July 25th, 2025, p.01-32
湘南アイパークサイエンス・プレス

Shonan iPark

Science Journal

湘南アイパーク
サイエンス・ジャーナル

vol.8



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 iPark Science Café Website QR code

湘南アイパークサイエンスカフェ・ホームページ https://ipark-science-cafe.hatenablog.com/

湘南アイパークサイエンスカフェ新任幹事のご挨拶

こんにちは！あすか製薬の岡田です。創薬で24年間Medicinal Chemistryに携わり、研究の難しさと楽しさを存分に味わってきました。これから、アイパークでの活動を通じて、科学の面白さを広めていけたらと思います！

所属コミュニティ

私は以下の5つのコミュニティで活動しています：

iPally代表 ― 誰もが居心地の良い研究環境を作り、多様性を尊重する場を提供！

サイエンスカフェ幹事 ― サイエンスカフェは敷居が高いと思われがちですので、ハードルを下げ親しみやすい雰囲気づくりをしたいと思います。また、若者への教育ボランティアを通じて、研究の魅力を伝えます！

World Café幹事 ― 出会いの場を作り、多様性を尊重する社会の実現を行います！

社会貢献クラブ会員 ― ささやかではありますができることから地道に社会貢献していきます。

サイエンスメンター ― 次世代の科学者たちをサポート＆応援します！

科学の話って、ちょっと敷居が高いと思われがちですが、もっと気軽に楽しくできる場を作りたいと思っています！

興味と想い

ESG・CSV・SDGsに興味があり、持続可能な創薬につなげていければと思います。科学の力を使って、社会貢献できる道を探っていきたいですね！

プライベートな話

実は、一卵性の双子の娘がいます！顔はそっくりでも、性格はまったく違うんです。

国立大学の工学部 ― 環境に配慮した化学を学び、研究者を目指す！

私立大学の文学部 ― 英語・イタリア語が得意で、言語の世界へ！

遺伝子は見た目を決めるけれど、性格や得意分野までは管理していないんですね。子育てを通して、遺伝学の奥深さを実感しています！

最後に

興味の幅が広く、色々とチャレンジするのが好きな人間です！アイパークを楽しい環境にしていきたいと思っていますので、どうぞよろしくお願いします！

あすか製薬株式会社 岡田 亮

目 次

ご挨拶

湘南アイパークサイエンスカフェ新任幹事のご挨拶　岡田 亮（あすか製薬株式会社）

発表内容

1.「ASOの脳内分布及び薬効における投与ルート間比較（ICV vs IT）」
2.「内在性コンドロイチンは*C.elegans*の寿命と健康寿命を延長する」
3.「ヒトミクログリア表現型を研究するためのin vivo神経免疫オルガノイドモデル」
4.「天然変性タンパク質における一分子構造変化と結合ダイナミクスの可視化」
5.「マウス脳で長期保持される核内RNAの存在」
6.「筋緊張改善剤エペリゾン塩酸塩は強力なP2X7受容体拮抗薬である」
7.「代謝性肝疾患の深層：細胞の表現型変化を追う」
8.「二重阻害アプローチとしてEGFRを標的とするPhosTACは、下流シグナル伝達の差異を明らかにする」
9.「ヒット化合物と臨床候補化合物の組み合わせ比較」
10.「妊娠中の悪心および嘔吐におけるGDF15の役割」
11.「三者複合体を指向した低分子タンパク質間相互作用誘導剤開発のための合理的スクリーニング」
12.「SPR顕微鏡による膵臓癌細胞のmucin-4を標的とする結合作用のグリカン依存的なヘテロジェネイティの特定」
13.「Transient stealth coating of the liver sinusoidal wall enables selective organ targeting of nanomedicines」
14.「視床下部弓状核における神経線維症の抑制が代謝疾患を改善する」
15.「多感覚ガンマ刺激はグリンパティックシステムを介したアミロイドのクリアランスを促進する」
16.「アンチセンスオリゴを用いた環状RNA生合成のアップレギュレーション」
17.「AIを用いた創薬/バイオマーカー探索」
18.「新規pH応答性タンパク質の構造予測に基づく設計と特性評価」
19.「LLMが睡眠および活動を調節する分子シグネチャの発見を促進する」
20.「小脳のゼブリン-II細胞サブタイプの調節異常がポリグルタミン失調症で確認された」
21.「近接誘導型核酸デグレーダーを用いた低分子化合物による標的RNAの分解」
22.「マウスB細胞がIgG-Fcγ受容体を介して、神経障害性疼痛を制御している」
23.「クリックケミストリー反応の速度とバイオメディカル応用への適合性の検討」
24.「画像と人工知能を応用した動物実験のDX化」
25.「脳オルガノイド基盤技術開発と認知症研究への挑戦」
26.「プロゲステロンにより転写制御されるB7-H4は、癌及び妊娠免疫寛容に関与する」

