

**「生体における動的恒常性維持・変容機構の解明と制御」**  
**研究領域 領域活動・評価報告書**  
—平成28年度終了研究課題—

研究総括 春日 雅人

1. 研究領域の概要

本研究領域は、生体をひとつの恒常性維持機構としてとらえ、生体の動的な恒常性の維持・変容機構を解明するとともに、老いや生活習慣病等の疾患のメカニズムの解明に挑戦する研究を対象とします。このような研究を推進することにより、生命体を統合的に理解することが可能になり、対症療法でない、生体全体を理解した上での診断・治療法の開発や年齢・ライフステージに応じた最適な医療の実現を目指します。

具体的には、下記の視点をもった研究を推進します。

- (1) 多臓器間の機能ネットワークを体系的に捉える視点
- (2) 恒常性維持機構の時間的変化を捉える視点
- (3) 疾患の原因としての恒常性維持機構の破綻を捉える視点

以上の視点を踏まえて、神経系・免疫系・内分泌系・血液系等の既に構築されている学術領域を超え、生体を1つの機構としてとらえた、分野横断的な研究を対象といたします。

2. 事後評価対象の研究課題・研究者名

件数： 16件(内、大挑戦型0件)

※研究課題名、研究者名は別紙一覧表参照

3. 事前評価の選考方針

選考の基本的な考えは下記の通り。

- 1) 選考は、「生体における動的恒常性の維持・変容機構の解明と制御」領域に設けた選考委員名の協力を得て、研究総括が行う。
- 2) 選考方法は、書類選考、面接選考及び総合選考とする。
- 3) 選考に当たっては、さきがけ共通の選考基準(URL: <http://www.jst.go.jp/pr/info/info986/sankou2.html>)を基本に行った。

4. 事前評価の選考の経緯

一応募課題につき領域アドバイザー・外部評価者23名のうちの3名が書類審査し、書類選考会議において面接選考の対象者を選考した。続いて、面接選考および総合選考により、採用候補課題を選定した。

選考	書類選考	面接選考	採択数
対象数	308件	34件	16件

※本領域においては、5年型、大挑戦型を公募しなかった。

備考:

- 1) 平成25年度採択課題のうち、以下は今年度事後評価対象としない。
  - ・村松里衣子研究者  
ライフイベントにより研究を一時中断し、終了年度がずれるため。
- 2) 加えて、以下を今年度の事後評価対象とする。

- ・三浦恭子研究者(平成24年度採択)  
ライフイベントによって研究を一時中断したため。

## 5. 研究実施期間

平成25年10月～平成29年3月(3年型)

## 6. 領域の活動状況

領域会議: 8回

研究総括(または技術参事)の研究実施場所訪問: 海外の上野将紀研究者を除く15名のサイトビジットを行った。海外の上野将紀研究者は領域会議来日に合わせて、研究総括への研究内容詳細報告を行った。

## 7. 事後評価の手続き

研究者の研究報告書を基に、評価会(研究報告会、領域会議等)での発表・質疑応答、領域アドバイザーの意見などを参考に、下記の流れで研究総括が評価を行った。

(事後評価の流れ)

平成 29年 2月 研究総括による事後評価

平成 29年 3月 被評価者への結果通知

## 8. 事後評価項目

- (1) 研究課題等の研究目的の達成状況
- (2) 研究実施体制及び研究費執行状況
- (3) 研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)
- (4) 共同研究の進展

## 9. 評価結果

総論: 本研究領域は、生体の恒常性維持機構に焦点をあて、その恒常性維持に関与する新しい臓器間等のネットワークに着目した研究、恒常性維持機構の時間的変化に着目した研究、あるいは疾患の原因としての恒常性維持機構の破綻に着目した研究で、内分泌学、代謝学、神経学、免疫学等の既存の学術領域を超えた視点をもった研究を中心に採択してきました。第1期では1課題が終了し、第2期では15課題が終了し、ハダカデバネズミ、マウス、ラットあるいはミツバチを用いてその恒常性維持機構の解明に迫り、いずれの研究課題も着実に成果をあげたと評価できます。第2期生では計算科学の研究者も採択し、領域会議での議論の幅が広がりました。また、生活習慣病、免疫疾患、精神・神経疾患などにより密接な研究課題が多く、新しい治療・診断方法などの契機になる成果が得られたと考えられます。

領域会議では、第2期生の研究者は領域アドバイザーに加えて、第1期生、3期生とも非常に活発な議論を展開し、その結果緊密な研究者間ネットワークが形成され、共同研究へと発展しており、このことも高く評価できます。

### 1. 三浦 恭子 研究者「超長寿げっ歯類ハダカデバネズミを用いた「積極的老化予防」機構の解明」

評価結果: 本研究課題では、老化およびがんを含む老化関連疾患に対して高度の抵抗性と異例の長寿を示すハダカデバネズミ(Naked mole rat, NMR)を対象として、NMR-iPS細胞や線維芽細胞などの培養細胞と臓器での遺伝子発現情報を用いて、NMR特異的ながん化ならびに老化耐性とそれに関与する遺伝子に着目した。その結果、種特異的ながん抑制遺伝子 ARF の活性化とがん遺伝子 ERAS のフレームシフト変異によってがん化耐性が制御されていることを明らかにした。また、iPS細胞樹立過程の解析から、NMR特異的ながん抑制機構 ASIS (ARF suppression-induced senescence)を同定し、論文発表を行った。また、NMR特異的な「老化細胞死」による老化細胞の蓄積の抑制は、NMR個体の老化耐性の一因であると考えられる結果も得ている。

今後、ASIS と老化細胞死の制御機構・誘導因子の解明を目指して研究を推進し、NMRにて同定した耐性因子を導入することで、マウス個体・ヒト細胞で、NMRの老化耐性・がん化耐性を再現することを目標として研究を発展させることが期待される。

研究期間内にテニュアトラックで独立。さらに、さきがけ研究期間にテニュアトラックを終了し准教授に就任し、今後の活躍が十分に期待される。

#### 2. 岩部 真人 研究者「栄養摂取バランスの崩れによる恒常性維持機構の破綻メカニズムの解明」

評価結果:本研究はアディポネクチンとその受容体である AdipoR を切り口とし、“過栄養に対する代償システム”の破綻とその結果により生じる動脈硬化ならびに悪性腫瘍の発症メカニズムの解明を目指した。AdipoR 活性化低分子化合物(Adiponectin Receptor Agonist; AdipoRon)の開発に成功し、AdipoRon が AdipoR に直接結合し、AMPK を活性化、ミトコンドリア機能を上昇させること、個体レベルでは AdipoR を介して抗糖尿病作用を発揮することを明らかにして、成果を論文として発表した。また、AdipoR の結晶構造を決定することに成功し、GPCR とは全く異なった構造及び機能を持つことも論文として発表した。さらに AdipoR 欠損マウスは短命であり、悪性腫瘍(肝細胞癌、大腸癌等)の頻度が増加することが分かり、AdipoR 活性化低分子化合物が寿命を回復することも論文発表している。今後の AdipoR の新たな機能解明研究および AdipoR 活性化低分子化合物の臨床応用が期待される。

成果としての論文発表、学会発表、特許の取得が多数あり、今後の活躍が十分に期待できる。

#### 3. 上野 将紀 研究者「中枢神経傷害における神経回路による恒常性機能の破綻と回復メカニズムの解明」

評価結果:本研究課題では運動神経、自律神経、および免疫制御の神経回路に着目し、中枢神経の障害後に代償性に変化する神経回路の実体を明らかにするとともに、その回路の形成機序の解明を目指した。その結果、脊髄損傷患者の主な死亡要因である感染症は、新たに形成される神経回路を介して免疫機能が低下することが原因であることを明らかにした。すなわち、トレーサーによる神経経路の可視化やケモジェネティクス的手法により、脊髄損傷により一度神経回路が破綻すると、免疫器官を制御する神経回路が脊髄内で代償的に新たな回路網を形成すること、新たな回路内での神経細胞の活動を遮断すると、免疫機能の低下が回復することを明らかにした。本研究から、脊髄損傷時に神経系を制御して免疫機能を改善する新たな治療法開発への期待が導かれた。この研究成果は Nature Neuroscience に発表した。その他、皮質脊髄路には多様な内在回路が存在することを見出すとともに皮質脊髄路の再生を促進する実験モデルの開発に成功した。研究者は、総説や招聘講演、学会発表等多数を行っている。さきがけ研究期間内に帰国後、国内の大学で教授として研究室を主宰することとなり、今後の活躍が十分に期待される。

#### 4. 梶島 健治 研究者「皮膚の恒常性維持機構からアレルギークロストークへの展開」

評価結果:本研究課題では、皮膚の動的恒常性維持機構について検討を行った。その結果、アトピー性皮膚炎において皮膚のバリア機能、炎症反応、かゆみに対して JAK シグナル、IL-31 シグナルがマウスにおいて重要であることを示し論文発表するとともに、臨床でも確認中である。基礎的には皮膚内でメモリーT 細胞が抗原提示を受けて活性化する場を世界で初めて特定して論文発表している。また、経皮感作による食物アレルギーの誘発のようなアレルギーマーチの機序の一端を解明して論文発表している。このように基礎研究の成果が臨床での実用化に向けて着実に研究が進められている。

さきがけの研究予算は細胞分取装置導入を増額予算で実施し、研究を加速させた。さきがけ研究の期間の途中で准教授から教授へと昇進し、基礎研究と臨床全体を主宰する立場となり、今後の飛躍が十分に期待される。

#### 5. 鎌倉 昌樹 研究者「女王蜂における寿命制御機構の解明」

評価結果:本研究課題では、ミツバチの女王蜂と働き蜂では同じ遺伝子型を持つにも関わらず、育て方の違いで寿命がそれぞれ2~3年と1ヶ月のように約20倍も異なる。その違いはエピジェネティックな制御の違いによるとの仮説について検討を行った。まずは、対象となるミツバチは実験動物として一般的ではなく、実験室内の飼育条件の検討から始めて寿命の違いを確認し、さらに、遺伝子のエピジェネティックな制御の解析を行うためのミツバチ成虫からのサンプル調整方法についても検討を重ねた。また、ミツバチの成育は季節に依存するため、検討に時間を要したようであるが、検討の準備は整ったようである。その結果、クロマチン修飾の変化は寿命に関連していることが示唆された。次に、DNA メチル化による発現制御を受ける因子の探索を行い、結果を解析中である。

残念ながら、本さきがけ研究期間中に成果を論文化は出来なかったが、検討条件が整い、今後の解析結果をまとめて論文化することが可能だと考えられる。ロイヤルゼリーの作用機序についてさきがけ研究者との共同研究も実施され、研究の幅が広がったと考えられる。今後の活躍が十分に期待される。

#### 6. 久場 敬司 研究者「RNA 分解による生体恒常性維持機構の解明と制御」

評価結果:本研究課題では、遺伝子発現調節因子である CCR4-NOT 複合体を介した RNA 分解と生体システムとの機能連関、相互作用に焦点を当てている。CCR4-NOT 複合体の RNA 分解活性によるオートファジー分子 Atg7 依存性の細胞死の制御機構ならびに心機能調節機構についての成果は、これまでに予想できなかった生体恒常性維持機構の実体をとらえることに成功し、現在論文投稿中である。また、CCR4-NOT 複合体が bulk mRNA の poly(A)鎖から AMP を生成すること、心不全モデルマウスでの AMP 減少と CCR4-NOT 複合体の一部の CNOT3 の低下が関連していることを解明して、論文投稿準備中である。一方、さきがけの本研究領域内での共同研究として、骨-心臓連環について検討したところ、骨粗鬆症マウスでは心不全マーカーの顕著な発現上昇、心不全マウスでは骨量の有意な減少がみられたことから、マウス疾患モデルで骨-心臓連環が存在する可能性が強く示唆され、クロストークにかかわる候補因子の絞り込みを行っている。このようにさきがけ研究で研究の幅が広がっている。

研究予算は、研究の進展のため新たな機器購入費用、共同 FS 実施のための増額を行った。さきがけ期間中に准教授から教授に昇進し、一つの研究室を主宰することとなり、今後の活躍が十分に期待される。

#### 7. 久保田 浩行 研究者「血中インスリンの時間パターンによる恒常性維持機構の解明」

評価結果:本研究課題では、インスリン作用臓器である肝臓と筋肉に注目し、血中インスリンパターンによるインスリンシグナル経路分子の選択的な制御と、そのメカニズムを明らかにすることを目的としている。生体のインスリン分泌を模して、麻酔ラットの門脈に繋がる腸管膜静脈からシリンジポンプを用いて投与する手法により、任意のインスリン投与可能な実験系を開発して検討した。その結果、インスリンの持続的な刺激、徐々に濃度が上昇する刺激やパルス刺激などの違いにより、肝臓と筋肉でのインスリンシグナル伝達経路の中心となる分子(IR, AKT, GSK3 $\beta$ , FoxO1, S6K)のリン酸化量の時間パターンが異なることがわかり、これらの分子が選択的に制御されることを明らかにした。これらの応答のメカニズムを明らかにするために、実験データを再現する微分方程式モデルを作成し、分子の応答の違いがネットワーク構造や、時定数や EC50 という酵素反応のパラメータの違いによることを明らかにした。これらの結果の論文での発表はもう少し時間がかかるようだが、着実に検討が進んでおり、本研究の完成が期待される。

さきがけ研究では、研究室の立ち上げによる研究計画の変更もあったが、研究を終了することができた。さきがけ研究期間内にさきがけ研究全体をまとめる論文の作成には至らなかったが、いくつか論文発表と学会発表を行った。領域会議では計算科学の視点から領域内の研究者とのディスカッションにより本領域のレベルアップに貢献した。さきがけの第二年次からは異動して教授に就任し、研究室を主宰することとなり、今後の活躍が十分に期待される。

#### 8. 佐藤 卓 研究者「組織修復における幹細胞-免疫システム連関機構の解明」

評価結果:本研究課題では、組織幹細胞が免疫ストレスによる機能低下を回避するメカニズムを解明することを目指した。その結果、免疫系のサイトカインであるインターフェロンが組織幹細胞である腸幹細胞の増殖を抑制していることを、インターフェロニンシグナル制御因子(IRF-2)の欠損マウスあるいはインターフェロン誘導剤などを用いて、マウス腸管および腸上皮幹細胞のオルガノドにおいて確認している。さらに、種々の組織幹細胞に対するサイトカインの作用についての研究が行われ、その成果の発展にも期待される。このように様々な組織幹細胞が持つサイトカインやケモカインなどの免疫ストレスからの回避機構について明らかにすることにより、その破綻が組織恒常性維持や疾患発症にどのように関わるかを明らかにしていくことに繋がって行くと考えられる。

残念ながら、本さきがけ研究期間中に成果を論文にまとめることが出来なかったが、近い内に論文として発表することが見込まれ、今後の活躍が十分に期待される。

#### 9. 志内 哲也 研究者「中枢・末梢・時間を統合した代謝生理学的ネットワーク機能の解明」

評価結果:本研究課題では、神経経路と液性経路を介した末梢と中枢の代謝、代謝変化と脳機能変化の生理学的連関作用、サーカディアンリズムや世代継承などの時間軸の3つの視点からの個体内の代謝生理学的ネットワークを解明することを目的とした。その結果、生活習慣として夜食症型の摂食リズムにより、骨格筋における糖代謝能力が低下することならびに恐怖への記憶が強くなることを見出し、その分子機序として、副腎から分泌されるグルココルチコイドと、それによって視床下部で発現が刺激される AgRP という神経ペプチドが関与することを見出している。また、妊娠期に同様の摂食リズムで生活すると、そのマウスから生まれた子供は、恐怖に対する記憶が強くなる「性格」を継承する可能性を見出している。残念ながら、本さきがけ

期間中に、研究全体をまとめる論文の発表には至らなかったが、今後の研究成果も含めて論文化されることが期待される。

本研究領域のテーマである多臓器間の連関に正面から取り組んだ研究成果であり、今後の研究者としての成長が十分に期待される。

10. 長井 良憲 研究者「生活習慣病における自然免疫系と代謝内分泌系との機能的クロストークの解明」  
評価結果:本研究課題では、「生活習慣病における慢性炎症」と「肥満」に着目し、免疫系と代謝内分泌系との機能的なクロストークが生体の恒常性を維持し、その破綻が生活習慣病の発症へと繋がるメカニズムの解明を目指した。その結果、TLRファミリー分子 RP105/MD-1 のリガンド候補分子や TRIF シグナルの内因性リガンドを複数発見するとともに、内臓脂肪炎症での好中球の役割を見出しており、詳細な解析の後に論文化する予定である。また、内臓脂肪炎症を抑制する天然物について企業との共同研究も進んでいる。論文発表などの外部発表や特許出願も多く、今後の活躍が十分に期待される。

11. 中岡 良和 研究者「内皮細胞を起点とした心血管系の恒常性維持機構の解明と制御」  
評価結果:本研究課題は、胎生期の心臓発生での冠血管新生の制御機構を解明して、成体での虚血性心疾患に対する新規治療法に敷衍すること、および、肺高血圧症に対して内皮保護シグナルと炎症シグナルのクロストークに焦点を当てて、肺高血圧症に対する新しい治療法を開発することが目的である。心筋特異的 Ang1 欠損マウス(Ang1CKO)を用いて、未分化内皮細胞からの冠静脈形成過程に Ang1 が重要な働きをしていることについて論文報告したが、成体での急性心筋梗塞モデルでの検討結果では Ang1 の効果が認められなかった。一方、IL-6 および IL-21 が肺高血圧症の病態形成に働くことを明らかにして論文発表した。今後、IL-6 と IL-21 に対する生物学的製剤が新しい肺高血圧症の治療薬に発展することが期待される。このようにさきがけ研究をまとめた論文を発表することが出来ている。

さきがけ研究期間の途中で国立循環器病センターへの異動があり、新たに研究室を主宰することになった。このように着実に成果を積み上げ、新しいポジションも得て、今後の飛躍が十分期待される。

12. 中島 友紀 研究者「運動器の動的恒常性を司るロコモ・サーキットの解明」  
評価結果:本研究課題は、運動器の主軸となる骨と筋肉の臓器連環クロストークの連環因子の同定、および、その制御機構と破綻のメカニズムを明らかにすることで、運動器の動的恒常性の理解と新規治療法の分子基盤の確立に繋げることを目標とした。細胞および生体レベルでの力学的負荷実験や新規細胞分化実験系を構築し、細胞や組織の網羅的なトランスクリプトームやプロテオーム解析を展開し、骨と筋肉の発現遺伝子・タンパク質の基盤情報のデータベースを構築している。また、これらを制御する分子の同定を試み、骨・筋肉連環因子の候補遺伝子を改変したマウスを作成し、生体レベルでその分子機構の解明を試みている。さらに、ハイスループットな骨・筋肉の機能スクリーニング系を新たに構築し、低分子ケミカルライブラリーを用いてスクリーニング中である。まだ、手がかりが得られた段階であるが、これまでの研究を進めることにより、実用化できるリード化合物を見出すことが期待される。論文報告や学会発表は多数に上る。

また、本研究領域内での共同研究の推進の中心的な役割を果たすだけでなく、領域終了後の研究者のネットワーク作りに積極的な役割を果たしている。さきがけ研究期間内に准教授から教授への昇進を果たし、今後の活躍が十分に期待される。

13. 中村 和弘 研究者「脳と末梢器官の新たな恒常性維持クロストーク機構の解明」  
評価結果:本研究では温度ストレス、心理ストレス、感染ストレス、飢餓ストレスなど、様々な環境ストレスから恒常性を守るために機能する中枢神経システムについて、視索前野のニューロンに注目し、末梢からの様々な入力、末梢効果器への出力をあわせて解明した。心理ストレスとしては、社会的敗北ストレスをラットに与え、それによって生じるストレス性体温上昇について解析し、また、飢餓ストレスについては、熱の産生に代表されるエネルギー消費を減らすとともに、食物を摂取する行動の惹起について解析し、その成果をそれぞれ論文として報告している。本研究で明らかにされた神経回路をたどっていくことで、「心理ストレス」の科学的実体が解明されることにより、ストレス疾患の発症基盤の理解と根本的治療法の開発につながることを期待される。また、ここで明らかになった飢餓反応の神経回路が、低体温症や肥満症などの関連疾患の発症メカニズムの解明と治療法の開発に貢献することも期待される。

異動に伴う研究体制の拡大もあったが、さきがけ研究費は当初予算どおり執行され、当初の研究計画の成果を得ることができている。さきがけ研究期間内に講師から准教授、教授へと昇進し、研究室を主宰することになり、今後の活躍が十分期待される。

#### 14. 中村 亨 研究者「精神疾患における行動制御系の破綻原理の解明と新規診断技術の開発」

評価結果:本研究の目的は、ウェアラブルデバイスを用いて日常生活下の身体活動データを連続的に計測することにより様々な精神疾患(大うつ病性障害、統合失調症など)において、行動パターンの生成に関する統計則の疾患特異的变化の動力的背景(微分方程式やその力学構造)を解明する数理科学的手法を開発することであり、これにより、行動異常を伴う精神疾患の早期検知・予測技術の創出を目指している。健常人、大うつ病性障害患者、統合失調症患者を対象に比較したところ、平衡点の位置の違いが確認され、疾患および病態の客観的評価に有用であることが示された。また、平衡点の安定性の評価は、疾患発症・病相変化の予兆検知、その数学的メカニズムの解明に繋がると期待され、これらの成果が論文として報告されている。

近年のウェアラブルデバイスに代表される ICT/IoT(モノのインターネット)の発展とあいまって、今後の活躍が十分に期待される。

#### 15. 藤生 克仁 研究者「マクロファージを軸とする細胞間・多臓器間連携による心臓恒常性維持機構の解明」

評価結果:本研究課題では、心臓ストレスに対する個体の恒常性維持機構、またその破綻である心不全について、細胞間コミュニケーションならびに臓器間連携の観点から解明することを目指した。その結果、心臓に圧負荷が加わると、そのシグナルが脳を介して腎臓集合管上皮の KLF5 を活性化し、血中の GM-CSF の上昇により心臓マクロファージの増加をきたすこと、更にこの心臓マクロファージがアンフィレギュリンを分泌し、心筋細胞肥大を生じることを見出し、論文として発表した。これ以外にも多数の論文、学会発表があり、それに加えて特許出願も行った。

本さがけ研究領域内、さらには他領域のさがけ研究者と共同研究を行い論文発表するなど、研究の幅が広がった。以上から、本さがけ研究が研究者としての飛躍につながったと考えられ、今後の更なる活躍が非常に期待される。

#### 16. 和氣 弘明 研究者「身体疾患で惹起される免疫変容が起こす神経回路恒常性の破綻と精神症状の解明」

評価結果:本研究課題では、身体疾患時において体循環系の免疫細胞がミクログリアを介して中枢神経系に及ぼす作用についてマウスを用いて検討した。その結果、ミクログリアのシナプス形成への作用および神経保護作用について論文として報告することができた。また、全身炎症時に体循環系免疫細胞が集積する中枢神経内の部位とミクログリアの関連、学習効果についての検討結果はさがけ研究期間中には論文発表できなかったが、現在は論文投稿の準備中である。

さがけ研究の課題はほぼ達成され、本研究中に見出された機能分子を標的とする薬剤開発にも道筋が開けており、今後の進捗が期待される。

本研究者はさがけ研究期間内に基礎生物学研究所助教から生理学研究所准教授、神戸大学教授へと昇進し、研究室を主宰することとなった。論文発表も含め、国際学会、国内学会での多数の報告がある。また、本研究成果から特許を出願することも出来ている。文部科学大臣表彰若手科学賞も受賞し、今後の活躍が十分に期待される。

10. 評価者

研究総括 春日 雅人 国立国際医療研究センター・総長

領域アドバイザー(五十音順。所属、役職は平成 28 年 7 月末現在)

植木 浩二郎	国立国際医療研究センター研究所 糖尿病研究センター長
黒川 峰夫	東京大学 大学院医学系研究科・教授
小室 一成*1	東京大学 大学院医学系研究科・教授
小安 重夫*2	理化学研究所・理事
品川 朗*3	第一三共 RD ノバーレ株式会社・取締役 創薬基盤ユニット長
反町 典子	国立国際医療研究センター・プロジェクト長
内匠 透	理化学研究所 脳科学総合研究センター・シニアチームリーダー
竹田 秀*4	東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科・教授
丹澤 和比古	理化学研究所 技術基盤研究センター・コーディネーター
本田 賢也	慶應義塾大学 医学部・教授
水島 昇	東京医科歯科大学医歯学総合研究科・教授
箕越 靖彦	自然科学研究機構 生理学研究所・教授
望月 敦史	理化学研究所 望月理論生物学研究室・主任研究員

- \*1 平成 24 年 10 月～平成 27 年 3 月まで参画
- \*2 平成 24 年 10 月～平成 28 年月まで参画
- \*3 平成 27 年 10 月～参画
- \*4 平成 24 年 10 月～平成 28 年7月まで参画

(参考)

件数はいずれも、平成29年3月末現在。

(1)外部発表件数

	国内	国際	計
論文	1	101	102
口頭	213	53	266
その他	71	10	81
合計	285	164	449

(2)特許出願件数

国内	国際	計
10	4	14

(3)受賞等

- ・三浦恭子  
平成 28 年度 北海道大学 研究総長賞 奨励賞(29.1)
- ・岩部真人  
第 17 回日本臨床分子医学会学術奨励賞(H26.4)  
平成 28 年度 Front Runner of Future Diabetes Research に関する研究助成最優秀賞(H28.7)
- ・椛島健治  
第 1 回 ポーラファルマ Rising Star 賞(H26.9)  
日本学術振興会賞(27.2)
- ・久場敬司  
秋田医学会学術賞(H26.2)
- ・志内哲也

- 日本体力医学会 大塚スポーツ医科学奨励賞(H28. 9)
- ・長井良憲
  - 大学産学交流振興会 平成 27 年度「実用化研究」(H27. 4)
  - 第 36 回日本炎症・再生医学会 優秀演題賞(H27.7)
  - 富山大学産学連携推進研究(H27.12)
  - 北陸産業活性化センター 平成 28 年度「R&D 推進・研究助成」(H28.7)
- ・中岡良和
  - 大阪大学総長奨励賞 (H26.7)
- ・中島友紀
  - 第 33 回日本骨代謝学会 学術賞(H27. 7)
  - 平成 26 年度 ノバルティス・リウマチ医学賞(H26. 6)
- ・中村和弘
  - 日本自律神経学会学会賞(H25. 10)
  - 2014 Henry Pickering Bowditch Award (H26. 4)
  - 第 11 回(平成 26 年度)日本学術振興会賞(H27.2)
  - 第 11 回(平成 26 年度)日本学士院学術奨励賞(H27.2)
- ・藤生克仁
  - 第 4 回万有医学奨励賞(H27.9)
  - 第 4 回万有医学奨励賞 最優秀賞受賞(H27.11)
- ・和氣弘明
  - 文部科学大臣表彰 若手科学賞(H26.4)

(4)招待講演

- 国際 14件
- 国内 105件

別紙

「成体における動的恒常性維持・変容機構の解明と制御」領域 事後評価実施 研究課題名および研究者氏名

(3年型)

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職(平成29年3月末現在) (応募時所属)	研究費 (百万円)
三浦 恭子 (兼任)	超長寿げっ歯類ハダカデバネズミを用いた「積極的老化予防」機構の解明 (北海道大学 遺伝子制御研究所)	北海道大学遺伝子制御研究所 准教授 (慶応義塾大学 日本学術振興会 特別研究員 SPD)	46
岩部 真人 (兼任)	栄養摂取バランスの崩れによる恒常性維持機構の破綻メカニズムの解明 (東京大学医学部付属病院)	東京大学医学部付属病院 特任准教授 (同上 特任助教)	40
上野 将紀 (兼任)	中枢神経傷害における神経回路による恒常性機能の破綻と回復メカニズムの解明 (シンシナチ小児病院医療センター)	新潟大学脳研究所 特任教授 (シンシナチ小児病院医療センター 客員研究員)	40
梶島 健治 (兼任)	皮膚の恒常性維持機構からアレルギー・クロストークへの展開 (京都大学大学院医学系研究科)	京都大学大学院医学系研究科 教授 (同上 准教授)	43
鎌倉 昌樹 (兼任)	女王蜂における寿命制御機構の解明 (富山県立大学工学部)	富山県立大学工学部 講師 (同上)	45
久場 敬司 (兼任)	RNA 分解による生体恒常性維持機構の解明と制御 (秋田大学大学院医学系研究科)	秋田大学大学院医学系研究科 教授 (同上 准教授)	45
久保田 浩行 (兼任)	血中インスリンの時間パターンによる恒常性維持機構の解明 (九州大学生体防御医学研究所)	九州大学生体防御医学研究所 教授 (東京大学大学院理学系研究科 特任准教授)	39
佐藤 卓 (兼任)	組織修復における幹細胞—免疫システム連関機構の解明 (東京医科歯科大学難治疾患研究所)	東京医科歯科大学難治疾患研究所 講師 (同上 特任助教)	40
志内 哲也 (兼任)	中枢・末梢・時間を統合した代謝生理学的ネットワーク機能の解明 (徳島大学大学院医歯薬学研究部)	徳島大学大学院医歯薬学研究部 准教授 (徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部)	40
長井 良憲 (兼任)	生活習慣病における自然免疫系と代謝内分泌系との機能的クロストークの解明 (富山大学大学院医学薬学研究部)	富山大学大学院医学薬学研究部 客員教授 (同上)	40
中岡 良和 (兼任)	内皮細胞を起点とした心血管系の恒常性維持機構の解明と制御 (国立循環器病研究センター)	国立循環器病研究センター研究所 部長 (大阪大学大学院医学系研究科)	44
中島 友紀 (兼任)	運動器の動的恒常性を司るロコモ・サーキットの解明 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科)	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 教授 (同上 准教授)	43
中村 和弘 (兼任)	脳と末梢器官の新たな恒常性維持クロストーク機構の解明 (名古屋大学大学院医学系研究科)	名古屋大学大学院医学系研究科 教授 (京都大学生命科学系キャリアパス 形成ユニット)	40

中村 亨 (兼任)	精神疾患における行動制御系の破綻原理の解明と新規診断技術の開発 (東京大学大学院教育学系研究科)	東京大学大学院教育学系研究科 特任准教授 ( 同上 )	37
藤生 克仁 (兼任)	マクロファージを軸とする細胞間・多臓器間連携による心臓恒常性維持機構の解明 (東京大学医学部付属病院)	東京大学医学部付属病院 特任助教 ( 同上 )	40
和氣 弘明 (兼任)	身体疾患で惹起される免疫変容が起こす神経回路恒常性の破綻と精神症状の解明 (神戸大学大学院医学研究科)	神戸大学大学院医学研究科 教授 (自然科学研究機構基礎生物学研究所)	44

# 研究報告書

## 「超長寿げっ歯類ハダカデバネズミを用いた「積極的老化予防」機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 28 年 11 月

研究者: 三浦 恭子

### 1. 研究のねらい

近年の医学の発展によりヒトの平均寿命は延びつつあるが、がん・脳機能の低下・心疾患・血管疾患などの様々な老化関連疾患により、健康を維持したまま天寿を全うすることは困難であるのが現状である。積極的な老化／老化関連疾患の予防法を開発するためには、既存のモデル動物のみを解析対象とするのではなく、「進化的に長寿化している」と考えられる動物の生体恒常性維持機構を解明することが、極めて重要である。

ハダカデバネズミ(Naked mole rat, NMR)はマウスと同等の大きさながら、最大寿命>30年という異例の長寿齧歯類である。生存期間の8割の期間は、老化の兆候(活動量・繁殖能力・心臓拡張機能・血管機能の低下等)を示さず、その期間は加齢に伴う死亡率の上昇も認められない。超高齢(28才以上)になると加齢性変化(筋肉量の減少、リポフスチンの沈着等)が認められてくるが、自発的な腫瘍形成はほとんど認められていない。つまりNMRは、老化そのものの、そしてがんを含む老化関連疾患に対して、極めて抵抗性を示す特異な哺乳類であると考えられる。

我々は現在、日本の研究機関で唯一のNMR飼育施設を有しており、これまでに、NMRの分子生物学的解析のために必要となる基礎的な研究基盤の構築を進めてきた。

本申請研究では、これまでに確立してきた研究基盤を元に、NMRの老化／老化関連疾患耐性に関わると考えられる、NMR特異的な現象の探索、分子機構の同定を目指して、研究を行った。本さきがけ研究期間中は、NMRの個体数が少なく貴重であったため、NMR-iPS細胞や線維芽細胞などの培養細胞、臓器での遺伝子発現情報を用いて、NMR特異的な老化耐性・がん化耐性現象と、関与する遺伝子に着目し、研究を行った。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

近年、細胞のがん化とリプログラミング過程には共通する多くの防御機構が存在することが明らかとなってきた。今回、老化・がん化耐性齧歯類NMR(図1)からiPS細胞を作製して性状を解析したところ、NMR-iPS細胞は*in vitro*での三胚葉系の細胞への分化能をもつにも関わらず、ヒトやマウス由来のiPS細胞の特徴である、未分化状態での造腫瘍性(奇形腫形成能)を示さないことが明らかとなった。解析の結果、NMR-iPS細胞では、種特異的ながん抑制遺伝子ARFの活性化とがん遺伝子ERASのフレームシフト変異によって腫瘍化耐性が制御されていることが判明した。また、iPS細胞樹立過程の解析から、NMR特異的ながん抑制機構ASIS(ARF suppression-induced senescence)を同定した。



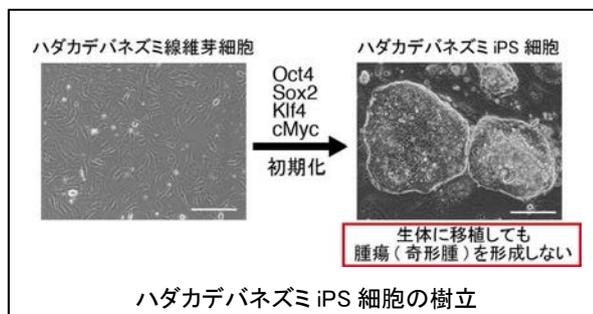
ハダカデバネズミ

ASIS は NMR 特異的な iPS 細胞の腫瘍化耐性に加えて、生体内のがん化耐性にも寄与すると考えられる。本内容は 2016 年に論文化した(論文 1, 学会発表 1, プレスリリース 1)。また、マウスと NMR 間の ARF の配列差について、2015 年に論文化した(論文 2)。次に、NMR の線維芽細胞において細胞老化を誘導したところ、NMR では、ヒト・マウスでは生じない、動物種特異的な「老化細胞死」が生じることを見出した。解析の結果、ある細胞老化関連遺伝子が発現上昇すると、NMR 特異的にアポトーシスが誘導されることが明らかになった。また、*in vivo* で細胞老化を誘導した場合も、マウスと異なり、NMR では細胞老化がほとんど起こらず、細胞死の亢進が認められた。近年、老化細胞の蓄積が個体の老化と密接に関連することが報告されている (Baker et al., *Nature*, 2011, 2016)。NMR 特異的な「老化細胞死」による老化細胞の蓄積の抑制は、NMR 個体の老化耐性の一因であると考えられる。本内容は現在論文投稿準備中である。

## (2) 詳細

### ・研究テーマ A 「NMR-iPS 細胞を用いた NMR 特異的ながん化抑制機構 ASIS の同定」

NMR 皮膚線維芽細胞に、レトロウイルスを用いて Oct4, Sox2, Klf4, cMyc を導入したところ、NMR-iPS 細胞の作製に成功した(右図)。解析の結果、NMR-iPS 細胞は培養下で三胚葉由来の細胞への分化能をもつにも関わらず、未分化な状態で移植しても、他の動物の iPS 細胞のように腫瘍(奇形腫)を

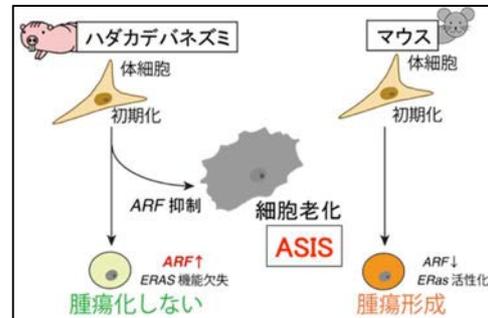


形成しなかった。腫瘍形成能を持つマウスやヒトの iPS 細胞では、2 つのがん抑制遺伝子、Ink4a と ARF の発現が強く抑制されていることが知られている。解析の結果、NMR-iPS 細胞では、INK4a の発現は抑制されているが、ARF の発現は活性化状態にあった。また、マウス ES 細胞の腫瘍形成能を正に制御するがん遺伝子 ERAS の配列を解析したところ、NMR-ERAS で種特異的なフレームシフト変異が生じていた。そこで NMR-iPS 細胞で、ARF のノックダウンとマウス ERAs の導入を行ったところ、腫瘍形成能が獲得された。さらにマウス iPS 細胞で NMR と同様に Arf を発現させると、腫瘍形成能が著しく抑制された。以上から、NMR-iPS 細胞では ARF の活性化と ERAS の機能欠失により腫瘍化耐性がもたらされていると考えられる。

ARF は初期化やがん化のストレスにตอบสนองして活性化し、細胞増殖を止める働きをもつ。ARF による防御機構を突破した細胞が iPS 細胞やがん細胞になると考えられている。実際、iPS 細胞や多くのがんでは ARF が抑制または欠失していることが報告されている。また、マウス iPS 細胞の作製過程で Arf を抑制すると、iPS 細胞の樹立効率が上昇することが知られている。そこで我々は、NMR で同様の実験をおこない、初期化ストレスに対する応答性を検証した。NMR 線維芽細胞に初期化因子を導入して初期化ストレスを与えたところ、マウスやヒトと同様に ARF の活性化が認められた。次に、初期化ストレス下で活性化した ARF をノックダウンしたところ、マウスとは対照的に、NMR 線維芽細胞は増殖を停止して初期化された細胞が出現しなくなった。解析の結果、ARF が抑制された NMR 線維芽細胞では、がん抑制機構の一つであ

る「細胞老化」が生じていた。我々はこの現象を、NMR 特異的な腫瘍化耐性機構のひとつとして、ASIS (ARF suppression-induced senescence)と命名した。NMR では、ASIS により ARF が抑制された細胞が増殖停止するため、対照的に、増殖する細胞である、ARF 活性化型の腫瘍化耐性 iPS 細胞が選択されたと考えられた。解析の結果、cMYC の過剰発現や培養による増殖ストレスなどのがん化ストレス下でも、同様に ASIS が生じることが判明した。

マウスやヒトなどの哺乳類の細胞では、初期化やがん化のストレスを受けると、防御機構としてがん抑制遺伝子 ARF が活性化され、その抑制もしくは破綻の結果として、腫瘍形成能をもつ細胞が出現する。一方で NMR では、ARF の活性化のみならず、活性化された ARF が抑制されてしまう状況下でも ASIS が機能し、二重の防御機構で初期化やがん化を抑制すると考えられた(右図)。



iPS 細胞は、様々な細胞へと分化する多能性を持つことから、細胞移植治療への応用が期待されているが、未分化状態での腫瘍形成能が細胞移植治療の障害の一つになっている。今回明らかになった NMR-iPS 細胞に特有の腫瘍化耐性機構を応用することで、将来、より安全なヒト iPS 細胞の作製につながる可能性があるかもしれない。また、ASIS では、細胞老化誘導において重要な役割をもつ INK4a, p21 の発現上昇が起こらないことが判明しており、その誘導機構は未だ不明である。引き続き分子機構の解明を進めることで、NMR の「体のがん化耐性」の仕組みが明らかになり、将来的にヒトに応用できる新たながん化抑制方法の開発につながることを期待される。

### 3. 今後の展開

これまでの解析により、NMR 特異的な老化耐性機構・がん化耐性機構として、「ASIS」と「老化細胞死」の現象・分子機構の一端が明らかになった。これらの現象は新規かつ NMR 特異的であり、制御機構と誘導因子に関しては、いまだほとんどが不明である。今後、ASIS と老化細胞死の制御機構・誘導因子の解明を目指して研究を推進する。申請者らの最終的な目標は、NMR にて同定した耐性因子を導入することで、マウス個体・ヒト細胞で、NMR の老化耐性・がん化耐性を再現することである。そのため、今後、ASIS 誘導因子・老化細胞死誘導因子を導入した遺伝子改変「デバ化マウス」を作出し、がん化耐性・老化耐性能を獲得させることを目指す。

今回のさきがけ研究では、個体数の制限から、*in vivo* での臓器や生体を用いた解析がほとんど進められなかったのが残念な点であった。しかし、本研究期間での繁殖法の改善が功を奏し、この4年で NMR の頭数は 50 頭から 300 頭に増大し、*in vivo* の解析を行うことが可能になりつつある。現在、さきがけでのネットワークを含めて、日本全国の各分野の専門家と、デバ研究ネットワークを広げていっている。今後、このネットワークを駆使し、様々な解析手段を組み合わせ、ハダカデバネズミの老化耐性・がん化耐性のメカニズムの全容の解明に迫りたい。上述の ASIS、老化細胞死の解析に加えて、組織幹細胞、脂肪、炎症、免疫、ミトコンドリア、腸内細菌、薬剤・遺伝子導入による発がん誘導への応答性などに着目し、共同研究も含めて、研究を展開する。また、現在要望が増大している、CRISPR-Cas9 を用いた遺伝子改変ハダカデバネズミの作出について、系の確立を目指す。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

