



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

2023 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



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、プロジェクト3年目にあたり原著論文 38 報、そのうち 4 件を JST との共同プレスリリースとして国内外に発信することができた。恒常性に関する臓器間ネットワークシステムの解析を多角的に進め、糖尿病や併発疾患の未病段階の詳細なデータを加味し、予防的介入法開発に向けた標的候補の同定を進めた。また、非侵襲デバイスを用いて、糖尿病や心不全などの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。さらに、糖尿病や併発疾患の未病期の理解に向け、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。(1)の目標に向け、医学・生物学の研究者と数理科学者とが連携し、一丸となって研究開発を展開した。

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、臓器間ネットワークの制御や膵への迷走神経刺激が糖尿病予防・治療法となる POC を示し、東北大学と JST の共同プレスリリースにつなげた(令和 5 年 11 月 10 日)。さらに、求心性神経を活性化し膵 β 細胞を増殖させる分子を *in vivo* でスクリーニングすることを目指し、目的の細胞の増殖を少量の採血でモニターできるマウスシステムの開発に成功し、東北大学と JST の共同プレスリリースを行った(令和 5 年 6 月 14 日)。また、求心性迷走神経、求心性交感神経の精緻な scRNA-seq 解析に成功し、新たなクラスター分類やそれぞれに特徴的な GPCR 発現を見出し、今後の求心性神経刺激による予防治療法の開発に役立つ成果を挙げた。

中枢神経での統御機構については、視床下部背内側部ニューロンの形態が加齢によって変容することが加齢性肥満(中年太り)の発症の根本的なメカニズムであることを発見し、名古屋大学と JST の共同プレスリリースを行った(令和 6 年 3 月 7 日)。ヒトでも fMRI 解析や経脊椎磁気刺激、迷走神経刺激装置埋め込み患者解析など検討を進めた。特定の腸内細菌が宿主の糖嗜好形成に果たす役割を解析し、糖嗜好は食事内容選択を介した高肥満作用に関与することを明らかにした。また、中鎖脂肪酸受容体 GPR84 遺伝子欠損マウスに見られる2型糖尿病様症状が部分的に腸管ホルモン GLP-1 の影響であること、また、MCT オイルによる代謝機能改善効果を見出した。

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。心不全時のストレスが、心臓から求心性神経・脳・遠心性神経を経由して骨髄内の造血

幹細胞にエピゲノム変化として蓄積し、心不全の再発や多病の原因となることを明らかにした。また、肥満に伴って脂肪組織に出現する形質芽細胞の生成を薬理的に抑制する手法を開発した。脳の毛細血管の太さをオプトジェネティクスの技術で特異的に制御した際の微小循環動態の変化について検討した。肝臓ならびに腎臓局所におけるケトン体産生の生理的役割を解明し、その破綻がサルコペニア発症に寄与することを示した。また、肝における類洞内皮細胞は、高脂肪食負荷、加齢によって **porosity** が縮小するが、内皮細胞炎症抑制マウスでは加齢による **porosity** 縮小が抑制されることを見出した。

研究開発項目3では、糖尿病のリスク因子である早期の高血圧の検出を行いながら、糖尿病を検出するアルゴリズムを検討し、知財申請を行った。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、これまでの糖負荷試験の際の呼気中に排出される $^{13}\text{CO}_2$ のデータを研究開発項目4での数理モデルにおける解析に応用するデータ基盤を作成するとともに、大迫コホートにおける糖負荷試験データと照合した。

研究開発項目5では、実験動物やヒトにおいて糖尿病未病・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を蓄積し、数理モデル解析にて臓器別の機能変化の抽出につなげた。また、脂肪細胞での熱産生を亢進させる化合物の探索から安全性と効果を詳細に検証し、動物実験にて抗肥満効果が発揮される化合物が見つかり、プレスリリースにつなげた(令和6年1月24日)。肥満を是正ならびに未病のうちに糖尿病を改善する画期的な治療戦略につながる事が期待される。

以上、個体レベルの恒常性について、数理解析を進めつつ、臓器間ネットワーク分子機序の解明や中枢・末梢の神経シグナルを解析するとともに、これらに基づく制御法を提案した。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り込み能については、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。**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。

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した。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、研究開発項目ごとに課題推進者が議論をする全体会議(5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(2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連携し、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。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用い情報発信を行っている。また、片桐 PM のインタビュー記事をインターネットに掲載し、ムーンショット研究の紹介を行った。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、高校生、大学生、一般市民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 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につなげた。

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: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4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(**single cell RNA-seq (scRNA-seq)**)の改良により、既報で示されていなかった分子(特に神経細胞の情報伝達において重要な役割を担う **GPCR** などの受容体)の発現を検出することが可能となり、詳細かつ包括的に求心性迷走神経のサブタイプおよびそれぞれに発現している遺伝子の発現パターンを決定することができた。その結果、求心性迷走神経は **23** のサブタイプに分類可能であり、その中に糖代謝・インスリン分泌と密接な関連がある **Glucagon-like peptide-1 受容体 (GLP-1R)** 陽性のサブタイプを複数見出した。

本年度は、詳細に分類することができた求心性迷走神経のサブタイプのうち、どのサブタイプが肝臓からの求心性神経シグナルの伝達に関与しているのかを、肝臓選択的に遺伝子を導入したモデルマウスなどを用いて解析する。また、求心性内臓神経においても、**scRNA-seq** のデータをもとにサブタイプ別に分類する。特に、膵β細胞増殖につながる神経細胞サブタイプの候補の同定を進める。そのうえで、**scRNA-seq** のデータを元に、迷走神経における **GPCR** の発現カタログの作製を試み、特定の **GPCR** 作動薬によって任意の迷走神経サブタイプを活性化できるかの検討に取り組む。

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 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の同定(山田)

令和4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 (single cell RNA-seq (scRNA-seq)) の改良により、既報で示されていなかった分子 (特に神経細胞の情報伝達において重要な役割を担う GPCR などの受容体) の発現を検出することが可能となり、詳細かつ包括的に求心性迷走神経のサブタイプおよびそれぞれに発現している遺伝子の発現パターンを決定することができた。

令和5年度は、詳細に分類することができた求心性迷走神経のサブタイプのうち、どのサブタイプが肝臓からの求心性神経シグナルの伝達に関与しているのかを、肝臓選択的に遺伝子を導入したモデルマウスなどを用いて解析した。具体的には、肝臓選択的にグルコキナーゼを遺伝子導入し、左右の **Nodose ganglion** をそれぞれシングルセルレベルで解析したところ、サブタイプ毎に遺伝子の発現に差異が生じていることが明らかとなった。これにより、肝臓からの求心性神経シグナルに関与するサブタイプの候補を見出すことができた。

② DREADD システムによる求心性迷走神経における GPCR シグナルの役割の解明 (青木)

当該年度は、Gq, Gi, Gs, G12-DREADD マウスを、Phox2b-cre または Wnt-1-cre ドライバーマウスとそれぞれ交配させることで、求心性迷走神経特異的 DREADD マウスを作製した。この中で、特に Phox2b 陽性(Nodose)迷走神経 DREADD マウスを用い、各種 G タンパク質シグナルが Nodose 神経活性に与える寄与の解析を行なった。各 DREADD マウスに合成リガンド CNO を投与し、Nodose 神経が投射する延髄における神経興奮マーカー c-fos を評価したところ、Gq-DREADD マウスでは顕著な c-fos 発現誘導が認められた。また、Gq-DREADD 迷走神経では CNO 依存的な Ca 濃度の上昇も確認された。従って、Gq シグナルは求心性迷走神経に対して活性化の方向に働くことがわかった。一方で、Gi, Gs, G12 シグナルはそれ単独では神経活性を変化させなかった。これらのシグナルに関しては、今後、複数の G タンパク質シグナル、または GPCR 以外のシグナルとの相乗効果を中心に解析していく。

また本年度は、迷走神経 G タンパク質シグナル依存的に変動する臓器機能に関しての探索も開始した。例えば、耐糖能に与える寄与を明らかにするため、各種 DREADD マウスに CNO を一過的に投与後、経口グルコース負荷試験を実施した。その結果、迷走神経 Gq シグナルは耐糖能を有意に悪化させた。興味深いことに、Gi シグナルを強く惹起した際にも類似の傾向が認められた。一方で、Gs シグナルは血中グルコースを低下させる傾向にあることから、耐糖能を改善することが示唆された。また、G12 シグナルは耐糖能を全く変化させなかった。現在、このような解析を様々な臓器パラメータに対して実施しており、今後、迷走神

経 GPCR が与える臓器機能への影響の全容を明らかにする予定である。

③ 求心性迷走神経における GPCR カタログの作製(青木)

当該年度は、マウス求心性迷走神経の scRNA-seq のデータから明らかとなった求心性迷走神経の各種サブタイプにおける GPCR の発現パターンから作製した迷走神経 GPCR カタログに、それぞれの GPCR の G タンパク質共役指向性の情報を加えてアップデートを行なった。GPCR の共役データは、以前に井上 G らが TGF-alpha shedding assay によって網羅的に解析したデータ(Inoue et al. Cell 2019)と、公共のデータベース(IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology および GPCRdb)に登録されているデータの両方を用いた。これによって、特定の迷走神経サブタイプに、特定の G タンパク質シグナルを惹起させるために有用となる情報基盤が整った。今後は、このカタログに②の DREADD マウスの解析から得られたデータをさらに統合し、それぞれの迷走神経 GPCR の機能の予測を目指す。

④ GPCR リガンド・合成作動薬を用いた糖尿病関連求心性迷走神経サブタイプの同定(青木)

当該年度は、③で記述した迷走神経カタログを用い、GLP1-R を発現している求心性迷走神経サブタイプを詳細に解析し、このサブタイプがさらに4つほどに分類可能であることを明らかとした。さらにこれらのサブタイプに発現している GPCR を抽出したところ、摂食応答を変化させることが知られているコレシストキニンとニューロペプチド Y の受容体が陽性のサブタイプが存在したことから、当該サブタイプが GLP1-R による摂食応答抑制を担うことが示唆された。また、これらサブタイプの一部に発現している GPCR のうち、機能未知のものとして F2rl2 (PAR3, Gq 共役型)の存在が明らかとなった。そこで PAR3 を特異的に活性化する可能性が報告されているペプチド C660 を合成し、TGF-alpha shedding assay にてその agonist 活性を確認した。現在、この C660 を用いた当該サブタイプの機能解明に取り組んでいる。

⑤ ノードーズ神経節に発現する GPCR の機能評価法(井上)

ノードーズ神経節に発現するリガンド既知 GPCR として、モノアミン受容体と脂質受容体をそれぞれ 2 種類ずつ、培養細胞レベルでその GPCR の活性化レベルを測定する手法の構築を試みた。これらの受容体を HEK293 細胞に対して GPCR シグナルレポーターコンストラクトと共に一過的に発現させ、濃度希釈系列をとったリガンドにより刺激を行った。ネガティブコントロールとして、GPCR を強制発現させずレポーターコンストラクトのみを導入した細胞を使用した。また、シグナルレベルが弱い場

合には、レポーターコンストラクトの組み合わせやプラスミド量を振って、アッセイ系の最適化を行った。その結果、TGF α 切断アッセイ、NanoBiT-G タンパク質乖離アッセイ、NanoBiT-G タンパク質活性化アッセイ、NanoBiT-アレスチンリクルートアッセイにおいて、強制発現させた GPCR 依存的にリガンドによる GPCR 活性化を検出できるアッセイ系を構築した。これらの結果を青木 G と山田 G に共有し、アッセイ系の移管ができる準備を整えた。

⑥ GPCR リガンドの合成の実施(土井)

青木・山田グループが進める迷走神経で機能する GPCR の同定、の課題に関して候補 GPCR リガンドの立体異性体の効率的な合成ルートの検討を進め、実際に GPCR のリガンドの合成、および外部合成依頼を担当した。

後根神経節および三叉神経系ニューロンにおいて、プロテアーゼ活性化受容体(PAR) 3 を選択的に活性化する PAR3 アゴニスト C660 について合成計画し、外部合成の選定・依頼・合成指導を実施し、モデルマウスへの投与に必要な 60 mg の合成を完了した。

また、GPCR リガンドの分布について質量分析を用いて検出するために必要な同位体元素を含む内部標準物質の合成を計画し、原料となる DHA を調達した。モデルとなるオレイン酸について $\alpha, \alpha, \beta, \beta$ -テトラジュテロオレイン酸に変換できることを確認した。DHA の重水素化体について合成を進めている。

⑦ 求心性神経の多様性の解明(片桐、山田)

本課題では、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からの内臓神経求心路に焦点を当て、その分子機序の解明を進めている。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。そこで、この課題を克服するために、内臓神経求心路の神経核が存在する Dorsal root ganglion 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。山田 G は、求心性神経節を構成する neuron などの構成細胞のシングルセルレベルでの遺伝子発現解析において必要な実験のプロトコルや留意すべき点について、片桐 G とディスカッションを行い共有した。前年度までは、従来法の 10x での scRNA-seq で検討を進めていたが、詳細なクラスター分けと受容体という発現量の少ない分子についても発現解析を進めるため、当該年度は、Taq-Seq を活用したシングルセル解析へと舵を切った。その結果、間質細胞と神経細胞の識別はもちろんのこと、求心性内臓神経は少なくとも 29 のクラスターに分類することに成功した。これは従来の報告(4-6

クラスター)をはるかに上回る詳細なクラスター分類であり、それぞれのクラスター別に特徴的な発現を示す **GPCR** を明らかに分けることができ、分子レベルで、求心性内臓神経の多様性を詳細に明らかにすることに成功した。

⑧ 求心性神経のシグナル伝達の分子メカニズムの解明(片桐)

⑦で得られた知見をもとに膵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への遺伝子導入を行った際に **cFos** が発現する **Dorsal root ganglion** に核を持つ求心性ニューロンについて、⑦で成功した **Taq-Seq** を活用した **scRNA-seq** 解析での詳細な発現データをもとに *in silico* で検討した。これまで検出が困難であった **cFos** の発現が、本解析では十分に検出できた。**cFos** 発現陽性ニューロンは、クラスターごとに多寡に違いを認めたものの、必ずしも一つのクラスターに集中するわけではなく、複数のクラスターにまたがって存在する結果が得られた。さらに、一部の **cFos** 陽性神経に発現する受容体へのアゴニスト投与により、実際に膵β細胞の増殖を認める結果が得られた。

