

学 校 名	東 北 医 科 薬 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	C型肝炎ウイルスCoreタンパク質の変異による C型肝炎病態への影響		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①Hepatitis C virus(HCV) ②肝病態(肝硬変・肝がん) ③Coreタンパク質 ④小胞体ストレス応答 ⑤小胞体関連分解(ERAD)			

## ○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
久 下 周 佐	薬 学 部	教 授	研究計画の立案・推進・取り纏め

## ○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
色 川 隼 人	薬 学 部	助 教	臨床研究の推進・取り纏め
佐 藤 賢 一	医 学 部	教 授	臨床研究の推進・取り纏め
小 暮 高 之	医 学 部	講 師	臨床検体・データの取り纏め
高 橋 庄 太	東北医科薬科大学病院部 薬 劑	薬 劑 師	臨床データの収集と解析

# C型肝炎ウイルス Core タンパク質の変異による C型肝炎病態への影響

## 1. 研究の目的

C型肝炎ウイルス（HCV）の持続感染は肝がんの主要なリスク因子である。HCV特異的抗ウイルス薬によりキャリア体内からHCVを排除しても発がんのリスクは残存することから、HCV持続感染時の持続的な細胞ストレスに起因した炎症などのDNA損傷に至る過程が肝細胞がんを発症につながる可能性が考えられる。HCVのゲノムRNAと結合し内核を構成するCoreタンパク質（Core）が肝がん発症に寄与することが報告されている。そこで本研究ではCoreの性状とCore発現にตอบสนองした細胞ストレス誘導機構を解明することを目的とした。

## 2. 研究の計画

CoreのC末端がシグナルペプチドペプチダーゼ（SPP）により切断され成熟型Coreへとプロセスされる。これまで、肝がんを発症した患者血清より分取したRNAを鋳型としてHCV cDNAを合成しCore部分の配列を決定した結果、複数の点変異バリエーションが存在することを明らかにした。そこで次の2点にフォーカスして変異による影響を検討した。

- (1) 各Coreバリエーションを細胞内に発現してその性状と細胞に与えるストレスの解析。
- (2) Coreによる小胞体ストレス誘導機構の解明。

本研究の臨床研究に関しては、東北医科薬科大学倫理審査委員会の審査の後承認を受けた上で東北医科薬科大学病院の患者さんの同意を得て実施した。

## 3. 研究の成果

- (1) 各Coreバリエーションを細胞内に発現させてCoreの細胞内プロセッシングとSDS-PAGE上の移動度の変化があることを見出した。
  - ① HCVは1本の長い読み取り枠からポリプロテインを合成する。N末端に位置するCore部分は、細胞質に存在し引き続き合成されるエンベローブタンパク質（E1）を小胞体内腔に輸送した後に小胞体膜のシグナルペプチダーゼにより切り離される。次に、CoreのC末端に存在するE1のシグナルペプチドとして機能したC末端14アミノ酸が小胞体膜のSPPによりトリミングされ成熟型Core（1-177aa）に変換される。我々はCoreのC末端のプロセッシングに着目して、肝がんを発症した7例の患者から取得した未成熟型Core（1-191aa）部分の塩基配列を決定した後、培養細胞に発現して細胞内におけるプロセッシングをCoreのN末端認識する抗体（Core抗体）を用いたウエスタンブロッティング法で解析した。その結果、それぞれのCoreには異なった塩基置換があること、ほとんどのCoreバリエーションはSDS-PAGE上で移動度を異にすることが判明した。
  - ② 肝がん患者由来のCoreバリエーションのSPPによるプロセッシングが正確に行われているかを検討する目的でCoreのC末端を認識するウサギポリクローナル抗体（Core-CT抗体）の取得を試みた。177番目のアミノ酸をC末端としたペプチドを免疫して得られたウサギ抗血清を用いて、CoreのC末端の177aa近辺で長さを改変したCoreシリーズ発現細胞をウエスタンブロッティング法で検証した結果、得られた抗血清（Core-CT抗体）は177aaがC末端となった成熟型Coreのみを検出する抗体であることが明らかになった。
  - ③ 肝がん患者由来のCoreバリエーションをCore-CT抗体を用いて解析した結果、検討した7名のCoreの末端はCore-CT抗体と反応することから、SPPによるプロセッシングは177番目の後ろで正確に行われていることが判明した。したがって、肝がん患者由来の成熟型Coreの移動度の違いはプロセッシング部位の違いではなく何らかの翻訳後修飾が寄与している可能性が考えられた。脱リン酸化酵素を用いて検証したところ、移動度に変化は与えなかったことからリン酸化以外の修飾が考えられた。
- (2) CoreのC末端のシグナルペプチド部分に変異したバリエーション（Core-Cmut）を見出した。このCoreバリエーションはこれまでの報告から、肝がん患者の血清中あるいは肝臓のがん部から見いだされていることが分かったため、このバリエーションによる細胞影響を検討した。
  - ① Core-Cmutを発現した細胞においては、Core-CT抗体には反応しない移動度が低下した（分子量の大きい）Coreが3分の1程度存在した。これはSPPを薬剤で阻害したときに検出

される分子と同様の移動度であることから、SPPによるプロセッシング効率が低下し未成熟型Core (Core1-191) が残存したものと考えられた。また、成熟型Coreのレベルが低下していることから、未成熟型Coreの安定性が低いことが全体量を低下させて可能性が考えられた。

- ② 小胞体ストレスによる転写誘導系 (ATF6, XBP1, ATF4) レポーター遺伝子を用いて変異のないCoreおよびCore-Cmutによる小胞体ストレス応答を検討したところ、3種のすべての転写を誘導することが判明した。特にCore-Cmut によるATF6とXBP1レポーター遺伝子の誘導が顕著であった。一方、変異のないCoreを発現した細胞をSPP阻害剤で処理した場合も小胞体ストレスを誘導するが、Core非発現細胞をSPP阻害剤で処理しても小胞体ストレスの誘導は全く誘導がないことから、未成熟型のCoreが小胞体ストレスを誘導すると考えられた。
- ③ 前述の結果から、Core-Cmutの「SPPによるプロセッシング効率の低下」、「不安定化」が「小胞体ストレスの誘導」に寄与する可能性を考えた。最近、SPPは小胞体膜上のE3ユビキチンリガーゼであるTRC8とMARCH6と複合体形成することが報告されていることから、変異Coreがこれらの因子に影響を与え、小胞体ストレスへの寄与につながる可能性を考えCRISPR/Cas9を用いてMARCH6ノックアウト細胞の取得を試み、MARCH6欠損細胞を取得した。TRC8のノックアウト細胞は分取できなかったためテトラサイクリン誘導型のmiRNA発現ノックダウン細胞を取得した。今後、これらの細胞を用いてCore-Cmutによる小胞体ストレスの誘導機構の解明を目指す。

#### 4. 研究の反省・考察

##### (1) 肝がん患者の Core の性状解析

肝がん患者由来のCoreのほとんどはSDS-PAGEにて移動度が変化することを初めて見出した。これまでに、このSDS-PAGEの条件はCoreのC末端を4アミノ酸短くしたCore(1-173)の移動度の違いを見分けることが可能であることから、肝がん患者のCoreのアミノ酸置換がSPPによるプロセッシングを変化させる可能性が考えられた。成熟型CoreのC末端を認識する抗体を作成し検証した結果、肝がん患者由来のバリエーションはSPPによる切断部位の変化ではなく翻訳後修飾である可能性が示唆された。本研究で得られたCore-CT抗体はCore-Cmutの未成熟Coreは反応しないことから、N末端側の抗Core抗体と組み合わせることで未成熟型Coreを同定するツールとして有用である。

アミノ酸変異による構造変化はSPPの切断部位には影響しなかったことから、アミノ酸置換は翻訳後修飾を起こすCoreの移動度を変化させた可能性がある。リン酸化ではない修飾が移動度を変化させた可能性が考えられたが、今回は同定するまでには至らなかったため、今後マスマス法などを用いて検討する必要がある。数か所のアミノ酸置換がCoreの立体構造に変化を与え、これが翻訳後修飾に影響した可能性が考えられる。構造変化がウイルス感染細胞への影響を変化させる可能性も考えられる。移動度の変化が病態に与える影響に関しては今後の課題である。

##### (2) Core の C 末端のバリエーション (Core-Cmut) の解析

小胞体ストレス応答は小胞体内腔に蓄積した変性タンパク質を、小胞体に分布するIre1およびPERKが感知して誘導する。変性タンパク質により活性化されたIRE1は細胞質側でXBP1 mRNAのスプライシングを行い、その結果XBP1転写因子の合成を誘導する。また、PERKが活性化されるとeIF2 $\alpha$ のリン酸化とATF4転写因子などの特異的合成誘導を行う。また、小胞体膜に分布するATF6は小胞体ストレスによりゴルジ体に輸送され活性化体となり特異的転写誘導を担う。本研究により未成熟型のCoreがATF6およびXBP1を誘導することが判明した。C末端の変異は複数の論文により肝がん患者より分離されていることから、肝がん発症の一要因である可能性がある。

小胞体ストレスはCa<sup>2+</sup>の漏出とミトコンドリア呼吸鎖からの活性酸素種の産生に寄与する。したがって、Coreによる小胞体ストレス誘導機構を解明することがHCVの持続感染による発がん機構の解明につながると考えられ、本研究から、Coreが小胞体膜上でプロセスされる過程で小胞体ストレス応答機構に影響を与えることが強く示唆され、そのプロセッシングに寄与するSPPおよび不安定化に寄与するTRC8-MARCH6の活性に与えるCoreの影響を解析する今後の研究の方向を与えた。

## 5. 研究発表

### (1) 学会誌等

- ① Circulating extracellular vesicle-encapsulated HULC is a potential biomarker for human pancreatic cancer.  
Takahashi K, Ota Y, Kogure T, Suzuki Y, Iwamoto H, Yamakita K, Kitano Y, Fujii S, Haneda M, Patel T, Ota T.  
Cancer Sci. 2020 Jan;111(1):98-111. doi: 10.1111/cas.14232. Epub 2019 Dec 5.
- ② Case reports of latent HBV hepatitis in patients after neurosurgical treatment for hypothalamic and pituitary tumors.  
Niizuma K, Ogawa Y, Kogure T, Tominaga T.  
BMC Infect Dis. 2020 Mar 18;20(1):230. doi: 10.1186/s12879-020-04971-2.

### (2) 口頭発表

- ① ピルビン酸キナーゼM2 (PKM2) レドックス制御におけるCys 残基翻訳後修飾の解析、色川隼人、沼崎賢史、加藤慎、久下周佐、生化学会東北支部第85回例会、仙台、2019年5月、演題番号P51
- ② C型肝炎ウイルスCoreタンパク質による小胞体ストレスの誘導  
久下周佐、色川隼人、高橋庄太<sup>a</sup>、小暮高之<sup>b</sup>、佐藤賢一<sup>b</sup> (東北医科薬科大学病院薬剤部<sup>a</sup>、東北医科薬科大学医学部<sup>c</sup>) 第31回微生物シンポジウム、京都、2019年8月、演題番号022
- ③ ピルビン酸キナーゼM2 型 (PKM2) のシステイン残基翻訳後修飾の多様性とその意義の解析、色川隼人、沼崎賢史、加藤 慎、久下周佐、衛生薬学環境トキシコロジーフォーラム、京都、2019年9月、演題番号P051
- ④ HSP70 コシャペロンBAG-1 による酸化ストレス応答機構の解析  
武田洗樹、色川隼人、久下周佐、衛生薬学環境トキシコロジーフォーラム、京都、2019年9月、演題番号P076
- ⑤ Bag-1はGSH合成阻害剤BSO存在下における細胞増殖と細胞内GSHレベルの低下に寄与する  
猪瀬一丸山敦史<sup>a</sup>、田口恵子<sup>b</sup>、守田匡伸<sup>c</sup>、山本雅之<sup>b</sup>、久下周佐、(日本薬科大学薬学部生命科学薬学分野(現住所)<sup>a</sup>、東北大学大学院医学系研究科医化学分野<sup>b</sup>、東北大学大学院医学系研究科環境医学分野<sup>c</sup>) 第92回日本生化学会大会、横浜、2019年9月、3P-189
- ⑥ 翻訳開始因子eIF2 $\alpha$ を介した酸化ストレス感知機構の解析  
武田洗樹、色川隼人、久下周佐、第58回日本薬学会東北支部大会、仙台、2019年10月、演題番号PB-14
- ⑦ ピルビン酸キナーゼM2 に存在するシステイン残基の酸化修飾の多様性  
色川隼人、沼崎賢史、加藤 慎、久下周佐、第58回日本薬学会東北支部大会、仙台、2019年10月、演題番号PC-05

### (3) 出版物

なし

学 校 名	埼 玉 医 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	ドーパミン受容体シグナルを介した好中球性炎症の 制御 —マウス乾癬モデルを用いて—		研究分野	医 学
キ ー ワ ー ド	①dopamine D2 receptor agonist ②tannic acid ③galloyl group ④inflammatory bowel disease			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
川 野 雅 章	医 学 部	准 教 授	総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
中 村 晃 一 郎	医 学 部	教 授	組織学的評価 (皮膚科領域(乾癬))
佐 藤 毅	医 学 部	准 教 授	組織学的評価 (歯科領域(歯周病))
高 木 理 英	医 学 部	助 手	実験・データ整理

