

# 日本応用酵素協会誌

## No.57

## 2022

### 総 説

- 力覚応答に関与する低分子量Gタンパク質Rhoファミリーの活性化因子RhoGEF……………1  
大橋 一 正
- ペプチド系天然物の生合成に関与するtRNA依存型アミド合成酵素……………11  
丸山千登勢, 濱野吉十
- もやもや病の分子病態をめぐる幾つかの論点……………19  
森戸大介, 折井みなみ
- 高度好塩性古細菌 *Haloarcula japonica* のイソプレノイド生合成経路の解析と  
代謝工学による有用物質生産……………27  
八波利恵

### 2022年度 研究報告

- 酵素の応用研究および生命科学に関連する酵素の研究……………33
- 成人病の病因・病態の解明に関する研究助成……………70
- Vascular Biology Innovation に関する研究助成……………115
- 全身性炎症疾患の病因・病態の解明に関する研究助成……………146
- Front Runner of Future Diabetes Researchに関する研究助成……………157

### 研究調査所 酵素情報

- N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼV (GnT-V)……………185
- ネクロプトーシスの実行因子MLKL……………188

# 総 説

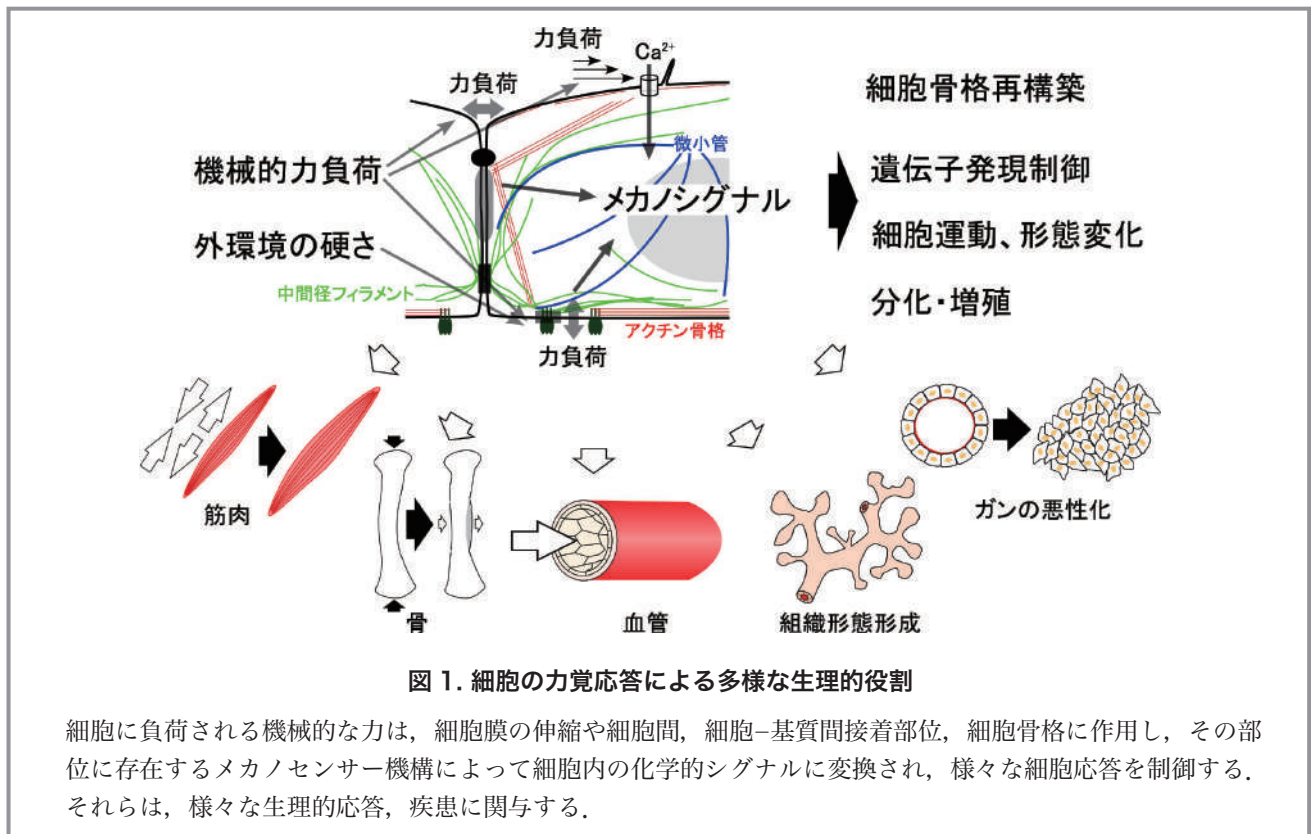
## 力覚応答に関する低分子量 G タンパク質 Rho ファミリーの活性化因子 RhoGEF

大 橋 一 正\*

### 1. はじめに

私たちの体は様々な機械的な力を常に受けており、組織を構成する細胞は機械的な力を感知して、細胞の形態、極性、運動、代謝、増殖と分化、細胞死など多様な生理的制御を行っている<sup>1-3)</sup>。機械的な刺激は、重力や圧力、浸透圧、呼吸、血液循環、筋収縮、また、組織の硬さや細胞が発する力によるものなど多岐にわたり、そのレンジも骨や筋肉にかかる大きな力から細胞同士の微弱な力まで幅広く多様である<sup>3)</sup> (図 1)。細胞はそれらを感知する多様な分子機構を有し、各々の環境に適応した応答によって生命活動に寄与していると考えられる。本総説では、このような機械刺激に対する生理的応答、細胞応

答を「力覚応答」と総称する。これまで、液性因子や細胞接着による様々な細胞応答について膨大な研究が行われ、細胞内のシグナル伝達機構は多くのことが明らかにされてきた。機械刺激でも同様の細胞応答を引き起こすことから、それらのシグナル伝達機構はどこかでリンクしているはずである。また、細胞応答は細胞骨格の再構築を伴うものであり、細胞への機械的な力の変化が生じると考えられることから、ほとんどの細胞応答は力覚応答と共役していると考えられる。しかし、実体の無い機械的な力の作用がどのような分子機構で感知されているのか、また、既知の細胞内シグナル伝達機構にどのように統御されているのかは未だ多くの部分が不明である。



\* 東北大学大学院生命科学研究所・分子化学生物学専攻・ケミカルバイオロジー講座・分子細胞生物分野

\*\* 東北大学大学院理学研究科・化学専攻・生物化学研究室

2020 年のノーベル医学生理学賞の対象となった Transient receptor potential1 (TRP1) や PIEZO といった機械刺激依存性カチオンチャネルは、機械刺激の感知機構の一角を担う重要なシステムであり、 $Ca^{2+}$  が機械刺激による多く応答を司ることが明らかになってきた<sup>4,6)</sup>。これに対し、機械刺激の方向や力の強さを定量的に感知して応答するためには、細胞骨格などの細胞内の 3 次元的な構造がセンサーとなり、応答することが合理的であると考えられる。しかし、解析の難しさから細胞接着や細胞骨格に負荷される力を感知するタンパク質や分子機構はわずかしか見出されていない<sup>7-10)</sup> (図 2)。近年、このような細胞骨格や細胞接着に依存した機械刺激の感知から既知の細部内シグナル伝達機構に至る分子機構の解明が進みつつある。特に、細胞内アクチン骨格は、ほとんどの細胞応答において再構築される動的な構造であるとともに、力覚応答において主要な働き

をする細胞骨格である<sup>11-12)</sup>。そのため、アクチン骨格の再構築を指標に力覚応答に関与するタンパク質が数多く見出されている<sup>10)</sup>。本総説は、アクチン骨格の再構築を複雑で多様に制御することを可能にした分子群の一つとして低分子量 G タンパク質 Rho ファミリー分子の活性化因子 (GTP-GDP 交換因子, Guanine nucleotide exchange factor : GEF) である RhoGEF に注目し、力覚応答のシグナル伝達への関与について解説する。

## 2. 細胞が機械的な刺激を感知する分子機構

細胞が機械的な力を感知するためには、機械的な力を細胞内の化学的なシグナルに変換する分子の存在が必要である。これまでに提唱されている機械刺激を感知するタンパク質や分子機構を図 2 に示す。機械刺激依存性カチオンチャネルである TRP ファミリーや PIEZO は、細胞膜が引き伸ばされることでゲートが開き  $Ca^{2+}$  を透

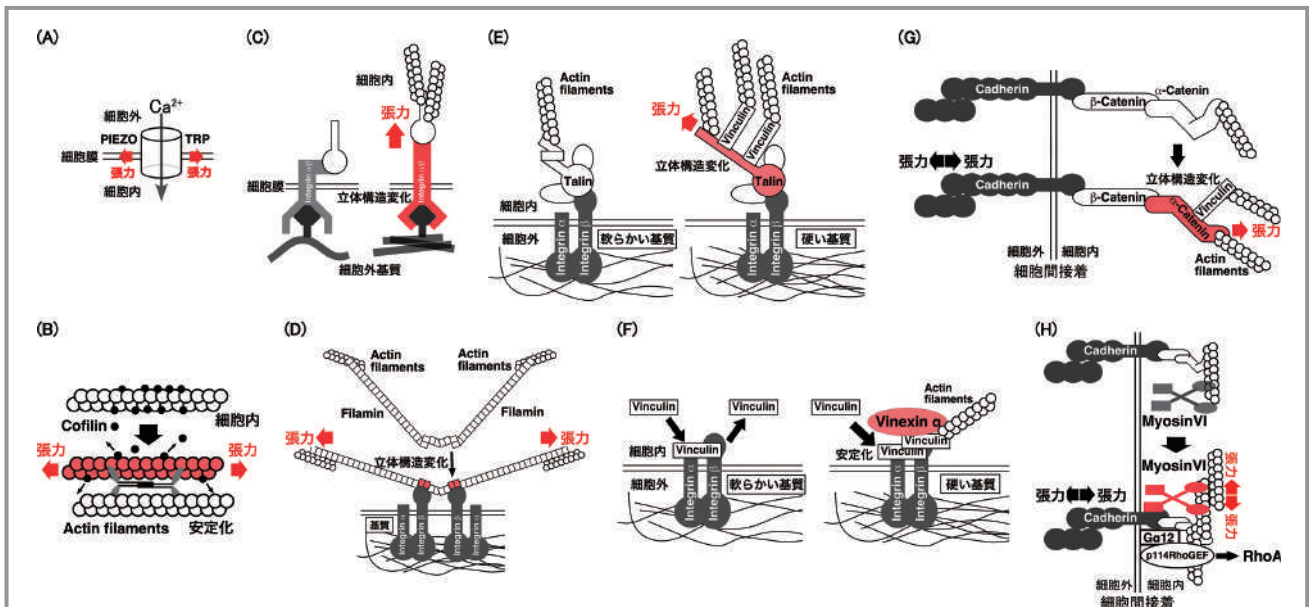


図 2. 細胞のメカノセンサー機構

A. 機械刺激依存性カチオンチャネル。膜張力の変化で  $Ca^{2+}$  を透過させる。B. Cofilin とアクチン線維による張力感知。張力が負荷されたアクチン線維は螺旋の間隔が広がり、Cofilin との親和性が低下するため安定化する。その結果、細胞内では張力の負荷されたアクチン線維が維持される。C. Integrin のキャッチボンド機構。基質と結合した Integrin は、張力の負荷によって立体構造が変化し、より強く結合する。D. Filamin. アクチン骨格と結合し、張力の負荷によって 20 番目と 21 番目の Filamin repeat ドメインの配置が変化し、Integrin 等との親和性が高くなる。E. Talin. Integrin とアクチン線維を連結し、張力の負荷によって新たに Vinculin を結合することでアクチン構造を強化する。基質の硬さ等のセンサーとして機能する。F. Vinexin  $\alpha$ . Integrin を介した基質との接着において、Vinculin との相互作用の変化を介して基質の硬さを感知するセンサーとして機能する。G.  $\alpha$ -Catenin. 細胞間接着分子の Cadherin の細胞内ドメインに結合し、Cadherin への張力の負荷に伴う立体構造変化で Vinculin と結合しアクチン構造を強化する。H. MyosinVI. 細胞間接着部位のアクチン繊維への力の負荷によって MyosinVI の Cadherin への親和性が増加する。その後、 $G\alpha 12/G\alpha 13$ , p114RhoGEF を細胞間接着部位へとリクルートすることで RhoA の活性化を促すメカノセンサーとして機能する。

過させ、細胞内の局所で  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を上昇させるメカノセンサーである<sup>13-14)</sup>(図 2A)。これは、細胞への機械刺激の場所と頻度、強さを感知する上で有効なセンサーであると考えられ、力覚応答の大きな部分を占める感知機構である。これに対し、細胞接着や細胞骨格に連動したメカノセンサーとして、アクチン繊維が働くことが示されている。細胞内で張力が負荷され引き伸ばされたアクチン繊維は、アクチン脱重合因子である Cofilin の結合が弱まり安定化される(図 2B)。これが細胞に負荷された力の方向と強さを感知する機構として働くと考えられている<sup>15)</sup>。細胞-基質間接着部位においては、接着因子である Integrin が張力の負荷で基質との結合が強くなるキャッチボンド機構によってメカノセンサーとして機能している<sup>16)</sup>(図 2C)。アクチン繊維の束化因子である Filamin は、張力の負荷によって C 末端付近の立体構造を変化することが示されている<sup>17)</sup>。これによって Integrin などとの親和性が変化することでメカノセンサーとして機能することが示唆されている(図 2D)。また、接着斑タンパク質の Talin が張力の負荷で構造変化し、Vinexin と結合することで基質からの機械刺激や基質の硬さを感知する主要な分子として機能することが示されている<sup>18-19)</sup>(図 2E)。接着斑タンパク質の Vinexin  $\alpha$  も基質の硬さに応じて Vinexin との結合を変化させ、基質の硬さの感知に必要であることが報告されている<sup>20)</sup>(図 2F)。細胞間接着部位では、Adherens junction において細胞間接着分子である Cadherin と細胞内のアクチン繊維をつないでいる  $\alpha$ -Catenin が、細胞間接着部位に負荷された張力によって構造変化し、やはり Vinculin が結合してアクチン繊維を係留することで細胞間接着部位の構造の強化、収縮力の発生に寄与することが明らかにされた<sup>8, 21)</sup>(図 2G)。また、細胞間接着部位への張力が負荷されると Myosin VI が下流のアクチン骨格の増強を促すメカノセンサーとして機能することが報告された<sup>22)</sup>(図 2H)。この報告では、初めてメカノセンサーから Rho ファミリーの活性制御に至るシグナル伝達機構が報告された(後述する)。その他、力覚応答に関与する分子は数多く報告されているが、メカノセンサーとしての作用機序が示されているものはほぼこれで全てである。しかし、多様な力覚応答を考えるとこれらの分子種では全く不足している。今後、力

の負荷による立体構造で機能を変化させるメカノセンサータンパク質が更に見出されてくることが期待される。

### 3. 力覚応答における低分子量 G タンパク質 Rho ファミリーの機能

アクチン骨格の再構築制御機構については、低分子量 G タンパク質 Rho ファミリーの発見から多くの制御機構が明らかにされている。個々の Rho タンパク質は特定のアクチン構造を形成する主要なスイッチタンパク質として働いている。細胞応答においてアクチン骨格の再構築は連動しており、Rho ファミリータンパク質の活性制御がほとんどのシグナル伝達経路にリンクしていると考えられる。Rho タンパク質は、ヒトゲノムに約 20 種類存在しており、各々の下流エフェクターとの相互作用によって特異的なアクチン骨格構造の形成を誘導する<sup>23)</sup>。これは比較的少ない分子種であり、シグナル伝達経路上のボトルネックな経由点となっている。これに対し、上流の制御因子で活性化因子として働く RhoGEF と不活性化因子として働く Rho GTPase activating protein (RhoGAP) が様々なドメインを持つ分子種として共に約 80 種類存在している。進化の過程で RhoGEF と RhoGAP が多様化し、限られた分子種の Rho ファミリータンパク質を時空間的に制御して複雑なアクチン骨格の再構築を可能にしていると考えられる<sup>24-26)</sup>。力覚応答においても Rho ファミリータンパク質を介してアクチン骨格の再構築は必須である。細胞表面を押し込んだり引っ張ることでアクチン繊維が重合することや、液体の流れによるずり応力、細胞接着を介した張力の負荷、基質の硬さなど、様々な機械的な刺激の応答に RhoA をはじめとして寄与することが示されている<sup>27)</sup>。しかし、Rho タンパク質群を操作すると、基本的な細胞応答に影響を受けるため、力覚応答における Rho タンパク質の時空間的な活性制御機構は未だ多くの点が不明である。近年、様々な細胞応答について Rho 経路の時空間的な制御を解明するために、RhoGEF や RhoGAP について様々な知見が得られてきている。

### 4. 力覚応答に関する RhoGEF

ヒトの RhoGEF は、約 70 種類の Diffuse B-cell lymphoma

(Dbl) ファミリータンパク質と 11 種類の Dedicator of cytokinesis (DOCK) ファミリータンパク質が知られている。Dbl ファミリーは、GEF 活性を担う Dbl homology (DH) ドメインと GEF 活性と形質膜への局在に寄与する Pleckstrin homology (PH) ドメインをタンデムに並べた共通の構造を有している。Dock ファミリーは GEF ドメインとして Dbl ファミリーとは異なる構造の Dock-homology region1, 2 (DHR1, 2) を共通して有する。これらの RhoGEF は、GEF 活性を持つドメイン以外は様々なドメインが配置された多様化した分子種であり、進化の過程で様々な応答におけるアクチン骨格の細分化された再構築に対応していると考えられる<sup>24-25)</sup>。細胞の機械刺激に対応したアクチン骨格の再構築も、これらの RhoGEF の働きによって区別して制御されていると考えられる。これまでに機械刺激に対する細胞応答に関与することが報告されている RhoGEF を表 1 に示す。多くは RhoA を活性化する RhoGEF である。これは、負荷された力に対して収縮力を発生させる細胞応答が検出しやすいため、収縮力の発生に主に働く RhoA の活性制御因子が多く見出されていると考えられる。Rho の上流には機械刺激を感知する多様なメカノセンサータンパク質が存在していると考えられるが、前述のとおり未だわずかな種類しか同定されていない。RhoGEF は、変化に富んだ分子種に多様化していることから、RhoGEF のなかにメカノセンサーが存在する可能性が示唆される。以降では、機械刺激に対する応答に関与する個々の RhoGEF について解説する。

## 5. Vav2

腎臓の糸球体毛細血管における高血圧による傷害のメカニズムについての研究から、繰り返し伸展刺激による RhoA の活性化に寄与する RhoGEF が報告された<sup>28)</sup>。糸球体毛細血管の支持細胞であるメサングウム細胞は、血圧の変化を模した繰り返し伸展刺激によって RhoA が活性化されることが知られており、この活性化を引き起こす RhoGEF が探索された。繰り返し伸展刺激による RhoA の活性化には細胞内チロシンキナーゼである Src が必要であることから、Src によるリン酸化によって活性化される RhoGEF である Vav ファミリーが検討された<sup>29)</sup>。その結果、Vav2 が、繰り返し伸展刺激によ

って活性化した Src によって 172 番目のチロシンをリン酸化されて活性化し、RhoA を活性化することが示された<sup>28)</sup>。これは、力覚応答に関与する RhoGEF の最初の報告である。

## 6. Guanine nucleotide exchange factor H1 (GEF-H1, 別名 ARHGEF2)

血管内皮細胞は、血管の内側を覆う一層の細胞層を形成しており、心臓の拍動や血圧の変化による伸縮や血流を感知して様々な応答を行っている。そのため、古くから力覚応答のモデルとして用いられている細胞である。血管内皮細胞は、心臓の拍動を模した繰り返し伸展刺激によって、層構造を維持しながら伸展方向に対して垂直に配向、整列することが知られている<sup>30)</sup>。肺動脈血管内皮細胞に対する繰り返し伸展刺激において、細胞内の微小管が細胞の層構造の維持や配向に必要であることが見出され、機械刺激による微小管を介したアクチン骨格の制御因子が探索された。GEF-H1 は微小管に結合する RhoGEF であり、微小管の脱重合によって微小管から解離することで活性化し RhoA を活性化することが知られていたため関与が検討された。その結果、繰り返し伸展刺激による細胞の配向や Rho 経路の活性化に GEF-H1 が必要であることが明らかになった<sup>31)</sup>。この報告が力覚応答に関与する RhoGEF の 2 番目の報告であり、その後、GEF-H1 は他の機械刺激に対する応答にも関与することが報告されている。繊維芽細胞に細胞外マトリックスタンパク質の Fibronectin をコートした磁気ビーズを付着させて磁力によって引張る刺激に対し、細胞が硬くなることや RhoA が活性化する応答に関与する RhoGEF が探索され、GEF-H1 と Leukemia-associated RhoGEF (LARG, 別名 ARHGEF12) が同定された<sup>32)</sup>。これは、Integrin を介した細胞-基質間接着からの機械刺激と考えられ、さらに、阻害剤を用いた解析から、この引張刺激における LARG と GEF-H1 の活性化には、細胞内のリン酸化酵素である Mitogen-activated protein kinase (MAPK) と Src ファミリーチロシンキナーゼの Fyn の働きが各々必要であることが示された<sup>32)</sup>。細胞間接着部位における張力の負荷による RhoA の活性化においても GEF-H1 の関与は報告されている。イムノグロブリンスーパーファミリーの細胞間接着因子で

ある Junctional adhesion molecule A (JAM-A) の特異的抗体をコートした磁気ビーズを細胞に付着させ、細胞間接着部位での JAM-A に依存した張力負荷を模した刺激を行うと RhoA が活性化される。これをモデルとして RhoGEF が探索され、GEF-H1 と p115RhoGEF (別名 ARHGEF1) の関与が見出された<sup>33)</sup>。また、GEF-H1 が微小管との結合によって活性が制御されることはよく知られていたが、力覚応答における GEF-H1 と微小管の相互作用の役割は不明であった。これに対し、接着斑において KN motif and Ankyrin repeat domains 1 (KANK1) タンパク質が微小管を係留することで GEF-H1 を抑制し、接着斑の動的状態を維持する (不安定化) することが示された<sup>34)</sup>。これは、接着斑の形成と消失のターンオーバーを促す機構として働くもので、Talin の下流で基質の硬さに対する応答に寄与すると考えられている<sup>34)</sup>。

## 7. RGS-RhoGEF ファミリー

LARG, PDZ-RhoGEF (別名 ARHGEF11), p115 RhoGEF は、Dbl ファミリーの中で、Regulator of G protein signaling (RGS) ドメインを N 末端に持つサブファミリーを構成している<sup>24, 35)</sup>。RGS ドメインは 3 量体型 G タンパク質の  $\alpha$  サブユニットの活性を抑制するドメインとして知られ、RGS-RhoGEF は、G タンパク質共役型受容体 (G protein-coupled receptor: GPCR) の下流で  $G\alpha 12/G\alpha 13$  を抑制すると共に、その結合によって活性化し、RhoA を活性化することが知られていた<sup>36)</sup>。力覚応答については、先に記した磁気ビーズによる Integrin を介した細胞への張力負荷で、RhoA を活性化する RhoGEF として LARG の関与が示された。また先に記したように、p115RhoGEF は細胞間接着因子である JAM-A を介した細胞への引張刺激において RhoA の活性化に必要であることが明らかにされた<sup>33)</sup>。また、PDZ-RhoGEF は、細胞間接着部位における張力によって局在変化し、細胞間接着構造の制御に寄与することが示唆されている<sup>37)</sup>。RGS-RhoGEF の上流因子である  $G\alpha 12/G\alpha 13$  は、GPCR からのシグナルの他に心筋細胞などへの伸展の刺激で RhoA を活性化するために必要であることが報告されており<sup>38)</sup>、上流のメカノセンサーからのシグナルを受けて  $G\alpha 12/G\alpha 13$  が RGS-RhoGEF の活性化を制御している可能性が考えら

れる。

## 8. p114RhoGEF (別名 ARHGEF18)

Yap らのグループは、イヌ腎上皮 MDCK 細胞の細胞層において、薬剤によるアクトミオシンの活性化や直接の引張によって細胞間接着部位への張力を負荷する実験方法を確立した。これを用い、細胞間接着部位への張力負荷依存性な RhoA の活性化に必要な RhoGEF が探索された<sup>22)</sup>。p114RhoGEF は、上皮細胞の細胞間接着部位における RhoA の活性を制御することや、上皮細胞集団の層構造において、細胞間接着部位の頂端側を取り巻くアクトミオシンリングの収縮力発生に関与することが報告されていたことから検討された<sup>39-41)</sup>。その結果、張力の負荷によって p114RhoGEF が細胞間接着部へ集積し RhoA を活性化することが見出された。また、p114RhoGEF は、3 量体型 G タンパク質の下流で働く RhoGEF の一つであることから検討され、3 量体型 G タンパク質の  $G\alpha 12/G\alpha 13$  が、p114RhoGEF の張力負荷依存性な細胞間接着部への集積に必要であることが示された。さらに、 $G\alpha 12/G\alpha 13$  の集積にはモータータンパク質である MyosinVI が必要であり、MyosinVI の E-Cadherin への結合がそれらのタンパク質の細胞間接着部位への局在を規定していることが示された<sup>22)</sup>。MyosinVI は、アクチン線維上を動くモータータンパク質であるが、結合したアクチン線維への力の負荷によって ATPase 活性が変化することでテンションセンサーとして働くことが示唆されている<sup>42)</sup>。細胞間接着部位への張力負荷は細胞内のアクチン線維と結合した E-Cadherin に作用し、細胞内のアクチン線維に張力を負荷する。これにより MyosinVI と E-Cadherin との親和性が増加し、 $G\alpha 12/G\alpha 13$ , p114RhoGEF が集積して RhoA を活性化するモデルが提唱されている<sup>22)</sup>。仮説の段階ではあるが、新規なメカノセンサータンパク質の同定から RhoGEF に至るシグナル伝達経路が示された興味深い報告である。

## 9. Solo (別名 ARHGEF40)

Solo は、低分子量 G タンパク質 Rho ファミリーの一つである Rac3 の結合タンパク質として酵母ツーハイブリットスクリーニングで見出され、RhoA と RhoC の

GEFとして働く RhoGEFである<sup>43)</sup>。また、ゼブラフィッシュの初期発生過程で、原腸陥入時の中胚葉細胞の収束伸長に必要なタンパク質であることが報告されていた<sup>44)</sup>。私たちは、血管内皮細胞に対し、繰り返し伸展刺激によって誘導される細胞の配向、整列をモデルに Dblファミリーの RhoGEF の RNA 干渉によるスクリーニングを行い、関与するものとして Solo, LARG や GEF-H1 を含む 11 種類同定した<sup>45)</sup> (表 1)。その中で、Solo タンパク質について解析を進め、VE-Cadherin や Fibronectin をコートした磁気ビーズを用いた細胞への引張刺激による RhoA の活性化に必要であることを明らかにした<sup>46)</sup>。さらに、Solo に対するプロテオミクス解析により、Solo は、単層上皮特異的に発現する中間径フィラメントである Keratin8/Keratin18 (K8/K18) 繊維に結合することを見出した<sup>46)</sup>。Solo は、N 末端から C 末端にかけて少なくとも 3 箇所の K8/K18 繊維との結合部位を有し、N 末端部の K8/K18 繊維との結合能を失うと張力負荷による RhoA の活性化の能力を失い、逆に優性不活性化型として振る舞うことを見出した。K8/K18 繊維を発現抑制した場合も張力負荷依存的な RhoA の活性化は抑制され、ケラチン繊維との相互作用が細胞の張力感知と RhoA の活性化による収縮力の発生に必要であることを明らかにした<sup>46)</sup>。上皮細胞は、細胞間接着を維持しながら細胞集団が同調して移動する集団移動を行うことが知られている。この時に細胞間接着部位に作用

する力によって細胞の同期した運動が制御されていると考えられる。イヌ腎上皮 MDCK 細胞の集団移動について Solo, 又は、K8/K18 の発現抑制を行うと、個々の細胞の移動速度は変化しないが、細胞集団となった時の移動速度が加速することが明らかになった<sup>47)</sup>。LARG と p115RhoGEF の発現抑制によっても同じように集団移動速度の上昇が見られており、これらの RhoGEF は、細胞間接着部位における張力の発生や力の平衡化に寄与していることが示唆される<sup>48-49)</sup>。

### 10. Obscurin (別名 ARHGEF30)

RhoA の GEF として働く Obscurin を発現抑制した乳腺上皮細胞を硬さの異なる基質上で培養すると、1 kPa 以上の硬さで細胞の運動性や移動速度が上昇することが見出された<sup>50)</sup>。Obscurin は、乳癌の転移を抑制する働きを持つことが示唆されており、基質の硬さに応じて RhoA を活性化し、接着斑の増強と収縮力の発生で細胞の移動を抑制する働きを持つことが示唆された。逆に、癌細胞における Obscurin の欠損は、硬さに対する細胞の応答が変化し、軟らかい乳腺組織において癌細胞の運動性の亢進を促し、転移を促進してしまうと考えられる<sup>50)</sup>。Obscurin は、類似した構造をもつ Obscurin-like-1 とサブファミリーを形成している。Obscurin と Obscurin-like-1 は、筋肉のサルコメア構造を形成するタンパク質である Titin と Myomesin を架橋するものとしても働

表 1. 力覚応答に關与する RhoGEF

Rho-GEFs	別名	関与する機械刺激	標的 Rho タンパク質	参考文献
Abr		繰り返し伸展刺激	RhoA/Rac1/Cdc42	45)
Alsin	ALS2	繰り返し伸展刺激	Rac1	45)
ARHGEF10	GEF10	繰り返し伸展刺激	RhoA/RhoB/RhoC	45)
Bcr	Bcr1	繰り返し伸展刺激	RhoA/Rac1/Cdc42	45)
GEF-H1	ARHGEF2	繰り返し伸展刺激, 細胞間, 細胞-基質間接着への張力負荷	RhoA	31-34)
LARG	ARHGEF12	繰り返し伸展刺激, 張力負荷	RhoA	32)
Obscurin	ARHGEF30	基質の硬さ(細胞-基質間接着への張力負荷)	TC10	50)
p114RhoGEF	ARHGEF18	繰り返し伸展刺激	RhoA/Rac1	22)
p115RhoGEF	ARHGEF1	細胞間接着の張力負荷	RhoA	22,23)
p190RhoGEF	ARHGEF28/RGNEF	繰り返し伸展刺激	RhoA	45)
PDZ-RhoGEF	ARHGEF11	細胞間接着の張力負荷	RhoA	37)
PLEKHG1	ARHGEF41	繰り返し伸展刺激	Rac1/Cdc42	45)
P-REX2		繰り返し伸展刺激	Rac1-3/Cdc42/RhoG/TC10	45)
Solo	ARHGEF40/Scambio/Quo	繰り返し伸展刺激, 張力負荷, 細胞間接着の張力負荷	RhoA/RhoC	45-47)
$\alpha$ -Pix	ARHGEF6/COOL-2	繰り返し伸展刺激, 細胞間接着の張力負荷	Rac1/Cdc42	45)
$\beta$ -Pix	ARHGEF7/COOL-1	繰り返し伸展刺激	Rac1/Cdc42	45,52)
Vav-2		繰り返し伸展刺激	RhoA	28)

いており、サルコメア構造の力学的な安定性に重要な役割を担っていることが知られている<sup>51)</sup>。この働きに RhoGEF としての活性が必要であるかは不明であるが、直接機械的な力が負荷される分子であることから、力覚応答に特化した機能を持つ可能性がある RhoGEF の一つである。

### 11. $\beta$ -Pix (別名 ARHGEF7, COOL-1)

癌細胞の転移能と P-Cadherin の発現に相関があることが知られている。また、癌細胞の浸潤や転移は細胞の集団移動によって進行することが知られている。これらの知見から P-Cadherin の集団移動に対する機能が解析され、移動方向に対する細胞-基質間、細胞間の収縮力の発生方向に P-Cadherin が特異的に寄与することが示された<sup>52)</sup>。これは P-Cadherin が、移動による細胞間の張力の感知と収縮力の発生に関与することを示唆している。P-Cadherin の結合タンパク質として  $\beta$ -Pix が同定され、 $\beta$ -Pix は、P-Cadherin 依存的な集団移動時の力の発生に必要であることが示された。また、集団移動時に P-Cadherin 依存的な Rho タンパク質の Cell division cycle 42 (Cdc42) の活性化に必要であることが示された<sup>52)</sup>。間接的ではあるが、Cdc42 を活性化する GEF が細胞間接着における張力に応答して働くことを示した報告である。

### 12. 繰り返し伸展刺激による細胞の配向に関する

#### RhoGEF

私たちは、Solo, LARG, GEFH1 とともに、繰り返し伸展刺激による血管内皮細胞の配向に関する RhoGEF として Abr, Alsin, ARHGEF10, Bcr, p190RhoGEF, PLEKHG1, P-REX2,  $\beta$ -Pix を見出した (表 1)。これらの中で p190RhoGEF と GEF-H1, Bcr と Abr,  $\alpha$ -Pix と  $\beta$ -Pix は各々 DH-PH ドメイン以外でも類似した構造をもつ RhoGEF であり<sup>24-25)</sup>、力覚応答において類似した働きを持つことが推測される。また、Alsin, PLEKHG1, pREX2,  $\beta$ -Pix は、アクチン骨格による突出構造である葉状仮足や糸状仮足の形成を促す Rac や Cdc42 を活性化する RhoGEF である。RhoA 以外の Rac や Cdc42 を制御している RhoGEF は新たな力覚応答の分子機構や役割を持つことが推測される。

### 13. おわりに

力覚応答を制御する分子機構は、今まさに様々な分子の関与が明らかにされつつある。しかし、センサーとして機能する分子や仕組みは未だにわずかしか明らかにされていない。RhoGEF タンパク質は、RhoGAP と共にアクチン骨格の再構築を制御する分子群の中で、その種類が多様化している分子群であることから、機械的な力によってその活性が変化するものが存在している可能性は高いと考えられる。また、分子の立体構造とその力学特性が正確に予測できるようになれば、メカノセンサータンパク質として機能するタンパク質やそのモチーフが予測できると考えられる。それらと Rho シグナルをメカノセンサー分子まで追跡する研究を積み重ねることで、力覚応答の分子機構の全貌が明らかにされて行くことが期待される。力覚応答に関するタンパク質は、癌の発症や悪性化、代謝の制御や組織のバリア機能などの不全による多くの疾患に関連することが示唆される。これらの疾患の原因を解明し治療をする上で、力覚応答の分子機構の研究は、今後、さらに重要になると考えられる。

#### 参考文献

- 1) Orr, A. W., et al.: Mechanisms of mechanotransduction, *Dev. Cell.* **10**, 11 (2006).
- 2) Vogel, V. and Sheetz, M.: Local force and geometry sensing regulate cell functions, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 265 (2006).
- 3) Jaalouk, D. E. and Lammerding, J.: Mechano-transduction gone awry, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 63 (2009).
- 4) Coste, B., et al.: Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels, *Science.* **330**, 55 (2010).
- 5) Caterina, M. J., et al.: The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway, *Nature.* **389**, 816 (1997).
- 6) Earley, S., et al.: The physiological sensor channels TRP and piezo: Nobel Prize in Physiology or Medicine 2021, *Physiol. Rev.* **102**, 1153 (2022).
- 7) Iskratsch, T., et al.: Appreciating force and shape—the rise of mechanotransduction in cell



- biology, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 825 (2014).
- 8) Huveneers, S. and de Rooij, J.: Mechanosensitive systems at the cadherin-F-actin interface, *J. Cell Sci.* **126**, 403 (2013).
  - 9) Fujiwara, S., et al.: [Roles of cytoskeletons and cell adhesions in mechano-sensing], *Seikagaku.* **88**, 443 (2016).
  - 10) Ohashi, K., et al.: Roles of the cytoskeleton, cell adhesion and rho signalling in mechanosensing and mechanotransduction, *J. Biochem.* **161**, 245 (2017).
  - 11) Pollard, T. D. and Borisy, G. G.: Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments, *Cell.* **112**, 453 (2003).
  - 12) Kelkar, M., et al.: Mechanics of the cellular actin cortex: From signalling to shape change, *Curr. Opin. Cell Biol.* **66**, 69 (2020).
  - 13) Wu, J., et al.: Touch, Tension, and Transduction - The Function and Regulation of Piezo Ion Channels, *Trends Biochem. Sci.* **42**, 57 (2017).
  - 14) Earley, S. and Brayden, J. E.: Transient receptor potential channels in the vasculature, *Physiol. Rev.* **95**, 645 (2015).
  - 15) Hayakawa, K., et al.: Actin filaments function as a tension sensor by tension-dependent binding of cofilin to the filament, *J. Cell Biol.* **195**, 721 (2011).
  - 16) Kong, F., et al.: Demonstration of catch bonds between an integrin and its ligand, *J. Cell Biol.* **185**, 1275 (2009).
  - 17) Rognoni, L., et al.: Dynamic force sensing of filamin revealed in single-molecule experiments, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 19679 (2012).
  - 18) del Rio, A., et al.: Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding, *Science.* **323**, 638 (2009).
  - 19) Elosegui-Artola, A., et al.: Mechanical regulation of a molecular clutch defines force transmission and transduction in response to matrix rigidity, *Nat. Cell Biol.* **18**, 540 (2016).
  - 20) Yamashita, H., et al.: The role of the interaction of the vinculin proline-rich linker region with vinexin alpha in sensing the stiffness of the extracellular matrix, *J. Cell Sci.* **127**, 1875 (2014).
  - 21) Miyake, Y., et al.: Actomyosin tension is required for correct recruitment of adherens junction components and zonula occludens formation, *Exp. Cell Res.* **312**, 1637 (2006).
  - 22) Acharya, B. R., et al.: A Mechanosensitive RhoA Pathway that Protects Epithelia against Acute Tensile Stress, *Dev. Cell.* **47**, 439 (2018).
  - 23) Mosaddeghzadeh, N. and Ahmadian, M. R.: The RHO Family GTPases: Mechanisms of Regulation and Signaling, *Cells.* **10**, (2021).
  - 24) Rossman, K. L., et al.: GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 167 (2005).
  - 25) Cook, D. R., et al.: Rho guanine nucleotide exchange factors: regulators of Rho GTPase activity in development and disease, *Oncogene.* **33**, 4021 (2014).
  - 26) Tcherkezian, J. and Lamarche-Vane, N.: Current knowledge of the large RhoGAP family of proteins, *Biol. Cell.* **99**, 67 (2007).
  - 27) Hoon, J. L., et al.: The Regulation of Cellular Responses to Mechanical Cues by Rho GTPases, *Cells.* **5**, (2016).
  - 28) Peng, F., et al.: Mechanical stretch-induced RhoA activation is mediated by the RhoGEF Vav2 in mesangial cells, *Cell Signal.* **22**, 34 (2010).
  - 29) Barfod, E. T., et al.: Src regulates distinct pathways for cell volume control through Vav and phospholipase Cgamma, *J. Biol. Chem.* **280**, 25548 (2005).
  - 30) Kaunas, R., et al.: Cooperative effects of Rho and mechanical stretch on stress fiber organization, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**, 15895 (2005).
  - 31) Birukova, A. A., et al.: Mechanotransduction by GEF-H1 as a novel mechanism of ventilator-induced vascular endothelial permeability, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **298**, L837

- (2010).
- 32) Guilluy, C., et al.: The Rho GEFs LARG and GEF-H1 regulate the mechanical response to force on integrins, *Nat. Cell Biol.* **13**, 722 (2011).
  - 33) Scott, D. W., et al.: Tension on JAM-A activates RhoA via GEF-H1 and p115 RhoGEF, *Mol. Biol. Cell.* **27**, 1420 (2016).
  - 34) Rafiq, N. B. M., et al.: Publisher Correction: A mechano-signalling network linking microtubules, myosin IIA filaments and integrin-based adhesions, *Nat. Mater.* **18**, 770 (2019).
  - 35) Siehler, S.: Regulation of RhoGEF proteins by G12/13-coupled receptors, *Br. J. Pharmacol.* **158**, 41 (2009).
  - 36) Hart, M. J., et al.: Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by Galpha13, *Science.* **280**, 2112 (1998).
  - 37) Ito, S., et al.: Induced cortical tension restores functional junctions in adhesion-defective carcinoma cells, *Nat. Commun.* **8**, 1834 (2017).
  - 38) Nishida, M., et al.: P2Y6 receptor-Galpha12/13 signalling in cardiomyocytes triggers pressure overload-induced cardiac fibrosis, *EMBO J.* **27**, 3104 (2008).
  - 39) Nakajima, H. and Tanoue, T.: Lulu2 regulates the circumferential actomyosin tensile system in epithelial cells through p114RhoGEF, *J. Cell Biol.* **195**, 245 (2011).
  - 40) Niu, J., et al.: G Protein betagamma subunits stimulate p114RhoGEF, a guanine nucleotide exchange factor for RhoA and Rac1: regulation of cell shape and reactive oxygen species production, *Circ. Res.* **93**, 848 (2003).
  - 41) Terry, S. J., et al.: Spatially restricted activation of RhoA signalling at epithelial junctions by p114RhoGEF drives junction formation and morphogenesis, *Nat. Cell Biol.* **13**, 159 (2011).
  - 42) Chuan, P., et al.: Robust mechanosensing and tension generation by myosin VI, *J. Mol. Biol.* **405**, 105 (2011).
  - 43) Curtis, C., et al.: Scambio, a novel guanine nucleotide exchange factor for Rho, *Mol. Cancer.* **3**, 10 (2004).
  - 44) Daggett, D. F., et al.: Developmentally restricted actin-regulatory molecules control morphogenetic cell movements in the zebrafish gastrula, *Curr. Biol.* **14**, 1632 (2004).
  - 45) Abiko, H., et al.: Rho guanine nucleotide exchange factors involved in cyclic-stretch-induced reorientation of vascular endothelial cells, *J. Cell Sci.* **128**, 1683 (2015).
  - 46) Fujiwara, S., et al.: Interplay between Solo and keratin filaments is crucial for mechanical force-induced stress fiber reinforcement, *Mol. Biol. Cell.* **27**, 954 (2016).
  - 47) Isozaki, Y., et al.: The Rho-guanine nucleotide exchange factor Solo decelerates collective cell migration by modulating the Rho-ROCK pathway and keratin networks, *Mol. Biol. Cell.* **31**, 741 (2020).
  - 48) Kher, S. S., et al.: A novel role for p115RhoGEF in regulation of epithelial plasticity, *PLoS One.* **9**, e85409 (2014).
  - 49) Medlin, M. D., et al.: Sphingosine 1-phosphate receptor 2 signals through leukemia-associated RhoGEF (LARG), to promote smooth muscle cell differentiation, *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 1779 (2010).
  - 50) Stroka, K. M., et al.: Loss of giant obscurins alters breast epithelial cell mechanosensing of matrix stiffness, *Oncotarget.* **8**, 54004 (2017).
  - 51) Pernigo, S., et al.: Binding of Myomesin to Obscurin-Like-1 at the Muscle M-Band Provides a Strategy for Isoform-Specific Mechanical Protection, *Structure.* **25**, 107 (2017).
  - 52) Plutoni, C., et al.: P-cadherin promotes collective cell migration via a Cdc42-mediated increase in mechanical forces, *J. Cell Biol.* **212**, 199 (2016).



# 総 説

## ペプチド系天然物の生合成に関する tRNA 依存型アミド合成酵素

丸山 千登勢\*, 濱野 吉 十\*

### 1. はじめに

ペプチド系天然物は、その多くが細菌やカビなどの微生物によって生産され、臨床利用されている<sup>1,2)</sup>。これらを構成するアミノ酸は、リボソーム依存的またはリボソーム非依存的なシステムの触媒により、アミド（ペプチド）結合を介して結合している。ATP-grasp ligase<sup>3)</sup> (図 1A) や非リボソーム型ペプチド合成酵素<sup>1,2)</sup> (NRPS, 図 1B) はリボソームに依存しないアミド合成酵素の代表的な一群であり、その触媒過程には、基質アミノ酸のカルボキシル基の、ATP-grasp ligase ではリ

ン酸化、NRPS ではアデニル化による ATP 依存的な活性化が必須である。ATP-grasp ligase は、形成したアミノアシル-リン酸 (aa-P) を直接伸長ユニットとして使用してペプチド鎖の形成と伸長を触媒する。しかしながら NRPS においては、アミノアシル-アデニル酸 (aa-AMP) は、peptide carrier protein (PCP) ドメイン上の 4'-phosphopantetheine 基の SH 基に転移され、チオエステル結合で PCP ドメインに共有結合したアミノ酸は、ペプチド鎖を伸長するための伸長ユニットとして使われる。ATP-grasp ligase は aa-P とフリーで存在

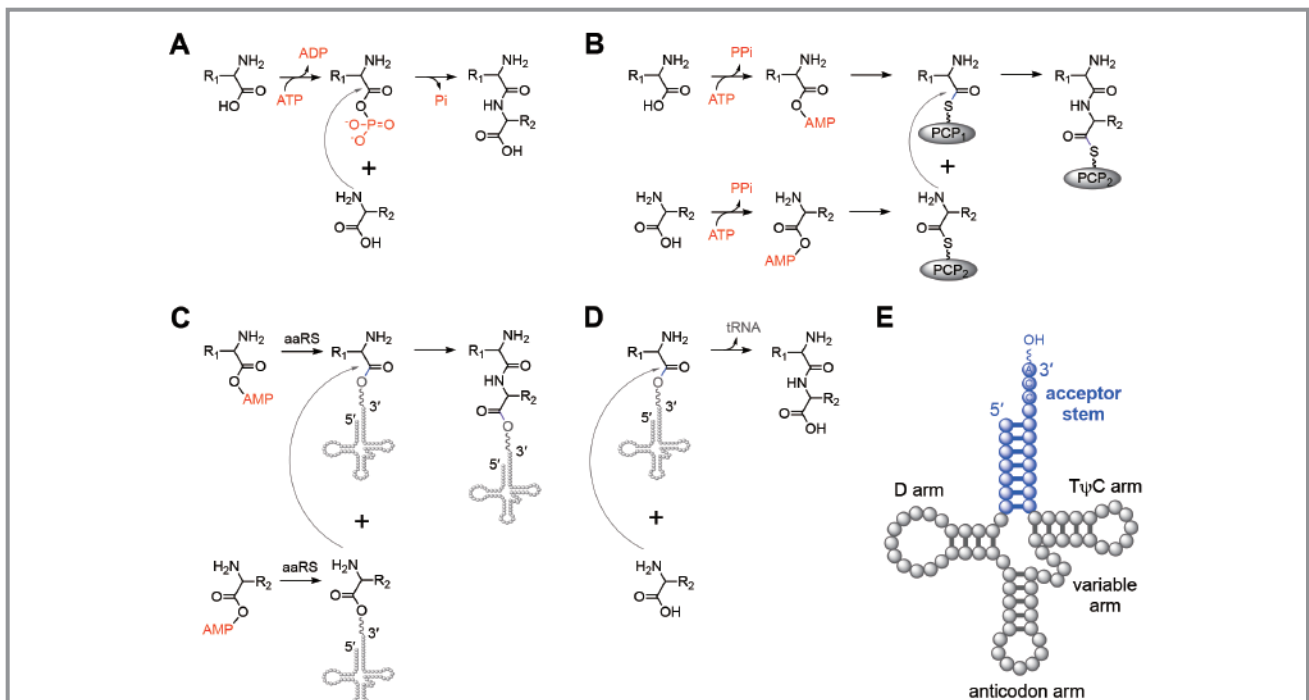


図 1 ペプチド鎖伸長におけるアミド形成の反応機構

A. ATP-grasp ligase : ATP 依存的にリン酸化による基質アミノ酸の活性化とアミド合成反応を触媒する . B. NRPS:基質アミノ酸は ATP 依存的にアデニル化され、PCP ドメインにチオエステル結合を介して活性化され、アミド形成に使用される. C. リボソーム依存的な翻訳システム：タンパク性アミノ酸基質は aaRS の触媒により、tRNA とのエステル結合を介して活性化され、タンパク合成に使用される. D. tRNA 依存型アミド合成酵素：タンパク質合成システムで aaRS によって形成される aa-tRNA を基質としてアミド合成反応を触媒する. E. tRNA の二次構造

\* 福井県立大学大学院 生物資源学研究所

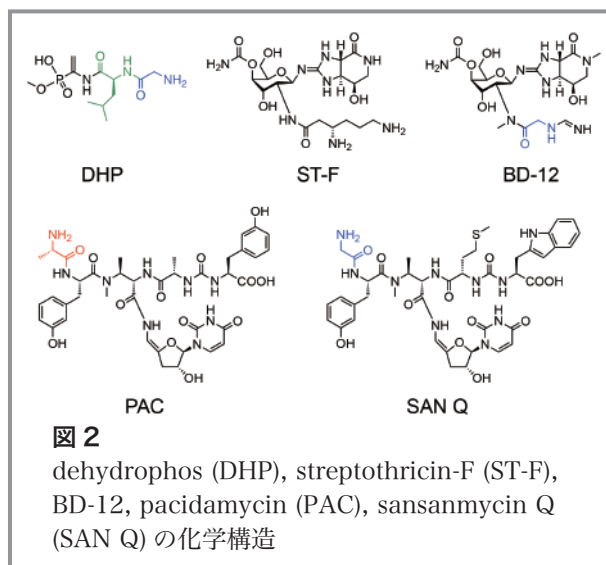
するアミノ酸との縮合反応を触媒するが、NRPS ではペプチド結合の形成が PCP ドメイン上で行われる。したがって、同じリボソーム非依存的な ATP-grasp ligase と NRPS であるが、基質アミノ酸の活性化とアミド形成システムに違いがある。しかしこれら 2 つのシステムはどちらも、基質としてタンパク性アミノ酸も非タンパク性アミノ酸も使用できることから、多様な構造を持つ生成物を作り出すことができる<sup>4-6)</sup>。

それと比較して、リボソーム依存的なペプチド結合形成においては、基質となるタンパク性アミノ酸の厳密な選択と結合に、多くの巨大分子の協調的な働きによる複雑なプロセスが必要であり、それにより基質アミノ酸のカルボキシル基はアデニル化によって活性化される (図 1C)。このように形成された aa-AMP は、それぞれのアミノ酸に適した tRNA に転移され、アミノアシル-tRNA (aa-tRNA) が形成される<sup>7)</sup>。この工程は、aa-tRNA 合成酵素 (aaRS)<sup>8)</sup> として知られる各アミノ酸特異的な活性化酵素によって触媒され、アミノ酸はそのアミノ酸に適した tRNA のリボース 3'-末端の水酸基にエステル結合を介して付与される。このように NRPS のシステムは、アミノ酸の活性化体として PCP ドメインとのチオエステル結合を利用し、リボソーム型の翻訳システムでは、タンパク性アミノ酸の活性化体に tRNA とのエステル結合を利用し、これら 2 つのシステムにおけるペプチド鎖の伸長はどちらも、tRNA や PCP などの巨大な生体分子を足場として起こるといって共通している。

aa-tRNA は元来、リボソーム型翻訳システムで同定されたものであるが、近年、aa-tRNA 依存型酵素が一次代謝・二次代謝に関わらず、様々な細胞内プロセスで利用されていることが明らかになっている<sup>7)</sup>。特にペプチド系天然生理活性物質の生合成において、aa-tRNA をアミノアシル供与体として利用する酵素ファミリーの数は着実に増加している (図 1D)<sup>9, 10)</sup>。本総説では、近年、急速に増加する GCN5-related N-acetyltransferase (GNAT) fold を有する tRNA 依存型アミド合成酵素の知見について述べる。

## 2. dehydrophos の生合成に関与する GNAT-fold tRNA 依存型アミド合成酵素

dehydrophos (DHP, 図 2) は *Streptomyces luridus*



によって生産される phosphonopeptide 抗生物質であり、グラム陰性・陽性の両者に対して幅広い抗菌活性を有する。DHP の N 末端に存在する Gly と L-Leu からなるジペプチド構造は、細胞内への取り込みを促進し、抗菌活性に必須の構造であることが明らかになっている<sup>11)</sup>。ジペプチド分子の生合成には、2 つの GNAT-fold tRNA 依存型酵素、DhpK と DhpH の C 末端ドメイン (DhpH-C) が関与しており、これらの酵素はそれぞれ Gly-tRNA<sup>Gly</sup> と Leu-tRNA<sup>Leu</sup> を基質にアミド結合を形成する (図 3A)<sup>12)</sup>。機能未知タンパクについて、立体構想予測を基に機能推定するオンラインプログラム、HHpred を用いた解析で、DhpH-C と DhpK は、ペプチドグリカン生合成に関与する酵素である Fem transferase の立体構造に類似していることが示された (図 3B)。ペプチドグリカンの構成ユニットは、N-acetylmuramic acid (MurNAc) と N-acetylglucosamine (GlcNAc) からなり、MurNAc にはペプチドが結合している<sup>14)</sup>。グラム陽性菌において Fem transferase は、ペプチドグリカン前駆体である UDP-MurNAc-peptapeptide の 3 番目に位置する L-Lys (グラム陰性菌では meso-diaminopimelic acid) の側鎖アミン ( $\epsilon$ -アミノ基) に、aa-tRNA からアミノ酸を転移する反応を触媒する。*Weissella viridescens* が有する FemX<sub>WV</sub> は Ala-tRNA<sup>Ala</sup> を使って Ala を転移し、また *Staphylococcus aureus* が有する FemX<sub>Sa</sub> は、Gly-tRNA<sup>Gly</sup> から Gly を転移する<sup>15)</sup>。著者らはこの報告の中で、ペプチドグリカン前駆体へ効率的かつ特異的に Ala を転移するためには tRNA の acceptor stem 構造が重要であることを

示した (図 1E) <sup>15, 16</sup>. 彼らはさらに, FemX<sub>Wv</sub> の活性部位として Phe304 と Lys305 を提唱した <sup>17</sup>. Phe304 は, tRNA<sub>3'</sub> - 末端の CCA 配列のうち, 真ん中の C 残基のリボースと  $\pi$ スタッキングで相互作用し, また Lys305 は, 中間体との静電的相互作用による安定的な結合に重

要な役割を担うと考えられている.

DhpH-C は, Ala(P) と称されるアミノリン酸アナログ, (R)-1-aminoethylphosphanate と Lue-tRNA<sup>Lue</sup> との縮合反応を触媒する (図 3A). 近年, van der Donk らは, DhpH-C と tRNA<sup>Lue</sup> の変異解析による触媒残基の同定と基質認識機構の解明を試みた <sup>18, 19</sup>. この報告で著者らは, DhpH-C は tRNA<sup>Lue</sup> の acceptor stem 構造と tRNA<sup>Lue</sup> に結合したアミノアシル基の両方を認識することを明らかにした. また, DhpH-C の Phe328 と Lys329 は, FemX の Phe304 と Lys305 に相当することから, おそらく tRNA と相互作用する Phe-Lys モチーフを形成すると提唱した. DhpH-C は, Lue-tRNA<sup>Lue</sup> に対して最も高い酵素活性を示したが, Ile-tRNA<sup>Lue</sup>, Val-tRNA<sup>Val</sup>, Phe-tRNA<sup>Phe</sup> についても基質認識が可能であり, さらに興味深いことに, DhpH-C は, 2つの非天然型 aa-tRNA 合成基質, Ile-tRNA<sup>Lue</sup> と acceptor stem 構造のみからなる分子についても基質として認識した. これらの知見から著者らは, DhpH-C が有する高い基質寛容性を利用して, Ile-, Ala-, Val-, norvaline-, norleucine-tRNA<sup>Lue</sup> を基質に DHP 類縁体を創出した <sup>20</sup>.

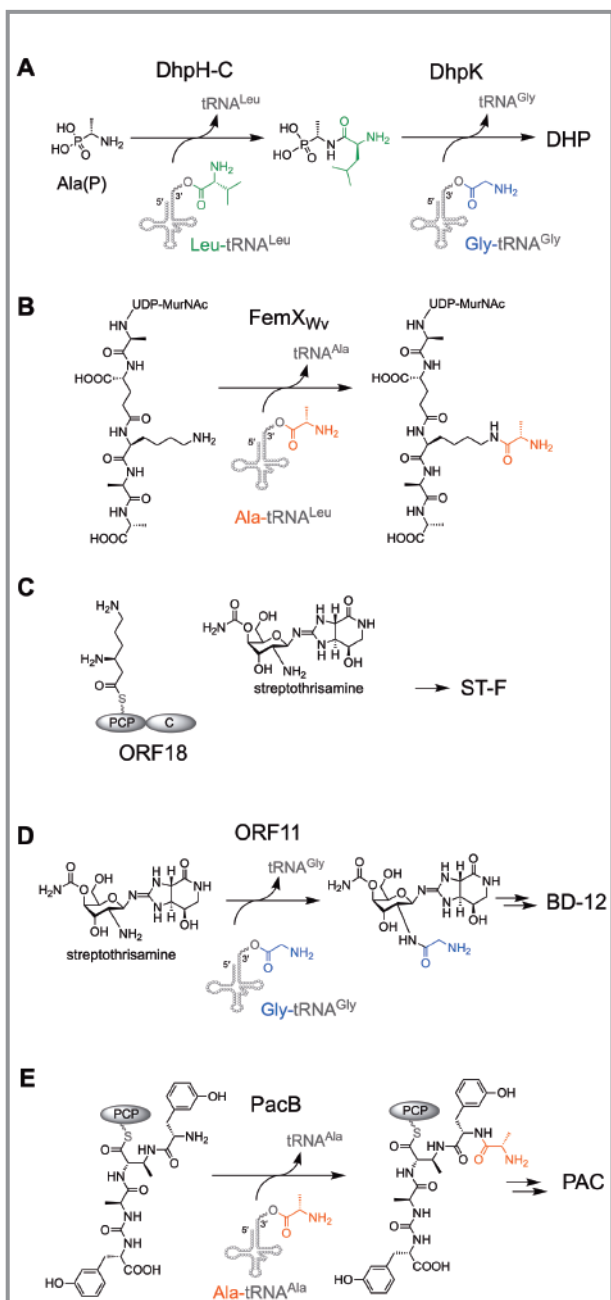


図 3 3本総説に登場する様々なアミド合成酵素の反応機構

DHP 生合成酵素, DhpH-C と DhpK (A), ペプチドグリカン生合成に関与する FemX (B), BD-12 の Gly 側鎖形成に関わる Orf11 (D), PAC 生合成酵素, PacB (E) はいずれも GANT-fold tRNA アミド合成酵素である. また ST-F 生合成は NRPS システムにてアミド形成される (C).

### 3. streptothricin 類縁抗生物質 BD-12 の生合成から見出した GNAT-fold tRNA 依存型アミド結合合成酵素

streptothricin (ST) 類縁化合物は, L- $\beta$ -lysine ( $\beta$ -Lys) やそのオリゴペプチド [oligo( $\beta$ -Lys)] 構造を側鎖に有する N-グリコシド抗生物質の一群であり,  $\beta$ -Lys を 1 残基有する ST-F (図 2) が 1943 年に *Streptomyces lavendulae* から初めて単離された <sup>21</sup>. ST-F は原核生物におけるタンパク質合成系を阻害し <sup>22</sup>, また哺乳類を含む真核生物の生育を強力に阻害する <sup>23-25</sup>. また oligo( $\beta$ -Lys) 側鎖を有する ST 類縁化合物は, 原核・真核生物の両者に対して毒性を示すことから <sup>26, 27</sup>, ST 類縁化合物の中で実際に臨床利用された化合物はない. これらの ST 類縁化合物に加えて, *Streptomyces* 属放線菌は  $\beta$ -Lys の代わりに, Gly 側鎖や Gly 誘導体側鎖を持つ ST 類縁化合物を生産することが知られている. 例えば, *Streptomyces luteocolor* NBRC 13826 によって生産される BD-12 (図 2) は N-formimidoyl-Gly を側鎖に有している <sup>28, 29</sup>.

これまでに我々は ST-F と BD-12 の生合成研究において, streptothrisamine 分子とアミノ酸側鎖とのアミド結合に関わる酵素群を見出し<sup>30, 31)</sup>, 非タンパク性アミノ酸である  $\beta$ -Lys 側鎖の結合には NRPS システムが使用されることを証明した (図 3C)<sup>30)</sup>. 生合成経路は単独型アデニル化 (A) ドメインである Orf5 が  $\beta$ -Lys のアデニル化を触媒することから始まり, 形成された  $\beta$ -lysyl-*O*-AMP は Orf18 の PCP ドメイン上にロードされる<sup>30)</sup>. Orf18 の縮合 (C) ドメインは, 共有結合した  $\beta$ -Lys 残基と, フリーで存在するアミノ糖中間体 streptothrisamine との縮合反応を触媒し, ST-F を生成する<sup>30)</sup>. その一方で, Gly 誘導体側鎖を有する BD-12 の生合成では, FemX 様酵素である Orf11 が, Gly-tRNA<sup>Gly</sup> の Gly を streptothrisamine へ転移することが明らかにした (図 3D)<sup>31)</sup>. HHpred を用いた解析で, Orf11 の推定構造は FemX<sub>Wv</sub> の構造に類似することが示唆されたが, Orf11 の一次構造は有意な類似性を示さなかった<sup>31)</sup>. 前述したように, DHP 生合成に関与する DhpH-C は aa-tRNA 基質に対して寛容な基質認識を有することが示されたが<sup>20)</sup>, Orf11 は Gly-tRNA<sup>Gly</sup> に特異的であり, Ala-tRNA<sup>Ala</sup> を使ってほんのわずかに Ala 側鎖を有する化合物を与えた<sup>31)</sup>. DhpH-C と同じく, Orf11 も aa-tRNA 依存型酵素であるが, 注目すべき点は, Orf11 が基質としてアミノ糖を認識することであり, アミノ酸以外のドナー基質を認識する初めての tRNA 依存型アミド合成酵素であるという点である.

#### 4. uridyl peptide 抗生物質の生合成に関する

##### GNAT-fold tRNA 依存型アミド合成酵素

pacidamycin (PAC, 図 2)<sup>33-35)</sup> や napsamycin (NAP)<sup>36)</sup>, mureidomycin (MRD)<sup>37-39)</sup>, sansanmycin (SAN, 図 2)<sup>40, 41)</sup> は, *Streptomyces* 属放線菌によって生産される uridyl peptide 抗生物質である. これらの化合物はいずれも, 3'-deoxy-4',5'-enaminouridine (あるいはその dihydrouridine 誘導体), *N*-methyl-2s,3s-aminobutyric acid, そして ureido 結合の 3 つの分子を有することを構造的な特徴を持つ. これらの uridyl peptide 抗生物質は, 細菌の translocase I が触媒する脂質中間体の生成を標的としてペプチドグリカン生合成を阻害する.

2010 年に 2 つの異なる研究グループが PAC の生合成遺伝子群の同定を報告し<sup>42, 43)</sup>, 生化学的実験によって生合成経路を解明した<sup>44-46)</sup>. 興味深いことに, pentapeptide 骨格の形成は, NRPS と aa-tRNA 依存的アミド合成酵素の共同作用によるものであった (図 3E). *Streptomyces coeruleorubidus* NRRL 18370 から同定された PacB は, tetrapeptide 中間体の *N* 末端に Ala を導入するために Ala-tRNA<sup>Ala</sup> を使う<sup>47)</sup>. HHpred による解析で, PacB の立体構造は FemX<sub>Wv</sub> や FemX<sub>Sa</sub> の構造と類似しているが, その一次構造は FemX との有意な類似性は示さなかった<sup>47)</sup>.

PacB ホモログ酵素をコードする遺伝子が, NAP や MRD の生合成遺伝子群にも見ついているが, これらの機能については明らかにされていない. しかしながら最近, Hong らのグループが, 新規 sansanmycin 類縁体, SAN Q (図 2) を同定し, SAN 生合成遺伝子群が有する PacB ホモログ遺伝子 ssaB が, tRNA 依存的なアミド形成に関与することを証明した<sup>48)</sup>.

#### 5. おわりに

近年, 原核生物や真核生物から 10 万種類を超える GNAT スーパーファミリーが見出されており, それらはそれぞれに相当する基質の, アシル化を介した複数の生理学的機能に寄与している. このファミリーに属する DhpH-C<sup>12, 18)</sup> や DhpK<sup>12)</sup>, Orf11<sup>31)</sup>, PacB<sup>47)</sup>, SsaB<sup>48)</sup> は, ペプチド系二次代謝産物の生合成研究で見出された. これらの tRNA 依存型触媒機能と tRNA の基質認識に関与する構造上の特徴は, ペプチドグリカン生合成に関わる FemX<sub>Wv</sub> とともにいまだに議論されている<sup>17)</sup>. 実際に DhpH-C は, いくつもの aa-tRNA を認識するほど基質に寛容であるが, 他の酵素 (DhpK, Orf11, PacB, SsaB) は 20 種類の aa-tRNA のうち, 認識する aa-tRNA 基質は 1 種類のみであり, これらの構造的な違いは未解明である. これら酵素群の更なる構造解析は, これらの酵素がどのように基質特異性をコントロールしているのかを理解するために必要であり, その結果, 広い基質特異性を有する変異型酵素が構築できれば, ペプチド系天然物の化学的多様性を広げるアプローチとして有効な手段となりうるだろう.

## 文献

- 1) Sussmuth RD, Mainz A: Nonribosomal peptide synthesis-principles and prospects, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **56**, 3770 (2017)
- 2) Giessen TW, Marahiel MA: Ribosome-independent biosynthesis of biologically active peptides: Application of synthetic biology to generate structural diversity, *FEBS Lett.*, **586**, 2065 (2012)
- 3) Winn M, *et al.*: Harnessing and engineering amide bond forming ligases for the synthesis of amides, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **55**, 77 (2020)
- 4) Hedges JB, Ryan KS: Biosynthetic pathways to nonproteinogenic alpha-amino acids, *Chem. Rev.*, **120**, 3161 (2020)
- 5) Kudo F, *et al.*: 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 (2019)
- 6) Walsh CT, *et al.*: Nonproteinogenic amino acid building blocks for nonribosomal peptide and hybrid polyketide scaffolds, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **52**, 7098 (2013)
- 7) Shepherd J, Ibba M: Bacterial transfer RNAs, *FEMS Microbiol. Rev.*, **39**, 280 (2015)
- 8) Ibba M, Soll D: Aminoacyl-tRNA synthesis, *Annu Rev Biochem.*, **69**, 617-650 (2000).
- 9) Ulrich EC, van der Donk WA: Cameo appearances of aminoacyl-tRNA in natural product biosynthesis, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **35**, 29 (2016)
- 10) Moutiez M, *et al.*: Aminoacyl-tRNA-utilizing enzymes in natural product biosynthesis, *Chem. Rev.*, **117**, 5578 (2017).
- 11) Kuemin M, van der Donk WA: Structure-activity relationships of the phosphonate antibiotic dehydrophos, *Chem. Commun. (Camb)*, **46**, 7694 (2010)
- 12) Bougioukou DJ, *et al.*: Revisiting the biosynthesis of dehydrophos reveals a tRNA-dependent pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **110**, 10952 (2013)
- 13) Soding J, *et al.*: The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction, *Nucleic. Acids. Res.*, **33**, W244 (2005)
- 14) Monteiro JM, *et al.*: The pentaglycine bridges of *Staphylococcus aureus* peptidoglycan are essential for cell integrity, *Sci. Rep.*, **9**, 5010 (2019)
- 15) Dare K, Ibba M: Roles of tRNA in cell wall biosynthesis, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.*, **3**, 247 (2012)
- 16) Villett R, *et al.*: Idiosyncratic features in tRNAs participating in bacterial cell wall synthesis, *Nucleic. Acids Res.*, **35**, 6870 (2007)
- 17) Fonvielle M, *et al.*: The structure of FemX(Wv) in complex with a peptidyl-RNA conjugate: mechanism of aminoacyl transfer from Ala-tRNA(Ala) to peptidoglycan precursors, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **52**, 7278 (2013)
- 18) Ulrich EC, *et al.*: Investigation of amide bond formation during dehydrophos biosynthesis, *ACS Chem. Biol.*, **13**, 537 (2018)
- 19) Zhang Y.: I-TASSER server for protein 3D structure prediction, *BMC Bioinformatics.*, **9**, 40 (2008)
- 20) Bougioukou DJ, *et al.*: Use of the dehydrophos biosynthetic enzymes to prepare antimicrobial analogs of alaphosphin, *Organic & Biomolecular Chemistry*, **17**, 822 (2019)
- 21) Waksman SA: Production and activity of streptothricin, *J. Bacteriol.*, **46**, 299 (1943)
- 22) Haupt I, *et al.*: Streptothricin F, an inhibitor of protein synthesis with miscoding activity, *J. Antibiot.*, **31**, 1137 (1978)
- 23) Inamori Y, *et al.*: Toxicological approaches to streptothricin antibiotics. II. The developmental mechanism of delayed toxicity in mice and rats, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **27**, 230 (1979)
- 24) Inamori Y, *et al.*: Toxicological approaches to streptothricin antibiotics. III. Biological studies on delayed toxicity of streptothricin antibiotics in



- rats, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 27, 2570 (1979)
- 25) Inamori Y, *et al.*: Toxicological approaches to streptothricin antibiotics. I. Implications of delayed toxicity in mice, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 26, 1147 (1978)
- 26) Voronina OI, *et al.*: Streptothricin X, a new antibiotic on the streptothricin group produced under specific biosynthetic conditions, *Antibiotiki (Moscow)*, 14, 1063 (1969)
- 27) Hamano Y, *et al.*: A novel enzyme conferring streptothricin resistance alters the toxicity of streptothricin D from broad-spectrum to bacteria-specific, *J. Biol. Chem.*, 281, 16842 (2006)
- 28) Ito Y, *et al.*: New basic water-soluble antibiotics BD-12 and BY-81. II. Isolation, purification and properties, *J. Antibiot. (Tokyo)*, 21, 307 (1968)
- 29) Furumai T, *et al.*: New basic water-soluble antibiotics BD-12 and BY-81. I. Taxonomy of the producing organisms and antibiotic production, *J. Antibiot (Tokyo)*, 21, 283 (1968)
- 30) Maruyama C, *et al.*: A stand-alone adenylation domain forms amide bonds in streptothricin biosynthesis, *Nat. Chem. Biol.*, 8, 791 (2012)
- 31) Maruyama C, *et al.*: tRNA-dependent aminoacylation of an amino sugar intermediate in the biosynthesis of a streptothricin-related antibiotic, *Appl. Environ. Microbiol.*, 82, 3640 (2016)
- 32) Niikura H, *et al.*: Functional analysis of methyltransferases participating in streptothricin-related antibiotic biosynthesis, *J. Biosci. Bioeng.*, 125, 148 (2018)
- 33) Karwowski JP, *et al.*: *Pacidamycins*, a novel series of antibiotics with anti-*Pseudomonas aeruginosa* activity. I. Taxonomy of the producing organism and fermentation, *J. Antibiot (Tokyo)*, 42, 506 (1989)
- 34) Fernandes PB, *et al.*: *Pacidamycins*, a novel series of antibiotics with anti-*Pseudomonas aeruginosa* activity. III. Microbiologic profile, *J. Antibiot (Tokyo)*, 42, 521 (1989)
- 35) Chen RH, *et al.*: *Pacidamycins*, a novel series of antibiotics with anti-*Pseudomonas aeruginosa* activity. II. Isolation and structural elucidation, *J. Antibiot (Tokyo)*, 42, 512 (1989)
- 36) Chatterjee S, *et al.*: *Napsamycins*, new *Pseudomonas* active antibiotics of the *mureidomycin* family from *Streptomyces* sp. HIL Y-82,11372, *J. Antibiot (Tokyo)*, 47, 595 (1994)
- 37) Isono F, *et al.*: *Mureidomycins* A-D, novel *peptidynucleoside* antibiotics with spheroplast forming activity. III. Biological properties, *J. Antibiot (Tokyo)*, 42, 674 (1989)
- 38) Isono F, *et al.*: *Mureidomycins* A-D, novel *peptidynucleoside* antibiotics with spheroplast forming activity. II. Structural elucidation, *J. Antibiot (Tokyo)*, 42, 667 (1989)
- 39) Inukai M, *et al.*: *Mureidomycins* A-D, novel *peptidynucleoside* antibiotics with spheroplast forming activity. I. Taxonomy, fermentation, isolation and *physico-chemical* properties, *J. Antibiot (Tokyo)*, 42, 662, (1989)
- 40) Xie Y, *et al.*: A new *nucleosidyl-peptide* antibiotic, *sansanmycin*, *J. Antibiot (Tokyo)*, 60, 158 (2007)
- 41) Xie Y, *et al.*: *Sansanmycins* B and C, new components of *Sansanmycins*, *J. Antibiot (Tokyo)*, 61, 237 (2008)
- 42) Zhang W, *et al.*: Identification of the biosynthetic gene cluster for the *pacidamycin* group of *peptidyl nucleoside* antibiotics, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 107, 16828 (2010)
- 43) Rackham EJ, *et al.*: *Pacidamycin* biosynthesis: identification and heterologous expression of the first *uridyl peptide* antibiotic gene cluster, *Chem-biochem*, 11, 1700 (2010)
- 44) Zhang W, *et al.*: Activation of the *pacidamycin PacL* adenylation domain by *MbtH*-like proteins, *Biochemistry*, 49, 9946 (2010)
- 45) Zhang W, *et al.*: Nine enzymes are required for

- assembly of the *pacidamycin* group of peptidyl nucleoside antibiotics, *J. Am. Chem. Soc.*, 133, 5240 (2011)
- 46) Ragab AE, *et al.*: Biogenesis of the unique 4',5'-dehydronucleoside of the *uridyl* peptide antibiotic *pacidamycin*, *J. Am. Chem. Soc.*, 133, 15288 (2011)
- 47) Zhang W, *et al.*: tRNA-dependent peptide bond formation by the transferase *PacB* in biosynthesis of the *pacidamycin* group of *pentapeptidyl* nucleoside antibiotics, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 108, 12249 (2011)
- 48) Shi Y, *et al.*: *Rescrutiny* of the *sansanmycin* biosynthetic gene cluster leads to the discovery of a novel *sansanmycin* analogue with more potency against *Mycobacterium tuberculosis*, *J. Antibiot (Tokyo)*, 72, 769 (2019)



# 総 説

## もやもや病の分子病態をめぐる幾つかの論点

森戸 大介\*, 折井 みなみ\*

### 1. はじめに

もやもや病は原因不明の、かつ現在まで根治療法の確立されていない脳血管疾患である（指定難病 22）<sup>1)</sup>。患者の多くが日本を始めとする東アジアにルーツを持ち、半数程度は 10 歳以下で発病している。体幹から脳に到る主要な血管の一つである内頸動脈の進行性・両側性の狭窄に始まり、動脈内腔の狭小化による脳血流障害、脳虚血、脳梗塞へと病態は進む。さらに、慢性的な脳虚血・低酸素状態への応答として病変部周辺に微細な毛細血管網を新生し（特徴的な形状から煙に例えてもやもや血管と呼ばれる）、血流を代償するが、やがてこの血管が破れて症状の増悪を招く（図 1）。

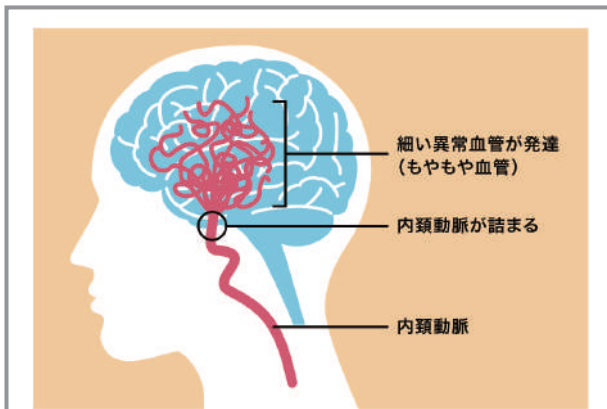


図 1 もやもや病の病態

多くは 10 歳以下の子どもの、内頸動脈が脳底で分岐する付近（内頸動脈終末部）において動脈の狭窄を生じる。そのため体幹から脳への血液供給が障害され、患者は脳虚血・脳梗塞に陥る。血流を代償するためもやもや血管が新生されるが、成人以後にしばしばこの部位から出血を生じる。

もやもや病をめぐる最も主要な問題として、①なぜ内頸動脈（の終末部周辺）でのみ狭窄を生じるのか？（病変の場所の問題）、②どの組織・細胞のどのようなイベントを起点として、どのように病変を形成していくのか？

（プロセス、メカニズムの問題）の二点が挙げられる。

問題①については、もやもや病における内頸動脈終末部以外の血管の形状変化（頭蓋内の末梢動脈全般における動脈外径の縮小）や、後述のもやもや病関連変異が他の狭窄性血管疾患とも相関していることなどが見出されており、必ずしも内頸動脈終末部に限った病態ではないのではないかと考えられ始めている（ただし最も明瞭・高頻度に病変が現れるのは内頸動脈終末部であり、その理由は依然として明らかでない）。

問題②については、病変部の主な病理所見は動脈中膜の菲薄化と内膜の肥厚（と血管内腔の狭小化）であるが、その起点が動脈内皮の異常なのか、それとも動脈平滑筋自体の異常なのか、あるいはマクロファージ等の免疫細胞や血中を循環する造血幹細胞の関与があるのか等、臨床においてもコンセンサスが得られておらず、研究の方向性が定まり難い状況にある。

このような状況を打破し得る重要な手掛かりとして、2011 年にもやもや病発病と深く関わる新規遺伝子の同定が報告された。また特に 2019 年ごろから、本遺伝子に関わる分子・細胞レベルでの重要な発見が相次いでおり、もやもや病の機序解明につながっていくことが予想されるが、個々の発見ともやもや病の関係はまだまだ明瞭でない。著者らは本遺伝子の最初の分子クローニングを行い、これまで生理・病態機能解明を進めてきた。本稿では近年の急速な分子・細胞レベルの知見の集積により幾らか混乱している現況の整理を試みてみたい。

### 2. もやもや病遺伝子ミステリン

もやもや病は日本を始めとする東アジア地域に多い<sup>1)</sup>。東アジアでのもやもや病有病率は約 1/10,000 であり、白人間での有病率約 1/100,000 に比べて 10 倍程度

\* 昭和大学医学部生化学講座

高い。またもやもや病患者の 10 ~ 15% は明瞭な家族歴を示す。これらの事実からもやもや病の発病には民族性あるいは家族性の遺伝要因が関わる事が推測されていた。

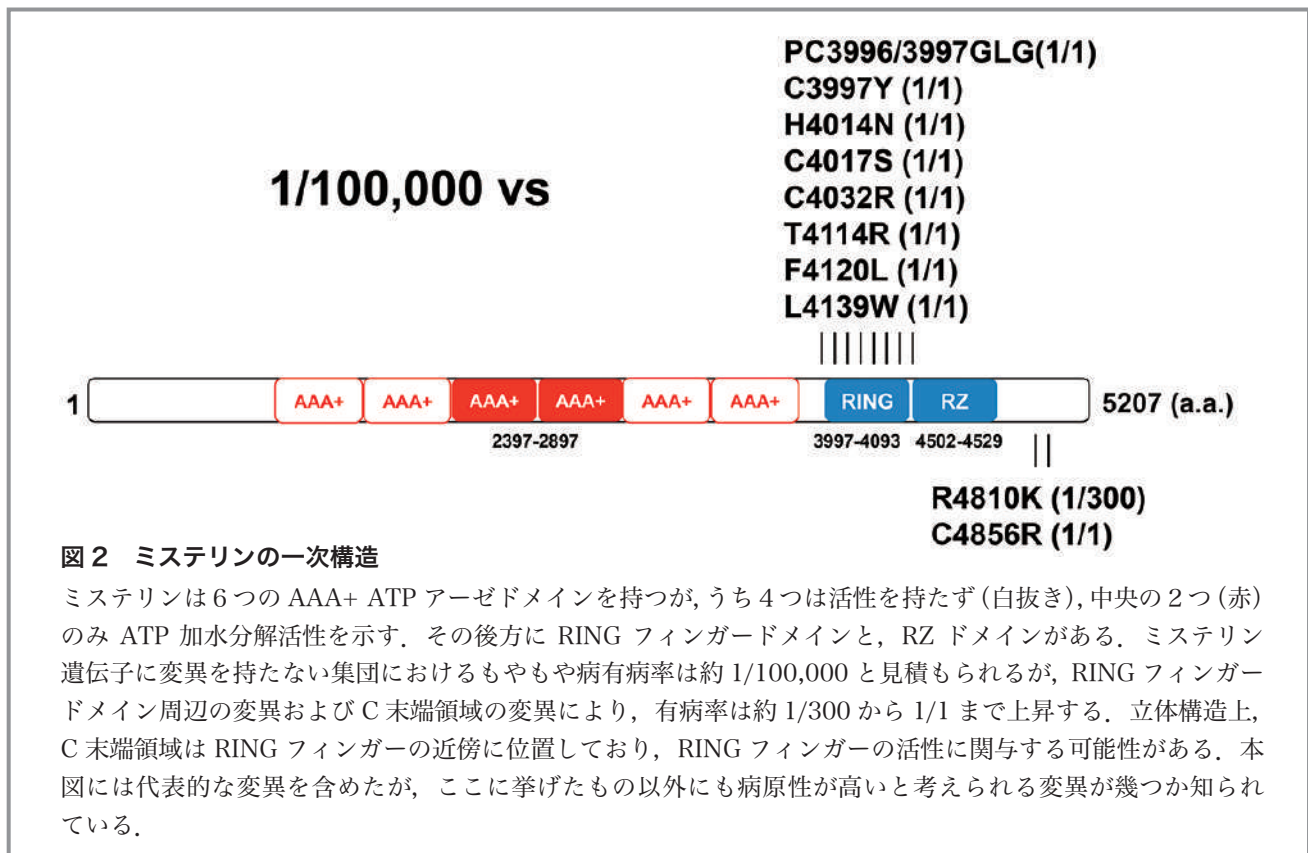
2000 年代の後半ごろ、東北大・医・小児科（呉繁夫教授ら）を中心とするグループと京大・医・環境衛生学（小泉昭夫教授ら）を中心とするグループがそれぞれ東アジア孤発例、家族例に着目した遺伝解析を行い、遺伝要因の同定に独立に成功した<sup>2), 3)</sup>。17 番染色体の長腕末端領域にある新規遺伝子ミスチリン（別名 RNF213）のミスセンス一塩基多型（p.R4810K, あるいは長さの異なるアイソフォーム配列に基づいて p.R4859K とも）がそれである。東アジアもやもや病患者の約 9 割がこの多型の保因者であり、従来孤発例と考えられてきた症例の大部分も、実は遺伝的背景に基づいて発症していたことが明らかとなった。一方で、明瞭な家系を形成する家族例でも同じ多型が同定された点について、なぜ対象家系での発病頻度が同じ多型を有する見かけ上の孤発例の家系内発病頻度を大きく上回るのか、現在も明らかではない（すなわち、明瞭なもやもや病家系を特徴づける要因はいまも明らかでない）。いずれにせよ見かけ上の孤発例、家族例を含む東アジアもやもや病全体と強く相

関する多型が見出され、もやもや病研究の大きな転機となった。

小泉教授らとの共同研究として、著者（森戸、当時・京大・再生研）の手によりミスチリン遺伝子の初めての分子クローニングを行った<sup>3)</sup>。本遺伝子は約 600 kDa の巨大な細胞内タンパク質をコードしており、その後、著者らや Tim Clausen ら（オーストリア・IMP）、Felix Randow と Gisela Otten ら（英・MRC 分生研）によって、これが微小管モーター・ダイニンに類似した 6 連続 AAA+ ATP アーゼドメインと 2 つの亜鉛結合型ユビキチンリガーゼドメイン（RING フィンガーおよび RZ フィンガー）を持つユニークな酵素であることが明らかにされている<sup>3-6)</sup>。

ミスチリンは脊椎動物を含む脊索動物に保存され、ヒト・マウスでは概ねユビキタスな発現パターンを示すが、特に脾臓、マクロファージなど免疫関連組織・細胞に発現が高い<sup>2), 3)</sup>。また当初見出された p.R4810K 多型に加えてその後、幾つかのより病原性の高いもやもや病関連変異が見つかった<sup>7-11)</sup>。ミスチリンの一次構造と主な変異の一覧を図 2 に示す。

ミスチリン遺伝子に変異を持たない集団でのもやもや病有病率は約 1/100,000 であり、p.R4810K 保因者間



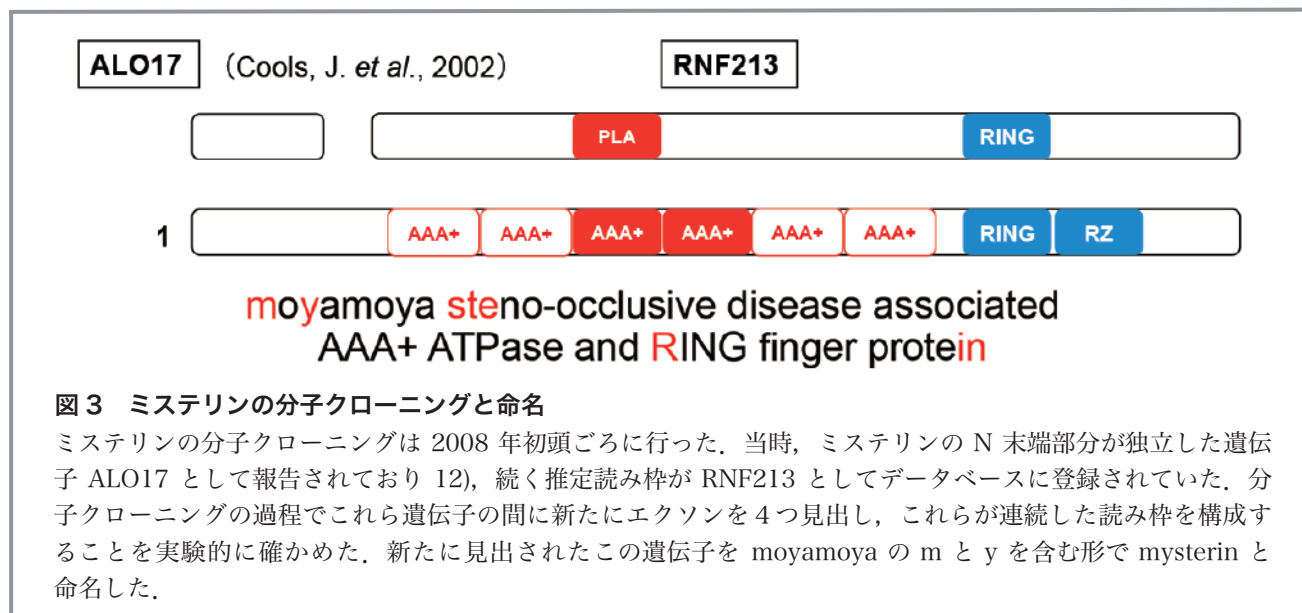


図3 ミステリンの分子クローニングと命名

ミステリンの分子クローニングは2008年初頭ごろに行った。当時、ミステリンのN末端部分が独立した遺伝子 ALO17 として報告されており<sup>12)</sup>、続く推定読み枠が RNF213 としてデータベースに登録されていた。分子クローニングの過程でこれら遺伝子の間に新たにエクソンを4つ見出し、これらが連続した読み枠を構成することを実験的に確かめた。新たに見出されたこの遺伝子を moyamoya の m と y を含む形で *mysterin* と命名した。

ではこれが約 1/300 まで上昇する<sup>2),3)</sup>。p.R4810K は一塩基多型であり東アジア人口の約 0.5～2.5% 程度(全体で約 1,500 万人) が保因している。他方、白人はもともこの多型を持たない。すなわち東アジアでの高いもやもや病有病率は p.R4810K 多型により説明される。p.R4810K 多型の遺伝的浸透率はしかし不完全であり、前述の通り有病率約 1/300、すなわち保因者の約 300 人に 1 人しかももやもや病を発病しない。従ってこれは発病の感受性を増大させる感受性変異であり、発病には追加の遺伝要因ないし環境要因が必要であると考えられる。一方で、その後見出された RING フィンガードメインの保存されたアミノ酸変異や周辺領域変異の保因者は、知られている限り全員がもやもや病を発病している。すなわち有病率 1/1 と推定され、これら変異は追加の要因なしに発病を導く原因変異であると考えられる<sup>7-11)</sup>。

ここで付記としてミステリン遺伝子の命名に触れておきたい。著者が分子クローニングを行った当時、本遺伝子の N 末端領域が独立した遺伝子 ALO17 として論文報告されており<sup>12)</sup>、そこから少し離れて続く推定読み枠が別の遺伝子 RNF213 としてデータベースに登録されていた。クローニングの過程でこれら二つの遺伝子が実は単一の遺伝子を構成することが実験的に確かめられたため、共同研究者間で協議の上、moyamoya の m と y を冠にして本遺伝子を *mysterin* と命名した(図3)。特許申請には本名称を用いたが(特許 5854423, 2009 年出願)<sup>13)</sup>、2011 年の論文発表時には既に何らかの経緯で RNF213 の登録内容が正しい全長読み枠に訂正さ

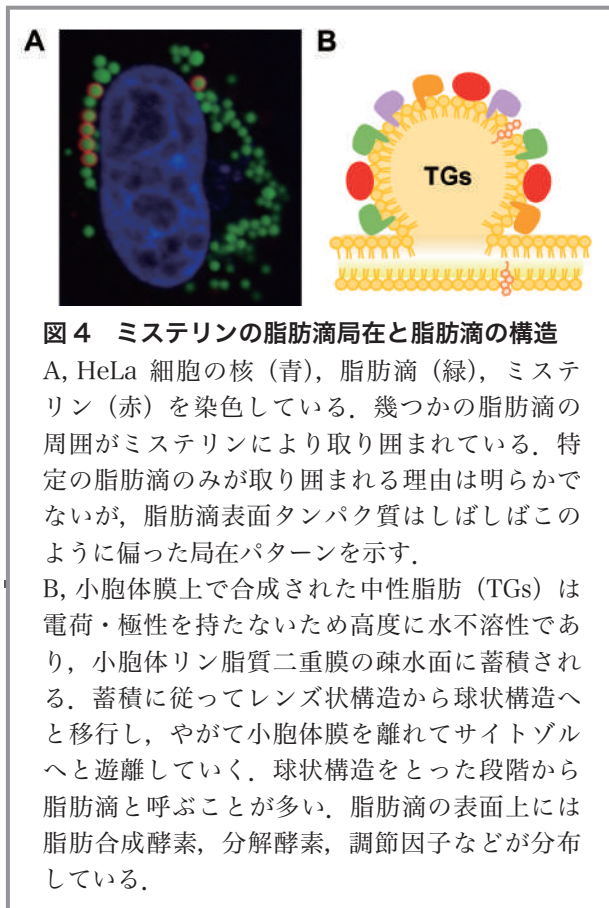
れていたため、論文には RNF213 の名称を用いた<sup>3)</sup>。しかしながら著者にはユニークな名称への愛着もあったため、続報において改めて *mysterin* の名称を提案し<sup>4)</sup>、現在、著者グループを中心に本名称を用いている。

### 3. ミステリンの脂質関連機能

現在までミステリンの生理・病態機能として多岐に渡る生体・細胞内ではたらきが提案されているが、その後の検証を経て確立されたと言えるものはまだ少ない。これまで脂質に関連した機能・現象が比較的良好に確かめられているが、これは著者らによる発見を嚆矢としている。

ミステリンは新規遺伝子であり、同じドメイン構成を持つ既知のファミリー遺伝子も存在しない。そのためクローニング後、ゼロから機能探索を行う必要があった。著者らは幾つかの手法による機能探索を試みる中で、野生型ミステリンタンパク質が特徴的な細胞内局在パターンを示すことに気がついた。細胞培地に脂肪酸を加えると培養細胞は中性脂肪を合成して脂肪の滴として細胞内に蓄積する。野生型ミステリンは脂肪滴を取り囲む美しい局在パターンを示す(図4)<sup>14)</sup>。

よく知られている通り、油は水に溶けない。中性脂肪は単分子として細胞内液中を拡散することはなく、寄り集まって油滴(脂肪滴)を形成する。その表面はリン脂質一重膜に覆われ、内部の疎水環境と外部の親水環境がうまく仲介されている。脂肪滴の表面には脂肪合成酵素、分解酵素、調節因子等が結合しており、細胞外刺激や栄養状態に応じてタイムリーに脂肪の量や脂肪酸のリリー



**図4 ミステリンの脂肪滴局在と脂肪滴の構造**

A, HeLa 細胞の核 (青), 脂肪滴 (緑), ミステリン (赤) を染色している. 幾つかの脂肪滴の周囲がミステリンにより取り囲まれている. 特定の脂肪滴のみが取り囲まれる理由は明らかでないが, 脂肪滴表面タンパク質はしばしばこのように偏った局在パターンを示す.  
 B, 小胞体膜上で合成された中性脂肪 (TGs) は電荷・極性を持たないため高度に水不溶性であり, 小胞体リン脂質二重膜の疎水面に蓄積される. 蓄積に従ってレンズ状構造から球状構造へと移行し, やがて小胞体膜を離れてサイトゾルへと遊離していく. 球状構造をとった段階から脂肪滴と呼ぶことが多い. 脂肪滴の表面上には脂肪合成酵素, 分解酵素, 調節因子などが分布している.

スが調節される. 脂肪滴は従って, 栄養代謝や脂質リソースの供給・貯蔵の重要な起点 (あるいは終点) としてはたらく.

ミステリンが脂肪滴の表面に結合すると, 同じく脂肪滴表面に結合している中性脂肪分解酵素 ATGL が競合的に排除される. これにより脂肪分解が停止し, 細胞内の脂肪貯蔵が増強される. そして最も興味深いことにこのようなミステリンの脂肪滴局在はもやもや病変異により障害される<sup>14)</sup>. 前述の通り, もやもや病変異には病原性の弱い感受性変異と病原性の強い原因変異がある. ミステリンの脂肪滴局在・機能は原因変異により著明に障害されたが, 一方で, 感受性変異による障害はほぼ認められなかった. すなわち変異の病原性の強さとミステリンの脂肪滴局在・機能異常の程度はよく相関していた. 従って, ミステリンの局在異常 (およびそこからくる機能異常)こそがもやもや病発病の分子・細胞レベルでの起点ではないかと考えられた.

著者らの報告に続いて幾つかのグループがミステリンの脂肪滴局在・機能について報告している. それらはいずれも代謝と云うよりは自然免疫・炎症との関連を示唆している. 順序立てて議論してみたい.

#### 4. ミステリンの感染防御機能

ミステリンの確かな細胞内局在として現在まで脂肪滴ともう一つ, 驚くべきことに細胞に感染した細菌の外膜上が知られている. Randow と Otten らは 2021 年, 非免疫細胞に感染・侵入したサルモネラ菌の外膜表面にミステリンが結合して, 外膜上のリポ多糖をユビキチン化し, その下流でオートファジーによる細菌の除去と NF $\kappa$ B の活性化が起こることを報告して, 大きな話題となった<sup>6)</sup>. 続いてごく短い期間のうちに, Francis Impens ら (ベルギー・VIB)<sup>15)</sup> や, Jörn Coers ら (米・デューク大)<sup>16), 17)</sup> により, この応答が幅広い細菌に対して起こることが確かめられた.

もともと国内の幾つかのグループにより, ミステリンがインターフェロン $\beta$ ・ $\gamma$ や TNF $\alpha$  など炎症促進性サイトカインによる誘導を受けることが報告されており, ミステリンと炎症の関連が想定されていた<sup>18), 19)</sup>. その意味は必ずしも明らかではなかったが, 細菌感染に関する近年の一連の結果を併せて考えると, 免疫細胞・非免疫細胞への感染によりサイトカインが産生・放出されて, 感染細胞内でミステリンの発現誘導が起こり, 直接のエフェクターとして細菌を攻撃 (ユビキチン化) し, 細菌の除去と炎症を活性化するというシンプルな流れを想定できる.

前述の脂肪滴との関連で言えば, 興味深いことに Impens らはインターフェロンで誘導されたミステリンが脂肪滴上で多量体化し, 続いて細菌膜表面に移行することを提案している<sup>15)</sup>. これまで脂肪滴はむしろ細菌・ウイルスにより感染・増殖のためにハイジャックされる構造として認識されてきた. しかし最近になり例えば, 細菌感染時に脂肪滴を足場としてエフェクタータンパク質複合体が形成され, 脂肪滴と細菌の物理的な結合を介して感染防御にはたらくことが報告されるなど, 脂肪滴を免疫応答の場として見直す流れが生まれつつある<sup>20)</sup>. Impens らの発見はこの経路の一端に位置付けられるのではないかと.

