

「代謝と機能制御」研究領域 領域活動・評価報告書
—平成21年度終了研究課題—

研究総括 西島 正弘

1. 研究領域の概要

本研究領域は、細胞内の代謝産物を解析し、細胞機能を効率的に制御することを可能とする基盤的な技術に関して、個人の独創的な発想に基づく革新的な技術の芽の創出を目指す研究を対象とする。

具体的には、脂質、糖、アミノ酸、核酸関連物質などの代謝産物群の体系的あるいは網羅的解析、代謝産物情報に基づく細胞状態の評価・分類、細胞の代謝経路のモデル化とシミュレーション、代謝経路を制御する化合物の予測と設計、新機能を付与した細胞の作製などに関して、新たな方法論の創出や技術展開の契機となることが期待される研究であり、それぞれの要素技術から細胞制御研究までを対象とする。

細胞内の代謝研究は、現在、質量分析計などを活用して代謝産物群を体系的あるいは網羅的に解析するメタボローム解析手法の導入により新しい時代に入っている。我が国の代謝研究は脂質や糖をはじめ様々な物質領域で国際的に高いレベルに有り、まだ端緒についたばかりのメタボローム研究においても世界をリードする独創的な研究成果が出る事が期待される。

2. 研究課題・研究者名
別紙一覧表参照

3. 選考方針

選考の基本的な考えは下記の通り。

- 1) 選考は「代謝と機能制御」領域に設けた選考委員 15 名と研究総括で行う。
- 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、研究構想、研究のねらい、研究の主体性、独創性、新規性、等を中心に審査した。研究課題が戦略目標、並びに、本研究領域の趣旨に合致していることについても重視した。また、イノベーションの芽を育む基礎研究の見地から、将来大きく発展する可能性が高いかを考慮した。

4. 選考の経緯

一応募課題につき領域アドバイザー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、採用候補者を選定した。

選考	書類選考	面接選考	採用者
対象者数	158 名	22 名	11 名

5. 研究実施期間

平成 18 年 10 月～平成 22 年 3 月

6. 領域の活動状況

領域会議: 7 回

研究報告会: 1 回

研究総括(または技術参事)の研究実施場所訪問: 研究開始時に研究総括と技術参事、事務参事が研究現場を訪問し、研究状況の把握と研究環境、設備等の確認、並びに、上司への協力依頼を行った。その後は、研究実施場所の移動環境の確認、物品確認等の際に、研究総括または技術参事、事務参事が適宜訪問し、研究進捗状況の把握と支援に役立てた。

7. 評価の手続き

研究総括が研究者からの報告・自己評価を基に、領域アドバイザーの協力を得て行った。また、研究報告会の参加者の意見も参考にした。

(評価の流れ)

平成 18 年 10 月～	研究期間終了
平成 22 年 3 月	
平成 21 年 12 月	研究報告会開催
平成 22 年 2 月	研究報告書及び研究課題別評価提出
平成 22 年 3 月	研究総括による評価

8. 評価項目

- (1) 研究計画書の目標に対する研究課題の達成度
- (2) 外部発表(学術論文、口頭発表など)、特許など研究成果の発信状況
- (3) 学術賞、学会招待講演、新聞記事発表など外部からの評価状況
- (4) 得られた研究成果の科学技術への貢献度

9. 研究結果

本研究領域では、メタボローム研究に資する新しい分析手法の開発、微生物・動物・植物の変異・病態・発生過程等におけるメタボローム解析、特定の細胞状態を規定する代謝産物の同定、新しい代謝過程の発見、代謝産物の変化情報に基づく細胞機能の解明と制御など、広い分野の研究課題が採択されている。昨年度に続き、本年度も広い専門分野の研究者やアドバイザーの交流により活発な研究課題の展開が見られ、メタボローム研究の新しい流れができてきた。新しい生理活性代謝産物の発見、疾患特異的な代謝マーカーによる診断法の開発、並びに、代謝疾患治療薬の開発、有用な代謝産物を効率よく産生する有用生物の開発に結びつくことが期待される。研究者別にそれらの研究目的と結果および評価を記述する。

○有田 誠 研究者

炎症反応は感染症などに対する重要な生体防御機構であるが、一方で生物は炎症を積極的に収束させるシステムを兼ね備えている。本研究では、炎症を収束に導く分子機構を、とくに脂質代謝の観点から包括的に理解することを目指した。その結果、炎症後期におこる抗炎症反応を引き起こす脂肪酸代謝産物のメタボローム解析を進め、抑制メカニズムに関する新しい知見を得た。白血球の 12/15 リポキシゲナーゼ産物が抑制因子として作用していることを見出した。オメガ3脂肪酸が遺伝学的に亢進された Fat-1 トランスジェニックマウスを用いて、炎症抑制因子の同定に成功した。本成果により、炎症を積極的に収束させる機序の一つが明らかに出来たとと言える。オリジナリティの高い研究で、極めて高いレベルの研究が行われたと評価する。今後はその制御機序や、さらにはヒトの疾患との関連、治療法の開発応用などに発展させることを期待する。

○今井 浩孝 研究者

脂質ヒドロペルオキシドは様々な疾病や酸化ストレスで生じた活性酸素による生体膜の酸化により生成する他、特異的な脂質酸化酵素により生成するが、その生理機能や病態との関連については未だ不明確である。本研究では、この酸化脂質の唯一の還元酵素であるリン脂質ヒドロペルオキシドグルタチオンペルオキシダーゼ (PHGPx) の欠損細胞や欠損マウスを用いてメタボローム解析を行い、酸化脂質による細胞増殖制御機構や病態進展のメカニズムを明らかにすることを目指した。その結果、PHGPx の細胞質型が、正常な細胞増殖や個体の発生、器官形成に必須であることを見だし、PHGPx 欠損によるリン脂質ヒドロペルオキシドの生成により細胞死が起きることを明らかにした。この過程でおこる細胞死は、ネクローシス、アポトーシス、オートファジーのいずれも関与しない新しい細胞死である可能性を指摘した。本研究により、新しい細胞死が存在する可能性を示すことが出来たとと言える。当初の計画に沿って順調に進展し、成果は上がったと評価する。今後、本機序による細胞死を抑制する化合物の応用の可能性が期待できる。

○榎本 和生 研究者

脳神経ネットワーク形成において脂質代謝物が重要な機能を果たしていることが示唆されているが、その作用機序は不明である。本研究では、ショウジョウバエを個体モデルとして、脳神経系の多様な脂質代謝物を生み出す分子基盤を網羅的に同定するとともに、その神経突起形成における機能の解明を目指した。ショウジョウバエを使って、神経ネットワーク形成に関与する遺伝子の解析を進めた結果、候補遺伝子の中からイノシトールリン脂質代謝に関与する酵素がネットワーク形成に、TOR(Target of Rapamycin)キナーゼシグナルを介して作用することを見出した。ネットワークの再構築にはマトリックスメタロプロテアーゼ MMP2 酵素が関与することを明らかにした。本研究により、脳神経系で働く代謝酵素の同定と機能解析は進展したと言える。当初の計画に沿って順調に進展していると評価できる。大変興味ある視点からの研究であり、今後は神経機能を直接評価するための新技術等に

についても発展を期待する。

○川島 博人 研究者

糖鎖は細胞接着やタンパク質品質管理などの機能を担う重要な代謝産物であり、組織特異的発現パターンを示すが、糖鎖の組織特異的発現制御機構に関しては不明な点が多くある。本研究では、ユニークな硫酸化糖鎖を豊富に発現するリンパ節高内皮細静脈(HEV)に着目し、硫酸化糖鎖の HEV 特異的 *in vivo* 機能解析、およびその発現制御機構の解明を目指した。HEV 特異的に発現制御できる遺伝子改変マウスの系統を作製した結果、硫酸基転移酵素 GlcNAc6ST-2 が、末梢リンパ節 HEV とともに、鼻咽頭リンパ節 HEV、大腸の上皮細胞にも発現することを見出した。大腸上皮細胞に発現する硫酸基転移酵素は、腸内細菌により誘導されること、酪酸が転写促進に作用することを見出した。組織特異性を重視した糖鎖研究の糸口も提供され、当初の計画に沿って成果は上がったと評価する。今後は、その病態生理的意義に関する詳細な解析や他の生理的意義の解明等、硫酸化糖鎖の生理的意義の解明を更に進展させることを期待する。

○小松 雅明 研究者

オートファジー(自食作用)は細胞内で中心的な役割を果たしているタンパク質代謝系であり、その破綻は神経変性疾患や肝障害を引き起こす。本研究では、オートファジーによる特異的な基質分解阻害の分子機構を明らかにし、重篤疾患の発症機構を解明することを目指した。その結果、哺乳動物でのオートファジーの分子メカニズムの解析を進め、臓器特異的オートファジー欠損マウスを作製して、飢餓状態のみでなく、恒常的にオートファジーが機能していることを証明した。肝細胞特異的、脳神経細胞特異的遺伝子破壊マウスに、肝細胞、神経細胞にユビキチン化タンパク質の凝集体が蓄積していることを見出した。中心的な役割を担っている分子として p62 を同定し、オートファジーによる p62 の代謝不全が病態発症のキーイベントであることを明らかにした。本研究により、哺乳動物におけるオートファジーの役割が明らかにされた。当初の計画に沿って順調に進展し、高いレベルの研究成果を得たと評価する。今後は、代謝される特異的分子のモニター系の確立やその代謝を促進もしくは遅延させる化合物の同定等を進め、重篤疾患の診断・創薬に繋げることを期待する。

○佐野 元昭 研究者

心不全患者に占める高齢者の比率が増加しており、心不全に対する有効な治療法を確立するためには、「心筋の老化」という修飾因子も考慮に入れ発症の分子メカニズムを理解する必要がある。本研究では、メタボローム解析手法の導入により、心不全や老化を規定する代謝産物の同定や新しい代謝過程の発見、さらには代謝産物の変化情報に基づく心筋細胞機能の制御法の確立を目指した。その結果、心筋細胞に注目して、心不全に対応する細胞ストレスが引き起こすエネルギー産生系、異化、合成系に関してメタボローム解析を展開した。メタボローム解析から細胞がストレス下では、分解系から合成系へのシフトがおき、グルタチオン合成の亢進などが起きていることを見出した。酸化ストレスに対する防御反応を明らかにした。本研究により、心不全に対する新たな視点が示され、成果は上がったと評価する。今後は、心筋細胞機能の制御法を進展させ、心不全治療への応用を期待する。

○重信 秀治 研究者

アブラムシの細胞内には共生細菌「ブネラ」が棲んでおり、両者の間には栄養のギブ・アンド・テイクを基礎にした絶対的な相互依存関係が成立している。例えば、ブネラは細胞膜の合成酵素さえゲノムから失っている。本研究では、このような緊密な共生系において両者の代謝がどのようにオーガナイズされているのかを明らかにすることを目指した。その結果、発生のごく初期から核で発現する転写因子 *Distal-less* が共生細胞バクテリオサイトで発現を維持していることを見出した。また、アブラムシとブネラのトランスクリプトーム解析により、共生関係の成立する仕組みを明らかにし、新たな分泌タンパク質候補を同定した。アブラムシの全ゲノム塩基配列の決定に参加し、共生系において両者の代謝の解明がゲノム解析レベルで大きく進展したと言える。成果は上がったと評価する。今後は、代謝の生化学的研究を進め、共生系における代謝や発生などの生命システムの統合的な解明に発展することを期待する。

○新藤 隆行 研究者

アドレノメデュリン(AM)は、強力な血管拡張作用とともに臓器保護作用、抗動脈硬化作用などの多彩な作用を有する生理活性物質である。本研究では、AM の生理活性が、受容体活性調節タンパク(RAMP)によって制御されていることに着目し、AM や RAMP の遺伝子操作マウスを用いて、AM-RAMP システムの病態生理学的意義の全容を明らかにすることを目指した。RAMP サブアイソフォーム(RAMP2)の遺伝子破壊マウスを作製した結

果、胎生致死で心血管の発達不全、浮腫、出血が見られた。RAMP2 の薬剤誘導型コンディショナルノックアウトマウスで、拡張型心筋症のモデルを作製し、心臓のメタボローム解析を行った。心筋における AM-RAMP2 系は、酸化ストレスや、心リモデリングの制御に加え、心ミトコンドリア機能維持を介して、心保護的に働いている事を明らかにした。本研究により、AM-RAMP システムの病態生理学的意義の解明は大きく進展したと言える。AM-RAMP システムに関して、当初の計画以上に大きく進展し、成果は上がったと評価する。今後は、AM-RAMP システムの制御による新規治療法の開発へと進展させることを期待する。

○中戸川 仁 研究者

オートファジーは、細胞が自身の中身をオートファゴソームと呼ばれる脂質膜の袋で包み込んで分解する現象である。オートファジーにより、細胞は栄養が枯渇しても分解産物であるアミノ酸を糧に生き抜くことができ、また、細胞内を常に綺麗に保つことができる。本研究では、どのようにしてオートファゴソームが形作られるのか、そのメカニズムを解明することを目指し、オートファジーの分子メカニズムを酵母で解析した。その結果、オートファゴソームの形成に必要なタンパク質 Agt8 と脂質分子ホスファチジルエタノールアミン PE との結合体 Agt8-PE が、ヘミフュージョンによって膜状複合体の形成開始に関与することを明らかにした。種々の重要な生理機能が明らかにされつつあるオートファジーにおけるオートファゴソーム形成の分子機構の解明を大きく進展させた。本研究により、オートファジーの全容を明らかにする糸口が見いだされ、高い成果が上がったと評価する。今後、生命の基本となる生体膜動態の解明と制御に向け、大きな貢献が期待される。

○西野 邦彦 研究者

異物排出トランスポーターは、細胞異物となる分子を細胞内から排出していると考えられてきたが、近年代謝産物輸送や細菌病原性発現等の生理的機能を担っていることが分かってきた。本研究では、輸送基質が未知の異物排出トランスポーターの生理的基質を決定し、輸送体による細胞機能制御機構の解明を目指した。その結果、サルモネラ菌に存在する異物排出トランスポーターを9つ同定した。これらのトランスポーターは菌にとって異物排出のみでなく、病原性に関与するファクターの排出にも関与することを見出した。病原細菌にとって鉄は必須の元素であり、異物排出トランスポーターを介して鉄をキレートする分子が排出され、鉄複合体が吸収されるメカニズムのあることを見出した。本研究により、輸送体による細胞機能制御機構の解明を大きく進展させることができ、また、異物排出トランスポーターの阻害剤の研究も進展しており、成果が上がったと高く評価する。今後は、臨床研究者との連携により、感染症克服につながる薬剤の開発へと更に進展させることを期待する。

○眞鍋 一郎 研究者

メタボリックシンドロームと動脈硬化は、病態の初期から互いに関連し合いながら進展する。その背景には、代謝に関わる臓器と血管の両方で同時に、肥満や代謝異常に伴う様々なストレスへの絶えざる応答とその破綻による臓器の機能低下や、高次構築の改変が進んでいると考えられる。本研究では、代謝の異常によって生み出されるストレス分子を見だし、どのように細胞がストレスに応答するのか、その破綻がどのように病的な状態を作り出すのかを解明することを目指した。その結果、肥満した内臓脂肪組織には炎症細胞が存在し、脂肪組織は炎症反応により全身に影響を与える内分泌臓器として働くことを明らかにした。転写因子 KLF5 を同定し、脂肪細胞分化にも関与することを明らかにした。独自に開発したレーザー共焦点顕微鏡技術を用いて研究を展開し、メタボリックシンドロームと動脈硬化において炎症の重要性を明確にし、高い成果が上がったと評価する。今後は、新しい治療戦略の開発へと研究を展開させることを期待する。

10. 評価者

研究総括 西島 正弘 国立医薬品食品衛生研究所 所長

領域アドバイザー氏名(五十音順)

新井 洋由	東京大学大学院薬学系研究科 教授
稲垣 暢也	京都大学大学院医学研究科 教授
寒川 賢治	国立循環器病センター研究所 所長
木下 タロウ	大阪大学免疫学フロンティア研究センター 副拠点長／微生物病研究所 教授
斉藤 和季	千葉大学大学院薬学研究院 教授
鈴木 明身	東海大学未来科学技術共同センター 教授
鈴木 紘一	東京大学 名誉教授
田口 良	東京大学大学院医学系研究科 客員教授

寺部 茂*1 兵庫県立大学 名誉教授
 富田 勝*1 慶應義塾大学先端生命科学研究所 所長／環境情報学部 教授
 永井 良三 東京大学大学院医学系研究科 教授
 西村 紀 島津製作所ライフサイエンス研究所 技術顧問
 深見 希代子 東京薬科大学生命科学部 教授
 正木 春彦 東京大学大学院農学生命科学研究科 教授
 横田 明穂 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科 教授

*1 平成 17 年 8 月～平成 19 年 5 月まで参画

(参考)

(1)外部発表件数

	国内	国際	計
論文	2	112	114
口頭	256	81	337
その他	44	15	59
合計	302	208	510

※平成 22 年 3 月現在

(2)特許出願件数

国内	国際	計
5	1	6

(3)受賞等

- ・有田 誠
文部科学大臣表彰 若手科学者賞(H21.4)
- ・今井 浩
日本酸化ストレス学会 学術賞(H20.6)
- ・榎本 和生
日本生化学会 奨励賞(H18.10)
文部科学大臣表彰 若手科学者賞(H20.4)
- ・小松 雅明
日本生化学会 奨励賞(H18.10)
日本分子生物学会 三菱化学奨励賞(H21.12)
- ・佐野 元昭
International Society for Heart Research, Young Investigator Award(H19.6)
慶應義塾大学医学部 三四会賞(北里賞)(H20.6)
慶應義塾大学医学部 三四会奨励賞(H22.1)
- ・新藤 隆行
国際高血圧学会 JSH Award(H18.10)
Vascular Biology Innovation Conference 最優秀賞(H19.8)
日本心血管内分泌代謝学会 高峰譲吉研究奨励賞(H21.10)
- ・西野 邦彦
日本抗生物質学術協議会 奨励賞(H19.11)
日本化学療法学会 西日本支部支部長賞(H20.1)
文部科学大臣表彰 若手科学者賞(H20.4)
日本ビフィズス菌センター 研究奨励賞(H20.6)
日本化学療法学会 上田泰記念感染症・化学療法研究奨励賞(H20.6)
国立大学法人大阪大学 教育・研究功労賞(H21.2)
花王芸術・科学財団 花王研究奨励賞(H21.6)
病態代謝研究会 最優秀理事長賞(H19.8)

(4)招待講演

国際 31 件
国内 76 件

「代謝と機能制御」領域 研究課題名および研究者氏名

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職 (応募時所属)	研究費 (百万円)
有田 誠 (兼任)	炎症反応の収束に関わる脂質性メディエーターの代謝と網羅的解析 (東京大学大学院薬学系研究科)	東京大学大学院薬学系研究科 准教授 (ハーバード大学医学部 講師)	52
今井 浩孝 (兼任)	脂質ヒドロペルオキシドによる細胞機能制御と疾病との関連の解析 (北里大学薬学部)	北里大学薬学部 准教授 (同上 助教授)	47
榎本 和生 (兼任)	脳神経ネットワーク形成における脂質機能の網羅的解析 (情報・システム研究機構国立遺伝学研究所)	情報・システム研究機構国立遺伝学研究所 准教授 (同上 助教授)	49
川島 博人 (兼任)	硫酸化糖鎖の組織特異的な機能発現機構の解明 (静岡県立大学薬学部)	静岡県立大学薬学部 准教授 (同上 助教授)	46
小松 雅明 (兼任)	オートファジーによる選択的代謝経路とその破綻による病態発生 (東京都臨床医学総合研究所)	東京都臨床医学総合研究所 副参事研究員 (順天堂大学医学部 助手)	49
佐野 元昭 (兼任)	代謝産物の変化情報に基づく心筋機能制御法の確立 (慶應義塾大学医学部)	慶應義塾大学医学部 講師 (同上)	51
重信 秀治 (専任)	複合系の代謝制御ーアブラムシ細胞内共生系をモデルとして (自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター)	科学技術振興機構 さきがけ研究者 (自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター 助手)	43
新藤 隆行 (兼任)	受容体活性調節タンパクの機能解明と血管新生および血管合併症治療への応用 (信州大学大学院医学系研究科)	信州大学大学院医学系研究科 教授 (同上)	56

中戸川 仁 (兼任)	オートファジーにおける脂質膜組織化 機構の解明 (東京工業大学統合研究院)	東京工業大学統合研究院 特任助教 (自然科学研究機構基礎生物学研 究所 助手)	45
西野 邦彦 (兼任)	異物排出トランスポーターによる細胞 機能制御の解明 (大阪大学産業科学研究所)	大阪大学産業科学研究所 准教授 (同上 特任助手)	49
眞鍋 一郎 (兼任)	ストレス応答破綻としてのメタボリック シンドロームと動脈硬化の分子機構解 明 (東京大学大学院医学系研究科)	東京大学大学院医学系研究科 特 任准教授 (同上 特任講師)	45

研究課題別評価書

1. 研究課題名

炎症反応の収束に関わる脂質性メディエーターの代謝と網羅的解析

2. 氏名

有田 誠

3. 研究のねらい

急性炎症反応は「起炎反応」とそれに続く「収束過程」に分けられ、その進行は浮腫、好中球の浸潤、マクロファージの浸潤と続く一連の連鎖反応である。起炎反応は好中球が炎症部位に浸潤して異物を排除する過程であり、サイトカイン、ケモカイン、プロスタグランジン、ロイコトリエンなどの起炎性メディエーターの関与が示されている。一方の収束過程においては、好中球が減少する一方でマクロファージの流入が増大し、アポトーシスした好中球や組織片がマクロファージに貪食され、さらにリンパ管から所属リンパ節へ向かうドレナージを介する炎症浸出液の吸収および炎症細胞の消散が認められる。このような収束過程は、一旦炎症が生じた組織が正常な状態に回復する上で重要であると考えられるが、その分子機構に関してはいまだ不明な点が多い。一方で、魚油に含まれるオメガ3系脂肪酸(エイコサペンタエン酸(EPA)やドコサヘキサエン酸(DHA))に由来する抗炎症性代謝物が、炎症の収束に関わる可能性が示唆されている。そこで本研究では、炎症反応の収束に関わる脂質性メディエーターの代謝フローを総合的に捉えるためのメタボローム解析を行い、さらに炎症部位で必要な時期に炎症収束性メディエーターが産生される機構を明らかにすることによって、炎症の収束を制御するメカニズムを分子レベルで明らかにすることを目的とした。

4. 研究成果

4-1. 脂肪酸代謝物の包括的メタボローム解析システムの確立

分子中に二重結合を含む多価不飽和脂肪酸の多くは、酵素的な酸化反応によって生理活性を獲得し、脂質メディエーターとして生体機能の調節的役割を果たしている。例えば、アラキドン酸由来のプロスタグランジンやロイコトリエンが炎症の初期過程において機能することは良く知られており、一方で炎症の収束過程において

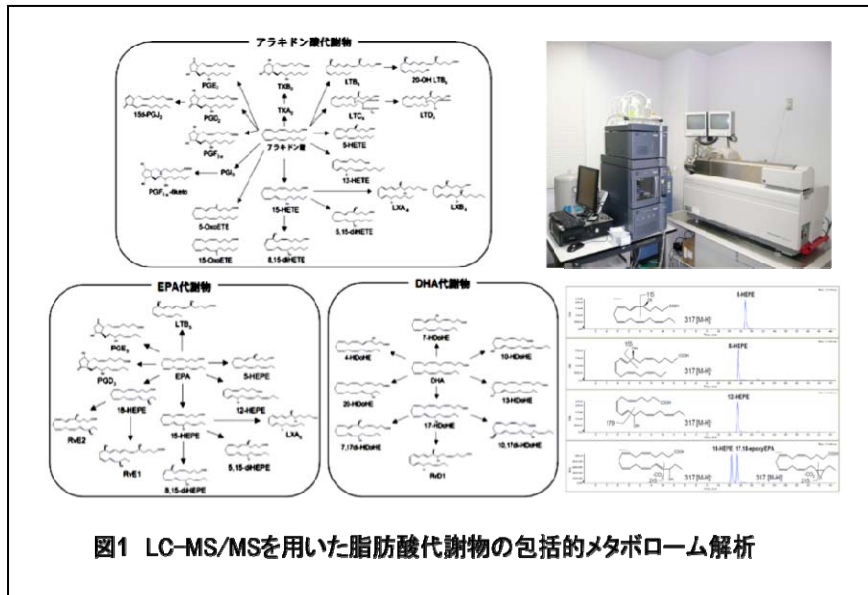


図1 LC-MS/MSを用いた脂肪酸代謝物の包括的メタボローム解析

は、アラキドン酸由来のリポキシン、およびエイコサペンタエン酸(EPA)やドコサヘキサエン酸(DHA)などオメガ3系脂肪酸に由来する抗炎症性代謝物(レゾルビン、プロテクチン)の関与が示唆されている。我々は、これら炎症を制御する脂質性メディエーターの代謝フローを総合的に捉える目的で、三連四重極型質量分析計の multiple reaction monitoring (MRM)を利用した脂肪酸代謝物の一斉定量分析システムを確立した。この系を用いることで、アラキドン酸、オメガ3系脂肪

酸代謝物を網羅する約 120 種類の代謝物をピコグラム感度で一斉定量分析することが可能になった。

4-2. 炎症の収束期に誘導される脂肪酸代謝物についての解析

酵母ザイモザンで惹起したマウス急性腹膜炎の炎症局所から経時的に炎症浸出液を採取し、脂肪酸フラクションを固相抽出で調製し、高速液体クロマトグラフィー・タンデムマススペクトロメトリー(LC-MS/MS)によるメタボローム解析を行った。その結果、シクロオキシゲナーゼ(COX)、リポキシゲナーゼ(LOX)などの脂肪酸代謝酵素の産物がそれぞれ特徴的な挙動を示すことが明らかになった。中でもとくにマウス 12/15-LOX によって産生される一連の代謝物の挙動が、炎症の開始とともに減少し、炎症の収束期にかけて再び増加するといったユニークなパターンを示し、その中には DHA から 12/15-LOX によって産生される抗炎症性メディエーター、プロテクチン D1(PD1)が含まれていた。この結果から、12/15-LOX を発現してPD1を産生する何らかの細胞が、収束期に炎症部位に集積している可能性が考えられ、次にそのような細胞の探索を行った。

