

研究助成 業績報告集

2019 年度

公益財団法人 小柳財団

創立者あいさつ

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

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

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

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



公益財団法人 小柳財団
設立代表者 小柳 昌之

財団概要

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

役員一覧

評議員	小柳昌之
評議員	知野秀雄
評議員	石川和則
理事長	大倉一郎
理事	蟻川芳子
理事	小柳典子
監事	宮崎一成

2019 年度 研究助成選考委員名簿

財団役職	氏 名	経 歴
選考委員長	小澤 俊彦	放射線医学総合研究所 名誉研究員 昭和薬科大学 酸化ストレス研究室 特任教授
選考委員	蟻川 芳子	日本女子大学 名誉教授 (前日本女子大学学長・理事長)
選考委員	大倉 一郎	東京工業大学 名誉教授 (前東京工業大学副学長)
選考委員	上村 みどり	帝人ファーマ株式会社 生物医学総合研究所創薬化学研究所 上席研究員
選考委員	畑中 研一	東京大学 生産技術研究所 教授
選考委員	三原 久和	東京工業大学 生命理工学院 教授

● 研究助成業績報告集 ●

2019年度

[2019年4月1日～2020年3月31日]

公益財団法人 小柳財団

目 次

- 1 非構造性概日時計たんぱく質を調節する有機分子の創製 P.8
研究者 > 信州大学 学術研究院 ケミカルバイオロジー研究室：大神田 淳子

 - 2 尋常性白斑における免疫担当細胞・マクロファージの
分極制御による治療法の開発 P.9
研究者 > 京都府立大学 大学院：南山 幸子

 - 3 ウレミックスサルコペニアの予防・治療法に関する研究 P.10-11
研究者 > 東北大学：佐藤 恵美子

 - 4 新規認知症モデルマウスを用いた生理的刺激の
疾患発症・進展に対する影響の評価 P.12
研究者 > 国立精神・神経医療研究センター：荒木 敏之

 - 5 美しい歩行を損なう変形性関節症に対する
分子標的療法開発を目指す基礎研究 P.13-14
研究者 > 岡山大学：久保田 聡

 - 6 脂肪細胞が分泌するエクソソームによる骨格筋細胞の制御 P.15-16
研究者 > 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構：尾嶋 孝一

 - 7 ヘム合成の活性化による新規脂肪代謝制御法の開発 P.17-18
研究者 > 東京工業大学 生命理工学院：小倉 俊一郎

 - 8 高機能化タンパク質ハイドロゲルの創出と
三次元生体組織構築への応用 P.19-20
研究者 > 東京工業大学 生命理工学院：小島 英理
-

9	生体酸化ストレス評価のための銀イオン交換ゼオライトの 合成と活性酸素種生成の定量的解析	P.21
研究者 > 東京工業大学 物質理工学院：馬場 俊秀		
10	理論的予測法の汎用性を実証するためのGPCRの X線結晶構造解析	P.22
研究者 > 関西医科大学：小林 拓也		
11	白色脂肪のベージュ化をメカニズムとする痩身食品の開発	P.23-24
研究者 > 芝浦工業大学 システム理工学部 生命科学科：越阪部 奈緒美		
12	特殊構造をもつペプチドの合成系酵素の構造解析と創薬利用	P.25
研究者 > 国立研究開発法人 理化学研究所 生命機能科学研究センター：田上 俊輔		
13	脂肪燃焼に対する機能性物質の添加効果および 活性酸素の影響の解明	P.26
研究者 > 東京工業大学 生命理工学院：蒲池 利章		
14	ユビキチン-プロテアソーム系活性化剤の抗老化作用に関する研究	P.27-28
研究者 > 富山大学 医学部：甲斐田 大輔		
15	マスト細胞とアレルギー親和性依存的浸潤細胞の クロストークによる皮膚ホメオスタシス制御機構	P.29-30
研究者 > 金沢大学 医薬保健研究域 薬学系：鈴木 亮		
16	脳の健康の維持を担う分子メカニズム	P.31-32
研究者 > 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 神経薬理研究部：村松 里衣子		
17	認知機能・活動量・血液マーカーを用いた「ストレス」の客観的評価	P.33-34
研究者 > 国立精神・神経医療研究センター 精神保健研究所 行動医学研究部：堀 弘明		
18	新規DNA修復活性測定法を利用した、がん予防薬・ 放射線障害治療薬としてのゲノム保護薬の開発	P.35
研究者 > 東北大学 加齢医学研究所 腫瘍生物学分野：吉野 優樹		
19	毛の発生と再生を制御する亜鉛シグナルの役割解明： 「健康と美」への新しい戦略構築	P.36
研究者 > 徳島文理大学 薬学部：深田 俊幸		

目 次

-
- 20 不活性型アデノシン受容体の特異的に認識する
機能性モノクローナル抗体の開発 P.37-38
研究者 > 千葉大学 大学院：小笠原 諭
-
- 21 生理活性を付与したペプチドマテリアルを利用した
骨芽細胞の培養と分化制御 P.39-40
研究者 > 東京工業大学：堤 浩
-
- 22 ペプチド-ピリドキサル型分子を利用するタンパク質標識化法の開発 P.41
研究者 > 東京大学 生産技術研究所：工藤 一秋
-
- 23 濫用される銀イオン検出用呈色試薬の開発 P.42
研究者 > 東京理科大学：宮村 一夫
-
- 24 エネルギー代謝からみたオメガ3脂肪酸による
心臓の若返りへの試み P.43-44
研究者 > 岐阜大学 大学院医学系研究科：小畑 孝二
-
- 25 ヒトORC1のグアニン四重鎖結合活性の
DNA複製開始における役割 P.45-46
研究者 > 日本女子大学 理学部 物質生物科学科：和賀 祥
-
- 26 大豆イソフラボンの骨格筋における脂質燃焼亢進
メカニズムの解明と疾患予防への応用 P.47-48
研究者 > お茶の水女子大学 基幹研究院：飯田 薫子
-
- 27 分子内の隣接カルボニル基の還元-酸化反応を利用する
再活性-再使用可能な有機還元剤分子の開発と洗練化 P.49-50
研究者 > 東京農工大学：岡本 昭子
-
- 28 腸内の細菌由来のエンドトキシンの定量的な
挙動解析とその高度利用 P.51-52
研究者 > 筑波大学：青柳 秀紀
-
- 29 近赤外光に応答して一酸化炭素を放出する生体適合性分子の開発
-ガス医療への利用に向けて- P.53-54
研究者 > 大阪市立大学：中島 洋
-
- 30 酸化マンガ表面におけるCr(Ⅲ)イオンの吸着と酸化 P.55-56
研究者 > 日本女子大学：宮崎 あかね
-

31 ストレスによる内側前頭皮質由来てんかん発作発症機構の
解明と治療薬の探求 P.57-58
研究者 > 金沢大学 医薬保健研究域 薬学系：金田 勝幸

32 リンパ球分化における新規代謝調節因子の機能解析 P.59-60
研究者 > 東京理科大学 生命医科学研究所：伊川 友活

33 TNF受容体型分子に着目したアレルギー発症の
新たなメカニズムの解明 P.61-62
研究者 > 東北大学 大学院 医学系研究科：奥山 祐子

34 樹状細胞の活性化を誘導する細胞外危険シグナルによる
抗腫瘍免疫誘導 P.63
研究者 > 岡山大学 大学院：古田 和幸

35 新規糖ペプチド解析法の開発と健康長寿マーカー探索への応用 P.64-65
研究者 > 東京都健康長寿医療センター研究所：津元 裕樹

非構造的概日時計たんぱく質を調節する 有機分子の創製

研究者 ▶ 信州大学 学術研究院 ケミカルバイオロジー研究室：大神田 淳子（おおかんだ じゅんこ）

【緒言】 天然変性たんぱく質 (IDPs) は、細胞内信号伝達系の調節に主要な役割を果たしている。加えて近年、液—液相分離によってたんぱく質合成などの過渡的な反応場の形成に関わることも明らかにされており、IDPs の生物学的な機能解明に向けて研究が進んでいる。しかし遺伝子組み換え型 IDPたんぱく質の実験的な扱いの難しさや構造情報の不足などの点から、IDP 標的創薬はもちろんのこと化学生物学的な研究はほとんど行われていない。本概日時計転写因子 Bmall および Clock は全長の 30% 以上が非構造領域である典型的な IDPs である。両者はヘテロ 2 量体を形成して E-box 配列 DNA に結合し、CRY、PER の発現を誘導するが、細胞内の CRY、PER が蓄積すると、今度は CRY/PER がヘテロ 2 量体を形成して Bmall/Clock の転写活性を抑制する。このように Bmall/Clock は哺乳類の 24 時間リズムの維持の中心的な役割を果たすたんぱく質であり、ヘテロ 2 量体形成を調節する化合物は概日時計機構解明の分子プローブあるいは不眠症等の創薬に向けたリードとして期待される。そこで本研究では、Bmall および Clock 両者のヘテロ 2 量体形成を分光学的手法により簡便に検出可能とするたんぱく質間相互作用 (PPI) 評価系の構築を目指した。さらにこの検出系を基盤とする HTS ライブラリスクリーニングを実施し、Bmall/Clock 相互作用阻害剤を見出すことを目的とした。

【結果と考察】 計算に基づき Bmall/Clock の PPIs には直接関与しないと予想した転写活性化領域を両者から除去し、それぞれの N 末端にチオレドキシニンおよび His タグを付与した遺伝子組み換え型モデルたんぱく質を設計した。モデルたんぱく質は大腸菌を形質転換して発現し、封入体の尿素変性、アフィニティカラム精製、及び透析による再構成を経て精製して得た。Bmall/Clock ヘテロ 2 量体形成能を FAM 修飾 E-Box オリゴ DNA への 2 量体依存的な結合に基づく蛍光偏光強度変化を指標として評価した結果、1:1:1 複合体を形成し、その際の解離定数は文献値と一致することを確認した。続いて、この *in vitro* 評価系に基づいた 96well フォーマット HTS スクリーニングを 1,780 個の芳香環化合物ライブラリに対して実施し、4 種類の基本骨格を有する化合物群に分類される 27 個のヒット化合物を見出した。そのうち化合物 1 について精査した結果、1 は濃度応答的な阻害活性を示し、zinc finger の GC Box 結合試験を用いた評価によりその活性は Bmall/Clock 選択的であることが明らかになった。また 1 の構造類縁体による構造活性相関を検討した結果、1 の求電子性と阻害活性に相関関係があり、たんぱく質と不可逆的に反応する可能性が示唆された。このことは HPLC 解析および質量分析からも支持されている。以上、本研究では、概日時計転写因子の IDP モデルたんぱく質の取得と分光学的 *in vitro* PPI 評価系を確立し、96 ウェルフォーマットに展開したうえ化合物ライブラリスクリーニングを実施し、Bmall/Clock PPI を阻害する低分子化合物を見出すことに成功した [1]。現在、両者の PPI を直接観測可能なスクリーニング系の開発を検討しており、今後ヒット化合物のより詳細な分子間相互作用解析に生かしていくとともに、有望な化合物の細胞実験を行う予定である。また、本研究の一環としてジテルペン系天然物誘導体を用いたリン酸化 IDPs 変調剤の開発にも取り組み、クリック反応を用いた IDP 鋳型たんぱく質に対する中分子阻害剤の開発に成功した [2]。本研究により遺伝子組換え型 IDP モデルたんぱく質を切り口とする新しい IDP 化学生物学研究に向けて有益な知見を得ることができたと考えている。

文献

[1] Y. Hosoya, J. Ohkanda, et al. manuscript in preparation.

[2] R. Masuda, J. Ohkanda, et al. Chem. Asian J. 2020, 15, 742-747.

尋常性白斑における免疫担当細胞・マクロファージの分極制御による治療法の開発

研究者 ▶ 京都府立大学 大学院：南山 幸子（みなみやま ゆきこ）

① 研究の背景及び目的

尋常性白斑（別名：シロナマズ）は、皮膚色素をつくる部位の損失を不規則に引き起こす慢性的な皮膚疾患であり、皮膚科領域でも治療が困難であり、美容学的にも多大なストレスを感じる患者が多い。本疾患は後天性疾患であり、遺伝、自己免疫疾患、環境因子の複合作用であることが示唆されているが、その原因は明確になっていない。また、表皮において過酸化水素産生の亢進やそれを消去するカタラーゼ活性の低下も報告されており、メラノサイトの酸化還元動態の変化も一因ではないかと考えられている。そこで、マクロファージ（MΦ）がメラノサイトへの司令塔として作用し、その分極制御を可能にする薬剤が尋常性白斑を治療できるのではないかと考えた。本申請では、このような酸化還元動態に起因する治療薬剤の開発およびMΦへの分極とメラノサイトへの効果、その機構解明を明らかにすることを課題とした。MΦはM1（炎症性）、M2（抗炎症性）などに代表されるような表現型として分極し、そのバランスが重要とされている。本仮説を元に、いくつかの新規薬剤を合成し、MΦの分極制御および尋常性白斑のモデルとしてメラノサイトを用いた評価系について検討した。

② 研究方法

1) 新規化合物S-allyl glutathione (SAG) およびその誘導体をいくつか合成した。ラット骨髄由来MΦを用いて、naïve MΦ (M0)、LPS+IFN- γ 添加MΦ (M1)、IL-4+IL-13 添加MΦ (M2) に分極させ、新規薬剤が分極に影響するかを検討した。

2) 次に、これらMΦ分極に影響した上清と細胞への影響やメラニン合成の関係を調べるため、B16 マウスメラノーマ細胞を用いて、酸化ストレスによる細胞での評価系を確立することを試みた。紫外線から産生される一重項酸素の発生剤であるendoperoxide (EP) (100, 250 μ M) または過酸化水素 (5, 10 μ M) を α -MSH (0.1, 0.5, 5 μ M) 有無で刺激したB16 細胞に添加し、酸化ストレス動態を中心に検討した。

③ 研究成果

1) 分極MΦに対する新規化合物の効果

合成した約10 種類の新規薬剤のうちSAG はfM 以下でM2 分極マーカー（Mannose 受容体、chichinae など）を制御し、最も感度が高かった。M1 マーカー（iNOS、TNF- α ）はSAG と同様の強さの化合物があった。今回までの新規化合物の中でSAG を超えるものは見つからなかったが、今後、この活性評価を元に、構造活性相関を検討し更なる合成と検討を継続する。

2) B16 マウスメラノーマ細胞における酸化ストレスによる評価系の検討

一重項酸素の発生剤であるEP または過酸化水素をB16 細胞に添加したところ、SOD1 はEP により薬1/3 に減少、SOD2 は濃度依存性に著明に増加した。 α -MSH の添加ほどの濃度もSOD1 を約2 倍に増加、SOD2 はあまり変化がなかった。 α -MSH で刺激した細胞へのEP の添加は、濃度依存性にSOD1 を減少し、SOD2 を増加させる傾向であった。過酸化水素添加は α -MSH の添加の有無にかかわらず、SOD1 にはほぼ影響なかったが、SOD2 は10 μ M で減少した。その他尋常性白斑患者で減少していることが報告されている（Am J Pathol 169, 1652, 2006）catalase、microphthalmia-associated transcription factor (MITF) なども解析中であり、論文として今後まとめたい。本申請では、新たなマクロファージの分極制御化合物とメラノーマ細胞との相互反応による影響を検討するには至らなかったが、EP によるメラノーマ細胞への酸化ストレス応答の評価は新規性があり今後論文化するための展望が得られたことは貴財団に感謝の意を表したい。

ウレミックサルコペニアの予防・治療法に関する研究

研究者 ▶ 東北大学：佐藤 恵美子（さとう えみこ）

【研究背景・目的】

我が国は1970年代に高齢化社会へ突入し、その後も高齢化率は上昇し続け、現在は超高齢化社会へと突入した。そのため、医療や福祉など増加する高齢人口の問題に対応することが、緊急の課題となっている。加齢に伴い進行する筋量・筋力の低下をサルコペニアと呼ぶが、サルコペニアは容易に転倒を引き起こし、骨折・寝たきり・死亡リスクを高めるため、健康寿命の短縮や生活の質を低下させる原因となる。近年、我々は腎機能の低下とともに体内に蓄積する尿毒素が筋を萎縮させることを明らかにした。尿毒素が原因となるサルコペニアはウレミックサルコペニアと呼ばれており、死亡率と強く相関し、重大な臨床問題になっている。高齢者は腎機能が低下しているため、体内に尿毒素が蓄積し、サルコペニアを加速させていることが考えられる。しかしながら有効な治療薬や予防法がないのが現状であり、発症機序を解明し予防・治療法を確立することが課題となっている。これまでの我々の研究から、骨格筋内における代謝変調がサルコペニアの発症に関与していることを明らかにした (Sci Rep, Sato E et al, 2016)。そのため、骨格筋内における代謝変調を是正することがウレミックサルコペニアの予防・治療法になると考えた。これまでの報告から、代謝で重要な役割を果たすNAD⁺の前駆体であるニコチンアミドがウレミックサルコペニアの予防・治療薬になり得ると考えた。そこで本研究では、ニコチンアミドのウレミックサルコペニアの予防・治療効果を評価することを目的とした。

【研究方法】

本研究では、腎不全マウスによるin vivo 実験、細胞株を用いたin vitro 実験を行った。In vivo 実験では、ニコチンアミドの①予防効果と②治療効果を評価した (図1)。

腎不全マウスとしてアデニン誘発腎不全マウスを用いた。C57BL/6J マウスに0.2% アデニン食を6週間投与し、アデニン誘発腎不全マウスを作製した。①予防効果の評価では、アデニンの投与と同時にニコチンアミド (1.2%, 0.6%, 0.3%) を自由飲水で与えた。コントロールマウスにも同様にニコチンアミドを自由飲水で与えた。②治療効果の評価では、6週間0.2% アデニン食を投与後、ニコチンアミド (1.2%, 0.6%, 0.3%) を自由飲水で与えた。コントロールマウスにも同様にニコチンアミドを自由飲水で与え、下図のような群を作成した。

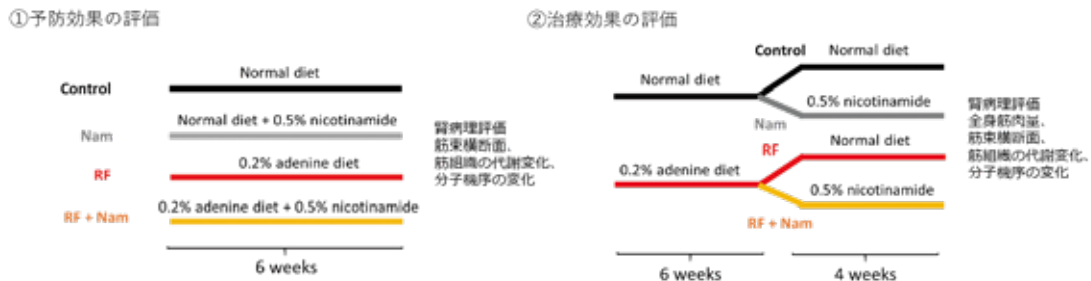


図1. アデニン誘発腎不全マウスを用いたニコチンアミドの予防・治療効果の実験スケジュール

各群のマウスから、血液、腎臓、筋肉を回収した。それぞれの臓器を対象とし、腎病理および筋病理を評価した。さらに、定量PCRにて腎臓、筋肉の炎症、線維化について評価した。

③In vitro 実験では、腎臓近位尿細管由来HK-2細胞を対象とした、尿毒素の影響およびニコチンアミドの効果の評価を行った。

【研究成果】

①ニコチンアミドによる予防効果

1.2% ニコチンアミドを投与することで、腎不全時に起こる体重減少、腎機能低下の抑制が認められた(図2)。

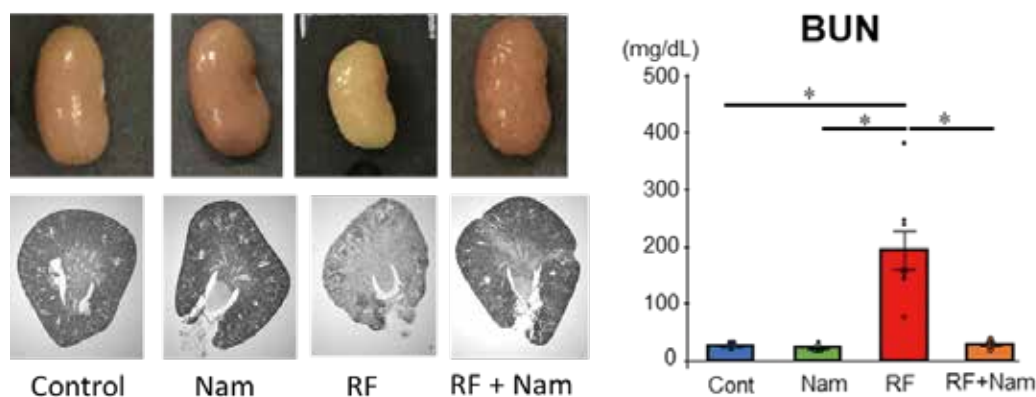


図2. アデニン誘発腎不全マウスの腎臓病理および、血中尿素窒素 (BUN) の変化

さらに、血中尿素窒素についても、RF 群では Control 群と比較して、有意に上昇していたが、RF+Nam 群では有意に低値を示した。また、筋束横断面も R 群では有意に低値を示したが、RF+Nam 群では有意に高値を示した。これらのことから、腎不全マウスにニコチンアミドを投与することで、腎機能低下が抑制され、サルコペニアが抑制されることが明らかとなった。0.3%、0.6% ニコチンアミドの投与効果については、現在データを解析中である。

②ニコチンアミドによる治療効果

アデニン誘発腎不全マウスに 1.2% ニコチンアミドを投与し、治療効果の評価をおこなったが、1.2% ニコチンアミドの場合、腎不全マウスが飲水を十分に行わなかったため脱水となり、正確な評価を行うことができなかった。しかし、アデニン誘発腎不全マウスに 0.3% ニコチンアミドを投与したところ、腎機能が改善し、尿毒素の蓄積の抑制を認めた。このことから、腎不全時にニコチンアミドを投与することで、腎機能低下が改善されることが示唆された。

③ HK-2 を対象とした In vitro 実験の結果

代表的な 6 種類の尿毒素の HK-2 細胞に対する毒性を MTT アッセイで評価した。その結果、6 種類のうち 4 種類の尿毒素が HK-2 細胞の生存率を有意に低下させた。さらに、この 4 種類を混合した尿毒素混合液を作成し、HK-2 細胞に対する毒性も評価した。尿毒素混合液では、100 μ M で 48 時間暴露することで有意に生存率が有意に低下することが明らかとなった。今後、ニコチンアミドの効果について評価を行う。

以上の結果から、腎不全マウスにニコチンアミドを投与することで、腎機能が改善し、サルコペニアも抑制することが示唆された。

新規認知症モデルマウスを用いた生理的刺激の疾患発症・進展に対する影響の評価

研究者 ▶ 国立精神・神経医療研究センター：荒木 敏之（あらかしゆき）

（緒言）アルツハイマー病の危険因子の一つは加齢であると考えられているが、その一方で、その分子レベルの実体は十分に解明されていない。本研究は、加齢と類似した変化を加速的に進行させることが明らかとなった「間欠的低酸素負荷（IHT）マウスモデル」を活用し、認知症をはじめとする神経変性疾患の発症または進行に関して、加齢がどのような影響を及ぼすのかを解明することを目的とした。従来の研究ツールでは、この問題に踏み込むことは難しかったが、本研究では、よりヒトの病状を反映すると期待されるモデルとして、ヒト型のアルツハイマー病関係タンパク質を生理的レベルで発現するモデル（ヒト型APPノックイン（AppNL-G-F KI）マウス、ヒト型タウノックイン（MAPT KI マウス）を用い、ストレスや老化に関連した刺激の意義に関する研究を行った。

（方法）IHTは睡眠時無呼吸症候群の実験モデルとして用いられている。IHTは、マウスのケージに対し、ガス注入用のチューブにマウスのケージに1分間窒素注入することで、ケージ内の酸素濃度を5%に低下させた。次に、ケージに2分間空気を注入することによってケージ内の酸素濃度を21%に上昇させた。この3分間のサイクルを1日8時間（8:30から16:30まで）行った。その後の16時間（16:30から翌朝8:30まで）、マウスは通常の酸素濃度（21%）で飼育した。このような実験手法により、実際にIHTを行ったマウスの体内では、酸素濃度低下に伴いヘモグロビンの酸素飽和度が60%ほどに減少し、酸素濃度の上昇に伴って酸素飽和度が正常値に戻ることが確認されている。この24時間のサイクルを4日間行った。

（結果）これまでの予備的な検討において、主として初代培養神経細胞を用いて、神経活動および神経活動依存的な新規遺伝子発現が、リン酸化タウの増減に影響を与えることを明らかにしてきた。本研究では、神経活動依存的な新規遺伝子発現に寄与するカスケードの変化が、リン酸化タウを持続的に増加させる可能性について検討し、CaMKK2というキナーゼに着目することにした。初代培養神経細胞において、CaMKK2の阻害剤および発現抑制を行うと、リン酸化タウが増加することを明らかにした。

上記の結果をもとに、CaMKK2の阻害剤をMAPT KIマウスの脳内に投与したところ、リン酸化タウが顕著に増加していることを明らかにした。またその際、リン酸化CREBが増加していることを明らかにした。また、この実験と並行し、リン酸化タウを増加させることが分かっている刺激、IHT負荷を行った。まず、先行研究と同様、負荷を行った直後に脳を摘出して解析したところ、リン酸化タウの増加を確認した。次に、負荷をかけた後、1ヶ月ほど通常環境で飼育したマウスの脳を調べたところ、リン酸化タウが増加しており、IHTが、リン酸化タウのレベルが増加した状態を持続させる可能性を明らかにした。なお、この時もリン酸化CREBが増加していた。

（考察）今後、CaMKK2の阻害剤投与、CaMKK2の発現抑制、もしくはIHTをMAPT KIマウスに対して行い、タウの凝集が認められるか、神経原線維変化の形成が見られるかを明らかにすることを旨とする。

この検証を進めるため、新たに二種類のマウスを作製する。一つは、ヒト型APPノックイン（hAPP-KI）マウスとhTau-KIマウスとを掛け合わせたマウスであり、既に作製を進めている。二つ目は、タモキシフェンを投与することにより神経細胞特異的にCaMKK2の発現を抑制できるhTau-KIマウスである。サルコシル不溶性タウの増加を指標に、リン酸化タウの増加とタウの凝集との関係を明らかにする。また、タウが凝集していく過程における記憶・学習への影響を明らかにするため、行動解析やシナプスタンパク質の発現、局在解析を行う予定である。

