

学 校 名	北 里 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	造血ホルモンとしてのアルドステロン:機能解明と創薬		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①アルドステロン ②バソプレシン ③エリスロポエチン ④腎			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
野々口 博史	メデイカルセンター 総合内科	部 長	研究全般

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
河原 克雅	医 学 部	教 授	光学顕微鏡測定
安岡 有紀子	医 学 部	講 師	In situ hybridization
天羽 康之	医 学 部	教 授	幹細胞培養
三井 純雪	医 学 部	講 師	細胞培養・クローン化
広野 修一	薬 学 部	教 授	In silico 解析
小林 憲忠	メデイカルセンター 研究センター	部 長 補 佐	細胞培養

造血ホルモンとしてのアルドステロン：機能解明と創薬

1. 研究の目的

(1) 腎尿細管でのエリスロポエチン産生の証明

- ① 腎臓は、細胞外液の水電解質組成を制御するだけでなく、生後、造血ホルモン・エリスロポイエチン (Epo) を産生・分泌する唯一の臓器である。腎障害は、Epo 産生能を低下させ貧血を招き、貧血は腎機能を一層低下させるため、腎性貧血の改善は、腎機能維持と心循環系保護に良い影響を与え、生活の質 (QOL) の向上と健康寿命を延長する。しかし、腎臓内での Epo 産生部位、産生機序には不明の点が多く、腎臓の Epo 産生能を維持する保存的治療、薬の開発分野は未開拓である。

私たちは、*In situ* hybridization (ISH) 法を用いて、正常状態のマウス腎皮質部ネフロンで Epo が産生されることを明らかにした (Nagai T et al, Biochem Biophys Res Commun. 2014)。マウスを低酸素あるいは貧血にすることで、尿細管および間質での Epo 産生は増加したが、これまでは腎間質細胞でのみ産生されるとされてきたため、尿細管での Epo 産生機序については全く検討されてこなかった。

副腎皮質ホルモンであるアルドステロンは、容量調節系であるレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系の最終産物であり、腎集合管のアルドステロン受容体 (Mineralocorticoid receptor, MR) に作用し上皮型 Na チャネル (ENaC) の発現量を増加させ細胞外液量を維持する (Koshimizu TA, Nonoguchi H, et al, Physiol Rev. 2012 ; 92: 1813-64.)。私たちは、アルドステロンが、腎集合管間在細胞 (IC) における酸塩基調節の修飾因子であることを証明した (Izumi Y, Nonoguchi H, et al, J Am Soc Nephrol. 2011;22:673-80)。慢性腎不全進行阻止のための降圧薬では、尿蛋白がある患者においては、ACE-I, ARB といった RA 系阻害薬の有用性が確立している。しかし、RA 系阻害薬投与により代謝性アシドーシスとともに、貧血が生じることも良く知られているが、その原因は明らかでなかった。これらの事を総合的に考慮すると、腎尿細管での Epo 産生は、アルドステロンにより制御されている可能性が高い。この研究の目的は、腎尿細管での Epo 産生を ISH 法以外の方法で確認し、アルドステロンによる Epo 産生調節機構を解明することである。私たちの「アルドステロン=造血ホルモン説」は、この RA 系阻害薬による貧血機序を見事に説明している。アルドステロン産生を低下させる RA 系阻害薬は、Epo 産生も阻害することで、貧血を生じる。RA 系阻害薬による腎性貧血に対する新たな治療的予防法の開発に繋がり、多数の国民を悩ます一般的な貧血に対する治療法の開発も期待される。

- ② アルドステロンによる Epo 産生制御機構の解明

Epo 産生の規定因子としては、低酸素誘導因子 (Hypoxia-inducible factor) 2α が最も重要と考えられてきたが、アルドステロンにより制御されていると言う報告はない。アルドステロンでの Epo 産生制御機構を明らかにする。

2. 研究の計画

(1) 腎尿細管での Epo 産生部位とその産生機序の解明

- ① 私たちは、マウス腎尿細管 (近位・遠位・集合管) 細胞において、(1) 標準飼育で Epo 遺伝子発現があること、(2) 低酸素環境 (4時間) で、遺伝子発現量が有意に増加することを高感度 Tyramide-ISH 法で証明した。

そこで、単離腎尿細管を用いて、尿細管の部位ごとの Epo 遺伝子発現を real time PCR 法で検討した。まず、尿細管懸濁液を腎皮質、髓質外層、髓質内層の3つの部位に分けて調整する。また、実体顕微鏡下で microdissection にて採取した尿細管を単離採取する。その後、RNA を抽出し、real time PCR を行った。Epo、HIF1 α 、HIF2 α 、PHD2 の尿細管における発現を定量的に測定した。サンプルが極めて微量であるため、RNA 抽出が一番重要であるため、

Dynabeads® mRNA DIRECT Micro Purification Kit (Ambion®)、ArrayPure™ Nano-scale RNA Purification Kit (Epicentre)、RNeasy mini kit (Quiagen)のRNA抽出キットを比較検討した。

さらに、病理学的には、腎性貧血を引き起こしたCd腎症モデルラット腎標本を比較検討した。

3. 研究の成果

(1) 腎尿細管におけるEpo産生部位

- ① まず、RNA抽出法の検討を行った。Dynabeadsh社のキットは、含まれているビーズがreal time PCRに影響していい結果を得られなかった。Epicentre社のキットは、良好であったが、手作業で手間と時間がかかるのが欠点であった。QiagenのRNeasy kitはQiacubeを使用するため30分で抽出が完了し、良好な結果を得ることができ、それを採用した。

腎臓を皮質、髓質外層、髓質内層の3つに分け、尿細管懸濁液(Tubule suspension)を調整し、Epo mRNA発現をまず検討した。内因性コントロールであるGAPDHに対する発現量で比較検討した。Epo mRNA発現量は、皮質、髓質外層において認められ、髓質内層での発現はわずかであった。皮質でのEpo mRNA発現は時間とともに大きく減少し、2時間後には、大きく低下した。そこで、アルドステロンを 10^{-9} M、 10^{-6} Mの濃度で尿細管懸濁液をインキュベートしたところ、皮質及び髓質外層でEpo mRNA発現の増加を認めた。次に、microdissection法で尿細管を単離し、セグメントごとのEpo mRNA発現とアルドステロンの効果を検討した。まず、糸球体から尿流に従って、髓質内層集合管までの部位におけるEpo mRNA発現量を検討した。ほとんどの尿細管セグメントで正常状態においてEpo mRNA発現を認めた。

次にアルドステロンの受容体が発現している遠位部ネフロンでアルドステロンの効果を検討した。アルドステロンは、皮質部及び髓質部ヘンレの太い上行脚(CAL, MAL), 皮質部、髓質外層及び髓質内層集合管(CCD, OMCD, IMCD)のいずれの部位においても、Epo mRNA発現を増加させた。

- ② 次にバソプレシンを用いて、アルドステロンと同様の検討を行った。バソプレシンもアルドステロンと同様に、遠位部ネフロンでのEpo mRNA発現を増加させた。

(2) アルドステロンによるEpo産生制御機構

- ① まず、尿細管懸濁液を用いて、アルドステロンのEpo mRNA発現増加の際のHIF2 α , HIF1 α , PHD2, MR, V2R, V1aRの遺伝子発現の変化を検討した。アルドステロンにより、MR遺伝子発現は増加したが、V2R, V1aR遺伝子発現も増加し、アルドステロンがその核内受容体であるMRのみならずバソプレシン系にも影響していることが明らかとなった。また、アルドステロンはHIF2 α だけでなく、HIF1 α 遺伝子発現も増加させることが明らかとなった。MAL, OMCDを用いて行った同様の検討でも、同じような結果を得た。また、Epo産生を抑制するとされてきたGATA2, GATA3遺伝子発現がアルドステロンにより亢進し、IN-IC細胞において、アルドステロンはGATA2, GATA3の細胞質から核内への移動を促進させることも明らかとなった。以上より、アルドステロンとバソプレシンはHIF2 α の活性化を介して、遠位部ネフロンでのEpo産生を亢進させることが明らかとなった。

4. 研究の反省・考察

(1) 腎尿細管におけるEpo産生部位

- ① 腎尿細管すべての部位において、Epo産生が行われていることが、明らかとなった。
- ② アルドステロンは、髓質部ヘンレの太い上行脚以降の遠位部ネフロンにおいて、Epo mRNA発現を増加させることが明らかとなった。その機序は、HIF2 α の活性化を介するものであることも明らかにした。

(2) 腎近位尿細管でのEpo 産生

- ① 近位尿細管でもEpo産生が行われていることを明らかにしたが、遠位部ネフロンにおけるアルドステロンの様にホルモンでの制御を受けるかどうかについては、今回は検討できなかった。近位尿細管に作用するホルモンを用いての検討を計画している。
- ② IN-IC 細胞を用いての実験は、継代数の増大も有り、十分な検討が行えなかった。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

Yasuoka Y, Sato Y, Healy JM, Nonoguchi H, Kawahara K. pH-sensitive expression of calcium-sensing receptor (CaSR) in type-B intercalated cells of the cortical collecting ducts (CCD) in mouse kidney. Clin Exp Nephrol. 2015; 19:771-782.

(2) 口頭発表

- ① Izumi Y, Yasuoka Y, Nakayama Y, Inoue H, Mukoyama M, Kawahara K, Nonoguchi H. HIF1a and HIF2a-induced erythropoietin production along the nephron. Annual Meeting of the American Society of Nephrology. 2015.11.7 San Diego
- ② Yasuoka Y, Oshima T, Sato Y, Nonoguchi H, Kawahara K. Hypercalcemia in mice with high CaP diet co-operatively stimulated renal alpha and beta intercalated cells (IC-A and -B) via basolateral Ca sensing receptor in IC-B. Annual Meeting of the American Society of Nephrology. 2015.11.7 San Diego
- ③ Izumi Y, Eguchi K, Nakagawa T, Nakayama Y, Inoue H, Kakizoe Y, Kuwabara T, Nonoguchi H, Mukoyama M. TSS-Seq analysis of low pH induced gene expressions in the intercalated cells. Annual Meeting of the American Society of Nephrology, 2015.11.7 San Diego
- ④ 泉裕一郎、安岡有紀子、中山裕史、井上秀樹、向山政志、河原克雅、野々口博史。腎尿細管におけるhypoxia-inducible factor 2 α の発現の検討。日本腎臓学会総会。2015.6.5 名古屋
- ⑤ Nonoguchi H, Izumi Y, Yasuoka Y, Nakayama Y, Nagai T, Nanami M, Nakanishi T, Mukoyama M, Kawahara K. Aldosterone and vasopressin are erythropoietic hormones, Annual Meeting of the American Society of Nephrology 2016.11 Chicago (予定)

(3) 出版物

なし

学 校 名	杏 林 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	RNA異常をターゲットとした新規抗悪性腫瘍薬の開発		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①スプライシング ②マイクロRNA ③胆道癌 ④肺癌			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
渡 邊 卓	医 学 部	教 授	研究の総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
大 西 宏 明	医 学 部	教 授	腫瘍の遺伝子解析、論文の作成
大 塚 弘 毅	医 学 部	助 教	RNAの機能解析
滝 田 順 子	東 京 大 学 医 学 部	准 教 授	ゲノムワイドの解析

RNA異常をターゲットとした新規抗悪性腫瘍薬の開発

1. 研究の目的

我々はこれまで、肺癌や造血器腫瘍の遺伝子異常の解析に精力的に取り組み、特に造血器腫瘍においてRNAのスプライシング異常が深く関与していることを明らかにしてきた。また、肺癌においては分子標的薬の耐性に関与する遺伝子異常に対し、siRNAを用いたRNAターゲティングにより薬剤耐性を克服できる可能性を明らかにしている。これらの知見をもとに、本研究では、各種の悪性腫瘍においてmicroRNAを含むRNAの異常や、その調節機構の破綻の原因となる非翻訳領域の異常について解析を行い、新たな抗悪性腫瘍薬の開発の基礎となる知見を得ることを目指す。これらの研究により、従来の抗癌剤の枠を超えた新規抗腫瘍薬の開発が可能となり、いまだ途上にあるがん征圧に向けた新たな治療戦略の構築に大きく寄与することが期待される。

2. 研究の計画

27年度は、それまでに同定した各種腫瘍に見られるRNA異常およびRNA修飾・調節の異常をターゲットとした治療法の開発を目指した研究を行う予定であったが、これらの異常の検索および解析が遅れているため、以下の項目も引き続き行う。

(1) RNA発現異常の解析

発現アレイを用いて、各種腫瘍におけるRNA発現異常の有無を検索する。

(2) RNAスプライシング異常の同定

① スプライシングアレイを用いて、各種腫瘍におけるスプライシング異常の有無を検索する。

(3) スプライシング関連蛋白の異常の同定

① スプライソソーム等のスプライシング関連蛋白の異常の有無について、エクソーム解析等の手法を用いて検討を行う。

(4) microRNA発現異常の同定

① 上記腫瘍検体から抽出したRNAに対し、アレイを用いたmicroRNA発現解析により、microRNAの発現異常の有無について検索を行う。

3. 研究の成果

(1) RNA異常をターゲットとした治療法の開発

① 胆管癌2株(HuH-28, TKKK)、胆嚢癌5株(TGBC24, TGBC14, TGBC2, NOZ, G415)から抽出した高品質かつ十分量のRNAにて、正常組織のRNAと比較した高精度のスプライシングアレイを完了した。これらの細胞では、癌幹細胞で重要なSLC7A11(xCT)アミノ酸トランスポーターの高発現を認めた。xCTは癌幹細胞のマーカーであるCD44分子のスプライシングバリエントで安定化されることより、CD44のスプライシングバリエントに注目した。その結果、CD44v2-10あるいはCD44v3-10のバリエントを有する細胞株(NOZとG415以外)を同定した。CD44のスプライシング異常はESRP1により引き起されるため、ESRP1の発現を検討したところ、CD44のバリエントタイプを有する細胞のみにESRP1の高発現を認めた。その他のRNA異常として、癌胎児性蛋白分子としても知られるSLC7A5(LAT-1)アミノ酸トランスポーター遺伝子高発現を認めた。SLC7A8(LAT-2)は正常組織にのみ認められるトランスポーターであるが、我々の検討でも同様であった。LAT-1とLAT-2のどちらにもダイマー化する共役分子であるSLC3A2(4F2hC)は腫瘍細胞において比較的高発現していた。悪性度が極めて高い腫瘍において、アルギニン合成酵素の鍵酵素であるASS1が抑制され、その結果腫瘍細胞内のアルギニンが欠乏し、腫瘍細胞内へのアルギニンの取り込みが亢進する腫瘍が存在する。今回の検討でも胆道癌細胞の多くでASS1の低発現が確認された。さらにアルギニンを細胞内に取り込むSLC7A1(CAT-1)アミノ酸トランスポーターの高発現を認めた。非翻訳領域のRNA異常では、胆管癌株TKKKと胆嚢癌株NOZにおいて、乳癌でみられ腫瘍増殖に関与する