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: 脳内で情動やストレスを処理する皮質辺縁系と生体調節を担う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、皮質辺縁系と自律神経制御系とを連関させる神経回路内の特定の脳領域間をつなぐ投射ニューロンへ選択的に任意の遺伝子を導入することを可能にするウイルスの作製技術を確認する。そして、そのウイルスや神経トレーサーなどを用いた手法を駆使して、心理ストレスや情動によって活性化される皮質辺縁系と自律神経制御系のニューロン同士の接続関係を特定する。また、研究開発課題 3 で確立する技術を用いて交感神経の活動計測を行いながら、特定の脳領域の神経活動を薬物注入によって活性化あるいは抑制することによって、体温・代謝調節関連臓器や器官を交感神経支配する脳領域を特定する。さらに、動物実験から得られる皮質辺縁系と自律神経制御系のニューロン同士の接続関係に関する知見と、ヒトで非侵襲的に計測した脳活動との類似点ならびに相違点を明確にすることによって、ヒトの代謝調節機能や循環調節機能を制

御する技術開発の手がかりを探求する。加えて、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を継続して行う。

また、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とその神経回路を制御する手法の開発に向け、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する。また、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する。

さらに、膵β細胞の増殖につながる肝への遺伝子導入を行い、活性化がみられる脳の部位を、全脳において網羅的かつ経時的に検出し、膵β細胞増殖につながる中枢神経経路の候補を同定する。

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、神経トレーサーやウイルスなどを用いた手法を駆使して、心理ストレスや情動によって活性化される皮質辺縁系と自律神経制御系のニューロン同士の接続関係を特定した。

② 実験動物の心身相関神経回路の制御(中村)

実験動物において、皮質辺縁系と自律神経制御系とを連関させる神経回路の活動を人為的に抑制あるいは活性化する技術を確認し、全身の代謝調節機能や循環調節機能を長期的に制御する手法を開発する目標の達成のため、今年度は、皮質辺縁系と自律神経制御系とを連関させる神経回路内の特定の脳領域間をつなぐ投射ニューロンへ選択的に任意の遺伝子を導入することを可能にするウイルスの作製技術を確認した。

③ 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」で確立する技術を用いて交感神経活動の計測を行いながら、特定の脳領域の神経活動を薬物注入によって活性化あるいは抑制することによって、体温・代謝調節関連臓器や器官を交感神経支配する脳領域を

特定した。その結果、レプチン—メラノコルチンシグナル(飽食シグナル)が視床下部背内側部を介して褐色脂肪熱産生や代謝亢進を駆動することを見出し、そのシグナルを担う視床下部背内側部ニューロンの形態が加齢によって変容することが加齢性肥満(中年太り)の発症の根本的なメカニズムであることを発見した(Oya et al., *Cell Metabolism*, in press)。肥満は糖尿病の未病段階に起こることから、この発見が糖尿病発症機序の解明とその克服に大きく貢献すると考えられる。また今年度は、行動性・自律性体温調節を担う中枢神経路を特定することにも成功した(Yahiro et al., *Journal of Neuroscience* 43:5221-5240, 2023)。さらに、膵β細胞の増殖につながる肝への遺伝子導入を行い、活性化がみられる脳の部位を、全脳において網羅的かつ経時的に検出し、膵β細胞増殖につながる中枢神経経路の候補を同定した。

④ ヒトの fMRI 計測による心身相関神経回路の解析(中村)

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、今年度は、本課題推進者(中村)が動物実験から得る皮質辺縁系と自律神経制御系のニューロン同士の接続関係に関する知見を提供し、西村幸男(東京都医学総合研究所)らがヒトで非侵襲的に計測した脳活動との類似点と相違点を明確にすべく検討を行った。

⑤ 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)

情動が喚起される場面を想像した直後に随意運動を実行する課題を 29 名の参加者に課し、これまでに開発した撮像シーケンスを用いて視床下部脳幹系活動を計測した。情動喚起場面を想像した直後に握力計を素早く握る動作を行うと、非情動喚起場面を想像した場合に比べて速さと強さがともに向上した。fMRI データの解析により、情動喚起場面の想像は視床下部および腹側中脳を賦活させ、視床下部脳幹系の活動が強いほど心拍数が速くなることが分かった。さらに、想像中だけでなく、実際に握る動作を行う間も視床下部と腹側中脳は賦活していた。以上の結果から、視床下部脳幹系が全身の代謝機能を促す指令を送り、直後の随意運動を向上させるメカニズムの一端を担うことが明らかになったと考えている。

⑥ ヒトでの自律神経活動の自己制御(西村)

副交感神経を自己制御する方法として、上記の腹側中脳と心拍数の連関に着目した。こ

れまでの成果として、目標を達成しようとする場面を想像することで、心拍数を自分で増加させられることを示した。さらに、このような想像をしている間に腹側中脳が活動するほど、心拍数が増加することが分かった。このような腹側中脳と心拍数の関連性から、腹側中脳の活動を下げようという想像をすれば、副交感神経が賦活し、心拍数が低下するのではないかという仮説を得た。この仮説を実証するため、腹側中脳の活動をリアルタイムに参加者へフィードバックする **fMRI neurofeedback** システムを開発し、腹側中脳の活動を自己制御することに成功した。現時点までに 7 名の参加者を対象として、腹側中脳の活動を下げようという **fMRI neurofeedback** を実施した。心拍数・皮膚電気活動といった自律神経応答も同時記録しているため、**fMRI neurofeedback** という方略を用いて、副交感神経の自己制御ができるかを検証していく。

⑦ 非侵襲的ヒト臓器情報モニタリング法の開発(西村)

3 名の健常参加者を対象として予定通り臓器 **fMRI** の撮影を開始した。前年度までに開発した膀胱 **BOLD** 信号計測用のシーケンスを応用することで、膀胱と肝臓の **BOLD** 信号を同時に記録することに成功した。15 秒間の息止め撮影と 15 秒の呼吸を繰り返し行うことで、30 秒に 1 回の計測を行った。10 分間の休憩を挟みながら、10 分間の計測を 3 回繰り返し、計 30 分の **BOLD** 信号変化を記録した。膀胱と肝臓の各 **voxel** から **BOLD** 時系列を抽出し、**voxel-to-voxel** の相関解析に基づくクラスタリングを実施した。結果として、**BOLD** 信号の時系列パターンから臓器内のクラスター構造を描出することに成功し、非侵襲的な活動計測を用いて膀胱および肝臓内の機能区分を行うことが可能になった。さらに、膀胱と肝臓の機能区分間には正負両方の相関が認められ、**BOLD** 信号を用いて膀胱と肝臓の間での機能的ネットワークを評価できる可能性が示唆された。

⑧ 脳深部刺激による恒常性の制御法の開発(西村)

マカサル 3 頭に対して、線条体に対し深部電極の埋め込みを行った。心拍数や瞳孔径をモニターしつつ電気刺激を行ったが、顕著な変化を検出できる刺激部位を線条体内では特定するには至らなかった。現在その原因を探るため、組織実験を行ない、刺激されていた部位の検証を行っている。

⑨ 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ィ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。前年度に、項目2の課題推進者松本桂彦と連携し、**FOS-TRAP** マウスの透明化脳の解析を行い、目的のタイミングで、脳内での活性化している部位を定量的に解析する検出法を確立した。そこで、当該年度は、この検出法を活用して経時的な解析を進めた。具体的には、膵β細胞の増殖につながる肝への恒常活性型 **MEK** の遺伝子導入を行い、活性化がみられる脳の部位を、全脳において網羅的かつ経時的に解析したところ、時間的空間的に中枢神経が活性化される様子を明らかにすることに成功した。これにより、膵β細胞増殖につながる中枢神経経路について、複数パターン候補を同定した。

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：自由行動下のラットの迷走神経活動の計測技術の改良を進め、神経活動の長期計測を可能にする。**alpha-2 adrenalin agonist (Dexmedetomidine)**の投与により迷走神経活動を変化させ、遠心性と求心性の迷走神経活動の弁別方法の検討をする。また、**Streptozotocin(STZ)**投与により血糖値が急性に上昇する過程での迷走神経活動と交感神経活動の動的な経時変化を記録する。さらに、得られたデータは項目4の数値チームと共有し、自律神経活動による血糖値調節の不安定性を示す数理的表現を探索する。

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、多点電極を用いた電気信号の取得法の開発を引き続き継続する。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る。

また、自律神経活動の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、その性能をテストする。ヒトで非侵襲的に刺激することで、臓器の機能を制御する方法を開発する。

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、データの収集を行う。

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）

ヒト対象研究において、心臓血管系機能を司る自律神経系を制御する人工神経接続シス

テムを構築し、ベンチテストを行った。非観血式連続血圧計によって指先から記録した血圧の連続データを使用して、血圧が閾値を下まわったら、人工神経接続を介して血圧を測定している被験者自身が経脊椎磁気刺激を開始し、閾値を越えたら経脊椎磁気刺激を停止させるシステムを構築した。連続血圧データは、心臓の拍動毎に最高血圧から最低血圧まで変動しているため、刺激閾値の設定が困難であり、かつ経脊椎磁気刺激による血圧の変動は心拍数よりも遅い時定数であることが判明したため、連続血圧データによる刺激制御を変更した。現在、連続血圧データからオンラインで最高血圧、最低血圧、中間血圧、心拍数などのパラメータを抽出し、それによって経脊椎磁気刺激を制御する人工神経ソフトウェアを新たに開発している。

② 臓器機能の遠心性制御法の開発(西村)

ヒトでの非侵襲的な臓器機能制御法の開発

ヒト対象研究において、経脊椎磁気刺激によって循環器機能を司る心臓血管系の臓器機能制御の実験を開始した。ベッド上で腹臥位の姿勢をとった健常成人の指先に血圧カフを装着し、非観血式連続血圧計を使用して心拍毎の血圧および心拍数を連続的にモニタリングできる状態で、経脊椎磁気刺激の効果を観察できる実験系を確立した。

マカサルを用いた研究については、1頭に対して開腹手術を行い、1)膵臓へのアプローチ経路の確認、2)膵臓を支配する神経の同定、および、3)膵臓を支配する神経への刺激電極巻き付けを行った。1)においては、上腹部正中を皮膚切開後、腹直筋を切開、腹膜を穿破し、胃と横行結腸を避けながら腹腔深部の膵臓まで到達するルートを確認した。2)においては、血管と並走し、膵頭部から膵臓内へ侵入し、膵尾部へ向かうように走行している神経を同定した。膵臓を支配する迷走神経であると推測された。3)においては、神経に糸を巻き付け、僅かに持ち上げることによって他組織と分離し、神経にカフ電極を巻き付けた上から糸を巻き付けて固定する手技を確認した。今回、刺激電極を留置しての閉腹は行わなかった。刺激電極を慢性的に留置するためには、ケーブルの走行路を検討する必要がある。

③ 自律神経活動の長期測定技術の改良の実施(吉本)

迷走神経活動と交感神経活動を同時に長期連続計測するための、3入力連結の超低ノイズ差動入力アンプを作成した。特徴は、電源ラインを別にしたこと、入力初段のヘッドアンプの選別を行い、これまで以上の低ノイズ化を図ったこと、3入力アンプを一体化して小型化したことである。既製品の低ノイズ電源(NF回路ブロック)を使い電源ラインからのコモンモードノイズ混入を防いだ。入力初段の作動型アンプの特性の評価を厳密に行い、ノーマルとコモンモードノイズの混入の防止を行い、ヘッドア

ンプの **Signal/Noise** 比の向上を図った。迷走神経活動1チャンネル、交感神経活動2チャンネル入力を1つの小型ボックスにまとめて、動物に近い位置に置くことによりノイズの混入を防いだ。

以上、動物を使った迷走神経および交感神経活動の計測 **Signal/Noise** 比を高め、コンパクトに一体化したヘッドアンプを作成した。これを活用し、より安定した長期の自律神経活動計測を目指す。

④ 副交感神経活動の測定技術の開発(吉本)

左あるいは右の迷走神経活動を2週間程度連続記録可能であるが、方法論として検討すべき点はまだ残っている。当該年度は、遠心性迷走神経活動と求心性迷走神経活動の弁別方法の検討を継続した。具体的には、迷走神経活動を薬物投与 ($\alpha 2$ アドレナリン受容体作動薬 (**Dexmedetomidine**)) により人為的に変化させて、その応答から弁別方法の検証と問題点の把握を行った。

迷走神経活動計測点より末梢側にマイクロカテーテルを慢性留置し、局所麻酔薬(レボブピバカイン, **0.75% 30 μ l**)を投与して求心性迷走神経活動のブロックを行った。ブロック前は求心性と遠心性の両方の活動が計測されているが、ブロック後は遠心性迷走神経活動のみが計測されている。従って、ブロック前の計測値よりブロック後の計測を差し引くと求心性迷走神経活動の時間変化が算出可能である。

この方法を用いて、**alpha-2 adrenaline agonist (Dexmedetomidine)**を静脈内投与して、迷走神経活動を人為的に変化させた。 $\alpha -2$ 受容体は脳内の迷走神経活動調節に関与する神経核に発現していることが知られている。そこで、上記の方法を用いて、 $\alpha 2$ アドレナリン受容体作動薬の **Dexmedetomidine** を用い、 $\alpha 2$ アドレナリン受容体作動薬が頸部迷走神経活動に及ぼす影響を検討した。実験は、右あるいは左の迷走神経活動計測と、無処置あるいは **Levobupivacaine** による求心性迷走神経活動ブロックの組み合わせの 4 群で実施した。結果、**Dexmedetomidine** の静脈内投与により、右頸部迷走神経活動は低下し、投与後約 14 分で最低値を示した。同様に左頸部迷走神経活動は投与後約 11 分で最低値を示した。**Levobupivacaine** を投与した実験においても、右頸部迷走神経活動は低下し、投与後約 11 分で最低値を示した。同様に左頸部迷走神経活動は投与後約 11 分で最低値を示した。本研究では、頸部迷走神経活動の左右差と、**Levobupivacaine** 投与による迷走神経活動の差は見られなかった。このことから、**Dexmedetomidine** は左右の遠心性頸部迷走神経活動を低下させることが示された。