4-3. 炎症の収束期に出現するPD1 産生細胞の同定と機能解析

ザイモザンを投与後、経時的に炎症巣に集積する細胞をフローサイトメトリーで解析した。その結果、収束期にはマクロファージのマーカ分子であるF4/80 陽性の細胞群の増加が認められた。さらに、このF4/80 陽性細胞群が、蛍光色素Rhodamine123 (R123)によって、2群に分かれることを見出した(図2)。このとき、R123で強く染まる細胞はマクロファージに特徴的な形状および遺伝子発現を示し、一方、弱く染まる細胞はマクロファージとは異なる形状および遺伝子発現を示した。以下この細胞をF4/80 + R123^{lo}細胞と呼ぶことにする。図2に示すように、F4/80 + R123^{lo}細胞は炎症の収束期(24-48h)に出現する細胞群であり、炎症の収束に積極的に関与している可能性が

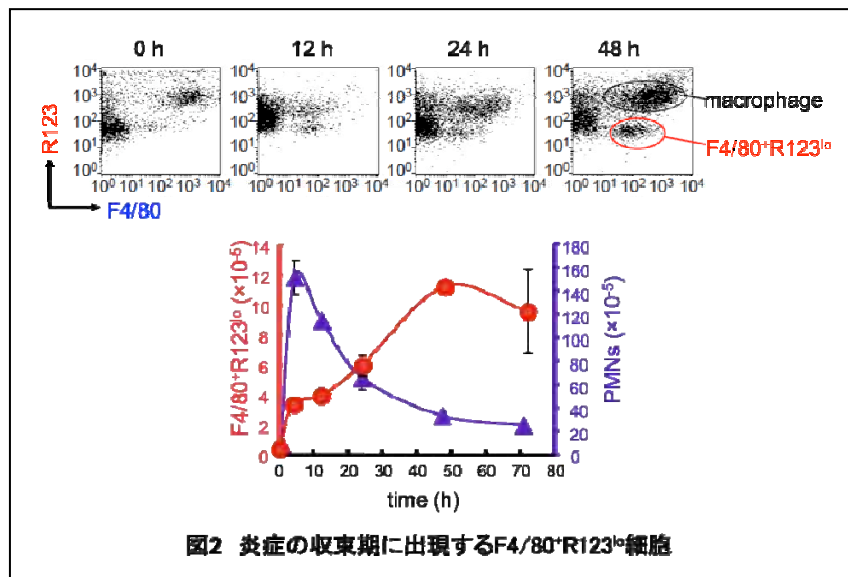
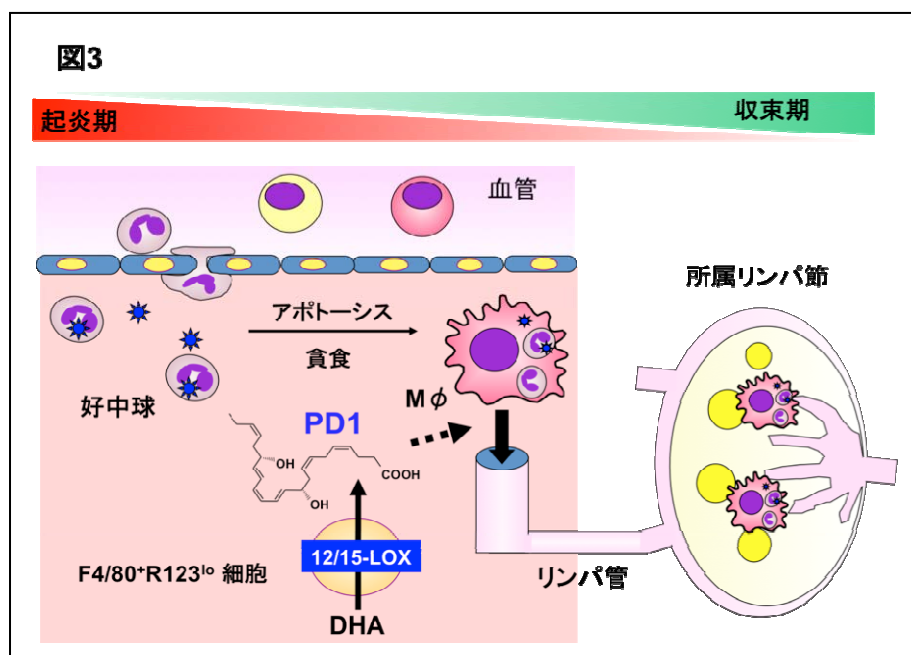


図2 炎症の収束期に出現するF4/80⁺R123^{lo}細胞

図3



考えられた。

そこで次に、F4/80⁺R123^{lo}細胞がPD1 産生細胞である可能性について検討した。炎症収束期であるザイモザン投与後 24 時間の時点において、F4/80⁺R123^{lo}細胞をdepletionしたマウスの炎症浸出液中の脂質メディエーター量をLC-MS/MSを用いて測定したところ、コントロールマウスに比べてPD1 をはじめとする 12/15-LOX代謝物のレベルが著しく低いことが明らかになった。さらに腹腔内から回収された細胞を *ex vivo*で刺激したところ、F4/80⁺R123^{lo}細胞をdepletionした状態では明らかにPD1 の産生量が低下していた。また、F4/80⁺R123^{lo}細胞はPD1 の産生酵素である 12/15-LOXの発現量が、同時期に存在する好中球やマクロファージと比べても非常に高いことが確認された。以上の結果より、F4/80⁺R123^{lo}細胞は炎症収束期においてPD1 を産生する主要な細胞であることが明らかになった。

次に、F4/80⁺R123^{lo}細胞のdepletionによって炎症収束に及ぼす影響について調べた。炎症の収束は、(1)腹腔内に残存する好中球の数、(2)蛍光標識したザイモザンを取り込んだ炎症細胞の所属リンパ節への移行、を指標に評価した。その結果、炎症収束期であるザイモザン投与後 24 時間の時点において、F4/80⁺R123^{lo}細胞をdepletionしたマウスは明らかな炎症収束の遅延が認められた。以上の結果から、炎症収束期に現れるF4/80⁺R123^{lo}細胞は炎症の収束に促進的に働く細胞であることが示された。さらにPD1 を炎症部位に直接投与すると、F4/80⁺R123^{lo}細胞をdepletionした際に認められる炎症収束の遅延がほぼ完全に回復した。以上から、F4/80⁺R123^{lo}細胞は炎症部位でPD1 などの炎症収束性メディエーターの産生を介して周囲の組織に作用し、炎症が速やかに収束する環境を整えるような役割を果たしている可能性が考えられた(図3)。

5. 自己評価

脂肪酸代謝物の網羅的メタボローム解析系の確立と、それを用いた新しい抗炎症性脂質メディエーターの同定を目指した本研究課題は、当初の計画通り順調に進んでいる。とくにオメガ3脂肪酸代謝物に重点を置いたMRMライブラリーの完成度は高く、検出感度と網羅性において世界最先端のメタボローム解析システムが完成したことは特筆に値する。このシステムを用いてこれまでにオメガ3脂肪酸由来の新規活性代謝物の同定にも成功しており、今後それぞれの化合物の作用機構について解析を進める予定である。また、炎症の収束機構の解析において、炎症収束期に出現する細胞としてF4/80⁺R123^{lo}細胞を見だし、この細胞が炎症収束性の脂質メディエーターの産生細胞であり、炎症細胞がリンパ組織へクリアランスされていく過程を促進する活性を有していることを明らかにした。今後の創薬標的として大いに注目されるポイントである。

6. 研究総括の見解

脂肪酸代謝物の包括的メタボローム解析等により、炎症収束期に誘導される脂質性メディエーターの同定とその産生にかかわる細胞の同定、並びに Fat-1 トランスジェニックマウスを用いた新しい抗炎症性脂質性メディエーターを発見するなど、研究は順調に進められ、極めて優れた研究成果を挙げた。炎症を収束させるメカニズムの研究として世界的に見ても非常にレベルの高い研究成果であり、創薬につながる成果でもある。脂質代謝物の高感度な包括的メタボローム解析の開発は、他の病態代謝研究などへの波及効果も大である。今後は、メディエーターの受容体の同定とその下流のメカニズムの解明も重要課題であろう。

7. 主な論文等

A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

①論文

1. Arita M, Ohira T, Sun YP, Elangovan S, Chiang N, Serhan CN. Resolvin E1 selectively interacts with leukotriene B4 receptor BLT1 and ChemR23 to regulate inflammation. *J. Immunol.* 178, 3912–3917, 2007
2. Schwab JM, Chiang N, Arita M, Serhan CN. Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature* 447, 869–874, 2007
3. Ohira T, Arita M, Omori K, Recchiuti A, Van Dyke TE, Serhan CN. Resolvin E1 receptor

activation signals phosphorylation and phagocytosis. *J Biol Chem.* in press

4. Seki H, Fukunaga K, Arita M, Arai H, Nakanishi H, Taguchi R, Miyasho T, Takamiya R, Asano K, Ishizaka A, Takeda J, Levy BD. The anti-inflammatory and pro-resolving mediator resolvin E1 protects mice from bacterial pneumonia and acute lung injury. *J Immunol.* in press

②特許

研究期間累積件数: 1 件

1. 発明者: 有田誠、新井洋由、磯部洋輔、田口良
発明の名称: 新規抗炎症性化合物
出願人: 東京大学
出願日: 2009年2月20日

③受賞

1. 平成 21 年度文部科学大臣表彰若手科学者賞(2009 年 4 月 6 日)

④著書

1. Bannenberg G, Arita M, Serhan CN. Endogenous receptor agonists: resolving inflammation. *Scientific World Journal.* 7, 1440-1462, 2007
2. Seki H, Tani Y, Arita M. Omega-3 PUFA derived anti-inflammatory lipid mediator resolvin E1. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 89, 126-130, 2009

⑤招待講演

1. Makoto Arita, Lipidomic analysis of Fat-1 transgenic mice. 2nd Congress of the International Society of Nutrigenetics/Nutrigenomics (ISNN), Geneva, Switzerland, October 2008
2. Makoto Arita, Anti-inflammatory lipid mediators derived from omega-3 polyunsaturated fatty acids. Lipid Peroxidation 2008, Karuizawa, Japan, October 2008
3. Makoto Arita, Functional lipidomics of omega-3 PUFA derived lipid mediators. 4th International Conference on Phospholipase A2 and Lipid Mediators (PLM2009), Tokyo, Japan, May 2009

B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

①論文

1. Campell EL, Louis NA, Tomassetti SE, Canny GO, Arita M, Serhan CN, Colgan SP. Resolvin E1 promotes mucosal surface clearance of neutrophils: a new paradigm for inflammatory resolution. *FASEB J.* 21, 3162-3170, 2007

研究課題別評価書

1. 研究課題名

脂質ヒドロペルオキシドによる細胞機能制御と疾患との関連の解析

2. 氏名

今井 浩孝

3. 研究のねらい

生体膜を構成するリン脂質は、主に2位の位置に多価不飽和脂肪酸を有しているため、紫外線や炎症性細胞などの活性酸素などにより、リン脂質の酸化を引き起こし、1次生成物としてリン脂質ヒドロペルオキシドが生じ、更にアルデヒドやカルボン含有酸化リン脂質に代謝され、細胞膜の崩壊などを伴う細胞死を引き起こすと考えられている。一方、生体内にはリン脂質を特異的に直接酸化し、リン脂質ヒドロペルオキシドを生成する酵素 15-リポキシゲナーゼが存在するが、その生理的意義はよくわかっていない。我々はこれまでに、リン脂質ヒドロペルオキシドを直接還元できる細胞内の主要な酵素、リン脂質ヒドロペルオキシドグルタチオンペルオキシダーゼ (PHGPx) の機能の解析をとおして、細胞内のオルガネラ局所で生じる脂質ヒドロペルオキシドの生理的な役割について、エイコサノイド産生制御機能、カルジオリピンヒドロペルオキシドを介したアポトーシス制御などをPHGPx高発現株を用いて明らかにしてきた。PHGPxは一つの遺伝子から、ミトコンドリア、核小体、細胞質や核などオルガネラに局在する3つのタイプが存在する。我々はPHGPxの全欠損マウスは発生初期過程の 7.5 日から 8.5 日の間で致死となることを報告したが、なぜPHGPxが欠損すると発生初期過程で致死となるのかは明らかではなかった。

本研究では、なぜ PHGPx が欠損すると発生初期過程で致死となるのか、またどのオルガネラで生成するどのような酸化脂質の生成がこの発生過程の細胞死に重要であるのか。またこの細胞死は発生過程に特異的なことであるのかをオルガネラ選択的PHGPx欠損マウスや細胞を用いて酸化脂質メタボローム解析を行い明らかにすることを目的とした。さらに、各臓器でのPHGPxを欠損させ、酸化脂質の代謝経路を破綻させたとき、脂質ヒドロペルオキシドが起因となってどのような疾病が引き起こされるのかについて解析することを目的とした。これらの解析から新たな脂質ヒドロペルオキシドの機能としての新規細胞死制御機構や病態発生のメカニズムを明らかにすることを目指した。

4. 研究成果

1) 発生過程における3つのタイプのPHGPxの機能解析

PHGPxは一つの遺伝子から、ミトコンドリア、核小体、細胞質や核などオルガネラに局在する3つのタイプが存在する(図1)。

PHGPxの全欠損マウスは発生初期過程の7.5日から8.5日の間で致死となる。なぜPHGPxが欠損すると発生初期過程で致死となるのか、どのタイプのPHGPxが発生過程で重要なのかについて明らかにするために、まず3.5日受精卵の初代培養系を構築し検討した。Wildの3.5日受精卵は、培養2日目にハッチングが起こり、4日目以降ES細胞の元になるInner Cell Mass(ICM)を形成するが、3.5日KO受精卵はハッチング後、4日目以降

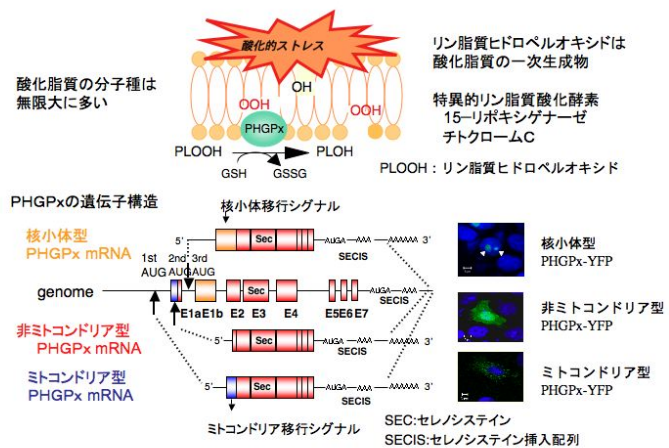


図1 リン脂質ヒドロペルオキシドグルタチオンペルオキシダーゼの (PHGPx) の構造と機能

ICM 形成ができず致死となった(図2)。この致死がどのタイプの PHGPx が重要であるのかをレトロウイルス感染系にて、ミトコンドリア型、非ミトコンドリア型、核小体型のそれぞれの cDNA を導入したところ、非ミトコンドリア型のみで ICM 形成不全をレスキューできた。一方、非ミトコンドリア型 PHGPx の活性中心のセレノシステインをセリンに変換したものではレスキューできなかった。興味深いことに、低分子化合物の抗酸化剤を培地中に添加したところ、脂質の過酸化を抑制できる、ビタミンE、ビタミンEの誘導体のトロロックス、PHGPx 活性をもつエブセレンにより ICM 形成不全がレスキューできた。しかし、スーパーオキシドを消去できる MnTBAP や過酸化水素生成をおさえるN-アセチルシステインやグルタチオンでは ICM 形成不全を抑制することができなかった。これらの結果から、ICM 形成の際にはなんらかの脂質過酸化反応が常に起こっており、正常な ICM 形成には PHGPx によるこの脂質酸化物の生成を抑制することが必須であることが明らかとなった(図2)。

次に個体レベルでどのタイプの PHGPx が発生過程に必須であるのかを明らかにするために、トランスジェニックレスキュー法を用いて、胚致死のレスキュー実験を試みた。3つのタイプの PHGPx は Ia エクソン中の2つの開始コドン、Ib エクソン中にひとつの開始コドンをもつ(図1)。それぞれの開始コドン ATG を TTG に変異させた、トランスジェニックゲノム遺伝子(Tg 遺伝子)を導入したトランスジェニックマウスを作成し、PHGPx ヘテロマウスと交配し、更に内在性の PHGPx ゲノムが KO になると胚致死になるところを、導入した Tg 遺伝子によりレス

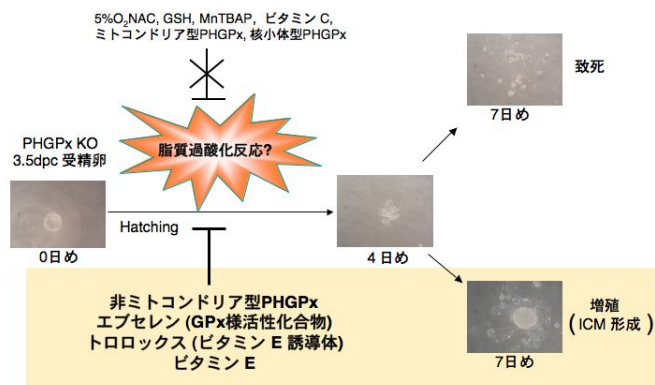


図2 3. 5日PHGPxKO受精卵のICM形成不全とその抑制効果

キューできるのかについて検討した。loxP 配列では含まれた3つとも正常な PHGPx を発現できる正常 PHGPx ゲノム Tg 遺伝子(図4A)、ミトコンドリア型単独変異 Tg 遺伝子、核小体型単独変異 Tg および、ミトコンドリア型、核小体型ダブル変異(非ミトコンドリア型のみ発現) Tg 遺伝子ではレスキューできたが、非ミトコンドリア型単独変異 Tg 遺伝子及び全タイプの変異 Tg 遺伝子ではレスキューできなかった。またミトコンドリア型、核小体型ダブル変異(非ミトコンドリア型のみ発現)マウスは正常に生育した。以上の結果から、胚発生過程及び、受精卵の ICM 形成には非ミトコンドリア型のみが必須であることが明らかとなった。

2)PHGPx欠損によるMEF細胞の新規細胞死の解析

3.5 日のPHGPx欠損受精卵の致死が胚発生特有な現象であるのか、一般の細胞でも見られるのかを明らかにするために、loxP配列では含まれた正常なマウスPHGPxゲノムTg遺伝子によりレスキューされたfloxマウス(図4A)胎児より、不死化したMEF細胞を樹立し、更にタモキシフェン誘導型CreERT²遺伝子を導入したCRE ERT²細胞を樹立した。本細胞はタモキシフェンを培地中に添加すると、Creタンパク質が核内に移行し、導入したPHGPxゲノムTg遺伝子を破壊することにより、PHGPx欠損細胞となる。本細胞にタモキシフェン添加を行うと24時間でPHGPxタンパク質がほぼ消失し、更にG1-S期で細胞周期が停止し、48時間後から72時間の間で致死となることが明らかとなった(図3)。このPHGPx欠損による細胞死も脂質酸化を抑制するビタミンEやビタミンEの誘導体トロロックスやプロブコールで致死が抑制されたが、MnTBAP、EUK-8、N-アセチルシステインでは抑制できなかった。また各オルガネラ局在型のPHGPx cDNAを導入したところ、ミトコンドリア型、核小体型ではレスキュー効果は弱く、核内局在型PHGPxでは抑制できず、核外放出型PHGPxで効率よくレスキューできることが示され、本細胞死の脂質過酸化は、ミトコンドリアや核内の脂質の酸化が起因となるのではなく、細胞質側の脂質過酸化が起因となっていると考えられた。

そこで本細胞死のメカニズムを詳細に検討した結果、アポトーシスの阻害剤や、抗アポトーシスタンパク質 Bcl-xL の高発現によっても致死が抑制できないこと、カスパーゼの活性化、チトクロームCの放出も見られないこと Apoptosis inducing factor (AIF)のノックダウンによってもレスキューできないことから、典型的なアポトーシスとは異なることが明らかになった。また、ネクローシスの指標である HMGB1 の核からの放出、細胞膜の膨潤、崩壊も見られず、ネクローシスでもないことが明らかとなった、また第3の細胞死経路としてオートファジー性細胞死が報告されているが、本細胞死過程においてはオートファジーの指標である LC3 の脂質付加体が誘導され、オートファジーの誘導がおきていた。しかし、オートファジー関連タンパク質の ATG5 のノックダウン細胞でも致死の抑制効果が見られないことから、オートファジー性細胞死とも異なる全く新しい細胞死が誘導されていることが明らかとなった。

そこで本細胞死におけるリン脂質の変化についてメタボローム解析を行った。タモキシフェン添加後の経時的なホスファチジルコリン(PC)の酸化分子種の変動を LC-ESI-MS/MS を用いて検出したところ、タモキシフェン添加24時間後に PCOOH(PC ヒドロペルオキシド)の分子種の上昇が最大となり、36、48時間で減少した。PHGPxが欠損しているにも関わらず、36時間以降 PCOH(PCヒドロキシ体)の生成が上昇した。PCOOH の代謝産物である PC アルデヒド、PC カルボン酸の量的変動はわずかであった。また PCOOH の24時間での増加は、ビタミンE誘導体であるトロロックスの添加により完全に抑制された。トロロックスの添加時期の違いによる致死のレスキュー効果を検討したところ、24時間以降にトロロックスを添加するとレスキュー効率が著しく減少したことから、この24時間までに生成する微量の PCOOH がこの新規細胞死の誘導を起こしていると考えられた。15-リポキシゲナーゼは PCOOH の産生をする、しかし、樹立した細胞では、15-リポキシゲナーゼの発現は見られなかった。また様々な既知の活性酸素産生酵素の阻害剤においても致死は抑制できなかったこと、さらには、2%酸素状態でも致死が誘導されることから、未同定の新規膜酸化システムの存在が示唆された。以上の結果から、PHGPx は細胞増殖必須因子であり、PHGPx やビタミンEはこの未同定の新規膜酸化システムによる膜リン脂質酸化を抑制あるいは還元することにより、細胞膜状態のホメオスタシスを維持することにより、細胞増殖を正常に維持していること、このホメオスタシスの破綻により新規の細胞死が誘導されることが明らかとなった(図3)。

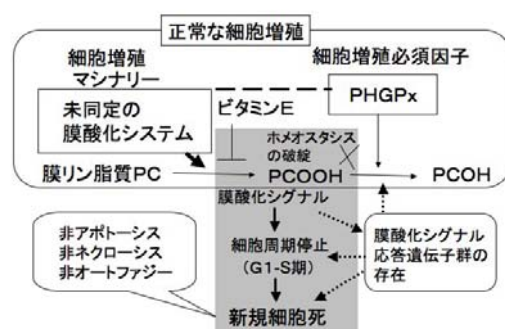


図3 新たな膜酸化シグナル経路と細胞増殖制御機構

3) 組織特異的PHGPx欠損マウスのフェノタイプ解析

A) 精巣特異的 PHGPx 欠損マウスのフェノタイプの解析

我々はこれまでに男性不妊症患者のうち重度乏精子症の約3割の患者において、精子中の PHGPx が著しく低下した症例を見出している。PHGPx の精巣、精子での欠損が本当に不妊症を引き起こすのかについて、精母細胞特異的 Cre 発現マウス (pgk2-Cre) とトランスジェニックレスキュー法にて作成したコントロール flox マウスと交配して作成した(図4A, B)。精巣特異的 PHGPx 欠損マウスはオス、メスとも正常に生育したが、雄において精巣中の精母細胞の約80%が細胞死を引き起こし脱落し、著しい精子数の減少を引き起こした。また生成された精子はミトコンドリア膜電位が消失し、精子の尻尾が折れ曲がるフェノタイプを示し、卵子との受精能を消失し、雄が不妊となることが明らかとなった(図4B)。本マウスはヒトの不妊症と同様のフェノタイプを示した。またオルガネラ選択的 PHGPx 欠損マウスの解析から、ミトコンドリア単独欠損マウスや、核小体型、ミトコンドリア型ダブル欠損マウスでは、精子数の減少は観察されなかったが、精子の形態異常及びミトコンドリア膜電位の低下が観察され、精子の異常のフェノタイプはミトコンドリア型 PHGPx の欠損によるものであることが明らかとなった。

B) 心筋特異的 PHGPx 欠損マウスのフェノタイプの解析

土壌中のセレン欠乏地域に住むヒトでは心筋症を引き起こすことが知られている。PHGPx の心筋での機能を明らかにする目的で心筋特異的 Cre 発現マウス (MCK-Cre) とコントロール flox マウスと交配して心筋特異的 PHGPx 欠損マウスの作成を試みたが、発生過程の 17.5 日から 18.5 日の間で致死となることが明らかになった。このマウスでは心臓は正常に形成されていたが、17.5 日に心筋が TUNEL 陽性となり致死となることが明らかとなった (図 4C)。

PHGPx は心筋における機能、生存に重要な役割をしていることが明らかとなった。

C) 肝臓特異的 PHGPx 欠損マウスのフェノタイプの解析

PHGPx の肝臓における機能を明らかにする目的で肝臓特異的 Cre 発現マウス (Alb-Cre) とコントロール flox マウスと交配して、肝臓特異的 PHGPx 欠損マウスの作成を行った。肝臓特異的 PHGPx 欠損マウスは出生直後に速やかに死亡することが明らかとなった。肝臓の形態、機能について観察したところ、17.5 日以降、肝臓の萎縮及び TUNEL 陽性細胞が出現し、肝細胞の脱落が観察された。18.5 日では PCOOH の蓄積及び血液中の GOT の著しい上昇が見られ、肝障害により致死となることが示された (図 4D)。

