循環器内科)

【背景】

心不全を一度発症すると、心不全入院を繰り返すとともに慢性腎臓病やサルコペニアなど多臓器不全を呈する。心不全を発症すると、造血幹細胞 (HSC, hematopoietic stem cell) がエピゲノムレベルで変化し、その分化様式は末梢血で骨髄球系へ偏り (Myeloid shift), さらに単球から臓器保護的なマクロファージへの分化が障害された。これにより、各臓器で更なるストレスに対する忍容性を低下させることが分かった (Nakayama Y, Goto K, *Sci Immunol*. 2024). HSC がエピゲノムレベルで変化をきたす全容は未だ明らかになっておらず、骨髄内の微小環境 (骨髄ニッチ) に焦点を当てて研究を行った。

【目的】

心不全における骨髄ニッチの変化が造血幹細胞を介して心機能に与える影響を解明し、心不全に対する新規治療標的を同定し、新たな治療法の開発を目指す。

【結果&考察】

骨髄ニッチの中でも HSC の未分化維持に最も主要な役割を果たす間葉系間質細胞 (MSC, mesenchymal stromal cell) に着目し、マウス心不全 (TAC) モデルを用いて心不全発症後の MSC のトランスクリプトーム解析を行った。TAC 後の MSC は脂肪細胞関連遺伝子の発現が上昇しており、MSC の脂肪分化が進んでいることが分かった。骨髄の免疫染色では成熟脂肪細胞が増加しており、分化誘導実験でも TAC マウス由来の MSC で脂肪分化が進んでいた。次に脂肪分化した MSC の、造血への影響を確認するために、コントロールマウスと心不全マウスの MSC を、HSC とともに移植したとこ

ろ、TAC マウス由来の MSC 群のレシピエントは造血幹前駆細胞レベルから末梢血に至るまで Myeloid shift しており、心臓では CCR2+ の炎症性マクロファージの割合が増加していた。心不全発症後の MSC が HSC の表現型に与える影響についてさらに詳細な解析を進めるため、コントロールと TAC マウスそれぞれから HSC と MSC を分取し、シングルセル RNA シークエンスを行った。MSC-HSC 間の Interactome 解析では、TAC マウスで MSC における geneX の発現が有意に低下し、同時に HSC の geneX に関わるシグナルも有意に低下していた。既報に基づくと、HSC におけるこのシグナル低下は HSC の増殖や分化を引き起こすことが知られているため、TAC における HSC の Myeloid shift の原因の一つに、MSC の脂肪分化とそれに伴う geneX の発現低下が関わっていることが示唆された。以上から、MSC そのものも心不全の病態形成に深く関与していることが分かったため、今後の論文化を目指して追加実験を進めている。

【文献】

Nakayama Y, Fujiu K, Oshima T, Matsuda J, Sugita J, Matsubara TJ, Liu Y, Goto K, Kani K, Uchida R, Takeda N, Morita H, Xiao Y, Hayashi M, Maru Y, Hasumi E, Kojima T, Ishiguro S, Kijima Y, Yachie N, Yamazaki S, Yamamoto R, Kudo F, Nakanishi M, Iwama A, Fujiki R, Kaneda A, Ohara O, Nagai R, Manabe I, Komuro I. Heart failure promotes multimorbidity through innate immune memory. *Sci Immunol.*, 9(95), eade3814 (2024).

糖尿病性腎症の進展における新規 BMP 拮抗分子の機能解析

小林 洋輝

(日本大学医学部 腎臓高血圧内分泌内科)

【序論】

申請者は糖尿病患者を対象に、血漿中蛋白を網羅的に解析し、その中から NBL1 が糖尿病性腎症の進展において重要な役割を担うことを明らかにした。また NBL1 は心臓の線維化にも関与することが考えられ、今年度

は、本研究において、NBL 1 が心臓の線維化にどのように関与するかについて検討した。

【方法】

- ① ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) をリコンビナント NBL1 で刺激を行い、線維化に関連する遺伝子及び蛋白の発現の変化について検討した。
- ② NBL1 ノックアウトマウスに対して、非選択的 β アドレナリン受容体作動薬であるイソプロテレノールを投与し、心臓組織における NBL1 の役割について検討した。

【結果】

- ① HUVEC をリコンビナント NBL1 (1000 ng/mL) を添加した培地で3日間培養した後、EndMTに関連する遺伝子をリアルタイム PCR で解析したところ、コントロール群と比較して、NBL1 添加群では fibronectin の有意な上昇が認められた。また、HUVEC をリコンビナント NBL1 で7日間培養後に固定し、血管内皮細胞に特異的に発現し、内皮細胞の形態を維持する VE-cadherin を蛍光免疫染色で検出した。その結果、コントロールの HUVEC では細胞間に VE-cadherin の発現が認められたが、NBL1 で刺激した HUVEC では VE-cadherin の発現が減少していた。これらの結果から、NBL1 は内皮細胞の形態および分子マーカーの変化を誘導し、EndMT 様の細胞応答を促進する可能性が示唆された。今後は、NBL1 が EndMT を誘導する際に関与する分子機構について明らかにしたい。
- ② NBL1 ノックアウト (KO) マウス (-/-) および野生型 (WT) マウス (+/+) に対して、イソプロテレノールを 20 mg/kg/day で7日間、浸透圧ポンプで皮下持続投与し、心筋障害モデルを作製した。心臓組織での遺伝子発現解析を行った結果、イソプロテレノール投与群では、コントロール群に比べて線維化関連遺伝子の発現が上昇しており、加えて、炎症性ケモカインである MCP-1 の発現も増加していた。また、Sirius Red 染色では、投与群において、コラーゲン線維の増加が認められた。今後は NBL1 KO マウスと WT マウス間で線維化や炎症応答に差異が認められるかどうかについて、組織学および分子生物学的評価を通じて検討する予定である。

非心筋細胞の心不全病態及び多臓器連関における役割の全貌解明とそれに基づく新規治療法開発

小室 仁

(東京大学大学院医学系研究科)

【目的】

心不全 (HF) は世界的に増加しており、依然として複雑な病態の全容は解明されていない。心臓を構成する細胞の多くは非心筋細胞であり、その中でも線維芽細胞 (CF) は心筋細胞 (CM) と密接に相互作用する。従来 CF は線維化の担い手として研究されてきたが、CM 機能に与える直接的影響は不明であった。本研究では、CF に注目し、心不全進展における新規分子機構を解明することを目的とした。

【方法】

マウス圧負荷モデルを用い、心肥大期・心不全期の心臓を scRNA-seq で解析し、心不全期に特異的に出現する MYC 高発現 CF を同定した。CF 特異的 MYC 欠失 (KO) および過剰発現 (OE) マウスを作製し、圧負荷下で心機能を比較。さらに RNA-seq とパスウェイ解析により候補分子を探索した。ヒト拡張型心筋症心筋サンプルでは snRNA-seq と smFISH を行い、マウスでの結果を検証した。加えて、CF に対しメカニカルストレス、酸化ストレス、神経体液性因子、炎症性サイトカインを負荷し、MYC 発現の上流因子を探索した。CF-CM 相互作用後の下流シグナルは Western blot で検討した。

【結果】

OE マウスでは心機能低下が増悪し、KO マウスでは抑制されたことから、CF における MYC 発現が心不全進展に関与することが示された。RNA-seq 解析より、MYC が CF で CXCL1 を直接誘導・分泌し、CM に発現する CXCR2 を介して病態進行を促すことを確認した。さらに、CXCL1 は CM で ERK 経路を活性化し、この作用は CXCR2 中和抗体により抑制された。ヒト不全心サンプルでも MYC-CXCL1 陽性 CF が有意に増加していた。上流因子の検討では、X のみが MYC 発現を有意に上昇させた。

【考察】

心不全期において炎症細胞由来の X が CF で MYC 発現を誘導し、CXCL1 分泌を介して CM の CXCR2 を刺激することで ERK 経路が活性化し、心不全病態が進展することが示唆された。本研究は、CF という非心筋細胞が CM に直接作用し心不全を悪化させる分子機構を世界で初めて提示したものであり、新規治療標的としての可能性を有する。

運動による動脈硬化予防機序の解明

崎谷 直義

(産業技術総合研究所)

【背景・目的】

動脈硬化予防に対する運動の有効性は示されているが、その分子メカニズムには未解明な点が多い。運動動作では、身体局所に変形や内圧変化が生じ、その部の細胞に力学的刺激が加わる。我々はこれまでに、齧歯類動物を用いた実験で「適度な運動」として用いられる中速度トレッドミル走行で前肢の接地時に頭部に伝わる衝撃は約 $1 \times g$ であること、この衝撃を再現する受動的頭部上下動が中速度トレッドミル走行と同様に高血圧を改善し、その効果は、間質液流動で生じる流体せん断力を介したアストロサイトの機能制御によるものであることを明らかにした (*Nat Biomed Eng* 2023)。間質液は身体の全ての組織に存在しており、「身体運動→組織局所の内圧変化→間質液流動→細胞への流体せん断力」という系による機能制御が、運動の健康増進効果に広く関与している可能性がある。そこで、運動による動脈硬化予防効果において、運動時に身体に生じる力学的刺激 (運動模倣力学的刺激) が重要な役割を果たすという仮説を立てた。今年度は、この仮説検証の一環として、動脈硬化のリスク因子のひとつである糖代謝機能障害に対する運動模倣力学的刺激介入の効果を検討した。

【方法・結果・考察】

齧歯類動物を用いた実験で「適度な運動」として広く用いられる中速度トレッドミル走行時の身体の上下方向の動きとピーク加速度を再現する受動的体上下

動介入を確立した。受動的身体上下動介入（30分/日、5日/週）は、高脂肪餌給餌マウスで生じる空腹時高血糖、耐糖能障害、高インスリン血症を改善した。一方で、通常餌給餌マウスでは、受動的身体上下動介入の有無で、空腹時血糖および耐糖能には有意な差は認められなかった。また、受動的身体上下動介入の有無で、摂餌量や除脂肪体重、活動量に有意な差は認められなかった。これらの結果から、受動的身体上下動介入で認められた糖代謝機能障害改善効果において、力学的刺激が重要な役割を果たすことを示唆される。

「加齢関連線維性疾患」概念の確立及び治療法開発

蕭 詠 庭

(国立循環器病研究センター 心血管老化制御部)

【目的】

本研究の目的は、加齢関連線維性疾患 (A-FiD) に対する疾患横断的な治療法を開発することであり、PCPE-1 を標的とした治療法の開発を目指した。特に MASH と HFpEF の病態に着目し、PCPE-1 抑制による新規治療法の開発に挑戦した。HFpEF の分子機序は未だ未解明な点が多いが、心臓の線維化による拡張不全が主たる病態である。MASH は肝臓の線維化が主たる病態の一つである。HFpEF や MASH の治療法は極めて限定され新規治療法の開発は急務である。そこで、本研究課題において MASH, HFpEF における PCPE-1 の病的意義を明らかにし、同分子を標的とした新規治療法を開発を目指した。

【方法】

PCPE-1 を標的とした MASH, HFpEF 治療法の開発

本研究課題に先行する形で行なった検討において、様々な遺伝子改変動物を用いた検討の結果、MASH における、PCPE-1 の病的意義が明らかになりつつあった。PCPE-1 に対するペプチドワクチンを用いた検討の結果、ワクチンを投与した MASH 肥満モデルマウスの肝臓で線維化が抑制されることがわかっていた。そこで、PCPE-1 を抑制するスクリーニングの系の確立も目指した。また、ヒト化 PCPE-1 過剰発現モデルマウスを複製し、PCPE-1 中和抗体により肝臓や心臓の線維化が抑

制されるか検討することを目指した。

PCPE-1 制御メカニズムの検討

バイオインフォマティクスの手法等を用いた検討の結果、PCPE-1 が主に褐色脂肪(BAT)で産生されること、PCPE-1 のプロモーター領域に転写因子である c-Fos が結合し、発現を生に制御する可能性が示唆されていた。肥満マウスの褐色脂肪を用い c-Fos のレベルを検討したところ、高脂肪食負荷時には褐色脂肪の c-Fos の発現が上昇することがわかった。そこで c-Fos を発現するアデノ随伴ウイルスを作成し、代謝ストレス→c-Fos の核への移行→PCPE-1 発現レベルの上昇、という経路を検討することとした。老化に伴い褐色脂肪で PCPE-1 が増加することも確認されているが、詳細な機序の解明に挑んだ。

【結果】

加齢に伴い血中 PCPE-1 レベルが有意に上昇することから、PCPE-1 を「老化促進タンパク」と定義した。肝臓線維化に関する我々の先行研究はすでに *EMBO Journal* に報告しており (*EMBO J.* (2024) 43: 4846-4869)。さらに、老化褐色脂肪組織では活性酸素種(ROS)および DNA 損傷マーカーの増加が認められた。また、*in vitro* 解析から、ROS/DNA 損傷 /c-Fos/c-Jun 経路が褐色脂肪細胞における線維化促進性分泌蛋白 PCPE-1 産生に関与することが示された。BAT 特異的欠失モデルの検討により、PCPE-1 の主要な産生源が BAT であることが確認された。さらに、時間的加齢に加え、食餌性肥満によっても心筋 PCPE-1 蛋白レベルが上昇した。機能喪失モデル (全身 PCPE-1 KO と BAT 特異的 PCPE-1 KO) および機能獲得モデル (ヒト化 PCPE-1 KI と BAT 標的 AAV-PCPE-1 投与) を用いた解析では、PCPE-1 が肥満 HFpEF モデルにおける左室線維化および拡張不全を増悪させることが明らかとなった。加えて、ヒト検体の解析においても、加齢に伴う血漿 PCPE-1 の上昇が確認され、HFpEF 患者の拡張不全と正の相関を示した。以上より、ROS/DNA 損傷 /c-Fos/c-Jun 経路を介した BAT 由来 PCPE-1 産生増加が、肥満あるいは加齢 HFpEF モデルにおける心筋線維化および拡張不全の増強に寄与することが示された。

【考察】

PCPE-1 に対する中和抗体の開発を今後の大きな課

題と位置づけており、現在シーズ抗体の探索を進めている。将来的には、PCPE-1を標的とした抗体療法の有効性を動物モデルで検証し、その臨床応用の可能性を探る必要がある。また、本研究で示されたような病態を「A-FiD」という概念で包括的に定義することにより、老化や肥満に伴う心不全病態と肝臓線維化の理解をさらに深化させることが期待される。

【文献】

Harrison SA, Allen AM, Dubourg J, Noureddin M, Alkhouri N. Challenges and opportunities in NASH drug development. *Nat Med* 29: 562-573 (2023).

Mantovani A, Byrne CD, Benfari G, Bonapace S, Simon TG, Targher G. Risk of heart failure in patients with nonalcoholic fatty liver disease JACC review topic of the week. *J Am Coll Cardiol* 79:180–191 (2022).

SPP1 マクロファージによる生活習慣病増悪機序の 解明

白川 公亮

(慶應義塾大学医学部循環器内科)

【目的】

生活習慣病に関連する免疫学的病態において、炎症性タンパク質 SPP1 は疾患臓器特異的な細胞に発現し、線維化や炎症を惹起する重要な病態増悪因子である。本研究では、SPP1 が病態形成に重要な役割を果たすことが報告されている肺線維症と大動脈弁狭窄症に注目し、各疾患における SPP1 産生細胞とその制御方法を解明し、SPP1 を標的とした免疫学的手法による新たな治療法の開発を目的とした。

【方法】

① 肺線維症の病態解明

Spp1-EGFP knock-in reporter マウスを用いた Bleomycin 誘発肺線維症モデルを作成した。Flow cytometry により EGFP 陽性細胞を同定・回収し、RNA-seq, scRNA-seq, 質量分析によるマルチオミクス解析を実施した。また、肺線維症患者検体の scRNA-seq 解析も実施して、Cellchat@DB による細胞間相互

作用解析を実施した。また、ヒト肺線維症患者の肺病理切片を用いて、マルチオミクス解析で同定された分子の免疫染色を実施した。

② 大動脈弁狭窄症の病態解明

ヒト大動脈弁の scRNA-seq 解析および外科的に摘出された大動脈弁検体を用いた SPP1 の免疫染色を実施した。さらに、Spp1-EGFP knock-in reporter マウスの骨髄を移植した大動脈弁狭窄症モデルマウスを作成し、FACS でソートしたマクロファージの bulk RNA-seq を実施した。ヒト弁間質細胞を樹立し、解析により得られた重要因子を投与して線維化および石灰化の程度を評価した。

【結果】

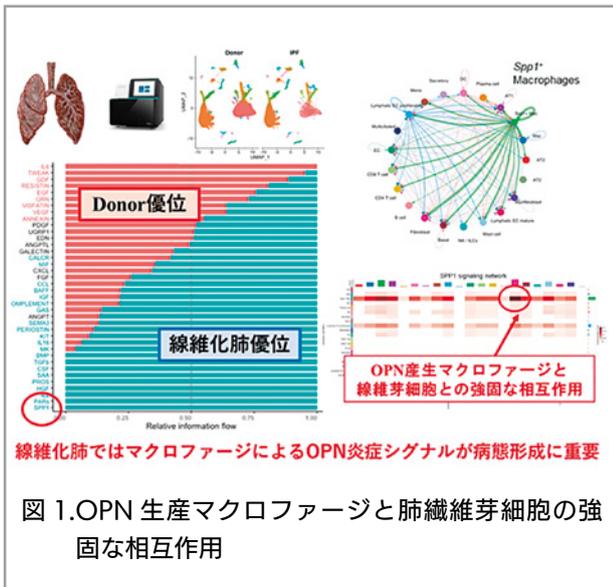
① 肺線維症の病態解明

Bleomycin 誘発 Spp1-EGFP knock-in reporter マウス肺線維症モデルの肺組織細胞を Flow cytometry で解析した結果、Spp1 転写活性の上昇は間質マクロファージに認められ、病理学的には高度に線維化した肺組織に EGFP 陽性マクロファージの集積が観察された。

肺線維症患者検体の scRNA-seq 解析では、Spp1 を発現する細胞はマクロファージのみであり、病理学的にも線維化部位に一致して SPP1 陽性マクロファージが確認された。

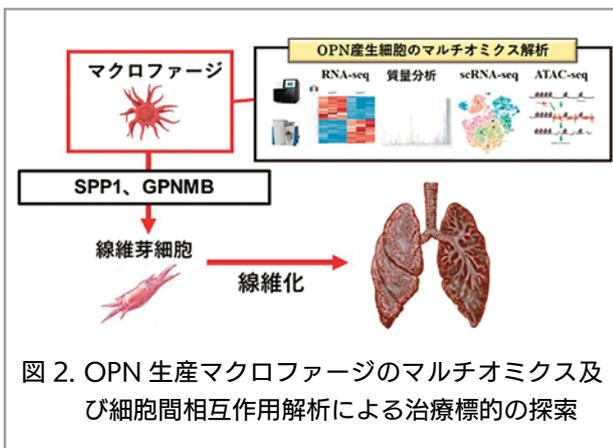
Spp1 knock-out マウスに骨髄照射を行い、Spp1 wild-type マウスの骨髄を移植した群では肺線維化が誘導されたが、Spp1 knock-out マウスでは線維化が軽減されたことから、マクロファージ由来の Spp1 が肺線維化において重要な役割を果たすことが示唆された。

さらに、ヒト scRNA-seq データに対して CellChat による細胞間相互作用解析と RankNet 解析を行ったところ、健常肺に比して肺線維症患者では SPP1 シグナルが最も活性化しており、SPP1 を発現するマクロファージが線維芽細胞と強く相互作用していることが示された(図 1)。



また, Spp1 陽性マクロファージの細胞系譜を明らかにするために monocle3 による Trajectory 解析を実施すると, 末梢循環血中の単球が, Spp1 陽性間質マクロファージに分化し, その後炎症・線維化の慢性期に, Spp1 陽性肺胞マクロファージとして分化して, 慢性炎症を惹起していることが示唆された。

Spp1-EGFP knock-in reporter マウスの線維化肺から FACS でソートした EGFP 陽性マクロファージと線維芽細胞の primary culture の共培養では, 線維芽細胞の活性化が認められた。さらに, EGFP 陽性マクロファージに対して RNA-seq, 質量分析, scRNA-seq によるマルチオミクス解析を行い, ヒト線維化肺の scRNA-seq データと統合することで, 肺線維化および炎症に関与するいくつかの遺伝子やタンパク質を同定した (図 2)。



マルチオミクス解析で得られた分子の内, 肺線維症マクロファージ特異的に発現するインターロイキン7受容

体遺伝子 (Il7r) に注目し, Cre-loxP システムを使用して, マクロファージ特異的に Il7r をノックアウトしたマウスの Bleomycin 誘発肺線維症モデルを作成した。このマウスでは, コントロールマウスと比較して, 病理学的にも胸部CT検査でも共に線維化が有意に抑制された。

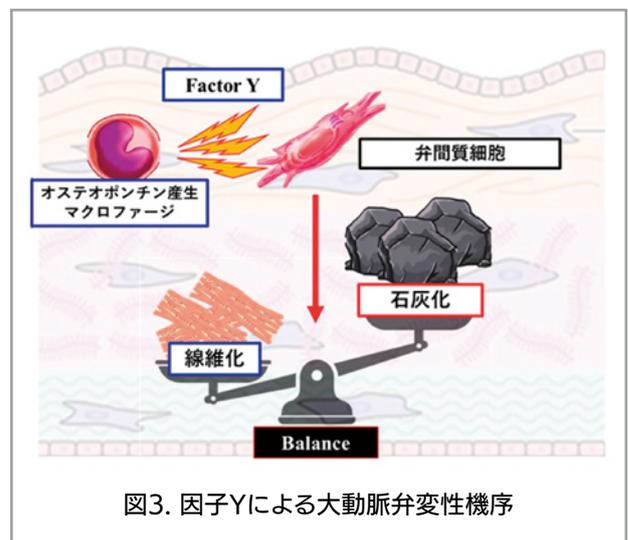
② 大動脈弁狭窄症の病態解明

ヒト大動脈弁の scRNA-seq および病理学的評価により, 変性した大動脈弁において SPP1 を発現する細胞はマクロファージであることが示された。

ApoE ノックアウトマウスをベースとした, 生活習慣病を模倣した AS モデルマウスを作成した。Spp1-EGFP knock-in reporter マウスの骨髄を移植した AS モデルマウスを作成し, FACS によりソートした SPP1-EGFP 陽性および陰性マクロファージの bulk RNA-seq を実施し, SPP1 陽性群で発現が上昇しているいくつかの遺伝子を同定した。また, ヒト大動脈弁の scRNA-seq データセットからマクロファージを抽出し, サブクラスタリングを行うことで, SPP1 を高発現するサブセットで特異的に発現が上昇する遺伝子群を同定した。

マウスおよびヒトに共通する因子 Y を同定し, 弁変性早期に因子 Y が弁変性の開始部位である弁輪付近の fibrosa 領域に集積していることが分かった。

ヒト弁間質細胞の初代培養系を確立し, 因子 Y を特殊な条件下で負荷し弁間質細胞を RNA-seq もしくは, アリザリンレッド染色, α SMA 染色で評価すると, 因子 Y は弁変性初期における, 弁変性過程の線維化と石灰化のバランスを調整する細胞である可能性が示唆された。



【考察】

本研究により、線維化肺における SPP1 産生マクロファージは肺線維芽細胞と強く相互作用することで肺線維化を惹起している可能性が示唆された。また、マルチオミクス解析により同定された SPP1 産生マクロファージを制御する複数の因子に介入することで、肺線維化の制御が可能であることも示された。さらに、大動脈弁狭窄症においても、SPP1 産生マクロファージが弁間質細胞に作用して石灰化や線維化を誘導している可能性が示され、弁変性機序の一端を明らかにする成果となった。

興奮転写連関を介した血管リモデリング形成機構の
解明

鈴木 良 明

(名古屋市立大学 大学院薬学研究科 細胞分子薬効解析学分野)

【背景・目的】

血管平滑筋細胞 (VSMC) の細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 上昇は、興奮 - 転写連関 (E-T coupling) を介して、マクロファージ (MΦ) の集積と VSMC の脱分化・増殖を促して血管リモデリングを発生させる^{1,2)}。本研究では、増殖型 VSMC (pVSMC) における E-T coupling の役割を解明することを目的とした。

【方法・結果】

RNAseq 解析の結果、ラット大動脈由来 pVSMC において Junctophilin (Jph)-2 が、 Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} (CRAC) チャネル - カルシニューリン - NFAT 系を介して増殖や遊走、炎症を促進することを明らかにした。scRNA-seq 解析からリモデリングの成熟期で Jph2 が高発現すること、を明らかにした。Kir2.1 チャネルと CRAC チャネルが MΦ の遊走を促進することを明らかにした³⁾。

【考察】

Jph2 は CRAC チャネルを起点とした E-T coupling によりリモデリングの成熟に関わると考えられた。Jph2 の平滑筋特異的 KO マウスを作製したため、Jph2 の欠損により血管リモデリング形成が抑制されるか検証する予定である。

【文献】

1. Suzuki Y*. Ca^{2+} microdomains in vascular smooth muscle cells: Roles in vascular tone regulation and hypertension. *J Pharmacol Sci.* 158: 59-67 (2025).
2. Suzuki Y*, et al. Ca^{2+} signaling in vascular smooth muscle and endothelial cells in blood vessel remodeling: a review. *Inflamm Regen.* 44(1):50 (2024).
3. Suzuki Y*, et al. Kir2.1 channels drive macrophage migration through enhancing store-operated Ca^{2+} entry. *Am J Physiol Cell Physiol.* 329: C413-C425 (2025).

In vivo perturb-seq 技術を用いた心不全における
心筋リプログラミング治療候補因子の網羅的解析

戴 哲 皓

(東京大学大学院医学系研究科先端循環器医学講座)

【背景・目的】

心不全の進展過程において心筋細胞における保護的因子が存在し、それらの因子の導入による心筋リプログラミング治療が期待されている。しかし、古典的に個々の候補に対する遺伝子改変動物を作成することは効率が低いため、網羅的且つハイスループットな遺伝子機能解析法の確立が急務である。CRISPR/Cas9 を応用しマウス個体における *in vivo* perturb-seq が開発され、神経系や腫瘍領域の研究に応用した報告があるが、心臓における応用は皆無である。

【方法・結果】

心不全をレスキューする心筋リプログラミング治療候補をスクリーニングする目的に、心筋特異的に特定遺伝子の発現を上昇させるモデル動物の作製も重要であり、申請者は世界初の TET1-XTEN80-dCas9 を心筋細胞特異的に発現してターゲット遺伝子の脱メチル化を可能とする遺伝子改変マウス (以下、CRISPRon マウス) の樹立に成功した。転写活性化因子 Rta と連結した gRNA を搭載した MyoAAV2A ウイルスライブラリーを作製し投与することで、個々の心筋細胞に異な

る gRNA が搭載された MyoAAV2A が感染し、心筋細胞ごとに異なった遺伝子の発現が活性化されるシステムの構築に取り組んだ。①初期検証実験として、心筋細胞特異的 CRISPRon マウスに、ターゲット遺伝子に対する gRNA を搭載した MyoAAV2A-gRNA-Rta を投与することで、ターゲット遺伝子の発現活性化が得られることを検証した。②続いて、マウス心不全モデルのシングルセル解析で絞り込んだ不全心筋レスキュー因子となりうる転写因子 20 個に対して MyoAAV2A-gRNA-Rta ライブラリを設計し、作製を完成させた。MyoAAV2A-gRNA-Rta 投与後、単離心筋の cDNA ライブラリーから各々の MyoAAV2A に搭載された識別バーコードをリカバーすることが可能であることを検証した。③現在、CRISPRon マウスに圧負荷心不全を生じさせたのちに MyoAAV2A ライブラリを投与する実験を 1 匹ずつ行っており、個体数が蓄積してきた。今後単離した心筋細胞のシングルセル解析によって、不全心筋をレスキューし得る転写因子を同定し、該当転写因子の機能解析に移る予定である。

【考察】

本研究は着実に進行しており、今後心筋細胞特異的 CRISPRon マウスの心不全個体に、20 種類の候補遺伝子に対する MyoAAV2A-gRNA-Rta ライブラリーを投与したのちに回収した心筋細胞を用いて、シングルセル解析を行うことにより心筋細胞ごとのトランスクリプトームとエピゲノムの変化を解析し、心筋細胞の状態(不全心筋, 代償心筋)を分類して明らかにする。バーコードの判読で発現活性化された遺伝子の種類の情報が得られ、統合解析することで網羅的かつ効率的に心筋細胞傷害をレスキューする遺伝子・シグナル経路を同定する。同定された因子に対して、機能解析を行なった上、心不全の心筋プログラミング治療の開発を進めていく。

心疾患における骨格筋異常—これまでと今後の課題

高田 真吾

(北翔大学大学院 生涯スポーツ学研究所)

【目的】

心疾患は、質的・量的な“骨格筋異常”をしばしば伴い、日常生活動作や生活の質を著しく損なう主要原因となっている^{1,2)}。臨床研究においては、全身の運動耐容能の低下や筋萎縮は頻繁に観察されているが、その詳細な病態機序は依然として不明な点が多い。一方、基礎研究で明らかにされつつある分子機序が、臨床研究で確認される例は極めて少ない。

我々は脳由来神経栄養因子 (BDNF) が心不全患者において低下し、BDNF レベルは運動耐容能と負の相関を示すことを報告してきた^{1,2)}。そこで本研究では、心疾患における骨格筋異常および運動耐容能の低下に対して、BDNF を中心とした新規および既存薬剤による治療法の開発を目的とした³⁾。

【方法・結果】

BDNF は骨格筋の遅筋線維に豊富に局在し、骨格筋ミトコンドリア機能および全身の運動能力を制御する可能性が示唆された。そこで、心筋梗塞後 2 週間の心不全マウスにおける骨格筋 BDNF レベルを検討したところ、タンパク発現が有意に低下した。さらに、同モデルマウスに対して心筋梗塞 2 週間後からリコンビナントヒト BDNF を 2 週間にわたり投与したところ、骨格筋のミトコンドリア機能および運動耐容能の低下が有意に改善した^{2,4,5)}。

【考察】

我々は、本研究を含む基礎・臨床研究の結果から、BDNF の投与が心疾患における骨格筋ミトコンドリア機能・量および運動耐容能の低下を改善する可能性を示した。今後、心疾患における骨格筋異常の理解が深まることで、BDNF を標的とした新規治療法の開発や、既存薬剤の新たな適応拡大が期待される。

【文献】

1. **Takada S†**, Sabe H, Kinugawa S. Abnormalities of Skeletal Muscle, Adipocyte Tissue, and Lipid Metabolism in Heart Failure: Practical

Therapeutic Targets. *Front Cardiovasc Med*. 2020;7:79. doi:10.3389/fcvm.2020.00079

2. **Takada S**[†], Sabe H, Kinugawa S. Treatments for skeletal muscle abnormalities in heart failure: sodium-glucose transporter 2 and ketone bodies. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Feb 1 2022;322(2):H117-H128. doi:10.1152/ajpheart.00100.2021
3. Nambu H, **Takada S**[†], Maekawa S, et al. Inhibition of xanthine oxidase in the acute phase of myocardial infarction prevents skeletal muscle abnormalities and exercise intolerance. *Cardiovasc Res*. Feb 22 2021;117(3):805-819. doi:10.1093/cvr/cvaa127
4. Matsumoto J*, **Takada S***, Furihata T, et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor Improves Impaired Fatty Acid Oxidation Via the Activation of Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase-α - Proliferator-Activated Receptor-γ Coactivator-1α Signaling in Skeletal Muscle of Mice With Heart Failure. *Circ Heart Fail*. Jan 2021;14(1):e005890. doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.119.005890
5. Matsumoto J*, **Takada S***, Kinugawa S, et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor Improves Limited Exercise Capacity in Mice With Heart Failure. *Circulation*. Oct 30 2018;138(18):2064-2066. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.118.035212

アドレノメデュリン-RAMP2系による血管恒常性
制御機構による腫瘍転移抑制薬の開発

田 中 愛

(信州大学)

【目的】

血管内皮細胞は、循環調節、免疫細胞の動員、組織恒常性の維持において中心的な役割を果たしており、その機能は疾患の発症や進展に深く関与している。な

かでも、リンパ節に特異的に存在する高内皮細静脈(HEV)は、リンパ球を組織内に導くことで免疫応答を支える特殊な血管構造であり、近年では腫瘍免疫や治療応答への関与も示されている。一方で、HEVの構造破綻が腫瘍転移に与える影響や、その制御機構については、いまだ不明な点が多く残されている。本研究では、血管恒常性維持に関与するアドレノメデュリン(AM)-RAMP2系に着目し、HEV構造の恒常性と腫瘍転移との関係を明らかにすることを目的とした。この検討を通じ、循環器疾患研究で培われた血管制御の知見を腫瘍制御に応用する“Reverse Onco-Cardiology”という新たな視点の構築を目指す。

【結果】

血管内皮細胞特異的 RAMP2 ノックアウトマウス(DI-E-RAMP2^{-/-})の足底部にルイス肺癌細胞(LLC)を移植すると、原発巣の増殖は抑制された一方、リンパ節転移は顕著に亢進した。免疫染色により、転移リンパ節におけるMECA-79陽性HEVの構造破綻と接着因子(ICAM-1, GlyCAM-1など)の発現低下が確認され、これに伴ってCD4⁺およびCD8⁺T細胞のリクルートが著しく低下していた。さらに、抗原提示細胞の局在異常とT細胞の活性化不全、IL-2発現の消失、幹細胞様CD8⁺T細胞の枯渇など、免疫応答の質的破綻が生じていた。シングルセルRNA-seq解析でも同様の傾向が確認され、転移巣においてはT細胞の疲弊や免疫不全を示す所見も認められた。一方、血管内皮細胞でRAMP2を過剰発現させたマウスではHEV構造とT細胞局在が安定化し、転移抑制に寄与する可能性が示された。

【考察】

本研究では、AM-RAMP2系による血管恒常性の維持が、HEVの構造と機能を支え、免疫環境を通じて腫瘍転移に影響を与えることを示した。循環器疾患の領域で蓄積されてきた血管研究の知見が、腫瘍免疫の理解にもつながる可能性が示され、本研究の結果は、両分野を架橋する視点の一つとして捉えられる。血管の恒常性制御は、循環器疾患のみならず、がん治療においても有望な治療標的となることが期待される。

ヒト iPS 由来三次元心組織を用いた心臓病に対する病態解明と新規治療法の開発

谷 英 典

(藤田医科大学 臨床再生医学)

【目的】

左室収縮能が保たれている心不全 (Heart failure with preserved ejection fraction : HFpEF) の罹患者数は増加しているが、未だ確固たるエビデンスのある治療法が確立していない。動物においては HFpEF モデルとして肥満や II 型糖尿病の病態を有するモデルが使用され、近年では高脂肪食と NOS 阻害薬の二重の負荷によってよく再現されることが報告されている¹⁾。しかしながら、ヒトにおいてはこうしたモデルは確立しておらず、機序の解明や治療薬の開発が急務である。我々はこれまでにヒト iPS 由来心筋細胞を用いて創薬や病態モデルに応用すべく、ブタ心臓コラーゲンをを用いた三次元心組織の開発を進め、従来の方法よりも形状維持能が高く、収縮 / 拡張力の強い成熟化した心組織を作製することに成功した²⁾。本研究では、こうした成熟度の高いヒト iPS 由来心組織において高脂肪酸と NOS 阻害薬の添加培地で HFpEF モデルのヒト心組織を作製し、心不全の新規病態機序の解明や治療薬の発見に応用することを目的とする。

【方法】

ヒト iPS 細胞由来の心筋細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞を用いて EHT (Engineered Heart Tissue) と呼ばれる三次元心組織を作製した。高濃度の脂肪酸と NOS 阻害薬を添加した培地 (心不全培地) 条件で EHT を培養し、ライブセルイメージングシステムを用いて経時的に収縮 / 拡張能を評価した。一定期間の培養後、組織から RNA やタンパクを抽出して遺伝子解析を行い、免疫染色や電子顕微鏡での形態学的評価を行った。

【結果】

心不全培地条件下では、EHT の収縮能は保たれる一方で、脂肪酸と NOS 阻害薬の濃度依存性に経時的に拡張能が低下することを確認した。組織像の評価では線維化や脂肪滴の蓄積、破壊されたミトコンドリア像などが確認された。タンパクや遺伝子の発現ではマウス

の HFpEF モデル同様の経路の異常が確認された。さらにタイチンの isoform が N2BA より N2B 優位になり、コラーゲンが type1 優位になることを確認した。

【考察】

本研究では、培養皿上のヒト iPS 細胞由来の三次元心組織において培地条件を変えることで生体内の心筋で起こる変化を模倣した拡張能の低下を再現することに成功した。また、線維化や炎症など既存の報告に矛盾しない変化が起こっていることが確認できた。こうした拡張能の低下には、心筋関連タンパクであるタイチンや、細胞外基質であるコラーゲンのアイソタイプの変化による心組織の硬さへの影響が関与することが示唆された。

【文献】

- 1) Schiattarella GG, et al., Nitrosative stress drives heart failure with preserved ejection fraction. *Nature*. 568(7752):351-356, 2019.
- 2) Tani H, Tohyama S, et al: Heart-derived collagen promotes maturation of engineered heart tissue. *Biomaterials*. 299:122174, 2023.

