

学 校 名	岩 手 医 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	抗炎症性血球細胞ニッチ誘導による抗粥状硬化症新規治療法の開発 —革新的細胞治療による抗動脈硬化療法の開発—		研究分野	医 学
キ ー ワ ー ド	①歯周病 ②動脈硬化症 ③M2マクロファージ ④間葉系幹細胞 ⑤ニッチ ⑥細胞治療 ⑦アテローム硬化			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
石 崎 明	歯 学 部	教 授	研究の計画、研究全般

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
八 重 柏 隆	歯 学 部	教 授	研究の計画、研究全般
原 田 英 光	歯 学 部	教 授	研究の計画、組織学的実験
佐 原 資 謹	歯 学 部	教 授	研究の計画、動物学的実験
加 茂 政 晴	歯 学 部	准 教 授	細胞培養実験、分子生物学的実験
客 本 齊 子	歯 学 部	研 究 員	細胞培養実験、分子生物学的実験
帖 佐 直 幸	歯 学 部	准 教 授	細胞培養実験、分子生物学的実験
滝 沢 尚 希	歯 学 部	助 教	細胞培養実験、動物実験、分子生物学的実験

# 抗炎症性血球細胞ニッチ誘導による 抗粥状硬化症新規治療法の開発 — 革新的細胞治療による抗動脈硬化療法の開発 —

## 1. 研究の目的

- (1) アテローム硬化症の発症や進行には炎症性マクロファージ (M1-MΦ) のプラーク周囲への浸潤が著明であり炎症巣としての病変は明らかであるが、炎症症状を抑制する機能を有する抗炎症性マクロファージ (M2-MΦ) の集積は少ない。また、他の研究グループによる動物実験で明らかとされたエビデンスにより、多くの M2-MΦ をプラーク周囲に集積させ、その抗炎症機能を強く発現させればアテローム硬化症は治癒に向かうことは間違いないと考えられる。しかし、自己の M2-MΦ を *ex vivo* で大量に増殖させる技術や、プラーク周囲に M2-MΦ を選択的に集積させる技術は確立されていない。加えて、プラーク周囲への歯周病菌の感染が、どのようにアテローム硬化症の発症の誘導に関わるかは分子レベルで不明である。
  - ① これまでの我々の調査により明らかとなった抗炎症性血球細胞ニッチとしての間葉系幹細胞と M2-MΦ あるいはその前駆細胞との細胞間相互作用による M2-MΦ の活性化機構について、分子生物学レベルで明らかとする。
  - ② ① で明らかとされた間葉系幹細胞による M2-MΦ の活性化機構を応用した *ex vivo* M2-MΦ 大量培養系を確立し、間葉系幹細胞と M2-MΦ との併用による革新的な細胞治療基盤を動物実験レベルで樹立する。
  - ③ 間葉系幹細胞と M2-MΦ との相互作用によるアテローム硬化治癒機構に歯周病がどのように関わるかについて分子生物学レベルで明らかとする。

## 2. 研究の計画

抗炎症性血球細胞ニッチとしての間葉系幹細胞と M2-MΦ あるいはその前駆細胞との細胞間相互作用による M2-MΦ の活性化機構の全容について、分子生物学レベルで明らかとする。

- (1) M2-MΦ 前駆細胞の増殖・分化を促進する因子 (液性因子、接着因子) の候補となるモデル因子 (遺伝子) のピックアップをする。
  - ① マウス脛骨髄より骨髄細胞を採取し我々の確立した独自の条件下で培養を行う。この条件下では間葉系幹細胞と血球系細胞の共存下、M2-MΦ が増殖することが分かっている。共培養 (赤血球は培地交換時に除かれる) を行った細胞を Lineage Depletion Kit を用いて間葉系幹細胞と Lin+ 細胞に分離する。
  - ② ① により得た間葉系幹細胞と Lin+ 細胞を用いて、A. それぞれの単独培養、B. トランスウェルを利用した非接着共培養、C. 接着共培養の3つの培養法を行う。培養後、間葉系幹細胞と Lin+ 細胞をそれぞれ回収し mRNA を抽出する。C では混在する両細胞を上記キットで分離してそれぞれの mRNA を得る。次いで DNA アレイ法により間葉系幹細胞と Lin+ 細胞それぞれにおいて A と B 間、また B と C 間に発現頻度差のある遺伝子を網羅的に解析しピックアップする。この中から細胞増殖因子、サイトカイン、受容体ならびに接着因子を見いだして候補 (モデル) 遺伝子とする (A と B 間では液性因子、B と C 間では接着因子としてのモデル因子がピックアップされる)。
- (2) M2-MΦ 増殖・分化を制御する液性因子と接着性因子の同定
  - ① (1)-② でピックアップされたモデル因子が M2-MΦ 前駆細胞の増殖・分化誘導能があるか各因子 (遺伝子) 過剰発現系を用いて検討する。この際、因子の発現ベクターが市販されている場合はこれを用いるが、そうでない場合には、因子をクローニング (In-Fusion cloning) 後アデノウイルス発現ベクターを構築し、これを用いて間葉系幹細胞ならびに、骨髄を採取し分離した Lin+ 細胞にモデル因子をそれぞれ過剰発現させる。
  - ② (2)-① によりモデル因子を過剰発現させた間葉系幹細胞と Lin+ 細胞を共培養し、(ア) 細胞増殖能を調べる (過剰発現させない場合と比較)。(イ) 共培養した間葉系幹細胞から

Lin<sup>+</sup>細胞を(1)-①の方法により分離し、M2-Mφマーカー(IL10, Arg-1, CD206)の発現を調査する。これら(ア), (イ)より、ピックアップされたモデル因子が実際にM2-Mφ前駆細胞の増殖・分化を促進するか否かが明らかになり、真の因子(液性因子と接着因子)が同定される。

### 3. 研究の成果

- (1) M2-Mφ前駆細胞の増殖・分化を促進する因子(液性因子、接着因子)の候補となるモデル因子(遺伝子)のピックアップと一部因子の同定に成功した。
  - ① マウス脛骨髄より骨髄細胞を採取して低酸素条件(5% O<sub>2</sub>ならびに5% CO<sub>2</sub>の条件)で培養すると、IL-10を分泌するM2-Mφが大量に得られることを明らかとした。そこで、この低酸素培養におけるM2-Mφ増殖促進メカニズムについて細胞・分子レベルで明らかとするため、この骨髄細胞を構成する間葉系幹細胞と血球系細胞とを分離した後、各細胞間で5倍以上発現の異なる遺伝子について調査した。とくに、間葉系幹細胞で多く発現するサイトカインと血球細胞側で多く発現するサイトカイン受容体との組合せを検討したところ、macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)とM-CSF受容体の組み合わせが明らかとなった。加えて我々は、この間葉系幹細胞から産生・分泌されるM-CSFが骨髄細胞に含まれるM2-Mφ前駆細胞を刺激して増殖させることを明らかとした
  - ② 間葉系幹細胞の表面に発現する接着因子intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)とM2-Mφ前駆細胞の表面に発現する接着因子lymphocyte function associated antigen-1 (LFA-1)との結合により、M2-Mφ前駆細胞が成熟したM2-Mφに分化誘導されることを明らかとした。
  - ③ 我々が発見した骨髄細胞の低酸素培養条件では、通常の培養条件と比較しても間葉系幹細胞からのM-CSFの発現やM2-Mφ前駆細胞におけるM-CSF受容体の発現が促進される訳ではなく、低酸素培養によりM2-Mφ前駆細胞を選択的に増殖させるためにはM-CSFとその受容体を介した増殖メカニズムのみならず、その他の分子メカニズムの存在が示唆された。現在、この分子メカニズムを解明するため、低酸素培養と通常培養条件下で発現が異なる遺伝子発現について各細胞で明らかにすべく調査を実施しているところである。この研究結果が明らかとなれば、我々の発見した骨髄細胞の低酸素培養での選択的なM2-Mφの増殖メカニズムの全容解明に近づくものと大いに期待される。

### 4. 研究の反省・考察

- (1) M2-Mφ増殖・分化を制御する液性因子と接着性因子のさらなる同定を継続中である。
  - ① 平成29年度研究計画に従い、細胞単独培養、非接着性共培養ならびに接着性共培養の間で比較した際に各々の培養条件で発現の異なる遺伝子を同定するための研究を実施しているところであるが、3-(1)-①ならびに②に記載した液性因子と接着因子以外には新たに同定された分子は得られていない。このため、M2-Mφ増殖・分化を制御する液性因子と接着性因子のさらなる同定を継続中である。
- (2) M2-Mφ大量培養キー遺伝子の同定を実施している。
  - ① 上記3-(1)-③にも記載したように、低酸素培養と通常培養条件下で発現が異なる遺伝子発現についても調査中であり、これらの研究によりモデル遺伝子のピックアップと、それらの中からのM2-Mφ大量培養キー遺伝子の同定を継続して実施している。

### 5. 研究発表

#### (1) 学会誌等

- ① Takizawa, N., Okubo, N., Kamo, M., Chosa, N., Mikami, T., Suzuki, K., Yokota, S., Ibi, M., Ohtsuka, M., Taira, M., Yaegashi, T., Ishisaki, A., and Kyakumoto, S. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells propagate immunosuppressive/anti-inflammatory macrophages in cell-to-cell contact-independent and -dependent manners under hypoxic culture. *Exp. Cell Res.*, 358: 411-420, 2017.
- ② Nemoto, A., Chosa, N., Kyakumoto, S., Yokota, S., Kamo, M., Noda, M., and Ishisaki, A. Water-soluble factors eluted from surface pre-reacted glass-ionomer

filler promote osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Mol. Med. Rep.*, 17: 3448-3454, 2018.

- ③Chosa, N., and Ishisaki, A. Two novel mechanisms for maintenance of stemness in mesenchymal stem cells: SCRG1/BST1 axis and cell-cell adhesion through N-cadherin. *Jpn. Dent. Sci. Rev.*, 54: 37-44, 2018.
  - ④石崎 明、帖佐直幸. 間葉系幹細胞の幹細胞性維持のために働く新たな分子機構. *生化学*, 89: 428-431, 2017.
  - ⑤Kikuchi, K., Masuda, T., Fujiwara, N., Kuji, A., Miura, H., Jung, H-S., Harada, H., and Otsu, K. Craniofacial bone regeneration using iPS cell-derived neural crest like cells. *J. Hard Tissue Biol.*, 27: 1-10, 2018.
  - ⑥Shimizu, T., Wisessmith, W., Li, J., Abe, M., Sakimura, K., Chetsawang, B., Sahara, Y., Tohyama, K., Tanaka, K.F., Ikenaka, K. The balance between cathepsin C and cystatin F controls remyelination in the brain of Plp1-overexpressing mouse, a chronic demyelinating disease model. *Glia* 65:917-930, 2017.
- (2) 口頭発表
- ①客本齊子、滝沢尚樹、大久保直登、加茂政晴、帖佐直幸、横田聖司、大塚正人、衣斐美歩、八重柏隆、石崎 明. 低酸素培養下においてマウス骨髄由来間葉系幹細胞は細胞間接着依存的ならびに非依存的に免疫抑制（抗炎症）性マクロファージ（M2-MΦ）を誘導する. 第40回日本分子生物学会年会, 2017年12月7日（神戸ポートアイランド）
  - ②根本 章、帖佐 直幸、客本齊子、横田聖司、加茂政晴、野田 守、石崎 明. 歯科材料からの溶出成分がヒト間葉系幹細胞の骨芽細胞分化に与える影響. 第40回日本分子生物学会年会, 2017年12月7日（神戸ポートアイランド）
  - ③太田麻衣子、帖佐直幸、横田聖司、客本齊子、加茂政晴、佐藤健一、城 茂治、石崎 明. 歯周靭帯由来細胞における神経栄養因子NGFの発現機構に関する研究. 第40回日本分子生物学会年会, 2017年12月7日（神戸ポートアイランド）
  - ④Harada H. Contact inhibition of locomotion via EMT by TGF-Rho signal leads to genesis of Epithelial cell rests of Malassez from Hertwig' s epithelial root sheath. 15<sup>th</sup> Annual Meeting of the Korean Basic Dental Science Society Association, 25 November 2016 (Seoul, Korea)
- (3) 出版物  
なし

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 －iPS細胞移植によるin vivoモデルの病態解析－		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) 優性遺伝性パーキンソン病 (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 使用した 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 1 名の iPSC 1 株を用いる。また、本研究で樹立したゲノム編集で I2020T 変異を修復した PD 患者 iPSC (ゲノム編集 iPSC) も使用する。分化誘導法は、iPSC から神経幹細胞 (NS) を形成させて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。
  - ② iPSC-NS 移植マウスを作製するために、8~22 週齢の雄性 SCID マウスまたは雄性 RAG2-KO マウスを使用し、ソムノペンチル麻酔下で脳定位固定装置に固定し切開後、マイクロシリンドジを用いて右線条体 (Br; 0.0 mm, L; 2.0 mm, D; 3.0mm) に iPSC-NS 懸濁液を  $4 \times 10^5$  cells/4  $\mu$ l ずつ移植する。また Injection control として、NS 用培地を移植する。
  - 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、オープンフィールド、ロータロッドテスト、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。
  - ⑤ 一部の移植マウスは、解剖時に右および左線条体領域を摘出して RNA を抽出し、炎症関連シグナル伝達分子および炎症性サイトカイン群の mRNA 発現レベルを定量的 PCR で調べる。さらに、摘出した線条体または中脳について、HPLC を用いて脳内モノアミンの測定を行う。
- (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
  - ① TALEN 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。
  - ③ LRRK2-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。
  - ④ PD 患者 iPSC およびゲノム編集 iPSC 由来神経細胞に対して、薬剤スクリーニングによる神経保護効果薬の探索を行う。神経保護効果の指標は、酸化ストレスに対するアポトーシスの抑制、神経突起や軸索の伸長について評価する。
- (3) I2020T-LRRK2 トランスジェニックマウスにおける遺伝子修復 iPSC の細胞治療
  - ① 申請者の研究室が作製の I2020T-LRRK2 トランスジェニックマウス (LRRK2-TG マウス) は、23 および 34 週齢において運動機能異常を示すことを報告している (Molecular Neurodegener 2012)。LRRK2-TG マウスを繁殖させ、移植に備えて 20 週齢および 30 週齢まで育成する。
  - ② 樹立ゲノム編集 iPSC-NS を実験 I と同様の方法で線条体に移植する。移植後、細胞治療による治療効果として、運動機能テストを行い、運動機能異常の改善がみられるかどうかを評価する。
  - ③ 移植マウスは、免疫組織化学染色による形態学的解析と HPLC による生化学的解析を行い、

