

学 校 名	北 里 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	iPS細胞を用いた遺伝性パーキンソン病の創薬研究 ーiPS細胞移植によるin vivoモデルの病態解析ー		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①パーキンソン病 ②iPS細胞 ③LRRK2 ④ゲノム編集 ⑤神経幹細胞移植 ⑥免疫不全マウス ⑦PD病態モデル ⑧創薬研究			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
太 田 悦 朗	医 療 衛 生 学 部	講 師	研究代表者総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
永 井 真 貴 子	医 学 部	講 師	実験・論文作成・データ整理
江 島 耕 二	医 学 部	准 教 授	実験・データ整理

iPS細胞を用いた遺伝性パーキンソン病の創薬研究 — iPS細胞移植による *in vivo*モデルの病態解析—

1. 研究の目的

(1) 優性遺伝パーキンソン病 (PD) の原因分子LRRK2に変異をもつ患者は、臨床症状や発症年齢が孤発性PD患者と類似した特徴を示す。そのため、LRRK2に起因した病態の解析は、孤発性PDの発症機序解明の鍵となる。申請者は、日本の優性遺伝PD家系 (相模原家系) のI2020T変異LRRK2をもつPD患者2名からiPS細胞 (LRRK2-iPSC) を樹立し、解析を進めてきた。その結果、LRRK2-iPSC由来神経細胞を用いて、患者脳内における病態を再現し、ドーパミン放出異常やリン酸化タウの増加などPD発症メカニズムの一端を明らかにした。そこで本研究は、PDのさらなる病態解明を目指し、iPSC由来神経幹細胞移植マウスにおける *in vivo*のPD病態モデルの作製および遺伝子修復iPSCの樹立と創薬研究を展開する。

2. 研究の計画

(1) iPSC由来神経幹細胞 (iPSC-NS) 移植マウスにおける *in vivo* PD病態モデルの作製

①使用するiPSCは、慶應義塾大学との共同研究で樹立のI2020T変異LRRK2をもつ相模原家系内PD患者2名のiPSC 2株と健常者2名のiPSC 2株を用いる。分化誘導法は、iPSCから胚様細胞塊を介して神経幹細胞塊を形成させ、神経細胞に分化誘導する。また、低分子化合物を用いた神経細胞への分化誘導法も検討する。

②iPSC-NS移植の予備実験は、8週齢のC57BL/6マウスを麻酔下で定位脳手術装置に固定し切開後、マイクロシリンジを用いて片側線条体にPD患者iPSC-NS (4×10^5 cells/4 μ L) を移植する。その後、本実験として、8週齢の免疫不全マウス (SCIDマウス) の片側線条体にiPSC-NSを移植する。

③移植マウスにおける運動機能および行動異常を調べるために、シリンダーテスト、飲水量や摂食量の測定を行う。

④移植マウスにおけるiPSC-NSの生着および分化を評価するため、脳を灌流固定後、凍結切片を作製してHE染色および免疫組織化学染色を行う。

(2) 遺伝子修復iPSCの樹立および薬剤スクリーニングによる神経保護効果薬の探索

①TALENを用いたゲノム編集によってLRRK2-iPSCにおけるI2020T変異を遺伝子修復する。

②多能性マーカー発現および正常な染色体核型解析などのcharacterizationを行って、遺伝子修復したPD患者iPSC (TALEN-iPSC) を樹立する。

③LRRK2-iPSCとTALEN-iPSCから分化誘導させた各神経細胞を用いて、神経突起長や酸化ストレス抵抗性について解析を行う。

3. 研究の成果

(1) iPSC由来神経幹細胞 (iPSC-NS) 移植マウスにおける *in vivo* PD病態モデルの作製

①胚様細胞塊を介した神経細胞への分化誘導においては、神経前駆細胞やグリア前駆細胞が含まれるため、分化させた細胞を免疫細胞化学染色で評価した。その結果、80%以上が神経細胞 (そのうち約7%がドーパミン作動性神経細胞) で、約5%がアストロサイトであることを確認した。また、低分子化合物を用いた神経細胞への分化誘導においては、60%以上が神経細胞であり、そのうち約20%がドーパミン作動性神経細胞であった。

②移植後7日のC57BL/6マウス脳を灌流固定後、凍結切片を作製してHE染色を行った結果、iPSC-NS移植側の線条体では、神経細胞様の形態を示す細胞が複数みられ、移植細胞の正着を確認した。また、Iba1抗体による免疫組織化学染色を行った結果、短期移植のマウスミクログリアでは、非移植側に比べ、形態学的な変化や細胞数に差異がみられなかった。

③移植後3、16、20、30、36、51、77、95、120日のPD患者iPSC-NS移植SCIDマウスと injectionコントロールSCIDマウスにおける運動機能をシリンダーテストで解析した結果、51日以降において差異が生じ始める傾向を確認した。また、移植後における飲水量および摂食量を測定した結果、移植後76日以降のPD患者iPSC-NS移植SCIDマウス群において共に低下する傾向がみられた。

④移植後213日のPD患者iPSC-NS移植SCIDマウスにおいて、ヒト細胞質特異的抗体 (Stem121抗体) とヒト核特異的抗体 (Stem101抗体) を用いて免疫組織化学染色を行った結果、PD患者iPSC由来の移植細胞の正着を確認した。さらに、ヒトGFAP特異的抗体 (Stem123抗体) 陽性のアストロサイトへの分化生着も確認した。また、移植側のマウス由来ミクログリアでは、非移植側に比べ、形態学的な変化がみられる部位が確認された。

(2) 遺伝子修復iPSCの樹立および薬剤スクリーニングによる神経保護効果薬の探索

①TALENによるゲノム編集によって遺伝子修復したiPSC (TALEN-iPSC) を樹立し、多能性マーカーの発現および正常な染色体核型を確認した。

②低分子化合物を用いてiPSC-NSを介して神経細胞に分化させ、分化誘導効率を調べた結果、70%以上が神経細胞であり、そのうちドーパミン作動性神経細胞が15-20%程度であった。

③神経突起長について解析を行った結果、TALEN-iPSC由来神経細胞および健常者iPSC由来神経細胞に比べ、PD患者iPSC由来神経細胞の神経突起長は短いことがわかった。また、酸化ストレスに対する脆弱性について解析を行った結果、TALEN-iPSC由来神経細胞の酸化ストレスに対する脆弱性は、健常者iPSC由来神経細胞と同程度であり、PD患者iPSC由来神経細胞では、酸化ストレスに対する脆弱性が亢進していた。

4. 研究の反省・考察

(1) iPSC由来神経幹細胞 (iPSC-NS) 移植マウスにおける *in vivo* PD病態モデルの作製

①C57BL/6マウスを用いて、iPSC-NS移植部位の選定、HEおよび免疫組織化学染色、行動実験に関する条件検討を行った。この予備実験を通して、本実験であるiPSC-NS移植SCIDマウスの作製を円滑に進めることができた。

②移植後76日以降のPD患者iPSC-NS移植SCIDマウス群では、injectionコントロールSCIDマウスに比べ、飲水量および摂食量の低下が疑われたが、今後再現実験を行う必要がある。

③シリンダーテストにおいて、移植後76日以降で両群に差異が生じ始める傾向を確認したため、現在、ビームテストやオープンフィールドテストなどの行動解析を進めている。また、行動実験を評価する上で、injectionコントロールSCIDマウスではなく、健常者iPSC-NS移植SCIDマウスを作製し、病態解析を行う必要がある。

④移植後213日のPD患者iPSC-NS移植SCIDマウスにおいて、ヒト由来移植細胞の正着を確認し、非移植側に比べ、移植側のマウス由来ミクログリアの活性化を予測する形態学的な変化を見出したため、詳細な解析が必要である。また今後、移植後分化した神経細胞およびアストロサイトが、マウス脳内の既存の神経細胞およびアストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリアを含めた脳内環境に神経炎症を惹起するかどうかを調べる予定である。

(2) 遺伝子修復iPSCの樹立および薬剤スクリーニングによる神経保護効果薬の探索

①多能性マーカーの発現および正常な染色体核型を示したことから、遺伝子修復したiPSC (TALEN-iPSC) が樹立できた。しかし、全ゲノム解析とオフターゲットの有無について、詳細な解析を行う必要がある。

②樹立したTALEN-iPSCから低分子化合物を用いて神経細胞へと分化させた結果、高効率で神経細胞になり、分化誘導効率は、PD患者iPSCと比べて差異はみられなかった。また、病態解析を行った結果、PD患者iPSC由来神経細胞でみられた神経突起の異常短縮や酸化ストレスに対する細胞脆弱性が、TALEN-iPSC由来神経細胞では、健常者iPSC由来神経細胞と同程度まで回復することを確認した。今回、TALEN-iPSC由来神経細胞が健常者と同じ正常な表現型を示したことは、病態解析のコントロールだけでなく、将来的に細胞治療にも応用できる可能性

を示している。また現在、TALEN-iPSC由来神経細胞とPD患者iPSC由来神経細胞を用いて、薬剤スクリーニングによる神経保護効果薬の探索を進めている。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

①Kubo M, Nagashima R, Ohta E, Maekawa T, Isobe Y, Kurihara M, Eshima K, Iwabuchi K, Sasaoka T, Azuma S, Melrose HL, Farrer MJ, Obata F. Leucine-rich repeat kinase 2 is a regulator of B cell function, affecting homeostasis, BCR signaling, IgA production, and TI antigen responses. J Neuroimmunol., 292, 1-8, 2016

②Tominaga N, Iizuka T, Kaneko J, Nagai M, Hara A, Onozawa Y, Kanazawa N, Nishiyama K. Autoimmune brachial amyotrophic diplegia and sensory neuronopathy with Sjögren's syndrome: A case report. J Neurol Sci., 368, 1-3. 2016

③太田悦朗、曾根岳史、大日方友理、鵜飼英樹、久松知子、北川季子、石川充、駒野肇、上田泰己、小幡文弥、岡野栄之「遺伝性パーキンソン病患者由来iPS細胞におけるゲノム編集iPS細胞の樹立」第16回日本再生医療学会総会、2017年3月

④Hoshino K, Hayashi M, Isono Y, Nagao Y, Kimura K, Hachimori K, Nozaki H, Ohta E, Obata F, Kawarai T, Kaji K. Segawa disease with action retrocollis (cervical dystonia); A case report of 23-year-old female. 14th International Child Neurology Congress, 2016.5

⑤大日方友理、太田悦朗、曾根岳史、鵜飼英樹、久松知子、石川充、駒野肇、上田泰己、小幡文弥、岡野栄之「遺伝性パーキンソン病患者由来iPS細胞のゲノム編集および病態解析」第11回日本臨床検査学教育学会学術大会、2016年8月

⑥太田悦朗、曾根岳史、大日方友理、鵜飼英樹、久松知子、北川季子、石川充、駒野肇、上田泰己、小幡文弥、岡野栄之「遺伝性パーキンソン病患者由来iPS細胞におけるゲノム編集iPS細胞の樹立」第39回日本神経科学大会、2016年7月

(2) 口頭発表

①太田悦朗、曾根岳史、大日方友理、鵜飼英樹、久松知子、北川季子、石川充、駒野肇、上田泰己、小幡文弥、岡野栄之「遺伝性パーキンソン病患者由来iPS細胞におけるゲノム編集iPS細胞の樹立」第16回日本再生医療学会総会、2017年3月

②大日方友理、太田悦朗、曾根岳史、鵜飼英樹、久松知子、石川充、駒野肇、上田泰己、小幡文弥、岡野栄之「遺伝性パーキンソン病患者由来iPS細胞のゲノム編集および病態解析」第11回日本臨床検査学教育学会学術大会、2016年8月

(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 －内耳イオン環境と聴覚神経の変性・回復機構－		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+チャンネル 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

(1) 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)。本研究では蝸牛内リンパ液維持機構とその破綻による遺伝性難聴の分子病態を様々な薬理活性物質を用いて解明し、これらの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。

2. 研究の計画

(1) 蝸牛イオン輸送経路の修復による蝸牛内リンパ液恒常性の回復

以下の材料・方法により蝸牛リンパ液恒常性の回復に標的を絞った新たな難聴治療法を開発する。【遺伝子改変難聴モデル動物および薬剤スクリーニング用モデル細胞】Cx26-Tgマウス (Kudo, *Hum. Mol. Genet.*, 2003) Cx26-KOマウス (Kamiya, *J. Clin. Invest.*, 2014) 【選抜した薬剤の内耳局所治療による聴力回復】蝸牛ギャップ結合形成細胞を用いて選抜した薬理活性化化合物を様々な条件で遺伝子改変難聴モデル動物の内耳へ投与し、聴力をモニタリングする。これにより安全で有効性の高い化合物を更に選抜する。必要であればこれらの効果を補足するため、アデノ随伴ウイルスでのCx26遺伝子治療や細胞治療との混合治療の検討を行う。