# ドーパミン受容体シグナルを介した好中球性炎症の制御 —マウス乾癬モデルを用いて—

## 1. 研究の目的

- (1) 本研究では、ドーパミンやドーパミン D2 受容体アゴニストシグナルによるサイトカイン分泌制御メカニズムを解明し、アトピー性皮膚炎、腸炎、乾癬、歯肉炎などの、好中球性の炎症性免疫疾患に効能のある新規治療薬を提供することを目的としている。我々は、獲得免疫応答において、未熟 T 細胞が成熟 T 細胞に分化する際に、Th1, Th2, または Th17 に選択的に分化誘導させる物質をスクリーニングする系を構築し、この系を利用して、複数の試薬や上市薬をスクリーニングした結果、免疫活性化の際に Th2 および Th17 を顕著に抑制する物質として、ドーパミン受容体関連薬を同定した。Th2 および Th17 が、アレルギー、喘息、自己免疫疾患に関与していることから、ドーパミン受容体関連薬がこれらの疾患の発症を抑制する予防的効果があると期待された。実際、種々の自己免疫病マウスモデルにパーキンソン病の治療薬を予防的に投与すると、病勢を抑制した。
- (2) さらに 2017 年度の御財団の第 43 回学術研究振興資金による援助により、自然界に存在する物質からドーパミン D2 受容体アゴニストとして新規にタンニン酸 (TA, tannic acid) を同定し、期待した通り TA は、炎症性サイトカイン分泌、および、IL-8 分泌を抑制し、大腸炎、乾癬、歯周病の病態を著しく改善させるという結果を取得した。また、自然免疫におけるドーパミン受容体シグナルによる抗炎症作用のメカニズムを解明し、特にドーパミン D2 受容体アゴニストが炎症性サイトカインの分泌を抑制することを示した。
- (3) 本研究では、ドーパミン D2 受容体アゴニスト作用を有する物質の様々な好中球性の炎症性自己免疫疾患に対する効能を解析した。抗炎症作用のメカニズムとしてはドーパミン D2 受容体アゴニスト作用による、炎症性サイトカインの分泌段階での抑制機構を解明した。既存の天然物である TA に炎症性自己免疫疾患に劇的な効能があることを示し、その抗炎症作用を解明することは、安価で顕著な抗炎症作用を有する新規治療薬を提供に繋がるものと考えられるため、近年問題になっている医療のコストの削減にも寄与できるものと期待される。

## 2. 研究の計画

- (1) 免疫細胞に対する TA の作用解析を行った。ドーパミンは、サイトカインの分泌を制御し、CD4<sup>+</sup> T 細胞、CD8<sup>+</sup> T 細胞、natural killer (NK) 細胞からの Interferon (IFN)- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , LL-1 $\beta$ , IL-8 の放出を抑制する一方、好中球、単球、B 細胞、マクロファージ、樹状細胞からの IL-10 の分泌を促進する。そこで、TA がサイトカイン分泌を制御することを詳細に解析した。
  - ① ドーパミンD2L受容体 (D2L, D2受容体long isoform) 強制発現細胞株 (ドーパミン D2L受容体は、作動薬 (agonist, アゴニスト) 作用による活性化によって、下流のcAMPシグナルを抑制するために、cAMPを分解することでcAMP濃度を下降させる) を用いて、そのcAMPの分解率から、TAの詳細な50%効果濃度 (EC<sub>50</sub>, half maximal effective concentration) を算出した。
  - ② マウスリンパ球に、TAを投与した後、サイトカインの分泌をlipopolysaccharide (LPS)、および、抗CD3/CD28抗体 (CD3/CD28) で誘導して24時間後に培養上清を回収して、そこに含まれる、IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , LL-1 $\beta$ , IL-8, IL-10の分泌量をELISA法で解析した。
  - ③ マウスリンパ球より、CD4<sup>+</sup> T細胞、CD8<sup>+</sup> T細胞、NK細胞、好中球、単球、B細胞、マクロファージ、樹状細胞を調製し、上記と同様の方法でサイトカインの分泌量を解析した。
  - ④ TAが未熟CD4<sup>+</sup> T細胞 (naive CD4<sup>+</sup> T細胞) からのTh1、および、Th17分化を抑制することを解析した。
  - ⑤ 選択的ドーパミンD2受容体拮抗薬が、TAによって、誘導、および、抑制されるサイトカイン分泌を無効にすることを解析した。

### 3. 研究の成果

- (1) TA が免疫細胞からのサイトカイン分泌を制御することを詳細に解析し、以下の成果を得た。
  - ① TAのドーパミンD2L受容体に対するアゴニスト作用は、 $EC_{50}$  (half maximal effective concentration) として $3.23 \pm 1.20$  ( $\mu\text{M}$ ) (one standard deviation) であった。
  - ② LPS刺激によってマウス脾臓細胞からのIFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ の放出をTAは抑制する一方、TNF- $\alpha$ 、および、IL-10の放出をTAは促進した。
  - ③ CD3/CD28刺激によってマウス脾臓細胞からのIFN- $\gamma$ 、IL-17の放出をTAは抑制する一方、IL-4、および、IL-10の放出をTAは促進した。
  - ④ TAはLPS刺激やCD3/CD28刺激で誘導されるマウス脾臓細胞におけるextracellular signal-regulated kinase 1/2/ (ERK1/2)、c-jun N-terminal kinase (JNK)、p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK) の活性化を抑制することはなかった。
  - ⑤ CD3/CD28刺激によってマウスCD4<sup>+</sup> T細胞からのIFN- $\gamma$ 、IL-17の放出をTAは抑制する一方、IL-4、および、IL-10の放出は促進した。
  - ⑥ CD3/CD28刺激によってマウスCD8<sup>+</sup> T細胞からのIFN- $\gamma$ の放出をTAは抑制した。
  - ⑦ LPS刺激によってマウス好中球、単球、腹腔マクロファージ、および、骨髄由来樹状細胞からのTNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ の放出をTAは促進した。また、LPS刺激によってマウスB細胞、好中球、および、腹腔マクロファージからのIL-10の放出をTAは促進した。さらに、LPS刺激によってマウス腹腔マクロファージからのIL-6の放出をTAは促進した。
  - ⑧ TAは、マウス未熟CD4<sup>+</sup> T細胞のTh1、および、Th17への分化を抑制することが示唆された。
  - ⑨ 選択的ドーパミンD2受容体拮抗薬は、TAによるLPS刺激マウス脾臓細胞からのIFN- $\gamma$ 産生の抑制を解除した。また、選択的ドーパミンD2受容体拮抗薬は、TAによるCD3/CD28刺激マウス脾臓細胞からのIFN- $\gamma$ 産生、および、IL-17産生の抑制を解除し、一方、TAによるCD3/CD28刺激マウス脾臓細胞からのIL-4産生の促進を解除した。

### 4. 研究の反省・考察

- (1) 本研究では、ドーパミンやドーパミン D2 受容体アゴニストシグナルによるサイトカイン分泌制御メカニズムを解明し、アトピー性皮膚炎、腸炎、乾癬、歯肉炎などの、好中球性の炎症性免疫疾患に効能のある新規治療薬を提供することを目的とした。実際、TA の詳細なドーパミン D2L 受容体に対するアゴニスト作用を解析し、 $EC_{50}$  として  $3.23 \pm 1.20$  ( $\mu\text{M}$ ) (one standard deviation) という値を取得した。TA は、水に可溶のポリフェノールで、ガロタンニンとも呼ばれる。他には、エラジタンニン、TA とエラジタンニンが複合体となったもの、および、縮合型タンニン、が知られている。TA は、5つのポリガロイルエステルがエステル結合で中心のグルコース分子と結合して放射状に広がっている構造を有していることから、ガロイル基がドーパミン D2 受容体に作用してアゴニスト活性を発揮しているものと示唆された。
- (2) 本研究ではさらに、好中球性炎症疾患に有効な薬剤として、我々が新規に同定しドーパミン D2L 受容体アゴニストである TA を取り上げた。TA の薬剤の作用メカニズムとしては、ドーパミンの免疫細胞への作用メカニズムと比較した。その結果、ドーパミンと同様に、TA は LPS 刺激によってマウス脾臓細胞からの IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ の放出を抑制する一方、IL-10 の放出を TA は促進することを明らかにした。さらに、ドーパミンと同様に、TA は LPS 刺激によってマウス B 細胞、好中球、および、腹腔マクロファージからの IL-10 の放出を促進した。加えて、ドーパミンと同様に、TA は LPS 刺激によってマウス腹腔マクロファージからの IL-6 の放出を促進した。このことから、TA は、ドーパミンと似たパターンのサイトカイン分泌の転調を促すことによって、好中球性の炎症性自己免疫疾患を含む好中球性炎症疾患に効能を発揮する可能性を提案することができた。その一方で、ドーパミンとは異なり、TA は LPS 刺激によってマウス好中球、単球、腹腔マクロファージ、および、骨髄由来樹状細胞からの TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ の放出を TA は促進した。このことは、TA 作用によって転調したヘルパーT 細胞の非存在

下では、TA は好中球、単球、腹腔マクロファージ、および、骨髄由来樹状細胞の活性化、および、炎症誘導を惹起してしまう可能性が示唆された。一方で、シグナル伝達経路への作用としては、ドーパミンと同様に、TA はLPS 刺激で誘導されるマウス脾臓細胞における ERK1/2、JNK、p38MAPK の活性化を抑制することはなかった。このことから、本研究の目的であった、ドーパミンやドーパミン D2 受容体アゴニストシグナルによるサイトカイン分泌制御メカニズムを解明し、アトピー性皮膚炎、腸炎、乾癬、歯肉炎などの、好中球性の炎症性免疫疾患に効能のある新規治療薬を提供するという目的は達成されたと考えられる。

(3) 一方、TA のドーパミン D2 受容体へのアゴニスト作用がどのような分子メカニズムでサイトカイン分泌を制御するのかは今回の研究では明らかにできなかった。この分子メカニズムを解明することで、ドーパミン D2 受容体の活性化が炎症性の好中球性自己免疫疾患を含む炎症性疾患に有効である理由が明らかになるものと期待されるので、ドーパミン D2 受容体活性化によるサイトカイン分泌制御の詳細なメカニズムの解析が待たれる。

(4) また、本研究では、生体外からドーパミン D2 受容体のアゴニストである TA を添加することで、免疫細胞のサイトカインの分泌を制御し、好中球性の自己免疫疾患を含む炎症性疾患に有効であることを解析したが、生体内でも神経伝達物質であるドーパミンが免疫細胞に発現しているドーパミン D2 受容体を活性化することでサイトカインの分泌を制御していることを解析する必要があると思われる。本研究では、自己免疫疾患モデルマウスとしては、硫酸デキストランを投与することで腸炎を誘導し、TA の投与がその腸炎誘導を抑制することを示した。このことは、TA がドーパミン D2 受容体を発現している腸に存在する免疫細胞、および、腸における神経系に作用して腸炎を抑制する可能性を示唆していると考えられる。腸の神経系は脳神経系とも密接な相互作用があることが知られており、また、TA がアルツハイマー病にも効能があるという報告もあるため、TA の腸神経系への作用が、脳神経系にも作用し、結果として、アルツハイマー病の病態の改善にも繋がっている可能性が考えられる。これらの可能性を示すためには、神経細胞と免疫細胞との間の相互作用を解析するための系を構築し、神経細胞からのドーパミン分泌が免疫細胞のサイトカイン分泌制御に利用されていることを解析すると共に、その系における TA の投与がどのようなサイトカイン分泌制御の転調を誘導するかを解析することが必要だと考えられる。また、この系への TA の投与が神経細胞からの他の神経伝達物質の放出の誘導、および、転調にも関わっていることを解析することが必要だと考えられる。

## 5. 研究発表

### (1) 学会誌等

① Tannic acid acts as an agonist of the dopamine D2L receptor, regulates immune responses, and ameliorates experimentally induced colitis in mice. Kawano M., Saika K., Takagi R., Matsui M., Matsushita S. *Brain, Behavior, & Immunity - Health*, 査読有り, 5:100071, 30 April. 2020.

