

ERATO 末松ガスバイオロジープロジェクト事後評価（最終評価）報告書

【研究総括】末松 誠（慶應義塾大学 医学部 医化学教室／教授）

※期間：プロジェクト開始～平成 27 年 3 月

【研究総括代行】梶村 眞弓（慶應義塾大学 医学部 医化学教室／准教授）

※期間：平成 27 年 4 月～平成 28 年 3 月

【評価委員】（敬称略、五十音順）

堅田 利明（東京大学 大学院薬学系研究科／教授・研究科長）

上村 みどり（帝人ファーマ株式会社 生物医学総合研究所 創薬科学研究所／課長）

西島 正弘（委員長；昭和薬科大学／学長）

福崎 英一郎（大阪大学 大学院工学研究科／教授）

吉川 敏一（京都府立医科大学／学長）

### 評価の概要

ERATO 末松ガスバイオロジープロジェクトは、ガス分子（酸素（O<sub>2</sub>）、一酸化炭素（CO）、硫化水素（H<sub>2</sub>S）、二酸化炭素（CO<sub>2</sub>）、一酸化窒素（NO）等）の受容体を同定し、これらの分子による未知の生体調節機構の解明を行い、新しい病態制御法を創出することを目標とした。「ガスバイオロジー」という言葉そのものが本プロジェクトで創成された新たな学術的領域であり、このプロジェクトが世界に与えた影響は大きい。

末松研究総括の卓越したリーダーシップの下に、工学、理学、医学など異なる専門性を有した研究者が集結し、「ケミカルバイオロジーコアグループ」、「バイオイメーキングコアグループ」、「メディカルアプリケーションコアグループ」の3グループで研究を推進している。「ケミカルバイオロジーコアグループ」は、最先端のナノテクノロジーにより開発されたアフィニティ精製技術を利用し、独創的な発想によるガス標的分子の探索を行い、これまで未知であったガス標的分子を同定することに成功した。この技術により同定された解糖系の酵素である GAPDH<sup>1</sup>や progesterone 結合膜タンパク質である PGRMC1<sup>2</sup>の構造・機能解析により、ガス分子が特異的に結合することで引き起こされる生理作用を解明した成果は、極めて独創性と先導性が高いものであり、「ガスバイオロジー」分野の研究を促進させる上で高く評価でき、創薬の新しいターゲットを示唆した点でも評価できる。「バイオイメーキングコアグループ」は、包括的かつ高空間分解能で生体物質を解析する手法として、高精度分析可能な質量分析イメージング技術や表面増強ラマンイメージング技術を開発した。質量分析イメージング技術の開発は本プロジェクトの大きな成果の一つであり、汎用性の高い技術であるため、関連研究への波及効果も大きいと考えられる。この技術を用い、脳梗塞で虚血を起こした脳のエネルギー代謝の可視化や低酸素状態の脳において、CO と H<sub>2</sub>S が連動して行う血管拡張の機構解明にも成功しており、開発された質量分析技術が生理学的に意味のあるガス依存的な代謝制御を捕らえるのに極めて有効であることを示す例といえる。また、ここで得られた知見は脳血管障害の新しい治療法の開発に繋がるものと期待される。「メディカルアプリケーションコアグループ」は、遺伝子改変動物モデルを新規に開発し、H<sub>2</sub>S 合成酵素であるシスタチオンβ合成酵素の欠損で水腎症が引き起こされること、細胞内のミトコンドリアの機能障害に H<sub>2</sub>S が関与すること、低酸素応答が乳酸の産生だけでなく乳酸代謝全体を制御していることなど、優れた研究成果を挙げており、生体における低酸素応答の新しい機能・

<sup>1</sup> GAPDH : Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

<sup>2</sup> PGRMC1 : Progesterone receptor membrane component 1

概念を提唱するに至っている。これら3つのコアグループにおいては若手研究者がその能力を十分に発揮し、それぞれのグループが開発してきた研究手法と要素技術、及び関連企業が補完的に機能し、優れた研究を展開した。

本プロジェクトでは、3つのコアが開発してきた技術を利用して、ガス分子によるがんの代謝システム制御機構の解明にも取り組んできた。ヒト大腸がん細胞株を用いた肝臓転移モデルマウスを用い、がんは宿主である肝臓の代謝機構を巧妙に利用して自身の生存を図ることや、硫化水素イオンが抗がん剤耐性を引き起こすことなど、独創的な研究成果を挙げている。これらの成果は、がんの代謝制御によりがんを治療できる可能性を示すものであり、従来の直接がんを叩く化学療法や放射線療法等とは異なる新たながん治療薬の開発に繋がるものとして今後の更なる発展が期待できる。