3. 研究の成果

(1) 本研究ではGJB2変異型遺伝性難聴の発症機構を患者細胞にて再現する難聴モデル細胞を薬剤スクリーニングに応用することを目的とし、難聴モデル動物由来induced pluripotent stem (iPS) 細胞からの分化誘導を試みた。まず、正常マウスiPS細胞から外胚葉、非神経外胚葉への分化誘導を行い、蝸牛様CX26ギャップ結合プラークの形成能を持つ細胞の作製法を選抜した。さらにCx26欠損難聴モデルマウスの蝸牛線維細胞からiPS細胞の樹立した。これらのiPS細胞から内耳細胞への分化誘導を行い、GJB2変異型遺伝性難聴の疾患モデル細胞を作製することに成功した (Fukunaga, *Stem Cell Reports*, 2016, 7(6), 1023–1036)。Cx26欠損難聴モデルマウスにおいて見られるGJB2崩壊の分子病態はCx26欠損難聴モデルマウスのiPS細胞から分化誘導した内耳細胞においても再現することが可能であった。

4. 研究の反省・考察

(1) 上記のように遺伝子改変難聴モデルマウスから難聴疾患モデル細胞を開発することに成功したが、この開発に時間と労力を費やしたことにより、疾患モデル細胞を用いて薬剤を選抜す

るには至らなかった。しかし、上記のGJB2変異型遺伝性難聴の疾患モデル細胞は、蝸牛における難聴の発症機構を再現することを可能とし、これにより患者由来内耳細胞を用いた大量の薬剤スクリーニングが可能となることが考えられる。これらの成果は遺伝性難聴の創薬や再生医療の開発へ活用されることが大いに期待できる。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①福永一朗, 藤本あゆみ, 畠山佳欧里, 青木徹, 西川貴菜, 美野輪治, 池田勝久, 神谷和作.
マウスiPS細胞からコネキシン26陽性細胞への分化誘導とギャップジャンクションプラークの形成.
耳鼻咽喉科ニューロサイエンス 30, 11-12
- ②福永一朗, 池田勝久, 神谷和作.
iPS細胞からコネキシン26発現細胞への分化誘導とギャップ結合プラークの構築.
Otology Japan 26, 298
- ③福永一朗, 青木徹, 池田勝久, 神谷和作.
iPS細胞からConnexin26(Cx26)発現細胞および細胞間ギャップ結合プラーク構築細胞への分化誘導.
日本耳鼻咽喉科学会会報 119, 534
- ④神谷和作, 飯塚崇, 福永一朗, 青木徹, 安齋崇, 池田勝久.
GJB2変異遺伝性難聴の分子病態解析と新規治療法の開発.
日本耳鼻咽喉科学会会報 119, 534
- ⑤神谷和作, 池田勝久.
GJB2変異型遺伝性難聴への細胞治療法・遺伝子治療法の開発.
Audiology Japan 59, 607-608
- ⑥安齋崇, 池田勝久, 神谷和作.
コネキシン26欠損モデルマウスにおける外有毛細胞の変形とカベオリン2の集簇.
日本耳鼻咽喉科学会会報 119, 614

(2) 口頭発表

- ①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 大阪市、2016年3月17日
- ②Kazusaku Kamiya.
Genetics in otology, Molecular pathology of cochlear gap junction in GJB2 associated hearing loss.
10th International Conference on Cholesteatoma and Ear Surgery
英国・エジンバラ 2016年6月8日(招待講演)
- ③Katsuhisa Ikeda.
Virus induction therapy for GJB2 abnormality animal.
10th International Conference on Cholesteatoma and Ear Surgery
英国・エジンバラ 2016年6月8日(招待講演)
- ④Fukunaga I, Iizuka T, Hatakeyama K, Fujimoto A, Minowa O, Ikeda K, Kamiya K.
Gene therapy and cell therapy targeting cochlear gap junction formation for GJB2 associated hearing loss.
Inner Ear Biology 53rd Workshop フランス・モンペリエ 2016年9月20日
- ⑤神谷和作, 池田勝久
GJB2 変異型遺伝性難聴への細胞治療法・遺伝子治療法の開発

第61回日本聴覚医学会総会 岩手県盛岡市、2016年10月21日

(3) 出版物

① Fukunaga, I., Fujimoto, A., Hatakeyama, K., Aoki, T., Nishikawa, A., Noda, T., Minowa, O., Kurebayashi, N., Ikeda, K., and Kamiya, K.
In Vitro Models of GJB2-Related Hearing Loss Recapitulate Ca²⁺ Transients via a Gap Junction Characteristic of Developing Cochlea.
Stem cell reports 2016, 7, 1023-1036

学 校 名	昭 和 薬 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	YAPシグナル制御に基づく分子標的抗がん剤開発の 基盤研究		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	① YAP ② 中皮腫 ③ SNIPER ④ IAP ⑤ プロテインノックダウン ⑥ TMEPAI ⑦ TGF- β シグナル			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
伊 東 進	薬 学 部	教 授	研究総括、TMEPAIに関する研究

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
岡 本 巖	薬 学 部	教 授	化合物合成ルートの検討・合成
山 崎 龍	薬 学 部	准 教 授	新規化合物のデザイン・合成
伊 藤 愛	薬 学 部	助 教	化合物合成ルートの検討・合成
中 野 なおこ	薬 学 部	助 教	YAP阻害剤及びSNIPERを用いたin vitro及び in vivo実験
内 藤 幹 彦	国立医薬品食品衛生研究所	部 長	SNIPER合成展開時のモデル化合物・リード化合物の提供、SNIPER合成技術提供

YAPシグナル制御に基づく分子標的抗がん剤開発の基盤研究

1. 研究の目的

本研究では、様々な腫瘍で恒常的に活性化されている転写コアクチベーターYAPの活性を阻害することで腫瘍進展を抑制することを目的としている。その方法として、申請者らが単離し、その機能解析を世界に先駆けて行ってきたTGF- β シグナル抑制分子であるTMEPAIファミリー (TMEPAIとC18orf1)がYAPの活性を抑制する結果を得たことに基づいて(図1)、下記(1)~(4)の研究課題を行った。

(1) TMEPAIファミリーによるYAP抑制メカニズムの解明

YAPの恒常的活性化が高頻度で認められる悪性中皮腫でYAPシグナルとTGF- β シグナルが協調してがんを悪性化することが報告されている。すでに申請者らが精力的に解析を進めているTMEPAIファミリーがYAPの活性を抑制する基礎データを得たので、TMEPAIファミリーがYAPシグナルとTGF- β シグナルを共に抑制し、悪性中皮腫の進展を抑制する可能性があるかと推測し(図2)、その分子メカニズムの解明を試みた。

(2) YAP阻害剤の探究と分子標的薬の合成展開

YAPは中皮腫以外の様々ながんでも恒常的に活性化されているので、YAPの活性抑制は、がん征圧に繋がる可能性を秘めている。そこで、YAPを標的としたリード化合物の探究及び合成展開を目指した。すでに申請者らは、2万を超える化合物ライブラリースクリーニングでYAP結合化合物を約30種類同定している。これらの化合物の中にYAP活性を阻害する化合物を見出すことを目的とした。加えて、他の化合物ライブラリーの網羅的スクリーニングを展開した。

(3) YAPを標的としたSNIPER(Specific Non-genetic IAP dependent Protein ERaser)法による分子標的薬の合成展開

申請者らは、SNIPER法と呼ばれる新規概念に基づいた低分子化合物を合成し、YAPタンパク質の発現を抑制することで抗腫瘍活性を持つ分子標的薬の基盤研究を進めるために以下の研究を展開した。SNIPER法とは、E3ユビキチンリガーゼcIAP1に結合する化合物BS (Bestatin-methyl ester)に標的タンパク質に高親和性を持った低分子化合物Xを共有結合した化合物(SNIPER)であり、このSNIPERにより、目的タンパク質を強制的にユビキチン化し、分解する方法(図3)である。すでにYAPに結合する化合物を見出しているので、BSと共有結合が可能かつYAPと高親和性のSNIPER候補化合物を見出すことを目的とした。

(4) 新たなSNIPERに利用できるE3ユビキチンリガーゼの同定

他のE3ユビキチンリガーゼに結合する低分子化合物を化合物ライブラリーで探索し、効率よく標的分子を分解できるSNIPERの開発を目的とした。

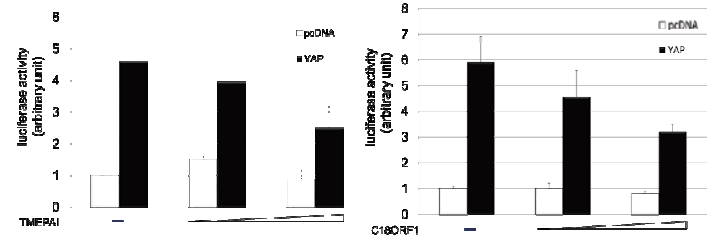


図1 TMEPAIファミリーは、YAPによるレポーターの活性化を抑制する

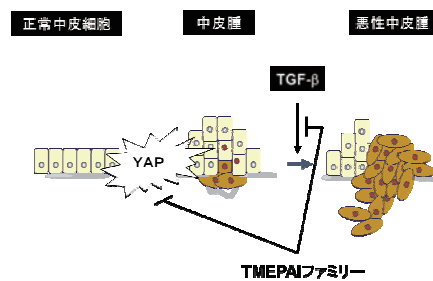


図2 悪性中皮腫におけるYAP、TGF- β シグナル:悪性中皮腫では恒常的にYAPシグナルが活性化されており、加えてTGF- β シグナルが細胞増殖促進に働く。TMEPAIファミリーは両シグナルを抑制し、がん進展を阻害する分子となる。

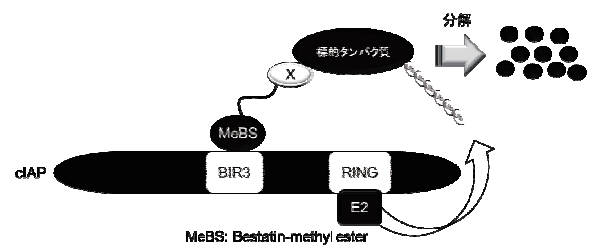


図3 SNIPERによる標的タンパク質分解: MeBSと化合物Xを共有結合した新規化合物を合成し、cIAPを標的タンパク質の近傍に寄せることにより、ポリユビキチン化し、分解する。

2. 研究の計画

(1) TMENPAIファミリーによるYAP抑制メカニズムの解明

- ① TMENPAIファミリーがYAPと直接結合して機能を抑制するか、それともYAPの機能を抑制するHippoシグナル系を活性化することにより抑制するかをルシフェラーゼアッセイ、免疫沈降法、ウェスタンブロット法で確認することを計画した。
- ② 申請者らは、中皮腫細胞株を所有しているため、TMENPAIファミリーを高発現及びsiRNAまたはCrisper/Cas9システムによりノックダウンさせることにより、中皮腫の悪性度が変化することをin vitro腫瘍形成実験及びin vivoゼノグラフトモデルで確認することを計画した。

(2) YAP阻害剤の探究と分子標的薬の合成展開

- ① 約30種類存在するYAP結合化合物がYAPシグナルを抑制することをルシフェラーゼアッセイ並びにYAPによって誘導される遺伝子発現で確認した。
- ② ①においてYAP阻害活性の強い化合物Aを用いて、中皮腫細胞でin vitro細胞増殖抑制実験、in vivoゼノグラフトモデルを行った。
- ③ ②と同時に、本学天然物化学研究室が所有する化合物ライブラリーを用いて、ピアコアによるハイスループットスクリーニング(HTS)を行い、YAPに結合する化合物を選別した。

(3) YAPを標的としたSNIPER法による分子標的薬の合成展開

- ① ピアコアを用いて、すでにYAPと結合することが認められている約30種類の化合物の中から高親和性で結合する化合物を見出すことを計画した。
- ② ①の中で見出した高親和性化合物Bをリード化合物として、さらにYAPに対して高親和性を有する化合物の合成を試みた。

(4) 新たなSNIPERに利用できるE3ユビキチンリガーゼの同定

- ① E3ユビキチンリガーゼの中で、ユビキタスに発現している分子を分類する目的で、各種中皮腫細胞から全RNAの調製を行った。

3. 研究の成果

(1) TMENPAIファミリーによるYAP抑制メカニズムの解明

- ① TMENPAIファミリーのC18ORF1を用いてYAPとの結合領域を検討したところ、C18ORF1のPYモチーフを介して結合していることを明らかにした(図4)。加えて結合領域を欠損した変異体(C18ORF1 Δ PY)はYAPシグナルを抑制できなかった(図5)。さらにC18ORF1がYAPタンパク質の不安定化に関与している可能性を見出した(図6)。

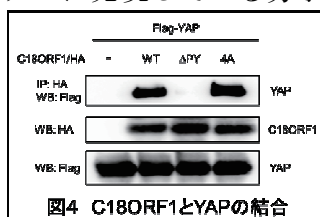


図4 C18ORF1とYAPの結合

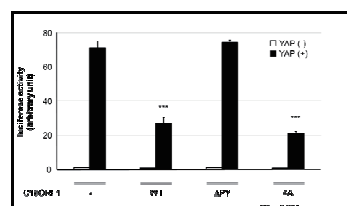


図5 C18ORF1によるYAPシグナル抑制
C18ORF1 Δ PYは、抑制活性を有しない

- ② 中皮腫細胞を用いて、TMENPAIファミリーノックダウン細胞をCrisper/Cas9システムにより樹立することを試みたが、現在まで有望なノックダウン細胞の樹立に成功していない。