また, より不明瞭な関連ではあるが, Tobias Walther ら (米・ハーバード大・公衆衛生) は, ミステリンが飽和脂肪酸の脂肪毒性による NF $\kappa$ B 活性化を仲介することを報告している<sup>21)</sup>. 脂肪毒性と称されるものの分子実態は必ずしも明らかでないが, 過剰な脂肪酸が組織を

障害することや、細胞レベルでは ROS 産生、小胞体ストレス、細胞死等につながる事が知られており、NF $\kappa$ B 活性化もそのうちに位置付けられる。データはパルミチン酸による NF $\kappa$ B 活性化がミステリンの発現抑制で改善することを示しているが、分子メカニズム、脂肪滴との関連については明らかになっていない。ミステリンにより脂肪滴が安定化されることを考えれば、パルミチン酸とグリセロールの脱水縮合で生じる中性脂肪の安定化により細胞内のパルミチン酸レベルは低下し、むしろ脂肪毒性が低減する可能性も考えられるが、検証されていない。Walther らは脂肪滴に関して世界でも有数の研究グループを形成しており、なぜ脂肪滴との関連を検討しなかったのかよく分からない。脂肪毒性と脂肪滴、感染との関連について今後の展開があるなら俟ちたい。

ここまで述べたように現在、ミステリンの炎症誘導性と感染防御機能については前述のようにシンプルな理解が成立するだろう。一方でそれら機能とミステリンの脂質関連機能がどう相関しているのか、明確な解明はまだ与えられていない。さらにまたミステリンの免疫機能と脂質関連機能のそれぞれがどのようにもやもや病の発病に関わるのか、鍵となるのはもちろんそれぞれの場面におけるもやもや病変異ミステリンの挙動であるが、この点についても現在、明確な解明を俟つ状況である。

## 5. ミステリンの ATP アーゼ活性と機能

ミステリンの機能について前節、前々節で述べた内容のうち多くは 2019 年以降の知見に基づいている。前節の末尾に述べたように、ミステリンの完全な機能解明まではまだ幾らか時を要する状況であるが、長い間全く手掛かりのなかったもやもや病の分子病態の解明もいよいよ遠くないことを感じさせる。このような最近の急速な研究の進展は、著者らや Clausen, Randow, Otten らによるミステリントタンパク質の構造と活性の解明にも支えられている。本節と次節ではこの点に触れておきたい。

ミステリンの分子クローニング時、BLAST 解析により Walker 型 ATP アーゼドメインが一つと RING フィンガー型ユビキチンリガーゼドメインが一つ見出され、いずれについても活性が検出された<sup>3)</sup>。さらに二次構造予測などに基づいてこの ATP アーゼドメインがシンプルな Walker 型ドメインではなく、周辺に追加の構造を

伴う AAA+ 型ドメインであること、当初見出された AAA+ ドメインの後方にさらにもう一つの AAA+ ドメインが存在することなどが明らかとなった<sup>4)</sup>。AAA+ ドメインのように配列ではなく構造で規定されるドメインの場合、このように単純な BLAST 解析のみでは検出に十分でないことがある。

AAA+ タンパク質の多くは分子内に一つもしくは二つの AAA+ ドメインを持つ。いずれの場合にも 6 分子が集まってドーナツ状の 6 量体を形成し、協調した ATP 加水分解に伴う複合体全体の構造変化を通じて、細胞内における幅広い物理過程を仲介する（膜の結合・分離、タンパク質の構造破壊・複合体解離、細胞骨格と結合してのモーター機能など）。著者らが検討したところ、確かにミステリンのホモ多量体形成を示唆するデータが得られたため、ミステリンも他の AAA+ タンパク質と同様、ドーナツ状 6 量体を形成すると考えた<sup>4)</sup>。しかしこれは半分正しく、半分誤っていた。

2020 年に至り Clausen らは独自に精製した全長マウスミステリンを用いてクライオ電子顕微鏡解析を行い、ミステリンの全長構造解明に成功した<sup>5)</sup>。驚いたことに著者らが同定した二つの活性型 AAA+ ドメインの前後に、さらに二つずつの不活性 AAA+ ドメインが見出された。すなわちミステリンは合計 6 つの活性/不活性 AAA+ ドメインを持ち、それらが分子内で 6 量体様構造を形成することが明らかとなった（図 2）。数多い AAA+ タンパク質のうち例外的にダイニンなどがこのような分子「内」6 量体様構造をとる。すなわちミステリンはダイニンに近い AAA+ タンパク質であり、当初想定された分子「間」6 量体はおそらく形成しないのだろう。

一方で、著者らや Impens らはミステリンが ATP アーゼ活性依存的に脂肪滴上で多量体化することを検出しており、これらのデータは信頼してよいように思われる<sup>4), 14), 15)</sup>。著者らが想定した分子「間」6 量体形成モデルは誤っていた可能性が高いが、ATP アーゼ依存的な多量体化・局在化については支持するデータが多い。前節、前々節で述べた通りミステリンの機能は局在によって規定されるため、多量体化・局在化・機能までつないだ包括的な理解が今後重要になるだろう。



## 6. ミステリンのユビキチンリガーゼ活性と機能

ミステリンには二つのユビキチンリガーゼドメインがある。最初に見出された典型的なユビキチンリガーゼドメインである RING フィンガー<sup>2), 3)</sup> と、最近 Randow, Otten らが見出した新しいタイプのユビキチンリガーゼドメイン・RZ<sup>6)</sup> である (図2)。二つのドメインは比較的近い位置にあり、この周辺に集中して存在するもやもや病変異がどちらの活性に影響を与えるのか分かりにくい。幾つかの変異は RING フィンガーの構造形成に必須の保存されたシステイン、ヒスチジン部位に入っている<sup>7-9)</sup>。これら変異により RING フィンガーのユビキチンリガーゼ活性が消失することから<sup>22)</sup>、RING フィンガー活性の障害・喪失がもやもや病発病の基底にあると考えられる。

前述の通り、RING フィンガー変異によりミステリンの脂肪滴局在は大きく損なわれ、残存の局在が部分的に認められるのみとなる<sup>14)</sup>。ミステリンの RING フィンガーユビキチンリガーゼ活性の標的基質は、では何であろうか。単純には、ミステリンが自己をユビキチン化することで自己の局在を規定するという可能性が最も考えやすい。あるいはサイトゾル中の局在化因子や、標的膜上の受容体 (いずれも未同定) をユビキチン化することで、ミステリンの正しい局在化機構が担保されている可能性がある。これらについて現在まで解明が及んでおらず、今後の検証が必要である。また Randow, Otten らの報告では、細菌膜上への局在は RING フィンガー変異の影響を受けないとしており<sup>6)</sup>、脂肪滴の場合と異なるようにも思えるが、これについては定量的な再検証が今後必要ではないかと著者らは考えている。

また、RZの活性は細菌膜のユビキチン化、細菌の除去、NF $\kappa$ B 活性化に重要であることが Randow, Otten らのデータから明確である<sup>6)</sup>。特に興味深い点としてこの場合のユビキチン化基質が細菌膜上のリポ多糖であることがある。これまでユビキチン化はタンパク質に対してのみ起こる修飾反応であると考えられてきたが、Randow, Otten らにより初めて非タンパク質性のユビキチン化反応が見出された。新たに見出されたこの活性がミステリンの脂肪滴上での機能およびもやもや病発病にどのように関わるのかは大変に興味深く、今後の検証が俟たれる。

## 7. おわりに

長い間、謎の疾患として認識されてきたもやもや病の研究は、責任遺伝子ミステリンの単離により転機を迎えた。当初、ミステリン R4810K 変異の解析によりもやもや病の分子病態解明、動物モデル開発などが一挙に進むものと思われたが、しかし培養細胞を含む *in vitro* の実験系を用いて R4810K 変異体について見出された幾つかの分子・細胞異常のうち、検証を経てコンセンサスを得るに至ったものはまだない。著者らのこれまでの解析でも R4810K に起因する如何なる分子・細胞異常も検出できていない<sup>3), 4), 14), 23), 24)</sup>。また R4810K 変異を導入したトランスジェニック/ノックインマウスが作製されたが、これまでのところ軽微な表現型を示すに留まっており、もやもや病を再現するには至っていない<sup>18), 25)</sup>。

おそらくこれは R4810K 変異の病原性が低いこと (保因者有病率 1/300) を反映しており、この観点からは、近年発見されたより病原性の高い変異に着目した解析の必要性が示唆される。とは言え、R4810K 変異がもやもや病の重大なリスク因子であることは遺伝学的には間違いなく、また本稿では触れなかったが、この変異がさらにアテローム血栓性脳梗塞など広範な狭窄性血管病変の遺伝的素因となっていることも見出されつつある<sup>26)</sup>。併せて一塩基多型である p.R4810K が東アジア地域の約 1,500 万もの人々に保因されていることを考えると、本変異の研究を避けることはできない。

おそらく R4810K は軽微もしくは潜在的な分子・細胞障害をもたらす変異であり、明確に焦点を絞ったアッセイ系による定量的な解析による他、分子・細胞障害の実態をつきとめることはできないのではないかと。著者らはまず病原性の高い変異を対象とした解析により変異ミステリンの関わる細胞・生体内の病的プロセスを明確にした後、R4810K 変異について再度の解析を行う戦略で現在、研究を進めている。

## 参考文献

- 1) 富永悌二ほか：もやもや病 (ウイリス動脈輪閉塞症) 診断・治療ガイドライン (改訂版), 脳卒中の外科, 46, 1-24 (2018)
- 2) Kamada, F. *et al.*: A genome-wide association

- study identifies RNF213 as the first Moyamoya disease gene, *J Hum Genet.*, **56(1)**, 34-40 (2011)
- 3) Liu, W. *et al.*: Identification of RNF213 as a susceptibility gene for moyamoya disease and its possible role in vascular development, *PLoS One.*, **6(7)**, e22452 (2011)
  - 4) Morito, D. *et al.*: Moyamoya disease-associated protein mysterin/RNF213 is a novel AAA+ ATPase, which dynamically changes its oligomeric state, *Sci Rep.*, **4**, 4442 (2014)
  - 5) Ahel, J. *et al.*: Moyamoya disease factor RNF213 is a giant E3 ligase with a dynein-like core and a distinct ubiquitin-transfer mechanism, *Elife.*, **9**, e56185 (2020)
  - 6) Otten, E.G. *et al.*: Ubiquitylation of lipopolysaccharide by RNF213 during bacterial infection, *Nature.*, **594(7861)**, 111-116 (2021)
  - 7) Cecchi, A.C. *et al.*: RNF213 rare variants in an ethnically diverse population with Moyamoya disease, *Stroke.*, **45**, 3200–3207 (2014)
  - 8) Raso, A. *et al.*: Moyamoya vasculopathy shows a genetic mutational gradient decreasing from East to West, *J. Neurosurg. Sci.*, (2016)
  - 9) Guey, S. *et al.*: Rare RNF213 variants in the C-terminal region encompassing the RING-finger domain are associated with moyamoya angiopathy in Caucasians, *Eur. J. Hum. Genet.*, **25**, 995–1003 (2017)
  - 10) Strong, A. *et al.*: A new syndrome of moyamoya disease, kidney dysplasia, aminotransferase elevation, and skin disease associated with de novo variants in RNF213, *Am J Med Genet A.*, **185(7)**, 2168-2174 (2021)
  - 11) Pinard, A. *et al.*: Association of De Novo RNF213 Variants With Childhood Onset Moyamoya Disease and Diffuse Occlusive Vasculopathy, *Neurology.*, **96(13)**, e1783-e1791 (2021)
  - 12) Cools, J. *et al.*: Identification of novel fusion partners of ALK, the anaplastic lymphoma kinase, in anaplastic large-cell lymphoma and inflammatory myofibroblastic tumor, *Genes Chromosomes Cancer.*, **34(4)**, 354-62 (2002)
  - 13) Koizumi, A. *et al.*: Moyamoya disease-related genes and their use, JP-5854423-B2 (2009)
  - 14) Sugihara, M. *et al.*: The AAA+ ATPase/ubiquitin ligase mysterin stabilizes cytoplasmic lipid droplets, *J Cell Biol.*, **218(3)**, 949-960 (2019)
  - 15) Thery, F. *et al.*: Ring finger protein 213 assembles into a sensor for ISGylated proteins with antimicrobial activity, *Nat Commun.*, **12(1)**, 5772 (2021)
  - 16) Walsh, S.C. *et al.*: The bacterial effector GarD shields *Chlamydia trachomatis* inclusions from RNF213-mediated ubiquitylation and destruction, *Cell Host Microbe.*, **30(12)**, 1671-1684 (2022)
  - 17) Hernandez, D. *et al.*: Interferon-Inducible E3 Ligase RNF213 Facilitates Host-Protective Linear and K63-Linked Ubiquitylation of *Toxoplasma gondii* Parasitophorous Vacuoles, *mBio.*, **13(5)**, e0188822 (2022)
  - 18) Kobayashi, H. *et al.*: Biochemical and Functional Characterization of RNF213 (Mysterin) R4810K, a Susceptibility Mutation of Moyamoya Disease, in Angiogenesis In Vitro and In Vivo, *J Am Heart Assoc.*, **4(7)**, e002146 (2015)
  - 19) Ohkubo, K. *et al.*: Moyamoya disease susceptibility gene RNF213 links inflammatory and angiogenic signals in endothelial cells, *Sci Rep.*, **5**, 13191 (2015)
  - 20) Bosch, M. *et al.*: Mammalian lipid droplets are innate immune hubs integrating cell metabolism and host defense, *Science.*, **370(6514)**, eaay8085 (2020)
  - 21) Piccolis, M. *et al.*: Probing the Global Cellular Responses to Lipotoxicity Caused by Saturated Fatty Acids, *Mol Cell.*, **74(1)**, 32-44 (2019)
  - 22) Takeda, M. *et al.*: Moyamoya disease patient mutations in the RING domain of RNF213 reduce its ubiquitin ligase activity and enhance NF  $\kappa$  B activation and apoptosis in an AAA+ domain-depen-

- dent manner, *Biochem Biophys Res Commun.*, **525(3)**, 668-674 (2020)
- 23) Kotani, Y. *et al.*: Neuromuscular regulation in zebrafish by a large AAA+ ATPase/ubiquitin ligase, mysterin/RNF213, *Sci Rep.*, **5**, 16161 (2015)
- 24) Kotani, Y. *et al.*: Alternative exon skipping biases substrate preference of the deubiquitylase USP15 for mysterin/RNF213, the moyamoya disease susceptibility factor, *Sci Rep.*, **7**, 44293 (2017)
- 25) Kanoke, A. *et al.*: Temporal profile of the vascular anatomy evaluated by 9.4-tesla magnetic resonance angiography and histological analysis in mice with the R4859K mutation of RNF213, the susceptibility gene for moyamoya disease, *Brain Res.*, **1624**, 497-505 (2015)
- 26) Okazaki, S. *et al.*: Moyamoya Disease Susceptibility Variant RNF213 p.R4810K Increases the Risk of Ischemic Stroke Attributable to Large-Artery Atherosclerosis, *Circulation.*, **139(2)**, 295-298 (2019)

## 高度好塩性古細菌 *Haloarcula japonica* の イソプレノイド生合成経路の解析と代謝工学による有用物質生産

八 波 利 恵\*

### 1. はじめに

イソプレノイドは、イソプレン (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>) を構成単位とする一群の天然化合物の総称である。イソプレノイドには、植物の精油に含まれるテルペン、ステロイド、カロテノイドなどが含まれ、5万種類以上が確認されている。イソプレノイドは有用物質の宝庫であり、医薬品、化粧品、食品添加物、工業製品原料などを通じて私たちの生活に広く利用されている。そのため、生理活性の解析、生合成経路の解明、微生物をはじめ、酵母・植物における大量生産系の構築など、イソプレノイド研究は常に発展を遂げてきた<sup>1,2)</sup>。

本項では、筆者が古細菌として初めて明らかにした高度好塩性古細菌 *Haloarcula japonica* のカロテノイドおよびスクアレンの生合成経路を中心に、本菌がもつイソプレノイド生合成経路を紹介する。また、代謝工学に

よるスクアレン高生産系の構築についても述べる。

### 2. 高度好塩性古細菌 *Haloarcula japonica* における カロテノイド生合成経路の解明

#### [1] *Ha. japonica* が生産するカロテノイドの同定

高度好塩性古細菌とは、生育に 2.5 M 以上の塩化ナトリウム (NaCl) を要求する好塩性の古細菌である。ある種の高度好塩性古細菌は、β-カロテンや炭素数 50 (C<sub>50</sub>) のバクテリオルベリン (BR) (図 1) といったカロテノイドを生産することが知られている。高度好塩性古細菌の一種、*Halobacterium salinarum* は、光駆動型プロトンポンプであるバクテリオロドプシンを有し<sup>3)</sup>、その発色団であるレチナールはリコペン、β-カロテンを経て合成される。一方で、リコペンは、C<sub>50</sub> カロテノイドの前駆体であり、最終的には BR に変換される。

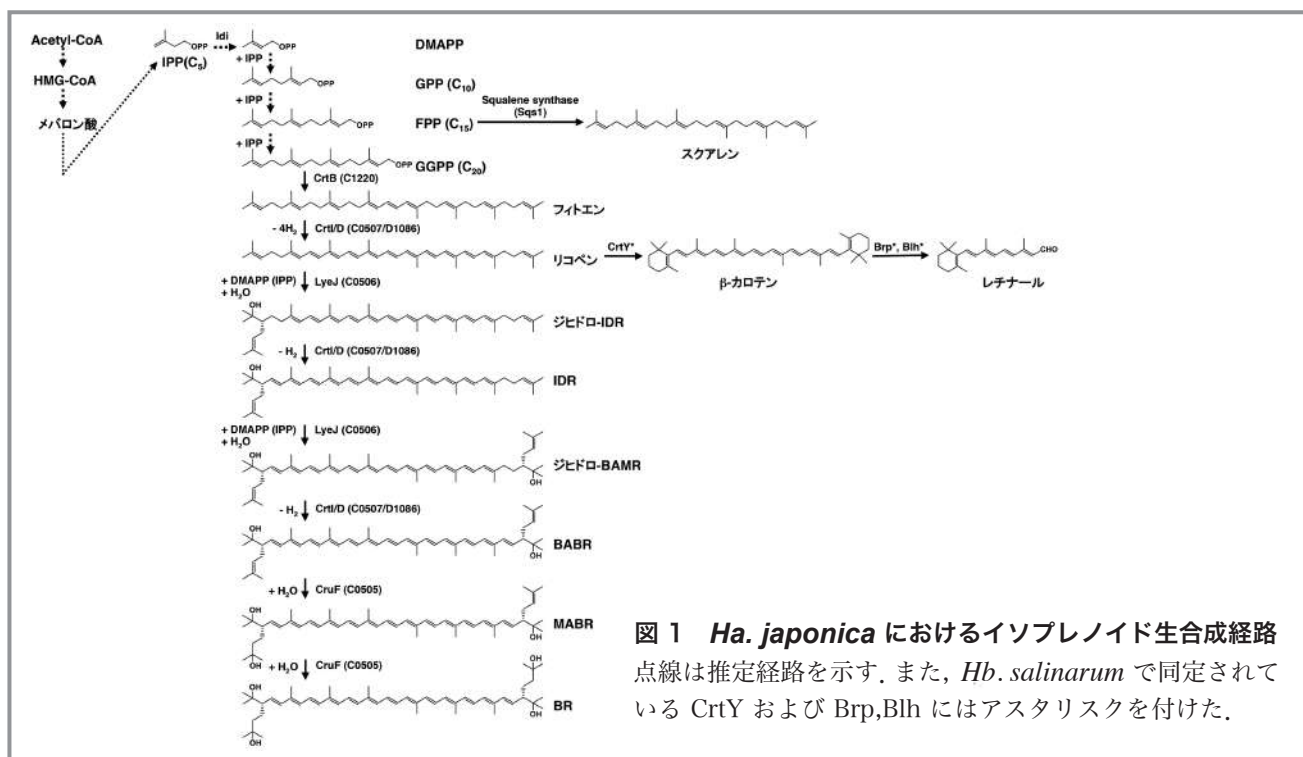


図 1 *Ha. japonica* におけるイソプレノイド生合成経路  
点線は推定経路を示す。また、*Hb. salinarum* で同定されて  
いる CrtY および Brp, Blh にはアスタリスクを付けた。

\* 東京工業大学生命理工学院

$\beta$ -カロテンおよびレチナールの生合成に関与する CrtY および Brp, Blh は, *Hb. salinarum* より同定されている<sup>4,5)</sup>。また, 同じく *Hb. salinarum* よりリコペンへの C<sub>5</sub> 付加に関与するリコペンエロンガーゼ (Lye) も見つかった<sup>6)</sup> もの, BR に至る生合成経路の全貌は不明であった。

*Haloarcula japonica* は, 石川県塩田土壌より分離された高度好塩性古細菌であり, 三角形平板状という特徴的な形態を有している (図 2)<sup>7)</sup>。2011 年には全ゲノム配列解析が終了し, 本菌は 2 つの環状染色体と 3 つの環状プラスミドを有することが明らかとなった<sup>8)</sup>。本菌のコロニーは赤色を呈しており, カロテノイドを生産していると推察された。そこで, *Ha. japonica* におけるカロテノイド生合成に関わる酵素群の特定し, その生合成経路を明らかにすること目的とし, まず本菌の生産するカロテノイドを同定することとした。*Ha. japonica* を培養後, 全カロテノイドを抽出し, 逆相 HPLC とフォトダイオードアレイ検出器を用いて解析したところ, 本菌は類縁菌 *Hb. salinarum* と同様, フィトエン, リコペン, イソペンテニルデヒドロロドピン (IDR), ビスアンヒドロバクテリオルベリン (BABR), モノアンヒドロバクテリオルベリン (MABR) および BR を生産していることがわかった (図 1)<sup>9)</sup>。

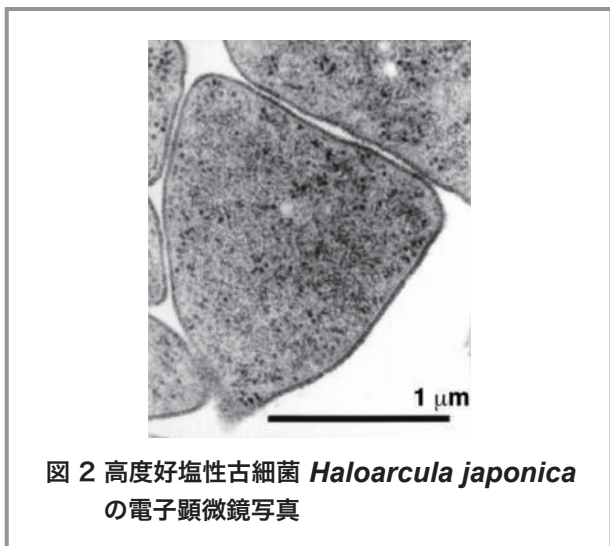


図 2 高度好塩性古細菌 *Haloarcula japonica* の電子顕微鏡写真

## [2] ゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) からリコペンの生合成経路の解明

細菌におけるカロテノイド生合成の初期段階はイソプレンの合成である。単位構造であるイソペンテニルピロリン酸 (IPP) の生合成は, メバロン酸経路または非メ

バロン酸経路のどちらかをとる。高度好塩性古細菌は, メバロン酸経路で IPP を合成することが知られており, その出発物質はアセチル Co-A である (図 1)。以降の経路については概略を説明するが, アセチル Co-A から HMG-CoA, メバロン酸を経由して, C<sub>5</sub> の IPP が合成される。合成された IPP は, 異性化酵素 (Idi) により, ジメチルアリルピロリン酸 (DMAPP) に異性化され, 順次 IPP と縮合していくことにより, C<sub>10</sub> のゲラニルピロリン酸 (GPP), C<sub>15</sub> のファルネシルピロリン酸 (FPP), C<sub>20</sub> のゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) というように鎖長を延ばしていく。さらに, フィトエンシンターゼ (CrtB) により, ATP を用いて 2 分子の GGPP が結合することで, イソプレノイド 8 分子からなる最初の C<sub>40</sub> カロテノイドである 15-シスフィトエンが合成される<sup>10)</sup>。

上述したように, 本研究を開始した時点では高度好塩性古細菌において, GGPP から BR 合成に至る生合成経路の全貌は明らかとされていなかった。そこで, まずフィトエン生合成に関与するフィトエンシンターゼ (CrtB) をコードする遺伝子ホモログを *Ha. japonica* 全ゲノム配列より検索した。その結果, 染色体 1 上に *crtB* 遺伝子とアノテーションされるオープンリーディングフレーム (ORF) (*c1220* 遺伝子) が見出された。C1220 のアミノ酸配列は, 土壌細菌 *Pantoea ananatis* および放射線耐性細菌 *Deinococcus radiodurans* RI の CrtB<sup>11,12)</sup> といずれも 28% の相同性を示した。これより, *c1220* 遺伝子が本菌における CrtB をコードしていると考えられた。そこで, 当該遺伝子破壊株を構築し, 破壊株が生産するカロテノイドを調べた。その結果, 野生株の培養液は BR 由来の赤色を呈するのに対し, *c1220* 遺伝子破壊株の培養液は無色となり (図 3), 生産するカロテノイド種が異なることが予想された。そこで, *c1220* 遺伝子破壊株から得られた全カロテノイドを解析したところ, 破壊株は BR などのカロテノイドを生産していないことがわかった。これより, *c1220* 遺伝子が本菌の CrtB をコードしていることが示唆された<sup>13)</sup>。

フィトエンからリコペンに至る反応では, ある種の細菌のカロテノイド生合成経路においてフィトエンデサチュラーゼ (CrtI) の関与が知られている。そこで上述と同様に本菌ゲノム上より *crtI* 遺伝子ホモログの有無を調べた結果, 4 つの遺伝子が見出された。このうち,

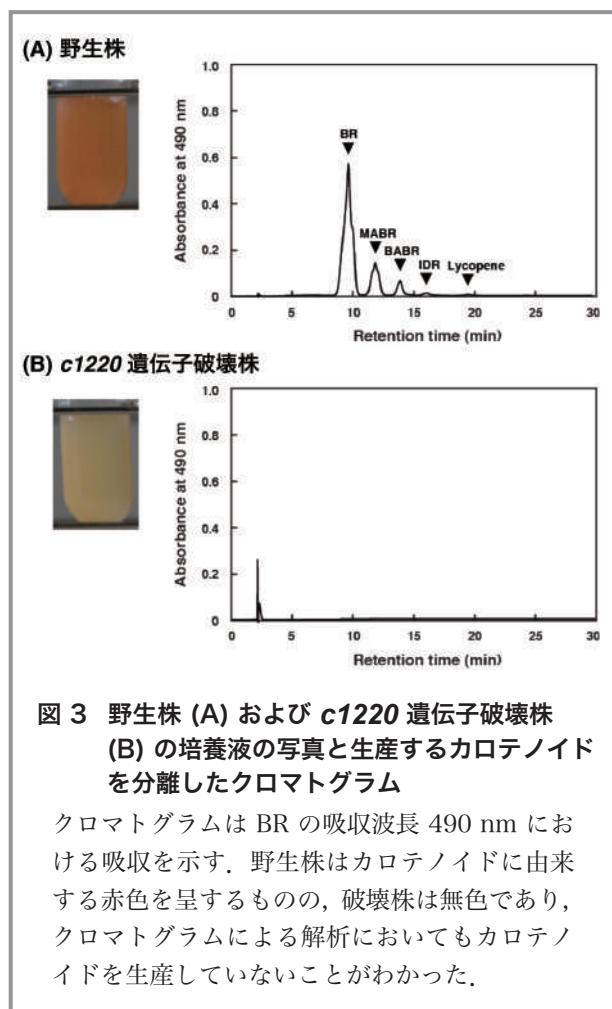


図3 野生株 (A) および *c1220* 遺伝子破壊株 (B) の培養液の写真と生産するカロテノイドを分離したクロマトグラム

クロマトグラムは BR の吸収波長 490 nm における吸収を示す。野生株はカロテノイド由来する赤色を呈するものの、破壊株は無色であり、クロマトグラムによる解析においてもカロテノイドを生産していないことがわかった。

既知の *crtI* 遺伝子と相同性のより高い 2 つの遺伝子ホモログ (*c0507* および *d1086* 遺伝子) の機能を明らかにするため、これらの遺伝子の単独破壊株および二重破壊株の構築し、生産するカロテノイド種の解析を行った。その結果、*Ha. japonica* のフィトエンからリコペンに至る反応においては、*c0507* および *d1086* 遺伝子にコードされる 2 つの *crtI* 遺伝子が関与する生合成経路が存在することが明らかとなった (図 1) <sup>14)</sup>。

### [3] リコペンから BR の生合成経路の解明

*c0507* 遺伝子近傍のゲノム配列を詳細に解析したところ、*c0507* 遺伝子のすぐ下流に存在する *c0506* および *c0505* 遺伝子が、それぞれリコペンエロンガーゼおよびヒドラターゼの遺伝子ホモログであることがわかった。これら 3 つの遺伝子はクラスターを形成し、共転写されていたことから、本菌のカロテノイドの生合成に密接に関与していると予想された。そこで、*c0507/c0506/c0505* 遺伝子クラスターを構成するそれぞれの遺伝子の単独破壊株を構築し、それらの生産するカロテノイド種の分析を行った。その結果、C0506 は

イソプレンおよび水酸基を付加する二機能酵素 (リコペンエロンガーゼおよび 1,2-ヒドラターゼの両方の活性をもつ酵素)、C0507 は、リコペンから BR の生合成においては、3,4-デサチュラーゼ (*CrtD*)、そして C0505 はヒドラターゼ (*CruF*) として機能することがわかった (図 1) <sup>15)</sup>。C0506 は、既に *Hb. sarimurum* より同定されている *Lye* と 60% 程度の相同性を有することから、*LyeJ* と名付けた。これより、*c0507/c0506/c0505* 遺伝子クラスターにコードされる 3 つの酵素がリコペンから BR の生合成系に関与することが明らかとなった。C0507 は先にも述べたとおり、フィトエンデサチュラーゼ活性も有することから *CrtI/D* とよべる。また、本研究における *CrtI*、*CrtD* および *CruF* の同定は、古細菌において初めてのものであった。

## 3. 高度好塩性古細菌 *Haloarcula japonica* におけるスクアレン生合成経路の解明とスクアレン高生産系の構築

### [1] *Ha. japonica* が生産するスクアレンの同定

スクアレンは、イソプレンを構成単位とするトリテルペンであり、ステロイドやホパノイドなど、多くの生理活性物質の前駆体である。スクアレン自体にも価値があり、保湿剤等の化粧品用途から、ワクチンのアジュバンド等の治療用途まで幅広く利用されている <sup>16, 17)</sup> 他、近年はバイオ燃料の原料としても注目されている <sup>18)</sup>。現在、工業的に用いられるスクアレンは、主に深海鮫の肝油から抽出されている。しかしながら、深海鮫は絶滅危惧種に指定されており、漁獲には制限がある。従って、安定した供給および大量に確保することは難しく、スクアレン生産の代替法の検討が急務となっている。上述したように高度好塩菌は高塩濃度環境で生育するため、他の微生物の混入 (コンタミネーション) の可能性が低い。そのため、高度好塩菌は、オープンポンドでの物質生産が可能な工業生産宿主であり、すでに塩湖にて好塩菌を培養し (生育させ)、 $\beta$ -カロテンなどのカロテノイドを生産させる例が世界各国で進んでいる <sup>19)</sup>。

そこで筆者らは、*Ha. japonica* によるスクアレン大量生産を目指し、まず本菌がスクアレンを生産するか否かを調べた。*Ha. japonica* からテルペノイド類を抽出し、逆相 HPLC、GC-MS により解析した。その結果、

スクアレンの生産が確認された(図4)。また、スクアレンに水素が付加された誘導体である、ジヒドロスクアレンおよびテトラヒドロスクアレンも確認された。これらのスクアレン誘導体は、スクアレンが生産されたのちに還元されたものと考えられた。これらの誘導体を生産する微生物は極めて珍しく、その生理機能解明に興味が保たれるところである。

## [2] スクアレンシンターゼ遺伝子の同定

スクアレン生合成遺伝子は、細菌、藻類などからクローニングされ、遺伝子にコードされる酵素の性質検討も行われている。細菌におけるスクアレン生合成は、FPPの合成までカロテノイド合成経路(図1)をたどる。そして、スクアレンシンターゼ(Sqs)により2分子のFPPが縮合することでスクアレンが合成される<sup>20)</sup>。そこで、*Ha. japonica* 全ゲノム配列をもとに *sqs* 遺伝子ホモログを検索したところ、染色体1上にフィトエン/スクアレンシンターゼとアノテーションされている遺伝子ホモログが2つ見出された。そのうちの1つ(*c1220* 遺伝子)は、上述したようにフィトエンシンターゼ(CrtB)をコードしていると推定されている。そこで、もう一方の遺伝子が本菌のスクアレンシンターゼをコードしていると考えられ、*sqs1* 遺伝子と名付けた。

*Ha. japonica* における *sqs1* 遺伝子の機能を明らかにするため、*sqs1* 遺伝子破壊株を構築し、スクアレンの生産量を調べた。破壊株からテルペノイド類を抽出し、上述と同様に逆相 HPLC によるスクアレンの検出を

行った。その結果、*sqs1* 遺伝子破壊株はスクアレンおよびその誘導体を生産していないことがわかった。これより、*sqs1* 遺伝子が本菌のスクアレンシンターゼをコードしていることが明らかとなった。

## [3] 代謝工学によるスクアレン生産の向上

前述により、本菌のスクアレンシンターゼをコードする遺伝子は *sqs1* 遺伝子であることがわかった。そのため、*sqs1* 遺伝子を過剰発現させることでスクアレン生産を向上させることができると考えた。

*sqs1* 遺伝子を過剰発現させるために、*sqs1* 遺伝子高発現型プラスミド(pJsqs1)を構築した。この際、プロモーターは、*Ha. japonica* における遺伝子高発現のために用いられてきた、すでに実績のある *Ha. japonica* 細胞表層糖タンパク質をコードする遺伝子(*csg* 遺伝子)のものを用いた。pJsqs1を *Ha. japonica* 野生株へと形質転換し、形質転換体よりテルペノイド類を抽出して、スクアレンおよびその誘導体の生産量を調べた。その結果、pJsqs1を有する形質転換体のスクアレンおよびその誘導体の生産量の合計は、4.8 mg/Lであった(表1)。一方、空ベクターである pWL102 を有する形質転換体生産量は 0.71 mg/L であった。これより、*sqs1* 遺伝子を過剰発現させることで、生産量は 6.8 倍となり、スクアレンおよびその誘導体の生産向上を達成した。また、pJsqs1 を有する形質転換体のスクアレン生産量は 0.94 mg/L であり、pWL102 を有する形質転換体の約 18 倍となった。

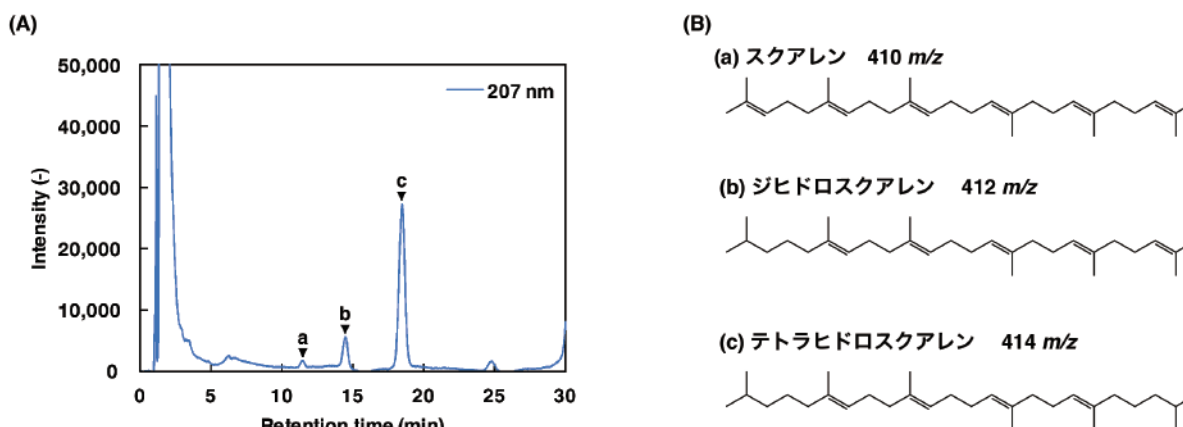


図4 *Ha. japonica* が生産するテルペノイド類のクロマトグラム (A) と GC-MS 分析より同定されたスクアレンおよびその誘導体の構造 (B)

(A) スクアレンの吸収波長である 207 nm にて検出されたクロマトグラムを示す。

(B) クロマトグラムにおける各ピークに由来する物質を GC-MS により解析して同定した化合物の構造を示す。

表 1 各組換え体が生産するスクアレンおよびスクアレン誘導体の各生産量と総生産量

保有するプラスミド	スクアレン (mg/L) [fold]	ジヒドロスクアレン (mg/L) [fold]	テトラヒドロスクアレン (mg/L) [fold]	総生産量 (mg/L) [fold]
pWL102	0.052 [1]	0.15 [1]	0.51 [1]	0.71 [1]
pJsqsm1	0.94 [18]	2.6 [17]	1.2 [2.4]	4.8 [6.8]

[ ] 内の数字は pWL102 を保有する組換え体における生産量を 1 とした場合の生産量を表す。

#### 4. おわりに

本稿では、高度好塩性古細菌 *Haloarcula japonica* のカロテノイドおよびスクアレン生合成経路を紹介し、スクアレンについては、生産向上の研究例を述べた。アスタキサンチン、 $\beta$ -カロテンをはじめとするカロテノイドは、生物からの抽出、化学合成、発酵法などにより工業生産されている<sup>21)</sup>。その世界市場規模は、現在 20 億ドルであり、2027 年には 27 億ドルへと拡大するといわれている。また、スクアレンの市場規模はカロテノイドに比べて低いものの、新型コロナウイルスに対するワクチン需要の増加もあり、1 億 4,300 万ドルから同じく 2027 年に 1 億 9,800 万ドルに達すると予測されている。現在、深海鮫からのスクアレン生産の代替法として、大腸菌<sup>22)</sup>、酵母<sup>23)</sup>などを用いた研究が進められている。本研究では、高度好塩性古細菌 *Ha. japonica* を用いたスクアレン高生産を試みたが、その生産量は既報と比べても低く、市場単価を考慮するとさらなる改善が必要である。しかしながら、本菌の培養はコンタミネーションのリスクが極めて低いため、厳密な無菌操作および培地を含むリアクターの加圧蒸気滅菌(高温高圧滅菌)が不要である。従って、高温高圧滅菌に伴う膨大な熱エネルギーの消費と CO<sub>2</sub> 排出を削減することができる。そして、生産の場としては、地球上の高塩環境(塩害土壌、塩田、塩湖など)を利用することが可能である。すなわち、高度好塩菌による物質生産は、SDGs に貢献するとともに、貴重な水を膨大に使用してきたこれまでの発酵産業を大きく変換・転換する生産系の一つといえよう。

#### 参考文献

- 1) Viclers, C. *et al.*: Recent advances in synthetic biology for engineering isoprenoid production in yeast, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **40**, 47 (2017).
- 2) Zhang, C. *et al.*: Production of terpenoid by synthetic biology approach, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **8**, 347 (2020).
- 3) Lanyi, J. K. *et al.*: Bacteriorhodopsin, *Curr. Opin. Struct. Bio.*, **11**, 415 (2001).
- 4) Peck, R. F. *et al.*: Identification of a Lycopene  $\beta$ -Cyclase Required for Bacteriorhodopsin Biogenesis in the Archaeon *Halobacterium salinarum*, *J. Bacteriol.*, **184**, 2889 (2002).
- 5) Peck, R. F., *et al.*: *brp* and *blh* are required for synthesis of the retinal cofactor of bacteriorhodopsin in *Halobacterium salinarum*, *J. Biol. Chem.*, **276**, 5739 (2001).
- 6) Dummer, A. M. *et al.*: Bacterioopsin-Mediated Regulation of Bacterioruberin Biosynthesis in *Halobacterium salinarum*, *J. Bacteriol.*, **193**, 5658 (2011).
- 7) Nishiyama, Y. *et al.*: Ultrastructure of the cell wall of the triangular halophilic archaeobacterium *Haloarcula japonica* strain TR-1, *FEMS Microbiol. Lett.*, **99**, 43-47 (1992).
- 8) Nakamura, S. *et al.*: *Extremophiles Handbook*, vol. 2 Springer, Heidelberg (2011).
- 9) Yatsunami, Y. *et al.*: Identification of carotenoids from the extremely halophilic archaeon *Haloarcula japonica*, *Front. Microbiol.*, **5**, 1 (2014).
- 10) Alcaino, J. *et al.*: Functional characterization of



- the *Xanthophyllomyces dendrorhous* farnesyl pyrophosphate synthase and geranylgeranyl pyrophosphate synthase encoding genes that are involved in the synthesis of isoprenoid precursors, *PloS One*, **9**, e96626 (2014).
- 11) Misawa, N. *et al.*: Elucidation of the *Erwinia ure-dovora* carotenoid biosynthetic pathway by function analysis of gene products expressed in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **172**, 6704 (1990).
- 12) Zhang, L. *et al.*: Knockout of *crtB* or *crtI* gene blocks the carotenoid biosynthetic pathway in *Deinococcus radiodurans* R1 and influences its resistance to oxidative DNA-damaging agents due to change of free radicals scavenging ability, *Arch. Microbiol.*, **188**, 411 (2007).
- 13) 八波 利恵, 他 .: 高度好塩性古細菌 *Haloarcula japonica* のフィトエンシターゼ遺伝子のホモログの解析と当該微生物が生産するカロテノイド種の抗酸化活性, 第29回カロテノイド談話会 (2015).
- 14) 八波 利恵 .: 古細菌のカロテノイド生合成経路, 生物工学, **93**, 394 (2015) .
- 15) Yang, Y. *et al.*: Complete biosynthetic pathway of the C<sub>50</sub> carotenoid bacterioruberin from lycopene in the extremely halophilic archaeon *Haloarcula japonica*, *J. Bacteriol.*, **197**, 1614 (2015).
- 16) Amarowicz, R. *et al.*: Squalene: A natural antioxidant?, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **111**, 411 (2009).
- 17) Kopicová, Z. and Vavreinová, S.: Occurrence of squalene and cholesterol in various species of Czech freshwater fish, *Czech. J. Food Sci.* **25**, 195 (2007).
- 18) Oya S. *et al.*: Catalytic production of branched small alkanes from biohydrocarbons, *Chem. Sus. Chem.* **8**, 2472 (2015).
- 19) Borowitzka, L. J. *et al.*: Commercial production of  $\beta$ -carotene by *Dunaliella salina* in open ponds, *Bull. Mar. Sci.* **47**, 244 (1990).
- 20) Hauss, T, *et al.*: Squalane is in the midplane of the lipid bilayer: implications for its function as a proton permeability barrier, *Biochem. Biophys. Acta.*, **1556**, 149 (2002).
- 21) 三沢 典彦, .: 大腸菌・酵母によるカロテノイド生産, 化学と生物, **35**, 60 (1997).
- 22) Kakabami, A. *et al.*: Production of squalene by squalene synthases and their truncated mutants *Escherichia coli*, *J. Biosci. Bioeng.*, **119**, 165 (2015).
- 23) Wei, L-J. *et al.*: Improved squalene production through increasing lipid contents in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnol. Bioeng.*, **115**, 1793 (2018).

## 酵素の応用研究および生命科学に関連する酵素の研究

AMP キナーゼによる NAD<sup>+</sup> 合成律速酵素  
Nampt 制御機構の解明

五十嵐 正樹

(東京大学医学部附属病院)

## 【研究の背景と目的】

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

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

て制御され、NAMPT mRNA 発現調節領域に結合するような新規の因子を明らかにする。

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

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

## 【研究方法】

C2C12 細胞株を用いて実験を行う。RNA 安定性に関わる領域を同定するために、3'UTR (AU リッチエレメント) に着目して、Nampt mRNA 3'UTR を様々な長さで欠失させたコンストラクトを作成し、pAcGFP ベクターの GFP 遺伝子の後ろに挿入する。これらの GFP 発現ベクターを C2C12 筋管細胞や HEK293 に恒常的に発現させた細胞株を作成する。この細胞をアクチノマイシン D で処理し、AICAR 処理の有無で、GFP mRNA 発現の検討を行う。AMPK 活性化による NAMPT mRNA の応答に重要な役割をもつような領域を明らかにする。

## 【研究成果】

分化した C2C12 筋管細胞では、AICAR による AMPK 活性化によって NAMPT だけでなく、NAD<sup>+</sup> 合成に関わる NMNAT1 mRNA の発現上昇を認めた。一

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

一般に, mRNA 安定化に関わる 3'UTR に着目した. NAMPT の 3'UTR は 2838bp であるが, 複数の AU リッチエレメントの存在を認める. まず, full length の NAMPT 3'UTR を AcGFP-N1 ベクターの GFP の 3'端につないだベクターを作成した. そして, それを C2C12 細胞にトランスフェクトし, G418 でセクションをかけ, かつ GFP の蛍光で sorting をおこない, GFP-Nampt 3'UTR 発現 C2C12 細胞を樹立した. 一方で, NAMPT 3'UTR を 3'側から様々な長さで欠失させた配列を GFP 遺伝子の 3'端につないだベクターを複数作成した. これらも同様に恒常的に発現する細胞を樹立した. GFP-full length Nampt 3'UTR 発現 C2C12 細胞をアクチノマイシン処理すると, GFP mRNA 発現は 30% 程度減少する. しかし, AICAR 0.5mM, AICAR 2.0mM で処理すると GFP mRNA の回復傾向を認めた. その dose response は明らかではなく, また同じ実験を繰り返すとその再現性は十分ではなかった. 特に, アクチノマイシン D 処理後の GFP mRNA 低下が 30% 前後とわずかであり, 内因性の NAMPT mRNA がアクチノマイシン D 処理で半分以下に低下するのと対照的であった. C2C12 細胞では, 実験系が安定しない可能性を考えた.

安定発現細胞株を作成する際のトランスフェクション効率が C2C12 細胞でかなり低いことから, トランスフェクション効率の良い HEK293 を使用した. 同様に, GFP-full length Nampt 3'UTR 発現 HEK293 細胞を樹立した. 3'UTR をもたない control の GFP ベクターを安定発現させた HEK293 では, GFP mRNA がアクチノマイシン D 処理でまったく発現が変化しないのとは対照的に, GFP-full length Nampt 3'UTR 発現 HEK293

細胞ではアクチノマイシン D 存在下で GFP mRNA 発現を安定して 50% 以上低下させることができた.

GFP-full length Nampt 3'UTR 発現 HEK293 細胞を樹立し, AICAR による NAMPT mRNA 安定の効果の評価可能であると思われた. しかし, AICAR 0.5mM, AICAR 2.0mM で処理したときの GFP mRNA 発現の dose response はやはり明らかではなく, また同じ実験を繰り返すとその再現性は十分ではなかった. NAMPT 3'UTR を 3'側から様々な長さで欠失させた配列を GFP 遺伝子の 3'端につないだベクターについても同様に, HEK293 細胞に恒常的に発現した細胞を作成した. NAMPT 3'UTR 全体の 90% 以上を欠失させた場合にもアクチノマイシン D 存在下で GFP mRNA 発現が有意に低下することから, Nampt の安定化配列は, N 端から 100 塩基程度のところにまでに少なくとも 1 か所は存在することがわかった. しかし, AICAR 0.5mM, AICAR 2.0mM で処理したときの GFP mRNA 発現の dose response はやはり明らかではなかった. これらの結果から, Nampt mRNA の安定化に関わる配列は Nampt mRNA の C 端に存在するが, 明らかに AMPK に反応する配列は Nampt mRNA の C 端には存在しないと結論づけた.

NAD<sup>+</sup> が mRNA 5'端の NAD<sup>+</sup> capping を通じて mRNA 安定化に関わることが報告されており, AMPK により NAMPT や NMNAT mRNA など複数の mRNA の安定性が変化したことからも, この機構の関与を考えて解析を進めていきたい.

### 低毒性がん転移阻害剤の創製を目指した CaMKP 阻害剤のケミカルバイオロジー

石田 敦彦

(広島大学大学院統合生命科学研究科)

#### 【目的】

CaMKP (別名 POPX2/PPM1F) は 1998 年にラット脳より, CaM キナーゼ II の自己リン酸化部位を脱リン酸化する酵素として, 申請者らによって発見された PPM ファミリーに属するセリン/スレオニンプロテ

ンホスファターゼである<sup>1,2)</sup>。近年、CaMKP とがん細胞の遊走・浸潤との関連が相次いで報告されるようになったことから、本酵素は新たなドラッグターゲットとして注目されつつあるが<sup>2)</sup>、本酵素を含む PPM ファミリーホスファターゼの特異的阻害剤の報告例は少ない。申請者らは以前より CaMKP 特異的阻害剤の開発を目指した探索的研究を進めており、CaMKP 阻害剤として、1-amino-8-naphthol-4-sulfonic acid (ANS) 及び 1-amino-8-naphthol-2, 4-disulfonic acid (ANDS) を報告しているが<sup>2)</sup>、これらの化合物の特異性はまだ十分ではない。より特異性の高い阻害剤を開発すべく、(1) 新たな構造を持つ CaMKP 特異的阻害剤の探索、(2) 既報の ANS/ANDS を化学修飾することによる特異性の増強、という二つのアプローチを取ることにした。(1) のアプローチについては、東大創薬機構より提供された化合物ライブラリーの大規模スクリーニングを行い、ANS/ANDS とは全く構造の異なる CaMKP 特異的阻害活性を持つ化合物を見いだした。ここでは知財の関係上、(1) のアプローチに絞って現状を報告する。

#### 【結果】

大規模スクリーニングの結果、ピロガロール骨格を持つ gallic acid やそのアルキルエステルが、近縁の PPM1A を殆ど阻害せず、CaMKP を強く阻害することが判明した。これらの化合物は阻害に伴って、CaMKP タンパク質を顕著にカルボニル化することが分かった。基質リン酸化ペプチド存在下ではカルボニル化が顕著に亢進すること、このカルボニル化反応には  $Mn^{2+}$  や  $Cu^{2+}$ 、 $Co^{2+}$  などの 2 価の金属イオンが必須であったこと、ピロガロール骨格の 4 位の水酸基がカルボニル化に必須であることなどから、CaMKP の活性中心の金属結合部位、基質ペプチド結合部位などの活性中心、またはその近傍に gallic acid 及びそのアルキルエステルが結合し、何らかのラジカル反応を介して近傍のアミノ酸側鎖をカルボニル化する結果、CaMKP 活性が不可逆的に阻害される機構が考えられた。ヒト乳がん細胞株 MDA-MB-231 を ethyl gallate で処理すると、CaMKI のリン酸化が顕著に亢進したことから、ethyl gallate は細胞内に浸透して CaMKP 活性を抑制し得ることが示された<sup>3)</sup>。

#### 【考察】

阻害剤が酵素をカルボニル化する結果として特異的な阻害をもたらすという例は、我々の知る限りこれまでに知られていない。今回同定された gallic acid 関連化合物の合成展開をおこない、このような新奇な特異的阻害機構を利用した、より阻害特異性・阻害活性の高い阻害/不活化剤をデザインすることができるかも知れない。ethyl gallate, propyl gallate は既に酸化防止剤として広く食品添加物に利用されており、その細胞毒性が極めて低いことが確立されている点は興味深い。より毒性が低く、且つ効果的ながんの転移・浸潤を抑制する薬剤をデザインすることが出来れば、がん細胞の完全撲滅ではなく、がんの転移・浸潤を効果的に抑制して、がんと共存するという新しいコンセプトに基づくがん治療が可能となる。今後、これらの化合物の構造を元に、様々な化合物をデザインすることで改良を加え、より効果的な“低毒性がん転移抑制剤”の創製を目指していきたい。

#### 【文献】

- 1) Ishida, A., Kameshita, I. & Fujisawa, H.: A novel protein phosphatase that dephosphorylates and regulates  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II, *J. Biol Chem.* **273**: 1904–1910 (1998).
- 2) Ishida, A., Sueyoshi, N. & Kameshita, I.: Functions and dysfunctions of  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase phosphatase (CaMKP/PPM1F) and CaMKP-N/PPM1E, *Arch. Biochem. Biophys.* **640**: 83–92 (2018).
- 3) Akizuki, K., Ishikawa, S., Obatake, R., Ozaki, H., Shimoda, N., Nehira, T., Yamazaki, T., Kinumi, T., Osawa, J., Sueyoshi, N., Kameshita, I., Shigeri, Y. & Ishida, A.: CaM kinase phosphatase (CaMKP/PPM1F/POPX2) is specifically inactivated through gallate-mediated protein carbonylation. *Arch Biochem Biophys.* **720**: 109170 (2022).

**膜受容体による加水分解活性と代謝性疾患制御メカニズムの解明**

岩部 美紀

(東京大学大学院医学系研究科)

**【目的】**

これまでに、当研究室では、肥満に伴って生理活性物質アディポネクチンが低下することが、生活習慣病・メタボリックシンドローム・糖尿病激増の主要な原因になっていることを示し、アディポネクチンの受容体として AdipoR1 および AdipoR2 を同定した<sup>1)</sup>。非常に重要な点は、AdipoR は、亜鉛イオンが結合しており、Gタンパク質共役受容体(GPCR)とは逆の膜トポロジーを持つ新規の7回膜貫通型の受容体であり、Gタンパク質とは共役しておらず、構造学的・機能学的にも前例のない受容体であることである<sup>2)</sup>。AdipoR は、Progesterone and AdipoQ Receptor (PAQR) ファミリー分子の一つである。これらの発見を手がかりとして、PAQR ファミリー分子が新規の逆向き7回膜貫通型の受容体であるだけでなく、受容体でありながら、亜鉛イオンを結合し、加水分解活性を有する全く新規のユニークな受容体ファミリーであることが明らかになりつつある。本課題では、AdipoR を中心とした PAQR ファミリー分子の新しい機能として、加水分解活性メカニズム、さらにシグナル伝達機構を解明することを目的とする。

**【方法】**

- (1) PAQR ファミリー分子の糖・脂質代謝における細胞内シグナル伝達機構の解明：AdipoR を中心とした PAQR ファミリー分子の基質特異性、さらに代謝産物に関して網羅的に解析する。さらに、代謝産物の組成及び変化を解析し、AdipoR を中心とした PAQR ファミリー分子のシグナル伝達機構を解明する。
- (2) PAQR ファミリー分子の変異体マウスを用いた病態生理的意義の検討：CRISPR/Cas9 システムを用いて、加水分解活性が消失した PAQR ファミリー分子の変異体マウスを作製し、全身の糖・脂質代謝を検討する。さらに、AdipoR を中心とした PAQR ファミリー分子の変異体マウスの各臓器における代謝産物の変化を解析することにより、臓器特異的な加水分解活性につい

て明らかにする。

**【結果】**

- (1) PAQR ファミリー分子の糖・脂質代謝における細胞内シグナル伝達機構の解明：AdipoR を中心とした PAQR ファミリー分子の基質特異性、さらに代謝産物に関して網羅的に解析した(未発表)<sup>3)</sup>。さらに、代謝産物の組成及び変化の解析より、PAQR のシグナル伝達機構の一部を明らかにした(未発表)<sup>4)</sup>。
- (2) PAQR ファミリー分子の変異体マウスを用いた病態生理的意義の検討：新たに PAQR 変異体マウスを作製し、全身の糖代謝を解析し、各臓器における代謝産物の変化を解析した(未発表)<sup>2)</sup>。

**【考察】**

本課題の成果により、PAQR ファミリー分子の多様性と普遍性の理解がより深まり、生物界における未知の受容体活性化メカニズムが存在する可能性も示唆され、学術的貢献・意義も極めて高いと考えられる。

**【文献】**

- 1) Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Tsuchida, A., Yokomizo, T., Kita, S. *et al.*: Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*. **423**, 762-769 (2003).
- 2) Tanabe, H., Fujii, Y., Okada-Iwabu, M., Iwabu, M., Nakamura, Y., Hosaka, T. *et al.*: Crystal structures of the human adiponectin receptors. *Nature*. **520**, 312-326 (2015).
- 3) Tanabe, H., Fujii, Y., Okada-Iwabu, M., Iwabu, M., Kano, K., Kawana, H. *et al.*: Human adiponectin receptor AdipoR1 assumes closed and open structures. *Commun Biol*. **3**, 446 (2020).
- 4) Ohn, J., Been, KW., Kim, JY., Kim, EJ., Park, T., Yoon, HJ. *et al.*: Discovery of a transdermally deliverable pentapeptide for activating AdipoR1 to promote hair growth. *EMBO Mol Med*. **13**, e13790 (2021).

ユビキチンライゲース酵素 PRC1 の HR における新規活性制御機構

宇井 彩子

(東北大学加齢医学研究所)

婦人科がんの一つの特徴として、Homologous Recombination (HR) 不全 (相同組換え修復不全; HRD) がある。申請者は、がんで高頻度に異常しているクロマチンリモデリングの DSB 修復や HR 修復での機能を解析してきた (業績 Ui *et al.*, *Molecular Cell*, 2015;

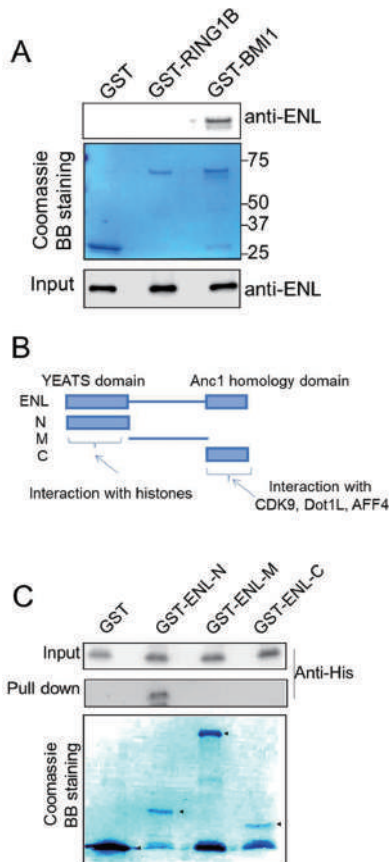


図 1

- A. 申請者は、以前に ENL と PRC1 の BMI1 が直接相互作用することを報告した (Ui *et al.*, *Mol Cell*, 2015)
- B. そこで本研究では、ENL の BMI1 の相互作用涼氣を明らかにするために、変異型タンパク質を作成した。
- C. その結果、ENL の YEATS domain が BMI1 と直接相互作用することが明らかになった。

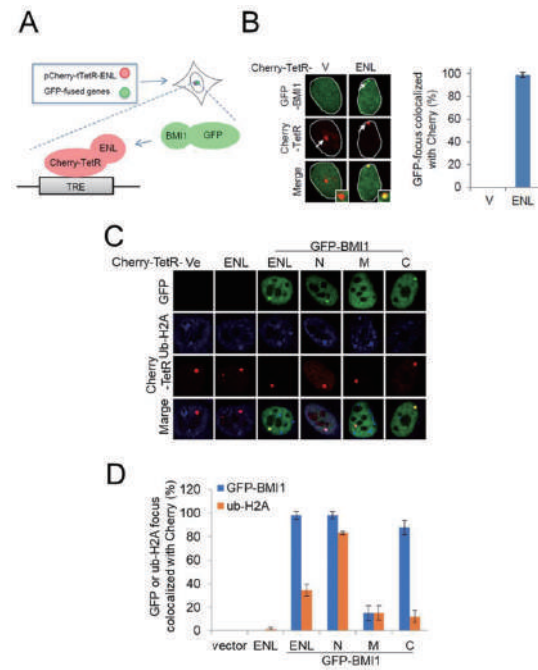


図 2

- A. B. 図 1 で ENL の結合領域が PRC1 のクロマチンのユビキチン化に与える影響を調べるために、以前報告した A のようなアッセイを使用した。このアッセイでは、実際に ENL が PRC1 のクロマチンへの結合を促すことが分かっている (Ui *et al.*, *Mol cell*, 2015)
- C. そこで本研究で見出したそれぞれの変異蛋白質をクロマチンにテザリングさせた結果、一部の領域で BMI1 の結合と、クロマチンのユビキチン化が観察された。
- D. B. の結果を数値化したグラフである。

Ui *et al.*, *Oncogene*, 2014; Watanabe *et al.*, *Cancer Res.*, 2014; Kato *et al.*, *Molecular Cell*, 2014; Ogiwara *et al.*, *Oncogene*, 2011; Ogiwara *et al.*, *Carcinogenesis*, 2010; Lan *et al.*, *Molecular Cell*, 2010). その中で、申請者が以前に新規相互作用を報告した (Ui *et al.*, *Molecular Cell*, 2015), 白血病の原因遺伝子として知られる ENL とヒストンのユビキチンライゲース複合体である BMI1/RING1B を含む PRC1 が新たに HR に関わることを見出した。しかし HR における ENL と PRC1 によるユビキチン化と機能に関しては不明である。そこで PRC1 のヒストンのユビキチン化による HR 経路の制御のメカニズム解明を明らかにするために、まず本研究では ENL の PRC1 結合領域の解析と、その領域が PRC1 のクロマチンのユビキチン化活性に及ぼす

影響を解析した。

以前に申請者は、ENLがPRC1複合体のBMI1と直接相互作用することにより、DSBにตอบสนองしてPRC1の転写部位での機能を促進することを報告したが、ENLによるPRC1の機能制御のメカニズムは不明である。そこで、まずENLとBMI1がどの領域で相互作用するのかを検討した。GSTタグ付きのタンパク質を精製して、相互作用領域を検討したところ、ENLのN末端領域のYEATS domainが直接相互作用することが明らかになった。一方で、ENLのC末端領域のAnc1 homology

domainは相互作用に関与しないことが明らかになった。

次に、この相互作用がPRC1のクロマチンのユビキチンライゲース活性にどのような影響をもたらすかを以前開発した実験系を用いて検討した (Ui *et al.*, *Molecular Cell*, 2015)。この実験系は細胞のクロマチンにENLをテザリングさせることにより、BMI1の結合とPRC1のクロマチンへのユビキチン化活性を同時に検討できる。その結果、ENLのN末端領域をクロマチンにテザリングさせると、PRC1のクロマチンに対するユビキチン化活性が促進された。一方でC末端領域はユビキチン化を促進させなかったが、BMI1との相互作用を認めた。この図1と2の結果より、細胞内ではBMI1はENLとC末を介して相互作用できることを示している。

さらにこのENLのC末を介した結合のメカニズムを明らかにするために、C末の機能解析を行った。このC末は、PRC1複合体の別の因子であるCBX8と相互作用することが報告されている。そこで、CBX8との相互作用領域に変異を導入してBMI1との相互作用を確認したところ、BMI1はENLと結合できなくなった。以上の結果より、細胞内ではC末端領域のENLもCBX8を介してBMI1と相互作用することが明らかになった。

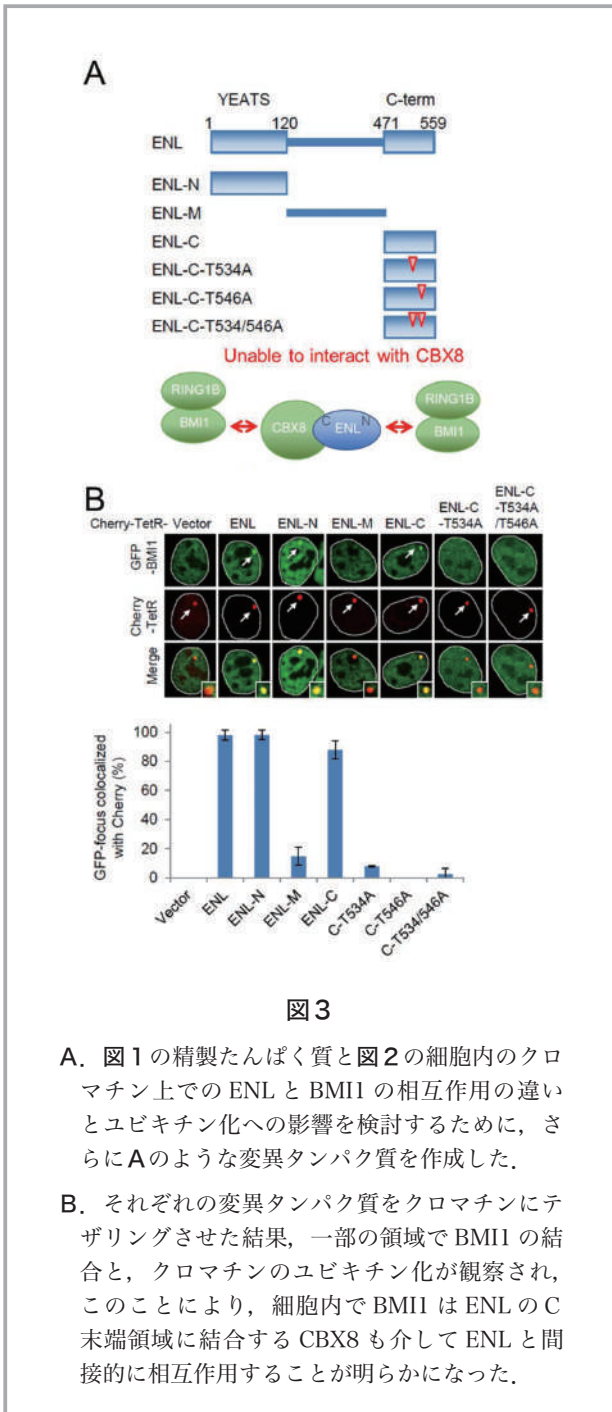


図3

- A. 図1の精製たんぱく質と図2の細胞内のクロマチン上でのENLとBMI1の相互作用の違いとユビキチン化への影響を検討するために、さらにAのような変異タンパク質を作成した。
- B. それぞれの変異タンパク質をクロマチンにテザリングさせた結果、一部の領域でBMI1の結合と、クロマチンのユビキチン化が観察され、このことにより、細胞内でBMI1はENLのC末端領域に結合するCBX8も介してENLと間接的に相互作用することが明らかになった。

超長鎖脂肪酸伸長酵素 (ELOVL) を介した脂肪酸プロファイル変化をもたらす血管炎症制御メカニズム

上田 和孝

(東京大学医学部附属病院)

【目的】

生活の質や生命を脅かす虚血性心疾患や脳卒中などの動脈硬化性疾患の克服は喫緊の課題であり、効果的な予防・治療法の開発には動脈硬化形成の分子メカニズムの解明が必要不可欠である。動脈硬化は血管炎症の経時的変化をもたらす慢性炎症疾患の典型といえる。申請者らは、動脈硬化形成時の炎症の主要な舞台として、動脈周囲に存在する脂肪組織である血管周囲脂肪 (perivascular adipose tissue; PVAT) に注目した (図1)。予備検討として行ったトランスクリプトーム解析で、動脈ストレスによりPVATで炎症関連の遺伝子群が増加する

とともに、『PVATの褐色脂肪化』という特徴的な応答を示すことを見出した。脂肪の褐色化とは、白色脂肪組織が様々な刺激により褐色脂肪組織様の性質を示す現象を指す。特筆すべきことに、薬剤によりこのPVATの褐色脂肪化を抑制すると、血管の炎症と病的リモデリング（動脈硬化）が増悪することを突き止めた。これらの結果は、PVATが血管炎症を感知して褐色化し、炎症を収束に導く火消し役を果たしていることを示唆する。

では、褐色化PVATはいかにして炎症を収束に導い

ているのであろうか。申請者は脂肪細胞内で脂肪酸の炭素鎖の伸長に関わる酵素である **elongase of very long chain fatty acid (ELOVL)** ファミリーの働きに着目した(図2)。最近の研究で、脂肪酸には炎症を惹起するものと抗炎症的に作用するものがあることが明らかになってきている。また、ELOVL分子の発現制御により脂肪細胞で産生される脂肪酸のプロファイルに変化がみられることも知られている。申請者は、褐色化制御因子であるPRDM16のsiRNAを用いて培養脂肪細胞でPVAT褐色化を抑制すると、複数のELOVL分子の発現が著明に低下することを見出した(図3)。

そこで本研究では、PVAT褐色化におけるELOVLファミリーを介した抗炎症作用のメカニズムを、遺伝子改変マウス、培養細胞、網羅的遺伝子解析を通じて検討する。本研究は、これまで単なる支持組織でしかないと考えられてきたPVATが、ELOVLによる脂肪酸発現制御を介して血管炎症に秩序をもたらしていると捉え、「炎症」、「PVAT」、「褐色化」を有機的に結び付けることで動脈硬化形成機序の新しい革新的概念を生み出そうとするものである。本研究を通じて、動脈硬化形成メカニズムを炎症の遷延と収束の観点から理解し、動脈硬化の新たな予防・治療のターゲットの創出を目指す。

【方法】

1. 褐色化ブロックマウスを用いたELOVLを介した炎症制御メカニズムの解明

本研究では脂肪細胞に特異的に発現する adiponectin のプロモーター領域を含む配列の下流に Cre 発現遺伝子配列を組み込んだ adipoq-Cre マウスと、脂肪褐色化を制御する PRDM16 遺伝子 exon9 の floxed マウスを交配し、脂肪特異的 PRDM16 ノックアウトマウス (adipoq-Cre PRDM16 flox) を褐色化ブロックマウスとして用いる。本マウスは入手済みですぐに使用可能な状態にある。

本マウスを用いてワイヤー擦過による大腿動脈内皮傷害を作成した後、PVAT組織における各種ELOVL分子の発現を、qRT-PCR、免疫組織染色、ウエスタンブロットで解析し、野生型マウスと比較する。前述の培養細胞におけるELOVL分子の発現データと照合し、重要な作用を持つELOVL分子の候補(複数種を想定)を見極め、pluronic gelを用いたsiRNAオリゴの *in vivo* 導入法を



図1 血管周囲脂肪組織  
perivascular adipose tissue (PVAT)

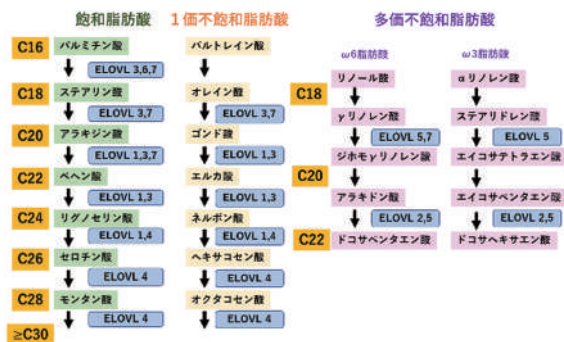


図2 超長鎖脂肪酸伸長酵素 (ELOVL) ファミリーは脂肪酸プロファイルを制御する

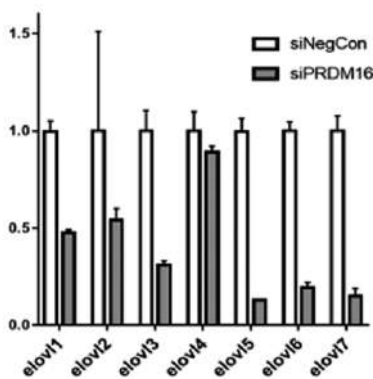


図3 PVAT褐色化の抑制は様々なELOVL分子の発現を低下させる



用いて PVAT 局所で ELOVL をノックダウンし、病的血管リモデリングを比較する。

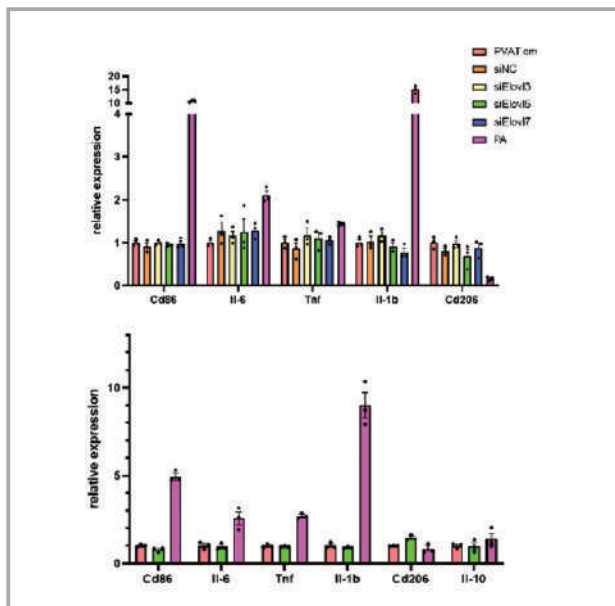
## 2. 網羅的解析による褐色化 PVAT 由来の抗炎症性分泌因子の同定

申請者らは野生型マウスの褐色化 PVAT 由来 stromal vascular fraction (SVF) 細胞株の樹立に成功した。研究 1 で血管リモデリングに影響を及ぼす ELOVL 分子を同定できれば、その ELOVL 分子を野生型マウス由来 PVAT-SVF を用いて *in vitro* でノックダウンし、炎症性/抗炎症性脂肪酸の変化と RAW264.7 への作用を解析する。また、組織 1 細胞解析により褐色化脂肪由来の抗炎症分子を同定し、その役割を *in vivo*, *in vitro* で検証する。

### 【結果】

#### 1. 褐色脂肪による抗炎症作用における ELOVL の役割

先行研究や自身の予備データを基に、ELOVL の中で炎症制御に関与している可能性が高いと思われる ELOVL3, 5, 7 に着目し、それぞれの siRNA オリゴを用意した。PVAT 由来の SVF から褐色脂肪細胞への分化を誘導する際に、Elovl 3, 5, 7 の各 siRNA オリゴを遺伝子導入した。各遺伝子は 80% 以上の良好なノックダウン効率を得られることを q-RT-PCR で確認した。一方で UCP1 等の褐色脂肪マーカーは Elovl のノックダウンの有無に影響を受けず、Elovl は褐色脂肪分化には影響しないことが確認された。その上で、褐色脂肪細胞の培養上清で RAW264.7 を刺激したところ、いずれの Elovl のノックダウンによっても RAW264.7 の抗炎



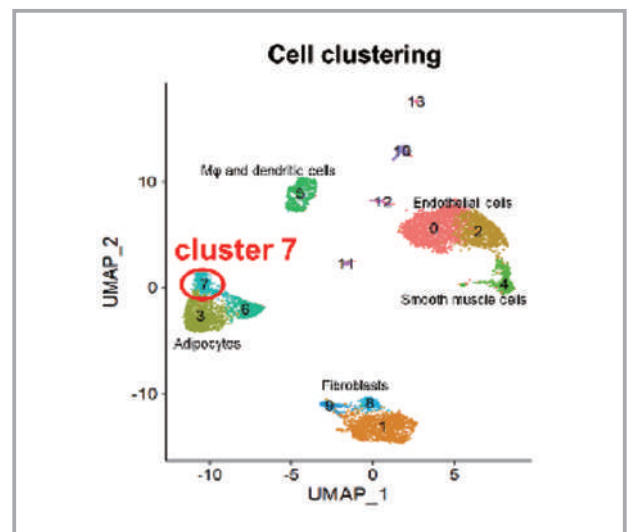
症型へのシフトと炎症性サイトカインの減少が認められた。この結果からは、各種 ELOVL の中でも少なくとも ELOVL3, 5, 7 の各単体においては褐色脂肪による抗炎症作用メカニズムの主体をなすものではないことが示唆される。今後はその他の ELOVL アイソフォームについても検討を加えるほか、Elovl3 と 7 など、複数の因子を同時にノックダウンした際の変化についても検討を追加する方針である。

#### 2. PVAT 褐色化は傷害後の血管炎症を収束に導く

褐色化ブロックマウス (adipoq-Cre PRDM16 flox) において血管傷害を作成すると、傷害 14 日後の血管内膜肥厚が野生型マウスに比べて増悪した。F4/80 による免疫染色では、PVAT および血管におけるマクロファージの集積の程度には両群で差がなかった一方で、褐色化ブロックマウスにおいては、炎症型マクロファージマーカーである iNOS 陽性細胞数は顕著に増加しており、一方で抗炎症型マクロファージである CD206 陽性細胞数は減少していたことから、褐色化をブロックすることでマクロファージの性質が変化することが示唆された。

#### 3.1 細胞解析による褐色化 PVAT 由来の抗炎症性分泌因子の同定

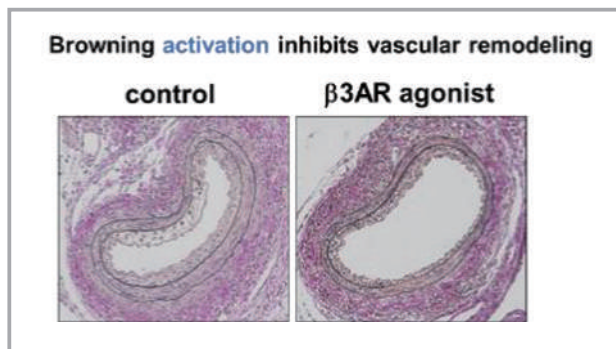
我々は、公表されている遺伝子発現データを活用し、マウス脂肪組織を用いた 1 細胞解析を行った。細胞ごとの発現遺伝子の特徴によるクラスター分類で、マウス内臓脂肪は個別の特徴を有する 15 のクラスターに分類された。その中で、褐色化を刺激する  $\beta 3$  受容体刺激薬投与後の脂肪において、ある一つのクラスター (C7) が特徴的に現れることが分かった。このクラスターの特



徴を詳しく見てみると、褐色脂肪に特徴的に発現する遺伝子群 (*Ucp1*, *Cidea*, *Ppargc1a* 等) が増加しており、本クラスターは褐色化した脂肪細胞の群であることが分かった。Gene Ontology によって遺伝子の機能的特徴を解析すると、C7 に特徴的に発現する分泌性タンパクとして、Neuregulin4 をコードする遺伝子 *Nrg4* が見出された。

#### 4. 褐色化 PVAT 制御による血管炎症抑制効果

$\beta 3$  受容体刺激薬 (CL316243) は PVAT の褐色化を強く促進することを確認した。この CL316243 をマウス大腿動脈周囲に塗布したのち、血管傷害を加えたところ、傷害 14 日後の血管では、iNOS 陽性細胞数が減少し、CD206 陽性細胞数は増加しており、血管リモデリングは有意に抑制された。また、上記研究 2 で同定した *Nrg4* から生成されるタンパク NRG4 で培養マクロファージ細胞 (RAW264.7) を刺激すると、マクロファージの抗炎症型へのシフトが起こり、炎症性サイトカインの発現も減少した。



#### 【考察】

本研究から、血管傷害後に生じる PVAT の褐色化によって、PVAT から分泌される因子がマクロファージに作用し抗炎症型へシフトさせることで、血管の炎症を取束に導き、病的な血管リモデリングを抑制することが示唆された。現時点では、褐色脂肪による抗炎症効果のメカニズムにおける ELOVL 分子の役割は明らかにはなっていないが、今後さらに検討を進める予定である。一方で本研究では、褐色化脂肪由来の Neuregulin4 が炎症抑制に重要な役割を持っていることが明らかとなった。この結果は、褐色化刺激薬が動脈硬化予防・治療に有用である可能性を示唆するものであり、今後は、将来の臨床への応用の可能性を見据え、血管傷害以外の血管疾患モデルでの検討や、ヒトの動脈サンプルを用いた検討な

どをさらに追加して行っていく予定である。

#### 【文献】

Adachi, Y., Ueda, K., Nomura, S., Ito, K., Katoh, M., Katagiri, M., Yamada, S., Hashimoto, M., Zhai, B., Numata, G., Otani, A., Hinata, M., Hiraike, Y., Waki, H., Takeda, N., Morita, H., Ushiku, T., Yamauchi, T., Takimoto, E. & Komuro, I.: Being of perivascular adipose tissue regulates its inflammation and vascular remodeling. *Nature Communications*, **13**(1): 5117, 2022.

#### 細胞の力学的環境を感知するメカノセンサー蛋白質の同定

大橋 一正

(東北大学大学院生命科学研究所)

#### 【目的】

私たちの体は様々な機械的な力を受けており、組織を構成する細胞はこれらを感じて応答する力覚応答を行っている。その機械的な力を感じするために、細胞は力の負荷によって立体構造が変化するセンサー蛋白質を持つことが明らかにされてきた。しかし、機械的な力の作用によって酵素としての活性が変化する蛋白質はほとんど報告がない。私たちは、力覚応答に関与する低分子量 G 蛋白質 RhoA の活性化因子 RhoGEF として Solo を見出した。また、Solo は、細胞内でケラチン 8/18 繊維に結合して機能を発揮すること明らかにしてきた。これらの知見から、本研究は、Solo が力の作用によって GEF 活性が変化するメカノセンサー酵素として働く可能性を検証するとともに、Solo の力覚応答における機能解明を目的とした。

#### 【方法・結果】

##### 1. Solo がメカノセンサー酵素として働く可能性の検証

シリコーンゴムの薄膜にケラチン繊維を共有結合で結合させ、そのケラチン繊維に動物細胞に発現させて精製した Solo 蛋白質を結合させた。このシリコーン膜上の Solo に対し RhoA の GEF 活性を測定した。反応中、シリコーン膜は Solo 結合面を引き伸ばすことができるように装置を自作した。この装置を用い、シリコーン膜を

約 10% 引き伸ばした条件で Solo の GEF 活性を測定した。しかし、結合した Solo 蛋白質の密度が十分ではなく、GEF 活性の変化を測定できなかった。

**2. 細胞への張力負荷による Solo のセンサー機能の検証**

FK506-binding protein (FKBP) がラパマイシンを介して FKBP12-rapamycin associated protein (FRB) と結合する化学誘導二量体形成法を利用し、人為的に収縮する細胞を作製した。細胞膜への局在化シグナルを付加した FKBP と、RhoA の活性化ドメイン (RhoGEF, LARG の DH ドメイン) と FRB の融合蛋白質を共に発現する MDCK 細胞はラパマイシン添加で収縮する。この細胞によって蛍光タンパク質を付加した Solo を発現させた細胞を引張り、Solo の張力負荷に対する機能を解析した。その結果、引張刺激から 30 分経過後、Solo が細胞間接着部位へ集積することが明らかになった。さらに、デスモソーム構成蛋白質の一つが Solo の細胞間接着部位への局在に必需であることが明らかになった。

**【考察】**

Solo 蛋白質への直接の力負荷による酵素活性変化は、Solo のシリコン膜への固相化密度に限界があり困難であった。より高密度に Solo 蛋白質を直接固相化する方法を検討する必要がある。また、細胞への張力の負荷で Solo が細胞間接着部位へ集積することを見出した。その局在変化は張力負荷と同期しないことから、Solo は張力センサーではなく、上流のセンサー蛋白質の作用により細胞間接着部位へ局在化したと考えられる。Solo は、力覚応答において、局在変化によってアクチン骨格とともにケラチン繊維の構造変化を行うことで細胞間接着部位の力学的環境を制御していると考えられる。

**ペプチドに D-体アミノ酸残基を導入する新規エピメラーゼの解析と応用研究**

小笠原 泰志

(北海道大学大学院工学研究院)

**【目的】**

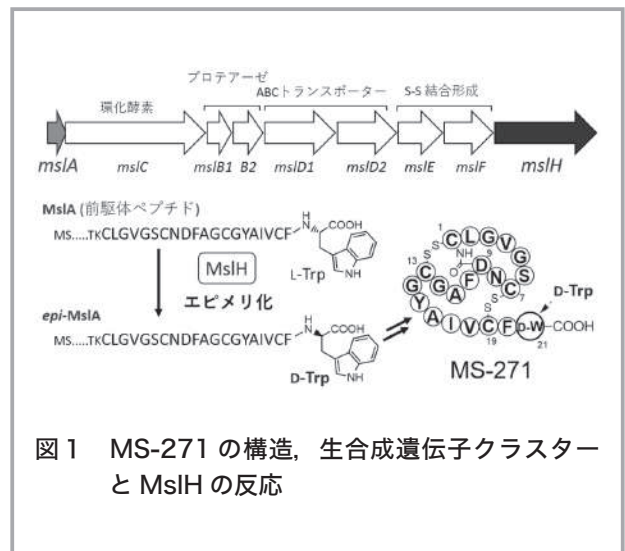
微生物や植物が生産する二次代謝産物は構造多様性があり、それらを生合成する酵素には興味深いメカニズムを有するものが数多く存在する。ゆえに、二次代謝産物

の生合成酵素に我々が学ぶことは多く、新規反応を触媒する酵素の発見とその解析は、遺伝子工学による非天然型生理活性物質の創製の基盤となる。

MS-271 は放線菌 *Streptomyces* sp. M-271 から単離され、21 アミノ酸残基からなるラッソペプチド (投げ縄構造を持つペプチド二次代謝産物の一群) である。構造上の特徴として C 末端に D-トリプトファン (Trp) を有する。その生合成について、一般にラッソペプチドはリボソーム由来のため、非タンパク質性の D-Trp の導入機構に興味を持たれた。最近我々は、生合成遺伝子クラスターを同定し、リボソームでの翻訳で C 末端が L-Trp の前駆体ペプチド (MslA) が生成し、ペプチド上のエピメリ化 (立体反転反応) によって D-Trp が導入されることを明らかとした<sup>1)</sup>。また、本反応は、既知の立体反転酵素と全く相同性を示さない新規酵素 MslH によって触媒されることを *in vivo* と *in vitro* 実験で見出した (図 1)。本酵素は、リボソーム由来ペプチドの C 末端のアミノ酸残基を D 体へ変換する初の例である<sup>2)</sup>。MslH は、特徴的なモチーフ配列や補酵素結合領域を持たず、反応機構が学術的に興味深い。そこで本研究では MslH の反応機構の解明を目的とした。

**【方法】**

MslH は、既知の酵素との相同性がなく特徴的なモチーフ配列を持たないため、配列解析での活性残基の推定が困難である。そこで MslH と基質類縁体を用いた X 線結晶構造解析で活性残基や基質認識部位を推定し、アミノ酸変異実験により推定活性残基をそれぞれ検証した。



【結果と考察】

複合体の結晶構造解析には、本来の基質の代わりに反応が進行しない基質類縁体を用いる必要がある。これまで MslH のエピメリ化には MslA の C 末芳香族アミノ酸が必須であることが分かっていたため、C 末 Trp を脂肪族アミノ酸に置換した MslAW21V 変異体と Trp を欠失させた MslAΔW21 変異体を大腸菌を宿主に発現、精製して調製した。各変異体と MslH との共結晶化を試みたところ、MslAΔW21 変異体で共結晶が得られたことから構造解析した。その結果、MslH に MslAΔW21 変異体が結合した電子密度が得られ、その近傍に Ca<sup>2+</sup> と推定される 2 価金属の電子密度が観測されたことから、基質の C 末 Trp が Ca<sup>2+</sup> に配位することが示唆された。また、推定活性部位を挟んで 2 つの His 残基 (His88, His295) とその外側にそれぞれ Asp 残基 (Asp11, Asp91) が観測された。このことから、これらがエピメリ化に必要な脱プロトン化/プロトン化を担うアミノ酸残基と示唆された。また、アミノ酸変異実験で、変異体のエピメリ化活性が完全に消失したことから、これらのアミノ酸残基が反応に必須であることが示された。

【文献】

- 1) Z, Feng., Y, Ogasawara., S, Nomura. & T. Dairi.: Biosynthetic Gene Cluster of a D-Tryptophan-Containing Lasso Peptide, MS - 271. *ChemBioChem*, **19**, 2045 (2018).
- 2) Z, Feng., Y, Ogasawara. & T, Dairi.: Identification of the Peptide Epimerase MslH Responsible for D-amino Acid Introduction at the C-terminus of Ribosomal Peptides, *Chem. Sci.*, **12**, 2567 (2021).

糖転移酵素の協調作用を介した新たな Notch 受容体発現制御機構

岡島 徹也

(名古屋大学糖鎖生命コア研究所)

【目的】

Notch シグナルの制御異常は癌を含む様々な疾患と関連する。これまでに、NOTCH1 受容体の細胞外ドメイ

ンが、リガンドを介した Notch シグナル伝達と腫瘍の血管新生を阻害することが報告されている。NOTCH1 細胞外ドメインは、上皮成長因子様 (EGF) 反復配列からなるが、発現したタンパク質は細胞外への分泌の効率が低く、細胞内に主に保持される。これは、NOTCH1 が 30 以上の EGF リピートから構成されるためと推定される。

EGF リピートは、O-フコース、O-グルコース、O-GlcNAc を含む 3 種類の O-型糖鎖で修飾される。これらの糖鎖修飾の最初のステップは、O-フコース転移酵素 1 (POFUT1)、O-グルコース転移酵素 1 (POGLUT1)、EGF ドメイン特異的 O-GlcNAc 転移酵素 (EOGT) であり、小胞体での酵素反応である。本研究では、これらの糖転移酵素を様々な組み合わせにて発現させ、NOTCH 細胞外ドメインの分泌発現における糖転移酵素群の協調作用について検討した。

【方法と結果】

Notch1 の分泌発現をモニターするために FLAG: N1-EGF 発現プラスミドを構築し、小胞体に局在する修飾酵素として、POFUT1、POGLUT1、EOGT の 3 種類、ゴルジ体に局在する酵素として L-FNG を、様々な組み

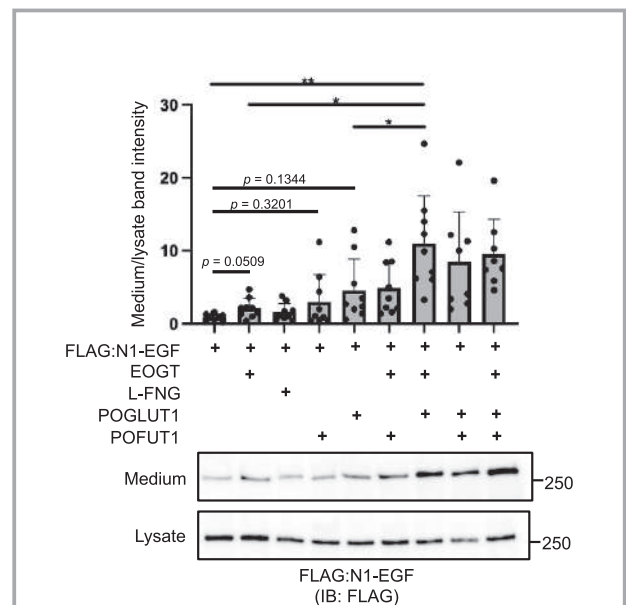


図 1

FLAG: N1-EGF を POFUT1、POGLUT1、EOGT、L-FNG を含む様々な組合せで FLAG: N1-EGF とともに HEK293T 細胞に共発現させた。Medium もしくは Lysate 中のタンパク量を定量、比較を行なった。文献 1 より改変

合わせて FLAG:N1-EGF とともに HEK293T 細胞において共発現させた (図 1)。

分泌された FLAG: N1-EGF 量は EOGT の共発現により増加し、L-FRING では増加しなかった。内在性 NOTCH 受容体の分泌経路における POFUT1 及び POGLUT1 の必要性に反して、FLAG: N1-EGF NOTCH1 に関する POFUT1 又は POGLUT1 の過剰発現の効果は、統計的に有意ではなかった。一方、EOGT/POFUT1ではなく、EOGT/POGLUT1 を共発現させると、EOGT 単独と比較して分泌がさらに亢進した。これらの結果から、HEK293T 細胞では、EOGT の主要な役割に比べて、POGLUT1 には副次的な役割があるのに対して、POFUT1 の影響は限定的であることが明らかとなった。

EOGT と POGLUT1 の共発現による O 型糖鎖修飾の変化を評価するために、FLAG: N3-EGF を用いた質量分析を実施した。糖ペプチドの比較解析の方法論を単純化するために、MS/MS スペクトルからの糖ペプチド同定に適した検索エンジンである Proteome Discoverer と Byonic node を利用して、ラベルフリー定量ワークフローを採用した (図 2)。EOGT の糖転移酵素活性と一致して、O-GlcNAc, O-GlcNAc-Gal, または

O-GlcNAc-Gal-NeuAc 糖ペプチドの存在比は、EOGT/POGLUT1 過剰発現によって EGF9, 10, 25, 31, 34 で著しく増加した。一方で、O-Glc 修飾に対する EOGT/POGLUT1 の効果は不明瞭で、EOGT/POGLUT1 の過剰発現をさせなくても、O-Glc 修飾部位は糖鎖修飾されていた。POGLUT1 を過剰発現させることで、O-グルコース化が不十分な結果、細胞内に保持される FLAG: N3-EGF の割合が低下したためと考えられるが、今後の更なる解析が必要である。

### 【考察】

本研究を通じて、小胞体に局在する糖転移酵素の最適な組み合わせは、培養細胞において NOTCH 細胞外ドメインを効率的に分泌発現するための有効な戦略であることを示した。さらに、NOTCH 受容体の O 型糖鎖の比較プロテオミクスのための簡便な方法論の開発に成功した。この糖鎖分析法による O 型糖鎖修飾状態の評価は、糖鎖によって安定性とリガンド結合能が調節される NOTCH 受容体において、特に重要であり、他の類似の糖タンパク質の解析にも応用可能である。

### 【文献】

- 1) Zhang, A., Tsukamoto, Y., Takeuchi, H., Nishiwaki, K., Tashima, Y. & Okajima, T. : Secretory expression of mammalian NOTCH tandem epidermal growth factor-like repeats based on increased O-glycosylation, *Anal. Biochem.* in press. (2022).
- 2) Tsukamoto, Y., Ogawa, M., Yogi, K., Tashima, Y., Takeuchi H. & Okajima, T. : Glycoproteomics of NOTCH1 EGF repeat fragments overexpressed with different glycosyltransferases in HEK293T cells reveals insights into O-GlcNAcylation of NOTCH1, *Glycobiology*, **32**, 616-628 (2022).

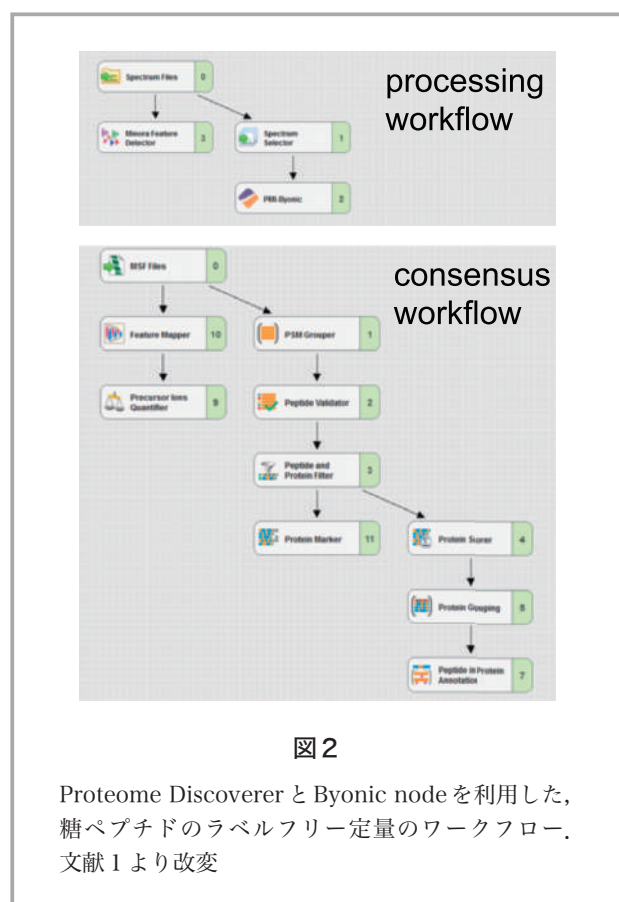


図 2

Proteome Discoverer と Byonic node を利用した、糖ペプチドのラベルフリー定量のワークフロー。文献 1 より改変

**電位依存性ホスファターゼを原型とする、イノシトールリン脂質シグナル伝達解析のための分子ツールの創製**

岡村 康司

(大阪大学大学院医学系研究科)

**【目的】**

膜電位感受性をもつイノシトールリン脂質脱リン酸化酵素である VSP を原型とし、イノシトールリン脂質シグナル伝達解析に有用な分子ツールを改良することを目指した。

**【方法】**

主にアフリカツメガエル卵母細胞の発現系細胞を用い、カタユウレイボヤ由来 VSP を原型として、アミノ酸変異を導入し、膜電位依存的ホスファターゼ活性の増強と、基質特異性の変更を試みた。特に動物種間でアミノ酸配列の保存性の高い、4番目の電位センサー膜貫通ヘリックスの S4 と S4 直下のリンカー部分、酵素活性中心の Cx5R に着目した。発現系細胞からの電気生理学的計測および FRET センサーによる Voltage clamp fluorometry をおこない、後者は細胞外側へのマレイミド蛍光化合物の導入法および非天然蛍光性人工アミノ酸 Anap の導入法により蛍光分子を導入し、分子構造の変化と電位依存的な構造変化の検出をした。

**【結果】**

S4 からリンカーにかけてアミノ酸変異を導入のスクリーニングを行い、S4 の細胞内側の L233, F234 の変異により電位依存的酵素活性が大きく変化した。他の疎水性アミノ酸へ置換することで酵素活性が増強し、この変化は電位センサーと酵素のカップリングの変化で生じることが判明した。またこれらの部位およびリンカー部分 (H237 など) は、酵素ドメイン中において共役に重要である hydrophobic spine と直接相互作用することが判明した<sup>1)</sup>。次に、活性中心付近のアミノ酸配列 Cx5R が、有袋類の複数の種では活性中心の Cys のひとつ手前の Lys が Met と Leu になっている。この Lys (Ci-VSP のアミノ酸番号で 364 に該当) は VSP と相同性のある 3-phosphatase PTEN においても保存され、COSMIC データベースにおいて癌患者での変異が

報告されており、またアミノ酸変異により 3-phosphatase 酵素活性が減弱することが知られている。VSP は 5-phosphatase 活性と 3-phosphatase 活性をあわせもつが、K364 の変異により 5-phosphatase 活性のみに限定できる可能性を考え、K364 を Met や Leu に変更し、電位依存的酵素活性を 5-phosphatase 活性、3-phosphatase 活性のそれぞれについて計測を行った。その結果、K364A や K364I では 3-phosphatase 活性が減弱することが判明した。

また複数の有袋類でみられる Met へ変更した場合には 3-phosphatase 活性と 5-phosphatase 活性の両方が増強し、意外なことに電位センサーとの共役が増強していた。Zebrafish 由来 VSP (Dr-VSP) に同様な変異 (K303M) を導入すると、KCNQ2/3 チャネルを PI(4,5)P<sub>2</sub> センサーとして用いた計測で、野生型 Dr-VSP よりも有意に電位依存性酵素活性が増強していた。

**【考察】**

hydrophobic spine と相互作用する S4 から linker にかけての疎水性アミノ酸の重要性を明らかにし、また活性中心の cysteine の 1 つ手前の Lys の重要性を明らかにした。これら各部位を変更することで共役を増強することが可能になった。これらを組み合わせることで相乗的に活性を増強できるかが次のステップである。基質特異性について、Cx5R のアミノ酸変異により 3-phosphatase 活性を減らすことが可能であり、これまでより PI(4,5)P<sub>2</sub> に特化した有用なツール開発に繋がると期待できる。

**【文献】**

- 1) Mizutani, N., Kawanabe, A., Jinno, Y., Narita, H., Yonezawa, T., Nakagawa, A. & Okamura, Y.: Interaction between S4 and the phosphatase domain mediates electrochemical coupling in voltage-sensing phosphatase (VSP). *Proc Natl Acad Sci U S A.* **119**(26): e2200364119. (2022).

**生体恒常性を制御する新しい RNA 修飾代謝酵素の機能解明**

小川 亜希子

(東北大学加齢医学研究所)

**【目的】**

生体内の液性因子のうち、核酸型液性因子はアデノシンや ATP に集約されており、他の液性因子と比べて多様性が極端に乏しい。近年、RNA には 150 種にも及ぶ多彩な化学修飾が存在することが発見された。RNA 修飾は転写後の遺伝子発現制御を担い、修飾異常が疾患発症原因となることが明らかになりつつあるが、分解後にどのように振る舞い、細胞機能に影響を与えるか不明であった。研究代表者は RNA 修飾由来代謝物が眼房水や血清中といった生体中の細胞外液に豊富に含まれることを示し、さらにその中には液性因子として受容体を強力に活性化して下流のシグナルを誘導し、生体機能を調節しうるものが存在することを証明した。すなわち RNA 修飾研究が細胞の中から外へ大きな転換点を迎えている。そこで本研究では多彩な RNA 修飾代謝の観点より、測定最適化と関連酵素の同定と機能解析を目的とする。

**【方法】**

(1) RNA 修飾代謝の網羅的検出法の確立

質量分析を用いて細胞外液に含まれる RNA 修飾の代謝物を安定して測定する手法の確立を目指して比較検討を行った。また、この系を用いてヒト眼房水や血漿、尿中の代謝物の定量評価を行った。

(2) RNA 修飾代謝物の生理活性の検討

ヒト細胞外液中に存在する RNA 修飾の代謝物の液性因子としての活性評価を TGF- $\alpha$  shedding assay 法 (Inoue *et al.*, *Nature Methods*. 2012) を用いて行った。各種 G タンパク質共役受容体 (GPCR) の発現ベクターとアルカリフォスファターゼ融合 TGF $\alpha$  (AP-TGF $\alpha$ ) を一過性に HEK293A 細胞に強制発現させ、代謝物を添加した際に GPCR を介した活性化が起こると細胞膜から培養上清中に遊離する AP-TGF $\alpha$  量を測定した。

(3) RNA 修飾代謝物の活性機構の解明と生理作用の同定

GPCR 活性が明らかになった RNA 修飾代謝物の活性機構の解明を *in silico* モデルと変異体作成により行った。

更に外的環境に応じた RNA 修飾代謝物の生体内での変動の有無を測定し、その変動の機序について核酸分解と核酸代謝の観点から検討を行った。更に受容体を介した代謝物の生理作用・病的作用について、生体モデルを用いて検討した。

**【結果】**

(1) RNA 修飾代謝の網羅的検出法の確立

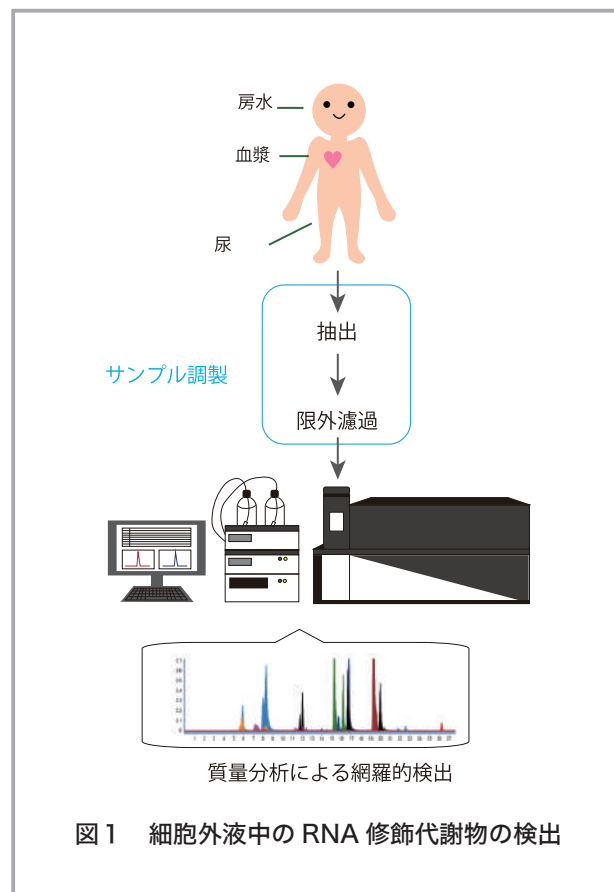
生体サンプルは採取後 -80°C で保存し、測定日に解凍し、有機溶媒を加えて除タンパクした後水を添加して液層を 2 層に分け、そのうちの水層を限外濾過を行った後に回収した。

回収した水層を遠心濃縮して超純水に再溶解し、質量分析装置により RNA 修飾代謝物を検出した (図 1)。

(2) RNA 修飾代謝物の生理活性の検討

上記検出法を用いてヒトを含む様々な生物種の細胞外液中の RNA 代謝物の分布を測定したところ、多種の代謝物が検出された。これらの代謝物はヌクレオシドの修飾体であるため活性スクリーニングを行った。その結果、N6-methyladenosine (m6A) がアデノシン A3 受容体に対して特異的な活性を有することことを同定した。

(3) RNA 修飾代謝物の活性機構の解明と生理作用の同定



m6Aの強力な受容体活性機構を解明するためにホモロジーモデリングによる予測構造を調べ、さらに変異体アッセイを行うことで裏付けを取り、m6A結合に特異的な疎水性アミノ酸残基を同定した。次にm6Aの制御機構を調べるため様々な外的刺激を加えて変動を調べたところ、細胞傷害時特異的なRNA分解がリソソームで起こることでm6がA細胞外で増えることが修飾酵素のノックアウト細胞株作成により分かった。さらにこのm6A-アデノシンA3受容体の下流シグナル伝達により生体内でI型アレルギーあるいは局所的な炎症性サイトカインの産生が増えることが分かった。

#### 【考察】

近年、DNAやタンパク質だけでなく、RNAもメチル化やアセチル化といった化学修飾を受けることが明らかになり、RNA修飾がエピジェネティクスに次ぐ新たな研究分野として定着しつつある。本研究ではRNA修飾代謝に着目し、その網羅的検出の最適化を行い、更にこの手法を用いて様々な検体を解析することにより成果を得た。更に研究の段階で新規RNA修飾代謝酵素の同定に成功しており、現在解析を進めている。

#### 【文献】

- 1) Ogawa, A., Nagiri, C., Shihoya, W., Inoue, A., Kawakami, K., Hiratsuka, S., Aoki, J., Ito, Y., Suzuki, T., Suzuki, T., Inoue, T., Nureki, O., Tanihara, H. & Tomizawa, K.: Wei FY. N6-methyladenosine (m6A) is an endogenous A3 adenosine receptor ligand. *Mol Cell*. **81**, 659-674 (2021).
- 2) Watanabe-Kitamura, F., Ogawa, A., Fujimoto, T., Iraha, S., Inoue-Mochita, M., Watanabe, T., Takahashi, E., Tanihara, H. & Inoue, T.: Potential roles of the IL-6 family in conjunctival fibrosis. *Exp Eye Res*. **210**: 108708 (2021).
- 3) Ogawa, A. & Wei, FY.: Protocol for preparation and measurement of intracellular and extracellular modified RNA using liquid chromatography-mass spectrometry. *STAR Protoc*. **2** (4): 100848 (2021). \* 責任著者
- 4) 小川亜希子, 松尾紀孝, 齋藤一創, 魏范研:「COVID-19 ワクチン接種後のRNA修飾代謝物排泄の変動」.