###### (研究者)

本さがけ研究を実施することで、NMR 特異的ながん抑制機構 ASIS と、NMR 特異的な老化抑制機構「老化細胞死」について、現象・分子機構の一端を明らかにすることが出来た。老化細胞死について論文化まであと一歩であることと、上記現象の誘導因子の同定にはまだ至っていないのが残念な点ではあるが、これまでに立ち上げた基礎的な研究基盤を元に、ほぼゼロの状態から、細胞レベルでの NMR 特異的な老化耐性・がん化耐性現象と機構の一端を明らかにすることが出来たのは、本研究課題での成果であると考えている。本結果に関しては、15年後の社会実装を目指していきたい。また、本研究期間でNMRの繁殖方法の改善に成功し、個体数を50頭から300頭に増加させることができたのも、成果のひとつである。現在も極めて順調に個体数が増加しつつあり、次のステップにおいて、さらに日本における NMR 研究を本格化させて、各研究分野に展開させるための目処を立てることができた。また、研究実施体制・研究費執行についても、適切に運営することで、上記の成果につなげることが出来た。今後、予想外の老化抑制・がん抑制機構の同定を目指すと同時に、将来的にヒトに応用可能な耐性因子の同定を目指して、国内外の各分野の研究者と協力しながら、ハダカデバネズミ研究をさらに深めていきたい。

##### (2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

###### (研究総括)

本研究課題では、老化およびがんを含む老化関連疾患に対して高度の抵抗性と異例の長寿を示すハダカデバネズミ(Naked mole rat, NMR)を対象として、NMR-iPS細胞や線維芽細胞などの培養細胞と臓器での遺伝子発現情報を用いて、NMR 特異的ながん化ならびに老化耐性とそれに関与する遺伝子に着目して検討した。その結果、種特異的ながん抑制遺伝子 ARF の活性化とがん遺伝子 ERAS のフレームシフト変異によってがん化耐性が制御されていることを明らかにした。また、iPS細胞樹立過程の解析から、NMR 特異的ながん抑制機構 ASIS (ARF suppression-induced senescence)を同定し、論文発表を行った。また、NMR 特異的な「老化細胞死」による老化細胞の蓄積の抑制は、NMR 個体の老化耐性の一因であると考えられる結果も得ている。

今後、ASIS と老化細胞死の制御機構・誘導因子の解明を目指して研究を推進し、NMR にて同定した耐性因子を導入することで、マウス個体・ヒト細胞で、NMR の老化耐性・がん化耐性を再現することを目標として研究を発展させることが期待される。

研究期間内にテニュアトラックで独立。さらに、さがけ研究期間にテニュアトラックを終了し准教授に就任し、今後の活躍が十分に期待される。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1)論文(原著論文)発表

1. Miyawaki S, Kawamura Y, Oiwa Y, Shimizu A, Hachiya T, Bono H, Koya I, Okada Y, Kimura T, Tsuchiya Y, Suzuki S, Onishi N, Kuzumaki N, Matsuzaki Y, Narita M, Ikeda E, Okanoya K, Seino K, Saya H, Okano H, **Miura K.**  
Tumour resistance in induced pluripotent stem cells derived from naked mole-rats.  
*Nature Communications*, 2016, 10;7:11471
2. Miyawaki S, Kawamura Y, Hachiya T Shimizu A, **Miura K.**  
Molecular cloning and characterization of the Ink4a and ARF genes in naked mole-rat.  
*Inflammation and Regeneration*, 2014, 35(1):42-50

### (2)特許出願

研究期間累積件数:0件

### (3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

#### 学会発表

1. **Miura K.**, Tumour resistance in induced pluripotent stem cells derived from naked mole-rats.  
Cold Spring Harbor Meeting, Mechanisms of Aging, アメリカ、ニューヨーク、2016年9月27日
2. **三浦恭子**, 長寿・がん化耐性ハダカデバネズミの分子生物学  
第39回日本分子生物学会年会 公募シンポジウム、日本、神戸、2015年12月1日

#### 受賞

平成28年度 北海道大学 研究総長賞 奨励賞

#### プレスリリース・報道・取材

1. がんになりにくい長寿ハダカデバネズミから初めてiPS細胞作製に成功  
2016年5月10日 URL:<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20160510/>  
同プレスリリースについて、朝日新聞デジタルを始め、ウォール・ストリート・ジャーナル日本版、日本経済新聞、北海道新聞、京都新聞、神戸新聞、日刊工業新聞などの紙面、オンライン版に掲載された。北海道医療新聞では特集として掲載された。
2. 朝日新聞出版「AERA」2014年12月29日-1月5日合併号で、「日本を突破する100人」として紹介された。

# 研究報告書

## 「栄養摂取バランスの崩れによる恒常性維持機構の破綻メカニズムの解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 岩部 真人

### 1. 研究のねらい

地球上の全ての生物の進化は、飢餓や低栄養に対する適応の歴史であり、人類も含め、生物の寿命はこれらの環境因子によって規定されてきた。実際、飢餓や低栄養、それに伴う免疫力の低下による感染症がヒトの死因の上位を占めていたことは記憶に新しい。一方で、これら外界からのストレスを何とかして克服し、生命を紡ぐために、生物は長い年月をかけて飢餓や低栄養に対する様々な恒常性維持機構、この場合、“飢餓に対する代償システム”（≡ 儉約シグナル）を勝ち取ってきた。ところが20世紀後半より、人類は歴史上未経験の未曾有の過栄養の時代を迎え、この過栄養が全身での長期にわたる免疫反応を基盤とした生活習慣病を引き起こし、その結果、心血管疾患、悪性腫瘍が現代人の主な死因となり、寿命を短縮している。これまでの進化の過程上、未体験であるがゆえに、生物にはこの過栄養に対する代償システムはほとんど備わっておらず、栄養摂取バランスの破綻に対し、現代人の恒常性維持機構、この場合、“栄養に対する代償システム”は容易に崩壊してしまう。そのため、このような短期間の劇的な栄養・環境の変化によりもたらされる問題を抜本的に解決するためには、“栄養に対する代償システム”の根源を俯瞰的に理解し、生体内における恒常性の破綻メカニズムの解明が不可欠である。

この“栄養に対する代償システム”の破綻メカニズムの一部として、栄養摂取バランスの崩れに伴って、脂肪細胞から分泌される生理活性物質アディポネクチンの低下、さらに全身の各組織におけるアディポネクチン受容体 (AdipoR) の低下が、メタボリックシンドローム・2 型糖尿病激増の主因になっていることが国内外の研究より明らかになっている。さらに私は、アディポネクチン/ AdipoR が、カロリー制限や運動により活性化される健康長寿シグナルを介して代謝作用を高めると共に、細胞内ストレスを低減させるなど、過栄養に対する恒常性維持機構を有することを明らかにし、報告してきた (*Nature Med.* 2007; *Nature* 2010)。

本研究課題では、栄養に対する代償システムの恒常性維持機構をアディポネクチンとその受容体という切り口を中心として、その破綻メカニズムと破綻により生じる疾患の分子メカニズムを解明し、先制医療実現への貢献を目指した。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

我が国では、糖尿病とその合併症の患者数は増加の一途をたどり、平成 26 年国民健康・栄養調査によると、糖尿病が強く疑われる人の割合は、男性で 15.5%、女性で 9.8%にものぼる。従って、より一層効果的な糖尿病・生活習慣病対策が必要であり、より根本的な治療に向けた研究推進が必須であり、社会的要請も高い。

本研究課題では、研究課題(1)「免疫細胞・実質細胞における“栄養に対する代償システム”破綻メカニズムの解明」研究課題(2)「栄養摂取バランスの崩れにより発症する動脈硬化症の分子メカニズムの解明」研究課題(3)「栄養摂取バランスの崩れにより発症する悪性腫瘍の分子メカニズムの解明」について、アディポネクチンとその受容体である AdipoR を切り口とし、“栄養に対する代償システム”の破綻メカニズムと栄養摂取バランスの破綻により生じる動脈硬化、悪性腫瘍の発症分子メカニズムを解明した。さらにそのメカニズムの解明の過程において、AdipoR 活性化低分子化合物の取得に成功した。この化合物は、経口投与可能で、AdipoR に直接結合し、実際に抗糖尿病作用を発揮した。また、“栄養に対する代償システム”が崩壊した AdipoR 欠損マウスは短命であり、AdipoR 活性化低分子化合物は過栄養に対する代償作用を強く発揮し、生活習慣病モデルマウスの短くなった寿命を回復することを明らかにした(*Nature* 503: 493, 2013)。この化合物をシーズとして、臨床応用に向けたヒトへの最適化は、重要な課題である。そのためのツールとしてもさらに、AdipoR の機能解明においても AdipoR の立体構造情報は非常に有用であり、世界中の研究機関によりその解明が急がれていたがこれまで明らかになっていなかった。その背景として、AdipoR が7回膜貫通型受容体でありながら G タンパク質共役受容体とは逆の膜トポロジーを持つため結晶化が最難関であったことが挙げられる。従ってあらゆる膜タンパク質生産技術を駆使し、AdipoR の立体構造を決定した(*Nature* 520: 312, 2015)。このことより、恒常性維持機構における AdipoR の意義や機能解明の研究推進に強力なツールを得ただけでなく、AdipoR の立体構造情報に基づく、AdipoR 活性化低分子化合物のヒトへの最適化の加速も期待できる成果が得られた。

## (2) 詳細

### 研究課題(1)

#### 「免疫細胞・実質細胞における“栄養に対する代償システム”破綻メカニズムの解明」

アディポネクチン/AdipoR シグナルを増強し、代謝能の質を変化させることは、過栄養により破綻した個体の代謝環境を健常化すると考えられる。従って、AdipoR 活性化薬は、メタボリックシンドローム・2型糖尿病・動脈硬化の根本的な治療薬となることが強く期待され、その開発が待たれていた。東京大学の創薬オープンイノベーションセンターの化合物ライブラリーなどをもとにスクリーニングし、AdipoR 活性化低分子化合物(Adiponectin Receptor Agonist; AdipoRon)の取得に成功した。AdipoRon は、AdipoR に直接結合し、AMPK を活性化、ミトコンドリア機能を上昇させ、個体レベルでは AdipoR を介して抗糖尿病作用を発揮することを明らかにした(*Nature* 503: 493-498, 2013)(図1)。

さらに、AdipoR 活性化低分子化合物(Gain of function)と各組織特異的 AdipoR 欠損マウス(Loss of function)をツールとして駆使し、免疫細胞における AdipoR1 が、過栄養により惹起されるインフラマソーム活性を抑制すること、一方で実質細胞における AdipoR1 および AdipoR2 を介し AMPK/SIRT1/PPAR 経路を活性化し、実質細胞-免疫細胞間での恒常性の維持に寄与し、最終的には全身でのインスリン抵抗性を改善することを明らかにした(未発表)。

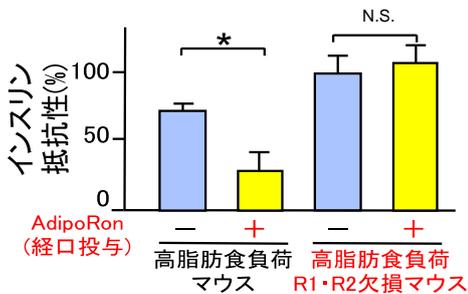
### 研究課題(2)

#### 「栄養摂取バランスの崩れにより発症する動脈硬化症の分子メカニズムの解明」

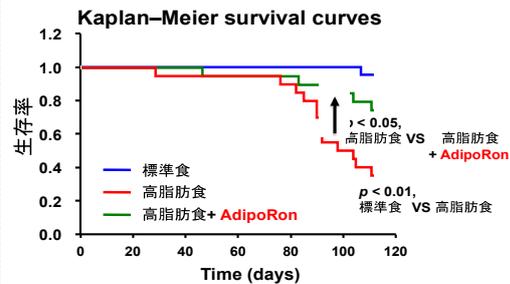
図1

## アディポネクチン受容体活性化低分子化合物 (AdipoRon, Adiponectin Receptor Agonist) の取得に成功

AdipoRonは、  
インスリン抵抗性を改善する



AdipoRonの経口投与により、高脂肪食負荷によって短くなった寿命は改善した



Nature, 503, 493-499, 2013

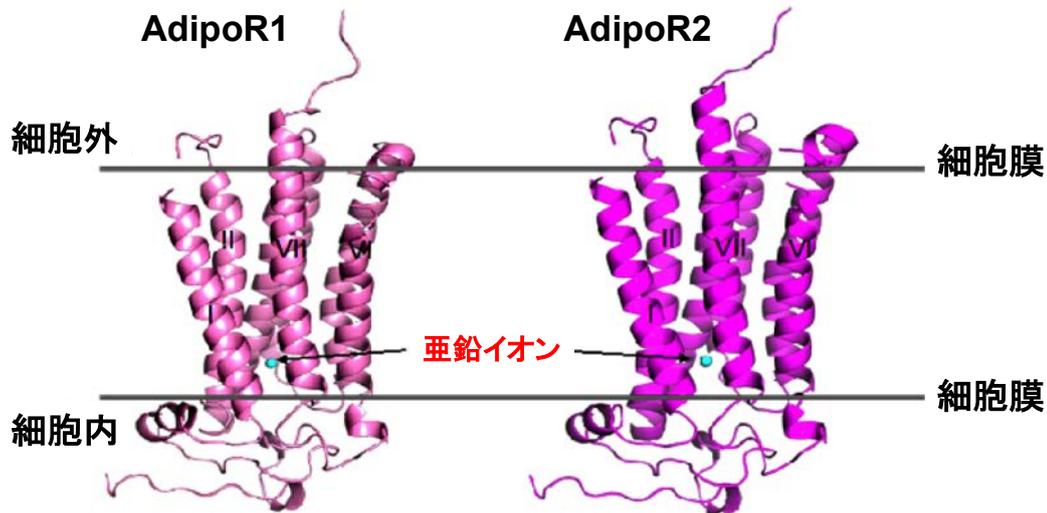
栄養摂取バランスの崩れにより発症する動脈硬化症の原因の一部として、血中のアディポネクチンレベルの低下が関与していることが、国内外の臨床研究を含めた研究より明らかになっている。しかしながら、その作用における AdipoR の意義およびその詳細なメカニズムについては、不明であった。

高脂肪食負荷マウスおよび動脈硬化モデルの ApoE 欠損マウスの血管(実質細胞)において AdipoR2 の発現が低下し、さらに、抗動脈硬化作用を有する PPAR $\gamma$ 、酸化ストレス消去にかかわる SOD1 の発現が有意に低下し、肥満・2 型糖尿病などの病態の血管では AdipoR2 が病態生理的に重要な役割を果たしていることが明らかになった(未発表)。また、Loss of function の実験系として、血管内皮特異的 AdipoR2 欠損マウスを作製し解析を行ったところ、このマウスでは、カフ障害による内膜肥厚が増悪することが分かり、血管内皮における AdipoR2 が抗動脈硬化作用を有することが明らかになった(未発表)。一方で、AdipoR1 欠損マウスの骨髓を移植したマウスでもカフ障害による内膜肥厚が増大することが分かり、骨髓における AdipoR1 が抗動脈硬化作用を有することも明らかになった(未発表)。さらに、AdipoR 活性化低分子化合物は、免疫細胞における AdipoR1 と実質細胞における AdipoR2 を介し、抗動脈硬化作用を有することも明らかにした(未発表)。

これまで、AdipoR は、G タンパク質共役受容体(GPCR)とは、膜への配向が逆である 7 回膜貫通型の受容体であると推測していた。GPCR は、G タンパク質との複合体の構造解析などにより、その活性化機構が明らかになりつつある一方で、AdipoR の構造は未知であった。従って、AdipoR の立体構造を明らかにすることは、その構造から AdipoR の新たな機能解明のみならず、構造ベース創薬への応用にも展開が広がると考えてきた。AdipoR の発現系および精製法を構築し、さらに AdipoR の構造を認識する抗体を作製し、AdipoR と抗体との複合体を脂質メソフェーズ法により結晶化した。得られた結晶から AdipoR1 および AdipoR2 の結晶構造をそれぞれ分解能 2.9 Å および分解能 2.4 Å で決定することに成功し、一連の立体構造解析から、AdipoR は、GPCR とは全く異なった構造及び機能を持つことが明らかになった(Nature 520: 312-316, 2015)(図2)。

図2

## AdipoRの立体構造を明らかにした



*Nature*, 520, 312-316, 2015

### 研究課題(3)

「栄養摂取バランスの崩れにより発症する悪性腫瘍の分子メカニズムの解明」

実験的・疫学的研究により過栄養・飽食の状態では、哺乳類など多臓器を有するような生物を含め、恒常性維持機構の破綻による老化が促進し、その結果、個体寿命が短縮することが分かっている。観察事実として栄養状態と老化の速度には深い関係があり、これには各臓器での様々な栄養素に対する代謝・ストレス応答などの生体反応が存在し、それらが統合されて個体の寿命の決定に至っているものと考えられる。

大変興味深いことに、“栄養に対する代償システム”が崩壊した AdipoR 欠損マウスは短命であることが明らかになった(*Nature* 503: 493-498, 2013)。さらに、その寿命が短くなる原因の一部として、AdipoR 欠損マウスでは悪性腫瘍(肝細胞癌、大腸癌等)の頻度が増加することが分かり、その詳細なメカニズムの一部として、腸内細菌叢が関与していることを明らかにした(未発表)。さらに、AdipoR 活性化低分子化合物は、過栄養に対する代償作用を強く発揮し、生活習慣病モデルマウスの短くなった寿命を回復することも明らかにした(*Nature* 503: 493-498, 2013)(図1)。

### 3. 今後の展開

現代社会においては、過食・運動不足による肥満を病態基盤とするメタボリックシンドローム・糖尿病・心血管疾患・悪性腫瘍が激増しており、そのような現状に対し、代謝経路制御を基盤とした健康長寿を実現する方法が世界中で待望されている。これまでに、肥満に伴う AdipoR の作用低下が、メタボリックシンドローム・2 型糖尿病の原因になっていることを明らかにしてきたが、本研究課題の遂行により、AdipoR 経路の活性化が抗動脈硬化作用、

悪性腫瘍抑制作用を発揮することを明らかにした。さらに、そのメカニズム解明の過程で、先制医療のコンセプトではなく、確かな手がかりと方法論として、AdipoR 活性化低分子化合物の取得と AdipoR の立体構造解析に成功した。得られた AdipoR の立体構造情報は、AdipoR の新たな機能解明に繋がるのみならず、AdipoR 活性化低分子化合物の臨床応用に向けたヒトへの最適化を推進し、その成果は、新規糖尿病治療薬さらにはその合併症治療薬の開発を加速することが期待される。

#### 【研究成果の科学技術への波及効果】

AdipoR は、GPCR とは逆向きのトポロジーを持つ 7 回膜貫通型受容体であり、新規の受容体ファミリーを形成している。構造生命科学分野の発展と貢献により、最近では、高難度とされていた GPCR の立体構造が徐々に明らかとなっており、その構造解析情報も次第に蓄積されつつある一方で、AdipoR は、GPCR よりさらに結晶化が難しく、構造解析は極めて困難であった。AdipoR は新規の受容体ファミリーであるがゆえに、分子レベルでの活性制御メカニズムやシグナル伝達機構等、未知の部分も多く残されていたが、AdipoR の立体構造解析の成功により、新たな受容体ファミリーの全容を明らかに出来つつある。今回の研究成果は、新規の生活習慣病治療薬への開発のみならず、新規の膜貫通型受容体研究の学術的発展に貢献することも期待される。

#### 【研究成果の社会・経済への波及効果】

糖尿病が強く疑われる人の割合は、男性で 15.5%、女性で 9.8% (平成 26 年国民健康・栄養調査) にのぼり、医療費の面からも、糖尿病・生活習慣病の克服は、活力ある高齢化社会の実現に向けて、行政上極めて重要な課題である。本研究課題の成果は、これまでにない代謝改善作用メカニズムを有した副作用の少ない新規メタボリックシンドローム・糖尿病・動脈硬化治療薬の開発の道を切り開き、経済的な貢献をもたらす可能性があると考えている。

## 4. 評価

### (1) 自己評価

#### (研究者)

本研究課題では、アディポネクチンとその受容体である AdipoR を切り口とし、“栄養に対する代償システム”の破綻メカニズムと栄養摂取バランスの破綻により生じる動脈硬化、悪性腫瘍の発症分子メカニズムを解明することができた。また、研究は予想以上に進展し、AdipoR の機能解明に有用となる AdipoR 活性化低分子化合物及び AdipoR の立体構造情報の取得に成功し、先制医療の実現に向けた新規生活習慣病治療薬となるシーズの創出、さらには臨床応用に向けた基盤となる技術の確立にも展開でき、本領域の戦略目標と照らし合わせても、研究目的は概ね達成できたと思われる。また、新たな膜貫通型受容体研究の学術的意義、生活習慣病抑制に向けた社会的意義を持つなど、様々な波及効果も期待できると考えている。

研究代表者自身は代謝学が専門でありながら、循環器領域、がん領域のテーマでも予想以上に研究が進展できたと考える。その理由は、このさきがけ領域【生体における動

的恒常性維持・変容機構の解明と制御】の研究者が、それぞれの専門分野の最先端を走っており、それぞれの専門分野の垣根を越えて、一同に集結した「さきがけラボ」であったことが挙げられる。分野を跨いだディスカッションは時には思いも寄らないアイデアを生み、個々の研究者が得意とする専門性の高い高度な技術の共有は、一個人では突破できなかった壁を乗り越える大きな推進力となり、また複数のテーマが共同研究といった形に発展した。研究実施期間終了後も、このさきがけ領域により築かれたネットワークは、より学術的に高度に発展・拡大する体制を取り、今後も更なる研究成果を出し続ける新たな学問領域の創成が見込まれ、その挑戦に、研究代表者自身も貢献したいと考える。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

本研究はアディポネクチンとその受容体である AdipoR を切り口とし、“過栄養に対する代償システム”の破綻とその結果により生じる動脈硬化ならびに悪性腫瘍の発症メカニズムの解明を目指した。AdipoR 活性化低分子化合物(Adiponectin Receptor Agonist; AdipoRon)の開発に成功し、AdipoRon が AdipoR に直接結合し、AMPK を活性化、ミトコンドリア機能を上昇させること、個体レベルでは AdipoR を介して抗糖尿病作用を発揮することを明らかにして、成果を論文として発表した。また、AdipoR の結晶構造を決定することに成功し、GPCR とは全く異なった構造及び機能を持つことも論文として発表した。さらに AdipoR 欠損マウスは短命であり、悪性腫瘍(肝細胞癌、大腸癌等)の頻度が増加することが分かり、AdipoR 活性化低分子化合物が寿命を回復することも論文発表している。今後の AdipoR の新たな機能解明研究および AdipoR 活性化低分子化合物の臨床応用が期待される。

成果としての論文発表、学会発表、特許の取得が多数あり、今後の活躍が十分に期待できる。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Okada-Iwabu M\*, Yamauchi T\*, Iwabu M\*, Honma T, Hamagami K, Matsuda K, Yamaguchi M, Tanabe H, Kimura-Someya T, Shirouzu M, Ogata H, Tokuyama K, Ueki K, Nagano T, Tanaka A, Yokoyama S and Kadowaki T. A small-molecule AdipoR agonist for type 2 diabetes and short life in obesity. *Nature* 503, 493–498, 2013 (\*These authors contributed equally to this work.)
2. Kadowaki T, Yamauchi T, Okada-Iwabu M and Iwabu M. Adiponectin and its receptors: Implications for reduction of obesity-associated diseases and prolongation of longevity. *The Lancet Diabetes and Endocrinology* 2, 8–9, 2014
3. Iwabu M, Okada-Iwabu M, Yamauchi T, Kadowaki T. Adiponectin/adiponectin receptor in disease and aging. *npj Aging and Mechanisms of Disease* 1, 15013, 2015
4. Tanabe H, Motoyama K, Ikeda M, Wakiyama M, Terada T, Ohsawa N, Hosaka T, Hato M, Fujii

Y, Nakamura Y, Ogasawara S, Hino T, Murata T, Iwata S, Okada-Iwabu M, Iwabu M, Hirata K, Kawano Y, Yamamoto M, Kimura-Someya T, Shirouzu M, Yamauchi T, Kadowaki T and Yokoyama S. Expression, purification, crystallization, and preliminary X-ray crystallographic studies of the human adiponectin receptors, AdipoR1 and AdipoR2. *J Struct Funct Genomics*. 16, 11-23, 2015

5. Tanabe H, Fujii Y, Okada-Iwabu M\*, Iwabu M\*, Nakamura Y\*, Hosaka T, Motoyama K, Ikeda M, Wakiyama M, Terada T, Ohsawa N, Hato M, Ogasawara S, Hino T, Murata T, Iwata S, Hirata K, Kawano Y, Yamamoto M, Kimura-Someya T, Shirouzu M, Yamauchi T, Kadowaki T and Yokoyama S. Crystal structures of the human adiponectin receptors. *Nature* 520, 312-316, 2015 (\*These authors contributed equally to this work.)

## (2)特許出願

研究期間累積件数:3件

1.

発明者: 門脇 孝, 山内 敏正, 岩部 美紀, 岩部 真人, 横山 茂之, 本間 光貴

発明の名称: アディポネクチン受容体活性化化合物

出願人: 東京大学

出願日: 2014/9/30

出願番号: PCT/JP2014/076185

## (3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表(招待講演)

1. 岩部 真人 第36回日本炎症・再生医学会(2015年7月21日 東京)「腸内細菌と代謝疾患」(招待講演)
2. 岩部 真人 フォーラム富山 創薬 第42回研究会(2015年9月15日 富山)「アディポネクチン受容体アゴニストの開発」(招待講演)
3. MASATO IWABU The 8th Asia-Oceania Conference on Obesity (2015年10月4日 Nagoya, Japan)「Crystal structures of the human adiponectin receptors」(招待講演)
4. 岩部 真人 高度医療都市を創出する未来技術国際シンポジウム 生命医用工学の新展開(2016年3月10日 岡山)「アディポネクチン受容体シグナル伝達機構の解明と創薬への展開」(招待講演)
5. 岩部 真人 第59回日本糖尿病学会年次学術集会(2016年5月20日 京都)「アディポネクチン受容体をターゲットにした運動模倣薬開発への挑戦」(招待講演)

受賞

1. 岩部 真人 第17回日本臨床分子医学会学術奨励賞(2014年4月12日)「アディポネクチン受容体活性化経路の運動模倣効果の検討と糖尿病治療薬開発への応用」
2. 岩部 真人 平成28年度 Front Runner of Future Diabetes Research に関する研究助成最優秀賞(2016年7月24日)「アディポネクチン受容体を介する運動模倣効果の検討」

## 著作物

1. 岩部 真人, 山内 敏正, 岩部 美紀, 門脇 孝:【糖尿病と合併症(前篇) 糖尿病】「2 型糖尿病、インスリン抵抗性 アディポネクチンの生理学と創薬への期待」:最新医学(最新医学社)70 巻 3 月増刊, 564-571, 2015
2. 岩部 真人, 山内 敏正, 岩部 美紀, 門脇 孝:【臓器連関による代謝制御を中心とした恒常性維持と生活習慣病】「アディポカインによる代謝制御と生活習慣病」:内分泌・糖尿病・代謝内科(科学評論社)42 巻 5 号, 311-315, 2016
3. 岩部 真人, 山内 敏正, 岩部 美紀, 門脇 孝:【特集 生活習慣病と栄養～カルシウム・ミネラル管理の側面より～】「アディポネクチン受容体を標的とした生活習慣病治療」:CLINICAL CALCIUM(医薬ジャーナル社)26 巻 3 号, 73-78, 2016
4. 岩部 真人, 山内 敏正, 岩部 美紀, 門脇 孝:【新時代の臨床糖尿病学(上)-より良い血糖管理をめざして-】「糖・エネルギー代謝制御因子 脂肪細胞・アディポカイン アディポネクチンの分泌機構と全身の作用」:日本臨床(日本臨床社)166-169, 2016
5. 岩部 真人, 山内 敏正, 岩部 美紀, 門脇 孝:【“運動”を科学する】「運動模倣薬の開発」:Medical Science Digest(北隆館)42 巻 1 号, 29-32, 2016

## プレスリリース

1. 「アディポネクチン受容体を活性化して健康長寿を実現する内服薬の種を発見 -アディポネクチン受容体を活性化する内服薬が、運動と同様の効果をもたらし、メタボリックシンドロームや糖尿病の治療薬となることが期待-」, 東京大学, 2013 年 10 月 31 日
2. 「糖・脂質代謝に重要なアディポネクチン受容体の立体構造を解明 -メタボリックシンドローム・糖尿病治療薬の開発へ前進-」, 東京大学, 2015 年 4 月 9 日

# 研究報告書

## 「中枢神経傷害における神経回路による恒常性機能の破綻と回復メカニズムの解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 上野 将紀

### 1. 研究のねらい

外傷や血管障害により中枢神経系が傷害されると、神経回路網の破綻に伴い、運動・感覚といった身体機能や自律神経・免疫系をはじめとする恒常性維持機構が失われ、重大な障害をもたらす。これら脳や脊髄の障害に対する有効な治療法は未だ確立されていない。機能回復をもたらすには、破綻した神経回路を新たに作り直すことが必要であるが、成体において回路が再生する能力はきわめて限定的であり、完全な機能回復には至らない。一方で、一度失われた機能は、その後一定の回復傾向を示したり、あるいは逆に増悪するなど変容することが知られており、病態の回復過程を大きく左右していく。これら機能の変化には、残存した回路の可塑的・代償的变化が寄与すると推定されているが、その実体は不明のままである。回路が可塑的に変化する機序が明らかになれば、その変化を制御することで、回路の再建と機能の回復をうながす重要な治療戦略となる可能性がある。

本研究では、「運動および自律神経、免疫制御の神経回路」に着目し、中枢神経の障害後に代償性に変化する神経回路の実体を明らかにするとともに、その回路の形成機序の解明に挑む。これら解析から、神経回路がおよぼすと考えられる生体恒常性の破綻および回復過程の実体を明らかにする。最終的には、回路を再建し恒常性機能の回復をもたらす治療戦略の構築を目指す。本研究の成果をもとに、中枢神経の障害後に正しい神経回路の形成を促し機能を回復へと導くことが可能となれば、脳や脊髄の障害に対して有用な治療方法となることが期待できる。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究では、健常脳、障害脳における神経回路の詳細な接続様式と機能の解析を行うことにより、神経回路が通常どのように動作し、また障害後に、どのような回路の変化が生体の恒常性を破綻させ、あるいは回復に寄与するかを、「運動および自律神経、免疫制御の神経回路」に着目して明らかにした。

まず免疫機能を制御する自律神経回路に着目し、解析を行った。その結果、脊髄損傷後に起こる免疫機能の低下が、免疫を制御する神経回路の異常な活動により引き起こされることを発見した。脳・脊髄障害後の死亡要因の第一位は感染症であり、免疫機能の低下がその要因であると考えられているが、免疫機能が低下するメカニズムは不明のままであった。その原因として本研究では、免疫器官である脾臓と接続する神経回路に着目した。その結果、脊髄損傷により一度回路が破綻すると、免疫器官を制御する回路が、脊髄内で代償的に新たな回路網を形成することを見いだした。新たな回路内での神経細胞の活動を遮断すると、

免疫機能の低下が回復することを明らかにした。本研究から、脊髄の障害後に神経原性に起こる免疫機能低下の新たな病態メカニズムが明らかになった。神経系を制御して免疫機能を改善する新たな治療法の開発につながると期待される。

また、筋と接続して運動機能を制御する神経回路の解析も行った。その結果、健常脳内において複雑な運動機能を制御する根幹となる回路を見出した。この成果は、障害後、機能を回復するにはどのような回路の再建が必要であるのか、その神経基盤を明らかにするものである。さらには、脊髄の障害後に、運動回路の再生を抑制している分子3種を新たに見出した。これら分子は、機能的な回路を再建するための重要な治療標的分子になると期待される。

## (2) 詳細

### 研究テーマA「脊髄損傷後の自律神経回路の再編による免疫機能低下のメカニズムの解明」

脊髄損傷患者の死亡要因は、肺炎や敗血症を伴う感染症が第一位である。これら感染症は、免疫機能の低下により発症すると考えられるが、なぜ脊髄の障害で免疫機能が低下するのか、その原因は不明のままであった。

本研究では、免疫機能を制御する自律神経回路に着目し、それら回路が、脊髄損傷後の免疫機能の変化にいかに関わるか探ることを目的とした。脊髄損傷後、自律神経系の破綻により起こる症状として、自律神経過反射が知られる。この病態では、血圧の急上昇とそれに伴う心拍数の低下、頻繁な発汗や頭痛など、自律神経機能の異常を引き起こす。これら症状は、交感神経系の過剰な活性化により起こると考えられている。通常、交感神経系は脳幹部から胸髄へと至る神経回路により適切に活動が制御されているが、この回路が脊髄損傷により破壊されると、損傷部より下位の交感神経回路が制御を失い、過剰に活性化してしまうとされる。交感神経系の最終神経伝達物質であるノルアドレナリンが免疫細胞に対し負の作用を持つことが知られることから、本研究は、免疫器官に接続する交感神経の過活動が、免疫器官の機能を抑制する可能性について検討した。

まず、免疫器官である脾臓と接続する交感神経回路が、脊髄損傷後どのように変化するか解析した。脳や脊髄から脾臓へ至る神経回路は、複数の神経細胞の接続により成り立つが、この回路に組みする神経細胞を標識するため、経シナプス逆行性トレーサーである Pseudorabies virus (PRV) を脾臓に注入し、回路網を可視化した。脊髄損傷後の回路を観察した結果、損傷部より下位の脊髄内において、回路に接続する神経細胞数の増加が観察された。すなわち、損傷後に脾臓と接続する神経回路が再編し、新たな回路網を形成することが明らかになった。

脊髄内の交感神経回路を構成する神経細胞は、脊髄からの最終出力細胞である交感神経節前ニューロンと脊髄介在ニューロンである。損傷後の回路網に新たに組み込まれた神経細胞の種類を調べたところ、Vglut2 陽性の興奮性脊髄介在ニューロンであった。したがって、これら興奮性細胞が回路網に新たに加わることで交感神経が過剰に活性化し、免疫機能を低下させると想定された。この事象を確認するため、ケモジェネティクス(化学遺伝学的手法)により、興奮性神経細胞の活動を遮断する方法を確立した。人工的に改変した Gi タンパク質共役型のムスカリン受容体 hM4Di を、アデノ随伴ウイルス(AAV)をベクターとして、Vglut2 陽

性の脊髄介在ニューロンのみを発現させ、次に、脊髄損傷後にhM4DiのリガンドCNOを長期間投与し、Vglut2陽性神経細胞の活動を抑制した。マウスにおいて、脊髄損傷後には、脾臓の萎縮と免疫細胞の減少を伴う免疫機能の低下が観察されたが、Vglut2陽性神経細胞の活動を抑制すると、脾臓の萎縮と免疫細胞の減少を顕著に抑えることができた。これら結果から、脊髄損傷後、損傷部の下位において残存した脾臓に接続する交感神経回路が、興奮性神経細胞との接続を増やして変化し、この回路の活性化が免疫機能を低下させることが明らかになった。

本研究から、脊髄の障害後に、神経回路が変化して免疫機能を低下させる新たな病態メカニズムを明らかにすることができた。本成果は、*Nat Neurosci.* 19(6): 784-787, 2016にて発表した(主な研究成果リスト、論文1)。

### 研究テーマB「中枢神経系-筋をつなぐ運動回路の接続解析」

運動機能は、上位中枢と脊髄を結ぶ多様な回路により成り立つとされるが、なかでも大脳皮質と脊髄を結ぶ「皮質脊髄路」は、自発・巧緻運動に必須の重要な回路とされる。この回路は、脳や脊髄の障害においてしばしば破綻し、重篤な運動障害を引き起こすことから、本回路を再建する手法の確立が求められている。この回路は私たちの以前の研究で、脳の障害後に可塑的に変化し、新たにできた回路が自然回復に寄与することが示されている(Ueno et al., *Brain* 2012)。神経回路が再編する機序をより詳細に解明するには、そもそも健常状態での回路の構成や動作原理を明らかにする必要がある。特に皮質脊髄路が、どのような接続様式をもって複雑な巧緻運動を制御するのか、その原理はほとんどわかっていなかった。

本研究では、遺伝子改変マウスや神経トレーサーを駆使して、皮質脊髄路の接続様式を詳細に解析した。その結果、同回路のなかに多様な内在回路が存在することを見出した。本成果は、運動を制御する神経回路の動作原理の解明に寄与するとともに、障害後、機能を回復するにはどのような回路の再建が必要であるのか、その神経基盤を明らかにするものである。本成果は、未発表である。

### 研究テーマC「新規の回路形成促進モデルの開発」

成体において軸索の伸長や再生が起こりにくい要因として、1)軸索周囲環境に存在する軸索伸長阻害因子(外的要因)、2)軸索伸長を促す神経細胞内シグナルの枯渇(内的要因)が考えられている。これまで多くの軸索伸長阻害因子(MAG, Nogo, OMgp, Ephrin, RGM, CSPGなど)が同定されているが、これらを単独で除去しても軸索の再生は顕著には起こらないため、再生を効果的に促す分子標的の探索が求められている。

本研究では、軸索伸長の反発を担う軸索ガイダンス分子 Semaphorin ファミリー、細胞骨格を制御する低分子量Gタンパク質 RhoA、mTOR pathwayの阻害蛋白であるPTENを標的に、外的・内的要因を排除する遺伝子改変マウスを用いて、脊髄損傷により破綻した運動回路の再生を促すことができるか検討した。その結果、皮質脊髄路の再生を促進する実験モデルの開発に成功した。これら分子は、機能的な回路を再建するための重要な分子標的になると期待される。本成果は、未発表である。

### 3. 今後の展開

本研究から、中枢神経系の障害後に、神経回路の変化により交感神経回路が活性化し、免疫機能が低下する新たな病態メカニズムが明らかになった。免疫系に対する神経回路の動作原理を詳細にし、その活動を効果的に制御できるようになれば、免疫機能を改善し感染症のリスクを抑える新たな治療法の開発に結びつくと期待される。

また交感神経回路の活性化は、免疫系のみならず、血圧や心拍数、消化機能、体温、発汗など、多岐にわたる自律神経機能にも影響を与える。本研究の成果は、脳や脊髄の障害後に起こる、これら機能の疾患メカニズムの理解へも結びつくと期待される。

本研究から、中枢神経系が障害を受けると、残存した回路が変容し機能回復へ影響を与えることがわかってきた。障害脳、健常脳双方を対象に、回路の構成、動作原理、形成機序を探索し、障害後に回路が変容するメカニズムを理解することで、機能回復へ導く適切な接続を持った神経回路を再建することが可能になると期待される。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

研究目的の達成状況: 本研究では、免疫や運動回路を軸として、中枢神経系の障害後に、神経回路の変化によって恒常性機能が破綻し、また変容していくメカニズムを解明することを目指した。その結果、脊髄損傷後の回路の再編により免疫機能が低下していくという新しい病態メカニズムを明らかにすることができた。また、運動回路の再編過程を解析するために必須であった、健常脳における運動回路の詳細な接続様式と動作原理を明らかにすることができた。またこの回路の再生促進モデル2種の開発にも成功した。これら成果から、運動回路の機能的な再編をうながすための重要な基礎データ、技術基盤を確立できた。本研究を通して、上記計4つの大きな課題を解決し、当初の目標をおおむね達成できたと考える。

研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況): データ収集・解析補助、実験動物管理等で研究補助員や学生と協力する研究実施体制を構築した結果、効率よく研究を進行することができた。研究費は、1. 各神経細胞種をラベルする多様な遺伝子組換えマウスの作成・入手とその維持費、2. 神経回路をラベルし制御することを可能とする多様なウイルス、ツールの作成・入手費用、3. 神経回路解析に必要な各種試薬類の購入費、等に主に使用し、その結果、健常脳、障害脳双方における回路の詳細な接続様式と動作原理を明らかにすることができた。

研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む): 本研究では、脳や脊髄の障害後に、回路が障害後に再編し、機能の変容をもたらすことを明らかにした。特に、回路の変化が免疫低下を引き起こすという新しい病態メカニズムを示すことができた。この成果は、原因のわからなかった脊髄障害後の免疫機能低下に対する新たな治療標的を提示するものである。また、その他脳脊髄の障害後に起こる自律神経疾患に対しても、病態メカニズムへ多くの示唆を与えると考えられる。また運動を司る神経回路については、回路の基礎となる動作原理や再生をうながすための分子標的を明らかにした。これら成果は、中枢神経の障害後に、機能回復へと導く回路を再建するための重要な足がかりとなり、霊長類での研究を経て、将来的には、ヒトでの脳脊髄障害の治療法へ貢献することが期待される。

その他領域独自の評価項目: 本研究では、神経-免疫システムを新たな臓器連関ととらえ、脊髄

の障害を起点として、時間経過とともに免疫の恒常性維持機構が破綻していく神経原性の免疫機能低下のメカニズムを明らかにした。この成果は、本領域において推進された、多臓器間にて維持される生体の恒常性機構が時間経過とともに破綻するという新たな視点から、疾患の発症機序の解明に成功したものである。本研究の成果は、多臓器間の機能ネットワークで結ばれた恒常性維持機構とその破綻のメカニズムとして疾患を統合的に理解し、また生体全体を捉えた治療法の開発へ資するという、本領域の目標に大きく貢献するものと考えられる。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

本研究課題では運動神経、自律神経、および免疫制御の神経回路に着目し、中枢神経の障害後に代償性に変化する神経回路の実体を明らかにするとともに、その回路の形成機序の解明を目指した。その結果、脊髄損傷患者の主な死亡要因である感染症は、新たに形成される神経回路を介して免疫機能が低下することが原因であることを明らかにした。すなわち、トレーサーによる神経経路の可視化やケモジェネティクス的手法により、脊髄損傷により一度神経回路が破綻すると、免疫器官を制御する神経回路が脊髄内で代償的に新たな回路網を形成すること、新たな回路内での神経細胞の活動を遮断すると、免疫機能の低下が回復することを明らかにした。本研究から、脊髄損傷時に神経系を制御して免疫機能を改善する新たな治療法開発への期待が導かれた。この研究成果は Nature Neuroscience に発表した。その他、皮質脊髄路には多様な内在回路が存在することを見出すとともに皮質脊髄路の再生を促進する実験モデルの開発に成功した。研究者は、総説や招聘講演、学会発表等多数を行っている。さがけ研究期間内に帰国後、国内の大学で教授として研究室を主宰することとなり、今後の活躍が十分に期待される。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Ueno M, Ueno-Nakamura Y, Niehaus J, Popovich PG, Yoshida Y. Silencing spinal interneurons inhibits immune suppressive autonomic reflexes caused by spinal cord injury. *Nat Neurosci*. 19(6): 784-787, 2016.