② 発明の名称：活性化T細胞からのIL-8産生を抑制するための組成物 発明者：松下祥、川野雅章、高木理英 特許第6562332号 特願2017-106234 PCT/JP2018/020696 特許登録日：2019年8月2日

### (2) 口頭発表

なし

### (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	筋ジストロフィーの中樞神経障害におけるBRAG分子の役割		研究分野 医 学
キ ー ワ ー ド	①シナプス ②可塑性 ③小胞輸送 ④エンドソーム ⑤低分子量GTP結合タンパク質		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
阪 上 洋 行	医 学 部	教 授	研究の総括と論文作成

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
深 谷 昌 弘	医 学 部	准 教 授	実験・データの解析、論文作成
菅 原 健 之	医 学 部	助 教	実験・データの解析、論文作成

# 筋ジストロフィーの中樞神経障害における BRAG 分子の役割

## 1. 研究の目的

シナプスにおける細胞接着分子や神経伝達物質受容体の発現は、エンドソームを介する細胞内小胞輸送経路を介して厳密に制御され、神経回路形成やシナプス可塑性に深く関与している。ADP リボシル化因子 6 (Arf6) は、細胞膜とエンドソーム間の小胞輸送を制御する低分子量 G 蛋白質で、グアニンヌクレオチド交換因子である BRAG 分子ファミリーにより活性化を受け、小胞輸送を介したグルタミン酸受容体や GABA 受容体のシナプス発現を調節し、シナプス形成やシナプス可塑性に関わることが近年明らかになっている (D'Souza and Casanova, 2016; Um, 2017)。BRAG 分子ファミリーは、異なる遺伝子から生じる 3 種のアイソフォーム (BRAG1、BRAG2、BRAG3) が存在し、研究代表者はこれまでの研究により、① 網膜視細胞のリボンシナプスにおいて、BRAG2 がジストロフィンと複合体を形成して局在すること (Sakagami et al., J. Comp. Neurol. 2013; Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2017)、② 網膜型ジストロフィン遺伝子欠損マウスにおいて、視細胞シナプスにおける BRAG2 のシナプス集積が著明に減少すること (Sakagami et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2017)、③ BRAG3 がジストロフィンと複合体を形成し、海馬神経細胞の抑制性シナプスに特異的に局在すること (Fukaya et al., J. Neurochem. 2011) を見出し、シナプス機能における BRAG ファミリー分子とジストロフィンと機能的関連の可能性を明らかにしてきた。

デュシェンヌ型筋ジストロフィーは、ジストロフィン欠損による進行性の筋萎縮・変性を主症状とする X 連鎖性遺伝病である。ジストロフィン分子は骨格筋とともに脳や網膜にも豊富に発現し、筋ジストロフィーは、筋症状とともに知的障害、精神症状 (自閉症、うつ病)、網膜電図の異常などの中枢神経障害を合併する。近年のエキソンスキッピングを始めとする革新的治療法の開発や合併症の管理などの医療技術の向上により、患者の平均寿命は飛躍的に伸びている。しかしながら、従来の研究の多くは筋変性の機序に着目されたものであり、中枢神経症状の機序の解明は立ち遅れ、患者が高年齢化するなかで今後克服すべき新たな課題となっている。近年、ジストロフィンが神経細胞の抑制性シナプスの後膜において局在し、抑制性シナプス伝達に関与すること (Wada et al., Brain 2009)、網膜の視細胞においてジストログリカンを介して細胞外基質ピカチュリン分子と複合体を形成し、網膜の神経回路形成・維持に関与することが明らかになってきた (Sato et al., Nat. Neurosci. 2008)。しかしながら、ジストロフィンによる抑制性シナプスや視細胞でのシナプスの形成機構や機能的役割について未だ不明な点が多い。

本研究はこれらの研究背景をもとに BRAG 分子のシナプス神経機能の解明、特に BRAG-ジストロフィン間の相互作用に着目した機能的役割の解明を目指し企画した。

## 2. 研究の計画

### (1) ジストロフィンの神経系における免疫組織学的検出法の確立

モノクローナル抗体を用いた中枢神経系におけるジストロフィンの局在に関する従来の免疫組織学的解析の結果は必ずしも一定しておらず、ジストロフィンの機能を考える上で、免疫組織学的検出法の確立が重要である。パラフィン包埋の脳標本を用いて、抗原賦活法などの条件検討を行いジストロフィン検出法の最適化を目指す。

### (2) BRAG ファミリー分子の神経系における分子ネットワークと機能解明

BRAG ファミリー分子の神経系における分子ネットワークを明らかにするため、酵母ツーハイブリット法を用いて BRAG ファミリー分子の新規結合タンパク質の網羅的な単離を試みる。特に、スクリーニングにより BRAG2 の新規結合分子をして見出したエンドフィリンとの相互作用の機能的役割に関して、海馬初代神経細胞を用いてジストログリカンやグルタミン酸受容体などの膜タンパク質のシナプス発現の小胞輸送における機能関与の観点から解析を行う。

### 3. 研究の成果

#### (1) ジストロフィンの神経系の免疫組織学的検出法の確立

4%パラフォルムアルデヒドで灌流固定を施した脳のパラフィン切片に対して、TE バッファーやクエン酸バッファーなどを用いた種々の条件での抗原賦活処理を行い、マウス抗ジストロフィン抗体を用いて免疫染色法を行い、免疫反応の検出方法の最適化を行った。その結果、TE バッファー(pH 9.0)を用いた抗原賦活処理により、海馬アンモン角の錐体細胞とその樹状突起分布領域において、明瞭な点状の免疫陽性反応が検出された。また、小脳皮質においてプルキンエ細胞の細胞体とその樹状突起が存在する分子層において明瞭な点状の免疫陽性反応が検出された。一方、パラフィン切片に対して抗原賦活処理を行わなかった場合、これらの免疫陽性反応はほとんど検出できなかった。また、二重蛍光免疫染色により、海馬や小脳で観察された点状の免疫陽性反応が抑制性シナプス後膜に局在するゲフィリンやBRAG3 陽性反応と一致することより、ジストロフィンの抑制性シナプスでの局在が確認できた。

#### (2) BRAG2 の分子ネットワークと神経機能の解明

##### ① BRAG2 の細胞内局在解析

BRAG2 の2つのバリエーション BRAG2a と BRAG2b に対する特異的な抗体を作製し、中枢神経系における局在を免疫組織学的に解析した結果、BRAG2a が興奮性シナプスのシナプス後肥厚部に特異的に局在する一方、BRAG2b は細胞質に顆粒状に存在し、BRAG2a と BRAG2b の相異なる細胞内局在を示すことを見出した。

##### ② BRAG2a の結合タンパク質の同定

BRAG2a のシナプス後肥厚部への局在機構とシナプス機能を明らかにするために、BRAG2a に特異的な PDZ 結合部位とプロリン・リッチ領域を含む C 末端領域を餌として、酵母ツーハイブリット法により脳 cDNA ライブラリーをスクリーニングした。その結果、シナプス後肥厚部の主要な足場蛋白質である PSD-95 とエンドサイトーシス関連分子であるエンドフィリン 2/3 の単離に成功した。さらに結合責任部位を検討した結果、BRAG2a は、C 末端部の PDZ 結合部位を介して PSD-95 の PDZ 領域 23(PDZ2)と、プロリン・リッチ領域を介してエンドフィリン 3 の SH3 領域と結合することが明らかになった。また、脳抽出液を用いた免疫沈降法により、BRAG2a が PSD-95 およびエンドフィリンと複合体を形成することが確認できた。

##### ③ BRAG2a のシナプス局在機構の解明

BRAG2a の種々の領域を欠損した変異体と EGFP 融合タンパク質を初代海馬神経細胞に発現させて BRAG2a のシナプス局在機構を検討した結果、野生型 BRAG2a(EGFP-BRAG2a) は、内因性 BRAG2a と同様にシナプスに特異的に局在するのに対して、PSD-95 との結合に必要な C 末端部の PDZ 結合部位を欠損させた変異体(EGFP-BRAG2a-ΔSTVV)は樹状突起と棘突起に均一に分布し、シナプス局在能が消失した。以上の結果から、BRAG2a は PSD-95 との相互作用を介してシナプスに局在する可能性が強く示唆された。

##### ④ BRAG2a のエンドフィリンとの相互作用を介した機能解明

BRAG2a は、シナプス可塑性のひとつである長期抑圧(LTD)において AMPAR のエンドサイトーシスを制御することが報告されている(Scholz et al., 2010)が、その詳細な分子機構は不明である。代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)依存的 LTD での AMPAR のエンドサイトーシスにおける BRAG2a とエンドフィリン 3 間の相互作用の機能的な役割を検討するために、RNA 干渉法を用いて BRAG2 を発現抑制した初代海馬神経細胞に、BRAG2a の種々の変異遺伝子を発現されて、mGluR 依存的な AMPAR のエンドサイトーシスへの影響を検討した。その結果、BRAG2 のノックダウンにより、mGluR 依存的な AMPAR のシナプス発現の減少が阻害されるのに対して、野生型 BRAG2a の発現により表現型が回復した。一方、エンドフィリンとの結合能を欠落した変異体(BRAG2a-P956/957A)の発現では、BRAG2 のノックダウンにより観察された表現型のままで野生型 BRAG2a の発現されたようには回復できないことが明らかになった。以上の結果から、BRAG2a は、エンドフィリンとの相互作用を介して mGluR 依存的な AMPAR のエンドサイトーシスに関与することが示唆された。

## 4. 研究の反省・考察

### (1) ジストロフィンの神経系の免疫組織学的検出法の条件検討

本研究により、パラフィン切片を用いた中枢神経系におけるジストロフィンのマウスモノクローナル抗体による免疫組織学的検出法を確立することができた。今後、中枢神経系におけるジストロフィンの安定した発現解析の結果を得るために非常に有益と考えられる。

### (2) BRAG2によるグルタミン酸受容体のシナプス発現調節機構の解明

シナプス可塑性のひとつである長期抑圧(LTD)は、記憶の消去や概念化に関与することが知られ、活動依存的な AMPAR エンドサイトーシスが細胞レベルで中心的な現象であると考えられているが、その分子制御機構の解明は長期増強に比較して立ち遅れ未解明な点が多い。本研究は、長期抑圧において、BRAG2a がエンドサイトーシスの積荷タンパク質となる AMPAR とエンドサイトーシス制御分子であるエンドフィリンとを繋ぎ合せ、Arf6 依存的な AMPAR のエンドサイトーシスを制御していることを見出し、Scholz ら(2020)が提唱した BRAG2-Arf6 による AMPAR のエンドサイトーシスの分子制御機構モデルをさらに進展させた(Fukaya et al., J. Neurosci., 2020)。また、これらの研究と同時に本研究のきっかけとなった BRAG 分子とジストロフィン複合体との機能的連関に関する機能解析に関しては年度内には研究成果の報告には至らなかったが、今後さらに機能解析を進めていく予定である。

## 5. 研究発表

### (1) 学会誌等

- ① Saegusa S, Fukaya M, Kakegawa W, Tanaka M, Katsumata O, Sugawara T, Hara Y, Itakura M, Okubo T, Sato T, Yuzaki M, Sakagami H. Mice lacking EFA6C/Psd2, a guanine nucleotide exchange factor for Arf6, exhibit lower Purkinje cell synaptic density but normal cerebellar motor functions. *PLoS One* 14: e0216960 (2019)
- ② Kikuchi K, Ihara D, Fukuchi M, Tanabe H, Ishibashi Y, Tsujii J, Tsuda M, Kaneda M, Sakagami H, Okuno H, Bito H, Yamazaki Y, Ishikawa M, Tabuchi A. Involvement of SRF coactivator MKL2 in BDNF-mediated activation of the synaptic activity-responsive element in the Arc gene. *J Neurochem.* 148: 204-218 (2019)
- ③ Tatsumi Y, Matsumoto N, Iibe N, Watanabe N, Torii T, Sango K, Homma K, Miyamoto Y, Sakagami H, Yamauchi J. CMT type 2N disease-associated AARS mutant inhibits neurite growth that can be reversed by valproic acid. *Neurosci. Res.* 139:69-78 (2019)
- ④ Khrongyut S, Rawangwong A, Pidsaya A, Sakagami H, Kondo H, Hipkaeo W. Localization of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase (PIP5K)  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  in the three major salivary glands *in situ* of mice and their response to  $\beta$ -adrenoceptor stimulation. *J. Anat.* 234:502-514 (2019)
- ⑤ Sakai Y, Kassai H, Nakayama H, Fukaya M, Maeda T, Nakao K, Hashimoto K, Sakagami H, Kano M, Aiba A. Hyperactivation of mTORC1 disrupts cellular homeostasis in cerebellar Purkinje cells. *Sci. Rep.* 9(1): 2799. (2019)
- ⑥ Takabatake S, Ohtsuka S, Sugawara T, Hatano N, Magari M, Sakagami H, Tokumitsu H. Regulation of  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase  $\beta$  by cAMP signaling. *Biochim. Biophys. Acta. Gen. Subj.*, 1863: 672-680 (2019)
- ⑦ Moriguchi S, Kita S, Inagaki R, Yabuki Y, Sasaki Y, Ishikawa S, Sakagami H, Iwamoto T, Fukunaga K. Aberrant amygdala-dependent cued fear memory in  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger 1 heterozygous mice. *Mol. Neuropharmacology.* 56:4381-4394 (2019)
- ⑧ Imaizumi N, Takeuchi Y, Hirano H, Torii T, Seki Y, Morimoto T, Miyamoto Y, Sakagami H, Yamauchi J. Data on the effects of Charcot-Marie-Tooth disease type 2N-associated AARS missense mutation (Arg329-to-His) on the cell biological properties. *Data Brief* 25:104029 (2019)

### (2) 口頭発表

- ① 井瀧貫太、深谷昌弘、阪上 洋行、神経細胞におけるArf6活性化因子EFA6AとKalirin-7との新規相互作用の機能的役割、第107回日本解剖学会関東支部学術集会(東京女子医科大学) 2019年11月2日

### (3) 出版物

なし

学 校 名	慶 應 義 塾 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	腸内細菌による自己免疫応答制御作用の解明 —超高齢化社会に向けた自己免疫疾患制御—		研究分野 医 学
キ ー ワ ー ド	①自己免疫系疾患 ②関節リウマチ ③酪酸 ④濾胞制御性T細胞		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
長 谷 耕 二	薬 学 部	教 授	自己免疫疾患モデルの評価

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
金 倫 基	薬 学 部	教 授	腸内細菌叢と代謝物の解析

# 腸内細菌による自己免疫応答制御作用の解明 — 超高齢化社会に向けた自己免疫疾患制御 —

## 1. 研究の目的

(1) 研究背景：腸内細菌の異常による疾患形成

- ① 我が国では少子高齢化に伴い、65歳以上の高齢者人口が2025年には約30%、2050年には約40%にも達する超高齢化社会の到来が予想されている。この社会構造や生活習慣の変化により、関節リウマチや全身性エリテマトーデスなど何らかの自己免疫疾患を有する患者の増大が予想されている。このうち、特に慢性関節リウマチは、現時点でも国内患者数は約70万人と患者数が多く、毎年1.5万人が新たに患者として認定されている。さらに、「手足の関節が痛む」という疾患予備群は560万人（人口の4.5%）におよび、国民病となりつつある。慢性関節リウマチは、リウマトイド因子を始めとする自己抗体の産生を特徴とし、関節の滑膜に炎症が生じることで病態が進行する。その病因・病態は未だ十分に解明されたとはいえず、効果的な対症療法はあるものの、根治療法は確立されていないのが現状である。
- ② 近年、腸内細菌の異常が関節リウマチなど自己免疫疾患の発症に関わることが示唆されている。腸内細菌のヒトの大腸には100兆個以上もの腸内細菌が定着しており、消化液では分解できない食物繊維などを腸内発酵により分解し、生体にとって有用な短鎖脂肪酸に作り替える働きをしている。しかし、ひとたび腸内細菌叢のバランスに異常をきたすと、炎症性腸疾患や大腸癌などの消化器疾患に加えて、アレルギーや自己免疫性疾患、さらには精神性疾患や生活習慣病といった全身性の疾患が誘導されることが示唆されている。つまり腸内共生バランス失調は各種疾患の発症に関わる鍵因子であると想定されているが、その病態メカニズムは不明である。