美しい歩行を損なう変形性関節症に対する 分子標的療法開発を目指す基礎研究

研究者 ▶ 岡山大学：久保田 聡（くぼた さとし）

①研究の背景及び目的

変形性関節症（以下OA）は主として高齢者に見られる関節疾患であるが、若年者においても運動に伴う靭帯損傷などに続発して発症する。膝関節や股関節に頻発するこの疾患は急性発作を繰り返しながら進行し、患者のquality of lifeを長期にわたり損なうことになる。つまり、比較的初期の段階から、膝・股関節という歩行に最も重要な関節の運動が障害される結果、患者は美しい歩き方を奪われてしまう。超高齢化が進む現在、このOAが社会にもたらす悪影響は増すばかりである。また現在のOA治療は、末期における人工関節置換術が主流であり、初期段階でOAを制御できる方法はいまだに確立されていない。この問題を解決する1つの新しい治療戦略としてOAを引き起こす分子に対する分子標的療法が挙げられる。本研究では線維芽細胞成長因子（FGF）1を、その標的分子と見定めている。FGF-1はFGFファミリーの古典的メンバーであるが、その軟骨組織における分子動態や生物学的機能についてはほとんど情報が無い。申請者らは最近の研究で、OA患者の関節軟骨から得た軟骨細胞がFGF-1を産生していることに発見し、そこからFGF-1のOA病態における役割を解明すべく研究を開始した。現在までのところ、ラットの正常な関節軟骨組織にはFGF-1の蓄積はみられないこと、そしてモノヨード酢酸（MIA）で代謝障害を引き起こしOAを誘発すると大量のFGF-1が産生されることを明らかにしている。また、ヒト軟骨細胞様細胞株を用いた実験では、FGF-1がこの細胞からのアグリカン（ACAN）やII型コラーゲン（COL2A1）などの軟骨細胞外基質分子群の産生を抑制する、つまり軟骨の修復を妨害することと、逆にこれら分子群を分解する酵素マトリクスメタロプロテアーゼ13（MMP-13）の産生を増強する、すなわち軟骨破壊を導くことも明らかにしてきた。さらにFGF-1が軟骨再生因子として知られるCCNファミリー2（CCN2）の産生を強く抑制することも実証した。しかしどのようにしてFGF-1が上記の作用を発揮するのかは未だ謎である。本研究ではこれらの成果に基づき、FGF-1がヒトOAの発症において果たす役割を明確にし、それが関節軟骨を破壊に導く分子機構を明らかにすることを目的と定めた。そして将来、ここで得られた結果に基づきFGF-1そのもの、並びにそのシグナルを媒介する分子に狙いを定めた分子標的治療法の開発を目指す。

②研究方法

FGF-1がOAを直接誘発する能力を検証するために、ラット膝関節に徐放性担体であるゼラチンハイドロゲルに吸着させたFGF-1を注入し2週間後に組織切片を作製、染色して組織像を解析した。またヒトのOA関節軟骨組織におけるFGF-1 mRNA発現情報を得るため、米国国立バイオインフォマティクスセンターのGene Expression Omnibus（GEO）データベースを解析した。FGF-1がOAを誘発する分子メカニズムを解明するにあたっては、FGF-1が軟骨細胞に作用すると自身の遺伝子発現を増強すると同時に、軟骨再生分子であるCCN2を抑制する点に着目して研究を進めた。以下の解析は軟骨細胞の形質をよく保ったヒトHCS-2/8細胞株を用いて行った。まずFGF-1が、FGF-1自身およびCCN2 mRNAの細胞内半減期に与える影響を評価するために、アクチノマイシンDで転写を阻害した条件下でそれぞれのmRNA量を時間を追って定量RT-PCR法で測定、解析した。続いてFGF-1がこれら遺伝子のクロマチン構造の変化を通じ効果を発揮している可能性を検証するため、各種ヒストン脱アセチル化複合体（HDAC）阻害剤を作用させてFGF-1の効果が影響を受けるかを検証した。そして標的遺伝子であるFGF1、CCN2それぞれの近位プロモーター領域に結合する転写因子を割り出すため、ENCODEデータベースからのクロマチン免疫沈降シーケンシング（ChIP）データをin silico解析した。こうして得られた転写遺伝子候補の機能解析には、特異的siRNAによ

る遺伝子サイレンシングの手法を用いた実験を援用した。すなわち当該転写因子に対するsiRNAを合成し、HCS-2/8細胞にトランスフェクションを行い、同転写因子の遺伝子発現が減弱している条件下でFGF-1を作用させた。続いて同細胞からRNAを抽出し、定量的RT-PCR法でFGF-1およびCCN2のmRNA発現量を測定し、FGF-1の作用をサイレンシングを施さない対照群と比較評価した。

③研究成果

1) FGF-1のラット膝関節に対するOA誘発能

徐放性ゼラチンハイドロゲルに1 μ gのFGF-1を吸着させラット膝関節腔に投与し、OAが誘発されるかを病理組織学的に検討したところ、関節軟骨組織に変性を示す所見が観察された。しかし本実験の実施計画が大学に承認されるのに時間を要したため、現時点ではまだ科学的結論に至るほどの実験は実施できておらず、本実験には今後も引き続き取り組む。

2) ヒトOA症例におけるFGF-1遺伝子の発現状況

ヒトサンプルを用いた臨床実験に進む前段階として、GEOデータベースから得たビッグデータ解析によって研究の方向性を再検証した。すなわちOA治療としての股関節置換術によって得られたOA軟骨組織と、大腿骨頸部骨折のために同様に得られた正常関節軟骨組織を高速RNAシーケンシングで分析した結果からは、OA軟骨組織におけるFGF-1の遺伝子発現増強は観察されなかった。この所見はFGF-1がOAの発症、つまり初期に重要な役割を演ずるという本研究の仮説と相反するものではなく、むしろ符合する。そしてこの事実は関節置換術を行わねばならないような末期OAでは、もはやFGF-1の役目は終わっていることを示している。したがって、今後手術が必要になるような末期OAを対象とする組織学的解析は行わないこととした。

2) FGF-1がFGF-1遺伝子発現を増強し、CCN2遺伝子発現を抑制するメカニズムの解明

(i) FGF-1がFGF-1およびCCN2 mRNAの半減期に与える影響

FGF-1を軟骨細胞に作用させるとFGF-1 mRNAレベルが上昇し、軟骨を再生させるCCN2のmRNAレベルが低下する。この変動は転写の増減ばかりでなく、mRNA分解の速度によっても、もたらされる。後者の可能性を検証するため、FGF-1添加後アクチノマイシンDで転写を止め、残っている各mRNAの消長を追った。その結果、FGF-1は自身のmRNAの半減期には影響を与えず、CCN2 mRNAの半減期をむしろ延長することが明らかになった。

(ii) HDAC阻害剤がFGF-1によるFGF-1 mRNA発現増強とCCN2 mRNA発現抑制効果に与える影響

上記の結果より、FGF-1のFGF-1 mRNA発現増強とCCN2 mRNA発現抑制効果は、mRNA分解ではなく、転写段階で行われていることがほぼ確定的となった。遺伝子の転写制御はクロマチン構造変換を伴うことが多いため、次にクロマチン構造を薬剤によって開放し、FGF-1による転写制御が影響を受けるかを検証した。しかし、HDAC阻害剤であるバルプロン酸、およびHDACII阻害剤であるトリコスタチンAを作用させても、FGF-1によるFGF-1とCCN2の遺伝子発現制御力は衰えなかった。

(iii) FGF-1によるFGF-1、CCN2両遺伝子発現制御を媒介する転写因子の探索

HDAC阻害剤を用いた実験から、FGF-1による上記の2遺伝子の制御はクロマチン構造の変換より、むしろ標的遺伝子に働く転写因子の量的質的変動によってもたらされると考えられた。よってこの転写因子の候補を探り当てる目的で、ENCODEビッグデータを解析した。具体的には、まずFGF-1、CCN2両遺伝子でクロマチンが開放されている領域を、アセチル化ヒストンに対する抗体によるChIPシーケンシングデータを使い探索し、プロモーター近傍にエンハンサー、サイレンサーと思われる領域を特定した。次にその領域に結合する転写因子を、さまざまな転写因子に対する抗体を用いたChIPシーケンシングデータから絞り込んだ。その結果、FGF-1とCCN2のエンハンサー、サイレンサー領域両方に結合する転写因子を1つ発見した。

(iv) FGF-1によるFGF-1、CCN2両遺伝子発現制御を媒介する転写因子の同定

こうして得られた転写因子候補に対して、ヒトHCS-2/8細胞で遺伝子サイレンシングを行なって発現を低下させた。その状態でFGF-1を作用させたところ、その効果は有意に減弱した。以上より、FGF-1のOA誘発効果はこの転写因子が媒介しておりその機能を阻害する分子が、OAによって美しい歩行が損なわれることを防ぐための新たな手段となることを、本研究はここに示すことができた。

脂肪細胞が分泌するエクソソームによる骨格筋細胞の制御

研究者 ▶ 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構：尾嶋 孝一（おじま こういち）

①研究の背景及び目的

骨格筋は生体重の約半分を占め、活動に欠かせない組織である。一方、骨格筋組織内に異所的に脂肪細胞が蓄積することが知られている。同一骨格筋組織内に存在する骨格筋細胞と脂肪細胞の間でコミュニケーションをとり、骨格筋組織内で脂肪細胞が勢力を拡大した結果、骨格筋細胞が萎縮し、脂肪細胞の蓄積が進むと考えられるが、そのメカニズムは不明な点が多い。一方、エクソソームは細胞が分泌する直径～200nmの小胞であり、その中にはエクソソームを分泌した細胞由来のmicroRNA (miRNA)が含まれている。miRNAはタンパク質に翻訳されない21～25塩基の一本鎖RNAであり、miRNAが標的とする遺伝子の発現を抑制する作用を持つ。本研究では、脂肪細胞と骨格筋細胞間のコミュニケーションツールとしてエクソソームに着目し、脂肪細胞が分化・成熟過程で分泌するエクソソーム内に含まれるmiRNAをプロファイリングし、脂肪細胞由来のエクソソームが骨格筋細胞に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

②研究方法

細胞培養用血清に含まれるエクソソーム画分の影響を最小限に抑えるために、血清は超遠心した後、エクソソーム画分を除去してから使用した。培養脂肪細胞はマウス3T3-L1細胞を用いた。分化誘導後、2日おきに培養液を回収した。培養液を超遠心(10万g、70分)した後、得られた沈殿を回収しエクソソーム画分とした。エクソソーム画分に含まれるタンパク濃度をBCA法にて測定した。さらに、エクソソーム画分をネガティブ染色し透過型電子顕微鏡にて観察した。miRNAの発現プロファイルを作成するために、脂肪細胞が分泌したエクソソーム画分からtotal RNAを調製し、miRNAの網羅的な発現解析をマイクロアレイにて行った。代表的なmiRNAの発現はPCRにて確認した。次に、miRNAの標的遺伝子をTargetScanMouse (release 7.1)で予測した。予測された標的遺伝子を用いてGene Ontology解析をDAVID (ver. 6.8)で行い、どのような遺伝子群が変動するのかを検討した。培養骨格筋細胞はマウス骨格筋細胞を用いた。成熟脂肪細胞から調製したエクソソーム画分を培養骨格筋細胞の培養液に添加し、16時間後に細胞を回収した。エクソソーム処理した骨格筋細胞、およびPBS処理したコントロールの骨格筋細胞からそれぞれRNAを調製後、cDNAを作成し、リアルタイムPCRにて骨格筋調節因子の遺伝子発現レベルを比較した。

③研究成果

培養脂肪細胞は脂肪細胞分化後4日目には細胞質内に小さな脂肪滴を貯留しはじめ、分化12日目では脂肪滴も肥大化することが形態学的に観察できた。脂肪分化の生化学的な指標としてアディポネクチンのmRNA発現量をPCR法にて測定した結果、分化誘導ともに発現量が増大したことを確認した。これらの結果は、実験に用いた脂肪細胞は培養日数が経過するにつれて分化・成熟することを示している。

培養脂肪細胞が放出するエクソソームを調製するために、脂肪分化誘導後12日目までの培養液を2日おきにそれぞれ回収し、超遠心後、エクソソーム画分を調製した。エクソソーム画分に含まれるタンパク量を指標として、脂肪細胞が分泌するエクソソーム量を測定した。その結果、分泌量が最も多かったのは脂肪分化誘導後0日目であり、その後減少し、分化8日目には最低となり、その後、徐々に分泌量が増えていくことが明らかとなった。この結果は、分化時期に応じて分泌するエクソソーム画分の量が異なることを示している。

エクソソーム画分にエクソソームが含まれているのかを確かめるために、エクソソーム画分を電子顕微鏡にて観察した。その結果、直径約100nmの小胞が多数観察できたことから、エクソソーム画分にはエクソソームが含まれていることが示された。

エクソソームが含有するmiRNAの発現プロファイリングをするために、脂肪細胞を分化誘導後0、4、および12日目から調製したエクソソームからmiRNAを調製し、マイクロアレイ解析に供した。その結果、分化誘導後0、4、および12日目で検出されたmiRNAの数は329、426、および406であった。検出できたmiRNAを使って階層的クラスタリング解析をした結果、エクソソーム内に含まれるmiRNAの質および量が各分化段階で異なることが判明した(図1)。これらの結果は、脂肪細胞が分化の時期に応じて分泌するエクソソーム画分の量自体も変化するが、エクソソーム内のmiRNAの内容および量も変化していることを示している。

脂肪細胞が放出するエクソソームの中で、脂肪分化0日目と比較して、分化12日目に2倍以上発現上昇するmiRNAを対象とし、miRNAが標的とする遺伝子をデータベース上から抽出した。その遺伝子群を用いてGene Ontology (GO)解析をDAVIDを用いて行った結果、脂肪細胞由来エクソソームに存在するmiRNAの標的となる候補遺伝子群として、転写調節に関与する遺伝子群が挙げられた。

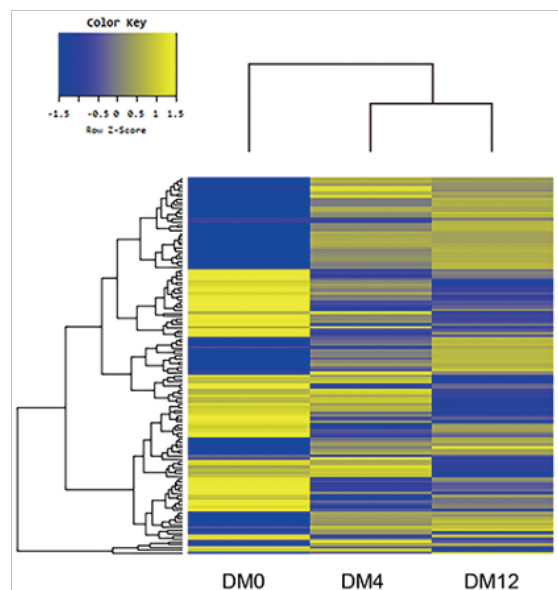
脂肪細胞が放出するエクソソームが骨格筋細胞に及ぼす影響を検討するために、成熟脂肪細胞由来エクソソーム画分を骨格筋細胞の培養液中に添加した。その後、骨格筋細胞からRNAを調製した。上記実験で転写調節に関わる遺伝子群が成熟脂肪細胞由来エクソソーム内に存在するmiRNAの標的候補として挙げられたので、骨格筋分化の代表的な4つの調節因子であるMyod、Myog、Myf5、およびMyf6の各遺伝子の発現量をリアルタイムPCRにて測定した。その結果、Myf5がコントロール群と比較すると有意に発現量が低下した。また、有意差はないがMyogの発現量も減少傾向にあった。この結果は、脂肪細胞由来のエクソソームにより、骨格筋分化が部分的に抑制されることを示唆している。

本研究により、成熟脂肪細胞が分泌するエクソソームにはmiRNAが含まれ、脂肪細胞の成熟段階に応じてエクソソーム内のmiRNAの種類および量が異なることが明らかとなった。これらのmiRNAを含むエクソソームと骨格筋細胞と一緒に培養した結果、骨格筋細胞内では骨格筋分化を抑える方向に遺伝子発現が変化した。このようにin vitroにおいて脂肪細胞由来のエクソソームを介して骨格筋細胞の運命を調節していることから、生体の骨格筋組織においても脂肪細胞と骨格筋細胞のエクソソームを介したコミュニケーションを経て、骨格筋組織内で異所性脂肪が形成されると考えられる。

本研究の一部は米国で開催された2019 ASCB EMBO meetingにて発表した。

図1 脂肪細胞が分泌するエクソソーム内で発現するmiRNAの階層的クラスタリング解析

DM0、DM4、およびDM12は脂肪細胞を分化誘導後の日数を示す。発現量が高いmiRNAは黄色、低いmiRNAは青色で示した。発現量のKEYは図左上にある。



へム合成の活性化による新規脂肪代謝制御法の開発

研究者 ▶ 東京工業大学 生命理工学院：小倉 俊一郎（おぐら しゅんいちろう）

①研究の背景と課題、目標

肥満は全世界規模で社会問題となっており、脂肪細胞の分化メカニズムや体内の中性脂肪蓄積量の減少に関する研究はめまぐるしく発展してきた。2008年に白色脂肪細胞・褐色脂肪細胞に並んで、第3の脂肪細胞であるベージュ脂肪細胞が発見された。ベージュ脂肪細胞は白色脂肪細胞が分化した細胞であり、細胞内のミトコンドリア数が顕著に増えることによって、褐色脂肪細胞と同様な脂肪燃焼機能を得ていると考えられている。すなわち脂肪の代謝にはミトコンドリアの機能が大きく関わる事が明らかとなってきている。

一方、当研究室ではアミノレブリン酸 (ALA) を投与することによりミトコンドリア機能にとって重要な補因子であるへムが蓄積し、シトクロム c オキシターゼ (COX) 活性が向上することを見出している。さらに2018年度に小柳財団研究助成金を受給し、様々な細胞におけるミトコンドリア機能の活性化を示しつつある。そこで本研究ではこのミトコンドリア機能向上法をさらに展開し、脂肪代謝制御法に応用する。脂肪細胞の分化や脂質代謝等の細胞モデルとして活用されているマウス胎児繊維芽細胞 3T3-L1 を用い、in vitro において ALA 添加が脂肪代謝に与える影響を調べた。

②実験方法

3T3-L1 細胞の脂肪細胞への分化誘導を開始する際に、アミノレブリン酸 (ALA) を添加し、所定時間培養を行った。分化誘導終了後、脂肪細胞内に蓄積された中性脂肪を脂溶性色素であるオイルレッド O によって染色した。オイルレッド O によって染色された脂肪細胞の量をコントロールと比較することで分化したことを確かめられる。さらに、分化誘導後の 3T3-L1 細胞を回収し、cDNA を作製した。ALA 添加群と非添加群に対し、脂肪細胞特有遺伝子とアラキドン酸カスケード関連遺伝子の mRNA 量を定量的に評価した。

③研究成果

以下に本研究で得られた研究成果を項目ごとにまとめる。

[1] ALA 添加時の分化後 3T3-L1 細胞内における中性脂肪量の解析

脂肪細胞の分化や脂質代謝の細胞モデルであるマウス繊維芽細胞 3T3-L1 に ALA 添加が与える影響を評価した。その結果、ALA 添加濃度依存的に細胞内の中性脂肪量が減少した (図 1)。この結果から、脂肪細胞の蓄積は ALA によって大幅に阻害されることが分かった。

[2] ALA 添加が脂肪細胞各種遺伝子の発現量に与える影響の解析

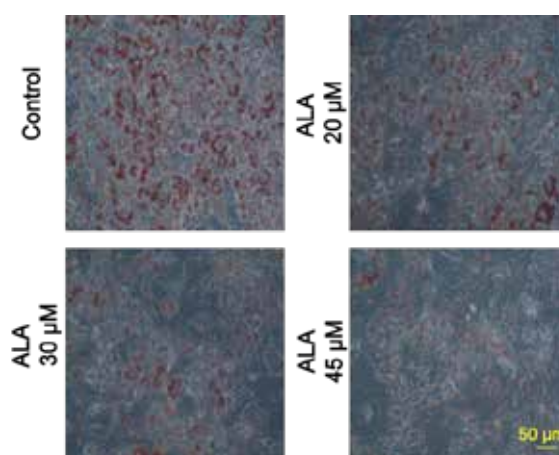


図 1 各濃度の ALA 添加が 3T3-L1 細胞の分化に与える影響
オイルレッド O によって中性脂肪が赤く染色される

上記の結果は、分化が阻害された結果であることを検証するために、脂肪細胞の分化マーカーとして知られている FABP4 と脂肪細胞分化のマスターレギュレーターとして知られている PPAR γ の mRNA 発現量を評価した。その結果、ALA 添加によってどちらの遺伝子も顕著に減少することが分かった (図 2)。これらの結果から、ALA 添加は脂肪細胞への分化を阻害する効果を持つことが示された。

[3] ALA 添加がアラキドン酸カスケード (AAC) 関連遺伝子の発現量に与える影響の解析

ALA 添加による脂肪細胞の分化阻害が行われる経路を検証することを目的に本項の実験を行った。過去の研究から、AAC のうち、シクロオキシゲナーゼとエポキシゲナーゼを介して生成される代謝物のいくつかは、脂肪細胞の分化を阻害することが確認されている。また、これらの代謝物はヘムタンパク質を介して生成されるため、ALA 添加によって生合成が促進されることが期待される。そこで、シクロオキシゲナーゼ経路の律速酵素である COX I 及び COX II、エポキシゲナーゼ経路の酵素である CYP2J 及び CYP2C の mRNA 発現量を評価した。その結果、これら 4 つの全ての遺伝子は、ALA 添加によって顕著に増加した (図 3)。これらの結果から、ALA 添加による脂肪細胞の分化阻害は ACC の活性化を介してもたらされることが示唆された。

[結論]

繊維芽細胞である 3T3-L1 細胞は、ALA 添加によって脂肪細胞への分化が阻害されることを示した。また、この ALA 添加効果は ACC の活性化を介してもたらされることが示唆された。これは正常の線維芽細胞が脂肪細胞へ分化する脂肪蓄積の根本を阻害しているということを意味している。これらの成果は「人間の美」のみならず、肥満によって惹起される生活習慣病・三大疾病の予防にもつながることができ、「人間の健康」に大きく貢献できると言える。

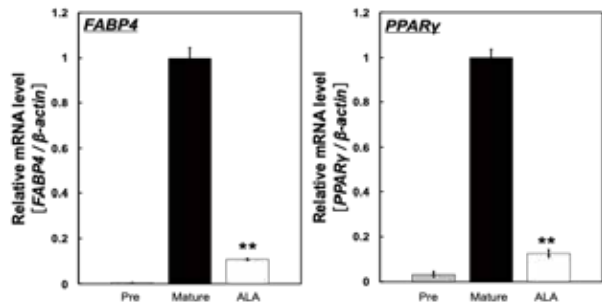


図 2 ALA 添加による脂肪細胞特有遺伝子の発現量変化

Pre : 脂肪細胞前駆体, Mature : 脂肪細胞, ALA : ALA 添加脂肪細胞
(non-paired T-test n=3 **:p<0.005)

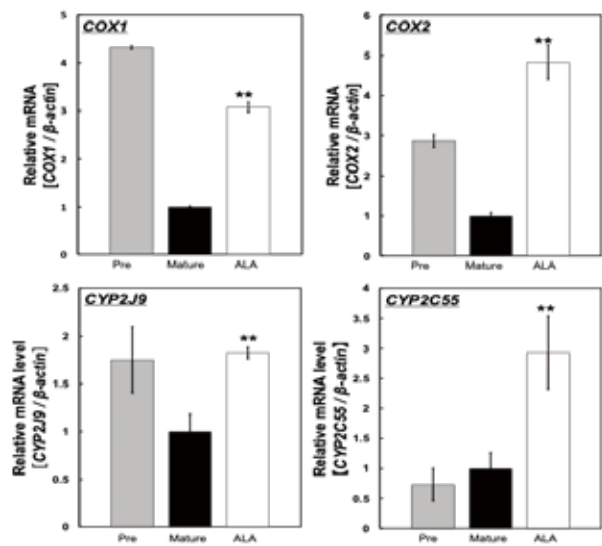


図 3 ALA 添加による ACC 関連遺伝子の発現量変化

Pre : 脂肪細胞前駆体, Mature : 脂肪細胞, ALA : ALA 添加脂肪細胞
(non-paired T-test n=3 **:p<0.005)

高機能化タンパク質ハイドロゲルの創出と 三次元生体組織構築への応用

研究者 ▶ 東京工業大学 生命理工学院：小島 英理（こばたけ えいり）

①研究の背景及び目的

人工多能性幹細胞（iPS 細胞）から分化誘導した種々の細胞を利用して構築される組織は、再生医療のみならず難病治療法の開発や創薬研究にも有用であるため、医工学分野への貢献度は計り知れない。しかし細胞は自律的に組織化できないため、細胞から組織を構築するには、生体組織を模倣した細胞周辺環境の再現が必須である。

生体組織は各組織特有の細胞が生理活性シグナルを受容して、細胞外マトリックス（Extracellular matrix; ECM）と複合化した構造を形成し、その機能を発現している。特に細胞の足場となるECMの役割は重要で、これまでに様々な人工足場材料の開発が行われてきた。人工足場材料には、生体親和性・生分解性・生体吸収性に加え、栄養・酸素などの供給ならびに老廃物・二酸化炭素の排出、接着・増殖・分化等細胞制御機能の保持など、様々な特性が求められる（図1）。しかし、以上の条件を全て満たし、生体内に近い環境を提供できる理想的な材料は未だ開発途上にあり、その実現は組織工学・再生医療を強力に推進するために喫緊の課題である。

本研究は、タンパク質分子間相互作用を基盤として、タンパク質分子のみを構成成分とする高機能ハイドロゲルを創出すること、およびそれを利用して三次元生体組織構築へ応用展開することを目的として行った。

②研究方法

1. タンパク質の設計および発現・精製、キャラクタリゼーション

温度応答して自己組織化により安定な集合体を形成する配列（Elastin Like Polypeptide; ELP）と、電荷および親水性・吸水性を有する配列の組み合わせに、架橋点として分子間で特異的相互作用しホモ4量体を形成する配列（Coil-LL）を導入して、タンパク質のみにより構成されるハイドロゲルを創製した。ハイドロゲルを形成する基本構成単位となるタンパク質は、大腸菌を利用して遺伝子工学的に作製した。このタンパク質をCUBEと命名した。また細胞接着能を有するRGD配列を導入したR-CUBEも作製した。

2. 三次元細胞培養系の構築とその評価

CUBEとR-CUBEそれぞれの溶液を、比率を変えて混合して加温し、RGDの密度が異なるタンパク質ハイドロゲルを作製して、その特性を調べた。次いで、細胞の三次元空間への保持について、以下の方法で検討した。タンパク質ハイドロゲルを作製する際に、Tt（30℃程度）以下のタンパク質溶液と細胞（ヒト臍帯静脈内皮細胞：HUVEC）懸濁液を混合して、細胞培養用ディッシュに注ぎ、Tt以上で加温した。ゲル形成後、内部に保持される細胞を共焦点レーザー顕微鏡により経時的に観察した。RGD密度が異なるタンパク質ハイドロゲルで、保持される細胞数、生存率等を測定して、三次元細胞培養のための至適条件を確立した。また