病態の改善がみられるかどうかを評価する。

### 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33週の長期移植におけるPD患者iPSC-NS移植SCIDマウスから作製した脳凍結切片を用いて、HE染色を行った。その後、ヒト特異的抗体STEM121（細胞質タンパク質）およびSTEM123（アストロサイトGFAPタンパク質）を用いて免疫組織化学染色を行った結果、移植側の線条体において、iPSC-NS由来の神経細胞およびアストロサイトの生着を確認した。さらに、STEM121抗体陽性神経細胞がTH抗体と共局在していることを確認した。また、移植後31週のPD患者iPSC-NS移植SCIDマウスにおいては、ヒト特異的抗体STEM101（核タンパク質）、STEM121、STEM123にそれぞれ陽性を示す細胞を多数確認した。さらに、STEM121抗体がヒト神経細胞特異的なhMAP2抗体と共局在していることを確認した。同様に、移植後33週のPD患者iPSC-NS移植RAG2-KOマウスにおいても、STEM121抗体陽性神経細胞がTH抗体と共局在していることを確認した。また、移植後36週および39週のPD患者iPSC-NS移植RAG2-KOマウスにおいても、STEM121抗体陽性神経細胞を確認した。
- ③ 移植したPD患者iPSC-NS由来細胞がマウスミクログリアに及ぼす影響を調べるために、Iba1抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。その結果、移植後33週のSCIDマウスにおける移植側の線条体ミクログリアは、非移植側に比べ、形態学的な変化や細胞数に差異はみられなかった。しかし、移植側の線条体ミクログリアは、細胞質が肥大したPD患者iPSC-NS由来アストロサイトの周囲に多数存在していた。
- ④ iPSC-NS移植による運動機能の差異を調べるため、移植後3日から195日間におけるPD患者iPSC-NS移植SCIDマウス群とInjection control SCIDマウス群について、シリンダーテストを行った。その結果、PD患者iPSC-NS移植SCIDマウス群では、Injection control SCIDマウス群に比べ、立ち上がり時の前肢がシリンダー壁内に触れる回数に増加傾向がみられた。また、前肢がシリンダー壁内に触れる回数に左右差はみられなかった。また、移植後36日から181日までの期間におけるPD患者iPSC-NS移植SCIDマウス群とInjection control SCIDマウス群について、飲水および摂食テストを行った結果、PD患者iPSC-NS移植SCIDマウス群において、飲水量および摂食量が減少している傾向がみられた。オープンフィールド、ロータロッドテストについては、現在解析中である。
- ⑤ 移植した健常者およびゲノム編集、PD患者iPSC-NS由来細胞がマウスミクログリアに及ぼす影響を調べるために、健常者およびゲノム編集、PD患者iPSC-NS移植SCIDマウスを作製した。移植後3週、10週、20週、31週の各iPSC-NS移植SCIDマウスにおける脳凍結切片を作製し、免疫組織化学染色を行い、現在解析中である。
- ⑥ iPSC-NS移植細胞が誘発するミクログリアの活性化について明らかにするために、移植後20週の健常者およびゲノム編集、PD患者iPSC-NS移植SCIDマウス群の線条体におけるmRNA発現レベルを調べた。mRNA発現解析の結果、PD患者iPSC-NS移植SCIDマウス群では、健常者およびゲノム編集iPSC-NS移植SCIDマウス群に比べ、ERK1、p38、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ のmRNA発現レベルが増加していた。

#### (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

- ① 低分子化合物を用いて、樹立したゲノム編集iPSCから神経細胞を分化誘導した。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。
- ② 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。

- ③5種の既存化合物を用いた解析から、アポトーシスの抑制、神経突起や軸索の伸長を示すCompound Xを見出した。現在、詳細を解析中である。
- (3) I2020T-LRRK2 トランスジェニックマウスにおける遺伝子修復 iPSC の細胞治療
- ①現在、LRRK2-TGマウスを繁殖させ、移植に備えて20週齢および30週齢まで成育中である。今後、LRRK2-TGマウスに遺伝子修復iPSC-NSを実験(1)と同様に脳内移植する予定である。

#### 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
- ①PD患者iPSC-NS移植SCIDマウスの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、健常者およびゲノム編集iPSC-NS移植SCIDマウスを作製し、病態解析を現在進めている。
- ②PD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、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。
- ③移植後20週の PD患者iPSC-NS移植SCIDマウス群では、健常者およびゲノム編集iPSC-NS移植SCIDマウス群に比べ、炎症性サイトカインが増加していたため、今後再現実験を行う必要がある。
- (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樹立したゲノム編集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、ゲノム編集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。
- ②今回のゲノム編集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。
- ③既存化合物を用いた解析から、アポトーシスの抑制、神経突起や軸索の伸長を示すCompound Xを見出したため、今後詳細について解析を必要がある。
- (3) I2020T-LRRK2 トランスジェニックマウスにおける遺伝子修復 iPSC の細胞治療
- ① 現在、LRRK2-TGマウスを繁殖させ、移植に備えて20週齢および30週齢まで成育中である。今後、LRRK2-TGマウスに遺伝子修復iPSC-NSを脳内移植する予定である。

#### 5. 研究発表

- (1) 学会誌等
- ①Murakami N, Ishikawa T, Kondo T, Keiko Imamura, Tsukita K, Enami T, Funayama M, Shibukawa R, Matsumoto S, Izumi Y, Ohta E, Obata F, Kaji R, Inoue H. Establishment of DYT5 patient-specific induced pluripotent stem cells with a GCH1 mutation. *Stem Cell Res.*, 24, 36-39, 2017.
- ②Ohta E, Sone T, Obinata Y, Ukai H, Hisamatsu T, Kitagawa T, Ishikawa M, Komano H, Ueda HR, Obata F, Okano H. Generation of gene-corrected iPSC from patient-derived iPSC with familial Parkinson's disease: International Society for Stem Cell Research 2017 Annual Meeting, USA(Boston) 2017.
- ③Obinata Y, Iwashita Y, Nagai M, Hattori A, Eshima K, Obata F, Okano H, Ohta E. Generation of a mouse model of familial Parkinson's disease bearing patient iPSC-derived transplanted neurospheres: XXIII World Congress of Neurology, Japan(Kyoto) 2017.
- ④Ohta E, Obinata Y, Iwashita Y, Nagai M, Hattori A, Eshima K, Obata F, Okano H. Generation of a mouse model of familial Parkinson's disease bearing patient



iPSC-derived transplanted neurospheres: The 8th meeting of Asian Cellular Therapy Organization, Japan(Tokyo) 2017.

- ⑤大日方友理、岩下由佳、永井真貴子、服部精人、江島耕二、岡野栄之、小幡 文弥、太田悦朗「遺伝性パーキンソン病患者iPS細胞由来神経幹細胞移植マウスの作製」 第40回日本神経科学大会、2017年7月
  - ⑥大日方友理、岩下 由佳、永井 真貴子、服部 精人、江島 耕二、小幡 文弥、川村 俊彦、岡野 栄之、太田悦朗「遺伝性パーキンソン病患者iPS細胞由来神経幹細胞移植マウスの作製および病態解析」 第17回日本再生医療学会総会、2018年3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、川村俊彦、岡野栄之「遺伝性パーキンソン病患者iPS細胞由来神経細胞における経時的なmRNA発現解析」 第17回日本再生医療学会総会、2018年3月
- (3) 出版物
- ①高橋良輔（企画）、太田悦朗（分担執筆）：週刊「医学のあゆみパーキンソン病の新展開－発症の分子機構と新規治療」（担当箇所：LRRK2(PARK8)の病態）、医歯薬出版株式会社、262巻6号、pp. 591-596、2017

学 校 名	東京慈恵会医科大学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	動脈管閉鎖機序の解明 －動脈管開存症の新たな治療法開発をめざして－		研究分野	医 学
キ ー ワ ー ド	①未熟児 ②胎児循環 ③血管生物学 ④先天性心疾患 ⑤プロスタグランジン ⑥血管リモデリング ⑦内皮細胞 ⑧治療法開発			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
南 沢 享	医学部 医学科 細胞生理学講座	教 授	研究の立案と統括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
赤 池 徹	医学部 医学科 細胞生理学講座	講 師	分子生物学的実験を担当

# 動脈管閉鎖機序の解明

## —動脈管開存症の新たな治療法開発をめざして—

### 1. 研究の目的

動脈管は胎生期に肺動脈と大動脈とを連結して、右室からの血液を直接、体循環に送る大血管であるが、出生後数日で閉鎖しなくてはならない。出生後も動脈管が閉鎖しない場合を動脈管開存症 (PDA) と呼び、未熟児に高頻度 (出生体重 1500 g 未満の低出生体重児の 40-50%) で認められ、未熟児の予後を決定する因子として極めて重要である。未熟児 PDA への治療はカテーテル治療や手術治療が困難なため、動脈管収縮を促すインドメタシンなどのプロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 合成阻害剤による薬物療法が主体となるが、無効例や副作用も多い。しかし、インドメタシンに代わる新たな薬剤は未だに開発されていない。申請者らは PGE<sub>2</sub> が動脈管拡張という機能的役割以外に、その特異的受容体 EP<sub>4</sub> を介して、動脈管血管内膜肥厚を促進すること及び動脈管弾性線維の形成不良の主因となることを明らかにした。これらの一連の先行研究によって「動脈管の恒久的な閉鎖には血管収縮のみならず、構造的機能的分化・成熟を促すことが重要である」ことが明らかとなり、本研究では、動脈管の閉鎖・開存を制御する分子機序に基づいた新たな治療法を開発・確立することを目的とした。小児医療の分野では極めて重要な研究課題であるが、基礎的研究が進展していないため、本研究によって PGE<sub>2</sub> 合成阻害剤に代わる新たな治療法が開発が期待され、新生児・小児医療上の臨床的意義が大きいと考えられる。また、本研究により得られた知見は、動脈硬化や機械的血管内皮障害によって、病的な内膜肥厚が形成されることや加齢に伴い血管弾性線維の低形成が生じることから、血管病変の病態の解明に寄与すると考えられる。

### 2. 研究の計画

#### (1) 動脈管内皮細胞特異的因子の役割解明:

先行研究で見出した動脈管内皮細胞に高発現する因子が血管収縮や組織構築に果たす役割を明らかにすることを目指した。血管内皮細胞は血管内腔に面し、血流中の様々な刺激や変化を最初に感知し、血管全体に伝える。そのために血管内皮細胞は一酸化窒素 (NO) やエンドセリンの産生をはじめ、重要な血管機能が備わっている。動脈管で酸素や PGE<sub>2</sub> に対して感受性が高い原因には、それらを感知する内皮細胞の性質が、隣接する他の血管の内皮細胞の性質と異なることが推測される。我々は先行研究において FACS 法を用いてラット胎仔動脈管内皮細胞を単離・収集し、DNA マイクロアレイ法を用いて、動脈管内皮細胞で高発現している遺伝子の同定に初めて成功した。これらの遺伝子群の中から、血管リモデリングに関与する可能性の高い遺伝子をさらに選択し、神経堤細胞に高発現するとされる Tbx1、Pitx2、Fgf10 が血管収縮や組織構築に大きな役割を果たすと考え、その役割を明らかにすることを目指した。

#### (2) PGE<sub>2</sub>-EP<sub>4</sub> 刺激下における非 cAMP 経路の動脈管閉鎖機序の解明:

先行研究の結果、EP<sub>4</sub> 刺激が弾性線維形成を抑制する下流シグナルとして Src-PLC 経路が働くことを平滑筋培養細胞実験において見出した。しかし、実際の生体内でこの経路が働いているのかに関しては実験的に確かめられていない。弾性線維は EP<sub>4</sub> 刺激によって、細胞外での架橋形成が不良になる。そこで動脈管平滑筋細胞に EP<sub>4</sub> 刺激を与えた際に分泌が変化するエラスチン以外の細胞外基質因子を LC-MS/MS 分析法で調べた。これによって EP<sub>4</sub> 下流における cAMP を介さない経路の同定と機能解明について実験的に検証した。

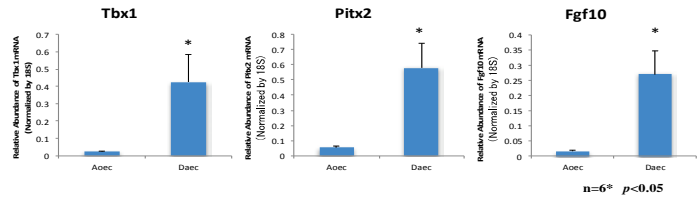
#### (3) PGE<sub>2</sub>-EP<sub>4</sub> シグナル経路を介さない動脈管リモデリング因子の同定:

平成 29 年度は酸素分圧の上昇と動脈管リモデリングの研究に着手した。動脈管平滑筋培養細胞を 1% 低酸素下で培養後に、正常酸素下 (21%) に戻す実験系において、低酸素から正常酸素下に戻した過程で、培養上清中に分泌が変化する細胞外基質因子を LC-MS/MS 分析法で調べた。さらに PGE<sub>2</sub>-EP<sub>4</sub> シグナルを介さない経路の研究のため、胎生期の PGE<sub>2</sub> 主要産生臓器である胎盤を持たない鳥類 (ニワトリを使用) の動脈管におけるリモデリング機序の解明にも着手した。

### 3. 研究の成果

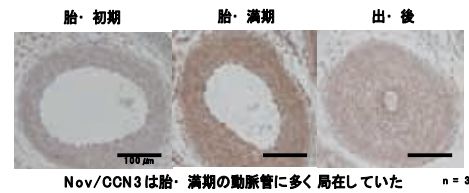
#### (1) 動脈管内皮細胞特異的因子の役割解明

先行研究 (Liu et al. Plos One 2013)で見出した動脈管内皮細胞に高発現する遺伝子のうち、Tbx1、Pitx2、Fgf10が血管収縮や組織構築に大きな役割を果たすと考えた。最初にFACS法を用いてラット胎仔・新生仔動脈管内皮細胞を単離・収集し、RT-PCR法でこれらが動脈管内皮細胞で高発現していることを確認した(右図: 生直後: 各パネル左が大動脈内皮細胞、右が動脈管内皮細胞)。Fgf10に関しては、免疫染色法にて、ラット動脈管内皮細胞に高発現していることも確認できた。その他、eNOS、エンドセリン受容体(A、B)、P2X4などが動脈管内皮細胞で特異的に発現が上昇していることをRT-PCRで確認した。



#### (2) PGE<sub>2</sub>-EP4 刺激下における非 cAMP 経路の動脈管閉鎖機序の解明

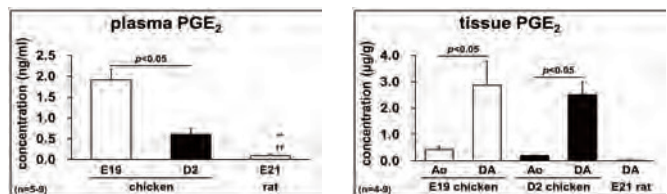
EP4刺激が弾性線維形成を抑制するSrc-PLC経路を検証するのに先だって、動脈管平滑筋細胞にEP4刺激を与えた際に分泌される、エラスチン以外の細胞外基質因子をLC-MS/MS分析法で調べた。その結果、Nov/CCN3が有意にPGE<sub>2</sub>およびEP4刺激により動脈管平滑筋細胞培養上清中に増加することを見出した。Nov/CCN3は他の血管でリモデリングに影響を及ぼす可能性が示唆されているものの、これまで、動脈管リモデリングについては全く研究がなされていなかった。そこで、Nov/CCN3リコンビナントタンパク質を使って、Nov/CCN3が動脈管平滑筋細胞からのヒアルロン酸の分泌量を低下させること、平滑筋細胞増殖能へは大きな影響を与えないことを明らかにした。EP4刺激によって、細胞外基質が複雑に変化し、動脈管リモデリングに影響を及ぼす可能性が示唆された。また、Nov/CCN3が胎生後期のラット動脈管に強く発現することを見出した(右図)。



#### (3) PGE<sub>2</sub>-EP4 シグナル経路を介さない動脈管リモデリング因子の同定

動脈管平滑筋培養細胞を1%低酸素下で培養後に、正常酸素下(21%)に戻す実験系において、低酸素から正常酸素化過程で、培養上清中のエラスチンが減少すること、平滑筋細胞内カルシウム濃度が上昇すること、平滑筋細胞遊走能が亢進することを見出した。これらの結果は酸素化が動脈管リモデリングを促進していることを強く示唆していた。

また、ニワトリ胚を使った実験において、まずPGE<sub>2</sub>が本当に少ないのかどうかを検証したところ、想定外にもニワトリ胚の血中PGE<sub>2</sub>濃度はラット胎児以上に高値であった。さらに血管組織においてもニワトリ動脈管ではPGE<sub>2</sub>濃度が大動脈に比して有意に高値であった(右図)。



### 4. 研究の反省・考察

#### (1) 動脈管内皮細胞特異的因子の役割解明

- ①ラット動脈管内皮細胞において、Tbx1、Pitx2、Fgf10の発現が高いことが確認できた。この結果からラット動脈管内皮細胞の多くは神経堤細胞由来であることが示唆された。本結果はラットのみならず、今後、ヒト動脈管組織を収集し、Tbx1、Pitx2、Fgf10などの内皮細胞での発現確認が必要である。
- ②当初計画していたラット動脈管内皮細胞の継代培養実験系は、平成29年度内では確立できてなかった点が反省点である。この大きな原因は小さい組織から十分量の細胞数を取るための細胞分離方法が試行段階であることである。実験個体数を増加させる、分離の負荷を減らす工夫をして生細胞数を多くするなど、細胞数の確保を目指す必要がある。

(2) PGE2-EP4 刺激下における非 cAMP 経路の動脈管閉鎖機序の解明

- ① Nov/CCN3はこれまで、動脈管リモデリングについては全く研究がなされていなかったことから、今後、その機能解明をさらに進めていくことが期待される。
- ② 一方、EP4-Src- PLC経路が生体内においても弾性線維形成の抑制に働くことを検証する実験があまり進展しなかったことが反省点である。

(3) PGE2-EP4 シグナル経路を介さない動脈管リモデリング因子の同定

- ① 平成29年度に着手したニワトリ胚動脈管を使った実験は大きく進展し、The 8th TAKAO International Symposium (2017年10月)に2題ポスター発表し、そのうちのひとつがPoster Awardを受賞した。
- ② 一方、一酸化窒素、エンドセリンが、動脈管リモデリングに関与しているか否かを明らかにする実験があまり進展しなかったことが反省点である。

## 5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Fujimoto Y, Urashima T, Kawachi F, Akaike T, Kusakari Y, Ida H, Minamisawa S. Pulmonary hypertension due to left heart disease causes intrapulmonary venous arterialization in rats. J Thorac Cardiovasc Surg. 154(5):1742-1753、2017。
- ② Yokoyama U, Y Ichikawa, Minamisawa S, Ishikawa Y. Pathology and molecular mechanisms of coarctation of the aorta and its association with the ductus arteriosus. J Physiol Sci 67(2):259-270、2017。

(2) 口頭発表

- ① 南沢 享。心筋筋小胞体でのカルシウム再取り込み機構。第94回日本生理学会大会。 浜松、3月。(シンポジウム)
- ② 金 美香、横山詩子、石渡 遼、南沢 享、石川義弘。酸素化により動脈管は解剖学的閉鎖を誘導する。第94回日本生理学会大会。浜松、3月。(シンポジウム)
- ③ 岩城隆馬、松久弘典、大嶋義博、赤池 徹、南沢 享、築部 卓郎。プロスタグランディン(PGE1)製剤の長期投与が動脈管に及ぼす組織的变化の検討。第47回日本心臓血管外科学会学術集会。 東京、3月。
- ④ 横山詩子、南沢 享、石川義弘。動脈管の基礎研究から臨床へ。第120回日本小児科学会学術集会。 東京、4月。

(3) 出版物：なし

学 校 名	芝 浦 工 業 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	脳障害により失われた脳神経を修復・再生する低分子化合物の創製 －強力な神経分化誘導作用をもつ化合物の開発－		研究分野	医 学
キ ー ワ ー ド	①脳神経幹細胞 ②ニューロン ③ビタミンK ④分化誘導			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
須 原 義 智	システム理工学部 生命科学科	教 授	研究総括、化合物の合成および論文作成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
廣 田 佳 久	システム理工学部 生命科学科	助 教	化合物の生物活性評価
中 川 公 恵	神戸薬科大学 衛生化学研究室	准 教 授	作用メカニズムの解析
栗 原 正 明	国立医薬品食品 衛生研究所	有機化学部 部長	フォーマコフォア解析

# 脳障害により失われた脳神経を修復・再生する低分子化合物の創製 —強力な神経分化誘導作用をもつ化合物の開発—

## 1. 研究の目的

### (1) 背景

現在わが国は急速な高齢社会を迎えており、それに伴う高齢身体障害者の急激な増加は極めて深刻な社会問題となっている。高齢者の寝たきり発生原因の40%以上が脳血管障害などの中枢神経障害であるとされており、これらの疾患に対する有効な治療法の開発は、高齢社会において解決しなければならない喫緊の課題である。

これまでに、脳梗塞後の機能回復を目標に無数の研究が行われており、動物実験では1,000以上の治療薬が有効と報告され、そのうちの100以上において臨床試験が実施されたが、明確な有効性を証明できたものは皆無である。現在唯一の治療法である組織プラスミノゲン活性化因子を用いる方法も治療期間がごく短く、その期間を過ぎるとリハビリ訓練以外に有効な治療法はなく、そのリハビリの効果も限定的である。以上の背景から、新規の概念による治療法が切望されている。

### (2) 目的

このような薬剤による治療に対して我々は、最近益々注目されている「再生医療」の観点から、脳障害により失われた「脳神経の再生」を目指しつつ、「脳を正常な状態に戻す」ための新たな治療法を開発することを目標に基礎研究を行っている。脳神経系の細胞は、神経伝達を担うニューロンと支持細胞として働くグリア細胞（アストロサイト、オリゴデンドロサイト）から構成される。これらの細胞は、脳の複雑な高次構造の中で時間的かつ空間的に高度な遺伝子制御を受けて未分化の神経幹細胞から増殖・分化し、脳の高次機能を制御している。我々は、脳神経の素となる脳神経幹細胞から脳神経細胞への分化を、従来の遺伝子導入によらず、安全性の高い低分子の神経分化誘導物質によって誘導し、脳神経を修復・再生することを目指している（図1）。脳神経幹細胞は高齢者にも存在することが確認されていることから、このような化合物が創製できれば、高齢者の脳神経をも再生させることが可能であり、脳梗塞などの脳障害やパーキンソン病をはじめとした各種の脳神経変性疾患に対する治療法に応用できると考えている。

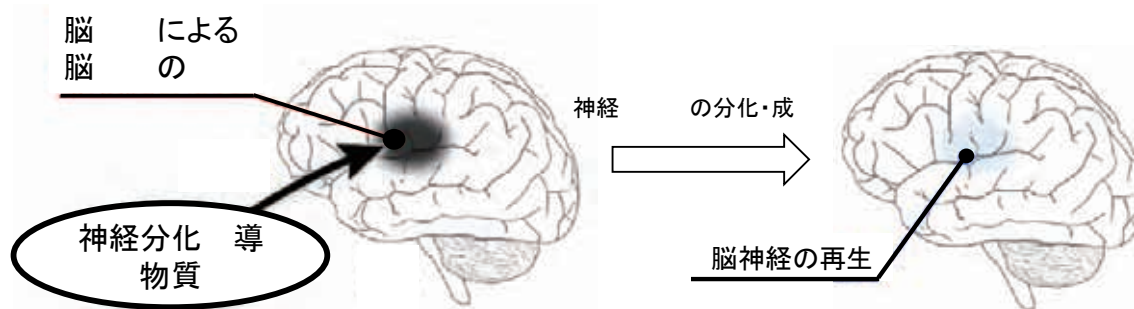


図1. 脳神経の再生・修復を促す神経分化誘導物質の開発

すでに当研究室では、脳内に存在するビタミンKが、マウス胎仔大脳由来の脳神経幹細胞を脳神経細胞へ選択的に分化させる作用をもつことを見出している。さらに、ビタミンKの側鎖末端部に様々な置換基を導入した誘導体を合成し、同様の評価系で細胞毒性が無く、天然のビタミンKと比較して約2倍の脳神経細胞選択的な分化誘導作用をもつ誘導体を得た。しかし、脳障害治療の候補化合物に応用可能にするには活性をさらに強力にする必要がある。そこで、安全性が高くかつ強い神経分化誘導作用を有する新たな誘導体の創製を本研究の目的とした。

## 2. 研究の計画

### (1) 研究計画の概要

これまでの我々の知見から、ビタミンKの側鎖部分を修飾した化合物に高い分化誘導活性が見られたため、側鎖部分を系統的に修飾した化合物を合成した。合成した化合物ライブラリーから高活性を有する化合物を抽出し、構造活性相関からさらに強い活性をもつ化合物をデザインしていく。また、得られた高活性化合物を基にして標識化合物を合成して、標的タンパク質を解析し作用メカニズムを明らかにする。

### (2) 具体的な研究計画

#### ① 分化誘導活性を示すビタミンK誘導体を簡便に合成する方法の確立

我々がこれまでに見出した分化誘導活性をもつビタミンK誘導体の知見を基にして、すでに明らかにされている神経分化を誘導する化合物の部分構造を融合した多数の誘導体を合成し、新規の化合物ライブラリーを構築する。このとき、「組み合わせ」の概念により、一度に多種多様な化合物を合成する方法として知られている「コンビナトリアルケミストリー」の手法を応用する。

#### ② 高活性を示す化合物の選別

化合物ライブラリーの分化誘導活性を評価するために、高効率なHigh-Throughput Screening法を用いる。細胞は取扱いが簡単で再現性の高い、市販の株化されたヒト脳神経幹細胞を用いる。具体的な評価方法として、分化したニューロンの表面に特異的に発現するタンパク質 (MAP2) やアストロサイトの表面に特異的に発現するタンパク質 (GFAP) などを認識する一次抗体と蛍光標識した二次抗体を用いて、化合物がどのくらい分化を促進したのかを細胞表面の蛍光強度によって測定する。得られた結果から高活性化合物を選別し、高活性を示す化合物を見出す。