(2) YAP阻害剤の探究と分子標的薬の合成展開

- ① YAPに結合することを見出した化合物AがYAPシグナルを抑制すること(図7)並びに中皮腫細胞の増殖を抑制する(図8)ことを見出した。
- ② ルシフェラーゼ遺伝子を導入した中皮腫細胞をヌードマウス胸腔内に移植後、化合物Aを週1回腹腔内投与を行い、経時的に腫瘍の大きさを測定したところ、綿実油を投与したマ

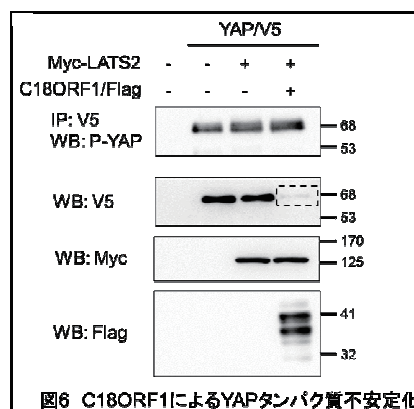


図6 C18ORF1によるYAPタンパク質不安定化

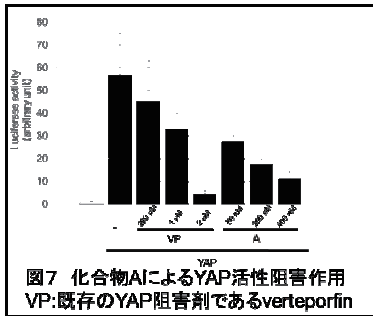


図7 化合物AによるYAP活性阻害作用
VP:既存のYAP阻害剤であるverteporfin

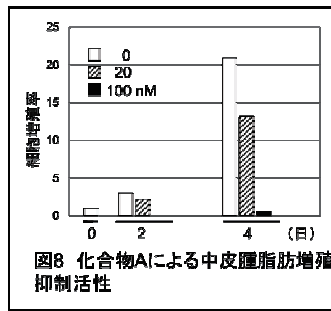


図8 化合物Aによる中皮腫脂肪増殖抑制活性

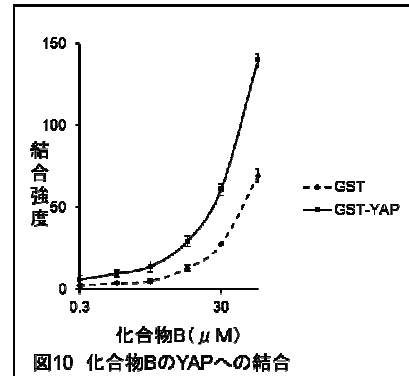


図10 化合物BのYAPへの結合

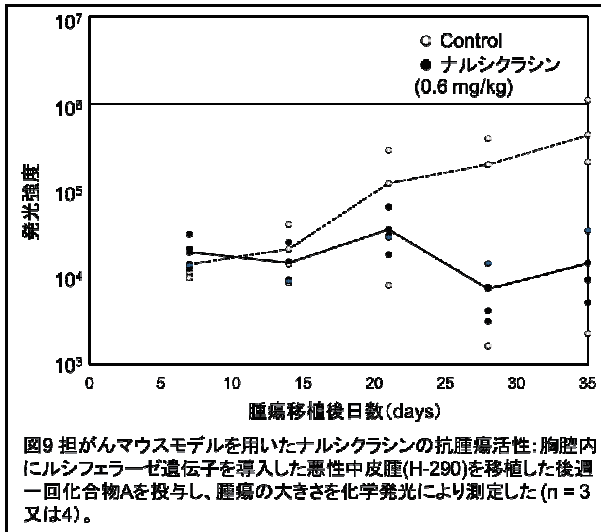


図9 担がんマウスモデルを用いたナルシクラシンの抗腫瘍活性: 胸腔内にルシフェラーゼ遺伝子を導入した悪性中皮腫(H-290)を移植した後週一回化合物Aを投与し、腫瘍の大きさを化学発光により測定した(n = 3又は4)。

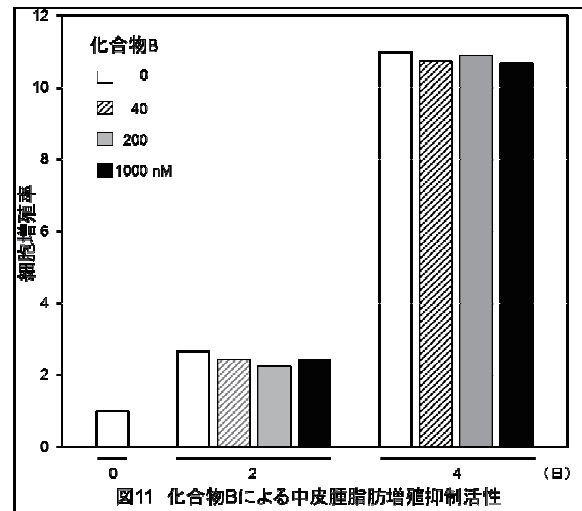


図11 化合物Bによる中皮腫脂肪増殖抑制活性

ウスに比較し、腫瘍増殖が抑制された(図9)。

③ 本学天然物化学研究室が所有する化合物ライブラリーを用いて、YAPに結合する化合物の探索をピアコアで行っているが、現在まで有望な化合物を見出すことができていない。

(3) YAPを標的としたSNIPER法による分子標的薬の合成展開

① 化合物BはYAPに対する結合能が高いが、中皮腫細胞増殖抑制が弱かった(図10、11)のでSNIPERのリード化合物として利用することにした。

② 化合物Bをリード化合物として、いくつかの化合物合成を行った。

(4) 新たなSNIPERに利用できるE3ユビキチンリガーゼの同定

① 中皮腫に発現しているE3ユビキチンリガーゼをRNAレベルで調べるために、全RNAをいくつかの中皮腫から調製したが、確認まで至らなかった。

4. 研究の反省・考察

(1) TMPEAIファミリーによるYAP抑制メカニズムの解明

① TMPEAIファミリーがPYモチーフを介してYAPタンパク質を不安定化することによりYAPシグナルを抑制していることを見出した。

② 中皮腫細胞でTMPEAIファミリーの発現を抑制した細胞株を樹立することができなかった。細胞の樹立は本プロジェクトに必要な不可欠であるので次年度さらに精力的に取り組む、in vivoでの作用を明らかにする。

(2) YAP阻害剤の探究と分子標的薬の合成展開

① 化合物AがYAP阻害剤として見出すことができ、さらにin vivoで中皮腫細胞増殖を抑制することができた。今後は化合物AのYAP阻害機構の分子メカニズムの解明を行う。

(3) YAPを標的としたSNIPER法による分子標的薬の合成展開

① 化合物BがYAPのリガンドのリード化合物になることを見出したので、さらに高親和性リガ

ンドの合成を行った。

- ② 今後は合成した化合物の中で高親和性リガンドを見出し、それを用いてSNIPER化合物合成を行う。

(4) 新たなSNIPERに利用できるE3ユビキチンリガーゼの同定

- ① (1)～(3)の研究課題を中心に行ったため、本プロジェクトを進めることが殆どできなかった。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

- ① 転写因子YAPを標的としたプロテインノックダウン法の確立 中野なおこ、服部隆行、内藤幹彦、伊東進 第75回日本癌学会学術総会 横浜 (パシフィコ横浜)

(3) 出版物

なし

学 校 名	聖 路 加 国 際 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	世代間交流看護ベストプラクティスのための支援ガイドの創生		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①世代間交流 ②地域看護 ③生涯発達看護 ④ベストプラクティス			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
亀 井 智 子	大学院看護学研究科	教 授	研究の統括・文献検討・支援ガイドの編集、論文作成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
川 上 千 春	大学院看護学研究科	准 教 授	文献検討・データ収集・支援ガイド分担作成、論文作成
金 盛 琢 也	大学院看護学研究科	助 教	文献検討・データ収集・支援ガイド分担作成、論文作成
桑 原 良 子	大学院看護学研究科	助 教	文献検討・データ収集・支援ガイド分担作成、論文作成
目 黒 齊 実	大学院看護学研究科	助 教	文献検討・データ収集・支援ガイド分担作成、論文作成
山 本 由 子	武蔵野大学人間科学部	准 教 授	文献検討・データ収集・支援ガイド分担作成、論文作成

世代間交流看護ベストプラクティスのための支援ガイドの創生

1. 研究の目的

看護の実践現場における「ベストプラクティス」は、ある結果を得るための最も効率の良いプロセスや、そのための活動のことをさしている。そのためには、対象者のニーズを明確化し、エビデンスに基づいて看護職が直接的な解決策を提供することであり、最善策を検討する必要がある。

世代間交流を取り入れた看護支援は、高齢者看護や地域看護の中では新しい領域であるが、超少子・高齢社会となったわが国において、持続可能なプログラム開発が望まれており、地域のニーズに応じたベストプラクティスのための知見を集積している段階であるといえる。

本研究の目的は、市民主導型の世代間交流看護支援に関するベストプラクティスについて具体的要素を示し、それにもとづく支援ガイドを創生することである。

2. 研究の計画

(1) 世代間交流実践にもとづく「世代間交流看護支援のベストプラクティス」の要素の抽出

以下①～③の対象者からそれぞれデータを収集し、高齢者と子ども(小学生)の間の世代間交流量、および利用者の交流満足度、世代間交流プログラムを運営するボランティアと主催者の支援内容を収集・分析し、ベストプラクティスの要素を明確化する。

① 世代間交流プログラム利用者

本学内で毎週開催している世代間交流プログラムを研究フィールドとし、そこに参加した高齢者と子ども(小学生)の間に生じる世代間交流の内容、交流の様子について、聖路加式世代間交流観察尺度(SIEROインベントリー)を用いて観察・評価する。また、各回のプログラム終了時に利用者によるプログラム参加満足度を0(とても不満)～10(とても満足)のvisual analog scale(VAS)-10により収集する。

② ボランティア

プログラム終了時にインタビューを行い、世代間交流プログラムの内容や最良と考えるプログラム運営等について意見を収集し、分析する。

③ 支援者

世代間交流プログラムの主催者について、高齢者と子どもとのコミュニケーションの特徴、および会の前後のミーティングの内容を分析し、最良の世代間交流のプログラムの内容とその時に行われていた支援方法について分析する。

(2) 先行研究からの「世代間交流看護支援のベストプラクティス」の要素の分析

医中誌webおよびCINAHL Plus with Full Textを用いて、世代間交流看護に関する国内外の関連文献を検索・収集し、世代間交流支援のベストプラクティスとは何か、ベストプラクティスの構成要素などをレビューし、要素を明確化する。

(3) 世代間交流看護支援ベストプラクティスのための支援ガイドの創生

(1)(2)で明確化したベストプラクティスの要素に基づき「世代間交流看護支援ベストプラクティスのための支援ガイド」原案を作成する。このガイドでは、世代間交流プログラムの利用者(高齢者、子ども)、ボランティアからのプログラム参加による感想文を加え、市民主導による世代間交流プログラムを運営する際の手引きとなる支援ガイドとして完成する。

3. 研究の成果

(1) 世代間交流実践にもとづく「世代間交流看護支援のベストプラクティス」の要素

プログラムは年間35回開催され、全ての回をSIEROインベントリーを用いて観察し、各回

終了時には、利用者の参加満足度を収集した。

① 利用者の特性

高齢者は全て女性で、年齢平均79.9±5.8歳、一般高齢者5名、虚弱高齢者9名、認知症高齢者2名であった。利用期間は平均5.0±2.6年であった。小学生は女子7名、年齢平均8.0±0.8歳、参加期間は平均5.1±1.8年であった。

② 交流プログラムの内容

行われた交流プログラムは、ちぎり絵などの共同制作、歌、回想法、話し合い、朗読、書道、体操、おやつ作り、ゲーム、季節の行事、ミニ映画鑑賞、アロマケア、共におやつを食べるであった。

③ プログラム別の満足度および世代間交流量の評価

全ての回の参加満足度(VAS-10)は平均9.2であった。高齢者・子どもの両世代の満足度が高かったプログラムは、アロマハンドケア、話し合い、歌、体操、おやつ作りなどの会話や身体活動、ふれあいを取り入れた内容であった。

プログラム別のSIEROインベントリーを用いた世代間交流量は、アロマケア、おやつ作り、ゲームなどで多かった。

④ 実践から示されたベストプラクティスの要素

高齢者と子どもの交流量や参加満足度が高いプログラムに含まれる共通した要素として「高齢者と子ども両世代の関心事を取り入れる」「教え-教えられる」「自然な双方向的コミュニケーションの成立」「高齢者と子ども両世代の協力や助け合いによる共同・連帯感」「成果などを喜びあう」という、互惠性、および世代継承性、コミュニケーションを含むものであることが示された。