Long Noncoding RNA (lncRNA) のCCAT1の高発現を検出した。癌の転移に関わり、乳癌の治療の標的として最近注目されているlncRNAのMALAT1に関しては今回検討した細胞株すべてで発現異常を認めなかった。

- ② 胆道癌14細胞株すべてにおいて、全エクソンシーケンスを施行した。バイオインフォマティクス解析の結果、スプライシング関連遺伝子に変異を認めなかった。主要癌関連遺伝子変異では、胆管癌株HuH-28のRB1、胆嚢癌株G415のARID2の癌抑制遺伝子にsplice site変異を認めた。
- ③ 胆嚢癌株であるTGBC14以外の13株の胆道癌細胞でRNAシーケンスに成功した。その結果、胆管癌株HuH-28およびTFK-1に、我々が知る限り過去に未報告の融合遺伝子異常を検出した。

(2) microRNA発現解析

肺癌患者の血清を用いたcirculating miRNAの定量では、TaqMan法のspike-in controlとして用いる合成cel-miR-39が本解析に応用可能であることを明らかにした。本解析法によるmiR-21とmiR-223の定量において、患者の検体の保存状況が全血室温3時間以内、血清4℃6時間以内であれば、それらの定量の測定値に影響を与えないことを確認した。さらに本解析の測定値に影響する患者因子の検討では、受動喫煙がmiR-21の血中濃度低下に関連することを見出した。

4. 研究の反省・考察

(1) RNA異常をターゲットとした治療法の開発

- ① 胆管癌2株(HuH-28, TKKK)、胆嚢癌5株(TGBC24, TGBC14, TGBC2, NOZ, G415)以外の残りの7胆道癌細胞でも高精度スプライシングアレイで解析中である。それらの細胞株でも今回の検討で明らかにしたRNA異常が高頻度に検出されることが予想される。今後は胆道癌症例の臨床検体でも同様の異常の有無を確認する。システインはSLC7A11(xCT)により細胞内に取り込まれ、抗酸化物質である還元型グルタチオンに変換して、細胞の増殖や様々なストレスからの防御に関与する。xCTによるシステインの細胞内への取り込みは、関節リウマチや潰瘍性大腸炎、クローン病の治療薬として使用されているスルフォサラジンで抑制されることがわかっている。CD44のバリエーションタイプは癌幹細胞のマーカーとして知られ、癌幹細胞の抗癌剤耐性を克服する治療として、スルフォサラジンを使用する胃癌治療の臨床試験が進行中である。我々の胆道癌の検討でもCD44バリエーション異常を高頻度に有し、胆道癌においてもゲムシタピンなどの抗癌剤耐性克服にスルフォサラジンが有効であるかどうかを検証する予定である。SLC7A5(LAT-1)は胆道癌細胞に高発現し、正常細胞においてアミノ酸を取り込むトランスポーターとして主要な働きをするSLC7A8(LAT-2)の発現が極めて低い。このことは胆道癌治療においてLAT-1を標的とする妥当性を与える。このRNA異常を標的にする治療としてLAT-1阻害剤であるJPH203が開発され、前臨床研究も開始されている。本阻害剤のオーファンドラッグ認定のための申請基礎データとして本研究の成果を役立てる予定である。またLAT-1はホウ素中性子捕捉療法(BNCT)のホウ素を取り込むことが知られている。今後は腫瘍組織におけるLAT-1高発現がBNCTの効果予測のバイオマーカーとなるかどうかを検討する。さらによりLAT1に特異的に取り込まれるホウ素製剤の開発を目指す予定である。膵臓癌や肝臓癌、肺癌や悪性胸膜中皮腫など悪性度が極めて高い腫瘍の中には、癌細胞の増殖や生存にアルギニンの必要性が極めて高い腫瘍が存在する。胆道癌でもアルギニン合成酵素であるASS1が低発現でSLC7A1(CAT-1)が高発現しており、胆道癌でもアルギニンの必要性が高いことが予想される。アルギニンの癌細胞内への取り込みを抑制する治療薬としてADI-PEG20が開発され肝臓癌のフェーズ3臨床試験、膵臓癌のフェーズ1試験で好成績を示した。胆道癌でも同じ治療が有効であるかどうかを検討する。非翻訳領域のlncRNA異常では、CCAT1を標的にする治療としてBET阻害剤が応用できることが知られており、乳癌ではその治療が注目されている。CCAT1を高発現した胆道癌でもBET阻害剤が有効であるかどうかを検討する予定である。

- ② RB1、ARID2癌抑制遺伝子のsplice site変異とスプライシング異常との関係を検討する。機能解析により本変異がスプライシング異常を通してがん抑制機能に異常をもたらしていることを確認する。治療薬の開発研究までには至っていないが、今後本変異を標的として、がん抑制機能を回復する治療法を見出したい。
 - ③ 胆道癌症例の臨床検体において今回新たに検出された融合遺伝子異常の有無を確認する。全エクソンシーケンスにより見出された他のドライバー遺伝子異常との比較や本融合遺伝子異常の機能解析にて、本遺伝子異常が腫瘍形成におけるドライバーな異常であることを確認する。治療薬の開発研究までには至っていないが、本融合遺伝子異常が腫瘍の主要なドライバー遺伝子異常であることが確認されれば、本異常をターゲットにした治療法の開発に取り組みたい。
- (2) microRNA発現解析
- 肺癌患者の血清を用いたcirculating miRNAの定量では、安定な測定値を得ることができる解析法を開発した。本解析法によって、現在客観的な評価法を有さない受動喫煙を定量化できる可能性を見出した。本解析法は肺癌特に受動喫煙による肺癌の病態の理解のために大いに貢献できると考えた。現在、肺癌症例におけるmRNAについては検体の収集をほぼ終えており、解析も行っているが、一部手術後の検体の収集が未完結である。今後はプロスペクティブに症例検討を行い、microRNA異常と受動喫煙、発癌との関連性を検証していく。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Yoshiyama A, Morii T, Ohtsuka K, Ohnishi H, Tajima T, Aoyagi T, Mochizuki K, Satomi K, Ichimura S. Development of Stemness in Cancer Cell Lines Resistant to the Anticancer Effects of Zoledronic Acid. *Anticancer Res.* 2016 Feb;36(2):625-31.
- ② Kobayashi T, Masaki T, Nozaki E, Sugiyama M, Nagashima F, Furuse J, Onishi H, Watanabe T, Ohkura Y. Microarray Analysis of Gene Expression at the Tumor Front of Colon Cancer. *Anticancer Res.* 2015 Dec;35(12):6577-81.
- ③ 相磯 聡子, 関根 名里子, 高城 靖志, 大西 宏明. Spike-in controlを用いた血中マイクロRNAの測定における検体保存温度および時間についての検討. *臨床病理* 2015 63巻6号 Page688-693.
- ④ 横山 政明, 大西 宏明, 大塚 弘毅, 渡邊 卓, 大倉 康男, 古瀬 純司, 杉山 政則. 胆道癌における増殖シグナル伝達因子の発現と遺伝子変異の多様性 KRAS変異の胆道癌バイオマーカーとしての可能性. *胆と膵* 2015 36巻2号 Page143-151.

(2) 口頭発表

相磯 聡子, 関根 名里子, 高城 靖志, 大西 宏明, 渡邊 卓. 喫煙が健常人血中miR-21レベルに及ぼす影響. 第62回日本臨床検査医学会学術集会平成27年9月19—22日. 岐阜.

(3) 出版物

なし

学 校 名	東 京 慈 恵 会 医 科 大 学	研究所名等	総 合 医 科 学 研 究 セ ン タ ー
研 究 課 題	植物細胞を用いた安価で安全なライソゾーム蓄積症 酵素製剤の開発 ー酵素製剤に対する免疫寛容導入もめざしてー	研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①ライソゾーム蓄積症 ②酵素補充療法 ③中和抗体 ④アレルギー反応 ⑤中枢神経障害		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
大 橋 十 也	総合医科学研究センター 研究部門遺伝子治療研究部	教 授	研究代表者、総括、論文作成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
井 田 博 幸	医 学 部	教 授	研究への助言、データ整理
小 林 博 司	総合医科学研究センター 研究部門遺伝子治療研究部	准 教 授	動物実験
嶋 田 洋 太	総合医科学研究センター 研究部門遺伝子治療研究部	助 教	治療効果の生化学的検討
樋 口 孝	総合医科学研究センター 研究部門遺伝子治療研究部	助 教	抗体の測定、フローサイトメトリーなどの免疫学的 検討
藤 山 和 仁	大 阪 大 学 生物学国際交流センター	教 授	植物細胞を用いた組み換え酵素の作成

植物細胞を用いた安価で安全なライソゾーム蓄積症酵素製剤の開発 — 酵素製剤に対する免疫寛容導入もめざして —

1. 研究の目的

ライソゾーム蓄積症はライソゾームに存在する水解酵素の遺伝的欠損により中枢神経障害をはじめとする様々な症状を呈する疾患群である。ライソゾーム酵素は細胞表面上にある受容体により細胞内に局在する性質があり、それを利用して現在、40疾患あるライソゾーム蓄積症の内7疾患に対して欠損する酵素を経静脈的に補充する酵素補充療法が行われているが問題点も多い。その中で重要なものとして、中枢神経系に効果がないこと、中和抗体が出現したりアレルギー反応が出現したりなどの酵素に対する免疫応答が惹起されたりすること、酵素が非常に高価であり費用対効果が低いことなどが挙げられる。本研究の目的は植物細胞の発現系を用いて、これらの問題点を克服することである。今年度は、ムコ多糖症II型、ならびにゴーシェ病を対象に研究を進めた。それぞれの疾患に対する研究目的は以下の通りである。

- (1) ムコ多糖症II型：ムコ多糖症II型は中枢神経障害を呈するため、脳へ酵素を到達させることが治療上重要である。腸管で吸収された蛋白質は効率良く脳内に取り込まれるとの報告がある。植物細胞内で発現している蛋白質は植物細胞の特有の細胞壁のため胃内で分解を受けず、効率良く腸内に到達する。その性質を利用して植物細胞にムコ多糖症II型の欠損酵素であるIduronate 2-sulfatase (IDS) を発現させ経口投与しムコ多糖症II型の中枢神経障害の治療を目指す。もう一つは大量の酵素を経静脈的に投与すると脳内へある一定程度酵素が到達することが知られている。ただ大量の酵素を経静脈的に投与すると酵素に対して免疫応答が起り治療効果の減弱やアレルギー反応が起こることが予測される。それを回避する目的で経口免疫寛容導入を、IDS発現植物細胞で行う。以前我々は酵素を経口投与すると免疫寛容が導入できることを報告したが、大量の酵素が必要であった。最近、酵素を発現している植物細胞を経口投与することにより、先に述べた理由で腸管細胞に効率よく酵素が導入出来て免疫寛容が導入されたという報告がある。よってまずIDS発現植物細胞を経口投与し免疫寛容を導入した後に大量のIDSを経静脈的に投与しムコ多糖症II型の中枢神経病変の治療を目指す。
- (2) ゴーシェ病：ゴーシェ病の欠損酵素 (glucoerebrosidase, GC) の酵素製剤は植物細胞を使用して作成されたものが既にある。この場合ニンジンの細胞を使用している。今回我々はタバコの細胞を使用する。タバコ細胞は様々な変異体があり、ライソゾーム酵素の細胞への取り込みを担う糖鎖の改変が容易である。また植物細胞は動物由来の成分を含まずHIVなどの感染症の危惧が少なくまた培養も安価である。

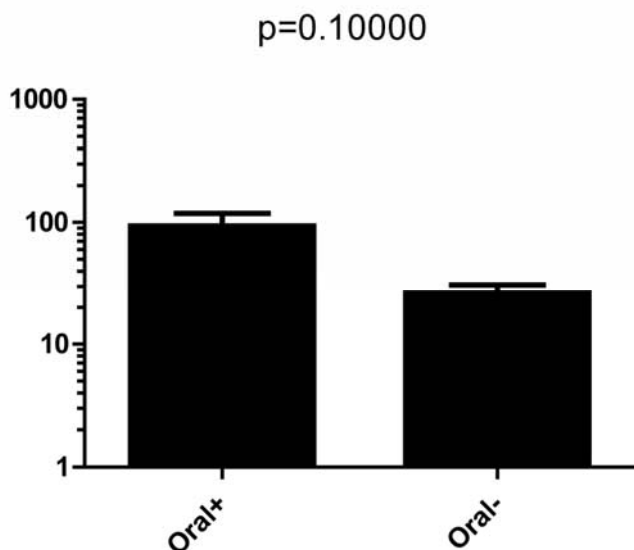
2. 研究の計画

- (1) ムコ多糖症II型：昨年度は植物細胞においてIDSを発現させ組換え酵素の作成を行った。今年度は、IDSを発現させた植物細胞 (カルスの状態) の経口投与による免疫寛容誘導を検討した。ワイルドタイプのC57BK/6マウスを使用し、植物細胞の細胞壁を破壊しないような状態までホモジェネートし、顕微鏡で植物細胞が形態を保っていることを確認後、経口投与した。この植物細胞懸濁液を3日連続経口投与し、その後、既存の酵素補充療法 (エラプレース®) を1 mg/kgを7日ごとに4回マウスに尾静脈投与し、経口投与が抗体産生に与える影響を検討した。4週間後に静脈採血を行い、血液中の酵素に対するIgG抗体価をELISA法により定量した。
- (2) ゴーシェ病：昨年度は植物細胞でRNAiでN-acetylglucosaminyltransferaseをノックアウトし植物特有の糖である、fucose、xloseを減少させたhigh mannose型のGCを作成し、ゴーシェ病の主な罹患細胞であるマクロファージにマンノース受容体を介して取り込まれることが明らかとなった。今年度は、本酵素をマウスに静脈内投与し、各臓器での活性の上昇を検討した。ワイルドタイプのC57BK/6マウスを使用した (三協ラボより購入)。本マウスに90単位

