

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。





第4号発行に寄せて ●■■■■■

サイエンスジャーナル第4号の発行、おめでとうございます。

サイエンスカフェは約2年半前、現在代表を務める野上さんの、たったひとりの呼びかけから発足しました。湘南アイパーク1周年の記念イベントで、入居者600人を前にサイエンスカフェ結成を呼びかけていた熱いピッチを、今でも鮮明に覚えています。

以来、多くの会社から研究者が次々と参加し、コロナ禍でもオンラインで着実に活動を広げられて、現在は250人の登録者を誇る一大研究者コミュニティになっているとうかがいました。野上さんはじめ幹事の方々の求心力と実行力、そしてメンバーの皆様のあくなきサイエンスへの探究心が、その原動力となっているものと思います。 湘南アイパークはこれからも、研究者の皆様がサイエンスを探究する火を燃やし続けていけるよう、こうした皆様の活動を精一杯、応援・サポートさせていただきたいと思います。

湘南ヘルスイノベーションパーク 日比野 はるか











目 次

「ご挨拶」第4号発行に寄せて

湘南ヘルスイノベーションパーク・日比野 はるか

スペシャルレヴュー

シングル核遺伝子発現解析の医療・創薬応用への可能性 荒川 佑一(Axcelead Drug Discovery Partner株式会社)

第4期 発表内容

- 1.「ヒト多能性幹細胞から線条体オルガノイドと大脳皮質-線条体アセンブロイドの生成」
- 2. 「神経細胞に豊富なミトコンドリア蛋白質をCRISPRを用いて誘導することにより、グリアから ニューロンへのDirect Conversionが促進される」
- 3. 「クッパー細胞によるPEG化インターフェロンのクリアランスはHBV感染患者のNK細胞活性化と 治療反応を制限する」
- 4.「アストロサイトによる脳内のエタノール代謝がエタノール中毒の運動失調を惹起する」
- 5.「環状ペプチドにおいて連続した疎水性表面が膜透過性を促進する」
- 6.「眼への局所的なドラッグデリバリーを延長するゲル化低張ポリマー溶液」
- 7. 「学習によって得られた世代を超えて伝わる病原菌忌避行動は、アルゴノートとTGP- β によって仲介される」&「線虫は、病原菌忌避行動を学習するために、細菌の非コードRNAを取り込む」
- 8.「リプログラミングにより若齢時のエピジェネティック情報を復元して視力を回復させる」
- 9. 「ショウジョウバエにおいてPPARγ coactivator-1 alphaがスクロース感受性を制御する」
- 10. 「ハッチンソン・ギルフォード早老症(HGPS)に対する標的型アンチセンス治療法の開発」
- 11. 「PROTACs技術の応用により、転写因子の分解誘導が可能となる」
- 12. 「新たな lung-on-a-chip 3Dモデルの構築」
- 13. 「ApoE4 variantはどの細胞においてLOF(機能喪失)かGOF(機能獲得)か?」
- 14. 「環状ペプチドを"コピー&ペースト"することであらゆるタンパク質を高機能化する」
- 15. 「老化細胞を選択的に除去するGLS1阻害剤(グルタミノリシス阻害)が加齢現象を改善させる」
- 16. 「胎盤SOD3は妊娠中の運動で発現増加し、胎仔の糖代謝改善に寄与する」
- 17.「RNAを標的とした低分子創薬の展望」
- 18.「CD63はIRE-IRPシステムを介して鉄によって制御され、細胞外小胞によるフェリチンの分泌に重要である」
- 19. 「SLE患者において赤血球に保持されたミトコンドリアにより骨髄性細胞依存的なI型インターフェロンが誘発される」
- 20.「GBAおよびαシヌクレイン変異を有するヒト中脳オルガノイドにおけるレビー小体様封入体」
- 21.「ミクログリアはナノチューブを介した分配によりα-シヌクレイン繊維を共同で分解する」
- 22.「老化によるエピジェネティクス修飾変化に伴うcryptic転写の増加」

編集後記

シングル核遺伝子発現解析の 医療・創薬応用への可能性

荒川 佑一 (Axcelead Drug Discovery Partners 株式会社)

yuuichi.arakawa@axcelead.com

はじめに

シングル核遺伝子発現解析(シングル核解析)は核からRNAを取得して1細胞レベルで網羅的な遺伝子発現解 析を行う手法であり、シングルセル遺伝子発現解析(シングルセル解析)では評価できなかった凍結組織が対応 可能な最先端の研究手法である。シングル核解析により、従来のシングルセル解析ではアプローチが困難であっ た中枢性疾患を含む種々の疾患の病態機構を解明していく事が可能になった。本稿では、シングル核解析の概 略、シングル核解析を用いた最近の研究報告および課題と今後の展望について概説したい。

シングル核解析の概略

シングルセル解析では細胞内のmature mRNAを用いるのに対して、シングル核解析では核内のpre-mRNAを 用いて1細胞レベルの網羅的な遺伝子発現情報を取得する。また、シングルセル解析には未凍結の新鮮(fresh) な組織を用いる制限があるが、シングル核解析は凍結組織を使用できる特徴がある。シングル核解析により、シ ングルセル解析で得られる細胞種や各細胞種において検出される遺伝子数などの点で類似な結果が得られる と全般的に言われている。以下、試験工程とシングルセル解析に比したシングル核解析の長所を紹介する。

試験工程

シングル核解析は、1)サンプルの準備、2)核取得、3)単一核単離とcDNA/ライブラリー調製、4)シークエンス、 5)データ解析、の大きく5つの工程からなる。それぞれ一般的には、1)はドライアイスや液体窒素などを用いて凍 結組織を取得して、-80℃で冷凍保存する。2)はダウンス型ホモジナイザーなどを用いて細胞から核を分離し、密 度勾配法により核取得を行う方法などが知られている。また、各組織においてそれぞれ最適な核取得条件を設 定する事が重要である。例えば、脳組織では、細胞から核分離を行う際にミエリン鞘由来の残渣(debris)が多い ため、debris除去を加味した条件設定が必要になる。3)はドロップレット方式やマイクロウェル方式などにより単 一核単離とcDNA/ライブラリー調製を実施する。4)は次世代シークエンサーを用いてシークエンスを実施する。 5) はシークエンスデータからマッピングを行い、さらに次元削減やクラスタリングによって細胞型の同定を実施 する。その後、各細胞型データについてパスウエイ解析などを実施する。

シングル核解析の長所

シングル核解析は、シングルセル解析に比して、下記のような長所が知られている。

- 1) 死後の凍結脳組織等、これまで扱えなかった組織の解析が可能
- 2)酵素が多い膵臓等、ダメージを受けやすい組織に対して、より正確な解析が可能
- 3) 新鮮組織の扱いは時間や場所の制限があるのに対して、柔軟な試験計画を実現する事が可能

シングル核解析を用いた最近の研究報告

これまで新鮮組織の入手が比較的容易ながん領域などでは、シングルセル解析手法を用いた研究が盛んに行 われてきたが、死後脳検体を用いる中枢性疾患研究では、凍結組織が適応可能なシングル核解析手法の登場ま で、1細胞レベルでのトランスクリプトーム変化の解明は難しかった。シングル核解析手法を用いた研究報告を疾 患別に見ると、中枢性疾患での報告がやはり多い1)-7)。

中枢性疾患

中枢領域におけるシングル核解析研究としては、まず、げっ歯類脳組織を用いた検討結果が報告された。 Bakkenら®は、新鮮と凍結の正常マウス脳組織を用いてそれぞれシングルセル解析/シングル核解析によって得 られた神経細胞における結果の比較を行い、シングル核解析より、シングルセル解析と同様に神経細胞種を同定 できる事を示した。その後、中枢性疾患患者の死後脳検体を用いたシングル核解析結果が報告された。Renthal ら1)は、レット症候群の疾患モデルマウス (Mecp2ヘテロマウス) の脳組織およびレット症候群患者の死後脳組織 からそれぞれシングルセル解析とシングル核解析によって各細胞種を同定し、さらにアレル特異的なSNP解析に よって野生型/変異型の神経細胞種を分離した上で、発現変動遺伝子解析を行った。その結果、疾患モデルマウ スおよびレット症候群患者共に、変異型の神経細胞種において発現変動遺伝子数(誤制御された遺伝子数)が 増加する事を報告した。この論文は、疾患モデルマウス脳組織のシングルセル解析結果と中枢性疾患患者の死 後脳検体のシングル核解析結果を比較して類似性を最初に示した報告と思われる。蛇足になるが、筆者は同論 文にシングル核解析手法の可能性を感じて、第一号のiPark Science Journalで紹介させて頂いた。

2019年以降、種々の中枢性疾患患者(自閉症2)、多発性硬化症3)、アルツハイマー病4)5)、ハンチントン舞踏病6)、 パーキンソン病⁷⁾)の死後脳検体を用いたシングル核解析結果が次々に報告された。Lengら5)は、アルツハイマー 病患者の死後脳組織(嗅内皮質)を用いたシングル核解析により、脆弱な興奮性神経細胞の選択的マーカーとな るRORB(RAR-related Orphan Receptor B)を見出した。そして、定量的な病理組織学的解析により、疾患の進 行に伴って、その脆弱な興奮性神経細胞の割合が減少する事を確認した。一方、アルツハイマー病病態との関連 が注目されているグリア細胞についても解析を行い、ホメオスタシス機能に関連する遺伝子の発現レベルが低下 した、反応性アストロサイトの亜細胞を見出した。また、Leeら6)は、ハンチントン舞踏病の疾患モデルマウス (R6/2マウス)の脳組織(線条体)のTranslating Ribosome Affinity Purification(TRAP)解析およびシングル核 解析、さらにハンチントン舞踏病患者の死後脳組織(線条体)のシングル核解析を通じて、ハンチントン舞踏病で 最も脆弱な細胞種である線条体の有棘投射神経細胞において、ミトコンドリアから細胞質内にミトコンドリア RNAが放出される事と自然免疫応答シグナルが亢進している事を示した。更に、そのミトコンドリアRNAは自然 免疫応答のセンサーであるPKRに結合する事を明らかにした。これらの結果は、変異ハンチンチンタンパク質の 新規な毒性機構を明らかにすると共に新たな治療方法の可能性を示した。

その他の疾患

中枢性疾患以外の疾患(臓器)では、糖尿病性腎症(腎臓)⁹⁾、膵炎(膵臓)¹⁰⁾、がん¹¹⁾、COVID-19感染症(肺)¹²⁾な どを対象とする報告がされている。腎臓組織を用いたシングルセル解析研究は、腎臓を構成する全ての細胞種を 正確に検出する事が難しいなどの課題があった。そこで、Wuら13)は、正常マウス腎臓組織を用いてシングル核と シングルセルの解析結果を比較し、シングルセル解析では検出できなかった糸球体の細胞種も含めて各細胞種 をシングル核解析により同定できる事を示した。その後、Wilsonらりは、早期糖尿病性腎症患者の腎組織(腎皮 質)を用いてシングル核解析を行い、患者組織において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応する遺伝子発現の特徴を見出した。また糸球体(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エイ亢進が認められる事を報告した。膵臓組 織を用いたシングルセル解析研究は、加水分解酵素を多く含むために膵臓を構成する細胞種を正確に解析する 事が困難であった。そこで、Tostiら10は、新生児および健常成人の膵臓組織を用いたシングル核解析を実施して、 上皮細胞、非上皮細胞およびこれまでヒトのシングルセル解析研究で未同定であった腺房細胞を含めてヒト膵 臓の各細胞種を同定した。また、慢性膵炎患者の膵臓組織を用いたシングル核解析より、腺房導管化生や上皮内 腫瘍の病態に関連する事が知られている腺房細胞(REG・)の存在を確認した。がん組織を用いたシングルセル解 析研究は既に盛んに行われてきたが、酵素によりダメージを受けやすいがん組織の解析や新鮮ながん組織の扱 いに関する時間の制限などの課題があり、凍結組織を用いるシングル核解析が適するケースがある。そこで、 Slyperら11は、新鮮と凍結のがん組織からそれぞれシングルセル解析/シングル核解析を行うための体系的なプ ロトコールを開発して、異なる組織の特性を持つ8種(非小細胞肺がん、神経芽細胞腫、転移乳がん、など)のがん 組織を用いてシングルセル解析/シングル核解析を行った。体系的なプロトコールと得られた結果は今後のがん 研究を行う際の指針を与えるものである。

課題と今後の展望

死後脳検体を用いたシングル核解析が潮流となってきているが、技術上の課題も知られるようになってきて いる。例えば、Dachetら14)は、てんかん患者から手術後に取得した新鮮な脳組織を用いて、死後脳検体の死後経 過時間を模して経時的にシングル核解析を行ったところ、ニューロンおよびグリア細胞における一部の遺伝子に ついて特徴的な経時的遺伝子発現変化が認められた。これらの結果から、経時的な遺伝子発現の特徴を理解 した上でヒト脳疾患のデータ解釈を行う事が重要と結論している。今後の展望として、死後脳検体を用いたシン グル核解析は、死後経過時間をより踏まえた試験デザインを行い、場合によっては、標準的なプロトコールに準 拠の上、適切な補正をして解析が実施されるように工夫する必要があるかもしれない。

また、凍結組織が適応可能なシングル核解析手法の特性を更に活かすため、病院やバイオバンクと連携した 動きが中枢性疾患研究を中心に広がっていくと考えられる。例えば、米国と英国に拠点を構えるCerevance社は 独自技術Nuclear Enriched Transcript Sort sequencing(NETSseq™)を用いてシングル核解析を行う医薬品 のスタートアップ企業であり、既に世界21か所のブレインバンクと連携してヒト脳検体の広範な取集網を構築し ている¹⁵⁾。