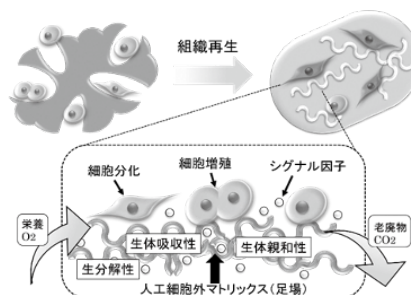


図1 足場材料に求められる特性

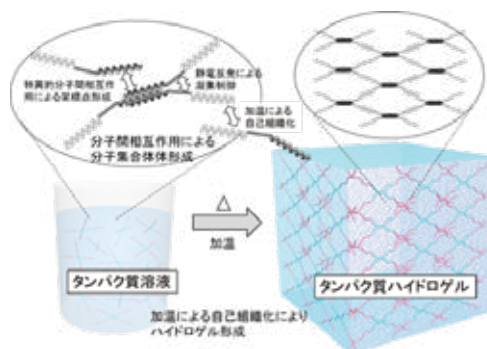


図2 タンパク質ハイドロゲル形成の模式図

細胞増殖・分化を制御するため、繊維芽細胞成長因子 (bFGF) をハイドロゲル内に導入し、分化誘導による血管組織の形成を試みた。

③研究成果

1. CUBE タンパク質の温度応答特性評価

得られたCUBE タンパク質溶液を30℃に加熱すると、ゲル化することが示された。またゲル化したタンパク質を24℃に冷却すると速やかにゾル化し、このゾル-ゲル転移が可逆的であることが明らかになった (図3)。

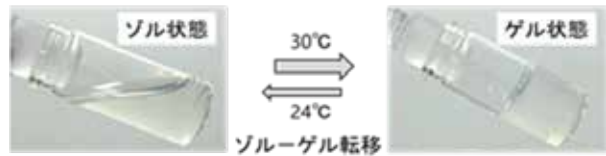


図3 CUBE タンパク質のゾル-ゲル転移

2. CUBE タンパク質による細胞の三次元培養

CBBE および R-CUBE の細胞に対する特性を比較するため、それぞれのタンパク質をコーティングしたプレート上に HUVEC を播種し、細胞接着能を評価した (図4)。その結果、CUBE に比較して R-CUBE は良好な細胞接着を示し、細胞培養に適することが示された。そこで R-CUBE を用いてハイドロゲルを作製し、その中で細胞の三次元培養を行った。また、細胞はゲル中においても1週間以上の長期に渡り生存し、増殖することが明らかとなった。

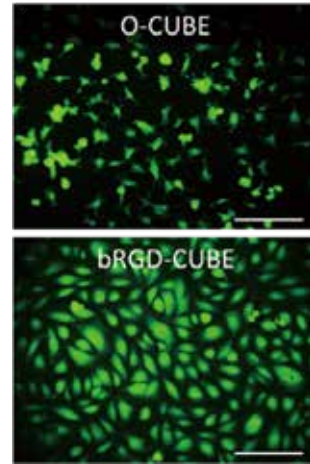


図4 細胞接着評価

3. 高機能化タンパク質ハイドロゲルの構築

機能性タンパク質の導入により、タンパク質ハイドロゲルを高機能化して、ゲル内に保持した細胞の増殖、分化を誘導し、組織構築を行った。Coil-LL は4量体を形成するため、ハイドロゲル形成時にこの配列を有するシグナル因子等のタンパク質を架橋点に導入できる (図5)。ここでは、種々の細胞の増殖・分化を制御できるbFGF を導入した。その結果、ハイドロゲル内で三次元培養したHUVEC は分化誘導され、血管様組織が形成されることが明らかとなった。

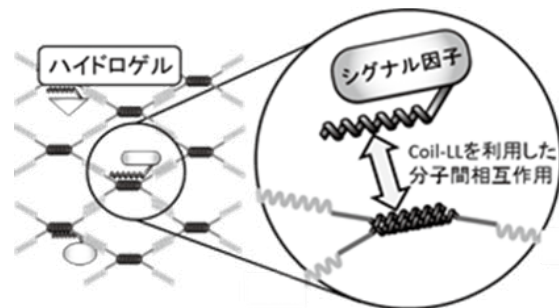


図5 ハイドロゲル内へのシグナル因子導入

以上、本研究で得られた成果は、組織を再構築し、健全な機能を取り戻すことにより、「人間の健康と美」に大きく貢献することが期待される。

生体酸化ストレス評価のための銀イオン交換ゼオライトの合成と活性酸素種生成の定量的解析

研究者 ▶ 東京工業大学 物質理工学院：馬場 俊秀（ばば としひで）

【研究の背景】

ゼオライトは、主に結晶性アルミノケイ酸塩であり、規則的な細孔構造をもつ多孔性物質である。このゼオライトは、触媒用途のみならず、脱臭剤、脱水剤、化粧品、抗菌剤、脱臭材、脱湿乾燥材、水処理材、触媒及びその担体、土壌改良剤、家畜排泄物処理材、猫砂等の用途は多様化している。中でも銀イオン交換ゼオライトには脱臭、抗菌作用が高く、我々の生活において身近となっている。このゼオライトは細胞内でヒドロキシラジカル生成を惹起し (Inoue et al. 2002, *J. Inorg. Biochem.*)、DNA や RNA への損傷をもたらす (Inoue & Hamashima 2012, *J. Biomat. Nanobiotech.*) ことが報告されている (図1)。そのため、ゼオライトおよびその金属イオン交換体の使用には健康への定量的な安全性評価が必要である。

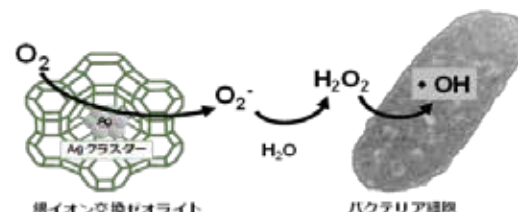


図1 銀イオン交換ゼオライトに起因するヒドロキシラジカル生成

細胞毒性とヒドロキシラジカル生成量との間には相関性が見出されており (Miyaji et al. 2016, *J. Clin. Biochem. Nutr.*)、銀イオン交換ゼオライトをはじめとする種々ゼオライトについてヒドロキシラジカル生成機能を定量的に解析することで、これらゼオライトの安全性を検証することが可能である。必要となるのは、検証に用いる種々ゼオライトである。そこで本研究では、ゼオライトの酸化ストレス機能を解明することをめざし、粒子径やイオン含有量が異なる種々のゼオライトの合成法を確立することを目的とした。

【研究結果】

本研究ではゼオライトの健康被害を評価することをめざしている。口腔あるいは鼻腔内の粘膜を通して生体内に取り込まれるのはPM2.5と称される2.5 μmの粒子である。そこで、粒子径が2.5 μmのゼオライトを合成するように合成条件を検討した。

種々のゼオライト（アルミノシリケートおよびアルミノリン酸塩モレキュラーシーブ）は水熱合成法によって合成した。水熱合成は容積が50～300 mLのテフロン製オートクレーブを用いて行った。合成したゼオライトの構造はX線回折（XRD）により確認した。また、ゼオライト結晶の形状と大きさを調べるため、走査電子顕微鏡（SEM）による観察を行った。平均粒子径はSEM像の中からランダムに150粒子を選んで測定した粒子径サイズから算出した。

原料の仕込み量や水熱合成温度、時間構造規定剤の種類を検討して合成を行った結果、平均粒子径が0.2～2 μmの範囲で、員環数、骨格構造、細孔入り口径が異なる20種類のゼオライトを合成することができた。さらに、市販のゼオライトを用いて銀イオン交換ゼオライトの調製法を検討した結果、銀イオンで交換したゼオライト3種類を調製することもできた。

今後、本研究により合成したゼオライトについて細胞毒性評価を行う。ゼオライトが人間の美と健康を犯すことのない安全な物質であることを評価するため、ヒドロキシラジカル生成を解析する予定である。生成するヒドロキシラジカル生成量は、スピントラップ剤DMPOを用いた電子スピン共鳴（ESR）法によって測定する。

理論的予測法の汎用性を実証するための GPCR のX線結晶構造解析

研究者 ▶ 関西医科大学 医学部：小林 拓也（こばやし たくや）

①研究成果の目的

がん・心臓疾患・脳血管疾患など日本人の死因の上位を占める疾患、ならびにそれらの発症・増悪を誘発する主因ともなる糖尿病・高血圧症・高脂血症等に対する治療薬の開発には強い社会的要請がある。医薬品の標的分子の精密立体構造情報を活用した、より合理的でかつ副作用の少ない医薬品および医療法の開発が、医学・創薬研究における大きな課題と糖尿病・高血圧症・高脂血症等に対する治療薬の開発には強い社会的要請がある。医薬品の標的分子の精密立体構造情報を活用した、より合理的でかつ副作用の少ない医薬品および医療法の開発が、医学・創薬研究における大きな課題となっている。現在市販されている医薬の7割程度が、Gタンパク質共役受容体（GPCR）、チャネル、膜輸送体、膜酵素などの細胞膜中に存在する膜タンパク質を作用点とすることが知られているが、ヒト・哺乳類由来の膜タンパク質の構造決定は依然として難度が高いため、現時点では構造ベースの創薬研究の展開はきわめて限定的で停滞している。

②研究方法

木下正弘(京都大学)との共同研究により、理論的予測法を使って、様々な種類のG蛋白質共役受容体(GPCR)、例えばプロスタグランジン(PG)受容体など広く脂質受容体に応用する。まず始めに、緑色蛍光タンパク質(GFP)を野生型膜タンパク質のC末端に融合させたコンストラクトを出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*の発現系で生産し、バク質のC末端に融合させたコンストラクトを出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*の発現系で生産し、蛍光サイズ排除クロマトグラフィー(FSEC)により発現レベルと分子サイズ分布の単分散性を評価する。種々の温度にて一定時間、加熱処理した試料を用いてFSECを行うことにより熱安定性評価を行う。試料を用いてFSECを行うことにより熱安定性評価を行う。このとき膜タンパク質に対して結合する高親和性の低分子化合物(アゴニスト・アンタゴニスト等のリガンド)が存在することが既知の場合は、その添加・非添加の差分評価も実施する。また、膜タンパク質の可溶化に用いる界面活性剤の種類を検討し、その最適化も行う。最も良好な性状を示した変異体については昆虫細胞Sf9発現系を構築し、大量精製・精製の予備実験を行う。構造解析ターゲットとしての適性が良好とみなされるものについて、膜タンパク質の結晶化に適した脂質キュービック相(LCP)法により、結晶を作製してSPring-8の放射光マイクロフォーカスビームにより回折データを収集する。

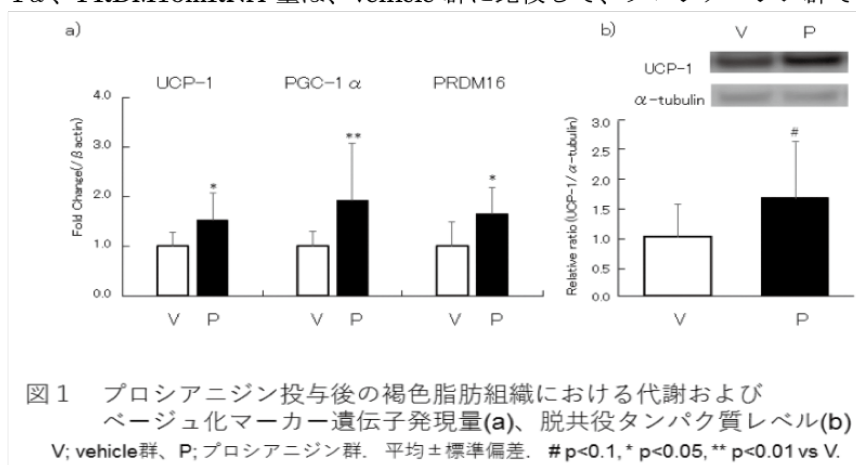
③研究成果

PG受容体の第3膜貫通領域の3.39部位をArgまたはLysに置き換えることで、アンタゴニスト結合型に安定化されることが確認された。ただ、安定化しないGPCRが存在することも明らかになってきた。この変異体を用いて結晶化を行ったところ、結晶の分解能が向上した。現在、分解能向上を目指して結晶化条件の最適化を試みている。不活性型構造を決定するには有効な方法であると思われる。実際、国内でも他のグループでも応用されるようになり、アンジオテンシン受容体やセロトニン受容体の3.39部位に変異を導入することで不活性型の構造解析に成功しているようである。国外においても、カンナビノイド受容体に応用し、アロステリックモジュレーターが結合した構造解析に成功しており、我々の論文を引用している(Nature Chemical Biology, 15:1199-1205, 2019)。ここ数年は、GPCRの構造解析は、X線結晶構造解析からクライオ電子顕微鏡による単粒子構造解析が主流となってきた。X線結晶構造解析では難易度の高いシグナル伝達分子と共役した複合体として高分解能で構造解析を行う。今後は、これまで以上に立ち上げた理論的予測法をX線結晶構造解析だけでなく、クライオ電子顕微鏡による単粒子構造解析にも汎用性の高い技術にできるよ努めていきたい。

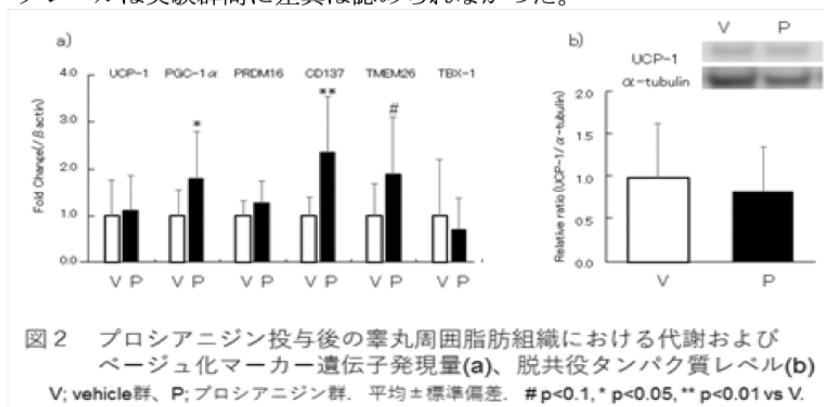
白色脂肪のベージュ化をメカニズムとする 痩身食品の開発

研究者 ▶ 芝浦工業大学 システム理工学部 生命科学科：越阪部 奈緒美 (おさかべ なおみ)

二週間馴化した 12-14 週令雄性 C57BL/6J マウスを vehicle(V)群、プロシアニジン(P)群の二群に分け、精製水または 50mg/kg プロシアニジン画分を強制経口投与し、2 週間飼育した。飼育期間終了後、麻酔下で解剖し、腎周囲脂肪、後腹壁脂肪、鼠径部脂肪、褐色脂肪を摘出した。褐色脂肪組織の uncoupling protein (UCP)-1、 Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator(PGC)1 α 、PRD1-BF-1-RIZ1 homologous domain containing protein (PRDM)16 の mRNA を qRT-PCR 法を用いて、UCP-1 タンパク質レベルを Western Blot 法で測定した結果を図 1 a および b に示す。褐色脂肪組織中の UCP-1、PGC-1 α 、PRDM16mRNA 量は、vehicle 群に比較して、プロシアニジン群では有意な増加を



示した。睾丸周囲脂肪中の UCP-1、PGC-1 α 、PRDM16 およびベージュ化マーカーである CD137、transmembrane (TMEM)26、T-box transcriptional factor(TBX)1 の mRNA を qRT-PCR 法を用いて、UCP-1 タンパク質レベルを Western Blot 法で測定した結果を図 2 a および b に示す。睾丸周囲脂肪においては、PGC-1 α 、CD137、TMEM26mRNA 発現量の増加がプロシアニジン群において認められたが、UCP-1 タンパクレベルは実験群間に差異は認められなかった。



鼠蹊部脂肪中の UCP-1、PGC-1 α 、PRDM16 および CD137、TMEM26、TBX1 の mRNA を qRT-PCR 法を用いて、UCP-1 タンパク質レベルを Western Blot 法で測定した結果を図 3 a および b に示す。鼠蹊部脂肪においては、プロシアニジン群では PRDM16 の mRNA 発現量の有意な増加が認められた、UCP-1 のタンパク質レベルも同様に有意な増加が見られた。摘出した鼠蹊部脂肪の凍結切片を作成し、HE 染色により、病理学的な解析を試みた結果を図 4 c に示す。

Vehicle 群では、大型で脂肪球を有する脂肪細胞がほとんどを占めているのに比較して、プロシアニジン群においては細胞の顕著な細胞および脂肪球の収縮が認められた。

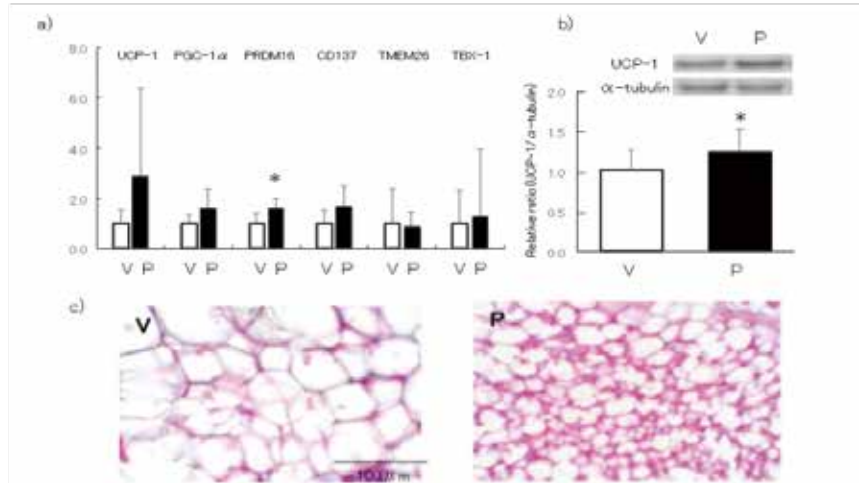
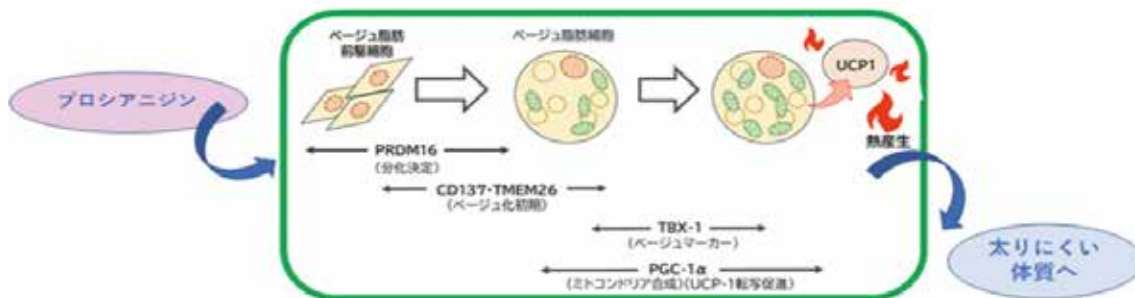


図 2 プロシアニジン投与後の睾丸周囲脂肪組織における代謝およびベージュ化マーカー遺伝子発現量(a)、脱共役タンパク質レベル(b)、HE染色像(c)

V; vehicle群, P; プロシアニジン群. 平均±標準偏差, * p<0.05, ** p<0.01 vs V.

以上の結果から、カカオ、リンゴ、ブドウなどのプロシアニジンを豊富に含む食事の摂取により、褐色脂肪が活性化し、腎周囲および鼠蹊部脂肪がベージュ化することによって熱産生が高まり、太りにくい体質を維持する可能性が示唆された。



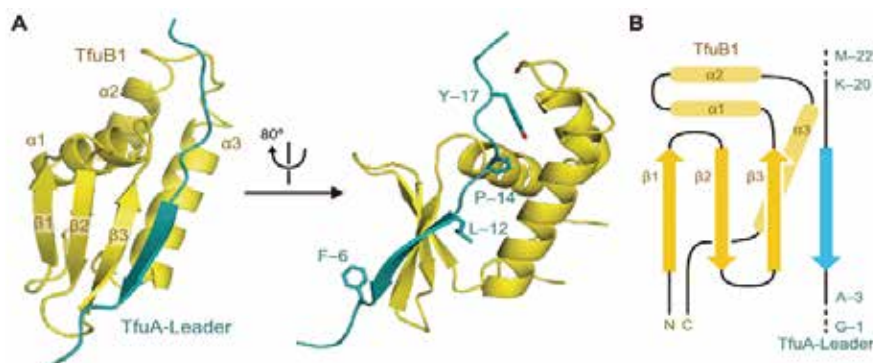
特殊構造をもつペプチドの合成系酵素の 構造解析と創薬利用

研究者 ▶ 国立研究開発法人 理化学研究所 生命機能科学研究センター：田上 俊輔（たがみ しゅんすけ）

一部の細菌が産生するlasso ペプチドと呼ばれる種類のペプチドは、特徴的な結び目状の構造を持っており、細菌が他の細菌を攻撃するためなどに用いられることが報告されている (Maksimov M. O., et al., Nat. Prod. Rep., 2012)。本研究ではlasso ペプチド合成酵素群の立体構造をX線結晶構造解析を用いて明らかにし、特殊な結び目構造がどのように作られるのかを明らかにすることを目指して実験を行った。

lasso ペプチドではN末端のアミノ基と約8残基目の酸性アミノ酸の側鎖の間でペプチド結合が形成され、環状構造が形成されている。さらに、C末端側の直鎖構造が環状構造の中を通ることでlasso ペプチドに特徴的な三次元構造が実現されている。このような構造はリボソームによって翻訳されたlasso ペプチド前駆体がlasso ペプチド合成酵素群によって修飾反応を受けることによって実現されている。lasso ペプチド合成酵素群 (A, B1, B2, C, D) は通常ひとつのオペロンとして転写されるが、このうちAタンパク質はlasso ペプチド前駆体そのものであり、lasso 構造の成熟を行うのはB1, B2 及びCタンパク質である。B1・B2タンパク質が前駆体ペプチドのリーダーペプチドを切断し、続いてCタンパク質が環状構造の形成を触媒して、特異的な三次元構造が形成される (Yan K. P., et al., ChemBioChem, 2012)。Dタンパク質はlasso ペプチドの分泌を行うトランスポーターである。

本研究において、我々はまず様々な細菌から安定なlasso 合成酵素群を探索し、B1タンパク質については大量調整を行い、B1タンパク質と前駆体タンパク質のリーダーペプチド部位の複合体の結晶構造解析にも成功した。図に好熱性放線菌 *Thermobifida fusca* (TfuB1) のB1タンパク質とリーダーペプチド (TfuA-Leader) との複合体結晶構造を示す。この構造から、B1タンパク質によるリーダーペプチド認識の詳細なメカニズムを明らかにすることが出来た。TfuB1は、N末側のβシートとC末端の3本のαヘリックスで構成されているが、TfuB1・TfuA-Leader複合体構造中ではTfuA-LeaderはTfuB1のN末側βシートの端に追加のβストランドとしてドッキングしていた。リーダーペプチドの3つの保存されたアミノ酸残基 (TfuA Tyr-17, Pro-14, および Leu-12) は、TfuB1のβシートと隣接するヘリックス間の疎水性の裂け目によくはまり込んでおり、これによってリーダーペプチドとB1タンパク質の強固な相互作用が保たれているのだと考えられた (図)。さらに、生化学的分析によって、これらの保存された残基がTfuB1とTfuA-Leader間の結合に不可欠であることも示された。以上の結果は、本研究期間中にACS Chemical Biology誌上において発表することができた (Sumita T et al., ASC Chemical Biology, 2019)。



脂肪燃焼に対する機能性物質の添加効果 および活性酸素の影響の解明

研究者 ▶ 東京工業大学 生命理工学院：蒲池 利章（かまち としあき）

①研究の背景および目的

肥満の予防と対策は、「人間の美容と健康」において重要な位置づけを持つ。日本においても食生活を取り巻く社会環境の変化から、肥満の予防・対策が急務となっている。肥満とは、体脂肪が過剰に蓄積した状態であり、糖尿病や脂質代謝異常症・高血圧・心筋疾患など様々な疾患の原因となるため、その予防・対策は重要であるといえる。生体内で脂肪の蓄積を主に担っている細胞が、脂肪細胞である。脂肪細胞では、摂取エネルギーと消費エネルギーのバランスが余剰側に傾いた際に、余剰のエネルギーを脂肪として蓄積する。蓄積された脂肪は、エネルギー消費が高まると細胞内で分解され、生体内のエネルギー源であるATPへと変換される。このATP生産は、主にミトコンドリアにおける酸化的リン酸化によって行われ、酸素分子が最終電子受容体として消費される。つまり、生体内での脂肪の燃焼や、生体内でのエネルギー消費の増加は細胞内の酸素消費につながる。

本研究では、2018年度の助成による研究成果を踏まえ、さらに、脂肪燃焼の評価を酸素濃度イメージングにより実施した。具体的には機能性物質の添加効果および活性酸素の影響を、酸素濃度ダイナミクスとしてとらえた。

②研究方法

脂肪燃焼の評価を酸素濃度イメージングにより実施した。脂肪燃焼に対する機能性物質の添加効果では、分化誘導したマウス繊維芽細胞3T3-L1、ラット褐色脂肪細胞・白色脂肪細胞などを用い、PLIMによる細胞内酸素濃度イメージングと、脂肪滴の同時観察を行った。脂肪の燃焼は、脂肪滴のライブイメージングが可能である脂肪滴染色蛍光試薬 (LipiDye, フナコシ株式会社) を用いた。細胞内酸素濃度イメージングと脂肪滴のライブイメージングにより、脂肪燃焼評価系の実証を行った。脂肪消費を向上させる薬剤添加後、酸素濃度イメージングを行い、脂肪の燃焼に伴う酸素消費の増加をPLIMにより測定した。

③研究成果

脂肪燃焼に対する機能性物質の添加効果では、分化誘導したマウス繊維芽細胞3T3-L1を用い、細胞内酸素濃度イメージングと、脂肪滴の同時観察を行った。脂肪の燃焼は、LipiDyeを用い、蛍光顕微鏡により行った細胞内酸素濃度イメージングと脂肪滴のライブイメージングにより、脂肪燃焼評価系の実証をおこなった。フォルスコリンを添加することにより、脂肪消費速度が向上し、脂肪滴の消失を観測した。また、細胞内の酸素濃度変化の同時測定が実現できた。

脂肪燃焼に対する活性酸素の影響では、 $^1\text{O}_2$ 、 O_2^- 、 OH^\cdot 、 H_2O_2 などの活性酸素に着目し、脂肪の燃焼に伴うこれら活性酸素種の細胞内酸素濃度変化を測定を目指した。細胞内で活性酸素を生成させることにより、脂肪滴の消失が阻害されることが分かった。本年度、新たに開発した酸素イメージング用色素を用いると、脂肪滴の分解と、細胞内の酸素濃度イメージングの同時測定が可能であることがわかり、現在、本色素を用いて脂肪の燃焼に伴う、脂肪滴の消失と、酸化ストレスの関係を継続的に解析している。

近年は、2009年のNatureにオートファジーによる脂肪滴分解が報告され、リポファジーと呼ばれる脂質代謝の新たなプロセスも注目されている。これまでに、培養細胞を用いた脂肪燃焼における活性酸素の影響を明らかにできた。このような研究をさらに推進することで、脂肪の燃焼を積極的に促進し、肥満症対策へ効果的なアプローチを提唱できる可能性があることから、「人間の美容と健康」に対して、大きな貢献が期待できるといえる。