本プロジェクトは ERATO International 型研究として、低酸素、がん研究で世界的に著名なジョンズ・ホプキンス大学のグレッグ・セメンザ（Gregg L. Semenza）教授との共同研究を実施している。若手研究員を派遣して、 $H_2S$  の生体制御機構や、がん細胞の代謝機構について研究を行っている。この共同研究は若手研究者の国際化に資すると共に、研究者ネットワークの拡大にも貢献している。当研究分野の一層の国際的発展につながるものと期待できる。

科学技術への貢献としては、これまで分析が困難であったガス分子を分析できる基盤的技術をいくつも開発したことが特筆に値する。各種の分析技術の開発は、先端的な分析技術を持つ企業との密な協力、共同研究の下に行われた。この分析技術を用いて、ガス分子が介在する生体調節機構の解明に成功しており、今後も様々な未知の生物作用が解明されるものと期待される。成果の一部は PNAS<sup>3</sup> や Nature Communications に掲載され、世界的な評価を受けている。

社会・経済への効果としては、がんと宿主組織の相互作用の解明や脳の低酸素下での血管拡張機構の解明など、新しい抗がん剤標的の発見などの医薬応用に発展可能な知見を掴みつつある点が挙げられる。今後、臨床現場との連携を行えば、医療への貢献が加速されると期待される。また、アフィニティ精製技術は企業に注目され、慶應義塾大学と企業の間で機能性分子の機能解明の共同研究が始められており、すでに産業界で分析技術の利用が展開されているといえる。

以上を総合すると、本プロジェクトは卓越した研究水準を示し、戦略目標「代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御に関する基盤技術の創出」の達成に資する十分な成果が得られたと評価する。

## 1. 研究プロジェクトの設定および運営

### 1-1. プロジェクトの全体構想

ガス分子は極小分子量からなる生体の構成成分であり、生体内に過剰に存在すると毒性を示すが、微量であると神経、血管、免疫系の制御分子として有益な生物作用を発揮することが明らかにされている。しかしながら、その生物作用を発揮するメカニズムや、生体内での輸送、拡散、ガス分子が介する生体の代謝機構の解明は遅れている。それは、糖質、脂質、たんぱく質、核酸などに比べ、生化学的基盤分析技術が乏しく、ガス分子の生体内での受容体の同定を系統的に推進することが困難なことや、ガス分子と生体高分子との相互作用は、生体内でガス分子が結合することによる生体高分子の構造変化によって起きるため、生体情報を良好に保存できる状態でないという意味のある実験ができなかったためである。

本プロジェクトは、これまで欠如していた生化学的基盤分析技術を構築して、ガス分子が結合して生物作用を引き起こす未知の受容体の系統的探索、生体内における時空間的なガス分子の動態解析（局在や局所での濃度）、およびガス分子の代謝システム全体に及ぼす影響の解析に取り組み、その成果を医療へ応用することを目指した。このプロジェクトは、未開拓な分野であるガス

<sup>3</sup> PNAS : Proceedings of the National Academy of the United States of America

バイオロジー（ガス分子による生体制御生物学）に対して、ガス分子の新たな分析技術の開発と生体作用のメカニズム解明を並行して行うという極めて挑戦的なものであり、この分野を世界的にも先導するものとして、ERATO で推進するに相応しいものといえる。

## 1-2. プロジェクトの目標・計画

1-1 で示した研究構想を実現するため、下記①～④の新しい技術を開発し、生体内のガス分子が「いつ、どこで、どのように」働くかを、分子から動物個体レベルに及ぶ各階層で解析し、ガス分子自身あるいは体内のガス分子の量や情報伝達機構を制御できる医薬品等の探索を行った。

- ① ナノテクノロジーにより開発されたアフィニティカラムを用いたガス標的分子の系統的探索技術の開発
- ② 解剖学的構成を崩さずに細胞特異的な代謝システムを解析可能とする質量分析イメージング技術の開発
- ③ 金、銀などの金属微粒子ナノ配列技術による、ガス分子および低分子化合物の検出を可能とする振動分光学的バイオイメージング技術の開発
- ④ ガス標的分子等の発現がコントロールされた疾患モデルマウスの開発

アフィニティカラム精製法、質量分析イメージング技術、振動分光学的バイオイメージング技術、疾患モデルマウスなどを導入した研究アプローチは、科学的にも技術的にも新規性に富むと共に、構造生物学、物理化学、分析化学、生化学、分子生物学、医学などの広い研究分野を融合した学際的なものとして高く評価できる。

## 1-3. プロジェクトの運営

本プロジェクトは、アフィニティナノビーズ（以下、ナノビーズ）を駆使したガス受容体の系統的な探索、ガス分子受容体の構造と機能の解明、及び細胞への作用機構の解明を目指した「ケミカルバイオロジーコアグループ」、質量分析イメージング技術や振動分光学的イメージング技術の開発と、ガス分子による生体制御機構解明を目指した「バイオイメージングコアグループ」、遺伝子改変動物を新規作出して病態制御機構の解明を目指した「メディカルアプリケーションコアグループ」3つの研究グループから構成されている。グループリーダーには、各グループの研究基盤となる工学、理学、医学を専門とする優秀な研究者が選ばれており、グループリーダーのもとに若手研究員も適切に選考、配置されている。3つのグループは、同一の研究棟内の物理的に近い場所で研究が行われ、末松研究総括は優れたマネジメントにより、これらのグループを掌握、相互のシナジー効果を発揮できるように、極めて適切に統括していたと評価する。