最後に、シングル核解析結果を生物学・医学でより広く応用できるかは重要である。この点については、現在、 人体を構成する約37兆個の細胞ひとつひとつの遺伝子発現パターンをデータベース化しようという計画、 Human Cell Atlas(HCA)が国際的プロジェクトとして進行しており、既にシングルセル解析結果だけでなく、シ

ングル核解析結果も公開され始めている16)。今後、世界中で得られるシングル核解析結果について、更にデータ ベース化が進む事が考えられる。

おわりに

これまで概説したようにシングルセル解析でアプローチが難しかった中枢性疾患領域やその他の疾患領域に おいて、シングル核解析を用いた研究報告が増加している。シングル核解析によって得られる新たな知見からヒト 生物学と病態機構の理解が進み、より適切なバイオマーカーや創薬標的などの発見につながっていくであろう。 シングル核解析は医療・創薬の発展に更なる恩恵をもたらす新しい研究手法として期待される。なお弊社ではシ ングル核解析の検討を実施して、既にシングル核解析の受託体制が整っているので、こうした医療・創薬の発展 に貢献できれば大変幸いである。

参考文献

- 1) Nature Neurosci, 2018, 21, 1670-1679
- 2) Science, 2019, 364, 685-689
- 3) Nature, 2019, 573, 75-82
- 4) Nature. 2019. 570. 332-337
- 5) Nature Neurosci, 2021, 24, 276-287
- 6) Neuron, 2020, 107, 891-908
- 7) Acta Neuropathol, 2021, 142, 449-474
- 8) PLoS One. 2018. 13. e0209648
- 9) Proc Natl Acad Sci U S A, 2019, 116, 19619-19625
- 10) Gastroenterology, 2021, 160, 1330-1344
- 11) Nature Method, 2020, 26, 792-802
- 12) Nature, 2021, 595, 114-119
- 13) J Am Soc Nephrol, 2019, 30, 23-32
- 14) Sci Rep, 2021, 11, 6078
- 15) https://cerevance.com/
- 16) Mapping the Human Body at the Cellular Level (humancellatlas.org)

ヒト多能性幹細胞から 線条体オルガノイドと 大脳皮質-線条体アセン ブロイドの生成

Miura et al., 2020, Nature Biotechnol, 38, 1421-1430

キーワード

- ヒト脳オルガノイド
- 線条体
- アセンブロイド
- 22q13.3欠失症候群
- ■患者iPS細胞

要旨

大脳皮質-線条体の神経回路は動機付けを 制御するが、精神疾患にも関連がある。

線条体オルガノイドと大脳皮質オルガノイド を融合させたアセンブロイドを生成した。

大脳皮質から線条体オルガノイドへの神経 突起の投射を電気生理学的に確認できた。

22g13.3欠失症候群の患者iPS細胞から各オ ルガノイドを分化誘導しても、大きさは健常 人iPS細胞由来のオルガノイドと同等だった。

GCaMP6イメージング解析から、患者モデル で神経発火活動の増加と同期の低下がみら れるフェノタイプが再現できた。

背 黒 —

大脳皮質と線条体の神経回路は動機付け行動や運動を制 御する。大脳皮質には興奮性神経細胞、線条体には抑制性 神経細胞が多く存在して、神経回路の調整をしている。この 大脳皮質と線条体の機能異常が自閉症、統合失調症、強迫 性障害などの神経発達障害に関連すると考えられている。 しかしながら22q13.3欠失症候群のような患者の脳におい て、どのような機能異常があるか等の病態のメカニズムは、 詳細にはわかっていない。そこで著者らは、近年報告されて いる大脳皮質オルガノイドだけでなく、線条体オルガノイド の分化誘導方法を新たに開発した。そして両オルガノイドを 融合(アセンブロイド)することでヒト脳の一部である大脳 皮質-線条体における神経回路の病態を再現した。

ヒト線条体オルガノイドの分化誘導法の開発

線条体は抑制性神経が発生する領域で、脳オルガノイド研究で は分化誘導方法が未だ確立されていなかった。そこで著者らは GSX2-mCherry発現系からretinoid X receptor (RXR) アゴニ スト作用があるSR11237を添加することで、ヒトの線条体 (PCW20-25, Allen Brain Atlasのデータ)と相関性の高いオル ガノイドの分化誘導法を確立した。Single cell RNA-sequence 解析からもGABA作動性神経が多く、d85(分化誘導85日め)に は線条体に特異的なMedium spiny neuronマーカーである DARPP32陽性細胞が30%近く存在することを確認した。

大脳皮質オルガノイドと線条体オルガノイドのアセンブロイド

大脳皮質オルガノイドの分化誘導法(2008, Eiraku, et al、2013, Kadoshima, et al) は、今回の著者であるSergiu Pascaらも2015 年に報告している。しかし、大脳皮質オルガノイドと他の領域のオ ルガノイドを共培養する検討はしていない。著者らは病態再現の ために、大脳皮質と線条体のオルガノイドを同じ環境下で培養し た。その結果、72時間後に双方のオルガノイドが融合し、21日目に は大脳皮質オルガノイドの神経細胞から線条体オルガノイドへ 神経突起が伸長することと神経発火の同期も確認された。

22q13.3欠失症候群の患者iPS細胞による病態の再現

22g13.3欠失症候群(別名;フェラン-マクダーミド症候群)は知 的障害、発語遅滞、新生児筋緊張低下の症状があり、自閉症ス ペクトラム症に分類される。欠失部位にはSHANK3, ACR, RABL2Bの3遺伝子が位置し、SHANK3ノックアウトマウスで大 脳皮質-線条体において神経の過剰興奮を示す報告(2016, Rui T. Pexioto et al.) があるが、ヒト患者での解析はされていない。 そこで著者らは患者由来iPS細胞からアセンブロイドを作成し、 単一オルガノイドとの比較を行った。その結果、患者細胞の大脳 皮質-線条体アセンブロイドの特有の現象として、神経発火活動 の増加と同期の低下を見出し、疾患のモデル化を確立した。

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

ー言 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iPS細胞で病態を解析するアプローチが世界中で行われ、その 成果をもとに2021年5月に慶應大学はALSに対するドラッグリポジショニング薬の医師主導治験を完了しました。今後、患者iPS細 胞で創薬の加速が期待されますが、精神疾患のように複雑な病態を再現できず、創薬に至らない希少疾患もあります。今回の論文 は異なる領域の脳オルガノイドを組み合わせるという発展的な取り組みで病態再現を試みています。このような中枢系疾患に対し て、患者iPS細胞による創薬に興味があり、今後もこのような研究が進むことを期待しています。

shunsuke.yoshida@kpharma.co.jp

06

神経細胞に豊富なミトコン ドリア蛋白質をCRISPRを 用いて誘導することによ り、グリアからニューロン へのDirect Conversionが 促進される

Gianluca L. Russo et al., Cell Stem Cell, 2021

キーワード

- Direct conversion
- 遺伝子治療
- Astrocyte-to-Neuron (AtN)
- CRISPRa
- Ascl1
- ミトコンドリア蛋白質

要旨

アストロサイトと線条体ニューロンのミトコン ドリアプロテオームは異なる。

AtNの際に、アストロサイトに豊富なミトコンド リア蛋白質の発現は下がり、ニューロンに豊 富なミトコンドリア蛋白質の発現は上がる。

ニューロンに豊富なミトコンドリア蛋白質を AtN早期誘導することによって、変換効率は 顕著に上がる。

アストロサイトからニューロンへの in vivoでの変換は、神 経置換治療法として非常に期待されている。本論文では、ア ストロサイトとニューロンのミトコンドリアプロテオームを網 羅的に解析する手法により、トランスポーター、代謝酵素、細 胞特異的抗酸化物質を含む、各細胞種において有意にエン リッチされた約150のミトコンドリア蛋白質が同定された。ま た、アストロサイトからニューロンへの変換期間をライブイ メージング観察することで、ミトコンドリア蛋白質の早期活 性化の影響を明らかにした。ミトコンドリア蛋白質をコード する遺伝子を、CRISPRaを用いて早期に活性化すると、特に ニューロンに富んだ抗酸化蛋白質では変換効率が有意に改 善したが、アストロサイトに富んだ抗酸化蛋白質では変換効 率は改善しなかった。例えば、Sod1は変換されたニューロン の生存を改善するだけでなく、より速い変換速度も誘発し、 この過程においてミトコンドリア蛋白質が達成因子及び推進 因子として作用することを示した。

アストロサイトとニューロンはミトコンドリア構造や機能、 そしてプロテオームレベルで異なることを示した

vitroで、ミトコンドリア形状がAstrocyte-to-Neuronのリプログ ラミング中に変化する。変換されたニューロンおよび初代培養 のアストロサイトの機能的生体エネルギーをシーホース解析し、 ミトコンドリア機能に違いがあることが示唆した。さらに、WBと 電子顕微鏡(EM)によりミトコンドリア構造が異なることも示し た。ミトコンドリアプロテオーム的には、液体クロマトグラフィー タンデム質量分析(LC-MS/MS)を用いて、顕著な差異を示した。

ニューロン濃縮ミトコンドリア蛋白質の CRISPRaによる活性化は直接ニューロンの 再プログラミング効率を改善する

Astrocyte-to-Neuronのリプログラミング中に、ニューロンのミト コンドリアに豊富な蛋白質の8つの候補、Sod1、Prdx2、Acot7、 Arg2、Gls, Mgst3、Pgam5、及びSlc25a22をCRISPRaを用いて活 性化した結果、Ascl1-Sod1+Prdx2またはAscl1-Slc25a22が共発 現する細胞の神経突起と神経分岐が発達していた。これは、 ニューロン特有なミトコンドリア蛋白質はアストロサイトがニュー ロンへ変換する際に重要な役割を担っている証拠である。

連続単細胞生細胞イメージングは ニューロン再プログラミングにおける Prdx2-Sod1活性化の役割を明らかにする

ニューロン変換に対するミトコンドリア蛋白質の早期活性化の 影響を検討するために、単一細胞をトランスフェクション後28時 間から6日間、4時間毎に撮影したGFP/DsRed画像でライブイ メージングした。Ascl1-Prdx2-Sod1発現細胞は速い変換効率を 示し、また生存率も高かった。これは大いにアストロサイトから ニューロンへの変換の早期に、ニューロン特有なミトコンドリア 蛋白質の役割を示す証拠である。

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

細胞の再生が必須になってくる。今回の論文は、患者さんの脳内の存在しているアストロサイトを神経細胞へのDirect conversionさせ ることにより、マウスモデルでは神経細胞の機能回復やマウスの運動機能改善や寿命の延長を示唆した。さらに著者らはcell Therapeutics, Inc.というベンチャーを立ち上げ、今後in vivo Direct Conversion治療法の臨床開発を行っている。大いに期待している。

クッパー細胞によるPEG 化インターフェロンのク リアランスはHBV感染 患者のNK細胞活性化と 治療反応を制限する

Nishio et al., 2021, Sci Transl Med, 10.1126/scitranslmed.aba6322

キーワード

- ■ポリエチレングリコール(PEG)
- ■抗PEG抗体
- インターフェロン (IFN)
- ■B型肝炎ウイルス (HBV)
- ■NK細胞

要旨

PEGがコンジュゲーションされた $IFN-\alpha$ (PEG-IFN-α)は、限られたHBV患者のみが 治療応答性を示す理由が不明であった。

PEG-IFN-αの免疫調節機能 – 特にNK細胞 活性化 - が治療応答性に重要な役割を果た すことが判明した。

クッパー細胞による抗体-PEG化薬剤複合体 のクリアランスの加速は、HBV治療の分野を 超えて、あらゆる疾患治療のためのPEG化薬 剤の薬効改善のために重要である。

背 黒

HBV感染により毎年多くの人が死亡しており、その数は増 加傾向にある。HBVの"cure"は、血中のHBV DNAおよび hepatitis B surface antigen (HbsAq)の消失で定義され るが、核酸アナログ治療ではウイルスの増殖は抑えられる 一方、完全なcureとはならない問題があった。これに対し て、PEG-IFN-αを用いた治療では、HBV DNAおよび HBsAqの消失が可能である。ただし、2-10%程度の患者の みで効果を発揮し、その理由は不明であった。筆者らは、 PEG-IFN-α治療に効果がある患者では、血中での alanine aminotransferase (ALT; 肝臓に最も多く含まれ る酵素で、肝細胞の破壊の有無を示す)活性の上昇がよ く確認されることから、活性化された免疫細胞による肝細 胞のlysisの可能性を考え、PEG-IFN-αの免疫調節機能に ついて評価することとした。

慢性HBV感染患者のうち、PEG-IFN-α治療により NK細胞が活性化した患者群ではHBV治療効果が高い

慢性HBV感染患者 合計13人の臨床サンプルを用いて、IFN-α に素早く応答するNK細胞に注目して評価したところ、 PEG-IFN- α 治療後にNK細胞が活性化したグループと、そうで ないグループに層別化することができ、かつNK細胞活性化と ALT上昇(肝細胞の破壊を示す)が相関した。また、NK細胞が活 性化したグループでは、よりHBV感染肝細胞のアポトーシスが 上昇し、血中HbsAgが減少していることが分かった。

