



## 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

## 2022年度版

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](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	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 研究院 生活環境科学系	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	特任准教授
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	教授
松本 桂彦	理化学研究所 生命機能科学研究センター	客員研究員
山田 陸裕	理化学研究所 生命機能科学研究センター	上級研究員
藤生 克仁	東京大学 医学部附属病院	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

### (1) 研究開発プロジェクトの概要

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臓器間ネットワークの機序を包括的に解明する。それに基づき、糖尿病やその併発疾患である心不全などについて、未病期段階の状態をより精密に検出する技術の開発を進める。さらに、未病段階から正常へと改善する手法の開発を目指し、臓器間ネットワークの制御法を開発する。それにより、2050年には、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。

### (2) 研究開発プロジェクトの実施状況

当該年度は、6月から新たに「糖尿病や併発疾患の未病段階の理解とデータ基盤の構築」を目指し研究開発項目5を立ち上げ、2型糖尿病や併発疾患である心不全について、未病期段階の理解に向け、実験動物での未病データセットの収集を急ピッチで進めた。また、住民コホートデータをもとに、正常耐糖能者における血糖データと生命予後の関連を解明し、これまでの常識を覆す「命に関わる糖尿病未病段階の定義づけ」を進めた。さらに、非侵襲デバイスを用いて、糖尿病や心不全をはじめとする併発疾患の検出に向け、独自のアルゴリズムを用いたヒトデータ解析を推進した。また、ゲノムコホートの大規模データを用い、独自の統計的機械学習手法を適用して、糖尿病オムジーンモデルの構築を進めた。さらに、実験動物を用いた検討により、神経・心臓・脂肪組織などにおける種々の状態での一細胞発現解析、血液サンプルでのメタボローム解析、全細胞アトラスによる中枢神経解析などのデータ駆動を中心とした手法と、生理学的手法や分子生物学的手法を融合させ、恒常性を司る臓器間ネットワーク機構の回路・分子機序の解明やその制御による疾患予防・治療法の開発に向けた研究を強力に推進した。これらにより、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。また、NII(国立情報学研究所)の GakuNin RDM に共有可能なデータの保管を進め、数理モデル構築、包括的データベース構築等への利活用へつなげた。

研究開発項目1～5が相互に連携しながら研究開発を推進している。

研究開発項目1では、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、臓器間ネットワークの制御や膝への迷走神経の刺激が糖尿病予防・治療法となる POC を示した。求心性経路の分子機構の解明に連携して着手し、これまでになく精緻な scRNA-seq 解析に成功し、求心性迷走神経、求心性交感神経の新たなクラスター分類を示した。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ト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、名古屋大学と JST との共同プレスリリースを行った。さらに、脳の中で体温調節の司令塔として機能する神経細胞群も同定し、JST との共同プレスリリースを行った。ヒトでも fMRI 解析や脊髄磁気刺激、刺激装置の埋め込み患者解析など検討を進めた。糖嗜好性に関し、関与する腸内細菌の同定や分子機序を解明し、腸内細菌依存的に糖

嗜好性が決定されるという新たな概念を提唱し、その分子メカニズムを解明した。また、中鎖脂肪酸受容体 GPR84 のシグナルにより、糖尿病併発症である非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) の発症が予防されることを示した。

研究開発項目2では、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。今回、心不全造血幹細胞移植だけでなく、うつ病が造血幹細胞の変化を誘導し心不全を引き起こす可能性を見出すとともに、造血幹細胞の変容が多臓器不全につながるメカニズムを提唱した。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と血管運動に関する画像評価法の構築に関する論文を発表した。腎近位尿細管細胞でケトン体合成酵素を欠損するマウスが、多尿、筋力低下、筋萎縮の表現型を示すことを明らかにし、近位尿細管細胞でのケトン体産生低下が高齢者での尿濃縮力低下と共に、サルコペニアにも関わり得る可能性を示した。また、食後の血糖値や肝のインスリン作用に関わる機序として、肝における類洞内皮細胞が、高脂肪食や老化で変容することを示した。

研究開発項目3では、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を知財化し、昨年9月より治験を開始した。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見出し、糖尿病・動脈硬化・悪性腫瘍に共通する発症基盤の存在を提唱した。さらに、 $^{13}\text{CO}_2$  呼気試験による肝の糖取込み能評価方法の特許を取得し、ヒトにおける糖尿病超早期診断法の開発へとつなげた。さらに、これらの正常耐糖能者の詳細なヒトでのデータに基づいて、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構築し、ブラッシュアップを行った。研究開発項目5では、糖尿病未病・超早期状態や併発疾患の未病臓器間ネットワークにおけるデータセットの構築と解析を実験動物やヒトにおいて開始した。

以上まとめると、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、NASHへの中鎖脂肪酸-GPR84 シグナル、サルコペニアにおけるケトン体の意義など、機序やターゲットを提案した。特に心不全状態や肝糖取込み能については、超早期にヒトで検出する手法の開発に成功し、社会実装につなげつつある。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その死因が明らかとなり、未病の新たな定義づけにつながるものとなった。

### (3) プロジェクトマネジメントの実施状況

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、福重真一が PM 補佐・URA を担当した。計画通り、PM との密接な連携のもと、PM がプロジェクトに専念できる体制を整備し一体的に推進している。

また、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するとともに、課題推進者の全体会議や小会議の開催を支援し、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推進者が議論をする全体会議（4回実施）や数理モデル構築について数理科学者と医学・生命科学者が議論する会議（4回実施）の開催を支援した。

さらに、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。本年度は、東北大学産学連携機構、東北テクノアーチとの連携によって<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>呼気試験による肝の糖取込み能評価方法の特許を米国で取得した。研究における国際連携も積極的に推し進めると共に、アウトリーチ活動としてプロジェクト独自のホームページを立ち上げ情報発信を行っている。また、各種メディア（テレビ、新聞、webなど）や高校、大学への出張講義を通じ、一般市民、高校生、大学生への情報発信も積極的に行ってきた。

データマネジメントに関しては、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、プロジェクト内のデータ共有の場として活用している。また、ムーンショット目標2全体での包括的未病データベース構築およびそれらのデータを用いたビッグデータ解析や数理モデル化に向け、積極的なデータデポジットを推進していく。

## 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:

肝臓からの求心性神経シグナルは迷走神経や内臓神経によって脳に伝達されるが、それぞれの神経束を構成する神経線維（神経細胞）は heterogeneous であることが明らかになっており、このことが求心性神経伝達の分子メカニズムの解明を困難にしてきた。令和3年度に施行した単細胞レベルでの遺伝子発現の網羅的解析により明らかになってきた求心性迷走神経のサブタイプにおいて、肝臓などの末梢臓器から脳にいたる臓器連関に関与する求心性神経細胞のサブタイプ候補を一つ見出した。さらに、求心性迷走神経に発現している GPCR のパターンを決定した。同時に候補 GPCR 作動薬による迷走神経活性への影響と、その迷走神経依存的な薬理作用を明らかにした。GPCR 作動薬の研究を加速するツールとして、DREADD と呼ばれるデザイナーGPCR を Cre リコンビナーゼ依存的に発現するトランスジェニックマウスを作製した。また、求心性迷走神経と同様に末梢臓器から脳に代謝情報を伝達している求心性内臓神経についても、そのクラスター及びサブタイプの同定及びサブタイプ毎の遺伝子発現解析に着手した。

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・片桐）

まず、片桐 G は、オプトジェネティクス的手法を用いて、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きたが、当該年度は、その手法を活用することで、

膵臓に投射する迷走神経を選択的に刺激することにより、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(論文受理)。この成果は、臓器間ネットワークを介した膵への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 POC となったと考える。

上記の POC をもとに、これら臓器間ネットワークを刺激することで、エネルギー代謝亢進や膵β細胞増加による肥満や糖尿病の予防・改善方法の開発をめざし、臓器間ネットワークの起点となる肝臓からの求心性シグナルの分子機構の解明とその制御を目指した研究を展開している。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、求心性内臓神経を介する糖代謝制御システムを解明しその系を持つ片桐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、臓器間ネットワークに関わる受容体の同定を目指している。

山田 G と青木 G は、NG における GPCR 発現パターン決定を目的として、1細胞トランスクリプトーム解析に取り組んだ。研究を進める過程で single nuclear (sn) RNA-seq が NG に対してうまくワークしないという結果を受け、当初予定していた手法を single cell (sc) RNA-seq の手法に切り替えて解析を実施した。その結果、既存のデータベースでは検出されていない GPCR も含め、各ノードズ神経において多くの遺伝子の検出に成功し、これを用いた求心性迷走神経サブタイプ分類が可能となった。NG を構成するニューロンは23のサブタイプに分類でき、左右の迷走神経サブタイプ間で遺伝子発現レベルに差が認められた。肝臓からの神経シグナルが左の NG を経由して脳に伝達されることを鑑みると、右の NG との比較が肝臓からの代謝情報を伝達する神経シグナルのクラスターを同定する際に有用な情報になるものと考えられた。さらに、青木 G は、糖尿病関連求心性迷走神経サブタイプとして働く可能性の高い、glucagon-like peptide-1 受容体 (GLP-1R) 陽性サブタイプを同定し、このサブタイプに発現しているその他の GPCR をリストアップした。井上 G は、糖尿病関連神経 GPCR としてプロテアーゼ活性化受容体 3 (PAR3) を見出し、PAR3 と関連 GPCR (PAR1, PAR2, PAR4) のシグナルアッセイの結果や GPCR シグナルアッセイのための関連プラスミドコンストラクトを青木 G と共有した。

片桐 G は、膵β細胞増殖につながる臓器間ネットワークを構成する肝臓からの内臓神経求心路の神経核が存在する Dorsal root ganglion (DRG) を単離し、単細胞レベルでの遺伝子発現を網羅的に解析した。その結果、求心性内臓神経は少なくとも6以上のクラスターに分けることができ、それぞれのクラスターに特徴的な遺伝子発現を見出すことができた。さらに、間質細胞など、ニューロン以外のクラスターを同定することもでき、求心性内臓神経の多様性を明らかとすることができた。また、膵β細胞増殖につながる臓器間ネットワークに関与する求心性神経のサブタイプを同定しシグナル伝達の分子メカニズムの解明につなげるべく、研究を進めた。具体的には、膵β細胞増殖につながる臓器間ネットワークを活性化させるため、恒常活性型 MEK をコードしたアデノウィルスを用いた肝臓への遺伝子導入を行い、DRG の単細胞レベルでの発現を解析し、Fos が発現するニューロンを *in silico* で同定した。

## ② GPCRリガンド・合成作動薬を用いた迷走神経活性制御機構の解明(青木)

当該年度は、近年解析が進んでいる生理活性リゾリン脂質であるリゾホスファチジルセリ



ン(LysoPS)の受容体 LPS3 に着目し、その作動薬を用いた解析を進めた。求心性迷走神経において LPS3 は、同じく生理活性リゾリン脂質であるリゾホスファチジン酸受容体 LPA3 と同一サブタイプに発現していることがわかっている。前年度までの研究から求心性迷走神経における LPA3 の活性化は、血圧・心拍数の低下および呼吸リズムの変動を惹起することが明らかとなっているため、有機化学的に合成した LPS3 作動薬投与時のこれらのパラメータの解析を行った。その結果、LPS3 の活性化は血圧・心拍数には影響せず(静脈内投与)、呼吸回数のみ若干減少させた(気管内投与)。これらの結果は、例え同一の神経細胞上に発現している GPCR であっても下流シグナルが異なることで、神経活性に対する影響が異なる可能性を示している。実際、LPA3 及び LPS3 の G タンパク共役性を調べたところ、LPA3 は主に Gq、LPS3 は Gs 共役型の GPCR であることがわかった。従って、次年度以降は、下記③で開発した DREADD マウスを用いてそれぞれの G タンパク質シグナルの作用も明らかにしつつ、その結果を踏まえて、それぞれの迷走神経サブタイプに発現している GPCR の機能を効果的に明らかにしていく必要がある。

### ③ 迷走神経 GPCR を標的とした研究ツール(マウス・作動薬)の開発(青木・土井・井上)

当該年度は、求心性迷走神経において任意の GPCR シグナルを薬理的に惹起できる迷走神経 DREADD マウスの作製を行い、実際に DREADD リガンドの投与によって迷走神経依存的な薬理応答を確認した。

まず、LPA3 及び LPS3 の迷走神経特異的 KO マウスの作製を試みた。このうち、海外の共同研究者から入手した LPA3 flox マウスが正しく loxP 配列が挿入されていないことが判明したため、国外のマウスリソースセンターより凍結精子を新たに購入し、その作製を進めている。

次に DREADD マウスは、Gq/Gi-DREADD の2種類を Jax Lab より購入し、Gs-DREADD は受精卵へのプラスミドインジェクションにより新たに作製した。G12-DREADD は井上 G より供与を受けた。これら4種類の DREADD マウスを、迷走神経プロモーターである Phox2b または Wnt-1 の下流で Cre を発現するドライバーマウスとそれぞれ交配し、計8種類の迷走神経 DREADD マウスの作製が完了した。さらに神経を活性化させることが想定される Gq-DREADD マウスを用い、DREADD リガンドであるクロザピン N オキシド(CNO)を当該マウスに投与したところ、迷走神経依存的な降圧/徐脈作用や粘液分泌亢進作用が認められた。従って、これら DREADD が確かに求心性迷走神経に発現していることが確認された。次年度以降、これら DREADD マウスを用いた解析を順次進めていく予定である。

