



ムーンショット目標 2

2050年までに、超早期に疾患の予測・予防をすることができる
社会を実現

実施状況報告書

2021 年度版

2021年4月～2022年3月

恒常性の理解と制御による糖尿病および

併発疾患の克服

片桐 秀樹

東北大学 大学院医学系研究科



研究開発プロジェクト概要

AI・数理モデル解析などを活用して、代謝・循環の調節に重要である自律神経を介した臓器間ネットワークの機序を包括的に解明し、その制御手法を開発し、未病期段階の状態をより精密に検出します。それにより、2050年には、糖尿病および併発疾患の発症を未然に防ぐ社会の実現を目指します。

https://www.jst.go.jp/moonshot/program/goal2/23_katagiri.html

課題推進者一覧

課題推進者	所属	役職
山田哲也	東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科	教授
青木淳賢	東京大学 大学院薬学系研究科	教授
井上飛鳥	東北大学 大学院薬学研究科	准教授
土井隆行	東北大学 大学院薬学研究科	教授
片桐秀樹	東北大学 大学院医学系研究科	教授
中村和弘	名古屋大学 大学院医学系研究科	教授
西村幸男	公益財団法人東京都医学総合研究所 脳・神経科学研究分野	プロジェクトリーダー
吉本光佐	奈良女子大学 大学院人間文化総合科学研究科	准教授
笠原好之	東北大学 大学院医学系研究科	講師
新妻邦泰	東北大学 大学院医工学研究科	教授
寺谷俊昭	慶應義塾大学 医学部	専任講師
木村郁夫	京都大学 大学院生命科学研究科	教授
眞鍋一郎	千葉大学 大学院医学研究院	教授
鈴木一博	大阪大学 免疫学フロンティア研究センター	教授
正本 和人	電気通信大学 大学院情報理工学研究科	教授
久米真司	滋賀医科大学 医学部	講師（学内）
松本桂彦	理化学研究所 生命機能科学研究センター	研究員
史 蕭逸	東京大学 大学院医学系研究科	助教
藤生克仁	東京大学 大学院医学系研究科	特任准教授
田宮元	東北大学 大学院医学系研究科	教授
澤田正二郎	東北医科薬科大学 医学部	准教授
水藤寛	東北大学 材料科学高等研究所	教授
長山雅晴	北海道大学 電子科学研究所	教授
千葉逸人	東北大学 材料科学高等研究所	教授

1. 当該年度における研究開発プロジェクトの実施概要

本研究開発プロジェクトは、2050年に、健診で採血を行わなくても、糖尿病や併発疾患についての情報が本人にフィードバックされ、超早期の段階で正常に復することが一般的となる社会の実現を目指すものである。当該年度は、臓器間ネットワークの解明とその活用、糖尿病における多臓器変容メカニズムの解明と制御、ヒトでの生体情報を簡便に取得する技術の開発とヒトデータ解析に向け、医学・生物学の研究者と数理科学者とが連携し、研究開発を展開した。

個体レベルの恒常性について、数理的解析を進めつつ、臓器間ネットワークの分子機序の解明や中枢・末梢の神経シグナルを解析する基盤が整い、これらに基づく制御法の提案が行える段階となった。さらに、併発疾患については、心不全に対する骨髄細胞の機序、非アルコール性脂肪肝炎(NASH)への中鎖脂肪酸-GPR84シグナル、ケトン体投与などの機序やターゲットが想定できる。特に心不全については、超早期にヒトで検出する手法の開発に成功し、社会実装につなげる。また、実際に健常人と考えられていたヒトで寿命に関連する糖代謝状態や肝インスリンシグナルとの連関が想定され、超早期糖尿病の新たな定義づけやその意義が明らかとなる。

研究開発項目1: 臓器間ネットワークによる恒常性メカニズム解明と治療・診断法の開発

実施内容:

代謝や循環に関わる個体レベルでの恒常性を維持する臓器間ネットワーク機構の解明を進める。特に、求心性経路の分子機構、中枢神経での統御機構、遠心性神経の活動実態、腸管を介した制御、液性因子による代謝関連主要臓器・組織の個体レベルでの制御機構について解明するとともに、研究開発項目4の数理解析との連携により、包括的な理解につなげる。これにより、多臓器生物における恒常性の維持、極言すると、生命とは何かについての理解を進める。さらに、恒常性の乱れた状態としての糖尿病や併発疾患に対して、これらの研究から得られた知見から見いだされた新たな治療・予防・診断の制御候補を提案し、食事や化合物、デバイスでの介入を進める。

当該年度においては、代謝や循環に関わる個体レベルでの恒常性を維持する臓器間ネットワーク機構の解明を進めた。特に、求心性経路の分子機構の解明に連携して着手し、中枢神経での統御機構については、新たに視床下部に存在するオキシシン神経群が褐色脂肪熱産生を制御する中枢機能を持つことを発見した。遠心性神経の活動実態やヒトでの制御に向けた倫理等の手続きを進め、腸内細菌が糖嗜好性に関与すること、さらには、中鎖脂肪酸カプリン酸(C10)やラウリン酸(C12)がGPR84を介し非アルコール性脂肪肝炎(NASH)を抑制することを見出した。

研究開発項目2: 糖尿病における多臓器変容メカニズムの解明と制御

実施内容:

糖尿病は多臓器の変容によっておこり、また、糖尿病になることで多臓器の変調をきたす。心・肝・脳・腎などの臓器や血管において、臓器の変容を機能・形態の両面から解析する。さらに、炎症細胞などの制御機構との関連やケトン体の投与効果などを検討し治療・診断標的を提案し、実証につなげる研究を促進する。研究開発項目1とも連携して、神経系の関与についても検討を進め、さらに研究開発項目4における数理科学によるモデル解析も加え、糖尿病に関連する多臓器変容のメカニズムを解明し、治療・予防・診断法の開発に

つなげる。

当該年度においては、糖尿病における多臓器変容メカニズムを解明するため、心・肝・脳・腎・骨髄などの臓器や血管において、臓器の変容を機能・形態の両面から解析した。特に、心不全マウスの造血幹細胞の移植により、レシピエントマウスで自然発症の心不全が誘導され、さらに、腎臓や骨格筋などで、ストレス脆弱性を増すことを発見した。また、脂肪組織に形質芽細胞が存在することを発見しその意義の検討を進めた。脳毛細血管内の赤血球動態の定量解析手法を確立した。ケトン体の投与によりマウスの寿命が大きく伸長すること、投与タイミングが重要であることを見出した。

研究開発項目3:ヒトでの生体情報を簡便に取得する技術の開発とヒトデータ解析

実施内容:

糖尿病や併発疾患は、特に病初期は無症状であることが多い。これらの患者を超早期に見出すためには、できる限り簡便かつ非侵襲的に検出できる技術の開発が重要である。そこで、まず、心機能について、技術開発を進める。並行して、糖尿病における種々の変容を解析する技術を開発する。これらの技術を用いて、ヒトデータを取得し解析を進める。これらのデータを活用し、研究開発項目4における数理モデル解析を行い、糖尿病や併発疾患の進展、未病期の定義づけにつなげる。さらに、ゲノム情報解析の推進により超早期糖尿病の予測につなげる。これらの検討を通じ、早期の糖尿病や併発疾患を検出・予測する手法を開発し、社会実装につなげる。

当該年度においては、ヒトにおいて心不全発症前からより鋭敏に心不全の兆候を検出できるアルゴリズムの構築に成功した。また、コホート研究により、正常耐糖能者の余命に関わる糖代謝状態を明らかとした。

研究開発項目4:数理モデル解析による恒常性の理解とその応用

実施内容:

研究開発項目1・2の動物実験データ、研究開発項目1・2・3のヒト生体データを用いて、数理モデル解析を進め、重要要素の抽出による包括的な理解につなげる。数理科学者と医学・生物学の研究者との連携により、実験・データ取得とモデル解析を連動させ、数理モデルをもとに実験科学だけでは見出し得ない機序の発見やターゲットの創出につなげる。

当該年度においては、正常耐糖能者の詳細な解析データを得て、研究開発項目4における数理モデル解析を進め、実態を説明できると考えられるコンパートメントモデルを提唱した。

2. 当該年度の研究開発プロジェクトの実施内容

(1) 研究開発項目1:臓器間ネットワークによる恒常性メカニズム解明と治療・診断法の開発

研究開発課題1:末梢臓器情報を中枢に伝達する分子機序解明とその制御法の開発

当該年度実施内容:

本課題は、5人の課題推進者(山田哲也、青木淳賢、井上飛鳥、土井隆行、片桐秀樹)が連携し役割分担しながら推進している。

① 求心性神経のクラス分けとエネルギー代謝・糖代謝などに関与する受容体の解明(山

田・青木・井上)

まず、求心性迷走神経を介するエネルギー代謝制御システムを解明しその系を持つ山田と求心性迷走神経核が存在する nodose ganglion (NG) の網羅的遺伝子発現解析の経験を持つ青木が連携し、コントロールマウスと肝臓遺伝子導入マウスにおいて、臓器間ネットワークに関わる受容体の同定に向け、NG における遺伝子発現の比較検討を進める計画である。まず青木が、既存のデータベース(single cell RNA-seq)を用い、GPCR の発現に基づく NG のクラス分けが可能かどうかを検証した結果、青木が既に bulk の解析により発現を確認した着目すべき GPCR の多くが、既存のデータベースには含まれていないことが明らかとなった。そこで、当初の計画通り、山田・青木グループと共同で、single nuclear RNA seq (snRNA-seq) の手法で、新たに NG 細胞の発現解析に取り組んだ。実際に相互の研究室に行き来し、一体となって研究を進めている。

野生型 C57BL/6J マウスおよそ 100 匹から左右の NG を別々にサンプリングし、単一核をソーティングしたのち snRNA-seq 解析を行なった。しかし、今回実施した snRNA-seq ではシグナル領域にある遺伝子数が著しく低く十分なクオリティのデータが取得できなかった。同一の試験をもう一度実施したが、結果は同様であった。従って研究戦略を既に実績のある single cell RNA-seq に変更し、より詳細な検討を進めていく必要が生じた。一方、細胞分離などの実験操作の過程で mRNA 発現に影響が生じる可能性があることから、神経節を採取後すみやかに凍結し解析まで進めることができる「核を対象とする解析」の更なる改良も進めている。具体的には、Nature (2022/3/31, 603, 7903) で報告された gentle MACS Dissociator を用いる核抽出法について、白色脂肪組織を対象として予備実験を行い評価した。その結果、FACS ソーティング法や密度勾配遠心分離法に比して、核の回収効率が約 10 倍に上昇し、得られた核のクオリティにも大幅な改善が認められたため、NG に対しても同様の結果が得られるか検証を行っている。

片桐は、膵β細胞増殖につながる肝からの神経ネットワークの分子機構の解明のため、求心性内臓神経の核が存在する dorsal root ganglion (DRG) における解析を中心に推進している。消化器を専門とする課題4の課題推進者寺谷と連携し、内臓神経のうち、肝からの求心性神経の細胞体は Th8-10に存在する DRG であることを同定し、これらの DRG の回収を進めた。肝で ERK 経路を活性化させる(MEK アデノウィルスの投与)と膵β細胞増殖につながるが、実際に、ERK 経路の活性化により、これらの DRG での c-fos の発現の上昇を確認することができた。そこで、活性化を示す神経細胞の特徴を明らかとするため、DRG から核抽出を行い、単核での RNAseq 解析を進めている。すでに一回目のサンプルを調整し、外注しその発現解析結果を待っている段階にある。このように、発現解析の開始としたマイルストーンは達成された。

さらに片桐は、オプトジェネティクスの手法を用いて、各臓器選択的に迷走神経を刺激する手法を世界に先駆けて開発しており、その手法を活用することで、本年度は、マウスの糖尿病発症を予防することができることを明らかとした(論文改訂中)。この成果は、迷走神経刺激が全く新しい視点での糖尿病予防・治療法となりうることを示すものとして重要と考える。

② リガンド・合成アゴニストを用いた新規迷走神経制御 GPCR のスクリーニング(青木・井上)

青木と井上は、本年度連携基盤を構築したうえで、迷走神経に発現しうる GPCR の cDNA ライブラリーの準備を行なった。さらに、これら GPCR の中で、作動薬によって受容体特異的な活性化が確認されている候補 GPCR である LPA₃、LPS₃、S1P₃ の3つに関して、作動薬をマウスに全身性または肺内に投与することで、迷走神経活性化の指標である孤束核における c-fos の発現を解析した。その結果、いずれの作動薬においても有意な c-fos の発現上昇が認められたことからこれら3つの GPCR は活性化に伴い、個体レベルで迷走神経を興奮させることが実証された。次年度以降も特に土井グループによって合成された新たな GPCR 作動薬に対して同様の評価を行っていく予定である。

また、井上は、オーファン受容体に対する新規リガンド探索に向け、補酵素断片法 NanoBiT システムを用いた β アレスチンリクルートアッセイの高感度化に取り組んだ。これまでの NanoBiT β アレスチンアッセイでは、全長の GPCR の C 末端にフレキシブルリンカーを介して SmBiT 断片を融合し、 β アレスチンの N 末端に LgBiT を融合したコンストラクトを共発現させていたが、リガンド刺激による β アレスチンリクルート応答が低い GPCR が多々存在した。そこで、GPCR のヘリックス 8 以降を β アレスチンと高親和性に結合することが知られるバソプレシン受容体 V2 由来配列に置換したコンストラクトを検討し、 β 2 アドレナリン受容体と μ オピオイド受容体を用いてシグナル応答が 5 倍以上の高感度化を達成した。

井上は、 β アレスチンに対するバイアス性が発揮される受容体の研究をさらに発展させ、スフィンゴシン 1-リン酸(S1P)受容体 S1PR1 の単粒子クライオ電顕構造解析を共同研究により実施し、変異体実験や分子動力学シミュレーションを組み合わせた解析により、 β アレスチンに対するバイアス性が発揮される受容体の構造基盤を解明した(Nat Struct Mol Biol)。

③ 特定の神経細胞を活性化する手法の開発(青木・土井)

当初の予定では、リガンドおよび特異的な作動薬が入手できない候補 GPCR の機能解析のツールとして、GPCR リガンド非依存的に活性化する手法としてオプトジェネティクスまたはデザイナーGPCR のノックインマウスの作製を試みる予定であったが、現時点で候補となる GPCR には全て作動薬が存在したことから、これらと受容体 KO マウスで研究は進行可能と判断し、予定していたマウス作製には着手していない。一方、従来の全身性の GPCR KO マウスでは迷走神経における直接的な影響を解析するには不十分であるという問題も生じたため、求心性迷走神経特異的な Phox2b または Wnt1 遺伝子のプロモーター下流で Cre リコンビナーゼを発現するマウスを導入、標的 GPCR の floxed マウスを経卵管ゲノム編集(iGONAD)法で作製を試み、コンディショナル GPCR KO マウスの準備を進めた。さらに、導入した Cre ドライバーマウスを利用し、迷走神経特異的 GFP 発現マウスの作製もおこなっている。このマウスは、single cell RNA-seq を今後実施するにあたって有用な研究ツールとなり得る。また、次年度以降に計画している迷走神経 GPCR の可視化(GPCR-tag マウスの作製)と、迷走神経における特

定の GPCR シグナルの伝達(迷走神経 DREADD マウスの作製)においても今年度導入した Cre ドライバーマウスを応用する予定である。

さらに土井が、将来的にはユニークな GPCR 作動薬を合成する計画である。本年度は、ユニークな GPCR リガンドを得るため、新規な母骨格の合成を試み、新たに二重結合を導入した骨格を用いて GPCR リガンド類縁体を合成した。

まず本課題により臓器間ネットワークの解明を進める下記課題推進者間、所属研究者間での情報交換を推進し、連携研究の基盤を構築した。そのうえで、NG の RNA-seq 解析から求心性迷走神経に発現する GPCR を網羅的に解析し、臓器間神経ネットワークを担う可能性のある候補受容体を探索した。さらに、マウス DRG を構成する個々の細胞(神経細胞や間質細胞)の単離を進め、次年度における単細胞での網羅的解析に向けての準備を進めた。

課題推進者: 山田哲也(東京医科歯科大学)、青木淳賢(東京大学)、井上飛鳥(東北大学)、土井隆行(東北大学)、片桐秀樹(東北大学)

研究開発課題2: 中枢における情動-自律神経連関の神経回路解明とその制御法の開発

当該年度実施内容:

① 実験動物の心身相関神経回路の解明

中村は、実験動物(マウス、ラット)の脳内において、情動やストレスを処理する皮質辺縁系から自律神経制御系へ情動信号やストレス信号を伝達し、全身の代謝調節や循環調節に影響を与える中枢神経回路メカニズムを、*in vivo* 生理学や神経解剖学的手法などを用いて解明する目標の達成のため、今年度は、中枢ニューロンの活動を *in vivo* で計測するシステムを導入し、心理ストレスや情動刺激に対する自律生理反応を生理学的に捕らえる実験系と組み合わせた *in vivo* 計測を開始した。

中村は、さらに、様々な情動刺激によって活性化される視床下部のオキシトシン神経細胞を解析する中から、その神経細胞群の一部が、延髄の交感神経プレモーターニューロンを興奮させ、褐色脂肪熱産生と心拍数の増加を引き起こすことをラットで見出した。このオキシトシン神経系の新しい生理機能は、情動刺激に対して生じる交感神経反応の発現に関与するだけでなく、オキシトシン神経細胞の発生不全を伴う遺伝性疾患である Prader-Willi 症候群の肥満症状の発症機序を説明する可能性を有する。この新知見は現在論文としてまとめ、投稿中である。

② ヒトの fMRI 計測による心身相関神経回路の解析

ヒトを用いた fMRI 等の非侵襲的脳活動計測によって、皮質辺縁系の情動処理メカニズムと視床下部-脳幹系の自律神経制御メカニズムについての知見を得るとともに、実験動物での知見とあわせて、ヒトの代謝調節機能や循環調節機能を人為的に制御する技術開発の手がかりを得る目標の達成に向けて、西村らが実施する fMRI 等の非侵襲的脳活動計測の実験系構築などに対し、中村が必要に応じて協力や助言を行った。また、課題1や3の求心性・遠心性神経の研究者との連携や、項目4の数値研究者との情報交換も前年度に引き続き行った。

③ ヒト fMRI による視床下部脳幹系の自律神経制御メカニズム解明

西村は、複数断面同時計測が可能な高速 fMRI 撮像法を利用することで、2mm 角の解像度で視床下部脳幹系を含めた全脳活動を、毎秒記録するシーケンスを確立することに成功した。さらに、このシーケンスを用いることで、実際に視床下部脳幹系の活動を描出できるか検証する 3T-MRI 実験を行なった。自律神経応答が生じるように金銭的報酬を期待する行動課題を被験者に課し、その間に開発シーケンスによる fMRI 計測を実施した。結果として、腹内側前頭前野や側坐核といった皮質および基底核に加えて、視床下部や中脳でも期待する金銭的報酬量に依存した活動上昇を描出することができた。以上の検証により、確立したシーケンスが視床下部脳幹系を含む全脳活動を十分に計測できることが明らかになった。

④ ヒトでの自律神経活動の自己制御

西村は、交感神経活動を自己制御するための方法として、目標を達成しようと挑戦する運動場面を被験者に想像してもらった。15 名を対象とした行動実験を行い、挑戦的運動場面を想像することで主観的な覚醒度だけでなく、直後に実施する運動パフォーマンスも向上することを示した。この成果に基づいて、挑戦的運動場面の想像といった自己制御を行う間に、脳活動と自律神経応答を同時計測する fMRI 実験を 7T-MRI 装置を用いて開始した。7T-MRI 装置環境下でも、心電図・呼吸計・皮膚コンダクタンス反応を同時に計測しながら、視床下部脳幹系を含む全脳計測ができる系を確立した。7T-MRI 装置は 3T-MRI 装置よりも計測される MRI 信号強度が高いため、相対的に小さい活動変化であっても描出できるという利点を持つ。現時点で 28 名の被験者を対象とした計測が完了しており、解析を実施している。

⑤ 非侵襲的ヒト臓器情報モニタリング法の開発

西村は、膵臓の代謝関連活動を非侵襲的に評価することを目指して、脳の fMRI 計測に使われている T2*強調画像を用いた膵臓の BOLD 信号計測を試みた。BOLD 信号とは、血中酸素濃度に依存して T2*値が変化することに由来する MRI 信号変化である。脳のように T2*変化に感度の高い計測に必要なパラメータについての情報が存在しないため、MRI 信号の時間的変化から組織の T2*定量値を計算する手法を用いた。また、呼吸による腹部の上下動があると計測することができないため、計測時は息を止める必要がある。これらの制約条件のため 30 秒毎の計測と時間分解能は低くなってしまいが、1.5mm 角という高空間分解能で T2*定量画像を計測することに成功した。この撮影シーケンスの持つ高空間分解能を活かして、膵臓の局所信号動態を定量化することが可能である。今後は代謝を誘発する糖負荷などを被験者に課して、開発した撮影シーケンスによる計測値から臓器の代謝関連活動を評価可能か検討する予定である。

課題推進者: 中村和弘(名古屋大学)、西村幸男(東京都医学総合研究所)

研究開発課題3:遠心性神経による臓器機能調節の実態解明とニューロン制御法の開発

当該年度実施内容:

① 臓器機能調節に適した人工神経接続システムの開発

西村は、2頭の自由行動下のサルで自由飲水・飲食時の血糖値の計測を試みた。サルの腕に添付した血糖値センサーが1頭のサルでは3日程度ではがれてしまい、計測できなくなった。もう1頭では予定していた7日間計測できた。自由飲食下ではほとんど血糖値の変化が見られなかった。その原因として、飲食したものに糖があまり含まれていなかったためであると考えられた。そのため、ヒトの糖負荷試験時に用いられるトレーランG液を自由飲水・自由行動下で計測したが、血糖値の変化があまり見られなかった。

自由行動下・自由飲食下の健常人3名で血糖値を10日-2週間計測し、血糖値の変化動態を観察した。3名ともに特に食後に一過性の血糖値の上昇が見られたが、その上昇は症状範囲内であった。その一過性の血糖値の上昇は約1時間程度で食事前の値にまで戻った。この一過性の血糖値の上昇をもとに、人工神経接続システムで閾値を設定し、その閾値を超えている間、刺激装置を駆動するプログラムを作成し動作確認を行った。

② 交感神経活動の長期計測技術の改良の実施

吉本は、超小型アンプを内蔵した慢性留置可能な電極を開発した。電極の先端部に超小型低ノイズ高感度のプリアンプを配置した。また、後続の計測機からのノイズ混入を防ぐために電池駆動型にした。Signal/Noise比の向上にむけて、ヘッドアンプの初段入力IC(INA333, TI社)を極超低ノイズの差動IC(INA848)に換装することを検討開始した。計画どおり神経活動計測精度の向上を図った。

③ 迷走神経計測用の電極と手術手技の改良開発

吉本は、電極形状、手術手技(特に神経剥離の程度)、電極固定、神経活動計測用アンプの精度、術後管理(迷走神経刺激による分泌物の増加)、遠心性と求心性情報の区別に使用する薬物(局所麻酔薬ポプスカイン)投与のためのマイクロカテーテルの慢性留置方法など、検討項目のリストアップをした。これらの問題について、一つ一つ検討を重ねた結果、意識下のラットで頸部迷走神経活動の計測に成功した。また、意識下での交感神経活動と頸部迷走神経活動の同時測定に、われわれの知る限りでは、初めて成功した。頸部迷走神経活動の計測期間の長期化、頸部の動きによるノイズ発生など、解決すべき問題が具体的になった。

④ 交感神経活動を介した糖尿病・併発疾患への影響実態の解明の実施

吉本は、自由行動下のラットの視床下部室傍核神経活動と腎及び腰部交感神経活動の同時連続計測に成功した。この試みも、我々が初めてであり、生体の恒常性調節のメカニズムを理解する上で意義は大きい。室傍核神経活動と腎及び腰部交感神経の周波数特性を明らかにするため周波数解析を行った。結果、4つの周波数帯が区別された:1つ目が0.06-0.2Hzのvery-low-frequency帯(VLF)、2つ目が0.2-1Hzの

low-frequency 帯(LF)、3 つ目は respiratory-related frequency 帯(HF)、4 つ目が 6-8.5Hz の cardiac-related frequency 帯(CF)。室傍核神経は VLF と LF の低周波数帯で交感神経活動を調節していることが示された。

さらに、この方法を援用して扁桃体神経活動と交感神経活動の同時測定を行った。扁桃体神経活動は、腎交感神経活動と高い線形相関関係を示したが、腰部交感神経活動とは有意な相関を示さなかった。扁桃体は情動反応の中核であるが、情動ストレス時に特異的に生じる循環反応は、扁桃体による腎と腰部の交感神経活動に地域特異的調節に依存することが明らかとなった。

以上、中枢神経系はゆっくりとした変動で、交感神経活動を地域特異的に調節していることが明らかとなった。これは、交感神経活動の人為的制御をおこなう上でそのアルゴリズム作成の基礎データとなる。

⑤ 「数理モデル解析による恒常性の理解と応用」との連携

吉本は、研究室に、外部からアクセス可能な大容量 NAS を設置して、交感神経活動を中心とする時系列データベースの作成を開始した。

次に、数値解析グループに数理モデル解析に有用と思われるデータを提供して数理解析の糸口をつくることを試みた。閉塞性睡眠時無呼吸時の交感神経活動と動脈圧の同時記録データの解析を提案した(令和4年度に本実験実施予定)。予備実験の交感神経反応のデータを項目4の水藤に送った。結果、「交感神経データの遅延座標埋め込みによる解析の試行」がなされた。遅延座標系による時系列解析は支配方程式のわからないような現象の解析やモデリングに用いられている。今後、交感神経の時系列データの共有を増やし、連携解析を継続する。

⑥ 自律神経活動を経時的に計測する技術の開発と応用

笠原は、マウスなどの動物モデルを用いた交感神経および副交感神経活動を経時的に計測する技術の開発を行うために、複数の電極を用いて多点とし、電気信号の取得法の開発を開始した。自律神経活動の直接計測は、信号強度が小さいことに加え、多数のノイズに信号が紛れてしまい、目的とする信号の抽出が困難であると予測できた。したがって、ノイズの中から目的とする信号を取り出すアルゴリズムとして、同研究グループの木村芳孝名誉教授が考案・開発した参照系 AI 技術を用いることとし、参照系 AI 技術を本研究に用いるための技術的検討を開始した。参照系 AI は、複数の電極から得られた複数の時系列データから、ノイズと信号を分離し、目的とする信号を抽出し再構成することができるアルゴリズムである。しかし、参照系 AI を用いて、ノイズの中から目的とする信号を高精度で抽出するためには、目的信号と対応し参照するための手本となるデータが必要である。現在のところ、目的の信号を抽出するための参照データの候補のひとつとして、心拍変動データを選定している。加えて、実際の計測から得られる電気信号の数と質に関しても、目的信号を抽出するための精度に大きく影響する。そのため、電気信号の計測のための電極の数や位置、ノイズの状況等に関して、実験系の条件を検討している段階である。現状では計測と信号の抽出に関して、データを得ることはできていない。オプトジェネティクスによる光刺激データに関して、参照データ

として有効であると考えられるが、それに取り掛かる前段階として、計測とアルゴリズムの最適化が必要であったため、現状ではオプトジェネティクスによる自律神経活性化と計測を行うための技術開発には着手していない。

一方で、電気信号の計測は技術的難易度が高く、電気信号の計測や電気信号からの目的信号の抽出がうまくいかない等の問題が生じる可能性が考えられる。この問題を予め想定し、自律神経活動の直接計測の技術開発だけではなく、間接的な計測技術についても検証を行った。間接的な自律神経活動評価法には心電図を利用した。心臓は自律神経の制御下にあり、交感神経活動および副交感神経活動の変化を反映し、心拍が変動する。心拍変動は、パワースペクトル解析を行うことで交感神経活動および副交感神経活動を算出可能であることから、間接的な自律神経活動評価に用いることができる。交感神経系あるいは副交感神経系の活動を変化させる薬剤を用いて、心拍変動から導出される自律神経活動が、実際の自律神経活動性を反映しているかに関して、検証を進めた。これは、先に述べた参照系 AI による自律神経活動の抽出に対して、心拍変動を参照データとして用いるためにも必要な検証である。同時に、⑦の項で行うマウス胎児を用いた研究のために、胎児を対象に同様の検証を進めている。

⑦ 発達を追った恒常性の理解による糖尿病と併発疾患の病態解析

糖尿病や肥満は多くの疾患と併発しそれには自閉症などの発達障害や精神神経疾患なども含まれる。これらの疾患には遺伝的要因に加え環境要因が重要であるとされ、特に近年では胎児期の環境要因が生後の疾患リスクに大きく影響するという概念が提唱されている (Developmental Origin of Health and Disease: DOHaD)。妊娠中の母体の低栄養あるいは肥満は、胎児が出生後、将来の肥満や糖尿病のリスクを有意に引き上げることが明らかとなっているが、そのメカニズムの詳細は不明であり、早期診断や治療の妨げになっている。そこで笠原は、当研究室が開発したマウス胎児心電図計測技術を用いて、胎児期の恒常性発達に着目した糖尿病および併発疾患の病態解明を開始した。令和3年度は胎児期に原因を持つ糖尿病動物モデルとして、2型糖尿病モデルであるレプチン受容体に変異を持つ db/db マウスを選定し、胎児期の自律神経系の活動性に関して検証を行った。db/db マウスは雌雄ともに不妊であるため、ヘテロ型同士の交配から胎児を得て、計測や胎児の遺伝子型の決定などの、データを得るための条件検討を行い、実験系の確立を完了した。野生型、db ヘテロ欠損型および db ホモ欠損型のマウス胎児に対する胎児心電図計測を行い、心拍変動から算出される自律神経活動性の変化に関して検証を行った。その結果、現在までのところ、胎児期においては db 遺伝子型による自律神経活動性の差異は見出されていない。一方で、8-9 週齢の雌雄 db 各遺伝子型マウスの心電図を計測し、同様に自律神経の活動性を評価したところ、雌の db ホモ欠損型のマウスでは、他の遺伝子型に比して副交感神経活動が上昇していた。したがって、胎児期から成体期に至る発達過程で、副交感神経の活動性が変化することが示された。以上より、今後は db/db マウスを用いて、発達に関する検証を進めると同時に、野生型ならびに db ヘテロ欠損型の妊娠マウスに対して高脂肪食負荷を行い、環境的要因および環境と遺伝の相互作用を持つ実験系の確立を進め、胎児期からの発達を追った恒常性の検証を行う必要がある。

- ⑧ 迷走神経刺激による臓器調節の実態解明とその制御法の開発に関する研究の実施
研究名称「迷走神経刺激による臓器調節の実態解明とその制御法の開発に関する前向き観察研究」につき、片桐 PM、課題推進者 水藤寛、長山雅晴、千葉逸人、新妻邦泰らを含む研究体制を構築し、東北大学大学院医学系研究科倫理委員会の承認を得た。

上述の倫理委員会の承認までに多数の修正が必要となり、承認が 9 月 27 日となったこともあり、症例組み入れ期間が短かったため、2 例の登録、臨床データ収集に留まった。ただし、実質の登録機関が 5 か月のみであったことを勘案すると、症例の収集速度は予定以上と考えられた。

- ⑨ 頭蓋内電極埋め込み患者における自律神経系の影響ならびに糖代謝に関する研究の実施

新妻は、研究名称「てんかん外科手術の予後に関する神経心理学的、画像学的、電気生理学的縦断研究迷走神経刺激による臓器調節の実態解明とその制御法の開発に関する前向き観察研究」につき、糖代謝や自律神経機能を測定できるようにすでに承認が得られていた計画書を変更し、東北大学大学院医学系研究科倫理委員会に申請し、承認を得た。

糖代謝に直接関連するような部位に病変を有する頭蓋内電極留置患者がおらず、頭蓋内電極留置自体は行われているものの、本研究に関する組み入れはなかった。

課題推進者：西村幸男(東京都医学総合研究所)、吉本光佐(奈良女子大学)、笠原好之(東北大学)、新妻邦泰(東北大学)

研究開発課題4:腸-肝臓-脳相関による自律神経反射を介した糖尿病・併発疾患の病態解明と新規治療法の確立

当該年度実施内容:

- ① 糖尿病および併発疾患の発症・進展における、腸-肝臓-脳相関の役割の解明

寺谷は、栄養素(糖や脂質)に応答する求心性迷走神経を同定するため、FosTRAP2(活性化神経に CreERT2 が発現するマウス)xAi14(Cre による組換えで tdTomato を発現するマウス)を交配した二重変異マウスを作製した。これらマウスに糖もしくは脂質を与え、投与後 6 時間以内で活性化する神経を追跡した。脂質に応答する求心性迷走神経は、右頸部の節状神経節に所属していた。一方で、糖に応答する求心性神経は、左頸部の節状神経節に所属しており、迷走神経肝臓枝由来であった。

野生型マウスに甘味度を調整したグルコース溶液と人工甘味料溶液を異なるボトルで同時に与える(2-bottle assay)と、投与開始直後は両溶液を同じ頻度で摂取するが、時間経過に伴いカロリーを含むグルコース溶液を選択する比率が増加していき、開始 72 時間後にはグルコースのみを選択するようになる。この現象を糖嗜好性と呼ぶ。そこで、糖嗜好性に対する糖応答性求心性迷走神経の役割を評価した。糖嗜好性に対する FosTRAP2 マウスにグルコースを経口より負荷したのち、左頸部の節状神経節に AAV9-Flex-DTA(活性化神経にジフテリア毒素を発現させ、細胞死を誘導する)をインジェクションした。糖応答性迷走神経が欠如したマウスにおいて、糖嗜好性が形成され

ることはなかった。これらの結果より、糖嗜好性において、腸-肝臓-脳相関が極めて重要であることが示された。種々の嗜好性の形成において腸内細菌の役割が示唆されているが、この説を支持する基盤データは未だに不足している。そこで、本モデルにおいて糖嗜好性形成における腸内細菌の役割を明確にすることにした。まず、無菌マウスでは糖嗜好性が形成しないことを確認した。無菌マウスに SPF 環境下で飼育したマウスの腸内細菌を移植すると、糖嗜好性の形成が回復した。逆に、SPF マウスの腸内を抗生剤で除菌したところ、糖嗜好性形成が失われた。甘みに対して感受性のないマウス(TRPM5 欠損マウス)において、同様の試験を実施した。TRPM5 欠損マウスは野生型マウスと同様に 2-bottle assay 開始 72 時間後までに完全にグルコースを選択するようになったが、腸管除菌した TRPM5 欠損マウスは、グルコースへの嗜好を示さなかった。これらの結果は、糖嗜好性形成が、味覚ではなく、腸内細菌に依存することを示している。人工甘味料の過剰摂取は、腸内細菌の変容を介して、糖尿病や心血管疾患のリスクを増大させることが懸念されることから、腸内細菌叢攪乱が糖に対する嗜好性を変化させ糖尿病に対して影響を及ぼすと考えられた。次年度においては、糖嗜好性を規定する腸内細菌探索を実施する。

糖応答性の左求心性迷走神経は糖嗜好性に関わる重要な神経であり、これら神経の活性化は腸内細菌による影響を強く受けることが示された。以上のことより、本年度のマイルストーンは十分に達成された。

② 迷走神経刺激療法の開発と糖尿病改善効果の非臨床 POC の取得

寺谷は、前年度までに設計した動物用カフ電極の耐久性を確認したところ、マウス体内(迷走神経肝臓枝)に設置した電極が 2 ヶ月以内で破損することを確認した。そこで、一からの電極設計を見直し、新たなマウス迷走神経肝臓枝電気刺激用カフ電極を設計した。新電極に変更したことにより、設置後3ヶ月以内の破損・断線が大幅に改善した。新電極を用いて、迷走神経肝臓枝を求心的に刺激した場合、左迷走神経節・延髄孤束核さらに視床下部の神経が活性化された。現在、迷走神経肝臓枝の電気刺激により活性化した神経の生理機能は、前述した FosTRAP2 マウスを用いて解析している。次年度以降も引き続き、迷走神経肝臓枝刺激法を用いて、求心性迷走神経肝臓枝の遺伝的特徴と個別神経の生理機能の解明を推進する。

カフ電極の耐久性が改善され、迷走神経肝臓枝電気刺激による糖尿病の治療法確立に向けたデバイスが完成できた。以上のことより、本年度のマイルストーンは達成された。

課題推進者: 寺谷俊昭(慶應義塾大学)

研究開発課題5: GPCR リガンドによる早期診断・予防治療法の開発

当該年度実施内容:

① リガンドによる GPCR 活性化の検出系の構築

青木は、まずリガンドそのものの検出系として、従来の LC-MS/MS 系を、分離カラムの検討および検出チャンネルを最適化することで高感度化を行なった。その結果、LPA であれば、検出下限 0.01 nM、定量下限 0.1 nM が担保されたため、通常、50 nM

ほど存在する血中 LPA を精度良く捉えることが可能となった。次に GPCR 活性化の検出系として、TGF α 切断アッセイの高感度化に取り組み、迷走神経 GPCR の候補である、LPA₃、LPA₅、LPS₃、S1P3 について、いずれも 1-30 nM 程度のリガンドをその受容体の活性化として捉えることができた。また、これらの GPCR については、検出感度が TGF α 切断アッセイより劣るものの、いずれも β アレスチンクルートアッセイで検出することも可能であった。さらに、これらのアッセイ系において用いる生体サンプル由来のリガンド(今回は脂溶性リガンド)の抽出を検討し、GPCR 活性化検出系で評価することが可能であることを実証できた。この手法を用いて、接触性皮膚炎の病態部由来の脂溶性リガンドが、迷走神経および感覚神経に発現する GPCR (Mrgb5)を活性化することを見出すことができた。

② 脂質をリガンドとする GPCR の迷走神経における機能解明

青木は、当該年度、LPA₃ の新たな機能解明を目的として、作動薬(T13)の薬理効果を探した。その結果、従来見出していた心肺機能抑制効果に加え、マウスの摂食行動抑制作用があることがわかった。さらに T13 は肺の難治性疾患として知られる特発性肺線維症のマウスモデルに対して、疾患抑制作用を示すことを見出した。次に LPS₃ 作動薬に関しては、迷走神経サブタイプにおいて LPA₃ と類似の発現パターンを示すことから肺・呼吸機能に影響を与える可能性を考え、気管内投与を行なったところ、マウスの呼吸リズムを変動(浅く早い)させることを見出した。以上の作用に関して、受容体を介した作用であるかについて受容体 KO マウスを用いて検証するとともに、迷走神経依存性の検討を進めている。

③ 疾患における GPCR リガンドの測定

④ 糖尿病モデルマウスにおける GPCR リガンドの検出

青木は、まず当該年度、今後、ヒト疾患検体中の GPCR リガンド(特にリゾリン脂質)を正確に測定するため、MS の測定系を改良する(上述)とともに、再現性の向上を目的に、重水素化内部標準物質と、ヒト血液プールサンプルによるクオリティコントロールサンプルの導入を行ない、安定性の検証を行なった。また、当該年度に新たに導入したイオンモビリティ型質量分析計(cyclic IMS)の立ち上げを進め、本分析系を用いることで、リン脂質の構造異性体(リノール酸含有と共役リノール酸含有リン脂質、グルコシルセラミドとガラクトシルセラミドなど)を区別して検出することが可能であることを実証した。さらに cyclic IMS に TriVersa NanoMate を組み合わせ、微量サンプルのダイレクトスプレーによる MS 解析法の開発を進めた。次に、①および③の手法を用いて、糖尿病の前病態である肥満モデル(高脂肪食モデル)、ストレプトゾトシン糖尿病モデルを対象とし、血中および肝臓のリゾリン脂質・リン脂質の解析を行なった。その結果、高脂肪食モデルにおいて、ステアリン酸やアラキドン酸含有型のリン脂質のバランスが大きく変化することを見出した。ストレプトゾトシン糖尿病モデルにおいても、一部のステアリン酸含有(リゾ)リン脂質の変動が認められた。また、これらのモデルマウスの肝臓に対して、MALDI-MS imaging を行うことで、リン脂質を含む分子量 400-900 付近の低分子代謝物(数百種類以上)の網羅的な検出を行なった。

⑤ リガンドによる GPCR 活性化の検出系の構築

井上は、TGF α 切断アッセイの条件検討の結果、LPA₅ の活性化を高感度に検出する組み合わせとして、HEK293T 細胞株 + G α q/i1 共発現 + LPA₁₋₃ 阻害剤 Ki16425 添加が適切であることがわかった。LPA 受容体は多くの細胞株に高発現しており、外来から発現させた LPA₅ と内因性に発現する LPA 応答を識別することは LPA 受容体の課題であった。上記の条件では内因性の LPA 受容体を介した応答を低減しつつ、発現させた LPA₅ を高感度に検出できることがわかった。LPS₃ についても同様な検討により、HEK293A 細胞株 + G α q/13 共発現が高感度に LysoPS 応答を検出できることがわかった。次に、NanoBiT システムを用いた β アレスチンリクルートアッセイの条件検討を行ったところ、LPA₅ の C 末端にフレキシブルリンカーを介して SmBiT 断片を融合したコンストラクトと β アレスチン 1 の N 末端に LgBiT 断片を融合したコンストラクトを共発現することで LPA 刺激による LPA₅ の β アレスチンリクルート応答を良好に検出できた。さらに、 β アレスチン 1 の C 末端ループに存在する AP2 結合モチーフに変異を入れたコンストラクトでは β アレスチンリクルート応答が増加した。一方、LPS₃ については上記の直接法やバイスタンダー法を試したものの、LysoPS 添加による β アレスチンリクルート応答は観察されなかった。さらに、 β アレスチンと高親和性に結合するバソプレシン受容体 V2 由来配列を付加したコンストラクトを検討したが、 β アレスチンリクルート応答は見られなかった。従って、LPS₃ は β アレスチン経路を誘導しない G タンパク質選択的受容体であるものと結論づけた。これら最適化したアッセイ条件を青木グループに提供した。

並行して、構造情報を用いて親和性や特異性の向上をデザインすることができるかどうか、脳内神経伝達ペプチドであるバソプレシンに対する受容体(オキシトシンにも交差する)をモデルとして改変を試みた。バソプレシン結合型 V2 受容体のクライオ電顕構造を元に、オキシトシン結合部位を推定し、オキシトシン親和性を低下し、バソプレシン親和性を向上する変異をデザインして cAMP アッセイにより機能評価を行った。バソプレシンとオキシトシンの選択性は 3 倍程度改良することが可能であったが、バソプレシンそのものに対する親和性は大きく低下した。このことから、スナップショットの構造情報を元にした親和性向上改変の難易度は高く、意図通りのリガンド選択性を改変するにはリガンド結合の中間状態をモデリングする必要があるものと考察した。

⑥ ノードズ神経節に発現する GPCR のシグナルクラス分類

井上は、発現情報からシグナル経路の定量化を行うため、個別の GPCR に対する G タンパク質共役情報のキュレーションを行った。まず、井上グループが過去に構築した TGF α 切断アッセイ法による GPCR-G タンパク質共役の定量的実験データベースを再解析し、後述の他のデータベースと比較できるよう以前算出した LogRAi 値以外の共役スコアとして Efficacy と Potency を個別に算出した。この過程で 2 つの GPCR の共役データを追加した。次に、Bouvier らが構築した EMTA 法による GPCR-G タンパク質共役定量的実験データベースがプレプリントサーバーの BioRxiv に投稿されたため、個別の GPCR に関して Efficacy と Potency のデータを抽出した。さらに、BPS/Guide to Pharmacology に登録されていた定性的データベースから GPCR-G タンパク質共役を

網羅した。その結果、TGF α 切断アッセイ法、EMTA 法、BPS/Guide to Pharmacology データベースがそれぞれ 150 種類、100 種類、254 種類の GPCR をカバーし、3 つのデータベースで共通に解析した GPCR は 70 種類であった。これらの方法を用いて、GPCR と G タンパク質共役の統合データベースを構築した。青木グループが当該年度以前に実施したバルクのノードズ神経節の RNA-seq データから、RNA-seq カウントの閾値を設定し、ノードズ神経節に高発現する GPCR のうちリガンド既知 GPCR で統合データベースに存在するものとして、28 種類をリストアップし、その共役情報を付与した。これらから Gi に共役する種類が最も多いことがわかった。

⑦ リゾリン脂質 GPCR リガンドの合成

土井は、青木グループが進める迷走神経における脂質 GPCR の機能解明に関して、その研究ツールとしての合成リガンドの創出を試みた。具体的には、これまで作動薬の報告がない LPA₅ 受容体に関し、青木グループで考案されたリゾホスファチジン酸 (LPA) 構造類似体の合成を行った。非天然型の L-グルコールを出発物質として、12 段階の合成法を確立し、立体配座が固定された GPCR リガンドの合成に成功した。

⑧ GPCR を介した食・栄養シグナルによる包括的恒常性維持機構の解明

木村は、今年度、脂肪酸受容体遺伝子改変マウス群の表現型解析を中心に行った。特に、中鎖脂肪酸受容体 GPR84 に関しては、その遺伝子欠損マウスにおいて、高脂肪食負荷による体重の増加が妨げられること、低インスリン血症、血中腸管ホルモン GLP-1 濃度の低下および血中において炎症マーカーである TNF α 濃度の上昇という表現型が得られた。この時、中鎖脂肪酸の中でも、特に C10:0 摂取が GPR84 を介した腸管ホルモン分泌を介し、糖代謝制御を伴って代謝機能改善効果を発揮することを明らかにし、論文発表を行った (Nonaka et al. Front Nutr. 2022)。さらに、この GPR84 遺伝子欠損マウスは高脂肪食長期負荷による脂肪肝誘発時、肝臓の線維化が劇的に進み、非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) 様症状を呈することがわかった。同時に、中鎖脂肪酸のうち、GPR84 のリガンドとなりえるカプリン酸 (C10) やラウリン酸 (C12) をマウスに摂取させた時においてのみ、NASH 誘導食による肝臓の線維化および NASH 進行を劇的に改善すること、そしてその効果は、GPR84 遺伝子欠損マウスでは消失することも確認した。

⑨ 食由来代謝物・腸内細菌代謝物群からの生体恒常性制御物質同定

木村は、昨年度までに得られた、様々な栄養環境変化におけるマウス血液メタボロームデータの解析を行った。また、来年度以降の GPCR スクリーニングを見据えて、当研究室で確立している Tet-On/Off システムを用いた安定発現細胞株での実験に加えて、本領域の青木グループが独自に確立した TGF α 切断アッセイについて、青木グループから習得を行った。

課題推進者: 青木淳賢 (東京大学)、木村郁夫 (京都大学)、井上飛鳥 (東北大学)、土井隆之 (東北大学)

(2) 研究開発項目2:糖尿病における多臓器変容メカニズムの解明と制御

研究開発課題1:多臓器での炎症・ストレス応答機序の解明と制御

当該年度実施内容:

① 心不全における心臓・免疫ネットワークの解明の実施

眞鍋は、糖尿病併発疾患のうち心不全について免疫系、神経系に着目して解析する。これまでに心臓に存在する組織マクロファージが心臓恒常性の維持に必須であることを見いだしている。マクロファージがどのような機序で恒常性を維持しているのか、その機能変容がどのように恒常性を変調させ、心不全等の病態を誘導するかを明らかにすることを目的として、本年度は心臓ストレスによる心臓マクロファージ変調について1細胞レベル、またサブタイプレベルでの解析を進めた。横行大動脈結紮による心臓圧負荷を与え、末梢血ならびに心臓マクロファージのバルク RNA-seq、シングルセル RNA-seq を行った。これらマウスのデータに加え、ヒトの公開データも活用し、心臓マクロファージのサブタイプを複数同定し、心臓圧負荷による変化を解析した。特に既に同定した心臓保護因子であるアンフィレグリンを発現するサブポピュレーションが心臓圧負荷等により変化することを見いだした。また、課題内の研究者との共同研究の相談を進めた。シングルセル解析では、マクロファージ以外に、樹状細胞、リンパ球、自然リンパ球についても解析を行った。以上のように設定したマイルストーンを達成した。

② 造血・免疫系による多臓器ストレス応答制御

糖尿病併発症の特徴は、複数の疾患が並列して発症・進行すること、また疾患の間に密接な相互作用が想定されることである。例えば心不全や慢性腎臓病は糖尿病によって発症リスクが増加し、また予後が悪化するだけでなく、心不全と慢性腎臓病の間で相互に病態を推進することが強く示唆されている(心腎連関)。眞鍋は、これまでに心腎連関の機序として心臓-脳-腎臓の臓器間ネットワークが重要なことを報告した。これら多臓器の疾患を関連させる機序として造血-免疫系に着目した解析を行った。特に、心不全が造血幹細胞の変化を誘導し、その結果として心臓マクロファージを変容させ、恒常性を変調させるかどうかを検討した。横行大動脈結紮術により心臓圧負荷を与え、心不全を誘導したマウスから、造血幹細胞を取得し健常マウスに移植したところ、数ヶ月後に自然に心臓組織リモデリングと心機能障害を誘導することを見いだした。つまり、心臓圧負荷の刺激は骨髄で造血幹細胞の変化を誘導すること、この変化が心臓の恒常性を障害することが明らかとなった。心臓圧負荷による造血幹細胞の変化と、その子孫細胞である免疫細胞への影響を検討するため、造血幹細胞移植後の末梢血や心臓マクロファージについてバルク、シングルセル RNA-seq 等を行った。その結果、心臓圧負荷は単球由来マクロファージの分化・成熟を障害することを見いだした。このような変化は、心臓ストレスによって誘導される未病状態を理解する上に重要と考えられた。以上のように設定したマイルストーンを達成した。

③ 脂肪組織 Bリンパ球のキャラクタリゼーション

鈴木は、脂肪組織 Bリンパ球サブセットを網羅的に同定するに当たって、高脂肪食負荷により肥満させたマウスの精巣上体脂肪からセルソーティングにより Bリンパ球を

分取し、シングルセル RNA シークエンスを行った。その結果、肥満マウスの精巣上体脂肪に存在する B リンパ球は、遺伝子発現様式に基づいて8つのサブクラスターに分けられることがわかった。各サブクラスターにおける遺伝子発現を詳細に解析したところ、これまで脂肪組織に存在することが報告されていなかった形質芽細胞(plasmablast)のサブクラスターが存在することがわかった。形質芽細胞は、自己免疫疾患や COVID-19 の重症化に関与することが示唆されていることから、脂肪組織における炎症の進展にも関与している可能性がある。今後は、シングルセル RNA シークエンスの解析結果に基づいて、脂肪組織の形質芽細胞をフローサイトメトリーで検出するためのマーカー分子を同定し、これらを利用して肥満の過程で形質芽細胞がいつ、どこで B リンパ球から分化するのかを解析する。

④ 自律神経を介する脂肪組織 B リンパ球の機能制御機構の解明

鈴木は、脂肪組織に投射する自律神経を同定するに当たって、本プロジェクト研究開発項目 1 の課題推進者である寺谷と連携して、脂肪組織を起点とする神経トレーシング法についての検討を開始した。現時点においては、蛍光標識した神経向性分子を脂肪組織に注入し、脂肪組織に投射する自律神経を逆行性にトレーシングする手法について検討を進めている。

課題推進者: 眞鍋一郎(千葉大学)、鈴木一博(大阪大学)

研究開発課題2: 糖尿病における脳血管の変容解明と制御

当該年度実施内容:

① 血管狭窄/閉塞時の側副血行路発達のメカニズムの解明

新妻は、中大脳動脈閉塞モデルを用いて、その後の脳血管側副路の発達や脳実質におけるシグナリングを調査した。特に tRNA シグナリングの中でも tRNA 修飾遺伝子である *ALKBH1* が中大脳動脈閉塞後の分子シグナルに強く関与することが示唆されたため、その詳細を検証するために、shRNA を用いた脳内での knock down のシステムを構築した。

まず、最初に *ALKBH1* を knock down するレンチウイルスベクターを構築し、*in vitro* で *ALKBH1* が 90%以上の効率で knock down されることを確認した。次いで、この系を *in vivo* に持ち込んだが、大脳皮質にある程度の感染が得られ、遺伝子発現が抑制できたものの、効率が悪いため、未だ最適化が必要な状態である。

ALKBH1 が側副血行路発達や脳実質のシグナリングに影響を与える可能性が高い分子として同定され、マイルストーンを達成しているが、より詳細な解析を継続中である。

② 脳微小血管のリモデリングにおける血管周辺ミクログリアの動態解析

正本は、二光子顕微鏡法を用いてマウス大脳皮質における脳微小血管のリモデリングとミクログリアの動態を同時に長期反復イメージングし、以下の結論を得た。低酸素曝露に対してミクログリアの顕著な形態変化や細胞密度の変化は認められなかった。一方、低酸素からの回復期においてミクログリアの形態および細胞密度に有意な変化が認められた。

③ 脳毛細血管の応答性に関する評価指標の確立

正本は、脳の複雑な毛細血管構造を定量化するために、空間方向(血管の長さ方向)において血管径の拡大収縮に関する方向性が変わる節目(変曲点)を数学的に導き、毛細血管構造の最小長さとなる機能単位を定義した。さらに、安静時における脳毛細血管の構造変化を解析し、同様に変動の大きさが変わる節目(変曲点)を定義した。その結果、二つの方法によって導かれた脳毛細血管の機能単位は、 $6 \pm 4 \mu\text{m}$ という結果が得られ、両手法による違いはみられなかった。さらに機能単位に分割することで毛細血管内の刺激応答性に関してよりばらつきの小さい結果が得られ、血管機能の評価が正しく行われていることが示唆された。

④ 脳毛細血管内を流れる赤血球動態と血管運動に関する画像評価法の構築

脳微小血管による機能応答の結果、脳微小血管ネットワークを流れる赤血球の分布がダイナミックに変化する。正本は、本年度、2本の毛細血管が合流もしくは分岐する接続点に着目し、血管内を流れる赤血球の流速および流速の勾配とさらに各血管部位の血管径を自動で計測し、これらの動的な変化を定量評価するための Matlab ベースのソフトウェアを構築した。解析の結果、毛細血管の分岐部において血球流れの不均質性が生じ、毛細血管接続部位の入口において急速に血球の流れが変化することがわかった。さらにこのときの流れの変化は、毛細血管の径の変化とは独立であったことから、接続する血管前後の圧力勾配と血管内では粘性による抵抗の変化によって血球の流速が変化する可能性が示唆された。一方の合流部では血球の流れに関する空間勾配はむしろ流れが加速する方向に働いており、さらに合流部の毛細血管の径が合流前よりも大きいことから、下流の血管抵抗が上流よりも低いことによって血球が淀むことなく合流する流れが形成されていることが分かった。また、単一の毛細血管内では血球間の距離が一定であり、このことは血球の壁と内皮細胞の内腔とが密閉されており血球間の血しょうが血球によって区切られて、閉鎖空間が形成されている可能性が示唆された。今後は、これらの脳内における毛細血管の流れが糖尿病態とくに血管内皮の障害の有無によってどのように変化するのか、詳細に解析する。

課題推進者:新妻邦泰(東北大学)、正本和人(電気通信大学)

研究開発課題3:糖尿病における肝の変容解明とその制御

当該年度実施内容:

① 類洞内皮細胞、および、クッパー細胞の単離と培養法の確立

片桐は、マウス肝臓より、篩板孔を作り出す類洞内皮細胞、および、クッパー細胞の単離に向けた検討を行った。単離については、種々の手法を駆使し試行錯誤を繰り返したが、最終的には、MACS を用いた単離により、類洞内皮細胞、および、クッパー細胞ともに、それぞれ、非常に純度が高くコンタミの少ない細胞を効率的に回収することに成功した。次年度以降に行う、神経因子などによる類洞内皮細胞篩板孔の porosity の変化やその機序の解明の基盤となる、個別、あるいは、混合した *ex vivo* 培養法の確立に成功した。以上より、当該年度のマイルストーンは達成された。

② 類洞内皮細胞の遺伝子発現の網羅的解析の実施

片桐は、若年マウスと高齢マウス(1年齢)を用い、①により確立した手法により単離された、類洞内皮細胞・クッパー細胞について、RNAseqを行い、網羅的な遺伝子解析を進め、pathway解析を行った。

その結果、高齢マウスにおいては、類洞内皮細胞における免疫・炎症シグナルの亢進や、細胞接着分子群の発現亢進が認められた。同時に、これらのマウスにおける篩板孔の porosity を検討したところ、1年齢のマウスにおいて、有意に篩板孔が縮小し、血中のインスリン/C-ペプチド比が増加していることが示された。以上より、類洞内皮細胞における接着分子の発現亢進とクッパー細胞などの免疫細胞との接着による炎症機序が、高齢マウスにおける類洞内皮篩板孔の縮小に寄与していることが示唆された。このように、当該年度マイルストーンは達成された。

課題推進者:片桐秀樹(東北大学)

研究開発課題4:ケトン体を用いた糖尿病併発症への予防・治療法の開発

当該年度実施内容:

① 動物実験を用いた、ケトン体代謝の組織修復における役割の全容解明、糖尿病併存疾患の病態に果たす役割の解明

実験1:腎臓、脳における糖尿病に関連する臓器障害モデルを作製し、臓器局所におけるケトン体関連酵素群の発現変化、ケトン体濃度を含めた代謝変化を検証した。

実験2:臓器特異的にケトン体代謝が障害される、臓器特異的 Hmgcs2 欠損マウス、臓器特異的 Scot 欠損マウスの作製を開始した。

実験3:糖尿病性腎臓病モデル、マウス脳虚血モデルに対するケトン体投与の臓器保護効果の検証を行う。ケトン体前駆物質である 1,3-butanediol の長期投与により、糖尿病に関連した臓器障害モデルの臓器障害を改善しえるかを検証した。

<腎臓>

- スレプトゾトシン(STZ)を用いた糖尿病モデルマウスの腎では、糖尿病誘発後24週以降に腎近位尿細管細胞での Hmgcs2 酵素の発現増加が確認されたため、久米は、腎近位尿細管細胞特異的 Hmgcs2 欠損マウスの作製を行い、同マウスに対して STZ を用いた糖尿病を誘発し、その腎障害の評価実験を開始した。
- 非糖尿病状態であるが、腎近位尿細管細胞特異的 Hmgcs2 欠損マウスでは、血中尿素窒素の有意な上昇が確認された。
- STZ 糖尿病モデルマウスに対し、1,3-ブタンジオール(β -OHB 前駆物質)投与による腎障害改善効果を検証した結果、治療により血中尿素窒素上昇の抑制、糖尿病に伴う多尿の改善が確認された。

<動脈硬化>

- 動脈硬化モデルマウスである ApoE 欠損マウスに対し、インスリンを使用した重症低血糖を週に1度、22週間誘発することで、マウス死亡率の増加、動脈硬化の悪化を認め、その病態は 1,3-ブタンジオールの投与により予防された。そこで、久米は、低血糖における動脈硬化悪化における血管内皮でのケトン体代謝の役割を検証

するため、ApoE-Scot 二重欠損マウスの作製を開始した。

<脳>

- ・総頸動脈コイルングを用いた慢性脳虚血モデルに対する 1,3-ブタンジオール投与の効果を検証した結果、治療により慢性脳虚血に伴う認知機能異常の改善が確認された。よって、久米は、認知機能におけるニューロンでのケトン体利用の役割を解明するため、ニューロン特異的 Scot 欠損マウスの作製を開始した。

<その他>

- ・小腸、膵β細胞において、強い Hmgcs2 発現、Scot 発現がそれぞれに確認されたため、久米は、小腸上皮特異的 Hmgcs2 欠損マウス、膵臓β細胞特異的 Scot 欠損マウスの作製を行い、その表現系の解析を開始した。

② 動物実験を用いた、ケトン体代謝が哺乳類寿命に及ぼす影響の検討

- ・全身 Hmgcs2 欠損マウスは野生型マウスに比し短命であり、その寿命短縮は 1,3-ブタンジオール投与により回復した。また、若年期野生型マウスに対する長期 1,3-ブタンジオール投与もまた、寿命短縮をもたらしたことから、哺乳類の寿命においては、血中ケトン体濃度の至適濃度が存在することが明らかとなった。
- ・一方、高齢期野生型マウス、ApoE 欠損マウスといった、病態モデルに対する 1,3-ブタンジオール投与は寿命延長をもたらしたことから、ケトン体は老化や動脈硬化にかかわる何らかの臓器障害に対して、臓器保護的に働くことも明らかとなった。

課題推進者:久米真司(滋賀医科大学)

研究開発課題5:糖尿病の臓器変容の解明のための多臓器全細胞アトラスの作製と応用

当該年度実施内容:

① マウス臓器アトラス作製用の高解像度光シート顕微鏡の構築の実施

松本は、マウス臓器の全細胞を対象として疾患の詳細な情報を得るために必要な光シート顕微鏡の構築および 3 次元の高速高解像イメージングのための制御プログラムの作成を行い、マウス臓器の全細胞解析が可能な光シート顕微鏡を完成させた。顕微鏡はマウス臓器内で最大の臓器である肝臓全体を撮影するには十分なチャンバーサイズ、電動ステージ(zyx 軸それぞれ 60 mm)を有しており、0.1 μm の分解能を有する光学式のリニアエンコーダを設置することで、常に高い位置精度のタイリング撮影、z 軸のスタック撮影が可能である。また、電動ステージは最大速度が 10 mm/s であり、10 μm 間隔のスタック撮影においても MOVIE 法を用いて最大 1000 fps が可能な仕様となっている。また、レーザーを走査するためのガルバノミラーはイメージング速度の律速になることが多い。汎用的なガルバノミラーでは 5-10° の振幅で 250 Hz 程度で軸ブレまたはスキャンミスが起き撮影速度があげられなかったため、特別に調整してもらったガルバノミラー(1° :2kHz, 10° 350 Hz)を導入した。これらの組み合わせから、低倍率(広視野撮影)においては光シートの品質の良い画面の中央のみを用いることで 200 fps 以上、高解像では全画面で 40 fps での安定運用可能となった。また、低倍率撮影において様々な臓器サイズによって自由に倍率を変更できるように倍率可変のズーム筐体を導入した。ズーム筐体に電動モーターを取り付け、PC 上から倍率を制御できる

ようにすることで、異なるサンプルや倍率の違う撮影を自動で行うことができる。これらと4色のレーザー(488, 532, 592, 647 nm)と電動フィルターホイール、sCMOS カメラ(Orca-Fusion)を制御して透明臓器の多色、複数条件の3次元撮影撮像が可能な制御ソフトウェアを作成した。ソフトウェアは、MOVIE 法でリアルタイムの像処理速度と高速な顕微鏡本体へのフィードバックが必要なため、C++/CLI を用いて作成した。低解像イメージングでは、高品質な画像は視野の一部(画面の中央付近)しか確保することができないため、x方向のタイリング撮影をする方式を採用した。そのため、撮影した各タイル画像を再構成するための3Dのタイリング用のソフトウェアの作成も行った。

② マウス多臓器の全細胞アトラスの作製の実施

松本は、①で作製した光シート顕微鏡および既に当研究室で有していた高解像イメージング用光シート顕微鏡を用いてマウス臓器の全細胞アトラスの作製を開始した。既に全細胞品質での透明化とアトラス作製が行われているマウス脳をコントロールとして用い、肝臓、肺、腎臓、心臓、脾臓の透明化、核染色条件の検討を行った。それぞれ、脱脂処理時間の調整と、肝臓では段階的な屈折率調整の実施により高い透明度を達成することができた。また、それぞれの臓器の細胞も1細胞を検出できる品質で全臓器が撮像されていることを確認しており、マウス肝臓で3億5千万以上、肺で1億細胞の検出ができています。これらすべての細胞の3次元的な座標情報を取得し、各臓器のアトラスとした。

③ 糖尿病モデルマウスの作製

史は、Streptozotocin (STZ) を 250 mg/kg で C57BL/6N マウスに腹腔内投与し、投与後 0 日、4 日、8 日に血糖値測定を行った。Saline 投与マウスを対照群とし、N=7 で比較したところ、4 日目ですべてのマウスが高血糖基準(300 mg/dl 以上)を満たした。この結果は複数回再現されたため、STZ 投与による糖尿病モデルマウス作製プロトコールとして採用し、今後の睡眠解析および中枢神経系の解析に用いる。

④ 糖尿病モデルマウスの機能解析(1):STZ 投与マウスの睡眠解析

史は、STZ を 200 mg/kg で C57BL/6N マウスに腹腔内投与し、投与後 0 日から 2 週間の睡眠測定を行った。睡眠測定には、呼吸の変化から睡眠覚醒を判定するシステム(SSS)を用いた。脳波測定ではないため、REM 睡眠、NREM 睡眠の評価ではなく、総睡眠時間や睡眠、覚醒の遷移確率の評価を行った。

STZ 投与後 0 日から 2 日では睡眠表現型に関する有意な差は観察されなかったが、投与後 4 日から 8 日にかけて、睡眠時間の有意な増加が認められた。睡眠時間の増加は暗期に集中しており、約 1 時間程度であった。また、睡眠から覚醒、覚醒から睡眠の遷移確率(Psw, Pws)を計算すると、STZ 投与マウスでは Psw の現象が観察されており、睡眠時間の増加は、入眠の増加ではなく、睡眠エピソードの増加であることがわかる。

睡眠時間および Psw の増加は、レプチン受容体の欠損マウス(db/db マウス)でも観察されることから、中枢神経系から見た時に同じ作用があることが期待される。一方で、

野生型マウスにグルコースおよびマニトールを腹腔内投与したマウスでは、顕著な睡眠時間および Psw の変化が観察されなかったため、STZ 投与マウスで観察された睡眠表現型は慢性的な高血糖が必要であることが示唆された。

⑤ 糖尿病モデルマウスの機能解析(2):睡眠表現型を示す変異体マウスに対する STZ 投与および睡眠解析

史らは Camk2a および Camk2b のノックアウトマウスにおいて、睡眠時間の有意な減少を観察し、睡眠覚醒サイクルの制御にリン酸化を介した制御が重要な役割を果たしていることを報告している (Tatsuki et al., Neuron 2016)。一方で、高血糖条件下においては、心臓、脳における CaMKII タンパク質の O-GlcNAc 化が報告されており、O-GlcNAc による CaMKII タンパク質のリン酸化が阻害されることが報告されている (Erickson et al., Nature 2013)。そこで、史は Camk2a のノックアウトマウスに対して、STZ 投与を行い、血糖値の測定と睡眠表現型の測定を行った。

Camk2a ノックアウトマウスは野生型と同様に STZ 投与後 4 日で高血糖を示し、睡眠表現型に関しても睡眠時間の増加と Psw が観察された。睡眠表現型の変化は野生型マウスと同等で、その間に有意差は観察されなかったため、STZ 投与マウスにおける睡眠表現型変化に CaMKII が関与している可能性は低いと考えられる。

⑥ 糖尿病モデルマウスの機能解析(3):STZ 投与マウスの全脳透明化および c-fos の発現解析

STZ 投与マウスは STZ 投与後 4 日から高血糖および有意な睡眠表現型の変化を示すことから、史は、投与後 4 日のマウスを還流固定し、脳を取り出し、透明化処理を行った。今後、神経活性化マーカーの一つである c-fos の染色を行うことで、睡眠表現型の変化の背後にある神経科学的な基盤への理解を深める。

課題推進者:松本桂彦(理化学研究所)、史 蕭逸(東京大学)

(3) 研究開発項目3:ヒトでの生体情報を簡便に取得する技術の開発とヒトデータ解析

研究開発課題1:接触・非接触生体情報取得デバイスの開発と社会実装

当該年度実施内容:

本課題の最終目標は、これらの新規デバイスから、採血することなく自律神経機能・心機能や耐糖能に関する時系列ビッグデータを取得・AI 解析・数理モデルを構築し、心不全や糖尿病の超早期診断につなげることを目標とする。その技術開発とヒトデータ解析を行う。

本研究計画では、最終的に非侵襲デバイスのみから糖尿病や心不全を早期発見するデバイスの社会実装を目標とする。具体的には、ここでの非侵襲的デバイスとは、非能動的にデータが取得でき、本人の苦労なく未病の段階で発見がなされるデバイスを考えている。そのためには、カメラデバイスや日常的に触れることが出来るデバイスからの情報取得が有効である。このため、カメラデバイスについては、可視光～赤外光(400nm-1800nm)の広範囲のスペクトルに存在する生体情報を取得する特殊な機器を開発し、非接触で取得できる生体情報のみから未病であることを検出するアルゴリズムを深層学習、

数理モデルを用いて構築する。また、接触デバイスについては、心電情報や様々な情報を容易に取得できるデバイスを開発する。

これらの複数の情報を時系列で取得することで、単に従来から取得できる生体情報を非侵襲的に取得するだけでなく、さらに取得したデータをヒトのディープフェノタイプとしてとらえることで、未病状態の表現型を検出することを目指す。

そのためには、まず検出・評価系の構築から行い、動物疾患モデルからディープフェノタイプを取得し、どのような情報が未病状態の取得に必要であるかを見極める。その後、ヒト病態にて同様の検討をしたのち、デバイス開発、改良、その評価、社会実装を目指す。

本年度は、昨年度に引き続き、非接触デバイスの開発に向けた検出・評価系の構築および動物モデルでの検出・評価を行い、前倒しでヒトでの検討を開始した。さらに接触デバイスについては、心不全の早期検出のためのアルゴリズムを構築し、治験プロトコル相談まで進んだ。

- ① 非侵襲生体情報デバイスから糖尿病及び併発疾患の早期検出を行うデバイス技術開発の実施(R2年12月～R8年3月)

非接触デバイスの開発

藤生は、まず、ハイパースペクトルカメラを疾患動物モデルからの情報の取得が可能となるように、最適化、改良を昨年にも引き続き行った。さらに本年度は、マウスモデルを用いて、糖尿病モデル、心血管疾患モデルの時系列データを従来の測定装置を用いて実測するとともに、ハイパースペクトルカメラを用いて、広範なスペクトルデータを取得する。通常の画像である三次元情報(3D)に加えて、ハイパースペクトルカメラによるスペクトル情報を含めた四次元情報(4D)の取得を行った。このスペクトル変化は見た目でもやや変化していることが確認できるが、明らかではないため、PCA解析によって次元圧縮を行い解析を行った。その結果、高血糖のマウスと通常血糖のマウスは明らかに分けることができることが分かった。また、各要素の寄与度をみると、ほぼ一つの要素で決定されることが分かった。このことは、明らかな高血糖であれば、1波長の赤外光で判定が可能であることを示す。次に、LPS投与による敗血症モデルで同様の検討を行ったところ、こちらも正常マウスと敗血症マウスは、背中の皮膚のスペクトルによって分けられことが分かった。また、要素を検討すると、おおよそ2波長の赤外スペクトルを用いると判定できることが分かった。次に、高血糖と、敗血症によるスペクトル変化は、それぞれに特異性があるかを検討した。すなわち、高血糖マウスと敗血症マウスを非接触で判定できるかを検討した。その結果、こちらも見分けることが可能であり、その必要な波長は1～2波長であることが分かった。上記の実験は、静止画によるスペクトル解析ですでに判別可能であったため、スペクトルの動画、すなわち4Dの情報の検討は不要と考えた。

さらに、今回、静止画かつ赤外領域スペクトルは2波長程度で、いくつかの疾患が、疾患特異的に判定ができる可能性が見られた。当初、赤外スペクトルを多種類大量に取得して疾患による変化を判定しようとしていた。多種類のスペクトルデータを取るには、静止画で取得がコストの面から最適であり、動画での撮影は不可能と考えている。今回、

赤外スペクトルは2波長程度で良いとすると、これらは、高速撮影が可能である。高速撮影が可能であれば、比較的安価に可視光1~2波長と組み合わせて、病態だけでなく、バイタルの測定も同時に可能となる。

そこで、今回、赤外スペクトルと、可視スペクトルを組み合わせた高速撮影が可能なスペクトルカメラを作成し、予定より前倒しで、ヒトからデータを取得し、血圧のデータも取得できないかを検討した。研究倫理申請を行い、通過させることが出来たため、実際に臨床試験による検討を開始した。

まず、顔や手からスペクトルを動画で取得し、既報の通り、そこから脈波を検出することが出来た。この時点で、脈拍、脈の不整、SpO2、呼吸数などの検出、算出は可能である。さらに、複数個所からの時系列データを取得し、現在データノイズ処理フィルター処理を検討している。まず、30名の高血圧、正常血圧者からデータを取得して、血圧の変化を捉えられるかに挑戦している。解析としては、深層学習を使用している。

接触デバイスの開発

藤生は、前年度行った心電情報から心不全を早期検出するアルゴリズムを知財確保し、登録にいたった。PCT 移行を行っている。さらに性能向上に向けたアルゴリズム改良を行い、NYHA よりもさらに細かく心不全の程度を示す HF-index を開発し、知財出願を行った。HF-index は心不全の発症、改善、再発をI誘導心電図のみから再現することができたため、知財申請を行った。また、BNP と HF-index との相関を検討すると、 $R=0.9$ と高い相関を示し、採血なしでも BNP を類推できることを表している。さらに、我々が独自に開発した心電くんによる I 誘導心電図とアップルウォッチから取得される I 誘導心電図が病院で取得する12誘導心電図中の I 誘導心電図とどのような関係にあるかしらべたところ、非常に高い関係を得ることが出来た。

現在国内では、心不全患者に対して、NYHA I/II の患者が NYHA III 以上になることを検出する、すなわち再発を早期に検出するデバイスとして、PMDA と治験プロトコール相談を行っている。治験は東京大学医学部附属病院と東京女子医科大学病院で行う予定。

FDA への申請も同時に行っており、米国では一般人口を対象として、全く心臓に異常がない方と、心不全患者(NYHA I 以上)を分けるアルゴリズムを要求され、そのような広い層を対象とした実装を目標に進めている。

課題推進者:藤生克仁(東京大学)

研究開発課題2:ゲノム解析による臓器間ネットワークの新規モデル生成と糖尿病超早期リスク予測

当該年度実施内容:

田宮は、東北メディカル・メガバンク機構の既存要約統計量を用いた糖尿病関連形質の解析を継続して行っている。また、既存ゲノムコホートである UK バイオバンクの大規模データを取得した他、その他のゲノムコホートの大規模データについても取得申請中である。これらのデータは、実施者の開発した柔軟な統計的機械学習手法を適用することで、糖尿病関連形質に寄与する遺伝子、環境因子、相互作用因子の検索を開始した。1

億人単位での糖尿病と他疾患の併発ネットワーク解析を行い、特に、神経系と糖尿病関連臓器との関係について検討を行った。

課題推進者: 田宮元(東北大学)

研究開発課題3: 糖尿病超早期段階の予測法の開発と予後予測

当該年度実施内容:

① 大迫住民コホートデータにおける糖負荷試験データの時系列解析

大迫コホートでは、長年にわたる住民データが蓄積されており、糖負荷試験の結果も 20 年にわたり経時的に追跡できる。そこで、本年度は、これらコホートデータを解析し、糖負荷試験の結果にもとづくアウトカムの検討を進めるべく、データの収集・整理を行った。まず、中間値で比較を行うと、得られていたすべての血液データの中で、糖負荷試験 1 時間値が最も有意かつ高いハザード率で、その後の寿命と関連することが見出された。そこで、未病状態の解析を目指し、糖負荷試験の結果にて正常耐糖能 (NGT) と判定された住民に絞った解析によっても、同様の結果を認めた。つまり、糖尿病発症していない(未病)の被検者において、糖負荷後 1 時間の血糖上昇が余病と強く関連するという驚くべき結果が得られた。このように、寿命という最も重要な観点から、糖尿病超早期段階の定義づけが進みつつあり、次年度以降さらに n を増やして詳細に解析を進める。以上、当該年度のマイルストーンは達成され、それ以上の成果が得られている。

② $^{13}\text{CO}_2$ 呼気試験研究の実施

片桐は、超早期の糖代謝異常の検出を目的として、健常人を対象に 15g のブドウ糖 (^{13}C Carbon-ブドウ糖を含む) を経口負荷した時の代謝変化を、呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 量を測定することにより推測する「 $^{13}\text{CO}_2$ 呼気試験」を実施した。15g のブドウ糖を経口負荷後、経時的に呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 、血中グルコース、血中インスリン、血中 C ペプチドを測定し、肝インスリンクリアランスの指標に C ペプチドとインスリンの比を用いて解析を進めた。糖負荷 15 分後における糖応答性肝インスリンクリアランスが増加、糖負荷 15~30 分後の血糖上昇、糖負荷 15~45 分後の呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ (全身の糖酸化を意味する) の低下の 3 群がそれぞれ強い相関を示した。この一連の結果は、肝インスリンクリアランスが増加、つまり、肝でのインスリン作用により、負荷された糖のうち肝に取り込まれグリコーゲン合成 (CO_2 を産生しない反応) に回る部分が増加し、末梢血での負荷後血糖上昇が抑制されたことを意味すると考えられる。このことは、ヒトにおいて、正常耐糖能者における肝インスリン作用や食後肝糖取り込みの食後血糖上昇における重要性を示したものと考えられ、肝糖処理能の程度は超早期の糖代謝異常を反映するという機序の解明につながることも、 $^{13}\text{CO}_2$ 呼気試験がこの機序を簡便に検出する検査法となりうることを示したもので、機序的・実用的両面から重要な知見と考えられる。そこで、①の大迫研究の糖負荷試験との結果を総合することを考え、次に 75g の ^{13}C -グルコースを負荷して同様の検討を進めることを計画した。本課題では、課題推進者澤田正二郎(東北医科薬科大学)と連携し、 ^{13}C グルコースを摂取後の呼気中に排出される $^{13}\text{CO}_2$ を測定することにより、個体レベルでの糖酸化能をヒトにおいて経時的に計算する検査法の開発を

進めている。当該年度は、倫理委員会での審査を合格し、正常耐糖能者を対象に被検者のリクルートを進める準備が整った。以上、当該年度のマイルストーンは達成され、それ以上の成果が得られている。

課題推進者：片桐秀樹(東北大学)、澤田正二郎(東北医科薬科大学)

(4) 研究開発項目4:数理モデル解析による恒常性の理解とその応用

研究開発課題1:数理モデル解析による恒常性の理解とその応用

当該年度実施内容:

- ① 循環系臓器ネットワークモデルの要素となる1次元モデルの検討の実施
水藤は、全身の循環系ネットワークモデル構築を進めた。具体的にはまず脳動脈系に対するネットワークモデルを構築して試算を行った後、全身の主要な動脈系に対するネットワークモデルを実装した。ただし、この段階では主要動脈系以外は0次元モデルでまとめて表現されている。次年度以降に、静脈系と門脈系に対するモデリングを追加することで、全身の循環系ネットワークモデルへと発展させていくことが必要である。
- ② 分岐部における物理量の保存や伝播を正当に表現する数理モデルの検討の実施
水藤は、全身の循環系ネットワークモデルに数多く存在する分岐部における適切な接合条件を設定する検討を行った。具体的には、分岐部の流量に対してリーマン不変量の接続を課すことで、血流の方向に正しく合致した接続条件を実装することができた。このことは、全身の循環系ネットワークモデルを構築するために重要なステップとなった。
- ③ 循環系臓器ネットワークモデルに現れる生理的パラメータについての検討の実施
水藤は、他の研究開発項目の医学・生物系研究者との議論を通して、臓器間ネットワークモデルに含まれるべきパラメータを明確にする作業を続けた。具体的には、代謝系のモデリングに必要となる9コンパートメントモデルを他の課題推進者と議論して構築した。今後は、この仕組みを全身の循環系ネットワークモデルに進めることになる。
- ④ 9コンパートメント数理モデルの構築
長山は、臓器間ネットワーク数理モデルの構築に向けてどのような数理モデルを構築するか、他の課題推進者と議論を重ね、グルコース・インスリン・C-ペプチド動態を記述する9コンパートメント数理モデルを構築した。その数理モデルに対して健常者経口糖負荷試験データ結果を用いてパラメータのベイス推定を行った。決定したパラメータを用いて医学的知見のあるC-ペプチドとインスリンの半減期および肝臓でのインスリンクリアランスを推定した。その結果、C-ペプチド半減期とインスリン半減期について医学的知見と大きな差異がない結果を得ることができた。また、肝臓でのインスリンクリアランスについても医学的知見と大きな差異がないことがわかった。この結果から、糖代謝数理モデルの基盤となるモデルの構築はできたと考えられる。また生命科学との連携を行うための情報交換を進めている。以上のことから、研究はほぼ予定通り進んでいると判断している。

⑤ 臓器間ネットワーク数理モデルの構築と解析の実施

千葉は、臓器間ネットワーク数理モデルの構築を進めると同時に、その数学的な解析を行い、予定通りの進捗があった。

課題推進者:水藤 寛(東北大学)、長山雅晴(北海道大学)、千葉逸人(東北大学)

3. 当該年度のプロジェクトマネジメント実施内容

(1) 研究開発プロジェクトのガバナンス

進捗状況の把握

① 代表機関のPM支援体制チーム

東北大学総長の強いリーダーシップの下、代表機関として本研究開発プロジェクトに特化し、強力に支援するための「ムーンショット型研究開発事業戦略室」を設置した。知財戦略や国内外の研究開発動向等についても「ムーンショット型研究開発事業戦略室」と連携し、PMを支援する体制が整っている。また、戦略室内に、PM補佐 兼 URAとして福重真一が着任し、PMのマネジメントを強力に支援できる体制を構築した。

② 重要事項の連絡・調整(運営会議の実施等)

運営会議を設置して重要事項の連絡を随時行い、速やかに判断できる体制を構築した。本年度は、令和4年2月28日に理化学研究所・山田陸裕のプロジェクト研究参加に伴う運営会議をメール形式で開催し、プロジェクト参加承認を議決した。また、併せて令和4年4月1日から片桐PMも課題推進者として新たに研究開発課題「中枢における情動-自律神経連関の神経回路解明とその制御法の開発」を開始するお知らせをした。

③ 研究開発機関における研究の進捗状況の把握(サイトビジット、課題推進者会議等)

等、進捗把握に関する実施内容

課題推進者の全体会議や数多くの課題推進者との小会議を通じ、情報を蓄積し、進捗状況を把握した。当該期間中には、課題項目ごとに課題研究者が議論をする4回の全体会議(令和3年9月3日、9月5日、9月14日、9月20日 web)およびPD、アドバイザーを含めたプロジェクト会議(令和3年10月12日 web)の開催を支援した。さらに、数理科学者と医学・生命科学者がインスリンクリアランスの数理モデル構築について議論する5回の会議(令和3年6月30日、9月1日、令和4年2月8日、3月17日 web、令和3年11月16日 対面、東北大学)の開催を支援した。また、数理科学者と未病の数理について議論するため、令和4年3月23日にweb会議を開催した。

研究開発プロジェクトの展開

本研究開発プロジェクトの目標達成のために、最適な人材をセレクトした。ターゲットとする糖尿病自体を専門とする研究者はむしろチーム内では少数で、多臓器の変容や併発症や臓器変容などについての循環器・腎臓・消化器・脳外科・産科などの医学の研究者はもちろん、神経生理学・循環生理学・医工学・薬学などのバイオの研究者に加え、神経介入法や薬学、さらには、工学・数学など、多領域の学問分野が結集し、それぞれの独自の技術を活用した研究開発を進めている。さらに、5回にわたる公式の会議に加え、そのほかに

も非常に頻繁に課題推進者間での議論が各自行われており、先端技術や材料、その成果また研究推進上の問題点をも共有している。これらを通じ、それぞれの課題推進者が行う研究のプロジェクト全体に占める位置づけが明らかとなり、自然発生的に多くの連携が進んでおり、各課題推進者のモチベーションが高まっていることを実感する。ステージゲートについても、PM 片桐が頻回の meeting を通じ全課題の進捗状況を逐一把握し評価をするとともに、必要経費などについても情報交換を行い、最も効率よく研究が進捗するよう調整を進めている。

(2) 研究成果の展開

これらの研究を社会実装するためには、民との連携が必要である。藤生は接触・非接触デバイスの開発に向け、複数の企業と共同研究を進め、知財の確保と企業導出を積極的に推進しているほか、片桐・田宮も企業との共同研究について交渉中であり、東北大学の創生応用医学研究センター(片桐 PM がセンター長)のデジタルメディシナルハブでの産学連携システムを活用できる体制を築いている。

東北大学産学連携機構、技術移転機関の株式会社東北テクノアーチ、東北大学ナレッジキャスト株式会社との連携を開始し、成果が得られた際に遅滞なく事業展開できる体制を構築した。

また、田宮は、大規模医学文献データに基づく疾患類似性ネットワーク解析について、アステラス製薬との共同研究につき交渉中である。また、片桐 PM は、非侵襲的に糖尿病を検出するデバイスや診療人工知能の開発に向けての共同研究につき、複数の企業と交渉を進めている。

(3) 広報、アウトリーチ

積極的な情報発信の基盤として、令和3年11月25日、本プロジェクト独自のホームページ(<https://www.moonshot-katagiri.proj.med.tohoku.ac.jp/>)を公開した。本ホームページを介してプロジェクトの概要、各種お知らせや研究成果などをリアルタイムに発信している。

また、これまでに、一般市民への科学啓蒙となるテレビ出演の依頼があった場合には積極的に依頼を受け、研究成果などをわかりやすく解説してきた(藤生:令和4年1月2日 NHK BS1 テレビ「私たちのデジタル医療革命 2022」、中村:令和4年1月14日 NHK テレビ「チョコちゃんに叱られる!」)。さらに、田宮は、GWAS 要約統計量及び GWAS 解析について専用ホームページにより広報活動を行うとともに、来年度の日本メディカル AI 学会においてシンポジウム開催を予定している。

長山は、札幌南高等学校への出前授業(令和3年9月25日)で高校生対象に数理モデリングの講義を行った。また、眞鍋は、長生高等学校での「大学教授と語る会」(令和3年11月11日)においてプロジェクトの紹介を行った。

(4) データマネジメントに関する取り組み

NII(国立情報学研究所)の GakuNin RDM に新規データプロジェクト「片桐 PJ データ」を作成した。今後、プロジェクト内のデータ共有の場として活用していく。具体的には、実験系の課題推進者が「片桐 PJ データ」にデータを保存し、数理系の課題推進者がそのデータを入手、

解析後、解析データを保存、実験系の課題推進者が解析結果を見るといったことを促進する。また、これを基に、プロジェクト内のデータ共有から目標2全体のデータ共有へ繋げていくことを想定している。

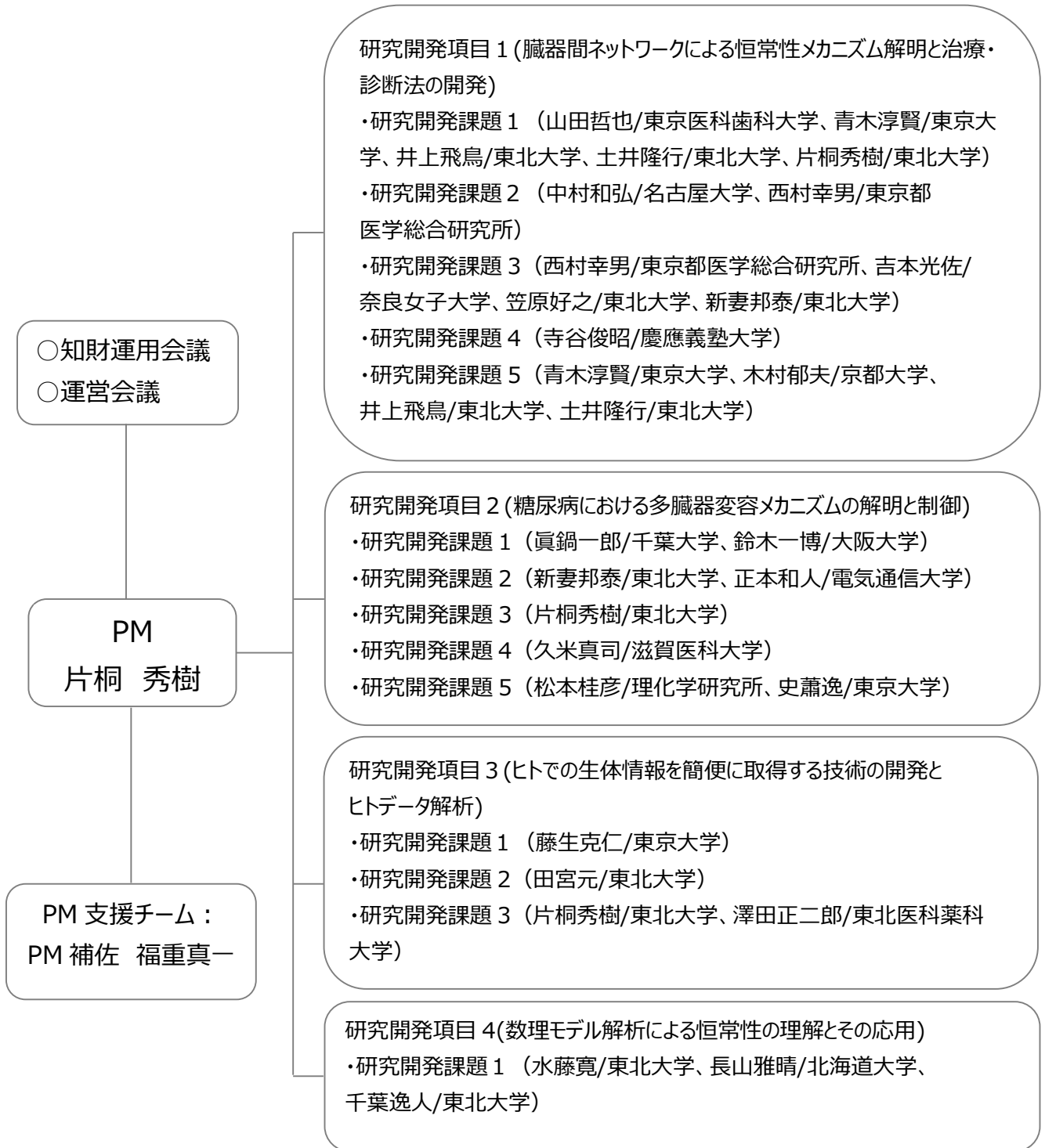
吉本は、ラット交感神経活動の連続測定データをまとめて研究室内に設置した NAS (Synology DS420j) に保存している。データは 2kHz-10kHz で数時間にわたり記録されたものがあり、大容量になる。NAS にデータ保存することにより、水藤を中心とする数理チームとのデータ共有を容易にする。セキュリティを含め、現在試験的運用を行っている。これらのデータは、上記 GakuNin RDM の「片桐 PJ データ」にも保存する。

松本は、マウス多臓器の全細胞アトラス作製のためのマウス臓器の顕微鏡撮影画像および検出された細胞座標情報などを研究室内のローカルサーバーに保存している。細胞座標情報に領域名などをレジストレーションしてアトラス化し、解析プログラムを作成した後、共有、公開予定(来年度以降)である。

田宮は、大規模医学文献データに基づく疾患類似性ネットワーク解析についてデータの保存をおこなっている。また、水藤は、数理モデルの定式化、コード、計算結果については保存し、プロジェクトの数理チーム内では共有しており、論文発表後は公開可能となる。

一方、ヒトデータを扱う澤田は、 $^{13}\text{CO}_2$ 呼気試験の実施に伴うデータ保存はインターネットに繋がらないパソコンでデータを整理して記憶媒体に保存している。また、記憶媒体は東北医科薬科大学内の鍵のかかる引き出しで管理している。

4. 当該年度の研究開発プロジェクト推進体制図



知財運用会議

当該年度は、会議は開催していない。

運営会議 実施内容

運営会議を設置して重要事項の連絡を随時行い、速やかに判断できる体制を構築した。本年度は、令和4年2月28日に理化学研究所・山田陸裕のプロジェクト研究参加に伴う運営会議をメール形式で開催し、プロジェクト参加承認を決議した。

5. 当該年度の成果データ集計

知的財産権件数				
	特許		その他産業財産権	
	国内	国際(PCT含む)	国内	国際
未登録件数	2	2	0	0
登録件数	1	0	0	0
合計(出願件数)	3	2	0	0

会議発表数			
	国内	国際	総数
招待講演	37	18	55
口頭発表	6	1	7
ポスター発表	4	7	11
合計	47	26	73

原著論文数(※proceedingsを含む)			
	国内	国際	総数
件数	0	15	15
(うち、査読有)	0	15	15

その他著作物数(総説、書籍など)			
	国内	国際	総数
総説	7	6	13
書籍	1	1	2
その他	0	0	0
合計	8	7	15

受賞件数		
国内	国際	総数
3	0	3

プレスリリース件数
0

報道件数
4

ワークショップ等、アウトリーチ件数
2