心エコー AI のアクセス拡大を目指したマルチビュー・エンコーダー構築

遠 山 岳 詩

(マサチューセッツ工科大学)

【目的】

心エコー図は心血管診断の要であるが、最新の AI は大規模な計算資源と膨大なデータセットを必要とするため、限られた企業、地域でのみ開発可能という課題がある。本研究では、心エコーの基盤モデルから抽出したベクター埋め込みを活用し、計算負荷を大幅に削減しながら多視点のエコー検査において高精度な AI 性能を実現するマルチビューエンコーダー (MVE) を開発した。さらに、人口統計学的バイアスの問題に対し、敵対的学習を用いた公平性向上手法を検討した。

【方法】

MIMIC-IV-ECHO データセット (7,169 件) を使用し、心エコーの基盤モデルから 512 次元のベクター埋め込

みを抽出した。MVE はアテンション機構により可変数の心エコービューを統合して検査単位の埋め込みを可能にした。敵対的学習では、性別と人種の予測精度を抑制するよう設計し、敵対的重み (ω) を 0 から 1.0 まで変化させて性能とバイアス軽減のトレードオフを評価した。21 の臨床タスク (駆出率低下, 弁膜症, 心筋梗塞等) で AUC を主要評価指標として性能を評価した。

【結果】

MVE (軽度敵対的学習, $\omega = 0.1$) は基盤モデルと比較して平均 9.0 AUC ポイント (12.0% 相対改善) の向上を達成した。21 タスク中 20 タスクで性能改善を示し、中央値 9.0 ポイント (IQR: 5.7-11.1) の改善が得られた。ただし、敵対的学習による人口統計学的ショートカットの削減効果は限定的で、強い敵対的重み ($\omega \geq 0.5$) では臨床タスク性能が大幅に低下した。

【考察】

本研究により、MVE フレームワークは限られた計算資源しか持たない医療機関でも高度な心臓診断 AI の開発を可能にすることが示された。基盤モデルが数週間から数ヶ月の訓練を要するのに対し、MVE は数時間で訓練が完了し、心エコー AI のアクセス拡大に寄与する。アテンション機構による動的な重み付けは、従来の平均化手法を上回る性能を実現し、ドプラエコーや非定型ビューの統合において有効であった。一方、敵対的

学習による公平性向上には根本的な課題があり、人口統計学的特徴と病態生理学的特徴の複雑な相互作用は単純なアルゴリズム的介入では分離困難であることが判明した。今後は外部検証による汎用性の確認と、より効果的なバイアス軽減手法の開発が必要である。

心血管疾患の遺伝子 - 環境相互作用解明によるゲノム個別化医療と創薬

難波 真一

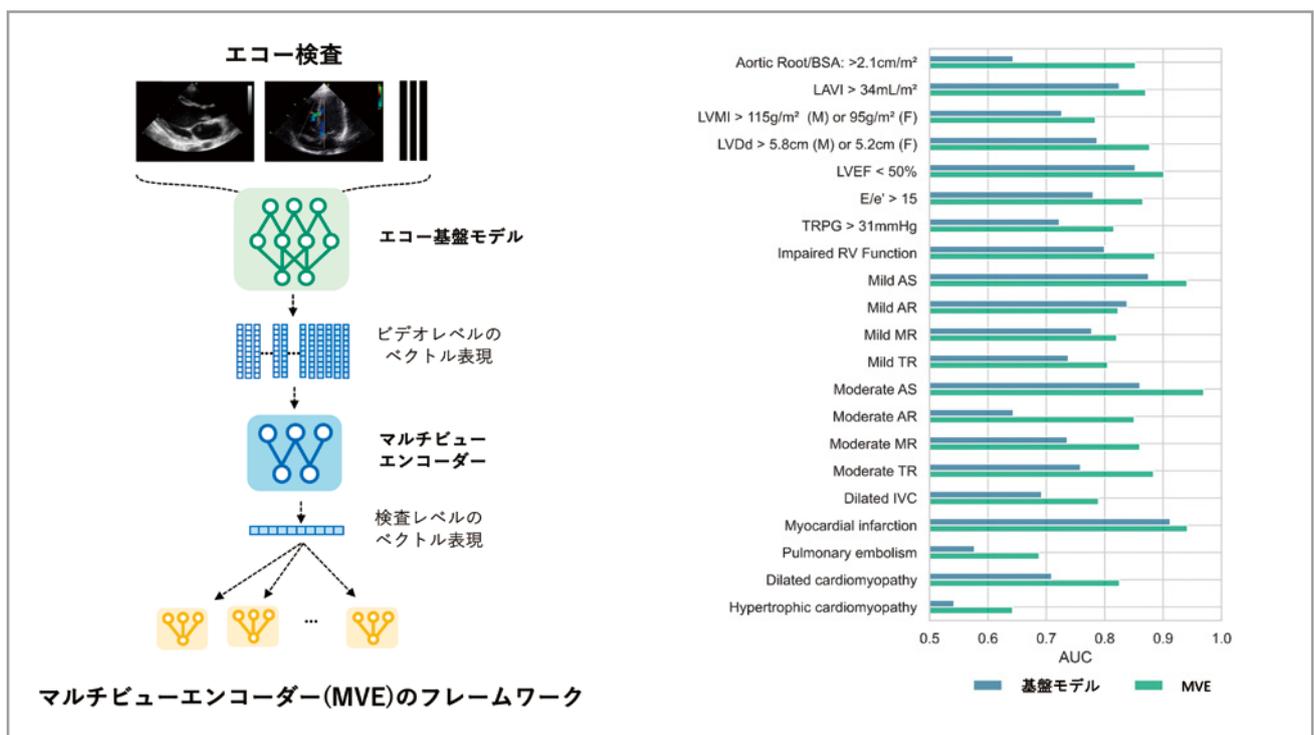
(東京大学大学院医学系研究科遺伝情報学)

【目的】

ゲノムワイド関連解析に基づき幅広いヒト形質を遺伝的に予測した値をポリジェニックスコア (PRS) と呼ぶ。PRS を用いて疾患の早期発見・介入を行う個別化医療が期待されているが、その実現前に、体外受精における着床前遺伝学的検査として胚の PRS を計算し、将来の形質や疾患リスクを予測して胚選択を行うサービスが世界各地で提供されている。本研究では本サービスの信頼性について定量的に検証した。

【方法】

PRS には際立って優れた計算手法は存在せず、研究者により異なる手法が用いられる。我々は 6 種の主要



な PRS 計算手法を用いて成人身長 of PRS を構築した。バイオバンクジャパンの公開ゲノムデータを利用して仮想的に 500 組のカップルを生成し、遺伝子組み換え過程を再現したシミュレーションにより、各カップルに 10 個の胚ゲノムを生成した。これら胚ゲノムに対して PRS を適用し、胚の順位の PRS 手法間での一貫性を検証した。

【結果】

PRS 手法ペア間で、一位に選ばれた胚の一致率は中央値 30.0% であった。ある手法で一位だった胚は、他の手法を用いていたならば 5.9% の確率で最下位であり、逆に最下位の胚は他の手法では 5.2% の確率で一位に選ばれていた。条件を変えてシミュレーションを繰り返し、企業の対象疾患である二型糖尿病でも同様の結果が得られること、ゲノム解析を大規模化して PRS の形質予測精度を高めても PRS 手法間で胚の順位は一貫しないままであることを示した。さらに、同じ PRS 手法を繰り返し計算するだけでも異なる胚が選ばれ、PRS による胚選択はランダムな確率的浮動の影響を受けていた。

【考察】

本研究によって、PRS を用いた胚選択サービスには計算手法間での一貫性がなく、信頼性に欠ける手法で胚を選び、結果として他の胚を捨ててしまうという重大な倫理的課題が提起された。サービスの提供にあたっての遺伝カウンセリングやインフォームド・コンセントにおいても大きな要素となると予想され、PRS による胚選択サービスの許容または規制のあり方について社会全体で議論することが求められる。

【文献】

Namba S et al.: Inconsistent embryo selection across polygenic score methods, *Nat Hum Behav*, 8, 2264–2267 (2024)

女性 HFpEF における miRNA-cGMP の臨床的意義とメカニズム解明

沼田 玄理

(東京大学 アイソトープ総合センター)

【背景】

HFpEF は心不全の約半数を占め、特に閉経後女性で有病率が急増する。HFpEF の診断や治療法には未だ発展途上であり、特に性差を考慮したアプローチは乏しい。cGMP シグナルを活性化する ARNI は PARAGON-TRIAL サブ解析で女性 HFpEF の再入院リスクを軽減する可能性が示唆されているが、女性 HFpEF と cGMP シグナルの病態的意義は未確立である。miRNA は様々なシグナルを反映する非侵襲バイオマーカーとして注目されているが、女性 HFpEF の病態・診断における miRNA-cGMP 軸の位置付けに関しても不明である。

【目的】

女性 HFpEF における循環 miRNA と cGMP シグナルの関連解明を行い、新規診断・治療法の創出を目指す。

【方法】

- 国内 6 施設で 60-90 歳の男女心不全患者 (HFpEF, HFrEF), 心血管リスクを有する対照群 (Control) を登録し、血漿 miRNA シークエンス (miRNAseq) を施行した。臨床データ・血中 BNP 濃度・血中 cGMP 濃度と統合解析を行い、機械学習を用いた診断モデルの構築、および Weighted Gene Coexpression Network Analysis (WGCNA) を用いた miRNA 共発現モジュールと入院回数および BNP, cGMP との関連を解析した。
- cGMP と関連した女性心不全モデル解析を行うため、エストロゲンシグナルに関連する遺伝子改変マウスを用い、心不全モデルの作成および解析を行った。

【結果】

- 60-90 歳の Control (男性 41 人, 女性 41 人), HFpEF (男性 39 人, 女性 37 人), HFrEF (男性 54 人, 女性 23 人) に対して miRNAseq が施行された。miRNA プロファイルは男女で明確に異なった。男性においては、Control と比較して HFpEF, HFrEF で異なる miRNA の発現パターンが確認されたが、女性

心不全では HFpEF, HFrEF のいずれも Control に対する個々の miRNA の変化は観察されなかった。一方で、機械学習を用いた HFpEF 診断における AUC を最適化する特徴量選択では、男女で異なる miRNA が抽出され、男女ともに miRNA を BNP, cGMP と組み合わせることで診断 AUC を向上させることが確認され、特に女性においてはその有効性が顕著であった (AUC 0.84[心不全パラメーターのみ] vs 0.901[心不全パラメーター + miRNA])。

また、WGCNA を用い入院回数とのモジュール解析を施行したところ、女性 HFpEF のみで入院回数と相関する module が確認された。同モジュールは男性 HFpEF においても保存されていたが、入院回数との相関は女性のみであり、さらに cGMP との相関関係は男女で逆方向を示した。モジュールハブ miRNA に関しても同様に女性 HFpEF のみで入院回数および cGMP と正の相関を示していた。オントロジー解析によりモジュール内 miRNA は血管新生や炎症、代謝関連シグナルと関連していることが確認された (論文投稿準備中)。

2. マウスモデルにおいて心拍変動と連動した拡張障害を捉える新たな解析手法を確立した¹⁾。さらに同手法を用い、内皮エストロゲン関連シグナルがメスマウスにおいて圧負荷心不全モデルに対する心保護作用を cGMP シグナルと関連して示すことを報告し²⁾、さらに同内皮エストロゲンシグナルが枯渇している状況では、カテコラミン刺激が慢性期に HFpEF 様病態へとつながることを確認した (論文投稿中)。

【考察】

閉経後女性 HFpEF ではエストロゲン非核シグナル低下に伴う NO-cGMP 経路の障害が微小血管障害と拡張不全を引き起こす可能性が示唆された。

また本研究は、miRNA と BNP, cGMP の併用が診断とリスク層別化を補完しうることを、並びに cGMP 関連治療の個別化適応へと繋がる可能性を示した。

【参考文献】

1. **Genri Numata**, Eiki Takimoto, Issei Komuro et al. A Pacing-Controlled Protocol for Frequency-Diastolic Relations Distinguishes Diastolic Dysfunction Specific to A Mouse HFpEF Model.

American journal of physiology. Heart and circulatory physiology 323(3) H523-H527 (2022)

2. *Nobuaki Fukuma., ***Genri Numata**, Eiki Takimoto et al. Endothelial oestrogen-myocardial cyclic guanosine monophosphate axis critically determines angiogenesis and cardiac performance during pressure overload. **Cardiovascular research**, 120(15), 1884–1897. (2024) (***Equally Contributed**)

オミクス解析を用いた遺伝子関連全身血管病の病態解明と新規創薬ターゲットの探索

平出 貴裕

(慶應義塾大学医学部 循環器内科)

【研究の背景と目的】

難病疾患に指定されている血管病には、肺動脈疾患や脳動脈疾患、大動脈疾患などがあり、本邦での推定患者数は併せて2万人を超える。しかし発症原因の多くは特定されておらず、根本的な治療法に乏しい。肺動脈性肺高血圧症 (PAH) は妊娠可能年齢の女性に好発する、生命予後不良の指定難病である。申請者の研究チームは特発性 PAH 患者検体の次世代シーケンサー解析を施行し、日本人 PAH 患者特有の発症原因遺伝子候補として Ring finger Protein 213 (RNF213) 遺伝子の多型変異 (R4810K) を同定した。RNF213 R4810K は従来の治療に反応性が乏しく予後不良であり、PAH の根本的治療法の開発が望まれる患者群であることを報告した (Hiraide T, et al. 2021)。RNF213 はもやもや病や末梢性肺動脈狭窄症など、複数の難治性血管病において関連があり、RNF213 関連血管病という新規疾患概念を提唱した。これら疾患を網羅的に解析することで、新規発症機序の解明や創薬が期待できる。

肺動脈性肺高血圧症 (pulmonary arterial hypertension: PAH) は妊娠可能年齢の女性に好発する、生命予後不良の指定難病であり、「告知番号 86」として指定されている。PAH 難病登録患者数は本邦では約 3700 名で、PAH 患者の背景疾患として結合組織病や先天性心疾患などがあるが、全体の約 3/4 は原因を特定できない「特発性

PAH] である。PAHは肺血管壁細胞が異常に増殖することで、肺血管の内腔が狭窄し、肺血管抵抗の上昇によって右室の圧負荷が増大し、右心不全を呈する疾患である。有効な治療法がなかった時代、診断からの平均余命は約2.8年と極めて予後不良な疾患であった。PAHは遺伝子型因子と環境因子が関わる多因子疾患であるが、PAH発症に至る分子機構の大半は不明であり、根本的な治療方法は確立していない。

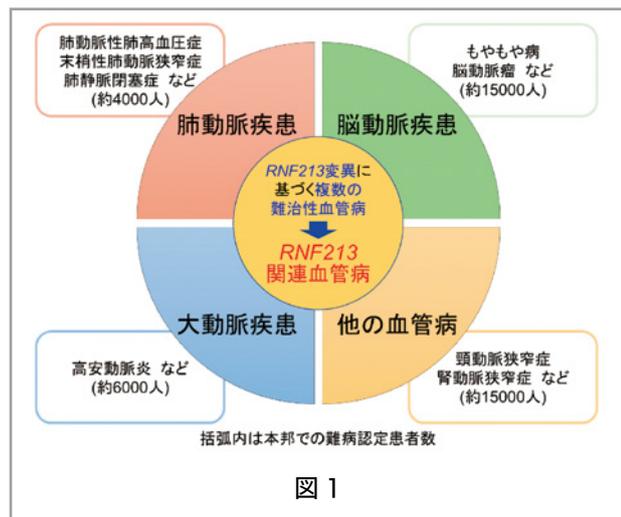


図 1

【実験方法と結果】

ヒトでの *RNF213* R4810K 病的バリエントは現行の肺血管拡張薬への治療抵抗性がある予後不良因子であり、また複数の血管病に関連していることから、疾患発症に関連する分子メカニズムの解明が求められる。申請者の研究チームはCRISPR-Cas9システムを用いて、*Rnf213* R4810Kバリエントのノックインマウスの作製に成功した。野生型および *Rnf213* R4810Kヘテロマウスを常酸素下、および10%低酸素下で3ヶ月間飼育したところ、常酸素環境下(Nx)ではPAHの発症は両群とも認めなかったが、低酸素環境下で飼育した *Rnf213* R4810Kヘテロマウス(hetero+Hx)は野生型(wild+Hx)と比較して、有意な右室収縮期圧の上昇、および肺血管中膜肥厚を認めた。右室および肺動脈のリモデリングが確認され、低酸素負荷によりPAHが惹起された(図2)。実臨床でも *Rnf213* R4810Kは発症感受性遺伝子として報告されており、*Rnf213*バリエントという内的要因に、低酸素負荷(外的要因)が加わるsecond hitによりPAHが発症したと考えられた。マウス肺組織からRNAを抽出し、マイクロアレイ解析を施行したところ、低酸素負荷を

行った *Rnf213* R4810Kヘテロマウスは、低酸素負荷をした野生型マウスと比較して、*Cxcl12*や*Cdk19*など細胞増殖シグナルを促進する因子の上昇を認めた(図3)。

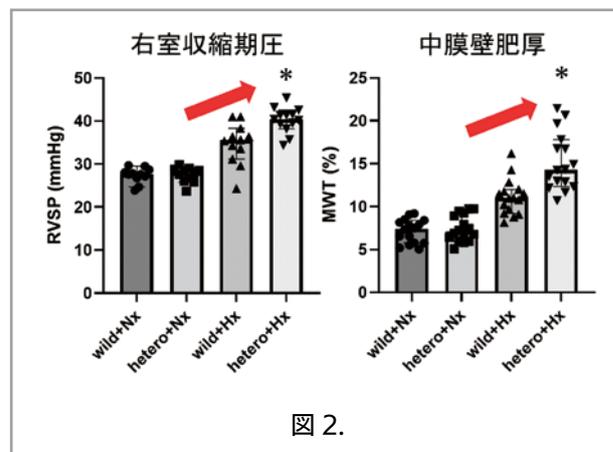


図 2.

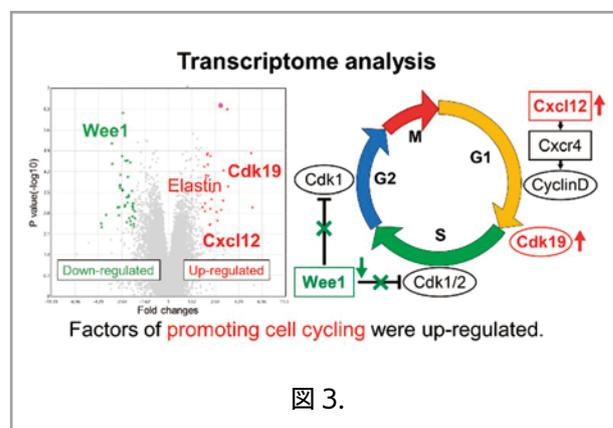


図 3.

既報で癌細胞の増殖との関連性が報告されている *Cxcl12*に着目し、受容体である *Cxcr4*の阻害薬(AMD3100)を追加で腹腔内投与すると、低酸素負荷をしたヘテロマウスでのPAHが軽症になることを確認した。*Cxcl12*-*Cxcr4*シグナルが *Rnf213* R4810KマウスのPAH発症に関連していることが示唆された(図4)。

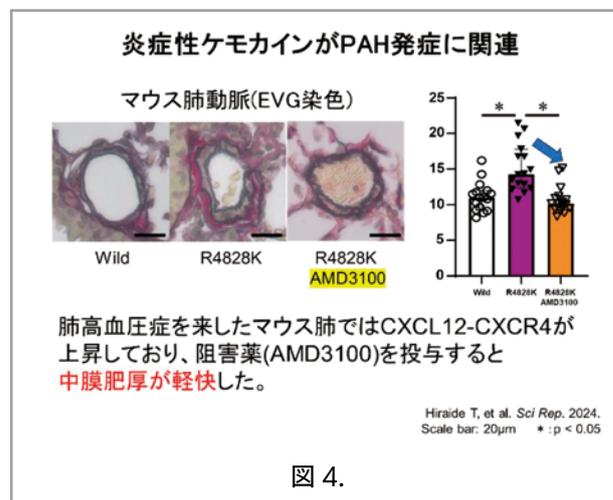


図 4.

CXCR4は肺血管外膜および間質内に存在するvimentin陽性細胞に高発現しており、active fibroblastが肺高血圧症発症に関連している可能性が示唆された。CXCR4の発現はマウスのみならず、*RNF213* R4810K陽性の重症PAH患者の剖検肺でも認めた(図5)。今後は*RNF213*がCXCL12-CXCR4シグナルに関連する詳細なメカニズムを解明していく。Cxcl12-Cxcr4シグナルが新規根治療法のターゲットになる可能性があり、実臨床への応用に向けて検証を進めていく。

なお上記成果は、*Scientific Reports*にacceptされた¹⁾。

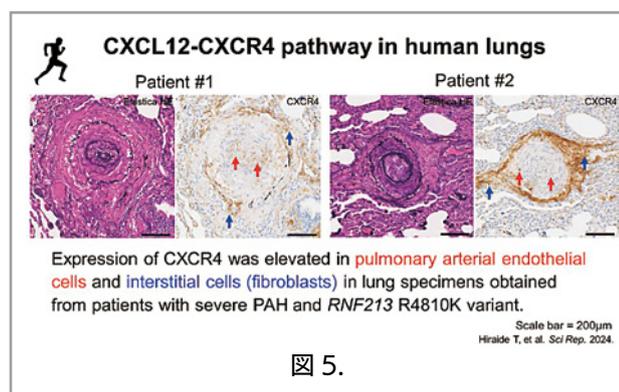


図5.

【文献】

1) [Hiraide T, Tsuda N, Momoi M, et al. CXCL12/CXCR4 pathway as a novel therapeutic target for RNF213-associated pulmonary arterial hypertension. *Sci Rep.* 2024;14:26604.](#)

心不全における生体膜リン脂質リモデリング機構の解明

武城 怜史

(ケンブリッジ大学)

【目的】

リン脂質リモデリング(リン脂質を構成する脂肪酸組成の変化)は生体膜の機能調節や恒常性維持に働き、細胞内のシグナル伝達やエネルギー代謝に影響を与えることが知られている。本研究は、心臓における生体膜の主要なリン脂質であるホスファチジルコリン(PC)とホスファチジルエタノールアミン(PE)のリモデリングに寄与するリゾリン脂質アシル基転移酵素(LPLAT)7に着目し、心不全への影響を検討した。

【昨年度までの経過】

遺伝子発現情報データベース(Gene Expression Omnibus)より、LPLAT7遺伝子発現が心不全、そして心筋細胞で低下していることを見出した。さらに、心筋細胞特異的*Lplatt7*コンディショナルノックアウト(cKO)マウス($\alpha MHC-Cre^{+/-}; Lplatt7^{flox/flox}$)の心収縮機能が低下すること、その原因として、心臓のRNA-seq解析よりPKA-カルシウムシグナル伝達経路の関与が疑われた。

【方法】

- ① *Lplatt7*-cKOマウスとsi*Lplatt7*を導入した新生仔ラット心筋細胞を用いて、PKA依存的なカルシウムハンドリング関連タンパク質のリン酸化を検証した。
- ② si*Lplatt7*を導入したヒトiPS細胞由来心筋細胞を用いて、心収縮機能の指標であるカルシウムトランジェントを評価した。
- ③ PKA阻害剤であるH89を、*Lplatt7*-cKOマウスおよびsi*LPLAT7*を導入したヒトiPS細胞由来心筋細胞に投与し、心臓超音波による心機能やカルシウムトランジェントを評価した。

【結果】

- ①心筋細胞*Lplatt7*欠損は心筋PKAを活性化する
マウス心臓とラット心筋細胞の両者で、*Lplatt7*の抑制に伴い、PKAによって触媒されるタンパク質であるホスホランバンやリアノジン受容体のリン酸化が増加した。
- ②*LPLAT7*抑制は心筋細胞のカルシウム動態異常を誘発する
*LPLAT7*の発現抑制により、カルシウムトランジェントの振幅の低下、持続時間の延長、そして上昇および下降速度の低下などの異常を観察した。
- ③PKA阻害はin vivo/in vitroで共に心収縮機能を回復する
H89の投与により、*Lplatt7*-cKOマウスの心収縮機能の改善およびsi*Lplatt7*導入心筋細胞の異常カルシウムトランジェントの回復を認めた。

【考察】

心筋細胞のLPLAT7欠損が、PKA-カルシウムシグナル伝達経路の異常を介して、心収縮機能不全を引き起こすことを見出した。しかし、LPLAT7による生体

膜のリン脂質リモデリングがPKAを活性化する機序は未だ不明であり、今後の研究課題である。

**時空間的イメージングシステムを用いた肺動脈性肺
高血圧症の病態解明およびその治療応用**

藤原 隆行

(東京大学医学部附属病院循環器内科)

【目的】

肺動脈性肺高血圧症 (PAH) 基礎研究における課題である (1) 従来の病理組織学的評価では複雑な血管の形態描出が困難であること, (2) PAH 動物モデルの多くは人為的誘発モデルであること, (3) PAH では肺生検は禁忌であり, ヒト組織を用いた実証が難しいこと, を解決し, PAH 新規治療薬開発につながる研究を展開する。

【方法】

申請者が開発した三次元可視化システム¹⁾を用いて得られた, 低酸素負荷 PAH モデルにおける肺血管内皮細胞 PGC-1 α の代償的血管新生²⁾について効能検証を行うため, CRISPR-Cas9 を用いてヒト重症 PAH 家系における遺伝子変異 (*BMPR2*^{Y247X/+}) をマウスに導入し, より生理的な動物モデルとしての実証を進めたのちに, 肺内皮細胞 PGC-1 α の役割について検討する。またヒト PAH 患者の肺移植時における摘出肺の採取を行い, 遺伝子・タンパク発現や三次元解析における動物モデルとの共通点・差異について検討し, モデル動物における現象の検証を推し進めていく。

【結果】

BMPR2^{Y247X/+} マウスは通常大気下で血管中膜肥厚を呈するものの有意な右室圧上昇はきたさなかった。そのため PAH モデルの確立のため, *BMPR2*^{Y247X/+} マウスにおいて肺血管内皮細胞特異的に PGC-1 α を欠損させ (*BMPR2*^{Y247X/+}; *Alk1*-Cre; *Pgc1 α* ^{fl/fl}), 評価を行った。このマウスでは通常大気下で右室圧は有意に上昇し, PAH を発症したと考えられた。また血管中膜肥厚に加えて内膜の異常増殖, 特に PAH 病理所見のうち最重症である叢状病変の出現を認めた。また三次元可視化システムにより, 叢状病変の三次元可視化に成功した。

この新規 PAH モデルマウスの発症機序を探索すべく,

シングル核 RNA シーケンスを施行したところ, 炎症応答に関する遺伝子群の発現上昇を認め, 病態への関与が示唆された。特にその中の因子 X はヒト PAH 内皮細胞においても発現が上昇しており, 現在因子 X の PAH 肺内皮細胞での役割を解明すべく, ウイルス導入による発現制御を行っている。

またヒト PAH 患者の肺検体採取 (移植時) の施行について倫理審査を通過し, すでに 5 例の PAH 患者の肺検体の採取を行っている。これらの検体を用いて, 末期 PAH 患者の肺では PGC-1 α の発現が低下していることを確認している。

【考察】

BMPR2 単独の変異導入ではマウスにおいて PAH は発症しなかったが, 肺血管内皮細胞特異的 PGC-1 α 欠損により通常大気下で PAH を誘導することに成功した。これは PAH 発症メカニズムで提唱されているセカンドヒットセオリーに合致するものであり, また病理像もヒト重症 PAH 病変と類似しており, 生理的な PAH モデルの確立に成功したと言える。またシングル核 RNA シーケンスにより, 炎症細胞応答が病態に関与していることが示唆され, そのうちの因子 X はヒト PAH 肺内皮細胞において発現が増強することが知られているため, これについて機能解析を進めていく。さらにヒト肺検体を用いた病態の検証を行っていく。

【文献】

- 1) Fujiwara T, Takeda N, Hara H, Ishii S, Numata G, Tokiwa H, Maemura S, Suzuki T, Takiguchi H, Kubota Y, Seo K, Sakata A, Nomura S, Hatano M, Ueda K, Harada M, Toko H, Takimoto E, Akazawa H, Nishimura S, Komuro I. Three-Dimensional Visualization of Hypoxia-Induced Pulmonary Vascular Remodeling in Mice. *Circulation*, 144, 1452-1455 (2021)
- 2) Fujiwara T, Takeda N, Hara H, Ishii S, Numata G, Tokiwa H, Katoh M, Maemura S, Suzuki T, Takiguchi H, Kubota Y, Nomura S, Hatano M, Ueda K, Harada M, Toko H, Takimoto E, Akazawa H, Morita H, Nishimura S, Komuro I. PGC-1 α -mediated angiogenesis prevents pulmonary hypertension in mice. *JCI Insight*, 2023;8(17):e162632.

リンパ管新生による急性心筋炎治療の開発

丸山和晃

(三重大学修復再生病理学)

【目的】

急性心筋炎はウイルス感染や薬剤を契機に発症する自己免疫性疾患であり、病理組織像はリンパ球性、好酸球性、巨細胞性に分類される。重症例では心不全や致命的経過をとるが、好酸球性心筋炎に対するステロイド以外に確立した治療法は存在せず、自然軽快を待ちながら血行動態を維持することが中心である。近年、COVID-19 関連心筋炎や小児多系統炎症性症候群 (MIS-C/PMIS)、COVID-19 ワクチン関連心筋炎、さらには免疫チェックポイント阻害薬による心筋炎が注目され、社会的・臨床的な重要性が増している。

一方、心臓は人体で最もリンパ管密度が高い臓器の一つ¹⁾であり、リンパ管は浮腫液の排出や炎症細胞の回収に加え、免疫寛容の誘導を介して炎症収束に寄与する。近年の空間トランスクリプトーム解析により、ヒト心外膜にはリンパ管と免疫細胞が協調して恒常性を維持する「心外膜免疫ニッチ」²⁾が存在し、炎症時にはその構造と機能が大きく変化することが明らかとなった。このニッチは心筋炎の免疫応答を統御する重要な拠点であると考えられる。

本研究では、リンパ管内皮細胞特異的に作用する VEGFR3 選択的アゴニスト **VEGF-C C156S** を用い、急性心筋炎における心外膜免疫ニッチを標的としたリンパ管新生促進が炎症収束・心機能保持に寄与するかを検証した³⁾。

【方法】

まず、ヒト剖検心を対象として急性心筋炎症例と非心疾患対照例の心外膜領域を免疫染色により比較し、リンパ管ネットワークの変化を解析した。次に、マウスに α -ミオシン重鎖ペプチドを二回免疫することで自己免疫性心筋炎 (EAM) を誘導し、第2回免疫後に VEGF-C C156S を腹腔内投与して炎症極期に先行してリンパ管新生を刺激した。病理組織学的評価としては HE 染色および VEGFR3 免疫染色によりリンパ管の密度・分岐・径を解析し、Elastica-Sirius Red 染色により

線維化の程度を定量した。心機能は心エコーを用いて左室駆出率 (EF) や短縮率 (FS) を測定した。さらに、浮腫解析として心筋乾燥重量法による水分量測定および Evans blue dye clearance によるリンパ排液能評価を行った。分子レベルの解析では qPCR および RNA-seq を用いて炎症関連遺伝子や線維化関連遺伝子の発現を網羅的に検討した。

【結果】

ヒト剖検心解析により、急性心筋炎では心外膜リンパ管ネットワークが炎症極期に顕著に拡張することを初めて確認した。EAM モデルにおいて、VEGF-C 投与は心外膜リンパ管の新生を促進し、対照群と比べて炎症細胞浸潤を顕著に抑制した。特に **iNOS 陽性炎症性マクロファージが選択的に減少**し、修復性マクロファージや T 細胞は保持されていた。線維化領域は縮小し、心筋浮腫量も減少した。心エコーでは EF・FS の保持が確認され、心機能低下が防がれた。RNA-seq では炎症性サイトカイン遺伝子群 (Il1b, Il6, Tnf 等) や細胞外マトリクス産生遺伝子群の発現が抑制され、免疫環境が修復優位にシフトしていた。

【考察】

本研究は、心外膜免疫ニッチが急性心筋炎における免疫制御拠点であることを実証し、VEGF-C によるリンパ管新生刺激がそのニッチを再編成することで炎症収束と心機能保持に寄与することを示した。リンパ管は単なる浮腫排出経路ではなく、炎症性マクロファージを選択的に制御する免疫学的機能を担っており、VEGF-C はこの機能を活性化する新規治療戦略である。従来の免疫抑制療法に代わり、心筋炎の病態に根ざした分子標的治療としての可能性を提示した点に独自性がある。今後は企業との共同研究を通じ、臨床応用と特許化を見据えた開発を進める予定である。

【謝辞】

本研究は公益財団法人日本応用酵素協会 Cardiovascular Innovative Conference (CVIC) 研究助成の支援を受け遂行された。多年にわたるサポートに深く感謝申し上げます。

本研究はリバイス中であまもなく論文化予定である³⁾。

【参考資料】

1. Maruyama K, Miyagawa-Tomita S, Mizukami K,

- Matsuzaki F, Kurihara H. Isl1-expressing non-venous cell lineage contributes to cardiac lymphatic vessel development. *Dev Biol* 2019;452(2):134–43.
2. Kanemaru K, Cranley J, Muraro D, et al. Spatially resolved multiomics of human cardiac niches. *Nature* 2023;619(7971):801–10.
3. Nakanishi N, Nakamori S, Hara S, et al. VEGF-C-mediated Cardiac Lymphangiogenesis Promotes Inflammation Resolution in Autoimmune Acute Myocarditis in Mice. *bioRxiv* 2025;2025.05.25.656051.

