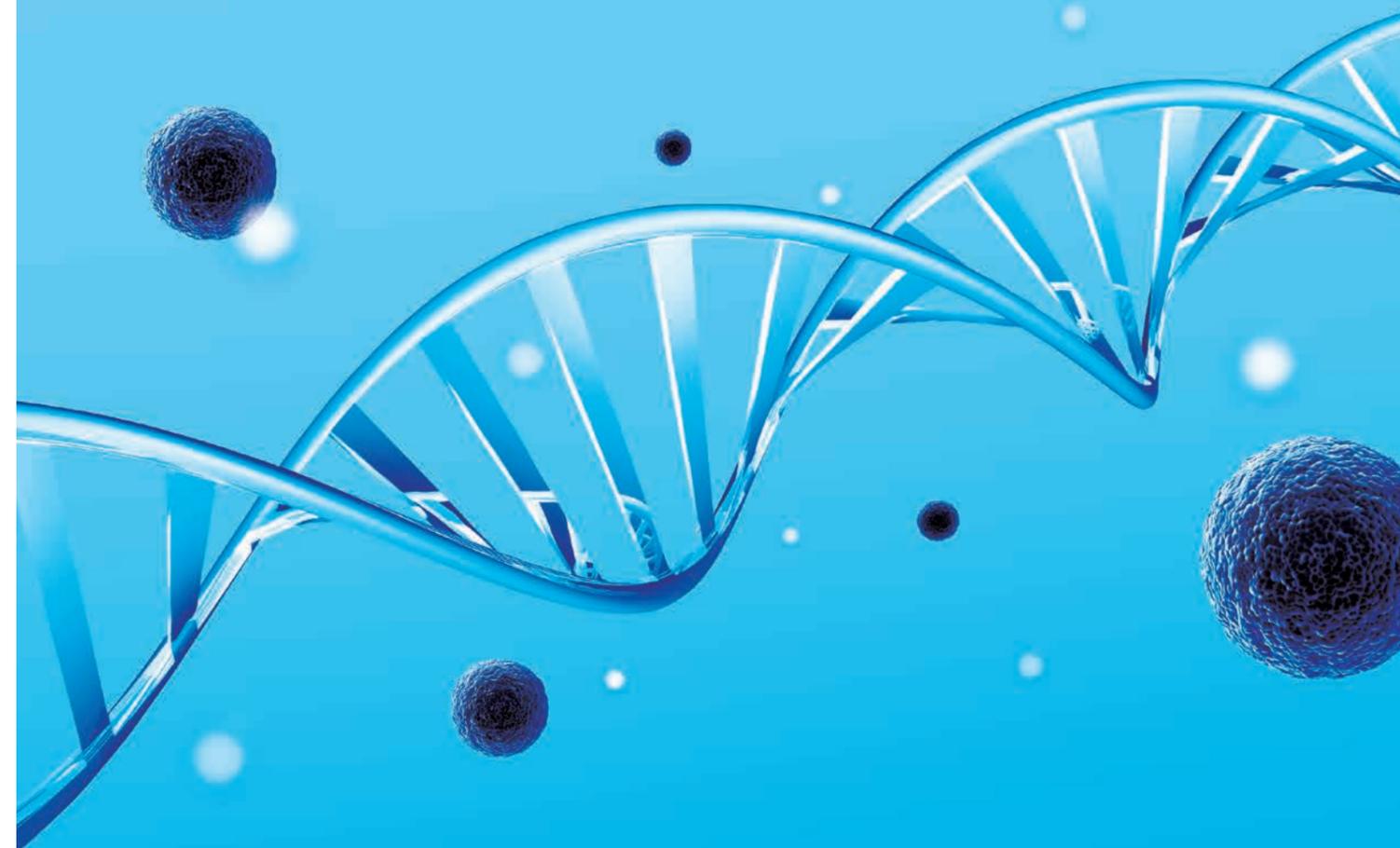


Shonan iPark

Science SJ Journal

湘南アイパーク
サイエンス・ジャーナル



湘南アイパークサイエンスカフェ (iPark Science Café) では、湘南アイパークテナント・メンバーシップ団体のボランティア研究者によって、2019年7月から今日に至るまで、最新サイエンティフィックプレゼンテーションが実施されてきました。

本冊子は、iPark Science Caféにて提供された話題・発表内容をそれぞれ1ページにまとめたもので、iPark Science Caféの活動記録として発行し、湘南アイパーク内外へ配布します。本冊子を通じ、湘南アイパークのサイエンスの深化やネットワーキング、新たなイノベーションの創成にさらに貢献することが私たちの願いです。

Shonan Health Innovation Park
湘南ヘルスイノベーションパーク

〒251-8555 神奈川県藤沢市村岡東二丁目26番地1
E-mail: shonan-health-innovation-park@takeda.com
Website: <https://www.shonan-health-innovation-park.com/>



Shonan iPark
Science Café
Website QR code



ご挨拶

サイエンスカフェ代表の野上さんと副代表の小笠原さんを微力ながらお手伝いをさせて頂いております西村です。本会を盛り上げたいと思っておりますので皆様よろしくお願い致します。

湘南アイパークサイエンス・ジャーナルの第2号が創刊されたこと、大変嬉しく思います。多岐に渡る専門分野の進捗がまとまっており、サイエンスカフェの多様性が垣間見えることと思います。コロナ渦で発表形式をオンラインへ移行したことで、対面でのディスカッションのきっかけ作りなど、直接的な交流が難しい状況ではございます。一方で湘南アイパーク勤務以外の方々の参加頂ける機会が増え、今後のサイエンスカフェの更なる発展も期待されます。今後は是非皆様にご意見頂きながら、様々な形の交流の機会を作りたいと考えております。結びに、本ジャーナル創刊にご協力頂いた皆様、並びにご参加くださった皆様に心より感謝申し上げます。

あすか製薬株式会社・西村 徹

サイエンスカフェ代表の野上さんと副代表の小笠原さんを、盛り上げてさしあげたいと、気持ちだけは大きくありますが、実際、オンライン周りの本当に小さなところをお手伝いしています。

野上さんから、「運営に参画していただけますか?」とご提案いただいたときは、「野上さんよりも年上だし、持病もあるし、湘南アイパークの重点領域である神経疾患も不案内であるし…」と悩みましたが、あすか製薬が湘南アイパークの一員として認めていただいた感じがあり、お請けすることにしました。

そして、7月、持病を隠して、湘南アイパークにいる再生医療の専門家の皆様から、最先端のご意見を伺いたと思い、「パーキンソン病患者由来の人工多能性幹細胞(iPS細胞)を用いた幹細胞治療」を報告しました。臨床系の文献と、珍しいこともあり、その時聴かれた方々はそれまでの最多記録を更新しました。ご興味を持っていただき、ありがとうございます。そして、10月、研究者と患者のサイエンスコミュニケーションの場を、湘南アイパークに作る活動を提案しました。湘南アイパーク内で、サイエンスカフェをきっかけに、パーキンソン病患者背景を持つ研究者としてのアイデンティティを確立しつつあります。エンドユーザでありながら、創薬の先端の場に身を置き、それにかかわる皆様とディスカッションできるのは、とても幸せなことです。多様な参加者を許容してくれるサイエンスカフェの、ますますの発展を祈念します。

あすか製薬株式会社・鈴木 桂



編集後記

新型コロナの感染拡大が続くなか、発刊記念イベントの中止に始まり、第1号の配布が遅れ、従来の講演型のリアルiPark Science Caféの開催中止と、心痛い状況が続いておりました。iPark Science Caféをオンラインセミナー形式に変更することで継続し、勤務もままならないみなさんのつながりを「サイエンス」で、つなぎとめることがもできていますとすれば、大変幸いです。新たに運営サイドに加わってくださった鈴木さん、西村さん、どうもありがとうございます。そしてついに、演者のみなさんとともにiPark Science Journal第2号を発行することができ、喜びをかみしめております。サイエンスカフェとiPark Science Journalの未来をみなさんと一緒に造っていきたいです。運営サイドへのご参画もお待ちしております(野上)

新型コロナの感染拡大により、iPark Science Caféも大きな変革を迫られました。世の中が大きな混乱に包まれる中、“サイエンス”の面からこの未知のウイルスの実像に迫ろうと、多くの皆様がボランティアとして文献調査・御発表をして下さいました。そうした背景があり、この冊子には新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)に関する内容が多く盛り込まれています。ご専門と違う領域であるにも関わらず、お時間を割きご協力して下さいました皆様に、この場を借りて改めて御礼申し上げます。残念ながらまだリアルiPark Science Caféの復活がいつになるか見込めない状況ですが、オンラインだからこそ拠点の違う皆様ともディスカッションができるという良い面も見えてきました。リアルとオンライン、双方の良い所を融合しつつ、野上さん・鈴木さん・西村さんや御参加頂いている皆様と共に、このiPark Science CaféやJournalをより一層魅力的なものにしていきたいと思っております(小笠原)



目次

「ご挨拶」 アイパークサイエンスカフェ・西村徹、鈴木桂

第2期 発表内容

1. 「ヒトマイクロバイオームと疾患との関連性～自閉症での知見～」
2. 「Pbp1の酸化還元によって制御される液-液相分離はミトコンドリア機能をTORC1活性と共役させる」
3. 「早期糖尿病性腎症患者のシングルセルトランスクリプトームの全体像」
4. 「FTLD-Tauのヒト in vitro modelは軸索起始部(AIS)可塑性の異常および過興奮を示す」
5. 「ヒト幹細胞の多能性(pluripotency)の定義について」
6. 「3' UTR依存性蛋白質複合体形成を介した、BIRC3蛋白質のさらなる機能獲得」
7. 「生分解性ナノカプセルを用いたCRISPR-CAS9によるin vivoゲノム編集」
8. 「Sall1欠損ラットにおけるマウスES細胞由来腎臓の作製」
9. 「新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)の細胞内侵入機構」
10. 「SARS-CoV由来小分子RNAは感染症関連肺病理に寄与する」
11. 「フェレット、猫、犬、その他の家畜のSARS-CoV-2の感受性」
12. 「臨床グレード可溶性ヒトACE2を用いた人工ヒト組織におけるSARS2-CoV-2感染の抑制効果」
13. 「2020年5月1週時点のSARS-CoV-2のワクチン開発」
14. 「喫煙及び炎症性シグナルは、気道におけるACE2(SARS-CoV-2レセプター)の発現を上昇させる」
15. 「Upstream ORFによるMAVSの自発的な凝集抑制と自然免疫恒常性の制御」
16. 「Th17細胞は滑膜細胞と自然免疫リンパ球からサイトカインGM-CSF産生を誘発し、関節炎の増悪化に関与する」
17. 「脳深部刺激療法に基づく光遺伝学はパーキンソン病様症状を改善する」
18. 「腸内細菌叢：寄生虫が自己免疫疾患の発症を抑える、そのメカニズムとは？」
19. 「BRD4機能の制御異常がMeCP2変異ニューロンの機能異常をもたらす」
20. 「パーキンソン病患者由来の人工多能性幹細胞(iPS細胞)を用いた幹細胞治療」
21. 「脳内到達する抗体DDSシステムによるアルツハイマー型認知症モデルマウスのアミロイドβ凝集の抑制」
22. 「Virus-like particleを用いたCRISPR-Cas9細胞内送達システムの開発」
23. 「Fcフラグメント血液脳関門輸送媒体を用いたマウスおよびサルにおける治療用タンパク質の脳デリバリー」
24. 「What exactly gets across the Blood-Brain-Barrier?
-Physiological blood-brain transport is impaired with age by a shift in transcytosis-」
25. 「汎用性の高いバイオセンサーの設計により、生細胞における三量体Gタンパク質の活性を明らかにする」
26. 「スライスしたヒト大脳皮質オルガノイドによる大脳皮質の層構造形成のモデル化」

編集後記

ヒトマイクロバイオーム と疾患との関連性 ～自閉症での知見～

Sharon et al., 2019, Cell, 177, 1600-1618

キーワード

- 腸内細菌叢(マイクロバイオーム)
- 神経疾患
- 自閉症
- 細菌代謝物
- ヒトフローラマウス

要旨

自閉症の発症と腸内細菌叢は関連している。

自閉症患者由来の糞便をマウスへ移植すると自閉症症状が発症する。

自閉症患者由来の糞便移植マウスでは中枢の遺伝子発現が変化する。

自閉症患者の腸内代謝物は一部の代謝物が減少しており、これらの代謝物を投与すると自閉症症状が改善する。

背景

疾患発症には環境的要因と遺伝的要因があり、近年マイクロバイオーム(細菌叢)は環境的要因の大きな一つの因子と考えられ研究が活発化している。NGS技術による細菌叢の解析方法が確立されて以来、その理解が飛躍的に進み、直近10年で多くの疾患との関連性が分かってきた。そんな中でマイクロバイオームと自閉症の関係性は比較的古く、20年ほど前から報告されていたがその発症メカニズムは長らく不明であった。患者由来糞便を移植するヒトフローラマウスや糞便のメタボローム解析などマイクロバイオーム研究の技術的な進捗にともない、自閉症発症のメカニズムの一端が見えてきた。

自閉症の発症と腸内細菌叢は関連している

自閉症患者と健常人で腸内細菌叢は異なり、自閉症患者でBacteroidesやLachnospiraceaeが増加している。また、自閉症患者に抗生物質を投与し腸内細菌叢を破壊すると短期間で自閉症症状が回復することから、自閉症患者特有の腸内細菌叢が疾患発症に寄与していると考えられる。

自閉症患者由来の糞便をマウスへ移植すると自閉症症状が発症する

自閉症患者由来の糞便を無菌マウスへ移植すると、BacteroidesやLachnospiraceaeなどの細菌の増加などは自閉症患者と同様に維持されており、フェノタイプとして社交性の低下などの自閉症症状が確認される。(自閉症ヒトフローラマウス)

自閉症患者由来の糞便移植マウスでは中枢の遺伝子発現が変化する

自閉症患者由来の糞便を移植されたマウスの脳をアレイ解析(mRNA解析)すると、RNA splicing関連のRibosome binding proteinなどの遺伝子発現を制御する遺伝子群が変化している。

自閉症患者の腸内代謝物は一部の代謝物が減少しており、これらの代謝物を投与すると自閉症症状が改善する

自閉症患者の腸内容物を質量分析したところ、Taurineや5-amino valeric acidなどの代謝物が減少している。これら代謝物を自閉症ヒトフローラマウスへ投与すると自閉症症状が軽減する。マイクロバイオームは神経活性物質の産生を助け、脳神経細胞での適切なexcitation-inhibitionバランスを保ち正常な脳機能維持に寄与する。