以上、上記の方法は左右の遠心性迷走神経活動の低下の時間変化を定量評価できることが示された。

⑤ 交感神経と迷走神経活動を介した糖尿病・併発疾患発症のメカニズムの解明(吉本)

正常状態から糖尿病発症に至る過程の自律神経活動の時系列データ取得を目的として、対照期の後に STZ (65mg/kg) を腹腔内投与して I 型糖尿病を誘発した。実験期間中、脳波、筋電図、心電図、腎及び腰部 交感神経活動、頸部迷走神経活動を長期間連続計測し、さらに組織液糖濃度を 15 分毎に計測した。結果、組織液糖濃度(血糖値)は、STZ 投与後数時間以内に増加し、約 1~2 時間後に一過性にピーク値(約 350mg/dl)に達したが、その後減少した後に再度上昇し、STZ 投与 24 時間以降は約 350mg/dl の高いレベルを維持した。血糖値が上下する過渡期において、腎及び腰部交感神経、頸部迷走神経活動、および心拍数は、血糖値と連動した特異的な変化は観察されなかった。しかし、高血糖で一定になった定常期では、腰部交感神経活動は増加し、一方心拍数は低下した。腰部交感神経活動は高血糖時に特徴的に変化した。正常時に腰部交感神経活動は、2Hz と 6 Hz にピークを持つリズムのある周期的な変化を示した。一方、高血糖定常時には、腰部交感神経の活動周期のピークは 4Hz になり、単調なリズムに変化した。このリズムの変化は、心拍数の変動との因果関係が示された。

以上、高血糖の定常期には腰部交感神経活動が増加し単調なリズムに変化することが明らかとなった。これは、糖尿病発症時の心拍数変動の変化や、筋肉での非インスリン性糖取り込みに関与していることが示唆された。

⑥ 「数理解析による恒常性の理解と応用」との連携(吉本)

正常状態から疾病発症に至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。当該年度は、正常から STZ 投与誘発性 1 型糖尿病発症に至る過程での、血糖値、交感神経活動、迷走神経活動、心拍数および動脈圧の経時的な連続計測データを蓄積した。Zoom ミーティングにより、水藤教授および長山教授と得られたデータをもとに、遅延座標埋め込み解析を含め、その他数理解析の可能性を討論した。結果、血糖値の経時変化のデータは長山教授と共有した。交感神経活動の解析の手法については、多因子の相互因果関係の数値化方法など、可能性のある数値解析について討論した。動物実験の実測データを数理モデルに適応させるには、計測ナマデータの処理が必要であることを実感した。

以上、Zoom ミーティングにて 1 型糖尿病発症の時系列データを数理チームの教授に紹介し討論した。血糖値データは長山数理モデル解析に供し、その他は数理モデル化にむけてナマデータの解析を継続することとした。

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て交感神経および副交感神経活動性を経時的に計測する技術の開発を継続した。膵臓を標的臓器とし、多点となるように取り付けられた複数の電極から生体電気信号を取得し、その中に含まれる自律神経活動に起因する成分を分離抽出する技術開発を進めた。この技術を開発するためには、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るが、両者は不可分であり、相互の最適化が必要である。また、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性を示す成分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。膵臓から得られた生体電気信号の中から自律神経活動性に一致する特徴量の探索を進め、候補となる成分を見出した。この成分が真に自律神経活動性を示す成分であるかにかについて、実験系ならびにデータ解析法の相互最適化を進めながら、検証を進めている。

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、胎児期に遺伝的要因あるいは環境的要因を持つ糖尿病モデルマウスを用いて、心拍変動による胎児の自律神経活動の評価を進めた。胎児の自律神経活動性の評価にはマウス胎児心電図計測技術を用いた。遺伝的要因としては 2 型糖尿病モデルマウスであるレプチン受容体欠損マウス(db マウス)を用いた。db/+の妊娠マウスに対し通常食あるいは高脂肪食を負荷しても、胎児の遺伝子型による自律神経活動の変化は見られなかった。一方で、通常食と高脂肪食負荷を比較すると、胎児の遺伝子型に関わらず、高脂肪食時で胎児の自律神経活動の低下が見られた。この検証のために野生型の妊娠マウスに対しコントロール食あるいは高脂肪食を負荷し、胎児の自律神経活動を検証したところ、同様に高脂肪食負荷時に胎児の自律神経活動が低下していた。この結果は、胎児の自律神経活動性に関しては、遺伝的要因よりも環境的要因の影響が大きいことを示唆していると考えられる。現在は母体遺伝子型の違いによる子宮環境の変化が胎児に与える影響の検証を進めるとともに、母体への高脂肪食負荷が胎児の自律神経活動を変化させる機序の特定と、胎児の自律神経活動の変化が、将来の疾患発症に果たす役割に関し、検証を進めている。

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」として承認されている。本年度は 6 例の患者登録を行い、倫理委員会承認後の合計組み入れ数は 11 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、4 例の頭蓋内電極留置を行った。

また、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、当該年度には迷走神経刺激と頭蓋内電極留置を合わせて 10 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。特に、迷走神経刺激の臨床試験においては、一年後の入院検査が障壁となり組み入れが伸びない現状が明らかになったため、外来ベースの検査で研究を進められるように、研究プロトコルを修正することを検討中である。

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：本研究課題では、メタボリックストレスによって変化する「腸-肝臓-脳軸」が、糖尿病および併発疾患の発症進展に果たす役割を明らかにする。腸脳相関が動物の糖嗜好形成に重要であることが明示されているが、宿主の糖嗜好形成における腸内細菌の役割は明確でなかった。前年度までに、無菌マウスもしくは腸管除菌マウスにおいては糖嗜好性が形成されないこと、特定の腸内細菌が宿主の糖嗜好形成に重要であることを見出した。本年度は、特定した腸内細菌が宿主の糖嗜好形成に果たす役割を分子レベルで明確にしていく。さらに糖を含む栄養素によって活性化される求心性迷走神経を人為的に制御し、新たな糖尿病治療法の開発に取り組む。

本課題は、課題推進者、寺谷俊昭が推進している。

① 宿主の糖嗜好性形成に関わる腸内細菌が腸管構成細胞に果たす役割について

令和4年度までの解析により、ヒトおよびマウス腸内には、宿主の糖嗜好性形成に関与する細菌が存在することが明確になった。そこで、当該年度では、糖嗜好関連細菌の特性を遺伝学もしくは生化学的手法を用いて評価した。

・宿主糖嗜好形成関連腸内細菌における酢酸合成能と糖嗜好形成の関係について

マウスより小腸上部内容物を回収し、小腸上部における腸内細菌叢解析を実施した。糖嗜好試験前後で小腸上部における腸内細菌叢は異なっていた。試験後の小腸上部細菌叢においては、試験前と比べて、菌種 A や菌種 B が増加しており、菌種 C~G の減少が認められた。さらに、糖嗜好と関連が想定された上記 7 種類の細菌を小腸上部より分離・培養を実施した。これら細菌の酢酸合成能を *in vivo* および *in vitro* 解析で評価した。上記 7 種類の菌をそれぞれ単独で無菌マウスに移植し、その後、糖嗜好試験実施後の小腸上部内容物に含まれる代謝物 X の濃度を評価したところ、菌種 A および菌種 B を移植したマウス小腸上部で明確な代謝物 X の蓄積を認めた(前年度の解析により、菌種 A もしくは菌種 B を移植したノバイオームマウスが糖嗜好を示し、他 5 種の細菌を移植したマウスはいずれも糖嗜好を示していない)。さらに、上記 7 種の GAM 培地で 48 時間の嫌気培養を実施した。各細菌培養液に含まれる代謝物 X の濃度を定量したところ、菌種 A および菌種 B の培養液中に含まれる代謝物 X の濃度は、他 5 種の菌体培養液の酢酸濃度よりも有意に高値を示した。最後に、上記 7 菌の全ゲノムシーケンス解析を実施したところ、菌種 A および菌種 B は、その他の5菌と比べて、炭水化物から酢酸を合成する遺伝子群を豊富に所有していることが明確となった。これらの結果は、糖利用を介して代謝物 X を合成できる細菌が宿主の糖嗜好に影響し得ることを示唆している。

・糖尿病発症進展における糖嗜好性の役割について

60% Fat 含有の高度肥満食(HFD)を負荷したマウスは、糖嗜好を消失していた。そこで、小腸上部内容物に含まれる菌種 A 量を測定したところ、HFD の摂餌により菌種 A 量が有意に低下していた。そこで、HFD 食摂餌したマウスに菌種 A を経口より補充したところ、菌種 A 投与により HFD 負荷マウスにおいても糖嗜好が形成された。そこで、菌種 A 補充しながら、上記の肥満モデルマウスにグルコース溶液と人工甘味料溶液を異なるボトルに分けて自由飲水で 30 日間与えた。菌種 A 投与をしないマウスは、HFD により糖嗜好が消失するため、グルコース溶液と人工甘味料を同率で飲水し続けた。一方で、菌種 A 投与群のマウスは、HFD 摂餌下においても糖嗜好を示し、実験開始 3 日目以降においては、常にグルコース溶液を飲水した。試験開始 30 日後に糖負荷試験およびインスリン感受性試験を実施した。菌種 A 非投与群は、投与群と比較して、さらなる耐糖能異常を示した。これらの結果より、糖嗜好は食事内容選択を介した高肥満作用を有していることが考えられた。

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

R4 年度までに実施した解析により、迷走神経肝臓枝電気刺激法(VHNS)はマウス糖尿病

病態を改善することが示された。そこで、**VHNS** によって活性化する神経細胞を特定するため、活性化神経細胞を標識する **FosTRAP2 x Ai14** マウスを用いた解析を実施した。

・迷走神経肝臓枝電気刺激が活性化する脳領域と代謝機能の関係

VHNS は、左側求心性迷走神経・延髄孤束核・視床下部室傍核・扁桃体等の領域を活性化させた。そこで、これら脳内神経細胞を標的とした形質導入法を確立することにした。予備検討として、扁桃体内に存在する **Pkcd** 陽性神経を **ablation** するため、**Pkcd** プロモーター下で **Cre** リコンビナーゼが発現する **Pkcd-Cre** マウスの脳内に **AAV9-Flex-DTA** を投与した。**AAV9** 感染後2週間目のマウスより脳を採取し、蛍光顕微鏡で観察したところ、**AAV9** 投与により目的とする **Pkcd** 陽性神経の除去を確認した。扁桃体 **Pkcd** 陽性神経が脱落したマウスは、コントロール群と比較して、解剖時点の摂餌量・飲水量・血糖のいずれの項目において有意な違いを示さなかった。脳内の特定領域を標的とした **AAV** インジェクト法が当教室内でも確立された。同様の方法を用いて、**VHNS** で活性化された様々な脳領域を個別に **ablation** して、**VHNS** の糖尿病改善作用に関わる脳領域を探索している。

脳内の **AAV9** インジェクト法が確立できたことは非常に大きな進捗であったが、脳領域と代謝機能の関係については現在調査中である。

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: 前年度までに、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を確立した。これを用いて、ストレプトゾトシン糖尿病モデルマウスの解析を行ったところ、パルミチン酸など特定の脂肪酸を含む、リゾリン脂質・リン脂質分子種の変動が観察された。さらに、前年度までにこれまでアディポネクチン受容体として知られてきた **AdipoR1** および **R2** がホスホリパーゼ **A** (**PLA2** あるいは **PLA1**) 活性を有し、リン脂質の脂肪酸リモデリング反応を通じてリン脂質脂肪酸のバランスを変化させること、特に、**AdipoR2** は飽和脂肪酸による小胞体ストレス応答に対して抵抗性を示す機能を持つことが明らかとなった。また、**AdipoR1**, **AdipoR2** を含む、11 種類の **PAQR** ファミリー分子が **PLA2** あるいは **PLA1** 活性を持つことが判明し、そのいくつかはリゾホスファチジルイノシトール (**LPI**)、リゾホスファチジルセリン (**LysoPS**) の産生酵素として機能することも明らかになりつつある。従って、**PAQR** 分子が、上述の糖尿病モデルにおけるリン脂質分子種の変動に寄与し、細胞膜リン脂質のリモデリングやさらにリゾリン脂質受容体のリガンドを産生することで、糖尿病病態の進展に影響して

いる可能性が示唆される。そこで本年度は、糖尿病病態におけるリン脂質の変動を詳細に調べ、さらにその脂質変動における AdipoR1/R2 を含む PAQR 分子の関与を明らかにし、糖尿病病態との関連解明を目指す。

また、これまでに GloSensor cAMP アッセイを改良することで、狭雑物に耐性のある GPCR アッセイ系を構築してきた。本年度はこのアッセイを高度化し、GPCR のシグナル解析を簡便に実施する手法を構築する。

さらに、GPCR の人工リガンドや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を進める。食由来代謝物関連研究課題に関して当該年度においては、前年度の栄養環境応答に関与するであろう候補代謝物の絞り込みより得られた候補群に対して、GPCR スクリーニングにより脂肪酸受容体への親和性評価を行う。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、更に詳細な機能解析を進めるとともに、GPCR リガンドによる疾患治療評価を行う。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繋げる。

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 糖尿病モデルにおける GPCR リガンド並びにリン脂質分子種の解析(青木)

これまでに青木 G が開発した LC-MS/MS システムによるリン脂質一斉定量系を用いて、片桐 G から提供を受けた高脂肪食負荷マウスの血液および肝臓を含む各種臓器に対するリポドミクス解析を実施した。その結果、高脂肪食群のほとんどの検体において、アラキドン酸(20:4)含有型のリン脂質の上昇を認めた。また、脂肪酸を1つだけ有するリゾリン脂質においては、特に血液検体において、パルミチン酸(16:0)結合型が低下する一方で、ステアリン酸(18:0)結合型が増加するという脂肪酸組成バランスの変動が生じていた。これらの LC-MS データはデータベース化した上で、GAKUNIN にアップロードした。

② リゾリン脂質産生酵素としての PAQR 分子の機能解明(青木)

