

# 「生体における動的恒常性維持・変容機構の解明と制御」研究領域 領域活動・評価報告書 —平成27年度終了研究課題—

研究総括 春日 雅人

## 1. 研究領域の概要

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

具体的には、下記の視点をもった研究を推進します。

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

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

## 2. 事後評価対象の研究課題・研究者名

件数：9件

※研究課題名、研究者名は別紙一覧表参照

## 3. 事前評価の選考方針

選考の基本的な考えは下記の通り。

- 1) 選考は、「生体における動的恒常性の維持・変容機構の解明と制御」領域に設けた選考委員25名の協力を得て、研究総括が行う。
- 2) 選考方法は、書類選考、面接選考及び総合選考とする。
- 3) 選考に当たっては、さきがけ共通の選考基準(URL: <http://www.jst.go.jp/pr/info/info825/besshi4.html>)を基本に行った。

## 4. 事前評価の選考の経緯

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

選考	書類選考	面接選考	採択数		
			10件	内訳	3年型
対象数	234件	24件			

※本領域においては、5年型、大挑戦型を公募しなかった。

備考:

- 1) 平成24年度採択課題のうち、以下は今年度事後評価対象としない。
  - ・三浦恭子研究者  
ライフイベントにより研究を一時中断し、終了年度がずれるため。

## 5. 研究実施期間

平成24年10月～平成28年3月(3年型)

## 6. 領域の活動状況

領域会議:6回

研究総括(または技術参事)の研究実施場所訪問:海外の梶村研究者を除く9名のサイトビジットを行った。

## 7. 事後評価の手続き

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

(事後評価の流れ)

平成 28年2月 研究総括による事後評価

平成 28年3月 被評価者への結果通知

## 8. 事後評価項目

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

## 9. 評価結果

総論:本研究領域は、生体の恒常性維持機構に焦点をあて、その恒常性維持に関与する新しい臓器間等のネットワークに着目した研究、恒常性維持機構の時間的変化に着目した研究、あるいは疾患の原因としての恒常性維持機構の破綻に着目した研究で、内分泌学、代謝学、神経学、免疫学等の既存の学術領域を超えた視点をもった研究を中心に採択してきました。第1期としては9課題が終了し、ショウジョウバエ、マウスあるいはハムスターを用いてその恒常性維持機構の解明に迫り、いずれの研究課題も着実に成果をあげたと評価できます。本研究領域の趣旨に最も合致した成果をあげた研究としては、褐色脂肪の熱産生以外の機能が代謝の恒常性に重要な働きをしていることを見出した研究ならびに骨細胞と胸腺あるいは脂肪組織とを結ぶネットワークの存在を明らかにした研究をあげることができます。また、最も臨床応用が近いと考えられる研究は、腸管IgA抗体による腸管細菌叢の制御に関する研究で、治験に持ち込めるのではないかと期待されます。また、冬眠に関する研究は、まだ緒に着いたばかりであります。将来、エネルギー代謝等の恒常性維持機構の解明に新しい視点をもたらしてくれることが期待されます。

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

### 1. 梶村 真吾 研究者「褐色脂肪—骨格筋間の新たな臓器間ネットワークの解明」

評価結果:本研究課題では、褐色脂肪と骨格筋の間をつなぐ新たな液性因子を同定し、その生体内におけるエネルギー代謝・糖代謝の恒常性維持に関わる機能の解明を目指した。その結果、褐色脂肪細胞の分化に必須である因子を欠損させたマウスは、顕著な脂肪肝や、骨格筋や肝臓におけるインスリン抵抗性が認められた。さらに、褐色脂肪(褐色脂肪細胞とベージュ細胞)の熱産生機能を亢進する低分子化合物を同定し、高脂肪食下のマウスに投与すると、熱産生の亢進のみならず、脂肪肝の改善や、骨格筋や肝臓におけるインスリン抵抗性の顕著な改善が認められた。このように、褐色脂肪の熱産生以外の機能が糖代謝の恒常性維持に重要な役割を持つことが示唆され、ヒトにおける知見を含めて、新たな褐色脂肪の機能を探索することにより、新たな糖代謝異常疾患の治療戦略の展開が期待される。

本研究者は、さきがけ研究により、国際的な表彰を受賞しており、原著論文も含め、総説等の執筆も増えており、また、他領域のさきがけ研究者との共同研究にも発展しており、研究者としての飛躍につながった。

### 2. 片山 義雄 研究者「骨を要とする多臓器恒常性維持機構の解明」



評価結果:本研究課題は、骨を要とした多臓器間機能的ネットワークの解明をめざして行われ、具体的には重力を感知する骨細胞を除去したマウスを作成し、それを用いて、骨細胞が骨髄中で造血幹細胞のニッチの機能を交感神経からの指令をうけつつ調整していることを明らかにした。また、この骨細胞除去マウスでは胸腺が皮質間葉系支持細胞の減少により著明に萎縮しており、また、全身の脂肪組織も消失していた。すなわち、骨組織内骨細胞は隣接している骨髄のみでなく胸腺、脂肪といった遠隔臓器にも影響を及ぼしていることが明らかとなった。

以上から、「骨を要とする多臓器恒常性維持機構」の存在が明確になった。本研究者は、さきがけ研究により、インパクトのある原著論文を発表し、新しい分野のトップランナーとして注目され、研究者としての飛躍につながった。

研究費は、本研究を着実に迅速に実施するために病理組織標本作成装置を計画外の増額予算で購入した以外は、計画通りの予算で研究を行った。

### 3. 久万 亜紀子 研究者「恒常性維持・変容を支える細胞内分解系オートファジーの生理的意義」

評価結果:本研究課題は、オートファジーの生理機能と制御機構に焦点を当て、生体の恒常性維持・変容機構の解明に挑戦することであり、具体的には、摂食によるオートファジーの主要な制御因子は臓器によって異なり、肝臓ではアミノ酸、骨格筋ではインスリンであることを見出した。さらに、オートファジー遺伝子 Atg5 欠損マウスは生後1日で死亡するが、Atg5 欠損マウスの神経のみにオートファジー活性を回復させたところ、ほぼすべての Atg5 欠損マウスが新生仔死亡を回避できたことにより、オートファジー欠損での全身網羅的な表現型解析が可能となり、これらのマウスでは生殖器の萎縮と鉄欠乏が特に顕著であることを見出し、その分子機序を解析中である。本マウスを用いた今後の研究により、さらにオートファジーの全身における生理的意義の理解が進むことが期待される。

研究費は、計画通りの予算で研究を実施することができた。

本研究者は、さきがけ研究により、国内の学会ではあるが招待講演も多数実施しており、原著論文も含め、総説等の執筆も増えており、また、他領域のさきがけ研究者との共同研究にも発展しており、今後の活躍が十分に期待される。

### 4. 佐伯 久美子 研究者「ヒト生体ホメオスターシス維持の安定化および攪乱に寄与する新規生理活性物質の同定」

評価結果:本研究課題は、日本人の健康寿命の延長に向けた治療開発の重要性が高い「虚血性疾患」と「糖代謝異常」を対象に、病態を「恒常性維持機構の破綻」という立場から理解すべく「血管内皮細胞」と「褐色脂肪細胞」に注目してヒト多能性幹細胞を用いて研究を行った。その結果、内皮には「平滑筋増殖抑制型(善玉)」と「平滑筋増殖促進型(悪玉)」の2種類のものがあり、前者は傷害血管の狭窄を阻止し、後者は狭窄を増悪することが確認された。さらに内皮の形質差を決める分子を探索し、内皮の悪玉化を生じる責任遺伝子として Regulator of G-protein signaling 5 (RGS5)を同定し、RGS5 の下流で p38 MAPK が内皮の品質管理に関与することを明らかにした。また、褐色脂肪細胞は熱産生とは独立に、新規の可溶性生理活性物質を介して糖代謝を改善していることが判明し、網羅的遺伝子転写速度解析という新技術を適用することで「転写速度の振動」に着目した独自の解析法を編み出すことで、褐色脂肪細胞分化に関わる新規パスウェイを同定することに成功した。このように、血管内皮細胞の形質差を生み出す新たな分子機序の解明、褐色脂肪細胞の分化に関わる新たな分子機序の解明により、それぞれが関わる疾患に対する治療薬開発の基礎情報の取得に成功した。

研究費は、計画通りの予算で研究を実施することができた。

本研究者は、さきがけ研究により、国際シンポジウムでの講演も多数行っており、原著論文も含め、総説等の執筆も増えており、今後の活躍が十分に期待される。

### 5. 新藏 礼子 研究者「腸管 IgA 抗体による腸内細菌制御機構の解明と応用」

評価結果:腸内細菌叢のバランスの崩れが多くの疾患の原因になることが最近明らかにされてきた。すなわち、腸内細菌叢は生体の恒常性維持・変容に大きく関与している。また、最近の研究では腸管腔に分泌される IgA 抗体が腸内細菌を識別して制御することが示唆されている。

本研究者は腸管 IgA 産生細胞からハイブリドーマを多数作製し、多くの腸内細菌に最も高い結合力を示した W27 モノクローナル抗体を選択し、その抗原分子、分子内エピトープも同定し、この抗体がエピトープ部分のアミノ酸の違いを識別して、各腸内細菌への結合力が異なることも明らかにした。すなわち、W27 抗体は腸内細菌の悪玉菌を識別して結合し、その増殖を抑え、一方で善玉菌には結合しないため、その増殖を阻害しない

ことが明らかになった。さらに腸炎モデル(DSS 誘導性腸炎、および T 細胞移入腸炎)マウスに W27 抗体を投与し、その腸炎抑制効果も確認した。以上から、W27IgA 抗体は腸内細菌制御に有効な経口治療薬候補であることを明らかにした。今後は W27 IgA 抗体の臨床応用が期待される。

研究費は、論文投稿のための治療実験に用いる抗体作成費用として 332 万円、抗体によりどのような腸管細菌が増減するのかを確かめるためのメタボローム解析費用として 240 万円の増額、総額 572 万円の増額を行うことにより、より詳細な研究を実施し、臨床開発に近づけることができた。

本研究者は、さきがけ研究により、国内学会ではあるが、招待講演もいくつか行っており、原著論文も投稿中で、今後の活躍が十分に期待される。また、本抗体が医薬品として臨床開発される日も近いと期待される。

#### 6. 成 耆 鉉 研究者「胎児プログラミング仮説の分子機構の解明と医療への応用」

評価結果: 胎生期、幼児期の栄養状態が、成人になってからの生活習慣病発症に影響するという、胎児プログラミング仮説(DOHaD)は、環境ストレスがどのように生活習慣病などの発症に影響するかについての新たな視点をもたらし、注目を集めている。本研究課題では、多様な遺伝学的手法が利用でき、生活環の短いショウジョウバエを用いて、様々な環境ストレスによるエピゲノム変化が、生体の恒常性維持機構に、どのような分子メカニズムを介して、影響を及ぼすのか、また、その影響は遺伝するかどうかを明らかにすることを目指した。いくつかの環境ストレスの中で、拘束ストレスは、次世代のヘテロクロマチン状態に最も大きな影響が出ることが見出され、エネルギー恒常性に大きな影響を与えていると考えられた。更にストレス依存的に Upd3 発現の誘導が生じ、精巣器官に伝えられ、生殖細胞系列において p38-dATF-2 経路を介したエピゲノム変化を引き起こすことが確認された。今後、具体的なエピゲノムの制御がどのように起こっているのかを明らかにし、ストレス応答機構、ならびに、エピゲノム状態の維持機構を理解することが必要で、さらに、マウスなどの哺乳動物やヒトでも同様のエピゲノム変化とその世代を超えた継承が存在するか興味を持たれる。

研究費は、計画通りの予算で研究を行った。

本研究者はさきがけ研究により、国際学会での発表や総説の執筆も実施しており、今後の活躍を十分に期待できる。

#### 7. 丹羽 隆介 研究者「個体の発育の恒常性を調節する器官間液性因子ネットワークの解明」

評価結果: 生物の発育過程は個体の内外の環境に応じて柔軟に調節され、さまざまな器官からのシグナルによって発育が協調的に進行する。本研究課題では、ショウジョウバエでの発育段階調節のキーププレーヤーであるステロイドホルモンに注目し、その生合成が液性因子シグナルにより調節される分子機構の解明を目指した。その結果、昆虫ステロイドホルモン(エクジステロイド)の生合成を調節する液性因子として、セロトニン、チラミン/オクトパミン、および Sex peptide の同定に成功し、それぞれの調節機序も明らかにした。解明されたメカニズムは今後の新しい創薬ターゲットになる可能性が期待され、特に、Noppera-bo の酵素活性を阻害することで昆虫発育を攪乱する薬剤を発掘するためのアッセイ系の構築に成功していることは評価に値する。

研究費は、計画通りの予算で研究を実施し、さらに海外研究者との共同研究のための国際支援費用として 75 万円の増額により、研究を進展させた。

本研究者は、さきがけ研究により、国際学会での招待講演も多数行っており、原著論文も多数発表した。また、他領域のさきがけ研究者との共同研究、その他国内国外研究者との共同研究にも発展しており、研究者としての飛躍につながった。

#### 8. 山口 良文 研究者「冬眠を可能とする生体状態の可視化とその誘導メカニズムの解明」

評価結果: 本研究課題は、冬眠制御に重要な脳中枢と末梢臓器との相互作用という観点から、冬眠可能な生体状態の実体を最新の解析技術を用いて解明し、その制御機構に迫ることであり、具体的には、シリアンハムスターを用いて安定した冬眠誘導系を立ち上げ、冬眠可能状態への変化過程で生じる全身性変化の解明を行った。その結果、前冬眠期に冬眠に先駆けて上昇する多数の遺伝子経路を経時的発現解析から明らかにした。今後は、これら遺伝子発現パターンの冬眠における意義およびその分子機構が明らかにされることが期待される。冬眠については、これまで遺伝子解析できるモデル動物がなかったことから、新たな研究領域を切り拓く研究として本研究の成果は重要と考えられる。

研究費は、当初計画よりは 250 万円の増額をしたものの、総額は 3900 万円で研究を実施することができた。本研究課題の成果により、冬眠という新たな切り口からの生体における動的恒常性の維持・変容機構の理解が進むことにより、虚血再灌流障害予防、肥満・糖尿病予防などに対するさまざまな新たな治療戦略の確立に貢献することが期待される。

本研究者は、論文発表は1件と少ないが、多くのさきがけ研究者との共同研究にも発展しており、今後の活躍が十分に期待される。

9. 渡部 徹郎 研究者「血管の動的恒常性の破綻による疾患進展機構の解明」

評価結果: 炎症やがんなどの病的状態において血管内皮細胞が内皮間葉移行(EndMT)によって間葉系細胞を生じる。この間葉系細胞が各種病態を進行させることが明らかになりつつある。本研究者は腫瘍組織において TGF-βが腫瘍血管における血管内皮細胞に働きかけ、EndMT を誘導することを見出し、さらに腫瘍組織において豊富に存在する他の因子の TGF-βによる EndMT の誘導における調節機構を明らかにした。本課題において開発された TGF-βシグナルの新規阻害剤の利用などを通じて EndMT を標的とした癌や心疾患の治療法開発が期待される。

研究費は、異動に伴って購入が必要となったリアルタイム PCR システムの購入のために 4160 千円の増額、さらに EndMT において起こる遺伝子発現変動をゲノムワイドで解析するために蛍光顕微鏡 2057 千円の増額を行った。

本研究者は、さきがけ研究により、海外の学会における招待講演も多数実施しており、原著論文の執筆も増えており、今後の活躍が十分に期待される。

10. 評価者

研究総括

春日 雅人 国立国際医療研究センター・総長

領域アドバイザー(五十音順。所属、役職は平成 28 年 3 月末現在)

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

\*1 平成 24 年 10 月～平成 27 年 3 月まで参画

\*2 平成 27 年 10 月～参画

(参考)

件数はいずれも、平成28年3月末現在。

(1) 外部発表件数

	国内	国際	計
論文	0	24	24
口頭	3	7	10
その他	13	3	16
合計	16	34	50



(2)特許出願件数

国内	国際	計
6	3	9

(3)受賞等

・梶村 真吾

- 2015 NISTEP Award, National Institute of Science and Technology Policy, Japan
- 2014 The Helmholtz Young Investigator in Diabetes Award (HelDi Award), Nature Medicine
- 2014 Baker IDI Metabolism & Inflammation Distinguished Lecture
- 2013 The Presidential Early Career Award for Scientists and Engineers from the White House (PECASE Award)
- 2013 Pew Scholar

・丹羽 隆介

- 2013年2月 平成24年度 筑波大学若手教員奨励賞
- 2013年10月 平成25年度 筑波大学若手教員奨励賞
- 2014年4月 平成26年度 科学技術分野の文部科学大臣表彰 若手科学者賞
- 2014年6月 平成26年度 筑波大学若手教員特別奨励賞

(4)招待講演

- 国際 14件
- 国内 17件

別紙

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

(3年型)

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職(平成28年3月末現在) (応募時所属)	研究費 (百万円)
梶村 真吾 (兼任)	褐色脂肪—骨格筋間の新たな臓器 間ネットワークの解明 (カリフォルニア大学サンフランシスコ 校)	カリフォルニア大学サンフランシスコ 校 アシスタントプロフェッサー (同上)	42
片山 義雄 (兼任)	骨を要とする多臓器恒常性維持機構 の解明 (神戸大学 医学部附属病院)	神戸大学 医学部附属病院 講師 (同上)	44
久万 亜紀子 (兼任)	恒常性維持・変容を支える細胞内分 解系オートファジーの生理的意義 (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 助教 (東京医科歯科大学 大学院医歯 学総合研究科 助教)	40
佐伯 久美子 (兼任)	ヒト生体ホメオスタシス維持の安定 化および攪乱に寄与する新規生理活 性物質の同定 (国立国際医療研究センター 研究所)	国立国際医療研究センター 研究 所・疾患制御研究部 室長 (同上)	40
新藏 礼子 (兼任)	腸管 IgA 抗体による腸内細菌制御機 構の解明と応用 (長浜バイオ大学 バイオサイエンス学 部)	長浜バイオ大学 バイオサイエンス 学部 教授 (同上)	51
成 耆鉉 (専任)	胎児プログラミング仮説の分子機構 の解明と医療への応用 (理学研究所 石井分子遺伝学研究 室)	科学技術振興機構 さきがけ研究 者 (理化学研究所 基幹研究所 研究 員)	40
丹羽 隆介 (兼任)	個体の発育の恒常性を調節する器 官間液性因子ネットワークの解明 (筑波大学 大学院生命環境科学研究 科)	筑波大学 大学院生命環境科学研 究科 准教授 (同上)	41
山口 良文 (兼任)	冬眠を可能とする生体状態の可視化 とその誘導メカニズムの解明 (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 助教 (同上)	39
渡部 徹郎 (兼任)	血管の動的恒常性の破綻による疾 患進展機構の解明 (東京医科歯科大学 大学院医歯学総 合研究科)	東京医科歯科大学 大学院医歯学 総合研究科 教授 (東京大学 大学院医学系研究科 准教授)	46

# 研究報告書

## 「褐色脂肪-骨格筋間の新たな臓器間ネットワークの解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 9 月～平成 27 年 3 月

研究者: 梶村真吾

### 1. 研究のねらい

ほ乳類には二種類の形態的・機能的に異なる脂肪細胞(白色脂肪細胞と褐色脂肪細胞)が存在する。白色脂肪細胞が主に余剰エネルギーの貯蓄庫として機能するのに対し、褐色脂肪細胞は発熱によってエネルギーを消費し、体温の保持に重要な役割を持つ特殊な細胞である。近年、ヒト成人においても予想以上に多くの褐色脂肪が存在することが明らかになり、その生体内における役割と肥満治療への可能性に注目が集まっている。従来、褐色脂肪の生理学的意義は熱産生による体温調節が主とされてきたが、近年の研究から、褐色脂肪は単なる熱産生器官ではないことが示唆されている。本研究では特に、褐色脂肪と骨格筋の間をつなぐ新たな液性因子を同定し、その生体内におけるエネルギー代謝・糖代謝の恒常性維持に関わる機能の解明を目指す。

### 2. 研究成果

#### (1)概要

従来、褐色脂肪の生理学的意義は熱産生による体温調節が主とされてきた。しかし、近年の研究から、褐色脂肪は単なる熱産生器官ではないことが示唆されている。例えば、褐色脂肪細胞の分化に必須である因子を欠損させたマウスは、褐色脂肪細胞の分化・発生が顕著に減退するのみならず、肥満表現系が現れる前段階で脂肪肝や骨格筋や肝臓におけるインスリン抵抗性が認められる。その逆の例として、褐色脂肪(特にベージュ細胞の分化)を活性化したマウスモデルでは、高脂肪食下において脂肪肝や骨格筋や肝臓におけるインスリン抵抗性の顕著な改善が認められる。これらの褐色脂肪を介した代謝恒常性の変化は、体重の変化のみでは必ずしも説明がつかないため、褐色脂肪細胞が熱産生以外の機能を介して代謝恒常性維持に関わっていることが示唆される。その一つとして、褐色脂肪と、肝臓や骨格筋など末梢組織との間で分泌因子を介した臓器間ネットワークを形成していることが示唆される。例えば、褐色脂肪から分泌される因子群(Slit2 など)が骨格筋や肝臓へ作用し、エネルギー代謝や糖代謝の恒常性維持に重要な役割を持つことが考えられる。