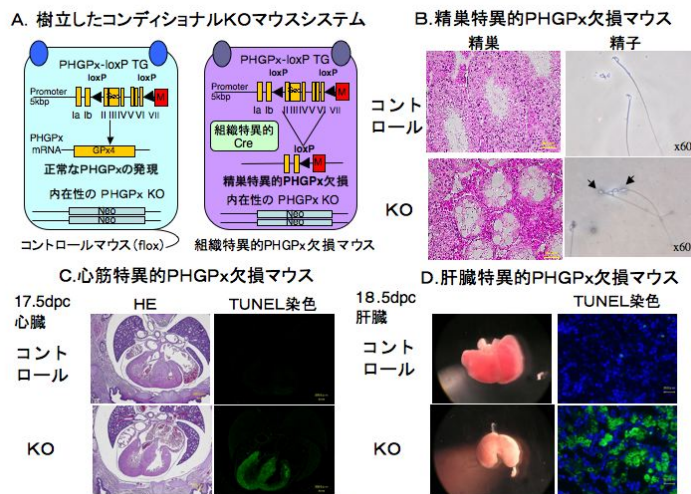


図4 組織特異的PHGPx欠損マウスのフェノタイプのまとめ

5. 自己評価

本研究では、3つのタイプのPHGPxのうち細胞質に存在するタイプが、受精卵、MEF細胞、肝細胞、心筋細胞、精母細胞において、正常な増殖に必須なタンパク質であり、正常な個体発生、器官形成にも重要な役割を担っていることを明らかにした。MEF細胞におけるPHGPx欠損による細胞死の解析から、細胞増殖の際には常に未同定の膜酸化システムにより、微量のリン脂質ヒドロペルオキシド(PCOOH)が産生されており、ビタミンEはその産生自身を抑制することにより、またPHGPxはその還元により膜の酸化状態のホメオスタシスを維持することにより、正常な細胞増殖を維持していることを見いだした。この生体膜の酸化状態のバランスの破綻は、これを感知するシステムにより非アポトーシス、非ネクローシスの新規な細胞死を引き起こすことが明らかとなった。本さきがけ研究では、当初目的とした、3つのタイプのオルガネラ選択的PHGPx欠損マウス、精巣、肝臓、心筋特異的PHGPx欠損マウスの作成に成功し、特に精巣特異的PHGPx欠損マウスは、男性不妊症の原因であること、心筋特異的PHGPx欠損マウスは脂質過酸化が起因となる心不全モデルマウスであることを明らかにできた。酸化脂質メタボローム解析からは、新規細胞死のマーカーとなりうる候補分子種の同定まで行うことができ、当初の目的はほぼ達成できたという点では評価できると考えている。これらの研究の論文発表はもとより、今後、本研究で得られた成果をさらに大きく飛躍させることで、本研究成果の評価をさらに高めたいと考えている。

6. 研究総括の見解

酸化脂質の還元酵素PHGPxの欠損細胞や欠損マウスを用い、本酵素が正常な増殖や個体発生、器官形成に必須であること、PHGPx欠損による細胞死が非アポトーシス、非ネクローシスの新規な細胞死であることなど、研究は計画通り順調に進捗した。研究が多岐に亘っているため、今後は、新規細胞死メカニズムやさらに詳細なメタボローム解析など、焦点を絞った解析が望まれる。優れた研究成果が数多く得られており、早く論文発表へと完成させて欲しい。

7. 主な論文等

A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

①論文

1. Hattori, H. Imai, H. Kirai, N., Furuhashi, K., Sato, O., Konishi, K., Nakagawa, Y. Identification of a responsible promoter region and a key transcription factor, CCAAT/enhancer-binding protein epsilon, for up-regulation of PHGPx in HL60 cells stimulated with TNF-alpha. **Biochem.J.** 408, 277-286 (2007)
2. Imai, H., Hakkaku, N., Iwamoto, R., Suzuki, J., Suzuki, T., Tajima, Y., Konishi, K., Minami, S., Ichinose, S., Ishizaka, K., Shioda, S., Arata, S., Nishimura, M., Naito, S., Nakagawa, Y. Depletion of selenoprotein GPx4 in spermatocytes causes male infertility in mice. **J. Biol. Chem.** 284, 32522-32532(2009)
3. Imai, H. New strategy of functional analysis of PHGPx knockout mice model using transgenic rescue method and Cre-loxP system. **J. Clin. Biochem. Nutri.** 46, 1-13 (2010)

②特許

研究期間累積件数: 0 件

③受賞

1. 日本酸化ストレス学会学術賞(2008年6月19日)

④著書

1. 今井浩孝、中川靖一 リン脂質ヒドロペルオキシドグルタチオンペルオキシダーゼの体内機能—新たな細胞機能制御因子としての脂質ヒドロペルオキシド 細胞工学 26, 1269-1275 (2007)
2. 今井浩孝、グルタチンペルオキシダーゼ4(GPx4、PHGPx)による胚発生・精子形成の制御機構、実験医学増刊号 酸化ストレスと病態 1, 細胞分化増殖・シグナル異常と再生医療 27, 112-117 (2009)
3. 今井浩孝、セレン酵素PHGPx欠損と男性不妊症との関連 総説 Biomed. Res. Trace Elements 20, 3, 232-239 (2009)

⑤招待講演

1. Hirotsugu Imai, Depletion of GPx4 in testis and sperm caused male infertility in mice and human. BOSH 2008 “Biomarkers of oxidative Stress in Health and Diseases”, Osaka, Japan, January 2008
2. Hirotsugu Imai, Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is essential for spermatogenesis and development of functional spermatozoa, Lipid Peroxidation 2008 Session 6 Antioxidant enzymes, Karuizawa, Japan, October 2008
3. Hirotsugu Imai, The physiological role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase during embryogenesis and spermatogenesis, The 4th International Conference of Phospholipase A2 and Lipid Mediators, Tokyo, Japan, May 2009
4. 今井浩孝 3つのタイプのリン脂質ヒドロペルオキシドグルタチオンペルオキシダーゼ(PHGPx)の個体レベルでの機能解析(日本酸化ストレス学会学術賞講演)第62回日本酸化ストレス学会(福岡)2009,6,11
5. Hirotsugu Imai, Phenotype analysis of tissue specific phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase knockout mice, The 1st International Conference of Lipid Hydroperoxide Biology and Medicine, Sendai, Japan, November 2009

⑥シンポジウム

1. 今井浩孝、抗酸化酵素PHGPxと男性不妊症との関連 第8回日本抗加齢医学総会シンポジウム6 フリーラジカルの医学・生物学(東京)2008,6,6
2. 今井浩孝、抗酸化酵素PHGPxと男性不妊症との関連 第61回日本酸化ストレス学会シンポジウム5 遺伝子改変マウスが解き明かす抗酸化遺伝子の真の役割(京都)2008,6,20
3. 今井浩孝、セレン酵素PHGPxと男性不妊症との関連 第19回日本微量元素学会 シ

ンポジウム セレン研究の最前線（東京）2008,7,4

4. 今井浩孝、オルガネラ選択的、臓器特異的PHGPx欠損マウスを用いた個体レベルでの PHGPxの機能解析 第82回日本生化学会 シンポジウム 翻訳されうる21番目のアミノ酸 セレノシステインを含有するタンパク質研究のブレーク・スルー（神戸）2009,10,22
5. 今井浩孝、新規膜酸化ストレス細胞死におけるリポドミクス解析 第4回メタボロームシンポジウム リポドミクス（横浜）2009,11,19

B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

①論文

1. Imai, H., Saito, M., Kirai, N., Hasegawa, J., Konishi, K., Hattori, H., Nishimura, M., Naito, S., Nakagawa, Y. Identification of the positive regulatory and distinct core regions of promoters, and transcriptional regulation in three types of mouse phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. **J. Biochem (Tokyo)**, 140, 573–590 (2006)
2. Kadota Y., Suzuki, S., Ideta, S., Fukinbara, Y., Kawakami, T., Imai, H., Nakagawa, Y., Sato, M. Enhanced metallothionein gene expression induced by mitochondrial oxidative stress is reduced in phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase overexpressed cells. **Eur. J Pharmacol.** 626, 166–170 (2010)

研究課題別評価書

1. 研究課題名

脳神経ネットワークの形成における脂質機能の網羅的解析

2. 氏名

榎本 和生

3. 研究のねらい

我々の脳では、1000 億個ものニューロンが、軸索と樹状突起という機能・形態的に異なる2種の神経突起を介してネットワークを形成している。脳神経ネットワークが正しく構築されるためには、ニューロンが神経突起を適切な方向に伸長・分岐させることが必須である。アルツハイマー病やダウン症候群など精神疾患患者の脳では、神経突起の構造や分岐の異常が頻繁に観察されることから、神経突起の形態異常に起因する神経回路の破綻が発症の主因である可能性が指摘されている。従って、生体脳内における神経突起形成の分子基盤を明らかにすることは、精神疾患発病のメカニズムを理解し、予防や治療の手がかりを得る上でも重要である。一方で、脂質代謝機構に異常が生じると、神経突起の形成不全を伴う精神疾患を発症する確率が高いことから、脂質が神経突起形成において重要な機能を果たしていることが予想されているが、その機能メカニズムについては不明な点が多い。本研究では、ショウジョウバエを個体モデルとして、脳神経系の多様な脂質代謝物を生み出す分子基盤を網羅的に同定するとともに、その神経突起形成における機能を解明することを目的とした。更に、脂質代謝物の動態や神経機能を生体脳内において直接評価するための新技術を創出することにより、脂質による脳神経ネットワーク形成制御機構を総合的に理解することを目指した。

4. 研究成果

(1) 感覚ニューロン樹状突起の形成・維持・再編に関わる脂質代謝酵素群の網羅的同定

ゲノムワイド in situ ハイブリダイゼーション法を用いて、脳神経系に発現する脂質代謝関連遺伝子群を同定した。これに並行して、誘導型 RNAi システムを用いて、樹状突起形成に働く脂質代謝関連遺伝子群の網羅的同定を試みた。誘導型 RNAi とは、個々の遺伝子に対する RNAi コンストラクトを組み込んだショウジョウバエ系統のことであり、Gal4/UAS システムと併用することにより、時期および細胞特異的に特定遺伝子の機能を抑制することが可能となる。具体的には、それぞれの脂質代謝酵素に対応する RNAi コンストラクトを、感覚ニューロン特異的に発現させたときに、樹状突起の「伸長」、「分岐」、「停止」、「シナプス形成」の各ステージに特異的な表現型をしめす遺伝子群を抽出した。まず、ショウジョウバエ神経系に発現することが確認できた脂質関連遺伝子の中で、(1)動物培養細胞等ですでに性状解析されている脂質代謝酵素群(約 150 遺伝子)と、(2)既存の脂質代謝酵素群と一定のホモロジーを有するが機能未知である遺伝子群(約 500 遺伝子)にグループ化し、(1)に属する遺伝子群から優先的に RNAi 解析を行なった。これまでに、(1)グループに属する遺伝子群すべてと、(2)グループ群に属する遺伝子群の一部(約 200 遺伝子)のスクリーニングが終了し、約 10%にあたる 41 遺伝子(「伸長」25 遺伝子;「停止」11 遺伝子;「シナプス形成」5 遺伝子)において特徴的な表現型が観察された(図1)。

(2) イノシトールリン脂質代謝とTORキナーゼによる樹状突起伸長・分岐と領域化の制御

上記の RNAi 解析において「伸長・分岐」に顕著な表現型を示す遺伝子群の中には、ホスファチジルイノシトール(PI)代謝経路に関わる因子群が多数含まれることに着目し、遺伝子欠損変異体(null 変異体)を用いて PI 代謝と樹状突起形成との関連に付いて更なる検討を行った。その結果、脂質メディエーターPIP3 産生の律速酵素である PIP3 キナーゼの変異株では樹状突起の長さと同分岐数がともに激減し、逆に PIP3 分解酵素である PTEN ホスファターゼの変異体では樹状突

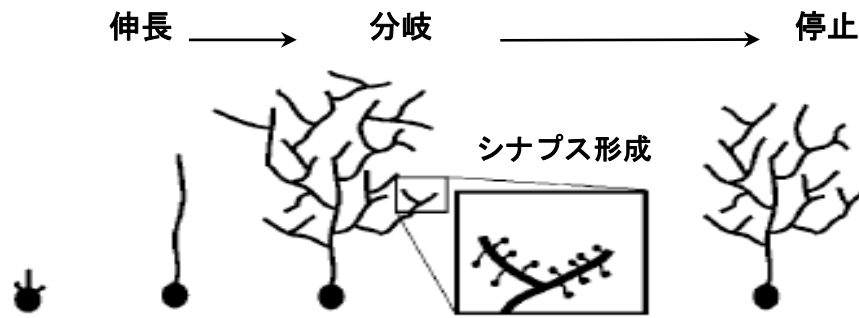


図1 神経突起形成の概念図

神経突起形成は、主として突起の「伸長」、「分岐」、「停止」という3ステージから成り、その間に「シナプス形成」が行われる。本研究では、それぞれのステップにおいて特異的に機能する脂質産物の同定を目指す。なお、本モデルでは、樹状突起形成のみを示している。

起の長さや分岐数が大幅に増加していた。従って、PIP3 産生が樹状突起の分岐・伸長制御に必須であることが示された。更に、PIP3 の主要な下流エフェクター因子群として Akt キナーゼと TOR (Target of Rapamycin) キナーゼを同定した。近年 TOR キナーゼは2種の異なる複合体を形成することが報告されている(図2)。TOR が Raptor らと形成する TOR 複合体 1(TORC1)は S6K を直接的な基質とし、翻訳制御を介して細胞増殖を促進する。一方で、TOR が Sin1 や Rictor などと形成する TOR 複合体 2(TORC2)は細胞骨格制御を担うことが提唱されている。そこで、樹状突起形成における各複合体の機能を個別に解析したところ、TORC1 は突起伸長・分岐に必須であり、TORC2 は突起伸長の領域化(樹状突起の大きさが一定値に達すると突起伸長を停止する)に必須であることが明らかとなった(図2)。つまり、TORC1 は PIP3→Akt 経路の下流で樹状突起の伸長・分岐を促進するのに対して、TORC2 は PIP3→Akt 経路に対してネガティブに働きかけることが示された。これらの結果から、TOR キナーゼが、樹状突起の「伸長・分岐(=アクセル)」と「停止(ブレーキ)」を協調的に制御するための「クラッチ」のような役割を果たす事により、樹状突起の大きさが一定に保たれるという作動モデルを提唱するに至った(EMBO J. 2009)。

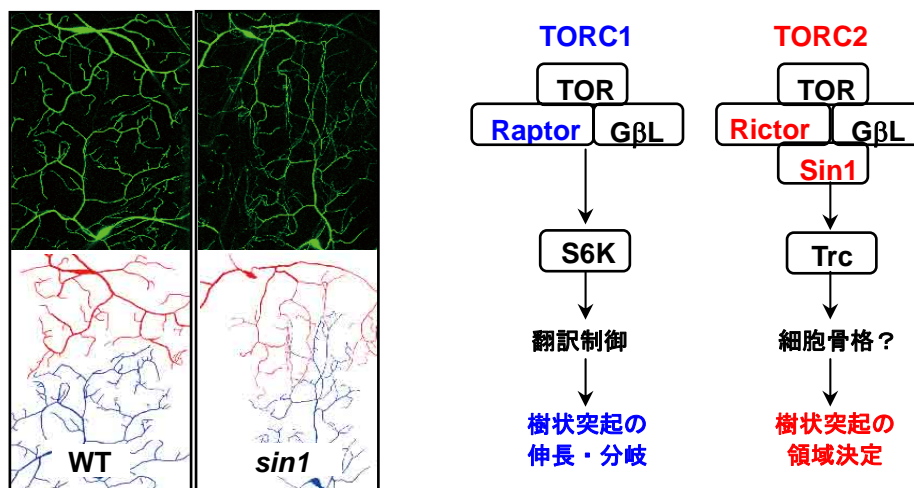


図2 TOR キナーゼは2つの複合体を介して、樹状突起の「伸長・分岐」と「領域決定」を制御する
 左図: 正常体(WT)では樹状突起間に重なりがなくタイル状に配置されるのに対して、TORC2 に異常をきたす変異体(*sin1*)では、適切な位置で伸長・分岐を停止できない為にタイル状の領域形成ができない。右図: ニューロンでは、TORC1 は翻訳制御を介して樹状突起の伸長・維持を司るのに対して、TORC2 は突起の伸長・分岐を制限することにより領域決定を行なう。

(3) 樹状突起の再編(リモデリング)を制御する細胞外マトリックス代謝

神経突起を介したニューロン間ネットワークは、ヒトでは胎生後期から生後にかけて構築されるが、各ニューロンが神経活動を開始すると、神経活動依存的な配線の切り替えが頻繁に行われる。特に、視神経や体性感覚神経などの感覚ニューロンは、外界からの入力に依存して樹状突起形態を大きく変化させることで、最終的に適切な受容領域を獲得する。このような樹状突起リモデリングは、神経回路が機能的に成熟するための必須ステップであるが、簡便な解析システムが確立されていないために、その制御機構に関してはほとんど明らかにされていない。私達は、ショウジョウバエ腹部に位置する感覚ニューロンの樹状突起が、ハエ成虫が羽化してから 24 時間以内に、放射状から梯子状へと劇的にリモデリングすることを見出した(図3)。羽化後 24 時間は、ハエ成虫が、温度・匂い・機械刺激など様々な外界情報を受容し始める時期であり、感覚ニューロンにおいて感覚刺激依存的な神経活動(sensory-evoked neural activity)が急激に上昇する時期と合致する。したがって、私達が見出したショウジョウバエ感覚ニューロンの樹状突起リモデリングは、外界からの感覚入力依存的な樹状突起リモデリングの分子メカニズムを遺伝学的に解明するための有用な解析モデルとなると考えられた。そこで RNAi ノックダウン法を用いて樹状突起リモデリングに必要な遺伝子の網羅的検索を行い、細胞外マトリックスの分解酵素である Matrix metalloproteinase (Mmp)を同定した。続いて、Mmp の発現が樹状突起リモデリングの時期にあわせて一過的に上昇し、誘導された Mmp は感覚ニューロン周辺の細胞外基質を限定分解することにより樹状突起リモデリングを促すことを明らかにした。これらの結果は、細胞外マトリックスの限定分解が、樹状突起リモデリングの基本制御メカニズムである事を初めて示した成果である(*Developmental Cell* in press)。

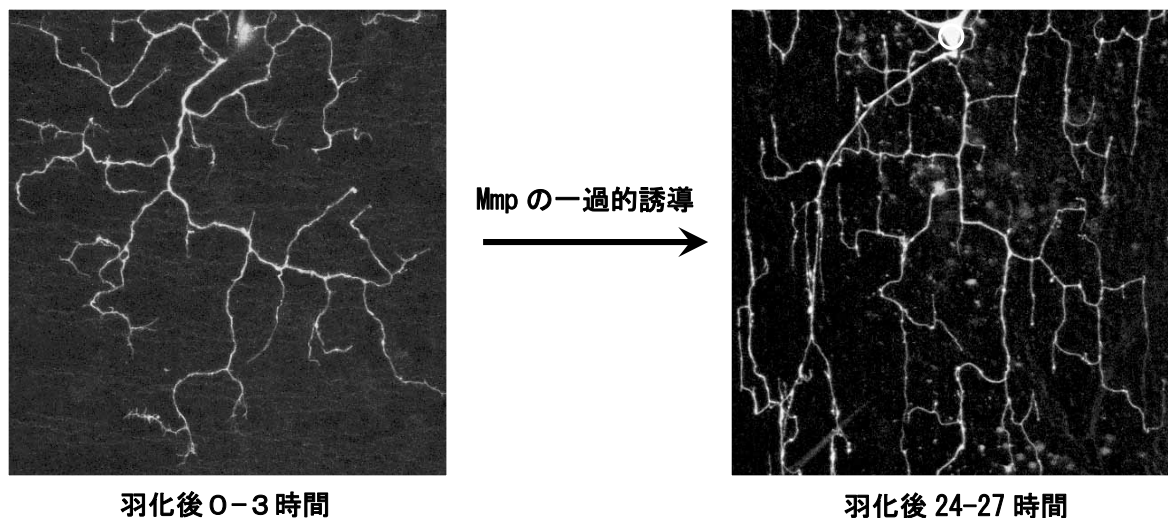


図3 ショウジョウバエ成虫羽化後 24 時間以内に起きる樹状突起リモデリング

蛹から羽化直後のショウジョウバエ腹部感覚ニューロンの樹状突起は放射状に配置されている(左)が、同じニューロンを 24 時間後に観察すると、その形態は梯子状へと大きく変化していた(右)。この樹状突起リモデリングは、細胞外マトリックス分解酵素 Mmp が一過的かつ局所的に誘導されることにより、感覚ニューロン近傍の細胞外マトリックスが限定分解されることにより引き起こされる。

5. 自己評価

ショウジョウバエ遺伝学を駆使することにより、樹状突起の形成・維持・再編制御における脂質

代謝の位置づけを明確にすることができた。まず、イノシトールリン脂質代謝産物 PIP3 の下流において TOR キナーゼが機能すること、さらには TOR を含む2つの複合体(TORC1 と TORC2)が、樹状突起形成において相反する制御を行なうことを発見した。TORC1 と TORC2 は翻訳レベルや翻訳後修飾レベルなど複数の異なる階層において互いにネガティブなクロストークを行なうことが知られている。これらの結果から、TORC1 と TORC2 のクロストークを介して、樹状突起の「伸長・分岐」と「領域化(樹状突起の大きさが一定値に達すると突起伸長を停止する)」が協調的な制御を受け、最終的に樹状突起の大きさ(受容領域)を一定に保つことができるという作動モデルが考えられた。脳内の各ニューロンは、それぞれの機能に応じて適切な大きさの受容領域を作り上げるが、その制御機構は不明であった。本成果により、樹状突起の大きさを制御する分子機構の一端をはじめて明らかにできたと考えている。

次に、ショウジョウバエ成虫初期において、樹状突起が劇的にリモデリングすることを発見した。これまでにマウスやネコ等をモデルとして樹状突起リモデリングの存在とその重要性が示唆されてきたが、分子遺伝学的解析が困難であるために、樹状突起リモデリングの制御メカニズムについてはほとんど理解されていない。本研究において見出されたショウジョウバエ感覚ニューロンの樹状突起リモデリングは、様々な点においてマウスやネコに見出されたリモデリングと相同であることから、分子遺伝学的な解析モデルとして有用であると考えられる。

6. 研究総括の見解

ショウジョウバエ遺伝学を駆使し、イノシトールリン脂質 PIP3 の下流で TOR キナーゼが機能し、TOR を含む2つの複合体が樹状突起形成において相反する制御を行うこと、細胞外マトリックスの限定分解が樹状突起リモデリングの基本制御メカニズムであることなど、計画に沿った独創性の高い研究成果を挙げた。これらは国際的にも高く評価されるものである。今後は、脂質分子の *in vivo* イメージングなどにより、神経機能における脂質代謝物の役割が更に解明されることを期待する。また、これらの研究がヒトを含む高等動物での研究へと発展し、精神疾患の病因解明と治療法開発に発展することを期待する。

7. 主な論文等

A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

①論文 *corresponding author

1. Koike-Kumagai, M., Yasunaga, K., Morikawa, R., Kanamori, T., and *Emoto, K. : Target of rapamycin complex 2 controls dendritic tiling of Drosophila sensory neurons through the Tricornered kinase signaling pathway. *The EMBO Journal* 28: 3879 – 3892 (2009).
2. Yasunaga, K., Kanamori, T., Morikawa, R., Suzuki, E., and *Emoto, K. Dendrite reshaping in adult Drosophila sensory neurons requires matrix metalloproteinase-mediated modification of the basement membranes. *Developmental Cell* in press.
3. *Emoto, K. : Genetic control of dendritic patterning in Drosophila sensory neurons. *Dev. Growth Differ., Review* in press.

②受賞

1. 平成 18 年度日本生化学会奨励賞(2006 年 10 月 27 日)
2. 平成 20 年度文部科学大臣表彰若手科学者賞(2008 年 4 月 15 日)

③著書

1. 榎本和生:「ニューロンはいかにして固有の受容領域を獲得し、それを維持・管理するのか?」蛋白質核酸酵素 54: 842-852 (2007).
2. 榎本和生:「リン脂質分子の膜動態と細胞骨格制御」生化学 80:811-819 (2008).
3. 榎本和生:「神経突起のパターン形成」特集:神経系の発生とその異常」*BRAIN and NERVE* 60: 351-364 (2008).
4. 金森崇浩・榎本和生:「脂質代謝物による細胞分裂の時空間制御」*ファルマシア* 44:1157-1160 (2008).

④招待講演

1. Emoto, K.: How do neurons establish and maintain their unique dendritic fields? **NAIST International Symposium “Cell Signaling”** 2008.11.3–5, Nara
2. Emoto, K.: The molecular mechanisms that regulate establishment, maintenance, and remodeling of dendritic fields. **The 1st iCeMS Symposium** 2008.2.20–22, Kyoto

B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

①論文

1. Soba, P., Zhu, S., Emoto, K., Younger, S., Yang, S.J., Yu, H.H., Lee, T., Jan, L.Y., and Jan, Y.N.: *Drosophila* sensory neurons require Dscam for dendrite self avoidance and proper dendritic organization. **Neuron** 54: 403–416 (2007).
2. Parrish, J. Z., Emoto, K., Jan, L., and Jan, Y. N.: Polycomb genes interact with the tumor suppressor *hippo* and *warts* in the maintenance of *Drosophila* sensory neuron dendrites. **Genes Dev.** 21: 956–972 (2007).