遺伝性大動脈瘤・解離症の病態生理の探索と創薬に向けたトランスレーショナルリサーチ

八木 宏 樹

(東京大学医学部附属病院 循環器内科)

マルファン症候群 (MFS) は細胞外基質であるフィブリリン1をコードする *FBNI* の病的変異によって大動脈瘤などを発症する常染色体顕性様式の遺伝性結合組織疾患 (HCTDs) (指定難病 167) である。大部分の MFS 患者では、幼少期より大動脈基部が拡大傾向となるが、多くの症例において身長伸びる青年期で拡大速度が増加し、成人以降で緩徐となるため、未成年期の動脈基部拡大とそれに伴う大動脈瘤への進展の予防が非常に重要である。これまでの海外のランダム比較試験などから、アンジオテンシン II (Ang II) 1型受容体 (AT₁) 阻害剤 (ARB) (ロサルタン, イルベサルタンなど) と β 遮断薬の大動脈基部拡大の抑止効果が報告されてきた。しかし実臨床において、これらの薬剤は降圧剤としての側面を持つため、MFS 患者によってはふらつきや眩暈といった副作用により忍容性がなく、適切な量を投与できないこともあり、予防的な大動脈置換術に至る症例もしばしば経験する。

MFS モデルマウスや MFS のヒト大動脈組織において、TGF- β シグナルの過剰な活性化の重要性が、最近の基礎研究によって示唆されたが、*FBNI* 変異を原因とする本症の病態発症・進展機序を一元的に説明できていない。また血管平滑筋細胞 (vSMCs) が大動脈瘤の

主要な舞台として考えられてきたが、近年は大動脈の様々な構成細胞も *FBNI* 変異によって影響を受けていることが示唆されつつある。我々は、MFS における大動脈瘤形成の分子機序の解明と創薬を実現する上での核心的な問いは、*FBNI* 変異に伴う大動脈の個々構成細胞 (血管内皮細胞 (vECs), vSMCs, 炎症細胞, 血管周囲脂肪組織 (PVAT) 等) とフィブリリン1を含む細胞外基質の時空間的な制御機構や相互連関を解明する必要がある点だと考え、これまで MFS の大動脈瘤形成の新たな分子機序の解明と革新的治療薬の開発に向けた橋渡し研究を行ってきた。

まず我々は、MFS 患者と *Fbn1*^{C1041G/+} (MFS モデル) マウスの大動脈組織を用いて、活性酸素種 (ROS) が血管全層で亢進し、vECs において ROS の産生起源であるキサンチンデヒドロゲナーゼ (*Xdh*) の遺伝子発現、キサンチンオキシドレダクターゼ (*XOR*) の蛋白発現と活性が有意に亢進していることを見出した。血管内皮特異的 *Xdh* ノックアウト *Fbn1*^{C1041G/+} マウスを作成し、或いは *Fbn1*^{C1041G/+} マウスに *XOR* 阻害剤 (フェブキソスタット) を投与すると、共に大動脈径の拡大が有意に抑制された。MFS 患者と *Fbn1*^{C1041G/+} マウスの大動脈でメカニカルストレス転写因子の *Egr-1* が有意に上昇していたことから、*FBNI* 変異に伴う vECs のメカニカルストレス応答異常が *XOR* 活性を上昇させていると想定した。*Fbn1*^{C1041G/+} マウスの大動脈に横行大動脈縮窄術で圧負荷をかけ、或いはヒト大動脈内皮細胞に伸展刺激をしたところ、メカニカルストレス応答シグナルの FAK, p38-MAPK リン酸化とともに *Egr-1*, *XOR* の発現が有意に亢進した。vECs に存在するメカニカルストレス異常応答のエフェクター分子である *XOR* から生じる ROS が MFS の大動脈瘤形成に重要であることを明らかにし、MFS 患者に対するフェブキソスタットの Proof of concept 試験の準備を進めている (図 1.) (*ATVB*. 2025;45(3):e63-e77. doi: 10.1161/ATVBAHA.124.321527).

今日までに我々は、AT₁ 受容体がメカニカルストレスにより恒常的に活性化し、心血管疾患の病態形成に関わることを明らかにし、心血管疾患に対するインバースアゴニスト活性を有する ARB の有効性について報告してきた。現在、臨床現場で MFS の大動脈瘤に対して

最も使用されるロサルタンは、インバースアゴニスト活性が弱いARBである。MFS患者と *Fbn1*^{C1041G/+} マウスの大動脈において、メカニカルストレス応答性転写因子の Egr-1 や細胞内シグナル伝達系である ERK1/2 のリン酸化が有亢進していたことから、*FBN1* 変異に伴う組織脆弱性から生じるメカニカルストレスが AT₁ 受容体を恒常的に活性化させていると仮説をたて、インバースアゴニスト活性に優れたARBがより瘤形成の抑制には有効なのではないかと考えた。Ang II による AT₁ 受容体の活性化と、Ang II に依存しないメカニカルストレスによる AT₁ 受容体の活性化のどちらが MFS の大動脈瘤の病態形成に重要かを検討するために、*Fbn1*^{C1041G/+} マウスにインバースアゴニスト活性を有するカンデサルタンとインバースアゴニスト活性が低くアンタゴニスト作用のみを有するカンデサルタン誘導体(カンデサルタン 7H)を投与し検証した。その結果、カンデサルタン投与群では、カンデサルタン 7H 投与群と比較し、大動脈径の拡大が有意に抑制され、中膜のエラスチンの断裂が著明に改善し、Egr-1 や ERK1/2, FAK, p38-MAPK のリン酸化が抑制された。一方で、両群間で血圧や心機能に有意差は認めなかった。これらの結果は、*FBN1* 変異に伴う過剰なメカニカルストレスによる AT₁ 受容体の恒常的な活性化が、MFS の大動脈瘤形成の重要な促進因子であり、インバースアゴニスト活性を有するARBがMFSの大動脈瘤の進展抑制の新たな治療戦略となる可能性を示唆している(図1.) (ATVB in revision).

またPVATを含む脂肪組織が様々なサイトカイン分泌を介して生体恒常性維持に関わることが明らかになり、血管疾患におけるPVATの役割に注目が集まっているが、MFSの大動脈瘤形成におけるPVATの関与は不明であった。そこでMFS患者と *Fbn1*^{C1041G/+} マウスの大動脈組織を用いて、PVATの炎症がMFSの大動脈瘤の進展にもたらす影響について検証した。まずMFS患者および *Fbn1*^{C1041G/+} マウスの両方で大動脈PVATに顕著な炎症細胞浸潤を見出した。続いて、高脂肪食(HFD)を用いて *Fbn1*^{C1041G/+} マウスのPVATの代謝ストレスを亢進させ、血管周囲の炎症と大動脈瘤形成に与える影響を評価したところ、*Fbn1*^{C1041G/+} マウスではHFD負荷によりPVATの炎症の増悪と共に大動脈瘤形

成の進展を認め、中膜における弾性線維の断裂、線維化、プロテオグリカンの貯留、TGF-βシグナルの活性化が生じていた。これらの所見は、脂肪組織に対して抗炎症作用を呈する低用量ピタバスタチン(0.3mg/kg/day)によって血中脂質パラメーターを変化させることなく、PVATの炎症が減弱し、前述の中膜の変性と大動脈瘤の進展が抑制された。さらに患者CT画像から大動脈PVATの炎症を非侵襲的に捉える新たな手法(fat attenuation index; FAI)を構築し、それを人工知能(artificial intelligence; AI)を用いて自動測定する技術(AI-FAI)を樹立した。AI-FAIによる解析でMFSは非HCTDs患者に比べ著しいPVAT炎症を示すことが明らかとなった。これらの結果は、PVATの炎症はMFSの大動脈瘤進展の重要な要因であり、血管周囲の炎症を標的とした治療によってMFSの大動脈瘤形成を抑制できる可能性が示唆された(図1.) (JCI insight accepted).

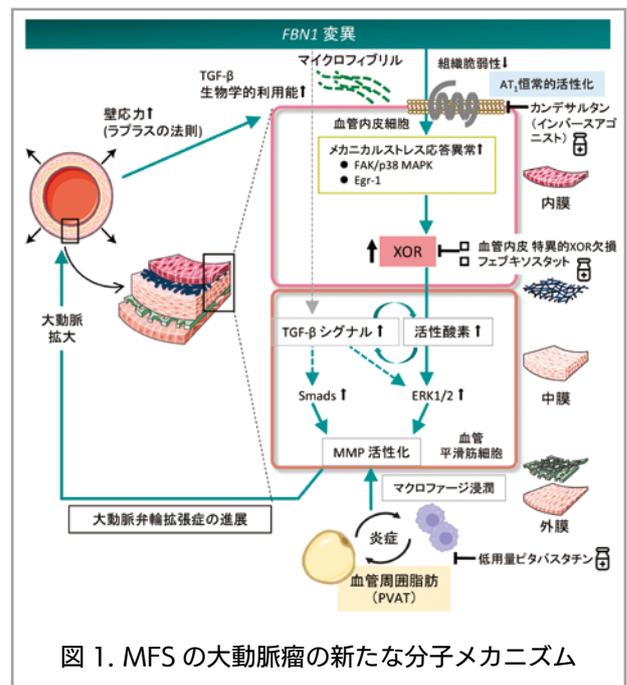


図 1. MFS の大動脈瘤の新たな分子メカニズム

【謝辞】

長い間、CVIC に関する研究助成で、我々の研究を支援いただき、誠にありがとうございました。上記のように、遺伝性大動脈瘤・解離症の新たな病態生理の一端を解明することができました。関係各所の方々、諸先生方に御礼申し上げます。今後も上記成果に基づいた橋渡し研究を行ってまいります。今後とも何卒よろしくお願い致します。

シングルセルマルチオーム解析を用いた特異性拡張型心筋症における病態経路の探索

山田 臣太郎

(セントルイス・ワシントン大学)

【目的】

難治性拡張型心筋症に対する病態理解は不十分であり、既存の治療のみでは、心移植が必要となる症例が少なくない。本研究ではその病態経路の探索を目的とした。

【方法】

まず、当院で左室補助人工心臓 (LVAD) 植え込み術を施行した 38 例の心不全患者 (拡張型心筋症 23 例, 拡張相肥大型心筋症 5 例, 心筋炎 3 例, アドリアマイシン心筋症 2 例, サルコイドーシス心筋症 4 例, 周産期心筋症 1 例) を対象として, LVAD 植え込み術時の左心室検体の single-nucleus RNA-seq (snRNA-seq) 解析を行った。コントロール群は心疾患歴がなく, 他疾患で死亡した患者の剖検検体 6 例とした。次に上記のうち, 拡張型心筋症 7 例, コントロール群 4 例に対して, 同一細胞における snRNA-seq および single-cell ATAC-seq (scATAC-seq) (マルチオーム解析) を行った。さらに, 上記の結果, 心不全心筋に特徴的な転写因子 X を抽出し, AAV9-shX ベクターを用いた転写因子 X ノックダウンモデルマウスを用いて, 機能解析を行った。Sham 群, Trans aortic constriction (TAC) 後 4 週間群 (TAC4W 群), AAV9-shX 投与 + TAC 後 4 週間群 (KD+TAC4W 群) における, 心臓超音波検査での心機能評価および

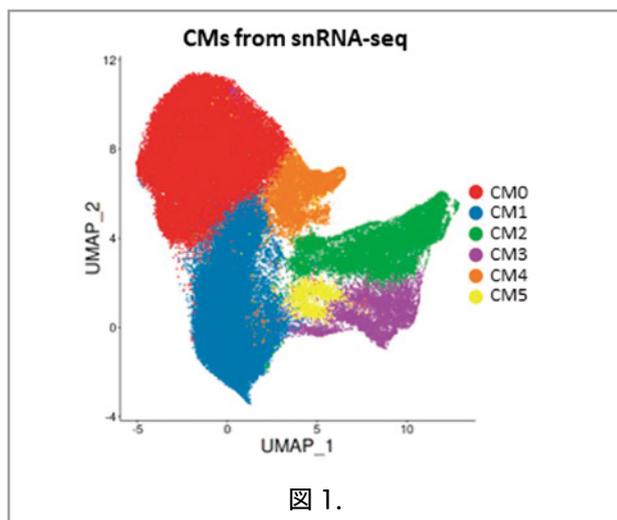


図 1.

single-cardiomyocyte RNA-seq (scRNA-seq) による心筋細胞での遺伝子発現変化の比較を行った。

【結果】

snRNA-seq 解析において, 心筋細胞のクラスタリング解析を行い, 心不全群において特徴的な心筋細胞クラスターを特定した (図 1, 図 2 における CM0)。この不全心筋クラスターでは *FGF1*, *FGFR1*, *PIK3R1*, *BDNF* などの PI3K-Akt 経路に関わる遺伝子発現の上昇, および *MEF2A*, *MEF2C*, *MEIS1*, *GATA4* など心臓発達に関わる遺伝子の発現上昇を認めた。次にこれら不全心筋に特徴的な遺伝子発現を制御する転写因子の探索のため, マルチオーム解析を行った。マルチオーム解析における遺伝子発現解析においても, 前述の snRNA-seq と同様の不全心筋クラスターの出現を認めため, 同クラスターに特徴的な遺伝子発現の制御因子を探索した。その結果, *ZBTB20*, *MITF*, *ATF3*, そして転写因子 X が不全心筋クラスター遺伝子を制御していることが推測された (図 3)。これら 4 つの転写因子の中で転写因子 X は, マルチオーム解析のみならず, snRNA-seq 解析においても, 病因によらず心不全群で有意に発現が上昇しており, 転写因子 X の機能解

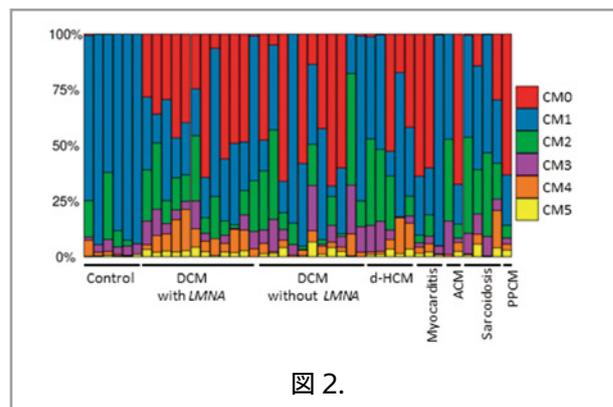


図 2.

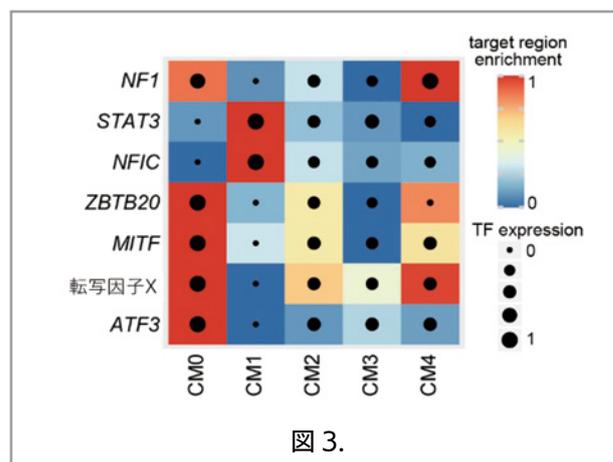


図 3.

析を行った。心臓超音波検査の結果、KD+TAC4W 群では TAC4W 群と比較して、有意に心機能低下が抑制された。scRNA-seq の結果、TAC4W 群では Nppa や Nppb の発現が高い高度不全心筋クラスターが出現したが、KD+TAC4W 群ではその高度不全心筋クラスターは少なく、代わりに Nppa や Nppb の発現が相対的に低い軽度不全心筋クラスターの割合が増加した。この軽度不全心筋クラスターでは pathway Y に関連する遺伝子発現の増加を認めた。

【考察】

snRNA-seq 解析により、病因によらず心不全群において特徴的な不全心筋クラスターを同定した。さらにマルチオーム解析により、その不全心筋クラスターを特徴づける遺伝子群の発現は転写因子 X により、制御されていると考えられた。また、X のノックダウンマウスでは、TAC 後の心機能低下が抑制され、その心筋細胞 RNA-seq の結果では pathway Y に関連する遺伝子発現の増加を認めた。これらのことより、不全心筋クラスターでは転写因子 X の発現が増加することにより、pathway Y の機能が抑制され、心機能低下が促進すると考えられた。今後は転写因子 X の ChIP-seq などを行い、pathway Y を制御する機構を解明する方針である。

分岐鎖ケト酸とその代謝酵素に着目した肥満症に対する新規治療薬の開発

吉田 尚史

(国立循環器病研究センター 先端医療技術開発部)

昨年までの研究により、分岐鎖アミノ酸の代謝物である分岐鎖ケト酸が、肥満症患者の血液で増加している事が明らかとなった。加えて動物実験により、褐色脂肪組織における分岐鎖アミノ酸/ケト酸代謝の低下が肥満の強い誘導因子である事を明らかとした。そこで同代謝を促進する化合物のハイスループットスクリーニングにより、肥満を治療する薬剤の同定を試みている。

一方、分岐鎖ケト酸のトランスポーターに着目した新しい肥満制御法の開発も試みている。分岐鎖ケト酸はミトコンドリアで代謝され、その代謝経路について

は解明されているが、分岐鎖ケト酸のミトコンドリアトランスポーターについては未解明である。このトランスポーターを同定できれば、ミトコンドリア内への分岐鎖ケト酸の流入を制御できるため、画期的な肥満制御法の開発に繋がる可能性があり、現在研究を進めている。

さらに、肥満領域以外における分岐鎖ケト酸の生体作用を解明することを目的とした介入研究も行っており、本年度はこの臨床研究の成果について報告する。

【目的】

開心術後の患者への分岐鎖ケト酸代謝物の投与は、術後の身体機能と合併症に影響をあたえるかを明らかとする事。

【方法】

開心術術前の患者 44 名を HMB 群と対照群に無作為に割り付けた。HMB 群では、術前 1 か月間に分岐鎖ケト酸代謝物である HMB (β -hydroxy- β -methylbutyric acid) 1.2g に加え、L-グルタミン 7g および L-アルギニン 7g を毎日経口摂取した。対照群には特別な介入は行わなかった。主要評価項目は手術前後の 6 分間歩行距離とし、副次評価項目として周術期合併症の発生率、四肢骨格筋量・筋力、および身体機能を設定した。

【結果】

患者の平均年齢は 72.5 歳であった。HMB 群は対照群と比較して、術後の 6 分間歩行距離低下が有意に抑制されていた(群間差 [95% CI]: 95.7m [67.7 to 123.7])。また筋力や身体機能においても HMB 群で有意な低下抑制効果が見られたが ($p < 0.05$)、筋量については有意差がみられなかった ($p=0.82$)。周術期合併症の発生率も両群間で有意な差はなかった ($p=0.29$)。

【考察】

分岐鎖ケト酸代謝物の HMB はタンパク分解を抑制することが知られており、HMB の作用が、周術期の運動耐容能および身体機能低下に対して効果的であった可能性がある。今後も分岐鎖ケト酸とその代謝物の生理作用を解明したい。

【文献】

1. Ogawa M, Satomi-Kobayashi S, Yoshida N, Komaki K, Hirabayashi T, Wakida K, Saitoh S,

Inoue T, Yamashita T, Sakai Y, Takahashi M, Okada K, Hirata KI. Effects of preoperative beta-hydroxy-beta-methylbutyrate, arginine, and glutamine supplementation on cardiac surgery: A randomized controlled trial. *Clin Nutr*. 45; 91-100: 2024.

マクロファージの系譜記憶が制御する多様な形質獲得機構の解明

劉 孟 佳

(熊本大学 国際先端医学研究機構)

【目的】

我々は、これまでに心臓組織マクロファージの一部が、心臓そのものに由来することとその分子メカニズムを明らかにしてきた。胎生期の心内膜床部分の心内膜細胞が、転写因子 Nkx2-5 の制御下で内皮造血転換を経て造血前駆細胞となり、その多くが組織マクロファージへと分化して心内膜床のリモデリングに寄与する¹⁾。出生後も、この心内膜由来マクロファージが心臓に5～40%の割合で持続的に存在することがわかっている²⁾。心臓組織マクロファージはこの心内膜由来の他に、卵黄囊EMP(ErythroMyeloid Progenitor)、胎児肝単球、および骨髄単球由来の複数の系譜によって構成される。本研究では、これらのマクロファージの系譜に基づく局在パターンや特異的機能の解明を目指す。

【方法】

Nkx2-5 レポーターマウスを用いた系譜追跡により、心内膜由来マクロファージの局在を解析した。また、公開されているシングルセル RNA シーケンス (scRNA-seq; Tabula Muris) データ解析を用い、心内膜由来マクロファージと心臓構成細胞間の相互作用機構を予測した。さらに、心内膜由来マクロファージの役割を明らかにするため、Nkx2-5 系譜マクロファージ欠損マウスの心臓における表現型を解析した。

【結果】

心内膜由来マクロファージは、心臓弁の内側および冠血管周囲に局在することがわかった。scRNA-seq

データと NicheNet 解析により、これらのマクロファージは心内膜細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞などと相互作用する分泌シグナル特性を有する亜集団と予測された。さらに、では、冠血管周囲領域における線維化の亢進傾向が認められた。

【考察】

心内膜由来マクロファージは、新生仔期に心臓弁間質リモデリングに重要であることは報告済みである^{1,2)}。本研究により、成体心臓でも心臓弁や冠血管周囲に局在し、間質環境の制御に関わる可能性が示された。現在、心内膜由来マクロファージの線維化抑制効果を検証するため、Nkx2-5 系譜マクロファージ欠損マウスに対して大動脈弓縮窄術を施した解析を進行中である。

本研究は、マクロファージの機能が局所環境だけでなく、その発生系譜に依存する特異的役割を持つことを明らかにし、「系譜記憶」に基づく形質獲得の新しい概念を提示するものである。

【文献】

1. Liu, N. *et al.* Notch and retinoic acid signals regulate macrophage formation from endocardium downstream of Nkx2-5. *Nat Commun* **14**, 5398 (2023).
2. Shigeta, A. *et al.* Endocardially Derived Macrophages Are Essential for Valvular Remodeling. *Dev Cell* **48**, 617-630.e3 (2019).

Front Runner of Future Diabetes Research に関する研究助成 (FFDR)

高脂肪食負荷に対する全身代謝応答における骨格筋でのリジン脱メチル化酵素 LSD1 の役割

荒木 裕 貴

(熊本大学大学院生命科学研究部代謝内科学講座)
(熊本大学発生病学研究所 細胞医学分野)

【目的】

栄養は骨格筋の筋線維組成や代謝表現型に影響を及ぼす環境刺激の一つだが、その応答を制御するエピジェネティックな機構は十分に解明されていない。そこで、骨格筋において環境ストレス応答を緩和し過剰な環境適応を防ぐ役割が報告された LSD1 の、高脂肪食 (HFD) 負荷時の骨格筋環境応答における役割を明らかにする。また、LSD1 の補酵素である FAD 合成の元となるリボフラビン (Rf) の投与が HFD 負荷時の骨格筋表現型に影響するか評価し、LSD1 を標的とした代謝疾患等の治療の可能性に関して検討する。

【方法】

7 週齢の野生型マウス及び骨格筋特異的 LSD1 KO マウス (LSD1-mKO マウス) に通常食及び HFD を 17 週間負荷し、糖負荷試験 (GTT) や代謝ケージ飼育での全身代謝評価、体重・筋重量変化の評価、採取した骨格筋の RNA-seq、組織染色などを行なった。

また、食餌負荷後の 10 - 17 週に飲水中に Rf を加え、同様の評価を行なった。

【結果】

HFD を与えた野生型マウスでは通常食を与えたマウスと比較し、LSD1 発現が腓腹筋や前脛骨筋では上昇、ヒラメ筋で低下した。また、HFD を負荷した mKO マウスは野生型と比較し、空腹時血糖値や GTT の AUC の有意な低下を認めた。さらに、前脛骨筋の RNA-seq の結果、mKO マウスで TNF α シグナリングや IF γ 応答など炎症に関連する遺伝子の発現上昇、好気代謝遺伝子の発現低下を認めた。

Rf を与えた野生型 HFD 群では、Rf 非投与群と比べ

体重の有意な減少、前脛骨筋、腓腹筋重量の増加、さらに空腹時血糖値の有意な低下及び GTT での血糖上昇の抑制傾向を認めた。さらに、代謝ケージではエネルギー消費量の増加傾向を示し、RNA-seq では TNF α シグナリングに関連する遺伝子の発現低下を認めた。一方で、これらの Rf 投与による変化は mKO マウスでは認められなかった。

【考察】

骨格筋の LSD1 欠損により全身代謝が悪化し、好気代謝遺伝子や炎症関連遺伝子の発現変化が認められたことから、HFD に対する骨格筋での代謝応答の制御に LSD1 が関わる可能性が示唆された。

また、HFD 負荷時の Rf 投与による骨格筋重量変化、体重減少及び糖代謝の改善が LSD1-mKO マウスでは認められないことから、Rf が骨格筋の LSD1 を介して代謝表現型を改善する可能性が示唆された。

しかし、mKO マウスで低下した遺伝子と、野生型で Rf 投与により上昇した遺伝子の重複はほとんどなく、LSD1 欠損時と Rf による LSD1 活性化時では制御する遺伝子が異なる可能性が示唆された。

膵 β 細胞における MEK/ERK シグナルの役割の解明とその治療応用

生島 芳子

(東北大学 SiRIUS (医学イノベーション研究所) 医学創生研究部)

【概要】

2021 年度より、骨髄脂肪に焦点を当てた研究を展開してきた。カロリー制限 (Caloric restriction: CR) 下で認められる血中 adiponectin の濃度上昇に骨髄脂肪から分泌される adiponectin の増加が寄与していることから、主に adiponectin の CR 下での役割の検討を行ってきた。

【結果と考察】

これまでに行なった Adiponectin 全身欠損マウス (KO) と野生型マウス (WT) の肝臓での RNA-seq では、通常食下と異なり、CR 下の KO の肝臓ではアミノ酸異化に関連する遺伝子群の発現が亢進していた。このため、CR 下では adiponectin がアミノ酸が分解されてエネルギー源として利用されることを防ぐ機能を持つのではないかと考えたが、WT と KO 間で腓腹筋重量および筋繊維の太さに差を認めなかった。また、血漿および肝臓中アミノ酸量を測定したが、CR 下において、総じて adiponectin KO による差異はほとんど認められず、CR 下における KO マウスの肝臓でのアミノ酸異化関連遺伝子群の発現亢進の生理学的な意味については今後更なる検討を要する。また、雌雄両性での脂質負荷試験により、雌の KO では、雄と異なり、通常食下でも CR 下でも TG クリアランス障害が認められないという性差を見出した。以上により、adiponectin の機能は食餌条件・性別によって大きく異なることを明らかにした。

【文献】

1. **Ikushima YM^{*#}**, Chen KC*, Sulston RJ, Mattiucci D, Brain EJ, Fung SA, Suchacki KJ, Thomas BJ, Lovdel A, Bennett M, Kobayashi H, Whitfield PD, Takubo K, Baker AH, Morton NM, Semple RK, Cawthorn WP[#]. Adiponectin exerts sex-dependent effects on lipid, amino acid, and glucose metabolism during caloric restriction. *bioRxiv*. 2025 doi: <https://doi.org/10.1101/2025.01.20.633882>.

*These authors contributed equally. #They are joint corresponding authors.

高血糖下の膵島で増加するアルドラーゼ B を介した膵β細胞障害機構の解明

井上 亮太

(群馬大学 生体調節研究所 代謝疾患医科学分野 助教)

【目的・背景】

慢性の高血糖は膵β細胞からのインスリン分泌を障害するが(糖毒性)、その分子機構は不明な点が多い。

我々は、2型糖尿病患者の膵島で増加するミトコンドリアタンパク質の UCP2 に着目し、膵β細胞特異的 UCP2 過剰発現マウス (β UCP2Tg) がインスリン分泌障害を伴う高血糖を呈することを報告した (Inoue R, et al., *iScience* 2022). β UCP2Tg マウスの膵島では解糖系酵素のアルドラーゼ B (AldoB) の遺伝子発現が約 70 倍に最も増加し、AldoB のノックダウンは β UCP2Tg マウス膵島のインスリン分泌障害を回復させた。以上より、2型糖尿病では UCP2 により増加する AldoB が糖毒性による膵β細胞機能障害の一つの原因である可能性が示された。本研究では、(1) AldoB による膵β細胞機能障害の分子機構および、(2) AldoB の欠損が糖尿病下の膵β細胞機能を回復させるかを検討した。

【結果】

(1) AldoB による膵β細胞障害機構の検討

AldoB を過剰発現した MIN6-M9 膵β細胞株では、グルコース応答性インスリン分泌およびミトコンドリア膜電位が低下した。解糖系においては、アルドラーゼを介して生成される DHAP から糖化ストレスに関わるメチルグリオキサール (MG) が副産物として生じるが、AldoB を高発現する β UCP2Tg マウスの膵島では MG の含量が増加し、膵β細胞特異的 AldoB 欠損マウス (β AldobKO) の膵島では MG は減少した。

(2) 膵β細胞特異的アルドラーゼ B (AldoB) 欠損マウスの解析

β UCP2Tg マウスのインスリン分泌障害に AldoB が寄与するかを、 β AldobKO マウスにより検討した。 β AldobKO マウスの体重、血糖値および血清インスリン濃度は対照マウスと同等であった。 β UCP2Tg マウスに β AldobKO マウスを交配すると、 β UCP2Tg マウスのインスリン分泌障害が部分的に回復した。 β AldobKO の膵島ではミトコンドリア呼吸が促進され、Ins1, Ins2, Mafa, Pdx1 および Slc2a2 などの膵β細胞の機能に関わる遺伝子の発現が増加しており、 β UCP2Tg マウスのインスリン分泌の回復に寄与した可能性がある。また、 β AldobKO マウスの膵島では高グルコース誘導性の膵β細胞アポトーシスの増加が抑制されており、AldoB が膵β細胞の量の制御に関わる可能性が示された。

【考察】

マウス膵島において MG はインスリン分泌を低下させることが報告されているが、その分子機構は不明である。今後は、MG が膵β細胞の機能や量および AldoB の発現に与える影響や、糖尿病下の膵島における MG 分解酵素の発現量などを解析する。

ユビキチン様修飾因子 UFM1 の膵β細胞における病態生理学的意義の解析

鶴澤博嗣

(順天堂大学大学院 医学研究科 代謝内分泌内科学講座 助教)

【目的】

UFM1 による翻訳後修飾である UFMylation (UFM 化) は、小胞体 (ER) ストレス応答や選択的オートファジーの一つである ER-phagy および ER 膜上におけるリボソーム品質管理 (ER-RQC) との関連が注目されている。しかし、その病態生理学的意義は未解明な点が多い。膵β細胞はインスリン産生に伴う恒常的なストレスに曝されており、これらに対応するため ER ストレス応答やオートファジーといった細胞内恒常性維持機構が発達している。我々は、これらの機構の制御に UFM 化が関与することに注目し、UFM 化は膵β細胞の恒常性維持に重要な役割を果たすという仮説を提示した。本研究では膵β細胞において UFM 化が持つ病態生理学的意義を解明することを目的とする。

【方法】

UFM1-β KO マウスでは耐糖能が悪化する。その背景として UFM 化不全によって ER ストレス応答が障害され、小胞体の品質管理が毀損される結果、膵β細胞死の増加が生じる可能性が考えられた。本年は UFM1 欠損とこれらの表現型を繋ぐ因子を特定するため ER-phagy および ER-RQC の評価を行い、UFM1 欠損によって ER ストレス応答が障害される分子機構を解析した。

【結果】

ER-phagy : Halo-mGFP-KDEL を *gUfm1*-INS1E 細胞に導入して検討した。*gUfm1*-INS1E 細胞は対照群と比較して、飢餓刺激によって誘導される Halo 単量体は著しく減少し、形態学的には Halo 単独の dot

も減少した。

ER-RQC: 糖尿病モデルマウス (ob/ob, db/db) では、UFM 化 RPL26 は増加していた。一方で、ユビキチン化を受けた eS10, uS10 の発現量は WT マウスと同等であった。*gUfm1*-INS1E 細胞を用いた検討においても、ユビキチン化 eS10, uS10 の発現量は増加しなかった。

【考察】

UFM1 欠損では ER-phagy は抑制される一方で、ER-RQC の程度は変化しないという結果を得た。また糖尿病モデルマウスでは UFM 化 RPL26 が増加している一方で、ユビキチン化 eS10, uS10 は増加しないことが明らかになった。これらの結果から、膵β細胞における UFM1 欠損は、ER-phagy の抑制を介して ER ストレス応答を障害する可能性が高いと考えられた。

副腎由来ホルモンの多様性に基づいた糖尿病および慢性合併症進展機構の解明

馬越真希

(九州大学大学院医学研究院病態制御内科学分野)

主要な内分泌臓器である副腎は、内外のストレスに応答してホルモンを分泌し、生体の恒常性を維持している。副腎は3層構造を呈する皮質と髄質より構成され、皮質では層特異的にステロイドホルモン (ミネラルコルチコイド, グルココルチコイド, 副腎アンドロゲン) が産生され、髄質ではカテコールアミンが産生される。ホルモン過剰状態では、ストレス応答性が破綻し、糖尿病などの様々な加齢性疾患を引き起こす。我々はこれまで、LC/MS/MS 法を用いたステロイドミクス解析を開発し、副腎由来ホルモンの過剰状態をきたす副腎腫瘍患者および非機能性副腎腫瘍患者を対象として、副腎由来ステロイド代謝産物と代謝疾患との関連を検討してきた。その結果、コルチゾール産生副腎腫瘍患者では複数のステロイド代謝産物が協調して骨粗鬆症の発症・進展に影響すること¹⁾、さらに非機能性副腎腫瘍患者においても糖尿病の有無で血中ステロイドプロファイルが顕著に異なり、特に 11βヒドロキシテストステロンが糖尿病の発症・進展や膵β細胞機能の低下に関与し得ることを見出した²⁾。本年度は、副腎皮質に

おけるステロイドホルモン産生の複雑性をより詳細に理解するため、副腎皮質腫瘍を対象とした単一細胞レベルでのマルチオミクス解析を実施した。シングルセル RNA-seq (n = 8; 53,007 細胞), 空間トランスクリプトーム解析 (SRT), およびコルチゾールイメージングを統合的に実施し、腫瘍内で不均一に産生されるステロイドホルモンが骨粗鬆症の発症に関与することを単一細胞レベルで実証した³⁾。解析の結果、副腎皮質腫瘍内では、アルドステロン産生細胞、コルチゾール産生細胞、間質様細胞、ストレス応答性細胞が空間的に不均一に分布しており、特にコルチゾール産生領域では骨代謝関連遺伝子の発現変化が観察された。網羅的ステロイドミクス解析と統合することで、複数のステロイド中間代謝産物が協調して骨強度を制御することを明らかにした。この知見は、糖尿病患者においてしばしば合併する骨粗鬆症の分子基盤を理解する上で重要な意義を持つ。また、本研究で確立された統合オミクス解析手法は、糖尿病患者における副腎皮質の構造・機能変化の解析にも応用可能であり、血糖コントロール指標では捉えられない合併症リスク因子の同定に向けた新たなアプローチを提供する。従来の単一ホルモン過剰という概念を超えて、複数のステロイドホルモンが協調的に作用するという新たな病態概念は、糖尿病合併症の理解と治療標的の探索に貢献することが期待される。

【文献】

1. Nakao H[#], Yokomoto-Umakoshi M^{#,*}, Nakatani K[#], Umakoshi H, Ogata M, Fukumoto T, Kaneko H, Iwahashi N, Fujita M, Ogasawara T, Matsuda Y, Sakamoto R, Izumi Y, Bamba T, Ogawa Y^{*}. Adrenal steroid metabolites and bone status in patients with adrenal incidentalomas and hypercortisolism. *EBioMedicine*. 95:104733, 2023.
2. Nakano Y[#], Yokomoto-Umakoshi M^{#,*}, Nakatani K[#], Umakoshi H, Nakao H, Fujita M, Kaneko H, Iwahashi N, Ogasawara T, Fukumoto T, Matsuda Y, Sakamoto R, Izumi Y, Bamba T, Ogawa Y^{*}. Plasma Steroid Profiling Between Patients With and Without Diabetes Mellitus in Nonfunctioning

Adrenal Incidentalomas. *J. Endocr. Soc.* 8(9):bvae140, 2024.