また、青木 G が保有する LPA アナログのうち、LPA5 に作動活性を有するものをスタートとして、土井 G と共同で化合物の構造展開を行った。当該年度は 25 種類の LPA アナログが土井 G によって合成され、青木 G ではそれらの化合物の LPA 受容体への活性化評価を行った。その結果、LPA5 受容体に対してポジティブコントロールである LPA と比較して 30 倍程度活性が高く、それ以外の5種類の LPA 受容体に対しては LPA より 1/10 程度の活性しか示さない化合物を見出した。従って本化合物は LPA5 選択的作動薬として有望な可能性がある。次年度以降で、本化合物をベースに更なる構造修飾の可能性を検討するとともに、本化合物を用いることで求心性迷走神経活性における LPA5 の役割について検証していく予定である。

さらに、井上 G は、インフォマティクス研究者との共同研究により、言語学習を用いて GPCR のシグナル選択性に関わる一次配列の特徴を解析し、G タンパク質や  $\beta$ -アレスチンとの相互作用を探索するアルゴリズム PRECOGx を開発した。本手法は、ヒト GPCR の疾患変異体 (ClinVar) やスプライスアイソフォーム (GTEx) のシグナル伝達への寄与を解析することができ、シグナルデータベースとインフォマティクスの統合による、疾患機序の理解に貢献する。

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:

脳内で情動やストレスを処理する皮質辺縁系と自律神経制御系とが連関する神経回路メカニズムの解明やその神経回路を制御する手法の開発に向け、心理ストレスや情動によって活性化される中枢ニューロンを、組織化学マーカーを用いる方法あるいは *in vivo* で計測する方法を用いて同定した。また、研究開発課題 1 で得られる、末梢臓器から脳への感覚の求心性神経情報を受容する脳領域に関する知見をもとに、脳の上位中枢への情報伝達経路を組織学的に探索した。

また、ヒトを対象として、fMRI による脳活動と自律神経応答との同時計測系を確立した。特に、自律神経を制御している視床下部脳幹系の BOLD 信号を高解像度で計測するシーケンスを開発した。また、fMRI により非侵襲的に臓器状態をモニタリングする方法や脳深部刺激により恒常性を制御する方法を開発した。さらに、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の数理研究者との情報交換を継続して行った。

本課題は、3人の課題推進者(中村和弘、西村幸男、片桐秀樹)が連携し役割分担しながら推進している。

#### ① 実験動物の心身相関神経回路の解明(中村)

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、心理ストレスや情動によって活性化される中枢ニューロンを、組織化学マーカーを用いる方法に加えて、*in vivo* マルチファイバーフォトメトリーで計測する方法を用いて同定した。

#### ② 実験動物の感覚-効果器連関に関わる脳領域の解明(中村)

実験動物において、脳が末梢臓器からの感覚情報を処理し、遠心路を通じて末梢臓器・器官を制御する、感覚-効果器連関メカニズムに関わる脳領域を明らかにする目標の達成のため、今年度は、研究開発項目1の研究開発課題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」で得られる、末梢臓器から脳への感覚の求心性神経情報を受容する脳領域に関する知見をもとに、その脳領域を起点として脳の上位中枢へ至る情報伝達経路を組織学的に探索した。特に、外側腕傍核を介した感覚情報の上



行路を複数同定した。

### 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)

令和3年度の時点で 3T-MRI 装置を用いて、2mm 角の解像度で視床下部脳幹系を含む全脳活動の計測環境を確立した。令和4年度では、7T-MRI 装置を用いて、1.6mm 角の解像度で全脳を計測する系を確立した。さらに、視床下部脳幹部に局限した撮像については、1.2mm 角までは解像度を上げて、fMRI 計測によって局所脳活動を描出できることを確認し、高解像度で視床下部脳幹系を含む脳活動を記録するシーケンスを確立した。また、自律神経応答の計測系に関しては、3Tと7Tのいずれの装置においても、心拍・呼吸・皮膚電気活動といった自律神経応答を同時記録することが可能であり、行動課題中に同時記録したデータから、運動の準備及び実行に伴う心拍数の変動を示すことに成功した。従って MRI 環境下での自律神経応答計測系を確立した。

### ④ ヒトでの自律神経活動の自己制御(西村)

令和3年度では、多数の被験者(28名)に挑戦的運動場面を想像させ、交感神経の自発的な賦活状態を、7T-MRI 装置を用いて fMRI 計測を行い、そのデータを獲得した。令和4年度では、これらの fMRI データの解析を行い、挑戦的運動場面の想像中には前部帯状回や前部島皮質だけでなくドーパミン細胞が密集する腹側中脳も賦活することを明らかにした。この計測により、交感神経活動の自己制御時の脳活動の計測を開始した。さらに、交感神経の自発的な賦活の度合いを確認する実験を行い、通勤場面の想像や何も想像しない直後に比べ、要求度の高い挑戦的運動場面を想像した直後が反応時間が短く最大握力が強い把持反応をすることを確認した。次に、fMRI 計測と同時に皮膚電気活動の計測を行い、挑戦的運動場面での自律神経応答がより大きい傾向も確認した。これにより、fMRI 計測と自律神経応答の同時記録実験も開始できた。現在は、自律神経応答と直接関連する脳領域を調べるための追加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)

令和3年度では、内臓の代謝関連活動を非侵襲的に評価することを目指し、T2\*強調画像を用いて膵臓および肝臓の BOLD 信号計測系を確立した。令和4年度は、この計測手法によって算出される T2\*定量値の安定性を評価するため、膵臓および肝臓を対象に、10分間の計測を10分の休憩を挟んで3回繰り返す実験を実行した。結果として、膵臓および肝臓から計測された T2\*値は時間的に安定していることを確認し、内臓の代謝関連活動の非侵襲的な評価を行うための撮影シーケンスの安定性を確認し、そのプロセスを確立した。また、次の段階として、膵臓の代謝活動が T2\*値の変化として描出できるかを検証するため、MRI 装置内でグルコース溶液を経口摂取させる計画を立案した。血糖値を統制するための一定時間の飲食制限とグルコース溶液の摂取について、倫理委員会での審議を受け、年度内に実施する承認を得ることができた。したがって、令和5年度には実際にグルコース溶液摂取に伴う代謝関連活動について、確立した T2\*強調画像による計測系を用いて検討する予定である。

⑥ 脳深部刺激による恒常性の制御法の開発(西村)

脳深部電気刺激によって自律神経活動を制御でき得る脳領域の探索を行なった。当該年度は、サルが運動課題を行なっている最中に側坐核あるいは分界条床核への電気刺激(50Hz, 1~3 mA)をオンオフするブロックデザインで実験を行なった。自律神経応答の指標として、心電図および瞳孔径を記録した。分界条床核への刺激は刺激オン時には心拍数の増加と瞳孔径の拡大を誘発した。一方で、側坐核への刺激では明確な心拍数の変化や瞳孔径の変化は観られなかった。

⑦ 肝からの求心性神経シグナルによる中枢経路の解明とその制御による臓器代謝に及ぼす影響の解明(片桐)

恒常活性型 MEK をコードしたアデノウイルスを用いた肝への遺伝子導入により、膵β細胞が増殖する独自の系を用い、その際の、中枢神経経路の解明を目指している。そこで、当該課題においては、Fos-TRAP マウスを入手し、肝への恒常活性型 MEK の遺伝子導入を行ったのち、脳を取り出し透明化を行うことで、全脳における Fos 活性化ニューロンを網羅的に検討した。コントロールの LacZ アデノウイルスに比して、恒常活性型 MEK アデノウイルスの投与により、著明に多くの神経細胞の活性化が観察された。さらに、各脳部位を詳細に検討することで、活性化ニューロンが局在する部位を見出すことができた。以上、恒常活性型 MEK アデノウイルスを用いた肝への遺伝子導入により、中枢神経におけるニューロンの活性化を初めて示すことに成功した。

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)、片桐秀樹(東北大学)

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:

自律神経活動の実態解明については、実験動物を用い、神経活動計測の signal/noise 比を向上させて、交感神経活動計測の高精度化を図った。交感神経活動が正常から未病、病的な状態への遷移を予測するパラメータになる可能性を検討するため、閉塞性睡眠時無呼吸モデルを用い、交感神経活動が正常から異常な活動に至る過渡的な応答とそのメカニズムの検討を試みた。また、ラットを用い意識下での迷走神経活動の計測方法の検討を行った。さらに、項目4と連携し数理的に交感神経の連続した活動パターンのモデル化を進めた。

また、多点電極による電気信号の取得法の開発を継続した。さらに、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を進める目的で、胎児期に原因を持つ糖尿病および併発疾患の動物モデルを用いた解析を進めた。

また、制御法の開発に向けて、臓器機能調節に適したアルゴリズムとハードウェアを組み込んだ人工自律神経のための人工神経接続システムを作成した。さらに、ヒトでの実証に向け、迷走神経刺激患者における臨床研究、ならびに頭蓋内脳波埋め込み患者における臨床研究の両方において、データの収集を行った。

本課題は、4人の課題推進者(西村幸男、吉本光佐、笠原好之、新妻邦泰)が連携し役

割分担しながら推進している。

### 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)

血糖値等を測定し、閾値を超えると人工神経接続からの脊髄や頭部への電気刺激を行い、自律神経の状態によって臓器機能調節を行う遠心性神経の人工神経接続システムのソフトウェア・ハードウェア開発を下記のように行った。まず、そのソフトウェアにおけるアルゴリズムは、入力された血糖値等のアナログ値が設定パラメーター(閾値、最大値、変化率)に応じて、刺激信号の出力強度と時間当たりの出力回数をそれぞれリアルタイムで算出し、電圧として出力するように設計した。また、このようなプロセスを効果的に行うため、グラフィカル・ユーザー・インターフェースを介してリアルタイムでモニタリングしながら、入力信号における設定パラメータを変更可能としたため、効果をモニタリングしながら出力電圧の柔軟な微調整が可能なハードウェアシステムを構築した。さらに、リニアアイソレーター装置(UNIQ MEDICAL 社製)をシステムに取り入れ、出力電圧信号に相関する定電流に変換するように設計を強化し、出力電圧信号の強度や波形に相関する電気刺激を可能とするシステムを製作した。以上のように構築した人工神経接続システムを用いて、血糖値等の入力値の変化に応じた実時間電気刺激が可能であることを確認した。また、本システムを用いた動物実験を想定し、サル 1 頭の開腹手術によって、膵臓を支配する自律神経の腹腔内の走行路を確認し、神経へのアプローチ方法と刺激用電極のデザイン・留置方法を検討した。

### ② 臓器機能の遠心性制御法の開発:ヒトでの非侵襲的な臓器機能制御法の開発(西村)

ヒト対象研究において、経脊椎脊髄磁気刺激に対する迷走神経応答を測定するための研究として脊髄磁気刺激の前後で糖代謝応答を測定する研究計画を新たに作成し、東京都医学総合研究所人対象研究倫理審査委員会にて倫理承認を得た。これまで東京都総合研究所脳機能再建プロジェクトにおいて取得してきた経脊椎脊髄磁気刺激に対する呼吸循環器系応答の既存データを用いて、脊髄磁気刺激が血圧、心拍数、末梢静脈血中酸素飽和度などの自律神経応答に及ぼす影響について解析を行った。健常成人被験者 30 名の既存データの解析から、拡張期血圧と血中酸素飽和度が刺激直後に僅かに上昇することが分かった。収縮期血圧、心拍数には統計的に優位な変化は見られなかった。12 名の慢性期脊髄損傷者の既存データの解析では、収縮期・拡張期血圧、心拍数、血中酸素飽和度のいずれにも刺激後の変動は確認できなかった。これらの結果から、ホメオスタシスの維持された健常者の自律神経応答については、脊髄損傷によって自律神経系が障害されている患者のそれよりも比較的容易に磁気刺激の介入が行える可能性が示された。

### ③ 自律神経活動の長期測定技術の改良の実施(吉本)

迷走神経活動は、交感神経活動よりも電圧ピークレベルが低いため、ピーク間で  $5\mu$  ボルト以下の計測が必要である。ヘッドアンプの増幅シグナル・ノイズ比を上げるために、高精度低ノイズプリアンプの作製および神経活動に最適なアクティブフィルターの特性検討を併せて行った。世界的な IC の供給不足により、代替できない IC の入荷待ちが長く続いたが、令和 4 年度末に部品が供給され、プロトタイプを作製した。令和 5 年度には、ラットでの実測に用いるフィルターなどの微調整を行う。これによって、迷走神経活動計測シス

テムの高精度化が可能になった。

#### ④ 迷走神経計測用の電極と手術手技の改良開発(吉本)

意識下のラットの右頸部迷走神経活動の計測に成功し、基本的な手技を確立した。ステンレス製のマイクロ電極を迷走神経に接触させ、二液混合性のゲルで固定する。電極から約 5mm 尾側に局所麻酔薬投与のためのマイクロカテーテルを留置する。電極の間隔、神経剥離の程度、アース電極の位置、ゲルの量など、少しの違いが計測のノイズ・シグナル比に大きく影響する。現在、電極の形状を含め手術手技をさらに改良している。

さらに研究を進めて、遠心性と求心性迷走神経活動の分離計測を開始した。長期作用型の局所麻酔薬投与用(レボブピバカイン、0.75% 30  $\mu$ l)のカテーテルを電極から尾側に留置することにより、求心性迷走神経活動の抑制を試みた。結果、レボブピバカイン投与後約 50–80%の迷走神経活動が抑制され、求心性迷走神経活動を可逆的に抑制することができた。今後、この技術をさらに改良し、遠心性および求心性迷走神経活動の特性や機能に関する研究の基礎技術の確立をめざす。

次に、迷走神経活動と腎交感神経活動の同時測定を行った。コレシストキニン-8(CCK8、50  $\mu$ g/kg)を腹腔あるいは静脈内投与し、求心性迷走神経活動と腎交感神経活動の応答の違いを検討した。CCK8 の腹腔内投与は選択的に求心性迷走神経活動を刺激し、腎交感神経活動、動脈圧および心拍数に影響を与えないことが明らかになった。CCK8 の腹腔内投与は、求心性迷走神経活動の計測のテスト試薬として使用できる。