### (2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

(総説、著書)

1. 上野将紀、Phillip Popovich、吉田富. 脊髄損傷後の自律神経回路の再編成による免疫機能低下のメカニズム. 実験医学. 羊土社. 34(14),2328-2331, 2016.
2. Ueno M, Yamashita T. The brain-immune network in spinal cord injury. *Neurodegenerative Disorder as Systematic Diseases*. Keiji Wada (Ed.), Springer, 41-66, 2015.

3. Ueno M, Fujiki R, Yamashita T. A selector orchestrates cortical function. *Nat Neurosci*. 17(8): 1016–1017, 2014.
4. Ueno M, Yamashita T. Bidirectional tuning of microglia in the developing brain: from neurogenesis to neural circuit formation. *Curr Opin Neurobiol*. 27C: 8–15, 2014.

(講演)

1. 上野将紀. 脳脊髄障害後の神経回路の再編とその動作原理. 大阪大学分子神経科学セミナー. 大阪. 2016年9月. 招待講演
2. 上野将紀. 脳脊髄障害後の神経回路の再編成と動作原理. 東京医科歯科大学学内セミナー. 東京. 2015年12月. 招待講演.

(学会)

1. Ueno M, Ueno-Nakamura Y, Niehaus J, Popovich PG, Yoshida Y. Rewiring of sympathetic circuitry and immune suppression after spinal cord injury. Neuroscience 2016, San Diego, CA. 2016年11月.
2. Ueno-Nakamura Y, Ueno M, Niehaus J, Lu QR, Yoshida Y. Semaphorins limit axon regeneration after spinal cord injury. Neuroscience 2016, San Diego, CA. 2016年11月.
3. Ueno M, Ueno-Nakamura Y, Niehaus J, Lu QR, Yoshida Y. Semaphorins limit axon regeneration after spinal cord injury. 16<sup>th</sup> International Symposium of Neural Regeneration, Pacific Grove, CA. 2015年12月.
4. Noble B, Ueno M, Eroglu C, Yoshida Y, Popovich PG. Enhanced synaptogenesis in autonomic circuitry following spinal cord injury. 16<sup>th</sup> International Symposium of Neural Regeneration, Pacific Grove, CA. 2015年12月.
5. Gu Z, Sarrad N, Baccei ML, Li J, Ueno M, Liang M, Martin JH, Yoshida Y. Skilled grasping requires non-apoptotic Bax/Bak-mediated corticospinal circuit refinement. Neuroscience 2015. Chicago, IL. 2015年10月.
6. Gu Z, Sarrad N, Ueno M, Liang M, Li J, Baccei ML, Martin JH, Yoshida Y. Coordinating flexor and extensor muscle activity requires Bax/Bak-caspase-dependent synaptic refinement of corticospinal circuits underlying skilled movements. Wiring the brain, Gold Spring Harbor, NY. 2015年3月.
7. Kalamogias J, Gu Z, Ueno M, Kumanogoh A, Martin JH, Yoshida Y. Elimination of cortico-motoneuronal connections during development by Sema6D-PlexA1-mediated axon pruning in mice. Neuroscience 2014. Washington. 2014年11月.
8. Gu Z, Kalamogias J, Han W, Kawasaki Y, Ueno M, Blatz E, Liang M, Weirauch M, Sestan N, Martin JH, Yoshida Y. Construction of species-specific corticospinal circuit by differential activation of Sema6D/PlexA1-mediated axon pruning. 79<sup>th</sup> Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology Cognition. Cold Spring Harbor, NY. 2014年5月.
9. Tanaka T, Fujita Y, Ueno M, Yamashita T. Suppression of SHP-1 promotes functional corticospinal tract rewiring after brain injury. Neuroscience 2013, San Diego, CA. 2013年11月.

10. Hasebe N, Fujita Y, Ueno M, Yoshimura K, Fujino Y, Yamashita T. Soluble  $\beta$ -amyloid precursor protein alpha peptide (sAPP  $\alpha$ ) binds to p75 neurotrophin receptor (p75NTR) to promote neurite outgrowth. Neuroscience 2013, San Diego, CA. 2013 年 11 月.

(プレスリリース、ニュース)

1. 「神経回路が免疫機能を抑制するメカニズムを発見～脳脊髄障害で起こる感染症の新たな治療法に光～」 JST プレスリリース 2016 年 4 月 <http://www.jst.go.jp/pr/info/info1177/>
2. Researchers Find Possible Treatment for Suppressed Immunity from Spine Injuries. シンシナティ小児病院プレスリリース 2016 年 4 月  
<https://www.cincinnatichildrens.org/news/release/2016/spine-injury-research-4-18-2016>
3. 「免疫抑制的自律神経反射を抑えるしくみをマウスで解明」 日本せきずい基金ニュース No.69, 2016 年 6 月

# 研究報告書

## 「皮膚の恒常性維持機構からアレルギークロストークへの展開」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 梶島 健治

### 1. 研究のねらい

皮膚は外的刺激に常時曝露されているが、動的な恒常性維持機構が作用し、生体は生命バランスを維持している。そこで、「皮膚バリアという構造学的観点、免疫学的観点、そしてかゆみという皮膚生理学的観点という3つの異なる学術領域が三位一体となって皮膚恒常性の動的維持に関与する」という新たな概念(Kabashima K J Dermatol Sci 2013)に基づき、皮膚の恒常性維持機構を解明することが本研究の一つ目のねらいである。その際に、我々が立ち上げてきた生体イメージング技術などを用いて、獲得免疫反応の主役をなすメモリーT細胞の皮膚内における活性化機構の解明も図る。

一方、皮膚恒常性の破綻を契機に、経皮感作を介した皮膚アレルギーが誘導される。また、アレルギーマーチという概念より、各アレルギーが相互関連していることが示唆される。そこで、遺伝子改変マウスなどを用いてアレルギーマーチの進展機序を解明し、新たなアレルギー発症機序に基づく治療法開発にむけた分子基盤を形成することが二つ目のねらいである。

一方、小動物を用いた疾患モデルの解析をそのまま臨床に応用することはできない。小動物で得られた研究成果を、臨床検体を用いて再検証し、ヒトと小動物の皮膚免疫の相異を明確にし、ヒトの病態解明と治療への応用に直接還元させることが三つ目の狙いである。

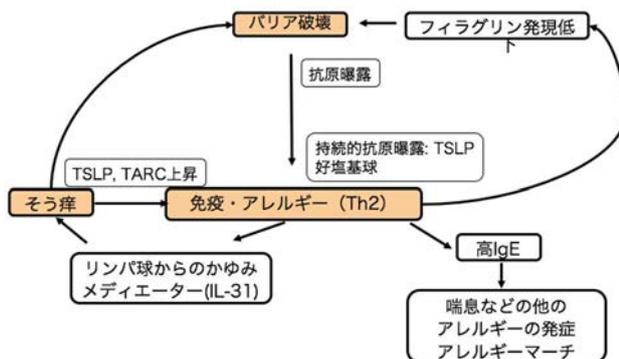
以上より、(1)皮膚の恒常性維持機構の解明、(2)皮膚と他臓器のアレルギークロストークの解明、(3)マウスで得られた知見の臨床への還元、という3つの課題に取り組み、既存の学術領域を越えた横断的かつ統合的アレルギーシステムの理解を目指す。皮膚における生体応答を自在に操り、アレルギー性皮膚疾患の制御のみならず、アレルギー全般の理解や治療開発に繋げ、ライフ・イノベーションの推進を試みたい。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

申請者は、「皮膚恒常性の破綻を契機に経皮感作を介して皮膚アレルギーが誘導され、後にアレルギー全般の発症に進展しうる」という作業仮説を立て、その検証を図った。

まず、バリア機能が障害された小動物を作製し、バリア破壊が経皮感作に繋がりをを見出した(Yasuda T et al. J Clin Invest 2016)。また、アトピー性皮膚炎のバリア障害に、JAK-STAT シグナルが関与することを明らかにし、さらに JAK シグナルを阻害する新規化合物が、バリア機能を回復



させ、さらに炎症反応の減弱にもつながることを確認した (Amano W et al. J Allergy Clin Immunol. 2015)。また、かゆみに関与する IL-31 シグナルを阻害することにより、アトピー性皮膚炎をコントロール可能であることを見出した(Ruzicka T et al. N Engl J Med accepted)。以上より、皮膚の恒常性維持において、バリア、免疫、かゆみの 3 つの要素が三位一体となって役割を果たしていることが強く示唆された。

さらに、二光子励起顕微鏡を用いた生体イメージング技術を導入する事により、皮膚内でメモリーT細胞が抗原提示をうけて活性化する場所を世界で始めて特定し、inducible Skin-Associated Lymphoid Tissue (iSALT)と命名した(Natsuaki Y et al. Nat Immunol 2014)。

一方、経皮感作によるIgE誘導に、好塩基球とTSLPが重要であることを、遺伝子改変マウスを用いて明らかにした。また、経皮感作を介した食物アレルギーが誘導できること、その際にはIL-33シグナルが必須であることを見出した(Muto T et al. Int Immunol 2014)。さらに、フィラグリン発現低下により誘導されるアトピー性皮膚炎モデルにおいて、皮膚を弱酸性に保つことによりプロテアーゼの活性化が抑制され、バリア機能が回復すること、経皮感作により誘導される他臓器のアレルギーの発症を抑制できることを見出した(Lee HJ et al. Exp Dermatol 2017)。

上記で得られた知見を臨床に生かすべく、現在 JAK 阻害薬の臨床試験 (Phase II)を進めている。また、IL-31 の中和抗体の国際共同臨床試験 (Phase II)を実施し、抗 IL-31 中和抗体がかゆみを阻害すること、そしてかゆみを抑制することが、のちに皮疹そのものの改善にも繋がることを検証した(Ruzicka T et al. N Engl J Med accepted)。さらに、マウスで我々が見出した iSALT と同様の構造が、ヒトの皮膚内にも存在する事も見出した(Kogame et al. Br J Dermatol 2017)。

以上より、(1)皮膚恒常性維持におけるバリア、免疫、かゆみの役割、(2)皮膚と他臓器のアレルギークロストーク機構の解明、(3) マウスで得られた知見の臨床への還元、という3つ研究成果を得た。皮膚をプラットフォームにアレルギー全般の発症機序の解明に繋がりを研究すること期待される。

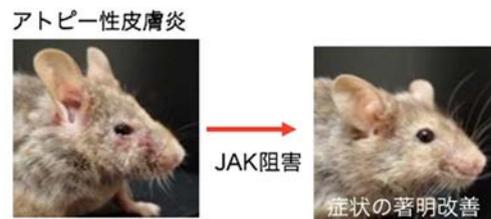
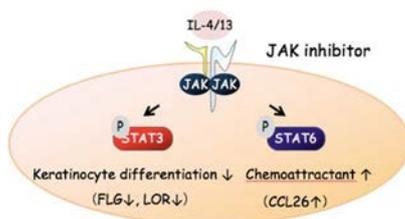
## (2) 詳細

### 研究テーマ A 「皮膚の恒常性維持機構の解明」

#### (1) バリア、免疫・アレルギー、かゆみの三要素から捉えた皮膚の恒常性維持機構の解明

表皮角化細胞における JAK1 のドミナントアクティブな JAK1 変異マウスがアトピー性皮膚炎を自然に発症する事をまず見出した。JAK-1 バリア機能が障害された小動物を作製し、バリア破壊が経皮感作に繋がることを見出した(Yasuda T et al. J Clin Invest 2016)。

また、アトピー性皮膚炎のバリア障害における、JAK-STAT シグナルが関与することを特定し、JAK シグナルを阻害する新規化合物が、バリア機能を回復させ、さらに免疫応答の減弱にもつながることを確認した (Amano W et al. J Allergy Clin Immunol. 2015)。



また、IL-31 シグナルを阻害することにより、かゆみを抑制できること、そしてさらにアトピー性皮膚炎の炎症そのものをも制御できることを検証した(Ruzicka T et al. N Engl J Med accepted)。以上より、皮膚の恒常性維持において、バリア、免疫、かゆみの3つの要素が三位一体となって役割を果たしていることが明らかとなった。

## (2) Inducible Skin-Associated Lymphoid Tissue (iSALT)の提唱

二光子励起顕微鏡を用いた生体イメージング技術を接触皮膚炎モデルに応用することにより、真皮後毛細血管静脈周囲において抗原特異的メモリーT細胞の活性化が誘導されることを見出した(Natsuaki Y et al. Nat Immunol 2014)。その際に、表皮角化細胞が産生するIL-1aが血管周囲マクロファージに作用してCXCL2ケモカインの発現を誘導し、真皮樹状細胞が後毛細血管周囲に集積するという分子機序も解明した。

一方、接触皮膚炎反応の惹起時に樹状細胞サブセットを除去する系を用いて責任樹状細胞の同定を試みた。ランゲルハンス細胞を除去しても炎症は減弱しなかったが、真皮樹状細胞を除去することにより炎症反応の増悪が認められた。従ってハプテンのような低分子の抗原に曝露された際には真皮に存在する樹状細胞が重要であることが示唆された(Natsuaki Y et al. Nat Immunol 2014)。



## 研究テーマB「皮膚と他臓器のアレルギークロストーク」

### (1) アレルギーマーチの発症機序

卵白アルブミンを用いた経皮感作によるIgE誘導の際に、好塩基球とTSLPが重要であることを好塩基球とTSLP受容体欠損マウスを用いて見出した。また、経皮感作を介したIgE誘導により、経口でのOVAチャレンジが食物アレルギーを誘発することを示し、さらにその際にはIL-33シグナルが必須であることを見出した(Muto T et al. Int Immunol 2014)。以上より、経皮感作を介した他臓器のアレルギー誘導機構(アレルギーマーチ)の機序の一端が明らかとなった。

### (2) 経皮感作を防ぐことによる他臓器アレルギーの予防機序

フィラグリン発現低下により誘導されるアトピー性皮膚炎モデルにおいて、皮膚を弱酸性にすることによりバリア機能が回復し、さらに経皮感作により誘導される他臓器のアレルギーの発症が抑制できることを見出した(Lee HJ et al. Exp Dermatol 2017)。この事実より、皮膚バリア機能の保持により他臓器のアレルギーの制御にも繋がることが示唆された。

## 研究テーマC「マウスで得られた知見のヒトへの還元」

### (1) JAK 阻害薬と IL-31 中和抗体の臨床応用

上記で得られた知見を臨床に生かすべく、現在 JAK 阻害作用を有する化合物の外用剤を開発し、アトピー性皮膚炎における臨床試験 (Phase II) を進めている。また、マウスの実験結果より、かゆみを阻害することが想定されていた IL-31 を標的とした中和抗体の国際共同臨床試験 (Phase II) を実施し、IL-31 の阻害がかゆみを抑制すること、そしてかゆみの抑制が皮疹そのものの改善にも繋がることを検証した (Ruzicka T et al. N Engl J Med accepted)。以上より、マウスで得られた知見が、アトピー性皮膚炎の臨床現場に応用されつつある。

### (2) ヒトにおける iSALT 様の構造の発見

我々はマウスの皮膚に iSALT を見出したが、ヒトでも iSALT が存在するのかは不明であった。そこで、梅毒患者の皮膚病理組織を検討することにより、CXCL13 陽性の線維芽細胞様の細胞を中心とした iSALT 様の構造がヒトの皮膚内にも存在する事を見出した (Kogame et al. Br J Dermatol 2017)。ヒトの皮膚においてもメモリー T 細胞が活性化される部位が存在することが推測される。

## 3. 今後の展開

### 研究テーマ A 「皮膚の恒常性維持機構の解明」

#### (1) バリア、免疫・アレルギー、かゆみの三要素から捉えた皮膚の恒常性維持機構の解明

我々は、皮膚の恒常性維持において、バリア、免疫、かゆみの 3 つの要素が三位一体となって役割を果たしていることを明らかにした。今後はアトピー性皮膚炎患者の個人における 3 要素の関与を相対的に評価することによる新たな治療方針の確立に尽力したい。

#### (2) Inducible Skin-Associated Lymphoid Tissue (iSALT) の提唱

接触皮膚炎モデルを用いることにより、真皮後毛細血管静脈周囲において抗原特異的メモリー T 細胞の活性化が誘導されることを見出した。今後は、iSALT を標的にした皮膚免疫応答の制御を目指したい。現在メラノーマの治療に応用されている抗 PD-1 抗体の作用機序は、iSALT に集積する CD8T 細胞の機能を調節している可能性も十分にあると申請者は考えている。

### 研究テーマ B 「皮膚と他臓器のアレルギークロストーク」

#### (1) アレルギーマーチの発症機序

卵白アルブミンを用いた経皮感作による IgE 誘導の際に、好塩基球と TSLP が重要であることを好塩基球と TSLP 受容体欠損マウスを用いて見出した。現在は IgE がアレルギーマーチの進展における鍵と考えられているので、IgE の誘導機構の詳細を解析している。

#### (2) 経皮感作を防ぐことによる他臓器アレルギーの予防機序

フィラグリン発現低下により誘導されるアトピー性皮膚炎モデルにおいて、皮膚を弱酸性にすることによりバリア機能が回復し、さらに経皮感作により誘導される他臓器のアレルギーの発症が抑制できることを見出した。上記結果はマウスを用いた解析に留まるため、今後は本機序が臨

床でも応用できるかどうかを検証したい。

#### 研究テーマ C 「マウスで得られた知見のヒトへの還元」

##### (1) JAK 阻害薬と IL-31 中和抗体の臨床応用

JAK 阻害外用剤と IL-31 の中和抗体の第 2 相臨床試験を無事終了した。今後も引き続き第 3 相臨床試験へと展開させ、臨床応用にむけた検討を継続する。

##### (2) ヒトにおける iSALT 様の構造の発見

梅毒患者の皮膚病理組織の検討により iSALT 様の構造をヒトの皮膚内に見出した。今後は梅毒以外の各種皮膚疾患における iSALT の存在を検証し、その生理的役割の解明を図りたい。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

(研究者)

##### 研究目的の達成状況

本研究の目的として、(1)皮膚の恒常性維持機構の解明、(2)皮膚と他臓器のアレルギークロストーク、(3)マウスで得られた知見の臨床への還元という3つの課題を掲げた。いずれの目標においても進捗があったと感じている。研究成果の多くは論文発表に至っているが、一部の成果は現在論文作成の段階にある。これらの研究成果もきちんと論文発表まで至るように心がけたい。

##### 研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)

本プロジェクトは 2 名の大学院生、1 名の実験助手が最終の研究体制で行っている。大学院生が上記の各研究課題を一部担当し、それらの進捗状況を代表研究者が総括している。

研究費の執行は滞りなく進んだものとする。

##### 研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果

本研究により、我々は、皮膚の恒常性維持において、バリア、免疫、かゆみの 3 つの要素が三位一体となって役割を果たしていることを明らかにした。今後はアトピー性皮膚炎患者の個人における 3 要素の関与を相対的に評価し、新たな治療方針の確立に繋がる可能性がある。

また、iSALT という皮膚免疫応答を誘導するのに重要な場を見出した。今後は、iSALT を標的にした皮膚免疫応答の制御を目指し、アトピー性皮膚炎をはじめとするアレルギー性皮膚疾患のみならず、メラノーマなどの悪性腫瘍に対する新規治療標的として展開する可能性を検証したい。

さらに、アレルギーマーチの進展に際し鍵となる細胞と分子機序の同定を行った。皮膚を標的として他臓器アレルギーの制御にも取り組み、アトピー性皮膚炎のみならず、喘息や食物アレルギーなどの克服を目指したい。

これらの小動物を中心とした研究結果を臨床に還元するために、JAK 阻害薬と IL-31 中和抗体をアトピー性皮膚炎の臨床応用を進めている。新たなアトピー性皮膚炎の治療薬をできるだけ早

期に国民に届けたい。アトピー性皮膚炎は、かゆみによる不眠などで患者の QOL の低下に関わるため、アトピー性皮膚炎を副作用の少ない治療で克服することにより、社会に貢献したい。

#### その他領域独自の評価項目

さきがけ研究を開始してから、研究を巡る環境が飛躍的に向上した。平成 27 年 6 月に京都大学皮膚科学教室の教授就任し、日本皮膚科学会、世界皮膚科連合や日本炎症再生学会の理事、日本アレルギー学会や免疫学会の評議員に選出され、臨床と基礎研究の両方の領域に於いて責任ある仕事に関わる機会が増えた。自身のサイエンスの向上のみならず、日本や世界のサイエンスの発展に今後も貢献できるように尽力したいと思う。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

本研究課題では、皮膚の動的恒常性維持機構について検討を行った。その結果、アトピー性皮膚炎において皮膚のバリア機能、炎症反応、かゆみに対して JAK シグナル、IL-31 シグナルがマウスにおいて重要であることを示し論文発表するとともに、臨床でも確認中である。基礎的には皮膚内でメモリー T 細胞が抗原提示を受けて活性化する場を世界で初めて特定して論文発表している。また、経皮感作による食物アレルギーの誘発のようなアレルギーマーチの機序の一端を解明して論文発表している。このように基礎研究の成果が臨床での実用化に向けて着実に研究が進められている。

さきがけの研究予算は細胞分取装置導入を増額予算で実施し、研究を加速させた。さきがけ研究の期間の途中で准教授から教授へと昇進し、基礎研究と臨床全体を主宰する立場となり、今後の飛躍が十分に期待される。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Ruzicka T, Hanifin JM, Furue M, Pulka G, Mlynarczyk I, Wollenberg A, Galus R, Etoh T, Mihara R, Yoshida H, Stewart J, and Kabashima K. A Phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled, multiple-dose study to evaluate the safety, tolerability, and efficacy of CIM331 in atopic dermatitis patients who are inadequately controlled by or intolerant to topical therapy (EXCIMA study). *New Engl J Med*. 2017 (in press)
2. Sachiko Ono, Gyohei Egawa, Akihiko Kitoh, Teruki Dainichi, Atsushi Otsuka, Saeko Nakajima, Tetsuya Honda, and Kenji Kabashima. Local inflammation exacerbates cutaneous manifestations in a murine autoimmune pemphigus model. *J Allergy Clin Immunol*. (in press)
3. Amano W, Nakajima S, Kunugi H, Numata Y, Kitoh A, Egawa G, Dainichi T, Honda T, Otsuka

A, Kimoto Y, Yamamoto Y, Tanimoto A, Matsushita M, Miyachi Y, Kabashima K. The Janus kinase inhibitor JTE-052 improves skin barrier function through suppressing signal transducer and activator of transcription 3 signaling. J Allergy Clin Immunol. 2015 Sep;136(3):667-677

4. Sawada Y, Honda T, Hanakawa S, Nakamizo S<sup>3</sup>, Murata T, Ueharaguchi-Tanada Y, Ono S, Amano W, Nakajima S, Egawa G, Tanizaki H, Otsuka A, Kitoh A, Dainichi T, Ogawa N, Kobayashi Y, Yokomizo T, Arita M, Nakamura M, Miyachi Y, Kabashima K. Resolvin E1 inhibits dendritic cell migration in the skin and attenuates contact hypersensitivity responses. J Exp Med. 2015 Oct 19;212(11):1921-30.

5. Natsuaki Y, Egawa G, Nakamizo S, Ono S, Hanakawa S, Okada T, Kusuba N, Otsuka A, Kitoh A, Honda T, Nakajima S, Tsuchiya S, Sugimoto Y, Ishii KJ, Tsutsui H, Yagita H, Iwakura Y, Kubo M, Ng Lg, Hashimoto T, Fuentes J, Guttman-Yassky E, Miyachi Y, Kabashima K. Perivascular leukocyte clusters are essential for efficient activation of effector T cells in the skin. Nat Immunol. 2014 Nov;15(11):1064-9.

(2)特許出願

研究期間累積件数:2件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 椋島健治 日本テレビ 世界で一番受けさせたい授業 平成 25 年 10 月 30 日放送  
アトピー性皮膚炎の発症機序に関する話題 対象者:一般市民
2. 椋島健治 BS日テレ 深層ニュース 平成 25 年 12 月 20 日放送 アトピー性皮膚炎  
の発症機序に関する話題 対象者:一般市民
3. 第 1 回 ポーラファルマ Rising Star 賞 平成 26 年 9 月 11 日
4. 第 11 回 日本学術振興会賞 平成 27 年 2 月 24 日

# 研究報告書

## 「女王蜂における寿命制御機構の解析」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 鎌倉 昌樹

### 1. 研究のねらい

これまでの寿命に関する研究は、線虫やショウジョウバエなどのモデル生物を中心に行われているが、これらの動物を用いた解析では、変異などにより本来の寿命を少し変化(20～30%の変化)させるだけの現象を解析の対象としており、寿命というよりは延命という色合いが強い。これでは、生物個体が持つ延命機能を解析することとなるので、本来の寿命の制御メカニズムの解析とはならないものと推察される。従って、真に生物の寿命制御機構を解明するためには、固有の寿命が個体間同士で異なるものを実験対象とし、長寿の個体が短命の個体よりなぜ寿命が長いかを解析することが必要であると考えられる。ミツバチは、女王蜂と働き蜂からなる階級社会(カースト)を形成しているが、働き蜂の寿命は、通常1ヶ月くらいであるのに対し、女王蜂の寿命は2年～3年くらいと20倍以上長く生きる。ミツバチの寿命の分子メカニズムは未だ明らかになっていないことから、この働き蜂と女王蜂の寿命の違いを解析することにより、新たな切り口からの寿命研究を推進することができる。**女王蜂は寿命が長いにも拘らず、働き蜂に比べ体サイズが1.5倍で1日に2000個の卵を産み、従来知られている「生物の寿命が延長する場合は繁殖能が低下する」という原理とは相反して高い生産性や活動能を維持したまま寿命が長いという特徴をもっており、「健康で長生きする」という人類の目標を象徴した生物種と言える。**また、ミツバチの同じ遺伝子型をもつ雌の幼虫のなかでも王台という女王蜂を育てるための部屋で成育した個体のみが、働き蜂の分泌するローヤルゼリー(RJ)を摂取して女王蜂へと分化することから女王蜂の長寿は、エピジェネティックな制御によってもたらされたものである。人類の老化や寿命も生まれた後の生活習慣の違いによってもたらされるものであることから、**ミツバチは人類の寿命や老化の解析に適した生物種であると考えられる。**そこで本研究では、生物における老化・寿命のエピジェネティックな制御機構を明らかにすることを目的として、ミツバチの寿命制御の分子メカニズムを解析する研究を実施した。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

ミツバチは、女王蜂と働き蜂からなる階級社会(カースト)を形成しているが、働き蜂の寿命は、通常1ヶ月くらいであるのに対し、女王蜂の寿命は2年～3年くらいと20倍以上長く生きる。ミツバチの寿命の分子メカニズムは未だ明らかになっていないことから、本研究において、生物の老化と恒常性維持機構との関係を明らかにすることを目的として、女王蜂の寿命制御の分子機構の解明を試みた。本研究では、寿命測定とクロマチン修飾の解析を寿命解析のアッセイ系として用いて、寿命制御に関与する因子の探索を試みた。まず、ミツバチ

の寿命の *in vitro* アッセイ系の構築に着手し、外的要因の影響を受けず室内の閉鎖系においてミツバチの寿命を正確に測定する方法を確立した。次に、女王蜂と働き蜂におけるクロマチン修飾の違いを組織化学的に解析できる方法を確立し、この方法を用いて両個体間でのクロマチン修飾の違いを解析した結果、ヘテロクロマチン化に関与するクロマチン修飾の変化が働き蜂に比べ女王蜂で増加していた。また、クロマチン修飾が見られない系統の女王蜂は寿命が短かった。これらの結果から、女王蜂では働き蜂に比べクロマチン修飾を介したヘテロクロマチン化が進行し、これが女王蜂の長寿命化に関与している可能性が示唆された。次に、女王蜂の寿命制御因子を見出すため、天然で飼育された働き蜂と女王蜂を対象として、トランスクリプトーム解析 (RNA-seq 解析) と染色体の網羅的なメチローム解析を実施し、女王蜂において DNA メチル化による発現制御を受ける遺伝子群を解析した。これまでに、RNA-seq 解析においては、サンプルの RNA 調製、ライブラリー調製、次世代シーケンサーの解析、データ解析を完了した。これまでにミツバチに適したメチローム解析の方法を確立し、これまでにメチローム解析とデータ解析を実施した。また、羽化直後の女王蜂においてヘテロクロマチン化により寿命制御に関与する因子を見出すため、ミツバチの ChIP-seq 解析の方法を確立し、ミツバチの中腸を対象としてクロマチン修飾の抗体を用いた ChIP-seq 解析を現在実施している。これまでの解析結果から、女王蜂では何らかのクロマチン修飾誘導因子の発現によりヘテロクロマチン化が誘導され、そのヘテロクロマチン化により女王蜂の寿命制御に関与する実行因子の発現制御を受け、同実行因子が寿命延長をもたらしているものと考えられる。今後、RNA-seq 解析、メチローム解析、ChIP-seq 解析の結果などから、女王蜂における寿命制御因子を見出したいと考えている。

## (2) 詳細

本研究者はこれまでに、女王蜂への分化誘導機構の解析を行った結果、ローヤルゼリー中に含まれる成分である「ロイヤラクチン」というタンパク質が上皮増殖因子受容体 (EGFR) を介して女王蜂の分化を誘導することを明らかにしてきた。しかし、女王蜂における寿命制御機構についてはこれまでに明らかになっていないことから、本研究において、生物の老化と恒常性維持機構との関係を明らかにすることを目的として、女王蜂の寿命制御の分子機構の解明を試みた。線虫やショウジョウバエなどでは、エピジェネティックなクロマチン修飾を介したヘテロクロマチン化が寿命に影響を及ぼすことが報告されている。また、これまでにロイヤラクチンによりショウジョウバエの雌の寿命が延長することが明らかになっているが、線虫におけるヘテロクロマチン化による寿命延長には、雌の生殖細胞が深く関わっていることが報告されている。また、EGFR の下流で Sirt1 が発現変動するとの報告もあることから、ロイヤラクチンがメチル化、アセチル化を含めたクロマチン修飾に何らかの影響を及ぼしている可能性もある。そこで本研究では、女王蜂と働き蜂との間でクロマチン修飾の状態にどのような違いがあるのかについて解析するとともに、ミツバチの寿命制御機構の解明のための重要な測定項目としてクロマチン修飾の解析を本研究に取り入れた。本研究では、寿命測定とクロマチン修飾の解析を寿命解析のアッセイ系として用いて、寿命制御に関与する因子の探索を試みた。

## 研究テーマ A「ミツバチの寿命アッセイ系の構築」

これまでに室内の閉鎖系における寿命アッセイ系が確立されていなかったことから、ミツバ

チの寿命の in vitro アッセイ系の構築に着手した。寿命の in vitro アッセイ系の設計目標は、人工飼育した働き蜂と人工飼育した女王蜂との間で明確な寿命の差が見られるアッセイ系の構築である。人工飼育した女王蜂及び働き蜂において、天然の女王蜂、働き蜂のそれぞれの発生期間を反映した孵化後 16 日～18 日及び孵化後 19 日～21 日の個体の寿命を測定し比較した結果、人工飼育した働き蜂と人工飼育した女王蜂との間で明確な寿命の差が見られた。これにより、人工の働き蜂と人工の女王蜂での寿命アッセイ系を構築することができた。寿命測定の間は、働き蜂と女王蜂に対してローヤルゼリー、花粉、ハチミツを同等に与え、餌による寿命への影響を排除した。さらに、ミツバチの幼虫からの人工飼育の条件や成虫個体の飼育条件において、ミツバチの寿命アッセイ系における最適化も行った。これにより、外的要因の影響を受けず室内の閉鎖系においてミツバチの寿命を正確に測定する方法を確立した。

#### 研究テーマ B「ミツバチのクロマチン修飾の解析」

新たに女王蜂成虫と働き蜂成虫の全身(頭部、胸部、腹部)におけるクロマチン修飾の違いを組織化学的に解析できる方法を確立し、この方法を用いて天然飼育で羽化直後の女王蜂と働き蜂におけるクロマチン修飾の違いを解析した。その結果、ヘテロクロマチン化に関与するクロマチン修飾の変化が働き蜂に比べ女王蜂で増加していた。また、新たに確立した in vitro 飼育による寿命アッセイ系により天然飼育で羽化直後の女王蜂と働き蜂の寿命を測定した結果、天然女王蜂の寿命は天然の働き蜂の寿命より有意に増加していた。一方、日本に通常に生息する系統に比べ、病気に弱く寿命も比較的短いという性質を有しているイタリアン系統において女王蜂のヘテロクロマチン化が見られず、in vitro 寿命アッセイ系における女王蜂の寿命がイタリアン系統で通常種の系統に比べ有意に短かった。従って、ミツバチのクロマチン修飾の変化は寿命に関連していることが示唆された。これらの結果から、女王蜂では働き蜂に比べクロマチン修飾を介したヘテロクロマチン化が進行し、これが女王蜂の長寿命化に関与している可能性が示唆された。女王蜂は、高い産卵能を維持したまま、長寿命であることから、ゲノム上に遺伝子発現の盛んなユークロマチン領域と生命の維持のために無駄な遺伝子発現が抑えられたヘテロクロマチン領域が存在すると考えられる。女王蜂でヘテロクロマチン化の増加が見られたことから、女王蜂のゲノム上のヘテロクロマチン領域において寿命延長に関与する寿命制御実行因子が抑制的に発現制御を受けているものと考えられた。

#### 研究テーマ C「寿命制御に関与する DNA メチル化による発現制御を受ける因子の探索」

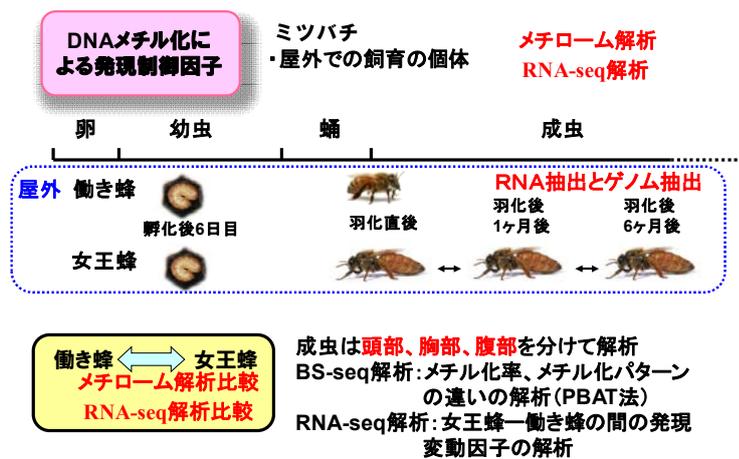
働き蜂と女王蜂を対象として、トランスクリプトーム解析と染色体の網羅的なメチローム解析を実施し、女王蜂において寿命制御に関与する DNA メチル化による発現制御を受ける遺伝子群を解析した。天然の女王蜂と天然の働き蜂を対象としたトランスクリプトーム (RNA-seq) 解析、メチローム (BS-seq) 解析では、女王蜂の幼虫、働き蜂の幼虫、羽化直後の女王蜂、羽化直後の働き蜂、交尾後で羽化 1 か月後の女王蜂、羽化 6 ヶ月後の女王蜂の計 6 ポイントを対象とした(下図参照)、また、成虫については、頭部、胸部、腹部に分けて解析を実施した。これまでに、RNA-seq 解析においては、これらすべてのサンプルの RNA 調製、ライブラリー調製、次世代シーケンサーの解析、データ解析を完了した。クロマチン修飾の違いが見られた羽化直後の女王蜂と働き蜂において遺伝子発現の違いを解析した結果、女王蜂が働き蜂に

比べ、ヘテロクロマチン化の抑制に関与するヒストン修飾酵素の遺伝子発現の低下が見られた。この女王蜂と働き蜂との間の遺伝子発現の変動は、クロマチン修飾の変化と一致するものであり、羽化直後の女王蜂で見られたヘテロクロマチン化は、ヒストン修飾酵素の遺伝子発現の変動によりもたらされたものであることが明らかとなった。現在、取得したデータのさらなる詳細な解析を進めている。一方のミツバチの BS-seq 解析においては、通常のバイサルファイト処理では、工程内に PCR 反応を含むため、PCR がかかりにくい locus においてはメチル化率が実際とは異なってくる問題が発生する可能性があるため、バイサルファイト処理において PCR を含まずランダム

プライマー伸長反応によって鑄型を調製する方法(PBAT 法)を用いて解析した。ミツバチゲノムを対象とした PBAT 法解析でのライブラリ調整の最適化を行い、約 80%のマッピング率での解析ができる条件を見出した。これまでに、BS-seq 解析とデータ解析を実施した。また、羽化直後の

女王蜂においてヘテロクロマチン化により寿命制御に関与する因子を見出すため、ミツバチの ChIP-seq 解析の方法を確立し、ミツバチの中腸を対象としてクロマチン修飾の抗体を用いた ChIP-seq 解析をこれまでに実施した。

### 次世代シーケンサー解析の実施計画



### 3. 今後の展開

本研究におけるこれまでの解析から、女王蜂では何らかのクロマチン修飾誘導因子の発現によりヘテロクロマチン化が誘導され、そのヘテロクロマチン化により女王蜂の寿命制御に関与する実行因子の発現制御を受け、同実行因子が寿命延長をもたらしているものと考えられる。今後、幼虫期における RNA-seq 解析と BS-seq 解析の結果や女王蜂分化に重要である EGFR の RNAi 個体の RNA-seq 解析の結果などから、女王蜂のヘテロクロマチン化に関与するクロマチン修飾因子を同定する。さらに、RNA-seq 解析と ChIP-seq 解析の結果から、羽化直後の女王蜂でヘテロクロマチン化を介して発現制御を受ける寿命制御実行因子を見出す。最終的には、同定したクロマチン修飾因子の RNAi により、羽化直後の女王蜂において寿命制御に関与する実行因子の発現変動を反転させ、寿命延長を抑制する因子を見出すことで、女王蜂における寿命制御因子を見出していく予定である。

### 4. 評価

- (1) 自己評価  
(研究者)

本研究において女王蜂が長寿である分子メカニズムについて解析した。本研究において、これまでに見出されていなかった外的要因の影響を受けず室内の閉鎖系においてミツバチの寿命を正確に測定する *in vitro* の寿命アッセイ系の構築を達成できた。また、女王蜂が働き蜂よりヘテロクロマチン化が亢進していることを新たに見出した。ミツバチの DNA のメチル化解析はこれまでに他の研究者によってなされているが、クロマチン修飾の変化についてはこれまでにない初めての解析結果である。また、本研究でミツバチでの ChIP-seq 解析についても、その解析方法を新たに確立し、PBAT 法での DNA メチル化の解析もこれまでに報告はなく、本研究で新たに組み組んだ。このように、ミツバチを対象として DNA、RNA、タンパク質を対象として総合的にエピゲノム解析を実施することは、ミツバチに関する研究においてこれまでにない初めての試みであり、研究に関する新規性、独自性は高いものであると考えられる。ただ、当初の計画としては、終了年度までに寿命制御因子を見出す予定であったが、予定通り研究を進めることができなかったことは反省すべき点である。実験が計画より遅れた理由としては、ミツバチはすべてが野生種であり、個体のばらつきや系統による差異も大きく、その対応や調整に時間がかかったことやサンプリングにおいても天候に左右されて同一系統での経時サンプルの取得にも時間がかかったことなどが挙げられる。今後は、これまでの経験を活かし、研究対象としてのミツバチの特性を理解し、合理的に実験を進めるように留意したいと考えている。目標である女王蜂における寿命制御因子の同定に向け、今後も研究を進めていきたいと考えている。また、今後、見出されたミツバチの寿命制御因子の発現と飼育条件との関係を明らかにし、近年寿命が短くなってきているミツバチ(女王蜂、働き蜂)の寿命延長を促進し、野菜や果物の受粉に必要なミツバチの飼育の安定化に貢献していきたいと考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