⑤ 主催者、および支援ボランティアによる支援内容

高齢者と子どもの交流が促進されるよう、好みの活動をプログラムとして取り入れる、子どもの特技を披露してもらい、テーブルや座席の配置を十分検討する、事故予防など心地よい場を作ることに主眼をおいたものであった。また、高齢者に対しては、身体機能や認知機能などに応じて子どもに関心が向けられるよう支援し、子どもに対しては、プログラムを通じて高齢者との会話を橋渡しするなど、両者の特徴やペースに応じてコミュニケーションをつなぐ支援をタイムリーに実施していた。さらに認知症高齢者の家族には、参加中の様子などを伝え、会に安心して参加し続けられるよう支援していた。

(2) 文献検索とレビューの結果

医中誌webから「世代間交流」and「原著」で検索し、計30和文献、CINAHL Plus with Full Textからは同様の検索用語で7英文献が検索された。各文献からベストプラクティスの要素を抽出した結果「孤立している一人一人をつなぐ」「各自のコンフォートゾーンを侵さない」「自然な関係性を構築する」「家族支援として家族にも利益となることを考える」「相互の理解」「世代継承性の増加」「身体・心理・社会的well-being」「人間関係の広がり」「地域共生」「パートナーシップを築く」の要素が抽出できた。

(3) 世代間交流看護支援ベストプラクティスのための支援ガイドの創生

前述の世代間交流プログラムにおける調査、および文献レビューの結果を統合し、世代間交流看護支援のベストプラクティスの要素を抽出した。それらは、<心身の健康状態を観察する><参加者の好みの活動を取り入れる><自然なコミュニケーションを促進する><高齢者と子どもの一人ひとりの特性に配慮する><高齢者と子どもの特技や強みを引き出す><高齢者と子ども間の互惠性を引き出す><世代継承性を狙う><心地良い空間を創る><高齢者と子どもの関係づくりを支える><参加者が満足できるかを考える><認知症高齢者の家族に参加中の様子を伝える>が挙げられた。これらに基づき、世代間交流支援ガイドとして「地域における世代間交流ベストプラクティスハンドブック」を編集し、冊子を刊行した。

4. 研究の反省・考察

(1) 高齢者と子どもの交流を促進する世代間交流看護支援のベストプラクティス

高齢者・子どもの両世代において満足度が高い交流活動として、アロマケア、話し合い、歌、体操、おやつ作りなどが挙げられた。これらのプログラムでは、参加者の好みの活動を取り入れることや、高齢者と子どもの自然なコミュニケーションを促進すること、互恵性・世代継承性が引き出されるなどの要素が含まれていた。一方、虚弱高齢者や認知症高齢者ではこれらの交流活動においても、子どもに関心が向くことが少なく、交流頻度が少なかった。そのため多様な高齢者が利用する世代間交流プログラムでは、高齢者と子どもの一人ひとりの特性に配慮することも重要な要素であると考えられた。また両世代の自然なコミュニケーションを促進する上では、高齢者・子どもにとって心地良い空間を創ることや、高齢者と子どもの関係づくりを支える支援が必要であった。

世代間交流は、両世代のニーズに合致した安心できる場や、豊かなプログラム内容の提供により、両世代がパートナーシップの構築を通して、互恵性と世代継承性を発揮するというプログラムデザインに基づくもので、これらにより参加者が満足できることが、世代間交流看護支援のベストプラクティスにとって重要であると考えられた。

(2) ベストプラクティス支援ガイドの活用と今後の課題

本研究で作成した「地域における世代間交流支援ベストプラクティスハンドブック」は、実践から得た量的・質的データの統合、および文献検討から得たベストプラクティスの構成要素をまとめ、それに基づいて構成した。そのため、世代間交流のための手引書として有用であると考えられる。一方で、各地で開催される世代間交流プログラムの実施頻度や内容、場所は多様化しており、参加者や支援者も多様である。特に看護職が大学において継続的に開催している世代間交流プログラムは先例がなく、本支援ガイドが今後すべての世代間交流プログラムに適用可能であるかは検討の余地がある。今後は、他の世代間交流プログラム実践機関の協力を得て、本支援ガイドの転移可能性を検討する必要がある。多様な地域や対象者における世代間交流看護支援の実践が集積され、ベストプラクティスを希求した支援が浸透し、超少子・高齢社会のさらなる進展が予想されるわが国においての持続可能なプログラム運営により、両世代の生活の質の向上に寄与するものとなることが望まれる。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①金盛琢也、亀井智子、山本由子：都市部多世代交流型デイプログラムにおける参加高齢者特性および活動内容別の世代間交流の評価、日本世代間交流学会誌、6(1)、83-88、2016.
- ②亀井智子：都市部地域における多世代交流型デイプログラムを通じた高齢者の社会参加支援とPeople-Centered Careの開発、Geriatric Medicine、55(2)、185-90、2017.

(2) 口頭発表

- ①亀井智子、山本由子、川上千春、金盛琢也、桑原良子、目黒齊実：多世代交流看護支援ベストプラクティスの開発：第1報参加者満足度によるプログラム評価、第36回日本看護科学学会学術集会、2016(東京).
- ②山本由子、亀井智子、川上千春、金盛琢也、桑原良子、目黒齊実：多世代交流看護支援ベストプラクティスの開発：第2報プログラム別交流感と満足度の関連、第36回日本看護科学学会学術集会、2016(東京).
- ③目黒齊実、亀井智子、川上千春、金盛琢也、桑原良子：認知症高齢者への世代間交流看護支援の検討：2年7か月の参加経過のケーススタディ、第21回聖路加看護学会学術大会、40、2016(東京).

(3) 出版物

- ① 日本混合研究法学会監修、抱井尚子、成田慶一編、亀井智子他著、混合研究法への誘い、第8章看護における混合研究法の活用例、67-75、2016、遠見書房(東京).
- ② 亀井智子、川上千春、金盛琢也、目黒齊実、桑原良子、山本由子、百武ひとみ、ボランティア・参加者一同:地域における世代間交流支援ベストプラクティスハンドブック、1-54、2017、聖路加国際大学大学院看護学研究科老年看護学(東京).

(4) 投稿中

Tomoko KAMEI, Takuya KANAMORI, Yuko YAMAMOTO, Chiharu KAWAKAMI, Satomi MEGURO, Yoshiko KUWABARA: The best practice of intergenerational programs based on a reciprocity and generativity between non-frail, frail and cognitive impairment older adults and school aged-children through a mixed methods study.

学 校 名	創 価 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	ES/iPS細胞のナীব状態を決める糖鎖と再生医療への応用 ー糖鎖の網羅的探索と新規培養法の開発ー		研究分野 医学
キーワード	① ES細胞 ② 糖鎖 ③ ナীব状態		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
西 原 祥 子	理 工 学 部	教 授	全体の統轄、糖鎖構造を制御したES細胞の作製、各種シグナルの解析

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
高 瀬 明	理 工 学 部	教 授	ベクターの作製、分子生物学的解析
一 宮 智 美	理 工 学 部	研究支援員	ES細胞の培養、生化学的解析

ES/iPS細胞のナীব状態を決める糖鎖と再生医療への応用 —糖鎖の網羅的探索と新規培養法の開発—

1. 研究の目的

ヒトとマウスのES/iPS細胞は、異なる発生段階にある。マウスES/iPS細胞はより初期の内部細胞塊に対応する状態、すなわち、ナীব状態にあり、ヒトES/iPS細胞はこれより少し分化した状態、エピブラストに近いプライム状態にある。このため、両者は異なる性質を示す。マウスES/iPS細胞は、単一細胞で培養可能で増殖能が高く、培地に白血病抑制因子（LIF）を添加して、未分化性を維持する。一方、ヒトES/iPS細胞は、増殖が遅く、単一細胞では生存性が低く、扱いにくい。未分化性維持には、LIFではなく、FGF2とactivinが必要である。再生医療への応用を容易にするため、ナীব状態のヒトES/iPS細胞の作製されている。このような背景から、我々は、これらにおける糖鎖修飾に注目した。

糖鎖修飾は、主な翻訳後修飾の一つであり、細胞表面や細胞外に分泌されるタンパク質の80%が糖鎖修飾を受けるとされる。また、細胞表面には、様々な糖鎖を持つ糖脂質も存在している。これらの糖鎖は、各組織や癌などの疾病の状態を反映して変化し、細胞外からの様々なシグナルを制御している。生物の発生過程においても、糖鎖は、発生段階特異的に顕著に変化する。ES/iPS細胞の表面マーカーは、SSEA-1やSSEA-4、TRA-1-60抗原、GCTM2抗原など、その多くが糖鎖であるが、マーカー糖鎖の機能は明らかではない。

ES/iPS細胞は、自己複製能と多能性を持つ。ナীবなマウスES細胞の自己複製能・多能性は、転写因子であるOct3/4やNanogといった細胞内因子の発現に加え、LIF、Wnt、骨形成タンパク質（BMP）などの細胞外因子からのシグナル伝達によって維持される。我々は、ナীবなマウスES細胞を用い、RNAiにより糖鎖合成に関わる100種以上の糖転移酵素を網羅的にノックダウンして、自己複製能・多能性維持に必須な糖鎖修飾の探索を行ってきた。これまで、(1)グリコサミノグリカンの一種であるヘパラン硫酸が、WntやBMPシグナルを制御して自己複製能と多能性維持に、また、FGF4やFasシグナルを制御して分化に関与すること、(2)ラックダイナック糖鎖構造(GalNAc β 1-4GlcNAc)が、LIFシグナルを介して自己複製能と多能性維持に関与することを明らかにしてきた。さらに、現在、関与の可能性がある新たな糖鎖を見出している。

本研究では、新たな糖鎖を加えた「ナীব状態で働く糖鎖の役割の解明」とそれに基づいた「ナীবなES/iPS細胞の作製と維持を促進する糖鎖制御培養法への応用」を目的とした。本年度は、関与の可能性がある新たな糖鎖、すなわち、*O*-GlcNAc (*O*-結合型*N*-アセチルグルコサミン)の役割を明らかにすることを目的とした。

2. 研究の計画

O-GlcNAc修飾は、核・細胞質内に存在する種々のタンパク質のセリン(Ser)、スレオニン(Thr)残基に、GlcNAcが1分子結合したものである。*O*-GlcNAc転移酵素(Ogt)は、タンパク質のSer、Thr残基に、UDP-GlcNAcからGlcNAcを転移する。一方、*O*-GlcNAcは、*O*-GlcNAc分解酵素(Oga)により分解される。

(1) ナীব状態のマウスES細胞におけるOgtの機能解析

マウスES細胞において、short hairpin RNA (shRNA)発現ベクターによる*Ogt*のノックダウンを行い、アルカリフォスファターゼ(ALP)染色やナীব状態の未分化性維持因子の発現を検討した。

(2) プライム状態のES cell-derived epiblast stem cells (ESD-EpiSCs)におけるOgtの機能解析

ナীব状態のマウスES細胞を、LIFを添加せずに、15ng/ml FGF2と、0.6 μ M JAK阻害剤(LIFシグナル阻害剤)を加えて培養し、プライム状態のES cell-derived epiblast stem cells (ESD-EpiSCs)に分化させ、*Ogt*、*Oga*、*O*-GlcNAcの局在を検討した。さらに、*Ogt*阻害

剤であるPhenyl 5-chloro-2-oxo-3-hydrobenzoxazole-3-carboxylateと、Oga阻害剤であるPUGNAcを用いた検討も行った。

(3) プライム状態からナイーブ状態への移行におけるOgtの機能解析

プライム状態のESD-EpiSCsを、FGF2とJAK阻害剤を加えずに、LIFとFGFシグナル阻害剤であるPD0325901を1 μ M、Wntシグナル促進剤であるCHIR99021を3 μ M加えて、1週間フィーダー細胞上で培養し、ナイーブ状態のマウスES細胞様の細胞 (reverted ESCs : rESCs) へ戻した。この時、Ogt阻害剤とOga阻害剤を加え、ALP染色によりナイーブ化効率を検討した。

3. 研究の成果

(1) ナイーブ状態のマウスES細胞におけるOgtの機能解析

① ナイーブ状態のマウスES細胞におけるO-GlcNAcの機能を検討するため、OgtをRNAi法によりノックダウン (KD) し、O-GlcNAcを減少させた。O-GlcNAc修飾されたタンパク質の発現は、KD効率に比例して減少した。ALP染色を行ったところ、Ogt KD細胞におけるALP陽性コロニーの数は顕著に減少した。また、ナイーブ状態の未分化性維持因子であるNanogとSox2のmRNAとタンパク質の発現も、コントロールに比較し有意に減少した。これらの事実から、ナイーブ状態のマウスES細胞の維持には、OgtによるO-GlcNAc修飾が必要であることがわかった。

② ナイーブ状態のマウスES細胞から胚様体 (EB) を形成し、分化に伴うOgtの発現の変化を検討した。Ogtの発現はEB分化に伴い減少し、O-GlcNAcの発現も、また、減少した。