研究拠点を集約したことは、装置等の有効活用の面でも有利に働いており、研究費の効率的な執行にも貢献した。

質量分析イメージング、振動分光学的イメージング技術の開発にあたっては、分析手法やナノ材料開発において最先端技術を持つ企業の協力の下、効果的な連携が行われたと評価できる。

また、下記の4-3に述べるように ERATO International 型研究としてジョンズ・ホプキンス大学のグレッグ・セメンザ教授との共同研究体制を確立し、研究を加速させた。

〔研究プロジェクトの全体構想〕〔研究プロジェクトの目標・計画〕〔研究プロジェクトの運営〕  
a+（十分に的確かつ効果的である）

## 2. 研究の達成状況および得られた研究成果

### 2-1. ケミカルバイオロジーコアグループ

本プロジェクトでは、ガス分子の生体作用解明の方法の一つとして、ナノビーズを用いたアフ

イニティ精製技術<sup>(1)</sup>を開発し、ガス分子と結合して生体作用をもたらす未知のガス分子受容体を系統的に探索し、その構造・機能解析をするアプローチをとった（1-2. 開発項目①）。ガス分子は金属含有タンパク質の金属中心に配位しやすい性質を持っていること、特にヘムたんぱく質はCO、NO、O<sub>2</sub>などに応答することに着目し、ヘム（鉄原子を持つ補欠分子族）をナノビーズに接合して、その補欠分子族に特異的に結合するタンパク質をガス受容体たんぱく質として網羅的に探索する技術を開発した。この発想は極めて独創性に富むものであり、開発された技術により、解糖系の酵素として知られていたGAPDHやプロゲステロンを結合することは知られていたが生理機能が不明であったPGRMC1が、ガス受容体タンパク質として同定され、これらたんぱく質の新しい機能が見出された。

GAPDHに関しては、この酵素の活性がヘムにより阻害され、COがヘム部分に結合することで、その阻害効果がさらに増強されること、また、COはGAPDHのヘム部分に結合してNOによるGAPDHの酸化を阻害し、NOによる細胞死誘導を抑制することなど非常に興味深い結果が得られた。PGRMC1に関しては、X線構造解析により、PGRMC1のヘムはたんぱく表面より突出しこのヘム部分同士が結合することにより二量体化すること、二量体化されたPGRMC1には上皮成長因子受容体（EGFR<sup>4</sup>）が会合してがん増殖シグナルを増強すること、一方、COはヘムに入り込み、PGRMC1の二量体構造を解離することで、がん増殖シグナルを阻害することなど、新規性に満ちた成果が得られている。平成28年2月にPGRMC1はヘム依存的に二量体を形成し、がんの増殖と化学療法耐性を促進することを明らかにした論文を発表しており、新たながん治療薬の創薬ターゲットを示唆するものとしても高く評価できる。

O<sub>2</sub>ガス濃度がオリゴデンドロサイト前駆細胞（OPC）の分化・増殖に及ぼす影響についても研究が展開され、中枢神経系の生理的環境に近い3%O<sub>2</sub>ガス濃度でのOPCの分化速度は、通常の培養環境である20%O<sub>2</sub>ガス濃度での分化速度に比べ遅く、より生体に近いものであることなど、興味深い成果が数多く得られている。また、低酸素、甲状腺ホルモン存在下、*in vitro*でアダルト型OPC（中枢神経系の体性幹細胞の一種で、活発に細胞分裂を繰り返す髄鞘形成期のOPCの一部が髄鞘化完了後に、分化能を保持したまま休眠状態になった細胞）を作成することに成功し、この成果は、体性幹細胞の分化を簡便に誘導する手法のヒントとなるものとして期待される。

## 2-2. バイオイメージングコアグループ

本プロジェクトでは、2-1の分子レベルからの研究手法に加えて、ガス分子が生体内で感知・受容されることにより惹起される代謝システムの変化を可視化して解析し、生理的に意味のあるガス依存性代謝制御ポイントの探索を目指した。ガス分子を介した標的物質は複数あることや、目的物質の細胞内分布や組織での局在に着目して、包括的に高空間分解能で生体の物質代謝を解析する手法が必須との考えに基づき、質量分析イメージングでの解析技術の開発が行われた。