/kgの量の2種類のGC（ワイルドタイプのGCとfucose xloseを減少させたhigh mannose typeのGC、それぞれGC^{WT}とGC^{gnt1}と略す）を尾静脈より投与した。コントロールとしてPBSを同量投与した。投与後60分にマウスをPBSにて還流後、安楽死させ、脾臓、肝臓、肺、腎臓を採取した。採取後20mMリン酸バッファーpH7.2/20mM ascorbic acid/1% Triton X-100でホモジェナイズし酵素源とした。基質は4MU-glycopyranosideを用い活性を測定した。

3. 研究の成果

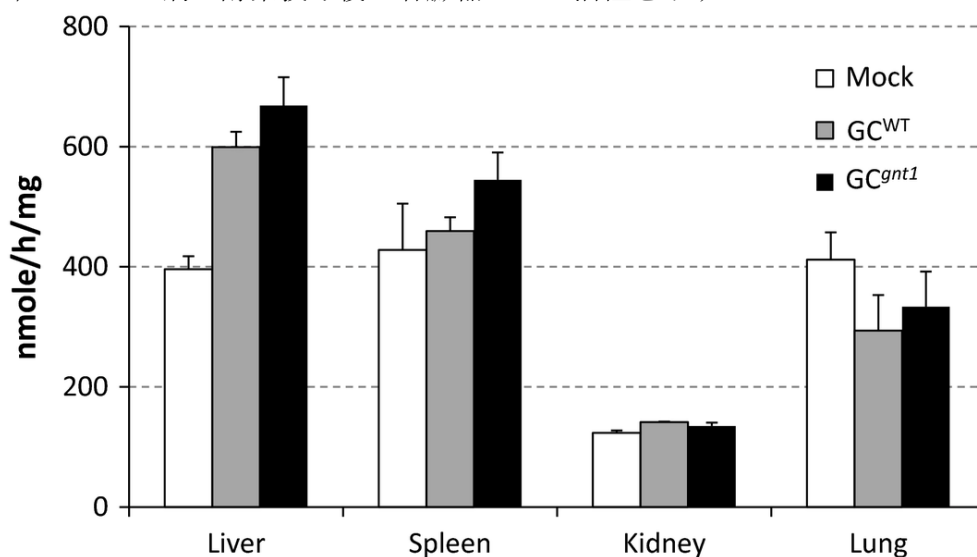
(1) ムコ多糖症II型：ELISA法で定量した酵素に対するIgG抗体価を示す



脚注：Oral+経口投与群 Oral-経口非投与群

IDS発現植物細胞の経口投与によって明らかな抗体産生抑制効果は認められなかった。

(2) ゴーシェ病：酵素投与後の各臓器でのGC活性を示す



脚注：MockはPBSを投与したマウス。

GC^{WT}とGC^{gnet1}ともに肝臓、脾臓で酵素活性が上昇した。一方腎臓、肺では酵素活性の上昇は認められなかった。しかしながらGC^{WT}とGC^{gnet1}の間には肝臓(p=0.267)、脾臓(p=0.171)で差が認められなかったが、GC^{gnet1}の方がGC^{WT}と比べ高い傾向はあった。

4. 研究の反省・考察

- (1) ムコ多糖症II型：IDS発現植物細胞の経口投与によって短期的には抗体産生抑制効果は認められなかった(p=0.0100)。期待していた効果が得られなかった原因としては、投与した植物細胞の量が少なかった、抗体産生に影響するエピトープの発現が不十分だった、観察期間が不十分だったなどの要素が影響していると考えられた。今後は、より多くの植物細胞懸濁液を、より頻回、かつ多くの回数を投与し、長期に観察を行い、抗体価の測定を行う予定である。また、経口投与による免疫寛容誘導ではエピトープの発現が重要であるため、ウエスタンブロットなどによる酵素蛋白の機能評価も必要になると考えられた。さらに、ムコ多糖症II型モデルマウスを使用することによって、より実際の免疫反応現象に近い系での評価検討も必要と考えられた。
- (2) ゴーシェ病：作成された酵素はゴーシェ病の主な罹患臓器である肝臓、脾臓で活性の上昇が認められた。以上よりin vivoにおいても本植物細胞由来の酵素はゴーシェ病に治療薬として有用である事が判明した。しかしながら今回の検討ではゴーシェ病モデルマウスではなくワイルドタイプマウスを使用しているため、酵素のバックグラウンドが高く、正確な活性上昇の評価が困難であった。またそれ以上に、酵素の静脈内投与により蓄積物質であるglucocerebrosideが減少させられるかどうかの検討が出来なかった。今後、ゴーシェ病モデルマウスでの検討を予定している。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

Limkul J, Iizuka S, Sato Y, Misaki R, Ohashi T, Ohashi T, et al. The production of human glucocerebrosidase in glyco-engineered *Nicotiana benthamiana* plants. *Plant Biotechnol J* 2016 Feb 12.

(2) 口頭発表

The Production of Human Glucocerebrosidase in *Nicotiana benthamiana* Plants. 第57回日本先天代謝異常学会、2015、大阪

(3) 出版物

なし

学 校 名	順 天 堂 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	蝸牛リンパ液恒常性維持機構の破綻と聴覚神経系の可塑性変化 ー内耳イオン環境と聴覚神経の変性・回復機構ー		研究分野	医 学
キ ー ワ ー ド	①遺伝性難聴 ②ギャップ結合 ③コネクシン ④細胞治療 ⑤遺伝子治療 ⑥電位依存性Na ⁺ チャネル ⑦聴覚神経回路 ⑧再生医療			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
神 谷 和 作	医 学 部	准 教 授	動物実験の実施・解析

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
池 田 勝 久	医 学 部	教 授	臨床データとの比較解析・研究の総括
井 下 綾 子	医 学 部	助 教	聴力検査・解析
岡 田 弘 子	医 学 部	助 教	遺伝子解析と臨床データ解析
城 所 淑 信	医 学 部	助 教	分子生物学的解析
飯 塚 崇	医 学 部	非常勤助教	遺伝子治療実験

蝸牛リンパ液恒常性維持機構の破綻と聴覚神経系の可塑性変化 —内耳イオン環境と聴覚神経の変性・回復機構—

1. 研究の目的

遺伝性難聴は約1600出生に一人と高頻度に発生し、近年までに様々な原因遺伝子が同定されている。その中で圧倒的多数を占めるのが、コネキシン等の蝸牛内リンパ液イオン組成の恒常性維持機構に関連した遺伝子群の変異である。この恒常性維持機構は突発性難聴、加齢性難聴にも関わることが知られており、聴覚障害の臨床において最も重要な生理機構であることが明らかとなってきた。最近我々は遺伝性難聴で世界最大の原因であるコネキシン (Cx) 26の変異がギャップ結合複合体の劇的崩壊現象を引き起こし、上記恒常性を破綻させ難聴を発症させることを発見した (Kamiya, *J Clin Invest*, 2014, 時事通信、日経産業新聞2014年3月他)。同遺伝性難聴では脳への聴覚伝達が低下し、神経可塑性による変性を示すことが予測される。一方で有毛細胞感覚毛の配列異常で周波数認識異常を有する新たな聴覚障害も発見した (Kamiya, *PNAS*, 2014, 科学新聞2014年7月他)。この聴覚障害では、内リンパ液の動的恒常性は維持し、脳への周波数特異的な神経情報伝達のみが異常となる。我々は以前、多能性幹細胞の内耳移植により蝸牛リンパ液恒常性を回復させ、聴力改善を導く方法を開発した (Kamiya, *Am. J. Pathol.* 2007, 読売新聞2007年6月他)。

末梢 (内耳) の聴覚入力情報を中枢 (脳) に伝達し、可塑的な神経発達を促すためには神経細胞の電位依存性ナトリウムチャンネル (Nav) による活動電位発生が必須であることが知られている。聴覚系では主に2型 (Nav1.2) と6型 (Nav1.6) が機能しており、可塑的な神経ネットワーク形成に寄与している。我々は以前、難治性てんかん患者からNav1.2変異を同定、これによる脳萎縮と発達障害を示すメカニズムの一端を解明、Nav1.2が発達脳の神経ネットワーク形成に重要な役割を担うことを報告した (Kamiya, *J Neurosci*, 2004, 日経産業新聞、薬事日報、他)。

本研究では蝸牛内リンパ電位維持機構とその破綻による聴力障害メカニズム、およびそれに対応した可塑的な脳の神経ネットワーク形成変化を解明し、これらを制御する遺伝子、タンパク質、脂質による分子経路、更には聴覚回復に重要な分子制御メカニズムを独自の遺伝子改変難聴モデルにより明らかにする。本研究により将来的な聴覚障害患者に対する内耳治療と、それに並行し聴覚神経賦活を目的とした聴覚リハビリテーション治療を視野に入れた、遺伝性難聴の根本的治療法の開発が期待できる。

2. 研究の計画

(1) 平成27年度

蝸牛内リンパ液恒常性維持機構の破綻による難聴病態の分子経路と悪性化因子の同定

遺伝性難聴で最も頻度の高いCx26変異難聴のモデル動物により、我々はギャップ結合複合体の生化学的崩壊という新しい分子病態が恒常性維持機構を破綻させることを発見した (Kamiya, *J. Clin. Invest.* 2014)。当該年度はこの病態の制御機構を同定する。これまでカベオリン分子の増加やギャップ結合間の脂質集積が発見されたが、既知薬理活性ライブラリを用いて更に詳細な分子病態経路や新たな悪性化因子の特定を行う。

1. 【蝸牛ギャップ結合崩壊の *in vitro* 評価系の作製】 コネキシン遺伝子を可視化するため、Cx26野生型、変異体およびCx30遺伝子にEGFP (緑色蛍光) およびmCherry (赤色蛍光) のタグを付加した発現用プラスミドから難聴患者に対応した様々な安定発現細胞株を作製。これにより遺伝性難聴のギャップ結合を再現する最適条件 (プラスミド、培地組成、観察条件等) を決定する。
2. 【薬理反応による病態分子経路の同定：1. 構造的・生化学的評価】 上記のギャップ結合評価系に既知薬理活性化化合物ライブラリ (1280種、LOPAC@1280, SIGMA-ALDRICH) を添加しギャップ結合プラークの構造安定化に対する有効性を解析。構造安定化に寄与する化合物

の薬理活性情報より生化学的分子経路の絞り込みを行う。

3. 【薬理反応による病態分子経路の同定：2. 生理的評価】上記で選抜された薬剤添加細胞に物質透過能（蛍光色素透過試験）を指標とした薬理活性解析を行い、更なる病態制御機構の絞り込みを行う。

3. 研究の成果

- (1) 蝸牛ギャップ結合崩壊の *in vitro* 評価系の作製

我々はGJB2変異型遺伝性難聴の *in vitro* 評価系としてmCherry、GFP、V5を付加したCX26野生型、R75W変異型およびCX30野生型発現プラスミドを作製し安定発現株を樹立した。全ての細胞が培養細胞において蝸牛同様のギャップ結合プラークの形成パターンを有し薬剤評価用細胞として有用と考えられた。

- (2) 薬理反応による病態分子経路の同定

これらの評価用細胞を用い、GJP形成の評価を行ったところ、既知化合物からGJPの集積安定化に効果のある3種の化合物を選抜した（未発表データ）。化合物情報から悪性化に関与する分子経路の推測が可能となり更に候補化合物を探索している（未発表データ）。選抜された3種の化合物を様々な条件下で難聴モデルマウス内耳への局所投与を行ったところこのうち1種の化合物では20KHzで約25dbの聴力改善が確認された（未発表データ）。現在、同化合物を用い、安定して聴力改善効果が得られる最適投与条件を探索している。今後は同化合物の既知薬理活性情報から更なる候補化合物を探索し、薬剤選抜を進める予定である。

- (3) 遺伝子治療によるギャップ結合プラークの修復と聴力回復

更に我々はギャップ結合プラーク修復のためにアデノ随伴ウイルスによるCx26遺伝子導入を行い有意な聴力回復効果が確認された。

(Iizuka, Kamiya, *Hum Mol Genet*, 2015, 朝日新聞、読売新聞、NHKニュース2015年4月他)

4. 研究の反省・考察

- (1) 蝸牛ギャップ結合崩壊の *in vitro* 評価系

開発した細胞におけるギャップ結合プラークはmCherry、GFP、V5等の融合タグの負荷により細胞膜に局在する効率がタグ負荷のない発現タンパク質に比べて低下していた。これはタグタンパク質不可による分子サイズの増大により、細胞膜への輸送・挿入が困難となり、合成されたタンパク質が細胞質やゴルジ体に蓄積したことによると考えられる。今後は融合タグ付きギャップ結合プラークにおいてもタグ負荷のないギャップ結合プラークと同様の細胞膜発現効率を示す培養条件の検討を検討する。タグ融合ギャップ結合プラークの効率的な発現誘導により、ギャップ結合プラークのライブイメージングが可能となり、病態メカニズムのさらなる解析および効果的な薬剤の有効性判定が可能となることが期待できる。

5. 研究発表

- (1) 学会誌等

- ① 神谷和作.

【内耳研究最前線1】 蝸牛イオン輸送に不可欠なコネキシンによる新たな生化学機構.
Otology Japan 25, 119-122, 2015

- ② 福永一朗, 畠山佳欧里, 池田勝久, 神谷和作.

蝸牛に発現するケモカインおよびその受容体を応用した内耳細胞治療法の開発.
耳鼻咽喉科免疫アレルギー 33, 102, 2015

- ③ 神谷和作, 池田勝久.