担当者 平田拓 所属 田辺三菱製薬株式会社 専門 膜イオントランスポーター、マイクロバイオーム、代謝性疾患

一言 神経疾患とマイクロバイオームとの関連性についての研究は近年急速に進み、マイクロバイオームの異常が今回の自閉症を始めとして多くの神経疾患に関わりが報告されてきています。神経疾患では特に菌が出す代謝物の関わりが深く、神経伝達物質との関わりが示されています。細菌叢は人種や国の違いが多いですが、菌代謝物は比較的同一であることが多く、創薬標的の主要な作用点の一つと期待されます。今後の研究が楽しみな領域です。

✉ hirata.taku@ma.mt-pharma.co.jp

背景

TORC1は、栄養源の状況に応答してタンパク質の翻訳レベルや細胞代謝など数多くの細胞プロセスを制御するキナーゼ複合体である。TORC1が阻害されるとオートファジーが誘導されて、細胞質内容物やオルガネラが分解され、栄養飢餓時の細胞生存を維持するように働く。TORC1シグナルの制御異常やオートファジーの阻害は、がんや神経変性疾患と関連するとの知見が数多く存在する。今回著者らは、酵母を用いたスクリーニングを実施した結果、TORC1やオートファジーの新規制御因子としてPbp1を同定した。Pbp1は神経変性疾患と関連深いヒトAtaxin-2のホモログであったが、その生理機能はこれまであまりよくわかっていなかった。

Pbp1は自己cross-β-polymer化し、TORC1を抑制することでオートファジーを促進する

Pbp1のC末端にはLow complexity(LC)ドメインが存在する。Pbp1はこのLCドメインを介して液-液相分離(LLPS)を形成したが、その性質は液体というよりもゲル状で、cross-β-polymerであることが分かった。このLCドメインを欠失させると、飢餓時のオートファジー応答が不全となったが、TORC1阻害剤ラパマイシンによりオートファジー応答が回復した。

Pbp1-LCドメインのメチオニン残基が酸化ストレスを感知し、Pbp1のcross-β-polymer化を抑制する

Pbp1-LCドメインには24ものメチオニン残基が存在するのが特徴的で、Pbp1-LCドメインによるLLPS形成は、H₂O₂によって酸化ストレス負荷により抑制された。さらにメチオニン残基8つをセリンへ置換すると、LLPS形成は維持されるものの、ゲル化は抑制され、飢餓時のオートファジー応答が不全となった。

Pbp1機能不全は、ミトコンドリア異常の原因となって細胞生存を低下させると同時に、ミトコンドリア異常はオートファジーを抑制する

Pbp1-LCドメインのcross-β-polymer形成不全は、ミトコンドリア異常の原因となり、細胞生存を低下させた。加えて、Antimycin Aによってミトコンドリア呼吸鎖を機能不全化して活性化酸素産生を促すと、飢餓時のオートファジーが抑制された。Pbp1-LCドメインLLPS形成の酸化依存的な抑制は、メチオニンスルホキソ還元酵素の作用により解除することが可能で、*in vivo*において酸化されたPbp1も脱酸化することが可能であった。

Pbp1の酸化還元によって制御される液-液相分離はミトコンドリア機能をTORC1活性と共役させる

Yang et al., 2019, Cell, 177, 697-710
Kato et al., 2019, Cell, 177, 711-721

キーワード

- 液-液相分離(LLPS)
- 酸化還元
- Pbp1 RNA結合蛋白質(RNABP)
- TORC1
- オートファジー

要旨

酵母における新規オートファジー制御因子としてPbp1(ヒトAtaxin-2ホモログ) RNABPを同定。

Pbp1は自己cross-β-polymer化し、TORC1を抑制することでオートファジーを促進する。

Pbp1-LCドメインのメチオニン残基が酸化ストレスを感知し、Pbp1のcross-β-polymer化を抑制する。

Pbp1機能不全は、ミトコンドリア異常の原因となって細胞生存を低下させると同時に、ミトコンドリア異常はオートファジーを抑制する。

担当者 野上真宏 所属 武田薬品工業株式会社 専門 RNA生物学、核酸医薬、神経変性疾患

一言 新しいオートファジー制御因子としてPbp1を同定したTuは、LLPSに関して第一線で活躍しているMcKnight研の出身で、Pbp1-LCドメインがLLPSによってcross-β-polymer化することがTORC1抑制に大事であることに辿り着きました。LCドメインcross-β-polymerの生理機能の発見です。神経変性疾患で認められるAtaxin-2のトリプレットリピート異常がTORC1とどのように関連していくのか?、その他神経変性疾患におけるAtaxin-2の役割は?など、これからの展開に目が離せません。

✉ masahiro.nogami@takeda.com

早期糖尿病性腎症患者のシングルセルトランスクリプトームの全体像

Wilson et al., 2019, Proc Natl Acad Sci USA, 116, 19619-19625

キーワード

- 単一核 (single nucleus) RNA-sequence (snRNA-seq)
- 早期糖尿病性腎症
- カリウム分泌関連遺伝子
- 血管新生関連遺伝子

要旨

凍結腎臓組織を用いたsnRNA-seq解析より、腎臓の主要な細胞種を同定した。

遺伝子発現解析より、イオントランスポート、血管新生、免疫細胞活性化に重要な遺伝子の細胞種特異的な変化が見られた。

ヘンレ係蹄の上行脚、末遠位尿細管および集合管において尿中カリウム分泌促進と傍細胞性カルシウム/マグネシウム再吸収に適應する遺伝子発現の特徴が認められた。

多くの腎臓細胞種(糸球体(内皮細胞)、等)において血管新生亢進に関連する遺伝子発現の特徴が認められた。

背景

糖尿病性腎症は腎不全を引き起こす原因であるが、早期腎症期のトランスクリプトーム変化について不明な点が多い。また、糖尿病性腎症の組織学的特徴は知られているが、各病態期における細胞種毎のパスウェイ変化についても不明な点が多い。これまでbulk RNA-seq解析はなされてきたが、その結果は種々の細胞種が混ざった遺伝子発現の総和の解釈という制限があった。シングルセルRNA-seq解析は細胞種毎の遺伝子発現を捉える事が可能であるが、未凍結の細胞/組織を用いる必要がある事、またシングルセル分離操作の影響の課題が知られている。今回著者は、従来法からの利点を持つsnRNA-seq解析手法を用いて早期糖尿病性腎症患者の凍結腎臓組織の解析を行った。

snRNA-seq解析による腎臓細胞種の同定

コントロール3例、早期糖尿病性腎症患者3例(軽度から中程度の糸球体硬化症と間質性腎線維化を示すが、推算糸球体濾過量(eGFR)はコントロール群と差なし)の凍結腎臓組織(腎皮質)から核を取得し、snRNA-seq解析を行った。合計23,980核から一核あたり平均2541遺伝子を取得した。更に、11の腎臓の主要な細胞種(糸球体、近位尿細管、等)、4の免疫細胞種(T細胞、B細胞、等)を同定した。

腎臓細胞種毎の遺伝子発現解析

細胞種毎の遺伝子発現解析により、コントロール群と比較して、早期の糖尿病性腎症患者の腎臓では、イオントランスポート、血管新生、免疫細胞活性化に重要な遺伝子の細胞種特異的な変化が認められた。

ヘンレ係蹄の上行脚等の細胞種において、尿中カリウム分泌促進に適應する遺伝子発現の特徴が認められた

患者のヘンレ係蹄の上行脚、末遠位尿細管および集合管においてNa⁺/K⁺-ATPアーゼ、カリウム分泌の調節に関わるWNK1とNEDD4L、ミネラルコルチコイド受容体、カルシウム感知受容体(CASR)およびタイトジャンクションの透過性に関わるCLDN16の遺伝子発現変化等より、尿中カリウム分泌増加と傍細胞性カルシウム/マグネシウム再吸収の減少に適應する遺伝子発現の特徴が認められた。

多くの腎臓細胞種(糸球体(内皮細胞)、等)において血管新生亢進に関連する遺伝子発現の特徴が認められた

患者の糸球体(内皮細胞)、近位尿細管、遠位尿細管および集合管において血管新生促進遺伝子の発現亢進とそのパスウェイ亢進が見られた。

担当者 荒川佑一 所属 アクセリード 専門 in vivo薬効薬理、精神疾患、トランスレーショナル研究

一言 第一期サイエンスカフェに続き、今回もsnRNA-seq解析に関する論文報告を取り上げました(因みに第一期はRett症候群患者の死後脳組織のsnRNA-seq解析でした、ご興味があればそちらも併せてご覧ください)。筆者は、snRNA-seq解析により、早期糖尿病性腎症の腎臓細胞種毎における特徴(尿中カリウム分泌増加、血管新生シグナル亢進、等)を示し、得られた知見はバイオマーカー探索等に有用かもしれないと考察しています。snRNA-seq解析は、シングルセルRNA-seq解析と類似な結果が得られ、且つ凍結組織を使える点で利便性が高いため、今後更に文献報告が増えそうな最先端技術として注目しています。

✉ yuuichi.arakawa@axcelead.com

FTLD-Tauのヒトin vitro modelは軸索起始部(AIS)可塑性の異常および過興奮を示す

Sohn et al., 2019, Neuron, 104, 458-470

キーワード

- hiPSC由来大脳皮質神経
- FTLD(前頭側頭葉認知症)
- タウ
- AIS(軸索起始部)
- AIS plasticity(軸索起始部可塑性)

要旨

FTLDは初老期に発症する一次変性認知症で、大脳前方部に限局性変性を示す点で、大脳後方の障害が目立つAD(アルツハイマー病)と対比される。

タウ病理を伴うFTLDは神経回路の異常興奮性に関連している。

AIS(軸索起始部)には電位依存性イオンチャンネルが高密度に存在し、活動電位の発生に重要な役割を担う。

タウ変異を有するhiPSC由来神経では、AISの細胞骨格異常を原因とするAIS plasticityの消失および活動電位の恒常性異常が認められ、結果として神経ネットワーク機能の調節不全が引き起こされている。

背景

タウ病理を伴う前頭側頭葉認知症(FTLD)は神経回路の異常興奮性に関連している。しかしながら、タウが神経の興奮性を制御するメカニズムはよく分かっていない。一方、FTLDを伴うタウ変異は微小管結合部位に多く認められることから、タウ変異が微小管安定性の異常を介してFTLDを惹起する可能性が考えられていた。しかしながら、その本質的意義については疑う意見もあった。Sohnらはタウ変異を有するヒトiPSC由来大脳皮質神経が、AIS(軸索起始部)の細胞骨格異常を原因とするAIS plasticityの消失および活動電位の恒常性異常を示し、結果として神経ネットワーク機能の調節不全が引き起こされている可能性を報告した。

hiPSC由来大脳皮質神経においてTau^{V337}変異は過剰興奮および活動電位の恒常性異常を引き起こす

Tau^{V337}変異を導入したhiPSC由来大脳皮質神経(NGN2誘導性神経)の活動電位をMEA(微小電極アレイ)により記録したところ、過剰興奮(ネットワークバースト頻度の増加)が観察された。また、KCl 48h処理による恒常的脱分極刺激後に通常認められる発火頻度低下(homeostatic plasticity)が、変異導入神経では認められなかった。

Tau^{V337}変異導入神経においてAIS長およびAIS plasticityの減少が認められる

活動電位の恒常性維持はAIS plasticityによって制御されることが報告されている。すなわち神経活動依存的にAISの長さが変化し活動電位の発生頻度が調整される。そこでAnkyrin G等のマーカーでAISを可視化しAIS長を調べたところ、変異導入神経ではAIS長が短くなっていた。また、恒常的脱分極刺激後に通常認められるAIS長の減少(AIS plasticity)が、変異導入細胞では認められなかった。

Tau^{V337}変異はAISにおけるEB3の蓄積を誘導しAIS plasticityおよび活動電位恒常性の異常を引き起こす

End-binding protein 3(EB3)はTau結合タンパクのひとつである。EB3を介してAnkyrinGが安定化し、AIS構成タンパク・電位依存性チャンネル等がAISにリクルートされる。筆者らはTau^{V337}変異によりTauへのEB3結合が増加することを見いだした。変異神経でEB3の発現を抑制するとAIS plasticity・活動電位恒常性の異常が正常化した。すなわち、変異神経におけるEB3の異常蓄積がAIS plasticityを傷害し、結果として神経ネットワーク機能の調節不全を引き起していると考えられた。Tau^{V337}以外のタウ変異や他のFTLD病態でもAISの異常が関与するか、今後の解析に興味をもたれる。

担当者 丸山穂 所属 武田薬品工業株式会社 専門 神経科学、ミトコンドリアバイオロジー、GPCR創薬

一言 入社以来15年以上GPCR創薬(オーファンGPCR研究)に携わり、現在はiPSC由来細胞を用いた機能解析プラットフォーム開発・薬効評価などを担当しています。サイエンスの理解、新たな発見を通じ、これまでに存在しない新たな価値を見出す、「ファーストペンギン」になりたいと思っています。好きな言葉:「Focus on out of focus」

✉ minoru.maruyama@takeda.com

ヒト幹細胞の多能性 (pluripotency) の定義について

Yilmaz and Benvenisty, 2019, Cell Stem Cell, 3, 9-22
Yilmaz et al., 2018, Nat Cell Biol, 20, 610-619

キーワード

- Pluripotent stem cells
- Pluripotency
- Induced pluripotency
- Multipotency
- Totipotency
- Developmental cycle
- Essentialome

要旨

多能性(pluripotency)を単なる細胞の特性と捉えるだけでなく、何が多能性をもたらしているのかを解明する必要がある。

発生、遺伝子発現制御、リプログラミングに加えて新規技術のessentialomeを加えた4つの視点から「多能性」を捉える事が重要である。

In vitroでの真の多能性獲得は現在も研究過程であるが、達成される可能性は高い。

これまでの遺伝子発現プロファイリングだけでは多能性獲得に関する知見は限定的である。

Essentialome解析によって多能性のmaster regulatorsに関する知見が刷新された。

担当者 亀井孝幸 所属 武田薬品工業株式会社 T-CiRAディスカバリー 専門 幹細胞、神経変性疾患

一言 ヒト iPS細胞の最初の報告からすでに10年以上が経過しています。その間に新しく有効な培養方法や分化方法が数多く見つけられ、ヒトiPS細胞を用いる研究のハードルは格段に下がっています。その結果、成果重視の応用研究への偏重を招いている感があります。今、原点である「多能性」を新たな角度から再確認することは、これからのヒトiPS細胞を使った創薬研究に不可欠であると考えています。今回の論文は総論ですが、リファレンスでの深堀の一助となれば幸いです。