(2) 研究目的：

- ① 興味深いことに、炎症性腸疾患、関節リウマチ、肝硬変、メタボリックシンドロームなど炎症反応を伴う疾患で共通して見られる異常の一つは、酪酸産生菌種の減少である。申請者は初年度までの成果として、関節リウマチ患者の便中において実際に酪酸産生量が低下しており、自己免疫性関節炎モデルにおいて、酪酸は関節炎の発症を顕著に抑制することを見出した。さらに、酪酸は、リンパ濾胞内に存在する濾胞制御性T (follicular regulatory T: Tfr) 細胞を誘導することで、自己抗体の産生を抑制していることを明らかにした。
- ② これら一連の研究成果は、『Tfr細胞を増加することで全身性の自己免疫応答を制御することができる』という新たな疾患制御法の同定につながるものであった。その実現に向け、2年目には、Tfr細胞の*in vitro*誘導条件を世界に先駆けて確立するとともに、Tfrレポーターマウスを用いてTfr細胞分化誘導活性のハイスループットスクリーニング系の構築を試みた。

## 2. 研究の計画

(1) Tfr細胞分化誘導スクリーニング系の構築

- ① 2018年度までの研究成果に基づき、自己免疫疾患の新たな制御療法確立を目指し、新規Tfr細胞誘導物質の探索に着手した。そのためにまず、Tfr細胞のマーカー分子であるBcl-6レポーターマウスから調整したナイーブT細胞をTfr分化条件で培養した。
- ② 上記培養系にポジティブコントロールとして酪酸を添加し、Tfr誘導活性が見られることを検証した。

(2) Tfr細胞誘導活性を有する低分子化合物の探索

- ① (1) で構築した *in vitro*スクリーニング系に腸内代謝物ライブラリーを添加し、Tfr細胞誘導活性を有する代謝物の探索を行った。

### 3. 研究の成果

#### (1) *In vitro*にて誘導した Tfr 細胞の性状解析

- ① Tfr細胞を分化誘導する *in vitro*培養条件を確立し、その性状解析を行った結果、本細胞はFoxp3, Bcl-6, CXCR5といったマーカー分子や、PD-1のような免疫抑制分子を発現しており、生体内のTfr細胞と同様の特徴と自己免疫抑制作用を持つことが示唆された。
- ② さらに本培養系に酪酸を添加することで、Tfr細胞の割合が有意に上昇することが判明した。そのメカニズムを検証したところ、酪酸はHDAC阻害作用を介してTfr細胞の分化を促進することが判明した。酪酸によって *in vitro*で誘導したTfr細胞を、コラーゲン誘導性関節リウマチマウスに移入したところ、病態の発症が抑制された。このことから、*in vitro*で誘導されたTfr細胞は機能的にも自己免疫抑制効果を保有していることが明らかとなった。

#### (2) Tfr 細胞分化誘導スクリーニング系の構築

- ① *In vitro*で機能的なTfr細胞が誘導できることを検証できたことから、続いて、Tfr細胞誘導活性を持った化合物のスクリーニング系の構築に着手した。これまではTfr細胞に対する特異的抗体を用いて染色を行った後、フローサイトメーターを用いてTfr細胞の検出を行ってきたが、操作が煩雑でスループット性に欠けることから、レポーターマウスを用いることとした。すなわち、Tfr細胞のマスター転写因子であるBcl-6遺伝子プロモーターの顆粒にtdTomatoを発現するレポーターマウスよりナイーブT細胞を取得し、Tfr細胞分化条件で培養を行った。酪酸の添加によりtdTomato発現細胞の上昇が観察されたことから、スクリーニング系として使用可能であることが明らかとなった。以上の知見をまとめて、特許出願を行った（特願2019-185826）。

#### (3) Tfr 細胞誘導活性を有する低分子化合物の探索

- ① (2) で構築したTfr細胞分化誘導スクリーニング系を用いて、Tfr誘導物質の探索に着手した。まず腸内代謝物ライブラリー（協同乳業株式会社研究所・松本光晴博士より供与）に含まれる化合物を添加した結果、2種類の化合物に誘導活性が認められた。
- ② Tfr細胞分化に影響を与えるシグナルパスウェイを明らかにするために、分子標的が既知であるSCADキット（文科省・新学術領域・化学療法基盤支援活動）に含まれる97種の合成化合物のスクリーニングを実施した。その結果、いくつかの化合物に誘導活性が見られたが、これらはいずれもT細胞受容体の下流で調節されるシグナル分子を標的とするものであった。

### 4. 研究の反省・考察

#### (1) *In vitro*にて誘導した Tfr 細胞の性状解析

- ① これまで *in vitro* においてTfr細胞を分化誘導したという報告は無く、今回の研究で初めて誘導することに成功した。そのため、*in vivo*のTfr細胞とどの程度類似しているのかが重要であるが、少なくともマーカー分子（Bcl-6, CXCR5, PD-1）や自己免疫応答抑制機能においては類似性が高いと判断できた。
- ② ただし、エピジェネティックな状態がどの程度類似しているかどうかは不明である。また、生体に細胞移入した際の安定性については今後の検討課題である。

#### (2) Tfr 細胞分化誘導スクリーニング系の構築

- ① Bcl-6-tdTomatoレポーターマウスを用いることで、Tfr細胞の検出が容易になった。一方で、スループット性を高めるために、Cell Insight CX5 (Thermo Fisher) を用いて、tdTomatoを発現するTfr細胞の定量を試みた。その結果、定量解析は可能であるものの、機器の操作自体が煩雑であるという問題点が判明した。そこで、オールインワン蛍光顕微

鏡 (Keyence) を用いたところ、簡便な定量解析を行うことが可能となった。今後は、様々な化合物を用いてハイスループットスクリーニングを実施していく。

### (3) Tfr 細胞誘導活性を有する低分子化合物の探索

- ① これまでに複数の化合物について Tfr 細胞誘導活性が見られていることから、今後、2 次スクリーニングとしてフローサイトメトリーを用いて再現性を確かめる。さらに、マウスに投与して同様の活性が認められるかどうかを検証する。

## 5. 研究発表

### (1) 学会誌等

- ① \*Kimura I, Miyamoto J, Ohue-Kitano R, Watanabe K, Yamada T, Onuki M, Aoki R, Isobe Y, Kashihara D, Inoue D, Inaba A, Takamura Y, Taira S, Kumaki S, Watanabe M, Ito M, Nakagawa F, Irie J, Kakuta H, Shinohara M, Iwatsuki K, Tsujimoto G, Ohno H, Arita M, Itoh H, and \*Hase K, Maternal gut microbiota in pregnancy influences offspring metabolic phenotype. **Science**, 367: eaaw8429, 2020.
- ② \*Kimura S, Nakamura Y, Kobayashi N, Shiroguchi N, Kawakami E, Mutoh M, Takahashi-Iwanaga H, Yamada T, Hisamoto M, Nakamura M, Udagawa N, Sato S, Kaisho T, Iwanaga T, and \*Hase K. Osteoprotegerin-dependent M-cell self-regulation balances gut infection and immunity. **Nat. Commun.** 11: 234, 2020.
- ③ Nakamura Y, Mimuro H, Kunisawa J, Furusawa Y, Takahashi D, Fujimura Y, Kaisho T, Kiyono H, \*Hase K. Microfold cell-dependent antigen transport alleviates infectious colitis by inducing antigen-specific cellular immunity. **Mucosal Immunol.** 13: 679-690, 2020.
- ④ Hino S, Mizushima T, Kaneko K, Kawai E, Kondo T, Genda T, Yamada T, Hase K, Nishimura N and \*Morita T. Mucin-derived O-glycans act as endogenous fiber and sustain mucosal immune homeostasis via short-chain fatty acid production in rat cecum. **J. Nutr.** 2020, in press.
- ⑤ Isobe J, Maeda S, Obata Y, Iizuka K, Nakamura Y, Fujimura Y, Kimizuka T, Hattori K, Kim YG, Morita T, Kimura I, Offermanns S, Adachi T, Nakao A, Kiyono H, \*Takahashi D, \*Hase K. Commensal-bacteria-derived butyrate promotes the T cell-independent IgA response in the colon. **Int. Immunol.** 32: 243-258, 2020.
- ⑥ Yamada T, Hino S, Iijima H, Genda T, Aoki R, Nagata R, Han KH, Hirota M, Kinashi Y, Oguchi H, Suda W, Furusawa Y, Fujimura Y, Kunisawa J, Hattori M, Fukushima M, Morita T, \*Hase K. Mucin O-glycans facilitate symbiosynthesis to maintain gut immune homeostasis. **EBioMedicine.** 48:513-525. 2019.
- ⑦ Kobayashi N, Takahashi D, Takano S, Kimura S, \*Hase K. The roles of Peyer's Patches and microfold cells in the gut immune system: Relevance to autoimmune diseases. **Front Immunol.** 10:2345, 2019.
- ⑧ Nagai M, Noguchi R, Takahashi D, Morikawa T, Koshida K, Komiyama S, Ishihara N, Yamada T, Kawamura YI, Muroi K, Hattori K, Kobayashi N, Fujimura Y, Hirota M, Matsumoto R, Aoki R, Tamura-Nakano M, Sugiyama M, Katakai T, Sato S, Takubo K, Dohi T, \*Hase K. Fasting-refeeding impacts immune cell dynamics and mucosal immune responses. **Cell** 178: 1072-1087, 2019.
- ⑨ \*Nishida K, Hasegawa A, Yamasaki S, Uchida R, Ohashi W, Kurashima Y, Kunisawa J, Kimura S, Iwanaga T, Watarai H, Hase K, Ogura H, Nakayama M, Kashiwakura JI, Okayama Y, Kubo M, Ohara O, Kiyono H, Koseki H, Murakami M, Hirano T. Mast cells play role in wound healing through the ZnT2/GPR39/IL-6 axis. **Sci Rep.** 9:10842, 2019.
- ⑩ Ohashi W, Hara T, Takagishi, Hase K, \*Fukuda T. Maintenance of intestinal epithelial homeostasis by zinc transporters. **Dig. Dis. Sci.** 64:2404-2415 2019.
- ⑪ Xiong E, Li Y, Min Q, Cui C, Liu J, Hong R, Lai N, Wang Y, Sun J, Matsumoto

R, Takahashi D, Hase K, Shinkura R, Tsubata T, \*Wang J-Y. MZB1 promotes the secretion of J chain-containing dimeric IgA and is critical for the suppression of gut inflammation. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 116:13480-13489, 2019.

- ⑫ \*Kimura S, Mutoh M, Hisamoto M, Saito H, Takahashi S, Asakura T, Ihshii M, Nakamura Y, Iida J, Hase K, Iwanaga T. Airway M cells arise in the lower airway due to RANKL signaling and reside in the bronchiolar epithelium associated with iBALT in murine models of respiratory disease. **Front. Immunol.** 10:1323, 2019.

(2) 口頭発表

- ① 長谷耕二, 栄養シグナルによる免疫バリアの制御, 東邦大学研究ブランディング事業最終シンポジウム, 2020/1/23, 国内.
- ② 長谷耕二, 栄養シグナルによるパイエル板リンパ球動態制御, Science Pioneers Consortium (SPC) 2019, 2019/12/21, 国内.
- ③ Koji Hase, Nutritional Signals regulate lymphocyte homing to gut-associated lymphoid tissue, The 48th Annual Meeting of Japanese Society for Immunology, 2019/12/12, 国内.
- ④ 長谷耕二, 栄養シグナルによるパイエル板リンパ球動態制御, 日本食品免疫学会設立 15 周年記念学術集会, 2019/11/20, 国内.
- ⑤ 長谷耕二, 栄養シグナルによるパイエル板リンパ球動態制御, 30th Forum in DOJIN “Nutrio-Metabolomic Pathology”, 2019/11/11, 国内.
- ⑥ 長谷耕二, 腸管における免疫監視機構, 第 22 回 日本臨床腸内微生物学会総会・学術集会, 2019/9/14, 国内.
- ⑦ 長谷耕二, 腸内細菌を標的とした創薬イノベーション, JASIS2019 ライフサイエンスイノベーション, 2019/9/3, 国内.
- ⑧ 長谷 耕二, 自己免疫疾患の発症を制御する短鎖脂肪酸, 神奈川歯科大学研究談話会, 2019/7/5, 国内.
- ⑨ 長谷 耕二, 食物アレルギーの発症に及ぼす腸内代謝物の影響, 第 68 回日本アレルギー学会, 2019/6/15, 国内.
- ⑩ 長谷耕二, 腸内エコシステムの異常と炎症性腸疾患, 第 6 回日本母子栄養懇話会学術集会. 2019/6/1, 国内.