研究課題別評価書

1. 研究課題名

硫酸化糖鎖の組織特異的な機能発現機構の解明

2. 氏名

川島 博人

3. 研究のねらい

糖転移酵素や硫酸基転移酵素などの糖鎖関連遺伝子産物を介して産生される代謝産物である糖鎖は、細胞接着、免疫、がん転移、ウイルス感染、タンパク質品質管理などにおいて重要な役割を果たしている。糖鎖構造は非常に多様性に富む一方で、しばしば組織特異的に特定の機能を発揮する。しかしこれまでに、糖鎖の組織特異的な機能を *in vivo* で解析する研究手法は十分には確立されていない。また、糖転移酵素などの糖鎖関連遺伝子の組織または細胞特異的な発現制御機構に関しては、数例に関して解明が進んでいるものの、いまだに不明な点が数多く残されている。本研究では、これまで我々が特に着目して研究を行ってきた硫酸化糖鎖の *in vivo* における組織特異的な機能解析およびその発現を制御する硫酸基転移酵素の発現制御機構の解明を通じて、代謝産物である糖鎖の機能および発現制御機構を組織特異的に解析するための基盤技術の整備を指向した研究を進める。

我々はこれまでに、硫酸基転移酵素遺伝子欠損マウスを用いて、高内皮細静脈(HEV, high endothelial venule)に特異的に発現するユニークな構造を持つ硫酸化糖鎖 PNA_d (peripheral lymph node addressin)が、末梢リンパ節へのリンパ球ホーミングに必須の役割を果たすことを示してきた(Kawashima *et al.*, *Nature Immunology*, 6:1096-1104, 2005)。PNA_d はリンパ球ホーミングレセプター・L-セレクチンの特異的なリガンドとして機能し、リンパ球の HEV 表面上におけるローリングを媒介する。本研究の具体的な研究の進め方は、以下の通りである。すなわち、はじめに PNA_d の生合成に参与する硫酸基転移酵素 GlcNAc6ST-2 (*N*-acetylglucosamine-6-*O*-sulfotransferase-2)が HEV 特異的に発現することに着目し、そのプロモーター/エンハンサーの支配下に Cre リコンビナーゼを発現する新規トランスジェニックマウスを樹立し、組織特異的な糖鎖機能の解明のためのツールを樹立する。このマウスを用いることにより、これまで末梢リンパ節 HEV 特異的に発現すると考えられてきた GlcNAc6ST-2 の詳細な組織分布を解明する。この過程で硫酸基転移酵素 GlcNAc6ST-2 がこれまでに知られていない組織でも発現することが確認された場合には、すでに樹立している GlcNAc6ST-2 ノックアウトマウスを用いてそれらの組織特異的な硫酸化糖鎖の機能を詳細に解析する。さらに、本研究で樹立する Cre トランスジェニックマウスをヘパラン硫酸伸長酵素 EXT1 の flox マウスと掛け合わせ、組織特異的なヘパラン硫酸欠損マウスを作製し、機能解析を進める。リンパ球の浸潤過程においては、ローリングに引き続き、HEV に発現する硫酸化糖鎖の一種であるヘパラン硫酸に提示されたケモカインによるリンパ球上の接着分子インテグリンの活性化が起こると考えられているが、EXT1 の全身性ノックアウトマウスは胎生致死であるため、*in vivo* における証明はなされていない。本研究では、上記の様に独自に樹立する Cre トランスジェニックマウスを用いて HEV 特異的なヘパラン硫酸欠損マウスを作製し、*in vivo* においてヘパラン硫酸がケモカインの提示分子として機能するか否かを解明する。

4. 研究成果

(1) GlcNAc6ST-2-Cre Tg マウスの樹立

はじめに、HEV 特異的な硫酸基転移酵素 GlcNAc6ST-2 の遺伝子発現調節領域を含む BAC (bacterial artificial chromosome) に Cre リコンビナーゼ遺伝子を挿入した組換え型 BAC を作製した(図 1 参照)。次に、この組換え型 BAC をマウス受精卵にマイクロインジェクションし、GlcNAc6ST-2 遺伝子のプロモーター/エンハンサーの支配下に Cre リコンビナーゼを発現する新規トランスジェニックマウス (GlcNAc6ST-2-Cre Tg マウス) の樹立を行った。この

GlcNAc6ST-2-Cre Tg マウスは外見・行動・受精ともに正常であり、リンパ球ホーミングアッセイによる検討を行ったところ、リンパ球の体内動態も正常であった。

次に、Cre リコンビナーゼを発現する組織で特異的に LacZ を発現する ROSA26 レポーターマウスと GlcNAc6ST-2-Cre Tg マウスを掛け合わせることで、GlcNAc6ST-2-Cre Tg マウスにおける Cre リコンビナーゼの組織分布を X-Gal と反応させることで詳細に解析した。その結果、末梢リンパ節(PLN)のみではなく、鼻咽頭関連リンパ組織(NALT)の HEV(図 2 参照)および大腸上皮細胞においても Cre リコンビナーゼが強く発現することを見いだした。この結果は、NALT の HEV および大腸上皮細胞には GlcNAc6ST-2 が発現することを示している。そこで、GlcNAc6ST-2 の遺伝子座に EGFP 遺伝子を挿入したノックインマウスを用いて検討を行ったところ、確かに NALT の HEV および大腸上皮細胞のいずれにおいても GlcNAc6ST-2 遺伝子の発現に由来する EGFP の緑色蛍光が観察された。

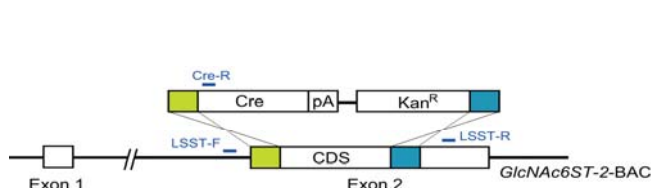


図 1 組換え型 BAC クローン

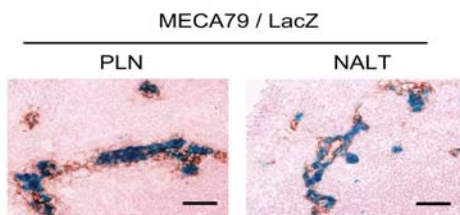


図 2 PLN および NALT の MECA79 抗原陽性 HEV (茶色)における LacZ (青色)の発現

(2) NALT の HEV における硫酸化糖鎖の機能解析

上記の解析により、NALT の HEV には硫酸基転移酵素 GlcNAc6ST-2 が発現することが分かった。そこで次に、その機能解析を試みた。はじめに、GlcNAc6ST-2 および HEV を含む広汎な組織に発現する硫酸基転移酵素 GlcNAc6ST-1 の両者を欠損するダブルノックアウトマウス(DKO マウス)と野生型マウスの NALT の凍結切片を作製し、PNA_d を認識する MECA-79 抗体および L-セレクチン-IgM キメラ分子を用いて DKO マウスの NALT HEV における PNA_d の発現を解析したところ、DKO マウスにおいては L-セレクチンのリガンドとして働く PNA_d の発現が完全に消失することが確認された。GlcNAc6ST-2 単独欠損マウスでは PNA_d の発現は低下するものの完全には欠失しなかったことから、GlcNAc6ST-1 と GlcNAc6ST-2 の両者が NALT の HEV における PNA_d の生合成に関与すると考えられた。次に、リンパ球ホーミングアッセイにより、NALT へのリンパ球ホーミングにおける硫酸化糖鎖の役割を検討した。その結果、DKO マウスにおいては、約 80% NALT へのホーミングが抑制されることを見いだした。次に、卵白アルブミン(OVA)をアジュバントとともに経鼻的にマウスに投与し、アレルギー反応を惹起した。その結果、DKO マウスにおいては、OVA 特異的 IgE 抗体産生および経鼻的に OVA を投与した直後に誘導されるくしゃみの回数が有意に低下した。以上の結果より、PNA_d はこれまでに知られていた末梢リンパ節 PLN へのホーミングのみでなく、粘膜系のリンパ組織の一種である NALT へのホーミングにも関与すること、また経鼻的に侵入する抗原に対するアレルギー反応に関与することが明らかになった。これらの知見は、PNA_d をターゲットとした新しい抗アレルギー薬の開発が可能であることを示唆するものであり、医学・薬学的見地から興味深い。

(3) 大腸上皮細胞における硫酸化糖鎖の機能解析

上記(1)の解析により大腸上皮細胞においても GlcNAc6ST-2 が発現することを見いだした。そこで次に、その発現調節機構の解析および機能解析を試みた。はじめに、抗生物質のアモキシシリンを飲水中に加えて腸内細菌を除去したところ、大腸における GlcNAc6ST-2 の発現が低下することを見いだした。腸内細菌の嫌気発酵産物である単鎖脂肪酸 (SCFA) は、大腸内においていくつかの遺伝子の発現を制御することが知られている。そこで次に、SCFA を用いて大腸上皮由来培養細胞株における GlcNAc6ST-2 の発現誘導を検討した。その結果、上皮細胞成長因子

(EGF) 存在下で、SCFA の一つである酪酸により GlcNAc6ST-2 mRNA が誘導されることを見いだした。大腸の粘膜表面はムチン層により保護されており、分泌型ムチンである Muc2 が主要な成分である。そこで、マウス大腸の凍結切片を用いて、抗 Muc2 抗体染色および硫酸化糖鎖を選択的に染色する pH1.0 の条件下におけるアルシアンブルー染色を行ったところ、GlcNAc6ST-2 欠損マウスでは、Muc2 の発現は変化しないが糖鎖の硫酸化が著しく減少することが明らかになった。さらに Muc2 を野生型マウスおよび GlcNAc6ST-2 ノックアウトマウス(KO マウス)の大腸より調製し、LC-ESI-MS/MSを用いてその O-型糖鎖の詳細な構造解析を行ったところ、KO マウスにおいては Muc2 上の GlcNAc-6 硫酸構造が完全に消失することが明らかになった。また、デキストラン硫酸誘発性大腸炎モデルにおいて、KO マウスで野生型マウスに比べて大腸炎の増悪化が認められた。以上の結果より、GlcNAc6ST-2 は大腸内において腸内細菌の嫌気発酵産物である酪酸によりその発現が制御され、Muc2 の O-結合型糖鎖を硫酸化することで上皮細胞の保護や恒常性の維持および大腸炎に対する防御機能を果たすことが示唆された。

(4) ヘパラン硫酸コンディショナルノックアウトマウスの作製とその解析

ヘパラン硫酸伸長酵素 EXT1 (図 3 参照)をコードする遺伝子のエキソン 1 の両端が loxP サイトで挟まれた EXT1-flox マウスを Tie2-Cre マウスと掛け合わせて血管内皮細胞全般においてヘパラン硫酸を欠損させたところ、血管密度の低下を伴ってマウスは胎生致死に陥るを見いだした。胎生致死となる理由は現在までのところ明らかではないが、ヘパラン硫酸が胎児血管に対する増殖因子の提示に関与し、その傷害により胎生致死となった可能性を今後検討する予定である。

研究のねらいの項で述べたように、リンパ球の浸潤過程においては、上述の L-セレクチンと PNA_d の相互作用によるローリングに引き続き、HEV に発現する硫酸化糖鎖の一種であるヘパラン硫酸に提示されたケモカインによるリンパ球上の接着分子インテグリンの活性化が起これと考えられているが、*in vivo* における証明はない。そこで次に、上記の GlcNAc6ST-2-Cre Tg と EXT1-flox マウスとの掛け合わせを行い、末梢リンパ節 HEV および大腸上皮細胞特異的ヘパラン硫酸欠損マウスの作製を行った。得られたコンディショナルノックアウトマウスにおいては、抗ヘパラン硫酸鎖抗体により確かに末梢リンパ節 HEV および大腸上皮細胞におけるヘパラン硫酸の発現がほぼ欠損することが示された。また、末梢リンパ節 HEV に局在するケモカイン CXCL12 の量が大きく低下し、ヘパラン硫酸が HEV 上におけるケモカインの提示に関与することが明らかになった。

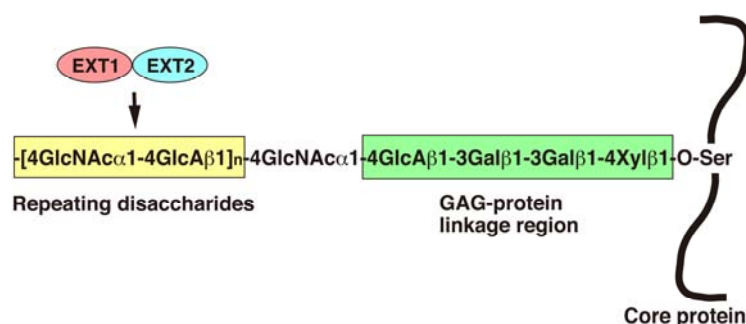


図 3 ヘパラン硫酸鎖の伸長
GlcNAc と GlcA の繰り返し構造は
EXT1/EXT2 ヘテロダイマーにより
生合成される。EXT1 を欠損すると
ヘパラン硫酸鎖は伸長しない。

5. 自己評価

本さきがけ研究で私は、硫酸基転移酵素 GlcNAc6ST-2 遺伝子のプロモーター/エンハンサーの支配下に Cre リコンビナーゼを発現する新規トランスジェニックマウス(GlcNAc6ST-2-Cre Tg)の樹立に成功し、詳細な組織学的検討の結果、GlcNAc6ST-2 が末梢リンパ節 HEV だけでなく鼻咽頭関連リンパ組織 NALT の HEV および大腸上皮細胞にも強く発現することを見いだした。そこでさらに硫酸基転移酵素遺伝子欠損マウスを用いた解析を進め、硫酸化糖鎖 PNA_d が末梢リンパ節のみではなく、NALT へのリンパ球ホーミングおよび経鼻的に体内に侵入する抗原に対するアレルギー応答にも必須の役割を果たすことを明らかにした。また、大腸上皮細胞においては

GlcNAc6ST-2 が大腸ムチンの GlcNAc の 6 位の硫酸化を担うこと、さらには炎症モデルを用いた解析から、大腸ムチンの粘膜バリアとしての働きに GlcNAc6ST-2 によって生合成される硫酸化糖鎖が重要な役割を果たすことを明らかにした。さらには、大腸における GlcNAc6ST-2 遺伝子の発現制御機構に関して、腸内細菌およびその代謝産物である酪酸がその発現制御に関与する事を明らかにした。これらの硫酸化糖鎖の機能解析と平行して、ヘパラン硫酸コンディショナルノックアウトマウスの作製に成功し、ヘパラン硫酸が胎児血管の形成および HEV におけるケモカインの提示に関与することを見いだした。研究開始当初は、硫酸基転移酵素 GlcNAc6ST-2 は末梢リンパ節 HEV に特異的に発現すると考えられてきたが、本研究で初めてその他の組織におけるこの硫酸基転移酵素の組織分布の詳細を明らかにするとともにそれぞれの組織における組織特異的機能を明らかにすることができた。また、硫酸化糖鎖の発現を規定する硫酸基転移酵素 GlcNAc6ST-2 の発現制御機構の一端を明らかにすることもできた。以上のことから、本研究課題「硫酸化糖鎖の組織特異的な機能発現機構の解明」は、糖鎖生物学と免疫学の接点で重要な成果をあげることができたと自己評価している。

6. 研究総括の見解

種々の遺伝子改変マウスの作成により、硫酸基転移酵素 GlcNAc6ST-2 が末梢リンパ節 HEV だけでなく NALT の HEV や大腸上皮細胞にも強く発現すること、硫酸化糖鎖 PNA_d が末梢リンパ節のみではなく、NALT へのリンパ球ホーミングおよび経鼻性抗原に対するアレルギー応答にも必須の役割を果たすことを明らかにした。これらの結果から、PNA_d の機能阻害による免疫応答制御の可能性が示唆された。また、大腸ムチンの GlcNAc 6位の硫酸化は GlcNAc6ST-2 により行われ、これは粘膜バリア機能に必須であること、GlcNAc6ST-2 の発現調節に腸内細菌およびその代謝産物である酪酸が関与することなどを明らかにした。このように、研究は極めて順調に行われた。免疫疾患治療への応用の道も見える。

7. 主な論文等

A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

①論文 *corresponding author

1. Hirose M, Murai T, and Kawashima H*. Elevation of rat plasma P-selectin in acute lung injury. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Basis Dis.*, 1772:382-389, 2007.
2. Kawashima H*, Hirakawa J, Tobisawa Y, Fukuda M, and Saga Y. Conditional gene targeting in mouse high endothelial venules. *J. Immunol.*, 182:5461-5468, 2009.
3. Tobisawa Y, Imai Y, Fukuda M, and Kawashima H*. Sulfation of colonic mucins by N-acetylglucosamine-6-O-sulfotransferase-2 and its protective function in experimental colitis in mice. *J. Biol. Chem.*, in press

②著書

1. Kawashima H. Determination of chemokine-glycosaminoglycan interaction specificity. *Methods in Enzymology* 416:254-263, 2006.
2. Kawashima H. Functions of glycans revealed by gene inactivation of L-selectin ligand sulfotransferases in mice. *Methods in Enzymology* 416:279-290, 2006.

B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

①論文

1. Mitoma J, Bao X, Petryanik B, Schaerli P, Gauguet JM, Yu SY, Kawashima H, Saito H, Ohtsubo K, Marth JD, Khoo KH, von Andrian UH, Lowe JB, and Fukuda M. Critical functions of N-glycans in L-selectin-mediated lymphocyte homing and recruitment. *Nature Immunology*, 8:409-418, 2007.
2. Hatakeyama S, Sugihara K, Nakayama J, Akama TO, Wong SM, Kawashima H, Zhang J, Smith DF, Ohyama C, Fukuda M, and Fukuda MN. Identification of mRNA splicing factors as the endothelial receptor for carbohydrate-dependent lung colonization of cancer cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106:3095–3100, 2009.

②総説

1. Kawashima H. Roles of sulfated glycans in lymphocyte homing. *Biol. Pharm. Bull.* 29:2343–2349, 2006.

研究課題別評価書

1. 研究課題名

オートファジーによる選択的代謝経路とその破綻による病態発生

2. 氏名

小松 雅明

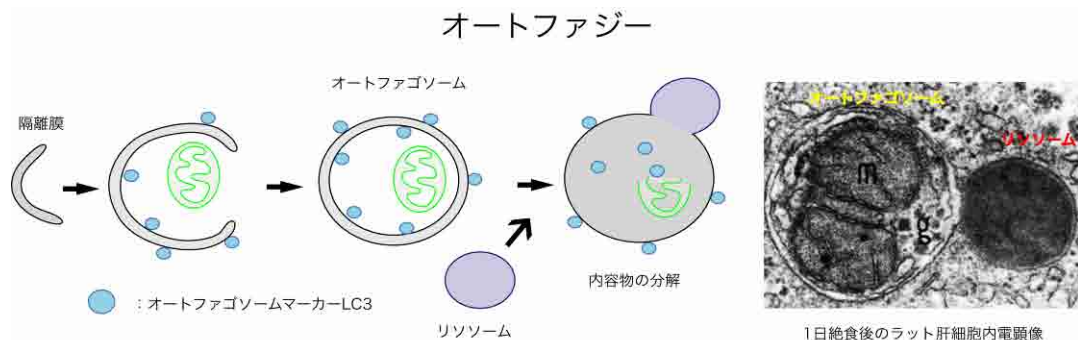
3. 研究のねらい

これまでオートファジーは、自己分解によるアミノ酸供給が主な役割であり、実際、栄養飢餓などで激しく誘導されることが知られていたが、マウス遺伝学を駆使した我々の動物オートファジーの発生工学的研究から、恒常的に起こっているオートファジー(恒常的オートファジー)が細胞の恒常性維持に不可欠であり、その破綻が様々なヒト疾病の発症原因となることが判明した。しかし、恒常的オートファジーの破綻による病態発症機構は不明であった。ごく最近我々は、そのプロセスにおいて中心的な役割を担っている分子として p62 の同定に成功した。本研究課題では、p62 の分子から個体レベルの研究を包括的に推進し、最初に恒常的オートファジーの機構解明を遂行し、次いで神経変性疾患や糖尿病発症に関与するタンパク質 p62 のモニター系の確立およびその代謝を制御する化合物の同定を行い、病態発症メカニズムおよび発症予防・治療方法の確立を目指す。

4. 研究成果

はじめに

細胞内には複数のタンパク質分解経路が存在し、それぞれが独立的に時には協調的に働くことにより、細胞の恒常性を維持・監視する役割を担うと考えられる。その一つである、オートファジー(self-eating: 自食作用)は一般に非選択的なタンパク質分解経路であると考えられてきた。栄養飢餓などの刺激により、細胞質の単膜構造体・隔離膜が伸長しオルガネラを含む細胞質成分を取り囲んだ脂質二重膜構造体(オートファゴソーム)が形成される。オートファゴソームは速やかにリソソームと融合し、その内容物はリソソーム内の消化酵素により構成成分(タンパク質の場合、アミノ酸)にまで分解され、再利用される(下図)。



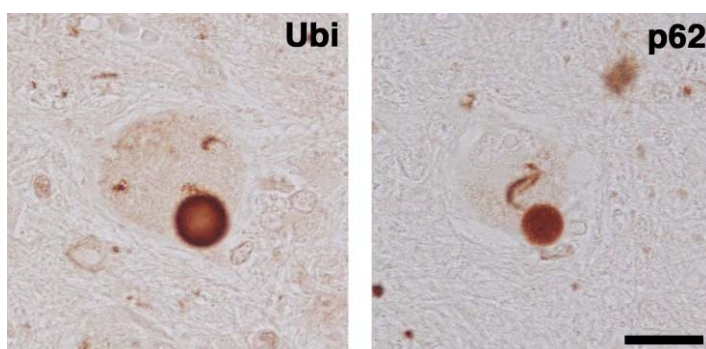
この分解系は、栄養飢餓により激しく誘導されることから、自己タンパク質分解によるアミノ酸供給を介した究極の生存戦略と考えられてきた。しかしながら、最近、高等動物においてオートファジーは飢餓時のみならず、十分に栄養が供給された状態でも恒常的に起こっていることが示唆されてきた。実際、我々が作製した様々な臓器特異的オートファジー欠損マウスの解析から、これらマウスは栄養飢餓に対するタンパク質分解阻害のみならず定常状態においてもユビキチン陽性封入体や異常オルガネラの蓄積を伴った肝障害、神経変性、糖尿病やミオパチーを引き起こすことが明らかになった(Komatsu et al. *J. Cell Biol.*, 2005, *Nature* 2006, *PNAS* 2007, Ebato et al., *Cell*

Metab., 2008, Masiero et al., *Cell Metab.*, 2009)。これらの一連の研究からオートファジーによる異常タンパク質除去機構(新しいタンパク質品質管理機構)が肝細胞、 β 膵細胞、骨格筋や神経細胞において極めて重要な役割を果たしていることが判明した。また、ユビキチン陽性封入体はヒト神経変性疾患や肝疾患で確認される特徴的構造体であることから、これら疾患発症とオートファジーの関連が注目された。しかしながら、どのようなメカニズムでユビキチン陽性封入体が形成されるのか?どのようにして病態発症に至るのか?は全く不明であった。

オートファジー選択的基質p62

我々は、オートファゴソームに局在しその後リソソームにて分解される分子 LC3 をベイトにプロトオーム解析を行った結果、LC3 と予想外のタンパク質 p62 との相互作用を確認した。p62 は、N 末端側の Phox and Bem1p (PB1)ドメイン、ジンクフィンガードメインなどを介して TRAF6 や Caspase-8 などの多彩な分子群と相互作用することから、スカフォールドタンパク質と考えられてきた。興味深いことに、p62 は C 末端に存在するユビキチン会合ドメイン(UBAドメイン)を介してユビキチン鎖と結合すること、さらに N 末端の PB1 ドメインは自己オリゴマー形成することが明らかにされている。LC3 は Atg 結合システム依存的にホスファチジルエタノールアミン(PE)にアミド結合され、オートファゴソームの内膜及び外膜に局在する。PE 化された LC3(LC3-II)は、隔離膜の伸張に必須と考えられている。オートファゴソーム形成に伴い、外膜に局在する LC3-II はシステインプロテアーゼ Atg4B により膜から切断され再利用される一方、内膜に局在する LC3 はオートファゴソームがリソソームと融合することによりオートファゴソームに取り囲まれた細胞質成分とともに分解される。実際、リソソーム酵素阻害剤を処理すると、LC3-II はリソソーム内に蓄積する。同様に、p62 もリソソーム酵素阻害剤やリソソーム内の酸性化を阻害する Bafilomycin A1 処理によりリソソーム内に蓄積する(プロテアソーム阻害剤処理によっては影響されない)。さらに、オートファジー欠損細胞や組織においても p62 の大量蓄積が確認されている。これらのことは、p62 は LC3 との相互作用を介してオートファジー—リソソーム系で分解されることを意味する。LC3 を含む *Atg* 遺伝子の多くは真核生物に広く保存されている一方、p62 は多細胞生物から出現している。このことは、p62 はオートファゴソーム形成に関与する分子というよりはむしろ、オートファジーの選択的基質と捉えることができる。実際、*p62* ノックアウトマウスにおいて正常なオートファゴソーム形成及びリソソームによるタンパク質分解が確認されている。

我々は、オートファジーによる p62 の代謝の意義を検討するため、肝臓もしくは脳特異的 *Atg7* 欠損マウスにおける p62 の動態を調べた。その結果、*Atg7* を欠失させた肝臓もしくは脳においては、p62 が蓄積、不溶化し、最終的に p62 陽性の封入体形成が確認された。興味深いことに、*Atg7* 欠損肝臓、脳において、ユビキチン化タンパク質と p62 は比例的に蓄積し、ほぼ全ての封入体がユビキチン-p62 陽性であった。重要なことに、ユビキチンだけでなく p62 をも含む封入体は、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患やアルコール性肝炎、脂肪肝、肝癌患者組織において同定されている(下図)。



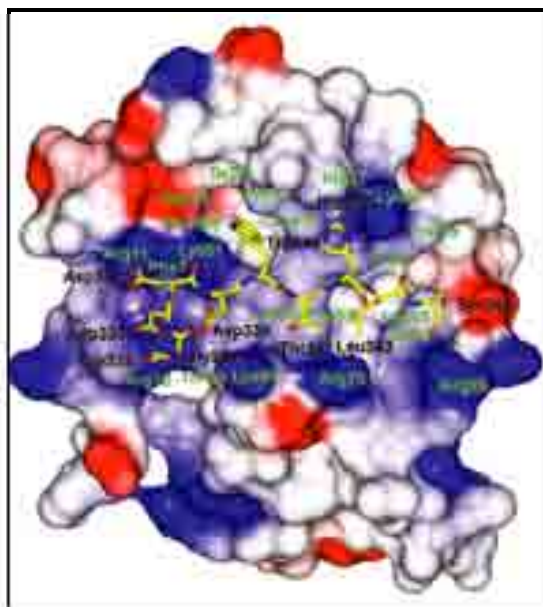
筋萎縮性側索硬化症患者組織におけるユビキチン-p62 陽性封入体。茶色に染まっている構造体が神経細胞内に蓄積しているユビキチン-p62 陽性封入体。

さらに、封入体形成における p62 の役割を検討するために、*Atg7/p62* ダブルノックアウトマウスを作製した結果、驚いたことに、オートファジー不全により出現する封入体は、p62 の同時欠失によってユビキチン化タンパク質の蓄積に関わらずほぼ完全に消失した(Komatsu et al., *Cell* 2007)。この *p62* 欠失による封入体形成の抑制は、オートファジー欠損肝臓、脳ともに確認されることから、

組織普遍的な現象と思われた。これらのことは、ヒト神経変性疾患や肝疾患で観察される封入体形成がオートファジーの減弱に起因しうること、そして p62 が封入体形成の責任分子であることを強く示唆している。