本研究課題では、ミツバチの女王蜂と働き蜂では同じ遺伝子型を持つにも関わらず、育て方の違いで寿命がそれぞれ2~3年と1ヶ月のように約20倍も異なるため、その違いはエピジェネティックな制御の違いによるとの仮説から検討されている。まずは、対象となるミツバチは実験動物として一般的ではなく、実験室内の飼育条件の検討から始めて寿命の違いを確認した。さらに、遺伝子のエピジェネティックな制御の解析を行うためのミツバチ成虫からのサンプル調整方法についても検討を重ねた。また、ミツバチの成育は季節に依存するため、検討に時間を要したようであるが、検討の準備は整ったようである。その結果、クロマチン修飾の変化は寿命に関連していることが示唆された。次に、DNA メチル化による発現制御を受ける因子の探索を行い、結果を解析中である。残念ながら、本さがけ研究期間中に成果を論文化は出来なかったが、検討条件が整い、今後の解析結果をまとめて論文化することが可能だと考えられる。ロイヤルゼリーの作用機序についてさがけ研究者との共同研究も実施され、研究の幅が広がったと考えられる。今後の活躍が十分に期待される。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1)論文(原著論文)発表

0件

### (2)特許出願

研究期間累積件数:0件

### (2)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. Masaki Kamakura Royalactin induces queen differentiation in honeybees. International congress of international union for the study for social insects(オーストラリア、クイーンズランド) 2014.7.17 招待講演
2. 鎌倉昌樹 ミツバチの女王蜂分化と寿命制御 第15回日本抗加齢医学会総会(日本、福岡) 2015.5.29 招待講演
3. 鎌倉昌樹 ミツバチの女王蜂分化と寿命制御 脳心血管抗加齢研究会 2015(日本、大阪) 2015.11.28 招待講演
4. 鎌倉昌樹 ミツバチの寿命におけるエピジェネティック制御機構の解析 第130回大阪大学大学院生命機能研究科研究交流会(FBSコロキウム)(日本、大阪) 2016.2.3 招待講演
5. 鎌倉昌樹 ミツバチの寿命におけるエピジェネティック制御機構の解析 第88回日本遺伝学会大会(日本、三島) 2016.9.7 招待講演

# 研究報告書

## 「RNA 分解による生体恒常性維持機構の解明と制御」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 久場 敬司

### 1. 研究のねらい

CCR4-NOT 蛋白複合体は酵母から保存された分子量 1 MDa の巨大な遺伝子発現調節因子であるが、複合体の構成因子や会合分子により、転写調節、RNA 分解、蛋白修飾など幅広い機能をもつ。とりわけ CCR4-NOT の RNA 分解作用は、翻訳終結、RNA の運命制御、miRNA などによる RNA 代謝制御において重要な役割を担うことが示唆されていた。本研究者はショウジョウバエの *in vivo* 心不全スクリーニングから CCR4-NOT 複合体を新規の心機能調節因子として単離し、その構成因子の CNOT3 がマウス、ヒトでの心機能の恒常性維持に不可欠な役割を担うことを明らかにした (*Cell* 2010)。さらにマウス *Cnot3* が肝臓におけるエネルギー恒常性の維持を制御することや T 細胞性急性リンパ性白血病においてヒト CNOT3 の遺伝子変異／欠失が重要であることが報告されたが、CCR4-NOT 複合体による生体の恒常性の維持機構やその破綻による病態の形成メカニズムについては、未だ不明な点が多かった (*EMBO J.* 2011, *Nat Genet.* 2013)。本研究者は複数の CCR4-NOT 構成因子の遺伝子改変マウスの作製、機能解析ならびに遺伝子ネットワークの解析から、複合体の RNA 分解作用が心機能の恒常性維持に重要であることを示唆する予備的な知見を得ていた。本研究では、CCR4-NOT 複合体の RNA 分解作用を介したシステム間相互作用による生体の恒常性維持の役割、意義を明らかにすることを目的として研究を行った。さらに、CCR4-NOT 複合体の機能破綻が心不全、感染症、癌などの疾患を発症するメカニズムを解明し、それに基づいた新しい治療薬の開発を目指すことを第二の目的とした。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究では、CCR4-NOT 複合体を介した RNA 分解と生体システムとの機能連関、相互作用に関する研究項目に特に焦点を当てて研究を進めた。具体的な研究成果としては、まず心機能調節において CCR4-NOT 複合体の RNA 分解活性によるオートファジー分子 Atg7 依存性の細胞死の制御機構ならびに心機能調節機構を明らかにした。次に、CCR4-NOT 複合体が bulk mRNA の poly(A)鎖短縮、RNA 分解の実行因子として働くことによりエネルギー感知シグナルを制御するという分子機構が存在することを解明した。合わせて、心不全病態における RNA 分解の役割、意義についても解析を進めた。さらに CCR4-NOT による poly(A)鎖短縮の RNA 認識などの分子機構の解明を目指して CNOT4 ユビキチンリガーゼの分子機能の解析を行った。また、RNA 代謝との観点から共通項があることから、coding RNA と non-coding RNA の 2 機能性分子である ELABELA 遺伝子についての解析も合わせて進めた。最後に、疾患治療への RNA 分解制御の応用を目指した研究項目として、CCR4-NOT 構成因子 CNOT6L deadenylase の阻害剤を *in silico* ならびに wet で化合物スクリーニングを行った。研究成果全

体としては、RNA 分解と生体システムとの機能連関についてこれまでに予想できなかった生体恒常性維持機構の実体をとらえることに成功した。

## (2) 詳細

### ①CCR4-NOT 複合体によるオートファジー分子 Atg7 の p53 転写調節制御機構の解明

心臓特異的な CCR4-NOT 複合体の欠損マウスとして、心臓特異的な Cnot1 欠損あるいは Cnot3 欠損マウスを樹立して解析したところ、CCR4-NOT 欠損により著しい心収縮力低下、QT 時間の延長の表現型を示し、心不全により死亡することが分かった。これらのマウスの心組織の電顕解析から心筋細胞がネクローシスならびにオートファジー空胞形成の像を呈して細胞死をきたすことが分かった。オートファジー分子の発現制御を調べたところ、CCR4-NOT 複合体は Atg7 を始めとする一部のオートファジー遺伝子 mRNA の poly(A)短縮、翻訳抑制により発現レベルを制御することが分かった。CCR4-NOT 欠損による心筋細胞死の分子機構をさらに検索したところ、Atg7 は本来のオートファジー空胞形成で果たす分子機能とは異なる p53 の転写活性を亢進するという別の分子機能を介して細胞死を誘導することが分かった。実際、Atg7 欠損あるいは Atg5 欠損と CCR4-NOT 欠損との二重欠損マウスを作製すると、Atg7 特異的に心不全が改善された。さらに、Cnot3 欠損の心臓において、Atg7 依存的な細胞死関連遺伝子の発現上昇が認められた。したがって、CCR4-NOT 複合体による RNA 分解は、Atg7 による細胞死誘導を制御し、心筋細胞の生存、心機能制御に寄与することが分かり、RNA 分解とオートファジー分子との新しい相互作用のメカニズムが解明された(論文投稿中)。

### ②bulk RNA の poly(A)分解によるエネルギー感知シグナル制御機構の解明

CCR4-NOT 複合体は、酵母や線虫において多くの mRNA の poly(A)鎖短縮、RNA 分解の実行因子として働くことが知られていたが、高等生物においては不明であった。Cnot1 欠損あるいは Cnot3 欠損マウスの心臓の遺伝子発現解析の結果、CCR4-NOT 欠損により数千におよぶ遺伝子の発現量が上昇していた。そこで、mRNA の poly(A)鎖の 3' 末端を <sup>32</sup>P ラベルし、RNase 処理することにより、bulk mRNA poly(A)鎖の長さ、分布を調べたところ、CCR4-NOT 欠損の心臓では延長した poly(A)鎖(およそ 100~300nt)を持つ mRNA が蓄積し、poly(A)鎖のアデニン含量が増加していることがわかった。一方で、心筋組織のアデニン核酸量を質量分析で測定したところ、CCR4-NOT 欠損によりアデノシンリン酸(AMP)のレベルが低下していた。そこで、細胞内エネルギーセンサーとして AMP によって活性化される AMPK のリン酸化状態を調べたところ、CCR4-NOT 欠損により AMPK のリン酸化レベルは有意に低下していた。一方で、AMP の結合した AMPK をリン酸化することで知られる上流の LKB1 について調べたところ、CCR4-NOT 欠損の心臓において LKB1 の発現レベルや活性化状態に変化は見られなかった。さらに、AMPK の活性化状態の機能的意義について評価するため、AMPK アゴニスト(AICAR, A769662)を CNOT3 欠損マウスに投与したところ、いずれの AMPK アゴニストも CCR4-NOT 欠損による心機能低下を改善した。したがって、CCR4-NOT 複合体による bulk mRNA の脱アデニル化反応は、non-genomic なアデニン核酸の代謝制御ならびにエネルギー感知シグナルの制御に寄与することが分かった。さらに、横行大動脈縮窄術(TAC)による心

不全モデルのマウスにおいて、心機能が低下する非代償期において Cnot3 発現の低下を認め、これと相関して AMP レベルが有意に低下することを見出したことから、心不全の進行に AMP レベルの低下が重要であることが示唆された(論文投稿準備中)。

#### ③ユビキチンリガーゼ CNOT4 による RNA 分解制御機構の解析

CCR4-NOT 複合体による RNA 分解制御の分子機構解明を目指して、CCR4-NOT と会合する機能不明なユビキチンリガーゼ CNOT4 に着目して解析を行った。Cnot4 欠損マウスを作製、解析したところ、Cnot4 ホモ欠損マウスは胎生致死で、Cnot4 ヘテロ欠損マウスはやせの表現型を示し、高脂肪食負荷による肥満に耐性、加齢に伴う心機能低下を示した。これらの表現型は Cnot3 ヘテロ欠損マウスと似通っていた。CNOT4 は分子内に RNA 認識モチーフを持つことから、CNOT4 が RNA と直接結合するかどうかを PAR-CLIP で検討したところ、CNOT4 とは異なる蛋白ではあるが CNOT4 と安定的に結合する蛋白が RNA を認識することが分かった。CNOT4 の免疫沈降、質量分析により同定された蛋白群について検索したところ、この CNOT4 と結合する蛋白を IP, WB により同定することができた。同定された蛋白は RNA の安定性にかかわる RNA 結合蛋白であり、CNOT4 の標的候補 RNA について解析したところ、CNOT4 もこの RNA に対して安定性を増加させる方向に作用することが分かり、CNOT4 とこの RNA 結合蛋白の複合体が CCR4-NOT に対する負の調節因子として機能することが示唆された。現在、この CNOT4 の PAR-CLIP サンプルからライブラリーを調製し、次世代シーケンサーの解析を行っている。

#### ④Elabela - APJ シグナルによる心機能制御機構の解明

ELABELA (ELA)は、non-coding RNA で機能不明な分子として看過されてきたが、近年新規の APJ/Apelin 受容体リガンドとして同定され、さらに 3' UTR 領域が核内 non-coding RNA として機能することが報告された。私達はそれまでに心機能調節において Apelin が ACE2 の陽性調節因子であることを解明してきた(*J Clin Invest* 2013)ことから、ELA の心機能調節における役割、意義について解析を行った。ELA ペプチドを横行大動脈縮窄術(TAC)による心不全モデルのマウスに投与したところ、有意に心肥大や線維化が抑制された。また、APJ KO マウスでは ELA による心保護効果を認めなかったことから、ELA は APJ 受容体依存的に心保護効果を発揮していることが分かった。ELA は Apelin とは異なり ACE2 の転写レベルへの影響は小さかったものの、FoxM1 転写因子の発現抑制を介して ACE の転写レベルを抑制することが分かった。さらに、ELA はアンジオテンシン II 投与にて誘導される心肥大や血圧の上昇も抑制した(*Cardiovasc Res*, in press)。さらに、ELA の non-coding RNA としての役割、意義を解明するために ELA KO マウスを解析したところ、心不全モデルで予想外の結果が得られたので現在さらに解析を進めている。

#### ⑤CNOT6L deadenylase 酵素阻害剤の探索

CCR4-NOT 構成因子 CNOT6L deadenylase の阻害剤を *in silico* の計算科学でスクリーニングし候補化合物を選別する目的で、CNOT6L の活性中心のポケットに対する化合物の結合をシミュレーションするために Rigid-base docking (DOCK v6.4)と Flexible Docking (GOLD v1.3)

の2つのアルゴリズムで計算した。計算結果で上位にランク付けされた 100 個程度について化合物を入手し、大腸菌の蛋白質発現系で調製した組換え CNOT6L 蛋白質を用いて実際に wet で酵素活性をスクリーニングした。その結果、#29 の化合物が *in vitro* において CNOT6L 蛋白質による poly(A) RNA オリゴの分解、短鎖化を抑制し、deadenylase 酵素の阻害活性があることを見出した。しかしながら、阻害剤候補#29 の構造類自体 50 個を入手して解析を行ったもののいずれも#29 のような阻害剤活性を示さなかったため、#29 の化合物が *in silico* で予想された CNOT6L の酵素活性部位に結合している可能性は低いと考えられた。さらに、東北大学の約 6,000 個の化合物ライブラリーを用いた wet でのスクリーニングを行った。1 次スクリーニングで 1 個のヒット化合物を見出すことができたものの、2 次スクリーニングで残念ながら非特異的な阻害反応であることが分かり、結果的に阻害物質は得られなかった。

#### ⑥骨-心臓連関による生体恒常性維持機構の解明(共同研究 FS の追加支援による)

骨-心臓連関による生体恒常性維持機構の解明することを研究目的として、篠原正浩博士との共同研究で骨細胞と心筋細胞の間のシグナル伝達分子を網羅的なレンチウイルスベクター-cDNA 発現スクリーニングにより同定することを試みた。ところが、初代培養心筋細胞へのレンチウイルスベクターによる cDNA 発現の条件検討を行ったところ、網羅的なスクリーニングを行うには導入遺伝子の発現効率が良くないため困難であることが判明した。そこで、方針転換して骨粗鬆症モデルマウス、心不全モデルマウスで、それぞれ心機能測定、骨量定量などを行い、さらに心不全、骨粗鬆症マーカーを定量することにより、骨粗鬆症、心不全とのクロストークにかかわる候補因子を探索するアプローチに変更した。その結果、まず骨粗鬆症マウスでは心不全マーカーの顕著な発現上昇、心不全マウスでは骨量の有意な減少がみられたことから、マウス疾患モデルで骨-心臓連関が存在する可能性が強く示唆された。この結果に基づき、現在それぞれの疾患モデルの遺伝子発現プロファイルを検索し、クロストークにかかわる候補因子の絞り込みを行っている。今後、骨細胞と心筋細胞の間のシグナル伝達候補分子をそれぞれの細胞に発現させるなどして機能解析を進めていく予定である。

### 3. 今後の展開

本研究で RNA 分解とオートファジー分子あるいはエネルギー感知シグナルとの相互作用を明らかにすることができたが、さらに踏み込んで RNA 分解とエネルギー代謝との直接的な機能連関について研究を進めていく。メタボロームにおける代謝フラックス解析など RNA 分解によって産生される核酸代謝物がエネルギー代謝にどのようにかかわっていくかを解明することで、新たな細胞エネルギー恒常性維持機構の解明につながることを期待される。さらに RNA 分解の多様な制御機構についてその分子機構を解明していくことにより、RNA にコードされる未解明の動的な遺伝情報を読み解いていきたいと考えている。本研究の成果から、分子生物学のセントラルドグマ(DNA→RNA→タンパク)にとらわれないシステム間の相互作用を介した新しい生体の恒常性の維持機構の解明につながることを期待される。

### 4. 評価

- (1) 自己評価  
(研究者)

研究目的の達成状況については、RNA 分解と生体システムとの機能連関による生体恒常性維持機構に関する研究項目においておおむね達成できたものと考えている。一方で、疾患病態モデルにおける検討や RNA 分解酵素阻害剤の探索では十分に達成できなかった。RNA 分解酵素阻害剤の探索では in silico 解析、wet screening など健闘したが、成果につなげることができなかった。製薬企業など専門家との連携などを積極的に行う必要があったのではないかと考えている。研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)については、地方大学医学部という学生、大学院生のマンパワーが期待できない研究環境においては、研究員ならびにさががけ研究費で雇用した研究補助員と連携して研究を推進していくことができ、ベストではないがベターな研究実施体制であったと思われる。研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)については、RNA 分解の生体恒常性維持における新たな意義付けという観点から、本研究成果は疾患病態の理解、治療法の開発において今後大きな波及効果があるものと期待している。その他領域独自の評価項目については、本研究は細胞内システムに着目した研究であったが、個体レベルでの解析も含んでおり、生体全体で俯瞰した時の細胞集団の相互作用などによる生命現象に関する研究も進められるとよかったと考えている。そういった意味では、共同研究 FS の支援で骨と心臓の臓器間相互作用の共同研究を東京医科歯科大の篠原正浩博士と進められたのは大変貴重で有意義であった。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

本研究課題では、遺伝子発現調節因子である CCR4-NOT 複合体を介した RNA 分解と生体システムとの機能連関、相互作用に焦点を当てている。CCR4-NOT 複合体の RNA 分解活性によるオートファジー分子 Atg7 依存性の細胞死の制御機構ならびに心機能調節機構についての成果は、これまでに予想できなかった生体恒常性維持機構の実体をとらえることに成功し、現在論文投稿中である。また、CCR4-NOT 複合体が bulk mRNA の poly(A)鎖から AMP を生成すること、心不全モデルマウスでの AMP 減少と CCR4-NOT 複合体の一部の CNOT3 の低下が関連していることを解明して、論文投稿準備中である。一方、さががけの本研究領域内での共同研究として、骨-心臓連環について検討したところ、骨粗鬆症マウスでは心不全マーカーの顕著な発現上昇、心不全マウスでは骨量の有意な減少がみられたことから、マウス疾患モデルで骨-心臓連環が存在する可能性が強く示唆され、クロストークにかかわる候補因子の絞り込みを行っている。このようにさががけ研究で研究の幅が広がっている。

研究予算は、研究の進展のため新たな機器購入費用、共同 FS 実施のための増額を行った。さががけ期間中に准教授から教授に昇進し、一つの研究室を主宰することとなり、今後の活躍が十分に期待される。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Sato T, Sato C, Kadowaki A, Watanabe H, Ho L, Ishida J, Yamaguchi T, Kimura A, Fukamizu

<p>A, Penninger JM, Reversade B, Ito H, Imai Y, <u>Kuba K</u>. ELABELA – APJ axis protects from pressure overload heart failure and Angiotensin II-induced cardiac damage. <i>Cardiovasc Res</i>, in press.</p>
<p>2. Kimura H, Eguchi S, Sasaki J, <u>Kuba K</u>, Nakanishi H, Takasuga S, Yamazaki M, Goto A, Watanabe H, Itoh H, Imai Y, Suzuki A, Mizushima N, Sasaki T. Vps34 regulates myofibril proteostasis to prevent hypertrophic cardiomyopathy. <i>JCI Insight</i>. 2: e89462, 2017.</p>
<p>3. Yang CY, Ramamoorthy S, Boller S, Rosenbaum M, Rodriguez Gil A, Mittler G, Imai Y, <u>Kuba K</u>, Grosschedl R. Interaction of CCR4–NOT with EBF1 regulates gene-specific transcription and mRNA stability in B lymphopoiesis. <i>Genes Dev</i>. 30: 2310–2324, 2016.</p>
<p>4. Demetz E, Schroll A, Auer K, Heim C, Patsch JR, Eller P, Theurl M, Theurl I, Theurl M, Seifert M, Lener D, Stanzl U, Haschka D, Asshoff M, Dichtl S, Nairz M, Huber E, Stadlinger M, Moschen AR, Li X, Pallweber P, Scharnagl H, Stojakovic T, März W, Kleber ME, Garlaschelli K, Uboldi P, Catapano AL, Stellaard F, Rudling M, <u>Kuba K</u>, Imai Y, Arita M, Schuetz JD, Pramstaller PP, Tietge UJ, Trauner M, Norata GD, Claudel T, Hicks AA, Weiss G, Tancevski I. The arachidonic acid metabolome serves as a conserved regulator of cholesterol metabolism. <i>Cell Metab</i>. 20: 787–798, 2014.</p>
<p>5. Sato T, Suzuki T, Watanabe H, Kadowaki A, Fukamizu A, Liu PP, Kimura A, Ito H, Penninger JM, Imai Y, <u>Kuba K</u>. Apelin is a positive regulator of ACE2 in failing hearts. <i>J Clin Invest</i>. 123: 5203–5211, 2013.</p>

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

シンポジウム発表：“CCR4–NOT complex controls adenine nucleotide metabolism and energy sensing in cardiac homeostasis.” 第 89 回日本生化学会大会 シンポジウム 3S17 “Multiple RNA control freak CCR4–NOT protein complex revealing novel paradigm of gene expression.”(英語、研究者がオーガナイザー) 2016 年 9 月 27 日、仙台

シンポジウム発表：“Angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) links Apelin and angiotensin systems in controlling heart function” 第 120 回 日本解剖学会・第 92 回 日本生理学会合同大会 シンポジウム 「アンジオテンシンによる循環構造・機能調節研究の最前線」(英語) 2015 年 3 月、神戸

シンポジウム発表：「RNA 分解制御による心臓エネルギー恒常性維持の分子機構」BMB2015(第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会合同大会)ワークショップ「mRNA 分解の機能破綻がもたらす多様な疾患病態」2015 年 12 月、神戸

シンポジウム発表：“CCR4–NOT deadenylase complex links mRNA metabolism to energy

sensing in cardiac homeostasis” 第 31 回 国際心臓研究学会 (ISHR) 日本部会、2014 年 11 月 29 日、名古屋

受賞：秋田医学会学術賞「呼吸循環器疾患の病態における分子ネットワークの同定、解析」2014 年 2 月 10 日、秋田

# 研究報告書

## 「血中インスリンの時間パターンによる恒常性維持機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 久保田 浩行

### 1. 研究のねらい

血中のほぼ全てのホルモンが特徴的な血中パターンを示し、そして、いくつかのホルモンにおいてはこれらの血中パターンがその作用に重要であることが報告されている。このようなホルモンの中で最も研究されているのがインスリンである。インスリンの血中パターンは複数からなり、これらのパターンがインスリンの恒常性維持に重要であることが報告されている。また、糖尿病患者では血中インスリンの時間パターンが健常者と異なることから、糖尿病の一因は血中インスリンパターン異常によるインスリン作用の恒常性維持機構の破綻であると考えられる。このように血中インスリンパターンの重要性は 30 年近くも前から認識されているが、その分子機構は未だ不明のままである。近年、我々は同じ分子でもその異なる時間パターンに異なる情報がコードできるという「時間情報コード」の概念を世界に先駆けて提唱し、実験と実験結果に基づいたモデルを作成することで研究を行っている。特に我々は、ラット肝がん由来の Fao 細胞と初代培養肝細胞を用いた研究から、インスリンがその時間パターンの情報を AKT というインスリンシグナル伝達経路のハブとなる分子に多重にコードし、下流の分子を選択的に制御できることを明らかにしてきた。また同様に、インスリンの時間パターンにより細胞内の代謝物も選択的に制御できることを見出してきた。このような研究を我々の生体に応用できれば、生体内における糖代謝や脂質代謝をインスリンの血中濃度をコントロールすることである程度制御可能になるのではないかと期待できる。例えば、食事方法による糖代謝や脂質代謝のゆるやかな調節や、糖尿病の予防や治療に応用できる可能性がある。しかし、培養細胞と生体内の応答は大きく異なることが予測され、生体内におけるインスリン作用が細胞と同様にインスリンの時間パターンによって制御されているかどうかは未だ不明のままである。そこで本研究では、インスリン作用臓器である肝臓と筋肉に注目し、血中インスリンパターンによって生体内のインスリンシグナル経路の分子が選択的に制御されているか、そしてそのメカニズムを明らかにすることを目的とする。これにより、生体内における「時間パターン」の存在意義を明らかにし、今後のホルモンによる生体の恒常性維持機構の研究領域に「時間情報コード」という新たな着眼点を与えることを目的とする。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

生体内での血中インスリンパターンの重要性を明らかにするためには、生体に出来るだけ近い条件で任意のインスリンパターンを投与する必要がある。通常、動物を用いた持続的なインスリン刺激では頸静脈からの注入が良く行われている。しかし本実験では、述べた通り、

血中インスリンパターンの重要性に着目しているため、頸静脈からのインスリン注入では目的に沿わない。そこでまず、SD ラットを用いて門脈(実際には門脈の少し上流の腸管膜静脈)からインスリン刺激を行う手法の開発を行った。刺激法の開発後、3 濃度(2, 6.7, 20 $\mu$ M)のインスリンを用いて 2 時間までの持続的な刺激を行い、任意の時間において肝臓と筋肉を採取した。その後、肝臓と筋肉からサンプル調製を行い、インスリンシグナル伝達経路の主要分子である IR, AKT, GSK3 $\beta$ , FoxO1, S6K のタンパク質量とリン酸化量をウェスタンブロッティング法で測定した。また、G6Pase の発現量は qPCR 法で測定した。上記の時系列データの解析から、測定した分子の時間パターンが異なることが明らかになった。これらの結果は、生体内においても培養細胞と同様に血中インスリンの時間パターンが下流分子を選択的に制御していることを強く示唆している。特に S6K は、培養細胞の結果と同様に一過的なリン酸化パターンを示すことから、インスリンの時間変化にตอบสนองしていることが強く示唆された。そこで次に、これらの分子が実際にインスリン濃度や速度を検知しているかどうかを任意のインスリン刺激パターンを用いて検証した。その結果、実際にこれらの分子が血中インスリンの異なる時間パターンにตอบสนองしていることが明らかになった。これにより、生体内においてインスリンパターンによる細胞内分子の選択的制御が存在することを世界に先駆けて明らかにした。また、肝臓と筋肉では G6Pase の発現以外同じインスリンシグナル経路の分子を共有するにも関わらず、その応答が異なることが明らかになった。次に、これらの選択的応答のメカニズムを明らかにするために、上記で得られた実験データを再現する微分方程式モデルを作成した。その結果、これらの応答の違いがネットワーク構造の違いや、時定数や EC50 という酵素反応のパラメータの違いで生じていることが明らかになった。本研究により、血中インスリンパターンによる選択的制御の存在とそのメカニズムが明らかになっただけでなく、ホルモンの血中パターンによる選択的制御という新たな概念を提示することができた。

## (2) 詳細

### 研究テーマ「ラット門脈へのインスリン刺激手法の開発」

生体においてインスリンは肝臓へと続く門脈に膵臓から分泌され、その 40%程度が肝臓で消費されると報告されている。その後、インスリンは筋肉を含む全身を巡り再び門脈に戻ってくる。つまり、生体内のインスリン応答を明らかにするには、通常行われている頸静脈からのインスリン刺激ではなく、門脈からのインスリン刺激が必須となる。そこで、本研究では麻酔下で門脈に繋がる腸管膜静脈からシリンジポンプを用いて任意のインスリン量を投与する手法を開発した(図1)。また同時に、血糖値の維持と内在性のインスリン分泌を抑制するため、頸静脈から任意量のグルコースと一定量のソマトスタチンを投与した。これにより、生体のインスリン分泌を模した、任意のインスリン投与可能な実験系を開発することができた。



図1 門脈からのインスリン刺激手法

### 研究テーマ「健常ラットでの AKT 経路モデルの作成」

初めに、上記で確立した投与手法を用いて3濃度(2, 6.7, 20 $\mu$ M)のインスリンを用いて2時間までインスリンの持続的な刺激を行い、0, 2, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120minの時間において肝臓と筋肉を採取した(各点 n=3)。得られた臓器を用いてインスリンシグナル伝達経路の中心となる分子(IR, AKT, GSK3 $\beta$ , Fox01, S6K)のタンパク質量とリン酸化量、肝臓においては G6Pase の発

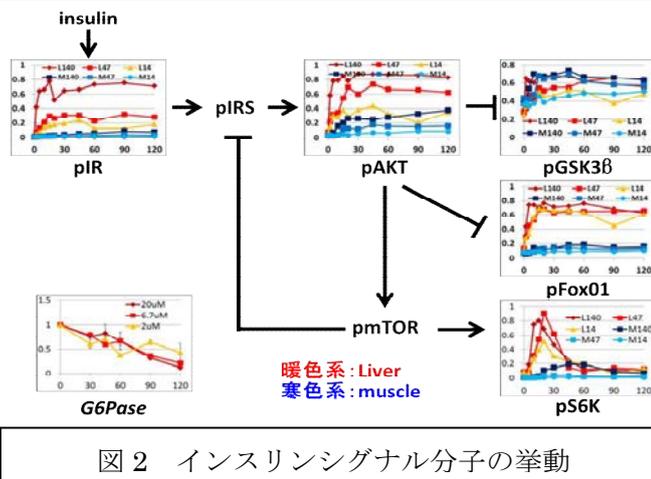


図2 インスリンシグナル分子の挙動

現量も測定した(図2)。その結果、図2に示す通り、測定した分子の時間パターンが異なることが明らかになった。特に、S6Kは培養細胞の結果と同様に一過的なリン酸化パターンを示すことから、インスリンの時間変化にตอบสนองしていることが強く示唆された。また、肝臓と筋肉の定量的な比較から、筋肉におけるIRやFox01のリン酸化は肝臓に比べて著しく少ないことが明らかになった(図2)。これらの結果は、生体内においても血中インスリンの時間パターンにより下流分子を選択的に制御していることを強く示唆しているだけでなく、臓器によっても分子の応答(=戦略)が異なることを意味している。次に、測定した分子が実際にインスリン濃度や速度を検知しているかどうかを「ランプ刺激」と「2回のパルス刺激」を用いて検証した(図3)。

ランプ刺激は徐々に刺激濃度が上昇する刺激であり、速度変化が少ない刺激パターンである(図3上)。パルス刺激は急激に一過的な入力を加える刺激であり、さらにこれを2回繰り返すことで、インスリンの濃度変化に対する応答を観測できる刺激パターンである(図3下)。これらの刺激パターンによる実験の結果、S6Kのリン酸化はインスリンの濃度ではなく濃度変化にตอบสนองすることが確認でき、生体内において血中インスリンの時間パターンによる下流分子の選択的制御の存在が明らかになった。次に、これらの応答のメカニズムを明らかにするために、実験データを再現する微分方程式モデルを作成した。モデルの構造は、以前作成した培養細胞でのモデルを参考にほぼ同様の構造を用いた。微分方程式モデルを作成することで、分子の応答を予測するだけでなく、応答の違いを生み出すシステムを定量的かつ客観的に比較することが出来る。モデル解析の結果、分子の応答の違いはネットワーク構造や、時定数やEC50という酵素反応のパラメータの違いが原因であることが明らかになった。さらに詳細な解析を行った結果、肝臓と筋肉において血中インスリンパターンの情報はAKTまでは比較的保存されて伝達されるが、AKTより下流には経路に応じて伝達される情報が異なることが明らかになった。これらの結果により、実際の臓器における細胞内の分子が選択的制御を受けているだけでなく、AKTといったシグナル伝達経路の「ハブ分子」まで出来るだけ多くの情報を伝達し、その後、下流の経路が必要な情報だけ抜き出しているという生命応答の精妙な制御機構の存在とメカニズムも明らかになった。

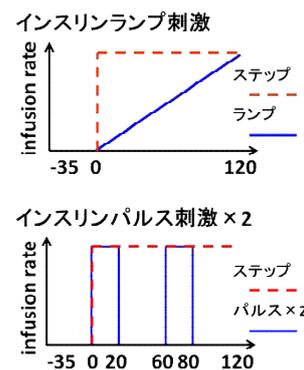


図3 刺激パターン

### 3. 今後の展開

インスリンの生体内での主要な役割は血糖値制御を含む代謝調節である。特に、血糖値においては、インスリンの一定刺激よりも15分程度の周期的刺激の方が効率的に血糖値を抑制できるとの報告がある。インスリンシグナル伝達経路における選択的制御の存在から、肝臓と筋肉の代謝も同様に、インスリンの時間パターンによって選択的に制御されていると考えられる。そこで、今後の展開として血中インスリンパターンにより肝臓と筋肉の代謝がどのように調節されているかを明らかにしたい。特に、インスリンから代謝物までのモデルが作成できれば、健常者または糖尿病(肥満)患者の効率的なインスリンによる血糖値制御のための基礎が明らかになると期待される。また、特徴的な分泌パターンを持つホルモンは数多くある。本研究から、これらのホルモンの血中パターンもその作用に重要であることが強く示唆された。よって今後は、ホルモンの血中パターンに注目した新規の視点からの研究領域が拓かれると期待される。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

##### 研究目的の達成状況、研究の進め方について

本研究の目的は「生体内におけるインスリンパターンによる選択的制御の存在の実証と、そのメカニズムの解明」である。進捗が遅れ論文での発表はもう少し時間がかかるが、上記で報告した通り、その目的は概ね達成された。進捗が遅れた理由として、勤務地の移動に伴う実験を行うことが出来ない期間があったことが挙げられる。この遅延を取り戻すべく、移動後、テクニカルスタッフを雇用するなど研究実施体制と予算執行の変更を行った。この研究実施体制の変更により、最終的な遅延は最小限に抑えられたと考えられる。

##### 研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果について

分子の変動の時間パターンに情報がコードされるという考え方は近年注目されている。細胞レベルにおいては ERK の活性化パターンにより細胞の運命が決定されることが良く知られている。また、細胞間においても、神経細胞が他の神経からの入力パターンを処理することでその応答が決定される。しかし、ホルモンの血中パターンの意義とその分子メカニズム、つまり、臓器レベルでの時間パターンの重要性とそのメカニズムについては全く不明のままであった。本研究により、インスリンによる臓器レベルでの選択的応答とそのメカニズムが明らかになったことで、分子の変動の時間パターンに情報がコードされるという考え方が臓器レベルでも存在する、生物の一般的な概念であるという事が世界で初めて示された。今後、他の多くのホルモンにおいても「時間パターンによる選択的制御」という新たな研究領域が拓かれると期待される。また、生体内の細胞応答をモデル化した例は今までになく、外部からの刺激によって生体内の応答を(ある程度)任意にコントロールできたという点も非常に特筆すべきことである。このように、本研究の科学技術への波及効果は非常に大きいと考えられる。一方で、社会・経済への波及効果については今のところ直結するものはない。しかし、実験データとコンピュータシミュレーションを用いた効率的な創薬や任意のインスリン投薬による代謝制御へと繋がる基礎が構築されたことから、本研究を土台とした今後の波及効果のポテンシャルは高いと期待される。

#### (2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での

評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

本研究課題では、インスリン作用臓器である肝臓と筋肉に注目し、血中インスリンパターンによるインスリンシグナル経路分子の選択的な制御と、そのメカニズムを明らかにすることを目的としている。生体のインスリン分泌を模して、麻酔ラットの門脈に繋がる腸管膜静脈からシリンジポンプを用いて投与する手法により、任意のインスリン投与可能な実験系を開発して検討された。その結果、インスリンの持続的な刺激、徐々に濃度が上昇する刺激やパルス刺激などの違いにより、肝臓と筋肉でのインスリンシグナル伝達経路の中心となる分子(IR, AKT, GSK3 $\beta$ , FoxO1, S6K)をリン酸化量の時間パターンが異なることを明らかにし、これらの分子が選択的に制御されることを明らかにした。これらの応答のメカニズムを明らかにするために、実験データを再現する微分方程式モデルを作成し、分子の応答の違いがネットワーク構造や、時定数やEC50という酵素反応のパラメータの違いによることを明らかにした。これらの結果の論文での発表はもう少し時間がかかるようだが、着実に検討が進んでおり、本研究の完成が期待される。

さきがけ研究では、研究室の立ち上げによる研究計画の変更もあったが、研究を終了することができた。さきがけ研究期間内にさきがけ研究全体をまとめる論文の作成には至らなかったが、いくつか論文発表と学会発表を行った。領域会議では計算科学の視点から領域内の研究者とのディスカッションにより本領域のレベルアップに貢献した。さきがけの第二年次からは異動して教授に就任し、研究室を主宰することとなり、今後の活躍が十分に期待される。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Sano T., Kawata K., Ohno S., Yugi K., Kakuda H., Kubota H., Uda S., Fujii M., Kunida K., Hoshino D., Hatano A., Ito Y., Sato M., Suzuki Y., and Kuroda S.  
Selective control of up-regulated and down-regulated genes by temporal patterns and doses of insulin., 2016, *Sci. Signal.*, 9(455): ra112
2. Yugu, K<sup>†</sup>., Hiroyuki, K<sup>†</sup>., et. al <sup>†</sup>co-first, Reconstruction of insulin signal flow from phosphoproteome and metabolome data., 2014 *Cell. Rep.* 8, 1-13

### (2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

第 18 回 Clinical Science club (招待講演)

# 研究報告書

## 「組織修復における幹細胞-免疫システム連関機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 佐藤 卓

### 1. 研究のねらい

組織幹細胞は、生体組織の恒常性維持や損傷時の再生を司る重要な細胞であるため、その数や機能は個体の生涯にわたり厳密に保たれている。免疫系は、様々な病原体の感染から個体を保護するために必須のシステムであるが、その一方、最近免疫系に重要ないくつかのサイトカインやケモカインが、老化に伴って生じる組織幹細胞の機能低下に深く関わっていることが報告された(Nature. 2011,477:90.)。この事実は、生体防御の要である免疫因子が、実は組織幹細胞にとっては重大な「ストレス因子」であることを示唆している。従って、「免疫系」と「組織幹細胞システム」が共存する生体内においては、組織幹細胞がこの免疫ストレスを適切に回避するメカニズムが存在するはずである。しかしながら、この点についてはこれまでにほとんど明らかにされていない。私は、この免疫ストレス因子の一つとして、生体の抗ウイルス応答に重要なサイトカインである「インターフェロン(IFN)」に着目し、その組織幹細胞機能への影響について検討してきた。IFNは、感染のない状態でも生体内でごく微量に分泌されており、これは病原体感染時に効果的な免疫系の活性化に働くことが知られている(Nat Rev Mol Cell Biol. 2001,2:378.)。これまでに私は、この IFN シグナルの負の制御因子である Interferon regulatory factor-2 (IRF-2)を欠損するマウス(Irf2<sup>-/-</sup>マウス)では、血液の供給源である造血幹細胞の造血再構築能が破綻することを報告してきた(Nat Med. 2009, 15:696; Blood. 2013,121:3267)。Irf2<sup>-/-</sup>マウスの造血幹細胞では IFN シグナルが過剰となった結果、幹細胞性維持に必要な休止状態を保てなくなることが原因で幹細胞枯渇が生じていた。このように、IFN は造血幹細胞機能に影響を与える免疫ストレスの一つであり、造血幹細胞が IRF2 を介して IFN シグナルを適切に制御することが幹細胞性の維持には必須であると言える。そこで、これらの知見を踏まえ、本研究では、様々な組織幹細胞が持つ免疫ストレス回避機構について明らかにし、その破綻が組織恒常性維持や疾患発症にどのように関わるかを検討することを目的とした。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

造血幹細胞にとって、生理レベルの IFN の作用は機能破綻を引き起こす重大な細胞ストレスである(Nat Med. 2009, 15:696; Blood. 2013,121:3267)。本研究では腸上皮幹細胞機能に与えるこの生理的 IFN ストレスの影響を Irf2<sup>-/-</sup>マウスを用いて検討した。腸上皮幹細胞は、成体マウス腸陰窩底部に局在し、Lgr5 遺伝子を発現する細胞として検出される。Irf2<sup>-/-</sup>マウスでは、同幹細胞がコントロールマウスに比べ 1/10にまで減少し、組織を再構築する幹細胞ポテンシャルも著しく低下していた。また、腸上皮細胞特異的 Irf2 欠損マウスの解析から IRF2 が腸上皮幹細胞にイントリンジックに働く、幹細胞性維持に必須の分子であることが判明し

た。さらに、網羅的遺伝子発現解析データから、IRF2 が失われることで幹細胞が前駆細胞様の遺伝子発現パターンを示すことが分かり、幹細胞機能低下の原因が幹細胞に異常分化が生じた結果であると考えられた。一方、マウスに IFN の誘導剤である poly(I:C) を少量ずつ繰り返し投与することで、IFN の作用を慢性的受けた腸上皮幹細胞では、Irf2<sup>-/-</sup>マウスの場合同様、著しい幹細胞性の低下が生じ、同時に異常分化の表現形を示した。以上の結果から、慢性的な IFN シグナルは確かに腸上皮幹細胞機能を低下させる免疫ストレスであり、おそらく IRF2 はこのようなストレスから腸上皮幹細胞を保護し、生涯それらの数と質を保つために働く重要な分子と考えられる。また、IRF2 は、IFN 誘導性の幹細胞機能低下を引き起こす分子の発現を恒常的に制御している可能性が想定されるため、現在その転写制御機構の詳細をエピゲノム解析によって検討中である。本研究をとおして、組織幹細胞維持における免疫ストレス調節機構の一端を明らかにできたが、炎症や免疫因子及びそれらがもたらす細胞内シグナルは多岐にわたることから、同様の調節機構は他にも存在すると考えられる。