✉ takayuki.kamei@takeda.com

3' UTR依存性蛋白質複合体形成を介した、BIRC3蛋白質のさらなる機能獲得

Lee & Mayr, 2019, Mol. Cell, 74, 701-712

キーワード

- 3' UTR(3' 非翻訳領域)
- 選択的polyA付加反応 (alternative polyadenylation)
- 慢性リンパ性白血病(CLL)
- RNA結合蛋白質(RNABP)

要旨

mRNA-3' UTRは、選択的polyA付加反応により、鎖長の異なる複数種類のフォームを有する場合がある。

CLLでは、BIRC3 mRNA-3' UTRのlong フォーム(LU)発現が亢進しており、LU依存的な、BIRC3蛋白質複合体形成を制御していた。

LU依存的なBIRC3蛋白質複合体は、CXCR4の細胞表面移行を制御することで、癌細胞の浸潤に関与した。

3' UTRは、自身のmRNAがコードする蛋白質複合体形成を制御する役割を果たす。

担当者 野上真宏 所属 武田薬品工業株式会社 専門 RNA生物学、核酸医薬、神経変性疾患

一言 RNA標的創薬では、mRNAやその前駆体であるpre-mRNAを標的として考えることが多いです。その平均的なmRNA像としては、10のエクソンと9のイントロンからなるpre-mRNAからRNAスプライシングによって、およそ1300塩基の蛋白質コード部分を有すmRNAへとプロセスされます。一方、同時にmRNAは、非コードな3' UTRをおよそ1300から2500塩基も有しています。どうしてそんなに長い3' UTRを有するのか?どういった意味があるのか?今回の報告は、新しい3' UTRの機能にスポットライトが当てられた素晴らしい報告でした。RNA標的創薬へ全く新しいアプローチを提案する可能性もありますでしょうか。

✉ masahiro.nogami@takeda.com

背景

幹細胞とは自己複製能と分化能を同時に持つ細胞と定義される。このうち分化能として多能性、すなわち三胚葉全てに分化できる能力を持つ細胞を多能性幹細胞(pluripotent stem cells)と呼ぶ。そのひとつであるヒトiPS細胞は再生医療および疾患研究において中心的な役割を果たしているが、最初の報告からすでに10年以上が経過している。応用研究が重視、というより偏重されている中、今一度「多能性」に関する知見をup-dateすることは、幹細胞を用いた次世代の創薬研究の方向性を見極めるために必要であると考えて今回のテーマを選択した。

Different Views on Pluripotency

iPS細胞の多能性を次の4つの異なる側面から捉える;(1) embryonic development,(2) transcriptomes of pluripotent cell stages,(3) genes and pathways that reprogram somatic cells into pluripotent stem cells, および(4) the recent identification of the human pluripotent stem cell essentialome。

Developmental view

多能性幹細胞をnaïve型とprimed型に分類することが提唱されているが、これに従えばヒトiPS細胞はprimed型の特性を持ち、マウスのES/iPS細胞とは異なるバイアスのかかった(すでに分化が進行した)三胚葉性を具している。ヒトnaïve型多能性幹細胞を用いたprimed型では困難な細胞への分化誘導が期待されている。

Transcriptomic view

遺伝子発現プロファイリングによって、非常にたくさんの転写因子や細胞表面分子が異なる分化ステージで多能性のマーカーとして同定されている。同定された転写因子によって発現制御される多くの遺伝子は、体細胞における多能性獲得にも重要な役割を果たしているが、その機能に関する知見は未だ乏しい。

Reprogramming view

Takahashi and Yamanakaによる“induced pluripotency”は多能性の新しい道を開いた。Chemically induced PSCs研究の過程でOSKM(OCT4, SOX2, KLF4およびMYC)によるリプログラミングとは異なるfate transitionsの可能性がマウスで示唆された。ヒトへの外挿性は不明。

Essentialome view

CRISPR-Cas9を用いたゲノムワイドなloss-of-function screen(essentialome)が可能になったことで、多能性幹細胞の必須遺伝子による多様性の新たな定義がなされた。これまでのtranscriptome解析ではgene redundancy(同じ機能を持つ複数の遺伝子)による限界のため細胞種に対する必須遺伝子を指すだけのものであった。Essentialome解析によって新たなreprogramming factorsと遺伝子ネットワークが明らかになったことで多能性のmaster regulatorsに関する知見が刷新された。

背景

mRNA上の3' UTRは非翻訳領域にも関わらず、mRNA安定性や局在性、翻訳制御などを担っており、多様な遺伝子発現システムの原動力となっている。3' UTR鎖長は、種により大きく異なり、ヒトなど複雑な生物ほど長く、種間保存性が低い。さらに選択的polyA付加反応の結果、一つの遺伝子から、鎖長の異なる複数種類の3' UTRを有す場合もある。今回、慢性リンパ性白血病(CLL, chronic lymphocytic leukemia)において、BIRC3 mRNAにおいて3' UTR鎖長の異なるlongフォーム(LU)が高発現することを見出し、LUの有す分子機能に迫った。

CLLでは、BIRC3 mRNAの3' UTRのlongフォーム(LU)が発現亢進していたが、LUは翻訳量や転写量、蛋白質局在やmRNA局在に影響を与えなかった

CLL患者由来の悪性B細胞では、正常CD5⁺B細胞と比較して、E3ユビキチンリガーゼBIRC3のmRNA-3' UTRのshortフォーム量が低下し、longフォーム(LU)量が増加していた。LUは、3' UTR-LUは、転写量や翻訳量、RNA局在性や翻訳蛋白質の局在性へ影響を与えなかったことから、別の機能を有す可能性が考えられた。

3' UTR-LUは、LUに結合するRNABPの作用によって、自身のmRNAがコードするBIRC3の蛋白質複合体の種類をコントロールする役割を果たす

3' UTR-LU依存性にかつ特異的にBIRC3と結合する蛋白質を探索したところ、RALAやQGAP1が見いだされた。さらにRALAやQGAP1などとのBIRC3複合体形成は、LUに結合するHuRやStaufenなどRNA結合蛋白質により仲介させることを見出した。以上のことから、3' UTR-LUには、自身のmRNAがコードするBIRC3の蛋白質複合体の種類をコントロールする役割を果たすことが明らかとなった。

LU依存的なBIRC3蛋白質複合体は、細胞浸潤に関わる受容体CXCR4の細胞表面移行を制御することで、細胞浸潤に関与した

LUを特異的に発現抑制した細胞では、細胞遊走能が低下すると共に、細胞浸潤に関わるCXCR4受容体の細胞表面膜における量が低下していた。またCXCR4は、LU依存性BIRC3蛋白質複合体と相互作用することで、細胞表面へ移行した。以上のことから、高発現したLUがCXCR4の細胞表面移行を促進して癌悪性化に関与する可能性が示唆された。

生分解性ナノカプセルを用いたCRISPR-CAS9によるin vivoゲノム編集

Chen et al., 2019, Nat Nanotechnol, 14, 974-980

キーワード

- タンパク質デリバリー
- 生分解性ポリマー
- ナノカプセル化
- CRISPR-CAS9
- In vivoゲノム編集

要旨

CAS9 nuclease/single-guide RNA複合体タンパク質 (RNP) と様々なモノマーとを相互作用させ、その状態でラジカル重合することでRNP1分子をカプセル化することに成功。

本ナノカプセルは市販されているRNP用キャリア (CRISPERMAX) より細胞毒性が低く高いin vitro細胞導入効率を有していた。

本ナノカプセルを健常マウスに局所投与したところ、骨格筋細胞または網膜色素上皮組織においてRNPによるin vivoゲノム編集が可能であった。

背景

CRISPR-CAS9を利用する際は主にウィルスベクターを用いることが多いが、高価であり、また安全性やウィルスベクターへの抗体産生という懸念がある。リボソームや高分子ミセルを用いる方法もあるが、その場合は直径が100 nm以上となってしまう、in vivoで届けたい場所に届けられない、また安定性が低いという欠点を有している。そこで筆者らは、それらの代替法としてCAS9 nuclease/single-guide RNA複合体 (RNP) と様々なモノマーとを混合した状態でラジカル重合させることで、RNPを高分子材料で被覆した、従来のキャリアよりも低毒性で標的指向性のあるRNP内包ナノカプセル (直径25 nm) を調製することに成功した。

RNP内包ナノカプセルの調製・特徴

RNPとモノマーとの相互作用は静電相互作用および疎水-疎水相互作用を利用している。筆者らはアニオン性、カチオン性、イミダゾール基 (プロトンスポンジ効果に利用)、S-S結合またはPEG鎖を有する6種類のモノマーを用い、最も細胞に取り込まれやすく遺伝子編集効率が高いモノマー比率を見出した。本ナノカプセルは細胞内のグルタチオン濃度環境下においてのみS-S結合が切断され、RNPを覆う高分子膜が分解される仕組みとなっている。またナノカプセルの表面にはPEG鎖が修飾されており、その末端にリガンドを修飾することで標的指向性を持たせることも可能である。

凍結乾燥保存が可能で、市販の導入剤CRISPERMAXよりも遺伝子編集効率が高い。

mCherry-HEK293 cellsに対する遺伝子編集効率は、市販の導入試薬CRISPRMAXが約60%であるのに対し、ナノカプセルは約80%であった。ナノカプセルはリガンド修飾が容易であることを踏まえると、さらに細胞への導入効率を高くすることが期待できる。また凍結乾燥後と前を比較しても、遺伝子編集効率はほとんど変わらないことが示されていた。

健常マウスに対しても遺伝子編集可能

筆者らはリガンドであるトレチノインを修飾したナノカプセルを調製し、健常マウスの網膜に局所投与した。その結果、網膜色素上皮組織において、トレチノインを修飾していないナノカプセルおよびRNP単体では遺伝子編集が確認されなかったが、修飾ナノカプセルではmCherryの発現が確認されていた。またナノカプセルを筋肉内投与したところ、骨格筋細胞でも同様の遺伝子編集が可能であることが示されていた。以上の結果から、筆者らはRNP封入カプセルがin vivoでも実用可能であると主張している。

担当者 森山 壘 所属 LTTバイオファーマ 専門 DDS、高分子化学、核酸化学、タンパク質修飾

一言 RNP内包ナノカプセルの調製・特徴 RNPとモノマーとの相互作用は静電相互作用および疎水-疎水相互作用を利用している。筆者らはアニオン性基、カチオン性基、イミダゾール基 (プロトンスポンジ効果に利用)、チオール基 (ジスルフィド結合に利用) またはPEG鎖を有する6種類のモノマーを用い、最も細胞に取り込まれやすく遺伝子編集効率が高いモノマー比率を見出した。本ナノカプセルは細胞内のグルタチオン濃度環境下においてのみS-S結合が切断され、RNPを覆う高分子膜が分解される仕組みとなっている。またナノカプセルの表面にはPEG鎖が修飾されており、その末端にリガンドを修飾することで標的指向性を持たせることも可能である。

✉ moriyama@ltd.co.jp

Sall1欠損ラットにおけるマウスES細胞由来腎臓の作製

Goto et al., 2019, Nat Commun, 10, 451

キーワード

- 臓器移植
- 再生医療
- 異種胚盤胞置換法
- Sall1

要旨

異種胚盤胞置換法により、異種で膀胱等の臓器作製が可能となったが、腎臓での成功例はなかった。

腎臓の発生に必要なSall1に変異を入れたラットを作製した結果、腎臓が形成できなくなることを確認した。

Sall1変異ラットにマウスES細胞を注入した結果、マウスサイズの腎臓が形成され、膀胱とも接続されていることを確認した。

腎構成細胞の多くがマウスES細胞由来細胞に置換されていたが、血管等の一部の細胞はラット由来の細胞が混在していた。

背景

近年、透析を要する慢性腎不全患者数が増加傾向であるが、最も有効な根治治療である腎移植に関して、ドナー腎不足が課題となっている。課題解決に向け、ヒトiPS細胞由来の腎臓作製が検討されているが、未だ移植に堪えうる腎臓の作製には至っていない。異種胚盤胞置換法は、胚盤胞に異種細胞を注入することで異種細胞が欠損している臓器 (細胞) を補充する方法であり、既にマウス内でラットiPS細胞由来膀胱を作製することに成功している。一方、同手法でマウス内ラットiPS細胞由来腎臓の作製には成功していない。筆者らは、マウスiPS細胞がラット腎で後腎間葉に分化しやすいことを見出したことから、ラット内でマウスiPS細胞由来腎臓の作製を試みた。

マウスES細胞はラットにおいて後腎間葉に分化しやすい

ラットおよびマウスES細胞をそれぞれマウス・ラットの胚盤胞に注入し、後腎間葉中のSall1 (腎臓の発生に必須の遺伝子で、後腎間葉で高発現する因子) 発現細胞における異種由来ES細胞の割合を検討した。マウスES細胞をラットに注入した方が、異種由来ES細胞の割合が高かった。

Sall1変異ラットによる腎臓不形成の確認

ラット内でマウスES細胞由来の腎臓を作製するために、Sall1変異ラットを作製した。過去の報告から、Sall1変異マウスで腎臓が形成されないことが明らかになっていたが、ラットでも同様に腎臓不形成が確認された。

Sall1変異ラットにおけるマウスES細胞由来腎臓の作製

Sall1変異ラットにGFPでラベルしたマウスES細胞を注入した結果、ラットの体内でマウスサイズの腎臓が作製され、糸球体形成も認められた。このとき、腎臓が尿管を介して膀胱へも接続していることも確認した。次に、腎臓の各種構成細胞マーカーとGFPの共染色を行った結果、後腎間葉系の細胞 (ポドサイト、近位尿管、ヘンレループ、遠位尿管) について、マウスES細胞由来の細胞に置き換わっていることを確認した。一方で、他の細胞 (糸球体周囲血管、尿管周囲毛細血管、集合管、間質) については、ラット由来の細胞が混在していた。

本研究の展望と課題

ヒトと臓器サイズに近いブタを用いて、ヒト細胞由来の臓器を作製する研究が進んでいる。今回の研究の応用による、ブタにおけるヒト腎臓作製が期待される。一方、本研究では後腎間葉系以外の細胞がキメラ状態であり、移植後の拒絶反応が懸念される。今後、Sall1と他の遺伝子変異を組み合わせることで、解決可能と考えられる。

担当者 藤本 由り 所属 田辺三菱製薬株式会社 専門 薬理 (腎臓)、核酸医薬 (miRNA...)