オートファジーによるp62 認識分子機構

上述の通りオートファジーを介した p62 の選択的分解経路が存在することは明白であるが、その分子メカニズムは不明なままだった。ごく最近、我々はマウス p62 分子内の 11 アミノ酸 (Ser334-Ser344) が LC3 によって認識される配列 (LC3-recognition sequence; LRS) であることを見出した。LRS は種間で高度に保存された酸性アミノ酸クラスター及び疎水性アミノ酸 (DDDWXXL) を有していた。さらに、LRS と LC3 の共結晶構造解析から、(1) LRS 内 Trp-340 及び Leu-343 と LC3 のユビキチンフォールド内の二つの疎水性ポケットとの相互作用、(2) LRS 内酸性クラスターと LC3 分子表面の塩基性アミノ酸との相互作用が明らかになった (Ichimura et al., *J. Biol. Chem.*, 2008)。In vivo の解析から、LC3 との相互作用能を欠失した変異 p62 は、オートファジーによる分解を逃れ PB1 ドメイン依存的にユビキチン化タンパク質を含んだ封入体を形成することが判明した。すなわち LC3 を介した p62 の分解阻害のみで、封入体形成が十分であることを意味する。さらに、PB1 ドメインを介した p62 のオリゴマー形成は、オートファジーを介した p62 の効率的な分解に重要であった。興味深いことに、Cvt 経路 (出芽酵母におけるオートファジーと分子機構をシェアする恒常的なアミノペプチダーゼ I 及び α -マンノシダーゼの液胞輸送経路) における選択的なアミノペプチダーゼ I の取込み機構には、アミノペプチダーゼ I 受容体として働く Atg19 と LC3 ホモログである Atg8 との結合が必須であるが、Atg19 の C 末端 10 アミノ酸からなる Atg8 結合領域は LRS 様配列 (WXXL) を含んでいる。さらに、Atg19 の LRS 様配列と Atg8 との共結晶構造解析が行なわれ、この結合様式が p62-LC3 結合様式と同様であることが明らかにされた。従って、WXXL 配列はオートファゴソーム膜に選択的に取り込まれるための普遍的な目印と考えられるのかもしれない。

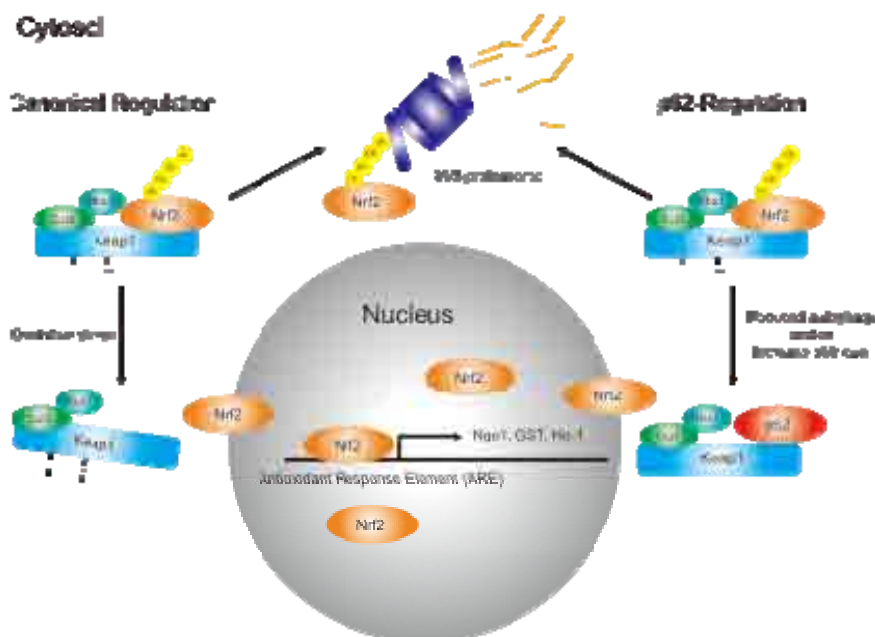


p62-LRS (LC3 recognition sequence) と LC3 結合体の構造。LC3 の分子表面 (表面電荷の塩基性は青、酸性は赤) と LRS ペプチドを黄色のスティックモデルで表している。LRS と相互作用している LC3 のアミノ酸残基は緑で記してある。

p62 の代謝異常による病態発症機序

オートファジーの減弱に起因する病態発症機序は複雑である。オートファジー不能マウスにおける p62 の同時欠損は肝障害を抑制するが、神経変性は抑制しない (Komatsu et al., *Cell* 2007)。このことは、オートファジーの破綻により発症する肝障害は p62 の異常蓄積に起因する一方、神経では異なった病態発症機序があることを意味する。神経においては神経細胞の軸索終末におけるオートファジーを介したオルガネラ代謝が極めて重要であり、その破綻が軸索変性を伴った

神経変性を引き起こすことを示唆する結果を得た (Komatsu et al., *PNAS*, 2007)。一方、肝臓におけるオートファジー減弱 (p62 蓄積) と病態発症機序においては、不透明のままだった。我々は、肝特異的 *Atg7* および *Atg7/p62* 欠損肝臓を用いたトランスクリプトームとプロテオーム解析に p62 タンパク質のインタラクトーム解析を併せることにより、p62 による新たなストレス応答転写制御機構を見出した。一連のストレス応答タンパク質群の遺伝子発現は転写因子 Nrf2 により正に制御されるが、我々は p62 が Nrf2 のユビキチンリガーゼである Keap1 と直接相互作用することを見出した。さらに、生化学的および構造学的解析から、p62 が結合する Keap1 の領域は、Nrf2 が結合する Keap1 の領域と全く同一であることを明らかにした。これらのことから、「p62 が Keap1-Nrf2 の結合を競合的に阻害し、その結果として Nrf2 の活性化とそれに引き続く抗酸化タンパク質群や解毒酵素群の遺伝子発現を上昇させる」という新しい転写制御機構があることが判明した (下図、Komatsu et al., *Nature Cell Biology*, in press)。さらに、このストレス応答転写制御機構がオートファジー欠損肝臓において異常亢進しており、その結果として肝障害を引き起こすことを明らかにした。



5. 自己評価

概ね達成できている。特に、非選択的タンパク質分解系であると信じられていたオートファジーにおいて、選択的分解機構の存在を示した論文の評価は高いと考えられる。オートファジー選択的基質 p62 に関しては、分子から個体レベルの研究を包括的に行なっており、オートファジーを介した p62 の代謝分子メカニズムやその生理的意義を明らかにしつつある。また、我々が発見した恒常的オートファジーの各臓器や各細胞での役割が、我々が作製した条件付きオートファジー欠損マウスをベースに明らかにされている。但し、研究目的に掲げた p62 のモニター系の確立およびその代謝を制御する化合物の同定は、今後の課題と考えられる。

6. 研究総括の見解

オートファジーにおいて重要な役割を演じる分子 LC3 として p62 タンパク質を同定し、この分子がオートファジー選択的基質となることを明らかにし、また LC3 による p62 認識の分子機構も結晶解析により解明した。さらに、p62 の蓄積は、Keap1 と転写因子 Nrf2 との相互作用を阻害することを明らかにし、その結果として肝障害等を引き起こすことを示した。このように、研究は極めて順調に進行し、予想外の新しい発見をするにいたっている。数多くの国際会議での招待講演から明

らかなように、国際的にも高く評価されている。新しい創薬の切り口となる研究としても今後の更なる発展が期待できる。

7. 主な論文等

A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

①論文 *corresponding author

1. Komatsu, M., Waguri, S., Koike, M., Sou, Y.s., Ueno, T., Hara, T., Mizushima, N., Iwata, J.I., Ezaki, J., Murata, S., Hamazaki, J., Nishito, Y., Iemura, S., Natsume, T., Yanagawa, T., Uwayama, J., Warabi, E., Yoshida, H., Ishii, T., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Yue, Z., Uchiyama, Y., Kominami, E. and *Tanaka, K. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell*, 131:1149–63 (2007)
2. Komatsu, M., Wang, Q.J., Holstein, G.R., Friedrich, Jr V.L., Iwata, J.I., Kominami, E., Chait, B.T., Tanaka, K., and *Yue, Z. Essential role for autophagy protein Atg7 in the maintenance of axonal homeostasis and the prevention of axonal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104:14489–94 (2007)
3. Ichimura, Y., Kumanomido, T., Sou, Y.s., Mizushima, T., Ezaki, J., Ueno, T., Kominami, E., Yamane, T., Tanaka, K., and *Komatsu, M. Structural basis for sorting mechanism of p62 in selective autophagy. *J. Biol. Chem.*, 283, 22847–57 (2008)
4. Sou, Y.S., Waguri, S., Iwata, J.I., Ueno, T., Fujimura, T., Hara, T., Sawada, N., Yamada, A., Mizushima, N., Uchiyama, Y., Kominami, E., Tanaka, K., and *Komatsu M. The Atg8 conjugation system is indispensable for proper development of autophagic isolation membranes in mice. *Mol. Biol. Cell*, 19, 4762–4775 (2008)
5. *Komatsu, M., Kurokawa, H., Waguri, S., Taguchi, K., Kobayashi, A., Ichimura, Y., Sou, Y-s., Ueno, I., Sakamoto, A., Tong, K.I., Kim, M., Nishito, Y., Iemura, S.I., Natsume, T., Ueno, T., Kominami, E., Motohashi, H., *Tanaka, K. and *Yamamoto, M. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through Keap1-inactivation. *Nature Cell Biology*, In press

②受賞

1. 平成 18 年度日本生化学会奨励賞 (2006 年 10 月 27 日)
2. 第 7 回日本分子生物学会三菱化学奨励賞 (2009 年 12 月 11 日)

③招待講演

1. Masaaki Komatsu: Selective Autophagy Regulates Formation of Intracytoplasmic Inclusions. Keystone Symposium on Autophagy in Health and Disease, April 15–20, 2007, Monterey, CA.
2. Masaaki Komatsu: Role of p62/SQSTM1 degradation by autophagy in cytoplasmic inclusion formation. 3th GRC AUTOPHAGY IN STRESS, DEVELOPMENT AND DISEASE, January 6–11, 2008, Ventura, CA.
3. Masaaki Komatsu: Autophagy and Neurodegeneration. Keystone Symposium on Neurodegenerative Diseases: New Molecular Mechanisms, Feb. 17–22, 2009, Keystone Resort in Keystone, Colorado, USA.
4. Masaaki Komatsu: Important roles of autophagy-specific substrate p62 in environmental stress response. International Symposium on Autophagy, Sep. 25–28, 2009, Otsu Japan
5. Masaaki Komatsu: Important roles of autophagy-specific substrate p62 in environmental stress response. EMBO Conference AUTOPHAGY Cell biology, Physiology & Pathology, Oct 18–21, 2009, Monte Verita, Ascona, Switzerland

研究課題別評価書

1. 研究課題名

代謝産物の変化動態に基づく心筋ストレス応答機構の解明

2. 氏名

佐野 元昭

3. 研究のねらい

心不全(心機能低下)は心筋梗塞をはじめとするすべての心臓病の終末像でありその生命予後は不良である。心不全の発症頻度は加齢とともに増加する。高齢者では加齢に伴う高血圧、糖・脂質代謝異常などのリスクの集積によって心筋梗塞や心不全を煩う頻度も増加してくる。高齢者では様々な「ストレス応答の低下」から若年者と比して心不全に陥りやすくまた一度心不全を発症するとその生命予後も不良である。最近の薬物療法や非薬物療法の進歩によって心筋梗塞、心不全の患者の生命予後は改善されてきてはいるもののまだまだ社会的要望を満たしているとは言えず(unmet need) 治療法のさらなる改善の余地が残されている。私たちは心筋細胞内代謝や新規の心臓生理活性物質の探索を介して、心筋保護による新規心臓病治療法の開発をめざして研究を続けている。

4. 研究成果

4. 1 ミトコンドリア酸化ストレスに対する心筋細胞代謝リモデリング

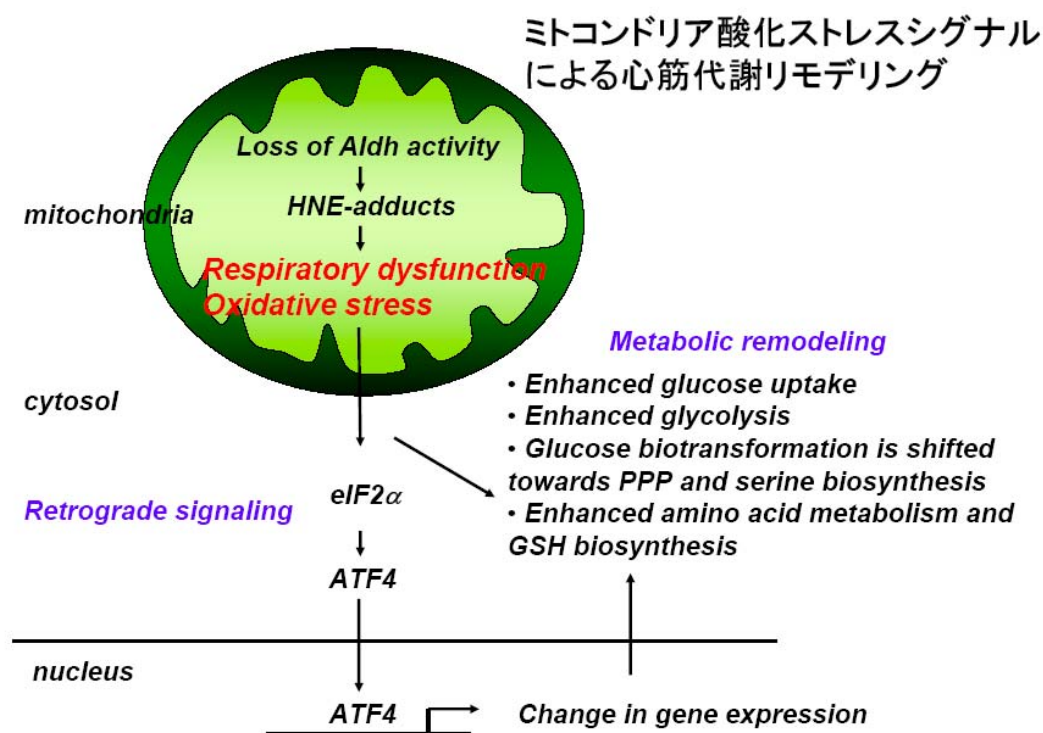
心筋細胞は終末分化した細胞である細胞周期から逸脱している。グルコースや脂肪酸をミトコンドリアでの酸化的リン酸化によって CO₂ まで完全に燃焼させ効率よくエネルギーを(ATP)産生している。一方で心臓に血行力学的負荷(高血圧による圧負荷、心筋梗塞による作業心筋の喪失など)が加わると脂肪酸の酸化とミトコンドリアでの酸化的リン酸化が抑制され、かわりにグルコースの心筋細胞内への取り込みが亢進する。このメタボリックリモデリングは心不全への進行を予防するための適応現象なのか、反対に心不全への進行を加速させる有害な反応なのか、これまで議論的であった。心不全を発症した心筋細胞内はエネルギー飢餓状態にある。ミトコンドリアでの酸化的リン酸化の低下は ATP 産生効率の低下をもたらす。一方で、特に障害をうけたミトコンドリアでの酸化的リン酸化の亢進は過剰な活性酸素の産生を招き、脂質過酸化、酸化的 DNA 障害を介してミトコンドリアのさらなる障害や細胞死を誘導して心不全の発症を招く。

脂質過酸化反応の終末代謝産物であるアルデヒドは酸化ストレス性障害の実行分子と考えられる。心不全患者の心筋細胞ミトコンドリア内にはアルデヒドが蓄積している。ミトコンドリア内でアルデヒドを無毒化する主要な代謝酵素であるアルデヒド脱水素酵素 ALDH2 を不活性化した遺伝子操作マウスでは、ミトコンドリア内にアルデヒドが蓄積して、ミトコンドリア内における酸化ストレス状態が亢進している。この遺伝子操作モデルマウスにおける心筋細胞内代謝応答を網羅的に検討したところ、ミトコンドリアでの酸化的リン酸化の低下し、グルコースの取り込みは亢進していた。しかし、この酸化ストレスモデルマウスの心筋細胞内エネルギー貯蔵レベルの指標であるクレアチンリン酸や ATP の低下はなく心筋収縮力も正常に維持されていた。さらに驚いたことに冠動脈結紮(虚血)・再灌流障害による急性の酸化ストレスによる心筋障害に対しても正常野生型マウスよりむしろ抵抗性を示した。

キャピラリー電気泳動質量分析装置を用いたメタボローム解析の結果、解糖系の亢進に伴ってペントースリン酸経路やアミノ酸合成経路が活性化され、結果的に細胞内還元型グルタチオン濃度が高いレベルに維持されていることが分かった。還元型グルタチオンは抗酸化ストレス応答を担う鍵分子であり、転写因子 ATF4 をノックダウンして還元型グルタチオン濃度を低下させると冠動脈結紮(虚血)・再灌流障害による急性の酸化ストレスに対する抵抗性が抑制された[図]。

以上の結果から、ストレスをかけられた心筋細胞における代謝リモデリングはミトコンドリアでの酸化的リン酸化を抑えて、活性酸素の発生を抑えるという意味においては生体にとって有利に働

く適応現象である可能性が示唆された。また、心筋収縮機能維持に必要なエネルギー産生は解糖系の亢進によってミトコンドリアでの酸化的リン酸化の低下を補える可能性が示唆された。



4. 2 グルコルチコイドによる心筋保護効果とプロスタグランジンD₂

グルコルチコイドは臨床の場で抗炎症・抗免疫作用を期待して汎用されている。例外的に心筋梗塞、心筋炎には臨床経験上、グルコルチコイドの使用は推奨されていない。むしろ禁忌と考えられている。しかし、グルコルチコイドが心筋細胞にどのような影響を与え、また病的状態下でのグルコルチコイド投与は心筋細胞に対して保護的に働くのか、障害促進性に働くのかはこれまで全く明らかにされてこなかった。

我々はグルコルチコイドがマウス心筋虚血再灌流障害やウイルス性心筋炎による心筋細胞死に対して心筋保護的に働くことを確認した。DNA gene chip解析を行い心筋細胞におけるグルコルチコイドの標的遺伝子を網羅的にスクリーニングした結果、グルコルチコイドは心筋細胞において例外的にphospholipase A2 (PLA2), cyclooxygenase-2 (COX-2) の発現を誘導してアラキドン酸代謝を活性化させることが明らかになった。このグルコルチコイドの作用はグルコルチコイド受容体GRを介していた。グルコルチコイドによる心筋保護効果はCOX-2 阻害剤で消失することからアラキドン酸代謝の活性化が心筋保護効果に直接関与していると考えられた。液体クロマトグラフィー/タンデム型質量分析法を用いた酸化脂質の半定量解析の結果、グルコルチコイドで刺激された心臓からはPGD₂が優位に産生させることを見出した。PGD₂合成酵素の中では、グルコルチコイドによってリポカリン型PGD₂合成酵素 (L-PGDS)が誘導されていた。

以上の結果は、心筋細胞に対してグルコルチコイド治療は細胞保護的に作用するがその効果は COX-2 依存性であることを示している。臨床の現場でしばしば解熱鎮痛剤として投与されるCOX-2 阻害剤との併用によってグルコルチコイドの心筋細胞保護効果がマスクされている可能性が示唆された。

5. 自己評価

何よりもさきがけ研究を通じて分野を超えた友達の輪、共同研究の輪が広がったことが大きな財産となった。メタボローム解析は慶應義塾大学の末松誠先生、東京大学の田口良先生との共同研究によって成し得たものでこの場を借りて厚く御礼申し上げたい。メタボローム技術を応用して「心筋細胞内代謝の病態生理学的意義を明らかにする。」「新規の心臓生理活性物質の探索を介して、心筋保護による新規心臓病治療法の開発をめざす。」という当初の課題に関してはこの4年間で一定の成果が得られつつある。医学研究におけるメタボローム解析の有用性を世界に向けて発信するという「代謝と機能制御」の研究領域全体としての目的にも少しは貢献できたのではないかと思う。

6. 研究総括の見解

心臓のストレスに対する恒常性維持機構に関し、メタボローム解析手法等により eIF2 α のリン酸化シグナルを介した代謝応答によりグルタチオンレドックスサイクルを活性化させて還元状態にすることに基づくことなど明らかにし、研究は目的に沿って順調に進められた。国際学会での招待講演も行い、国際的にも高く評価されている。心不全の治療や予防への発展が期待される。

7. 主な論文等

A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

①論文

1. Sano M, Tokudome S, Shimizu N, Yoshikawa N, Ogawa C, Shirakawa K, Endo J, Katayama T, Yuasa S, Ieda M, Makino S, Hattori F, Tanaka H, Fukuda K. Intramolecular control of protein stability, subnuclear compartmentalization, and coactivator function of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha. *J Biol Chem.* 2007; 282(35): 25970-80.
2. Hayashida K, Sano M, Ohsawa I, Shinmura K, Tamaki K, Kimura K, Endo J, Katayama T, Kawamura A, Kohsaka S, Makino S, Ohta S, Ogawa S, Fukuda K. Inhalation of hydrogen gas reduces infarct size in the rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 373(1):30-5.
3. Sano M, Fukuda K. Mitochondrial biogenesis by hormesis. *Circ Res.* 2008; 103:1191-3.
4. Tokudome S, Sano M, Shinmura K, Matsushashi T, Morizane S, Moriyama H, Tamaki K, Hayashida K, Nakanishi H, Yoshikawa N, Shimizu N, Endo J, Katayama T, Murata M, Yuasa S, Kaneda R, Tomita K, Eguchi N, Urade Y, Asano K, Utsunomiya Y, Suzuki T, Taguchi R, Tanaka H, Fukuda K. Glucocorticoid protects rodent hearts from ischemia/reperfusion injury by activating lipocalin-type prostaglandin D synthase-derived PGD2 biosynthesis. *J Clin Invest.* 2009; 119(6):1477-88.
5. Endo J, Sano M, Katayama T, Hishiki T, Shinmura K, Morizane S, Matsushashi T, Katsumata Y, Zhang Y, Ito H, Nagahata Y, Marchitti S, Nishimaki K, Wolf AM, Nakanishi H, Hattori F, Vasiliou V, Adachi T, Ohsawa I, Taguchi R, Hirabayashi Y, Ohta S, Suematsu M, Ogawa S, Fukuda K. Metabolic Remodeling Induced by Mitochondrial Aldehyde Stress Stimulates Tolerance to Oxidative Stress in the Heart. *Circ Res.* 2009; 105(11):1118-27.

②特許

研究期間累積件数: 1 件(出願公開前)

③受賞

1. 慶應義塾大学医学部三四会賞(北里賞) (2008年6月12日)
2. 慶應義塾大学医学部三四会奨励賞 (2010年1月5日)

④著書

1. 佐野元昭. 第1章「循環器の生物学」PGC-1 と心機能、心筋代謝. *Annual Review 循環器* 2008年版 16-22(中外医学社)
2. 佐野元昭. ミトコンドリアエネルギー代謝. *Heart Review* Vol. 12 No. 7 (2008) p.776-781

(Medical Review 社)

3. 佐野元昭, 菱木貴子, 末松 誠, 中西広樹, 田口 良. 第1章「循環器の生物学」メタボローム. Annual Review 循環器 2009年版 25-28(中外医学社)
4. 佐野元昭, 横尾〔徳留〕さと. 遺伝子医学MOOK16号「メタボロミクスと最新分子バイオマーカー研究」ステロイドホルモンの心筋障害抑制作用とプロスタグランジンD₂ (株式会社メディカルドゥ)
5. 佐野元昭. 心筋ミトコンドリアの酸化的障害に対する代謝応答. 医学のあゆみ「心不全—研究と臨床の最前線」 Vol. 232 No. 5 (2010) p.359-364 (医歯薬出版株式会社)

研究課題別評価書

1. 研究課題名

複合系の代謝制御—アブラムシ細胞内共生系をモデルとして

2. 氏名

重信 秀治

3. 研究のねらい

“Nothing, it seems, exists except as part of a network of interactions.” (Gilber & Epel, 2008)

地球上全ての生物の生命活動は、多かれ少なかれ他個体との相互作用の上で成り立っている。例えば、ヒトを含む多くの多細胞生物は体内に共生微生物を保有しており自前で合成できない栄養分を共生微生物から得たり、消化できない物質の分解を共生微生物に依存したりしている。このような「複合系」の協調的代謝の例は多数知られているものの、その多くが記載的な報告にとどまっており、その遺伝子・分子基盤についてはほとんど分かっていない。

本研究では、アブラムシ細胞内共生をモデルとして複合系の代謝調節機構を明らかにする。アブラムシ (*Acyrtosiphon pisum*) は、腹部体腔内に共生器官をもちその細胞内に共生細菌ブネラ (*Buchnera aphidicola*) を恒常的に維持して

いる。両者の間には絶対的な相互依存関係が築かれ、お互い相手なしでは生存が不可能である。栄養物質のやりとりに基づく相利栄養共生であることがわかっている (Douglas 1998 Annu Rev Entomol)。私は共生細菌のゲノムを解読し、宿主に依存できる代謝経路の遺伝子は共生細菌から失われていることを明らかにしていた (Shigenobu et al. 2000 Nature)。進化の過程で欠失した代謝パスウェイが、宿主との相互作用によってどのように補償され、ひとつの共生系として統合的に機能しているのかを明らかにすることが本研究の目標である。

4. 研究成果

4. 1 宿主昆虫のゲノム解読: 共生微生物と相補的遺伝子レパートリー、免疫系遺伝子の欠如

国際コンソーシアムにグループリーダーとして参加し、宿主昆虫エンドウヒゲナガアブラムシ *A. pisum* のゲノム 450Mbp を解読した (文献 1-5; Pennisi 2009 Science)。コンピュータプログラムにより約3万5千個の遺伝子を予測した。アブラムシの遺伝子セットを比較ゲノミクスにより精査したところ、アブラムシとブネラの栄養共生がゲノムに見事に反映されていることが分かった。私は、以前に共生細菌側の全ゲノムを解読し、その遺伝情報から、アミノ酸等の生合成に関わる遺伝子セットが宿主昆虫と共生細菌で相補的な関係になっていることを報告していたが、今回、両方のゲノムが揃ったことにより、その相補性をさらに強く裏付けたのみならず、ヌクレオチドなど他の代謝経路においても遺伝子セットの相補性を見いだした。これは、アブラムシと共生細菌という異なる生物種が、まるで一つの生物のように一体となって協調的な代謝を行っていることを示している。

ほかにも共生に関する新たな示唆が得られた。例えば、多細胞生物としては例外的に、細菌に対する免疫系の遺伝子が失われている事が明らかになった。共生微生物獲得のための適応進化であると解釈できる。他にもアブラムシの遺伝子セットには他の昆虫に見られないユニークな点が多い。2,000 種類以上の遺伝子がアブラムシ特異的に増幅している。重複している遺伝子は、ク

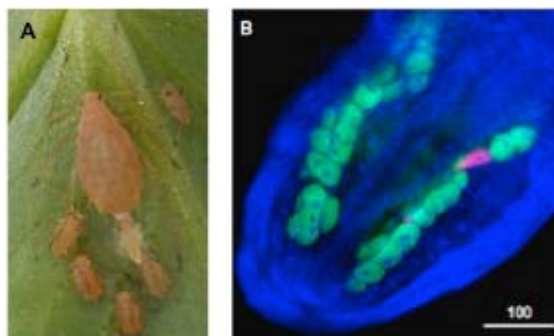


図 1 A) エンドウヒゲナガアブラムシ *Acyrthosiphon pisum*。B) 共生器官。緑: 共生細菌、青: 宿主細胞 DNA。(International Aphid Genomics Consortium 2009 より引用)