(3) 出版物

なし

学 校 名	昭 和 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	腸内細菌叢の解析による妊娠・分娩予後の検討 —腸内細菌叢の子宮内細菌叢への影響と 妊娠予後への関与—		研究分野 医 学
キ ー ワ ー ド	①腸内細菌叢 ②子宮内細菌叢 ③次世代シーケンサー		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
関 沢 明 彦	医 学 部	教 授	研究総括、検体採取

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
角 田 卓 也	医 学 部	教 授	NGSデータの解析
吉 村 清	医 学 部	教 授	細菌叢の分析、データ管理
小 出 馨 子	医 学 部	講 師	検体採取

# 腸内細菌叢の解析による妊娠・分娩予後の検討 — 腸内細菌叢の子宮内細菌叢への影響と妊娠予後への関与 —

## 1. 研究の目的

- (1) 妊娠初期（4～7週）の妊婦の腸内および腔内細菌叢と妊娠予後の関連を検討する
- (2) 子宮内細菌叢と腸内細菌叢の関連を検討する

## 2. 研究の計画

- (1) 妊娠初期（4～7週）の妊婦の腸内および腔内細菌叢と妊娠予後の関連を検討する
  - ① 妊娠初期の女性の腔分泌物・便を採取し、各部位の細菌叢を分析する

研究協力の同意を得られた妊娠初期（妊娠4～7週ころ）の妊婦から腔分泌物、便を採取しDNAを抽出した。16SrRNA遺伝子をPCRで増幅し、次世代シーケンサーにより各部位の細菌叢を分析した。

- ② 正期産群と流産群とでは妊娠初期の腸内細菌叢パターンは異なることを確認するとともに、【自然流産に至った女性に特徴的な腸内細菌叢パターン】、【自然早産に至った女性に特徴的な腸内細菌叢パターン】、【妊娠が成立し、かつ生児を獲得できる女性に特徴的な腸内細菌叢パターン】を把握する

(1)-①の妊婦の妊娠終了後に①自然流産群、②自然早産群、③正期産群の3群に分類し、細菌叢の相違と妊娠予後との関連を解析する。また、妊娠初期の腔内細菌叢と腸内細菌叢ではどちらがより妊娠予後に影響を及ぼすのかについても検討する。

- (2) 子宮内細菌叢と腸内細菌叢の関連を検討する

- ① 生殖補助医療（体外受精）を実施する女性、習慣流産患者もしくは妊娠中期流産の既往のある女性の子宮内腔細菌叢と腸内細菌叢を分析する

研究協力の同意を得られた原因不明な習慣流産患者もしくは妊娠中期流産の既往のあり、かつ検査前1ヶ月の間に抗菌薬を投与されていない女性を対象に、排卵期に子宮内膜組織と便を採取しDNAを抽出した。16SrRNA遺伝子をPCRで増幅し、次世代シーケンサーにより各部位の細菌叢を分析した。

- ② 腸内のdysbiosisにより、子宮内腔細菌叢における乳酸桿菌属の占める割合が低下する可能性について検証する

(2)-①の症例を子宮内細菌叢におけるLactobacillusの占める割合により以下の3群（90%以上をLacto高率群、30%以上90%未満をLacto中等度群、30%未満をLacto低率群）に分類し、3群の腸内細菌叢を比較する。Lacto高率群、Lacto低率群のそれぞれに特徴的な腸内細菌叢パターンを把握することで、挙児希望女性における適正な腸内細菌叢パターンを解明するとともに、dysbiosisな状態である女性への介入法（食事指導など）の開発の一助となる知見を得る。

### 3. 研究の成果

#### (1)

- ① 2020年6月時点での本検討への協力者数は44名で、便検体を採取できたのは34名であった。この34名の妊娠予後の内訳は生児獲得群22名、妊娠中10名、流産群2名であり、全ての検体からDNAを抽出し-80℃で保管した。生児獲得群、流産群に分類された症例においては16SrRNA遺伝子をPCRで増幅し、次世代シーケンサーにより各部位の細菌叢を分析した。
- ② 2020年6月時点で便検体を採取できた34名を妊娠予後により分類したところ、自然流産2名、妊娠中10名、生児獲得22名（うち早期前期破水→自然早産3名、前期破水4名、適時破水15名）であった。全ての妊婦の妊娠が終了後に、【早期前期破水→自然早産群】と【適時破水群】の2群間の腸内細菌叢、膣内細菌叢を比較し、妊娠初期の腸内・膣内細菌叢の相違と妊娠予後との関連を解析する予定である。自然流産の症例数が比較解析を実施するのに十分数に至った際には【自然流産群】と【正期産群】との比較解析も実施する予定である。

#### (2)

- ① 2020年6月時点で本検討への協力者数は24名であった。全ての検体からDNAを抽出し-80℃で保管した。全ての症例の子宮内腔細菌叢、腸内細菌叢の解析を実施した。
- ② (2)-①の症例を子宮内腔細菌叢におけるLactobacillusの占める割合により以下の3群（90%以上をLacto高率群、30%以上90%未満をLacto中等度群、30%未満をLacto低率群）に分類した結果、Lacto高率群は12名、Lacto中等度群は4名、Lacto低率群は8名であった。Lacto高率群、Lacto低率群のそれぞれの腸内細菌叢パターンの特徴について解析を行っている。

### 4. 研究の反省・考察

#### (1)

- ① 本研究への参加を同意したにもかかわらず予定通りに便検体を回収できなかった症例の大半が自然流産に至った症例であった。自然流産に至ると予約外受診をすることが多く、このことが便検体回収率低下の要因であったと思われる。
- ② 一般の自然流産率と比較すると本研究参加者における自然流産率は低かったこと、さらに、上述の理由から自然流産症例における便検体回収率は低かったため、2020年6月時点の自然流産群は2名と少なく、比較解析を実施できる人数に到達していない。

#### (2)

- ① 生殖補助医療（体外受精）を実施する女性は、子宮鏡検査などの検査に伴い抗菌薬を投与されていることが多く、本研究計画時に推定した参加人数よりも少なくなった。
- ② Lacto高率群、Lacto低率群と比較しLacto中等度群の割合は少なかったため、Lacto高率群とLacto低率群を比較することとした。計画したペースで検討を実施できず、2020年6月時点で解析終了に至っていない点は反省すべきであると考えられる。

### 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	東 海 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	がん幹細胞を標的とした革新的がん治療法の確立 —がん幹細胞の治療高感受性化の実現—		研究分野	医 学
キ ー ワ ー ド	①がん幹細胞 ②白血病 ③分子標的薬 ④幹細胞動態制御			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
八 幡 崇	医 学 部	准 教 授	がん幹細胞の性状解析と研究全体の総括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
安 藤 潔	医 学 部	教 授	白血病の臨床試験と患者検体を利用した解析
平 山 令 明	先進生命科学研究所	所 長	PAI-1阻害薬の最適化と適応拡大
穂 積 勝 人	医 学 部	教 授	がん幹細胞生体モデルの作製

# がん幹細胞を標的とした革新的がん治療法の確立

## —がん幹細胞の治療高感受性化の実現—

### 1. 研究の目的

白血病幹細胞はがんの発症起点であり、供給源でもある。抗がん剤は、活動的ながん細胞には作用するが、静止状態にあるがん幹細胞には効果が薄い。つまり、治療によってがん細胞が現在の技術では検出限界以下に至った場合でも、治療抵抗性白血病幹細胞が極僅かに残存してしまうことが再発の原因であり、完治を困難にしている最大の要因である。この幹細胞の静止状態は、ニッチと呼ばれる細胞との緊密な接着により誘導される。したがって、もしがん幹細胞をニッチから離脱させ静止状態を解除できれば、抗がん剤に対する治療抵抗性が減弱し『高感受性化』するので、がん幹細胞の完全な排除を実現する理想的な治療法が確立することが期待出来る。

研究代表者らは、ニッチ因子である TGF- $\beta$  が幹細胞の PAI-1 発現を強力に誘導すること、そしてその PAI-1 が幹細胞に運動能を付与する因子である膜型メタロプロテアーゼ (MT1-MMP) の活性を抑制するため、幹細胞の運動能が制限されることを明らかにした。すなわち、ニッチから離脱しないように幹細胞を繋ぎ止めている主要な因子は PAI-1 であることを突き止めた (Blood, 2017)。本研究は、TGF- $\beta$  が誘導する PAI-1 によって白血病幹細胞がニッチに留まることが治療抵抗性の根本原因であるという仮説に基づき『ニッチからの離脱によるがん幹細胞の治療高感受性化』によりがんの撲滅を実現する斬新で独創的ながん治療コンセプトの確立を目指す。

### 2. 研究の計画

申請者らが開発した PAI-1 阻害剤が白血病に対して治療効果を発揮することをモデルマウスによる治療実験にて検証した。申請者らはすでに、白血病モデルマウスに抗がん剤と PAI-1 阻害剤を併用投与すると白血病細胞が著明に減少することを見出している。しかし、がん治療においてはいかにして再発を防ぐかが重要であり、再発の根本的な原因であるがん幹細胞に対する効果は明確にされていない。そこで、がん幹細胞に PAI-1 阻害剤が作用してニッチからの離脱を促すだけでなく、がん幹細胞が体内から排除され、抗がん剤治療による生存率の向上や再発の予防を達成できることを実証するために、以下の研究課題に取り組んだ。

- (1) PAI-1 阻害剤によってがん幹細胞がニッチから離脱することの実証
- (2) PAI-1 阻害剤と抗がん剤との併用によるがん幹細胞に対する効果の検討
- (3) PAI-1 阻害剤併用投与群でのがん再発率の検討に取り組み、本剤による白血病幹細胞の排除機構を明確にすることを試みた。

### 3. 研究の成果

- (1) PAI-1 阻害剤によってがん幹細胞がニッチから離脱することの実証
  - ・ 白血病モデルマウスに PAI-1 阻害剤を投与すると、がん幹細胞がニッチから離脱し末梢血に動員されることを、組織学的あるいはフローサイトメトリーで確認した。
- (2) PAI-1 阻害剤と抗がん剤との併用効果の検討
  - ・ 抗がん剤単独投与群と比較して、PAI-1 阻害剤併用投与群では白血病幹細胞の細胞死が誘導され、効率よく排除されることを確認した。
- (3) PAI-1 阻害剤によってがん幹細胞がニッチから離脱することの実証
  - ・ 抗がん剤を一定期間 (2週間～4週間) 投与後に中止し、PAI-1 阻害剤併用投与群では再発率が有意に減少されることを確認し、本剤による白血病幹細胞の排除機構を明確にした。

## 4. 研究の反省・考察

幹細胞は、細胞分裂による機能低下を防ぐために増殖しないように保護されている。その保護作用の基盤がニッチとの相互作用である。現在、幹細胞の静止状態に関しては、細胞が増殖しない仕組みにのみ焦点を当てた研究が先行しており、本研究で着目する幹細胞の動きそのものという視点が全く欠如している。ニッチとの相互作用が幹細胞の保護作用の根幹であるからには、幹細胞がニッチから離脱しないように留めておく仕組みの解明が、がんの撲滅を実現するための重要な課題である。本研究の遂行により、がん幹細胞がニッチに静止するメカニズムを明らかにすることができた。また、本剤は白血病治療に有効であることが証明できた。PAI-1阻害剤のがん治療への適用に向けた理論的基盤が確立しただけでなく、全く新しい研究領域を切り拓く知見が得られたことは大きな成果であると言える。

## 5. 研究発表

### (1) 学会誌等

- ① Ibrahim AA, Yahata T\*, \*\*, Muguruma Y, Miyata T, Ando K. Blockade of plasminogen activator inhibitor-1 empties bone marrow niche sufficient for donor hematopoietic stem cell engraftment without myeloablative conditioning. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019; 516:500-505. IF: 2.56. \*co-first author, \*\*corresponding author
- ② Katahira Y, Higuchi H, Matsushita H, Yahata T, Yamamoto Y, Koike R, Ando K, Sato K, Imadome KI, Kotani A. Increased Granulopoiesis in the Bone Marrow following Epstein-Barr Virus Infection. *Sci Rep.* 2019; 9: 13445. IF: 4.53.
- ③ Yahata T\*, Ibrahim AA, Hirano KI, Muguruma Y, Naka K, Hozumi K, Vaughan DE, Miyata T, Ando K. Targeting of plasminogen activator inhibitor-1 activity promotes elimination of chronic myeloid leukemia stem cells. *Haematologica.* 2020; pii: haematol.2019.230227. IF: 7.57. \*corresponding author
- ④ Imai J, Yahata T, Ichikawa H, Ibrahim AA, Yazawa M, Sumiyoshi H, Inagaki Y, Matsushima M, Suzuki T, Mine T, Ando K, Miyata T, Hozumi K. Inhibition of plasminogen activator inhibitor-1 attenuates against intestinal fibrosis in mice. *Intest Res.* 2020; 18: 219-228.
- ⑤ Watanabe N, Kidokoro M, Tanaka M, Inoue S, Tsuji T, Akatsuka H, Okada C, Iida H, Okada Y, Sato T, Yahata T, Hirayama N, Nakagawa Y, Inokuchi S. Podoplanin is indispensable for cell motility and platelet-induced epithelial- to- mesenchymal transition-related gene expression in esophagus squamous carcinoma TE11A cells. *Cancer Cell Int.* 2020; 20:263. IF: 2.41.

### (2) 口頭発表

- ① 今井 仁、八幡 崇、他7名、Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1)制御による腸管線維化抑制の検討、第47回日本潰瘍学会、2020年1月

### (3) 出版物

- ① 八幡 崇、PAI-1阻害剤の造血再生と白血病治療への応用、日本血栓止血学会誌、2020; 31: 791-796.