一言 血液透析は、患者さんのQOL低下につながるだけでなく、毎年1人あたり500万円と高額で、国の医療費の面からも問題となっています。腎臓の再生医療は大きく注目されていますが、複数の構成細胞で機能単位 (ネフロン) を形成するため、試験管内での作製は非常にチャレンジングと考えています。一方、異種胚盤胞置換法を用いたブタにおけるヒト腎臓の作製については、実現度が高まっていると感じております。気になるのは倫理面の課題で、今後の国内外の動向が注目されます。臓器移植問題・再生医療に興味がある方、是非議論させてください。※たなみんランチ・寺子屋たなみんなど、田辺三菱発のiParkイベントにも携わっております。微力ながらiParkの活性化に貢献していければと思いますのでよろしく願います。✉ fujimoto.yuri@ma.mt-pharma.co.jp

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2)の細胞内侵入機構

Hoffmann et al., 2019, Cell, 181, 1-10

キーワード

- SARS-CoV-2
- ACE2
- TMPRSS2
- Pseudotype virus
- プロテアーゼ阻害剤

要旨

SARS-CoV-2は、SARS-CoVと同様に細胞表面にあるレセプター(ACE2)を介して細胞に感染する。

SARS-CoV-2は、SARS-CoVと同様にカテプシン又はTMPRSS2といったプロテアーゼによるSタンパク質の切断を介して細胞に感染すると必要と考えられる(主に寄与するのはTMPRSS2と考えられる)。

TMPRSS2発現細胞へのSARS-CoV-2感染は、TMPRSS2阻害能を持つセリンプロテアーゼ阻害剤(Camostat)によって抑制される。

SARS-CoVの中和抗体は、SARS-CoV-2に対しても交叉反応性を示す。

背景

SARS-CoV2は、その名前が示す通りSARS-CoV(2002-2003年に流行したSARSの原因ウイルス)との相溶性が高いウイルスである。SARS-CoVは細胞表面のACE2に結合した後、エンベロープ膜にあるSpike(S)タンパク質がカテプシンやTMPRSS2といった種々のプロテアーゼによって切断される事で細胞に感染する。また、TMPRSS2 KOマウスにおいて肺細胞へのSARS-CoV感染が著しく抑えられる事から、種々のプロテアーゼの中で特にTMPRSS2が重要な働きを担うと考えられている。しかし、SARS-CoV2がこうしたSARS-CoVと同様の機構で細胞に感染しているかは未知であった。

Sタンパク質の配列相同性比較

SARS-CoV-2のSタンパク質は、SARS-CoVのSタンパク質と76%の相同性を有し、プロテアーゼによる切断に重要なアルギニン残基やACE2への結合に重要なアミノ酸が保存されていた。すなわち、SARS-CoV-2がSARS-CoVと同様の機構で細胞内に侵入している可能性が推察された。

SARS-CoV-2感染におけるACE2の関与

VSV(水疱性口内炎ウイルス)の糖タンパク質をSARS-CoV-2等のSタンパク質に置き換えたpseudotype virusを複数作製した(※こうした事で、BSL2での実験が可能・レポーター遺伝子による定量化が可能等の種々利点がある)。BHK-21細胞にコロナウイルスのレセプターとして報告のあるタンパク質を一過性発現させ、pseudotype virusを反応させた所、ACE2を過剰発現させた場合のみ感染が確認された。この感染は、抗ACE2抗体によって濃度依存的に阻害された。また、ACE2過剰発現細胞へのSARS-CoV-2感染も確認できた。この事よりSARS-CoV-2の感染にはACE2が関与すると結論付けられた。

SARS-CoV-2感染に関わるプロテアーゼ

TMPRSS2非発現のVero細胞ではカテプシンB/L阻害剤(E-64d)によって感染が抑えられた。一方で、TMPRSS2を過剰発現させたVero細胞では、E-64dのみでは不十分であり、TMPRSS2阻害能を持つセリンプロテアーゼ阻害剤(Camostat)を共暴露させる事で細胞感染が著しく抑えられた。この事より、SARS-CoV-2の細胞感染には、SARS-CoVと同様にカテプシンとTMPRSS2が関与していると考えられた。なお、Camostatによる感染抑制効果はヒト気管上皮由来のCalu3や初代ヒト肺細胞でも確認された。

担当者 小笠原彬 所属 田辺三菱製薬株式会社 専門 HTS、核酸医薬、遺伝子治療

一言 SARS-CoVとの相溶性が高く、ある程度予想が立てやすい事情があったとはいえ、この短期間で社会的に意義のあるデータをまとめる世界の研究者のスピード感を改めて実感させられました。この研究の内容も含め、東京大学のグループがセリンプロテアーゼ阻害剤の臨床試験を進めつつあり、今後の進展が気になる所です。また、今回の文献の結果では、SARS-CoV2のSタンパク質がSARS-CoVよりも不安定である事を示唆する結果が出ていました。実際、SARS-CoV2はS1ドメインとS2ドメイン間にあるアルギニンの数がSARS-CoVよりも多く、プロテアーゼに切られやすい可能性があります。こうした点がこのウイルスの高い伝搬性等に寄与しているのではないかと感じており、今後の研究の進展を待ちたいと思います。✉ ogasawara.akira@ma.mt-pharma.co.jp

SARS-CoV由来小分子RNAは感染症関連肺病理に寄与する

Morales et al., 2017, Cell Host & Microbe, 21, 344-355

キーワード

- SARS-CoV
- Small viral RNAs(svRNAs)
- Lung inflammatory pathology
- Antisense oligonucleotides

要旨

SARS-CoV 由来のsmall viral RNAが感染した肺や細胞から同定された。

SARS-CoVのプロセシングはRNase IIIや感染細胞の種類、生物種には依存しない。

svRNA-Nは、3' UTR内の特異的標的配列を介してターゲットmRNAの発現を抑制した。

In vivoにおけるsvRNA-N抑制は、肺病理と炎症誘発性サイトカインを減弱させた。

背景

重症急性呼吸器症候群コロナウイルス(SARS-CoV)は、2002年に発生し、30カ国以上に拡大、約8000人が感染、若年層では10%、高齢層では最大50%の死亡率を示した。SARS-CoVは急性呼吸窮迫症候群(ARDS)に伴う炎症反応の悪化に寄与する小さな膜貫通エンベロープ(E)タンパク質をコードし、病因に寄与するウイルス因子である。一方、タンパク質成分に加え、ウイルスゲノムはノンコーディングRNA(ncRNA)をコードすることが可能で、病原性においてもsmall ncRNAが機能的であるとの報告もある。そこでSARS-CoVが感染時にsmall ncRNAを生成するのか検討したところ、small viral RNAを見出すことに成功した。さらに感染症関連病理との関係も検討した。

SARS-CoV感染細胞の小分子RNAディープシーケンシングによりSARS-CoV由来のsmall viral RNAを発見

マウスに感染するように馴化したSARS-CoV-MA15-wtをマウスへ感染させ、肺組織中の小分子RNAを次世代配列解析により探索しウイルス由来small viral RNA(svRNA)としてsvRNA-nsp3.1, svRNA-nsp3.2, svRNA-Nを同定した。肺の炎症反応悪化を伴わないE蛋白質コードを欠いたSARS-CoV-MA15-ΔEを用いて同様に解析したところ、相対的にウイルス価が低いものの、これら3種類のsvRNAを検出した。またその発現レベルは低かった。同様に異なったウイルス価を示す培養細胞でのSARS-CoV感染試験の結果、いずれもsvRNAを検出するものの、ウイルス価に対応したsvRNA量が検出された。

SARS-CoV感染細胞におけるsvRNAの解析

svRNAの産生プロセスに関して解析するため、miRNAプロセスの中心的な2つのRNase IIIヌクレアーゼであるDroshaおよびDicerを欠いた培養細胞を用い、SARS-CoV感染後のsvRNA産生は、これらRNase IIIが必要ないことが明らかとなった。また、産生されたsvRNA-Nに関しては、その標的配列を3' UTR内に有する人工的なmRNAに対してノックダウン活性を示した。

SARS-CoV感染マウスモデルにおけるsvRNAアンチセンスオリゴ核酸による抗ウイルス効果

SARS-CoV感染細胞において、svRNA-N inhibitorはsvRNA-N発現を抑制したと同時に、培養上清中のウイルス価も顕著に抑制した。さらに、SARS-CoV感染マウスモデルにて、LNAベースのanti-svRNA-Nを投与したところ、ウイルス増殖を抑制しなかったものの、感染時の肺浮腫などの病理像や炎症誘発性サイトカインの産生を抑制した。

担当者 野上真宏 所属 武田薬品工業株式会社 専門 RNA生物学、核酸医薬、神経変性疾患

一言 SARS-CoV-2は一本鎖RNAウイルスであるために、その生活環や感染に伴う病理の理解には、RNA生物学の理解が欠かせない。本研究は3年前に報告されたSARS-CoVに関する論文であるが、COVID-19に対する新しいアプローチの存在を示唆しているように感じました。世界中の研究者が手を取り合い、もちろんRNA生物学者や創薬研究者も含めて、SARS-CoV-2の制圧を目指して果敢なチャレンジを続けている。私も世の中のために、まずはサイエンスカフェを通じて微力ながら貢献したいと考えています。

✉ masahiro.nogami@takeda.com

フェレット、猫、犬、その他の家畜のSARS-CoV-2の感受性

Shi et al., 2020, Science, 368, 1016-1020

キーワード

- SARS-CoV-2
- Intermediate animal
- Companion and domestic animals
- Airborne infection
- Viral RNA

要旨

フェレットにおいてSARS-CoV-2は、上部気道組織でのみ複製する。

フェレットとネコはSARS-CoV-2に高感受性、特にネコでは若齢ネコで重篤化する傾向があり、空気感染も成立する。

犬において感染は起こるものの低感受性、豚、鶏、アヒルなどの家畜はSARS-CoV-2に感染しにくい。

フェレットの2型肺胞上皮細胞および気管、気管支粘膜上皮のACE2発現が、SARS-CoV-2感受性と関連している可能性がある。

フェレットとネコのACE2の配列は2アミノ酸しか変わらず、その保存性が高感受性の理由ではないかと示唆される。

担当者 山崎緑 所属 武田薬品工業株式会社 専門 獣医病理学、自己免疫疾患、DDS、再生医療

一言 2019年に初めてヒト症例が報告されたCOVID-19は全世界にパンデミックを引き起こし、2020年現在において未だ終息の気配を見せない。治療薬およびワクチン開発が急務とされ、原因ウイルスSARS-CoV-2に関する学術論文が急ピッチで公開されている。本論文において著者らはSARS-CoV-2の新たな中間宿主を探索する過程で、SARS-CoV-2がヒトだけでなく、ネコ科の伴侶動物にも感染すること、ブタや鶏などの家畜では感受性が低いであろうことを示した。今後、SARS-CoV-2研究における最適なモデル動物の選定やアニマルマネジメントにおいて、本報告は貴重なリソースとなると考えられる。個人的な感想として、SARS-CoV-2感染患者の臨床現場での傾向から、若齢ネコは成体ネコよりも感受性が低いのではないかと予想したが、逆の結果で興味深く、単純に年齢差では説明できないCOVID-19病態の複雑さを反映していると感じた。✉ midori.yamasaki@takeda.com

臨床グレード可溶性ヒトACE2を用いた人工ヒト組織におけるSARS2-CoV-2感染の抑制効果

Monteil et al., 2020, Cell, 181, 905-913

キーワード

- SARS-CoV-2
- アンジオテンシン変換酵素2(ACE2)
- 可溶性ACE2
- 血管
- ヒトオルガノイドモデル(血管、腎臓)

要旨

SARS-CoV-2はヒト血管オルガノイドとヒト腎臓オルガノイドに感染する。

臨床グレードのリコンビナントの可溶性ヒトACE2は細胞(Vero-E6細胞)とヒトオルガノイドモデル(血管、腎臓)におけるSARS-CoV-2の初期の感染に対して抑制作用を示す。

担当者 荒川佑一 所属 アクセリード 専門 in vivo薬効薬理、精神疾患、トランスレーショナル研究

一言 当時COVID-19(=新型コロナウイルス感染症)の肺における重篤な呼吸器障害に注目が集まっていましたが、COVID-19患者における血管内皮細胞へのウイルス感染と血管内皮炎を示唆する文献報告(Varga et al, 2020, Lancet, 395, 1417-1418)がpre-proofでされ、また足の指が「しもやけ」のように赤くなる事例、30-40代の軽症者が脳梗塞を起こす事例および子供で川崎病に似た症状を示す事例など血管系に関連する事例もニュースで報告され始めていたので、この文献を選びました。現在、世界中でワクチン開発が進んでおりますが、COVID-19の病態理解と新規治療法開発を考える上で重要な報告だと思えます。

✉ yuuichi.arakawa@axcelead.com

背景

SARS-CoV-2はACE2を受容体として利用して標的細胞に侵入する。ACE2の肺での発現はCOVID-19の重篤な呼吸器障害を説明すると考えられる。一方、肺以外のACE2の組織発現(心臓、腎臓、血管および小腸等)はCOVID-19患者で見られる多臓器不全を説明する可能性が考えられる。また、特にウイルスの大きさの観点から考えると、SARS-CoV-2は局所組織に感染する前に血管へ最初に感染する可能性が考えられる。本研究では、臨床グレードのリコンビナントの可溶性ヒトACE2(以下、可溶性ACE2)が細胞においてウイルス感染抑制作用を示すか、更にSARS-CoV-2がヒトオルガノイドモデル(血管、腎臓)に感染するか、可溶性ACE2はその感染に対しても抑制作用を示すかについて検証を行った。

SARS-CoV-2の単離

2020年2月、COVID-19患者(スウェーデン人)の鼻咽頭からサンプルを採取し、ウイルスを単離した。得られたウイルスの次世代シーケンシングを行い、系統的にSARS-CoV-2のA3に属する事を確認した。

ヒト可溶性ACE2は細胞株(Vero-E6細胞)においてSARS-CoV-2感染を抑制する

異なるウイルス数(PFU:10²~10⁶)のSARS-CoV-2をVero-E6細胞に感染させた。その後ヒト可溶性ACE2(25-100 μg/mL)を1時間処置して15時間培養を行い、ウイルス量を測定した。その結果、ヒト可溶性ACE2は、コントロール群に比して、SARS-CoV-2の感染レベルを有意に抑制した。一方、マウス可溶性ACE2はSARS-CoV-2の感染レベルの抑制作用を示さなかった。

SRAS-CoV-2はヒト血管オルガノイドとヒト腎臓オルガノイドに感染し、ヒト可溶性ACE2はその感染を抑制する

作製したヒト血管オルガノイドにSARS-CoV-2を処置し、その3、6日後にウイルス量を測定したところ、経時的なウイルス量増加が見られた。この結果はSARS-CoV-2の活動的な複製を示す。更に、その6日後に得られた上清をVero-E6細胞に48時間処置してウイルス量の測定を行い、子孫ウイルスが感染能力を持つ事も確認した。最後に、ヒト血管オルガノイドにSARS-CoV-2(PFU:10⁶)を感染させ、その後ヒト可溶性ACE2(50-100 μg/mL)を1時間処置して3日間培養を行い、ウイルス量を測定した。その結果、ヒト可溶性ACE2は、コントロール群に比して、SARS-CoV-2の感染レベルを有意に抑制した。ヒト腎臓オルガノイドにおいてもヒト血管オルガノイドと同様な実験を行い、同様な結果が認められた。

2020年5月1週時点の SARS-CoV-2のワクチン 開発

Gao et al, Science, 2020, eabc1932.