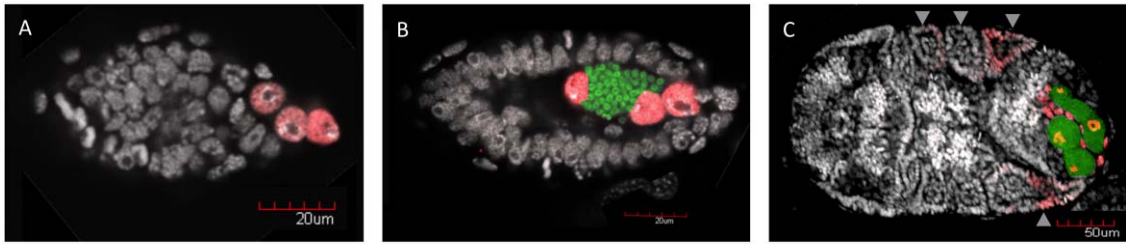


図2 アブラムシ胚発生における共生器官の形成、共生細菌の感染と転写因子 *Distal-less* の発現の関係。白:DNA, 緑:共生細菌, 赤:DII 抗体。すべて左-右が、前後軸になるように配置。A) 細胞性胞胚期前期(Stage 6)。細菌が感染直前からDIIの発現が始まる。B) 細胞性胞胚期後期(Stage 7)。胚後極より母親由来の共生細菌が腔内に流入。DII 発現核と密接に接触している。共生器官はまだ細胞化していない。C) 胚帯伸長期(Stage 14)。共生器官は細胞化。DII は共生器官の細胞核に加えて、形成途中の付属肢でも発現している(矢尻)。

ロマチン修飾や miRNA 経路など遺伝子発現調節に関わる遺伝子群、ウイルス媒介に重要な働きをする膜輸送関連の遺伝子、遺伝子発現制御脊椎動物様のエピジェネティック制御など、広いカテゴリーに渡る。また、アブラムシ独特な遺伝子が全遺伝子の約 4 割にのぼる。これらの重複遺伝子や種特異的遺伝子の共生や代謝との関わりは今後のポストゲノム研究を待たなければいけない。

4. 2 ホメオボックス転写因子 DII の機能解析

Distal-less (DII)は共生器官の発生のごく初期から核で発現する転写因子であり、いくつかの傍証から協調的プロセスを制御する master gene である可能性が高いと考えられて来た(Braendle et al. 2003 PLoS Biol)。今回、アブラムシ DII の同定、クローニングに成功した。アブラムシは DII を1コピーもっており、アミノ酸配列は他の昆虫と高い保存性を示した。抗体作成にも成功し、発現パターンを解析したところ、DIIは共生細菌が感染する直前から将来共生器官になる核で発現を開始し、その後アブラムシのライフサイクルを通じてずっと強い発現が維持されることが分かった(図2; 投稿準備中)。さらに、DII は他の昆虫と同様、形成途中の付属肢の先端でも発現を示した。DII は進化的に高度に保存されている肢形成に関わる発生遺伝子である。このアブラムシでの観察結果は、DII が元来の機能である付属肢形成の機能を保持した上で、共生というアブラムシに新規の機能を獲得したことを示唆している(co-option)。

4. 3 共生器官のトランスクリプトーム解析

アブラムシの場合、共生細菌は共生器官の細胞内にも棲息する。この特殊な細胞の中で、共生細菌と宿主はまるでひとつの生物のように一体化し、そこでアミノ酸等栄養分の協調的代謝が営まれている。それを支える遺伝子制御ネットワークを明らかにするために、共生器官のトランスクリプトーム解析を、次世代シーケンサーを用いた RNA-seq 法により解析した。同様の解析は EST(Expressed Sequence Tag) 法で行い、共生器官で発現する 276 遺伝子、enrich している遺伝子約 20 を報告していたが(Nakabachi, Shigenobu et al. 2005 PNAS)、今回、新技術により発現遺伝子1万以上、enrich している遺伝子 1000 以上を同定した(未発表)。予想通り、アミノ酸代謝遺伝子が高い発現



図3 アブラムシ特異的分泌タンパク質 SP4 の mRNA の分布。上)成虫の共生器官バクテリオサイトでこの遺伝子が高発現している。下)胚発生における発現分布。共生細菌が感染した直後のステージから bacteriocyte で特異的に発現している。BC:バクテリオサイト。

を示していた。さらに、多種類のアブラムシ特異的遺伝子が高発現していることを見いだした。アミノ酸配列からの機能予測はできなかったが、驚いたことに、これらの遺伝子の全ての N 末にシグナルペプチドがコードされていた。つまり、これらは新規の分泌タンパク質＝シグナル因子である。共生細胞との相互作用において重要な役割を果たしている可能性がある。

5. 自己評価

「共生」をゲノム科学やメタボロームなどの新しい技術と、発進進化化学などの新興研究分野の視点をとりにて統合的に理解する、という、私が長年あたためていた構想を、今回さきがけ事業によって現実のものとして立ち上げることができた。非モデル生物を扱っているため、その基礎的な実験系の構築には大きな労力を要した。幸い、さきがけ研究によって、アブラムシの完全長 cDNA ライブラリなどの研究リソースをはじめ、次世代シーケンサーを利用した解析技術やイメージング技術、遺伝子データベースを開発することができた(文献 2-4)。これらは今後の研究にとってもきわめて有用であり、研究者コミュニティにも公開している。「共生」は生物が新規機能を獲得する上で重要な役割を果たしており(Smith 1989 Nature)、共生生物学には基礎と応用科学の両面で注目が高まっている。本研究で開発したリソースによって、アブラムシ共生系は共生による代謝的新規性を遺伝子レベルで研究できるモデルとしての地位を確立したといえる。

アブラムシのゲノム解析や共生器官のトランスクリプトームにより、代謝の共生的制御に関わる可能性のある遺伝子の候補を多数見いだすことに成功した。これらは、共生を支える分子機構の詳細を明らかにする上で、強力な基礎的データである。

さきがけ研究は個人研究であるゆえ、研究を進展させるためには他の研究者との連携が重要である。国際アブラムシゲノム解析コンソーシアムに参加しただけでなく、本研究期間の約半分は米国プリンストン大学に研究拠点を置いたことにより、広い人的ネットワークを築くことができた。今後の研究を展開する上で重要な財産になろう。

6. 研究総括の見解

アブラムシと細胞内共生細菌の協調的な代謝制御のメカニズムをゲノムレベルで解析し、アミノ酸等栄養分代謝の遺伝子レパートリーが昆虫と細菌で相補的であること、共生をコントロールする master gene 候補 DII の同定、共生器官が産生する新規分泌たんぱく質の同定など優れた成果が得られた。これらの成果は今後さらに詳細な検討がなされるべきものであり、今後の発展を大いに期待したい。当初計画されていた代謝の生化学的研究については今後の研究に委ねられることになるが、成果を期待する。

7. 主な論文等

A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

①論文 *corresponding author

1. Shigenobu, S.*, Bickel, R.D., Brisson, J.A., Butts, T., Chang, C., Christiaens, O., Davis, G.K., Duncan, E.J., Ferrier, D.E.K., Iga, M., Janssen, R., Lin, G., Lu, H., McGregor, A.P., Miura, T., Smagghe, G. Smith, J.M., van der Zee, M., Velarde, R., Wilson, M. J., Dearden, P.K., Stern D.L. Comprehensive survey of developmental genes in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*: frequent lineage-specific duplications and losses of developmental genes . *Insect Mol Biol*, in press.
2. Shigenobu S.*, Richards S., Cree A. G., Morioka M., Fukatsu T, Kudo T., Miyagishima S., Gibbs R. A., Stern D. L., Nakabachi A. A full-length cDNA resource for the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Insect Mol Biol*, in press.
3. International Aphid Genomics Consortium. (2009) Genome sequence of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *PLoS Biology*, in press.
4. Legeai, F., Shigenobu, S., Gauthier, J., Colbourne, J., Rispe, C., Collin, O., Richards, R., Wilson, A., and Tagu, D. AphidBase: A centralized bioinformatic resource for annotation of the pea aphid genome. *Insect Mol Biol*, in press.

②招待講演

1. 重信秀治「発生学・共生学の接点－アブラムシ細胞内共生系を中心に」日本節足動物発生学会第45回大会(ひたちなか)2009年6月5-6日
2. Shigenobu S., Stern D., “Interdependent Genomes: the Aphid and the Bacterial Symbiont” The 7th Okazaki Biological Conference. Kakegawa, Japan. Jan 11-14, 2010.

B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

①論文

1. Huang, T., Cook, C.E., Davis, G.K., Shigenobu, S., Chen, C., and Chang, C.C. Anterior development in the parthenogenetic and viviparous form of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*: hunchback and orthodenticle expression. *Insect Mol Biol*, in press.

研究課題別評価書

1. 研究課題名

受容体活性調節タンパクの機能解明と血管新生および血管合併症治療への応用

2. 氏名

新藤 隆行

3. 研究のねらい

アドレノメデュリン(AM)は、心血管系をはじめ、全身の組織で広範に産生される 52 個のアミノ酸からなるペプチドである。AM は強力な血管拡張作用を有する降圧物質として発見されたが、それ以外にも多彩な生理活性を有することが明らかとなってきた。AM と、生活習慣病を中心とした多くの病態との関連も示唆されている。

我々はこれまで AM とその関連因子の遺伝子操作動物の解析などから、これらの病態生理学的意義を検討してきた。AM ヘテロノックアウトマウス(AM+/-)では、血圧上昇や、心血管系に傷害が加わった際、動脈硬化や臓器障害の増悪が認められるのに対し、AM 過剰発現マウスは逆に抵抗性を示すことから、AM が抗動脈硬化作用、臓器保護作用を有することを報告した。一方、AM ノックアウトマウスのホモ接合体(AM-/-)は血管の発達が未熟であり、胎生中期にびまん性出血や浮腫が原因で致死であることから、AM が血管新生そのものに必須であることを初めて明らかとした。更に成体に AM を投与したときにも血管新生促進効果が確認されることから、AM の虚血性疾患などへの治療応用も期待される。

一方、AM の受容体システムについては、巧妙な制御系が報告されている。AM とそのファミリー因子であるカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)は、同一の G タンパク共役型受容体(GPCR)である CRLR (calcitonin receptor like receptor)を共用している。CRLR は、受容体活性調節タンパク RAMP (receptor activity modifying protein) 1、2、3 のいずれかと重合する事により、リガンドである AM や CGRP などの AM ファミリー因子との親和性が制御されており、こうした受容体システムの巧妙さが、AM の生理機能の多様性を生み出していると予想される。

本研究は、RAMP システムの病態生理学的意義とそのメカニズムを明らかとする共に、血管新生療法や、血管合併症などに対する新規治療法開発へと展開させることを目的とした。

4. 研究成果

AM-RAMP2系と血管新生

AM ノックアウトマウスが致死となる胎生中期の血管において、複数の RAMP サブアイソフォームの中でも、特に RAMP2 の発現が亢進している事に着目し、血管における AM の機能が主として RAMP2 によって制御されている可能性を考え、まず RAMP2 単独ノックアウトマウスを樹立した。RAMP2 ホモノックアウトマウス(RAMP2-/-)は、AM-/-同様、胎生中期に致死であり、AM-/-と同様の血管の発達不全と共に、著明な浮腫や出血、心嚢水貯留が認められた(図1A)。RAMP2-/-では、卵膜上を走る卵黄動脈の発達が抑制されており、電顕による観察では、卵黄動脈の血管内皮細胞の基底膜からの剥離が認められた(図1B)。また、大動脈では、血管壁の4型コラーゲン及びアクチンの発現低下が認められ、血管壁の菲薄化と、層状構造の破綻が観察された(図2)。以上の所見から、RAMP2-/-では、血管構成細胞は正常に分化するが、脆弱な血管構造のため、循環開始と共に浮腫や出血を生じることが示唆された。

次に、遺伝子発現の変化を検討したところ、RAMP2-/-では、胎児の血管における4型コラーゲンなどの基底膜構成因子、VE-カドヘリンやクローディン 5 など、血管内皮細胞のアドヘレンスジャンクション、タイトジャンクションを構成する因子の低下が認められた。更に、RAMP2-/-においては、代償性の AM の発現亢進を認めたが、CRLR や、その他の RAMP 発現に変化を認めず、RAMP2 欠損により、血管の発生における機能的 AM 受容体が失われること、その他の RAMP サブアイソフォームとの間には機能的な相補性がなく、血管の正常な発生には、AM-RAMP2 系が必

須であることが初めて明らかとなった。

一方、RAMP2 ノックアウトマウスのヘテロ接合体(RAMP2+/-)では、血管における RAMP2 の発

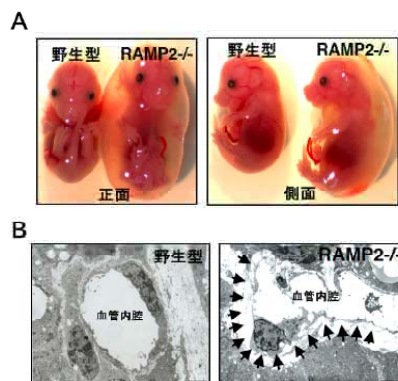


図1 RAMP2ノックアウトマウス(RAMP2-/-)胎仔の外観と血管構造の異常

A. マウス胎仔外観
B. 卵黄動脈の電顕像 Bar=2μm

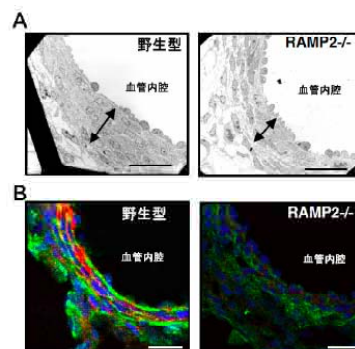


図2 RAMP2ノックアウトマウス(RAMP2-/-)胎仔の大動脈壁構造の異常

A. 血管壁の電顕像 (矢印=平滑筋層)
B. 免疫染色像 (緑=4型コラーゲン、赤=平滑筋層) Bar=25μm

現が半減していたが、大きな外観上の異常を認めず、成体が得られた。RAMP2+/-成体を用いて、マトリジェルプラグアッセイや、大動脈標本を用いた大動脈リングアッセイを行ったところ、RAMP2+/-では、野生型と比較して、血管形成の減弱が観察された。更に、AM+/-と同様に、虚血時の血管再生能の低下も観察されたことから、成体における AM の血管新生作用においても、AM-RAMP2 系が中心的役割を担っているものと考えられた。更に、RAMP2+/-成体では、ヒスタミン皮下注射による皮下浮腫モデル、傷害性脳浮腫モデルなどの各種の浮腫の病態モデルにおいて、血管透過性の亢進が認められたことから、AM-RAMP2系が、成体における血管構造安定化にも寄与していることが推測された。

次に、AM-RAMP2 系を賦活化した場合、実際に血管新生の亢進や、血管構造安定化が得られるか検討するため、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を細胞株化した EAhy926 細胞に、RAMP2 を安定過剰発現させた細胞を樹立し、細胞機能の変化を検証した。RAMP2 過剰発現細胞では、アポトーシスが抑制されており、マトリジェル培養での管腔形成は著明に亢進していた。また、管腔形成は PI3K 阻害剤と PKA 阻害剤により抑制された。RAMP2 過剰発現細胞では、コントロール細胞と比較して、基底膜構成因子、細胞接着因子の遺伝子発現亢進が認められた。RAMP2 過剰発現内皮細胞を半透膜フィルター上で単層培養し、蛍光標識デキストランの透過を蛍光プレートリーダーで計測することで血管内皮細胞の透過性を評価した結果、RAMP2 過剰発現内皮細胞では透過性が抑制されていることが確認された。更に、過酸化水素処理後、RAMP2 過剰発現内皮細胞では、コントロール細胞と比較して、タイトジャンクション構造がより多く保たれているのが確認された。以上より、血管内皮細胞の AM-RAMP2 系を選択的に賦活化させることにより、管腔形成の亢進に加えて、血管構造の安定化が得られることが証明された。

AM-RAMP2 系を標的とすることで、従来の血管再生療法の問題であった、再生血管の退縮や、浮腫などの弱点を克服し、構造的、機能的に安定した血管を作出する新たな血管新生療法への応用、更に、AM-RAMP2 系の血管透過性抑制作用、抗浮腫作用を応用することで、難治性浮腫の新規治療法開発への展開などが視野に入る。

血管・心臓特異的ジーンターゲティングによる RAMP2 の機能解析

続いて我々は、血管における RAMP2 の意義を直接明らかとするために、血管内皮細胞特異的 RAMP2 ノックアウトマウス(E-RAMP2-/-)を樹立した。E-RAMP2-/-の 95%は出生直前に致死であり、全身性の浮腫を認めた。一方で、血管の RAMP2 発現が 2 割程度残存する 5%の E-RAMP2-/-は、成体が得られた。成体の E-RAMP2-/-では、血管壁構造の異常に加え、腎系球体硬化症などの自然発症が認められた。さらに、肺、肝臓、腎臓などの主要臓器の血管周囲に、著明な炎症細胞浸潤が認められた。

以上の結果から、発生段階および成体期共に、AM-RAMP2 系が、血管新生および血管恒常性維持に必須であることが明らかとなった。

一方、薬剤投与誘導型心筋特異的 RAMP2 ノックアウトマウス(C-RAMP2^{-/-})では、ターゲティング誘導後、心拡大と心拍出低下を認め、拡張型心筋症様変化が認められた。C-RAMP2^{-/-}では、心不全や線維化マーカー、ゼラチナーゼ、NADPH オキシダーゼなどの発現亢進に加え、レニン-アンジオテンシン系関連因子の発現亢進が認められた。また早期の段階で、ミトコンドリアの膨化などの異常が認められた。

以上の結果から、心筋における AM-RAMP2 系は、酸化ストレスや、心リモデリングの制御に加え、心ミトコンドリア機能維持を介して、心保護的に働いている事が明らかとなった。

5. 自己評価

本研究により、これまで、詳細が不明であった RAMP の病態生理学的意義を初めて明らかとする事が出来た。特に、AM の発生における血管新生作用が、RAMP2 によって規定されていること、成体においても、AM による血管新生、血管保護作用、臓器保護作用が RAMP2 によって制御されていることを解明したことは評価されると考える。AM は、その臨床応用が期待される一方、血中半減期が短いため、それ自体を慢性疾患の治療薬として応用するには多くの制約が考えられていた。本研究では、RAMP2 を標的とすることで、AM の生理作用を制御できる可能性を示した。AM-RAMP2 システムの分子メカニズムに立脚した治療薬が開発されれば、メタボリックシンドロームの様な病態を包括的に改善する、新たな治療法開発への展開も期待される。

6. 研究総括の見解

AM、RAMP2、RAMP3 の遺伝子操作マウスを用いて、AM-RAMP システムの病態生理学的意義の解析を行い、AM の血管保護作用、臓器保護作用が RAMP2 によって制御されていること、心臓では酸化ストレス、心臓リモデリング、ミトコンドリア機能維持を介する心臓保護に働くことを明らかにするなど、計画に沿って優れた成果が挙げられた。今後、RAMP2 を治療標的分子とする創薬へ向けた成果を期待したい。

7. 主な論文等

A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

①論文

1. Kusano S, Kukimoto-Niino M, Akasaka R, Toyama M, Terada T, Shirouzu M, Shindo T, Yokoyama S. Crystal structure of the human receptor activity-modifying protein 1 extracellular domain. *Protein Sci.* 17(11):1907-14. 2008.
2. Sakurai T, Kamiyoshi A, Watanabe S, Sato M, Shindo T. Rapid zygosity determination in mice by SYBR Green real-time genomic PCR of a crude DNA solution. *Transgenic Res.* 17(1):149-55. 2008.
3. Ichikawa-Shindo Y, Sakurai T, Kamiyoshi A, Kawate H, Iinuma N, Yoshizawa T, Koyama T, Fukuchi J, Iimuro S, Moriyama N, Kawakami H, Murata T, Kangawa K, Nagai R, Shindo T. The GPCR modulator protein RAMP2 is essential for angiogenesis and vascular integrity. *J Clin Invest.* 118(1):29-39. 2008.
4. Kamiyoshi A, Sakurai T, Shindo Y, Iinuma N, Kawate H, Yoshizawa T, Koyama T, Muto S, Shindo T. Endogenous α -calcitonin gene-related peptide mitigates liver fibrosis in chronic hepatitis induced by repeated administration of concanavalin A. *Liver Int.* 29(5):642-9. 2009.
5. Iinuma N, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Arai T, Yoshizawa T, Koyama T, Uetake R, Kawate H, Muto S, Tagawa Y, Miyagawa S, Shindo T. Adrenomedullin in sinusoidal endothelial cells play protective roles against cold injury of liver. *Peptides.* (in press). 2010.

②特許

研究期間累積件数:2件

発明者:新藤隆行

発明の名称:代謝症候群の治療もしくは予防剤、検査方法、検査薬、及び代謝症候群
の治療薬の候補化合物のスクリーニング方法

出願人:科学技術振興機構

1. 国内出願 出願日:2007年11月26日
2. 国際出願 出願日:2008年11月21日

③受賞

1. 第21回国際高血圧学会 JSH Award(2006年10月15日)
2. 第2回 Vascular Biology Innovation Conference 最優秀賞(2007年8月26日)
3. 第13回高峰譲吉研究奨励賞(2009年10月23日)

B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

①招待講演

1. Takayuki Shindo, Pathophysiological roles of Adrenomedullin-RAMP system in cardiovascular diseases, CV Expert Forum, Seoul, Korea (2008/5/3)
2. 新藤隆行、発生および病態におけるアドレノメデュリン-RAMP システムの意義、第1回臨床研究フォーラム(静岡)(2008年8月9日)
3. 新藤隆行、アドレノメデュリン受容体活性調節システムとその病態生理学的意義、第6回 CEM フォーラム(京都)(2009年4月4日)
4. 新藤隆行、アドレノメデュリン受容体活性調節システムとその病態生理学的意義、第6回 GPCR 研究会基調講演、(東京)(2009年5月8日)
5. Takayuki Shindo, RAMP2 is the Key Determinant of the Vascular Functions of Adrenomedullin, CVEM2010, Nara, Japan (2010/4/1)

研究課題別評価書

1. 研究課題名

オートファジーにおける脂質膜組織化機構の解明

2. 氏名

中戸川 仁

3. 研究のねらい

細胞は、飢餓状態に陥るとオートファジーを誘導する(図1)。小さな扁平状の膜が細胞質に現れ、これが袋状に伸展して細胞質の一部やオルガネラを包み込み、最終的に閉じて直径 0.5-1 μ m 程のオートファゴソームと呼ばれる膜胞が形成される。オートファゴソームが種々の加水分解酵素を含むリソソームや液胞と融合することで、オートファゴソームの中身が消化される。その分解産物を再利用して、細胞は飢えを凌ぐことができる。こうした飢餓応答だけでなく、発生や分化、抗原提示等、多彩な生理機能にもオートファジーが関与することが明らかになってきた。また、オートファジーは、細胞内に侵入した細菌や、神経変性疾患等の原因となる異常タンパク質の除去にも重要な役割を果たすことから、こうした病気との関連でも注目を集めている。

私たちは、出芽酵母をモデル生物として、オートファゴソームの形成機構に関する研究を進めてきた。オートファゴソームの形成に必須の因子として、Atg と名付けられた特異な因子群が同定され、その詳細な解析が進んでいるが、オートファゴソームの膜が何に由来し、どのようにして形成されるのか、そのメカニズムは未だ謎に包まれている。本研究では、Atg8 というユビキチン様タンパク質に注目し、オートファゴソーム形成機構の全容解明に向けて突破口を開くことを目的とした。

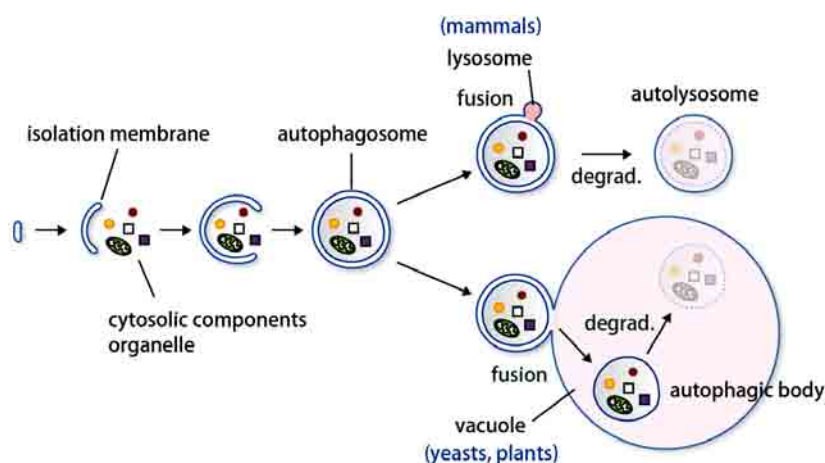


図1 オートファジーの進行過程

4. 研究成果

I. Atg8-PE の機能の解明

Atg8 は、オートファゴソームの形成に必要なユビキチン様タンパク質であるが、ユビキチンや他のユビキチン様タンパク質とは異なり、標的タンパク質のリジン残基ではなく、脂質分子ホスファチジルエタノールアミン(PE)の親水性頭部のアミノ基に結合するというユニークな特徴を持っている(図2)。Atg8 は、おそらくは PE との結合体(以下、Atg8-PE と記す)として伸張中のオートファゴソームの膜に局在することから、Atg8-PE の機能の解明は、膜形成のメカニズムの理解に直結すると考えられてきた。Atg8 と PE との結合反応は、Atg8 および、E1 酵素 Atg7, E2 酵素 Atg3 それぞれの精製タンパク質を、PE を含む人工膜小胞、ATP と共にインキュベーションすることで、in vitro

で再構成できる。この反応液を光学顕微鏡で観察したところ、Atg8 が人工膜小胞上の PE と結合体を形成するにしが、人工膜小胞が巨大な凝集体を形成することが明らかとなった。電子顕微鏡解析および、生化学的アッセイ系を用いて調べたところ、人工膜小胞は、結合し合う(図3, 左上パネル矢頭)だけでなく、ヘミフュージョン(向かい合う二枚の膜(脂質二重層)において近接した層(外層)同士のみが融合すること)と呼ばれる特異な融合反応を起こしていることが示された(図3, 左上パネル矢印および下図)。免疫電子顕微鏡解析の結果、Atg8-PE が人工膜小胞同士の接合面に濃縮された様子を捉えることができた(図3, 右上パネル)。さらに、化学的架橋試薬を用いた実験から、Atg8 は PE との結合に伴い、多量体を形成することが示唆された。以上の結果から、Atg8 には、PE と結合すると多量体を形成し、自身がアンカーされた脂質膜を繋ぎ合わせ、ヘミフュージョンさせる機能があることを提唱した。