免疫活性化の度合いはPEG-IFN-αのPKで決定される

PEG-IFN-α治療前後の末梢血単核細胞 (PBMC) での免疫関 連遺伝子の発現量変化を調べたところ、NK細胞が活性化した グループではより強くIFN stimulated geneと炎症性サイトカイ ン反応が現れていた。ただし、in vitroではPBMCのIFN刺激応 答性に差が見られなかったことから、in vivo の PEG-IFN- α の PKに着目したところ、NK細胞が活性化したグループでは plasma中のPEGおよびIFN- α の濃度上昇が早かった。また、血 中および肝臓で、 $IFN-\alpha$ 量とNK細胞活性上昇が相関した。

PEG特異的B細胞応答がクッパー細胞による PEG-IFN-α/IgMのクリアランスに寄与する

PEG-IFN-α治療後の肝臓細胞の免疫染色において、NK細胞 が活性化しなかったグループでは、PEG陽性・IgM陽性のクッ パー細胞が観察された。更に、治療前はどの患者でもPEG特異 的B細胞の割合や抗PEG IgG, IgMのタイターに大きな差は見ら れなかったが、治療後はNK細胞が活性化しなかったグループ の方が抗PEG IgMが増加した。以上から、抗PEG抗体を介した クッパー細胞によるPEG-IFN- α /IgMのクリアランスが起こる患 者では、plasma中PEG-IFN-α濃度の上昇が妨げられ、NK細胞 の初期応答が起きないために、治療効果が見られないことが示 唆された。

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

一言 安全性が高いとされ、これまで多くの医薬品や化粧品、日用品に用いられてきたPEGですが、長い間抗PEG抗体の存在が懸念され てきました。最近では、新型コロナウイルスに対するmRNAワクチンにも含まれることにより、一般にも少し馴染みのあるワードに なってきたと思います。高いレベルの抗PEG抗体を持つ人は若い世代ほど多いとも言われており、今後どう対応していくか考える必 要がありそうです。

nagasawa.maya@ma.mt-pharma.co.jp

アストロサイトによる脳 内のエタノール代謝がエ タノール中毒の運動失 調を惹起する

Jin et al., 2021, Nature Metabolism, 3, 337-351

キーワード

- アストロサイト
- ALDH2
- エタノール
- GABA
- ■小脳

要旨

アストロサイトのALDH2は、発現の高い小脳 で酢酸及びGABAを産生していた。

ALDH2によって、エタノールから産生された GABAは持続的に神経を抑制し、マウスの運 動失調を惹起した。エタノールによる神経抑 制・運動失調はAldh2GFAP-/マウスでは起きな

酢酸もエタノールと同様に、小脳でGABAの 合成と持続的な神経抑制を亢進した。

培養したアストロサイトで、エタノールや酢酸 からGABA、グルタミン酸(Glu)、グルタミン (Gln) が合成された。

背 黒

アストロサイトは、グルコースをニューロンの主要なエネル ギー源である乳酸へと代謝し、グルタミン酸やGABAなどの神 経伝達物質の取り込みや細胞外カリウムイオン濃度の調節、 神経損傷後の瘢痕形成、神経栄養因子(Neurotrophin)の合 成と放出、免疫系などに関与することが知られている。中間径 フィラメントの構成タンパク質であるGFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein)が、代表的なマーカーとして知られている。ま たエタノールは、ALDH2(2型アルデヒド脱水素酵素)により 酢酸になった後、TCA回路を介して、Glu、GABAへと代謝され る。Glu 以降の代謝経路はアストロサイトとニューロンの双方 で働く。この論文において、エタノールによる神経抑制や運動 失調に、小脳のALDH2によってエタノールから代謝された酢酸 の産生が関与していることが示唆された。

アストロサイトALDH2は、発現の高い 小脳で酢酸及びGABAを産生していた。

マウスの各脳組織中のAldh2とGfapの発現量を調べたところ、小 脳で発現が高く、両者の発現量は相関していた。またマウスとヒト の小脳において、両者の発現は共局在していた。アストロサイト Aldh2を欠損させると、小脳のAldh2の発現は顕著に減少した。こ れらのことから、脳中のAldh2は主に小脳のアストロサイトで発現 していることが示唆された。またエタノールを腹腔内投与した際 に、小脳中のアセトアルデヒドはアストロサイトALDH2を欠損して も有意な変化は認められなかったが、小脳中の酢酸、GABA、Gln、 Glu, NAA(N-アセチルアスパラギン酸)が優位に減少した。

小脳のアストロサイトALDH2によって、 エタノールから産生されたGABAは 持続的に神経を抑制した。

スライス培養したマウス小脳の神経活動とGABAの産生を調べたと ころ、エタノールや酢酸処理により、GABA産生が増大し、GABAに より持続的な神経抑制が起こった。エタノールよる作用は、アストロ サイトAldh2の欠損により抑制された。

アストロサイトALDH2は、 エタノールによる運動失調を仲介していた。

Rotarodにより運動機能を測定した。エタノール投与による運動失 調は、アストロサイトALDH2のKOによって改善された。また酢酸投 与でも運動失調が惹起された。KOではなく、AAVによるGFAP-Cre の小脳内投与でアストロサイトALDH2量を下げた場合でも、エタ ノールによる運動失調が抑制された。エタノールや酢酸の脳室内投 与によっても運動失調が惹起され、GABARアンタゴニストによって 抑制された。

担当者 松尾 毅 所属 武田薬品工業株式会社 専門 細胞内情報伝達、幹細胞、神経疾患

り、内容に恐怖しつつ、楽しく読めました。酢酸により運動失調が起こるという話は結構衝撃でした。みなさん、飲み過ぎには気を付 けましょう。またNature Metabolism は今まで読む機会が無かったので新鮮でした。

tsuyoshi.matsuo@takeda.com

環状ペプチドにおいて連 続した疎水性表面が膜 透過性を促進する

Hoang et al., 2021, Angewandte Chemie, 133.15, 8466.

キーワード

- 環状ペプチド
- 中分子
- 膜透過
- 極性表面積
- 最大疎水性表面積

要旨

環状ペプチドにおいて、同じ大きさの疎水性 表面(極性表面)を有していても膜透過速度 が異なるケースがある。

この原因の一つとして、溶液中において疎水 性表面が分散せずにひとつの塊となってい る事が重要であると解明した。

環状ペプチドの膜透過速度に関係する最大 の疎水性表面積をLHSA(largest hydrophobic surface area)と定義し、 Lipnskのルールオブ5などに加えて優れた 膜透過性を有する中分子の指標になる事を 報告した。

背 黒

環状ペプチドは標的分子の広い範囲に結合する事ができ るため、低分子では狙えないような蛋白-蛋白相互作用 (PPI)を阻害する事が可能であり、注目されている。しか し、多くの環状ペプチドは細胞膜透過性が低いため、細胞 内標的を狙う上で制限となっている。

環状ペプチドのアミドのN-Hのメチル化や α 位のメチル化 が膜透過性を向上させるケースが知られており、膜透過性 による制限を克服するヒントとなっている。メチル化ペプ チドの膜透過性試験が多数報告されているものの、メチ ル化によって実際に膜透過性が上がるのかどうかを理論 的に予測する方法はいまだ存在しない。これまでに環状ペ プチドや環状化合物の膜透過性と極性表面積や溶媒接 触表面積、オクタノール/水-溶解性などの物性をまとめて 関連付ける試みが行われているが、一貫した結果は得られ ていない。

環状ペプチドにおいてメチル基の位置異性体は 脂溶性を変化させる

環状ヘキサペプチドにおいて、N-メチル化の部位が異なる4つ の位置異性体は計算上の物理化学的パラメータは同一である ものの、UPLCにおいて異なる保持時間を示し、実験値において 脂溶性が異なる事が示唆された。

脂溶性の違いは構造のフレキシビリティでは説明できない

このN-メチルの部位が異なる環状ペプチドの脂溶性の違いを 明らかにするために、三次元溶解構造をNMRによって解析し た。主鎖構造はCDCl3、DMSO、H2O中で同一であり、前述の脂溶 性が変化する理由を、構造的なフレキシビリティの違いからは 考察できなかった。

環状ペプチドにおける脂溶性の違いは 最大の連続した疎水性表面積の影響を受ける

次に最小エネルギー状態における疎水性表面の配置に注目し た。上述の4つの位置異性体において疎水性表面同士が結合し、 大きな一つの塊となっているほど脂溶性が大きい事を見出した。

最大の疎水性表面積をLHSA (largest hydrophobic surface area)と 定義し、膜透過速度との関連や 他の環状ペプチドでの一般性を確認した

次に他の環状ペプチドへの一般性と膜透過速度への影響を確 認した。他の環状ヘキサペプチドやCyclosporin類、Guangomide 類において、三次元構造中のLHSAと実験的な脂溶性や膜透過 速度が関連している事が示唆された。以上により、LHSAを増加 させるようなメチル化などの戦略的デザインが環状ペプチドの 膜透過性を増加させるカギとなると考えられた。

担当者 内野祐次郎 所属 Axcelead Drug Discovery Partners 専門 有機化学

にしております。また、読んだ事がある論文や良く知っている分野に関する発表であっても、自分とは異なる専門の方から見るとこ んなに感じ方が違うのか、というところに毎回驚きと楽しみを感じております。

yujiro.uchino@axcelead.com

眼への局所的なドラッグ デリバリーを延長するゲ ル化低張ポリマー溶液

Kim et al., 2020, Nat Biomed Eng, 11, 1053-1062.

キーワード

- ■眼
- 低張
- ゲル化
- ポリマー
- DDS

要旨

低張ゲル化製剤は、眼表面での均一なコー ティングとゲル化を可能にした。

低張ゲル化製剤は、親水性、疎水性、疎水性 ペプチドなど、様々な性質の薬物の眼内吸収 を増加させた。

低張ゲル化製剤は、後眼部への薬物送達を 可能にした。

低張ゲル化製剤は、眼表面の安全性や視界 に影響を与えなかった。

背 黒

点眼薬は、緑内障、ドライアイ、炎症、感染症、アレルギー などの眼疾患に使用される主要な剤形で、眼科用医薬品 の90%以上を占めています。点眼薬は、非侵襲的、使用が 簡便といったメリットがあるものの、涙液や頻繁なまばた きによって、薬物の保持が制限されてしまいます。そのた め、複数回の投与による副作用や患者のアドヒアランスの 低下が問題となっており、より眼表面に薬物を保持するア プローチが望まれています。これまでに、薬物の滞留時間 を増加させるアプローチの1つとして、適用時にゲル化する 点眼薬の研究が行われてきましたが、視界がぼやけるよう なゲルの塊を形成するといった問題がありました。しか し、今回、ゲル化する前に、眼表面で透明な薄層を形成し、 従来の問題点を回避する、新たな眼へのDDS製剤の可能 性が示されました。

低張ゲル化製剤を作成し、眼表面での均一な コーティングとゲル化を可能にした

種々の医薬品に使用されているポリマー、F127を使用し、低張 ゲル化ポリマー溶液を作成した。①生体よりもイオン含有量を 少なくすることで、このポリマー溶液は、眼表面に対して低張と なり、適用時に浸透圧によって溶液から水が失われ、濃縮され ることを想定した。また、②37℃においてゲル化する濃度未満 のポリマー濃度とすることで、このポリマー溶液は、眼表面で液 体として広がることを想定した。①、②より、適用時に、ポリマー 溶液が眼表面で液体として均一に広がり、その後、浸透圧に よって溶液が濃縮され、溶液がゲル化する濃度を超えると、溶 液がゲル化し、薄層ゲルを形成するといった製剤を構築した。 実際に、この製剤が、ウサギ眼表面で均一に広がり、その後、薄 層ゲルを形成し、まばたきによってもゲルが剥がれないことを 確認した。

低張ゲル化製剤は、種々の性質の薬物の 眼内吸収を増加させた

親水性の眼圧(IOP)低下薬である酒石酸ブリモニジン(BT)、疎 水性のIOP低下薬であるブリンゾラミド(BRZ)、疎水性ペプチド であるシクロスポリン(CsA)の低張ゲル化製剤を作成した。市 販薬や従来のゲル化製剤と比較して、低張ゲル化製剤は、眼内 薬物吸収を増加させた。

低張ゲル化製剤は、眼表面の安全性や 視界に影響することなく、 後眼部への薬物送達を可能にした

レーザー誘発脈絡膜血管新生モデルブタに、血管新生阻害薬で あるスニチニブリンゴ酸塩(SM)の低張ゲル化製剤を適用した ところ、後眼部への薬物吸収が確認され、血管新生の抑制も示 された。また、低張ゲル化製剤は、眼表面の安全性や視界に影 響を与えないことも示された。