キーワード

- SINOVAC社
- 不活性化ワクチン (Active immunization)
- moderna社
- RNAワクチン

要旨

SINOVAC社(中国)の不活性化ワクチンは非臨床で忍容性と予防効果があると示され、臨床が開始された。

moderna社(US)のRNAワクチンの非臨床データは公表されていないものの(5月時点)、同等のスピードで臨床開発が進んでいる。

背景

2020年5月時点でのSARS-CoV-2ワクチン開発状況を紹介します。サイエンスカフェ発表当時、104個のワクチン開発が登録されていた。中でも、一般的なワクチンプラットフォームである不活性化ワクチンを開発するSINOVAC社(中国)と、最新のプラットフォームであるRNAワクチンを開発するmoderna社(US)の進捗(2020年5月時点)について着目。本論文では、SINOVAC社は、見出した最適な不活性化株が非臨床で予防効果を示す事を報告した。同時期moderna社も臨床試験を既に開始している。

不活性化ワクチン(SINOVAC社)の進捗 (2020年5月時点)

製造条件には、ウイルス生産中に変異が入りにくいウイルスを選抜する必要がある。そこで、11名の感染患者の気管支肺胞液を*in vitro*で10回継代培養し、遺伝子解析したところ、CN2株は2か所の変異に留まり、最も良好な株と判明された(重要なスタンパクに変異無)。げっ歯類への免疫で得られた抗体の大部分は、(ウイルスの表面で感染に重要な)Spike部に対するものであり、従来の別ウイルスワクチンによる抗体と類似であり、期待できる結果となった。次にアカゲザルに中もしくは高用量を筋肉内に投与(3 or 6 ug)した後、気管にSARS-CoV-2を投与し、肺炎を惹起させたところ、プラセボ群では重度の間質性肺炎が認められた一方で、中・高用量群では軽度であった。不活性化ワクチンで懸念されるAntibody-dependent enhancement of infection(ADE)は観察期間内では認められず、忍容性でも良好な結果となった。[9月末時点情報では、本ワクチンはPhi-IIで忍容性が確認され(peer review journalに投稿中)、PhiIIIに移行検討中とのこと]

RNAワクチン(moderna社)の進捗 (2020年5月時点)

非臨床データが(5月時点では)公表されていないが、2020年3月末で既にRNAワクチンが健常者に投与されている。5月初旬にFast Track designationに承認されており、最速で2021年での承認が見込まれている。工業生産時に、変異導入の懸念が無く、製造が早く、免疫原性が低減される最先端のRNAワクチンも同等のスピードで開発されている。[9月末時点情報/Phiで忍容性が報告(PMID: 32663912)され、7月からPhiIII開始]

担当者 鈴木俊也 所属 大塚製薬株式会社 専門 RNA生物学、神経変性疾患

一言 核酸ベースのモダリティーで多くの臨床成功が報告され始めた(SPINRAZA, onpatroなど)。moderna社のRNAワクチンの成功は、mRNAそのものがワクチンにも利用できたことを示すのみならず、製造の過程(コスト、変異、免疫原性など)で不活性化ワクチンの利点を上回るかもしれない。ますます核酸プラットフォームの活用が拡大するのかもしれない。

✉ Suzuki.Shunya@otsuka.jp

喫煙及び炎症性シグナルは、気道におけるACE2(SARS-CoV-2レセプター)の発現を上昇させる

Smith et al., 2020, Dev Cell, 53, 514-29

キーワード

- SARS-CoV-2
- ACE2
- 喫煙
- single RNA-seq
- IFN (Interferon)

要旨

喫煙者において、分泌系を含む種々の肺の細胞で、ACE2(SARS-CoV-2レセプター)の発現が上昇している。

慢性的な喫煙により、ACE2陽性の肺分泌細胞数および細胞当たりのACE2発現量が、共に上昇する。

禁煙により、ACE2発現は喫煙者と比べて減少する。

ACE2の発現は、ウイルス感染やInterferon(ウイルス感染に伴い分泌されるタンパク質)によっても上昇する。ウイルス感染による炎症がACE2を誘導し、更に感染を悪化させる可能性が示唆される。

背景

SARS-CoV2により引き起こされるCOVID19は、2019年に出現した新規の呼吸疾患群である。SARS-CoV2は細胞表面にあるACE2レセプターを介して細胞に感染する事が報告されており、ACE2の発現量や調節機構はSARS-CoV-2の感受性に重要な影響を与えていると考えられる。SARS-CoV-2感染症の致死率は5%未満とされているが、男性および高齢者は特に重症化しやすいとの報告がある。また、COVID-19を有する喫煙者は、集中治療室(ICU)への入院を要する可能性が非喫煙者に比べて有意に高いという報告もある。しかし、これらの事象の背景にある要因については、十分に理解されていなかった。

喫煙によるACE2発現上昇

GTEx等のデータベースや既存のコホートデータを再解析する事で、SARS-CoV-2の感受性に影響を与える因子を検討した。年齢・性別とACE2の発現の関係については関連性が見られなかったものの、喫煙者および非喫煙者の3つのコホート研究を再解析する事で、喫煙により肺のACE2発現が上昇する事が示された。Pack Years(喫煙量を表す国際的指標)が高い人ほど肺におけるACE2の発現が高く、用量依存性がある事も確認された。また、12カ月以上禁煙した元喫煙者のコホート研究より、喫煙によるACE2発現上昇は可逆的である事も併せて示された。

喫煙による肺分泌細胞数及びACE2発現の上昇

肺は30以上の細胞種で構成される臓器である。この中で特に重要な細胞種を特定するため、ヒト肺におけるsingle RNA-seqデータを再解析した。その結果、ACE2発現がEPCAM陽性の肺上皮細胞(中でもLAMP3陽性の肺泡2型細胞及びMUC5AC陽性のゴブレット/クラブ細胞といった肺分泌細胞群)で特に強く見られた。特筆すべき事として、喫煙により、「ACE2陽性の肺分泌細胞数」と「肺分泌細胞内のACE2発現量」の両方が増加した。後者は、ALI(Air-Liquid Interface)法で肺分泌細胞へ*in vitro*分化させる過程でタバコの煙を暴露させる実験でも確認された。

ACE2発現上昇に関わる炎症性シグナル

種々のコロナウイルス感染及びウイルス複製中に産生される2本鎖RNAへの暴露でACE2の発現が上昇する事より、筆者らはACE2の発現上昇に炎症性シグナルが関与しているか検討した。その結果、IFN- α とIFN- β が小気道上皮及び気管の初代培養細胞におけるACE2発現を上昇させる事がわかった。IFNは抗ウイルス作用を持つサイトカインであるが、SARS-CoV-2はそのACE2発現誘導作用を自身の感染・伝播に上手く活用している可能性が示唆された。

担当者 小笠原彬 所属 田辺三菱製薬株式会社 専門 HTS、核酸医薬、遺伝子治療

一言 社会的にも非常に意義のある研究ではないかと感じています。これまで得られたコホートデータを上手く活用しながら、短期間で疫学現象の背景に潜む要因を突き止める姿勢に感銘致しました。また、今回示唆された正のフィードバック機構は、このウイルスの巧妙さを如実に表していると感じます。

✉ ogasawara.akira@ma.mt-pharma.co.jp

Upstream ORFによるMAVSの自発的な凝集抑制と自然免疫恒常性の制御

Shi et al., 2020, iScience, 23, 101059

キーワード

- 自然免疫
- upstream open reading frame (uORF)
- MAVS
- RNAウイルス

要旨

RNAウイルスに対する自然免疫反応にはミトコンドリア外膜タンパクのMAVSがシグナル伝達のハブの役割で関与している。

MAVS mRNAには通常のORFの上流にuORFが存在している。

抗ウイルス応答の際に起こるミトコンドリア膜上でMAVSの凝集形成はuORFによるタンパク翻訳調節によって制御されている。

MAVS凝集体はマイトファジーによって除去されることで異常な自然免疫反応を防ぎ、自然免疫の恒常性を維持している。

背景

RNAウイルスに対する自然免疫反応にはミトコンドリア外膜上のMAVSがハブの役割を果たし、I型インターフェロンや炎症性サイトカイン産生を引き起こす。ウイルスが感染した際に、RIG-IやMDA5のようなRNAセンサー分子がウイルスRNAを認識することで、自然免疫反応のシグナル伝達が始まり、MAVSがミトコンドリア上で凝集形成することで、下流の転写因子にシグナルを伝達していくことが明らかになっている。これまでに、MAVSを介した自然免疫反応は様々な制御因子やミトコンドリアの生理機能によって調節されていることが分かっているが、MAVSがどのように凝集体を形成するのか、凝集体をどのように除去して自然免疫反応を収束させるのか、その詳細なメカニズムは明らかになっていなかった。

MAVSを介した自然免疫応答はMAVS uORFの欠失によって活性化される

ヒトのMAVS mRNAには3つのuORFが存在している。筆者らは、MAVSが欠損した細胞にuORFを有したMAVSや一部あるいは全部のuORFを欠失させたMAVSコンストラクトを発現させた。uORFを欠失したMAVS mRNAを発現する細胞では、RNAウイルス(センダイウイルス)の感染がない場合でも、自発的に抗ウイルス応答を誘導して、IFN- β や炎症性サイトカインの産生を起こした。

MAVSの凝集形成はuORFによるmRNAからのタンパク翻訳制御により抑制されている

uORFを欠失したMAVSを発現する細胞では、センダイウイルスの感染がない場合にも凝集形成を引き起こした。MAVSには全長のM1型とシグナル伝達に必須なCARDドメインを欠失したM2型の2つのアイソフォームが存在しており、M2型のMAVSはドミナントネガティブに機能して、M1型MAVSの凝集形成を抑制することが分かっている。今回の検討で、上流から2つのuORFがM1型の翻訳抑制、最下流のuORFがM2型の翻訳抑制を担い、M1型とM2型の発現比を変化させMAVSの凝集形成を調節している事がわかった。

MAVS凝集はマイトファジーによって除去される

内在性のMAVS uORFを欠損させた細胞ではMAVSのタンパク発現量が減少するが、オートファジー阻害剤によって発現量が回復した。また、この細胞では、ミトコンドリア量が減少し、マイトファジーが起きていることが示唆された。オートファゴソーム形成の際にミトコンドリア側のレセプターとして機能するNIXはMAVSと結合しており、NIXをノックダウン(KD)することでMAVSの凝集が蓄積すると共にウイルス感染がなくてもIFN- β の産生が起こった。以上よりMAVS凝集がマイトファジーによって除去される事が自然免疫の恒常性に関与していると考えられる。

担当者 安川開 所属 田辺三菱製薬株式会社 専門 核酸医薬、分子生物学

一言 社内では核酸医薬品の創製に携わっていて、創業標的になるRNAのバイオロジーについて興味を持っています。ちょうど、学生の頃に研究していたミトコンドリアと自然免疫がRNAからの翻訳調節で制御されている本報告があり、今回紹介させていただきました。自然免疫はウイルスや病原菌に対する最前線の重要な生体防御反応ですが、異常な反応は自己免疫疾患等の原因にもなります。今回紹介したMAVSの凝集蓄積による過剰な免疫反応は全身性エリテマトーデス患者さんで起こっているとの報告もあり、RNA機能と疾患との関連がより明らかになってくると疾患治療への応用へとつながっていくと今後の展開に期待しています。

✉ yasukawa.kai@mk.mt-pharma.co.jp

Th17細胞は滑膜細胞と自然免疫リンパ球からサイトカインGM-CSF産生を誘発し、関節炎の増悪化に関与する

Hirota et al., 2018, Immunity, 48, 1220-1232

キーワード

- 自己免疫疾患
- Th17細胞
- サイトカインGM-CSF
- 関節炎・滑膜細胞
- RAG2^{-/-}(免疫不全)マウス

要旨

Th17細胞が産生するGM-CSFは炎症の強さには関連するが、発症には関与しない。

滑膜細胞・自然リンパ球から産生されるGM-CSFが関節炎の発症および増悪に重要である。

滑膜の自然リンパ球はIL-2、インターロイキン33、TLR9のリガンドに反応して、GM-CSF産生をし、関節炎の増悪に関与することが示唆。

関節リウマチ患者の滑膜液にもGM-CSFを産生する自然リンパ球が存在する。

背景

Th17細胞は自己免疫疾患において重要であるにも関わらず、一体どのようにして自己免疫に関わる組織内に存在し、他の抗炎症性細胞をコントロールしているのかは明らかになっていません。著者らは、関節炎を自然発症する自己免疫性関節リウマチモデルを用い、Th17細胞が、インターロイキン-17(IL-17)を介して線維芽細胞様の滑膜細胞を刺激してサイトカインGM-CSFを分泌する仕組みと病態に及ぼす影響について考察しています。