PAQR5, 8, 9, 10, 11 をそれぞれ HEK293 細胞に過剰発現させ、そのリン脂質プロファイルを LC-MS/MS 解析により決定した。その結果、PARQR5, 8, 9 発現細胞では LysoPS が、PAQR10, 11 発現細胞では LPG と LPI のレベルが顕著に増加した。また、PARQR8, 9 発現細胞は LysoPS と同様に LysoPS 受容体(GPR34/LPS1)を、PAQR10, 11 発現細胞は LPI 受容体 GPR55 を活性化した。したがって、PAQR8,9 は

LysoPS 産生酵素として、PAQR10, 11 は LPI 産生酵素として機能することが明らかとなった。

③ PAQR 分子の脂肪酸リモデリング応答と糖尿病病態への関与(青木)

リコンビナント PAQR1 (AdipoR1)と PAQR2 (AdipoR2)はともに *in vitro* で Dipalmitoyl PC に対して PLA2 活性を示した。今回新たに、PAQR5, PAQR10 に関して FLAG タグを N 末端に持つリコンビナントタンパク質として HEK293 細胞に発現させ、anti-FLAG 抗体を用いアフィニティー精製を行った。また、調整したリコンビナントタンパク質を用い、それぞれのリコンビナントの PLA2 活性の測定を実施したが、現在の調整品ではいずれも強い PLA2 活性を検出することはできなかった。現在、Expi293 細胞の回転培養系を用いリコンビナント PAQR タンパク質の大量発現、大量精製を行っている。また、各種 PAQR 欠損マウスの作製も順調に進んでおり、マウスが得られ次第、組織リン脂質レベルの分析と、糖尿病モデルにおける表現型を解析していく予定である。

④ cAMP GloSensor アッセイの高度化によるシグナル切り分け(井上)

GloSensor cAMP アッセイと Gs 欠損細胞を用いて、GPCR の G タンパク質共役を評価する実験系の構築に取り組んだ。Gs 欠損 HEK293 細胞に対して、評価対象の GPCR と Glosensor cAMP レポーターおよび Gs 骨格キメラ G タンパク質を発現させ、ルシフェリンを取り込ませた後に、濃度希釈系列をとったリガンドで刺激を行い、発光シグナル変化を計測した。評価 GPCR として、Gs 共役型、Gi 共役型、Gq 共役型、G12 共役型をそれぞれ選択して、本実験を行った。その結果、元々共役する G タンパク質由来の C 末端を有するキメラ G タンパク質を共発現した際に、最も強いシグナルが検出された。Gq 骨格キメラ G タンパク質と TGF α 切断アッセイのデータと比較したところ、C 末端キメラの指向性は有意な正の相関が見られた。このシグナルアッセイの高度化により、生体抽出物などの夾雑物存在下においても GPCR のシグナル解析を実施できる基盤が整った。

⑤ リゾリン脂質 GPCR リガンドの合成の実施(土井)

青木 G 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 受容体を標的にして青木 G 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。前年度までに合成した高活性作動薬を基に、骨格および側鎖改変体の設計・合成を行い、9 個のリガンドを合成した。評価の結果、LPA₅ 受容体に対し LPA(EC₅₀ 78 nM)より 50 倍高活性で、かつ他の受容体に対して 45 倍の選択性を示すアゴニスト、および LPA₃ 受容体に対して

LPA(EC_{50} 73 nM)より29倍高活性を示すアゴニスト、並びに LPA₄ 受容体に対して強力なアゴニスト活性を示す LPA(EC_{50} 21 nM)より9倍高活性なアゴニストを見出した。

⑥ 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、中鎖脂肪酸受容体 **GPR84** に関しては、高脂肪食長期負荷により、内因性中鎖脂肪酸が血中で過剰に上昇すること、またその時、**GPR84** 遺伝子欠損マウスにおいては、体重の増加の抑制と、高血糖・高脂血症を伴う、低インスリン血症を呈する2型糖尿病様症状を見出したが、これが部分的に、腸管からの腸管ホルモン **GLP-1** の影響であること、また、**MCT** オイル、特にカプリン酸(**C10**)における代謝機能改善効果について、その一部が **GPR84** を介した **GLP-1** 分泌の促進作用によるものであることを、**GPR84** 遺伝子欠損マウスを用いた **MCT** 食の長期負荷モデルで明らかにした(Nishida et al. 論文投稿中)。

また、長鎖脂肪酸受容体 **GPR40**、**GPR120** に関しては、老齢マウスにおいて、代謝機能変化に影響を与えうる油脂の消化・吸収能の減弱と腸管ホルモン分泌異常へ **GPR40** や **GPR120** が関与することを見出したが、その分子作用実体と予想される老化に伴い蓄積する腸内細菌由来リノール酸腸内細菌代謝産物 **HYB**・**KetoB** の経口負荷試験が、**GPR40** と **GPR120** に対してアンタゴニストとしての生理活性を有し、遺伝子欠損マウスの表現型を再現できることを確認した。

また、短鎖脂肪酸受容体 **GPR41** と **Olfir78** に関しては、それぞれの遺伝子欠損マウスを用いて、胎児期・哺乳期・成体それぞれの時系列に沿った、交感神経節における **RNAseq** 解析や交感神経細胞初代培養株を用いて検討した結果、**Olfir78** が乳児期特異的に **cAMP** 濃度の上昇を介し、交感神経細胞の成熟に影響する(**GPR41** は **MAPK** 経路活性化による初期神経幹細胞の交感神経分化)という受容体・リガンドスイッチング機構を新たに見出した。

⑦ 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)

前年度までに見出した **TriC10**(中鎖脂肪酸)、**HetoB** と **HYB**(リノール酸腸内細菌代謝物)に加え、当該年度は、昨年度報告した乳酸菌 *Leuconostoc mesenteroides* による代謝機能改善効果(Miyamoto et al. Gut Microbes 2023)について、その分子作用実体である **LmEPS**(スクロース由来乳酸菌産生難消化性多糖)の摂取が効率的に腸管内で短鎖脂肪酸の産生を促す **GPR41**、**GPR43** 作動性物質であることを見出した。また、コーヒーに含まれるポリフェノールであるフェルラ酸をもとに腸内細菌によって代謝されて産生される還元型フェルラ酸が、短鎖脂肪酸受容体の中でも **GPR43** や **Olfir78** には親和性を示さず、

GPR41 特異的に活性化する GPR41 選択的作動物質であることを見出し論文化した(Ohue-Kitano et al. Sci Rep. 2024)。

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する。

前年度までの解析結果に基づき、細胞間相互作用と多臓器連携の機序解析を進める。また課題内の研究者との連携を深める。

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、それらの肥満および糖尿病の病態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)。また、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)。さらに、これらの知見に基づいて糖尿病の発症予防と病態改善に資する脂肪組織 B リンパ球の制御法を開発する。令和4年度までの研究から、自己免疫性の炎症に関与することが知られる形質芽細胞が脂肪組織 B リンパ球の中に含まれることが明らかになった。令和5年度は、脂肪組織の形質芽細胞のキャラクタリゼーションをさらに進め、それらの産生をマウスにおいて薬理的あるいは遺伝学的に抑制する手法について検討するとともに、脂肪組織に投射する自律神経を同定する。

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。心臓における細胞間相互作用に関して、多細胞間相互作用の変容がどのように組織恒常性を変調させ、未病状態をもたらすかを明らかにすることを目的に、特にマクロファージを中心とする多細胞ネットワークの変容に着目して解析を進めた。前年度までに同定した細胞間相互作用のメディエータについて、ノックアウトマウスならびに薬剤を用いた解析を進めた。CCL3 については、心臓組織マクロファージから分泌され、線維芽細胞・血管内皮細胞の相互作用を介して線維芽細胞からの VEGF-A 等の血管新生誘導因子の

発現を誘導し、心筋内の血管新生を制御して心臓の恒常性を維持していることを見いだした。

② 造血・免疫系による多臓器ストレス応答制御(眞鍋)

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。前年までの研究で、多臓器の疾患を関連させる機序として造血-免疫系の変化が重要であることを見いだしたことから、造血-免疫系に着目した解析を行った。心臓圧負荷による心不全で、造血が誘導され、造血幹前駆細胞のエピゲノムが変動すること、このエピゲノムの変動が、マクロファージを始めとする子孫免疫細胞の機能を変調させ、組織恒常性やストレス応答を障害することを明らかにした。心不全から骨髄へのシグナルについての解析を進め、パラバイオシスモデルでは心臓ストレスを与えた個体では造血が誘導されるが、パートナーのマウスでは生じないことから、血中のメディエータではなく、自律神経が重要であると考えられる。交感神経について骨髄組織の透明化によって検討したところ、交感神経活性が顕著に抑制されることを見いだした。この交感神経の傷害は、シュワン細胞での $\text{TGF-}\beta$ 活性化を阻害する。 $\text{TGF-}\beta$ シグナルの低下が、造血幹細胞のエピゲノム変化の誘導に重要であると考えられた。

社会的敗北モデルならびに高脂肪食負荷によっても造血幹前駆細胞の変化が誘導されることも見いだした。心不全、社会的敗北モデル、高脂肪食負荷によって誘導される造血幹細胞のストレスメモリの共通性と相違についての解析を行った。これらのストレスはいずれもミエロイド系造血を誘導するが、造血幹細胞や心臓組織マクロファージのトランスクリプトームへの影響は異なっており、ストレスに応じたエピゲノム変化が導入されることが強く示唆された。また造血幹細胞から心臓組織マクロファージまで一貫して発現変化する遺伝子について、ノックアウトマウスと薬理的介入による解析を開始した。

③ 脂肪組織 B リンパ球のキャラクタリゼーション(鈴木)

B リンパ球の抗原受容体すなわち B 細胞受容体 (B cell receptor, BCR) の遺伝子配列は B リンパ球クローンに固有であるため、異なる分化段階にある B リンパ球サブセットの BCR 遺伝子配列の同一性を解析することにより、B リンパ球サブセットの分化経路を明らかにすることができる。また、BCR 遺伝子配列を元に作成した BCR の可溶性リコンビナントタンパク(抗体)を利用して、BCR が特異的に認識する抗原を同定することも可能である。そこで今年度は、肥満マウスの脂肪組織から採取した形質芽細胞を含む B リンパ球サブセットについて BCR 遺伝子配列を解析した。その結果、脂肪組織の形質芽細胞の BCR 遺伝子配列

は、脂肪組織に含まれる他の B リンパ球サブセットの BCR 遺伝子配列との共通性に乏しいことが判明した。このことから、脂肪組織の形質芽細胞の多くは、他の組織で分化し、脂肪組織に移動したものであることが示唆された。

肥満に伴って脂肪組織に出現する形質芽細胞が、脂肪組織の炎症において果たす役割を明らかにするに当たって、脂肪組織の形質芽細胞の生成を薬理的または遺伝学的に抑制する手法について検討する。課題推進者の最近の研究から、ある抗炎症性生薬の薬効成分である化合物が、炎症性疾患のマウスモデルにおいて形質芽細胞の生成を抑制することが明らかになった。そこで今年度は、この化合物を肥満マウスに投与することによって脂肪組織の形質芽細胞の生成が抑制されるか検討した。その結果、当該化合物を投与することによって、脂肪組織の形質芽細胞の数が減少することが確認された。

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)

脂肪組織 B リンパ球の自律神経による機能制御機構を明らかにするに当たって、脂肪組織に投射する自律神経を同定する。最近、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ことから(Cardoso et al. Nature 2021)、この知見を検証する形で脂肪組織に投射する自律神経を同定する。今年度は、アドレナリン作動性神経に蛍光タンパクを発現するマウスの脂肪組織を透明化した上で、ライトシート顕微鏡を用いて脂肪組織に投射するアドレナリン作動性神経を網羅的に可視化することを試みたが、十分に可視化することができなかった。今後、透明化方法を改善する、自律神経を抗体で染色するなど、可視化条件の最適化を行う。

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る。

当該年度においては、昨年度までに血管狭窄に関連する候補遺伝子として同定された *ALKBH1* 遺伝子の分子シグナルの詳細を検証するとともに、糖尿病下においてどのような影響を与えるかどうかを検証する。また、ミトコンドリアストレスに mcm5u や Q など様々な tRNA 修飾が関連することが分かってきたため、これらのシグナルの詳細を検証するとともに糖尿病下でどのような影響を与えるかを検証する。さらには、側副血行路発達をより効率よく検証できるような慢性虚血モデルの最適化を継続する。

また、糖尿病や脂質異常症を呈するモデル動物を導入し、これまでに対照群の正常動物で構築した *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。

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、まず、定常状態での哺乳動物組織の tRNA エピトランスクリプトームの役割を検討するため、マウスの 7 種類の組織より RNA を採取し、質量分析、small RNA シーケンスにより、それぞれ tRNA 修飾、tRNA 発現量を含む small non-coding RNA 解析について網羅的に解析し、リボソームプロファイリング(Ribo-seq)の手法と組み合わせることでコドン使用頻度のバイアスと tRNA エピトランスクリプトームの関連についてバイオインフォマティクス解析を行った。さらに得られた情報を基に、tRNA 修飾量に基づくコドン改変により組織特異的な蛋白質発現量の調整が可能かについてマウスを用いて検討を行った。質量分析ではハイスループットに多くの修飾を検出可能な解析技術を用いることにより、45 種類の RNA 修飾を定量可能であり、脳では tRNA のコドン認識に重要である Queuosine (tRNA-Q)修飾や mcm5U 修飾を多く認め、脾臓や肺では tRNA 以外の non-coding RNA 由来と考えられる m6,6A 修飾などを多く認めるなど、組織ごとに異なった tRNA 修飾量の分布を認めた。

一方で tRNA シーケンスでは、アンチコドンやアミノ酸ごとにみた tRNA 発現量のパターンは多くの組織で類似していた。Ribo-seq の発現解析結果から算出したコドン使用頻度を用いてコドン使用頻度と tRNA 修飾量、tRNA 発現量の関係について検討すると、コドン使用頻度のバイアスは tRNA 発現量よりも tRNA 修飾量により影響を受けている可能性が示唆された。以上の結果をもとに tRNA-Q 修飾量が少ない組織で翻訳効率が落ちるようにコドンを改変した EGFP 蛋白をマウスで発現させると、tRNA-Q 修飾が豊富であった脳では野生型と変異型で発現量が変化しなかったのに対し、tRNA-Q 修飾に乏しい肝臓では変異型 EGFP 蛋白の有意な発現量の低下を認め、tRNA 修飾に基づいた蛋白発現量の調整が可能であった。