3. Yokomoto-Umakoshi M^{#,*}, Fujita M[#], Umakoshi H^{#,*}, Ogasawara T, Iwahashi N, Nakatani K, Kaneko H, Fukumoto T, Nakao H, Haji S, Kawamura K, Shimma S, Seki M, Suzuki Y, Izumi Y, Oda Y, Eto M, Ogawa S, Bamba T, Ogawa Y^{*}. Multiomics analysis unveils the cellular ecosystem with clinical relevance in aldosterone-producing adenomas with *KCNJ5* mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 122(9): e2421489122, 2025.

血管内皮における O-GlcNAc 修飾による糖尿病合併症進展機構の解明

大橋 夏子

(滋賀医科大学 内科学講座 糖尿病内分泌・腎臓内科)

【目的】

糖尿病や肥満の世界的増加は克服すべき重要な臨床課題である。これらの疾患では高血糖やインスリン抵抗性に伴う高インスリン血症により、血管内皮障害を介して多彩な臓器障害が惹起されるため、糖尿病治療においては症状の改善のみならず合併症の発症・進展予防が極めて重要である。

O-GlcNAc 修飾は、解糖系側副路であるヘキサミン生合成経路を介して産生される UDP-GlcNAc を基質とし、O-GlcNAc 転移酵素により蛋白質の Ser/Thr 残基に付加され、O-GlcNAc 分解酵素により除去される可逆的修飾である。高血糖状態では細胞内グルコース流入増加によりヘキサミン経路が活性化されるため、O-GlcNAc 修飾は糖尿病合併症の成因進展に寄与する可能性が指摘されてきた。しかし、血管内皮細胞における O-GlcNAc 修飾の役割については未だ明らかでない。

そこで本研究では、血管内皮細胞における O-GlcNAc 修飾の生理的機能および病態生理学的意義を明らかにし、糖尿病合併症進展機構への関与を検討する。

【方法】

タモキシフェン誘導性血管内皮細胞特異的 Cre 発現

マウス (VEcad-BAC-CreERT2 マウス) と *Ogt-flox* マウスとの交配を行い、タモキシフェンを腹腔内投与し血管内皮細胞特異的 *Ogt* 欠損 (*Ogt-ECKO*) マウスを作製した。通常食モデル、STZ モデル、高脂肪食モデルを作製し、その表現型を解析した。

【結果】

通常食モデルにおいて、*Ogt-ECKO* マウスは対照マウスと比較し体重増加の抑制を認めたが、空腹時血糖や耐糖能、インスリン感受性、血圧、尿所見、心臓や大動脈、腎臓における組織学的変化に関して有意な差を認めなかった。STZ・高脂肪食モデルにおいて、*Ogt-ECKO* マウスは対照マウスと比較して有意に収縮期血圧が低値であり、Apo-E と *Ogt* の double KO マウスに高脂肪食を摂餌させる動脈硬化モデルでは、大動脈弓部における動脈硬化巣面積に差異を認めなかったが、収縮期血圧は double KO マウスにおいて有意に低下していた。また、網膜での血管新生を評価するモデルである相対的低酸素による虚血性網膜症モデル (未熟児網膜症モデル) で検討すると、*Ogt-ECKO* マウスの網膜において新生血管の増殖が顕著に抑制されていた。

一方で、高脂肪食モデルにおいて、*Ogt-ECKO* マウスでは体重増加が顕著に抑制され、白色及び褐色脂肪組織の肥大化が抑制されていた。基礎代謝は両群に差を認めなかった。経口での脂質投与では血中トリグリセリド (TG) 増加が有意に低下していたが経静脈での脂質投与では差がなく、*Ogt-ECKO* マウスの便中 TG が有意に増加していたことから、*Ogt-ECKO* マウスでは腸管からの脂質吸収が低下することが示唆された。走査電子顕微鏡 (TEM) で腸管を観察したところ、小腸絨毛リンパ管内皮細胞間結合が *Ogt-ECKO* マウスにおいて強固な zipper type へ変化していた。そのため摂取した脂質がリンパ管内へ移行できず排泄され、高脂肪食による肥満に抵抗性を示すと考えた。また、*Ogt-ECKO* マウス内皮細胞の VEGFR3 及び NOS3 の発現が低下していた。VEGFR3 は腸のリンパ管維持と TG 吸収に関与していることから、*Ogt-ECKO* マウスでは VEGFC-VEGFR3 経路を介して TG 吸収が低下していると考えられた。VEGFC-VEGFR3 シグナル伝達は、リンパ管の透過性に影響を及ぼす一酸化窒素 (NO) の産生に重要であることが知られており、*Ogt-ECKO* マウスでは NOS3 の発現が低下し

ていることから、血清 NO 濃度を測定した。その結果、*Ogt-ECKO* マウスでは *Ogt-flox* マウスに比べて NO 濃度が有意に低いことが示された。そこで我々は、血清 NO 濃度の低下を回復させることで、腸からの脂質吸収が改善するのではないかと考え、NO 供与体である DETA-NONOate を用いて OLTT を行ったところ、NO ドナーを投与された *Ogt-ECKO* マウスでは OLTT 中に低下した血清 TG レベルが無処置対照群である *Ogt-flox* マウスと同様のレベルに戻り、体重も増加した。さらに、TEM 分析でも腸乳管内皮細胞間結合が観察され、ジッパー結合の開通と乳管内への TG の移動が確認された。

【考察】

O-GlcNAc 修飾は、糖尿病性細小血管合併症の発症に関係することが知られていることから、我々は当初、血管内皮細胞の O-GlcNAc 修飾が糖尿病合併症において果たす役割に関して検討を行っていた。しかし、今回の我々の検討では、STZ 投与により糖尿病を発症させた *Ogt-ECKO* マウスにおいて、網膜血管密度、尿蛋白量、感覚神経閾値など細小血管合併症の表現型に関しては、対照群と比較し有意な変化を認めなかった。これらの結果より、血管内皮細胞における O-GlcNAc 修飾の欠損は、糖尿病モデルマウスにおける主要な糖尿病細小血管合併症には影響を与えないと考えた。

一方で、検討を重ねていく中で、血管内皮細胞における O-GlcNAc 修飾の欠損が、腸管からの脂質吸収の低下による体重増加不良、特に高脂肪食負荷時の体重増加を抑制することが明らかとなった。

今回の検討で、*Ogt-ECKO* マウスは *Ogt-flox* 対照マウスに比べて食事誘導性肥満に抵抗性であることから、内皮細胞における O-GlcNAcylation が腸からの脂肪吸収に関与していることを発見した。さらに、脂肪吸収に影響する腸リンパ管内皮細胞の細胞間結合の変化を同定し、*Ogt-ECKO* マウスに NO ドナーを補充すると脂肪吸収が回復することを証明した。以上より、*Ogt-ECKO* マウスでは、VEGFC-VEGFR3 シグナルを介した NO 産生が減少したためと思われる、高脂肪食負荷時の腸管脂肪吸収の減少を呈することが明らかとなった。

内皮細胞における O-GlcNAcylation が腸の脂肪吸収に重要な役割を果たしていることが示唆された。

【文献】

Ohgaku S, Ida S, Ohashi N(Corresponding), Morino K, Ishikado A, Yanagimachi T, Murata K, Sato D, Ugi S, Nasiri A, Shulman GI, Maegawa H, Kume S, Fujita Y. O-GlcNAc modification in endothelial cells modulates adiposity via fat absorption from the intestine in mice. *Heliyon*. 2024 Jul 14;10(14):e34490

褐色脂肪活性化因子 SerpinA1 の同定と作用メカニズムの解明

岡川 章太

(熊本大学大学院生命科学研究部 代謝内科学講座)

【背景】

脂肪組織は、脂質をエネルギーとして貯蔵する白色脂肪と、熱産生しエネルギーを消費する褐色脂肪に大

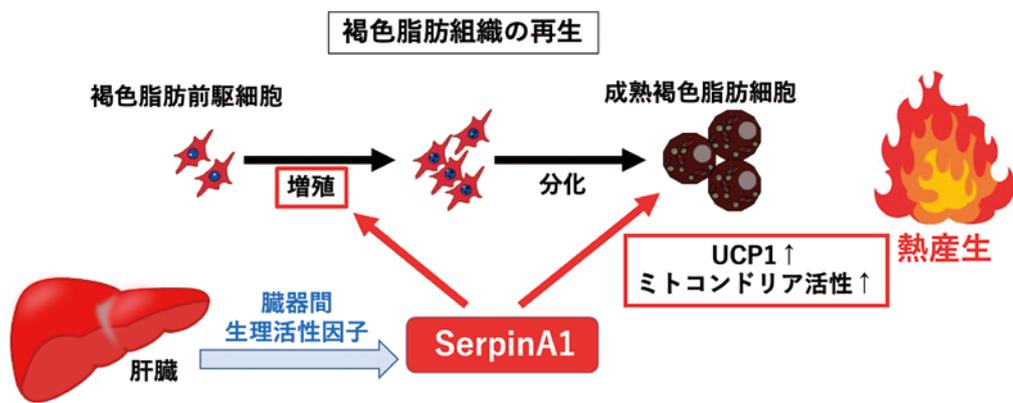
別される。近年、ヒト成人においても、褐色脂肪の活性化は肥満やインスリン抵抗性を抑制することが明らかとなり、生活習慣病予防の観点から注目されている。成熟マウスで脂肪特異的にインスリン受容体と IGF1 受容体を誘導性にダブルノックアウト (Ai-DKO) すると、脂肪組織が消失してメタボリックシンドロームを呈するが、長期観察すると新たに褐色脂肪組織も再生し代謝が改善する (*Cell Metabolism* 2017)。

【目的】

Ai-DKO マウスを用いて、褐色脂肪活性化因子を同定し作用機序を明らかにする。

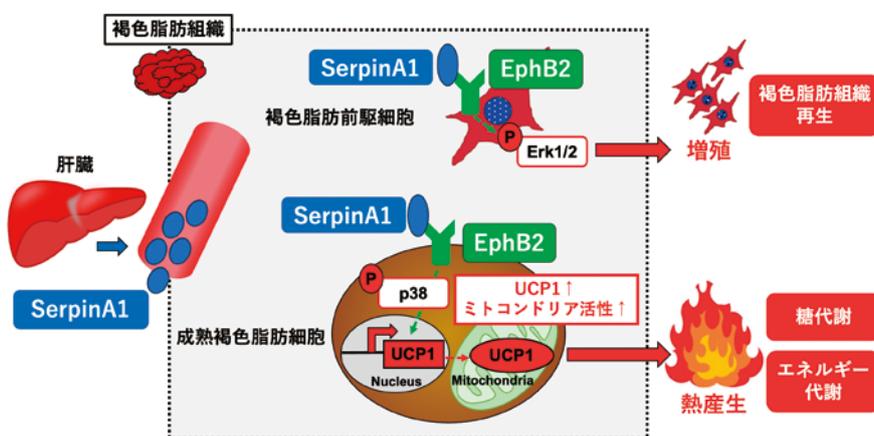
【研究内容】

Ai-DKO マウスの血清をプロテオミクス解析し、褐色脂肪組織の再生時に発現上昇する褐色脂肪活性化因子として serine protease inhibitor A1 (SerpinA1) を同定した。マウスの褐色脂肪細胞に SerpinA1 を添加し、EDU 染色による増殖能評価及び細胞外フラックス



Okagawa S., Sakaguchi M., Kubota N., Araki E. et al., *Nature Communications* 2024

図1. SerpinA1による褐色脂肪組織の再生と活性化



Okagawa S., Sakaguchi M., Kubota N., Araki E. et al., *Nature Communications* 2024

図2. 褐色脂肪を活性化する肝臓由来のSerpinA1の作用メカニズム

アナライザーを用いた解析を行い、Serpina1 は褐色脂肪のミトコンドリア機能を活性化し、褐色脂肪の増殖・活性化をもたらすヘパトカインであることを見出した。肝臓特異的 SerpinA1 過剰発現 Tg (SPA1Tg) マウスを作製し解析すると、耐糖能改善及び褐色脂肪組織の uncoupling protein 1 (UCP1) の発現上昇を認め、寒冷刺激下での熱産生が上昇することを確認した。一方、作製した SerpinA1 全身ノックアウト (SPA1KO) マウスでは、耐糖能悪化及びインスリン抵抗性や酸素摂取量低下、耐寒能低下を認めた。褐色脂肪組織の UCP1 発現低下がみられ、高脂肪食摂取下では肥満傾向を示した。また、Serpina1 過剰発現褐色脂肪前駆細胞を用いて免疫沈降後にプロテオミクス解析を行い、Serpina1 の結合蛋白として Eph receptor B2 (EphB2) を同定した。Serpina1 は β アドレナリン受容体非依存的な経路による UCP1 発現調節やミトコンドリア活性化を誘導することが示唆された。

【考察】

肝臓由来の SerpinA1 は褐色脂肪の増殖や活性化を誘導することから、メタボリックシンドロームにおける肝臓 - 脂肪の臓器連関作用による 2 型糖尿病治療への展開が期待できる。

【謝辞】

上記の研究は、公益財団法人日本応用酵素協会 Front Runner of Future Diabetes Research に関する研究助成 (FFDR) による研究助成を受け、2024 年 11 月に Nature Communications 誌に採択されました。ここに厚く御礼申し上げます。

Okagawa S., Sakaguchi M., Kubota N., Araki E. et al. Hepatic SerpinA1 Improves Energy and Glucose Metabolism through Regulation of Preadipocyte Proliferation and UCP1 Expression. *Nature Communications* 15, 9585 (2024).

可溶性 T- カドヘリンの生理的役割と産生制御

沖田 朋憲

(大阪大学大学院医学系研究科 内分泌・代謝内科学)

【背景】

T- カドヘリン (T-cad) は心臓、血管内皮、骨格筋、間葉系幹細胞等に発現し、アディポネクチンに特異的に結合する GPI アンカー型タンパク質である¹⁾。また T-cad は可溶性 T-cad (sT-cad) として血中にも存在する²⁾。T-cad 全身 KO マウスは高脂肪食負荷時に膵 β 細胞の代償性増殖不全を示し、肝特異的発現プラスミドベクターを用いて血中 sT-cad を補充すると膵 β 細胞増殖が改善することを明らかにした³⁾。

【目的】

血中 sT-cad 濃度を制御するメカニズムおよび生理的役割を明らかにする。

【方法】

- 血中 sT-cad の産生組織：T-cad を発現する組織として血管内皮、骨格筋および心筋に着目し、それらの組織特異的 T-cad KO マウスを作製し血中 sT-cad を測定した。
- マウスおよびヒトにおける血中 T-cad の動態：ストレプトゾシン (STZ) およびインスリン受容体阻害薬 S961 を負荷した野生型マウス、並びに *db/db* マウスの血中 sT-cad を測定した。ヒト血中 T-cad の評価のため、糖尿病患者の糖尿病性ケトアシドーシス (DKA) 急性期や卵巣癌患者に対しフォスファチジルイノシトール 3 リン酸キナーゼ α (PI3K α) 阻害薬を投与した際の血中 sT-cad を測定した。
- sT-cad とインスリンシグナルの関係：ヒト臍帯静脈由来内皮細胞 (HUVEC) を用いインスリンシグナルと培養上清中 sT-cad の関係を評価した。
- 血中 sT-cad の生理的役割 (膵以外への作用)：7 週齢の野生型マウスに肝発現プラスミドベクター pLIVE を用いて血中 sT-cad を高発現させたのち、大動脈弓縮窄術 (TAC) を行い圧負荷心不全を誘導したときの心機能を評価した。

【結果・考察】

心筋および骨格筋特異的 T-cad KO マウスではコント

ロールに比して血中 sT-cad は低下しなかったが、血管内皮特異的 T-cad KO マウスでは sT-cad が有意に減少した。血中 sT-cad は少なくとも血管内皮細胞からは供給されていると考えられる。

血中 sT-cad は STZ, S961 負荷および *db/db* マウスの 11 週齢以降で有意に増加した。また糖尿病患者の DKA 急性期において、血中 sT-cad はインスリン治療後に減少した。卵巣癌患者に対し PI3K α 阻害薬を投与すると、血中 sT-cad が増加した。これらのマウスおよびヒトの血中 sT-cad プロファイルは、インスリン欠乏または薬理的なインスリン抵抗性が惹起されると血中 sT-cad が増加する点が共通しており、sT-cad 産生とインスリンシグナルの関連が示唆された。さらに HUVEC にインスリンを添加すると培養上清中 sT-cad は有意に減少し、インスリン受容体阻害薬または Akt 阻害薬を添加すると培養上清中 sT-cad の減少が見られなくなった。血管内皮細胞由来 sT-cad の産生はインスリン-Akt シグナルにより制御されていると考えられた。

上記の研究結果に対し論文報告を行った⁴⁾。並行して人間ドック受診者を中心としたヒト血清サンプル中の sT-cad 濃度を測定し、濃度制御に関わる臨床的特徴について解析をすすめている。

また最近、TAC を施行することでマウスの心機能は悪化するが、血中 sT-cad を高発現させたマウス (TAC-sT-cad) ではコントロールマウス (TAC-Control) に比して左室駆出率および心重量の悪化が有意に軽減した。組織学的には TAC-sT-cad 群は TAC-Control に比して心筋細胞の肥大および心臓の線維化が抑制されていた⁵⁾。

以上のように、sT-cad が膵以外の組織に対しても生理的役割をもつ可能性を見出している。標的となる組織を探索しつつ、sT-cad の受容機構や受容後のシグナル伝達機構についても解明をすすめる。

【文献】

- 1) Kita S, et al. eLife 2019
- 2) Fukuda S, et al. JCEM 2021
- 3) Okita T, et al. iScience 2022
- 4) Okita T, et al. BBRC 2024
- 5) Kondo Y, et al. BBRC 2025

弾性線維関連蛋白 Fibulin-5 によるインスリン抵抗性制御機構の解明

奥山 朋子

(横浜市立大学医学部 内分泌・糖尿病内科学)

【背景・目的】

我々はマウス膵島をグルコキナーゼ活性化薬で 24 時間刺激した際に発現上昇する分子として Fibulin-5 (Fbln5) を同定し、膵島における Fbln5 の発現制御機構について報告した。Fbln5 は弾性線維形成に必須の分泌蛋白であり、細胞外マトリックス分子である。Fbln5 欠損マウスを入手しその糖代謝表現型を解析したところ、インスリン感受性の亢進を認め、脂肪肝の改善や体重増加の抑制も伴ったことから、Fbln5 欠損によるインスリン感受性および糖エネルギー代謝制御機構について検討してきたが、本年度は膵 β 細胞における Fbln5 の作用について中心的に解析した。

【方法】

Ins-1-Cre マウスおよび *Fbln5*-floxed マウスを交配し、膵 β 細胞特異的 *Fbln5* 欠損マウス (β *Fbln5*KO) を樹立し、インスリン分泌能や膵 β 細胞増殖を解析した。 β *Fbln5*KO から単離直後の膵島を用いてマイクロアレイ遺伝子発現解析を行った。また野生型マウスの単離膵島および INS-1 細胞を用いて *Fbln5* 発現アデノウイルスを用いた過剰発現実験を行い、膵 β 細胞増殖を解析した。

【結果】

まず β *Fbln5*KO の単離膵島における *Fbln5* の発現低下を確認した。マウスおよびヒト膵島において、高グルコース刺激により Fbln5 の発現が上昇することを免疫染色で確認し、既存の膵島 single-cell RNA-seq データを用いて膵 β 細胞に Fbln5 が発現していることを確認した。 β *Fbln5*KO (*in vivo*) における耐糖能の増悪はわずかであったが、膵 β 細胞増殖は有意に低下し、FoxM1 の核内局在の低下、ERK リン酸化の低下を伴っていた。一方で、単離膵島 (*in vitro*) での解析では膵 β 細胞特異的 *Fbln5* 欠損による膵 β 細胞増殖の低下を認めず、FoxM1 の核内局在や ERK リン酸化の変化も消失した。Matrigel を用いて β *Fbln5*KO を細胞外マトリッ

クスと共培養した際には、膵β細胞増殖の低下が再現された。β *Fbln5*KO の単離直後の膵島の GO 解析では ERK-FoxM1 シグナルにより制御され膵β細胞増殖との関与が報告されている PLK1 経路に関する分子群の発現低下を認めた。

次に *Fbln5* 発現アデノウイルス (Ad-*Fbln5*) を用いた検討を行った。野生型マウス膵島に *Fbln5* を強制発現させたところ、膵β細胞増殖が亢進した。INS-1 細胞および野生型マウス膵島に Ad-*Fbln5* を感染させ、その培地にて Ad-*Fbln5* 非感染 INS-1 細胞およびマウス膵島を培養したところ、膵β細胞増殖の有意な増加を認めた。この際、FoxM1 阻害薬および PLK1 阻害薬との共培養により、膵β細胞増殖への作用は消失した。

【考察】

Fbln5 は膵β細胞に発現しており、膵β細胞特異的 *Fbln5* 欠損により *in vivo* では膵β細胞増殖が低下したが、*in vitro* では膵β細胞増殖の低下は認めなかった。グルコース刺激により膵β細胞から分泌された *Fbln5* は、細胞外マトリックスとの協調により autocrine/paracrine に作用し、ERK/FoxM1/PLK1 シグナルを介して膵β細胞増殖を制御すると考えられた。

【文献】

Okuyama, T., Tsuno, T., Shirakawa, J., et al.: The matricellular protein Fibulin-5 regulates β-cell proliferation in an autocrine/paracrine manner, *iScience.*, 28, 111856 (2025).

肥満時の癌発症・進展における M2 マクロファージの役割

角 朝 信

(富山大学医学部附属病院第一内科)

【目的】

肥満は乳癌、大腸癌、子宮体癌など数種の癌リスクを増加させる。しかしながら、肥満がどのように癌発症・進展に関与するか根本的な機序は十分に解明されていない。血管新生や免疫抑制を介して癌細胞の増殖や転移に寄与するマクロファージが存在する。マクロファージは細胞表面マーカーを用いて M1 マクロファージ、

M2 マクロファージに大別して解析されてきた。しかしながら、それぞれのマクロファージが癌の発症・進展にどのような役割を果たしているか、*in vivo* モデルでの検討は充分に行われておらず分子機構についても未だ明確ではない。本研究の目的は 1) X+ マクロファージが癌発症・進展を促進していないか、2) 肥満による X+ マクロファージの表現型や細胞数の変化が、癌の発症・進展を促進していないかを解明することである。

【方法】

乳癌を発症する遺伝子改変マウスを高脂肪食群と通常食群に分けて、腫瘍の発生時期や、重量、体積、数を測定。摘出した腫瘍を FACS, MACS, IHC, qPCR などを用いて解析した。また、独自に作製した担癌マウスモデルで X+ マクロファージの数を減らした際の癌の発症・進展への影響を評価した (腫瘍の発生時期、腫瘍重量、腫瘍体積)。摘出した腫瘍について組織学的評価、遺伝子発現解析、FACS, scRNA-seq(10x Genomics) を行った。

【結果】

高脂肪食負荷で腫瘍の発生が早まり、腫瘍の重量・体積・数が増加した。PD-1+ CD8+ T 細胞の遺伝子発現を解析すると PD-1⁺CD8⁺ T 細胞と比較して *Opn* を高発現し、細胞障害性の指標となる *Ifng*, *Gzmb* は低発現であった。免疫組織化学でも PD-1+ 細胞が OPN を高発現していた。独自に作製した担癌マウスモデルで X+ マクロファージの数を減らすと癌の発症、進展は抑制された。摘出した腫瘍について組織学的評価、遺伝子発現解析 (qPCR, RNA seq), FACS を行い、X+ マクロファージの減少による癌周囲微小環境の変化について確認した。また、腫瘍の scRNA-seq により、遺伝子発現の特徴から細胞種アノテーションを行い、X+ マクロファージが構成するニッチが明らかになりつつある。

【考察】

高脂肪食による肥満で細胞障害性が低く、OPN を発現し癌細胞増加促進作用をもつ PD-1+ CD8+ T 細胞が腫瘍内で増加した。肥満による CD8+ T 細胞の疲弊の加速が癌発症・進展促進と関連することが示唆された。また、X+ マクロファージの数を減らすと癌の発症、進展は抑制されることが明確となり、X+ マクロファージ

に着目した癌治療薬開発が有望であることが示唆された。今後、その機序の解明を進めると同時に臨床応用を目指した基礎研究を行う予定である。

【文献】

1. Kado T*, Nishimura A, Tobe K*. History and future perspectives of adipose tissue macrophage biology. *Front Pharmacol.* 18;15:1373182. 2024.
2. Watanabe Y, Fujisaka S, Morinaga Y, Watanabe S, Nawaz A, Hatta H, Kado T, Nishimura A, Bilal M, Aslam MR, Honda K, Nakagawa Y, Softic S, Hirabayashi K, Nakagawa T, Nagai Y, Tobe K*. Isoxanthohumol improves obesity and glucose metabolism via inhibiting intestinal lipid absorption with a bloom of *Akkermansia muciniphila* in mice. *Mol Metab.* 12;77:101797. 2023.
3. Nawaz A, Bilal M, Fujisaka S, Kado T*, Aslam MR, Ahmed S, Okabe K, Igarashi Y, Watanabe Y, Kuwano T, Tsuneyama K, Nishimura A, Nishida Y, Yamamoto S, Sasahara M, Imura J, Mori H, Matzuke MM, Kudo F, Manabe I, Uezumi A, Nakagawa T, Oishi Y, Tobe K*. Depletion of CD206⁺ M2-like macrophages induces fibro-adipogenic progenitors activation and muscle regeneration. *Nat Commun.* 21;13(1):7058. 2022.
4. Nawaz A, Nishida Y, Takikawa A, Fujisaka S, Kado T, Aminuddin A, Bilal M, Jeelani I, Aslam MR, Nishimura A, Kuwano T, Watanabe Y, Igarashi Y, Okabe K, Ahmed S, Manzoor A, Usui I, Yagi K, Nakagawa T, Tobe K*. Astaxanthin, a Marine Carotenoid, Maintains the Tolerance and Integrity of Adipose Tissue and Contributes to Its Healthy Functions. *Nutrients.* 6;13(12):4374. 2021.
5. Kado T, Nawaz A, Takikawa A, Usui I, Tobe K*. Linkage of CD8(+) T cell exhaustion with high-fat diet-induced tumorigenesis. *Sci Rep.* 9(1):12284, 2019.

免疫チェックポイント阻害薬投与後発症 1 型糖尿病の発症メカニズム解明と発症予測

川 田 哲 史

(大阪大学大学院医学系研究科内分泌代謝内科学)

【目的】

我々は、PD-1 抗体により 1 型糖尿病を発症する機序として、1 型糖尿病発症患者では膵島周囲のマクロファージ浸潤が多いこと、PD-1 抗体の投与で膵島周囲の T リンパ球浸潤が増加し、一方で膵 β 細胞での PD-L1 発現が低下することを明らかとした。しかし PD-1 抗体投与後 1 型糖尿病を発症しなかった患者でも T リンパ球の浸潤は認めており、完全な 1 型糖尿病発症メカニズムの解明には至っていない。本研究により、PD-1 抗体投与後に 1 型糖尿病を発症する機序をさらに明確にする。

【方法】

ICI 投与後に 1 型糖尿病を発症した 3 症例 (T1D)、PD-1 抗体投与も糖尿病を発症しなかった 3 症例 (non-T1D)、control 7 症例の膵組織を用いて① β 細胞における MHC クラス I の発現、②制御性 T 細胞の存在、③ FAS/FAS-L 発現の確認について探索する。

【結果】

T1D のほとんどの残存 β 細胞に MHC class I 発現を認めたが、non-T1D および control の β 細胞にはほとんど発現がなかった。膵島周囲に浸潤する FoxP3 陽性細胞数は T1D および control に比べ、non-T1D において有意に増加していた。しかし、膵実質に浸潤する FoxP3 陽性細胞数には T1D と nonT1D において差は認めなかった。膵島周囲に浸潤するリンパ球における Fas-L の発現について、T1D と non-T1D では差を認めなかった。

【考察】

ICI 関連 1 型糖尿病の発症メカニズムの一因として、T1D は MHC class I 過剰発現による T 細胞への抗原提示能の増強により β 細胞傷害を受けやすい状態となり、non-T1D は制御性 T 細胞による免疫寛容により β 細胞傷害を回避できたと推察される。また、T1D と non-T1D においてリンパ球における Fas-L 発現に差がなかつ

たことから、膵β細胞における Fas 発現に差があるかを検討していく予定である。

膵島と腺房細胞の相互作用による GLP-1 を介した膵β細胞制御機構の解析

京原麻由

(横浜市立大学大学院 医学研究科 分子内分泌・糖尿病内科学)

【目的】

GLP-1 による膵β細胞増殖制御における新規経路を同定する。

【方法・結果】

マウスの単離膵島に GLP-1 受容体作動薬 (GLP-1RA) を添加し培養した後に、膵島の定量的プロテオミクス解析を行った。膵島の lysate より 1226 個のタンパク質が同定された。GLP-1RA 添加により膵島において 13 個のタンパク質が有意 (>2 倍, $P < 0.05$) に上昇し、9 個が膵腺房細胞に発現する外分泌酵素関連タンパクであり、膵β細胞増殖因子として報告される Lithostathine-1 (Reg1) の上昇も認めた (2.77 倍)。GLP-1RA にて有意に発現上昇したタンパク質群は、KEGG pathway 解析にて Protein digestion, Fat digestion といった、膵外分泌に関わる term に顕著なエンリッチメントが認められ、膵外分泌機能との関連が示唆された。単離膵島と膵腺房細胞の共培養系を確立し、GLP-1RA 添加により膵島への腺房細胞の付着が増加し、膵島において Reg1 や細胞接着因子の発現が上昇した。Reg1 欠損マウスでは GLP-1RA 皮下注による膵β細胞増殖促進が消失した。野生型マウス (WT) 単離膵島と WT 腺房細胞との共培養では、GLP-1RA により膵β細胞増殖は促進されたが、WT 単離膵島と Reg1 欠損マウス (KO) 腺房細胞との共培養では GLP-1RA による膵β細胞増殖は促進を認めなかった。一方、KO 単離膵島と WT 腺房細胞の共培養では、GLP-1RA により膵β細胞増殖は促進された。マウス単離膵島に組み換え Reg1 を添加すると膵β細胞増殖は促進され、GLP-1RA 添加による膵β細胞増殖の増大は認めなかった。膵腺房細胞における Gp1r 発現は極めて低く、マウス腺房細胞の単独培養では GLP-1RA 刺激により Reg1 発現は変化しなかった。一方、GLP-

1RA を添加しマウス単離膵島を培養した、培養上清にて刺激したマウス腺房細胞における Reg1 の発現は上昇した。

【考察】

GLP-1RA は膵島の GLP-1 受容体に作用し、膵島由来の液性因子を介して、腺房細胞で Reg1 が誘導され、腺房細胞由来の Reg1 が膵β細胞増殖を促進するという、膵島と腺房細胞との接着因子や分泌因子を介した、膵島と腺房細胞の相互作用による Reg1 を介した新規経路の存在が示唆された。

エピゲノムを介した肥満・糖尿病遺伝機構の解明と応用

小塚智沙代

(理化学研究所生命医科学研究センター)

【目的】

肥満や 2 型糖尿病に罹患した親を持つ子では生活習慣病の発症率が高い。この遺伝機構として、妊娠前の親の環境因子が、エピジェネティックな変化を介して次世代の疾患リスクに影響を与える可能性が注目されている。しかし、卵子がどのようにして母親の環境因子を感知しているのかはこれまでに全く報告がない。我々はこれまでに卵子におけるヒストン修飾 H3K27me3 が受精後も維持され、その異常が発生遅延や胎生致死、出生後の過体重の原因となることを報告しており (Genes Dev 36:483, 2022)、エピジェネティックな肥満・糖尿病の遺伝機構に卵子のヒストン修飾の関与が示唆される。本研究では、卵子が外部からの刺激を感知する分子として核内受容体に注目し、核内受容体が卵子において母親の環境因子に応答して H3K27me3 を変化させるのか、さらに、その結果として仔にどのような影響を及ぼすのかを明らかにする。

【方法・結果】

卵子から受精後の着床前までの発生過程においてどのような核内受容体が発現しているのかを RNA-seq 解析により調べたところ、排卵前に卵子に発現する核内受容体は 8 つであった (fPKM>10)。このうち PPAR γ を含む 4 つの核内受容体について Cre/LoxP システム

による卵子特異的な欠損マウスを作製し、卵巣内での卵成長過程において核内受容体シグナルが消失することで卵子における H3K27me3 分布が変化するのかを調べた。その結果、いずれの核内受容体の欠損卵子においても顕著な H3K27me3 分布の変化は認めなかった。核内受容体シグナルの亢進による影響を調べるため、卵母細胞の対外成長培養系を用いて、卵母細胞が成長する過程で核内受容体のリガンドを添加することで卵子の H3K27me3 分布に及ぼす影響を現在検討中である。

卵子における核内受容体シグナル消失による仔への影響を調べるため、胎盤および新生児マウスの表現型を調べた。卵子特異的 PPAR γ 欠損マウスと健常野生型オスとを交配して得られた仔では、受精後の遺伝子型はヘテロ欠損であるが、胎盤の過形成と胎児の発生遅延を認めた。これは卵子特異的に H3K27me3 を消失した際に見られる表現型と同一である。また興味深いことに、PPAR γ 欠損精子を有するオスと健常野生型メスとの交配から生まれた父性欠損の仔では、胎盤過形成や胎児の発生遅延の表現型は母性欠損の仔に比べて軽度であった。

【考察】

卵子特異的 PPAR γ 欠損マウスが卵子特異的な H3K27me3 消失と同様の表現型を示したことから、胎盤系列の細胞への影響が考えられる。排卵前の卵子における H3K27me3 分布には変化が認められなかったが、今後は排卵以降の H3K27me3 分布や受精後の胚発生をより詳細に評価することで、受精前の卵子における PPAR γ 欠損が受精後の胚にどのように影響を及ぼしているのかを明らかにしていきたい。

膵島における細胞可塑性の解明

椎木 幾久子

(山口大学大学院医学系研究科病態制御内科学講座)

【目的】

糖尿病病態における膵 β 細胞と、生理条件下での膵 α 細胞の可塑性を明らかにするため、① Wolfram 症候群モデル *Wfs1* 欠損マウスでの β 細胞可塑性、② 栄養環境に応じた α 細胞の可塑性と制御機構を検討した。

【方法】

- ① *Wfs1* 欠損マウスについて β 細胞の系譜解析および組織学的解析、単離膵島を用いた遺伝子発現解析、代謝解析を行った。
- ② 低炭水化物 / 高蛋白質食 (LCHP) または対照食を C57BL/6J 雄マウスに 10 日間摂餌させ、血漿解析、膵・脳組織染色、肝代謝物測定を行った。

【結果】

- ① *Wfs1* 欠損マウスでは、進行性にインスリン陽性細胞減少とグルカゴン陽性細胞増加を認め、高血糖を発症する。若齢期には空腹時および随時血糖値は正常ながら、 β 細胞は MafA 発現低下を来し Neurogenin3 を発現する膵内分泌前駆様細胞に脱分化しており、グルコース異化障害に基づく ATP 産生障害を認めた。一方、ストレス応答分子 *Txnip* 発現が亢進しており、*Txnip* 欠損によってエネルギー代謝改善と脱分化抑制とともに糖尿病発症が抑制された。Wolfram 症候群患者膵島においても脱分化を含む細胞可塑性が認められた。
- ② LCHP 摂餌マウスでは血糖値には変化がないものの、血中グルカゴン上昇・インスリン低下、総アミノ酸濃度低下、肝臓でのアミノ酸異化および糖新生亢進を認めた。膵組織では膵管近傍に新生 α 細胞クラスターが出現し、交感神経遮断や迷走神経肝臓枝切断で抑制された。中枢では交感神経起始核である淡蒼縫線核および求心性迷走神経中枢の延髄孤束核特異的に FosB 陽性細胞の増加が観察された。

【考察】

- ① Wolfram 症候群では脱分化が β 細胞不全の成因であり、*Txnip* を介したストレス病態での細胞内エネルギー代謝障害と脱分化誘導との関連性が示唆された。
- ② 高蛋白栄養下では肝臓 - 中枢 - 膵 α 細胞間神経ネットワークにより α 細胞が制御され、糖新生が飢餓応答として活性化されると考えられた。

【文献】

Amo-Shiinoki, K., Tanabe, K., Tanizawa, Y., et al. : β cell dedifferentiation, the underlying mechanism of diabetes in Wolfram syndrome. *Sci. Transl. Med.* 17, eadp2332 (2025).