## (2) 詳細

### **研究テーマ A: 「Irf2 欠損マウスに認められる腸幹細胞減少メカニズムの解明」**

生理的な IFN シグナルは組織幹細胞の幹細胞性低下をもたらす「免疫ストレス」の一つであり、これはおそらく造血幹細胞に限った現象ではなく、各組織の組織幹細胞に共通の作用が想定される。本研究では腸上皮幹細胞機能に与える生理的 IFN ストレスの影響を Irf2<sup>-/-</sup>マウスを用いて検討した。腸上皮幹細胞は、幹細胞マーカーである Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5 (Lgr5) 遺伝子を発現しており、またこの遺伝子をタグにした腸上皮幹細胞レポーターマウス (Lgr5-GFP-Ires-CreERT2 マウス) が利用可能である。Irf2<sup>-/-</sup>マウスを背景とし、腸上皮幹細胞を可視化するマウスを作成し、同細胞分画の数を検討したところ、Irf2<sup>-/-</sup>マウスではこれがコントロールマウスの 1/10 程度にまで減少していた。また、同レポーターマウスから幹細胞を精製しオルガノイド培養によりその幹細胞ポテンシャルを検討したところ、これも著しく低下していた。即ち、Irf2<sup>-/-</sup>マウスでは、腸上皮幹細胞の数及び質のいずれもが減少、低下していると言える。また、本研究では独自に Irf2-fox マウスを作製し、腸上皮細胞特異的に Irf2 を欠損するマウスを樹立した。これらのマウスにおいても、トータルノックアウトマウスと同様の腸上皮幹細胞異常を認めたことから、IRF2 が腸上皮幹細胞にイントリンジックに働く、幹細胞性維持に必須の分子であることが判明した。また、これを反映し、Irf2<sup>-/-</sup>マウスでは、小腸、大腸ともに腸上皮組織損傷後の再生が破綻していた (図 1)。このような Irf2<sup>-/-</sup>マウスの幹細胞機能低下の原因に関連し、網羅的遺伝子発現解析から Irf2<sup>-/-</sup>マウスの腸上皮幹細胞では、コントロールマウスの同細胞に比べ腸上皮幹細胞特異的遺伝子群の発現が有意に低下し、一方でより分化の進んだ前駆細胞遺伝子の発現が亢進していたことから、IRF2 が失われることで幹細胞が前駆細胞様に異常分化していることが考えられた (図 2)。

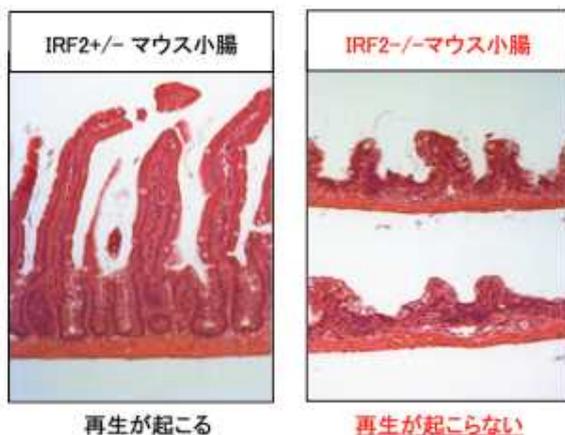


図1. IRF2<sup>-/-</sup>マウスでは、腸上皮損傷後の再生が起こらない。図は抗がん剤 5フルオロウラシル投与によって破壊された腸上皮組織の再生後の様子。

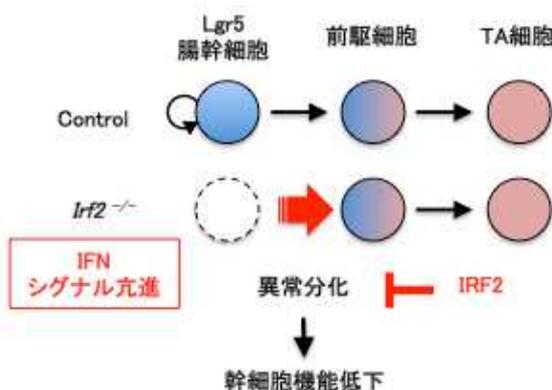


図2. IRF2<sup>-/-</sup>マウスの腸上皮幹細胞に認められる異常分化 (本文参照)

そこで、IFN シグナルそのものが、腸上皮幹細胞機能低下をもたらすかを確認するために、IFNの誘導剤である poly(I:C)を、それぞれコントロール腸上皮幹細胞レポーターマウス及び IFN の作用しない IFN 受容体欠損 (Ifnar1<sup>-/-</sup>)レポーターマウスに少量ずつ繰り返し投与し、IFN の作用を慢性的に受けた腸上皮幹細胞の幹細胞ポテンシャルについて検討した。その結果、予想された通り、IFN の作用は腸上皮幹細胞のオルガノド形成能を有意に低下させた。また、遺伝子発現解析から、Irf2<sup>-/-</sup>マウスの場合同様、IFN の作用を受けた腸上皮幹細胞では腸上皮幹細胞特異的遺伝子群の発現低下と前駆細胞遺伝子の発現亢進が認められた。以上の結果から、慢性的な IFN シグナルは確かに腸上皮幹細胞機能を低下させる免疫ストレスであり、IRF2 はこのようなストレスから腸上皮幹細胞を保護し、長期にそれらの数と質を保つために働く重要な分子と考えられる。また、Irf2<sup>-/-</sup>マウスの腸上皮幹細胞と、IFN

の作用を受けた同細胞で発現亢進する上位の遺伝子群は類似しており、データベース解析からこれらの多くは IFN 誘導性遺伝子であることを確認した。つまり、これらの遺伝子産物が両幹細胞の幹細胞機能低下に関わる直接の原因である可能性が高い。

これらの結果に基づけば、Irf2<sup>-/-</sup>マウスの腸上皮幹細胞機能低下は、IFN シグナルを抑制することで回復すると考えられた。既知の細胞内 IFN シグナル経路は、I 型 IFN 受容体 (Ifnar1 遺伝子) と転写因子である STAT1 (Stat1 遺伝子) を同時に欠損することで完全に阻害されると考えられる (JAKSTAT. 2013;2:e27521.)。そこで、Irf2 と同時にこれらの遺伝子を欠損する三重欠損マウスを作製し、腸上皮幹細胞機能について解析した。しかしながら、このマウスの腸上皮幹細胞では、期待された IFN シグナルの抑制が認められず、よって当然のことながら腸上皮幹細胞機能も回復していなかった。この結果の要因としては、IRF2 が細胞外からの IFN シグナルに依存しないユニークな IFN 誘導性遺伝子の発現制御機能を担っている可能性を想定している。つまり、IRF2 が転写阻害因子として恒常的にゲノム上に会合し、幹細胞性を低下させるこれらの IFN 誘導性遺伝子発現を抑制している可能性が考えられる。IRF2 がどのように幹細胞維持に関わるかを明らかにする上では、同転写因子による恒常的な転写制御機構を明らかにする必要がある。

### 3. 今後の展開

#### **研究テーマA:「Irf2 欠損マウスに認められる腸幹細胞減少メカニズムの解明」**

IRF2 が定常時にも核内に発現局在する転写因子であることから、恒常的に幹細胞機能維持に影響を及ぼす遺伝子群(特に IFN 誘導性遺伝子)の転写制御に関わっている可能性が示唆される。現在、腸上皮幹細胞を対象とし IRF2 を標的とした Chip-シーケンスを行っており、得られたデータを遺伝子発現データと統合することでこの点を明らかにする。このメカニズムが明らかになれば、既に報告した造血幹細胞の結果と合わせ、免疫ストレスの調節が組織幹細胞維持に必須であるという概念を強く提唱できる。本研究については、さきがけ研究期間内に論文化の計画である。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

##### (研究者)

本さきがけ研究では、免疫系と組織幹細胞のシステム間の関係について研究を遂行してきた。研究期間内には、組織幹細胞が免疫・炎症因子の作用によって機能低下や異常を引き起こすことを裏付ける現象を新たに捉えることができ、この点では良かったが、いずれの研究も 2017 年 1 月時点で論文化に至っておらず、この点で到達目標に達しなかった。これについては、引き続き 2017 年 3 月までの論文化を目指す。研究体制は、必ずしも十分であったとは言いが、一方、予算の用途については、顕微鏡の購入や高額を受託解析に活用でき、研究の効率化を測ることができた。また、本研究では、組織幹細胞が定常的にどのような生体内環境ストレスにさらされているのか？また、それらにどのように対応し、幹細胞らしさを長期に保つのか？という、幹細胞生物学領域においてこれまでに明らかにされていないが重要な疑問について。その仕組みの一端を明らかにできた。今後、この新たな視点から組織幹細胞の生態の理解がさらに深まると考えられる。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

##### (研究総括)

本研究課題では、組織幹細胞が免疫ストレスによる機能低下を回避するメカニズムを解明することを目指した。その結果、免疫系のサイトカインであるインターフェロンが組織幹細胞である腸幹細胞の増殖を抑制していることを、インターフェロングレナリ制御因子(IRF-2)の欠損マウスあるいはインターフェロン誘導剤などを用いて、マウス腸管および腸上皮幹細胞のオルガノドにおいて確認している。さらに、種々の組織幹細胞に対するサイトカインの作用についての研究が行われ、その成果の発展にも期待される。このように様々な組織幹細胞が持つサイトカインやケモカインなどの免疫ストレスからの回避機構について明らかにすることにより、その破綻が組織恒常性維持や疾患発症にどのように関わるかを明らかにしていくことに繋がって行くと考えられる。

残念ながら、本さきがけ研究期間中に成果を論文にまとめることが出来なかったが、近い内に論文として発表することが見込まれ、今後の活躍が十分に期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

該当無し

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

該当無し

# 研究報告書

## 「中枢・末梢・時間を統合する代謝生理学的ネットワーク機能の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 志内 哲也

### 1. 研究のねらい

本研究では、神経経路と液性経路を介した末梢と中枢の代謝連関作用、代謝変化と脳機能変化の生理学的連関作用、およびサーカディアンリズムや世代継承など時間軸を加えた、3つの視点からアプローチする研究を行うことで、個体内の代謝生理学的ネットワークを解明することがねらいである。栄養の摂取と運動の実施は、生体の動的恒常性を大きく刺激する。そこで本研究では、夜食症型摂食スケジュールで飼育することによりインスリン抵抗性を発症するモデルマウスを用いて、視床下部 AgRP 発現、骨格筋における異所性脂肪蓄積、肝臓の時計遺伝子発現に着目し、中枢・末梢・時間を統合した代謝生理学的連関メカニズムについて個体レベルだけでなく分子レベルで明らかにするとともに、このようなネットワーク機能を利用する生体内の生理的意義について解明する。さらに、生体リズムの乱れにより変化した動的恒常性が世代を超えて受け継がれるかを調べることで、動的恒常性の重要性を鑑みる。また、運動による脳を介した代謝亢進作用機構の解明や、臓器間ネットワークを用いて運動モチベーションを増強させる可能性を探る。これにより、夜型生活による「痩身型」糖尿病という現代病の発症機序を解明するとともに、動的恒常性を生かした処方法を創出する。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

活動期後半を中心とした夜食症型の摂食リズムで生活すると、睡眠深度が浅くなること、肝臓から脳を介して骨格筋における糖代謝能力が低下すること、および恐怖への記憶が強くなることを突き止めた。これらの一部には、副腎から分泌されるグルココルチコイドと、それによって視床下部で発現が刺激される AgRP という神経ペプチドが関与することを見出した。また、妊娠期に同様の摂食リズムで生活すると、そのマウスから生まれた子供は、恐怖に対する記憶が強くなる「性格」を継承する可能性を示した。

一方、肥満症患者は脂肪組織から分泌されるレプチンというホルモンの効きが悪いことで知られているが、運動によりオレキシンニューロンが活性化することで、レプチンが脳の視床下部へ効きやすくなることを解明した。また、特定分子に対する刺激により、神経性に脳内ドーパミンが活性化し、それにより運動へのモチベーションが亢進する可能性を見出した。

これらの結果はすべて、末梢と中枢が神経や血液などを介して有機的につながることで、栄養や運動の作用が営まれることを示唆する。さらに時間の影響が大きく関与する。このようなメカニズムを応用することで、生活習慣病を予防・治療する新たなプログラムの開発が期待できる。

## (2) 詳細

### 研究テーマA「摂食リズム誘導性視床下部 AgRP による代謝制御機構とその意義」

本研究では、雄性 C57BL/6J マウスの摂食時間を暗期後半 4 時間のみ (Evening 群) に制限した群と、摂食時間を暗期前半 4 時間に制限した群 (Morning 群)、および暗期のみ自由摂食 (Ad-lib 群) の 3 群を作成し、8 週間飼育した後のインスリン感受性を評価した。その結果、Evening 群の骨格筋においてインスリン感受性の低下を示すとともに、視床下部 AgRP の発現が増強することを見出した。Evening 群のマウスにグルココルチコイド受容体 (GR) 阻害剤を経口投与すると、増強していた AgRP 発現が有意に低下した。そこで、Cre-loxP システムを用いて AgRP ニューロン特異的 GR 欠損マウスを作成し、摂食リズムを上記の 3 群に分けて飼育した。その結果、AgRP ニューロン特異的 GR 欠損マウスでは、Evening 群で飼育しても AgRP 発現増強は見られず、骨格筋におけるインスリン感受性の低下も見られなくなった。以上より、活動期後半中心の食餌リズムにおける骨格筋インスリン感受性低下の原因として、視床下部のグルココルチコイド感受性亢進による AgRP 発現増強が、その一端を担っていることが示唆された。

一方、AgRP 増強は摂食リズム形成 2 週間後には見られるにもかかわらず、全身のインスリン抵抗性は 8 週間後まで見られない。このタイムラグから、AgRP 発現増強はインスリン抵抗性発症が真の目的ではなく、他の生理学的意味を持つと予想された。様々な検討の結果、恐怖に対する記憶や応答が、Evening 群では強くなり、AgRP ニューロン特異的 GR 欠損マウスでは Evening 群として飼育しても、恐怖への対応は変化しなかった。これらのことより、摂食リズム誘導性 AgRP は、代謝異常を発症する前に、情動行動を制御するための発現である可能性が示唆された。

### 研究テーマB「破綻した生体リズムの影響は次世代へ継承されるか？」

研究テーマAにおいて見出された摂食リズムによる代謝生理学的影響は、次世代へ引き継がれるのかを検討した。妊娠期後半の 2 週間において、研究テーマAと同様の 3 群を作成して飼育し、出産後は自由摂食に切り替えた。その結果、Evening 群の飼育条件から産まれた仔は、成獣後に恐怖記憶の増強による過敏な行動を示した。研究テーマAで見られたような代謝異常は見られなかった。また、AgRP ニューロン特異的 GR 欠損マウスの雌を用いた実験では、妊娠期後半の 2 週間において Evening 群で飼育された母マウスから産まれた仔は、成獣後に恐怖記憶の増強による過敏な行動を示さなかった。これらの結果より、妊娠期における摂食リズムは、仔における情動系の発達に大きな影響を与えることが示唆された。また、この作用には、グルココルチコイドで発現増強された AgRP が、妊娠中に何らかの作用を発揮している可能性が考えられる。

### 研究テーマC「運動が中枢性代謝調節機構に与える影響」

本研究は、持久的運動後の視床下部におけるレプチン感受性の変化と、そのメカニズムについて検討した。雄性 C57BL/6J マウスに対して 45 分間のトレッドミル走運動 (15m/min) を実施し、走運動終了直後にレプチン (2 mg/kg) を腹腔内に投与した。レプチン投与 45 分後にマウ

ス視床下部を採取し、ウエスタンブロット法および免疫組織化学染色法を用いて STAT3 のリン酸化を測定した。トレッドミル走運動後にレプチンを投与した場合、腹内側視床下部 (MBH) における STAT3 のリン酸化が、走運動しない場合よりもさらに増強した。また、オレキシンニューロンにおける c-Fos 発現が、トレッドミル走運動により増加することを認めた。オレキシン受容体阻害薬をトレッドミル走運動前にマウス脳室内に投与しておく、MBH における STAT3 リン酸化の増強が見られなくなったことから、運動後のレプチン感受性増強にはオレキシンニューロンの活性化が関与すると考えられる。しかしながら、直接 MBH へオレキシンを投与しても、レプチン感受性は上昇せず、むしろ低下したことから、運動によりオレキシンは間接的に作用し、MBH におけるレプチンの STAT3 リン酸化を亢進すると考えられる。また、脳室内へレプチンを投与した場合、STAT3 のリン酸化に運動の有無による違いは見られなかったことから、運動後、MBH において直接的にレプチン感受性が亢進するのではなく、別のメカニズムが関与することを示唆する。

### 3. 今後の展開

活動期後半を中心とした摂食リズムで生活すると、睡眠深度が浅くなることを報告したが、この現象に AgRP が関与するかどうかは不明である。睡眠障害が代謝異常を引き起こすことも考えられるため、これらの連関についても明らかにする。

研究テーマBにおいて、行動異常を示した仔マウスのどの脳部位にどんな分子レベルの異常があるかを探索し、AgRP ニューロン特異的 GR 欠損マウスから産まれた仔と比較することで、責任部位と分子を同定する。

研究テーマCにおいて、運動によるオレキシンニューロンの活性化経路の探索を行う。また、運動後のレプチン感受性亢進作用に必要なオレキシンが作用する脳部位を、光遺伝学的手法を用いて同定する。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

研究目的はほぼ達成できたが、メインテーマの研究内容をさきがけ任期が終わるまでに論文としてまとめ、世に出すことができなかったことが悔やまれる。遺伝子改変マウスの搬入や、仮説の棄却など、当初計画していた通りに進まなかったことや、途中で他の研究内容にも拡大・融合したことが原因として考えられる。

研究に関しては、それぞれ異なる手技が得意な研究補助員を雇って効率的に進めることができた。また、ウイルスの作成やサンプルの網羅的解析など、所属研究室内のハードやソフトでは不可能な部分を外部委託することで、効率的に研究を実施することができた。

本研究の成果は、予防医学的見地から社会に啓発できる内容であり、医療費の抑制など経済的な部分にも波及効果が見込まれる。また、創薬科学的見地からも末梢・中枢連関の動的恒常性を見据えた新規薬剤の開発に役立つと思われる。

これらは、他臓器間の機能的ネットワークを体系的な視点で解明するとともに、その時間的変化および破綻を捉えており、本領域の戦略目標である「先制医療の実現に向けた動的恒常性の維持・変容機構の統合的解明」に大きく寄与できた。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

本研究課題では、神経経路と液性経路を介した末梢と中枢の代謝、代謝変化と脳機能変化の生理学的連関作用、サーカディアンリズムや世代継承などの時間軸の3つの視点からの個体内の代謝生理学的ネットワークを解明することを目的とした。その結果、生活習慣として夜食症型の摂食リズムにより、骨格筋における糖代謝能力が低下することならびに恐怖への記憶が強くなることを見出し、その分子機序として、副腎から分泌されるグルココルチコイドと、それによって視床下部で発現が刺激される AgRP という神経ペプチドが関与することを見出している。また、妊娠期に同様の摂食リズムで生活すると、そのマウスから生まれた子供は、恐怖に対する記憶が強くなる「性格」を継承する可能性を見出している。残念ながら、本さきがけ期間中に、研究全体をまとめる論文の発表には至らなかったが、今後の研究成果も含めて論文化されることが期待される。

本研究領域のテーマである多臓器間の連関に正面から取り組んだ研究成果であり、今後の研究者としての成長が十分に期待される。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Miyatake Y, Shiuchi T(equal contribution), Mawatari K, Toda S, Taniguchi Y, Futami A, Sato F, Kuroda M, Sebe M, Tsutsumi R, Harada N, Minokoshi Y, Kitamura T, Gotoh K, Ueno M, Nakaya Y, Sakaue H. Intracerebroventricular injection of ghrelin decreases wheel running activity in rats. *Peptides*. 2017 Jan;87:12–19.
2. Oura K, Otsuka A, Shiuchi T(Corresponding author), Chikahisa S, Shimizu N, Séi H. Late feeding in the active period decreases slow-wave activity., *Life Sci*. 2016 Sep 1;160:18–26.
3. Otsuka A, Shiuchi T(Corresponding author), Chikahisa S, Shimizu N, Séi H. Voluntary exercise and increased food intake after mild chronic stress improve social avoidance behavior in mice., *Physiol Behav*. 2015 Nov 1;151:264–71.

### (2) 特許出願

研究期間累積件数:0件

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

<受賞>

「日本体力医学会 大塚スポーツ医科学奨励賞」(責任演者として)(2016)

<主要な学会発表>

「摂食リズムによるエネルギー代謝と高次脳機能の変容」日本薬学会(2017年3月)

「Hypothalamic control of insulin sensitivity in skeletal muscle is modulated by feeding rhythm」

Keystone symposium (2015年10月)

「Feeding rhythm during active phase influences hypothalamic regulation of insulin sensitivity in skeletal muscle」Asian Congress of Nutrition 2015 (2015年5月)

「Hypothalamic AgRP-mediated energy metabolism in skeletal muscle is a critical regulatory system in feeding rhythm-induced insulin resistance」Experimental Biology 2015 (2015年4月)

<著作物>

「運動と食欲」PharmaMedica、Vol34、No.5、p27-31、(2016)

「中枢性エネルギー代謝調節機構と末梢時計に対する摂食リズムの影響」内分泌・糖尿病・代謝内科、Vol41、No.1、p31-35、(2015)

「視床下部とメタボリックシンドロームの改善」体育の科学、Vol4、No.5、p331-338、(2014)

# 研究報告書

## 「生活習慣病における自然免疫系と代謝内分泌系との機能的クロストークの解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 長井 良憲

### 1. 研究のねらい

近年、免疫系は単に病原体の認識・排除や感染症の病態に関わるだけでなく、自己抗原やストレス応答を察知し、それらを排除・修復することにより自己免疫病などの危険な疾患の回避に寄与していると考えられている。したがって免疫系は様々な組織・器官において生体の恒常性維持に関わる重要な生命システムの一つと考えられる。本研究では、生体恒常性維持機構の破綻モデルとして、「生活習慣病における慢性炎症」と「肥満」に着目し、免疫系と代謝内分泌系との機能的なクロストークが代謝内分泌系の恒常性を維持し、その破綻が生活習慣病の発症へと繋がるメカニズムの解明を目指す。

近年、申請者は、①TLR4 類似分子 RP105 とその会合分子 MD-1 が内臓脂肪組織の M1 マクロファージに高発現し、慢性炎症やインスリン抵抗性を制御すること、②脂肪細胞からの遊離脂肪酸産生により、好中球を主体とした内臓脂肪組織炎症が惹起されること、③TLR シグナルアダプター分子 TRIF が中枢神経系において摂食応答を調節し肥満の病態に関わること、を見出した。これらの知見は、TLR などの自然免疫センサーが様々な代謝内分泌器官において機能し、慢性炎症や肥満の発症に関わることを示している。そこで本研究では、1) 内臓脂肪組織における自然免疫センサーのシグナル伝達経路と内因性リガンドの探索、及び遊離脂肪酸による炎症発症機構の解明を目指すと共に、2) 中枢神経系における TRIF の発現を解析し、炎症反応および接触抑制性ホルモンであるレプチンの応答における TRIF シグナルの機能を解明する、の 2 点を主な研究目標として研究を行った。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

TLR ファミリー分子 RP105/MD-1 が内臓脂肪組織炎症及びインスリン抵抗性を制御するメカニズムを探索するために、RP105/MD-1 の内因性リガンド及びシグナル伝達分子をメタボローム解析及び免疫沈降法で探索した。RP105/MD-1 に結合し、リガンドまたはシグナル伝達分子候補となり得る酸性リン脂質または内臓脂肪組織中の蛋白質を複数見出した。しかし、それらの正確な同定と生理的作用・意義については未解決であり、現在解析を継続している。また RP105/MD-1 が内臓脂肪組織マクロファージにおいて炎症の惹起に関わることを証明するために、マクロファージ特異的 RP105 または MD-1 KO マウスの作製を進めた。flox マウスの樹立に時間を要したが、現在 Lys-M Cre マウスとの掛け合わせを進めており、研究を継続中である。

遊離脂肪酸が自然免疫系を活性化し、内臓脂肪組織炎症を惹起する機序を解明する手掛かりとして、脂肪融解を惹起し多量の脂肪酸を遊離させる  $\beta$  アドレナリン受容体アゴニスト CL316,243 を用いた解析を行った。その結果、脂肪細胞からの脂肪酸遊離により、好中球を

主体とした内臓脂肪組織炎症が惹起され、それに伴い産生される IL-1 $\beta$ が炎症及びインスリン抵抗性の惹起に中心的な役割を果たすことが分かった。また、定常状態の脂肪組織好中球は IL-1 $\beta$ 前駆体の発現が他の細胞に比べて顕著に高く、IL-1 $\beta$ 産生し易い前炎症状態にあることが明らかとなった。この前炎症状態には脂肪細胞との直接的な相互作用及びそれによる NF- $\kappa$ B 活性化が重要であることが示唆された。また、好中球からの IL-1 $\beta$ 産生には NLRP3 以外のインフラサーム活性化が重要であることが示された。

TLR シグナルアダプター分子 TRIF が視床下部において摂食応答を調節し肥満の発症に関わる機序を解明するために、視床下部における TRIF の発現、視床下部炎症及びレプチン抵抗性の惹起における TRIF の機能について解析した。視床下部において TRIF mRNA の発現を確認したが、蛋白レベルでの検出は困難であった。また、野生型マウスに比較し TRIF KO マウスでは高脂肪食摂餌による視床下部炎症及びレプチン抵抗性が軽減していた。以上から TRIF は視床下部の炎症を惹起し、レプチンシグナルを阻害することで摂食応答を亢進させることが示唆された。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A「RP105/MD-1 の細胞内シグナル伝達経路の解析」

①これまでの解析から、RP105/MD-1 は主に B 細胞やマクロファージなどの免疫細胞に発現することが明らかとなっている。免疫細胞に発現する RP105/MD-1 が内臓脂肪組織炎症の惹起に関わることを確認するために、骨髄キメラマウスを作製した。RP105 KO マウスを用い、血球系または非血球系において RP105 が欠損するマウスを作製し、高脂肪食を摂餌させた。予想に反して、どちらの骨髄キメラマウスも野生型マウスに比較して、肥満及び内臓脂肪組織炎症が同程度に改善した。以上から、非血球系細胞にも RP105/MD-1 が発現し、内臓脂肪組織炎症の惹起に関わることを示唆された。②内臓脂肪組織において RP105/MD-1 は M1 マクロファージに高く発現している。そこで RP105/MD-1 が内臓脂肪組織マクロファージで機能することを予想し、マクロファージ特異的 RP105 または MD-1 KO マウスの作製に着手した。相同組換え ES 細胞及びキメラマウスの確立に時間を要したが、H28 年度に両マウスの flox マウスを樹立した。現在、Lys-M Cre マウスとの掛け合わせを進めている。③免疫沈降法及びプロテオーム解析を用いて、RP105 と会合する内臓脂肪組織中の蛋白質を探索した。複数の会合分子候補を見出したが、まだ蛋白の同定には至っていない。

### 研究テーマ B「RP105/MD-1 の未知の内因性リガンドの探索」

TLR4/MD-2 がパルミチン酸などの飽和脂肪酸を認識するように、RP105/MD-1 も内因性リガンドとして脂質成分を認識するとの予想のもと、脂質やその代謝物を対象としたメタボローム解析を行った。高脂肪食を摂餌した野生型マウスの血清及び内臓脂肪組織の溶解物を抗 RP105 抗体または抗 MD-1 抗体で免疫沈降し、RP105/MD-1 と結合する脂質などを探索した。酸性リン脂質の結合を検出したが、現在その再現性を確認すると共に、その生理的意義について解析中である。

### 研究テーマ C「遊離脂肪酸が内臓脂肪組織炎症を惹起する機構の解析」

内臓脂肪組織炎症における遊離脂肪酸の機能を解明するために、脂肪融解を惹起し多量の脂肪酸を遊離させる  $\beta$  アドレナリン受容体のアゴニスト CL316,243 を用いた解析を行った。

① CL316,243 の腹腔内投与により、野生型マウスの内臓脂肪組織において多数の好中球浸

潤と TNF- $\alpha$  IL-1 $\beta$  MCP-1 などのサイトカイン・ケモカインの遺伝子発現増加を認めた。特に IL-1 $\beta$  の遺伝子発現は顕著であり、内臓脂肪組織の器官培養により、成熟型 IL-1 $\beta$  の産生を確認した。抗 Gr-1 抗体による好中球の除去により、内臓脂肪組織における IL-1 $\beta$  産生が著減することから、主要な IL-1 $\beta$  産生細胞は好中球であることが示唆された。また好中球の浸潤に遅れてマクロファージが浸潤することも見出した。さらに GL316,243 の投与により、内臓脂肪組織及び肝臓でのインスリンシグナルが阻害され、このシグナル阻害は抗 IL-1 $\beta$  の投与により改善した。以上から、遊離脂肪酸による内臓脂肪組織炎症とそれに伴うインスリン抵抗性の惹起には、好中球の浸潤とそれから産生される IL-1 $\beta$  が重要な役割を果たすことが示唆された。②成熟型 IL-1 $\beta$  の産生にはインフラマソームの活性化が重要である。GL316,243 投与による IL-1 $\beta$  産生にインフラマソームが関与するか、インフラマソームを構成する ASC, Caspase-1/11, NLRP3 の各 KO マウスを用いて解析を行った。GL316,243 投与による好中球浸潤は、ASC 及び Caspase-1/11 KO マウスで完全に抑制されていたが、NLRP3 KO マウスは野生型と同等であった。以上から、GL316,243 による好中球浸潤は、NLRP3 以外のインフラマソームが関与することが示唆された。③内臓脂肪組織の好中球が多量の IL-1 $\beta$  を産生する機序を解析するために、内臓脂肪組織より常在性の好中球、マクロファージ及びそれら以外の細胞を単離し、IL-1 $\beta$  の発現をリアルタイム PCR 及び FACS で検討した。その結果、好中球における IL-1 $\beta$  mRNA 及び蛋白レベルでの発現が、他の細胞群に比べて顕著に高かった。また、内臓脂肪組織の好中球は同組織のマクロファージまたは骨髄の好中球に比べて、NF- $\kappa$ B コンポーネントである p65 が核内に高く発現していた。以上から、内臓脂肪組織の好中球は、定常状態で NF- $\kappa$ B の活性化が高く、そのため IL-1 $\beta$  の転写が誘導されることが示唆された。④内臓脂肪組織の好中球において、NF- $\kappa$ B の活性化及び IL-1 $\beta$  の発現が高い機序を解析するために、3T3-L1 脂肪細胞株と骨髄由来好中球との共培養を行った。共培養後 1 時間で IKK B  $\alpha$  の発現が上昇し、6 時間後に IL-1 $\beta$  の発現が上昇した。これらの発現誘導は、Trans-well を用いた共培養では認められなかった。また、IL-1 $\beta$  の発現誘導は、IKK 阻害剤である BAY11-7082 の添加により、阻害された。以上から、内臓脂肪組織の好中球における IL-1 $\beta$  の発現誘導には、脂肪細胞との直接的な相互作用とそれに伴う NF- $\kappa$ B の活性化が重要であることが示唆された。

#### 研究テーマ D「視床下部における TRIF の発現解析と TRIF 上流の受容体の同定」

野生型マウスより、視床下部を採取し、TRIF の発現をリアルタイム PCR 法で解析した。視床下部において TRIF mRNA の発現を認めた。他の脳部位(大脳、小脳、海馬など)との比較では、視床下部で特に高い発現を示す傾向はなかった。数種類の抗 TRIF 抗体を購入し、視床下部における TRIF 蛋白の発現をウェスタンブロット法で検討したが、検出は困難であった。陽性対照として用いた脾臓でも検出は困難であったため、用いた抗体がワークしない可能性が示唆された。

#### 研究テーマ E「視床下部のレプチン応答及び炎症状態における TRIF シグナルの解析」

摂食調節及び視床下部炎症における TRIF シグナルの機能を解明するために、野生型マウス及び TRIF KO マウスに高脂肪食を摂餌させ、12 週間後にレプチン応答性及び炎症性遺伝子発現を解析した。野生型マウスでは高脂肪食によりレプチン抵抗性が誘導されるために、レプチン脳室内投与による STAT3 リン酸化及び摂餌量の減少が抑制され、視床下部での

TNF- $\alpha$ の発現が増加していた。一方、TRIF KO マウスでは TNF- $\alpha$ の発現は誘導されず、レプチン感受性は保たれていた。以上から視床下部において TRIF シグナルは視床下部の炎症を惹起し、レプチンシグナルを阻害することが示唆された。

### 3. 今後の展開

本研究では内臓脂肪組織炎症と視床下部炎症がインスリン抵抗性やレプチン抵抗性を誘導する機構における免疫シグナルの重要性を複数の自然免疫センサー・シグナル分子に焦点を当て解析した。今後は自然免疫系が上記炎症を惹起する詳細な機序、主に内因性リガンドの同定とその作用、シグナル伝達経路の解析、免疫細胞と非免疫細胞との相互作用について解析する。高脂肪食摂取マウスの解析より、RP105/MD-1 は TLR4 よりも 2 型糖尿病、肥満の発症に深く関与することは明らかである。候補の内因性リガンド、シグナル伝達分子を同定し、それらの生理作用を明らかにする。またコンディショナル KO マウスの解析により、RP105/MD-1 が機能し炎症惹起に重要な細胞を同定する。以上から 2 型糖尿病、肥満の発症における RP105/MD-1 の全体像を明らかにする。

今回、これまでに報告のない、内臓脂肪組織に常在する好中球のユニークな特徴を見出した。好中球の前炎症状態が誘導されるには、脂肪細胞との接触性相互作用が重要であることが示されている。相互作用による好中球の変化をマイクロアレイや RNA seq を用いて網羅的に解析し、前炎症状態となる機序を解明する。

今回見出した TRIF シグナルは視床下部炎症の惹起に関わる新しいシグナル経路と考えられる。KO マウスの解析から、TRIF シグナルがレプチン抵抗性を誘導するのは明らかであり、今後は TRIF シグナルの誘導に関わる内因性リガンドとその産生機序、TRIF 発現細胞の同定を進める。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

本研究では、免疫系、特に原始的な免疫系である自然免疫系と代謝内分泌系、特に内臓脂肪組織と視床下部とのクロストークが慢性炎症を誘導する機構について解析を進めた。研究者が独自に見出した RP105/MD-1 の内臓脂肪組織炎症の誘導機構については、内因性リガンドの同定には至っておらず、コンディショナル KO マウスの作製にも遅延が生じた。本来の期待した成果を出すことは出来なかったが、今後も研究を継続し、RP105/MD-1 の機能解明に取り組みたい。一方、内臓脂肪組織に常在する好中球のユニークな機能を発見し、IL-1 $\beta$ を介する内臓脂肪組織炎症に、好中球が中心的な役割を果たすことを見出した。これは、これまでに報告のない興味深い成果と考えており、現在論文執筆中である。摂食調節における TRIF シグナルの解析については、内因性リガンド候補として stathmin を見出し、TRIF シグナルを介して視床下部炎症・レプチン抵抗性を誘導するという機序の解明に繋がる成果が出ている。今後、詳細な解析を行い、H29 年度中に論文を投稿する予定である。また、自然免疫センサーの活性化を阻害し、内臓脂肪組織炎症・線維化を抑制する甘草由来の天然物 isoliquiritigenin を見出しており、原薬製造メーカーと共同で本薬物を多く含む甘草エキスの抽出に取り組んでいる。今後、抽出エキスの抗炎症作用を解析し、産学連携による機能性食品の開発に取り組む

と共に、本薬物が今回見出した内臓脂肪組織炎症・視床下部炎症の機構を抑制するかどうかについても解析を行いたい。

研究実施体制については、実験の補助に必要な補佐員を雇用し、研究の進捗に大いに役立った。また研究費については、フリーザーが故障したため新規に購入した以外は、ほぼ計画通りに執行した。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

本研究課題では、「生活習慣病における慢性炎症」と「肥満」に着目し、免疫系と代謝内分泌系との機能的なクロストークが生体の恒常性を維持し、その破綻が生活習慣病の発症へと繋がるメカニズムの解明を目指した。その結果、TLRファミリー分子 RP105/MD-1 のリガンド候補分子や TRIF シグナルの内因性リガンドを複数発見するとともに、内臓脂肪炎症での好中球の役割を見出しており、詳細な解析の後に論文化する予定である。また、内臓脂肪炎症を抑制する天然物について企業との共同研究も進んでいる。論文発表などの外部発表や特許出願も多く、今後の活躍が十分に期待される。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Honda H, Nagai Y, Matsunaga T, Okamoto N, Watanabe Y, Tsuneyama K, Hayashi H, Fujii I, Ikutani M, Hirai Y, Muraguchi A, Takatsu K. Isoliquiritigenin is a potent inhibitor of NLRP3 inflammasome activation and diet-induced adipose tissue inflammation. *J Leukoc Biol* 96(6), 1087–1100, 2014
2. Yanagibashi T, Nagai Y, Watanabe Y, Ikutani M, Hirai Y, Takatsu K. Differential requirements of MyD88 and TRIF pathways in TLR4-mediated immune responses in murine B cells. *Immunol Lett* 163(1), 22–31, 2015
3. Nakamura T, Nishibu A, Yoshida N, Yasoshima M, Anzawa K, Watanabe Y, Nagai Y, Takatsu K, Ogawa K, Mochizuki T. Glycyrrhetic acid inhibits contact hypersensitivity induced by trichophytin via dectin-1. *Exp Dermatol* 25, 299–304, 2016
4. Watanabe Y, Nagai Y, Honda H, Okamoto N, Yamamoto S, Hamashima T, Ishii Y, Tanaka M, Suganami T, Sasahara M, Miyake K, Takatsu K. Isoliquiritigenin attenuates adipose tissue inflammation in vitro and adipose tissue fibrosis through inhibition of innate immune responses in mice. *Sci Rep* 6, 23097; doi:10.1038/srep23097, 2016
5. Takikawa A, Mahmood A, Nawaz A, Kado T, Okabe K, Yamamoto S, Arif A, Senda S, Tsuneyama K, Ikutani M, Watanabe Y, Igarashi Y, Nagai Y, Takatsu K, Koizumi K, Imura J, Goda N, Sasahara M, Matsumoto M, Saeki K, Nakagawa T, Fujisaka S, Usui I, Tobe K. HIF-1  $\alpha$  in myeloid cells promotes adipose tissue remodeling toward insulin resistance. *Diabetes* 65(12), 3649–3659, 2016

## (2)特許出願

研究期間累積件数:5 件

1.