以上から、tRNA エピトランスクリプトームに関わる複数の要素について網羅的な解析を行い、特に tRNA 修飾は哺乳動物組織における蛋白質生合成において翻訳効率とコドン最適性を調節することで、蛋白質発現量を微調整していることが分かった。tRNA 修飾は細胞の状態に応じて動的に変化することから、ストレス応答における素早い対応が可能であると

推察される。また、治療戦略として tRNA 修飾を変化させるだけでなく、tRNA エピトランスクリプトームの状態に応じてコドン最適化させた mRNA 医薬により標的組織に特異性を高めた治療を行うことも可能となると考えられた。

次に、酸化ストレス時の細胞応答における tRNA エピトランスクリプトームの役割を探索するため、哺乳動物細胞にミトコンドリア電子伝達系 (ETC) 阻害によるストレスに対する翻訳応答を RNA-seq、Ribo-seq、tRNA-seq、LC-MS/MS を用いて解析した。その結果、ミトコンドリアストレスに対して tRNA 修飾 (f5C, hm5C, Q および誘導体, mcm5U) が動的に変化し、コドンの解読、使用、最適性が変化することが明らかになった。ETC 阻害により多くの RNA 修飾は 4 時間後に低下し 8 時間後にコントロール群よりも高値となるという傾向を示した。しかし tRNA-Q 修飾は他の修飾と異なり 4 時間後から一貫して上昇していた。また、mcm5U 修飾は非 ETC 酸化ストレスにより上昇したが、mcm5s2U 修飾などの mcm5U 誘導体の多くは ETC 阻害により上昇しており、一連の酵素で誘導される修飾群の中でも異なる傾向を示していた。

さらに、mRNA 安定性に関わるモチーフ解析により、ミトコンドリアストレス下で mRNA 安定性に関わると考えられる RNA 結合蛋白の候補が同定された。そのうち 1 つは今までミトコンドリアストレスに関する観点からの報告はなく、新規のターゲットとなりうると考えられた。次に RNA-Q に着目し、合成酵素である QTRT1、QTRT2 のノックアウトを行うと、細胞増殖は変化しないがミトコンドリアの機能障害や翻訳異常、ミトコンドリア関連の代謝経路に変化を認めた。さらに血清除去や基質である Queuine 補充により tRNA-Q の修飾量を変化させると、他の tRNA 修飾にも変化が波及することが明らかになり、上記変化が複数の修飾の作用により生じている可能性が考えられた。以上から、tRNA 修飾はコドンの解読変化を促進することによってミトコンドリアストレス応答の主要な制御因子となっていることが示唆された。上記は、bioRxiv に preprint として掲載した。現在は学術誌に論文として投稿中の状態である。

以上より、f5C, hm5C, manQ, galQ, mcm5U, Q 等の tRNA 修飾が酸化ストレスやそこからつながる側副血行路発達や糖尿病の治療ターゲットとなる可能性が示唆され、次年度以降の更なる検証を予定している。

正本 G は、当初の計画通り、側副血行路の有無による神経保護効果に関して検討を進めた。機能的な解析については実験系のセットアップが遅れているが、形態的な解析では進展がみられた。成体マウスに対して虚血低酸素を施したところ、血管のリモデリングが生じる際に発芽からやや遅れて (1~4 日以内) 新生血管周囲のミクログリアの足突起による新生部位へのサポートが重要な役割を果たしていることがわかった。またミクログリアを消去した対照実験では、新生血管の接続が有意に減少した。これらの研究成果はオーストラリアで開催された Brain &

BrainPET2023 でポスター発表により報告した。

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脳サンプル供与を受けて tRNA 修飾の解析を開始したが、未だ計測中である。上記の酸化ストレス下での tRNA 修飾等の変化がみられることが想定されるが、詳細な検証は次年度に行う方針である。

正本 G は、脂質異常症を呈する肥満モデル動物を用いて脳微小循環における血管内皮障害の程度を評価した。定性的ではあるが、高脂血症により脳微小循環内での赤血球の Stall 現象が好発してみられることを確認した。一方、血液脳関門の破綻で見られるような微小循環の障害は認められなかった。次年度に引き続き糖尿病モデルマウスでの同様の評価を行っていく。

③ 糖尿病状態における脳卒中治療法および予防法の開発(正本)

正本 G は、糖尿病モデルマウスの導入が書類手続きで遅れており、まずは高脂血症による肥満モデルマウスにおいて微小循環および認知行動の評価を行った。また微小循環および内皮障害の評価法として、血管内皮細胞の表面に発現する糖鎖を生体内で染色する手法を利用し、脳微小血管の内腔における糖鎖の発現量を *vivo* で評価した。次年度は脳虚血に対する tRNA による修飾効果をこれまでに開発した生体内での計測手法を用いて評価する。

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: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 評価法を確立し、それを活用して、*ex vivo* における神経伝達物質による肝類洞内皮細胞での porosity に与える影響の解析を行う。

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、走査型電子顕微鏡を活用した類洞内皮細胞の **porosity** 評価法を用いて、高脂肪食負荷による肥満糖尿病マウスなどのモデルマウスにおいて検討を進めた。具体的には、肥満糖尿病マウスや加齢マウス、内皮細胞炎症抑制マウスにおける篩板孔の **porosity** を経時的に測定し、血中インスリン/C-ペプチド比、耐糖能などの糖代謝指標や遺伝子発現を検討したところ、高脂肪食負荷においては、経時的に類洞内皮細胞の **porosity** が縮小すること、また加齢を重ねるにつれ類洞内皮細胞の **porosity** が縮小するが、一方で、内皮細胞炎症抑制マウスでは、この加齢による類洞内皮細胞の **porosity** 縮小が抑制されることを明らかとした。

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

ex vivo での **porosity** 評価法により、肝類洞内皮 **porosity** におけるアセチルコリンの影響が観察された。そこで、当該年度は、項目1で開発した臓器選択的自律神経活性化システムを肝臓に応用し、肝に投射する交感神経・副交感神経を選択的に任意のタイミングで刺激・抑制する手法の開発を進め、チャンネルロドプシンやアーキロドプシンを用いた光遺伝学的手法や **AAV** を用いた化学遺伝学的手法を用い、肝臓に投射する自律神経を制御する手法の開発を進めた。

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、「病態モデル」における各臓器でのケトン体代謝の意義を解明することを目的とする。令和5年度は、令和4年度に引き続き、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る。また臓器局所のケトン体代謝の異常がサ

ルコペニアに及ぼす影響も検討する。これらの研究成果を通じて、ケトン体代謝に着目した健康寿命延伸に関わる疾患予測指標の探索も開始する。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も探る。

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

実験1) 腎臓局所におけるケトン体産生の生理学的意義の解明

ケトン体産生の律速酵素 **Hmgcs2** 遺伝子を腎臓、肝臓でのみ欠損する腎近位尿細管特異的 **Hmgcs2** 欠損マウス、肝特異的 **Hmgcs2** 欠損マウスを作製し、肝臓、腎臓におけるケトン体産生の役割を検討した。結果、肝臓のケトン体産生は絶食時の血中ケトン体上昇に不可欠であること、腎臓のケトン体産生は絶食時の腎臓局所のケトン体濃度の維持に関与すること、その絶食時の腎ケトン体濃度の上昇は、絶食中のナトリウム再吸収を介した尿濃縮に不可欠であること、そして、その障害はナトリウム喪失とその代償として筋肉分解による尿素を介した尿濃縮機構の活性化を招き、絶食時また高齢マウスのサルコペニアをもたらすことを明らかとした。以上の結果より、肝臓ならびに腎臓局所のケトン体産生の生理的役割が解明されるとともに、その破綻がサルコペニアの発症に寄与することが示された。

実験2) 膵β細胞におけるケトン体利用の意義の解明

ケトン体利用の律速酵素 **Scot** 遺伝子を膵β細胞でのみ欠損する膵β細胞特異的 **Scot** 欠損マウスを作製し、絶食、非絶食、糖尿病状態での耐糖能を評価した。現在、膵β細胞特異的 **Scot** 欠損マウスでの有意な表現系は得られておらず、引き続き検討中である。

実験3) インスリン過剰による低血糖に伴う動脈硬化悪化におけるケトン体の意義の解明

マウス動脈硬化モデル(**ApoE** 欠損マウス)において、週1回の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確認された。また、ケトン体前駆物質である **1,3BD** 投与によりその悪化は有意に抑制されることを明らかとしている。その **1,3BD** 投与の効果における血管内皮と平滑筋細胞での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** マウスと血管平滑筋特異的 **Scot/ApoE-DKO** マウスを作製した。現在、これらのマウスに対し低血糖を誘発するとともに **1,3BD** を投与し、ケトン体

による動脈硬化予防効果のメカニズムの検討を継続している。

実験4) 小腸上皮細胞におけるケトン体産生の意義の解明

小腸特異的 **Hmgcs2** 欠損マウスを作製し、その表現系解析を実施した。各種栄養素の吸収、インクレチン分泌に及ぼす小腸ケトン体代謝の役割を検討し、中性脂肪吸収制御、インクレチン分泌制御に関わる可能性を示す結果を得ている。

本年度の当初の予定になかった実験

実験5) ポドサイトにおけるケトン体産生の糖尿病性腎症発症における役割の解明

ポドサイト特異的 **Hmgcs2** 発現亢進マウスを作製し、対照群とともにストレプトゾトシン誘発糖尿病モデルとした。結果、糖尿病で増加するアルブミン尿がポドサイト特異的 **Hmgcs2** 発現亢進マウスでは減少することが確認された。現在、その分子機序の解明を進めている。

実験6) 褐色脂肪細胞、骨格筋におけるケトン体代謝の生理的意義と病態形成における役割の解明

次年度以降の解析として、褐色脂肪細胞と骨格筋におけるケトン体代謝の意義の解明を検討しており、両組織における組織特異的 **Scot** 欠損マウスを作製した。

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

当初、①-実験1)の尿メタボローム解析を予定していたが、本年度は腎近位尿細管特異的 **Hmgcs2** 欠損マウスにおいて、腎局所のケトン体代謝変容が生じているかを確認するため、まず腎局所でのメタボローム解析を実施した。結果、絶食時に腎局所のケトン体(**BHB**、**AcAc**)が上昇すること、腎近位尿細管特異的 **Hmgcs2** 欠損マウスではその上昇が有意に抑制され、さらには、ケトン体代謝以外の多くの代謝変容が副次的に生じることを確認した。特に腎内アデノシン濃度に変化があり、病態との関連指標となる可能性を考えている。今後、尿中メタボローム解析を追加し、この腎臓内のケトン体代謝変容に関連した尿中指標を探索し、アデノシン代謝を含め、腎障害やサルコペニアの発症予測指標の同定に繋げる。

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る。

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る。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する。また、全細胞アトラスを用いて、特に中枢神経系において活動が変化する領域を見出す。

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 疾患モデルマウスの多臓器全細胞解析(松本)

STZ を投与して作製した 2 型糖尿病モデルマウスの脳の全神経細胞の活動を定量化するため、Anti-c-Fos 抗体で全脳の免疫染色を行った。免疫染色には CUBIC-HV2 試薬を用いて実施した。免疫染色したマウス全脳に CUBIC 試薬を用いて透明化を行い、アガロースゲルに包埋して本プロジェクトで作成したライトシート顕微鏡をもちいて全脳の c-Fos 陽性細胞を撮影した。その結果、STZ 投与群(N=3)の脳で特徴的に強く c-Fos 陽性細胞数の多い領域がいくつか確認された。現在、これらを正確かつ高感度に解析するための c-Fos 陽性細胞の高精度な検出アルゴリズムの作製と全脳解析手法を開発中である。

また、STZ 投与マウスの多臓器の解析を開始した。腎臓、膵臓の細胞核(SYTOX-Green)、血管(alpha-SMA)、TH 陽性細胞の染色を実施した。3D で臓器全体の血管、TH 陽性神経細胞を可視化することができた。現在、これらの定量解析とともに他の臓器の染色、解析とともに、他の神経細胞種(NF200,ChAT など)の染色条件の検討も実施中である。さらに、高脂肪食を与えたマウスの脳の神経活動および多臓器の解析も開始している。肝臓は重度の脂肪肝のため、従来の CUBIC 透明化技術では透明化することができなかったが、他の臓器は通常のマウスと同様に染色、透明化が可能であることを確認した。

② 糖尿病由来の睡眠覚醒リズム異常の特徴を解析(山田)

前年度までに、Streptozotocin(STZ)を用いた 1 型糖尿病の誘導、および高脂肪飼料を用いた 2 型糖尿病の誘導を行いながら、呼吸波計測による睡眠表現型を計測した。本年度は、これらの計測データを解析し、糖尿病状態もしくはその前段階である未病状態において睡眠覚醒リズムに特徴的な睡眠表現型がみられるかどうかを検証した。また、昨年度に引き続いて、高血糖に伴う睡眠表現型変化をより安定して誘導するための条件検討を行った。

この結果、高脂肪食を4～6週間与えて飼育したマウス群の睡眠時間は増加し、その後、通常食に戻して飼育すると、睡眠時間が通常食群レベルに一過的に

減少するものの1～2週間経過すると再び高脂肪食群の睡眠時間に近づく、睡眠時間が記憶される現象、が確認された。また、睡眠表現型の一つとして環境変化への応答性を定量した。具体的には、飼育ケージを新しくした際の睡眠減少に着目し、高脂肪食群のマウスではケージ交換後の睡眠減少応答が低減する傾向を確認した。この傾向には、高脂肪食群の睡眠量増加が顕著になった後もしくは直前で有意差がみられた。さらに、高脂肪食群のマウスでは、睡眠量の増加が顕著になる以前から、覚醒→睡眠の切り替え頻度(Pws)と睡眠→覚醒の切り替え頻度(Psw)の両方の指標がわずかに上昇傾向にあり、睡眠が断片化していることが見いだされた。

③ 糖尿病由来の睡眠覚醒リズム異常の分子メカニズムの解明(山田)

我々の研究室では最近、Calcium/Calmodulin Dependent Protein Kinase II (CaMKII)遺伝子のリン酸化による活性化が睡眠時間の延長に寄与することを見出している。また CaMKII 遺伝子は 1 型・2 型ともに糖尿病由来のストレスによって活性化されることが知られている。また、CaMKII 遺伝子は記憶学習に関わる可塑性にも重要な遺伝子である。一方で、高脂肪食を与えたマウスに睡眠時間の長期記憶が見られたことから、高脂肪食によって中枢神経系の報酬経路が変質している可能性も示唆される。この可能性をより追及するために、セロトニンレセプターのノックアウトマウスを包括的に解析する試みを開始した。STZ もしくは高脂肪食の影響による睡眠表現型に関与する候補遺伝子の検証を進め、脳領域の同定のための透明化組織サンプリングを進めた。

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、本年度は①糖尿病や併発疾患に向けた非侵襲生体情報取得デバイスの少なくとも1つのプロトタイプを作出する。また②糖尿病や併発疾患に向け開発した非侵襲生体情報取得デバイスによるヒトからのデータ取得を開始する。

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

本年度は、非接触デバイスの開発に向けた検出・評価系の構築及びヒトでの予備検討を

行った。糖尿病を未病の段階で検出するためには、そのリスク因子も同時に検討する必要があると考え、**R4** 年度に初期の高血圧(収縮期血圧 **130mmHg** 以上)を検出するアルゴリズムを作成し、知財申請を行った(3つめのプロトタイプ構築)。これに続いて、本年度は、早期の高血圧の検出を行いながら、糖尿病を検出するアルゴリズムを検討し、知財申請を行った(3つめのプロトタイプの構築)。以上から1つのアルゴリズムの最終版の完成と3つのプロトタイプを構築しえた。

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

高血圧、糖尿病の早期検出においては、東京大学医学部附属病院および同院健康管理センターにおいて患者および健常人から前倒しでデータ取得を開始している。**R6**年3月の段階で約220名のデータ取得が出来ており、糖尿病の早期検出の効果と判定精度の向上を検討している。

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を整備する。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する。

当該年度は **UK** バイオバンクやその他大規模データのネットワーク解析を実施するとともに、既存の大規模発現ネットワークとの情報の統合を行う。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る。また、神経系の寄与や糖尿病関連形質に寄与する神経系についても、併発ネットワークから新たな知見を得る。

また、統計的機械学習手法についても、**UK** バイオバンクのデータを用いて糖尿病のリスク予測精度向上を目指す。さらに、**HbA1c** の **DNB** 利用についても、**GWAS** の結果に統計的機械学習手法を適用し、リスク予測の精度を確認する。

本課題は、課題推進者、田宮元が推進している。

① 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

本年度は併発ネットワークの知見整理を進めていくにあたり、「1)糖尿病遺伝子ネットワークのコミュニティを形成する可能性のある疾患パスウェイと各臨床サブ

クラスとの関連性の評価」、「2) 各サブクラスを規定するパスウェイのエンリッチメントを考慮した疾患リスク予測」を行った。なお、上記二つの解析を実施するにあたり、これまでインスリン抵抗性および分泌能の指標 (HOMA-IR, HOMA- β) が欠測していると糖尿病臨床的サブクラスに分類することが不可能であったが、我々は当該指標の変数が欠損していたとしてもその分類を高精度に行うための機械学習手法の開発に成功した。開発した手法を TMM で収集されたコホートの糖尿病検体に適用しサブクラスへのラベル付けが実現している。

- 1) については遺伝子ネットワークのコミュニティ形成に関与する可能性のある 5 種類の疾患パスウェイと 5 つの糖尿病臨床的サブクラスとの関連性が明らかとなり、病態に応じた遺伝子ネットワークの仮説を取得した。各パスウェイの遺伝的クラスターの情報は、コンソーシアムで公開している大規模な糖尿病関連形質 GWAS 要約統計量に機械学習手法を適用することで発見された、信頼性の高いものである。
- 2) については、本邦で有病率が低く、解析に耐えられるほどのサンプルサイズを確保することが困難な糖尿病サブクラスにおいて高精度なリスク予測を実現可能なものとした。当該クラスターは合併症発生率の高い重症クラスターであり、予防的介入の観点からも本研究の成果は大変意義のあるものである。

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。糖負荷試験データをもとに糖尿病型ではないと判定された住民のその後の糖尿病の発症や生命予後、さらには脳卒中やがんの発症・死亡との関連を解析することで、どのようなヒトが糖尿病を発症するか、さらには、糖代謝関連指標における寿命との関連を検討することができる。大迫コホートは、30 年の検査データの蓄積があり、これらについての解析を進め、糖尿病超早期段階にある者の予後を予測する。特に、糖負荷試験で正常型でありながら、負荷後高血糖となる者を、採血をせずに見出す手法の開発を進める。そのため、 $^{13}\text{C}\text{O}_2$ 呼気試験による糖処理と糖酸化の関連を検討し、コホートの予後に及ぼす影響との関係を推定する。当該年度においては、大迫コホートのデータを活用し、寿命と最も関連する因子を見出し、その死因についての検討を進める。さらに、正常耐糖能を示す者のうち、将来糖尿病へと進展する集団を抽出し、新たな進展予測パラメータの検討や、数理モデルを活用したシミュレーターによるメカニズム推定へとつなげる基盤とする。また、前年度までに開発した ^{13}C グルコース摂取後の

$^{13}\text{CO}_2$ 呼気試験の手法を 75g ^{13}C -グルコース負荷におけるデータの蓄積につなげ、大迫コホートで得られた寿命関連結果との照合を進める。

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(片桐、澤田)

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検討を進めたところ、前年度までに正常耐糖能者において、糖負荷試験負荷後 1 時間血糖値と余命の間に関連があることが明らかとなった。そこで、当該年度においては、糖負荷試験負荷後 1 時間血糖値と関連する死因について検討を進め、その死因として、心血管死および悪性新生物死が有意に相関していることを示す結果を得た。特にその hazard ratio は 3 前後と極めて強い相関を示し、糖負荷試験負荷後 1 時間血糖値の上昇という糖代謝の変化と動脈硬化や悪性腫瘍との共通の発症基盤が存在することが示唆された。

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(片桐、澤田)

正常耐糖能を示した中で、どのような集団が将来糖尿病へと進展するのかを検討する。前年度までに、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た。そこで、当該年度は、これらの結果をもとに、正常耐糖能を示した中で、その後、糖尿病に進展したコホート参加者を抽出し、次年度以降における、新たな進展予測パラメータの検討や、数理モデルを活用したシミュレーターによるメカニズム推定へとつなげる基盤を構築した。

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(片桐、澤田)

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、 ^{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評価した。呼気試験の実施条件を決めるための予備実験を行い、75 g/150 mL の非標識ブドウ糖液に ^{13}C 標識ブドウ糖を 0.5 g 溶解したものを負荷試験で使用する飲料と定めた。これを 4 分間で飲用し、内服前(0 分)、内服後 15, 30,

45, 60, 75, 90, 105, 120, 150, 180 分に採血を行い、血糖値、インスリン値、C-ペプチド値を測定することとした。予備実験では健常者の血糖値のピークは約 30 分後に現れ、血中のインスリンと C-ペプチドは約 45 分後にピークとなった。呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ は 150 分後にピークとなった。以上より、採血と呼気収集の採取時間を上記のように決定した。これらの予備実験を踏まえ、多数例の健常ボランティアに実施するための研究計画書の作成を行い、認定特定臨床研究審査委員会への申請準備を行った。当該年度においては、これまでの糖負荷試験の際の呼気中に排出される $^{13}\text{CO}_2$ のデータを項目 4 での数理モデルにおける解析に応用するデータ基盤を作成するとともに、大迫コホートにおける糖負荷試験データと照合した。

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を構築する。全身の循環系ネットワークモデルにおいて、上流から下流に向かっの流量や圧力等の情報伝達を受け渡す仕組みに加えて、下流から上流への情報伝達を適切に考慮するモデルの整備を進める。また、この循環系ネットワークモデルと代謝系モデルの統合を進め、測定データと数理モデルを適切に同化させる解析システムの構築を進める。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発展させると共に、9コンパートメントモデルを用いて、血糖値ダイナミクスの詳細な検討を医学・生物学の研究者と行い、糖尿病発症に関連するパラメータ候補を選定する。さらに、その手法を **SAP (Sensor Augmented Pump)** 療法におけるパラメータ推定に適用する検討も進める。また、令和5年度から新たに、状態遷移数理モデルの構築と解析を開始する。これは、循環系、代謝系、神経系の数理モデルを密に結合させること、及びそれを縮約することで、健康状態から未病状態への遷移を表現することにつながるものである。

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推進している。

① 臓器間ネットワーク数理モデルの構築と解析の実施（水藤、長山、千葉）

1) 1次元及び0次元モデルの評価（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

を適切に積分して1次元モデルとすること、及びそれをさらに簡略化し、電気回路を模して表現した0次元モデルとすることが必要となる。R4年度はこれらを組み合わせて全身の循環系1次元+0次元モデルを構築し、逐次的な計算から並列計算をした上で各部位の接合条件を最適化する手法に移行した。令和5年度は令和4年度までに構築したシステムの評価のため、他の医学・生物系研究者から提供された脳動脈系における測定結果と比較するための作業を行った。これにより、糖尿病併発疾患の解析を通して本循環系モデルの信頼性評価とその改善につなげるものである。さらに、全身の循環動態に対する表現能力の評価を行う可能性を検討した。これは安静時と運動時の血流動態を比較することで、心臓からの拍出と各血管系部分のインピーダンス等の変化によって実現される各臓器への血流配分の変化を再現するものである。

2) 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(水藤)

令和4年度は、本循環系モデルを代謝系モデルと結合するために、各血管セグメント・臓器における変動の時間遅れを算出する手法を構築した。しかし検討の結果、拍動を伴う血流では血管のインダクタンスやキャパシタンスが影響するため、単純な計算では現実から乖離する状況も見えてきていた。令和5年度はこれらの知見に基づき、生体内の循環動態を正しく反映し、インスリンと血糖値の挙動解析に正当に貢献できるような循環モデルへの改善を行った。具体的には、1)で述べた安静時と運動時の血流動態比較を通して各部位に与える生理的パラメータを検討し、より妥当な設定ができるよう、改善を行った。

3) 血糖値—インスリンモデルの検討(水藤)

令和4年度は特にSAP療法への適用を意識し、グルコースの取り込みやインスリンの分泌を表現する比較的単純な数理モデルを構築してきた。R5年度はこれに基づき、特に夜間の血糖値変動に的を絞り、患者ごとに異なる循環・代謝パラメータの同定と適切なコントロールアルゴリズムの構築に進んだ。具体的には、これまでの決定論的モデルから、確率論的モデルに移行し、生体パラメータの時間変動や、機器の測定誤差に由来する変動を考慮することで、より妥当な生体パラメータ同定と血糖値変動の再現を実現することができた。

4) 9コンパートメントモデルの応用(長山)

血糖値の動的恒常性維持メカニズムを理解するための数理モデル構築を開始した。前年度構築した経口糖負荷試験モデルをベースにして、消化モデル、糖吸収モデル等を詳細に記述することで24時間周期の血糖値ダイナミクスモデルの構築を行った。食事に対する消化モデルのパラメータは

食種によって大きく変化することから、簡略化した糖摂取モデルを検討している。さらに、腸内細菌叢ダイナミクスを考慮した9コンパートメントモデルの構築も開始した。細菌叢ダイナミクスのパラメータを小腸での糖吸収パラメータにどのように反映させるかが課題となっており、次年度も引き続き検討していく。

9コンパートメントモデルを応用して IVGTT 結果を用いたパラメータ推定を行い、3時間絶食後と12時間絶食後の各臓器での糖取り込みの結果を推測した。その結果、実験結果と定性的に同じ結果を得ることができた。この結果は構築した9コンパートメントモデルがヒト糖代謝シミュレーターとして機能することを示唆している。

前年度完成させた9コンパートメントモデルを用いて、糖負荷試験時の血糖値ダイナミクスの詳細な解析を医学・生物学の研究者と行い、週齢別、食種別マウスの OGTT 結果に対するパラメータ推定方法およびクラスタリング手法、重要因子推定法を確立した。クラスタリングは各臓器における糖取込量とインスリン取込量、腎臓での C-ペプチド排出量、インスリン感受性をパラメータとすることが有効であることがわかった。また、得られた重要因子に対して数理モデルのパラメータを評価することから、原因因子を推定することが可能であることがわかった。今後は健常マウス→糖尿病マウスへと遷移する同一個体マウスデータを9コンパートメントモデルに適用することで、糖尿病特異的に変化するパラメータを同定し、マウスにおける糖尿病発症のメカニズムを数理科学的に明らかにする。

5) 膵臓、肝臓と血糖値のネットワークの数理モデル(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。

② 未病解析データに対する数理モデルの構築とその解析の実施(長山)

研究開発項目5で得られる未病解析データを用いた数理モデリングに取りかかった。研究開発項目4内の他の課題推進者、医学・生物学の研究者と共同して、腸内細菌叢に注目した数理モデリングに取りかかっている。現時点では、腸内細菌叢を共生系と競争系の混合モデルとして表現している。注目する菌種数に応じて変数が変化するモデル(摂食によって絶えず移入する種の侵入過程と共生・競争系個体群ダイナミクスモデルのハイブリッド)となっており、データ解析から健康から病気へと遷移するパラメータ変化を捉えるために、もっと簡略化した数理モデルを検討する。

③ 状態遷移数理モデルの構築と解析(水藤、長山、千葉)

1) 循環系、代謝系、神経系の数理モデルの結合(水藤、長山、千葉)

研究開発項目 4 内の他の課題推進者と協力し、循環系、代謝系、神経系の数理モデルの結合と、その適切な縮約方法についての検討をおこない、状態遷移数理モデルを提示するための検討を開始した。今年度は循環系モデルの解析から得られた血流データを、9コンパートメントモデルの体循環モデルに時間遅れ項として導入することができた。これによって血液循環モデルと代謝モデルの結合が完了した。今後、縮約されたモデル中に含まれる各種パラメータについては、医学・生物学の研究者の実験データを用いて同定していく予定であり、今後も彼らと綿密な議論を継続する。

また、令和 5 年度は神経系モデルの構築に着手した。神経系における電気信号の伝搬を適切に表現するモデルを実装し、その上での様々な挙動が正しく表現されるかどうかを確認することで、循環系モデルとの結合に対する準備作業とした。