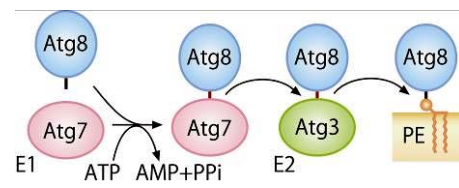


図2 Atg8 と PE の結合反応



図3 Atg8 による人工膜小胞の繋ぎ合わせとヘミフュージョン

II. Atg8 の機能とオートファゴソーム形成との関連

In vitro の反応系で明らかとなった Atg8 の機能と、細胞内でのオートファゴソーム形成との関連を調べるために、立体構造情報をもとにした系統的変異解析をおこない、オートファジーに欠損を示す Atg8 の変異体を複数分離した。変異型タンパク質を精製し、調べたところ、その多くが、PE との結合体は形成するが、膜の繋ぎ合わせとヘミフュージョンに欠損を示すことが明らかとなった。さらに、電子顕微鏡解析により、Atg8 の機能が著しく低下した変異体を発現する酵母細胞では、オートファゴソームが形成されないことが明らかとなった(図4, F104A+Y106A 変異株の液胞(V)には野生株(WT)の液胞中に見られるオートファジックボディ(図1を参照)が見られない)。すなわち、

Atg8 による膜の繋ぎ合わせとヘミフュージョンは、オートファゴソームの形成に重要であることが示唆された。さらに、Atg8 の機能が部分的に低下した細胞では、野生株に比べ顕著に小さなオート

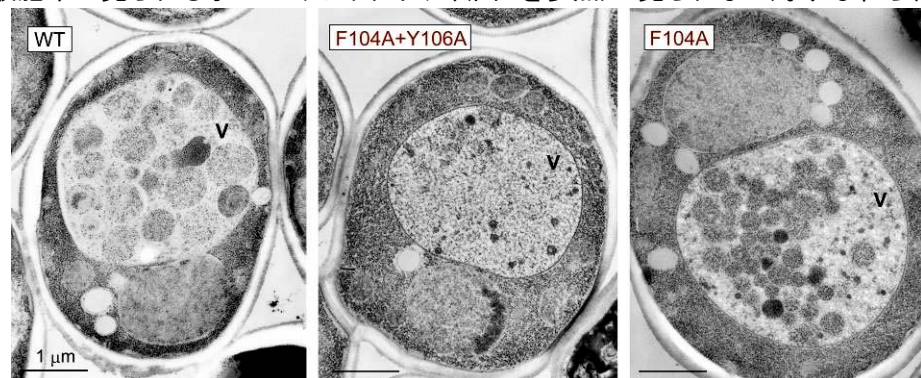


図4 Atg8 の機能が欠損した酵母細胞の電子顕微鏡像

ファゴソームが形成されることが示された(図4, F104A 変異株)。Atg8 による膜の繋ぎ合わせとヘ

ミフュージョンは、特にオートファゴソームの膜の伸張過程に重要であることが示唆された。

以上の成果は、これまで全く未知であったオートファゴソームの形成メカニズムに、膜動態と直接関連する Atg タンパク質の機能の発見とその重要性を示すことで、初めて具体的に切り込んだ研究として高い評価を得た。また、本成果は、以下に記すような、数々の新たな疑問を具体的に提起するものであり、オートファゴソーム形成のメカニズムの全容解明に向けての起爆剤となると期待される。

III. 脂質修飾サイクルによる Atg8 の機能制御機構

上述のように、Atg8 が持つ膜の繋ぎ合わせとヘミフュージョン活性は、PE との結合により誘起される。本研究では、Atg8 から PE を切り離す活性を持つシステインプロテアーゼである Atg4 のリコンビナントタンパク質を精製し、この Atg8-PE の脱結合反応を再構成することにも成功した。これにより、Atg8 が脱 PE 化されると、Atg8 の多量体が解離し、人工膜小胞の凝集も速やかに解消されることが明らかとなった。すなわち、Atg8 の機能は脂質修飾サイクルによって可逆的に制御されるものであることが示唆された。また、変異解析により明らかとなった膜の繋ぎ合わせとヘミフュージョンに重要なアミノ酸残基(これらは Atg8 の PE 化に伴う多量体化にも重要である)を Atg8 の立体構造上にマッピングした結果、同機能に重要な分子表面領域を特定することができた。この領域は、PE と結合していない Atg8 の立体構造において、Atg8 自身の N 末端領域で覆い隠されているが、この N 末端領域は PE との結合に伴って開くような構造変化を引き起こすことが以前の研究で示唆されている。これらに基づき、Atg8 は PE と結合すると N 末端領域に構造変化を起こし、上記の分子表面領域を露出させ、多量体を形成して膜の繋ぎ合わせとヘミフュージョンを誘起する、とのモデルを提唱した。

IV. 選択的オートファジーにおける Atg8 の役割

上述の系統的変異解析は、選択的オートファジーにおける Atg8 の機能に関する研究にも発展した。飢餓で誘導されるオートファジーでは、細胞質成分がランダムにオートファゴソームに取り込まれるのに対し、特定の「積み荷」が識別されて選択的にオートファゴソームに取り込まれる場合もあり、このようなケースは「選択的オートファジー」と呼ばれ近年特に注目を集めている。積み荷は、特定の酵素や、ミトコンドリア、ペルオキシソーム等のオルガネラ、ユビキチン陽性のタンパク質凝集塊、細胞侵入性細菌等、多岐にわたり、それぞれに結合する特異的な「受容体タンパク質」が存在する。受容体タンパク質のいくつかは、さらに Atg8 と相互作用することが知られており、おそらくは伸張中のオートファゴソーム膜上の Atg8-PE と結合することで、積み荷を効率良くオートファゴソームに取り込ませると考えられている。本研究における Atg8 の変異解析の過程で、飢餓誘導性のオートファジーには欠損を示さないが、選択的オートファジーと同等の経路を介した Ape1 という酵素の液胞への輸送に異常を示す変異体を複数同定し、それら変異体には Ape1 の受容体である Atg19 との相互作用に異常があることを明らかにした。変異部位を立体構造上にプロットすると、Atg8 の分子表面の特定の領域に集中し、同領域が Atg19 との相互作用部位であることが示唆された。この予想の通り、北海道大学 稲垣冬彦教授のグループによる Atg8 と Atg19 との複合体の構造解析の結果、Atg19 の C 末端領域にある Trp-X-X-Leu という配列が、上記 Atg8 の分子表面にある疎水性のポケットに深く入り込んで結合していることが示された(図5)。このポケットは、Atg8 のホモログ間で高度に保存されたアミノ酸残基で構成されている。同グループによる Atg8 の哺乳動物ホモログである LC3 とユビキチン化されたタンパク質凝集塊の選択的オートファジーにおいて受容体として機能する p62 との複合体の構造解析の結果、p62 も、Trp-X-X-Leu という配列を使って、Atg8-Atg19 間の相互作用と

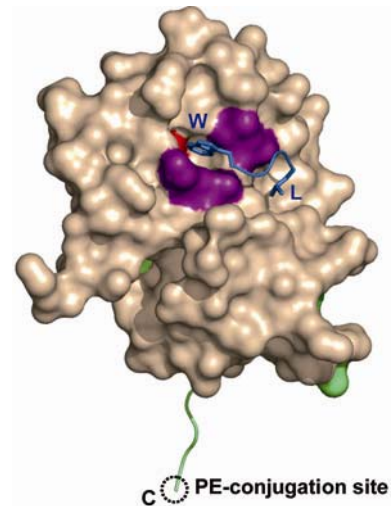


図5 Atg8-Atg19 由来ペプチド複合体の立体構造

酷似した様式で LC3 と結合していることが明らかとなった。またごく最近、酵母におけるミトコンドリアの選択的オートファジーの受容体である Atg32 も同様の相互作用様式で Atg8 と結合することが明らかにされた。このように、選択的オートファジーにおいて、積み荷、生物種を問わないユニバーサルな Atg8-受容体タンパク質間相互作用を明らかにすることができた。

5. 自己評価

本研究の提案書では、次の 5 つの研究項目を掲げた。

- (i) 隔離膜の伸長における Atg8-PE の機能の解明
- (ii) 脂質修飾サイクルによる Atg8 の機能制御機構の解明
- (iii) 隔離膜への脂質供給源と供給様式の解明
- (iv) オートファゴソーム形成における膜融合機構の解析
- (v) 隔離膜の組織化機構の解析

項目(i)と項目(ii)については、ほぼ当初の目標を達成できたと考えている。項目(iii)については、オートファゴソーム膜の前駆体様構造を捉えることができたため、さらなる研究の継続により、近く目標を達成できると考えている。項目(iv)については、当初、SNARE タンパク質のオートファゴソーム形成への関与を系統的に調べることを計画していたが、本研究の過程で Atg8-PE 自身に膜をヘミフュージョンさせる活性を見出し、また、Atg8-PE を含むオートファゴソーム膜の前駆体様構造を検出することができたため、この構造体に含まれるタンパク質を決定することがこの項目の目標の達成に繋がると考え、計画をそのように変更した。項目(v)については、本研究期間内に実質的な成果を得ることはできなかったが、隔離膜に局在する Atg タンパク質の変異解析を開始した。今後も研究を継続していきたいと考えている。

6. 研究総括の見解

In vitro での Atg8-PE 形成反応の顕微鏡解析などから、この反応により膜のつなぎ合せとヘミフュージョンが引き起こされることを発見し、更に同様の反応が in vivo でも起こることを明らかにするなど、オートファゴソーム形成機構の一端を見事に示すことに成功した。更に、選択的オートファジーにおける Atg の役割についても解明が進められている。これらの研究は、極めて独創的なものであり、国内外を問わず、他の追従を許さないものである。これらの研究がヒトを含む高等動物での研究へと発展し、病因解明や治療法開発に発展することも期待できる。

7. 主な論文等

A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

①論文

1. Nakatogawa, H., Ichimura, Y., and Ohsumi, Y. Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion. *Cell*, **130**, 165-178, (2007).
2. Oh-oka, K., Nakatogawa, H. and Ohsumi, Y. Physiological pH and acidic phospholipids contribute to substrate specificity in lipidation of Atg8. *J. Biol. Chem.*, **283**, 21847-21852, (2008).
3. Noda, N.N.*, Kumeta, H.*, Nakatogawa, H.*, Satoo, K., Adachi, W., Ishii, J., Fujioka, Y., Ohsumi, Y., Inagaki, F. Structural basis of target recognition by Atg8/LC3 during selective autophagy. *Genes Cells*, **13**, 1211-1218, (2008). * These authors contributed equally to this work..

②著書

1. 中戸川 仁 「オートファジーにおける膜新成のメカニズム —ユビキチン様タンパク質 Atg8 が統御するユニークな膜動態—」 生化学 79, 20-23 (2007).
2. 中戸川 仁、大隅 良典 「出芽酵母のオートファジー —分子機構研究の最前線」 蛋白質 核酸 酵素 増刊「メンブレントラフィックの奔流」 大野 博司, 吉森 保 編 53, 2099-2105. (2008).

3. Nakatogawa H, Ohsumi Y. Starved cells eat ribosomes. *Nat. Cell Biol.*, 10, 505–507, (2008).
4. Nakatogawa H, Oh-oka K, Ohsumi Y. Lipidation of Atg8: How is substrate specificity determined without a canonical E3 enzyme? *Autophagy*, 4, 911–913, (2008).
5. Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y., Ohsumi, Y. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 10, 458–467, (2009).

B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

①論文

1. Fujioka Y, Noda NN, Nakatogawa H, Ohsumi Y, Inagaki F. The dimeric coiled-coil structure of *Saccharomyces cerevisiae* Atg16 and its functional significance in autophagy. *J. Biol. Chem.*, 285, 1508–1515, (2010).

②招待講演

1. 中戸川 仁, 大隅 良典 「オートファゴソーム形成におけるユビキチン様タンパク質Atg8の機能とその脂質修飾による制御」 日本ヒトプロテオーム機構(JHUPO) 第 5 回大会 東京, 2007 年 7 月 30 日
2. Nakatogawa, H. "Membrane dynamics during autophagy: The function of the ubiquitin-like protein Atg8 in autophagosome formation", G-COE International Symposium on Frontier of Organelle Dynamics and Protein Functions, Nagoya, Japan, Mar. 13, 2008.
3. 中戸川 仁, 大隅 良典 「Atg8 の解析から探るオートファゴソームの膜の由来」 BMB2008 神戸, 2008 年 12 月 12 日
4. Nakatogawa, H. and Ohsumi, Y. "Analyses of Atg8-PE-containing structures involved in autophagosome formation", 5th International Symposium on Autophagy, Ohtsu, Japan, Sep. 25, 2009.

研究課題別評価書

1. 研究課題名

異物排出トランスポーターによる細胞機能制御の解明

2. 氏名

西野 邦彦

3. 研究のねらい

近年、多剤耐性細菌の出現が医療現場において大きな問題となっている。化学療法が困難な多剤耐性菌の出現により、人類は多くの感染症の脅威に曝されており、今日もなお感染症の克服は医学的重要課題の一つである。一方で、細菌ゲノム配列が次々と解読され、細菌染色体上には、異物排出トランスポーターをコードしている遺伝子が数多く潜在していることが明らかとなってきた。異物排出トランスポーターは抗菌薬や細胞障害性異物を菌体外に排出することにより、細菌を様々な化合物に対して耐性化させる。また、異物排出トランスポーターは異物排出のみならず、代謝産物の輸送、情報伝達物質の排出、および細菌病原性の発現に関与していることが明らかになってきた。本研究は、病原細菌の薬剤耐性化と病原性発現における異物排出トランスポーターの役割とその生理機能を解析し、トランスポーターによる細菌機能制御の仕組みを解明することを目的とする。研究を通して、生理的基質排出による細菌機能調節機構を理解すると同時に、多剤耐性細菌による感染症を克服するための情報基盤を構築する。

4. 研究成果

(1) 細菌ゲノムに潜む異物排出トランスポーターの同定と薬剤耐性化における役割

サルモネラ属菌は自然界に広く存在し、急性胃腸炎やチフス・パラチフスを引き起こす原因菌が含まれる。近年、サルモネラによる食中毒事例が増えており、その多くが多剤耐性を示すことが報告されている。この病原細菌に内在する多剤耐性因子を解明するため、ポストゲノム手法を用いた異物排出トランスポーターの網羅的解析を行った。その結果、サルモネラには少なくとも9個の異物排出トランスポーターが存在していることが判明した(図1)。内1個はサルモネラ特異的に存在するものであり、私達はこれを *mdsABC* (*mds* for multidrug transporter for Salmonella)と名付けた。これら異物排出トランスポーターが実際に薬剤耐性化に関与しているかどうかを調べるために、各トランスポーター遺伝子をクローニングし、発現株を構築した。これらトランスポーターの発現はいずれも、サルモネラを薬剤耐性化させることを明らかにした。また、トランスポーター欠損株を構築し、フェノタイプマイクロアレイを用いて約2000種類の異なる環境下における細菌の生育を観察したところ、欠損株は図2に示す抗菌薬・色素・界面活性剤といった様々な化合物に対して感受性化していることが分かった。これら9個のトランスポーターはサルモネラの自然耐性に深く関与していることが明らかになった。

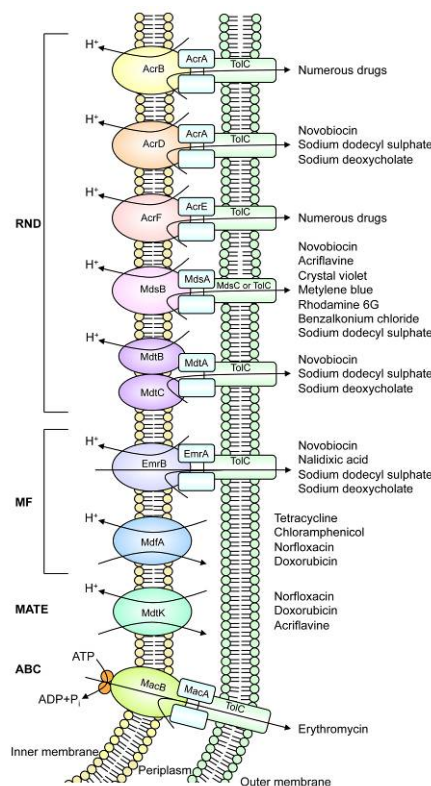


図1. サルモネラに存在する異物排出トランスポーター群

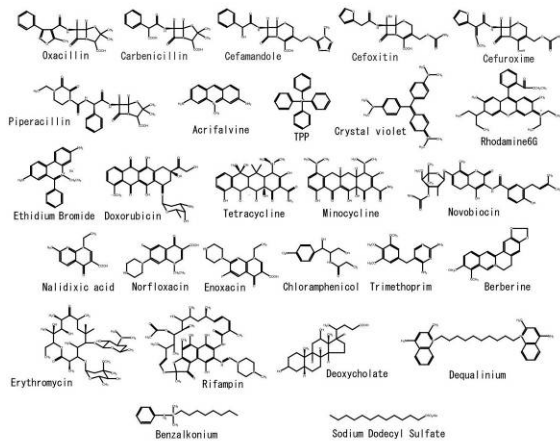


図2. 異物排出トランスポーターの基質

(2) 病原性における異物排出トランスポーターの役割

これまで、異物排出トランスポーターは、細菌の多剤耐性因子として注目されてきた。しかし、抗菌薬のほとんどが人工的に創られたものであり、細菌ゲノムにコードされている異物排出トランスポーターが抗菌薬耐性のためだけに用意されているとは考えにくい。これら異物排出トランスポーターは、薬剤耐性以外にも本来の生理機能を保有していると思われる。研究過程において、排出トランスポーター欠損株を用いた感染実験から、異物排出トランスポーターは細菌病原性発現に関与することが分かった。サルモネラ野生株をマウスに経口投与する

と、マウスは約 6~9 日で死に至る。一方で、9 個の薬剤排出システムを欠損させたサルモネラでは、マウス致死能が完全に消失している(図3)。最も病原性に関与しているものは ABC 型排出システムの MacAB システムであった。MacAB はこれまで、マクロライド抗菌薬を特異的に認識する排出システムであると考えられていたが、この結果から、細菌病原性や毒性に関わる何らかの生理的基質を輸送していることが考えられる。また、MacAB はサルモネラ病原性を調節する PhoPQ 二成分情報伝達系によって厳密に制御され、その発現がマクロファージ内で調節されていることが明らかとなった。

(3) 異物排出トランスポーター発現制御機構の解明

これまでに数多くの異物排出トランスポーターを同定したが、これら異物排出トランスポーターがどのようなシグナルによって発現誘導されるのかは、ほとんど知られていない。感染の場において、サルモネラは様々な宿主環境を経験する。サルモネラが感染時に定着する腸内には、腸内細菌が産生するインドールや、宿主が産生する胆汁酸等の環境シグナルが存在する。感染の場において、実際に細菌がどのような形で異物排

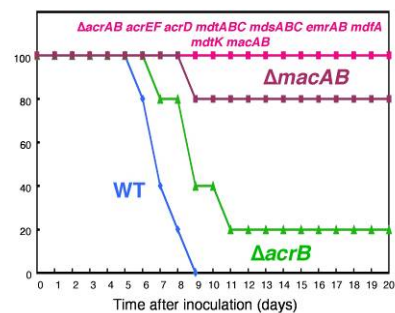


図3. サルモネラを感染させたマウスの生存率。異物排出トランスポーター遺伝子欠損株のマウス致死能力は野生株に比べ、顕著に低下している。

出トランスポーターを利用して、薬剤耐性化と病原性をコントロールしているのかを知ることは重要な課題である。そこで、宿主環境中に存在する代謝産物がサルモネラ異物排出トランスポーターの発現にどのような影響を及ぼすか検討した。その結果、インドールや胆汁酸といった化合物が、新規のレギュレーターRamA を介して、AcrAB 異物排出トランスポーターの発現を誘導していることを明らかにした。インドールは RamA の発現を上昇させることにより AcrAB を誘導するのに対して、胆汁酸は RamA に直接結合して活性化させることにより、AcrAB 誘導を行っていた。すなわち、RamA はインドールや胆汁酸といった異なるシグナルインプットに対して、「過剰発現型」と「活性型」という2つの制御モードにより AcrAB を誘導しているという、新規異物排出トランスポーター制御機構を発見した(図4)。現在、これら制御因子の構造解析にも取り組んでおり、その詳細が明らか

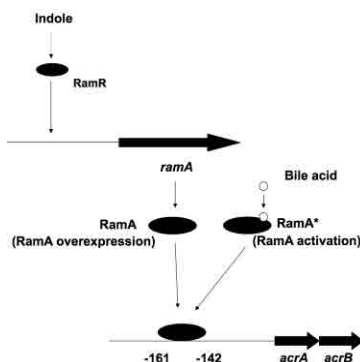


図4. RamA による AcrAB 発現調節モデル。インドールは RamR を介して RamA の発現を上昇させることにより AcrAB を誘導する。胆汁酸は RamA を活性化させることで AcrAB を誘導する。

になることで、出現が上昇傾向にある多剤耐性菌に対する阻害剤の開発や分子生物学的診断法
の開発等に役に立つものと考えられる。

(4) 異物排出トランスポーター生理機能の解明

(4-A. 鉄代謝における異物排出トランスポーターの役割)

サルモネラの異物排出トランスポーターであるAcrDとMdtABCは、 β -ラクタム剤をはじめとする
抗菌薬を排出し、細菌を多剤耐性化させる。一方で、この2つの排出システム欠損株はマウスに
対する病原性が減弱している。これら異物排出トランスポーターは、薬剤耐性以外にどのような生
理機能を担っているのだろうか。AcrDとMdtABCは通常ほとんど発現していないが、鉄欠乏条件
下において誘導される。この2つのトランスポーターは、Furという鉄代謝に関わる調節因子によ
って制御されていることを発見した。また、鉄欠乏条件下において、これら排出トランスポーターが細
菌の生育に必要であることが分かった。鉄は病原性細菌にとって必須の微量元素であり、細菌は
効率的な鉄取り込み様式をもっている。細菌はシデロフォアとよばれる Fe^{3+} と特異的に結合する分
子(キレーター)を分泌し、シデロフォア- Fe^{3+} 複合体を取り込むことにより鉄を吸収する。解析の結
果、AcrDおよびMdtABCはシデロフォアであるエンテロバクチンを排出し、菌の鉄獲得に関与して
いることを発見した(図5)。病原性細菌は、宿主体内に多く存在するヘムタンパク質やトランスフェ
リン、ラクトフェリンなどの鉄輸送タンパク質から鉄を吸収する系など、生存のために多彩な方法で
宿主から鉄を取り込む。病原細菌にとって鉄は病原性を成立させるために必須の元素であり、細
菌が宿主から鉄を奪うのに対して、宿主側は細菌の鉄吸収を抑制することにより、その増殖を阻
害する感染防御機構を保持している。異物排出トランスポーターによるシデロフォア排出は、宿主
内において細菌が鉄を獲得するために必要であり、この機構が病原性成立に関与していることが
強く示唆される。

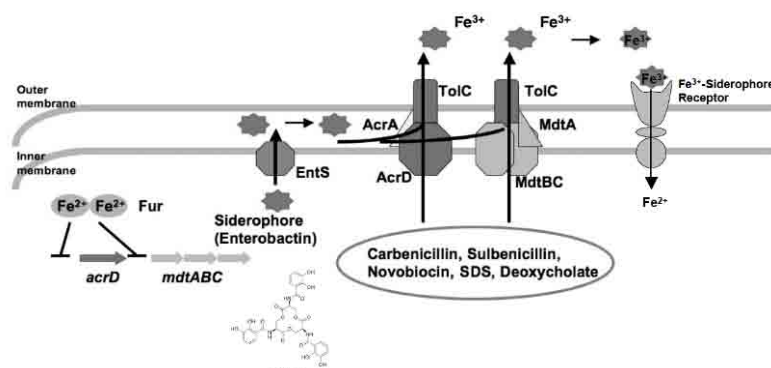


図5. 異物排出トランスポーターによる薬剤と鉄キレーターへの排出。AcrDとMdtABCトランスポ
ーターは、細菌の鉄ホメオスタシスに関与するFurによって制御されている。鉄欠乏状態において、外環
境に存在している鉄を獲得するための鉄キレーター「エンテロバクチン」を異物排出トランスポーターが
排出しているという生理機能を発見した。

(4-B. 抗菌ペプチド耐性とLPS構造維持における異物排出トランスポーターの役割)

抗菌ペプチドは自然免疫の重要な因子であり、両生類、昆虫、哺乳類など、様々な生物に保存
されている感染防御システムである。ポリミキシンBはカチオン性抗菌ペプチドであり、細菌膜に
対して傷害性がある。宿主内で、細菌が生存するためには、このような宿主からの攻撃因子に対
して自身を防御しなくてはならない。サルモネラの全ての異物排出トランスポーターを欠損させた
株は、野生株に比べ、ポリミキシンBへの感受性が100倍以上高くなっていることを明らかにした
(図6)。また、トランスポーター単独欠損株を用いた解析の結果、サルモネラ特異的な排出トラン
スポーターであるMdsABC-TolCがポリミキシンB耐性に関与していることが明らかになった。ポリ
ミキシンBのターゲットであるLPSの構造についてMALDI-TOFを用いて解析した結果、サルモネ
ラ野生株とMdsABC-TolC欠損株との間で、LPSのlipidA部分に構造的な違いがあることが判明
した。MdsABC-TolCトランスポーターは、lipidAのリン酸基数を調整し、外膜の負電荷を軽減させ

ることにより、抗菌ペプチド耐性化に関与していることが考えられる。異物排出トランスポーターは、薬剤耐性化だけではなく、宿主の自然免疫から逃れるという生理機能を担っていることが示唆される。

(5) 異物排出活性測定デバイスの開発

これまで、異物排出活性を簡便かつ迅速に検出する手法は確立していなかった。大阪大学・産業科学研究所・野地研究室との共同研究にて、微細加工技術を駆使して異物排出活性を細菌1細胞レベルで高感度に検出する新手法を開発した。フェムトリッターチャンバーや、マイクロ流路を用いて、1細胞での高感度検出に適用することにより、10～15分で細菌の排出活性ならびに阻害剤の効果の両方を測定することに成功した。本手法を応用することで、短時間で多剤耐性菌を検出することのできる検査キットの開発や、新しい抗菌薬のスクリーニングデバイス開発につながるものと期待される。