#### ③ さらに高活性を示す化合物を得るための検討

上記で得られた化学構造と分化誘導活性の関係から、高活性化合物のどの部分が生物活性に重要なのかをファーマコフォア解析により考察する。さらに、化合物の三次元構造と電子配置の関係を表すファーマコフォアモデルを計算化学の手法により構築する。その情報を基にして新たな誘導体を設計し、さらに強い分化誘導活性を有する化合物を目指す。

#### ④ 作用発現に関与するタンパク質の解析手法の確立と評価

上記により化合物ライブラリーから得られた高活性化合物について、作用メカニズムを明らかにするために、どのようなタンパク質に作用しているのかをアフィニティークロマトグラフィーを用いたpull-down法により分離・精製して明らかにする (図2)。その後、化合物の分化誘導作用のメカニズムを解明する。

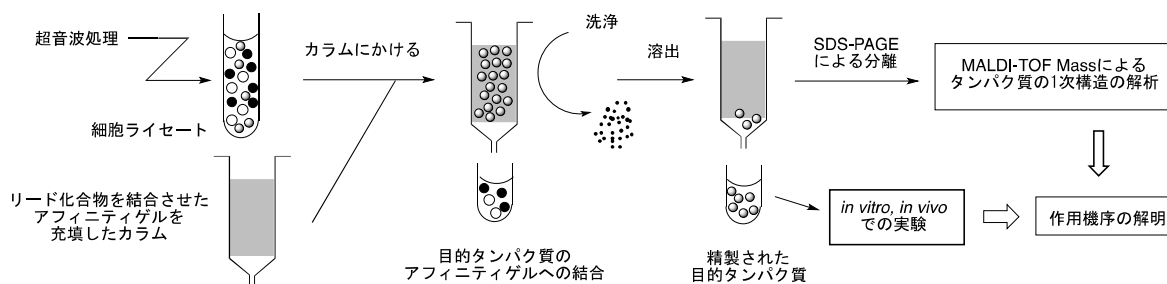


図2. 高活性化合物を固定化したアフィニティークロマトグラフィーによる作用タンパク質の解析

#### ⑤ 作用発現に関与するタンパク質に作用する神経分化誘導物質の探索

上記で得られた神経分化誘導作用の発現に関係するタンパク質に、強く作用する化合物を化合物ライブラリーから探索する。その際に得られた化合物が実際に強い神経分化誘導作用を持つのかを活性評価により確かめる。



### 3. 研究の成果

#### (1) 化合物ライブラリーの構築について

今回我々はビタミンKの側鎖部分に着目し、側鎖末端部に芳香環を導入した化合物我々がこれまでに見出した分化誘導活性をもつビタミンK誘導体の知見を基にして、構造修飾を施した新規誘導体の化合物ライブラリーを構築し、構造活性相関を検討した。研究計画では、「コンビナトリアルケミストリー」の手法により様々なビタミンK誘導体を合成する予定であったため、側鎖末端部に様々な脂溶性の官能基をはじめとして窒素原子、酸素原子、電子求引性の置換基などを導入した誘導体1-34を合成した(図3)。

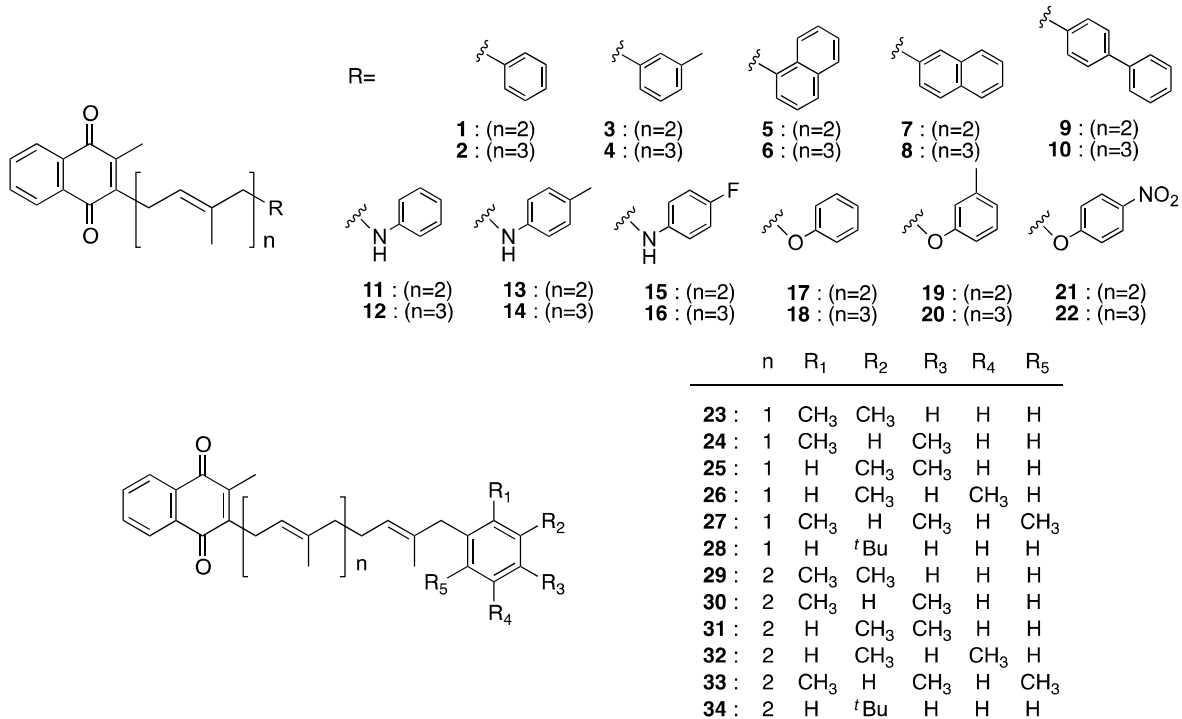


図3. コンビナトリアルケミストリーの手法によって合成した多様なビタミンK誘導体

#### (2) 化合物の分化誘導活性評価

これらの誘導体について、マウス胎仔大脳由来の神経幹細胞を用いて神経細胞への分化誘導活性を調べた。活性の評価方法として、神経細胞への分化マーカーであり神経細胞表面に特異的に発現するタンパク質(Map2)のmRNA量を、リアルタイムPCR法により定量して調べた。その結果、興味深いことに、天然のビタミンKより強い分化誘導活性をもつ化合物と共に、神経細胞への分化を抑制する化合物が含まれていることが明らかとなった。

#### (3) 作用タンパク質を解明するための標識化合物の合成と作用タンパク質の解析

上記で得られた情報から、高活性を示した化合物について、それらの作用タンパク質を解析するためのツールとして用いる標識化合物を合成した。標識化合物として、ビタミンKの側鎖の末端に蛍光物質を導入したものと、ストレプトアビジンを結合させた磁気ビーズに結合させるためのビオチン標識化合物を合成した。

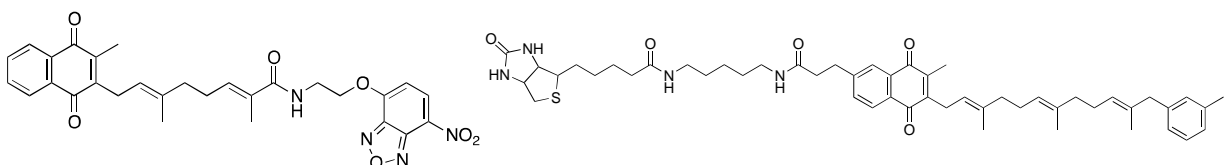


図4. 作用タンパク質を解析するための蛍光標識化合物(左)およびビオチン標識化合物(右)

#### 4. 研究の反省・考察

今回我々の見出した化合物は、ニューロンへの分化を促進するものと、反対に抑制する化合物を見出した。しかしながら、いずれもニューロンへの分化誘導活性がin vitroで1  $\mu$ Mレベルのものであるため、動物レベルで効果のある化合物を得るためには、さらに強力な活性を持った化合物の開発が必要である。また、これら化合物の分化誘導作用に関与するタンパク質も明らかになっていない。今後は作用タンパク質を明らかにした後、それに強力に作用してnMレベルで幹細胞から神経細胞への分化を選択的かつ強力に誘導する化合物を得る必要がある。そして、さらに次のステップで「脳血管障害のモデル動物を用いた活性評価」などを行い、我々の化合物が脳神経の再生・修復に応用できる可能性を示すことを目標にする予定である。

#### 5. 研究発表

##### (1) 学会誌等

- ①木村キミト、廣田佳久、中川公恵、和田昭盛、岡野登志夫、須原義智 「分子内にヘテロ原子を導入した新規ビタミンK誘導体の神経分化誘導作用の検討」 第58回天然有機化合物討論会，2016年9月14日，仙台
- ②木村キミト、廣田佳久、中川公恵、和田昭盛、岡野登志夫、須原義智 「側鎖末端にヘテロ原子を導入した新規ビタミンK誘導体の合成と神経分化誘導作用の検討」 第60回日本薬学会関東支部大会，2016年9月17日，東京
- ③木村キミト、廣田佳久、中川公恵、和田昭盛、岡野登志夫、須原義智 「ニューロンへの分化を高選択的に誘導する新規メナキノン誘導体の合成」 第34回メディシナルケミストリーシンポジウム 2016年12月1日，つくば

##### (2) 口頭発表

- ①木村キミト、廣田佳久、坂根里枝、中川公恵、和田昭盛、岡野登志夫、須原義智 「ビタミンKの側鎖末端を修飾した誘導体の合成と核内受容体SXRに対する転写活性の検討」日本ビタミン学会第68回大会，2016年6月17日，富山

##### (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	iPS細胞を用いた孤発性パーキンソン病の再分類と創薬		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①パーキンソン病 ②iPS細胞 ③ドーパミンニューロン ④創薬スクリーニング ⑤神経幹細胞			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
赤 松 和 土	医 学 部	特 任 教 授	研究代表者・総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
服 部 信 孝	医 学 部	教 授	臨床検体採取・解析手法の提供
斉 木 臣 二	医 学 部	准 教 授	臨床検体採取・解析手法の提供・実験
常 深 泰 司	医 学 部	准 教 授	臨床検体採取・解析手法の提供・実験

# iPS 細胞を用いた孤発性パーキンソン病の再分類と創薬

## 1. 研究の目的

疾患特異的 iPS 細胞は、病変部位へのアクセスが困難な神経疾患の解析ツールとして極めて有用であるが、iPS 細胞樹立・解析クローン選択・分化誘導のステップに要する日数が長く作業量も膨大である。従来の解析方法では単一遺伝子病の数例の解析(平均して1つの研究あたり約3症例)が国内外での既報の研究における現実的な限界であった。しかしながら、パーキンソン病 (PD) や ALS を例にとると、その大半 (~90%) が孤発性であり家族性の症例が占める比率は多いとは言えない。このような神経疾患の孤発性症例の病態再現においては、iPS 細胞で再現される Genetic, Epigenetic な変異だけでなく、環境要因などの要素が含まれる点を考慮すると、その解決策としては従来のスケール (1 研究あたり遺伝性症例を 3-5 症例程度) に比して、極めて多くの症例数 (n>100) の解析を行う必要があるのではないかと考えられる。申請者はこの問題を解決すべく、患者検体からの iPS 細胞の樹立と神経分化誘導システムを小スケール・効率化して 96well プレートで解析する方法を開発してきた。

本研究では、研究代表者が持つこの技術を用いて順天堂大に通院する孤発性 PD 患者 (数百例) において複数の表現型を小スケールで定量的に解析し、各症例が示す表現型から孤発性症例を仮分類する。臨床経過の分析と、細胞機能異常で分類されたそれぞれのグループに対して、申請者が現在同定を進めている薬剤スクリーニングで得られた細胞機能特異的な薬剤を用いてその効果を評価する。これらの結果から孤発性 PD を細胞生物学的表現型によって分類し再定義する。パーキンソン病の病態はドーパミンニューロンの脱落を主とするが、その病態は解明されておらず、治療は主に不足するドーパミンの補充に留まっている。ドーパミン神経脱落を抑え、病気の進行を止める disease modifying effect を有する新規治療薬の開発が期待されているが、本研究によってそのような新規治療薬の開発が期待できる。一方、このように大規模に孤発性症例の iPS 細胞の解析を行い結論を得ている報告は世界でも例が無いために、本研究で構築されるシステムが初めての孤発性疾患に対する系統的な iPS 細胞モデルの確立となると思われる。さらにこの方法をモデルとして他の孤発性疾患、多因子疾患の疾患 iPS 研究の大規模化が実現され、疾患病態解明・治療薬探索研究の加速・発展に繋がると期待される。本研究における患者検体の採取と利用は順天堂大学の倫理委員会の承認を得ている (順大医倫第 2015094 号)。

## 2. 研究の計画

### (1) 孤発性 PD 患者からの末梢血の採取とリンパ球のストック

研究開始までに順天堂医院に通院する孤発性 PD 患者・対照約 150 例のリンパ球および一部の症例でリンパ芽球細胞株の樹立を行っている。孤発性患者リクルートと検体採取は継続的に行い、研究期間終了までに 400-500 症例の検体採取を目指す。実際の患者検体は病院外来で末梢血 10ml 程度を採取し、T 細胞を分離培養し順次蓄積する。