発 明 者: 藤本ゆかり、深瀬浩一、高津聖志、長井良憲、岡本直樹  
発明の名称: トール様受容体 4 活性化作用を有するフニコロシン誘導体及びその用途  
出 願 人: 富山大学、大阪大学、テイカ製薬株式会社  
出 願 日: 2014/9/30  
出 願 番 号: 特願 2014-201593

## (2)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

### 主要な学会発表

1. 長井良憲、渡邊康春、本田裕恵、戸邊一之、高津聖志 メタボリック症候群における慢性炎症を制御する自然免疫シグナルの解析 第 34 回日本肥満学会、東京、2013 年 10 月 11 日
2. 長井良憲、渡邊康春、高津聖志 遊離脂肪酸誘発性の内臓脂肪組織炎症における好中球と IL-1 $\beta$ シグナルの機能解析 第 35 回日本肥満学会、宮崎、2014 年 10 月 24 日
3. 長井良憲、渡邊康春、高津聖志 遊離脂肪酸誘発性の内臓脂肪組織炎症モデルにおける好中球と IL-1 $\beta$ の機能解析 第 36 回日本炎症・再生医学会、東京、2015 年 7 月 21 日
4. 長井良憲 メタボリック症候群と慢性炎症: 炎症を改善する天然薬物の探索 とやま市民公開講座「慢性炎症疾患の発症・進行と制御」、富山、2015 年 10 月 3 日(招待講演)
5. 長井良憲 自然免疫を標的とした慢性炎症治療薬の創薬研究 第 62 回薬事研究会総会特別講演、富山、2016 年 5 月 23 日(招待講演)
6. 長井良憲 自然免疫の光と影～慢性炎症における自然免疫異常と天然薬物による制御～ 第 9 回高サイトカイン血症研究会講演会、東京、2016 年 11 月 5 日(招待講演)

### 受賞

1. 長井良憲 遊離脂肪酸誘発性の内臓脂肪組織炎症モデルにおける好中球と IL-1 $\beta$ の機能解析 第 36 回日本炎症・再生医学会優秀演題賞 2015 年 7 月 22 日

### 著作物

1. 長井良憲、渡邊康春、高津聖志 自然免疫系受容体 RP105/MD-1 によるメタボリック症候群の制御 内分泌・糖尿病・代謝内科 37(6): 610-616, 2013
2. Nagai Y and Takatsu K. Section2. Part E. 26. Role of the immune system in obesity-associated inflammation and insulin resistance. In “Nutrition in the Prevention and Treatment of Abdominal Obesity” (Ronald R. Watson), pp281-293, ELSEVIER/Academic Press, New York, 2014
3. 本田裕恵、長井良憲、高津聖志 第 6 章 3 植物由来成分による TLR4/MD-2 シグナルの抑制 エンドトキシン・自然免疫研究 17 谷徹、横地高志編集 80-85, 医学図書出版

株式会社, 東京, 2014

4. 長井良憲、渡邊康春、高津聖志 第4章13節 RP105 「series モデル動物利用マニュアル 疾患モデルの作製と利用-脂質代謝異常と関連疾患<下巻>」尾池雄一、佐々木雄彦、村上誠、矢作直也編集 133-142, 株式会社エルアイシー, 東京, 2015
5. 長井良憲、渡邊康春、高津聖志 自然免疫系センサーによる慢性炎症制御と代謝リック症候群 別冊 BIO Clinica 慢性炎症と疾患 「慢性炎症制御による加齢関係疾患治療の展望」第4巻第2号, 67-72, 2015
6. 長井良憲、高津聖志 自然免疫センサーによる炎症性マクロファージの制御と天然薬物による炎症制御 週刊医学のあゆみ 第1土曜特集「代謝調節における免疫細胞の役割」 Vol.257, No.6, 613-619, 2016
7. Nagai Y, Honda H, Watanabe Y, Takatsu K. Chapter 30 Potential therapeutic natural products for the treatment of obesity-associated inflammation by targeting TLRs and inflammasomes. In “Chronic Inflammation – Mechanisms and Regulation –“ (M. Miyasaka and K. Takatsu), pp379-397, Springer Japan, Tokyo, 2016
8. Nagai Y, Watanabe Y, Honda H, Takatsu K. Isoliquiritigenin: A unique licorice component that attenuates adipose tissue inflammation and fibrosis by targeting the innate immune sensors. In “Research of licorice in the past, present and future – Preparation of various bioactive extracts as alternative medicines” (H. Sakagami), IN TECH, in press

#### プレスリリース

1. 「生薬甘草の成分が内臓脂肪の炎症・線維化を抑制する機序を解明」 富山大学と JST とで共同リリース 2016年3月14日

# 研究報告書

## 「内皮細胞を起点とした心血管系の恒常性維持機構の解明と制御」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 中岡 良和

### 1. 研究のねらい

生活習慣の欧米化で、本邦でも生活習慣病を背景とした虚血性心疾患が増加の一途にある。虚血性心疾患での冠血管新生には、胎生期の冠血管発生と同様の分子機序が一部は共有されていると考えられ、虚血性心疾患に対する革新的な新規治療法開発を考える場合には胎生期の冠血管発生の詳細な解明が必要である。胚発生期には最初は心筋細胞に酸素や栄養物は受動的拡散で供給されるが、心臓の成長で心室壁厚が肥厚するとともに冠血管が形成され、冠血管による供給へ移行する。よって、心臓発生に冠血管は必須であるが、冠血管内皮の発生起源とそれを制御する分子機構は不明であった。

そうした状況で、Stanford 大学のグループは冠動脈内皮と冠静脈内皮はともに右房に隣接する静脈洞の内皮細胞が遊走して心室に進入する直前に脱分化して、心室筋内の未知のシグナル機構で心外膜直下を走行する血管は冠静脈に、一層内側の心筋層内を走行する血管は冠動脈となると報告した(Red-Horse et al. *Nature* 464, 549, 2010)。また、Albert Einstein 医科大学のグループは冠動脈内皮の起源は心内膜内皮に依存し、その血管新生は心筋から分泌される VEGF-A が心内膜細胞に発現する VEGFR2 に作用することが必要と報告した(Wu et al. *Cell* 151, 1083, 2012)。一方、冠静脈形成の分子機構は全く不明であったが、申請者らは心筋から分泌される血管新生因子 angiopoietin-1(Ang1)が冠静脈形成に必須である可能性を見出していた。以上より、胎生期の心臓発生で冠動脈と冠静脈の起源はそれぞれ心内膜内皮と静脈洞内皮にあり、心筋由来の異なる血管新生因子が冠動脈と冠静脈の形成を制御する可能性が考えられる。胎生期の心臓発生での冠血管新生の制御機構を解明して、さらに成体での虚血性心疾患に対する新規治療法に敷衍することが第 1 の狙いである。

また、肺高血圧症のような血管の慢性炎症が背景にある難病で、IL-6 などの炎症シグナルに対して Ang1 を介した内皮細胞を起点としたシグナルが拮抗して恒常性破綻を防ぐ可能性が近年示唆されている。そこで Ang1 を介した内皮保護シグナルと IL-6 シグナル、そしてこれら 2 つのシグナルのクロストークに焦点を当てて、肺高血圧症に対する新しい治療法を開発することが第 2 の狙いである。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究では内皮細胞を起点とした心血管系の恒常性維持機構の解明を目指して、まず胎生期の冠血管新生機構の解明に取り組んだ。心筋細胞由来 Ang1 が胎生期の心臓での血管新生で担う役割を解明するため、心筋特異的 Ang1 欠損マウス(Ang1CKO)を作製した。Ang1CKO マウスは CD31 の免疫組織学的解析で心外膜直下の血管、すなわち冠静脈の形成不全を呈することが示唆された。Ang1CKO マウスで形成不全を来す血管が冠静脈かを確認

するため、静脈マーカーの APJ, EphrinB4, COUP-TFII の発現状態を免疫組織染色、in situ hybridization、動脈内皮、静脈内皮特異的 lacZ ノックインマウスでの X-gal 染色で検討したところ、Ang1CKO マウスは冠静脈形成不全を呈することが明らかになった。また、心臓に隣接する静脈洞内皮細胞のうち、APJ 陰性の未分化内皮細胞が Ang1 の作用で心臓内に誘引されて進入して、冠静脈形成がなされることが経時的な免疫組織学的解析で明らかとなった。また、Ang1 は未分化内皮細胞に作用して静脈分化を促進することも明らかとなった。以上の成果は 2014 年 7 月 29 日 *Nature Communications* 誌に掲載された。さらに成体での薬剤誘導性心筋細胞特異的 Ang1 欠損マウス (Ang1ICKO) を作製して、急性心筋梗塞を誘導して Ang1 欠損の影響を検討したが、野生型と Ang1ICKO では心筋梗塞サイズ、梗塞後の心機能、梗塞後の血管新生に有意な差異を認めなかった。

また、内皮保護因子の Ang1 シグナルと拮抗する炎症性サイトカインの interleukin-6 (IL-6) が血管病の肺高血圧症の病態を促進する分子機構の解明にも取り組んだ。低酸素誘発性肺高血圧症モデルマウスの系を用いて、低酸素刺激で主に肺動脈内皮細胞から分泌される IL-6 が肺組織で Th17 細胞を誘導すること、Th17 細胞から分泌される IL-21 が肺内のマクロファージを M2 マクロファージ優位な状態に極性化すること、M2 マクロファージ由来の液性因子が肺動脈平滑筋細胞の増殖を促進して肺高血圧症の病態形成に働くことを明らかにした。以上の成果は 2015 年 5 月 4 日 *PNAS* 誌電子版に掲載された。今後、IL-6 と IL-21 に対する生物学的製剤が新しい肺高血圧症の治療薬に発展することが期待される。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A 「胎生期の冠血管新生機構の解明」

心筋細胞由来 Ang1 が胎生期の心臓での血管新生で担う役割を解明する目的で *Ang1<sup>fllox</sup>* マウスと *α-MHC-Cre* トランスジェニックマウスを交配して心筋特異的 Ang1 欠損マウス (Ang1CKO) を作製すると、Ang1CKO は E12.5-14.5 で胎生致死を呈した。研究開始時点で、

- ① 野生型の心外膜直下に観察される CD31 陽性像が Ang1CKO では著明に減少すること
- ② ホールマウント免疫染色後に薄切すると 2 層の CD31 陽性冠血管像で、外側の冠静脈と考えられる血管が特異的に Ang1CKO では心臓背側から側壁で著減していること
- ③ 心外膜直下に見られる 2 層の CD31 陽性血管像で内側の冠動脈と考えられる血管数に野生型と Ang1CKO で有意差は認めないこと
- ④ 免疫染色での静脈マーカー APJ の発現解析、そして静脈内皮特異的に *lacZ* 遺伝子を発現する *EphB4-lacZ* ノックインマウスとの交配マウスでの Xgal 染色解析から、Ang1CKO で APJ 陽性、EphB4 陽性の冠静脈が欠損すること (図 1a-l の写真, q, r: 定量)

を見出して、心筋由来 Ang1 が冠静脈形成に必須の役割を担う可能性が示唆されていた。

そこで Ang1CKO での冠静脈欠損を更に確認するため、静脈分化に必須の転写因子 *COUP-TFII* の発現を in situ hybridization で検討すると、野生型では *COUP-TFII* の発現

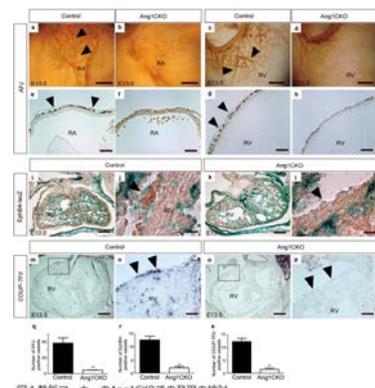


図 1 静脈マーカーの Ang1CKO での発現の検討

が見られたが Ang1CKO では欠損していた(図 1m-p, s:定量)。また、インク注入での冠動脈造影と動脈内皮特異的に *lacZ* 遺伝子を発現する *EphrinB2-lacZ* ノックインマウスと Ang1CKO と交配したマウスで X-gal 染色すると、Ang1CKO マウスで冠動脈形成に異常を認めなかった。

Ang1 の受容体である *Tie2* 遺伝子に *lacZ* 遺伝子をノックイン(KI)した *Tie2-lacZ* KI マウスを用いて、心臓に冠血管が入る直前の E10.5 に *Tie2* の発現がどこに見られるかを検討すると、*Tie2* の発現は静脈洞の内皮に強く観察された(図 2a,b)。右心房に隣接する静脈洞の内皮が心臓へ進入して冠血管を形成するとする Red-Horse らの報告(*Nature*. 2010;464:549-553)を踏まえて、E10.5 の野生型及び Ang1CKO から心室と心外膜を単離して、E10.5 の *Tie2-lacZ* ノックインマウスから単離した静脈洞と心房とを密着させて器官培養した。*Tie2* 陽性(X-gal 染色陽性)内皮細胞は野生型の心室へは進入したが、Ang1CKO の心室への進入は有意に減少していた。よって、心室筋由来 Ang1 は静脈洞の *Tie2* 陽性内皮細胞を心臓内へ誘引する可能性が示唆された(図 2c-f: X-gal 染色像、g 定量結果)。

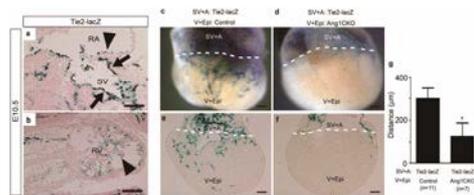
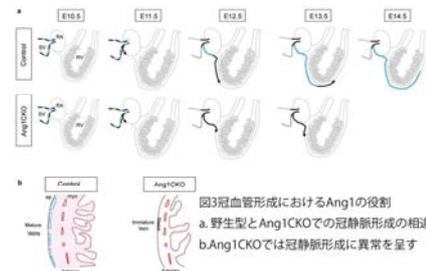


図2 心筋由来Ang1はTie2陽性静脈洞内皮を心臓内へ誘引する

更に免疫組織染色による検討で、E10.5 のマウス胚の静脈洞には APJ 陽性と APJ 陰性の内皮細胞が混在することを見出した。静脈洞の APJ 陽性、APJ 陰性の 2 種類の細胞集団で、APJ 陰性 CD31 陽性の未分化内皮細胞が E10.5~E11.5 には右心房へ進入、さらに E12.5 には心室へと進入して、その後の心筋由来 Ang1 の作用により APJ 陽性静脈内皮細胞に分化することが、経時的に詳細な免疫組織学的解析を行うことで明らかとなった(図 3)。



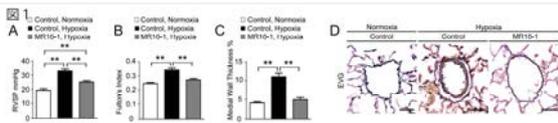
また、ES 細胞由来 Flk1(VEGFR2)陽性血管内皮前駆細胞の未熟な内皮細胞分化系を用いて、Ang1 が静脈分化誘導を促進するか検討した。ES 細胞由来 Flk1 陽性血管内皮前駆細胞に VEGF+cAMP を添加すると動脈内皮マーカーEphrinB2 の発現が誘導されるが(Yamashita JK et al. *Nature*. 2000;408:92-96)、この系に Ang1 活性化アナログ(COMP-Ang1)を添加すると EphrinB2 の誘導は抑制されるのに対して静脈マーカーCOUP-TFII の発現が逆に誘導されて、Ang1 は静脈分化を促進して動脈分化を抑制することが示唆された。また、Ang1 による静脈分化は *Tie2* のノックダウンでキャンセルされることも分かった。以上の研究成果をまとめて 2014 年 7 月 29 日に *Nature Communications* 誌で報告した。

### 研究テーマ B 「心筋梗塞後の血管新生での Ang1/Tie2 シグナルの役割の解明」

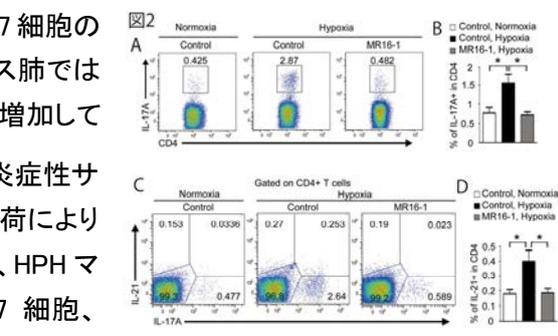
成体での薬剤誘導性心筋細胞特異的 Ang1 欠損マウス(Ang1CKO)を作製して、急性心筋梗塞を誘導して Ang1 欠損の影響を検討した。しかし、野生型と Ang1CKO では心筋梗塞サイズ、梗塞後の心機能、梗塞後の血管新生に有意な差異を認めず、進展させられなかった。

### 研究テーマ C 「Ang1/Tie2 シグナルと interleukin-6(IL-6)シグナルに着目した肺高血圧症の病態形成機構の解明」

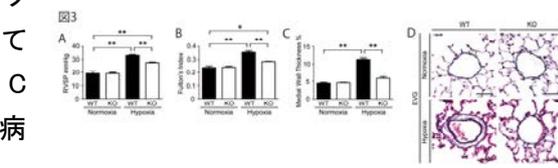
本研究を開始する時点で、Ang1/Tie2 シグナルは血管難病の1つ肺高血圧症の発症を抑制する内皮保護シグナルとして機能する可能性が報告されており(Kugathasa et al. *J. Exp Med.* 206–2221, 2009)、一方で炎症性サイトカインの IL-6 は肺高血圧症病態を促進する可能性に関する報告がなされていた(Steiner et al. *Circ. Res.* 104, 236, 2009)。研究開始時にマウスを空気中の酸素濃度(21%)より低い酸素濃度(10%)に曝露して作製する低酸素負荷誘発性肺高血圧症(Hypoxia-induced Pulmonary Hypertension; HPH)マウスの肺で、①IL-6 が低酸素負荷後2日目をピークに肺細小動脈の内皮細胞で強く発現誘導されること、②HPHマウスに抗IL-6受容体モノクローナル抗体MR16-1を投与するとコントロール抗体の投与群に比べてHPH病態が有意に抑制されることを見出していた(図1A-D)。



ヘルパーT細胞の1サブセットのTh17細胞が関節リウマチなどの自己免疫疾患の病態で重要であることが報告されていたが、肺高血圧症でのTh17細胞の役割は不明であった。そこでHPHマウス肺でのTh17細胞の動態とTh17細胞の産生するサイトカインを解析した。HPHマウス肺では低酸素負荷後3日目に、Th17細胞が著明に増加して(図2A,B)、さらにTh17細胞が主に産生する炎症性サイトカインのIL-17やIL-21が共に低酸素負荷により肺組織での発現が有意に増加していた。また、HPHマウス肺において低酸素負荷で増加するTh17細胞、IL-17、IL-21の動態は、MR16-1投与で有意に抑制された(図2C,D)。そこでHPHマウスに抗IL-17中和抗体を投与してHPH病態への影響を検討すると、IL-17阻害ではHPH病態形成に有意な阻害効果を認めなかった。一方、IL-21受容体ノックアウト(IL-21RKO)マウスでは野生型マウスに比べてHPH病態が有意に抑制されている(図3:A右室収縮期圧、B右室/左室重量比、C中膜肥厚係数)、IL-6の下流でIL-21がHPH病態形成に重要である可能性が示唆された。



HPHマウス肺ではM2マーカーのFizz1やMrc1などの発現が優位なM2マクロファージが増えて、M2マクロファージ極性化がHPH病態で重要とされていたが(Vergadi et al. *Circulation* 123:1986, 2011)、そのM2極性化機構は不明であった。抗IL-6受容体抗体を投与されたマウス肺ではコントロール抗体を投与されたマウスに比べて肺組織のM2マクロファージの集積が有意に抑制されて、またIL-21RKOマウス肺では野生型マウス肺に比してHPH病態でのM2マクロファージの集積が有意に抑制されていた。また、マウス肺から気管支肺泡洗浄で単離した肺泡マクロファージをIL-21添加条件で*in vitro*培養するとM2マクロファージマーカーの発現が誘導された。以上より、IL-21がHPHマウスでのM2マクロファージ極性化に重要であることが示唆された。



次に肺高血圧症病態で最終的に観察される肺動脈平滑筋細胞の増殖、中膜肥厚と上記シグナルとの関連を検討した。ヒト肺動脈平滑筋細胞(HPASMC)を血清除去後、IL-6、IL-6と

遊離型 IL-6 受容体の共刺激、または IL-21 で刺激したが、何れでも増殖反応は見られなかった。一方、マウス肺から気管支肺胞洗浄で単離したマクロファージを IL-21 処理して M2 極性を誘導した細胞を HPASMC と共培養すると HPASMC の増殖が誘導された。また、肺移植を受けた特発性肺動脈性肺高血圧症 (IPAH) 患者での IL-21 と M2 マクロファージマーカー (Mrc1 と Arg1) の発現を検討したところ、IPAH 患者肺では非肺高血圧症患者肺に比べて有意に IL-21 と M2 マクロファージマーカーの発現が亢進していた (図 4)。

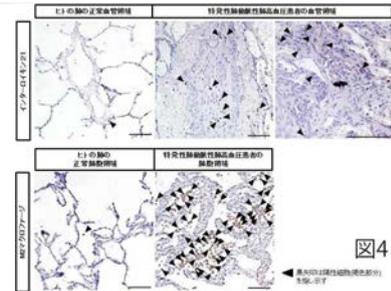


図4

以上より、主に肺動脈内皮細胞から分泌される IL-6 は肺組織で Th17 細胞を誘導して、Th17 細胞から分泌される IL-21 が肺内のマクロファージを M2 極性化することで肺動脈平滑筋細胞の増殖を促進して肺高血圧症の病態形成に関与

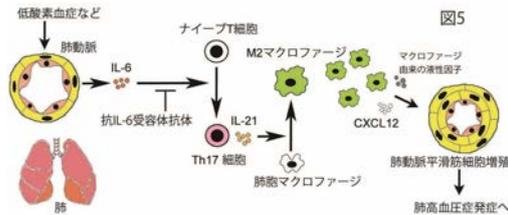


図5

することが明らかとなった (図 5)。IL-6 による肺高血圧病態形成機構の解析は予定通り進捗して、研究成果は 2015 年 5 月 4 日 *PNAS* 誌電子版に掲載された (*Proc Natl Acad Sci U S A*. 112(20): E2677-86, 2015)。一方、Ang1/Tie2 シグナルと IL-6 による肺高血圧病態のクロストークの検討は十分に進捗をはかれなかった。

### 3. 今後の展開

研究テーマ A では心臓発生における冠血管形成で Ang1 が特に未分化内皮を心臓に遊走させて、静脈内皮に分化する作用を担うことを明らかにした。未分化内皮細胞に対して静脈分化を誘導するシグナルについては不明な点が非常に多く、静脈化に重要な役割を果たすことが明らかになった Ang1 の機能解明を今後進めると、血管新生の効率化に繋がれると期待される。

また、研究テーマ C では難病の肺高血圧症に対して新たに炎症性サイトカインの IL-6 や IL-21 を標的とした生物学的製剤 (抗体医薬) が治療薬になる可能性が示唆されている。肺高血圧症に対する薬物治療はこの 10 年間の発展は目覚ましいものがあるが、何れの薬剤も平滑筋細胞の弛緩・収縮制御を標的とした薬剤ばかりである。そうした状況で炎症が肺高血圧症の病態促進の鍵を握ると、学会でも考えられており我々の成果は注目を集めている。近い将来にヒトの難治性肺高血圧症患者を対象とした臨床試験を立ち上げて、炎症性サイトカインを標的とする新しい肺高血圧症の治療法の開発へ繋げたい。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

- ・ 心臓の胎生期の冠血管形成の分子機構でこれまで明らかでなかった冠静脈の形成機構について、心筋由来の Ang1 が静脈洞内皮を心臓内へ誘引して静脈分化も促すことで制御される分子機構を明らかにした。
- ・ 成体マウスで心筋梗塞モデルを作製して、この胎生期の冠血管形成のメカニズムを敷

衍することは難しい結果が得られた。仮説と異なる結果が出た場合の対処を綿密に考えておく必要があるが、このテーマについてはあったと反省している。

- ・ 低酸素誘発性肺高血圧症マウスで、低酸素刺激により肺動脈内皮から分泌される IL-6 が Th17 細胞/IL-21/M2 マクロファージ極性を介して肺高血圧症病態を促進することを解明した。IL-6 や IL-21 のシグナルを阻害する生物学的製剤が新しい肺高血圧症の治療法になる可能性が示唆されて、近い将来に難治性の肺高血圧症患者を対象にした臨床試験でこれらの薬剤の有効性を検討することで、新しい肺高血圧症の治療法開発に繋がる可能性がある。
- ・ 科学技術の社会への情報発信を目的として上記2つの研究成果をプレスリリースしたところ、新聞報道(2014年7月23日、7月24日)や TV ニュース(2015年5月5日)で取り上げられ、社会から一定の反響を得ることが出来た。
- ・ 研究テーマ「内皮細胞を起点とした心血管系の恒常性維持機構の解明と制御」で掲げた3つのテーマのうち、2つで論文をはかり成果をまとめることが出来て、研究目的の70%程度を達成したと考える。未達成の部分は、今後の課題として取り組みたい。
- ・ 研究の実施体制は、一緒に大学院生 2 名と実験を進めた。また、さきがけ研究期間の途中で独立ポジションを得る幸運に恵まれたが、阪大循環器内科の大所帯でシェアしていた研究設備から離れることで、多数の実験機器を購入する必要が生じた。こうした研究費面での困難は春日雅人・総括と JST から適切な追加支援、増額支援のサポートを頂けたため、何とか乗り切れた。その他の研究費執行は問題なく遂行した。
- ・ 本さきがけ研究の成果が認められ、厚生労働省難治性血管炎研究班の大型血管炎分科会・分科会長を 2018 年から拝命する予定であり、本さきがけ研究は私の研究者としての飛躍につながったと考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

本研究課題は、胎生期の心臓発生での冠血管新生の制御機構を解明して、成体での虚血性心疾患に対する新規治療法に敷衍すること、および、肺高血圧症に対して内皮保護シグナルと炎症シグナルのクロストークに焦点を当てて、肺高血圧症に対する新しい治療法を開発することが目的である。心筋特異的 Ang1 欠損マウス(Ang1CKO)を用いて、未分化内皮細胞からの冠静脈形成過程に Ang1 が重要な働きをしていることについて論文報告したが、成体での急性心筋梗塞モデルでの検討結果では Ang1 の効果が認められなかった。一方、IL-6 および IL-21 が肺高血圧症の病態形成に働くことを明らかにして論文発表した。今後、IL-6 と IL-21 に対する生物学的製剤が新しい肺高血圧症の治療薬に発展することが期待される。このようにさきがけ研究をまとめた論文を発表することが出来ている。

さきがけ研究期間の途中で国立循環器病センターへの異動があり、新たに研究室を主宰することになった。このように着実に成果を積み上げ、新しいポジションも得て、今後の飛躍が十分期待される。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Hashimoto-Kataoka T, Hosen N, Sonobe T, Arita Y, Yasui T, Masaki T, Minami M, Inagaki T, Miyagawa S, Sawa Y, Murakami M, Kumanogoh A, Yamauchi-Takahara K, Okumura M, Kishimoto T, Komuro I, Shirai M, Sakata Y, **Nakaoka Y.\*** Interleukin-6/interleukin-21-signaling axis is critical in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 May 19; 112(20): E2677-86. doi: 10.1073/pnas.1424774112. Epub 2015 May 4. (\*corresponding author)
2. Arita Y, **Nakaoka Y.\***, Matsunaga T, Kidoya H, Yamamizu K, Arima Y, Hashimoto-Kataoka T, Ikeoka K, Yasui T, Masaki T, Yamamoto K, Higuchi K, Park JS, Shirai M, Nishiyama K, Yamagishi H, Otsu K, Kurihara H, Minami T, Yamauchi-Takahara K, Koh GY, Mochizuki N, Takakura N, Sakata Y, Yamashita JK, Komuro I. Myocardium-derived angiopoietin-1 is essential for coronary vein formation in the developing heart. *Nature Communications* 2014 Jul 29; 5: 4552. doi: 10.1038/ncomms5552. (\*corresponding author)

### (2) 特許出願

研究期間累積件数: 1件

1.

発 明 者: 中岡 良和、片岡 崇弘

発明の名称: 肺高血圧症治療薬およびそのスクリーニング方法

出 願 人: 国立大学法人大阪大学

出 願 日: 2014/9/8

出 願 番 号: 特願2014-181860

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

#### (主要な学会発表)

1. 中岡良和. 炎症性シグナルに焦点を当てた肺高血圧の病態形成機構. 第1回日本肺高血圧・肺循環学会学術集会 シンポジウム「PHに対する最新基礎研究の成果」(2016年10月2日京王プラザホテル)
2. Nakaoka Y. "Angiopoietin-1 derived from myocardium is essential for coronary vein formation in the developing heart" 日本血管生物医学学会春季特別シンポジウム・招請講演(2015年5月13日大阪大学微生物病研究所谷口記念講堂)
3. Nakaoka.Y. The role of angiopoietin-1 in coronary vessel formation in the developing heart. Symposium on Arterial Disease. The 18<sup>th</sup> International Vascular Biology Meeting (IVBM2014) (2014年4月14日、京都みやこめっせ)

#### (受賞)

4. 大阪大学総長奨励賞「冠血管形成の分子機構の研究」2014年7月

#### (プレスリリース)

5. 「心不全につながる難病 肺高血圧症の発症メカニズムを解明」

<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20150505/>

2015年5月1日大阪大学・JST共同プレスリリース

⇒2015年5月5日NHKのTVニュースで放送

6. 「心臓の血管新生の新メカニズムを解明～心筋梗塞などの新しい治療法開発へ光～」  
[http://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2014/20140722\\_1](http://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2014/20140722_1)  
2014年7月18日大阪大学プレスリリース  
⇒2014年7月23日毎日新聞、産経新聞、日経新聞、7月24日朝日新聞の4紙に掲載

# 研究報告書

## 「運動器の動的恒常性を司るロコモ・サーキットの解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 中島友紀

### 1. 研究のねらい

運動器の主な構成要素である骨と筋肉は、ヒト組織重量の約 70%を占める臓器であり、動的な恒常性を維持しながら統合的な運動機能を実現している。生体はレジスタンストレーニングやスポーツなどの運動によるメカニカルストレスに应答し骨と筋肉の組織量を増加させる。一方、宇宙空間など力学的負荷が少ない環境においては、速やかな骨と筋肉の減少が引き起される。また、加齢に伴うサルコペニアや、様々な神経系、運動器系疾患は、日常生活動作を低下させ、自立した生活を障害することで寝たきり生活へと繋がり、生命予後を決定する大きな要因となっている。

メカニカルストレスが増えると骨と筋肉は丈夫になり、逆にストレスが減ると骨と筋肉が弱くなることを、人類は経験的に理解している。しかし、骨と筋肉は、どの様に力学的負荷や環境変化に対応し、同時にその組織量を再構築するのか？骨と筋肉は、個別の臓器として力学的負荷を感受し、その再構築の実現や破綻に至るのか？または、骨と筋肉の臓器間でいかなる連環クロストークがあり協調的な生命システムとして、その再構築や破綻を導いているのか？など、不明な点が多いのが現状である。

また、運動機能の低下で寝たきり状態になると認知症や他の内臓器疾患が発症しやすいことや、歯牙の崩落により咀嚼機能が低下した患者では、記憶や学習能力の低下が見られることが知られている。すなわち、運動器系の破綻が全身性の生体制御機構に関与していることが予測されるが、それらの制御メカニズムもまた、いまだに十分に理解されているとは言い難い。

本研究では、運動器の主軸となる骨と筋肉の臓器連環クロストークを「ロコモ・サーキット」と名付け、骨・筋肉連環因子の同定や、その制御機構と破綻のメカニズムを明らかにすることで、運動器の動的恒常性の理解と新規治療法の分子基盤の確立に繋げることを目標としている。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究は、ロコモ・サーキットの制御機構を解明するため、細胞および生体レベルでの力学的負荷実験や新規細胞分化実験系を構築した。そして、細胞や組織の網羅的なトランスクリプトームやプロテオーム解析を展開し、骨と筋肉の発現遺伝子・タンパク質の基盤情報のデータベースを構築、この情報をプラットフォームとすることで、ロコモ・サーキットを制御する分子の同定を試みた。また、骨・筋肉連環因子の候補遺伝子の改変マウスを作出し、生体レベルでその分子機構の解明を試みた。さらに、ハイスループットな骨・筋肉の機能スクリーニング系を新たに構築し、低分子ケミカルライブラリーを用いて、ロコモ・サーキットの人為的な制御法の確立に道をつけた。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A: 骨・筋肉連環因子の同定

骨細胞特異的蛍光マウスを用いて採取した高純度の骨細胞を用いて、網羅的なトランスクリプトーム解析を実施し、全遺伝子の発現プロファイリングを構築した。また、新たに構築された骨細胞分化実験系(研究テーマ B)を活用し、網羅的なプロテオーム解析を実施することで、骨形成系細胞である骨芽細胞と骨細胞の発現タンパクの差異を明確に明らかにすることに成功した。また、骨細胞の *in vitro* メカニカルストレス実験系(伸張負荷刺激 3 次元培養系)の構築を試み、力学的な環境変化に伴う遺伝子の発現を網羅的に解析した。さらに、筋分化系における遺伝子発現のプロファイリングを試みた。

生体レベルでのメカニカルストレス免荷モデルとして、新規廃用性筋萎縮モデルを作成、メカニカルストレス負荷モデルとして、自発的なレジスタンストレーニングとなるマウスクライミング実験系の確立や強制的レジスタンストレーニングであるトレッドミル運動実験系を構築から、骨と筋組織の変動解析を実施した。本生体レベルでの実験系の構築が、網羅的なトランスクリプトーム解析のサンプル獲得を可能とした。

老化などに伴う歯牙の崩落により咀嚼機能が低下した場合、高次脳機能など様々な全身性の生体制御に影響を及ぼすことが知られている。咀嚼機能は、顎骨とそれを基軸として駆動させる筋力に依存するため、ロコモ・サーキットによる全身性の制御機構を解析する上で重要な鍵となると考えられた。そこで、新規の無歯顎モデルなど研究デバイスを構築し高次脳機能の解析を試みた。また、餌の硬度を変化させることで咀嚼機能を変化させる実験系の構築にも成功し、高次脳機能と咀嚼機能の連環関係を見出すモデルの構築ができたと考えられる(論文投稿中)。

### 研究テーマ B: 細胞レベルでの骨・筋肉連環因子の機能解析

これまで明確な実験方法が確立されていない骨細胞の分化実験系を構築することができた。遺伝子改変マウスを用いたこの方法は、骨芽細胞(EGFP 陰性)から骨細胞(EGFP 陽性)へ分化をビジュアル化・定量解析することができる。網羅解析(研究テーマ A)から同定される候補因子のスクリーニングに活用することが可能となり、今後、本研究テーマを加速させることが期待される。

また、細胞融合により成熟・機能する破骨細胞の分化過程を定量化する実験系を構築した(論文報告 2014)。これまで破骨細胞の分化評価は、術者の視覚による実測が主であり、細胞融合を特徴となす破骨細胞の正確な評価系は確立されていなかった。本研究では、細胞融合を繰り返し分化・成長する巨細胞である破骨細胞を、細胞質・核を異なる蛍光標識を用い最新のイメージサイトメトリーを活用することで、正確な分化評価系を構築すると可能とした。

さらに、この原理・技術を応用し、筋芽細胞の線維化(筋分化)を正確に評価できる実験系の構築に繋がった。細胞融合により分化する多核の線維細胞である筋芽細胞の評価系は、破骨細胞同様に、これまで正確な評価とは言い難かった。しかし、本実験系を活用することで、筋分化過程のビジュアル化および定量評価が可能になり、様々な遺伝子や化合物の機能解析のデバイスとして、大きな期待がもたらされた。

### 研究テーマ C:生体レベルでの骨・筋肉連環因子の機能解析

生体レベルでロコモ・サーキットを制御する方法を確立するため、研究テーマ B で構築したハイスループットな筋分化スクリーニング系を活用し、低分子ケミカルライブラリーを用いて、大規模な機能スクリーニングを展開した。第 1 スクリーニングとして、筋分化を促進する低分子ケミカルを選抜し、第 2 スクリーニングとして骨芽細胞の促進効果、第 3 スクリーニングとして破骨細胞の抑制効果を検討した。本機能スクリーニングから、現在、いくつかのロコモ・サーキット制御ケミカルが同定され、生体レベルで筋と骨を同時に強化する創薬シーズとして、さらなる解析が進行している。

また、骨・筋肉連環因子の候補遺伝子も、研究テーマ A でいくつか同定されており、新規骨・筋連環遺伝子のコンディショナル KO マウスの作成に着手することができた。さらに、遺伝子の発現プロファイリングから、細胞系譜特異的な遺伝子発現が見出され、この特性を活かした細胞特異的な新規 Cre マウスの作成などデバイス構築など新たな展開へと繋がった。

### 3. 今後の展開

網羅的な遺伝子プロファイリングから得られた骨・筋肉連環因子の候補遺伝子の解析を継続して実施し、遺伝子改変マウスを作出することで、その機能を明らかにする。また、低分子ケミカルライブラリーの大規模スクリーニングから、さらなるロコモ・サーキット制御ケミカルを同定し、生体レベルでの骨粗鬆症や筋萎縮モデルマウスへの薬物動態および薬力学実験を実施し、ロコモ・サーキット破綻を抑制する人為的制御法の確立へと繋げることを目指す。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

研究者は、これまで骨生物学の領域において、研究を展開してきた。しかし、多くの骨疾患の制御法が実現される今日においてもなお、運動器疾患による要介護率の増加に、歯止めがかかっているとは言い難いのが現状である。運動器疾患は、自立した生活を障害し、寝たきり生活へと繋がり、生命予後を決する大きな要因となっている。

骨と筋肉は、同じ運動機能を担う重要な組織であるにもかかわらず、これまで、個々が独立した基礎医学系分野を形成し発展してきた。従って、統合的な運動器として骨と筋肉の臓器間に連環クロストークが存在し、その破綻が運動器疾患に繋がっているのかについて、いまだ明確な解答は得られていない。本さきがけ研究では、運動器の主軸となる骨と筋肉の臓器連環クロストークを「ロコモ・サーキット」と名付け、その動的な恒常性と破綻メカニズムの解明を目指す試みを提案した。

異なる研究領域間を紡ぎ合わせる挑戦的な研究目的であったが、骨・筋肉連環を司る候補因子の同定や、新規スクリーニング法の構築から創薬ターゲットとなるロコモ・サーキット制御ケミカルの発見など、運動器の動的な恒常性を制御する分子基盤を解き明かす足掛かりが見出されたと考えられる。特に、骨も筋肉も強化するケミカルの同定は、創薬シードとして興味深く、グローバルレベルで急速に進行する高齢化社会において、運動器疾患の制圧・予防を目指した革新的な分子基盤の確立として、社会的に要求が高く大きな意味を持つと考えられる。

また、本さがけ研究の採択によって、内外の研究者との交流や連携が活性・強化され、多くの異分野との共同研究へと繋がっている。そして、様々な学会への招聘や医学賞の受賞などに繋がり、自身のプロモーションも達成された。この挑戦的な新たな研究領域を開拓することで、研究者としても、大きな飛躍に繋がったと考えられる。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

本研究課題は、運動器の主軸となる骨と筋肉の臓器連環クロストークの連環因子の同定、および、その制御機構と破綻のメカニズムを明らかにすることで、運動器の動的恒常性の理解と新規治療法の分子基盤の確立に繋げることを目標としている。細胞および生体レベルでの力学的負荷実験や新規細胞分化実験系を構築し、細胞や組織の網羅的なトランスクリプトームやプロテオーム解析を展開し、骨と筋肉の発現遺伝子・タンパク質の基盤情報のデータベースを構築している。また、これらを制御する分子の同定を試み、骨・筋肉連環因子の候補遺伝子を改変したマウスを作出し、生体レベルでその分子機構の解明を試みている。さらに、ハイスループットな骨・筋肉の機能スクリーニング系を新たに構築し、低分子ケミカルライブラリーを用いてスクリーニング中である。また、手がかりが得られた段階であるが、これまでの研究を進めることにより、実用化できるリード化合物を見出すことが期待される。

論文報告や学会発表は多数に上る、

また、本研究領域内での共同研究の推進の中心的な役割を果たすだけでなく、領域終了後の研究者のネットワーク作りに積極的な役割を果たしている。さがけ研究期間内に准教授から教授への昇進を果たし、今後の活躍が十分に期待される。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Terashima A, Okamoto K, **Nakashima T**, Akira S, Ikuta K, Takayanagi H. Osteoblasts mediate immunosuppression in sepsis. *Immunity* 44(6):1434-43. (2016).
2. Iida A, Xing W, Docx MK, **Nakashima T**, Wang Z, Kimizuka M, Van Hul W, Rating D, Spranger J, Ohashi H, Miyake N, Matsumoto N, Mohan S, Nishimura G, Mortier G, Ikegawa S. Identification of biallelic LRRK1 mutations in osteosclerotic metaphyseal dysplasia and evidence for locus heterogeneity. *J Med Genet*. 53(8):568-74. (2016).
3. Ono T, Okamoto T, **Nakashima T**, Nitta T, Hori S, Iwakura Y, Takayanagi H. IL-17-producing  $\gamma\delta$  T cells enhance bone regeneration. *Nat Commun* 11(7):10928. (2016)
4. Guerrini MM, Okamoto K, Komatsu N, Danks L, **Nakashima T**, Takayanagi H. Inhibition of the TNF family cytokine RANKL prevents autoimmune inflammation in the central nervous system. *Immunity* 43(6): 1174-85. (2015).
5. Danks L, Komatsu N, Guerrini MM, Sawa S, Armaka M, Kollias G, **Nakashima T**, Takayanagi H. RANKL expressed on synovial fibroblasts is primarily responsible for bone erosions during joint inflammation. *Ann Rheum Dis* 75(6):1187-95. (2015).