ユビキチン-プロテアソーム系活性化剤の 抗老化作用に関する研究

研究者 ▶ 富山大学 医学部：甲斐田 大輔（かいだ だいすけ）

①研究の背景および目的

ユビキチン-プロテアソーム系は、細胞内の異常タンパク質などの分解を行う機構であり、老化に伴い、その活性が減少することが知られている。その結果、異常タンパク質が蓄積し、アルツハイマー病などの老化関連疾患を引き起こす。一方、モデル生物ではプロテアソームの活性を上昇させることで、寿命の延伸が見られるようになる。このように、ユビキチン-プロテアソーム系による異常タンパク質の分解は、老化や老化関連疾患と密接な関係があると考えられる。申請者の先行研究から、化合物Aはユビキチン-プロテアソーム系によるタンパク質分解を促進することが明らかとなった（図1）。

したがって、化合物Aは老化に伴うユビキチン-プロテアソーム系の活性低下を抑制し、アルツハイマー病をはじめとした老化関連疾患に対する治療効果があるのではないかと考えた。そこで、本研究では、化合物Aがアルツハイマー病モデルマウスの認知機能を向上できるかどうかを明らかにするための実験を行った。本研究から得られた知見は、高齢化に伴う認知症患者の増加など、現在の我が国が抱える様々な問題の解決に大きく貢献できると考えている。

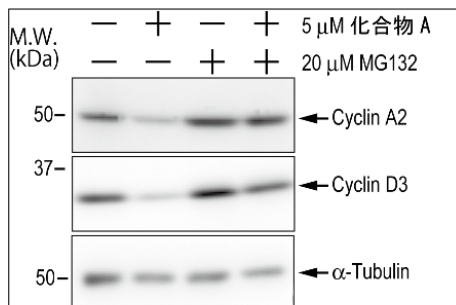


図1 細胞を化合物Aで処理することにより、サイクリンタンパク質が減少する。しかし、プロテアソーム阻害剤のMG132を同時処理することにより、その効果が見られなくなる。

②研究方法

化合物Aがアルツハイマー病に対する治療効果を有するかどうかを検討した。マウス神経細胞由来の初代培養細胞をアミロイドβで処理することにより、アルツハイマー病様の神経細胞の萎縮が観察されることが知られている。そこで、アミロイドβで処理し萎縮した神経細胞を化合物Aで処理し、萎縮が回復するかどうかを確かめた。

また、個体レベルでの効果を観察するため、家族性アルツハイマー病のモデルマウスに化合物Aを30日間投与し、認知記憶実験を行った。

③研究成果

アミロイドβで処理しアルツハイマー病様の萎縮を示した神経細胞に化合物Aを処理した結果、神経細胞の回復が観察された（図2）。しかしながら、アミロイドβで処理していない正常な神経細胞の軸索や樹状突起の長さや形状には影響を与えなかったことから、化合物Aは神経細胞の長さを長くするのではなく、

アルツハイマー病様の萎縮した神経細胞を回復させることが明らかとなった。すなわち、培養細胞レベルでは、化合物Aはアルツハイマー病に対する治療効果を示した。

次に、個体レベルでの効果を観察するため、家族性アルツハイマー病のモデルマウスに化合物Aを30日間投与し、認知記憶実験を行ったところ、化合物A処理により、アルツハイマー病モデルマウスの認知記憶能力に改善が見られた(図3)。したがって、化合物Aはマウス個体においてもアルツハイマー病に対する治療効果を示すことが明らかとなった。

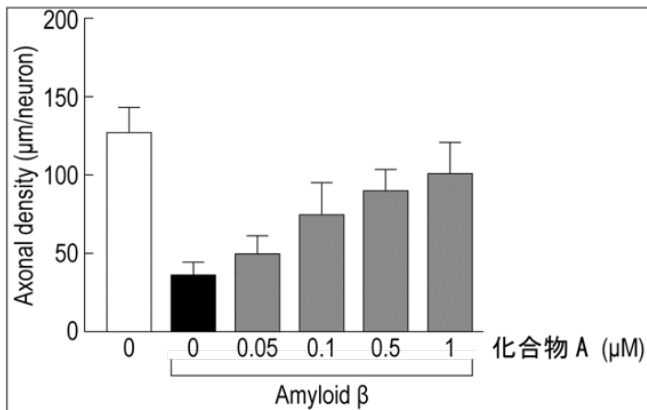


図2 化合物A処理により、萎縮した神経細胞が回復した。

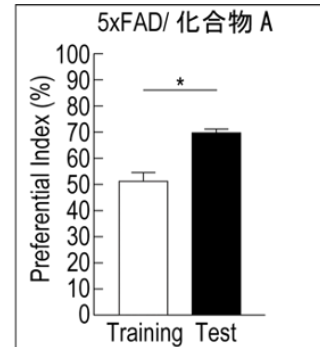


図3 化合物A処理により、アルツハイマー病モデルマウスの物体認知記憶が改善した。

マスト細胞とアレルギー親和性依存的浸潤細胞の クロストークによる皮膚ホメオスタシス制御機構

研究者 ▶ 金沢大学 医薬保健研究域 薬学系：鈴木 亮 (すずき りょう)

我々を取り巻く、住環境（乾燥、紫外線など）や生活環境（食生活、コスメ基剤など）の変化によって、皮膚はトラブルを抱えやすくなっている。特に多くのアレルギー疾患（アトピーや接触性皮膚炎、食物アレルギーによる皮膚症状など）が原因となって、皮膚に多大なダメージ与えることが明らかになっている。これら多くのアレルギー疾患には、マスト細胞が極めて重要な役割を担っており、マスト細胞膜上に発現しているIgE受容体が、アレルギー（食物、ハウスダスト、金属など）によって活性化されると、炎症性メディエータが分泌され様々なアレルギー反応が惹起される。

このような中、我々は抗原とIgEの親和性が、分泌する炎症性メディエータの種類を厳密に制御し、浸潤する免疫細胞の種類（高親和性：好中球、低親和性：単球）に違いを生じさせており、その結果アレルギー炎症反応を調節していることを明らかにした。これらの研究成果は、抗原親和性依存的な浸潤細胞とマスト細胞のクロストーク（相互作用）が、アレルギー疾患の病態決定に寄与していることを強く示唆していた。本研究では、アレルギー親和性依存的な浸潤細胞（好中球及び単球）とマスト細胞のクロストーク研究からアレルギー疾患の実体を解明し、皮膚恒常性維持及び損傷機構を明らかにすることを目的とした。

はじめに、マスト細胞と浸潤細胞（好中球）の相互作用を分子・細胞レベルで追究するため、マウス骨髄由来マスト細胞とマウス骨髄から単離・精製した好中球及び単球を用いた独自のin vitro 共存培養システムを確立し、顕微光学技術と組み合わせることによって、両者の相互作用によるアレルギー疾患制御機構を明らかにすることを試みた。

マスト細胞と好中球のin vitro 共存培養システムには、マウス大腿骨から分化させた骨髄由来マスト細胞、マウス骨髄からマグネットビーズを用いて精製した骨髄好中球を用いた。分化および精製した細胞をフローサイトメータでマーカー蛋白質の発現を確認したところ、両細胞とも95%以上の細胞で目的細胞であることが確認できた。ここで得られた骨髄由来マスト細胞と単離好中球を、マトリゲルコートしたディッシュ上で共存培養したところ、どちらの細胞も球形をしており、好中球はマスト細胞（直径：12 μm）と比較し、やや小さい（直径：7 μm）ことが分かった。そこで、マスト細胞を抗原で特異的に活性化した際の両細胞間での相互作用について、細胞形態及び動態を指標にライブイメージング解析を行った。その結果、マスト細胞を抗原で特異的に刺激すると、抗原によって活性化されたマスト細胞では、脱顆粒反応（ケミカルメディエータの開口放出）が誘導され、それに伴う形質膜の波打現象（ラフリング）が観察された。その後、丸い形態をしていた好中球が、紡錘形に変化しマスト細胞の方向へ移動する様子が観察された。そして複数の好中球が、脱顆粒をしているマスト細胞と相互作用（接着）している様子が観察された。そこで、相互作用の足場として重要な細胞骨格に着目し、マスト細胞と好中球の相互作用にともなう細胞骨格蛋白質の局在変化について追求した。ここでは、様々な細胞間相互作用において、接着部位で細胞骨格蛋白質の変化が明らかになっているFアクチンの集積やチューブリン（MTOC; 微小管形成中心）の極性などについて、共焦点レーザー顕微鏡を用いた画像解析により追究した。はじめに、相互作用に伴うチューブリンの極性変化を免疫染色法によって追究したところ、共存培養を行った細胞と共存培養していない細胞では明確な極性変化は観察されなかった。一方、アクチンについて相互作用に伴うFアクチンの局在変化を、ファロイジンを用いたFアクチンの特異的染色法により追究した。その結果、マスト細胞と好中球が相互作用（接着）している部分で、Fアクチンが顕著に集積している様子が観察された。このような接着面でのFアクチンの集積は、接着していないマスト細胞や好

中球では観察されなかった。現在は、これらFアクチンの集積を生細胞レベルで追究する為、Fアクチンバイオセンサーの構築を行なっている途中である。次に、マスト細胞と好中球の相互作用に寄与する分子について解析を行なった。免疫細胞間で行われる細胞間相互作用には免疫シナプスと呼ばれる、相互部位（細胞接着部位）で観られる特徴的な分子の集合体が形成される。免疫シナプスに関与する各種分子（接着分子、受容体、シグナル分子など）について、マスト細胞と好中球の相互作用に寄与する分子の探索を行なった結果、接着分子であるインテグリン（CD18、CD54）が、マスト細胞と好中球が相互作用することによって局在変化を起していることが明らかになった。

次に、低親和性抗原でアレルギー炎症組織に有意に浸潤する単球とマスト細胞の相互作用について、先述したマスト細胞-好中球相互作用研究で有用性が示された *in vitro* 共存培養システムを用いて追究した。マスト細胞には、骨髄由来マスト細胞を用い、単球としてはマウス骨髄から単離した骨髄単球を用いた。単球の単離にはマグネットビーズを用い、フローサイトメータを用いてマーカー蛋白質の発現により単離状態の確認を行なった。その結果、90%以上の純度で単球が精製できていることが分かった。

これらの細胞を共存培養しマスト細胞を抗原で特異的に刺激したところ、抗原刺激を行った場合には、刺激72時間後には、ほぼ全ての細胞でマクロファージのマーカー蛋白質（F4/80）が発現しており、大部分の単球がマクロファージに分化していることが明らかになった。このようなマクロファージへの分化は、マスト細胞と共存培養していない単球では観察されなかった。最近の研究成果では、単球やマクロファージには性質の異なる様々な単球やマクロファージが存在することが明らかになっている。また我々の研究成果から、親和性の異なる抗原によって活性化されたマスト細胞は、親和性特異的な遊走因子を分泌することなども明らかになっている。そこで、異なる親和性抗原が様々な単球の組織遊走能に影響を及ぼしているのではないかと考え、トランスウェルを用いて異なる親和性抗原のマスト細胞の活性化と様々な単球の遊走能の関係について検証した。その結果、高親和性抗原及び低親和性抗原のいずれの抗原で刺激された場合でも、マスト細胞の活性化に伴い単球がマスト細胞方向へ遊走している様子が観察された。さらに遊走される単球の詳細な解析を行なったところ、高親和性抗原と低親和性抗原では、マスト細胞方向に遊走する単球の性質や機能に違いが生じている可能性が示唆された。このことから、異なる親和性の抗原で活性化されたマスト細胞から放出される異なる炎症性メディエータによって、性質の異なる単球が遊走され、その結果、異なる性質のマクロファージへの分化が誘導されていることが示唆された。現在は、遊走される単球の違いによる異なるマクロファージへの分化誘導メカニズムやアレルギー病態調節における役割について研究を行なっている。

本研究で用いた異なる親和性を有する抗原やマウス組織から分化・単離・精製した細胞を用いた独自の *in vitro* 共存培養システムは、これまで明らかにならなかった細胞間相互作用について、様々な分子基盤の研究を可能にし、相互作用が担う分子・細胞機能を明らかにする上で極めて有用な研究システムであった。本システムを用いて研究をさらに展開することによって、細胞間相互作用が担うアレルギー疾患の病態決定メカニズムの一端が明らかになり、マスト細胞と浸潤細胞の相互作用といった新たな視点から複雑なアレルギー疾患の原因を究明するとともに、皮膚をはじめとする組織ホメオスタシス制御機構の実体解明について新たな展開をもたらせるものと期待される。

脳の健康の維持を担う分子メカニズム

研究者 ▶ 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 神経薬理研究部：村松 里衣子（むらまつ りえこ）

脳は全身状態を制御する臓器のため、脳の健康が破綻すると全身の健康が損なわれる。脳の健康が最も顕著に破綻するのは、脳疾患に罹患した際であり、疾患により傷ついた脳の修復は全身の健康維持に重要と考えられる。しかし現時点で、傷ついた脳の修復を促す医薬品は上市されていない。そのため脳の修復を促すメカニズムを解明し、その知見を薬剤開発へつなげることは、脳神経疾患による寝たきりからの回復を促すと期待され、また医療経済学的重要性も指摘されている。

脳の機能維持に重要な構造物の一つに髄鞘がある。髄鞘は神経細胞間のネットワークの恒常性を担う働きをもつ構造物で、グリア細胞の一種であるオリゴデンドロサイトによって形成されている。オリゴデンドロサイトはその前駆細胞が成体の脳や脊髄に広く分布しており、傷害による刺激を受けたオリゴデンドロサイト前駆細胞が増殖を促進し、修復部位へ集積し、成熟オリゴデンドロサイトへ分化することで、髄鞘が修復される。特に成熟細胞への分化は、髄鞘修復に必須のプロセスであるが、その分子メカニズムには不明な点が多い。

本研究ではオリゴデンドロサイトの分化のメカニズムを解明するため、髄鞘が修復しやすい条件としにくい条件のオリゴデンドロサイトの性質を比較した。既報では、加齢あるいは慢性病態下ではオリゴデンドロサイトの分化力が低下すると示唆されている。そこで、老齢マウスおよび指定難病である多発性硬化症のモデルマウスからオリゴデンドロサイト前駆細胞を採取し（磁気ビーズにオリゴデンドロサイト前駆細胞の細胞表面マーカーを発現した抗体を結合させて単離）、各細胞における遺伝子発現を網羅的に検討した。各群における遺伝子発現量が1.5倍以上差があるものを抽出したところ、老齢マウスにおける遺伝子発現は、若齢マウスと比較し、発現量が増加しているものと減少しているものが計192種類あった。若齢マウスにおいて発現が高い遺伝子が、髄鞘形成に関わるという仮説を立て、上位10種類の遺伝子についてsiRNAを合成し、培養オリゴデンドロサイトに導入し、その発達への作用を評価した。その結果、一部の遺伝子の発現抑制により、オリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖や分化が阻害される結果が得られる。このことから、若齢オリゴデンドロサイトに高発現する遺伝子が、髄鞘の形成や安定性を担っている可能性が示唆された。そこで、この分子の発現様式を生体内で検出するため、マウスの各臓器からRNAサンプルを採取し発現比率を検討したところ、脳の他にも肝臓など複数の臓器に発現する様子が検出された。そこでこの遺伝子の髄鞘形成に対する作用を検討するため、本遺伝子の欠損マウス（対象群と生存に差はない）の髄鞘形成を組織学的に解析した。脳梁、小脳、脊髄からそれぞれ組織髄鞘関連タンパク質を可視化して検出したところ、特に脳梁の髄鞘形成に不良が認められた。続いて、髄鞘の発達だけでなく、修復に対しても異常が認められるかを検討するために、成体マウスに対して脱髄を誘導させ、その後自然に生じる髄鞘修復における作用を検討した。脳梁に局所的にリゾフォスファチジルコリンを注入すると、注入部位に限局して脱髄巣が形成される。注入後4週間ほどをかけて髄鞘は修復していくため、この過程に対して、同定した遺伝子からなるタンパク質に対する阻害剤あるいは活性化剤をマウスの脳室内に持続的に投与した。

組織学的解析を行った結果、阻害剤を同定した群では、時間経過にともなう髄鞘形成が不良であり、またオリゴデンドロサイト系譜細胞自体の数も対象群と比較して少なかった。一方で活性化剤を投与した群では、術後2週間の時点で髄鞘の旺盛な修復が見られ、またオリゴデンドロサイト系譜細胞の数自体も

多かった。これらのことから、同定した遺伝子・タンパク質は、オリゴデンドロサイト前駆細胞の内因性の増殖機構維持に促進的に働くことで、髄鞘の形成や維持を担うものであること増強させることによりオリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖力を高め、髄鞘の修復を促進させる治療的な意義を有することが示唆された。

今後病態モデルを用いた解析を進め、同定因子の治療効果についてより詳細に解析していきたい。

認知機能・活動量・血液マーカーを用いた「ストレス」の客観的評価

研究者 ▶ 国立精神・神経医療研究センター 精神保健研究所 行動医学研究部：堀 弘明（ほり ひろあき）

【背景】

現代はストレス社会といわれ、メンタル不調からうつ病を発症する者が増加している。うつ病の発症には性差があり、女性の有病率は男性よりも高い（厚生労働省の統計による）。うつ病やうつ状態は、罹患者本人の苦痛はもとより、重大な社会経済的損失をもたらすことから、メンタルヘルスの向上は喫緊の課題となっている。このようなメンタルヘルス上の問題を軽減するためには、不調を早期に発見し、うつ病などのストレス関連精神疾患を発症する前に適切に対処・介入することが重要である。しかし、この早期発見に有用な客観的検査指標は存在せず、そのため予防的な対応や介入は困難であるのが現状である。

一方、うつ状態やストレスフルな状況下では、不安や睡眠障害といった症状が現れ、記憶力や注意力などの認知機能が低下し、血液中ではcortisolなどのストレスホルモンやサイトカインなどの炎症性物質が増加することが多くの研究によって明らかにされている。これらの所見は客観的検査によって定量的に測定することができるというメリットがある。

本研究では、一般人口から募集した108名の女性を対象に、ストレスに関連した心理症状の評価に加え、認知機能測定および血液ストレスマーカー（炎症分子、ストレスホルモン）測定を行い、うつ病などのストレス関連精神疾患の早期発見に資する指標を開発することを目的とした。

【方法】

本研究は国立精神・神経医療研究センター倫理委員会の承認を得て実施し、各被験者に研究の内容を十分説明した上で文書にて同意を得た。

はじめに各被験者に対して、精神科医あるいは臨床心理士が「精神障害の診断・統計マニュアル」第4版（アメリカ精神医学会）に基づく構造化面接を行い、うつ病を含む精神疾患に罹患していないことを確認した。

ストレスに関連して生じうる代表的な心理症状である不安症状、抑うつ症状、睡眠障害について、それぞれ以下の自記式質問紙を用いて評価した。これらの質問紙はいずれも、妥当性の確立された日本語版を使用した。

・不安症状: State-Trait Anxiety Inventory (STAI; Spielberger et al., 1970)

・抑うつ症状: Beck Depression Inventory-II (BDI-II; Beck et al., 1996)

・睡眠障害: Athens Insomnia Scale (AIS; Soldatos et al., 2000)

認知機能は、標準化された神経心理学的検査バッテリーである Repeatable Battery for the Assessment of Neuropsychological Status (RBANS; Randolph et al., 1998) を用い以下の領域を評価した。

・即時記憶・視空間/構成・言語・注意・遅延記憶. さらに、これらを総合した「総指標得点」を算出した。

炎症分子・ストレスホルモンの測定については、正午・昼食前に約15mlの採血を行い、以下を測定した。

・Interleukin-6 (IL-6)

・高感度tumor necrosis factor- α (TNF- α)

・高感度C-reactive protein (CRP)

・Interleukin-1 β (IL-1 β)

・Cortisol

・Adrenocorticotrophic hormone (ACTH)

・Dehydroepiandrosterone-sulphate (DHEA-S)

これらの測定は、臨床検査会社であるエスアールエル社において、enzyme-linked immunosorbent assay 法やchemiluminescent enzyme immunoassay 法により実施された。

心理症状と認知機能および炎症マーカー・ストレスホルモンの関連は、データの分布を考慮し、Spearman の順位相関係数 (ρ) を用いて検討した。なお、うつ病の有病率や認知機能、ストレスマーカー濃度は年齢によって影響されうることから、若年者と中高年者で得られる所見が異なる可能性を考慮し、すべてのデータ解析は被験者を若年期 (20 ~ 39 歳) 女性 62 名と中高年期 (40 ~ 64 歳) 女性 46 名に分けて行った。

【結果】

< 中高年期女性における結果 >

中高年期女性における心理症状と認知機能の間の相関については、状態不安・特性不安症状と言語の間に有意な負の相関が認められた (状態不安: $\rho = -0.32$, $p = 0.025$; 特性不安: $\rho = -0.28$, $p = 0.047$)。

心理症状と血液マーカーの間の相関については、抑うつ症状は、IL-6 濃度との間に有意な負の相関 ($\rho = -0.39$, $p = 0.008$) が、IL-1 β 濃度との間に有意な正の相関 ($\rho = 0.31$, $p = 0.039$) が認められた。

睡眠障害は、IL-6 濃度との間に有意な負の相関 ($\rho = -0.40$, $p = 0.006$) が、高感度 TNF- α 濃度との間に有意な正の相関 ($\rho = 0.35$, $p = 0.018$) が認められた。

< 若年期女性における結果 >

若年期女性では、中高年期女性の結果と同様、特性不安症状と言語の間に有意な負相関 ($\rho = -0.26$, $p = 0.047$) が認められた一方で、どの心理症状についても炎症マーカー・ストレスホルモンとの間に有意な相関は認められなかった (すべて $p > 0.05$)。

【考察】

本研究により、中高年期女性におけるストレス関連心理症状は認知機能検査低成績および炎症性サイトカイン濃度変化と関連することが示された。不安症状は RBANS の言語課題によって測定された前頭葉機能低下と関連しており、抑うつ症状および睡眠障害は血中 IL-6 低値、IL-1 β ・高感度 TNF- α 高値と関連していた。他方、若年期女性ではストレス関連心理症状は炎症マーカーと有意に関連していなかった。これらの結果から、ストレスが心身の健康に及ぼす悪影響は若年期よりも中高年期において明瞭に現れるという可能性が示唆される。うつ病は若年期に比べて中年期に発症することが多いとされており (厚生労働省の統計による)、今回の結果はそういった疫学データに符合するものである。

炎症性サイトカインの中で、IL-1 β と TNF- α は心理症状と正の相関を示したのに対し、IL-6 は心理症状と負の相関を示したことは興味深い。前述のようにストレスによって炎症性サイトカインが増加することが基礎研究で明らかにされており、IL-1 β と TNF- α についての結果はこれに対応するものであるが、IL-6 の結果は一見これに反するものであるように思われる。しかし、IL-6 は、炎症性サイトカインであると同時に抗炎症作用を有し、過剰・過少の両方ともが好ましくない影響をもたらす可能性が指摘されている (Scheller et al., 2011)。

これらの知見は、心理的ストレスに適切に対処することの重要性と同時に、認知機能や血中炎症性サイトカイン濃度がストレス症状の客観的指標として有用である可能性を示唆するものである。さらなる研究によって、うつ病などの精神疾患の予防に資する客観的ストレス症状測定法の開発へとつながることが期待される。

新規DNA修復活性測定法を利用した、がん予防薬・放射線障害治療薬としてのゲノム保護薬の開発

研究者 ▶ 東北大学 加齢医学研究所 腫瘍生物学分野：吉野 優樹（よしの ゆうき）

細胞のゲノムは複製や細胞分裂時のエラーや、放射線や化学物質などの外的要因によって傷害される。ゲノム損傷が蓄積すると、加齢や発がんの原因となる。これらの傷害を修復し、ゲノム安定性を維持するため、細胞は様々な機構を有する。BRCA1は相同組み換え修復によるDNA損傷修復と、中心体複製制御を介した染色体安定性の維持に寄与しており、ゲノムの「care taker」と言われている。BRCA1の機能障害はDNA損傷修復能の低下を引き起こし、変異の蓄積を加速させる。

また、BRCA1欠損細胞では中心体の異常増加が生じる結果、細胞分裂時に染色体が均等に分配されず、染色体不安定性が誘導される。

これらの異常が重なることで、BRCA1変異キャリアでは乳がんや卵巣がんを極めて高率に引き起こす。また、BRCA1欠損細胞では、放射線や抗がん薬への感受性が増大する。抗酸化物質など、ゲノム損傷の原因となる化学物質を除去することでゲノムを保護する化学物質は知られているが、積極的にゲノム安定性を向上させる化学物質は知られていない。このような化学物質、ゲノム安定化薬が開発できれば、発がんの抑制に用いることができるほか、積極的治療法が存在しない放射線傷害や抗がん薬による副作用の治療にも有用な可能性がある。そこで、本研究ではゲノム安定化薬の開発を目標とし、そのための分子生物学的な基盤を構築することを目的とした。

本研究では、BRCA1欠損によるゲノム不安定性をモデルとして用い、ゲノム不安定性を改善する化合物をゲノム安定化薬の候補とした。さらに、ゲノム安定化の薬理学的機序の解明するために、網羅的プロテオーム解析によって候補化合物の標的分子の同定を試みた。

まず、BRCA1欠損によるゲノム不安定性を改善しうる化合物として、疫学的に発がんリスクの低下との相関が報告されている化合物Aに着目した。また、スクリーニングが容易なゲノム不安定性の指標として、中心体増幅を用いた。不死化正常乳腺細胞において、BRCA1をRNAiでノックダウンすると中心体増幅が誘導される。

BRCA1のノックダウンと同時に化合物Aを培地に添加すると、中心体増幅が抑制された。

BRCA1欠損乳がん細胞株を化合物Aで処理した場合も、同様に中心体増幅が抑制された。

これらから、化合物AはBRCA1欠損による中心体増幅を抑制することが明らかになった。化合物Aが有する中心体増幅抑制活性の分子薬理学的機序を明らかにするため、化合物Aの標的分子の探索を行った。化合物Aの類縁体を磁性ビーズに固層化し、アフィニティクロマトグラフィーによって化合物Aと結合する分子を細胞抽出液から分離した。これを網羅的質量分析によって解析し、コントロールサンプルに対する相対定量を行い、化合物A固層化ビーズによって特異的に濃縮・分離されるタンパク質を探索した。その結果、化合物Aの2個の類縁体で共通して濃縮されたタンパク質を約400種同定した。これらから gene ontology 解析によって、中心体制御とDNA損傷修復の双方に関連するものを絞りこんだところ、ユビキチンリガーゼ複合体構成因子であるFactor Bが当てはまった。

現在、Factor Bが化合物Aと結合すること、および、化合物Aによる中心体増幅抑制活性にFactor Bが寄与することの確認を行っている。

毛の発生と再生を制御する亜鉛シグナルの役割解明： 「健康と美」への新しい戦略構築

研究者 ▶ 徳島文理大学 薬学部：深田 俊幸（ふかだ としゆき）

【研究の背景・目的】亜鉛は生命維持に必要であり、亜鉛の欠乏は毛などの異常を主訴とする亜鉛欠乏症をもたらす。

本研究では、亜鉛シグナルがどのように毛の発生と再生に関わるのか、その分子機序の解明と創薬および再生医療を念頭に実験を行った。

実験の具体的内容：本研究では、(1) 発毛サイクルにおけるZIP10 の役割解明、(2) ZIP10 を制御する分子の同定、(3) 発毛に関する創薬の観点から、毛の発生と再生における亜鉛シグナルの役割の解明を目標とした。