コネキシンが構成するギャップ結合プラーク形成変化によるGjb2変異型難聴の病態機構.
Audiology Japan 58, 615-616, 2015

- ④ 城所淑信, 神谷和作, 美野輪治, 池田勝久.
Brn4-K0マウスにおけるギャップ結合プラークの崩壊. *耳鼻咽喉科ニューロサイエンス* **29**, 14, 2015
- ⑤ 安齋崇, 神谷和作, 池田勝久.
コネキシン26遺伝子改変マウスにおけるカベオリン2の集簇. *Audiology Japan* **58**, 617-618, 2015
- ⑥ 安齋崇, 神谷和作, 池田勝久.
遺伝性難聴における蝸牛コルチ器の変性とカベオリンの集積. *耳鼻咽喉科免疫アレルギー* **33**, 115, 2015
- (2) 口頭発表
- ① Kazusaku Kamiya, Ichiro Fukunaga, Kaori Hatakeyama, Toru Aoki, Ayumi Fujimoto, Atena Nishikawa, Takashi Anzai, Osamu Minowa, Katsuhisa Ikeda
Cochlear gap junction plaque, stabilized macromolecular complex composed of specific connexins
52nd Inner Ear Biology Workshop, イタリア・ローマ, 2015年9月13日
- ② 神谷和作, 池田勝久
コネキシンが構成するギャップ結合プラーク形成変化によるGjb2 変異型難聴の病態機構
第60回日本聴覚医学会総会 2015年10月23日
- ③ 神谷和作
GJB2変異遺伝性難聴に対する細胞治療・遺伝子治療法の開発
第15回日本再生医療学会総会 2016年3月17日
- (3) 出版物
- ① Kazusaku Kamiya, Keiko Karasawa, Kazuma Kobayashi, Asuka Miwa and Katsuhisa Ikeda.
Differentiation of iPS Cells to Cochlear Cells are Regulated Depending on the Part of Co-cultured Organs. *J Otol Rhinol S1*, 34-36, 2015
- ② KamiyaK.
Inner ear cell therapy targeting hereditary deafness by activation of stem cell homing factors. *Frontiers in pharmacology* **6**, 2, 2015
- ③ Kazusaku Kamiya, Ichiro Fukunaga, Kaori Hatakeyama and Katsuhisa Ikeda.
Connexin26 regulates assembly and maintenance of cochlear gap junction macromolecular complex for normal hearing.
AIP Conference Proceedings **1703**, 30018:30011-30013, 2015
- ④ IizukaT., KamiyaK., GotohS., SugitaniY., SuzukiM., NodaT., MinowaO., and IkedaK.
Perinatal Gjb2 gene transfer rescues hearing in a mouse model of hereditary deafness. *Human molecular genetics* **24**, 3651-3661, 2015
- ⑤ Hiroko Okada, Kazusaku Kamiya, Takashi Iizuka and Katsuhisa Ikeda.
Postnatal Development and Maturation of the Vestibular Organ in Dominant-Negative Connexin 26 Transgenic Mouse. . *J Otol Rhinol S1*, 37-40, 2015
- ⑥ AnzaiT., FukunagaI., HatakeyamaK., FujimotoA., KobayashiK., NishikawaA., AokiT., NodaT., MinowaO., IkedaK., and KamiyaK.
Deformation of the Outer Hair Cells and the Accumulation of Caveolin-2 in Connexin 26 Deficient Mice.
PLoS one **10**, e0141258, 2015

学 校 名	東 京 医 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	機能性ナノ磁気微粒子を用いた抗てんかん薬の作用機序の解明 －抗てんかん薬バルプロ酸の標的分子の探索－		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①てんかん ②バルプロ酸 ③機能性ナノ磁気微粒子 ④成体脳のニューロン新生 ⑤海馬			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
石 龍 徳	医 学 部	主 任 教 授	研究総括および実験計画の立案

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
半 田 宏	医 学 部	特 任 教 授	バルプロ酸結合分子の同定
大 山 恭 司	医 学 部	准 教 授	てんかんモデルマウスの作製
柏 木 太 一	医 学 部	助 教	バルプロ酸結合分子のPC12細胞における解析
篠 原 広 志	医 学 部	助 教	脳におけるバルプロ酸結合分子の発現解析
権 田 裕 子	医 学 部	助 教	てんかんモデルマウスの組織学的解析

機能性ナノ磁気微粒子を用いた抗てんかん薬の作用機序の解明 —抗てんかん薬バルプロ酸の標的分子の探索—

1. 研究の目的

- (1) てんかんの発症率は人口の約1%であり、身近な疾患の1つである。多くの場合、20歳までに発症するが、近年では高齢化に伴い晩発性のてんかんも増加してきている。また、てんかん患者による交通事故など社会的な問題とも密接にかかわっている。現在では、てんかん発作の70~80%は適切な薬剤の投与でコントロール可能であるとされているが、抗てんかん薬の作用機序については明らかになっていない部分が多い。

てんかんを抑制する抗てんかん薬には様々な種類があるが、小発作に大発作が合併する場合の第1選択薬は、バルプロ酸である。バルプロ酸は、抗てんかん薬としての働きに加えて、うつ病等の気分障害の治療薬としても広く用いられている薬物である。抗てんかん薬としてのバルプロ酸の作用は、現在のところ、GABAトランスアミナーゼ阻害効果により、異常興奮を抑制することにあると考えられている。しかし、バルプロ酸が直接結合する標的分子や細胞内で起こる分子カスケードは全く分かっていない。また、最近になってバルプロ酸はヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) の阻害剤として働き、遺伝子の転写を抑制することが報告されている。しかし、エピジェネティックな遺伝子の調節機構が抗てんかん作用と関係しているのかはわかっていない。また、バルプロ酸には催奇性があり、妊娠初期の服用には注意が必要であるが、その作用機序も分かっていない。このように、有効な抗てんかん薬であり、その服用には注意が必要であるにもかかわらず、その作用機構が未だに明らかになっていない。その最大の原因は、バルプロ酸の標的分子が解明されていないことにある。

本研究では、機能性ナノ磁気微粒子によるバルプロ酸標的分子の同定と、新規てんかんラットモデルによるバルプロ酸の評価から、バルプロ酸の作用機序を解明することを目的としている。

- ① まず第1に、バルプロ酸の標的分子を、半田宏が開発したナノビーズによる分子探索法を用いて同定する。半田宏は自身が開発した機能性ナノ磁気微粒子である「半田ビーズ」を用いて、催奇性薬物であるサリドマイドの標的タンパク分子セレブロンを発見した業績を持っており、薬物に結合する分子を探索するための高い技術を持っている。本研究ではこの技術を用いる。
- (2) てんかん発作に伴う組織病変に対するバルプロ酸の効果を検討する。正常な海馬歯状回の顆粒細胞層では細胞が密に並んでいるが、てんかん患者では、顆粒細胞が分子層側に分散することが知られている。この分子層側への細胞移動はてんかん患者の海馬の異常な興奮と関係することが推測されるが、いままでラットのてんかんモデルでは、このような現象を引き起こすことができなかった。
- ① この点に関して、研究代表者の石龍徳は、最近海馬歯状回の顆粒細胞に存在する未熟なニューロン (新生ニューロン) が、分子層側に分散するてんかんラットモデルを開発した。本研究では、遺伝子改変マウスを用いて、解析するために、このてんかんモデルラットと同等のモデルをマウスで開発する。
- (3) バルプロ酸結合分子が明らかになったら、その分子に関する遺伝子改変マウスを作製し、てんかん発作におけるバルプロ酸結合分子の機能を明らかにする。

2. 研究の計画

- (1) バルプロ酸標的分子の探索
- ① 機能性ナノ磁気微粒子にバルプロ酸を結合させる。
- ② マウス脳抽出液とバルプロ酸結合機能性ナノ磁気微粒子を混合し、バルプロ酸に結合する標的分子を機能性ナノ磁気微粒子に結合させる。

- ③ 溶出後SDS-PAGE、銀染色、質量分析によって精製した分子の構造を決定する。
 - ④ バルプロ酸結合分子の海馬における分布を調べる。
 - ⑤ バルプロ酸結合分子の発現をin vitroで調べる系を確立する。
- (2) 新規てんかんマウスモデルを用いたバルプロ酸の抗てんかん作用の解析
- ① ノックアウトマウスで実験するため、新たにマウスを用いててんかんモデルを作製する。
 - ② マウスにアセチルコリン受容体刺激剤のピロカルピンを投与してけいれんを起こさせる。
 - ③ 免疫組織化学法により、神経前駆細胞、未熟ニューロンに特異的な分子を染色し、異常な細胞の有無を検討する。
 - ④ てんかん発作マウスに対するバルプロ酸の影響を調べる。
- (3) バルプロ酸結合分子に関連する遺伝子改変マウスを作製する。

3. 研究の成果

- (1) バルプロ酸標的分子の探索
- ① バルプロ酸標的分子の候補分子を決定することができた。それは、膜輸送関連分子DM73（仮称）であった。
 - ② DM73のマウス海馬における分布を調べたところ、海馬全体で見られたが、とくに錐体細胞の細胞体に強く発現していた。しかし、ニューロン新生が行われる顆粒細胞下帯では発現が低下していた。また、てんかんラットモデルの海馬では、顆粒細胞や錐体細胞に障害が見られる部分では、その発現が低下していた。しかし、顆粒細胞に障害が見られる部分では、NeuNなどの他のタンパクの発現も低下しているので、DM73に特異的な変化ではないと考えられる。PC12細胞において、DM73の発現を調べたところ細胞体に発現が見られたので、in vitroでDM73の動態を解析できる可能性が出てきた。
- (2) 新規てんかんマウスモデルを用いたバルプロ酸の抗てんかん作用の解析
- ① てんかんラットモデルを作製したときと同じ条件でピロカルピンを投与し、マウスにてんかん発作を起こさせる実験を行ったが、同じ条件では全く発作を起こさなかった。そこで、投与量を増加させるなどして、様々な条件を検討したが、43匹中1匹（2.3%）しかけいれん発作を起こさなかった。
 - ② 文献を詳細に検討したところ、我々の用いているC57BL/6はてんかんを起こしにくい系統であることが明らかになった。しかし、多くの遺伝子改変マウスがこのC57BL/6をバックグラウンドに持つため、遺伝子改変マウスでてんかんの研究をするためには、C57BL/6でけいれん発作を起こさせる系を開発することは必須である。さらに多数の文献を検討した結果、若年ラットのてんかん発作が温度依存性であるとの文献を見出した。そこで、室温31℃の中で実験を行ったところ、25匹中15匹（60%）でけいれん発作を観察した。けいれん発作を起こしたマウスの海馬の形態を解析したところ、神経前駆細胞の形態に異常が見られた。

4. 研究の反省・考察

- (1) バルプロ酸標的分子候補をかなり早い時期に同定できたのは幸運であった。ただし、この分子が真の標的分子であるかどうかを今後は十分に検討する必要がある。
- (2) てんかんモデルラットの系を、マウスに変更するだけの実験から始めたが、ラットとマウスではけいれん発作に対する感受性がかなり異なることが明らかになった。また、文献からC57BL/6は、ピロカルピンによってけいれん発作が誘導されにくい系統であることが明らかになった。しかし、C57BL/6は遺伝子改変マウスが多数作製されているマウスの系統であり、このC57BL/6でけいれん発作を起こさせる系を確立することは、てんかん研究の重要なポイントであると考え、今後は、C57BL/6のけいれん発作に対する温度の影響を解析することを課題の一つとすることを考えている。この系が確立されれば、最終目的である、バルプロ酸標的分子の解析に役立つと同時に、遺伝子改変マウスを用いた総てのてんかん研究に役に立つと考

えている。今後は、より詳細に条件を検討して、ピロカルピンで確実にけいれん発作を誘導できる系を確立したいと考えている。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

Yamaguchi M, Seki T, Imayoshi I, Tamamaki N, Hayashi Y, Tatebayashi Y, Hitoshi S (2015) Neural stem cells and neuro/gliogenesis in the central nervous system: understanding the structural and functional plasticity of the developing, mature, and diseased brain. *J Physiol Sci.* 2015 Nov 17. [Epub ahead of print].

(2) 口頭発表

① Kashiwagi T, Shioda S, Seki T: BMP signaling induce Gfap-expressing NSCs which restrictedly exist in the developing hippocampus. 第38回日本神経科学大会（神戸）プログラム p148 (1P015), 2015. 7. 28.

② Shinohara H, Shioda S, Seki T: Cell-tracing analysis for progenitor cell migration in the embryonic dentate gyrus. 第38回日本神経科学大会（神戸）プログラム p149 (1P022), 2015. 7. 28.

③ 篠原広志, 塩田清二, 石龍徳: 細胞移動を基軸とする海馬歯状回形成のメカニズム探索. 第121回日本解剖学会総会・全国学術集会（福島）講演プログラム・抄録集 p153(1P-87), 2016. 3. 28.

④ 柏木太一, 塩田清二, 石龍徳: 胎生期海馬歯状回形成過程におけるBMPシグナルの役割. 第121回日本解剖学会総会・全国学術集会（福島）講演プログラム・抄録集 p153(AP-88), 2016. 3. 28.

(3) 出版物

石龍徳 (2015) 12章 §1 神経系の発生. 所収: 「小児脳神経外科学」(改訂2版、山崎麻美、坂本博昭編集) 金芳堂, pp927-947.