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

ー言 普段私は、ドラッグリポジショニング(DR)の研究をしていて、主に細胞を用いたスクリーニングを行っています。今回、薬理ではな く、DDSの発表をさせていただきました。というのも、低張ゲル化製剤がスニチニブの後眼部への薬物送達を可能にしたように、最 近は、他の手法と組み合わせることで、DRが発展する可能性に興味を持っているからです。サイエンスカフェを通して、新たなシナ ジーが生まれたら面白いと思っております。皆様とのディスカッションが楽しみです。

y.noda@ltt.co.jp

学習によって得られた世代を超えて 伝わる病原菌忌避行動は、アルゴ ノートとTGP-βによって仲介される

Moore et al., 2019, Cell, 177, 1827-1841

線虫は、病原菌忌避行動を 学習するために、細菌の非 コードRNAを取り込む

Kaletsky et al., 2020, Nature, 586 445-451

キーワード

- エピジェネティクス
- 学習
- 非コードRNA
- 病原菌忌避行動

要旨

C. elegansでは、学習によって得た緑膿菌へ の忌避行動が、4世代後まで維持される。

忌避行動の維持は子孫の生存に有利に働く。

忌避行動の維持にはアルゴノート相同遺伝 子とsmall RNA (sRNA)が関与する。

緑膿菌由来のsRNAを C. elegans が取り込む ことで、エピジェネティックな忌避行動が引 き起こされる。

sRNAは、神経活動に関与する、進化的に保 存されたMacoilinホモログを抑制する。

背 黒 —

飢餓やストレスなどの環境要因が、エピジェネティックな 仕組みを介して次世代以降の代謝などに影響を与える例 は広く知られており、いわゆるオランダ飢饉などを対象に ヒトに対する研究もすすんでいます。これに対して、エピ ジェネティックな仕組みを介した行動への影響は理解が 進んでいませんでした。エピジェネティックな仕組みと行 動の関係を研究する上で、世代時間が3日と短く、神経系 に個体差の少ない C. elegans は非常に適した材料である といえます。C. elegansは、病原性緑膿菌にさらされるこ とで、緑膿菌に対する忌避行動を学習することが知られて います。今回の論文は、病原菌に対する忌避行動を対象 に、次世代以降へ忌避行動を伝播するエピジェネティック な分子機構を明らかにしました。

獲得した病原性緑膿菌からの忌避行動は、 世代を超えて伝えられる

C. elegans は4時間のトレーニングで緑膿菌からの忌避行動 を学習するが、さらに24時間までトレーニングを行うことで、次 世代以降も忌避行動を行うようになる。このエピジェネティック な情報の伝播は、精子、卵子のいずれからも行われうる。忌避 行動はトレーニング後4世代にわたって観察することができた が、5世代目には忌避行動が見られなくなった。また、忌避行動 を獲得後、次世代で病原性緑膿菌存在下での生存率が上昇し た。緑膿菌に対する耐性は見られないことから、忌避行動の獲 得が生存に有利に働くと考えられる。

緑膿菌由来sRNAがアルゴノート相同分子Piwi/PRG-1を介して エピジェネティックな忌避行動を引き起こす

忌避行動を引き起こす病原性緑膿菌と、引き起こさない非病原 性緑膿菌のsRNAを比較し、病原性緑膿菌特異的sRNAの中か ら忌避行動に必要なsRNAとしてP11を同定した。また、RNA依 存的RNA複製機構によってsRNAが増幅され、核内ではH3K9メ チル化結合タンパク質依存的なサイレンシング機構が関与する ことが示された。

エピジェネティックな忌避行動は Macoilin/MACO-1の抑制で引き起こされる

病原性緑膿菌由来sRNA(P11)は、C. elegans の maco-1 遺伝 子を抑制することで、忌避行動を引き起こした。興味深いこと に maco-1 は忌避行動の学習には関与せず、忌避行動のエピ ジェネティックな伝播にのみ必要であった。このように病原菌 由来のsRNAを、エピジェネティックな防御機構の引き金として 利用している点で、この現象は大変興味深いといえる。

担当者 柴田幸政 所属 HIROTSUバイオサイエンス 専門 発生、エピジェネ、クロマチン、C.elegans

一言 私は現職では C.elegans の行動解析を業務としておりますが、前職までは、エピジェネティックな仕組みによる分化制御を研究し てきました。特に細胞が徐々に分化して多能性を失っていく過程で、ヒストンバリアントとヒストン修飾の果たす役割にアプローチ していました。紹介した論文では、C.elegansが学習した病原菌からの忌避行動が子孫にも伝わる、というストーリーになっており ます。しかし、忌避行動そのものが、学習によって惹起される部分と、緑膿菌由来のsRNAによって惹起される部分の二段構造に なっている可能性も残されていると感じます。 y.shibata@hbio.jp

リプログラミングにより 若齢時のエピジェネ ティック情報を復元して 視力を回復させる

Lu et al., 2020, Nature, 588, 124

キーワード

- エピジェネティクス (epigenetics)
- DNAメチル化(DNA methylation)
- リプログラミング (reprogramming)
- 網膜神経節細胞(retinal ganglion cell)

要旨

DNAメチル化パターンといったエピジェネ ティック情報は老化に伴い変化する。

AAVにより山中因子を網膜神経節細胞に共 発現させる(リプログラミングする)ことで軸 索再生能が高まる。

損傷時/老齢マウスの網膜神経節細胞をリプ ログラミングすると、正常時/若齢時の遺伝 子発現・DNAメチル化パターンが回復する。

緑内障モデル、老齢マウスの視機能はリプロ グラミングによるDNA脱メチル化に基づいて 回復する。

背 黒

老化は退行性変化であり、組織の機能不全や最終的には 死につながる現象である。老化の要因として、エピジェネ ティックな異常が蓄積して正常な遺伝子発現パターンが 乱れることが提唱されている。特に、DNAメチル化パター ンの経時的変化は"老化時計"の指標となっている。しか し、老化した個体が正常なDNAメチル化のパターンを保持 しているのか、そして若齢時のパターンへと復元できるの かどうかは明らかではなかった。本論文では、山中因子と して知られる Oct4、Sox2、KIf4をマウスの神経節細胞に発 現させることで、若齢時のエピジェネティック状態を回復 させ、損傷後の軸索再生、緑内障モデルおよび老齢マウス での視機能回復につながるという報告をしている。

AAVにより Oct4、Sox2、Klf4 を網膜神経節細胞に導入して リプログラミングすることで軸索再生能が高まる

Oct4、Sox2、Klf4 (OSK) を網膜神経節細胞へ導入するために Doxycycline誘導性発現システム搭載のAAVをマウスの硝子体 内へ投与した。このマウスの視神経を切断した後にOSK発現を 誘導すると、軸索の伸長が誘導された。一方で、OSKを発現さ せない場合は軸索が再生されることはなかった。

リプログラミングによる軸索再生は DNA脱メチル化が必要である

視神経損傷モデルでは、DNAメチル化レベルが高まり、OSK発 現によりそのDNAメチル化レベルは正常化することが示され た。さらに DNA脱メチル化を担うTet2 が存在しない条件であ る Tet2 KOマウスで視神経損傷実験を行い、OSK発現を誘導し ても軸索再生が見られなかった。よって、DNAメチル化レベル の変化が軸索再生に必要だと示された。

神経節細胞のリプログラミングは 緑内障モデル・老齢マウスの視機能を回復させる

リプログラミングによって緑内障による視機能低下が改善され るかどうかマウスの眼圧上昇モデルを用いて検証し、OSK誘導 により視機能が改善されることを示した。次に、老齢マウスが 若齢時の機能を復元できるかどうか確かめるため3か月齢(若 齢)と11か月齢(老齢)マウスの視機能を比較した。老齢マウス では視機能が低下するが、OSK発現した老齢マウスは若齢マウ スと同程度であった。さらに、OSK発現により老齢マウスの DNAメチル化パターンは若齢状態に遷移し、Tet2ノックダウン すると視機能回復が見られなかった。以上より、リプログラミン グは網膜神経節細胞のDNAメチル化状態を若齢時に戻し、視 機能回復できることを示した。

担当者 薄葉 亮 所属 田辺三菱製薬株式会社 専門 血管生物学、神経・網膜系疾患、Microphysiological system (MPS)

──言 私は血管生物学や神経・網膜系疾患に興味を持っています。入社後は遺伝子治療といったモダリティに携わり、治療コンセプトの 実現スピードが速まっていることを実感しています。老化は不可逆的な現象であり、その克服はSFの世界の話だと思っていました が、今回紹介した論文のように遺伝子治療、エピジェネティクス、再生医療的発想によっては現実のものとなるかもしれないと期待 させられました。今後も最新の動向を追っていきたいと考えています。

usuba.ryo@ma.mt-pharma.co.jp

12

ショウジョウバエにおいてPPAR γ coactivator-1alphaがスクロース感受性を制御する

Wang et al., 2020, Cell Report, DOI: 10.1016/i.celrep.2020.03.044

キーワード

- ショウジョウバエ
- シグナル経路同定
- 味覚感受性
- ドーパミン
- 長寿

要旨

摂取させる食餌の種類を変えることによって、ショウジョウバエの甘みの感受性が可逆的に変化した。

この感受性変化にはドーパミンD1受容体 (D1R)、その下流で行動可塑性や長期記憶形成に関連する転写制御因子・cAMP応答配列結合タンパク質(CREB)が必要であることを見出した。

CREBの標的として、ミトコンドリアの機能亢進や長寿に関連するPPAR γ coactivator-1 alpha (PGC1 α)が、甘みの感受性制御因子の一つであることを同定した。

背景

Presentation Phase 1

食事と健康とは切っても切り離せない関係があり、肥満や 拒食症を抱える人口の増加、高齢者の食事量の低下が叫 ばれる近年では、ますます重視されている。特にエネル ギー源として重要なのが炭水化物である。食事が含む炭 水化物の量自体は変えられないものの、甘みの感受性は 日々の食事の影響を受け可逆的に変化することが、疫学 調査や動物、昆虫を用いた研究で報告されている。例え ば、急激な絶食時や人工甘味料の慢性的な摂取は甘みの 感度を上げ、逆に満腹状態や多量のスクロース摂取時は 感度が低下することが知られている。しかしながら、この メカニズムはこれまで明らかになっていなかった。本研究 で筆者らは、ヒトと味覚の認知機構がよく似ており、味覚 研究でよく用いられているショウジョウバエを用いて、食 事内容による甘みの感度変化を調節するシグナル経路の 同定を試みた。

与える食餌の内容によって、ショウジョウバエの スクロース感受性が可逆的に変化する

糖質量やタンパク質含有量が異なる食餌を、各群のショウジョウバエに6日間与え、吻の伸長度合いで甘みの感受性を評価した。その結果、対照食と比べ、高スクロース食を摂取した群ではスクロース感受性が低下し、逆に無糖食または高タンパク質食を摂取した群ではスクロース感受性が増加していた。無糖食を6日間与えた後、対照食を3日間摂取させた場合、スクロース感受性の増加は完全に打ち消されたことから、この感受性変化は食餌の甘みの影響を受けた、一時的な変化であることが示唆された。

D1R下流の転写制御因子CREBが無糖食や 高タンパク質摂食によるスクロース感受性増強に関与する

プロテオーム解析およびGAL4/UASシステムによる味覚神経特異的な遺伝子発現制御を行い、甘みの感受性を制御するシグナル経路を探索したところ、D1R、cAMP、プロテインキナーゼA、そしてCREBと呼ばれる転写制御因子が関与していることがわかった。しかし、これら遺伝子をノックダウンしても高スクロース食摂取による甘みの感受性低下は変化しなかったことから、本シグナル経路は甘みの感度増強のみに関与していることが示唆された。

長寿とも関連深いPGC1αが、スクロース感受性の変化を制御する因子の一つである

プロテオーム解析ではミトコンドリア関連遺伝子の発現変化が認められていたため、筆者らはCREBの標的候補として、ミトコンドリアの生合成を亢進するPGC1αに着目した。PGC1α遺伝子のノックダウン/ノックインにより、甘み感受性だけでなく、味覚受容時のスパイク発火にも変化が見られたことから、本遺伝子が甘みの感受性を調節する重要な制御因子であることが示された。

担当者 秋山栞里 所属 キリンホールディングス株式会社 専門 細胞生物学、神経科学、酸化ストレス

一言 湘南アイパークの中ではまだまだ数少ない食品企業からの発表ということで、「食」と「中枢・神経」に関連する内容でお話ができればと思い、この論文を選びました。摂食に関する疾患は勿論のこと、味覚や嗅覚機能の低下が先行して起こる神経変性疾患の早期診断などにも応用ができそうな研究結果です。

Shiori_Akiyama@kirin.co.jp

ハッチンソン・ギルフォー ド早老症(HGPS)に対す る標的型アンチセンス 治療法の開発

Erdos et al., 2021, Nature Med, 27, 526

キーワード

- 希少疾患
- ハッチンソン・ギルフォード早老症(HGPS)
- LMNA遺伝子
- ホスホロジアミダートモルフォリノオリゴ (PMO)

要旨

HGPSは、平均寿命14歳の重篤な希少疾患である。

原因遺伝子はラミンを生成するLMNA遺伝子であり、患者の90%は一塩基変異によるスプライシング変異によって生成される異常ラミンA(プロジェリン)によって引き起こされる。

モルフォリノオリゴ (SRP-2001) にて、プロジェリンをin vitro およびin vivoにて低下させた。

原因遺伝子を遺伝子導入したモデルマウスでSRP-2001投与により平均寿命は61.6%延長した。

SRP-2001はHGPSの治療手段となる可能性がある。

背景

近年、LMNA遺伝子の変異は、筋ジストロフィーから早老までの表現型を持つ、ラミノパチーと総称される多くの遺伝性疾患の原因となることが明らかとなってきた。これらのラミノパチーのうち、HGPSは2,000万人に1人の割合で発症する超希少疾患であり、患者の90%は、LMNAのExon11内のクリプティックスプライシングを活性化させる一塩基変異よってプロジェリンを生成して発症する。本疾患に対する治療としては、既存の低分子薬の適応拡大による臨床試験が先行しているが、副作用が強いことが懸念されている。本研究では、プロジェリン転写産物をホスホロジアミダートモルフォリノオリゴマー(PMO)で特異的に標的化する戦略を提案している。

In vitroで最適なスプライシング阻害活性を示す PMOの探索

LMNA c.1824C>T遺伝子座における異常スプライシングを阻害するための最も特異的かつ効果的なアンチセンスを設計するために、まずエクソン11のクリプティックスプライスサイトに対して5ヌクレオチド間隔で14本のホスホロジアミダートモルフォリノオリゴマー(PMO)を設計した。次に、PMOの中で最も優れたものを中心に11本のPMOを1塩基ずらして設計・合成し、最も強く異常スプライシングを抑制するSRP-2001を見出した。