編集後記

2024年度の湘南アイパークサイエンスカフェの活動

ASOの脳内分布及び薬効における投与ルート間比較(ICV vs IT)

Sano et al., Poster P2-41,
The 8th Annual Meeting of the Nucleic Acids Therapeutics Society of Japan, 2023

キーワード

- Antisense oligonucleotide(ASO)
- Drug delivery
- Intracerebroventricular(ICV) administration
- Intrathecal(IT)administration

要 旨

マウスにおける堅牢な髄腔内投与法を構築した。

中枢におけるASOの分布及び遺伝子発現はICV投与とIT投与で異なる値を示した。IT投与はICV投与と比較して線条体のASOの暴露量及びknockdown効率(K_D)が低値を示し、一方で脊髄へのASOの暴露量及びknockdown効率(K_D)が高値を示した。

中枢をターゲットとしたASOの開発において、非臨床試験での投与ルートについてICV投与のみならず、臨床で汎用されるIT投与での評価も必要であると考えられる。

背景

Antisense oligonucleotide(ASO)を用いて中枢神経を標的とする場合、多くのASOは血液脳関門を通過できないため、脳室内(intracerebroventricular; ICV)投与や髄腔内(intrathecal; IT)投与といった中枢神経系へ直接暴露させる投与ルートが選択される。臨床適応では侵襲性の低いIT投与が選択されることが多いが、非臨床試験、特にマウスにおいてはICVが汎用され、IT投与後のASOの脳内分布、暴露量および作用を評価した報告は少ない。そこで、本研究では、マウスにおける堅牢なIT投与法を構築し、投与ルートの違いによる体内動態やknockdown効率(K_D)の相違について、Malat1に対するASOを用いて検討した。

IT投与法の構築

IT投与の問題点のひとつに投与の成功率が低いことが挙げられる。我々はマウスIT投与法を構築し、C57BL/6JマウスにMalat1遺伝子に対するASOをIT投与し、ASOの分布及びMalat1の発現量について評価を行った。その結果、ASOによって各脳部位のMalat1がK_Dされることを確認した。また、再現性試験ではASO濃度及びK_D効率が良好に再現することを確認した。すなわち、我々は堅牢なマウスIT投与法を構築した。

ICV vs IT

C57BL/6Jマウスに上述のASOをICV投与、IT投与あるいは皮下投与し、投与後の各脳部位、脊髄、腎臓および肝臓のASO濃度および遺伝子発現量を測定した。その結果、皮下投与(50mg/kg)では、IT投与(37.5μg/head)およびICV投与(37.5μg/head)と比較して、脳および脊髄いずれにおいてもASO濃度が低値を示し、遺伝子の発現低下も認められなかった。一方、ICV投与とIT投与においては、遺伝子発現量の低下が認められた。すなわち、我々が用いたASOは循環血から中枢へほとんど移行しないことが確認された。ICV投与とIT投与の各脳部位でのASO濃度を比較すると、ICV投与においてはおおよそ均一に脳内に分布したのに対し、IT投与においては、脳の部位によって暴露量に差が認められた。IT投与後の線条体はICV投与と比較して、ASOの暴露量が低く、一方、脊髄ではASOの暴露量が高値を示した。また、それに伴ってK_D効率に差が生じた。これらの結果から、脳の部位によってはICV投与とIT投与で薬効に必要な投与量に大きな差が生じると考えられた。以上から、中枢をターゲットとしたASOの開発において、非臨床試験で汎用されるICV投与のみならず、臨床で汎用されるIT投与を用いた評価も必要であると考えられる。