学 校 名	日 本 医 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	細胞老化による癌発生メカニズムの解明 ーテロメア長短縮化の発がんへの関与の解明ー		研 究 分 野 医 学
キ ー ワ ー ド	①加齢 ②細胞老化 ③発癌 ④テロメア長 ⑤先天性角化不全症 ⑥慢性炎症性疾患		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
猪 口 孝 一	大 医 学 学 研 究 院 科	教 授	研究代表者、研究の総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
山 口 博 樹	医 学 部	准 教 授	研究分担者、症例蓄積の統括、各分野の研究データの統括、造血器系のテロメア長測定、ゲノム解析
岡 田 尚 巳	大 医 学 学 研 究 院 科	教 授	研究分担者、in vitroウイルススペクター作成
内 田 英 二	大 医 学 学 研 究 院 科	教 授	研究分担者、消化器系症例の蓄積、消化器系のテロメア長測定、ゲノム解析
弦 間 昭 彦	大 医 学 学 研 究 院 科	教 授	研究分担者、呼吸器系症例の蓄積、呼吸器系のテロメア長測定、ゲノム解析
久 保 田 馨	医 学 部	准 教 授	研究分担者、呼吸器系症例の蓄積、呼吸器系のテロメア長測定、ゲノム解析
佐 伯 秀 久	大 医 学 学 研 究 院 科	教 授	研究分担者、皮膚科系症例の蓄積、皮膚科系のテロメア長測定、ゲノム解析
前 田 美 穂	医 学 部	教 授	研究分担者、小児科系症例の蓄積、小児科系のテロメア長測定、ゲノム解析
瀧 澤 俊 広	大 医 学 学 研 究 院 科	教 授	研究分担者、組織学的検体種別、各組織のテロメア長測定
金 田 誠	大 医 学 学 研 究 院 科	教 授	研究分担者、iPS細胞作製、in vitroでのiPS機能実験

細胞老化による癌発生のメカニズムの解明 ーテロメア長短縮化の発がんへの関与の解明ー

1. 研究の目的

老化と癌化には深い相関関係があると想定されるが、その詳細な因果関係は不明である。細胞老化にはテロメア短縮化により細胞分裂が停止するテロメア依存性細胞老化と、活性酸素種、放射線、癌遺伝子発現亢進といったテロメア短縮化に依存しないストレス細胞老化とがある。細胞老化はp53-p21waf1/Cip1経路やp16Ink4a-RB経路といった増殖抑制因子群の活性化を引き起こし不可逆的に細胞分裂が停止しアポトーシスへと誘導をする。このように細胞老化は加齢に伴う個体老化を導く負の側面がある一方で、正常細胞に発癌の危険性が生じた際に作動する癌抑制機構の側面もある。

加齢によって悪性腫瘍の発生率が高くなることから、細胞老化による癌抑制機構の破綻は発癌において最も重要な機序であると考えられる。たとえばテロメアの短縮化した細胞にp53などの変異がはいると、DNA損傷チェックポイントによって染色体末端融合などが引き起こされ染色体不安定性が亢進する。しかし現時点で悪性腫瘍発生における細胞老化による癌抑制機構の活性低下や破綻の機序に関しては不明な点が多い。その理由の一つとしてこれまでの研究が生体とは異なる非生理的な環境でのin vitroでの細胞実験や、ヒトと比較して寿命が短く、ヒトより4-5倍長いテロメア長をもつマウスを用いたin vivoでの解析が多く、ヒト本来の老化と癌化の関係は未だ不明と言って過言ではない。

ヒトのテロメア長短縮化による発癌モデルとして先天性角化不全症(DKC)という先天性疾患がある。DKCはテロメアを制御する遺伝子の変異によってテロメア長の短縮化が通常に加齢よりより早く進行し、細胞老化の過剰促進によって造血器、消化器、皮膚、肺などの幹細胞が枯渇することで様々な臓器障害が発生する。そして高率に多臓器悪性腫瘍を発生することも知られており、テロメア依存性細胞老化と癌化を研究するうえで良いヒトのモデルとなり得る。またテロメア長は生後から加齢に伴いS字カーブを描いて短縮化をするが、60歳以降の短縮化は個人差が大きく、特に炎症性疾患を合併した臓器では他と比較して短縮化の進行が大きいと思われる。実際に慢性炎症性疾患は発癌の高リスク因子であることが知られているが、細胞老化の促進が発癌リスクを高めている可能性が高い。以上より高齢者慢性炎症性疾患患者もテロメア長短縮化による発癌モデルとして良い研究対象であると考えられる。

本研究はDKC症例や高齢者慢性炎症性疾患症例を解析することで、悪性腫瘍発生における細胞老化による癌抑制機構の破たん機序を解明し、ヒトにおける老化と癌化の関係を明らかにすること、癌発生の予想バイオマーカーの抽出、さらには癌発生の予防医療への発展を目的としている。

2. 研究の計画

(1) DKC症例における各臓器のテロメア長短縮化の評価

DKC症例において炎症性消化管粘膜障害から消化器癌、間質性肺炎から肺癌、皮膚炎より皮膚癌、骨髄不全症から造血器腫瘍などを高率に発症する。このことは各臓器における炎症性病変やサイトカイン刺激による細胞増殖がテロメア長の短縮化を促進させて発がんリスクを増加させると予想する。そこでDKC症例において、表皮、肺組織、胃粘膜組織、口腔粘膜組織、骨髄、末梢血などの各組織における正常部位と炎症病変部位、並びに同部位に発生した悪性腫瘍のテロメア長をq-FISH法やq-PCR法などで明らかにする。

(2) テロメア長短縮化細胞のゲノム不安定性を誘導する新規遺伝子変異の探索

加齢による悪性腫瘍の発生には、p53変異のようなp53-p21waf1/Cip1経路やp16Ink4a-RB経路の変異によって細胞老化による癌抑制機構の破たんがその一つの機序として考えられている。しかし悪性腫瘍におけるこれらの経路の遺伝子変異の検出は半数にも満たない。このことはテ

ロメア長が短縮化した細胞において細胞老化による癌抑制機構の破たんを引き起こす未知の遺伝子変異の存在を示唆する。そこで上述のテロメア長短縮化を評価した同一症例の各組織に対して次世代シーケンサーを用いて全ゲノムシーケンスを行い、各組織のテロメア長短縮化とゲノム不安定性のプロファイリング、癌化へ導く新規の遺伝子変異の探索を行う。

3. 研究の成果

(1) DKC症例における各臓器のテロメア長短縮化の評価

テロメア長測定にはサザンブロット法、FlowFISH法、FISH法、q-PCR法などがあるが、骨髄や末梢血以外の微小な組織検体のテロメア長測定にはサザンブロット法やFlowFISH法は向いていない。そこで感度が良いq-PCR法によるテロメア長測定が必要になるが、これまで報告のあるq-PCR法によるテロメア長測定はテロメア長の定量性が不安定で確立されたプロトコールはない。本研究計画ではテロメア長の定量性に対して安定かつ再現性があるq-PCR法の開発が必要であった。まずテロメアリピート配列に対しての間欠的シーケンスを有する特異プライマーの構築を行った。Forwardプライマー(tel1 primer)は3' 端より6、12、18、24、30、32-37塩基が、Reversプライマー(tel2 primer)は6、12、18、24、30、34-39塩基がヒトテロメアTTAGGG繰り返し配列とミスマッチの配列となっている。このミスマッチによってそれぞれのprimerはヒトテロメア配列にannealingすることが可能であるが、tel1 primerとtel2 primerはどのような形でannealingをしても、3' 端の塩基がミスマッチとなりprimer dimmerによる増幅が起こらない様に工夫をしている。この新規primerによるq-PCR法によってテロメア長の定量性に対して安定かつ再現性があるq-PCR法が可能となった。

(2) テロメア長短縮化細胞のゲノム不安定性を誘導する新規遺伝子変異の探索

DKC症例に対して次世代シーケンサーを用いて各組織のテロメア長短縮化とゲノム不安定性や癌化へ導く新規の遺伝子変異の探索を行った。この結果として①テロメラーゼ複合体遺伝子群の1つである *telomerase-associated protein 1 (TEP1)* 変異、②Shelterin複合体遺伝子群の1つである *adrenocortical dysplasia homolog (ACD(TPPI))* 変異、③DNAヘリカーゼ遺伝子群である *Bloom syndrome, RecQ helicase-like (BLM)* 変異と *BLM 5'-to-3' DNA helicase(PIF1)* 変異との複合へテロ変異、*Werner syndrome, RecQ helicase-like (WRN)* 変異と *RecQ protein-like 4(RECQL4)* との複合へテロ変異を発見した。

- ① TEP1はそのN端側のp80ホモロジドメインを介してTERCと結合し染色体末端のテロメアにテロメラーゼ複合体をリクルートする作用があるのではないかと推測されているが、テロメア短縮補正に対しての機能は明らかになっていない。またTEP1はmajor vault protein (MVP)、vault poly (ADP-ribose) polymerase (VPARP)、1種類の非翻訳RNAと共にボルト (vault) と呼ばれる細胞質内で最大の分子量を持ち幅広い真核生物種に存在する核酸タンパク質複合体を構成する。ボルトの細胞内機能に関しては核—細胞質間物質輸送や多剤耐性がん細胞における抗がん剤の核外排出、細胞内シグナリングや自然免疫反応への関与などが報告されているが、依然として不明な点が多い。今回DKCにて発見した変異は、1症例はnonsense mutationもう1症例はframeshift mutationで、p80 homologyドメインを保存しC末端のWD40リピートドメインなどが欠損する変異であった。
- ② ACD変異は1症例に認められ、すでにDKCの原因遺伝子として同定されているTINF2結合領域の一塩基変異であった。TRF1やTRF2などのShelterin複合体を構成する他のテロメア結合タンパク質は概して、テロメラーゼの作用を活性化せずに、むしろ阻害することが多いが、ACDはPOT1やTINF2と複合体を形成しヒトテロメラーゼコア酵素の活性と伸長能を増大させると考えられている。
- ③ DNAヘリカーゼ遺伝子群はDNA/DNAやDNA/RNAの二本鎖構造あるいはRNAの二次構造を、水素結合を切断することによりときほぐして一本鎖にする機能をもつ。DNAの複製、修復、組み換え、RNAの転写、スプライシング、蛋白への翻訳などに幅広く関与すると考えられているが、RecQタイプのDNAヘリカーゼ遺伝子ファミリーは、ヒトにおいては少なくとも5種類以上

のメンバーからなることが知られている。そのうちの3種類は、高発がん性をともなう遺伝性早老症であるウェルナー症候群、ブルーム症候群、ロスマンド・トムソン症候群の原因遺伝子（WRNヘリカーゼ、BLMヘリカーゼ、RECQ4ヘリカーゼ）として同定され、いずれもDKCと同様に細胞内のテロメア長短縮がその病態に関与していると考えられている。現在新規に発見したこれらの遺伝子変異のin vitroでの機能解析を行っている。

4. 研究の反省・考察

(1) DKC症例における各臓器のテロメア長短縮化の評価

骨髄や末梢血以外の微小な組織検体のテロメア長測定を行うために新規primerによるq-PCR法を開発することに成功した。現在DKC症例において、表皮、肺組織、胃粘膜組織、口腔粘膜組織、骨髄、末梢血などの各組織における正常部位と炎症病変部位のテロメア長測定を行っているが、それぞれの部位における悪性腫瘍の検体の収集や解析が限られた臓器でしか行うことができていない。

(2) テロメア長短縮化細胞のゲノム不安定性を誘導する新規遺伝子変異の探索

上述のようなテロメア長短縮化細胞のゲノム不安定性を誘導する新規遺伝子変異の候補を発見することができた。現在これらの遺伝子変異を有するcDNAを作成しレトロウイルスベクターを用いてテロメラーゼ陰性のVA13細胞などに遺伝子導入を試みているが、遺伝子変異導入効率が悪くこれらの遺伝子変異を安定して発現している細胞株を作成することに難渋をしている。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Yamaguchi H, Sakaguchi H, Yoshida K, Yabe M, Yabe H, Okuno Y, Muramatsu H, Takahashi Y, Yui S, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Inokuchi K, Ito E, Ogawa S, Kojima S. The clinical and genetic features of dyskeratosis congenita, cryptic dyskeratosis congenita, and Hoyeraal-Hreidarsson syndrome in Japan. *Int J Hematol.* 2015 Nov;102(5):544-52.
- ② Moriya K, Niizuma H, Rikiishi T, Yamaguchi H, Sasahara Y, Kure S. Novel Compound Heterozygous RTEL1 Gene Mutations in a Patient With Hoyeraal-Hreidarsson Syndrome. *Pediatr Blood Cancer.* in press.
- ③ 山口博樹. 骨髄不全症候群におけるテロメア制御異常. *日本医科大学雑誌.* 2015; 11(3): 136-144.

(2) 口頭発表

Yamaguchi H, Sakaguchi H, Yoshida K, Yabe M, Yabe H, Okuno Y, Muramatsu H, Takahashi Y, Yui S, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Inokuchi K, Ito E, Ogawa S, Kojima S. The clinical and genetic features of dyskeratosis congenita, cryptic dyskeratosis congenita, and Hoyeraal-Hreidarsson syndrome in Japan. 第77回日本血液学会. 2015年 10月 金沢.

(3) 出版物

山口博樹, 猪口孝一. 再生不良性貧血と骨髄異形性症候群: 汎血球減少の臨床的な鑑別. *血液内科.* In press.