年度末には、左頸部迷走神経に電極を慢性的に留置する方法の検討を行い、麻酔下のラットの左頸部迷走神経活動計測に成功した。迷走神経活動の左右差の検討が可能になった。

#### ⑤ 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)

閉塞性無呼吸の繰り返し負荷の効果:正常状態から疾病発症に至る過程における交感神経活動の経時的応答計測

正常状態から病気になる過程での時系列データ取得を目的として、閉塞性睡眠時無呼吸の繰り返し負荷を実施し、交感神経活動の時間依存的な応答を計測した。Wistar 系雄ラットを用いて、腎および腰部交感神経活動、脳波、心電図、頸部筋電図、横隔膜筋電図測定用電極、脳組織酸素飽和度測定用プローブ、動脈圧測定用カテーテル、気管閉塞用チューブを慢性留置した。術後の回復が十分になった後、4 日間連続して 40 秒間の気管閉塞を 10 分おきに 300 分間実施した。

心拍数、腎交感神経活動、および腰部交感神経活動は、300 分間でベースラインの変化がほとんど見られなかった。しかし、腎交感神経活動は、4 日目には 1 日目と比較して約 2 倍に時間的に蓄積して増加した。動脈圧、心拍数、および腰部交感神経活動は有意な変化はなかった。動脈圧反射特性を検討した結果、腎交感神経活動の時間依存した蓄積的な増加は、腎交感神経の最大反応領域の増加を伴うことがわかった。気管閉塞性無呼吸の繰り返しは、腎交感神経のフィードフォワード増幅を引き起こし、時間的に蓄積して増加することが明らかとなった。時間依存的に蓄積した腎交感神経活動の増加は、腎ナトリウムの再吸収の増加、レニン-アンギオテンシン-アルドステロン系の活性化などを慢性的に

引き起こし、高血圧発症や心血管疾患の発症につながる原因となると考えられる。

⑥ 「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)

正常状態から病気になるプロセスでの交感神経活動および迷走神経活動の時系列データを計測し、数理解析グループに時系列データを提供し、健康、未病、病気のプロセスの数理解析の糸口を提供することを目指している。今年度は、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蓄積ができた。データは各チャンネル 20kHzで収録しており、1ファイルが1GBの大容量になっている。Matlab、Python、LabVIEWなどのソフトでデータの前処理と切り出しを試みているが、大容量データの同時処理は困難な課題であり、検討中である。また、合原プロジェクトの会議に参加し、数理解析に適したデータについて検討している。今後、昨年度行った遅延座標系による時系列解析などを含め、自律神経活動の時系列データの共有を増やし、連携解析を継続する。

⑦ 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)

マウスなどの動物モデルを対象とし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、多点となるよう取り付けられた複数の電極を用いての生体電気信号の取得法に関する技術開発を継続し行った。この技術を開発するには、計測のための複数の電極による電気信号の取得と、多数のノイズの中から目的とする信号を取り出す技術の開発が求められたが、両者は不可分であり、相互に最適化が必要である。令和4年度は計測を行うための実験系の開発を継続し、膵臓に3点の電極を設置し生体電気信号の取得法の検討を行った。同時に心電図の計測を行い、心電図から得られる心拍変動を自律神経活動の指標とし、膵臓から取得した生体電気信号の中から自律神経活動を示す信号を特定するための参照データとした。開発中のアルゴリズムとAI技術は、最適化のために事前の詳細なデータの分析と特徴抽出が必要であるため、現在データの検証作業を進めている。取得したデータは、自律神経の活動性を変化させる薬剤を投与した条件下において膵臓の生体電気信号の計測を行ったものであり、生体電気信号データの中から自律神経活動性の変化に一致する特徴量の探索を行った。その結果、膵臓の信号の周波数変化または強度変化として、心電図におけるRR間隔の変化と相関が見られる成分が含まれていた。これは膵臓の自律神経の活動を捉えたものである可能性があるが、再現性を含め、詳細な検証を要する。電極による膵臓からの生体電気信号の取得と、得られた信号の解析手法の確立は、相互に条件をフィードバックし、全体のシステムとしての最適化を行う必要があるため、今後も継続して取り組む予定である。オプトジェネティクスによる光刺激データに関しても、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。

⑧ 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(笠原)

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を進める目的で、胎児期に原因を持つ糖尿病モデルを用いて、心拍変動による胎児の自律神経活動の評価を進めた。これにはマウス胎児の心電図計測技術を用いた。令和4年度は環境要因による

動物モデルとして妊娠マウスに対して高脂肪食負荷を行い、胎児の自律神経活動を評価した。雌の C57BL/6J マウスの妊娠直後から高脂肪食あるいはコントロール食を負荷し、妊娠 18.5 日目に胎児に対し胎児心電図の計測を行った。心拍変動から算出される自律神経活動の評価を行ったところ、母体に対して高脂肪食を負荷した胎児では、コントロール食を負荷した胎児に比べて、副交感神経活動ならびに交感神経活動がともに低下することを見出した。このことは妊娠中の母体の高脂肪食の摂取は、胎児の自律神経系の発達と活動性に影響することを示しており、胎児の将来の疾患リスクの一因となる可能性を示唆する。また、胎児期から自律神経系の変化を検出することが可能であったことは、発症前の未病の状態における診断および治療介入の可能性を示すものである。今後は、胎児期に母体が高脂肪食を負荷された胎児が、出生・成育にとまない、どのように糖尿病・肥満のリスクが表出するかについて、検証を進める予定である。

また、遺伝要因と環境要因の相互作用として、2 型糖尿病モデルである db/db マウスを用いて、db ヘテロ遺伝型の妊娠マウスに対して高脂肪食負荷を行い、胎児の自律神経活動に与える影響を精査した。令和 3 年度までに、遺伝要因としての db/db マウスの各遺伝子型の胎児は、自律神経活動に差異は認められなかったことは検証済みである。雌 db ヘテロ遺伝子型マウスの妊娠直後から高脂肪食を負荷し、妊娠 18.5 日目に胎児に対し胎児心電図の計測を行った。その結果、母体に高脂肪食を負荷しても、胎児の db 遺伝子型による自律神経活動性の差異は見出されなかった。C57BL/6J マウスを用いた結果とあわせ、妊娠期の胎児の自律神経系の発達と活動性には、環境要因が強く影響することが示唆された。しかしこの実験においては、胎児に全ての遺伝子型を得る目的で、母体マウスは全て db ヘテロ型を用いたが、母体の遺伝子型が胎児の発達に与える影響は未検証である。今後、その検証を行い、胎児期の遺伝要因と環境要因の相互作用を精査する必要があると考えられる。

#### ⑨ 迷走神経刺激療法および迷走神経刺激装置埋め込み患者の研究(新妻)

迷走神経刺激に関する研究は、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」として倫理委員会に承認されている。本年度は 3 例の患者登録を行った。この間の迷走神経刺激装置植え込み術野件数が 8 件であった。患者負担もあることから、半数程度の組み入れに留まると想定していたが、若干組み入れが少なくなってしまった。今後、更なる患者のリクルートを促進していく方針である。なお、2023 年 5 月、6 月と、次年度すでに 2 例の組み入れが予定されている。倫理委員会承認後の合計組み入れ数は 5 例となっている。

また、頭蓋内電極留置は、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」として倫理委員会に承認されている。本年度は、糖尿病、睡眠に関連する領域の 6 例の頭蓋内電極留置を行った。2023 年 5、6、7 月にあわせて 3 例の頭蓋内電極留置も予定されている。

頭蓋内脳波による睡眠ステージ判定に関する筑波大学との共同研究を施行中である。

上記のように、当該年度には 9 例の臨床データ収集を行い、予定以上に進捗している

状況であるが、更なる情報収集を目指し、患者組み入れ率の向上を図る。

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:

本研究課題は、メタボリックストレスによって活性が変化する神経回路を同定し、特定神経回路の人為的制御による糖尿病および併発疾患病態を制御することを目的とする。前年度までに、遺伝子組換え動物(FosTRAP2 マウス)を用いて、糖や脂質によって活性化する神経回路および脳領域の観察に成功した。そこで、当該年度の研究計画では、活性化する神経回路および脳領域が代謝疾患に与える影響を動物モデルで評価した。得られた実験データをもとに、同領域内の研究者と意見交換を実施して、ヒト糖尿病病態と関連性を推察した。

本課題は、課題推進者、寺谷俊昭が推進している。

##### 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

###### 1) メタボリックストレス応答性神経が代謝機能に及ぼす影響に関する評価の実施

活性化神経特異的に形質導入可能なマウス(FosTRAP マウス)を用いて、糖もしくは脂質に応答する求心性迷走神経細胞の除去を実施した。通常飼育下において、糖応答性迷走神経除去マウス、脂質応答性迷走神経除去マウスおよびコントロールマウスの糖代謝に明確な違いを認めなかった。糖応答性迷走神経除去マウスは、他 2 群と異なり、糖嗜好を示さなかった。

###### 2) 糖嗜好に関わる腸内細菌の同定の実施

糖嗜好形成において、脳腸相関が重要であることが示されている。昨年度までに、我々の実施した検討において、糖嗜好が腸内細菌依存的に形成することが証明された。当該年度は、糖嗜好を決定づける特定腸内細菌の同定を目標とした。

求心性迷走神経は、頸部左右 2 か所に存在する神経節に由来する。これら神経は、横隔膜下で複雑に分岐して、消化管を含む様々な臓器を支配する。これら迷走神経分枝を個別に切除したところ、糖嗜好に関わる迷走神経分枝は主に小腸上部を支配していた。この事実より、小腸上部に存在する細菌に着目して解析を進めた。

各種抗生剤の組み合わせ投与およびノバイオームマウスを用いて解析したところ、酢酸産生腸内細菌が糖嗜好形成に重要であることを突き止めた。これらの腸内細菌は、ヒトおよびマウスの十二指腸に存在することを 16s メタゲノム解析により明らかとした。

##### 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

前年度までに長期モデルにおける迷走神経肝臓枝電気刺激法を確立した。そこで、当該年度は、この迷走神経肝臓枝電気刺激法を用いて糖尿病病態のコントロールを試みる。具体的な方法は以下に記す。オスの野生型マウスの迷走神経肝臓枝に電気刺激デバイ



スを設置する。その後、マウスに脂肪食を毎日 1 回の頻度で電気刺激を行う。未刺激群と刺激群を比較して、電気刺激が代謝機能異常に与える影響を評価した。電気刺激は、高脂肪食負荷による耐糖能異常を部分的に改善させた。電気刺激は、高脂肪食負荷による脂肪肝病態および肝細胞障害を改善しなかった。

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:

これまで、血漿、血清、尿、脳脊髄液等の体液中のリン脂質、リゾリン脂質、脂肪酸等の GPCR のリガンドとなりうる脂質分子の質量分析計を用いる検出手法、特に、安定した測定が困難であった血漿リゾホスファチジン酸 (LPA) の正確な測定手法を確立した。また、マウス肥満モデルや高脂肪食を与えたマウスでは、ステアリン酸 (18:0) を含む分子種が増大し、パルミチン酸 (16:0) を含む分子種の減少を認めた。そこで、今年度は、糖尿病マウスモデル、高脂肪食マウス、ob/ob マウス等のモデルマウスでリゾリン脂質・リン脂質分子種の変動を解析した。次年度以降、ヒトの肥満、糖尿病におけるリゾリン脂質・リン脂質分子種のバイオマーカーとしての探索につなげる。

また、生体抽出物からの GPCR リガンドの同定可能な GPCR 活性化検出法の開発を進めた。脂肪酸などの食由来代謝物を用いた糖尿病や併発疾患の治療法開発に向けた研究については、前年度のメタボローム解析で得られた結果をもとに、栄養環境応答に関与する可能性をもつ候補代謝物の絞り込みを行った。加えて、前年度に得られた、栄養状態変化に伴い観察される脂肪酸受容体遺伝子改変マウスにおけるエネルギー代謝関連表現型について、その分子メカニズムを明らかにするため、細胞レベルでの機能解析を行った。以上の研究を遂行することにより、次年度以降の栄養代謝機能の分子作用機序の同定および、食由来新規機能性代謝物の発見につなげる。

本課題は、4 人の課題推進者 (青木淳賢、木村郁夫、井上飛鳥、土井隆行) が連携し役割分担しながら推進している。

##### ① 糖尿病モデルマウスにおけるリン脂質分子種変動の解析 (青木)

マウスレベルでの解析として、ストレプトゾトシン (STZ) 投与または、高脂肪食摂取による糖尿病モデルマウスを作製し、有意に変動する血中リン脂質の探索を行なった。STZ 投与においては条件設定を行い、STZ 繰り返し投与によって徐々に血糖値が上昇する実際に病態に近いモデルマウスを作製した。このモデルの血漿リポドミクスを行ったところ、血中の主要なリン脂質であるホスファチジルコリン (PC) において、その構成脂肪酸にステアリン酸 (18:0) を含むものが血糖値の上昇に伴って増加傾向にあることがわかった。一方で、高脂肪食モデルの解析からは、当初予想されたパルミチン酸 (16:0) およびステアリン酸含有リン脂質の変化は微細で、それ以上にオレイン酸およびアラキドン酸含有リン脂質レベルが劇的に変動することがわかった。この結果は、おそらく用いた高脂肪食に含まれる脂肪酸の割合に起因しており、事実、今回用いた高脂肪食 (クレア HFD32) では通常食またはその他のメーカーの高脂肪食と比較してオレイン酸の含有量が非常に高いことが判明した。従って、高脂肪食モデルを用いた糖尿病バイオマーカーの探索には用いる高脂肪食の種