Th17細胞が産生するGM-CSFは関節炎症の強さに関連するが、発症には関与しない

炎症関節内ではIL-17とGM-CSFの分泌が多くみられ、これらは炎症関節においてサイトカイン産生細胞数に関連した。一方で、GM-CSFを欠損させたSKGマウスとIL-17産生力を欠損させたマウスでは関節炎の強さが極めて低いことがわかった。また、慢性期において、野生型よりもGM-CSF欠損型のほうが関節炎の強さが抑制されたが、発症に影響はなかった。これらの結果から、T細胞以外の細胞が産生するGM-CSFが関節炎発症に関与することが示唆された。

滑膜細胞・自然リンパ球から産生されるGM-CSFが関節炎の発症および増悪に重要である

SKGマウスの炎症関節から分離した滑膜繊維芽細胞にIL-17刺激を与えると、8つの遺伝子の発現上昇が見られた。そのうち、遺伝子発現量が最も多く現れたものはCsf2(GM-CSFをコードする遺伝子)であることがわかった。

滑膜の自然リンパ球は、IL-2、IL-33、TLR9リガンドに反応したGM-CSF産生と、関節炎増悪化に関与する

自然リンパ球は炎症を起こす前の正常な関節に常に存在し、関節炎発症により増殖する。一方で、IL-2、IL-7、IL-33が2型自然リンパ球の機能を制御することが知られていることから、これらが滑膜中でGM-CSF産生にどのように関わるかを検討した。これらのサイトカインは単独でもGM-CSF産生を誘導した。またTLR9リガンド(CpG DNA)は、単独ではGM-CSFを誘導しなかったものの、IL-33によるGM-CSF産生を増大させた。

関節リウマチ患者の滑膜液にもGM-CSFを産生する自然リンパ球が存在

関節リウマチの患者の滑膜液における自然リンパ球の存在頻度は、変形性膝関節症(OA)の患者の滑膜液および末梢血に比べ有意に高かった。また、GM-CSFを産生する自然リンパ球が滑膜液中で有意に増加していた。このことから、関節リウマチ患者の滑膜液にもGM-CSFを産生する自然リンパ球があることが示唆された。

担当者 内田真理恵 所属 武田薬品工業株式会社 専門 免疫、抗体精製、遺伝子解析

一言 炎症性サイトカインは自己免疫疾患の発症に関連していて、炎症性疾患の発症と治療法の模索において重要であることが示唆されてきました。しかし、炎症性サイトカインが炎症の発症に関与する機構については環境要因・遺伝要因なども複雑に関与し、詳しいことはあまりよくわかっていませんでした。本研究では滑膜細胞と自然リンパ球から産生されるサイトカインと、その他の免疫細胞が産生するサイトカインとそれらと関節炎の関係について、様々な角度から考察しています。この論文の坂口先生は免疫学の次のノーベル賞候補とも言われていて、これからも研究にも注目が集まりそうです。

✉ marie.uchida@takeda.com

脳深部刺激療法に基づく光遺伝学はパーキンソン病様症状を改善する

Valverde et al., 2020, Nat Commun, 11, 2388

キーワード

- パーキンソン病
- 脳深部刺激療法 (DBS)
- GABA抑制神経
- 光遺伝学

要旨

DBSはGABA抑制ニューロンをリクルートすることでパーキンソン病における大脳皮質の発火頻度の上昇を抑制する。

DBSによる大脳皮質の発火頻度抑制は、ソマトスタチン (Sst)陽性のGABA抑制ニューロンをリクルートすることによる効果である。

DBS又は光遺伝学を用いたパルプアルブミン (PV) or Sst陽性細胞への刺激により、モデル動物における行動薬理を改善する。

背景

パーキンソン病の主な治療方法はレボドパやドパミン作動薬によってドパミンを補充することだが、ハネムーン期間(初期の段階における薬剤が良く効く期間)の後には運動合併症が避けられない。このステージの治療にはDBS(視床下核への脳深部刺激療法)が最も効果的な治療法である一方で、DBSは侵襲性が高い為に厳格な基準があり、少数の患者にしか適用ができない。また、DBSのメカニズムに関しても、色々な仮説が提示されているが、あまり理解が進んでいない。そこで筆者らは、パーキンソン病モデル動物におけるDBSの治療メカニズムを解明し、またその結果から、DBSに代わる非侵襲的な治療方法の可能性を示した。

DBSはGABA抑制神経をリクルートすることでパーキンソン病における大脳皮質の発火頻度を抑制する

パーキンソン病モデルラット(6-OHDAを黒質緻密部に注射)において、DBS刺激を行ったところ、モデルラットで確認される大脳皮質における発火頻度の上昇が抑制された。また、視床下核にDBS刺激をした際のearly PSP(postsynaptic potential)との逆転電位は、Cl⁻の平衡電位と一致した。これにより、DBSはGABA抑制ニューロンをリクルートすることで、大脳皮質の過活動を抑制していることが判明した。

DBSによる抑制は、ソマトスタチン(Sst)陽性のGABA抑制ニューロンをリクルートすることによる効果である

PVもしくはSst陽性細胞特異的にChR2(チャンネルロドプシン)を発現させたマウスを用いることで、DBSがどのGABA抑制ニューロンをリクルートしているかを検討した。その結果、DBSによりPV陽性細胞の活動電位は抑制され、Sst陽性細胞の活動電位は活性化することを見出した。これにより、DBSによる抑制はSst抑制ニューロンをリクルートすることによる効果であることが判明した。

DBS又は光遺伝学を用いたPV or Sst陽性細胞への刺激により、モデル動物における行動薬理を改善する

PVもしくはSst陽性細胞特異的にChR2を発現させたマウスを用いてパーキンソン病モデルを作成し、その際の行動薬理を実施した。DBS刺激を行ったマウス及び光刺激を行いPV/Sst陽性ニューロンを活性化させたマウスにおいて、行動薬理の改善が確認された。これにより、DBSに置き換わる方法として、光遺伝学の可能性が示唆された。

担当者 栗田卓 所属 田辺三菱製薬株式会社 専門 HTS、核酸医薬、Biophysics、電気生理学

一言 大学時代は名古屋市立大学の薬学部(今泉研)で電気生理学(特にパッチクランプ)にひたすら従事しておりました。会社に入ってからHTSやBiophysics(SPRやITC)、核酸医薬に携わっておりますが、論文を読んで一番興味を持てるのは、電気生理学だと常々感じています。電気生理学関連で面白そうな論文を見つけた際には、気軽に議論をさせて頂ければと思っています。今後とも宜しくお願い致します。

✉ kurita.takashi@ma.mt-pharma.co.jp

腸内細菌叢：寄生虫が自己免疫疾患の発症を抑える、そのメカニズムとは？

Shimokawa et al., 2020, Nat Commun, 11, 1922

キーワード

- 腸内細菌叢(マイクロバイオーム)
- 自己免疫疾患
- Treg細胞
- トレハロース
- 寄生虫

要旨

寄生虫の感染者数が劇的に減少した地域では自己免疫疾患の患者数が疫学的に増加している(衛生仮説)。

寄生虫(線虫)の感染によりCD8⁺ Treg細胞が誘導され、自己免疫疾患である一型糖尿病の症状が抑えられる。

線虫によるTreg細胞誘導の作用は腸内細菌叢を介して行われている。

線虫はトレハロースを分泌しており、このトレハロースがヒトの腸内細菌叢に影響を及ぼし、結果としてTreg誘導、自己免疫疾患の症状を抑えることにつながると考えられる。

背景

近年、我々の住む環境は衛生的に劇的に改善し、寄生虫病や感染症は大幅に減少した。しかし一方で、現代病として、そのような地域での自己免疫疾患の患者数が増加していることが疫学的に証明されている(衛生仮説)。この関連性は何か?寄生虫は宿主に寄生するために宿主の免疫機能を低下させる仕組みを持っていると考えられており、これが自己免疫疾患の過剰な免疫反応を抑えてくれていると考えられるが、その詳細なメカニズムはあまりよくわかっていなかった。本論文では自己免疫疾患の一つである一型糖尿病に着目し、その発症と寄生虫感染との関連性を解き明かしている。

寄生虫(線虫)の感染によりCD8⁺ Treg細胞が誘導され、自己免疫疾患である一型糖尿病の症状が抑えられる

制御性T細胞は免疫応答を負に制御し自己免疫や過剰な炎症反応などの有害な免疫反応を抑制する細胞であるが、マウスに線虫を感染させるとこのCD8陽性Treg細胞が誘導された。また、一型糖尿病モデルマウスにおいて、線虫感染により同様にTreg細胞誘導されるが、上昇していた血糖値が低下、低下していた血中インスリン濃度が上昇し、糖尿病症状が抑制、改善された。

線虫によるTreg細胞誘導の作用は腸内細菌叢を介して行われている

抗生剤により腸内細菌叢を破壊したマウスを用いて、上記と同様に線虫感染の作用を検討したところ、CD8陽性Treg細胞は誘導されず、血糖値などの糖尿病症状も改善しないことがわかった。以上の結果は線虫によるTreg細胞誘導のメカニズムは腸内細菌叢を介していることを示す。

線虫はトレハロースを分泌しており、このトレハロースがヒトの腸内細菌叢に影響を及ぼし、結果としてTreg誘導、自己免疫疾患の症状を抑えることにつながると考えられる

線虫に感染したマウスの腸内容物を質量分析したところ、二糖類であるトレハロースが増加しておりこれは線虫により分泌されていることがわかった。トレハロースを単独投与すると線虫感染で見られていたようなTreg細胞誘導や糖尿病症状の改善が確認された。線虫感染やトレハロース投与時の腸内の細菌叢を確認したところ、*Ruminococcus*属の細菌が増加していることが分かり、この細菌をマウスへ投与すると同様にTreg細胞誘導や糖尿病症状の改善が確認された。一型糖尿病患者でも*Ruminococcus*属の腸内細菌は少なく、また血中トレハロースが低く、ヒトとの相関性もある。

担当者 平田拓 所属 田辺三菱製薬株式会社 専門 膜イオントランスポーター、マイクロバイオーム、代謝性疾患

一言 マイクロバイオームと免疫疾患との関連性は非常に研究が盛んなところですが、寄生虫の持つ宿主の免疫機能を抑え込むメカニズムの解明からのアプローチということで既存の研究とは異なる視点が見どころの論文です。実際に寄生虫が宿主に定着するメカニズムなので、これを利用した創薬も比較的安全性の高いものとして薬効も期待できるかもしれません。また、患者さんは特有の細菌叢になるので患者層別化やプレジジョンメディスンのような未病介入への活用にも使えるかもしれません。今後の研究が楽しみです。

✉ hirata.taku@ma.mt-pharma.co.jp

BRD4機能の制御異常がMeCP2変異ニューロンの機能異常をもたらす

Xiang et al., 2020, Mol Cell, 79, 84-98

キーワード

- レット症候群(RTT)
- 介在ニューロン(IN)
- 脳オルガノイド
- エピジェネティクス
- 低分子化合物

要旨

MeCP2変異は脳皮質の介在ニューロンに重大な障害を与える。

BRD4の制御異常はRTT介在ニューロンのトランスクリプトーム異常に寄与する。

MeCP2変異はヒト脳オルガノイドにおいて細胞型特異的な障害を引き起こす。

BET阻害はRTT様表現型を是正する。

背景

レット症候群(RTT)は神経発達障害の一つで、生後6か月以降に知的障害、てんかんなどの症状を呈する。8割の患者でX染色体にあるMeCP2遺伝子に変異があり、ほぼ女児だけが発症する。MeCP2は発生に必須であり、主に転写活性や抑制を担い、他にクロマチン再構築やスプライシングも制御している。大脳皮質系においてMeCP2が発現している細胞型がわかっているが、神経病態を説明できる分子メカニズムについて不明な部分が残っている。本論文でヒトES細胞を用いてRTTの病態再現を行い、MeCP2変異介在ニューロン(IN)の機能不全を確認している。さらにRTT様表現型を軽減する特定の薬剤も発見している。

RTT INの転写異常や機能障害の矯正

MeCP2変異ES細胞を用いてINを作製し、広範囲に転写異常を来し、成熟的な機能不全を起こしていることがわかった。そこで低分子化合物を用いて、ワイドな転写障害を矯正するために、発現調節因子を阻害するJQ1という化合物に着目した。RTT INにJQ1を処置することで、トランスクリプトームや機能的な異常が緩和した。

MeCP2-BRD4 axis がゲノムワイドに転写を調節している

緩和作用を示したことから、JQ1のメインターゲットであるプロモドメインタンパクBRD4の挙動解析が実施された。RTT INにおいて、BRD4は脱分極関連遺伝子座への過剰な結合を起こし、これらの遺伝子の転写活性を誘導していた。BRD4結合標的領域が、本来MeCP2が結合する領域と大きくオーバーラップしていたことから、MeCP2の欠損によりBRD4が過剰にクロマチンにアクセスでき、異常な転写活性を示すことが示唆された。

JQ1はオルガノイドや動物モデルの表現型を軽減する

MeCP2変異の影響を他の細胞型や脳の領域特異的に解析するために、脳オルガノイドとシングルRNA-seqを組み合わせた。脳オルガノイドより神経細胞とグリア細胞を区別し、MeCP2変異条件において遺伝子発現の障害を確認したが、JQ1を作用させることで異常な転写が改善された。RTT動物モデルにおいてもJQ1は寿命をのばし、神経症状を和らげることが確認された。本研究でRTTにおけるBRD4のメカニズムの重要性及びBRD4をターゲットにした治療法の可能性が見いだされた。

担当者 市島ホセ 所属 武田薬品工業株式会社 専門 RNA生物学、iPS細胞、発生、病態解析

一言 本論文のように自分の専門性に近く、治療法への介入の可能性を示している論文をよく読んでいます。これまで多くの疾患で原因遺伝子が特定されてきたが、病状に繋がる詳細なメカニズムが不明のままでは治療法の開発失敗の恐れが残る。しかしながら、技術の進歩で詳細な分子メカニズムまでよく理解されている疾患が数多く増えてきました。これからはサイエンスカフェで希少疾患を含め、病態のメカニズムを明らかにした報告を紹介させていただけたらと思っています。