質量分析技術は、近年大きく進歩し、二次元的に画像化する質量分析イメージング技術が開発され、細胞や組織の形態情報を保ったまま細胞内の代謝物質等の微量成分を測定することが可能となり、また質量分析装置を2段に直列接続して行うタンデム質量分析により、高感度に代謝物を解析することもできるようになっている。本プロジェクトにおいて、定量性は劣るが空間分解能に優れたマトリクス支援レーザー脱離イオン質量分析イメージング(MALDI-IMS<sup>5</sup>)と、組織をすりつぶして測定するために空間分解能は得られないが、定量分析に優れたキャピラリー電気泳動質量分析(CE/ESI/MS<sup>6</sup>)を融合した「定量的質量分析イメージング法」を開発した（1-2. 開発項目②）。これにより、定量性を保ちつつ、ガス分子の生体内作用点の代謝解剖学的解析が可能となったことは高く評価できる。

<sup>4</sup> EGFR : Epidermal growth factor receptor

<sup>5</sup> MADLI-IMS : Matrix Assisted Laser Desorption Ionization / Imaging Mass Spectrometry

<sup>6</sup> CE/ESI/MS : Capillary Electrophoresis-ElectroSpray Ionization-Mass Spectrometry

また、質量分析には前処理として、適切な試料調製が必要であるが、分解されやすい低分子代謝物の分解を抑える効果的な試料調製方法として、組織を急速冷却して代謝物を捕捉する方法（in-situ freezing 法）を開発した。この処理を施したマウス虚血脳の代謝物の経時間的変化を可視化した。その画像から、虚血部分とその周辺の血流が低下しているが、細胞死は免れている領域（ペナンプラ）の代謝には明らかな違いがあり、ペナンプラでは血流が低下するにもかかわらず、時間経過とともにアデノシン三リン酸（ATP）が増加することが判明し、梗塞病巣の近隣部では、活発にエネルギー産生が行われていることが示唆された。この結果は、質量分析の手法を用いてガスが介在する代謝物の同定とその可視化に成功した画期的な成果であるといえる。脳梗塞時にペナンプラに効果的な処置を施すことにより、脳細胞の壊死を最小限に食い止めることができる可能性があり、メカニズム解明に向けた研究のさらなる発展を期待する。別の試料調製方法として、杉浦悠毅「さきがけ」専任研究員（「疾患における代謝産物の解析および代謝制御に基づく革新的医療基盤技術の創出」領域）と共に、マイクロウェーブを短時間照射して個体の代謝を止めるという画期的な方法である Focused MicroWave 法（以下、FMW 法と称す）を開発した。これにより、in-situ freezing 法では分析できなかった解糖系の代謝物なども測定できるようになり、質量分析イメージングにおいて、測定可能な生体分子の種類を拡張した。in-situ freezing 法や FMW 法による前処理の創意工夫により、質量分析イメージング能力の向上に努力している点も評価に値する。

本プロジェクトでは、中枢神経系で産生されるガスによる脳局所血流調節と代謝メカニズムの解明に取り組んできた。脳では神経細胞に局在する構成型ヘムオキシゲナーゼ（HO-2）により CO が産生されることが分かっていたが、生理学的な役割は不明であった。そこで CO を受容するたんぱく質であるシスタチオンβ合成酵素（CBS）に着目し、マウスを用いて CO や H<sub>2</sub>S 量の変化と連動して、血管の口径や脳のエネルギー代謝がどのように変化するかを検証した。その結果、脳では CBS が血管拡張作用のある H<sub>2</sub>S を生成しており、正常時の脳では、CO が CBS の働きを阻害して H<sub>2</sub>S の量を抑えているため、血管が少し収縮した状態にあることが分かった。一方、低酸素時には CO 濃度が低下し、CBS の抑制が解除され、H<sub>2</sub>S が増加することによって血管が拡張することを明らかにした。これは、低酸素時の神経血管ユニット（Neurovascular Unit）における O<sub>2</sub>—CO—H<sub>2</sub>S ガスシグナリングを介した血管拡張反応機構を解明した大きな発見である。（平成 24 年 1 月 10 日プレス発表：<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20120110/>）

上記の H<sub>2</sub>S の生体組織内濃度や分布の分析において、従来の H<sub>2</sub>S 測定方法では生体試料の一部から H<sub>2</sub>S や S イオンが遊離して測定値が過大になる可能性があった。これに対して本プロジェクトでは、H<sub>2</sub>S の特異的な反応で二次的に生成される低分子を用い、トリプル四重極型液体クロマトグラフィー質量分析（トリプル四重極型 LC-MS/MS<sup>7</sup>）により HS<sup>-</sup> の高感度な測定に成功した。また、H<sub>2</sub>S の生体組織での局在を可視化するため、飛行時間型二次イオン質量分析法（TOF-SIMS<sup>8</sup>）を用い、前処理に銀蒸着板を使う先端的な技術を導入して H<sub>2</sub>S の測定に挑んだ（1-2. 開発項目②）。生体試料の測定では、ガスのような低分子とたんぱく質等の高分子に由来する夾雑成分を区別することが困難で、夾雑成分を低減する必要があった。H<sub>2</sub>S と反応性が高い銀に着目し、銀を均一に塗布した銀蒸着板に生体試料を反応させ、かつ、測定では夾雑成分となる銀最表面をイオンビームで除去することで、銀と H<sub>2</sub>S の反応由来による Ag<sub>2</sub>S や臭素、ヨウ素等の成分を可視化することに成功した。