2) 循環系臓器間ネットワークモデルの縮約(水藤)

1 次元+0 次元全身循環系ネットワークモデルは、循環動態を表現するための **minimal model** として、100 以上の血管セグメントと数 10 の臓器コンパートメントからなる複雑な構造となっている。このモデルを健康と未病の状態遷移数理モデルに用いるためには、大幅なモデル縮約が必要である。令和 5 年度から開始した本項目では、循環動態の本質を失わずに縮約を行う手法について検討を開始した。具体的にはこれは複数の 1 次元モデルからなら部位をまとめて 0 次元モデルとし、その挙動を元の 1 次元モデルの集合体と比較することで、その正当性を評価する作業を開始した。

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・糞便などを回収し、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。また、ヒトでの検討については、コホート関連は片桐が、肥満患者に関する解析については、新たに課題推進者として加わった長谷川豊が担当する。さらに、これらから得られる高容量データについては、新たに高山順が課題推進者として加わり、それぞれのサンプル解析の担当者と連携して、バイオインフォマティクスを活用した解析を進める。さらに、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するとともに、中岡慎治を初め合原プロジェクトの研究者との協議を継続する。

本課題は、6人の課題推進者(片桐秀樹、山田哲也、青木淳賢、木村郁夫、長谷川豊、高山順)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継続した。マウスに高脂肪食を負荷した際の糖代謝変化について、経時的に糖負荷試験を実施し、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を収集した。さらに、雌雄、老若での比較検討も並行して推進した。

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。当該年度は、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継続した。回復可能期、不能期の特定に向け、これらのマウスを作製し、基礎データの収集を継続した。

③ 高脂肪食負荷による加齢と性差に関する時系列の代謝解析(片桐)

①で記載した高脂肪食負荷による解析を、若年オスマウスのみならず、若年メス、壮年オス、壮年メスのマウスを用いて、経時的に、詳細な解析につなげるべくデ

ータを蓄積した。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を含む血液生化学データ等を収集した。

④ 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)

前年度に継続して、①③で確立したマウスモデルを用い、高脂肪食負荷の期間について経時的に、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・筋の遺伝子発現を解析した。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を進めた。

⑤ 正常・未病・糖尿病状態における肝の電子顕微鏡解析(片桐)

前年度に継続して、①③で確立したマウスモデルを用い、高脂肪食負荷の期間について経時的に、門脈域・肝静脈域の zonation を考慮した肝内の画像解析を進め、画像データを蓄積した。

⑥ 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)

①③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ている。当該年度は、前年度までに確立した個体間の比較検討法を用い、脳の透明化を進め、各病期で活性化している脳部位のデータを蓄積した。

⑦ 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、将来、正常耐糖能を維持する者、耐糖能異常や糖尿病へと進展する者の正常耐糖能を示していた時点での血液サンプルを用い、miRNA、プロテオーム、メタボロームの解析を推進する。当該年度は、目的に合致する 20 人ずつのサンプルを抽出し、パイロット的に miRNA、プロテオーム、メタボロームの検討を進めた。結果として、長期保存されていたサンプルであっても、それぞれ検出可能であることが示された。

⑧ 高脂肪食負荷による副腎の遺伝子発現の変化(1 細胞レベル)(山田)

将来のヒト副腎での解析を見据えて、糖尿病の発症に深い関係を有する副腎疾患について、ヒト患者副腎検体を対象として我々の知る限り初めてシングル核解析を実施し、論文発表した (Hypertension. 2024 Feb;81(2):361-371.)。これにより、これまで知られていなかった病態が明らかとなり、マウス副腎でのシングル核解析の結果と照らし合わせることで、より詳細な糖尿病発症の分子メカニズムの解明に寄与するものと考えられた。

⑨ 褐色脂肪組織の機能的な雌雄差の分子メカニズムの解明 (山田)

褐色脂肪組織 (BAT) は熱産生によりエネルギー消費を亢進する独自の機能を有した脂肪組織であり、その機能に雌雄差が存在することがヒトにおいても示されているが、その詳細なメカニズムは不明であった。そこでマウス BAT を対象に検討したところ、機能的、組織学的な雌雄差が存在し、さらに雌性マウス BAT の Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α (PGC-1 α) 遺伝子発現が雄性に比して高いことを見出した。そこで、後天的脂肪細胞特異的 Pgc1a ノックアウトマウス (KO) を作製し、BAT の雌雄差に及ぼす影響を雌雄の野生型マウス (WT)、KO で比較検討した。WT では、ノルエピネフリン投与後の酸素消費量や寒冷環境下での直腸温について雌性が雄性に比べ高値を示したが、KO では雌性のみ低下した。加えて、WT では雌性が雄性に比べ BAT ミトコンドリアの総クリステ長が有意に長かったが、雌性 KO でのみ短縮し、その性差が消失した。BAT の遺伝子発現の網羅的解析では、雌性 KO で新規脂肪合成関連遺伝子群の発現が低下した。また、メタボローム解析で TCA 回路の代謝産物が、リピドーム解析でミトコンドリア呼吸能に重要な成熟カルジオリピンの比率が雌性 KO でのみ低下した。さらに、新規脂肪合成関連遺伝子群の発現を制御する転写因子 Carbohydrate responsive element-binding protein β (Chrebp β) の BAT 特異的ノックダウン実験を雌性 WT に行ったところ、雌性 KO と同様の表現型が再現された。一方、雌雄 WT にエストロゲン受容体拮抗薬を投与すると、PGC-1 α 遺伝子発現の有意な低下は認めなかったが、ノルエピネフリン投与後の酸素消費量の低下、ミトコンドリアクリステの短縮、新規脂肪合成関連遺伝子群の発現低下などが、KO 同様に雌性のみで認められた。さらに雌雄それぞれのコントロールおよび KO マウスの BAT について *ex vivo* でエストロゲン投与実験を行ったところ、雌性のみで新規脂肪合成関連遺伝子群の発現が上昇し、その上昇は雌性 KO マウスから採取した BAT では認められなかった。

以上より、雌性 BAT で高発現する PGC-1 α は、エストロゲンシグナルと協調関連し個体レベルのエネルギー代謝を制御していることが明らかとなった。また、そのメカニズムとして BAT の PGC-1 α が、雌性に選択的なエピジェネ

ディックなメカニズムにより Chrebp β を介した新規脂肪合成を誘導することで雌性 BAT のクリステリッチなミトコンドリアの形成に寄与し、ひいては雌性ミトコンドリアの高い TCA 回路活性と熱産生機能を司っていることが判明した。

⑩ 糖尿病モデルマウス血漿および臓器に対するリポドミクス・メタボロミクスデータベースの構築と分析(青木)

これまでに青木 G が開発した LC-MS/MS システムによるリン脂質一斉定量系を用いて、片桐 G から提供を受けた高脂肪食負荷マウスの血液および肝臓を含む各種臓器に対するリポドミクス解析を実施した。その結果、高脂肪食群のほとんどの検体において、アラキドン酸(20:4)含有型のリン脂質の上昇を認めた。また、脂肪酸を1つだけ有するリゾリン脂質においては、特に血液検体において、パルミチン酸(16:0)結合型が低下する一方で、ステアリン酸(18:0)結合型が増加するという脂肪酸組成バランスの変動が生じていた。これらの LC-MS データはデータベース化した上で、GAKUNIN にアップロードした。一方、青木 G が独自に作製した高脂肪食負荷マウスにおいては、やはり同様にアラキドン酸含有型リン脂質が上昇するとともに、リノール酸含有型も顕著な増加が認められた。しかし、このマウスのリゾリン脂質では 16:0/18:0 バランスの変動は小さく、むしろオレイン酸(18:1)型の上昇を認めた。このモデルによる脂質変動の違いは、モデル作製に用いる高脂肪食の違いに起因する可能性が想定された。次年度以降は、より様々な肥満・糖尿病モデルのリポドミクスデータの取得とそのデータベース化に取り組んでいく予定である。

⑪ 糖尿病モデルマウス肝臓・腎臓の質量分析イメージングデータベースの構築と分析(青木)

当該年度は糖尿病モデルマウス由来の病理切片の完成が遅れたため、まずは野生型の健常マウスの肝臓を用いてリン脂質および代謝物(ATP をはじめとする解糖系の中間・最終産物)の MALDI-MS imaging データの取得を進めた。解糖系の代謝物に関しては、切片の前処理条件(有機溶媒による洗浄)と、マトリクス 9-AA の塗布条件を見直すことで、高感度化を実現した。この条件下において、空間分解能 $10\mu\text{m}$ でデータ取得することによって肝臓の zonation を区別しながら標的分子の MS imaging 像を取得することに成功した。さらに、片桐 G との共同研究の一環で、肝臓に加えてマウス腎臓において、絶食条件下や KPCK1 の欠損条件下における MS imaging データの取得も行なった。今後は、肥満モデルを中心とした糖尿病モデルマウス由来の検体の MS imaging データの取得とデータベース化を急ぎ実施していく予定である。

⑫ ヒト血漿に対するリポドミクス・メタボロミクス解析の実施(青木)

東京大学医学部附属病院検査部蔵野先生との共同研究で、2型糖尿病患者の血液(血清)検体のリポドミクス解析を実施した。その結果、既存の報告と一致して、リン脂質の中でもスフィンゴ脂質(セラミド、スフィンゴシン、スフィンゴシン1リン酸)の変動が有意に認められ、さらにこの変動が特定のリポタンパク質画分で認められる可能性が示唆された。上述のマウスモデルで実施したリポドミクス分析では、これらスフィンゴ脂質の一部の測定が含まれていなかったため、今後は、スフィンゴ脂質の網羅的な分析系も追加し、マウスレベルでの検証も行なっていく。

また、岩手医科大学長谷川先生・梅邑先生らからの提供によって、肥満外科手術を受けた患者の術前・術後の血液(血清)検体のリポドミクス解析を実施した。この解析では、患者のうち一定の割合で、術後血中でホスファチジルセリン(PS)のレベルが劇的に上昇することを見出した。この PS の上昇は特定の PS 分子種に限らず、ほぼ全ての PS 分子種で認められた。リゾリン脂質では、生理活性脂質であるリゾホスファチジン酸(LPA)のレベルが術後に低下することが明らかとなった。今後、検体数を増やしてさらに解析を進め、これらの変動の確からしさを検証するとともに、LPA 産生酵素 ATX に関しても解析を行う予定である。また、これらのデータについてもデータベース化を順次進めていく。

⑬ 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、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った。中岡グループとの協力体制のもと、肥満者と健常者の腸内細菌叢菌叢解析の結果、健常者において有意に占有率の高い共生細菌種である Ss 菌を新たに見出した。さらにこの Ss 菌は菌体外多糖(EPS)の高産生能を有しており、宿主腸管内において、宿主がスクロースを摂取した時に、スクロースを小腸内で EPS に変換することで、小腸での糖吸収を阻害すること、さらに変換された EPS は難消化性糖であるため、大腸まで移行し、そこで特定の腸内細菌によって短鎖脂肪酸産生に寄与する結果、宿主の肥満に対する抵抗性を与えることをマウス実験により明らかにした。また同時に、この EPS や短鎖脂肪酸の変化は健常者と肥満者における Ss 菌の占有率の変化と相関性のあることも明らかにした(Shimizu et al. 論文投稿中)。

⑭ ヒト肥満者サンプルを用いた代謝変動に寄与する因子検索(長谷川)

岩手医科大学において減量・代謝改善手術を施行した高度肥満者からのサンプルを活用

し、青木淳賢課題推進者と連携して、手術前後の血液サンプル、肝臓生検サンプルのメタボローム解析に着手した。代謝変動に寄与する因子として、顕著な変動を示したリン脂質を同定することができた。

減量・代謝改善手術を施行した患者から摘出したヒト内臓脂肪組織サンプルより **RNA 抽出・cDNA 合成** を行った。比較する非肥満の対象サンプルとして、糖代謝異常のない胃癌患者から摘出した同部位の脂肪組織を利用した。

⑮ 脂肪細胞の熱産生を促進する化合物の探索(長谷川)

脱共役蛋白質1 (Uncoupling protein 1) は、脂肪細胞における熱産生に深く関与するタンパク質である。Ucp1 遺伝子の Exon 領域に、ルシフェラーゼを組み入れたマウスを作製し、このマウスから樹立した培養脂肪細胞株を利用して、UCP1の活性を上昇させる低分子化合物のスクリーニングを進めた。4800 種の化合物ライブラリと GPCR に特化した化合物ライブラリ(300 種)を利用し、4種類の化合物を同定できた。そのうちの1つの化合物について、安全性と効果を詳細に検証し、動物実験にて抗肥満効果が発揮されることを明らかにでき、論文報告 (Obesity 2024, doi: 10.1002/oby.23948.)した。さらに、所属機関の岩手医科大学を通じて特許申請(発明名称:「脂肪細胞の熱産生を亢進させる肥満・メタボリックシンドロームの治療薬および予防薬」)を行った。

これらの同定した化合物は、脂肪細胞での熱産生を亢進させる作用が発揮されるため、ヒトにおいては基礎代謝が亢進し、食欲を抑制させることなく肥満を抑制できると考えられる。肥満を是正ならびに未病のうちに糖尿病を改善する画期的な治療戦略につながる事が期待される。

⑯ 糖尿病未病データセットの構築とその解明・介入点探索(高山)

糖尿病未病データセットの構築のため、ローカルのサーバにおいてデータ収集と解析を行う環境を整備した。この環境を用いて、マウスの種々の組織、実験条件での一細胞 RNA シークエンシング結果をプロジェクト内のグループから提供を受け、実験の生データである Fastq ファイルまたは遺伝子発現量を定量したカウントデータファイルから情報解析を行った。このローカル解析環境では、実験データと解析結果だけでなく中間ファイルや解析スクリプトも蓄積しており、研究の再現性と今後の実験データの拡充に対応できるように整備を行なっている。さらに令和5年度より運用とデータ収集が開始された NII GakuNin RDM にもこれらのデータをアップロードしており、プロジェクト内で共有された糖尿病未病データセットの構築を進めている。

⑰ 一細胞シーケンシングの情報解析(高山)