学 校 名	東 京 歯 科 大 学	研究所名等	口腔科学研究センター
研 究 課 題	マルチシグナル分子を標的とする象牙質再生創薬 基盤の確立 —象牙芽細胞賦活シグナルネットワーク解析—		研究分野 医 学
キ ー ワ ー ド	①象牙芽細胞 ②象牙質再生 ③TRPチャネル ④細胞分化 ⑤分化誘導因子 ⑥細胞間シグナル ⑦分子創薬		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
澁 川 義 幸	歯 学 部	教 授	研究の総括、生理学的実験、生理学的象牙質形成と象牙芽細胞機能の分子細胞学的評価

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
東 俊 文	歯 学 部	教 授	象牙芽細胞の分化誘導実験
松 永 智	歯 学 部	准 教 授	再生象牙質の物理化学的物性の評価
溝 口 利 英	歯 学 部	准 教 授	Coll-Cre/flox-stop-flox-ジフテリア毒素受容体マウスを用いた「象牙芽細胞枯渇」による本細胞の機能評価
中 村 貴	歯 学 部	講 師	DMP1-Creマウスを用いた象牙芽細胞分化と誘導された象牙芽細胞の機能評価

# マルチシグナル分子を標的とする象牙質再生創薬基盤の確立 ー象牙芽細胞賦活シグナルネットワーク解析ー

## 1. 研究の目的

- (1) 象牙芽細胞の細胞膜センサータンパク質活性化シグナル因子、歯髄幹細胞から象牙芽細胞への分化シグナル因子と、これらの標的受容体を同定し、象牙芽細胞の機能と分化を制御するシグナルネットワークに対する直接的な作用を有する次世代型象牙質再生薬剤の分子創薬基盤を確立する事を目的とする。
  - ①象牙芽細胞分化の制御と修復象牙質形成の機能連関を明らかにし、センサータンパク質の活性化シグナル因子、歯髄幹細胞から象牙芽細胞への分化シグナル因子と、その標的受容体を同定する。
  - ②これら因子の象牙芽細胞・歯髄幹細胞に対する薬理学的効果を検討し、象牙芽細胞の機能と分化を制御するマルチシグナルネットワークに対して直接的な作用を有する次世代型薬剤の創出を目的とする。

## 2. 研究の計画

- (1) 象牙芽細胞分化誘導シグナルの同定・修復象牙質の形成促進機構の解析
  - ①DMP1-Cre/DTR/GFPマウスの作出：薬剤投与で象牙芽細胞の死滅を生じ、GFPによる象牙芽細胞分化がモニタリング可能なマウス系統の作出を行う。
  - ②象牙芽細胞分化誘導シグナルの同定：DMP1-Cre/DTR/GFPマウスから歯髄細胞を培養し、神経ペプチド・成長増殖因子・細胞内シグナル因子・細胞外化学因子などを投与し、Dmp1遺伝子の発現を蛍光でモニタリングすることで、象牙芽細胞分化を促進する因子の特定を行う。
  - ③象牙芽細胞分化促進因子の時空間的作用の検討：上記マウスのGFP蛍光を指標に、特定された因子の象牙芽細胞分化に対する時間依存性を検討する。
  - ④象牙芽細胞分化促進因子の薬理学的効果の検討：分化促進因子と、それによって発現上昇する受容体・細胞内シグナルのヒト培養象牙芽細胞に対する効果、その象牙質形成能を検討する。

## 3. 研究の成果

- (1) 象牙芽細胞の細胞膜センサータンパク質を活性化する候補物質を同定した。
  - ①ヒト象牙芽細胞のセンサー受容体を活性化させ、象牙質形成を促進させる物質をin Vitroで同定した。
  - ②マウスを用いた実験で、象牙芽細胞が象牙質の感覚受容細胞である事が確かめられた。本マウスを用いた象牙芽細胞の枯渇実験系では、切歯でも象牙芽細胞が枯渇していることを確認できた。
  - ③Dmp1-T2A-Creマウスの2Aシステムが生体レベルで正常に機能し、硬組織細胞特異的にCreが発現している事を確認した。またアルカリホスファターゼが骨形成系細胞の分化を促進する事を見出した。

## 4. 研究の反省・考察

- (1) 象牙芽細胞の細胞膜センサータンパク質を活性化するシグナル因子の候補物質を同定について
  - ①2019年度内の特許出願を検討していたが、COVID-19の感染拡大により申請が遅れている。研究再開後、速やかに提出を検討する。
  - ②DTRマウスとDmp1-T2A-Creマウスの交配で作出されるDMP1-Cre/DTR/GFPマウスの作製が遅れている。同様にCOVID-19の感染拡大の影響もあり、研究再開後、実験を再開したい。

## 5. 研究発表

### (1) 学会誌等

#### 澁川義幸

- ① Higashikawa A, Kimura M, Shimada Y, Ohyama S, Ofusa W, Tazaki M, Shibukawa Y. Merkel Cells Release Glutamate Following Mechanical Stimulation: Implication of Glutamate in the Merkel Cell-Neurite Complex. *Front Cell Neurosci*, 13: Article 255, 2019. doi: 10.3389/fncel.2019.00255
- ② 木村麻記、東川明日香、村松敬、石原和幸、齋藤淳、国分栄仁、柴山和子、菊池有一郎、櫻井敦朗、喜田大智、大野建州、澁川義幸、歯学の進歩・現状「顎骨疾患プロジェクトからの情報発信」、細胞膜タンパク質を標的とする石灰化機構の解明と応用 歯科学報, 119:301-306, 2019
- ③ Satou R, Shibukawa Y, Kimura M, Sugihara N. Light Conditions Affect Rhythmic Expression of Aquaporin 5 and Anoctamin 1 in Rat Submandibular Glands. *HELIYON*, in Press, 2019, doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02792.
- ④ 村松敬、木村麻記、東川明日香、大野建州、菊池有一郎、喜田大智、国分栄仁、柴山和子、櫻井敦朗、澁川義幸、齋藤淳、石原和幸、歯学の進歩・現状「顎骨疾患プロジェクトからの情報発信」9. 根尖部歯周組織の病態生物学、歯科学報, 119:365-370, 2019
- ⑤ Tanaka A, Shibukawa Y, Yamamoto M, Abe S, Yamamoto H, Shintani S. Developmental studies on the acquisition of perception conducting pathways via TRP channels in rat molar odontoblasts using immunohistochemistry and RT-qPCR. *Anat Sci Int*. 95(2):251-257, 2019 Dec 17. doi: 10.1007/s12565-019-00517-y.
- ⑥ Nakano R, Kitanaka T, Namba S, Kitanaka N, Sato M, Shibukawa Y, Masuhiro Y, Kano K, Matsumoto T, Sugiya H. All-trans retinoic acid induces reprogramming of canine dedifferentiated cells into neuron-like cells. *PLOS ONE*, 15(3), e0229892, 2020, doi: 10.1371/journal.pone.0229892
- ⑦ 澁川義幸、なぜ「歯が痛くなるの？」歯痛発生のメカニズム、公益財団法人8020推進財団会誌、19:26-29、2019

#### 東 俊文

- ① Odashima A, Onodera S, Saito A, Ogihara Y, Ichinohe T, Azuma T. Stage-dependent differential gene expression profiles of cranial neural crest-like cells derived from mouse-induced pluripotent stem cells. *Med Mol Morphol*. 2020;53(1):28-41. doi: 10.1007/s00795-019-00229-2.
- ② Zujur D, Kanke K, Onodera S, Tani S, Lai J, Azuma T, Xin X, Lichtler AC, Rowe DW, Saito T, Tanaka S, Masaki H, Nakauchi H, Chung UI, Hojo H, Ohba S. Stepwise strategy for generating osteoblasts from human pluripotent stem cells under fully defined xeno-free conditions with small-molecule inducers. *Regen Ther*. 2020;14:19-31. doi: 10.1016/j.reth.2019.12.010.

#### 松永 智

- ① Furukawa, T., Matsunaga, S., Morioka, T., Nakano, T., Abe, S., Yoshinari, M., Yajima, Y. Study on bone quality in the human mandible -Alignment of biological apatite crystallites. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 107(3): 838-846, 2019. (doi: 10.1002/jbm.b.34180. 30296354.)
- ② Takano, N., Takizawa, H., Ito, K., Odaka, K., Matsunaga, S., Abe, S. Study on compressive property on aluminum alloy lattice structure additively manufactured by 3D printing technology. *Journal of the Society of Materials Science Japan*, 68(4):351-357, 2019.
- ③ Tasaka, A., Matsunaga, S., Odaka, K., Ishizaki, K., Ueda, T., Abe, S., Yoshinari, M., Yamashita, S., Sakurai, K. Accuracy and retention of denture base fabricated by heat curing and additive manufacturing. *Journal of Prosthodontic Research*, 63(1):85-89, 2019. (doi: 10.1016/j.jprior.2018.08.007.)

- ④Matsunaga, S., Yamada, M., Kasahara, N., Kasahara, M., Odaka, K., Fujii, R., Miyayoshi, N., Sekiya, S., Sako, R., Sugiuchi, A., Abe, S., Furusawa, M. Tooth root cross-section variations of significance for endodontic microsurgery and predicted risk of concealed canal isthmus based on cross-sectional morphology: three-dimensional morphological analysis of Japanese maxillary first molars using micro-CT. *Journal of Hard Tissue Biology*, 28:1-5, 2019.
- ⑤Tasaka, A., Uekubo, Y., Mitsui, T., Kasahara, T., Takanashi, T., Homma, S., Matsunaga, S., Abe, S., Yoshinari, M., Yajima, Y., Sakurai, K., Yamashita, S. Applying intraoral scanner to residual ridge in edentulous regions: in vitro evaluation of inter-operator validity to confirm trueness. *BMC Oral Health*, 19(1):264, 2019
- ⑥高野直樹、瀧澤英男、伊藤幸太、小高研人、松永 智、阿部伸一、3Dプリンティング技術により積層造形されたアルミ合金ラティス構造の圧縮特性に関する研究、*材料*、68(4): 351-357、2019
- ⑦Arakawa, K., Matsunaga, S., Nojima, K., Nakano, T., Abe, S., Yoshinari, M., Sueishi, K. Micro- and nanostructural characteristics of rat masseter muscle entheses *JHTB*, 28(4):365-370, 2019.

### 溝口利英

- ①Yang M., Arai A., Udagawa N., Zhao L., Daisuke N., Murakami K, Hiraga T., Takao-Kawabata R., Matsuo K., Komori T, Kobayashi Y., Takahashi N., Isogai Y., Ishizuya T., Yamaguchi A., and Mizoguchi T. Parathyroid hormone shifts cell fate of a leptin receptor-marked stromal population from adipogenic to osteoblastic lineage. *Journal of Bone and mineral Research*, 34(10):1952-1963, 2019
- ②Nguyen HT., Ono M., Oida Y., Hara ES., Komori T., Akiyama K., Nguyen HTT., Aung KT., Pham HT., Tosa I., Takarada T., Matsuo K., Mizoguchi T., Oohashi T., and Kuboki T. Bone marrow cells inhibit BMP-2-induced osteoblast activity in the marrow environment. *Journal of Bone and Mineral Research*, 34(2):327-332, 2019
- ③溝口利英、硬組織維持に働く幹細胞の新たな研究手法と最近の知見、*日本歯科医師会雑誌*、72(8):17-25、2019
- ④溝口利英、日本骨代謝学会 Hot Paper、海外文献紹介：骨量減少を改善するために血管内皮細胞を標的にする、*THE BONE*、32(3): 116、2019
- ⑤溝口利英、日本骨代謝学会 Hot Paper、海外文献紹介：SIRT7はSP7/Osterixにおけるリンのアシル化を調節することにより骨形成に重要な役割を担う、*THE BONE*、32(3): 116、2019

### 中村 貴、東 俊文

- ①Nakamura T, Nakamura-Takahashi A, Kasahara M, Yamaguchi A, Azuma T. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase promotes the osteogenic differentiation of osteoprogenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020;524(3):702-709. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.01.136. Epub 2020 Feb 5. PubMed PMID: 32035618.