さらに、多光子生体顕微鏡装置を使って、生きたマウスの脳血管拡張作用を直に観察できる実験系も構築し、低酸素になると血管が拡張する様子を観察できるようにした。この新しい手法は、生きたまま観察ができるという点で画期的である。また、後述するがんの代謝研究において、アンモニアの局在を明らかにするため、タンデム質量分析イメージング技術を使ってアンモニア付加体を検出する方法を開発した。フリーの状態でアンモニアを質量分析することはできなかった

<sup>7</sup> LC-MS/MS : Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry

<sup>8</sup> TOF-SIMS : Time of Flight Secondary Ion Mass Spectrometry

が、がん組織の中にトリグリセリドとアンモニアの複合体が蓄積していることを見出し、前処理を工夫することにより、アンモニア付加体で検出する手法を確立した（1-2. 開発項目②）。検出の困難さを克服するために、アンモニアの複合体に着目した研究者の発想が光る成果といえる。

以上の高分解能をもった質量分析イメージング技術の開発は、病理の解明に貢献することを期待させるものである。質量分析イメージングでは世界でも希少なアプリケーション研究といえる。

一方、イオン化できないために質量分析機器が利用できない物質を解析する方法として、これらの物質が金属と相互作用して分子特異的に振動信号を発する性質（ラマン散乱）を利用した振動分光学的イメージング分析技術の構築が行われた。具体的には、最先端のナノ微細加工技術により開発された金ナノ粒子配列基板（Gold Nano Coral：以下、GNC と称す）と生体試料を反応させ、基板表面上の金粒子間のナノギャップで増強されるラマン散乱光を分光学的に解析するイメージング技術（GNC-based SERS-imaging<sup>9</sup>）を開発し（1-2. 開発項目③）、この技術を用いて尿素分子のイメージングに成功した（2-4）。振動分光学的イメージング分析技術の開発は、標識や前処理なしで測定できる点で MALDI-IMS より優れており、質量分析技術を補完する独創的な分析手法として高く評価できる。

銀蒸着板を用いた TOF-SIMS、及び金ナノ粒子配列基板を用いた GNC-based SERS-imaging は、金属微粒子ナノ配列に卓越した技術を持つ富士フィルム（株）との共同研究によるものである。企業との効果的な連携により基盤的なバイオイメージング分析に関して世界をリードする優れた技術が開発され、この技術を用いてガス分子の機能に関する顕著な研究成果を上げた。また、分析に可視化する技術を取り入れたことは、分析結果の評価において説得力があり、臨床応用も可能な有益な方法といえる。

### 2-3. メディカルアプリケーションコアグループ

生体レベルでのガス分子が介在する代謝調節メカニズムを解明するために遺伝子改変マウスは必須なツールである。本プロジェクトでは CO や H<sub>2</sub>S を生体内で生成する酵素遺伝子や、ガス分解遺伝子の発現を自由に制御できるマウスを作製し、ガス分子の存在量を制御することで、生体組織内のガス分子の生理機能を探索できる実験系を構築した（1-2. 開発項目④）。具体的には、H<sub>2</sub>S が有する生理機能の解明を目指し、未知の領域が多い H<sub>2</sub>S の分解・代謝系の解明に挑んだ。ガス応答性たんぱく質の遺伝子改変マウスの作製は、今後のガスバイオロジー研究に非常に役立つものと考えられる。

H<sub>2</sub>S 合成酵素である CBS に着目し、CBS を欠損したマウスを作製したところ、腎臓でのカルシウム再吸収障害で起きる水腎症が高頻度に現れた。CBS を欠損したマウスは低カルシウム血症を起こしており、その原因は、カルシウムトランスポーターであるナトリウム・カルシウム交換輸送体（NCX1<sup>10</sup>）の発現が低下し、カルシウムの再吸収が低下していることであるとことを明らかにし。また、ビタミン D 活性酵素（ $\alpha$  酵素（ $\alpha$  ミン、カルシウム）の発現が亢進しており、CBS はビタミン D 依存的に発現制御を受け、さらにビタミン D 受容体（VDR）に特異的な転写因子として働く可能性を示した。これは CBS の新しい機能の発見であり、今後、より詳細なメカニズムの解析を期待する。