### (2) In Cell Analyzer を用いた iPS 細胞樹立・神経分化誘導の改良

申請者はこれまで 96well 中で T 細胞から iPS 細胞を樹立し、分化誘導する手技を確立しつつある。実際に患者から採取された複数の T 細胞を同時に 96well 上で iPS 細胞化しドーパミンニューロンへ分化させるプロトコルを確立する。また既存の誘導法では目的の神経細胞に誘導できなかった細胞が混入するため、アッセイによっては目的細胞の抽出が必要で画像解析プログラムのような画一的評価システムでは異常検出が難しいものも多いため、正確な解析のための高純度な分化誘導方法の確立を目指す。

### (3) 遺伝性 PD-iPS を用いた細胞機能特異的表現型検出法の確立

申請者らはこれまでに自身が樹立した遺伝性 PD のうち PARK2-iPS 細胞を用いて、細胞死・神経突起の脱落・ミトコンドリア機能異常のそれぞれを小スケールで In Cell Analyzer を用いて定量する方法を確立している。さらに、 $\alpha$ シヌクレイン凝集を示す PARK4-iPS 細胞を用いて Lewy 小体を形成する  $\alpha$ シヌクレインの異常凝集を定量化する。リソソーム異常が病態に関与する PARK9-iPS 細胞では、不要タンパク質分解障害をきたすリソソーム内 pH 異常をすでに再現しており、これを小スケール化する。PARK8-iPS 細胞においては tau のリン酸化異常を示すことが既に明らかであるが、この表現型を小スケール化する。

### (4) 遺伝性 PD-iPS を用いた細胞機能特異的治療薬候補のスクリーニング

申請者らはこれまでに細胞死・神経突起の脱落・ミトコンドリア機能異常を指標に

PARK2-iPS 細胞を用いて、それらの表現型を改善する薬剤をスクリーニングしている。約 200 種類の既存薬ライブラリーをスクリーニングし、すべての表現型を回復させる候補薬剤を同定している。この方法を③で開発する他の遺伝性 PD-iPS の細胞機能特異的表現型を指標にして、それぞれのタイプの遺伝性 PD-iPS 細胞において固有の表現型を回復させる薬剤候補を同定する。

### 3. 研究の成果

#### (1) 孤発性 PD 患者からの末梢血の採取とリンパ球のストック

H29 年度までに順天堂医院に通院する約 300 症例の孤発性症例を中心とするパーキンソン病および正常対照から末梢血検体を採取し、T 細胞もしくは不死化リンパ芽球の状態でゲノム・再生医療センターに細胞をストックした。一部の検体に関しては iPS 細胞の樹立と解析を進め、iPS 細胞樹立と神経分化および表現型解析が可能であることを確認している。

#### (2) In Cell Analyzer を用いた iPS 細胞樹立・神経分化誘導の改良

(1) で樹立したリンパ球を小スケールで iPS 樹立し、クローン選択せずに神経分化誘導を行い、同一の Well 上で(3)で開発された表現型解析を行う方法を確立した。この方法で順次孤発性検体の解析を進めている。

#### (3) 遺伝性 PD-iPS を用いた細胞機能特異的表現型検出法の確立

すでに樹立済みの遺伝性パーキンソン病患者由来の iPS 細胞において、細胞死・神経突起進展など共通の表現型と、ミトファジー異常・ $\alpha$ シヌクレイン蓄積など細胞機能特異的な表現型の検出方法を確立し、それぞれの遺伝性症例における各表現型のパネル化をほぼ終了した。

#### (4) 遺伝性 PD-iPS を用いた細胞機能特異的治療薬候補のスクリーニング

PARK2 に関しては全ての表現型を改善する化合物候補を複数同定済み、PARK9 に関して一次スクリーニングを終了している。その他遺伝性 PD に関してはスクリーニングの準備中である。

### 4. 研究の反省・考察

#### (1) 孤発性 PD 患者からの末梢血の採取とリンパ球のストック

患者検体の収集は予定通りに進行し、特に問題点は無かった。iPS 細胞の樹立効率が低い検体が一定頻度で存在したため、T 細胞のストックまでの方法の改良を続ける。

#### (2) In Cell Analyzer を用いた iPS 細胞樹立・神経分化誘導の改良

①小スケールでの iPS 樹立が 6-7 割程度の成功率であったため、樹立不成功例は通常スケールで順次 iPS 細胞樹立を行わざるを得なかった。さらにプロトコールの改良が必要である。

②神経分化誘導に関して順調に安定して再現出来た。

#### (3) 遺伝性 PD-iPS を用いた細胞機能特異的表現型検出法の確立

問題なくそれぞれの遺伝性症例における各表現型のパネル化をほぼ終了した。

#### (4) 遺伝性 PD-iPS を用いた細胞機能特異的治療薬候補のスクリーニング

一部のスクリーニングを終了し他を順調に遂行中である。

### 5. 研究発表

#### (1) 学会誌等

①Nakazawa T, Kikuchi M, Ishikawa M, Yamamori H, Nagayasu K, Matsumoto T, Fujimoto M, Yasuda Y, Fujiwara M, Okada S, Matsumura K, Kasai A, Hayata-Takano A, Shintani N, Numata S, Takuma K, Akamatsu W, Okano H, Nakaya A, Hashimoto H, Hashimoto R. Differential gene expression profiles in neurons generated from lymphoblastoid B-cell line-derived iPS cells from monozygotic twin cases with treatment-resistant schizophrenia and discordant responses to clozapine. *Schizophr Res.* 181:75-82. 2017

②Shiba-Fukushima K, Ishikawa KI, Inoshita T, Izawa N, Takanashi M, Sato S, Onodera O, Akamatsu W, Okano H, Imai Y, Hattori N. Evidence that phosphorylated ubiquitin signaling is involved in the etiology of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet.* 2017 Aug 15;26(16):3172-3185.

- ③Fujimori K, Matsumoto T, Kisa F, Hattori N, Okano H, Akamatsu W. Escape from Pluripotency via Inhibition of TGF- $\beta$ /BMP and Activation of Wnt Signaling Accelerates Differentiation and Aging in hPSC Progeny Cells. *Stem Cell Reports*. 2017 Nov 14;9(5):1675-1691. (赤松和土は責任著者)
- ④Okuno H, Renault Mihara F, Ohta S, Fukuda K, Kurosawa K, Akamatsu W, Sanosaka T, Kohyama J, Hayashi K, Nakajima K, Takahashi T, Wysocka J, Kosaki K, Okano H. CHARGE syndrome modeling using patient-iPSCs reveals defective migration of neural crest cells harboring CHD7 mutations. *Elife*. 2017 Nov 28;6. pii: e21114.
- ⑤Mao D, Chung XKW, Andoh-Noda T, Qin Y, Sato SI, Takemoto Y, Akamatsu W, Okano H, Uesugi M. Chemical decontamination of iPSC cell-derived neural cell mixtures. *Chem Commun (Camb)*. 2018 Feb 1;54(11):1355-1358.
- ⑥ Suda Y, Kuzumaki N, Sone T, Narita M, Tanaka K, Hamada Y, Iwasawa C, Shibasaki M, Maekawa A, Matsuo M, Akamatsu W, Hattori N, Okano H, Narita M. Down-regulation of ghrelin receptors on dopaminergic neurons in the substantia nigra contributes to Parkinson's disease-like motor dysfunction. *Mol Brain*. 2018 Feb 20;11(1):6.
- (2) 口頭発表
- ①赤松和土「Patient-specific iPSC cells for neural disease modeling and drug screening」65th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research シンポジウム (招待講演) 2017.11.19
- ②赤松和土「iPSC 細胞を用いた神経疾患の病態解析」iCell Users' Meeting 2018 Keynote lecture (招待講演) 2018.2.7
- ③赤松和土「Patient-specific iPSC cells for neural disease modeling and drug screening」国際シンポジウム 早老症と関連疾患 2018 (RECQ2018) シンポジウム (招待講演) 2018.2.18
- (3) 出版物  
なし

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	①YAP ②中皮腫 ③SNIPER ④IAP ⑤プロテインノックダウン⑥TMEPAI ⑦TGF-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
福 田 和 男	薬 学 部	特 任 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実験
佐 野 圭 吾	薬 学 部	特 任 助 教	YAP阻害剤及びSNIPERを用いたin vivo実験

# 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- $\beta$  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)~(3)の研究課題を行った

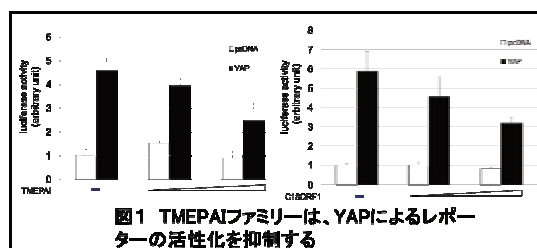


図1 TMEPAIファミリーは、YAPによるレポーターの活性化を抑制する

### (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- $\beta$  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- $\beta$  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。

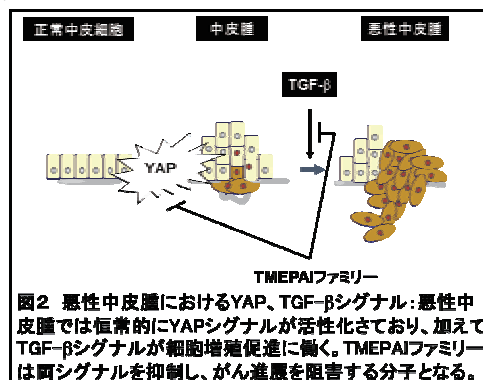


図2 悪性中皮腫におけるYAP、TGF- $\beta$ シグナル:悪性中皮腫では恒常的にYAPシグナルが活性化されており、加えてTGF- $\beta$ シグナルが細胞増殖促進に働く。TMEPAIファミリーは両シグナルを抑制し、がん進展を阻害する分子となる。

### (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。最近 BS よりさらに cIAP に高親和性で結合する LCL161 が報告されているので、本研究では LCL161 を用いて合成を行うことにした。すでに YAP に結合する化合物を見出しているので、LCL161 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。

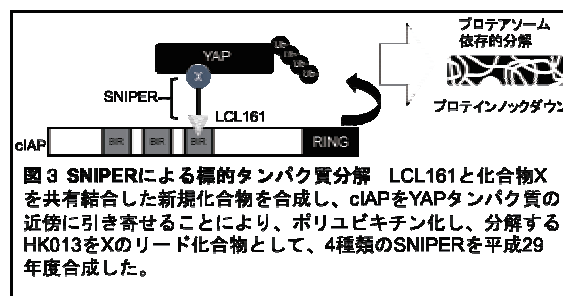


図3 SNIPERによる標的タンパク質分解 LCL161と化合物Xを共有結合した新規化合物を合成し、cIAPをYAPタンパク質の近傍に引き寄せることにより、ポリユビキチン化し、分解するHK013をXのリード化合物として、4種類のSNIPERを平成29年度合成した。

## 2. 研究の計画

### (1) TMEPAI ファミリーである C18ORF1 による YAP 抑制メカニズムの解明

① TMEPAI ファミリーが YAP タンパク質の分解を促進することを確かめるために、YAP タンパク質の半減期及びポリユビキチン化についての検討を免疫沈降・ウェスタンブロット法



により検討した。

②中皮腫細胞にTMEPAIファミリーであるC18ORF1を大量発現させ、*in vitro*腫瘍形成実験及び*in vivo*ゼノグラフトモデルでTMEPAIファミリーが腫瘍形成を抑制するか否か検討した。

(2) YAP 阻害剤の探究と分子標的薬の合成展開

①化合物AのYAP結合部位の同定を行った。

②化合物AによるYAP活性阻害作用の検討をルシフェラーゼ法により行った。

③*in vitro*腫瘍進展抑制作用について軟寒天培地を用いて行った。

④19種類の化合物B誘導体 (HK002~HK020) のYAP結合能についてビアコアを用いて検討を行った。

⑤化合物B誘導体 (HK002~HK020) の中皮腫細胞増殖抑制活性の検討を行った。

(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

①HK002~HK020の中で、YAPと最も強く結合したHK013を用いて、LCL161とのSNIPER合成法の検討を行った。

### 3. 研究の成果

(1) TMEPAI ファミリーである C18ORF1 による YAP 抑制メカニズムの解明

①COS7細胞にV5-YAPを発現させ、100 mg/mL シクロヘキシミドを加えることで、新たなタンパク質合成を阻害し、C18ORF1/Flag存在下でのYAPタンパク質の半減期を検討したところ、C18ORF1/Flag存在時に劇的にV5-YAPの半減期が減少した(図4)。さらにYAPのポリユビキチン化を調べたところ、C18ORF1存在下でYAPのポリユビキチン化の亢進が認められた。YAPのポリユビキチン化は、C18ORF1存在下でさらに増加した(図5)。

②悪性中皮腫細胞であるNCI-H290細胞にC18ORF1を大量発現させたところ、*in vitro*腫瘍形成として知られる軟寒天培地を用いた腫瘍細胞コロニー形成実験で、C18ORF1を高発現した細胞では、コントロール細胞に比べてコロニー形成能は著しく低下した(図6)。

(2) YAP 阻害剤の探究と分子標的薬の合成展開

①化合物AのYAPとの結合領域をビアコアを用いて検討したところ、YAPのN末端から280番目の間で結合することが認められた(図7)。この領域には、YAPとTEAD間の結合部位である61番目のセリンから99番目のプロリンまで含まれているので、この領域に化合物Aが結合するか否かを検討したところ、YAPの85番目のプロリンから99番目のプロリン間の15アミノ酸からなるペプチドに化合物Aが結合することが見いだされた(図8)。

②化合物AがYAP阻害剤として知られているVP (verteporfin) より強いYAP阻害活性を有することをYAP活性を検出することができるルシフェラーゼ法により明らかにした。