(6) 異物排出トランスポーター阻害剤による新規治療法確立の試み

異物排出トランスポーターは多剤耐性化に関与し臨床的に問題となっていることから、その阻害剤検索は製薬企業も注目している。上記の研究から、異物排出トランスポーターは、薬剤耐性化に加えて、細菌の病原性発現にも関与していることが明らかになった。この事実から考えると、異物排出トランスポーターを阻害することにより、細菌の病原性および薬剤耐性化が軽減される可能性がある。臨床分離株を用いて調べた結果、異物排出トランスポーター阻害剤(PAβN)には、細菌の多剤耐性化を軽減させる効果があることが分かった。これまで効かないとされていた抗菌薬も阻害剤を併用することにより、感染症を治療することが可能になると思われる。すなわち、既存薬を有効に利用することが可能になる。さらに、異物排出トランスポーター阻害剤は単独で、サルモネラの細胞侵入性低下を引き起こし(大阪大学・歯学研究科・川端研究室との共同研究)、また、カイコへの致死性を減弱させる(東京大学・薬学系研究科・関水研究室との共同研究)といった、細菌病原性を軽減させる効果もあることが分かった(図7)。

5. 自己評価

本研究により、多剤耐性化と細菌病原性という本来結びつかなかった現象に、つながりがみえるようになった。異物排出トランスポーターが異物だけではなく、細菌体内の代謝物質を輸送し、細菌の感染宿主環境適応において重要な役割を果たしていることを発見した。これまで、異物排出トランスポーターは抗菌薬耐性という観点から解析が進められてきたが、これらトランスポーターの生理基質を同定することが、病原性といった細菌機能を理解する上で重要であることが分かった。本研究成果を受け、ゴードン会議や米国微生物学会総会(ASM)をはじめとした国際会議、そして複数の国内学会から招待講演依頼があり、異物排出トランスポーターによる細菌病原性制御という新しい研究領域の発端を提示することが出来たものと考えている。

6. 研究総括の見解

サルモネラ菌の9個の異物排出トランスポーターを同定し、これらトランスポーターの病原性発現、インドールや胆汁酸などの宿主環境物質による発現制御機構、鉄代謝や抗菌ペプチド耐性

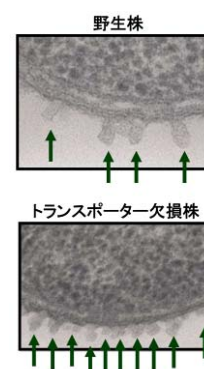


図6. 異物排出蛋トランスポーターが抗菌ペプチド耐性に与える影響. 排出トランスポーターを欠損したサルモネラは抗菌ペプチドに感受性を示す. 抗菌ペプチドで処理すると、野生株に比べて、より多くの突起状構造物(電子顕微鏡図)が外膜において観察される。

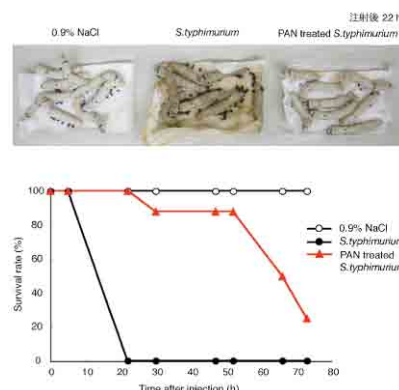


図7. 異物排出トランスポーター阻害剤(PAβN)は細菌病原性を軽減する。

における役割など順調に研究成果を得た。また、異物排出活性測定デバイスの開発や多剤耐性克服へ向けた異物排出トランスポーター阻害剤の開発など応用研究においても良好な発展がなされた。MdsABC-TolC トランスポーターによる lipidA リン酸基数の調節機構が解明されれば、lipidA 代謝におけるユニークな研究となる。細菌感染症対策に向けた研究として今後の更なる発展が期待できる。

7. 主な論文等

A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

①論文 *corresponding author

1. Nishino, K., Nikaido, E., Yamaguchi, A.* Regulation of multidrug efflux systems involved in multidrug and metal resistance of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* 189, 9066–9075 (2007)
2. Nishino, K., Yamaguchi, A.* Role of xenobiotic transporters in bacterial drug resistance and virulence. *IUBMB Life* 60, 569–574 (2008)
3. Nikaido, E., Yamaguchi, A.*, Nishino, K.* AcrAB multidrug efflux pump regulation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by RamA in response to environmental signals. *J. Biol. Chem.* 283, 24245–24253 (2008)
4. Nishino, K., Nikaido, E., Yamaguchi, A. Regulation and physiological function of multidrug efflux pumps in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1794, 834–843 (2009)
5. Nishino, K., Hayashi-Nishino, M., Yamaguchi, A. H-NS modulates multidrug resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by repressing *acrEF* multidrug efflux genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 3541–3543 (2009)

②受賞

1. 第9回日本抗生物質学術協議会奨励賞 (2007年11月8日)
2. 日本化学療法学会西日本支部支部長賞 (2008年1月8日)
3. 平成20年度文部科学大臣表彰若手科学者賞 (2008年4月15日)
4. 上田泰記念感染症・化学療法研究奨励賞 (2008年6月6日)
5. 第11回花王研究奨励賞 (2009年6月1日)

B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

①特許

研究期間累積件数: 2件

1. 発明者: 飯野亮太、西野邦彦、仲田昌義、榊原昇一、山口明人、野地博行
発明の名称: 細胞検体の異物排出活性検出方法、及びその利用
出願人: 大阪大学
出願日: 2006年10月30日
2. 発明者: 加藤修雄、平岡正光、大神田淳子、河野富一、山口明人、平田隆弘、西野邦彦、恵比須繁之、ボニー・エル・バスラー
発明の名称: オートインデューサー-2受容体のモデュレーター
出願人: 大阪大学
出願日: 2007年3月6日

②招待講演

1. Nishino, K. Phenotypic analysis of multidrug efflux pumps – not just for multidrug resistance. Florence Conference on Phenotype MicroArray Analysis of Microorganisms (Florence, Italy 2008/3/19–21)
2. Nishino, K. Physiological functions of multi-drug efflux systems in *S. enterica*. The Gordon Research Conference on Multi-Drug Efflux Systems (Texas, USA. 2009/3/22–27)

3. Nishino, K. Unexpected role of multidrug efflux pumps in *Salmonella* virulence. 3rd Symposium on Antimicrobial Resistance in Animals and the Environment (Tours, France 2009/6/2)
4. Nishino, K. Virulence and drug resistance roles of multidrug efflux systems in *Salmonella enterica*. ASM American Society for Microbiology 110th General Meeting (San Diego, USA 2010/5/25)

研究課題別評価書

1. 研究課題名

ストレス応答破綻としてのメタボリックシンドロームと動脈硬化の分子機構解明

2. 氏名

眞鍋 一郎

3. 研究のねらい

過剰なカロリー摂取や運動不足により肥満が急増しているが、肥満は様々な生活習慣病のリスク要因となることが知られている。特に、内臓肥満を基盤として高血圧、耐糖能異常や脂質代謝異常を併発するメタボリックシンドロームは、動脈硬化性疾患や代謝疾患の重大なリスクとなることが明らかとなっている。脂肪組織は、単に脂肪を蓄積する臓器ではなく、多様な生理活性物質（アディポカイン）を分泌する内分泌臓器であり、メタボリックシンドロームに中心的な役割を果たすと考えられている。我々は、生きている脂肪組織を観察する新しい手法を開発し、肥満脂肪組織にダイナミックな炎症変化が起こっていることを見いだした。脂肪組織の肥満で生じている変化は、動脈硬化形成過程に見られる変化と多くの共通点をもつ慢性炎症と捉えられる。本研究では、生活習慣病の病態メカニズムについて、(1)代謝組織における炎症の意義について解析すること、(2)心血管細胞と代謝細胞の両方でストレス応答を担う転写制御機構について、転写因子 KLF5 に着目した解析を行うこと、(3)心血管系と代謝系の両者に共通して病態を惹起する代謝ストレスの同定とそのシグナル機構の解明を目指して研究を進めた。

4. 研究成果

1 肥満は内臓脂肪組織の炎症を惹起する

脂肪組織はアディポカインと呼ばれる多数の生理活性物質を分泌する。内臓脂肪の肥満は、アディポカインの分泌を変化させ、TNF- α 等の炎症性サイトカインの発現が増加する。このような炎症性サイトカインが、遠隔臓器に炎症を惹起し、動脈硬化やインスリン抵抗性の原因となることが提唱されている。当初、脂肪細胞が炎症性サイトカインを産出すると考えられていたが、肥満した脂肪組織にマクロファージが集積することが明らかとなり、肥満脂肪組織に炎症が生じていることが示唆された。しかし、組織学的に炎症が生じているかど

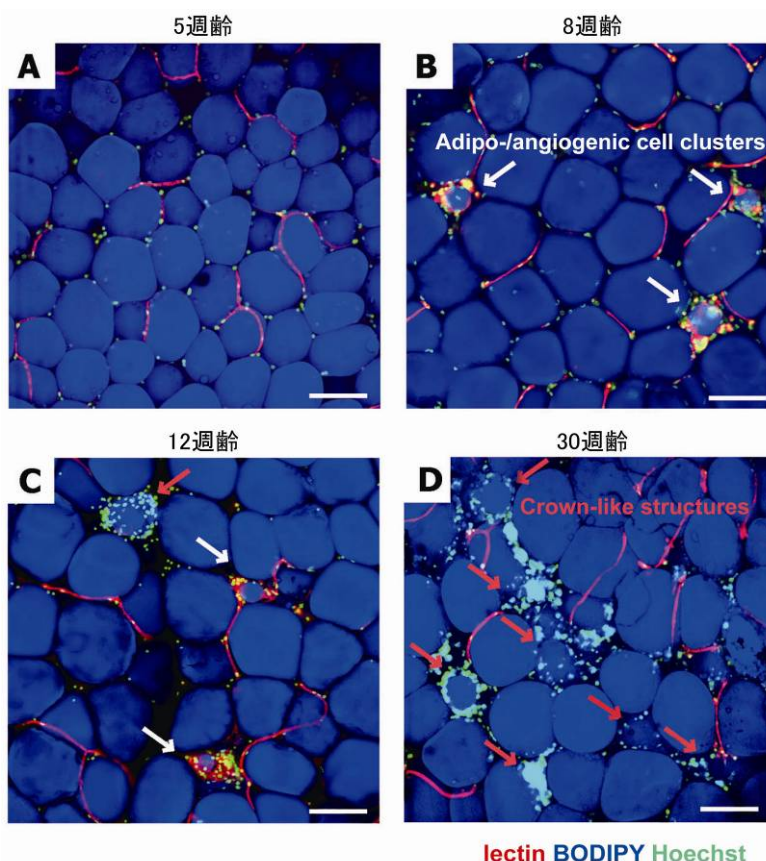


図1 adipo-/angiogenic cell clusters と crown-like structures
db/db マウス精巣上体脂肪組織の肥満過程を観察すると、まず adipo-/angiogenic cell clusters により脂肪細胞新生（組織の hyperplasia）が起こり、これに遅れて肥満が進行すると crown-like structures がみられるようになる。

うかは明確ではなかった。炎症などの多数の細胞が関与して進む複雑な生命現象を解析するためには、その場所で何が起っているかを観察できる手法が必須となる。特に、脂肪組織は脆く、固定・切片作成の際に組織構築を維持することが難しく、また大きな脂肪細胞が主体であることから、従来の観察方法では三次元的なイメージを捉えることが難しい。そこで我々はレーザー共焦点顕微鏡を用いて、生きている脂肪組織を未固定のまま観察できる新しいイメージング法を開発した。この方法を用いて、内臓脂肪組織を観察したところ、肥満過程においてダイナミックな細胞現象が生じていることが明らかとなった。例えば、

血管新生 (angiogenesis) とリンクした脂肪細胞新生 (adipogenesis) が、我々が adipo-/angiogenic cell clusters と名付けた細胞集団形成によって生じる (図 1)。また、肥満の進行によってマクロファージが王冠状に脂肪細胞の周囲に集合する別の種類の細胞集団 (Crown-like structures) が形成され、死んだ脂肪細胞をマクロファージが処理する。肥満慢性期には線維化も認められる (Diabetes 2007)。我々はさらに脂肪組織内血管における細胞・分子現象をリアルタイムで観察する方法を開発した。この方法により、肥満によって血管内皮と白血球の相互作用が亢進することが明

確になった。また、血流の低下も認められ、血管機能の変化が脂肪組織機能異常の原因となっている可能性が示唆された (J Clin Invest 2008)。これらの結果は、肥満した脂肪組織において、明確に慢性炎症と捉えられるダイナミックな変化が生じていることを明らかとした。

このように肥満によって慢性炎症プロセスが惹起されることから、次

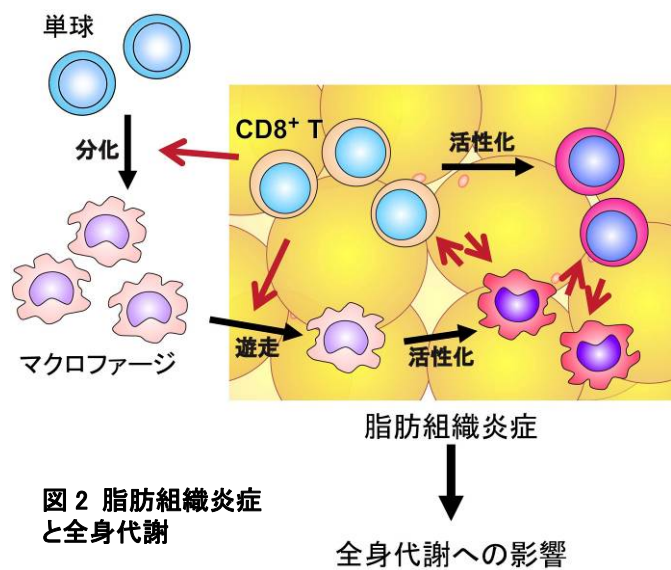


図 2 脂肪組織炎症と全身代謝

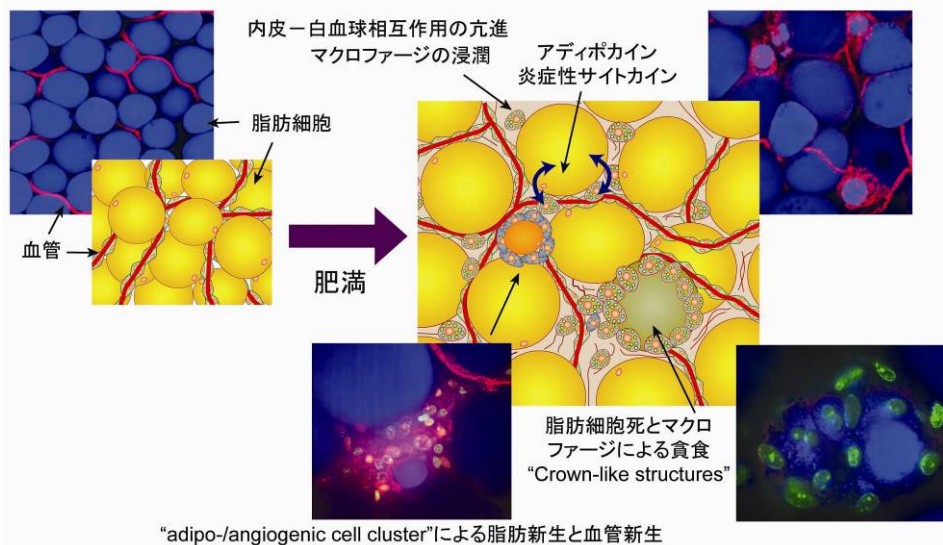
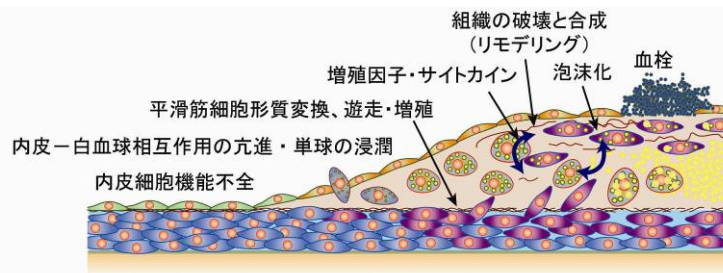


図 3 動脈硬化と脂肪組織の肥満

に我々はその誘導メカニズムの解析を行った。高脂肪食負荷による肥満形成過程における精巢上体脂肪組織の stromal-vascular (SV) fraction に存在する細胞種の変化をフローサイトメトリーで解析したところ、M1 マクロファージが増加する以前に effector CD8+ T 細胞が増加することを見いだした。一方、CD4+ T 細胞や制御性 T 細胞は CD8+ T 細胞は減少する。そこで CD8+ T 細胞が脂肪組織炎症に寄与すると考え、複数の方法で CD8+ T 細胞へのインターベンションを行った。抗体による CD8+ T 細胞除去により、脂肪組織へのマクロファージ浸潤は抑制され、炎症性サイトカイン発現も減少した。一方、全身のインスリン感受性は改善した。CD8a ノックアウトマウスでは、高脂肪食により肥満は生じるものの、脂肪組織炎症は著明に抑制されていた。ここに、CD8+ T 細胞を補充すると、脂肪組織炎症が惹起され、インスリン抵抗性も誘導された。これらの結果は、CD8+ T 細胞が肥満脂肪組織における炎症カスケードの誘導に必須であることを示す。さらに、いったん確立した脂肪組織肥満も、CD8+ T 細胞除去により改善することから、脂肪組織炎症の維持にも必須であることが示された。共培養系などの検討により、CD8+ T 細胞、マクロファージ、脂肪細胞の間に密接な相互作用があり、脂肪組織肥満において炎症カスケードを誘発・維持することが示された(図 2)。このように、脂肪組織の肥満においてはダイナミックな炎症プロセスが機能しており、全身の代謝にも多大な影響を与える。

脂肪組織の肥満に認められる現象の多くは、動脈硬化の進展過程で共通して認められる。このことは、代謝組織と血管の病態で多くの共通したメカニズムが機能していることを示唆する(図 3)。

2 心血管疾患と代謝疾患の両者に重要な転写因子 KLF5

我々は転写因子 KLF5 を、血管病態において平滑筋細胞の形質変換を制御する転写因子として同定した(*Nat Med* 2002, *Circ Res* 2005)。KLF5 ヘテロノックアウトマウス(*KLF5*^{+/−})の血管に傷害を与えると、このストレスに対して形成される新生内膜がヘテロノックアウトマウスでは全く認められず、むしろ血管壁は菲薄化する。また、KLF5 は心肥大と線維化にも重要である。興味深いことに KLF5 ヘテロノックアウトマウスは皮下白色脂肪組織(WAT)の発達遅延を示す。この結果は KLF5 が脂肪細胞分化に必要であることを示唆する。我々は KLF5 が脂肪細胞の分化を制御する転写ネットワークの重要な構成因子であることを見いだした(*Cell Metab* 2005)。



図 4 KLF5 の SUMO 化は脂肪酸燃焼関連遺伝子群発現制御の分子スイッチとして機能する

KLF5 が脂肪細胞分化に必須であることから、我々は KLF5 が成体のエネルギー代謝制御にも関わるのではないかと考えた。高脂肪食負荷を与えると、*KLF5*^{+/−}マウスでは摂餌量はむしろ亢進しているにもかかわらず、体重増加は有意に抑制されることが明らかとなった。また、耐糖能やインスリン感受性も維持されており、*KLF5*^{+/−}は高脂肪食によるタボリックシンドロームを呈しにくいことが分かった。KLF5 機能の詳細を解析し、KLF5 が筋細胞内で脂肪酸酸化にかかわる遺伝子群の発現を制御していることを見いだした。定常状態では、KLF5 は small ubiquitin-related modifier (SUMO) が KLF5 のリジン残基に結合する SUMO 化を受けることによって、転写を抑制するコリプレッサーと会合して脂肪酸燃焼に関わる遺伝子群の転写を負に制御している。ここに、PPARδ アゴニストが与えられると、KLF5 の脱 SUMO 化が生じ、SUMO が外れた KLF5 は、今度は転写を活性化するコアクチベーターと会合して、転写を正に制御することが明らかとなった。つまり、KLF5 の SUMO 化は、ちょうど転写の on/off スwitch のような機能を持つ(図 4)。このように、KLF5 は心血管疾患とメタボリックシンドロームの両方で重要な機能を持っている(図 5)。

3 共通した病態惹起因子と慢性炎症を標的とした治療戦略

我々の解析は、代謝臓器の病態にも慢性炎症が重要であることを明確に示した。慢性炎症は、心血管系疾患と代謝疾患の両方で共通した基盤病態であると考えられる。肥満を背景として増加する病態因子として、我々は遊離脂肪酸に着目し、遊離脂肪酸が血管と代謝系の両方で細胞機能異常を惹起することを見いだした。

慢性炎症が基盤病態として重要なことから、慢性炎症プロセスに介入する新しい治療戦略が考えられるだろう。また一方で、炎症はナノ粒子によるよい治療標的となり得る(*Cancer Res* 2009)。今後さらに、ストレス応答や慢性炎症プロセスによる病態発症メカニズムを解明することによって、新たな治療標的が同定されることが考えられる。

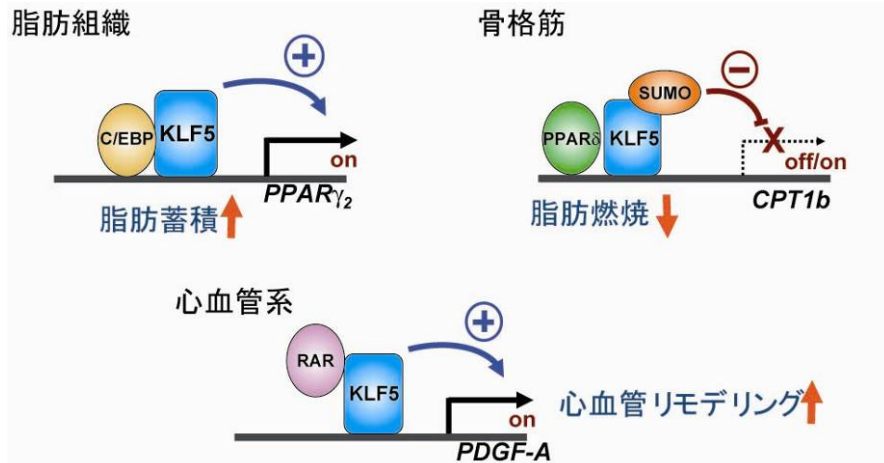


図5 KLF5は心血管系・代謝系の両方で機能して、メタボリックシンドロームと心血管疾患の両方で重要である

5. 自己評価

脂肪組織の肥満で明確な炎症が生じていること、また、自然免疫系だけではなく、獲得免疫系も重要な役割を担っていることを明確に示すことによって、慢性炎症が生活習慣病全体に重要であることを示せたと思う。また、その分子機構についても、転写因子KLF5が傷害ストレスと代謝ストレスの両方に応答し、組織リモデリングとエネルギー代謝を制御することを示すことが出来た。今後、傷害的なストレスへの応答と代謝の調節機構のクロストークについての研究を進めることによって、生活習慣病における組織機能障害の分子機構について、新たな視点を与えることが出来ると考える。

6. 研究総括の見解

肥満により脂肪組織にマクロファージが蓄積し、慢性炎症を引き起こすこと、即ち、肥満により脂肪組織に動脈硬化と類似した慢性炎症が惹起されること、遊離脂肪酸が心血管系と代謝系の両方で共通して炎症プロセスを惹起すること、さらに転写因子KLF5がストレス応答と代謝制御の両方で機能すること等を明らかにした。研究は極めて順調に進められ、得られた成果は国際的にも高く評価されるものである。また、レーザー共焦点顕微鏡を用い、生きた脂肪組織を未固定のまま観察する技術の開発はインパクトのある技術である。今後、新しい治療標的の同定につながることを期待できる。

7. 主な論文等

A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

①論文

1. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Seo K, Yamashita H, Hosoya Y, Ohsugi M, Tobe K, Kadowaki T, Nagai R, Sugiura S. In vivo imaging revealed local cell dynamics in obese adipose tissue inflammation. *J Clin Invest* 118:710-721, 2008.
2. Oishi Y, Manabe I, Tobe K, Ohsugi M, Kubota T, Fujiu K, Maemura K, Kubota N, Kadowaki T, Nagai R. SUMOylation of Krüppel-like transcription factor 5 acts as a molecular

- switch in transcriptional programs of lipid metabolism involving PPAR- δ . *Nat Med* 14:656-666, 2008.
3. Yagi N, Manabe I, Tottori T, Ishihara A, Ogata F, Kim JH, Nishimura S, Fujiu K, Oishi Y, Itaka K, Kato Y, Yamauchi M, Nagai R. A Nanoparticle System Specifically Designed to Deliver Short Interfering RNA Inhibits Tumor Growth In vivo. *Cancer Res* 69:6531-6538, 2009.
 4. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, Otsu M, Hara K, Ueki K, Sugiura S, Yoshimura K, Kadowaki T, Nagai R. CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med* 15:914-920, 2009.
 5. Takeda N, Manabe I, Uchino Y, Eguchi K, Matsumoto S, Nishimura S, Shindo T, Sano M, Otsu K, Snider P, Conway SJ, Nagai R. Cardiac fibroblasts are essential for the adaptive response of the murine heart to pressure overload. *J Clin Invest* 120:254-265, 2010.
- ②著書
1. Nagai R, Manabe I, Suzuki T. Krüppel-like Factors: Ingenious Three Fingers Directing Biology and Pathobiology. in *The Biology of Krüppel-like Factors*. 3-18, 2009.
 2. Manabe I, Nagai R. Drug development and Krüppel-like factors. in *The Biology of Krüppel-like Factors*. 245-253, 2009.
- ③招待講演
1. 真鍋一郎、血管脂肪毒性と炎症、第 17 回日本血管生物医学学会、東京、2009 年 10 月 8 日
 2. 真鍋一郎、肥満と血管炎症、第 24 回日本糖尿病合併症学会 シンポジウム 3 糖尿病血管合併症と炎症、岡山、2009 年 10 月 9 日
 3. Manabe I, Chronic inflammation is a common pathological basis of cardiovascular and metabolic diseases, 12th Cardiovascular Genomics and Atherosclerosis Symposium, Seoul, Korea (2009/10/16)
 4. 真鍋一郎、心血管・代謝疾患の基盤病態である慢性炎症と遊離脂肪酸、第 82 回日本生化学会大会、神戸、2009 年 10 月 22 日
 5. 真鍋一郎、生活習慣病における慢性炎症プロセス、第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、2009 年 12 月 11 日