#### (2)詳細

熱産生機能を有する褐色脂肪細胞には二種類の細胞群:胎児期にすでに細胞運命が決定している「既存型」(classical brown adipocyte)と、成人期において様々な環境要因(例えば長期の寒冷刺激など)により白色脂肪細胞から分化誘導されるベージュ細胞(beige adipocyte)と呼ばれる「誘導型」の褐色脂肪細胞が存在する。我々は近年、ヒト成人の首近辺に存在する褐色脂肪

はベージュ細胞に近い性質を持つことを明らかにし、ベージュ細胞の重要性が認識されつつある (Shinoda et al., Nature Medicine 2015)。

従来、褐色脂肪の生理学的意義は熱産生による体温調節が主とされてきた。しかし、近年の知見から、褐色脂肪は単なる熱産生器官ではないことが示唆されている。その仮説を支持する本研究期間中に得られた知見を以下に示す： 1)我々は褐色脂肪細胞の分化に必須であるメチル化転換酵素(EHMT1)を同定し、脂肪細胞特異的に欠損させたマウスを作成した。EHMT1 の脂肪特異的欠損マウスは、褐色脂肪細胞の分化・発生が顕著に減退するのみならず、肥満の表現系が現れる前の時点から顕著な脂肪肝や骨格筋や肝臓におけるインスリン抵抗性が認められる (Ohno et al., Nature 2013)。 2)褐色脂肪(褐色脂肪細胞とベージュ細胞)の熱産生機能を亢進する低分子化合物を同定し、高脂肪食下のマウスに投与すると、熱産生の亢進のみならず、脂肪肝の改善や骨格筋や肝臓におけるインスリン抵抗性の顕著な改善が認められた (Galmozzi et al., Cell Reports 2014)。 3)ベージュ細胞の分化に重要なリン酸化酵素(CK2) を同定し、アンチセンスオリゴの投与によりベージュ細胞分化を選択的に亢進すると、脂肪肝の改善や骨格筋や肝臓におけるインスリン抵抗性の顕著な改善が認められた (Shinoda et al., Cell Metabolism 2015)。これらの褐色脂肪を介した代謝恒常性の変化は、体重の変化のみでは必ずしも説明がつかないため、褐色脂肪細胞が熱産生以外の機能を介して代謝恒常性維持に関わっていることが示唆される (Kajimura et al., Cell Metabolism 2015)。

その一つとして、ベージュ細胞と肝臓や骨格筋など末梢組織との間で分泌因子を介した臓器間ネットワークを形成していることが上げられる。例えば、骨格筋由来の Irisin や 肝臓由来の FGF21 などの分泌因子がベージュ細胞の分化を誘導することが報告されている。一方、ベージュ細胞より分泌されるペプチド分泌因子として Slit2 が一例として挙げられる (Svensson et al., Cell Metabolism 2016)。さらに複数のベージュ細胞由来の分泌因子の存在が示唆され、さらに仔細な機能解析を今後発展させていく予定である。

### 3. 今後の展開

当初の予想以上に、ベージュ細胞の熱産生以外の機能が糖代謝の恒常性維持に重要な役割を持つことが示唆された。今後、ヒトにおける知見を含めて、新たな褐色脂肪の機能を探索していきたい。

### 4. 評価

#### (1)自己評価

(研究者)

- ・ 大まかな仮説はおそらく正しいが、仔細な作用機序の解明を含めて詰め切れない部分が残ることから、目的達成には遠い。
- ・ スピンオフした研究分野が予想外に発展する見込みであることは良かった。
- ・ さきがけを通じた共同研究が複数立ち上がったことは大変良かった。

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

評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

本研究課題では、褐色脂肪と骨格筋の間をつなぐ新たな液性因子を同定し、その生体内におけるエネルギー代謝・糖代謝の恒常性維持に関わる機能の解明を目指した。その結果、褐色脂肪細胞の分化に必須である因子を欠損させたマウスは、顕著な脂肪肝や、骨格筋や肝臓におけるインスリン抵抗性が認められた。さらに、褐色脂肪(褐色脂肪細胞とベージュ細胞)の熱産生機能を亢進する低分子化合物を同定し、高脂肪食下のマウスに投与すると、熱産生の亢進のみならず、脂肪肝の改善や、骨格筋や肝臓におけるインスリン抵抗性の顕著な改善が認められた。このように、褐色脂肪の熱産生以外の機能が糖代謝の恒常性維持に重要な役割を持つことが示唆され、ヒトにおける知見を含めて、新たな褐色脂肪の機能を探索することにより、新たな糖代謝異常疾患の治療戦略の展開が期待される。

本研究者は、さきがけ研究により、国際的な表彰を受賞しており、原著論文も含め、総説等の執筆も増えており、また、他領域のさきがけ研究者との共同研究にも発展しており、研究者としての飛躍につながった。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Shinoda K., Ohyama K., Hasegawa Y., Chang H-Y, Ogura M., Sato A., Hong H., Hosono T., Sharp L.Z., Scheel D.W., Graham M., Ishihama Y., & **Kajimura S.** (2015). Phosphoproteomics Identifies CK2 as a negative regulator of beige adipocyte thermogenesis and energy expenditure. *Cell Metabolism* 22(6):997-1008.
2. **Kajimura S.**, Spiegelman B.M. & Seale P. (2015). Brown and beige fat: Physiological roles beyond heat-generation. *Cell Metabolism* 22(4):546-559.
3. Shinoda K., Lujten I. H.N., Hasegawa Y., Hong H., Sonne S. B., Xue R., Chondronikola M., Kim M., Cypess A.M., Tseng Y., Nedergaard J., Sidossis L.S., & **Kajimura S.** (2015). Genetic and functional characterization of clonally-derived adult human brown adipocytes. *Nature Medicine* 21(4):389-394. PMC4427356
4. Galmozzi A.\*, Sonne S.B.\*, Keylin S., Hasegawa Y., Shinoda K., Lujten I., Chang J.W., Sharp L.Z., Cravatt B. F., Saez E., & **Kajimura S.** (2014). ThermoMouse: an in vivo model to identify modulators of UCP1 expression in brown adipose tissue. *Cell Reports* S2211-1247. PMC4268417 (Selected in Faculty1000)
5. Ohno H., Shinoda K., Ohyama K., Sharp L.Z. & **Kajimura S.** (2013). EHMT1 controls brown adipose cell fate and thermogenesis through the PRDM16 complex. *Nature* 504(7478):163-167. PMC3855638 (Selected in Faculty1000) Comment in “An enzymatic chromatin switch that directs formation of active brown fat.” [Cell Metabolism. 2014]
6. Ohyama K, Nogusa Y, Shinoda K, Suzuki K, Bannai M, & **Kajimura S.** (2016). A synergistic anti-obesity effect by a combination of capsinoids and cold temperature through promoting beige adipocyte biogenesis. *Diabetes*. In press

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

受賞

2015 NISTEP Award, National Institute of Science and Technology Policy, Japan

2014 The Helmholtz Young Investigator in Diabetes Award (HeIDI Award), Nature Medicine

2014 Baker IDI Metabolism & Inflammation Distinguished Lecture

2013 The Presidential Early Career Award for Scientists and Engineers from the White House (PECASE Award)

2013 Pew Scholar

著作物

- 1.実験医学 2014年2月号 Vol.32 No.3 生活習慣か,遺伝か,腸内細菌か? 肥満克服のサイエンス～代謝の変容と脂肪細胞の制御から,最新治療まで 単行本 use pre formatted date that complies with legal requirement from media matrix - 2014/1/21 梶村 真吾 (編集)
- 2.実験医学増刊 Vol.34 No.2 「解明」から「制御」へ 肥満症のメディカルサイエンス 単行本 use pre formatted date that complies with legal requirement from media matrix - 2016/1/21 (編集) 梶村 真吾 ・ 箕越 靖彦

# 研究報告書

## 「骨を要とする多臓器恒常性維持機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者: 片山 義雄

### 1. 研究のねらい

骨を要としたネットワークの破綻により引き起こされる多臓器不全の理解とその制御をねらいます。硬組織である骨の機能異常に基づく骨粗鬆症・造血幹細胞ニッチ制御不全・免疫不全・体内脂肪分布不全マウスモデルを独自に確立しており、これによる骨を要とした多臓器間機能的ネットワーク理論の確立をめざし、脳を最上位においた各臓器への一方通行のシグナルではなく、脳との双方向性ないしは脳を介さない骨を起点とした末梢臓器間シグナルネットワークの存在を明らかにします。また、この機構の破綻を疾病罹患素因ととらえる新たな概念に基づくより効果的な先制医療を確立します。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

骨内には「骨細胞」の縦横に張り巡らされたネットワークがあります。一般に重力感知装置として知られるこの細胞が、骨髄中で全ての血球の元となる造血幹細胞の本来の居場所(ニッチと呼びます)の機能を、交感神経からの指令をうけつつ調整していることを明らかにしました。すなわち、脳と血液を骨がつないでいることとなります。また、骨細胞ネットワークは、骨から離れた免疫臓器である胸腺でのリンパ球造血機能も司っていることがわかりました。加えて、皮下や内蔵といった全身の脂肪の保持に必須の役割も担っており、更に脳と協調して肝臓への脂肪の蓄積も調整していることが明らかになりました。すなわち、「骨」は一部脳と相談しつつ、実際には隣接した骨髄機能のみでなく免疫システムや脂質エネルギー代謝システムといった全身の遠隔臓器機能を統合しており、脳よりもむしろ多臓器間ネットワークの頂点に位置する役割を果たしていることが見えてきました。

#### (2) 詳細

##### 1. 「骨細胞」の骨髄造血システムとの関係

さきがけ研究開始前に、我々は、サイトカイン granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) 投与後に骨髄中の造血幹前駆細胞が末梢血に大量に流出(血液内科で動員とよばれる現象で、既に実臨床では保険診療として応用されています)する際に、G-CSF が骨髄交感神経を刺激してカテコラミンを放出し、造血幹細胞ニッチの一つである骨芽細胞がこの神経シグナルを感知して抑制されることで惹起される事を報告していました(Katayama et al. Cell 2006; Kawamori, Katayama et al. Blood 2010)。この現象に骨表面の骨芽細胞のみでなく、骨組織内に埋もれ骨関連細胞の 90%以上を占め、重力感知装置として知られている「骨細胞」がどのような役割を果たし

ているか検討してみました。

まず、骨表面の骨芽細胞と骨組織に埋もれた骨細胞どちらにはじめに影響が及ぶのかを検討してみました。遺伝子変化を定量的にみていくと、骨芽細胞ではG-CSF投与数日してからその遺伝子変化が生じるのに比べ、骨細胞では初回投与後数時間という急速な抑制系の反応が観察されました。免疫染色で $\beta$  アドレナリン受容体が骨細胞に発現していることを確認し、また機能的にもこれが骨細胞への交感神経支配によるものであることを外科的神経切除実験で示す事ができました。さらに、遺伝子組み換え技術を用いて作製された骨細胞特異的ジフテリア毒素受容体発現マウス(DMP1-DTR T<sub>g</sub> マウス)にジフテリア毒を投与することにより骨細胞を誘導性に除去した上でG-CSFによる動員を検討したところ、骨髄中の造血幹細胞数は骨細胞除去で変わらないものの、G-CSFによる動員はほぼ起きない、すなわち骨組織中の骨細胞が働かなければ骨髄中の造血幹細胞が骨髄から遊離できないことが確認されました。また、骨細胞除去を行うと、骨髄腔側から骨芽細胞性造血幹細胞ニッチをサポートしている骨周辺マクロファージ(osteomacと呼ばれる)が著減することもわかりました。骨芽細胞性造血幹細胞ニッチは、骨髄腔側からマクロファージに、骨組織側からは骨細胞に、双方向から強力に支持されているわけです。ここにG-CSFが投与されることにより、交感神経シグナルによる骨芽細胞直接抑制経路に加え、同じ交感神経シグナルによる骨組織内骨細胞の機能抑制と、これに引き続き骨髄腔のosteomacの抑制がおこり、これらに伴うサポートシグナルの減少、すなわち骨芽細胞ニッチにとっては3つの経路で強力に抑制されることとなります。

これらの研究により、神経系による骨代謝を介した造血システム制御 Brain-Bone-Blood integration の概念が確立しました(5. 主な研究成果リスト 論文リスト 3)。しかし、これは臓器連関の中でも、骨芽細胞性造血幹細胞ニッチという隣り合った臓器における局所的ターゲットを中心にみた構図であり、そこから一步離れて、骨細胞が遠隔臓器を含めた全身に及ぼす影響を以下に述べます。

## 2. 骨組織による免疫・脂質代謝制御

寝たきりの高齢者と宇宙飛行士に共通した臨床症状として、急速に進行する骨粗鬆症は容易に思い至ります。これは微小重力による骨組織内骨細胞への刺激の低下ととらえることは既に一般的に受け入れられている考え方です。もう一つ共通した臨床所見として、免疫不全を我々は想定しました。宇宙飛行士の地球への帰還後のリンパ球の数や機能が異常であることは多くの報告があり、また寝たきりの高齢者の易感染性は臨床的に良く知られています。

一定期間マウスの尾部懸垂により後ろ足のみ荷重負荷を解除すると、この部分の骨組織内骨細胞ネットワークは破綻し、その部分の骨髄中 B リンパ球数は著明に減少していました。ところが、前足は地上に着いているため全身的な荷重除去ではなく、末梢血の B リンパ球を含めた血球数は全て正常でした。重力シグナルと局所リンパ球造血の関係を骨を介して説明する一例と考えられます。更に深く骨細胞とリンパ球造血の関係を探るため、DMP1-DTR T<sub>g</sub> マウスに骨代謝がほぼ平衡となる 15 週齢でジフテリア毒を投与し骨細胞除去(osteocyte-less:OL)マウスを作成しました。OL マウスでは骨細胞ネットワークの破綻に伴い、末梢血中の B/T リンパ球の減少、胸腺の著明な萎縮、脾臓の萎縮が見られました。骨髄球系細胞の低下は認められず、リンパ球系特異的な減少でした。

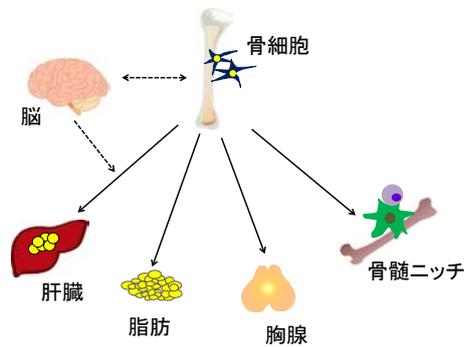
次に、リンパ球造血に必須の一次リンパ臓器を詳細に検討しました。B リンパ球の一次リンパ臓器は骨髄です。OL マウスの骨髄では、B リンパ球前駆細胞(免疫グロブリン陰性分画)が著明に減少していました。分化段階を詳細に解析すると造血幹細胞や共通リンパ球前駆細胞といった非常に未分化な部分は大きな減少は見られませんでした。一方、pro-B/pre-B 細胞と呼ばれる骨髄支持細胞依存的な細胞集団が特異的に減少していました。一方骨髄球系の前駆細胞数や造血幹細胞は正常であり、この異常がやはりリンパ球造血特異的なものであることが再確認されました。次に、B リンパ球造血を培養で再現できる長期骨髄培養を行いました。野生型マウスの骨髄からは6週間以上の長期にわたるBリンパ球造血を造血支持細胞とともに培養皿の中で再現できますが、OL マウスの骨髄からはBリンパ球は産生されず、培養皿底面の付着系細胞もフローサイトメリーの解析で本来Bリンパ球造血をサポートするはずの間葉系細胞が野生型の培養では30-40%認められるものの、OL マウスの培養ではほぼ消失していました。一方、骨髄球系の長期培養では野生型、OL マウスいずれからも、長期に骨髄球系前駆細胞の産生をサポートする間葉系支持細胞が同じように確認できました。すなわち、骨細胞を除去した OL マウスの骨髄では、Bリンパ球特異的にサポートする間葉系支持細胞が欠落していたわけです。

次に、Tリンパ球の一次リンパ組織である胸腺の解析を行いました。OL マウスでは胸腺は著明に萎縮しますが、免疫染色ではこれは胸腺皮質間葉系支持細胞の減少によるものでした。すなわち、骨髄でのBリンパ球造血同様、血球そのものではなく環境側の異常に起因することが示唆されました。これを確認するため、2匹のマウスの側腹部を手術でつなぎ、側腹血行路を介し血流を共有させたパラバイオシスモデル(併体接合)を用いました。野生型とDMP1-DTR Tg の2匹をパラバイオシスとし、両者にジフテリア毒を投与することにより、DMP1-DTR Tgのみ OL マウスとなるも、血流は野生型と共有されている状態ができあがります。このモデルでは、血行性の液性因子(ホルモンなど)やTリンパ球前駆細胞も隣のマウスに移動できます。OL マウス由来のTリンパ球前駆細胞は野生型マウスの胸腺で正常に分化することができましたが、野生型マウス由来のTリンパ球前駆細胞はOL マウスの胸腺で分化増殖ができませんでした。この実験で、OL マウスでの胸腺萎縮は、血球側ではなく環境側の問題であることが強く考えられました。骨組織とは明らかに離れた免疫臓器が骨で制御されている構図です。

またOL マウスでは急速に体重が低下します。これは、全身の脂肪組織の消失に起因していました。失われた脂肪は決して肝臓に貯留しているわけではなく、むしろ肝臓内の脂肪も減少している傾向でした。これは、高脂肪食を食べさせて脂肪肝にした状態で骨細胞除去をしても同様であり、通常食マウスより非常に厚い皮下脂肪とともに肝内脂肪も消失しました。一方、視床下部の摂食中枢を化学的に破壊することで過食となり非常に脂肪層の厚くなったマウスでも骨細胞除去により同様に皮下脂肪や内蔵脂肪は消失しましたが、この場合は肝臓が激しい脂肪肝となりました。遺伝子解析より、脳の部位によっては摂食中枢の破壊そのもので、また脳の別の摂食中枢を破壊した上での骨細胞除去によっても、肝臓での脂肪クリアランスを司る遺伝子の発現が抑制されていたため、肝での脂肪排出機能異常が原因の一つと考えられました。これらから、骨細胞は全身の脂肪の適切な保持に必須の役割を果たしていること、またこの調整機能は脳や肝臓と協調して行われている構図が見えて来ました。

このマウスを約3ヶ月間そのまま飼育していると、骨細胞の再生とともにこれらリンパ球数や脂肪量は回復するため、やはり骨細胞とリンパ球造血・脂肪調整は深く関連していることが示唆されました。以上のことから、骨組織内骨細胞は、隣接している骨髄のみでなく、胸腺、脂肪、肝臓と

いった遠隔臓器をも機能的に調整している、すなわち「骨を頂点とした多臓器連関」の構図が見えて来たわけです(右図)(5. 主な研究成果リスト 論文リスト2)。



以上より、当初のさががけ研究目的の一つである「骨を要とした多臓器間機能的ネットワーク理論の確立」は達成され、脳を最上位においた各臓器への一方通行のシグナルではなく、脳との双方向性ないしは脳を介さない骨を起点とした末梢臓器間シグナルネットワークの存在が明らかになりました。しかし、この連関の分子メカニズムの解明や、この機構の破綻を疾病罹患素因ととらえる新たな概念の構築とそれに基づくより効果的な先制医療の確立に関しては、さががけ研究期間内に十分達成することができず、今後の研究課題として残りました。現在、これらの研究を進めているところで、その重要性についても啓蒙を進めています(5. 主な研究成果リスト 論文リスト1)。

### 3. 今後の展開

本研究で明らかとなった「骨」を頂点とした多臓器間ネットワークは、骨疾患・血液疾患・免疫異常・脂肪エネルギー代謝異常など全身疾患に対して、深い病態理解のみでなく、科学的理論に基づいた骨への刺激や運動、既存の薬剤による本来の薬効と違った利用法による新たな治療や効果的に予防していく先制医療への応用が期待されます。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

申請時に打ち立てた研究目的のうち、最も重要である「骨を要とする多臓器恒常性維持機構」の存在は証明できました。この目的のための研究実施体制構築や研究費執行もほぼ予定通り進行できています。実質的なラボの規模から考えると、いただいた研究費を無駄にすることなく、比較的スムーズに具体的成果につなげて行く作業ができたと思っております。しかし、私個人としては、研究内容が部分的に論文化されたことも大事ではありますが、本研究に携わってくれた研究者の研究に対する意識、すなわち、論文作製済みの2人がいずれも海外でポスドクとして研究の研鑽を続けていること、現在携わってくれている大学院生も、研究を続けて行きたい希望があると聞いている事が、研究責任者として何よりうれしく、本研究計画の大きな隠れた成果のひとつと考えております。

現在はまだ、「骨を要とする多臓器恒常性維持機構」の存在を示したに過ぎませんが、今後、骨を起点とする連鎖的臓器破綻シグナルの実態が明らかになれば、免疫不全、脂質代謝異常を是正する全く新規の薬理標的が見つかる可能性が高いと考えられます。おそらく老化に伴う免疫不全や脂質代謝異常にも大きく影響してくる事が予想され、対象は疾患特異的では

なく人類全てになるため、社会的にも大きなインパクトをもたらす展開が予想されます。

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

(研究総括)

本研究課題は、骨を要とした多臓器間機能的ネットワークの解明をめざして行われ、具体的には重力を感知する骨細胞を除去したマウスを作成し、それをを用いて、骨細胞が骨髄中で造血幹細胞のニッチの機能を交感神経からの指令をうけつつ調整していることを明らかにした。また、この骨細胞除去マウスでは胸腺が皮質間葉系支持細胞の減少により著明に萎縮しており、また、全身の脂肪組織も消失していた。すなわち、骨組織内骨細胞は隣接している骨髄のみでなく胸腺、脂肪といった遠隔臓器にも影響を及ぼしていることが明らかとなった。

以上から、「骨を要とする多臓器恒常性維持機構」の存在が明確になった。本研究者は、さきがけ研究により、インパクトのある原著論文を発表し、新しい分野のトップランナーとして注目され、研究者としての飛躍につながった。

## 5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Asada N, Sato M, Katayama Y. Communication of bone cells with hematopoiesis, immunity and energy metabolism. *Bonekey Reports* 2015, 4, 748. (invited review article)
2. Sato M, Asada N, Kawano Y, Wakahashi K, Minagawa K, Kawano H, Sada A, Ikeda K, Matsui T, Katayama Y. Osteocytes regulate primary lymphoid organs and fat metabolism. *Cell Metabolism* 2013, 18, 749–758.
3. Asada N, Katayama Y, Sato M, Minagawa K, Wakahashi K, Kawano H, Kawano Y, Sada A, Ikeda K, Matsui T, Tanimoto M. Matrix-embedded osteocytes regulate mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells. *Cell Stem Cell* 2013, 12: 737–747.