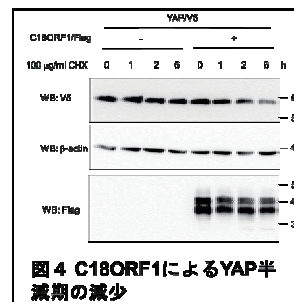


図4 C18ORF1によるYAP半減期の減少

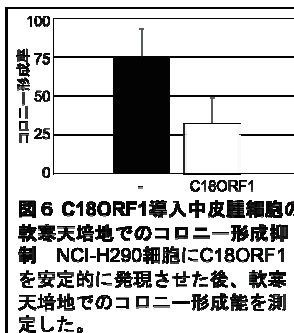


図6 C18ORF1導入中皮腫細胞の軟寒天培地でのコロニー形成抑制 NCI-H290細胞にC18ORF1を安定的に発現させた後、軟寒天培地でのコロニー形成能を測定した。

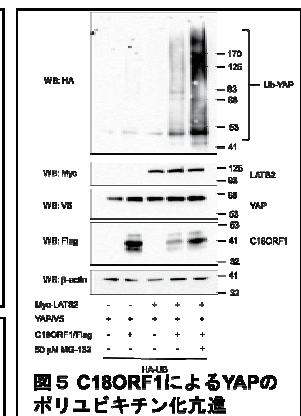


図5 C18ORF1によるYAPのポリユビキチン化亢進

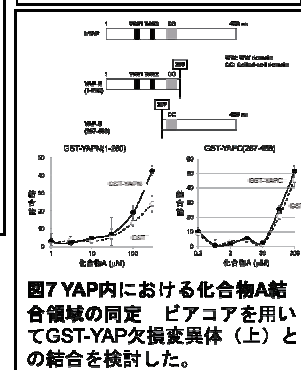


図7 YAP内における化合物A結合領域の同定 ビアコアを用いてGST-YAP欠損変異体(上)との結合を検討した。

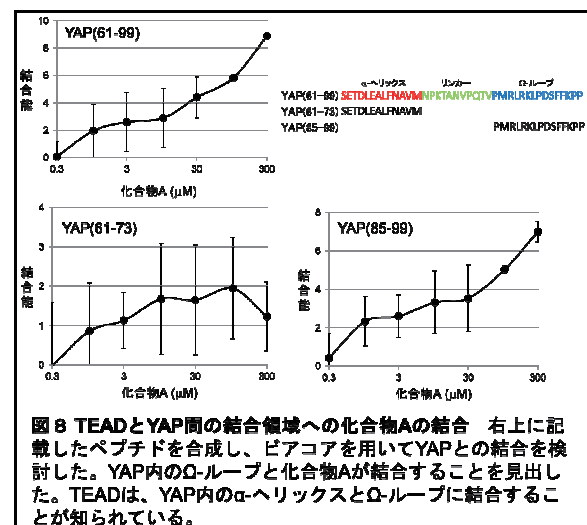
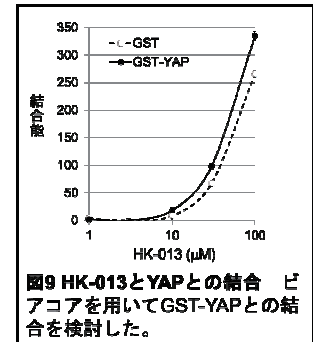


図8 TEADとYAP間の結合領域への化合物Aの結合 右上に記載したペプチドを合成し、ビアコアを用いてYAPとの結合を検討した。YAP内のα-ループと化合物Aが結合することを見出した。TEADは、YAP内のα-ヘリックスとα-ループに結合することが知られている。

- ③NCI-H290細胞を用いたin vitro腫瘍形成実験で、化合物Aは容量依存的にコロニー形成を抑制することができた。
- ④HK002～HK020までの19種類の化合物D誘導体を用いて、ビアコアによるYAPとの結合活性を調べたところ、HK013がYAPとの強い結合が認められた(図9)。
- ⑤HK002～HK020は、化合物Dと同様に、中皮腫細胞増殖抑制活性をほとんど有していなかった。
- (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
- ①HK013とLCL161間を共有結合させた化合物を合成するために、リンカー長を変えたSNIPER化合物4種類の合成を行った (HK021～HK024)。



#### 4. 研究の反省・考察

- (1) TMEMPAI ファミリーである C18ORF1 による YAP 抑制メカニズムの解明
- ①TMEMPAIファミリーがYAPのポリユビキチン化を促進することによりYAPを分解する可能性を見出したが、実際ポリユビキチン化を行う酵素については同定できていない。
- ②C18ORF1大量発現系において、中皮腫細胞の増殖抑制活性を見出すことができたが、未だC18ORF1の発現を抑制した中皮腫細胞を樹立できていない。C18ORF1発現抑制（又は欠損）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組み、ゼノグラフトモデルを含めて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の85番目のプロリンから99番目のプロリン間の領域と結合したことから、化合物AはYAPとTEAD間の結合を阻害することで、YAP活性を抑制していると考えられた。現在実際化合物AがYAPとTEADの結合を抑制することを培養細胞で検討している。
- ②現在まで知られているYAP阻害剤VPより低濃度で化合物AはYAP活性を抑制することができたので、新規抗YAP活性を有する中皮腫治療薬のリード化合物となる可能性が見いだされた。
- ③HK013は、親化合物である化合物Dより強いYAP結合を有するが、化合物Dと同様にYAP活性を阻害しないことより、有望なYAPリガンドとして、SNIPER化合物合成に使用できると考えられた。
- (2) 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
- ①HK021～HK024までの合成が終了したので、SNIPER化合物として、YAPを特異的に分解し、抗中皮腫活性を有していることを今後検討する。さらにHK013を基本構造としたさらにYAPに強い親和性を持った化合物の合成にも着手したい。

#### 5. 研究発表

- (1) 学会誌等  
なし
- (2) 口頭発表
- ①YAPを標的とした中皮腫進展制御と分子標的薬開発 伊東進、中野なおこ、佐野圭吾、中根孝久、岡本巖、内藤幹彦 日本薬学会第138年会（金沢）
- ②プロテインノックダウン法を利用したYAPシグナル阻害剤の開発 石川遼、河本恵理、福田和男、森彩里穂、岸福子、正田卓司、小野寺祥子、服部隆行、栗原正明、内藤幹彦、山崎龍、中根孝久、岡本巖、中野なおこ、伊東進 平成29年度日本生化学会関東支部例会（東京）
- ③YAP阻害剤による抗腫瘍活性をin vivoイメージングで評価する 入江美樹、幾田鞠子、中野なおこ、佐野圭吾、伊東進 平成29年度日本生化学会関東支部例会（東京）
- ④新規YAP阻害剤による悪性中皮腫細胞増殖抑制機構 岸福子、河本恵理、石川遼、小野寺祥子、内藤幹彦、中野なおこ、伊東進 平成29年度日本生化学会関東支部例会（東京）
- ⑤がん遺伝子YAPを標的とした抗がん剤開発 中野なおこ、正田卓司、服部隆行、栗原正明、内藤幹彦、伊東進 第21回日本癌分子標的治療学会（福岡）

⑥TGF- $\beta$ シグナルによるがん進展制御機構 伊東進 第一回細胞内シグナル応答研究会  
(熱海)

(3) 出版物

なし

学 校 名	日 本 大 学	研究所名等	薬 学 研 究 所
研 究 課 題	糖尿病発症の新たな責任分子としての脂肪組織ダイオキシン受容体 —一分子基盤の解明と新規糖尿病治療薬への展開—		研究分野 医 学
キ ー ワ ー ド	①ダイオキシン ②糖尿病 ③脂肪細胞		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
榛 葉 繁 紀	薬 学 部	教 授	研究代表者 総括、マウスの管理・解析

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
内 山 武 人	薬 学 部	教 授	リガンドの合成、分析
和 田 平	薬 学 部	助 教	マウスの解析

# 糖尿病発症の新たな責任分子としての脂肪組織ダイオキシン受容体 — 分子基盤の解明と新規糖尿病治療薬への展開 —

## 1. 研究の目的

### (1) 背景

戦後のわが国におけるライフスタイルの変化は糖尿病をはじめとする生活習慣病の患者数の増加を招いており、その制圧は喫緊の課題であるといえる。糖尿病への罹患要因として、食事性脂肪の過剰摂取や運動不足などが挙げられるが、ダイオキシン類などの内分泌かく乱物質への曝露もそのひとつである。現在、わが国においてダイオキシン類の排出レベルは減少し、高濃度曝露とその急性毒性が問題となる可能性は少ない。しかしながら、近年の国内外における多くの疫学研究によりダイオキシン類に対して職業曝露あるいは事故曝露などが無い一般住民においても体内に微量のダイオキシン類が存在すること、そしてその血中レベルと糖尿病発症との間に正の相関が存在することが示されている。

生体内に取込まれたダイオキシン類は、主に脂肪細胞に貯蔵される。脂肪細胞は、単に過剰な脂溶性物質の貯蔵の場ではなく、様々な生理活性物質の産生・分泌を介して全身の代謝調節を行う。そしてその機能変化がインスリン抵抗性を誘発し、糖尿病の発症へとつながる。細胞内においてダイオキシン類は、その特異的受容体 Ah レセプター(AhR)と結合して毒性の多くを発現する。したがって脂肪組織における AhR の機能解析は、ダイオキシン類の慢性毒性発現機構の解明への主たる戦略である。

以上をふまえて我々は、脂肪細胞特異的 AhR KO(A-AhR)マウスを確立した。本マウスの使用により従来成し得なかった極微量ダイオキシン類の慢性曝露による脂肪細胞の機能かく乱とそれに起因した疾病の発症メカニズム解析を行うことが可能となった。例えば高脂肪食下において飼育した本マウスに対してグルコース負荷試験並びにインスリン負荷試験を課したところ、顕著な耐糖能並びにインスリン感受性の亢進を示した。この結果は、全身の耐糖能並びにインスリン感受性が脂肪細胞における AhR 遺伝子の有無により変化することを示している。すなわち疫学的に示されてきた「極微量ダイオキシンの持続的な曝露による慢性毒性としての II 型糖尿病」において、脂肪細胞 AhR が発症の責任分子であることが強く示唆された。

### (2) 研究期間内に、何をどこまで明らかにしようとするのか

本研究では、脂肪細胞特異的に AhR を欠損したマウスの病理的、病態生化学的並びに分子生物学的な解析を通じて、インスリン感受性の制御に関連した脂肪細胞機能（他臓器とのクロストークを含む）の AhR による調節を明らかにする。さらにはこれらの知見を基に AhR アンタゴニストの糖尿病治療・改善薬としての可能性を検証する。

以上の検討により得られた知見は、極微量ダイオキシンの持続的曝露の影響並びに糖尿病の発症といった2つの社会的問題の解決において科学的な基盤を提供するものである。

## 2. 研究の計画

### (1) 高脂肪食負荷時における脂肪組織特異的 AhR KO (A-AhR KO) マウスの病態生化学的・病理学的解析

- ① 体重、摂餌量、呼吸商（酸素吸入量・二酸化炭素排出量）、脂肪組織重量、血液パラメーター（コレステロール、トリグリセリド、遊離脂肪酸及びアディポサイトカイン類、随時インスリン並びにグルコース負荷試験時のインスリン）量を常法に従い測定する。
- ② 白色並びに褐色脂肪組織をそれぞれ精巢上体、腸間膜、皮下及び肩甲骨周辺より採取し、その組織を固定、切片化、そして染色（ヘマトキシリン・エオシン）し、脂肪細胞数並びに大きさを中心に定性的に観察する。
- ③ 病理切片の確認時には、併せてマクロファージ等の免疫担当細胞の染色並びに遺伝子発現を解析し、炎症の有無とその程度についても検討する。
- ④ II型糖尿病患者では、脂肪組織における脂質代謝異常に起因した肝臓や骨格筋での異所性脂肪の蓄積が認められる。そこで肝臓と骨格筋におけるトリグリセリド含量、遊離脂肪酸含量並びにコレステロール含量を測定する。これらの解析により差異が認められたならば、各組

織における病理所見、そして脂質代謝に関連した因子の遺伝子発現も検討する。

## (2) A-AhR KO マウスのインスリン感受性亢進に関わる責任臓器の同定

- ① 肝臓、骨格筋並びに精巣上体脂肪組織におけるインスリンシグナル伝達活性を解析するため、短時間の絶食後、マウスに対してインスリン(0.5 U/Kg体重)を投与する。一定時間後、各臓器を摘出し、ウエスタンブロット法によりインスリンシグナル伝達因子の活性を評価する。
- ② 肝臓における糖新生活性を評価するため、ピルビン酸 (2g/Kg体重) を負荷し、その後の血糖値を経時的に測定する。

## 3. 研究の成果

### (1) 高脂肪食負荷時における脂肪組織特異的 AhR KO (A-AhR KO) マウスの病態生化学的・病理学的解析

A-AhR KO マウスにおける全身性のインスリン感受性の変化は、多くの代謝機能の変化を伴うと予想できる。そこで本年度は、A-AhR KO マウスのより詳細な生化学的並びに生理学的な特徴を明らかにする目的で、マウスを通常食並びに高脂肪食 (12 週間) 下で飼育し、生理・生化学的パラメーターを解析した。