(1) 毛サイクルにおけるZIP10 の役割解明

毛包外根鞘に発現するZIP10 の機能喪失は毛包の喪失をもたらすが、ZIP10 がどのように毛包の形成に関わるのか、その分子機序は解明されていない。そこで、Zip10 プロモーターの下流にGFP-EGFP-IRES-ERT2Cre 遺伝子カセットをノックインしたマウス (Zip10-GFP-KI マウス) を作製し、このマウスの毛包からGFP 発現を指標にしてZIP10 陽性細胞をソーティングする。この細胞からmRNA を抽出し、RNA-sequence によって遺伝子発現の特徴を解析する。

(2) ZIP10 を制御する分子群の同定

ZIP10 の亜鉛シグナルがどのように毛包の形成を制御するのか、その分子メカニズムを解明する。具体的には、ZIP10 に会合する蛋白質をYeast two hybrid 法で単離する。ベイトには、上述のZIP10 陽性細胞から調整したcDNA ライブラリーする。

(3) 発毛に関する創薬

ZIP10 を安定的に発現させた細胞株とZip10-GFP-KI マウスの毛包から単離したZIP10 陽性細胞を用いて、ZIP10 の亜鉛輸送能や発現変化を指標にして、ZIP10 およびZIP10 結合分子の機能に影響を与える化合物をスクリーニングする。

結果と今後の方針：

(1) 毛の発生と再生におけるZIP10 の役割解明

Zip10-GFP-KI マウスを作成し、完成した (未発表)。現在、本研究助成金で購入したTd-tomato-KI マウスと交配して、ZIP10 発現細胞を単離して、遺伝子発現の特徴を解析するとともに、スフェロイド培養法を適用してZIP10 発現細胞の毛包幹細胞としての性質を精査する計画である。

(2) ZIP10 を制御する分子群の同定

ZIP10 に会合する蛋白質として、ATG4D をYeast two hybrid 法で単離した (未発表)。ATG4D はオートファジーに関連する分子であり、毛包形成におけるZIP10 とオートファジーとの関わりについて精査している。

(3) ZIP10 を制御する創薬と再生医療研究

ZIP10 の機能に影響を与える化合物をスクリーニングするために、ZIP10 を安定的に発現させた細胞株の作成を行った。薬剤添加に依存してZIP10 の発現が誘導されるプラスミドの構築を試みたが、サブクローニングの際にZIP10 遺伝子に無秩序に変異が挿入される問題が発生し、その解決のためにプラスミドのプロモーターの変更や、トランスフォームする際の菌株を変更することを始めとする多くの作業を試行した。現在、薬剤誘導性の発現を精査しており、その有効性を化合物スクリーニングに適用するための細胞株として確立する計画である。

不活性型アデノシン受容体の特異的に認識する 機能性モノクローナル抗体の開発

研究者 ▶ 千葉大学 大学院：小笠原 諭（おがさわら さとし）

【研究の背景と課題、目標】

膜蛋白質は、創薬においても重要なターゲットと位置づけられ、立体構造解明は構造に基づいた医薬分子設計において非常に重要である。しかし、膜蛋白質は安定性が非常に乏しく、大量に生産、精製することが非常に困難、つまり構造を得るための結晶化に至らない場合が多い。この問題を解決するため、本研究室では、統計熱力学計算法を用いて理論的にGPCRの耐熱化変異体を予測法する方法を開発した(エントロピー基盤法: EBM)。この計算方法は「生体膜を形成するリン脂質の炭化水素鎖の並進配置エントロピーが膜蛋白質の熱安定性を決定づける最も重要な因子である」という全く新しい理論に基づき、1つのアミノ酸置換に伴う生体膜のエントロピーの利得(損失)を液体の統計力学理論と形態熱力学のアプローチの統合型計算を行うものである。

耐熱化モデルGPCRとして、我々が抗体を用いて構造決定したアデノシンA2a受容体(A2aR)についてEBMを適用した。A2aRの拮抗薬はパーキンソン病等の治療薬、一方で作動薬は緑内障改善、創傷治癒などの目的で開発が進んでいる。さらに近年、A2aRは新しいがん免疫の分子標的として注目されている。がん細胞で過剰に放出されるアデノシンがA2aRに受容されることで、T細胞活性がん細胞で過剰に放出されるアデノシンがA2aRに受容されることで、T細胞活性を抑制し、がん細胞が免疫回避することが明らかとなってきた。A2aR阻害は、PD-L1やCTLA-4等の免疫チェックポイント分子に対する阻害剤効果を増幅し、CD73阻害活性を増加することが報告され、A2aR拮抗薬はがん免疫療法薬として開発が盛んとなってきている分子である。EBMにより、野生型に比べて12度の上昇する耐熱化変異体が得られた。興味深いことにこの変異型A2aRは作動薬が結合せず、拮抗薬のみが結合する、つまり不活性型構造であることが示唆されている。EBMは迅速に熱安定化置換体を得られ、かつリガンド非存在下でGPCRを機能性構造へ安定化する変異体を得られる方法であり、安定的に固定化されたGPCRを抗原として抗体作製を行うことで、機能性抗体を積極的に取得できる可能性が期待される。

本研究では、不活性型A2aRを抗原に、構造解析を目指す立体構造認識抗体、および抗体単独でアンタゴニスト(拮抗薬)様活性を有する機能性抗体の開発を目的とする。2018年度は、不活性型A2aRを抗原として複数のモノクローナル抗体を樹立した。得られた抗体をツールとしてGPCRの不活性型構造の解明と、抗体の応用利用を目指した。

【研究方法】

出芽酵母により発現・精製したヒトアデノシンA2a受容体はリン脂質を用いてプロテオリポソームへ再構成した。このプロテオリポソームをマウスへ免疫して抗体価の上昇を確認後、ハイブリドーマを作製した。プロテオリポソームを用いたELISA法によりスクリーニングを行なって、モノクローナル抗体を樹立した。樹立した抗体は、蛍光検出を用いたゲル濾過クロマトグラフィー、ウェスタンブロッティング、フローサイトメトリー、タンパク質間相互作用解析等、種々の解析を行なって性質決定を行なった。

【研究成果】

Balb/cマウスにヒトアデノシンA2a受容体プロテオリポソームを免疫し、抗体価の上昇を確認したところで、脾臓細胞を摘出し、ミエローマ細胞と細胞融合することでハイブリドーマを作製した。ハイブリドーマを培養して得られた培養上清を用い、ヒトアデノシンA2a受容体プロテオリポソームELISAとウェスタンブロッ

ティング、およびゲル濾過クロマトグラフィーのスクリーニングから、ヒトアデノシンA2a 受容体の立体構造を認識と考えられる抗体を21 クローン樹立することに成功した。樹立したクローンからプロテインG レジン精製により精製抗体を取得し、サブクラスを決定し、一部のクローンはBLItz を用いた親和性測定を行って表1にまとめた。得られた精製抗体は以降の実験に用いた。まず、ヒトアデノシンA2a 受容体を強制発現させた培養細胞株を用いたフローサイトメトリー解析から、細胞外領域を認識するクローンが2 つあることを確認した。さらに、アデノシン受容体のサブファミリーであるA1、A2b、A3を強制発現させた培養細胞株を用いてフローサイトメトリー解析した結果、この2クローンはサブファミリーに対して反応しないA2aR 特異的な抗体であった(図1)。次に、フローサイトメトリー解析に用いた細胞の可溶性画分を用いてウェスタンブロッティング(WB)を行うと、クローン52はWB 陽性、クローン472はWB 陰性の性質であった。さらにクローン52はA2aR 特異的な抗体であった(図2)。クローン472のA2aR 特異性を確認するため、免疫沈降実験を行った。まず、クローン472をNHS-セファロースへアミンカップリングにより固相化を行った。

次に、フローサイトメトリー解析に用いた細胞の可溶性画分を用いて472 固相化レジン、あるいはポジティブコントロールとしてanti-FLAGレジンを用いて免疫沈降を行い、その後、SDS-PAGE、ウェスタンブロッティングを行った。その結果、クローン472はSDS-PAGEのような変性したA2aRには結合せず、変性していないA2aR 特異的に結合することが分かり、その特異性・親和性とも非常に高いことが明らかとなった(図3)。

クローン472はA2aRの細胞外領域を認識し、かつ立体構造認識抗体であることから、機能性を持っていると予想された。そこで、精製タンパク標品を用いて簡易的にA2aRのリガンド結合測定ができ、かつ精製標品中に存在する界面活性剤の影響を受けないナノディスク(nanodisc)の再構成を試み、リガンド結合アッセイ系の構築を試みている。現在、A2aR ナノディスクは再構成効率が低いものの、作成できることを確認した。今後、ビアコア(Biacore)などの装置を用いて詳細なりガンド結合アッセイを行っていく予定である。

Summary of anti-A2a mAbs

Clone No.	Sequence	Subclass	ADORA2A	ADORA2B	ADORA2C	ADORA1	ADORA3	ADORA2A	ADORA2B	ADORA2C	ADORA1	ADORA3
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

表1 樹立したクローンのまとめ

Flow Cytometry analysis

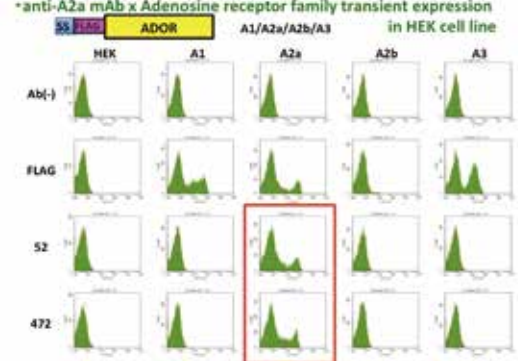


図1 フローサイトメトリー解析

Western Blot analysis

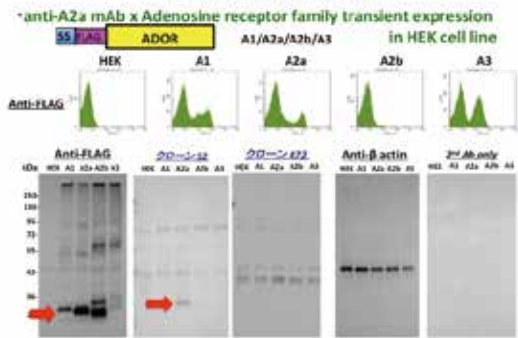


図2 ウェスタンブロッティング解析

WB analysis after Immunoprecipitation with Clone 472

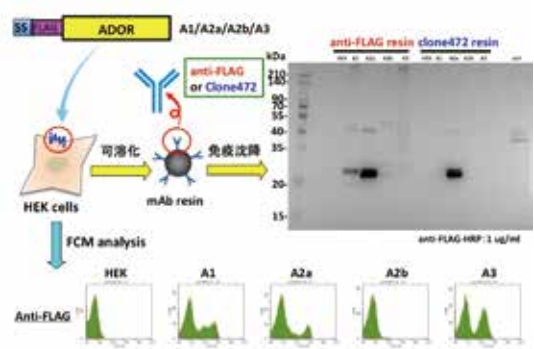


図3 クローン472の免疫沈降実験

研究テーマ

生理活性を付与したペプチドマテリアルを利用した骨芽細胞の培養と分化制御

研究者 ▶ 東京工業大学：堤 浩 (つつみ ひろし)

これまでに両親媒性に設計したペプチドE1Y9 (Ac-EY₂EYKY₂EYKY-NH₂)が水中で自己組織化してβシート構造をとり、ネットワーク性のナノファイバーを形成することを見出してきた(図1)。また、E1Y9は末端に配置したグルタミン酸との相互作用によりカルシウムイオン応答的にヒドロゲルを形成可能であることを明らかにしてきた。

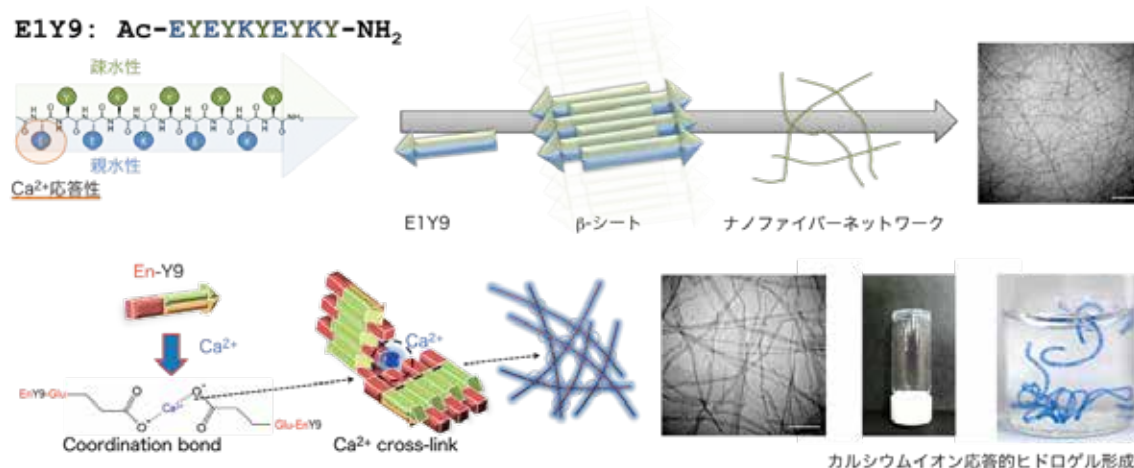


図1. E1Y9の構造と自己組織化によるナノファイバーネットワークおよびヒドロゲルの形成。

本研究では骨芽細胞の培養と分化制御のために、カルシウムイオン応答的に調整したE1Y9から成るヒドロゲルに生理活性配列を導入し、細胞足場材料の創製を行った。これまでの検討で、カルシウムイオンを豊富に含んだE1Y9ゲルが骨芽前駆細胞であるMC3T3 E1の培養に適した足場材料であることがわかっている。また、細胞接着などを促進する生理活性配列をE1Y9に導入することにより、MC3T3 E1細胞の接着・増殖が促進され、効率的な培養が可能であることを見出している。

特に、ALKRQGRTLYGFという配列を導入したE1Y9-ALKがMC3T3 E1細胞の培養に適していることから、E1Y9-ALKを中心に、生理活性配列を導入したE1Y9ヒドロゲルを細胞培養の足場材料として、MC3T3 E1細胞の培養と骨芽細胞への分化制御を行った。

研究方法

以下に示す5つのペプチドをFmoc固相合成法により合成した。

E1Y9: Ac-EY₂EYKY₂EYKY-NH₂

E1Y9-ALK: Ac-EY₂EYKY₂EYKY-GGG-ALKRQGRTLYGF-NH₂

E1Y9-DGR: Ac-EY₂EYKY₂EYKY-GGG-DGRGDSVAYG-NH₂

E1Y9-PRG: Ac-EY₂EYKY₂EYKY-GGG-PRGDSGYRGDS-NH₂

E1Y9-RGD: Ac-EY₂EYKY₂EYKY-GGG-RGDS-NH₂

カバーガラス上にシリコンリングを固定したマイクロウェルを作成し、このウェル中でペプチド水溶液をカルシウムイオン処理することによりディスク状のヒドロゲル(図2)を調製し、MC3T3 E1 細胞の培養を行った。培養後、培地に分化誘導因子を加えることにより、骨芽細胞への分化誘導を行った。各生理活性配列を20%含むE1Y9ゲルにおける細胞の増殖と分化誘導について評価した。また、E1Y9-ALKと他の生理活性配列を導入したE1Y9誘導体を組み合わせた混合ゲルについても検討を行った。



図2. ディスク状ヒドロゲルの調製と細胞培養

研究成果

MC3T3 E1 細胞の接着・増殖を評価した結果、生理活性配列を導入した4つのE1Y9ゲルの中で、E1Y9-ALKゲルが細胞接着能と増殖促進効果を示すことが明らかとなった。また、E1Y9-DGRゲルおよびE1Y9-RGDゲルはE1Y9最も高い単独よりも細胞接着と増殖を促進することもわかった。そこで、E1Y9-ALKとE1Y9-DGRまたはE1Y9-RGDを組み合わせた混合ゲルについても評価を試みたが、これらのE1Y9誘導体の混合液ではヒドロゲルを調製することができなかった。これまでの検討で、E1Y9-ALKは単独ではヒドロゲルを形成することができず、安定なヒドロゲルを形成するためにはE1Y9との混合ゲルにする必要があることがわかっている。また、安定なヒドロゲルを調製するためには、E1Y9-ALKはE1Y9に対して重量比で最大20%までしか添加できないため、他の生理活性配列を導入したE1Y9誘導体をさらに混合することによって、ヒドロゲルを形成できなくなったものと考えられる。

次に、培養したMC3T3 E1細胞の骨芽細胞への分化誘導を行った。分化誘導後、14日目に分化誘導のマーカートンパク質であるアルカリホスファターゼの活性を調べた結果、生理活性配列を導入した4つのE1Y9ゲルはE1Y9ゲル単独より高い活性を示し、中でもE1Y9-ALKが最も高い活性を示した。さらに、分化誘導後、7日目と14日目に、分化誘導中期から後期のマーカートンパク質であるオステオポンチンとRUNX2の発現を蛍光免疫染色により評価した結果、E1Y9-ALKゲルとE1Y9-RGDゲルにおいて、E1Y9ゲル単独よりも各マーカートンパク質の発現が促進されていることがわかった。分化誘導7日目において、RUNX2は、E1Y9-ALKゲルとE1Y9-RGDゲル上で培養した細胞の核に局在していたが、E1Y9ゲル単位では細胞質にも発現している様子が観察された。RUNX2は核内で転写因子として機能するため、導入した生理活性配列によりその機能が促進されたものと考えられる。また、分化誘導14日目において、E1Y9-ALKゲル上で培養した細胞ではRUNX2の局在が核から細胞質に移行しているのに対し、E1Y9-RGDゲル上で培養した細胞ではRUNX2は核に局在したままであった。RUNX2は分化の後期段階では分化抑制的に働くことから、分化を促進する上では核の中に長期に渡って局在することは好ましくないと考えられている。E1Y9-ALKゲルでは、RUNX2の発現誘導と局在制御が適切に行われていると考えられ、骨芽細胞の分化を正しく骨芽細胞の分化を正しくられている。E1Y9-ALKゲルでは、RUNX2の発現誘導と局在制御が適切に行われていると考えられ、制御していることが示唆された。これらの結果から、生理活性配列を導入した自己組織化ペプチドを足場材料とすることにより、骨芽細胞の分化制御ができることがわかった。

ペプチド-ピリドキサル型分子を利用する タンパク質標識化法の開発

研究者 ▶ 東京大学 生産技術研究所：工藤 一秋（くどう かずあき）

①研究の背景と目的

タンパク質への機能性分子の部位特異的導入は、分子生物学研究において重要な位置を占める。その一つとして、ピリドキサルリン酸 (PLP) やその類縁体を用いるアミノ酸代謝反応触媒活性を応用したタンパク質 N 末端アミノ基のカルボニル基への変換がある。生成物の α -ケトアミドは求電子性が高く、種々のアミン類あるいはヒドロキシアミン類と反応させることで標識化が可能である。ただし、この方法では複数種存在するタンパク質のうち特定のものだけを反応させることは困難である。一方、細胞内で特定のタンパク質をターゲットとして標識する方法も知られる。タンパク質に結合するリガンドを利用するもので、リガンドに反応性基を結合させておき、タンパク質-リガンド相互作用による近接効果によって目的タンパク質のみを標識する方法がその代表的なものである。しかしながらこれは、特定のリガンドをもたないタンパク質の標識には適用できない。

上記の問題に対して、本研究では、ペプチド-ピリドキサル型分子による解決を提案する。ペプチドはタンパク質同様アミノ酸で構成されており、タンパク質との相互作用が期待できる。また、合成ペプチドならばピリドキサル誘導体を共有結合的に導入できる。この複合分子の作用により目的タンパク質の N 末端をケト基に変換し、これを標識の足掛かりにすることを旨とする。

②研究方法

まず初めに、モデル化合物としてアラニン N-ブチルアミドを用いて、ピリドキサル存在下、水-THF 混合溶媒中でのトランスアミノ化を試みた。次に、ペプチド-ピリドキサル型分子の設計・合成を行い、これを用いてトランスアミノ化反応を行った。

③研究成果

モデル化合物のトランスアミノ化反応では、単離収率35%で対応するケト体が得られ、反応効率に検討の余地はあるものの、望む反応が進むことが確認できた。ペプチド-ピリドキサル型分子の調製として、ピリドキサル5位のヒドロキシメチル基をカルボン酸に誘導してペプチド N 末端に導入することとした。まず、ピリドキサルのアルデヒド部位をイミンに、フェノールをメトキシメチル (MOM) エーテルに誘導しての酸化反応を計画したが、フェノールを保護した時点でイミンが化学的に不安定となり、断念した。次に、ピリドキサルのアルデヒド部分がアルコールに還元された形のピリドキシンを原料とし、TBDPS 基による3位フェノール性水酸基と4位ヒドロキシメチル基の選択的な保護を経て、5位ヒドロキシメチル基をカルボン酸へと酸化、TBDPS 基の脱保護を行った後に4位をホルミル基へと酸化するルートを検討したが、最終段階の酸化反応が複雑な混合物を与えてしまい、不適と判断した。結局、上記のビスTBDPS 保護体を希酸処理してフェノール部分を選択的に脱保護し、これを改めて MOM エーテルに誘導することで、4位のアルデヒド基への酸化がきれいに進むことを見出した。しかしながら、この方法では通算収率が5%と極めて低く、また、ピリドキシン誘導体をペプチドに導入した後の酸化反応となるため、アミノ酸側鎖が損傷してしまう懸念が残った。合成上の問題が残るもののペプチド-ピリドキサル型分子ができたため、Pyridoxal-Pro-d-Pro-Aib-Trp-Trp を用いて、モデル反応としてジフェニルグリシンの脱炭酸を伴うトランスアミノ化に供したところ、室温・3日という条件で50%程度の転化率で反応が進むことが分かり、本法が実現可能であることが確認できた。

上記のように、合成が予想外に難航したため、当初計画よりも相当に遅れてしまったが、とにかくも方法論を確立できたので、今後さらに研究を進めることによって目的を達成する所存である。

濫用される銀イオン検出用呈色試薬の開発

研究者 ▶ 東京理科大学：宮村 一夫（みやむら かずお）

銀イオンは、人体に対して無害である一方、菌類に対する抗菌作用が極めて強く、菌類によって生じる脇下のおいなどを発生しにくくする目的で、消臭スプレーなどとして広く利用されている。抗菌作用は、銀イオンの持つ親硫黄性に基づく含硫黄アミノ酸残基との結合力と銀イオンの持つ強い酸化力によるものとされているが、WHO によって人体に対しては無害と確認されている。しかし化学的な反応性は人体に対しても変わらないので、人体に備わった無害化の機構によって、安全に利用できているものと考えられている。

本申請では、抗菌薬として濫用されている銀イオンの検出試薬を開発することを目的とした。通常、銀は一価のイオンとして存在し、d 軌道が満たされた状態になるため可視域に吸収がなく、無色であり、吸光法での検出は難しい。このため、ハロゲン化物として沈殿させてその存在を調べることが多い。しかし、環状テトラミンである cyclam と反応すると、錯形成が起き、電子を放出して銀 (II) イオンとなり、可視域に吸収が現れることが知られている。しかし、この反応で得られる錯体は不安定で、すぐに分解してしまうため、呈色試薬としての利用は困難であった。当初、申請者は cyclam 配位子にペンダント基を導入して錯体の分解を抑制することを狙いに研究を開始したが、ペンダント基の導入によって、錯形成が起りにくくなることが分かった。Cyclam との反応ではこの配位子の平面性が高いため、d 軌道のうち、 dx^2-y^2 が非共有電子対との反発から銀イオンから放出されるが、ペンダント基の導入によって平面配位性が弱められたため、錯形成が起りにくくなったものと考えられる。そこで平面性を強めるため、cyclam に C-メチル基をメソ型になるように 2 つ導入したところ、銀 (II) 錯体の安定性が向上した。さらに 4 つある 2 級アミノ基の対角線にある 2 つにも N-メチル基を導入したところ、さらに安定化し、反応後 30 分程度であれば、定量分析が可能であることを確認した。なお、この分解反応は光分解反応であり、完全に遮光した条件では、銀 (II) の錯体は安定に存在することも確認した。

この配位子を用いて、種々の濃度の銀 (I) イオンの検出を試みた結果、検出下限は $18 \mu\text{mol/L}$ であった。妨害となるイオンもあるが、銀イオンとの反応で得られる錯体のみが光分解するので、時間経過を見ることによって選択性を得ることができる。結果を発表したポスターの pdf ファイルを添付した。

今回、光分解反応の抑制を種々試みた過程で、まったく新しいことが見つかった。それは、反応条件をうまく選べば、光分解反応で金属銀のナノ粒子が得られることである。光分解反応では、得られた銀 (II) 錯体が分解して金属銀が析出する。銀と配位子の濃度が濃ければ銀が粒子として沈殿するが、薄くすると反応がゆるやかに進行して、銀鏡となってガラスの壁に析出することもある。この反応速度を落としてやることによって銀粒子から銀鏡へと析出形態が変わる際に、界面活性剤を添加しておくこと、銀粒子の成長が抑制されて銀のナノ粒子が得られたのである。界面活性剤として用いたのは、アルキルアミンであり、アルキル基の長さが 3 (プロピル) から 6 (ヘキシル) のアミンの場合に、銀ナノ粒子が安定的に得られることが分かった。これは吸収スペクトルに銀ナノ粒子のプラズモン共鳴に基づく 420nm 付近の吸収が出現することからも確認できた。また、透過型電子顕微鏡観察からも 10nm 程度の粒のそろったナノ粒子が得られることを確認した。

通常、銀ナノ粒子の調製には水素化ホウ素ナトリウムなどの還元剤が用いられることが多いが、今回の試薬を用いると、還元反応ではなく、分解反応を通して銀ナノ粒子が得られるので、より温和な反応条件でナノ粒子が調製できる。新しいナノ粒子の調製法を今回見出すことができた。

検出試薬の研究は 3 年生の平山が、銀ナノ粒子の調製試薬の研究は修士課程の勝間が修士論文の研究として行った。論文の投稿については、検討中である。

エネルギー代謝からみたオメガ3脂肪酸による 心臓の若返りへの試み

研究者 ▶ 岐阜大学 大学院医学系研究科：小畑 孝二（おばた こうじ）

心臓は血液を全身に送り出すポンプであり、その機能の低下が心不全である。心臓のポンプ機能は、ATPという化学的エネルギーを拍動という機械的エネルギーへと変換することである。通常時の心筋のATP産生において、エネルギー源の多くは脂肪酸であり、残りをグルコース、乳酸等である。一方、心不全等の病的な心臓では、脂肪酸からグルコースへと代謝基質の割合が変わること（代謝シフト）が知られている。本研究では、自然発症高血圧ラット（SHR）と、同系統で肥満と糖尿病を発症するSHR/NDmc-cp（CP）の心臓を用いて、左心室の力学的エネルギー学的性質（メカノエナジェティクス）解析およびメタボローム解析を行う。それによって、心臓のエネルギー代謝と心機能の調節メカニズムを明らかにし、心臓の若さの維持や若返りを目指す。さらに近年、心臓のエネルギー代謝の調節に関与することが報告されているスペルミジン（SP）の慢性投与による影響についても検討した。