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

プレスリリース「骨が免疫を育て脂肪バランスを整える～骨をターゲットにした新たな治療戦略の提示へ～」(2013年10月) <http://www.jst.go.jp/pr/announce/20131018/>

# 研究報告書

## 「恒常性維持・変容を支える細胞内分解系オートファジーの生理的意義」

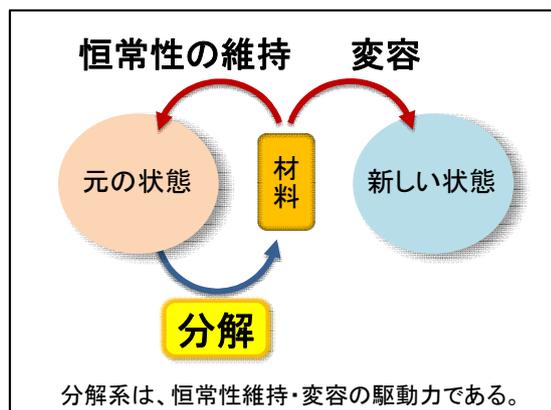
研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 9 月～平成 28 年 3 月

研究者: 久万 亜紀子

### 1. 研究のねらい

生体は動的に恒常性を維持し、あるいは変容して生きている。恒常性の維持とは、生体の内部環境をほぼ一定に保つことであり、例えば古くなった物を新しい物と交換することで元の状態を維持する。一方変容とは、新しい状態を作り出すことであり、分化や環境変化（栄養飢餓など）への適応が挙げられる。例えば、分化に際しては細胞内構成因子が大きく入れ替わり、飢餓に対しては



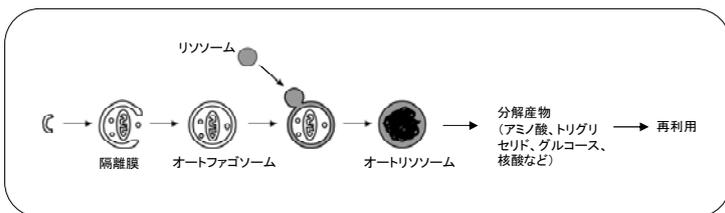
代謝系が大きく変化する。恒常性の維持・変容を生み出すためには材料が必要である。代謝回転の盛んな生体では、材料の調達手段として分解系が特に重要となる。分解産物を新たな合成の材料として提供できるからである。また分解系によって、既存物を消去することも新しい環境を作るうえで有効である。よって、壊すこと(分解系)が作り出すことを支えていると言える。分解系の中でも、タンパク質分解は既存のタンパク質を分解してアミノ酸を細胞に供給し、それが新しいタンパク質の合成を可能にするため、恒常性の維持・変容においては特に重要であると考えられる。本研究のねらいは、「タンパク質分解系は恒常性維持・変容を生み出すための駆動力となるプロセスである」(図1)という立場から、細胞内の主要な分解系であるオートファジーを理解し、生体の恒常性維持・変容機構の解明に挑戦することである。具体的には、オートファジーの生理機能と制御機構に焦点を当てる。これらは、オートファジー分野における最重要課題の1つであるが、従来の方法ではオートファジーの一側面だけの評価であったり、生理条件を十分に反映させるのが難しかったりした。本研究では、申請者らが作製した新しいモデルマウスを活用し、メタボローム解析やグルコースクランプなどの実験手法を取り入れて、これらの問題に取り組む。これらの解析により、「分解系」という切り口から、生体の恒常性維持・変容機構の理解をめざす。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

オートファジーは、細胞質成分を分解するシステムである。オートファジーが誘導されると、膜が細胞質成分を包み込みながら伸長し、オートファゴソームと呼ばれる小胞を形成する。続いて、オートファゴソームがリソソーム(各種分解酵素を含むオルガネラ)と融合することで、オ

オートファゴソームで包んだ自身が分解される。分解産物は、細胞内で再利用される(図)。オートファジーは摂食・絶食によってその活性がダイ

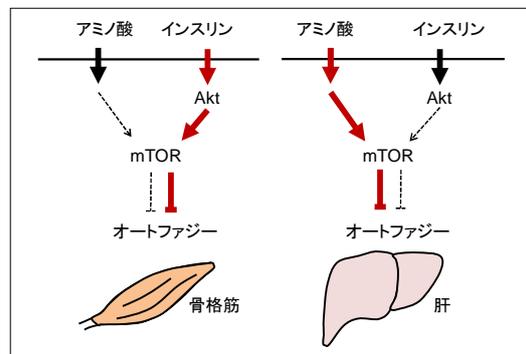


ナミックに制御されるが、その制御機構の詳細は不明である。さらに、これまでの研究からオートファジーが生体内での様々な現象に関わることがわかってきているが、多様な基質をバルクに分解することから、新たな役割が十分に考えられた。そこで本課題では(1)個体におけるオートファジー制御機構の理解、(2) 栄養代謝におけるオートファジーの役割、(3)オートファジーの新たな生理機能の探索という3つのテーマを掲げて取り組んだ。(1)については、摂食によって大きく変動するインスリンおよびアミノ酸によるオートファジーの抑制効果を臓器別に解析した。これにより、肝臓ではアミノ酸、骨格筋ではインスリンによって強く制御されることを明らかにした。これらの単独投与によって、ほぼ摂食と同等にオートファジー活性が抑制されることから、アミノ酸およびインスリンが摂食によるオートファジーの主要な制御因子であると考えられる。(2)については、オートファジー遺伝子 *Atg5* 欠損肝臓の解析を行った。メタボローム解析により、絶食時の酸化が *Atg5* 欠損マウスで低下していること見出し、脂質代謝に重要な転写因子 *PPARα* の活性低下がその原因として考えられた。(3)については、私たちはこれまでオートファジーの生理機能を調べるためにオートファジー遺伝子 *Atg5* 欠損マウスの解析を行ってきた。*Atg5* 欠損マウスは生後1日で死亡するが、その死因は明らかではなかった。今回、*Atg5* 欠損マウスの神経のみにオートファジー活性を回復させたところ、ほぼすべての *Atg5* 欠損マウスが新生仔死亡を回避したことから、*Atg5* 欠損マウスの死因は神経異常(吸啜障害を含む)であることが明らかになった。さらに、このマウスを用いて全身網羅的に表現型解析を行ったところ、新たな表現型として生殖器の異常と鉄吸収異常を見出した。これらの知見は、オートファジーの生理機能および病態への関与を理解する上で重要であり、今後の解析につなげたい。

## (2) 詳細

### 研究テーマ (1) 「オートファジーの制御機構」

**研究成果:** マウス個体において、オートファジーの活性は摂食・絶食によってダイナミックに制御される。本研究では、生体内におけるオートファジーの制御機構を理解することを目的に、摂食・絶食で大きく変動する因子であるインスリンとアミノ酸によるオートファジー抑制効果を、グルコースクランプ法を利用して検討した。その結果、これらの単独投与によって、ほ



ぼ摂食と同等にオートファジー活性が抑制されることから、アミノ酸およびインスリンが摂食によるオートファジーの主要な制御因子であると考えられた。また、骨格筋ではインスリンによってオートファジーが強く抑制されるのに対し、肝臓では抑制効果が弱いことが分かった。一

方、アミノ酸は肝臓のオートファジーを強く抑制することが明らかとなった。

**達成状況:** 臓器による制御の違いが生じるメカニズム解明が課題として残ったが、インスリンとアミノ酸のオートファジー抑制効果を個体で評価した重要な仕事であると考え、平成 25 年 1 月に JBC に投稿し、6 月に受理された (JBC 288; 21074-21081, 2013)。

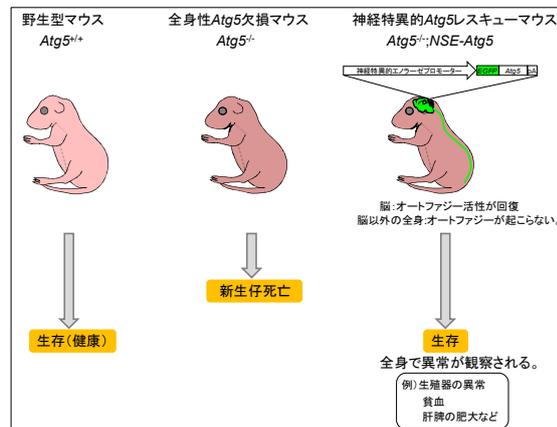
### 研究テーマ (2) 「栄養代謝におけるオートファジーの役割」

**研究成果:** オートファジーによる栄養リサイクルの重要性を明らかにすることを目的に、肝特異的 *Atg5* ノックアウトマウスの肝臓のメタローム解析を行った。オートファジー欠損により解糖系・ $\beta$ 酸化・アミノ酸・リン脂質代謝系の代謝中間体に影響が出ることが明らかとなった。特に、*Atg5* 欠損肝では絶食時のアセチル CoA およびケトン体の濃度が低く、 $\beta$ 酸化の低下が疑われたため、本研究では脂質代謝に注目した解析を行った。コントロールマウスでは、絶食により脂肪組織から供給された脂肪酸が肝臓でトリグリセリドとして蓄積されるが、*Atg5* 欠損肝では観察されなかった。脂肪酸代謝過程の主要因子の発現を mRNA レベルで調べたところ、*Atg5* 欠損肝では脂質代謝の主要制御因子である PPAR  $\alpha$  の発現と活性化が強く抑制されていることが分かった。PPAR  $\alpha$  の発現および活性低下は、培養細胞における *Atg5* ノックアウトおよびノックダウンでも確認され、オートファジー欠損によるプライマリーな異常であると考えられた。オートファジーが転写活性調節に参与する可能性を含め、解析を進めている。

**達成状況:** オートファジーによる栄養リサイクルの重要性を解明する目的であったが、肝臓では様々な表現型が観察されリサイクルのみを解析することが難しいと判断し、脂質代謝に注目した表現型解析に計画を変更した。このため進行が遅れた。

### 研究テーマ (3) 「オートファジーの生理機能」

**研究成果:** 私たちはこれまでオートファジー遺伝子 *Atg5* 欠損マウスを用いて、オートファジーの生理機能解析を行ってきた。*Atg5* 欠損マウスは生後 1 日で死亡するが、その死因は明らかではなかった。今回、*Atg5* 欠損マウスの神経のみにオートファジー活性を回復させたところ、ほぼすべての *Atg5* 欠損マウスが新生仔死亡を回避した。よって、*Atg5* 欠損マウスの死因は神経異常 (吸啜障害を含む) であることが明らかとなった。



さらに、この神経特異的 *Atg5* レスキューマウスを用いて全身網羅的に表現型解析を行ったところ、成長不全、肝脾腫、複数組織における炎症、生殖器の委縮、鉄欠乏、貧血などを認めた。特に顕著であった生殖器の委縮と鉄欠乏について、詳細な解析を行った。

神経特異的 *Atg5* レスキューマウスの雄では、精巣・精嚢が小さく、成熟精子の減少、唾液腺の導管発達不全が見られた。雌では、卵巣・子宮が小さく、黄体が形成されない。これらはテストステロンおよび性腺刺激ホルモン (LH, FSH) の低下によるホルモン制御異常に起因することが示唆された。また、神経特異的 *Atg5* レスキューマウスは鉄欠乏性貧血を呈し、小腸上皮細胞における鉄吸収に関連する因子 (フェロポーチン、DMT1) の発現低下が観察され

た。その原因としてこれらの因子の転写誘導不全が疑われた。

**達成状況:** (1) 神経でオートファジー活性を回復させれば *Atg5* 欠損マウスの新生仔死亡がレスキューされること、(2) アダルトマウスの全身表現型解析結果、これら2つをまとめて論文投稿した。さきがけ研究期間内には、鉄吸収異常およびホルモン低下を伴う性腺委縮の発症機序までは明らかにできなかったが、オートファジーの生理機能理解への手掛かりとして今後の解析につなげたい。

### 3. 今後の展開

今回、神経特異的 *Atg5* レスキューマウスの全身解析を通じて、オートファジー遺伝子欠損の影響が免疫系、脂肪組織、生殖器に大きく出ることが明らかとなった。また、鉄欠乏による貧血が確認された。今後は、これらの発症機序を明らかにすることで、オートファジーの生理機能および病態への関与を理解したい。また、今回、オートファジーによる細胞内クリアランス作用を臓器間で比較するなど、このマウスモデルでしか成し得ない貴重な知見を得ることができた。オートファジーによる細胞内タンパク質の品質管理における寄与は、肝や骨格筋で大きかったが、他の臓器では顕著ではなかった。このことから、従来言われているクリアランス不全がすべての表現型を説明できるわけではないことは明らかである。今後、このモデルマウスを用いて、各臓器におけるオルガネラの品質やオートファジー選択的基質 p62 蓄積の表現型への寄与などを評価することで、いままで様に議論されていたオートファジーの生理的役割の臓器ごとの違いが明らかになると考えられる。オートファジーの生理的意義のさらなる理解へとつなげたい。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

本研究では、3つの研究テーマを掲げて取り組んだ。

(1) 個体におけるオートファジー制御機構の理解

(2) 栄養代謝におけるオートファジーの役割

(3) オートファジーの新たな生理機能の探索

研究テーマ(1)と(3)については、一定の成果が得られ、おおむね当初の目的を達成できたと考える。研究テーマ(2)については、当初、オートファジーによる栄養リサイクルの重要性を解明する目的であったが、肝臓では様々な表現型が観察されリサイクルのみを解析することが難しいと判断し、脂質代謝に注目した表現型解析に計画を変更した。このため進行が遅れた。研究テーマ(3)で解明した *Atg5* 欠損マウスの新生仔死亡の原因については、2004年の論文報告以降、未解決の問題として分野に残された課題であり、本研究でこの問題を解決したことは特筆に値する。また、オートファジー遺伝子欠損マウスは生後1日で死亡するため、アダルトマウスにおける全身解析ができなかった。本研究において初めて全身網羅的解析が可能となり、全身観察結果を論文にまとめたことには大きな意義があったと考える。また、オートファジーによる細胞内クリアランスの作用を臓器間で比較するなど、このマウスモデルでしか成し得ない、貴重な知見を得ることができた。本研究をさらに発展させ、オートファジーの生理機能の理解

へとつなげたい。

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

(研究総括)

本研究課題は、オートファジーの生理機能と制御機構に焦点を当て、生体の恒常性維持・変容機構の解明に挑戦することであり、具体的には、摂食によるオートファジーの主要な制御因子は臓器によって異なり、肝臓ではアミノ酸、骨格筋ではインスリンであることを見出した。さらに、オートファジー遺伝子 Atg5 欠損マウスは生後1日で死亡するが、Atg5 欠損マウスの神経のみにオートファジー活性を回復させたところ、ほぼすべての Atg5 欠損マウスが新生仔死亡を回避できたことにより、オートファジー欠損での全身網羅的な表現型解析が可能となり、これらのマウスでは生殖器の委縮と鉄欠乏が特に顕著であることを見出し、その分子機序を解析中である。本マウスを用いた今後の研究により、さらにオートファジーの全身における生理的意義の理解が進むことが期待される。研究費は、計画通りの予算で研究を実施することができた。

本研究者は、さきがけ研究により、国内の学会ではあるが招待講演も多数実施しており、原著論文も含め、総説等の執筆も増えており、また、他領域のさきがけ研究者との共同研究にも発展しており、今後の活躍が十分に期待される。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Takako Naito, Akiko Kuma, and Noboru Mizushima Differential contribution of insulin and amino acids to the mTORC1-autophagy pathway in the liver and muscle. <i>The Journal of Biological Chemistry</i> (2013) 288(29) 21074-81.
2. Takako Watanabe-Asano, Akiko Kuma, Noboru Mizushima Cycloheximide inhibits starvation-induced autophagy through mTORC1 activation. <i>Biochemical and Biophysical Research Communications</i> (2014) 445(2) 334-9.
3. 投稿中。

### (2) 特許出願

研究期間累積件数:0件

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

[招待講演]

1. 久万亜紀子「新規モデルマウスによるオートファジーの生理機能解析」第35回日本分子生物学会年会、ワークショップ、福岡、2012年12月11日
2. 久万亜紀子「哺乳動物におけるオートファジーの生理機能」日本農芸化学会2014年度大会、シンポジウム、東京、2014年3月30日
3. 久万亜紀子「哺乳動物におけるオートファジーの生理機能」第77回日本生化学会大

会、シンポジウム、神戸、2014年10月16日

4. 久万亜紀子「Physiological role of autophagy in mammal」日本薬学会第135年回、シンポジウム、神戸、2015年3月27日

[邦文著書]

1. 8章:哺乳類におけるオートファジーの生理的役割  
水島昇・吉森保 編「オートファジー:生命をささえる細胞の自己分解システム」化学同人 100-116 (2015)
2. 久万亜紀子、水島昇「代謝とオートファジー」  
春日雅人 編集「糖尿病学イラストレイテッド」羊土社 285-290 (2012)

[邦文総説]

1. 久万亜紀子、水島昇 栄養代謝とオートファジー 生体の科学 65: 339-343 (2014)
2. 久万亜紀子、水島昇 オートファジーの生理機能 Diabetes Frontier 24: 493-500 (2013)
3. 吉井紗織、久万亜紀子、水島昇 オートファジーの生理機能 Bio Clinica 28: 622-626 (2013)
4. 貝塚剛志、久万亜紀子、水島昇 mTOR によるオートファジー制御 細胞工学 31:1313-1317 (2012)

# 研究報告書

## 「ヒト生体ホメオスタシス維持の安定化および攪乱に寄与する新規生理活性物質の同定」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 9 月～平成 28 年 3 月

研究者: 佐伯久美子

### 1. 研究のねらい

ヒト生体の恒常性維持機構の解析においては、1)ヒト検体が入手できない(希少性・コスト・倫理的問題・医学的問題・安全性)、2)ヒト検体は入手できるが機能変性を生じるため研究に使用できない、3)適切な動物モデルがない、などの理由から研究が遅れている領域がある。これらの問題に対して、無限増殖能と多能性分化能を持つ「ヒト多能性幹細胞」から高品質な細胞を作製して研究を行うことは極めて有用である。本課題では、日本人の健康寿命の延長に向けた治療開発の重要性が高い「虚血疾患」と「糖代謝異常」を対象に、病態を「恒常性維持機構の破綻」という立場から理解すべく「血管内皮細胞」と「褐色脂肪細胞」に注目して研究を行う。心筋梗塞などの虚血疾患は動脈狭窄を原因として発症するが「動脈の恒常性維持」における内皮細胞の役割は示されていない。ヒト検体から調製した「初代培養内皮」を用いた従来の研究では、内皮が平滑筋の増殖を促進する(動脈狭窄を助長する)という、臨床経験と矛盾する知見が報告されていた。ヒト検体からの調製過程で受ける様々なストレス(剥離等の物理的ストレス、酵素処理等の化学的ストレスなど)により細胞機能は変調するため「ヒト生体の恒常性維持機構」を正しく理解できない。一方、ヒト多能性幹細胞から作製した「フレッシュな内皮細胞」を用いれば正しい理解を得ることができる。また肥満/代謝異常の治療開発に向けて「燃える脂肪」として注目される「褐色脂肪細胞」もヒト検体は入手できない。量が少なく(希少性)、採取による肥満/代謝異常の発症リスクの増大も懸念される(医学的問題)。また検出には PET-CT という高額機器を要し(コスト)、放射線被爆も伴うことから(安全性)、褐色脂肪を検出しやすい多い若年層への実施に議論がある(倫理的問題)。さらに蛋白分解酵素や RNA 分解酵素を高発現するため、動物検体を用いても蛋白/遺伝子発現を正しく解析することは困難である。このため肥満防止や代謝向上の効果が報告されているにも関わらず「代謝の恒常性維持」における褐色脂肪細胞の役割は解明されていない。脂肪燃焼によるカロリー消費が関係すると考えられたきたが、否定的な見解が蓄積している。ヒト多能性幹細胞から作製した「高品質な褐色脂肪細胞」を用いた研究を実施することで褐色脂肪細胞の役割を正しく理解し、さらに新規な創薬標的を同定することも可能となる。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