46巻2号(2022). \*in press

### NKT細胞を活性化するスフィンゴ糖脂質の機能解明を目指した糖脂質合成酵素の開発

沖野 望

(九州大学大学院農学研究院)

#### 【目的】

スフィンゴ糖脂質は真核生物に幅広く存在するセラミド骨格を有する一群の糖脂質であるが、スフィンゴモナスやバクテロイデスなど一部の細菌もスフィンゴ糖脂質を合成することが知られている。細菌由来のスフィンゴ糖脂質は真核生物と異なり、糖が $\alpha$ 結合でセラミドに結合するという特徴を持つと共に、ヒトやマウスのナチュラルキラーT (NKT) 細胞の活性化能を有することから、その生物活性に注目が集まっている。我々は最近、細菌由来の $\alpha$ -グルクロノシルセラミド( $\alpha$ -GlcACer)合成酵素を同定すると共に、そのホモログを $\alpha$ -ガラクトシルセラミド( $\alpha$ -GalCer)の生産菌であるバクテロイデス属細菌に見出し、 $\alpha$ -GalCer合成酵素の同定にも成功した<sup>1)</sup>。本研究では、 $\alpha$ -GalCerの発酵生産や機能解明に役立つ $\alpha$ -GalCer合成酵素を開発することを目的として研究を実施した。

#### 【方法】

$\alpha$ -GalCerが最初に発見されたのはカイメンの一種からであり、実際にはカイメンの共生細菌が合成している可能性が高い。そこで、本研究では $\alpha$ -GalCer合成酵素のホモログを細菌ゲノムやカイメンを含む海洋メタゲノムのデータベースから探索した。次に、これらホモログの中から幾つかの遺伝子を人工合成し、マルトース結合タンパク質(MBP)との融合タンパク質として大腸菌で発現させて、セラミドに対する糖転移酵素の活性を測定した。

#### 【結果】

$\alpha$ -GalCer合成酵素のホモログとして、細菌のゲノムデータベースから4個の遺伝子を海洋メタゲノムのデータベースからは5個の遺伝子を選択した。それぞれの遺伝子を大腸菌で発現させて、セラミドに対する糖転移



酵素の活性を測定したところ、細菌のゲノムデータベースからは3個の  $\alpha$ -GalCer 合成酵素と1個の  $\alpha$ -GlcACer 合成酵素の遺伝子を、海洋メタゲノムのデータベースからは2個の  $\alpha$ -GlcACer 合成酵素の遺伝子を同定することに成功した。

#### 【考察】

本研究により、新たに3個の  $\alpha$ -GalCer 合成酵素と3個の  $\alpha$ -GlcACer 合成酵素の遺伝子を同定することが出来た。新たに同定した  $\alpha$ -GalCer 合成酵素と  $\alpha$ -GlcACer 合成酵素の中にはそれぞれ海洋由来のサンプルも含まれており、本研究により、初めて海洋に  $\alpha$ -GalCer と  $\alpha$ -GlcACer を合成する細菌が存在することが示唆された。今後は、今回同定した遺伝子を出芽酵母などで発現させることにより、 $\alpha$ -GalCer の発酵生産の基盤を構築したいと考えている。

#### 【文献】

- 1) Okino, N., Li, M., Qu, Q., Nakagawa, T., Hayashi, Y., Matsumoto, M., Ishibashi, Y. & Ito, M.: Two bacterial glycosphingolipid synthases responsible for the synthesis of glucuronosylceramide and  $\alpha$ -galactosylceramide, *J. Biol. Chem.*, **295**, 10709 (2020).

消化管肉腫キナーゼ KIT のゴルジシグナルの原因となる ARF GTPase の同定、その理解に基づく抗がん剤開発

小幡 裕希

(国立がん研究センター研究所)

#### 【背景・目的】

本研究は、消化管間質細胞腫 (GIST) 等の大きな原因の一つである KIT チロシンキナーゼの ER→シグナルの場 (ゴルジ体) の輸送阻害作用を有するブロッカーについて、抗がん剤として開発するにあたり、直接のターゲット分子を解明することを目的としている。開発中のブロッカーは、ARF small GTPase の阻害を介して輸送ブロックすると考えられているが、複数同定されている ARF のうち、どのメンバーの抑制が重要なのかは不明

であり、その解明を試みた。

#### 【方法・結果】

GIST 細胞に複数の ARF に対する siRNA をトランスフェクションし、イムノプロットおよび免疫染色法・共焦点レーザー蛍光顕微鏡で化合物処理のフェノコピーの探索を試みた。GIST 細胞に、メジャーな ARF のうち、ARF1-6 を複数の組み合わせでノックダウンし、KIT の ER→ゴルジの輸送には、少なくとも、ARF1,4,5 が必須であることを見出した。ARF1,4,5 ノックダウン時、KIT の自己リン酸化および下流シグナルが抑制され、これらの点について、化合物処理のフェノコピーを得るに至った。さらに、開発化合物処理時に、確かに ARF1,4,5 が抑制されていることを確認するために、*in vitro* GGA3 プルダウンアッセイをおこなった。定常状態では、ARF1,4,5,6 の活性化が認められたが、ブロッカー処理時、ARF1,4,5 の活性化が有意に抑制されることが明らかになった。

#### 【考察】

GIST 細胞の KIT は、ARF1,4,5 の三者に依存して、小胞体からシグナルの場であるゴルジ体に移行することが明らかになった。これらを同時に輸送する開発中のブロッカーは、抗がん剤として、現在、前臨床研究中であり、本研究を新機序の分子標的薬開発の一助としたい。今後、白血病や肺腺がん等の他のがんにおける検討を進める予定である。

#### 【関連する発表論文】

Yamawaki, K., Shiina, I., Murata, T., Tateyama, S., Maekawa, Y., Niwa, M., Shimonaka, M., Okamoto, K., Suzuki, T., Nishida, T., Abe, R. & Obata, Y.: FLT3-ITD transduces autonomous growth signals during its biosynthetic trafficking in acute myelogenous leukemia cells. *Scientific Reports*, **11**, 22678 (2021) doi: 10.1038/s41598-021-02221-2.

## ルシフェラーゼの改変体を利用した小胞体機能の解析と有用化合物の探索

門倉 広

(東北大学多元物質科学研究所)

### 【目的】

大腸菌ではジスルフィド結合形成能力の低下やタンパク質の分泌活性の低下に伴い、 $\beta$ -ガラクトシダーゼを発現する鋭敏なレポーター<sup>1)</sup>が開発されている。我々は、この系を参考にヒト小胞体関連機能の変化を検出する鋭敏で簡便な新規レポーターの開発を進めている。この目的で、蛍光ルシフェラーゼに多数のシステインを導入して作った改変型ルシフェラーゼ (FLuc\*) に、分泌タンパク質のシグナル配列を付与した融合タンパク質 (FLuc\*レポーター) を作製した。本タンパク質を発現する HeLa 細胞では、a) 小胞体内で FLuc\* にジスルフィド結合が形成され、ルシフェラーゼ活性が大きく低下するが、b) 局在化が阻害されると、FLuc\* はサイトゾルで正しく折り畳まれ、活性が上昇する。よって、本タンパク質は、小胞体へのタンパク質局在化効率の低下を検出するためのレポーターとして機能することが判明した。本研究では、本レポーターの更なる機能評価を行うとともに、小胞体機能の解析と有用化合物の探索に本レポーターを利用した。

### 【方法】

- (1) ジスルフィド結合形成はヒト細胞表層タンパク質の立体構造形成に重要であり、小胞体内で行われる<sup>2)</sup>。上記レポーターは、その構造的特質から、ジスルフィド結合形成能力の変化も検出する可能性があり、この点を検証した。また、小胞体機能の解析に本レポーターを利用した。
- (2) ウイルスの感染に必要なタンパク質の生合成を阻害する化合物を発見する目的で、当該タンパク質のシグナル配列の下流に FLuc\* を連結し、探索実験に用いた。

### 【結果と考察】

- (1) 本レポーターを発現する HeLa 細胞では、小胞体内におけるジスルフィド結合形成能力の低下 (増大) にともない、ルシフェラーゼ活性が再現性良く上昇 (低下) した。よって、ジスルフィド結合形成能力の変化

を検出するための鋭敏かつ簡便なレポーターとしても機能することが分った (論文準備中)。

- (2) 80 種類の天然化合物からルシフェラーゼ活性を上昇させる複数の候補化合物を得たが、これらは標的タンパク質のシグナル配列に特異的ではなかった。よって、目的の阻害剤を得るためには、今後、より多くの化合物を調べる必要がある。

### 【文献】

- 1) Kadokura, H., Tian, H., Zander, T., Bardwell, J.C.A. & Beckwith, J.: Snapshots of DsbA in action: Detection of proteins in the process of oxidative folding. *Science*. **303**, 534 (2004).
- 2) Kadokura, H., Dazai, Y., Fukuda, Y., Hirai, N., Nakamura, O. & Inaba, K.: Observing the nonvectorial yet cotranslational folding of a multidomain protein, LDL receptor, in the ER of mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **117**, 16401 (2020).

## 細胞極性複合体から迫る Rap1 の活性化機構の解明と腎疾患治療への応用

佐々木 和教

(順天堂大学大学院医学研究科)

### 【目的】

細胞極性は、タンパク質などの成分が一つの軸に沿って不均等に分布する現象であり、各種シグナルの時空間制御を通じて、細胞間接着や上皮組織の秩序に関与する。上皮組織の細胞極性異常が要因の一つとなる疾患に、腎臓のネフローゼ症候群がある。近年、腎臓の血液ろ過に低分子量 G タンパク質 Rap1 が関与し、ネフローゼ症候群と Rap1 異常の関連が分かってきた。これまでに我々は、細胞極性複合体の中心的なタンパク質キナーゼ aPKC の結合タンパク質を探索し、Rap1 の調節因子として Shank2 (Sasaki *et al.*, *Cell Reports* 2020) と p200 を見出してきた。これら aPKC 結合タンパク質による Rap1 の調節機構を解明することで、ネフローゼ症候群の新たなバイオマーカーや治療開発が期待された。そこで本研究では、aPKC 結合タンパク質 p200 の機能

解析を進め、細胞極性及び Rap1 の調節における p200 の役割を明らかにすることを目的とした。

#### 【方法】

生化学的な結合実験：HA タグ付き aPKC と FLAG-SBP タグ付き p200 を HEK293T 細胞に共発現させ、SBP タグで p200 を精製した。精製画分に対して、抗 HA タグ抗体を用いたウェスタンブロットを行った。

細胞内局在及び表現型の解析：FLAG-SBP タグ付き p200 を上皮細胞にトランスフェクションし、細胞を固定後、SBP タグや細胞間接着タンパク質に対する抗体で免疫染色した。

#### 【結果】

分子メカニズム解明のために、細胞極性タンパク質 aPKC に結合するタンパク質の網羅的な探索を進め、Rap1 に関連する p200 を同定した。本研究では aPKC と p200 の結合を検証するため、タグ付き aPKC 及び p200 を培養細胞にて発現させ、生化学的な結合実験を行った。タンパク質の精製画分に対するウェスタンブロットの結果から、aPKC が p200 と結合することを確認した。また、p200 の欠失変異体を用いた結合実験から、p200 上の aPKC 結合領域を特定した。

次に p200 の機能を探るために、上皮細胞における p200 の細胞内局在を検討した。タグ付き p200 を培養上皮細胞に発現させ、タグ抗体で免疫染色を行った。共焦点蛍光顕微鏡での観察から、p200 は上皮細胞の細胞間接着部位に局在することが分かった。そこで細胞極性における p200 の役割を調べるために、p200 を上皮細胞に過剰発現し、表現型を観察した。その結果、p200 を過剰発現した細胞は、コントロール細胞に比べて細胞間接着が強固であることが分かった。

#### 【考察】

本研究から、aPKC 結合タンパク質 p200 が細胞間接着部位に局在し、細胞間接着に関与することが分かってきた。腎臓における aPKC, Shank2, p200 ノックアウトマウスは、Rap1 のノックアウトマウスと似たような表現型を示し、ネフローゼ症候群様の表現型を呈する。今後、aPKC-p200 複合体のさらなる解析を進め、これら複合体による Rap1 の調節機構を解明することで、ネフローゼ症候群の新たなバイオマーカーや治療につながることを期待される。

#### 【文献】

- 1) Ozaki, A., Motomura, H., Tamori, S., Onaga, C., Nagashima, Y., Kotori, M., Matsuda, C., Matsuda, A., Mochizuki, N., Sato, T., Hara, Y., Sato, K., Miyagi, Y., Nagashima, Y., Hanawa, T., Harada, Y., Xiong, Y., Sasaki, K., Ohno, S. & Akimoto, K\*.: High Expression of *p62* and *ALDH1A3* Is Associated With Poor Prognosis in Luminal B Breast Cancer. *Anticancer Res.* **42**, 3299-3312, 2022.
- 2) Onaga, C., Tamori, S., Matsuoka, I., Ozaki, A., Motomura, H., Nagashima, Y., Sato, T., Sato, K., Xiong, Y., Sasaki, K., Ohno, S. & Akimoto, K\*.: High expression of SLC20A1 is less effective for endocrine therapy and predicts late recurrence in ER-positive breast cancer. *PLoS One.* **17**, e0268799, 2022.
- 3) Sakamoto, M., Sasaki, K., Sugie, A., Nitta, Y., Kimura, T., Gürsoy, S., Cinletci, T., Iai, M., Sengoku, T., Ogata, K., Suzuki, A., Okamoto, N., Iwama, K., Tsuchida, N., Uchiyama, Y., Koshimizu, E., Fujita, A., Hamanaka, K., Miyatake, S., Mizuguchi, T., Taguri, M., Ito, S., Takahashi, H., Miyake, N\* & Matsumoto, N\*.: *De novo* ARF3 variants cause neurodevelopmental disorder with brain abnormality. *Hum Mol Genet.* **31**, 69-84, 2022.
- 4) Motomura, H., Ozaki, A., Tamori, S., Onaga, C., Nozaki, Y., Waki, Y., Takasawa, R., Yoshizawa, K., Mano, Y., Sato, T., Sasaki, K., Ishiguro, H., Miyagi, Y., Nagashima, Y., Yamamoto, K., Sato, K., Hanawa, T., Tanuma, S., Ohno, S. & Akimoto, K\*.: Glyoxalase 1 and protein kinase C $\lambda$  as potential therapeutic targets for late-stage breast cancer. *Oncol Lett.* **22**, 547, 2021.
- 5) Miyatake, S., Kato, M., Kumamoto, T., Hirose, T., Koshimizu, E., Matsui, T., Takeuchi, H., Doi, H., Hamada, K., Nakashima, M., Sasaki, K., Yamashita, A., Takata, A., Hamanaka, K., Satoh, M., Miyama, T., Sonoda, Y., Sasazuki, M.,

Torisu, H., Hara, T., Sakai, Y., Noguchi, Y., Miura, M., Nishimura, Y., Nakamura, K., Asai, H., Hinokuma, N., Miya, F., Tsunoda, T., Togawa, M., Ikeda, Y., Kimura, N., Amemiya, K., Horino, A., Fukuoka, M., Ikeda, H., Merhav, G., Ekhlévitch, N., Miura, M., Mizuguchi, T., Miyake, N., Suzuki, A., Ohga, S., Saito, H., Takahashi, H., Tanaka, F., Ogata, K., Ohtaka-Maruyama, C. & Matsumoto, N\*.: *De novo* ATP1A3 variants cause polymicrogyria. *Sci Adv.* **7**, eabd2368, 2021.

**アーキアにおける脂肪酸生合成機構の解明と機能性脂肪酸の合成**

佐藤 喬章

(京都大学大学院工学研究科)

**【背景・目的】**

アーキアは真核生物や細菌とは異なる第三の生物群を構成する原核微生物であり、他の2つの生物群は持たない特有の酵素や代謝経路を数多く有する。また、アーキ

アの大きな特徴の一つとして膜脂質の構造が挙げられる(図1)。細菌および真核生物の膜脂質の疎水性尾部は脂肪酸由来の直鎖状炭化水素であるが、アーキアでは枝分かれ構造のあるイソプレノイドである。よってアーキアは脂肪酸を生合成しないと思われてきたが、近年少量ながらもアーキア細胞から脂肪酸が検出され、その生合成系が存在する可能性が示唆されている。しかし、その生合成機構は解明されていなかった。

リポ酸は硫黄元素を含む脂肪酸で(図2)、グリシン由来の炭素原子を他の化合物に付加するC<sub>1</sub>代謝で機能する補酵素である。大腸菌では脂肪酸生合成系で合成した acyl carrier protein (ACP) 上のオクタノイル基(C8)をH-protein上に転移し、lipoyl synthase (LipA)が硫黄を挿入して、タンパク質上でリポ酸を生合成する(図3a)。一方、多くのアーキアはこれらの反応を触媒する酵素を持っていなかった。しかし申請者らは、85°Cの高温環境で生育する超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* において、LipAと同じ反応を触媒するが一次配列は新規な lipoyl synthase (LipS)を同定した(図3b 右下)<sup>1)</sup>。この結果からもアーキアは脂肪酸を生合成している可能性が示唆されたが、LipSが触媒するステップ以外のリポ酸生合成経路は不明であった。そこで本研究では、アーキアにおけるリポ酸を含めた脂肪酸の生合成機構を解明することを目的とした。また、同定した各酵素の基質特異性を検討し、含硫脂肪酸合成への応用の可能性も検討した。

**【方法・結果】**

○ LplA ホモログ組換え型タンパク質の *in vitro* 解析

Lipoate-protein ligase (LplA) はリポ酸を直接 H-protein に結合する salvage 経路で機能するとされている(図3a 左下)。 *T. kodakarensis* における LplA ホモログのリポ酸生合成への寄与を明らかにするため、既知 LplA の N, C末端領域とそれぞれ相同性を示す TK1234, TK1908 の各組換え型タンパク質を大腸菌で調製し、熱処理および各種カラムクロマトグラフィーにより精製した。両精製タンパク質を添加した際に、H-protein 由来のペプチド断片とリポ酸を結合する lipoate-protein ligase 活性(図3b 中央下)が検出された。興味深いことにオクタン酸を基質に用いた場合でもリポ酸に対する活性とそれほど変わらない protein ligase 活

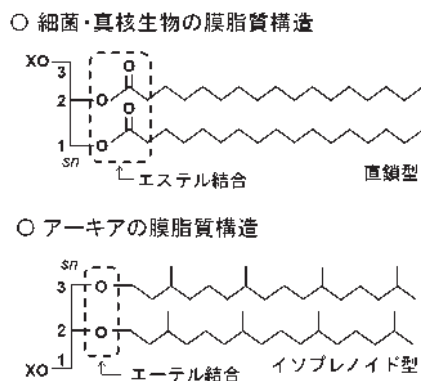


図1 各生物における膜脂質の構造

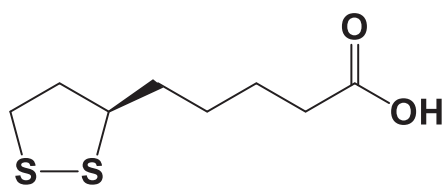


図2 リポ酸の構造

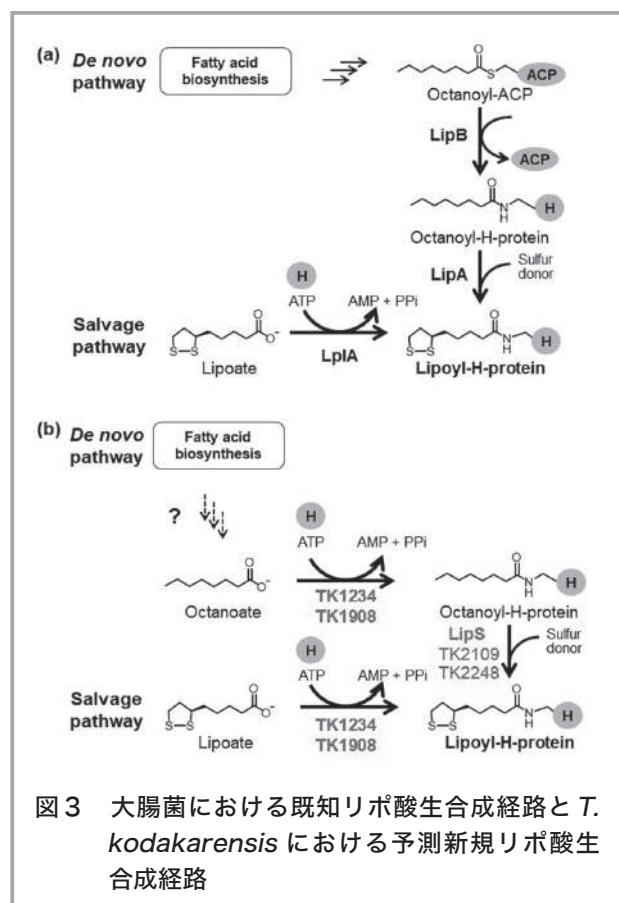


図3 大腸菌における既知リポ酸合成経路と *T. kodakarensis* における予測新規リポ酸合成経路

性 (図 3b 中央上) を示し、さらに鎖長が短いヘキサン酸 (C6) やブチル酸 (C4) などの脂肪酸も基質として認識した。一方, octanoyl-CoA は基質とならなかった。

#### ○ LplA ホモログ遺伝子の *in vivo* 解析

LplA ホモログの遺伝子破壊株を作製し, 増殖特性を調べた。LplA は遊離リポ酸 salvage で機能していると考えられており, LipS を介した *de novo* リポ酸合成機構は残っていることから, 破壊株はセリン要求性を示さないと考えていた。しかし, 意外なことに TK1908 破壊株はセリン要求性を示した。TK1234/TK1908 はリポ酸の salvage だけでなく, (オクタノイル基ではなく) オクタン酸を H-protein 上に結合する octanoate-protein ligase 活性により H-protein 上でのリポ酸合成機構にも寄与することが示唆された (図3b)<sup>2)</sup>。

#### ○ LipS の基質特異性の検討

含硫脂肪酸合成への応用の可能性を検討するため, hexanoyl-peptide および butyryl-peptide が LipS の基質となるかを検討したが, これらに対しては硫黄挿入活性を示さなかった。また, 遊離のオクタン酸やオクタン酸とペプチド断片の混合物を基質に用いても残念ながら硫黄挿入活性は示さなかった<sup>2)</sup>。

#### 【考察】

本研究により, LplA が構成する遊離のオクタン酸を経由する新規な含硫脂肪酸合成経路の存在が示唆された (図3b)。これは遊離のオクタン酸を中間体とする, アーキアの新規脂肪酸合成経路の存在をも示唆している。LipS は基質特異性が厳密で様々な含硫脂肪酸合成への応用は難しいことが分かったが, LplA は基質特異性が広く, ペプチドの脂肪酸修飾への応用の可能性が示唆された。

#### 【文献】

- 1) Jin, J.Q., Hachisuka, S.I., Sato, T., Fujiwara, T. & Atomi, H.: A structurally novel lipoyl synthase in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*, *Appl. Environ. Microbiol.* (Spotlight Selection) **86**, e01359-20 (2020).
- 2) Jin, J.Q., Sato, T., Hachisuka, S.I. Atomi, H.: A lipoyl-protein ligase is required for *de novo* lipoyl-protein biosynthesis in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*, *Appl. Environ. Microbiol.* (Spotlight Selection) **88**, e0064422 (2022).

#### タンパク質架橋酵素の局在依存的な基質架橋部位の網羅的同定・定量法の開発

辰川 英樹

(名古屋大学大学院創薬科学研究科)

#### 【目的】

タンパク質架橋化酵素 (トランスグルタミナーゼ, TGase) はタンパク質中のグルタミン残基 (Gln) とリジン残基 (Lys) との間に共有結合を形成して架橋修飾を行う酵素であり, 幅広い生物において標的タンパク質の機能や性状変換を介して種々の生命現象に関わる。血液凝固, 皮膚形成, 死細胞除去を始め多彩な生命現象に関与する一方, 異常なレベルの架橋形成は多種の疾患 (肝腎肺疾患, 神経変性疾患, 糖尿病, 癌の悪性化, 自己免疫疾患など) の原因となる。

私たちはこれまでに肝臓、腎臓、肺の障害や炎症、線維化における TGase の関与について検証し、病態進行に関与する経時的な TGase の活性分布および標的基質タンパク質の同定に成功してきた。同手法により同定された候補基質タンパク質の中には、確かに生体内で TGase の基質として架橋され、基質因子自身の活性の向上や低下に繋がる例があった。しかしながら、同定されたタンパク質の多くは単に存在量が多いタンパク質であり、生体内では架橋されない擬陽性の因子が多く含まれていた。組織抽出液を用いた既存の解析法では、生体内の TGase の局在が反映されないこと、および標識プローブと架橋した標的ペプチド群の検出感度が低いため、未修飾のペプチド由来のバックグラウンドに埋もれて網羅的な同定解析ができないことが問題点として挙げられた。

本研究では、未固定の組織切片を用いて架橋反応を行い、トリプシン消化後に標識プローブが架橋されたペプチド群のみを精製し、網羅的に架橋修飾残基を同定および定量する新たな実験手法の開発を目的とした。同手法では、標識化されたペプチド断片を精製するため、非特異吸着や基質タンパク質の相互作用因子、基質因子の架橋されない領域由来のペプチドを除くことが可能であり、既存の問題を解決できる。同手法を用いた疾患増悪に関わる TGase 基質の架橋残基の網羅的同定は、基質の架橋修飾領域を標的とした新たな創薬シーズの提供に貢献できる。

#### 【方法】

TGase 活性の上昇を示すブレオマイシン投与による肺線維化のモデルマウスを作製し、回収した肺組織を用いて以下の実験を行った。未固定の組織切片上に標識プローブ（ビオチン化ペンチルアミン；BPA）を添加し、内在性の TGase 活性により切片中の基質タンパク質の Gln 残基と BPA の一級アミン（Lys 残基を模倣）を架橋させた。BPA と架橋した基質タンパク質は蛍光物質もしくはペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンにより検出した。TGase により特異的に架橋された BPA 修飾基質を同定するため、組織切片上での反応後の抽出液中の BPA 修飾タンパク質をモノアビジンレジンにより精製し、質量分析を用いて架橋修飾基質を網羅的に同定・定量解析した。一方、BPA が修飾された残基を網

羅的に解析するため、尿素を含む組織抽出液を用いて架橋反応後の組織切片を変性溶解し、トリプシン処理によりタンパク質を消化切断した後に、精製および同定解析を行った。

#### 【結果】

肺線維化のモデルマウスを作製し、未固定の組織切片上に標識プローブの BPA を添加してインキュベーションしたところ、TGase の発現が上昇する線維化領域において、TGase の架橋活性を反映するような BPA が修飾された基質タンパク質が顕著に検出された。次に、このような BPA 修飾された基質タンパク質をモノアビジンレジンにより精製した後に、プロテオミクス解析を行った。同様の TGase 欠損マウスを用いた比較解析を経て、肺線維化において特異的に架橋される 126 個の BPA 修飾タンパク質を同定することができた。同定した架橋基質タンパク質群の情報に基づき、パスウェイ解析を行ったところ、肺線維化の患者における過去の遺伝子発現解析において変動が報告された活性化経路と類似性が見られ、TGase による基質の架橋修飾を起点としたシグナル伝達機構の活性化が病態形成に寄与する可能性が示唆された。

さらに TGase の架橋修飾残基を同定する手法を開発するため、上記の架橋基質の同定解析手法を再検証した。トリプシンにより消化したペプチドの精製条件を厳しく設定し、夾雑ペプチドを限りなく抑えて質量分析による検出ピークの S/N 比を高めることにより、肺線維化において TG2 により架橋される 119 個の基質タンパク質と 201 個所の架橋修飾残基の網羅的同定に成功した。

#### 【考察】

本研究により、これまで TGase の局在分布が失われた組織抽出液を用いて架橋される基質タンパク質を解析していた従来の実験手法を大きく改良することができ、組織中の TGase 活性の局在を反映した架橋基質タンパク質の網羅的な同定・定量解析が可能となった。また、架橋修飾残基を包括的に同定・定量する新たな解析手法の開発に成功した。これにより、今後は基質タンパク質の架橋修飾残基を標的とした架橋反応の特異的な制御剤を探索することにより、関連疾患の新たな治療薬開発への貢献が期待される。

【文献】

- 1) Tatsukawa, H. & Hitomi, K.: Role of Transglutaminase 2 in Cell Death, Survival, and Fibrosis, *Cells.*, **10**, 1842 (2021).
- 2) Takeuchi, T., Tatsukawa, H., Shinoda, Y., Kuwata, K., Nishiga, M., Takahashi, H., Hase, N. & Hitomi, K.: Spatially resolved identification of transglutaminase substrates by proteomics in pulmonary fibrosis, *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, **65**, 319 (2021). (本学プレスリリース)
- 3) 辰川英樹, 人見清隆: 臓器の線維化を誘導するタンパク質架橋酵素の網羅的な分子標的解析, *B&I バイオサイエンスとインダストリー*, **80**, 113 (2021).

エクテナサイジン 743 高機能化類縁体の化学-酵素ハイブリッド合成

谷藤 涼

(東京大学)

【目的】

天然物エクテナサイジン 743 (1, 図1A) は悪性軟部腫瘍の治療薬として臨床応用されている (Yondelis®)。1 は DNA アルキル化を担う五環性母骨格とタンパク質相互作用部位がマクロ環で連結されている。マクロ環構造の多様化により DNA-タンパク質間相互作用を選択的に制御する中分子群の創製が期待されるが, 1 はその構造の複雑さから, 半合成においても多段階変換 (>20

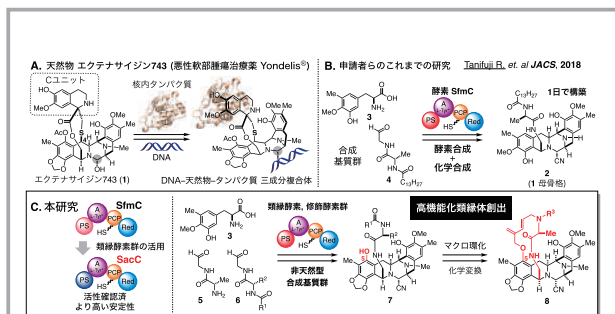


図 1

- A. 研究背景, B. 申請者らのこれまでの研究, C. 本研究の概要

工程) を要する上に, 構造改変部位が限定される。そこで, より簡便かつ迅速 (<10 工程) に構築可能なマクロ環含有中分子 (3 等, 図1C) を設計した。申請者がこれまでに開発した化学-酵素ハイブリッド合成法により, 単純な合成基質群 (3, 4) から 1 の母骨格 2 を迅速構築可能である<sup>1)</sup>。本研究では, 本合成法を改良しながら非天然型基質群 (5-6) 等の適用を進め, 複雑母骨格 (7 等) の迅速構築と (図1B), デザインした分子群 (8 等) の化学-酵素ハイブリッド合成に向けた基盤の確立を進めた。

【方法】

酵素 SfmC を活用した化学-酵素ハイブリッド合成法の基質適用範囲拡大を目指し, 天然型基質である 4 の 1) アシル鎖長, 2) アミド結合, 3) L-アラニン残基をそれぞれ改変した 13 種の基質群を化学合成した。合成基質群をもう一つの基質である 3 と共に酵素 SfmC へと作用させた。酵素変換の後, 中間体を単離せずにシアノ化, N-メチル化の 2 段階の化学変換を施して安定な化合物へと変換した。LC システムを用いてそれぞれの基質から得られた反応溶液を分析し, 五環性母骨格に由来する 280 nm の波長の吸収ピーク面積を算出した。この面積比から, 天然型基質 4 の変換率 100% とした相対的な変換効率を算出した。全ての反応について 3 つの反応容器にて同時に実施し, 平均値を計算してグラフ化し, 標準誤差をエラーバーとして示している。

【結果】

まず, 天然型基質 4 と炭素鎖が 2 つずつ違う 9, 10 と,

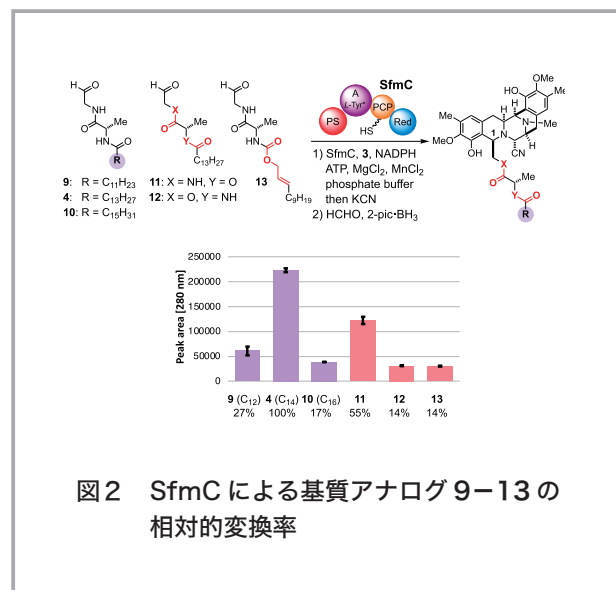


図 2 SfmC による基質アナログ 9-13 の相対的変換率

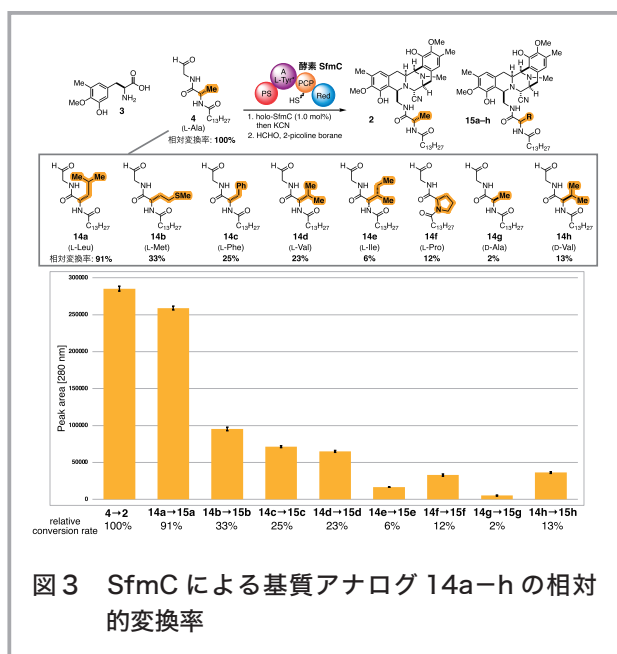


図3 SfmCによる基質アナログ 14a-hの相対の変換率

4の2つのアミド結合をそれぞれエステル、アシルカルバメートとした11-13の基質群について上記手法に従って相対的変換率を算出した(図2)。4の変換率を100%とすると、9, 10の変換率はそれぞれ27%, 17%と著しく低下した。一方で、アミド結合の一つをエステルとしたは天然型基質の55%程度の効率で変換が進行した。他方のアミド結合を改変した12, 13ではどちらも14%程度にまで変換率は落ち込んだものの、SfmCには受容され対応する五環性骨格が得られた。

天然型基質4のL-アラニン残基を種々アミノ酸へと改変した基質アナログ群についても同様の検討を行なった(図3)。SfmCは非常に広い基質許容能を示し、全ての基質アナログ14a-hから対応する五環性骨格15a-hが得られた。本成果はTetrahedron Chem誌の創刊号へ詳報として公表した<sup>2)</sup>。SfmCの類縁酵素SacCについても同様の検討を進めながら、スケール・効率の向上を進めている。

#### 【文献】

- 1) Tanifuji, R., Koketsu, K., Takakura, M., Asano, R., Minami, A., Oikawa, H.\* & Oguri, H.\*: Chemo-enzymatic Total Syntheses of Jorunnamycin A, Saframycin A, and N-Fmoc Saframycin Y3, *J. Am. Chem. Soc.*, **140**, 10705-10709 (2018).
- 2) Tanifuji, R.\*, Haraguchi, N. & Oguri, H.\*: Chemo-enzymatic total syntheses of bis-tetrahydroiso-

quinoline alkaloids and systematic exploration of the substrate scope of SfmC, *Tetrahedron Chem*, **1**, 100010 (2022).

### アミノアシル tRNA を標的とする病原性バクテリア由来アセチル化酵素の特異性分子基盤

富田 耕造

(東京大学大学院新領域創成科学研究科)

#### 【目的】

Toxin-antitoxin (TA) システムはバクテリアにおいて広く見いだされ、ストレス環境下にバクテリアが生存するために獲得したシステムであり、ストレス環境下におけるバクテリアの休眠・活動休止 (dormancy) や、抗生物質暴露時のバクテリアの抗生物質耐性獲得 (persister/drug tolerance) などに関与している。最近、サルモネラ菌においてタイプ II に属する新規な TacT (Toxin)-TacA (antitoxin) システムが発見された。TacT はアセチル転移酵素にみられる GNAT (GCN5-related N-acetyltransferase) モチーフを有する Toxin であり、tRNA のアミノアシル部位のアミノ基へアセチル CoA のアセチル基を転移する。アミノアシル tRNA のアセチル化によって翻訳が阻害される。しかし、TacT による特異的なアミノアシル tRNA の認識・識別機構は明らかにされていない。また、各 Toxin によって基質となるアミノアシル tRNA 種が異なるが、この基質認識の違いの分子基盤も明らかにされていない。本研究では、TacT の X 線結晶構造解析および生化学的解析を通して TacT の基質アミノアシル tRNA の認識・識別機構を明らかにしたので報告する。

#### 【方法】

TacT が標的とするアミノアシル tRNA の解析は、TacT を誘導発現した大腸菌より調整したアミノアシル tRNA 画分を質量分析によって解析した。TacT は Gly-tRNA<sup>Gly</sup> を特異的にアセチル化する活性があることが判明したため、さらに TacT の基質認識機構を明らかにするため TacT による変異体 Gly-tRNA<sup>Gly</sup> のアセチル化効率の測定、および各種アミノアシル tRNA のアセチ



ル化の効率の測定を行った。また、TacT 変異体の大腸菌生育阻害解析をも行った。また、TacT とアセチル化された Gly-tRNA<sup>Gly</sup> との複合体の X 線結晶回折実験はつくばの高エネルギー研究機構 (KEK) のビーライン BL17A を用いて行った。

### 【結果と考察】

#### (i) TacT によるグリシンを受容した tRNA<sup>Gly</sup> の特異的なアセチル化

2016 年にサルモネラ菌由来の TacT が各種アミノアシル tRNA をにアセチル化し、翻訳過程を阻害すると報告された<sup>2)</sup>。そこで、TacT の標的となるアミノアシル tRNA を解析した。TacT を大腸菌内で発現し、その後、直ちに大腸菌からアミノアシル tRNA を酸性条件下で分離し、得られたアミノアシル tRNA を質量分析によって解析した。その結果、TacT によって、グリシンを受容した tRNA<sup>Gly</sup> が特異的にアセチル化を受けていることが分かった。グリシン以外のアミノ酸を受容したアミノアシル tRNA は TacT によってアセチル化されない。この結果は、以前の報告とは異なるものであった。そこで、試験管内で各種アミノアシル tRNA (Ala-tRNA<sup>Ala</sup>, Ile-tRNA<sup>Ile</sup>, Leu-tRNA<sup>Leu</sup>, Trp-tRNA<sup>Trp</sup>, Phe-tRNA<sup>Phe</sup>, Gln-tRNA<sup>Gln</sup>, Cys-tRNA<sup>Cys</sup>, Ser-tRNA<sup>Ser</sup> など) が TacT によってアセチル化されるか解析を行った。その結果、TacT は Gly-tRNA<sup>Gly</sup> を他のアミノアシル tRNA と比較して、酵素学的に 20 ~ 倍以上効率よくアセチル化することが分かった。これらの結果から、TacT は Gly-tRNA<sup>Gly</sup> 特異的なアセチル転移酵素であることが明らかになった。

#### (ii) TacT とアセチル化された Gly-tRNA<sup>Gly</sup> 複合体の結晶構造解析

TacT による Gly-tRNA<sup>Gly</sup> の特異的なアセチル化の分子機構を詳細に明らかにするため、TacT とアセチル化された Gly-tRNA<sup>Gly</sup> (Ac-Gly-tRNA<sup>Gly</sup>) の複合体結晶を製作し、その三次元構造を X 線結晶構造解析にて 3.2Å の分解能で決定した。構造解析から、TacT の二量体に 2 分子の tRNA 分子が結合しており、tRNA 分子のアクセプター領域のみが TacT と相互作用し、アンチコドン領域などは TacT と相互作用しないことが明らかになった。さらに、TacT の二量体分子の接触境目の領域にまたがって tRNA<sup>Gly</sup> のアクセプター領域が結合することが分かった。このことは、以前の TacT の酵素活性や細胞

内での毒性には TacT が二量体を形成することが必要であること、すなわち、tRNA の結合には TacT の二量体化が必要であることを示している。

今回の構造解析から、TacT による tRNA のアクセプターステムの特異的な相互作用がみいだされた。特に、tRNA<sup>Gly</sup> のみに見出される U74 (識別塩基とよびます) とアクセプター内の G71 が TacT によって特異的な水素結合で認識されている様子が明らかになった。サルモネラ菌のすべての tRNA 配列を比較してみると、U74 および G71 を有する tRNA は tRNA<sup>Gly</sup> のみである。結晶構造解析から明らかになった、tRNA<sup>Gly</sup> の U74 あるいは G71 を認識する TacT 内のアミノ酸へ変異を導入し、それらの変異 TacT を大腸菌で発現誘導し、大腸菌の成長が抑制されるか解析した。結果、G71, U73 を認識するアミノ酸残基の変異 (Trp29Phe, Asn37Ala, Arg78Ala, Asn79Ala) によって、TacT の活性 (大腸菌内での毒性) が抑制された。これらの解析より、TacT は tRNA<sup>Gly</sup> のみに見られる特徴的な塩基配列を認識して、他の tRNA は認識しないことが明らかになった。

#### (iii) TacT の tRNA<sup>Gly</sup> 認識の解析

大腸菌内で TacT がアセチル化するアミノアシル tRNA の質量分析、さらに X 線結晶構造解析による TacT とアセチル化されたアミノアシル tRNA 複合体解析から、TacT が Gly-tRNA<sup>Gly</sup> 特異的なアセチル転移酵素であることが明らかになった。この認識メカニズムを明らかにするため、変異体 Gly-tRNA<sup>Gly</sup> を調整し、TacT によるそれらのアセチル化効率を解析した。U73 を A73 あるいは C73 へ変異を導入すると Gly-tRNA<sup>Gly</sup> のアセチル化の効率は顕著に減少した。一方、U73 を G73 へ変異を導入した Gly-tRNA<sup>Gly</sup> は通常の Gly-tRNA<sup>Gly</sup> と同レベルでアセチル化された。これは U73 の認識に関わる TacT の Asn79 が G73 とも相互作用できるためであると考えられた。また、アクセプターステム内の C2-G71 を G2-C71 へ変異を導入すると、Gly-tRNA<sup>Gly</sup> のアセチル化の効率は顕著に減少した。これらの結果は、TacT とアセチル化された Gly-tRNA<sup>Gly</sup> 複合体の結晶構造解析から明らかになった tRNA 認識機構と一致する。したがって、TacT が tRNA<sup>Gly</sup> のみに見られる特徴的な塩基配列を認識して、他の tRNA は認識しないことが支持された。

(iv) TacT によるアミノアシル部位の認識

tRNA<sup>Gly</sup>の変異体を用いた Gly-tRNA<sup>Gly</sup>のアセチル化解析より U73 を G73 へ変異を導入した Gly-tRNA<sup>Gly</sup> は効率よく TacT によってアセチル化されることが明らかになった。サルモネラの tRNA 配列を調べてみると、G73 をもち、G71 の tRNA として、tRNA<sup>Arg</sup> と tRNA<sup>Asn</sup> が存在することが分かった。そこで、これらのアミノアシル tRNA (Arg-tRNA<sup>Arg</sup> あるいは Asn-tRNA<sup>Asn</sup>) が TacT によってアセチル化されるか解析した。結果、Arg-tRNA<sup>Arg</sup> および Asn-tRNA<sup>Asn</sup> とともに TacT によってアセチル化されることが分かった。この結果は、大腸菌内で TacT を発現させたときに、Arg-tRNA<sup>Arg</sup> および Asn-tRNA<sup>Asn</sup> はアセチル化されていないことと一致する。また、この結果は TacT が tRNA<sup>Gly</sup> の特異的な塩基配列を認識しているだけでなく、3' 末端に受容しているアミノ酸をも識別していることが示唆された。TacT の活性触媒ポケットの近傍には、アミノアシル tRNA のアミノアシル部位と結合できる小さなポケットが存在する。このポケットは、Gly-tRNA<sup>Gly</sup> の Gly の側鎖 (H) は収まることができ、Arg-tRNA<sup>Arg</sup> や Asn-tRNA<sup>Asn</sup> のアミノアシル部位の側鎖は収まることができない。したがって、TacT はアミノアシル tRNA の tRNA 内の特異的な配列を認識すると同時に、3' 末端に受容しているアミノ酸の大きさも認識していることが示唆された。そこで、TacT の触媒ポケット近傍のアミノアシル部位が結合すると予想される部位に変異をかけた TacT を大腸菌で発現させ、大腸菌の生育阻害効果が抑制されるか検討した。結果、モデルで予想されるポケットを構成するアミノ酸の変異によって TacT の毒性が抑制された。

【要約】

TacT は各種アミノアシル tRNA をアセチル化し、結果、翻訳を阻害する作用があると報告された。しかしながら、本研究から TacT は Gly-tRNA<sup>Gly</sup> を特異的にアセチル化することが明らかになった。さらに、TacT は Gly-tRNA<sup>Gly</sup> のみにみられる、U73 と G71 を特異的に認識するとともに、小さいアミノアシル部位を認識することが明らかになった。したがって、TacT は Gly-tRNA<sup>Gly</sup> 特異的なアセチル化酵素であることが明らかになった。

【発表論文】

Yashiro, Y., Zhang, C., Sakaguchi, Y., Suzuki, T. & Tomita K.: Molecular basis of glycyI-tRNA<sup>Gly</sup> acetylation by TacT from Salmonella Trp<sup>h</sup>imurium. *Cell Reports*, doi: 10.1016/j.celrep.2021.110130, 2021.

脂肪肝形成における O-GlcNAcylation によるタンパク安定化と転写因子機能制御

中川 嘉

(富山大学和漢医薬学総合研究所)

【目的】

現在、食生活の欧米化に伴い生活習慣病患者の増加が社会問題であり、その中でも脂肪肝の増加が特に問題となっている。脂肪肝は悪性化すると肝がんに至り悪化し、生死につながる。そのため、脂肪肝の発症メカニズムの解明から新規治療応用が必要である。CREBH は転写因子として肝臓では糖・脂質代謝に係る酵素遺伝子の発現を調節し、小腸では栄養吸収に係る遺伝子の発現を制御し、腸肝を介し、全身の栄養代謝改善に機能することを明らかにしてきた (Nakagawa and Shimano, 2018)。その中で CREBH 欠損 (CREBH KO) マウスは様々な高栄養食負荷時に脂肪肝を呈する。本課題では CREBH KO マウスに高フルクトース食 (HFruD) 負荷時に生じる脂肪肝の発症メカニズムを明らかにすることを目的とした。

【方法】

- ・正常 (WT) マウスと CREBH KO マウスに通常食 (MF)、HFruD を 8 週間負荷し、血液解析、病理解析、タンパク・遺伝子発現解析などを行った。
- ・293 細胞に CREBH, ChREBP, O-GlcNAc transferase (OGT) を過剰発現し、分子間の結合と O-GlcNAc 付加、タンパク安定化を検証した。

【結果】

CREBH KO マウスに HFruD を負荷すると生活習慣病改善ホルモン FGF21 の血中、肝臓 mRNA レベルの低下、血中肝炎マーカーの増加に伴い、脂肪肝、肝炎の病態の増悪化が認められた。HFruD で WT マウス

の肝臓では CREBH mRNA に変化しなかったが、タンパク量が著しく増加した。糖代謝に関わる ChREBP は HFruD で増加するが、CREBH KO マウスでは ChREBP mRNA、タンパクの低下に伴い、その標的遺伝子の発現低下が観察された。CREBH KO マウスでは線維化マーカーの発現が増加した。

HFruD で肝臓内 O-GlcNAc 量が増加するが、CREBH KO マウスではその増加が抑制された。このマウスでは O-GlcNAc の生合成経路（ヘキソサミン合成経路）を構成するいくつかの酵素の発現が低下した。ChREBP は OGT により O-GlcNAc が付加されることで、安定化される。CREBH KO マウスでは ChREBP の O-GlcNAc 付加も抑制されることもタンパク量を減少させた原因の一つであった。同様に CREBH も OGT により O-GlcNAc が付加されることで、タンパク分解酵素 (HRD1) による分解を回避し、安定化されることを見出した。

HFruD による肝臓 FGF21 の発現誘導は CREBH と ChREBP により制御されており、CREBH KO マウスでは FGF21 プロモーターにリクルートされる ChREBP, Pol II, 転写活性化のマーカーに関連するヒストンマーカーである H3K9ac が低下していた。CREBH が ChREBP を制御することで FGF21 発現を制御することを見出した。

#### 【考察】

本研究で CREBH タンパクが糖鎖修飾を受けることで、タンパク分解系を回避し、安定化され、活性化されることを見出した。さらに、そのプロセスに関わる糖質 (O-GlcNAc) の合成は CREBH が制御することを新たに見出した。これらメカニズムを介し、CREBH が糖質代謝を制御するため、CREBH KO マウスでは HFruD 負荷時の糖脂質代謝に異常を来す。そのため、CREBH の欠損は脂肪肝・肝炎を助長することを明らかにした。本研究では糖質摂取における栄養代謝の恒常性維持における CREBH の新たな重要性を明らかにした。

#### 【文献】

Nakagawa, Y. & Shimano, H.: CREBH Regulates Systemic Glucose and Lipid Metabolism. *Int J Mol Sci*, 19(5): 1396. (2018).

### イノシトールリン脂質キナーゼによる膜接触部位を介した脂質交換輸送制御機構

中津 史

(新潟大学医学部)

#### 【目的】

近年、細胞膜やオルガネラは部分的に接して「メンブレンコンタクト」と呼ばれる領域を形成することがわかってきた。そしてメンブレンコンタクトは、脂質の輸送の場として機能することが明らかになりつつある。申請者は、小胞体-細胞膜間のメンブレンコンタクトにおいてオキシステロール結合タンパク質ファミリー (ORPs) により脂質が交換輸送されること、そしてその仕組みとしてイノシトールリン脂質 PI4P の濃度勾配が鍵を握っていることを明らかにした。本研究では、この PI4P 駆動型の脂質交換輸送が小胞体-エンドソーム間の脂質交換輸送も制御している可能性を検証し、PI4 キナーゼによる小胞体-エンドソーム膜接触部位での脂質交換輸送の制御機構の解明を目的とする。

#### 【方法】

PI4 キナーゼ PI4K2a 及び脂質交換輸送タンパク質 ORPs の局在や動態は、共焦点レーザー顕微鏡によるイメージング手法により解析した。ORP10 のリガンドは、ORP10 の脂質輸送ドメインを精製し、質量分析により決定した。ORP10 の脂質交換輸送活性は、*in vitro* 脂質交換輸送アッセイ系を用いて検証した。PI4 キナーゼや ORP10 の細胞機能は、FKBP/FRB を用いたラパマイシン依存的 2 量体化法による機能獲得法、および CRISPR/Cas9 によるノックアウト機能喪失法により解析した。

#### 【結果】

イメージング解析から、ORP10 は PI4K2a によるエンドソーム PI4P 合成に依存して小胞体-エンドソームコンタクトに局在した。生化学的解析から、ORP10 は PI4P をリガンドとすること、また *in vitro* において PI4P とホスファチジルセリン (PS) を交換輸送する活性を有することが判明した。培養細胞のライブイメージング解析から、ORP10 は小胞体-エンドソームコンタクトにおける PI4P/PS 交換輸送を介してエンドソーム

ムへPSを供給する役割を担うこと、そしてこれによりEHD1をエンドソームヘリクルートし、エンドソームの膜分裂を制御することが明らかになった<sup>1)</sup>。

**【考察】**

小胞体—エンドソーム間の膜接触部位においてもPI4キナーゼに依存した脂質交換輸送が作動していたことから、PI4P駆動型脂質交換輸送システムが哺乳類細胞に備わる普遍的な脂質輸送機構の一つであることが証明された。また、ORP10が脂質交換輸送を介して細胞内膜輸送を制御していることが判明し、PI4P駆動型脂質交換輸送システムが制御する生命現象が明らかになったことは、基礎・医学応用の観点から大きな意義を有する。

**【文献】**

1) Kawasaki *et al.*: PI4P/PS countertransport by ORP10 at ER-endosome membrane contact sites regulates endosome fission. *J. Cell Biol.* **221**, 2022.

**プロリン異性化酵素 Pin1 による組織線維化制御機構の解明**

中津 祐介

(広島大学大学院医系科学研究科)

**【目的】**

近年、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) の患者数は増加の一途をたどっている。NASHは、肝臓へと移行することがあるため、その発症メカニズムの解明及び治療薬の開発は喫緊の課題である。

我々が着目しているプロリン異性化酵素 Pin1 は、標的蛋白のプロリンの cis-trans 異性化を行うことにより、その機能を調節しているユニークな酵素である。興味深いことに NASH モデルマウスの肝臓では、Pin1 の発現量が顕著に増加しており、また Pin1 null マウスは NASH 発症を顕著に抑制する (*J. Biol. Chem.*, 2012)。しかしながら、その詳細なメカニズムは明らかにされていなかった。今回、肝線維化に重要な役割を果たしている肝星細胞における Pin1 の役割を明らかにすることを目的に研究を行った。

**【方法及び結果】**

① Pin1 による肝星細胞活性化への影響

Pin1 が TGF 刺激時の細胞外マトリクスの発現に影響するかについて肝星細胞 LX-2 細胞を用いて検討した。TGF 刺激を行うと、期待通り Collagen1a1/2 や星細胞活性化マーカー Smooth Muscle actin の発現量が顕著に増加した。一方、siRNA で Pin1 をノックダウンするとこれらの発現は、mRNA 及び蛋白レベルにおいて顕著に抑制された。以上の結果より、Pin1 は細胞外マトリクスの発現誘導に重要であることが明らかとなった。

② Pin1 阻害剤による細胞外マトリクス発現抑制の検討

次に、Pin1 阻害剤が同様の効果をもたらすかについて検討した。Pin1 阻害剤として、EGCG, ATRA, API-1 を用いて TGF 刺激後の細胞外マトリクスの変化について mRNA と蛋白量の測定を行った。その結果、いずれの阻害剤も細胞外マトリクスの発現を抑制する効果が認められた。

③ TGF 刺激により、Smad シグナルが活性化することが知られている。そこで、Pin1 が Smad family と結合するかについて検討した。その結果、Pin1 は、Smad2/3/4 と結合することが明らかとなった。

④ Pin1 を介した Smad シグナルへの影響を検討したところ、Smad3 のリン酸化や局在性には影響を与えなかったが、転写活性は Pin1 ノックダウンにより減弱した。

⑤最近、Hippo pathway の主要因子である YAP/TAZ が Smad3 と結合し、その転写活性を増加させることが報告されている。そこで、Pin1 がこれらの結合に影響するかを検討したところ、Pin1 は Smad3-YAP の複合体には影響を与えなかったが、Smad3-TAZ の複合体形成を促進することが明らかとなった。

**【考察】**

上記の結果より、Pin1 は、Smad3-TAZ 複合体形成を促進することで肝星細胞の活性化に寄与していると考えられた。

## 炎症増進により感染症を重篤化させるリン酸化酵素の同定

原 英樹

(旭川医科大学医学部)

### 【目的】

病原体が感染するとインフラマソームとよばれる炎症応答が引き起こされる。インフラマソームの構成分子は、NLRP3 や AIM2 などの細胞内受容体、アダプター分子 ASC、タンパク分解酵素カスパーゼ 1 であり、インフラマソームが活性化すると炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$  や IL-18 が産生される。我々は、細菌感染においてインフラマソーム応答が感染病態を重症化させることを見出した<sup>1)</sup>。また、インフラマソームの活性化にはリン酸化経路の活性化が必須であることを突き止めている。そこで本研究では、インフラマソーム炎症の増進に関わるリン酸化酵素の同定を行った。

### 【方法・結果】

ASC のリン酸化に関わる酵素をデータベースで絞り込み Kinase A がヒットしたことから、Kinase A と ASC を反応させ質量解析を行った。その結果、ASC の 3 つのアミノ酸が Kinase A によってリン酸化を受けることが判明した。次に、同リン酸化がインフラマソーム応答に影響するのかわかるために、同アミノ酸変異 ASC を発現するマクロファージを作製し AIM2 リガンドで刺激した。その結果、92 番目のセリンを変異させた場合にのみ IL-1 $\beta$  産生が減弱した。次に、黄色ブドウ球菌をマクロファージに感染させ Kinase A 阻害剤を作用させたところ、IL-1 $\beta$  産生が顕著に減少した。また、CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術で Kinase A 欠損マクロファージを作製したところ、同様の結果が得られた。さらに、抗菌薬の効かない薬剤耐性黄色ブドウ球菌をマウスに感染させ、ASC のリン酸化を抑制するために Kinase A 阻害剤を投与し治療効果を検証した。薬剤耐性黄色ブドウ球菌をマウスに感染させ、ピペラシリンを投与したところ治療効果が認められなかったが、Kinase A 阻害剤を投与したマウス群においては IL-1 $\beta$  や IL-18 の産生が減少し、それに伴って臓器内菌数も減少した。

### 【考察】

以上の結果から、インフラマソーム応答に必要なリン酸化酵素を阻害すると感染病態が改善することから、有効な治療手段が限られる薬剤耐性菌などへの臨床応用が期待される。

以上のような研究の進展に大いなる援助をいただいた公益財団法人日本応用酵素協会に心より感謝申し上げます。

### 【文献】

- 1) Hara, H. *et al.*: The NLRP6 inflammasome recognizes lipoteichoic acid and regulates Gram-positive pathogen infection. *Cell*. **175**, 1651-1664, 2018.

## 脱ユビキチン化酵素による骨格筋量制御機構の解明と筋萎縮治療への応用

常陸 圭介

(藤田医科大学)

### 【目的】

筋萎縮は、高齢者や患者の生存率や生活の質を低下させる主要因であるが、筋萎縮に対する安全で有効な治療法は未だ存在していない。我々は脱ユビキチン化酵素 Otud1 に非常に強い骨格筋量の増加作用があることを見出した。本研究では、Otud1 による筋肥大効果を検証することで、Otud1 を利用したヒトの筋萎縮に対する新たな治療法の開発基盤を構築することを目的とする。

### 【方法】

T2A 配列を利用して、マウス Otud1 のコード配列直下に EGFP を発現するコンストラクトを作製した。このコンストラクトを元にアデノ随伴ウイルス (AAV9) を作製した。ヒト初代骨格筋細胞は、過去の報告<sup>1)</sup>に基づいて培養を行い筋管細胞へと分化誘導処理を行った。5.0  $\times 10^{10}$ gc 量の AAV を筋管細胞へと感染させた。処理から 48 時間後に細胞を固定し、筋ミオシンと GFP 抗体を用いて免疫染色を行い筋管細胞のサイズを計測した。6.0  $\times 10^{10}$ gc 量の AAV を 8 週齢の C57BL/6J マウスの前脛骨筋へと注入した。投与から 21 日後に前脛骨

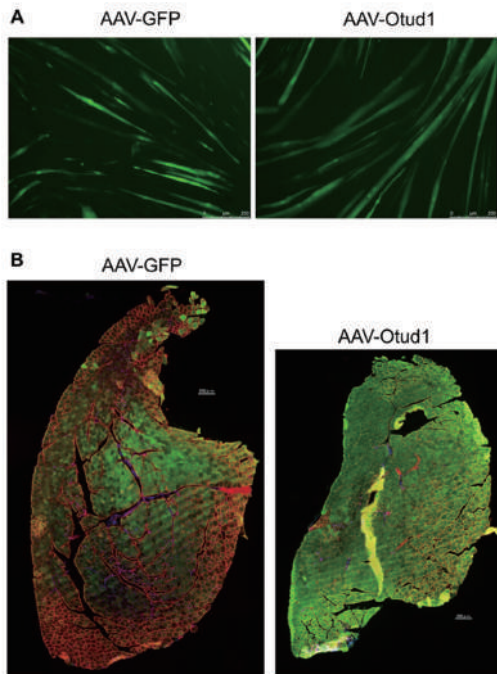
筋を単離し筋重量を測定した。前脛骨筋の切片を作製しラミニンや GFP などの抗体を用いて免疫染色を行い、筋線維の面積を測定した。

**【結果】**

ヒト筋管細胞のサイズは、GFP-AAV 感染群が  $29.9 \pm 3.52 \mu\text{m}$  に対して、Otud1-AAV では  $37.5 \pm 0.78 \mu\text{m}$  であり Otud1 による筋肥大効果が観察された ( $p = 0.0216$ )。前脛骨筋の重量は、GFP-AAV 感染群では  $47.5 \pm 0.84 \text{ mg}$  に対し、Otud1-AAV では  $43.8 \pm 3.49 \text{ mg}$  と Otud1 導入により筋量が減少した ( $p = 0.0312$ )。筋線維の断面積は、GFP-AAV 感染群が  $1111.0 \pm 140.2 \mu\text{m}^2$  に対し、Otud1-AAV が  $1043.8 \pm 52.0 \mu\text{m}^2$  と変化 ( $p = 0.2971$ ) は認められなかった。

**【考察】**

ヒト骨格筋細胞においても Otud1 で筋肥大を誘導できることが明らかとなった。一方で、マウス骨格筋では Otud1 は筋重量の低下をもたらした。筋線維のサイズ自体には変化は認められないため、筋線維以外の細胞に Otud1 が作用している可能性が考えられる。



(A) AAV-GFP と AAV-Otud1 を導入したヒト骨格筋細胞。GFP 抗体による免疫染色図。  
 (B) AAV-GFP と AAV-Otud1 を導入したマウス前脛骨筋の断面図。GFP とラミニン抗体による免疫染色図。

**【文献】**

1) Kusano, T., Nakatani, M., Ishiguro, N., Ohno, K., Yamamoto, N., Morita, M., Yamada, H., Uezumi, A. & Tsuchida, K.: Desloratadine inhibits heterotopic ossification by suppression of BMP2-Smad1/5/8 signaling. *J. Orthop. Res.* 2021, **39**(6): 1297-1304.

**RNA 編集技術のためのオフターゲット結合評価法の開発**

藤田 敏次

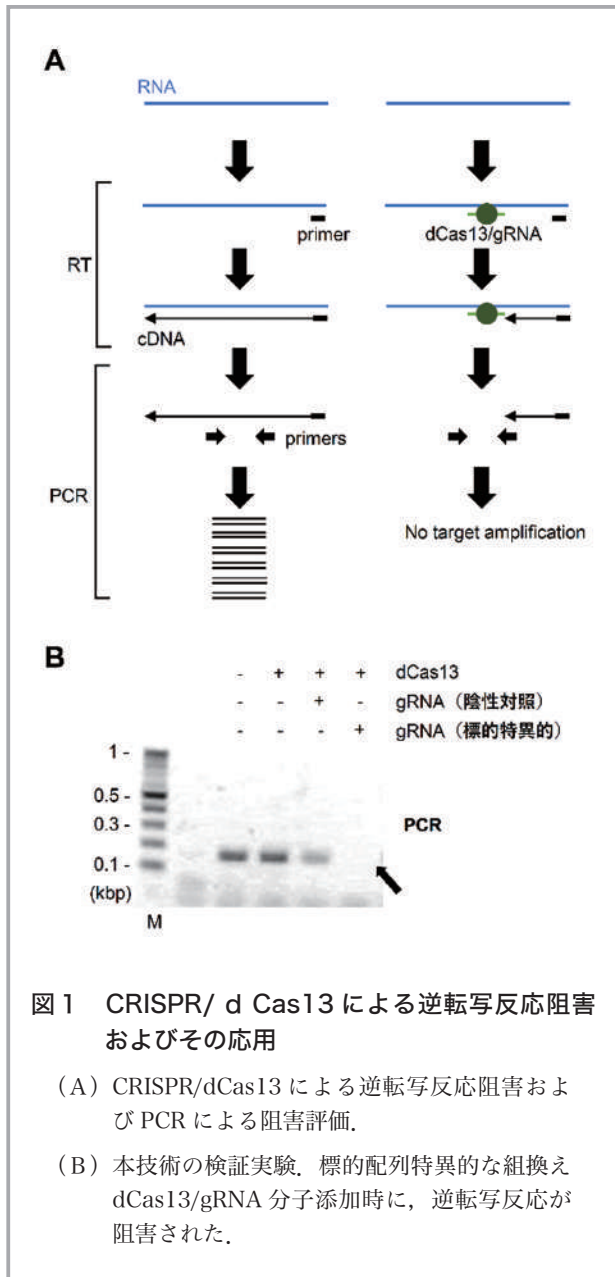
(弘前大学大学院医学研究科)

**【目的】**

ゲノムから転写される RNA は、mRNA として翻訳に利用されるものに加え、ノンコーディング RNA やマイクロ RNA など機能性分子として作用するものが数多く知られている。細胞内 RNA の配列・修飾・機能・局在などを人為的に操作することができれば、翻訳制御や機能制御、塩基配列置換による疾患発症制御が可能となる。近年、配列特異的に RNA を認識・切断できる CRISPR/Cas13 が報告され、翻訳制御や機能制御が可能となった。さらに、RNA 切断活性欠損変異体である dead Cas13 (dCas13) に ADAR 蛋白質を融合させておくことで、標的 RNA の配列変換を行うことができる。CRISPR/Cas13 (dCas13) のこれら RNA 編集への応用には、標的 RNA 配列への特異的結合が重要である。そこで本研究では、組換え CRISPR/dCas13 分子を用いることで、標的 RNA 配列への特異的結合およびオフターゲット結合を試験管内で評価できる技術を開発する。

**【方法】**

近年、我々は、精製 RNA を鋳型とした試験管内逆転写反応において、組換え CRISPR/dCas13 分子が逆転写酵素の伸長を阻害する阻害分子として機能することを見出した (図 1)<sup>1)</sup>。本研究では、逆転写酵素の伸長停止部位を次世代シーケンス解析 (NGS 解析) で同定することで、CRISPR/dCas13 分子の標的 RNA 配列への特異的結合およびオフターゲット結合を評価できる技術の開発を進めた。



【結果および考察】

本研究ではモデル系として, EGFR mRNA などを標的 RNA として研究を進めた. ヒト細胞株から RNA を精製し, 調製した RNA と標的 RNA 配列に対応した dCas13/gRNA 複合体を試験管内で混合した後, 逆転写反応を行った. 市販のライブラリーの調整キットを組み合わせることで, NGS 解析用の cDNA ライブラリーの調整に成功した. 現在, 調整した cDNA ライブラリーを NGS 解析することで, cDNA の伸長停止箇所 (標的配列および非特異的結合領域) の解析を進めている.

【文献】

1) Fujita, T., Nagata, S., Yuno, M. & Hodaka, F.: Sequence-specific inhibition of reverse tran-

scription by recombinant CRISPR/dCas13a ribonucleoprotein complexes *in vitro*, *Biol. Methods Protoc.*, **6**, bpab009 (2021).

【謝辞】

本研究を遂行するにあたり, 多大なるご支援を賜りました公益財団法人日本応用酵素協会に深く感謝いたします.

リン酸化・脱リン酸化酵素による小胞体出芽部位 ER exit site の崩壊と再形成の分子機構

前田 深春

(秋田大学大学院医学系研究科)

【目的】

インスリンやコラーゲンなど生体分子のおよそ 3 割は細胞外に分泌されて機能する. これらのタンパク質は小胞体で翻訳された後, 小胞体上の特殊な領域である ER exit site において形成される COPII 小胞に詰め込まれ, ゴルジ体へ輸送される. ER exit site は通常, 細胞あたり数百個存在するが, 哺乳細胞では栄養状態や小胞体ストレス等に応じて ER exit site の数や大きさを変化させることで, 小胞体からの分泌量を積極的に調節していることが最近明らかになってきた. また, この制御の破綻は, がんや神経変性疾患などと密接に関与する可能性が示唆されている. しかしながら ER exit site が小胞体上のどこに, どのような分子メカニズムで形成されるかは不明である.

我々はこれまで, ER exit site に局在する膜タンパク質 TANGO1 が Sec16 と結合することを見出し, この結合が ER exit site の形成に必要なことを明らかにしてきた (Maeda *et al.*, *JCB*, 2017). さらに, TANGO1 はカゼインキナーゼ 1δ (CK1δ) によってリン酸化されること, プロテインホスファターゼ 1 (PP1) によって脱リン酸化されることを見出し, 細胞分裂期において TANGO1 のリン酸化が亢進することで Sec16 との結合親和性が低下し, 一時的な ER exit site の崩壊と小胞体からの分泌停止が生じることを明らかにした (Maeda *et al.*, *Dev. Cell*, 2020). 以上の結果から TANGO1 と

Sec16がER exit site形成の起点として機能することが明らかとなった。

さらに我々は、TANGO1だけでなくSec16もリン酸化修飾を受けることを見出している。そこで本研究では、Sec16の新規リン酸化・脱リン酸化酵素を明らかにすることを目的として解析を行った。

**【方法】**

まずSec16の新規相互作用因子を探索するため、Sec16の免疫沈降サンプルに対してLC-MS/MSを用いたショットガン解析を行った。次に、解析結果を既存のタンパク質間相互作用データベースや細胞内局在データベースと重ね合わせて、より確度の高い相互作用因子を絞り込んだ。

**【結果・考察】**

ショットガン解析の結果、Sec16の内在免疫沈降サンプルより数千点のタンパク質が検出された。この結果を既存のデータベースと重ね合わせ、重複の多い順にタンパク質をスコアリングした。TANGO1を含め、Sec16との相互作用が報告されている因子はすべてハイスコアであったことから、この解析方法が妥当であることがわかった。さらに、ハイスコアの因子からキナーゼ活性が報告されているものを数十種類まで絞り込むことに成功した。今後は、これらの因子を個別に解析することで、Sec16のリン酸化修飾を通したER exit siteの制御メカニズムを明らかにしていきたい。

**蛋白質連結酵素による次世代抗体医薬品構築**

真壁 幸樹

(山形大学大学院理工学研究科)

**【目的】**

二重特異性抗体は二種類の抗原認識部位を一つのタンパク質分子上に持つために、二種類の抗原を空間的に近接させることが出来る。例えば癌細胞上の抗原と免疫細胞上の抗原をそれぞれ認識する抗体から二重特異性抗体を作製すると、癌細胞特異的に免疫細胞が集積し、癌の治療薬として用いることが出来る。二重特異性抗体では、たとえ同じ抗原に対する抗体を用いても、結合する際の

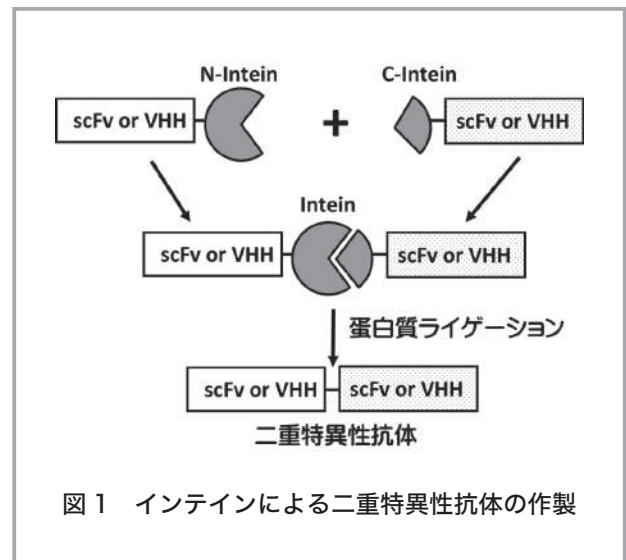


図1 インテインによる二重特異性抗体の作製

配向性や結合親和力の違いによって、二重特異性抗体としての効果が異なってくる。このため、同じ抗原を標的としているいくつかの抗体で組み合わせを変更して効果を検討する必要がある。それぞれの構成を遺伝子工学的に作り出す必要があるため時間と手間が大きかった。

本研究で対象となる酵素、インテインはもともと生体内で自身のポリペプチドを再連結させる酵素として見出された。これはRNAでの著名な自己切断反応であるRNAスプライシングと対比され、タンパク質スプライシングと呼ばれる。インテインによってポリペプチドを結合させることができるため、これまでタンパク質の部分特異的同位体標識や有機化学的に固相合成したペプチドとの結合など幅広く応用されてきている。

本研究では、二種類の抗体を組み合わせる二重特異性抗体を作り出す際に、インテインを用いて、環状構造などで配座を固定した構造を実現する。高い効率で蛋白質ライゲーションさせるため、インテインのタンパク質工学的な改変を行う。現在のインテイン活性を凌駕する変異体は様々な応用へ重要である。抗体はインテインのN末端断片とC末端断片に結合させて作り出す(スプリットインテイン)。

**【方法】**

二重特異性抗体として融合させる抗体断片に一本鎖Fv抗体(scFv)を用いる。我々が以前にVHHを用いて成功させた方法に基づいて分子を構築した<sup>1)</sup>。インテインはスプリットインテインによって、二重特異性抗体のN末端側とC末端側に分離インテインに融合させる。このインテインの活性が二重特異性抗体の作製のボトル



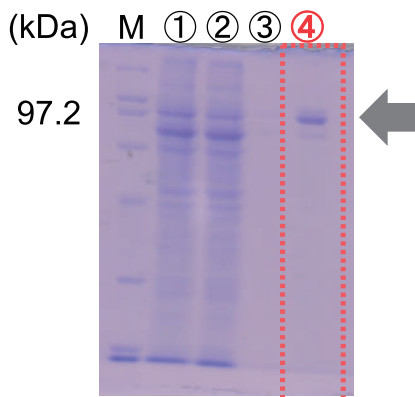


図2 両端に分離インテインを融合させたタンデム scFv の動物細胞による発現と Ni-NTA カラムによる精製.

①カラム前, ②素通り, ③洗浄, ④溶出画分

ネックとなるため、反応条件を検討し、短時間で反応する変異を見つけ出す。本研究では溶媒条件で連結反応が起こる分離インテインを用いた。この変異体をコードしたプラスミドを動物細胞に導入し、発現蛋白質を精製後に末端の連結反応を行った。これによって配座が固定された二重特異性抗体を作り出した。

#### 【結果】

動物細胞に構築したプラスミドをトランスフェクションし、7日間振盪培養を行った。培地上清画分を Ni-NTA カラムによって精製した (図2)。得られた目的蛋白質を溶媒条件を変化させることで、連結反応を誘導し、環状に連結されたタンデム scFv を作製した。連結時のリンカー長を変化させたクローンも作製し、連結効率がリンカー長の影響を受けることを見出した。

#### 【考察】

環状に連結させた二重特異性 scFv (タンデム scFv) の作製に成功し、その連結効率にはドメイン間のリンカー長が影響することを見出した。これはリンカーの長さが、分離インテインが複合体を形成に重要であることを示唆している。

#### 【文献】

- 1) Hemmi, S., Asano, R., Kimura, K., Umetsu, M., Nakanishi, T., Kumagai, I. & Makabe, K.\*: Construction of a circularly connected VHH bispecific antibody (cyclobody) for the desirable

positioning of antigen-binding sites., *Biochem Biophys Res Commun.*, 523(1): 72-77., 2020.

#### 微生物由来非タンパク性アミノ酸の生合成研究と臨床診断用酵素への応用展開

丸山 千登勢

(福井県立大学大学院生物資源学研究科)

#### 【目的】

非タンパク性アミノ酸 (NPAA) は、その化学構造と物性に起因するユニークな生理活性から、ペプチド創薬への応用が期待されている。さらに NPAA 生合成に関わる酵素は、その生合成前駆体であるアミノ酸に対して特徴的かつ特異的な修飾反応を触媒することから、様々な疾病に起因する血中アミノ酸濃度の変化を迅速定量する臨床診断用酵素への応用も期待されている。そこで我々は、NPAA および新規アミノ酸修飾酵素の新たな探索資源として、微生物が生産する NPAA 含有天然有機化合物に着目した。

#### 【方法】

3つの NPAA から構成されるペプチド化合物 resormycin (RM)<sup>1,2)</sup> は、*Streptomyces* 属放線菌が生産する植物病原真菌特異的な抗生物質である。構成成分の一つである  $\beta$ -hLys は、有機合成品が医薬品の合成原料やアミノ酸アナログとして市販されているが、天然からは唯一、RM の化学構造の中のみ見つかっている。これまでに  $\beta$ -hLys 構造の生合成に関する研究報告はなく、 $\beta$ -hLys は新規経路によって生合成される可能性が示唆された。また RM の構成成分である Phe 誘導体は、Phe のクロル化や水酸化、脱水素化を経て生合成されると考えられ、これらの生合成酵素は血中 Phe 濃度の診断用酵素への応用が期待される。そこで我々は、RM 生合成遺伝子群の解析による新規アミノ酸修飾酵素の探索を試みた。

#### 【結果】

これまでの種々解析から同定した RM 生合成遺伝子群 (RM 遺伝子群) について遺伝子破壊実験を試みたところ、RM 遺伝子群が有する 19 の遺伝子のうち、7つ

の遺伝子が  $\beta$ -hLys の生合成に関与していると予想された。7つの遺伝子のうち一つは Arg 代謝に関与する酵素のホモログであったことから、 $[^{13}\text{C}_6]$ -L-Arg の添加培養実験を行ったところ、生産された  $\beta$ -hLys にラベル体の取込みが観察された。また RM 構造内の Phe 誘導体は2つの水酸基を有しているが、Phe の水酸化に関わる酵素遺伝子は1つしか存在しておらず、その組換え酵素を用いた *in vitro* 反応の結果、Phe を基質に2箇所の水酸化反応を触媒した。したがって本酵素は、1つの酵素で2度の水酸化反応を触媒する新規 Phe 水酸化酵素であることが判明した。

### 【考察】

$[^{13}\text{C}_6]$ -L-Arg の添加培養にて Arg が  $\beta$ -hLys に取り込まれたことから、 $\beta$ -hLys の出発物質は Arg であることが判明し、予想通り、新規生合成機構により生合成されることが強く示唆された。また本研究で見出した Phe 水酸化酵素は、1つの基質に対して2度の水酸化反応を触媒することから、これまでの Phe 定量用酵素と比較して、2倍の酵素活性を示す高感度な Phe 診断用酵素としての開発が期待された。

- 1) M, Igarashi., N, Kinoshita., T, Ikeda., M, Kameda., M, Hamada. & T, Takeuchi.: Resormycin, a Novel Herbicidal and Antifungal Antibiotic Produced by a Strain of *Streptomyces platensis*, I. Taxonomy, Production, Isolation, and Biological Properties. 1997. *J. Antibiot* (Tokyo), **50**(12): 1020-1025.
- 2) M, Igarashi., H, Nakamura., H, Naganawa. & T, Takeuchi.: Resormycin, a Novel Herbicidal and Antifungal Antibiotic Produced by a Strain of *Streptomyces platensis*, II. Structure Elucidation of Resormycin. 1997. *J. Antibiot* (Tokyo), **50**(12): 1026-1031.

## 気孔閉鎖応答の制御にかかわる $\text{Ca}^{2+}$ センサータンパク質キナーゼの機能解析

宗正 晋太郎

(岡山大学)

### 【目的】

高等植物の葉の表皮には、一对の孔辺細胞からなる気孔と呼ばれる通気口が存在する。気孔は、光合成に必要な二酸化炭素の吸収や、蒸散による水蒸気放出を調節する重要な場所である。気孔の閉鎖応答を制御する孔辺細胞シグナル伝達において、孔辺細胞の細胞質遊離カルシウムイオン ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ ) がセカンドメッセンジャーとして機能することが明らかとなっている。しかし孔辺細胞  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  の感知を担う分子機構は完全に解明されていない。これまでに我々の研究グループは、モデル植物であるシロイヌナズナを用いた研究により、孔辺細胞  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  感知にかかわる因子を同定してきた (Brandt, Munemasa *et al.*, 2015). 本研究では、孔辺細胞  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  の感知にかかわる新規因子の候補である GCCK (Guard Cell  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent Kinase) に着目し、その機能解析を行った。

### 【方法】

GCCK の活性制御機構を明らかにするため、大腸菌を用いた GCCK 発現系の構築を行った。また植物体における GCCK の生理機能を明らかにするため、GCCK 遺伝子破壊植物体の表現型解析を行った。また GCCK との機能重複が想定される GCCK ホモログ遺伝子も破壊した GCCK 多重遺伝子破壊植物体を作成し、その表現型解析を行った。

### 【結果】

様々な大腸菌タンパク質発現系を試験したが、*in vitro* キナーゼアッセイに利用可能な GCCK リコンビナントタンパク質の発現系の構築は不首尾に終わった。そのため現在、無細胞発現系や動物・植物細胞発現系を用いた GCCK リコンビナントタンパク質の調製を進めている。

遺伝子破壊植物体の気孔表現型解析により、GCCK との機能重複が疑われるホモログ遺伝子をいくつか同定した。 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  と同様に、活性酸素種 (Reactive

Oxygen Species: ROS) も気孔閉鎖応答を媒介する孔辺細胞シグナル伝達においてセカンドメッセンジャーとして機能する。細胞内 ROS 検出試薬である H<sub>2</sub>DCF-DA を用いた実験により, GCCK とそのホモログ遺伝子を破壊すると, 孔辺細胞内の ROS 産生が抑制されることが明らかとなった。

#### 【考察】

本研究により, GCCK はそのホモログ遺伝子との間には機能重複が存在すること, また GCCK は, 気孔閉鎖応答を制御する孔辺細胞シグナル伝達において, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> に依存した ROS 産生に関与することが示唆された。今後, GCCK タンパク質発現系を構築してその活性制御機構を明らかにすることで, Ca<sup>2+</sup> による気孔開度調節機構の全容解明を進めていく。

#### 【文献】

Brandt, B.\*, Munemasa, S.\*, Wang, C., Nguyen, D., Yong, T., Yang, PG., Poretsky, E., Belknap, TF., Waadt, R., Alemán F. & Schroeder, JI.: Calcium specificity signaling mechanisms in abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis* guard cells, *eLife* (2015) 4: e03599.

### 高度好塩性古細菌による持続可能なスクアレン生産

八波 利恵

(東京工業大学生命理工学院)

#### 【目的】

スクアレンは炭素数 30 (C30) の不飽和炭化水素であり, 化粧品材料, 工業用潤滑油として, またインフルエンザワクチンのアジュバンドとしても使用されている<sup>1,2)</sup>。一方, スクアレンから得られる C4, C5, C25, C26 などの飽和炭化水素は, ガソリンやジェット燃料などへの利用が見出され<sup>3)</sup>, その需要はますます拡大している。しかしながら, スクアレンは, 絶滅危惧種である深海ザメから抽出されていることから, 今後漁獲に規制が入り, その生産の持続性が懸念されている。

申請者は, 近年世界で初めて高度好塩性古細菌 *Haloarcula japonica* がスクアレンを生産することを見出し, 生合成に関与するスクアレンシンターゼ (SQS) の同

定に成功した。SQS は 2 分子のファルネシル二リン酸 (FPP) からスクアレンを合成する酵素である。そこで本研究では, 持続可能なスクアレン生産を達成するために, 高度好塩性古細菌 *H. japonica* を使って大量に生産させることを目的とした。

#### 【方法】

1. *H. japonica* 由来 *sqs* 遺伝子高発現型プラスミドの構築

*H. japonica* 由来 *sqs* 遺伝子を高度好塩性古細菌用発現型プラスミドに挿入し, *sqs* 遺伝子高発現型プラスミドを作製した。なお, その際 *sqs* 遺伝子プロモーターは, *H. japonica* 内で働く強力なプロモーターに置換した。発現型プラスミドを用いて *H. japonica* 野生株を形質転換した。形質転換体よりテルペノイド類を抽出した後 HPLC 分析に供し, スクアレンの生産量を調べた。

2. 培養条件の検討

*H. japonica* の培地の塩濃度を変化させ, 種々の条件下で生育した菌体からテルペノイド類を抽出した後, 上述と同様にしてスクアレンの生産量を調べた。

#### 【結果および考察】

1. *H. japonica* 由来 *sqs* 遺伝子の過剰発現によるスクアレン生産の向上

*H. japonica* において *sqs* 遺伝子を過剰発現させ, スクアレンを大量生産させることとした。野生株を *sqs* 遺伝子高発現型プラスミドを用いて形質転換し, 形質転換体のスクアレン生産量を調べた。その結果, 形質転換体は野生株に比してスクアレン生産量が 7.8 倍に向上していた。これより, *sqs* 遺伝子の過剰発現は, スクアレンの増産につながることがわかった。

2. 塩濃度変化によるスクアレン生産の向上

スクアレン生産における *H. japonica* の最適な培養条件を検討するために, 培地の塩濃度を変化させ, それぞれの条件下で生育した菌体が生産するスクアレンの量を調べた。その結果, 本菌は 3.4 M の至適 NaCl 濃度より低い塩濃度で培養した場合, スクアレン生産量は増加するものの, スクアレン誘導体を含めた生産量は大幅に低下することがわかった。今後は様々な温度において本菌を培養し, その菌体のスクアレン生産量を調べ, スクアレン生産に最適な培養条件を決定する予定である。

**【文献】**

- 1) Amarowicz, R.: Squalene: A natural antioxidant?, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 111, 411 (2009).
- 2) Kopicová, Z. and Vavreinová, S.: Occurrence of squalene and cholesterol in various species of Czech freshwater fish, *Czech. J. Food Sci.* 25, 195 (2007).
- 3) Oya, S., Kanno, D., Watanabe, H., Tamura, M., Nakagawa, Y., and Tomishige, Keiichi.: Catalytic production of branched small alkanes from *biohydrocarbons*, *Chem. Sus. Chem.* 8, 2472 (2015).

**細胞接着・遊走制御機に関わる細胞膜脂質反転酵素の解析**

米田 敦子

(東京薬科大学)

**【目的】**

脂質 2 重層からなる細胞膜の外側（外葉）と細胞質側（内葉）では脂質組成が異なるが、アポトーシス時のホスファチジルセリンの外葉への露出のように一過的に反転し、重要な機能をなす例が知られている。最近我々は、内葉にのみ存在すると長年考えられてきたホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸（PIP2）が細胞膜外葉にも存在し、がん細胞の接着、遊走に働くことを報告した<sup>1)</sup>。本研究では、がん細胞の接着・遊走を制御する PIP2 反転酵素を同定することで、外葉 PIP2 による新規細胞接着・遊走様式の分子機構解明を目的とした。

**【方法】**

- 1) 外葉 PIP2 量の異なる細胞株間の遺伝子発現を次世代 RNA シークエンシングと定量的 PCR により比較し、外葉 PIP2 量の多い細胞で発現が高く、少ない細胞で低いリン脂質反転酵素を探索した。
- 2) 絞り込まれた候補酵素を外葉 PIP2 量の多い細胞で発現抑制し、外葉 PIP2 量を減少させる酵素を探索した。当該酵素をクローニングし、外葉 PIP2 量の少ない細胞で過剰発現し、外葉 PIP2 量が増加するか検討した。

**【結果】**

- 1) 外葉 PIP2 量の異なる細胞株間の遺伝子発現を RNA シークエンシングにより比較したが、候補の絞り込みには至らなかった。既知のリン脂質反転酵素の遺伝子発現量を定量的 PCR により比較したところ、4 種の候補酵素に絞り込まれた。
- 2) 絞り込まれた候補酵素を外葉 PIP2 量の多い細胞株で発現抑制したところ、発現抑制により外葉 PIP2 量が減少する酵素 1 種が見出された。当該酵素をクローニングし、外葉 PIP2 量の少ない細胞株数種で過剰発現したところ、1 種の細胞株において外葉 PIP2 量が増加した。

**【考察】**

当該酵素の発現抑制により外葉 PIP2 量の減少が認められたが、完全な消失にはいたらなかった。また過剰発現実験も細胞によっては増加が観察されなかったことから、当該酵素以外に増減に関わる因子の存在が考えられた。今後、当該酵素の細胞での局在の検討、細胞接着・遊走の解析を進めるとともに、さらなる制御因子の探索も進める。

**【文献】**

- 1) Yoneda, A., Kanemaru, K., Matsubara, A., Takai, E., Shimosawa, M., Satow, R., Yamaguchi, H., Nakamura, Y., & Fukami, K.: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate is localized in the plasma membrane outer leaflet and regulates cell adhesion and motility, *Biochem Biophys Res Commun.* 527, 1050 (2020).

**超硫黄分子が関与する鉄硫黄クラスター組立機序の解明**

和田 啓

(宮崎大学医学部)

**【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。これらの機能を支えるコ

ファクターがFe-Sクラスターである。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合成を担う。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、SufS-SufE複合体(硫黄の供給)、SufB-SufC-SufDコア複合体(合成の足場)という多成分複合体と、単独の成分SufAが協調的に機能する。

コア複合体の機能に必須な残基を探索したところ、SufBサブユニットCys405およびCys254が硫黄種の受け取りに機能に必須であることを明らかにしたが、これらの残基はそれぞれ分子の両端に位置しており25Å以上離れていた。コア複合体の立体構造の詳細を分析したところ、これらの残基間を繋ぐように分子内部を貫通するトンネルが存在していることが分かった。

#### 【目的】

ごく最近、生体において硫黄原子が数珠状に連なった「超硫黄分子」と呼ばれる状態が存在し、様々なタンパク質に一過的に結合していることが報告されている。現段階において超硫黄分子の生理的機能は未知であり、その立体構造を捉えた例も皆無に等しい。

本研究では、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、コア複合体複合体内部の「トンネル構造」の生理機能を明らかにする。このトンネル構造は硫黄分子の輸送トンネルであり、ここには硫黄分子が連なった“超硫黄分子”が充填されることを予想している。

#### 【方法】

それぞれの蛋白質複合体を発現・精製し、コア複合体への硫黄転移反応を試験管内で進行させた。この際、硫黄供与タンパク質(SufSおよびSufE)には精製用タグを導入することで、反応後の硫黄結合型コア複合体を分離・精製した。得られた硫黄結合型コア複合体を用いて、X線結晶構造解析(SPring-8/AMED BINDS)およびクライオ電子顕微鏡解析(東北大学/AMED BINDS)を進めた。

#### 【結果】

SufS/SufEおよびSufB-SufC-SufDコア複合体を精製し、遊離システインを基質としたでデスルフィラーゼ反応によりコア複合体への硫黄充填反応を行った。コア複

合体に結合した硫黄分子を定量した結果、一分子あたり10～50個という複数個の硫黄原子の結合が明らかになった。この硫黄結合型SufB-SufC-SufDコア複合体を用いてクライオ電子顕微鏡データを収集し、現在、構造解析を進めている。

### ユニークな巨大酵素ミステリンの病態機能解明

森戸 大介

(昭和大学医学部)

#### 【目的】

ミステリンは4つの不活性型ATPアーゼドメインと2つの活性型ATPアーゼドメイン、2つのユビキチンリガーゼドメインを持つ約600kDaのユニークな巨大酵素である。脊索動物以上に保存され、ヒト・マウスではおおむねユビキタスな発現パターンを示す。ミステリン・ユビキチンリガーゼドメイン周辺の変異によりヒト脳血管疾患もやもや病が引き起こされるが、そのメカニズムは明らかでない。

ミステリンは、細胞内においては脂肪貯蔵オルガネラである脂肪滴に局在して、脂肪滴からリパーゼATGLを取り去り、脂肪分解の抑制、脂肪滴の安定化を導く。本研究では野生型ミステリンの脂肪滴局在・制御を指標として変異ミステリンの挙動を評価し、変異ミステリンによる細胞・個体障害の実態とメカニズムの解明を試みた。

#### 【方法】

ヒトおよびマウス培養細胞(HeLa, HEK293T, MEFなど)に一過的もしくは安定的に野生型、疾患変異型、各種の酵素活性変異型ミステリンを発現させ、それぞれの局在、機能について評価を行った。また分子・細胞レベルでの結果に基づいて、ミステリンノックアウトマウス、変異マウスの表現型解析を行った。

#### 【結果】

野生型ミステリンは脂肪滴に局在し、リパーゼATGLを排除して脂肪滴を安定化するが、加えて特異的に排除される複数の因子と、また排除されない複数の因子を新たに同定した。これに対して一部の疾患変異体と一部の

酵素活性変異体では、脂肪滴への局在・脂肪滴上での特異的な作用が失われていた。これら変異体の多くは細胞内に凝集様の構造を形成し、炎症反応を惹起した（未発表）。

また、これらの結果を踏まえてミスチリンノックアウトマウス、変異マウスの表現型解析を行った。ノックアウトマウス、変異マウスそれぞれで生理的機能の欠失と病的機能の獲得に焦点をあてた解析を行い、一定の成果を得た（未発表）。

#### 【考察】

野生型ミスチリンの脂肪滴における機能の解析より、ミスチリンが複数の因子に作用することが分かった。この作用は特異的であり、何らかの特徴に基づいて特定のタンパク質グループを見分けて脂肪滴の挙動を制御するらしい。

このようなミスチリンの局在と機能は一部の酵素活性変異体では失われており、それらの活性がミスチリンの局在と機能に重要であることが分かった。また、もやもや病変異ミスチリンが凝集様の構造を形成して炎症反応を惹起したことから、このような細胞障害性の凝集を起点とした細胞の機能変容がもやもや病発病の最も基底にあることが示唆された。

ミスチリンノックアウトマウスと変異マウスを用いた解析から、ミスチリンの代謝制御機能および変異による機能獲得について個体レベルでの知見を得ることができた。今後、本研究の進展によりもやもや病の発病・進展プロセスの解明が期待できる。

## 成人病の病因・病態の解明に関する研究助成

## 肥満に伴う高インスリン血症における肝臓が及ぼす影響とその機序の探索

浅井 洋一郎

(東北大学病院糖尿病代謝科)

## 【目的】

肥満や脂肪肝では、肝臓におけるインスリン分解が低下することが報告されている。そのため、高インスリン血症が助長され、肥満がさらに加速する悪循環が考えられる。脂肪肝における肝臓でのインスリン分解低下の機序はこれまで十分に明らかとなっておらず、本研究では肥満・脂肪肝モデルマウスを用いて、肝臓でのインスリン取り込み/分解が低下する機序の検討を行った。

## 【方法】

1. 野生型マウスに対し高脂肪食の負荷を行い、肥満と脂肪肝を形成させ、ブドウ糖負荷試験における血中インスリンと血中Cペプチドとのモル比の測定を行うことで肝臓のインスリンクリアランスを評価した。
2. 肝臓におけるインスリン分解に関与するインスリン分解酵素 (IDE: Insulin degrading enzyme), CEACAM1 (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1) について遺伝子発現、タンパク発現を評価した。
3. 走査型電子顕微鏡を用いて類洞内皮細胞の形態学的評価を行った。
4. MACS (Magnetic-activated cell sorting) を用いて特異的に類洞内皮細胞を単離し、RNA sequence による網羅的遺伝子解析を行った。

## 【結果】

1. 高脂肪食群では肝臓のインスリンクリアランスが低下することがわかった。
2. 肝臓における IDE, DEACAM1 の遺伝子発現・タンパク発現は高脂肪食群で低下することがわかった。
3. 高脂肪食群において類洞内皮細胞の篩板孔の減少が

観察された。

4. 高脂肪食群の類洞内皮細胞では、炎症や細胞外基質に関わる遺伝子群が上昇していることがわかった。

## 【考察】

高脂肪食負荷マウスにおいて肝臓のインスリンクリアランスの低下を認め、インスリン分解に関わる遺伝子発現、タンパク発現が低下していることがわかった。これに加え、類洞内皮細胞の篩板孔の減少は肝臓におけるインスリン取り込み低下に関与することが報告されており、高脂肪食群における肝臓インスリンクリアランス低下の原因の一つである可能性が考えられた。また、高脂肪食群の類洞内皮細胞において発現が上昇していた炎症や細胞外基質に関わる遺伝子群が、篩板孔減少に関与しているか今後検証を行う予定である。肥満に伴う高インスリン血症における肝臓の役割を検討し、肥満を予防するための基盤となる知見を得ることを目指して研究を進める予定である。

## 免疫学的アプローチによる腎臓病に対する新規治療戦略の開発

畔上 達彦

(慶應義塾大学保健管理センター)

## 【背景・目的】

慢性腎臓病 (CKD) は末期腎不全や脳心血管疾患の発症・死亡のリスク因子で、患者数は本邦で 1330 万人、世界で 8 億 5000 万人にのぼる。CKD、末期腎不全やその合併症の治療に要する医療費は、医療保険財源を逼迫する一因となるが、CKD に対する根本的な治療法は確立していない。したがって、CKD に対する新たな治療戦略を構築することは、患者個人の生命予後、健康寿命の観点だけでなく、医療経済的な側面からも、喫緊かつ重要な医療課題であると考えられる。

CKD を制御するために、本研究では、原因として最

多である糖尿病性腎臓病 (DKD) と、進展機序の final common pathway である間質線維化に着目した。特に DKD の発症・進展に深く関与する終末糖化産物受容体 (RAGE) と、線維化の key factor である connective tissue growth factor (CTGF) を治療標的に選択した。

CKD は一般に、慢性の経過で進行するため治療が長期間に及ぶ。ワクチン接種により、標的分子の機能を阻害する抗体を誘導することができれば、少ない投薬回数で長期間にわたる治療効果を得ることが可能となり、医療費の軽減や治療アドヒアランスの向上に寄与することができる。

このような背景を踏まえ、本研究では、アンメット・メディカル・ニーズの高い CKD に対して、RAGE, CTGF を標的とした治療ワクチンの開発に取り組み、腎臓領域における新たな治療戦略の構築を目指している。

## 【方法】

### 1. RAGE ワクチンによる DKD 治療・予防効果の検討

1 型糖尿病モデルとして、DBA/2J マウスに膵  $\beta$  細胞毒性を持つストレプトゾトシンを投与する。また、2 型糖尿病モデルとして、BKS. Cg+Leprdb/Leprdb マウス (db/db マウス) を利用する。DKD モデルマウスに、RAGE ワクチンを隔週で計 3 回投与し、尿中アルブミン排泄測定、光学顕微鏡解析 (メサンギウム基質面積、糸球体径)、電子顕微鏡解析 (糸球体基底膜厚) を行う。

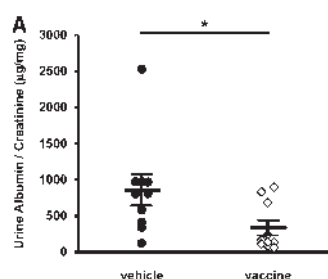
### 2. CTGF ワクチンによる CKD 治療・予防効果の検討

腎線維化モデルとして片側尿管結紮 (UUO) マウスを、腎不全モデルとしてアデニン負荷マウスを利用する。マウスに、CTGF ワクチンを隔週で計 3 回投与し、両モデルマウスの腎間質線維化を光学顕微鏡で評価し、さらにアデニン負荷マウスの血清クレアチニン、尿中アルブミン排泄を測定する。

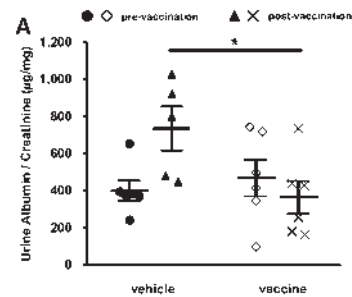
## 【結果】

### 1. RAGE ワクチンによる DKD 治療・予防効果の検討

#### 1 型糖尿病モデル



### 2 型糖尿病モデル

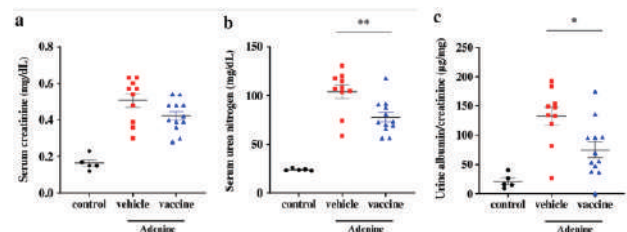


Azegami, T. et al.: *Diabetes*. 2021; **70**(9): 2147-2158

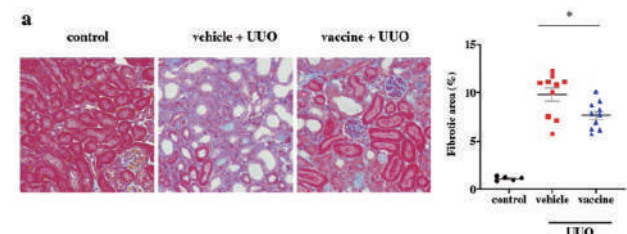
RAGE ワクチン接種群で、尿中アルブミン排泄は少なく、糸球体腫大・メサンギウム基質拡大が軽減され、DKD に対する腎保護効果が示された。

## 2. CTGF ワクチンによる CKD 治療・予防効果の検討

### 慢性腎不全モデル



### 腎線維化モデル



Nakayama, T., Azegami, T.\* (corresponding author) et al.: *Sci Rep*. 2022; **12**(1): 10933

CTGF ワクチン接種群で、アデニン負荷マウスの腎機能障害が軽減した。また、アデニン負荷マウス、UUO マウスにて、腎間質線維化が軽減され、CKD に対する腎保護効果が示された。

## 【考察・今後の展望】

上記の検討結果にて、抗 RAGE ワクチン、抗 CTGF ワクチンの腎保護効果が確認された。現在、特許を出願し、審査に向けて準備中である。最終的に臨床応用できるように、検討を進めていく方針である。また、今後の展開として「炎症」の制御を目的に、新たなワクチン開発 (plasminogen activator inhibitor-1; PAI-1 を標的とするワクチン) に着手している。



百寿者の腸内細菌解析による長寿メカニズムの解明

新 幸二

(慶應義塾大学医学部)

【目的】

昨年度より、百寿者の腸内細菌叢を解析することにより長寿に関連する腸内細菌種の同定とそのメカニズムの解明を行う。これまでの研究において、百寿者の便中には胆汁酸代謝に関与する細菌種が多く存在し、3位のヒドロキシ基がアルファからベータへと変換（異性化）されたイソ体や5位の水素がベータからアルファへと変換されたアロ体などの特殊な二次胆汁酸が多く存在していることが明らかになり、これらの2時胆汁酸が抗菌活性を持ち病原性細菌の排除に関与していることを明らかにしてきた。腸内細菌による胆汁酸の代謝経路の解明から、ステロイド（テストステロン）も同様の代謝酵素によって代謝されると想定すると以下の図1のような経路が考えられた。そこで本年度は胆汁酸とよく似た構造をもつステロイド代謝にも腸内細菌が関与しているのかを検討した。

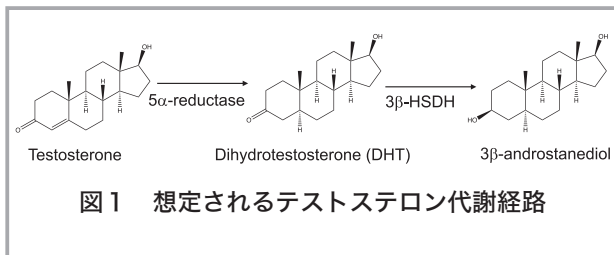


図1 想定されるテストステロン代謝経路

【方法】

百寿者由来の胆汁酸代謝に関与する腸内細菌株の培養中にステロイド化合物を添加し、時間経過を追って培養上清を回収し、残存しているステロイド化合物を四重極型質量分析計により定量する。また、新規代謝産物の同定のため Q-TOF 型の質量分析計を用いて網羅的に測定を行う。

【結果】

胆汁酸の 5a-reductase 活性を持つ *Parabacteroides merdae* 1 株, *Odoribacteraceae* 4 株を用いて、テストステロンを培養液に加え培養上清中のテストステロン、ジヒドロテストロン (DHT), 3β-アンドロスタンジオールの量を測定した結果, *Odoribacteraceae* St21,

St22, St23 株では時間経過とともにテストステロンが減少し, DHT, 3β-アンドロスタンジオールが増加することが明らかになった (図2)。一方で *Parabacteroides merdae* は胆汁酸の代謝は効率よく行うことができるが、テストステロンへの活性は低いこと、また胆汁酸代謝に関与する 5α-reductase を欠損した株では DHT が全く検出されないことから、胆汁酸代謝と同じ酵素がステロイドの変換に関与していることが明らかになった。また、興味深いことに *Odoribacteraceae* の 48 時間後の培養上清中のステロイドを測定すると、テストステロン, DHT, 3β-アンドロスタンジオールともに検出限界以下になっていることから、効率よくテストステロンを変換し、さらに β-アンドロスタンジオール以降も何か新規ステロイドへと代謝している可能性が考えられた。

そこで、次に培養上清中のノントarget解析を行

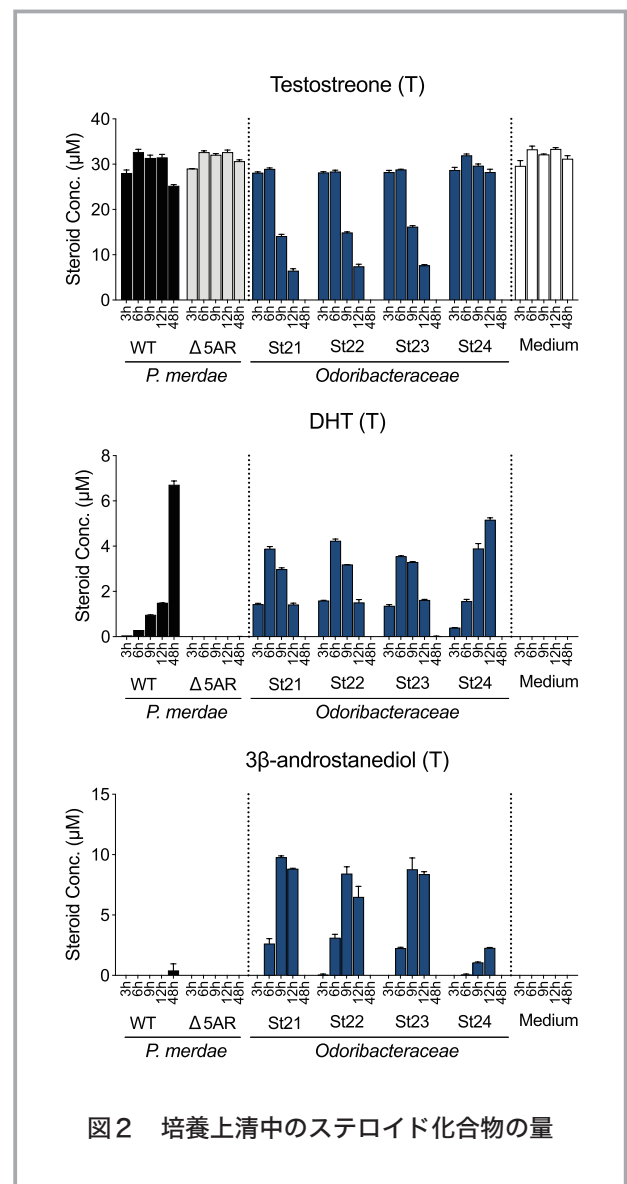


図2 培養上清中のステロイド化合物の量

い、どのようなステロイドが培地中に存在しているのかを探索した。その結果、*Odoribacteraceae* の培養上清中にはこれまで知られていない新規のステロイド化合物として、保持時間が4.8, 6.2, 14.1, 15.68分, m/zが416.2, 414.2, 301.2, 299.2の4つの化合物が検出された(テストステロンは保持時間14.4分, m/z 289.2)。現在、これら4つのステロイド化合物がどのような組成式でどのような構造かを検証するため、精密質量の測定、分取してNMR解析を行う計画で準備を行なっている。

### 【考察】

長寿に関与する腸内細菌の役割のひとつに胆汁酸を代謝し、産生された二次胆汁酸が抗菌活性を持つことを明らかにした。一方で、これらの胆汁酸代謝に関与する細菌種がステロイド化合物も代謝し、新たなステロイドへと変換していることが明らかになった。高齢になるとともにテストステロンやエストロゲンなどのステロイドホルモンが減少し、骨粗鬆症や筋量の低下につながることが報告されている。そこで、今後腸内細菌によるステロイド代謝経路が明らかになれば、ステロイドホルモンを介した長寿への関与について理解がすすむと考えられる。さらには、腸内細菌を用いた健康長寿へつながる薬剤やサプリメントへの開発につながることが期待できる。

### 【文献】

- 1) Sato, Y.#, Atarashi, K.#, Plichta, DR.# *et al.*: Novel bile acid biosynthetic pathways are enriched in the microbiome of centenarians, *Nature*, **599**, 458-464, (2021) # Contributed equally.

### 軟骨細胞内 Ca<sup>2+</sup>制御機構と生理機能の解明

市村 敦彦

(京都大学大学院薬学研究科)

### 【目的】

本研究では、独自に樹立した軟骨細胞内 Ca<sup>2+</sup>イメージング技術を用い、C型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)及び小胞体膜タンパク質TRIC-Bが軟骨細胞内 Ca<sup>2+</sup>制御を通じて制御している生理機能の解明を目的とした。

### 【背景】

我々はこれまでに軟骨細胞内 Ca<sup>2+</sup>自発的変動を発見し、TRPM7を制御分子として同定した。*Trpm7*軟骨特異的欠損マウスが骨伸長障害を示したことから、生理的な骨伸長に軟骨細胞内 Ca<sup>2+</sup>シグナルが重要であることを着想した。そこで、骨伸長作用を有するCNPおよび遺伝子欠損により骨形成不全症を来すTRIC-Bに注目し、軟骨細胞内 Ca<sup>2+</sup>制御と軟骨組織における生理的役割の解明を試みた。

### 【方法】

遺伝子欠損マウスの病理学的解析を実施した。生化学的手法により細胞内シグナルを評価した。マウス胎児軟骨スライス試料を用いてCa<sup>2+</sup>イメージングを行った。

### 【結果】

CNP処置によって軟骨細胞内 Ca<sup>2+</sup>シグナルが活性化されることを明らかとした。複数のシグナル解析から、NPR2-PKG-BKチャンネル-TRPM7チャンネル-CaMKIIシグナル経路を同定した。*Trpm7*欠損器官培養軟骨においてはCNPの骨伸長効果が観察されなくなった。また、BKチャンネル活性化薬により器官培養軟骨の伸長を促進できることを見出した。以上の一連の解析から、CNPの骨伸長に関与する新たなシグナル経路を同定し、新たな創薬標的分子を示した(Miyazaki & Ichimura, *et al.*, *eLife*, 2022)。

*Tric-b*欠損により軟骨組織中に死細胞が出現することを見出した。*Tric-b*欠損により細胞内にII型コラーゲンが蓄積することが明らかとなった。小胞体ストレス経路の活性化が観察され、アポトーシスが惹起されていることがわかった。*Tric-b*欠損により基底状態の細胞内 Ca<sup>2+</sup>が上昇しており、軟骨細胞内 Ca<sup>2+</sup>ハンドリングに異常が生じていることが示唆された。

### 【考察】

CNPが細胞内 Ca<sup>2+</sup>を介して骨伸長を促進する新たな細胞内シグナル経路を同定した。CNPアナログが軟骨無形成症治療薬として承認されたばかりであることから、本研究成果は作用増強などに資する基盤的情報を提供することが期待される。TRIC-B遺伝子変異は胎児骨格異形成症を引き起こすことが報告されており、さらなる解析による病態分子機序の解明が期待される。

## 疾患特異的 iPS 細胞を用いた特発性拡張型心筋症の病態解明と治療化合物の探索

伊藤 正道

(東京大学大学院医学系研究科)

### 【背景】

特発性拡張型心筋症 (DCM) は心腔の拡大と心臓収縮力の低下を特徴とする難治性の疾患である。DCM 患者の約 10% に認められるラミン遺伝子 (LMNA) 変異を持つ患者群は、既存薬物療法に反応せず、特に予後不良であり、治療法開発が急務である<sup>1)</sup>。

### 【目的】

LMNA 変異を有する DCM の病態を明らかにし、同疾患患者の新規治療薬候補化合物の同定を試みる。

### 【方法・結果】

#### ① LMNA 変異 DCM 患者由来 iPS 細胞株の樹立

LMNA 変異 (p.Q353R) を持つ患者から iPS 細胞を樹立した。また、ゲノム編集により該当変異を修復したコントロール株を作成した。これらの株を心筋細胞 (iPSCM) に分化させ、解析を行った。

#### ② 化合物スクリーニング

iPSCM を用い、DNA 二重鎖切断マーカー  $\gamma$ H2A.X の染色を行いその定量化を行ったところ、LMNA 変異株では有意に高度に心筋細胞の DNA 損傷が蓄積していることが判明した。次に、DNA 損傷の蓄積軽減をリードアウトとして化合物のスクリーニングを行った。その結果、ビタミン D2 がヒット化合物として抽出された。同化合物は心不全モデルマウスの心機能を改善した。

LMNA 変異 iPSCM にビタミン D2 を投与して RNA-seq を行ったところ、投薬により DNA 修復に関与する酵素群の発現が誘導されていることが判明した。

#### ③ 機序解明

変異と DNA 損傷蓄積の関連を明らかにするため、変異 LMNA タンパクに結合する分子のスクリーニングを行った。その結果、ビタミン D 受容体 VDR と変異 LMNA の結合性が、野生型 LMNA に比べて 4 倍程度高いことが明らかになった。変異 LMNA による VDR の核膜辺縁へのトラップがビタミン D による修復酵素誘導を妨げている可能性が示唆された。

### 【考察】

LMNA の変異は Hutchison-Gilford 症候群に代表されるように老化の促進と関与するが、それらの詳細なメカニズムは明らかになっていない。本研究によって、ビタミン D によって LMNA 心筋症の治療できる可能性が示唆された。今後は他変異での有効性、Vitamin D を用いた臨床試験を計画する。

### 【文献】

- 1) *Sci Rep*. 2018 3 1; **8**(1): 1998.
- 2) *JACC: Basic Transl Sci*. 2019, **4**(6), 670-80.

## 脂肪肝再生過程で生じる肝細胞死様式選択メカニズムの解明

稲葉 有香

(金沢大学新学術創成研究機構)

肝細胞内脂肪蓄積は、その多寡により、異なる様式の細胞死を誘導する。細胞死の様式として、非炎症性のアポトーシスと、炎症性の溶解性細胞死が知られる。高度脂肪肝では溶解性細胞死が発症し、急性肝障害や非アルコール性脂肪肝 (NASH) の発症・増悪と密接に関与する。本研究課題では、高度脂肪肝で誘導される溶解性細胞死の様式の同定、及びその誘導メカニズムの解明を行った。

高脂肪食誘導性の中等度または高度脂肪肝マウスに対し、70% 肝切除を行い、障害後の肝細胞死を検討した。肝細胞死は TUNEL 染色により、肝細胞死様式は TUNEL/活性型 caspase3 (CI-CASP3) 蛍光二重染色により、評価した。高度脂肪肝切除後は、中等度脂肪肝と比較し、血中 ALT 値の高値、CI-CASP3 陰性細胞死の増加、大規模な巣状細胞死の出現を呈した。また、溶解性細胞死の一つであるネクロトーシスの制御因子 Ripk3 の発現と、ストレス誘導性転写因子 Atf3 の発現が誘導された。肝細胞 Ripk3 ノックダウンにより、高度脂肪肝で認められた巣状細胞死は消失し、血中 ALT 値も低下した。ATF3 欠損高度脂肪肝では、肝切除後の巣状細胞死が消失し、Ripk3 発現誘導・CI-CASP3 陰性細胞死が減少し、血中 ALT 値も低下した。一方、ATF3 過剰発現は、Ripk3 発現を誘導し、CI-CASP3 陰性細胞

死を増加した。ネクロプトーシス誘導における ATF3 の役割を検討する為、培養肝細胞への ATF3 過剰発現を行った。初代培養肝細胞では、ATF3 が Ripk3 プロモーター領域に結合し、Ripk3 発現を誘導した。ネクロプトーシス検出肝細胞株を用いた検討により、ATF3 過剰発現が、TNF 誘導性の肝細胞死をアポトーシスからネクロプトーシスへと変化させることを明らかにした。次に、NASH における ATF3 依存性ネクロプトーシス誘導の重要性を検討した。メチオニン・コリン欠損餌 (MCD) 誘導性マウス NASH では、肝 Atf3・Ripk3 発現が増強した。肝 ATF3 欠損は、MCD 負荷後の Ripk3 発現を抑制し、肝細胞死数を減少させ、肝炎症・線維化関連遺伝子発現も低下させた。ヒト NASH 症例の肝生検組織では、肝細胞障害・線維化の高度な症例で、ATF3・RIPK3 陽性細胞数が増加した。

高度脂肪肝で発症する溶解性細胞死が、RIPK3 依存的ネクロプトーシスであり、その誘導メカニズムとして ATF3 が中心的役割を担うことを明らかにした。本研究成果は、ATF3 誘導性 RIPK3 発現が、急性・慢性肝障害の新規治療標的として有用である可能性を示唆している。

### アルドステロン産生細胞群 (APCC) の 1 細胞単位での遺伝子発現特性評価

馬越 洋宜

(九州大学病院)

#### 【背景】

副腎皮質は球状層 (ZG: Zona Glomerulosa), 束状層 (ZF: Zona Fasciculata), 網状層から構成される。アルドステロン合成酵素 (CYP11B2) を強く発現するアルドステロン産生細胞群 (APCC: Aldosterone Producing Cell Clusters) は、成人の副腎で頻繁にみられ、アルドステロン産生腺腫 (APA: Aldosterone Producing Adenoma) でも検出される体細胞変異を保有している。原発性アルドステロン症は、主に APA や特発性高アルドステロン症 (IHA: Idiopathic Hyperaldosteronism) に起因する。我々は、APCC が IHA を引き起こしており、APA の前駆体であると推定

している。しかし、APCC の遺伝子発現特性、特にその発生についてはよくわかっていない。

#### 【目的】

本研究では、APCC のトランスクリプトームを 1 細胞単位で解析し、APCC の発生過程を分化経路推定解析により明らかにすることを目的とした。

#### 【方法】

ヒト成人副腎 2 個のシングルセル RNA シークエンス (scRNA-seq) を実施した。

#### 【結果】

2928 個の副腎細胞の scRNA-seq データを取得し、教師なしクラスタリングとマーカー遺伝子の発現に基づいて 1765 個の副腎皮質細胞を同定した。副腎皮質細胞は 6 つのクラスターに分けられ、そのうち 3 つのクラスター (923 細胞) が APCC/ZG 細胞で構成されていた。さらにサブクラスタリングにより、APCC/ZG 細胞は 3 つのクラスター (クラスター C1, C2, C3) に分けられ、最終的に APCC クラスター (C3) と ZG クラスター (C1) が確認された。クラスター C2 は、ZG から ZF への移行細胞の可能性が推定された。RNA velocity 解析により、クラスター ZG-クラスター-C1 から APCC-クラスター-C3 への発生方向が推定された。scRNA-seq により、多くの CYP11B2 陽性細胞が、コルチゾール産生には必須だがアルドステロン産生には必須でない CYP11B1 および/または CYP17A1 に陽性であることが判明した。

#### 【結論】

本研究により APCC の遺伝子発現特性を 1 細胞単位で明らかにし、一部の ZG 細胞が APCC にリモデリングすることを示した<sup>1)</sup>。

#### 【文献】

- 1) Iwahashi, N.\*, Umakoshi, H.\*, Seki, T., Gomez-Sanchez, CE., Mukai, K., Suematsu, M., Umezawa, Y., Oya, M., Kosaka, T., Seki, M., Suzuki, Y., Horiuchi, Y., Ogawa, Y. & Nishimoto, K.: "Characterization of aldosterone-producing cell cluster (APCC) at single-cell resolution". *J Clin Endocrinol Metab.* **107**(9): 2439-2448, 2022. (\*equal to 1<sup>st</sup> author).

## Bodywide transcriptome landscape in mouse models and human

浦山 恭次

(国際電気通信基礎技術研究所 佐藤匠徳特別研究所)

### 【目的】

心筋梗塞を含む心臓病は未だに多くの先進国においても死因の上位を占めており、慢性心不全へと移行すると生命を脅かす疾患にも関わらず、革新的な治療法がかけられている。そこで、既存の治療法の概念とは異なる新規治療法を提案することを目的とし研究を行った。その結果、細胞内代謝を制御することで抗がん作用があると報告されている回虫駆除薬（パモ酸ピルビニウム, PP）がマウス心筋梗塞モデルにおいて線維化を抑制することを報告した<sup>1)</sup>。また、心筋梗塞モデルにおいて、原発巣以外の多臓器で遺伝子発現変動が起きている事を見出し、多臓器連関ネットワーク解析へと研究を展開した。

従来の疾患研究は、少数の器官や組織に限定されていた。しかし、生体はより複雑な多臓器連関ネットワークで成り立っており、多くの疾患は一つの器官だけではなく、複数の器官に影響を及ぼすことがわかってきている。そこで、生体内には未だ発見されていない臓器間のクロストークが存在し、それらは個体レベルでの生理学的機能や疾患の発症において重要な役割を担っていると仮定し、生体内における臓器間のクロストークを網羅的にあぶり出すことを目的として研究を行った。

### 【方法&結果】

本研究では、5つの異なる疾患モデルマウス（心筋梗塞、糖尿病、がん、老化促進、腎障害）における病態発生から異なるタイムポイントで13-23臓器を回収しRNAseq解析を行い、各モデルの各臓器の異なるタイムポイントでの遺伝子発現変動を網羅的に解析し、全身レベルでのトランスクリプトームデータベース（全身網羅的多器官遺伝子発現地図, iOrgans Atlas）を構築した<sup>2)</sup>。

本データベースをデータマイニングする事で、骨で産生されるホルモン Fgf23 を介した骨と皮膚の新たな臓器連関ネットワークを解明した<sup>2)</sup>。さらに、唾液腺由来の分泌性タンパク質を介した骨と唾液腺という新しい臓器連関ネットワークを見出し、現在この分泌性タンパ

ク質の生体内における機能解析を多臓器 RNAseq 解析, scRNAseq 解析, 生理学的及び組織学的実験によって行っている。

今後も、本データベースを活用・発展させることで新規臓器連関の解明, 新規疾患マーカーや治療ターゲットの発見につながる研究を行っていく。

### 【文献】

- 1) Murakoshi, M., Saiki, K., Urayama, K. & Sato, T. N.: An anthelmintic drug, pyrinium pamoate, thwarts fibrosis and ameliorates myocardial contractile dysfunction in a mouse model of myocardial infarction, *PLoS One.*, **8**(11): e79374 (2013)
- 2) Kozawa, S.\*, Ueda, R.\*, Urayama, K.\*, Sagawa, F., Endo, S., Shiizaki, K., Kurosu, H., de Almeida, G. M., Hasan, S. M., Nakazato, K., Ozaki, S., Yamashita, Y., Kuro-o, M. & Sato, T. N.: The body-wide transcriptome landscape of disease models, *iScience.*, **2**, 238-268 (2018). \*These authors contributed equally

## 短眠を作る神経メカニズムの研究

大石 陽

(筑波大学医学医療系・国際統合睡眠医科学研究機構)

### 【目的】

我々の睡眠覚醒はホメオスタシスやサーカディアンリズムなど様々な要因に制御される。経験的に明らかなように、モチベーションも睡眠覚醒に影響を与えるが、その脳内メカニズムはほぼ不明であった。我々は、腹側被蓋野や側坐核がモチベーション行動において重要な役割を果たす点、側坐核に睡眠物質アデノシンの受容体が発現する点に注目し、両脳領域の睡眠覚醒制御における機能解析を行った。

### 【方法・結果】

まず、腹側被蓋野のドーパミン神経に着目し、同神経のドーパミン D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> 受容体依存的な覚醒維持作用をマウスにおいて見出した。次に、投射先の側坐核に注目し、D<sub>2</sub> 受容体およびアデノシン A<sub>2A</sub> 受容体を発現する間接

路神経のノンレム睡眠促進作用を見出した。同神経の活性はモチベーション刺激により低下し、それに伴って睡眠量が低下した。従って、側坐核はモチベーション刺激を感知し、さらに睡眠覚醒を制御する興味深い領域であることが明らかになった。

また、ジフテリア毒素の発現により腹側被蓋野をマウスにおいて欠損させたところ、予想に反して顕著な睡眠量の低下が見られた。解析の結果、GABA 作動性神経が責任細胞であり、正常な睡眠量を維持するために必須の神経であることが判明した。一方、同欠損マウスの行動を調べたところ、自発運動量増加、抗うつ行動、不安様行動の減少など、多くの躁病様行動が見られた。躁病の診断基準のひとつに睡眠欲求の減少があるため、同マウスの睡眠恒常性を解析したところ、断眠後に通常みられる睡眠リバウンドの消失が判明した。また、D<sub>2</sub> 受容体欠損マウスでは GABA 神経欠損による睡眠量の減少が大きく損なわれたため、ドーパミン系を介しての睡眠減少メカニズムが示唆された。

一連の研究により、ドーパミン系や関連する GABA 作動性回路が睡眠制御や躁病様行動の表出に重要であることが明らかになった。過去に報告のないシステムが含まれるため、詳細な解析により不眠症等の新たな治療薬の開発につながる可能性がある。

#### 【文献】

- 1) Honda, T. *et al.*: Ablation of Ventral Midbrain/Pons GABA Neurons Induces Mania-like Behaviors with Altered Sleep Homeostasis and Dopamine D2R-mediated Sleep Reduction., *iScience*. **23**(6): 101240 (2020).
- 2) Takata, Y. *et al.*: Sleep and Wakefulness Are Controlled by Ventral Medial Midbrain/Pons GABAergic Neurons in Mice., *J. Neurosci.* **38**(47): 10080-10092 (2018).
- 3) Oishi, Y. *et al.*: Slow-wave sleep is controlled by a subset of nucleus accumbens core neurons in mice. *Nat Commun.* **8**(1): 734 (2017).
- 4) Oishi, Y. *et al.*: Activation of ventral tegmental area dopamine neurons produces wakefulness through dopamine D2-like receptors in mice. *Brain Struct Funct.* **222**(6): 2907-2915 (2017).
- 5) Oishi, Y. & Lazarus, M.: The control of sleep and wakefulness by mesolimbic dopamine systems. *Neurosci Res.* **118**: 66-73 (2017).

#### 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)

#### 【背景および目的】

キヌレン酸 (KA) はトリプトファン (Trp) 代謝化合物の一つであり、KA の増加は二型糖尿病やうつ病で認められているが、KA の増加の原因や意義はよく分かっていない。

これまでに真核生物のモデル細胞である出芽酵母を用いて細胞内における KA の機能を調べてきた。その結果、KA は過剰な Trp を分解した結果で生じた排泄物の一種であることが示唆された (Ohashi. *et al.*, *Sci. Rep.*, 2017)。すなわち、KA 増加の一因は、Trp の蓄積であると考えられる。しかし、高濃度 Trp が細胞にどのような影響を及ぼすかもよく分かっていない。したがって、過剰な Trp による細胞毒性の解析が、病態の理解につながると期待される。

#### 【方法と結果】

高濃度 Trp による細胞毒性の原因を明らかにするため、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のスクリーニングを行った。その結果、細胞膜や細胞壁へのストレス応答に必要な Cell Wall Integrity (CWI) 経路の遺伝子欠損株の一部が、高濃度 Trp に感受性を示すことを見出した。CWI 経路の遺伝子欠損株について、改めて高濃度 Trp への感受性を調べたところ、CWI 経路上流の分子 (細胞表層のセンサーなど) の遺伝子欠損株は高濃度 Trp に感受性を示さなかったが、その下流のキナーゼカスケードや転写因子の遺伝子欠損株は高濃度の Trp に感受性を示した。このことから、CWI 経路の下流のシグナルが高濃度 Trp への耐性に必要であることが示された。また、細胞内に Trp が蓄積する遺伝子変異株を用いて、細胞内 Trp の蓄積は細胞壁ストレスへの感受性を引き起こすことも示唆された。

### 【考察】

以上の結果から、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、この仕組みが Trp の毒性に寄与している可能性が考えられた。

### 【文献】

Kazuto, Ohashi. & Romanas, Chaleckis.: High levels of tryptophan reduce cell wall or membrane stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **85**, 10, 2131-2136 (2021).

### 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)

### 【目的】

視床下部の食欲中枢機能は栄養情報を脳に伝える摂食調節ホルモンにより制御されている。最近私たちは、腸管由来のインクレチンホルモン GIP の視床下部 GPCR を介したホルモン感受性制御機構を解明し、視床下部のホルモン感受性が腸脳連関を介した内因性・外因性の GPCR リガンドの制御下にあること示した (*Cell Rep* 2016, *J Clin Invest* 2019, *Endocrinology* 2020, *JCI Insight* 2021)。

そこで本研究は、視床下部レプチンシグナルと相互作用を示す外因性の新規食成分の同定と作用機序解明を目指した。

### 【方法】

視床下部器官培養系はマウス新生仔より作製した脳スライスを用い、実際の脳組織に近い状態でホルモンや外因性成分の応答性が高い再現性をもって検出できる独自の評価系である。本系を用い、視床下部ホルモンシグナルと相互連関を示す食成分の同定を進めた。

食成分で前処理した後にレプチン依存性 STAT3 リン酸化を指標とした免疫組織化学により細胞内レプチンシグナルにおける食成分の効果を解析した。さらに肥満マウス個体を用いて、レプチン感受性への効果を検証した。

### 【結果・考察】

消化管を想定した酵素条件により緑葉ルビスコを酵素消化し、ペプチド一斉分析、包括的ペプチド情報、構造活性相関情報から生理活性ペプチドを探索した。結果、緑葉ルビスコ由来の 6 アミノ酸残基ペプチド YHIEPV を選定した。

そこで視床下部器官培養系を用い、レプチンシグナルに及ぼす効果を検討したところ、生理食塩水を添加したコントロール群と比較して、YHIEPV を添加した群では、レプチンによる STAT3 リン酸化 (レプチンの中核シグナル伝達経路) が有意に増加し、YHIEPV が細胞内レプチン感受性を増強することを見出した。肥満マウス個体を用いた検討により、経口投与した YHIEPV が脳室内投与したレプチンによる抗肥満効果を増大させることを確認した。さらに器官培養系にて、Rap1 活性化剤によるレプチン感受性障害の誘導が YHIEPV によりブロックできることを確認し、Rap1 経路の関与が示唆された。

今後の検討により、食による視床下部レプチン感受性制御の分子メカニズムや長期投与による抗肥満効果の実証が期待され、腸管由来食シグナルによるレプチン感受性の制御という新しい概念の提示に繋がることが期待される。

### 酵素活性検出蛍光プローブを用いたがん蛍光イメージング

神谷 真子

(東京工業大学生命理工学院)

### 【目的】

高齢化が進みがんの罹患者や死亡者も増え続けている現在、その治療法の開発の重要性も増している。現時点で最も確実な癌治療法の一つに外科的摘出があるが、目で見えないサイズの癌を完全に取り除くことは難しく再発の原因となっている。そこで我々は、蛍光法の持つ極めて劇的かつ精密にシグナル ON/OFF の制御が可能な特徴を最大限に生かし、がん部位を見分けてその蛍光特性が大きく変化する Activatable 型蛍光プローブの設

計・開発に取り組んだ。

### 【方法】

具体的には、分子内求核基を有するローグミン誘導体やロドール誘導体が示す特徴的な分子内スピロ環化平衡を活用した独自の分子設計法に則り、がん部位での発現亢進が報告されているアミノペプチダーゼやグリコシダーゼを標的とした蛍光プローブ群を開発した。また、分子内光誘起電子移動を動作原理としたカルボシキペプチダーゼを標的とした蛍光プローブも開発した。さらに、開発した蛍光プローブ群を、がん培養細胞、がんモデルマウス、臨床検体に適用し、がん特異的に蛍光を発する蛍光プローブを探索するとともに、標的酵素の同定ならびに、病理組織診断や免疫染色による標的酵素発現の確認を行った。

### 【結果】

開発した蛍光プローブライブラリーを臨床検体に滴下し、蛍光強度の変化をがん部と非がん部で比較した結果、DPPIV (DipeptidylpeptidaseIV) を標的とした蛍光プローブを用いることで食道がん特異的な蛍光イメージングが、 $\alpha$ -mannosidase を標的とした蛍光プローブを用いることで乳がんの良性腫瘍選択的な蛍光イメージングが可能であることを見出した<sup>1,2)</sup>。また、PSMA (前立腺特異的膜抗原) を標的とした蛍光プローブを用いることで前立腺がんの蛍光イメージングが可能であることも示した<sup>3)</sup>。

### 【考察】

このように、特定の酵素活性を持つがん部位を検出する蛍光プローブを開発することで、迅速かつ高感度ながん検出を可能とする新たな概念に基づくEBM (evidence-based medicine) が可能となると期待される。

### 【文献】

- 1) *Sci. Rep.* **6**, 26399 (2016).
- 2) *ACS Cent. Sci.* **6**, 2217-2227 (2020).
- 3) *J. Am. Chem. Soc.* **141**, 10409-10416 (2019).

## 副腎ペリリピン1は高血糖状態でのステロイドホルモン合成増加に關与する

亀田 啓

(北海道大学病院 糖尿病・内分泌内科)

### 【背景と目的】

2型糖尿病患者では、コルチゾールの基礎値と副腎皮質刺激ホルモンに対する反応性が亢進しているという報告がなされており、血糖上昇のみならず血管障害や臓器合併症の進行に關与していることが示唆されている。本研究では2型糖尿病の病態における副腎ステロイド産生の亢進のメカニズムを明らかとし、2型糖尿病の高血糖や慢性合併症の治療・予防の新たな治療標的を見つけ出すことを目的とする。脂肪滴周囲蛋白であるペリリピン1 (PLIN1) に着目し2型糖尿病の病態における副腎ステロイド産生の亢進のメカニズムを明らかにし、新たな治療標的を見つけ出すことを総合的な目的として研究を行った。2019年度の実験ではdb/dbマウスの副腎において脂肪酸取込み・分解の亢進、コレステロールの取込み・*de novo*合成の亢進という代謝変化が起きており、結果的に細胞内のコレステロール量が増加し、ステロイドホルモン合成が亢進することが示唆された。2020年度の実験ではPLIN1を副腎癌細胞株に過剰発現したところステロイド合成酵素のベースの発現が増加し、Dhcr24発現が増加、Irs1, Accの発現は低下し内因性コレステロール産生の増加ならびにインスリンシグナルと脂肪酸合成の低下が示唆された。2021年度はDHCR24阻害薬をdb/dbマウスに投与し血中ステロイドホルモンと副腎遺伝子発現の変化を検討した。

### 【方法】

8週齢雄db/dbマウスをDHCR24阻害薬U18666A 10mg/kg/週投与群(U群)と対照のPBS投与群(P群)に振り分け2週間薬剤投与ののち血液と副腎を採取し、ステロイドホルモン濃度の測定と副腎遺伝子発現を調べた。

### 【結果】

薬剤投与による体重や血糖値の群間差は認めなかった。血中ステロイドホルモン(コルチコステロン, アルドステロン)はともにU群でP群と比して有意に低下



した。副腎の皮質/髄質面積はU群で小さい傾向があり、副腎遺伝子発現では Cpt1a の低下ならびに Scd1, Fas の増加を認め脂肪酸分解の低下ならびに脂肪酸合成の増加が示唆された。

### 【考察】

肥満糖尿病モデルマウスへの DHCR24 阻害薬の投与により血中ステロイドホルモンの低下を認め、db/db マウス副腎での代謝変化の是正が示唆された。DHCR24 阻害薬は糖尿病病態におけるステロイドホルモン過剰分泌を是正し合併症の予防につながる可能性がある。

### がんによる宿主生理変容のメカニズム

河岡 慎平

(東北大学・京都大学)

がんは依然として我が国の主要な死因の一つである。2020年には、約38万人ががんで亡くなった。この数は総死者数の27%以上に相当する。がん医療の進歩をもってしても根治不能な症例が多く存在することを示唆するデータである。

根治不能ながんは個体にさまざまな悪影響をもたらす。例えばがんによる全身性の炎症や肝臓・脂肪における代謝異常、体重の減少や食欲の減退などを挙げられる。これらの異常はやがて患者の Quality of Life や治療感受性を減少させ、最終的に個体を死に至らしめる。

がんがどのようにして個体に悪影響を及ぼすのかという問題に関する我々の理解は限定的である。がんによって起こる症状が多様で、かつ、互いに関連しあっているために、その一つ一つを切り分けて理解することが難しいのである。ある一つの症状が「悪影響」なのか「個体によるがんへの抵抗」なのかを見分けることさえ難しい場合もある。

研究代表者は、がんによる宿主の病態生理という問題に対して、ある病態生理に重要な宿主側の因子を見つける、というアプローチで研究をおこなってきた。まず、がんをもつ個体の宿主臓器からマルチオミクスデータを取得する。本データを解析し、ある臓器にどのような問題が起こっているのか、また、どの因子が重要であり得るのかを絞り込む。次に、絞り込んだ因子を過剰発現あ

るいは欠失させた動物個体を作成し、改めてがんを発生させ、マルチオミクスデータを取得する。遺伝学的な介入によって緩和あるいは増悪する現象を探索する、というアプローチである。

最近、本アプローチによって、宿主にニコチンアミドメチル基転移酵素 (NNMT) が、がん起因する肝臓の代謝異常に重要な宿主因子であることを見出した。NNMT は S-アデノシルメチオニンからニコチンアミドへとメチル基を移し、1-メチルニコチンアミド (MNAM) を生成する酵素である。複数のマウスがん移植モデルを用いた実験から、がんの移植によって肝臓における NNMT 並びに MNAM の発現量が増加することを見出した。この増加の意味を探るために NNMT を欠失させたマウスを作成すると、NNMT の欠失によって MNAM が消失することがわかった。つまり、NNMT 欠失マウスでは、がん依存性 NNMT・MNAM の増加を完全にキャンセルすることができた。

次に、野生型・NNMT 欠失マウスにがんを移植し、肝臓におけるマルチオミクス解析を実施した。その結果、野生型では、がんの移植によってウレア回路の異常が起こることが判明した。ウレア回路とは、有毒なアンモニアを無毒なウレアへと変換する重要な代謝回路である。がんを移植した個体ではウレア回路を構成するアルギニンなどの代謝物が肝臓に蓄積し、血漿中のウレアの量が減少していた。興味深いことに、NNMT 欠失マウスでは、これらのウレア回路の異常が緩和されていた。さらに、ウレア回路の異常の緩和は、ウラシル生合成経路の異常の緩和と関連していた。以上の結果から、がんが肝臓のウレア回路・ウラシル生合成経路に異常を引き起こしていること、また、この異常には NNMT が必要であることが明らかとなった。

NNMT がどのようにしてウレア回路やウラシル生合成経路に関係しているかは、現時点では未解明である。手がかりとして、MNAM を処理したマウスの肝臓で、ウレア回路を構成する代謝物の一部が蓄積することがわかった。MNAM の増減がウレア回路に影響している可能性がある。また、本研究では、NNMT に依存しない異常（糖代謝の異常など）も複数同定された。言い換えると、がんによって生じるさまざまな異常を、NNMT への依存度によって切り分けることができた。

本研究では、NNMT ががん依存する肝臓の代謝異常を媒介する因子であることを発見した。今後は、そのメカニズムの解明、また、NNMT を必要としない異常についての研究を進めていきたい。

#### 【参考文献】

Mizuno, R., Hojo, H., Takahashi, M., Kashio, S., Enya, S., Nakao, M., Konishi, R., Yoda, M., Harata, A., Hamanishi, J., Kawamoto, H., Mandai, M., Suzuki, Y., Miura, M., Bamba, T., Izumi, Y., & Kawaoka, S.: (2022). Remote solid cancers rewire hepatic nitrogen metabolism via host nicotinamide -N- methyltransferase. *Nat Commun* 13, 3346.

### 成体における社会的行動異常に関与する大脳形成不全の原因の解明

川口 大地

(東京大学大学院薬学系研究科)

#### 【目的】

自閉症スペクトラムは、言語障害・コミュニケーション障害・限定された興味・反復行動などを主徴とする発達障害である。自閉症発症率は子供の 50-100 人に 1 人と高く、社会的にも大きな問題となっている。しかし、その発症原因について多くは不明である。これまでに、数割にのぼる多くの自閉症児について脳の局所（前頭前野など）における肥大が起こることが報告されている。前頭前野は言語機能や社会的行動の調節などを担う領域であり、前頭前野肥大化が自閉症発症に関与する可能性が十分に考えられるが、その関連は明らかになっていない。そこで本研究では、局所肥大を起こす分子メカニズムを明らかにすることを目指している。これにより、多くの自閉症患者に共通する疾患発症メカニズムの解明に繋がることを期待している。

近年、自閉症患者に特徴的な遺伝子変異を網羅的に探索する試みが活発に行われており、複数の FGF シグナル関連因子が自閉症原因候補遺伝子として挙げられている。FGF シグナルは発生過程において細胞増殖を制御して組織のサイズ決定に関与することが知られており、申請者はこのシグナルの異常が自閉症児にみられる前頭

前野肥大化に関与する可能性を考え解析を進めている。

#### 【方法と結果】

自閉症リスク因子に挙げられている FGF シグナル関連因子を胎生早期の大脳神経幹細胞特異的にノックアウトしたマウスを作成した結果、前頭前野が肥大すること、また、成体においてノックアウトマウスが自閉症様行動を示すことを見出した。また、自閉症患者においてみられる特徴である神経活動のバランス異常 (E/I バランス異常) が観察された。興味深いことに、異なる Cre 発現マウスラインを用いてニューロンに分化してから FGF 関連因子をノックアウトしても前頭前野の肥大や行動異常はみられなかった。これらの結果から、胎生期神経幹細胞における FGF シグナルの異常が脳肥大を引き起こすことで自閉症発症につながる可能性が示唆された。

#### 【考察】

本研究の結果から、局所脳肥大を伴う自閉症の発症メカニズムの一旦として、胎生期神経幹細胞における FGF シグナルの異常が関与する可能性が示唆された。自閉症研究は主に生後の自閉症症状を担う分子メカニズムの解析が中心となってきたが、本研究により胎生期において既に発症に関わる異常が引き起こされている可能性が考えられる。

### 腹内側核 PACAP 発現細胞の双方向性摂食調節メカニズムの解明と肥満症への関与

神戸 悠輝

(鹿児島大学大学院医歯学総合研究科)

#### 【序論】

厚生労働省「国民健康・栄養調査報告」によると、20 歳以上の人の肥満の割合は男性で 33.0%、女性で 22.3%と報告されている。肥満は単なる過剰体重だけでなく、心血管疾患、糖尿病、脂肪肝、肝硬変などの原因となることが知られている。このことから、新しい抗肥満薬の開発あるいは創薬ターゲットの探索は社会的に強く求められている。肥満の基準である BMI の遺伝率は約 40-70% と高いことが知られている。遺伝因子は主に視床下部に存在する摂食を調節する種々の神経ペプチド

およびその受容体と考えられている。PACAP もまた、視床下部に高発現する神経ペプチドで、体温調節あるいは摂食などエネルギー収支のバランスを制御する因子である事が報告されているが、PACAP による摂食調節メカニズムはそれぞれの報告で異なっており、詳細な解析が必要であった。

### 【方法と結果】

そこでまず、我々は PACAP-KO マウスを用いて、摂食量の検討を行った。その結果、10 週齢時において PACAP-KO マウスは、同腹仔のワイルドタイプ (WT) マウスと比較し、体重に顕著な差は観察されなかったにも関わらず、1 日の摂食量は有意に少なかった。さらに、2 日間絶食したそれぞれのマウスに対して餌を再度提示し、摂食量を測定すると、PACAP-KO マウスは WT マウスと比較して、摂食量が有意に少なかった。すなわち、PACAP は摂食を促進する神経ペプチドであると考えられた。続いて、摂食を促進する作用のある PACAP が発現する脳領域を探索するため、絶食下のマウスの脳標品に対し PACAP を認識する RNA プローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーションを実施すると、PACAP の mRNA 発現は、絶食に伴って視床下部腹内側核で顕著に増加した。さらに、*in situ* ハイブリダイゼーションの結果は、定量的 PCR によっても確認された。すなわち、視床下部腹内側核における PACAP は摂食促進作用を示すことが明らかになった。

しかし興味深いことに、1 日の摂食量をマウスの休息期である明期、あるいは活動期である暗期に分けて計測すると、WT マウスと比較して PACAP-KO マウスでは、明期の摂食量は増加傾向を示し、暗期の摂食量は有意に減少した。また、上述の様に視床下部腹内側核の PACAP は絶食に伴って増加することから、腹内側核に PACAP を過剰発現させるために、PACAP のコーディング領域をサイトメガロウイルスプロモータの下流に組み込んだアデノ随伴ウイルスを調製し、同ウイルスをマウス腹内側核に感染させた。この腹内側核 PACAP 過剰発現マウスの摂食量は、コントロールの腹内側核緑色蛍光タンパク質過剰発現マウスと比較して、明期に減少傾向を示し、暗期に有意に増加した。視床下部弓状核には、アグーチ関連ペプチド (AgRP, 摂食亢進ペプチド) およびプロオピオメラノコルチン (POMC, 摂食抑制ペプ

チド) が発現し、食欲を中心的に制御することが広く受け入れられている。そこで、腹内側核 PACAP 過剰発現マウス弓状核におけるこれら神経ペプチドの発現を、明期あるいは暗期に分けて測定すると、明期では POMC の、暗期では AgRP の発現が有意に増加することを見出した。一方で、過剰発現させた PACAP は明期・暗期間問わず増加傾向であった。すなわち、腹内側核 PACAP は、弓状核 AgRP あるいは POMC を介して、個体の状態依存的 (今回の研究では明期と暗期) に摂食を調節する可能性が明らかとなった。近年、弓状核の AgRP 発現細胞あるいは POMC 発現細胞に接続されるグルタミン酸含有細胞が、摂食を制御するホルモンであるレプチン (明期に高値) の作用によって比較的短時間において、接続相手を両細胞間でスワップすることが報告されている。一方、我々は PACAP が主にグルタミン酸含有神経細胞に共存することを明らかにしている。そこで、腹内側核 PACAP 発現細胞による明期・暗期間における双方向性の摂食調節メカニズムとして、腹内側核 PACAP 発現細胞から弓状核の AgRP 発現細胞あるいは POMC 発現細胞への神経投射先がスワップすると仮説した。そこで、PACAP プロモータの制御下で Cre リコンビナーゼを発現するノックインマウスの腹内側核に、Cre 依存的にシナプトフィジン EGFP キメラタンパク質 (軸索末端を緑色蛍光で標識) を発現させ、腹内側核 PACAP 発現細胞から弓状核 AgRP 発現細胞への神経投射をシナプトフィジン EGFP の蛍光強度により定量化すると、明期と比較して暗期では神経投射が有意に多い事が明らかとなった。以上の結果から、腹内側核 PACAP 発現細胞は、明期・暗期で神経投射をダイナミックに変えることで、明期では摂食抑制的、暗期では摂食促進的に作用する可能性が明らかになった。

この解剖学的に観察された現象の機能的評価を試みた。AgRP あるいは POMC プロモータの下流で RCaMP あるいは GCaMP (赤色あるいは緑色のカルシウムセンサータンパク質) を発現するアデノ随伴ウイルス (AAV) を開発し、PACAP-Cre マウスの弓状核に感染させた。さらに、腹内側核 PACAP 発現細胞の活動を特異的に調節するために、PACAP-Cre マウスの腹内側核に、Cre 依存的に hM3D (人工リガンド CNO で特異的に活性化される Gq 共役型受容体) を発現する AAV を感染さ

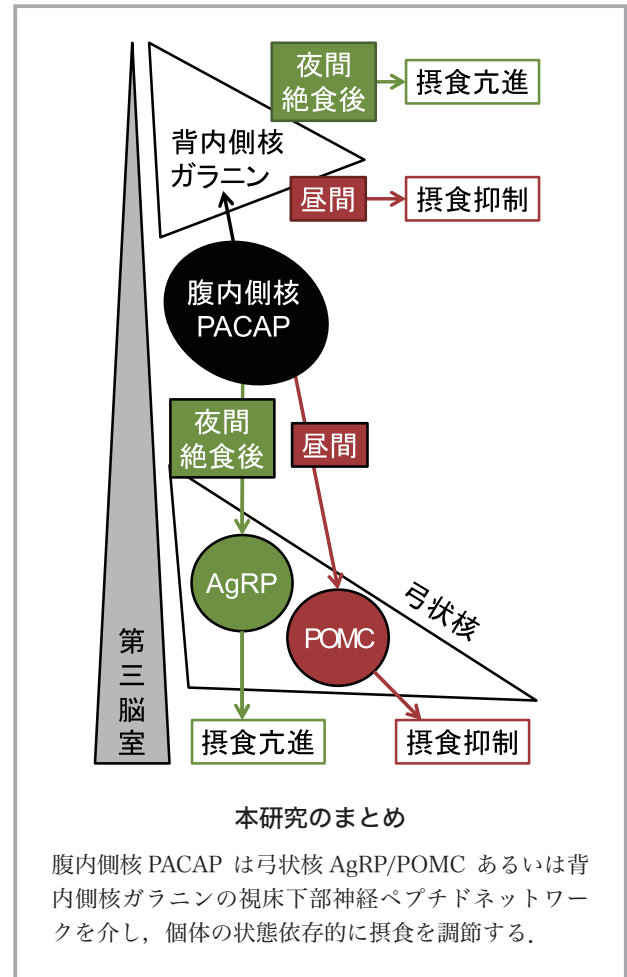
せた。その後、CNO 投与後の弓状核における赤色あるいは緑色の蛍光をファイバーフォトメトリーで計測すると、腹内側核 PACAP 発現細胞を活性化したときにおける、POMC あるいは AgRP 発現細胞の神経活動を同時に、自由行動下のマウスから測定できる。この実験系を利用して、夜間に CNO を投与した後、グレリンを脳室内投与した後において、POMC あるいは AgRP 発現細胞の神経活動を計測した。夜間に CNO を投与しても、GCaMP 蛍光強度の変化は観察されなかったものの、RCaMP 蛍光強度の減弱が観察された。すなわち、夜間に腹内側核 PACAP 発現細胞を活性化させると、弓状核 POMC 発現細胞の活動を抑制する可能性が示された。さらに、同様の処置をしたマウスの脳室内にグレリンを投与すると、弓状核 AgRP 発現細胞の発現する GCaMP 蛍光強度の変化は観察されなかったものの、弓状核 POMC 発現細胞の発現する RCaMP 蛍光強度の増強が観察された。この結果は、グレリンによる POMC 発現細胞の活性化を示唆する。一方、RCaMP および GCaMP を発現しているマウスを灌流固定し、組織学的な解析に供すると、光ファイバーが挿入されていた部位において RCaMP 陽性神経細胞が多数検出されたのに対して、GCaMP 陽性の細胞はほとんど観察されなかった。このことが、GCaMP の蛍光の増減が観察出来なかった理由と推察される。そこで、AgRP-GCaMP のプロモータ領域を最適化し、マウスに感染後、発現細胞を観察すると、弓状核の POMC-RCaMP を発現しない細胞において、緑色蛍光が観察された。

一方で、腹内側核 PACAP 発現細胞は視床下部背内側核にも非常に強く投射していた。非常に興味深いことに、背内側核もまた摂食調節において双方向性が報告されている領域である。背内側核は神経ペプチド・ガラニンが高発現する領域であることから、ガラニンの発現を検討すると、絶食によって増加し、この増加は PACAP-KO マウスでキャンセルされた。続いて、ガラニン発現制御における腹内側核 PACAP の重要性を検討した。その結果、腹内側核において PACAP を過剰発現あるいはノックダウンすると、ガラニンの発現は増加あるいは減少した。すなわち、ガラニンは腹内側核 PACAP の下流シグナルと推察される。そこで、背内側核のガラニンをノックダウンする目的で、背内側核にガラニンに対す

shRNA を発現させると、明期の摂食量は増加し、暗期あるいは絶食後の摂食量は減少した。これは、PACAP-KO マウスのフェノタイプと全く同じだった。

### 【考察】

以上の解析から、夜間に腹内側核 PACAP 発現細胞を活性化させると、摂食抑制系の弓状核 POMC 発現細胞を抑制する可能性が明らかとなった。申請者らはこれまでの報告において、腹内側核 PACAP 発現細胞は夜間に摂食亢進作用を惹起する可能性を示唆しており、その結果をサポートする重要なデータである。今回は、ファイバーフォトメトリー法を用いて、AgRP 発現細胞の神経活動を記録することが出来なかったが、AgRP プロモータの配列を最適化したことで、GFP の蛍光を観察することができた。今後は、この AAV を用いてファイバーフォトメトリー法を適用し、AgRP 発現細胞が上記と同条件において活性化することが確認できれば、非常に興味深い結果となる。一方で、グレリンは摂食亢進ホルモンであることから、グレリンの投与によって摂食を抑制する働きのある POMC 発現細胞を活性化したことは意



外であった。この理由は不明であるが、今後詳細に解析していく予定である。また、腹内側核 PACAP の下流シグナルとして、背内側核のガラニンを見出した。背内側核ガラニンもまた、腹内側核 PACAP と同様に双方向性の摂食制御を示すことが明らかとなった。

PACAP およびガラニンは摂食を促進する神経ペプチドである可能性があり、同シグナルを抑制する分子は抗肥満薬となりうる。加えて、PACAP およびガラニンによる摂食調節は、“状態依存的”な可能性がある。すなわち、食事は個体の生命活動に必須であり、過度な食欲の抑制は逆に健康を害すると考えられるが、PACAP およびガラニンは食への渴望が強い場合にのみ、摂食促進作用を発揮するかもしれない。この特徴をうまく利用すれば、肥満症患者の食物の過剰摂取のみを抑制できる安全な抗肥満薬の創薬ターゲットになる可能性がある。

**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

(日本医科大学)

**【目的】**

サルコペニアは、骨格筋の再生が正常に機能しないことにより起こる疾患である。骨格筋の再生は、骨格筋幹細胞の活性化、増殖、筋分化という大きく3つのステップを経て、連続的に行われる。この骨格筋再生過程の調節に中心的な役割を果たす細胞の一つがマクロファージである。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る。

**【方法】**

本年度は、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について、シングルセル RNA シークエンスにより解析した。

**【結果】**

再生過程のマウス骨格筋のシングルセル RNA シークエンス解析により、再生骨格筋組織中のマクロファージが様々なサブタイプ（亜集団）に分類されることを確認した。リガンド・レセプター解析の結果、これらのマク

ロファージ亜集団の1つが、他の亜集団よりも増殖中の骨格筋幹細胞と密接に相互作用していることが示唆された。このマクロファージ亜集団の機能を詳細に調べるには、マクロファージ集団全体からこの亜集団を分画することが必要である。そこで、シングルセル RNA シークエンス解析で得られた遺伝子発現情報をもとに、フローサイトメトリーに使用できる表面抗原マーカーの検証を行った。その結果、このマクロファージ亜集団が高い頻度で濃縮される条件を見出すことに成功した。今後、この条件下で分離されたマクロファージ亜集団が骨格筋幹細胞とどのように相互作用し、骨格筋再生に寄与するのか明らかにしていく予定である。

**グレリン分泌細胞における GPCR 発現解析および新規調節因子の探索**

小山 博之

(名古屋市立大学大学院医学研究科)

～研究1～

**【背景】**

サルコペニアは筋力と筋量の低下により QOL 低下や死の転帰を辿りうる疾患であり、早期診断と積極的な薬物介入は健康寿命を延伸し社会への貢献につながる。筆者はこれまで、グレリン細胞株を用いた網羅的遺伝子発現解析を行い高発現 GPCR を同定し、トリプトファンなどの栄養分子がグレリン分泌におよぼす影響および細胞内シグナル伝達経路の解明を行ってきた。ヒトにおいて複数の疾患でグレリン投与は食欲や骨格筋量を増やすことが報告されており (Nagaya *et al.*: *Circulation*, 2004 など)、サルコペニアに対する薬物治療としてグレリンは有望視されている。

薬物を含めた治療介入の効果・作用機序の解析にはモデルマウスが有用であるが、マウスはヒトと遺伝学・組織学的に相同性が高く加齢プロセスも類似するため、サルコペニアモデルとして老化マウスが多く用いられている。しかし、長期間飼育すると個体差が大きくなり、統計学的解析が困難になる問題点が存在する。一方、骨格筋量や筋力が低下する遺伝子改変マウスも数多く報告さ

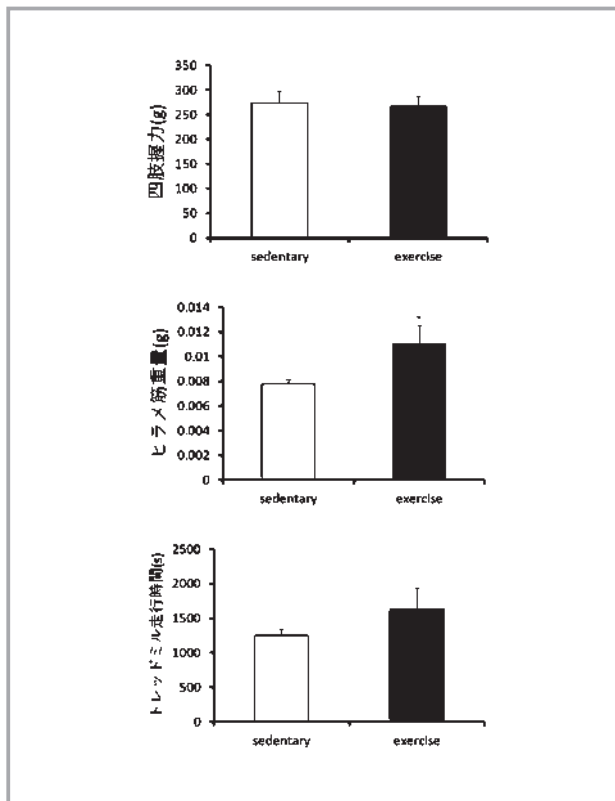
れているが、正常な加齢とは異なる外観や表現型を呈するためヒトへの外挿性に乏しい欠点がある。

### 【目的】

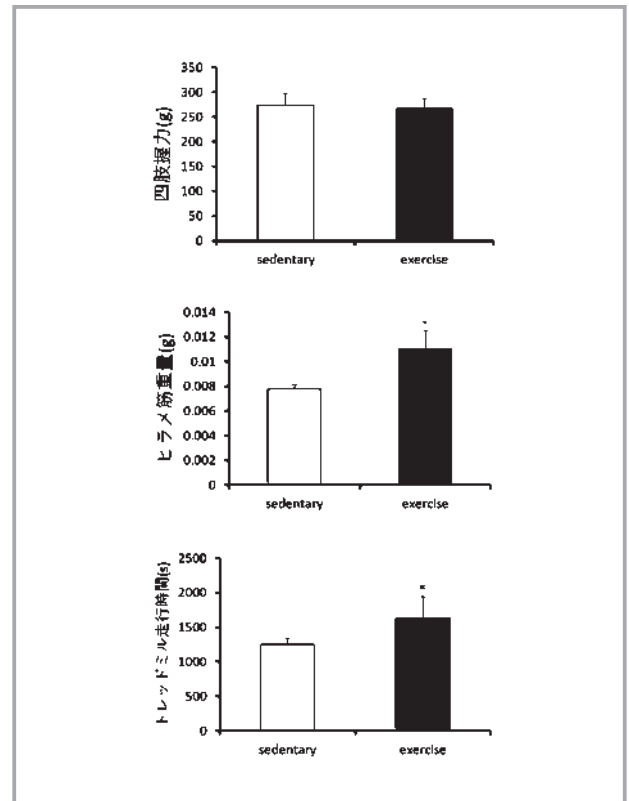
老化促進マウス SAMP1 がサルコペニアモデルマウスとして有用であることを証明する。

### 【結果】

18 週齢の SAMP1 マウスは対照マウス (SAMR) と比較して、サルコペニアの診断 (AWGS2019 サルコペニア診断ガイドライン) に必須の筋量・筋力・身体機能の低下を認めた (下図)。さらにヒトサルコペニアと共通する複数の表現型 (低栄養・耐糖能異常・テストステロン低下) を有していた。また、SAMP1 の血中デスアシングレリンおよび IGF-1 は有意な上昇を認めた。



次に、18 週齢の SAMP マウスを①回転かごを置いたケージで飼育した Exercise 群、②回転かごを置かない Sedentary 群に分け、8 週間飼育した。結果、Exercise 群は有意にヒラメ筋重量、トレッドミル試験走行距離が増加していた。



### ～研究2～

#### 【背景】

サルコペニアの診断に必要な骨格筋量の測定には DEXA や CT がガイドラインで推奨されているが、低侵襲・経済的・アクセス容易な超音波を用いた筋量評価の有用性に関する報告は多くない。

#### 【目的】

超音波で測定した甲状舌骨筋面積がサルコペニアの診断に有用であることを証明する。

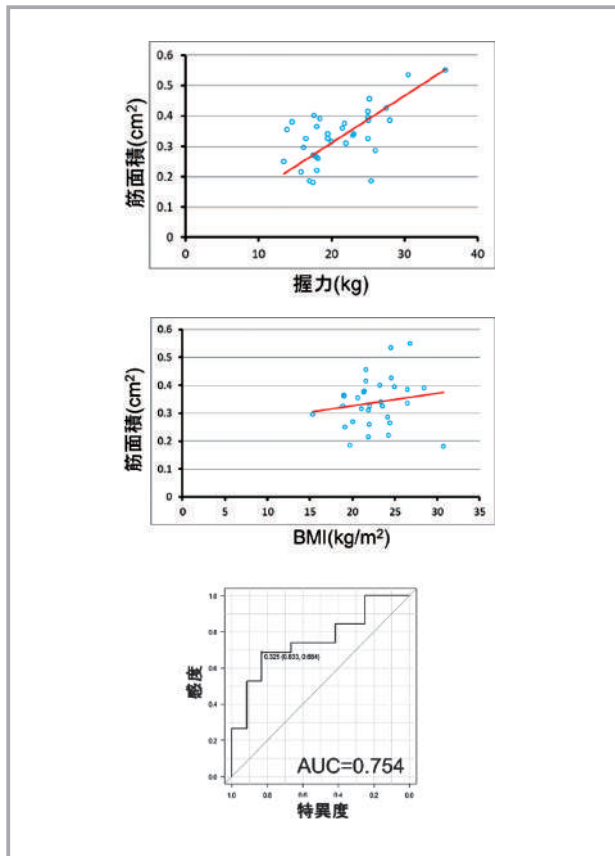
#### 【対象と方法】

2020 年 9 月～2021 年 3 月に名古屋市立大学病院で甲状腺超音波検査を受けた 65 歳以上の患者 31 人を対象に後ろ向き横断研究を行った。甲状舌骨筋の面積は両葉が最大径を示す横断画像を用いて計測し、面積と握力・年齢・BMI の相関を検討した。また、本研究では AWGS2019 診断ガイドラインに基づき握力が男性 28kg、女性 18kg 以下の場合をサルコペニアと定義し、サルコペニア診断における筋面積の有用性を ROC 解析にて検討した。

#### 【結果】

甲状舌骨筋面積は握力と正の相関を示した ( $r=0.613$ ,  $P=0.000112$ )。また、筋面積は年齢とは弱い

負の相関を示した ( $r=0.402$ ,  $P=0.0166$ ) 一方で BMI とは有意な相関を認めなかった ( $r=0.164$ ,  $P=0.378$ ). サルコペニア群は非サルコペニア群と比較して甲状舌骨筋面積は有意に低下していた ( $P=0.0079$ ) が, 年齢・BMI は両群で差を認めなかった. サルコペニアの診断における甲状舌骨筋面積の最適なカットオフ値は  $0.325\text{cm}^2$  (感度  $83.3\%$ , 特異度  $68.4\%$ ,  $\text{AUC}=0.754$ ) であった.



**【考察】**

AWGS2019 ではプライマリケアにて下腿周囲長測定が推奨されており, サルコペニアの予測モデルにおける  $\text{AUC}: 0.792\text{-}0.88$  との報告があるが, 本研究の方法はそれに匹敵する. 下肢周囲長は肥満・浮腫による過大評価や個人内変動のため正確ではない可能性があるが, 甲状舌骨筋量はそうした心配が少なく, 測定するエコー横断像は撮影方法としてコンセンサスがあり再現性も担保されることから, 今後, 本測定法のさらなる臨床応用を目指していきたい.

**オレキシン2受容体作動薬の活性立体配座制御に基づく新規誘導体の創製**

齊藤 毅

(筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構)

**【目的】**

オレキシンは, Gタンパク質共役型受容体 (GPCR) であるオレキシン受容体 ( $\text{OX}_1\text{R}$ ,  $\text{OX}_2\text{R}$ ) に作用することで睡眠覚醒や情動を制御する神経ペプチドである<sup>1)</sup>. オレキシン/ $\text{OX}_2\text{R}$ 系の機能不全が睡眠障害ナルコレプシーを引き起こすことが明らかになって以降,  $\text{OX}_2\text{R}$ 選択的作動薬はナルコレプシー治療薬として期待されている<sup>2)</sup>. これまでに我々は, 世界初の低分子  $\text{OX}_2\text{R}$  選択的作動薬 YNT-185 ( $\text{EC}_{50} = 28 \text{ nM}$  ( $\text{OX}_2\text{R}$ ),  $\text{OX}_1\text{R}/\text{OX}_2\text{R} = 100$ ) を見出し, ナルコレプシーモデルマウスにおいて顕著なカタプレキシー抑制作用を示すことを明らかにしている<sup>3,4)</sup>. しかしながら, YNT-185の活性発現に必要な構造情報は未だ明らかではなく, 更なる医薬品開発において詳細な構造活性相関の取得は重要である. そこで本研究では, YNT-185の活性立体配座の探索を目的として, 構造活性相関研究を実施した.

**【方法】**

YNT-185は, 分子内に柔軟性に富む鎖状エチレンジアミン構造を有し, 受容体ポケット内では特定の配座を取ることで活性を発現していると考えられる. つまり, 受容体との結合のためにエネルギー損失が伴っていることが示唆される. そのため, 活性発現に必要な活性立体配座を明らかにすることができれば, より強力な作動薬の創製に繋がると考えた. そこで, 鎖状構造を環化することで固定した新たな誘導体を設計, 合成し, オレキシン受容体作動活性を評価した.

**【結果】**

ナフトレン環を用いてアミド側鎖を伸長型と屈曲型にそれぞれ固定した誘導体を合成し, 評価したところ, 屈曲型誘導体がより強い  $\text{OX}_2\text{R}$  作動活性を示すことを見出した. さらに, 側鎖上アミド基の回転を制御するために隣接位に Me 基を導入したところ, 活性は大きく向上し, YNT-185を上回る活性を有する YNT-3757 ( $\text{EC}_{50}=9.21 \text{ nM}$  ( $\text{OX}_2\text{R}$ ),  $\text{OX}_1\text{R}/\text{OX}_2\text{R} = 16$ ) を見出すことに成功し

た<sup>5)</sup>。以上の結果から、屈曲した側鎖を有し、捻れたアミド基を介して芳香環が配向する配座がこれら OX<sub>2</sub>R 作動薬の活性立体配座であることが示唆され、この配座は OX<sub>2</sub>R とのドッキングシミュレーションの結果から支持された。続いて、本活性配座解析を踏まえ、より効率的な結合を実現するためにナフタレン環を還元したテトラリン型誘導体を設計、合成し、評価した。その結果、3メトキシフェニル酢酸アミドを側鎖上に有する誘導体 (R)-YNT-3708 が強力な OX<sub>2</sub>R 選択的作動活性を示すことを見出した (EC<sub>50</sub> = 2.69 nM (OX<sub>2</sub>R), OX<sub>1</sub>R/OX<sub>2</sub>R = 460)<sup>6)</sup>。

#### 【文献】

- 1) T, Sakurai. *et al.*: *Cell* **92**, 573-585 (1998).
- 2) M, Mieda. *et al.*: *PNAS*. **101**, 4649-4654 (2004).
- 3) T, Nagahara. *et al.*: *J. Med. Chem.* **58**, 7931-7937 (2015).
- 4) Y, Irukayama-Tomobe. *et al.*: *PNAS*. **114**, 5731-5736 (2017).
- 5) T, Hino. *et al.*: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **59**, 128530 (2022).
- 6) K. Iio *et al.*: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **59**, 128555 (2022).

#### 膵β細胞高血糖毒性感受性遺伝子の新規同定と解析

下 直樹

(和歌山県立医科大学)

#### 【背景】

2型糖尿病における慢性的な高血糖は膵β細胞機能障害を引き起こすことが示されており、高血糖毒性として知られている。一方、糖尿病治療による膵β細胞機能の改善も経験されるが、このような機能変化に関わる分子機序の全容は明らかでなく、未知の因子の関与が想定される。

#### 【目的】

高血糖毒性に対する感受性が高く、膵β細胞機能において重要な役割を果たす新規因子を同定し解析する。

#### 【方法・結果】

我々は、過食2型糖尿病モデルの *db/db* マウスに対する1週間の SGLT2 阻害薬投与により、高血糖毒性を

選択的に軽減し得ることを報告している (Shimo, N. *et al.*, 2015)。今回、本系の治療群と非治療群の膵島由来 mRNA を用いて microarray 解析を実施し、非治療群に比べ治療群で2倍以上の有意な高発現を示す43因子を抽出した。高血糖毒性に対し感受性の高いこれら遺伝子の中には、膵β細胞機能における役割は未知だが、GWASにおいて2型糖尿病疾患感受性遺伝子として報告 (Tabassum, R. *et al.*, 2013) されている Tmem163 が含まれており、ヒトの糖尿病病態との関連性を想定し、同因子の解析を進めることとした。マウスにおける局在に関し、免疫染色および免疫電顕での解析により、膵β細胞インスリン分泌顆粒 (SG) の顆粒膜への高度の限局が示唆された。膵β細胞特異的 Tmem163 ノックアウトマウス (KO) の経口ブドウ糖負荷試験において、血糖値は対照群に比べ有意な低値を、血漿インスリン値は有意な高値を示した。単離膵島のグルコース応答性インスリン分泌 (GSIS) も対照群に比べ有意な高値を示した。また電顕での解析にて、対照群に比べ SG の dense core 密度低下ならびに halo の消失が確認された。さらに対照群に比べ KO では、免疫染色にてインスリンの前駆体であるプロインスリンの分布が核周囲から細胞質全体へと変化しており、定量評価では膵島プロインスリン含量が増加傾向を示した。

#### 【考察】

以上より Tmem163 は、SG の成熟を介して、膵β細胞からの適切な GSIS の制御において必須の役割を果たしているものと推察される。上記インスリン分泌亢進や電顕における SG 成熟障害の像は、いずれも2型糖尿病初期に認められる所見であることから、本因子の2型糖尿病病態における意義を明らかにすべく、解析を続ける方針としている。

#### 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)

本研究では、社会的接触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 (Npbwr1) 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すことを確認した。さらに，Npbwr1 欠損マウスを独自に作成し，様々な行動テストを行った結果，このマウスは初めて対峙する相手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明らかになった。この時の心拍数，血圧を測定したところ，対照群に比べ顕著かつ持続的な上昇が見られた。また，恐怖記憶の形成に障害が観察された (Nagata et al., 2011)。これらの知見から，Npbwr1 を手がかりとして Npbwr1 が発現するニューロン (Npbwr1 ニューロン) の生理的役割を神経回路レベルで探索することで個体間距離を制御する分子・神経基盤の描出を試みる。

**【実験結果】**

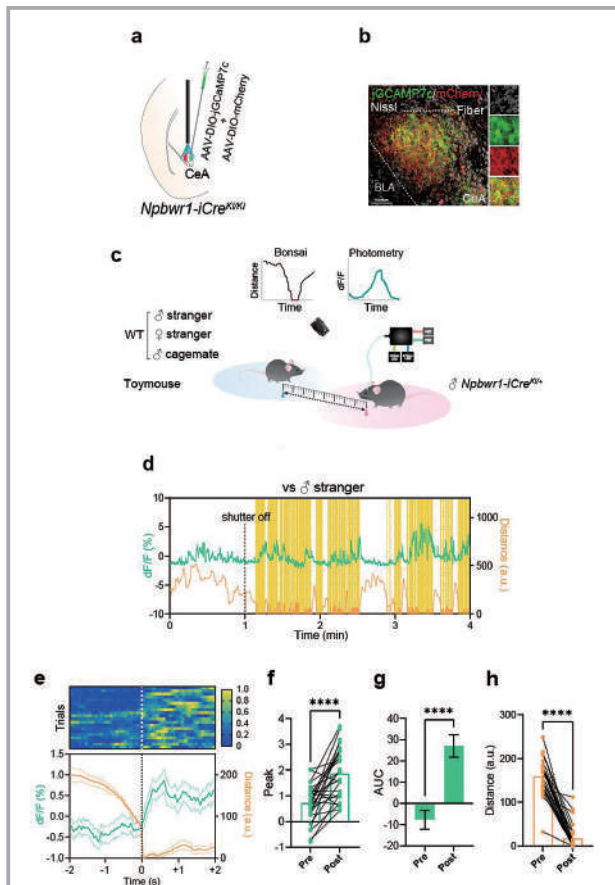


図1 Npbwr1 ニューロンのカルシウムイメージング  
a) *Npbwr1-iCre* の CeA に AAV-DIO-jRCaMP7c および AAV-EF1a-DIO-mCherry を投与した。

- b) 免疫抗体染色により jRCaMP7c および mCherry 陽性細胞を CeA において可視化した (スケールバー: 100 μm).
- c) ファイバーフォトメトリーを用いた社会行動実験の概要.
- d) 新規の雄マウスに対する社会行動中の Npbwr1 ニューロンのカルシウム動態
- e) 新規の雄マウスに対する社会的接触前後 (± 2 秒) の Npbwr1 ニューロンのカルシウム動態.
- f) 社会的接触前後 (± 2 秒) における平均最大蛍光強度.
- g) 社会的接触前後 (± 2 秒) における平均 AUC (Area Under Curve).
- h) 社会的接触前後 (± 2 秒) における平均個体間距離.

**【考察】**

本研究では，CeA の Npbwr1 ニューロンに着目し，見知らぬ他個体 (雄) に対する社会行動においてその活動がどのように変化するか観察した。その結果，CeA の Npbwr 1 ニューロンの活動は他個体と接触した時に増加することが明らかになった。したがって CeA の Npbwr 1 ニューロンは新規の個体との社会的接触を調節する役割があることが示唆される。今後は CeA の Npbwr 1 ニューロンが新規の雌マウスや慣れ親しんだケージメイト，マウスの形をした物体などに対してどのような応答をしめすのか検証する。

**ブタ LES において神経型ニコチン受容体刺激が引き起こす弛緩反応の機序**

田中 義将

(九州大学病院)

上記課題について Otsuka, Y. & Tanaka, Y. *et al.*: *Eur J Pharmacol* 2021 にて明らかにした。その後さらに消化管機能に関する研究として排便を制御する中枢神経の局在と役割についての検討に関する以下の研究を行った。

**【目的】**

排便は直腸平滑筋および肛門括約筋の協調運動により行われる。それらの障害により起こる便秘は，生活の質に影響を及ぼすととも近年，循環器疾患と脳血管疾患のリスク要因となり，生存率とも相関することが報告さ

れている。一方で、直腸平滑筋や肛門括約筋の収縮・弛緩には神経系の関与が報告されるが、排便中枢の局在や役割など未だ不明な部分が多く、光遺伝学的手法や化学遺伝学的手法を用いてこれを明らかにすることとした。

### 【方法】

まず、排便中枢の同定のために複数のシナプスに逆行性感染する仮性狂犬病ウイルス (pseudorabies virus; PRV) を肛門及び遠位結腸に注射し、脳内に標識される PRV を評価した。次に、これにより得られた排便中枢候補部位の機能を評価するために VGlut2-cre マウス、CRH-cre マウス、TH-cre マウスをそれぞれ用意し、これらマウスに対して光遺伝学的手法や化学遺伝学的手法を用いて遠位結腸内圧や肛門からのビーズ排出時間などの排便に関する各種評価を行った。

### 【結果】

PRV を用いたトレーシング実験においては橋に存在するバリントン核 (Bar) や青斑核 (LC) において PRV 標識ニューロンが確認された。Bar や LC に存在する VGlut2 陽性ニューロンに対する光遺伝学的手法による光刺激と連動して遠位結腸内圧上昇を引き起こし、Bar に存在する CRH 陽性ニューロンに対する光刺激は時間差があるが遠位結腸内圧上昇を引き起こした。いずれにおいてもビーズ排出時間や排便量の増加を認めた。一方で、LC に存在する TH 陽性ニューロンに対する光刺激は control 群と比較し有意な遠位結腸内圧変化やビーズ排出時間の短縮を引き起こさなかった。

### 【考察】

以上より Bar に存在する VGlut2 陽性ニューロン、CRH 陽性ニューロンが排便に関与する可能性が考えられた。また、それぞれが排便に対して異なるメカニズムで寄与することが想定された。

## メタボリックシンドロームにおける URAT1 のインスリン抵抗性の制御機構の解明

田中 祥朗

(東京慈恵会医科大学)

### 【背景・目的】

高尿酸血症と肥満やメタボリックシンドロームは関連

が強い事が報告されており、更に非アルコール性脂肪肝臓病 (NAFLD) やインスリン抵抗性 (IR) を引き起こす事が報告されている。URAT1 は腎臓に主に発現しており、高尿酸血症の発症に関与していると考えられているが、NAFLD や IR における病態生理学的意義に関しては不明な点が多い。我々は、URAT1 のメタボリックシンドロームにおける病態生理を明らかにするために肥満マウスを用いて検討を行った。

### 【手法】

16-18 週間、高脂肪食 (HFD) もしくは通常食 (NFD) を投与したマウスに対して URAT1 選択的阻害薬である

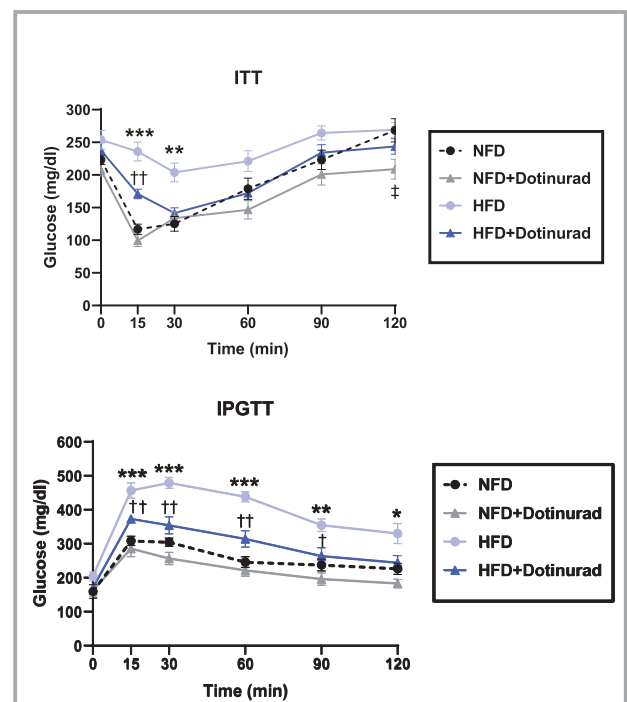


図 1

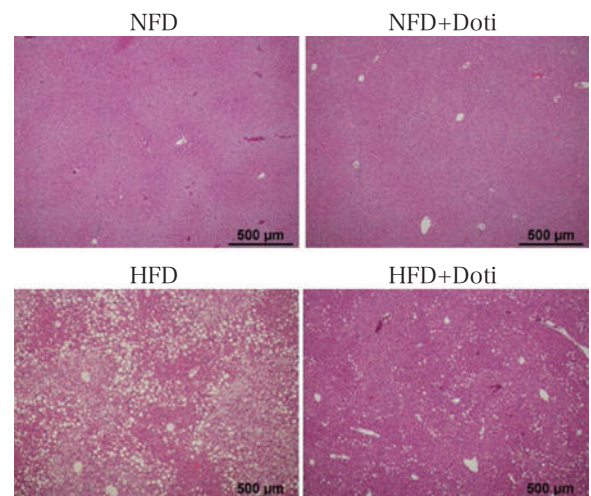


図 2

ドチヌラド (50mg/kg/day) を更に 4 週間投与を行った。

**【結果】**

インスリン負荷試験 (ITT), 腹腔内ブドウ糖負荷試験 (IPGTT) では, HFD 群で NFD 群と比較して顕著な IR の増悪を認めたが, ドチヌラド投与で顕著な改善を認めた (図 1)。また, URAT1 の mRNA の発現レベルは,

既報の通り腎臓で最も発現を認めており, 肝臓や褐色脂肪組織においても発現を認めた。HFD 群で褐色脂肪組織での URAT1 発現は, mRNA 及び蛋白レベルで顕著に増加していた。HFD 投与マウスの肝臓では, NFD 群と比較して顕著な脂肪肝を認めており (図 2), 肝臓組織の NAFLD score, 血清 ALT 活性, 組織 TNF $\alpha$ , Ccl2 の上昇が認められたが (図 3), ドチヌラド投与でこれらの変化が顕著に抑制されていた。更に, 褐色脂肪を観察したところ, 高脂肪食投与により褐色脂肪組織において顕著な脂肪滴の沈着 (Whitening) や褐色脂肪組織全体の ROS の産生が優位に増加していたが, ドチヌラド投与により減少しており (図 4), uncoupling protein 1 (UCP1) 蛋白発現の増加を認めており, rebrowning が促されている所見であった。

**【考察】**

URAT1 は NAFLD や褐色脂肪の白色化を介してメタボリックシンドロームの IR の増悪に寄与していると考えられた。URAT1 選択的阻害薬は高尿酸血症を合併した NAFLD や IR を背景とした患者に効果があると考えられた。

**【文献】**

Tanaka, Y., Nagoshi, T., Takahashi, H., Oi, Y., Yoshii, A., Kimura, H., Ito, K., Kashiwagi, Y., Tanaka, TD. & Yoshimura, M.: URAT1-selective inhibition ameliorates insulin resistance by attenuating diet-induced hepatic steatosis and brown adipose tissue whitening in mice. *Mol Metab.* 55: 101411; 2022.

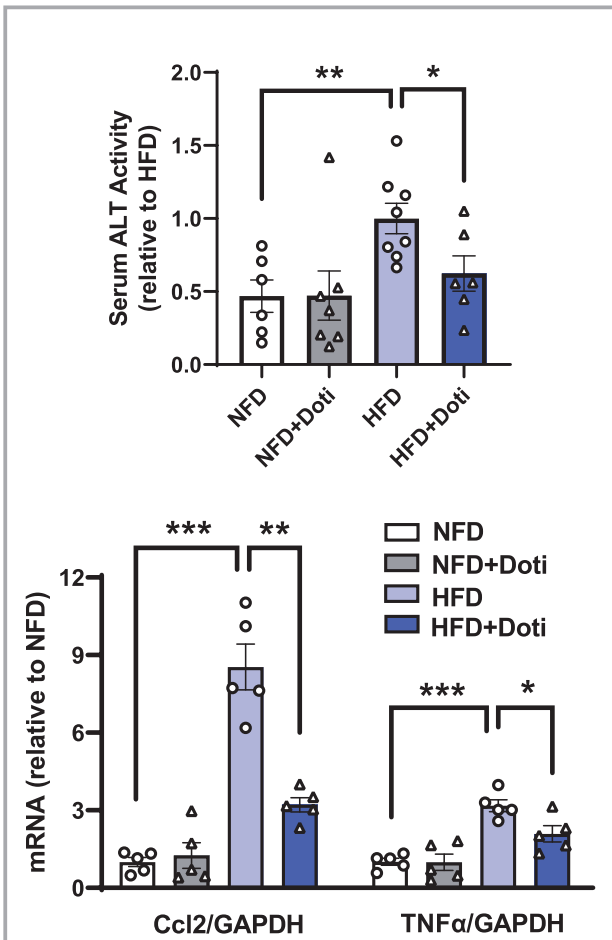


図 3

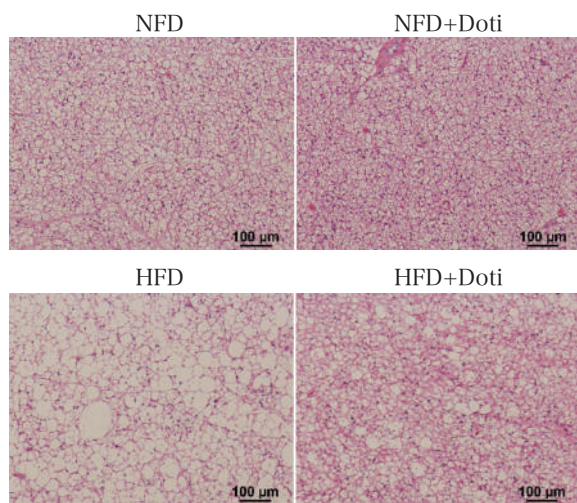


図 4

**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

(神戸大学大学院医学研究科)

**【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病態モデルにおいては前頭前皮質神経細胞の機能形態変化が情動変容に

重要であることが示唆されているが、その分子機序は未だに不明である。これまでの検討により、慢性ストレスがミトコンドリア過剰分裂を伴う樹状突起退縮を生じること、また、シナプスミトコンドリアを含むシナプス特異的にシナプス構造退縮を生じることが明らかにしてきた。その分子基盤を調べるべくプロテオミクス解析を実施し、シナプス特異的に糖輸送体や解糖系を担う酵素の発現亢進が生じること、すなわちシナプス特異的な中央代謝系変容が生じることを見出してきた。従って本研究においては、ストレスによる中央代謝系変容の実態と意義を明らかにすることを目的とする。

### 【方法】

慢性社会ストレスに供したマウスの内側前頭前皮質を回収し、キャピラリー電気泳動を用いた包括的メタボロミクス解析を実施した。さらに、発現亢進の認められた中央代謝系を担うタンパク質について、その遺伝子発現を抑制する人工マイクロRNAを発現するアデノ随伴ウイルスを両側の内側前頭前皮質に局所注入した上で慢性社会挫折ストレスに供し、その行動変化を社会相互作用試験や新奇物体認識試験、雌尿嗜好性試験を用いて調べた。

### 【結果と考察】

慢性社会ストレスにより、中央代謝系代謝物質並びにペントースリン酸回路の代謝物質の発現量亢進が明らかとなった。さらに、中央代謝系を担うタンパク質の発現抑制により、ストレスによる新奇物体認識の低下や、雌尿嗜好性（報酬嗜好性）の低下が減弱した。これらの知見は、慢性社会ストレスによる中央代謝系変容がうつ様行動を導くことを示唆する。今後は、中央代謝系変容の生じる意義や、中央代謝系変容が神経機能にもたらす影響について検討する予定である。

### 心臓圧負荷時における $p22^{phox}$ の分子メカニズムの解明

中田 康紀

(奈良県立医科大学循環器内科)

### 【目的】

NADPH オキシダーゼ (NOX) は、体内の活性酸素種 (ROS) の主要な供給源である<sup>1)</sup>。NOX ファミリー

の7つのメンバーのうち、NOX2 および NOX4 は心筋細胞でも豊富に発現している<sup>2)</sup>。NOX1-4 は、膜貫通タンパク質である分子量 22.0kDa の  $p22^{phox}$  と 1 : 1 の複合体を形成している<sup>3)</sup>。 $p22^{phox}$  の主な生理学的役割は、NOX と形成するヘテロダイマーの安定化であり、さまざまな臓器での ROS 産生に関与している。しかしながら、心筋細胞における  $p22^{phox}$  の正確な役割は未だ解明されておらず、本研究では心臓における内因性  $p22^{phox}$  の役割を明らかにすることを目的とした。

### 【方法と結果】

はじめに、ヒトの心臓サンプルで  $p22^{phox}$  の発現を確認したところ、心不全患者では健常者に比較して、 $p22^{phox}$  の発現が有意に増えており、マウスの胸部大動脈狭窄 (TAC) 後も同様に  $p22^{phox}$  の発現が有意に増えていた。そこで、心臓特異的  $p22^{phox}$  ノックアウトマウス ( $p22^{phox}$ -cKO) を作成し、TAC を施行したところ、 $p22^{phox}$ -cKO マウスではコントロールマウスと比較して、有意に心収縮能の低下を認め、肺重量も増加していた。次に、質量分析で  $p22^{phox}$  と結合するタンパクを調べたところ、心筋筋小胞体  $Ca^{2+}$ -ATPase (SERCA2a) が最も多い結果であった。そこで、 $p22^{phox}$ -cKO マウスの SERCA2a の発現量を調べたところ、コントロールマウスと比較し SERCA2a の mRNA の発現量に差は認めなかったが、SERCA2a のタンパク発現量が有意に減少していた。そこで、AAV9-SERCA2a を用いて、レスキュー実験を行ったところ、 $p22^{phox}$ -cKO マウス + AAV9-SERCA2a で TAC 後の心収縮力が保たれ、心不全増悪も抑制される結果であった。

### 【考察】

今後は、 $p22^{phox}$  がどのように SERCA2a を安定化しているかについて検討するとともに、 $p22^{phox}$  の心臓における ROS の産生調整などを明らかにする予定である。

### 【文献】

- 1) Maejima, Y., Kurodam J., Matsushima, S., Ago, T. & Sadoshima, J.: Regulation of myocardial growth and death by NADPH oxidase. *J Mol Cell Cardiol.* **50**, 408-16. (2011).
- 2) Schulz, E. & Munzel, T.: NOX5, a new "radical" player in human atherosclerosis? *J Am Coll Cardiol.* **52**, 1810-1812. (2008).

3) Bedard, K. & Krause, KH.: The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* **87**, 245-313. (2007).

**細胞競合を介した腫瘍形成機構の遺伝学的解析**

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。しかし、その分子メカニズムは全く分かっていなかった。本研究では、ショウジョウバエを用いた遺伝学的解析により、これを明らかにすることを目的とした。

**【方法】**

Yki の活性化による細胞競合を制御する因子を見つけるための遺伝学的スクリーニングを行った。具体的には、ショウジョウバエ複眼原基に Yki 活性化細胞集団と正常細胞集団をモザイク状に誘導し、正常細胞側のみ CRISPR-Cas9 ノックアウト変異（約 1500 遺伝子）を一つ一つ誘導していった際に、複眼の腫瘍形成が抑制される系統を探索した。この結果をもとに、さらなる遺伝

学的解析を進めることで細胞競合の分子メカニズムを解析した。

**【結果】**

正常細胞側にオートファジー関連遺伝子の変異が誘導されると、Yki の活性化による腫瘍形成が抑制された。解析を進めた結果、Yki 活性化細胞に近接する正常細胞ではオートファジーが活性上昇しており、これにより細胞死が引き起こされることが腫瘍形成に必要であることがわかった。そこで次に、正常細胞のオートファジー誘導に必要な Yki 活性化細胞のシグナルを解析した。その結果、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ており、これが周りの正常細胞のオートファジー誘導に必要であることがわかった<sup>1)</sup>。

**【考察】**

Yki 活性化細胞の TOR シグナルの活性化が正常細胞のオートファジー誘導に必要であることがわかったが、TOR シグナルを活性化しただけの細胞は周囲の正常細胞にオートファジーを誘導しないこともわかった。一方、*bantam* の過剰発現細胞は周囲の正常細胞にオートファジーを引き起こすことがわかったため、TOR シグナルに加え *bantam* の下流の何らかの因子が細胞競合を引き起こすのに必要であると考えられる（図 1）。今後は、これらの知見をもとに *bantam* のターゲットを解析することで、細胞競合を引き起こす十分条件を明らかにすることを目指す。

**【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).

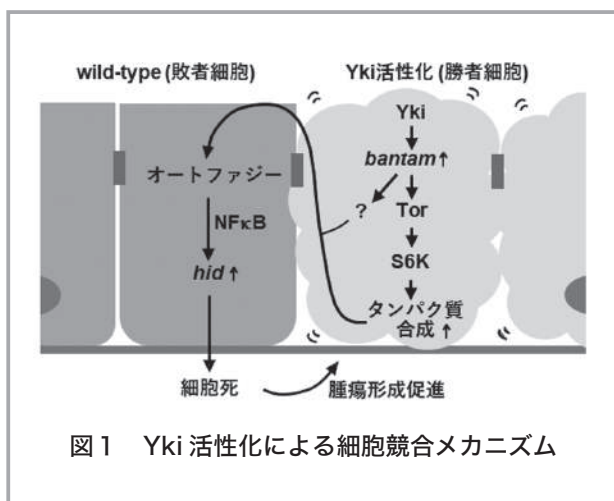


図 1 Yki 活性化による細胞競合メカニズム

## 神経ガイド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)

### 【目的】

神経由来セマフォリン 6D による情動と自律神経応答共役の制御機構解明

### 【方法】

神経細胞特異的セマフォリン 6D (Sema6D) 欠損マウスを用いて行動試験を行い, 神経細胞由来 Sema6D を介した中枢神経応答を評価した. さらに, 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神経細胞由来 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  $\beta 3$  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. 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った.

### 【結果】

Open field test, Elevated maze test などの行動試験を行なったところ, 神経細胞特異的セマフォリン 6D (Sema6D) 欠損マウス (*Sema6D<sup>CKO-Tau</sup>*) では不安様行動の増強を認めた (図 1). 次に高脂肪食負荷を行ったところ, *Sema6D<sup>CKO-Tau</sup>* マウスでは肥満抵抗性を認めた (図 2). また, 肝臓, 内臓脂肪, 皮下脂肪, 褐色脂肪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<sup>CKO-Tau</sup>* 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 (図 3). 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 (図 4).

情動と自律神経応答をともに制御する部位として大脳辺縁系の扁桃体が知られている. *in situ* hybridization を行ったところ, 扁桃体の抑制性ニューロンが Sema6D を高発現していた (図 5). さらに質量分析イメージングによる GABA の定量評価を行い, Sema6D 欠損マウスでは扁桃体の GABA 産生低下を認めた (図 6).

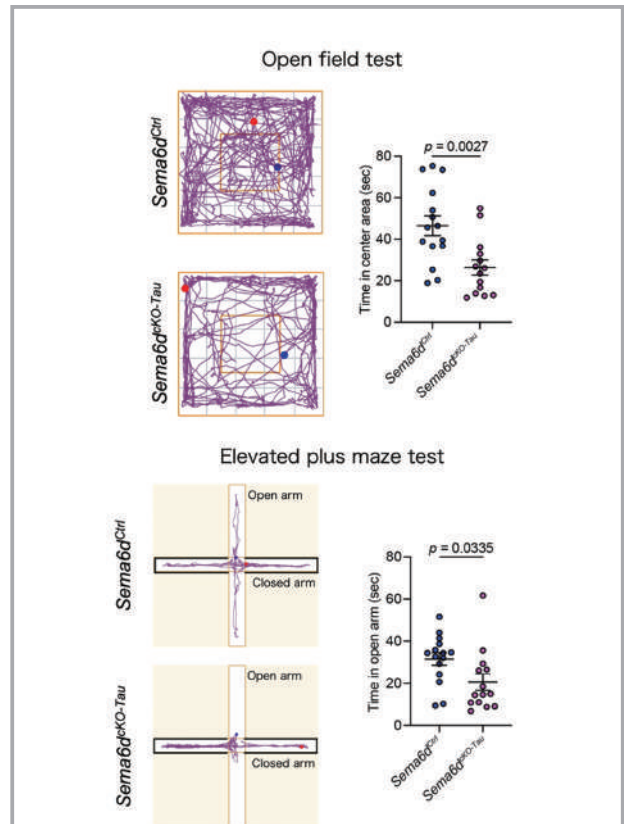


図 1 神経由来 Sema6D は不安応答を抑制する

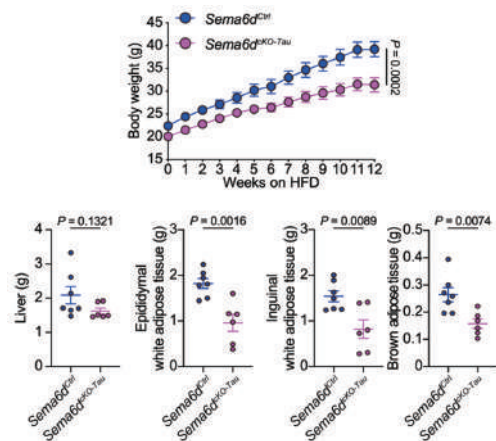


図 2 神経由来 Sema6D は全身代謝を制御する

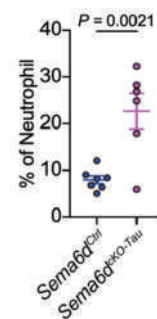


図 3 神経由来 Sema6D は代謝負荷下における造血を制御する

**【考察】**

以上の結果から、扁桃体の抑制性ニューロンに発現する Sema6D は GABA 産生を介して情動と自律神経応答を共役させることが明らかとなった。しかし、Sema6D による GABA 代謝のメカニズムは不明である。Sema6D は Plexin-A1/4 のリガンドとして神経ガイダンスを制御する一方、Plexin-A4 の受容体として細胞内代謝を制御する (*Nature Immunol* 2018)。抑制性ニューロンに Sema6D が発現しており、抑制性ニューロンが

GABA を産生することから、GABA 産生には Sema6D の逆行性シグナルを介した細胞内代謝制御が関与することが予想される。Sema6D を介した扁桃体抑制性ニューロンの細胞内代謝制御について今後検討していく予定である。

**【結論】**

扁桃体の抑制性ニューロンに発現する Sema6D は GABA 産生を介して情動と自律神経応答を共役させる。

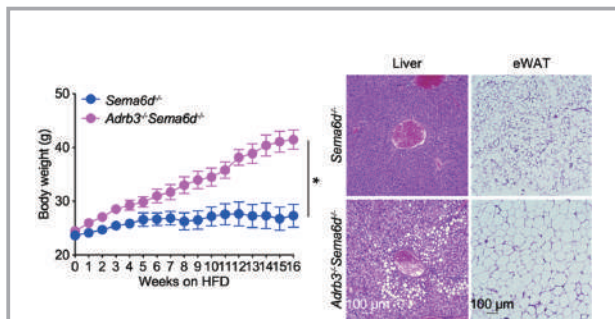


図4 Sema6D は交感神経応答を抑制する

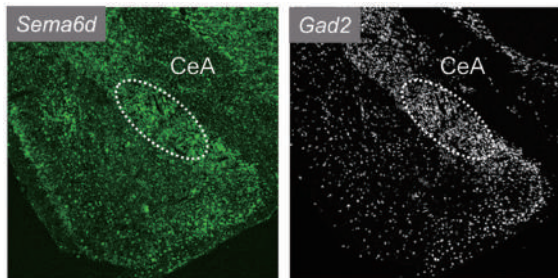


図5 Sema6D は扁桃体の抑制性ニューロンに高発現する

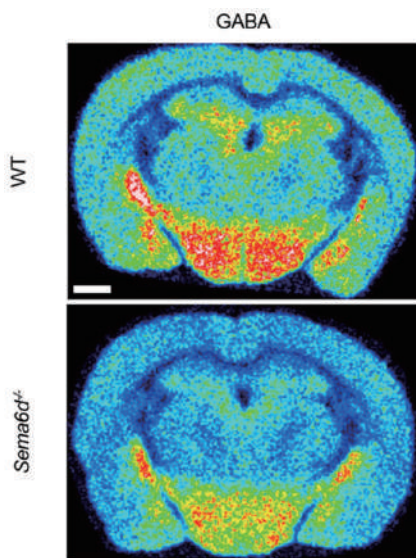


図6 Sema6D は GABA 産生を担う

**慢性活動性 EB ウイルス病に対するボルテゾミブの抗腫瘍、抗炎症効果**

西尾 美和子

(東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科)

**【目的】**

慢性活動性 Epstein-Barr virus 病 (Chronic active EBV disease: CAEBV) は、EB ウイルスに感染した T 細胞もしくは NK 細胞がクローナルに増殖、多臓器に浸潤し、感染細胞の活性化が生じて、全身臓器の慢性炎症が生じる重篤な疾患である。現在の治療法は造血幹細胞移植のみであり、有効な薬剤はない。

本研究では、プロテアソーム阻害剤であるボルテゾミブに着目し、細胞株と患者腫瘍細胞を用いて CAEBV に対する抗腫瘍、抗炎症作用を検討した。

**【方法、結果】**

EB ウイルス陽性 T/NK 細胞株および CAEBV 患者腫瘍細胞を用いてボルテゾミブを作用させた。ボルテゾミブは EB ウイルス陽性 T/NK 細胞株において生存細胞数抑制および Annexin V 実験によりアポトーシス誘導に働くことが示された。またウエスタンブロット法により ER ストレス関連分子 (Bip) の発現誘導が確認され、Bip 下流にあり生存促進因子である NF-κB を抑制し、アポトーシスを誘導することを示した。

次に CAEBV 患者から得られた EB ウイルス感染細胞を含む PBMC をボルテゾミブで処理することにより、細胞生存の抑制を示した。qRT-PCR 法により炎症性サイトカイン (*IFN $\gamma$* , *TNF $\alpha$* ) 発現の抑制がみられた。

最後に CAEBV の異種移植片移植マウスを作製し、ボルテゾミブの効果を検討した。コントロール群と比較し

て有意に末梢血中 EBV-DNA 量が減少した。また炎症性サイトカイン濃度の減少もみられた。

#### 【考察】

本研究で、ボルテゾミブは EB ウイルス陽性 T または NK 細胞の細胞生存および炎症性サイトカイン産生を抑制した。ボルテゾミブは CAEBV に対して、抗腫瘍のみならず、抗炎症効果を有した魅力的な治療薬であることが示唆された。

#### 【文献】

Yoshimori, M. *et al.*: Antineoplastic and anti-inflammatory effects of bortezomib on systemic chronic active EBV infection. *Blood Adv.* 2021; 5(7): 1805-15. 2021.

### オートファゴソーム形成とグリセロリン脂質合成系の密接な関係

西村 多喜

(東京大学医学系研究科)

#### 【目的】

オートファゴソーム形成はダイナミックな膜伸長や膜動態を伴う現象であるにも関わらず、膜脂質の供給源やリン脂質代謝系との関連に関しては不明な点が多く、またオートファジー関連 (ATG) 分子に存在する両親媒性  $\alpha$  ヘリックス (AH) がオートファゴソーム形成過程においてどのような機能を果たしているのか、その詳細な分子機構はよく分かっていない。そこで本研究では、これらの生物学的な謎に迫ることにした。

#### 【方法】

生化学的な手法によりオートファゴソーム関連膜精製系の確立に取り組むとともに、オートファゴソーム初期構造体が蓄積する条件下でリン脂質代謝系に焦点を当てた局在スクリーニング解析を行なった。ATG 分子に存在する AH の機能解析に関しては LC3 脂質化の最終ステップに関与する ATG3 に注目した解析を中心に行い、さらに ATG3-AH に共通した特徴を見出すため Python を用いた配列比較解析に取り組んだ。

#### 【結果】

局在スクリーニング解析では、ホスファチジルイノシ

トール合成酵素などのリン脂質合成系が蓄積することを見出し、小胞体膜上の PI が減少した条件下ではオートファゴソーム形成が著しく阻害されることが分かった。ATG3-AH は他の一般的な AH とは異なる特有の生物物理学的な物性を有しており、その特徴が機能にも必須であることが分かった。

#### 【考察】

本研究を通して、小胞体膜上でも特にリン脂質合成が盛んな場所の近傍でオートファゴソーム形成が開始されることが明らかになった<sup>1,2)</sup>。また、ATG3 の AH が他の分子では相補出来ないユニークな機能を果たしていることが示された。複雑な酵素反応の中で AH が実際にどのような機能を果たしているのかは、今後詳細に検証すべき課題である。

#### 【文献】

- 1) Nishimura, T. *et al.*: Autophagosome formation is initiated at phosphatidylinositol synthase-enriched ER subdomains. *EMBO J.*, **36**, 1719-1735 (2017).
- 2) Nishimura, T. *et al.*: Emerging roles of ATG proteins and membrane lipids in autophagosome formation. *Cell Discov.*, **6**, 32 (2020).

### 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)

#### 【研究背景】

腸内細菌は、宿主における糖質、脂質およびビタミンといった栄養素の消化・吸収に不可欠であると共に、短鎖脂肪酸や胆汁酸などの代謝物を介した全身の恒常性維持機構において重要な役割を果たしている。腸内細菌の種類、局在、数量および多様性に影響を及ぼす主要因として腸管運動機能が注目されてきたことは理にかなうことであるが<sup>1)</sup>、最近の研究にて、腸内細菌自体が宿主の腸管神経の発達や維持に必須の役割を果たし、逆に腸管運動機能を制御している可能性が示唆されたが詳細は不明である。すなわち、腸内細菌叢変化が腸管運動機能異常を病態とする慢性便秘症、過敏性腸症候群さらには慢



性特発性偽性腸閉塞症の原因となることを示すものである<sup>2)</sup>。本研究の目的は、腸内細菌を標的とする腸管運動機能異常に起因する疾患群の新規治療薬の開発を目指して、腸内細菌が腸管運動機能に及ぼす影響とその機序を解明することである。

【方法】

通常の腸内細菌を有するマウス (SPF), 無菌マウス (GF), 単一菌種定着ノトバイオームマウス (EC: *E.coli* 或は LB: *Lactobacillus*) に, *in vivo* 消化管運動機能, *ex vivo* 腸管平滑筋収縮機能, Nanostring による腸管組織遺伝子発現, 蛍光免疫染色による筋間神経叢の蛋白質発現評価を行った。

【結果】

胃排出機能は各群間に有意な差を認めなかった。腸管運動機能は, GF 群でその他の群と比較して有意に低下し, 経口金属ビーズの透視下観察では特に上部小腸の蠕動低下を認めた (図 1)。腸管平滑筋収縮能に関して, カルバコール刺激による筋原性収縮能は各群間に有意な差を認めなかったが, Field stimulation による収縮性は SPF 群と菌定着群で, GF 群と比較してコリン作動性神経が亢進し, 強い収縮性を示した。一方, 腸神

経のアセチルコリン産生酵素 (ChAT) の発現は各群間に有意な差を認めなかったが, それと共局在する神経に Vasoactive intestinal peptide (VIP) の発現は腸内細菌が存在する 3 群は GF 群のそれと比較して有意に強い発現を認めた (図 2, 3)。

【考察】

VIP 発現量は腸管運動機能と有意な正の相関を認め, 腸内細菌が腸神経の発達を制御することが示唆された。さらに, EC (グラム陰性菌) 群における VIP 発現量と腸管運動機能は LB (陽性菌) 群と比較して有意に亢進しているため, Toll like receptor (TLR) や腸管自然免疫の関与が考えられた。TLR 経路が活性化されない MYD88<sup>-/-</sup>TRIF<sup>-/-</sup>マウスを用いて, 無菌条件, SPF 環境条件およびノトバイオーム条件における VIP 発現量と腸管運動機能を評価する予定である。

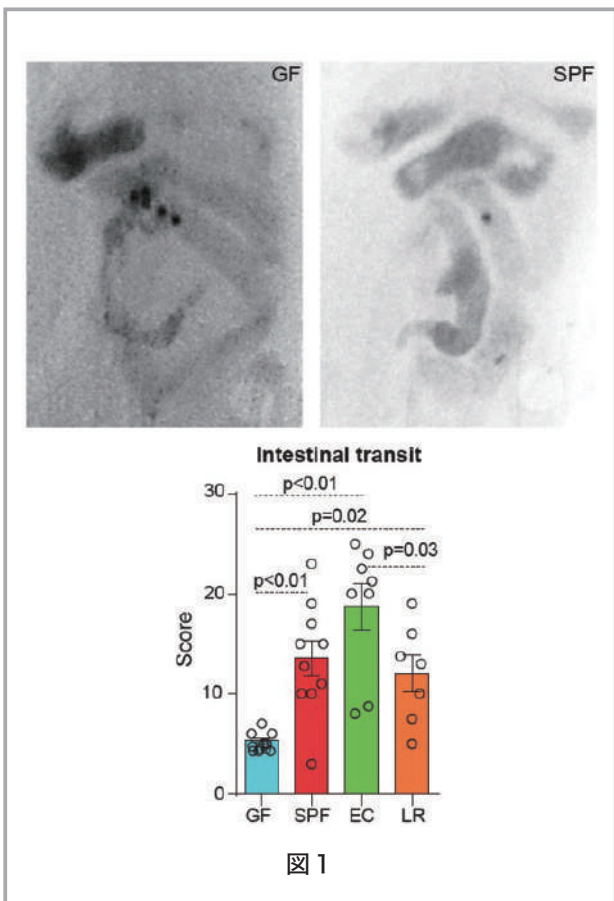


図 1

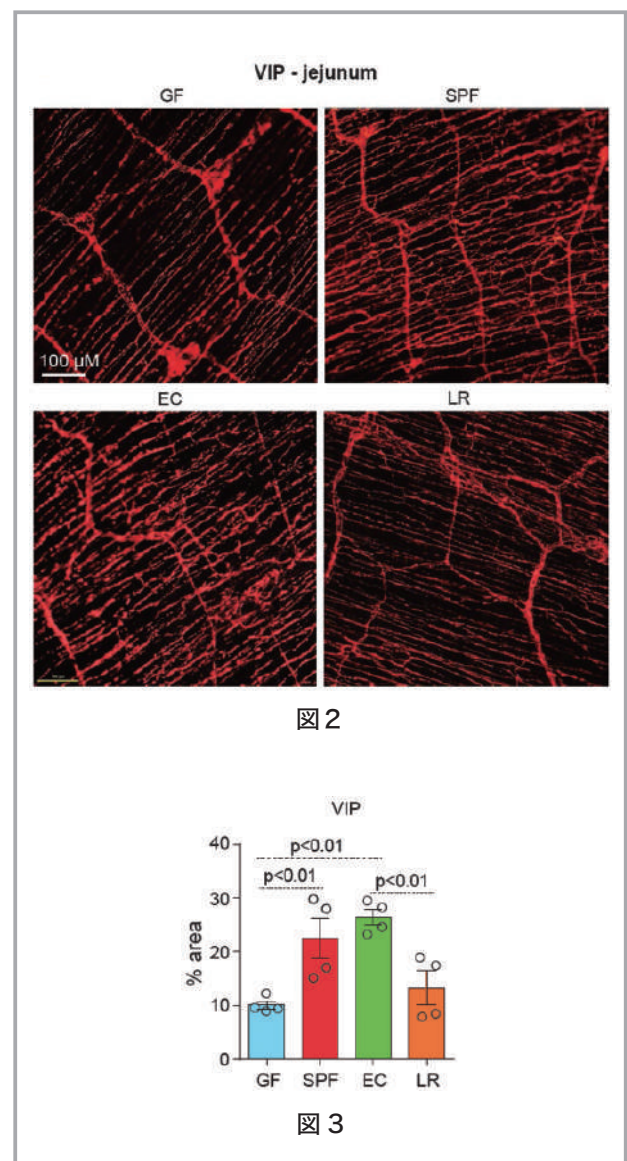


図 2

図 3

## 【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.

栄養への応答と代謝恒常性を支える全身性およびエピジェネティック制御機構の解明

服部 佑佳子

(京都大学大学院生命科学研究所)

## 【背景・目的】

栄養環境は、個体の成長のみならず、成体や次世代にまで影響を与える。しかし、様々な栄養環境に動物がどのように応答し適応しているかには、不明な点が多い。我々はこれまでに、ショウジョウバエ近縁種群のマルチオミクスによる比較解析を行ってきた。そして、自然界で様々な果物を食べるキロショウジョウバエ (*D. melanogaster*) の幼虫では、全身性の TGF- $\beta$ /Activin シグナル伝達経路 (Activin 経路) が、筋肉や腸、脂肪体などの体細胞において代謝遺伝子の発現を負に制御することで、代謝の恒常性を維持し、高炭水化物食下での幼虫期の成長に寄与することを見出した。一方、自然界で低炭水化物の果物しか食べないセイシェルショウジョウバエ (*D. sechellia*) では、そのような機構が働かず、高炭水化物食に適応できないことを明らかにした (Watanabe *et al.*: *Cell Reports*, 2019)。本研究課題では、ヒストン修飾酵素によるクロマチン構造の制御が、高炭水化物食への適応に果たす意義とその分子機構について解析を行う。加えて、オス成熟個体の生殖細胞における Activin 経路が、高炭水化物食下での生殖機能に果たす役割の解明を目指す。

## 【方法・結果】

- 1) 高炭水化物食下での個体成長を支えるクロマチン制御機構の解析

*D. melanogaster* の野生型および変異体、そして、*D. sechellia* の幼虫全身を用いて、CUT&RUN 法によ

るヒストン修飾のゲノムワイドなプロファイリングと、RNA-seq による遺伝子発現解析を行った。これらの解析を統合し、高炭水化物食下でヒストン修飾酵素によって発現制御を受ける遺伝子群を同定した。現在、変異体や *D. sechellia* において、これらの遺伝子群の発現調節不全によって、どの組織にどのような異常が生じているかの解析を行っている。

- 2) 高炭水化物食下での生殖機能を支える Activin 経路の解析

体細胞とは対照的に、高炭水化物食下において Activin 経路はオスの生殖細胞で高く発現する遺伝子群を正に制御することを見出していた。そこで現在、生殖細胞特異的に Activin 経路を阻害したオスの生殖能力や、精子数、精巣における遺伝子発現や代謝産物量の解析を行っている。

## 【考察】

今後、栄養バランス変化に対して、クロマチン構造がどのように調節されて適応を支えているか、そして、どの組織における遺伝子発現調節が適応に役割を担っているかを中心に解析を進めていく。一方、生殖細胞における Activin 経路については、精巣の代謝フラックス解析なども行うことで、生殖機能を支える上での役割を明らかにする予定である。

摂食関連 GPCR の活性化・不活性化における分子メカニズム解析

濱本 明恵

(岐阜大学工学部)

## 【目的】

エクソソームは直径 50-150 nm ほどの大きさで、細胞から分泌される細胞外小胞である。細胞間の情報伝達に重要な役割を担い、近年ではドラッグデリバリーシステム (DDS) としての利用が期待されている。我々は、このエクソソームに G タンパク質共役型結合受容体 (GPCR) を含有させ、DDS のように活用することを考えた。しかし、現在エクソソームに存在する GPCR は報告数が少なく、中でも摂食関連 GPCR の報告はない。そこで、今回はメラニン凝集ホルモン受容体 (MCHR1)

に着目した。MCHR1 は摂食中枢で広く発現しており、拮抗薬投与・欠損マウスによりヤセ傾向を示すことから摂食亢進 GPCR として知られている。

### 【方法】

MCHR1 安定発現細胞から細胞培養液を回収し、アフィニティー精製キットでエクソソームを精製後、HEK293 細胞に添加し、WB 法、RT-PCR、細胞免疫染色法、レポーターアッセイにより MCHR1 の発現と機能を解析した。

### 【結果・考察】

MCHR1 安定発現細胞の細胞培養液から精製したエクソソームを用いて WB 法、RT-PCR 法を行ったところ、エクソソームマーカーおよび MCHR1 の存在が確認された。また、エクソソーム放出量や MCHR1 の含有量はリガンド添加により増加する傾向が見られた。さらに、HEK293 細胞に MCHR1 含有エクソソームを添加して 3 時間後に MCHR1 の発現が確認された。また、MCHR1 安定発現細胞と HEK293 細胞の 48 時間の共培養においても MCHR1 がエクソソームを介して送達される様子が確認された。続いて、送達された MCHR1 が機能的に働かレポーター解析を行ったところ、MCHR1 添加により NFAT 活性が上昇した。最後に、エクソソームに存在する MCHR1 は糖鎖付加されていたことから、糖鎖付加阻害剤（ツニカマイシン）処理および MCHR1 の糖鎖付加部位を置換した変異体を現在解析中である。

以上より、エクソソームに MCHR1 が発現し、エクソソームを介して MCHR1 が他の細胞へと送達され機能することを初めて明らかにした。本研究により、エクソソームによる GPCR の送達機構が解明され、新規 DDS としての GPCR 含有エクソソームの活用が期待される。

## 虚血性心疾患に対する精密医療の推進

原 弘典

(東京大学医学部附属病院)

### 【背景・目的】

高齢化に伴い、冠動脈内の動脈硬化の進行が原因で起こる虚血性心疾患は増加し、多様化も進行している。現在、重症冠動脈病変患者に対し、冠動脈バイパス術

(CABG)、経皮的冠動脈形成術 (PCI) が広く普及しているが、治療選択に関しては多く議論されている。

患者個人の疾患背景に基づいて算出されるリスク予測モデルは、各々の患者が治療を選択する上で一助となりうる。血行再建前のベースラインの特徴（年齢、腎機能、糖尿病、左室駆出率、左冠動脈主幹部病変、冠動脈病変の解剖学的な複雑さ (SYNTAX score)、喫煙、慢性閉塞性肺疾患、末梢動脈疾患）をもとに、血行再建 (PCI, CABG) 後、5/10 年間の死亡、5 年間の死亡/心筋梗塞/脳卒中の予後を予測するモデルとして SYNTAX Score II 2020 が提唱されているが、日常臨床への適応という観点では、十分な検証がなされていない。

### 【方法・結果】

CREDO-Kyoto PCI/CABG レジストリーは、冠動脈血行再建術 (PCI または CABG) を初めて施行した連続 30866 症例に対して、5 年間、有害事象をフォローした日本で行われた観察研究である。このうち、重症冠動脈病変（三枝病変または左主幹部病変）を有する 7361 症例を対象に SYNTAX Score II 2020 の正確性を検討、その結果を基に、各々の患者において PCI または CABG のいずれを選択すべきかの検討も行った。

SYNTAX Score II 2020 における 5 年後の予測死亡率と CREDO-Kyoto PCI/CABG レジストリーにおける 5 年後の死亡率とは、PCI 後、CABG 後ともに非常に高い相関が示された<sup>1)</sup>。一方で死亡・心筋梗塞・脳卒中の複合エンドポイントの予測能力には乏しかった。

予測精度の高い 5 年後の死亡に関しては、日常臨床における冠動脈血行再建術の選択 (PCI または CABG) に適用できるように PCI と CABG の 5 年後の予測死亡率の差をもとに解析を行った。予測死亡率の差 (PCI 後の予測死亡率-CABG 後の予測死亡率) が 4.5% 以上であれば CABG が望まれ、それ以外のケースでは、PCI あるいは CABG の選択において予後に差は認めなかった。

### 【考察】

日本における日常臨床のレジストリーデータから、統計学的アプローチをもとに PCI または CABG の選択基準を提示した。最終的な治療選択は、SYNTAX Score II 2020 で考慮されている患者背景のみによるわけではないが、リスク予測モデルが治療選択を提示することは、患者の治療選択に役立てられると考えられる。精密医療

のために今後もリスク予測モデルの刷新，創出が望まれる。

## 【文献】

- 1) Hara, H., Kimura, T., Serruys, PW. *et al.*: External Validation of the SYNTAX Score II 2020. *J Am Coll Cardiol* 2021; **78**(12): 1227-1238.

### 高齢者急性腎障害における DNA 修復因子を介した アニオントランスポーター制御機構の役割の解明

菱川 彰人

(慶應義塾大学医学部)

## 【研究成果の概要】

近年，連続した2回目の急性腎障害（AKI）は1回目より腎障害が軽減されるというプレコンディショニング効果が報告されているが，DNA 損傷修復との関連は明らかではなかった。本研究では AKI およびそのプレコンディショニング効果と DNA 損傷修復との関連について，尿細管細胞における DNA 修復因子 KAT5 を中心に解析を行ない，KAT5 が Cl チャネル KCC3 発現調節を介して AKI のプレコンディショニング効果に参与する可能性を見出した。

## 【研究の背景・目的】

慢性腎臓病（CKD）患者数は世界的に増加傾向にあり，有病率は10%を超え，年間約100万人の死亡原因となっている。一方，急性腎障害（AKI）も増加傾向にあり，米国ではこの10年で2倍以上に増加している。AKI 症例の一部は CKD に移行することや，特に高齢者においては AKI の増悪リスクが高く，AKI 予防策の確立は腎臓病診療における最も重要な課題の一つである。

近年，連続した2回目の AKI は1回目より腎障害が軽減されるという「プレコンディショニング効果」が報告されており，AKI 予防策を解明する現象と期待されているが，その分子基盤は明らかではない。申請者は最近，腎糸球体ポドサイトにおける DNA 二本鎖切断（DSB）修復因子 KAT5 の発現低下が DNA 損傷修復不全に関連する DNA メチル化変化を惹起する可能性を見出した（*Cell Rep* 2019）。AKI では DNA 損傷が惹起されることも報告されており，今回 KAT5 と AKI およびそのプ

レコンディショニング効果との関連について特に糸球体濾過率の調整を担う糸球体尿細管フィードバック機構に参与するアニオントランスポーターの発現調整に注目して検討することを目的とした。本研究を通じ，AKI における KAT5 を介した DNA 損傷修復応答の病態生理的重要性，アニオントランスポーター調節機構の分子基盤が世界で初めて明らかになり，AKI の新規治療標的が同定される可能性が期待される。

## 【研究の成果】

野生型（WT），近位尿細管特異的 KAT5 ノックアウトマウス（KO）での両側腎虚血再灌流（IR）モデルを

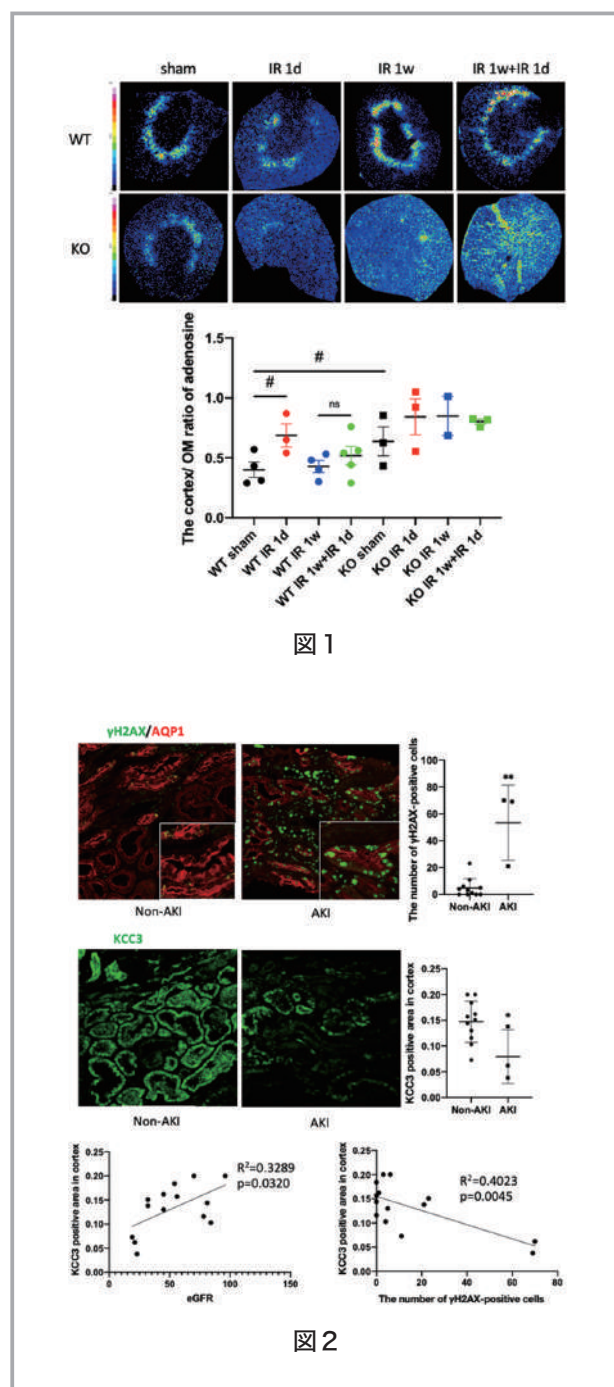


図2

作成し、プレコンディショニング (PC: 1 週間前の IR) の有無で比較した。その結果、WT では IR により腎皮質の DNA 二本鎖切断 (DSB) マーカー  $\gamma$ H2AX, KAT5 が増加するとともに、近位尿細管 Cl チャネル KCC3 が低下、尿中アデノシンが増加し尿細管糸球体フィードバック (TGF) が示唆された。IR 施行後 1 週間で再度 IR を施行した場合、初回 IR に比べて UN, Cr 上昇は抑制された (プレコンディショニング効果)。PC(+) 群では PC(-) 群と比較し、腎皮質の KAT5 発現が増加、KCC3 低下が抑制され、尿中アデノシンは減少し TGF 抑制が示唆された。また近位尿細管特異的 KAT5 ノックアウトマウスでは KCC3 発現が低下し、PC 効果も減弱した。質量分析イメージング (MALDI-IMS) を用いた検討においても TGF 亢進を示唆するアデノシン ( $m/z$  268.104) の皮質集積は、WT では IR に伴い亢進し、PC でその集積が減弱したが、KO では WT と比較し亢進し、PC による有意な分布変動を認めなかった (図 1)。したがって、KAT5 を介した TGF 減弱の PC 効果への関与が示唆された (2020 年 8 月 日本腎臓学会学術総会「優秀演題賞」)。

そして、ヒト腎生検検体では、AKI 症例で DSB マーカー  $\gamma$ H2AX が亢進し KCC3 発現が低下するとともに、eGFR が KCC3 発現と正の相関・ $\gamma$ H2AX と KCC3 発現が負の相関を認めた (図 2)。さらに、Antimycin A 投与によりヒト培養尿細管細胞 (HK2 細胞) に障害を惹起した結果、2 回目の投与では 1 回目にして KAT5, KCC3 が増加、KCC3 プロモーター領域のクロマチンアクセスビリティ上昇、ChIP 解析で同部位の KAT5 結合が増加した。

以上の結果より、KAT5 は AKI に伴う DNA 修復に加え、KCC3 発現のエピゲノム調節を介した糸球体濾過量調節に関与している可能性が示唆された。

本研究の成果に基づき、KAT5 あるいはアニオントランスポーターをターゲットとした AKI の予防や治療法・CKD 進展の予防法が確立されればその臨床的意義は非常に大きいと考える。

これらの成果を、*iScience* 誌にて報告した。

〈2021 年度の代表的な発表論文または学会発表題名〉

【発表論文】

Hishikawa, A., Hayashi, K., Kubo, A., Miyashita,

K., Hashiguchi, A., Kinouchi, K., Yoshimoto, N., Nakamichi, R., Akashio, R., Sugita, E., Azegami, T., Monkawa, T., Suematsu, M., Itoh, H.: DNA repair factor KAT5 prevents ischemic acute kidney injury through glomerular filtration regulation. *iScience*. 2021 Nov 14; 24(12): 103436.

【学会発表】

菱川彰人, 林香, 久保亜紀子, 宮下和季, 橋口明典, 吉本憲史, 中道蘭, 杉田絵里那, 赤塩理起, 門川俊明, 末松誠, 伊藤裕. DNA 修復因子 KAT5 を介した尿細管糸球体フィードバック制御 第 64 回 日本腎臓学会学術総会

### 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)

【目的】

睡眠は動物に不可欠な生理行動である。一時的な断眠は認知・学習機能や注意力の低下をもたらすが、断続的な不眠によって生物は様々な失調をきたし、重篤な場合には死に至る。重要なことに、睡眠の量に加えてタイミング (位相) も我々の健康に強く影響を与える。生物の行動や代謝は約 1 日周期のリズムを示し、このような概日性の生理リズムは概日時計と呼ばれる体内時計によって制御される。24 時間型社会と呼ばれる現代社会においては、不規則な生活による概日リズム障害が社会問題となっている。規則正しいリズムミクシな生理現象は生体恒常性の維持に必須であり、概日リズム障害とメタボリックシンドロームや精神疾患の発症には強い相関が見られる。そのため、概日時計から生理リズムへの出力経路の理解は、概日リズム障害によるメタボリックシンドローム発症メカニズムとその予防に大きく寄与すると期待できる。概日時計の中核は視床下部の視交叉上核 (SCN) に存在し、個々の神経細胞は自律振動する分子時計を内在する。SCN 時計は外界の明暗サイクルに同調し、他の脳領域や末梢組織に時刻情報を出力することで生理リズムを作り出す。概日時計から生理リズムの基本である睡眠覚醒リズムへの出力は極めて重要なプロセ

スである。そのため、概日時計の出力系の理解なくしては生理リズム形成の根幹を理解したとは言い難いが、SCN の“細胞内”の時計発振機構に比べて生理リズムの出力系を司る“SCN 外”の神経ネットワークの理解は進んでいない。そこで本研究計画では概日時計の重要な出力である睡眠リズムに着目し、SCN から投射される神経細胞の時刻・細胞特異的な操作を行うことで、睡眠覚醒リズムの制御メカニズムとその破綻がもたらす個体への影響を明らかにする。

### 【方法】

本研究は、神経トレーサーを利用して SCN から神経投射される細胞群の同定を行うとともに、人為的に神経活動を操作することでその神経連絡の睡眠覚醒サイクル制御における役割を明らかにする。特に、VLPO に投射している SCN 神経に着目し、その個性を理解するとともに睡眠覚醒リズム形成における寄与を調べて行動リズムを生み出す分子・神経機構を明らかにすることを目指した。まずはじめに、投射先特異的に SCN の神経細胞群をラベルし、その性状解析を行った。イヌ科アデノウイルス 2 型 (CAV2) は軸索末端から取り込まれ、逆行性に輸送されて細胞体において目的遺伝子を発現するため、CAV2 を VLPO に導入することで、その領域にのみ投射している神経細胞の遺伝子操作が可能である。さらに、薬理遺伝学的手法 (DREADD) を用いて、SCN → VLPO 神経を人為的に活性化したときのマウス自発行動および睡眠覚醒状態への影響を解析した。一方、神経毒素であるテタヌス毒素 (TeNT-LC) を用いて細胞の神経小胞を阻害した。具体的には、CAV2 と TeNT-LC および EYFP を発現する AAV を用いて VLPO に投射する SCN 神経のみに神経毒素を発現させた。そのあと赤外線センサーを用いてマウス行動リズムを測定した。

さらに TeNT-LC を発現させたマウスにおいて、中枢時計である視交叉上核 (SCN) の時計機能が失われるのかどうかを調べるため、SCN のイメージングを行う。時計タンパク質 PER2 は振幅の大きい発現リズムを示すため、PER2 にルシフェラーゼ (LUC) を融合させたタンパク質を用いることで PER2 タンパク質リズムを発光活性によってモニターできる。そこで Per2-Luc ノックインマウスを用いて VLPO に投射する SCN 神経のみを

抑制し、そのときの SCN における PER2 発現リズムを解析した。同時にマウスの行動リズムを測定し、PER2 リズム、すなわち SCN における時計機能との相関を解析した。SCN の PER2-LUC リズムの解析には、SCN 全体からの発光をクロノス HT (ATTO) を用いて経時測定する方法と、CCD カメラを用いてシングルセルレベルでイメージングする方法を用いた。さらに、赤色ルシフェラーゼを用いた *in vivo* 非侵襲イメージングも行った。イメージングには赤色ルシフェラーゼである AkaLuc をマウス脳内に発現させてルシフェラーゼの発光基質を投与し、自由行動下のマウスにおける発光を MIIS *in vivo* imager を用いて観察した。

### 【結果】

蛍光ラベルした SCN → VLPO 神経について、SCN に発現している神経ペプチドに対する免疫組織染色の結果から、VLPO に投射する SCN 神経は腸管作動性ペプチド (VIP) を主に発現し、アルギニンパソプレシン (AVP) 神経とガストリン放出ペプチド (GRP) とは共局在しないことが明らかとなった。さらに、DREADD を用いて SCN → VLPO 神経を活性化させたところ、マウスの自発行動が有意に減少した。興味深いことに、DREADD による行動抑制の効果は夜間にしか観察されなかった。また、EEG/EMG による睡眠覚醒解析の結果、マウスの覚醒時間が有意に減少することが明らかとなった。この結果は SCN から VLPO に投射する神経回路が直接的に睡眠覚醒制御を行い、マウス自発行動の変化をもたらしていることを示唆する。一方、TeNT-LC を発現させたマウスは徐々にリズムを失い、明暗サイクルにおいても行動リズムが大きく減弱した。さらに恒暗条件においても行動リズムはほぼ消失していた。TeNT-LC ではなく GFP を発現させたコントロールマウスにおいてはウイルスの投与後も明瞭な行動リズムが観察されたが、これらの結果から、マウスにおいて睡眠中枢に神経軸索を伸ばしている SCN 神経群は行動リズムの形成に必須の役割を果たしていることが明らかになった。一方、TeNT-LC を発現させたマウスにおいて PER2-LUC の発現リズムは視交叉上核 (SCN) 全体で観察しても、シングルセルレベルで観察しても影響は観察されなかった。このことは、TeNT-LC マウスにおいて SCN の時計機能は正常に働いている一方、SCN からの出力経路に異常があ

るために行動(睡眠)リズムが失われたことを示唆する。Aka-Lucを用いた非侵襲計測を試みたが、発光基質アカルミネでは発光が長続きしないことが判明した。そこで、Per2-Lucノックインマウスを用いて、自由行動下のマウスからイメージングを行なったところ、明瞭な概日リズムが観察された。特にTeNT-LCを発現させたマウスからもリズム的な発光が観察されたことから、やはり*in vivo*においても時計機能は失われていないことが明らかとなったが、今後、さらなる検証が必要である。

### 【考察】

本研究では、SCNからVLPOへの神経投射に焦点をあててその性状解析および機能解析を行なった。その結果、SCN→VLPO神経は主にGABAおよびVIP神経で構成されており、SCNの中でも特異的な細胞集団を形成すると考えられた。特にGRP神経が存在する外側コアの部分には、ほとんどVLPOに投射する神経が認められなかったことは興味深い。一過性にSCN→VLPO神経を活性化させた際にはマウスの睡眠量の増加が観察されたが、一過性の神経活動の誘導の効果は夜間のみ観察された。つまり、この効果には時刻依存性が存在しており、SCNの神経活動がマウスの休息期である昼間に上昇するという先行知見を考えると夜行性のマウスにおいて昼に神経活動が活発になり、神経連絡を通して視索前野の神経を活性化することで睡眠を誘導していると考えられる。また、神経毒素を用いてSCN→VLPO神経の神経連絡を阻害したところ行動リズムの減弱が観察されたが、SCNのイメージング実験によりSCN内の時計因子の発現リズムには大きな異常は見られなかった。つまり、TeNT-LCマウスで観察された睡眠リズムの消失は、SCNの時計機能が破綻したためではなく、出力経路の異常(SCN→VLPO経路)であると考えられる。

## 生理的アディポネクチン受容体・T-カドヘリンの血中可溶性フォーム(可溶性T-カドヘリン)の生理病態学的意義

福田 士郎

(大阪大学大学院医学系研究科)

### 【背景】

GPIアンカー型膜タンパク質であるT-カドヘリン(T-cad)は、脂肪細胞特異的に分泌されるアディポネクチン(APN)と非常に高い特異性と親和性で結合する<sup>1)</sup>。APNは血中に三量体、六量体、多量体として存在し、特に多量体APNと2型糖尿病や冠動脈疾患の関連が臨床疫学的に示されているが、この多量体APNと生理的濃度域で結合するのはT-cadのみである<sup>2)</sup>。

我々は近年、ヒト血中に130kDa体、100kDa体、30kDa体の合計3種類の可溶性T-cad分子が存在すること、またその濃度がメタボリックシンドロームに関連する複数の臨床パラメータと相関することを見出した<sup>3)</sup>。

### 【目的】

血中可溶性T-cadの生理的・病態学的意義を明らかにする。

### 【方法】

まず臨床研究として、健常者や様々な病態における血中可溶性T-cad濃度変化を検討する。前者は人間ドック受診者を対象とし、健診レベルで明らかな疾患のない受診者を「健常」と定義し、他疾患を有する受診者と比較する。この場合「疾患」は必然的に慢性期疾患が中心となるため、後者は主に急性期疾患(心筋梗塞、敗血症、COVID-19など)を集積し、経時的な変化を含め解析する。

### 【結果・考察】

急性期疾患の一つとしてST上昇型心筋梗塞患者の血中T-cad濃度を検討した。血中130kDaおよび100kDa T-cad濃度は病院搬入日をピークとして経時的に低下した。さらに、搬入日の血中130kDaおよび100kDa T-cad濃度が高く、かつ血中APN濃度が低い患者は、他の患者と比較して心筋梗塞範囲が有意に大きかった<sup>4)</sup>。

健康者や他の急性期疾患は症例集積の段階であり、今後順次解析をすすめる。

#### 【文献】

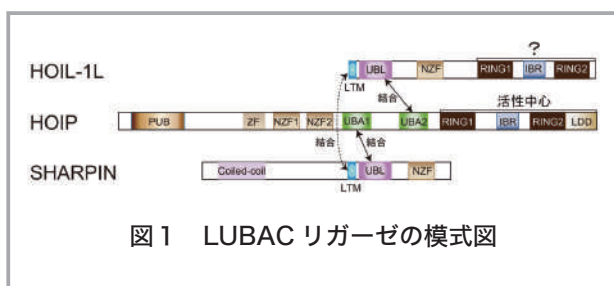
- 1) Fukuda, S. *et al.*: *J Biol Chem.*, **292**, 7840-9 (2017).
- 2) Kita, S., Fukuda, S. *et al.*: *Elife.*, **8**, e48675 (2019).
- 3) Fukuda, S. *et al.*: 2021. *J Clin Endocrinol Metab.*, **106**, 1333-44 (2021).
- 4) Iioka, M., Fukuda, S. *et al.*: *J Atheroscler Thromb.*, Online ahead of print. (2022).

### 直鎖状ユビキチン鎖が惹起する疾患の検索と制御戦略

藤田 宏明

(京都大学大学院医学研究科)

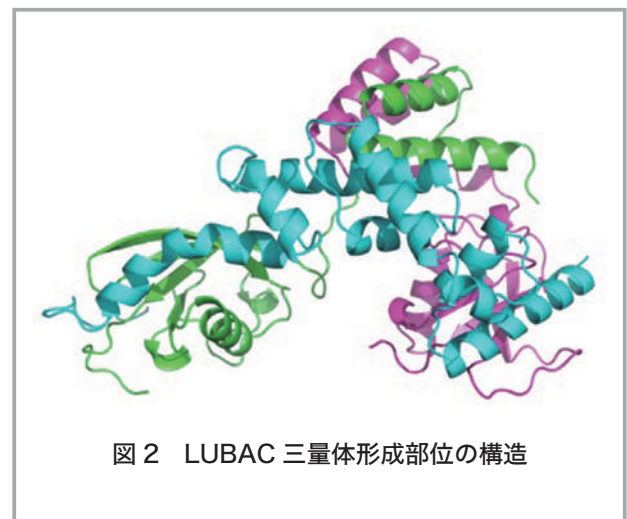
新奇のタンパク質翻訳後修飾である直鎖状ユビキチン鎖(直鎖)を特異的に生成する唯一の酵素であるLUBACユビキチンリガーゼ(E3)は、催炎症性転写因子であるNF- $\kappa$ B活性化、細胞死の抑制に関与する。LUBACは直鎖生成の活性中心を有するHOIP、アクセサリ分子であるHOIL-1L, SHARPINの三者複合体から構成される(図1)。



これまでに我々はLUBACの3サブユニット全てを欠損させた細胞を樹立し、細胞死の制御に必要なLUBACのドメインを探索した。その結果、LUBACの3量体形成に必要なHOIPの2つのUBAドメインとHOIL-1LとSHARPINに存在するUBLドメインを欠損させると、LUBACが不安定化し、直鎖状ユビキチン鎖生成活性が顕著に減弱することで細胞死が起こることを発見した<sup>1)</sup>。とりわけ、HOIL-1LのUBLとHOIPとの結合がより重要であるとの知見を得て、HOIL-1LのUBL欠損

マウスを作成したところ、LUBAC複合体が消失し活性中心のHOIPを欠失したマウスと同時期に胎生致死になることを見出した<sup>1)</sup>。

LUBACの安定化に着目してさらに解析したところ、生化学的実験よりHOIL-1LとSHARPINのUBLのN末側に存在する $\alpha$ -ヘリックスに富んだ領域(LTMモチーフと命名)が安定な複合体形成に不可欠であることに気付いた。そこでLUBACの3サブユニットの結合に必要な領域の共発現系を構築し、共結晶構造解析に成功した(図2)。その結果、HOIL-1LとSHARPINの2つのLTMモチーフが1つドメインを形成することで安定な結合体形成に寄与することを発見した。またLTMモチーフの変異によってLUBACが著減し、細胞死が誘発されることを見出した。これまでにLUBAC阻害によりB細胞リンパ腫の増殖を抑制できることが報告されていたが、LTMの相互作用を抑制するステープルペプチドはLUBACを減少させることでBリンパ腫細胞の増殖を抑制することも示した。



現在、臨床応用を視野にHOIL-1L LTM/SHARPIN LTM結合を阻害する低分子化合物の開発を行なっている。これまでにLUBAC3サブユニットの結合領域を大腸菌から精製し、精製タンパク質を用いて3サブユニットの結合を評価するFRET系を構築した。そのFRET系を用いてLTM結合を阻害する小分子化合物のスクリーニングを行った。またカウンターアッセイとしてHOIL-1L/HOIP間の結合を得られた化合物が阻害しないか解析を行った。得られた化合物でBリンパ腫細胞を処理すると、LUBAC発現量の減少に加え、細胞増殖を



抑制できることを見出した。

上記に加え、別の角度から LTM 阻害剤の開発もすすめている。近年 DEL library を用いた化合物スクリーニングが精力的に行われている。DEL library は数十億の化合物にそれぞれ DNA タグが結合した化合物ライブラリーで、タンパク質とライブラリーを混ぜ、タンパク質に結合した化合物を次世代シーケンサーで配列を読み、化合物を同定するものである。DEL ライブラリーによる LTM 結合化合物の探索にあたり、HOIL-1L LTM/SHARPIN LTM のタンパク質を精製した。LTM 結合部位は数十アミノ酸からなる非常に小さな領域であるが、それぞれの領域を大腸菌に共発現させ精製したところ、HOIL-1L LTM/SHARPIN LTM 二者複合体を大腸菌からほぼ夾雑物なく精製することに成功した。実際に精製した LTM 領域のタンパク質で DEL ライブラリーによる結合化合物を探索したところ、類似構造を持つ化合物をいくつか取得することができた。今後、それぞれの化合物クラスターごとに LUBAC の機能阻害効果などを検討する予定である。また実験ベースの化合物探索だけでなく、結晶構造から AI 技術を用いて LTM 結合に結合・阻害する化合物の *in silico* スクリーニングも行っている。これらの解析を通して、特異性の高い LTM 阻害剤の取得を目指している。

また、LTM 阻害だけでなく LUBAC の機能賦活化に向けた解析を行なっている<sup>2)</sup>。LUBAC は直鎖を生成する活性中心である HOIP に加え、HOIL-1L にもユビキチンリガーゼ活性が存在する。これまでに HOIL-1L の同活性を消失させると LUBAC の直鎖状ユビキチン鎖生成能が亢進して、LUBAC の 2 つの機能、NF- $\kappa$ B 活性化能と細胞死抑制能が顕著に亢進することを見いだしている<sup>2)</sup>。その詳細なメカニズムを解析から、HOIL-1L は自分自身をモノユビキチン化し、さらに HOIP がそのモノユビキチンを認識し、直鎖を付加することで LUBAC 自身が直鎖化されること、さらに LUBAC の直鎖化が LUBAC の機能を抑制することを見出している。また HOIL-1L の E3 活性を欠失させたマウスを作出し、12ヵ月齢までは顕著な症状は示さないが、全ての臓器において直鎖の生成が顕著に亢進することを見出している。

上記より HOIL-1L のユビキチンリガーゼ阻害剤は LUBAC 機能賦活剤となると考えられる。HOIL-1L のユ

ビキチンリガーゼドメインのタンパク質を大腸菌より大量精製し、化合物アレイにより結合化合物の探索を行った。得られた化合物に関しては HOIL-1L の機能を阻害し、LUBAC の直鎖活性を上昇させるか検討を進める。

#### 【文献】

- 1) Fujita, H., Tokunaga, A., Shimizu, S., Whiting, AL., Aguilar-Alonso, F., Takagi, K., Walinda, E., Sasaki, Y., Shimokawa, T., Mizushima, T., Ohki, I., Ariyoshi, M., Tochio, H., Bernal, F., Shirakawa, M., & Iwai, K.: Cooperative domain formation by homologous motifs in HOIL-1L and SHARPIN plays crucial roles in LUBAC stabilization. *Cell reports*, **23**, 1192-1204 (2018).
- 2) Fuseya, Y., Fujita, H., Kim, M., Ohtake, F., Nishide, A., Sasaki, K., Saeki, Y., Tanaka, K., Takahashi, R. & Iwai, K.: The HOIL-1L ligase modulates immune signaling and cell death via monoubiquitination of LUBAC. *Nature Cell Biology* (2020), **6**, 663-673

### ノンレム睡眠特異的脳波パターンを作り出す神経回路の解析

本城 咲季子

(筑波大学)

睡眠・覚醒を通じた大脳皮質神経活動における視床マトリックス細胞の役割を明らかにする

#### 【背景】

視床は末梢の感覚情報を大脳皮質に伝達する必須の役割を担っている。睡眠時、我々は外部感覚情報を認識しないため、視床の活動が低下する事が睡眠に重要ではないかと考えられてきた。これまでに我々は、視床の感覚情報の伝達を担う神経群（コア細胞）は睡眠覚醒制御に関与しない事、大脳皮質のほぼ全域に広く、非特異的に投射している神経群（マトリックス細胞）が高頻度で発火すると覚醒を促進する事を報告した。これらの神経群が睡眠時に果たす役割は明らかではなかったが、我々自身の予備的なデータから、マトリックス細胞がノンレム睡眠において果たす役割に着目した。

**【方法】**

視床マトリックス細胞の睡眠制御における役割を明らかにするために、以下の三つの観点から解析を行った。

**①睡眠・覚醒サイクルを通じた視床マトリックス細胞の活動解析**

自由行動下のマウスの睡眠覚醒サイクルを通じて、大脳皮質の神経活動を測定するために NeruoNexus 社製シリコン微小電極をマウス脳内に慢性的に留置する手術を行った。同時に脳波・筋電電極も挿入した。手術から十分に回復した後に神経活動記録装置にマウス頭部の電極のコネクターを慢性的に接続し、馴化期間を置いた。マウスの行動が安定した後、自由行動下のマウスにおいて 24 時間の活動電位・脳波・筋電記録を行った。記録データはオフラインの解析において、1. 脳波・筋電による睡眠覚醒判定と 2. 活動電位を波形に基づいて分ける Spike Sorting に用いられた。この二つの解析を完全に独立に行った後、それぞれの結果を統合して睡眠時の発火パターンの解析を行った。

**②視床マトリックス細胞の活性化**

視床マトリックス細胞を特異的に標識するために、マトリックス細胞のマーカーとされる Calb1 遺伝子のプロモーター下で Cre リコンビナーゼを発現させた遺伝子改変マウス（以下 Calb1-Cre）を用いた。Calb1-Cre の視床 Ventromedial Nucleus (VM) に光遺伝学受容体と EYFP を発現するアデノ随伴ウイルスベクター (AAV-EF1a-DIO-C1V1 (E162T)-TS-p2A-EYFP-WPRE) を局所感染させた。また光ファイバーを脳内に埋め込み、青色 (473 nm) の光を照射することで神経細胞の活性化を行った。

**③視床マトリックス細胞の活動阻害**

脳波の生成に果たす役割を解析するために、ジフテリアトキシン、あるいは細胞死を誘導するためのカスパーゼを視床神経核に AAV を用いて導入して細胞死を誘導した。これらのマウスにおいても脳波・筋電電極を挿入し、AAV 局所注入から四週間にわたって睡眠覚醒パターンを解析した。

**【結果】**

①ノンレム睡眠中のマトリックス細胞の活動電位の頻度は覚醒時に比べて顕著に低下し、バーストと呼ばれる発火パターンを示す。この発火パターンと大脳皮質脳

波の時系列を解析した結果、大脳皮質徐波と視床マトリックス細胞の発火が同期している事が明らかになった。具体的には、大脳皮質徐波のうち大脳皮質神経群が脱分極して発火する ON ピリオド中には視床マトリックス細胞も発火しており、大脳皮質神経細胞が同調して活動を低下させる OFF ピリオドには視床マトリックス細胞の発火も低下する事を見出した。

②光遺伝学を用いて、ノンレム睡眠中に、視床マトリックス細胞のバースト発火を模倣する 20 ミリ秒の光刺激を行った。その結果、大脳皮質において徐波様の局所電位パターン、および OFF ピリオド様の協調的な活動電位低下が観察された。

③ AAV によりジフテリア毒素、あるいは細胞死を誘導する改変型カスパーゼを視床神経核 (CM, VM) 導入してから 1, 2, 3, 4 週間後に 24 時間の睡眠覚醒記録、睡眠覚醒段階判定を行った。さらに、ノンレム睡眠中の脳波のパターンを解析したところ、高周波数成分は変化しないのに対し、0.5-4Hz の低周波数成分は二週間目から顕著に低下していた。

**【考察】**

我々の結果から、視床マトリックス細胞の発火は大脳皮質のノンレム睡眠特異的脳波、徐波と同調している事が明らかとなった。また、ノンレム睡眠時のマトリックス細胞の活動を模倣すると徐波が誘導されること、マトリックス細胞から構成される視床 VM 核、および視床 CM 各の神経を除去する事により、徐波が減弱する事を明らかにした。これらの結果から視床マトリックス細胞が睡眠の深さの指標である徐波の生成に寄与している事が明らかになった。視床マトリックス細胞、および視床神経核 CM はそれぞれ、覚醒時の高頻度・持続的な発火パターンで発火すると覚醒状態を促進する事がこれまでに報告されている。従って、これらの視床神経細胞は睡眠・覚醒ステージを通じてダイナミックに活動パターンを変化させながら、覚醒時には覚醒状態を促進し、ノンレム睡眠時には深いノンレム睡眠に貢献するという、多面的な機能を果たしていると考えられる。

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)

【目的】

タンパク質に対する食欲は、エネルギー摂取とは別個に調節されていることが、その調節機序は全く未解明である。タンパク質の需給を脳に伝える代謝性シグナル、および、脳内での調節責任領域のどちらも解明されていない。

近年、主に膵臓α細胞で合成・分泌されるグルカゴンの主要かつ特異的生理作用は、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。このことから、グルカゴンはアミノ酸の恒常性を維持するために、タンパク質の食欲制御に関わると着想した。そこで本研究では、未解明である「タンパク質に対する食欲」の調節機序を、グルカゴンをツールとして利用して解明することを目的とする。

【方法】

9週齢雄の野生型マウスに0.1, 0.5, 1mg/kgのグルカゴンを腹腔内(ip)投与し、普通食(NC) vs. 高タンパク質食(HPD: カゼイン)、高脂肪食(HFD)および高ショ糖食(HSD)の食餌選択試験を行った。さらに、9週齢雄の野生型マウスに1mg/kgのグルカゴンをip投与し、二瓶選択試験(水 vs. テスト溶液)を行った。試験溶液には1%カゼイン中に含まれるアミノ酸組成で作製したカゼイン溶液、必須アミノ酸溶液、非必須アミノ酸溶液を用いた。

【結果】

0.5, 1mg/kg グルカゴン投与で顕著なタンパク質嗜好性抑制作用が認められた(図1A)。他方、同様の検証を高ショ糖食、高脂肪食でも行ったが、それらの食餌に対する嗜好性の変化は認められなかった(図1B, C)。二瓶選択試験の結果は、グルカゴン投与でカゼイン溶液と非必須アミノ酸溶液に対する嗜好性抑制作用が認められた(図2A, C)。他方、必須アミノ酸溶液に対する嗜好性の変化は認められなかった(図2B)。

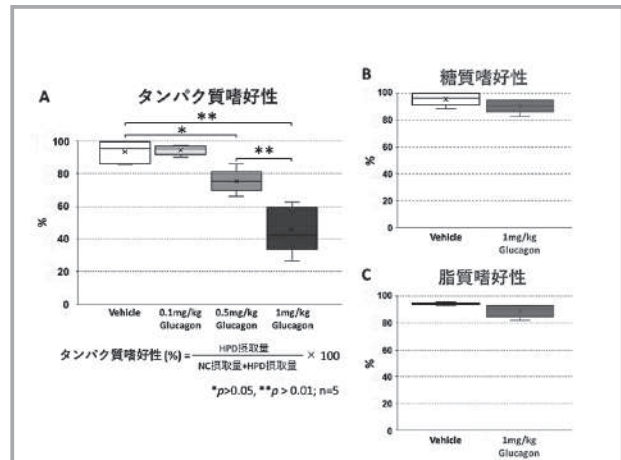


図1 グルカゴンはタンパク質嗜好性を抑制する

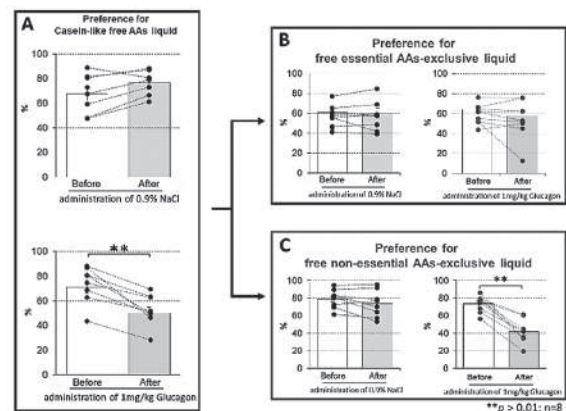


図2 グルカゴンは必須アミノ酸に対する嗜好性を抑制する

【考察】

これらの結果から、グルカゴンはタンパク質特異的に食行動を制御することが明らかになった。また、アミノ酸の中でも必須アミノ酸ではなく、非必須アミノ酸に対する摂取行動を制御する点については興味深い。体で合成できない必須アミノ酸の摂取行動を抑制することは生命の維持において危険である。他方、体の中で合成することのできる非必須アミノ酸の摂取行動抑制は、窒素源であるタンパク質の過剰摂取を制御する上でも理にかなっている。このことから、グルカゴンは単にタンパク質の摂取を制御するだけでなく、これまで明らかになっていない窒素の欲求制御を担うホルモンである可能性が示唆された。

## 慢性腎臓病の治療を目指したポドサイトにおける Rho-GTPase 制御機構の解明

松田 潤

(大阪大学)

### 【目的】

我が国では透析や腎移植にかかる費用が医療経済を圧迫しているが、慢性腎臓病の進行に歯止めをかける有効な治療手段の確立には至っていない。それは、腎機能低下の主な原因である糸球体障害の機序が明らかになっていないためである。

ポドサイト（糸球体上皮細胞）は、アクチン線維に富む特徴的な足突起を有し、血管内皮細胞および糸球体基底膜とともに濾過バリアを形成することで、蛋白の尿への漏出を防いでいる。そのアクチン線維の調節に関わるのが、20種類から成る Rho GTPase と呼ばれる蛋白群である。Rho GTPase は「活性化型」と「不活性化型」の2形態をとる分子スイッチである。遺伝子改変マウスや蛋白尿を呈する患者の腎検体を用いた既存研究から、ポドサイトにおける代表的な Rho GTPase である Rac1 の活性異常が糸球体病変や蛋白尿に関与することが分かってきた。しかし、ポドサイトでどのような機序によって Rac1 活性が制御されているかはいまだ不明である。そこで本研究では、ポドサイトにおける Rac1 の活性化/不活性化機構を解明すべく、近位依存性ビオチン標識法 (BioID) を用いて Rac1 と相互作用する蛋白の網羅的同定を試みた。

### 【方法】

Rac1 配列を含む pSTV6 ベクターを培養ポドサイトにトランスフェクションした。ドキシサイクリンとビオチンを培地に加えることで、Rac1 と相互作用する蛋白をビオチンリガーゼ (BirA) により選択的にビオチン化した後、ビオチン化蛋白をストレプトアビジンビーズによって回収し、質量分析に供した。

### 【結果・考察】

Rho GTPase の活性化因子として知られる ARHGEF7 や、同不活性化因子として知られる ARHGAP31 など複数の蛋白が同定され、ポドサイトの Rac1 活性は主にこれらの分子によって制御されていることが示唆された。現

在、同定された個々の蛋白が、Rac1 活性や細胞の接着能・運動能に及ぼす役割について解析を進めている。

## 血糖変動と認知機能の関連の解明のための前向き観察研究 (PROPOSAL 研究)

松原 正樹

(奈良県立医科大学)

### 【背景】

糖尿病患者では、アルツハイマー型認知症、血管性認知症の発症リスクがそれぞれ 1.5 倍、2.5 倍に増大することが知られている。糖尿病患者における認知機能低下や認知症の病態については、重症低血糖、慢性的な高血糖、高インスリン血症、脳血管障害、終末糖化産物の蓄積など多くの要因が示唆されているが未解明な部分が多く、また認知症予防のための血糖管理指標も明らかとなっていない。近年、血糖持続測定 (CGM) 機器の登場により糖尿病患者の血糖プロファイルを評価することが可能となり、横断研究で血糖変動と認知機能の関連が示唆されている。

### 【目的】

糖尿病患者の血糖変動と認知機能の関連を縦断的に解析することで、糖尿病患者で認知機能低下に至る病態を解明し、また糖尿病患者における認知症予防のための新規血糖管理指標を探索する。

### 【方法】

本研究は単施設 (国立循環器病研究センター) における 2 年間の前向き縦断研究であり、2019 年 3 月-2020 年 6 月の間に軽度認知障害を認める高齢 2 型糖尿病患者 109 名を登録した。CGM (リブレ Pro)、認知機能試験 (Montreal Cognitive Assessment, Alzheimer's Disease Assessment Scale) を登録時、1 年後、2 年後と縦断的に行い、得られた血糖変動指標と認知機能試験スコアとの関連を解析する。副次評価項目として、空腹時血糖値、HbA1c、診察室血圧、抑うつ・意欲の変化、炎症マーカーを登録時、1 年後、2 年後に、脳小血管病変の変化 (MRI で評価)、頸動脈の内中膜厚 (IMT) を登録時、2 年後に、また観察期間中の心血管イベント、腎イベントの発症をそれぞれ評価し、得られた血糖変動

指標もしくは認知機能試験スコアとの関連を解析する。Visit は前後2か月間を許容しているため、2022年8月に研究終了予定である。

#### 【進捗】

本研究はまだ終了していないため結果は得られていないが、以下に後述する登録時の横断解析を行った。

#### 【サブ解析】

2型糖尿病患者において、心筋梗塞、脳卒中などの動脈硬化性疾患 (ASCVD) が増加するが、ACCORD, ADVANCE, VADT といった大規模臨床研究では、HbA1c を管理目標とした厳格な血糖コントロールを行っても心筋梗塞、脳卒中などは減少せず、ASCVD と重症低血糖や血糖変動との関連が注目されるようになってきた。血栓性脳梗塞のリスクである頭蓋内動脈狭窄についても、空腹時血糖値や HbA1c との関連は報告により異なり一定した見解が得られていない。最近になり、持続血糖モニタリング (CGM) を用いて評価した血糖変動と、冠動脈疾患、内頸動脈の内中膜複合体厚 (IMT)、上腕一足首脈波伝播速度 (baPWV) などとの関連が報告されているが、我々の知る限り頭蓋内動脈狭窄との関連は報告されていない。そこで本研究の登録患者 109 例中 103 例を対象に血糖値、HbA1c、FreeStyle リブレから得られた SD、% CV、mean amplitude of glycemic excursions (MAGE) と、頭部 MRA で Warfarin-Aspirin Symptomatic Intracranial Disease 法 (WASID) 法で評価した血管狭窄との関連をロジスティック回帰分析にて解析を行った。結果、WASID 法で 70% 以上の高度狭窄がみられた 8 例は全て内頸動脈サイフォン部の狭窄であり、高度狭窄のない 95 例と比較し、SD  $53 \pm 12$  mg/dl vs.  $39 \pm 10$  mg/dl、% CV  $36 \pm 7$  % vs.  $29 \pm 6$  %、MAGE  $114 \pm 18$  mg/dl vs.  $90 \pm 23$  mg/dl といずれも有意に高値であった ( $p < 0.01$ )。またロジスティック回帰分析では、性別で調整した高度狭窄群のオッズ比 (OR) は SD (OR, 3.00; 95% confidence interval (CI), 1.32-6.84)、%CV (OR, 5.55; 95% CI, 1.23-25.2)、MAGE (OR, 1.52; 95% CI, 1.06-2.19) と有意であった。これらの結果より、頭蓋内血管狭窄病変を同定するにあたり、血糖変動指標に注目することが有用である可能性が示唆された。

### Long non-coding RNA から翻訳される新規ポリペプチドの解析による疾患の病因解明

松本 有樹修

(九州大学生体防御医学研究所)

#### 【目的】

Long noncoding RNA (lncRNA) はタンパク質を翻訳しない RNA と定義されているが、われわれは一部の lncRNA が翻訳されてポリペプチドを産生していることを明らかにした [Matsumoto, A. *et al.*, *Nature* (2017)]. そこで、これら新規ポリペプチドがどのような機能を持つかを明らかにしていく。

#### 【方法と結果】

われわれはこれまでに、精子特異的 lncRNA から翻訳される 2 つの新規ポリペプチドを同定した。これら 2 つのポリペプチドは同一遺伝子座の第一エクソンが異なる 2 つのアイソフォームから翻訳されていたことから、双子座の星から名前をとって、それぞれカストル Kastor、ポルクス Polluks と名付けた。これらポリペプチドはアミノ酸配列が全く異なるにも関わらず、どちらもミトコンドリアの外膜に局在する Voltage-dependent anion channel (VDAC) と非常に強く結合していた。VDAC3 欠損マウスは精子ミトコンドリアの形態異常により雄性不妊になることが知られていたため、Kastor と Polluks を両方欠損するマウスを作製したところ、顕著な雄性不妊が見られ、さらにこの変異マウス由来の精子は、VDAC3 欠損精子と類似したミトコンドリアの形態異常を示した。

そこで次に、Kastor と Polluks が VDAC3 の分子機能にどう影響するかを検討することにした。VDAC はミトコンドリアの代謝やカルシウムフラックスに影響することが知られているため、Kastor と Polluks を欠損した精子で、質量分析計を用いたメタボローム解析や、Seahorse XF を用いた細胞外フラックス解析、さらにカルシウムインディケーターを用いたカルシウムフラックス解析を行ったが、いずれも変化は見られなかった。さらに細胞死や酸化ストレスなどにも影響はなかった。興味深いことに、これらはいずれも VDAC3 欠損精子でも変化はなかったことから、精子ミトコンドリアで

見られた形態の異常は、精子特異的VDAC機能に起因するものと考えられた。以上の結果を、Nature Communications誌に報告した。

#### 【考察】

Kastor と Polluks は共にヒトを含む哺乳類に広く保存されており、これらの生物では、共通した機能を持つと考えられる。精巣特異的な遺伝子の機能解析は、男性不妊の原因解明だけでなく、これらを標的とした避妊薬の開発への展開が期待される。

#### 【文献】

- 1) Mise, S.†, Matsumoto, A.\*† (corresponding and equally first author), Shimada, K., Hosaka, T., Takahashi, M., Ichihara, K., Shimizu, H., Shiraishi, C., Saito, D., Suyama, M., Yasuda, T., Ide, T., Izumi, Y., Bamba, T., Kimura-Someya, T., Shirouzu, M., Miyata, H., Ikawa, M. & Nakayama, KI.\*: Kastor and Polluks polypeptides encoded by a single gene locus cooperatively regulate VDAC and spermatogenesis. *Nat. Commun.* Feb 28; **13**(1): 1071 (2022).
- 2) Nita, A., Matsumoto, A.\* (corresponding author), Tang, R., Shiraishi, C., Ichihara, K., Saito, D., Suyama, M., Yasuda, T., Tsuji, G., Furue, M., Katayama, B., Ozawa, T., Murata, T., Dainichi, T., Kabashima, K., Hatano, A., Matsumoto, M. & Nakayama, KI.\*: A ubiquitin-like protein encoded by the "noncoding" RNA TINCR promotes keratinocyte proliferation and wound healing. *PLoS Genet.*, **17**: e1009686 (2021).
- 3) Ichihara, K.†, Matsumoto, A.\*† (corresponding and equally first author), Nishida, H., Kito, Y., Shimizu, H., Shichino, Y., Iwasaki, S., Imami, K., Ishihama, Y. & Nakayama, KI.\*: Combinatorial analysis of translation dynamics reveals eIF2 dependence of translation initiation at near-cognate codons. *Nucleic Acids Res.*, **49**: 7298-7317 (2021).

### ビタミンKのフェロトーシス抑制作用の解明と還元酵素の同定

三島 英換

(ヘルムホルツセンター・ミュンヘン)

#### 【背景】

フェロトーシス (Ferroptosis) は2012年に新規細胞死概念として確立された非アポトーシスの制御性細胞死の一種であり、細胞内における過酸化脂質の蓄積をトリガーとして発動する細胞死である。種々の急性臓器障害 (虚血再灌流含む)、神経変性疾患、がん細胞における抗がん薬感受性に寄与するため、フェロトーシスの制御機構の解明はこれら病態の新規治療法への展開が期待されている。生体は過剰な脂質酸化に対する防御機構として Glutathione peroxidase-4 (GPX4) や CoQ10-Ferroptosis suppressor protein 1 (FSP1) 経路、内因性抗酸化ビタミンとしてのビタミンEを備えており、これらはフェロトーシスの主要な内因性防御機構として働く<sup>1)</sup>。しかしながら生体内におけるフェロトーシスの内因性または外因性の制御機構のさらなる解明が待たれている

#### 【目的・方法・結果】

フェロトーシス抑制能を有する新規内因性代謝物を探索することを目的として、誘導性GPX4ノックアウト細胞を用いて代謝物スクリーニングを行った結果、ビタミンK (フィロキノロンやメナキノロン4) が強力なフェロトーシス抑制能を有していることを同定した。メナキノロン4はフェロトーシス動物モデルである肝臓特異的GPX4 KOマウスへ投与することでフェロトーシスに伴う臓器障害・脂質酸化を抑制した。フェロトーシス抑制機序としては還元型のビタミンKが脂質ラジカルをスカベンジして脂質酸化を抑制することが分かった。また、これまでCoQ10還元酵素として知られていたFerroptosis suppressor protein 1 (FSP1) がフェロトーシス抑制に必要なビタミンKの還元を担う酵素であることを同定した。またFSP1は、血液凝固作用に必要なビタミンKサイクルにおいてこれまで正体が未同定であったワルファリン非依存性のビタミンK還元酵素でもあることを明らかにした。このFSP1によるビタミンKの還

元経路がわかったことは、ワルファリン中毒時になぜビタミンKが解毒剤となるのかの機序を解明したものである<sup>2)</sup>。

**【考察】**

ビタミンKはフェロトシス抑制作用を有しており、今後その作用の生体内における生理的意義、およびフェロトシス関連疾患に対する治療応用への展開が期待される。

**【文献】**

- 1) Mishima, E. & Conrad, M.: Nutritional and Metabolic Control of Ferroptosis. *Annu Rev Nutr.* 2022; 42: 275-309
- 2) Mishima, E. et al.: A non-canonical vitamin K cycle is a potent ferroptosis suppressor. *Nature.* 2022; 608: 778-783

**腫瘍内不均一性に着目した原発性アルドステロン症の病態解析**

村上 正憲

(東京医科歯科大学)

**【目的】**

PAの病型の一つであるアルドステロン産生腺腫(APA)は、外科治療による寛解が見込まれることから重要であるが、病態については不明点が多い。申請者は、免疫組織学的所見からAPAが腫瘍内不均一性に富む細胞集団であると報告されていることに注目し、腫瘍内の細胞集団の構成・分布が異なり、APAの臨床的特徴の不均一性に寄与している可能性を考えている。本課題は、APA患者から採取した凍結副腎サンプルを対象とするsingle-nuclear RNA-seq解析を基に、APAの発症機序に関わる細胞集団とその分化過程を評価することを目的とする。

**【方法】**

APA凍結検体から核抽出を行い、single-nuclear RNA-seq解析を施行した。解析によって抽出された遺伝子の機能解析のために、ヒト副腎皮質癌由来細胞株H295Rを使用した*in vitro*解析を施行した。

**【結果】**

single-nucleus RNA-seqを施行した結果、APA由来の3834個の核集団を解析することが出来、12個のクラスターに分類された。クラスター5はアルドステロン合成酵素であるCYP11B2をマーカー遺伝子としており、APAを特徴づける高度なアルドステロン合成能を有する集団と考えられた。クラスター5内において、CYP11B2の遺伝子発現と強く相関する遺伝子としてカルシウムチャンネルをコードするCACNB2遺伝子が抽出された。さらにCACNB2の機能解析のため、発現ベクターによるH295Rへの強制発現実験を施行したところ、CYP11B2の遺伝子発現上昇を誘導した。

**【考察】**

APA組織において高度なアルドステロン合成能を有する細胞集団を同定し、CYP11B2に並ぶマーカー遺伝子としてCACNB2を抽出した。これまでに申請者はAPA組織内においてCACNB2遺伝子がmiRNAの制御を受けて発現誘導されている可能性を示していることから<sup>1)</sup>、CACNB2遺伝子はAPA発症メカニズムに重要な役割を果たしていると考えられた。

**【文献】**

- 1) Nakano, Y., Yoshimoto, T., Watanabe, R., Murakami, M., Ogawa, Y. (他7名): miRNA299 involvement in CYP11B2 expression in aldosterone-producing adenoma. *Eur J Endocrinol.* 181(1): 69-78. (2019).

**白血病を維持する腫瘍エンハンサーの検索**

村川 泰裕

(京都大学高等研究院)

**【目的】**

成人病の柱の一つに悪性疾患が含まれる。とりわけ白血病は、発症年齢が若く、社会的にも重大な疾病である。本課題では、オリジナルなゲノム解析法から、病態解明、新たな分子標的薬やバイオマーカー検索を目指す。そのため、がんの細胞で特異的に発現しているRNA分子をゲノムワイドに網羅的にとらえ、独自のRNA分子アトラスを構築する。興味深いことに、ヒトゲノム90%以

上の領域から RNA 分子が転写されており、この中には、(1) 蛋白質をコードする mRNA の他にも、(2) 蛋白質をコードしないノンコーディング RNA (lncRNA)、そして (3) エンハンサー領域から合成されるエンハンサー RNA (eRNA) などが挙げられる。しかし、これらの分子には、とりわけ lncRNA や eRNA において、大多数の未知分子・未踏分子は存在していると考えられている。本研究では、独自のゲノム解析法を確立することで、こうした一連の RNA 分子を世界で初めて包括的に同定することに挑戦し、その中から機能的な新たな分子を探索し、白血病のメカニズムの理解や新しいバイオマーカーや治療標的の探索を通じた医学応用を最終目標とする。

#### 【方法】

- ① CAGE 法は、RNA の 5' 末端を次世代シーケンサーにより網羅的に解析する技術である。我々は、短寿命で低発現の lncRNA や eRNA も超高感度に同定できる「NET-CAGE 法」(Hirabayashi *et al. Nature Genetics*, 2019) を開発した。本 NET-CAGE 法では、短寿命な RNA 分子を濃縮する目的で、細胞のトータル RNA ではなく、新規に合成されている最中の新生鎖 RNA をクロマチン分画から濃縮する生化学的分画化法と CAGE 法を融合する。
- ② また、CAGE プロトコルを大幅に改良することで、従来では 1 週間かかる工程を 2 日に短縮し、さらにインデックスライブラリー法を導入し、1 週間程度で数百検体のサンプルを処理できる基盤を構築した(論文執筆中)。さらに、大規模のサンプルをラボ内で管理するための Laboratory Information Managing System (LIMS) を構築して、大量のヒト検体を効率的保管・処理している。
- ③ さらに、1 細胞レベルで CAGE のように RNA 分子の 5' 末端を解析できる「1 細胞転写開始点解析法」を開発した。本手法では、ノイズを除去できるバイオインフォマティクス法を開発し、飛躍的な正確度・感度で真の転写開始点のみを同定する新しい方法を確立した。本手法を用いて一細胞レベルで mRNA, lncRNA, eRNA を網羅的に同定することに成功している(論文執筆中)。
- ④ また、転写開始点のみならず、RNA 分子の完全長 RNA 解析を可能にする新技術を開発した(論文執筆

中)。本手法では、FLAM-seq 法、高効率逆転写技術など様々な要素技術を融合することで確立した。RNA 分子の 3' 末端のポリ A 鎖と 5' 末端のキャップ構造由来のシグナルを直接的にロングリードシーケンシング技術を用いて読むことで、完全長性をデータにより担保している。

こうした一連の独自のオリジナルのゲノム解析基盤のもとに、京都大学血液・腫瘍内科との共同研究により、約 100 人の造血器悪性腫瘍の患者検体から機能性ゲノム解析を実施した。

#### 【結果】

白血病に特異的に活性化している mRNA, lncRNA, eRNA を新しく数万の単位で同定することに成功した。また、新しく同定した RNA 分子の中には、全く新規の Open-reading frame を持っている RNA 分子も 100 近く同定した。これらの分子の中でも、白血病での発現特異性が高い分子は、病態解明の手掛かりにもなりえ、また、新規の診断マーカーや治療標的候補になりえる。また、現在は、一細胞 5' シーケンス解析法を行い、様々な異なる文化段階の白血病細胞由来の RNA 分子と、正常骨髄由来の RNA 分子を実験データにより区別している。今後、臨床データとも紐付けした統合解析や、新規分子の機能解析を行い、白血病の病因・病態の解明および医療応用を目指す。

#### 【考察】

本研究により同定された数万もの新規 RNA 分子が、患者毎にどのような発現分布をするのか、どのような機能を担っているのか、そして実際に臨床現場に実装することが可能なのかを今後明らかにする。また、今回新しく同定された分子の多くが、マウスには存在しておらず、霊長類からその発現が見いだされる。これらの霊長類・ヒト特異的な分子が、マウスでは説明できない、ヒトの白血病の理解につながるのか今後検証する。今後は、独自に構築した大規模データアトラスから、機能的分子・バイオマーカー候補分子を抽出して、そしてこれらの分子から新しい医療資源を創出することを目指す。



**がん免疫の成立機構に関する研究**

諸石 寿朗

(熊本大学大学院生命科学研究部)

**【目的】**

悪性腫瘍は、細胞の形質転換、腫瘍の増大、転移といったいくつもの過程において多様に細胞内シグナルや細胞代謝を変化させ、がん細胞と宿主の相互作用の中で進行していく。この相互作用の中で、特に、がん細胞に対する宿主の免疫応答は腫瘍運命に大きな影響を及ぼすが、がん細胞内のシグナル伝達や代謝制御が免疫応答に与える影響については十分解明されていない。本研究では、われわれがこれまで研究を重ねてきた Hippo 細胞内シグナルや鉄代謝に注目し、宿主の免疫応答に対してこれらの因子が与える影響を検討した。

**【方法】**

がん細胞において Hippo シグナルや鉄代謝を変容させたマウスがんモデルを作出し、それらのがん細胞に対する宿主の免疫応答を、組織学的解析、フローサイトメーター解析、シングルセル解析などの手法により調べた。また、その変化が起こる分子機序について、分子生物学や生化学的手法により検証した。

**【結果】**

がん細胞における Hippo シグナルの阻害は、がん細胞の種類により腫瘍増大に有利に働く場合と不利に働く場合があることがわかった [*Oncogene* **38**, 2595-2610 (2019)]. さらに、Hippo シグナルの阻害により宿主のがんに対する免疫応答が活性化される場合、腫瘍微小環境を構成する免疫細胞や間質細胞の種類や性質が大きく変化することがわかった。特に、がん細胞における Hippo シグナルの状態の変化に伴い、全く性質の異なるがん関連線維芽細胞が誘導されることを見出した。また、肝細胞における鉄代謝の変容は、慢性炎症環境を誘導し、肝臓がんの進行を促進することがわかった [*J. Exp. Med.* **216**, 950-965 (2019)]. さらに、大腸がんにおける鉄代謝異常は腸内細菌の変化と相乗的に働き、腫瘍促進性の炎症応答を誘導することを見出した [*JCI insight*, in press (2022)].

**【考察】**

研究を進めていく中で、がん細胞における細胞内シグナルや細胞代謝の変化は、がん細胞側と宿主側に時として相反する作用を誘導することがわかった(例: Hippo シグナルの阻害はがん細胞自身の増殖を促進する一方で、宿主の免疫応答を活性化することにより結果として腫瘍全体の増殖を抑える)。このことは、個々の細胞における細胞内シグナルや細胞代謝の機能研究のみでは、たくさんの細胞が複雑に相互作用する組織応答の理解は困難であることを示唆している。今後の研究において、細胞内シグナルや細胞代謝の制御を介して行われる多細胞間のコミュニケーションを解明していきたい。

**甲状腺ホルモン脱ヨード酵素を標的とした脂質・エネルギー代謝促進薬の開発**

山内 一郎

(京都大学大学院医学研究科)

**【目的】**

甲状腺ホルモン脱ヨード酵素には、1型(D1)、2型(D2)、3型(D3)の3種類があり、これらの発現制御により治療へ応用することを目指している。前年度までに、プロモーターアッセイを基盤としたハイスループットな系を開発し、臨床応用されている薬剤のライブラリー(2480種類)を用いたスクリーニング(HTS)を実施した。患者コホートを構築し、各ヒット化合物の内服前後での変化をレトロスペクティブに解析した結果、複数の化合物にて有意な変化が確認され、さらなる検証を進めた。

**【方法】**

6週齢雄のC57BL/6マウスに化合物を給水投与し、投与後の血清甲状腺ホルモン濃度(甲状腺機能)、遺伝子発現(甲状腺、肝臓、下垂体)を評価した。

**【結果】**

HTS、コホート研究を通じて絞り込んだ化合物を投与したところ、3日後、14日後のいずれにおいても甲状腺機能に有意な変化を認めたのは、アドレナリン受容体作動薬であるリトドリン、チロシンキナーゼ阻害薬(TKI)であるスニチニブのみであった。リトドリンは

HTSにおいてD2を正に制御し、コホート研究において内服による血清fT3/fT4比の上昇が確認された。マウスへの投与においても、血清fT3、fT3/fT4比の上昇と、甲状腺D2 mRNAの増加が認められ、矛盾しない結果であった。

TKIは、HTSではD1、D2、D3を正に制御し、コホート研究では内服による血清fT3、fT4減少、血清TSH上昇が確認された。しかし、スニチニブをマウスへ投与すると、血清fT4減少は認められたが、肝D3 mRNAはむしろ減少した。矛盾する結果であり、甲状腺ホルモン脱ヨード酵素以外を介した甲状腺機能の変化であることが示唆された。甲状腺ホルモン合成に関連する遺伝子群の発現低下を認めており、甲状腺機能変化に関連している可能性があると考えた。

#### 【考察】

HTSに臨床データを統合させる新手法を考案し、リトドリンが、甲状腺においてD2を正に制御し、甲状腺機能に有意な影響を与えるという新規の知見を得るに至った。

#### 【文献】

- 1) Yamauchi, I., Sakane, Y., Okuno, Y., Sugawa, T., Hakata, T., Fujita, H., Okamoto, K., Taura, D., Yamashita, T., Hirota, K., Ueda, Y., Fujii, T., Yasoda, A. & Inagaki, N.: High-throughput Screening in Combination With a Cohort Study for Iodothyronine Deiodinases. *Endocrinology*. 2022; **163**: bqac090.
- 2) Yamauchi, I., Sakane, Y., Yamashita, T., Hakata, T., Sugawa, T., Fujita, H., Okamoto, K., Taura, D., Hirota, K., Ueda, Y., Fujii, T., Yasoda, A. & Inagaki, N.: Thyroid hormone economy in mice overexpressing iodothyronine deiodinases. *FASEB J*. 2022; **36**: e22141.

### 腸管 NAMPT-NAD<sup>+</sup>合成系を標的とした NAD<sup>+</sup>中間代謝産物 NMN によるインスリン抵抗性発症予防法の開発研究

山口 慎太郎

(慶應義塾大学医学部)

#### 【目的】

哺乳類 NAD<sup>+</sup>合成系の鍵酵素である NAMPT は環境・栄養状態に応答することで NAD<sup>+</sup>量を調節し、生物学的な多彩な局面で重要な役割を果たす。申請者は脂肪細胞特異的 *Nampt* 欠損マウスを作製し、脂肪細胞 NAMPT-NAD<sup>+</sup>合成系が、インスリン抵抗性・エネルギー代謝を制御する事を報告した (*PNAS*. 2019, *Cell Rep*. 2016)。さらに、代謝疾患において NAMPT の酵素反応産物である NMN (nicotinamide mononucleotide) などの NAD<sup>+</sup>中間代謝産物が代謝臓器の NAD<sup>+</sup>量を回復し、病態を改善することも報告されている。最近 NMN のトランスポーターが小腸に存在することが報告され (*Nature Metab*. 2019)、代謝臓器の NAD<sup>+</sup>合成系を制御する主座として腸管が注目されている。

以上より、腸管の NAMPT-NAD<sup>+</sup>合成系のインスリン抵抗性発症における役割の検証を行った。

#### 【方法・結果】

##### ① 腸管 NAMPT-NAD<sup>+</sup>合成系と糖代謝

腸管上皮細胞特異的 *Nampt* ノックアウト (KO) マウスを作製した。腹腔内ブドウ糖投与試験での血糖値の変化にはコントロール群と有意な差は認めなかったが、経口投与では、KO マウスで血糖値は有意に上昇した。その背景病態として、KO マウスでは GLP-1 およびインスリン分泌障害を認めた。KO マウスに NMN を投与し、腸管 NAD<sup>+</sup>量を回復させると GLP-1 産生が改善することが示された。細胞培養系を用いた検証により、GLP-1 の産生は NAMPT-NAD<sup>+</sup>-Wnt axis により制御されていることも見出した。

##### ② NMN を用いた肥満マウスへの介入

高脂肪食を負荷した C57BL/6 マウスでは、通常食群と比較して腸管 NAMPT-NAD<sup>+</sup>合成系が有意に低下し、GLP-1 産生に参与する回腸での *Proglucagon* の発現が低下していた。NMN を投与したところ、GLP-1 分泌が

回復し、食後高血糖が改善した。

**【考察】**

腸管の NAMPT-NAD<sup>+</sup> 合成系の障害が、肥満における GLP-1 分泌障害および食後高血糖の原因であることが示され、肥満 2 型糖尿病に対する NMN 経口投与が GLP-1 産生促進を介する腸管を標的とした新規の糖尿病治療薬になる可能性を報告した (Nagahisa, Yamaguchi\* *et al. Endocrinology*. 2022).

## Vascular Biology Innovationに関する研究助成

## 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)

## 【目的】

血管の周りには血管周囲脂肪組織 (perivascular adipose tissue; PVAT) と呼ばれる支持組織が存在していることが知られている。血管炎症とリモデリング制御における PVAT の役割を明らかにすることを目的として、研究計画を立案した。

## 【方法】

本研究ではマウスの血管傷害モデルを用いた分子生物学的手法に加えて、システム生物学的手法を用いた解析により病態の解明に挑んだ。

## 【結果】

網羅的遺伝子発現解析の結果、血管傷害後の 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*<sup>+/-</sup>; *Prdm16*<sup>flx/flx</sup> マウス) 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、 $\beta$ 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、PVAT の炎症と血管リモデリングが抑制されることが分かった。一細胞 RNA-seq 解析により、褐色化したマウス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抗炎症型への分極作用が消失することを見

出した。

## 【考察】

本研究によって、動脈血管が傷つくと PVAT に褐色化が起これ、褐色化した PVAT は抗炎症物質 (NRG4) を分泌して、血管傷害後に起こる炎症を適切にコントロールしていることが分かった<sup>1)</sup>。今後は、PVAT の機能をターゲットにした動脈硬化性疾患の新しい治療法の開発を目的に研究を進めていく所存である。

## 【文献】

- 1) Adachi, Y., Ueda, K., Nomura, S., Ito, K., Katoh, M., Katagiri, M., Yamada, S., Hashimoto, M., Zhai, B., Numata, G., Otani, A., Hinata, M., Hiraike, Y., Waki, H., Takeda, N., Morita, H., Ushiku, T., Yamauchi, T., Takimoto, E. & Komuro I.: Being of perivascular adipose tissue regulates its inflammation and vascular remodeling. *Nat Commun.*, **13**, 5117 (2022).

## アルドステロン過剰におけるアルカローシス依存性の pendrin 制御機構の解析

鮎澤 信宏

(杏林大学医学部附属病院)

ミネラルコルチコイド受容体 (MR) は高血圧や心血管・腎障害の発症に関与する。助成期間中、これら病態における MR の活性化機構やその意義につき研究を行った。以下に成果を総括する。

- 1) 病的状態における MR 活性化はリガンド量のみには依らない。我々は、低分子 G 蛋白 Rac1 がリガンド非依存性に MR を活性化することを見出した。助成期間中、この Rac1-MR 経路が心不全の発症に関わるか検証した。マウス圧負荷性心不全モデルでは心臓において Rac1 と MR の活性化が見られたが、Rac1 阻害薬や心筋特異的 Rac1 ヘテロ欠損、MR 拮抗薬により

Rac1-MR 経路を遮断すると、酸化ストレスが減じ、心不全が改善した。すなわち Rac1-MR 経路が心不全発症に関わることが示された。

- 2) 最近、皮質集合管  $\beta$  間在細胞に発現する pendrin が NaCl 再吸収に働き、血圧調節に関わることが示された。我々は RAAS 亢進時には MR を介した二つの経路により pendrin 活性化が起こることを見出した。
- ①アンジオテンシン II 刺激時には間在細胞 MR の脱リン酸化・活性化を介して pendrin 活性化が起き、
  - ②一次性的アルドステロン過剰時には主細胞の MR-ENaC 経路活性化により起こる代謝性アルカローシスが pendrin 活性化を起こすことが示された。そして、これらの pendrin 活性化機構は血圧上昇に働き、特にサイアザイド利尿薬抵抗性の病態形成に関わることも示された。

#### 【文献】

- 1) Ayuzawa, N. *et al.*: Rac1 Mediated Activation of Mineralocorticoid Receptor in Pressure Overload Induced Cardiac Injury. *Hypertension.*, **67**, 99-106 (2016).
- 2) Ayuzawa, N. *et al.*: Two Mineralocorticoid Receptor Mediated Mechanisms of Pendrin Activation in Distal Nephrons. *J Am Soc Nephrol.*, **31**, 748-764 (2020).
- 3) Ayuzawa, N. *et al.*: The Mineralocorticoid Receptor in Salt-Sensitive Hypertension and Renal Injury. *J Am Soc Nephrol.*, **32**, 279-289 (2021).

#### 免疫学的介入に基づく循環器病に対する新規治療法の開発

安西 淳

(慶應義塾大学医学部)

#### 【研究目的】

本研究では遺伝子 X を中心とした心筋梗塞後の炎症・修復過程の新たな分子機序を明らかにし、新規治療法へと発展させることを目的とする。

#### 【研究方法・結果】

X-KO マウスに MI を作製し、28 日間観察すると、そ

の生存率は WT マウスと比較して改善傾向にあり、左心機能は有意差を持って良好であった。梗塞部位に集積する炎症細胞を flow cytometry 法で解析すると、X-KO マウスでは Ly6C<sup>high</sup> 単球 (CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup>Ly6C<sup>high</sup>) の浸潤が有意に低く、qPCR で解析した IL-1 $\beta$ , IL-6 などの炎症性サイトカイン、CCL2/CCL7 などのケモカインの遺伝子発現を検討すると、X-KO マウスで有意に減少していた。梗塞部においてどの細胞由来の X が重要かを骨髄移植モデルで確認すると、間質系細胞の重要性が示唆された。Flow cytometry 法により X の発現を検討すると、内皮細胞と線維芽細胞で X の発現を認めた。一方、各細胞群を FACS でソートし、CCL2 と CCL7 の遺伝子発現を検討すると、線維芽細胞でのみ有意な発現を認めた。以上より、心臓線維芽細胞由来の X の重要性が示唆されたため、心臓線維芽細胞特異的 X コンディショナル KO マウス (Tcf21<sup>Cre/+</sup> X<sup>flox/flox</sup>) に MI を作製し、4 週間後の生存率、心機能、梗塞部炎症性サイトカインや CCL2/CCL7 などのケモカインの発現、炎症細胞浸潤などを検討すると、X-KO マウスで見られた表現型が再現された。X-GFP レポーターマウスに MI を作製し、2 日後に GFP<sup>+</sup> と GFP<sup>-</sup> の心臓線維芽細胞を FACS でソートし、その遺伝子発現を比較検討する。予備的データでは GFP 陽性すなわち X 陽性線維芽細胞で有意に Ccl2/Ccl7 の発現が亢進していた。以上の結果は *in vitro* 実験でも再現された。

#### 【今後の展望】

網羅的解析を行い、*in vivo* での GFP<sup>+</sup> と GFP<sup>-</sup> の心臓線維芽細胞の比較、*in vitro* での X ノックダウンとコントロール心臓線維芽細胞の比較を行い、X の下流シグナルに関して検討を行う。

急性心筋梗塞に対する再灌流療法の発達は、急性期死亡率を劇的に低下させたが、重症例の救命によって慢性心不全の有病率をむしろ増加させるというパラドックスを生んだ。MI 後組織修復の過程には免疫応答の賦活化とそれに付随した炎症反応が不可欠であるが、これらが一度過剰になるとかえって組織障害を進展させ、梗塞後心不全を増悪させてしまう。近年、CANTOS 試験 (NEJM 2017) など、動脈硬化の二次予防に抗炎症作用を持つ薬剤が有効であることが実臨床でも明らかとなりつつあるが、MI 後に免疫応答や炎症反応が過剰となる機序は

未だ不明である。本研究で心臓線維芽細胞由来Xを中心とした新たな炎症分子カスケードが明らかになれば、梗塞後心不全予防のための創薬基盤につながる可能性があると考えられる。

### ペリサイトにおける ATP 依存性カリウムチャネルの心・脳における機能解析

安藤 康史

(国立循環器病研究センター研究所)

#### 【目的】

本年度はペリサイト選択的に発現する ATP 依存性カリウムチャネル (K-ATP チャネル) の中枢における役割の解明を通して、ペリサイトを基軸とした中枢疾患発症機構の理解と治療法開発への基盤形成を目指した。

#### 【結果・考察】

ATP 感受性カリウムチャネル (K-ATP) コード化遺伝子である KCNJ8 と ABCC9 の機能欠損または機能獲得変異は、ヒトの中枢神経系に原因不明の障害を引き起こす。そこで、マウスやゼブラフィッシュ、細胞培養モデルを用いて、K-ATP チャネルの機能変化に由来する脳機能異常とその分子機構を解析した。その結果、KCNJ8/ABCC9 を含む K-ATP チャネルの機能を遺伝学的または化学的に阻害または活性化することで、脳選択的に血管平滑筋細胞 (VSMC) への分化がそれぞれ抑制または促進されることが分かった。さらに、脳血管平滑筋は KCNJ8/ABCC9 を含む K-ATP チャネル陽性の (ペリサイト様) 前駆細胞から発生し、K-ATP チャネルは電位依存性カルシウムチャネルを介した細胞内 Ca<sup>2+</sup> 振動の調節を通じて、VSMC への分化を細胞自律的に制御していることが明らかになった。上記のような VSMC の発達障害と一致するように、*Kcnj8* ノックアウトマウスは、血管収縮能と神経誘発血管拡張能が欠損しており、局所的な神経活性化依存的な血流上昇が阻害 (neuro-vascular uncoupling) されていることが分かった。

これらの結果から、本 K-ATP チャネルによる正常な血管平滑筋分化制御は、例えば神経活性化依存的な脳血流の上昇にも極めて重要であることがわかり、

ABCC9・KCNJ8 の変異による本機構の破綻が中枢神経障害の背景にある可能性が示唆された (Ando *et al.*, *Developmental Cell*. 2022)。

#### 【文献】

- 1) Ando K. (co-corresponding author), Tong L., Peng D., Vázquez-Liébanas E., Chiyoda H., He L., Liu J., Kawakami K., Mochizuki N., Fukuhara S., Grutzendler J. & Betsholtz C.: KCNJ8/ABCC9-containing K-ATP channel modulates brain vascular smooth muscle development and neurovascular coupling. *Developmental Cell.*, 2022. 57(11): 1383-1399. e7.

### 心筋虚血再灌流傷害におけるフェロトーシスは小胞体の鉄過剰によって誘導される

池田 昌隆

(九州大学大学院医学研究院)

#### 【目的】

フェロトーシスは、「①鉄依存性に生じる脂質酸化により誘導され、②鉄のキレート剤もしくは脂質親和性抗酸化剤により抑制、③ GPx4 によって制御される細胞死」と定義される新規制御性細胞死である。心筋虚血再灌流傷害 (I/R 傷害) においてはフェロトーシスが関与することが報告されているが<sup>1)</sup>、I/R 傷害において既知の主たる細胞死である MPT-driven necrosis と比較した際の重要性および誘導分子機序については明らかではない。本研究は、GPx4 遺伝子改変マウスおよび単離心筋細胞を用いて I/R 傷害におけるフェロトーシスの重要性および誘導分子機序を明らかにすることを目的とした。

#### 【方法】

GPx4 過剰発現マウスに I/R モデルを作成、MPT-driven necrosis の阻害剤としてシクロスポリン A (CsA) を併用し、梗塞サイズを評価した。また単離培養心筋細胞において低酸素 / 再酸素化刺激 (H/R 刺激) を加え、鉄、過酸化脂質、細胞死を評価した。

#### 【結果】

I/R モデルにおいて、GPx4 過剰発現と CsA 投与による梗塞サイズ縮小効果はほぼ同等であった。さらに

GPx4 過剰発現マウスに CsA を投与したところ、野生型に CsA を投与した際と同等に梗塞サイズが縮小した。単離培養心筋細胞に H/R 刺激を加えたところ、過酸化脂質の増加と細胞死が誘導され、これらは鉄のキレート剤であるデクサラゾキサンおよび脂質親和性抗酸化剤であるフェロスタチンによって抑制された。H/R 刺激を加えた細胞では、全体としての総鉄量は不変であったが、小胞体内の鉄は著明に増加していた。I/R 傷害を受けた心筋組織および H/R 刺激を加えた単離心筋細胞ではヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) が増加しており、HO-1 を siRNA により silencing したところ、H/R によって生じる小胞体内の鉄の蓄積、過酸化脂質の増加、そして細胞死が抑制された。

#### 【考察】

*In vivo* の梗塞サイズの評価では、フェルトーシスと MPT-driven necrosis がほぼ同等に梗塞サイズに寄与していることが明らかとなった。さらに CsA の効果は野生型マウスに投与した場合と GPx4 過剰発現マウスに投与した場合にてほぼ同等であることから、フェルトーシスと MPT-driven necrosis は完全に独立した細胞死であることが示された。単離培養心筋細胞を用いた実験では、HO-1 の silencing によって H/R 刺激により誘導されるフェルトーシスが抑制されており、HO-1 によるヘムの分解亢進に基づく鉄が小胞体内に蓄積され、フェルトーシスの契機となることが明らかとなった<sup>2)</sup>。

#### 【文献】

- 1) Fang. *et al.*: Ferroptosis as a target for protection against cardiomyopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2019; **116**: 2672-2680
- 2) Miyamoto, DH. & Ikeda, M. (Corresponding author) *et al.*: Iron overload via heme degradation in the endoplasmic reticulum triggers ferroptosis in myocardial ischemia-reperfusion injury. *JACC Basic. Transl. Sci.*, 2022; **7**: 800-819

### 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

(九州大学大学院医学研究院)

#### 【目的】

近年、ミトコンドリアと 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。また、ER ストレス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】

左前下行枝の結紮による心筋梗塞モデルマウスの心筋および過酸化水素刺激における HERPUD1 の発現を評価した。また、HERPUD1 の homozygous KO マウスを作成し心筋梗塞を作成することで HERPUD1 の機能評価を行った。さらに心筋細胞においてアデノウイルスを用いて HERPUD1 を過剰発現させ、ミトコンドリア機能、心筋細胞死を評価した。

#### 【結果】

梗塞後心筋において HERPUD1 のタンパク量は 3 日目に有意に増加し、28 日目にかけてベースラインまで低下することが明らかとなった。また心筋細胞に対しての過酸化水素刺激でも同様に HERPUD1 のタンパク量が増加した。HERPUD1 の homozygous KO はベースラインでは心機能低下を引き起こさなかったが、心筋梗塞後の左室拡張末期径を拡大させ左室駆出率低下を増悪した。さらにアデノウイルスを用いた心筋細胞への HERPUD1 の過剰発現は過酸化水素によるミトコンドリア機能低下を抑制し、心筋細胞死を抑制した。

## 【考察】

以上の結果から、HERPUD1 は梗塞後心筋において発現が増加しており、ミトコンドリア機能低下の抑制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することが明らかとなった。

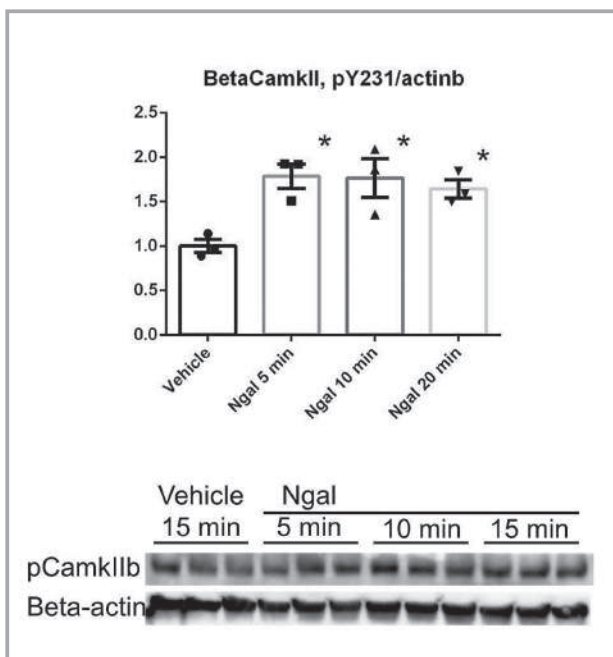
### ストレスホルモン制御機構である腎臓とその破綻の解析

上田 浩平

(国際医療福祉大学医学部)

## 【これまでの経緯】

2021年度はマウス尿管上皮 mDCT 細胞を用いて糖質コルチコイド-GR 系による NCC 活性制御機構について解析した。機器故障により保存されていた mDCT 細胞の状態が悪く内因性 NCC の良好な発現が確認できなかったため、急性腎障害バイオマーカー・A (NGAL) による NCC 活性化機序を解析した。その過程で NGAL による NCC 活性調節因子 Camk2b のリン酸化を同定した (図 1)。Camk2b は共同研究者 Frederic Jaisser 教授による RNA-seq 解析で NGAL により発現が上昇する遺伝子として同定されかつ最近、NCC 活性化機序として報告されており [Gholam, MF. *et al.*, 2021], NGAL による NCC 活性化制御機構として有力であり、鋭意解析を進めている。



並行して、“non-dipper” の普遍的な発症機序を明らかにするために、新たな動物モデルの開発を試みた。

## 【背景】

non-dipper を発症する原因として様々な背景因子が報告されている [Kimura. *et al.* 2010]. 大別して、①心不全・腎不全・糖尿病など腎障害 (血液ろ過量低下) による体液量過剰をきたす疾患が背景に存在し、日中に排尿を通じた適切な体液量調節が充分に行われず夜間睡眠中も体液量過剰が残存するがゆえに睡眠中の血圧が低下しないと考えられている病態、②自律神経障害や睡眠時無呼吸症候群など機序は不明であるが non-dipper を合併することが知られている病態、の 2 つである。

①は原疾患に引き続く二次的な体液量過剰が non-dipper 発症の原因と考えられている。しかし②についてはそもそも体液量過剰をきたすのかを含め不明な点が多く、未解明の機序が存在すると考えられる。ゆえに、②をモデル化した実験動物における non-dipper 発症機序の解明が求められており、さらにそのような病態モデルの解析を通じて、血圧の概日リズムを形成する仕組みとして不可欠な機序を明らかにすることができると考えられる。

## 【目的】

睡眠時無呼吸症候群モデル、すなわち睡眠時間断的低酸素による non-dipper マウスモデルを用いて、その発症機序を明らかにする。

## 【研究計画】

睡眠時間断的低酸素 (IH) モデルマウス [Shimosawa, *et al.* 2014, 2015]: C57Bl/6 野生型マウスを飼育する密閉された飼育箱の中へ 100% 窒素を注入することにより、酸素濃度を 90 秒間で室内気 (21%) から 4% へ低下させ、その後 90 秒間で室内気へ戻す 3 分間のサイクルを、8時から20時まで点灯する飼育室において9時から17時まで1日8時間施行する。開始した日を Day 0 として、Day 5-Day 7 で連続的に血圧を測定する。腎臓などマウス試料を採取する場合は、血圧測定用カテーテル留置外科手術の影響を考慮し、血圧測定実験用のマウスとは別に正常対照群とともに用意し、マウスの睡眠時である明期 (正午) に試料を採取する。

本研究計画では睡眠時無呼吸症候群による non-dipper 発症機序について、IH モデルマウスを用いて、



長期的な血圧調節異常に不可欠である体液量過剰依存性や腎機序を明らかにする。腎機序が明らかになった場合、その上流経路についても探索的に可能な限り明らかにする。具体的には以下となる。

### 1. 睡眠時間断的低酸素による non-dipper 型血圧の食塩感受性を明らかにする

図1に示されたように、減塩食によりIHモデルの血圧日内変動が回復することを、さらにサンプル数を増やして確認する。これにより、IHモデルの non-dipper が食塩感受性であること、つまりNa貯留を介した体液量過剰による腎機序であることを示す。この実験は、先行研究において non-dipper 発症機序として血管抵抗調節異常(血管機序)が主に示唆されてきたなかで画期的と考えられる。

### 2. 睡眠時間断的低酸素による non-dipper 型血圧の腎機序を明らかにする

予備実験(図1)において、IHモデルの non-dipper 発症機序として腎臓のNa輸送体蛋白、具体的にはNa<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup>共輸送体(NCC)・Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup>共輸送体(NKCC2)の活性化示された。共同研究者はNCCノックアウトマウスを保持している[Shimosawa *et. al.* 2011]。そこで、NCCとNKCC2の双方が発症機序として重要であると仮定し、

- ・IH環境下NCC-KOマウスにNKCC2阻害薬 furosemide を経口投与し血圧測定
- ・野生型のIHモデルマウスにNCC阻害薬 hydrochlorothiazide または furosemide を投与し血圧測定、次に hydrochlorothiazide と furosemide を併用投与し血圧測定

これにより、IHモデルの non-dipper 発症の腎機序を明らかにする。もしこれら薬剤投与によりIHモデルの血圧日内変動に改善が見られなければ、その他の腎Na輸送体蛋白、NHE3やENaCの代償的活性化が起きているかを確認し、それぞれの阻害剤併用投与と実験を行う。

### 3. 睡眠時間断的低酸素による Non-dipper 型血圧の腎機序の上流経路を明らかにする

睡眠時間断的低酸素から腎臓のNCC・NKCC2活性化を来す機序を探索的に明らかにする。NCCやNKCC2を活性化させる機序として一般的な経路は以下であるの

で、それぞれの阻害剤や、共同研究者が既に保持または作出可能な受容体ノックアウトマウスを用いて、上流経路を同定する。

- ・レニン-アンジオテンシン系：AT1受容体 losartan, AT1aR-KO
- ・交感神経系(特にβ作用)：β1/2阻害薬 propranolol, Adrb1/2-KO

そして睡眠時間断的低酸素がこれら経路を活性化する機序として、以下を想定し解析を行う。

- ・低酸素誘導因子HIF：腎尿細管特異的 Hif1a-KO(早稲田大学・合田教授より Hif1a-Flox マウス供与予定)
- また興味深いことに、IHモデル腎臓のmRNA発現量を解析すると概日リズム形成に関わる主要な時計遺伝子群の発現が著明に変化していた(図2)。特に発現が増加していたPer1は生理的には血圧が上昇する覚醒時に発現が上昇する。さらにPer1による腎NCC活性調節も報告されている[Gumz. *et. al.*, 2012]ので、Per1抑制によるIHモデルの腎NCC・NKCC2抑制や血圧日内変動改善の有無を明らかにする。

- ・時計遺伝子：Per阻害薬 PF-670462

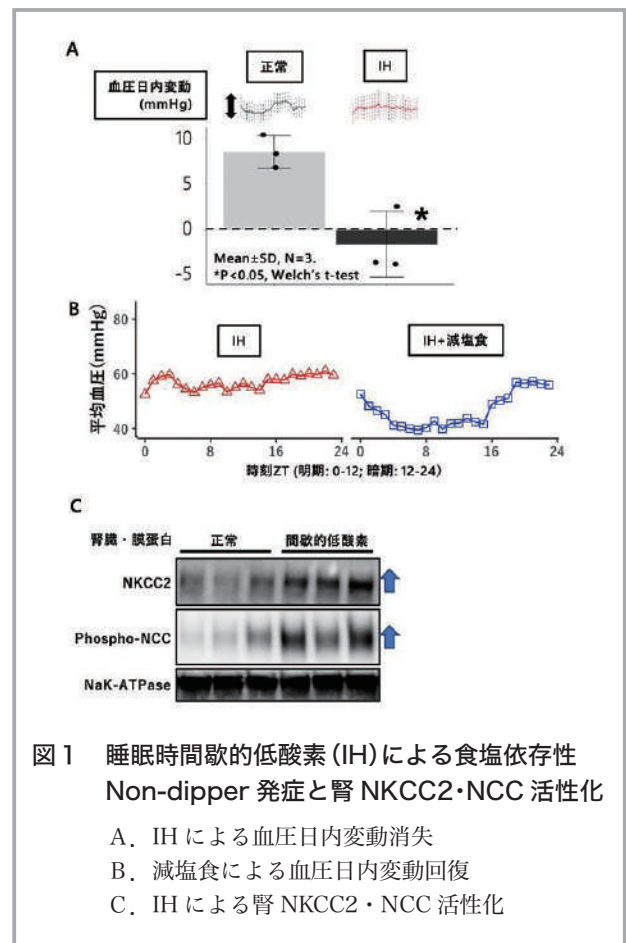


図1 睡眠時間断的低酸素(IH)による食塩依存性 Non-dipper 発症と腎 NKCC2・NCC 活性化  
A. IHによる血圧日内変動消失  
B. 減塩食による血圧日内変動回復  
C. IHによる腎NKCC2・NCC活性化

## 腸-骨髄連関から動脈硬化を制御する

江本 拓央

(神戸大学大学院)

## 1. 骨髄での単球の制御機構の解明

単球がどのように骨髄において維持されているのか、Colony stimulating factor-1 (CSF-1) が重要な働きを担っていることはよく知られていたが、骨髄のニッチの細胞が CSF-1 を分泌し、単球維持されているのかは分かっていなかった。Cre loxp system を用いて、血管内皮細胞 (Cdh5-Cre), Lepr 陽性間質細胞 (Lepr-Cre), 免疫細胞 (Vav1-Cre), 骨芽細胞 (Osx1-Cre, Dmp-1-Cre) と CSF-1<sup>lox</sup> マウスを掛け合わせることで、血管内皮細胞や Lepr 陽性間質細胞由来の CSF-1 が単球の維持に重要であることを証明した。特に血管内皮細胞は Ly6C<sup>low</sup> 単球に血管内皮と Lepr 陽性間質細胞は協調して、Ly6C<sup>high</sup> 単球の維持をになっていることが分かった。主にはトロント大学で留学中に行った仕事であるが、一

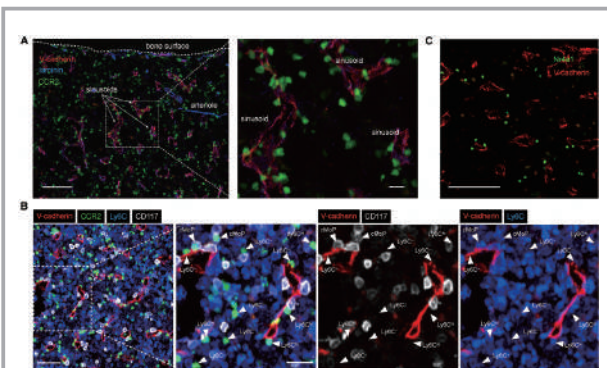


図1 BM monocytes reside within a perisinusoidal niche

(A) Representative image showing CCR2-GFP<sup>+</sup> BM monocytes reside adjacent to sinusoidal endothelial cells. Scale bars represent 100 mm in left panel and 20 mm in right panel.

(B) Representative BM image from CCR2-GFP<sup>+</sup> mice showing immunofluorescence imaging of VE-cadherin, Ly6C, and CD117 to identify cMoP (CCR2<sup>+</sup> Ly6C<sup>+</sup> CD117<sup>+</sup>), Ly6C<sup>hi</sup> monocytes (CCR2<sup>+</sup> Ly6C<sup>+</sup> CD117<sup>-</sup>), and Ly6C<sup>low</sup> cells (CCR2<sup>+</sup> Ly6C<sup>-</sup> CD117<sup>-</sup>), which could be either Ly6C monocytes or dendritic cells (DCs). Scale bars represent 50 mm in left panel and 25 mm in right panels.

(Emoto, T. *et al. Immunity*. May10; 55(5): 862-878. 8. 2 022.)

部リバイス実験を一部を日本で行い、論文受理された。

## 2. 急性冠症候群を引き起こすプラークのシングルセル解析

腸-骨髄連関の研究を行う前に、ターゲットとなる冠動脈プラーク粥腫破綻メカニズム解明のため、冠動脈粥腫摘除術の適応となった慢性冠症候群4例、急性冠症候群3例の免疫細胞のシングルセル解析を行った。

大きく分けると、T細胞、Myeloid細胞、B細胞に分けられた。骨髄球系細胞にフォーカスして解析したところ、単球、マクロファージ (Mφ), 樹状細胞、肥満細胞を認めた。Mφの分画はそれぞれの特徴的な遺伝子発現から、TNF<sup>+</sup> Mφ, C1Q<sup>+</sup> TREM2<sup>+</sup> fibrotic Mφ, CXCL3<sup>+</sup> IL1B<sup>+</sup> inflammatory Mφの3つに分けられた(図2)。IL1Bを強く発現するのは、単球とCXCL3<sup>+</sup> IL1B<sup>+</sup> inflammatory Mφであり、いずれも急性冠症候群でのみ認めるものであったことから、IL1Bの阻害薬の投与が心筋梗塞発症患者の2次予防に有効であったとするCANTOS trial (Ridker PM *et al. N Engl J Med*. 2017)をサポートする結果であった(図2)。(Emoto, T *et al. Circulation*. May 3; 145(18): 1434-1436. 2022.)

## 3. 大動脈瘤と腸内細菌との関連

動脈硬化と関連して、動脈硬化に起因する大動脈瘤の形成が腸内細菌叢と関連しているのか、動脈硬化モデルマウス (APOE ノックアウトマウス) にアンジオテンシンIIを負荷するモデルを使って調べた。腸内細菌を抗生剤でdepletionすると動脈瘤の形成が抑制されたのに対し、抗生剤を腹腔内投与しても動脈瘤の形成は抑制され

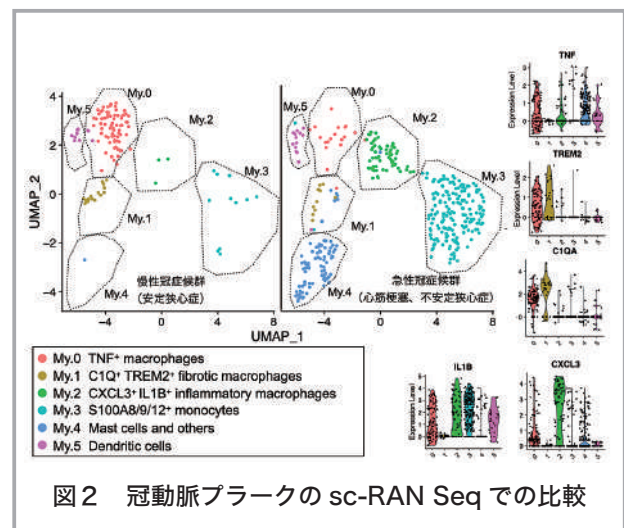


図2 冠動脈プラークの sc-RAN Seq での比較

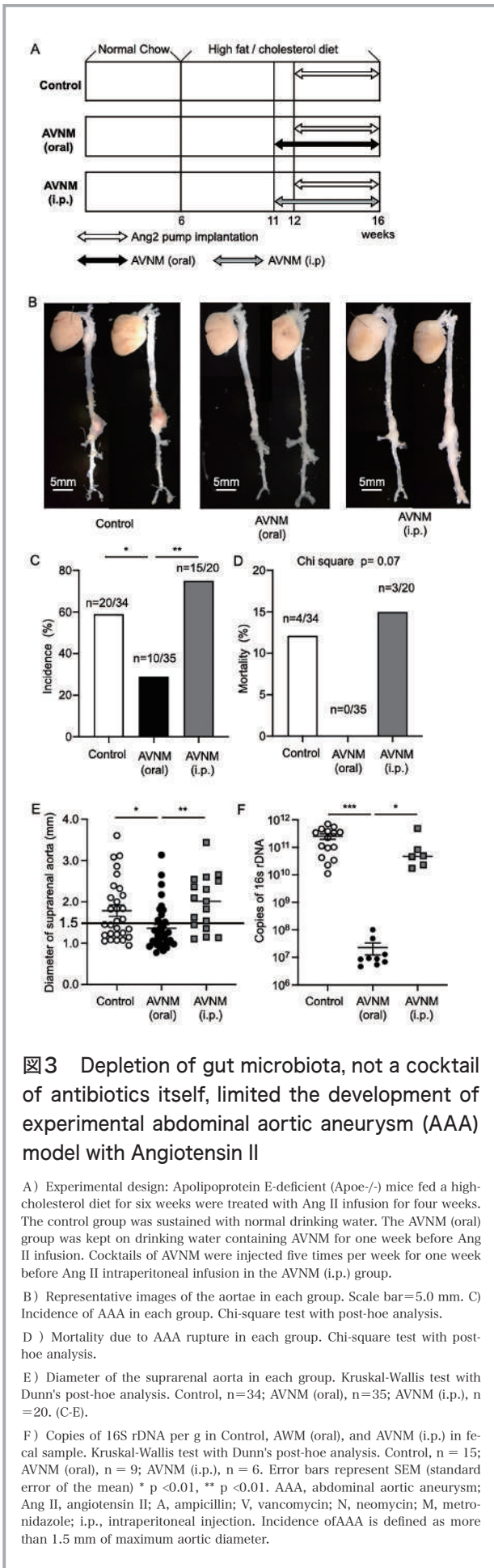


図3 Depletion of gut microbiota, not a cocktail of antibiotics itself, limited the development of experimental abdominal aortic aneurysm (AAA) model with Angiotensin II

A) Experimental design: Apolipoprotein E-deficient (ApoE<sup>-/-</sup>) mice fed a high-cholesterol diet for six weeks were treated with Ang II infusion for four weeks. The control group was sustained with normal drinking water. The AVNM (oral) group was kept on drinking water containing AVNM for one week before Ang II infusion. Cocktails of AVNM were injected five times per week for one week before Ang II intraperitoneal infusion in the AVNM (i.p.) group.

B) Representative images of the aortae in each group. Scale bar = 5.0 mm. (C) Incidence of AAA in each group. Chi-square test with post-hoc analysis.

D) Mortality due to AAA rupture in each group. Chi-square test with post-hoc analysis.

E) Diameter of the suprarenal aorta in each group. Kruskal-Wallis test with Dunn's post-hoc analysis. Control, n = 34; AVNM (oral), n = 35; AVNM (i.p.), n = 20. (C-E).

F) Copies of 16S rDNA per g in Control, AWM (oral), and AVNM (i.p.) in fecal sample. Kruskal-Wallis test with Dunn's post-hoc analysis. Control, n = 15; AVNM (oral), n = 9; AVNM (i.p.), n = 6. Error bars represent SEM (standard error of the mean) \* p < 0.01, \*\* p < 0.01. AAA, abdominal aortic aneurysm; Ang II, angiotensin II; A, ampicillin; V, vancomycin; N, neomycin; M, metronidazole; i.p., intraperitoneal injection. Incidence of AAA is defined as more than 1.5 mm of maximum aortic diameter.

なかった。

免疫染色, FACS データからは, 病変部への単球やマクロファージの浸潤が抑制されていることが示された。当初は骨髄の関与を想定していたが, 骨髄で作られる単球は変化なかったものの, 脾臓に貯蔵 (一部作られる) されている単球が著しく減少しており, 脾臓から病変部へ移行する単球が減ることが動脈瘤形成に良い影響を与えることを証明した。また腸内細菌由来の物質として, Nod1 が脾臓の単球に影響を与えていることも示すことができた。

(Shinohara, R., Nakashima, H., Emoto, T.: *et al. Hypertension*. 2022. in press.)

**Developmental Origins of Health and Disease としての AT<sub>1</sub> 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

(信州大学先鋭領域融合研究群バイオメディカル研究所)

**【目的】**

本研究は, 哺乳類の後腎発生における脈管・血管形成でのアンジオテンシン II (AngII) の作用メカニズムを解明し, Developmental Origins of Health and Disease の予防・治療法の開発を目指すことを目的としている。

AngII は, 後腎発生において, 腎内脈管・血管形成を誘導する重要な生理機能を有している。AngII はアンジオテンシン 1 型受容体 (AT<sub>1</sub>R) に結合することで作用し, G タンパク質経路と β アレスチン経路を介して細胞機能を調節しているが, 後腎発生におけるこれらの経路の特異的な作用については不明な点が多い。

**【方法】**

両経路を抑制する AT<sub>1</sub>R 拮抗薬「カンデサルタン」, および 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 β アレスチンバイアス AT<sub>1</sub>R アゴニスト「TRV027」を用いて, 新生児マウスの後腎発生における両経路の役割の解明を試みた。後腎形成が進行する出生 1 日目から 15 日目までの野生型マウスに生理食塩水, カンデサルタン, TRV027 を連日皮下投与した。投与

したマウスの血清を用いた腎機能の評価, および腎病理組織を用いた免疫・化学組織染色をそれぞれ行った。

### 【結果】

マウス血液検査の結果, カンデサルタン投与群でのみ有意な腎機能障害を認めた。腎病理組織解析を行ったところ, カンデサルタン投与群において小葉間動脈・輸入動脈の血管平滑筋の顕著な肥厚が確認され, 皮質の菲薄化などが確認された。さらに免疫組織染色の結果から, 異常な血管平滑筋様細胞の増加が認められた。

### 【考察】

後腎発生においては, AT1R 経路が血管の形成・成熟に機能することが示された。本研究は継続中であり, 現在カンデサルタンによる異常な血管平滑筋様細胞の増加について, そのメカニズムを検討している。また, さらなる解析のためのモデルマウスを構築中である。

## 血管病との関連から心腎肺疾患を紡ぐ VEGF-A の新機軸

菊地 良介

(名古屋大学)

2014年から2021年までの本助成期間を通して, VEGF-A の新機軸である VEGF-A<sub>165b</sub> (VEGF-A の相反する作用を有するアイソフォーム) と血管病との関連から心腎肺疾患における VEGF-A<sub>165b</sub> の役割について下記7点を明らかにした。血管病: ①血管病の一つである末梢動脈閉塞性疾患 (PAD) 患者の VEGF-A 血中濃度の上昇は, 動脈の閉塞に伴う組織の低酸素に応答した血管新生促進反応の結果という従来の概念を覆し, 「VEGF-A 研究のパラダイムシフトが起きた」とも言える研究成果を世界に先駆けて明らかにした<sup>1)</sup>。②PAD の発症要因である肥満症患者の胃縮小術前後で血中 VEGF-A<sub>165b</sub> 濃度に有意な差が認められ, 微小血管障害の改善指標として有用であることを明らかにした<sup>2)</sup>。③PAD の治療法の一つである脂肪由来間葉系幹細胞移植による血管新生療法の治療効果判定指標に VEGF-A<sub>165b</sub> の割合変化が有用であることを明らかにした<sup>3)</sup> (特許: 第 6685563 号)。心疾患: ④急性心筋梗塞 (AMI) を発症した患者では, VEGF-A<sub>165b</sub> が冠動脈病変の複雑性と AMI 発症後

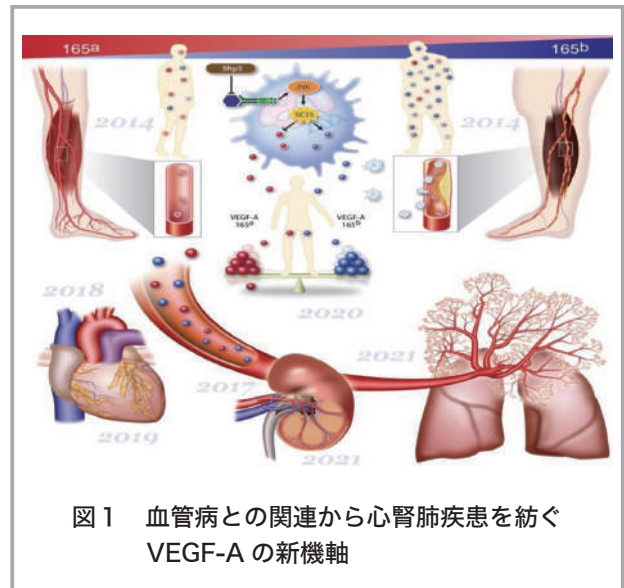


図1 血管病との関連から心腎肺疾患を紡ぐ VEGF-A の新機軸

の予後評価指標となりうることを明らかにした<sup>4,5)</sup> (特許: 第 7009977 号)。腎疾患: ⑤慢性腎臓病患者の尿中 VEGF-A<sub>165b</sub> 濃度が腎機能障害の重症度を反映しており, 透析導入直前の患者では血中 VEGF-A<sub>165b</sub> 濃度が上昇していることを明らかにした<sup>6)</sup> (特許: 第 6675687 号)。⑥国内最大コホートに参画し, ANCA 関連血管炎の寛解予測に血中 VEGF-A<sub>165b</sub> 濃度が有用であることを明らかにした<sup>7)</sup>。肺疾患: ⑦肺高血圧症の病態区分に血中 VEGF-A<sub>165b</sub> 濃度が有用であることを明らかにした<sup>8)</sup>。以上より, 本助成期間中に臨床検査医学への応用を視野に, 心腎肺疾患の臨床指標としての VEGF-A<sub>165b</sub> の役割について研究を展開した (図1)。

### 【文献】

- 1) Kikuchi, R., Nakamura, K., MacLauchlan, S., Doan, TM., Shimizu, I., Fuster, J., Katanasaka, Y., Qiu, Y., Yamaguchi, PT., Matsushita, T., Murohara, T., Bates, DO., Hamburg, NM. & Walsh, K.: An anti-angiogenic isoform of VEGF-A contributes to impaired vascularization in peripheral artery disease, *Nat. Med.*, **20**(12), 1464-1471 (2014).
- 2) Doan, TM., Farb, M., Kikuchi, R., Karki, S., Tiwari, S., Bigornia, S., Bates, DO., Hamburg, NM., Vita, JA., Hess, DT., Walsh, K. & Gokce, N.: Anti-angiogenic actions of VEGF-A<sub>165b</sub>, a novel isoform of VEGF-A, in human obesity, *Circulation.*, **130**, 1072-1080 (2014).

- 3) Katagiri, T., Kondo, K., Shibata, R., Hayashida, R., Shintani, S., Yamaguchi, S., Shimizu, Y., Unno, K., Kikuchi, R., Kodama, A., Takanari, K., Kamei, Y., Komori, K. & Murohara, T.: Therapeutic Angiogenesis using Autologous Adipose-derived Regenerative Cells in Patients with Critical Limb Ischaemia in Japan: A Clinical Pilot Study, *Scientific Reports.*, **10**, 16045 (2020).
- 4) Shibata, Y., Kikuchi, R., Ishii, H., Suzuki, S., Harada, K., Hirayama, K., Suzuki, A., Tatami, Y., Kondo, K. & Murohara, T.: Balance between angiogenic and anti-angiogenic isoform of VEGF-A is associated with the complexity and severity of coronary artery disease, *Clin. Chim. Acta.*, **478**, 114-119 (2018).
- 5) Harada, K., Kikuchi, R., Ishii, H., Shibata, Y., Suzuki, S., Tanaka, A., Suzuki, A., Hirayama, K. & Murohara, T.: Association between the ratio of anti-angiogenic isoform of VEGF-A to total VEGF-A and adverse clinical outcomes in patients after acute myocardial infarction, *Int. J. Cardiol. Heart. Vasc.*, **19**, 3-7 (2018).
- 6) Kikuchi, R., Yasuda, Y., Nakatochi, M., Shibata, Y., Hara, T., Suzuki, A., Imaizumi, T., Suzuki, S., Ishii, H., Takeshita, K., Matsushita, T., Maruyama, S. & Murohara T.: Urinary and circulating levels of the anti-angiogenic isoform of vascular endothelial growth factor-A in patients with chronic kidney disease, *Clin. Chim. Acta.*, **475**, 102-108 (2017).
- 7) Kikuchi, R., Tsuboi, N., Sada, K., Nakatochi, M., Yokoe, Y., Suzuki, A., Maruyama, S., Murohara, T., Matsushita, T. and Research Committee of Intractable Vasculitis Syndrome and Research Committee of Intractable Renal Disease of the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan; Amano, K., Atsumi, T., Takasaki, Y., Ito, M., Hasegawa, H., Dobashi, H., Ito, T., Makino, H. & Matsuo, S.: VEGF-A and VEGF-A165b are associated with time to remission of granuloma-

tosis with polyangiitis in a nationwide Japanese prospective cohort study, *Ann. Clin. Biochem.*, **58**(2). 86-94 (2021).

- 8) Adachi, S., Kikuchi, R., Shimokata, S., Suzuki, A., Yoshida, M., Imai, R., Nakano, Y., Kondo, T. & Murohara, T.: Endostatin and vascular endothelial growth factor-A165b may contribute to classification of pulmonary hypertension. *Circ. Rep.*, **3**(3). 161-169 (2021).

### 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

(東京大学医学部附属病院)

#### 【背景と研究目的】

細胞一つ一つから個別にトランスクリプトーム解析を行う Single-cell RNA-seq (scRNA-seq) はこの5年程の間に大きく普及し、今や生物学研究に欠かせないものとなった。昨今の国内外の研究情勢を鑑みるに、単なる scRNA-seq 解析のみならず、そこで得られる様々な情報をうまく処理して重要な分子生物学的事象を明らかにしたり、トランスクリプトーム以外の階層の解析技術とうまく統合したりすることが重要になってきている。申請者が取り組んでいる心不全研究に当てはめて言うならば、得られた膨大なデータを如何に処理し、有用な情報を抽出(新規心不全治療ターゲットの探索)するのかが喫緊の課題と言える。申請者らは本研究助成を受け、この課題に対して以下のように取り組み、本年度は一定の成果を得た。

#### 【方法】

##### (1)心筋細胞-非心筋細胞間コミュニケーションの解析

申請者等の過去の研究では心筋細胞単独に注目していたが、心臓に存在する非心筋細胞にも着目し、scRNA-seq データを用いて重み付け遺伝子共発現ネットワーク解析 (WGCNA) やリガンド-受容体解析 (LR 解析)、Pathway 解析といった新たな解析手法を加えることに

より、非心筋細胞-心筋細胞相互作用に基づく新たな心不全の病態解明を目指した。

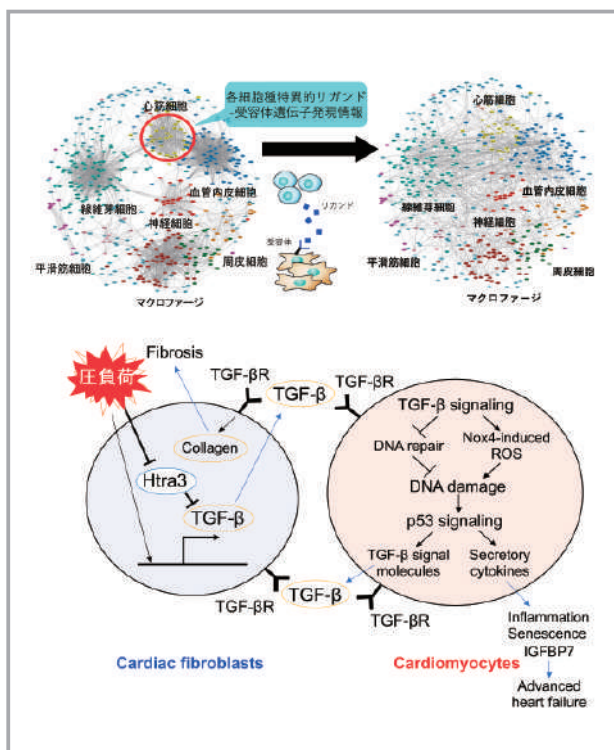
## (2) scRNA-seq と空間的遺伝子発現解析 (Spatial transcriptomics) の統合解析

scRNA-seq の最大の問題点は細胞単離の過程で元々個々の細胞が存在していた位置情報が失われる点にあるが、申請者らは組織上の細かな各領域でトランスクリプトームを調べる空間的遺伝子発現解析の手法を用いて、scRNA-seq と統合解析を試みた。

### 【結果及び考察】

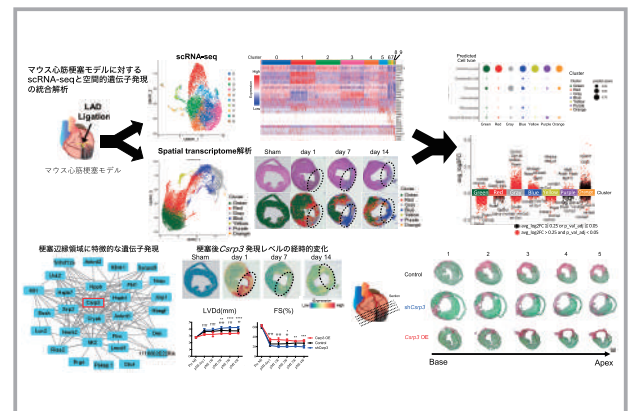
#### (1) 心筋細胞-非心筋細胞間コミュニケーションの解析

異なる細胞種の遺伝子ネットワークのうち、特にリガンド/受容体 (LR) 遺伝子を抜き出し、LR データベースを基に対応するリガンド-受容体 (LR) 同士をつなげることによって細胞種間コミュニケーションを可視化したところ、心臓においては心筋細胞-心臓線維芽細胞間のシグナル伝達のやり取りが最も盛んであることが分かった。線維芽細胞特異的に発現する Htra3 という分子に着目し、機能解析を進めたところ、Htra3 KO マウスは圧負荷に脆弱であり、圧負荷後に線維芽細胞で TGF $\beta$  シグナルの過剰活性化が生じ、それがさらに心筋細胞にも影響してこれを不全心筋化させることが分かった。逆に Htra3 の過剰発現は心保護的であり、新たな治療ターゲットであると考えられる。



## (2) scRNA-seq と空間的遺伝子発現解析 (Spatial transcriptomics) の統合解析

健常及び梗塞後の心臓組織標本を“数細胞レベル”の細かい解像度で空間的遺伝子発現プロファイルの解析を行い、これを scRNA-seq と統合解析した結果、心筋梗塞後急性期に梗塞周辺領域の心筋細胞において特徴的に見られる、Csrp3 に代表されるようなメカノストレス応答遺伝子の発現増加が心保護的に働き、将来的な梗塞後リモデリングを抑制することを見出した。



### 【文献】

- 1) Ko, T. & Morita, H.: Molecular Genomic Autopsy –Clues to Preventing Further Tragedy?–. *Circ J.*, 2022 Sep 17. doi: 10.1253/circj.CJ-22-0513.
- 2) Yamada, S., Ko, T. (co-first author), Hatsuse, S., Nomura, S., Zhang, B., Dai, Z., Inoue, S., Kubota, M., Sawami, K., Yamada, T., Sassa, T., Katagiri, M., Fujita, K., Katoh, M., Ito, M., Harada, M., Toko, H., Takeda, N., Morita, H., Aburatani, H. & Komuro, I.: Spatiotemporal transcriptome analysis reveals critical roles of mechano-sensing genes at the border zone in remodeling following myocardial infarction. *Nat Cardiovasc Res.*, 1: 1072-1083 (2022).
- 3) Katagiri, M., Yamada, S., Katoh, M., Ko, T., Ito, M. & Komuro, I.: Heart Failure Pathogenesis Elucidation and New Treatment Method Development. *JMA J.*, in press (2022).
- 4) Ko, T. & Morita, H.: Takotsubo Cardiomyopathy and Peripartum Cardiomyopathy: Similar in Features, but Different in Nature. *Int Heart J.*, 63: 651-653 (2022).

- 5) Ko, T. & Nomura S.: Manipulating Cardiomyocyte Plasticity for Heart Regeneration. *Front Cell Dev Biol.*, **10**: 929256 (2022).
- 6) Ko, T., Nomura, S., Yamada, S., Fujita, K., Fujita, T., Satoh, M., Oka, C., Katoh, M., Ito, M., Katagiri, M., Sassa, T., Zhang, B., Hatsuse, S., Yamada, T., Harada, M., Toko, H., Amiya, E., Hatano, M., Kinoshita, O., Nawata, K., Abe, H., Ushiku, T., Ono, M., Ikeuchi, M., Morita, H., Aburatani, H. & Komuro, I.: Cardiac fibroblasts regulate the development of heart failure via Htra3-TGF- $\beta$ -IGFBP7 axis. *Nat Commun.*, **13**(1): 3275 (2022).

### 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)

#### 【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。以上より、本研究では NBL1 が腎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 ヒト近位尿細管細胞 (HK-2 細胞) を用いて、NBL1 の発現を上昇させる因子の検討及びリコンビナント NBL1 (rNBL1) による刺激下での EMT 関連蛋白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、ストレプトゾトシン (STZ) にて糖尿病を誘導し、尿蛋白や腎線維化の程度を評価し、糖尿病性腎症における NBL1 の役割について検討した。

#### 【結果】

- ① HK-2 細胞を無血清培地 (コントロール: 低グルコース 5.6 mM) で serum starvation 後、高グルコース培地 (33 mM) で 24 時間刺激すると、コントロールと比べて高グルコース刺激の細胞では、NBL1 の

mRNA は有意に上昇した。また TGF $\beta$  1 (5 ng/ml) で 24 時間刺激した場合も同様の結果となった。この結果をもとに、リコンビナント NBL1 (rNBL1) 125 ng/ml で HK-2 細胞を 48 ~ 72 時間刺激すると、 $\alpha$ SMA や vimentin 等の EMT に関するマーカーの mRNA が有意に上昇した。また rNBL1 (500 ng/ml) で 72 時間刺激し、western blot で蛋白の発現を検討すると、 $\alpha$ SMA は、コントロールに対して、約 1.5 倍に有意に増加し、E-cadherin は低下した。

② 動物実験には、KO (NBL1: -/-) マウスと WT (NBL1: +/+) マウスを使用した。マウスの右腎臓を摘除し、2 週間の回復期間を与えた後に高脂肪餌を負荷し、STZ を腹腔内投与して血糖値が 300 mg/dl 以上の個体を糖尿病群とした。また STZ を投与せず普通餌で飼育する KO マウスおよび WT マウスをコントロール群とした。4 週毎に体重と血糖値、尿蛋白等の測定を行い、糖尿病発症後 24 週まで飼育し、検体を採取した。現在は血液、腎臓での NBL1 の発現量、線維化に関する蛋白の発現について解析を行なっている。

#### 【考察】

培養細胞において、NBL1 は高糖や TGF $\beta$  1 刺激で発現が増加し、rNBL1 は EMT を起こした。今後は NBL1 抑制下におけるこれらの刺激因子での EMT 現象や、さらに NBL1 がどのような発現機序を持つかについて検討する。

### ヒト iPS 細胞由来心臓予定領域および心筋細胞の作り分け

斎藤 幸弘

(岡山大学病院)

#### 【目的】

ヒト多能性幹細胞由来心筋細胞を左室・右室のサブタイプ別に誘導する方法は確立されていない。本研究では、ヒト iPS 細胞から左室様心筋細胞および右室様心筋細胞を別々に誘導する方法を検討した。

#### 【方法と結果】

GSK3 阻害剤と Wnt 阻害剤を用いる心筋分化プロトコル (Lian *et al. Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012)

を用いて、ヒト iPS 細胞の心筋細胞分化を誘導した。通常のプロトコールでは、主に一次心臓領域に相当する NKX2-5+/TBX5+ 心臓前駆細胞が誘導され、この前駆細胞集団からは最終的に左室心筋細胞に相当する TBX5+/MLC2v+ 心筋細胞が得られた。次に、このプロトコールの中胚葉誘導開始にあたる分化 0 日目に dorsomorphin を加えたところ、主に二次心臓領域に相当する NKX2-5+/TBX5-/CXCR4+ 心臓前駆細胞が誘導され、この前駆細胞集団からは最終的に右室心筋細胞に相当する TBX5-/MLC2v+ 心筋細胞が得られた。

#### 【考察】

GSK3 阻害剤と Wnt 阻害剤を使用する心筋分化プロトコールにおいて、中胚葉誘導期に BMP シグナルを阻害することで、左室の源となる一次心臓領域の誘導が抑制され、右室の源となる二次心臓領域に相当する細胞が特異的に誘導されることがわかった。これまでに、レポーター遺伝子導入 (Zhang *et al. Cell Stem Cell.* 2019; Pezhouman *et al. Cardiovasc Res.* 2022) や、細胞表面マーカーに対する抗体で異なる心臓領域前駆細胞を回収する方法 (Andersen. *et al. Nat Commun.* 2018) が報告されている。本研究では、培地交換のみの操作で、左室および右室心筋細胞を作り分けることができる簡便な心筋分化プロトコールを確立した。

#### 【学会発表】

斎藤 幸弘, 中村 一文, 伊藤 浩: Different Heart Field Progenitors and Chamber Cardiomyocytes Derived from Pluripotent Stem Cells, 第 86 回日本循環器学会学術集会, Special Session 16, 2022 年 3 月, 神戸.

#### 神経 - 免疫ネットワークを介して高血圧の臓器障害を抑制するニューロモデュレーション治療の開発

朔 啓太

(国立循環器病研究センター)

※本研究は、当初ラット高血圧モデルを対象に植え込み型迷走神経刺激装置を用いた実験を想定していたが、コロナ禍によって装置調達が可能となり、迷走神経刺激を用いた下記実験を本年度は推進した。

#### 【目的】

心不全状態では、過度の頻脈が心筋酸素消費量 (MVO2) を増加させ、心機能を悪化させる。しかし、不適切な心拍数 (HR) の低下は、逆に血行動態を悪化させる。迷走神経刺激 (VNS) の生理的反応として、心拍数の低下が知られている。我々は、これまでに、迷走神経刺激による心拍数減少の動的特性について繰り返し報告をしてきた。また、近年、我々は上大静脈 (SVC) に留置したバスケットカテーテルを介して右迷走神経を刺激できる静脈内留置型 VNS カテーテル (JOHAKU) を開発した。本研究において、我々は、急性心不全状態において、JOHAKU が HR, MVO2, 血行動態に与える影響について大動物を用いて検討した。

#### 【方法】

急性心不全状態を誘導したビーグル犬 5 頭を使用した。エタノールを心筋に直接注入 (0.5-2ml/kg) し、心筋障害を誘発した。右大腿静脈からカテーテルを挿入し、バスケット型電極を SVC に設置した。VNS の強度は HR が 10-20% 低下するように調整した (20Hz, 10-22V)。HR, 血圧 (BP), 心拍出量 (CO), 左回旋動脈血流 (CF) を同時に記録した。MVO2 はヘモグロビン濃度, CF および冠動脈と冠状静脈洞の酸素飽和度差の積で算出した。HR, MVO2, 血行動態をベースラインと刺激 5 分後で比較した。

#### 【結果】

エタノール直接注入により、CO (エタノール前: 2.0 ± 0.4 vs. エタノール後: 1.5 ± 0.2 l/min) と平均 BP (86 ± 6 vs. 75 ± 15 mmHg) が低下し、左室拡張末期血圧 (12 ± 6 vs. 16 ± 7 mmHg) は上昇した。VNS は急速かつ刺激強度依存的に HR を低下させた。急性心不全犬モデルでは、VNS は HR (ベースライン: 122 ± 7 vs. VNS5 分後: 108 ± 14 bpm, p < 0.05) と MVO2 (3.3 ± 0.4 vs. 2.8 ± 0.6 mlO2/min/100g) を有意に減少させたが、平均 BP (73 ± 8 vs. 72 ± 2 mmHg, p = 0.56) には影響を与えなかった。

#### 【考察】

VNS カテーテルは急性心不全モデル犬において、血行動態を悪化させることなく、HR と MVO2 を抑制させることができた。本機器は不安定な血行動態における過剰な心臓負荷の抑制に寄与する可能性がある。



## 【文献】

研究推進の過程で得られた知見を基に以下の論文報告を行った。

- 1) Uemura, K., Nishikawa, T., Hasebe, N., Yokota, S., Kakuuchi, M., Saku, K., Kawada, T., Morodome, S., Furukoshi, M. & Sugimachi, M.: A novel triple-bladder cuff method for blood pressure estimation based on pulse wave dynamics in brachial artery: theoretical and experimental analyses. *IEEE Trans Biomed Eng.*, 2022.
- 2) Ando, M., Watanabe, N., Saku, K. & Morishima, I.: Acute phase administration of Ivabradine supported by intra-aortic balloon pump induces myocardial recovery without significant haemodynamic worsening in a patient with acute fulminant myocarditis: a case report, *European Heart Journal Case Reports.*, 2022, **6**(8) ytac340.
- 3) Kawada, T.\*, Miyamoto, T., Mukkamala, R. & Saku, K.: Linear and nonlinear identification of the carotid sinus baroreflex in the very low-frequency range. *Physiological Reports.*, 2022, **10**: c15392.
- 4) Kawada, T.\*, Li, M., Suehara, S., Sawada, S., Zheng, C., Uemura, K., Sugimachi, M. & Saku, K.: Angiotensin II inhibition increases diuresis during acute sympathetic activation in intact and denervated kidneys in rats with chronic myocardial infarction. *Heart and Vessels.*, 2022, (37) 1636-1646.
- 5) Li, M.\*, Zheng, C., Kawada, T., Uemura, K., Inagaki, M., Saku, K. & Sugimachi, M.: Early donepezil monotherapy or combination with metoprolol significantly prevents subsequent chronic heart failure in rats with reperfused myocardial infarction. *The Journal of Physiological Sciences.*, 2022, **72**(12).
- 6) Kinoshita, H., Saku, K.\*, Mano, J., Mannoji, H., Kanaya, S. & Sunagawa, K.: Very short-term beat-by-beat blood pressure variability in the supine position at rest correlates well with the nocturnal blood pressure variability assessed by ambulatory blood pressure monitoring. *Hypertension Research.*, 2022, **45**(6): 1008-1017.
- 7) Saku, K., Yokota, S., Nishikawa, T. & Kinugawa, K.: Interventional heart failure therapy: A new concept fighting against heart failure. *J Cardiol.*, **16**: S0914-5087(21) 00339-7, 2021.
- 8) Kawada, T.\*, Nishikawa, T., Hayama, Y., Li, M., Zheng, C., Uemura, K., Saku, K., Miyamoto, T. & Sugimachi, M.: Quantitative assessment of the central versus peripheral effect of intravenous clonidine using baroreflex equilibrium diagrams. *J Physiol Sci.*, 2022, **71**(1): 39, 2021.
- 9) Kawada, T.\*, Yamamoto, H., Miyamoto, T., Hayama, Y., Li, M., Zheng, C., Uemura, K., Sugimachi, M. & Saku, K.: Ivabradine increases the high frequency gain ratio in the vagal heart rate transfer function via an interaction with muscarinic potassium channels. *Physiol Rep.*, 2021, **9**(23): e15134.
- 10) Umamoto, S., Abe, K.\*, Hosokawa, K., Horimoto, K., Saku, K., Sakamoto, T. & Tsutsui, H.: Increased Pulmonary Arterial Compliance after Balloon Pulmonary Angioplasty Predicts Exercise Tolerance Improvement in Inoperable CTEPH Patients with Lower Pulmonary Arterial Pressure. *Heart Lung.*, 2021, **52**: 8-15.

### 心筋リプログラミングによる革新的心不全治療法の開発

貞廣 威太郎

(筑波大学医学医療系)

## 【目的】

慢性心不全には心移植を除いては根本的な治療法はなく、心臓再生医療の応用が望まれている。我々は、心臓線維芽細胞に心筋特異的遺伝子を導入し、体内で直接心筋細胞を誘導して心臓を再生する「心筋直接リプログラ

ミング法」を開発し、マウス急性心筋梗塞モデルにおいて心筋再生と心臓機能の改善に成功している。本研究では、新規治療が熱望される慢性心不全に対し、心筋直接リプログラミングによる革新的治療法の確立を目的とする。

#### 【方法】

陳旧性心筋梗塞の慢性心不全マウスを作製し、心筋直接リプログラミングによる心臓再生を検討する。心臓線維芽細胞特異的に心筋リプログラミング遺伝子を発現させるため、タモキシフェン投与により遺伝子発現を制御できる遺伝子改変マウスを作製し、治療効果や分子生物学的機序を検討する。

#### 【結果】

1. リプログラミング遺伝子発現を時期・細胞特異的に制御できる CAG-CAT-MGTH2A Tg マウスを作製した。さらにこのマウスをタモキシフェン誘導型の心臓線維芽細胞特異的 Cre マウスとレポーターマウスと交配した。このマウスにタモキシフェンを投与することで、陳旧性心筋梗塞内の心臓線維芽細胞特異的に心筋リプログラミング遺伝子と蛍光タンパクを発現させることが可能となった。
2. 心筋梗塞 1 か月後のタモキシフェン投与の結果、心筋直接リプログラミングによって線維芽細胞から赤色の心筋細胞が再生され、心臓収縮能が改善した。さらに、心筋梗塞によって形成された線維化面積が減少した。
3. 心機能改善のメカニズムを明らかにするため、対照群とリプログラミング群の心臓における遺伝子発現を網羅的に解析したところ、心不全悪化と関連する線維化・炎症関連遺伝子群が著明に抑制されることを見出した。
4. 心筋再生が線維芽細胞に与える影響を生体外において解析する目的で、心筋梗塞瘢痕領域と同等の足場の硬さを再現した細胞培養システムを開発した<sup>1)</sup>。

#### 【考察】

心筋直接リプログラミングが心臓再生だけでなく、心不全に伴う線維化リモデリングを抑制することで、慢性心不全の心機能を改善している可能性が示唆された。現在は、これらのマウス心臓のシングルセル解析によって、分子生物学的な機序の解明を目的として、更なる解析を続けている。

#### 【文献】

- 1) Kurotsu, S.<sup>\*</sup>, Sadahiro, T.<sup>\*</sup>, Harada, I. & Ieda, M.: A biomimetic hydrogel culture system to facilitate cardiac reprogramming. *STAR Protoc.*, **3**, 101122 (2022). <sup>\*</sup>Equal contributors. Corresponding author

#### オステオポンチンを標的とした抗線維化薬の開発

白川 公亮

(慶應義塾大学)

#### 【目的】

肺には多種多彩な免疫細胞が集積し組織の恒常性を維持しているが、そのバランスが破綻すると様々な肺疾患の増悪を来す。肺間質マクロファージは定常状態では恒常性を維持しているが、病的な状態における肺間質マクロファージの機能や分化機序は明らかではない。肺疾患の病態を悪化させるサイトカインやケモカインは数多く報告されているが、オステオポンチン (OPN) は肺線維症などの呼吸器疾患に伴う気道周囲の線維化を増悪させ、呼吸器疾患の病態増悪に重要な役割を果たす。OPN の過剰な産生を抑制できれば、肺線維化を抑制し呼吸器疾患の予後改善につながる。本研究は、OPN 産生肺間質マクロファージの機能や分化誘導機序を解明し、肺線維化を抑制する治療法の開発を目的とした。

#### 【方法】

OPN をコードする *Spp1* 遺伝子の EGFP Knock-in (KI) reporter マウス (*Spp1*<sup>Egfp/wtt</sup> KI reporter マウス) に経気管的に Bleomycin を投与して Flow cytometry 及び病理学的に *Spp1* transcriptional activity が上昇する細胞を同定する。*Spp1*<sup>Egfp/wtt</sup> KI reporter マウスの Bleomycin 肺線維症モデルマウスの GFP 陽性肺マクロファージ、GFP 陰性肺マクロファージ及び血中単球を Flow cytometry でソートし、bulk RNA-seq 及び質量分析法により網羅的に遺伝子/蛋白の解析を実施する。*Spp1*-EGFP 陽性マクロファージの single cell (sc) RNA-seq 解析を実施する。

**【結果】****Bleomycin 投与後の *Spp1* transcriptional activity 上昇細胞はマクロファージであった**

*Spp1*<sup>egfp/-</sup> KI reporter マウスに Bleomycin を経気管投与し、肺の *Spp1*-EGFP<sup>+</sup> cells を flow cytometry で解析を実施した。 *Spp1*-EGFP<sup>+</sup> cells は、CD45<sup>+</sup>CD64<sup>+</sup> マクロファージであり、 *Spp1* transcriptional activity は Bleomycin 投与後 3 日目から上昇し、7 日目でピークとなり、14 日目も持続していた。 Bleomycin 投与 7 日目の *Spp1*-EGFP<sup>+</sup> マクロファージは大部分が SiglecF<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> の間質 subset であり、 *Spp1*-EGFP<sup>+</sup> マクロファージは Bleomycin 投与後肺の肥厚した間質内に集積していた。

***Spp1*-EGFP 陽性 CD11b 陽性マクロファージは肺線維化と好中球浸潤を促進した**

*Spp1*-KO マウスを骨髄照射し、 *Spp1*<sup>EGFP/wt</sup> もしくは *Spp1*<sup>EGFP/EGFP</sup> マウスの骨髄を移植したマウスに、Bleomycin を経気管投与した。 *Spp1*<sup>EGFP/wt</sup> BM → *Spp1* KO mice の 14 日目の肺には高度に炎症細胞が浸潤し、高度な線維化を認めた。一方で、 *Spp1*<sup>EGFP/EGFP</sup> BM → *Spp1* KO mice では、それらが改善された。 *Spp1*-EGFP<sup>+</sup> マクロファージ由来の OPN が fibroblast 分化に与える影響を明らかにするため、マウス肺由来線維芽細胞と肺由来マクロファージを共培養した。 PBS-treated *Spp1*<sup>EGFP/wt</sup> EGFP<sup>-</sup> SiglecF<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> subset は、fibroblast の  $\alpha$ SMA 発現を誘導しなかった。一方で、Bleomycin-treated *Spp1*<sup>EGFP/wt</sup> EGFP<sup>+</sup> SiglecF<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> subset は高度にその発現を誘導した。さらに、Bleomycin-treated *Spp1*<sup>EGFP/wt</sup> EGFP<sup>+</sup> SiglecF<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> subset を *Spp1*-KO マウスに経気管的に投与すると、局所的ではあるが、肺の線維化を促進し、炎症細胞の浸潤を促進した。

***Spp1*-EGFP 陽性 CD11b 陽性マクロファージは Arginase-1 を高度に発現した**

RNAseq と mass spectrometry を組み合わせたマルチオミクス解析によって、Bleomycin 投与後に *Spp1* transcriptional activity が最も上昇する day 7 の SiglecF<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> マクロファージを解析した。 Bleomycin-treated *Spp1*<sup>EGFP/wt</sup> EGFP<sup>+</sup> SiglecF<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> subset で発現が上昇する 37 個の遺伝子/蛋白を同定し

た。同定された中で、Arginase-1 の発現が最も上昇し、その他 Transmembrane glycoprotein NMB (Gpnmb)、リンパ管内皮細胞マーカーである Podoplanin、肺の炎症性免疫細胞浸潤を促進する Mmp12、エンドソーム/リソソームに局在する酸性プロテアーゼ群である種々のカテプシン (D, K, S, L) を高度に発現していた。

**IL7R<sup>+</sup> SiglecF<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> マクロファージは OPN を強力に産生した**

OPN 産生肺間質マクロファージの heterogeneity を明らかにするために、Bleomycin-treated *Spp1*<sup>EGFP/wt</sup> EGFP<sup>+</sup> SiglecF<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> subset の scRNA-seq を実施した。 Graph-based clustering method によって 11 のクラスターに分類され、 *Spp1* 発現が最も高い Cluster4 に注目すると、マルチオミクス解析で同定された *Mmp12* などの遺伝子発現が有意に上昇していた。 Flow cytometry による SiglecF<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> マクロファージの時系列解析では、マルチオミクス解析で同定された Podoplanin と IL7R の発現が bleomycin 投与後より増加し、7 日目には 50% 以上が Podoplanin<sup>+</sup> IL7R<sup>+</sup> subset となり、この subset で最も *Spp1* transcriptional activity が上昇していた。

**IL7 は肺マクロファージの OPN 産生を制御した**

Bleomycin 投与後 7 日目の肺では、気管支上皮を中心に IL7 の発現がみられ、周囲に *Spp1*-EGFP<sup>+</sup> subset が集積していた。 Bleomycin を投与した *Spp1*<sup>Egfp/wt</sup> KI reporter マウスに  $\alpha$ IL7R 抗体を i.v. 投与して IL7 signaling を抑制すると、マクロファージの絶対数は control に比して有意に減少し、 *Spp1* transcriptional activity が高度な細胞 (*Spp1*-EGFP<sup>high</sup> subset) の発現が抑制された。さらに、IL7 signaling の阻害は、肺への好中球をはじめとした炎症細胞浸潤や線維芽細胞の活性化を抑制した。

**IL7 は OPN 及び MMP12 を産生するマクロファージへの分化誘導を促進した**

*Mmp12* は、scRNAseq 解析で同定された *Spp1* 遺伝子発現が最も高い Cluster4 で有意に高発現している遺伝子であった。一方で、Cluster4 における *Arg1* の発現は、他のクラスターよりも低下していた。肺胞上皮細胞由来の GM-CSF は、肺マクロファージの分化誘導及び維持に必要である。 *Spp1*<sup>Egfp/wt</sup> reporter mice の

骨髄由来マクロファージでは、GM-CSF 刺激は Arg1 と Mmp12 の遺伝子発現を著明に上昇させ、GM-CSF で培養した骨髄由来マクロファージに IL4 を投与すると Arg1 及び Mmp12 の遺伝子発現が有意に上昇した。さらに、IL7 は *Spp1* と *Mmp12* の発現をさらに増加させ、一方で *Arg1* の発現を抑制した。この結果は、scRNA-seq 解析で *Spp1* 発現が最も高い Cluster4 の特徴と一致していた。

#### 【考察】

今回の実験では、マルチオミクス解析と scRNAseq 解析を用いてブレオマイシン投与後にオステオポンチンを高度に発現するマクロファージの分化機序を明らかにした。ブレオマイシン投与後7日目は炎症期から線維化への移行時期であるが、オステオポンチンは肺線維化を促進する炎症性サイトカインである。ブレオマイシン投与7日目のオステオポンチン主要産生源は SiglecF-CD11b+ マクロファージであり、マルチオミクス解析と scRNAseq 解析から、GM-CSF と IL4, IL7 の刺激によりオステオポンチン産生マクロファージに分化し MMP12 も産生していた。オステオポンチン産生肺マクロファージは線維化初期の Day7 より、線維芽細胞活性化による肺線維化促進と MMP12 による炎症細胞浸潤作用により病態を悪化させていると考えられた。

#### 【文献】

本研究成果は現在論文投稿準備中である。また本助成金により下記論文がアクセプトされました。

Kohsuke, Shirakawa. & Motoaki, Sano.: Neutrophils and Neutrophil Extracellular Traps in Cardiovascular Disease: An Overview and Potential Therapeutic Approaches, *Biomedicines.*, 2022; **10**(8): 1850. doi: 10.3390/biomedicines10081850.

### 心不全の骨格筋異常の治療における SGLT2 阻害剤

高田 真吾

(北翔大学生涯スポーツ学部)

#### 【背景】

心疾患は、質と量の両方で“骨格筋異常”を伴うことが多く、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。これらの異常に対して、運動療法は心

疾患の予防や治療にさえ有益であることが知られているが、しばしば運動が実施できない患者が存在するため、運動療法の代替法の発見も重要な課題となっている<sup>1,2)</sup>。また、心臓リハビリテーションを含め、骨格筋異常の発症機序におけるエビデンスはわずかながら蓄積されつつある<sup>1-3)</sup>。一方で、心不全における骨格筋異常が治療できるかどうかは、未だ不明な点が多い<sup>1-6)</sup>。

#### 【結果】

心筋梗塞2週間後の心不全マウスにおける SGLT2 阻害剤 (Empagliflozin, 300 mg/kg of food) の4週間投与は、骨格筋の脂肪酸を基質とした骨格筋ミトコンドリア呼吸能および筋持久力の低下を改善した<sup>3)</sup>。これらの改善には、血中ケトン体の増加が関連していた<sup>3)</sup>。その一方で、ピルビン酸を基質とした骨格筋ミトコンドリア呼吸能および最大酸素摂取量 (最大運動能力の指標) は低下した<sup>1)</sup>。

#### 【結論】

SGLT 阻害剤は、臨床試験の結果からも6分間歩行などの持久力を改善する<sup>7-9)</sup>。今回の研究結果は、心筋梗塞後から心不全に至る過程で生じる骨格筋異常の治療薬としての SGLT2 阻害剤の有用性を支持する<sup>1,3)</sup>。

#### 【引用文献】

- 1) Takada, S. (corresponding author), 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.*, 1; **322**(2): H117-H128, 2022.
- 2) Takada, S. (corresponding author), Sabe, H. & Kinugawa, S.: Abnormalities of skeletal muscle, adipocyte tissue, and lipid metabolism in heart failure: practical therapeutic targets. *Front Cardiovasc Med.*, 12; **7**: 79, 2020.
- 3) Nambu, H.\*, Takada, S.\* (first and corresponding author), ..., Kinugawa, S.: Empagliflozin restores lowered exercise endurance capacity via the activation of skeletal muscle fatty acid oxidation in a murine model of heart failure. *Eur J Pharmacol.*, 5; **866**: 172810, 2020.
- 4) Matsumoto, J.\*, Takada, S.\* (first author),

- Kinugawa, S. et al.: Brain-derived neurotrophic factor improves limited exercise capacity in mice with heart failure. *Circulation.*, **138**: 2064-2066, 2018.
- 5) Matsumoto, J.\*, Takada, S.\* (first author), ..., Kinugawa, S.: Brain-Derived Neurotrophic Factor Improves Impaired Fatty Acid Oxidation Via the Activation of Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase- $\alpha$  - Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  Coactivator-1 $\alpha$  Signaling in Skeletal Muscle of Mice With Heart Failure. *Circulation Heart Fail.*, **13**: e005890, 2021.
- 6) Nambu, H., Takada, S. (corresponding author), ..., Kinugawa, S.: Inhibition of xanthine oxidase in the acute phase of myocardial infarction prevents skeletal muscle abnormalities and exercise intolerance. *Cardiovasc Res.*, **22**; **117**(3): 805-819, 2021.
- 7) Nassif, ME. et al.: *Nat Med.*, **27**(11): 1954-1960, 2021.
- 8) Nunez, J. et al.: *Clin Cardiol.*, **41**(4): 476-480, 2018.
- 9) Santos-Gallego, CG. et al.: *JACC.*, **26**; **77**(3): 243-255, 2021.

**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】**

アドレノメデュリン (AM) は血管拡張ペプチドとして同定されたが、それ以外にも様々な作用を有することが明らかとなっている。私はこれまで、① AM とその受容体活性調節タンパク RAMP2 が、血管の恒常性維持に必須であること、② 誘導型の血管内皮細胞特異的 RAMP2 ノックアウトマウス (DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>) では、血管の傷害が転移前土壌形成を促進し、癌細胞の血行性転移を亢進させることを報告した。本年度の研究では、

DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>を用いて、癌細胞のリンパ節転移の検討を行った。

**【結果】**

リンパ節転移しやすい様に馴化したルイス肺癌細胞 (LLC) をマウス足底部に移植すると、DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>では、膝窩リンパ節への転移の亢進が認められた。DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>では、リンパ節内に特異的に存在する血管である高内皮細静脈 (HEV) の数の減少や、構造異常が認められた。さらに、組織透明化処理を行なった転移リンパ節を観察すると、DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>では、HEV に沿って、リンパ節内に癌細胞が浸潤、増殖する様子が確認された。RAMP2 欠損誘導後の血管内皮細胞では、細胞表面に無数の微小突起や細胞外小胞 (エクソソーム) が確認された。そこで次に、TNF- $\alpha$  を用いて、DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>内皮細胞を直接刺激してみたところ、Control と比べて、エクソソームの産生量が有意に増加した。DI-E-RAMP2<sup>-/-</sup>内皮細胞由来のエクソソームは、LLC 細胞の上皮間葉転換を促進させ、LLC 細胞の増殖、遊走を亢進させた。

**【考察】**

血管の AM-RAMP2 系の欠損は、リンパ節内の HEV の構造および機能を傷害し、癌細胞がリンパ節転移しやすい環境を作り出すことが明らかとなった。血管の AM-RAMP2 系の傷害は、血管内皮細胞由来のエクソソーム産生を介して、癌細胞の悪性化や転移を促進させる可能性がある。

**多能性幹細胞における代謝機構に基づく細胞作製と  
心臓再生医療への応用**

遠山 周吾

(慶應義塾大学医学部)

ヒト多能性幹細胞は心筋細胞を含む様々な細胞に分化する能力を有するため、心臓再生医療への応用が期待されている。一方で、ヒト多能性幹細胞を用いた心臓再生医療における臨床応用を実現化するためには多くの課題を克服する必要がある。その最も重要な課題の1つは、分化後に残存する未分化幹細胞を取り除き、効率よく心筋細胞のみを作製する技術の確立であった。我々はこれ

らの課題に対して、ヒト多能性幹細胞と分化心筋細胞の代謝プロファイルを詳細に解析することにより、培養環境により分化後に残存する未分化幹細胞を取り除き、分化心筋細胞のみを効率よくかつ大量に純化精製するという画期的手法を構築することにより克服することに成功した<sup>1-3)</sup>。さらに、我々は多能性幹細胞特異的な代謝機構に着目することにより、残存する未分化幹細胞を特異的に除去する手法を確立し<sup>4,5)</sup>、これまで確立してきた培養液による純化精製法との組み合わせによりさらに安全な心筋細胞の作製が可能となった。

しかしながら、依然として課題が存在する。それは、ヒト多能性幹細胞を用いた再生医療における臨床応用さらには産業化を実現化するためには、大量の細胞を作製する必要があり、それに伴い多くのコストが発生することである。この課題を克服するためには、ヒト多能性幹細胞を安価かつ効率よく作製する必要がある。一方で、ヒト多能性幹細胞における従来の培養液は、未分化維持および増殖において最適な条件ではなかった。そこで、我々はヒト多能性幹細胞の増殖に最適な培養条件を探索し、必須アミノ酸の1つとして知られるトリプトファン代謝を制御することにより、ヒト多能性幹細胞の増殖が促進されることを見出した<sup>6,7)</sup>。本研究成果は、安価に大量のヒト多能性幹細胞および分化心筋細胞を作製することに繋がるため、再生医療における臨床応用あるいは産業化の推進に貢献することが期待できる。さらに、ヒト iPS 細胞由来心筋組織球をラットあるいはブタの心不全モデル心臓に移植し、心機能が有意に改善することを確認している<sup>8,9)</sup>。また、最近では臨床グレードのヒト iPS 細胞から臨床グレードの培養液を用いて心筋細胞を製造し、サル的心不全モデルに移植することで、3か月間移植細胞が生着・成熟し、心機能が有意に改善することを確認している(論文準備中)。現在、これらの技術を用いて臨床グレード心筋細胞を作製し、重症心不全患者への移植に向けて準備を進めている。

#### 【文献】

- 1) Tohyama, S. et al.: (2013) *Cell Stem Cell.*, **12**, 127-137.
- 2) Tohyama, S. et al.: (2016) *Cell Metabolism.*, **12**, 663-674.
- 3) Tohyama, S. et al.: (2017) *Stem Cell Rep.*, **9**,

1406-1414.

- 4) Tanosaki, S., Tohyama, S. (Corresponding author), et al.: (2020) *iScience.*, **23**, 101535.
- 5) Tanosaki, S., Tohyama, S. (Corresponding author), et al.: (2022) *STAR Protocols.*, **3**, 101360.
- 6) Someya, S., Tohyama, S. (Corresponding author), et al.: (2021) *iScience.*, **24**, 102090.
- 7) Kameda, K., Tohyama, S. (Corresponding author), et al.: (2022) *STAR Protocols.*, **3**, 101341.
- 8) Tabei, R., Kawaguchi, S., Tohyama, S. et al.: (2019) *J Heart Lung Transplant.*, **38**, 203-214.
- 9) Kawaguchi, S., Soma, Y., Tohyama, S. et al.: (2021) *JACC-BTS.*, **6**, 239-254.

#### 心臓疾患における細胞・分子挙動の網羅的理解

野村 征太郎

(東京大学医学部附属病院)

筆者らはゲノム・オミックス解析を駆使し、心臓疾患における細胞・分子挙動の網羅的理解を目指してきた。

まずゲノム解析によって予後不良な重症心不全の原因である LMNA 遺伝子変異を同定し (*Sci Rep.* 2018)、診療ガイドラインにおいて本変異の検出が高く推奨されることとなった。また拡張型心筋症の新規原因遺伝子ミオシン軽鎖キナーゼ MYLK3 を同定した (*Sci Rep.* 2017)。さらに、炎症・高血圧・肥満・LDL コレステロール高値・中性脂肪高値・糖尿病が虚血性心疾患の原因であることを遺伝学的に証明して遺伝的リスクスコアを構築した (*Nat Genet.* 2020)。心房細動においても遺伝的リスクスコアを構築して心房細動 SNP 領域を制御する転写因子 ERRg を同定した (*Nat Genet.* in press)。

また筆者らは、心臓シングルセル RNA-seq 解析を世界で初めて確立し、負荷で肥大した心筋が代償型・不全型心筋に分岐すること、DNA 損傷・p53 シグナルが不全型心筋を誘導することを解明した (*Nat Commun.* 2018)。さらに、心筋 DNA 損傷の定量評価によって心不全の左室リバーシブルモデリングを高精度で予測できることを実証した (*JACC Basic Transl Sci.* 2019; 特許登録済み)。そして、心臓組織の 1 分子 RNA 定量解析

を世界初で確立し、圧負荷で胎児化する心筋は心臓の中間層に集中しており形態的に小さい、という既存の概念を覆す結果を見出した (*JMCC* 2019). また、心室性不整脈の原因となるドパミン D1 受容体陽性心筋を発見した (*Nat Commun.* 2020). 続いて、心臓線維芽細胞が発現するセリンプロテアーゼ HtrA3 を同定し、これが TGF- $\beta$  を分解して心筋の DNA 損傷を抑制すること、不全心筋から分泌される IGFBP7 は重症心不全の最も良い予測マーカーであることを発見した (*Nat Commun.* 2022; 特許出願済み). また、血管周囲脂肪組織のシングルセル RNA-seq によって、血管傷害によって活性化したマクロファージが褐色脂肪細胞および NRG4 発現を誘導して炎症沈静化に寄与することを解明し (*Nat Commun.* in press), 心筋梗塞後の心臓リモデリングの時空間的な遺伝子発現ダイナミクスを 1 細胞レベルで解明した (*Nat Cardiovasc Res.* in press).

このように筆者は世界に先駆けて心臓疾患の精密医療に資する基礎研究を展開してきた。最近では、100 種類以上のマーカーによるマルチプレックス免疫染色によって心臓組織から多様な心不全病態を層別化する手法を確立し、オールジャパン体制のゲノムコホート研究によってゲノム・オミックス情報と臨床情報を AI で統合する手法を開発し、心臓疾患の精密医療のさらなる発展を目指している。

リプログラミング法を利用した新たな心臓形成転写ネットワークの探索

橋本 寿之

(慶應義塾大学医学部)

【目的】

心臓発生に重要な複数の転写因子を強制発現させることにより線維芽細胞を心筋様細胞に直接分化転換することができる<sup>1)</sup>。最近我々はリプログラミングと心臓発生の間にはエピジェネティックなプロセスにおいて多くの共通点があることを見出した<sup>2)</sup>。このような知見から、今度は逆にリプログラミングの研究結果を参考にして、心臓発生を司る新たな転写制御機構を解明できるのではないかと考えた。よって、我々は先行研究結果<sup>3)</sup>に

おいて最も強く心筋分化転換効率を改善した転写因子 ZNF281/Zfp281 に着目し、ZNF281 の司る心臓発生の新たな転写制御機構を解析することを目的として、研究計画を立案した。

【方法】

本研究では胚性幹細胞 (ESC) およびモデルマウスを利用し、心臓形成における ZNF281 の役割を明らかにする。そのためには ZNF281 を過剰発現もしくはノックアウト (KO) した ESC を作成し、ZNF281 の発現量が心筋分化効率に及ぼす影響を解析する。また、CRISPR/Cas9 を用いて ZNF281 を心筋特異的に KO したマウスラインを樹立し、ZNF281 が心臓発生に必須の遺伝子かを明らかにする。

【結果】

これまでの研究成果として、申請者は CRISPR/Cas9 システムを用いて Zfp281KO 多能性幹 (ES) 細胞を作製し、Zfp281KO-ES 細胞では心筋分化誘導を行っても心筋細胞が誘導されない事を示してきた。

よって今年度は CRISPR/Cas9 システムを用いて Zfp281KO マウスを作製した。その結果、Zfp281KO マウスは産仔が 1 匹も確認できず、胎生致死であることが示唆された (図 1)。

しかし、器官形成期の胎仔シングルセル解析の結果、Zfp281 は個体において遍在的に発現していることが確認された。そのため、この結果だけでは Zfp281 欠損が

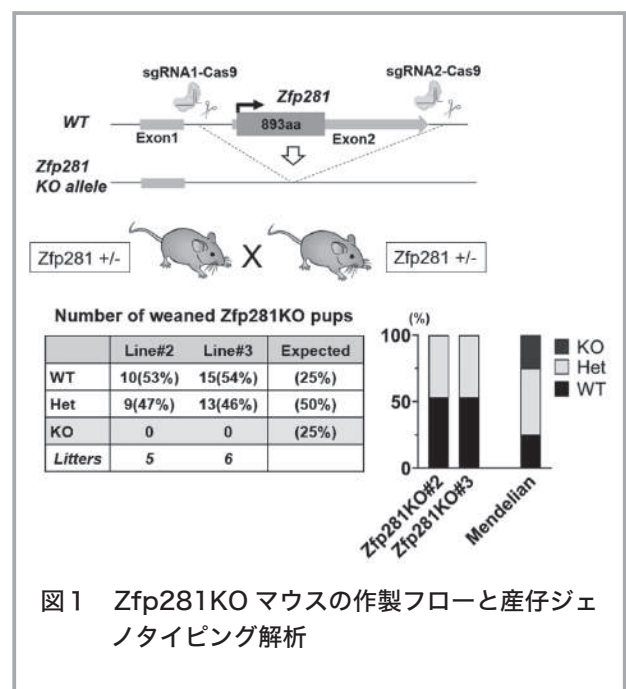


図 1 Zfp281KO マウスの作製フローと産仔ジェノタイプ解析

心臓の発生より早い原腸形成期等に影響を及ぼしている可能性が否定できなかった。

よって、申請者は次に Zfp281flox マウスを作製し、Mesp1-Cre マウスと Zfp281flox マウスを交配することにより心臓中胚葉特異的 Zfp281cKO マウスを作製した

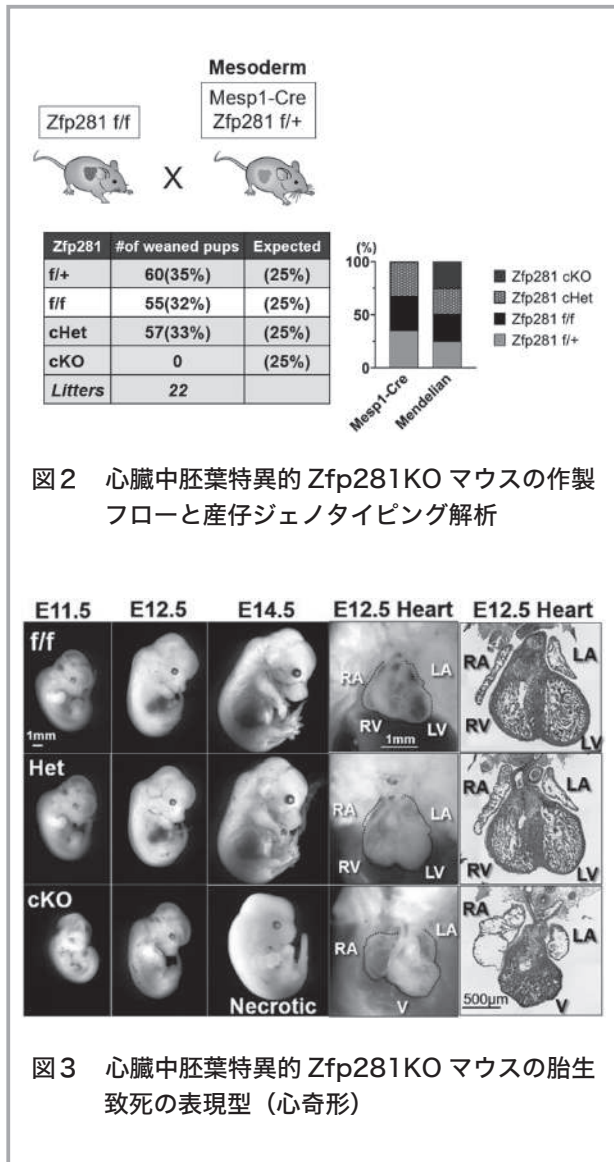


図2 心臓中胚葉特異的 Zfp281cKO マウスの作製フローと産仔ジェノタイプ解析

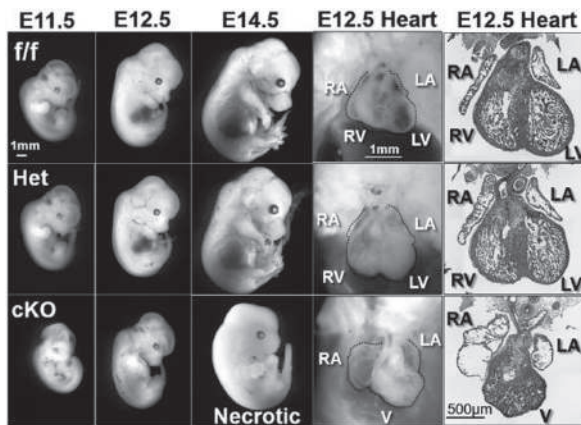


図3 心臓中胚葉特異的 Zfp281cKO マウスの胎生致死の表現型 (心奇形)

(図2)。その結果、このマウスでは胎生 9-11 日目より発達異常や胎生致死を認め、興味深いことに様々な心奇形を認めた(図3)。以上より、Zfp281 が心臓発生に必須の遺伝子である事が示唆された。

#### 【考察】

我々の遺伝子改変モデルマウス解析結果から、ZNF281 は心臓発生に必須の因子である事が明らかとなった。今後はマルチオミクス解析及びタンパク質間相互解析を用いて ZNF281 がどのように心筋形成の転写ネットワークを司っているのかを明らかにする予定であ

る。

#### 【参考文献】

- 1) Ieda, M. *et al.*: Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell*, **142**, 375-386, (2010).
- 2) Hashimoto, H. *et al.*: Cardiac Reprogramming Factors Synergistically Activate Genome-wide Cardiogenic Stage-Specific Enhancers. *Cell Stem Cell*, **25**, 69-86 e65, (2019).
- 3) Zhou, H. *et al.*: ZNF281 enhances cardiac reprogramming by modulating cardiac and inflammatory gene expression. *Genes & development*, **31**, 1770-1783, (2017).

#### DNA 損傷の心不全進展における役割解明からシステム生物学へ

肥後 友彰

(The Institute of Cancer Research, London/  
大阪大学大学院医学系研究科)

助成者は、本 VBIC 助成期間のうち、2013-2018 年は大阪大学大学院医学系研究科循環器内科で、その後 2018 年 6 月より The Institute of Cancer Research, London, Dynamical Systems Laboratory にて研究を行なっている。今回本助成卒業にあたり、以下前半と後半に分けてそれぞれの研究について総括する。

#### 【DNA 損傷の心不全進展における役割解明】

DNA 損傷により誘導される DNA 損傷応答 (DDR) 活性化は終末期心不全患者の心筋細胞で観察されるが、非分裂細胞である心筋細胞において何が DDR を活性化させるのか、また DDR が活性化することの病態生理学的意義は明らかになっていなかった。我々は圧負荷誘導性慢性心不全モデルマウスを用いて、不全心筋細胞において DNA 一本鎖切断 (single-strand break: SSB) が蓄積していることを見出した。また SSB 修復に必須の蛋白 XRCC1 を心筋細胞特異的に欠損させたマウス、および DDR エフェクター蛋白 ATM とのダブルノックアウトマウスを用いた実験から、不全心筋における SSB 蓄積が持続的 DDR 活性化を誘導し、心不全の進展を促進



していることを明らかにした<sup>1)</sup>。一方でマウス心筋梗塞モデルでは、梗塞後数日で心臓線維芽細胞 (CFs) における DDR 活性化が認められ、CFs の老化が誘導されていることを観察した。ATM ノックアウトマウスを用いた解析から、心筋細胞とは逆に CFs における DDR 活性化は心筋梗塞後の繊維化を抑制し、心臓保護的に働いていることを解明した<sup>2)</sup>。

#### 【癌細胞形態と免疫応答の共役に関する統合的解析】

上記一連の研究から助成者は「癌細胞・システム生物学」に興味を持ち、2018年より上記 Dr. Chris Bakal ラボへ留学をした。Bakal ラボはこれまで、ハイスループット画像解析システムを用いた細胞形態解析とその決定に関するシグナル解析、およびそれらと YAP/TAZ や NF- $\kappa$ B などの細胞内シグナル伝達との共役に関する解析をシステム生物学的アプローチにより行なって来たラボである。そこで、メラノーマ細胞の細胞形態およびそれに関わるシグナルが癌細胞の Neoantigen (癌細胞特異的抗原) 提示能・免疫原性を制御しているという仮説の下、細胞形態を操作することで癌細胞の免疫原性を高めることを最終的な目的とし、研究を進めている。これまでに PD-1 抗原発現は細胞形態の影響を受けにくいことが、抗原提示を行う MHC ClassI 発現は細胞形態の影響を受けやすいこと、また Focal adhesion が発達し、細胞面積の大きな細胞は形態操作による MHC ClassI の発現量変化を受けやすいことを明らかにしており、現在さらなる解析を進めている。

一連の研究を経て今後助成者はイメージング画像の定量評価から得られた数値情報を他のオミックスデータや臨床データと組み合わせ、新たな疾患分類を提唱したり心筋症の発症機序を解明したいと考えている。

#### 【文献】

- 1) Higo, T., Naito, AT., Sumida, T., Shibamoto, M., Okada, K., Nomura, S., Nakagawa, A., Yamaguchi, T., Sakai, T., Hashimoto, A., Kuramoto, Y., Ito, M., Hikoso, S., Akazawa, H., Lee, JK., Shiojima, I., McKinnon, PJ., Sakata, Y. & Komuro I.: DNA single-strand break-induced DNA damage response causes heart failure. *Nat Commun.*, 24; 8: 15104. 2017.
- 2) Shibamoto, M., Higo, T., Naito, AT., Nakagawa,

A., Sumida, T., Okada, K., Sakai, T., Kuramoto, Y., Yamaguchi, T., Ito, M., Masumura, Y., Higo, S., Lee, JK., Hikoso, S., Komuro, I. & Sakata, Y.: *Int Heart J.*, 27; 60(4): 944-957. 2019.

#### ミネラルコルチコイド受容体経路を標的とした糖尿病性腎症の新規治療法開発

広浜 大五郎

(University of Pennsylvania)

#### 【背景・目的】

糖尿病に伴う腎障害 (糖尿病性腎臓病, DKD) は腎不全の原疾患として最も多いが、根本的な治療法は未確立である。これまで DKD に対する治療法開発を妨げていた要因の一つとして、ヒトの病態と類似するモデル動物の欠如があげられる。申請者らは、低分子量 G 蛋白質 Rac1 がミネラルコルチコイド受容体 (MR) 転写活性化を促進し、この経路が生活習慣病に伴う腎障害の病態に関与する可能性を明らかにしてきたが (Shibata *et al. Nat Med* 2008, Shibata *et al. JCI* 2011, Hirohama *et al. Int J Mol Sci* 2020), DKD における意義は未解明である。本研究は (1) ヒト DKD と類似した病態を示すマウスモデルを確立すること (2) 確立したマウスモデルを用い、主に MR に焦点をあてて DKD 進行の分子基盤の一端を解明することが目的である。

#### 【方法】

肥満 2 型糖尿病モデルの db/db マウスに対して 4 週齢で片腎摘出を施行後、10 週間高食塩食を投与し (UNx-HS db/db マウス)、その表現型を評価した。db/m マウスに同様の処置を行った群をコントロール群とした。MR 拮抗薬、Rac1 阻害薬を UNx-HS db/db マウスに投与し効果を検討した。

#### 【結果】

UNx-HS db/db マウスは高アルドステロン血症を認め、上皮性 Na<sup>+</sup> チャネル活性化、低 K 血症、高血圧を呈した。UNx-HS db/db マウスは顕著なアルブミン尿に加え、糸球体結節性病変、糸球体障害も認めた。UNx-HS db/db マウスの腎皮質と単離糸球体で、Rac1 活性化、MR 標的遺伝子 Sgk1 発現の上昇を認めた。こ

これらの結果から遠位ネフロン、糸球体両者での Rac1-MR 経路活性化が示唆された。MR 拮抗薬、Rac1 阻害薬によりこれらの所見は改善された。

#### 【考察】

本研究を通して DKD の新たなモデルマウスとして UNx-HS db/db マウスを確立した。UNx-HS db/db マウスは、これまで一般的な糖尿病マウスでは認められなかった高血圧を呈し、顕著なアルブミン尿、DKD に特徴とされる糸球体結節性病変を伴っていたため、ヒト DKD に近い病態を示している可能性が考えられた。UNx-HS db/db マウスを用いた検討により、糸球体での Rac1-MR 経路活性化が、遠位ネフロンでの Rac1-MR 経路活性化によってもたらされる血圧上昇と協力して、DKD の進行に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

#### 【文献】

Hirohama, D. *et al.*: *Hypertension.*, 2021; **78**: 82-93.

### 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)

#### 【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<sup>1)</sup>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 $\alpha$  の代償的血管新生<sup>2)</sup>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*<sup>Y247X/+</sup>) 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 $\alpha$  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*<sup>Y247X/+</sup> 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*<sup>Y247X/+</sup> マウスにおいて肺血管内皮細胞特異的に PGC-1 $\alpha$  を欠損させ (*BMPR2*<sup>Y247X/+</sup>; *Alk1*-Cre; *Pgc1 $\alpha$* <sup>fl/fl</sup>)、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 が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 1 例 PAH 患者の肺検体の採取を行っている。

#### 【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 $\alpha$  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。今後このマウスの三次元解析・シングルセル RNA 解析を行い、病態進展の原因となる因子の同定を推し進める。またヒト検体を徐々に収集し、新規 PAH マウスにおいて得られた知見についての実証を進めていきたい。

#### 【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 $\alpha$ -mediated angiogenesis prevents pulmonary hypertension in mice. *JCI Insight.*, in revision.

### リンパ管新生による炎症収束を介した心臓病治療

丸山 和晃

(三重大学大学院医学系研究科)

#### 【背景】

心筋炎は心筋の炎症性疾患であり、臨床的時相、病因、病理学的に、分類される。急性期には心筋細胞周囲に著大な浮腫を呈す事が知られており、浮腫の改善とともに回復することが多くリンパ管による作用が想定される。我々はこれまで心臓リンパ管に関する研究を継続しており<sup>1-4)</sup>、心臓リンパ管新生が心筋梗塞後の線維化を抑制し、梗塞巣を縮小する事を見出している<sup>3)</sup>。心臓リンパ管は炎症細胞の排出促進や、細胞外マトリクスなどのマクロ分子排出路としての役割に加え、間質圧の制御など微小循環制御を介した多彩な作用があると想定しているが正確な機序はわかっていない。また、加齢や動脈硬化によりリンパ管自体の質的な機能不全が起こる事が知られているが、リンパ管欠損や質的な機能低下が心臓機能にどのような影響を与えるのかはモデル作成の難しさからも理解が進んでいない。

#### 【目的】

本研究はリンパ管新生によりマクロ分子や炎症細胞動態などの微小循環制御に着目し心臓におけるリンパ管の機能解析を行い心臓病の治療法開発を目指すものである。

#### 【方法】

我々は血管内皮細胞でリンパ管発生に重要な転写因子であるホメオボックス型タンパク Prox1 をノックアウトし、心臓リンパ管欠損を引き起こせる事を見出した(業績#5)。本研究では Tie2-Cre, CDH5-CreERT2 の 2 種類のマウスで心臓リンパ管の形成を阻害し、心筋炎モデルを作成し、炎症・線維化・浮腫の状態などを解析する。

さらに臨床応用を見据え、リンパ管新生を促進する血管内皮細胞増殖因子 (VEGF)-C を同モデルに投与し、リンパ管による心臓保護効果を確認する。

#### 【考察/進行状況】

当初は心筋梗塞をモデルとして使用予定であったが、所属研究室でモデルとして安定して作出可能な急性心筋炎を対象として変更した。心筋ミオシン軽鎖ペプチドで免疫する事で心臓にT細胞主体の急性炎症を引き起こす。

リンパ管欠損マウスでは当初、胚発生期の解析結果からリンパ管数は減少するかと思われたが、心臓では 8 週齢では拡張したリンパ管の過形成を認めた。またリンパ球循環障害による異所性リンパ組織を様々な臓器で認めた。今後はリンパ管欠損マウスの解析とともにリンパ管欠損マウスで心筋炎モデルを作成し、解析を行う。

#### 【文献】

- 1) \*Kazuaki, Maruyama. (責任著者), Sachiko, Miyagawa-Tomita., Yuka, Haneda., Mayuko, Kida., Fumio, Matsuzaki., Kyoko, Imanaka-Yoshida. & \*Hiroki, Kurihara.: The cardiopharyngeal mesoderm contributes to lymphatic vessel development. *bioRxiv*, doi: <https://doi.org/10.1101/2022.03.30.486479>, 2022 年 4 月
- 2) \*Kazuaki, Maruyama. (責任著者), Kyoko, Imanaka-Yoshida. (\*corresponding): The Pathogenesis of Cardiac Fibrosis: A Review of Recent Progress. *International Journal of Molecular Sciences*, **23**(5) 2617-2617 2022 年 2 月
- 3) \*Kazuaki, Maruyama. (責任著者), Kazuaki, Naemura., Yuichiro, Arima., Yasunobu, Uchijima., Hiroaki, Nagao., Kenji, Yoshihara., Manvendra K. Singh., Akiyoshi, Uemura., Fumio, Matsuzaki., Yutaka, Yoshida., Yukiko, Kurihara., Sachiko, Miyagawa-Tomita. & \*Hiroki Kurihara.: Semaphorin3E-PlexinD1 signaling in coronary artery and lymphatic vessel development with clinical implications in myocardial recovery. *iScience*, **24**(4) 102305-102305 2021 年 4 月
- 4) Kazuaki, Maruyama., Sachiko, Miyagawa-Tomita., Kaoru, Mizukami., Fumio, Matsuzaki. & Hiroki, Kurihara.: Isl1-expressing non-venous

cell lineage contributes to cardiac lymphatic vessel development. *Developmental Biology*, 452(2) 134-143 2019 年 8 月

### 腸内環境変化に着目した肥満症に関する基礎的研究

宮本 潤基

(東京農工大学大学院農学研究院)

#### 【目的】

これまでの研究で、食用油由来腸内細菌代謝物群が腸管ホルモンでインクレチンの一つである GLP-1 (glucagon like peptide-1) の分泌亢進を介して、生体エネルギー代謝調節に関与することを明らかにした。その過程で、GLP-1 受容体遺伝子改変マウスは、高脂肪食誘導性肥満に対して抵抗性を示すことを見出した (unpublished data)。また、野生型と GLP-1 受容体遺伝子改変マウスの間には劇的な腸内細菌の構成変化を明らかにしており、高脂肪食負荷時における腸内細菌の影響を抗生物質処置によって評価したが、GLP-1 受容体遺伝子改変マウスで観察された抗肥満作用に影響は及ぼさなかった。本研究では、妊娠期における抗生物質の投与が、次世代の高脂肪食誘導性肥満に及ぼす影響について、GLP-1 受容体遺伝子改変マウスを用いて検討することを目的とした。

#### 【方法】

GLP-1 受容体遺伝子改変マウスのヘテロ型を交配し、妊娠 0.5 日目から出生 (E18.5) までマウスに抗生物質 (ネオマイシン) を自由飲水させた。自然分娩後、出生以降の飼育環境を統一にするために、仮親飼育 (C57BL/6J マウスを使用) によって哺育した。仮親飼育期間中は水道水を自由飲水させた。4 週齢で離乳を行い、3 ヶ月間、高脂肪食負荷によって肥満を誘導した。なお、離乳時に野生型、ヘテロ型、ホモ型のそれぞれの遺伝子型で高脂肪食負荷試験を実施した。

#### 【結果】

通常飼育環境下における高脂肪食誘導性肥満を誘発した野生型マウスに対して、抗生物質を処置した母親マウスから出生した野生型及びヘテロ型マウスは同程度の肥満症状を呈した。一方、抗生物質を処置した母親マウス

から出生したホモ型マウスは、高脂肪食誘導性肥満に対して抵抗性を示した。この結果は、通常飼育環境下における高脂肪食誘導性肥満を誘発したホモ型マウスと同程度であった。

#### 【考察】

本研究結果によって、GLP-1 受容体遺伝子改変マウス (ホモ型) で観察された肥満抵抗性に腸内細菌の及ぼす影響は微弱であることが示唆された。しかしながら、これまでの研究報告で、腸内細菌及びその代謝物が GLP-1 分泌に関与することや、胎児期における GLP-1 の機能に腸内細菌が関与することは明らかにされており、腸内細菌—GLP-1 の相互作用が生体恒常性に重要な役割を果たしていることが期待される。また、これまでの検討で、ホモ型は離乳直後などの若齢期の段階で、体重が軽いことに着目し、今後、胎児期や乳児期における GLP-1 シグナルが、生後に伴う肥満や腸内細菌の定着などに関与している可能性を明らかにする。

### 低分子化合物による新生児期及び成体期線維芽細胞からの心筋直接誘導促進

村岡 直人

(ワシントン大学)

終末分化細胞である心筋細胞は再生能力の限られることから、心筋梗塞などにより障害を受けると失われ、代わりに線維芽細胞に増殖により置換され、心臓のポンプ機能は低下していく。重度に心機能の低下した例では心移植が根本的な治療となるが、本邦ではドナー不足という問題があることから、新たな治療法として心筋再生療法が注目されている。代表的な心筋再生の手法として多能性幹細胞由来心筋細胞の移植が挙げられるが、その臨床応用には多能性幹細胞の残存による腫瘍形成のリスク、移植心筋細胞の生着率などのいくつかの課題が残されている。一方で、障害を受けた心臓に大量に存在する線維芽細胞をその場で直接、高率に心筋細胞に転換できれば前述の課題を解決できる可能性がある。これまでに心筋特異的転写因子である Gata4/Mef2c/Tbx5 (GMT) または GMT/Msep1/Myocd 組み合わせにより、マウスの *in vitro*, *in vivo*, さらにヒト線維芽細胞からも

心筋細胞を直接誘導できることを報告したが (Ieda M, *Cell*, Inagawa K, *Circ Res*, Wada R, *PNAS*), 心筋誘導効率は低く, また心筋直接誘導のメカニズムは不明であった。

そこで注目したのが microRNA (miR) である。MiR は 発生における重要性が知られるが, 心臓発生においても筋特異的 miR のノックアウトにより, 先天性心疾

患の表現系を呈するなど, 細胞運命を制御することが示唆されている。心筋で高発現する 4 種の miR (miR-1, -133, -208, -499) について, リプログラミングへの効果を検討した。その結果, 心筋リプログラミング因子に miR-133 を加えることで, マウス及びヒト線維芽細胞からの心筋誘導効率が著明改善すること, さらには, そのメカニズムとして, 上皮間葉移行のマスター因子である Snai1 を miR-133 が直接抑制することで線維芽細胞の特性を消去し, 心筋誘導が促進されることを明らかにした (Muraoka N, *EMBO J*)。

胎児期の線維芽細胞においては高効率のリプログラミングが可能となった一方で, 臨床で治療対象となる小児期及び成体期の線維芽細胞では依然として効率が低いという課題が残されていた。そこで, 注目したのが低分子化合物である。低分子化合物はコスト, 安全面, 簡便さから臨床応用に向け優れた選択肢と考えられる。低分子化合物ライブラリーを用いて, マウス新生児期および成体期線維芽細胞から心筋細胞への誘導を促進する化合物を網羅的に探索した。その結果, 心筋誘導を改善する化合物として, 日常臨床で汎用される非ステロイド性抗炎症薬ジクロフェナクを同定した (Muraoka N, *Nature Commun*)。興味深いことに, 加齢に伴い線維芽細胞においてシクロオキシゲナーゼ-2, プロスタグランジン E2/プロスタグランジン E 受容体 4, インターロイキン-1β/インターロイキン 1 受容体タイプ 1 経路により炎症及び線維化が活性化していること, また, シクロオキシゲナーゼ阻害剤であるジクロフェナクはこの経路を抑制することにより活性化されている炎症さらには線維化特性を抑え, 心筋誘導を改善することが示され, 加齢や老化に伴うリプログラミングの障壁が初めて明らかとなった (図 1)。

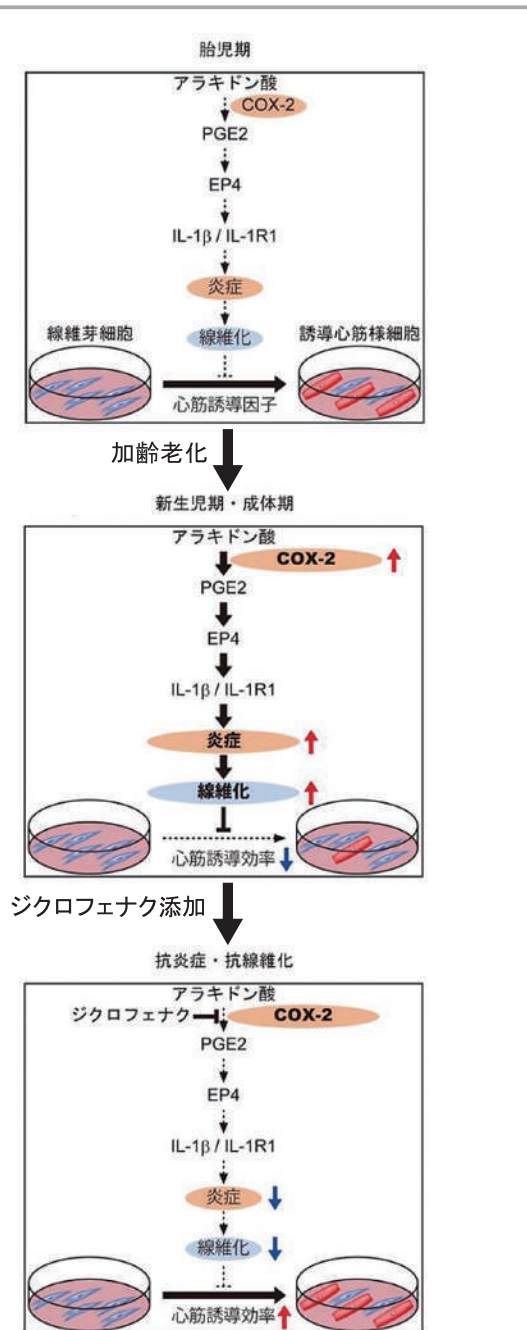


図 1 ジクロフェナクによる新生児期・成体期線維芽細胞からの心筋誘導促進

- (上) 胎児期線維芽細胞
- (中) 新生児期・成体期線維芽細胞
- (下) ジクロフェナク添加後

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)

【目的】

マルファン症候群 (MFS) はフィブリリン 1 をコー

ドする *FBN1* 遺伝子の異常によって大動脈瘤・解離を生じる常染色体顕性遺伝の全身性結合織病である。アンジオテンシン II (Ang II) 1 型 (AT<sub>1</sub>) 受容体阻害薬 (ARB) であるロサルタンは、TGF- $\beta$  シグナルの過剰な活性化を抑制し大動脈瘤に対する治療効果が期待されたが、無作為化比較対照臨床試験では  $\beta$  遮断薬を上回る効果が得られず、新たな分子機序の解明と創薬が急務である。

我々は、AT<sub>1</sub> 受容体がメカニカルストレスにより活性化し、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を有さない ARB である。MFS 患者とそのモデルマウスである *Fbn1*<sup>C1041G/+</sup> 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 のリン酸化が有意に亢進していたことから、*Fbn1* 異常に伴う組織脆弱性から生じるメカニカルストレスが AT<sub>1</sub> 受容体を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。

## 【方法】

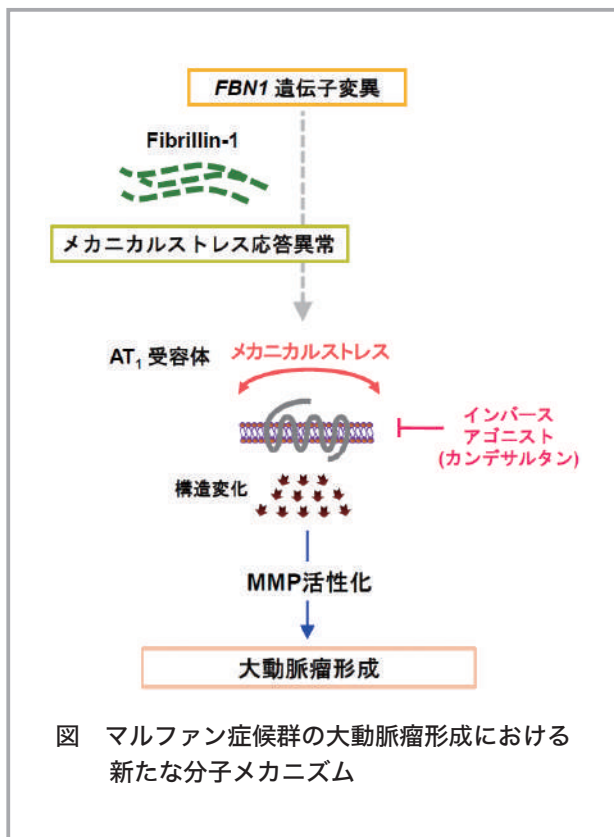
Ang II による AT<sub>1</sub> 受容体の活性化と、Ang II に依存しないメカニカルストレスによる AT<sub>1</sub> 受容体の活性化のどちらが MFS の大動脈瘤の病態形成に重要なかを検討するために、*Fbn1*<sup>C1041G/+</sup> マウスにインバースアゴニスト活性を有するカンデサルタンとインバースアゴニスト活性が低くアンタゴニスト作用のみを有するカンデサルタン誘導体 (カンデサルタン 7H) を投与し検証した。

## 【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 のリン酸化とともに MMP 活性化の亢進が抑制された。一方で、両群間で血圧や心機能に有意差は認めなかった。

## 【考察】

*FBN1* 異常に伴う過剰なメカニカルストレスによる AT<sub>1</sub> 受容体の活性化が、MFS の大動脈瘤形成の重要な促進因子であることを初めて見出した。インバースアゴニスト活性を有する ARB を使用することは、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がある。



## 血管壁の機械刺激応答と病態形成を誘導するシグナル分子の解析

山城 義人

(国立循環器病研究センター)

## 【目的】

内皮間葉転換 (EndMT) は血管リモデリングの基本的な過程である<sup>1)</sup>。しかし、新生内膜形成時の血管リモデリングの正確な制御機構や新生内膜細胞の供給源は完全には解明されていない。

## 【方法と結果】

新生内膜細胞の起源と血管壁リモデリングとの関連性を調べるために、EC 特異的系統追跡システム (VE-Cadherin (Cdh5)-BAC-CreERT2 マウス) と頸動脈結紮モデルを用い、内在性内皮細胞 (EC) が CD45 を発現する新生内膜細胞へ分化転化する証拠を示した。新生内膜形成の初期に、EC は造血マーカーである CD45 を一過性に発現し、多くの EndMT マーカーを伴い、CD31

と  $\alpha$ SMA が発達した新生内膜で顕著に発現していた。*In vitro* では、結紮した血管の低酸素状態を模倣したヒト初代 EC において、塩化コバルトによる HIF1 $\alpha$  の安定化または VHL 阻害剤によって CD45 陽性 EndMT が誘導され、インテグリン  $\alpha$ 11-SHARPIN 複合体の形成が促進された。注目すべきは、CD45 ホスファターゼ阻害剤がこの複合体を破壊し、それによって細胞間結合を不安定にしたことである。EC の Hif1 $\alpha$  を欠損させると、CD45 と EndMT マーカーの発現が抑制され、新生内膜形成が改善された。

**【結論】**

これらの結果は、HIF によって誘導される CD45 の発現は、通常 EC の運命と細胞間結合の保持に必要であり、CD45 陽性の EndMT (「部分 EndMT」と呼ばれる) は新生内膜形成と血管壁のリモデリングに寄与することを示唆している。

**【研究の展望】**

我々の研究は、新生内膜の起源が EC であり、それは partial EndMT によって生成されることを明らかにし、血管損傷後の新生内膜細胞の起源について長年議論されてきたことに新しい証拠を与えるものである。ECs における CD45 の異所性発現は、EndMT 過程における内皮細胞-細胞接合部の維持に関与していることが明らかになった。このデータは、新生内膜形成を制御するために、EndMT 過程を標的とした治療戦略の可能性を示唆している<sup>2)</sup>。

**【文献】**

- 1) Yan, Li., Kathy, O. Lui & Bin, Zhou.: Reassessing endothelial-to-mesenchymal transition in cardiovascular diseases. *Nature Review Cardiology.*, 15: 445-456, 2018.
- 2) Yoshito, Yamashiro., Karina, Ramirez., Kazuaki, Nagayama., Shuhei, Tomita., Yoshiaki, Kubota. & Hiromi, Yanagisawa.: *BioRxiv.*, 2021.

**ラミン変異特発性拡張型心筋症の分子病理学的機序の解明**

山田 臣太郎

(東京大学医学部附属病院)

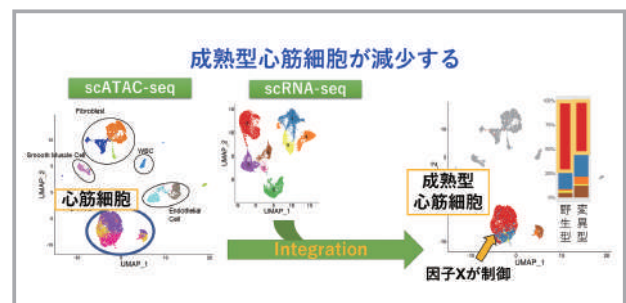
**【目的】**

特発性拡張型心筋症 (DCM) は進行性の心機能低下と不整脈を来す予後不良の疾患である。DCM 患者の中でラミン遺伝子 (*LMNA*) 変異を有する患者群は特に予後不良である。そこで、ラミン変異 DCM の分子病理学的機序の解明を目的とした。

**【方法・結果】**

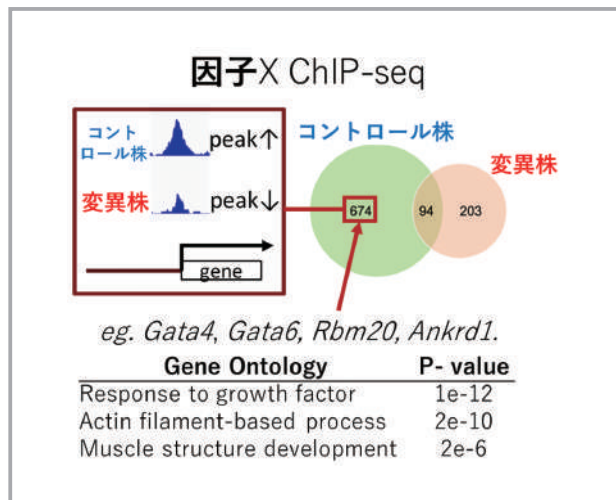
当院に通院する DCM 患者より同定された *LMNA* Q353R 変異を CRISPR/Cas9 システムを用いてマウスに導入した。*Lmna* 変異マウスでは心臓組織において核の異形を認め、また DCM 患者と同様に心拡大を認め、胎生致死となった。

胎仔マウスにおいて心臓組織のシングルセル RNA-seq (scRNA-seq) 解析を行ったところ、*Lmna* 変異マウスにおいて成熟した心筋細胞集団が減少することが分かった。次に、シングルセル ATAC-seq (scATAC-seq) 解析を行ったところ、シングルセル RNA-seq 解析結果と同様に、*Lmna* 変異マウスにおいて成熟心筋細胞集団が減少することが分かった。さらに、シングルセル ATAC-seq 解析により、それらの成熟心筋細胞集団の遺伝子発現は因子 X の制御を受けるとことが分かった。これらのことより、*Lmna* 変異マウスでは心筋細胞の成熟不良を認めるが、それは因子 X の制御不全が関与していることが考えられた。



次に、我々は患者由来の iPS 細胞から、遺伝子変異を修正して心筋細胞に分化させた細胞株(コントロール株)および遺伝子変異を修正せずに心筋細胞に分化させた細

胞株（変異株）を作成した。同 iPS 由来心筋細胞株を用いて因子 X の ChIP-seq 解析を行ったところ、コントロール株において認めるピークが一部を変異株において認めないことが分かった。また、それらのピーク近傍には心筋細胞の成熟に関与する遺伝子が多く存在することも分かった。これらのことより、因子 X は心筋細胞成熟化に関わる遺伝子を制御していると考えられた。



#### 【考察】

変異マウスにおけるシングルセル RNA-seq 解析およびシングルセル ATAC-seq 解析の統合解析、変異 iPS 由来心筋細胞における ChIP-seq 解析を用いて、*LMNA* Q353R 変異心筋細胞においては心筋細胞成熟化不良が起こっており、その原因として因子 X による心筋細胞成熟化遺伝子の制御不全が考えられた。今後は *LMNA* Q353R 変異心筋細胞における因子 X の機能不全の機序解明を目指したい。

#### クローン性造血が心血管病に与える影響の解明

由良 義充

(名古屋大学医学部附属病院)

#### 【目的】

高齢者に高頻度に確認されるクローン性造血という現象は、近年明らかになった心血管疾患の新規危険因子である。クローン性造血はがん治療を受けた患者にも高頻度に認められ、がん治療関連クローン性造血と呼ばれているが、心血管疾患に与える影響は不明であった。申請者はがん治療関連クローン性造血に特徴的な DNA 損

傷応答遺伝子 PPM1D に注目し、変異を有する免疫細胞が生体に与える影響について検討した。

#### 【方法】

免疫細胞における PPM1D 変異が心血管病に与える影響を解析するために、レンチウイルス CRISPR/Cas9 システムを用いて、*Ppm1d* クローン性造血モデルマウスを作成した。このマウスにアンジオテンシン II 負荷による心不全を発症させてその表現型を確認した。加えて、*Ppm1d* 変異を有するマクロファージ細胞株を作成し、その細胞機能を解析した。

#### 【結果】

*Ppm1d* クローン性造血モデルマウスは、アンジオテンシン II 刺激に対してコントロール群と比較して高度のリモデリングを来した。*Ppm1d* 変異マクロファージを用いた細胞実験においては、DNA 損傷応答が抑制され、NLRP3 インフラマソーム・炎症性サイトカインの過剰な活性化をきたしていることが確認された。変異免疫細胞における機能異常がマウスの心臓傷害につながることを示唆された。これらの知見を論文報告した (Yura *et al. Circ Res.*, 2021, *Heart Fail Clin.* 2022)。

#### 【考察】

本研究により DNA 損傷応答遺伝子変異によるクローン性造血が、心臓機能障害を引き起こす可能性が示唆された。がん治療により増強するクローン性造血が、治療関連心血管合併症の発症に関わる可能性を示したことで、この病態の新たな治療に繋がる道が開かれた。今後は詳細なメカニズムの解明や他病態に与える影響について研究が期待される。

#### 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

(Beth Israel Deaconess Medical Center and  
Harvard Medical School)

肥満に起因する多くの疾患が増加しており社会問題となっているが、肥満そのものに対する治療法は、限定的な抗肥満薬や外科手術しか存在しない。我々は既に、ヒトとマウスの血漿メタボロミクスにおいて、分岐



鎖アミノ酸 (BCAA) とその cognate である分岐鎖ケト酸 (BCKA) が体重と強く正に相関する代謝物である事を同定した。昨年度までに、肥満状態では褐色脂肪組織における BCAA/BCKA の利用が低下する事で血中 BCAA/BCKA が増加する事、また腸内細菌が遠隔臓器である褐色脂肪組織の BCAA/BCKA 代謝を制御する環境因子である事、を報告した。

### 【目的】

本年度は、腸内細菌がどのように褐色脂肪組織の BCAA/BCKA 代謝を制御しているのかについて解明を試みた。

### 【方法】

褐色脂肪組織の BCAA/BCKA 代謝を促進する作用を持つ *Bacteroides* 菌を投与したマウスの褐色脂肪組織と、vehicle を投与したマウス (コントロール) の褐色脂肪組織の RNA シークエンスを行い、KEGG pathway 解析を行った。また褐色脂肪細胞 HB2 cell とマクロファージ RAW264.7 cell を用いて *in vitro* の実験を行った。

### 【結果】

RNA シークエンスの結果、*Bacteroides* 投与群ではコントロール群に比して、TNF signaling pathway が最も有意に低下を認めた。その他の炎症マーカーも *Bacteroides* 群で有意に低下していた。TNF signaling pathway を構成する主要なサイトカインである TNF- $\alpha$  は主にマクロファージが分泌する事から、マクロファージが褐色脂肪組織の BCAA/BCKA 代謝に与える影響について *in vitro* で検討を行った。その結果、活性化されたマクロファージが褐色脂肪組織の BCAA/BCKA 代謝を低下させる事が分かった。

### 【考察】

褐色脂肪組織における代謝免疫連関の報告は極めて限られている。今回の結果から、褐色脂肪組織におけるマクロファージが、同組織の BCAA/BCKA 代謝を制御し、肥満形成に強く関与している事が示唆された。来年度以降、褐色脂肪組織における BCAA/BCKA 利用がどのように制御されているのか、まだ未同定な BCKA のミトコンドリアトランスポーターの解明も含めて、その全容を明らかとしたい。

## 生体膜リン脂質の”質”制御による血管内皮機能調節戦略

柳田 圭介

(国立国際医療研究センター)

### 【目的】

申請者は生体膜リン脂質中の脂肪酸の「質」の変容が成人病リスクや進行に関わる可能性を考えている。本研究では、マウスの生体膜リン脂質脂肪酸組成を遺伝学的に *in vivo* レベルで操作し、血管機能検証や成人病モデルにおける病態観察により、「血管内皮細胞リン脂質の”質”の差によるその機能変容」仮説を検証する。

### 【方法】

本年度は、血管内皮細胞リン脂質の“質”の違いによる血管バリア機能特に血液脳関門 (BBB) 機能に注目して研究を遂行した。具体的には、各種リゾリン脂質アシル基転移酵素遺伝子欠損マウスにおいて、エバンスブルーの脳内漏出を評価することで血液脳関門機能を検証した。さらに脳血管内皮細胞のリピドミクスを行うことで、リン脂質の”質”の違いと BBB との関連を追求した。

### 【結果】

検討したリゾリン脂質アシル基転移酵素遺伝子欠損マウス 8 系統いずれにおいてもエバンスブルーの脳内漏出は認められなかった。一方、脳血管内皮細胞のリピドミクスの結果より、これらの欠損マウスの脳血管内皮細胞においてリン脂質脂肪酸組成が実際に変動していることが確認された。したがって、脳血管内皮細胞がもつリン脂質脂肪酸組成の特徴そのものは定常状態の BBB 機能にさほど大きな影響を及ぼさないことがわかった。一方、別の脂質クラスが BBB に重要である可能性を考え、改めて複数の臓器における血管内皮細胞のリピドミクス比較を行なった。その結果、脂質クラス X が脳の血管内皮細胞に特徴的に多いことを見出した。さらに、脂質クラス X が欠乏する遺伝子改変マウスにおいてエバンスブルーの著しい脳内漏出が確認され、BBB が破綻していることが見出された。

### 【考察】

以上より、リン脂質脂肪酸組成変動は定常状態の BBB 機能に影響を及ぼさないことがわかった。注目の

べき点は、脳血管内皮細胞のドコサヘキサエン酸 (DHA) 含有リン脂質が BBB に重要であることが報告されているものの、本研究において DHA 含有リン脂質が激減する *Lplatt3* 欠損マウスにおいても BBB 漏出が認められなかったことである。代わりに「真に」BBB 機能に関わりうる脂質クラス X が同定されたため、今後脂質クラス X による BBB 制御のメカニズム解明および BBB 破綻病態における関与について研究を進めていきたい。

### ドパミンシグナルを介した心不全の新規病態生理の 解明と治療法の開発

山口 敏弘

(東京大学医学部附属病院)

#### 【背景】

従来の心不全の基礎研究では「モデル動物とヒトとの種差及び心不全の病態の差異」が臨床応用を妨げる重要な課題となってきた。我々は、ヒト心不全及び圧負荷モデルマウスのいずれの心臓においても発現が著増する共通の遺伝子としてドパミン受容体 D1 (D1R) を同定した上で、同 D1R がヒト、マウスのいずれにおいても心不全時の致死的心室性不整脈の発症に寄与していることが示唆されることを明らかとした。心臓 D1R をターゲットとした新規治療法をヒト臨床応用へと繋げるために、D1R トレーサーの開発及び評価系を確立することを目指しているところ、この評価系の確立にあたっては、心臓における D1R の発現状況について抗体を用いて描出する評価系を確立できていないことが喫緊の課題である。また、心不全において心臓 D1R が発現上昇をきたしているメカニズムは未だ不明であるところ、転写因子モチーフ解析によってその候補因子の抽出に成功しているが、その検証ができていない。

#### 【目的】

本研究の目的は、種を超えた心不全の本質的な病態形成に心臓 D1R が寄与するという仮説のもと、心不全の病態生理におけるドパミンシグナルの役割を解明するとともに、D1R を介した心不全の新規治療法の開発をすることである。

#### 【方法・結果】

D1R トレーサーの開発及び評価系の確立のための検討として、心臓特異的 D1R 過剰発現マウスの心臓組織を用い、心臓における D1R の発現状況を抗体を用いて評価することに成功した。また、心不全時の心臓 D1R の転写因子モチーフ解析によって抽出した候補因子 (NF- $\kappa$ B) の検証については、心不全時の心臓には小胞体ストレスがかかるとされていることに着目し、本研究の圧負荷モデルマウスの不全心において、小胞体ストレスの上昇及び NF- $\kappa$ B pathway の活性化が生じていることを確認した。その上で、培養心筋細胞を用い、小胞体ストレスを誘導したところ、D1R の発現が上昇し、この発現上昇は NF- $\kappa$ B pathway の抑制により抑制されることを確認した。このことから、心不全時の D1R の発現上昇においては、小胞体ストレスを介した NF- $\kappa$ B pathway が寄与していることが示唆された。

#### 【考察と今後の展望】

本年度の研究の結果、心筋 D1R に着目した慢性心不全治療薬の新たなターゲットとするヒト臨床応用への検討が進んだ。また、心不全において心臓 D1R が発現上昇しているメカニズムを明らかとするための検証を進めることに成功した。

## 全身性炎症疾患の病因・病態の解明に関する研究助成

## 内視鏡的表現型に基づく回腸囊炎発症機序の解明

秋山 慎太郎

(筑波大学医学医療系)

## 【目的】

潰瘍性大腸炎 (UC) 患者において、内科治療抵抗性もしくは発がんのために約 10% の患者が全大腸切除術を必要とする。炎症のない回腸で囊を形成しているにも関わらず、最大約 50% の患者に回腸囊炎が生じ、約 10% で回腸囊不全を呈することが知られる。回腸囊炎の内視鏡像は多彩であり、その表現型の違いが、回腸囊予後と関連することが明らかになってきている。また、回腸囊炎患者では、小腸粘膜である回腸上皮の大腸化が報告されており、炎症との関連が示唆される。そこで、本研究は、回腸囊炎表現型と予後、さらには小腸上皮大腸化との関連を明らかにすることを目的として、現在も解析を進めている。

## 【方法】

2005 年から 2022 年までに、筑波大学附属病院で大腸全摘及び回腸囊肛門吻合術を施行され、術後回腸囊内視鏡評価を受けた UC 患者を対象とした。回腸囊の解剖学的部位に基づき、内視鏡所見 (発赤、浮腫、びらん、潰瘍、狭窄、粗造粘膜、血管透見像消失) を評価した。シカゴ分類<sup>1)</sup>に基づき、(1) 正常、(2) Afferent limb に炎症を伴う型、(3) Inlet に炎症を伴う型、(4) びまん性回腸囊炎、(5) 限局性回腸囊炎、(6) Cuffitis、(7) 瘻孔を伴う型の 7 つの表現型に分類して評価した。

## 【結果】

51 例の UC 術後患者を同定した。UC 診断時及び大腸切除時の年齢中央値は、それぞれ 31 歳、41 歳、術前罹患期間中央値は 5 年、全大腸炎型は 88%、内科治療抵抗性例は 71% であった。術後に実施された回腸囊内視鏡は 395 件であり、最も多い表現型は、限局性回腸囊炎 39 例 (77%) で、Cuffitis 37 例 (73%)、Inlet

型 22 例 (43%)、Afferent limb 型 12 例 (24%)、びまん性回腸囊炎 11 例 (22%)、瘻孔型は 7 例 (14%) という頻度であった。予後解析の結果、びまん性回腸囊炎または瘻孔型を有する患者では、他の表現型と比較して、回腸囊不全リスクが有意に高いことが示された。

## 【考察】

UC 患者では、回腸囊にびまん性の炎症や瘻孔形成を認めた場合、予後不良であり、慎重な回腸囊評価と治療介入が必要であることが示唆された。今後、腸上皮の杯細胞が分泌するムチンの性状を評価し、これら予後不良表現型と小腸上皮大腸化との関連を理解することで、回腸囊炎の病態解明を目指す。

## 【文献】

- 1) Akiyama, S., Ollech, J.E. & Rai, V., *et al.*: Endoscopic phenotype of the J pouch in patients with inflammatory bowel disease: A new classification for pouch outcomes., *Clin Gastroenterol and Hepatol.*, **20**, 293-302 (2022).

## 自己炎症性疾患である中條-西村症候群における好中球の役割

稲葉 豊

(和歌山県立医科大学)

## 【目的】

中條-西村症候群 (NNS) は、若年で死亡することもある特異な遺伝性炎症・消耗性疾患である。2011 年に PSMB8 遺伝子のホモ変異によるプロテアソーム機能不全症であることが判明し、遺伝性自己炎症性疾患の一つとして指定難病に登録された。

プロテアソーム機能不全が自己炎症性の病態を来す詳細なメカニズムには不明な点が多い。NNS では凍瘡様の皮疹を呈することがあり、組織学的には好中球の浸潤を認めることがある。一方、多発性骨髄腫患者に対

する治療薬として、プロテアソーム阻害剤投与例では、sweet 病様皮疹の報告が散見されている。また好中球性皮膚症のベーチェット病は、自己炎症性疾患との鑑別が困難な症例も存在し、両疾患とも再燃、寛解を繰り返す好中球優位の炎症を病態の特徴とすることから両疾患の関連性が注目されている。

これらよりプロテアソーム機能不全による皮疹形成に好中球が関与することが予想された。本研究では作成済みの PSMB8 変異導入マウスを用い、皮疹形成における好中球の役割を解析する。

#### 【方法】

PSMB8 変異導入マウスにおいて、自然発症の皮疹形成を認めるか確認する。

皮疹を認めないなら 4,6-trinitrochlorobenzene (TNCB) をハプテンとして使用し、アレルギー性接触皮膚炎を惹起し、耳介腫脹の程度、HE, CD4, CD8, MPO 染色にて浸潤細胞数を確認する。

#### 【結果】

PSMB8 変異導入マウスにおいては、無刺激下では皮疹の形成を認めなかった。

そのためアレルギー性接触皮膚炎を誘発し、PSMB8 変異導入マウスにおいて耳介腫脹が野生型と比べ有意に増加していることを確認した。

HE, CD4, CD8 染色にて浸潤細胞数に差異は認めなかったが、MPO 染色にて有意に野生型に比べ PSMB8 変異導入マウスにおいて MPO 陽性細胞が増加していることがわかった。

#### 【考察】

ヒトと同様には、PSMB8 変異導入マウスにおいて皮疹の発症は認めなかったが、アレルギー性接触皮膚炎を誘導すると優位に耳介の腫脹と浸潤好中球が増加していることがわかった。アレルギー性接触皮膚炎モデルにおいて、感作相において好中球を欠損させると接触皮膚炎の程度が減弱<sup>1)</sup>されることがわかっており、PSMB8 変異導入マウスにおいて好中球の機能異常があることが予想された。

今後は、抗好中球抗体を投与し、好中球を欠損させた状態で耳介浸潤の程度の有無、また Neutrophil extracellular traps の関与に関しても解析する予定である

#### 【文献】

- 1) Felix C Weber. *et.al.*: Neutrophils are required for both the sensitization and elicitation phase of contact hypersensitivity, *J. Exp. Med.*, **212**, 15-22 (2015).

#### オメガ3不飽和脂肪酸の実験的ぶどう膜炎 (EAU) モデルにおける樹状細胞を介した抗炎症作用の検討

内 翔平

(山口大学医学部附属病院)

#### 【目的】

我々のグループはマウスにオメガ3不飽和脂肪酸を食事摂取させることで、自己免疫性ぶどう膜炎の臨床学および組織学的な炎症スコアが抑制されることを示した。オメガ3脂肪酸は細胞内に取り込まれたあと、複数のメディエーターに代謝され、プロスタグランジン (PG), ロイコトリエン (LT), レゾルビン, ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 (PPAR $\gamma$ ) リガンド, およびシトクロム P450 代謝物が産生される。本研究では、オメガ3脂肪酸のシトクロム P450 代謝物 (EEQ) による眼炎症に対する抑制効果について検討した。

#### 【方法】

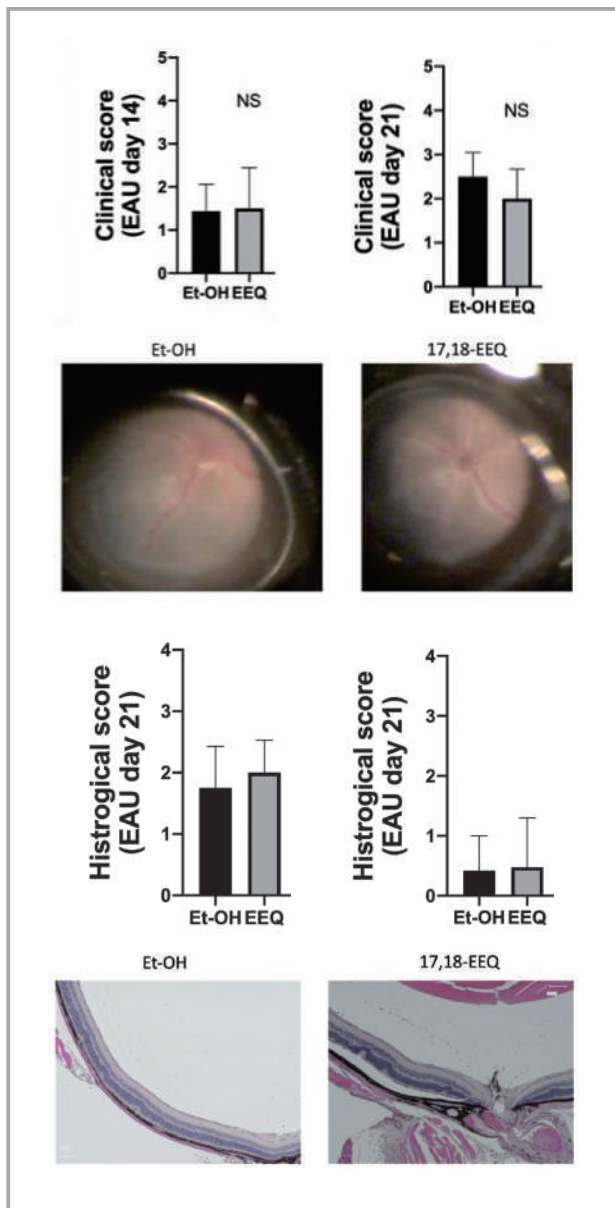
C57B/6 マウスに IRBP ペプチドと結核菌を含むアジュバンドとともに足底および鼠径部に下注射し、自己免疫性ぶどう膜炎を誘導した。誘導後 7 - 12 日目に EEQ を腹腔内投与し、14 日、21 日目に眼底検査で臨床スコア、および摘出眼球を HE 染色して組織学的スコアを算出して対照群 (Et-OH) と比較した。

#### 【結果】

$\omega$  3 脂肪酸のシトクロム P450 代謝物 (EEQ) は、自己免疫ぶどう膜炎誘導後 14 日および 21 日の臨床スコアを抑制しなかった。さらに、組織学的スコアにおいても、14 日目および 21 日目の炎症スコアを抑制しなかった。

#### 【考察】

オメガ3不飽和脂肪酸による自己免疫ぶどう膜炎の抗炎症効果にはシトクロム P450 代謝物は関与しないことが明らかとなった。今後、オメガ3不飽和脂肪酸の抗



炎症効果の作用メカニズムを解明することを目的として、プロスタグランジン (PG), ロイコトリエン (LT), レゾルビン, パルオキシソーム増殖因子活性化受容体 (PPAR $\gamma$ ) リガンドの関与について, 検討する予定である。

**【文献】**

1) Uchi S-H., Yanai, R (C)., Kobayashi, M., Hatano, M., Kobayashi, Y., Yamashiro, C., Nagai, T., Tokuda, K., Connor, KM., Sonoda, K-H. & Kimura, K.: Dendritic cells mediate the anti-inflammatory action of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in experimental autoimmune uveitis. *PLoS One* 14(7): e0219405, 2019. doi:10.1371/journal.pone.0219405.eCollection

tion 2019.

2) Hasegawa, E., Inafuku, S., Mulki, L., Okunuki, Y., Yanai, R., Smith, KE., Kim, CB., Klokman, G., Bielenberg, DR., Puli, N., Falck, JR., Husain, D., Miller, JW., Edin, ML., Zeldin, DC., Lee, KSS., Hammock, BD., Schunck, WH. & Connor, KM.: Cytochrome P450 monooxygenase lipid metabolites are significant second messengers in the resolution of choroidal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 114(36) E7545-E7553, 2017.

3) Yanai, R., Mulki, L., Hasegawa, E., Takeuchi, K., Sweigard, H., Suzuki, J., Gaissert, P., Vavvas, DG., Sonoda, KH., Rothe, M., Schunck, WH., Miller, JW. & Connor, KM.: Cytochrome P450-generated metabolites derived from  $\omega$ -3 fatty acids attenuate neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 111: 9603-9608, 2014.

**全身性強皮症における自然免疫系の役割の検討**

大石 京介

(金沢大学医薬保健研究域医学系)

**【目的】**

全身性強皮症は皮膚および内臓諸臓器の障害と線維化を特徴とする自己免疫疾患であるが, いまだ根本的な治療は確立されていない. その病態として近年の研究により自然免疫に重要な役割を有する Toll-like receptor (TLR) の関与が示されている. TLR7 および TLR9 は様々な細胞内のエンドソーム膜に発現しており細胞内に取り込まれた RNA や DNA 等を認識することで炎症性サイトカインの産生に関与しているが, 全身性強皮症患者ではこれら TLR7 および TLR9 の発現が亢進しており線維化病変との相関関係が認められている. このことから全身性強皮症の病態に TLR7 および TLR9 が関与していると考え, 全身性強皮症における TLR7 および TLR9 の機能およびそのメカニズムを解明するとともに, 全身性強皮症に対する新規治療開発の基板形成を目指す.

**【方法】**

全身性強皮症モデルであるブレオマイシン誘発強皮症マウスにおける TLR7 および TLR9 の関与を解明するため、皮膚・肺の線維化を評価するとともに線維化組織における炎症細胞浸潤、サイトカイン発現を評価する。

野生型マウス (Balb/c)、TLR7 欠損マウス、TLR9 欠損マウスにブレオマイシン溶液を投与し皮膚や肺に線維化を誘導する。コントロールには PBS を用いる。ブレオマイシン投与から 28 日目に皮膚・肺組織を採取し、複数の染色標本にて線維化の程度を評価する。また、免疫染色によりブレオマイシン誘発強皮症モデルマウス (野生型マウス、TLR7 欠損マウス、TLR9 欠損マウス) の皮膚・肺に浸潤した CD3<sup>+</sup>T 細胞、CD4<sup>+</sup>T 細胞、CD8<sup>+</sup>T 細胞、B220<sup>+</sup>B 細胞、F4/80<sup>+</sup>マクロファージ、NK1.1<sup>+</sup>細胞の数をカウントして評価する。

**【結果】**

ブレオマイシン誘発強皮症マウスでは、TLR9 欠損マウス群でコントロール群、TLR7 欠損マウス群と比較して有意に皮膚の線維化、肺の線維化が軽減された。その一方で、TLR7 欠損マウス群はコントロール群と比較して有意差はなかった。

**【考察】**

全身性強皮症の病態において、TLR7 よりも TLR9 がより重要な役割を果たしている可能性がある。

**カルパインを標的とした全身性強皮症の新規治療戦略**

笠松 宏至

(福井大学)

**【目的】**

全身性強皮症 (以下、強皮症) は免疫異常を背景に皮膚や内臓に線維化や血管病変をきたす膠原病であるが、その病態は明らかでなく、治療法も確立されていない。カルパインは細胞質内 Ca<sup>2+</sup>要求性プロテアーゼであるが、いまだその生理機能は不明な点が多い。カルパイン阻害剤は肺線維症・皮膚の癬痕形成などの線維化や血管障害を抑制するとの報告がみられており、強皮症にも有用な可能性があると考え検討した。

**【方法】**

*In vitro* では TGF- $\beta$  で刺激した培養ヒト皮膚・肺線維芽細胞の増殖・遊走、コラーゲン産生やサイトカインの発現、シグナル伝達分子のリン酸化に対するカルパイン阻害剤の影響を検証した。また、肺上皮細胞を用いて上皮間葉転換を抑制するかどうか評価した。

動物実験系では野生型マウスの背部に連日ブレオマイシンを皮下注射し作成した強皮症マウスモデルで、カルパイン阻害剤を腹腔内投与し皮膚・肺における抗線維化作用を検証した。

**【結果】**

*In vitro* においてカルパイン阻害剤を投与することで、TGF- $\beta$  で刺激した皮膚・肺線維芽細胞から産生される  $\alpha$ SMA、コラーゲン、ファイブロネクチン 1 を抑制した。また Smad2/3 の核内におけるリン酸化を低下させ、間葉移行に関わる転写因子である SNAIL2 や ZEB1 も抑制した。TGF- $\beta$  を用いて上皮間葉転換を誘導した肺上皮細胞においてはカルパイン阻害剤の投与により上皮マーカーである E カドヘリンの減少を抑え、間葉マーカーの上昇を抑制させた。

動物実験においては、カルパイン阻害剤投与群ではブレオマイシンによる皮膚肥厚を有意に改善させ、真皮内コラーゲンの増加も抑制した。さらにカルパイン阻害剤投与群で *in vitro* と同様 Smad のリン酸化が低下していたことに加え、真皮内のカルパインの発現低下を確認した。コントロール群に比し、リンパ球、マクロファージといった炎症細胞浸潤が弱い傾向にあった。

**【考察】**

カルパイン阻害剤は線維芽細胞からの細胞外マトリックスの産生を減少させた。また強皮症マウスモデルで皮膚の線維化を抑制した。この機序として TGF- $\beta$ /Smad シグナル伝達経路を抑制することがまず挙げられ、他に上皮間葉転換への影響、カルパインを介した経路が関わっている可能性がある。今後は血管障害に対する効果や、詳細な機序の解析を検討する。

## 全身性強皮症に対するB細胞除去療法における組織中B細胞の検討

久住 藍

(東京大学)

### 【目的】

全身性強皮症 (systemic sclerosis; SSc) は予後不良な自己免疫疾患で、治療法は確立されていない。B細胞が病態形成に重要なことから、抗 CD20 抗体による B細胞除去療法が SSc の新規治療として期待されているが、しばしば治療効果に乏しい。申請者は SSc モデルマウスの組織中 B細胞の一部が抗 CD20 抗体による除去に抵抗性であることを見出し、これが治療抵抗性に寄与しているのではないかと着想した。

本研究では、自己抗原反応性 B細胞をもつ独自のモデルマウスを用いて、抗 CD20 抗体による除去に抵抗性の組織中 B細胞の病原性を明らかにする。また、SSc の組織微小環境が組織中 B細胞の除去抵抗性に関与する可能性について、B細胞の生存と局在に重要な CXCL12-CXCR4 軸に着目して明らかにする。

### 【方法】

1) 抗 CD20 抗体による除去に抵抗性の組織中 B細胞の病原性の解析

野生型マウスに topoisomerase I (topo I) を免疫して作成した topo I 誘導 SSc モデルに抗 CD20 抗体を腹腔内投与し、皮膚・肺の線維化に対する効果を病理組織学的に評価し、骨髄・脾臓・肺・末梢リンパ節・末梢血を回収し、蛍光標識された topo I 抗原に結合する B細胞をフローサイトメトリーで解析し、組織中 topo I 反応性 B細胞の除去率を算出する。

2) CXCL12-CXCR4 軸の解析

Topo I 誘導 SSc モデルの骨髄・脾臓・肺・末梢リンパ節における CXCL12 の発現を real-time PCR および免疫染色で評価し、野生型と比べる。また、Topo I 誘導 SSc モデルにおける前述の各組織中の topo I 反応性 B細胞について、CXCR4 の発現をフローサイトメトリーで解析する。

### 【結果】

Topo-I-SSc モデルマウスの組織中 B細胞、特に組織

中の topo-I 反応性 B細胞は、抗 CD20 抗体による除去に強い抵抗性を示した。また、topo-I-SSc モデルマウスの脾臓・肺・末梢リンパ節では CXCL12 の発現が上昇していた。さらに、topo-I-SSc モデルマウスの組織中 B細胞、特に topo-I 反応性 B細胞では CXCR4 の発現が上昇していた。

### 【考察】

本研究の結果から、SSc の組織中 B細胞、特に組織中の自己反応性 B細胞は抗 CD20 抗体による除去に抵抗性を示し、その除去抵抗性には CXCL12-CXCR4 軸のシグナルが関与している可能性があることが示された。

## ルーティン末梢血液検査結果を用いた機械学習によるぶどう膜炎診断

坪田 欣也

(東京医科大学)

### 【目的】

ぶどう膜炎の中には急激な視力低下をきたす疾患や生命予後不良となる仮面症候群などもあり、適切な診断のもとに早急な治療の開始が求められるが、しばしば診断には苦慮することがある。末梢血液検査は一部のぶどう膜炎の診断に有用であり、サルコイドーシスでは可溶性 IL-2 受容体などが診断基準に含まれ、ベーチェット病では好中球とリンパ球比の増加が報告されている。我々は、眼内液と機械学習を組み合わせ、様々な眼疾患の新たなバイオマーカーの創出を報告してきた。本研究では末梢血液検査項目の更なる解析によって、新たなバイオマーカーを検出することで、眼内液の採取といった侵襲的な検査を行わずに早急な治療を要するぶどう膜炎疾患の診断を可能とすることを目的とする。

### 【方法】

2004 年 4 月から 2020 年 3 月に東京医科大学病院眼科で新たにぶどう膜炎と診断された患者 4,423 人を対象とし、ぶどう膜炎診断時に施行されるルーティン末梢血液検査結果を用いた。フォークト-小柳-原田病、サルコイドーシス (サ症)、ベーチェット病、ヘルペス性虹彩炎、眼内リンパ腫、若年性慢性虹彩毛様体炎、急性網膜壊死、眼内炎、その他のぶどう膜炎 (Other)、原因

不明の10種に分類したぶどう膜炎をサポートベクターマシーン線形、サポートベクターマシーンカーネル法(SVM-RBF)、ランダムフォレスト(RF)、決定木分析、ナイーブベイズ、線形判別分析の6種のアルゴリズムを用いて診断し、正解率を用いて各種アルゴリズムの診断精度を解析した。各種アルゴリズムは2分割交差検証を繰り返し100回行い検討した。

**【結果】**

ぶどう膜炎診断の中央正解率はRFが最も高く0.51±0.20、次いでSVM-RBFが0.49±0.01であった。SVM-RBFを用いたf値は上位より原因不明57.3±0.7、眼内炎55.0±3.2、サ症50.7±3.3、Other32.1±2.5であった。

**【考察】**

眼内炎、サ症において、ルーティン末梢血液検査を用いた機械学習によるぶどう膜炎診断率は50%を超えており、ぶどう膜炎診断の補助として有用である可能性が示唆された。しかし、本研究は単施設による診療録を用いた検討のためバイアスが大きい可能性は否定できない。さらに高性能な診断補助アルゴリズム作成には前向き研究、他施設研究が望まれる。

SPF B)の腸管微生物叢を移入し、GFマウス、SPFマウス、元無菌マウス(SPF A移入群:ex-GF A, SPF B

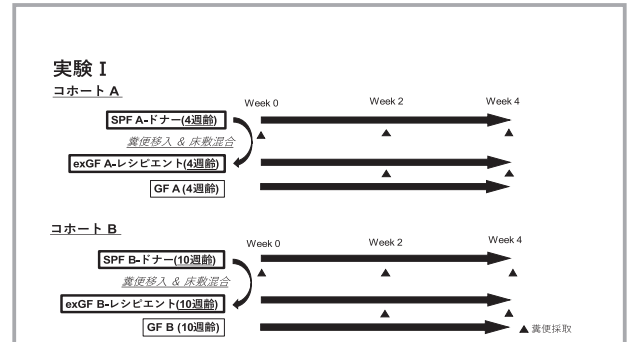


図1 実験Iのデザイン

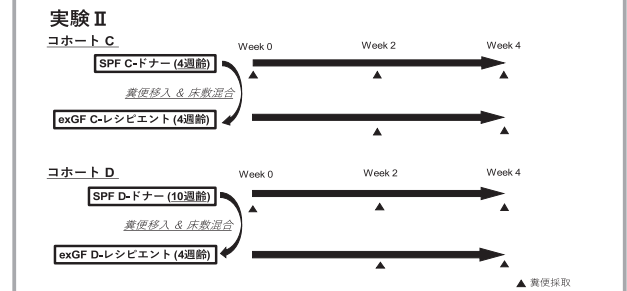


図2 実験IIのデザイン

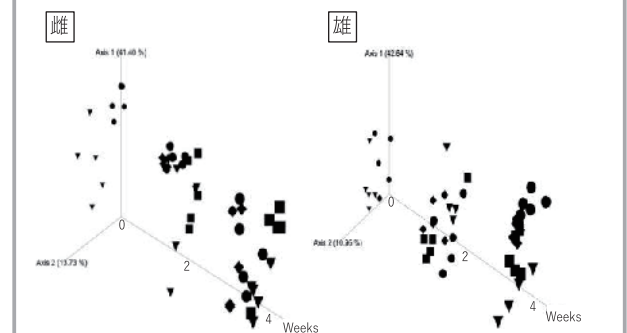


図3 Weighted Unifrac Distances PCoA plot (●: SPF A, ▼: SPF B, ◆: ex-GF A, ■: ex-GF B)

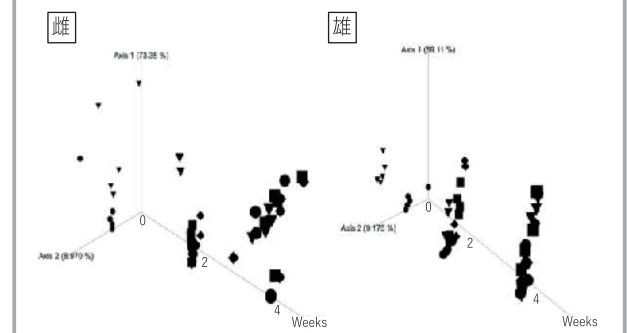


図4 Weighted Unifrac Distances PCoA plot (●: SPF C, ▼: SPF D, ◆: ex-GF C, ■: ex-GF D)

炎症性腸疾患の病態における幼少期微生物叢の関与

西成田 悠

(杏林大学)

**【背景】**

幼少期の dysbiosis が炎症性腸疾患 (IBD) 発症に寄与することが示唆されている<sup>1)</sup>。幼少期に適切な腸管微生物叢に曝露することが健全な宿主免疫発達に重要であると考えられている<sup>2)</sup>。

**【目的】**

幼少期の宿主免疫と微生物叢の相互作用を理解するため、腸管微生物叢に曝露する時機の違いと曝露する腸管微生物叢の違いが免疫発達に与える影響について検討した。

**【方法】**

4 または 10 週齢無菌 (GF) マウスに週齢・性別が一致する SPF マウス (4 週齢群: SPF A, 10 週齢群:



移入群：ex-GF B) の腸管細菌構成，免疫機構（脾臓・腸間膜リンパ節の CD4<sup>+</sup>T 細胞分画，大腸粘膜サイトカイン mRNA 発現）を検討した（図 1，実験 I）。4 週齢 GF マウスに性別が一致する 4 週齢 SPF マウス (SPF C) の腸管微生物叢を移入した群 (ex-GF C) と 10 週齢の SPF マウス (SPF D) から移入した群 (ex-GF D) の腸管細菌構成，免疫機構を検討した（図 2，実験 II）。

**【結果】**

Ex-GF A と ex-GF B の腸管細菌構成は異なっていた（図 3，雌  $p=0.041$ ，雄  $p=0.005$ ）。免疫学的には ex-GF A のみ SPF と類似した。Ex-GF C と ex-GF D の腸管細菌構成は類似し（図 4，雌  $p=0.553$ ，雄  $p=0.091$ ），SPF C に類似した。ex-GF 間の免疫学的な違いは認めなかった。

**【考察】**

幼少期でのみ免疫学的可塑性が存在し，同期間に週齢相応の腸管細菌叢が生着して健全な免疫発達を可能とする機構が存在することが示唆された。

**【文献】**

- 1) Miyoshi, J. *et al.*: Early-Life Microbial Restitution Reduces Colitis Risk Promoted by Antibiotic-Induced Gut Dysbiosis in Interleukin 10<sup>-/-</sup> Mice. *Gastroenterology.*; **161**(3): 940-952. (2021).
- 2) Parkin, K. *et al.*: Risk Factors for Gut Dysbiosis in Early Life. *Microorganisms.*; **9**(10): 2066. (2021).

**眼症状型重症薬疹の遺伝要因に由来する発症メカニズムの解明と個別化医療の構築**

人見 祐基

(国立国際医療研究センター研究所)

**【目的】**

重症薬疹は，薬剤などを契機に生ずる重篤な病変を特徴とする疾患であり，発症メカニズムは不明である<sup>1)</sup>。本研究では，助成者らがゲノムワイドな探索<sup>2)</sup>にて同定した疾患感受性遺伝子 *HLA* class I，および，患者のゲノム DNA に rare variant の集積が見られた *TRPM8* に起因する，発症メカニズムの解明と個別化医療の構築を目指した研究を実施した。

表 1 日本人において頻度の高い *HLA* class I アリル

<i>HLA-A</i>	(%)	<i>HLA-B</i>	(%)	<i>HLA-C</i>	(%)
A*24:02	36.21	B*52:01	11.01	C*01:02	17.26
A*02:01	11.23	B*51:01	8.73	C*03:03	14.00
A*02:06	9.50	B*35:01	8.45	C*07:02	12.70
A*11:01	8.91	B*15:01	7.96	C*03:04	12.17
A*31:01	8.62	B*40:02	7.79	C*12:02	10.88
A*26:01	7.64	B*54:01	7.59	C*08:01	7.34
A*33:03	7.37	B*44:03	6.66	C*14:02	6.82
A*02:07	3.25	B*40:01	5.56	C*14:03	6.41
A*26:03	2.51	B*07:02	5.43	C*04:01	4.34
		B*40:06	4.79	C*15:02	3.10
		B*46:01	4.51		
		B*39:01	3.40		
		B*48:01	2.89		
		B*55:02	2.47		
		B*59:01	2.03		
		B*15:18	1.58		
		B*13:01	1.17		
		B*67:01	1.13		
		B*15:11	0.94		
		B*56:01	0.91		

**【方法】**

日本人で頻度が高い *HLA* アリル (95 パーセントイル以上) の遺伝子全長 (約 8.5kb) を，日本人健常者のゲノム DNA より正確にクローニングした(表 1)。また，ゲノム DNA において *HLA* を完全に欠損した HeLa 細胞を，ゲノム編集にて作成した。

また，*TRPM8* エクソン内に存在する非同義置換の rare variant によるタンパク産物へのダメージの影響を，Polyphen2, SIFT, CADD を用いる *in silico* 解析にて検証した。

**【結果】**

日本人において頻度の高い *HLA* アリルすべての遺伝子全長について，クローニングが完了した。また，*HLA* 欠損 HeLa 細胞の樹立にも成功した。現在，*HLA* 欠損 HeLa 細胞へ，ゲノム編集を用いた *HLA* アリル全長のノックインを進めており，完了次第，細胞レベルでの *HLA* アリル機能比較実験を予定している。

また，重症薬疹症例にのみ検出された 8 か所の *TRPM8* の rare variant は，いずれも *TRPM8* タンパク機能に対して高い damaging score を示しており，発症への強い寄与が示唆された (表 2)。

表 2 *TRPM8* にて検出された rare variant に対する *in silico* 解析

患者症例 (n)	健常者 (n)	Polyphen2	SIFT	CADD
W89R	1	0	PROBABLY DAMAGING	DAMAGING 26.7
S166N	1	1	BENIGN	TOLERATED 23.9
K314N	1	0	PROBABLY DAMAGING	TOLERATED 23.8
T365M	2	0	POSSIBLY DAMAGING	TOLERATED 23.3
R475H	1	0	PROBABLY DAMAGING	DAMAGING 29.4
A512T	1	0	POSSIBLY DAMAGING	TOLERATED 24.5
N572T	1	1	PROBABLY DAMAGING	DAMAGING 25.9
R585G	0	1	BENIGN	TOLERATED 19.07
P767H	1	0	POSSIBLY DAMAGING	TOLERATED 15.48
S773*	3	3	(Stop codon)	Damaging due to stop 37
R829*	1	0	(Stop codon)	Damaging due to stop 40
L959M	0	1	PROBABLY DAMAGING	DAMAGING 23.8
R1009H	1	0	POSSIBLY DAMAGING	DAMAGING 26.7

**【考察】**

本研究では、重症薬疹の発症に強く影響する2か所の遺伝子に対する研究が大きく進捗した。現在、更なる発展的研究を実施中であり、新規知見を得ることができる見込みである。特にHLAにおいては、眼症状型以外の重症薬疹もHLAが強く影響することが分かっており、これらも含めた発症メカニズムの解明や個別化医療の実装を前進させる研究成果が得られたと考えられる。

**【文献】**

- 1) Roujeau JC, et al.: *N Engl J Med* 1995; **333**: 1600-7.
- 2) Kawai Y\*, Hitomi Y\*, Ueta M\*, Khor SS\*, et al (\*共同筆頭著者): *NPJ Genom Med* 2021; **6**: 9.

**クローン病の体内侵入菌の同定と腸炎病態への関与の解明**

三上 洋平

(慶應義塾大学医学部)

**【背景】**

食の西洋化や抗生剤が乱用される本邦において、炎症性腸疾患 (IBD; inflammatory bowel disease) の罹患率は若年者を中心に急増している。遺伝的素因に加えて、腸内細菌をはじめとした環境要因による影響が複雑に絡み合っている腸管の慢性炎症が、IBD病態の本質とされる。しかし、現状におけるIBDの治療法は炎症細胞もしくは炎症性サイトカインを標的としたものであり、とくにこれらの分子標的薬は一定の成果を上げてきたものの、非常に高額かつ輸入に頼っており、本法の医療経済的に安価で有効な治療法が期待されている。さらに、長期間の罹患に伴い、IBDは患者の著しいQuality of Lifeの低下や経済的負担の増大に加えて、腸管や肛門部に発生する炎症発がんが近年増加しており、治療法の開発は急務である。このように、病態形成後の炎症を修飾する治療は充実してきているものの、病態形成機序に即した有効的なIBD治療法はなく、病態形成に関与する腸内細菌にアプローチした比較的安価でかつ副作用の少ない治療法の開発は、医療経済的なメリットにとどまらず、若年者の生産性の向上による実体経済へ与える

インパクトは極めて大きい。

近年、腸内細菌の解析は、メタゲノム解析技術の進歩に伴い飛躍的に向上し、その結果IBD病態発症・進展において腸内細菌の重要性がますます示唆されている。しかし、腸炎病態に相関する様々な細菌が同定されてきたものの、未だに真の病原菌は不明である。さらに、IBDに合併する皮膚疾患、肝炎および胆管炎、関節炎、等の腸管外合併症の病態形成に関与する腸内細菌も次々と報告され、申請者は、皮膚疾患に関わる *Lactobacillus murinus* (Mikami, Y. et al. *Cell Rep.* 2017) を、肝臓疾患に関わる *Lactobacillus johnsoni* (Nakamoto, N., Mikami, Y. et al., *Cell Rep.* 2017; Taniki, N., Mikami, Y. et al. *JCI insight* 2017) を同定し、当該研究領域の発展に貢献した。IBDの病態形成における腸内細菌の関与は以前より示唆されるが、病態機序や原因菌の特定には至っておらず、腸内細菌を標的とし治療法が有効であると断言できなかった。

**【目的】**

当教室で開発したヒト患者糞便サンプルから原因菌を絞り込む新規スクリーニング法 (図1) を用いて、IBD患者糞便よりIBDの原因菌を同定し、病態解明につなげることを目的とする。

IBDにおける腸管および腸管外病変の病態形成において、エフェクターT細胞が病態機序の中心的な役割を担うとされる (Neurath, MF. *Nat Rev Immunol.* 2014; Biedermann, T. et al. *Front Immunol.* 2015)。IBD患者の口腔内にはTh1誘導性細菌が、腸管内にはTh2およびTh17誘導性細菌が増殖しており (Atarashi, K. et al. *Science.* 2017; Britton, GJ. et al. *Immunity.* 2019)、これら腸内細菌が、所属リンパ節を経由して体内に侵入し、腸管病変ならびに皮膚病変に関与すると想定された。図1で示す新しい腸内細菌スクリーニング法と、IBDモデル、抗生剤乱用によるdysbiosisモデル

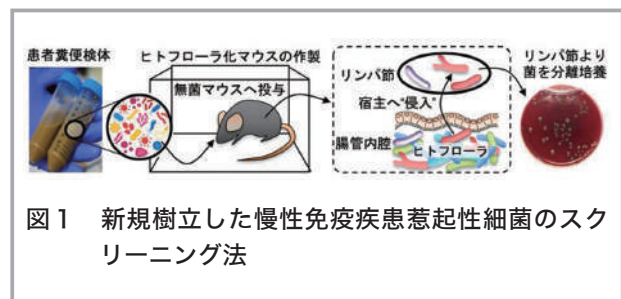
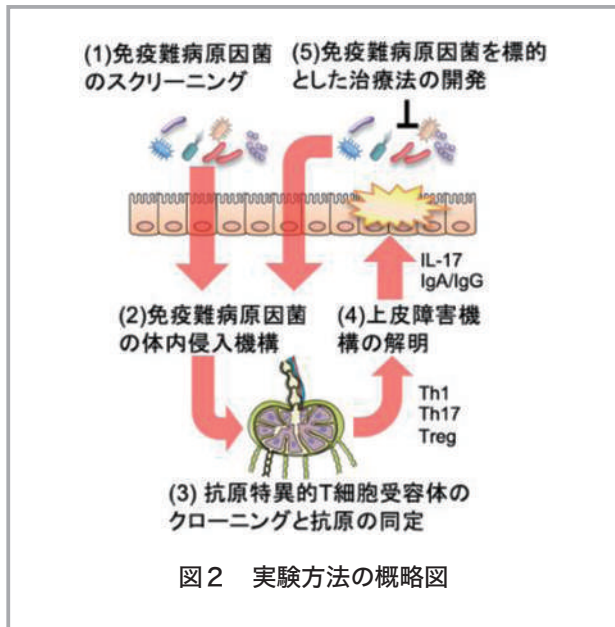


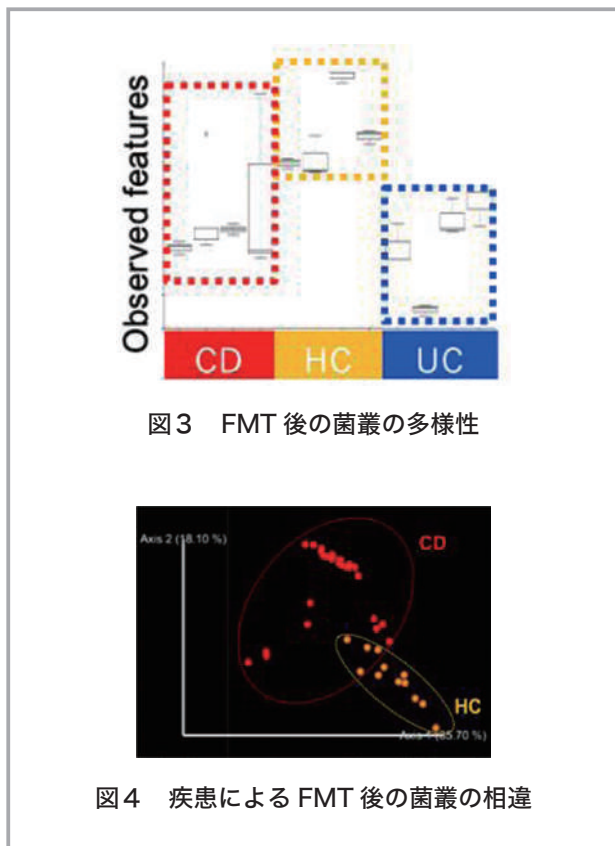
図1 新規樹立した慢性免疫疾患惹起性細菌のスクリーニング法



を組合せて、免疫難病原菌が、腸炎病態の発症・進展に及ぼす機能解析を行うことを目的とする。

**【方法と結果】**

まず、クローン病患者由来の“体内侵入菌”を同定することを目的とし、図1で示す新しい腸内細菌スクリーニング法を用いて、クローン病手術患者より得られた腸内細菌を、無菌マウスに投与し (CD-FMT マウス)、CD-FMT マウスの腸間膜リンパ節を培養した。さらに、



16S rRNA シーケンス法を用いて、健常人およびクローン病患者検体由来の糞便検体を解析し、糞便中の疾患特異的腸内細菌スペクトラムを解析することにより、クローン病患者由来の“体内侵入菌”のスクリーニングを行った。

クローン病 (CD) に加えて、IBD の代表疾患である潰瘍性大腸炎 (UC) の患者便検体をアイソレーター内で無菌マウスに投与し (FMT: fecal microbiota transplantation)、マウスの腸内細菌を解析したところ、CD、UC 由来の便 (FMT 便) においては、健常人 (HC) と比べて菌叢の多様性が低下していることが示された (図3)。これは、FMT 前の糞便 (*de novo* 便) の多様性を記した既報において、IBD 患者糞便中の筋層の多様性が低下しているというデータとも合致する結果となった (*Lloyd-Price J (HMP2). Nature. 2019*)。これを4人の患者由来の糞便サンプルにおいて行い、同様の結果が得られた。

さらに、既報の *de novo* 便の比較では、IBD と NL では多くの患者検体がオーバーラップしている中で統計学的に有意差を示していたが、FMT 便においては CD と HC の菌叢の組成がより顕著に異なり (図4)、本スクリーニングシステムの有効性が示唆される結果であった。

**【今後の展望】**

すでに、入院を要する重症クローン病患者4名よりスクリーニングした9菌が得られている。検体をさらに蓄積し、より多くの患者に存在する菌を同定するとともに、得られた菌体の中から、腸炎発症を誘引する菌 (群) を絞り込む。今後とも、新規樹立したスクリーニング法を用いた IBD の原因菌の同定と Th 細胞分化を含めた疾患病態への寄与の解明、さらに特定の腸内細菌を標的とした新規治療法の開発につなげていきたい。

**NUDT15 酵素活性制御機構の解明**

宮谷 侑佑

(北里大学北里研究所病院)

**【目的】**

チオプリン製剤は炎症性腸疾患 (IBD) において寛解維持療法として広く使用される。チオプリン代謝酵素 NUDT15 は 6-TGTP を 6-TGMP に代謝する酵素であ

り、NUDT15 の遺伝子多型は白血球減少など重篤な有害事象発現と相関するとされている。しかしながら同じNUDT15 遺伝子多型においても個人間でのチオプリン投与量に差異を認め、これらの既知の因子以外にもチオプリン代謝に影響を与える要因が存在すると考える。そこで我々はチオプリン代謝の詳細を明らかにするために、白血球中の 6-TGTP 代謝活性の生化学測定系の構築を試みた。

#### 【方法】

LC-MS/MS によるチオプリン代謝物を定量的に解析するため、予想される 6-TGTP 代謝物すべてについて検量線を作成した。チオプリン非投与患者の末梢血 10ml を Lymphoprep® で遠心分離し末梢血単核細胞を分取し、CD3/CD28 抗体を用いて細胞増殖刺激を与えたのち細胞を回収した。細胞抽出液を調製し、これを酵素源として 6-TGTP の代謝物を測定した。

#### 【結果】

まず予備検討として血液由来のサンプルを酵素源とし、NUDT15 遺伝子変異について既知の 4 名の健常者を解析対象とした（2 名 NUDT15 野生型、2 名ホモ変異）。NUDT15 タンパク質の発現量を確認すると、遺伝子変異を含む細胞では、NUDT15 タンパク質発現が堅調に減少していることが確認された。これらの検体を酵素源として 6-TGTP、6-TGDP、6-TGMP、thioguanosine、6-TG について測定したところ、野生型の検体による 6-TGMP の生成量は、変異型検体と比較して有意に高いことが明らかになった。さらに、遺伝子多型既知の IBD 患者 9 名より検体にて同様の実験を行った（7 名 NUDT15 野生型、2 名テロ変異型）。いずれの検体においても 6-TGTP から 6-TGMP に代謝する活性が検出された。

#### 【考察】

今回我々は血液サンプルを用いた 6-TGTP 測定系を構築した。今後は細胞抽出液の調整法、測定系の改善を通して、NUDT15 の酵素活性検出の効率性を上げ、チオプリン代謝関連因子のさらなる探索を目指す。

### サイトカイン産生の制御機構に着目した炎症性腸疾患の病態解明

持丸 友昭

(福島県立医科大学)

#### 【目的】

炎症性腸疾患 (IBD) に対する初の分子標的薬として抗 TNF 製剤が実用化され約 20 年が経過するが、その高い有効性から抗 TNF 抗体は IBD に対し現在でも広く使用され、IBD の病態に TNF が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制御機構について詳細な研究が行われてきたが、TNF 産生の制御機構はその存在も含めて多くが明らかではない。

*In vitro* において、マクロファージ様細胞 Raw 264 は LPS 刺激で一過性に TNF を発現するが、申請者らは ikarugamycin 併用下では TNF の発現が増強・遷延することを見出した。このことは、TNF の産生過程において、過剰な炎症を抑制する制御機構が存在することを示唆しており、本研究では TNF 産生制御機構に着目し免疫恒常性維持機構を明らかにすることを目的とする。

#### 【方法・結果】

Raw 264 を LPS で刺激し、細胞免疫染色による TNF の動態解析を行った結果、TNF と細胞内のリソソームの共局在を確認した。抗 TNF 抗体を培養上清に添加し LPS 刺激を行った結果、一旦細胞表面に発現した TNF が細胞内に取り込まれることを認めた。さらに、Cell surface biotinylation 法でも TNF がエンドサイトーシスされることを確認した。ikarugamycin 併用下では、TNF の細胞内取り込みは阻害され、細胞膜表面で発現が増強することを明らかとした。

TNF 産生制御機構の分子機序を明らかにするため、TNF に対する免疫沈降を行い、質量分析で TNF 複合体の解析を行い多数のタンパクを同定した。現在、ウエスタンブロットで発現を確認し、そのタンパクの機能解析を行なっている。

#### 【考察】

本研究により、産生細胞レベルで TNF 発現が収束する機構が存在し、その本態はエンドサイトーシスによる制御であることを明らかにした。今後、その分子機序を

明らかにすることにより、炎症性疾患の新規病態解明及び治療法の開発につながることを期待される。

#### 【文献】

- 1) Minamidate, A., Onizawa, M., Saito, C., Hikichi, R., Mochimaru, T., Murakami, M., Sakuma, C., Asakawa, T., Hiraoka, Y., Oshima, S., Nagaishi, T., Tsuchiya, K., Ohira, H., Okamoto, R. & Watanabe, M.: A potent endocytosis inhibitor Ikarugamycin up-regulates TNF production. *Biochem Biophys Res Rep.* **27**: 101065 (2021).

### 腸炎モデルマウスにおける生体内イメージングを用いたT細胞動態の解析

森川 亮

(東京医科歯科大学)

#### 【目的】

炎症性腸疾患は再燃寛解を繰り返す難治性の疾患であり、長期的な投薬による維持治療が必要となることが多い。本疾患の病態を解明するために、当施設では大腸炎モデルを用いて、炎症性腸疾患の難治性の原因が腸管粘膜局所や腸管外組織に維持されている腸炎惹起性のメモリーT細胞である可能性等を報告している。しかしながらその機序に関してはまだ詳細に解明されておらず、これには腸炎疾患モデルにおけるT細胞の動態や空間的配置の可視化が必要になってくると考えられる。以上より我々は、CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> T細胞移入大腸炎モデルを用いて *in vivo* live imaging 及び 3D imaging を行うことで、腸炎発症時及び寛解時における腸炎惹起性 CD4<sup>+</sup>T細胞の動態及び空間的配置を可視化し、新たな治療標的を探索することを目的とした。

#### 【方法】

mTmG マウスから CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> T細胞を sorting して RAG<sup>-/-</sup>マウスに移入し、大腸炎モデルを作成した。寛解モデルではこれに GFP マウスより sorting した CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T細胞を加えた。これら移入モデルの大腸粘膜を対象として二光子蛍光顕微鏡を用いた *in vivo* live imaging を行った。

#### 【結果】

移入より6週間後のマウスを用いて *in vivo* live imaging を行った。アーチファクトを低減した上で個々の細胞がダイナミックに移動している状態を描出することに成功した。

#### 【考察】

腸炎発症時及び寛解時における腸炎惹起性 CD4<sup>+</sup> T細胞の動態を解析するツールを構築した。今後は本法を用いて定量的解析を行う予定である。また、2次リンパ装置における *in vivo* live imaging や、透明化を用いた 3D imaging を行うための系を構築していく予定である。

#### 【文献】

Nemoto, Y. *et al.*: Bone Marrow Retaining Colitogenic CD4<sup>+</sup> T Cells May Be a Pathogenic Reservoir for Chronic Colitis, *Gastroenterology.*, **132**, 176-189 (2007).

## Front Runner of Future Diabetes Researchに関する研究助成

### 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

(The University of Edinburgh)

#### 【目的】

昨秋よりエジンバラ大学に移り、骨髄脂肪の全身代謝や免疫系における役割に焦点を当てた新たな研究を展開している。

骨髄脂肪は体内脂肪総量の約10%を占め、肥満や加齢等によりその量や機能が変化することが報告されているが、まだ十分な解析が進められていない。カロリー制限 (Calorie restriction: CR) 下で認められる血中 Adiponectin の濃度上昇には、骨髄脂肪から分泌される Adiponectin の増加が寄与しており、本研究では Adiponectin 分泌を中心に、カロリー制限下における骨髄脂肪の役割の検討を進めている。

#### 【方法】

Adiponectin 全身欠損マウスをカロリー制限下で飼育し、耐糖能試験、脂質負荷試験等の負荷試験を行い、野生型や通常食 (Ad libitum: AL) 飼育対照群と比較する。また、骨髄・末梢血サンプルの FACS 解析により造血幹細胞や分化細胞分画の変化を解析する。また、肝臓サンプルの RNA-seq 解析により、得られる表現型の分子的背景を明らかにする。

#### 【結果・考察】

カロリー制限下のマウスは糖負荷試験において通常食マウスよりも低い血糖値を示すが、我々は、予想外にカロリー制限下の Adiponectin 全身欠損マウス (CR/KO) がカロリー制限下の野生型マウス (CR/WT) よりもさらに低い血糖値を示すことを見出した。また、血漿 NEFA 濃度はカロリー制限下で上昇するが、この効果は KO マウスにおいてより顕著であった。この結果から、CR/KO マウスはカロリー制限下において、脂肪酸 (お

よびグリセロール) をエネルギー源として効果的に利用することができずにグルコースを利用するため、低い血糖値を示すのではないかと仮説を立てた。この検証のため、現在脂質負荷試験を進めている。また、カロリー制限下での雌雄のエネルギー源利用の差異の有無、および Adiponectin の関与についても検証を進めている。

また、末梢血・骨髄の血球解析では、カロリー制限自体が末梢血分画に変化を生じさせること、またその効果は雌雄によって差異が認められることを確認した。今後、カロリー制限や Adiponectin が免疫系に及ぼす影響について、一層の検討を進める計画である。

### GLP-1 の非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) に対する臓器保護効果の機序の解明

井上 智彰

(株式会社麻生飯塚病院)

#### 【目的】

糖尿病合併非アルコール性脂肪肝疾患 (NAFLD) では肝線維化が進展し、非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) に進展するリスクが高く、有効な治療戦略の確立が喫緊の課題である。新規糖尿病治療薬である GLP-1 受容体アナログが NASH 患者を対象とした臨床研究 (LEAN 試験) において、肝の線維化進行を抑制することが報告されている。しかしながら、肝細胞には GLP-1 受容体が存在しないなど、組織分布とそれに対応する臓器保護効果には解離があり、機序の詳細は明らかではない。そこで本研究では GLP-1 受容体組織特異的欠損マウスを用いて詳細な機序の検討を行い、GLP-1 が持ち合わせる臓器保護効果のメカニズムの解明を目指す。

#### 【方法】

申請者らが独自に作出した loxP 配列で gpl1r 遺伝子のエクソン 4, 5 を挟む, flox マウス (GLP-1r flox/flox

mice) と、LysM-Cre マウスとの交配によって、単球・マクロファージ特異的 GLP-1 受容体欠損マウスを作出する。単球・マクロファージ特異的 GLP-1 受容体欠損マウスに 10 週間高脂肪食負荷を行い、コントロールマウスと比較検討することで、単球・マクロファージに発現する GLP-1 受容体と肝臓との関連を検討する。

#### 【結果】

GLP-1R flox/flox LysM<sup>-</sup>Cre マウスの GLP-1 受容体の発現が単球特異的に欠損していることを RT-PCR 法で確認した。コントロールマウス及び単球・マクロファージ特異的 GLP-1 受容体欠損マウスを 10 週齢から 20 週齢まで高脂肪食負荷を行った。血糖値、体重、肝臓の線維化について評価を行ったが、両群に差を認めなかった。肝逸脱酵素 ALT、炎症性サイトカイン TNF $\alpha$ 、肝臓マクロファージについては、単球・マクロファージ特異的 GLP-1 受容体欠損マウスで増加していた。

#### 【考察】

肝臓マクロファージ GLP-1 受容体を介したシグナルが、高脂肪食負荷での肝臓炎症・肝細胞障害に寄与している可能性が示唆された。GLP-1 受容体アナログが肝臓マクロファージを介して、NASH の有効な治療薬になることが期待される。

### ユビキチン様修飾因子 UFM1 の膵 $\beta$ 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)

#### 【目的】

ユビキチン様修飾因子 (UFM1) による翻訳後修飾である UFMylation は、小胞体 (ER) ストレス応答やオートファジーとの関連が注目されている。一方で、その病態生理学的意義は未解明な点が多い。膵  $\beta$  細胞は大量のインスリン産生に伴う恒常的ストレスに晒されている細胞であり、特に 2 型糖尿病発症に先行すると考えられるインスリン抵抗性の増大によりインスリン分泌需要が増大することは膵  $\beta$  細胞に対して過酷な負荷がかかることを意味する。従って、膵  $\beta$  細胞はそれらのストレスに対

する応答システムを発達させており、細胞内恒常性維持のための ER ストレス応答やオートファジー機構の重要性は我々も以前から指摘している。我々は、これらの恒常性維持機構の制御に UFMylation が関与していることに注目し、UFMylation は膵  $\beta$  細胞の恒常性維持にも重要な役割を果たすという仮説を提示するに至った。

本研究ではこの仮説を検証するために、膵  $\beta$  細胞特異的 UFM1 欠損マウスを中心に解析を行い、膵  $\beta$  細胞における UFMylation 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】

*Ins1* 制御下に Cre-ERT を発現する *Ins1*-Cre-ERT マウスおよび *Ufm1*<sup>flox/flox</sup> マウスを交配し、タモキシフェン (TM) 誘導性に膵  $\beta$  細胞特異的 *Ufm1* 欠損が可能な *Ufm1*<sup>flox/flox</sup>: *Ins1*-Cre-ERT (UFM1- $\beta$ KO) マウスを作製し、耐糖能評価・膵島の形態学的評価を行った。

#### 【結果】

UFM1- $\beta$ KO マウスと対照群 (Ctrl) マウスに対し 6 週齢で TM を投与した。糖負荷試験では、オスでは TM 投与後 11 週後に、メスでは 16 週後に UFM1- $\beta$ KO において耐糖能が増悪した。インスリン感受性は両群で差を認めなかった。高脂肪食飼育の条件下でも経時的に耐糖能は増悪した。組織学的検討では UFM1- $\beta$ KO マウスの膵島は Ctrl 群と比較してインスリン染色の染色性が低下している傾向が見られた。電子顕微鏡では UFM1- $\beta$ KO 膵島では ER 形態変化が観察された。

#### 【考察】

UFM1- $\beta$ KO マウスでの耐糖能悪化やインスリン染色性の低下は、UFMylation 欠損によって膵  $\beta$  細胞機能不全が生じる可能性を示唆している。今後は、その分子メカニズムの詳細を細胞生物学的手法により明らかにしていきたい。

### 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)

#### 【背景】

サルコペニアは進行性があり全身性の筋力・筋肉量の低下を特徴とする症候群で、糖尿病との関連が示唆されている。超高齢社会を迎えたわが国では、健康寿命延伸の観点より、サルコペニアの病態解明は喫緊の課題ある。代表的な副腎由来ホルモンであるコルチゾールは、副腎皮質束状層から分泌されて、ストレスに応答し、糖・脂質代謝をはじめとする生体恒常性を維持している。しかし、過剰なコルチゾールは有害であり、例えば、コルチゾールを過剰に分泌するクッシング症候群やステロイド薬の長期投与による副作用として、様々な代謝疾患が認められる。一方、健常者においても加齢や過度のストレスが続くことによって、コルチゾール分泌が軽度かつ持続的に上昇して、筋力・筋肉量の低下に影響する可能性があるが、両者の因果関係は不明であった。

#### 【目的】

メンデルランダム化 (MR) 研究によりコルチゾールと筋力と筋量の因果関係を明らかにする。

#### 【方法】

健常者対象の早朝血漿コルチゾール濃度におけるゲノムワイド関連解析 (GWAS;  $n = 12,597$ ) より、関連する3つの SNP を操作変数として用いた。アウトカムは握力、インピーダンス法による全身・四肢除脂肪体重を選択した。FUMA ソフトウェアを用いて機能的アノテーションと遺伝子マッピングを実施した。

#### 【結果】

コルチゾールは握力と負に関連し ( $\beta, -0.031$ ; 95%CI  $-0.052 \sim -0.011$ ;  $P = 0.003$ )、除脂肪体重とも負に関連した。性差解析では女性にのみ関連を認めた。多変量 MR 法によるコルチゾールと握力の関連は血糖による補正後に消失し、MR ベイジアンモデル平均法による媒介分析でも、血糖は最上位の媒介因子であった。コルチゾール関連 SNP による機能的アノテーションと遺伝子マッピングでは、筋量の負の制御因子である

ASB2 遺伝子の関与が示唆された。

#### 【結語】

MR 研究により、コルチゾールと筋力・筋量低下との因果関係が明らかとなり、サルコペニア進展への影響が示唆された。

#### 【文献】

Katsuhara, S., Yokomoto-Umakoshi, M., Umakoshi, H., Matsuda, Y., Iwahashi, N., Kaneko, H., Ogata, M., Fukumoto, T., Terada, E., Sakamoto, R. & Ogawa, Y.: Impact of cortisol on muscle strength and mass: A Mendelian randomization study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **107**(4): e1477-e1487, 2022.

### 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)

#### 【目的】

糖尿病や肥満の世界的な急増は克服すべき重要な臨床課題である。そ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、全身の血管の内皮機能障害から様々な臓器障害が惹起される。O-GlcNAc 修飾は、全身の血管障害により引き起こされる糖尿病合併症の成因進展機構の一つとして着目されてきた。しかし、内皮細胞における O-GlcNAc 化の役割、特に肥満と内皮細胞との関係については未だ不明である。そこで、血管内皮細胞における O-GlcNAc 修飾の生理学的役割と、糖尿病及び肥満状態における病態生理に与える影響に関して検討する。

#### 【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-VEKO) マウスを作製した。通常食モデル、高脂肪食摂餌による肥満モデルを作製し、その表現型を解析した。



【結果】

Ogt-VEKO マウスは対照マウスと比較し、エネルギー摂取および消費量に有意な差は認めなかったものの、通常食モデルにおいて体重増加不良を呈し、高脂肪食モデルでは体重増加がより顕著に抑制された (図1). 体組成解析の結果、除脂肪量には差がなく、Ogt-VEKO マウスにおいて脂肪量の有意な減少を認めた. 糖代謝に関しては、高脂肪食開始4週間後では、腹腔内ブドウ糖負荷試験時の血糖値および血漿インスリン濃度に差はなかった. 一方、腹腔内インスリン負荷試験中の血糖値は、対照マウスに比べOgt-VEKO マウスで低くなっていた. 経口ブドウ糖負荷試験でも両群に差はなかったが、経口脂質負荷試験ではOgt-VEKO マウスにおいて脂質負荷後のトリグリセリド (TG) の上昇が抑制されていた (図2). 一方で、静脈内脂質負荷試験中のTGは群間で同等であり、糞便中のTGは対照群に比べOgt-VEKO マウスで増加していた. これらの結果より、

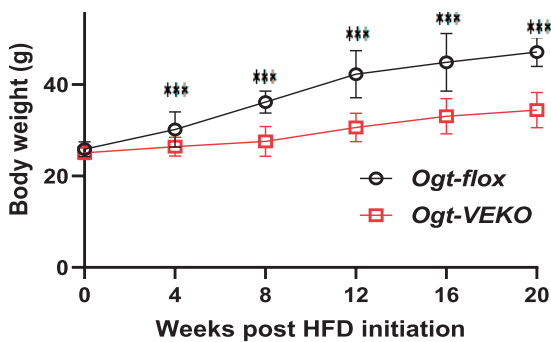


図1 高脂肪食摂餌下での体重変化

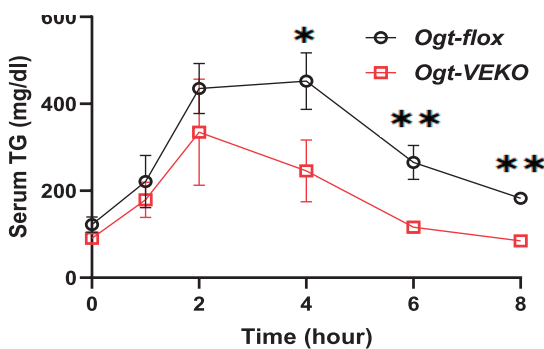


図2 経口脂質負荷試験における血清 TG の変化

図1, 2 :

\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001

Ogt-VEKO マウスで観察された体重増加の減少は腸管からの脂質の吸収不良によることが示唆された. 興味深いことに、腸管の形態学的解析では、Ogt-VEKO マウスのリンパ管内皮細胞-細胞接合部は連続した「ジッパー」構造であり、リンパ管内腔にはTG小胞がかなり少ないことが明らかとなった. 次に、vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) がリンパ管内皮細胞-細胞間結合の「ジッパー」構造に深く関与していることが報告されているため、VEGFR タンパク質の発現をwestern blottingにより検討した. すると、VEGFR1とVEGFR2の蛋白発現が両群で同等であるのに対し、VEGFR3の蛋白発現はOgt-VEKO マウスにおいて著しく低下していた.

【考察】

O-GlcNAc 修飾は、網膜症、腎症、神経障害などの糖尿病性微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、我々は当初より、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-VEKO マウスにおいて、網膜血管密度、尿蛋白量、感覚神経閾値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微小血管合併症に影響を与えないと考えられた.

検討を重ねていく中で、これまでの研究結果より、血管内皮細胞におけるO-GlcNAc 修飾の欠損は、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. VEGFR3は、腸のリンパ管維持やTG吸収に関与することが報告されており、Ogt-VEKO マウスではVEGFR3のタンパク質発現が顕著に低下していたことから、VEGFC-VEGFR3経路を介してTGの吸収が低下している可能性が考えられた. さらに、VEGFC-VEGFR3シグナルは、NO産生に寄与し、NOがリンパ管の透過性に影響を与えることが報告されている. 今後、Ogt-VEKO マウスの経口脂質負荷時の脂質吸収の低下がNOによって回復されるかどうかを検討する予定である.

## 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)

### 【目的】

細胞外弾性線維関連蛋白である Fibulin-5 (Fbln5) を介した糖代謝およびエネルギー代謝の制御機構の解明を目的とする。

### 【方法・結果】

Fbln5 欠損マウス (Fbln5KO) および野生型マウス (WT) における通常食/高脂肪食負荷における代謝表現型の解析により、Fbln5KO で体重非依存性のインスリン感受性の亢進、体重増加の抑制を認め、高脂肪食誘導性の肥満・肝脂肪蓄積・脂肪細胞肥大化が抑制された。グルコースクランプを用いた解析により、Fbln5 欠損による全身のインスリン感受性亢進が示唆された。Fbln5KO では皮脂腺の萎縮を認め、寒冷刺激に対する体温低下が顕著であったが、脂肪組織における熱産生・脂肪酸燃焼に関連する遺伝子群の発現は亢進しており、代償性変化と考えられた。通常食下で Fbln5KO の酸素消費量は WT と同等であったが活動量の低下を認め、30°Cでの飼育においても Fbln5KO では体重増加が抑制され、インスリン感受性の亢進は残存した。Fbln5KO は血管の脆弱性を呈することから、血管を介したインスリンの組織移行性への影響についても検証した。下大静脈からの標識インスリン投与後の肝臓におけるインスリン取り込みは Fbln5KO で亢進した。そこで Fbln5-floxed マウスを入手し肝細胞特異的 Fbln5KO、脂肪細胞特異的 Fbln5KO、皮膚(表皮)特異的 Fbln5KO、血管平滑筋特異的 Fbln5KO、血管内皮特異的 Fbln5KO、骨格筋特異的 Fbln5KO を樹立したが、いずれにおいても体重やインスリン感受性はコントロールマウスと同等であった。現在血管内皮/血管平滑筋両 Fbln5 欠損マウスを樹立している。

### 【考察】

弾性線維関連蛋白 Fbln5 による、皮膚を介したエネルギー代謝制御や血管を介したインスリン移行性の制御の存在が示唆され、Fbln5 欠損によるインスリン感受性

亢進や体重変化は臓器連関や間接作用を介した作用であると考えられた。今後さらなる検討を加え、新たな代謝制御機構を明らかにしていく。

## 血管内皮 PDK1 の病態生理学的役割の解明

小畑 淳史

(医療法人仁聖会小畑醫院)

### 【背景】

我々は血管内皮特異的に PDK1 を欠損させることで、生理的または高脂肪食負荷条件下では、主に脂肪組織における血管新生が抑制され、脂肪の縮小に伴うアディポカイン発現の改善に伴い、全身でのインスリン抵抗性が改善することを明らかにした。一方で、血管内皮特異的に PDK1 を欠損させることで、膵β細胞における血流が低下し、血管内皮構造の構築の乱れを生じ、膵β細胞機能が低下することを明らかにした。これらの研究は主に生理的条件または高脂肪食負荷下での表現型であり、高血糖状態での血管内皮 PDK1 が果たす役割は明らかにされていない。また、これまで「恒常的に発現している」とされていた PDK1 は、ヒト大動脈血管内皮では肥満に関連して発現が低下していることも明らかにしている。

### 【目的】

高血糖状態における血管内皮 PDK1 の役割を解明すること、及び血管内皮における PDK1 の発現制御のメカニズムを明らかにする。

### 【方法】

血管内皮特異的 PDK1 欠損マウスを用いて、STZ で高血糖を誘発し、全身の糖代謝に及ぼす影響を解明すること、及び様々なモデルを用いて血管内皮 PDK1 の発現がどのように制御されているかを明らかにする。

### 【結果】

STZ によって高血糖を誘発すると、血管内皮特異的 PDK1 マウスではインスリン抵抗性が惹起された。また Akt のリン酸化を評価したところ、その主たる臓器は骨格筋であることが明らかになった。骨格筋における vascularity は PDK1 欠損マウスで有意に低下しており、TUNEL assay でも有意に血管内皮の apoptosis

の亢進が確認された。In vitro でもヒト臍帯動脈血管内皮細胞を用いて PDPK1 をノックダウンすると cleaved caspase3 の発現が有意に増加し、血管増殖に重要な役割を果たす VEGFR2 の発現は有意に低下していた。電子顕微鏡による評価では、骨格筋のミトコンドリア構造の乱れや脂肪の蓄積が確認された。以上から血管内皮特異的 PDPK1 欠損マウスは STZ 誘導性高血糖下では骨格筋の vascularity を低下し、さらには mitochondria biogenesis を低下することで骨格筋においてインスリン抵抗性を惹起することが明らかになった。血管内皮 PDPK1 の発現については db/db マウス及び高脂肪食負荷 C57BL/6J マウスにおいては有意に発現が低下しており、一方で STZ 誘導高血糖モデルでは有意に発現が増加していた。

#### 【結論】

血管内皮 PDPK1 欠損は STZ 誘導性高血糖下では骨格筋でのインスリン抵抗性が惹起される。また、様々な条件により血管内皮 PDPK1 の発現は「恒常的ではない」ことが明らかになった。

### 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)

#### 【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。肥満者は世界的に増加傾向であり、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が解明できれば社会的な貢献は大きいものと考えられる。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 (Cell. 141: 39-51, 2010.)。乳癌、肺癌、メラノーマ等の数種類の癌においてマクロファージの浸潤が高度であるほど予後が悪いことが知られ、マクロファージを標的とした癌治療が有望である可能性が指摘されている。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) CD206+M2 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 CD206+M2 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。

独自に作製した乳癌マウスモデルで CD206+M2 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 などを行った。

#### 【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。

独自に作製した乳癌マウスモデルで CD206+M2 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 などを行い、CD206+M2 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。

#### 【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、CD206+M2 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った。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) 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*. Dec 6; **13**(12): 4374. 2021.
- 2) Bilal, M., Nawaz, A., Kado, T., Aslam, MR., Igarashi, Y., Nishimura, A., Watanabe, Y., Kuwano, T., Liu, J., Miwa, H., Era, T., Ikuta, K., Imura, J., Yagi, K., Nakagawa, T., Fujisaka, S. & Tobe, K.: Fate of adipocyte progenitors during adipogenesis in mice fed a high-fat diet. *Mol Metab*. 2021.
- 3) Watanabe, Y., Fujisaka, S., Ikeda, K., Ishikawa, M., Yamada, T., Nawaz, A., Kado, T., Kuwano, T., Nishimura, A., Bilal, M., Liu, J., Yagi, K., Hase, K. & Tobe, K.: Gut microbiota, determined by dietary nutrients, drive modification of the plasma lipid profile and insulin resistance. *iScience*. Apr 16; **24**(5): 102445. 2021.

#### グルコース応答性高分子ゲルを用いた自律型インスリン投与デバイスの開発

木村 真一郎

(名古屋大学環境医学研究所)

#### 【目的】

インスリン療法は糖尿病治療の根幹を成すが、QOLを損なう上、低血糖の危険を有する。また近年では、平均血糖の高値に加えて、血糖変動が糖尿病血管合併症のリスクになることが報告されている。そのため、血糖応答性にインスリンを放出する人工膵臓様デバイスの開発が求められている。そこで我々は、グルコース濃度に

答して物理的性質が劇的に変化するフェニルボロン酸を含む高分子ゲル（ゲル）を利用して、エレクトロニクスフリーで操作が簡便な、人工膵臓様デバイスを開発した。本研究では、デバイスの効果と安全性を評価するとともに、臨床応用の可能性について検討した。

#### 【方法・結果】

既に我々は、ゲルとシリコンカテーテルを融合させて、マウスを用いた機能実証に成功した。今回、臨床応用を見据え、インスリン放出の有効表面積を拡大するために、血液透析用中空糸を融合した次世代型デバイスを開発した。マウスの10倍の体重を有するラットの皮下にデバイスを留置したところ、血糖依存的なインスリン放出と血糖低下作用および、良好な生体適合性を認めた。また、1型糖尿病モデルを用いた検討では、平均血糖の低下のみならず、夜間活動期の血糖上昇がデバイス留置群で有意に抑制され、血糖日内変動が改善された。さらに我々は、ブタを用いて検討を行い、1型糖尿病ブタにラット用のデバイスを8個挿入することで、血糖依存的なインスリン放出と、血糖低下を認め、臨床応用に向けては更なるスケールアップの必要性和、侵襲性の改善が必要と考え、マイクロニードル技術を応用することを着想した。マウスやブタに装着し、血糖依存性のインスリン放出を確認しているが、臨床応用に向けては、皮膚への刺入性および機能の持続性について改善が必要であり、課題に取り組んでいる。

#### 【考察】

血液透析用中空糸を融合した次世代型デバイスにより、大幅なスケールアップに成功し、安全性を確認するとともに、グルコース応答性のインスリン放出特性により、平均血糖のみならず血糖日内変動が改善することを示した。さらに我々は、臨床応用を見据え、マイクロニードルを融合した新たなインスリンデバイスの開発を進めている。本デバイスにより、インスリン療法の早期導入の促進、および糖尿病合併症の発症・進展抑制に重点を置いた新たなインスリン治療を提案できると考える。

## 膵島と膵房細胞の相互作用による GLP-1 を介した膵 $\beta$ 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)

### 【目的】

GLP-1 による膵  $\beta$  細胞増殖制御における新規経路を同定する。

### 【方法・結果】

GLP-1 受容体作動薬のリラグルチド (Lira) を添加し一晚培養したマウス単離膵島の定量的プロテオーム解析を行った。Lira 添加により膵島において発現上昇したタンパク質を解析したところ、Alpha-amylase 1 (Amy-1) などの膵腺房細胞に発現する外分泌酵素関連タンパクが多く同定され、GLP-1 により膵島と周囲の膵房細胞の接着が促進される可能性が想定された。また Lira 添加の膵島で、膵腺房細胞に発現し膵  $\beta$  細胞増殖に関与する分泌因子である Lithostathine-1 (Reg1) が発現上昇することも見出した。リコンビナント Reg1 添加膵島の  $\beta$  細胞増殖は促進し、さらに Lira を添加することによる  $\beta$  細胞増殖の促進作用は認めなかった。膵腺房細胞には Gp1r 発現を認めず、Lira や高グルコース刺激膵房細胞の Reg1 発現に変化はなかった。一方、インスリン刺激膵房細胞の Reg1 発現は上昇した。膵島と膵房細胞の共培養系を確立し、膵房細胞と共培養した膵島では Reg1, Amy1 が膵房細胞付着により増加し、P-Cad や Cx26 等の細胞接着因子の発現が上昇した。

次に Reg1 欠損マウスを用いた解析を行い、免疫染色において、Reg1 は膵腺房細胞に発現し、膵島での発現を認めなかった。野生型マウス (WT) 単離膵島と WT 膵房細胞との共培養では、Lira により膵  $\beta$  細胞増殖は促進されたが、WT 単離膵島と Reg1 欠損マウス (KO) 膵房細胞との共培養では Lira による膵  $\beta$  細胞増殖は促進を認めなかった。一方、KO 単離膵島と WT 膵房細胞の共培養では、Lira により膵  $\beta$  細胞増殖は促進された。マウスへの Lira 皮下注による膵  $\beta$  細胞増殖は、WT に比較し KO で低下した。

### 【考察】

GLP-1 は、膵  $\beta$  細胞の GLP-1R に作用し、インスリ

ンや膵島からの液性因子を介して、膵島と膵房細胞の接着を促進、また、膵房細胞での Reg1 発現の誘導により、膵房細胞由来の Reg1 が膵島に作用して膵  $\beta$  細胞増殖を促進するという、膵島と膵房細胞との接着因子や分泌因子を介した機序が想定された。

## 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】

エピゲノム修飾は環境因子によって変化する。エピゲノム異常が肥満や糖尿病の発症リスクに関与する可能性が示唆されているが、その分子メカニズムは未だほとんど分かっていない。これまでに、胎児期の低栄養によって成長後に代謝疾患を発症するメカニズムに、胆汁酸-Farnesoid X receptor (FXR)-Fibroblast growth factor 15/19 (FGF15/19) 経路により介在される腸-肝連関の異常が関与していることが報告されている (*Endocrinology* 2017)。そこで、胎児期の低栄養がエピゲノム変化を介して腸-肝連関に異常を起しているのではないかと考え、本研究では小腸において作用し、全身の糖代謝調節に関与するエピゲノム調節因子を探索した。

### 【方法・結果】

アセチル化ヒストンに結合する転写調節因子である Bromodomain-containing protein 4 (Brd4) の阻害剤である JQ-1 をマウスに 14 日間投与すると (50mg/kg/day, ip, n = 6)、高血糖や耐糖能異常を呈した。このとき、JQ-1 投与により小腸における FGF15 (マウス型) の発現が抑制され、その結果、肝臓における FGF 受容体 4 (FGFR4) シグナルの低下、グルコース産生の亢進がみられた。一方、Brd4 投与による高血糖・耐糖能異常は、FGF19 (ヒト型) の過剰発現によって完全に回復した。次に、ヒト腸管細胞株 HT-29 細胞を用いてクロマチン免疫沈降法により Brd4 の FGF19 プロモーター領域への結合を調べた。Brd4 が FGF19 のプロモーター領域上に結合し、JQ-1 の添加により結合が阻害されると FGF19 の発現レベルも低下した。

**【考察】**

エピゲノム制御に関わる Brd4 は小腸における FGF15/19 の新しい転写調節因子であり、FGF15/19 の発現変化を介して肝臓および全身の糖代謝調節に関与することが明らかになった。今後は胎児期の母体環境が糖尿病発症リスクを上昇させるメカニズムへの関与を検討していきたい。

**【文献】**

Kozuka, C. *et al.*: Bromodomain Inhibition Reveals FGF15/19 As a Target of Epigenetic Regulation and Metabolic Control. *Diabetes* 71: 1023-1033 (2022).