肥満治療ターゲットの同定と機能解析

Shin Jihoon (シン ジフン)

(Harvard Medical School)

【背景】

肥満は糖尿病を含むさまざまなメタボリックシンドロームの原因となり、新規治療法の開発が求められている。本研究では、脂肪組織を標的とした肥満治療候補因子の同定とその機能解析を目的とした。

【方法】

ヒト脂肪組織および脂肪細胞の公開トランスクリプトームデータを解析し、生理的・環境的・病態的・遺伝的条件下で脂肪組織量と相関する因子を探索した。さらに、脂肪組織特異的遺伝子欠損マウス、薬物投与モデルマウス、ならびに3T3-L1脂肪細胞を用いて、候補因子の機能と治療ターゲットとしての可能性を検討した。

【結果】

統合的トランスクリプトーム解析により、HSP47を同定した。HSP47は小胞体に局在するコラーゲン特異的シャペロンタンパクであり、フォールディングや分泌に関与することが知られているが、脂肪細胞における機能は不明であった。

HSP47はヒトおよびマウス脂肪組織ならびに脂肪細胞で高発現しており、肥満や過食条件下で発現が増加し、運動・カロリー制限・絶食条件下で低下した。さらに、HSP47遺伝子変異(rs606452-A, rs668347-T, rs645935-T, rs584961-A)は脂肪組織における発現を上昇させ、ウエストやヒップ周囲径などの体脂肪量増加と相関した。

Hsp47^{flox/flox}マウスとAdipoq-Creマウスを交配して作製した脂肪特異的Hsp47欠損(AdHSP47KO)マウスでは、体重や摂食量に差はみられなかったが、内臓脂肪および皮下脂肪量が減少した。同様に、HSP47阻害剤投与モデルにおいても脂肪量の低下が確認された。

作用機序として、HSP47はコラーゲンマトリックスのフォールディングおよび分泌を介して細胞外マト

リックスとインテグリン受容体の結合を促進し、その結果FAKシグナルを活性化してPPAR γ タンパク質の分解を抑制することが明らかとなった。

【考察】

HSP47は脂肪組織の細胞外コラーゲンマトリックスを調節する重要因子であり、その発現は脂肪組織量を規定することが示唆された。一方で、脂肪組織特異的または薬理的にHSP47を抑制すると脂肪量は減少するものの、脂肪細胞に貯蔵されなかった栄養が肝臓に蓄積し、全身の糖代謝やインスリン感受性を悪化させることが分かった。この現象はヒトにおけるリポシトロフィーの病態と類似しており、HSP47を直接的な肥満治療標的とすることは困難である。しかしながら、本研究は細胞外マトリックス制御と脂肪細胞維持の重要性を明確に示している。今後は、全身のエネルギー代謝を高めることで間接的に脂肪細胞への栄養蓄積を抑制する戦略を検討し、その関連因子の同定と機能解析を進めていく予定である。

【文献】

Shin, J. et al. HSP47 levels determine the degree of body adiposity. *Nature communications* 14, 7319 (2023).

single-cell RNA sequencingを用いた β 細胞新生経路の解明

鈴木 路 可

(University of California, San Francisco)

2020年度から上記施設に留学し、研究を行っている。

【目的】

肥満や2型糖尿病の発症過程において、 β 細胞は過剰なインスリン需要に曝され、小胞体(ER)ストレスが亢進する。その結果、適応的な小胞体ストレス応答(UPR)が病的UPRへと移行し、 β 細胞機能不全と細胞死が進行する。本研究の目的は、肥満モデルマウスであるob/obマウスを用いて、IRE1 α シグナルの異常活性化が糖尿病病態に果たす役割を明らかにし、さらにIRE1阻害剤(KIRA8およびPAIR2)の治療的可能性を検証することである。

【方法】

レプチン遺伝子変異により肥満・高血糖を呈する ob/ob マウスに対し、IRE1 α 阻害剤 KIRA8 または PAIR2 を投与し、血糖値、インスリン抵抗性、インスリン分泌、小胞体ストレスマーカーの発現を評価した。また、細胞株においても、これらがオンターゲットに ER ストレスを調節し、インスリン抵抗性を改善することを確認する。

【結果】

ob/ob マウスでは糖尿病の進展に伴い、IRE1 α シグナルが過剰に活性化し、膵島における小胞体ストレス応答の破綻とインスリン分泌不全が認められた。IRE1 阻害剤の投与により、小胞体ストレスマーカーの発現が低下し、インスリン抵抗性が改善した。特に PAIR2 は KIRA8 よりも高い選択性と有効性を示し、血糖コントロールの著明な改善をもたらした。また、これらの改善は IRE1 を介したインスリン抵抗性の調節であることを細胞株を用いた実験でも確認した。

【考察】

本研究は、IRE1 α 阻害剤が肥満糖尿病における新規治療標的となり得ることを示した。特に PAIR2 は、病的 UPR を制御することでインスリン抵抗性を改善し、最終的には β 細胞の機能低下を防ぎ、糖尿病の進展抑制に寄与する可能性がある。従来の血糖降下薬とは異なる作用機序を持つため、新たな治療戦略としての臨床応用が期待される。また、同研究室から報告された Vincent Auyeung らの JCI 論文 (2029 年) においても、IRE1 依存性 RNA 分解 (RIDD) の病態形成への関与が明らかにされており、本研究の成果はそれと相補的な知見を提供する。

【文献】

Vincent C. Auyeung, Tavienne Steinberg, Alina Olivier, **Luka Suzuki**, Imran S. Khan, Michael S. Downey, Maike Thamsen, Lu Guo, Bradley Backes, Dean Sheppard, Feroz Papa (corresponding author). Specific pharmacologic inhibition of regulated IRE1 α -dependent RNA decay protects alveolar epithelial identity and prevents pulmonary fibrosis in mice. *Journal of Clinical Investigation*. (2025, Accepted).

臨床情報、ゲノム情報を活用した 2 型糖尿病のサブタイプ分類

鈴木 顕

(東京大学医学部附属病院糖尿病・代謝内科)

※

【目的】

2 型糖尿病の病態を分子レベルで考察するため、複数の民族集団において、2 型糖尿病に関連する様々な組織における遺伝子発現およびタンパク質レベルと 2 型糖尿病リスクとの因果関係を、メンデルランダム化 (MR) 解析を用いて調査した。

【方法】

250 万人以上を対象とした 2 型糖尿病の多民族ゲノムワイド関連解析 (GWAS) と、アフリカ系 (AFR)、アメリカ系 (AMR)、東アジア系 (EAS)、ヨーロッパ系 (EUR) の各民族集団における遺伝子 (eQTL) およびタンパク質 (pQTL) の定量形質遺伝子座データを利用した。メンデルランダム化解析と共局在解析 (colocalization analysis) を用いて、血中および 7 つの 2 型糖尿病関連組織 (皮下脂肪、内臓脂肪、肝臓、脳の視床下部、骨格筋、膵臓全体、膵島) における分子の発現レベルと 2 型糖尿病リスクの因果関係を推定した。

【結果】

血中データからは、2 型糖尿病リスクに因果関係を持つ 335 個の遺伝子と 46 個のタンパク質が特定された。これらのうち、81 個の遺伝子と 5 つのタンパク質の因果関係は、多民族メタ解析で有意であることが判明した。PTGES2 や FAM20B といった新規の関連性も特定された。因果関係は民族集団間でほとんど差がないが、組織間では大きく異なり、血中データで見つかった因果関係を持つ遺伝子の 85% は、2 型糖尿病関連組織では検出されなかった。

【考察】

本研究は、2 型糖尿病における遺伝的・分子メカニズムを多民族・多組織で詳細に解析した最大規模の研究である。結果は、因果関係が民族集団間で共通している可能性が高い一方で、組織によって大きく異なることを示している。特に、血中データだけでは、2 型糖尿病の病態を完全に理解するには不十分であり、2 型糖尿

病関連組織の分子レベルでの解析が重要であることを強調している。今回の発見は、2型糖尿病治療の新たな分子標的候補として、*CPXM1*, *PTGES2*, *FAM20B* などの遺伝子やタンパク質を特定した。

【結論】

本研究は、2型糖尿病の病態における分子レベルでの原因を明らかにし、多民族と組織にわたる因果関係の推定の有用性を示した。これらの知見は、2型糖尿病の

治療や予防に向けた分子標的の優先順位付けに役立つことが期待される。

【文献】

Unravelling the molecular mechanisms causal to type 2 diabetes across global populations and disease-relevant tissues. Ozvan Bocher, Ken Suzuki, et al. medRxiv 2025.05.05.25326880; doi: <https://doi.org/10.1101/2025.05.05.25326880>

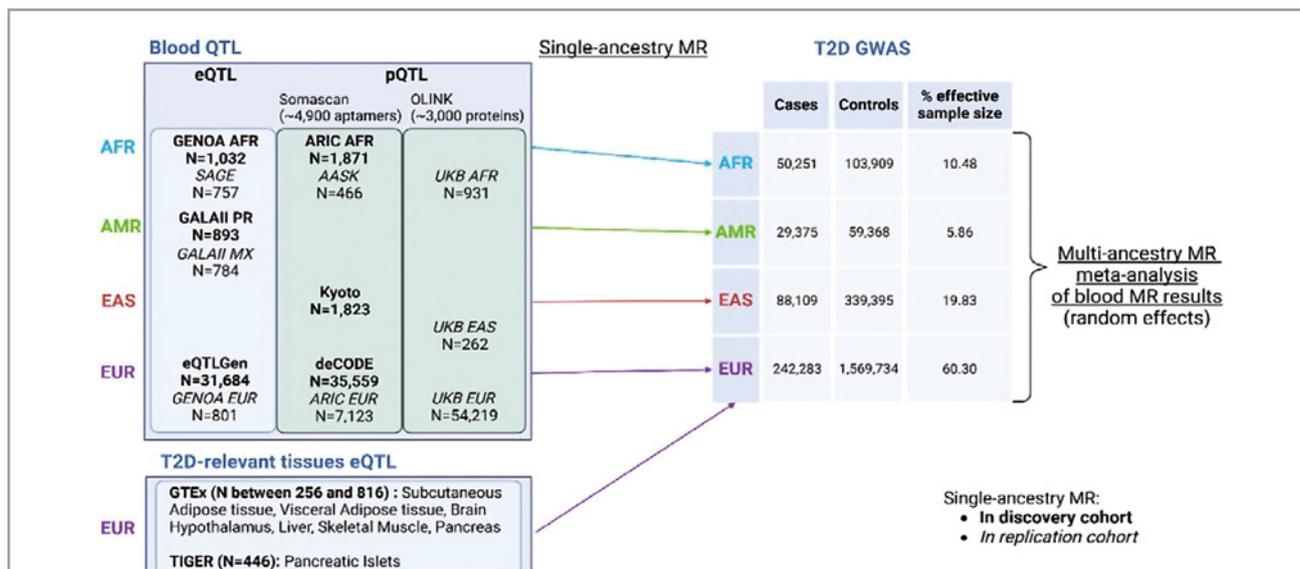


図1. メンデルランダム化分析に用いられたコホートと組織の概要。メンデルランダム化分析は、ヨーロッパ系 (EUR)、アフリカ系 (AFR)、混血アメリカ系 (AMR)、東アジア系 (EAS) の集団で、各民族集団別実施された。Discovery cohort は太字で replication cohort はイタリック体で示されている。

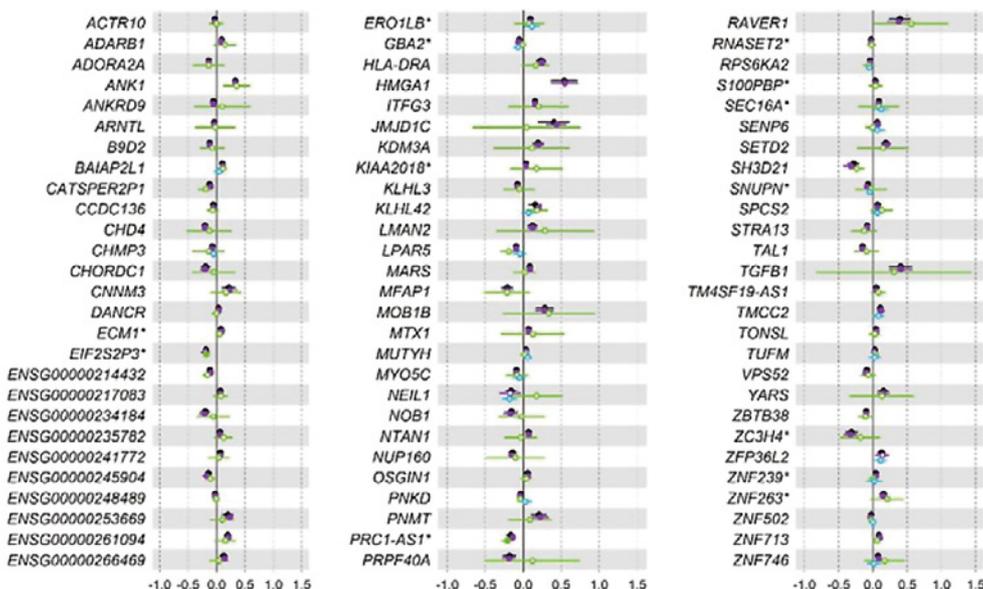


図2. MR解析の多民族メタ解析で特定された、2型糖尿病と因果関係を持つ遺伝子とタンパク質。中央線の右側に行くほど2型糖尿病リスク上昇効果が高い。各点の色はMR解析に活用したGWAS, QTLデータの民族集団を示し、紫：ヨーロッパ系、緑：アメリカ系、水色：アフリカ系、赤：東アジア系、黒：多民族メタ解析を示す。

メタボローム解析を用いた脂肪細胞分化・褐色化制御に関する研究

高橋 春 弥

(京都大学大学院農学研究科)

【研究背景・目的】

脂肪組織は生命維持に必要なエネルギーを脂肪として蓄積する役割に加え、アディポカイン分泌等を介した生体恒常性維持にも重要な役割を担う。脂肪細胞の機能についてはこれまでの多くの先行研究において多面的に解析されており、特に脂肪細胞の分化過程や熱産生能を有するベージュ脂肪細胞への変換（褐色化）過程は、主に遺伝子やタンパク質発現制御に関する知見に基づくメカニズム解析が盛んである。他方、これらの過程における低分子代謝物の挙動や役割についての知見は、遺伝子やタンパク質発現制御に関する知見と比較すると相対的に少ない。これまでの研究では、脂肪細胞の分化や褐色化に関わる生体内低分子成分を同定してきたが¹⁻³⁾、今年度は脂肪細胞の分化に関わる食品由来低分子成分の探索を主軸とした研究を行った。

【方法】

様々な農林水産物抽出物に含まれる低分子成分をメタボローム解析によりリスト化すると同時に、当該抽出物の抗炎症能を、マクロファージ様培養細胞を用いた一酸化窒素産生抑制能により評価した。また、メタボローム解析により検出された多様な成分の各抽出物中含有量と抗炎症活性の相関解析から有用候補成分の探索を行うと共に、当該成分が脂肪細胞分化に与える影響を、培養脂肪細胞を用いて評価した。

【結果・考察】

抗炎症作用を有する成分として複数同定された成分の内、フタリド類に分類される低分子化合物 A は、培養脂肪細胞に添加することにより、脂肪細胞分化関連遺伝子の発現量を増強すると共に、アディポネクチン分泌量を増加させることを見出した。また、天然フェノール化合物に分類される低分子化合物 B は、培養脂肪細胞に添加することにより細胞内に蓄積される中性脂肪量を抑制させることを見出した。

今回着目した化合物 A 及び B は、脂肪細胞の分化に

関わる新規の食品由来成分であると考えられる。今後はこれらの化合物の詳細な作用メカニズムを検討すると同時に、脂肪細胞の褐色化への影響についても検討を進めたいと考えている。

【文献】

1. Takahashi, H., Tokura, M., Kawarasaki, S., Nagai, H., Iwase, M., Nishitani, K., Okaze, H., Mohri, S., Ito, T., Ara, T., Jheng, H.F., Nomura, W., Kawada, T., Inoue, K. & Goto, T.: Metabolomics reveals inosine 5'-monophosphate is increased during mice adipocyte browning. *J Biol Chem.*, 298(10), 102456 (2022).
2. Takahashi, H., Nishitani, K., Kawarasaki, S., Martin-Morales, A., Nagai, H., Kuwata, H., Tokura, M., Okaze, H., Mohri, S., Ara, T., Ito, T., Nomura, W., Jheng, H.F., Kawada, T., Inoue, K. & Goto, T.: Metabolome analysis reveals that cyclic adenosine diphosphate ribose contributes to the regulation of differentiation in mice adipocyte, *FASEB J.*, 38(1), e23391 (2024).
3. Takahashi, H.: Application of mass spectrometry data for health evaluation, *Biosci Biotechnol Biochem.*, 89(2), 215-223 (2025).

肝臓の脂肪滴形成におけるミトコンドリアダイナミクスの機能的意義の解明

武市 幸 奈

(九州大学病院 内分泌代謝・糖尿病内科)

【目的】

近年、脂肪滴 (LD) 結合タンパクであるペリリピン (PLIN) がミトコンドリア分裂因子 (Mff) を介して心筋における LD 形成を制御し、心機能障害などの病態形成に関与する可能性が示された (*Cardiovasc. Res.* 2020)。一方で、metabolic dysfunction associated steatohepatitis (MASH) の発症起点である肝細胞の LD 形成において、ミトコンドリア分裂因子の役割は不明である。我々は、肝細胞特異的 Mff 欠損 (KO) マウスの解析により、ミトコンドリア分裂不全マウス

では、肝細胞における ER ストレス亢進と脂肪酸代謝障害を認め、肝細胞の LD が過剰に蓄積し MASH 発症に寄与することを明らかにした (Takeichi Y, et al. *Diabetologia* 2021). 以上より、ミトコンドリア分裂阻害は肝臓における DL の形態変化を制御し MASH 発症へ影響を与えるのではないかと考えた。本研究の目的は、ミトコンドリア分裂が肝細胞の DL 形成に与える影響を評価し、MASH の脂肪蓄積機序を明らかにすることである。

【方法と結果】

ミトコンドリア分裂阻害による DL 形態評価 (1) *in vivo*: 高脂肪食負荷コントロール (CONT), KO マウスの肝臓における DL サイズを電子顕微鏡で解析すると、MASH 所見を呈した KO マウスでは、肝細胞内 LD が有意に大型化していた。(2) *ex vivo*: 初代培養肝細胞 (PH) にミトコンドリア分裂刺激であるグルコース (25mM) / オレイン酸 (300 μ M) 処理を行い、LipidTOXTM にて DL を蛍光染色し共焦点顕微鏡を用いて DL サイズを解析すると、いずれの刺激でも、CONT マウスでは小型化した DL が増加したのに対し、KO マウスでは DL が大型化していた。更に NASH を発症した KO マウスではオートファジー制御に関わる PLIN2 の遺伝子発現が増加し、LD 成熟に関与する CIDEC やミトコンドリアと LD のテザリングに作用する ACSL1 の遺伝子発現が減少していた。

【考察】

Mff を介したミトコンドリア分裂阻害は、肝細胞における LD 形成あるいは分解など LD サイズの制御に関与する可能性が示された。

摂食時の正常な腸管免疫応答を維持する新規肥満治療の検討

戸田 郷太郎

(東京大学医学部附属病院)

【目的】

免疫細胞の食後の反応が肥満時に破綻するメカニズムを検討するため、門脈内代謝物が免疫細胞を介して代謝機能に及ぼす影響を解析した。

【方法】

短鎖脂肪酸の一つである酪酸を培地に添加した初代培養マクロファージ、モデルマウスを用いて NF- κ B 活性化の各段階への影響、代謝機能の変化を解析した。

【結果】

小腸パイエル板での Bulk RNA-seq による遺伝子発現の検討で食後、Hsp70 の発現が増加し、scRNA-seq では骨髓系細胞、B 細胞、T 細胞で食後の発現増加が確認された。発現変化が見られる遺伝子の転写開始点近傍のモチーフ解析では NF- κ B, Fos:Jun など急性期応答を促進すると考えられる転写因子に対応するモチーフが複数の遺伝子で共通していた。RT-PCR で同様のサンプルを解析すると、IL-1 β , IL-10 などいずれも NF- κ B により発現誘導される因子の発現が増強していた。酪酸の存在下で、食後に増強するシグナルである LPS, インスリン刺激下で I κ B α の RNA 発現は減少しない一方で蛋白量が減少したことから同蛋白の分解が促進されていると考えられた。同様の条件で NF- κ B p65 の核内移行は減少したがインスリンによる p65 リン酸化、核内蛋白の増加は保たれた。I κ B α と共免疫沈降される p65 は酪酸の作用下で増加した。Cre-loxP システムによる Hdac2 欠損下でも同様の変化が見られ、高脂肪食摂取下で食後の高インスリンが改善した。DXA 法による測定で体脂肪率が低下し、MRI で内臓脂肪量が減少し肝脂肪が減少傾向にあり、この代謝変化を説明すると思われた。

【考察】

NF- κ B の活性化は肥満状態で障害される、腸管免疫の正常な応答と考えられた。肥満状態では短鎖脂肪酸により促進される I κ B α 蛋白の分解が低下し、複数シグナルによる相加的な NF- κ B 活性化が障害されることにより免疫細胞の機能異常をきたす可能性がある。Hdac2 の抑制は複数シグナルによる NF- κ B 活性化を維持し、異所性脂肪蓄積を抑制することにより食後のインスリン抵抗性を緩和すると思われた。

ヒト iPS 細胞レポーター株を用いた新生児糖尿病原因遺伝子 *RFX6* の膵・腸管発生成熟機構に関する役割の解明

中村 聡 宏

(京都大学)

【背景・目的】

RFX6 は膵・腸管形成不全を伴う新生児糖尿病を呈する Mitchell-Riley 症候群 (MRS) の原因遺伝子であり、若年発症成人型糖尿病家系での遺伝子変異の報告や膵β細胞でのインスリン分泌調節への関与、また、腸管内分泌細胞である K 細胞での発現を示す報告もある。本研究は、内分泌臓器発生分化、また、分化後の膵・腸管を含めた内分泌細胞における *RFX6* を含めた転写因子発現調節機構及び機能解明を目的としている。

【方法】

RFX6 ヒト iPS 細胞ノックインレポーター株 *RFX6*^{+/eGFP} 及び *RFX6*^{eGFP /eGFP} ノックイン・ノックアウト株を樹立、分化誘導を行った。また、ヒト膵島と幹細胞由来膵島様細胞のトランスクリプトームの比較、また、ヒト小腸上皮細胞と、腸管内分泌細胞のプロファイルを含有する腸管オルガノイドのトランスクリプトームとの比較をデータベースを用いて行った。

【結果・考察】

プロファイリングの比較と誘導法、関連する転写因子との関係性について追加的に検討を行い、現在の人工誘導内分泌細胞の成熟性に関する解析を行っている。現在 1 型糖尿病に対しての幹細胞由来細胞移植が臨床フェーズに入り、2 型糖尿病において GLP-1 作動薬が多くの症例に使用されている中で、膵・腸管を含めた内分泌細胞の発生分化、その分泌機構に関するより詳細な理解が求められている。

【文献、発表】

1. 中村聡宏, 藤倉純二, 伊藤遼, 境内大和, 矢部大介. 第 68 回日本糖尿病学会年次学術集会 新生児糖尿病原因遺伝子 *RFX6* の初期内胚葉パターンニング制御機構の解明 2025 年 5 月 30 日.
2. 中村聡宏, 藤倉純二. 糖尿病治療の選択肢 膵臓移

植・膵島移植. 内科. 2024;133 (5):1100-1105.

3. 中村聡宏, 藤倉純二. 1 型糖尿病への再生医療 - 現在地と将来展望, 移植新章への幕開け - 2025. In press
4. Nakamura, T., Fujikura, J., Ito, R., Keidai, Y., & Inagaki, N. (2024). Human RFX6 regulates endoderm patterning at the primitive gut tube stage. *PNAS nexus*, 3(1), pga001.
5. Motohashi K, Murakami T, Otani D, Nakamura T, Kato T, Seguchi O, Ogura M, Yabe D, Inagaki N. Decreased β-cell function in a case with Becker muscular dystrophy accompanied by post-transplant diabetes. *Endocrinol Diabetes Metab Case Rep*. 2025 Aug 13;2025(3):e250038.

骨格筋代謝障害に対する内因性 AMPK 活性化物質 AICARP の役割の解明

中村 慎太郎

(九州大学病院 内分泌代謝・糖尿病内科)

【目的】

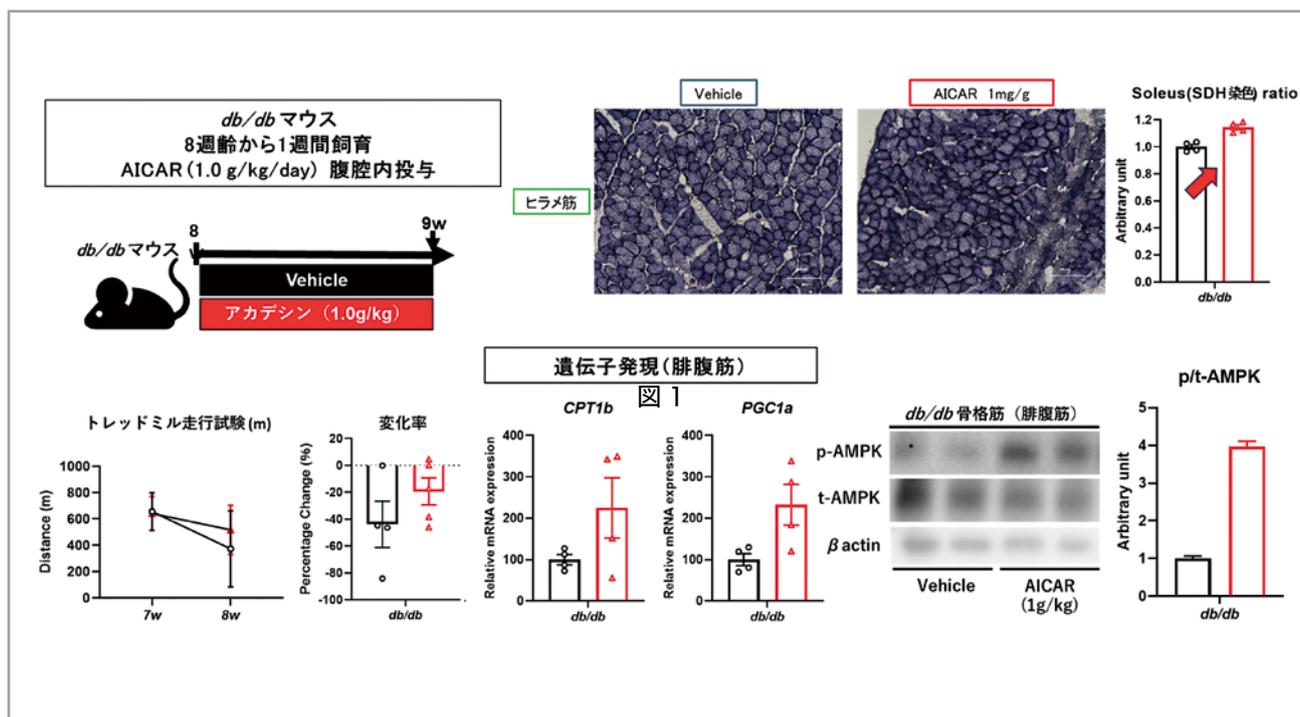
全身投与による AICAR (5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide) の効果を検討し、AMPK 活性化を介した骨格筋代謝改善が糖尿病マウスの運動機能に与える影響を明らかにする。

【方法】

持久運動機能の低下が報告されている肥満糖尿病モデルマウス (*db/db* マウス) を用い、AICARP の骨格筋内濃度を上昇させ AMPK を活性化するとされる AICAR を 1 g/kg の用量で腹腔内投与した。投与後、血糖、体重、摂餌量、各組織重量 (骨格筋・肝臓・精巢上体脂肪) を測定し、運動機能は握力測定およびトレッドミル走行試験により評価した。加えて、ヒラメ筋および腓腹筋を回収し、遺伝子発現 (qPCR) および組織学的解析 (SDH 染色) を行った。

【結果】

AICAR 投与により、血糖や各組織重量に有意な変化は見られなかったが、摂餌量および体重は増加傾向を示した。運動機能に関しては、群間で有意差はなかったものの、トレッドミル走行距離の低下割合は AICAR 群



で抑制されていた。分子生物学的解析では、腓腹筋において AMPK 標的遺伝子である CPT1b および PGC1α の発現が上昇し、ウエスタンブロッティング検査では AMPK のリン酸化が亢進していた。また、ヒラメ筋では SDH 染色によるミトコンドリア活性が増加傾向を示した。

【考察】

AICAR の全身投与により、*db/db* マウスの持久運動機能低下の進行が抑制される可能性が示唆された。この効果は、骨格筋における AMPK 活性化を介したミトコンドリア機能の改善と関連していると考えられる。一方で、体重増加および摂餌量の増加が確認されており、これが持久運動機能の改善効果を部分的に相殺した可能性がある。特に、視床下部弓状核の AMPK 活性化による食欲亢進が関与している可能性があり、AICAR の中枢作用にも留意する必要がある。

CD206⁺ M2I Like Macrophage-Derived Signals Regulate Adipocyte Progenitor Fate via C1q and Wnt Signaling

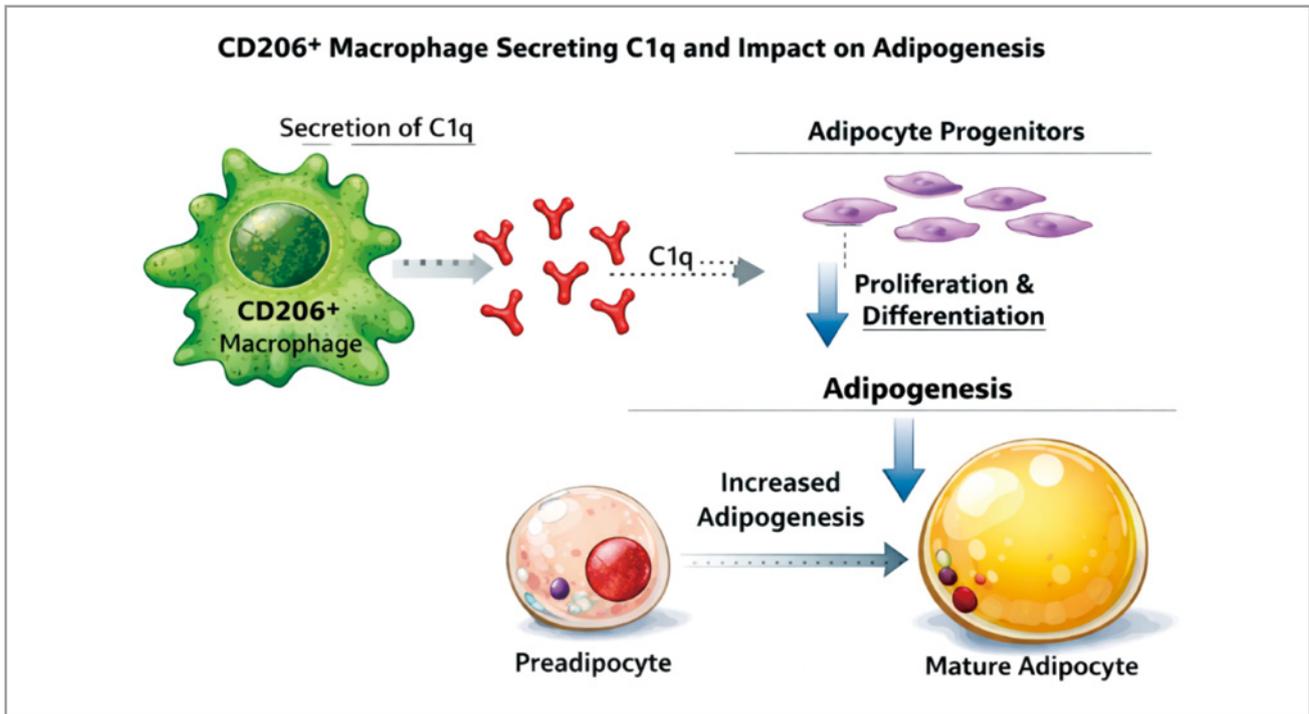
Allah Nawaz^{1,2}, Kazuyuki Tobe¹

(¹ University of Toyama, Toyama, Japan, ² Joslin Diabetes Center, Harvard Medical School, Boston, MA, USA.)