虚血性疾患の病態生理を理解するために「血管構造の恒常性維持」における血管内皮細胞の役割を解析した。血管は内膜・中膜・外膜から成り、内膜は血管内腔面を覆う一層の内皮細胞から、中膜は平滑筋細胞から、外膜は線維芽細胞から構成される。血管が傷害されると平滑筋細胞が内膜へ遊走し増殖する。結果、内膜は肥厚して血管は狭窄する。即ち、血管狭窄の実態は平滑筋細胞の過剰増殖である。血管狭窄は内皮が変性/脱落する状況で見られ

るため、臨床的には内皮は平滑筋の増殖を抑制すると考えられる。しかし、ヒト検体から調製した初代培養内皮細胞を用いた実験は、内皮が平滑筋の増殖を促進することを示していた。これは臨床知見とは相容れず、初代培養内皮細胞を用いた研究は「血管構造の恒常性維持」の解析に適さないと考えられる。そこで「ヒト多能性幹細胞」から内皮を作製して解析したところ、フレッシュな内皮は平滑筋の増殖を抑制するが、老化や酸化ストレスにより変性した内皮は平滑筋の増殖を促進した。即ち、内皮には「平滑筋増殖抑制型(善玉)」と「平滑筋増殖促進型(悪玉)」の2種類のものがあることが判明した。また血管傷害モデルマウスへの移植実験から、前者は傷害血管の狭窄を阻止し、後者は狭窄を増悪することが確認された。さらに内皮の形質差を決める分子を探索し、内皮の悪玉化を起す責任遺伝子として Regulator of G-protein signaling 5 (RGS5)を同定し、RGS5 の下流で p38 MAPK が内皮の品質管理に関与することを明らかにした。また肥満・糖代謝異常の病態を理解するため「代謝の恒常性維持」における褐色脂肪細胞の役割を解析した。褐色脂肪細胞はヒト検体が入手できず、動物からも品質を維持した状態で回収することは困難である。そこで、ヒト多能性幹細胞から褐色脂肪細胞を作製して解析した。結果、褐色脂肪細胞は熱産生とは独立に、可溶性因子(ホルモン)を介して糖代謝を改善していることが判明した。この因子は既知のどのホルモンとも分子量が異なり「新規ホルモン」であることが示された。またヒト多能性幹細胞の褐色脂肪分化初期過程での遺伝子発現制御機序を解析した。網羅的遺伝子転写速度解析という新技術を適用することで「転写速度の振動」に着目した独自の解析法を編み出すことで、褐色脂肪分化に関わる新規パスウェイを同定することに成功した。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A「血管狭窄への影響から見た内皮細胞の品質評価の基盤技術の確立」

ヒト血管平滑筋細胞と様々なヒト血管内皮細胞を共培養し、内皮細胞が平滑筋細胞の増殖に与える影響を定量的に評価した。結果、ヒト初代培養血管内皮細胞は、由来する組織の種類に関わらず、平滑筋細胞の増殖を促進した(悪玉内皮)。一方、ヒト ES 細胞から作製した内皮細胞は、ES 細胞の株に関わらず、作製直後のフレッシュな状態では平滑筋細胞の増殖を抑制したが(善玉内皮)、継代を重ねたり酸化ストレスに暴露された後では平滑筋細胞の増殖を促進した(悪玉内皮)。またヒト iPS 細胞から作製した内皮細胞では、株により異なる結果が得られた。レトロウイルスベクターを用いて樹立したヒト iPS 細胞は、ES 細胞と同様の結果を示す株と、作製直後から悪玉の形質を示す株とがあった。一方、センダイウイルスベクターを用いて樹立したヒト iPS 細胞は、作製直後はもちろん、継代を重ねても酸化ストレスへの暴露後も善玉性がよく維持された。このような iPS 細胞の株による違いは、外来遺伝子の染色体挿入の有無に基づくゲノムストレスの差異を反映していると考えられる。即ち、樹立時にゲノムストレスに暴露された iPS 細胞(レトロウイルスベクターで樹立)に由来する内皮は悪玉にシフトし、ゲノムストレスを受けずに樹立された iPS 細胞(センダイウイルスベクターで樹立)に由来する内皮は善玉にシフトする、と考えられる。さらに善玉内皮群と悪玉内皮群で網羅的遺伝子発現解析(マイクロアレイ)を実施し、悪玉群に選択的に発現している遺伝子として Regulator of G-protein signaling 5 (RGS5)を同定した。かつ遺伝子導入実験およびノックダウン実験から RGS5 が「悪玉化遺伝子」であることを確認した(論文1)。さらに蛋白キナーゼの体系的活性測定(proteomic kinase assay)ならびに特異的阻害剤を用いた実験から、p38 MAPK が RGS5

下流で内皮の品質管理(善玉/悪玉)に関わることを見いだした(論文2)。そして内皮分類に関する新しい概念(善玉/悪玉)の妥当性を検証するために、傷害を与えたマウス大腿動脈にヒト iPS 由来内皮(善玉, 悪玉)を移植して動脈狭窄の進行状況を追跡した結果、善玉内皮を移植した大腿動脈は狭窄が阻止されたが、悪玉内皮を移植した大腿動脈は狭窄が増悪した(図1)(論文3)。以上、ヒト血管内皮細胞の品質管理における新規指標として「RGS5 遺伝子発現レベルに基づいた善玉内皮(血管狭窄防止性)と悪玉内皮(血管狭窄増悪性)の分類」に関する基盤技術を確立した(特許1)。

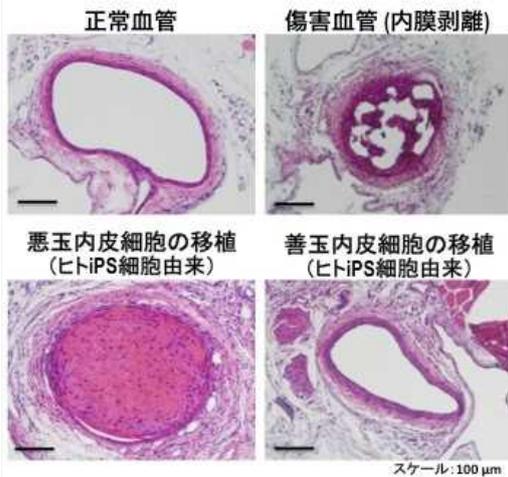


図1 善玉内皮による血管狭窄の防止

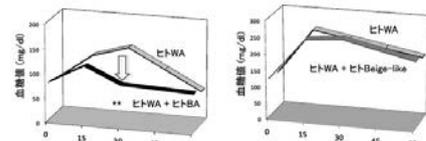


図2 ヒト褐色脂肪細胞の糖代謝改善効果

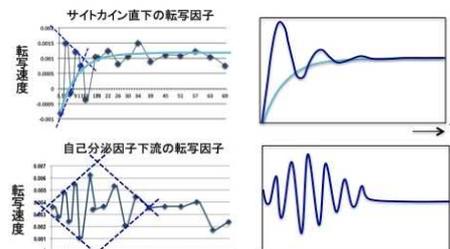


図3 褐色脂肪分化過程の転写速度解析

### 研究テーマ B「ヒト褐色脂肪細胞の糖代謝向上効果の解析技術の開発」

ヒト多能性幹細胞から作製した褐色脂肪細胞(以下、ヒト褐色脂肪細胞)を移植したマウスは、翌日には早々に糖代謝が改善する(Nishio et al., Cell Metab 2012)。これは従来の考え(褐色脂肪細胞は熱産生に伴うカロリー消費による体重減少を介して糖代謝が改善するという考え)を覆す所見であり、糖代謝改善は褐色脂肪細胞が産生する液性因子(ホルモン)を介する作用であることが強く示唆される。このような早い時間経過で糖代謝が改善されることはそれまで知られていなかったが、それは「高品質の褐色脂肪細胞」を得る手段がなかったことに起因する。糖代謝改善と熱産生が独立の現象であることは、ヒト白色脂肪細胞(以下、ヒトWA)を汎用の処理により熱産生能を賦与した細胞(ヒト beige-like)を移植しても、ヒト褐色脂肪細胞(ヒト BA)で見られたような糖代謝改善効果は認められなかったことから支持される(図2)。さらにヒト BA の培養上清(BA-Sup)をマウスに投与すると糖代謝が改善したことから、ヒト BA は糖代謝改善性ホルモンを分泌することが明らかとなった。このホルモンの分子量は既知の糖代謝改善性ホルモンのどれとも異なっていたことから新規分子であることを確認し、現在、当該分子を純化中である。

### 研究テーマ C「ヒト褐色脂肪細胞初期発生過程の遺伝子発現制御システムの解析技術の開発」

それまで解析が全くなされてこなかった「ヒト BA の初期発生過程」を理解するため、ヒト ES/iPS 細胞からの BA 分化誘導過程において経時的(~72 時間後)に網羅的遺伝子発現解析(マイクロアレイ)を実施した。また、特定の時点にて actinomycin-D 処理により転写を停止

させた細胞で経時的(～8時間)にマイクロアレイを行うことで、各メッセージの半減期を算出した。これらの2つの解析結果を組み合わせることで各遺伝子の転写速度を計算した(網羅的遺伝子転写速度解析)。結果、分化培地に添加されているサイトカインの直下で機能する転写因子をコードする遺伝子群の転写速度は、初期時間帯(～14時間)において減衰振動を示すことを見いだした(図3)。BA分化過程では、サイトカイン刺激により直下で機能する転写因子は活性化されて核内に移行して転写を促進した後で分解される。BA分化誘導過程では培地に添加されたサイトカインからのシグナルは常にオンの状態になっているため、分解された分を補充するためには転写因子をコードする遺伝子群の転写が一過性に促進されることとなる。このようなフィードバックシステムが機能することで当該遺伝子群の転写速度に減衰振動が見られると考えると、上記の現象を理解することができる。この考えをさらに発展させると、ヒトES/iPS細胞が分化過程で分泌する因子(autocrine factor)をコードする遺伝子の転写速度には、減衰振動の前に増幅型振動を起すことが想定される。そこで転写速度に増幅減衰型の振動が見られる遺伝子を探索したところ、ヒトBA初期分化誘導過程で機能する「新規なautocrine factor」を同定するができた。

### 3. 今後の展開

#### 研究テーマ A「血管狭窄への影響から見た内皮細胞の品質評価の基盤技術の確立」

血管内皮細胞の悪玉化を引き起こす「RGS5-p38 MAPK signaling axis」の全貌を解明し、血管内皮細胞の悪玉化を阻止する効果のある薬剤を開発する。現在、RGS5-p38 MAPK シグナルの下流で悪玉化に寄与するエフェクター分子を同定しつつある。今後は、当該エフェクター分子の悪玉化への関与を実証したうえで、これを標的とした創薬研究を展開する。現在、Crispr/Cas9システムを駆使し、薬剤スクリーニングに有効な「遺伝子改変ヒトiPS細胞株」の樹立に向けて基礎検討を進めている。「悪玉化エフェクター分子」の阻害薬が開発されると、日本人死因の上位を占める虚血疾患の予防と治療が大きく発展することが期待される。

#### 研究テーマ B「ヒト褐色脂肪細胞の糖代謝向上効果の解析技術の開発」

今後は、ヒトES/iPS細胞から作製した褐色脂肪細胞の培養上清(BA-Sup)中に存在する糖代謝改善因子を純化し、質量分析装置や核磁気共鳴の技術を駆使して当該分子の構造を決定する。これにより「糖代謝改善作用のある新規ホルモン」が同定されるが、必要に応じて構造活性相関解析を行うことで最も有効に作用するホルモン誘導体の作製も行う。将来的には、これらの分子に関して、糖代謝異常(インスリン抵抗性、2型糖尿病)の新規治療薬としての有効性を評価すべく臨床治験を実施する計画である(phase I～III)。

#### 研究テーマ C「ヒト褐色脂肪細胞初期発生過程の遺伝子発現制御システムの解析技術の開発」

網羅的転写速度解析という新技術を適用することで、ヒトES/iPS細胞のBA分化初期過程で機能する新規なautocrine factorを同定することに成功した。現在、この因子をコードする遺伝子を欠損するヒトiPS細胞株を樹立中であり、今後は同株を用いて当該因子の機能につき解析を進めていく計画である。また本技術を適用して、ヒト褐色脂肪細胞発生過程の全貌を明らかにするとともに、同技術を他分野に応用することで様々なヒト組織(肝臓、膵臓、脳など)の発生

過程の解析を行い、多様な疾患に対してそれぞれ新しい創薬標的分子を同定していく計画である。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

(研究者)

##### ■血管内皮細胞の研究に関して:

ヒト血管内皮細胞の品質管理に関する新しい概念(善玉/悪玉)を提唱し、その分子基盤として“RGS5-p38 signaling axis”を同定し、さらに生体における妥当性(in vivo relevance)を移植実験により証明した。それまで誰も知らなかった『善玉内皮』の存在を「ヒト iPS 細胞の分化誘導技術」に立脚した研究により世界で初めて見だし、かつ生体から採取することができない「稀少」かつ「高価値」の細胞を研究対象として取り扱うことを可能にした本研究は、ヒトにおける生体恒常性維持機構の理解に大きく貢献するものとなった。本研究期間内に当初の計画は達成され、新規の研究費を獲得を通じて研究を継続・展開する基盤も整えることができた。現在、世界的に注目されている「疾患特異的マイクロ RNA 解析」の立場に立脚して、内皮の悪玉化を惹起するマイクロ RNA の同定を進めているが、興味深いことにこのマイクロ RNA は内皮の悪玉化のみならず、生活習慣病の様々な病態を再現できることが示唆され、生活習慣病を「生体恒常性維持機構の破綻」として理解することの妥当性を支持するものとなった。今後は、本研究の成果をもとに、基礎研究のみならず創薬研究の展開も睨んで研究を発展させる所存である。

##### ■褐色脂肪細胞の研究に関して:

「ヒト ES/iPS 細胞の高効率褐色脂肪細胞分化誘導技術」の開発に立脚して、それまで誰も知らなかった「ヒト褐色脂肪細胞が分泌する糖代謝改善ホルモン群」の存在を提示した本研究は、21 世紀の国民病とも言われる糖代謝異常の病態把握ならびに創薬研究の発展に貢献するものとなった。今後は上記ホルモンの分子構造を同定して創薬研究を展開する計画である。また本研究では、それまで不可能であった「ヒト褐色脂肪細胞発生過程」を解析するための新技術として「網羅的転写速度解析に立脚した転写速度振動遺伝子の抽出による遺伝子発現制御解析技術」を開発した。これにより褐色脂肪分化に寄与する新規サイトカインの同定にも成功した。このように「独自の培養技術」と「独自の解析技術」の開発に基づき、それまで研究ツールがないための研究が遅れていた、しかしヒト生体の恒常性維持機構の理解とその破綻による疾病の病態解明に重要である「ヒト褐色脂肪細胞」に関する諸解析を可能とした本研究の意義は高く、今後は 21 世紀の国民病である糖代謝異常の治療開発に向けて研究を展開する所存である。

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

(研究総括)

本研究課題は、日本人の健康寿命の延長に向けた治療開発の重要性が高い「虚血性疾患」と「糖代謝異常」を対象に、病態を「恒常性維持機構の破綻」という立場から理解すべく「血管内皮細胞」と「褐色脂肪細胞」に注目してヒト多能性幹細胞を用いて研究を行った。その結

果、内皮には「平滑筋増殖抑制型(善玉)」と「平滑筋増殖促進型(悪玉)」の2種類のものがあり、前者は傷害血管の狭窄を阻止し、後者は狭窄を増悪することが確認された。さらに内皮の形質差を決める分子を探索し、内皮の悪玉化を生じる責任遺伝子として Regulator of G-protein signaling 5 (RGS5)を同定し、RGS5 の下流で p38 MAPK が内皮の品質管理に関与することを明らかにした。また、褐色脂肪細胞は熱産生とは独立に、新規の可溶性生理活性物質を介して糖代謝を改善していることが判明し、網羅的遺伝子転写速度解析という新技術を適用することで「転写速度の振動」に着目した独自の解析法を編み出すことで、褐色脂肪細胞分化に関わる新規パスウェイを同定することに成功した。このように、血管内皮細胞の形質差を生み出す新たな分子機序の解明、褐色脂肪細胞の分化に関わる新たな分子機序の解明により、それぞれが関わる疾患に対する治療薬開発の基礎情報の取得に成功した。

本研究者は、さきがけ研究により、国際シンポジウムでの講演も多数行っており、原著論文も含め、総説等の執筆も増えており、今後の活躍が十分に期待される。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1)論文(原著論文)発表

1. Nishio M, Nakahara M, Sato C, Saeki K, Akutsu H, Umezawa A, Tobe K, Yasuda K, Yuo A, Saeki K. New categorization of human vascular endothelial cells by pro- versus anti-proliferative phenotypes. *World J Transl Med* 4: 88-100, 2015.
2. Nakahara M, Nishio M, Saeki K, You A, Saeki K. p38 MAPK regulates type-I versus type-II phenotyping of human vascular endothelial cells. *World J Transl Med* 4: 101-112, 2015.
3. Nishio M, Nakahara M, Saeki K, Fujiu K, Iwata H, Manabe I, Yuo A, Saeki K. Pro- versus anti-stenotic capacities of type-I versus type-II human iPS-derived endothelial cells. *World J Transl Med* 4: 113-122, 2015.

### (2)特許出願

研究期間累積件数: 1件

1.

発明者: 佐伯久美子、湯尾明、西尾美和子、佐伯晃一、長谷川護、

発明の名称: 血管平滑筋細胞の増殖を抑制する血管内皮細胞の検出方法

出願人: 独立行政法人国立国際医療研究センター、ディナベック株式会社

出願日: 2013/5/31

出願番号: 特願 2013-115325

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

#### 【国際シンポジウムでの講演】

- 1.Saeki K. "Dual Roles for Endothelial Cells in Arteriosclerosis Development: Unexpected Impacts of Human iPS-derived Endothelial Cells on Ischemic Disease Control". BIT's 8th Annual World Congress of Regenerative Medicine & Stem Cells 2015. Mar 20, 2015, Busan, Korea.
- 2.Saeki K. Human ES/iPS-derived cells provide a breakthrough technology by creating

innovative cell models for biomedical research. Therapeutics Discovery Symposium Asia – 2013, Nov 25–26, 2013, Tokyo, Japan

3. Kumiko Saeki. “Production of Functional Brown Adipocytes from Human Pluripotent Stem Cells.” Epigenomics, Sequencing & SNIps–2013 Meetings (Harvard University) Jul 10–11, 2013, Boston. USA

#### 【英文総説】

1. Nishio M, Saeki K. Differentiation of human pluripotent stem cells into highly functional classical brown adipocytes. *Methods Enzymol.* 2014; 537: 177–197.
2. Nishio M, Nakahara M, You A, Saeki K. Human pluripotent stem cells: towards therapeutic development for the treatment of lifestyle diseases (Review). *World Journal of Stem Cells: in press*

#### 【プレスリリース】

1. ヒトiPS細胞から「やせる細胞」産経新聞 2012年10月16日号
2. 「NCGMなど、ヒトES/iPS細胞の90%以上を機能性褐色脂肪細胞に分化誘導、遺伝子導入は不要」日経バイオテク 2012年11月5日号

# 研究報告書

## 「腸管 IgA 抗体による腸内細菌制御機構の解明と応用」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者: 新藏 礼子

### 1. 研究のねらい

腸管内には多種多様な細菌が常に生息し、宿主と平和的な共生関係を築いている。この共生関係が崩れると、炎症性腸疾患や肥満、糖尿病をはじめとする生活習慣病、大腸ガンなど各種疾患の発症に繋がるため、腸内環境を恒常的に維持することは健康維持に重要である。腸は宿主と腸内細菌による共生の重要な場であり、恒常性維持のために多くの免疫細胞や分子が働いているが、IgA は粘膜面の病原菌防御だけでなく腸内常在細菌の制御にも重要であり、このような共生関係の維持にも極めて重要であると考えられている。腸管に分泌される IgA は腸内細菌に対して poly-reactive に反応し粘膜面の第一線防御に重要と考えられてきた。最近の研究では腸管腔に分泌される IgA 抗体が腸内細菌を識別して制御することが示唆されているが、具体的に腸内細菌の何をどのように認識し制御するかは明らかではない。

抗体のクラススイッチは正常に起こるが体細胞突然変異が障害されているマウス (AID<sup>G23S</sup> マウス) の病態解析から、細菌に強く結合する IgA を産生できないと腸内細菌の異常増殖や腸炎が発症することが明らかとなった。この病態の治療には野生型マウス由来の多種類の腸内細菌に強い結合力を持つ IgA 抗体を経口で補充することが有効ではないかと考えた。この仮説を証明するために以下の実験を行った。

1、野生型マウスの腸管 IgA 産生細胞からハイブリドーマを作製し、多種類の細菌に強く結合する IgA モノクローナル抗体を得る。

2、得られた IgA モノクローナル抗体を AID<sup>G23S</sup> マウスや腸炎モデルマウスに経口投与して、腸炎の抑制効果を調べる。

3、得られた IgA モノクローナル抗体が細菌の何を認識するのかを明らかにする。この解析により、今まで推測の域でしか理解されていなかった「腸管内で分泌型 IgA が腸内細菌叢をどのように認識し制御しているか」を明らかにする。

4、以上の成果をもとに IgA 抗体経口投与による炎症性腸疾患の治療への応用を目指す。腸内細菌は種類が多く、外的要因により容易に変化するため、全貌を解析することは難しく、また炎症の原因菌を特定することはきわめて難しい。上記の仮説が正しくマウスでの腸炎抑制効果が見られた場合、IgA モノクローナル抗体の細菌特異性が広いので、原因菌を同定する必要はなく、腸内細菌叢制御による炎症性腸疾患の治療薬として使用できると考える。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

私たちは野生型マウスの腸管 IgA 産生細胞からハイブリドーマを多数作製した。その

中から多くの腸内細菌に最も高い結合力を示した W27 モノクローナル抗体を選択した。W27 抗体は大腸菌や *Pseudomonas fulva* には強く結合したが、*Lactobacillus casei* や *Bifidobacterium bifidum* のようないわゆる善玉菌には弱くもしくはほとんど結合しなかった。つまり、W27 抗体は善玉菌には結合しないように細菌を識別する抗体であることがわかった。マス解析により私たちは W27 が認識する大腸菌の抗原分子が Serine hydroxymethyltransferase (SHMT) という代謝酵素であること、またその分子内エピトープも同定した。W27 抗体はこのエピトープ部分のアミノ酸の違いを識別して、各細菌への結合力が異なることも明らかにした。さらに W27 抗体は強く結合する大腸菌の増殖を抑制したが、ほとんど結合しない *Lactobacillus casei* の増殖は抑制しなかった。すなわち、悪玉菌を識別して結合しその増殖を抑え、一方で善玉菌には結合しないため善玉菌の増殖を阻害しないことがわかった。W27 抗体をマウスに経口投与することで、腸内細菌叢のバランスが変化し、腸管の B 細胞の過剰増殖を抑制することを示した。さらに W27 抗体を腸炎治療用抗体の候補とし経口投与を行い、マウス腸炎モデル (DSS 誘導性腸炎、および T 細胞移入腸炎) で W27 抗体の腸炎抑制効果も確認した。

以上から、W27 IgA 抗体は腸内細菌制御に有効な経口治療薬候補であることを明らかにした。今後は W27 IgA 抗体の臨床応用を目指し、抗体投与量設定や製剤化を検討する。

## (2) 詳細

### テーマ1) 腸内細菌制御に有効な IgA モノクローナル抗体候補 W27 の獲得

野生型マウスの小腸粘膜固有層の IgA 産生細胞由来ハイブリドーマを作成した。数多くのハイブリドーマの中で、多種類の細菌に強く結合する IgA 抗体を産生する W27 を選択した。結果の一部を図1左に示した。示した細菌以外にも調べた12種の腸内細菌に対して W27 は他の IgA 抗体より強く結合することが各細菌をコーティングした ELISA より確認できた。しかし、W27 抗体は *Bifidobacterium bifidum* に対しては弱く、また *Lactobacillus casei* に対してはほとんど結合しなかった。すなわち、W27 抗体は多種類の細菌にランダムに結合するのではなく、選択的に細菌を認識して結合することがわかった。W27 は細菌に結合するだけでなく共培養することで強く結合する大腸菌の増殖を抑制し(図1右)、一方でほとんど結合しない *Lactobacillus casei* の増殖は抑制しなかった(図1右)。これらの結果から、W27 IgA 抗体は善玉菌には結合せず増殖を阻害することなく、腸炎などを惹起する可能性のある細菌には強く結合してその増殖を抑制することで、結果的に腸内細菌叢全体のバランスを整える効果があると考えられた。

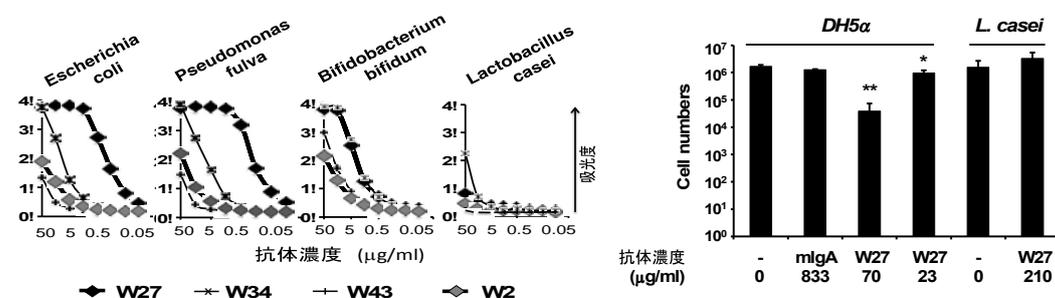


図1 (左)各種細菌に対するモノクローナル IgA 抗体(4種)の結合力の測定(ELISA 法)

(右)大腸菌と *Lactobacillus casei* 菌と W27 抗体、コントロール IgA 抗体 (mIgA) を共培養したときの細菌数を qPCR により測定して抗体の増殖抑制効果を検討した。

#### テーマ 2) W27 抗体が認識する分子とそのエピトープの同定

W27 抗体が認識する分子は代謝酵素 serine hydroxymethyltransferase (SHMT) であることを大腸菌の抽出タンパク質を用いたマス解析により明らかにした。さらに大腸菌 SHMT 分子のエピトープがアミノ酸 25-45 番目の領域であることを確定した。

#### テーマ 3) W27 抗体経口投与による AID<sup>G23S</sup> マウスの小腸パイエル板胚中心 B 細胞の減少(免疫系過剰刺激の改善)

AID<sup>G23S</sup> マウスに W27 抗体 (25 μg/ml、給水瓶に添加) を 4 週間投与して、小腸パイエル板胚中心 B 細胞数と大腸組織を観察した。図 2 左に示すように W27 抗体経口投与により有意に胚中心 B 細胞数が低下し、すなわち免疫系の過剰刺激が改善された。コントロール抗体として結合力の弱い W2 抗体を同時に投与したが有意な効果は見られなかった。

W27 抗体投与により、図 2 右に示すように大腸クリプト損傷も改善された。

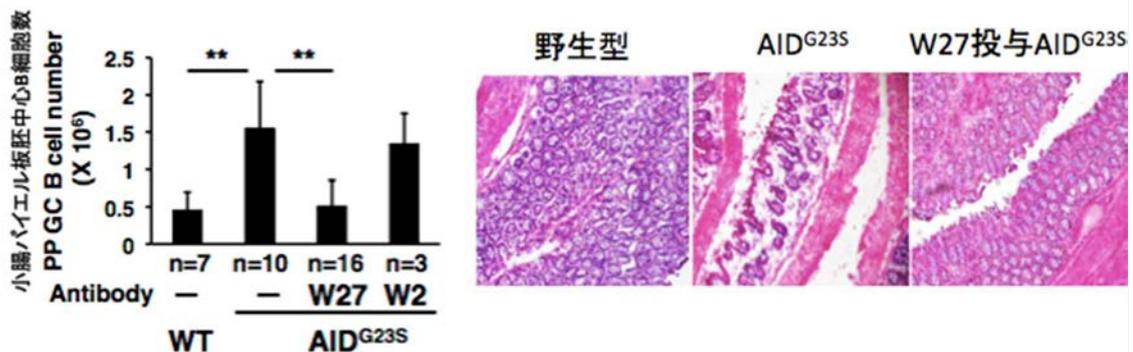


図 2 W27 抗体経口投与後のパイエル板胚中心 B 細胞数の減少と大腸組織像の改善

#### テーマ 4) DSS 腸炎モデルと T 細胞移入腸炎モデルに対する W27 抗体の腸炎抑制効果

上記と同様に W27 抗体 (25 μg/ml、給水瓶に添加) を 4 週間投与して、2 つの腸炎モデルにおいて体重減少率を腸炎抑制効果として評価した。図 3 に示すように 2 つのモデルにおいて W27 抗体経口投与により、有意にマウスの体重減少が抑制された。大腸組織の損傷も軽度であった。

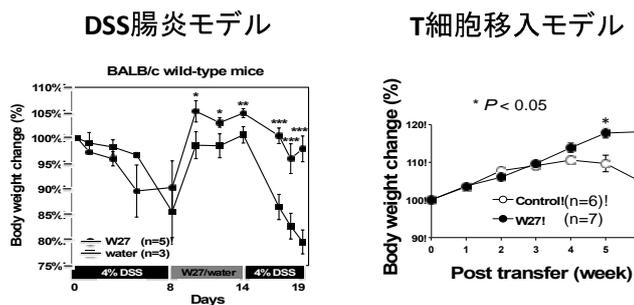


図3 DSS 腸炎とT細胞移入腸炎モデルにおけるW27抗体経口投与の体重減少抑制効果

### 3. 今後の展開

リコンビナントヒトキメラW27IgA抗体の一量体、二量体、分泌型IgA、Fab断片、さらにIgG型を作成して、細菌増殖抑制効果とマウス腸炎抑制効果を比較して治療効果の最も高い最適な剤形を決定する。

ヒト便サンプルから抽出したIgA抗体を用いて、炎症性腸疾患患者の大腸菌に対する結合力が健常人に比べて弱いというデータを得た。種々の細菌に対する反応性を調べて、W27抗体のような高い結合力を持つ抗体を患者の腸管内に補充する合理性を得る。

マウス腸管内容物中の腸内細菌をW27抗体が結合する細菌と結合しない細菌にセルソーターで分離し、細菌種に違いがあることを見つけた。宿主の腸内環境にとってこの細菌群の違いがどのような生理学的意味を持つかをメタボローム解析結果から考察する。これにより何をゴールにIgA抗体が腸内細菌を制御しているのか、を明らかにする。

以上の研究成果を抗体医薬の実用化への根拠としたい。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

- ・ 研究のねらいの達成度
  1. 研究のねらいに記載した4項目について、ほぼ達成した。
- ・ 研究成果の公表  
研究成果を広く世に知らしめるためには論文を発表しなければならなかったが、1月中旬現在、まだ投稿中でありとても残念である。一日も早く世に出せるようさらに努力する。
- ・ 特許出願  
特許出願は長浜バイオ大学の知財部門(研究推進機構事務局)のご協力を得て適時に実施できた。日、米、欧、中国に大学経費で移行(出願)した。今後は日本国だけでなく、外国での特許成立を目指し製薬企業への導出を加速したい。
- ・ 科学技術および社会・経済への波及効果  
腸管IgAが細菌の何を認識してどのような効果を及ぼすのか、について世界的に見ても非常に新しい知見を得たと自負する。IgA抗体が治療薬として活用できることもマウスの実験ではあるが示すことができた。宿主にとって良い細菌は殺さずに腸内細菌をコントロールできる新しい発想の治療薬を日本から発信したい。

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

(研究総括)

腸内細菌叢のバランスの崩れが多くの疾患の原因になることが最近明らかにされてきた。すなわち、腸内細菌叢は生体の恒常性維持・変容に大きく関与している。また、最近の研究では

腸管腔に分泌される IgA 抗体が腸内細菌を識別して制御することが示唆されている。

本研究者は腸管 IgA 産生細胞からハイブリドーマを多数作製し、多くの腸内細菌に最も高い結合力を示した W27 モノクローナル抗体を選択し、その抗原分子、分子内エピトープも同定し、この抗体がエピトープ部分のアミノ酸の違いを識別して、各腸内細菌への結合力が異なることも明らかにした。すなわち、W27 抗体は腸内細菌の悪玉菌を識別して結合し、その増殖を抑え、一方で善玉菌には結合しないため、その増殖を阻害しないことが明らかになった。さらに腸炎モデル(DSS 誘導性腸炎、および T 細胞移入腸炎)マウスに W27 抗体を投与し、その腸炎抑制効果も確認した。以上から、W27IgA 抗体は腸内細菌制御に有効な経口治療薬候補であることを明らかにした。今後は W27 IgA 抗体の臨床応用が期待される。

本研究者は、さきがけ研究により、国内学会ではあるが、招待講演もいくつか行っており、原著論文も投稿中で、今後の活躍が十分に期待される。また、本抗体が医薬品として臨床開発される日も近いと期待される。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1)論文(原著論文)発表

論文投稿中

### (2)特許出願

研究期間累積件数:4 件

1.

発 明 者: 新藏 礼子(100%)

発明の名称: モノクローナル IgA 抗体の製造方法 原案: 炎症性腸疾患治療用の経口投与用モノクローナル IgA 抗体医薬の開発

出 願 人: 学校法人 関西文理総合学園

出 願 日: 2013/3/11

出 願 番 号: 特願 2013-048365

2.

発 明 者: 新藏 礼子(100%)

発明の名称: モノクローナル IgA 抗体の製造方法

出 願 人: 学校法人 関西文理総合学園

出 願 日: 2013/8/9

出 願 番 号: 特願 2013-167120

注)特願 2013-048365 を先の出願とする優先権出願である。共に、JST 特許出願支援制度(国際出願)に採択された(2013/9/10)。JST 整理番号: S2013-0229

3.

発 明 者: 新藏 礼子(100%)

発明の名称: モノクローナル IgA 抗体の製造方法

出 願 人: 学校法人 関西文理総合学園

出 願 日: 日本 2015/8/31)

出 願 番 号: 日本 PCT/JP2014/056216

出願日：米国 2015/09/09  
出願番号：米国 14/773923  
出願日：欧州 2015/10/09  
出願番号：欧州 14762432.4  
出願日：中国 2015/11/10  
出願番号：中国 201480026684.0

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

招待講演

1. IgA 抗体による腸内細菌制御—炎症性腸疾患新規治療薬候補として—  
新蔵礼子  
第 8 回鹿児島 FD・IBS 研究会（鹿児島）2015 年 7 月（特別講演）
2. Oral administration of dimeric monoclonal IgA antibody as a candidate  
therapeutic approach for spontaneous colitis in mice. 新蔵礼子  
JDDW2014（神戸）  
2014 年 10 月（シンポジウム）
3. 腸内細菌制御における腸管 IgA 抗体体細胞突然変異の役割 新蔵礼子  
第 18 回腸内細菌学会（東京）2014 年 6 月（ワークショップ）

論文（総説）

1. IgA 抗体による腸内細菌の制御機構. 新蔵礼子  
医学のあゆみ 5 月号（土曜増刊）, 375-380, 2015.
2. 腸管免疫の恒常性における免疫グロブリン遺伝子の体細胞突然変異の重要性.  
新蔵礼子  
臨床免疫・アレルギー科 (58 巻・4 号) 361-367, 2012.

# 研究報告書

## 「胎児プログラミング仮説の分子機構の解明と医療への応用」

研究タイプ: 通常型(※大挑戦型課題として延長無)

研究期間: 平成24年10月～平成28年3月

研究者: 成 耆 鉉

### 1. 研究のねらい

ストレスにより誘導されたエピゲノム変化による、個体の環境適応と、その遺伝機構の解明は、生命の恒常性維持機構、及び、疾患発症機構を理解する上で重要である。英国の Barker 教授が最初に提唱した「低体重で生まれた子供は成長後に糖尿病などの生活習慣病を発症し易い」という説(Barker 説)は、疫学調査の結果とも合致し、現在では「胎児・乳幼児期の栄養状態が成長後の疾患発症頻度に影響する」という胎児プログラミング仮説(Developmental Origin of Health and Disease: DOHaD)として広く知られ、急速に関心が高まってきている。また、このような環境ストレスの影響は、世代を超えて、次世代へと引き継がれていくという報告もなされている。しかしこれまで、この説を検証する緻密な実験が困難であることや、分子メカニズムが全く不明であることから、この説を信じない研究者も多かった。ようやく、ラットとマウスに高脂肪餌、低タンパク質餌を与えると、次世代の代謝状態、遺伝子発現に変化が現れることが報告され(Ng ら、Nature, 2010; Carone ら、Cell, 2010)、研究が始まったばかりである。また、母親ラットを子供から分離すると、成長した子供が行動異常を呈することが報告されている(Weaver ら、Nat Neurosci, 2004)。これは、グルココルチコイド受容体遺伝子の発現制御領域のエピゲノム変化に起因することが示されているが、次世代に遺伝し得るかどうかは、報告がない。また、胎児期における、栄養、感染、母体の喫煙のような環境ストレスが、新生児の免疫能力に影響を及ぼすことが、報告されており、このような現象が、一群の遺伝子のエピゲノム変化を介していることが示唆されているが、そのメカニズムは全く不明である。このように、様々なストレスによる、エピジェネティック変化と、次世代への影響については、世界的に関心が高まっているが、その分子機構に迫る知見はまだ得られていない。

本研究では、多様な遺伝学的手法が利用でき、生活環の短いショウジョウバエを用いて、様々なストレスによるエピゲノム変化が、恒常性維持機構に、どのような分子メカニズムを介して、影響を及ぼすのか、また、その影響は遺伝するかどうかを明らかにすることを目指した。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

親の受けたストレスが次世代に影響するかどうかという問題は、恒常性維持機構の理解する上でも、大変重要な課題である。しかしながら、科学的な解析が行われるようになったのは、極めて最近のことで、その分子機構については何も分かっていないのが現状であった。そこで、本研究で私は、この現状を打破するため、1)次世代に影響を及ぼすストレスを特定し、実験系を確立すること、2)その分子機構を明らかにすること、3)この仕組みの生物学的意義は何なのかを明らかにすること、そして、4)本研究成果を医療に繋げていくことを目標と

した。

まず、私は、ショウジョウバエを用いた実験系の確立を目指し、様々なストレスを用いて次世代の影響を探ったところ、拘束ストレスをもちいた実験系の確立に至ることができた。父親に拘束ストレスを与えることにより、次世代におけるヘテロクロマチン形成に顕著な影響が合わられ、更には、その過程に、p38-dATF-2 経路が関与していることが示された。また、親の受けたストレスがどのように次世代に伝わるのかを理解するため、ストレス情報の生殖細胞系列への伝達の仕組みがあると考え探索したところ、サイトカインの1つ Upd3 が、拘束ストレス依存的に誘導され、次世代におけるエピゲノム変化に関与していることを見出した。さらに、親の拘束ストレスの次世代にける影響を明らかにするため、RNA-seq とメタボローム解析を行い、次世代において、解糖系、TCA 経路、電子伝達経路等のエネルギー代謝に顕著な変化が合わられることを見出し、親の拘束ストレスが、次世代におけるエネルギー恒常性に大きな影響を与えていることを見出した。

## (2) 詳細

### 1) 次世代に影響を及ぼすストレスを特定と実験系の確立

私は、まず、どのようなストレスが次世代において顕著な影響を示すのかを明らかにするため、次世代のヘテロクロマチン形成に影響を及ぼすストレスの探索を行った。その中で、拘束ストレスは、次世代のヘテロクロマチン状態に最も大きな影響が出ることを見出され、更にその条件検討を行っていった。そして、父親に三日間連続で10時間の拘束ストレスを与えることにより、次世代のヘテロクロマチンに効果的に影響を及ぼすことを見出した。

### 2) その分子機構を明らかにすること

拘束ストレスが次世代のヘテロクロマチンに影響することから、以前に私が見出した dATF-2 がこの現象に関与しているものと考え、その関係を調べることにした。そのために、まず、dATF-2 のノックアウトシステムの作製を試み、その作製に成功した。このノックアウトシステムは、特に見だった表現型を示さず、野生型とほぼおなじに見えたが、dATF-2 ノックアウトシステムに実際に拘束ストレスをかけると、次世代におけるヘテロクロマチンへの影響が全く現れないことが分かった。さらには、dATF-2 の上流因子である MEKK1 の機能欠失変異体においても、同様に拘束ストレスによる影響を見出すことが出来なかった。また、dATF-2 の発現組織を特定するために RNA in situ ハイブリダイゼーション法を用いた処、dATF-2 は精巣で非常に高く発現していることが確認された。また、実際に拘束ストレスによって、p38 のリン酸化レベルが精巣において上昇することが見出された。このような結果から、dATF-2 生殖細胞系列において、ストレス依存的なエピゲノム変化に関与していることが明らかになった。

また、親の拘束ストレスが次世代に影響するためには、ストレスの情報が生殖細胞に伝わらないといけないことから、そこには、ストレス情報を伝達する何らかの情報伝達機構があるものと考え、その解明に取り組んだ。その結果、サイトカインの1つである Upd3 が、拘束ストレス依存的に発現誘導がかかり、更には、Upd3 の発現上昇によって、次世代のヘテロクロマチン形成に影響を及ぼすことをみいだした。

このような結果から、拘束ストレスによる次世代への影響には、まず、ストレス依存的に Upd3

発現の誘導が起こり、精巣器官に伝えられ、生殖細胞系列において、p38-dATF-2 経路を介したエピゲノム変化を引き起こし、その影響が次世代に出ていることが示唆された。

### 3) この仕組みの生物学的意義の解明

私は、親の拘束ストレスの次世代に及ぼす影響の生物学的意義に迫るため、まず、RNA-seq 解析とメタボローム解析を行った。RNA-seq 解析の結果、親への拘束ストレスにより、約200の遺伝子の発現が上昇し、500の遺伝子発現の低下が認められた。更に、パスウェイ解析をおこなったところ、特に、拘束ストレスを受けた親由来の子において発現が減少した遺伝子群には、解糖系や TCA 回路などのエネルギー代謝経路の遺伝子が多く含まれていることが明らかになった。さらに、私は、同じように拘束ストレスを与えた親とストレス無しの親由来の次世代成虫からサンプルを調整し、メタボローム解析を行った。興味深いことに、メタボローム解析の結果からも、多くの解糖系、TCA 回路、電子伝達系などのエネルギー代謝経路の代謝産物において、顕著な変化があるということが明らかとなった。そこで、実際に ATP 産生の阻害剤であるロテノン感受性を観察した処、やはり、親の拘束ストレスにより、ロテノン感受性が亢進することがしめされた。

このような結果は、親への拘束ストレスが、次世代のエネルギー恒常性に大きな影響を与えているということを強く示唆するものであった。

### 4) 本研究成果を医療に繋げていくこと

本研究において、得られたように親の拘束ストレスは次世代のエネルギー代謝に影響及ぼすことが示された。そこで、エネルギー代謝に関わるような疾患との関連性を調べることにした。その1つとして、パーキンソン病の原因因子の1つである、Parkin のショウジョウバエホモローグ *Park<sup>1</sup>* の突然変異体を用いて関連性があるかどうかを検討してみた。*Park<sup>1</sup>* は、形態的には野生型とそれほど変わりはないのだが、そのホモ個体では、高頻度で発生致死となる。そこで、この表現型が、親世代における拘束ストレスで、影響を受けるかどうかを検討したところ、実際に、致死性が回復するということが見出された。

## 3. 今後の展開

本研究をどうして私は、親の拘束ストレスが次世代のエネルギー恒常性に影響を与えることを見出し、その過程に p38-dATF-2 経路が関わっていることを見出した。本研究は、まず、親のストレスの遺伝的分子メカニズムについては、その多くが分かっていないなか、その一部分を明らかにしてきたことは大きな意義があると考えられる。今後の展開としては、さらに、具体的なエピゲノムの制御がどのように起こっているのかを明らかにし、ストレス応答機構、制御機構、エピゲノム状態の維持機構の理解に迫っていく必要があると考えている。また、医学的な関連性においては、今回ショウジョウバエで明らかになったような次世代への影響が、マウスなどの哺乳動物やヒトではどうなのか、dATF-2 のホモローグである ATF-7 などによる制御が保存されているのかを明らかにしていく必要があると考えている。ショウジョウバエで見出された dATF-2 経路をかいいたストレス依存的エピゲノム変化とその遺伝現象が他の動物種で保存されていることが証明されれば、医学的見地からも、本研究の推進が更に重要性を増し

ていくものと考えている。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

(研究者)

本研究では、次世代に影響が大きく出るようなストレスを探すところから開始し、なかなか困難を極めたが、拘束ストレスの実験系の確立までこぎつけたことは、重要な成果の1つだと考えている。また、強い精神的ストレスが、次世代のエネルギー恒常性に影響を与えているという結果は、社会的に見ても大きなインパクトを与えうるものと考えている。しかしながら、論文として完成するには、本研究期間内に達成できなかったことから、社会的波及効果へまだつなげることができていず、早急に論文公表するため取り組んでいかないと行けないと考えている。

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

(研究総括)

胎生期、幼児期の栄養状態が、成人になってからの生活習慣病発症に影響するという、胎児プログラミング仮説(DOHaD)は、環境ストレスがどのように生活習慣病などの発症に影響するかについての新たな視点をもたらし、注目を集めている。本研究課題では、多様な遺伝学的手法が利用でき、生活環の短いショウジョウバエを用いて、様々な環境ストレスによるエピゲノム変化が、生体の恒常性維持機構に、どのような分子メカニズムを介して、影響を及ぼすのか、また、その影響は遺伝するかどうかを明らかにすることを目指した。いくつかの環境ストレスの中で、拘束ストレスは、次世代のヘテロクロマチン状態に最も大きな影響が出ることが見出され、エネルギー恒常性に大きな影響を与えていると考えられた。更にストレス依存的に Upd3 発現の誘導が生じ、精巣器官に伝えられ、生殖細胞系列において p38-dATF-2 経路を介したエピゲノム変化を引き起こすことが確認された。今後、具体的なエピゲノムの制御がどのように起こっているのかを明らかにし、ストレス応答機構、ならびに、エピゲノム状態の維持機構を理解することが必要で、さらに、マウスなどの哺乳動物やヒトでも同様のエピゲノム変化とその世代を超えた継承が存在するか興味を持たれる。

本研究者はさきがけ研究により、国際学会での発表や総説の執筆も実施しており、今後の活躍を十分に期待できる。

#### 5. 主な研究成果リスト

##### (1) 論文(原著論文)発表

投稿準備中

##### (2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

(著作物)

Seong KH, Maekawa T, Ishii S. **Chapter 6** Inheritance of stress-induced epigenetic changes mediated by the ATF-2 family of transcription factors, **Stress-Induced Mutagenesis**, David Mittelman(Ed), Springer-Verlag New York Inc., 2013. 103-118.

成耆鉉、石井俊輔. 環境要因によるエピゲノム変化と記憶. **細胞工学**. 2015年9月号. Vol. 34 No. 9. 879-883.

(学会発表)

Seong, KH, Ishii, S

Epigenetic inheritance caused by paternal restraint stress in *Drosophila*.

24th European *Drosophila* Research conference, 2015年11月,  
Heidelberg, Germany.

Seong, KH, Ishii, S

Epigenetic change and its inheritance caused by paternal restraint stress in *Drosophila*.

Waddington Symposium Epigenetics in dialogue with THE GENOME, 2015年6月,  
Edinburgh, UK.

Seong, KH

Inheritance of stress-dependent epigenetic change in *Drosophila melanogaster*

8<sup>th</sup> world congress on developmental origins of health and disease, 2013年11月, SUNTEC  
Singapore

成耆鉉、石井 俊輔

Epigenetic change and its inheritance caused by paternal restraint stress in *Drosophila*

第37回日本分子生物学会年会, 2014年11月、横浜

成耆鉉、石井 俊輔

Inheritance of epigenome changes induced by restraint stress in adulthood

第36回日本分子生物学会年会, 2013年12月、神戸

成耆鉉、李棟, 中邑 亮一, 石井 俊輔

ショウジョウバエにおけるストレス依存的エピジェネティック制御とその遺伝の解析

第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月、福岡

# 研究報告書

## 「個体の発育の恒常性を調節する 器官間液性因子ネットワークの解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成24年10月～平成28年3月

研究者: 丹羽 隆介

### 1. 研究のねらい

生物の発育プログラムは個体内外の環境に応じて柔軟に変化するポテンシャルを秘めており、遺伝プログラムには幾つものバリエーションがある。例えば、生物個体が幼体から成体に移行するステップでは、栄養量が成熟を促す条件の1つとして挙げられる。貧栄養条件下で個体が生育した場合には、幼若期が延長されるようにプログラムが修正されることで個体に必要な栄養が確保され、個体の成熟化がある程度保証される。このような発育プログラムの柔軟性は、発育の「恒常性」を支えるために生物にとって重要な特性である。しかしながら、この恒常性を支える分子基盤については未だ不明な点が多く残されている。

本研究で我々は、発育の恒常性を維持するキープレーヤーとしてステロイドホルモンに着目し、分子遺伝学的技術の発達したモデル生物キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* を用いて、以下に掲げる問題に取り組んだ。

- ①どの器官から分泌されるどの液性因子がステロイドホルモン生合成に影響を与えるのか？また、これらの液性因子の作用は、栄養、温度、個体密度などの個体内外の環境に応じて変化するのか？
- ②これらの液性因子シグナルは、エクジステロイド生合成のいずれの過程の調節を担うのか？関連して、エクジステロイド生合成過程の調節を担う未解明のシグナル伝達分子や転写因子のどのようなものか？
- ③ステロイドホルモン生合成のタイミングを適応的に調節するために、複数のシグナルの情報はエクジステロイド生合成という単一のアウトプットにいかに統合されるのか？

本研究によって、外環境からのインプット→様々な器官での情報の受容と伝達→ステロイドホルモン生合成調節→発生の進行(アウトプット)の全体を包括的に捉え、発生の恒常性の理解に貢献することを目指した。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究期間中に我々は、昆虫ステロイドホルモン(エクジステロイド)の生合成を調節する複数の液性因子の同定に成功した。そのうちの1つは神経伝達物質セロトニンであり、発生過程でのエクジステロイド生合成を正に制御した。興味深いことに、セロトニン産生神経はエクジステロイド生合成器官(前胸腺)に直接投射しており、しかも、この投射パターンは個体を取り巻く栄養状態に応じて変化した。この発見は、栄養依存的なステロイドホルモン生合成調節に関わる特異的な神経経路の存在を、あらゆる動物を通じて初めて明らかにしたものである。別に同定したモノアミン性液性因子であるチラミン/オクトパミンは、前胸腺自身で合成されオートクライン的に作用した。また、チラミン/オクトパミンは、幼虫から蛹への変化のタイミングを

決める際の幼虫の体重の閾値のシグナリングに関与することが示唆された。一方、発生過程の前胸腺だけでなく、エクジステロイドは成虫卵巣においても生合成されるが、その生合成を促す液性因子としてオス精液中に存在する Sex Peptide を同定し、卵巣エクジステロイド生合成が Sex Peptide 依存的な生殖幹細胞増殖に必須であることを見出した。

液性因子の同定と機能解析と併行して、前胸腺で機能するエクジステロイド生合成の新規細胞内因子の解明にも従事した。研究期間の間に、コレステロールの動態調節に関わるグルタチオン S-転移酵素 Noppera-bo や、無脊椎動物ではじめてとなるステロイドホルモン生合成に特化した転写因子 Ouija board を発見した。

一連の成果は、昆虫が個体内外の環境に応じて柔軟に発育プログラムを変化させる仕組みの一端を明らかにすると共に、ヒトを含む高等動物におけるステロイドホルモン生合成調節機構にも新たな視座を与える。また、社会貢献の側面では、解明されたメカニズムが今後の新しい創農薬ターゲットになる可能性を持つ。特に、研究期間の間に、Noppera-bo の酵素活性を阻害することで昆虫発育を攪乱する薬剤を発掘するためのアッセイ系の構築に成功した。

## (2) 詳細

研究テーマA「栄養状態に応じてエクジステロイド生合成を調節するセロトニン神経経路の発見」(「5. 主な研究成果リスト」原著論文4)(研究のねらい①に関連)

絵本作家エリック・カールの有名な絵本『はらぺこあおむし』にも描かれる通り、昆虫が幼虫から蛹へと変態を遂げるためには、幼虫期に十分な栄養を摂取することが必須である。しかし、十分に栄養を得た後で個体がより成熟した発育段階へと変化するためにどのような遺伝子レベル・細胞レベルのメカニズムが必要なのか、未だに不明な点が多い。本研究で我々は、幼虫から蛹への移行のタイミングを制御するエクジステロイドの生合成が、個体の栄養状態に特異的に反応する神経によって調節されることを明らかにした。我々は、今回同定した新規セロトニン産生神経  $SE0_{PG}$  が、ショウジョウバエ幼虫が摂食する栄養量に応じて神経突起の形を変化させ、エクジステロイドが合成されるタイミングを調節することを明らかにした。従来のエクジステロイド生合成調節の研究においては、主に神経ペプチド因子に多くの関心が払われてきたが、それに対して今回の発見は、非ペプチド性液性因子がエクジステロイド生合成器官に作用することを初めて報告したものである。また、栄養状態に応じたステロイドホルモン生合成の調節において、ステロイドホルモン産生器官に直接投射する神経経路が存在することは、あらゆる動物を通じて初めての知見であり、学術的に重要な意味を持つ。

研究テーマB「前胸腺に投射する神経経路の網羅的記載と機能解明」(研究のねらい①に関連)

研究テーマAの成果を受けて、エクジステロイド生合成器官である前胸腺に直接投射し、エクジステロイド生合成経路に影響を与えるような神経経路は他にどのようなものが存在するのかを追究した。我々は、ショウジョウバエ研究コミュニティによって整備されたエンハンサートラップ系統と画像データベースを援用したスクリーニングを実施した。その結果、従来報告されていた PTH 神経と上述のセロトニン神経に加えて、新たに2種類の前胸腺投射神経細胞の発見に成功した。この2種類の神経細胞の産生する神経伝達物質もすでに特定しており、

現在これらの物質を欠いたショウジョウバエの発育の表現型を精査している。

研究テーマC「前胸腺活性を調節するチラミン／オクトパミン経路の研究」(「5. 主な研究成果リスト」原著論文3)(研究のねらい①に関連)

研究テーマ A で同定したセロトニンとは別に、同じモノアミン性液性因子であるチラミン／オクトパミンが前胸腺でのエクジステロイド生合成の調節に関わることを見出した。チラミン／オクトパミンは前胸腺によって合成され、それがオートクライン的に前胸腺自身に受容され、エクジステロイド生合成を正に調節する。また、ショウジョウバエの蛹化のタイミングの決定には自身の体重がある閾値を超えることが重要であるとされるが、チラミン／オクトパミンのシグナリングはこの閾値を超えたあとの蛹化のスイッチングに必須の役割担うことを明らかにした。

研究テーマD「交尾刺激に伴う卵巣内エクジステロイド生合成を促進する Sex Peptide シグナリングの研究」(研究のねらい①に関連)

成虫期の昆虫において、エクジステロイドの主要な生合成部位は卵巣であることが知られている。今回我々は、卵巣におけるエクジステロイドの生合成が、オスとの交尾に伴って上昇することを見出した。これ極めて単純な事実でありながら、これまで記載のなかった現象である。また我々は、交尾刺激は卵巣中の生殖幹細胞の増殖を引き起こすこと、そしてこの増殖に卵巣内エクジステロイドが必須であることを見出した。さらに我々は、この一連の現象が、オス精液中に含まれる Sex Peptide と呼ばれる液性因子によってトリガーされることを見出した。この成果は、動物の個体間の相互作用が生殖状態に影響を与える際に関与する神経内分泌経路を具体的に明らかにした点で意義深い。

研究テーマE「エクジステロイド生合成調節因子 Noppera-bo の発見と機能解析」(「5. 主な研究成果リスト」原著論文2と5、および特許)(研究のねらい②に関連)

過去10年間、我々を含む国内外の研究グループによって前胸腺細胞内で機能する酵素や調節因子が多く同定されてきたが、いまだ未解明の因子が多数存在することが予想されている。そこで我々は、エクジステロイド生合成調節を担う液性因子の研究と併行して、前胸腺細胞内で機能する新たな調節因子の探索を進めた。この過程で、エクジステロイド生合成に必須の役割を果たすグルタチオン S-転移酵素(GST)ファミリーの分子 Noppera-bo を同定した。我々は、Noppera-bo が、前胸腺においてエクジステロイド生合成の原材料であるコレステロールの動態調節に関与することを明らかにした。

また、Noppera-bo は GST であることから、大腸菌を用いた組換えタンパク質を容易かつ大量に得ることが出来ることに気づいた。これを利用し、GST 活性検出用蛍光プローブを用いた簡便な酵素活性アッセイ測定方の開発に成功した。このアッセイ系は今後、創農業を意識した Noppera-bo 活性阻害剤の探索系として用いることが可能である。

研究テーマF「昆虫エクジステロイド生合成を調節する新規転写因子 Ouija board と Séance の発見」(「5. 主な研究成果リスト」原著論文1)(研究のねらい②に関連)

研究テーマEと関連して、前胸腺で機能する転写因子の同定にも成功した。複数の転写因

子の機能解析に従事したが、特に Ouija board は無脊椎動物においてはじめてのステロイドホルモン生合成に特化した転写因子として注目された。Ouija board は Zn フィンガー型転写因子であり、興味深いことにエクジステロイド生合成酵素遺伝子 *spookier* を単一のターゲットとすることが強く示唆された。研究期間の間に、Ouija board が液性因子の影響によってどのようにしてエクジステロイド生合成の調節に関与するのかの追究も開始した。さらに、エクジステロイド生合成に関わる別の転写因子 *Séance* も発見し、機能解析を進めている。

研究テーマG「母性ステロールが次世代の子の発生に与える影響の評価」(研究のねらい②に関連)

研究テーマEの研究の過程で、餌中のステロール量を変えてショウジョウバエの発育を評価するための実験系を確立した。そして、当初は想定していなかったが、餌中のステロールが母親から子(卵)への伝搬されることが、子の正常な発生に必須であることを見出した。その影響は、卵膜の外界からのバリアー機能、胚性ステロイド生合成、また孵化のプロセスの完了などの広範な現象に関わることが示された。さらに興味深いことに、子に渡されるステロールは子の胚発生のみならず、その後の幼虫から蛹の発生過程においても影響をもたらすことを見出した。本研究の成果は、母性因子としての栄養の存在意義を解明した点で重要な成果である。本研究は、JST の国際強化支援のご支援をいただいた。

その他の成果(研究のねらい②に関連)

上述した以外に、前胸腺で機能する複数の新規遺伝子を発掘しており、詳細な機能解析を継続している。

### 3. 今後の展開

解決すべき直近の課題としては、前説の「詳細」に記載した研究内容のうち、研究テーマB、D、FおよびGの成果を原著論文として公表することが挙げられる。公表に向けた細部のデータ取得と論文執筆を鋭意進めている。

一方、エクジステロイド生合成調節機構をより詳細かつ包括的に理解していくために、前胸腺や卵巣を刺激する液性因子と、これらのエクジステロイド生合成器官内で機能する細胞内因子の役割を関連づける研究を展開したい。それぞれの液性因子が駆動するシグナリング経路が最終的に生合成酵素の転写や酵素活性に与える影響をより検討することで、複合的なシグナルがエクジステロイド生合成というアウトプットへと収斂し、最終的に個体発育調節の柔軟性を実現させるメカニズムの研究を継続する。

将来的な社会実装の側面としては、次節の自己評価欄にも詳述するように、特に私は Noppera-bo の酵素活性を阻害する化合物スクリーニングに注力し、将来的な創農薬の可能性も視野にチャレンジをしていく。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

(研究者)

##### 【研究目的の達成状況】

冒頭の「研究のねらい」で掲げた①～③に即して記す。

ねらい①: 個体内外の環境に応じてエクジステロイド生合成を調節する液性因子として、我々は5つの因子を発見し、共同研究の体制も構築しながら各々の機能解析を実現した。このことは、当初の研究目的に照らして満足いく成果である。特に、栄養に応答してエクジステロイド生合成を調節する神経経路  $SE0_{PG}$  を発見し、論文として公表したことは、国際的にも高い評価をいただいた。また、Sex Peptide シグナリングが成虫卵巣エクジステロイドの生合成と生殖幹細胞増殖に関与することは、幹細胞生物学および昆虫生理学の分野において重要な発見であると自負している。一方、研究開始時には、神経系以外の器官から前胸腺に対して作用する因子の発掘も目指した。チラミン/オクトパミンをその一例として報告したことは意義ある成果である。しかし、腸や脂肪組織から作用する因子として当初期待していた因子の機能解析では、残念ながら目立った成果を得ることが出来なかった。

ねらい②: 液性因子とは別に、Noppera-bo、Ouija boardなどの新規因子を発掘したことも、エクジステロイド生合成器官で機能する因子をさらに発掘するという研究目的を達成するものと自負している。特に Noppera-bo は、従来まったく想定されていなかった GST ファミリーに属する因子として、研究者たちに驚きを持って迎えられた。また、Ouija board も無脊椎動物で初めてのステロイドホルモン生合成に特化した転写因子の発見であり、さらにホルモン生合成の特異的段階のみに関与する転写因子としてはじめての事例として、高い評価をいただいた。一方、エクジステロイド生合成調節機構の包括的理解には、これらの細胞内因子の役割を液性因子と関連づけて解明することが必須である。しかし、このことは研究期間の間に実現することは残念ながら出来なかった。今後の研究でこの未解決問題に迫っていきたい。