担当者 佐野 典康 所属 発表時 Axcelead Drug Discovery Partners株式会社(現、ファイメクス株式会社)
専門 薬物動態、実験動物技術、中枢薬理(マイクロダイアリシス(モノアミン、ペプチド)、脳波測定・解析など)

一言 本研究のきっかけは、中枢へ直接暴露させる投与ルートについて臨床と非臨床で投与方法が異なることに疑問を抱いていたことです(2つの投与ルートは同等なのか、対象が小さいことを理由に投与方法を変えてよいのか?など)。また、実際の試験は、技術の構築皮切りに学会発表まで約半年間と、とても短い期間で実施しました。タイトスケジュールの中、試験系の堅牢性を確認しつつ、チームで効率的に評価をすることができたことは、私にとってとても良い経験となりました。チームメンバーに心より感謝します。

noriyasu.sano@fmecs.com

内在性コンドロイチンは *C. elegans*の寿命と健康寿命を延長する

Shibata et al., Sci Rep. 2024
DOI: 10.1038/s41598-024-55417-7

キーワード

- コンドロイチン
- 老化遅延
- 長寿
- *C. elegans*
- MIG-17/ADAMTS proteinase
- Forward genetics
- MIG-22/ChPF
- SQV-5/ChSy

要 旨

生殖巣形態異常を持つ*mig-17*/ADAMTS変異体の抑圧変異としてコンドロイチン重合因子*mig-22*/ChPFの優性変異を単離した。

mig-22/ChPF優性変異は体内のコンドロイチン量を2倍に増加させることを発見した。

コンドロイチンの増加が寿命を延長し、老化を遅らせることを明らかにした。

背景

コンドロイチンは細胞外マトリックスの構成成分として知られる、プロテオグリカンに結合した長鎖の糖である。このコンドロイチンは加齢性の症状に対する医薬品やサプリメントとして市販されている。しかし、個体全体の老化に対するコンドロイチンの効果はほとんど分かっていない。モデル動物を使った研究では、線虫*C. elegans*でコンドロイチン硫酸の摂取による寿命延長が見られる。コンドロイチンは生存に不可欠であり、合成酵素の欠損は致死となる。しかし、これまでにコンドロイチン量は低下するものの致死とはならない点変異体が線虫*C. elegans*で得られていた。さらに、体内のコンドロイチン量が増加する変異体が得られれば、遺伝学的にコンドロイチン量を操作し、老化との関係を明らかにできる。

コンドロイチン重合因子*mig-22*/ChPFの優性変異の単離

細胞外マトリックスの機能を明らかにする目的で、基底膜に局在するMIG-17/ADAMTS proteaseの変異体で見られる生殖巣形態異常を抑圧する*mig-22*(*k185*)変異を単離した。この変異の原因遺伝子を同定したところ、コンドロイチン重合因子*mig-22*/ChPFであった。MIG-22はSQV-5/ChSyと複合体を作りコンドロイチンの合成を行うタンパク質である。生殖巣形態異常の抑圧において、この*k185*変異は優性であった。また、変異箇所はヒトも含めて進化的に保存されているアミノ酸残基であった。

mig-22/ChPF優性変異は体内のコンドロイチン量を2倍に増加させる

mig-22(*k185*)変異体のコンドロイチン量を定量し、野生型の2倍に増加していることを明らかにした。また、機能低下型である*sqv-5*(*k175*)変異体では、野生型の約1/10にコンドロイチン量が低下していた。これにより、遺伝学的に体内のコンドロイチン量を操作する系が確立できた。

コンドロイチンの増加が寿命を延長し、老化を遅らせる

mig-22(*k185*)変異体と、*sqv-5*(*k175*)変異体を用いて、コンドロイチンに寿命延長効果があることを明らかにした。また老化とともに身体機能が低下することに着目しコンドロイチンの効果を検証したところ、コンドロイチンは老化に伴う身体機能の低下を抑制することが明らかとなった。具体的には、老化に伴う移動速度の低下や、規則的な筋肉の収縮による咽頭のポンプ運動および、周期的なカルシウム濃度の増減によって制御される排便運動の、老化に伴う周期の長期化が、コンドロイチンによって抑制された。老化に伴う複数の現象がコンドロイチンによって抑圧された事から、コンドロイチンには老化の進行を遅らせる効果があることが明らかとなった。
最後に、*mig-17*変異体の寿命は野生型と同じであったが、老化時の身体機能の低下は野生型より早く起こった。この結果はコンドロイチンが、MIG-17/ADAMT Sproteaseの下流で老化を制御していることを示している。

担当者 柴田 幸政 所属 関西学院大学(現所属:北京脳科学研究所)
専門 老化、発生、コンドロイチン、エピジェネティクス、行動解析

一言 今回は自身の論文を紹介させていただきました。コンドロイチンが増加する変異体の報告は初めてであり、サプリメントではなく、体内のコンドロイチンの増加による効果を直接的に示す報告となります。またこの論文の新規変異はforward geneticsを用いたからこそ得られた点変異でもあります。ゲノム編集は、遺伝学的スクリーニングにとって変わるものではないことを示してくれる良い例です。

yukimasashibata@cibr.ac.cn

ヒトミクログリア表現型を研究するための in vivo神経免疫オルガノイドモデル

Schafer et al., Cell, 2023,
DOI: 10.1016/j.cell.2023.04.022

キーワード

- 神経免疫
- ミクログリア
- 脳オルガノイドモデル
- 異種移植
- 自閉症

要 旨

ヒトミクログリア研究のための生体内プラットフォームとして脳オルガノイドを異種移植することで多能性幹細胞から分化誘導したヒトミクログリア（hMG）を作製した。

hMGはヒト特有のトランスクリプトームシグネチャーを獲得し、生体内のミクログリアと同等の特性を獲得した。

hMGはヒト脳環境を監視する機能を示し、その環境異常に対して免疫応答した。

患者由来hMGモデルにより、自閉症における脳環境誘発性の免疫反応を示した。

背景

ミクログリアは、脳の発達、恒常性維持、そして組織修復において中心的な役割をもつ。ミクログリアは卵黄嚢由来赤血球系前駆細胞（EMP）から発生し、ヒトでは妊娠4.5週から5.5週の間に脳内に侵入すると推定されている。ヒトおよび動物モデルの研究において、ミクログリアが自閉スペクトラム症（ASD）などの神経発達障害や神経変性疾患の発症や進行への関与が示唆されている。これまでのヒトの病態を反映した患者の脳細胞とミクログリアの相互作用を研究するモデルには限界があり、成熟したミクログリアの必要性も指摘されていた。そこで著者らはヒト多能性幹細胞（hiPSC）を用いて脳オルガノイド内で分化誘導したミクログリアと共にマウス脳内に異種移植することを試みた。

hPSC由来EMPと脳オルガノイドを異種移植することでhMGへと分化誘導と成熟化を促す

hPSC由来ミクログリアをトランスジェニック免疫不全マウスモデルに異種移植することでヒトミクログリアの特性を獲得する報告は知られているが、長期期間の観察に適していない。そこで著者らはhPSCからミクログリアの発生起源となるEMPを分化誘導して皮質オルガノイドへ生着させてから、免疫不全NOD/SCIDマウスの脳板後皮質に移植した。hPSC由来EMP（tdT陽性）はミクログリアマーカーであるIBA1、TMEM119、P2RY12を発現し、ラミファイド型（分岐鎖をもつ形態）の生体内と類似した形態を示した。

生体内と同等の特性を獲得し、免疫応答を示す

scRNA-seqからP2RY12とTMEM119がそれぞれ80、70%以上陽性であり、ラミファイド型の形態が96%以上の恒常性ミクログリアと確認した。移植後6、11、24週のhMGとマウス/ヒト胎児ミクログリアの比較から、ミクログリアの発達軌道に沿っており、ミクログリアの機能に必要なセンソーム遺伝子種の増加からも成熟化を示した。2光子顕微鏡下で生体内hMGを観察した結果、突起の進展と退縮を繰り返し、期間依存的に静止状態へと移行した。一方で、生体へのレーザーによる局所障害への応答やLPS刺激によるラウンド型（活性化状態）への形態変化から免疫応答を確認できた。

自閉症患者由来hMGの病態モデル化

自閉症スペクトラム障害において、ラウンド型ミクログリアの増加が病態に関与する報告がある。著者らは上述の方法でASD患者hMGを生体内で12週間観察した結果、健常株との比較で患者hMG数の増加と細胞体の大きさの増大、細胞体から出現する一次突起の厚さの増加、および突起から出現するフィロポディア数の有意な増加を示した。健常株では25%のラミファイド型が患者hMGにおいて75%へと増加していたことからも患者特有の表現型である可能性を示し、病態モデルとして今後の活用が期待される。

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

一言 患者iPS細胞を中枢神経疾患の創薬にどのように活かすかに興味をもっています。最近では、ALS患者由来iPS細胞で薬剤スクリーニングをする創薬やiPS細胞由来の神経細胞を使った薬効評価が臨床試験や申請書に活用され始めています。今回の論文のように中枢神経疾患に対して、患者iPS細胞の可能性を活かした論文が今後も発表されることを期待しています。

shunsuke.yoshida@kpharma.co.jp

天然変性タンパク質における一分子構造変化と結合ダイナミクスの可視化

Visualization of Single-molecule Conformational Transition and Binding Dynamics in Intrinsically Disordered Proteins

Holehouse et al., Nat Rev Mol Cell Biol. 2024, DOI: 10.1038/s41580-023-00673-0.
Liu et al., Nat Commun. 2023, DOI: 10.1038/s41467-023-41018-x.

キーワード

- Intrinsically Disordered Protein（IDP）
- Intrinsically Disordered Region（IDR）
- SiNW-FET-based single-molecule device

要旨

IDRをターゲットとした創薬研究において、様々なイノベーションが起こっている。IDRは従来の創薬標的とは異なる特性を持ち、その不規則な構造や機能に対する理解が不十分であったため、この領域に対する創薬研究は比較的新しいものである。近年判ってきたIDRがもつ細胞における分子メカニズムを紹介し、創薬研究への応用が可能となる化合物のIDRに対する結合ダイナミクス解明技術について紹介する。

背景

天然変性タンパク質/領域（IDP（Intrinsically disordered protein）/IDR（Intrinsically disordered region））の性質は古くから知られているが、かつては重要な役割を持たない、或いは単なるリンカーと考えられていた。最近は多くの生物学的プロセスにおいてIDP/IDRが重要な役割を果たしていることが判りつつある。例えばヒストンは広範な翻訳後修飾を受けるIDRをもち、エピジェネティック状態を決定するためのパートナー蛋白質の動員又は排除の両方を制御する。また、多くのGPCRはその細胞内及び細胞外ループと尾部にIDRを含み、細胞内外とのシグナル伝達に関与する。IDRはRNA結合タンパク質にも多く認められ、蛋白質–蛋白質と蛋白質–RNA相互作用に寄与する可能性が示唆されている。近年、IDRをもつタンパク質が細胞内で液–液相分離を起こし、サブミクロンスケールの分子凝集体、あるいは非膜オルガネラを形成する現象が注目を浴びている。

IDRに関するバイオインフォマティクス

過去25年間でIDRに関するバイオインフォマティクス技術が飛躍的に発達し、MobiDB（https://mobidb.org/）などIDR領域の予測に関して精度と速度が高いツールが公開されている。これらの技術によって、ヒトプロテオームにおけるタンパク質全体で約40%が100残基以上のIDRを、約70%が30残基以上のIDRをもつことが示された。IDRは細菌及び古細菌では一般的に頻度が低いが、真核生物及びウイルスでは頻度が高いことが示されており、高度な進化との何らかの関連が示唆されている。