類が大きく影響することから、今後の解析において慎重に結果を解釈する必要があることがわかった。

#### ② 健常人を対象とした血糖値と相関するリン脂質分子種の探索(青木)

ヒトにおいて上記の血中リン脂質の変動が認められるのかを明らかにするため、臨床検体(ヒト血液)を用いた検証を行った。当該年度は、健常人およそ 300 名の血液検体の解析を行った。この血液の採取は、これまでに青木 G が開発したリン脂質濃度の人工的な変化を抑制するための手法(J lipid Res. 2021)に基づいて実施することで、正確な血中リン脂質レベルの決定を実現した。まず、事前の生化学的な分析から、全ての被験者は、糖尿病は発症していないものの、正常範囲で血糖値及び HbA1c のレベルは大きくバラついていることを確認した。そこでこれらのパラメータのばらつきと、LC-MS 分析によって決定した各種リン脂質分子種の濃度の相関性を調べた。その結果、血糖値及び HbA1c に対し、飽和脂肪酸またはモノ不飽和脂肪酸含有型のホスファチジルコリンのレベルは正に相関するのに対し、ドコサヘキサエン酸やアラキドン酸のような高度不飽和脂肪酸含有型のホスファチジルコリンは負に相関することが明らかとなった。以上の結果は、血中リン脂質の脂肪酸バランスは何らかのメカニズムによって糖尿病未病状態において血糖値のコントロールに影響していることを示唆している。また、これらのリン脂質分子種は糖尿病発症前段階のバイオマーカーとして利用できる可能性が考えられた。

#### ③ アディポネクチン受容体 (AdipoR1/2) による膜リン脂質の不飽和化機構の解明(青木)

上述のリン脂質における脂肪酸バランスを規定する新たな因子としてアディポネクチン受容体 (AdipoRs) に着目した研究を行った。本研究では AdipoRs が加水分解酵素に特徴的な触媒活性部位と予想される構造を持つことに着目し、特に、AdipoR2 のリン脂質分解活性を検討した。その結果、AdipoR2 がリン脂質の sn-2 位に結合するパルミチン酸を特異的に加水分解する PLA2 型酵素であることが判明した。また、細胞にパルミチン酸を添加すると、パルミチン酸はリン脂質に取り込まれ、糖尿病病態の要因の一つとなりうる小胞体ストレスを引き起こすことも明らかとなった。さらに、AdipoR2 はこのパルミチン酸により誘導される小胞体ストレスを抑制する活性を持つことも判明した。したがって、AdipoR2 はリン脂質の飽和脂肪酸を除去することで、飽和脂肪酸による小胞体ストレスに代表される脂肪毒性を軽減する機能を持つことが想定された。

#### ④ 汎用性の高い cAMP Glosensor アッセイの構築(井上)

Gs 欠損 HEK293 細胞に Glosensor cAMP レポーター、テスト GPCR、キメラ G タンパク質を一過的に発現させ、これを 96 ウェルプレートに再播種し、ルシフェリンを取り込ませた。2 種類ずつの Gs 共役型受容体 (V2R,  $\beta$ 2AR)、Gi 共役型 GPCR (MOR, D2R) および Gq 共役型 GPCR (H1R, AT1R) に対して、G タンパク質コンストラクトとして全長 Gs、キメラ Gs-i3 およびキメラ Gs-q をそれぞれ共発現させた。この細胞にリガンド刺激したところ、発光シグナルの増加が検出された。一方、キメラ G タンパク質を添加しない条件や受容体を発現させない条件においては、リガンド添加後も発光シグナルは変わらず、導入したキメラ G タンパク質や GPCR 依存的な応答であることがわかった。血清存在下でこれらのシグナルが

計測できるかどうか検討するため、10% FBS におけるアッセイを行なった。その結果、血清が存在している条件においても、リガンド依存的な発光カウントの増加が観察され、血清の妨害を受けにくい GPCR アッセイ系であることがわかった。

#### ⑤ Gq 活性化検出法と TGF $\alpha$ 切断アッセイの応用(井上)

構造研究者との共同研究により、ガラニン受容体 2 (GALR2) のクライオ電顕解析を行なった。内因性神経ペプチドであるガラニンおよび改変型三量体 Gq を結合した GALR2 シグナル複合体構造を決定した。本研究を通じて、Gq 活性化を G $\alpha$ q サブユニットと PLC $\beta$  の NanoBiT 相互作用により検出する手法を開発した。この Gq 活性化検出法を用いた変異体実験により、ガラニンを認識する GALR2 のアミノ酸残基を決定した。これらの情報は神経ペプチドがどのように GPCR を活性化するかを理解することに役立つ。

GPCR アッセイとして開発した TGF $\alpha$  切断アッセイを TRP チャネルの活性化検出に応用することを試みた。その結果、各種 TRP チャネル (TRPV1, TRPA1, TRPM8 など) のリガンド依存的な活性化や、インバースアゴニスト活性を測定することが可能であった。また、GPCR と TRP チャネルで TGF $\alpha$  切断を担うプロテアーゼが異なることもわかった。このアッセイ系の拡張生理活性物質の標的探索に役立つ。

#### ⑥ リゾリン脂質 GPCR リガンドの合成(土井)

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進めた。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。前年度合成した作動薬を基に、さらに LPA5 選択的に作用する化合物を得るため、骨格改変体の設計・合成を進め、新規 GPCR リガンドを8個合成した。その結果、LPA5 に対して生体内リガンドより50倍強力に作用し、かつ他の LPA 受容体に対し40倍以上の選択性を有する化合物を見出した。

#### ⑦ 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)

当該年度においては、特に、中鎖脂肪酸受容体 GPR84 に関して、高脂肪食摂取から肝臓において高産生された中鎖脂肪酸が GPR84 に作用することで、マクロファージの過剰な活性化を抑制し、脂肪肝から進展する肝臓の炎症とそれに伴う肝線維化を防ぐことを見出した。さらに、非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) モデルマウスにカプリン酸 MCT オイルを食事への補充、あるいは GPR84 作動剤の投与の結果、NASH への進展を著しく防ぐことを明らかにした (Ohue-Kitano et al. JCI Insight. 2023)。加えて、GPR84 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、高血糖・高脂血症を伴う、低インスリン血症を呈する代謝機能異常を生じる分子メカニズムを明らかにするために、まずは、その責任臓器の特定を行うため、GPR84 $flox$  マウスの作成を行った。

#### ⑧ 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)

メタボローム解析結果をもとにした候補代謝物の絞り込みの過程で見出した菌体外多糖 Exopolysaccharide (EPS) に関して、乳酸菌の1種である *Leuconostoc mesenteroides* が

スクロースを基質として産生する菌体外多糖 EPS を高産生すること、そして、この発酵食品からの EPS の摂取が特定の腸内環境を変え、主要な腸内細菌代謝物である短鎖脂肪酸の産生を亢進することで、肥満を防ぐことを明らかにした (Miyamoto et al. Gut Microbes. 2023)。加えて、若齢および老齢マウスの腸管内容物の高脂肪食負荷前後の比較を行い、若齢と老齢マウスの高脂肪食負荷によって、異なった変動をするリノール酸由来の腸内細菌代謝脂肪酸 3 種類を見出した。このうち、2 種類に関して、さらに GPR40 と GPR120 に対する親和性評価を行ったところ、アンタゴニストとしての作用を有する可能性が示唆された。

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)、土井隆行 (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:

糖尿病の主要な併存病態である心血管代謝疾患について、その発症超早期からの病態間相互作用の基盤を解明することを目的に、免疫系と神経系による慢性炎症ならびにストレス応答機序を解析した。前年度までの解析結果に基づき、心臓での細胞間相互作用の解析と、骨髄に着目して多臓器連携の機序解析を進めた。

また、脂肪組織 B リンパ球のサブセットを網羅的に同定するとともに、それらの脂肪組織の炎症における役割を明らかにする (脂肪組織 B リンパ球のキャラクタリゼーション)。さらに、自律神経が脂肪組織 B リンパ球の機能に及ぼす影響とそのメカニズムを解明し、糖尿病の発症予防と病態改善に資する自律神経を介した脂肪組織 B リンパ球の機能制御法を開発する (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)。令和 4 年度は、令和 3 年度までの研究成果に基づいて、脂肪組織 B リンパ球サブセットを網羅的に同定するとともに、脂肪組織に投射する自律神経を同定する予定であったが、ポルトガルの研究者らによって、脂肪組織から脳に至るまでの神経路が偽狂犬病ウイルスを用いた神経トレーシングにより同定された。今後は、彼らの知見を検証した上で、それに基づいて研究を進めていく。

本課題は、2 人の課題推進者 (眞鍋一郎、鈴木一博) が連携し役割分担しながら推進している。

#### 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)

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を進めた。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いる。昨年度までに同定したマクロファージが分泌するメディエータのうち、CCL3、CCL4 等の解析を進めた。これらは加齢マウスのマクロファージでは発現が低下する。CCL3 についてはノックアウトマウスによって、心臓組織マクロファージの成熟化、心血管の維持や線維化の制御によって心臓の恒常性を維持していることを見いだした。CCL4 についても圧負荷への応答に重要であることを認めている。シングルセル RNA-seq データを用いて心臓の間質細

胞間の相互作用解析を行い、定常状態では心臓線維芽細胞が VEGF-A を産生し血管密度を制御していること、マクロファージと線維芽細胞との相互作用が、線維芽細胞による線維化や血管制御に重要であることを明らかにした。

## ② 造血・免疫系による多臓器ストレス応答制御(眞鍋)

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進めている。心不全や精神ストレスが骨髄でどのように造血幹細胞の変化を誘導するかについての解析を行い、社会的敗北モデルによる精神ストレスによって、ミエロイド系造血が促進することを確認した。重要なことに、社会的敗北モデルでうつ状態になったマウスの骨髄を健常マウスに移植すると、レシピエントマウスが心機能障害を呈することから、精神的ストレスによって誘導される造血幹細胞の変化が心疾患を始めとする慢性疾患の基盤となること、つまりうつに伴う疾患の未病状態を構成する主要な要因であることが示唆された。また、心不全によって刻まれる造血幹細胞のストレスメモリーについて明らかにするために、造血幹細胞、末梢単球、心臓組織マクロファージに一貫して変化するエピジェネティック制御因子を同定し、転写因子の機能解析を始めた。

心不全から骨髄へのシグナル機序として、交感神経が重要であることを見いだした。心不全によって骨髄交感神経機能が抑制されること、これにより活性化 TGF- $\beta$  が抑制、その結果として造血幹細胞が活性化される機序を同定した。

## ③ 脂肪組織 B リンパ球のキャラクタリゼーション(鈴木)

令和 3 年度に実施した脂肪組織 B リンパ球のシングルセル RNA シークエンスにおいて、複数の B リンパ球サブセットと共に、これまで脂肪組織ではその存在すら知られていなかった形質芽細胞が検出された。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おり、脂肪組織の炎症にも関与している可能性がある。そこで、脂肪組織 B リンパ球の中でも特に形質芽細胞に注目して解析を進めることとした。令和 4 年度は、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細胞表面マーカー分子を探索した。その結果、脂肪組織の形質芽細胞は、CD98 と CD319 を共に発現する細胞として同定し得ることがわかった。

形質芽細胞、および形質芽細胞よりも1段階分化の進んだ形質細胞では、B220 や CD19 といった典型的な B リンパ球マーカーの発現が低下する。令和 3 年度に実施したシングルセル RNA シークエンスでは、これらの B リンパ球マーカーを発現する細胞を対象としたため、全ての形質芽細胞および形質細胞を検出できていなかった可能性がある。そこで、脂肪組織の免疫細胞から T リンパ球と骨髄球系細胞を除いた細胞集団について改めてシングルセル RNA シークエンスを実施した。その結果、令和 3 年度に実施したシングルセル RNA シークエンスに比べて 2 倍程度多くの形質芽細胞が検出されたのに加えて、形質細胞も検出された。

令和 4 年度は、脂肪組織 B リンパ球サブセットをシングルセル RNA を用いて網羅的に同定する手法に加えて、脂肪組織の形質芽細胞をフローサイトメトリーを用いて同定する手法を確立できた。当初は、多パラメータのマスサイトメトリーでも脂肪組織 B リンパ球サブ

セットを網羅的に同定することを予定していたが、シングルセル RNA シークエンスによりそれが可能であることが判明し、今後注目すべき脂肪組織の形質芽細胞および形質細胞を同定する手法が確立できたことから、マスサイトメトリーによる脂肪組織 B リンパ球サブセットの解析を実施する必要性は低いと思われる。

#### 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)

令和 4 年度は、脂肪組織に投射する自律神経を神経トレーシングを用いて同定する予定であったが、ポルトガルの Veiga-Fernandes らによって、脂肪組織から脳に至るまでの神経路が偽狂犬病ウイルスを用いた神経トレーシングにより同定された(Cardoso et al., Nature 2021)。そこで、今後は彼らの知見を検証した上で、それに基づいて研究を進めることとする。

このように、他の研究グループの研究成果ではあるが、脂肪組織から脳に至るまでの神経路についての情報が得られた。

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:

糖尿病を背景とした脳血管の変容メカニズムの解明と制御を解析するためのモデルとして、脳虚血時の側副血行路の発達機能に着目し、糖尿病が脳血管に及ぼすメカニズムの解明と制御法の開発を進めた。当該年度においては、*in vivo* 二光子顕微鏡による長期反復イメージングを行い、4 次元画像データの定量解析を実施し、脳血管の狭窄もしくは閉塞時に惹起される側副血行路の発達メカニズムを明らかにするための実験モデルや解析基盤を構築した。さらに、側副血行路発達や糖尿病におけるシグナリングに関連する候補分子として tRNA 修飾の役割について検討した。