ねらい③: 複数のシグナルからエクジステロイド生合成という単一のアウトプットへの統合メカニズムの理解は、本さきがけ研究の柱の一つとして想定していたが、3年半の研究期間中に公表に耐える成果を得ることは叶わなかった。今後、我々が解明した液性因子と細胞内因子を研究の足がかりとして、この問題へのチャレンジを継続したい。

##### 【研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)】

さきがけ研究期間中、私の主催する研究室に所属する大学院生と研究員が年々増えてくれた。人数が増えたことにより様々な議論やアイデアがさらに生まれ、多面的な側面から研究を推進させた。また、私の研究室だけでは解決することが困難な技術的な問題に関して、私は国内外と問わず多くの研究者の方々との充実した共同研究を実施することが出来た。特に、複数の欧米の研究チームとの共同研究を実施することが可能となったのは、さきがけ期間中の学会での成果発表などで私の研究内容を知ってくださる海外の研究者が増えたことが非常に大きいと考えている。研究期間を通じて構築した共同研究の体制は将来的な研究展開にとっても重要な基盤であり、今後も有意義な共同研究を進めていきたいと願っている。

一方、研究進捗に関する後悔として、Noppera-bo の研究がフランスを中心とした研究グループと競合していることが途中で発覚し、論文の早期公表が最優先事項となりハイインパクト

ファクター誌への投稿の挑戦が出来なかったことがある。海外からの情報収集の未熟さを痛感したが、今後の研究で我々のプレゼンスを世界に示したい。

#### 【研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)】

本研究において我々が解明した昆虫発育制御のメカニズムの一部には、ヒトを含む高等動物において検証の価値がある問題で含まれている。特に、セロトニンおよびチラミン／オクトパミンとステロイドホルモン生合成調節との関連性や、触媒段階特異的な転写因子の存在は、高等動物研究者にも関心を持っていただいた発見である。今後、これらの事象がヒトを含む脊椎動物においても見られるのか否か、検証されていけば喜ばしい。

一方、昆虫ホルモンの研究のより直接的な社会貢献は、農業害虫あるいは衛生害虫の発育を抑制するための新たな戦略を与えることである。本研究で見出したメカニズムはそうした戦略を今後展開していく上でのヒントになる可能性がある。実際、我々が Noppera-bo の酵素活性の簡便かつ迅速なアッセイ系を開発したことにより、Noppera-bo の活性を阻害する作用を持つ農薬の発見・開発が現実味を帯びた。現在我々は、有機化学、薬理学、構造生物学、そして農薬科学の専門家を交えたチームを構築し、この課題へのチャレンジをすでに開始している。

#### 【その他の事項】

この3年半、我々のグループの研究は国際的にも認知度が上がったと自負しており、このことがさきがけ研究での大きな成果の1つと考えている。その証左として、本期間中に国際会議から8件の招待講演依頼をいただくことが出来た。さらに、過去50年以上の伝統がある国際エクジソンワークショップ(現・国際昆虫ホルモンワークショップ)の組織委員会より、次回開催のオーガナイザーとして私が指名され、アジアではじめての開催を行うことになった(2017年7月那須高原にて開催予定)。このような栄誉をいただくことが出来たのは、さきがけ期間中の研究が評価されたものと自負している。

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

##### (研究総括)

生物の発育過程は個体の内外の環境に応じて柔軟に調節され、さまざまな器官からのシグナルによって発育が協調的に進行する。本研究課題では、ショウジョウバエでの発育段階調節のキープレイヤーであるステロイドホルモンに注目し、その生合成が液性因子シグナルにより調節される分子機構の解明を目指した。その結果、昆虫ステロイドホルモン(エクジステロイド)の生合成を調節する液性因子として、セロトニン、チラミン／オクトパミン、および Sex peptide の同定に成功し、それぞれの調節機序も明らかにした。解明されたメカニズムは今後の新しい創農薬ターゲットになる可能性が期待され、特に、Noppera-bo の酵素活性を阻害することで昆虫発育を攪乱する薬剤を発掘するためのアッセイ系の構築に成功していることは評価に値する。

研究費は、計画通りの予算で研究を実施し、さらに海外研究者との共同研究のための国際

支援費用として 75 万円の増額により、研究を進展させた。

本研究者は、さきがけ研究により、国際学会での招待講演も多数行っており、原著論文も多数発表した。また、他領域のさきがけ研究者との共同研究、その他国内国外研究者との共同研究にも発展しており、研究者としての飛躍につながった。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1)論文(原著論文)発表

1. Komura-Kawa T, Hirota K, Shimada-Niwa Y, Yamauchi R, Shimell M, Shinoda T, Fukamizu A, O'Connor MB, Niwa R. The *Drosophila* zinc finger transcription factor Ouija board controls ecdysteroid biosynthesis through specific regulation of *spookier*. PLOS Genetics, 2015, 11, e1005712
2. Fujikawa Y, Morisaki F, Ogura A, Morohashi K, Enya S, Niwa R, Goto S, Kojima H, Okabe T, Nagano T, Inoue H. A practical fluorogenic substrate for high-throughput screening of glutathione S-transferase inhibitors. Chemical Communications, 2015, 51, 11459-11462.
3. Ohhara Y, Shimada-Niwa Y, Niwa R, Kayashima Y, Hayashi Y, Akagi K, Ueda H, Yamakawa-Kobayashi K, Kobayashi S. Autocrine regulation of ecdysone synthesis by  $\beta$ -octopamine receptor in the prothoracic gland is essential for *Drosophila* metamorphosis. Proceedings of National Academy of Science of the United States of America, 2015, 112, 1452-1457.
4. Shimada-Niwa Y, Niwa R. Serotonergic neurons respond to nutrients and regulate the timing of steroid hormone biosynthesis in *Drosophila*. Nature Communications. 2014, 5, 5778.
5. Enya S, Ameku T, Igarashi F, Iga M, Kataoka H, Shinoda T, Niwa R. A Halloween gene *noppera-bo* encodes a glutathione S-transferase essential for ecdysteroid biosynthesis via regulating the behaviour of cholesterol in *Drosophila*. Scientific Reports 2014, 4, 6586.

### (2)特許出願

研究期間累積件数:1 件

1.

発 明 者: 藤川雄太、井上英史、丹羽隆介

発明の名称: フルオレセイン誘導体またはその塩、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ測定用蛍光プローブ、およびこれを用いたグルタチオン-S-トランスフェラーゼ活性の測定方法

出 願 人: 東京薬科大学、筑波大学

出 願 日: 2014 年 12 月 4 日

出 願 番 号: 特願 2014-246154

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

【国際会議招待講演】



- (i) Yuko Shimada-Niwa, Yosuke Umei, Ryusuke Niwa, 『Adaptive regulation of ecdysteroid biosynthesis in the prothoracic gland through serotonin-producing neurons in the fruit fly *Drosophila melanogaster*』、International Insect Hormone (19th Ecdysone) Workshop 2013、2013年7月22日、University of Minnesota、Minneapolis, MN、アメリカ合衆国。
- (ii) Ryusuke Niwa, 『Transcriptional regulation of a specific steroidogenic P450 gene in the fruit fly *Drosophila melanogaster*』、The 12th International Symposium on Cytochrome P450 Biodiversity and Biotechnology、2014年9月25日、京都市国際交流会館、京都府京都市。
- (iii) Yuko Shimada Niwa, Ryusuke Niwa, 『Neuronal controls of developmental transition via modulating steroid hormone biosynthesis in the fruit fly *Drosophila melanogaster*』、48<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists co-sponsored by Asia-Pacific Developmental Biology Network、2015年6月5日、つくば国際会議場、茨城県つくば市。
- (iv) Tatsuya Komura-Kawa, Outa Uryu, Keiko Hirota, Yuko Shimada-Niwa, Rieko Yamauchi, MaryJane Shimell, Tetsuro Shinoda, Akiyoshi Fukamizu, Michael B. O' Connor, Ryusuke Niwa, 『Ouja board is the zinc finger transcription factor controlling ecdysteroid biosynthesis through specific regulation of *spookier* in *Drosophila*』、The 2nd International Insect Hormone Workshop、2015年7月13日、Orthodox Academy of Crete, Kolymbari (Crete)、ギリシャ。
- (v) Ryusuke Niwa, 『TBA』、The 64th NIBB Conference “Evolution of Seasonal Timers”、2016年4月22～24日、岡崎コンファレンスセンター、愛知県岡崎市。(予定)
- (vi) Ryusuke Niwa, 『TBA』、The Asia and Oceania Society for the Comparative Endocrinology meeting 2016, Symposium「Insect neuroendocrinology、2016年6月20～24日、Seoul、韓国。(予定)
- (vii) Ryusuke Niwa, 『TBA』、International Congress of Entomology 2016, Symposium “Molecular endocrinology”、2016年9月20～26日、Orlando, FL、アメリカ合衆国。(予定)
- (viii) Yuko Shimada-Niwa and Ryusuke Niwa, 『TBA』、Behavioral Neurogenetics of *Drosophila* Larva、2016年10月23～26日、Janelia Research Campus, VA アメリカ合衆国。(予定)

【国内招待講演(学会のみ)】

- i) 丹羽隆介, 『進化的に特殊化した遺伝子による、進化的に保存された経路の制御: ショウジョウバエのステロイドホルモン生合成の研究から』、国立遺伝学研究所研究集会「新機能獲得の分子進化」、2013年8月17日、国立遺伝学研究所宿泊施設、静岡県三島市。
- ii) 丹羽隆介、天久朝恒、平野陽太、塩谷天、五十嵐史彦、片岡宏誌, 『「母性因子」再考: ショウジョウバエの母から子へと伝えられる栄養の力』、第85回日本遺伝学会・ワークショップ「ショウジョウバエの最新遺伝学」、2013年9月19日、慶応義塾大学第4校舎独立館、神奈川県横浜市。
- iii) 島田裕子、梅井洋介、丹羽隆介, 『栄養依存的な昆虫ステロイドホルモン生合成調節機構

における新規ニューロンの同定と役割の解析』、第 85 回日本遺伝学会・ワークショップ「ショウジョウバエの最新遺伝学」、2013 年 9 月 19 日、慶応義塾大学第4校舎独立館、神奈川県横浜市。

iv) 丹羽隆介、島田(丹羽)裕子、梅井洋介、『エクジステロイド生合成を介した昆虫変態誘導の新しい調節機構』、第 36 回日本分子生物学会年会・ワークショップ「動物のメタモルフォーゼ: 個体のライフスタイルの劇的変容を支える分子・細胞基盤に関する研究の最前線」、2013 年 12 月 4 日、神戸国際展示場2号館、兵庫県神戸市。

v) 丹羽隆介、天久朝恒、『昆虫“脱皮”ホルモンの脱皮・変態後における役割: 交尾刺激と生殖幹細胞』、日本動物学会第85回仙台大会、2014 年 9 月 12 日、東北大学川内北キャンパス講義棟、宮城県仙台市。

vi) 丹羽隆介、『昆虫変態の研究は創農薬の夢を見るか?』、日本動物学会第 86 回新潟大会・シンポジウム「動物の変態・成熟の分子基盤」、2015 年 9 月 18 日、朱鷺メッセ、新潟県新潟市。

vii) 丹羽隆介、『脱皮ホルモン生合成のケミカルバイオロジー(の試み)』、平成 27 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会・公開シンポジウム「次世代を担う若手研究者が語る昆虫科学最前線」、2015 年 9 月 26 日、北海道大学大学院農学研究院、北海道札幌市。

#### 【受賞】

2013 年 2 月 平成 24 年度 筑波大学若手教員奨励賞

2013 年 10 月 平成 25 年度 筑波大学若手教員奨励賞

2014 年 4 月 平成 26 年度 科学技術分野の文部科学大臣表彰 若手科学者賞

2014 年 6 月 平成 26 年度 筑波大学若手教員特別奨励賞

#### 【プレスリリース】

2014 年 10 月 10 日プレスリリースプレスリリース(筑波大学、農業生物資源研究所)『細胞内コレステロールの挙動調節に必須の新しい遺伝子「ノッペラボー」を発見 ～ショウジョウバエのステロイドホルモン生合成の研究から～』

(<http://www.tsukuba.ac.jp/attention-research/p201410101800.html>)

→メディア報道: 財経新聞 2014 年 10 月 14 日、化学工業日報 2014 年 10 月 20 日

2014 年 12 月 15 日 プレスリリース(筑波大学、JST)『栄養に应答して発育を制御する神経とホルモンの新しいメカニズムの発見～はらぺこの幼虫が満腹になると蛹になる仕組み～』

(<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20141215/index.html>)

→メディア報道: JST サイエンスポータル 2014 年 12 月 16 日、財経新聞 2014 年 12 月 18 日、EconomicNews 2014 年 12 月 21 日、日刊工業新聞 2014 年 12 月 22 日、日本経済新聞 2014 年 12 月 28 日、科学新聞 2015 年 1 月 1 日(ウェブ 8 日)、nature asia 注目の研究 2015 年 2 月 4 日、太田出版『ケトル』Vol23「日本最先端の頭の中身」2015 年 2 月 14 日

2015 年 1 月 21 日 プレスリリース(基礎生物学研究所)『幼虫から生殖能力を有する成虫への



変化を制御する新たな仕組みをショウジョウバエで発見』

(<http://www.nibb.ac.jp/press/2015/01/21.html>)

→メディア報道: JST サイエンスポータル 2015 年 1 月 23 日

2015 年 12 月 11 日 プレスリリース(筑波大学、JST、農業生物資源研究所)『「お化け」遺伝子呼び出す「こっくりさん」タンパク質の発見～昆虫のステロイドホルモン生合成に関わる新知見～』

(<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20151211/>)

→メディア報道: 化学工業日報 2015 年 12 月 14 日、日経バイオテクオンライン 2015 年 12 月 14 日、日経産業新聞 2015 年 12 月 16 日、農業協同組合新聞 2015 年 12 月 22 日、日本農業新聞 2015 年 12 月 30 日、常陽新聞 2016 年 1 月 7 日

# 研究報告書

## 「冬眠を可能とする生体状態の可視化とその誘導メカニズムの解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者: 山口 良文

### 1. 研究のねらい

冬眠は、寒冷かつ餌の枯渇といった極限環境を、代謝活動を劇的に減少させ低体温状態で乗り切る現象である。哺乳類の中には、食物の枯渇する厳しい冬を代謝を低下させ低体温状態で乗り越える事の出来る、リスやクマ、ハムスターをはじめとした、冬眠する哺乳類が存在する。彼らは、巣穴の中で寝たきりでも筋肉・骨がそれほど衰えない「寝たきり耐性」や、秋に蓄えた脂肪を効率的にエネルギーに変えられる「健康肥満」など、冬眠しない哺乳類には見られない驚くべき能力を備えている。しかし、冬眠できる哺乳類と、私たちヒトを含む多くの冬眠出来ない哺乳類との差は何なのか、未だほとんど不明である。本研究の狙いは、冬眠制御に重要な脳中枢と末梢臓器との相互作用という観点から、冬眠可能な生体状態の実体を最新の解析技術を用いて解明し、その制御機構に迫ることである。具体的には、リスやクマなどの冬眠動物も一年中冬眠できる状態にあるのではなく、夏の終わりから冬にかけて季節性に体を冬眠仕様すなわち「冬眠可能状態」へと全身的に変化(リモデリング)するという事実に着目し、この「冬眠可能状態」の実体解明(可視化)とその誘導機構の解明を目指す。こうして得られる知見は、冬眠動物がしめす季節性生体システム変化機構を明らかにする点で生物学的に興味深いだけでなく、虚血再灌流障害予防、糖尿病予防、廃用筋萎縮予防、冬期うつ症の理解など、さまざまな医学的応用も期待される。

### 2. 研究成果

#### (1)概要

哺乳類の中には、食物の枯渇する厳しい冬を代謝を低下させ低体温状態で乗り越える事の出来る、リスやクマ、ハムスターをはじめとした、冬眠する哺乳類が存在する。彼らは、巣穴の中で寝たきりでも筋肉・骨がそれほど衰えない「寝たきり耐性」や、秋に蓄えた脂肪を効率的にエネルギーに変えられる「健康肥満」など、冬眠しない哺乳類には見られない驚くべき能力を備えている。しかし、リスやクマなどの冬眠動物も一年中冬眠できる状態にあるのではなく、夏の終わりから冬にかけて季節性に体を冬眠仕様すなわち「冬眠可能状態」へと全身的に変化(リモデリング)させることが、これまでの研究から示唆されていた。しかし、この「冬眠可能状態」がどのようなものか、またいかにして誘導されるのか、未だ殆ど解明されていない。

これらの点を解明すべく、私たちは、シリアンハムスターを用いて研究を行った。シリアンハムスターは環境条件を変えることで実験室での人為的冬眠誘導が可能な、数少ない冬眠実験モデル哺乳類である。しかし、リスやクマと同様に「冬眠可能状態」への季節性リモデリングが生じるかについては不明であった。そこでまず、私たちは安定した冬眠誘導系を立ち上げ、冬眠可能状態への変化過程で生じる全身性変化の解明を行った。その結果、これらの動物

では深冬眠誘導に必要な体重の閾値があること、さらに冬眠に先駆けて前冬眠期に基礎体温が低下することを明らかにした。次にこれらの知見を活用し、冬眠誘導において重要な役割を担うと目される、脂肪組織、肝臓、脳など複数の臓器について次世代シーケンサー解析を行い、冬眠可能状態で発現変動する遺伝子経路を多数同定した。さらに、これらの変化は長期間の短日寒冷刺激により前冬眠期に冬眠に先駆けて上昇することを経時的発現解析から明らかにした。これらの成果は、シリアンハムスターが冬眠可能状態への季節性リモデリング機構を解明するうえで有用なモデル動物となることを示すだけでなく、冬眠可能状態の実現に重要なシグナルおよび組織間相互作用を同定していく上で礎となる重要な知見といえる。

## (2) 詳細

### 研究成果1: 前冬眠期に体をリモデリングする過程で生じる生理現象の解明

条件的冬眠動物であるシリアンハムスターは、ジリスやヒグマなどの内因性年周リズムが冬であることが冬眠のための必須条件である義務的冬眠動物と異なり、短日寒冷下での飼育により冬眠誘導が通年可能である。しかし、シリアンハムスターにおいても、短日寒冷移行から実際の冬眠誘導までには数ヶ月を要することから、この間に全身状態が冬眠不能状態から冬眠可能状態へとリモデリングされると予想された。そこでまず、食餌や飼育条件の検討により、安定した冬眠誘導系を構築した。これらの過程で、以下の点を見出した。1) 長期短日寒冷飼育により、基礎体温値の漸進的低下が生じ、初回の深冬眠誘導時に最低値となる。さらに、この基礎体温値は深冬眠-中途覚醒の繰り返しにより上昇する。最終的には、自発的に冬眠を終了したリフラクトリ個体において、短日寒冷飼育誘導直後の基礎体温値に戻る。2) 深冬眠が確認された個体は、いずれも体重が 130g より少なくなっていた。すなわち、深冬眠誘導には、体重の閾値があった。これらの結果は、シリアンハムスターの冬眠可能状態には、基礎体温値の設定変更機構と生体内の備蓄エネルギーを何らの形でセンシングする機構とが関与することを示唆する重要な知見である(Chayama et al., in press)。

### 研究成果2: 冬眠可能状態に特徴的な遺伝子発現パターンの同定

次に、冬眠可能状態を遺伝子発現から記述し可視化することを試みた。短日寒冷飼育下で深冬眠状態および中途覚醒状態の個体を冬眠可能状態、長日常温飼育下の個体を冬眠不能状態、短日寒冷飼育下に長期間置かれたにも関わらず冬眠していない体重の重い個体を冬眠不能状態から冬眠可能状態への遷移過程の個体と見なして、次世代シーケンサーによる遺伝子発現比較解析を冬眠制御に重要と目される複数の臓器について行った。その結果、冬眠可能状態に特異的に発現する遺伝子群を同定し、冬眠可能状態の遺伝子発現レベルでの解明に成功した(未発表データ)。

## 3. 今後の展開

本研究により同定した、冬眠可能状態特異的遺伝子発現パターンの冬眠における意義の解明を行う。これと並行して、それら遺伝子発現パターンを指標として、夏の冬眠不能状態の個体に、冬眠可能状態を誘導する分子機構を同定していく。具体的には、基礎体温調節機構、

肝臓・白色脂肪組織・骨格筋・脳視床下部・脳幹の変化に注目する。これらの研究を通じて、長期的には、そこで同定した分子機構を増強または減弱させることにより、冬眠動物の備える冬眠耐性能を非冬眠動物に一部なりとも賦与することを目指す。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

(研究者)

研究目的の達成状況:

本さがけ研究では、冬眠可能な生体状態の分子実体を解明し、さらにその誘導機構に迫ることを目指した。その結果、これまで全く不明であった、シリアンハムスターの冬眠可能状態に特異的な遺伝子発現パターンを、エネルギー代謝・全身恒常性制御に重要な臓器ごとに解明することに成功した。さらにそれら冬眠可能状態特異的遺伝子発現群の中から、前冬眠期に冬眠にさがけて発現上昇する複数の遺伝子の同定にも成功した。これらの点から、冬眠可能状態の分子実体をまず記述する、という当初の目的については十分に達成できたといえる。一方、冬眠可能状態へと変化した個体を深冬眠誘導前に実際に「見分ける」手法の開発と、冬眠可能状態の誘導機構の同定については、完了にはもうしばしの時間を要する。しかし、研究自体は上述した知見を礎として順調かつ着実に進展しているといえる。

研究の進め方:

要所所で適切な方向付けが行えたため、順調に進展したといえる。具体的には、冬眠誘導用の専用低温室をさがけの予算により作成し安定した冬眠導入系の確立が行えたこと、ゲノム配列読みの未完成であるシリアンハムスターを用いて遺伝子発現解析を行うために、非モデル生物における次世代シーケンサー解析の専門家と共同研究を開始したこと、さらに領域内の多様な研究者間の活発な交流により、適切な解析技術・実験手技・研究の視座が得られたことで、等が挙げられる。これらにより当初想定していた以上のデータを得る事ができている。

研究成果の波及効果: 本研究により明らかになった冬眠可能状態に特異的遺伝子発現パターンは、冬眠動物が備える「健康肥満」「寝たきり耐性」「虚血耐性」等の驚異的な能力の分子的基盤となっている可能性が高い。私たちはこの分子基盤の機能解析をさらに進めることで、非冬眠動物において見られるこれらの能力を非冬眠動物に賦与する手法の開発も目指している。そうした手法の開発は、高齢化社会を迎える日本をはじめ先進諸国において問題となっている高齢者の QOL の維持や、現在対症療法しかない種々の疾患に対する先進医療手段としての活用も大きく期待される。

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

(研究総括)

本研究課題は、冬眠制御に重要な脳中枢と末梢臓器との相互作用という観点から、冬眠可能な生体状態の実体を最新の解析技術を用いて解明し、その制御機構に迫ることであり、具体的には、シリアンハムスターを用いて安定した冬眠誘導系を立ち上げ、冬眠可能状態への変化過程で生じる全身性変化の解明を行った。その結果、前冬眠期に冬眠に先駆けて上昇

する多数の遺伝子経路を経時的発現解析から明らかにした。今後は、これら遺伝子発現パターンの冬眠における意義およびその分子機構が明らかにされることが期待される。冬眠については、これまで遺伝子解析できるモデル動物がなかったことから、新たな研究領域を切り拓く研究として本研究の成果は重要と考えられる。

研究費は、当初計画よりは250万円の増額をしたものの、総額は3900万円で研究を実施することができた。

本研究課題の成果により、冬眠という新たな切り口からの生体における動的恒常性の維持・変容機構の理解が進むことにより、虚血再灌流障害予防、肥満・糖尿病予防などに対するさまざまな新たな治療戦略の確立に貢献することが期待される。

本研究者は、論文発表は1件と少ないが、多くのさきがけ研究者との共同研究にも発展しており、今後の活躍が十分に期待される。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Chayama, Y., Ando, L., Tamura, Y., Miura, M., Yamaguchi, Y. Decreases in body temperature and mass constitute pre-hibernation remodelling in the Syrian golden hamster, a facultative mammalian hibernator. *R Soc Open Sci.* 2016, *in press*

### (2) 特許出願

研究期間累積件数: 0件

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

#### 主要な学会発表

1. **山口良文**. 哺乳類の代謝が劇的に変わるとき～胚発生と冬眠制御. シンポジウム～先端メタボロミクスを駆使して展開する新しい代謝生物学. 2013.9.18, 東京 (招待講演)
2. **山口良文**. 哺乳類の代謝が全身性に変わるとき～胚発生と冬眠. 第7回シンフォニー. 2014. 9. 14, 東京 (招待講演)
3. Yamaguchi, Y., Chayama, Y., Ando, L., Shigenobu, S., Tamura, Y., Miura, M. Global gene expression analysis to identify molecular mechanisms that enable hibernation in mammals. The Joint conference of the 120<sup>th</sup> Annual Meeting of The Japanese Association of Anatomists & the 92<sup>nd</sup> Annual Meeting of The Physiological Society of Japan, 2015.3.22, Kobe, Japan.
4. **山口良文**. 冬眠する哺乳類に学ぶ代謝制御. 脳心血管抗加齢研究会 2015 2015.11.28, 大阪 (招待講演)
5. **山口良文**. 何が哺乳類の冬眠を可能とするのか?～前冬眠期における、冬眠のための体組織リモデリングの同定. 第38回日本分子生物学会ワークショップ「異種間比較が解き明かす生命システムの普遍性と多様性」. 2015.12.1, 神戸 (招待講演)

アウトリーチ活動

サイエンティスト・クエスト—あなたと考えるあたらしい科学とくらし「冬眠する哺乳類のスゴイ能力～健康的なゴロ寝生活！？」日本科学未来館 2015.1.24, 東京

<http://www.miraikan.jst.go.jp/event/1512281519272.html>

人間も冬眠？ 実現すれば究極のアンチエイジング法に 新しいメタボ予防法や健康長寿実現への応用も 日経グッディ（取材記事・北村昌陽氏）

<http://gooday.nikkei.co.jp/atcl/report/14/091100018/012000033/>

# 研究報告書

## 「血管の動的恒常性の破綻による疾患進展機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月

研究者: 渡部 徹郎

### 1. 研究のねらい

血管は血液や酸素、種々の因子などを各組織に運ぶことにより生体の恒常性を維持するのみならず、様々な形で周囲の組織と相互作用しあい、発生過程、臓器形成、病態形成過程等それぞれにおいて多彩な特徴や役割を有しており、生体の動的恒常性を維持する上で中心的な役割を果たしている。このような多様な血管構造は可塑的に変化することにより周辺臓器に影響を与えるが、特に炎症やがんなどの病的状態において血管内皮細胞が内皮間葉移行 (EndMT) によって生じる間葉系細胞が病態を進行させることが明らかになりつつあり、治療の新規標的として注目を集めている。EndMT は形質転換増殖因子 (TGF- $\beta$ ) ファミリーなどさまざまなシグナルにより調節されているが、まだ詳細な分子機構については不明な部分が多く、関連疾患の診断や治療を困難なものにしている。そこで本研究のねらいは EndMT の時間的な変化をリアルタイムで「見る」システムを構築し、EndMT の詳細な分子機構をゲノムレベルで「知る」ことにより、血管が果たす生体の動的恒常性維持の解明を行なうとともに、がん・心疾患・糖尿病などの疾患を病的な EndMT により血管の動的恒常性が破綻した状態ととらえて EndMT を標的として「治す」ことである。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

腫瘍組織において存在する線維芽細胞ががん細胞の増殖を亢進する成長因子を分泌することで、がんを進行させることが知られている。つまり、がんを撲滅するために、がん細胞以外のがん関連線維芽細胞(CAF)を標的とすることにより、新たな治療法を開発することができる可能性があるが、CAF がどのように形成させるかについては未解明な部分が多く残されている。本研究では、腫瘍組織において多く存在する炎症細胞が分泌する因子の一つである TGF- $\beta$  が腫瘍血管における血管内皮細胞に働きかけ、間葉系細胞(線維芽細胞など)へと移行させることを見出した。この現象は内皮間葉移行(EndMT)と呼ばれるが、さらに本研究では腫瘍組織において豊富に存在する他の因子がどのようにして TGF- $\beta$  による EndMT の誘導を調節するか明らかにした。本研究成果はがんの悪性化因子である EndMT がどのようにして誘導されるか、その分子機構を明らかにしたという点で、基礎医学における意義が大きいとともに、新たながんの治療法が開発できる可能性を開いたという点で社会におけるインパクトの大きさが期待される。

#### (2) 詳細

### 研究テーマ A. EndMT を「見る」

(目的)リアルタイムで EndMT を検出できる実験系を作出する

(成果)血管内皮細胞を遺伝学的に標識する遺伝子改変マウス (EndMT レポーターマウス) を作出した。このマウスにおいては以前血管内皮細胞であったが、その性質を失っている間葉系細胞 (すでに EndMT を起こした細胞) ならびに現在 EndMT 過程にある細胞を検出することができることを見出した。

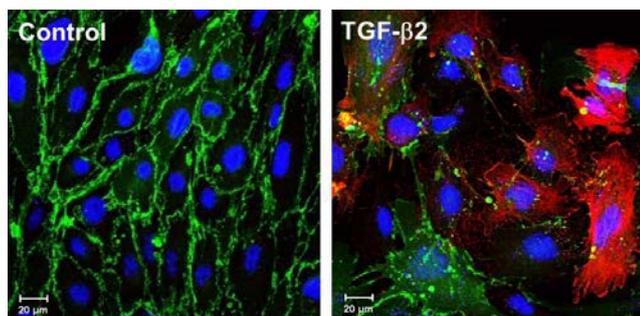
### 研究テーマ B. EndMT を「知る」

(目的)EndMT を誘導するシグナルの解明を試みる

(成果)がん微小環境におけるがん関連線維芽細胞 (CAF) はがん細胞の増殖や悪性を亢進することから、がん治療の新たな標的として注目を集めている。また、近年の報告により CAF の約 30% が血管内皮細胞から EndMT により形成されることが示されており、EndMT を抑制することでがんの進展を抑制する方法に期待が集まっている。多くの種類のがんにおいて炎症細胞由来が分泌する TGF- $\beta$  が EndMT を誘導することが示されている。しかし、TGF- $\beta$  がどのようにして EndMT を誘導するかについては詳細なメカニズムは解明されていない。

腫瘍組織における炎症細胞は TGF- $\beta$  や TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインを分泌することが知られており、TGF- $\beta$  と TNF- $\alpha$  が協調してがん細胞の上皮間葉移行 (EMT) を誘導することにより、がんの悪性に重要な役割を果たすことが私たちのグループを含む複数のグループにより報告されているが、TNF- $\alpha$  の TGF- $\beta$  による EndMT における役割については未解明な部分が多く残っていた。そこで、本研究課題においてはマウス脾臓由来の血管内皮細胞 MS-1 を用いて、TNF- $\alpha$  が TGF- $\beta$  による EndMT の誘導においてどのような作用を持つか検討した。

MS-1 細胞は通常では血管内皮細胞のマーカである VE-cadherin を発現し、敷石状のシートを形成する (図左)。しかし、TGF- $\beta$  を加えると多くの細胞において VE-cadherin 発現は消失し、間葉系マーカである smooth muscle  $\alpha$ -actin ( $\alpha$ SMA) の発現が上昇するとともに、細胞間接着が失われた (図右)。この TGF- $\beta$



緑：内皮マーカ (VE-cadherin) 赤：間葉系マーカ ( $\alpha$ SMA) 青：核

による EndMT の誘導を TNF- $\alpha$  存在下で行うと、TNF- $\alpha$  が TGF- $\beta$  による EndMT を顕著に亢進していることが見出された。以上の結果から、がん微小環境において豊富に存在する炎症性サイトカインである TGF- $\beta$  と TNF- $\alpha$  が協調して EndMT を誘導し、がんの悪性に寄与していることが示唆された。

### 研究テーマ C. EndMT を「治す」

(目的)EndMT を誘導するシグナルを抑制することにより、がんなどの EndMT が関連する疾患の新規治療方法の開発を目指す

(成果)TGF- $\beta$ はEMT(上皮間葉移行)を誘導することにより、がん細胞の浸潤・転移を促すとともに EndMT を誘導することでがん微小環境におけるがん関連線維芽細胞の量を増やし、がん細胞の増殖や悪性化を亢進することから、TGF- $\beta$  シグナルはがん治療の標的として注目を集めている。TGF- $\beta$  には 1~3 の3つのアイソフォームがあり、それぞれ発現様式やシグナル伝達形式に差が見られる。TGF- $\beta$  の阻害剤としてこれまで II 型受容体の細胞外領域に抗体の Fc 領域を結合したキメラ受容体(T $\beta$ RII-Fc)が用いられてきたが、これは TGF- $\beta$ 1 と TGF- $\beta$ 3 は抑制するものの、TGF- $\beta$ 2 は抑制できないことが示されてきた。一方 TGF- $\beta$ 2 は発生過程において EndMT の誘導に重要な役割を果たすことが報告されていることから、本半期では TGF- $\beta$ 2 を含む全ての TGF- $\beta$  アイソフォームを抑制する阻害剤の開発を試みた。

T $\beta$ RII-Fc に I 型受容体(ALK5)の細胞外領域を結合したタンデムキメラ受容体(ALK5-T $\beta$ RII-Fc)を作成した。数種類の培養細胞を用いて T $\beta$ RII-Fc と ALK5-T $\beta$ RII-Fc の TGF- $\beta$ 1~3 に対するシグナル抑制能を検討したところ、T $\beta$ RII-Fc は TGF- $\beta$ 1 と TGF- $\beta$ 3 のみを抑制したが、ALK5-T $\beta$ RII-Fc は全てのアイソフォームを抑制することができた。以上の結果から、ALK5-T $\beta$ RII-Fc は全ての TGF- $\beta$  アイソフォームを標的とできる新規阻害剤であることが示唆され、TGF- $\beta$ 2 を高発現するがんなどの治療への使用が有効であることが期待される。本研究成果は特許出願を行った(特願 2014-163803)。

### 3. 今後の展開

本研究においては、がんなどの疾患において悪性化要因である EndMT の分子機構を明らかにすることを目的として TGF- $\beta$  をはじめとした複数のシグナル伝達経路の役割と明らかにするとともに、それらのシグナルを標的とした新たな治療方法の開発を試みた。今後も本研究をさらに発展させていく予定であるが、これから EndMT を司る分子機構を詳細に明らかにすることにより、さまざまな疾患のみならず心臓の形成などの発生機序の解明が進むという点で基礎生物学上の意義は大きい。さらに、臨床医学の観点では、本課題において開発された TGF- $\beta$  シグナルの新規阻害剤の利用などを通じて EndMT を標的とした癌や心疾患の治療法開発が期待されるという点でインパクトが大きい。

### 4. 評価

#### (1)自己評価

(研究者)

本研究課題を開始した際には、EndMT レポーターマウスと培養細胞の両者を用いて EndMT の分子機構を解明し、関連疾患の治療法の樹立を試みる計画であった。後者の培養細胞を用いた解析は順調に進展し、すでに1報の論文が受理され、現在 2 報の論文を投稿中であり、さらに2報の論文を準備中である。得られた知見をもとに特許出願も2件行い、現在これらのツールを用いて前臨床試験を進行中であり、対象としている疾患ががん・心疾患・糖尿病といった患者数が多いことも考慮して、社会・経済への波及効果の大きさが期待される。つまり、本研究課題においては戦略的な基礎研究を推進することで、科学技術イノベーションのためのシーズを創出することができたと考えられ、この点では研究目的の達成状況は極めて良好である。

また、本研究課題の開始時(平成 24 年 10 月)には研究者は東京大学大学院医学系研究

科において准教授であったが、平成 25 年 7 月に東京薬科大学生命科学部において教授として独立した。研究室の運営は順調であり、研究実施体制及び研究費執行状況といった研究の進め方は良好であった。また、平成 27 年 7 月には東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科にへ異動した。研究者自身にとっては、この異動は臨床研究の機会を大きくするなどの利点も考慮した上での重要な選択であったが、研究課題の遂行に対しては、これらの異動は多少の遅延を招いたと認めざるを得ない(特に EndMT レポーターマウスの樹立)。しかし、領域代表ならびに JST のご理解とご支援のおかげでこれらの遅延を最小限に留めて、研究期間中に EndMT レポーターマウスから血管内皮細胞を調製するところまで到達できたことは大変有難いと感じています。

このような中で、研究者自身にとってはさきがけ研究期間は研究者として大きな飛躍の期間となった。本研究課題は主に血管研究についてのものであったが、本さきがけ研究の成果が認められ、研究者は日本血管生物医学会と日本リンパ学会の理事、さらに日本癌学会と日本生化学会の評議員に就任した。特に日本血管生物医学会では中心的なメンバーとして第 18 回国際血管生物学会(平成 26 年 4 月)の開催に尽力した。また、国際学会の招待講演の回数が増え、血管・リンパ管研究においてはトップランナーの一人として活躍した。現在は血管をテーマとした新学術領域研究の課題を領域代表として提案しており、もしこの提案が採択されればさらに大きなステップアップが期待できる。以上は、領域代表、アドバイザーの先生方ならびにさきがけ研究者との交流のおかげであり、心より感謝しています。

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

(研究総括)

炎症やがんなどの病的状態において血管内皮細胞が内皮間葉移行(EndMT)によって間葉系細胞を生じる。この間葉系細胞が各種病態を進行させることが明らかになりつつある。本研究者は腫瘍組織において TGF- $\beta$ が腫瘍血管における血管内皮細胞に働きかけ、EndMTを誘導することを見出し、さらに腫瘍組織において豊富に存在する他の因子の TGF- $\beta$ による EndMT の誘導における調節機構を明らかにした。本課題において開発された TGF- $\beta$ シグナルの新規阻害剤の利用などを通じて EndMT を標的とした癌や心疾患の治療法開発が期待される。

研究費は、異動に伴って購入が必要となったリアルタイム PCR システムの購入のために 4160 千円の増額、さらに EndMT において起こる遺伝子発現変動をゲノムワイドで解析するために蛍光顕微鏡 2057 千円の増額を行った。

本研究者は、さきがけ研究により、海外の学会における招待講演も多数実施しており、原著論文の執筆も増えており、今後の活躍が十分に期待される。

## 5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Katsura A, Suzuki HI, Ueno T, Mihira H, Yamazaki T, Yasuda T, **Watabe T**, Mano H, Yamada Y, \*Miyazono K. (2016) MicroRNA-31 is a positive modulator of endothelial-mesenchymal transition and associated secretory phenotype induced by TGF- $\beta$ . *Genes to Cells*.

21:99-116
2. Miyazaki H, Yoshimatsu Y, Akatsu Y, Mishima K, Fukayama M, * <u>Watabe T.</u> , Miyazono K. (2014) Expression of platelet-derived growth factor receptor $\beta$ is maintained by Prox1 in lymphatic endothelial cells and is required for tumor lymphangiogenesis. <i>Cancer Science</i> . 105:1116-1123
3. Yoshimatsu Y, Lee YG, Akatsu Y, Taguchi L, Suzuki HI, Cunha SI, Maruyama K, Suzuki Y, Yamazaki T, Katsura A, Oh SP, Zimmers TA, Lee SJ, Pietras K, Koh GY, *Miyazono K, <u>Watabe T.</u> (2013) Bone morphogenetic protein-9 inhibits lymphatic vessel formation via activin receptor-like kinase 1 during development and cancer progression. <i>Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America</i> . 110:18940-18945
4. Yamazaki T, Suehiro J, Miyazaki H, Minami T, Kodama T, Miyazono K, * <u>Watabe T.</u> (2013) The COUP-TFII variant lacking a DNA-binding domain inhibits the activation of the Cyp7a1 promoter through physical interaction with COUP-TFII. <i>Biochemical Journal</i> . 452:345-357.
5. Suzuki HI, Mihira H, <u>Watabe T.</u> , Sugimoto K, *Miyazono K. (2013) Widespread inference of weighted microRNA-mediated gene regulation in cancer transcriptome analysis. <i>Nucleic Acids Research</i> . 41:e62.

## (2) 特許出願

研究期間累積件数: 2 件

1.

発 明 者: 渡部徹郎、宮園浩平、鯉沼代造、江幡正悟、赤津裕一

発明の名称: TGF  $\beta$  阻害機能を持つキメラタンパク質

出 願 人: 東京大学

出 願 日: 2014/8/11

出 願 番 号: 特願 2014-163803

## (3) その他の成果 (主要な学会発表、受賞、著作物、等)

主要な学会発表

1. Watabe T., Roles of signaling and transcriptional networks during the formation of vascular systems (2015) *Asia-Australia Vascular Biology Meeting*, Busan, Korea (招待講演)
2. Watabe T., Roles of signaling and transcriptional networks during the formation of vascular systems. (2014) *The 18<sup>th</sup> International Vascular Biology Meeting*, Kyoto, Japan (招待講演)
3. Watabe T., BMP-9/ALK-1 Signals Negatively Regulate Lymphatic Vessel Formation during Development and Cancer Progression through Down-regulation of Prox1 Expression (2014) *Gordon Research Conference on Molecular Mechanisms in Lymphatic Function and Disease*, Lucca, Italy (招待講演)
4. Watabe T., Roles of TGF- $\beta$  family signals during the formation of vascular systems. (2013) *Joint Symposium of 2<sup>nd</sup> Asia-Pacific Vascular Biology and 10<sup>th</sup> Frontiers of Biomedical Sciences*, Tainan, Taiwan (招待講演)
5. Watabe T., FGF2 negatively regulates endothelial-to-mesenchymal transition in tumor microenvironment. (2013) *TGF- $\beta$  Meeting in Uppsala*, Uppsala, Sweden (招待講演)