(2)特許出願 該当なし

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主な学会発表や科学雑誌業績

国内外の学会における招待講演:19講演(日本骨代謝学会、日本リウマチ学会など)

医科学系雑誌の総説:32報(Clinical Calcium、実験医学など)

受賞業績

平成27年第33回日本骨代謝学会 学術賞

平成26年平成26年度ノバルティス・リウマチ医学賞

# 研究報告書

## 「脳と末梢器官の新たな恒常性維持クロストーク機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 中村 和弘

### 1. 研究のねらい

脳における恒常性維持システムは、自律神経系や内分泌系の出力を制御することによって様々な末梢臓器・器官の活動を調節する。一方、末梢の臓器・器官は、求心性神経や液性因子を介した伝達によって、末梢における様々な情報を脳へ送る。この脳-末梢間で絶えず繰り返されるクロストークが、生体の恒常性維持機構の根幹メカニズムの一つとなっている。脳は、末梢から送られてくる多種多様な情報を統合した上で、生体恒常性を保つために最も適切な制御信号を様々な末梢臓器・器官へ出力する。末梢から神経性ならびに液性の求心性情報を受け取る脳の部位としてはいくつかの神経核が提唱されてきたものの、受け取った情報をどのように統合し、末梢への制御信号をどのように自律神経系や内分泌系へ出力するのかについてはほとんど明らかにされていない。

本研究者は脳における恒常性維持機構の「司令塔」として、視床下部最吻側に位置する視索前野に注目し、その脳領域に起始する神経回路が恒常性維持の多臓器統御を担うという仮説を立てた。視索前野のニューロンは末梢から様々な情報入力を受け取り、恒常性維持のための指令を末梢効果器へ出力するだけでなく、その指令を送る中枢神経システムは、温度ストレス、心理ストレス、感染ストレス、飢餓ストレスなど、様々な環境ストレスから恒常性を守るために機能すると考えられる。本研究では、*in vivo* 生理実験系や神経解剖学、電気生理学、神経活動の操作技術などを多面的に組み合わせることで、脳-末梢クロストークにおける新たな情報処理の要としての中枢神経回路の機能を解明する。さらに、多様な環境ストレスに応じて、生体恒常性を守るための適切な多臓器制御を実現する中枢神経回路メカニズムを個体レベルで解明する。そして、こうした解析を通じて、恒常性維持における脳-末梢クロストークの核心メカニズムを提示する。

この研究によって恒常性維持を担う中枢神経回路の動作原理が明らかになれば、この神経回路を制御する創薬などの応用を経て、全身の恒常性維持システムの人為的な調節が可能となり、肥満や高血圧、糖尿病など、恒常性維持機構の破綻によって引き起こされる様々な疾病の革新的な治療法の開発につながるものと考えられる。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

視索前野は寒冷刺激や感染時の発熱刺激を受けると、熱産生の指令を出力する (Nakamura *et al.*, *J. Neurosci.* 22:4600-4610, 2002; *Nature Neurosci.* 11:62-71, 2008)。この指令は視床下部背内側部と延髄縫線核を経て脊髄の交感神経出力系へ伝達され、末梢の体温調節の効果器へ出力される (Nakamura, *Am. J. Physiol.* 301:R1207-R1228, 2011)。本研究では、視索前野に起始するこの指令伝達経路が心理ストレスや飢餓ストレスを生き延びる

ために機能することを明らかにした。また、視索前野のニューロンが末梢由来の様々な情報を受容して恒常性維持の指令を出力することも明らかにした。

生体は心理ストレスを受けると体温、脈拍、血圧などを上昇させることで身体パフォーマンスを向上させ、天敵に狙われるなどの「闘争か逃走か」というストレス状況を有利に切り抜けようとする。本研究では、心理ストレスの信号が視床下部背内側部から延髄縫線核への神経伝達を活性化することによって褐色脂肪熱産生が惹起され、体温が上昇することを見出した(Kataoka *et al.*, *Cell Metab.* 20:346-358, 2014)。また、心理ストレスによって活性化され、抗不安薬によって抑制される前脳の神経細胞群をマッピングすることによって、心理ストレス信号を生み出す上位の神経回路を研究する基盤的な知見を得た(Lkhagvasuren *et al.*, *Neuroscience* 272:34-57, 2014)。

生体はまた、飢餓ストレスを受けると熱産生を抑制するとともに摂食行動を亢進させることで飢餓を生き長らえようとする。本研究では、視床下部が末梢からの飢餓信号を感知すると、その信号を延髄の網様体へ伝達し、GABA 作動性ニューロンを活性化することを見出した。活性化された GABA 作動性ニューロンは延髄縫線核からの熱産生の交感神経出力を抑制することでエネルギー消費を節減するとともに、運動神経系を通じて咀嚼を惹起することで摂食を促進することがわかった(Nakamura *et al.*, *Cell Metab.* in press, 2017)。

本研究の成果は、視索前野に起始する恒常性維持の中枢神経回路が心理ストレスや飢餓ストレスなどの様々な環境ストレスから生命を守る機能を担う重要な仕組みであることを証明したものである(図1)。この成果は、心因性発熱などの様々なストレス疾患や肥満症などの生活習慣病の発症基盤の理解と新規治療技術の開発に貢献するものである。

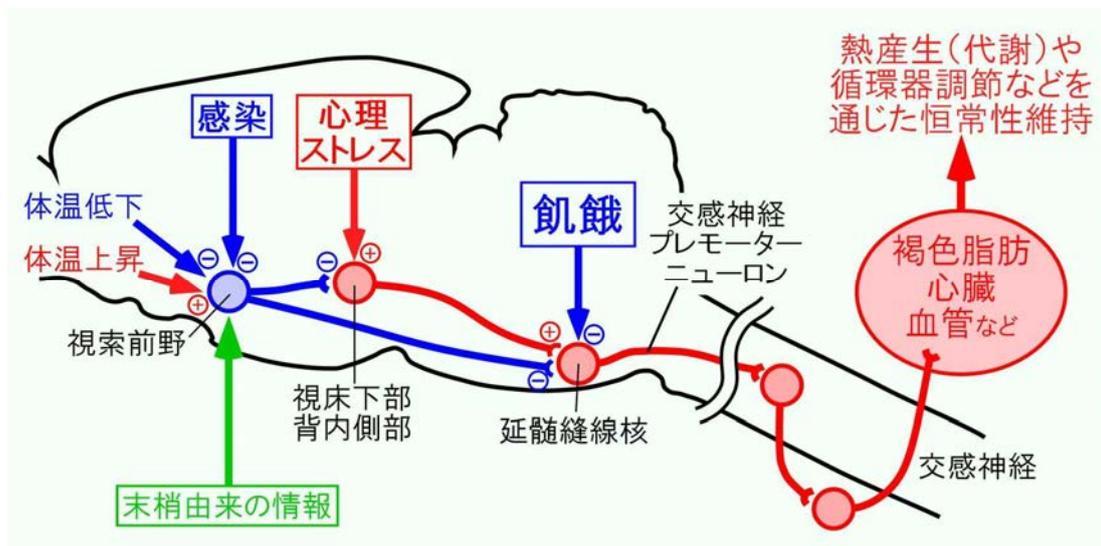


図1: 本研究で明らかにした恒常性維持の中枢神経回路メカニズム

体温の維持に機能する神経回路として本研究者が研究してきた神経回路であるが、心理ストレス、飢餓ストレス、感染ストレスなどの様々な環境ストレスから恒常性を守るために機能する、生命活動に重要な神経回路であることが本研究から明らかとなった。その神経回路の司令塔として視索前野が機能しており、末梢からの温度情報や様々な情報を受け取って統合し、多臓器の統御を行うための指令を行う。

## (2) 詳細

### 研究成果 A 「心理ストレスによる体温上昇を駆動する中枢神経回路の解明」

人間を含めた多くの哺乳類では、心理ストレスを受けると体温、脈拍、血圧が上昇するなど様々な生理反応が生じる。こうした反応は、天敵に狙われるなど、生命の危機に直面した際に身体パフォーマンスを向上させて生存に有利に働くという生物学的意義がある。しかし、現代の人間社会では、長期にわたる過剰な心理ストレスが生体調節に異常をもたらすことで生じる様々なストレス疾患の患者が増加している。特に、ストレスによる高体温が長期間続く心因性発熱は解熱剤が効かないため、治療が困難となっている。こうしたストレス反応や疾患の根本的な仕組みは脳の中の神経回路にあるが、その実体は未解明であった。

本研究では、個体間ストレスの動物モデルである社会的敗北ストレスをラットに与え、それによって生じるストレス性体温上昇を駆動する脳内の神経回路を解析した。社会的敗北ストレスを受けたラットでは、褐色脂肪組織で熱が産生され、体温が上昇した。そこで、ストレスを与える前に微量の薬物を注入して、視床下部背内側部あるいは延髄縫線核の神経細胞を抑制すると、ストレスを与えても熱産生や体温・脈拍上昇が起こらなくなった。この実験結果は、視床下部背内側部と延髄縫線核という2つの脳部位の神経細胞がこのストレス反応の発現に機能することを示す。延髄縫線核については、本研究者らが、熱産生を指令する交感神経信号を褐色脂肪組織へ送り出す役割を担う脳部位であることを明らかにした(図1)。

さらに組織化学的な解析を行った結果、視床下部背内側部から延髄縫線核へ信号を直接伝達するグルタミン酸作動性の神経細胞がストレスに反応して活性化することがわかった。そこで実際に、視床下部背内側部から延髄縫線核への直接の神経伝達を選択的に光で活性化する実験を行い、ストレス反応に類似した生理反応が生じるかを調べた。あらかじめウイルスを使って、光で活性化する陽イオンチャネルをラットの視床下部背内側部の神経細胞に発現させた。このチャネルは神経細胞から伸びる軸索線維の終末まで運ばれることが確認できた。そこで、このラットの脳内に光ファイバーを挿入し、視床下部背内側部の神経細胞から延髄縫線核へ伸びた軸索線維の終末に光を照射した。すると、ストレス反応に似た、褐色脂肪熱産生や脈拍・血圧の上昇反応が生じた。

こうした実験から、視床下部背内側部から延髄縫線核へのグルタミン酸作動性神経によるストレス信号の伝達が、心理ストレスによって体温や脈拍を上昇させる脳の神経回路における重要な仕組みであることを解明した(図2)。また本研究では、視床下部背内側部から視床下部室傍核への神経伝達も心理ストレスによって活性化されることを明らかにし、この神経伝達が心理ストレスによるストレスホルモンの分泌を駆動する可能性を示した(図2)。こうした知見は、心理ストレスによる多様な反応を生み出す神経回路において視床下部背内側部が神経伝達の重要なハブとして機能することを示すものである(Kataoka *et al.*, *Cell Metab.* 20:346-358, 2014)。

本研究ではさらに、視床下部背内側部へ心理ストレス信号を入力する上位の神経細胞群を探索すべく、心理ストレスで活性化され、抗不安薬で抑制される前脳の神経細胞をマッピングした(Lkhagvasuren *et al.*, *Neuroscience* 272:34-57, 2014)。この情報を元に現在、視床下部背内側部へ心理ストレス信号を入力する神経細胞群の解明に取り組んでいる。

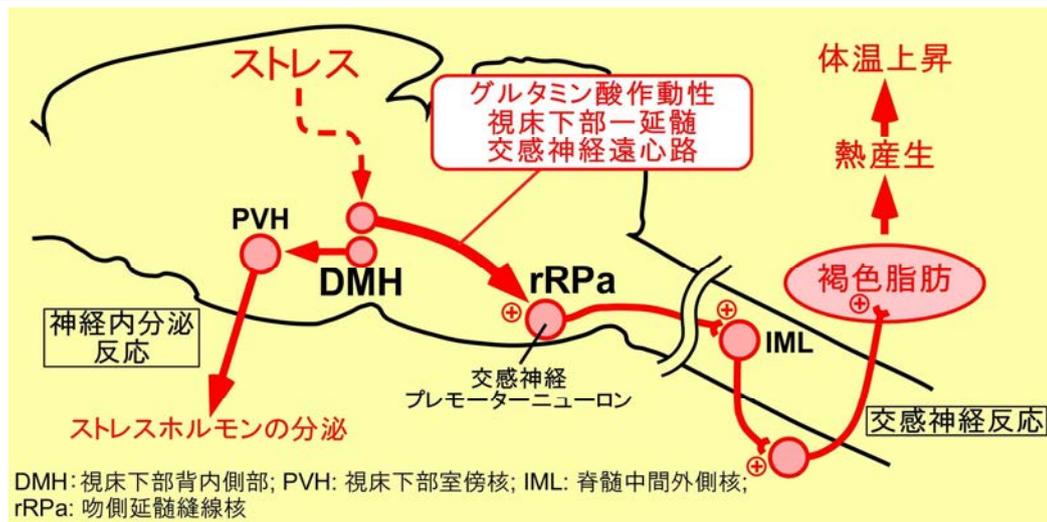


図2: 本研究で明らかにした心理ストレス性熱産生と体温上昇の中樞神経回路メカニズム

心理ストレスの信号は視床下部背内側部へ入力され、その背側部のニューロン群が活性化されると延髄縫線核へグルタミン酸作動性の神経伝達を行うことによって交感神経出力を亢進し、褐色脂肪熱産生を惹起するとともに頻脈反応を起こす。一方、視床下部背内側部の腹側部のニューロン群が活性化されると視床下部室傍核を介した神経内分泌系が活性化され、ストレスホルモン分泌が亢進する。

#### 研究成果 B 「飢餓ストレスを生き抜くために機能する中枢神経回路の解明」

人を含めた哺乳類では、空腹や飢餓になると、熱の産生に代表されるエネルギー消費を減らすとともに、食物を摂取する行動が促進される。これらの「飢餓反応」は、空腹時に胃から分泌されるグレリンなどの信号を脳の視床下部が受け取ることが引き金となる。こうした信号によって空腹であることを視床下部が感知すると、視床下部内の弓状核ニューロンが活性化され、ニューロペプチドY (NPY) を室傍核に放出する。この NPY の作用によって脳内に飢餓信号が生み出されるが、それがエネルギー消費の抑制と摂食促進という2つの飢餓反応を駆動する神経回路メカニズムは不明であった。特に、「熱の産生(体温調節)」と「摂食」はそれぞれ交感神経系と運動神経系という独立した神経系によって制御されることから、それらを脳がどのように統合的に調節して飢餓反応を引き起こすのかは長年の謎であった。

本研究では、ラットとマウスを使って、交感神経系を通じた褐色脂肪組織での熱産生を調節する脳内の神経細胞群を探索する中から、新規の神経細胞群を延髄の網様体と呼ばれる場所に発見した。この神経細胞群は、視床下部の NPY による飢餓信号を受けると活性化され、抑制性の神経伝達物質 GABA を放出して延髄縫線核の交感神経プレモーターニューロンを抑制することがわかった。DREADD 技術を用いて、この網様体の GABA 作動性神経細胞群だけを選択的に活性化すると、褐色脂肪組織における熱産生が強く抑制された。また、この網様体の神経細胞群が働かなくなると、視床下部に NPY が作用しても熱産生は抑制されなくなった。これらの実験結果は、網様体の GABA 作動性神経細胞群が視床下部からの飢餓信号によって活性化され、交感神経系を抑制することによって熱産生(エネルギー消費)を抑制する働きがあることを示している。

興味深いことに、網様体の GABA 作動性神経細胞群が、熱産生を調節する交感神経系だけでなく咀嚼を駆動する運動神経系にも信号を送ることも見いだした。網様体の神経細胞群を刺激すると、褐色脂肪組織の熱産生を抑制(エネルギー節約)するとともに、咀嚼運動が引き起こされ、摂食量が増加(エネルギー摂取)した。一部のラットでは、唾液分泌も促進された。これらはいずれも、飢餓時に生体で生じる典型的な飢餓反応である。

こうした実験結果から、本研究で発見した網様体の GABA 作動性神経細胞群は、視床下部からの飢餓信号によって活性化され、その信号を交感神経系と運動神経系へ伝えることで、エネルギーの「節約」と「摂取」の両方の飢餓反応を同時に駆動するという重要な役割を担うことが明らかとなった(図3)。本研究で明らかとなった仕組みは、空腹時に体内にエネルギーを蓄積し、飢餓を生き延びるための本能機能を担う脳の神経回路の根本的な仕組みである(Nakamura *et al.*, *Cell Metab.* in press, 2017)。

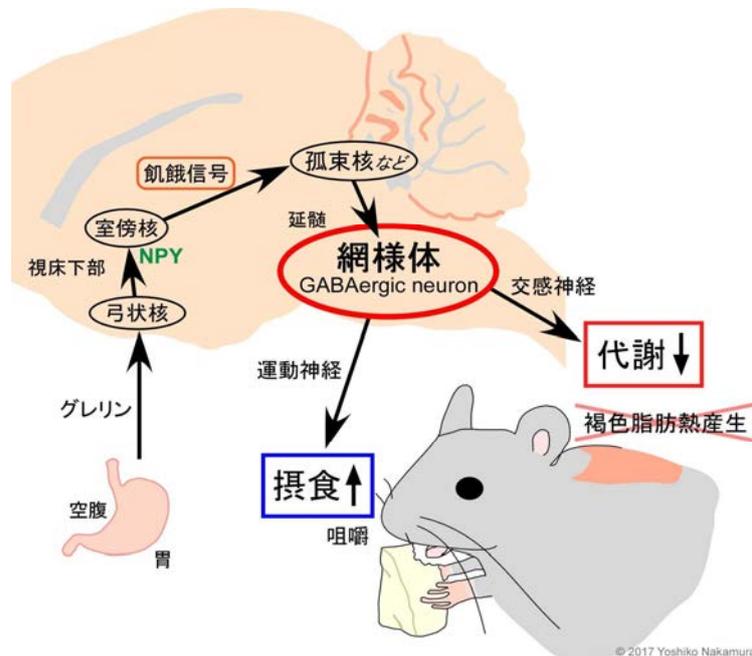


図3: 本研究で明らかにした飢餓反応の中樞神経回路メカニズム

空腹時には胃からグレリンが分泌され、空腹信号として視床下部弓状核へ伝達される。それによって弓状核から室傍核へ投射するニューロンから NPY が放出され、これが飢餓信号として延髄網様体へ伝達される。その結果、網様体の GABA 作動性ニューロン (GABAergic neuron) が活性化され、交感神経系を抑制することで代謝(エネルギー消費)を抑制するとともに、運動神経を介した咀嚼を惹起することで摂食(エネルギー摂取)を促進する。

### 3. 今後の展開

本研究では、生体の恒常性維持に機能する中枢神経回路メカニズムが明らかとなった。生活習慣や老化などが原因となって、この神経回路の機能バランスが崩れると、さまざまな疾患につながると考えられる。特に視索前野はその中枢神経回路の司令塔として機能しており、その神経機能を人為的に制御することで、崩れた恒常性バランスを戻す技術の開発につながる可能性を秘めている。視索前野の局所神経回路の解明をさらに進めることによって、そのような技術の開発につなげていきたい。

また、この中枢神経回路は環境ストレスから生命を守る機能を持つことが明らかとなった。本研究で明らかにした心理ストレスに対する生理反応の神経伝達経路は、脳内の心理ストレス信号を交感神経系へ伝え、熱の産生や体温の上昇という生体反応を生み出す基本的な仕組みである。本研究では、この神経伝達経路が心理ストレス性の頻脈の発現にも関わることを示した。強度の慢性心理ストレスを受けたときには、この神経伝達経路が過剰に活性化し、心因性発熱などの様々なストレス疾患を引き起こすと考えられる。現在、視床下部背内側部へ心理ストレス信号を入力する上位の脳領域の特定を急いでおり、さらにその神経回路をたどっていくことで、我々が「心理ストレス」と呼ぶものの科学的実体を解明したい。そして、そのような今後の研究から得られる基礎的知見を元にして、ストレス疾患の発症基盤の理解と根本的治療法の開発へつなげていきたい。

また本研究では、飢餓反応を生み出す神経回路の基本的な仕組みが明らかになった。この神経回路は、熱産生の抑制を通じて体温を低下させることから、現代社会で増加している、過度のダイエットや拒食(栄養不足)によって生じる低体温症の発症に関わっているものと考えられる。また、この飢餓反応の神経回路が、何らかの原因によって平常時でも活性化されると、肥満につながると考えられ、新たな肥満発症メカニズムの発見につながる可能性がある。今後、本研究をさらに発展させ、体温や代謝を調節する脳の本質的な仕組みの全貌解明を進めるとともに、低体温症や肥満症などの関連疾患の発症メカニズムの解明と治療法の開発に貢献する。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

(研究者)

##### ・ 研究目的の達成状況

さきがけに採択された3年半の間に、視索前野に起始する恒常性維持を担う中枢神経回路が心理ストレスや飢餓ストレスといった環境ストレスから生命を守る生理反応の惹起に機能することを明らかにし(図1)、本研究者が責任著者となって3報の原著論文を国際誌に発表した(*Cell Metabolism* 2014; *Neuroscience* 2014; *Cell Metabolism* 2017)。心理ストレスを受けた際に生じる体温上昇や頻脈といった生理反応は、人間を含めたほぼすべての哺乳類で見られる普遍的な防衛反応である。また、飢餓時に代謝を抑制し、摂食行動を促進する反応は、動物が常に戦ってきた飢えを生き長らえるために進化過程の早い時期から生体に備わってきた生存機能である。本研究は、こうした哺乳類の基本的な生命機能を担う中枢神経回路メカニズムを世界に先駆けて解明したものである。特に、心理ストレスの研究では、自律神経調節の中枢神経回路の研究を心理や情動の脳科学にまで拡張することに成功した。また、飢餓反応の解析を通じて、熱産生を抑制する仕組みだけでなく、飢餓時に咀嚼や摂餌行動を起こす運動の仕組みにまで踏み込んだ知見を提示することができた。これらの成果は、本研究の課題である、「脳と末梢器官のクロストーク機構の解明」のうち、脳がどのようにして様々な末梢器官を統合的に制御し、環境の状況に応じた適切な生理反応や行動を生み出すかという問題に明確な答えを提示した。

また、恒常性維持における視索前野の機能解析についても、遺伝子改変動物を用いて生理学的、神経解剖学的、分子生物学的手法を組み合わせた実験を進め、特定の神経細胞群

が恒常性維持に重要な機能を担うことを明らかにしつつある。特に、神経活動解析に苦労はしたものの、末梢器官からの様々な情報が視索前野にどのように作用するのかについて興味深い知見が得られている。これらの成果については未発表であるが、今後も精力的に解析を進め、速やかに国際誌に論文発表を行いたい。以上の研究成果を総合的に判断し、当初の研究目的を概ね達成したものと考える。

- ・ 研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)

さがけ採択後、2015年3月まで、京都大学のテニュアトラック部局である生命科学系キャリアパス形成ユニットに在籍し、独立した研究グループを率いて自らのアイデアで研究を遂行することができた。さがけ採択2年目以降はさがけ研究費で研究補助員を雇用し、同じ研究チームの博士研究員らの協力も得て研究を遂行することができた。さがけ研究費を用いて電気生理学実験に用いるデータ取得装置ならびに温度測定装置などを購入することで、神経活動記録実験の精度を上げることができた。2015年4月に名古屋大学大学院医学系研究科に異動して生理学教室を主宰するようになってからも、同規模の研究グループを維持することができ、さがけ研究費で研究補助員を雇用しつつ、独立した形で精力的に研究を進めることができた。異動後の研究室にてさがけ研究を発展させるために、組織切片作製用のマイクロームや *in vivo* 神経活動イメージング実験や *in vivo* 電気生理実験用の機器類を購入して新たな実験系を構築することができた。

- ・ 研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)

本研究の成果は、視索前野に起始する中枢神経回路が、体温や血液循環の調節をはじめとする恒常性の維持に機能するだけでなく、心理ストレスや飢餓ストレスなどの様々な環境ストレスから生命を守る機能をも担う重要な仕組みであることを証明したものである(図1)。この成果は、心因性発熱などのストレス疾患や肥満症などの生活習慣病の発症基盤の理解に貢献するものである。特に、これまで、心理ストレスが体温を上昇させることは一般的に認知されておらず、心因性発熱の存在を知らない臨床医も少なからず存在した。そのため、原因不明の発熱を訴えて病院にかかっても「不明熱」と診断され、治療できずに苦しむ患者が社会に多く存在した。本研究で得られた心理ストレスによる体温上昇のメカニズムの研究成果を報道などを通じて社会に公表したことで、心因性発熱の存在を社会に広く認知させることができ、大きな反響を得た。

本研究で得られた知見は、恒常性維持や環境ストレスから生命を守るために機能する中枢神経回路に関する基本的なメカニズムであるが、今後、これらの基礎的知見をもとにして、この中枢神経回路を薬物などを用いて人為的に操作する技術を確立することができれば、心理ストレスによって生じる心因性発熱などの様々なストレス疾患や、高血圧、肥満症、糖尿病などの生活習慣病を克服するための画期的治療法の開発につながることを期待される。

- ・ その他領域独自の評価項目に基づいて、研究者自身の評価を簡潔にまとめてください。

さがけ採択期間内に、本研究成果に直接関連した3報の原著論文を国際誌に発表し、英文総説を1報、共同研究による国際誌への原著論文を3報発表した。生理学の教科書の執筆や英文の教科書の翻訳にも参加した(下記、「5. 主な研究成果リスト」を参照)。また、33

回の招待講演を行い、そのうち 5 回は国際的な学会・研究会・財団などからの招待講演であった。本研究の成果や受賞などについてはプレスリリースを積極的に行い、報道取材を受けた結果、これまでに国内外を合わせて 30 件の新聞掲載、テレビ・ラジオ・ウェブ報道が行われた。

これまでの本研究者の研究成果が国内外で評価され、さきがけ採択期間内に、米国生理学会 Henry Pickering Bowditch Award、日本学士院学術奨励賞、日本学術振興会賞、日本自律神経学会学会賞を受賞した。中でも Henry Pickering Bowditch Award は米国生理学会最高の賞の一つであり、学会員からの他薦によって 1956 年から毎年一名ずつ 42 歳未満の卓越した生理学研究者に授与している歴史ある賞である。これまでにノーベル賞受賞者を含めた数々の著名な生理学者が受賞してきた。

本研究者は 2014 年 2 月に京都大学准教授に昇任し、2015 年 4 月には名古屋大学大学院医学系研究科教授に就任した。また、2015 年 6 月には、このさきがけ研究の成果をもとにして申請した科研費新学術領域研究「温度を基軸とした生命現象の統合的理解(温度生物学)」が採択され、計画班の研究代表者として 5 年間の研究を実施している。このように、さきがけの支援を受けたことで、今後の研究をさらに国際的に展開するための重要な礎を築くことができた。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年 2 回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

本研究では温度ストレス、心理ストレス、感染ストレス、飢餓ストレスなど、様々な環境ストレスから恒常性を守るために機能する中枢神経システムについて、視索前野のニューロンに注目し、末梢からの様々な入力、末梢効果器への出力をあわせて解明した。心理ストレスとしては、社会的敗北ストレスをラットに与え、それによって生じるストレス性体温上昇について解析し、また、飢餓ストレスについては、熱の産生に代表されるエネルギー消費を減らすとともに、食物を摂取する行動の惹起について解析し、その成果をそれぞれ論文として報告している。本研究で明らかにされた神経回路をたどっていくことで、「心理ストレス」の科学的実体が解明されることにより、ストレス疾患の発症基盤の理解と根本的治療法の開発につながるものが期待される。また、ここで明らかになった飢餓反応の神経回路が、低体温症や肥満症などの関連疾患の発症メカニズムの解明と治療法の開発に貢献することも期待される。異動に伴う研究体制の拡大もあったが、さきがけ研究費は当初予算どおり執行され、当初の研究計画の成果を得ることができている。さきがけ研究期間内に講師から准教授、教授へと昇進し、研究室を主宰することになり、今後の活躍が十分期待される。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Nakamura, Y., Yanagawa, Y., Morrison, S.F., Nakamura, K. Medullary reticular neurons mediate neuropeptide Y-induced metabolic inhibition and mastication. ***Cell Metabolism***, 2017, 25:322–334.

2. Kataoka, N., Hioki, H., Kaneko, T., Nakamura, K. Psychological stress activates a dorsomedial hypothalamus–medullary raphe circuit driving brown adipose tissue thermogenesis and hyperthermia. *Cell Metabolism*, 2014, 20:346–358.
3. Lkhagvasuren, B., Oka, T., Nakamura, Y., Hayashi, N., Sudo, N., Nakamura, K. Distribution of Fos-immunoreactive cells in rat forebrain and midbrain following social defeat stress and diazepam treatment. *Neuroscience*, 2014, 272:34–57.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

・主要な学会発表

1. Nakamura, K. and Kataoka, N. Higher brain stress signalling that drives the hypothalamo-medullary pathway for stress-induced hyperthermia. *6th International Conference on the Physiology and Pharmacology of Temperature Regulation*, December 6, 2016, Ljubljana, Slovenia. (招待シンポジスト)
2. Nakamura, K. Central pathways for cold-induced thermogenesis. *The Wenner-Gren Foundations International Symposium "Brown adipose tissue and euthermia"*, May 27, 2016, Stockholm, Sweden. (Wenner-Gren財団 招待シンポジウム)
3. 中村和弘. 体温調節の神経機構. 第93回日本生理学会大会, 2016年3月23日, 札幌. (教育講演)
4. Nakamura, K. Cold-defense neural pathway drives stress-induced hyperthermia. *International Society for Autonomic Neuroscience 2015*, September 26, 2015, Stresa, Italy. (招待シンポジスト)
5. Nakamura, K. Central thermoregulatory system: a mechanism that defends life from various environmental stressors. *Experimental Biology 2014*, April 27, 2014, San Diego, CA, U.S.A. (Henry Pickering Bowditch Award Lecture, 受賞講演)

・受賞

1. 第11回(平成26年度)日本学士院学術奨励賞
2. 第11回(平成26年度)日本学術振興会賞
3. 2014年 米国生理学会 Henry Pickering Bowditch Award
4. 2013年度 日本自律神経学会 学会賞

・主要な著作物

1. 中村和弘. 第15章 体温の調節. *コメディカル専門基礎科目シリーズ 生理学* (桑名俊一・荒田晶子 編著 理工図書) 357–378, 2016. (生理学教科書)
2. 中村和弘. 体温の中枢制御機構. *Annual Review 2016 糖尿病・代謝・内分泌*

- 泌 (寺内康夫、伊藤 裕、石橋 俊 編 中外医学社) 80–86, 2016. (日本語総説)
3. 樋口 隆、中村和弘. 第 39 章 体温調節. **オックスフォード・生理学 原書4版** (岡野栄之・鯉淵典之・植村慶一 監訳 丸善) 823–836, 2016. (英文教科書翻訳)
  4. Nakamura, K. Neural circuit for psychological stress-induced hyperthermia. **Temperature** 2:352–361, 2015. (総説)
  5. 中村和弘. 褐色脂肪細胞の熱産生を制御する視床下部–延髄–交感神経回路. **糖尿病学 2015** (門脇 孝 編 診断と治療社) 35–44, 2015. (日本語総説)
  6. 中村和弘. 第 38 章 温熱ストレスと発熱. **リップンコットシリーズ イラストレイテッド生理学** (鯉淵典之・栗原 敏 監訳 丸善) 544–552, 2014. (英文教科書翻訳)

#### ・プレスリリース

1. New insights into brain circuit for hunger responses during starvation. **Nagoya University** 2017 年 1 月 26 日.
2. 飢餓を生き延びるための脳の仕組みを解明. **名古屋大学・科学技術振興機構** 2017 年 1 月 6 日.
3. 心理ストレスを受けたときに体温を上昇させる脳神経回路を解明 –ストレス疾患の発症機構の解明に期待–. **京都大学** 2014 年 6 月 27 日.
4. Researchers identify brain circuits involved in stress-induced fevers. **Cell Press** 2014 年 4 月 26 日.
5. APS Announces 2014 Society Lectureship Award Winners. **The American Physiological Society** 2014 年 4 月 26 日.
6. 中村和弘 学際融合教育研究推進センター・生命科学系キャリアパス形成ユニット講師の Bowditch 賞受賞が決定しました. **京都大学** 2013 年 10 月 31 日.

# 研究報告書

## 「精神疾患における行動制御系の破綻原理の解明と新規診断技術の開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 中村 亨

### 1. 研究のねらい

うつ病をはじめとする精神疾患の早期検知・診断、適切な対処・治療の重要性が強く認識されています。しかしながら、疾患に伴う気分・身体症状などの病態変化を客観的に記述し、臨床の場でも使用可能なバイオマーカが未だ発見されていないことが、それらの大きな障壁となっています。私たちは、多くの精神疾患で行動異常が見られることから、ウェアラブルデバイスを用いて日常生活下の身体活動データを連続的に計測し、そこに行動パターンの生成に関する普遍的な統計則(休息と活動状態の持続性に関する統計法則)が存在すること、様々な精神疾患(大うつ病性障害、不安障害、双極性障害、統合失調症など)において、統計則が疾患特異的に変化することを報告してきました。これらの報告は、従来は全く不可能であった精神疾患の客観的診断、病態の連続モニタリングが可能であることを示唆するものでした。一方、日常行動に潜む統計則とその変化が数理モデルによって説明可能であり、その背後に動力学の機序が存在する可能性を示唆してきました。

これらのことから、神経・生理学的機序がほとんど解明されていない精神疾患の発症を生体システムの動的恒常性の破綻という観点から捉えようとした際、一つの切り口として、「身体活動パターン(行動則)の生成に関わる行動制御機構の不安定化や動的平衡からの逸脱・遷移・破綻」と捉えることも可能であるとの考えに至りました。

本研究の目的は、様々な精神疾患における行動制御系の不安定化や動的平衡からの逸脱・遷移・破綻を評価する指標の開発と、その恒常性維持に関わる動力学的背景(微分方程式やその力学構造)を解明する数理科学的手法を開発することです。これにより、行動異常を伴う精神疾患の早期検知・予測技術の創出を目指します。

近年、身体活動が記録可能なウェアラブルデバイスの普及が加速化しており、特にヘルスケア分野でのデータの利活用が模索されています。本研究で開発される技術は、活動データの有用な活用手段を提供するとともに、精神疾患の発症予測や予防などの心の健康維持にも貢献することが期待されます。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

精神行動異常の生成に関わる動力学構造を身体活動時系列データからデータ駆動型で推定する手法の確立および、その有用性・妥当性の検証を行いました。本研究では、身体活動時系列の動特性を記述するモデル候補としてランジュバン型確率微分方程式を使用しました。この方程式は、決定論的ダイナミクスを表現するドリフト項と確率論的ダイナミクスを表現する拡散項から成り、両項はシステムの状態(身体活動量)に依存する関数として表現されます。

健常人(n=11)、大うつ病性障害患者(n=15)、統合失調症患者(n=19)の日中覚醒時の身

体活動時系列データ(>1週間)から両項の推定を行いました。推定したシステムは一つの安定な平衡点(活動レベルのセットポイントに相当)を持ち、うつ病患者では健常人および統合失調症患者と比較して、平衡点の位置が低活動の方向へ有意に移動していることを確認しました。一方、気分障害患者の回復過程では、平衡点の位置の正常化が確認されました。さらに、うつ病相から軽躁病相への病相遷移が確認できた双極性障害患者においては、平衡点の位置が低活動レベルから高活動レベルへと主観的気分と共変して移動すること、病相遷移時期には平衡点の安定性が低下し、特徴的なゆらぎ特性を持つ“臨界減速”現象が生じていることを示唆する結果を得ました。これらは、安定点の評価が疾患診断・病態評価に有効であること、さらに病相転移にはシステムの分岐現象が関与していることを意味します。平衡点の安定性評価は、疾患発症・病相変化の予兆検知、その数学的メカニズムの解明に繋がると期待されました。

一方、ランジュバン方程式のドリフト項と拡散項は、それぞれ Chapman-Kolmogorov 方程式の Kramers-Moyal 展開の1次と2次の係数に相当すること、身体活動データでは2次上の係数でも有意な疾患依存性が確認されたことから、1次から4次までの展開係数を多項式回帰によりパラメタ化し、クラスタリングを行うと、高精度(97%程度の判別能力)で健常人と疾患患者(大うつ病性障害、統合失調症)との弁別が可能であることを確認しました。また、推定した力学構造の変化は、先行研究における間欠性の増大や休息・活動の持続性の変化といった行動変化と関連することも明らかにし、行動指標の動力学的意味付けも行いました。

## (2) 詳細

### 研究テーマ1 「行動制御系の逸脱・破綻に関わる動力学構造の違いの定量化」

身体活動量の長期連続計測データに基づき、行動制御系の動力学構造を再構築し、精神疾患の種類・病態による動力学構造の違いを明らかにすることを目的としました。非平衡散逸系における不規則信号のモデルとして、ランジュバン型の確率微分方程式(以下、ランジュバン方程式)が用いられることが多く、本研究でも身体活動時系列データの動特性を記述するモデルとして採用しました。ランジュバン方程式は次の式で記述されます。

$$\frac{dx}{dt} = D^{(1)}(x) + \sqrt{D^{(2)}(x)}\Gamma(t) \quad (1)$$

ここで、 $x$  は状態変数で、本モデルでは身体活動量になります。 $D^{(1)}(x)$ 、 $D^{(2)}(x)$  はそれぞれ、ドリフト係数、拡散係数で状態  $x$  に依存します。 $\Gamma(t)$  は平均0、分散1のガウシアンホワイトノイズです。 $D^{(1)}(x)$  はシステムの決定論的ダイナミクスを表現し、拡散係数が  $D^{(2)}(x)$  の外乱によってシステムは揺動されます。各係数は次式で求められます。

$$D^{(n)}(x) = \lim_{\tau \rightarrow 0} \frac{1}{\tau} \int \frac{[x' - x]^n}{n!} p(x', t + \tau | x, t) dx' \quad (2)$$

健常人(n=11)、大うつ病性障害患者(n=15)、統合失調症患者(n=19)を対象に、ローパス

フィルタを通した日中覚醒時の身体活動時系列データ(>1 週間)から(1)式を推定しました。推定システムは健常、疾患群ともに一つの安定な平衡点(活動レベルのセットポイントに相当)を持ち、うつ病患者(平衡点の位置は活動量  $107.5 \pm 26.5$  カウント/分に相当)では健常人( $162.8 \pm 35.5$ )および統合失調症患者( $168.3 \pm 37.3$ )と比較して、平衡点の位置が低活動の方向へ有意( $p < 0.01$ )に移動していることを確認しました。さらに、双極性障害患者において躁病相では平衡点の位置が上昇し、うつ病相では低下、その変化が主観的気分と共変していることを確認しました。また、気分障害患者の回復過程では、平衡点の位置の正常化が確認されました。

ランジュバン方程式のドリフト係数と拡散係数は、それぞれ Chapman-Kolmogorov 方程式の Kramers-Moyal 展開の1次と2次の係数に相当すること、身体活動データでは2次以降の係数でも有意な疾患依存性が確認されたことから、1次から4次までの展開係数を(2)式に従い導出し、それぞれ多項式回帰によりパラメタ化し、クラスタリングを行うと、高精度(97%程度の判別能力)で健常人と疾患患者(大うつ病性障害、統合失調症)との弁別が可能であることを確認しました。

以上の結果は、身体活動時系列生成に関わるシステムの平衡点(1次統計量)および高次統計量の評価が、疾患および病態の客観的評価に有用であることを示唆します。

#### 研究テーマ2 「病相・病態遷移現象の機序解明と予測技術の創出」

双極性障害は、循環的な病相転移(劇的な病態の変化)を呈する疾患です。その動力学的機序を解明することは、疾患の増悪・寛解の早期予兆検知、さらには疾患発症の予測技術の開発にもつながる可能性があると考えられます。

うつ病相から躁病相への病相遷移が確認された双極性障害患者の連続身体活動時系列データ(>3年)を使用し、(1)式における係数を連続的に推定しました(研究テーマ1の記述参照)。システムの平衡点の安定性解析は、システムが呈する挙動の動力学的背景の理解につながります。そこで、平衡点近傍でドリフト項をテーラー展開し、その安定性を評価しました。その結果、病相転移時期において平衡点の安定性が低下する(ヤコビ行列の固有値の実部が0に近づく)ことが確認されました。これは、病相転移にシステムの分岐現象(平衡点の不安定化)が関与していること、さらに、それは臨界減速現象として状態のゆらぎから検知することが可能であることを示唆します。平衡点の安定性の評価は、疾患発症・病相変化の予兆検知、その数学的メカニズムの解明に繋がると期待されます。

### 3. 今後の展開

近年、ヘルスインフォマティクスと呼ばれる情報通信技術(ICT)を活用した新しい健康科学が注目されており、特に、ウェアラブルデバイスを利用した生体信号等の収集と、それらを用いたストレス・生活習慣マネージメントや精神疾患・慢性疾患の管理・予防システムの研究開発が、国際的にも精力的に行われています。本研究で開発した精神疾患の評価・早期検知手法は、このような ICT 健康医療システムを構築する上で最も重要な異常検知や病態評価といった基盤要素技術の開発に貢献すると考えられます。また、このような技術は、個人最適化が可能であり、個人のライフスタイルや特性に基づく変調の検知・介入技術の開発へ発展させることも可能です。これらのことから、開発技術をウェアラブルデバイスに搭載

し、疾患発症の兆候や前駆症状の検知、病態・病相の変化の検知、に基づく介入(生活・運動指導やコンピュータ認知行動療法など)が可能なシステムの開発へと展開を図る予定です。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

(研究者)

本研究は、神経・生理学的機序が明確でない精神疾患を、行動制御機構の破綻、すなわち身体活動時系列の生成に関わるダイナミカルシステムの力学的特性の変化(動的平衡からの逸脱・遷移・破綻)という観点で捉え、精神行動異常の動力学的背景の解明、精神疾患の診断・早期検知・予測技術の創出を目的としたもので、国際的にも類をみない極めて挑戦的な研究課題であったと考えます。高度な解析に資する長期(1週間から数年)の連続身体活動データを様々な精神疾患患者から計測・蓄積し、その動力学的特性の疾患依存性、病態依存性を明らかにしたことは、精神疾患の客観的診断・病態評価などへの発展を鑑みても大変意義深い成果と考えます。また、病相遷移における特徴的な変動現象の発見は、疾患発症や症状の増悪・寛快の早期兆候である可能性があり、予測医学に新たな知見を与えるものです。昨今のウェアラブルデバイスに代表される ICT/IoT(モノのインターネット)の発展・普及は著しく、本研究での開発技術・知見との融合は、精神疾患の発症予測や予防などの心の健康維持へ貢献することが期待されます。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

本研究の目的は、ウェアラブルデバイスを用いて日常生活下の身体活動データを連続的に計測することにより様々な精神疾患(大うつ病性障害、統合失調症など)において、行動パターンの生成に関する統計則の疾患特異的変化の動力学的背景(微分方程式やその力学構造)を解明する数理科学的手法を開発することであり、これにより、行動異常を伴う精神疾患の早期検知・予測技術の創出を目指している。健常人、大うつ病性障害患者、統合失調症患者を対象に比較したところ、平衡点の位置の違いが確認され、疾患および病態の客観的評価に有用であることが示された。また、平衡点の安定性の評価は、疾患発症・病相変化の予兆検知、その数学的メカニズムの解明に繋がると期待され、これらの成果が論文として報告されている。

近年のウェアラブルデバイスに代表される ICT/IoT(モノのインターネット)の発展とあいまって、今後の活躍が十分に期待される。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1)論文(原著論文)発表

1. J. Kim, T. Nakamura, Y. Yamamoto, “A Momentary Biomarker for Depressive Mood”, InSilico Pharmacology, 4:4-1-6, 2016.
2. T. Nakamura, K. Kiyono, H. Wendt, P. Abry, Y. Yamamoto, “Multiscale Analysis of Intensive Longitudinal Biomedical Signals and its Clinical Applications”, Proceedings of the IEEE, 104(2), pp. 242-261, 2016.
3. J. Kim, T. Nakamura, H. Kikuchi, K. Yoshiuchi, T. Sasaki, Y. Yamamoto, “Continuous estimation of depressive mood from spontaneous physical activity in major depressive disorder”, IEEE J Biomed Health Inform.,19(4), pp. 1347-55, 2015.
4. J. Kim, T. Nakamura, H. Kikuchi, Y. Yamamoto, “Psychobehavioral Validity of Self-reported Symptoms Based on Spontaneous Physical Activity”, Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc. 2015, pp. 4021-4024.
5. J. Kim, T. Nakamura, H Kikuchi, K. Yoshiuchi, Y. Yamamoto, “Co-variation of Depressive Mood and Spontaneous Physical Activity Evaluated by Ecological Momentary Assessment in Major Depressive Disorder”, Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc. 2014, pp. 6635-6638.