本課題は、2 人の課題推進者(新妻邦泰、正本和人)が連携し役割分担しながら推進している。

#### 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・正本)

新妻 G は、血管狭窄/閉塞時のシグナリングに関連する候補分子として *ALKBH1* 遺伝子を神経細胞や血管内皮細胞で抑制し、治療への応用を図るための実験系の確立に取り組んだ。前年度には、生きたマウスの脳内で *ALKBH1* を効率よく抑制することが難しかったが、当該年度には遺伝子抑制手法を確立することが出来た。

この系を用いて神経細胞の *ALKBH1* をノックダウンし、神経細胞と血管の相互作用を観察しながらシグナリングを検証する。この確立した系を用いれば、様々な遺伝子を容易に抑制できるため、今後、*ALKBH1* 以外の遺伝子も抑止して治療効果を検証可能である。

糖尿病下で生じてくるミトコンドリアストレスが側副血行路発達に関与する可能性が高いため様々な刺激下にミトコンドリアストレス関連遺伝子の発現を、RNA シークエンス、mRNA stability 解析、Ribosome プロファイリングならびに tRNA シークエンス解析を用いて検証し、さらに tRNA 修飾を LC-MS/MS を用いて解析した。tRNA 修飾解析の結果、f5c, hm5c の低下と mcm5U の上昇はヒ素刺激後のみに生じていたが、manQ, galQ, Q 等の Queuosine

に関連した修飾は刺激の種類によらず生じることが明らかになり、Queuosine 修飾がミトコンドリアストレスに大きく関連することが示唆された。

そこで、我々は、Queuosine の働きを明らかにするために、その制御に関わる *QTRT* (queuine tRNA-ribosyltransferase catalytic subunit)1 および *QTRT2* の KO および double KO のセルラインを CRISPR を用いて作製した。この細胞を用いて様々な検証を行っている段階であるが、*QTRT1* を KO することにより、活性酸素を消去する働きを持つ Putrescine が上昇し、すべての KO 細胞において serotonin の downregulation が生じることなどが観察された。*QTRT1* KO 後の代謝の変化がストレス応答に重要な役割を果たすことが示唆され、治療ターゲットとして更なる検証を予定している。

正本 G は、当該年度において大規模顕微鏡画像の定量解析のための基盤技術を構築することができた。令和5年度中には、正常脳における脳血管周囲環境の違いによるマイクログリア形態ならびに動態の比較と脳病態時のマイクログリアの炎症反応性に関して 2 件の国際誌への論文投稿を予定している。具体的には、顕微鏡画像より蛍光輝度の不均質性を修正したうえでピクセル輝度のクラスタリングにより、形態情報を細胞体領域ならびに突起部および背景へと自動で分離する手法を構築した。二光子顕微鏡画像では深さや画像平面内における SNR (シグナルノイズ比) の不均質性が定量解析において克服すべき課題となるが、新規に最適化した画像輝度の空間周波数に基づいた補正ならびにバンドパスフィルタの適用により、それぞれの形状を精度よく、さらに低 SNR 条件下での抽出効率の向上を達成した。特に本実験計画で取り組む病態モデルでは、画像の質が劣化し SNR の低下が懸念されるため、開発した前処理の手法はこれらの病態画像に対して有用であると期待される。

次に、連続断層画像より抽出されたマイクログリアの二次元平面画像を 3 次元再構成し、細胞体部分の体積ならびに突起部の立体構造の定量化を行った。突起部の解析については、細胞体重心の 360 度全方位における突起の分布を検出することで、突起部の空間配向性を評価することが可能となった。通常、2 次元画像を扱う解析ソフトは市販化されているが、二光子の光軸方向における点広がり関数を考慮し正確に 3 次元形状を再構成し定量化するソフトウェアはこれまでになく、既存手法に対する本手法の優位性が得られた。3 次元形状解析により、脳血管との空間的な位置関係や細胞および突起部の遊走ならびに伸展方向に関する評価が可能となった。これらの定量指標は、脳血管とマイクログリアが相互に修飾される脳血管病態を評価する際にマイクログリアの異常を検知する感度が向上されたと期待できる。

脳微小血管の 4 次元解析については、正常マウスおよび正常ラットの大脳皮質において、二光子顕微鏡法によって得られた脳微小血管画像を単一ピクセル毎に血管径を計測するための高速アルゴリズムを開発し、論文成果 (IF: 6.9) を得た。本手法では、一辺が 0.5 mm 四方の空間において約 5000~8000 点の毛細血管形状データを自動で取得し、さらに各点において時間方向の血管径の揺らぎに基づいた血管の運動性の評価を可能にした。その結果、安静時の脳毛細血管には 2 つの状態をとることが明らかになり、さらにこれらの状態の違いによって機能的な応答性が異なることを明らかにした。また、この 2 つの状態の違いには血管周囲の細胞構造を含めた解剖学的な特性が関与していると考えられたため、つぎに血管周皮細胞を光刺激によって収縮拡張させるオプトジェネティクスの技術を導入



した。今後は、糖尿病モデルにおける脳血管障害時の血管応答性について同様に調べることで病態解明に向けた基礎研究を実施する。

得られた微小血管内の流れ場を評価するため血球を可視化し、高速撮像により毛細血管内を流れる血球を追跡し流速画像を得た。当該年度では、健常モデルを用いて正常値を評価し、さらに微小血管内における粘性項の影響を評価するため、実験動物に 20 時間の脱水を負荷し、脳微小循環内における流動分布の違いを解析した。その結果、体重減少率 5%程度の軽度の脱水においても脳微小循環における血球分配が不均質になり、流れが停滞する毛細血管が出現することが明らかとなった。これらの脱水による脳微小循環への影響については、糖尿病態によって修飾を受けるか、次年度以降に検討したい。

これら脳微小循環不全による脳機能への影響評価として、実験動物の行動学習を評価するための実験系を構築した。予備的データではあるが、実験時の温度環境（環境温度の低下）が学習機能に影響することを確認した。今後は、環境温度の低下が中枢の温度や脳神経活動にどのように影響するのか脳温と脳神経活動の機能イメージングを行い、明らかにする。

## ② 糖尿病(高血糖)状態が側副血行路発達に及ぼす影響の解明(新妻・正本)

新妻 G は、糖尿病下のシグナリングを検証するために、共同研究者から糖尿病マウスのサンプル供与を受けて研究を進める体制を構築した。実際のデータ収集は 2023 年度から行う。

正本 G は、新規に遺伝性の高脂血症マウスを導入し、脳微小循環に関する基盤データの計測を行った。糖尿病態同様に微小循環への影響として血管内皮細胞の糖鎖に着目し、マウス大脳における微小血管内の糖鎖の厚みを蛍光イメージングによって定量化するための実験系を構築した。次年度以降、糖尿病のモデル動物を導入し、同様の計測システムを用いた評価実験を実施し、脳梗塞時の側副血行路の発達阻害の病態解明ならびに介入操作による治療効果について解析を進める。

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:

肝細胞でのインスリン作用や糖取り込み、さらにその協調で行われるグリコーゲン合成を効率よく進め、食事由来のブドウ糖の末梢血流入を減らすことが糖尿病の予防・治療に重要であり、そのメカニズムの障害が糖尿病発症の第一段階とも考えられる。類洞内皮細胞が形成する篩板孔の porosity がこの糖代謝制御機構に重要な役割を果たすと考え、その決定メカニズムを解明し、健全に維持する手法の開発を進める。当該年度は、肝類洞 porosity の *in vivo*、および、*ex vivo*での porosity を走査型電子顕微鏡を用いて評価する手法を確立した。さらに、その手法を活用して、*ex vivo*において単離肝類洞内皮細胞を用い、アセチルコリンが porosity に与える影響を明らかとした。

本課題は、課題推進者、片桐秀樹が推進している。

### ① 糖尿病の病態の進展に伴う肝類洞内皮細胞や免疫細胞の変容解析

食事由来の栄養素やインスリンなどの膵臓からのホルモンは、直接門脈血中に放出され、肝類洞に流れ込む。類洞内皮細胞が形成する篩板孔を通して Disse 腔に入って初めて肝細胞と接触し、肝細胞へのインスリン作用やブドウ糖の取り込みが開始し、その多くがグリコーゲンとして肝細胞内に蓄積する。この食事やホルモンが肝臓を最初に通過するステップで、インスリンが肝で作用し、大量のブドウ糖が末梢血に流れ出る前に肝臓で処理（グリコーゲンへと合成）される。類洞内の血流が Disse 腔へ移動する割合は、篩板孔の大きさや数による porosity が決定しているものと考えられるため、食後血糖値には、この porosity が大きく関与しているという独自の仮説を立て、本課題を推進している。

当該年度は、前年度に確立された単離類洞内皮細胞と単離クッパー細胞の個別および混合培養法を活用して *ex vivo* で、さらに *in vivo* から得られたサンプルを用いて、porosity 評価法を確立した。具体的には、走査型電子顕微鏡を活用し、肝類洞の描出を行い、自動解析ソフトを活用して、porosity の評価法を確立した。

## ② 肝類洞内皮細胞や免疫細胞の変容と神経シグナルとの関連の解析

肝類洞内皮 porosity における迷走神経をはじめとする自律神経シグナルが与える影響について、①で確立した *ex vivo* での porosity 評価法を用い、まず、類洞内皮細胞にアセチルコリンを加えて培養したところ、類洞内皮細胞の porosity が有意に増加する結果が得られた。一方で、類洞内皮細胞と類洞クッパー細胞とを共培養した状態でアセチルコリンを加えたところ、類洞内皮細胞の porosity が有意に減少した。つまり、神経シグナルは、類洞内皮細胞に直接的にも、あるいは、クッパー細胞を介して間接的にも、porosity に影響を与えるという、非常に興味深い知見が得られた。

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：

本課題は、ケトン体の安全かつ有効なヒト糖尿病併発症・合併症の予防・治療法の開発を目指し、各臓器での「病態モデル」における全身並びに臓器局所のケトン体代謝の意義を解明することを目的とする。当該年度は、糖尿病併存症・合併症として、特に、糖尿病性腎臓病と動脈硬化の発症病態における腎臓局所、動脈局所のケトン体代謝の意義の検討を進めた。また全身におけるケトン体産生の欠如、あるいは、過剰な状態が、哺乳類の寿命に及ぼす影響を結論付けた。一連の研究に関して、糖尿病・循環器・中枢神経などを専門とする研究開発項目1課題1・2・4、項目2課題1などの課題推進者との連携により、ケトン体による臓器保護効果における臓器間ネットワークの関与の可能性を探った。

本課題は、課題推進者、久米真司が推進している。

### 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

検討1) 腎近位尿細管細胞特異的 *Hmgcs2* 欠損マウス、腎近位尿細管細胞特異的 *Scot* 欠損マウスを作製し、ストレプトゾトシン誘発 1 型糖尿病モデルとしたが、腎病変の悪化は確認されず、少なくとも 1 型モデルにおいては内因性の腎臓内ケトン体産

生には腎保護的役割は見出せなかった。

検討2) 腎近位尿細管細胞特異的 *Scot* 欠損マウスは絶飲食時状況でも大きな腎臓表現系を示さなかったが、腎近位尿細管細胞特異的 *Hmgcs2* 欠損マウスは絶飲食時の尿量減少が見られず多尿となった。現時点で、この表現系のネフロン責任部位は主にヘンレループ上行脚であること、この機構がサルコペニアの病態形成に寄与する可能性を見出している。

検討3) ケトン体が欠如する全身 *Hmgcs2* 欠損マウス、ケトン体が過剰となる 1,3-ブタンジオール(1,3BD,  $\beta$ -OHB の前駆物質)投与を用い、血中ケトン体濃度の増減がマウス寿命に及ぼす影響を検討し、両者ともに短命となったことから、ケトン体の欠如、過剰いずれもが哺乳類の寿命に悪影響を及ぼすことが明らかとなった。一方で、高齢マウスや動脈硬化モデルである ApoE 欠損マウスなどの病態モデルマウス対しては 1,3BD 投与により、その寿命が延長することが明らかとなった。内因性ケトン体産生が生命維持に不可欠であること、外的なケトン体補充は病態に応じた効果を示すことが明らかとなった。

検討4) *Scot* 発現は比較的多くの組織に確認されるが、中でも膵  $\beta$  細胞に強いことを確認している。ケトン体利用の低下がインスリン分泌に及ぼす影響を明らかにするため、膵  $\beta$  細胞特異的 *Scot* 欠損マウスを作製した。通常飼育環境下では 30 週齢まで顕著な耐糖能異常は見られていない。今後高脂肪食負荷などのモデルでの検討を開始する。

検討5) 動脈硬化モデル(ApoE 欠損マウス)において、インスリン過剰投与による低血糖を週1回、22 週間連続で惹起したところ、生存率の悪化と動脈硬化の悪化が見られ、その悪化は 1,3BD 投与により抑制されることを明らかとしている。この 1,3BD の効果における血管構成細胞によるケトン体利用の重要性を検討するため、血管内皮特異的 *Scot/ApoE*-DKO、血管平滑筋特異的 *Scot/ApoE*-DKO マウスを作製した。今後これらのマウスに低血糖+1,3BD を行い、1,3BD 投与による血管保護における *Scot* の重要性を解明する。また同マウスを糖尿病状態とし、動脈硬化進展における血管構成細胞によるケトン体利用の役割を検討する。

## ② 動物実験・ヒト臨床コホートを用いた、ケトン体代謝に着目した疾患予測指標の探索・同定・有用性の評価

研究①のモデルの中から健康寿命に関わるケトン体指標の探索に最適なモデルを検討する予定であったが、モデル動物の作製に時間を要したため、本年度にケトン体代謝に着目した疾患予測指標、治療適応指標の探索は着手できなかった。

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:

疾患による各臓器の全細胞を対象とした変容を定量的・空間的に理解することを可能にするマウス臓器の全細胞アトラスの作製を進めた。また、次年度以降の糖尿病疾患モデルマウスの解析のため、多臓器の全細胞解析パイプラインの作成を行った。解析のコントロールとして、薬剤などで臓器損傷を引き起こしたマウス臓器を用い、その解析感度などの定量化を行った。また、当初の想定以上に細胞密度の高かった脾臓、胸腺についてはさらに高解像度化を進めた顕微鏡を作製し、アトラス作製の画像取得を進めた。さらに、高脂肪食を与えたマウスの睡眠データを計測することで、糖尿病につながる睡眠特徴を探索した。

本課題は、2人の課題推進者(松本桂彦、山田陸裕)が連携し役割分担しながら推進している。

### ① マウス臓器の全細胞アトラスの作製(松本)

マウスの各臓器のアトラスを作成するために、膵臓・腎臓・心臓・肝臓・肺・甲状腺・膀胱・唾液腺・精巣・精巣上体の合計10臓器の全細胞解析を行い、すべての細胞の三次元的な座標情報を取得した。細胞が同定できる倍率で撮影した顕微鏡画像は視野に臓器全体が入らないため、臓器全体の画像を得るためにタイリングを行う。一細胞解像度のアトラスを作成し、臓器の全細胞の場所を正確に同定するために、一細胞の精度でステッチングを行う必要がある。マウス臓器内で最大の臓器である肝臓のデータは10Tbと巨大であり、既存のステッチングプログラムでは困難であったため、ステッチングのプログラムを自作した。さらに、高倍率で撮影した核染色画像の核の検出を行う全細胞解析を行った。核のセグメンテーションにはHDoG(Hessian-based difference of Gaussian)フィルタを用いた。HDoGフィルタとは、核の大きさよりも少し小さいガウシアンフィルタと少し大きいガウシアンフィルタの差分をとるフィルタであり、核の辺縁を強調することができる。さらにそれぞれのセグメンテーションされた箇所に対して、ヘシアン行列を計算することで、シグナルの急峻度の指標であるstructurenessを計算した。シグナルの強度とstructurenessを同時に比較することでノイズを除去し、核の検出を行った。これらの解析にはGPUを用いることで、約2Tb/hの解析スピードを実現した。前述の画像ベースのステッチングにより計算されたパラメータを用いて、臓器全体において検出された細胞の核の座標の計算を行い、臓器全体における全細胞の三次元的な座標を取得した。

糖尿病で臓器障害をきたすことが知られている腎臓に関して、細胞がどの領域に属しているかのアノテーションを行った。腎臓においては、腎臓の外側より皮質、尿細管系、腎盂に領域が分かれている。三次元の腎臓の画像において領域ごとにセグメンテーションしたデータは報告されていなかったため、腎臓の細胞密度画像を用いてセグメンテーションを行った。ボクセルサイズが $50\mu\text{m}$ の画像を使用し、画像ベースの機械学習のソフトウェアであるilastikを利用することで、三次元画像に対してセグメンテーションを行い、腎臓のすべての細胞をいずれかの領域に分類し、腎臓の全細胞アトラスを作成した。腎臓の全細胞アトラスの応用として、腎臓の臓器障害モデルでの検討をおこなった。抗がん剤であるシスプラチンは腎障害を起こすことが知られており、シスプラチン投与による腎障害モデルマウスを作製できることが知られている。シスプラチン腹腔内投与群のマウスと、コントロールと

して生理食塩水腹腔内投与群のマウスを準備し、投与から72時間後に還流固定の後、腎臓を摘出し、組織透明化および撮影・解析を行った。臓器全体の細胞数はシスプラチン投与群においてコントロール群と比較して減少していた。また、領域ごとの解析においては、尿細管系と腎盂においては細胞数に有意な変化はないが、皮質で有意に細胞数が減少していることを見出した。腎臓全細胞アトラスを用いることで、腎臓の細胞障害という病理学的現象を、腎臓全体において解析できることを示した。

## ② 睡眠表現型に現れるリズム変容の計測(山田陸裕)

マウスに高脂肪飼料を与えることで睡眠表現型に現れるリズム変容の計測を行った。睡眠は1~2週間程度の連続飼育を行いながら計測される。この期間中は飼育環境をできるだけ一定に保ち、飼育者の介入も最小限にとどめることが望ましい。このため、通常飼料とほぼ同様の取り扱いが可能な脂肪由来カロリー45%の高脂肪食を用いて計測を実施した。行った計測では、高脂肪飼料を約4もしくは5週間与えた後、対照飼料に切り替えて睡眠表現型を計測した。

また、Streptozotocin(STZ)を用いた糖尿病モデルマウスにおける睡眠表現型の計測を併せて行った。昨年度までの検討で、STZを200 mg/kg および250 mg/kg で腹腔内投与したマウスにおいて糖尿病の発症を血糖値計測によって確認していた。しかしその後の検討では200mg/kg では睡眠表現型の変化は弱く、WT マウスの睡眠表現型に有意な変化が認められたのは300 mg/kg まで濃度を上昇させた場合であった。しかしながらSTZの濃度を上昇させた場合、マウスの健康状態にあたる影響が大きくなる。AAVを用いてCaMK2 遺伝子の機能阻害を行った上でSTZ投与し睡眠表現型を計測するためには、安定した睡眠表現型が得られるSTZ濃度をより詳細に検討する必要がある、これに取り組んだ。

この結果、180 mg/kg であればSTZ投与後1~2週間程度の期間にわたって睡眠表現型を計測できることが分かった。しかしながら180 mg/kg でも2週目には健康状態に顕著な異常が見られ、個体ごとの睡眠表現型に大きなばらつきが認められた。STZ濃度を140 mg/kg まで低下させた場合には2週目の個体間のばらつきは対照群と同程度であったが、睡眠表現型の変化も対照群と比較して限定的であった。

昨年度までSTZ 200mg/kg 程度の濃度で得られる睡眠表現型の変化は弱いと考えられていたが、今回の検討では180 mg/kg 投与でも投与後1週間は対照群と比較して顕著な睡眠時間の変化が見られることが分かり、またこれより低い濃度では睡眠表現型を確認することが難しいことが判明した。これにより、睡眠表現型の計測に望ましいSTZを用いた糖尿病モデルマウス誘導条件を得ることができた。

課題推進者: 松本桂彦(理化学研究所)、山田陸裕(理化学研究所)

## (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:

非侵襲的な接触デバイス、カメラや振動波測定による非接触デバイスを用い、糖尿病お

よび糖尿病併発疾患(特に心不全)の発症予測に向け、①ヒト病態を用いて非侵襲デバイスで取得すべきデータの抽出を行った。また、②非侵襲生体情報デバイスによる糖尿病及び併発疾患のヒト病態での評価の実施に向け、ヒト病態からデータ取得する臨床試験の倫理申請を行った。

本課題は、課題推進者、藤生克仁が推進している。

#### 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

心不全の検出については、在宅の心電図からの心不全を「早期に」検出するアルゴリズムを検討してきた。今年度さらに「超早期」発見へのアルゴリズムを構築した。これまで開発した心電図上の心不全の特徴を数値化した HF-index をヒト心不全の後ろ向きデータ、前向きデータを用いて、時系列で解析したところ、心不全の発症の数週間前、および心不全の回復過程において、HF-index に揺らぎが生じることを見出した。HF-index を周波数解析するアルゴリズムを開発し、この揺らぎを自動検出するアルゴリズムを開発した。このアルゴリズムによって、心不全発症の数週間前にアラートを出すことが可能ではないかと思っている。

続いて、糖尿病を超早期に検出するアルゴリズムの検討においては、非接触・非能動的に検出を行うことを目標として、スペクトルカメラや赤外分光計を組み合わせた実験系を組み、これまで動物モデルを用いた検討や、HbA1c やブドウ糖自体を用いた基礎的な実験を行ってきた。その結果、高血圧と糖尿病を同時に検出する必要があると考えた。

まず、以前から検討を行っていた高血圧を早期に検出するアルゴリズムを駆動させ、その後、HbA1c の上昇傾向を検出するアルゴリズムを構築している。すでに動物および人の顔あるいは手のひらの皮膚から、情報を取得し、ノイズ除去を行い、必要な情報を取得するシステムの構築に成功した。

#### ② 非侵襲生体情報デバイスによる糖尿病及び併発疾患のヒト病態での評価の実施

本年度は、心不全の「早期」検出については、治験の実行を行っている。「超早期」検出アルゴリズムの構築についても、倫理申請を完了し、前向きデータ取得を行っている。また、本研究結果は、日本生理学会のシンポジウムで発表し、前向き臨床試験の結果は論文のリバイズ中である。

また、収縮期血圧130mmHg 以上の早期高血圧を検出するアルゴリズムの前向き臨床試験についても、現在開始しており良好な結果を得たため、本年度の日本循環器学会学術集会のシンポジウムで発表し、現在論文作成中である。

さらに、糖尿病の早期検出アルゴリズムについては、現在東大病院の病棟および検診センターにおいて、ハイパースペクトルカメラおよび高速スペクトルカメラによって、前向きにデータ取得中である。これまでのところ 91 名の被検者からデータ取得が完了した。合計 300 名の取得を来年度目指している。

以上から、現在すべての検討項目(4種類のアルゴリズム)において、前向きの臨床試験を開始している。

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:

糖尿病関連形質の関連遺伝子セットについて、発現組織・臓器の遺伝子ネットワーク、タンパク質相互作用ネットワークや代謝ネットワーク、さらに、ジェノミクスイングランドや小児未診断疾患プロジェクト(IRUD-P)で取得されているメンデル性疾患遺伝子の情報を統合できるよう、大規模データの解析を進め、AI 解析に向けた研究環境の整備を行った。特に、メンデル性疾患と多因子疾患の併発ネットワーク解析を推進した。

本課題は、課題推進者、田宮元が推進している。

### ① 糖尿病関連形質の関連遺伝子セットの抽出

東北メディカル・メガバンク機構や UK バイオバンク、その他の既存ゲノムコホートの大規模データを取得し、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行った。また、同時に、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探索を行った。

### ② 関連遺伝子セットに関する発現組織・臓器の遺伝子ネットワーク構築

上記によって取得された関連遺伝子について、既存の大規模発現ネットワークからの情報の統合を行った。これらの統合された情報から、糖尿病オムジーンモデルの精度向上を図り、併発ネットワーク解析から得られた神経系の寄与について、整理を行った。

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:

糖尿病の超早期段階を予測するには、糖負荷試験データとその後の長期にわたる追跡データを保有する住民コホートが必要である。さらに、個体レベルでの糖酸化や肝での糖処理を推定できる新たな簡便検査法の開発も重要と考える。そこで、当該年度においては、20 年の検査データの蓄積がある大迫コホートから、前年度に抽出された糖負荷試験のデータを用い、種々の代謝と関連しないパラメータとの関連の総合的解析を進め、糖負荷試験 1 時間血糖値と生命予後とが強く関連することを明らかとした。さらに、ヒトでの糖酸化と臓器別糖処理の推定に向け、 $^{13}\text{CO}_2$  呼気試験についてのデータ収集を開始した。

本課題は、2 人の課題推進者(片桐秀樹、澤田正二郎)が連携し役割分担しながら推進している。

### ① 大迫コホートデータ解析による糖負荷試験と予後との関連検討

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経時的に追跡できる。この糖負荷試験結果とそれぞれの住民のその後の予後についての関連解析を進める。特に、糖負荷試験において正常型と判定された住民の糖負荷試験の各パラメータ(空腹時・1 時間・2 時間の血糖値)のデータの蓄積があり、その後の寿命をはじ



めとする大迫コホートに蓄積されたデータとの関連を検討することが可能であると考えられる。そこで、当該年度においては、20年の検査データの蓄積がある大迫コホートから、前年度に抽出された糖負荷試験のデータを用い、種々の代謝と関連しないパラメータ、特に、寿命との関連について、総合的解析を進めた。その結果、大迫コホートで収集されているデータの中で、最も余命と相関したのは、糖負荷試験 1 時間血糖値であるという極めてインパクトのある結果が得られた。

## ② 大迫コホートデータ解析による将来の糖尿病発症者の予測

上記①では、代謝と一見関連しないと考えられるパラメータ解析を進めるが、②においては、代謝疾患との関連、特に、糖尿病発症へのタイムコースを検討する。つまり、糖尿病型でないと判定された住民のうち、どのようなポピュレーションがどのようなタイムコースで実際に糖尿病を発症するかを検討し、糖尿病の克服に向け、重点的にターゲットとすべき集団について、その特徴を明らかにする。当該年度は、大迫コホートにおいて、糖負荷試験や HbA1c などの糖尿病に関連するデータの時系列での抽出を進め、糖尿病に進展した正常耐糖能者をリスト化することができた。

## ③ $^{13}\text{CO}_2$ 呼気試験を用いた糖酸化・肝糖処理能の簡便検査の開発

これまで、非侵襲的・簡便に個体レベルでの糖酸化や肝糖処理能をヒトで検討する検査法は開発されていない。そこで、本課題では、課題推進者の片桐と澤田が連携し、 $^{13}\text{C}$  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評価した。特に、糖負荷後の血糖上昇は、負荷後早期は肝での糖処理(肝細胞でのグリコーゲン変換)が大きな決定因子として想定される。この肝でのグリコーゲン合成は、 $\text{CO}_2$  排出をとまなわないため、本検査により、その多寡を推定できるものと考えた。そこで、当該年度においては、75g 糖負荷試験の際の呼気中に排出される $^{13}\text{CO}_2$ を経時的に測定し、そのデータ収集を進めた。

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:

臓器間ネットワークのうち、循環系、糖代謝系、膵臓と血糖値の数理モデルの構築を進めた。循環系、糖代謝系の9コンパートメントのグルコース・インスリンダイナミクス数理モデルを構築し、健常者経口糖負荷試験データに対するパラメータ推定法を確立した。この手法を用いて通常食マウス、高脂肪食マウスに対する経口糖負荷試験結果のパラメータ推定を行い、実験データのパラメータ推定の手順を構築した。他の研究開発項目において展開される動物実験やヒト生体情報に基づくデータを用いて数理モデル中に含まれるパラメータを適切に推定するためのデータ同化の手順を構築すると共に、臓器間ネットワーク制御機構解明に向けた医学・生物学の研究者との連携を継続・強化した。