(2) プライム状態のESD-EpiSCsにおけるOgtの機能解析

① Ogtには、nucleocytoplasmic Ogt(ncOgt)、mitochondrial Ogt(mOgt)、short Ogt(sOgt)の3種のアイソフォームがある。ncOgtとsOgtは核と細胞質に、mOgtはミトコンドリアに局在する。また、Ogaにはlong-Oga(L-Oga)とshort-Oga(S-Oga)の2種のアイソフォームがある。ncOgtの発現は、ナイーブ状態のマウスES細胞とプライム状態のESD-EpiSCsで変化が認められなかったが、L-OgaとS-Ogaの発現は、ESD-EpiSCsで顕著に増加した。また、タンパク質のO-GlcNAc修飾のパターンも両状態で異なっていた。

② ESD-EpiSCsにおけるOgt、Oga、O-GlcNAcの細胞内局在を検討したところ、ncOgtは核と細胞質に局在し、L-OgaとS-Ogaは細胞質のみに局在していた。また、核と細胞質画分におけるタンパク質のO-GlcNAc修飾のパターンは異なっていた。

③ Ogt阻害剤とOga阻害剤を用いて、ESD-EpiSCsにおけるOgaとOgtの機能について検討した。Ogt阻害剤を加えると、O-GlcNAcが減少した。未分化性に変化は認められなかったが、死細胞の数が有意に増加し、Ogtがプライム状態のESD-EpiSCsの生存に必要であることがわかった。また、Ogaは生存や未分化性維持には関与していなかった。

(3) プライム状態からナイーブ状態への移行におけるOgtの機能解析

① Ogt阻害剤とOga阻害剤を用いて、ナイーブ化効率を検討した。Ogt阻害剤を加えた場合も、Oga阻害剤を加えた場合も、有意にナイーブ化効率が減少し、プライム状態のESD-EpiSCsからナイーブ状態のrESCsへの移行には、OgtとOgaの両者が必要であることがわかった。

4. 研究の反省・考察

(1) プライム状態のESD-EpiSCsにおけるOgtの機能解析

プライム状態のESD-EpiSCsにおいて、Ogtは未分化性には関与しないが、生存に必須であることが、明らかになった。

(2) プライム状態からナイーブ状態への移行におけるOgtの機能解析

プライム状態のESD-EpiSCsからナイーブ状態への移行にはOgtとOgaの両者が必須であることが、明らかになった。

(1)(2)の結果は、ナイーブ状態とプライム状態の維持と遷移において、タンパク質のO-

GlcNAc修飾が重要な役割を担っていることを示していた。現在、修飾を受けているタンパク質を同定しているところである。今後は、同定されたタンパク質に変異を導入して、各シグナルとの関連を検討する予定である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等 * corresponding author

① Miura T, Nishihara S*: O-GlcNAc is required for the survival of primed pluripotent stem cells and their reversion to the naïve state.

BBRC, 480, 655-661 (2016).

② Nishihara S*: Glycans define the stemness of naïve and primed pluripotent stem cells.

Glycoconj J. 2016 Oct 28. [Epub ahead of print] PMID: 27796614.

(2) 口頭発表

① 三浦太一, 西原祥子: 細胞内糖鎖修飾であるO-GlcNAcによる多能性幹細胞のナイーブ状態とプライム状態の制御機構.

第16回日本再生医療学会総会, 仙台, 3月, 2017.

(3) 出版物

① 西原祥子: 多能性幹細胞における糖鎖の機能-ナイーブ状態とプライム状態に関わる糖鎖.

Bio Clinica, 32, 412-418 (2017) .

学 校 名	帝 京 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	乾癬の病態における尿酸結晶の役割の研究 －乾癬治療薬としてのP2Y6阻害剤の検討－		研究分野 医学
キ ー ワ ー ド	① 乾癬、尿酸、受容体拮抗薬		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
多 田 弥 生	医 学 部	准 教 授	研究代表者 総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
石 川 武 子	医 学 部	助 手	データ整理、解析
武 岡 伸 太 郎	医 学 部	後期研修医 (大学院生)	実験・データ整理・論文作成

乾癬の病態における尿酸結晶の役割の研究 —乾癬治療薬としてのP2Y6阻害剤の検討—

1. 研究の目的

(1) 研究目的の要旨

尋常性乾癬は厚い鱗屑と血管拡張を伴う紅斑を特徴とし、炎症性角化症に分類されている皮膚疾患である。病因として多因子遺伝、免疫学的異常、ケラチノサイトの分化、増殖異常などが言われているが、その病態の多くは不明である。古くから、乾癬患者の半数近くで高尿酸血症があり、表皮内に尿酸結晶があることも報告されているが、尿酸結晶の乾癬の病態への関与は不明である。尿酸結晶がケラチノサイトにP2Y6受容体を介してサイトカイン分泌を促すことは代表者が以前報告した (Uratusji H, Tada Y et al. *J Immunol* 2012)。今回はP2Y6阻害剤を乾癬の治療薬として使用できるかどうかをイミキモドを用いた乾癬マウスモデルを用いて検討した。

(2) 研究の学術的背景

① 乾癬の病態の理解の必要性

乾癬は有病率が日本では0.025%~0.11%で、欧米では2~3%の疾患であり、世界中に多くの罹患患者がいる。全身に厚い鱗屑を伴う紅斑が散在するため、鱗屑が移動のたびににはがれおち、美容上の問題も伴うため、患者のQOLが著しく障害され、その苦しみからうつ病になったり、自殺することがあることも知られている。乾癬の病態を理解することは乾癬の治療につながり、世界中の多くの乾癬患者の治療に役立てることができると考えた。

② 乾癬の病態形成におけるケラチノサイトと炎症細胞のクロストークの重要性

最近までの研究から乾癬患者の病変部と末梢血においてはケラチノサイト、免疫担当細胞の双方に異常があり、また、それらがお互いに影響しあうことにより、さらに病態が悪化することがわかってきている。病変部皮膚ではケラチノサイトからIL-8/CXCL8, S100A7/A8/A9などのケモカインが分泌され、好中球が病変部に遊走してくる。さらにこのケラチノサイトの近くには多くのCD11c陽性CD83陽性樹状細胞 (Dendritic cells: DC) が存在していることを研究代表者らは見出した (Komine M, ..., Tada Y: *J Invest Dermatol* 2007)。これらの樹状細胞に加え、特に乾癬病変部に特異的に出現するとされる樹状細胞: Tip-DC (TNF and iNOS-producing DC) はTNF- α , IL-23, IL-20を産生し、T細胞、ケラチノサイトを活性化する。さらに、末梢血においても、乾癬患者単球においてIL-23のサブユニットであるIL-12p40の産生が、健常人と比較して亢進していることも研究代表者らは報告している (Tada Y et al.: *Br J Dermatol* 2006)。さらに脂肪細胞が分泌するadipokineが乾癬の主要な免疫反応であるTh17系免疫反応を制御することを代表者らは報告した (Shibata S, Tada Y et al. *Nat Commun* 2015)

③ 乾癬と高尿酸血症

乾癬患者の半数において、高尿酸血症が認められ、乾癬の加療により、その多くで、血中尿酸値の低下が認められることは広く知られている。これは乾癬表皮のturn overの亢進により、ヌクレオチドの代謝産物である尿酸の産生亢進が表皮で起こり、末梢血中に影響を及ぼした結果と推測されている。この尿酸は、生体内で飽和濃度を超えると、容易に結晶化することが知られている。事実、Goldmanらは偏光顕微鏡などを用いて、乾癬の表皮内に尿酸結晶が存在することをすでに報告している (Goldman M: *Am J Dermatopathol* 1981)。この尿酸結晶がケラチノサイトにP2Y6を介してIL-8/CXCL8など病態に重要なサイトカイン分泌を促すことは代表者が報告した (Uratusji H, Tada Y et al. *J Immunol* 2012)。

④乾癬モデルマウスでのP2Y6阻害剤の治療効果の検討

乾癬の病態にはケラチノサイト、T細胞をはじめとする様々な炎症細胞の関与がこれまでに指摘されており、この炎症が抑制できる薬剤は、実際の治療に結びつく可能性がある。本研究の目的はイミキモド誘発乾癬マウスモデルを用いて、P2Y6阻害剤の乾癬治療薬としての可能性とその作用機序を探ることにある。

2. 研究の計画

(1) 乾癬モデルマウス作成と阻害薬投与による臨床的、組織学的改善の評価

①乾癬モデルマウス作成と阻害剤投与

野生型マウスにイミキモドを連日（6日間）外用し、乾癬皮疹を誘導する。具体的には、剃毛したマウスの背部皮膚にイミキモド（商品名：ベセルナクリーム、持田製薬株式会社）を125mg/日で、6日間連日外用し、乾癬皮疹が誘導されることを確認する。外用開始1日前（day-1）と3日目（day3）にPBS0.1mlまたはP2Y6阻害剤0.1ml（3.0mg/kg）を腹腔内投与する。

②皮疹の重症度評価（臨床的評価、組織学的評価）

外用終了後にP2Y6阻害剤投与群およびPBS投与群各マウスの背部皮膚における紅斑、浸潤、鱗屑の程度を乾癬重症度のスコア法であるPASI（Psoriasis Area and Severity Index）スコアに準じて、1-5のスコアリング（1なし、2軽度、3中等度、4高度、5極めて高度）で評価し、P2Y6阻害剤が乾癬皮疹の形成を抑制できるかどうかを検討する（Van der Fits L et al. J Immunol. 182:5836, 2009）。同時に、組織学的にも治療効果を検討する。具体的には、P2Y6阻害剤およびPBS投与群の各マウスの背部皮膚を6mmトレパンを用いて採取し、ホルマリン固定パラフィン包埋し、6 μmの厚さで切片を作製し、ヘマトキシリン&エオジン染色を行った。1検体中5箇所をランダムに選び、表皮の厚さを測定し、平均化する。乾癬の皮疹に浸潤する細胞（T細胞、樹状細胞、単球、好中球）の数をP2Y6阻害剤投与群およびPBS投与群で免疫組織学的に検討し、P2Y6阻害剤がどの炎症細胞浸潤を抑制しているかを検討する。6日間のイミキモド連日外用終了後に背部皮膚を6mmのトレパンを用いて採取し、ホルマリン固定パラフィン包埋する。切片は次いでT細胞のマーカーCD3、樹状細胞のマーカーCD11cまたは単球のマーカーCD14、好中球のマーカーGr1で染色する。

(2) P2Y6阻害剤投与のサイトカイン発現への影響の検討（mRNAレベルでの検討）

P2Y6阻害剤およびPBS投与下のイミキモド誘発乾癬マウス皮膚におけるサイトカイン、ケモカインのmRNA発現をreal-time PCR法にて定量的に測定する。サイトカインとしては、①Th1サイトカインであるIFN- γ 、CXCL9、CXCL10、CXCL11、②Th17サイトカインおよびケモカインであるIL-17A、IL-17F、IL-12p40、IL-23、CCL20、③乾癬の病態形成に関与している各種サイトカインであるTNF- α 、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-10、IL-22などを測定する。イミキモド外用開始前、2日後、4日後、6日後において、これらのサイトカイン、ケモカインのmRNAの発現をreal-time PCR法によって経時的に評価する。全RNAを凍結皮膚組織よりQIAGEN RNeasy spin column（QIAGEN社）を用いて単離する。Messenger RNAはその後cDNAにTaqman® Reverse Transcription Reagents（Applied Biosystems）にて逆転写する。プライマーとプローブはPre-Developed TaqMan® Assay Reagents（Applied Biosystems社）にてデザインする。Real-time PCRはABI Prism 7000 Sequence Detector（Applied Biosystems社）を用いて行う。組織の固定、real time PCRのprimerに経費を使用する。

3. 研究の成果

(1) 乾癬モデルマウス作成と阻害薬投与による臨床的、組織学的改善の評価

①乾癬モデルマウス作成と阻害剤投与

野生型マウスにイミキモドを連日（6日間）外用し、乾癬皮疹を誘導し、外用開始1日前（day-1）と3日目（day3）にPBS0.1mlまたはP2Y6阻害剤0.1ml（3.0mg/kg）を腹腔内投与することで、P2Y6発現がmRNAレベルで認められることを確認し、このプロトコールが適切であることを確認できた。

②皮疹の重症度評価（臨床的評価、組織学的評価）

ダブルブラインドでP2Y6阻害剤投与の効果を臨床的、組織学的に評価した。まず臨床的には2回、コントロール抗体投与群も含め、3匹ずつのグループで検討を行ったが、2回とも有意差をもって、PBS投与群、あるいはコントロール中和抗体投与群と比較して、臨床的な改善を認めた。HE標本による組織学的な検討においては、表皮肥厚、浸潤細胞数いずれにおいてもP2Y6阻害剤による改善を認めた。浸潤細胞のうち、T細胞を含めたいずれの細胞が特に浸潤が抑制されていたかについては、まだ検討中である。

(2)P2Y6阻害剤投与のサイトカイン発現への影響の検討(mRNAレベルでの検討)

サイトカイン、ケモカインなど計画にあげたもののうち、特に乾癬の病態に重要なIL-17Aについては検討し、阻害剤投与により、発現が低下する傾向があることがわかった。皮疹誘導の比較的早期に認められる傾向があったため、今後経時的に最も適切な評価時期を検討の上、よりn数を増やして検討を続ける必要があると考えた。