✉ jose.ichishima@takeda.com

パーキンソン病患者由来の人工多能性幹細胞(iPS細胞)を用いた幹細胞治療

Schweitzer et al., 2020, N Engl J Med 382,1926-19322

背景

米国のパーキンソン病患者数は約100万人と推定されています。発症原因は不明ですが、進行すると、運動や感情の制御に関わる神経伝達物質のドパミンを産生する神経細胞が失われていくことが分かっています。主な症状は手足の震えやこわばり、協調運動障害などですが、抑うつ症状や興奮、記憶力や思考能力の低下なども見られ、いずれも時間経過とともに悪化します。薬物治療などで症状を軽減することは可能ですが、完治には至らない疾病です。今回紹介する報告では、孤発性パーキンソン病(sporadic PD)患者1例を対象に、患者本人から樹立したiPS細胞を使用してドパミン前駆細胞へと分化させ、autologous移植が実施されたので紹介する。

キーワード

- パーキンソン病(PD)
- Autologous(自己移植)
- 免疫抑制剤
- PDQ-39(The Parkinson's Disease Questionnaire, PD質問票)
- MDS-UPDRS(Unified Parkinson's Disease Rating Scale, PD臨床評価スケール)

要旨

孤発性PD患者1例に対し、患者自身由来のiPS細胞から分化させたドパミン前駆細胞を線条体へautologous移植。

免疫抑制剤なしでの移植片生着を18F-L-dopa PETプローブで確認。

手術後のPDの症状の臨床的指標は、移植後18~24ヶ月で安定化または改善。

担当者 鈴木桂 所属 あすか製薬株式会社 専門 内分泌(甲状腺)、RWD研究、患者市民参画

一言 創薬アイデアの企画提案からanimal POC取得する仕事に従事する薬理系の研究者です。自覚症状約10年、薬剤治療歴6年目のPD患者当事者でもあります。湘南アイパークにいる再生医療の専門家の皆様から、最先端のご意見を伺いたと思い、演者から逆に質問する発表形式を取りました。また別の機会に、PD患者さんにもかみ砕いてこの論文を紹介してみました。やはり、患者さんには、「よくわからないけど万能」という認識が多い印象でした。「一人で聞いたら(完治には至らないことが)ショックだったかもしれないけど、みんなで聞いたから受け入れられた」とおっしゃる患者さんもういらっしゃいました。2020年、iPASSでもPatient Involved Science Communicationを提案します。皆様のご参加をお待ちしております。✉ suzuki-k@aska-pharma.co.jp

移植実施されたPD患者の状況について(細胞移植前時点)

69歳男性医師、進行期、孤発性PD歴10年。服用していた薬剤は、Rytary(カルビドパ/レボドパ徐放製剤)23.75/95mg、1日4回3カプセル、ロチゴチン4mg/日、ラサギリン1mg/日。レボドパ当量は、904mg。オフタイム:1日平均3時間。本患者へのレボドパの高用量投与は起立性低血圧を悪化させ、運動機能のさらなる改善をもたらさなかった。認知機能は正常で、幻覚症状はなし。

移植手術について

- 盲検化されていない状況で介入。
- FDAに準拠し、MRIガイド付き定位手術により、6ヵ月間隔で左半球と右半球を隔てて被殻に移植した。術前にセファゾリンを静脈内投与した。
- 免疫抑制剤、グルココルチコイド、抗痙攣剤は一切使用しなかった。各手術後、患者は一晚モニターののち、翌日に退院した。

細胞移植後

- 線条体へ細胞移植したところ、免疫抑制剤なしで18F-L-dopaを用いたPET像における移植片の生着が示唆された。手術後のPDの症状の臨床的指標は、移植後18~24ヶ月で安定化または改善。
- 服用レボドパ当量は、847mgとやや低下した一方、droxydopaが追加された。運動スコアとADL(日常生活動作)の改善。レム睡眠行動障害(RBD)の症状、咽頭痛と嚥下障害。不安と抑うつ症状の軽減を含む睡眠の質の向上。
- 主観的認知機能の低下は認められず、認知機能試験MoCAスコア27~30。

脳内到達する抗体DDSシステムによるアルツハイマー型認知症モデルマウスのアミロイドβ凝集の抑制

Xie et al., 2020, ACS Nano, 14, 6729-6742

キーワード

- 血液脳関門 (BBB)
- GLUT1 (グルコーストランスポーター1)
- アルツハイマー病 (AD)
- ドラッグデリバリーシステム (DDS)
- 血中グルコース濃度変化

要旨

Fabをアミド化反応によりシトラコニル化することでチャージコンバージョンさせpH応答性をもつグルコースリガンド搭載DDS (BBB突破型DDS)を開発した。

絶食24h後、グルコースを腹腔内投与することで血中グルコース濃度変化させ、グルコース修飾率25%のBBB突破型DDSキャリアで抗体の脳内到達率3%を達成した。(通常の抗体では0.6%以下)。

APP/PS1マウス (ADモデルマウス) にBBB突破型DDS (1.8 mg/kg) 投与でアミロイドβ量を減少させることに成功した。

背景

ADはアミロイドβ沈着によって生じることが知られている。その治療法として抗体医薬が挙げられるが、脳内移行が低いことが問題であった。その問題を回避するため脳内移行を上げるDDSが研究されてきている。脳へグルコースが供給されることから、グルコースを搭載したDDSは過去にも例があるが成果はあがっていない。そこで、筆者らは低血糖時、BBB血管内皮細胞の血管内腔側に高発現し、リサイクリングされるGLUT1に着目し、絶食とグルコース投与を併用することで脳内移行率を向上できると考えた。本研究では、アミロイドβに対する抗体断片FabをDDSに内包させ、抗体医薬の問題である脳内移行率の低さを解決することを試みた。

グルコース修飾率とチャージコンバージョン効果を併用したDDSを設計する

In vitroでグルコースの修飾率25、50、100%での細胞内取り込みを比較したところ、グルコース修飾率増加によって細胞内取り込みが向上した。またFabをシトラコニル化することでチャージコンバージョンを持たせることで、pH7.0では安定だが、還元環境かつ低pH環境でFabを効率的に放出させるDDSキャリアを開発した。筆者らのDDSは脳実質に到達した際、内包したFabを効率的に放出できることが明らかとなった。

グルコース修飾率25%のDDSが最も高い脳内移行率を示す

絶食24h後、グルコースの腹腔内投与から30分後にFab内包DDSをマウス尾静脈に投与したところ、in vitroと異なり、グルコース修飾率25%が最も高い脳内移行率3%を示し、Naked Fabと比較して42倍以上向上した。一方、グルコース修飾率が50、100%と増加すると脳内移行率は低下した。GLUT1とグルコースが多価効果により結合力が增强され、脳実質側で放出されにくくなったためと筆者らは考察している。

BBB突破型DDS投与でADモデルマウスの不溶性・可溶性の脳内アミロイドβを減少させる

血中グルコース濃度変化とグルコース修飾率(25%) DDS投与により、臨床試験中の抗体医薬に対し1/10もの低用量で、ADモデルマウスの不溶性・可溶性の脳内アミロイドβを減少させることに成功した。さらに、Fab存在下でアストロサイトにおいて取り込みが認められたところから、BBB突破型DDSから放出されたFabがアミロイドβと結合し、それをアストロサイトが認識して貪食すると考えられた。

担当者 松井秋倫 所属 東レ株式会社 専門 mRNA医薬、核酸医薬、DDS

一言 筆者らは2017年に初めてグルコースリガンド搭載DDSの高い脳内移行率を報告したが、今回、続報としてグルコースリガンド搭載率を最適化するという手法をとっており今後の神経疾患への適応が期待される。一方で、今回の報告では脳内アミロイドβの減少といった薬効が確認していない。臨床においても低用量でアミロイドβ減少は認められているので行動試験を含んだ続報が待ち遠しい。また、毒性試験についても記載されていなかったため、肝毒性や脳内の炎症についても評価すべきだと感じた。筆者らが開発したBBB突破型DDSは抗体だけでなく核酸や化合物も内包できるため、今後、中枢神経疾患に対して新しい治療法として期待される。

✉ akitsugu.matsui.v8@mail.toray

Virus-like particleを用いたCRISPR-Cas9細胞内送達システムの開発

Peter et al., 2020, Nat. Commun, 11, 1334

背景

遺伝子変異が原因で起きる疾患の新しい治療法開発に向け、CRISPR-Cas9などのゲノム編集技術を用いた遺伝子修復が注目されている。In vivoゲノム編集治療においては、ゲノム編集酵素を生体内組織に運ぶためのDDSが重要だが、遺伝子治療でよく用いられているウイルスベクターは、細胞内に導入後も長期的に発現するため、狙った箇所以外のゲノムを変えてしまうオフターゲット変異などを起こしてしまう可能性がある。ゲノム編集技術を医療に応用するためには、高い細胞内導入効率だけでなく、安全性が高いDDSの開発が必要である。堀田秋津博士(京都大学・CiRA)のチームは、CiRAと武田薬品との共同研究プログラムであるT-CiRAプロジェクトの一環として、新たな送達技術であるNanoMEDICを開発した。

キーワード

- CRISPR-Cas9
- Virus like particle (VLP)
- Duchene muscular dystrophy
- Gene therapy

要旨

ゲノム編集に必要なCas9タンパク質とガイドRNAを高効率でウイルスナノ粒子に封入するNanoMEDICシステムを開発した。

NanoMEDICに搭載したCRISPR-Cas9をもちいて、DMD患者iPS細胞由来骨格筋細胞のジストロフィン遺伝子変異エクソンをノックアウトし、ジストロフィンタンパク質を部分的に回復させた。

NanoMedic-CRISPR-Cas9をレポーターマウスにin vivoで局所投与することでターゲット配列をノックアウトすることができた。

担当者 西垣竜一 所属 武田薬品工業T-CiRA Discovery 専門 遺伝子治療、DDS、Omics

一言 現在、遺伝子治療、特に新規モダリティ開発に取り組んでいます。紹介させて頂いたNanoMEDICはT-CiRAのPeterさんが中心となって開発され、非ウイルスベースのDDSとしてin vivoでCRISPR-Cas9システムを生体内送達できる画期的な技術です。(2020年3月に論文発表されており、本内容もすべて公開情報から入手したものです)

✉ ryuuichi.nishigaki@takeda.com

VLPをもちいてCRISPR-Cas9を細胞内に一過性発現するNanoMEDICを開発

Cas9タンパク質とgRNAの複合体(RNP)を細胞内送達する方法として、VLPに着目した。VLPの形状はウイルスに似ているものの、ウイルスゲノムを内包しない。レンチウイルスベクターのエンベロープ(粒子の外膜)とCas9、gRNAをそれぞれ別々のplasmidで培養細胞に共発現させてVLPを作成する。効率的にRNPをエンベロープで内包するため、VLP裏打ちタンパク質GagとFKBP12の融合タンパク質と、Streptococcus pyogenes由来Cas9 (SpCas9)とFRBの融合タンパク質を利用し、細胞膜透過性低分子化合物依存的に2量体化させ手法を開発した。最終的にHEK293T細胞を用いてSpCas9/gRNAを内包したVLP粒子を高効率で生成でき、これをNanoMEDICと名付けた。

患者さん由来iPS細胞を使って、NanoMEDICを用いたゲノム編集の効果を確認

DMD患者由来iPS細胞から骨格筋細胞へ分化させNanoMEDICを導入した。ターゲットエクソンを92%の高確率でノックアウトすることに成功し、ジストロフィンタンパクの発現回復を確認した。懸念されているオフターゲット効果はNanoMEDIC導入ではほとんど起こらなかった。

マウス生体内でもNanoMEDICを用いてエクソンスキッピングを誘導

in vivoゲノム編集可能か検証するため、ルシフェラーゼ遺伝子の中間にターゲット配列を挿入したレポーターマウスの腓腹筋にNanoMEDIC-Cas9/gRNAを局所投与した。その結果、ターゲット配列のノックアウトによるルシフェラーゼタンパク質の発現を確認でき、in vivoでもゲノム編集可能である事が示された。

Fcフラグメント血液脳関門輸送媒体を用いたマウスおよびサルにおける治療用タンパク質の脳デリバリー

Kariolis et al., 2020, Sci Transl Med, 12, eaay1359

キーワード

- 血液脳関門 (BBB)
- トランスフェリン受容体 (TfR)
- アミロイドβ (Aβ)
- ドラッグデリバリー (DDS)

要旨

BBB通過のため、抗体Fc部分を改変してTfRへ結合するようにしたBBB transport vehicle (TV)技術を開発した。

TVにFabを結合したantibody transport vehicle (ATV) moleculesは、マウスとサルにおいてCNS取り込みと薬効の上昇を示した。

TVはバispesific抗体やフュージョンタンパク質など様々な構成物と簡単に組み合わせることができ、高度にモジュール化されたCNSデリバリーのためのプラットフォームとなる。

背景

中枢神経系 (CNS) へのタンパク質製剤の効率的なデリバリーはBBBにより厳しく制限されている。CNSに滞留するバイオロジクスの量は、血清中濃度の0.1-0.4%程と報告されており、抗体では更に低いとされている。そのため、脳の内皮細胞に高発現したTfRなどを利用したreceptor-mediated transcytosisがよく研究されてきた。今回筆者ら (Denali Therapeutics) は、BBB transport vehicle (TV) という技術を開発した。TVは、アミノ酸の挿入や欠損、不自然な付属ドメインなどを使うことなく、抗体Fcの一部でTfRに結合するようにdirected evolutionにより開発された。TVにFabを結合したATVは、マウスとサルにおいてCNS取り込みと薬効の上昇を示した。

TVの作製と解析

FcRn、FcγRとの結合部位を避けてCH3ドメインの一部に狙って変異を導入したライブラリーを作成し、yeast displayによりヒトTfRに結合する候補クローンを取得した。ここから更に親和性成熟を行い、ヒトとサルどちらのTfRにも結合性のあるクローンを選択した。ヒトTfRに結合したTVの結晶構造解析を行ったところ、TfR-TVの相互作用部位はTfR-Tfの結合部位と重なることが確認された。また、以降の解析では、一価で結合する抗体の方が脳内取り込みが良いという報告から、knob-into-hole構造を採用し、TfR結合ドメインは1か所とした。更に、FcγRへの結合を回避するため、L234A/L235A変異が導入された。

TfR^{mu/hu} KI miceにおいて、TVは抗BACE1 Fabsの脳内取り込みを上昇させる

TVに抗BACE1 Fabsを結合したATV:BACE1を作製し、まず培養細胞を用いて細胞内取り込みを検討した。その結果、ヒトTfRに依存してATV:BACE1の細胞内取り込みが起こることが示唆された。

続いて、ATV:BACE1をTfR^{mu/hu} KIマウスにIV投与し、通常の抗BACE1抗体と比較したところ、TVにより投与した抗体の脳内濃度が上昇し、BACE1により産生されるAβの脳内量は減少することが分かった。

サルにおいて、TVは抗BACE1抗体の脳内暴露とファーマコダイナミクスを増強する

ATV:BACE1をサルにIV投与したところ、マウスの結果と同様の結果が得られた。また、尾状核、小脳、大脳皮質、海馬、視床など脳の各部位での効果がそれぞれ観察された。BBB通過が促進されATV:BACE1の脳内暴露が上昇し、薬効を高めることが示唆された。

担当者 長澤 菜耶 所属 田辺三菱製薬株式会社 専門 タンパク工学、ドラッグデリバリー、遺伝子治療

一言 TfRを利用して脳内のBACE1やAβを標的とした抗体の脳移行を改善する試みは、Genentech社の抗TfR/BACE1 bispecific抗体、Roche社のBrain Shuttle (通常の構造の抗体にFab fragmentを融合したもの) など、抗体の可変領域を利用する形で行われてきました。今回紹介したDenali社は、抗体の基本的構造はそのままに、Fc部分の一部の配列に変異を導入することでTfRへの結合性を得るというシナブルに見えて新しいアプローチを実施しており、製造や安定性の面で有利となる可能性があります。Fabと組み合わせるATVだけでなく、酵素と組み合わせるETVという形の報告も同時にされていました (Ullman et al., Science Translational Medicine, 2020)。抗体分子はまだまだ広がる可能性があるなど実感させられる報告でした。

✉ nagasawa.maya@ma.mt-pharma.co.jp

What exactly gets across the Blood-Brain-Barrier? -Physiological blood-brain transport is impaired with age by a shift in transcytosis-

Yang et al., Nature, 2020,583, 425-430

キーワード

- Blood-Brain-Barrier (BBB)
- Brain Microvascular Endothelial Cells (BMEC)
- Aging
- Receptor-mediated transcytosis (RMT)
- Nonspecific transcytosis

要旨

BBB allows blood borne proteins to enter the healthy brain at a much higher rate than previously thought.