Adipose tissue contains various types of cells beyond fat cells, including preadipocytes, endothelial cells, fibroblasts, exosomes, miRNAs, and immune cells. Among immune cells, macrophages play a crucial role in energy homeostasis and inflammation (Chait & den Hartigh, 2020; Nawaz et al., 2023; Samovski et al., 2025; Thomou et al., 2017). In lean white adipose tissue (WAT), most resident macrophages display an anti-inflammatory M2-like phenotype, whereas obesity recruits pro-inflammatory M1-like macrophages that drive chronic low-grade inflammation and insulin resistance. CD206 (mannose receptor 1), Arg1, and IL-10 are well-characterized markers of M2-like macrophages, and Cd11c, IL-6, TNF-α, and MCP-1 are markers of M1-like macrophages. We previously reported that the number of M1-like macrophages in

eWAT increased dramatically during the progression of obesity, thereby contributing to the development of insulin resistance by secreting various inflammatory cytokines (Fujisaka et al., 2009). We also showed that the majority of adipose tissue macrophages in lean mice are M2 types, the physiological roles of which are little known. We hypothesized that CD206 is selectively expressed by tissue-resident macrophages and play a critical role in the regulation of whole body metabolism. This provided an opportunity to elucidate the physiological role of M2-like macrophages in vivo using mouse model. We developed a transgenic model to deplete CD206⁺ M2-like macrophages and observed that depleting these cells improved glucose metabolism (Igarashi et al., 2018; Nawaz et al., 2017; Nawaz et al., 2022; Nawaz et al., 2023). We showed that M2-like macrophages maintain adipose tissue homeostasis by releasing TGF- β 1, which restrains adipocyte progenitor proliferation. Conditional depletion of CD206⁺ M2-like macrophages downregulated TGF- β signaling in adipose tissue and increased the number of smaller adipocytes. These mice exhibited greater proliferation and differentiation of APs, leading to improved systemic insulin sensitivity. Thus, CD206/TGF- β signaling helps tune the balance between AP quiescence and proliferation to maintain adipose tissue size and insulin sensitivity. Because Wnt signaling is a central regulator of adipocyte progenitor proliferation and differentiation, we investigated whether CD206⁺ M2-like macrophage depletion affects Wnt signaling. Our initial data showed that CD206⁺ M2-like macrophages express high levels of C1q, an extracellular ligand that activates canonical Wnt signaling, and that depletion of CD206⁺ M2-like macrophage reduces Wnt activity. Because Wnt5a and other ligands inhibit preadipocyte differentiation, a Wnt-rich niche regulated by CD206⁺ M2-like macrophages could keep APs in a quiescent state and favor the formation of larger,

insulin-resistant adipocytes. Depletion of CD206⁺ M2-like macrophage numbers would therefore decrease Wnt signaling (through loss of C1q and Wnt ligands), release Wnt-mediated inhibition of adipogenesis, and promote the proliferation of beige and white adipocyte progenitors. This mechanistic model integrates the observed improvements in insulin sensitivity after CD206⁺ M2-like macrophage depletion with known roles of Wnt ligands in progenitor biology and macrophage polarization. In this study, we employed CD206DTR mice to study Wnt signaling. We harvested eWAT from 12-14 week old B6/J mice and separated it into adipocyte and stromal vascular fraction (SVF), and isolated M1 and M2 macrophages using flow cytometry from SVF, and sorted cells were then subjected for gene expression analysis using real-time qPCR analysis. The gene expression study of these fractions showed that complement C1q is predominantly high in M2 macrophages. This led us to hypothesize that M2 macrophages are a primary source of C1q family genes, which are downstream in Wnt signaling. We then investigated whether the depletion of M2 macrophages (CD206) would impact C1q family gene expression. To do this, we injected CD206DTR mice with diphtheria toxin (DT) to specifically deplete CD206⁺ M2-like macrophages. Gene expression analysis of eWAT from DT-treated CD206DTR mice revealed that C1q family genes were decreased in eWAT of CD206⁺ M2-like macrophage depleted mice. These results suggest that the depletion of CD206⁺ M2-like macrophages may play a significant role in downregulating Wnt signaling. Overall, we demonstrated that C1q family genes are expressed in M2 macrophages and depletion of CD206⁺ M2-like macrophages reduces their expression levels. In this model, we propose that Wnt ligands and C1q derived from CD206⁺ M2-like macrophages maintain adipocyte progenitors in a quiescent state and promote the formation of larger,



insulin-resistant adipocytes. Accordingly, depletion of CD206⁺ M2-like macrophages reduces Wnt signaling, thereby permitting white and beige adipocyte progenitors to proliferate and differentiate, resulting in generation of smaller adipocytes and improved insulin sensitivity. Further studies are needed to test whether pharmacological or genetic inhibition of Wnt signaling in CD206⁺ M2-like macrophages abolishes the metabolic benefits of macrophage depletion, or whether restoration of Wnt activity reverses these benefits, thereby establishing Wnt signaling as a key mediator of CD206⁺ macrophage-dependent metabolic regulation.

【References】

1. Chait, A., & den Hartigh, L. J. (2020). Adipose Tissue Distribution, Inflammation and Its Metabolic Consequences, Including Diabetes and Cardiovascular Disease. *Front Cardiovasc Med*, 7, 22. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.00022>
2. Fujisaka, S., Usui, I., Bukhari, A., Ikutani, M., Oya, T., Kanatani, Y., Tsuneyama, K., Nagai, Y., Takatsu, K., Urakaze, M., Kobayashi, M., & Tobe, K. (2009). Regulatory mechanism for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice. *Diabetes*, 58, 2574-2582.
3. Igarashi, Y., Nawaz, A., Kado, T., Bilal, M., Kuwano, T., Yamamoto, S., Sasahara, M., Jiuxiang, X., Inujima, A., Koizumi, K., Imura, J., Shibahara, N., Usui, I., Fujisaka, S., & Tobe, K. (2018). Partial depletion of CD206-positive M2-like macrophages induces proliferation of beige progenitors and enhances browning after cold stimulation. *Scientific Reports*, 8(1), 14567. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32803-6>
4. Nawaz, A., Aminuddin, A., Kado, T., Takikawa, A., Yamamoto, S., Tsuneyama, K., Igarashi, Y., Ikutani, M., Nishida, Y., Nagai, Y., Takatsu, K., Imura, J., Sasahara, M., Okazaki, Y., Ueki, K., Okamura, T., Tokuyama, K., Ando, A., Matsumoto, M., . . . Tobe, K. (2017). CD206(+) M2-like macrophages regulate systemic glucose metabolism by inhibiting proliferation of adipocyte progenitors. *Nat Commun*, 8(1), 286. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00231-1>
5. Nawaz, A., Bilal, M., Fujisaka, S., Kado, T., Aslam, M. R., Ahmed, S., Okabe, K., Igarashi, Y., Watanabe, Y., Kuwano, T., Tsuneyama, K., Nishimura, A., Nishida, Y., Yamamoto, S.,

- Sasahara, M., Imura, J., Mori, H., Matzuk, M. M., Kudo, F., . . . Tobe, K. (2022). Depletion of CD206+ M2-like macrophages induces fibro-adipogenic progenitors activation and muscle regeneration. *Nature Communications*, 13(1), 7058. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34191-y>
6. Nawaz, A., Fujisaka, S., Kado, T., Jeelani, I., & Tobe, K. (2023). Heterogeneity of adipose tissue-resident macrophages-beyond M1/M2 paradigm. *Diabetology International*, 14(2), 125-133. <https://doi.org/10.1007/s13340-023-00624-2>
7. Samovski, D., Smith, G. I., Palacios, H., Pietka, T., Fuchs, A., Patti, G. J., Nawaz, A., Kahn, C. R., & Klein, S. (2025). Effect of Marked Weight Loss on Adipose Tissue Biology in People With Obesity and Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. <https://doi.org/10.2337/dc24-2739>
8. Thomou, T., Mori, M. A., Dreyfuss, J. M., Konishi, M., Sakaguchi, M., Wolfrum, C., Rao, T. N., Winnay, J. N., Garcia-Martin, R., Grinspoon, S. K., Gorden, P., & Kahn, C. R. (2017). Adipose-derived circulating miRNAs regulate gene expression in other tissues. *Nature*, 542(7642), 450-455. <https://doi.org/10.1038/nature21365>

脂肪組織常在性マクロファージに着目した糖・脂質代謝恒常性維持機構の解明

西村 歩

(富山大学学術研究部教育研究推進系)

【背景】

インスリン抵抗性の主な原因は内臓脂肪組織の炎症であるとされ、その発症機構はMΦのphenotypeの変化で説明されてきた。MΦはM1・M2に大別され、非肥満の脂肪組織では抗炎症性のM2MΦ優位であり、肥満の脂肪組織では炎症性のM1MΦ優位である(*Front. Pharmacol.* 15, 1–6, 2024.)。非肥満状態から肥満状態へ変化する際に、炎症性phenotypeを示す骨髄由来の

M1MΦがCCR2依存的に脂肪組織へ誘導され、増加する(*J. Clin. Invest.*116(1):1115-124, 2006)というのが定説であった。しかし近年、Single-cell RNA-seqなど単一細胞を評価する技術の進歩により、MΦをM1/M2という二分的な枠組みに分類することは過度に単純化された見方であり、脂肪組織MΦは、実際には多様な表現型および機能的特性を有する亜集団から構成されることが明らかになりつつある。特に肥満においてはLipid-associated macrophage(LAMs)が増加することが特徴的とされ、LAMsの起源についても骨髄由来のMΦであることが広く受け入れられている(*Proc Natl Acad Sci U S A.*115(22):E5096-E5105, 2018)。一方で、非肥満時から脂肪組織に存在する組織常在性MΦが肥満に伴ってphenotypeを変化させるのかについては明らかになっていない。

【目的】

非肥満時から脂肪組織に存在する組織常在性MΦが肥満に伴ってどのようにphenotypeを変化させるのかを明らかにする。

【方法】

脂肪組織常在性MΦを蛍光標識可能なレポーターマウスを作製し、非肥満時に蛍光標識された脂肪組織常在性MΦが高脂肪食負荷に伴ってどのような変化をするのかについてSingle-nucleus RNA-seq(snRNA-seq)を用いて解析した。

【結果】

snRNA-seqを実施した。シーケンス後のデータをCell Rangerを用いてリードのアライメント、UMI集計、細胞ごとのカウントマトリクスを作成した。その後、Seuratを用いてフィルタリング、正規化、次元削減、クラスタリング、マーカー遺伝子同定などの解析を行った。遺伝子発現の特徴から細胞種アノテーションを行い、Adipocyte progenitor cells, Adipocytes, B cells, Endothelial cells, Lymphatic endothelial cells, Macrophages, Mesothelial cells, Smooth muscle cells, T cellsの9種類を同定した。特にマクロファージについては詳細なクラスタリング、発現変動遺伝子の検出、エンリッチメント解析を行った。詳細な解析を行い、論文化する予定である。

【文献】

T. Kado, A. Nishimura, K. Tobe, History and future perspectives of adipose tissue macrophage biology. *Front. Pharmacol.* **15**, 1–6 (2024).

新規レポーターマウスを用いた膵 α 細胞新生・分化機構の解明

氷室美和

(順天堂大学代謝内分泌内科学)
(University of California, San Francisco)

【目的・方法】

α 細胞分化を時間軸に沿って解析するため、レポーターコンストラクト eGFP-IRES-mRFP を proglucagon gene に挿入した“Gcg-Timer マウス”を作製した。本マウスでは、内分泌前駆細胞から分化したばかりの新生 α 細胞は緑色蛍光、より分化した α 細胞は緑色および赤色蛍光を呈する細胞として標識されるため、 α 細胞を経時的に観察できる。本マウスを用いて「 α 細胞がいつ・どこで生まれるのか？」を明らかにするとともに、 α 細胞新生・分化過程における遺伝子発現プロファイルの変化を解析する。

膵 α 細胞の経時変化を一細胞レベルで解析するため、Gcg-Timer マウス胎生 17.5 日膵を FACS で新生 α 細胞、より分化した α 細胞に Sorting し、scRNA-seq を行った。

【結果】

新生 α 細胞の一部には Gcg mRNA に加え、Ins1, Ins2, Sst mRNA が高発現しており、以前行った bulk RNA-seq における新生 α 細胞の結果と一致していた。擬時間解析では、Gcg mRNA 発現は擬時間経過の早期にピークに達した後に漸減した。軌道解析では、軌道上で新生 α 細胞とより分化した α 細胞が混在しており、最も擬時間軸上で成熟した位置にある箇所においても新生 α 細胞が存在した。以上の結果は、 β 細胞新生分化過程において Ins1 mRNA が徐々に増加し、分化の軌道で新生細胞と分化細胞が明確に分かれる結果と異なっていた¹⁾。

【考察】

Glucagon promoter を用いた本マウスの scRNA-seq

解析の結果、 β 細胞新生過程とは異なり、 α 細胞新生・分化過程は、Stochastic (at random) に生じ、その後不均質に進行する可能性が示唆された。

【文献】

1. Sasaki S et al. : Spatial and transcriptional heterogeneity of pancreatic beta cell neogenesis revealed by a time-resolved reporter system, *Diabetologia*. **65**: 811-818 (2022).

NFIA が褐色脂肪細胞分化を制御するメカニズム及び全身代謝への影響の解明

平池勇雄

(東京大学大学院医学系研究科 先進代謝病態学講座)

【背景】

褐色脂肪細胞は「エネルギー消費の促進」に基づく肥満や糖尿病の治療標的として期待される。我々は褐色脂肪細胞の分化と機能を制御する鍵因子 nuclear factor I-A (NFIA) を同定し解析してきた (Hiraiki Y, et al. *Nature Cell Biology* 2017, *PLoS Genetics* 2020, *iScience* 2022)。NFIA はミトコンドリアの活性化ならびにエネルギー消費の亢進作用と抗炎症作用の双方を介して肥満や糖尿病に保護的に作用する (Hiraiki Y, et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2023)。更に我々は台湾 biobank の解析から褐色脂肪細胞の機能を介して作用する肥満感受性 SNP である *FTO* 遺伝子近傍の rs1421085 と定期的な運動習慣の間に追跡期間中の体重増加に対する遺伝子環境相互作用を同定した (Hiraiki Y. et al. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2021)。更に UK Biobank のデータを用いて 2 型糖尿病の遺伝リスクと身体活動が糖尿病患者における心筋梗塞や脳卒中など心血管病の発症に対して及ぼす遺伝子環境相互作用について検討し、polygenic risk score が高値の糖尿病患者においては血糖管理の水準を調整した後においても身体活動による心血管イベントの保護的効果が失われることを明らかにした。なお身体活動は polygenic risk score の高低に関わらず 2 型糖尿病患者の全死亡を有意に抑制しており、この遺伝子環境相互

作用は心血管イベントに特異的と考えられた (Lee CL., Hiraike Y., et al. *European Journal of Preventive Cardiology* 2024).

【結果】

脂肪組織特異的な NFIA ノックアウトマウスの表現型解析ならびに NFIA 蛋白複合体の解析に継続して取り組むとともに、褐色脂肪細胞の分化ならびに機能に関して総説を公表した (Hiraike Y. *The Journal of Biochemistry* 2025). また UK Biobank および Taiwan Biobank のデータと機械学習を活用して遺伝因子、環境因子ならびにこれらの相互作用が糖尿病や心血管病などに及ぼす影響の解析に取り組んでいる (Lee CL., Hiraike Y., et al. **in revision**).

【今後の展望】

引き続き褐色脂肪細胞の分子生物学的なメカニズム解析と大規模バイオバンクの統計解析を両輪として進めるとともに、両者を統合することによって生活習慣病領域における精密医療の実現を目指した研究を進める所存である。

【文献 (抜粋)】

1. Hiraike Y*. Transcriptional control of brown adipocyte differentiation and function by NFIA: recent perspectives on deciphering metabolic diseases. *The Journal of Biochemistry* 2025;178(3):147-159.
* Corresponding author
2. GBD 2023 Vaccine Coverage Collaborators. Global, regional, and national trends in routine childhood vaccination coverage from 1980 to 2023 with forecasts to 2030: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2023. *The Lancet* 2025;406(10500):235-260.
3. GBD 2021 Japan Collaborators. Three decades of population health changes in Japan, 1990-2021: a subnational analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *The Lancet Public Health* 2025;10(4):e321-e332.
4. GBD 2021 Adult BMI Collaborators. Global, regional, and national prevalence of adult overweight and obesity, 1990-2021, with forecasts

to 2050: a forecasting study for the Global Burden of Disease Study 2021. *The Lancet* 2025;405(10481):813-838.

5. GBD 2021 Adolescent BMI Collaborators. Global, regional, and national prevalence of child and adolescent overweight and obesity, 1990-2021, with forecasts to 2050: a forecasting study for the Global Burden of Disease Study 2021. *The Lancet* 2025;405(10481):785-812.

肥満によるインスリン抵抗性発症における M2 マクロファージ上の CD206 表面抗原の役割

The role of CD206 surface antigens on M2 macrophages in the development of insulin resistance due to obesity.

Bilal Muhammad, Kazuyuki Tobe

(University of Toyama, Toyama, Japan)

Adipose tissue (AT) metabolism involves coordinating various cells and cellular processes to regulate energy storage, release, and overall metabolic homeostasis. AT includes adipocytes, a stromal vascular fraction (SVF), and an extracellular matrix. Excess nutrients are associated with an expansion of white adipose tissue (WAT), leading to AT dysfunction, insulin resistance, type 2 diabetes, and other metabolic disorders. An excess of energy storage associated with obesity dysregulates the physiological functions of AT, the liver, and skeletal muscle. Previously, we reported that subcutaneous inguinal WAT expands through cellular hyperplasia improved metabolism and reduced inflammation compared to visceral epididymal WAT under high-fat-fed (HFD) conditions (Bilal M. et al. 2021). Obesity is a key driver of macrophage infiltration, initiation of chronic inflammatory conditions, disruption of WAT function, and development of insulin resistance (Chakarov S. et al. 2022; Nance S.A. et al. 2022). CD206 M2-like macrophages were believed to maintain insulin

sensitivity. In contrast, partial depletion of CD206 M2-like macrophages improves glucose metabolism and insulin sensitivity through downregulation of Tgf- β signaling (Nawaz et al., 2017). Tgf- β signaling induces hibernation of tissue stem cells, such as hematopoietic and melanocyte stem cells. Among various cytokines, the Tgf- β 1, a cytokine highly expressed in CD206 M2-like macrophages and associated with AT expansion and fibrosis. However, it remains unclear the role of Tgf- β 1 in context metabolism. To investigate the role of CD206 M2-derived Tgf- β 1 in metabolism, we utilized a CD206CreERT2; Tgf- β 1 f/f mouse model in which the Tgf- β 1 gene was selectively deleted in CD206 M2-like macrophages following tamoxifen administration and generated M2-Tgf- β 1 KO mice. First, we investigated in lean states, our data showed lack of CD206 M2-like macrophages derived Tgf- β 1 gene improved glucose metabolism and insulin sensitivity by enhancing adipogenesis via hyperplasia. The Tgf- β 1 gene, specifically from CD206 M2-like macrophages, deletion stimulated APs' proliferation and differentiation, leading to the generation of smaller mature adipocytes, therefore improving insulin sensitivity and glucose metabolism (Phoung & Bilal et al. 2025). Next, we evaluate the role of CD206 M2-derived Tgf- β 1 under obese conditions. In consistent with our NC data, I found M2-Tgf- β 1 KO mice improved glucose and insulin tolerance in diet-induced obese states. My data further showed that Tgf- β 1 KO mice have a higher frequency distribution of smaller adipocytes, which was associated with an increased ratio of committed *Dpp4*⁺/*Icam1*⁺ pre-adipocytes than control mice. Consistently, M2-TGF- β 1 KO mice also showed elevated M2 macrophage marker genes *Cd163* and *Mgl2*. Moreover, the deletion of the macrophage-specific TGF- β 1 reduces adipose tissue fibrosis (unpublished data). Recently, we reported that depletion of CD206 M2-like macrophages, or targeted deletion of their TGF- β 1 gene, promotes myogenesis and facilitates skeletal muscle regeneration. Our

findings demonstrate that removal of CD206 M2-like macrophages activates fibro/adipogenic progenitors (FAPs), which in turn secrete follistatin, a potent myogenic factor, thereby accelerating the muscle recovery process (Nawaz & Bilal et al. 2022).

Expectedly, I found higher expression of the adiponectin (AdipoQ) gene in AT of Tgf- β 1 KO mice. I hypothesized that higher expression of AT-derived AdipoQ may improve skeletal muscle function through regulation of AMPK signaling pathway. To evaluate my hypothesis, I administered TAM at the age of 6 weeks, then put mice on HFD for 12 weeks. My data showed that M2-Tgf- β 1 KO mice were insulin sensitive and improved glucose metabolism. Surprisingly, I found that M2-Tgf- β 1 KO mice enhanced exercise tolerance and grip hanging test compared to control mice under obese conditions. I also found that there is increased AMPK phosphorylation in M2-Tgf- β 1 KO mice. Mechanistically, deletion of Tgf- β 1 gene specifically in CD206⁺ M2-like macrophages alleviates obesity-associated skeletal muscle dysfunction, likely through two distinct mechanisms. First, it enhances myogenesis by stimulating FAPs-mediated expression of *Fst* and *Fstl1*, thereby upregulating genes involved in skeletal muscle regeneration. Second, it promotes adipocyte production and secretion of adiponectin into the circulation, which in turn improves mitochondrial function via activation of the AMPK/SIRT1/PGC1 α signaling pathway (under revision JCSM).

【References】

1. Bilal, M., Nawaz, A., Kado, T., Aslam, M.R., Igarashi, Y., Nishimura, A., et al., 2021. Fate of adipocyte progenitors during adipogenesis in mice fed a high-fat diet. *Molecular Metabolism* 54: 101328.
2. Chakarov, S., C. Blériot, and F. Ginhoux, 2022. Role of adipose tissue macrophages in obesity-related disorders. *Journal of Experimental Medicine* 219(7): e20211948.
3. Nance, S.A., L. Muir, and C. Lumeng., 2022.

Adipose tissue macrophages: regulators of adipose tissue immunometabolism during obesity. *Molecular Metabolism* 66: 101642.

4. Nawaz, A., Aminuddin, A., Kado, T., Takikawa, A., Yamamoto, S., Tsuneyama, K., et al., 2017. CD206⁺ M2-like macrophages regulate systemic glucose metabolism by inhibiting proliferation of adipocyte progenitors. *Nature Communications* 8(1): 286.
5. Phuong NQ, Bilal M, Nawaz A, Anh LD, Memoona, Aslam MR, Khalid S, Kado T, Watanabe Y, Nishimura A, Igarashi Y, Okabe K, Hirabayashi K, Yamamoto S, Nakagawa T, Mori H, Usui I, Fujisaka S, Hayashi R, Tobe K. Role of transforming growth factor- β 1 in regulating adipocyte progenitors. *Sci Rep.* 2025 Jan 17;15(1):941. doi: 10.1038/s41598-024-81917-7.
6. Nawaz A, Bilal M, Fujisaka S, Kado T, Aslam MR, Ahmed S, Okabe K, Igarashi Y, Watanabe Y, Kuwano T, Tsuneyama K, Nishimura A, Nishida Y, Yamamoto S, Sasahara M, Imura J, Mori H, Matzuk MM, Kudo F, Manabe I, Uezumi A, Nakagawa T, Oishi Y, Tobe K. Depletion of CD206⁺ M2-like macrophages induces fibro-adipogenic progenitors activation and muscle regeneration. *Nat Commun.* 2022 Nov 21;13(1):7058. doi: 10.1038/s41467-022-34191-y.

間葉系幹細胞における質的変化とエクソソームを介した細胞老化調節機構

堀谷 恵美

(大阪大学大学院医学系研究科 内分泌・代謝内科学)

【背景・目的】

我々は、NOD マウスへのヒト脂肪由来間葉系幹細胞 (hAD-MSC) の投与により、血中エクソソーム (Exo) の増加を伴い、抗 PD-L1 抗体投与による糖尿病発症が有意に抑制されることを報告した。また、アディポネクチン (APN) が T-cadherin (T-cad) を介して Exo 産生・分泌を促進し臓器保護に寄与すること、さらに移

植 MSC における T-cad を介した Exo 産生が心保護作用をもたらすことを報告した。近年、Exo による細胞内有害物排出が細胞老化への保護的に作用することが報告されている。本研究では、Exo 産生を含む MSC の質的変化と代謝・細胞老化調節、そしてそれらと APN/T-cad/Exo 経路の関連について明らかにする。

【方法】

間葉系細胞特異的に Exo 合成に関与する ALIX をノックアウトした (PDGFR α -ALIX KO) マウスとそのコントロールマウスより脂肪組織由来 MSC を採取し、RNA-seq 及び脂肪細胞への分化能を比較検討した。また、それら MSC に Doxorubicin (Dox) 処置にて細胞老化を誘導し、DNA 障害のマーカーである γ H2AX の変化を比較検討した。F2 細胞で siRNA により T-cad をノックダウン (KD) し、Dox 処置による細胞老化誘導で DNA 障害の変化を検討した。

【結果と展望】

PDGFR α -ALIX KO マウス由来の MSC はコントロールと比較し、炎症関連遺伝子の発現が有意に上昇していた。脂肪細胞への分化誘導を行うと、Oil red O 染色で軽度ではあるが有意な脂肪滴蓄積低下を認めた。また、KO マウス由来の MSC において、Dox 処置による γ H2AX の発現がさらに増加した。以上より MSC での Exo 産生が MSC の恒常性維持に重要であると考えられた。F2 細胞への Dox 処置では、T-cad の KD により γ H2AX の発現が増加する傾向を認め、APN/T-cad/Exo 経路による細胞老化への保護的作用が示唆された。今後老化関連遺伝子など老化表現型の変化についての検討を進める予定である。

【結語】

MSC の Exo 産生が MSC 自体の恒常性維持に重要であること、APN/T-cad/Exo 経路が細胞老化抑制に関与することが示唆された。これらの変化が MSC の治療効果と関連する可能性があり、今後、細胞内恒常性維持および細胞老化抑制機構の解明を進める。

腸管の老化細胞除去における耐糖能改善作用の検討

三浦雅臣

(東京大学医学部附属病院 糖尿病・代謝内科)

【目的】

これまでに行ったマウス腸管上皮幹細胞の RNA シークエンスの結果から、加齢に伴って最も変化する幹細胞の遺伝子は、細胞周期に関する遺伝子群であることが明らかとなった。細胞老化が腸管上皮細胞の老化を規定する重要な因子であると考え、腸管での細胞老化を抑制/促進するモデルマウスを作製した。①それらのマウスにおける糖吸収のメカニズム解明、②加齢における腸管上皮の細胞老化の検証・腸管における細胞老化を促進させるような病態の解明、③それらの解析から得られた結果を応用して耐糖能障害を改善させることを目的として研究を行った。そして昨年引き続き、腸管の細胞老化抑制のモデルマウスにおける RNA シークエンスを行い、細胞老化の抑制/促進における糖吸収のメカニズムについて検討することとした。

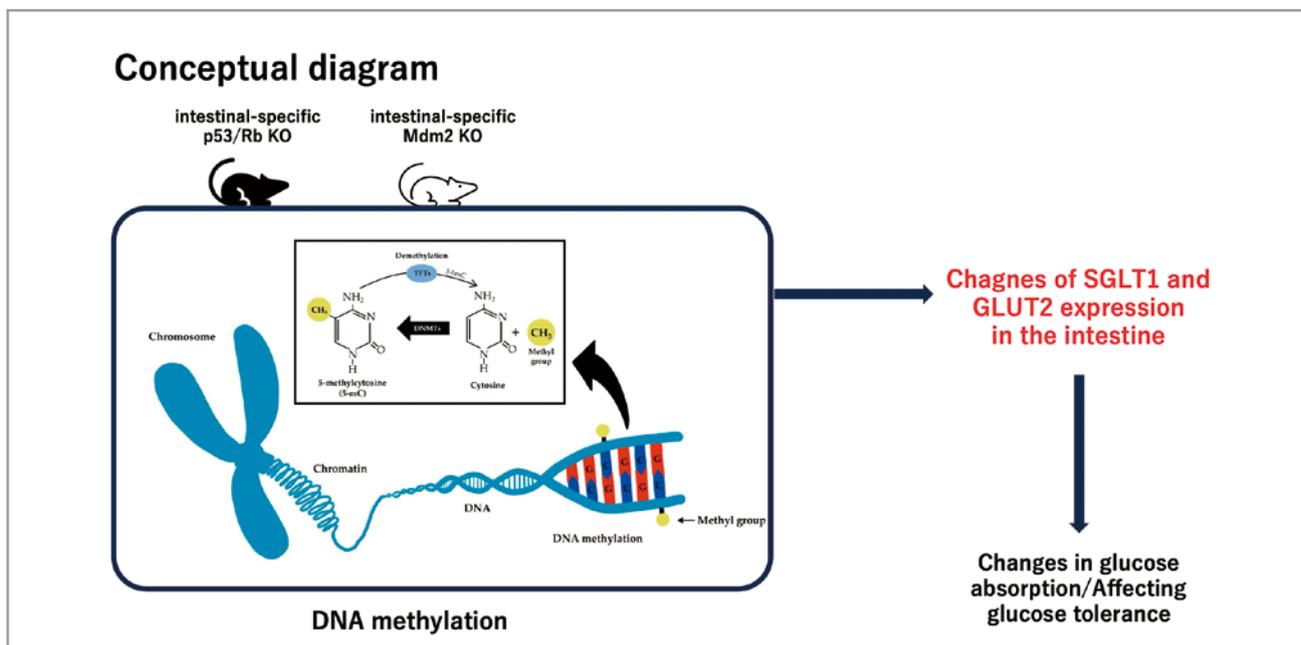
【方法】

腸管での細胞老化を抑制するモデルとして、Villin cre-ERT2 floxed p53 (腸管上皮特異的 p53KO) マウス、Villin cre-ERT2 floxed Rb (腸管上皮特異的 RbKO) マウス、腸管での細胞老化を促進するモデルとして Villin cre-ERT2 floxed Mdm2 (腸管上皮特異的 Mdm2KO)

マウスを作成し、糖・脂質の負荷試験を行った。また、腸管オルガノイドを用いて単層上皮を作成し、細胞周期関連遺伝子を変化させた際の糖・脂質吸収に関わる遺伝子変化を検証した。また、in vivo で細胞老化を検出する p16 cre-ERT2 マウスと、cre 活性に反応して tdTomato 蛍光を発するマウスとを交配させることで、p16 陽性細胞を検出できるマウス (= 老化を検出できるマウス) を作成し、高脂肪食やストレプトゾトシン (STZ) を投与したマウスにおいて、腸管の老化の蓄積があるかを確認した。腸管上皮特異的 p53KO マウスおよび RbKO マウスの腸管組織を採取し、コントロールマウスと比較してどのように RNA 発現が異なるか、RNA シークエンスを行って網羅的に解析した。

【結果】

腸管の老化が抑制されたマウス (腸管上皮特異的 p53KO マウス, RbKO マウス) では耐糖能改善を認め、逆に腸管の老化が促進されたマウス (上皮特異的 Mdm2KO マウス) では耐糖能の悪化を認めた。一方で脂質吸収に変化は認められなかった。それぞれのマウスの腸上皮の RNA 解析では、SGLT1, GLUT2 といった糖吸収に関わる遺伝子の変化が認められた。また、腸管オルガノイドから作成した単層上皮において、Tamoxifen を用いて p53 あるいは Rb をノックダウンしたうえで単層上皮の RNA 発現を確認すると、in vivo での実験系と同様に SGLT1, GLUT2 の発現変化が認められた。上記方法で述べた p16 陽性細胞を検出でき



るマウスに高脂肪食・STZを投与して腸管の老化を確認すると、腸管上皮の陰窩、絨毛それぞれの領域において老化が認められる結果であった。また、腸管上皮特異的 p53KO マウス、RbKO マウスにおける RNA シークエンスを行い、共通して発現変化 (DEG) を認めたものを抽出したところ、Dnmt1, Uhrf1, PcnA といった、DNAメチル化に関わる遺伝子発現の亢進が認められた。メチル化酵素である Dnmt1 は、ヘミメチル化 DNA を基質とし新生 DNA 鎖にメチル基を付加する働きがあり、Dnmt1 の DNA メチル化部位への集積はヘミメチル化 DNA 結合タンパク質である Uhrf1 に依存して起こる。PcnA は DNA 複製の重要な調節因子であり、DNA ポリメラーゼの進行を制御するものと知られ、いずれの遺伝子も、転写の制御に重要な役割を果たしている。細胞の老化によって DNA メチル化状態が変化し、それによって糖吸収に関わる遺伝子の変化が起こる可能性があることが分かった。今後、DNA メチル化が糖吸収にどのように関わるか、さらに検討予定である。

【考察】

腸管の細胞老化において、糖吸収遺伝子が増加することで糖代謝に影響を与えている可能性が示唆され、そのメカニズムに DNA メチル化の関与の可能性が示唆された。p53 や Rb は、がん抑制遺伝子としても知られ、DNA メチル化にも関与していることが知られており、一般にがんにおいてはメチル化の低下が認められている。そのため、腸管特異的 p53KO マウスや RbKO マウスにおいてメチル化亢進が認められているのは合理的と考えられる。今後、具体的にどの部位にメチル化が生じているかなど、エピジェネティックな変化を追及していきたいと考えている。

新規代謝物を起点とした、褐色脂肪組織の分化制御機構の解明および糖尿病・肥満症へ治療応用

南野 寛人

(京都大学大学院医学研究科 糖尿病・内分泌・栄養内科学)

【目的】

我々は、これまでの研究で、代謝物：テトラヒドロピオブテリン (BH4) が、褐色脂肪組織 (Brown adipose

tissue: BAT) の分化に不可欠な因子であることを、遺伝子改変マウスや細胞実験系を用い明らかにし、代謝物レベルでの BAT 制御が生体内で重要であることを示してきた。しかし、詳細な制御機構や、BAT 分化に関与するその他の代謝物についての知見は非常に乏しいのが現状である。

本研究課題では、これまでに同定した、BAT 分化を制御する代謝物：BH4 の下流シグナルや代謝物を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

野生型マウス、BAT 分化障害を来す BH4 欠乏マウス (Hph-1)、ならびに BH4 の補充を行った BH4 欠乏マウス由来の BAT を採取し、RNA-seq を用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、BH4 欠乏下で遺伝子発現が大きく減損し、BH4 補充による回復する遺伝子群をパスウェイ解析により複数同定した。同定された一部の候補について詳細な実験を行うため、褐色脂肪細胞株を用いた *in vitro* の検討を行い、BH4 と各パスウェイの阻害薬の共投与実験を行った。結果、一部経路 (一酸化窒素 - グアニル酸シクラーゼ - cGMP など) が BH4 由来の褐色脂肪分化に大きく寄与することが明らかとなった。上記実験と並行し、上述の BAT 試料を用い、メタボローム解析を行い、網羅的な代謝物の挙動の変化を調査した。結果、種々の triglyceride の組成が BAT 分化の状態と関連すること、ならびにこれまで報告のない複数の BAT 分化障害と関連する候補代謝物を同定した。

【考察および今後の展開】

本年度の課題の遂行により、代謝物による BAT 分化に制御機構の一端が明らかになった。本研究では、メタボロミクスによる網羅的代謝物解析により、BAT 分化の状態と関連する候補代謝物を複数拾い上げている。これらの代謝物について、今後マウスなどの齧歯類に対して、BAT 分化が変動する様々な条件における候補代謝物の挙動を把握する。また、候補代謝物の生成し、マウスへの投与を行い、マウスのエネルギー代謝へ与える影響を詳細に検討する。さらに、その後ヒト応用への基盤構築を見据え、京都大学が保有するヒトにおいて BAT が同定可能な FDG-PET/CT を含む臨床データベースと照合しながら、ヒトでも同定可能な、BAT 制御に関与する

新規の代謝物探索も並行して行う予定である。

非侵襲的膵β細胞イメージング技術を用いた、膵β細胞量を標的とした糖尿病の予防・治療法の開発

村上隆亮

(京都大学医学部附属病院 糖尿病・内分泌・栄養内科)

【背景・目的】

膵島移植は1型糖尿病の有用な治療法である。しかし、移植後生存膵島量の維持・保護に関しては課題が多く、インスリン治療からの離脱の維持など長期成績の更なる向上には、移植後生存膵島量の非侵襲的評価法の確立が重要である。近年、我々は、¹¹¹Inインジウム(In)標識 exendin-4 プローブを用いた Single photon emission tomography(SPECT) による非侵襲的な膵β細胞量評価法を開発した。具体的には、Glucagon like-peptide-1(GLP-1) 受容体に特異的に結合する Exendin-4 を骨格とした放射性同位元素標識プローブを用いた非侵襲的膵β細胞イメージング技術を開発し、Positron emission tomography(PET) や SPECT での生体マウス膵描出、同法を用いた膵β細胞量の縦断的評価が可能であることを複数の糖尿病モデルマウスで示した。今年度は、1) 膵島皮下移植における collagen-gelatin sheet の効果検証への同法の応用を行った。また、2) 臨床にて同法を用いて膵β細胞由来腫瘍であるインスリノーマの描出・検出能を検証した。

【方法】

- 1) C57BL/6 マウスに同系統膵島 200 個を生体吸収可能な collagen-gelatin sheet を用いて血管誘導した部位に皮下移植し、¹¹¹In-exendin-4 SPECT/CT を撮像した。
- 2) 臨床的にインスリノーマが疑われた 12 例の低血糖症例に対し、[¹⁸F]FB(ePEG12)12exendin-4 (¹⁸F-exendin-4)PET/CT を撮像した。

【結果】

- 1) ¹¹¹In-exendin-4 SPECT/CT では生体吸収可能な collagen-gelatin sheet を用いた皮下移植膵島を非侵襲的に検出可能であった。
- 2) 12 例全例で膵内に有意な局所集積を認め、根治的手術が可能であった。全例で手術病理学的にもインス

リノーマであったことが証明された。

【結語】

- 1) ¹¹¹In-exendin-4 SPECT/CT を用いて非侵襲的に皮下移植後生存膵島の描出評価が可能であった。
- 2) ¹⁸F-exendin-4 PET/CT のインスリノーマに対する感度が高いことを臨床的に証明できた。

【文献】

- Emoto N, Anazawa T, Yamane K, Fujimoto N, Murakami T, Fujimoto H, Jialin C, Ishida S, Kurahashi K, Izuwa A, Su H, Inoguchi K, Tada S, Nagai K, Hatano E. A novel subcutaneous islet transplantation method using a bioabsorbable medical device to facilitate the creation of a highly vascularized transplantation site. *Cell Transplant*. 2025. In press.
- Murakami T, Yoshida H, Sakaki K, Otani D, Miyake KK, Shimizu Y, Fujimoto H, Yabe D, Nakamoto Y, Inagaki N. Qualitative and Quantitative Analyses of Noninvasive Diagnosis of Insulinoma Using [¹⁸F]FB(ePEG12)12-Exendin-4 PET/CT. *J Clin Endocrinol Metab*. 2025. In press.