本課題は、3人の課題推進者(水藤寛、長山雅晴、千葉逸人)が連携し役割分担しながら

ら推進している。

#### ① 循環系ネットワークモデルの要素となる1次元及び0次元モデルの検討(水藤)

全身の循環系ネットワークモデルを構築するためには、各区間における物理現象の次元を適切に縮約して1次元モデルとすること、及びそれをさらに縮約して0次元モデルとすることが必要となる。R3年度の分岐部における接続条件に関する成果に基づいて、本年度は全身の循環系1次元+0次元モデルを実装した。また、その一部を取り出した門脈系についての詳しいシミュレーションを実施し、モデル中のパラメータの影響を調査した。今後は、このモデルの出力データを代謝系のモデリングを進めている長山グループに提供することを通して、循環系の挙動、特に循環量の収支を正しく表現するための数理モデルを構築していく。

#### ② 循環系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(水藤)

医学・生物系研究者から提供される測定データと循環系臓器ネットワークモデルの結果を整合させるためには、データ同化の手法が必要となる。本年度は、①で構築した循環系モデルを用いて循環系全体での流量と血圧の整合性を最適化問題として定式化し、反復計算に並列アルゴリズムを適用することによって効率的に解く手法を構築することができた。今後は、その中にさらに測定データとの整合を組み込み、数理と医学・生物系研究者との連携を進めていく。

#### ③ 血糖値—インスリンモデルの検討(水藤)

グルコースの取り込みとインスリンの分泌を表現する数理モデルを用い、測定データと整合させた上で、血糖値変動の予測につなげる手順を構築した。特に比較的細かい時間間隔でデータが得られているSAP (Sensor Augmented Pump) 療法への適用を意識し、測定データに対する適切な統計的処理についての検討を通して生体パラメータ推定におけるその影響の調査を進め、症例ごとに異なる生体パラメータを適切に推定する手法の構築を進めた。

#### ④ 臓器間ネットワーク数理モデルの構築と解析の実施(長山)

長山 G では、昨年度構築したグルコース・インスリン・C-ペプチド動態を記述する9コンパートメントモデルとその簡略版である8コンパートメントモデルを基盤にして、未病を定義するためにより詳細な数理モデルの構築を行った。今年度は、筋肉組織でのインスリン取り込みや筋肉組織のグルコース取り組みメカニズムをより詳細に記述した数理モデルを構築し、また経口糖負荷試験データに対応するために、糖の腸内吸収モデルの構築も行った。この数理モデル評価のために、昨年同様に健常者経口糖負荷試験データ結果を用いてパラメータ推定を行い、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、昨年度に得られた結果以上に、医学的知見に近い結果を得た。このモデルを用いて、通常食マウスと高脂肪食マウスに対する経口糖負荷試験データを用いたパラメータ推定を行った。この結果、24週齢高脂肪食マウス(高脂肪食を4ヶ月食べ続けたマウス)では筋肉組織でのグルコース取り込みパラメータおよびランゲルハンス島β細胞におけるインスリン生成パラメータに異常値が見られることがわか

った。この結果は、現在の数理モデルにおいて糖尿病特異的パラメータの発見が十分期待できると考えられる。この結果について、医学・生命科学の研究者と議論を行っており、情報交換を進めている。未病を定義するための臓器間ネットワーク数理モデルの構築に向けて順調に進んでいると考えられる。

また、医学・生命科学者との今後の議論を円滑に進めるために、9コンパートメントモデルを用いた経口糖負荷試験シミュレーターを開発した。このシミュレーターに GUI を実装しており、実験研究者でも手軽にパラメータ操作できるようになっている。このシミュレーターから各臓器でのインスリンやグルコース取り込みパラメータを動かすことで、容易に経口糖負荷試験の結果を予測できる。さらに、予想と異なる場合での数理モデルの改良にも非常に有効なツールとなっている。今後も GUI を改良してよりよいシミュレーターに発展させる予定である。

#### ⑤ 膵臓、肝臓と血糖値のネットワークの数理モデルの数学的な解析(千葉)

本年度においては膵臓、肝臓と血糖値、インスリン濃度に関する数理モデルを構築し、そのモデルを数学とコンピュータを用いた計算の両面から解析した。その結果、血糖値が時間に周期的に変動することが解明された。

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)

### (5) 研究開発項目5:糖尿病や併発疾患の未病段階の理解とデータ基盤の構築

#### 研究開発課題1:糖尿病未病・超早期状態におけるデータセットの構築と解析

当該年度実施内容:

2型糖尿病に関して、マウスへの高脂肪食負荷時の経時的な代謝関連データを採取し、未病から疾病への移行を観察すべくデータを蓄積する。さらに、高脂肪後普通食へと戻したマウスについても同様の検討を行い、回復可能不可能を決める臨界点を探索する。そのうえで、種々のタイミングで各臓器や血液・糞便などの回収を開始し、遺伝子発現やメタボローム、糞便の菌叢のデータを効率よく解析できるよう検討を開始する。ヒトコホートデータにアプローチができるよう、倫理申請などの手続きを進める。ロジスティクスとしては、飼育条件・環境によるばらつきを避けるため、東北大学で一括してマウスの飼育を行い、高脂肪食負荷による代謝変化の検討を詳細に行う。その結果を見ながら、適切なタイミングで臓器等を採取し、肝・膵については片桐秀樹が、脂肪・副腎については、山田哲也が発現解析等を進める。心臓・骨髄については、眞鍋一郎が本項目課題2として進める。糞便については木村郁夫が菌叢解析を行う。肝や脳については、画像解析に向けての臓器の蓄積を進める。メタボローム解析や臓器質量イメージング解析は青木淳賢が行う。これらの検討に向け、当該年度では、マウスの高脂肪食負荷飼育と代謝パラメータの採取を開始し、上記の解析に向けての機器の整備を進めた。さらに、合原プロジェクトから中岡慎治准教授が参画し、両プロジェクトの連携が開始した。

本課題は、4人の課題推進者(片桐秀樹、山田哲也、青木淳賢、木村郁夫)が連携し役割分担しながら推進している。

#### ① 高脂肪食負荷による糖尿病発症モデルマウスの作製と時系列の代謝解析(片桐)

本研究課題では、飼育条件・環境によるばらつきを避けるため、東北大学で一括したマウスの飼育を開始した。マウスに高脂肪食を負荷した際、どのタイミングで高血糖となるかについて、経時的にデータを収集した。具体的には、経時的に摂食量や体重などの基礎データ、糖負荷試験による血糖値・インスリン値・C-ペプチド値などの詳細な代謝関連データの収集を開始した。さらに、雌雄、老若での比較検討にも着手した。

## ② 高脂肪食負荷後普通食に戻した際の時系列の代謝解析(片桐)

point of no return(臨界点)のタイミングを見出すことで、未病の定義につなげることを目的とし、マウスに高脂肪食を負荷し血糖上昇をきたしたのち普通食に戻した際、高血糖状態から正常糖代謝に戻るか、どの程度高脂肪食を負荷すると回復不可能となるか、の検討を開始した。この系の確立に向け、壮齢マウスにも合わせて高脂肪食を負荷して解析した。具体的には、種々の高脂肪食負荷期間ののち、普通食に戻した点から、経時的に摂食量や体重などの基礎データ、糖負荷試験による血糖値・インスリン値・C-ペプチド値などの詳細な代謝関連データを含む血液生化学データ等の収集を開始した。当該年度は、回復可能期の不能期の特定に向け、これらのマウスの作製、基礎データの収集に着手した。

## ③ 高脂肪食負荷による糖尿病の発症過程での肝・膵島・筋における遺伝子発現データ解析(片桐)

①で確立したマウスモデルを用い、糖尿病の発症過程(正常→未病→糖尿病状態)での肝・膵島・筋の遺伝子発現解析を開始する。具体的には、それぞれの段階のマウスから肝・膵島・筋を回収し、バルク RNA-seq、ATAC-seq、一細胞 RNA-seq などによって網羅的な遺伝子発現解析に着手した。

## ④ 正常・未病・糖尿病状態における肝の電子顕微鏡解析(片桐)

①、②で確立したマウスモデルを用い、正常・未病・糖尿病状態において、肝を回収する。これらの肝を用いて、走査型電子顕微鏡解析を行い、経時的に、門脈域・肝静脈域の zonation を考慮した肝内の画像解析を進め、画像データを蓄積するとともに、糖代謝変動との関連を検討する。当該年度は、①のマウスを用いて、走査型電子顕微鏡を用い、肝内の画像データ、および、ソフトウェアによる定量化の技術を構築した。そのうえで、各段階の肝臓を用いたデータ蓄積に着手する。

## ⑤ 正常・未病・糖尿病状態における脳における神経活性化部位の画像解析(片桐)

①、②で確立したマウスモデルを用い、正常・未病・糖尿病状態において、脳を回収し、組織透明化を行い、Fos 染色などにより、各病期で活性化している脳内部位に関する画像データを蓄積する。個体間の違いを補正するアルゴリズムを用いて、正確な経時的な比較を進めるとともに、肝への MEK アデノウイルス投与マウスなどの糖代謝に変化があるモデルマウスでの検討も並行して行い、中枢神経活性化部位の比較を進める。当該年度は、①のマウスを用いて、脳の透明化を行い、その画像データを取得するとともに、個体間の比較検討法を確立した。

⑥ 大迫コホートにおけるヒト血漿メタボローム解析(片桐)

大迫コホートでは、経時的なヒト血漿サンプルが保管されている。糖負荷試験などの結果をもとに、正常・耐糖能異常・糖尿病の各段階を経る住民の選別を行う。当該年度は、倫理申請手続きを進め、目的に合致する住民サンプルの抽出・確保を開始した。

⑦ 高脂肪食負荷マウスにおける白色脂肪組織、褐色脂肪組織、副腎などの遺伝子発現データ解析(臓器レベル、1細胞レベル)のワークフローの確立(山田)

本研究課題では、解析として、バルク RNA-seq、ATAC-seq、1細胞レベルの RNA-seq 実施を予定しているが、この中で、高脂肪食負荷により肥大した脂肪細胞を対象とする1細胞レベルの RNA-seq は、通常のシングルセル RNA-seq では技術的に実施が困難であることが知られていた。そこで、肥大した脂肪細胞を対象としてシングル核 RNA-seq を行うべく、高効率に核を抽出し、高品質の RNA を採取する手法を確立することを試みた。まず、FACS ソーティング及び密度勾配遠心分離法による核抽出法を検討したが、シングル核 RNA-seq に供するには不十分であることが判明した。そこで、gentle MACS Dissociator を用いて核抽出法の改良を行ったところ、白色脂肪組織から脂肪細胞、間質細胞を含む構成細胞がシングルセル RNA-seq 解析で検出可能となり、1細胞レベルで網羅的な mRNA 発現解析を実施することができた。

通常食を与えて飼育したマウスと高脂肪食を12週負荷したマウスの白色脂肪組織に対して、上述の方法を用いてシングル核 RNA-seq 解析を実施し、各細胞の遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析した。その結果、白色脂肪組織において33の細胞集団が同定され、構成する細胞として、白色脂肪細胞、組織間質細胞に存在する脂肪前駆細胞と各免疫細胞(B細胞、T細胞、マクロファージなど)が検出された。また、同定された各細胞集団が高脂肪食負荷により変化することが明らかとなった。

⑧ リピドミクス、メタボロミクス解析(青木)

実際のモデルマウス由来の検体が送付される前段階の準備として、これまで青木 G が取得してきた臨床検体(血液)のリピドミクスデータのデータベース化を進めた。さらに本検体の中で生化学的なパラメータが明らかなものに関しては、それらの値と、リピドミクスデータ間の相関性を検証した。その結果、詳細は課題番号 JPMJMS2023-15 の実施状況報告書に記載したとおり、血糖値や HbA1c といった糖尿病と密接に関連するパラメータと特定のリン脂質レベルの(逆)相関性が認められることを明らかとした。次年度以降にデータ取得するモデルマウスにおいて、同様の現象が認められるかを確認するとともに、さらにヒト検体のサンプルサイズを拡大し、詳細な解析を行なっていく予定である。

⑨ 質量分析イメージング解析およびそのデータ解析の基盤構築(青木)

モデルマウスの解析の準備として、野生型マウスを用いてターゲット組織である肝臓、腎臓、脳の質量分析イメージングデータの取得を行なった。現在、これらのデータベース化の作業が進行中である。また、リン脂質だけではなく、解糖系中間代謝物の可視化を目指し、グルコースやその代謝物を MALDI-MS で検出するための手法の検討を行なった。

また、今後、領域内の研究者が質量分析イメージングの生データを用い、任意の質量

値を元に自由に画像化を行う手段の整備を進めた。まず、フリーのオープンソースインターフェイス(MSiReader)を用いた解析の検討を行い、青木 G がこれまでに取得した生データを元にして画像化が可能であることを確認した。これによって、本ソフトウェアを研究者の PC にダウンロードし、ムーンショットデータベースにアップロードした青木 G の任意の質量分析イメージングデータを用いることで、簡単な解析は実行可能になった。また、複数種類の分子のイメージングや、画像を元にした統計解析など、より高度な分析を行うケースに対しては、Imagereveal(島津製作所)ソフトウェアを導入した解析用 PC を新たに青木 G の研究室内にセットアップした。さらに、本 PC を外部からリモートアクセス可能な環境に整備したことで、領域内研究者が本 PC を用いて間接的に Imagereveal を使用することが可能となった。今後、希望する研究者には、本ソフトウェアの使用方法を青木 G がオンラインで説明し、自由に使用してもらうことを想定している。