- ① 通常食あるいは高脂肪食下で飼育したコントロールマウス及びA-AhR KOマウスにおける体重、脂肪組織重量、摂食量並びに血液パラメーター (随時血糖値、随時インスリン量、中性脂肪量、遊離脂肪酸量及びコレステロール量) を測定した。その結果、いずれの食事下においても両マウス間に違いは認められなかった。
  - ② 肥満時には脂肪組織において免疫担当細胞が浸潤し、その結果起こる炎症が糖尿病発症に強く関わっている。そこで脂肪組織における炎症の程度を病理学的並びに遺伝子発現の点から解析した。その結果、高脂肪食負荷によりコントロールマウスの脂肪組織ではマクロファージの浸潤並びに炎症の惹起が認められたが、A-AhR KOマウスにおけるその程度はわずかであった。一方、通常食飼育下ではこれらの違いは認められなかった。すなわちAhRが肥満時における脂肪組織の炎症の惹起に関与することが示された。
  - ③ 各組織における脂肪蓄積量は、インスリン感受性に大きく影響する。そのため脂肪組織、肝臓そして骨格筋における中性脂肪量を測定した。その結果、通常食で飼育した両マウスの各組織における中性脂肪量に違いは認められなかった。また高脂肪食負荷により両マウス共に各組織における中性脂肪量は増加したが、その程度は両マウス間で同程度であった。
- ### (2) A-AhR KO マウスのインスリン感受性亢進に関わる主たる臓器の同定

A-AhR KO マウスにおけるインスリン依存的な耐糖能の亢進の主な要因として以下のことが考えられる。すなわち脂肪細胞あるいは骨格筋における糖の取込み増加、そして肝臓における糖新生の抑制である。そこでインスリン感受性亢進における主たる臓器を明らかにする目的で以下の検討を行った。

- ① コントロールマウス及びA-AhR KOマウスを6時間の絶食下に置き、その後インスリン(0.5 U/Kg体重)を投与した。その15分後に肝臓、骨格筋並びに精巣上体脂肪組織を摘出し、各組織におけるインスリンシグナル伝達因子であるAKTのリン酸化状態からインスリンシグナル伝達活性を解析した。その結果、A-AhR KOマウス精巣上体脂肪組織においてインスリンシグナル伝達強度の増強が認められた。一方、骨格筋及び肝臓におけるインスリンシグナル伝達活性は、コントロールマウス及びA-AhR KOマウス間で同程度であった。
- ② 通常食飼育下及び高脂肪食飼育下の何れにおいてもA-AhR KOマウスの糖新生能は、コントロールマウスのそれと同程度であった。

## 4. 研究の反省・考察

- (1) 高脂肪食下で飼育した A-AhR KO マウスは、コントロールマウスに比較して良好な耐糖能及びインスリン感受性を示した。また体重増加率並びに脂肪組織重量に違いは認められないものの、脂肪組織におけるマクロファージ浸潤の抑制並びに炎症性サイトカイン発現量の低下が認められた。さらに A-AhR KO マウス脂肪組織におけるインスリン感受性の亢進が観察された。一方、これらの変化は、通常食飼育時には認められなかった。以上の結果は、AhR が肥満時における脂肪組織における炎症を惹起することで糖尿病発症に関与することを示している。

## 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	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ー慢性炎症病態の可視化と光制御ー		研究分野	医 学
キ ー ワ ー ド	①生体イメージング ②二光子顕微鏡 ③CMOS ④炎症・血栓・造血			

○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	研究計画と進捗管理、プロトタイプ製作、 知財管理

○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	平成30年3月 31日退職	動物実験、研究計画管理



# 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) マクロミクロイメージングシステムの開発

①生体レベルでのミクロとマクロをカバーするイメージングモダリティを開発し、個体全体をみつつ、細胞レベルの解析を行う基礎研究技術を開発する。同時に、本システムを臨床に活かすべく、さらに、手持ち可能な極小化したイメージングデバイスを開発する。CMOS センサー、ロボティクス、にくわえ、制御工学、情報工学との連携をはかった開発を行い、今まで「目で見えないものをみる」「画像から理解を直結させる」だけでなく、実時間で変動していく生体材料に対して低侵襲な治療を可能にする基盤技術を開発する。

#### (2) 慢性生命現象の可視化

①画像解析の対象として、従来画像化をし易かった発生・発がんなどの領域だけでなく、炎症・造血・臓器不全といった緩徐かつ慢性的に進む生命現象を扱う。

近年、生活習慣病・悪性腫瘍といった慢性疾患の背景には持続する炎症が存在することが示され、「慢性炎症」を鍵とした病態解明が試みられている。これまでに、急性の生命現象にはアプローチ方法が多く呈示されているのに比して、慢性かつ緩徐に進む現象への高感度の解析はほとんど存在していない。西村らは慢性生体へのマルチスケールな病態把握をめざし、マクロ・ミクロをカバーする生体イメージング技術を開発している。そのなかで、生体を網羅的に解析するための、低倍率・高解像度・CMOS イメージングシステム、紫外線・可視光・赤外線のを無収差・同一レンズで撮像できる結像システム（全波長顕微鏡）、および最小化光診断技術を開発している。これらの実証実験として、炎症・造血・臓器不全を対象とした可視化および光制御実験を行う。

### 2. 研究の計画

#### (1) マクロミクロイメージングシステムの開発

①生体に特化した一細胞を中心とする周辺環境とのマイクロネットワークを、長時間に長時間空間解像度で追従・可視化するマイクロイメージングシステムを基礎光学理論から開発する。新たな基礎光学理論では従来の結像光学では不可能な幅広いズーム比率、焦点可変、低収差をコンパクトに実現する。結像そのものからシステムまで幅広く知財化を行う。さらに、生体にフィットした光学要素技術として、高画素 CMOS を用いた生体深部・超多色・長時間解像度イメージング（NHK サイエンス ZERO、NHK スペシャル人体などでもたびたび取り上げられた）、ロボティクスによるリアルタイム追従制御を開発する。従来、観察視野と解像度にはトレードオフがあり、単一光学系でこれらの光学仕様を両立することは不可能であった。本研究ではこれらの実証に関して、基礎光学理論を構築するだけでなく、ワーキングサンプル、量産製品のプロトタイプ作成、実データのマウス・ウサギ・ブタでの撮影まで行う。その一部分として、臨床現場での使用を視野にいれ、臨床医師と直接議論をおこない、システムの作り込みを行っている。臨床医師（皮膚科・眼科など）からのフィードバックをもとに、それぞれの診療領域に応じた作り込みを行う。

#### (2) 慢性生命現象の可視化

①生体内で一細胞中心のネットワークをその細胞の生涯にわたって可視化し、細胞運命を解析・予測・制御をめざし、可視化と光制御を試みる。個々の細胞から生体を統合的に理解するためのネットワーク情報を引き出し、得られたネットワークの個々の繋がり（ノード）に対する検証を行うために、フェムト秒レーザーによる生体光操作および光化学反応による積極的介入と反応観察を行う。さらに、生体の超多色・多光子イメージングによる形態解析と組み合わせ、これまで評価対象としてこなかった慢性病態に対しても解析を行う。なお、初期には臓器不全を主要な研究対象としたが、むしろ緩徐にす

すむ生理的現象（造血など）においてイメージングの優位性が示されたため、研究内容をシフトしている。

本研究では個体のなかで既存の細胞生物学・分子生物学を展開するための基盤技術とし、形態をみる一細胞イメージングにくわえて、通常では「見えない」機能情報も同時に明らかにできるシステムを構築する。

慢性炎症をあつかうために、組織傷害時の好中球の挙動を時空的にマルチスケールで解析し、限局したミクロの傷害と、マクロな臓器連関作用を同時に明らかにする。光化学反応およびフェムト秒レーザーでの内皮傷害をもとに、炎症の終息機構の破綻、即ち慢性炎症の病態解明を行い、急性炎症に対して好中球を標的とした細胞操作を試み、観察臓器は末梢および肝臓での血管を対象とする。炎症を介在する因子として vWF (von willebrand factor) など血栓・凝固関連物質にも着目し、イメージング解析を行う。持続的な慢性炎症は、さらに、線維芽細胞の増殖、すなわち、線維化と臓器障害も引き起こす。心不全、腎不全など線維化が関与する臓器機能障害は従来考えられていたよりも広範であるため、線維化の初期因子および遷延化機構を明らかにし、光化学反応を用いた治療を試みる。

さらに、生体外では再現や解析がほぼ不可能である造血にも着目する。造血は緩徐なフェーズと、急性のフェーズが複雑に絡み合っていることから、骨髄イメージングでは時間・空間的に広スケールでの解析を行う。

### 3. 研究の成果

#### (1) マクロミクロイメージングシステムの開発

①マクロ・ミクロを網羅するイメージングシステムを開発し、複数の知財申請を行った。特に、マクロ・ミクロを単一かつ最小化したシステムで実現するために、独自の光路設計により、倒立顕微鏡に匹敵するミクロ像と、俯瞰操作が可能なマクロ像のシームレスを達成した。本特許は多くのアプリケーションを有しており、手術中にも運用可能なシステムになることから、医療デバイスとしての臨床応用を前提に開発研究を現在も行っている。さらに、結像にレンズとミラーを組み合わせ、紫外・可視光・赤外・遠赤外までのすべてを網羅する結像系を開発し、全波長がみえる顕微鏡を独自に開発した。可視光で詳細な形態・動態が明らかになると同時に、赤外で物質情報が得られている。物質は特有の赤外吸収・散乱をもたらすため、赤外線ではそれぞれの物質の局在を、染色を行わずに明らかにできる。さらに、通常 MRI や超音波観察では得られない、リアルタイム性、高解像度、物質特異性を得られることが特徴といえる。すでにワーキングプロトタイプと予備データを取得しており、知財化をすすめている。また、発光と蛍光を単一システムで観察するシステムを開発した。遺伝子治療におけるベクター発現をブタの手術により発光で確認し、免疫細胞療法における輸注細胞の分布をマウス生体で高解像度に画像化した。発光と蛍光とオーバーラップさせることで、癌部と正常部の組織・血管構造を一連のものとして広スケールで画像化した。いままでの血管新生研究ではごく限られた部位の反応のみを観察対象としていたが、本システムでは正常から癌壊死部までを一連のつながりとして解析できるため、治療法開発の面からも大きな進展が得られている。

#### (2) 慢性生命現象の可視化

①本システムでは、ごくミクロで生じる血栓止血反応・炎症反応と、マクロで生じる臓器障害・慢性化を結びつけることを可能にする。臓器線維化など通常であれば撮影が困難である慢性のプロセスに対しても、可視化・定量化を可能にする高い有用性が示された。一方で、慢性炎症における生体の変化率は大きくないため、ダイナミックレンジが重要なファクターであることも明らかになった。肝臓での虚血再還流傷害において vWF が重要な因子であることを、血小板および血管内皮との関連からも明らかにした。イメージングにより、従来難しかった、肝実質・血管・間質の相互作用を解析し、炎症性細胞の遊走を示した。さらに、レーザー傷害や光化学反応を用いた生体操作とあわせて、血栓病態モデルを光制御により作成し、心血管障害へのアプローチを行った。ROS 産生を伴う血栓形成モデル、血管内皮傷害・白血球遊走モデル、および、虚血再灌流モデルの 3

つの血栓動物モデルを確立した。内皮損傷を限局した部位に誘導すると、好中球が局所傷害後に集積するとともに、他の慢性炎症を引き起こす免疫細胞にもシグナルを伝播していた。ミクロでは好中球は血小板・内皮・周囲の免疫細胞とのネットワークを形成し遠隔連関を形成していた。このような、生体特有の非線形・二相性以上の複雑な時間変化を捉えるためにも、時空間マルチスケールな可視化手法が有効であった。

臓器不全は生活習慣病臨床で残された最も大きな課題である。心臓線維化による拡張障害が、主な原因と考えられる。本提案でのイメージングシステムでは、生体の線維化、肉芽形成、炎症といったプロセスが明らかになった。特に、比較的軽微な皮膚炎症については、炎症から創傷治癒、慢性化のプロセスを画像化により示すことができた。一方で、心臓・腎臓では十分な機能マーカーが見つけれず、機能変化をとらえるだけの感度や再現性はイメージングでは得られなかった。心臓の網羅的観察に関しては、ミラーを用いた全周性イメージングを行い、透明化・非透明化生体サンプル両方で網羅的イメージングを行った。

さらに、造血イメージングでは、血流の広スケール解析により「乱流」が最終的な造血を加速することを明らかにし、2018年に”Cell”に掲載される。乱流の解析は、従来生体外で流体力学的に行われていたが、今回の広スケールイメージングによりはじめて可能になったといえる。造血過程は、血球の成熟から放出まできわめて複雑である。成熟については一定の知見が得られているが、放出および血球老化については不明な点が多い。実際の臨床疾患でもこれらが問題となる場面は多いが、介入手段は限られていた。今回、乱流による血球放出にかかわる因子を複数同定できたため、生体外での人工血小板の作成や、血小板機能異常病態への治療など、現在治療の困難な場面へのアプローチが開かれたと言える。

#### 4. 研究の反省・考察

- (1) 本研究で得られるシステムは、免疫・炎症・再生・造血といった通常の顕微鏡観察では全貌を捉えることの難しい時間・空間的階層性をもった生命現象に対して、ミクロな分子生物学的機序とマクロな病態形成を同時に明らかにしている。一方で、得られる知見は、従来の仮説検証型研究のものとは異なるが多かった。限られた書面での伝達は困難なことから、特にアウトリーチ活動として講演・執筆だけでなく体験授業なども積極的に取り入れた。また、患者さんにとどくシステムを目指した事業化を考え、プロトタイプ製作にも多くの時間を費やし、研究とシステム製作を同時に行った。日本では、このようなプロトタイプを製作できるアカデミアラボは皆無に等しく、実際にそのような進行でアカデミアの提案が事業になった例を知らない。一つのラボで引き受ける内容としてはあまりに膨大であったため、よりオープンな体制の構築も今後の課題である。本研究資金は、このような体制の中において大きな位置づけを占めており、継続的な支援が得られたことに感謝の意を表したい。