The overall amount of plasma proteins entering the brain actually decreases with age.

Receptor-mediated transcytosis is significantly reduced and non-receptor-mediated (nonspecific) transcytosis increases with aging, leading to nonspecific entry of a larger variety of plasma proteins into the brain.

Pharmacological inhibition of the age-upregulated alkaline phosphatase, ALPL, increased receptor-mediated transcytosis of the transferrin receptor.

背景

The vascular interface of the brain, known as the blood-brain barrier (BBB), is understood to maintain brain function in part via its low transcellular permeability. Yet, recent studies have demonstrated that brain ageing is sensitive to circulatory proteins. The authors showed that plasma proteins readily permeate the healthy brain parenchyma by labelling hundreds of proteins constituting the mouse blood plasma proteome. Plasma protein uptake diminishes in the aged brain, driven by an age-related shift in transport from ligand-specific receptor-mediated to non-specific caveolar transcytosis. This age-related shift occurred alongside a specific loss of pericyte coverage. Pharmacological inhibition of the age-upregulated phosphatase ALPL, a predicted negative regulator of transport, enhances brain uptake of therapeutically relevant transferrin, transferrin receptor antibody and plasma. These findings reveal the extent of physiological protein transcytosis to the healthy brain, a mechanism of widespread BBB dysfunction with age and a strategy for enhanced drug delivery.

Circulatory proteins permeate the healthy adult brain

It has been proposed that the BBB becomes more permeable with age, but the authors showed that the BBB allows bloodborne proteins to enter the healthy brain at a much higher rate than previously thought by direct labelling of mice albumin/igG depleted plasma with ⁶⁴Cu and Atto 647N fluorophore using autoradiography and fluorescence microscopy respectively. This finding suggests that a wide variety of neural functions, including mood and behavior, could be modulated by systemic protein signals.

Blood-to-brain protein transcytosis shifts from receptor-mediated transcytosis to non-receptor-mediated transcytosis with age.

Plasma depleted of albumin and IgG uptake diminished by nearly half in the aged brain using labelled IgG. In addition by comparing with BMEC single cell transcriptome between 3 months young mice and 19 months aged mice, global shift from ligand-specific RMT to non-specific caveolar transcytosis with age in brain endothelial cells was observed and found diminished TFRC and MFSD2A abundances with age even in protein levels.

Inhibition of age-upregulated alkaline phosphatase restores receptor mediated transcytosis across the aged BBB.

In aged mice brain, pericyte loss and ectopic brain calcifications were observed, which are attributes of normal ageing. Administration of alkaline phosphatase, upregulated in aged mice BMEC, inhibitor dramatically enhanced the transcytosis of plasma and transferrin and TFRC antibody transport across the aged brain endothelium. BBB found to be more aptly characterized as an active interface that mediates communication between the periphery and the CNS. Understanding the principles of this communication, and how they change with age, may be fundamental to understanding the brain function in health and disease.

担当者 大儀和宏 所属 武田薬品工業株式会社 専門 核酸医薬、再生医療、遺伝子治療

一言 最近のscientific paperは非常に重厚なものも多く、多くの内容を説明するために本文中のfigureは小さくなり、extended dataにもたくさんのdataが記載されて、全部プリントすると50ページを超えるscientific paperは少なくありません。また、submitからacceptまで2年以上かかっているpaperも多く、どんどん本文中の内容が加筆されていて、paperの内容の流れが読者にとって非常にわかりにくくなっているように感じます。Science caféでの発表ではこのようなpaperでも、筆者らが一番伝えたいことは何かを、わかりやすくみなさんに伝えるようにするとともに、この発表時間をシェアしていただいた皆さんの研究に応用できるようなアイデアを含めて紹介していきたいと考えています。

✉ kazuhiko.ogi@takeda.com

汎用性の高いバイオセンサーの設計により、生細胞における三量体Gタンパク質の活性を明らかにする

Maziarz et al., 2020, Cell, 182, 770-785

キーワード

- Gタンパク質共役受容体 (GPCR)
- BRET
- 光学バイオセンサー
- シグナル伝達

要旨

生細胞において、Gタンパク質の活性化を直接検出するプローブを開発する。

単分子バイオセンサー「BERKY」を開発し、内因性Gタンパク質の活性化を検出する。

カスタマイズにより、種々の内因性Gタンパク質に特異的なBERKYを開発する。

BERKYにより、癌細胞株およびプライマリーニューロンにおいて、内因性GPCRを介した内因性Gタンパク質の活性化を検出する。

背景

Gタンパク質共役受容体(GPCR)は、広範な細胞外シグナルを受容し、細胞応答を開始する膜タンパク質である。GPCRの主な作用メカニズムは、三量体Gタンパク質の活性化によるため、Gタンパク質の活性を測定するツールの開発は、薬の作用機序の解明や、治療薬のスクリーニングに役立つと考えられる。しかし、これまでに報告されているツールは、 $G\alpha$ と $G\beta\gamma$ の解離をBRETにより検出するものがほとんどで、① $G\alpha$ とGTPの結合を検出していない、②Gタンパク質自体の過剰発現を行う必要があり、内因性Gタンパク質を検出していない、③数個の遺伝子を同時に過剰発現する必要があり、使用できる細胞に限られるといった欠点があった。そこで筆者らは、種々の細胞において、内因性Gタンパク質の活性化を直接検出するツールの開発を試みた。

Gタンパク質の活性化($G\alpha$ i-GTP)を直接測定するプローブを開発する

まずは、 $G\alpha$ i-GTPを直接測定するプローブを開発するため、KB-1753というペプチドを用いた。KB-1753は、 $G\alpha$ i-GTPには結合するが $G\alpha$ i-GDPや他の $G\alpha$ サブユニットには結合しない。また、 $G\alpha$ iのGDP-GTP交換に影響しない。KB-1753にBRETのdonorであるNlucを融合させたペプチドと $G\alpha$ iにBRETのacceptorであるYFPを融合させたタンパク質を細胞に発現させた。この融合タンパク質により、 α 2A-adrenergic receptor (α 2A-AR)を介した $G\alpha$ iの活性化をBRETにより検出できた。

内因性Gタンパク質の活性化を検出する単分子バイオセンサー「BERKY」を開発する

$G\alpha$ i-GTPを直接測定するプローブを単分子化するため、ER/Kという可動性の高い配列をBRETのdonorとacceptorのlinkerとして用いた。ER/Kの片端に膜結合配列およびNlucを、逆端にYFP-KB1753を結合させた分子「BREKY (BRET biosensor with ER/K linker and YFP)」を作成した。細胞膜で、 $G\alpha$ i-GTPとYFP-KB1753とが結合すると、ER/Kが屈曲して、NlucとYFP-KB1753とが近接し、BRETを起こす。BERKYを細胞に発現させることで、 α 2A-ARを介した内因性 $G\alpha$ iの活性化を検出した。また、 $G\alpha$ q、 $G\alpha$ 13に対するBERKY、 $G\beta\gamma$ や低分子量Gタンパク質Rhoに対するBERKYの作成にも成功した。

BERKYは、種々の細胞で、内因性GPCRを介した内因性Gタンパク質の活性化を検出する

BERKYを癌細胞株やプライマリーニューロンに発現させ、内因性GPCRを介した内因性Gタンパク質の活性化を検出した。よって、種々の細胞の内因性Gタンパク質の活性を直接検出するツールを完成させたといえる。

担当者 野田友人 所属 株式会社LTTバイオフーマ 専門 ドラッグリポジショニング(DR)

一言 薬理学の聖書「グッドマンギルマンの薬理学」の著者として知られるAlfred Goodman GilmanとMartin Rodbellによる1994年のノーベル医学・生理学賞受賞をはじめとして、GPCRに関係する研究分野は十指に余るノーベル賞受賞者を輩出しています。また、薬学教育モデル・コアカリキュラムにおいて、薬理の最初の項で扱うのもGPCRであり、FDA承認薬の30%以上がGPCRを標的とするといったデータもあります。GPCRは薬理学の基礎でありながら、未だ創薬の主要なターゲットです。将来的には、BERKYのような技術の進歩により、高次な薬剤スクリーニングやin vivoイメージングが可能になるのではと思うとワクワクします。

✉ y.noda@ltd.co.jp

スライスしたヒト大脳皮質オルガノイドによる大脳皮質の層構造形成のモデル化

Qian et al., 2020, Cell Stem Cell, 26, 766-781

背景

ヒトと動物の種差が知られている大脳皮質は脳の発生や精神疾患をはじめ中枢神経疾患に重要とされるが、ヒト大脳皮質を研究材料として利用するには制限があった。世界中でiPS細胞からヒト脳オルガノイドの作製が報告されているが、脳オルガノイド内部への栄養不足や酸素欠乏による細胞死やヒト胎児の発生でみられる層構造ができないという課題があった。筆者らは2016年にCell誌でSpin Ω という小型バイオリクターでiPS細胞からヒト脳オルガノイドを作製する方法について発表している。今回はそのヒト脳オルガノイドを定期的にスライスすることで、課題であった栄養や酸素などの物質拡散を改善して長期培養できるモデルを発表した。

キーワード

- 脳オルガノイド
- 大脳皮質ニューロン
- Wnt/ β -cateninシグナル
- 統合失調症
- DISC1変異の患者由来iPS細胞

要旨

ヒト脳オルガノイドをスライス化することで内部の細胞死を抑えて、大脳皮質の層構造の形成と長期培養を実現。

スライス化したヒト脳オルガノイド(SNO)は神経細胞の産生と大脳皮質の上層と下層を区別した皮質板の拡張を示した。

SNOで神経細胞の運命決定におけるWnt/ β -cateninシグナルの関与を再現した。

DISC1変異の患者由来iPS細胞をもつ統合失調症由来iPS細胞で分化誘導したSNOは大脳皮質の層構造が破綻しており、DISC1変異の患者由来iPS細胞をゲノム編集で修復すると層構造が改善することを示した。

担当者 吉田俊介 所属 株式会社ケイフーマ 専門 細胞生物学、発生・分化、中枢神経疾患

一言 ヒトiPS細胞の技術が活きる分野として創薬応用が挙げられます。患者由来iPS細胞で病態を解析するアプローチが世界中で行われ、実際にALSのドラッグリポジショニングが臨床試験へと進んでいます。しかし、今回の精神疾患のように複雑な病態が再現できず、治療のための研究が技術的に進まない疾患もあります。今回の論文はヒト脳オルガノイドの技術的な課題に取り組んで、統合失調症由来iPS細胞で病態再現を試みています。精神疾患のように病態再現が難しい疾患に対して、患者由来iPS細胞を用いた創薬開発に興味があり、今後も研究が進むことを期待しています。

✉ shunsuke.yoshida@kpharma.co.jp

ヒト脳オルガノイドを定期的にスライスすると内部の細胞死が減り、神経細胞の産生と放射状移動を示す層構造のモデル化ができた

通常、長期培養したヒト脳オルガノイドは直径3-4 mmとなるが、Day45以降に定期的に厚さ500 μ mにスライスすることで内部の細胞死マーカーCas3陽性エリアの増加を抑えて、HOPX(外側脳室下帯マーカー)エリアで増殖細胞を標識するKi67陽性細胞の増加と培養期間依存的に増殖細胞を標識するEdU陽性細胞の移動が確認でき、これまで不十分だった神経細胞が産生される外側脳室下帯の拡張ができた。

大脳皮質の上層と下層を区別した神経細胞サブタイプの運命決定ができ、その調節にWnt/ β -cateninシグナルが関与することを再現

大脳皮質の上層(SATB2とRORB)と下層(TBR1とCTIP2)マーカーの神経細胞がDay100-120にかけて分離して、両マーカーが陽性を示す分化途中の細胞が減少して各神経細胞のサブタイプへの運命決定が進むことを示した。Wnt/ β -cateninシグナル阻害剤あるいは活性化剤を添加すると、上層と下層の分離が妨げられて分化途中の細胞が増えたため、運命決定におけるWnt/ β -cateninシグナルの関与も再現できた。

DISC1変異の患者由来iPS細胞の統合失調症由来iPS細胞で作製したヒト脳オルガノイドは大脳皮質の神経細胞サブタイプへの運命決定が破綻していた

DISC1変異の患者由来iPS細胞(Exon12の4 bpが欠損)した患者由来iPS細胞でヒト大脳皮質オルガノイドを作製したところ、Wnt/ β -cateninシグナル阻害剤を添加したときと類似した層構造の破綻が確認できて、神経細胞のサブタイプの運命決定が進んでいないフェノタイプを明らかにした。

Memo _____