#### ⑩ 糖尿病未病・超早期状態から疾病への移行に伴い変動する腸内細菌叢解析の実施(木村)

当該年度においては、データ取得用のマウスモデルの最適化について、課題内チーム間での Zoom 会議やメール会議を行い、情報共有を進めた。また、糞便サンプルの採取時期や条件について、課題内チーム間で検討・情報共有・最適化を行ったうえで、予備検討として、当研究室内飼育マウスを用い、得られた糞便サンプルから腸内細菌叢ゲノムの抽出を行った。さらに、抽出したゲノムを用い、次世代シーケンサーに供することによって、腸内細菌叢ゲノムデータの取得を行い、実験条件・手技に問題のないことの確認を行った。同時に、得られた腸内細菌叢ゲノムデータを用いた次年度の腸内細菌叢解析に向けて、北海道大学の中岡慎治准教授と Zoom 会議を開催し、体制の構築および事前検討についての議論を行った。

課題推進者:片桐秀樹(東北大学)、山田哲也(東京医科歯科大学)、青木淳賢(東京大学)、木村郁夫(京都大学)

#### 研究開発課題2:糖尿病併発疾患の未病臓器間ネットワークデータセット構築と解析

当該年度実施内容:

糖尿病併発疾患に関し、高脂肪食による肥満、横行大動脈縮窄モデル、精神ストレスモデルなどにおいて未病期から疾病段階の遷移を表すモデルを作成・最適化する。特に骨髄細胞に由来するメカニズムを中心に、骨髄や心臓などの細胞浸潤臓器を取得し、発現やエピゲノム解析を少数のタイムポイントから開始する。ロジスティクスとしては、高脂肪食負荷マウスについては、課題1で東北大学で作成されたマウスを活用する。横行大動脈縮窄モデルは藤生克仁、精神ストレスモデルについては眞鍋一郎が作製し、各種表現型を取得する。その結果を見ながら、適切なタイミング・条件で臓器等を採取し、東京大学・千葉大学でライブラリーの作成を進め、シーケンシングについては外注ならびに千葉大学で行う。ムーンショット目標2内の数理研究者と連携した解析に向けデータを共有し、ビッグデータの解析や数理モデル作成に向け、合原プロジェクト等と協議を開始する。

本課題は、2人の課題推進者(眞鍋一郎、藤生克仁)が連携し役割分担しながら推進し

ている。

#### ① 心不全と併発症の未病臓器間ネットワークデータセット構築の実施(眞鍋・藤生)

糖尿病と心不全を中心とする併発症の未病臓器間ネットワークについて、心臓を中心とする末梢臓器、神経系、骨髄・造血系、免疫系についてのトランスクリプトーム、エピゲノムの時系列データを取得し、データセットを構築、解析することを目的とし、眞鍋 G は、高脂肪食負荷等の代謝ストレス、精神ストレスのマウスモデルの最適化を行った。高脂肪食負荷モデルに加えて、成人後の糖尿病リスクの高い低出生体重児のモデルとして、母胎カロリー制限モデルを確立した。また、うつ病・精神ストレスモデルとして、社会的敗北モデルを導入し、social interaction test による評価法も確立した。これらのモデルが心機能に影響するかどうかについて心エコーによる解析を行った。

組織ならびに細胞からのサンプル採取ならびにバルクならびにシングルセル RNA-seq、ATAC-seq、ChIP-seq、CUT&RUN-seq の安定した解析を可能とするワークフローの確立を目指した。シングルセル RNA-seq については、実験バッチ差を排除して、個体差の解析を可能とするために hashtag ならびに cell multiplexing による解析手法を確立した。また、組織からの細胞調整時に生じる遺伝子発現を抑制するために actinomycin D 添加の方法も最適化した。また、パイロットスタディーとして、長期高脂肪食負荷マウスの解析を行った。

藤生 G は、野生型マウス、横行大動脈結紮等の心臓ストレスモデルおよび、新しく見出した遺伝子 X 欠損マウス(マクロファージ特異的遺伝子 X ノックアウトによって、心臓特異的な老化現象が生じ、心不全が自然発症するマウス)を用いた。

これらのマウスから新規に導入したフローサイトメーター・セルソーターを用いて、安定した時系列取得ができるかどうかの検討を行った。また、時系列データの作成を安定させるべく、テクニシャンの技術の育成も行った。さらに、時系列解析の際に問題となるシングルセル溶液作成処理中の遺伝子発現の非特異的な変化や、シーケンスの際に生じる、シーケンサーのレーン間でのバッチエフェクトを最小限にするプロトコルを検討した。細胞の処理過程においては、アクチノマイシンの徹底的な添加を開始し、さらにその処理濃度、処理時間の検討を行った。また、1細胞シーケンスにおけるバッチエフェクトの調整においては、Cite-seq の導入を行ったことによって、良好な結果が得られるワークフローの構築に成功した。

#### ② 未病臓器間ネットワークの空間データセット構築の実施(眞鍋・藤生)

未病臓器間ネットワークを構成する臓器・組織の機能を、組織内の細胞間ネットワークに着目して解析することを目的とし、空間遺伝子発現解析を実施する。

眞鍋 G は、心臓ならびに心臓オルガノイドについて、組織構造や遺伝子発現解析のためのイメージング手法を確立するために、共焦点顕微鏡を導入した。また、細胞間相互作用解析のために心筋細胞、線維芽細胞、マクロファージのオルガノイドの作成について検討を開始した。空間トランスクリプトーム解析について、Visium データのインフォマティクス解析を開始した。

藤生 G は、本年度は、心臓、神経、骨髄、腎臓、肺、脳などの複数臓器を用いて、来年度行う空間データセット取得に向けた条件検討を行った。特に透明化など3D での観察およびそのデータの解析方法や、2D での解析においては、組織の切断をどこで行い、どの

断面で2Dでの空間情報を取得するかについて検討を行った。

特に心臓、腎臓、骨髄においては、神経が支配する近傍の組織とそうではない組織を区別しながら空間情報を取得できるように、蛍光色素およびウイルスベクターを用いて神経トレース、細胞トレースによって、標的となる部位の同定を行った。さらに、オプトジェネティクスによって疾患に関連する神経を活性化・抑制したうえでの3D、2Dでの空間情報取得に向けたシステムの構築のため、蛍光顕微鏡および多光子顕微鏡の調整を行った。

今年度、空間トランスクリプトーム解析の予備的検討として、特に心臓内、骨髄内での検討を中心に行った。心臓においては、どの部位における観察が適当であるかを詳細に検討した。現在新たに構築した遺伝子 Y の欠損マウスが心臓と神経の連携に重要な表現型を得ているため、遺伝子 Y の GFP レポーターマウスを用いて、空間トランスクリプトーム解析を行う場所の同定とその部位の RNA 抽出をテストし、良好な結果を得た。さらに、骨髄内については、心不全時に骨髄内で生じる新しい現象を同定したため、その知見をトランスクリプトーム解析で詳細に解析するべく、凍結切片で骨髄からサンプル取得する取り組みを行っている。この検討は次年度も継続し、さらに良好な条件を構築したい。

課題推進者: 眞鍋一郎(千葉大学)、藤生克仁(東京大学)

### 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

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」を活用し、PM との密接な連携により PM がプロジェクトに専念できる体制で一体的推進を行った。

運営会議を通じて重要事項の連絡を随時行い、速やかに判断できる体制にて、次項目に記載する課題推進者の全体会議や小会議の開催を支援し、情報を蓄積し進捗状況を把握した。

##### 研究開発プロジェクトの展開

当該年度に4回の課題推進者の全体会議を実施し、各課題推進者の研究開発の進捗状況、および、研究手法などの情報を共有し、連携の推進に活用した。さらに関連する課題や項目ごとに定期的にミーティングを開催し、研究開発を強力に促進した。

#### (2) 研究成果の展開

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。本年度は、東北大学産学連携機構、東北テクノアーチとの連携によって  $^{13}\text{CO}_2$  呼吸試験による肝の糖取込み能評価方法の特許を米国で取得した。

#### (3) 広報、アウトリーチ

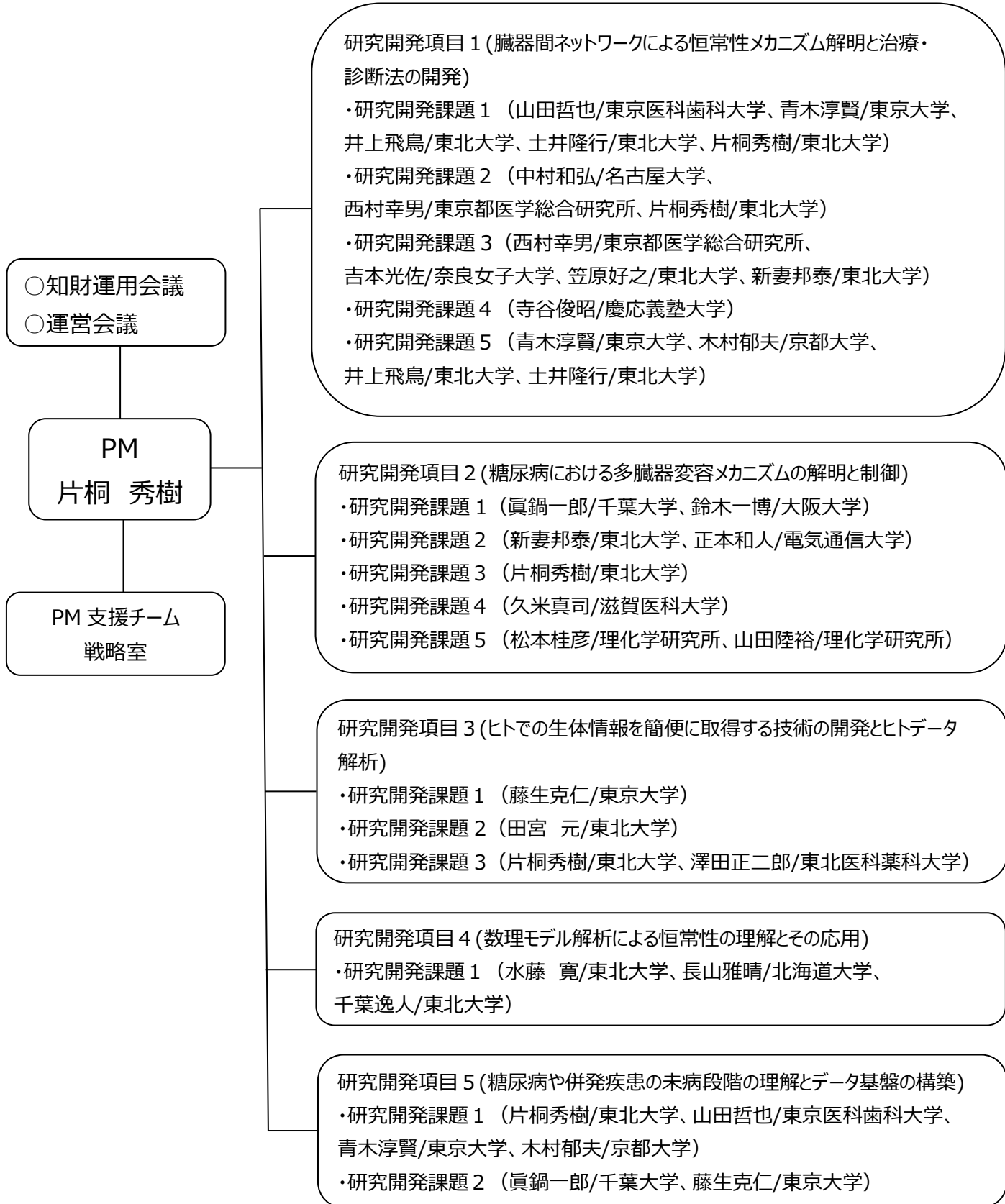


アウトリーチについては、プロジェクト独自のホームページを活用し積極的な情報発信を行った。また、各種メディア(テレビ、新聞、web など)や高校、大学への出張講義を通じ、一般市民、高校生、大学生への情報発信も積極的に行ってきた。また、視床下部に存在するオキシトシン神経群が褐色脂肪熱産生を制御する中枢機能を持つ発見や体温調節の司令塔として機能するEP3神経群の同定についての研究成果をそれぞれ、名古屋大学とJSTとの共同プレスリリースにつなげた。これらの成果は多くのマスメディアで報道され、特に、日経サイエンス誌やJST ニュースにおいて、ムーンショットプロジェクトの成果として、特集記事として掲載された。

#### (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に作成したデータプロジェクト「片桐PJデータ」に各課題推進者のデータを可能な限り保管し、プロジェクト内でのデータ共有、数理モデル構築に利活用した。特に、今後、項目5で得られた未病データは、ムーンショット目標2全体での包括的未病データベース構築およびそれらのデータを用いたビッグデータ解析や数理モデル化に必要なため、積極的なデータデポジットを推進していく。

#### 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 構成機関と実施内容

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。  
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5年2月13日に東北大学・高山順、岩手医科大学・長谷川豊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	0	0	0	0
登録件数	0	1	0	0
合計(出願件数)	0	1	0	0

会議発表数			
	国内	国際	総数
招待講演	38	14	52
口頭発表	30	3	33
ポスター発表	20	14	34
合計	88	31	119

原著論文数(※proceedingsを含む)			
	国内	国際	総数
件数	0	38	38
(うち、査読有)	0	38	38

その他著作物数(総説、書籍など)			
	国内	国際	総数
総説	3	2	5
書籍	1	0	1
その他	0	0	0
合計	4	2	6

受賞件数		
国内	国際	総数
8	2	10

プレスリリース件数
6

報道件数
12

ワークショップ等、アウトリーチ件数
4