データ解析のための環境は糖尿病未病データセット構築と合わせて、ローカルのサーバ

において整備した。令和5年度は東北大学片桐グループおよび東京医科歯科大学山田グループよりマウスの膵臓β細胞、脂肪細胞、神経節細胞等における一細胞 RNA シークエンシングデータの提供を受け、情報解析を行った。Fastq ファイルからの遺伝子発現量カウントデータの作成、品質管理、データの標準化と統合を行ったのちに細胞をクラスタリングし、既知のマーカー遺伝子の情報をもとに細胞クラスターを同定した。このデータを用いて、食餌や温度条件、遺伝子導入などによる差異発現遺伝子の同定と遺伝子セットのエンリッチメント解析、細胞のトラジェクトリ解析を行い、糖尿病の発症や組織の変化につながると考えられる遺伝子発現変化を抽出した。これらの解析は Seurat v5 パッケージやその他のツールを用いて行っており、解析の R スクリプトと各段階での実行結果と合わせてデータとして保存している。これにより、情報解析の再現性を担保するとともに、プロジェクト内で新しい組織の一細胞シークエンシングデータを取得したときに共通となる解析を加速することが可能である。このように一細胞シークエンシングの情報解析を行う基盤を構築し、実際に複数の組織の遺伝子発現定量と下流の解析に適用することで、糖尿病による組織の変化の解釈と介入点の探索に必要なデータを作成した。

⑱ 未病から2型糖尿病への遷移に関する数理モデル解析(高山)

プロジェクト内の数理モデル研究者とのミーティング、およびプロジェクト全体のミーティングにおける議論で、本グループで行う各種組織の一細胞シークエンシング解析からどのようなパラメータが臓器間ネットワークの数理モデル解析に応用できるかを検討した。パラメータの候補として特定の遺伝子または遺伝子グループの遺伝子発現量に着目し、これらの適用可能性について、シングルセル RNA 解析データをもとに検討した。

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)、長谷川豊(岩手医科大学)、高山順(東北大学)

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: 心不全は糖尿病の主要な併発症であり、糖尿病や肥満に伴う臓器間ネットワークの異常がその発症に大きく影響する。一方、一度心不全となると、心不全の再発、慢性腎臓病、サルコペニア、うつ病が発症しやすくなり、糖尿病の併発はさらにこれらの合併症のリスクを高める。そこで、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を用い、未病段階から病的状態にいたるまで、経時的に、臓器の遺伝子発現やエピゲノムデータの解析を進める。特に、令和3年度までにオリジナルの成果が得られている骨髓細胞や臓器浸潤細

胞の解析を進める。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の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ならびに代謝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。適切なタイミング・条件を確定し、臓器等を採取し、東京大学・千葉大学でライブラリの作成を進め、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する。ビッグデータの解析や数理モデル作成に向け、合原プロジェクトを含む数理研究者と協議する。

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)

眞鍋 G は、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の時系列データ解析として、心臓圧負荷による心臓ストレス、高脂肪食負荷による代謝ストレス、社会的敗北モデルによる精神ストレスについて、マウスモデルの最適化とフローサイトメトリーによる解析タイミングの探索を行った。また、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** ワークフローの最適化を行った。ハッシュタグによる複数個体の同時解析の方法を確立した。このワークフローに従って、心臓免疫細胞、末梢血、骨髓造血幹前駆細胞に関して、フローサイトメトリー解析、シングルセル **RNA-seq** 解析を開始した。高脂肪食負荷については、心エコーの経時解析も行い、心肥大が3か月後から認められることを見いだした。また、高脂肪食負荷投与 1、2、3、10 か月後について、心臓免疫細胞ならびに造血幹前駆細胞のシングルセル **RNA-seq** 解析を行い、時間と高脂肪食の二つによって影響される遺伝子ならびに細胞集団を同定した。時系列解析について従来からの手法による解析を行うと併に数理解析者との協議を開始した。心臓圧負荷については、圧負荷開始後4週の心臓免疫細胞と造血幹前駆細胞のシングルセル **RNA-seq** データを取得した。社会的敗北モデルについても、モデル作製直後の造血幹前駆細胞のシングルセル **RNA-seq** データを取得した。これらのデータセットについては、**GakuNin RDM** に登録した。また、次年度からの解析のために、**CUT&RUN-seq** ならびに **ATAC-seq** プロトコルの最適化を行い、心臓マクロファージならびに造血幹細胞でのワークフローを確立した。

藤生 G は、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、骨髓・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、解析した。心血管ストレスマウスモデルの最適化を行い、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** 等の最適化をさらに進め、最適なタイムポイントと解析項目を同定して、時系列データの取得を行った。併発症の未病から発症の鍵となる遺伝子の探索を行い、モデルマウスの解析を行った。

今回、一連の研究から、心不全によって、その心不全時のストレスが、心臓から求心性神経・脳・遠心性神経を經由して骨髓内の造血幹細胞に蓄積することを明らかにした。さらに、造血幹細胞のバルクならびにシングルセル **RNA-seq**、**ATAC-seq** から、心不全によって、骨髓内の交感神経に神経障害が生じ、神経の周囲のシュワン細胞から活性型 **TGF β** の分泌が低下することから、造血幹細胞の **SMAD** 結合部位を中心としてクロマチンの閉鎖が生じることを明らかにした。このエピジェネティック変化が、心不全による造血幹細胞へのストレスメモリー本体である。さらに、このストレスメモリーを有した造血幹細胞から供給される組織マクロファージは各臓器の機能低下や炎症惹起に関与しており、心不全の再発や、慢性腎臓病、サルコペニア、るい瘦などの多病の原因となっていることを明らかにした。この結果は、**Science Immunology** 誌にアクセプトされた。

数理モデル作成の基盤となるデータベースを構築し **GakuNin RDM** にアップロードし、解析を開始した。ムーンショット目標2プロジェクト間の連携により数理モデル解析でのさらに深い解析につなげる予定。

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)

眞鍋 G は、心臓等の臓器での空間解析を行うためにライトシート顕微鏡を作製した。細胞間相互作用解析のために、心筋細胞と心臓線維芽細胞、マクロファージの共培養系を確立し、これらの細胞間相互作用により心筋細胞の成熟と心臓マクロファージのマーカー遺伝子発現が誘導されることを見いだした。これらの細胞間相互作用を解析するためにシングルセル **RNA-seq** 解析を行った。共培養系についてはさらに心筋組織を模倣することを目的に培養法の検討を行った。細胞間相互作用については、心臓細胞で、マクロファージ、内皮細胞、線維芽細胞、平滑筋細胞間の相互作用についての解析を行い、性差も見いだししている。

空間トランスクリプトーム解析については、**Visium** による解析を検討するため骨格筋傷害後のデータ解析を行ったが、現行の **Visium** の解像度では有用な情報を得ることが難しいことが明らかとなった。

以上のように細胞間相互作用解析を進めるとともに空間解析の準備を行った。空間トランスクリプトーム解析については、次年度に **Visium HD** や **Xenium** の検討を行う予定である。

藤生 G は、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した。そのため空間遺伝子発現解析を実施する。今回、特に交感神経の空間データセットの取得の条件を検討し、CosMX を用いた解析を実行した。今後は空間遺伝子発現解析によって、空間における細胞間相互作用に着目した解析に発展させる。

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。

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

令和 5 年度から大規模データの解析を推進するため、課題推進者としてバイオインフォマティシャンである高山順(東北大学)が加わった。さらに、ヒトでの解析を推進するため、高度肥満患者の脂肪組織サンプルを豊富に有する長谷川豊(岩手医科大学)も課題推進者として加わり、片桐や青木との共同研究を推進している。

当該年度に5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。

数理科学に関する取り組みとして、片桐は、画像解析に対する深層学習のテクノロジーを活用した。また、項目 4 で進められている糖代謝シミュレーターの作成に、肝臓でのインスリン作用や糖処理能の要素を組み込むことで数理モデルが精緻化され、また、肝インスリン受容体欠損マウスのデータを用いることで、臓器別のシミュレーションの裏付けを得ることなどに、項目2課題3の成果が活用されている。また、 $^{13}\text{CO}_2$ 呼吸試験に関するヒトでの結果は項目4での数理解析やモデル構築の元データであり、今後、大迫コホートの大規模データを用いて、数理モデルの精緻化を図る。

(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連携し、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。研究の社会実装には、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・青木・鈴木・久米・田宮・千葉も企業との共同研究について契約締結あるいは交渉中であり、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。

(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、片桐 **PM** のインタビュー記事をインターネットに掲載し、ムーンショット研究の紹介を行った。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、高校生、大学生、一般市民への情報発信も積極的に行ってきた。

令和5年度は、プロジェクトの多くの研究成果が学術誌に発表されるとともに、国内外のメディアで広く報道された。

片桐は、体内の細胞増殖を生きたまま観察できるマウスの開発(令和5年6月15日)、インスリン細胞数を調節する新たな仕組みの解明(令和5年9月19日)、神経の活性化によるインスリン産生細胞の再生(令和5年11月10日)など次々と重要な研究成果を発表し、東北大学と **JST** との共同プレスリリースにつなげた。

また、中村は、一般市民も関心の高い、中年太りの仕組みを解明(令和6年3月7日)し、名古屋大学と **JST** の共同プレスリリースをおこなった。

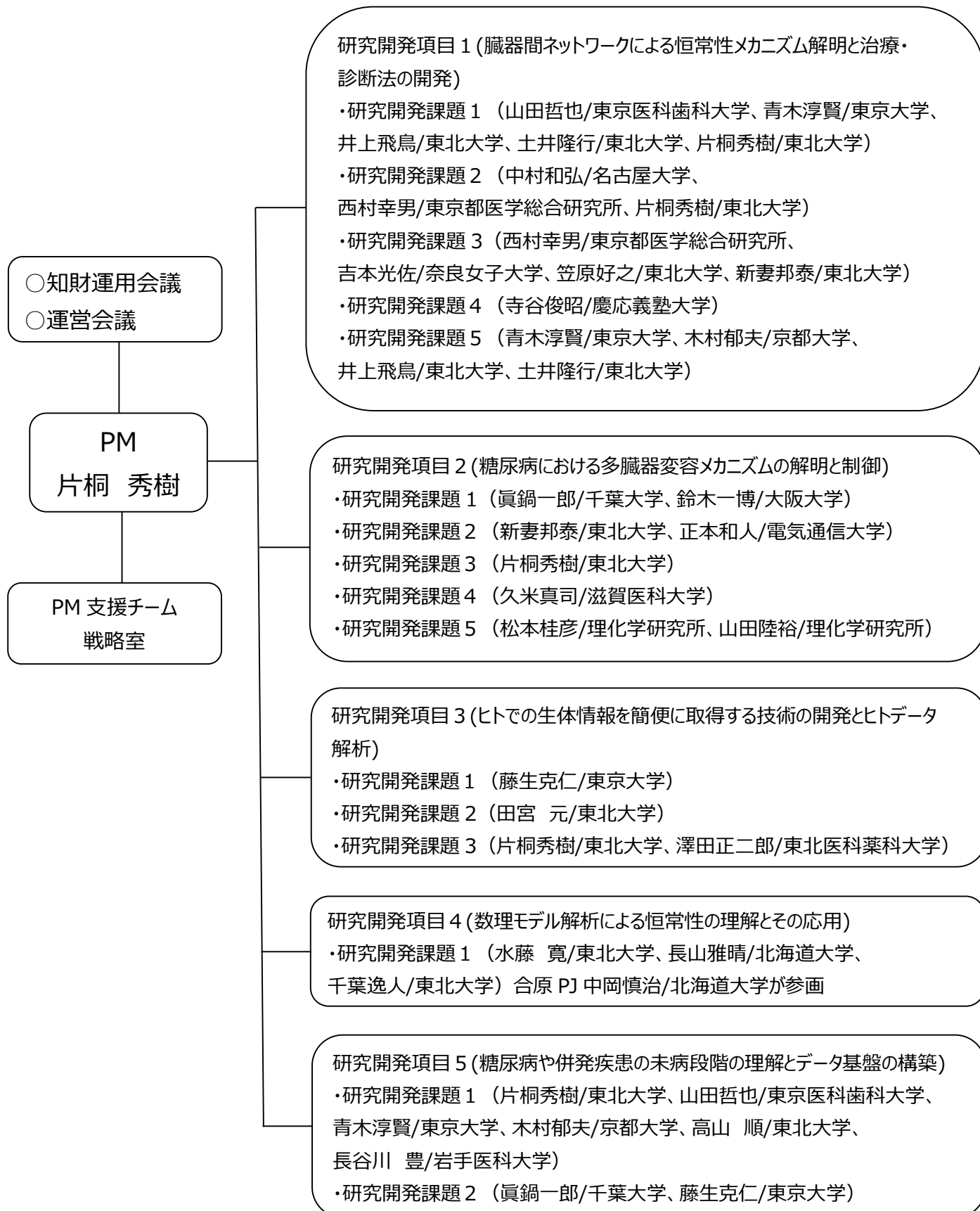
これらの成果は国内外の多くのマスメディアで報道され、**NHK** を始めとするテレビおよびラジオ、日本経済新聞、朝日新聞、読売新聞など新聞各社、**Yahoo** などのインターネットニュースなどで取り上げられ、広く注目を集めた。

(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、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、積極的にデータデポジットをおこなった。

GakuNin RDM へのデータデポジットに関しては、1ファイルあたりのデータ容量に制限があるため、大きな画像データのデポジットは現在困難であるが、これまで通りのアップロードとさらなる大規模データの蓄積を進める予定である。また、ヒトに関わるデータに関しては、**raw data** の公開は倫理上困難(同意書の取得ができない)であるが、倫理委員会で認められた研究者間でのデータ共有を **GakuNin RDM** を用いて開始した。

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、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。

当該年度、会議は開催していない。

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	1	1	0	0
登録件数	0	0	0	0
合計(出願件数)	1	1	0	0

会議発表数			
	国内	国際	総数
招待講演	42	13	55
口頭発表	44	9	53
ポスター発表	15	12	27
合計	101	34	135

原著論文数(※proceedings を含む)			
	国内	国際	総数
件数	1	37	38
(うち、査読有)	0	37	37

その他著作物数(総説、書籍など)			
	国内	国際	総数
総説	6	4	10
書籍	1	0	1
その他	0	0	0
合計	7	4	11

受賞件数		
国内	国際	総数
8	1	9

プレスリリース件数
13

報道件数
29

ワークショップ等、アウトリーチ件数
11