また、ミトコンドリアにおいて H<sub>2</sub>S を分解すると考えられている酵素である HSRE<sup>11</sup>に着目し、薬剤投与によって HSRE の発現を抑制できる遺伝子改変マウス（テトラサイクリン誘導性遺伝子発現ノックダウンマウス）を作製し、H<sub>2</sub>S の分解機構の破綻が生体に与える影響を調べたところ、空腹時の顕著な血糖値低下、個体サイズと体重、及び生存率の低下がみられた。電子顕微鏡によりミトコンドリア数が減少していることが観察され、ミトコンドリアの膜電位が低下しているこ

<sup>9</sup> GNC-based SERS-imaging : Gold Nano Coral-based Surface-Enhanced Raman Scattering

<sup>10</sup> NCX1 : Na(+)/Ca(2+)-exchanger1

<sup>11</sup> HSRE : H<sub>2</sub>S resolving enzyme

とも判明した。これらから、 $H_2S$  の除去機構の破綻によって  $H_2S$  が蓄積し、ミトコンドリア機能が障害を受け、心機能障害が生ずることが明らかにされた。この成果は、 $H_2S$  の過剰な蓄積の有害性を初めて示すものである。今後は、 $H_2S$  がどのたんぱく質や代謝物に反応するのかなどを調べることで、 $H_2S$  機能の解明がさらに進むことを期待する。

さらに、低酸素応答による細胞内エネルギー代謝制御機構の解明も行った。プロリン水酸化酵素（PHD<sup>12</sup>）は低酸素誘導因子（HIF<sup>13</sup>）の活性を負に制御しており、PHD2 を欠損すると HIF が活性化し恒常的に低酸素応答を ON にする。一方、低酸素応答の結果、細胞内のエネルギー代謝は嫌気解糖となることが知られている。PHD2 を欠損した細胞では乳酸が増加するにも拘わらず、個体レベルでは血中の乳酸が減少していることを示し、低酸素応答が乳酸の産生だけでなく、乳酸代謝全体を制御していることを明らかにし、低酸素応答の新しい概念を打ち立てた。今後、この概念のさらなる詳細な実証が待たれる。

#### 2-4. がん代謝機構の解明について

本プロジェクトは、ガス分子によるがんの代謝システム制御の解明に取り組んだ。従来のがん標的薬では薬剤耐性が生じて治療効果が発揮できなくなることから、がん細胞の代謝システムの兵糧攻めや、がん細胞が自己防衛に使う代謝システムの破壊に効力のある薬剤を開発してがん治療効果を高めることを目指した。この目的のため、肝臓にヒト大腸がん細胞株を移植した超免疫不全マウスを用い、本プロジェクトで開発した高い空間分解能の定量的質量分析イメージング技術や振動分光学的バイオイメージング技術を用いて研究を進めている。肝臓に転移したヒト大腸がんは、肝臓本来の役割である「アミノ酸をブドウ糖に変換すること（糖新生）」を利用して、腫瘍が自らに必要な核酸合成や ATP などの産生を促進させ、酸化ストレスや薬物解毒に必要な代謝物の合成を担保し、結果として肝臓の糖新生は減少することや、腫瘍のグルタミノリシス（グルタミンから乳酸を産生する代謝経路）は、グルタチオンの維持に貢献するのみならず、腫瘍が産生するアンモニアを尿素に代謝し、腫瘍がアンモニアの毒性から逃れることに寄与することを明らかにした。さらに、がん幹細胞の生存にグルタミノリシスによって増加する還元型グルタチオン（GSH<sup>14</sup>）が関わることや、硫化水素イオン（HS<sup>-</sup>）が抗がん剤を無力化するのに大きな役割を果たすことも明らかにした。ガス分子を介したがん増殖機構の解明は、腫瘍が宿主組織の代謝特性を利用して自身の生存を図るという新しい概念を産み出すとともに、がんの斬新な治療法の開発にも繋がる成果と言える。

#### 2-5. 予備評価後における成果

本プロジェクトは平成 25 年度に事後評価（予備）を行った。その後の 1 年間並びに平成 27 年 4 月～平成 28 年 3 月までの特別重点期間内で得られた代表的な成果として、下記のもの挙げられる。

- (1) CO/CBS 系に介在するアルギニンメチル化酵素 PRMT1 による糖代謝酵素のメチル化・脱メチル修飾による調節として、先の基質 PFKFB3 に加えて、新たに M2 型のピルビン酸キナーゼ（PKM2）を同定している。さらに、メチル化酵素 PRMT1 の自己メチル化が PRMT1 の核内移行に必要で、核内での基質 PFKFB3 および PKM2 のメチル化が、転写の活性化に寄与することを見出している。解糖系酵素群のメチル化修飾動態の調節から、がん細胞内のエネルギー代謝を人為的に制御できる可能性もあり、細胞形質転換技術などへの応用が期待できる。
- (2) 新規の CO ガス受容体として同定した PGRMC1 は、癌への効果ばかりでなく、肝炎やメタ