### (2) 口頭発表

#### 澁川義幸

- ①Shibukawa, Y. Intercellular Communication Between Odontoblast and Neuron Explains Sensory Transduction Mechanism for Dentinal Sensitivity Symposium, Neural and Non-neuronal Cell Communication in Homeostasis and Disease: 97th General session & exhibition of the IADR, June 19-22, 2019, Vancouver, Canada 97th General session & exhibition of the IADR Program book 230, 2019
- ②澁川義幸、歯内療法における痛みの分子細胞基盤、メインシンポジウム II 「歯内療法後の難治性疼痛をどうするか」、第24回 日本口腔顔面痛学会学術大会、2019年9月29日(日)、川崎市

## 松永 智

- ①松永 智、是澤和人、奥寺元、鈴木正史、吉成正雄、矢島安朝、阿部伸一  
歯科インプラント周囲に新生された顎骨のマイクロ/ナノ構造特性  
49回日本口腔インプラント学会、2019年9月21日、福岡市

## 溝口利英

- ①Toshihide Mizoguchi (招待講演), Hard tissue imaging analysis using genetically modified mice June 1, 2019, The7th Seoul Symposium on Bone Health in conjunction with the 31th Spring Scientific Congress of Korean Society for Bone and Mineral Research. 2019年, 6月1日 ソウル, 韓国 (Seoul Dragon City), The 7th Seoul Symposium on Bone Healthプログラム抄録集, 167, 2019
- ②溝口利英 (招待講演)、 遺伝子改変マウスによるイメージング手法を用いた硬組織研究 第71回再生医療カンファレンス、 2019年7月18日、 東京都(東京大学)
- ③溝口利英 (招待講演)、 Maintenance of hard tissue homeostasis by mesenchymal stem cells. The16th Meeting of Bone Biology Forum、 2019年、 8月16日 千葉市 (セミナーハウス クロス・ウェーブ幕張)、 The16th Meeting of Bone Biology Forumプログラム抄録集、 8、 2
- ④溝口利英 (招待講演)、 歯と骨の幹細胞の話、 インプラント研究会、 2019年10月6日、 東京都(住友化学株式会社 参宮寮)
- ⑤溝口利英 (招待講演)、 間葉系幹細胞が司る硬組織維持機構の解析、 第61回歯科基礎医学会学術大会、 アップデートシンポジウム4、 象牙芽細胞・骨芽細胞のcell differentiationアップデート、 2019年、 10月12日 東京都 (東京歯科大学)、 第61回歯科基礎医学会学術大会プログラム抄録集、 92、 2019
- ⑥溝口利英 (招待講演)、 In vivo Dynamics of Mesenchymal Stem Cells Maintaining Hard Tissue Homeostasis、 Japan Bone Academy 2019、 2019年、 12月14日 東京都 (セラトロン都ホテル東京)

### (3) 出版物

#### 澁川義幸

- ①澁川義幸、口腔顎顔面痛の神経生理、In: 口腔外科のレベルアップ&ヒント (片倉朗編著)、デンタルダイヤモンド社、2019、pp. 48-49

## 松永 智

- ①松永 智 (分担加筆) : やさしくわかる歯と口腔のビジュアルガイド、医歯薬出版株式会社、2020、(ISBN: 978-4-263-46154-9)

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 —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	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	准 教 授	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。

以上をふまえ我々は、脂肪細胞特異的 AhR (A-AhR) KO 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) AhR アンタゴニストによる糖尿病改善作用

昨年度までの検討により脂肪細胞 AhR の不活性化が、全身の代謝機能を改善することを明らかにした。そこで当該年度は AhR アンタゴニスト (CH223191) を用いて、その糖尿病改善薬としての効果を検討する。すなわち高脂肪食負荷した野生型 C57BL/6 マウスに対して CH223191 を4週間経口投与(10mg/Kg 体重)し、糖尿病の改善効果を以下の項目により検証した。

#### ① CH223191投与マウスにおける耐糖能並びにインスリン感受性の評価

CH223191投与マウスならびにVehicle投与マウスにブドウ糖負荷(2g/kg体重)を行い、その後2時間に渡って血糖値ならびに血中インスリン量を測定する。またインスリン負荷試験(0.75U/kg体重)を行い、負荷後2時間に渡る血糖値の変化を測定する。

#### ② 高脂肪食負荷時における CH223191 投与マウスの病態生化学的・病理学的解析

ア. 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、血液パラメーター量を常法に従い測定する。

- イ. 白色並びに褐色脂肪組織をそれぞれ精巣上体、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。
  - ウ. 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。
- ③ CH223191投与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  
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。

### 3. 研究の成果

(1) CH223191投与マウスにおける耐糖能並びにインスリン感受性の評価

耐糖能並びにインスリン感受性への AhR アンタゴニストの作用を耐糖能試験/インスリン負荷試験により検討した。通常食で飼育した Vehicle 投与マウスと CH223191 投与マウス間において耐糖能並びにインスリン感受性の違いは認められなかった。しかしながら高脂肪食で飼育した両群を比較した場合、CH223191 投与マウスは Vehicle 投与マウスよりも良好な耐糖能ならびにインスリン感受性を示した。その一方でグルコースに依存したインスリン分泌能に違いは認められなかった。

(2) CH223191 投与マウスの病態生化学的・病理学的解析

体重並びに各組織重量に関して、CH223191 投与マウスと Vehicle 投与マウスとの間に有意な違いは認められなかった。

次いで血液生化学パラメーターについて検討した。その結果、血中インスリン、アディポネクチン、トリグリセリドおよびコレステロール濃度において両群間に違いは認められなかったが、血中遊離脂肪酸濃度は CH223191 投与により低下を示した。

精巣上体周囲および皮下脂肪組織切片の病理組織学的解析を行ったところ、いずれの脂肪細胞の大きさにも違いは見られなかった。精巣上体周囲脂肪組織での遺伝子発現を解析したところ、炎症性サイトカイン IL-6、IL-1 $\beta$  および Mcp1 の発現量が CH223191 群において Vehicle 群に比較して減少を示した。この炎症の程度の違いを検討するために、接着関連遺伝子の発現量を解析したが、それらの発現量に違いは認められなかった。

(3) CH223191 投与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

前年度までの脂肪組織特異的遺伝子ノックアウトマウスとは異なり、低分子化合物を投与した場合、目的とする脂肪組織だけではなく、他臓器にも分布・作用して耐糖能やインスリン感受性に影響を与える可能性がある。そこで脂肪組織と同様にインスリン感受性組織である肝臓並びに骨格筋に与える CH223191 投与の影響を検討した。まず高脂肪食下で飼育した Vehicle 投与マウス並びに CH223191 投与マウスより肝臓を摘出し、病理組織学的解析を行ったところ免疫担当細胞の浸潤や大滴性の脂肪滴に差が認められなかった。また、炎症関連遺伝子、糖新生および脂肪酸酸化に関わる遺伝子の解析を行ったが、CH223191 投与の影響は認められなかった。さらに、高脂肪食誘発性の肝障害を評価する目的で逸脱酵素 (GOT、GPT) の測定を行ったが、両群間に差は認められなかった。骨格筋における遺伝子発現解析を行ったところ、炎症性サイトカインおよび脂肪酸酸化関連遺伝子の発現量において両群間に顕著な差は認められなかった。

インスリン感受性を示す責任臓器を解析するために、各組織の AKT 活性を検討した。AKT はインスリンシグナル伝達の仲介分子であり、その活性はインスリンシグナル活性と連動している。CH223191 投与マウスの精巣上体周囲脂肪組織において AKT 活性の増加が認められた。さらに、骨格筋においても CH223191 により AKT 活性の増加が認められた。一方、肝臓においてはインスリンを投与することにより、AKT 活性の増加が認められるものの、CH223191 投与の影響は見られなかった。

## 4. 研究の反省・考察

### (1) 考察

前年度までの A-AhR KO マウスの結果をもとに、AhR アンタゴニスト (CH223191) の糖尿病治療薬としての可能性を検討した。CH223191 投与マウスは A-AhR KO マウスとほぼ同様の表現系を示し、本化合物が AhR アンタゴニストとして作用していることが示唆された。CH223191 投与は食事誘導性肥満マウスの耐糖能並びにインスリン感受性を改善したことから糖尿病治療薬として可能性が期待できる。また脂肪組織における炎症性サイトカイン量の減少が示されたことから、本化合物の作用メカニズムとして、肥満に伴う脂肪組織への免疫担当細胞のリクルートの抑制並びに炎症の軽減が示唆された。

### (2) 今後の課題

AhRが如何にして免疫担当細胞を脂肪組織にリクルートするのか明らかにする。

## 5. 研究発表

### (1) 学会誌等

なし

### (2) 口頭発表

① 榛葉繁紀 「体内時計の破綻による糖尿病発症とその分子メカニズム」

第 18 回小樽糖尿病循環器カンファレンス 2019/11/08

### (3) 出版物

なし

学 校 名	自 治 医 科 大 学	研究所名等	共 同 研 究	
研 究 課 題	マシンインテリジェンスによる薬物依存モデルの評価と治療応用 —深層学習による中枢神経薬の効果判定—		研究分野	医 学
キ ー ワ ー ド	①依存症 ②医療用麻薬 ③マシンインテリジェンス ④深層学習 ⑤受容体 ⑥バゾプレシン ⑦創薬			

## ○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
興 水 崇 鏡	分 子 薬 理 学 部 門	教 授	深層学習、データベース作成

## ○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
谷 口 淳 一	分 子 薬 理 学 部 門	令和2年3月 31日 退職	細胞モデルの解析、薬物候補スクリーニング
土 屋 裕 義	分 子 薬 理 学 部 門	講 師	動物行動解析、動物モデルの解析
東 森 生	分 子 薬 理 学 部 門	学 内 講 師	組織学的評価、個体での化合物評価
藤 原 葉 子	分 子 薬 理 学 部 門	令和2年3月 31日 退職	遺伝子発現解析、受容体複合体解析

# マシンインテリジェンスによる薬物依存モデルの評価と治療応用 — 深層学習による中枢神経薬の効果判定 —

## 1. 研究の目的

(1) 薬物や行為の習慣性が過度となる「依存症」の治療が求められている。本研究では、近年進歩が目覚ましいコンピューター科学の力、特にその目であるコンピュータービジョンと学習能力を世界に先駆けて依存症の理解に導入し、対処法を開発する。病態の理解に加えて、麻薬鎮痛薬を含む中枢神経薬について、依存を避けながら鎮痛効果を安全に得るための信頼度の高い評価方法を確立する。この際には動物モデルとして、申請者らが開発したユニークな麻薬感受性を示す遺伝子改変マウスを最大限利用する。

(2) この研究では、依存症がもたらす社会的問題の解決に寄与することも大きな目的の1つである。米国では、連日100人に及ぶ命がオピオイド依存による過量投与で失われている。この数は、米国の銃と交通事故による死者を合わせた数よりも多く、米国大統領令により危機的状況クライシスが宣言され、英国でも同様にプレクライシスとされる。今年に入り新型コロナウイルスによる感染症は依存症の患者を直撃し、依存症患者の死亡率を平時よりもさらに高めることに繋がっている。よって、麻薬を含む物質依存症は、鎮痛治療に伴う現代の世界的難題と言える。この難題への突破口と、安全で先進的痛み治療の確立が我が国でも求められており、本研究において基礎科学の知見からこの問題の解決に寄与することを目的とする。

特に、本研究において麻薬性鎮痛薬の慣れによる効果の減弱から依存に至る過程を、正しく判断できる目と思考力を機械学習インテリジェンスを用いて確立し、依存症を避ける方法と依存症治療薬の開発を効率よく迅速に推進する。

## 2. 研究の計画

(1) 最新のコンピューター科学の力である深層学習を最大限活用した、麻薬依存症の治療薬開発を推進する。

(2) そのために、マウスの行動から依存症を判定できる深層学習数式モデルを作出する。依存症マウスを作成においては、野生型マウスに麻薬性鎮痛薬の典型であるモルヒネを連日投与し、この過程をビデオ記録する。続いて深層学習のために、OSがUbuntu 16.04または18.04で動作し、TensorflowとKerasソフトウェアを導入した計算環境を構築する。GPU用グラフィックボードは、Nvidia社のドライバーソフトとCUDA10を導入し並列計算に用いる。

(3) 続いて教師付き深層学習の環境を構築する。そのために、Googleが提供する物体検出アプリケーションであるObject detection APIを改変し、マウスの行動パターンを5Dテンソルデータとして学習させる。その際、140万枚の最新画像データベースImageNetV4からも訓練画像を取得する。また、すでに深層学習を終えたリカレントニューラルネットワークモデル(f-RCNN 2017+ResNet)を転用し学習効果を向上させる。

(4) 得られた計算結果を用い、新たな依存マウスを検出できるか検証する。以上より、信頼度が高く依存状態を検出する計算モデルを作成する。また同一マウスでも、依存症モデル作成後にのみ検出されることを確認する。さらに深層学習し判断した根拠を、中間層の可視化、判断フィルター、heat mapで明らかにする。

(5) 依存の分子基盤の理解を進める。申請者らは最近、下垂体ストレスホルモンであるバゾプレッシンが、V1bタイプ受容体を介し麻薬の鎮痛効果を抑制し、依存形成を促進することを見出した。さらにV1b受容体を欠失させ、鎮痛麻薬による身体的依存が軽減されるユニークなマウスを得る事に成功している。本研究において、V1b受容体を含むと考えられる、依存形成の分子基盤について解析を進める。具体的には、V1b受容体は、鎮痛麻薬の受け皿である $\mu$ -オピオイド受容体や、シグナルタンパク質アレスチンと高次の複合体を形成していることが判明したことより、受容体を含む高次複合体分子の働きを解明し、依存シグナルが受容体複合体から起こる機序を解明する。さらに、V1b- $\mu$ 受容体- $\beta$ アレスチン複合体に働く化合物を、治療薬候補として見出す。

### 3. 研究の成果

- (1) 我々はこれまでに、今日の代表的な実験動物であり、各種の毛色、大きさ、性、週齢の異なるマウスについて、写真上の分類と物体としての同定、位置座標の検出までを可能にする、コンピュータビジョンのモデルパラメーターを得ることに成功した。この過程においては、画像前処理のプロトコルを確立し、3000枚の画像中に検出されるマウスの座標とラベルを付与した。続いてTensorflowとKerasプログラムにより、既に140万枚の画像に対して学習を終えたResNet+f-RCNNモデルを転用学習に用いた。この結果、マウスの依存形成過程を含む行動は、ホームケージにおいて全て記録され、深層学習による評価を通じ解析可能となった。麻薬依存の形成過程は、従来のプロトコルでモルヒネを漸増する場合、10日間を要する。予備実験では、この間に130万枚の連続画像からマウスの行動解析を実施することが可能となっている。すなわち、1枚のグラフィックボードと1セットのCPUを用いた場合に、既に現在利用可能なハードウェアと計算モデルの限界の能力を発揮することに成功している。今後は並列計算の環境を整え、さらなる解析の高速化と効率化を目指す。
- (2) マウスの行動解析からは、基礎となる行動量が遺伝子欠損マウスで変化しているという意外な結果を得た。この結果はこれまでの報告では指摘されておらず、長時間の観察が可能となった本研究で立ち上げた実験系の利点と考えられた。この基礎値を考慮に入れて今後の実験結果を考察する必要があると考えられた。
- (3) これまでに我々が成果を挙げてきたV1b受容体を含む高次複合体の理解について、さらなる機能解析と治療薬の開発を進め、新たな成果を得た。特に申請者らは、V1b受容体が $\beta$ アレスチン2と恒常的に結合しているという、700種類ある受容体の中でも特異な性質を世界で初めて報告していたが、この恒常的結合のために薬物による刺激の効果を検出することが不可能であり、化合物のスクリーニングが出来ないという課題に直面していた。今回の研究課題の取り組みの中でこのオープンクエスションに挑戦し、測定系の工夫により問題を解決することに成功し、薬物刺激で $\beta$ アレスチン2を介する構造変化を検出することに成功した。これにより、V1b受容体複合体を介して依存を促進する化合物の特徴や、依存を防ぐ化合物のスクリーニングが可能となった。そこで我々は、薬物の化合物ライブラリーを入手して依存症治療薬を探すための大規模なスクリーニングを推進している。