方法として、当初の申請書ではZucker肥満糖尿病ラットとSHRを比較し、DHAやEPAなどのオメガ3脂肪酸を使用する予定であったが、同系統の方が良いと判断し、SHRから突然変異で肥満形質を持つ個体として作製されたCPを用いた(1)。さらにメタボローム解析に不都合が生じる可能性を考慮して、近年注目されているSPを用いた。SPは熟成したチーズ、マメ類、全粒穀物などの食品に含まれる天然のポリアミンであり、心臓の拡張機能障害の改善と寿命の延長が報告されている(2)。一方、スペルミジンは心筋のATP産生を抑制することで、陰性変力作用（収縮力を弱める）を示すことも報告されている(3)。つまり、全く反対の効果が報告されており、本研究結果はは大変興味深いといえる。8週齢のWistar kyotoラット（WKY）、SHRおよびCPをそれぞれ無作為に2群（n=5）に分け、SP（1 g/kg/日）となるように飲水に溶解させた。1日飲水量、体重および血圧を毎週測定し、19週齢まで飼育を続けた。今回、メタボローム解析を委託するヒューマンメタボロームテクノロジー社との話し合いにより、ラット摘出心臓の血液交叉灌流実験との同時実験を諦め、メタボローム解析を優先させた。19週齢のWKY、WKY-SP、SHR、SHR-SP、CP、CP-SPの各群について、ラットを頸椎脱臼後、開胸し心臓を摘出し、左心室の横断面から30-50mgの組織片を採取し、液体窒素により急速冷凍し、メタボローム解析のサンプルとしてHMT社に送付した。残りの組織はタンパク質やmRNAを抽出して生化学的解析および心筋細胞のアポトーシスや線維化等の組織学的解析を現在進行中である。

結果として、図1に示すように体重の変化は、8週齢ですでにCP群では有意に高く、その後も高値を示したが、SP投与では影響がなかった。SHR群では、WKY群に比べ若干週齢とともに減少したが、有意差はなかった。またSP投与によっても影響はなかった。この体重の変化は心肥大から心不全へと移行する過程での病態の進行によるものと考えられる。つまり、SPでは心不全への移行を抑制できないことが推測された。心重量の比較では、心重量および左心室重量ともに、SHR群およびCP群でWKY群に比し有意に増大していたが、SPでは影響されなかった。むしろ、左心室ではCP-SP群で増大しており、SPは心不全への移行を促進あるいは悪化させている可能性が示唆された（図2）。一方、血圧には各群間で有意な差はみられなかった。

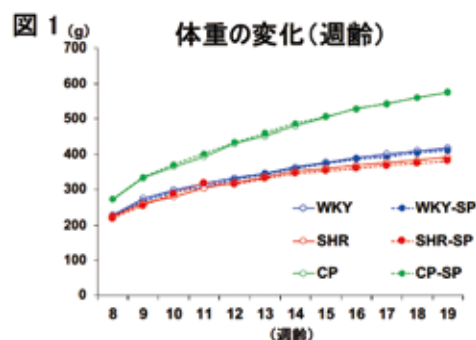


図3に示したように、メタボローム解析のヒートマップでは各群間でかなり違いがみられた。例を挙げると、最も重要である中心炭素代謝におけるグルコース代謝経路で Glucose 6-phosphate (G6P) および Fructose 1,6-diphosphate (F1,6P) は、WKY 群に比べ、SHR 群および CP 群で明らかに有意に増大している(図4)。つまり、心不全が進行するとエネルギー代謝が脂肪酸中心から糖へと変化するという既存の事実を裏付ける結果である。このとき、CP 群の方がさらに増大しており、より心機能が低下している可能性が示唆される。しかし残念なことに、これらにおいて SP 投与の影響はみられなかった。SP は糖代謝には関与しない可能性が示唆された。一方、G6P や F1,6P の増大は、その後代謝経路の遅延を意味する可能性もある。つまり、G6P や F1,6P の代謝酵素活性の低下により、それらが増大している可能性がある。今後、さらに検討を進めていく必要がある。データ量が膨大であるため詳細は割愛するが、この他に核酸代謝やアミノ酸代謝、脂質代謝など網羅的な解析により、各群間での違いが多数見られている。

図 2

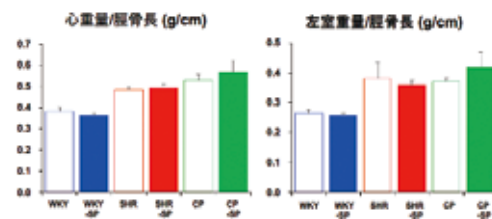


図 3

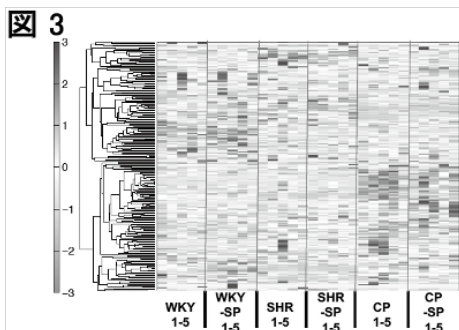
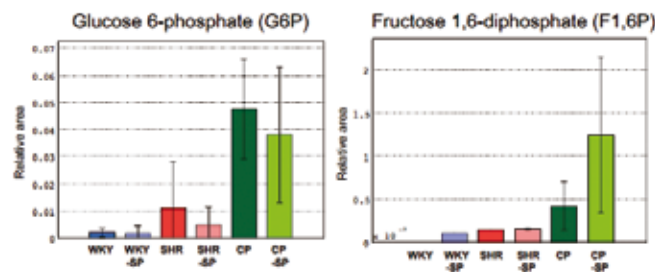


図 4



結論として、近年、高齢者社会における心機能の低下した患者の急増、いわゆる心不全パンデミックが懸念されている。健康寿命を全うするためには、心臓を若く保ち、心不全パンデミックを阻止する必要がある。本研究では、心臓の機能がエネルギー代謝によって調節されていると仮説し、日頃の食生活乱れや生活習慣病等の場合、心臓のエネルギー代謝が変わることで、心臓の老化が進行し、最終的に心不全に至ると想定した。そこで、高血圧による心臓への圧負荷だけの SHR と、肥満糖尿病モデルである CP の左心室のメタボローム解析を行った。我々の左心室メカノエナジェティクス解析は、世界にも他に類のない唯一の実験手法であり、非常に独創的である(4,5)。本財団の研究助成により、実験系と結果の概念の研究を医学系誌にて、本実験系について紹介した(6,7)。今後、メタボローム解析の結果をもとに、左心室メカノエナジェティクス解析および生化学的、組織学的な解析を進めていきたいと考えている。また今回、SP の効果についてもさらなる検討を進めていきたい。本研究は今後のさらなる発展が期待され、心臓のエネルギー代謝から心機能を調節できる仕組みを明らかにできれば、心臓を若く保つことで健康寿命を全うできるようになり、人類の幸せの一助となる。

参考文献

1. Takaya et al., Nat Genet. 14:130-131. 1996.
2. Eisenberg, et al., Nat Med. 22(12):1428-1438. 2016.
3. Guevara-Balcazar, et al., Biochem Pharmacol. 66(1):157-61. 2003.
4. Obata K and Takaki M. Methods Mol Biol. 1816:117-132. 2018.
5. Obata et al., Sci Rep. 8(1):16246. 2018.
6. 小畑孝二, 高木 都: Medical Science Digest, 45(11)42-43, 2019.
7. 小畑孝二, 高木 都: 別冊 BIO Clinica, 8(2)101-103, 2019.

ヒトORC1のグアニン四重鎖結合活性のDNA複製開始における役割

研究者 ▶ 日本女子大学 理学部 物質生物科学科：和賀 祥（わが しょう）

1: 研究の背景及び目的

DNAは遺伝子の本体であり、DNAの複製は生命の維持に必要な基本的な細胞機能の1つである。このDNA複製に関する研究は、ワトソンとクリックによる1953年のDNA二重らせん構造モデルの発表以来、多くの研究者によって進められてきた。特に大腸菌を代表とした細菌や出芽酵母などのDNA複製について精力的に解析されて、DNA複製に関する生物共通の基本的なしくみは明らかにされた。しかし、ヒトのもつDNAの複製に関しては、未だに解決されていない重要な問題が残されている。

その1つは、ヒトのDNA複製が始まる染色体DNA上の位置(複製開始点という)が、どういうしくみで染色体上の特定の位置に規定されるのかという問題である。この問題については、50年以上も研究者によって取り組まれてきたが、いまでも未解決のままである。私はこのヒトの複製開始点に関する問題に取り組んでいる。

細菌の複製開始点は、決まった共通の塩基配列によって規定される。その共通配列を目印に複製開始に働くタンパク質(複製開始タンパク質)が複製開始点に集合し、DNA複製開始の一連のプロセスが進む。

一方、ヒトの複製開始点については、それを規定する共通配列はないと考えられている。しかし、ヒトにおいても原則、決まった位置から複製は開始する。実際に、その複製開始点に複製開始タンパク質が集合している。すなわち、複製開始タンパク質を染色体DNAの決まった位置に集めるしくみが存在するのである。

私は、複製開始点に最初に結合するタンパク質複合体であるorigin recognition complex (ORC)の解析を進めている。近年、DNA結合に関し塩基配列特異性はないとされてきたヒトORCに、グアニン四重鎖(G4)という特殊なDNA構造に特異的に結合するという活性があることを発見した。このヒトORCの新規活性は、他のグループから報告された、ヒト複製開始点の多くにG4を形成し得る配列(G4モチーフ)が存在するという知見と密接な関係があると考えられた。さらに近年、いくつかの複製開始点の解析によって、G4モチーフが複製開始点の働きに重要であることも証明されている。しかし、DNA複製開始におけるG4モチーフの具体的な役割は未だ明らかではない。

そこで本研究では、ヒトORCのG4構造への結合の生物学的な意義、ならびに複製開始点に存在するG4モチーフの役割を明らかにすることによって、ヒト複製開始点が規定されるしくみを解明するきっかけをつかむことを目指した。

2: 研究方法

ヒト複製開始点で最初に働くタンパク質複合体であるORCに着目し、以下の方針で研究を進めた。

(1) ORC1サブユニットのN末端側領域のG4結合活性に関する構造・機能解析

ORCを構成する6つのサブユニット(ORC1-ORC6)のうち、ORC1サブユニットのN末端側領域がG4に結合する活性を有することを私たちはすでに見出している。なお、G4構造とは、グアニンの連続した配列で形成し得る四重鎖構造であり、少なくともin vitroでは非常に安定な構造である。私たちはこれまでに、ORC1のN末端側領域のG4結合を低下させるアラニン置換変異を同定している。そこで本研究では、ORC1のN末端側領域(野生型、変異型)をDox依存的に発現するヒト培養細胞を作出し、それぞれが発現した時の細胞の表現型を調べることによって同領域の役割に関する知見を得ることを計画し解析をすすめた。

(2) ORC1以外のサブユニットのG4結合活性の検索

ORC1のN末端側領域を欠如した変異ORC1 (ORC1 Δ N)は他の5つのサブユニットと複合体を形成する。そこで、ORC1 Δ Nを含む変異ORC6量体を調製し、本当にG4結合活性が失われたかを検証した。その結果、野生型ORC6量体に比較して活性は低下したものの、変異ORC6量体は依然としてG4結合活性を有することが判明した。そこで、ORC1以外にG4結合活性を有するサブユニットを同定するため、ORC2~ORC6の各サブユニットについてG4結合の有無をゲルシフト法によって調べた。

(3) ORCの超らせん誘導活性とG4結合活性との関連性に関する解析

これまでに私たちは、ヒトORC1のN末端側領域にDNA超らせん誘導活性があることを見出している。この活性は、複製開始点での複製開始のしくみと密接な関係があると予想し、G4モチーフをもつ超らせん型ミニ環状DNAを作製して、そのミニ環状DNAとORC1の結合に関する解析を進めた。

3: 研究成果

(1) ORC1のN末端側領域を発現するDox誘導系HeLa細胞クローンを作製した。野生型および変異型それぞれ1クローンずつしか得られなかったが、両クローンともDox添加によってORC1 N末端側領域の発現が確認され、その発現レベルは内在性ORC1と同レベルであった。ORC1 N末端側領域を発現させることにより、内在性ORCのはたらきの競合的な阻害、あるいはドミナントネガティブ効果が見られることを予想したが、細胞の増殖速度およびBrdUの取り込みを調べた限りでは、目立った効果は認められなかった。内在性ORC1に比べN末端側領域の発現量は少なかった可能性があるため、今後は別の条件での発現を検討していく。

(2) 上述のように、ORC1のN末端側領域を欠如したORC1 Δ Nを含む変異ORC6量体においても、G4結合が認められた。そこで、ORC2~6の個々のサブユニットについてG4結合活性の有無を調べた結果、ORC2とORC6において明確なG4結合活性が認められた。ORC6量体およびORC1のG4結合活性には、G4モチーフ配列に関して特異性があることから、ORC2とORC6についてG4配列特異性を調べた。その結果、ORC2のG4結合活性の特異性が、ORC6量体およびORC1の結合特異性とよく類似することが分かった。この結果は、ORCのG4結合活性にはORC1とORC2の両方が関与している可能性を示唆する。次に、ORC2のG4結合ドメインの同定を行った結果、G4結合ドメインとしてORC2のN末端側領域内の限られた領域に絞ることができた。さらに、同ドメインのG4結合活性に重要なアミノ酸残基の同定に成功し、G4結合活性が低下した変異ORC2を作製することができた。今後はこの変異ORC2を使ってORCのG4結合活性の解析を進める予定である。

ORC1およびORC2のG4結合ドメインは、いずれも天然変性領域の中に存在した。またいずれのドメインにおいても、塩基性アミノ酸がG4結合に重要であることが明らかになった。最近、他のグループからORCは*in vitro*でDNA依存的に液液相転移を引き起こす性質があること、さらにORC1の天然変性領域がそのような性質をもつことが報告された。上述のように、ORC1の天然変性領域はG4結合活性を有することから、ORCの液液相転移とG4結合活性との関係に興味をもたれる。今後は、細胞核内のORCの局在とG4結合活性や液液相転移との関係を調べる予定である。

(3) DNA超らせん誘導活性を有するORC1 N末端側領域と2kbのミニ環状DNAとの結合についてゲルシフト法による解析を行った結果、予備的な結果ではあるが、超らせん環状型、開環型および直鎖型の3者の間で、ORC1 N末端側領域の結合様式が異なる可能性を示唆する結果が得られた。特に、超らせん型と直鎖型の間には予想外の大きな違いが認められ、今後、結合様式を明らかにする解析を行う予定である。

大豆イソフラボンの骨格筋における脂質燃焼亢進 メカニズムの解明と疾患予防への応用

研究者 ▶ お茶の水女子大学 基幹研究院：飯田 薫子（いいた かおるこ）

【本研究の背景と目的】

大豆に多く含まれるイソフラボンは、女性ホルモンであるエストロゲンと似た構造をもち、植物エストロゲンと呼ばれる。生体内でもエストロゲン様作用を有し、閉経期の女性において骨粗鬆症や更年期症状を改善すること (AsiaPac J Clin Nutr 2010;19:33-; Menopause 2012; 19:776-)、近年では、皮膚の機能を改善すること (Nutrient 2017;9: 622) などが示されている。またイソフラボンは、肥満や糖尿病など様々な代謝性疾患の改善にも有用であることが多数報告され (Adv Nutr 2017;8 (5):705-; Am J Clin Nutr 2018;108 (1):49-) 世界中で注目されている。しかしこれら代謝疾患改善のメカニズムはエストロゲン様作用では説明できず、その全容解明が待たれている。

大豆に含まれる主なイソフラボンには、ゲニステイン (genistein) とダイゼイン (daidzein) の二種があり、女性ホルモン様作用は前者がより強い効果を有することが知られる。一方で我々はこれまで、ダイゼインが細胞や動物において、肥満改善、糖代謝改善作用をもたらす可能性を示し、さらに骨格筋細胞において、ミトコンドリア量やATP産生に関わる遺伝子の発現を増強すること、これらの作用はゲニステインでは弱く、またエストロゲンでは認められないことを報告してきた。

そこで本研究ではこの daidzein に着目し、骨格筋での脂質代謝への作用を中心に検討を行った。これまでに我々は daidzein を培養骨格筋細胞に負荷すると、脂質燃焼に関わる酵素の遺伝子発現が増加することを見出している。そこで本研究では、① daidzein が筋細胞において脂質代謝関連遺伝子の発現を制御する分子メカニズム、および脂質代謝に与える直接的な影響を明らかとし、さらに②生体において、daidzein が骨格筋での脂質燃焼を促進することにより、骨格筋の健全性維持に関与する可能性について検討を行なった。

【研究方法と結果】

①筋細胞における daidzein の脂質代謝関連遺伝子発現制御メカニズムと脂質代謝への影響

細胞はマウス筋芽細胞由来株 C2C12 細胞を使用した。自身の先行研究より、daidzein が筋細胞において脂質代謝関連遺伝子の発現を亢進するメカニズムとして、エストロゲン受容体に構造的に類似する転写因子 ERR α (estrogen receptor-related receptor α) の活性化作用を介していることが予想された。そこで C2C12 細胞に ERR α を強発現させたのちに、筋細胞へ分化させて daidzein を負荷し、ミトコンドリア関連遺伝子および脂質酸化関連遺伝子の発現を検討した。さらに変動の見られた各遺伝子のプロモーター領域を用いたレポーターベクター、および ERR α 結合領域の欠失変異体を作成して細胞に導入し、daidzein の遺伝子発現調節作用が、ERR α を介した転写調節を介しているかについて検討を行った。さらに筋細胞に脂肪酸を負荷することにより、細胞内への脂質蓄積を誘導した上で、daidzein を負荷し、脂質蓄積がどのように変化するかを検討した。

その結果、12.5-50 μ M の daidzein を C2C12 筋細胞に負荷したところ、Pdk4, Acadm, Cpt1b などの脂質酸化関連遺伝子および Atp5b, Cytb, Cox1 などの酸化的リン酸化関連遺伝子の発現が有意に増加した。これらの増加は ERR α 特異的阻害剤である XCT790 の同時負荷により軽減した。上記の遺伝子のうち、Pdk4, Acadm, Atp5b, Cytb の 4 遺伝子についてレポーターベクター作成し検討を行ったところ、50

μ M の daidzein は、いずれのプロモーターにおいてもその活性を増強したが、これら遺伝子のプロモーター領域から ERR α の結合領域 (ERRE) を欠失させると、daidzein の転写活性増強作用は減弱または消失した。さらに遊離脂肪酸負荷により筋細胞内トリグリセリド蓄積量は有意に増加したが、daidzein を負荷することにより細胞内トリグリセリド蓄積量は有意に減少し、この作用は、XCT790 により阻害されることを確認した。

以上より、daidzein は ERR α を介して脂質代謝に関わる遺伝子発現を増強し、脂質酸化を促進させる可能性が示唆された

② 生体における daidzein の骨格筋脂質燃焼に与える影響と筋組織変化の検討

既存の先行研究において、肥満者や高齢者では骨格筋の異所性脂肪 (骨格筋細胞内脂質) が蓄積し、蓄積した脂質による慢性炎症を起因とした筋萎縮や、全身性のインスリン抵抗性が生じることが多く報告されている。そこで高糖高脂肪食を摂取したマウスに下肢の運動制限を行うことにより、骨格筋の異所性脂肪蓄積モデルの作成を試み、さらに daidzein がこれらのモデル動物の骨格筋に与える影響を検討した。

検討には C57BL6 マウスを用いた。高糖高脂肪食を投与したマウスの尾部を懸垂することにより下肢の運動を制限し、運動制限を行わない群との比較検討を行なった。さらに運動制限を行う群は 2 群にわけ、1 群には 0.1% 重量比の daidzein を含む食餌を投与した。懸垂開始後、7 日目、14 日目にそれぞれマウスの下肢筋を採取し、遺伝子発現および組織学的な検討を行った

この結果、遺伝子発現については個体間での差が大きく、脂質代謝関連遺伝子である Pdk4, Acadm や、これらの発現を制御する転写因子である PPAR α , ERR α などの発現は、いずれの群間でも有意差は認められなかった。一方、組織学的な検討では、7 日目、14 日目ともに懸垂群ではコントロール群と比較して、有意な筋線維断面積の減少が認められ、14 日目の daidzein 投与群の骨格筋において、その減少が改善する傾向を認めた。

今後、運動制限の期間や daidzein の投与量などを見直した上で、さらなる詳細な検討を行う予定である。

【本課題研究に関する発表】

- 1) Kitamura K, Erlangga JS, Tsukamoto S, Sakamoto Y, Mabashi-Asazuma H, Iida K. Daidzein promotes the expression of oxidative phosphorylation- and fatty acid oxidation-related genes via an estrogen-related receptor α pathway to decrease lipid accumulation in muscle cells. J Nutr Biochem. 2020 Mar;77:108315. doi: 10.1016/j.jnutbio.2019.
- 2) 松本萌、北村奏乃、ジャネエルランガ、原奈摘、坂本友里、馬橋英章、飯田薫子 筋芽細胞 C2C12 におけるイソフラボン daidzein の ERR α を介した脂質酸化促進作用の検討 第 73 回日本栄養・食糧学会大会にて発表

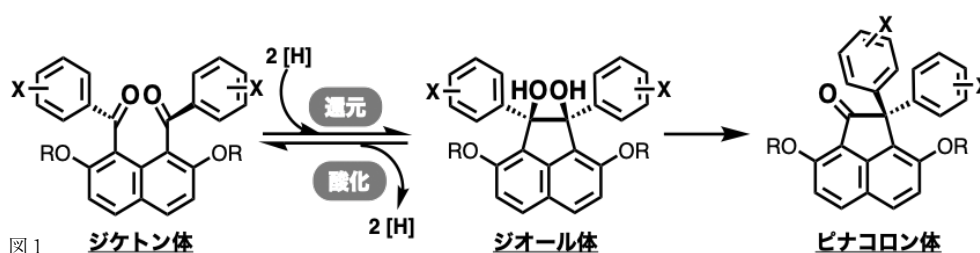
分子内の隣接カルボニル基の還元-酸化反応を利用する再活性-再使用可能な有機還元剤分子の開発と洗練化

研究者 ▶ 東京農工大学：岡本 昭子（おかもと あきこ）

①研究成果の概要

酸化-還元能を有する有機分子の開発について、前年度の研究を発展させ、共同研究者・米澤宣行教授と協力して、分子の構造と酸化-還元能発現の相関の解析を試みた。対象としている化合物は、有機分子基質に対して酸化あるいは還元、または双方の反応を媒介する化学的機能を示すと同時に、それ自身も有機分子という特徴を有するものである。そして、生体関連有機分子の酸化-還元のパテンシャル領域で作用し、加えて、酸化体が還元を受けた後、還元剤として働いて酸化体に戻り、また還元を受ける形で繰り返して作用が可能な「有機分子媒介体系」を開発分子像として想定している。

それを実現すべく、本研究課題では、分子内の近接した位置に二つの芳香族ケトンカルボニル基を有するナフタレン化合物（peri-アロイルナフタレン）とその還元体との酸化-還元反応を利用する、有機分子の還元剤の開発の展開で、前年度の研究を進展させて行ったものである。前年度の検討においては、「有機還元剤分子から脱水素化を起こす分子」として設計・合成したナフタレン化合物群（ジケトン体）の「有機還元剤分子」（ジオール体）への分子変換反応挙動解析を中心に進め、次いで、このジオール体が起こす反応についての解析を行った（図1）。特に、二つの芳香族ケトンカルボニル基上の置換基がこれらの反応に対してどのような影響を与えるかを詳しく調べた。ジオール体は還元剤として働いて（酸化されて）ジケトン体に戻る反応とともに、酸化度はジオール体と同一であるが、還元能を持たないピナコロン体への変換なども起こり、これらの反応の選択性や転化率と置換基との相関把握が一つの大きな未解決課題でもあった。



また、ジケトン体、ジオール体双方の示す反応性は用いる試薬の反応性から予想されるものに比して大きいものであり、この反応性・反応挙動は対象化合物の立体分子構造に由来しているものと推定した。それを踏まえて、分子の空間構造解析を併せて行ない、還元剤の活性化機構の提案とともに、対象化合物の新奇な非共有結合性相互作用の存在を明らかにした。さらに、ジアロイルナフタレンの分子空間構造の変化の自由度を下げるべく、ジアゾ基で分子内架橋させた大環状化合物（ジアゾ基も被還元部位となりうる）の合成にも着手し、予備的にその反応性も検討した。

本年度（2019年度）は、対象化合物として、1) 前年度に着手した分子内に二つ目の酸化-還元官能部位を有する大環状化合物、2) ナフタレン環の2,7-位のアルコキシ基をメトキシ基からエトキシ基に替えたジケトン体、さらに、3) 前年度の「過剰な還元能発現」の発見に基づいてこれまでに反応挙動および集合構造の解析が未了だった以前の類縁化合物、についてその合成と分子構造確認を行った。

その結果、これらの対象芳香族集積化合物骨格分子中の、酸化-還元に関わる部位およびその近傍に非共有結合性相互作用が集積されたヘテロ原子官能部位が存在し、通常と比べると大きく酸化-還元能力を変化させていることが分かった。

② 研究方法

1) 「分子内に二つ目の酸化還元官能部位を有する大環状化合物」について分子構造・溶液中の立体構造、結晶構造(単分子および集積構造)の確認を進めた。次いで、
 2) 「ナフタレン環の2,7-位のアルコキシ基をメキシ基からエトキシ基に替えたジケトン体」についてジケトン体—ジオール体間の酸化還元反応における、[酸化還元媒介剤の種類]、[反応条件]、[水の添加の効果(酸化還元促進能)]を解明すべく、還元的炭素—炭素結合生成(ジケトン体のベンズヒドロール化)、ジオール体からジケトン体への逆反応の両方の反応の生成物分布と転換率を調べ、2,7-位にメキシ基を有する同族体の反応性と比較した。さらに、3) 反応および集合構造の解析が未了だった以前の類縁化合物は、

3-1) 「1)の大環状化合物の酸化還元部位が一つ少ない同族体に相当する大環状化合物」の結晶構造の解析および溶液中の構造の再解析を行った。

3-2) 前年度までの反応挙動・構造解析で例外的な挙動が見られた「芳香環にフッ素が置換したジケトン体」について溶液中および結晶中の構造を解析した。溶液中の空間構造は、溶媒を変更したNMR測定、二次元NMR、温度を変えたNMR測定、等により解析した。結晶構造は適切な溶媒を用いて作製した高品質の結晶についてX線結晶構造解析により決定した。

③ 研究成果

1) 「分子内に二つ目の酸化還元官能部位を有する大環状のジケトン体」についてはそれぞれの還元部位が異なった順序で順次還元されるルートの存在が確認されたのに加え、ジオール化した部位が更に過剰還元される挙動も見いだされた。

これは有機反応化学的にはジケトンのマクマリーカップリングに相当するものであり、還元剤として用いた金属亜鉛が従来知られているよりも大きな還元能を発揮しているものと解釈できる。卑金属である亜鉛原子と酸化還元媒介体化学種が対象分子と適切な位置関係を採用することで高い還元能を発現したものと思われる。ただし、この二段階の還元がジオールを経由したものか、ジケトンから一段階で進んでいるかは解明できていない。

2) 「ナフタレン環の2,7-位のアルコキシ基をメキシ基からエトキシ基に替えたジケトン体」では、水の添加がジケトン基質の還元を促進すること、また1)と同様に過還元体が生成することが確認され、その挙動が媒介体の金属ハロゲン化合物と水の有無に大きく影響されることも分かった。

3-1) については、「2,7-位にヒドロキシ基を有する大環状化誘導体分子」は、結晶中でケトン酸素が水のハイブリッド環状六量体の形成に組み込まれること(図2)が、また、3-2)については、NMRを駆使して「ベンゼン環のo-位にフッ素を有するベンズドロール体」でフッ素とヒドロキシ基が分子内水素結合を作ること(図3)など、立体分子構造に由来する局所的に強化された酸素原子の電子対共有能力が示された。

有機分子の結晶中で、マイクロ視的には水の環状(ハイブリッド)六量体が形成されることは極めて稀であり、それに加えてさらに六量体が二次元的広がってマクロ視的にはシート状になっている安定な集合状態を形成していることは、大きな新知見である。

また、有機分子中のフッ素原子がヒドロキシ基の水素原子と古典的水素結合を形成することも極めて例が少なく、特にそれが溶液中で直接観測できたことは、申請者たちの知る限り初の例である。

これらの結果については以下の二報の報文にて(謝辞を付して)報告した。

図2

水分子

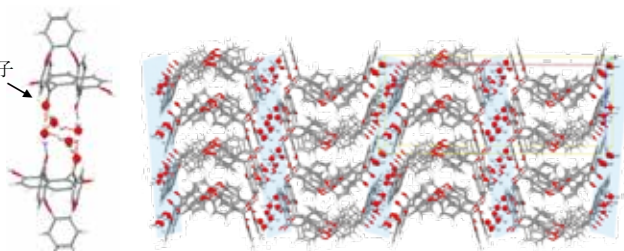
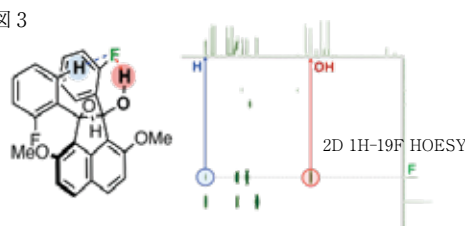


図3



【成果論文】Ogata, Mido, Siqingaowa, Noguchi, Yonezawa, Okamoto, Chem. Lett. 2019, 48 (12), 1522.
 Mido, Iitsuka, Kobayashi, Noguchi, Yonezawa, Okamoto, Chem. Lett. 2020, 49 (3), 295.