<sup>12</sup> PHD : Prolyl hydroxylase

<sup>13</sup> HIF : Hypoxia inducible factor

<sup>14</sup> GSH : Glutathione

- ポリックシンドロームにおいても作用を示すことを見出している。PGRMC1 の機能制御技術の進展は、多くの疾患に対する新たな創薬開発の基盤となることが期待できる。
- (3) 低酸素下でアダルト型 OPC に変換させるマスター遺伝子として Runx1 を同定し、さらに HIF の安定化が Runx1 の発現を上昇させることを明らかにした。
  - (4) CO/化合物 X は、脂肪酸やコレステロールの輸送に関与する PGRMC1 の機能を抑制し、肝保護作用を行うことを示した。
  - (5) プロピオン酸や酪酸などの直鎖の短鎖脂肪酸が選択的に ASC/PYCARD に結合し、inflammasome 形成を調節することを明らかにし、クローン病などの治療・予防に結びつく可能性を示した。
  - (6) Gold Nano Coral(GNC)デバイスを用い、ラマン顕微鏡による Surface-enhanced Raman Scattering(SERS)を測定する方法を改良することで CO などのガス分子バイオイメージングを更に進化させることに成功しつつある。
  - (7) 大気圧 MALDI の特徴を活用して組織内濃度の極めて低いグルタチオンパースルフィドの組織内分布測定に成功した。
  - (8) 低体温療法の生体内作用点の代謝解剖学的研究により、低体温療法の至適化にはアセチル基代謝の制御が重要であることを明らかにした。

以上、本プロジェクトは、ガス分子による未知の生体制御機構を解明するための基盤的分析技術を開発し、幾つかの新しいガス分子受容体の同定とそれらの機能解析に成功した。これらの研究成果は、新たな視点を盛り込んだ挑戦的、創造的、融合的な研究として高く評価でき、各研究テーマがそれぞれパイオニア的な成果をあげていることは特筆に値する。特許出願を優先し、その後論文化する手順を踏んでいるため、平成 25 年までの論文発表は十分とはいえなかったが、平成 26 年から 27 年にかけて多数の論文を発表している。この間、学会発表、アウトリーチ活動、特許の申請も数多く行われてきた点についても評価できる。今後、更に多数公表されることを期待する。

〔研究の達成状況および得られた研究成果〕 a+（十分に高い水準にある）

### 3. 研究成果の科学技術、社会・経済への貢献

#### 3-1. 科学技術への貢献

前述したとおり、「ガスバイオロジー」という言葉そのものが本プロジェクトで創成された新たな学術的領域であり、このプロジェクトが世界に与えた影響は大きいと考える。

NO、CO、H<sub>2</sub>S などのガス分子の生体内での輸送、拡散、代謝機構、生物活性については、他の生体成分と比べて分析技術が乏しいことにより、多くのことが未解決となっていた。このような状況の中、ナノビーズを用いたガス分子受容体の網羅的解析法や、精密質量分析イメージング装置を用いたガス分子の新規イメージング法の開発など革新的技術により、ガス分子の数々の新しい機能を明らかにした。両技術とも極めて汎用性の高い技術であり、応用分野は広く、産業界においても大きく貢献すると思われる。また、ベッドサイドで分析できる次世代型解析装置群の開発に資するものと期待できる。

これらの分析技術を用いて行われたガス分子の新規受容体の発見とその機能の解明は、今後、様々な疾患の病態の解明や治療法の開発につながることを期待できる。また、生体のシグナル伝達の観点からすれば、ガス分子の受容・応答に関わるシグナル伝達系が、これまでに解明されてきた多くのシグナル伝達経路とは差別化され得るユニークな特性を有する機構として、新しい概念の創出へと繋がる可能性も高い。

以上、これらの技術開発とその技術を用いて明らかにされた研究成果は、ガスバイオロジー研究において、極めて独創的、かつ先導的であり、国際的にも高く評価されるものである。従って、科学技術への貢献は大きいものと評価できる。

### 3-2. 社会・経済への貢献

ガス分子によるがんの代謝制御の解明や虚血脳での  $\text{H}_2\text{S}$  の産生による血管拡張の発見などの研究成果は、疾患の治療法や新しい創薬ターゲットの可能性提示しており、今後のさらなる研究の進展で、医療イノベーションとしての社会貢献が期待される。

慶應義塾大学と機能食品の開発を目指す企業では、アフィニティ精製技術を利用して機能性分子の機能解明をする共同研究が研究期間の中盤から始められている。ERATO プロジェクトで開発された技術がいち早く産業界に利用されたひとつの好例といえよう。

また、本プロジェクトで開発された定量的質量分析イメージング法などの分析技術は、先導的なものであり、今後広く利用されることが予想され、国内の経済に貢献することが期待される。