うつ様行動制御遺伝子 USP46 によるエネルギー代謝制御に関する研究

村田知弥

(岐阜大学 高等研究院 One Medicine トランスレーショナルリサーチセンター)

【目的】

脱ユビキチン化酵素 USP46 は神経系に高発現し、*Usp46* 欠損マウスはうつ様行動をほとんど示さない。我々は培養細胞を用い、近位依存性ビオチンラベリング (BioID) によるタンパク質相互作用の解析を行い、USP46 がエネルギー代謝関連因子と相互作用することを見出した (*FEBS Open Bio* 2025)。本研究では、USP46 とエネルギー代謝の関連の解明を目指し、*Usp46* 欠損マウスの解析と USP46-BioID ノックイン (KI) マウスを用いた *in vivo* BioID を実施する。

【結果と考察】

成獣 USP46-BioID KI マウスを用いた USP46 の網羅的タンパク質間相互作用解析の結果、大脳皮質、海馬、小脳の3領域において共通する USP46 の近接タンパク質 32 種を同定した。海馬を用いた発現解析の結果、*Usp46* 欠損マウスにおける PLPP3 タンパクの発現低下を見出した。PLPP3 は細胞膜に局在するホスファターゼであり、Lysophosphatidic acid などのリゾリン脂質を代謝し、それらの受容体シグナルを調節することで細胞増殖・移動、血管新生、炎症応答制御など多様な経路に関与する。次にマウス由来 Neuro2a 細胞において、Bimolecular fluorescent complementation (BiFC) 解析により、USP46 と PLPP3 の相互作用の局在について検証した。USP46-VN (Venus N 末端断片) と PLPP3-VC (Venus C 末端断片) を共発現させたところ、USP46-PLPP3 相互作用により Venus が再構築され、細胞質の一部と細胞膜において蛍光が認められた。以上より、USP46 は脳において PLPP3 の発現調節を行い、脳におけるリゾリン脂質代謝に関与する可能性が考えられる。

【文献】

Murata K*, Haneishi N, Nakagawa R, Daitoku Y, Mizuno S. “A novel miniTurbo knock-in mouse reveals a protein interaction network of USP46 in the brain.” *Exp. Anim.* Online ahead of print. (2025)

*Corresponding author

肥満 2 型糖尿病に対する GIP のアゴニズム、アンタゴニズムの意義：新規脂肪鎖修飾型 GLP-1, GIP 関連ペプチドを用いた解析

安田 拓真

(京都大学大学院医学研究科 糖尿病・内分泌・栄養内科学)

【目的】

Glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) は薬理的濃度では体重減少作用を示す一方、生理学的濃度では肥満促進やインスリン抵抗性の増悪に関与することが報告されており、その二面性の分子機序は未解明である。近年、GIP 受容体 (GIPR) を標的とする

アゴニストやアンタゴニストが肥満 2 型糖尿病の新規治療薬として注目されている。本研究は、トリプトファン選択的脂肪鎖修飾技術を用いて半減期を延長した新規 GIPR アゴニストおよびアンタゴニストを作製し、肥満 2 型糖尿病モデルマウスにおける有用性を比較検討することを目的とした。

【方法】

GIP(1-30) 由来アゴニストおよび GIP(3-30) 由来アンタゴニストに、それぞれトリプトファン残基へのパルミチン酸修飾を行い脂肪鎖修飾ペプチドを作製した。in vitro では COS-7 細胞にヒト GIPR を一過性発現させた後、各ペプチドによる cAMP 産生量を ELISA で測定した。in vivo では C57BL/6 マウスに腹腔内投与し、経口ブドウ糖負荷試験 (OGTT) による血糖値・血漿インスリン値の評価および摂餌量の測定を行った。

【結果】

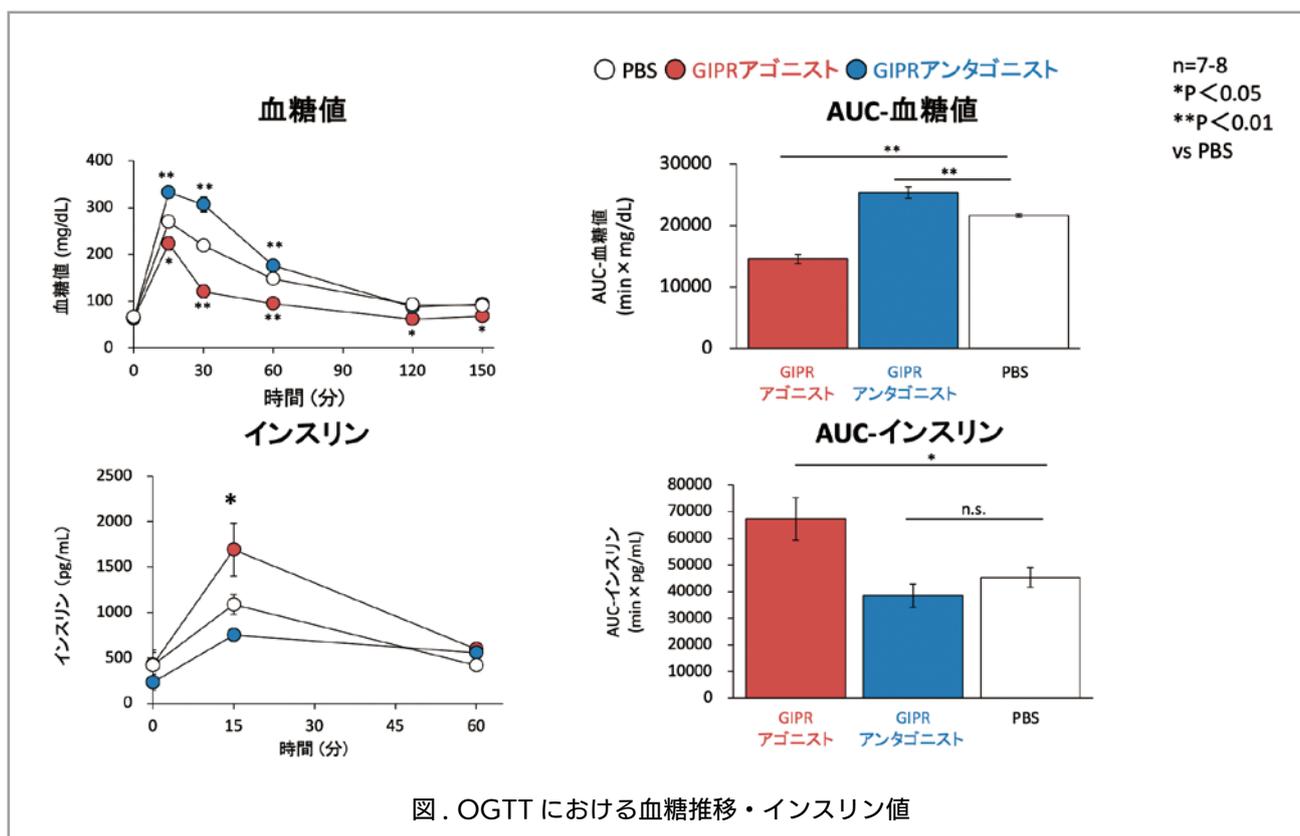
in vitro 解析において、脂肪鎖修飾 GIPR アゴニストは非修飾 GIP(1-30) と同等の cAMP 産生を誘導した。in vivo 解析では、アゴニスト投与群で OGTT 後の血糖 AUC 低下、インスリン AUC 上昇を認めた一方、アンタゴニスト投与群は血糖 AUC の上昇とインスリン分泌の抑制傾向を示した (図)。両群とも摂餌量に有意な変化はなかった。

【考察】

脂肪鎖修飾 GIPR アゴニストは受容体活性化と血糖低下作用を従来ペプチドと同等に維持しつつ半減期延長が期待される。一方、GIPR アンタゴニストは血糖上昇を示し、これまで報告されている生理学的濃度の GIP シグナル阻害による肥満・インスリン抵抗性改善効果とは異なる結果となった。今後はアンタゴニストによる cAMP・インスリン応答の詳細解析や、肥満モデルへの長期投与実験、中枢神経系への作用やエネルギー代謝への影響の評価が重要である。また、GLP-1 受容体アゴニストとの併用や受容体欠損モデルを用いた機序解明も、今後の治療戦略構築に有用と考えられる。

【文献】

Lu, X., Harada, N., Yasuda, T., Ikeguchi-Ogura, E., Kobayashi, D., Denda, M., Seno, Y., Yamane, S., Otaka, A. & Inagaki, N.: Effects of tryptophan-



selective lipidated GLP-1 peptides on the GLP-1 receptor in vitro and in vivo, *J. Endocrinol.*, 264, e240026 (2025).

Yasuda, T., Harada, N., Hatoko, T., Ichimura, A., Ikeguchi-Ogura, E., Murata, Y., Wada, N., Kiyobayashi, S., Yamane, S., Hirasawa, A. & Inagaki, N.: Inhibition of GPR120 signaling in intestine ameliorates insulin resistance and fatty liver under high-fat diet feeding, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 324, E449–E460 (2023).

Kobayashi, D., Kuraoka, E., Hayashi, J., Yasuda, T., Kohmura, Y., Denda, M., Harada, N., Inagaki, N. & Otake, A.: S-Protected cysteine sulfoxide-enabled tryptophan-selective modification with application to peptide lipidation, *ACS Med. Chem. Lett.*, 13, 1125–1130 (2022).

Innovative Research Group of Gastroenterology に関する研究助成 (IRGG)

慢性腸管炎症により生じる腸管マクロファージの持続的エピジェネティック変化が免疫機能へ及ぼす影響についての検討

小栗 典明

(杏林大学医学部消化器内科学)

【目的】

我々は、慢性炎症によって生じた腸管マクロファージ (Mφ) のエピジェネティック変化が、炎症寛解後も残存し、腸管免疫を炎症性に变化させ炎症性腸疾患の再燃に寄与する、という仮説を立てた。これまでに、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘導性慢性腸炎モデルマウスによる検討から、慢性腸炎により腸管 Mφ に DNA メチル化の変化が生じ、腸炎改善後もその一部が持続することを見出した。さらに、これらの腸管 Mφ では、TNF α 産生量が増加することを明らかにした。今回、DNA メチル化変化の TNF α 産生量増加への寄与を検討するため、腸管 Mφ におけるメチル化変化のパスウェイ解析およびマイクロアレイによる遺伝子発現解析を実施した。

【方法】

1.5% DSS を 5 日間飲水投与し、7 日間休薬を 3 回繰り返し、3 週間の腸炎回復期間を置く、DSS with recovery 群、その対照となる通常飲水のみを行う no-treatment (NT) 群を作成した (図 1)。腸管粘膜から CD11b 陽性細胞を Mφ として抽出し、メチル化可変領域に基づくパスウェイ解析およびマイクロアレイによる mRNA 遺伝子発現解析を実施した。



図 1. 本研究のマウス実験デザイン

【結果】

メチル化パスウェイ解析から、DSS with recovery 群では、NT with recovery 群と比較して、TNF α に関連する経路が有意に亢進し (図 2)、マイクロアレイによる遺伝子発現解析でも *Tnf* 遺伝子発現量が有意に増加した (図 3)。これらの結果は、以前の ELISA を用いた検討で、TNF α 産生量が DSS with recovery 群で上昇していた結果と矛盾しなかった。

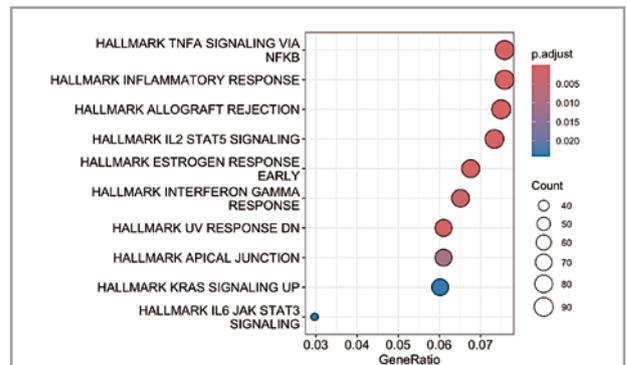


図 2. メチル化可変領域に基づくパスウェイ解析の dot plot

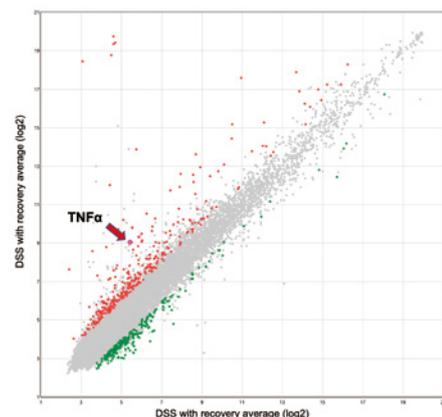


図 3. マイクロアレイによる遺伝子発現解析の比較散布図

【考察】

本研究により、炎症性サイトカインである TNF α 産生に関連する腸管 Mφ のメチル化変化は腸炎改善後も持続し、*Tnf* 遺伝子発現量増加、TNF α 産生増加につながることを示唆された。

cfDNA メチル化解析による炎症性腸疾患の新規分子マーカーの探索

清原 裕 貴

(慶應義塾大学医学部 内科学(消化器))

【目的】

炎症性腸疾患 (IBD) の疾患活動性のモニタリング方法として、近年便中カルプロテクチンや血清 leucine-rich alpha-2 glycoprotein, 尿中 Prostaglandin E-major urinary metabolite といった非侵襲的なバイオマーカーが次々と実用化されてきている。これらはいずれも、炎症の程度を反映するものであるが、炎症の局在を評価することは難しいという側面がある。クローン病に対する分子標的治療において、小腸病変の内視鏡的寛解の達成のためには、大腸病変単独の場合に比べてより高いトラフ濃度が必要である可能性が報告されており¹⁾、予後予測や治療戦略の構築の上で病変の局在を知ることが重要といえる。MR enterography や、腸管エコーなどの画像モダリティではこれら进行评估することが可能であるが、前者は前処置を必要とすること、後者は術者の技量により結果が大きく左右されるといった問題点もあり、繰り返し行うことを想定した場合には、より普遍的で簡便な手法の開発が望まれる。

近年がん研究の領域では Liquid biopsy の手法が注目されている。血液等の液体サンプルと主にゲノム解析技術を組み合わせることで残存腫瘍の検出などに応用されている。一方、炎症の存在下では組織傷害によって血液中に組織由来の DNA が流入する (cell free DNA; cfDNA) ことから、cfDNA をもとに組織傷害を推定できる可能性がある。さらに DNA のメチル化部位には組織特異性があることから、腸管組織に特異的な cfDNA を同定することで、疾患活動性を評価できる可能性もある。本研究は、Liquid biopsy を応用した IBD における新たなバイオマーカーの可能性を探索することを目的とする。

【方法】

本研究は、東京大学医科学研究所 (以下 医科研) ゲノム医科学分野、慶應義塾大学医学部 内科学 (消化器)、医科研附属病院 腫瘍総合内科ならびに東京大学

医学部附属病院 大腸・肛門外科の多施設共同研究として実施している。研究全体では、探索的な Discovery cohort と、得られた知見の再現性と治療介入による変化を検証する Validation cohort とに分けて行う。Discovery cohort では、活動期潰瘍性大腸炎患者、活動期クローン病患者、および健常人について、血漿約 5 mL より cfDNA を抽出し、エピゲノム解析としてメチル化のプロファイル解析を行う。なお、活動期の定義は、潰瘍性大腸炎では 2-items patient-reported outcome (PRO2) 1 点以上、クローン病では Harvey-Bradshaw index (HBI) 5 点以上とした²⁾。これにより、活動性を有する疾患毎における特徴を探索する。Validation Cohort では、上述の活動期の基準をみだし、新たな寛解導入療法を実施する潰瘍性大腸炎およびクローン病患者について、寛解導入療法前と、寛解導入療法開始 14 週後の 2 時点において、血漿約 5 mL を採取し、Discovery cohort と同様の解析を行う。Validation cohort においては、臨床的改善 (潰瘍性大腸炎: PRO2 50% 以上の減少, クローン病 HBI 3 点以上減少) との関連についても検討する。

【結果】

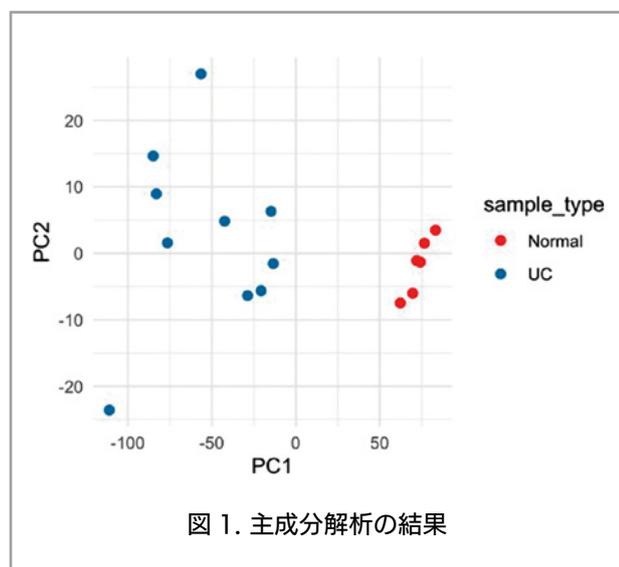
現在 Discovery cohort における検証を引き続き行っている。20 名の活動期潰瘍性大腸炎患者、10 名の活動期クローン病患者より血漿検体を収集の収集を終えている。そして、cfDNA を抽出し cfDNA のメチル化プロファイルを cfMeDIP-seq³⁾ により取得した。

cfMeDIP-seq の手法として、1 ng の cfDNA にフィラー DNA を加え、末端修復、A-tailing、アダプターライゲーションを行い、その後、メチル化された DNA 断片を抗 5-メチルシトシン抗体を用いて免疫沈降し、Polymerase chain reaction (PCR) で増幅した。次に、AMPure XP ビーズを用いたサイズ選択とクリーンアップを行い、最終的にバイオアナライザーでライブラリの品質を確認した。作成したライブラリは illumina Next-seq をもちいて、75 bp ペアエンド、1 サンプルあたり 3000 万リードの深度でシーケンスをおこなった。

シーケンスデータとして得られた Fastq ファイルは FastQC (v0.11.9) を用いて品質をチェックし、アダプターのトリミングを Trim Galore! をもちいておこなった。トリミングされたリードは Bowtie2 (v2.4.4)

を用いてヒト参照ゲノム (hg38) にマッピングし、Samtools 1.17 を用いてマッピング品質を 20 に設定し、Samtools を用いて PCR 重複を除去した。マップされたリードを 300 bp のゲノムウィンドウに分割し、R の QSEA パッケージを使用して各ウィンドウ内のリード数をカウントした。

以上のように得られたリードカウントデータより、各コーディング遺伝子のプロモータ領域 (転写開始点から上流 1 kbp まで) にオーバーラップするゲノムウィンドウのみを抽出した。そのデータと他プロジェクトで得られた健常者血漿サンプルデータを合わせて主成分解析を行った結果、活動期潰瘍性大腸炎患群 (n = 20) と健常者群 (n = 7) では異なるクラスターを形成することが観察された (図 1)。



【目的】

① DSSを用いた非感染性腸炎での腸管知覚過敏の誘発の有無や、② PI-IBS と腸内細菌叢の関与を明らかにする。加えて、③ PI-IBS において、TLR9 機能不全と BDKRB1/2 の発現誘導の間にあるシグナル伝達を解明する。

【方法】

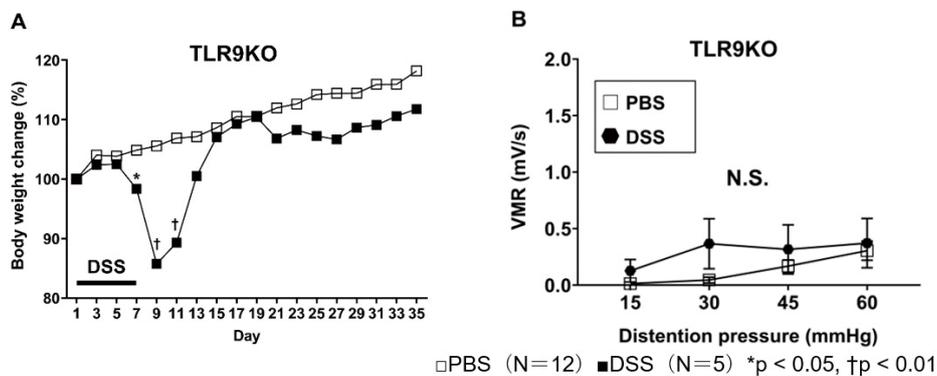
① TLR9KO マウスに 3%DSS を 7 日間投与することにより腸炎を発症させ、続いて通常の飲料水に戻して腸炎が改善した後に、腸管知覚測定や RT-PCR による BDKRB1/2 発現の評価を行う。② PI-IBS 発症後の TLR9KO マウスから採取した糞便を、抗生剤投与により腸内細菌を滅菌した後の WT・TLR9KO マウスに移植し、腸管知覚過敏の誘発の有無を評価する。③ TLR9 と BDKRB1/2 との間にあるシグナル伝達を既報から推測し、その経路を分子生物学的に実証する。

【これまでの結果】

① 3%DSS 投与群は、過去の *C. rodentium* 感染実験の際の PBS 投与群と比較して、顕著な体重減少を来しており、重度の腸炎を生じていたと考えられた (図 1A)。しかしながら、腸管知覚測定においては PBS 投

与群と同程度であった (図 1B)。そのため、感染という過程が腸管知覚過敏発症において重要と考えられた。

② バルーン圧が 60mmHg の際に TLR9KO マウスにおいて腸管知覚が WT マウスと比較して亢進しており ($p = 0.074$)、さらに TLR9KO マウスにおける BDKRB2 の発現は WT マウスと比較して有意に増加していた ($p < 0.05$ 。BDKRB1 の発現は同程度であった)。以上から腸内細菌叢は腸管知覚過敏の発症やブラジキニン受容体の発現に部分的に関与していると考えられた。③ これまでに TLR9 と BDKRB1/2 の間の直接的なクロストークに関する報告は見つからなかったが、既存の報告から 1 型 IFN を介して BDKRB2 の発現が亢進している可能性が考えられた。具体的には、TLR9 機能不全は 1 型 IFN (IFN- α , IFN- β) の産生を抑制すること^{1,2)} (図 3 ①), IFN- β は miR-129-5p を誘導し転写因子 Sp1 を低下させること³⁾ (図 3 ②), BDKRB2 の基礎転写は Sp1 に強く依存すること^{4,5)} (図 3 ③) が報告されている。そこで今後の実験で、TLR9 機能不全→IFN- β 低下→miR-129-5p 低下→Sp1 上昇→BDKRB2 転写亢進という連鎖を実証する。



□PBS (N=12) ■DSS (N=5) * $p < 0.05$, † $p < 0.01$

図 1

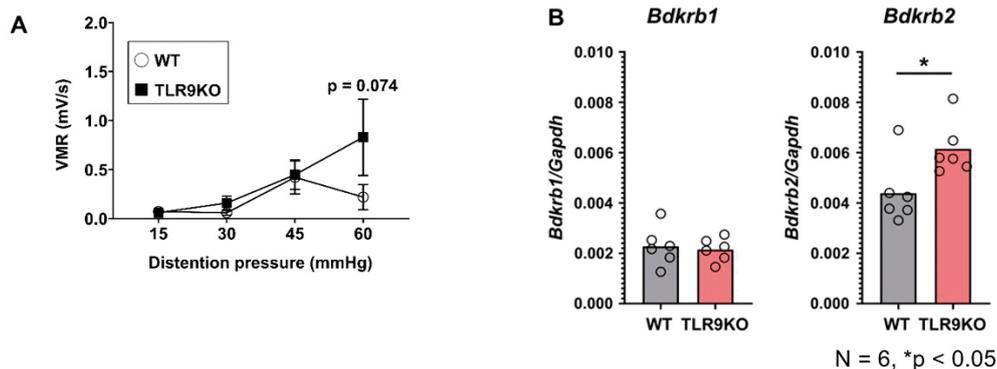


図 2

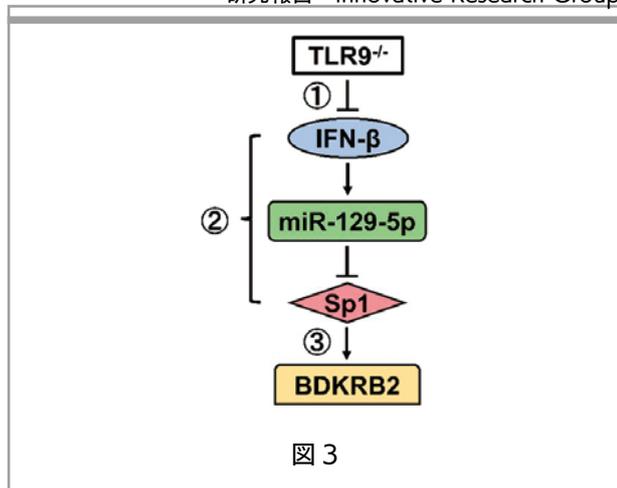


図 3

【今後の実験計画】

① WT ② WT + 抗 IFNAR1 抗体 (IFN シグナル阻害) ③ TLR9KO + vehicle control ④ TLR9KO + 組み換え IFN-β (rIFN-β) の 4 群を設け、いずれも *C. rodentium* 感染 6 週間後に(1)バロスタットによる内臓知覚, (2)結腸粘膜の *Ifnb1*, *p-STAT1*, *miR-129-5p*, *Sp1*, *Bdkrb2* の発現量を評価する。期待される結果としては, WT に IFNAR1 阻害を行うことで, TLR9KO と同様の腸管知覚過敏を示し, かつ TLR9KO マウスに対して rIFN-β を投与することにより, *Bdkrb2* の発現抑制と腸管知覚過敏の陰性化を生じると予想される。

【文献】

1. Tabeta K, et al. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Sci U S A*. 101, 3516-3521 (2004).
2. Katakura K, et al. Toll-like receptor 9-induced type I IFN protects mice from experimental colitis. *J Clin Invest*. 115, 695-702 (2005).
3. Zhang J, et al. Interferon-β induced microRNA-129-5p down-regulates HPV-18 E6 and E7 viral gene expression by targeting SP1 in cervical cancer cells. *PLoS One*. 8, e81366 (2013).
4. Prado GN, et al. Mechanisms regulating the expression, self-maintenance, and signaling-function of the bradykinin B2 and B1 receptors. *J Cell Physiol*. 193, 275-286 (2002).
5. Baptista HA, et al. Transcriptional regulation of the rat bradykinin B2 receptor gene: identification of a silencer element. *Mol Pharmacol*. 62, 1344-1355

(2002).

ユビキチン修飾系によるネクロトーシス制御に立脚した炎症性腸疾患発症機構の解明

清水 康平

(大阪公立大学大学院医学研究科医化学)

【目的】

- ① 大腸上皮オルガノイドの解析結果から, 新規 LUBAC 結合因子として同定した LAP1(LUBAC associated protein 1) が, RIPK3 の制御を介して RIPK1-dependent apoptosis (RDA) 経路を促進し, 間接的にもネクロトーシスを抑制する可能性を見出した。本年度はその分子機構解明を目指した。
- ② *Lap1* 欠損マウスで認められた DSS 誘発大腸炎の病態形成悪化は, *Lap1/Ripk3* 二重欠損マウスにおいて野生型マウスと同レベルまで緩和された。そこで *Lap1* 欠損マウスにおける腸管ネクロトーシスの実態を組織学的に調査した。

【方法】

- ① 野生型・*Lap1* 欠損・*Ripk3* 欠損・*Lap1/Ripk3* 二重欠損 MEFs を用いて RDA を誘導後, complex II b の形成状態と caspase-8 活性化状態を調べた。
- ② 野生型・*Lap1* 欠損・*Lap1/Ripk3* 二重欠損マウスに自由飲水にて 2.5% DSS を投与し, 3 日目に大腸の免疫組織学的解析を実施した。

【結果】

- ① *Lap1* 欠損 MEFs では RDA 誘導後, complex II b に RIPK3 及び cFLIP が多く動員され, caspase-8 の活性化が著しく抑制された。*Lap1/Ripk3* 二重欠損では cFLIP の動員が抑制され, caspase-8 の再活性化が認められた。
- ② *Lap1* 欠損マウスでは, DSS 投与 3 日目に P-RIPK3 陽性上皮細胞が認められたが, 野生型及び *Lap1/Ripk3* 二重欠損マウスでは認められなかった。アポトーシスは DSS 投与の有無に関わらず, 陽性細胞は僅かにしか認められず, genotype 間の差は認められなかった。

【考察】

- ① LAP1 は、昨年度報告した RIPK1 を介した直接的なネクロトーシスの抑制性制御に加え、RIPK3 を介して complex II b での caspase-8 の活性化を誘導し、間接的にもネクロトーシスを抑制する可能性が示された。
- ② *Lap1* 欠損マウスにおける DSS 誘導性潰瘍性大腸炎モデルの病態形成がネクロトーシスに依存していることが明示された。

潰瘍性大腸炎病変部特異的機構の解明

鈴木 宏 清

(筑波大学医学医療系消化器内科クリニック・筑波大学大学院 医学学位プログラム・大学院生)

【目的】

潰瘍性大腸炎 (UC) の治療目標は、粘膜治癒の達成であるが、特に直腸の治癒は困難な場合がある。さらに、直腸が UC の好発部位となる理由は不明である。本研究では、直腸と上行結腸における腸管上皮細胞 (IECs) の差異が UC の病態に重要な役割を果たし、これが直腸と結腸の治療応答の違いにつながっているのではないかと仮説を立てた。そこで、UC 患者の直腸 (病変部位) と上行結腸 (非病変部位) の IECs における遺伝子発現の違いに焦点を当てた。

【方法】

UC 患者の全大腸切除標本から、病変部および非病変部由来のオルガノイドを樹立し、非炎症環境下で培養した。これらのオルガノイドにマイクロアレイ解析を行い、UC の病態に関連する遺伝子を同定した。候補遺伝子として PITX2 を同定し、q-PCR でその発現を検証した。さらに、健常被験者の上行結腸オルガノイドにおいて PITX2 をノックダウン (KD) し、以前に確立されたヒト IBD の *in vitro* モデルに従い^{1,2)}、炎症性サイトカインで刺激した。この炎症モデルを用いて、NF- κ B シグナル経路、細胞増殖、スフィア形成能、およびアポトーシスを評価した。

【結果】

マイクロアレイ解析の結果、PITX2 が UC 患者の上行結腸オルガノイドおよび非病変組織で特異的に上方制御されていた。炎症刺激下において PITX2-KD オルガノイ

ドは、q-PCR で NF- κ B 下流遺伝子の発現や、蛍光免疫染色による NF- κ B p65 の核内移行に有意な差を示さなかったことから、PITX2 は炎症性シグナル伝達経路に影響しないことが示唆された。一方、炎症刺激下では PITX2-KD オルガノイドの細胞増殖とスフィア形成能が WT と比較して低下したことから、PITX2-KD により炎症刺激に対して脆弱になることが示唆された。また、炎症刺激後の PITX2-KD オルガノイドでは、WT に比して切断型 caspase-3 および 7 の発現が増加した。これらの結果は、PITX2 がエフェクターカスパーゼを介してアポトーシスを制御する可能性があることを示唆している。これらの結果は第 111 回日本消化器病学会総会で報告した。

【結論】

PITX2 は、UC 患者の非病変部で特異的に上方制御される遺伝子として同定され、炎症条件下で細胞増殖を促進する役割を担っていることが明らかになった。これらの知見は、PITX2 が炎症環境下での上皮細胞の生存とアポトーシスを制御することにより、UC の病態に寄与する可能性を示唆している。

【文献】

1. Watanabe, S., et al., Schlafen 11 Is a Novel Target for Mucosal Regeneration in Ulcerative Colitis. *J Crohns Colitis*, 2021.
2. Watanabe, S., et al., Importance of Telomere Shortening in the Pathogenesis of Ulcerative Colitis: A New Treatment From the Aspect of Telomeres in Intestinal Epithelial Cells. *J Crohns Colitis*, 2022.