SRP-2001は細胞の増殖と 核内ラミナプロテインの発現を回復した

SRP-2001を投与した患者細胞は、 $6~\mu$ M、7日間の培養で増殖能力が56%高まることがわかった。生体内での試験を開始する前に、細胞溶解液を用いたウエスタンブロット分析でB型ラミンの発現量を測定したところ、HGPSでは、無処置の場合、ラミンB1とラミンB2の両方が正常対照細胞に比べて75%減少していた(両方ともP<0.01)。正常対照細胞では処理の影響は見られなかったが、HGPS細胞ではSRP-2001が用量依存的にラミンB1レベルに有意な差はなく、ラミンB2レベルを2倍にまで増加させた。

TGマウスモデルにおいて、SRP-2001 は 良好な組織分布を示し、生存率が延長した

ヒトLMNA異常遺伝子を遺伝子導入したモデルマウスに SRP-2001を60mg kg-1を週に2回静脈内投与したところ、生理 食塩水対照群は平均213.5日生存したのに対し、SRP-2001を投与したマウスは平均346.5日生存し、平均生存日数を61.6%延長した(P<0.0001)。また、組織学的にはHGPS患者やHGPSモデルマウスに典型的なVSMCの消失が認められるが、SRP-2001によってVSMCが相対的に維持されることがわかった。

担当者 吉田信代 所属 株式会社リボルナバイオサイエンス 専門 薬理学、生物学

一言 遺伝性希少疾患を対象とした低分子医薬品の開発に従事しています。希少疾患の治療薬開発には、原因遺伝子の分子生物学、および創薬モダリティ等の最新の知見が必要だと痛感しています。サイエンスカフェでは、様々な最新の知識を吸収して、創薬に繋げたいと思っています

nobuyo.yoshida@rebornabiosciences.com

PROTACs技術の応用により、転写因子の分解誘導が可能となる

- ·Samarasinghe et al, 2021, Cell Chem Biol, 28,648-661.e5.
- ·Liu et al, 2021, J Am Chem Soc, 143, 8902-8910

キーワード

- 転写因子
- PROTACs
- CRISPR-Cas9システム
- **■** TRAFTACs
- **■** TF-PROTACs

要旨

各種遺伝子発現の制御に関わる転写因子の 殆どは、リガンドポケットを有しておらず、阻 害剤や分解誘導剤の開発には困難を伴う。

CRISPR-Cas9システムをPROTACs技術に応用したTRAFTACsにより、NF- κ B(p50)への分解誘導作用が確認された。

TRAFTACs複合体の受精卵への導入により in vivoレベルでの作用も確認された。

転写因子の認識DNA配列をE3リガンドに直接 連結したTF-PROTACsでも、TRAFTACs同様 に、転写因子の分解誘導作用が確認された。

背景

標的タンパクに結合するリガンドとユビキチンリガーゼ (E3)のリガンドをリンカーで連結したPROTACs技術の応用によって、近年、様々な蛋白質に対して分解誘導を引き起こせることが報告されています。転写因子は、認識DNA配列に結合し、各種制御遺伝子のmRNA転写亢進に関与するタンパク群であり、様々な疾患(特に癌)への関連が報告されています。しかしながら、いくつかの核内受容体を除き、殆どの転写因子はリガンドポケットを有していないため、結合するリガンドも報告されておらず、PROTACsへの応用も報告例も極めて少ない状況です。今回、転写因子が認識・結合するDNA配列をPROTACsへ活用することで、結合リガンドが未同定の転写因子に対しても分解誘導可能であることが示されました。

CRISPR-Cas9システムを応用したTRAFTACsにより 転写因子の分解誘導作用を確認

TRAFTACs (TRAnscription Factor Targeting Chimeras) は、以下の3因子から構成されている。1) Cas9認識配列 (gRNA) の下流に転写因子が認識する2本鎖DNA配列を連結した核酸、2) Halo-tagリガンド (Halo-tagと共有結合可能な分子) とE3リガンドをリンカーで連結したHalo-PROTACs、3) Halo-tagを融合したdCas9タンパク (切断活性を失活させたCas9)。NF-κBの構成因子であるp50の認識DNA配列を用いて、TRAFTACsの効果を細胞レベルで検証した。その結果、細胞内でこれら3因子が複合体を形成し、p50を分解誘導すると共に、p50の転写活性の低下も確認された。

in vivoレベルでもTRAFTACsの作用を確認

T-box転写因子の1種であるBrachyuryは、発生過程において脊索形成を制御する重要な転写因子であり、その発現低下により尾部の発達障害が報告されている。Brachyuryの認識DNA配列を用いたTRAFTACs複合体をゼブラフィッシュの受精卵へマイクロインジェクション法により直接導入した結果、ゼブラフィッシュの尾部形成異常が確認され、in vivoレベルでのTRAFTACsの効果を検証することができた。

E3リガンドに認識DNA配列を連結した TF-PROTACsも細胞レベルで分解誘導作用を確認

Liuらは、TRAFTACsよりも直接的に、NF-KBのp65の認識DNA配列とE3リガンドをリンカーで連結したTF-PROTACsを作製し、カチオン性脂質を用いて細胞内へ導入した。その結果、p65の分解誘導作用が確認された。TRAFTACsに比べ、TF-PROTACsの場合は、Halo-PROTACsやdCas9-Halo tagなどを用いる必要がないため、より簡便に転写因子の分解誘導が可能と推察された。

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)

新たなlung-on-a-chip 3D モデルの構築

Di Huang et al., PNAS, May 11, 2021, 118 (19)

キーワード

- organ-on-a-chip
- Alveolus
- Air-Liquid Interface (ALI)
- Breathing Lung Model
- SARS-CoV-2

要旨

疾患研究や創薬研究に適用できるような、ヒト細胞を用いた肺モデルの確立に対し、近年期待が高まっている。

本研究では、肺胞の3D構造を再現したオンチップモデルが構築された。

このモデル中で培養されたヒト肺胞上皮初代細胞は、2Dモデル中で培養された細胞と比べて、より生理的な機能を保持していた。

陰圧を付加することにより、自発的な空気の 流入・流出を伴った、呼吸が再現された。

このモデル中で培養された細胞は、タバコの煙やSARS-CoV-2への曝露に伴い、生理的な反応を示した。

背景

肺の疾患は、世界的に主要な死因の一つとなっている。しかし、ヒトの呼吸器疾患については、生理学的に適切で信頼性の高い動物モデルが少ないため、新薬開発における前臨床試験の系の確立が大きな課題となっている。動物モデルに代わる系として、ヒト細胞を用いたモデルの研究が進められてきた。これらのモデルは、高分子膜やエラストマー膜上での単純な2次元培養から、複雑なlung-on-a-chipデバイスまで多岐にわたる。しかし、これらの多くは、細胞を培養するために生理的でない剛性を持つ合成ポリマーが使用されていることや、呼吸のプロセスが反映されていないこと等、重要な課題がまだ多く残っている。

Gelatin methacryloyl (GelMA) をECMに用いて、 肺胞の3D on-a-chipモデルを作成した

次の方法で、肺胞の3D構造を模したECMをPDMSチップ上で作成した。①alginate microbeadsを最密充填構造に組み立てる。②間隙を7% GelMAで満たし、UVの照射により架橋する。③EDTAによりbeadsを溶解する。このように作成した3D ECM上でヒト肺胞上皮初代細胞(hAECs)を培養すると、肺胞様の空洞の壁面を覆うように増殖し、単層を形成した。ECMの剛性も、生理的な値を示した。平面状のGelMA上で培養した細胞との比較をmicroarray解析により行ったところ、ECM-receptor interactionsやTNF signaling pathwayに関与する遺伝子の発現量に違いが見られ、3D GelMA上で培養されたhAECsの方がより生理的な状態に近いことが示唆された。

自発的な空気の流入・流出が伴う、呼吸が再現された

3D GelMAが接着しているPDMSチップの片側とその反対側に 陰圧を加えることで、3D GelMAを伸縮させた。この時の肺胞様 の構造の伸縮率はヒトの呼吸時の肺胞の伸縮率と同程度であ り、また構造の伸縮に伴って空気が流入・流出することがシミュ レーションにより検証された。48時間の「呼吸」後においても、 hAECsは高い生存率を示した。

タバコの煙やSARS-CoV-2に曝露させると、 hAECsは生理的な反応を示した

「呼吸」を行っているモデル中にタバコの煙を満たすことで擬似的に喫煙を再現し、hAECの反応を調べた。すると、核内の4-hydroxynonenal量が顕著に上昇し、細胞の生存率も下がった。また、COVID-19に有効な種々の薬剤で処理した細胞をSARS-CoV-2に曝露すると、コントロールと比べて有意に細胞壊死率が下がった。総じて、喫煙や、SARS-CoV-2への感染について、本モデルで再現できることが示唆された。

担当者 柳瀬雄太 所属 武田薬品工業株式会社(派遣社員) 専門 分子生物学、核酸医薬

ー言 本発表では肺のオンチップモデルについて紹介させていただきましたが、他の臓器についてもオンチップモデル研究が盛んに行われています。また、それと並行して、様々な臓器オンチップを連結することでヒトの体全体を再現する「ヒューマンオンチップ」「ボディオンチップ」の研究開発も進められています。将来的に、一人の人から採取した細胞を用いて、その人の体全体をチップ上で再現できるようになるかもしれません。さらに将来的には、「この患者さんにどの薬剤を投与するのが最善か」「この人は将来どのような疾患にかかるリスクが大きいか」というようなことを完全に個人レベルで検証できるような時代が来るかもしれません。個別化医療の発展を願いつつ。 ✓ yuta.yanase@takeda.com

ApoE4 variantはどの細胞 においてLOF(機能喪失) かGOF(機能獲得)か?

Zalocusky et al., 2021, Nat Neurosci., 24, 786

キーワード

- アルツハイマー病
- ApoE
- ヒト疾患遺伝学

要旨

ApoE高発現細胞の存在が細胞特異的な神経変性のドライバーである可能性を見出した。

ApoE4バリアントでは、ApoE異常高発現細胞の出現の時期が早く、これがApoE4がアルツハイマー病リスクの原因の一部であると考えられる。

ApoEは神経細胞においてMHC-Iの発現を誘導し、ついでMHC-Iがtauopathyを悪化させる。

背景 -

神経変性疾患では特定の種類の神経細胞が最初に消滅するが、この選択的な神経細胞死のメカニズムは未解明である。本研究では、single cell RNAseq解析を用いて選択的な神経細胞死に寄与すると思われる因子を探索したところApoE遺伝子を見出し、そのメカニズムの解明を試みた。ApoEのアミノ酸置換を伴うバリアント(ApoE3/4)はアルツハイマー病のリスク因子として知られており、ApoE4の発現解析を含めて、ApoE異常高発現細胞の出現がApoE4バリアントでは早期化し、これが神経細胞においてMHC-Iの発現を誘導し、ついでMHC-Iがtauopathyを悪化させるというメカニズムを提唱した。

ApoEは神経細胞ごとのheterogeneityの 主要な要因である

ヒトApoE3/4ノックインマウスの海馬・大脳皮質、あるいはヒト死後脳のsingle cell RNAseq解析から、PCA解析により、PC1とApoE発現量に相関があることを見出した。すなわちApoEは神経細胞ごとのheterogeneityの主要な要因である。また、ヒトMCI/AD患者の死後脳において28%の神経細胞がApoEを高発現(それぞれの細胞種に応じた発現量の中央値から2 SD以上の乖離)していることを見出した。とりわけADで神経細胞死が見られる海馬dentate gyrus granule cell, CA1 pyramidal neuronで顕著にApoE高発現細胞が多い。

ApoE高発現細胞はMCIの時期に一過的に多い

マウス脳やヒト死後脳の解析から、ApoE高発現細胞はMCIの時期に多く、その後ADが発病すると減少することを見出した。また、ヒトApoE4ノックインマウスにおいてはApoE高発現細胞の出現ピークが早まっており、これは病態の発現時期の早まりと一致する。

ApoE高発現が神経細胞死に至るメカニズムの解明

ApoEはグリア細胞において発現が高いことから、グリア細胞における機能も報告されている。本論文では、ヒトApoE4ノックインマウスと、その神経細胞特異的な遺伝子発現のシャットオフの解析から、hApoEは神経細胞においてtoxicであり、他のグリア細胞の影響はないことを示唆するデータを得た。さらにこれらのマウスにおいてMHCの発現も低下すること、p-tauの凝集も減弱することから、ApoEは神経細胞においてMHC-Iの発現を誘導し、ついでMHC-Iがtauopathyを悪化させるというメカニズムを提唱した。すなわちApoE4バリアントは神経細胞においてtoxic GOFであると考えられる。

担当者 横山一剛 所属 アステラス製薬株式会社 専門 ヒト疾患ゲノム創薬

一言 さまざまなゲノム多型が疾患発症に関わることが示されてきましたが、そのメカニズムの解明や創薬への活用は、今後の課題だと 感じています。dryおよびwetの解析技術の進歩を患者さんの価値に変えることができるように、みなさまと一緒に取り組んでいけ たらと考えています。

kazumasa.yokoyama@atellas.com

環状ペプチドを"コピー &ペースト"することであ らゆるタンパク質を高機 能化する

Mihara et al., 2021, Nat. Commun. 12(1): 1543.

キーワード

- 環状ペプチド
- 抗体
- アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター
- タンパク質工学
- ドラッグデリバリーシステム(DDS)

要旨

ターゲットタンパク質に結合する環状ペプチドの取得方法としてRaPIDシステムが開発された。

ホルモン、アルブミン、酵素、抗体、AAVベクターに環状ペプチドを導入することで、環状ペプチドの結合能を持った新たなタンパク質を生み出した。

環状ペプチドの取得方法、タンパク質への導入方法を合わせることで、あらゆるタンパク質に複数機能を付与できる可能性が示された。

背景

環状ペプチドは、protein-protein-interactionなど低分子では達成できないタンパク質との相互作用が期待できるモダリティとして、近年着目されている。またターゲットタンパク質に結合する環状ペプチドの取得方法についてもRaPID法を代表するスクリーニング系が構築されるなど改良が進んでいる。一方抗体を始めとするタンパク質医薬については、バイスペシフィック抗体やADCなどDDSを含む様々な機能/用途を有するものが見出され、医薬品としての応用も進んでいる。今回の報告では環状ペプチドをあらゆるタンパク質の表面にコピー&ペーストすることで、抗体やAAVベクター表面タンパク質に新たな機能を付加することを達成している。

タンパク質の固定化構造周辺のループ領域に 環状ペプチドを導入することで、 環状ペプチド由来の結合性を付与する

Uteroglobin、Fibronectin、growth hormone、albumin、phosphataseなど様々なタンパク質に対し、ダイマー近接領域や β サンドイッチ、 α ヘリックス、 β バレルなどある程度固定化されたループ部分に環状ペプチドを導入した。この改変タンパク質のほとんどは、環状ペプチドが従来有するhuman Plexin B1への結合能を保持していた。

抗体のFc領域には最大3種類の環状ペプチドを導入して、 4つの異なるターゲットに結合できる

IgG抗体(抗Nrp1抗体、抗PD-L1抗体、抗CD3抗体)のFc領域を改変し、環状ペプチドを複数導入した。この複合抗体は、最大、4つのタンパク質(Nrp1、PlxnB1、MET、EGFR)に結合することが明らかとなった。またMET発現細胞とCD3発現細胞の共培養系にOKT3-aMD4複合抗体を添加すると、細胞近接効果が確認された。

AAVベクターカプシド表面を 環状ペプチドで修飾することによって、 細胞選択的な改変AAVベクターを作製した

AAVベクターによる遺伝子補充療法は近年着目されるモダリティだが、細胞非選択的に感染するため、目的臓器以外での毒性など課題が存在する。AAVベクターのs2領域はAAVRなどの結合に関与し、様々な細胞に感染するために重要な領域である。AAV1、AAV2のs2領域を環状ペプチドに置換することで、従来の細胞非選択的な感染ではなく、環状ペプチドの標的タンパク質を発現する細胞にのみ感染することが確認された。またこのAAVベクターは標的細胞への感染効率が野生型AAVベクターよりも向上しており、より低い用量で同程度の遺伝子導入が可能であった。

担当者 村上量弘 所属 田辺三菱製薬株式会社 専門 核酸医薬、ドラッグデリバリーシステム、神経系疾患

一言 昨今様々なモダリティが登場し、今までできなかったことができるようになる中、それでも神経系の疾患への適応には課題が残ります。その課題の一つのDDSに対し、私は化学の目線からその解決を目指しています。ただDDSは様々な学問の複合領域なので、今回の論文のようなタンパク質工学をはじめ、社内外の多くの分野の方と共に研究ができればいいなと考えています。

murakami.kazuhiro@ma.mt-pharma.co.jp

老化細胞を選択的に除 去するGLS1阻害剤(グ ルタミノリシス阻害)が 加齢現象を改善させる

Johmura et al., 2021, Science, 371, 6526, 265-270

キーワード

- GLS1
- 細胞内pH
- グルタミノリシス
- 抗加齢療法

要旨

老化細胞の生存にはGLS1の活性が必須で ある。

老化細胞においてリソソーム膜の障害が細胞 内酸性化の原因である。

様々な組織の老化細胞においてGLS1が高発 現している。

GLS1阻害剤BPTES投与により、老化に伴う 臓器疾患が軽減された。

背 黒

細胞はさまざまなストレスを受けると、不可逆的な増殖停 止を示す老化細胞に誘導されることが知られている。これ まで、老化細胞は加齢に伴い生体内に蓄積することや、老 齢マウスから遺伝子工学的に老化細胞を除去すると、動 脈硬化や腎障害などの老年病の発症が有意に遅れ、健康 寿命も延伸することが示されていた。しかし、組織・臓器に より老化細胞は多様性を有することが分かっており、多様 な老化細胞を除去するための薬剤の開発やその標的の 同定には至っていない。著者らのグループはp53を一過的 に活性化させることによって作成できる老化細胞を用い て、老化細胞の生存に必須な遺伝子群のスクリーニングを すると共にターゲット定量プロテオミクス技術「iMPAQT 法」により発現増加したタンパク質を探索した結果、グル タミン代謝に関与するGLS1を同定した。

老化細胞の生存にはGLS1の活性が必須である

レンチウイルスshRNAライブラリースクリーニングにて老化細 胞の生存に必須な遺伝子群の探索を行った結果、グルタミン代 謝に関与するGLS1が有力な候補遺伝子として同定された。ま た、老化細胞におけるGLS1の発現変化をiMPAQT法で解析した ところ、GLS1の発現が顕著に増加していることが分かった。さ らに正常細胞、および老化細胞の生存に対するGLS1阻害剤の 影響を検討したところ、老化細胞を選択的に死滅させることが 確認された。

老化細胞においてリソソーム膜の障害が 細胞内酸性化の原因である。

老化細胞ではリソソーム膜に損傷が生じ、細胞内pHが低下して いる。さらに、老化細胞においてGLS1を阻害すると、細胞内pH が大きく低下し細胞死が誘導された。一方、細胞培養液のpHを 弱塩基性にしたり、GLS1の副産物だと考えられていた塩基性 のアンモニアを過剰添加したりすると、GLS1阻害による細胞死 が抑制された。老化細胞は細胞内pHの低下に伴って、GLS1の 量を増やし過剰なアンモニアを生成することで恒常性を保ち、 生存を維持できるのではないかと考えられる。

GLS1阻害剤BPTES投与により、 老化に伴う臓器疾患が軽減された

老齢マウスにGLS1阻害剤BPTESを投与した。その結果、さまざ まな臓器・組織で老化細胞の除去が確認でき、加齢に伴う諸症 状が改善し得ることや、老化に伴う筋量低下などの進行が抑制 されることが分かった。さらに、さまざまな加齢関連疾患のモ デルマウスへBPTESを投与すると、肥満性糖尿病や動脈硬化な どの症状も緩和された。

担当者 伊神 恒 所属 LSIメディエンス/九州プロサーチ 専門 診断バイオマーカー、細胞外小胞、癌関連

献できないか。そんな思いをもって産学連携事業組織「九州プロサーチ有限責任事業組合:KPSL」を運営しております。当組合の注 力技術「iMPAQT法」にもしご興味ある方いらっしゃいましたらご一報まで。https://kpsl.jp/

igami.ko@mu.medience.co.jp

胎盤SOD3は妊娠中の運 動で発現増加し、胎仔の 糖代謝改善に寄与する

Kusuyama et al., 2021, Cell Metab, Volume 33, Issue 5, 4 May 2021, Pages 939-956.e8

キーワード

- 妊娠中の運動
- ■胎盤
- superoxide dismutase 3(SOD3)
- ビタミンD受容体
- DNA脱メチル化

要旨

活動量の多い妊娠期のマウスとヒトでは血中 及び胎盤のSOD3量が増加する。

母親マウスの運動で増加するビタミンD受容 体は胎盤SOD3発現に関与する。

胎仔肝臓においてSOD3によるAMPK活性 化とその下流のTET発現増加は、糖代謝遺 伝子のプロモーター領域の脱メチル化を誘 導する。

母親マウスの運動で仔の糖代謝を改善する ためには、胎盤SOD3が必要である。

背 黒

2型糖尿病(T2D)の患者数は、近年の生活習慣や社会環境 の変化に伴って急速に増加している。T2Dのリスク因子は肥 満が良く知られ、さらに幾つかの後ろ向きコホート研究で 母親の肥満が子の肥満リスクを増加させることも報告され ている。この母親から子への悪循環を抑制する手段を見出 すことは、公衆衛生上非常に重要である。これまでに著者 らやその他複数のグループは、妊娠期マウスの運動が仔の 代謝状態を改善することを報告している。また、著者らは仔 の肝臓が母親の運動の影響を良く受ける臓器であることも 報告している。今回著者らは、この世代を経る現象はエピゲ ノムを介する、母親の食事と運動が何らかの胎盤の内分泌 因子の分泌を変化させる、という仮説を立てて検証した。

母親マウスの運動が胎仔肝臓の 糖代謝遺伝子のエピゲノム状態を変化させる

著者らは妊娠中にランニングホイールで運動した母親マウスから 得た仔の肝臓のエピゲノム状態を解析した。運動しなかった母親マ ウスから得た仔と比べ、糖代謝遺伝子のプロモーター領域の5-メ チルシトシン (5mC) 量減少と5-ヒドロキシメチルシトシン (5hmC) 量増加を認めた。また、肥満の母親マウスから得た仔は5mC増加 と5hmC減少が起こるが、肥満のマウスも妊娠期に運動によって仔 の5mC減少と5hmC増加を認めた。このメチル化状態の変化は、胎 生期13.5日齢以降の胎仔肝臓で認められ、この時期に変化したエ ピゲノム状態が出生後も維持されることが示された。

胎盤SOD3が胎仔マウス肝臓で脱メチル化を誘導する

次に著者らは、母親マウスの運動で仔のエピゲノム状態が変化す る原因を調べた。母親マウスの運動で胎盤のビタミンD受容体発 現が上昇し、ビタミンDが十分存在するとsuperoxide dismutase 3(SOD3)の発現が増加することを見出した。さらに、SOD3は分 泌タンパク質であり、胎仔肝臓へ送達されるとAMP活性化プロ テインキナーゼ(AMPK)を活性化し、その下流で脱メチル化酵素 (TET)の発現が増加することが明らかとなった。また、リコンビナ ントSOD3投与によって胎仔肝臓のAMPK活性化・TET発現増加・ 糖代謝遺伝子プロモーター領域の5hmC増加が認められ、胎盤 特異的SOD3欠損マウスではこれらの変化は認められなかった。

ヒトも運動によって胎盤SOD3量が増加傾向を示す

最後に、著者らは妊娠女性のSOD3発現を調べた。妊娠の第一、第 二三半期と比較し、第三三半期で血中SOD3濃度が有意に高いこと を示した。Canadian physical activity guidelineを用いて活動量で 妊婦をActive群とInactive群に割り付けたところ、Active群で血中 SOD3濃度と胎盤中SOD3 mRNA量が有意に高いことを見出した。

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 私は婦人科系疾患の治療薬の薬理研究に取り組んでおります。少子高齢化が進む中で世代を超えた肥満や糖尿病の連鎖を断ち 切ることは、長期的な視点で疾患を抑制する興味深い手段となり得ると考え、紹介させて頂きました。サイエンスカフェでは生殖に 関連する発表が少ないですが、若干そちらに寄せた内容が紹介できたと思います。今後は婦人科疾患についての文献紹介もできた らと思っております。

nishimura-t@aska-pharma.co.jp

23

RNAを標的とした低分 子創薬の展望

Zhang et al., 2020, PNAS. 117(3)1457-1467 Palacino et al., 2015, Nat Chem Biol. 11(7)511-7

キーワード

- RNA targeting small molecule
- Knockdown
- Splicing
- Risdiplam

要旨

ヒトゲノム全体のうちタンパク質をコードして いるRNAは1.5%であり、現在、低分子薬で標 的とできるタンパク質は全体の0.075%であ る。そのためRNAを標的とする低分子創薬が 注目されている。

mRNA標的低分子の例として、αシヌクレイ ンmRNAを標的とした翻訳阻害剤、SMN遺伝 子のエクソン7領域を標的としたスプライシン グ調節薬をレビューする。

東レは2021年からmRNA標的低分子創薬の 研究を開始した。

背 黒

従来の低分子薬では標的とできるタンパク質はヒトゲノム 全体で0.075%である。そのため、タンパク質の設計図とな るRNAを標的とすることができれば、創薬の可能性が広 がる。しかしながら、RNAは立体構造に揺らぎがあるた め、創薬標的とすることが困難だった。ここでは、RNAを標 的とした創薬研究をレビューし、最新の動向を共有すると ともに、脊髄性筋萎縮症に対して、初のRNA標的低分子で あるRisdiplamといったスプライシング調節薬の開発戦略 を紹介する。また、RNA標的低分子は、モダリティそのも のは従来の低分子だが、その標的は核酸であるため、薬 理試験や毒性試験などの構築はまだまだ不十分である。 今回のセミナーではその点において議論もしていきたい。

RNA標的低分子のスクリーニング手法

RNAは一本鎖構造だが、その内部で塩基対を形成するため、ある立 体構造を形成する。しかしながら、塩基対は塩基同士の水素結合で 生じるため、その再形成も生じており、タンパク質などとは異なり特 定の1構造を取らない。短いRNA鎖においては結晶構造が取れる報 告もあるが、長鎖RNAでは現状困難である。そのため、RNA標的低 分子をスクリーニングするためには、ランダムスクリーニングとフェノ タイプスクリーニングがとられる。前者は単純なRNA構造に対して 結合する化合物をスクリーニングする手法であり、そのデータを基 に、標的RNAと結合する化合物を得る手法である。後者は、求める フェノタイプ(ノックダウン、スプライシング)を得られるように調節し た細胞系を構築しスクリーニングする手法である。

RNA標的低分子のMOA

上述のスクリーニング法で得られた化合物をin vitro、in vivoで 試験し、求める結果が得られたとしても、そのRNA標的化合物 のMOAはノックダウンやスプライシングといったフェノタイプで はないことを注意する必要がある。すなわち、RNA標的低分子 が作用する点、オンターゲット、オフターゲットを明らかにする 必要がある。オンターゲットであれば、標的RNAに直接結合して いるか、結合箇所の同定が必要となる。オフターゲットについて も、他の遺伝子に影響がないかなどトランスクリプトーム解析 が必要となると考えられる。

RNA標的低分子の展望

RNA標的低分子の成功例としてRisdiplamがあり、そのインパ クトが大きい。しかしRNAを標的とした低分子といったところ で、薬理試験や毒性試験の進め方のスタンダードは定まってい ない。一方、従来、標的とできなかったRNA標的低分子は、核酸 医薬では困難であった全身性疾患や早期患者への適用も大い に期待できる。東レにおいてはmRNA標的低分子創薬に関して 共同研究を実施し取り組んでいる。

担当者 松井秋倫 所属 東レ株式会社 専門 核酸医薬、mRNA医薬、DDS、核酸標的低分子

ー言 私は核酸医薬やDDSの研究を中心として働いておりましたが、その経験をもとに東レでRNA標的低分子に取り組んでおります。本セミ ナーでは、自身のレビューをもとにRNA標的低分子のインパクトやその創薬のハードルを共有することを目的としました。Risdiplamと いったSMAの低分子治療薬が上市され、業界にとってインパクトが大きく、その技術が展開することができれば、今まで難しかった疾患 への治療の糸口になると感じます。ただ、この技術によってすべてが解決し、核酸医薬がなくなるというとそうではないと感じておりま す。核酸医薬はその特異性の高さから、よりオーダーメイド医療に、核酸標的低分子は全身性疾患に、とすみ分けることになると感じま す。弊社ではRNA標的低分子の取り組みを始めましたので気軽にご連絡ください。 Akitsugu.matsui.v8@mail.toray

CD63はIRE-IRPシステ ムを介して鉄によって制 御され、細胞外小胞によ るフェリチンの分泌に重 要である

Yanatori et al., 2021, Blood, blood.2021010995

キーワード

- **CD63**
- 細胞外小胞(EV)
- 鉄
- フェリチン
- IRE-IRPシステム

要旨

過剰鉄によって直接組織が障害されないよ うに細胞内では鉄はフィリチン複合体に貯蔵 されている。

フェリチンなど鉄代謝関連蛋白質をコードす るmRNAには鉄応答エレメント(IRE)が存在 し、鉄濃度に応答して転写後調節をうける。

今回、細胞外小胞(EV)マーカーとして知られ るCD63のmRNA上にIREが発見された。

鉄濃度に応答してCD63発現およびEV分泌 量が増大し、EV中に鉄-フェリチン複合体が 濃縮されていた。

背 黒

生体内には、フェリチン(フェリチンHとLをサブユニットに 持つ)と共に存在する貯蔵鉄が存在します。過剰鉄はフ リーラジカル産生の原因にもなりえますので、過剰鉄が生 じないように鉄代謝に関わる遺伝子発現が厳密に調節さ れています。例えば、フェリチンH/LをコードするmRNAの 5'UTRには、鉄応答エレメントと呼ばれるRNAシスエレメ ント(IRE)が存在します。IREにはIRPと呼ばれるRNA結合 蛋白質が結合して翻訳抑制しますが、IRPは鉄にも結合し ます。過剰鉄が生じているような状況ではIRPに鉄が結合 します。その結果IRPはIREに結合できず、フェリチンH/L mRNAの翻訳レベルが促進されます。こうしたIRE-IRPシ ステムが、今回初めて、EVマーカー蛋白質として有名な CD63のmRNAにも見いだされ、鉄代謝制御とEV産生の関 係が示されました。

EVマーカーのCD63の翻訳は鉄依存性を示し、 フェリチンやCD63はEV経路で分泌促進される

ヒト繊維芽細胞をクエン酸鉄アンモニウム(FAC)で処理するこ とで細胞内鉄濃度を促進すると、フェリチンH/Lの翻訳量が増 大したが、このとき、EVマーカーのCD81翻訳量は変化しなかっ たものの、CD63翻訳量が促進された。一方、細胞を鉄キレート 剤処理するとCD63発現量が低下した。次に、分泌されるEV中 における蛋白質発現量を解析したところ、CD63、フェリチンは FAC処理で増加した一方、CD81や総蛋白質量には変化がな かった。さらに、FAC処理により分泌されるEVの総量も3倍程度 にまで増加していた。

鉄-フェリチン複合体はEVに濃縮されて 分泌されていた

フェリチンに含まれる三価鉄含有量を、Prussian Blue染色によ り測定したところ、細胞中のフェリチンと比較して、分泌される EV量中のフェリチンには5~6倍程度多くの鉄が含まれている ことがわかった。

CD63 mRNAの5' UTRにはIREが存在し、 IRE-IRPシステムによる転写後調節を受ける

CD63 mRNAの5' UTRにはIREと思われるRNA配列が存在した ため、IRP1/2の関与が想定された。そこでIRP1/2に対する siRNAで細胞処理した際のCD63翻訳量を解析したところ、 IRP1/2ノックダウンによりCD63蛋白質、フェリチン蛋白質、共に 発現促進した。一方で、CD81蛋白質発現には変化なかった。ま たCD63のIREへのIRP1/2蛋白質の結合について、プルダウン アッセイおよびゲルシフトアッセイを用いて確認した。今回見出 されたヒトCD63のIREは、霊長類において配列保存性が認めら れることから、IRE-IRPシステムによるCD63翻訳制御に進化的 な意義の存在が示唆された。

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

がけない論文に遭遇していつも楽しみながら探しているように思います。今回の論文は、「日本の研究.com」の「注目プレスリリー ス」で紹介されており、興味を持ちました。日本発の成果に限られますが、Facebookなどでもフォローできるのでお勧めです。みな さんはどのように論文探しますか?

masahiro.nogami@takeda.com

SLE患者において赤血球 に保持されたミトコンド リアにより骨髄性細胞 依存的なI型インターフェ ロンが誘発される

Caielli et al., 2021, Cell, 184, 4464-4479

キーワード

- ミトコンドリア
- 赤血球
- Systemic Lupus Erythematosus (SLE)

要旨

SIF患者由来の一部の赤血球はミトコンドリ アを保持したままになっており、ミトコンドリ アを保持した赤血球の割合が多い患者ほど SLE病態の重篤度が高い。

前赤芽球から赤血球へ分化していく過程で、 ユビキチン・プロテアソーム系とMitophagy が協調してミトコンドリアを除去している。

HIF-2αの分解による赤血球の代謝の変化が ミトコンドリア除去に必須。

ミトコンドリアを保持した赤血球を貪食したマ クロファージで、ミトコンドリアDNAが免疫応 答を惹起し、SLE病態を増悪している。

볼 -

赤血球では前赤芽球から成熟する過程で核などの細胞内 小器官が除去される。ミトコンドリアも成熟過程で除去さ れるが、ヒトの赤血球におけるミトコンドリア除去の詳細な メカニズムは不明だった。著者らは、全身性エリテマトーデ ス(SLE)患者では一部の赤血球のミトコンドリアが保持さ れたままであることを明らかにした。また、赤血球でのミト コンドリア除去がHIF-2αが介在する細胞内の代謝の変化 に伴って活性化するユビキチンプロテアソーム系やマイト ファジーによって起こり、SLE患者ではこの代謝の変化が 阻害され分解機構が不全になることで、ミトコンドリアが保 持され、そのミトコンドリアDNA(mtDNA)によって異常な免 疫応答が引き起こされる可能性を明らかにした。

赤血球の成熟過程でミトコンドリアは除去されるが、 SLE患者由来の一部の赤血球はミトコンドリアを保持している

SLE患者の赤血球には、ミトコンドリアを保持した赤血球が存 在しており、ミトコンドリア保持赤血球の割合とSLE病態スコア の重症度は相関した。著者らは前赤芽球から赤血球への成熟 過程をin vitroで再現し、ミトコンドリア除去機構を調べたとこ ろ、ユビキチン・プロテアソーム系とMitophagyが協調して起 こっていることが示唆された。また、プロテアソームサブユニット の機能不全が原因で生じるCANDLE症候群患者由来の赤血球 でもミトコンドリアが保持されていることを明らかにした。

HIF-2αによる代謝の変化がミトコンドリア除去に必須

前赤芽球は成熟に伴い、解糖系から酸化的リン酸化(OXPHOS) 優位な代謝へと変化し、その変化にHIF-2αが関与している。著 者らは、解糖系が優位な状態ではミトコンドリアの除去が阻害さ れることを明らかにした。ミトコンドリア保持赤血球を持つSLE 患者由来前赤芽球では成熟初期のHIF-2αの分解が抑制され、 OXPHOSへの代謝の変化が阻害されることで、プロテアソーム 活性が低下していることが示唆された。

赤血球のmtDNAによってマクロファージによる 免疫応答が惹起される

著者らはマクロファージと赤血球の共培養を行い、抗赤血球抗 体でオプソニン化されたミトコンドリア保持赤血球は共培養した マクロファージに貪食され、TNF-αやIFN stimulate genes (ISGs)産生が誘導されることを明らかにした。さらに、この免疫 応答はmtDNAを欠失したミトコンドリアを保持した赤血球と共培 養した場合には著しく抑制されること、細胞内のDNA感知機構の cGAS/STING経路を阻害した場合にも抑制されることから、 mtDNAによって免疫応答が惹起されていることが示唆された。

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

──言 今回紹介した論文を見つけて、前赤芽球が赤血球へ成熟していく過程で脱核するだけでなく、ミトコンドリアも細胞内から除去し ていることを初めて知りました。ミトコンドリアは、ヘム合成を行うことで、赤血球が酸素を運搬するための重要な働きを担ってい ますが、その役割を果たした後に、本来は除去されるようですが、疾患などの異常により保持されたままでは、異常な免疫応答を惹 起してしまう「諸刃の剣」になっているようです。ミトコンドリアの由来には、本来異物であるαプロテオバクテリアが細胞内に取り 込まれて共生するようになった細胞内共生説が知られていますが、細胞内に破綻が起こった際には、異物として見なされて、異常な 免疫応答を誘導してしまうのかもしれません。 xasukawa.kai@mk.mt-pharma.co.jp GBAおよび α シヌクレイ ン変異を有するヒト中脳 オルガノイドにおけるレ ビー小体様封入体

Jo et al., 2021, Ann Neurol, 90, 490

キーワード

- パーキンソン病
- レビー小体
- 中脳オルガノイド
- GBA

要旨

レビー小体はパーキンソン病の重要な組織 病理学的特徴だが in vitroで再現するのは 困難である。

2つのPDリスクファクターをヒト中脳オルガノ イド培養システムに導入することで、1)レ ビー小体様封入体、2)ドーパミン神経特異的 細胞死、を再現することに成功した。

レビー小体様封入体の形成に先立ち、βシー トオリゴマーを伴うαシヌクレインフィブリル の形成が認められた。

本モデルはパーキンソン病におけるレビー小 体形成/ドーパミン神経細胞死のメカニズム 研究、治療薬の開発に有用である。

背 黒

パーキンソン病 (PD) の重要な組織病理学的特徴は、 α シ xクレイン (α -syn) の原繊維沈着物を含むレビー小体 (LB)と呼ばれる神経内蛋白質封入体の存在である。しか しながら、LBの形成メカニズムおよびLBのPD病態への 寄与は明らかではない。この分野の研究が進まない原因 の一つは、in vitroでPDの組織病理学的表現型を確立す ることが困難なことである。筆者らは以前にヒト多能性幹 細胞からドーパミン(DA)神経を含むヒト中脳オルガノイド (hMLO)を作製することに成功した。本報告において、筆 者らはhMLOにGBA変異とSNCA(α-syn)過剰発現を導入 することで、LB様封入体(LBLI)を有するPD様表現型を in vitroで再現することに成功した。

GBA欠損かつSNCAを過剰発現する hMLOにおけるLBLIの形成およびDA神経細胞死

LB形成を伴う2つの家族性PDのリスクファクター(GBA-/-およ びSNCA過剰発現)をhMLOに導入したところ、DA神経内に LBLIが形成され、DA神経特異的な細胞死が認められた。LBLI は患者組織で認められるLBよりサイズが小さいものの、類似し た組織学的特徴(ユビキチン陽性コア、 α -syn陽性ハロなど) を示した。このモデルにおけるLBLI形成およびDA神経細胞死 は、GBA-/-・SNCA過剰発現それぞれを単独で有するhMLOに比 べて顕著であり、"Multi-hit"モデルが表現型の再現に重要であ ると考えられた。

LBLI形成に先立つ多量体化・線維化した αシヌクレイン凝集体の形成

本モデルでは、LBLIが形成される前段階からDA神経内に α シヌ クレイン凝集が認められており、またβシートオリゴマーを含む α -svnフィブリルが増加していた。さらに、これらのhMLOホモ ジネートをシードとし、PMCA (Protein Misfolding Cyclic Amplification) アッセイを実施した。その結果、GBA-/-・SNCA過 剰発現それぞれを単独で有するhMLOに比べて両方を有する hMLOは、SNCA変異を導入していないにも関わらず極めて毒性 の高い α -synを有していることが確認された。

今後の展開

LBLIを形成したhMLOから単離した α -synオリゴマーやフィブ リルの研究を進めることで、PDにおけるLB生合成の分子基盤 を明らかにできるかもしれない。さらに、このモデルを使用する ことで、進行性LB形成の根本的な機序およびDA神経細胞の選 択的脆弱性のメカニズムを解明し、またPDの治療薬候補をスク リーニングすることができるだろう。

担当者 丸山穣 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

ミクログリアはナノ チューブを介した分配に よりα-シヌクレイン繊維 を共同で分解する

Scheiblich et al., 2021, Cell 184, 1-18

キーワード

- ミクログリア
- $\blacksquare \alpha$ -syn(α - \forall 3 \forall 7 \forall 7 \forall 1)
- tunneling nanotubes (TNTs)
- LRRK2(leucine-rich repeat kinase 2)
- DLB: レビー小体型認知症

要旨

α-svnを取り込んだミクログリアは、炎症経 路や小胞体ストレスを介して細胞死を起こす が、近くにintactなミクログリアが存在するこ とで、そちらにα-synを移送し、細胞死を抑

α-synの移行は主にF-actin positiveなTNTs により移行する。

TNTsを介して、intactなミクログリアは弱った ミクログリアに向けてミトコンドリアを供給

上記の現象は、in vivo及びヒト細胞でも確認 され、患者由来細胞では弱まっていることが 示唆された。

背 县 —

パーキンソン病やレビー小体型認知症などでは、αシヌク レイン $(\alpha$ -syn) の凝集が関わっています。小胞体ストレ ス·活性酸素種の産生等のファクターによりα-synは凝集 したオリゴマーを形成し、これらのオリゴマーはミトコンド リアの機能障害やタンパク質分解経路の阻害を誘導し、 更なる負の連鎖を引き起こし、神経細胞死を引き起こしま す。脳内に常駐する免疫細胞であるミクログリアは α -syn の分解をする役割を果たしますが、取り込むにつれ分解能 力の低下、及び炎症性サイトカインや活性酸素種の放出 が起こり、ミクログリアの細胞死に繋がることが報告され ています。今回の論文では、TNTsを介して α -syn・ミトコン ドリアを相互に輸送を行うことで、ミクログリアが互いに 助け合い、細胞死を免れていることが示唆されました。

TNTsを介してα-synはミクログリア間で共有される。

 α -synを取り込ませたマウス初代ミクログリア(donor)の近く に、intactなミクログリア (acceptor)を播種することで、donor 側の α -synは減少し、細胞死は抑制された。この現象は Transwellでは起きない為、平面での共培養が重要であること が示唆された。遺伝子発現に関しても、α-syn添加直後には炎 症関連・小胞体ストレス関連の遺伝子発現が上昇するものの、 co-cultureにより時間依存的にacceptor(intactなミクログリ ア)と同じ遺伝子発現に近づくことが判明した。この現象は、 F-actinを増やす化合物により増強、F-actinを減らす化合物によ り減弱することから、F-actin positiveなTNTsを介してα-synが 移行していることが示唆された。

ミトコンドリアは弱ったミクログリアに供給される。

Acceptor側にmito-trackerを添加し、ミトコンドリアの動きを 観察した結果、Acceptor(intact)側からDonor(α-syn添加によ り細胞障害)ヘミトコンドリアが供給され、それによりROS産生 が抑制されることが判明した。これにより、TNTsを介した移行 はα-syn(Donor⇒Acceptor)だけでなく、ミトコンドリア (Acceptor⇒Donor)も関与していることが示唆された。

患者由来細胞ではTNTsを介した移行は弱まっている。

筆者らは、TNTsによる α -syn及びミトコンドリアの移行は、in vivo及びヒト細胞でも同様に起きていることを確認した。次に、 LRRK2のG2019S変異マウスの初代ミクログリア及びDLB患者 由来ミクログリアで同様の実験を行った。結果として、どちらの ミクログリアでもWT/健常者と比較し、acceptor側へのα-syn 移行の減少及びROSの産生増加が確認された。モデルマウス及 び患者由来細胞では、TNTsを介した移行が弱まっており、これ が病態発症/進展の一因であることが示唆された。

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

ー言 今回紹介した論文は、TNTsを介したミクログリア同士の"助け合い"の話でしたが、他細胞間でもTNTsを介した物質移行は報告されていま す(ガン細胞と間葉系幹細胞間、Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103: 1283-1288)。その為、ミクログリア間だけではなく、神経細胞とミクロ グリア間でも同様のことが起きるのか、という事に関して今後もウォッチしていきたいと思います。

kurita.takashi@ma.mt-pharma.co.jp

老化によるエピジェネ ティクス修飾変化に伴う cryptic転写の増加

McCauley et al., 2021, Nat Aging, 1, 684-697

キーワード

- 老化
- エピジェネティクス
- cryptic転写
- 幹細胞

要旨

遺伝子内の非プロモーター領域から転写が 開始される事をcryptic転写と呼ぶ。

哺乳類の幹細胞において、老化に伴い cryptic転写が上昇した。

老化に伴い、テロメア維持やタンパク質 フォールディングに関わる遺伝子でcryptic 転写が上昇していた(正常な機能への悪影響 が示唆)

cryptic転写開始部位では、ヒストン修飾及 びDNAメチル化がプロモーター様にエピジェ ネティクス変化していた。

背 县 -

cryptic転写は遺伝子内の非プロモーター領域から生じる 転写の事で、特に酵母で研究されてきた現象である。例え ば酵母でクロマチンのH3K36me3修飾が減少すると、 cryptic転写の上昇と共に寿命が短縮する事が知られてい る。また、H3K36me3によってリクルートされるタンパク質 の欠損でもcrypticが上昇する事が知られており、近年で は転写H3K36me3修飾を認識するDnmt3BをK0したES 細胞でcryptic転写が上昇するなど、哺乳類の細胞でも生 じる現象である事が示されている。真核生物では、老化に 伴いH3K36me3修飾の減少が起こる事が広く知られてい るため、筆者らは哺乳類の幹細胞において、老化に伴い cryptic転写が上昇するか検証した。

哺乳類幹細胞における老化に伴うcryptic転写の上昇

cryptic転写が生じた場合、本来の転写開始点よりも下流におけ る転写量が上昇すると考えられる。この事を踏まえ、NGSデータ の各エキソンにおけるリードカウント値をエキソン1(または2) のカウント値で割り、老齢細胞と若齢細胞の比較を行う事で、 老化に伴うcryptic転写を網羅的に解析した。その結果、ヒト間 葉系幹細胞(hMSC)を含む複数の幹細胞モデルにおいて、老化 に伴うcryptic転写の上昇傾向が認められた。興味深い事に早 老症モデルではcryptic転写の上昇は認められなかった。

cryptic転写開始部位の特定及びクラスタリング分析

内在性のTSS(転写開始点)から2,000bp以上離れた DECAP-segピークをcryptic転写開始部位(cTSS)と定義した。 老化に伴い転写量が増加した転写開始部位(Age-inc cTSS)で は既知の転写因子結合部位が濃縮されており、これらが cryptic転写に関与している事が示唆された。また、老化に伴い cryptic転写が増加した遺伝子群についてDAVIDでGene Ontology解析した結果、テロメア維持・タンパク質フォールディ ング・小胞体/ゴルジ関連遺伝子のクラスターが認められた。 cryptic転写は、正常な転写の妨害および異常タンパク質の翻訳 へ関与している可能性があるため、これらの機能を負に制御し ている事が示唆された。

cryptic転写開始部位におけるエピジェネティクス変化

Age-inc cTSS付近の領域において、CpGメチル化の低下と共に H3K36me3修飾の減少及びH3K4me3修飾の上昇が認められ た。また、老化に伴いそのようなクロマチン修飾変化を示す部位 を探索した結果、DECAP-seqでは見出せなかった新たな Age-inc cTSSが複数見つかった。この事から、老化に伴い生じ るプロモーター様のエピジェネティクス変化がcryptic転写の上 昇に関与している事が示唆された。

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

──言 老化現象が生物学的レベルで解明されるにつれ、老化研究を基盤とするベンチャー企業が数多く設立されるなど賑わいを見せてい ます。2021年に、老化を主軸としたNature姉妹紙(Nature Aging)が創刊された事は、そうした注目度の高まりを象徴する出来事のよ うに感じています。老化という視点から生命現象及び疾患を見る事で、これまで見えてこなかった治療介入手段などが出てくるかもし れません。今後もこの分野の進展を見届けていきたいと思います。

ogasawara.akira@ma.mt-pharma.co.jp

湘南アイパークサイエンスジャーナル編集委員・湘南アイパークサイエンスカフェ幹事

- ●野上 真宏(武田薬品工業株式会社)、代表
- ●小笠原 彬(田辺三菱製薬株式会社)、副代表
- ●西村 徹(あすか製薬株式会社)、幹事
- ●中島 康祐(武田薬品工業株式会社)、幹事

編集後記

日々の激務の中、サイエンスカフェでのご発表とその要点をご執筆くださいましたすべての演者のみなさま、 湘南アイパークサイエンスの深化へのご貢献に心より感謝申し上げます。第4号から、ちょっと一息のコーヒー ブレイク新コーナーでは湘南アイパーク近郊の名所を、裏表紙に湘南アイパークの森の植物とその和歌を紹介 させていただきました。湘南アイパーク近郊には鎌倉や湘南の海、少し足を延ばせば箱根や伊豆があり、数々 の名所で激務の疲れを癒すことができますし、お昼休みなどに湘南アイパークの森を散策して気分転換する こともできます。どうぞご参考になさってください。(野上)

お忙しい中、素晴らしいレビューを執筆された荒川さん並びに御執筆頂いた全ての皆様に御礼申し上げます。 特にこの第4号では新規に御発表をお願いさせて頂いた方が多くなっています。お陰様で、この第4号ではこれまで以上に多岐に渡るトピックに溢れ、充実した一冊になりました。皆様の多様なバックグラウンドを活かし、このサイエンスコミュニティがどんどん活発になる事を期待しております。是非今後ともサイエンスカフェに御参加頂けますと幸いです。今後ともよろしくお願いいたします。(小笠原)

サイエンスカフェにご参加頂いている皆様のおかげで第4号も作成することができました。感謝申し上げます。 オンライン開催が一般化したことで、本号の発行までに湘南アイパーク以外で勤務されている方々のご参加・ ご発表を頂ける機会も増え、湘南アイパークサイエンスカフェがさらに活性化したと感じております。参加者の 皆さんが交流する方法も模索していきたいと思いますので、そのようなアイデアやご意見をお持ちの方はどん な些細なことでも結構ですので是非ご教授頂きたいです。今後とも宜しくお願いいたします。(西村)

皆様、湘南アイパークサイエンスカフェへの積極的なご参加を有難うございます。コロナ禍でオンラインでの 企画となっても多くの企業・団体の方にご参加頂き、私自身にも良い刺激となっており、皆様にとっても価値が 高い活動となっていれば幸いです。また、レビューを寄稿いただいた荒川さん、ご発表をOnePagerに纏めて 頂いた皆様にも深く感謝いたします。所属も専門分野も異なる研究者の間での情報共有やアイデアの共有は 大変価値があると日々感じており、今後ともよろしくお願いいたします。(中島)

Coffee Break

湘南アイパーク近郊の名所旧跡 (1) 江ノ島





(左)大船駅からは大船モノレールで、藤沢駅からは小田急線かあるいは江ノ電に乗車して江ノ島最寄りの海岸へ。

Tokyo 2020オリンピックではセーリング競技も開催されました。(右)富士山と江の島、稲村ケ崎を望む。鎌倉・材木座海岸のほど近くにある和賀江島から撮影。和賀江島は鎌倉時代に造成された人工島で、現存する築港遺跡として日本最古のもの。江ノ島内にある岩屋洞窟(見学できます)と富士山は地下でつながっているとの伝説もあるそうです。

湘南アイパーク近郊の名所旧跡 (2) 遊行寺







時宗総本山の遊行寺(藤澤山 無量光院 清浄光寺とも)。毎年年始に開催される箱根駅伝では、境内南東に面した遊行寺坂が難所の一つです。この界隈は東海道の藤沢宿でもありました。宝物として国宝「一遍聖絵」など多数所蔵されています。(左)樹齢700年ともいわれる天然記念物の大銀杏。(中央)大銀杏の向こう側にある本堂。東海道最大級の木造本堂で1937年の再建。(右)宗祖の一遍上人像。遊行上人とも呼ばれた一遍は「南無阿弥陀仏 決定往生 六十万人」のお札をお配りしながら日本各地を回り遊行して踊り念仏を行いました。念仏踊りは「盆踊り」の起源とも考えられているそうです。

湘南アイパークの森の植物と和歌 (1) 栗







湘南アイパークの森は広く、研究の合間に散策して気分転換するには最高の場所です。そんな森に見られる植物と和歌を紹介するミニコーナーの第1回目は「栗」。こんなにも立派な実をつける木があるのは驚きです。そして栗にちなんだ和歌は、良寛和尚(1758年~1831年)の庵を訪ねた客人が帰ろうとした際に和尚が詠んだ歌です。

「月よみの光を待ちて帰りませ 山路は栗の毬の多きに」

足元を気を付けなければならないほどにはありませんが、湘南アイパーク森を散策して深まる秋を感じてみてはいかがでしょうか。ちなみに美味しい栗でした。

湘南ヘルスイノベーションパーク