**栄養学的アプローチによる動脈硬化予防効果の検討**

近藤 慶子

(滋賀医科大学 NCD 疫学研究センター)

**【目的】**

動脈硬化症は、糖尿病、高血圧、脂質代謝異常、喫煙、肥満などを危険因子として発症する。食事療法是糖尿病をはじめ様々な疾患の基本的な治療法であるが、動脈硬化予防に関するエビデンスは十分とは言えない。本研究助成期間中、栄養学的アプローチによる動脈硬化予防法について、健常者・糖尿病患者を対象とした介入研究、一般住民を対象とした疫学研究を実施し論文報告を行った。食事療法の効果は長期的な観察が必要であるが、メカニズムを解明するための栄養学的介入を長期に行う事は困難である。そこで、メカニズムの探索を目的に血管内皮機能等を動脈硬化のサロゲートマーカーとした短期間の介入研究、および、循環器疾患死亡等のハードエンドポイントをアウトカムとした長期間の観察を疫学研究で行った。

**【方法・結果】****<短期的検討>****介入研究 1: 魚摂取による血管内皮機能に及ぼす影響<sup>1,2)</sup>**

健常ボランティア 17 名に対し、魚食介入 (n-3 多価不飽和脂肪酸 [n-3 PUFA] 3.0g/日) を 8 週間行ったところ、血中 n-3 PUFA 濃度の上昇とともに血中トリグリセリド値の減少およびアディポネクチン濃度の上昇を認め、これらの変化は介入終了後 n-3 PUFA 濃度の低下と

ともに減少した<sup>1)</sup>。一方、血管内皮機能は魚食介入後、著明に改善し、その効果は介入終了後も持続した。さらに、糖尿病患者 23 名に対する 4 週間の魚食介入 (n-3 PUFA 3.0g/日) によっても、健常者と同様の結果を得た<sup>2)</sup>。

**介入研究 2: 高繊維食・玄米食が血管内皮機能に及ぼす影響<sup>3,4)</sup>**

肥満・耐糖能障害者 17 名に対し低脂肪・高繊維食介入を 8 週間の行った結果、エネルギー・脂質摂取量は減少し、食物繊維摂取量は増加するとともに、体重、糖脂質代謝だけでなく歯周病マーカーを改善した。これらの効果の少なくとも一部はエネルギー摂取量だけでなく、低脂肪・高繊維といった栄養組成によるものと考えられる<sup>3)</sup>。さらに、2 型糖尿病患者 28 名を対象とし、主食を玄米に置き換えた高繊維食が血管内皮機能に及ぼす影響について検討した<sup>4)</sup>。対象者を主食の種類別に玄米群 (n = 14) および白米群 (n = 14) に分け、8 週間のランダム化比較試験を実施した。玄米群で、食物繊維摂取量の増加および血管内皮機能の明らかな改善を認めた<sup>4)</sup>。血管内皮機能に影響を及ぼすと考えられる血糖、インスリン、高感度 CRP などは両群で差を認めなかった。高繊維食により腸内フローラが変化するとの仮説を立て、腸内フローラ解析を行ったところ、玄米群でのみ Bifidobacterium 属の増加および Bacteroides 属の減少を認めるとともに、短鎖脂肪酸の一つである酢酸の血中レベルの上昇を認めた。

**観察研究 1: 2 型糖尿病患者における二重標識水法を用いた総エネルギー消費量の検討<sup>5-7)</sup>**

糖尿病における食事管理においてエネルギー摂取量の設定は極めて重要である。しかし、特に日本を含めたアジアにおける糖尿病患者の総エネルギー消費量を評価した報告はほとんどない。そこで、総エネルギー消費量測定のコールドスタンダードな方法である二重標識水 (DLW) 法を用い、2 型糖尿病患者における総エネルギー消費量 (TEE) の実態を明らかにすることを目的に検討を行った。滋賀医科大学医学部附属病院に通院中の 60-79 歳の糖尿病患者 (52 名) および非糖尿病患者 (15 名) を対象とし、DLW 法を用いた TEE を測定し、間接熱量測定により基礎代謝量を評価した。性、年齢、脂肪量、除脂肪量および平均 METs で調整した平均 TEE

(kcal/day) および標準体重 1kg 当たりの平均 TEE (kcal/kg/day) は、糖尿病群で若干低値を示したが、2 群間に有意な差は認めなかった<sup>5)</sup>。また、糖尿病患者における食事調査の申告誤差と肥満との関連<sup>6)</sup>、TEE と身体活動レベルの推定に関する検討結果を報告した<sup>7)</sup>。

#### <長期的検討>

#### 疫学研究 1：日本人を対象とした食事因子による循環器疾患死亡リスク評価チャート<sup>8)</sup>

1980 年国民栄養調査および循環器疾患基礎調査の受検者を 29 年間追跡した NIPPON DATA80 対象者男女 9115 人を対象とし、食事因子の組み合わせによる循環器疾患死亡リスクとの関連を検討した。野菜、果物、魚、食塩摂取量の推奨量に対する過不足により、複数のカテゴリに分類し、追跡期間中の循環器疾患による死亡リスクとの関連を検討した。食事因子の組み合わせによる循環器疾患死亡リスクを図示した。野菜、果物、魚摂取量が最も少なく、食塩摂取量が多い場合、参照カテゴリ（野菜、果物、魚摂取量が最も多く、食塩摂取量が少ない場合）と比較して循環器疾患死亡リスクは 2.87 倍高かった。

#### 疫学研究 2：日本人一般男性における血中 n-3 PUFA 濃度と脳血管病変との関連<sup>9)</sup>

n-3 PUFA の抗動脈硬化・循環器疾患予防効果については、我々の検討を含め報告されているが、n-3 PUFA と脳血管病変との関連については十分明らかになっていない。そこで、n-3 PUFA と頭部 MRI 検査で評価した脳内の様々な潜在性血管病変との関連を検討した。滋賀県動脈硬化疫学研究の男性対象者 739 名において、血中 n-3 PUFA 濃度 1 標準偏差増加あたりの脳動脈狭窄の多変量調整オッズ比は有意に低かった。一方、その他の脳血管病変（ラクナ梗塞、微小出血、白質病変）と n-3 PUFA 濃度との明らかな関連は認めなかった。n-3 PUFA は脳内大血管病変に対して保護的に作用する可能性が示唆され、本研究結果は、近年日本人に増加しているアテローム血栓性脳梗塞の予防につながる可能性が示唆される。

#### 【まとめ】

糖尿病患者および健常者において、魚 (n-3 PUFA) は短期的・長期的に動脈硬化予防効果あると考えられた。また、食物繊維、野菜、果物、食塩は動脈硬化・循環器疾患と関連することが示唆された。今後も、食事と動脈

硬化予防作用との関連についてさらなる検討を行い、糖尿病患者の食事指導に役立てていきたい。これまで研究を支えてくださった、日本酵素応用財団に心より感謝いたします。

#### 【文献】

- 1) Kondo, K. *et al.*: *JAT* 2010; 30; 17(6): 628-37
- 2) Kondo, K. *et al.*: *Metabolism* 2014; 63(7): 930-40
- 3) Kondo, K. *et al.*: *Nutr Res* 2014; 34(6): 491-8
- 4) Kondo, K. *et al.*: *PLoS One* 2017; 12(6): e0179869
- 5) Morino, K., Kondo, K. *et al.*: *BMJ Open Diabetes Res Care* 2019; 7(1): e000648
- 6) Miyazawa, I., Kondo, K. *et al.*: *Clin Nutr ESPEN* 2020; 39: 251-4
- 7) Nishida, Y., Kondo, K. *et al.*: *Ann Nutr Metab* 2020; 76(1): 62-72
- 8) Kondo, K. *et al.*: *Circ J* 2019; 83(6): 1254-60
- 9) Kondo, K. *et al.*: *Cerebrovasc Dis.* 2022 Apr 27:1-7

#### 人の糖尿病病態と膵島細胞可塑性に関する研究

椎木 幾久子

(山口大学医学部分子代謝制御学講座)

#### 【目的】

膵β細胞の脱分化をはじめとする膵島の細胞可塑性について、2型糖尿病 (T2D) での膵島の組織学的変化との関連を病態進展の中で解明する。

#### 【方法】

膵胆道疾患により外科切除された膵組織標本を用いて、主要膵ホルモン、クロモグラニン A (ChgA)、アミラーゼ、膵内分泌細胞分化マーカーの発現を免疫組織染色により解析した。対照群 (正常耐糖能患者 11 例) と T2D 群で年齢、肥満度をマッチさせ、さらに T2D を罹患期間 (5 年以下 vs. 10 年以上)、糖尿病合併症 (無 vs. 細小血管障害を一つ以上有する)、インスリンおよび SU 薬治療 (無 vs. 1 年以上の薬剤使用) により早期群 12 例と進展群 11 例、中間群 3 例に分類し、主要膵ホルモン陰性クロモグラニン A 陽性細胞を脱分化細胞と

して計測した。

### 【結果・考察】

T2D 膵島では ChgA 陽性細胞数は維持されるものの  $\beta$  細胞数低下と  $\alpha$  細胞数増加が共通して観察された。脱分化細胞数は早期群から進展群において進行性に増加し、C-peptide index と有意な逆相関を示した。 $\beta$  細胞脱分化が 2 型糖尿病の  $\beta$  細胞不全に関連することが示唆された。一方、膵島内の  $\alpha$  細胞数は T2D において増加するが、進展群における早期群からの増加は観察されなかった。さらには、早期群に比して進展群では  $\alpha$  細胞のグルカゴン染色性および成熟  $\alpha$  細胞マーカーである MafB の発現量が低下しており、病態進展による  $\alpha$  細胞の成熟異常が示唆された。また、進展群の膵島では ChgA 陽性細胞の一部がアミラーゼとの二重陽性化を示し内分泌細胞から外分泌細胞への分化転換が示唆された。2 型糖尿病では細胞可塑性を基盤とする膵島リモデリングをきたし病態形成に大きく関与していることが推察された。

### 【文献】

Amo-Shiinoki, K., Tanabe, K., Hoshii, Y., Matsui, H., Harano, R., Fukuda, T., Takeuchi, T., Bouchi, R., Takagi, T., Hatanaka, M., Takeda, K., Okuya, S., Nishimura, W., Kudo, A., Tanaka, S., Tanabe, M., Akashi, T., Yamada, T., Ogawa, Y., Ikeda, E., Nagano, H. & Tanizawa, Y.: Islet cell dedifferentiation is a pathologic mechanism of longstanding progression of type 2 diabetes, *JCI insight.*, **6**(1), e143791(2021).

### 膵 $\alpha$ 細胞におけるインスリンシグナル依存性機能制御メカニズムの解明

渋江 公尊

(田附興風会医学研究所北野病院)

### 【背景】

膵  $\alpha$  細胞より分泌されるグルカゴンは 1 型糖尿病患者や進行した 2 型糖尿病患者において低血糖からの回復に重要なホルモンであるが、その詳細な機能制御機構は明らかではない。糖尿病患者における血糖応答性グルカゴン反応障害の機構についてのこれまでの研究は、グ

ルカゴン分泌をパラクラインに調節しているインスリン (*Cell Metab* 2009; 9: 350-361) やソマトスタチンの変化、自律神経調節の障害 (*N Engl J Med* 2013; 369: 362-372) などいずれも細胞外の調節因子に注目しており  $\alpha$  細胞内の分泌機構の変化について検討した研究報告は渉猟する限り見当たらない。血中グルカゴン測定に従来用いられてきたラジオイムノアッセイ法は、その交差反応の大きさのため正確性に問題があったが、近年より正確なサンドイッチ ELISA 法を用いた検討で 2 型糖尿病患者において食事負荷後にグルカゴン分泌が上昇していることが報告されている (*Endocr J.* 2020; 67: 903-922)。助成者は  $\alpha$  細胞におけるインスリンシグナルに注目し、インスリンシグナル依存性のグルカゴン制御機構について研究することとした。

### 【目的】

インスリンシグナル依存性のグルカゴン制御機構を明らかにする。

### 【方法および計画】

IRS1, IRS2 ノックダウン細胞株 (alphaIRS1KD, alphaIRS2KD) に対してグルコース応答性のグルカゴンの変化を観察すると同時にマイクロアレイ解析を行い、インスリンシグナル下流にある新規調節因子を検討した。

また膵  $\alpha$  細胞特異的 IRS1 および IRS2 ノックアウトマウスに対して糖負荷試験、インスリン低血糖試験を行った。同時に単離膵島を用いてグルコース依存性のグルカゴン分泌を検討した。

並行して上記の所見をより深めるため、申請者は 2021 年度初頭より mTmG 二重蛍光レポーターマウスを用いてマウス  $\alpha$  細胞を単離し、IRS1 下流に存在するグルカゴン分制御遺伝子を同定することを試みることにしている。申請者は本計画立案に先立ち  $\alpha$  細胞特異的 IRS1 ノックアウトマウスからの  $\alpha$  細胞単離を目的として 1. グルカゴンプロモーター下流で Cre を発現する Gcg-CreERT2 マウス, 2. Rosa26-mTmG 二重蛍光レポーターマウス, 3. IRS1 flox マウス (IRS1f/f) の 3 系統を交配したマウス (Gcg-CreERT2-mTmG-IRS1KO) を 2021 年度に作出した (未発表, 論文投稿準備中)。このマウスでは Cre 非発現時には全ての膵島細胞は tdTomato を発現しているが、タモキシフェン誘導性の Cre 発現により、 $\alpha$  細胞においてのみ tdTomato 発現が



EGFP 発現に切り替わる。従って Cre 発現後に単離した膵島から EGFP 発現細胞をフローサイトメトリーでソートすることにより  $\alpha$  細胞を回収することが可能となる。これら回収した細胞を用いて IRS1 下流に存在するグルカゴン分制御遺伝子のより広範なネットワークを明らかにする。

### 【結果】

2021 年までの結果を下に記す。

alphaIRS1KD ではインスリンによるグルカゴン抑制が対照群および alphaIRS2KD に比べて有意に障害されており、AKT のリン酸化も減弱し、カルシウムイオンの応答、ミトコンドリア機能も減弱していた。各細胞株のマイクロアレイ解析ではカルシウム応答に関連する *Trpc3* 遺伝子が alphaIRS1KD で変化していることが示された。

マウスモデルでは alphaIRS1KO マウスでは低血糖時のグルカゴン応答が障害され、単離膵島ではインスリンによるグルカゴン分泌抑制が対照群および alphaIRS2KO マウスで見られていたのに対し、alphaIRS1KO マウスでは分泌抑制が障害されていた。

2021年-現在に継続している状況：現在 RNA-seq 提出に十分な量の  $\alpha$  細胞を回収するため、共同研究先の Joslin Diabetes Center (Boston, MA, USA) にて *Gcg-CreERT2-mTmG-IRS1KO*, *Gcg-CreERT2-mTmG-IRS2KO*, *Gcg-CreERT2-mTmG-IRS1/IRS2KO* を繁殖している。一定数が揃った状況で細胞を回収し解析に取り掛かる予定としている。

### 【考察】

インスリンシグナル依存性のグルカゴン制御には IRS1 が主要な役割を果たしていることが示された。

今後単離  $\alpha$  細胞の解析を通して、インスリンシグナルにより調節されるグルカゴン分泌制御に関するさらに詳細なメカニズム解明に取り組んでいきたいと考えている。

## 脂肪組織マクロファージを介した GIP 受容体シグナルの作用

清水 辰徳

(秋田大学高齢者医療先端研究センター)

### 【目的】

近年、世界の肥満人口が急増する中、抗肥満薬の開発が進められている。Gastric inhibitory polypeptide (GIP) 受容体アンタゴニストや Glucagon-like peptide (GLP)-1 受容体・GIP 受容体のダブルアゴニストは有力な候補として注目を集めており、脂肪組織における GIP 受容体シグナルの解明は極めて重要である。我々はこれまでに、他組織(精巣)において、高脂肪食下(高 GIP 血症下)での GIP 受容体の発現低下 (*Endocrinology* 2017) を示しており、脂肪組織においても同様の発現低下を確認している。また、脂肪組織においては、脂肪細胞に加え、マクロファージに GIP 受容体が高発現していることを見出した。本研究では、脂肪組織マクロファージに対する GIP 受容体シグナルの作用とその基盤となる分子メカニズムを解明することを目的とする。

### 【方法・結果】

脂肪組織からマクロファージを含む SVF (Stromal Vascular Fraction) を分取し、これを CD45 抗体付きマグネットビーズによって CD45(+) 分画と CD45(-) 分画を作成。RT-PCR により、マクロファージを有する CD45(+) 分画に GIP 受容体遺伝子が強く発現していることを見出した。発現量は脂肪細胞を含む分画よりも多く、GIP のシグナルは脂肪細胞のみならず、脂肪細胞に近接して存在するマクロファージにも生理作用を及ぼしていることが強く推測された。これまでに、GIP 受容体欠損マウスの骨髄を野生型マウスに移植することにより、脂肪組織のマクロファージを GIP 受容体欠損マクロファージに置換するモデル(以下、骨髄移植モデル)を用いた検討を重ねている。GIP 受容体欠損マウスの骨髄を野生型マウスに移植した群 (KO→WT)、野生型マウスの骨髄を野生型マウスに移植した群 (WT→WT) をそれぞれ移植後 8 週経過したところから高脂肪食とし、体重推移・耐糖能を評価した。高脂肪食開始前の耐糖能は両群で差はなかった。高脂肪食負荷後の耐糖能は

有意差を認めなかったものの KO→WT 群においてインスリン感受性・血糖など耐糖能において良い傾向を認めた。また高脂肪食負荷後の体重増加は KO→WT マウス群において有意に抑えられており、興味深い結果と考えている。骨髄移植モデルの問題点として、移植細胞による置換は 100% とならず、また移植される骨髄量に個体差が生じ得ることが挙げられ、高脂肪食負荷後の有意な耐糖能の改善がみられなかった原因と考えている。また、末梢血での移植細胞の置換率は確認しているが、脂肪組織内での置換率の把握は困難であり、遺伝子改変技術を用いて作成した新たなモデルマウスでの再検証が必要である。CRISPR-Cas9 を用いたゲノム編集によりマクロファージ特異的 GIP 受容体欠損マウスの作製を進めているが、作成に難渋している。完成後は、当マウスの摂餌量・体重推移・耐糖能を通常食下で評価する。その後、骨髄移植モデルで示された高脂肪食下の肥満耐性について、当マウスで確認を行う。具体的には、高脂肪食開始前後の耐糖能・インスリン抵抗の調査、高脂肪食開始後の体重推移、脂肪組織の炎症性サイトカインの多寡について検討を行いたいと考えている。

#### 【総括】

卒業に際し、これまでについても触れる。最初に行った研究は GIP の精巣への作用であり、肥満・糖尿病に生じる男性不妊の原因の一つが精巣における GIP 受容体の発現低下による可能性を示すことを目的とした。精巣における GIP 受容体の発現を確認したところから始まり、GIP 受容体欠損マウスの精子の受精能が野生型マウスと比較して低いという表現型を見つけたものの、そのメカニズムの解明に難渋した。そのような中で、幸いなことに FFDR に参加させて頂けることとなった。毎年開催される研究発表会は緊張の連続であったが、その中で御指摘・御助言はもちろんのこと、多くの研究者の発表、素晴らしい成果にたどりつくまでに繰り返された多くの実験を肌で感じ、研究会から帰るときにはもう少し頑張ってみようと思えた。自身の研究は、時間がかかってしまったものの 2017 年に論文にすることができ、その年の研究発表会の際には多くの先生方にお声かけ頂いたことを鮮明に覚えている。FFDR に育てて頂いたことを今の研究、次の研究に生かし、FFDR の卒業生として恥じない研究者でありたいと考えている。

これまで長きに渡る御支援を賜り、心より御礼申し上げます。

#### HSP47 による脂肪組織量規定メカニズムの解明

Shin Jihoon

(大阪大学大学院医学系研究科)

#### 【目的】

ヒトの脂肪組織量は個人差が大きく、生理的、環境的、病態的、遺伝的要因が総合的に関与しているが、その詳細なメカニズムは不明である。本研究では脂肪組織量を規定する因子とそのメカニズムを解明すること目的とする。

#### 【方法】

脂肪組織量に関わる生理的、環境的、病態的、遺伝的な環境のトランスクリプトームの解析から可能性の高い脂肪組織量の規定因子を探索する。マウスモデルや脂肪細胞モデルを用い、規定因子の機序を調べる。

#### 【結果】

脂肪組織量に関わるトランスクリプトームの総合的な解析から可能性の高い因子として、HSP47 を同定した。HSP47 は ER に局在し、コラーゲンマトリックスのシャペロンタンパクとして知られており、そのフォールディングや分泌に重要な因子である。HSP47 は脂肪組織に高発現し、摂食/過食、肥満では増加し、逆に絶食や運動、肥満外科治療、Cachexia では低下した。遺伝的に高い HSP47 発現を有するヒトは太りやすく、逆にマウスの HSP47 阻害や欠損モデルでは脂肪組織が小さい。欠損モデルの脂肪組織では脂肪細胞のマスターレギュレーターである PPAR $\gamma$  のタンパク発現が低下していた。3T3-L1 脂肪細胞を用いた *In vitro* の実験でも同様の結果で、HSP47 のノックダウン及び阻害により PPAR $\gamma$  のタンパク発現が低下した。そのメカニズムとして、HSP47 は脂肪細胞外のコラーゲンマトリックスのフォールディングや分泌を増加させ、細胞膜インテグリンとのバインディングを介し、細胞内 FAK シグナルを誘導、PPAR $\gamma$  を安定化させ、脂肪組織量を規定していることが分かった。

**【考察】**

脂肪組織のコラーゲンマトリックスは病態的な繊維化因子としてよく知られていたが、その生理的意義や重要性については解明されていなかった。本研究ではヒトやマウスで脂肪組織に高発現し、脂肪組織量を規定する因子としてHSP47を同定した。HSP47は栄養・病態・遺伝的環境により発現が制御され、脂肪細胞外のコラーゲンマトリックスのタンパクの恒常性を変化させることで脂肪組織量を規定していることが分かった。現在その詳しい分子メカニズムを解明中である。

**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  
(The University of Manchester)

**【目的】**

本研究では、日本人集団及び欧米人集団における大規模バイオバンクのゲノム情報、臨床情報を活用し、ポリジェニック・リスク・スコア (polygenic risk score; PRS) およびその発展形であるパスウェイ PRS を用いて、2型糖尿病のリスク層別化およびサブタイプ分類を行う。本研究により、「遺伝情報により2型糖尿病の発症リスクおよびその表現型はどのように規定されるか」という疾患ゲノム研究の重要課題が明らかになることが期待される。

**【方法】**

バイオバンク・ジャパン 18万人のゲノムデータ、臨床情報を活用し、2型糖尿病および肥満のゲノムワイド関連解析 (genome-wide association study; GWAS) を実施した。そのサマリーデータを用いて、網羅的分子生物学的パスウェイ解析を実施し、これらの形質・疾患に統計学的に有意に関連する分子生物学的パスウェイを同定した。活用したパスウェイ・データベースは molecular signature database (msigDB) に登録されている一細胞遺伝子発現解析データで同定された302種類の細胞種特異的遺伝子セットから構成されており、形質・疾患の組織・細胞特異性を明らかにすることが可能である。同様に UK Biobank 50万人のゲノムデータ、

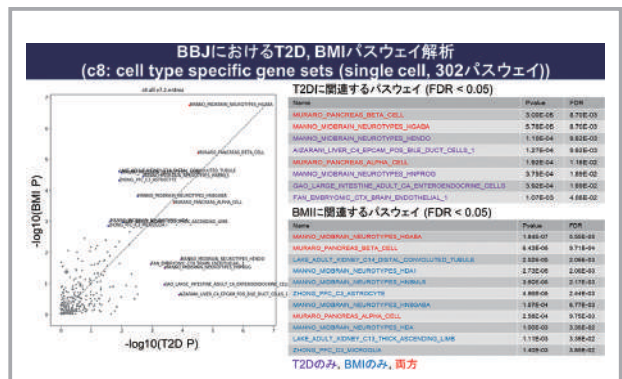


図1

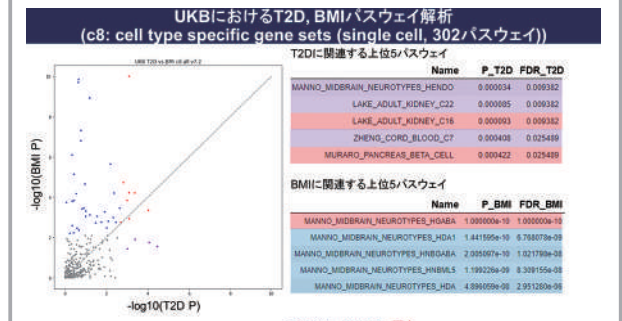


図2

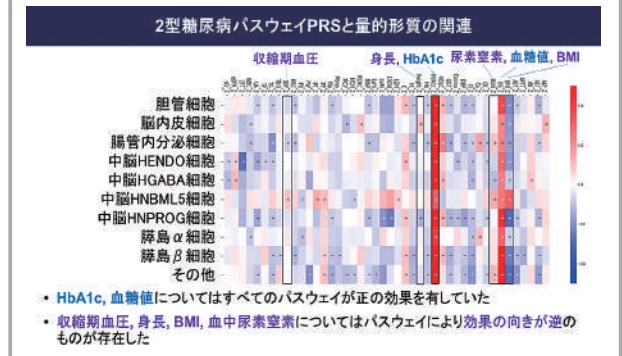


図3

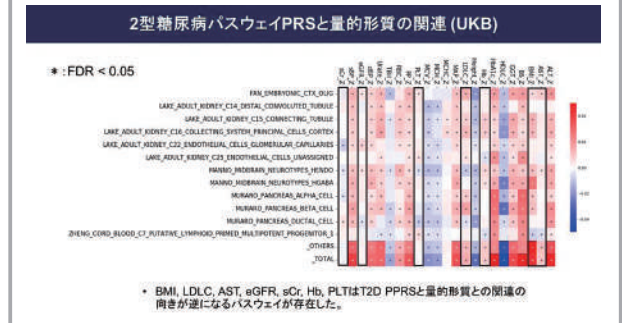


図4

臨床データを活用し、2型糖尿病、肥満のGWASを実施し、そのサマリーデータを用いて分子生物学的パスウェイ解析を実施した。

次に、上記で同定された分子生物学的パスウェイのポリジェニック・リスク・スコアを算出した。通常の

PRS は (リスク上昇効果) × (リスクアレルの数) を全ゲノムに渡り足し合わせるが、パスウェイ PRS では (リスク上昇効果) × (リスクアレルの数) を各パスウェイに所属する遺伝子領域に限定して計算することで、疾患のパスウェイ特異性を明らかにすることが期待される。

### 【結果】

日本人集団における分子生物学的パスウェイ解析では 2 型糖尿病は膵 β 細胞, α 細胞, 中脳神経細胞, 消化管内分泌細胞, 胆管細胞と有意に関連し, 肥満は膵 β 細胞, α 細胞, 中脳神経細胞, 腎臓集合管細胞, ヘンレ上行脚細胞等と有意に関連していた (図 1)。欧米人集団における分子生物学的パスウェイ解析では 2 型糖尿病は膵 β 細胞, 中脳神経細胞と関連し, 肥満は中脳神経細胞に特に強い関連を示した (図 2)。

これらのパスウェイデータを活用して, 2 型糖尿病のパスウェイ PRS を算出し, 各種臨床検査値との関連を調査したところ, パスウェイにより異なる臨床検査値に関連を示すことが明らかとなった。日本人集団においては, すべての 2 型糖尿病パスウェイ PRS について, HbA1c と血糖値に対しては正の効果をも有していた一方で, 収縮期血圧, 身長, 肥満, 血中尿素窒素についてはパスウェイごとに効果の向きが異なるものが存在した (図 3)。欧米人集団においては, HbA1c と血糖値に関しては全ての 2 型糖尿病パスウェイ PRS が性的関連を示した。一方で, 肥満, LDL コレステロール, AST, eGFR, 血清クレアチニン, Hb, 血小板数は 2 型糖尿病パスウェイ PRS と量的形質との関連の向きがパスウェイにより異なることが明らかとなった (図 4)。

### 【考察】

2 型糖尿病に関連する分子生物学的パスウェイに応じて計算されたパスウェイ PRS は, そのパスウェイに応じて異なる量的形質と関連することが分かった。これは日本人集団と欧米人集団のどちらにおいても観察された現象だが, そのパターンは集団に応じて異なっていた。今後はパスウェイ PRS の臨床的な意義を明らかにし, 2 型糖尿病の遺伝素因の分子生物学的パスウェイによる特徴づけを行っていく。

### 【文献】

1) Mahajan, A., Spracklen, CN., Zhang, W., Ng, MC., Petty, LE., Kitajima, H. *et al.*: Trans-ances-

try genetic study of type 2 diabetes highlights the power of diverse populations for discovery and translation. *Nature genetics*. in press.

2) Sakaue, S., Kanai, M., Tanigawa, Y., Karjalainen, J., Kurki, M., Koshiba, S. *et al.*: A cross-population atlas of genetic associations for 220 human phenotypes. *Nat Genet.* 2021 Oct; **53**(10): 1415-24.

3) Naito, T., Suzuki, K., Hirata, J., Kamatani, Y., Matsuda, K., Toda, T., *et al.*: A deep learning method for HLA imputation and trans-ethnic MHC fine-mapping of type 1 diabetes. *Nature communications*. 2021; **12**(1): 1-14.

4) Hosoe, J., Suzuki, K., Miya, F., Kato, T., Tsunoda, T., Okada, Y. *et al.*: Structural basis of ethnic-specific variants of PAX4 associated with type 2 diabetes. *Human Genome Variation*. 2021; **8**(1): 1-3.

5) Hosoe, J., Sonoyama, YK., Miya, F., Kadowaki, H., Suzuki, K., Kato, T. *et al.*: Genotype-Structure-Phenotype Correlations in Disease-Associated IGF1R Variants and Similarities to Those in INSR Variants. *Diabetes*. 2021.

### 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。脂肪組織を構成する細胞の中で, 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, 及び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

動についての知見は限られており、低分子代謝物の量的・質的变化の全体像については不明確な点が多く存在する。そこで、本研究では低分子代謝物の網羅的解析手法の一種であるメタボローム解析を活用し、本年度は特に、脂肪細胞の褐色化過程における代謝変動の全体像の把握及びそのメカニズム解明を目的とし、研究を行った。

#### 【方法】

培養脂肪細胞に mycophenolic acid (MPA, IMP dehydrogenase (IMPDH) inhibitor) を添加し、*Ucp-1* mRNA 発現量及び細胞中 IMP 量を測定した。また、mycophenolate mofetil (MMF, MPA プロドラッグ) をマウスに摂食させ、脂肪組織褐色化に関する解析を行った。さらに、マウス寒冷暴露時の *Impdh* mRNA 発現量の解析を行った。

#### 【結果・考察】

メタボローム解析を中心としたこれまでの研究結果より、脂肪細胞褐色化進行過程において、脂肪組織中 IMP 量が増加することを示唆するデータを得ていた。培養脂肪細胞への MPA 添加により、細胞中 IMP 量が増加すると同時に、*Ucp-1* mRNA 発現量も増加することを明らかにした。また、MMF マウス摂食実験より、MMF がマウス脂肪組織中 *Ucp-1* mRNA 発現量を増加させ、脂肪細胞小型化に寄与することを示した。さらには、マウス寒冷暴露時に、*Ucp-1* mRNA 発現量は増加する一方、*Impdh* mRNA 発現量は減少することを見出した。これらの結果より、脂肪細胞褐色化過程において、IMP 代謝経路の制御が重要であることが示された。

#### 【文献】

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).

### 脂肪組織マクロファージの役割に関する研究

瀧川 章子

(富山大学医学系研究科)

#### 【目的・方法】

脂肪組織では肥満時に慢性炎症や低酸素状態が惹起され (=病的肥大)、インスリン抵抗性の基盤病態となる。また脂肪組織の低酸素と炎症性マクロファージ (mφ) には関連がある。そこで肥満時の脂肪組織 mφ の活性化機構を解明するため、低酸素状態で活性化される転写因子 HIF-1α を mφ 特異的に欠損したマウス (HIF1KO マウス) を高脂肪食にて飼育し、解析した。

#### 【結果】

HIF1KO マウスは耐糖能が改善し、脂肪組織の炎症が軽減していた。高脂肪食下 HIF1KO マウスの脂肪組織では、野生型と比べ血管新生因子である VEGFa の遺伝子発現は低下したが、脂肪組織の血管数や血流量は増加していた。脂肪組織の細胞を分画したところ、HIF1KO マウスでは前駆脂肪細胞分画において血管新生促進因子の遺伝子発現が上昇していた。そこで前駆脂肪細胞の血管新生因子が mφ に影響されるか、3T3-L1 細胞と骨髄由来 mφ の共培養系で検討した。M1 分化刺激を加えた mφ と共培養した 3T3-L1 細胞では、M1 分化刺激を加えない mφ と共培養した 3T3-L1 細胞に比べ血管新生因子の発現が低下した。

#### 【考察】

mφ の HIF-1α は肥満時の脂肪組織における慢性炎症の増悪、インスリン抵抗性の進展に働く。また mφ の HIF-1α が前駆脂肪細胞や血管内皮の血管新生因子の発現を抑制することで脂肪組織の病的肥大を悪化させると考えられた<sup>1)</sup>。

今後は脂肪組織常在型 mφ について、インスリン感受性維持および脂肪組織の血管新生における役割を解明したい。任意のタイミングで脂肪組織常在型 mφ を除去可能な遺伝子改変マウス (CD206-DTR マウス) を用い、常在型 mφ と前駆脂肪細胞との関連について解析を進める予定である。

## 【文献】

- 1) Takikawa, A. *et al.*: HIF- $\alpha$  in myeloid cells promotes adipose tissue remodeling toward insulin resistance. *Diabetes*, **65**, 3649 (2016).

ニューロメジンUが膵 $\beta$ 細胞機能に与える影響とその分子機序の解析

張 維東

(宮崎大学医学部)

## 【目的】

Neuromedin U (NMU) is a 23–25-amino acid neuropeptide, which was first isolated from the spinal cord of pigs in 1985, and later from other species. It is a highly conserved peptide in mammals, and widely expressed in the central nervous system and peripheral tissues and has emerged as a new player in regulating appetite control, stress response, energy metabolism, inflammation, and glucose homeostasis. NMU has two receptors, NMU receptor 1 (NMUR1) and NMUR2, both of which are G-protein-coupled receptors (GPCRs). Only NMUR1 is expressed in mouse islets and  $\beta$  cell-derived MIN6-K8 cells. We previously reported that NMU produced in  $\beta$  cells suppresses GSIS and causes  $\beta$ -cell failure via NMUR1<sup>1,2</sup>). NMU was upregulated both after chronic palmitate treatment and in diabetic *db/db* mice islets, and then participated in  $\beta$ -cell dysfunction and development of diabetic pathogenesis via induction of mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum (ER) stress<sup>2</sup>). However, the downstream signal transduction of NMUR1 in  $\beta$  cells has not been elucidated.

In addition, preproNMU produces another peptide, NMU precursor-related peptide (NURP). ICV administration of NURP to mice increased their metabolic rate and caused a short-term (~4 h) increase in feeding. NURP cannot activate the two NMU receptors.

Further studies are needed to identify the molecular mechanisms underlying the insulinostatic action mediated by NMUR1 in  $\beta$  cells, and the cognate receptor for NURP and functional interactions between NMU and NURP.

## 【方法】

All types of  $G\alpha$  proteins are expressed in  $\beta$  cells and are involved in the regulation of insulin secretion. Given that NMUR1, but not NMUR2, is expressed in  $\beta$  cells, and NMU suppresses intracellular calcium mobilization and insulin secretion, we hypothesized that NMUR1 might use  $G\alpha_{i/o}$  for signal transduction in  $\beta$  cells. Using  $\beta$  cell-derived MIN6-K8 cells, isolated mouse and human islets, and single islet cells, we identified the molecular mechanisms by which NMU and NMUR1 regulate insulin secretion in  $\beta$  cells.

Considering NURP is also produced from preproNMU and is involved in the energy homeostasis, we also investigated the existence of NURP and its roles in the pancreatic function.

## 【結果】

The results of molecular mechanisms of NMU in the  $\beta$ -cell regulation were published in *PLoS ONE* in 2021<sup>3</sup>). We showed that NMUR1 in  $\beta$  cells uses  $G\alpha_{i/o}$  signaling to mediate the detrimental effects of NMU on insulin secretion. Pretreatment with the  $G\alpha_{i/o}$  inhibitor *Bordetella pertussis* toxin (PTX) abolished NMU-induced suppression of glucose-stimulated insulin secretion and calcium response in  $\beta$  cells. Knockdown of  $G\alpha_{i2}$  and  $G\alpha_o$  in  $\beta$  cells counteracted NMU-induced suppression of insulin secretion and gene alterations related to mitochondrial function and dynamics, ER stress, intracellular ATP level, and mitochondrial membrane potential. NMU decreased forskolin-stimulated intracellular cAMP in both mouse and human islets. We concluded that upon NMU binding, NMUR1 coupled to PTX-sensitive  $G\alpha_{i2}$  and  $G\alpha_o$  proteins in  $\beta$  cells, reduced intracellular  $Ca^{2+}$  influx and cAMP level which in turn

suppresses insulin secretion, thereby causing  $\beta$ -cell dysfunction and impairment.

In addition, I also published a new article to describe the current findings of NURP in energy homeostasis and discussed its possible interaction with NMU<sup>4)</sup>. Intriguingly in our study, NURP was found to be expressed in  $\alpha$  cells not as expected in  $\beta$  cells of mouse islets, and in  $\beta$  cell-derived MIN6-K8 cells, no NURP was detected. We further confirmed that NURP suppressed GSIS in both isolated mouse islets and MIN6-K8 cells. In MIN6-K8 cells, NURP was also found to reduce intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  influx, and impaired mitochondrial OCR.

#### 【考察】

Our results suggested that  $G\alpha_{i2}$  and  $G\alpha_o$  are involved in signal transduction of NMUR1 in  $\beta$  cells. Both  $G\alpha_i$  and  $G\alpha_o$  belong to the  $G\alpha_{i/o}$  subfamily, and it is usually assumed that if a receptor couples to  $G\alpha_i$ , it will also couple similarly to  $G\alpha_o$ . In addition, GPCRs can bind to distinct classes of heterotrimeric G-proteins in different cell types. Understanding more about these endogenous G-proteins opens the door to pharmaceutically targeting their activation, which would have major therapeutic potential in diabetes and obesity. Although the mechanisms underlying the involvement of  $G\alpha_i$  and  $G\alpha_o$  signaling in NMU inhibitory effects on insulin secretion require detailed investigation, including studies at the structural level, our findings provide important leads regarding the endogenous NMUR1 transduction pathway. In this study, PTX abolished NMU-suppressed calcium influx in  $\beta$  cells, suggesting that using different  $G\alpha$  proteins, NMUR1 apparently exhibits opposite effects on calcium mobilization, depending on different cell types. Knowledge of the NMU signaling cascades, NMU-NMUR1- $G\alpha_{i2}$  and  $G\alpha_o$ -cAMP-calcium-insulin, and the new findings of NURP may provide new insight into  $\beta$ -cell biology and the pathogenesis of diabetes related to NMU.

#### 【文献】

- 1) Zhang, W., Sakoda, H., Miura, A., Shimizu, K., Mori, K., Miyazato, M., Takayama, K., Hayashi, Y. & Nakazato, M.: Neuromedin U suppresses glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic  $\beta$  cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **493**: 677-683 (2017).
- 2) Zhang, W., Sakoda, H. & Nakazato, M.: Neuro-medin U suppresses insulin secretion by triggering mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress in pancreatic  $\beta$ -cells. *FASEB J.* **34**: 133-147 (2020).
- 3) Zhang, W., Sakoda, H., Nakazato, Y., Islam, MN., Pattou, F., Kerr-Conte, J. & Nakazato, M.: Neuromedin U uses  $G\alpha_{i2}$  and  $G\alpha_o$  to suppress glucose-stimulated  $\text{Ca}^{2+}$  signaling and insulin secretion in pancreatic  $\beta$  cells. *PLoS ONE.*, **16**: e0250232 (2021).
- 4) Ueno, H., Zhang, W. & Nakazato, M.: Regulation of feeding and therapeutic application of bioactive peptides. *Pharmacol Ther.*, **239**: 108187 (2022).

#### 消化管ペプチドと迷走神経ネットワークを介した恒常性維持機構の解明

坪内 拡伸

(宮崎大学医学部)

#### 【背景・目的】

グレリンは胃から分泌される生理活性物質であり、摂食亢進作用と強力な抗炎症作用を有する。我々は、グレリンの投与が強力な抗炎症作用を発揮し、肺炎症や線維化を強力に抑制することを見出した。しかし、内因性グレリンがどのように炎症病態に影響するのかわかりません。内因性グレリンシグナルが重篤な肺炎症においてどのような役割を持つのかを検討した。

#### 【方法】

10週齢のC57BL/6マウスおよびグレリン受容体(Ghsr1a)欠損マウス(Ghsr-KO)に、リポポリサッカ

ライド (LPS) 5mg/kg の気管内投与による急性肺損傷モデルを作成した。摂餌量、体重変化、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の総細胞数、肺組織中の炎症性サイトカインとケモカインの発現を検討した。次に腹腔内マクロファージを回収し、LPS 添加 2 時間後の炎症性サイトカインの発現およびミトコンドリア呼吸/解糖系比率を OCR/ECAR 比によって検討した。

### 【結果】

急性肺損傷モデルにおいて、Ghsr-KO マウスでは、C57BL6 マウスと比較して、摂餌量と体重には有意な差は認められなかった。その一方で、Ghsr-KO マウスでは、血管透過性の亢進、肺組織中の TNF- $\alpha$ 、IL-6、CXCL2 mRNA の発現亢進が抑制されていた。動脈血ガス分析では、P/F 比の低下が抑制され、肺組織の乾燥重量/湿重量比も低かった。以上の結果から、グレリン受容体の欠損は LPS に対する炎症応答が障害されていることが見出された。Ghsr-KO マウスでは、C57BL6 マウスと比較して LPS 投与 72 時間の生存率が向上していた。Ghsr シグナルの欠損が LPS に対する炎症応答を障害するメカニズムを検討するため、マクロファージの好氣的呼吸→解糖系へのシフトについて評価した。細胞外フラックスアナライザーを用いて解析した結果、Ghsr-KO マウスでは、LPS 添加刺激によってもたらされる解糖系へのシフトが障害されていた。

### 【考察】

GHSR-KO マウスを用いた検討では、内因性グレリンシグナルの欠損が LPS に対する炎症応答を抑制していた。炎症反応の開始および維持には、マクロファージの好氣的呼吸から解糖系へのシフトが重要である。本研究により、内因性グレリンシグナルが、マクロファージの炎症応答に重要であることが見出された。

### 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

を検討ため、今年度は肥満・糖尿病の環境因子に着目した治療を、正常時の免疫細胞の機能を維持することにより行うことを目標におき、外界への腸内環境、免疫の正常反応と肥満での変化を解析した。

### 【方法】

食物が早期に流入する小腸のリンパ組織であるパイエル板で、絶食時、摂食後に 1 細胞レベルで遺伝子発現を検討した。まず bulk RNA-seq を行い、その後変動が大きいと考えられた遺伝子を発現する細胞集団を明らかにするために single cell RNA-seq (scRNA-seq) により摂食時に変動する細胞集団、遺伝子発現変化、また肥満マウスモデルでのこれらの変化を検出することを目指した。

### 【結果】

Bulk RNA-seq による検討で小腸パイエル板では食後、Hsp70 の発現が増加し、scRNA-seq では骨髄系細胞、B 細胞、T 細胞で食後の発現が確認された。また空間的トランスクリプトーム解析で食後にパイエル板で upregulate されている遺伝子を列挙すると、NF- $\kappa$ B に関連する遺伝子発現変化が見られた。RT-PCR で同様のサンプルを解析すると、IL-1 $\beta$ 、IL-10 などいずれも NF- $\kappa$ B により発現誘導される因子の発現が増強していた。初代培養マクロファージにおける LPS による I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白の分解はインスリンと共に 30-60 分刺激する条件で亢進し、インスリン、LPS により活性化されるシグナルが合流する node のうちの一つであると考えられた。酪酸の存在下で、LPS とインスリンによる I $\kappa$ B $\alpha$  蛋白の分解が亢進したが、同じ条件で siRNA により Hsp70 を knockdown すると LPS とインスリンによる分解が障害された。

### 【考察】

NF- $\kappa$ 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 $\kappa$ B $\alpha$  蛋白の Hsp70 依存的な分解および NF- $\kappa$ B の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。NF- $\kappa$ B のインスリン依存的な活性化経路の中で、肥満状態で正常機能を障害する因子の同定と介入による機能解析を今後進める必要がある。



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)

【目的】

膵形成不全、腸管形成不全を伴う新生児糖尿病を主徴とする Mitchell-Riley 症候群 (MRS) の原因遺伝子 *RFX6* の原始腸管レベルにおける下流遺伝子制御機構についての検討を行うこと。

【方法】

*RFX6* ヒト iPS 細胞ノックインレポーター株 *RFX6<sup>+eGFP</sup>* 及び *RFX6<sup>eGFP/eGFP</sup>* ノックイン・ノックアウト株を用いて、*in vitro* での胚性内胚葉を経由した原始腸管への分化誘導を行った。各群においてフローサイトメトリーを用いて GFP 陽性細胞の生細胞ソーティングを行った。Cap analysis of gene expression (CAGE)-seq を使用し、*RFX6<sup>eGFP/eGFP</sup>* 群で有意に遺伝子発現低下を認める遺伝子群の転写開始点 (TSS) 上流配列領域からモチーフライブラリを用いて候補モチーフ抽出解析を行った。

【結果】

上記解析によって、RFX ファミリーに共通するモチーフ配列であるが *RFX6* については未報告のものが同定された。次に先行実験で *RFX6* との関係が示唆されていた後方前腸マーカー *PDX1* 及び中後腸マーカー *CDX2* との関係について検討を行った。上述のモチーフは *PD XI* 遺伝子 TSS 上流約 10kb、及び *CDX2* 遺伝子 TSS 上流約 2.6kb に確認された。これらのモチーフ含有配列と相同な合成したビオチン化プローブと、強制発現系を用いて抽出したタグ付きの *RFX6* 蛋白を用いて、non-RI ゲルシフトアッセイを行った。どちらのプローブとも *RFX6* 蛋白の直接的な結合シグナルが確認でき、一方で過剰な非ビオチン化プローブの使用で結合シグナルの減弱を認め、モチーフ配列を除去した配列に対しては結合シグナルが確認できなかったことから、*RFX6* 蛋

白と同モチーフは特異的に結合するものと考えられた。

【考察】

原始腸管段階において *RFX6* と下流遺伝子のエンハンサー候補領域の *RFX6* 結合モチーフとの直接的な結合を介した制御機構を有する可能性が示唆された。

Depletion of CD206 M2-like macrophage activates fibro-adipogenic progenitors, and enhances myogenesis during recovery process

Nawaz Allah

(University of Toyama)

【Purpose】

The purpose of this study was to investigate how CD206<sup>+</sup> M2-like macrophages (MΦ) regulate activation of fibro-adipogenic progenitors (FAPs) and muscle regeneration.

【Methods】

I utilized CD206DTR, CD206CreERT2/TGF-1<sup>f/f</sup> and PDGFR CreERT2 x Fst<sup>f/f</sup> mice to clarify the involvement of CD206-derived TGF 1 and FAPs-derived FST, respectively, in recovery process.

【Results】

Interestingly, our study show that the depletion of CD206<sup>+</sup> M2-like MΦ during the early phase of repair considerably accelerated the recovery from cardiotoxin (CTX)-induced muscle injury. Our total RNA sequencing and gene expression analysis revealed that the expressions of myogenesis-related marker genes, including *MyoD*, *MyoG*, and *Fst*, etc., were upregulated in areas of CTX-induced muscle injury in the TA muscle of DT-treated Tg mice, suggesting that the depletion of CD206<sup>+</sup> M2-like MΦ promotes the recovery of muscle from injury in Tg mice. Similar results were obtained in CD206-derived TGF-1 KO mice. Conversely, FAPs-derived Fst KO mice showed delayed recovery process, suggesting that deletion of FAPs-specific Fst gene results in impaired

myogenesis and muscle regeneration.

### 【Discussion】

Previous reports have shown that FAPs are essential for recovery process and they provide trophic signals to enhance myogenic differentiation, thereby boosting the recovery process<sup>1-3</sup>). However, interactions between immune cells (specifically CD206<sup>+</sup> M2-like MΦ) and FAPs during recovery process remains unknown. We recently reported that CD206<sup>+</sup> M2-like MΦ-derived TGF- $\beta$  1 inhibited the proliferation and differentiation of adipocyte progenitors in adipose tissue<sup>4-6</sup>). Our data support the notion that paracrine factors secreted by activated FAPs<sup>2,7,8</sup>) promotes the recovery process in coordination with diverse MΦ populations. We have provided evidence that CD206<sup>+</sup> M2-like MΦ provides a niche for FAPs and depletion of CD206<sup>+</sup> M2-like MΦ results in reduction of TGF- $\beta$  signaling, thereby promoting myogenesis and muscle regeneration.

### 【References】

- 1) Wosczyzna, M. N. *et al.*: Mesenchymal Stromal Cells Are Required for Regeneration and Homeostatic Maintenance of Skeletal Muscle. *Cell Reports* **27**, 2029-2035. e2025, doi: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.04.074> (2019).
- 2) Joe, A. W. *et al.*: Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nature cell biology* **12**, 153-163, doi: 10.1038/ncb.2010.15 (2010).
- 3) Uezumi, A., Ikemoto-Uezumi, M. & Tsuchida, K.: Roles of nonmyogenic mesenchymal progenitors in pathogenesis and regeneration of skeletal muscle. *Frontiers in physiology* **5**, 68, doi: 10.3389/fphys.2014.00068 (2014).
- 4) Nawaz, A. & Tobe, K.: M2-like macrophages serve as a niche for adipocyte progenitors in adipose tissue. *Journal of diabetes investigation*, doi: 10.1111/jdi.13114 (2019).
- 5) Igarashi, Y. *et al.*: Partial depletion of CD206-positive M2-like macrophages induces prolifera-

tion of beige progenitors and enhances browning after cold stimulation. *Sci Rep* **8**, 14567, doi: 10.1038/s41598-018-32803-6 (2018).

- 6) Nawaz, A. *et al.*: CD206<sup>+</sup> M2-like macrophages regulate systemic glucose metabolism by inhibiting proliferation of adipocyte progenitors. *Nature communications* **8**, 286, doi: 10.1038/s41467-017-00231-1 (2017).
- 7) De Micheli, A. J. *et al.*: Single-Cell Analysis of the Muscle Stem Cell Hierarchy Identifies Heterotypic Communication Signals Involved in Skeletal Muscle Regeneration. *Cell Reports* **30**, 3583-3595. e3585, doi: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.067> (2020).
- 8) Lukjanenko, L. *et al.*: Aging Disrupts Muscle Stem Cell Function by Impairing Matricellular WISP1 Secretion from Fibro-Adipogenic Progenitors. *Cell Stem Cell* **24**, 433-446. e437, doi: 10.1016/j.stem.2018.12.014 (2019).

### 新規レポーターマウスを用いた膵 $\alpha$ 細胞新生・分化機構の解明

氷室 美和

(順天堂大学)

### 【目的・方法】

近年、膵  $\alpha$  細胞の可塑性が明らかとなってきたおり、 $\alpha$  細胞の分化機構を明らかにすることは、 $\alpha$ -to- $\beta$  reprogramming を介した  $\beta$  細胞再生医療へと繋がる可能性がある。我々は  $\alpha$  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 IRES の影響により eGFP の緑色蛍光と mRFP の赤色蛍光との検出にタイムラグが生じ、内分泌前駆細胞から分化したばかりの新生  $\alpha$  細胞は緑色蛍光、より分化した  $\alpha$  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、共焦点レーザー顕微鏡及び flow cytometry を用いて  $\alpha$  細胞を経時的に観察できる。本マウスを用いて「 $\alpha$  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、 $\alpha$  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。

### 【結果】

*Gcg-Timer* マウス膝を共焦点レーザー顕微鏡及び flow cytometry を用いて観察した結果、緑色蛍光を呈する新生  $\alpha$  細胞は胎生期及び生後 7 日未満の新生仔期においてのみ観察され、成体マウスでは認めなかった。しかし 3～12 週齢の *Gcg* 欠損 *Gcg-Timer* マウス膝において、顕微鏡で緑色蛍光陽性、赤色蛍光陰性の細胞を認め、2～3 週齢における Flow cytometry でも同様に観察された。この結果をもとに、グルカゴン抗体やグルカゴン受容体拮抗薬を 2 ヶ月齢のマウスに投与し膝切片を顕微鏡で観察した。同時期の生理条件下では認めなかった緑色蛍光陽性・赤色蛍光陰性の細胞が観察された。

### 【考察および今後の展望】

グルカゴンシグナル抑制が  $\alpha$  細胞過形成を生じることが報告されており、そのメカニズムは  $\alpha$  細胞自己増殖によると考えられてきた。しかし今回 genetic ablation モデルのみでなく、薬物投与と実験によっても、グルカゴンシグナル抑制による  $\alpha$  細胞量増加に  $\alpha$  細胞新生が寄与していることが新たに示された。

今後さらに  $\alpha$  細胞新生がどこから生じるか、そしてどのような因子が関与するかを明らかにするため、顕微鏡解析やトランスクリプトーム解析を進めていく。

### 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

(東京大学保健・健康推進本部)

### 【背景】

肥満や 2 型糖尿病などの生活習慣病は全世界に蔓延している。とくに肥満は polygenic risk score を用いた biobank の大規模解析において高血圧と並んで寿命に最も強い負の影響を与える因子であったにも関わらず (Sakaue, S. *et al. Nature Medicine* 2020)、我が国で承認されてきた肥満の治療薬は副作用等に関する懸念から実際には殆ど使用されておらず、高度肥満例に対する

外科治療の有効性は確立されているものの手術適応となる患者数は多くない。また現存する肥満の薬物治療、外科治療は全て「エネルギー摂取の抑制」を意図しているが、エネルギー収支を平衡させるためには「エネルギー消費の促進」というアプローチも考えられる。褐色脂肪細胞はミトコンドリアにおける uncoupling protein-1 (Ucp1) の機能を介して熱を産生しエネルギーを消費する機能を有し、既に BMI と褐色脂肪細胞の活性が負に相関すること、加齢に伴い褐色脂肪細胞の活性が低下することが報告されている。申請者らは褐色脂肪細胞の分化を制御する鍵因子である転写因子 nuclear factor I-A (NFIA) をゲノムワイドなオープンクロマチン解析で同定し解析してきた (Hiraike, Y. *et al. Nature Cell Biology* 2017)。また中胚葉系の前駆細胞が褐色脂肪細胞に分化するためには褐色脂肪細胞の遺伝子プログラムの活性化に加えて骨格筋細胞の遺伝子プログラムの不活性化が必要だが、NFIA はその褐色脂肪細胞分化促進作用とは独立に骨格筋細胞分化のマスター転写因子 MyoD の転写を抑制することで褐色脂肪細胞分化を担保する (Hiraike, Y., *et al. PLoS Genetics* 2020)。更に我々は台湾 biobank の解析からもっとも代表的な肥満感受性 SNP のひとつであり褐色脂肪細胞の機能を介して作用する *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 (Hiraike, Y. *et al. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2021)。risk allele を有する被験者であっても、定期的な運動習慣によって追跡期間中の体重増加が抑制された。また baseline で定期的な運動習慣がないと回答した被験者に注目したサブグループ解析を実施し、baseline で定期的な運動習慣がなかったとしても追跡期間中に運動習慣を獲得することで risk allele 保有者の体重増加が抑制されることを明らかにした。

本研究は NFIA を標的として褐色脂肪細胞の数や働きを高めることで「エネルギー消費の促進」に基づく生活習慣病の治療を実現するための理論的基盤を提供することを目指すものである。

### 【結果】

ヒト褐色脂肪細胞の活性は BMI と負に相関し加齢とともに低下するが、若年者においてもその活性には 10

倍以上の個人差が存在し、マウス近交系においても褐色脂肪細胞活性には大きな差を認めることからゲノム多型の関与が想定される。本研究において我々はマウス近交系のうち太りやすく褐色化能が低く *Ucp1* 発現が低い C57BL/6J (B6) と太りにくく褐色化能が高く *Ucp1* 発現が高い 129X1/SvJ (129) およびこれらを交配させた F1 を用いて、ゲノム多型が脂肪細胞の褐色化能を規定するメカニズムを解明するための網羅的なゲノム-エピゲノム連関解析を遂行した。B6 と 129 それぞれのマウスから採取した褐色脂肪細胞は脂肪細胞分化の程度に差が無いにも関わらず、*Ucp1* は 129 において顕著に高発現していた。F1 マウス由来の褐色脂肪細胞において *Ucp1* mRNA には 129 由来のゲノムから優先して転写される allelic imbalance を認め、NFIA の ChIP-seq においても *Ucp1* 遺伝子エンハンサーへの結合に 129 優位の imbalance を認めた。実際、F1 細胞において Hi-C を用いてエンハンサー-プロモーター間の allele-specific なクロマチン相互作用を網羅的に解析したとこ

ろ *Ucp1* -12kb エンハンサーには 129 由来の allele 優位なクロマチン相互作用を認めた。NFIA の ChIP-seq に allelic imbalance を認める領域のモチーフ解析から、*Ucp1* -12kb エンハンサーに存在する rs47238345 が転写因子 VDR (vitamin D receptor) のモチーフを崩すことで VDR 自身及び競合する NFIA のゲノムへの結合に影響し褐色化能を規定することを同定した。更に rs47238345 を B6 の allele から 129 の allele へ置換したマウスにおいては *Ucp1* 発現が上昇することを示した。また 129 において B6 と比較して高発現している転写因子のスクリーニングから *Ucp1* の正の制御因子として Lim homeobox protein 8 (Lhx8) を同定した (Hiraike Y. *et al.* *iScience* in press)。

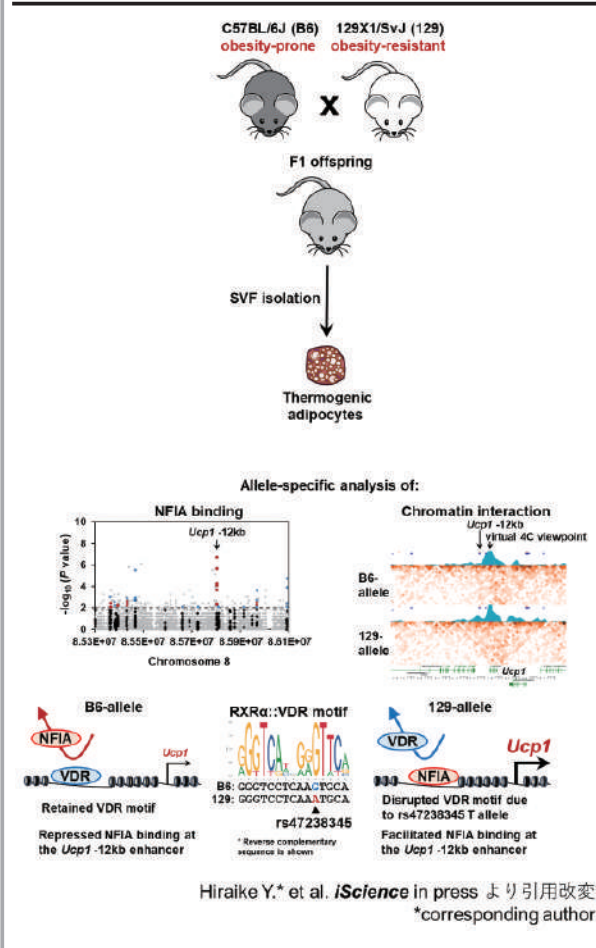
### 【今後の展望】

褐色脂肪細胞における NFIA が全身代謝に及ぼす影響及び作用メカニズムの全貌が明らかになれば、「エネルギー消費の促進」に基づく新たな生活習慣病の治療法の開発に結実することが期待される。また褐色脂肪細胞の活性が体重や血糖、心血管イベント等を与える影響をバイオバンクの大規模データで検証し特に遺伝子環境相互作用に注目して解析することにより、遺伝リスクに基づいた最適な生活指導という形で生活習慣病領域における精密医療の実現につながることが期待される。

### 【文献】

- 1) Hiraike, Y.\*, Tsutsumi, S., Wada, T., Oguchi, M., Saito, K., Nakamura, M., Ota, S., Koebis, M., Nakao, H., Aibta, A., Nagano, G., Ohno, H., Oki, K., Yoneda, M., Kadowaki, T., Aburatani, H., Waki, H. & Yamauchi, T.: NFIA determines the *cis*-effect of genetic variation on *Ucp1* expression in murine thermogenic adipocytes. *iScience* accepted. \*Corresponding author
- 2) GBD 2019 Adolescent Transport and Unintentional Injuries Collaborators. Adolescent transport and unintentional injuries: a systematic analysis using the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet Public Health* in press
- 3) Hiraike, Y.\*, Yang, CT., Liu, WJ., Yamada, T. & Lee, CL.: *FTO* obesity variant-exercise interaction on changes in body weight and BMI: The

### NFIA は *cis* regulatory variant に対する作用を介してマウス近交系における *Ucp1* 発現の差を規定する



Taiwan Biobank study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2021; **106**(9): e3673-e3681. \*Corresponding author

- 4) Hiraike, Y., Waki, H., Miyake, K., Wada, T., Oguchi, M., Saito, K., Tsutsumi, S., Aburatani, H., Yamauchi, T. & Kadowaki, T.: NFIA differentially controls adipogenic and myogenic gene program through distinct pathways to ensure adipocyte differentiation. *PLoS Genetics* 2020; **16**(9): e1009044
- 5) Hiraike, Y., Waki, H., Yu, J., Nakamura, M., Miyake, K., Nagano, G., Nakaki, R., Suzuki, K., Kobayashi, H., Yamamoto, S., Sun, W., Aoyama, T., Hirota, Y., Ohno, H., Oki, K., Yoneda, M., White, AP., Tseng, YH., Cypess, AM., Larsen, TJ., Jespersen, NZ., Scheele, S., Tsutsumi, S., Aburatani, H., Yamauchi, T. & Kadowaki, T.: NFIA co-localizes with PPAR $\gamma$  and transcriptionally controls the brown fat gene program. *Nature Cell Biology* 2017; **19**(9): 1081-1092. [Highlighted in News and Views, *Nature Cell Biology* 2017; **19**(9): 1006-1007.]

### アディポネクチンの組織修復機構の解明

藤島 裕也

(大阪大学大学院医学系研究科)

#### 【背景】

脂肪細胞特異的分泌蛋白である Adiponectin (APN) は、GPI アンカー型膜蛋白 T-cadherin (T-cad) と特異的かつ高親和性に結合することで、大動脈の血管内皮細胞や腎臓の血管周皮細胞に集積し、臓器保護作用を發揮することを報告してきた。しかし、糖尿病網膜症に代表される細小血管障害に対する APN の作用については十分に明らかではない。

#### 【方法・結果】

まず、野生型マウス (WT), APN 欠損マウス (APN-KO), T-cad 欠損マウス (T-cad-KO) の網膜 Flat mount を用

いた免疫蛍光染色により APN の局在を検討した。WT の網膜において APN は細動脈から毛細血管移行部にかけての血管内皮に局在していたが、T-cad-KO では消失しており、APN は T-cad 依存的に網膜血管内皮細胞に集積すると考えられた。続いて、Streptozotocin (STZ) 誘発糖尿病モデルマウスを用いて糖尿病状態における網膜血管の APN の集積の変化を検討した結果、網膜血管内皮の APN は糖尿病発症後経時的に減少することが確認された。

糖尿病網膜症の病態早期では、単球接着因子発現の上昇に伴う血管内皮の leukostasis や Tight-Junction の破綻が生じることで、血管透過性亢進が惹起され、その後の病態進展に関与することが知られている。WT に STZ 負荷を行ったところ、糖尿病発症後 6 週の早期においても、コントロール群に比して、網膜血管の APN 集積は有意に減少しており、同部位における血管透過性亢進 (Hoechst の血管外漏出により評価) が認められた。また、STZ 群では単球接着因子である VCAM-1 発現上昇と、主要な Tight-Junction 蛋白である Claudin-5 発現減少が観察された。一方で、これらの変化はいずれも、SGLT2 阻害薬である Dapagliflozin の投与により回復したことから、高血糖依存的であると考えられた。

最後に、早期網膜症に対する APN の役割を検討するために、WT と APN-KO の比較を行った。非糖尿病状態においては網膜血管透過性に両軍で差は認められなかった。しかし、APN-KO では、WT に比して、STZ 負荷・糖尿病発症後 4 週のより早期の時点で、網膜血管内皮における VCAM-1 の発現上昇と Claudin-5 の発現の低下が認められ、有意な血管透過性亢進を呈していた。

#### 【考察】

APN は T-cad を介して網膜血管内皮に集積し、糖尿病網膜症の発症・進展に対して抑制的に作用することが示唆された (*Sci Rep* 2022) 現在 T-cad flox マウスを用いて、各血管構成細胞 (内皮細胞あるいは周皮細胞) 特異的な T-cad 欠損マウスを樹立しており、血管障害・動脈硬化症に対する APN/T-cad の役割をより詳細に検討する予定である。

## 1型糖尿病における CD8+ T細胞の分化制御機構の解明

宮地 康高

(九州大学病院)

### 【目的】

1型糖尿病は、膵島炎を病理学的特徴とする自己免疫疾患であり、CD8 + T細胞は膵島炎において最も多く認められる炎症細胞である。樹状細胞などの抗原提示細胞は膵島自己抗原を取り込み、CD4 + T細胞が認識する。CD4 + T細胞はヘルパー細胞 (Th1) に分化し、CD8 + T細胞が細胞障害性T細胞 (エフェクターT細胞) に分化するのを促進する。細胞障害性T細胞はインターフェロン (IFN) やパーフォリンを分泌してβ細胞を破壊する。

先行研究により、ナイーブCD8 + T細胞がエフェクターCD8 + T細胞に分化する際、複数の転写因子が協調して作用すると想定されており、転写因子FoxO1は主要なものとして知られている。ウイルス感染などの刺激により、ナイーブCD8 + T細胞におけるFoxO1の転写活性が低下するとエフェクターCD8 + T細胞に分化する。一方、FoxO1の転写活性が維持されることが、メモリーCD8 + T細胞に分化するために必須であることが報告されている。

助成者は1型糖尿病モデル (NOD) マウスから脾細胞を単離し、FoxO1阻害薬 (*Cell* 2017; 171(4): 824-835. e18.) の前処置後に抗CD3/CD28抗体で刺激し、3日後にFACS解析を実施した。コントロールのDMSO群と比較してFoxO1阻害薬投与群ではナイーブCD8 + T細胞の増加とメモリーおよびエフェクターCD8 + T細胞の減少が認められた。さらに、2種類のFoxO1阻害薬を用いた検討から、上記の実験系においてIFN $\gamma$ の分泌が抑制されることを見出した。以上の予備データを踏まえて、本研究では、1型糖尿病においてFoxO1阻害がCD8 + T細胞の分化を抑制するか否か、病態を改善させるか否かを検証する。

### 【方法】

#### 1) FoxO1 と T-bet の共免疫沈降アッセイ

助成者は、FoxO1阻害薬は、抗原刺激後のCD8 + T細胞内の転写因子T-betを抑制する予備データを得ている。T-betはT細胞分化のマスターレギュレーターであり、IFN $\gamma$ の制御することが知られている。HEK293細胞にFoxO1-FlagとT-bet (-GFP) 発現プラスミドを過剰発現させ、ビーズ付きFlag抗体により免疫沈降し、FoxO1とT-betにタンパク質間相互作用の有無を検討した。

#### 2) IFN $\gamma$ のプロモーターアッセイ

HEK293細胞にLucコンストラクトとT-bet発現プラスミドを導入し、FoxO1の転写活性阻害によるIFN $\gamma$ プロモーター活性の変化を比較した。

#### 3) NOD マウスへの FoxO1 阻害薬投与

糖尿病発症前のNODマウスにポンプを植え込み、FoxO1阻害薬を4週間持続投与した。経時的に血糖値を測定し、糖尿病の発症・進捗が抑制されるか否かを検討した。投与終了後に膵臓組織を採取し、残存β細胞面積と炎症細胞浸潤を評価した。

### 【結果】

#### 1) FoxO1 と T-bet の共免疫沈降アッセイ

HEK293細胞にFoxO1とT-betの発現プラスミドを過剰発現させてT-bet (FLAG) 抗体で免疫沈降をおこなった。図1に示す通り、T-betの濃縮には成功したが、FoxO1のバンドを確認できなかった。

以上から、この実験系でFoxO1とT-betのタンパク質間相互作用を確認することはできなかった。

#### 2) IFN $\gamma$ のプロモーターアッセイ

マウス脾臓をテンプレートとして、マウスIFN $\gamma$ プロモーターの転写開始点から約1.5kb上流をクローニングして、プロモーターアッセイをおこなった。過去の報告通り、転写因子T-betによりプロモーターの活性が2-3倍上昇した。これまでに、FoxO1は複数の転写因子や転写共役因子と協調して遺伝子発現を制御することから、T-betと同時に野生型FoxO1あるいは恒常的活性型FoxO1(AAA)あるいはドミナントネガティブFoxO1(D256)をHEK293細胞に導入したところ、FoxO1がT-bet誘導性のIFN $\gamma$ プロモーター活性に与える影響は軽微であることが確認された (図2)。

### 3) NOD マウスへの FoxO1 阻害薬投与

6 週齢の NOD マウスに浸透圧ポンプ (Alzet 1004) を植え込み, FoxO1 阻害薬を高容量あるいは低容量 (1/10) で 4 週間投与した. 4 週間の投与中に对照群を含め糖尿病を発症する個体はいなかった. また, いずれの容量でも FoxO1 阻害薬により, 体重増加に影響はなかった. 投与終了後に肝臓および膵臓を摘出し, それぞれ遺伝子発現と免疫染色を行い, FoxO1 阻害薬の作用を検証した. 肝臓の遺伝子発現解析では, 容量依存的に糖新生関連酵素 G6Pase の減少を認め (図 3), 膵臓の組織解析では,  $\beta$  細胞の残存面積ならびにリンパ球

(CD3, CD4, CD8) の浸潤に明らかな差は認めなかった. 以上から, 4 週間の FoxO1 阻害薬投与に忍容性があることが確認された.

#### 【考察, 今後の方針】

本年度は, *in vitro* で転写因子 FoxO1 と転写因子 T-bet の相互作用の視点から遺伝子制御の解明に取り組んだ. 現時点ではっきりとした手がかりが得られているわけではないが, 次年度では FoxO1 阻害薬による T-bet の翻訳後修飾 (リン酸化, ユビキチン化など) に変化が無いかな否かを検証する予定である. また, FoxO1 阻害の前後で CD8 + T 細胞の網羅的な転写産物解析や代謝産物解析を行い, FoxO1 阻害による T 細胞分化への影響を探索する.

また, *in vivo* の検討では, 高容量の FoxO1 阻害薬の投与に忍容性があったことから, 投与時期や投与期間を変えて, FoxO1 阻害薬により 1 型糖尿病の発症に影響があるか否かを検証する予定である.

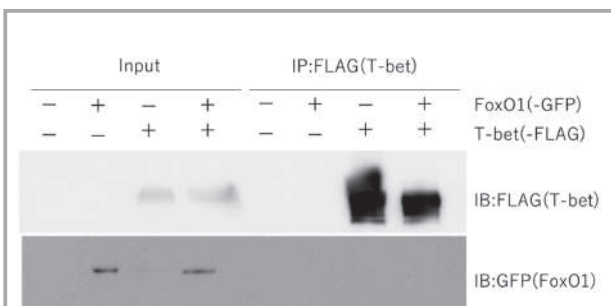


図 1 FoxO1 と T-bet の共免疫沈降

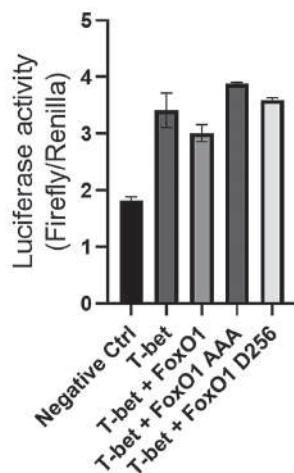


図 2 IFN $\gamma$  プロモーター解析

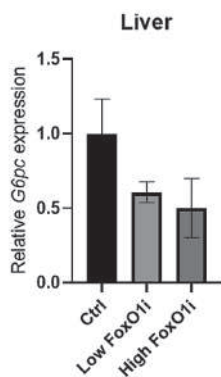


図 3 FoxO1 阻害薬投与後肝臓の遺伝子発現解析

#### 非侵襲的膵 $\beta$ 細胞イメージング技術を用いた, 膵 $\beta$ 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)

#### 【背景・目的】

本邦では軽微な肥満であっても糖尿病を発症する患者が急増しており, 耐糖能異常が出現する段階から既に膵  $\beta$  細胞量 (BCM) は減少していることが報告されている. このため, 糖尿病の発症・重症化予防のためには, BCM を指標に, より早期に介入することが有用と考えられる. また, BCM の減少は, 食事・薬物など各種治療効果の減弱または治療抵抗性の可能性に直結するため, BCM の減少を予防, または維持・回復させることが求められる. 我々は, 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  $\beta$  細胞イメージング技術を開発し, Positron emission tomography (PET) や Single photon emission tomography (SPECT) での生体マウス膵描出, 同法

を用いた BCM 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。Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) は高脂肪食 (HFD) 誘発性肥満に寄与することが知られているが、GIP の BCM への影響については未だ議論されている。本研究では独自のインジウム 111 ( $^{111}\text{In}$ ) 標識 exendin-4 SPECT/CT を応用し、HFD による肥満誘導と BCM の関係に GIP 分泌の有無が与える影響を調べた。

#### 【方法】

6 週齢の野生型 (WT) マウスと GIP 欠損 ( $\text{GIP}^{-/-}$ ) マウスを各々通常食 (CFD) 投与群 (WT+CFD,  $\text{GIP}^{-/-}$ +CFD) または 45% HFD 投与群 (WT+HFD,  $\text{GIP}^{-/-}$ +HFD) に分け、10 週間、体重と摂餌量、経口ブドウ糖負荷試験を含む耐糖能評価、インスリン負荷試験 (ITT)、CT による体脂肪量解析および  $^{111}\text{In}$ -exendin-4 SPECT/CT 撮像を行った。

#### 【結果】

WT+HFD は他群と比較して 10 週齢以降有意な体重増加、血中 GIP・インスリン濃度の有意な上昇を認めた。また WT+HFD は他群と比較して体脂肪量が多く、ITT での血糖値変化が小さかった。 $^{111}\text{In}$ -exendin-4 SPECT/CT 撮像結果では、WT+HFD は、WT+CFD と比較して、10 - 16 週齢で膵 RI 集積値が有意に高かった。一方、 $\text{GIP}^{-/-}$ +HFD は WT+CFD と比較して、10 週齢では膵 RI 集積値に有意差は認めず、16 週齢で  $\text{GIP}^{-/-}$ +HFD の膵 RI 集積値が有意に高かった。WT+HFD と  $\text{GIP}^{-/-}$ +HFD との比較では、WT+HFD の膵 RI 集積値が 10 週齢以降有意に高値であった。

#### 【結語】

$^{111}\text{In}$ -exendin-4 SPECT/CT により、HFD による肥満誘導と BCM の関係に GIP 分泌が与える影響が明らかになった。

#### 【文献】

Kiyobayashi, S., Murakami, T. *et al.*: Noninvasive Evaluation of GIP Effects on  $\beta$ -Cell Mass Under High-Fat Diet. *Front Endocrinol (Lausanne)*, **13**, 921125 (2022).

### 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

(筑波大学医学医療系)

#### 【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。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】

##### (1) *Usp46* 欠損マウスの解析

これまでに *Usp46* 欠損マウスは若齢期に低体重を示すことが判明している。この *Usp46* 欠損マウス成体における体重変化を検証したところ、野生型マウスとの体重差は生後 4 週以降、8-12 週齢にかけて小さくなる傾向が認められた。しかしその後、15 か月齢まで長期飼育したマウスでは体重差が増加に転じ、*Usp46* 欠損は老齢期の低体重にも関連することが判明した。

##### (2) USP46-BioID-KI マウスを用いた *in vivo* BioID

昨年度実施の *in vivo* BioID 解析により見出した USP46 の基質候補について、*Usp46* 欠損マウス脳におけるタンパク発現を検証した。その結果、抑制性神経伝達を担う GABA<sub>A</sub> 受容体の  $\alpha 1$  サブユニット (GABRA1) の発現低下が認められた。GABRA1 欠損マウスは若齢期に低体重を示すことが報告されており、USP46 が GABRA1 を安定化し体重の制御に関与する可能性が考えられた。

##### (3) USP46 変異マウスの作製

USP46 と高い相同性を有する USP12 は、脱ユビキチン化活性非依存的な機能をもつ。*Usp46* 欠損マウス



の表現型が酵素活性依存的であるか検証するため、酵素活性を持たない USP46-C44S 変異マウスと、Cofactor である WDR48 との結合能を失った USP46-Q236A, E237A 変異マウスを作製中である。後者は既に目的の変異を有する F0 マウスを得ている。

#### 【今後の展開】

Usp46 欠損マウスの摂食量やその他代謝表現型を検証する。USP46 変異マウスと、昨年度より作製中の脳特異的 USP46 欠損マウスの表現型解析を実施する。また USP46 による GABRA1 タンパク発現制御について解析を進めていく予定である。

### ネットワークメタアナリシスによる糖尿病の最良の治療選択エビデンスの確立：人工知能による臨床エビデンスの統合と体系化

山田 朋英

(東京大学)

#### 【目的】

本研究は人工知能を用いたヘルスケアの個別化アプローチと集団的アプローチの統合と展開への挑戦を目標とし、以下のプロジェクトを中心に進めた。

#### 【方法と結果】

##### 1. ヘルスケアの個別化アプローチ

###### ○ Precision Nutrition

精密栄養（精密治療）は、最適な健康のための栄養素の必要量、生活習慣が個人間で大幅に異なるという認識に起因する考え方である。我々は、ある個別の食生活や生活習慣によってその後の生存期間が改善するという個人を人工知能でクラスター化するためのアルゴリズムを開発した。つまりある種の食事や生活習慣介入を個別に提案し、また薬剤反応性が個人で異なるという点で、最適な個別薬剤介入の設計も行う。また、心電図やエコー、脈波、音声などの生体情報をより精密に反映するモデルを構築していく。

###### ○ Dynamic Treatment Regimes

最良の個別化治療の提案と、糖尿病専門医と同じ処方パターンを提案できる AI を作る。Dynamic Treatment Regimes は、ある状態の各糖尿病患者さんに最適の治

療法を強化学習（Q-Learning）で予測するものである。単に今ある治療法を選ぶのではなく、その結果こうなった場合にはどのように治療するか、など、あたかも将棋の手を読むかのように動的に予測する。我々は糖尿病治療のアドヒアランスの継続の価値を最大化するモデルを作成検証した（ISPOR 他）。さらに現在は糖尿病専門医と同じ処方パターンを提案できる AI 構築準備を進めている。

##### 2. ヘルスケアの集団的アプローチ

###### ○ Real-time Systematic Review and Meta-analysis の実現化

システマティックレビュー・メタアナリシスは臨床ガイドラインの礎である。この一連のプロセスを人工知能に自動化させ、常に最新の臨床治験をアップデートする研究を進めている。我々は深層学習の技法を用い文献検索の 10 倍の省力化を報告した（JMIR）。また、メタアナリシスの国際共同研究に参加した（Nature 他）。本研究の発展により全疾患領域で、現時点で最もエビデンスレベルが高い臨床知見を迅速かつ精密に提供することができる。ネットワークメタ解析に関し多くの報告を行った（Diabetes Care 他）、その成果は米国内科学会の ACP-Journal Club (Annals of Internal Medicine) や米国の救急治療ガイドラインに引用され、現場の臨床医の治療方針の意思決定に寄与した。

#### 【考察】

人間の経験値・暗黙知を学んだ人工知能が代行することで人類はより創造的かつ生産的な作業に従事することが可能となる。

## N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ V (GnT-V)

### 【はじめに】

糖鎖はグルコースなどの単糖が鎖状に繋がったものであり、核酸・タンパク質に並ぶ第三の生命鎖として近年注目されている。50%以上のタンパク質は、糖鎖による修飾を受けた糖タンパク質として存在しており、付加する糖鎖の構造により溶解性や安定性が変化する。糖タンパク質上の糖鎖の構造異常は、がん、アルツハイマーや糖尿病など様々な疾患の発症や悪性化に関与している。これらの糖鎖を形作っているのが糖転移酵素であり、現在ヒトでは約 180 種類ほどが知られている。

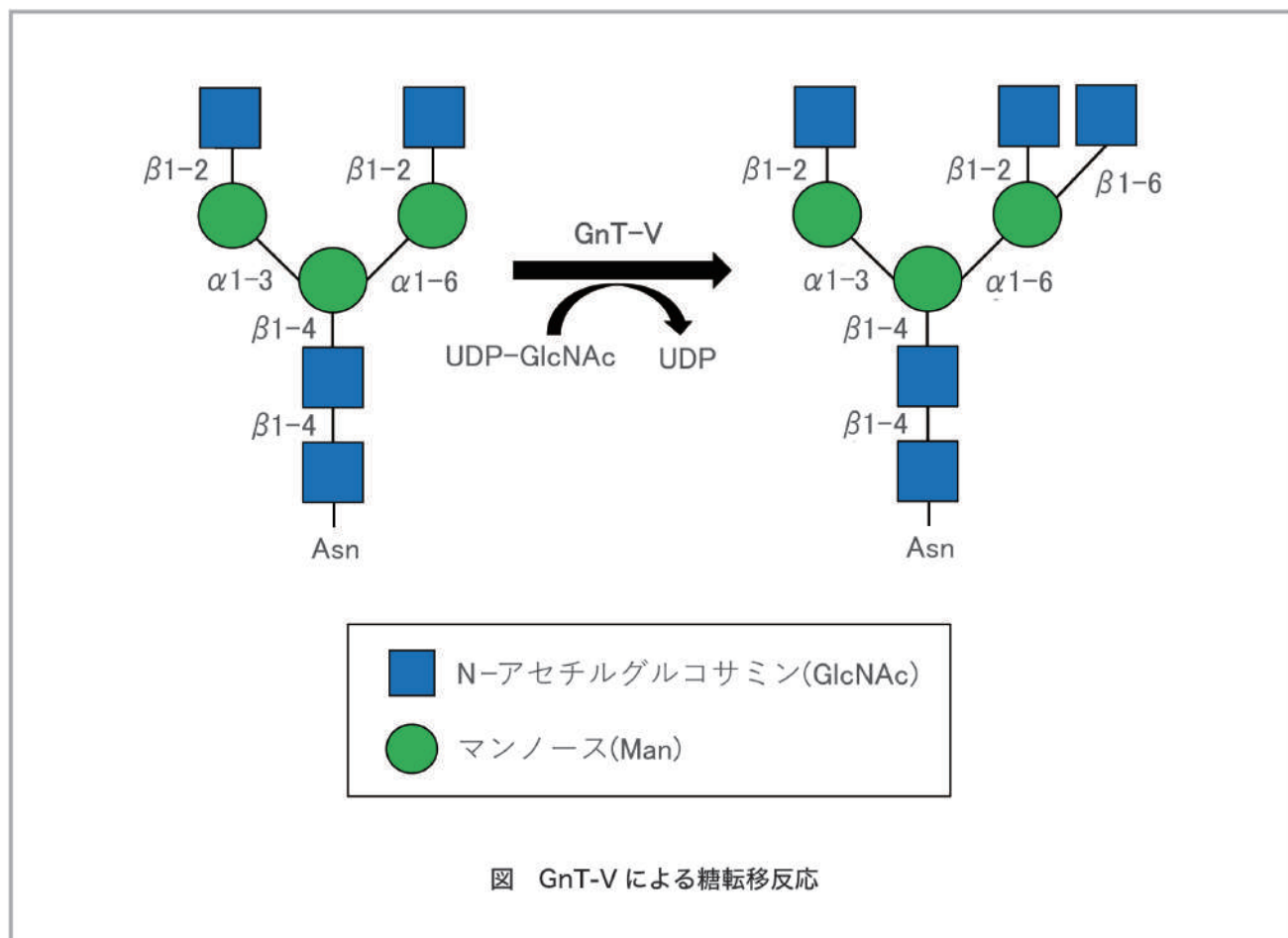
本稿では、糖転移酵素の一種である N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ V (GnT-V) について、その特徴や基質選択性の仕組み、疾患との関わりについて概説する。

### 【GnT-V の酵素反応と特徴<sup>1)</sup>】

GnT-V は、 $\alpha$ 1-6 結合したマンノース (Man) に  $\beta$ 1-6 結合で N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) と呼ばれる糖をタンパク質上の糖鎖に付加する糖転移酵素である (図)。この GlcNAc が付加することで糖鎖に分岐構造が生じ、その先へさらに糖鎖が伸長できるようになる。GnT-V は、他の GlcNAc 糖転移酵素 (Gnt- I, II, III, IVa, IVa など) とは異なり、多くの脊椎動物糖転移酵素に共通する糖結合モチーフである Asp-x-Asp (DXD, X は任意のアミノ酸残基) を欠いていることや、その触媒反応は金属に非依存であることなど、ユニークな特徴を有している。

### 【GnT-V の基質選択性の仕組み<sup>1,2)</sup>】

GnT-V の変異体解析により、E297 と E526 の 2 つの



グルタミン酸を変異させると酵素活性が失われることから、これら2つが触媒作用に不可欠であることが示されている。GnT-Vの内部は4つのドメインから成る十字型の構造を有しており、酵素反応が行われる中央の構造は狭く深い窪みになっている。GnT-Vは、その特徴的な窪みにより基質となるオリゴ糖を選択していることが示唆されている。複合体結晶構造解析により、窪み部分に存在するF380とW401の2つの芳香環が基質となるアクセプター糖鎖(GlcNAc $\beta$ 1-2Man $\alpha$ 1-6Man)を挟むように接触していることが確認されている。アクセプター糖鎖に含まれる二糖単位(GlcNAc $\beta$ 1-2Man)は $\alpha$ 1-3結合したManと $\alpha$ 1-6結合したManの両方に共通して存在するが、GnT-Vは $\beta$ 1-6結合のGlcNAcを $\alpha$ 1-3結合したManには付加せず、 $\alpha$ 1-6結合したManのみに選択して付加する。ドッキングモデルにより、GnT-Vと $\alpha$ 1-3枝の3糖単位(GlcNAc $\beta$ 1-2Man $\alpha$ 1-3Man)を重ね合わせると、 $\beta$ 1-4結合したManがW401の芳香環と立体的に衝突していることから、W401が $\alpha$ 1-6分岐したManを特異的に選択することに寄与していることが示唆されている。

また、GnT-Vは上記のアクセプター糖鎖を有するすべてのタンパク質に作用するわけではなく、特定のタンパク質を選別して作用する。GnT-Vには、触媒作用とは無関係と考えられるN末端側のドメイン(Nドメイン)が存在するが、Nドメインを欠失させると糖タンパク質に対するGnT-Vの活性は低下する。GnT-Vと糖タンパク質基質とのドッキングモデルから、GnT-VのNドメインが、糖タンパク質基質のタンパク質部分と直接相互作用しており、作用するタンパク質の選別に寄与している可能性が示唆された。

### 【GnT-Vの機能調節および疾患との関わり<sup>3-7)</sup>】

GnT-Vは、様々ながんの発症、増殖や転移に関与していることが報告されている。例えば、ポリオーマウイスミドルT抗原遺伝子により乳腺腫瘍を誘導するモデルマウスにおいては、GnT-Vを発現する野生型やヘテロマウスと比較してGnT-Vを発現しないGnT-V KOマウスでは、腫瘍の発症が遅れることや腫瘍のサイズが小さくなること、転移率が著しく低くなることが確認されている。また、大腸がん患者においては、がん組織中に

GnT-Vを発現する患者は発現しない患者と比較して遠隔転移率が高くなることや生存率が低くなることが示されている。

GnT-Vにより $\beta$ 1-6分岐が加えられた糖タンパク質は、どのようにがんの増殖や転移を引き起こすのであろうか。例えば、細胞の増殖や成長に関わるタンパク質であるEGFRがGnT-Vにより $\beta$ 1-6分岐糖鎖を発現すると、急速なエンドサイトーシスから逃れられるようになり、EGFRによる細胞増殖のシグナル伝達が延長され、結果的に細胞の増殖が促進される。また、マトリプターゼは、GnT-Vにより $\beta$ 1-6分岐糖鎖が形成されると分解に抵抗性を示し、活性が持続することで、がん浸潤エフェクターであるウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベータや肝細胞増殖因子の活性を亢進させ、がんの転移浸潤が促進する。

最近、GnT-Vによる $\beta$ 1-6分岐糖鎖の産生制御のメカニズムの一部が解明された。一般的に、GnT-Vをはじめ各種糖転移酵素は、ゴルジ体に局在し糖鎖の付加を行うが、シグナルペプチドペプチダーゼ様3というプロテアーゼに切断されると細胞外へ分泌される。多くのN型糖タンパク質には末端にシアル酸と呼ばれる糖が付加されているが、シアル酸を欠損させた細胞では、シグナルペプチドペプチダーゼ様3を介したGnT-Vの細胞外への分泌が抑制され、細胞内に留まることでGnT-Vにより合成される $\beta$ 1-6分岐の糖鎖の量が増加することが分かった。老化した細胞では、シアル酸量が徐々に減少することが報告されていることから、GnT-Vが細胞内に留まり $\beta$ 1-6分岐の糖鎖の量が増加している可能性がある。これらから、GnT-Vは老化によるがんの発症や悪性化メカニズムの一部を担っている可能性がある。

### 【おわりに】

近年、様々な糖転移酵素が疾患と深く関わっていることが判明している。例えば、今回紹介したGnT-Vと同じく糖鎖上に分岐を作る酵素であるGnT-IIIではアルツハイマー、GnT-IVaでは糖尿病、Fut8ではがんや慢性閉塞性肺疾患への関与が示されている。GnT-Vの例からも、糖転移酵素を創薬ターゲットとすることにより、疾患に関連した複数のタンパク質の活性を調節し得ることが伺える。しかし、糖転移酵素の立体構造や基質選択

性の仕組みは十分に解明されておらず、特異性の高い薬剤設計が課題となる。今後、さらに様々な糖転移酵素の詳細な解析が成され、画期的な新薬開発への糸口となることに期待したい。

#### 【参考文献】

- 1) Nagae, M. *et al.*: Structure and mechanism of cancer-associated N-acetylglucosaminyltransferase-V, *Nat. commun.*, **9**, 3380 (2018).
- 2) Osuka, RF. *et al.*: N-acetylglucosaminyltransferase-V requires a specific noncatalytic luminal domain for its activity toward glycoprotein substrates, *J. Biol. Chem.*, **298**(3), 101666 (2022).
- 3) Granovsky, M. *et al.*: Suppression of tumor growth and metastasis in Mgat5-deficient mice, *Nat. Med.* **6**, 306(2000).
- 4) Murata, K. *et al.*: Expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in colorectal cancer correlates with metastasis and poor prognosis, *Clin. Cancer Res.*, **6**, 1772(2000).
- 5) Partridge, EA. *et al.*: Regulation of cytokine receptors by Golgi N-glycan processing and endocytosis, *Science*, **306** (5693),120-124 (2004).
- 6) Shinji, I. *et al.*: Prometastatic effect of N-acetylglucosaminyltransferase V is due to modification and stabilization of active matriptase by adding beta 1-6 GlcNAc branching, *J. Biol. Chem.*, **277**(19), 16960 (2002).
- 7) Hirata, T. *et al.*: Shedding of N-acetylglucosaminyltransferase-V is regulated by maturity of cellular N-glycan, *Commun. Biol.*, **5**, 743 (2022).

#### 【著者】

田辺三菱製薬株式会社 創薬本部 モダリティー研究所  
神藤 彩加  
田辺三菱製薬株式会社 創薬本部 モダリティー研究所  
小寺 淳

## ネクロプトーシスの実行因子MLKL

### 【序】

個体発生や生命の恒常性維持において、細胞死が重要な働きを担っている。細胞死は形態学的にアポトーシス、オートファジー細胞死、ネクローシスの3種類に分類される。そのなかでネクローシスは化学的・物理的な刺激に対して偶発的に生じる細胞死と考えられており、細胞の膨張や破裂を特徴としている。近年になり、ネクローシスに類似した形態的特徴を持つが、細胞内で遺伝子発現やシグナル伝達を介して生じる能動的な細胞死の存在が明らかになり、ネクロプトーシスと名付けられた<sup>1)</sup>。以後、ネクロプトーシスのメカニズムや生理的意義等についての理解が急速に進み、mixed lineage kinase domain like pseudokinase (MLKL)がこの経路の最終実行因子であることが明らかにされた。本稿ではMLKLに焦点を当て、その機能や創薬標的としての可能性について述べる。

### 【ネクロプトーシスとMLKLの機能】

ネクロプトーシスとは、ネクローシスと同様に細胞の

膨潤と細胞膜構造の破綻という形態学的特徴を有する細胞死である。ネクロプトーシスは腫瘍壊死因子 (TNF) や Fas リガンド、インターフェロン、Toll 様受容体 (TLR) 等から刺激を受けて引き起こされる (図 1)。各種の刺激を受けて receptor interacting serine/threonine kinase 1 (RIPK1) や RIPK3 が活性化され、RIPK1/RIPK3/MLKL がネクロソームと呼ばれる複合体を形成する。ネクロソームにおいて RIPK3 によってリン酸化された MLKL は多量体を形成し、細胞膜に移行して細胞膜の透過性亢進や崩壊を引き起こす。また、細胞膜の破壊に伴い damage-associated molecular patterns (DAMPs) と呼ばれる細胞内分子が放出され、炎症反応が惹起される<sup>2)</sup>。

MLKL および RIPK1, RIPK3 のドメイン構造を図 2 に示す。MLKL は N 末端側の 4 ヘリックスバンドル (4HB) ドメイン、2つの  $\alpha$  ヘリックスからなるブレース領域、C 末端側のシュードキナーゼドメインで構成される。通常プロテインキナーゼには酵素活性に必要な3つのモチーフ (VAIK, HRD, DFG) が存在する

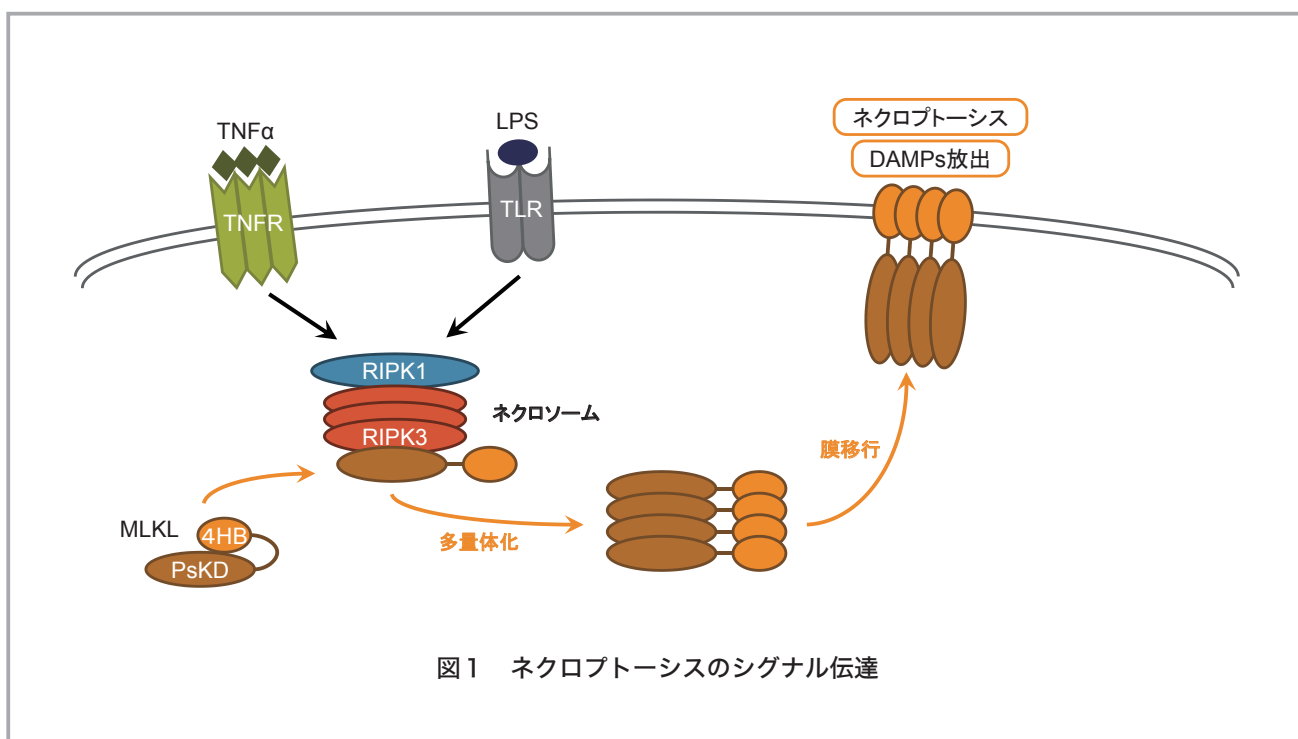


図1 ネクロプトーシスのシグナル伝達

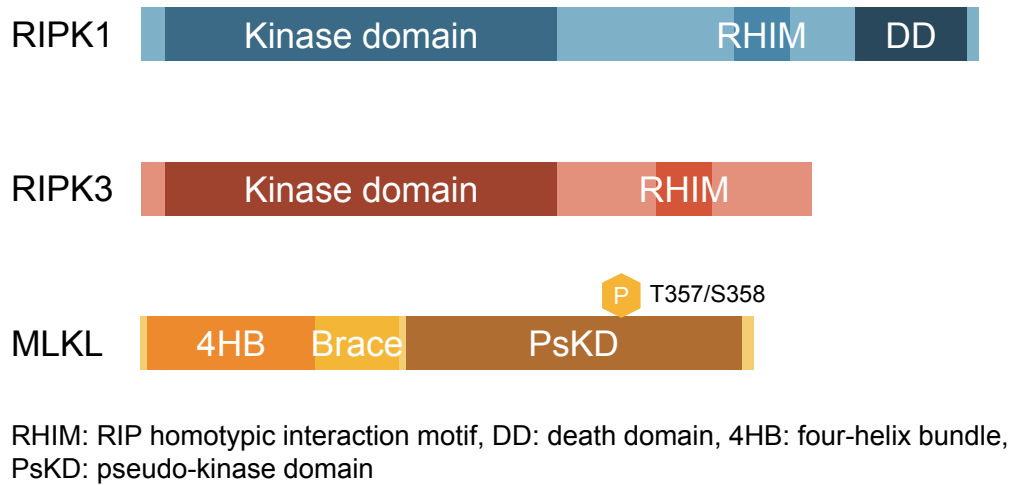


図2 MLKL, RIPK1, RIPK3 のドメイン

が、MLKLは触媒ループ上のHRDモチーフ、金属イオンと相互作用するDFGモチーフを持たないため、酵素活性が無いシュードキナーゼと分類されている。ネクロプトーシスのシグナル伝達経路において、活性化されたRIPK3のキナーゼドメインとMLKLのシュードキナーゼドメインが結合し、RIPK3によってThr357とSer358がリン酸化される。シュードキナーゼドメインがリン酸化されると構造変化が起こり、MLKLの多量体化が促進される。一方ATPとの結合に必要なVAILモチーフはシュードキナーゼドメイン内に存在し、ATPとの結合活性は保持されている。MLKLの機能に及ぼすATPの作用には不明な点が多いが、ATP結合によってMLKL単量体が安定になることが報告されており、MLKLの活性化を制御する可能性が示唆されている<sup>3)</sup>。

4HBドメインはネクロプトーシスを実行する役割を担っている。4HBドメインを欠損したMLKLは細胞死を誘導できないが、細胞質内で多量体化できるように修飾されたヒト4HBドメインのみを強制発現させると、膜移行してネクロプトーシスを引き起こすことが知られている<sup>4)</sup>。ネクロプトーシスのシグナル伝達過程において、RIPK3によってリン酸化されたMLKLは立体構造が変化し、4HBドメインが露出されて多量体を形成する。4HBドメインは細胞膜のホスファチジルイノシトールリン酸と相互作用することによって膜移行を促進し、

細胞膜上でさらに高親和性結合部位を露出して安定した構造を保つ<sup>5)</sup>。細胞膜上でのMLKLの高次構造情報は無く、細胞死を引き起こす詳細なメカニズムは不明なままであるが、細胞膜に数nmの開口部を形成するような構造をとってイオンチャネルとして機能する可能性が報告されており、マグネシウムイオン等が細胞内へ流入することによって最終的に細胞の膨潤と細胞膜の破綻を起こすと考えられている。

#### 【創薬標的としてのMLKL】

ネクロプトーシスの生理的役割のひとつは病原体に対する防御機能と考えられている。すなわち、ウイルスや細菌に感染された細胞がネクロプトーシスを起こすことによって感染の拡大を防ぐ作用と、DAMPsを放出することによって宿主免疫を活性化する作用の双方によって宿主防御機能を担っている<sup>6)</sup>。他方で、虚血性疾患、神経変性疾患や自己免疫疾患などにおいて、ネクロプトーシスによる組織損傷と炎症の増悪化が病態の発症・進展に関与することが報告されている<sup>7)</sup>。そのなかでも有効な治療法が少ない疾患において、ネクロプトーシスの経路を制御する薬剤が新規治療薬となることが期待されており、例えばRIPK1阻害剤SAR443820/DNL788が筋萎縮性側索硬化症を対象として、SAR443122/DNL758が皮膚エリテマトーデスを対象としてそれぞれ第2相

臨床試験が進められている。

MLKLを直接の標的とした薬剤の開発に関してはこれまでほとんど報告が無い。これはMLKLが酵素活性を持たないシュードキナーゼであり、多量体化することによって細胞死を起こすメカニズムであるため、低分子化合物ではMLKLの機能を十分に抑制することが困難であることが理由として考えられる。MLKLはネクロプトーシスの最終実行因子であるため、ネクロプトースとの関連が強い疾患においてMLKLを標的とした治療薬は強力な病態改善効果を持ち副作用の少ない薬剤となる可能性がある。今後、MLKLの詳細な機能解析や疾患との関連性についての研究の深化を注視するとともに、ネクロプトースを制御する治療薬の臨床応用や、新たな創薬手法の発展によるMLKLを標的とした薬剤の創出に期待したい。

#### 【参考文献】

- 1) Degterev, A. *et al.*: Chemical inhibitor of non-apoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol.* 2005; **1**(2): 112-9.
- 2) Seo, J. *et al.*: Necroptosis molecular mechanisms: Recent findings regarding novel necroptosis regulators. *Exp Mol Med.* 2021; **53**(6): 1007-1017.
- 3) Petrie, EJ. *et al.*: Conformational switching of the pseudokinase domain promotes human MLKL tetramerization and cell death by necroptosis. *Nat Commun.* 2018; **9**(1): 2422.
- 4) Tanzer, MC. *et al.*: Evolutionary divergence of the necroptosis effector MLKL. *Cell Death Differ.* 2016; **23**(7): 1185-97.
- 5) Quarato, G. *et al.*: Sequential Engagement of Distinct MLKL Phosphatidylinositol-Binding Sites Executes Necroptosis. *Mol Cell.* 2016; **61**(4): 589-601.
- 6) Mocarski, ES. *et al.*: True grit: programmed necrosis in antiviral host defense, inflammation, and immunogenicity. *J Immunol.* 2014; **192**(5): 2019-26.

- 7) Khoury, MK. *et al.*: Necroptosis in the Pathophysiology of Disease. *Am J Pathol.* 2020; **190**(2): 272-285.

#### 【著者】

田辺三菱製薬株式会社 創薬本部 免疫炎症創薬ユニット  
 杉本 貴彦  
 田辺三菱製薬株式会社 創薬本部 免疫炎症創薬ユニット  
 柳田 哲哉