腸内の細菌由来のエンドトキシンの 定量的な挙動解析とその高度利用

研究者 ▶ 筑波大学：青柳 秀紀（あおやぎ ひでき）

①研究の背景及び目的

エンドトキシン（内毒素）はグラム陰性桿菌の外膜構成成分の一種であり、血液中へ混入すると発熱や重篤なショック（全身性炎症反応症候群）など、深刻な症状を引き起こす。近年、腸内環境と疾病（あるいは健康）の関連に着目した研究が活発におこなわれている。その結果、腸内環境に存在するエンドトキシン（主に腸内細菌由来と考えられている）が、腸管膜を通じて血液中に侵入すると、未病も含めた様々な疾患が進行する可能性が示唆されている。

これまで、エンドトキシンは菌体に安定に保持されており、溶菌によってのみ菌体外に遊離するとされてきた。申請者は、LAL 固定化ビーズを用いたリムルス試薬（LAL）成分をナノ微粒子に固定化したLAL 固定化ビーズを独自に作成し、LAL 固定化ビーズを用いたエンドトキシンの超高感度・迅速測定法を開発した（LAL 固定化ビーズ法）。LAL 固定化ビーズ法は測定の感度が非常に高いため、試料の大幅な希釈が可能である。大幅な希釈により、夾雑物の影響を排除でき、従来は測定が困難であった濁度が高い試料に含まれるエンドトキシンの迅速かつ正確な濃度測定が可能となった。さらに、申請者は、LAL 固定化ビーズ法を用い、大腸菌 1 cell あたりの正確なエンドトキシン保持量の測定を試みた。この実験の過程でエンドトキシンが菌体外に顕著に遊離する現象を見出した（エンドトキシンが溶菌だけでなく、菌体の分裂、増殖でも菌体外に顕著に遊離することを定量的にはじめて示した）。これまで微生物の培養液中のエンドトキシン濃度を正確に測定することはできなかった（エンドトキシン濃度を測定するためには、培地由来のエンドトキシンの影響や測定に影響を与える因子を排除する必要がある）LAL 固定化ビーズ法では試料の大幅な希釈により、夾雑物の影響を排除することで、菌体から培養液中に遊離したエンドトキシン濃度の正確な測定にはじめて成功した。

以上の研究背景をベースに、本研究では、開発したLAL 固定化ビーズ法を活用し、(A) これまで測定が困難であった模擬腸液中のエンドトキシンの濃度の測定、(B) 模擬腸液中での培養に伴う大腸菌のエンドトキシンの挙動解析とその利用、について検討を試みた。

②研究方法

模擬腸液のモデルとして市販の2種類の経腸栄養剤（人体に必要な糖質、タンパク質、脂質、電解質、ビタミン、微量元素を経腸的に投与する。経腸栄養剤は消化管内に注入されるため、腸内細菌のエンドトキシンに影響を及ぼす可能性があるが、これまで経腸栄養剤中のエンドトキシン濃度の測定は困難であったため不明瞭な部分が多い）と人工腸液培地を使用した。本研究では、LAL 固定化ビーズ法を用いて各種の模擬腸液中での正確なエンドトキシン濃度測定が可能か否かを、添加回収試験により調べた。

添加回収試験は、各種の模擬腸液の希釈系列を作成しそれぞれに添加終濃度が0.01 (EU/mL)になるように標準エンドトキシン溶液を加えたものを測定し、その回収率を求めた。アメリカ食品医薬品局 (FDA) が定めたガイドラインに従い、エンドトキシンの添加回収試験を実施した際に、回収率が75～125%の範囲にある場合、LAL 反応における干渉が少なく、試料中のエンドトキシンが正しく測定できていると判断した。

大腸菌を模擬腸液100 mL 入った500 mL 容三角フラスコに植菌し、37℃、200 rpm で振盪培養し、培養8時間目の培養液をサンプリングした。サンプリングした培養液を用いて、生菌数の測定、培養液中および菌体内のエンドトキシン濃度の測定をおこなった。

③研究成果

(A) 模擬腸液中のエンドトキシンの濃度の測定

添加回収試験を実施した結果、今回使用した模擬腸液(2種類の経腸栄養剤と人工腸液培地)では全て、10,000倍以上の希釈をすることでFDAガイドラインが定める添加回収率が得られた。模擬腸液中には界面活性作用を有する成分や、濁度の高い有色の成分が含まれているが、適切な希釈条件下でLAL固定化ビーズ法を用いれば、LAL反応を阻害することなく正確にエンドトキシン濃度を測定可能であることが示された。以上の結果から、今後の実験においては、試料を10,000倍以上の希釈をして得られた値を使用した。

申請者が開発したLAL固定化ビーズ法はエンドトキシンの高感度かつ迅速な濃度測定が可能であり、本法により腸内環境のエンドトキシンの挙動を把握できる可能性が示唆された。

(B) 模擬腸液での培養に伴う大腸菌のエンドトキシンの挙動解析とその利用

一般的に使用されるコントロール培地で大腸菌を培養した場合、大腸菌の増殖とエンドトキシンの遊離が認められた。一方、2種類の経腸栄養剤で培養した場合、大腸菌はほとんど増殖しなかったが(大腸菌の生存は確認)、1cellあたりの遊離率が一つの経腸栄養剤では大幅に増加することが明らかになった。経腸栄養剤は腸内に直接投入されるため、経腸栄養療法を用いた際、腸内にエンドトキシンを保有する菌が多いと大量のエンドトキシンを遊離してしまう可能性があり、経腸栄養療法を遂行する際に留意する必要があることが考えられた(腸内環境が健常者よりも弱っている経腸栄養療法を受ける患者にとって重要な知見。適切な経腸栄養剤の選択が大切)。また、人工腸液培地で培養した大腸菌の増殖はコントロール培地と大差がないにもかかわらず、エンドトキシン遊離率が大幅に減少した。種々検討した結果、人工腸液培地中の成分に、エンドトキシン活性を低下させる作用を有するものがあることが示唆された。

そこで、人工腸液培地の成分の中で、食素材として使用可能な成分に着目し、種々探索した結果、グリシンなどにその効果が見られた。実際にグリシンの添加量を増した培地で、大腸菌を対数増殖期中期まで培養し、エンドトキシン活性を測定したところ、エンドトキシン活性の大幅な減少が認められた。

現在、他の成分についても検討中である。

研究テーマ

近赤外光に応答して一酸化炭素を放出する生体適合性分子の開発—ガス医療への利用に向けて—

研究者 ▶ 大阪市立大学：中島 洋（なかじま ひろし）

【研究背景および目標】一酸化炭素（CO）が哺乳類細胞における情報伝達物質として機能することが報告されて以降、COの生理的作用が次々と明らかにされている。中でも様々なストレスに応答する免疫系への関与は、幅広い医療分野への応用が期待されており、COを薬剤として投与する新たな医療（CO医療）が、敗血症等の重度炎症の抑制や血流制御、臓器移植時の免疫抑制など動物を対象とする非臨床レベルの研究で実施されている。ただし、治療効果がみられるCOは肺からの吸入の場合250ppm程度の濃度が必要と言われており、ヒトの場合COによる中毒症状が顕在化し始める値と重なる。このため、肺からのCO吸入を実際の医療現場で用いることは社会通念上難しく、吸入以外の方法で生体へ安全に投与でき、組織内で直接COを放出可能な分子（CO releasing molecule, CORM）の開発がCO医療の実現には必須といわれている。薬物動態（生体への導入、分布、代謝、排出）を考慮すれば、CORMには以下の性質が求められる。

- ① 体液に類似した水性溶媒に対する溶解性と溶存状態での安定性が高いこと
- ② CO放出後の残留錯体（特に残留金属イオン）の代謝、排出が容易であること
- ③ 何らかの刺激により目的の生体部位やタイミングでCOを放出できること

生体元素である鉄を中心金属に用いる光応答性カルボニル錯体は、これらの実現に向けた柔軟な分子設計が可能と考えられ、現在CORM研究の主流となっている。そうした中、我々の研究グループでは、ごく最近、生体透過性に優れた近赤外光（波長800nm）を含む幅広い波長域の光に応答して、CO放出可能な鉄カルボニル錯体（nir-[Fe-CO]）の合成に成功した。nir-[Fe-CO]の報告以前、光CO解離の最長波長は470nm程度であり、申請者らはこれを300nm超長波長化し、CORM研究で目標とされていた近赤外光応答性を獲得したことになる。ただしnir-[Fe-CO]は、CO放出後の分解過程で鉄二価イオンを生成する。生体内で遊離の鉄二価イオンは、毒性の高い活性酸素の生成を促進するため、nir-[Fe-CO]の生体適合性を高めるには、このイオンを生体内で素早く除去する必要がある。助成いただいた研究では、この問題を解決するため、フェリチンと呼ばれる鉄貯蔵タンパク質にnir-[Fe-CO]を包摂し、CO放出後に生成する鉄二価イオンをフェリチンの機能を使って代謝する仕組みを作り出し、薬物動態条件の全てに対応した生体適合性CORMの創出を目指した。

【研究方法】助成研究の概要を図1に示す。フェリチン（Fr）は中空球状のタンパク質であり、生体内の様々な代謝過程で発生する鉄二価イオンを酸化、鉄酸化物コアとして貯蔵し、その後に排出または必要に応じた再利用の役割を担う。ここではこの機能に着目し、フェリチンをnir-[Fe-CO]の生体へのキャリア分子として利用するとともに、CO放出後の代謝装置として利用する。フェリチンは、鉄イオンを取り込むために直径0.3nmのチャンネルを有するが、nir-[Fe-CO]のような錯体の取込みには小さい。そのため申請者が以前に開発した「拡大チャンネルにゲートを取り付けたフェリチン（gate-Fr）を用いることで、フェリチン内部空腔にnir-[Fe-CO]を取り込み、生体へ安定に輸送することを計画した。

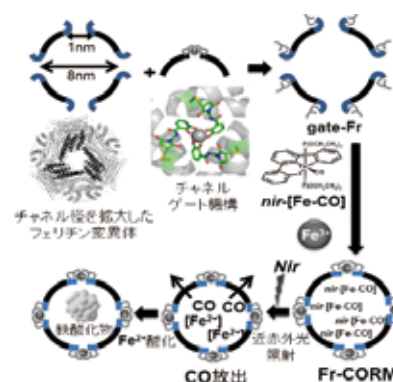


図1. 本研究の概要 申請者が開発したチャンネルゲート付きフェリチン（gate-Fr）にnir-[Fe-CO]を包摂し、CO放出後に問題となる鉄二価イオンの代謝を確実にを行う。

【研究成果】研究計画では、nir-[Fe-CO] を包摂後、内部空腔へ通じるチャネルを化学修飾で導入した配位子と鉄イオンによる錯形成によって封鎖し、包摂された状態を保つ予定であった。しかし、Fr のイオン取込みチャネルを拡張した変異体 (FrL134P) への nir-[Fe-CO] の包摂実験を進めた結果、チャネルを閉じた状態であるにもかかわらず、nir-[Fe-CO]@Fr の精製過程で、nir-[Fe-CO] が FrL134P 空腔内から、外部の溶液へ拡散することが判明した。この問題を解決するため、錯形成によるチャネルの封鎖、nir-[Fe-CO] の包摂を断念し、Fr の内部空腔に進入した nir-[Fe-CO] を空腔の内表面と共有結合によって固定することを目指し、図 2a に示す nir-[Fe-CO]-vinyl を設計した。nir-[Fe-CO]-vinyl の合成は既に終え、nir-[Fe-CO] と同様に近赤外光照射による CO 放出が可能であること、en-thiol 反応により (図 2b)、アルカンチオールとチオエーテル結合を形成することを確認している。

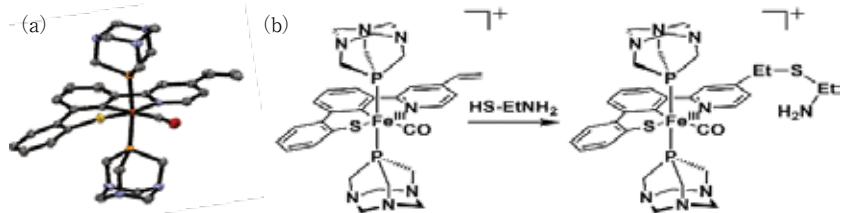


図 2. (a) 助成期間で新規に合成した nir-[Fe-CO]-vinyl の結晶構造。芳香環配位子にビニル基を導入した。(b) en-thiol 反応。ラジカル重合開始剤の存在下、室温で反応が進行することを確認した。

24 量体の FrL134P の空腔

内表面には、Cys48 に基づくチオール基が 24 か所存在する。現在は、Cys48 と nir-[Fe-CO]-vinyl 間の en-thiol 反応に取り組み、チオエーテル結合による nir-[Fe-CO]-vinyl 錯体包摂実現の最終段階にある。

研究助成期間では、nir-[Fe-CO] を Fr 空腔に固定するもう一つの手法として、内部空腔に錯体固定の足場となるマトリクス錯体の構築を構想した。具体的には、Fe₄[Fe(CN)₆]₃ の組成で示される三次元シアノ架橋錯体プルシアンプルー (PB) を Fr 空腔内に構築し、架橋錯体表面の配位不飽和鉄イオンを介して、nir-[Fe-CO] を固定する。これまでの研究で、250 個程度の鉄原子で構成される PB (立方体を仮定した場合、一辺に 6-7 鉄原子を含有) 包摂フェリチン (PB@Fr) の合成に成功した (図 3)。包摂された PB は、一般的な手法で合成するコロイド状 PB に比べ、幅広い pH 領域 (3-9) で安定であり、Fr タンパク質の殻によって PB が外部溶液からある程度隔離された状態にあることが視える。一方、溶存する配位性分子と錯形成することも確認しており、現在 nir-[Fe-CO] のリン配位子の一つをピラジンに置換した錯体を PB@Fr 中の PB 表面に固定する実験を進めている。なお、PB@Fr の合成については、この化合物自体新規性が高いため、一報の論文にまとめ、現在投稿中である

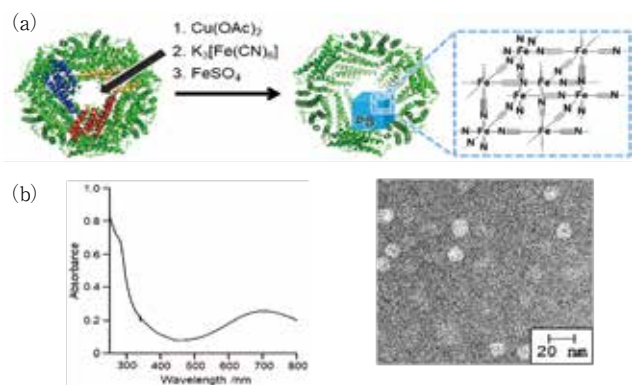


図 3. 助成期間で合成に成功した (a) PB@Fr の概要 (b) PB@Fr の吸収スペクトルおよび透過型電子顕微鏡像。PB 包摂後もフェリチンの球状構造が確認できる。

酸化マンガン表面におけるCr (III) イオンの吸着と酸化

研究者 ▶ 日本女子大学：宮崎 あかね (みやざき あかね)

① 研究の背景および目的

固体酸化物と重金属イオンとの固液界面反応は、鉱床形成、地球表層における元素の循環、及び重金属元素による土壌汚染、触媒調製など、多くの事象に関与している。これら固液界面反応は一般に「吸着現象」としてとらえられ、表面錯形成モデルで説明されてきた。酸化物表面における重金属イオンの吸着現象の多くは、固体表面の水酸基と金属イオンとの間の内圏錯体形成で表されている。

しかしながら、近年いくつかの内圏錯体形成反応について、それに続く過程があることが明らかになってきている。例えば、自然由来のCr(VI)による地下水の汚染が世界各地で報告されているが (Oze et al., 2007)、こうした地域では岩石の風化により溶出した無害なCr(III)イオンが、土壌中のMnO₂に触れることによって有害なCr(VI)に酸化されている。ここで鍵となるのはMnO₂表面におけるCr(III)の内圏錯体形成であり、吸着によって形成されたMn-O-Cr結合を通じて電子が移動していると考えられている (図1)。本研究では自然由来のCr(VI)による水汚染への対策のため、MnO₂表面とCr(III)との相互作用、特に吸着と酸化還元の関係性について解明することを目的とした。

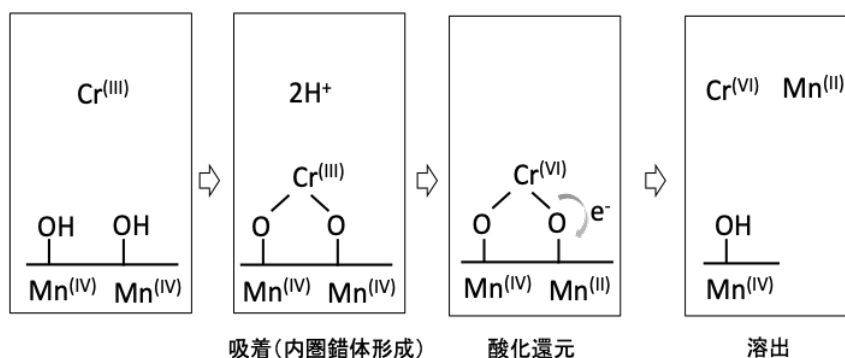


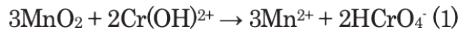
図1 酸化マンガン表面でのCr (III) イオンの吸着・酸化反応

② 研究方法

MnO₂に対するCr(III)の吸着実験を中心に研究を行った。ポリプロピレン製ビーカー中でMnO₂懸濁液を調製し、電極を用いてpH、酸化還元電位(ORP)、溶存酸素濃度(DO)をそれぞれ連続測定した。懸濁液が大気と平衡になったことを確認した後、CrCl₃・6H₂O水溶液を添加し、吸着実験を開始した。実験中は所定の時間に溶液を採取し、孔径0.22 μmのフィルターでろ過した。その後、ろ液中のMn、全Cr濃度をICP-AESで、Cr(VI)濃度をジフェニルカルバジドによる比色法によりそれぞれ定量した。β-MnO₂濃度0.01 g/L、Cr(III)濃度10⁻⁶ M、25°Cを基本条件としたが、β-MnO₂濃度を0.1、0.01、0.001 g/L、Cr(III)濃度を10⁻⁷、10⁻⁶ Mとそれぞれ変化させた実験も行なった。MnO₂の粒子径の影響を調べるため、粉末状および粒状のβ-MnO₂を用いた実験、結晶形の違いについて検討するため、δ-MnO₂を用いた実験も行なった。また、温度の影響についても検討するため、温度を1~4°Cとした実験も行なった。さらに、固体表面に吸着したCrの状態を分析するため、吸着実験後の固体を回収し、佐賀県立九州シンクロトロン光研究センターのBL06にて吸着生成物のCr K-吸収端XANESスペクトルを測定した。

③ 研究成果

酸化マンガンの懸濁液に塩化クロム (III) 水溶液を加えて吸着実験を開始すると、系全体での反応は以下に示す化学式に沿って進行する。



(1)式より、Cr(VI)に対して 1.5 倍の Mn(II)が生成するはずであるが、これまでの実験の結果、Mn(II)/Cr(VI)比の値は反応開始後約 30 分で 0.8 程度であり、150 時間程度をかけてゆっくりと上昇して 1.5 に近づくことが明らかになった。こうしたモル比のアンバランスは図 1 の模式図に示した界面での反応において、電子の移動速度とプロトンの移動速度が大きく異なっていることを示唆している。

今回、様々な実験条件を変化させて吸着反応を行った結果、MnO₂に対する Cr(III)の吸着は、ほぼ全ての実験系で実験開始後に生じている事が明らかになった。一方で、Cr(III)吸着後の Cr(VI)の溶出と Mn(II)の溶出は実験条件によって大きく異なっていた。Cr(III)濃度を变化させた実験では、高濃度の Cr(III)では Cr(VI)の溶出と Mn(II)の溶出が同時に起こっているのに対し、Cr(III)濃度が低くなるほど Cr(VI)の溶出と Mn(II)溶出の時間差が大きくなった。粒子径の異なる β-MnO₂を用いた実験では、粒子径が小さいものほど Cr(VI)の溶出と Mn(II)の溶出の時間差が大きかった。これらの結果は、MnO₂に吸着した Cr(III)の酸化および Cr(VI)の溶出速度を支配する因子と、Mn(II)の溶出速度を支配する因子が異なっている事を示唆している。

一連の実験の中で特に興味深かったのは、MnO₂濃度を变化させた実験である。反応溶液中の Cr (III) 濃度が 10⁻⁶ M で一定である場合、反応初期に吸着された Cr(III)量は MnO₂濃度によらずほぼ一定であった。これに対して Cr(VI)の溶出量は MnO₂濃度によって変化し、MnO₂濃度が低い場合には Cr(VI)の溶出量が減少している事が明らかになった。これらの結果は、MnO₂表面で Cr(III)の吸着密度が高くなった場合、Cr(VI)の溶出が起こりにくくなっていることを意味する。この理由として、MnO₂表面で Cr(III)から Cr(VI)への酸化が起こりにくくなっている、もしくは MnO₂表面で Cr(III)が Cr(VI)に酸化されているものの、その溶出が起こりにくい、といった二通りの可能性が考えられる。

そこで、MnO₂濃度 0.001 g/L、Cr(III)濃度 10⁻⁶ M で 6 時間吸着実験を行った後の固体を回収し、XANES スペクトルを測定したところ、図 2 に示すような結果が得られた。Cr(III)および Cr(VI)の標準物質として測定したそれぞれ Cr₂O₃と K₂CrO₄ のスペクトルと比較すると、吸着生成物には Cr(VI)に特徴的な 5.99 keV 付近のピークが見られない。したがって、Cr(III)は MnO₂表面に吸着したものの、Cr(VI)に酸化されていないことが明らかになった。金属元素の人体に対する影響は酸化数によって大きく異なり、Cr(III)が人体にとって必須であり、糖や脂肪の代謝に関わる一方、酸化力が強い Cr(VI)は細胞膜を透過しやすく、発がん性をもつことが知られている。近年、自然起源の Cr(VI)汚染が世界的に数多く報告され、対策が急務となっている。自然起源の Cr(VI)汚染は、主として世界的に広く分布する蛇紋岩に含まれるクロム鉄鉱由来の Cr(III)が、マンガン酸化物により酸化されることで生じている。本研究の結果から、MnO₂表面で Cr(III)の吸着密度が高まると Cr(VI)への酸化が進行せず、Cr は Cr(III)の状態ですべて吸着し続けることが明らかになった。今後はこの知見を生かし、Cr(III)が環境水中に放出され MnO₂に吸着したとしても、MnO₂表面での Cr(III)の吸着密度を高めることにより、Cr(VI)に酸化しないようにするための対策につなげたい。

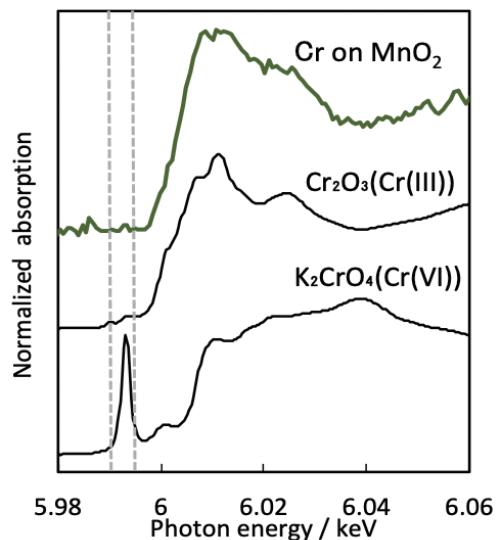


図2 MnO₂濃度 0.001 g/L、Cr(III)濃度 10⁻⁶ M で 6 時間吸着実験を行った後に回収された固体上の Cr の XANES スペクトル。Cr(III)、Cr(VI)の標準物質のスペクトルも併せて示す。

参考文献

Oze et al., PNAS 104, 6544-6549, 2007

ストレスによる内側前頭皮質由来てんかん発作発症機構の解明と治療薬の探求

研究者 ▶ 金沢大学 医薬保健研究域 薬学系：金田 勝幸 (かねだ かつゆき)