〔科学技術への貢献〕〔社会・経済への貢献〕 a+（十分な貢献が期待できる）

## 4. その他特記すべき事項

### 4-1. アウトリーチ活動

プロジェクト発足以来、毎年5件前後、高校や大学などで、研究紹介の講演を行った。これ以外にも、毎年の新聞、テレビ、科学雑誌などメディアでの情報発信や、プロジェクト主催、および、学協会との共催によるシンポジウムの開催などのアウトリーチ活動が行われ、生体内のガスが介する代謝機構や、病態制御について、学生や一般向けに理解促進を図る努力がなされていたと判断する。

### 4-2. ERATO International 型研究における相手国機関との研究交流実施状況

本プロジェクトは ERATO International 型研究として、ジョンズ・ホプキンス大学、細胞工学研究所のグレッグ・セメンザ教授と共同研究を行っている。セメンザ教授は、低酸素研究で世界的に著名な研究者で、低酸素における細胞や個体の環境応答において重要な働きをする転写因子（HIF）の発見者であり、また HIF とがん悪性化機構の研究の第一人者でもある。このような第一級の研究者との共同研究は、本プロジェクトの研究を世界に発信できる点でも有効であったと判断する。

平成23年からは若手研究者1名をセメンザ研究室に派遣し、低酸素と  $\text{H}_2\text{S}$  産生酵素の関わりや、CO が関与する抗がん剤耐性獲得のメカニズムについて研究を行っている。セメンザ教授の低酸素やがんに関する知見を、日本側が有する各種分析技術による解析に取り入れ、効果的に研究が進められており、同時に、積極的な人材育成にも取り組んだ。

共同研究により、低酸素下において HIF1 $\alpha$  が CBS の発現を誘導し、血管拡張作用のある  $\text{H}_2\text{S}$  の産生が上昇させることを分子レベルで明らかにした。さらに、マウスを用いた実験でも、低酸素状態に暴露された脳の血流維持や細胞損傷等の軽減のメカニズムの一端を解明した。

また、CO が関与するがんの糖代謝経路についても研究を行った。糖代謝酵素 PFKFB3<sup>15</sup> はがん細胞ではメチル化されているが、CO が CBS 活性を阻害することで脱メチル化されると、PFKFB3 の酵素タンパク質が分解され、ブドウ糖代謝の流れがペントースリン酸回路という分岐した代謝

<sup>15</sup> PFKFB3 : 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3

経路にシフトし、グルタチオンの還元力を持つ電子伝達体である NADPH<sup>16</sup>量が増大することで GSH が増大、がん細胞が抗がん耐性や、酸化ストレス耐性を獲得していることを明らかにした。

（平成 26 年 3 月 17 日プレス発表：<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20140317-2/index.html>）

また、両教授の相互訪問による研究議論や、研究講演の交流が行われ、これらをきっかけとして、研究者ネットワークが広がりを見せ、他の研究者との共同研究にもつながっている。この国際的な研究協力体制の構築は、今後のこの分野の国際的発展につながるものと期待できる。

## 5. 総合評価

本プロジェクトは、代謝経路マップにまだ多く隠されているガス分子の受容体を探索・同定し、これらの分子によって駆動する未知の生体制御機構を包括的に解明することにより、新しい病態制御法の創出を推進することを目標とした。目標達成に向け、プロジェクトはアフィニティーナノビーズを用いたガス分子受容体の網羅的解析法や高分解能精密質量機器を用いたガス分子の *in situ* イメージング法などの革新的技術を開発し、NO、CO、H<sub>2</sub>S などのガス分子の新しい機能を数多く明らかにしてきた。生化学的基盤技術が欠如していたガスバイオロジー研究に極めて大きな貢献をしていると評価できる。脳虚血やがん等の疾患におけるガス分子の役割についても世界をリードする研究成果が得られ、将来治療法にも繋がるものであり、今後の更なる発展が期待できる。

プロジェクト運営においても、3つのグループが開発してきた研究手法と要素技術、及び関連企業が補完的に機能するような研究体制を構築して、効果的に進めてきている。大学等の研究機関と企業との連携で基盤技術を深化させていく姿は、大学等の研究機関における研究のモデルケースの一つになると考えられる。

現在までの研究成果で、医学・医薬的応用の発展性も見えており、研究終了までのさらなる成果に大きな期待が持てる。臨床現場との協力関係が醸成されると、本プロジェクトの研究は一層進展するものと思われる。

末松誠研究総括が平成 27 年 4 月に国立研究開発法人日本医療研究開発機構の理事長に就任したため、平成 27 年 4 月から平成 28 年 3 月までの特別重点期間中はグループリーダーであった梶村眞弓准教授が研究総括代行に就任し、研究を遂行した。この期間もプロジェクトは高いレベルの研究活動を継続し、成果を挙げたと判断した。

以上、総合的に判断すると、末松ガスバイオロジープロジェクトは卓越した研究水準を示していると認められ、戦略目標「代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御に関する基盤技術の創出」の達成に資する十分な成果が得られたと評価する。

〔総合評価〕 A+（十分な成果が得られた）

以上

<sup>16</sup> NADPH : Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate