

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にお誘い頂き、運営をお手伝いすることになりました。

2018年に湘南アイパークが設立されて3年の間、製薬会社、研究機器製造会社、次世代医療やAI・IoTなどのベンチャー企業、投資会社、行政、商社など、2,000人以上、及び100を超える企業・団体が集結しています。このユニークなエコシステムは、ライフサイエンス（ヘルスケア）を共通のテーマとしながら多様性に富み、プレコンペティティブな連携・異分野融合を促進して互いに刺激し合うことによってイノベーションの相乗効果を生み出すことが出来ると考えております。このサイエンスカフェが、このような新たな連携の創出の一助となることに少しでも貢献できたらと考えております。

武田薬品工業株式会社 中島 康祐



iPark Science Café運営メンバー（iParkにて2021年5月撮影）。

左から順に、中島（幹事）、西村（幹事）、野上（代表）、小笠原彬（副代表）、小笠原貴久（協力メンバー）

目次

「ご挨拶」アイパークサイエンスカフェ・中島 康祐

スペシャルレビュー

「ミトコンドリアに薬を運ぶ技術開発」山田 勇磨（准教授・北海道大学 大学院薬学研究院）

第3期 発表内容

1. 「ハンチントン病マウスモデルでの線条体アストロサイトからGABA作動性神経細胞へのDirect Conversionによる遺伝子治療」
2. 「人工的なシナプスオーガナイザータンパク質がグルタミン酸作動性神経回路を修復する」
3. 「神奈川県におけるレニン-アンジオテンシン系阻害薬とCOVID-19の重症度」
4. 「新規人工臓器の開発を目指した血管新生デバイスの同種異系ラットモデルにおける機能と安全性評価」
5. 「老化細胞を標的としたCAR-T細胞は老化に関わる病理を正常化する」
6. 「ヒト特異的遺伝子ARHGAP11Bはミトコンドリア機能を制御しヒト様の新皮質発達を促進する」
7. 「SARS-CoV-2はヒト心筋細胞に感染し、細胞障害作用を誘発する」
8. 「Lysosome targeting chimaeras (LYTACs) 技術は、細胞膜上や細胞外のタンパクに対して分解誘導を可能にする」
9. 「ヒトの機能喪失型バリエーションを用いた薬物標的候補の評価」
10. 「インスリン遺伝子のイントロンから生成された環状RNAがインスリン分泌を制御する」
11. 「酵素阻害剤創薬におけるハイスループットスクリーニングの最近の動向及び阻害様式の検討」
12. 「ナンセンス変異依存mRNA分解を避けて標的タンパク質をアップレギュレーション」
13. 「ミトコンドリア局在circRNA SCARを標的とするミトコンドリアROS産生低下を介したNASHの改善」
14. 「DNAベースの電圧計で細胞小器官の膜電位を測定する」
15. 「プリオン病におけるRibosome profilingにより明らかとなった、グリア細胞特異的な翻訳変動」
16. 「アストロサイトを介するシナプス伝達の網羅的解析手法の一つ」
17. 「認知機能を増強させる低分子は、マウスの加齢性記憶力低下を可逆的に改善する」
18. 「TGF- β 1によるミクログリアの制御がマウス網膜変性モデルにおける錐体細胞を保護する」
19. 「再構築ヒト臓器モデルの定義、期待、利用例、並びに医薬品の研究開発に実装するための戦略」
20. 「連続的にゲノム編集されたiPS細胞は急性骨髄性白血病のクローン進化の軌跡を辿り、初期のターゲット分子の発見につながる」
21. 「ナノメディシンの送達向上を目的とした2本鎖PEGによる肝類洞壁の一過的なコーティング」

編集後記

ミトコンドリアに薬を運ぶ技術開発

山田 勇磨（北海道大学 大学院薬学研究院）

✉ u-ma@pharm.hokudai.ac.jp

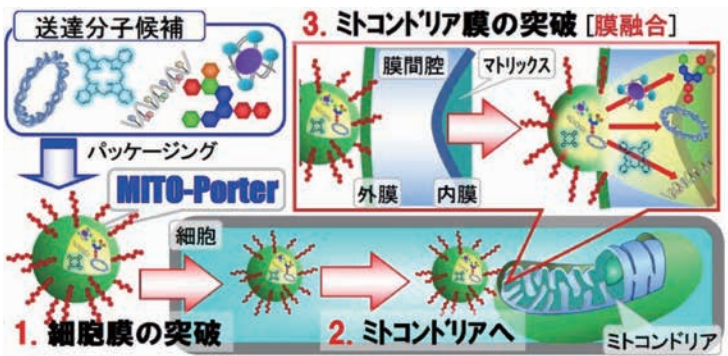
はじめに

2020年12月24日のクリスマス・イブに湘南アイパーク・サイエンスカフェでお話をさせて頂く機会を得た。その際に、ミトコンドリアに薬を運ぶ技術開発について、私たちが研究を進めているMITO-Porter(ミトコンドリア標的型ナノカプセル)を中心に話題提供させて頂いた。本稿では、MITO-Porterテクノロジーを基盤としたミトコンドリアを標的とするナノ医薬品の研究開発について記載する。また、湘南アイパークのクラウドファンディング第1号案件として実施した『副作用の少ない癌治療を、ミトコンドリアに薬を運ぶ技術開発で！』についても紹介する。

ミトコンドリア標的型DDS [MITO-Porter]の開発

私がミトコンドリア標的型Drug Delivery System(DDS)の研究に着手した頃のDDS技術では、ミトコンドリアに送達する分子の物性や大きさを制限するなど多くの課題が山積しており、ミトコンドリアを標的とした薬物治療に関する研究報告は極僅かであった。このような背景のもと、私達は、ミトコンドリアが細胞内で活発に融合・分裂を繰り返し、相互に生体分子(核酸、タンパク質など)を共有している点に着目し、ミトコンドリアと膜融合可能なナノカプセル【MITO-Porter】を考案、100種以上の組成の中からミトコンドリア高融合性ナノカプセルの同定に成功した(特許第5067733号)[Yamada Y, *et al.*, *Biochim Biophys Acta*1778: 423-432 (2008), Yamada Y, *et al.*, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 154-155: 187-209 (2020)]。膜透過性ペプチドOctaarginine(R8) (正電荷)が表面修飾されているMITO-Porterは、マクロピノサイトーシスを介して細胞内に取り込まれ(1)、静電的相互作用を介して負電位を有するミトコンドリアと結合し(2)、膜融合を介して内封分子をミトコンドリアに送達する(3)。本戦略は、「膜融合を介して内封分子をミトコンドリアに運ぶ」ため、送達分子の物性や大きさを制限しないDDSになり得ると考えた。

MITO-Porterに関する論文を2008年に発表し、学位(博士(薬学))を取得してからは、本DDS技術を発展させるための基礎研究に没頭した。この間、MITO-Porterを用いて様々な高分子[タンパク質、超分子、など]を細胞ミトコンド



リア内部まで送達可能である事を示し、さらに、MITO-Porterへの核酸搭載およびミトコンドリア核酸導入に成功し、本DDSがミトコンドリア標的型核酸導入技術としても有用であることを報告している。この頃を振り返ってみると「より性能の良いDDSを作りたい!」という思いが強く、私の興味は、細胞の中のナノカプセルの動き、動物における治療効果であり、ヒトの治療のための研究開発に注力していなかったように思う。

ベンチャー企業との連携および産業創出講座の設置

2012年に、「娘がミトコンドリア病であり、MITO-Porterを利用して病気を治したい。研究段階でも良いので是非使わせてほしい」という内容のE-mailが届いた。この時は、患者・家族の方からのメールに驚くとともに、『私達の研究の可能性を信じ、治療ができる』と期待して下さっていることを嬉しく思った。一方で、その当時の研究が治療を実現できるレベルに達していなかったことを非常に悔しく思った。メールを下さった方への返信では、現状の私達のDDS技術では治療をすることが難しいことを正直に伝え、「これから研究を進めて必ず治療できるようにします」という思いも伝えた。このような経験を通じて自身の研究成果を患者・家族の方々のために、少しでも役立てたいという思いが強くなり、ヒトを対象とした臨床応用を目指した活動に着手した。その一環として2014年より、自主臨床研究「ミトコンドリア病に対する薬物治療法確立に向けた検討」に着手し、患者由来の疾患細胞を用いてミトコンドリア治療戦略の有効性を示すことを到達目標とし、北海道大学薬学部、北海道大学病院、市立札幌病院の3施設で連携し、一定の成果を得ている。

2016年には、「ミトコンドリア病」の新しい治療法の研究開発を目指す創業プロジェクト「7 SEAS PROJECT (7SP)」に参画し、医療・経済・社会への貢献を目指した研究を計画・推進する機会を得た。このプロジェクトの代表は、2012年に私にメールを下さった患者家族の方であった。メールを頂いてから5年が経過し、ようやくミトコンドリア標的型DDSを基盤とした治療効果の検証ができる準備が整い、医薬品開発を目標とした活動を共に進められるようになった。2018年には、7SPのメンバーの研究技術をコアとするバイオベンチャー企業であるルカサイエンス株式会社が設立された。2019年からは北海道大学薬学部の原島秀吉教授と共に科学顧問に就任し、ミトコンドリア標的型DDS技術を基盤とする医療用ナノカプセルの製造業務に携わっている。2020年4月に北海道大学薬学部内に、北海道大学産業創出講座(北海道大学が企業と組織型の大型共同研究を推進するための制度:薬学部では初の開設)として「バイオDDS実用化分野」が開設され、研究代表者に就任し、ナノ医薬品の開発研究をさらに加速している。



クラウドファンディング活動への挑戦

ここまでに記載した活動は、大学の研究シーズを医薬品開発へつなげる戦略として皆様にも共感頂けるのでは？と思っている。医薬品の開発を、研究者、企業と共に患者・家族が参加する事は、素晴らしい創薬体制を構築するだろう。この創薬体制の輪に、一般市民の方も参加して頂くクラウドファンディング活動にも挑戦をした。ここからは、薬学部の研究を医薬品につなげる「新しい挑戦」として同窓会の皆様にも応援をお願いした本活動についてご紹介させて頂きたい。

2020年3月2日～5月31日の期間に研究資金650万円を募る『副作用の少ない癌治療を、ミトコンドリアに薬を運ぶ技術開発で！』と題するクラウドファンディング活動を行った(<https://readyfor.jp/projects/MITO-Porter>)。本プロジェクトは、湘南アイパークと国内最大級のクラウドファンディングサービス「READYFOR」の業務提携の第1号案件として実施した。この枠組みにおいて、研究者は、クラウドファンディングを通じた資金調達に挑戦、成功した場合は湘南アイパークの研究設備、また湘南アイパークが提供するサービス・機械を活用できるようになる。研究者が研究の意義を広く社会に発信し、人々の支援を得たプロジェクトに対して、湘南アイパークが研究の場を提供するというしくみである。本クラウドファンディングでは、MITO-Porterを利用して癌細胞ミトコンドリアに抗癌剤(光感受性物質)を運ぶ基盤技術(特許取得技術)をシーズとし、1年間の担癌マウスを用いた治療効果検証実験、薬物動態試験、毒性試験を行うための資金獲得を目指した。従来の光線力学療法では、重篤な皮膚炎症など副作用が問題となっていたが、癌細胞のエネルギー工場(ミトコンドリア)をピンポイントで狙う治療戦略によって副作用の少ない癌治療を提供できると考えた。

「研究活動」とは進め方が全く異なる、『クラウドファンディング』の挑戦に大いに苦戦したが、皆様のあたたかい応援とご支援のおかげで、最終的には459名の皆様により、当初目標額を大幅に上回る10,119,000円のご支援を頂いた。活動内容の詳細は割愛するが、「資金調達」以外にもクラウドファンディング活動によって多くのものを得た。その一つに、患者・家族の方々との交流の機会を得た事がある。研究者が研究対象としている病気の患者・家族の方々と、双方向につながる機会が得られるクラウドファンディングは、私達にとっては研究活動のモチベーションになり、患者・家族の方々には希望になると期待している。また、学生・市民への情報発信ツールとしてクラウドファンディングの威力を感じた。さらに、多くの市民の皆様に科学(理科)を知ってもらう機会(例えば、「科学の時間」の週間連載)を持てたことも収穫だった。小中高生にも科学に興味を持ってもらい、未来の研究者の卵の育成にも少しは役立てたのではと思っている。そして、お世話になっている・なっていた皆様とのつながりを再確認し、感謝する気持ちを改めて大切に思った。古くからの友人、お世話になっている先生方、同窓会、学会、共同研究者、取引業者、ご支援や情報拡散で本当に協力をして頂いた。



おわりに

本稿で紹介した話題を共有させて頂いたサイエンスカフェは、クラウドファンディング活動後に、湘南アイパークのコミュニティの皆様にご挨拶する初めての機会でもあった。サイエンスカフェの事務局から許可を頂き、講演動画を配信している(https://youtu.be/_l3iiDxcclc)。コロナ禍で直接皆様にお話をさせて頂く機会がなく非常に残念であるが、このような機会を頂けたのでご興味がある方は是非ご覧頂きたい。2021年、皆さんとお会いできる機会を持てる事を心より願うとともに、今できる最大限の活動を推し進め皆さんに研究の進捗をお伝えできるよう努めていきたい。

ハンチントン病マウスモデルでの線条体アストロサイトからGABA作動性神経細胞へのDirect Conversionによる遺伝子治療

Wu et al., Nature Commun., 11, 1105, 2020

キーワード

- ハンチントン病 (HTT)
- Direct conversion
- 遺伝子治療
- NeuroD1
- 線条体アストロサイト
- GABA作動性ニューロン

要旨

NeuroD1およびDlx2遺伝子をAAVベクターで導入し、マウス脳内の線条体アストロサイトをGABA作動性ニューロンに直接変換した (in vivo AtN)。

In vivo AtNにより生成したニューロンは活動電位とシナプスを示し、時間依存的に淡蒼球と黒質へ軸索を投射した。

NeuroD1およびDlx2遺伝子で治療したR6/2マウスの運動機能は改善し、寿命も延長した。

背景

ハンチントン病(HD)は、脳の中にある線条体と呼ばれる大脳基底核のある部位で神経細胞が失われていく進行性(徐々に症状が進んでいく)の神経変性疾患である。原因遺伝子であるハンチンチン(huntingtin)にあるCAGの繰り返し配列が異常伸長していることが知られている。現時点では有効な治療薬がなく、開発中の治療薬には異常HTT発現を抑えるアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)やアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを媒体としたmicroRNAなどがある。例えばuniQure社のAMT-130が臨床試験(第一/二相)を行っており、非常に注目されている。今回の論文は全く異なる方向性からアプローチしていて、ハンチントン病マウスモデルにおいて、新しい神経細胞を再生させるといった全く新たな遺伝子治療法を開発している。

マウスモデルにおける線条体アストロサイトのGABA作動性ニューロンへのDirect conversion

AAV2/5 Cre-FLEXシステムを用いて、成体マウス脳で線条体アストロサイトに導入した。NeuroD1およびDlx2それぞれ単独よりも、NeuroD1とDlx2を同時に導入した場合、線条体アストロサイトをより効果的にDARPP32陽性GABA作動性ニューロンに変換した。この論文では正常マウス、HDマウスモデルのR6/2とYAC128の3種類マウスでin vivo AtNを示した。

マウスの脳内で変換された線条体ニューロンの機能解析

R6/2マウスの従来のニューロン及び変換されたニューロンを比較し、電気生理学的解析により評価した。R6/2マウス脳の線条体アストロサイトから変換したGABA作動性ニューロンは機能性を示したことから、元の脳のシナプス回路に統合できることを示唆した。コントロールと比較して、NeuroD1+Dlx2を導入したR6/2マウスでは、線条体萎縮は軽減されていた。

脳内で線条体アストロサイトからGABA作動性ニューロンへと変換したマウスの行動解析

R6/2マウスの線条体におけるin vivo AtNにより、HD病態の表現型が軽減した。すなわち、キャットウォーク行動試験を行ったところ、R6/2マウスの運動機能が有意に改善され、寿命延長することも実証した。

人工的なシナプスオーガナイザータンパク質がグルタミン酸作働性神経回路を修復する

Suzuki et al., 2020, Science, 369, eabb4853

キーワード

- シナプスオーガナイザー
- 興奮性-抑制性神経伝達バランス
- アルツハイマー病
- 脊髄損傷
- 構造情報生物学

要旨

構造情報に基づく、人工シナプスオーガナイザーを開発し、CPTXと名付けた。

CPTXは、機能的・構造的な興奮性シナプスを形成し、シナプス機能、運動協調、空間および文脈記憶、移動運動を回復させた。

シナプス前後の異なる分子を標的とする、合理的に設計された細胞外足場タンパク質(ESP)は、神経回路障害に関連する疾患を研究し、治療する可能性のある強力なツールになる可能性がある。

背景

シナプスは神経回路内の基本的な構造・機能単位であるが、分子レベルでは、非常に動的であり、そのリモデリングは脳生理学の全ての側面に必須である。シナプスのエラーは、しばしば興奮性と抑制性のシグナル伝達の不均衡に繋がり、多くの精神神経疾患を引き起こすと考えられている。最近、シナプス前後の分子の集合を直接調節するシナプスオーガナイザーが多く同定されている。それらは、クレベリン(Cbln)等の分泌因子と、ニューレキシン(Nrx)等の細胞接着分子に分類される。ある種の分泌因子はシナプス細胞外マトリックスの成分であり、シナプス間隙で足場として働くので、細胞外足場蛋白質(ESP)と呼ばれる。今回は、グルタミン酸作働性神経のシナプスを標的にした、人工ESPの作製と機能を紹介する。

ESP型人工シナプスオーガナイザーのデザイン

ESPの一種であるCbln1は、N末のシステインリッチ領域(CRR)を介して、シナプス前部のNrx(+4)と結合し、シナプス後部のGluD2との橋渡しをしている。またNeuronal pentraxin 1(NP1)は、ペントラキシン(PTX)領域を介して、シナプス後部のAMPA型のイオンチャネル型グルタミン酸受容体(AMPA)を会合させる。これらの知見から、Cbln1のCRRとNP1のPTX領域を融合させ、Nrx(+4)とAMPAを橋渡しする人工的なESPを作製し、CPTXと命名した。Cbln1が、側座核の興奮性シナプスの形成と維持を行うことから、CPTXによる興奮性シナプスの形成が期待された。

CPTXは興奮性シナプス前後部位を誘導した。

小脳Cbln1-欠損顆粒細胞や海馬ニューロンを用いた*in vitro*試験で、CPTXがAMPA(GluA1-4)とNrxに結合し、3者が共局在した。

CPTX投与により、小脳性運動失調、家族性アルツハイマー、脊椎損傷の各モデルの症状を改善した。

小脳性運動失調モデル(Cbln1欠損マウス及びGluD2欠損マウス): CPTXを小脳に投与したところ、どちらも平行線維とプルキンエ細胞間のEPSC(興奮性シナプス後電流)が亢進し、歩行が改善した。
アルツハイマー病モデル(5xFADマウス): CPTXを海馬に投与したところ、野生型に比べて低下していた背側海馬のCA1錐体神経細胞の先端樹状突起のスパイン数や、Schaffer側枝のfEPSP(フィールド興奮性シナプス後電位)が回復した。また恐怖条件付け試験でも、低下していた5xFADマウスの空間記憶が回復した。
脊髄損傷モデル: 10番胸椎の半側切断により損なわれた運動機能の回復が、CPTXを切断部位に切断と同時に、もしくは1週間後に投与することによって、コンドロイチナーゼABC(ChABC)と同等以上に促進した。

担当者 李紅梅(リサ) 所属 武田薬品工業株式会社 専門 ゲノム編集、疾患モデル、遺伝子治療

一言 ハンチントン病に限らず、神経変性疾患の患者さんの多くの症例では神経細胞がダメージを受けているケースが多々あるため、そもそも神経再生による新しい神経細胞の補充が必須になってくるのではないかと考えられる。今回の論文は、患者さんの脳内に存在している線条体アストロサイトを神経細胞へdirect conversionさせることにより、マウスモデル神経細胞機能の回復、マウス運動機能の改善や寿命延長を実証した。さらに著者らはCell Therapeutics, Inc.というベンチャーを立ち上げ、in vivo Direct Conversion治療法の臨床開発を行っているため、この治療アプローチには大いに期待している。

✉ lisahongmei.li@takeda.com

担当者 松尾毅 所属 武田薬品工業株式会社 専門 細胞生物学、細胞内情報伝達、神経変性疾患

一言 前回の発表では、マクロの視点から脳オルガノイド研究の進展を紹介しましたが、今回は視点を大きくミクロに変えて、シナプス機能を人工的に修飾するシナプスオーガナイザーを紹介しました。シナプスは言うまでもなく、神経の情報伝達の要であり、その不具合は疾患に直結しますが、非常に小さいため、なかなか研究が進みにくい部分でもあります。そういうミクロの世界で、人工のシナプスオーガナイザーが仮説通りに機能したというのは、少なくとも私には大きな驚きでした。シナプスについての先人の知見が正しかったことを証明するとともに、シナプス異常による疾患に対する治療の可能性を期待させるものです。このようなインパクトのある研究が、地味だけれど非常に価値のある多くの研究に引き継がれて、最終的に患者さんの役に立つことを願っています。✉ tsuyoshi.matsuo@takeda.com

神奈川県におけるレニン-アンジオテンシン系阻害薬とCOVID-19の重症度

Matsuzawa Y et al., 2020, Hypertension Research, 43, 1257-1266

キーワード

- SARS-CoV-2
- COVID-19
- ACEI/ARB
- mental confusion(混乱)
- 神奈川で実施された多施設レトロスペクティブコホート研究

要旨

本研究は湘南アイパークの地元である神奈川で実施され、COVID-19の予後に関する日本初の多施設臨床研究の結果報告である。

院内死亡、機械的人工呼吸、および酸素療法
の頻度は、ACEI/ARB群で非服用群よりも低い傾向にあったが、ACEI/ARBの使用と主要転帰との間の有意な関連は確認できなかった。

ACEI/ARBは、高血圧患者においてCOVID-19誘発性の混乱(mental confusion)を抑制する可能性がある。

背景

新型重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2型(SARS-CoV-2)は、新型コロナウイルス感染症(COVID-19)を引き起こす。日本におけるCOVID-19は、横浜に寄港中の客船ダイヤモンドプリンセス号での発症が最初で、その後全国的な大流行となった。SARS-CoV-2は、アンジオテンシン変換酵素2(ACE2)を受容体としてヒト細胞に侵入し、急性呼吸窮迫症候群(ARDS)を発症させる。ACE阻害薬(ACEI)やアンジオテンシンII受容体拮抗薬(ARB)などのレニン-アンジオテンシン系(RAS)阻害薬がACE2の発現を増加させる可能性が示唆される一方で、大規模コホート研究では、ACEI/ARBの使用とSARS-CoV-2感染への感受性との間には関連性がないという報告も複数ある。さらに重要なことは、ACEI/ARBは、ACE2のダウンレギュレーションやRASの過剰活性化・サイトカインストームを抑制することで、COVID-19の臨床症状および予後を改善する可能性がある。RAS阻害薬が、SARS-CoV-2による肺障害を低減し、もしくはRASの抑制を介して臨床成績を改善する可能性を検証するために多施設共同のコホート研究が実施された。日本初のCOVID-19の多施設共同臨床研究の成果が、湘南アイパークの周辺を中心とする6医療機関の共同研究として報告されたので紹介する。

日本初の神奈川で実施された多施設共同研究報告

PCR検査によりCOVID-19と診断された患者を対象とした多施設レトロスペクティブコホート研究である。解析には神奈川県内の(1)横浜市立大学医療センター、(2)神奈川県立循環器・呼吸器センター、(3)市立藤沢病院、(4)神奈川県立足柄上病院、(5)横須賀市立病院、(6)横浜市立大学医学部附属病院の6病院から患者データが提供された。対象は2020年2月1日から5月1日までの入院患者151名。高血圧症25.8%、糖尿病20.5%、ACEI/ARBが処方されたのは14.6%であった。追跡調査の最終日は2020年5月20日。

COVID-19に対するACEI/ARBのベネフィット効果

本研究では、院内死亡、機械的人工呼吸、および酸素療法を必要とした頻度は、ACEI/ARB群で非服用群よりも低い傾向にあったが、ACEI/ARBの使用と主要転帰との間の有意な関連は検出できなかった。しかし以下のLimitationに留意すべきである。第一に、患者数が少なく、ACEI/ARBが処方されたのは高血圧患者21人のみであった。第二に、ACEIよりもARBが多く処方されており(ARB:18人、ACEI:3人)、患者数が少ないため、ACEIとARBを別々に解析することはできなかった。第三に、糖尿病は重度の肺炎と予後不良との関連が認められ、糖尿病の有病率はACEI/ARBを服用している患者の方が高かった(52.4%対16.7%、 $p=0.02$)。

ACEI/ARBはCOVID-19誘発性の混乱を防ぐ可能性

高血圧のCOVID-19患者では、ACEI/ARBの服用と混乱(mental confusion)の発生の低さとの関連は、年齢、性別、および糖尿病の罹患を調整しても有意であった(調整後オッズ比0.06、95%CI 0.002-0.69、 $p=0.02$)。ACEI/ARB群で混乱を呈した患者はセンテナリアンであった。混乱抑制のメカニズムとして、RAS阻害薬の炎症に対する保護効果が考えられる。

担当者 平原一郎 所属 テルモ株式会社 専門 腎臓・透析、周産期医療、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)
(日本病態プロテアーゼ学会 評議員)

一言 2020年に日本で開催予定だった東京オリンピックがCOVID-19の流行により順延となった。COVID-19により我々の生活スタイルも様変わりし、withコロナ、afterコロナの時代をどのように切り開いていくのかも我々に課せられた課題かもしれません。皆様のご教示を賜りながら、医療の進歩に貢献出来たら幸いです。

✉ ichirou_hirahara@terumo.co.jp

背景

1型糖尿病はインスリンの絶対欠乏を呈する自己免疫疾患であり、インスリン補充が唯一の治療法である。近年治療法が進歩し、自動的に血糖コントロールを行うインスリンポンプが開発されているが、それでも低血糖イベントが頻発するインスリンコントロールが不良の患者(ブリトル型)が一定数存在することが知られている。このような患者層は膵島移植の適応であり、膵島移植を受けた患者がインスリン離脱を達成するなど良好な経過報告が存在する。一方、現在主流となっている門脈経由での肝臓への膵島移植には課題があり、安全性・手術手技の利便性の向上を目的として、デバイスに膵島を内封した上で皮下移植を行う移植手法がフォーカスされ、非臨床・臨床研究の報告いずれも興味深い知見が蓄積されてきている。今回は、皮下移植用膵島内封デバイス開発を目指している研究グループからの非臨床モデルにおける成果を紹介する。

膵島内封デバイスMailPan®は、免疫隔離能を持つ血管新生デバイスである

膵島内封デバイスMailPan®は、現行の膵島移植の課題(免疫抑制剤の副作用回避、手術手技の利便性向上、複数回の移植手術の可否)をリカバーする工夫が施されている。まず本デバイスの半透膜の評価では、半透膜の持つ11-16nmの孔を通じてグルコース、インスリンを透過させる一方で、免疫細胞や免疫グロブリンは透過させないことが示された。加えて今回の検討では、あらかじめげっ歯類の皮下にデバイスを6週間静置し血管新生を促した後、直交偏光スペクトルイメージングやPETでデバイス周囲に血管化が起こっていることを証明した。これらの結果から本デバイスが酸素や栄養供給が不足し膵島生存に不利な状況であると報告されている皮下においても、膵島生着を凌駕できる環境を作出できる可能性が示された。

ラットインスリノーマ細胞株を内封したMailPan®は、糖尿病ラットにおけるデバイス皮下移植モデルにおいて薬効を発揮する

次に著者らは、糖尿病ラットモデルにデバイスを移植し血管化を促した後、ラットインスリノーマ細胞株をデバイスにローディングし薬効評価を行った。その結果、デバイス移植群では血糖正常化および体重維持を達成したことから、デバイスが効果的に機能を発揮していることを明らかにした。また著者らは、いったんデバイスに内封した膵島細胞をポート経由で取り出すことも成功し、本デバイスを用いることで移植した膵島細胞が回収可能であること、本デバイスが複数回の膵島移植にも対応できる仕様であることを示した。

MailPan®は、Allo移植系において内封した膵島とレシピエントの免疫系細胞のコンタクトをブロックする

最後に、著者らはAllo移植系において内封した膵島に対するレシピエントの免疫反応について検討した。デバイスに内封していない膵島のみを移植したレシピエントおよびデバイス内封膵島を移植したレシピエントの、血中のドナー抗体を評価した結果、デバイス内封膵島を移植したレシピエントにおいては、血中のマクログロブリン量およびドナーに対する抗体量(IgG)が膵島のみ移植のレシピエントよりも低く、この結果より本デバイスは移植膵島とレシピエントの免疫系細胞のコンタクトをブロックすることが示された。以上の結果から、本デバイスは免疫隔離能を持ち、免疫抑制剤非投与下においても、Allo移植系における拒絶反応から膵島を保護し、その皮下生着を可能にすることが示唆された。

キーワード

- 糖尿病
- 細胞治療
- 血管新生
- 免疫隔離
- 膵島内封デバイス
- In vivoイメージング

要旨

膵島内封デバイスMailPan®は、免疫隔離能を持つ血管新生デバイスである。

ラットインスリノーマ細胞株を内封したMailPan®は、糖尿病ラットにおけるデバイス皮下移植モデルにおいて薬効を発揮する。

MailPan®は、Allo移植系において内封した膵島とレシピエントの免疫系細胞のコンタクトをブロックする。

担当者 山崎緑 所属 武田薬品工業株式会社 T-CiRAディスカバリー 専門 獣医病理学、自己免疫疾患、DDS、再生医療

一言 再生医療は外科手術とセットで研究開発されるべきだ、というノーベル賞受賞者の山中伸弥教授の御言葉がある。すなわち、どんなにクオリティの高い細胞を分化誘導し作出できたとしても、そのポテンシャルを発揮できるかどうかは、手術方法・手技にかかっているということ。今回紹介した膵島内封デバイスの研究は、人口多能性幹細胞を用いた細胞治療にも応用可能な、再生医療実用化に向けた試みの1つであると言えるだろう。将来的にこのような特徴を持つデバイスを用いることで副腎や下垂体由来の膵島以外の内分泌細胞をターゲットとした再生医療への応用も期待したい。

✉ midori.yamasaki@takeda.com

老化細胞を標的としたCAR-T細胞は老化に関わる病理を正常化する

Corina Amor et al., 2020, Cell, 583, 127-132

キーワード

- CAR-T
- 細胞老化
- Senolysis
- uPAR

要旨

老化細胞選択的に発現上昇する細胞表面マーカーとしてウロキナーゼ型プラスミノージェンアクチベーター受容体(uPAR)を同定。

uPARを標的としたCAR-T細胞は、慢性臓器線維症及びNASHモデルマウスにおいて、細胞老化マーカー(SA-β-gal)及び線維化領域を減少させた。

薬効容量(0.5-1×10⁶cells)投与時には異常所見は認められなかった。

背景

細胞老化は前癌性細胞の増殖を防ぐ腫瘍抑制機構として重要な一方で、老化細胞の過剰な蓄積は慢性炎症を伴う組織の線維化や糖尿病・変形性関節症などの疾患を助長する。近年Senolysis(老化細胞の選択的な除去)を試みる低分子化合物に注目が集まっているが、多くは効力を欠き、副作用をもたらすのが現状である。そこで筆者らは別のアプローチとしてCAR-T細胞を用いたSenolysisを試みた。筆者らは、主要組織での発現が低く細胞老化時に誘導される細胞表面抗原としてuPAR(urokinase-type plasminogen activator receptor)を同定した。そしてこのuPARを標的としたCAR-T細胞が、senescence誘導モデルマウスにおける生存延長や、慢性臓器線維症モデルマウス・NASHモデルマウスにおける線維化抑制を起こす事を見出した。本文献は、CAR-T細胞の癌以外の疾患治療可能性を示唆するものである。

老化細胞特異的な細胞表面マーカー探索

CAR-T細胞の標的となる老化細胞特異的な細胞表面抗原を見出すため、筆者らは3つの細胞老化誘導モデル(①TIS:therapy induced senescence、②OIS:oncogene induced senescence、③RIS:replication induced senescence)のRNA-Seqデータから、共通して発現上昇する因子を探索した。得られた8つの候補遺伝子の中から、正常組織で発現が低く、KOマウスが繁殖/生存可能で細胞表面に発現するuPARをCAR-T細胞の標的として選別した。なお、細胞老化と関連の深い疾患である肝線維症や動脈硬化性プラークのヒト病理サンプルにおいてもuPARと細胞老化マーカー(p16など)の共局在が認められ、ヒトでも老化細胞でuPARの発現が亢進する事が示唆された。

CAR-T細胞による老化関連病変の改善

まず、TISモデル(肺腺癌同所性移植マウスに複数の阻害剤を暴露させて細胞老化を起こしたモデル)にuPAR CAR-T細胞を投与する事で、細胞老化マーカー(SA-β-gal)の減少及び生存延長が起きる事を確認した。続いて、細胞老化と関連性の高い慢性臓器線維症に対する影響を検証するため、CCl4誘発肝線維化モデル及びNASHモデルマウスにuPAR CAR-T細胞を投与した。その結果、どちらのモデルマウスにおいても、SA-β-gal及び線維化領域の減少が認められた。

サイトカイン放出症候群

上記各モデルマウスで薬効を示した投与量(0.5-1×10⁶cells)では体重低下や体温変化などの異常所見は特に認められなかった。高容量(2-3×10⁶cells)を投与した際には、一過性に体重低下、血清中サイトカイン濃度上昇などが認められたものの、IL-6R、IL-1Rの阻害剤でそれらのサイトカイン放出症候群様所見は緩和された。

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 Jan van Deursenらの先駆的なNature文献に端を発して、老化細胞の除去を疾患治療に活かそうとするSenolyticsの研究がベンチャー企業を中心に盛んになってきています。こうしたアプローチがどれ程のポテンシャルを有しているのか興味が有り、今後も動向を見ていきたいと考えています。

✉ ogasawara.akira@ma.mt-pharma.co.jp

背景

サルから人間への進化過程において知覚・記憶・言語・思考などといった高次の脳機能をつかさどる大脳新皮質が拡大するが、これは胎児の皮質形成期に脳室下帯の神経前駆細胞増殖が増幅するためであると考えられている。しかしながら、なぜヒトのみでこのような大脳新皮質の拡大が引き起こされるのかは分かっていなかった。

ARHGAP11Bはサルからヒトへの進化の過程で生まれた放射状グリアに高発現する新規遺伝子である

大脳新皮質が拡大するためには、発生初期に脳室帯・脳室下帯に存在する神経前駆細胞の増殖が必要と考えられる。マックスプランク研究所の研究者らは、前駆細胞のひとつ・放射状グリアに高発現するヒト特異的遺伝子として、ARHGAP11Bを同定した。この遺伝子はサルからヒトへの進化の過程でRho GTPase活性化タンパク質であるARHGAP11Aが重複してできたと考えられ、その過程でC末を欠失し、新たなアミノ酸を獲得している。その結果、ARHGAP11BはRhoGAP活性を持たない新たな機能未知遺伝子に生まれ変わっている。

マウス胎児新皮質・マーモセット胎児にARHGAP11Bを発現させると大脳皮質の肥大化、ヒト様の大脳皮質折り畳みが誘導される

マウス胎児新皮質にin utero electroporationでARHGAP11Bを発現させたところ、基底放射状グリアの増殖が促進され、さらに大脳皮質の肥大および通常マウスには認められないヒト新皮質様の折りたたみ構造が誘導された。さらに実中研マーモセット基盤技術センターの技術を用いマーモセット胚にレンチウィルスベクターでARHGAP11Bを発現させたところ、101日齢の胎児脳において、基底放射状グリアの増殖、大脳新皮質の肥大、通常この時期には見られないシワ構造が確認された。研究者らは倫理的な観点からすべての実験を胎児のみで行った。

ARHGAP11Bはミトコンドリアに局在し解糖からグルタミン分解への代謝切り替えを介し幹細胞の増殖を促進させる

ARHGAP11Aは核局在タンパク質だが、ARHGAP11Bはミトコンドリアに局在していた。ミトコンドリアに局在しない変異体では幹細胞増殖が抑制された。ARHGAP11BはミトコンドリアにおいてANT2と相互作用し、ミトコンドリア膜透過性遷移孔(mPTP)を制御することにより、結果的に解糖からグルタミン分解への代謝切り替えを誘導することが明らかとなった。この経路を阻害するとARHGAP11Bによる幹細胞増殖は抑制された。以上より、ARHGAP11Bはミトコンドリアの機能制御を介してヒト大脳新皮質の進化的肥大に貢献していると考えられた。

ヒト特異的遺伝子ARHGAP11Bはミトコンドリア機能を制御しヒト様の新皮質発達を促進する

Florio et al., 2015, Science, 347, 1465-70
Heide et al., 2020, Science, 369, 546-550
Namba et al., 2020, Neuron, 105, 867-881.e9.

キーワード

- 進化
- ヒト特異的遺伝子
- 大脳新皮質
- ミトコンドリア
- ARHGAP11B

要旨

サルから人間への進化過程において大脳新皮質が拡大する。

放射状グリアに発現するヒト特異的遺伝子としてARHGAP11Bが同定された。

マウス・マーモセット胎児にARHGAP11Bを発現させると大脳皮質が肥大化し、ヒト様の大脳皮質折り畳みが誘導される。

ARHGAP11Bはミトコンドリアに局在し、解糖からグルタミン分解への代謝切り替えを誘導する。

ARHGAP11Bは、ミトコンドリアの機能制御を介してヒト大脳新皮質の進化的肥大に貢献する。

担当者 丸山穰 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、現在はミトコンドリアバイオロジー関連創薬、iPS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

SARS-CoV-2はヒト心筋細胞に感染し、細胞障害作用を誘発する

Bojkova et al., 2020, Cardiovascular Res, 16, 2207

キーワード

- SARS-Cov-2
- 心毒性
- ヒトiPS細胞由来心筋細胞
- ACE2阻害剤
- レムデシビル

要旨

SARS-CoV-2はACE2やカテプシンを介して心筋に感染することが示された。

心筋へのSARS-CoV-2感染は、ACE2中和抗体やカテプシンを阻害するプロテアーゼ阻害剤、そしてレムデシビルにより阻害される可能性を示した。

本研究は、SARS-CoV-2の心筋への感染がCOVID-19患者の心障害の原因であるというエビデンスとはならないが、心障害発生機序の一つの可能性として重要な示唆を与えた。

ヒトiPS心筋細胞のウイルス感染に関する薬理モデルとしての有用性も示した。

背景

近年、SARS-CoV-2(エンペロープ型の一本鎖RNAウイルス)によって引き起こされるCOVID-19は地球規模の影響を与えています。COVID-19患者において、致死率と心筋マーカーの上昇の相関が疑われています。この心筋マーカーの上昇は、心筋へのSARS-CoV-2の感染が直接的な原因か、肺障害など他臓器の炎症からの二次的要因なのかは明らかではありません。この研究では、ヒト細胞(モデル)として、ヒトiPS細胞由来心筋およびヒト単離心筋細胞を用いて、SARS-CoV-2の心筋への直接的作用について検証しました。なお、ヒト心筋細胞モデルとして、ヒトiPS心筋は、近年薬理モデルとしての有効性について知見が蓄積されており、致死性不整脈(TdP)に関する医薬品評価のツールとしても利用が見込まれています。

ヒトiPS心筋細胞には、SARS-CoV-2が心筋細胞に感染・侵入するためのタンパク質が発現している。

ヒトiPS細胞由来心筋細胞(hiPS-CM)には、SARS-CoV-2が結合するACE2受容体と、SARS-CoV-2が結合した後に、膜融合を介して細胞表面から細胞内に感染する際に関与するプロテアーゼ(TMPRSS2)、そしてエンドソームから細胞内に侵入する際に必要なカテプシンをそれぞれ発現していることを見出した。

複数種のin vitro試験系において、SARS-CoV-2の細胞内への侵入が確認された。

hiPS-CMの平面培養法における感染実験、細胞シート(平面培養法の一つ)を用いた、感染後の機能評価(心拍数、細胞死、遺伝子発現)、さらには、3次元培養(スフェロイド)による感染後の拍動数変化、そして、ヒト単離心筋を用いての電顕によるウイルス局在評価を順次行い、いずれのモデルでもウイルス感染を支持する結果を得た。

各種化合物によるSARS-CoV-2感染阻害作用を評価した。

心筋細胞に発現している、ACE2、カテプシン、それぞれに対する阻害剤、およびレムデシビル(ウイルスRNA伸長阻害)を用いて感染阻害作用を確認したところ、いずれも阻害作用が確認された。

Lysosome targeting chimaeras(LYTACs)技術は、細胞膜上や細胞外のタンパクに対して分解誘導を可能にする

Banik MS et al, Nature 2020 Aug;584(7820):291-297
Ahn G et al, ChemRxiv 2020
<https://doi.org/10.26434/chemrxiv.12736778.v1>

キーワード

- タンパク分解誘導
- LYTACs
- リソソーム
- CI-M6PR(IGF2R)
- ASGPR

要旨

リソソームシャトリングタンパクのリガンドと標的タンパクのリガンドを連結したLYTACsは、リソソームを介して標的膜タンパクを分解誘導する。

LYTACsの作用発現には、CI-M6PRに加え、エンドソームの輸送、リソソーム融合などが関与する。

膜タンパクに加え、細胞外のタンパクにも適用可能な技術である。

ASGPRとそのリガンドを利用することで、肝臓特異的な分解誘導へ応用できる。

背景

近年、SNIPERやPROTACsなどのタンパク分解誘導技術(targeted protein degradation:TPD)は、標的タンパクに結合する化合物とユビキチンリガーゼに結合する化合物をリンカーで連結することで、標的タンパクへ強制的にユビキチンを付加させ、分解を誘導する新たな創薬手法として注目されています。しかしながら、これらの技術は、主に細胞質内のタンパクを標的とした手法であり、細胞膜上のタンパクや細胞外タンパクは対象外でした。今回の報告では、リソソームヘシャトリングする膜タンパクのcation-independent mannose-6-phosphate receptor(CI-M6PR)とそのリガンドを活用することで、細胞膜上または細胞外のタンパクに対しても、リソソームを介して分解誘導できることを報告しました。

CI-M6PRのリガンドと標的膜タンパクのリガンドを連結したLYTACsは、リソソームを介して標的タンパクを分解する

LYTACsは、リソソームヘシャトリングする膜タンパク(CI-M6PR)のリガンドであるM6PやM6Pnを非常に多数(20~90個)、標的となる膜タンパクのリガンド(小分子、抗体など)に連結した分子・技術の総称です。EGFRを標的膜タンパクとして、その抗体であるCetuximabにM6Pnを結合したLYTACsをHeLa細胞に処理することで、濃度、時間依存的なEGFRの発現量の低下が認められました。この作用が、CI-M6PRを介した作用であることを、ノックダウン処理、リガンド競合実験に加え、リソソーム阻害剤などを用いて確認しました。また、膜タンパクであるCD71、PD-L1に対しても、LYTACsにて分解誘導されることを示しました。更に、CRISPRi Libraryを用いて、LYTACsの分解誘導作用に関与する遺伝子をスクリーニングした結果、CI-M6PRに加え、エンドソームの輸送やリソソーム融合に関わる遺伝子群が見出されました。

細胞外のタンパクに対しても分解誘導が可能な技術

細胞外の標的タンパクとして、蛍光タンパクのmCherryや蛍光標識したIgGを培地中に添加し、それらに対する抗体にLYTACs技術を適用した結果、リソソームに蛍光タンパクが蓄積することが確認されました。このことから、本技術は細胞外のタンパクに対しても適用されることが示唆されました。

肝臓組織特異的な分解誘導作用も応用できる

肝臓特異的なシャトリングタンパク(ASGPR:asialoglycoprotein receptor)のリガンド(Tri-GaLNAc)をCetuximabに結合することで、肝臓癌細胞株(HEP3B)でのEGFRの分解誘導が認められました。一方、ASGPRが未発現のHeLa細胞では、HEP3Bに比べ、分解誘導作用は明確に低下していました。今回の一連の報告は、全て*in vitro*レベルですが、今後は*in vivo*レベルでの検証が期待されます。

担当者 長田智治 所属 株式会社LSIメディエンス 専門 薬理学、発生学、安全性薬理研究

一言 ヒトiPS細胞に限らず、新しい創薬ツールが薬事申請に採用される試験種として普及するには多くの時間と経験を必要としますが、創薬研究の発展には、絶え間のない新しいモデルの提唱やcase studyの蓄積が不可欠と実感します。

✉ osada.tomoharu@mg.medience.co.jp

担当者 是永滋 所属 あすか製薬株式会社 専門 タンパク分解、核内受容体転写制御(性ステロイド)

一言 海外では既に、PROTACsなどのタンパク分解誘導作用を有する複数の薬剤が、臨床試験を実施中です。今回の論文では、CI-M6PRのリガンドとして、M6Pnの多量体を利用していますが、最近では二重特異性aptamerや二重特異性抗体等、各種モダリティへの応用も報告されています。この様なタンパク分解誘導技術は、分子量が大きくなるため、創薬応用への難易度は高まりますが、現在、非常に活発な研究分野であるため、創薬への可能性を感じています。

✉ korenaga-s@aska-pharma.co.jp

ヒトの機能喪失型バリエーションを用いた薬物標的候補の評価

Minikel et al., 2020, Nature, 581 (7809), 459-464

キーワード

- Genome Aggregation Database (gnomAD)
- 予測の機能喪失型バリエーション (predicted loss-of-function (pLoF))
- 薬剤標的候補

要旨

ヒトの機能喪失型バリエーションが許容できない必須遺伝子でさえ、抑制性薬剤の標的として成功している。

ヒトの機能喪失型バリエーションの発生頻度は非常に低い。

自動化されたバリエーションのアノテーションとフィルタリングは有効であるが、偽陽性を除くためにはマニュアルのキュレーションは必須である。

背景

ヒトの遺伝的特徴は創薬の新規標的選択を考える上で重要である。例えば、疾患の原因としてヒト遺伝学的情報がある遺伝子を標的とする治療薬候補は臨床試験における承認確率が高い事が報告されている。一方、ヒト機能喪失型バリエーションの同定はいくつかの遺伝子で薬理学的抑制によるヒトにおける安全性と表現型の影響の予測を与えている。しかしながら、機能喪失型バリエーションを有する個人を同定する方法論については依然として課題が残っている。今回、新たに公開された14万人分のgnomAD v2データベースを用いて、薬剤標的候補のヒトの機能喪失型バリエーションの評価に関する検討を行い、得られた3つの重要な知見を報告する。

ヒトの機能喪失型バリエーションが許容できない必須遺伝子でさえ、抑制性薬剤標的として成功する

pLoFはナンセンス変異、必須のスプライシングサイト変異、フレームシフト変異が含まれており、機能喪失型と考えられる。またpLoF obs/exp ratioの指標は、バリエーションが自然選択においてどの程度選択されているかを示す。全遺伝子(17,604)と薬剤標的遺伝子(383)のpLoF obs/exp ratioの平均値はそれぞれ52%、44%であり、薬剤標的遺伝子の値は全遺伝子に比べて低かった。個別の遺伝子群はこれまで報告されているように不活性化の許容性に応じた多様性が認められた(例: 嗅覚受容体の遺伝子群、ハプロ不全の遺伝子群はそれぞれ約100%、約13%)。更によく知られた薬剤標的について調べたところ、PCSK9は約100%、HMGCR、PTGS2、TUBB、CHRM1、TOP1は約13%以下であった。例えば、TOP1とTUBBについては、細胞障害性を持つ化学療法剤の標的遺伝子であり、機能喪失型バリエーションが許容できない必須遺伝子でさえ、抑制性薬剤の標的として成功している事が分かった。

ヒトの機能喪失型バリエーションの発生頻度は非常に低い。

一般的にヒトの機能喪失型バリエーションは稀であり、遺伝子座両方2本でのバリエーション(ホモ接合型、複合ヘテロ接合型)を見極めるためには、仮に近親者にフォーカスしてリクルートしない場合、現在のおよそ1000倍のサンプルサイズが必要である事が分かった。

マニュアルのキュレーションは必須である。

自動化されたバリエーションのアノテーションとフィルタリングは有効であるが、偽陽性を除くためにはマニュアルのキュレーションが必須であり、そのポイント(コーディング領域の長さ、アレル頻度、バリエーションの分布パターン(具体例として、HTT、MAPT、PRNPの結果))を示した。

✉ yuuichi.arakawa@axcelead.com

インスリン遺伝子のイントロンから生成された環状RNAがインスリン分泌を制御する

Stoll et al., 2020, Nature Commun, 11, 5611

キーワード

- インスリン
- 環状RNA (circular RNA)
- 糖尿病
- RNA splicing
- TDP-43

要旨

ある種の環状RNAは細胞内で安定発現し、さまざまな生理機能を担っている。

ヒト、マウス、ラットの膵島には、インスリン遺伝子の第2イントロン由来の環状RNAが安定発現している。

アンチセンス核酸にてこの環状RNAをノックダウンするとインスリン分泌が異常となる。

2型糖尿病モデル動物、および糖尿病患者では、この環状RNA発現が低下している。

この環状RNAは核局在し、RNA結合タンパク質のTDP-43と相互作用していた。

背景

近年、生体内には多様な環状RNAが存在し、疾患の発症に重要な役割を果たすことが明らかになってきています。環状RNAは通常、タンパク質コード遺伝子のpre-mRNAから生成されますが、末端の5' Cap構造とpolyA配列を欠いており、共有結合的に閉じたRNAとして存在します。末端構造がないために、環状RNAはエキソヌクレアーゼに対して耐性があり細胞内でも安定です。膵島に存在する膵ベータ細胞は、栄養素やその他の非代謝性刺激などに反応してインスリンを分泌することで、血糖の維持に中心的な役割を果たしています。今回の報告では、膵島に発現する環状RNAを網羅的に発現解析し、インスリン分泌との関連について解析しました。

ヒト、マウス、ラットの膵島にはインスリン遺伝子第2イントロン由来の環状RNAが発現し、インスリン分泌に関わる

マウス膵島由来RNAの網羅的な配列解析から15925種類の環状RNAを見出した。この中には膵ベータ細胞でキーな遺伝子を由来とするRNAが含まれていた。*Ins2*がヒトインスリン遺伝子に相当するため、*Ins2*由来環状RNAに着目した。この環状RNAは、*Ins2*遺伝子第2イントロンから、RNAスプライシング反応により生じるラリアットRNAを含み、ラットやヒトの膵島でも同様に第2イントロン由来の環状RNAが確認された。これら環状RNAは第1イントロンRNAと比較して細胞内で安定で、環状RNAのつなぎ目配列に特異的なアンチセンス核酸で膵ベータ細胞の環状RNAをノックダウンすると、インスリン分泌能を抑制した。

2型糖尿病モデル動物、および糖尿病患者では、この環状RNA発現が低下している

実際、2型糖尿病患者の膵島ではコントロールと比較して、インスリン遺伝子発現に変化は認められなかったものの、この環状RNAは発現低下していた。また、糖尿病診断指標の一つ、血糖コントロールマーカーの糖化ヘモグロビン量と、この環状RNAの発現レベルは、2型糖尿病患者において逆相関を示した。同様に、肥満で高血糖の2型糖尿病モデル*db +/+*マウスではコントロール*db +/-*マウスと比較して*Ins2*遺伝子発現は変化しなかったものの、この環状RNAは発現低下していた。

この環状RNAは核局在しTDP-43と相互作用していた

第2イントロン由来環状RNAは核局在したことから、細胞質局在するmiRNAに対してmiRNA spongeとして機能する可能性は低いと考えられた。また、特異的に相互作用するRNA結合タンパク質として、イントロンラリアットRNAとの相互作用が報告されていたTDP-43を見出した。

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

一言 私は核酸医薬品の創製に業務として携わっており、ノーベル賞の受賞対象となってきたRNA splicingやRNAi、CRISPR/Cas9に代表されるRNAバイオロジーやその技術の創薬応用に強く興味を持っています。2013年にNature誌にて発表されたmiRNAスポンジとして機能する環状RNAの2報の衝撃は、いまなお忘れられません(Memczak et al., 2013; Hansen et al., 2013)。それから8年が経過しますが、今では環状RNAの産生メカニズムや各種機能、そして環状RNAの合成研究といった具合に幅広く世界中で進展しています。もしかしたら創薬への貢献もそう遠くない未来にあるかもしれません。

✉ masahiro.nogami@takeda.com

酵素阻害剤創薬におけるハイスループットスクリーニングの最近の動向及び阻害様式の検討

Matthew D Lloyd, J Med Chem.
2020 Oct 8;63(19):10742-10772.

キーワード

- ハイスループットスクリーニング(HTS)
- 低分子化合物
- 酵素阻害薬
- 新規阻害様式

要旨

昨今の新規創薬モダリティは目まぐるしく進化しているが、低分子創薬についても特殊な阻害様式等、依然として様々な価値がある。

Journal of Medicinal Chemistryに、ここ20年の酵素阻害剤創薬におけるハイスループットスクリーニング(HTS)の最近の動向が報告され、更によりImpactが高いHTS結果の傾向が示されたので、この内容について概説し、最近報告された新規阻害様式の例について紹介する。

背景

ヤナギ樹皮から単離されたサリシンを基に世界初の人工合成医薬品アスピリンが開発されるなど、かつては生薬や漢方薬などの生理活性をもった天然物を出発点とした創薬活動が盛んであった。1980年代頃からは、遺伝子クローニング等の分子生物学的技術に加え、蛍光検出法や発光検出法等によるハイスループットスクリーニング(HTS)技術の進展によって、特定のタンパク質標的の活性を調節する化合物を探索してその化合物の生体での薬効を確認するreverse pharmacology的アプローチが行われるようになった。更に2000年以降はヒトゲノム計画の完了やバイオインフォマティクスの発展によってHTSが爆発的に普及した。

ハイスループットスクリーニングの最近の動向

世界初のHTSによって同定された酵素阻害剤(HIV-RT阻害剤)は1994年に報告され、2002年にはProtein kinase 阻害剤ゲフィチニブ(Iressa)が抗がん剤として、2007年にはラパチニブ(Tykerb)が同じく抗がん剤として承認されたことをはじめとして、数多くのHTSを基にして開発された酵素阻害薬が承認されてきた。1994年から2018年までに報告されたHTSの6,639例全体では、ターゲットクラスではkinase及びproteaseが多く、対象疾患ではがん及び感染症が多かった。

ユニークな阻害様式をもつ酵素阻害薬の例

一方で、中でもImpactが高い(引用文献数が多い、或いはヒットからリード・臨床候補薬へと展開したもの)報告の特徴として、特異的共有結合、tight binder、slow binder、非拮抗型阻害剤といった、IC50と親和性がかならずしも相関しない薬剤が少なくないということが示された。実際、上記ラパチニブ(Tykerb)はHER2 slow binder、トラメチニブ(Mekinist)はATP非拮抗型MAP阻害剤であることが知られており、このような性質をもつ阻害剤に潜在的価値がある可能性がある。

新規阻害様式をもつ酵素阻害薬の例

フォスフォジエステラーゼ(PDE)2Aは脳で高発現しており、記憶、学習、認知機能に関連する中枢神経疾患における創薬ターゲット分子として注目されており、様々な阻害剤が報告されている。また、PDE2Aは細胞内高濃度cGMP存在下で活性が増大することが知られている。我々は、これまで知られている数々のPDE2A阻害剤は低濃度cGMP存在下で阻害活性が弱くなるという性質をもつことを見出した。これは、拮抗型阻害とは異なる新たな阻害様式の発見であり、PDE2A阻害剤に特有の性質であった。また、我々は、このような既知の化合物とは異なり、低濃度cGMP存在下でも阻害活性が弱くならない新規PDE2A阻害剤を同定した。この新規阻害様式はcGMP濃度が健常者と比較して低いことが知られている統合失調症などの疾患においてより有効である可能性がある。

ナンセンス変異依存mRNA分解を避けて標的タンパク質をアップレギュレーション

Lim et al., 2020, Nature Commun, 11, 3501
Han et al., 2020, Sci Transl Med, 12, 558, eaaz6100

キーワード

- ナンセンス変異依存mRNA分解
- アンチセンスオリゴ
- ドラベット症候群
- てんかん
- SCN1A

要旨

ナンセンス変異依存mRNA分解(NMD)と遺伝子疾患に関連がある。

アンチセンスオリゴ(ASO)は、生産的mRNA、正常タンパク質量を増加できる。

ドラベット症候群の原因遺伝子SCN1AはNMD発生率が高く、標的ASOにより正常タンパク質発現を誘導し、機能回復を促進できる。

正常タンパク質発現調節は新たな核酸医薬のターゲットである。

背景

単一遺伝子疾患の多くはタンパク質機能の喪失または低下によって引き起こされるが、これまでの標的mRNA分解型アンチセンスオリゴ(ASO)や標的エキソンスキップ型ASOでは十分解決されていない。Targeted Augmentation of Nuclear Gene Output(TANGO)テクノロジーは、自然発生するナンセンス変異依存mRNA分解を避け、機能回復に貢献する技術である。著者らは、ドラベット症候群と呼ばれる難治性のてんかんの原因遺伝子であるSCN1Aの標的ASOをスクリーニングし、in vitroだけでなくin vivoにおいても用量依存的に生産的mRNAおよびタンパク質の増加をもたらす新たな調節機構を明らかにした。

ナンセンス変異依存mRNA分解と遺伝子疾患

ナンセンス変異依存mRNA分解(nonsense mediated mRNA decay, NMD)は、真核生物に存在するmRNAの品質監視機構である。エクソンスキッピングを誘導するもの、エクソンインクルージョンを誘導するもの、特定のエクソン3'または5'末端を選択するもの、そしてイントロンを挿入するNMDについて網羅的に調査した。公開されているヒト肝臓、腎臓、中枢、眼RNA-Seqデータより、NMDである7757イベントを特定した。遺伝子疾患データベースOrphanetから1246イベントが遺伝子疾患と関連する可能性が示唆された。

ASOによる非生産的スプライシングイベント抑制

複数の異なる遺伝子(PCCA, SYNGAP1, CD274, SCN1A)のNMDに対するASOをin vitroスクリーニングし、生産的mRNAを増加させるASOを同定した。これらは、非生産的スプライシングを減少させ、生産的mRNAの増加を促進した。また、生産的mRNAの増加だけでなく、正常タンパク質量を増加させ、その平均は1.5~2.6倍であった。これは各遺伝子のNMD発生率と関連する。

ドラベット症候群標的ASOによる病態改善

ドラベット症候群は、主にSCN1A遺伝子の変異により惹起される、乳幼児期に発症する難治てんかんである。マウスでは、生後7日より生産的mRNAの増加が観察される。病態モデルマウスへの脳室内投与により、生産的mRNAの発現増加とともにSCN1A産物であるNav1.1タンパク質発現増加が観察された。投与後、ASOは脳内に14週間残存し、生産的mRNA発現、正常タンパク質発現を亢進させる。病態モデルマウスにおいて生後90日での生存率は23%であるが、ASO投与により97%に上昇した。ドラベット症候群は何度もけいれんが繰り返される病気であるが、ASO投与によりけいれん発作間隔が延長された。

担当者 中島康祐 所属 武田薬品工業株式会社 専門 神経精神疾患領域、薬理研究、スクリーニング

一言 私は、かつてはスクリーニンググループで低分子創薬における探索研究を担当しており、後には臨床試験に進むプロジェクトにも携わりました。その中では化合物の阻害様式の解明に注力し、ユニークな阻害様式をもつPDE2A阻害剤を見出したので、今回はこの例を含めて、最近まとめられたReverse pharmacologyの動向について紹介いたしました。現在は神経精神疾患領域において薬理研究を担当しており、特に遺伝性希少疾患においては新規モダリティ創薬研究にもフォーカスしており、これらの技術によっていち早く患者さんに治療薬を届けたいと考えています。

✉ kosuke.nakashima@takeda.com

担当者 兼子佳子 所属 レナセラピューティクス株式会社 専門 骨生物学、細胞生物学、核酸医薬

一言 昨年、国産初のアンチセンス核酸医薬品が承認され、再び核酸医薬への期待が高まっています。この論文で検証されているASOが機能発揮するには高濃度の投与が必要であり、投与量を減らすためにはさらなる基礎研究の積み重ねが必要です。ヘテロ二本鎖核酸という新技術を通して、核酸医薬のさらなる発展に貢献したいと思います。

✉ k.kaneko@renatherapeutics.com

ミトコンドリア局在circRNA SCARを標的とするミトコンドリアROS産生低下を介したNASHの改善

Zhao et al., 2020, Cell, 183, 76-93

キーワード

- ミトコンドリア
- 環状RNA (circRNA)
- Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)
- ROS

要旨

NASH患者由来肝線維芽細胞では環状RNAが発現変動しており、ミトコンドリアDNA由来環状RNAのSCARは発現が低下している

SCARを過剰発現すると、脂肪酸で惹起されるROS産生や炎症反応を抑制する

高脂肪食負荷マウスにSCARを過剰発現させるとインスリン抵抗性が改善し、肝臓でのコラーゲン蓄積、マクロファージの浸潤が抑制される

NAFLD患者での病態進展とSCARの発現量は負に相関する

背景

細胞内では様々な生理機能を持つ環状RNAが産生されており、疾患の発症にも関与することが明らかになっている。環状RNAの多くはゲノムDNAから転写されるプレmRNAから生成されるが、最近の研究ではミトコンドリアが独自に保持しているミトコンドリアDNAからも環状RNAが生成されることが明らかになった。今回の報告では、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) 患者における環状RNAの発現解析を行っており、NAFLD患者の肝臓で発現変動している環状RNAを見出した。その中のミトコンドリアDNA由来の環状RNAの機能解析を行い、NAFLD病態への環状RNAの寄与を調べた。

SCARはミトコンドリアDNA由来の環状RNAで、ミトコンドリアに局在して機能する

NASH患者由来肝線維芽細胞では、15種類の環状RNAの発現が上昇し、11種類の環状RNAの発現が低下していた。発現が低下している環状RNAの一つがミトコンドリアDNAから生成されるSCARで、SCARはミトコンドリアに局在することを明らかにした。さらに、SCARを過剰発現させた線維芽細胞ではパルミチン酸により惹起されるROS産生が低下し、IL-1 β やTNF- α などの炎症性サイトカイン産生が減弱した。

SCARはATP5Bと結合し、ミトコンドリア透過性遷移孔開口を阻害することでROS産生や炎症反応を抑制する

SCARを用いたプルダウン実験からATP合成酵素サブユニットのATP5Bと結合することを見出した。さらに、SCARはATP5Bと結合することでミトコンドリア透過性遷移孔 (mPTP) の開口に関与するCypDのmPTPへの結合阻害を介して、ROS産生や炎症反応を抑制することを明らかにした。また、SCARのホスト遺伝子が存在するミトコンドリアDNA軽鎖からのmRNA転写に関与するPGC-1 α のノックダウンや脂肪酸誘導のERストレスによるPGC-1 α の発現低下でSCARの発現量が低下したことから、SCARはPGC-1 α による発現調節を受けていることが示唆された。

SCARの過剰発現により高脂肪食負荷マウスのNAFLD病態が改善する

高脂肪食負荷マウスにSCARを発現するプラスミドをミトコンドリア標的ナノパーティクルを用いて静脈内投与することで肝臓中に過剰発現させた実験で、マウスのインスリン抵抗性が改善し、肝臓でのコラーゲン蓄積やマクロファージ浸潤を抑制した。また、NAFLD患者の解析で肝硬度やROS産生指標のDHE陽性線維芽細胞の割合とSCAR発現量が負に相関した。

DNAベースの電圧計で細胞小器官の膜電位を測定する

Saminathan et al., Nat Nanotechnol, 2021, 16, 96-103

キーワード

- 膜電位測定
- ライブセル
- DNAナノデバイス
- 細胞膜
- 細胞小器官

要旨

Voltairは38-merの二本鎖DNAに蛍光色素を付与したDNAベースの電圧計である。

Voltairで細胞膜の膜電位が測定された。

Voltairでエンドサイトーシスに関与する酸性細胞小器官の膜電位が測定された。

Voltairで細胞小器官の膜電位変化をタイムラプス計測でき、イオンチャネル阻害などによる膜電位変化もリアルタイムで観察された。

背景

細胞膜の膜電位は近年容易に測定されるようになったが、細胞小器官の膜電位はミトコンドリアやリソソーム以外は特異的なプローブが無いなどの理由から測定が困難とされる。膜電位の測定には、膜電位感受性蛍光タンパク質あるいは膜電位感受性色素が用いられる。前者は感度が高いというメリットに対し、pH変化に弱く酸性細胞小器官の膜電位測定が難しいというデメリットがある。また、後者はpH非感受性かつ容量負荷性が低いメリットがあるが、特定の細胞小器官を狙いにくいというデメリットがある。今回、著者らは両者のメリットを持ち、デメリットも克服したDNAベースの電圧計Voltairを構築し、細胞膜とエンドサイトーシスに関与する酸性細胞小器官の膜電位を測定した。

DNAベースの電圧計Voltairのデザインと評価

著者らが設計したVoltairは、電圧感受性蛍光プローブ (RVF)、蛍光色素Atto647N及び目的の細胞小器官に結合する化合物が38塩基の二本鎖DNAに結合した電圧計である。細胞膜に指向性を持たせたVoltair^{PM}は、励起光に対して一定強度で蛍光するAtto647Nが細胞外に、膜電位変化に応じた蛍光を発するRVFが細胞膜内に配置される。これをHEK293T細胞に処理し、パッチクランプ法で細胞膜膜電位を制御したところ、-100～+100mV間でRVF/Atto647N比の線形性を認めた。また、HEK293T細胞の静止膜電位は既報同様の値が得られ、これらのことからVoltairで膜電位測定が可能であることが示された。

エンドソームとリソソームの膜電位測定

著者らはエンドソームとリソソームの膜電位を測定するため、Voltair^{IM}を作製した。Voltair^{IM}はスカベンジャー受容体を介したエンドサイトーシスを利用し、細胞小器官に送達される。Voltair^{IM}は細胞への処理から10分後に初期エンドソーム、60分後に後期エンドソーム、100分後にリソソームにその大部分が送達され、それぞれのタイミングで各膜電位が測定された。さらに、チャネル阻害剤などによる膜電位変化もタイムラプス計測でリアルタイムに観察された。また、トランスゴルジネットワーク及びリサイクリングエンドソームの膜電位測定用のVoltairも示された。このように、Voltairはこれまで困難であった酸性細胞小器官の膜電位の測定に成功した。

Voltairの課題

Voltairはエンドサイトーシスを利用するため、ミトコンドリア、ペルオキシソーム、核に送達されない。シナプス小胞や分泌小胞への送達は、Voltairの分子量が制限となり送達されないと予想される。また、組織特異性が無いことがin vivoで活用する上での課題であり、今後の進展が期待される。

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 ミトコンドリアは独自のDNAを保持していて、酸化的リン酸化やATP合成に不可欠な遺伝子やtRNAをコードしています。さらに、最近の研究でミトコンドリアDNAからも核DNAと同様にnon-coding RNAを発現していることが明らかになりました。ミトコンドリアDNA由来のRNAやタンパクに対しては、細胞内で二重膜構造をもったミトコンドリア内に存在しているため、技術的に薬剤送達が困難でこれまでなかなか創薬に成功していません。しかし、近年ミトコンドリアをターゲットにした薬剤送達技術も発展しているので、今後、ミトコンドリアDNA由来の分子を狙った創薬も実用化されていくと期待しています。

✉ yasukawa.kai@mk.mt-pharma.co.jp

担当者 西村徹 所属 あすか製薬株式会社 専門 分子生物学、婦人科系疾患

一言 私は大学院時代では精子の発生に重要な分子メカニズムの研究に従事しておりました。特に生殖細胞のエピジェネティクスや小分子RNAに興味を持っております。入社後は婦人科疾患の治療薬のターゲット探索に取り組んでおります。サイエンスカフェでは生殖関連の発表を見た記憶が無いので、今後はそういった分野の研究も発表したいと考えております。

✉ nishimura-t@aska-pharma.co.jp

プリオン病における Ribosome profilingにより明らかとなった、グリア細胞特異的な翻訳変動

Scheckel et al., 2020,
eLife 2020;9:e62911

キーワード

- 翻訳
- リボソームプロファイリング
- グリア細胞
- プリオン病
- 神経変性疾患

要 旨

中枢神経細胞種特異的なリボソームの精製とリボソームプロファイリングを組み合わせることで、異常プリオンの蓄積によって引き起こされる翻訳の変化を同定した。

アストロサイトとミクログリアにおいて顕著な翻訳変化を示したが、ニューロンではほとんど変化はなかった。

類似した現象は、様々な疾患で共通する可能性が示唆されている。

グリア細胞における異常な翻訳が深刻な神経症状の発症と関連しており、プリオン病の進行にも関わっている可能性があるのではないか。

背 景

中枢神経系の病理研究において、細胞種選択的な解析の難しさがハードルとされています。遺伝子発現解析に着目しても、従来のFACSなどを用いた方法では、アーティファクトな結果を反映してしまうことが懸念されていました。筆者らは今回、Ribosome profilingを応用した手法により、細胞種特異的な翻訳制御の解析を可能にしました。Ribosome profilingとは、リボソームにより翻訳されているmRNAの配列を解析することで、リボソームによる翻訳活動のスナップショットを観察できる手法です (Ingolia et al., 2012, Nat. protoc.). 今回の報告で、中枢細胞ごとの特異的な遺伝子発現を観察することが可能になり、中枢神経系の研究がより一層進むことが期待されます。

リボソームの精製とリボソームプロファイリングの組み合わせによって、細胞種特異的な遺伝子発現変動の解析に成功した。

筆者らは、エピトープタグが付加されたリボソームが細胞種特異的に産生される遺伝子改変マウスを作製し、アフィニティー精製したリボソームが覆うmRNA配列をsequencingにより解析した。リボソームのタグ付けは、細胞種特異的に発現する遺伝子のプロモーター下流に、タグ配列が付加されたリボソームタンパク質の遺伝子を挿入することで実現した。本手法により、ニューロン、アストロサイト、グリア細胞それぞれにおけるリボソームの特徴的な翻訳活動を観察することが可能になった。

プリオン病モデルマウスでは、アストロサイトとミクログリアにおいて顕著な翻訳の変動がみられた。

筆者らは、Transcriptomeの変化を含むヒト病態の側面を多く反映することが知られているプリオン病モデルマウスと今回の手法を組み合わせることで、プリオン病モデルマウスにおける中枢細胞ごとの翻訳の変化を比較した。その結果、アストロサイトやミクログリアにおいて、特異的な翻訳活動が観察された。本結果により、グリア細胞における異常な翻訳がプリオン病の深刻な神経症状の発症と関連することを新たに見出した。

プリオン病モデルマウスにおけるグリア細胞特異的な翻訳の変化と他の神経疾患の関連性。

プリオン病の症状や遺伝子変異は、アルツハイマー病やパーキンソン病など他の神経変性疾患との関連も示唆されている。本解析で得られた情報は、ヒトプリオン病態の理解のみならず、他の疾患の理解に重要な情報となると考えられる。

アストロサイトを介するシナプス伝達の網羅的解析手法の一つ

Takano T et al., Nature.
2020 588. 296-302.

キーワード

- Astrocyte
- Tripartite synapse
- Neuronal cell adhesion molecule (NRCAM)
- GABAergic neurotransmission

要 旨

アストロサイトープレシナプスーポストシナプスの3者で構成されるTripartite synapseのシナプス距離はアストロサイトが管理する。

本文 献new technologyでTripartite synapseに118個の分子が同定される。

このうちのひとつのアストロサイト接着分子NRCAMのノックアウトは、抑制性シナプスの距離を広げてしまう結果、抑制性シナプス機能も特異的に低下させる。

シナプス距離の微調整が治療アプローチとなりうる。

背 景

シナプス伝達には、「神経のシナプスの因子」(＝神経伝達物質の放出率、量や受容体数)が主に関与すると考えられてきた。本論文では、新たに、「アストロサイトの接着分子」も伝達効率に寄与することを明らかにした。著者は、アストロサイトープレシナプスーポストシナプスの3者で構成されるTripartite synapseの局所に発現するタンパク質を網羅的に解析するNew technologyを確立した。この新技術で同定した接着分子の中の一つのNRCAM欠損が抑制性のシナプスの間隙を特異的に広げ、抑制性神経機能も特異的に低下させる事もin vivoで明らかにした。今後、「アストロサイトの接着分子」の増減を介して、シナプス距離とシグナルを特異的に是正する治療アプローチが展開されるだろう。

Tripartite synapseを構成する分子を網羅的に質量分析で同定する新技術 (Split-Turbo ID)を駆使して、全プレイヤーをリスト化し、その内のNRCAMに着目した。

Tripartite synapseに局在する膜タンパク質をin vivoでビオチン化した後、精製および質量分析して、118個のタンパク質を同定した。その中から、薬物依存症、自閉症スペクトラム障害や統合失調症に関与し、アストロサイトと神経に共発現するNRCAMに著者は着目し、解析した。

NRCAM欠損は抑制性シナプス機能のみを低下させる。

アストロサイトのNRCAMと神経のNRCAMは細胞外で同分子間にて結合を形成する (homophillic transcelluar interaction)。アストロサイト特異的にNRCAMをノックアウト (KO) しても、神経特異的にNRCAMをKOしても、抑制性シナプスの間隙は広がることを、VGAT (抑制性神経プレシナプスマーカー) とGephyrin (ポストシナプスマーカー) の免疫染色と誘導放出抑制顕微鏡法で示した。一方で、VGLUT1 (興奮性神経プレシナプスマーカー) とPSD95 (ポストシナプスマーカー) のシナプス距離は両KOで変わらなかった。次にKOによる抑制性シナプス機能の低下を測定するため、GABA電圧固定の電気生理評価を実施し、KOによって軸索終末からのGABA放出確率、リガンドの応答性の低下が生じる事を示した。

シナプス距離を調整する別アプローチもある。

別グループは、シナプス間をブリッジ可能な組換タンパク質 (人工シナプスコネクター) を脳内投与して、シナプス伝達効率を調整する治療法を報告している (Suzuki K et al., Science. 2020 369. eabb4853)。本文 献のTripartite synapseでの距離調節のみならず、人工シナプスコネクターも神経疾患の治療アプローチに考えられる。

担当者 松木泰子 所属 武田薬品工業株式会社 専門 分子バイオマーカー、RNA biology (翻訳)

一言 私は2020年度に入社し、現在は分子バイオマーカーの研究に携わっています。学生時代は東北大薬 (現東大医科研) の稲田利文先生の元、リボソームのユビキチン化に着目したmRNA分解・翻訳・タンパク質の安定性などの研究を行っていました。学生ながら、リボソームプロファイリングという画期的な方法の開発によって次々と新たな発見がなされていったことを日々体感していました。本文 献のような応用方法も多岐にわたっており、いつか自分でもこの手法を応用して何か創薬に貢献するアイデアを出せないかと思っております。

✉ yasuko.matsuki@takeda.com

担当者 鈴木俊也 所属 大塚製薬株式会社 専門 神経疾患

一言 受容体やチャネルの機能調節のためには、従来の低分子化合物加えて、本論文のTripartite synapseの調節、さらにはAAVや組換タンパク質による人工シナプスコネクターがアプローチになると分かった。シナプス伝達の是正には、神経に加えてアストロサイトなどのグリアも応用できることも分かり、ターゲット分子は広がる事が分かった。

✉ Suzuki.Shunya@otsuka.jp

認知機能を増強させる低分子は、マウスの加齢性記憶力低下を可逆的に改善する

Krukowski et al., 2020, eLife, 9:e62048

キーワード

- 老化
- eIF2
- ISR (Integrated Stress Response)
- ISRIB (ISR inhibitor)

要旨

ISRは様々なストレス負荷により、タンパク質の翻訳を全体的に抑制するが、老齢マウスではISRが恒常的に起きている。

老齢マウスへのISRIB投与は老齢マウスのIFN関連の炎症マーカーを減少させ、T細胞の集積を減少させる。

老齢マウスへのISRIBの投与は海馬における樹状突起密度・AHPを改善する。

ISRIBは空間記憶・エピソード記憶を改善する。

背景

医学の進歩による寿命の延長により、世界的に高齢者は年々増加しており、2050年までに日本の高齢者(65歳以上)は3626万人、米国では8370万人に達すると推測されている。その為、加齢による認知・学習・記憶機能の低下は社会的に大きな関心事であるが、有効な治療薬は無い。筆者らは、ストレスに晒された細胞が引き起こすISR (Integrated Stress Response)に着目し、ISRを阻害する低分子化合物であるISRIBを用いて、加齢による樹状突起密度の減少・電気生理学的・行動薬理的な変化が改善するかを検討した。

老齢マウスではISRが恒常的に起きており、ISRIBによりそれは阻害される

ISRはGCN2/PKR等のキナーゼから端を発するが、最終的にはeIF2aのリン酸化に集約され、それによりATF4の発現上昇及びタンパク翻訳量の減少が起きる。老齢マウスにおいて、ISR経路に関わる因子であるGCN2及びATF4の発現上昇が確認され、ISRIBによりそれらの発現は抑制された。

老齢マウスでは炎症マーカーの増加が確認されるが、ISRIBはそれを減少させる。

老齢マウスの海馬では、若齢マウスと比較し、IFN関連経路遺伝子やT細胞マーカーの増加が確認されたが、ISRIBの投与により、その発現は低下した。更に個々の老齢マウスを解析すると、IFN経路の遺伝子やその他の炎症マーカーの発現量とRadial Arm Water Maze (RAWM) 試験のエラー数は正に相関した。

ISRIBの投与は海馬のAHP、行動薬理を改善する。

筆者らはCA1における樹状突起密度は老齢マウスにおいて、減少することを確認したが、ISRIBの投与により改善した。更に、高頻度のspikeを起こした後の過分極(AHP)に関しても、老齢マウスでは過分極方向にシフトするが、ISRIBの投与により若齢マウスと同程度まで改善した。RAWM試験においても、老齢マウスは若齢マウスと比較し、エラー数が多くなるが、ISRIBの投与により、若齢マウスと同程度までエラー数は改善した。以上より、ISRは老齢マウスにおいて恒常的に起きているが、それを阻害することで、AHP・樹状突起密度・IFN応答・T細胞集積に作用し、空間記憶及びエピソード記憶を改善することが示唆された。

担当者 栗田卓 所属 田辺三菱製薬 専門 核酸医薬、電気生理学

一言 私は核酸医薬品の創製に業務として携わっております。最近是非臨床のデータを臨床にどうやって繋いでいくかを日々考えていますが、今回の加齢による記憶力低下に関しても、どうやって臨床に繋いでいくのだろう、と思いながら論文を読んでいた。その答えがまだ世の中にはない疾患も多くあると思いますので、日々勉強し、自分自身が納得のできる創業フローを考え抜き、患者さんへ1日でも早く薬を届けることに貢献したいと思います。

✉ kurita.takashi@ma.mt-pharma.co.jp

TGF- β 1によるミクログリアの制御がマウス網膜変性モデルにおける錐体細胞を保護する

Wang et al., 2020, J Clin Invest, 130, 4360–4369

キーワード

- 遺伝子治療
- 網膜色素変性症
- TGF- β
- ミクログリア

要旨

網膜色素変性症では、遺伝子変異によって桿体細胞が障害された後、二次的に中心視力を司る錐体細胞が障害される。

網膜に存在するミクログリアは組織障害に応じて活性化されるが、錐体細胞障害への寄与は不明である。

網膜色素変性症モデルマウスにAAVを用いて錐体細胞特異的にTGF- β を発現させることで、錐体細胞の減少、それに伴う視覚機能の悪化が抑制される。

TGF- β による錐体細胞保護作用は、ミクログリアのTGF- β シグナル亢進が関与する。

背景

網膜色素変性症は、網膜に異常をきたす進行性・遺伝性の難病です。原因遺伝子は70を超え、それぞれの原因遺伝子に対する遺伝子治療が開発されていますが、技術的に治療が難しい遺伝子変異及び稀な遺伝子変異を有している患者さんや、原因遺伝子未同定の患者さんは取り残されている状況です。そのような患者さんに対し、原因遺伝子に依存しない治療法が望まれています。ミクログリアは網膜とCNSに存在する免疫細胞で、組織障害に反応して活性化します。本論文では、網膜色素変性症で二次性に障害され、中心視力に寄与する“錐体細胞”に着目し、AAVでTGF- β を発現させ、近傍のミクログリアのTGF- β シグナルを活性化させることで、変異の種類に依らず錐体細胞を保護できる可能性を示しています。

網膜色素変性症モデルの炎症におけるミクログリアの関与

Rd1マウス(網膜色素変性症)にPLX5622(CSF-1R阻害薬)を経口投与した結果、網膜におけるミクログリアの除去、それに伴う網膜の炎症遺伝子発現抑制を確認した。このことから、網膜色素変性症モデルにおける炎症にミクログリアが関与することが示唆された。

TGF- β 発現による、網膜色素変性症モデルの錐体細胞保護作用

TGF- β はミクログリア活性化を抑制する抗炎症性サイトカインであることから、網膜色素変性症モデルにおける錐体細胞障害に対するTGF- β の関与について検討した。まず、Rd1マウスの錐体細胞にAAVでGFPを発現させ、飼育に伴う錐体細胞障害について検討した結果、P20～P50(AAV投与後20-50日後)にかけて錐体細胞が減少することを確認した。次に、Rd1マウスの錐体細胞にAAVでTGF- β アイソフォーム(1, 2, 3)を発現させ、P20～P50にかけて認められる錐体細胞の減少に対する抑制作用について検討した。その結果、TGF- β 1の発現によって明確な抑制作用が確認された。それに伴い、視覚機能の悪化も抑制された。同様に、他網膜色素変性症モデルマウス(rd10マウス(Pde6b変異、劣性遺伝)、RHO-/-マウス(優性遺伝))に対し、AAVでTGF- β 1を発現させることで、錐体細胞保護作用が認められた。

TGF- β 1発現による錐体細胞保護作用は、ミクログリアのTGF- β 1シグナル亢進が関与する

TGF- β 1発現による錐体細胞保護作用のメカニズムについて検討した。まず、網膜におけるTGF- β Rの発現を検討した結果、ミクログリアで高発現していたことから、ミクログリアの関与が示唆された。次に、TGF- β 1発現下でミクログリアを除去あるいはTGF- β Rを阻害し、錐体細胞保護作用への影響を検討した結果、いずれの場合も保護作用が減弱した。このことから、TGF- β 1発現による錐体細胞保護作用に、ミクログリアのTGF- β 1シグナル亢進が関与すると考えられた。

担当者 藤本ゆり 所属 田辺三菱製薬株式会社 専門 薬理(腎・眼)、核酸医薬(antisense)

一言 これまで主に腎疾患の薬理研究を担当しておりましたが、最近眼科疾患にも興味を持っております。眼科疾患は、UMNsが高く、局所投与可能という利点もあり、ゲノム編集・細胞治療など、新しいモダリティでの開発が活発です。ご興味ある方は一緒に議論させて頂けると幸いです。※コロナ禍で活動が止まっておりますが、過去にたなみんランチ・寺子屋たなみんなど、田辺三菱発のiParkイベントにも携わりました。微力ながらiParkのOI活性化に貢献していければと思いますのでよろしくお願いします。

✉ fujimoto.yuri@ma.mt-pharma.co.jp

再構築ヒト臓器モデルの定義、期待、利用例、並びに医薬品の研究開発に実装するための戦略

Tetsuka et al., 2020, Biol. Pharm. Bull, 43, 375–383

キーワード

- トランスレーショナルサイエンス
- 再構築臓器モデル
- 細胞生理学
- 薬物動態
- Microphysiological system

要旨

臨床試験の主要な失敗要因の解決策として microphysiological system (MPS) の活用
に期待が寄せられている。

MPSは「再構築ヒト臓器モデル」に分類される。

再構築ヒト肝臓モデルでは肝毒性を起こす薬剤の長期暴露評価や休薬による回復性評価が可能であった。

モデル開発者とインタラクティブな関係を構築することで、新規モデルを早期に評価し、利用することが可能になる。

背景

近年、組織工学や材料科学の進展や微細加工技術の進歩に伴って、長らく平面環境下で行われていた細胞培養の様相が変化している。それに伴い、3D培養、microphysiological system、organ-on-a-chip、body-on-a-chip、オルガノイドといった単語がいわゆるバズワードとなっている。これらの用語の定義は重要ではあるが、他の研究ツールとの類似点や長所・短所と共により体系的に理解することが求められている。また、これらの技術進展の恩恵を医薬品の研究開発に活用するにはいくつかのアプローチが考えられるが、その戦略を製薬企業の実践者の立場から具体的に言及される例は限られていた。

臨床試験の主要な失敗要因の解決策として MPSの活用に期待が寄せられている。

第二相臨床試験の主要な失敗要因は、候補薬のヒトでの有効性を示せない事と、予期せぬ副作用が認められ場合がある事である。これらを解決するため、アストラゼネカ社ではMPSへの期待を論文で表明している。

MPSは「再構築ヒト臓器モデル」に分類される。

MPSやorgan-on-chip、オルガノイドは再構築型のヒト臓器モデルに分類される。これらは摘出臓器モデルやヒト臓器を搭載した動物モデル（担癌マウスやヒト肝キメラマウスなど）と並び、広く「ヒト臓器モデル」と定義できる。従来型の動物モデルと相補的に活用することで医薬品の研究開発に貢献できる。

再構築ヒト肝臓モデルでは肝毒性を起こす薬剤の長期暴露評価や休薬による回復性評価が可能であった。

ヒトの肝細胞、星細胞、内皮細胞で再構築された3D-バイオプリント肝臓モデルにアセトアミノフェン（APAP）を長期暴露した際、単回暴露時よりも低濃度から細胞障害を検出できた。また、APAPを一定期間暴露後にウォッシュアウトした場合、ウォッシュアウトしない場合に比べて細胞障害性が低減していた。さらにAPAPのウォッシュアウト期間中に減少した組織中グルタチオン量が回復していた。

モデル開発者とインタラクティブな関係を構築することで、新規モデルを早期に評価し、利用することが可能になる。

再構築ヒト臓器モデルはready-to-use品の購入や委託試験で活用できる。一方、新規のモデルやニーズにあったモデルを活用するには、モデル開発者とインタラクティブな関係を構築することが効果的である。近年、モデル開発者と製薬企業の協働の成果が論文公表されつつある。この流れをさらに推進することで、医薬品を患者さんにより早く確実に届けることができる。

担当者 手塚和宏 所属 アステラス製薬株式会社 専門 薬物動態、再構築ヒト臓器モデル

一言 医薬品候補の非臨床での薬物動態評価で常に関われるのは、「結局ヒトではどうなるの?」ということです。これに応えるために種々の研究ツールや解析手法を活用しています。動物実験だけでは当然ながら種差の課題がある（しかもそれが第一相臨床試験で分かってしまう）ため、薬物動態研究者はヒト由来試料（細胞）に対する期待や感度が高いと考えています。突き詰めていくと、安全性や有効性の評価においてもヒト細胞の培養系を活用することで、これまでの課題が解決するかもしれません。ただし、細胞を単に平面培養するのではなく、何か工夫が必要ですね。と思いながら仕事をしていたら、いつの間にか3D培養マニアになっていました。

✉ kazuhiko.tetsuka@astellas.com

背景

急性骨髄性白血病(AML)は段階的に複数の変異を獲得するというクローン進化を経ながら進行していきます。これまでにAML患者及びその前ステージであるクローン性造血(CH)や骨髄異形成症候群(MSD)の患者よりゲノム解析で変異の相対的な獲得時期がわかってきているが、患者の遺伝的多様性が大きく影響し、可能な解析が限られてきた。遺伝的背景の差を最小限に留めるためにCRISPRを用いて変異を導入したiPS細胞を作製し、血球系統に分化させた。AMLの代表的な遺伝子変異を連続的に導入することで、表現型を再現するだけでなく、早期ステージで見られ、後期まで続く特徴的なシグナル経路にも着目することができた。

AML関連変異が導入されたiPS細胞はAMLの各ステージを再現する

健康人iPS細胞に最大3つの変異(ASXL1、SRSF2、NRAS)を連続的に導入し、変異の数によりAMLを段階的にモデルした。各株を血球分化させると、変異数が増える(=ステージが進行する)に従い分化能が低下することを確認し、未熟な前駆細胞が含まれるようになった。特に3つの変異の入ったSAR株は増殖能が高く、AML表現型の一つである骨髄移植で生着が見られた。またRNA-seq、ATAC-seqを実施することで、各株がAMLステージで見られる転写パターン、クロマチン状態に近いことがわかった。

早期段階で高発現していた炎症関連・自然免疫関連遺伝子は後期にも継続され維持される

株間を比較すると、変異の数に従い、発現が変化する遺伝子数も開閉状態が変化するクロマチン領域も増加していくことが確認された。特にMDSを模倣していた2変異のSA株で獲得される変化はそのステージ以降も維持されている。1変異のA株から後期ステージでも変化が見られる遺伝子の数は少なかったが、自然免疫、炎症関連にかかわる遺伝子の割合が多かった。

AML進行段階で標的可能な早期イベントの特定

SA株からSAR株で変化するイベントがAML確立に重要であることを仮説としてSA株でクロマチンがオープンになり、後期段階でも発現が上昇し続ける遺伝子を選抜したところ13種類あった。その内の一つ、ATP6V0A2の阻害剤を作用させると、SA、SARの両株の増殖を抑えることができた。さらに、早いステージに当たるA株から維持される炎症関連遺伝子の高発現に着目し、炎症シグナル阻害剤が健康株に影響を与えることなく3種類の変異株のコロニー形成能を抑制することがわかり、炎症関連シグナルを標的にしたAMLの治療介入の可能性を示した。

キーワード

- 急性骨髄性白血病
- CRISPR
- iPS細胞
- 炎症関連シグナル

要旨

ヒトiPSCsとCRISPRを駆使しながら急性骨髄性白血病(AML)モデルを作製。

前段階のクローン性造血(CH)と骨髄異形成症候群(MDS)の特徴も捉え、AMLの転写とクロマチン状態を再現。

クローン進化の初期で炎症関連シグナルの障害を特定し、後期にも持続することを確認。

早期のクローンにも作用する炎症関連シグナルを標的にした治療法の可能性。

担当者 市島ホセ 所属 武田薬品工業株式会社 専門 再生医療、RNA生物学、神経系疾患

一言 本論文の対象疾患は専門外の部分が多くあったが、病態メカニズムを詳細に調べることで新しい治療法の可能性を示しているところから多く学べました。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ります。しかしながら、技術の進歩で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。これからも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

Dirisala et al., 2020, Sci Adv. 6 : eabb8133

- 肝類洞壁によるトラップ
- PEG-OligoLys
- 体内動態
- DDS (Drug Delivery System)
- ナノメディシン (核酸医薬/遺伝子治療薬)

核酸医薬や遺伝子治療薬といったナノメディシンの多くは肝臓の類洞壁にトラップされ、動態の低下や予期せぬ肝毒性が生じる問題がある。

2本鎖PEG(40k)-OligoLysでは肝類洞壁を数時間コーティングするが、胆管を通して排泄された。

2本鎖PEG(40k)-OligoLys 投与後にDNAミセルもしくはAAV8を投与したところ、標的選択性が向上した。

近年、核酸医薬や遺伝子治療薬といったナノメディシンが上市されてきたが、肝類洞壁によるナノメディシンのトラップにより、ナノメディシンの動態が低下し、標的臓器へ十分な量送達されない問題があった。そのため、肝類洞壁を生体適合性の高いPEGでコートすることを筆者らは着想した。しかし、長期的に肝類洞壁をコートすることは肝臓の生理機能を損なう懸念があったため、一過的に制御することが求められた。また、全身の血管がコートされると副作用だけでなく、標的臓器への送達が阻害されるため、肝類洞壁選択的に結合するポリマー開発が求められた。筆者はカチオン性であるオリゴリシンにPEGを結合したポリマー、PEG-OligoLysを開発し、その効果を検証した。

PEGのないOligoLys、1本鎖PEG(80k)-OligoLys、2本鎖PEG(40k)-OligoLysを静脈投与したところ、OligoLysは投与直後から血管内壁に結合し、血中滞留性が低下したのに対して、1本鎖PEG-OligoLysおよび2本鎖PEG-OligoLysは血管内壁に結合せず、血中滞留性は高く保たれた。

全身の血管においては、PEG-OligoLysは結合しなかったが、次第に血中滞留性が低下した。肝臓組織をin vivo共焦点顕微鏡で観察したところ、PEG-OligoLysは肝類洞壁の内壁に結合していることが観察された。さらに、2本鎖PEG-OligoLysは3時間程度で胆管を通して排泄されることが明らかとなった。一方で、1本鎖PEG-OligoLysは胆管を通した排泄が殆ど認められなかった。この理由は、肝類洞壁の上皮細胞のエンドサイトーシス効率が1本鎖PEG-OligoLysでは低かったためと考えられた。また、PEG-OligoLysは膜傷害活性や肝傷害を誘発せず安全性が高いことが示唆された。これにより、2本鎖PEG-OligoLysによる一過的な肝類洞壁選択的コートが可能となった。

肝癌モデルマウスに2本鎖PEG-OligoLysを投与し5分後にPEG-PolyLysによるpDNAナノミセルを投与したところ、癌での発現効率が10倍程度向上した。つまり、EPR効果によるpDNAナノミセルの癌集積性が向上した。さらに心筋や筋肉に指向性があるAAV8で検証したところ、2本鎖PEG-OligoLysを予め投与すると、肝臓での感染が低下し、心臓や骨格筋での感染能が増加した。2本鎖PEG-OligoLysによる肝類洞壁の一過的なコーティングにより、核酸医薬やAAVといったナノメディシンの選択性を向上できることが示され、毒性低下や薬効改善が期待される。

一言 私は核酸医薬の創薬研究が「基盤技術」の構築を業務として携わっております。核酸医薬といったナノメディシンの臨床での問題は肝臓でのトラップによる血中滞留性の低下や予期せぬ肝臓での毒性がありました。本論文では、リガンド検討によるターゲティング効率を上げるといった手法ではなく、肝臓洞壁を一過的にPEGでコーティングすることで毒性なくナノメディシンの選択性を向上させるといった新しい切り口での研究です。本論文では予めの投与でしたが、同時投与でも問題ないことが示せれば、幅広い応用が期待されます。DDS研究といった場合に、ナノメディシン側の性能向上には必要ですが、プレクスルーがなかなかありません。受け手側を制御するDDSを研究していくことも将来の医薬品開発に重要かと思います。DDSに関係なく気軽にご連絡ください。

 akitsugu.matsui.v8@mail.toray



iPARK Policy Virtual Science Café

iPARK内のキャンプサイトで開催してまいりましたが、緊急事態宣言発令後はオンライン開催のスタイルをいち早く導入して継続しております。登録者200名に達し、Caféには69名の

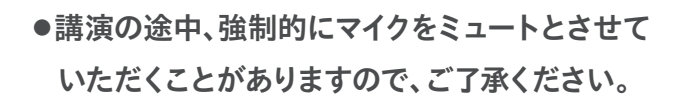
方にお越しいただくなど(2020年7月16日に記録しました)多くの皆様に認知いただける場に成長しております。

しかしながら、オンライン開催となり、メンバーは増えましたが、カメラオフの皆様がどなたなのかわからない事態も生じてまいりました。つきましては、Science Caféが、オンラインにおいてもさらに活発な交流の場になるためにルールを設けます。以下、ご協力いただき、withコロナ時代もproactiveに活動してまいりましょう！

- Web MTGシステムには、Zoomをメインに使います。
- 入室する際は、表示名を「お名前__御所属名」にお願いします。
例：相葉 亜久__iPARK

●ご発表内容は、既報文献、あるいは公知情報に基づきご準備をお願いいたします。

- ご発表内容や質疑応答に関しまして、ご所属会社の守秘義務には十分にご留意いただきますよう、よろしくお願いいたします。



- 発言されるときは、マイクをオンにしてください。

- 講演者やファシリテーター、質問者などが発声する際に、生活音(ドアベルや電話の呼び出し音、お子様の声)等が聞こえることがあります
が、ご了承ください。

masahiro.nogami@takeda.com

Memo

編集後記 ■■■■

第3号が完成いたしました！大変ご多忙の中、発表して下さったメンバーのみなさんに加えて、今回は山田先生が素晴らしいレビューをご執筆くださいました！心より感謝申し上げます。この冊子を通じ、現場のアイパークサイエンティストやアイパーク、そしてアイパークに関連するみなさまのサイエンスの進化に貢献できれば幸いです（野上）。

早いもので本冊子も3冊目となりました。今回はScience Café特別版として御発表頂いた山田先生のレビューが収録されています。アカデミアの先生とのコラボレーションは大変貴重であり、是非今後ともこうした交流が益々活発になればと感じております。末筆ではございますが、お忙しい中ご発表・ご執筆頂いた皆様に改めて御礼申し上げます（小笠原）。

今回の第3号分で初めて発表を担当させて頂き、非常に良い刺激になりました。また、オンライン飲み会などでも交流を深めることが出来たと感じております。今後もサイエンスカフェが多くの方々の交流の場となるよう微力ながら貢献できれば幸いです。是非これからもよろしくお願い致します（西村）。

当初は、コロナ禍の中でも気軽に参加できると思って、オンラインのiPark Science Caféに参加し始めました。毎回、普段の業務とは異なるトピックで最新の文献を精読され、詳細に紹介して頂く演者の皆様に感服致しております。この度、Science Journal出版に際しまして皆様の草稿をレビューさせて頂きましたが、皆様お時間を割いて頂いて詳細に記載して頂いているため、私の専門では無い分野も改めて深く理解できました。末筆ながら、参加者の皆様、特にご寄稿いただきました山田勇磨先生、演者の皆様に心より感謝申し上げます（中島）。