原発性硬化性胆管炎の病態における腸内細菌代謝産物の役割解明

田 中 美 帆

(東京慈恵会医科大学 内科学講座 消化器・肝臓内科)

【目的】

原発性硬化性胆管炎 (PSC) は、胆道の線維性炎症を特徴とする慢性胆汁鬱滞性肝疾患である。PSC は潰瘍性大腸炎 (UC) との合併が多いことで知られているが、PSC と UC の腸内細菌叢の構成は異なることが報告されている。原発性胆汁性胆管炎 (PBC) や自己免

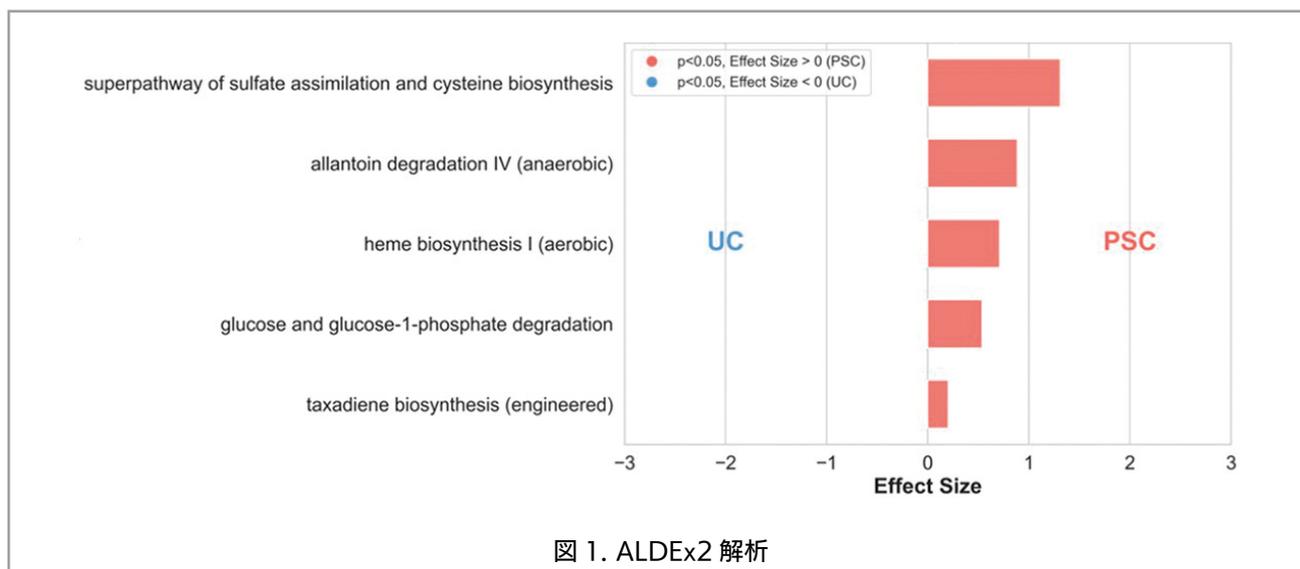


図 1. ALDEx2 解析

疫性肝炎 (AIH) など他の自己免疫性肝疾患と比較した報告は乏しく、腸内細菌叢の機能的な違いも不明である。本研究の目的はPSC患者に特徴的な腸内細菌叢の構成と代謝機能を明らかにすることである。

【方法】

2021年から2024年までに東京慈恵会医科大学附属病院を受診したPSC患者6名, AIH患者4名, PBC患者4名, UC患者11名, および健常者7名を対象とした。対象者の便検体を用いて16S rRNAメタゲノムシーケンスを行い, nf-core pipelineにより腸内細菌叢の構成を解析した。ConQuRを用いてバッチ効果と共変量を補正した。腸内細菌叢の多様性は, Shannon指数(α 多様性)とPCoA(β 多様性)によって評価し, PSC患者と他疾患患者における細菌叢の構成をLEfSe解析によって比較した。細菌間の相関はSparCCで評価した。MetaCycデータベースを用いてPICRUSt2による腸内細菌叢の機能予測解析を行い, ALDEx2によって疾患群間での比較を行なった。

【結果】

全てのPSCがUCを合併し, 内視鏡的寛解を達成していた。PSCを含めた各疾患群の間に有意なShannon指数の差を認めなかったが, PCoA解析の結果, 明らかな細菌叢構成の違いを認めた(PERMANOVA, $p < 0.05$)。LEfSe解析の結果, PSC患者では他疾患と比べて*Citrobacter werkmanii*と*Parasutterella secunda*の存在比率が有意に増加していた。相関解析の結果から, これらの細菌はそれぞれ*Escherichia coli*と

*Bifidobacterium longum*の存在比率と正の相関を示した。PSC患者の腸内細菌ではUC患者と比べて硫酸塩の同化とシステイン合成に関わる遺伝子の存在量が有意に増加していた(図1)。

【結語】

PSC患者の腸管では*C. werkmanii*と*P. secunda*が増加しており, 硫酸塩の同化やシステインの合成亢進に関与している可能性がある。

腸管微生物叢介入による宿主免疫機構の再教育を目指す炎症性腸疾患新規治療法の開発

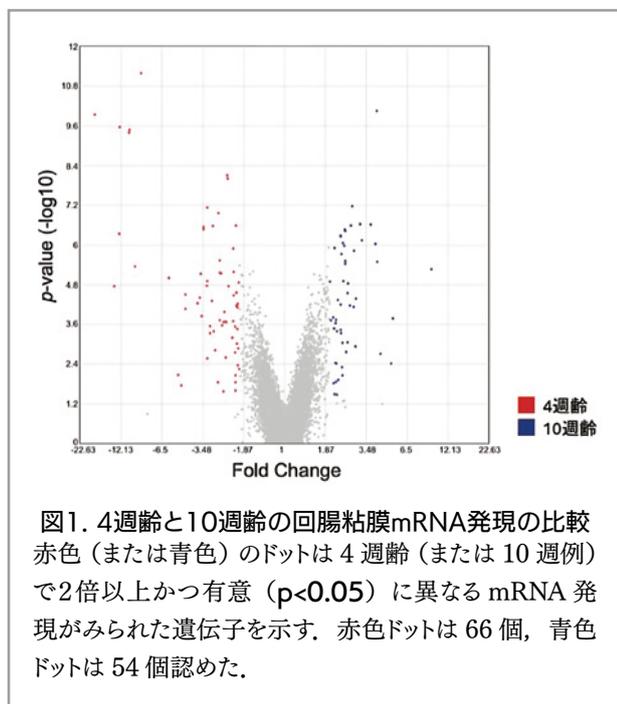
西成田 悠

(杏林大学医学部 消化器内科学)

【目的】

我々は, これまでの研究において, 4週齢GFマウスにおいて「健全な免疫発達のために必要な微生物の生着を可能にする機構」が存在するという仮説を立て, 宿主が腸管微生物に提供する局所環境の一面として回腸粘膜および大腸粘膜における遺伝子発現の週齢による差異を検討した。そして, 週齢により腸管粘膜における遺伝子発現プロファイルが異なり, 特に発現が有意に異なる遺伝子として, 4週齢に優位な66遺伝子, 10週齢に優位な54遺伝子を見出した(図1)。週齢に特徴的と考えられる遺伝子発現と正の相関を示す細菌は, その週齢に生着しやすい細菌と捉えられると考

え、本研究では、遺伝子発現との相関関係から4週齢 GF マウスに生着しやすい細菌を探索した。



【方法】

10週齢 SPF マウスをドナーとして4または10週齢 GF レシピエントマウスに FMT を実施したときに生着する細菌についての 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンシング解析では、1387 amplicon sequence variants (ASVs) が検出された。これらの ASV の検体中の存在比率と、昨年度報告した4週齢に優位な66遺伝子、10週齢に優位な54遺伝子の相関関係を検討した。

【結果】

4週齢 GF マウスに優位に発現する遺伝子と正の相関、10週齢 GF マウスに優位に発現する遺伝子と負の相関を示す36 ASVs を見出した。これらの ASVs に相当する細菌は、4週齢に生着しやすく、10週齢には生着しにくい細菌の候補と考えられた。これら36 ASVs のうち、12 ASVs は *Lachnospiraceae NK4A136 group* 属、7 ASVs は *Roseburia* 属であり、その他は細菌属まで同定できなかった。あらためて我々の施設における SPF 環境下飼育中の4週齢マウスにおける腸内細菌叢構成を解析すると、*Lachnospiraceae NK4A136 group* 属と *Roseburia* 属は上位2細菌属を占めており、その存在比率は10週齢よりも多かった。

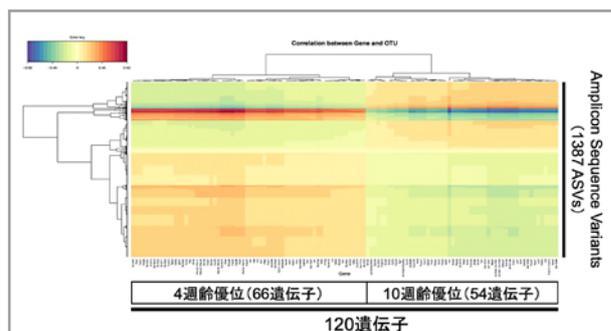


図2. 回腸粘膜に発現する遺伝子と生着する細菌の相関解析

4週齢に優位に発現する遺伝子と強い正の相関、10週齢に優位に発現する遺伝子と強い負の相関を示す ASV の一群を認める。

【考察】

4週齢マウスは、週齢に特徴的な消化管粘膜遺伝子発現プロファイルを有することで、*Lachnospiraceae NK4A136 group* 属や *Roseburia* 属の生着を促すと考えられた。これらの細菌属が幼少期に生着することが宿主・腸内細菌叢の発達に果たす役割については、さらなる検討を要する。

Bacteroidota 菌種に基づいた潰瘍性大腸炎の新規バイオマーカーの確立

野村 慧

(順天堂大学消化器内科)

【目的】

潰瘍性大腸炎 (UC) において腸内細菌叢の乱れ (dysbiosis) が病態に関与することが知られており、特に Bacteroidota 門の菌種は疾患活動性と関連することが報告されている。我々はこれまで抗菌薬併用腸内細菌叢移植 (A-FMT: Antibiotics-fecal microbiota transplantation) の臨床研究を通じ、Bacteroidota 菌種の減少が UC の増悪と相関することを明らかにしてきた (1)。本研究では、UC に対する標準的治療 (5-ASA, ステロイド, Advanced Therapy 等) 前後での腸内細菌叢変化を明らかにし、Bacteroidota 菌種を基盤とした新規バイオマーカーの確立を目的とした。

【方法】

新規に標準治療の強化を行った UC 患者を対象に、治療前後で臨床データ、血液検体、便検体を収集する。便検体については 16S rRNA 遺伝子解析およびメタゲノム解析を実施し、Bacteroidota 菌種を含む腸内細菌叢プロファイルを構築する。得られた腸内環境データを臨床情報、血液データと比較し、統計学的手法により治療前後との相関を検討する。

【結果】

今までに UC 患者 10 例の登録と、治療前後における便検体および血液検体の収集を完了した。現在、収集した検体の解析準備を進めており、腸内細菌叢の網羅的解析を実施予定である。症例登録や検体収集は順調に進んでおり、研究体制が安定して稼働している。

【考察】

初年度は症例集積と検体収集を中心に進め、順調に症例登録を進めている。今後、更なる症例登録ならびに解析により、UC 治療前後での Bacteroidota 菌種の変動と臨床的改善の関連を明らかにできれば、非侵襲的で特異性の高い新規バイオマーカーの確立につながると考えられる。従来の血液・便中マーカーは特異性や再現性に課題があるが、本研究で腸内細菌叢に基づく臨床応用可能な新たな指標を提示できれば、UC 診療において内視鏡依存を軽減し、治療選択やモニタリングの質を高めることが期待される。

【文献】

- (1) K Nomura, et al. Bacteroidetes Species Are Correlated with Disease Activity in Ulcerative Colitis. *Jornal of Clinical Medicine*. 2021;10:1749.

TNF 発現制御機構の生物学的意義および病態生理学的役割の解明

村上 舞

(公立大学法人福島県立医科大学医学部消化器内科学講座・助教)

【目的】

炎症性腸疾患 (Inflammatory bowel disease; IBD) の腸管局所では tumor necrosis factor-alpha (TNF) 発現が亢進し、抗 TNF 抗体が治療に高い有効性を示すこ

とから、TNF が病態に深く関与していると考えられている。TNF 受容体下流のシグナルカスケードは全体像が明らかになったが、TNF の産生制御機構は不明であった。我々は、クラスリン依存性エンドサイトーシス阻害薬 ikarugamycin が、TNF converting enzyme (TACE) 非依存性に膜型 TNF の発現を亢進させることを見出した¹⁾。このことは、TNF 産生を制御する細胞内機構の存在を示唆する。本研究の目的は TNF の発現制御機構を解明することであり、2024 年度は TNF の N-グリコシル化に着目し、N-グリコシル化の生物学的役割の解明を目指した。

【方法】

2023 年度に、CRISPR/Cas9 システムを用いてマウスマクロファージ様細胞株 RAW264 細胞の内在性 *Tnf* 遺伝子をノックアウト (KO) し、そこへ Tet3G 発現ベクターと TRE3G プロモーター下流に *mTnf* の cDNA を組み込んだレンチウイルスベクターを導入し、テトラサイクリン応答型制御システムによる doxycycline (Dox) 誘導性 TNF 発現細胞モデルを構築した。2024 年度はこのモデルを用いて、TNF KO RAW264 に野生型 TNF と N86A 変異型 TNF を発現させ、ベクター由来の TNF mRNA レベルを real-time quantitative PCR で、培養上清中および細胞溶解液の TNF を ELISA 法で定量した。

【結果】

野生型 TNF と N86A 変異型 TNF の両群で TNF mRNA は時間依存性に発現したが、両群間で TNF mRNA レベルに差は認めなかった。一方、培養上清中および細胞溶解液の TNF タンパクは、野生型 TNF と比較して N86A 変異型 TNF で発現が亢進した。

【考察】

野生型 TNF と比較して N86A 変異型 TNF で培養上清中のみならず細胞内においても TNF 発現が亢進したことは、N-グリコシル化が細胞内で TNF 発現を制御することを示唆している。両群間で TNF mRNA 量には差がないことから、N-グリコシル化が TNF 発現を制御するのは転写後の段階であると予想される。

【結語】

本研究によるマウス TNF の N-グリコシル化解析により、TNF の発現を制御する転写後の分子機構の存在

が明らかになった。研究成果の一部は、論文にまとめて報告した²⁾。今後は、TNF 産生制御機構の全体像を明らかにするために、研究を継続する。

【文献】

1. Minamide, M., Murakami M., et al.: A potent endocytosis inhibitor Ikarugamycin up-regulates TNF production, *Biochem. Biophys. Rep.*, 27, 101065 (2021).
2. Murakami, M., et al.: N-glycosylation negatively regulates the expression of tumor necrosis factor (TNF) in mouse macrophage, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 737, 150897 (2024).

炎症性腸疾患における重症化・難治化予測に関する 血小板関連新規バイオマーカーの探索

八木直人

(関西医科大学大学院医学研究科 内科学第三講座)

【目的】

潰瘍性大腸炎 (ulcerative colitis; UC) などの炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease; IBD) では重症・難治例が存在する。我々は、血小板活性化の指標 CD62P 発現が健常者 (healthy controls: HC) より UC で高く、とくに内視鏡的重症例で顕著であること、CD62P 発現が血小板-単球複合体 (platelet-monocyte conjugate: PMC) 割合と相関し、PMC 形成が内視鏡的最重症例で有意に促進していることを示した。さらに UC 手術検体の蛍光免疫染色で炎症局所における CD62P⁺CD14⁺PMC を世界で初めて確認し、PMC 個数が組織学的重症度と正相関することを明らかにした。これらと末梢血中 PMC 割合と内視鏡的重症度の相関¹⁾から、PMC は腸管炎症を反映する新規バイオマーカーとなり得る。

一方、末梢血中 PMC 形成は IBD を含む多様な疾患で報告されるが、炎症促進か抑制かについては一定の見解がない^{2,3)}。UC における PMC 形成の病態的意義を解明するには、PMC を形成する単球のフェノタイプ同定が必要である。近年、単球/マクロファージは従来の

M1/M2 に加え M2a-d などの機能的サブセットが報告されている^{4,5)}。本研究は、これらの知見を踏まえ、表面表現型と機能指標 (細胞内サイトカイン) の統合解析により、UC における PMC の病態寄与と臨床指標との関連を検証することを目的とする。

【方法】

解析は UC 約 20 例、対照 HC 約 20 例を予定した。採血時の人工的な血小板活性化を避けるため、駆血帯は使用せずに末梢血を採取した。細胞調製には BD Cytotfix/Cytoperm with BD GolgiStop を用いて固定・透過化を行い、表面マーカー及び細胞内サイトカインをフローサイトメトリーで解析した。

【結果】

- 1) ゲーティングと同定: FSC/SSC で単核球を展開し、CD14⁺ で単球を同定、さらに CD41⁺ により PMC (CD14⁺CD41⁺) を同定した (図 1)。
- 2) PMC 割合: 我々の既報と同様に、末梢血に占める PMC 割合は HC と比較して UC で高い傾向を再確認した (図 2)。
- 3) フェノタイプ分類: 既報^{4,5)} を参考に、M1 相当 (CCR7⁺/CD86⁺)、M2a (CCR7⁺/CXCR1⁺)、M2b (CCR7⁻/CD86⁺)、M2c (CCR7⁻/CCR2⁺)、M2d (CCR7⁻/A2AR⁺) の指標で分類したところ、これら複数マーカーの共発現を示す PMC サブ集団も観察された (図 3)。
- 4) PMC 単球の表面マーカー発現: HC と比べ UC では、PMC において CCR7 および CD86 が高い傾向、CXCR1 および A2AR が低い傾向を示した (図 4)。
- 5) 単球 (CD14⁺CD41⁻) の表面マーカー発現: 単球では CCR7 のみが UC で高い傾向を示し、その他 (CD86, CXCR1, CCR2, A2AR) には HC との差を認めなかった (図 5)。
- 6) UC 症例内での細胞種間比較: PMC 単球は血小板と結合していない単球に比べて CCR7, CD86, A2AR 高発現の傾向を示した (図 6)。
- 7) 細胞内サイトカイン: 現在解析中であり、結果は別途報告する。

【考察】

UC における PMC 増加と炎症局所での CD62P⁺CD14⁺PMC 形成は、PMC が全身・局所で炎症活動度

を反映することを示す。CCR7/CD86 の高発現は共刺激能 (CD80/CD86-CD28 軸) の亢進による T 細胞応答増強に直結する。A2AR は二層性を示し、群間比較では UC の PMC で低発現 (免疫ブレーキの低下) である一方、症例内比較では PMC が同症例の単球より高発現 (活性化後の補償的ブレーキの誘導) を示す。この乖離は、抑制経路が全体として弱い環境下でも、強く活性化された PMC ほど局所的に抑制を立ち上げる動的調節を示唆するが、その補償は不十分で共刺激が勝れば炎症は持続し得る。複数サブタイプに特徴的なマーカーの共発現を示す PMC の存在は、UC における PMC の可塑性を示す。これら所見は PMC の治療標的化および

治療奏効予測に臨床的意義がある。さらに CD62P 依存の結合は単なる接着にとどまらず単球の性質を変えサイトカイン産生を高め、CD86 誘導にも寄与し得るため、P-selectin/PSGL-1 軸の遮断は妥当な介入候補である。臨床応用では、末梢血 PMC の量的指標に質的指標 (CCR7/CD86/A2AR) を組み合わせることで、内視鏡的重症度や生物学的製剤・白血球除去療法の治療反応性の予測能向上が期待される。

【文献】

1. Sano Y, Tomiyama T, Yagi N, et al. Sci Rep. 14(1):28055 (2024).
2. Pamuk GE, Vural O, Turgut B, et al. Am J

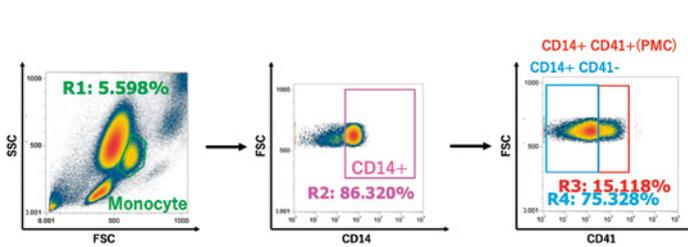


図 1. ヒト末梢血に存在する PMC の同定

HC : n=3, UC : n=6
Mann-Whitney U test : † P < 0.1, *P < 0.05 ***P < 0.01

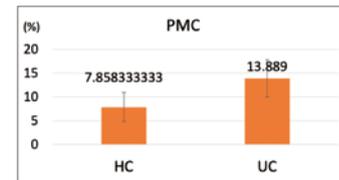


図 2. 末梢血単球に占める PMC の割合

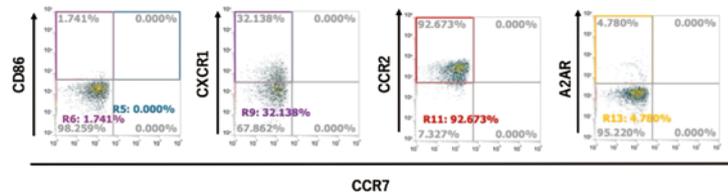


図 3. ヒト末梢血 PMC における phenotype の解析

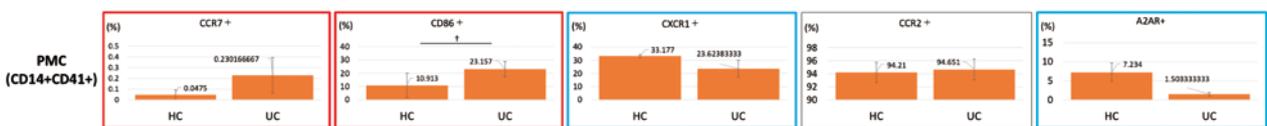


図 4. PMC 単球に発現する表面マーカーの比較 (HC-UC 間)

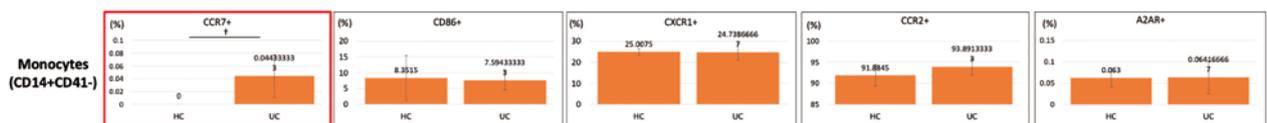


図 5. 単球に発現する表面マーカーの比較 (HC-UC 間)

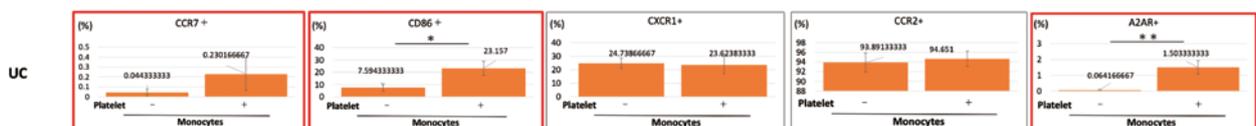


図 6. UC における PMC 単球と単球の表面マーカーの比較

Hematol. 81(10):753–759 (2006).

3. Zamora C, Canto E, Nieto JC, et al. Inflamm Bowel Dis. 24(4):818–828 (2018).
4. Hsieh SW, Huang LC, Chang YP, et al. Psychiatry Clin Neurosci. 74(7):383–391 (2020).
5. Sun JX, Xu XH, Jin L. Front Immunol. 13:880286 (2022).

クローン病肛門管癌の発癌メカニズムにおけるヒトパピローマウイルスの関与の検討

谷口勝城

(横浜市立大学附属市民総合医療センター 炎症性腸疾患 (IBD) センター)

【背景】

クローン病を含む炎症性腸疾患 (IBD) は、若年層に好発する近年増加している疾患である。近年の治療の進歩はめざましいが、一方で長期にわたる粘膜の慢性炎症を背景とする大腸癌・小腸癌の報告が増加しつつある。特にクローン病における肛門管癌は早期発見が難しいとされ、本邦の調査でも極めて予後不良であることが報告されている¹⁾。

ヒトパピローマウイルス (HPV) はヒトの皮膚や粘膜に感染するウイルスで、子宮頸癌のほか、肛門癌においても発癌に関与しているとされている。子宮頸部における発癌経路は広く調べられており、HPV は扁平上皮と円柱上皮の境界部に感染し増殖、その過程で E6, E7 と呼ばれるタンパク質を生成し、これらタンパク質が p53 を阻害し、感染した部位での発癌に寄与するとされている²⁾。肛門癌においては、ヒト免疫不全ウイルス陰性の肛門癌のうち 91% が HPV 陽性と報告されており、HPV 陽性肛門癌ではシスプラチン併用化学放射線療法の有用性が高いことも報告され、HPV 感染の有無は肛門癌の治療戦略にも関わる非常に重要な因子として考えられている³⁾。近年、HPV 陽性肛門癌のコホート研究にて、IBD 症例が non-IBD 症例に比較し有意なリスク因子であるという報告もあり⁴⁾、IBD における HPV 感染と肛門癌の関連が次第に明らかになりつつある。

上記のように HPV 感染がクローン病の肛門管癌のリスクとなる可能性が示唆されるが、現在までのところ

HPV 感染とクローン病合併肛門管癌との関連を直接示すような既報はない。

【目的】

クローン病合併肛門管癌と HPV 感染の関連性に着目し、クローン病合併肛門管癌発生のメカニズムを解析する。

【方法】

対象：2000 年 1 月から 2024 年 12 月の間に、クローン病と診断され、当院で直腸肛門管癌、痔瘻癌（術後に診断された患者、腺腫、dysplasia も含む）に対して腫瘍切除術（内視鏡的切除を含む）を受けた患者を対象とする。

方法：

① 遺伝子解析

手術時に切除された病理組織および術前の生検のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 検体（既存試料）について、腫瘍部および非腫瘍部より DNA 抽出を行い、腫瘍関連遺伝子の遺伝子解析を実施する。解析には iSeq100 (illumina) もしくは、Nextseq1000 (illumina) を用いて行う。同意が得られた対象者については、外部委託により全エクソーム解析を行う。

② 免疫染色

FFPE 標本に対し、E-cadherin・ β -catenin・p53・Ki67・CK7・CK20・PD-1・PD-L1・EGFR・CD4・CD8・Foxp3・p16・胃型マーカー (MUC5AC, MUC6)・腸型マーカー (MUC2, CD10, CDX2) などの免疫組織化学染色を行い、蛋白発現を評価する。

③ HPV 感染の評価

高リスク HPV (16, 18 型を含む) の定性的 PCR アッセイを用い、HPV 感染の有無およびジェノタイプを評価する。HPV 感染の有無と遺伝子変異との関連を検討する。

④ 解析

分子生物学的情報を、腫瘍部・非腫瘍部で比較、あるいは既存の大腸癌データベースと比較することにより、クローン病併発直腸肛門管癌の発癌経路の検討を行う。また、遺伝子学・免疫学的に得られた分子生物学的分類と診療録情報との比較を行い、発癌リスクの検討や、治療反応性や予後との関連を検討する。

【結果】

今年度は準備段階に注力し、研究の基盤整備を完了した。

- ・倫理審査委員会の承認：2025年8月に取得。現在は対象症例への本研究への同意取得中である。
- ・研究体制の構築：病理部の協力を得て、本研究への同意が取得された症例で、順次 FFPE サンプルの提供を受ける予定である。がんゲノム診療科との協議により iSeq100 (illumina) や Nextseq1000 (illumina) などの機器の使用及び解析結果の解釈など、連携体制を構築した。
- ・試薬の整備：本助成金を用いて解析に必要な試薬・消耗品を購入済みである。

【考察】

本年度は症例収集・解析には至らなかったが、研究遂行の前提となる倫理的承認および研究体制の整備を達成したことは大きな進展である。特に本研究は希少疾患を対象とするため、多部署との調整が不可欠であり、その体制構築に一定の時間を要した点は避けられなかった。

もしクローン病合併肛門管癌の発症に HPV が関与している場合、HPV 関連発癌では予防に HPV ワクチン接種が有効であることが示されている。欧州 IBD 学会のガイドラインにおいても IBD 症例に対する定期的な予防的 HPV ワクチン接種が推奨されており⁵⁾、本研究の成果は、肛門管癌の予防戦略（例：HPV ワクチン接種推奨）や前癌病変 (AIN) への治療介入⁶⁾につながることを期待される。

【文献】

1. Ogino, T., Mizushima, T., Fujii, M., et al. Crohn's Disease-Associated Anorectal Cancer Has a Poor Prognosis With High Local Recurrence: A Subanalysis of the Nationwide Japanese Study. *Am J Gastroenterol.*, 118:1626-1637 (2023).
2. Mirkovic, J., Howitt, BE., Roncarati P., et al. Carcinogenic HPV infection in the cervical squamo-columnar junction. *J Pathol.* 236:265-71 (2015).
3. Bruyere, D., Monnier, F., Colpart, P., et al. Treatment algorithm and prognostic factors for patients with stage I–III carcinoma of the anal

canal: a 20-year multicenter study. *Mod Pathol.* 34:116-130 (2021).

4. Segal, JP., Askari, A., Clark, SK., et al. The Incidence and Prevalence of Human Papilloma Virus-associated Cancers in IBD. *Inflamm Bowel Dis.* 27:34-39 (2021).
5. Rahier, JF., Magro, F., Abreu, C., et al. Second European evidence-based consensus on the prevention, diagnosis and management of opportunistic infections in inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis.* 8:443–68 (2014).
6. Wieland, U., Brockmeyer, NH., Weissenborn, SJ., et al. Imiquimod treatment of anal intraepithelial neoplasia in HIV-positive men. *Arch Dermatol.* 142:1438–1444 (2006).

炎症性腸疾患に対する HTS による新規薬剤開発及び初代培養細胞を用いた疾患関連遺伝子の同定

渡 辺 諭

(Massachusetts General Hospital)

【目的】

炎症性腸疾患 (IBD) では、腸内細菌叢の構成変化と腸上皮の機能障害が報告されている。本研究では、クローン病患者由来の大腸オルガノイドを用いて、腸内細菌由来代謝物が腸上皮細胞に与える影響を網羅的に解析し、疾患特異的な応答経路の同定を目指した。

【方法】

DAPT を添加してゴブレット細胞を富化させたクローン病由来のヒト大腸オルガノイドを 96 ウェルプレート上に均一に播種し、腸内細菌由来抽出分画で処理した。その後、RNA を回収し、Broad Institute にて 3' RNA-seq 解析を実施。発現変動を確認するため、対照として PGE2, LPS, Pam3CSK4, thapsigargin などの既知の刺激剤を含め、データの信頼性と再現性を検証した。

【結果】

PCA 解析および階層的クラスタリングの結果、特定の画分 (HME78) は対照群とは明確に異なるクラスター

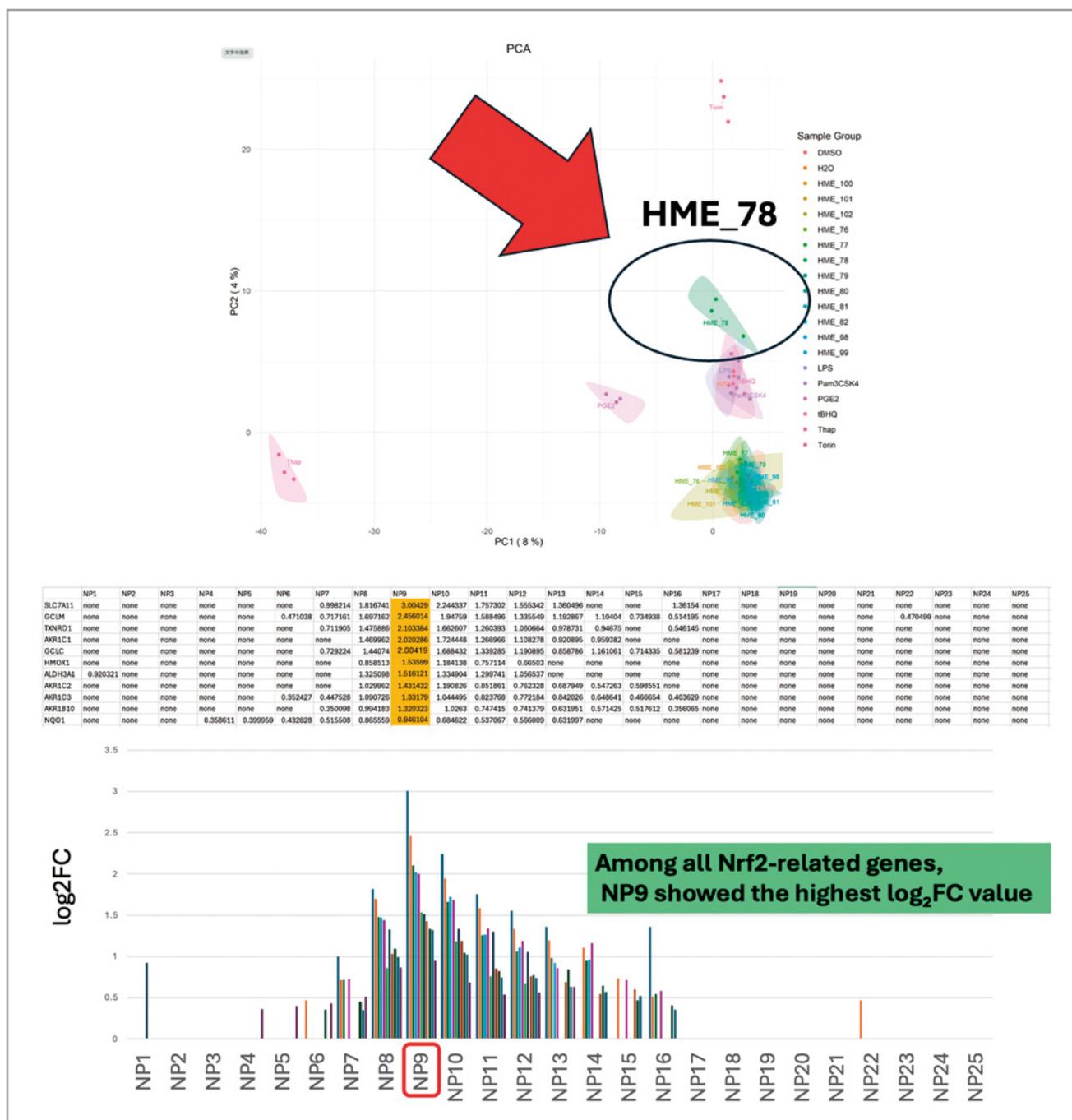
を形成し、特徴的な遺伝子発現プロファイルを示した。特に酸化還元制御，細胞死，膜輸送，バリア機能維持といった生物学的プロセスに関連する遺伝子群で，画分ごとに異なる発現パターンが認められ，特定の代謝物が選択的に細胞応答を誘導している可能性が示唆された。

具体的に HME78 分画は，クローン病に関連する細菌（未公表データであり，スクリーニングの結果，特定できた細菌であるため詳細は割愛させていただきます。）をクロマトグラフィーで処理し，クロロホルム分画から得られた代謝物で構成されている。この分画をさ

らに 25 個に細分化し，それぞれをオルガノイドに投与して RNA 解析を行った結果，HME78-NP9 を投与したサンプルで Nrf2 経路関連遺伝子の発現上昇が顕著に認められた。現在は，この HME78-NP9 分画をさらに 30 個に分けて精査し，その中で HME78-NP9-rp9 に目的の Pure material が含まれることを特定し，NMR 解析などによる構造同定を進めている。

【考察】

本研究により，細菌由来代謝物が腸上皮に与える影響を網羅的に評価するスクリーニング系が確立された。得られた知見は，腸内環境と上皮機能の相互作用を分



子レベルで理解する上で有用であり、今後は健常人オ
ルガノイドとの比較や、炎症モデルを用いた機能的検
証を進めることで、IBD における新たな治療標的や診
断マーカーの探索につながると期待される。