4. 研究の反省・考察

(1)イミキモド誘発乾癬マウスモデルに対するP2Y6阻害剤の治療効果について

臨床的にも組織学的にも治療効果が認められたため、P2Y6阻害剤が乾癬の炎症抑制効果を有する可能性があることがわかった。今後はn数を増やしより有意差がつくように検討を加えることと、さらに、P2Y6阻害剤の安全性についての検討も同時に始めるべきであると考えた。

(2)イミキモド誘発乾癬マウスモデルに対するP2Y6阻害剤の作用機序について

以前の我々の検討は主に、表皮細胞をとりまく炎症をP2Y6阻害剤が抑制する点について検討したが、今回の結果ではIL-17Aの発現低下が認められたことから、そのターゲット細胞が表皮細胞以外の免疫担当細胞である可能性も考え、今後引き続き検討が必要であると考えられた。

5. 研究発表

(1)学会誌等

特になし

(2)口頭発表

特になし

(3)出版物

特になし

学 校 名	自 治 医 科 大 学	研究所名等	分子病態治療研究センター 分子病態研究部	
研 究 課 題	慢性炎症病態のマルチスケール生体イメージングと光制御 -慢性炎症病態の可視化と光制御-		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①生体イメージング ②慢性炎症 ③生活習慣病 ④二光子顕微鏡			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
西 村 智	分子病態治療研究センター 分子病態研究部	教 授	研究計画立案・遂行, 論文執筆

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
坂 田 飛 鳥	分子病態治療研究センター 分子病態研究部	助 教	慢性炎症病態のイメージングと光制御
瀬 尾 欣 也	分子病態治療研究センター 分子病態研究部	平成29年 4月21日退職	バイオイメージングシステムの構築

慢性炎症病態のマルチスケール生体イメージングと光制御

－慢性炎症病態の可視化と光制御－

1. 研究の目的

(1) 生活習慣病、悪性腫瘍といった疾患の背景には慢性炎症病態が存在すると推測されている。この病態の理解のため、生体を網羅的・探索的に解析を行いたいというニーズが増えている。従来のフローサイトメーターなどを用いた位置情報が無い解析、あるいは病理サンプルなどの時間情報の失われた解析ではヘテロな細胞集団がリアルタイムに形作る病態を理解することは難しい。生体内の細胞の形態、動態を高い時間分解能で観察出来るバイオイメージングがこれらに代わる手法として注目されている。しかし、既存顕微鏡で用いられている顕微鏡レンズ、光路、撮像素子ではマクロ・ミクロの統合的理解のために必要な、広視野・高解像度の両立は不可能である。そこで我々は8K CMOSセンサと一眼レフカメラ用のレンズ、半導体用レンズ、天体望遠鏡用レンズなどの設計を応用してマクロ・ミクロ観察が可能な高解像度顕微鏡開発を計画した。さらに、手持ち運用が可能なマクロ・ミクロ光学観察機器を開発し臨床応用の可能性を探った。急性期の生体反応は光操作で血管傷害・炎症を惹起して評価した。慢性的な病態形成の評価にはレンズレス・オンチップイメージングで無麻酔の生体組織を長時間観察した。

2. 研究の計画

(1)

①マクロ・ミクロ観察が可能な高解像度顕微鏡の開発

工業用レンズ、一眼レフ用レンズ設計の応用と8K CMOSセンサの使用により、細胞内構造や細胞形態・動態といったミクロ情報から組織までを同時に観察可能な高解像度顕微鏡を開発する。8Kの超高精細画像を利用して俯瞰像で細胞間のクロストークを画像拡大による局所像から組織中での細胞の役割を明らかとする。

②手持ち運用可能なマクロ・ミクロ光学観察機器の開発

高倍率の顕微鏡用レンズ、オリジナル光路、民生用CMOSセンサを組み合わせ、手持ちで運用できる小型軽量のイメージング装置を開発する。本機器は臓器形状や臓器血流といったマクロ情報と血球細胞のようなミクロ情報を切り替えにより取得できる機器になる。ウサギ・ブタといった大型動物で模擬手術による実証実験を行う。

③光操作による血管傷害・炎症惹起

生活習慣病の臨床イベントとしておこる心血管病病態を光操作で再現する。光化学反応による活性酸素生成で血管内皮の機能障害と血栓形成を起こすモデル、血管内皮にレーザーを照射して作成した内皮破綻部位で血栓形成と引き続く炎症反応を観察するモデル、虚血再灌流による組織障害と炎症反応を観察するモデルを作成する。

④レンズレス・オンチップイメージングによる無麻酔の生体組織長時間イメージング

レンズレス・オンチップイメージング装置を開発する。動物体内に埋め込み可能なサイズまで小型化し、無麻酔自由行動下マウスの体内長時間イメージングを行う。

3. 研究の成果

(1)

①マクロ・ミクロ観察が可能な高解像度顕微鏡の開発

8K CMOSカメラの応用と同時に光路の最適化を行い、XY方向解像度8K、Z方向解像度1K、時間

分解能60fps、4色画像の超高速、高解像度、広視野イメージングを達成した。構造化証明をくみあわせ高速性と空間解像度を両立させた。8KサイズのCMOSセンサでは一分間に数百ギガバイトという圧倒的なデータ量が得られ、現在生体の網羅的解析につながる唯一のセンシング技術と考える。一方で画像センサの解像度のみあうレンズ、光路、スキャニング技術は無く、今回我々は従来の顕微鏡形態からくる制約を外し、新たに8K CMOSセンサのためのレンズ、光路設計の最適化を行った。本機器により血栓中での一血小板の挙動と組織応答、あるいは炎症時の一細胞の挙動と組織再構築を同時に評価できた。

②手持ち運用可能なマクロ・マイクロ光学観察機器の開発

顕微鏡用の高倍率レンズと申請者独自の光路系を組み合わせ、倒立顕微鏡に匹敵するマイクロ像とマクロの俯瞰像取得が可能な小型イメージング装置を開発した。本機器をウサギ腹腔内およびブタ腹腔内で腹腔鏡として用い、模擬手術を行った。マクロ像での腹腔鏡としての性能とマイクロ像でのリアルタイム顕微鏡としての性能を実証した。臨床では術中の病理学的診断だけでなく、リアルタイム画像であることを利用した臓器の柔軟性評価や機能評価にも応用が期待できた。

③光操作による血管傷害・炎症惹起

ア) 活性酸素による血栓形成モデル

光刺激による血栓惹起と血栓観察に同一の光源を用いることで血栓形成の初期よりタイムラグ無く継続した観察を可能とした。本モデルでは血管内皮破綻は無く、その構造は保たれた状態であった。

イ) 血管内皮損傷血栓モデル

観察と同時に任意領域に高エネルギーのレーザーを照射することにより血管内皮を傷害した。内皮破綻部位で活性化され血栓を形成する血小板と障害部位に遊走する白血球が観察できた。

ウ) 虚血再灌流モデル

局所臓器の栄養血管クリッピング/解除で再灌流後に血小板および白血球の血管内皮への接着が増加することが確認出来た。特に白血球の血管内皮への遊走亢進が顕著で、炎症病態の白血球解析に有用と思われた。

④レンズレス・オンチップイメージングによる無麻酔の生体組織長時間イメージング

本体が縦横7mm厚さ1.5mm程度の持つ小型のイメージング装置を開発し、マウス腹腔内に挿入して無麻酔自由行動下のイメージングを行った。腹腔内の組織と腸間膜血流を精細な画像で得ることに成功した。

4. 研究の反省・考察

(1)

①マクロ・マイクロ観察が可能な高解像度顕微鏡の開発

生体のマクロ変化とマイクロ変化を評価可能な手技を構築した。本機器の空間解像度、時間解像度、視野は世界的にも類を見ないものである。今後、慢性炎症病態の臓器機能不全における繊維化・炎症のプロセスを観察する。不可逆的障害の原因となる因子を解明し、その制御を試みる。

②手持ち運用可能なマクロ・マイクロ光学観察機器の開発

生きている大型動物体内のマクロ・マイクロ環境を観察出来る手技を構築した。運用には動物麻酔が必要であり、特にブタでは人工呼吸機管理、気腹装置などの補助が必要であるが、得られる情報は既存の腹腔鏡を遙かに超えるものであった。血流や臓器柔軟性といった機能情

報も取得可能であり、本機器は慢性炎症におけるマイクロでの繊維化とマクロでの柔軟性低下・機能異常を直接に評価できると考えられた。本機器の新規性・独自性は高く、基礎研究のみならず臨床においても貢献が期待できる。平成28年度研究成果として特許申請を行った。

③光操作による血管傷害・炎症惹起

生活習慣病の重要な臨床イベントである血栓症を再現可能なモデルを構築した。本手法をマクロ・マイクロ観察手技と組み合わせることで慢性炎症・心血管病の病態形成に重要な因子を明らかにすることができると思われた。

④レンズレス・オンチップイメージングによる無麻酔の生体組織長時間イメージング

生活習慣病では臨床イベント発症よりも前から血管や臓器の機能障害が進んでいると考えられるが、この変化は日にちや月の単位で緩やかに進行するものである。麻酔下に長時間観察を続けることは不可能であるため、従来、動物に観察窓を作る方法などがとられてきたが、侵襲が大きく、生理的とは言いがたかった。本機器では生理的状態の動物体内でゆっくりと進行する病態を連続して観察できる。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

無し

(2) 口頭発表

① 2016. 4. 7th Asian Pacific Topic Conference. Fluorescent imaging: from basic to application

② 2016. 4. 第89回日本内分泌学会学術集会. マルチスケールイメージングによる生活習慣病解析

③ 2016. 5. 第59回日本糖尿病学会年次学術集会. 生体イメージングを用いた無麻酔・自由行動下での代謝研究

④ 2016. 6. 第68回日本細胞生物学会大会共済ランチョンセミナー. イメージングの過去・現在・未来

⑤ 2016. 6. 第37回日本炎症・再生医学会. マルチスケールイメージングによる炎症反応と生活習慣病

⑥ 2016. 7. 第12回循環器専門医を志す研修医の為の卒後セミナー循環器卒後サマーキャンプ. うごめく生き物をそのまま撮影するために-蛍光イメージングの実情と展開

⑦ 2016. 8. 第17回日本分子脳神経外科学会. 生体イメージングで見る血栓・炎症

⑧ 2016. 9. 第89回日本生化学大会. Multi-scale fluorescent in vivo observation of thrombus formation

⑨ 2016. 10. 第37回日本肥満学会. ウェアラブルセンサと光計測による生活習慣病モニタリングシステム

⑩ 2016. 11. 第54回日本生物物理学会大会. 4K/8K CMOSイメージングによるマルチスケール生体全細胞解析

⑪ 2017. 3. 第8回クラスター研究会. 生体を光で理解する理工学アプローチ

(3) 出版物

無し

学 校 名	聖マリアンナ医科大学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	新たな腎臓病進行機序の解明とその治療法の確立 -尿細管間質障害をターゲットとして-		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①慢性腎臓病、②尿細管間質障害、③尿細管虚血、④上皮間葉移行			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
池 森 敦 子	医 学 部 ・ 解 剖 学 (機 能 組 織)	教 授	研究代表及び総括、実験・データ解析・論文作成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
柴 垣 有 吾	医 学 部 ・ 内 科 学 (腎 臓 ・ 高 血 圧 内 科)	教 授	データ解析・論文作成
黒 川 真 奈 絵	大学院医学研究科・疾患バイオ オマーカー・標的分子制御学	大学院教授	実験(プロテオミクス)・データ解析
菅 谷 健	医 学 部 ・ 内 科 学 (腎 臓 ・ 高 血 圧 内 科)	客員教授	実験(蛋白解析)
武 永 美 津 子	先端創薬科学(株LTTバイオ ファーマ寄附)研究部門	特任教授	実験・データ解析
有 戸 光 美	医 学 部 ・ 生 化 学	講 師	実験(遺伝子解析)・論文作成

新たな腎臓病進行機序の解明とその治療法の確立 —尿細管間質障害をターゲットとして—

1. 研究の目的

(1) 急性腎障害からの慢性期尿細管間質障害への進展機序の解明

急性腎障害で生じた尿細管虚血は、CKDの重要な進行因子である。申請者らは、腎虚血後3-6週間後においても腎虚血耐性（複数回の虚血刺激にも関わらず、間質線維化が進行しない）が維持される事を見出しており（未発表）、その分子機序を明らかにし、虚血耐性をさらに長期に維持することができればCKDの進行阻止に有効と考えられる。これに関わる遺伝子発現制御変化を、マイクロアレイを用いて解析し、治療標的となる分子を同定する。

(2) CKDにおける尿細管間質障害の進行機序の解明と新規治療法の開発

① Layilinを介したEMTによる腎間質線維化の機序解明

CKDで生じる尿細管上皮細胞のEMTは、炎症性サイトカイン（TNF- α ）により促進されることから、TNF- α によるEMT促進メカニズムの解明およびEMTの制御が、CKDにおける尿細管間質障害を抑制する可能性がある。Layilinは、C型レクチンと相同性を持つ膜貫通型蛋白質で、申請者らはTNF- α 刺激によりその発現が増強すること、かつ、EMT誘導に関与している可能性があることを見出している（Biochem Biophys Res Commun, Epub ahead of print, 2015）。そこで、Layilin欠損マウスを樹立し、LayilinのEMT促進機序を詳細に検討し、Layilinおよびその関連分子の制御が腎間質線維化を抑制することを立証する。