学 校 名	明 治 薬 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	アルツハイマー病創薬のためのヒトミクログリアTREM2シグナル伝達系モデルの樹立 -ミクログリア創薬モデル系樹立に関する研究-		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①アルツハイマー病 ②ミクログリア ③TREM2 ④細胞モデル			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
佐 藤 準 一	薬 学 部	教 授	研究代表者・総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
紀 嘉 浩	薬 学 部	講 師	実験・データ解析・論文作成

アルツハイマー病創薬のためのヒトミクログリアTREM2シグナル伝達系モデルの樹立 —ミクログリア創薬モデル系樹立に関する研究—

1. 研究の目的

アルツハイマー病(Alzheimer's disease; AD)は、中高年期に脳の神経細胞外にアミロイドベータ(amyloid-beta)と神経細胞内にリン酸化タウ(phosphorylated tau)と呼ばれる異常なタンパク質が凝集蓄積し、神経細胞死を来し、進行性の認知機能障害を呈する難病で、根本的な治療薬はない。ADの発症は遺伝的因子(APOE, ABCA7, BIN1, CASS4, CD33, CD2AP, CELF1, CLU, CR1, DSG2, EPHA1, FERMT2, HLS-DRB5-DBR1, INP5D, MS4A, MEF2C, NME8, PICALM, PTK2B, SLC24H-RIN3, SORL1, ZCWPW1などのリスク遺伝子多型)と環境要因(加齢、食事、運動、糖尿病など)の複雑な相互作用で規定されている。ApoE 遺伝子ε4 ホモ接合体の保有者は、AD発症リスクが12倍上昇する。近年、飛躍的に進歩した次世代シーケンサーによる遺伝子解析技術を用いて、全エクソーム解析(Whole exome sequencing; WES)により、triggering receptor expressed on myeloid cells 2(TREM2)遺伝子の多型 rs75932628(R47H)が、AD発症リスクを3倍上昇させることが報告された(Jonsson T et al. Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 368: 107-116, 2013)。TREM2は破骨細胞、樹状細胞、マクロファージ、単球に発現し、脳ではミクログリア限局的に発現し、TREM2(リガンドが結合する受容体)-DAP12(シグナル伝達のアダプター)複合体を形成している。TREM2遺伝子またはDAP12(TYROBP)遺伝子の完全な機能喪失変異では、多発性骨嚢胞による病的骨折と白質脳症を特徴とする那須・ハコラ病(Nasu-Hakola disease; NHD)を発症する。ADとNHDは進行性認知症という点で共通点を有する。

NHDは臨床経過から4つの病期に分類される。第1期は20歳頃までの無症候期(latent stage)である。生まれつきDAP2, TREM2の遺伝子変異が存在しているにも関わらず、小児期の発育発達には異常が見られない。第2期は20歳代に始まる骨症状期(osseous stage)である。この時期には四肢の長管骨の骨端部に、骨嚢胞が多発して病的骨折と骨痛を呈する。軽微な外力でも骨折を反復する。第3期は30歳代に始まる早期精神神経症状期(early neuropsychiatric stage)である。この時期には、脱抑制、多幸症、人格障害、言語障害などの前頭葉症状を主徴とする精神症状が明らかになる。てんかん発作は稀ではない。CTやMRIでは、前頭葉と側頭葉を主座とするび慢性かつ左右対称性の白質病巣、脳萎縮、脳室拡大、基底核石灰化が見られる。SPECTやPETでは、前頭葉、基底核、視床の血流低下と糖代謝低下を認める。第4期は40歳代以降に始まる晩期精神神経症状期(late neuropsychiatric stage)である。この時期には認知機能障害(cognitive impairment)が徐々に進行し、50歳頃までに失外套状態を呈して、嚥下性肺炎などの感染症を契機に死亡する。患者は日本とフィンランドを中心とする北欧に集積しているが、広く世界中から200例以上の報告が蓄積している。

TREM2のリガンドとしては現在まで菌体成分、アニオン脂質、核酸、アポトーシス神経細胞、ミエリンデブリス、HSP60, amyloid-beta, ApoEが報告されている。TREM2のR47Hはexon 2に存在し、細胞外Igドメインのリガンド結合部位に該当する。従ってH47ではミクログリアのTREM2リガンド結合能低下が示唆される。AD脳では活性化ミクログリアの集積を認め、TREM2陽性ミクログリアは老人斑のamyloid-betaやアポトーシスに陥った神経細胞の貪食除去に関与していると考えられる。しかし現在まで(1)ADにおける内在性TREM2特異的リガンド、(2)AD発症におけるTREM2-R47H変異の意義は解明されていない、(3)TREM2-DAP12を標的とするヒトミクログリア創薬モデル系は樹立されていない。本研究ではADおよびNHDの病態の解明のため、①TREM2-DAP12恒常的発現ヒトミクログリアの樹立、②TREM2リガンド候補の同定を目的とする。

2. 研究の計画

- (1) TREM2-DAP12安定発現ヒトミクログリアHMO6の樹立
 - ① 遺伝子導入: Flag-TREM2(R47, H47), DAP12をそれぞれ発現ベクターに組み込み、ヒトミクログリア細胞株HMO6(Cell Mol Neurobiol 31: 1009, 2011 ; この細胞はTREM2陰性, DAP12陰性である)に導入し、TREM2陽性DAP12陽性の薬剤耐性安定細胞株を樹立する。H47はQuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit(Agilent)を用いて、変異を導入して作成する。変異はシーケンスで確認する。選択用の薬剤はBlasticidin, Hygromycinを用いる。
 - ② 免疫細胞染色とウエスタンブロットでTREM2, DAP12の発現を確認する。抗体はTREM2 (R & D, AF1828), DAP12(Santa Cruz Biotechnology, FL113)を用いる。
- (2) TREM2リガンド候補の同定
 - ① 組換えヒトTREM2タンパク質の作成: リガンドの同定には純度が高い大量のTREM2タンパク質が必要である。そのためTREM2細胞外ドメイン部分(aa.19-172)に、N末端にシグナルペプチドとFlagタグ、C末端にHisタグを付加してpDESTベクターにクローニングし、カイコBacmidシステム(静岡大学グリーン科学技術研究所所長朴龍洙教授および北海道大学大学院薬学研究院生体分子機能学研究室前仲勝実教授より提供を受けた)を用いてBmNPV-SigFlagTREM2(R47 or H47)Hisを作成する。カイコではヒトに類似したタンパク質の翻訳後修飾が認められる利点がある。両者をおのおのカイコ5令幼虫に感染させ、体液中にFlagTREM2(R47 or H47)Hisを分泌させてHisカラムとFlag抗体ビーズで精製する。
 - ② TREM2リガンド候補との結合実験: 上記のFlagTREM2(R47, H47)Hisとヒト神経細胞膜画分から抽出したTREM2リガンド候補Xと結合させ、Flag抗体ビーズでプルダウンアッセイを行う。

3. 研究の成果

- (1) TREM2-DAP12安定発現ヒトミクログリアHMO6の樹立
 - ① TREM2-R47/DAP12, TREM2-H47/DAP12を発現するHMO6細胞株を各2株樹立出来た。免疫細胞染色とウエスタンブロットでTREM2(細胞膜), DAP12(細胞質)の発現を確認した。現在Flag抗体ビーズで刺激し、DAP12のITAMドメインチロシンリン酸化を確認する実験を計画中である。
- (2) TREM2リガンド候補の同定
 - ① カイコBacmidシステムを用いてBmNPV-SigFlagTREM2(R47 or H47)Hisを作成し、カイコ5令幼虫に注入して組換えタンパク質を得た。ウエスタンブロットでTREM2, Flag, His抗体に対する反応性を確認した。現在TREM2リガンド候補タンパク質を用いて、プルダウン実験を計画中である。

4. 研究の反省・考察

- (1) TREM2-DAP12安定発現ヒトミクログリアHMO6の樹立
 - ① TREM2-R47/DAP12, TREM2-H47/DAP12を発現するHMO6細胞株を各2株樹立出来たが、HMO6の増殖速度が極めて早いため、TREM2の発現が必ずしも安定ではなく、継代培養中に発現レベルが低下するトラブルに直面した。従ってこれらの細胞におけるTREM2-DAP12シグナル伝達系の解析が当初の予定より遅れている。今後、限界希釈法などでクローン化して安定化発現細胞を樹立する予定である。
- (2) TREM2リガンド候補の同定
 - ① カイコBacmidシステムを用いてBmNPV-SigFlagTREM2(R47 or H47)Hisをカイコ5令幼虫で発現させて組換えタンパク質を大量に産生することが出来た(朝比奈直弘, 修士論文)。しかしながらタンパク質を大量に産生させると凝集してしまうトラブルに直面した。今後リコンビナントタンパク質やリガンドの濃度や反応時間など結合条件を至適化する必要がある。

(3) 考察

ミクログリアは脳微細環境(microenvironment)の変化を常時監視しており、傷害神経細胞や不要なシナプス、タンパク質凝集体などを積極的に除去して、中枢神経系組織の恒常性維持に働いている。ミクログリアのTREM2-DAP12シグナル伝達系は、炎症を伴わないアポトーシス神経細胞の貪食受容体として重要な役割をしていると考えられている。TREM2にリガンドが結合すると会合しているDAP12のC末端側に存在するimmunoreceptor tyrosine-based activation motif(ITAM)部位が、チロシンキナーゼSrcによりリン酸化され、さらにチロシンキナーゼSykが会合して自己リン酸化され、多様なシグナル伝達因子(PI3K, PLC, PKC, MAPK)を經由して、下流にシグナルを伝達する。最近、システムズバイオロジー研究により、DAP12はアルツハイマー病脳遺伝子ネットワークの中心分子として働くことが明らかにされた(Zhang B et al. Integrated systems approach identifies genetic nodes and networks in late-onset Alzheimer's disease. Cell 153: 707-720, 2013)。さらにTREM2は細胞膜メタロプロテアーゼであるADAM10により切断されて、N末端側がsTREM2として細胞外へ放出され、C末端側は膜内でガンマセクレターゼにより切断される。sTREM2の機能は全くわかっていない。TREM2-DAP12シグナルは樹状細胞やマクロファージでは、Toll様受容体(TLR)を介する炎症反応を抑制する。すなわちDAP12またはTREM2の欠損細胞では、lipopolysaccharide(LPS)やCpG DNAによるTLR刺激を介する炎症性サイトカインやI型インターフェロンの産生が亢進している。TREM2は樹状細胞に発現しているSEMA6D受容体Plexin-A1とも結合し、DAP12はTREM2以外にもTREM1やbeta2インテグリンとも会合し、その場合は刺激強度に依存して活性化シグナルを伝達する。DAP12またはTREM2の欠損マウスではミクログリアの顕著な減少が見られるが、NHDと異なり白質脳症は見られない。TREM2のハプロ不全マウスではamyloid-betaのcompactionが障害されている。このようにTREM2-DAP12シグナル伝達系は非常に複雑であり、TREM2とDAP12の機能障害に関してマウスとヒトで異なる所見があり、ヒトミクログリアでTREM2のリガンドを明らかにすることは非常に重要である。本研究ではTREM2-DAP12を構成的に発現するヒトミクログリアモデルの樹立とリコンビナントTREM2タンパク質の大量産生に成功したが、TREM2の新規リガンドの同定には至っていない。技術的な問題を克服して当初の目標をクリアしたいと考えている。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Satoh J, Kino Y, Niida S. MicroRNA-Seq data analysis pipeline to identify blood biomarkers for Alzheimer's disease from public data. Biomarker Insights 10: 21-31, 2015.
- ② Satoh J, Kino Y, Motohashi N, Ishida T, Yagishita S, Jinnai K, Arai N, Nakamagoe K, Tamaoka A, Saito Y, Arima K. Immunohistochemical characterization of CD33 expression on microglia in Nasu-Hakola disease brains. Neuropathology 35: 529-537, 2016.
- ③ Satoh J, Kino Y, Asahina N, Takitani M, Miyoshi J, Ishida T, Saito Y. TMEM119 marks a subset of microglia in the human brain. Neuropathology 35: 39-49, 2016.
- ④ 佐藤準一: 那須・ハコラ病の脳分子病態. BRAIN and NERVE 68: 543-550, 2016.

(2) 口頭発表

なし

(3) 出版物

なし

学 校 名	自 治 医 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	加齢色素リポフスチン沈着の機序解明と治療薬の開発 —加齢シグナルとその薬物反応を明らかにする研究—		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①加齢色素 ②副腎皮質 ③受容体 ④遺伝子改変動物モデル			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
興 水 崇 鏡	医 学 部	准 教 授	研究統括、網羅的解析、質量分析

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
谷 口 淳 一	医 学 部	講 師	責任遺伝子スクリーニング、細胞内情報伝達の解析
土 屋 裕 義	医 学 部	講 師	ゲノム修飾解析、細胞モデル系の確立
藤 原 葉 子	医 学 部	ホ ^ス トドクター	転写因子部位の解析、個体での化合物評価

加齢色素リポフスチン沈着の機序解明と治療薬の開発 —加齢シグナルとその薬物反応を明らかにする研究—

1. 研究の目的

(1) 研究の全体像；老化に伴い生体に起こる器質的変化は多様である。疾患に直接関与する動脈硬化や血管の石灰化などについては多くの研究成果が得られているが、加齢に伴う色素性物質の沈着については、その機序を含め未だ不明な部分が多い。本研究では、正常な加齢現象に伴い非脂肪細胞内に色素性の蓄積が起こる過程について、そのメカニズムを検討する。特に本研究は、副腎に早期より加齢色素が沈着し、ステロイドホルモンの分泌障害が伴うユニークな加齢モデルを利用することを特徴とする。このモデル動物はホルモン受容体をノックアウトしたマウスであることより、受容体を介する細胞内情報伝達系が加齢色素沈着に関わる接点の解明と沈着過程をコントロールする方法の開発を目的とする。

加齢色素の物質的正体は未だ解明されていない。少数ではあるがこれまでの報告によると、脂肪酸を含む脂質や、過酸化脂質成分が多く含まれると予想される。この脂質成分の網羅的な解析により、G蛋白質共役型受容体を介する加齢変化成立機序について世界で初めて明らかにする。さらに本研究により、過酸化脂質が生成された後の細胞内での蓄積と輸送の新たな仕組みを解明し、細胞の加齢に伴う蛍光色素顆粒の蓄積を防ぐ、最初の方法論を提示する。すなわち、細胞機能を維持し、生物学的時間の進行による負の影響を止めるまたは遅らせるという、新たなパラダイムに挑戦する。受容体活性化による多段階的な効果を、個体、細胞、タンパク質、ゲノム修飾の各レベルで研究期間内に明らかにし、包括的脂質蓄積シグナル研究を展開する。

(2) 本研究では、申請者らが作出したユニークな加齢色素沈着モデルとして、V1aバズプレッシン受容体遺伝子改変マウスを用いる。この遺伝子改変マウスの特徴は、副腎皮質と髄質境界部分において、6週齢ではほとんど変化を認めないが約8週齢よりリポフスチン、または加齢色素と呼ばれる沈着物の蛍光が観察される点である。蛍光顕微鏡にて無染色の凍結切片を観察すると、蛍光顆粒の沈着を検出する。さらに、このマウスでは副腎皮質のホルモン分泌能が低下している。8から11週令でV1aノックアウトマウスに見られるリポフスチン蓄積と同程度の蓄積を野生型のマウスで観察するためには、およそ12か月齢の野生型マウスが必要となる。この事実より、V1a受容体ノックアウトマウスが、加齢色素蓄積を解析するための良いモデルであると考えられる。