#### 5. 研究発表

- (1) 学会誌等  
なし
- (2) 口頭発表
  - ① 西村 智、生体分子イメージングによる生活習慣病のとらえ方、第 65 回日本心臓病学会学術集会、2017 年 9 月
  - ② 西村 智、バイオイメージングが明らかにする血小板誕生から死滅まで、第 39 回日本血栓止血学会学術集会、2017 年 6 月
  - ③ 西村 智、Multi-Scale Visualization of Living Large Animals by Infrared and Minimized Microscope、Bordeaux, France. Fom、2017 年 4 月
- (3) 出版物  
なし

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 マ ー カ ー ・ 標 的 分 子 制 御 学	大 学 院 教 授	実験(エピジェネティック)・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 ) L T T 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

#### ①Layilin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- $\alpha$ ）により促進されることから、TNF- $\alpha$ 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- $\alpha$ 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。

#### ②L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 1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日後の計3ポイントで行う。

### (2) 尿細管のEMT抑制のための実験計画

#### ①Layilin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、CRISPR-Cas9システムを用いてLayilin欠損マウスを作製する

#### ②L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 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/R 1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/R 1日後の血清クレアチニンは、1回目I/R 9日後より上昇は認められたもの(0.32mg/dl)、その程度は、1回目I/R 1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/R 1日後と比較し、2回目I/R 1日後では、有意に抑制された。
- ③マイクロレイ解析を施行し、尿細管虚血耐性に関連する候補分子[X]を見出した。この候補分子[X]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いる。1回目IR19日後の腎臓からDNAを抽出し、候補分子[X]のプロモーター領域のChIP解析を行った結果、ヒストンアセチル化が確認された。現在、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤の腎保護作用の検討、さらに近位尿細管培養細胞を用いて、同様の現象を再現できるのか、検討をしている。

#### (2) 尿細管のEMT抑制

##### ①Layilin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。Layilin欠損マウス (F0) を野生型マウスと交配し、Layilin欠損ヘテロマウス (F1) を作製、さらには、F1同士を交配し、Layilin欠損ホモマウス (F2) を作製した。現在、F2の繁殖を行っている。

##### ②L型脂肪酸結合蛋白(L-FABP)によるEMT抑制の機序解明

ア 平成 28 年に摘出した糖尿病ヒト L-FABP 染色体遺伝子導入マウス (Tg) を使用し、腎障害の程度を糖尿病野生型マウス (WT) と比較した。血糖値や血清クレアチニンには、両群で同程度であったが、尿中アルブミンは、Tg マウスで有意に低値であった。

イ 腎組織の検討：糖尿病による糸球体障害は、認められなかったが、尿細管間質の炎症および線維化は、Tg マウスで有意に軽減していた。アポトーシスは、認められなかった。

ウ ミトコンドリアの形態・機能の検討：尿細管内のミトコンドリア形態は、電子顕微鏡で観察したが、明らかな形態異常は認められなかった。

エ ミトコンドリアの新生因子 (PGC-1 $\alpha$ ) の遺伝子発現は、Tg マウスで有意に亢進していた。PGC-1 $\alpha$  は、抗炎症による尿細管保護作用を有することが知られており、現在、L-FABP による PGC-1 $\alpha$  の発現亢進機序を、検討している。

### 4. 研究の反省・考察

#### (1) 急性腎障害の重症化抑制

- ①ヒストンアセチル化を維持するヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤を事前に投与することで、1回目の虚血腎障害が有意に抑制されていることを確認する。
- ②マウス近位尿細管細胞 (mProx) を使用し、近位尿細管における虚血耐性を確認するとともに、in vivoの系で見出した虚血耐性に関与する候補分子[X]の遺伝子・蛋白発現を確認する。

#### (2) 尿細管のEMT抑制のための実験計画

##### ①Layilin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) を作成したので、そのマウスを使用し、虚血再灌流モデルにおける慢性期EMT抑制および間質線維化の程度を組織学的 (PAS染色) および遺伝子・蛋白解析により評価する。さらに、Layilin欠損による腎臓以外の他臓器への影響も確認し、Layilinの新規機能の探索を行う。

##### ②L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、ミトコンドリアの新生因子 (PGC-1 $\alpha$ ) の発現を増加させ、腎保護的に作用していることを見出した。現在、マウス近位尿細管細胞 (mProx) およびヒトL-FABP発現mProxを使用し検討している。

## 5. 研究発表

### (1) 学会誌等

① Ichikawa D, Kamijo-Ikemori A, Sugaya T, Ohata K, Hisamichi M, Hoshino S, Kimura K, Shibagaki Y. Utility of urinary tubular markers for monitoring chronic tubulointerstitial injury after ischemia-reperfusion. *Nephrology (Carlton)*, 23:308-316, 2018.

② なし

### (2) 口頭発表

① 市川大介、池森敦子、菅谷健、柴垣有吾、急性腎障害後のnephron lossを鋭敏に反映するバイオマーカーの探索、第60回日本腎臓学会学術総会、2017年5月26日

② なし

### (3) 出版物

① なし

② 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破骨細胞 ⑥骨芽細胞分化 ⑦破骨細胞分化 ⑧カルシウム濃度		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
川 木 晴 美	歯 学 部 歯 学 科	准 教 授	研究の総括及び実験、論文作成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
近 藤 信 夫	歯 学 部	教 授	遺伝子発現解析及びデータ整理
高 山 英 次	歯 学 部	准 教 授	分子生物学的実験及びデータ整理
神 谷 真 子	経 営 学 部	准 教 授	細胞生物学的実験及びデータ整理
永 原 國 央	歯 学 部	教 授	動物実験及び標本作成、データ整理
吉 田 隆 一	朝 日 大 学	教 授	理工学的解析及びデータ整理
玉 置 幸 道	歯 学 部	教 授	骨補填材料作成及びデータ整理



# 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

(1) 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 低下が懸念され、社会生活を営むための機能を維持した健康寿命の延伸による健康長寿社会実現のための取り組みがなされている。特に、運動機能に深く関わる骨組織再生の分野では、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。そこで、異なる人工骨補填材上での由来組織の異なる移植幹細胞の応答変化の検討と、骨髄抽出液等を用いた破骨細胞分化における動態解析を行う。

①担体となる骨補填材上での幹細胞培養評価

②骨補填材上での破骨細胞分化評価

③①②の結果から、(2) で行う解析試料を選択

(2) 次いで、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ヒストン修飾解析

②DNA メチル化、脱メチル化部位の探索

## 2. 研究の計画

前年度に行った骨補填材担体上での骨髄由来幹細胞 (hBMSC) の遺伝子発現変化から、培養開始直後と、骨芽細胞様細胞へと分化した培養 14 日後の細胞より試料を調整する。また、同様に骨髄懸濁液を培養し、由来組織や足場条件の異なる幹細胞の骨芽細胞分化、破骨細胞分化におけるジェネティックおよびエピジェネティックな制御因子の探索、同定、および機能解析を以下の手順で行った。

(1) リアルタイム PCR を骨芽細胞、破骨細胞分化マーカーの発現変化の解析とメチル化 DNA の単離

hBMSC が骨補填材存在下では骨芽細胞分化誘導因子を必要とせず骨芽細胞へ分化したことから、通常の培養容器を比較対照とし、ラット頭蓋骨由来の焼成骨片を陽性対象として足場を用い、骨形成に関わる転写因子群の発現変化等を骨補填材の有無、種類ごとに解析した。また、ラット骨髄を抽出し、懸濁液を同様に培養して破骨細胞分化に関連する遺伝子発現変化を介指揮し、それぞれの試料からメチル化 DNA を回収した。

(2) ヒストン修飾 (脱アセチル化等) 解析

由来組織および担体となる材料の異なる培養細胞試料に HDAC 活性測定キットを用いて培養条件によるヒストン修飾の変化を解析した。

(3) DNA メチル化解析

破骨細胞分化過程において、担体となる材料の異なる培養細胞試料で DNA メチルトランスフェラーゼ、ヒストンメチルトランスフェラーゼの検出を試みヒストンのヘミメチル化、CpG 上のメチル化反応について解析した。

## 3. 研究の成果

(1) 骨芽細胞分化誘導因子を用いずに、hBMSC を通常培養、あるいは骨補填材、骨片上で培養し遺伝子発現解析を行い①の結果を、また、骨髄懸濁液を用いた同様の実験で②の結果を得た。

①骨芽細胞分化マーカーの発現変化は、通常の培養容器でも培養日数の増加に伴って徐々に上昇したが、骨補填材、骨片上で培養した試料では、転写因子 *Runx2* の発現をはじめ

めとして、アルカリホスファターゼ (ALP)、骨シアロタンパク質、オステオカルシン等のマーカー遺伝子の発現が顕著に上昇した。特に転写因子 Runx2 の発現上昇は培養 7 日目からみられ、骨片、水酸化アパタイト (HA)、炭酸アパタイト (CA) で顕著であったことから、培養液中に溶出したカルシウムの影響を検討するため、骨補填材を浸漬した培地でカルシウム濃度を測定したところ、細胞を培養した場合にカルシウム濃度が上昇していた。次いで、骨補填材を用いず、培養液に塩化カルシウム水溶液を加えてカルシウム濃度を変化させ、同様に培養し遺伝子発現変化を検討したところ、ALP、I 型コラーゲンの発現上昇はみられたが、他のマーカー遺伝子に顕著な発現変化はみられなかった。

- ②破骨細胞分化過程を①と同様の培養条件で検討したところ、骨補填材、あるいは骨片とともに培養することで培養液中のカルシウム濃度が顕著に上昇し、また、培養液にカルシウムを添加して培養すると、骨補填材、骨片存在下で培養した細胞と同様に破骨細胞分化マーカー、酒石酸耐性酸性ホスファターゼの発現上昇がみられた。
- (2) (1) と同様に培養した細胞を用いて HDAC 活性を測定し以下の結果を得た。
- ①コントロールとした通常の培養容器で培養した細胞よりも、骨補填材や骨片存在下で培養した細胞で HDAC 活性が顕著に検出され、何らかの制御が働いていると考えられたが、骨補填材の種類が異なっても大きな変化はみられなかった。
  - ②一方で、破骨細胞分化過程における検討では、コントロールとした通常の培養容器で培養した細胞よりも、骨補填材や骨片存在下で培養した細胞で HDAC 活性がより顕著に検出され、特に、 $\beta$ -TCP よりも、骨片、CA、HA で顕著であり、培地中のカルシウム濃度とも正の相関がみられた。
- (3) (2) で、骨髄懸濁液を培養して破骨細胞分化過程でのエピジェネティックな制御の有無を検討した試料で、より顕著な変化が見られたことから、(2) -②と同様に培養した細胞を用いてメチルトランスフェラーゼの検出を試み CpG 上のメチル化反応等を解析し、以下の結果を得た。
- ①コントロールとした通常の培養容器で培養した細胞よりも、骨補填材や骨片存在下で培養した細胞でメチルトランスフェラーゼ活性が顕著に検出された。
  - ②①のメチルトランスフェラーゼ活性はカルシウム濃度を変化させた培地を用いて培養を行った場合、カルシウムの濃度依存的に上昇した。

#### 4. 研究の反省・考察

- (1)骨芽細胞分化とエピジェネティックな因子の検討では、材料の違いによる大きな差異み見いだせなかったが、骨アパタイト、人工アパタイトいずれも骨芽細胞分を促進し、HDAC 活性にも変化が見られたことから、骨形成において、ジェネティックな因子のみでなく、なんらかのエピジェネティックな遺伝子発現制御機構の存在が考えられ、今後の研究課題として検討していきたい。
- (2)一方、破骨細胞分化においては *in vitro* の培養系においても、HDAC、メチルトランスフェラーゼ活性に顕著な変化が見られ、とくにアパタイト系骨補填材で顕著なこと、培養液にカルシウムを添加した場合に濃度依存的に骨片上での変化と同様の結果が得られたことから、破骨細胞による骨吸収とその結果もたらされるカルシウムイオンの増加が破骨細胞分化のエピジェネティックな制御に関与していると考えられた。エピジェネティックな遺伝子発現制御機構の解明は現在も発展段階にあり、活性の上昇している転移酵素の同定やターゲット遺伝子の同定を今後の課題としたい。

#### 5. 研究発表

##### (1)学会誌等

- ①Adachi M, Mizuno-Kamiya M, Takayama E, Kawaki H, Inagaki T, Sumi S, Ohashi M, Muramatsu Y, Sumitomo S, Sikimori M, Yamazaki Y, and Kondoh N. Gene expression analyses associated with malignant phenotypes of metastatic sub-clones derived from a mouse oral squamous cell carcinoma Sq-1979 cell line. *Oncol Lett.* In press.
- ②Azuma Y, Mizuno-Kamiya M, Takayama E, Kawaki H, Inagaki T, Chihara E, Muramatsu Y, and Kondoh N. The producing capabilities of Interferon-g and Inter-

leukin-10 of spleen cells in primary and metastasized oral squamous cell carcinoma cells-implanted mice. *Transl Med* 2017;3:194–199.

③Kawata K, Kubota S, Eguchi T, Aoyama, E, Moritani N, Oka M, Kawaki H, and Takigawa M. A tumor suppressor gene product, platelet-derived growth factor receptor-like protein controls chondrocyte proliferation and differentiation. *J Cell Biochem.* 2017 ; 118:4033-4044.

(2) 口頭発表

川木晴美, 石樽大嗣, 近藤信夫, 堀田正人. S-PRG フィラーと血清・唾液タンパク質の相互作用. 第3回生体機能性材料 S-PRG フィラー研究会. 2018年2月. 京都

(3) 出版物

なし