② L型脂肪酸結合蛋白(L-FABP)によるEMT抑制の機序解明

CKDの中でも、特に患者数が増加し続けている糖尿病性腎症に着目する。最近、糖尿病性腎症の進展機序として、尿細管のミトコンドリア機能障害が注目されており、ミトコンドリア異常がEMTに関与し、糖尿病性の尿細管間質障害を進行させる可能性がある。本研究では、申請者らが、長年研究しているL型脂肪酸結合蛋白(L-FABP)が、ミトコンドリア機能を維持する事でEMTを抑制し、糖尿病性尿細管間質障害を抑制する事をL-FABP染色体遺伝子導入マウスを用いて明らかにする。

2. 研究の計画

(1) 急性腎障害の重症化抑制：尿細管虚血耐性メカニズムの解明のための実験計画

2回の虚血再灌流(I/R)腎の作成：C57B16オスマウスの左腎動静脈茎を背側よりクランプし、20分後にクランプを開放、右腎臓を摘出し片腎とする。20日後に再度左腎動静脈茎を腹側クランプし、20分後に開放する。1回目I/R20日後、2回目I/R 20日後の計2ポイントで、大動脈よりカテーテルを挿入し、腎臓をリン酸緩衝液で環流後摘出する。血管からの採血は、1回目I/R 1日後、19日後、2回目I/R 1日後、19日後の計4ポイントで行う。

(2) 尿細管のEMT抑制のための実験計画

① Layilinを介したEMT促進の機序解明

Layilinを介したEMTによる尿細管間質性障害の機序を解明するため、Layilin欠損マウスをCRISPR-Cas9システムを用いて作製する。この手法により、従来の欠損マウス作製法と比較して短期間で作製が可能である。

② L型脂肪酸結合蛋白(L-FABP)によるEMT抑制の機序解明

ア 腎臓のL-FABP発現が、糖尿病性腎症において、ROS活性を低下させ、ミトコンドリア機能異常を抑制し、EMTが抑制されることを、in vitroおよびin vivoの検討で明らかにする。
イ 糖尿病性腎症モデルの作成：野生型マウス、ヒトL-FABP染色体遺伝子導入マウスにstreptozotocin (STZ, 50mg/kg body weight)を連日5日間腹腔内投与する。投与終了1週間後に血糖値を測定し250mg/dl以上であれば、糖尿病発症マウスとして以後の検討に使用する。

ウ 2週間おきに、体重、血糖測定、採尿を行い、糖尿病発症19週間後に採血および腎臓を摘出する。

3. 研究の成果

(1) 急性腎障害の重症化抑制

- ① 急性腎障害の程度は、血清クレアチニンで評価した。1回目I/R1日後の血清クレアチニンは著明に増加した(0.62mg/dl)。2回目I/R1日後の血清クレアチニンは、1回目I/R19日後より上昇は認められたものの(0.32mg/dl)、その程度は、1回目I/R1日後の値より有意に低値であった($p < 0.05$)。
- ② 尿細管壊死、アポトーシスの所見が、1回目I/R1日後と比較し、2回目I/R1日後では、有意に抑制された。
- ③ マイクロアレイ解析を施行し、尿細管虚血耐性に関連する候補分子を見出した。この候補分子の発現調節には、ヒストンアセチル化が関与していることが知られており、腎臓でも同様の発現調節が行われているかを確認する。

(2) 尿細管のEMT抑制のための実験計画

① Layilinを介したEMT促進の機序解明

Layilinを標的としたguideRNA及びcas9をDBA/1Jマウスの受精卵前核にマイクロインジェクションし、仮親に移植後ファウンダーマウス(F0)を作製した。F0のゲノム編集が成功しているか否かを検証するためにゲノタイピングを行ったが、Layilin欠損マウスであることを確認した。

② L型脂肪酸結合蛋白(L-FABP)によるEMT抑制の機序解明

ア 糖尿病発症ヒトL-FABP染色体遺伝子導入(Tg)マウスの腎臓では、非発症Tgマウスと比較し、有意に腎臓でのL-FABP発現が増加し、尿中L-FABP排泄が高値であった。

イ 糖尿病発症野生型(WT)マウスでは、尿アルブミン排泄が増加したが、糖尿病発症Tgマウスでは、その程度は、有意に抑制されていた。

ウ ミトコンドリア局在の酸化還元酵素(Superoxide dismutase2, SOD2)は、糖尿病発症2WTマウスでは、有意にその発現が低下したが、Tgマウスでは、その発現が維持された。

4. 研究の反省・考察

(1) 急性腎障害の重症化抑制

腎組織からヒストンを抽出し、ヒストンアセチル化程度を評価する。さらに、ChIP解析を行い、尿細管虚血耐性に関連する候補分子のプロモーター領域のヒストンアセチル化程度を評価する。

(2) 尿細管のEMT抑制のための実験計画

① Layilinを介したEMT促進の機序解明

Layilin欠損マウス(F0, F1)から、さらにF2(ホモ)を作成し、フェノタイプの検討を行う。

② L型脂肪酸結合蛋白(L-FABP)によるEMT抑制の機序解明

糖尿病性腎症の尿細管間質障害にL-FABPが、保護的に作用していることを再確認した。次に、L-FABPが、ミトコンドリア機能を維持する事を明らかにする。ミトコンドリアの新生因子(PGC-1 α)、融合関連因子(misofusin)、分裂促進因子(Drpl, Fis1)、オートファージマーカー(Atg5)、マイトファージ促進因子(Pink1)について、抗体を使用し免疫染色を行い、発現部位の確認および定量的評価を行う。さらに、マウス近位尿細管細胞(mProx)およびヒトL-FABP発現mProxを使用し、検証する。

5. 研究発表

(1) 学会誌等
なし

(2) 口頭発表
なし

(3) 出版物
なし

学 校 名	金 沢 医 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	糖尿病合併症の病態形成におけるオートファジーの意義 —オートファジーと糖尿病合併症—		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	① オートファジー ② たんぱく質制限 ③ 糖尿病腎症			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
古 家 大 祐	医 学 部	教 授	研究総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
金 崎 啓 造	医 学 部	准 教 授	実験・データ整理
北 田 宗 弘	医 学 部	准 教 授	実験・論文作成
神 谷 英 紀	愛知医科大学 医学部	准 教 授	実験・データ整理
中 村 二 郎	愛知医科大学 医学部	教 授	実験・データ整理

糖尿病合併症の病態形成におけるオートファジーの意義 —オートファジーと糖尿病合併症—

1. 研究の目的

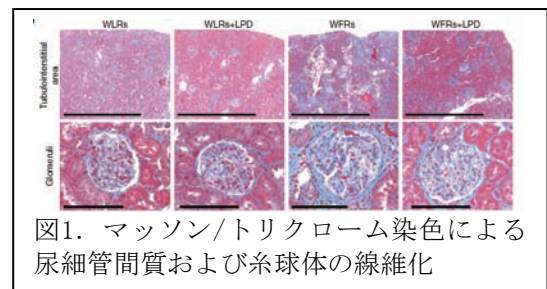
- (1) 糖尿病腎症から末期腎不全となり、透析導入される患者は増加の一途を辿っている。つまり、進行した糖尿病腎症に対する抜本的な治療手段がないのが実情である。そこで、臨床的エビデンスには乏しいが、厳格な低たんぱく質食の限定的な進行した腎症への有効性は報告されている。そこで、本研究では、オートファジーに着目して、厳格な低たんぱく質介入によって、進行した糖尿病腎症が改善されるか否かを明らかにすることを目的とした。
- (2) 既に、進行した糖尿病腎症がオートファジー機構の維持によって改善するとともに、代謝異常も改善傾向を示した。その結果、たんぱく質制限によって代謝改善作用があるのか否かを糖尿病発症早期から検討することを目的とした。

2. 研究の計画

- (1) 24週齢の肥満2型糖尿病ラット(Wistar Fatty rat)に、通常食 (Protein 23.84%、Lipid 16.8%、Carbohydrate 59.36%、Energy 3.55kcal/g ; STD)、低たんぱく質食 (Protein 5.77%、Lipid 16.48%、Carbohydrate 77.75%、Energy 3.54kcal/g; LPD) にて20週間介入して、代謝検査 (HbA1c、インスリン値、シスタチンC)、組織検査 (Masson-Trichrome染色、PAS染色、Kim-1免疫染色、電子顕微鏡検査、CD68免疫染色) と、栄養応答シグナル (mTOR 経路: p-S6RP免疫染色、オートファジー関連: p62免疫染色)、アポトーシス関連: cleaved caspase3 を検討した。一部のラットには、30%カロリー制限を行い同様に組織の検査をした。さらに、LC3-GFPトランスジェニックマウスを用い、オートファジーの可視化した。
- (2) 6週齢の肥満2型糖尿病ラット(Wistar Fatty rat)に、通常食 (Protein 23.84%、Lipid 16.8%、Carbohydrate 59.36%、Energy 3.55kcal/g ; STD)、低たんぱく質食 (Protein 5.77%、Lipid 16.48%、Carbohydrate 77.75%、Energy 3.54kcal/g; LPD) にて24週間介入して、上述した代謝検査に加えて、血中FGF21、アディポネクチン値を測定した。

3. 研究の成果

- (1) 糖尿病ラット (DM)-STD群では、非糖尿病コントロールラット (CONT) と比べ体重、脂肪重量、腎重量の増大を認めたが、DM-LPD群では体重、脂肪重量、腎重量ともに有意に減少した。平均血圧は4群間において差はなかった。摂食量は自由摂食下で、DM群に比べDM+LPD群では食事介入実験期間中、平均15.5%減少していた。DM-STD群においてCONTに比べ上昇したHbA1C値、CHO値はLPD群で有意に低下したが、ITT、GTT、IRI値、TG値、FFA値は両群間で有意な差はなかった。食事介入開始時のUA1b/Cr比およびULFAB/Crは、それぞれCONT群に対して、DM-STD群では有意に増加していた。介入20週間後においては、CONT群に比べDM-STD群ではUA1b/Cr比、血漿シスタチンC値の有意な増加を示した。DM-LPD群ではDM-STD群と比べUA1b・ULFAB・シスタチンC値)の有意な低下を認めた。マッソン/トリクローム染色による尿細管間質および糸球体の線維化は、CONTに比してDM-STD群においては著明に尿細管間質および糸球体の線維化は改善した (図1)。またDM-STD群で増加した腎皮質3型コラーゲンのmRNA発現も同様にDM-LPD群で低下した。尿細管障害スコア、Kim-1免疫組織染色強度、腎皮質Kim-1mRNA発現はいずれもDM-STD群ではCONTと比較して増加し、DM-LPD群で低下した。



CD68免疫組織染色強度、腎皮質CD68、MCP-1、IL-6、TNF- α 、TLR2 mRNA発現はCONTに比べてDM-STD群で有意に増加し、DM-LPD群で改善を認めた。DM-STD群では、近位尿細管細胞におけるミトコンドリアの断片化および膨化の増加、腎皮質におけるcleaved caspase3発現の増加（アポトーシスの増加）を認めたが、DM-LPD群で改善した（図2）。

DM-STD群では、CONT群に比し、p62・p-S6RP免疫染色強度の増強を認めるが、DM-LPD群にて改善した。DM群にて増加する腎皮質p-S6RP発現の増加は、STDからLPDに飼料をスイッチ2週間後で減少したが、DM-STD群とDM-LPD群間でp-Akt発現に差はなかった。

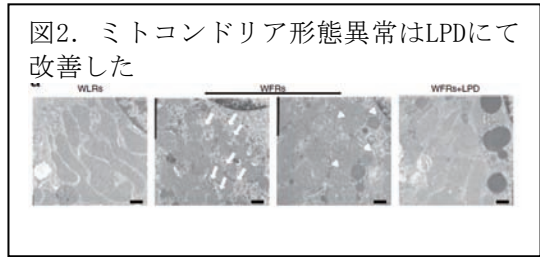
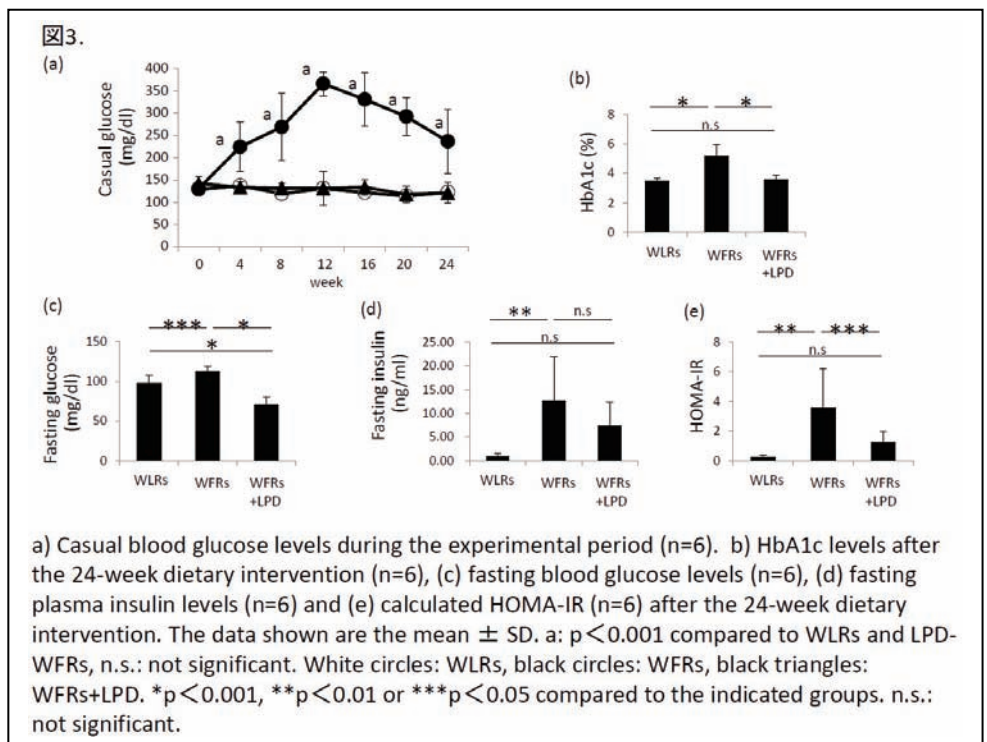