### (2)特許出願

研究期間累積件数:0件

### (3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. E. Shimizu, T. Nakamura, J. Kim, K. Yoshiuchi, Y. Yamamoto, “Application of Empirical Mode Decomposition to Mother and Infant Physical Activity: Synchronization of Circadian Rhythms is Associated with Maternal mental health symptoms”, Proceedings of BSI 2016, pp. 136-139 (The 8th International Workshop on Biosignal Interpretation, September 1-3, 2016, Osaka, Japan).
2. Yamaguchi, A. Kishi, F. Togo, T. Nakamura, Y. Yamamoto, “Wake-sleep transition from the perspective of cortico-thalamo-cortical loop: Electroencephalogram data analysis and simulation”, Proceedings of BSI 2016, pp. 112-115 (The 8th International Workshop on Biosignal Interpretation, September 1-3, 2016, Osaka, Japan).
3. Yamaguchi, F. Togo, A. Kishi, T. Nakamura, Y. Yamamoto, “Wake-Sleep Transition as an Opening of Cortico-Thalamo-Cortical Loop”, (The 37rd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, August, 25-29, 2015, Milan, Italy).
4. 中村亨, “ICT の活用による日常生活行動のモニタリングと行動変容“, (ヘルスケア IoT コンソーシアム:2016年7月28日, 東京, 招待講演)
5. 中村亨, “強縦断データを用いた動的疾患研究“, (第35回日本医用画像工学会大会:2016年7月21日, 千葉, 招待講演).
6. 中村亨, “IoT の時代の健康リスク科学~精神疾患での取り組み~, ((社)電子情報技術産業協会(JEITA) ヒューマンケアデバイス・システム技術分科会:2016年6月22日, 東京, 招待講演).

7. 中村亨, “自発的身体活動にみるヒト行動原理とその生成機序の解明“, (発達基礎科学研究会:2016年1月22日, 滋賀県, 招待講演).
8. 中村亨, “日常生活行動にみられる行動制御と精神疾患におけるその破綻“, (RIMS研究集会 第12回生物数学の理論とその応用:2015年11月24日~27日, 京都府, 招待講演).
9. 中村亨, 山本義春, “健康情報学の現状と課題 ~ 予測医療による健康リスク制御に向けて ~“, (ヘルスケア・医療情報通信技術研究会:2015年9月3日, 福岡県, 招待講演).
10. 中村亨, “精神疾患における行動制御系の破綻原理の機序解明に向けて“, (第78回形の科学シンポジウム「こころのかたち・こころのゆらぎ」:2014年11月22日~24日, 佐賀, 招待講演).

# 研究報告書

## 「マクロファージを軸とする細胞間・多臓器間連携による心臓恒常性維持機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 藤生 克仁

### 1. 研究のねらい

心臓にはさまざまな心ストレスがかかるが、通常、適応現象が生じるために、多少のストレスは代償され、生存が可能である。我々は、マクロファージを除去したマウスを用いて心臓ストレス応答を検討したところ、非常に興味深いことに、非常に高頻度に心不全死を生じた。このことは、心臓マクロファージは心臓の恒常性維持に必要であること、その破綻が心不全の発症の原因となっていることを示唆する。

さらに、慢性腎臓病で心不全リスクが高まることから心腎連関に注目が集まっているが、その分子機構はよく分かっていない。我々は、腎臓特異的にストレス応答遺伝子を欠失したマウスを作製し、心不全モデルを作成したところ、野生型マウスに比較して、腎臓特異的ストレス応答遺伝子ノックアウトマウスでは、低心機能から高率に心不全死することを見出した。その機序として、腎臓特異的ノックアウトマウスでは、心ストレス時に腎臓からの GM-CSF の分泌が減少しており、心臓マクロファージが増加しないことを見出し、その心不全死は GM-CSF の補充により改善することを見出した。さらに、心ストレス時にそのストレスを腎臓が感知するためには、心臓—脳—交感神経—腎臓経路が重要であることも見出した。以上のような知見から、我々は以下のようなモデルを考えた。

心臓ストレスに対して個体は、心臓マクロファージを軸とする心筋細胞、心臓繊維芽細胞との細胞間相互作用が重要であり、心臓内での恒常性維持、ストレス応答を行う。さらに、この心臓マクロファージの活性化・増加は、心臓・脳神経系・腎臓を含む多臓器間連携によっても、強く制御されており、長期の心臓ストレスに対しては、心臓のリモデリングのみならず、脳・腎臓の炎症性変化やリモデリングが生じ、臓器連関による恒常性維持機構が破綻し、心不全を発症させる。また、各組織のリモデリングも、免疫系、神経系、および液性因子によって仲介される臓器連関により促進される可能性がある。

この基本モデルのもとに、本研究計画では、(1) 心臓マクロファージによる細胞間相互作用および臓器間相互作用を介した心臓恒常性維持機構およびその破綻による心不全発症機序の解析を行い、その相互作用を司っている機構を同定すること、(2) マクロファージへの介入標的として心臓マクロファージ特異的に発現する long non coding RNA (lnc RNA) の同定と心臓恒常性維持におけるその意義を解析するとともに、(3) 同定した機序、因子、lnc RNA を心不全に対する新たな治療戦略の標的として検討することを目的とした。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

心不全発症を心ストレスに対する心臓マクロファージを軸とする心臓・脳・腎臓を含む多臓器連関による個体の恒常性維持機構の破綻として統一的に理解するとともに、特にその分子機構として、ストレスから細胞のエピジェネティック変化、転写ネットワークの変化、細胞内代

謝の変化を包括的に検討し、心不全を分子から個体レベルまで同時に検討する視点の確立をねらうとともに、恒常性破綻の機序の解明から根本的な心不全の原因を探り、根源的な治療法を開発することで、治療法へのトランスレーションの基盤を構築することを目指す。

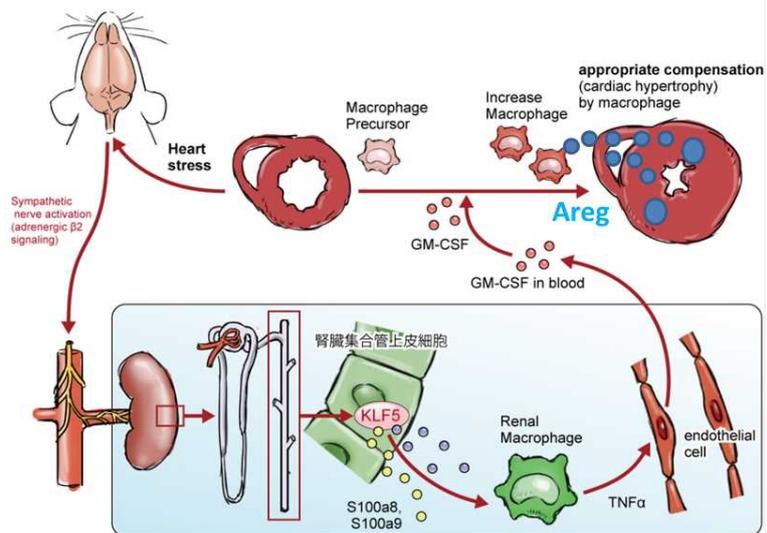
本研究計画では、心臓ストレスに対する個体の恒常性維持機構、またその破綻である心不全について、心臓マクロファージを軸とする心臓内の多種の細胞間コミュニケーションおよび多臓器が同時に臓器関連携を行いながら心臓マクロファージを最終エフェクターとして心臓恒常性維持を行っているとする観点から、心臓・脳・腎臓の三者を中心とする多臓器によるストレス応答を、時間的な変化を考慮しゲノムワイドで解析することにより明確にするとともに、心臓・脳・腎臓特異的遺伝子改変マウスを用いて、細胞間連携、臓器連関を司る重要な分子を同定し、恒常性と病態の両方における意義を解明することを目的とした。まず、心臓、脳、腎臓のマクロファージがどのような分子・機序を介して心機能に影響を与えているかを検討した(研究テーマA)、さらに、心臓のマクロファージ内でlncRNAがどのように、マクロファージの機能を修飾して、心機能に影響を与えているか検討した(研究テーマB)。最後に研究テーマA, Bから得られた分子が実際、心不全の治療に使用可能であるか動物モデルを用いて検討した(研究テーマC)。

## (2) 詳細

### (1) 研究テーマA: 心臓マクロファージによる cell-cell communication および inter-organ communication を介した心臓恒常性維持機構およびその破綻による心不全発症機序の解析

私はこれまでに、腎疾患の発症に腎臓集合管上皮細胞が新たな炎症惹起の鍵となる細胞であり、転写因子 KLF5 が同細胞内でストレス応答に働いていることを明らかにしていた(Fujiu et al, *JCI* 2011)。一方で腎疾患は心疾患の最も強力なリスク因子であることから、腎臓集合管上皮(collecting duct: CD)細胞特異的 Klf5 ノックアウトマウス(CD-KLF5KO)を作成し、圧負荷心不全モデル(Transverse Aortic Constriction: TAC)を行い、腎臓のストレス応答の欠損したマウスで心臓ストレスに対する心臓の反応がどのようになるか検討した。その結果、驚いたことに CD-KLF5KO は野生型マウスと比較して、本来生じるべき適応現象である心肥大が生じずに心機能が著明に低下し、心不全死した。心臓全体をフローサイトメーターで検討すると、野生型マウスの心負荷時に増加する心臓マクロファージが CD-KLF5KO では全く増加していないことを見出した。CD-KLF5KO の心臓に野生型マウスの心臓マクロファージを直接注射することで補うと心機能は改善し、心不全死が著明に改善した。さらに、クロドロネートリポソームを投与し、マクロファージを除去したマウスに心臓圧負荷を行っても、同様に圧負荷によって心機能が低下し、心不全死した。以上から、心負荷時に心臓マクロファージが増加することが心臓のストレス応答に必須であり、また、この増加は腎臓集合管上皮細胞を中心とした腎臓が臓器間連携を介して制御していることを示しており、心不全における心腎連関の存在を明確に示すことに成功した。

この新規臓器間連携の詳細は以下(右図)のとおりである。心臓に圧負荷が加わると迷走神経求心路および痛覚神経を介して脳にシグナルが伝わり、その後、交感神経遠心路(βシグナル)を介して腎臓に伝わる。CD cell 内の KLF5 が活性化し、その下流因子である S100A8, S100A9 が腎臓内に分泌され、腎



臓内のレジデントマクロファージが活性化し、TNFαを腎臓内に分泌する。このTNFαは腎臓内の血管内皮細胞 (CD31+, VEcadherin+ cell) に作用し、GM-CSF を血中に放出する。GM-CSF は心臓マクロファージ特異的増加を引き起こし、増加したマクロファージが心肥大を惹起する。GM-CSF 中和抗体の投与実験や、*Adrb2* ノックアウトマウス、交感神経βブロッカー、腎動脈周囲の交感神経アブレーションなどによっていずれかの経路を遮断した際にも、心臓圧負荷時の心臓マクロファージの増加が生じずに心不全・心不全死が生じることから各ステップが必須な反応系と考えられた。心臓マクロファージからの心筋細胞への最終エフェクター分子はアンフィレギュリン(AREG)という分泌タンパクであり、適応現象としての心筋細胞肥大を惹起し、心臓のストレス応答が成立する。以上の結果をまとめ、*Nature Medicine* 誌に Article として採択された。

心臓圧負荷ストレス時に心臓から迷走神経求心路、痛覚神経を介してシグナルが脳に伝わり、交感神経遠心路(βシグナル)によって腎臓集合管上皮細胞が活性化し、転写因子 KLF5-S100A8/S100A9 経路によって、腎臓マクロファージが活性化し、腎臓マクロファージから TNFαが分泌され、最終的に腎臓内の血管内皮細胞から GM-CSF が血中に分泌される。この腎臓由来の GM-CSF によって心臓マクロファージが増加し、アンフィレギュリン(AREG)が分泌される、アンフィレギュリンの分泌が心臓圧力負荷時の生存に必須である。

### 3. 今後の展開

本研究を通じて、心臓の恒常性維持に心臓・脳・腎臓の臓器間連携が非常に重要であること、さらにその鍵分子の同定に成功した。今後は、実際に腎臓病が発生した際にこの新しい臓器間連携がどのように破綻するかを検討し、治療への展開を検討する。さらに、本研究を通じて、心臓内に存在するマクロファージが心筋細胞との相互作用によって心臓に対して保護的に働くことを見出し、その鍵分子を3つ同定した。今後は、さらなる鍵分子の同定を試みるとともに、治療への応用を検討する。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

本研究を通じて、当初予定していた実験計画は達成できたと考えている。また、本研究によって独立した研究チーム、研究室を形成することができた。主たる研究成果は現在、製薬企業との共同研究として検討を行っており、治療薬として社会に貢献できる可能性に加え、得られた科学的知見は心臓病の領域において今後の研究に新しいプラットフォームを提供するため波及効果を大きいと考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

本研究課題では、心臓ストレスに対する個体の恒常性維持機構、またその破綻である心不全について、細胞間コミュニケーションならびに臓器間連携の観点から解明することを目指した。その結果、心臓に圧負荷が加わると、そのシグナルが脳を介して腎臓集合管上皮のKLF5を活性化し、血中のGM-CSFの上昇により心臓マクロファージの増加をきたすこと、更にこの心臓マクロファージがアンフィレギュリンを分泌し、心筋細胞肥大を生じることを見出し、論文として発表した。これ以外にも多数の論文、学会発表があり、それに加えて特許出願も行った。また、本さきがけ研究領域内、さらには他領域のさきがけ研究者と共同研究を行い論文発表するなど、研究の幅が広がった。以上から、本さきがけ研究が研究者としての飛躍につながったと考えられ、今後の更なる活躍が非常に期待される。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Fujiu K, Wang J, Nagai R, Cardio-Protective Function of Cardiac Macrophage, *Cardiovasc Res*, 102(2):232-9, 2014
2. Tan X, Fujiu K, Manabe I, Nishida J, Yamagishi J, Nagai E, Yanagi Y, Choroidal neovascularization is inhibited via an intraocular decrease of inflammatory cells in mice lacking complement component C3, *Sci Rep*, 15702, 2015
3. Ogata F, Fujiu K, Matsumoto S, Nakayama Y, Shibata M, Oike , Koushima I, Watabe T, Nagai R, Manabe I, Excess lymphangiogenesis co-operatively induced by macrophages and CD4+ T cells drives the pathogenesis of lymphedema, *J Invest Dermatol*, 136, 706-714, 2016
4. Tan X, Fujiu K, Manabe I, Nishida J, Yamagishi R, Terashima Y, Matsushima K, Kaburaki T, Nagai R, Yanagi Y, Choroidal Neovascularization Is Inhibited in Splenic-Denervated or Splenectomized Mice with a Concomitant Decrease in Intraocular Macrophage. *PLoS One*, 11(8):e0160985, 2016
5. Fujiu K, Shibata M, Nakayama Y, Ogata F, Matsumoto S, Noshita K, Iwami S, Nakae S, Komuro I, Nagai R, Manabe I, A heart-brain-kidney network controls adaptation to cardiac stress through tissue macrophage activation and cellular communication, *Nat Med*, in press.

## (2)特許出願

研究期間累積件数:2件

1.

発明者: 藤生克仁、真鍋一郎、柴田宗彦、永井良三、大村智、中野洋文、砂塚敏明、廣瀬友靖、山地賢三郎、木戸博

発明の名称: 新規 PDK4 阻害薬を有効成分として含有する心不全の治療および予防薬

出願人: 国立大学法人 東京大学、学校法人北里研究所、国立大学法人徳島大学

出願日: 2014年2月27日

出願番号: 2014-037339

発明者: 太田禎生、堀崎遼一、佐藤一誠、藤生克仁、山口聡子、脇嘉代、板橋踊子

発明の名称: 機械学習により自動的に高速・高感度・高精度化する次世代多次元情報フローサイトメリーの要素機構、及びその統合システム

出願人: 国立大学法人東京大学、大阪大学

出願日: 2015/10/28

出願番号: 2015-212356

## (3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

### 学会発表

中山 幸輝、真鍋 一郎、藤生 克仁、永井 良三、小室 一成、炎症性マクロファージにおける機能的長鎖ノンコーディング RNA、日本分子生物学会、神戸、2015

藤生克仁、臓器連関を介した心血管の恒常性維持機構、第31回日本糖尿病合併症学会、仙台、2016/10/8, (invited speaker)

藤生克仁、心臓のマクロファージによる心臓老化制御、脳心血管抗加齢研究会 2016、秋葉原、(invited speaker)

藤生克仁、臓器間連携による心臓恒常性維持機構、第20回日本心血管内分泌代謝学会学術総会(CVME2016)、東京、(invited speaker)

Makimoto H, Fujiu, K, Shimizu K, Amiya E, Kojima T, Daimon M, Meyer C, Komuro I, Diverge Responses of Cardiac Autonomic Function to Beta-blocker Therapy Depending on Chronic Kidney Disease, ESC, 2015

Sugita J, Fujiu K, Nakayama Y, Matsubara T, Matsuda J, Manabe I, Komuro I, Cardiac Macrophage is Required to Avoid Atrioventricular Block After Right Heart Pressure Overload, Annual Scientific Session of American Heart Association, New Orleans, USA, 2016

### 著作物

藤生克仁、心腎連関による心臓リモデリング機序、最新医学、最新医学社、Vol. 70, No. 6, 1130-1135, 2015

藤生克仁、心腎脳ネットワークと慢性炎症制御、別冊 BioClinica, vol.4 No.2, 91-96, , 北隆館 2015

藤生克仁、真鍋一郎、臓器連関、5. 心腎連関の機序の最新の知見、腎・高血圧の最新治療、14(1)、フジメディカル出版、2016

藤生克仁、心不全における細胞間および臓器間の相互作用、細胞、48(12)、14-17、2016

藤生克仁、心臓マクロファージによる心臓老化制御, Anti-aging Science, 8(1), P53, 2016

受賞

平成 25 年 10 月 Banyu Foundation Research Grant 2013 受賞

平成 27 年 9 月 第 4 回万有医学奨励賞受賞

平成 27 年 11 月 第 4 回万有医学奨励賞 最優秀賞受賞

アウトリーチ活動

平成 26 年 2 月 14 日、日本科学未来館、サイエンティスト・クエスト、心臓を動かす驚きの最強チーム！、藤生克仁

# 研究報告書

## 「身体疾患で惹起される免疫変容が起こす神経回路恒常性の破綻と精神症状の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 和氣 弘明

### 1. 研究のねらい

複雑に多様化する現代社会において、高次脳機能に障害を有する発達障害、精神疾患の解明が社会経済的に急務であり、その治療法の開発は喫緊の課題である。このような精神疾患の研究はこれまで遺伝的背景に着目され、精神疾患患者がもつ遺伝子異常を動物で再現し、その行動を検証する重要な研究が行われ一定の成果をあげてきた。しかしながら精神疾患で表出する精神症状は精神疾患でのみ表出するものではなく、自己免疫疾患や悪性腫瘍、また肝腎疾患などの身体疾患でも表出することが知られている。このような身体疾患では精神疾患特有の遺伝子異常を認められないと考えられる。その為遺伝的要因以外の影響による神経回路活動の異常を来す結果、精神症状が生じると考えられる。またこのような精神疾患を表出する身体疾患においては効率に免疫異常を認めることが知られている。そのため本課題では、身体疾患に付随する精神・神経症状の発現に着目し、身体疾患の体循環系における免疫異常が中枢神経系に作用し、神経回路活動の異常をきたすことで精神症状を発現する神経回路基盤およびそのメカニズムを明らかにすることを目的とする。

具体的には

1. 免疫異常をきたす身体疾患(自己免疫疾患など)における体循環系免疫細胞と中枢神経系免疫細胞であるミクログリアの相互相関を明らかにする
2. 体循環系免疫細胞との相互相関によって引き起こされるミクログリアの変容機構を明らかにする
3. さらに発達期および成熟期におけるミクログリアの新規生理機能を2光子顕微鏡などの新規光学システムによって解き明かす。
4. 上記新規生理機能の疾患モデルにおける変容を明らかにし、生理機能が破綻することによって引き起こされる神経回路活動の異常を可視化する。
5. 上記の変化による行動異常を個体計測によって明らかにする。

以上の研究内容を行うことで、精神症状を表出する神経回路活動を可視化することによって明らかにするとともに、遺伝子異常を伴わない精神症状の発現のうち、免疫と神経回路活動との相関による発現のメカニズムを明らかにし、最終的に異常を来す回路基盤の解明に挑戦する。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

多様化する現代社会において、高次脳機能に異常を呈する発達障害・精神疾患の病態の解明および治療法の開発は喫緊の課題である。本課題では、精神症状が精神疾患特異

的なものではなく、身体疾患(特に免疫異常を来す疾患群)にも発現することに着目し、体循環系免疫および中枢神経系の免疫の変容による神経回路活動の異常が起こるメカニズムを明らかにする。

免疫異常を来す身体疾患モデルとして全身性エリテマトーデスモデルを用い、全身炎症の際の血管周囲にはミクログリアが集積し、その集積部に特異的なシグナルにより体循環系免疫細胞の停留を促し、さらに血液脳関門の非薄化が生じ、体循環系の免疫細胞とミクログリアの接触による相互相関および脳内浸潤を促すことを明らかにした。このような接触の結果として全身慢性炎症時には血管周囲のミクログリアの突起の短縮などで観察される活性化を認めることを明らかにした。

このように全身慢性炎症時に活性化されるミクログリアの神経回路活動に対する寄与の検討を行った。体循環系免疫の活性化を行ったマウス第1次運動野2/3層の運動学習中の神経細胞集団の活動を可視化した。全身炎症によるミクログリアの活性化を伴うマウスにおいては神経細胞の同期性が低下することで学習が阻害されることがわかった。またこのような変化はミクログリアを除去したマウスにおいても認められることから、ミクログリアがその生理機能を喪失した結果神経回路活動の異常を引き起こし、学習行動を阻害することを明らかにした。

ミクログリアは発達期および成熟期においてその形態を大きく変化させることが知られている為、その発達期および成熟期に特異的な生理機能を持つことが考えられる。光学イメージングを駆使し、これまで、胎生期・発達早期・成熟期の生理機能を明らかにすることを試み、いくつかの新規生理機能を解き明かした。ミクログリアは発達早期では樹状突起に接触することにより、シナプス新生を促し、特定の神経回路形成に寄与することを明らかにした。さらに成熟期においてはシナプスに接触し、神経細胞間の協調活動を制御することを明らかにした。このミクログリアの生理機能は、活性化した体循環系の免疫細胞と相互相関することによって喪失し、協調的な神経細胞活動の異常が生じ、高次脳機能発現を阻害することを示した。本研究によって、全身炎症に伴う高次脳機能障害のメカニズムの一端を示すことができたとともに、このような免疫異常に伴って生じる精神症状の治療への新たな戦略を提示することができた。

## (2) 詳細

研究テーマA「全身炎症時における体循環系免疫細胞と中枢神経系ミクログリアの相互作用」

全身炎症モデルとして全身性エリテマトーデスの疾患モデルである MRL/lpr マウスを用いた。これまで MRL/lpr マウスは行動異常があることが報告されている。そこで、本マウスにおける中枢神経系における体循環系の免疫細胞動態および中枢神経系免疫細胞であるミクログリアの動態を調べた。

中枢神経系において、MRL/lpr のミクログリアは正常群に比して血管周囲にミクログリアがより集積することがわかった。さらに2光子顕微鏡を用いた in vivo イメージングによって、同部位に体循環系の免疫細胞が著明に停留することがわかった。同部位における停留するメカニズムとして、ミクログリアが集積する部位の血液脳関門の非薄化および血管内皮細胞

の分子特異的な発現によるものであることがわかった。さらなる詳細な観察をおこなった。ミクログリアに EGFP が発現する遺伝子改変マウスにおいて蛍光色素をもちいて血液脳関門を形成するアストロサイトの突起を生体で染色することによって両者の関係を可視化した。その結果ミクログリアは血液脳関門の内部に突起を伸展させることを明らかにした。またそれによって体循環系の免疫細胞と相互接触することを明らかにした。の体循環系免疫細胞との接触の結果、MRL/lpr マウスにおけるミクログリアは活性化し、さらに血管周囲に集積するミクログリアは MRL/lpr マウスにおいて活性化していることがわかった(投稿準備中)

#### 研究テーマB「中枢神経系ミクログリアの新規生理機能の解明」

ミクログリアは中枢神経系唯一の免疫担当細胞であり、これまでは中枢神経系の病態において形態を変化させ、神経保護的もしくは毒性作用を発揮し、病態の進行に関与することに着目した重要な研究が数多く行われてきた。しかしながら、その生理機能は技術的な問題から不明な点が多く、ミクログリアに一時的に起因する疾患の存在は不明のままであった。近年の光学技術の発達により生体内で生理的条件下におけるミクログリアを観察することができるようになり、その生理機能に着目した研究が進められるようになった。すなわちミクログリアは生体内において絶えずその突起を伸展・退縮させ(Nimmerjahn et al., Science 2005)、さらにミクログリア突起がその動きによって頻繁にシナプス構造に接触し、シナプス活動の監視を行っていることを我々が報告した (Wake et al., J. Neurosci 2009)。これらの監視機構によって、梗塞の周囲領域で神経回路の再編が生じていると考えられる領域ではミクログリアの接触を受けたシナプスが除去されることが示され、可塑的変化の高い領域においてミクログリアがシナプスの可塑的変化に関与することを明らかにした (Wake et al., J. Neurosci 2009.)。さらに発達期の回路再編時において、ミクログリアは神経活動依存性に古典的な補体経路を用いてシナプス除去過程に関与することがわかり (Schafer et al., 2012, Neuron; Tremblay et al., 2010, PLoS Biol.)、ミクログリアのシナプスに対する生理機能が明らかとなってきた(Wake et al., Trends in Neurosci, 2013)。本研究においては発達期・成熟期のミクログリアに着目し

1. 発達早期においてミクログリアが活性化体であることに着目し、そのシナプスに対する生理機能 (Miyamoto et al., 2016, Nature Commun)。
2. 障害時における神経細胞過剰応答の際に発揮されるミクログリアの神経保護作用 (Kato et al., 2016, eNeuro)。

を明らかにした。

ミクログリアは発達期において活性化体から静止体へ変化することが知られている。発達期のこの変化の時期を検証するためにミクログリアの活性化マーカーの一つである Iba1 mRNA の発現を検証したところ、Iba1 mRNA の発現が P8-10 で増加し、その後低下することがわかった。そこでミクログリア特異的に EGFP を発現しているマウス (Iba1-EGFP マウス) に子宮内電気穿孔法によって大脳皮質 2/3 層錐体細胞に赤色蛍光タンパク質(tDTomato)を発現させた。生後 8-10

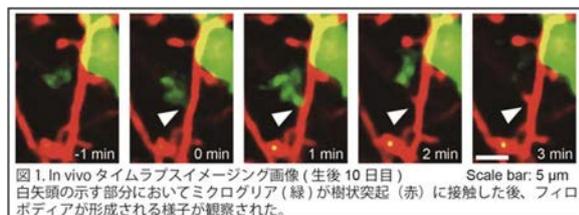


図 1. In vivo タイムラプスイメージング画像 (生後 10 日目) Scale bar: 5 μm  
白矢頭の示す部分においてミクログリア (緑) が樹状突起 (赤) に接触した後、フィロポディアが形成される様子が観察された。

日齢(P8-10)のマウスに2光子顕微鏡を適応させることにより、ミクログリアと樹状突起の相関を、大脳皮質体性感覚野 2/3 層にて観察した。

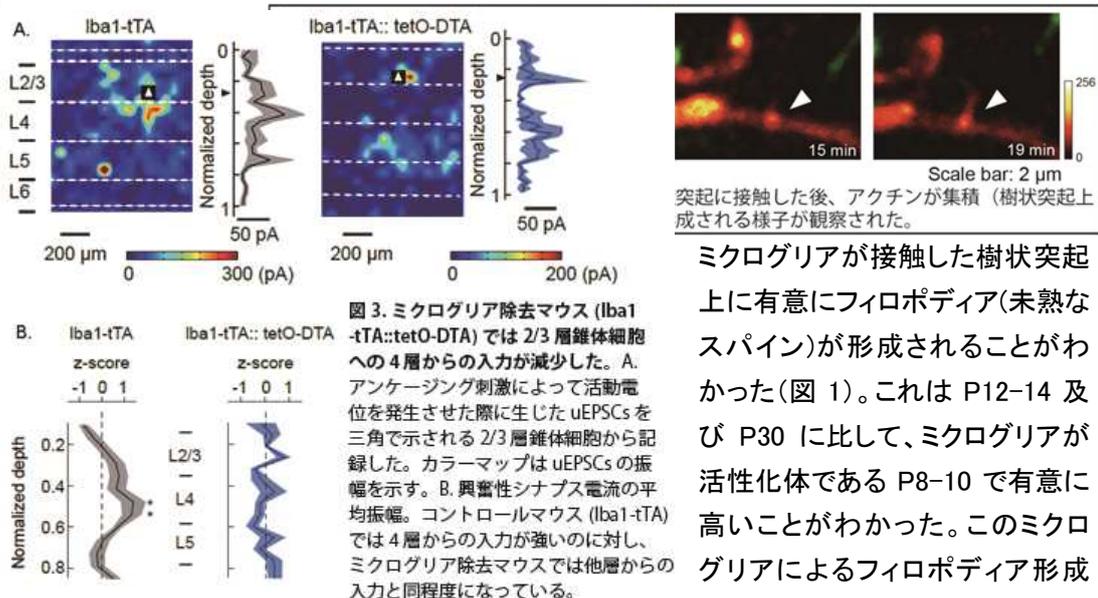
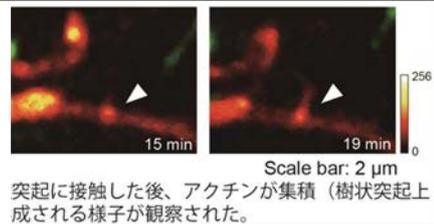


図 3. ミクログリア除去マウス (lba1-tTA::tetO-DTA) では 2/3 層錐体細胞への 4 層からの入力が増加した。A. アンケーシング刺激によって活動電位を発生させた際に生じた uEPSCs を三角で示される 2/3 層錐体細胞から記録した。カラーマップは uEPSCs の振幅を示す。B. 興奮性シナプス電流の平均振幅。コントロールマウス (lba1-tTA) では 4 層からの入力が高いのに対し、ミクログリア除去マウスでは他層からの入力と同程度になっている。



突起に接触した後、アクチンが集積 (樹状突起上成される様子が観察された)。

ミクログリアが接触した樹状突起上に有意にフィロポディア(未熟なスパイン)が形成されることがわかった(図 1)。これは P12-14 及び P30 に比して、ミクログリアが活性化体である P8-10 で有意に高いことがわかった。このミクログリアによるフィロポディア形成はカルシウム感受性緑色蛍光タンパク質(GCaMP)および赤色蛍光タンパク質(tdTomato)もしくはアクチン動態をアクチン結合ペプチドである Lifeact を大脳皮質 2/3 層錐体細胞に発現させて行った観察から、ミクログリアの接触によって、樹状突起にカルシウム上昇が生じ、それによってアクチン重合が促進された結果フィロポディアが形成されることが明らかとなった(図 2)。またカルシウムが上昇した樹状突起に形成されるフィロポディアは生存時間が長いことがわかった。遺伝的にミクログリアを除去したマウス(テトラサイクロン依存的にミクログリア特異的にジフテリア毒素 A 断片を発現)においてはミクログリアの密度が 50%程度減少し、さらにスパインの密度が有意に減少した。さらに本マウスの脳切片から計測される微小興奮性シナプス後電位 (mEPSC) の頻度が対照群と比較して優位に減少していることから密度減少による機能的差異も生じていることを明らかにした。すなわちミクログリアにより形成が促進されたフィロポディアは機能的シナプスの形成に寄与していることがわかった。

次にこのミクログリアによるシナプス形成が時期特異的に起こることから回路特異的シナプス形成に寄与すると考え、大脳皮質パレル野において層間結合の強度を、ミクログリアを除去したマウスを用いて検証した。レーザーによるグルタミン酸のアンケーシング法とホールセルパッチクランプ法を組み合わせ、各層からの機能応答を各層においてグルタミン酸のアンケーシングをおこない、その電気的応答を 2/3 層の錐体細胞で記録した。ミクログリアを除去したマウスから切り出した脳切片においては対照群に比して、4 層からの入力が増弱していることが明らかとなった。これは 4 層からの入力が増強されることと一致していた(図 3)。

またこのようなシナプス形成を担うミクログリアに発現する分子群を網羅的に解析し、候補分子を上げることができた。

研究テーマ「全身炎症時の神経回路基盤」

全身性炎症を引き起こすためにリポ多糖類を腹腔内投与したマウスにおいて、運動学習が損なわれていることがわかり、さらにその神経細胞集団の活動を 2 光子顕微鏡を用いて学習中に捉えることで、異常を検出することができた。この結果から神経細胞の同期性が損なわれること、これはミクログリアのシナプス活動修飾に起因することがわかった。

すなわちミクログリアは生理的にシナプスに接触することによって、その活動を増強し、さらにシナプスを持つ神経細胞の活動電位の発火頻度を増加させることが明らかとなった。これによって神経細胞間の同期性を促し、学習効率を維持する。一方、全身炎症をもつ個体では脳血管の血管透過性が亢進し、体循環系の免疫細胞がミクログリアと接触することによって、血管周囲のミクログリアを活性化し、これによってミクログリアが生理機能を喪失する結果、シナプス活動がミクログリアの接触によっても増強されず、神経細胞間の同期性が喪失し、学習行動が阻害されることを明らかにした(投稿準備中)。

以上の結果から全身炎症時には体循環系免疫細胞と中枢神経系免疫細胞が相互相関することによって中枢神経系免疫細胞であるミクログリアの変容を引き起こし、その生理機能を喪失させることによって神経回路活動が異常を呈することが明らかとなった。このような疾患を含めた精神・神経疾患においては脳免疫隔離療法が有用であると考えられることから、現在その戦略の開発を進めているところである。

### 3. 今後の展開

これまで体循環系免疫細胞の活性化および血管内の炎症によって、血液脳関門が非薄化し、中枢神経系の血管の透過性が亢進する。この血液脳関門が非薄化した部位において、体循環系の免疫細胞とミクログリアが接触し、相互作用していることが明らかとなった。そこで、このような全身炎症による高次脳機能障害を防ぐ治療戦略のために、血液脳関門が非薄化している部位における体循環系免疫細胞とミクログリアの相互作用を阻害するために、相互作用する分子機序の同定を図り、候補分子が絞れてきている。関連する分子に対する自己抗体もしくは阻害剤を血管内投与することで、体循環系免疫細胞—ミクログリア間の相互作用を阻害し、中枢神経系免疫を体循環系免疫から隔離する治療法の開発を行う。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

本研究により、体循環系免疫細胞が中枢神経系免疫細胞と中枢神経系内の血管で相互作用することおよびその分子メカニズムを明らかにした。さらに、ミクログリアの新規生理機能をいくつか明らかにすることによって、その生理機能の破綻による、神経回路活動の異常を検証し、個体計測にて行動異常を計測し、その相関を明らかにすることができたとともに、発達障害および精神疾患への新規戦略の可能性を示すことができた。研究実施体制は本研究期間中に2度の異動があったため、その時に応じた体制をとることができた。達成状況はおおむね順調であるが、研究成果の発表に少し遅れがある。

今後の研究成果の科学技術および社会経済への波及効果を期待するものとして、今後製薬



企業と合同で本研究によって明らかとなった分子への新規治療薬開発を進めることが決まっているため、治療薬が開発された際には十分な社会経済への波及効果があると考えられる。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

本研究課題では、身体疾患時において体循環系の免疫細胞がミクログリアを介して中枢神経系に及ぼす作用についてマウスを用いて検討した。その結果、ミクログリアのシナプス形成への作用および神経保護作用について論文として報告することができた。また、全身炎症時に体循環系免疫細胞が集積する中枢神経内の部位とミクログリアの関連、学習効果についての検討結果はさきがけ研究期間中には論文発表できなかったが、論文準備中のところまで進んでおり、さきがけ研究の課題はほぼ達成された。本研究中に見出された機能分子を標的とする薬剤開発にも道筋が開けており、今後の進捗が期待される。

和氣研究者はさきがけ研究期間内に基礎生物学研究所助教から生理学研究所准教授、神戸大学教授へと昇進し、研究室を主宰することとなった。論文発表も含め、国際学会、国内学会での多数の報告がある。また、本研究成果から特許を出願することも出来ている。文部科学大臣表彰 若手科学賞も受賞し、今後の活躍が十分に期待される。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Miyamoto A, Wake H, Ishikawa AW, Eto K, Shibata K, Murakoshi H, Koizumi S, Moorhouse AJ, Yoshimura Y, Nabekura J. Microglia contact induces synapse formation in developing somatosensory cortex. *Nature Commun.* 2016. Aug 25;7:12540. (IF=11.470 CI=0)
2. Kato G, Inada H, Wake H, Akiyoshi R, Miyamoto A, Eto K, Ishikawa T, Moorhouse AJ, Strassman AM, Nabekura J. Microglial Contact Prevents Excess Depolarization and Rescues Neurons from Excitotoxicity. *eNeuro.* 2016 Jun 21;3(3). pii: ENEURO.0004-16.2016. doi: 10.1523/ENEURO.0004-16.2016. eCollection 2016 May-Jun. (査読あり)
3. Wake H, Ortiz FC, Woo DH, Lee PR, Angulo MC, Fields RD. Non-synaptic junctions on myelinating glia promote preferential myelination of electrically-active axons. *Nature Commun.* 2015. Aug 4;6:7844. (IF=11.470 CI=0)

### (2) 特許出願

研究期間累積件数: 1件

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

#### 主要な学会発表

##### ① 国際会議

1. **Wake H.** Functional contacts between microglia and neural circuits in living brain:

implications for immune – brain interactions. Brain Sciences UNSW / School of Medical Sciences seminar, Sydney, Australia, 2016.10.26.

2. **Wake H.** Activity dependent myelination and impaired motor learning as the result of its disruption. Glial Heterogeneity Meeting, Dusseldorf, Germany, 2014.10.14.
3. **Wake H.** Activity dependent myelination and impaired motor learning as the result of its disruption. SFB 894 University of Saarland, Homburg, Germany, 2014.10.10.
4. **Wake H.** Disruption of myelin homeostasis impairs motor learning. 日韓シンポジウム, 岡崎, 2014.9.4.

## ②国内会議

1. **和氣 弘明.** 脳情報処理における髄鞘化の役割. 生理学研究所研究会「体内エレメントの探索的研究と新技術の開発」, 岡崎, 2016.10.13.
2. **和氣 弘明.** The role of microglia in learning during systemic inflammation. 第39回日本神経科学大会, 横浜, 2016.7.22.
3. **和氣 弘明.** 光を用いた脳機能計測と操作. 新学術領域「マイクロ精神病態」若手育成合宿, 埼玉(理化学研究所), 2016.3.2.
4. **和氣 弘明.** 光学顕微鏡による生体イメージング. 生理学研究所 第5回多次元脳トレーニング&レクチャー, 岡崎, 2016.2.23.
5. **和氣 弘明.** The role of microglia in the adult CNS of systemic inflammation. 第20回グリア研究会, 大阪, 2015.12.5.
6. **和氣 弘明.** The role of microglia in the adult CNS is systemic inflammation. 第58回日本神経化学会大会, 大宮, 2015.9.11.
7. **和氣 弘明.** Activity dependent myelination and impaired motor learning as result of its disruption. 第92回日本生理学会大会, 神戸, 2015.3.23.
8. **和氣 弘明.** Activity dependent myelination and impaired motor learning as the result of its disruption. 第37回日本神経科学大会, 横浜, 2014.9.12.

## 受賞

2014年 4月 15日

文部科学大臣表彰 若手科学賞