### 4. 研究の反省・考察

- (1) 依存に関わる脳内V1b受容体の発現部位の検索は、この期間内には達成できなかった。しかし我々は、c-fos遺伝子発現パターンが野生型と遺伝子欠損動物の間で異なる脳部位を同定することに成功した。すなわち、V1b受容体活性の違いがもたらすと考えられる依存に関係する脳部位が新たに明らかになっており、今後は組織化学的な検索を進める。さらに、c-fos発現部位での遺伝子発現プロファイルを得ることを計画しており、1細胞レベルでの依存症成立メカニズム解明に挑む準備が整っている。また機能的な解析を進めることができた。すなわち、c-fos発現部位がV1b受容体を介する依存形成に関与する可能性について、部位特異的V1b欠損動物作成のためのloxP配列挿入マウスの作成に成功し、チャンネルロドプシン発現マウスの開発を進めた。
- (2) 受容体遺伝子欠損の効果を受容体拮抗薬で再現する実験系を立ち上げた。拮抗薬を脳部位特異的に作用させて、遺伝子欠損と同じ効果を得ることができるとして、投与すべき脳部位が明らかになってきたことより、解析の計画が明確となった。既に脳部位得意的薬物投与の手技は確立している。
- (3) 新たな受容体拮抗薬開発の測定系を樹立した。V1b受容体を発現させた場合、 $\beta$ アレスチンと無刺激で相互作用してしまうため、依存形成に重要なステップであるアレスチンと受容体との結合を、刺激薬探索の指標とすることが困難であった。我々は今回の研究成果により、これまで不可能であった刺激薬に依存する受容体— $\beta$ アレスチン結合の検出系をV1b受容体において樹立することに成功した。この測定系を用いて、依存シグナルを活性化する、あるいは抑制する化合物のスクリーニングが可能となった。

以上、時間的な制約によって達成できなかった部分に関しては、次の段階の実験系や解析を準備することができたため、本研究の今後の大きな成果が期待される。

## 5. 研究発表

### (1) 学会誌等

- ① Vasopressin Increases Urinary Acidification via V1a Receptors in Collecting Duct Intercalated Cells. Giesecke T, Himmerkus N, Leipziger J, Bleich M, Koshimizu TA, Föhling M, Smorodchenko A, Shpak J, Knappe C, Isermann J, Ayasse N, Kawahara K, Schmoranzler J, Gimber N, Paliege A, Bachmann S, Mutig K. J Am Soc Nephrol. 2019 Jun;30(6):946-961. doi: 10.1681/ASN.2018080816.

### (2) 口頭発表

- ① Nuttawadee Ngamlertwong et. al. mu-オピオイド受容体-V1bバゾプレシン受容体複合体と相互作用するbeta-アレスタチンの解析 第140回日本薬理学会関東部会、2019年7月
- ② Nuttawadee Ngamlertwong et. al. Opioid-promoted complex involves mu-opioid and V1b receptors and beta-arrestin 2 第63回日本薬学会関東支部大会、2019年9月
- ③ 興水崇鏡、Chortip S、Fujianti C、Nuttawadee N、藤原葉子、東森生、土屋裕義、谷口淳一 オピオイド鎮痛耐性におけるV1bバゾプレシン受容体複合体の機能解析 第93回日本薬理学会年会、2020年3月
- ④ Nuttawadee Ngamlertwong et. al. Analysis of interaction between dimerized receptor and beta-arrestin 第93回日本薬理学会年会、2020年3月

### (3) 出版物

なし

学 校 名	北 陸 大 学	研究所名等	共 同 研 究
研 究 課 題	閾値下レーザーに応答する網膜色素上皮細胞の分子基盤 —糖尿病黄斑浮腫治療に向けた光刺激の実証—		研究分野 医 学
キ ー ワ ー ド	①糖尿病 ②糖尿病黄斑浮腫 ③レーザー治療 ④光エネルギー ⑤網膜色素上皮細胞 ⑥細胞応答 ⑦細胞恒常性 ⑧傍細胞輸送		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
周 尾 卓 也	薬 学 部	講 師	全体総括・分子細胞生物学実験・データ解析

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
柴 田 宏	医 療 保 健 学 部	教 授	生物医学実験監督評価
佐 藤 妃 映	医 療 保 健 学 部	准 教 授	生物物理学実験
大 越 貴 志 子	聖 路 加 国 際 大 学 ・ 研 究 セ ン タ ー	教 授	レーザー実験監督評価
稲 垣 圭 司	聖 路 加 国 際 大 学 ・ 聖 路 加 国 際 病 院 眼 科	副 医 長	生物化学実験・電気生理学実験

# 閾値下レーザーに応答する網膜色素上皮細胞の分子基盤 — 糖尿病黄斑浮腫治療に向けた光刺激の実証 —

## 1. 研究の目的

糖尿病黄斑浮腫は視覚情報の中心を担う黄斑部に出現するむくみで、糖尿病を契機に病期にかかわりなく発症し、患者の視力を奪うことで健康寿命を著しく害する。近年、糖尿病黄斑浮腫の治療には分子標的薬が積極的に導入されているが、繰り返し注射を頻回する施術は、患者の肉体的、精神的な負担だけでなく、高額な医療費による経済的な負担という点で問題を内包している。

閾値下レーザー光凝固は、網膜組織に凝固斑（瘢痕）を生じさせないように設定した強度で、眼内の浮腫に向けてレーザーを照射する手法で、旧来のように破壊的でない安全性と治療効果を両立している。しかし、レーザー光がどのような分子機序で浮腫に作用するかは不明であるために、最適な施術法の確立には至っていない。そこで我々は、自作のレーザー照射実験系を駆使した細胞レベルの研究から、浮腫を軽減する分子機序を理解することで、治療効果を最大限に発揮する非侵襲的な閾値下レーザー療法を提案を目指している。

眼内へと照射したレーザー光は網膜色素上皮層に選択的に吸収される。これまでに我々は、生体と同等の極性を獲得した単層細胞への光エネルギーの負荷に成功している。閾値下レーザーに対する網膜色素上皮層の反応として、3つの標的分子を明らかにした。

本研究では、標的分子の生理活性から予想される細胞機能を踏まえて、光エネルギーが負荷された網膜色素上皮細胞で、最初期に起こる変化を、(1)Hsp70 が担う恒常性の維持について、タンパク凝集とアポトーシスに着目して、分子細胞生物学および生物化学的に調べるとともに、(2)AMTN と ZO-1 が関与する微細構造の改変について、傍細胞輸送にかかわる溶質透過・経上皮電気抵抗・細胞膜電位に着目して、生物物理学および電気生理学的に調べる。

以上より、閾値下レーザーに応答する網膜色素上皮細胞の分子機序というテーマの解明を達成して、糖尿病黄斑浮腫に対抗する新たな学術的基盤の創出につなげる。

## 2. 研究の計画

有孔膜の表面にコンフルエントな単層として4週間培養した天然のヒト網膜色素上皮細胞に、一様にレーザーを照射して、経時的に実験に供する。レーザー照射部位の物理的な変容は明視野ライブイメージングおよび走査型電子顕微鏡により精査する。

### (1) 恒常性を維持する仕組みの解析

Hsp70 は、分子シャペロンとしてタンパク質の凝集を、あるいは JNK シグナル経路の賦活化によりアポトーシスをそれぞれに抑制することから、Pifithrin-u で Hsp70 の働きを阻害した条件で、タンパク質の凝集を Proteo Stat で検出されるアグリソームとして共焦点顕微鏡で定性、フローサイトメトリーで定量する。また JNK 経路 (JNK、c-Jun、Bax、cytochrome c) の賦活化は、JNK、c-Jun のリン酸化をウエスタンブロットで、Bax の細胞質からミトコンドリア膜への局在を免疫細胞化学で、cytochrome c の含有量を細胞質とミトコンドリア画分の ELISA で調べる。これにより、レーザー照射は温熱ストレスを惹起するが、網膜色素上皮細胞は Hsp70 の発現増強によって細胞の恒常性を維持していることを明らかにする。

### (2) 微細構造を改変する仕組みの解析

AMTN の同族である SPARC は細胞外基質に沈着することで細胞密度を調節し、ZO-1 はタイト結合の本体である Claudin を細胞骨格に繋ぎ止める。したがって、AMTN の発現増強や ZO-1 の脱局在は共にタイト結合の機能を変調すると考えられることから、バリウム有含・重炭酸不含の培養液やアンモニウムで経細胞輸送にかかわるイオンチャネルを阻害した条件で、単層細胞を横切る FITC 標識デキストランの変化量を蛍光プレートリーダーで、電気抵抗を経上皮電気抵抗計で、電解質 (LiCl/NaCl/KCl/RbCl/CsCl) に依存的な膜電位をウッシングチャンバへ接続した電流電圧クランプの回路で調べる。これにより、タイト結合が制御する傍細胞輸送に注目して、浮腫の軽減に直結する電解質や水の流動を明らかにする。

### 3. 研究の成果

光エネルギーを感受して作動する分子群のうち、Hsp70 (HSPA-1A、6)、DNAJB1 や BAG3 に加えて、新たに CXCL8 の上方制御が DNA マイクロアレイで検出され、定量リアルタイム PCR では 10 倍を超える一過性の発現上昇が確認できた。その一方で、標的分子の 1 つと考えていた AMTN の増強は胎児由来の細胞でのみ生じる現象であることがわかった。

#### (1) 恒常性を維持する仕組みの解析

##### ① Hsp70 は DNAJB1 や BAG3 と共役する

経時的に HSPA1A と連動する DNAJB1 と BAG3 の上方制御を示せた。温熱ストレスに耐性する網膜色素上皮細胞の恒常性が、Hsp70・DNAJB1・BAG3 複合体に依拠するオートファジー体系であることがわかった。

##### ② オートファジー体系が恒常性を担う

閾値下レーザー条件下であっても、HSF1、Hsp70、オートファジーそれぞれの活性阻害剤 BB11、PES、CQ の処置によって、細胞傷害性アデニル酸キナーゼの放出増加を示せた。転写因子 HSF1 を介する Hsp70 の発現誘導とオートファジー体系の関係性がわかった。

#### (2) 微細構造を改変する仕組みの解析

##### ① タイト結合は開閉する

一過的な経上皮電気抵抗値の減少を示せた。傍細胞輸送を調整する網膜色素上皮細胞の微細構造が、タイト結合の一時的な開口として変化することがわかった。

##### ② CXCL8 タンパク質の存在

出力依存的閾値下レーザーによる CXCL8 の発現増強を示せた。頂端部と基底部の発現量が同程度であることがわかった。

##### ③ ZO-1 に先立つアクチンの脱局在

閾値下かつ低出力の条件下にもかかわらず、レーザー照射部位からアクチンが脱局在することを示せた。比較的高出力であって、はじめて ZO-1 が脱局在することがわかった。

### 4. 研究の反省・考察

- (1) 恒常性を維持する仕組みを、オートファジー-リソソーム体系の構成要員となる Hsp70・DNAJB1・BAG3 複合体、CHIP、p62、LC3 として、明確化しなければならないが、種々のレーザー出力で発現増強するオートファジー体系のタンパク質分子全体を Py-Tag 誘導体で安定同位体標識し、液体クロマトグラフ質量分析計の多重反応モニタリングによる相対定量法で調べる予定である。

網膜色素上皮層は、多能性幹細胞 (iPS) から分化誘導されて、移植に供する再生医療の臨床治験が開始されている。本研究で探究する細胞恒常性の維持は、レーザー治療の学術的基盤となるだけでなく、生体外で細胞を賦活 (耐ストレス) 化する手段の開発に進展できると考えている。

- (2) 微細構造を改変する仕組みを、タイト結合の開閉やアクチンの再構築の観点から明確化しなければならないが、生細胞での脂質二重膜の張力やアクチン重合体をリアルタイムに観測できるプローブを利用し、細胞間隙やアクチン繊維の変化を光寿命顕微鏡法で調べる予定である。網膜色素上皮層は、関門形成により物質の往来を規定する。本研究で探究するタイト結合の開口は、浮腫軽減の基盤だけでなく、薬物送達的手段に進展できると考えている。

### 5. 研究発表

#### (1) 学会誌等

なし

#### (2) 口頭発表

##### ① 稲垣圭司、周尾卓也、大越貴志子

iPS 細胞由来網膜色素上皮における低侵襲マイクロパルスレーザー後の HSP70 の発現  
第25回日本糖尿病眼学会総会 2019年9月

##### ② 稲垣圭司、周尾卓也、大越貴志子

細胞障害を引き起こさないマイクロパルス波がヒト網膜色素上皮細胞に与える効果  
第123回 日本眼科学会総会 2019年4月

(3) 出版物  
なし