図2. ミトコンドリア形態異常はLPDにて改善した

(2) 6週齢からのDM-LPD介入は、摂餌量にDM-STD群と差がないものの、有意な体重増加と脂肪重量の抑制がみられた。随時血糖、HbA1c、空腹時血糖は、LPD介入によって有意に減少し、空腹時インスリン値は有意にLPD介入によって、STD群と比べて低下した（図3）。これらの結果から、LPD介入によってインスリン感受性の亢進が示唆された。そこで、その分子機構を明らかにする目的に、代謝改善作用を有するアディポネクチンおよびFGF21の血中濃度を測定した。CONT群に比べてDM-STDにて低下したアディポネクチンおよびFGF21濃度は、LPD介入によって改善していた。



4. 研究の反省・考察

低たんぱく質介入によって、糖尿病腎症におけるオートファジー機構の破綻の改善が有効な治療手段であることも報告できた。また、低たんぱく質食による早期からの介入は、糖尿病の増悪を改善する、つまりメタボリックヘルスを誘導することを見出した。その分子機構は、代謝改善作用を有するアディポネクチンとFGF21の増加による可能性が示唆された。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

① Kitada M, Ogura Y, Suzuki T, Sen S, Lee SM, Kanasaki K, Kume S, Koya D. A very-low-protein diet ameliorates advanced diabetic nephropathy through autophagy induction by suppression of the mTORC1 pathway in Wistar fatty rats, an animal model of type 2 diabetes and obesity. Diabetologia. 2016 Jun;59(6):1307-17.

- ② Kitada M, Ogura Y, Koya D. Rodent models of diabetic nephropathy: their utility and limitations. *Int J Nephrol Renovasc Dis.* 2016 Nov 14;9:279-290. eCollection 2016.
- ③ Kitada M, Ogura Y, Koya D. The protective role of Sirt1 in vascular tissue: its relationship to vascular aging and atherosclerosis. *Aging (Albany NY).* 2016 Oct 15;8(10):2290-2307

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	朝 日 大 学 歯 学 部	准 教 授	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	朝 日 大 学 歯 学 部	教 授	遺伝子発現解析実験 データ整理
高 山 英 次	朝 日 大 学 歯 学 部	准 教 授	分子生物学的実験 データ整理
神 谷 真 子	朝 日 大 学 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	朝 日 大 学 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	朝 日 大 学 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	朝 日 大 学 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やエピジェネティック因子の関与について解析することは、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。申請者らは、以下の計画で、細胞移植を伴う骨再生療法での移植細胞の運命と分化過程における調節機構の詳細を、担体となる骨補填材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

異所性骨誘導能評価系、幹細胞移植による骨伝導能評価系の構築を以下の計画により行う。

- (1) ヌードマウス皮下へ、骨補填材（炭酸含有アパタイト（CA）と、比較対照として水酸化アパタイト（HA）、 β リン酸三カルシウム（ β -TCP）を使用する）と共に培養し骨芽細胞様へと分化させた幹細胞の移植、あるいは未分化の状態での骨補填材との同時移植を行い、経時的に組織からパラフィン包埋切片を作製して以下の組織学的解析を行う。

① HE染色、特殊染色を行い、骨様組織の形成について組織化学的に解析する。

② 抗ヒト核抗体を、増殖細胞マーカーや骨芽細胞分化マーカーに対する抗体と組み合わせて蛍光多重染色を行い、その局在と、移植後の幹細胞の宿主側組織での動態を詳細に解析する。

- (2) ラット大腿骨欠損モデルを作製し、骨欠損部へ同様に移植する。

骨髄由来幹細胞、脂肪組織由来幹細胞についてはGFP発現TGラットより細胞を採取することを予定していたが、ヒト由来幹細胞の移植により、ヒト特異的抗体によって検出可能であったこと、歯髄由来の幹細胞も導入可能であることから、ヒト細胞に変更して実験を行うこととし、骨欠損部へ移植を行い(1)と同様に①②の解析を行うとともに、③欠損部の骨再生に伴って出現する破骨細胞の動態を解析する。

3. 研究の成果

(1) ヒト骨髄由来幹細胞（hBMSC）、ヒト歯髄由来幹細胞（hDPSC）、ヒト脂肪組織由来幹細胞（hASC）を骨補填材と共に7日間培養し、骨芽細胞様へと分化させた後にヌードマウス皮下へ移植した群と、培養用ディッシュから酵素処理により回収した未分化な状態の3種の幹細胞をそれぞれ骨補填材と混合して移植した群を作製し、経時的に組織からパラフィン包埋切片を作製して、① HE染色等による組織学的解析、②免疫染色による移植後の幹細胞の動態解析を行い以下の結果を得た。

① HE染色およびコラーゲン線維を染色するピクロシリウスレッド染色、マッソンゴールドナー染色により、骨用組織形成について検討したところ、移植後3週間で、全ての群で線維性コラーゲンの増生がみられたが、とくにhDPSCを用いた群で顕著であった。また、いずれの幹細胞でも、

あらかじめ分化を誘導した群で増生が旺盛であった。さらに6週間後の組織を検討したところ、hBMSCを用いた群で、CA、HAを用いた群で骨補填材周囲に硬組織様組織が形成されたが β -TCP群では石灰化組織はみとめられなかった。

②抗ヒト核抗体により移植幹細胞の検出を行ったところ、いずれの群でも移植後6週間を経過してもヒト核陽性細胞が検出された。また、osterix、osteocalcinをヒト核と共に検出したところ、特にCA、hBMSCを用いた群でヒト核陽性細胞に骨芽細胞マーカー陽性細胞が多数みとめられた。一方で、hDPSCを用いた群では、増殖細胞マーカーKi67陽性細胞が多数みとめられた。さらに、骨補填材を用いず、細胞のみの移植についても検討したが、いずれの幹細胞も移植部に石灰化様組織はみとめられなかった。

(2) ラット大腿骨欠損モデルを作製し、(1)と同様に移植実験を行い、以下の結果を得た。

①骨補填材と共に培養して分化誘導を行った後に移植した群では、CAあるいはHAと組合せたhBMSC群で顕著な新生骨の形成がみとめられた。一方でhASCを移植した群では骨形成が遅延する傾向にあった。

②移植後の組織を回収してRNAを抽出し、骨分化マーカー遺伝子の発現量を、ヒト特異的配列およびラット特異的な配列のプライマーを用いて検討したところ、hBMSCを用いた群でヒトおよびラットの配列ともに、Runx2、osterix、osteocalinの発現上昇が顕著であった。

③術後3か月から6か月で、CA、 β -TCP移植群でTRAP陽性細胞が顕著に検出された。そこで、破骨細胞分化誘導培養系での検討も行ったところ、他の骨補填材と比較して、CAを用いた群で、TRAP陽性細胞、カテプシンK活性陽性の多核の巨細胞が顕著にみられた。また、幹細胞を共培養した群で多核巨細胞の割合が多く、特にhBMSCを組合せた群で顕著であった。

4. 研究の反省・考察

(1) 幹細胞の異所性骨誘導能評価

①ヌードマウス皮下への骨補填材の移植実験ではCAとHAにのみ硬組織様組織形成をみとめられ、hBMSCとの組合せにより、硬組織形成が促進され、 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たが、幹細胞のみでは異所性骨誘導がみられなかったことから、骨の無機成分であるリン酸カルシウムと共存することで、骨芽細胞への分化、骨形成へと機能することが示唆された。また、hDPSCでは骨芽細胞への分化がhBMSCと比較して少数であったが、移植後も増殖を続けて生存していること示された。

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、hDPSC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、移植後の組織で長期間生存し、増殖していることが示唆され、用途によっては幹細胞移植療法に効果をもたらす可能性が示唆された。

(2) 骨欠損部への幹細胞移植による骨伝導能評価

皮下組織と異なり、骨欠損部では、hBMSCとhDPSCは細胞を移植しない群に比べて新生骨の形成を促進し、細胞移植が骨再生療法に効果的であることが示唆された。特にhBMSCでは骨分化マーカー遺伝子の発現上昇が顕著であり、ジェネティックおよびエピジェネティックな遺伝子発現変化の解析を行うための試料採取も継時的に行うことができた。一方でhASCを移植した群では骨再生が遅延する傾向がみられ、骨組織内への移植とい環境下でも由来組織により細胞の動態が異なることが示された。また、破骨細胞分化についてもhBMSC共存下で破骨細胞の分化が促進されていることから、hBMSCの関与を培養系でも検討する必要があると考えられた。

以上の結果から、骨再生には比較した3種の幹細胞では骨髄由来のhBMSCが最も適しており、由来組織によって移植後の幹細胞の動態が異なること、骨再生の過程で破骨細胞分化にも作用を及ぼすこと、骨補填材としてはハイドロキシアパタイトを主体とするCA、HAが骨再生に適した足場であり、特にCAは破骨細胞による吸収を受け得る材料であることが示された。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Adachi N, Takayama E, Adachi M, Mizuno-Kamiya M, Kawaki H, Takeuchi H, Kubo S, Ishigami H, Kurachi M, Kondoh N. Promotion of Nickel (Ni) Allergy by Anamnestic Sensitization with a Bacterial Component, Lipopolysaccharide (LPS), in Mice. *Open Dentistry Journal*. 2016. 30:10531-10537.
- ② Kawaki H, Kubota S, Takigawa M. Analysis of expression of CCN family genes in skeletal tissue-derived cells. *Methods of Molecular Biology*. 2017. 1489:33-41.
- ③ Kubota S, Kawaki H, Takigawa M. ELISA of CCN family proteins in body fluids including serum and plasma. *Methods of Molecular Biology*. 2017. 1489:127-138.
binding to CCN family proteins. *Methods of Molecular Biology*. 2017. 1489:155-167.
- ④ Kubota S, Kawaki H, Takigawa M. Protocols for screening peptide motifs for CCN family proteins. *Methods of Molecular Biology*. 2017. 1489:139-143.
- ⑤ Sumi S, Umemura N, Takayama E, Ohkoshi E, Adachi M, Mizuno-Kamiya M, Inagaki T, Kawaki H, Sumitomo S, Kondoh N. Metastasized murine oral squamous cell carcinoma cells induce intratumoral polymorphonuclear myeloid derived suppressor cells. *Oncology Report*. 2017. 37:2897-2904.
- ⑥ Masuda J, Takayama E, Strober W, Satoh A, Morimoto Y, Honjo Y, Ichinohe T, Tokuno SI, Ishizuka T, Nakata T, Mizutani A, Umemura N, Kitani A, Fuss IJ, Shigehiro T, Kawaki H, Mizuno-Kamiya M, Kondoh N, Seno M. Tumor growth limited to subcutaneous site vs tumor growth in pulmonary site exhibit differential effects on systemic immunities. *Oncology Report*. 2017. (in press)

(2) 口頭発表

- ① Hayashi Y, Kawaki H, Hori M, Hasegawa T, Tanaka M, Kawano S, Yoshida T, Tamaki Y. Characteristics of experimental calcium silicate as a pulp capping material. *International Dental Materials Congress 2016*. 2016年11月4日～6日. Bali, Indonesia.
- ② Uno M, Kawaki H, Doi Y, Kurachi M, Ishigami H. Effect of surface treatment on the bond strength between zirconia ceramic and core resin. *International Dental Materials Congress 2016*. 2016年11月4日～6日. Bali, Indonesia.
- ③ 近藤雄三, 山田尚子, 川木晴美, 高橋 潤, 長谷川ユカ, 近藤信夫, 玉置幸道, 永原國央. チタン表面への簡便なカルシウム修飾法の検討. 第20回日本顎顔面インプラント学会. 第20回日本顎顔面インプラント学会. 2016年12月3日～4日. 東京.

(3) 出版物

なし