①研究の背景及び目的

てんかん発作は脳内の興奮と抑制のバランスが崩れ過剰興奮状態となり、神経細胞・回路において病的オシレーションが発生することで発症する。てんかん患者やてんかんモデル動物では GABA 作動性神経伝達の機能異常が観察されること、また、GABA 受容体の阻害はインビボおよびインビトロにおいて、てんかん様活動を誘導することから、抑制性神経伝達の機能不全がてんかん発作の発生に重要な役割を果たす一因として考えられている。発作の焦点となることが多い海馬での研究に比べ、内側前頭皮質(mPFC)を原因部位とする治療薬抵抗性の難治性てんかんでの発作発症機構に関する知見は限られている。また、ストレスがてんかん発作の引き金となることが臨床的に知られているが、その神経機構は十分にはわかっていない。したがって、この機構を解明することは、ストレスによるてんかん発作の予防・治療薬の開発と、それを通じた患者の健康への貢献が期待できるため社会的要請は高く、きわめて重要である。mPFC は青斑核 (LC) からノルアドレナリン (NA) 作動性神経投射を受けており、ストレス負荷時には LC の活性化により、mPFC における NA 遊離が亢進する。我々はこれまでに、NA が mPFC 錐体細胞を興奮させることを見出しており、この興奮性作用がてんかん発作における神経細胞・回路における病的オシレーションの発生に寄与する可能性が考えられる。そこで本研究では、インビボ行動薬理学およびインビトロ電気生理学の手法を統合的に駆使して、mPFC での NA 遊離がストレス誘発性てんかん発作の発生に寄与するかどうかを解明し、治療薬・治療法を探求することを目的とした。

②研究方法

インビボ行動薬理学的手法では、雄性 C57BL/6J マウスの mPFC に GABA_A 受容体拮抗薬であるピクロトキシン (Pic) を局所投与することによって、てんかん発作を誘発させる、てんかんモデルマウスを作製した。このてんかんモデルマウスに対して、薬液の mPFC 内同時投与あるいは拘束ストレス負荷を行い、てんかん発作発生潜時への影響を計測した。

インビトロ電気生理学的手法では、雌雄 C57BL/6J マウスから mPFC を含む脳スライス標本を作製し、V層錐体細胞からホールセルカレントクランプ記録を行い、細胞の膜電位を記録した。また、ホールセルカレントクランプ記録と同時に神経細胞集団の活動を反映するフィールドポテンシャル記録を行い、同期的な活動を記録した。一部の実験では、mPFC 以外からの入力を排除するために mPFC を単離した脳スライス標本を使用した。

③研究成果

まず、インビボ行動薬理学的手法を用いて、Pic 誘発性てんかん発作の誘導が mPFC への NA 投与によって促進されるか否かを検討した。その結果、Pic と NA を mPFC に同時投与することによって、てんかん発作の発生潜時が短縮されることを見出した。そこで次に、この時の mPFC 神経活動の変化をインビトロ電気生理学的手法を用いて検討した。Pic 適用下において NA をバス適用すると、数分以内に持続性の脱分極とそれに伴う群発性活動電位から成る、てんかん様の異常なオシレーション (EA) が高頻度に誘導された。一方、Pic のみの適用では散発的な EA しか認められなかった。したがって、Pic 適用によ

り GABA による抑制性伝達を遮断した状況下では、NA は mPFC V 層錐体細胞において EA の誘導を促進することが示された。

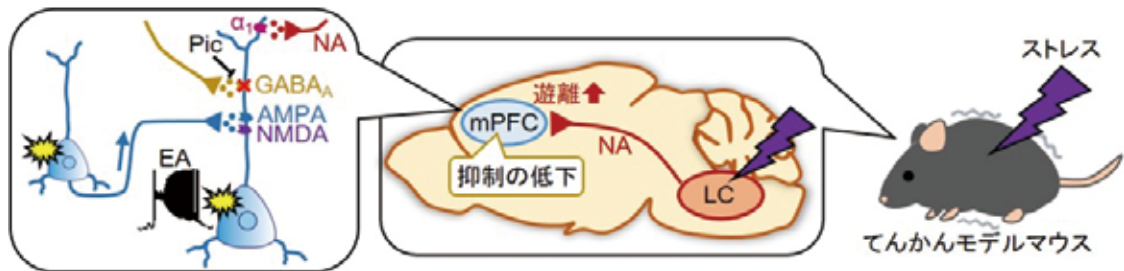
次に、観察された EA が神経細胞集団の同期的な活動であるかを確認するために、ホールセルカレントクランプ記録に加えて、フィールドポテンシャル記録を同時に行った。その結果、EA の発生と同期して神経細胞集団の活動が観察されたことより、EA が神経細胞集団において同期的に発生することが確認された。さらに、EA が mPFC 局所回路内で誘導されるのか、あるいは、mPFC 以外からの入力が必要なのかを調べるために、mPFC 以外からの入力を排除した mPFC 単離スライスを用いて記録を行った。その結果、mPFC 領域を単離した場合においても Pic と NA の同時適用により EA が誘導された。以上の結果は、mPFC 局所神経回路が EA の誘導に十分であることを示している。

これまでに我々は、NA が mPFC V 層錐体細胞においてグルタミン酸作動性神経伝達を増加させることを報告している。したがって、NA による EA の誘導にグルタミン酸作動性神経伝達を介した神経細胞の相互の活性化が関与する可能性が考えられる。この仮説を検証するために、グルタミン酸受容体の AMPA および NMDA 受容体拮抗薬である CNQX および AP-5 を EA 誘導後に適用した。その結果、CNQX の適用は EA の発生を消失させ、また、AP-5 の適用は発生頻度を顕著に減少させた。以上より、NA による EA 誘導の促進に AMPA および NMDA 受容体の両方を介したグルタミン酸作動性神経伝達に関与していることが明らかとなった。

次に、NA による EA 誘導の促進がどのアドレナリン受容体を介した作用であるかを検討するために、 α_1 、 α_2 および β 受容体拮抗薬であるテラゾシン、アチパメゾールおよびチモロールの作用を検討した。その結果、テラゾシンの適用は EA の発生頻度を減少させたが、アチパメゾールおよびチモロールは EA の発生頻度に影響を与えなかった。さらに、 α_1 受容体作用薬であるフェニレフリンを用いて、NA の作用を模倣することが出来るかを検討したところ、Pic 適用下においてフェニレフリンの適用は NA と同様に高頻度に EA を誘導した。これらの結果は、NA が α_1 受容体の活性化を介して EA の誘導を促進することを示している。

上記の結果を踏まえ、インビボ行動薬理学的実験において観察された、NA によるてんかん発作発生潜時の短縮が α_1 受容体を介した現象なのかを検討した。 α_1 受容体拮抗薬のテラゾシンを mPFC 内に同時投与することによって NA によるてんかん発作発生潜時の短縮が抑制された。すなわち、NA は α_1 受容体の活性化を介して Pic 誘発性てんかん発作の誘導を促進することが示唆された。最後に、ストレス負荷による内因性 NA の細胞外濃度上昇が Pic 誘発性てんかん発作の発生に影響を与えるかを検討した。mPFC において細胞外 NA 濃度が上昇することが報告されている拘束ストレスを負荷したところ、Pic 誘発性てんかん発作の発生潜時は有意に短縮した。したがって、ストレス負荷による mPFC 細胞外 NA 濃度上昇が Pic 誘発性てんかん発作の誘導を促進することが示唆された。

本研究により、ストレス負荷によって mPFC において遊離が亢進する NA が α_1 受容体の活性化を介して、てんかん発作の誘発促進に寄与することが明らかとなった（下図）。この知見は、mPFC に原因を持つてんかん患者においては、 α_1 受容体を遮断することをターゲットとした治療薬が有効である可能性を示している。



リンパ球分化における新規代謝調節因子の機能解析

研究者 ▶ 東京理科大学 生命医科学研究所：伊川 友活（いかわ ともかつ）

①研究の背景及び目的

B細胞を含む全ての血液・免疫細胞は造血幹細胞から作られる。その過程で多能性の造血幹細胞は徐々に分化能が限定されていき、最終的にB細胞にしかたれない前駆細胞に運命決定される。この運命制御には転写因子や増殖因子など様々な因子が関わるが詳細は明らかでない。特に、分化過程で代謝がどのように制御されているのか不明である。申請者らは最近、自己複製能と多能性を兼ね備えた人工白血球幹細胞（induced Leukocyte Stem：iLS細胞）を作成することに成功した。iLS細胞はB細胞分化に必須の転写因子 E2A の機能を阻害する Id3 を多能造血前駆細胞に発現させることにより作成・維持される。一方、Id3 の発現を解除すると T細胞、B細胞、顆粒球などへの分化が再開する。

我々は Id3 とエストロゲン受容体（ERT2）を用いることにより、このような分化停止・誘導を可能な培養系を開発した。この iLS細胞を用いて B細胞分化に重要な新規遺伝子をスクリーニングしたところ、核 DNA によりコードされ細胞内ではミトコンドリアに局在する Chchd10（Coiled-Coil-Helix-Coiled-Helix Domain Containing 10）が B細胞分化過程で一過性に発現することが明らかとなった。

そこで本研究では、B細胞分化運命制御における Chchd10 の役割を含めた代謝調節機構を明らかにすることを目的とする。

②研究方法

1. B細胞分化におけるミトコンドリアの役割の解析

(1) 骨髄細胞のミトコンドリア活性

B細胞分化におけるミトコンドリアの活性を明らかにするために、正常マウスから骨髄細胞を採取し、TMRE（Tetramethylrhodamine, ethyl ester）で染色したあと、フローサイトメーター（FACS）を用いて解析した。

(2) ミトコンドリア阻害剤を用いた B細胞分化におけるミトコンドリア機能の解析

正常マウスの骨髄細胞から造血幹細胞を採取し、B細胞分化を支持する TSt-4 ストロマ細胞上で培養した。ここへミトコンドリアの電子伝達系を阻害する Rotenone を添加した。培養 13 日後に細胞を回収し、B細胞マーカーで染色後、FACS を用いて解析した。

2. Chchd10 の B細胞分化における役割の解析

上記の TSt-4 細胞との共培養系において Chchd10 をノックダウンすることにより、B細胞分化が阻害されるかどうかを調べた。また、CRISPR/Cas9 ゲノム編集を用いて Chchd10 欠損マウスを作成し、このマウスの骨髄、脾臓、胸腺細胞など解析した。

③研究成果

1. 造血前駆細胞の各分化段階における TMRE の強度を比較したところ、pre-pro-B細胞で最も高いことが明らかとなった。造血幹細胞では低く、分化が進むに連れて上昇するが、pre-pro-B細胞以降は低下した。このことから、TMRE は B細胞分化過程において、一過性に上昇することが明らかとなった。ミトコンドリア阻害剤 Rotenone を in vitro における B細胞分化誘導系をへ添加したところ、濃度依存的に B細胞

分化が阻害された。0.01 μ M 加えると CD19 陽性細胞の出現がほとんど認められなかった。このことから、ミトコンドリア活性は B 細胞初期分化に重要であることが示された。

2. 造血幹細胞へ Chchd10 に対する shRNA を導入し、培養系を用いて B 細胞へ分化誘導したところ、CD19 陽性細胞の割合がコントロールの半分ほどに抑えられた。また、この B 細胞では ROS の活性が上昇した。さらに、培養後の qRT-PCR を行ったところ、Pax5, Igl11, Vpreb などの発現が顕著に減少していた。一方、Chchd10 欠損マウスを作成し解析したところ、コントロールマウスと比べて B 細胞の割合に変化は認められなかった。以上の結果から、B 細胞分化において、ミトコンドリア活性は重要な役割を果たすことが明らかとなった。

TNF 受容体型分子に着目したアレルギー発症の 新たなメカニズムの解明

研究者 ▶ 東北大学大学院 医学系研究科：奥山 祐子（おくやま ゆうこ）

①研究の背景及び目的

花粉症、気管支喘息、アトピー性皮膚炎を始めとするアレルギーは、その疾患そのものによる健康被害だけでなく、アレルギー症状が原因の不眠や精神的ストレスにより他の疾患の発症を引き起こす。したがって、アレルギーの発症機序の解明と予防法・治療法の開発は、国民の健康増進とアレルギー罹患者個人の美を保つ意味で重要な研究課題である。

自然リンパ球 (ILC) は、自然免疫系において機能するリンパ球細胞で、なかでも肺や皮膚、脂肪組織に存在する ILC2 は、Th2 サイトカイン IL-5、IL-13 の産生を介してアレルギー性呼吸器炎症、寄生虫感染防御、アトピー性皮膚炎等の病態形成に関与する。我々は、肺組織中の ILC2 に TNF 受容体型 T 細胞共刺激分子である GITR と OX40 リガンドが高発現することを見出した。そこで、実際に、GITR 欠損マウスに、ILC2 の活性化に依存して惹起される気管支喘息を惹起したところ、発症が強く抑制されることが明らかになった。さらに、GITR に関しては、GITR 阻害物質の投与によりマウス気管支喘息が抑制できることを見いだした。GITR は IL-33 シグナルと協調的に作用し ILC2 の増殖、サイトカイン産生を亢進することがわかった。

そこで本研究では、GITR および OX40 による ILC2 依存的なアレルギー疾患の発症機序を解析し、GITR および OX40 を標的としたアレルギー疾患治療法の可能性について明らかにする。

②研究方法

1) GITR リガンド発現細胞の同定：アレルギー病態において ILC2 に GITR 刺激を供与する細胞は同定されていない。GITR リガンドは膜型タンパク質であることから、アレルギー反応が惹起される部位（肺や皮膚など）では、ILC2 と GITR リガンド発現細胞が細胞間接着を介して GITR シグナルが供与されるはずである。そこで、定常状態あるいはアレルギー発症時のマウスの肺に存在する種々の細胞をセルソーターによって単離して、個々の細胞の GITR リガンド mRNA およびタンパク質の量を測定することにより、アレルギー反応を惹起する GITR リガンド発現細胞を同定する。GITR リガンド発現細胞が同定できれば、同細胞がアレルギー反応惹起時に生体内でどのような機序によって ILC2 と細胞間相互作用を起こすか、その相互作用に関与する分子は何か等を、GITR 欠損マウスおよび GITR リガンド欠損マウスを使用して解析し、ILC2 依存的アレルギー性喘息発症の分子機構の詳細を解明する。

2) ILC2 に発現する OX40 リガンドの役割：以前より、ILC2 に T 細胞への抗原提示能力があることが指摘されており、ILC2 上の OX40-L が、アレルギー反応の過程で、抗原提示を行うと同時に、T 細胞上の OX40 に OX40-L を結合させて、T 細胞を活性化させる可能性が想定された。本研究では、OX40 欠損マウス、OX40-L 欠損マウスや OX40 アゴニスト抗体などを使用して、アレルゲン特異的な T 細胞の活性化における ILC2 上の OX40 リガンドの役割を明らかにする。さらに、ヒト末梢血より ILC を精製し、in vitro にてサイトカイン刺激を行い、OX40-L の発現を解析する。OX40 シグナルによる ILC 機能制御におけるヒトのアレルギー疾患の予防および治療への有効性を評価する。

③研究成果

1) GITR-L 発現細胞の特定のため、IL-33 誘導性肺炎症を誘導し、炎症の前後での肺組織中の各免疫細胞における GITR-L の発現を解析した。その結果、肺炎症時 ILC2 における GITR-L 発現が確認された。次に、ILC2 を *in vitro* で培養しサイトカイン刺激による GITR-L 発現変化を解析した結果、IL-33 刺激特異的な GITR-L 発現誘導が確認された。実際に GITR-L 欠損マウスにパパイン誘導性外炎症を誘導したところ、炎症病態が減弱した。これらのことから ILC2 自身が GITR と GITR-L のどちらも発現し、ILC2 間のオートクライン刺激により ILC2 の活性化を促進していることが考えられる。

2) まず、*in vitro* でマウス肺組織由来 ILC2 を培養し、様々なサイトカイン刺激を行った結果、IL-33 刺激特異的に細胞上の OX40-L 発現が誘導された。次に、ILC2 に発現する OX40-L が T 細胞の OX40 を介したシグナル伝達を誘導し、T 細胞の機能制御を行う可能性について検証するため、*in vitro* において ILC2 と T 細胞の共培養実験を行った。

野生型マウス由来 ILC2 との共培養により CD4⁺T 細胞の TCR 刺激依存的な細胞増殖、サイトカイン産生が促進された。一方で OX40-L 欠損マウス由来の ILC2 を用いた場合や抗 OX40-L 阻害抗体を添加した場合はこれらの促進は認められなかった。以上より、ILC2 に発現する OX40-L は T 細胞の機能制御を介して IL-33 依存的なアレルギー疾患の発症に寄与することが示唆された。

今後さらに、ヒト PBMC 由来の ILC2 において、GITR、OX40-L を中心とした各種補助刺激分子のサイトカイン刺激による発現変化について解析を行い、アレルギー性疾患の治療標的としての有用性を検証していく。

樹状細胞の活性化を誘導する細胞外危険シグナルによる抗腫瘍免疫誘導

研究者 ▶ 岡山大学 大学院：古田 和幸（ふるた かずゆき）

研究の背景・目的

樹状細胞は、生体内に侵入した病原体や、生体内で発生した腫瘍細胞を取り込み、主要組織適合抗原 (MHC-I または MHC-II) を介して T 細胞に病原体由来抗原を提示することで、病原体や腫瘍細胞の排除のための獲得免疫応答を惹起する。抗原提示による T 細胞の活性化調節には、樹状細胞表面に発現する MHC 分子と共に補助因子が必要である。そのうち共刺激分子と呼ばれる CD80 や CD86 は T 細胞の活性化を促進し、一方で共抑制分子と呼ばれる PD-L1、PD-L2 は T 細胞の活性化を抑制する。T 細胞の活性化にはこれらの分子の発現が適切である必要があるが、これら分子の細胞表面発現は樹状細胞の活性化状態によって変化する。そのため、病原体の排除を有効に活性化するためには、適切な樹状細胞の活性化方法とその活性化メカニズムを理解することが重要である。

アデノシン三リン酸 (ATP) は生体におけるエネルギー分子であり、細胞内に豊富に存在するが、正常な組織の細胞外にはほとんど存在しない。一方で、組織が損傷を受けると細胞内から局所的に放出され周囲の細胞に作用し、炎症性サイトカイン産生などを誘導することが知られている。近年、ATP が樹状細胞の浸潤促進などを介して抗腫瘍免疫を亢進させることも報告されている。しかしながら、細胞外 ATP がどのようなメカニズムで樹状細胞の機能を制御するのかは明らかではない。そこで本研究では、樹状細胞の抗原提示関連分子の発現、および樹状細胞による T 細胞の活性化に対する細胞外 ATP の作用を解析し、抗腫瘍免疫活性化における役割を解析した。

方法・結果

検討にはマウスの骨髄細胞を GM-CSF の存在下培養し、分化させた骨髄由来樹状細胞 (BMDC) を用いた。細胞表面分子の発現はフローサイトメーターを用いて解析した。上清中のサイトカイン産生は ELISA 法によって測定した。

BMDC を ATP で刺激すると、細胞表面の MHC-II 分子および共刺激分子 CD80 の発現亢進が誘導された。一方、共抑制分子である PD-L1 および PD-L2 の発現には影響しなかった。

次に BMDC と T 細胞を共培養し、樹状細胞の抗原提示による T 細胞の活性化を検討した。活性化した T 細胞から産生される IFN γ は抗腫瘍免疫を促進することが知られている。そこで ATP 刺激した BMDC による T 細胞活性化による IFN γ の産生を検討したところ、ATP 刺激 BMDC は無刺激の BMDC と比較して T 細胞からの IFN γ 産生誘導能が高いことを見いだした。

考察

ATP 刺激は、樹状細胞の抗原提示分子および共刺激分子の発現を誘導し、抗原提示による T 細胞の活性化を増強し IFN γ の産生を誘導すると考えられた。IFN γ は抗腫瘍免疫を促進するため、ATP で刺激された樹状細胞が抗腫瘍性の免疫応答の活性化を誘導する可能性が考えられた。

研究テーマ

新規糖ペプチド解析法の開発と健康長寿マーカー探索への応用

研究者 ▶ 東京都健康長寿医療センター研究所：津元 裕樹（つもと ひろき）

① 研究の背景及び目的

少子高齢化社会において、健康寿命をいかにして延ばすかが大きな課題となっている。これまでに申請者らは、健康長寿のマーカーを探索するため、ヒト健康長寿モデルである超百寿者の血漿タンパク質のN型糖鎖解析を行い、シアル酸含有糖鎖の増加が超百寿者群に特徴的であることを明らかにした。シアル酸には生物学的に重要な二つの結合様式（ α 2,3- および α 2,6- シアル酸）が存在するため、これらを区別して解析することが望まれていた。これまでに、これらを質量分析法で容易に区別できるシアル酸結合様式特異的誘導体化を利用したN型糖鎖解析法を開発した。しかしながら、糖鎖変化の意義を明らかにするためには、タンパク質およびその修飾部位まで明らかにする必要がある。

そこで本研究では、シアル酸結合様式特異的誘導体化を糖ペプチド解析に応用した新規糖ペプチド解析法を開発し、健康長寿マーカーの探索を目的とした。

② 研究方法

新規糖ペプチド解析法の概略を図1に示す。糖タンパク質を酵素消化した後、化学誘導体化によるアミノ基の保護とアジド基の導入、光切断部位を含むアルキン-ビーズとのクリック反応によるビーズへのペプチド固定を行った。その後、ビーズ上でシアル酸結合様式特異的誘導体化を行い、光反応でペプチドをビーズから遊離させ、質量分析法により解析した。サンプルとして、 α 2,3- および α 2,6- シアル酸を二つ有する糖ペプチド標準品（ α 2,6- および α 2,3-SGP）、ヒト血漿由来の糖タンパク質としてN型及びO型糖鎖を有する fetuin-A を用いた。

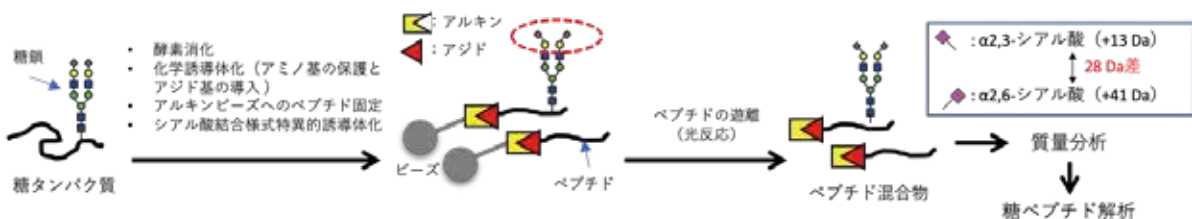


図1. ビーズ上でのシアル酸結合様式特異的誘導体化を用いた新規糖ペプチド解析法の概略.

③ 研究成果

最初に、糖ペプチド標準品を用いて本解析法を検討した。その結果、 α 2,3- および α 2,6-SGP ではそれぞれ m/z 3154.5 と 3210.6 にピークが検出された（図2）。シアル酸の誘導体化により α 2,6- および α 2,3- シアル酸の分子量差は 28 Da となる。得られたピークの分子量差がシアル酸二つ分に相当する 56 Da であったことから、糖ペプチドにおいてもシアル酸結合様式を区別した誘導体化が可能であることがわかった。これらのピークは光照射なしでは検出されなかったこと、 m/z 値が理論値と一致したことから、期待通りの誘導体化が進行したことがわかった。

次に、N型及びO型糖鎖を有する糖タンパク質のトリプシン消化物を用いて検討した。LC-MS/MS 及びデータベース検索を行った結果、 α 2,3- および α 2,6- シアル酸を区別してN型及びO型糖ペプチドの同定に

成功した(表1)。また、誘導体化前後に測定したfetuin-A由来のトリプシン消化ペプチドのMALDI-TOFマスペクトルを図3に示す。m/z 2864.5は α 2,3-シアル酸を一つもつO型糖ペプチドに相当する(表1)。誘導体化前、このペプチドに相当するピークはほとんど検出されなかったことから、本解析法によりシアル化糖ペプチドを高感度に検出できることもわかった。

以上の結果より、シアル酸の結合様式まで区別できる新規糖ペプチド解析法を開発することができた。今後、ヒト血漿タンパク質の糖ペプチド解析へ応用し、健康長寿の指標となるマーカー探索を進めていきたい。

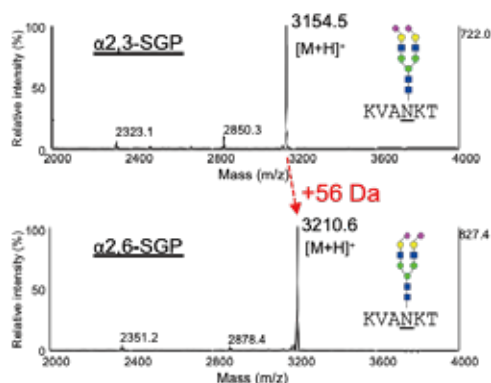


図2. 誘導体化シアル化ペプチドのMALDI-TOFマスペクトル。

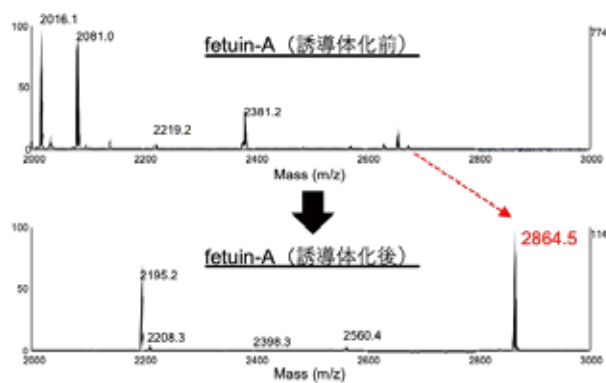


図3. 誘導体化前後のfetuin-A由来トリプシン消化物のMALDI-TOFマスペクトル。

表1. LC-MS/MS解析により同定されたfetuin-A由来のN及びO型糖ペプチド

Positions	Annotated Sequence	Theo. MH+ [Da]	Glycan type	Sites	Glycan Composition	NeuAc		Charge	m/z [Da]	RT [min]		
						α 2,3	α 2,6					
[145-159]	VCQDCPLLAPLNDTR	4319.99	N-Glycan	N157	HexNAc(4)Hex(5)NeuAc(2)	82	1258	3	1440.67	26.2		
[339-361]	TRTVVQPSVGAAAGPVVPPCPGR	2897.43	O-Glycan	S346	HexNAc(1)Hex(1)	0	0	3	966.49	21.9		
[341-361]	TVVQPSVGAAAGPVVPPCPGR	2398.27	O-Glycan	S346	HexNAc(1)	0	0	2	1199.63	21.9		
		2560.32	O-Glycan	S346	HexNAc(1)Hex(1)	0	0	3	854.11	21.6		
		2864.45	O-Glycan	S/T	HexNAc(1)Hex(1)NeuAc(1)	13	0316	1	0	3	955.48	21.3
		3196.60	O-Glycan	S346	HexNAc(1)Hex(1)NeuAc(2)	54	0946	1	1	3	1066.20	21.4

公益財団法人 小柳財団