2. 研究の計画

(1) V1a受容体遺伝子欠損による副腎の加齢色素沈着が、マウスの系統によらず保存されている証明。これまで解析を行ったV1a受容体欠損マウスは、遺伝背景が129/BL6系統であり、マウスの遺伝背景が加齢色素沈着に影響を及ぼす可能性も考えられる。そこで、遺伝背景をBL6に近づけた場合の副腎皮質について加齢色素沈着の程度を評価する。さらに、下垂体機能の低下から引き起こされる二次的副腎皮質機能不全のモデルマウスV1bバズプレッシン受容体欠損マウスを用い、副腎への蛍光物質の沈着の有無を検索する。

(2) V1a受容体シグナルの下流で脂質蓄積変化に関わる機構はこれまで不明である。そこで、培養細胞系においてV1a受容体に特異的な機能の解析を進める。具体的には、V1a受容体とアミノ酸配列が最も近いV1bバズプレッシン受容体とV1a受容体をそれぞれ培養細胞に発現させ、受容体サブタイプに特異的な機能を明らかにする。さらに、副腎皮質由来の細胞株の中でモデルとなる細胞を同定し、V1a受容体のシグナル伝達における役割を解明する。

(3) イメージング質量顕微鏡分析による蛍光物質の網羅的脂質プロファイル解析を行い、蛍光物質の脂質成分を同定する。

3. 研究の成果

- (1) V1a遺伝子欠損により、マウス系統を超えた加齢色素の沈着亢進；マウスの遺伝背景が加齢変化に影響を及ぼす可能性がある。そのため、これまで解析した129/B6系統マウスに加え、BL6の遺伝背景に統一した遺伝子欠損動物を作成し、その副腎皮質を観察した。その結果、BL6の遺伝背景においても、V1a遺伝子欠損の影響は保存され、副腎皮質に加齢色素の沈着が亢進することが明らかになった。よってV1a受容体はマウス系統によらず、細胞の加齢変化に重要な役割を果たすことが明らかとなった。さらに、V1b受容体遺伝子欠損マウスで下垂体機能低下を確認した上で副腎皮質を観察したところ、バゾプレッシン刺激時のACTH分泌が低下しているにもかかわらず、副腎の加齢変化に促進は見られなかった。よってV1a受容体欠損マウスで観察される加齢色素は、下垂体-副腎系の機能低下による二次的影響とは考えにくいことが判明した。
- (2) V1a受容体をV1b受容体と比較した場合の特徴；培養細胞系において、V1a受容体は非刺激時に細胞膜に分布するものの、V1b受容体は主に細胞質内に分布し、細胞膜には分布する割合は低下していることが明らかとなった。さらに、刺激に伴い受容体が細胞膜から内在化する場合、V1a受容体の内在化は、V1b受容体に比べて少ない割合であることが判明した。すなわち、V1a受容体は、細胞膜にあらかじめ存在するが、内在化する割合は低いことが特徴であった。次に、副腎皮質由来の細胞株を検索したところ、マウスY1細胞では、4種類のバゾプレッシン/オキシトシン受容体ファミリーの中でV1a受容体のみを発現していた。さらに、この細胞株は糖質ステロイドホルモンの分泌能を有し、ACTHホルモンの刺激によってホルモン分泌が増加した。よってV1a受容体機能を解析するためのモデル細胞としてY1細胞は最適であることが判明した。Y1細胞におけるバゾプレッシンの機能を解析したところ、ACTHとバゾプレッシンの同時刺激により、ACTH単独よりもコルチコステロンの分泌が増加することが判明した。この際の細胞内シグナルでは、バゾプレッシンがACTHによるcAMPの産生を有意に抑制した。よってバゾプレッシンによるコルチコステロンの分泌増加は、cAMP以外の機構が関与することが予想され、この細胞を用いたさらなる解析が有用と考えられた。
- (3) イメージング質量顕微鏡分析による蛍光物質の網羅的脂質プロファイル解析；これまで実験条件を改善してきたイメージング質量顕微鏡分析により、V1a受容体の蛍光部分と非蛍光部分について脂質プロファイルを取得した。実際には、副腎切片を端から50 μ mの半径で隈なく解析し、蛍光イメージと重ねた上で蛍光部分と非蛍光部分を区別して解析した。アッセイのコントロールとして、これまでリポフスチンの成分として報告のあるステアリン酸を検出することに成功した。

4. 研究の反省・考察

- (1) マウスの複数の系統を解析した結果、V1a受容体欠損の影響が系統を超えて広く及ぶことが明らかになった。加齢変化におけるV1a受容体機能の重要性を示唆しており、副腎皮質並びに髄質のV1a遺伝子発現分布と合わせた解析が有効であった。
- (2) V1a受容体機能の特徴を得ることに成功した。即ち、V1a受容体は細胞表面に局在する傾向がV1b受容体よりも強く、この事実より、一旦刺激された場合、より高度の脱感作を起こす可能性が考えられる。よって今後の薬物開発において有益な情報を得ることに成功した。また、マウスY1副腎皮質由来細胞株は、良いモデル細胞であることが判明した。
- (3) 加齢色素の脂質プロファイルを得ることに成功した。測定方法の改善をさらに重ね、より感度を上げ、脂質以外のタンパク質、核酸、代謝物などの解析に広げられる可能性が示された。本研究で得られた遺伝子発現プロファイルと脂質プロファイルを組み合わせることにより、加齢における代謝マップ上の特徴を明らかにする統合的解析に進むことが可能となった。よって今後は細胞加齢シグナルの全体像の解析に進むことが可能である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

Kashiwazaki, A., Fujiwara, Y., Tsuchiya, H., Sakai, N., Shibata, K., Koshimizu, T.A., Subcellular localization and internalization of the vasopressin V1b receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 765, 291-299. 2015, Oct.

(2) 口頭発表

① 奥水崇鏡、V1bバゾプレッシン受容体複合体の機能解析、バゾプレッシン研究会、平成28年1月7日

② 奥水崇鏡、バゾプレッシンV1b受容体の新知見と応用、下垂体研究会、平成27年8月7日

(3) 出版物

なし

学 校 名	朝 日 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	骨再生に応用する体性幹細胞の分子基盤構築 —分化動態解明からエピジェネティック解析へ—		研究分野 医 学
キ ー ワ ー ド	①骨再生 ②細胞移植療法 ③エピジェネティクス ④骨髄由来幹細胞 ⑤脂肪組織由来幹細胞 ⑥歯髄由来幹細胞 ⑦骨芽細胞分化 ⑧破骨細胞分化		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
川 木 晴 美	歯 学 部	講 師	研究の総括 動物実験 細胞培養実験 データ整理

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
近 藤 信 夫	歯 学 部	教 授	遺伝子発現解析実験 データ整理
高 山 英 次	歯 学 部	准 教 授	分子生物学的実験 データ整理
神 谷 真 子	経 営 学 部	准 教 授	培養細胞の染色、増殖、分化評価等細胞生物学的実験 RNA試料の調整 データ整理
永 原 國 央	歯 学 部	教 授	実験動物への移植実験 標本作製 染色、画像データ取得 データ整理
吉 田 隆 一	歯 学 部	教 授	移植実験後組織の分子生物学的実験 マイクロCT解析 SEMによる観察及び解析 データ整理
玉 置 幸 道	歯 学 部	教 授	骨補填材料の作製 XRD解析 データ整理

骨再生に応用する体性幹細胞の分子基盤構築 —分化動態解明からエピジェネティック解析へ—

1. 研究の目的

超高齢社会となった我が国では、加齢による骨量減少や骨修復能の減弱などに起因する国民のQOL低下は必至である。これを防ぐために、造骨細胞の供給等、骨再生や骨代謝系を人工的に導入し、組織工学的にコントロールする骨再生テクノロジーの確立が急務である。

近年、造骨過程でのエピジェネティック因子の関与が明らかとなってきている。由来組織の異なる移植幹細胞の造骨過程におけるクロマチン構造の変化を解析することは、骨再生の人為的コントロールによる治療や創薬につながると期待できる。そこで、細胞移植療法による骨再生での細胞の運命と分化過程における調節機構の詳細を担体の有無を区別して解明し、その分子基盤の確立を目指す。

- (1) 担体となる骨補填材上での幹細胞培養評価
- (2) 幹細胞の異所性骨誘導能評価
- (3) 骨欠損部への幹細胞移植による骨伝導能評価

上記より、由来組織の異なる幹細胞の担体の有無による分化動態、移植後動態を解析し、それらの調節に関わるエピジェネティック因子の解析を行うことにより、骨再生における幹細胞移植の分子基盤を構築することを目的とする。

2. 研究の計画

- (1) 担体となる骨補填材上での幹細胞培養評価
 - ① 骨補填材上で幹細胞を分化誘導あるいは増殖培地で培養し、骨芽細胞分化マーカーの発現変化を経時的に解析し、分化へ移行する時期、由来組織による差、分化誘導因子への応答性を解析する。
 - ② 骨芽細胞分化に必須のosterix, Runx2およびその共役因子であるcbfb他、骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現変化を、エピジェネティック解析の試料回収指標とするため詳細に追う。
 - ③ アルカリフォスファターゼ活性や石灰化の度合いを検討し、mRNA発現変化との相関性を確認する。
- (2) 幹細胞の異所性骨誘導能評価
 - ① ノードマウス皮下に骨補填材のみ、あるいは骨補填材と幹細胞を共に移植し、移植後の組織を経時的に取り出し組織化学的解析を行って、骨補填材そのものの異所性骨誘導および、幹細胞の有無による組織応答の違いを検討する。
 - ② 由来組織の異なる幹細胞の移植後の動態を免疫組織化学的に解析する。
- (3) 骨欠損部への幹細胞移植による骨伝導能評価
 - ① ラット大腿骨骨欠損部へ骨補填材のみ、あるいは骨補填材と幹細胞を共に移植し、移植後の組織を経時的に取り出しパラフィン包埋切片を作製する。
 - ② 由来組織の異なる幹細胞について①と同様に切片を作製する。

3. 研究の成果

- (1) 担体となる骨補填材上での幹細胞培養評価
 - ① 3種の骨補填材、炭酸含有アパタイト (CA)、水酸化アパタイト (HA)、 β -リン酸三カルシウム (β -TCP) を用いて骨髄由来、脂肪組織由来、歯髄由来の幹細胞を骨補填材と共に、骨芽細胞分化誘導培地を用いることなく、幹細胞増殖培地で培養し、アルカリホスファターゼ (ALP) の活性を指標に骨芽細胞への分化を検討した結果、骨髄由来幹細胞が最も早く骨芽細胞へと分化し、次いで脂肪組織由来幹細胞、歯髄由来幹細胞も培養2週間でALP活性の

上昇をみとめた。骨髄由来幹細胞および脂肪組織由来幹細胞はアリザリンレッドに濃染するカルシウムの沈着をみとめたが、歯髄由来幹細胞では石灰化の度合いが低く、*in vitro*の条件下で、骨芽細胞分化誘導因子を使用しない条件では硬組織への分化能が比較に用いた2種の幹細胞よりもやや弱い傾向にあると考えられた。

② 骨芽細胞分化マーカーの発現変化は、HA、CA、 β -TCPの順に I型コラーゲン、ALPの経時的発現量増加がみられた。幹細胞移植の効果と分化調節におけるエピジェネティック因子の関与についての評価の指標となるRunx2他、転写因子の発現レベル上昇に関しては現在も発現パターン変化等の詳細を検討中である。

③ I型コラーゲン、ALP、オステオカルシンなど一部の骨芽細胞分化マーカーではALP活性や石灰化の度合いと相関して発現上昇する結果が得られている。

(2) 幹細胞の異所性骨誘導能評価

① ノードマウス皮下への骨補填材の移植実験ではCAでコラーゲン性の線維組織の増生が顕著であり材料周囲に一層の硬組織様組織形成をみとめた。骨髄由来幹細胞を共に移植した場合、骨補填材単体では硬組織様組織形成のみられなかった β -TCP移植群でもわずかに硬組織様組織の形成がみとめられ、異所性骨誘導に貢献していることが示唆された。また、ヒト由来の細胞を同定するため、抗ヒト細胞核抗原抗体と抗骨芽細胞分化マーカー抗体を用いて蛍光免疫染色を行った結果、移植した細胞が骨芽細胞様へ分化していることが示唆された。

② 脂肪組織由来幹細胞、歯髄由来幹細胞では硬組織様組織形成の促進効果はみとめられなかったが、歯髄由来幹細胞は移植後も増殖細胞のマーカーであるKi-67陽性細胞として検出されるなど、移植後の組織で生存していることがわかった。

(3) 骨欠損部への幹細胞移植による骨伝導能評価

ラット大腿骨骨欠損部への移植実験後の切片を経時的に作製し、ノードマウスへの移植実験後の結果との比較を行いながら解析を継続中である。

4. 研究の反省・考察

(1) 担体となる骨補填材上での幹細胞培養評価

① 3種の骨補填材の作用を検討するため、骨芽細胞分化誘導培地を用いることなく検討した結果、CAで特に顕著な差がみられたことから、分化誘導因子として添加するリン酸の供給が他の2種の骨補填材に比べて有利な点と考えられた。この点をふまえて、培地中のリン酸およびカルシウム濃度の経時的測定を追加して行っている。

② 骨芽細胞分化マーカーの発現変化では、人工骨補填材上での*in vitro*の培養条件では転写因子の発現レベルが安定しないことから、ラット頭蓋骨から作製した骨片を比較対照として追加することとし、発現パターン変化等の詳細を検討中である。

③ ALP活性変化や石灰化ではCA、HAで特に顕著であり骨の無機成分の主要成分であるHAを本体とする2種の骨補填材が β -TCPと比較して有利であると考えられる。

(2) 幹細胞の異所性骨誘導能評価

① ノードマウス皮下移植実験から、CA移植群でコラーゲン性線維組織の増生と硬組織様組織の形成がみとめられるなど骨補填材周囲での骨芽細胞分化と骨形成に関連する所見が得られ、*in vitro*実験の結果を補強することができた。動物実験と*in vitro*実験を並行して行ってきたため、エピジェネティック解析の試料回収の指標となる骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現変化の検討についてやや遅れ気味であることが反省点として挙げられるが、これらの結果からRunx2やOsterix等の骨芽細胞マーカーの出現時期の同定を行っている。

② 歯髄由来幹細胞は*in vitro*では骨芽細胞への分化能が骨髄由来細胞よりも弱いと考えられたが移植後も宿主内で生存し増殖している所見が得られたことから、何らかの作用を有するものと考えられ、さらに長期間の移植後の生体内での動態を追う必要があると考えられた。

(3) 骨欠損部への幹細胞移植による骨伝導能評価

培養系の評価で十分な検討を重ねるため、そして、*in vivo*での結果と照合しつつ解析を進めるために、当初次年度に予定していた移植実験と切片作製を本年度中に進めることができ、現在、培養系での評価と並行して解析を進めるべく、骨芽細胞分化マーカーに加え、MAPK等の分化に関与する情報伝達系分子について免疫染色による検討を進めている。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Murase Y, Hattori T, Aoyama E, Nishida T, Maeda-Uematsu A, Kawaki H, Lyons KM, Sasaki A, Takigawa M, Kubota S. Role of CCN2 in Amino Acid Metabolism of Chondrocytes. *J Cell Biochem.* 117:927-937. 2016.
- ② Kawaki H, Kubota S, Takigawa M. Western blotting analyses of CCN proteins. *Methods Mol Biol.* 2015. (in press)
- ③ Kawaki H, Kubota S, Takigawa M. Immunohistochemical analyses of CCN proteins. *Methods Mol Biol.* 2015. (in press)
- ④ Kawaki H, Kubota S, Takigawa M. Analyses of signaling pathways activated by CCN proteins. *Methods Mol Biol.* 2015. (in press)

(2) 口頭発表

- ① 近藤雄三, 川木晴美, 高橋 潤, 田辺俊一郎, 近藤信夫, 永原國央. 炭酸含有アパタイトを足場材料とした骨芽細胞分化の特性解析. 第69回 NPO法人日本口腔科学会学術集会. 2015年 5月13日~15日. 福岡.
- ② 竹下信郎, 佐々木紀代, 星 健治, 川木晴美, 長谷川正和, 山本照子. CCN2/CTGFは *in vivo*の機械的刺激に対する初期反応において縫合細胞の血管内皮細胞分化と骨細胞のアポトーシスを誘導する. 第7回日本CCN研究会. 2015年 8月29日. 岡山.
- ③ 奥野公巳郎, 川木晴美, 田中雅士, 小栗健策, 森 春菜, 河野 哲, 近藤信夫, 吉田隆一. 象牙質顆粒と幹細胞を組み合わせたハイブリッド骨補填材の生体内での評価. 第11回日本歯内療法学会中部支部会. 2015年 9月27日. 名古屋.
- ④ 高橋 潤, 川木晴美, 近藤雄三, 山田尚子, 長谷川ユカ, 近藤信夫, 永原國央. 炭酸含有アパタイトの骨補填材として評価と破骨細胞分化に対する機能解析. 第19回日本顎顔面インプラント学会. 2015年11月28日~29日. 横須賀.

(3) 出版物

なし

学 校 名	摂 南 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	神経変性毒タンパク質の凝集および作用機序の 化学的解析 ータンパク質変性疾患の発症機序の化学的解析ー		研究分野 医 学
キ ー ワ ー ド	①神経変性毒タンパク質 ②プリオンタンパク質 ③ α -シヌクレイン ④SOD1 ⑤凝集		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
秋 澤 俊 史	薬 学 部	教 授	総括、ペプチド合成、金属結合性の検討、 論文作成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
小 西 元 美	薬 学 部	准 教 授	立体構造解析 (CD、NMR 測定) 論文作成
谷 口 将 济	薬 学 部	特 任 助 教	凝集性の確認、酵素による分解点の解析、 論文作成

神経変性毒タンパク質の凝集および作用機序の化学的解析 —タンパク質変性疾患の発症機序の化学的解析—

1. 研究の目的

- (1) 本研究は、プリオン病、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) などの発症原因と言われている神経変性を誘発する凝集性タンパク質の凝集メカニズムを α -シヌクレイン (α -Syn: パーキンソン病) と SOD1 (ALS) タンパク質のフラグメントペプチドを用いて化学的に明らかにすることを目的とするものである。

2. 研究の計画

- (1) 平成27年度は主として既に合成・精製しているプリオンタンパク質 (PrP) のフラグメントペプチドを用いた結合性の検討を行う。加えて、平成28年度以降に使用する合成ペプチドを準備する。
 - ① カラムスイッチ法によるペプチド間の結合性の検討: C-末端のフラグメントペプチドを HPLC 用担体に固定化し、HPLC 用カラムに充填したアフィニティカラムを作成する。それを第一カラムに用いたカラムスイッチ HPLC 法により、各フラグメントペプチドとの結合性と銅イオンの影響を検討する。
 - ② ペプチド間の会合性の検討: 分子間相互作用測定装置 (AFFINIX QN) を用いてペプチド間の会合性を検討する。
 - ③ 神経細胞への影響: iPS 細胞を神経細胞に分化誘導後、各フラグメントペプチドの共存した培養を行い、神経細胞に対する作用を観察する。
 - ④ 立体構造解析: 上記1) と2) の結果より、プリオンタンパク質の凝集に関与するフラグメントペプチドを特定し、NMR 測定を行うことで立体構造に必要なデータを収集する。
 - ⑤ α -シヌクレインと SOD1 由来のフラグメントペプチドの合成・精製を行う。

3. 研究の成果

- (1) 全体的に研究計画通り進行し、当初の目的は十分達成できていると判断している。さらに、 α -シヌクレインと SOD1 に関しては計画以上の成果が得られたと考えている。
 - ① ペプチド間の結合性に関しては、実験方法をカラムスイッチ HPLC 法から Pull down 法に変更して行ったが、目的とした結果を得ることができた。変更した理由は、C-末端のフラグメントペプチドが HPLC 用担体に非特異的に吸着を示し、完全に除去することが困難なため連続測定ができないことと、そのため定量性に問題が生じることである。Pull down 法を行うためのペプチド固定化レジンの作成は当初の予定通り行った。hPrP175-189 および hPrP180-192 をそれぞれ TOYOPEARL AF-Formyl-650 レジン (東ソー) に化学的に固定化した。固定化量は一定量のレジンを減圧下、6 規定塩酸で24 時間加水分解した後、ダブル誘導体化したアミノ酸を逆相 HPLC 法によるアミノ酸分析により算出した。hPrP175-189 を固定化したレジンは R175-189 は 163.8 pmol/mL、hPrP180-192 を固定化したレジンは R180-192 では 142.7 pmol/mL のペプチドが固定化されていると算出した。これらのレジンと hPrP-FP を用いて Pull down 法により各 hPrP-FP の結合量をアミノ酸分析法により算出した。その結果、R180-192 には hPrP175-189 および hPrP169-192 が、R175-189 には hPrP169-192 が結合していることが明らかとなった。同時に、反応液を HPLC 分析し、結合していない遊離の hPrP-FP 量を算出して結合量を求めたところ、アミノ酸分析と HPLC 分析の結果は一致した。これらの検討は、C-末端側の hPrP-FP がプリオンタンパク質の凝集の核となり得ることを強く示唆している。
「合成フラグメントペプチドを用いたヒトプリオンタンパク質 (PrP) C-末端領域の性質解

析：第28回バイオメディカル分析科学シンポジウム（長崎）において口頭発表」

- ② hPrP180-192 をAFFINIX QN μ のセンサーセルに固定化し、hPrP169-192, 169-183, 175-183, および180-192 との結合性を検討した結果、hPrP169-192 および hPrP180-192 が強く結合していることが明らかとなった。このことより、ヒトプリオンタンパク質の C-末端側の相互作用により凝集が起こることが示唆された。

「ヒトプリオンタンパク質 (hPrP) C-末端領域由来フラグメントペプチドの構造変化と分子間相互作用の検討：日本薬学会第136回年会（横浜）においてポスター発表」

- ③ iPS 細胞を用いる前に、取り扱いの易しいヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 株を用いて hPrP180-192 を含むC-末端領域のhPrP 由来フラグメントペプチド (hPrP-FP) の影響を検討した。その結果、hPrP-FP の添加時に凝集体が観察され、hPrP169-189 の添加による小胞様の SH-SY5Y 細胞の形態変化が認められた。また、hPrP-FP の添加による細胞増殖能の低下がみられ、特に hPrP169-189 では有意な増殖抑制作用が認められた。さらに、hPrP169-189 を添加した SH-SY5Y 細胞において Caspase-3 の活性化が認められ、hPrP169-189 が SH-SY5Y 細胞のアポトーシスを誘導している可能性が示唆された。

「ヒトプリオンタンパク質由来フラグメントペプチドの SH-SY5Y 細胞への影響：日本薬学会第136回年会（横浜）においてポスター発表」

- ④ hPrP169-183 を含む、C-末端由来のフラグメントペプチドの立体構造に及ぼす銅イオンの影響をCD測定により検討した結果、hPrP169-192 とhPrP169-183 は銅イオン添加により β シート構造に、hPrP175-183 はランダムコイル構造から α -ヘリックス構造に変化するが、hPrP180-192 は銅イオンにより影響されないことが明らかとなった。

「ヒトプリオンタンパク質 (hPrP) C-末端領域由来フラグメントペプチドの構造変化と分子間相互作用の検討：日本薬学会第136回年会（東京）においてポスター発表」

現在、順次、NMR 測定を行っており、今後詳細な立体構造の解析を行う予定である。

- ⑤ SOD1 と α -Syn の全長をカバーするため、SOD1 は7種類、 α -Syn は4種類のフラグメントペプチドを合成・精製ができた。そこで、銅イオンおよび亜鉛イオンとの結合性をカラムスイッチ HPLC 法で、また、CD 測定により立体構造変化を検討した。

まず、SOD1 について検討した。亜鉛結合性に関しては、分子中にヒスチジンを含む SOD1/39-52、SOD1/53-86、およびSOD1/104-124 は結合性を示したが、その他のSOD1/2-38、82-94、94-103、および124-154 は結合性を示さなかった。これらのペプチドの亜鉛存在下での CD 測定を行ったが顕著な構造変化は認められなかった。

一方、銅イオンの結合性に関しては亜鉛とは異なった結果が得られた。ヒスチジンを含み銅結合部位との報告のあるSOD1/39-52、SOD1/53-86、およびSOD1/104-124 は亜鉛と同様に高い結合性を示した。さらに亜鉛には結合しなかったSOD1/2-38、94-103、および 124-154 も弱いながら結合性を示した。これらのペプチドの銅存在下での CD 測定を行った結果、SOD1/124-154 でランダムコイル構造から α -ヘリックス構造へと変化する傾向が観察された。このような変化は亜鉛では認められておらず、銅との結合によりペプチドの立体構造が変化すると考えられる。他のフラグメントペプチドでは顕著な構造変化は認められなかった。

「SOD1 由来フラグメントペプチドの亜鉛結合性：第28回バイオメディカル分析科学シンポジウム（長崎）においてポスター発表」

「SOD1 由来フラグメントペプチドの銅結合性：第28回バイオメディカル分析科学シンポジウム（長崎）においてポスター発表」

次に、 α -Syn1-36、36-68、69-106、および101-140 の銅結合性を検討した。その結果、 α -Syn101-140 に弱い結合性が認められたが、他のフラグメントペプチドではほとんど結合が認められなかった。また、CD 測定の結果でも銅イオン添加による構造変化は認められなかった。 α -Syn には SOD1 の様な銅や亜鉛などの結合性の高いヒスチジンは含まれておらず、金属による立体構造の変化は少ないと判断しているが、現在、亜鉛の影響と細胞毒性を検討中である。

4. 研究の反省・考察

- (1) 全体的に実験においては予定以上の成果が出せていると考えており、かつ論文作成に必要なデータは得られていると判断している。しかしながら、論文作成は遅れており、早急に準備にかかる必要がある。
 - ① C-末端側フラグメントペプチドの性質により、カラムスイッチ HPLC 法での解析はできなかったが、Pull down 法を用いることで当初の目的は達成できた。
 - ② 分子間相互作用測定の結果は、①の結果とよい相関を示したことより、C-末端領域がプリオンタンパク質の凝集の核となると判断した。しかしながら、分子間相互作用が認められた、hPrP169-192 と認められなかったPrP169-183 はともに銅イオンの添加により β シート構造に変化することより、銅イオン存在下での検討を行う必要がある。
 - ③ 現在、hPrP-FP の添加による SH-SY5Y 細胞への影響に関して暴露時間や濃度の詳細な検討を行うとともに、hPrP-FP の凝集体の細胞内取り込みに関して検討を行っている。これらの検討が終了した後、iPS 細胞を用いた検討を行う予定である。
 - ④ C-末端側のフラグメントペプチドは銅イオンや pH により立体構造が変化するので、NMR 測定条件をかえて測定する必要がある。そのため、立体構造解析には時間を要することが予想されるが、凝集メカニズムの解析には必須であり、詳細な検討を行う予定である。
 - ⑤ 当初の研究計画ではフラグメントペプチドの合成・精製だけを行う予定であったが、金属結合性と立体構造変化の検討まで進むことができた。今後、プリオンタンパク質研究と同じ方法を用いて、SOD1 および α -Syn の凝集の核となる領域の同定を行う予定である。

5. 研究発表

- (1) 学会誌等
Aya Kojima, Yuko Sakaguchi, Hidenao Toyoda, Masanari Taniguchi, Motomi Konishi, and Toshifumi Akizawa, C-terminal Region of the hPrP Can Be the Core for the Structure Conversion and Aggregation, *Peptide Science* 2015, 217-220 (2016)
- (2) 口頭発表
小嶋絢、坂口裕子、永井裕子、豊田英尚、谷口将済、小西元美、秋澤俊史、合成フラグメントペプチドを用いたヒトプリオンタンパク質 (PrP) C-末端領域の性質解析、第28回バイオメディカル分析科学シンポジウム (BMAS2015)、2015年8月21日~22日 (長崎大学)
- (3) 出版物
なし