SiNW-FETによる一分子モニタリングデバイス

SiNW-FET（Silicon Nanowire-Based Field Effect Transistor、シリコンナノワイヤ電界効果トランジスタ）は、生体分子や金属イオンなどの電荷をもつ分子の動きによる電界の変化を検出する超高感度センサーである。この技術をSTORM顕微鏡と組み合わせてIDPの構造変化を測定することが可能となった。癌関連分子であるc-Mycは3つの構造状態（Unstructured/Partially folded/Encounter intermediate）の平衡を保ち、Apo体においてはUnstructuredがdominantであるが、Binding partnerであるMax存在下ではEncounter intermediateへと平衡がシフトし、binding-induced-folding/Induced-fit modelの形成が確認され、SPRによって得られる値と同様のK_D値を示した。

低分子阻害剤のc-Mycへの結合

上記デバイスにおいて、低分子c-Myc阻害剤の添加によって、c-MycはMax存在下で取り得るものとは異なる中間構造アンサンブルを示した。このように、c-Myc阻害剤はMaxと結合できる構造からのシフトを誘導することが一分子レベルで観察され、この技術によって標的とするタンパク質に結合するリガンドの結合様式を区別することが可能であることが示された。

担当者 中島 康祐　所属 武田薬品工業株式会社　専門 Neuroscience、In vitro pharmacology

一言 新規モダリティへの注目が顕著に増大する状況ではあるが、低分子モダリティとしてはRNAバインダーやProtein degrader に加え、これまで困難とされていたIDP/IDRに対するアプローチも開発されつつある。その生理的意義の更なる解明と共に、今後の創薬への応用が期待される。

kosuke.nakashima@takeda.com

マウス脳で長期保持される核内RNAの存在

Zocher et al., Science. 2024.
DOI: 10.1126/science.adf3481

キーワード

- RNA
- 神経
- 細胞種特異性
- ヘテロクロマチン

要旨

生後のマウス脳の一部の細胞において、少なくとも2年間消失されない核内RNAが特定され、その性質が解析された。

長期保持RNAは特定の神経細胞において核内で安定的に保持され、ヘテロクロマチンの維持に関わっている。

神経細胞の寿命は遺伝情報の保存に関わるDNAの分子寿命と、クロマチン機能を構成するRNAの安定性に依存している可能性が示唆された。

背景

マウスの脳における核内RNAに関する研究は、脳の発達や機能におけるRNAの役割を理解する上で重要な進展をもたらしています。従来、核内RNAは細胞内で短期間しか存在しないと考えられていましたが、本研究は特定の核内RNAが長期間にわたり脳内で維持されることを明らかにしました。この発見により、ゲノムの完全性や細胞の可塑性を維持するメカニズムについて新たな知見が得られました。特に、ニューロンや神経幹細胞におけるRNAの長期保持が、脳の機能的組織化や老化に与える影響を考察する上で本研究は重要な示唆を示しています。

マウス脳における核RNAの長期保持

本研究では、RNA標識を用いることで、マウス脳内で特定の核内RNAが少なくとも2年間保持されることが発見された。長期保持RNA（LL-RNA）は海馬や小脳で多く観察されたが、一次体性感覚野ではほとんど検出されなかった。また、ニューロンや神経幹細胞といった特定の細胞タイプがRNAを長期保持していることがわかった。このことからRNAの長期保持には脳領域・細胞特異的な転写や保持機構が関係していることが示唆された。

LL-RNAの分子的特徴

*In vitro*の系で、休止期の神経前駆細胞（NPC）にはLL-RNAが存在することが明らかになった。RNA-seqを用いた解析でLL-RNAにはprotein-coding RNAやnon-coding RNAが含まれており、クロマチン構造とエピジェネティックな制御に関連する遺伝子が含まれていることがわかった。RNA-seqデータを反復配列にマッピングした結果、LL-RNAにはさまざまなタイプの反復配列RNAが含まれていた。以上のことから、休止期NPCが反復配列RNAといったnon-coding RNAを長期保持していることがわかった。

ヘテロクロマチン維持におけるLL-RNAの役割

反復配列RNAが含まれるLL-RNAの局在を確認したところ、ヘテロクロマチン領域に集積していた。さらにLL-RNAに多く含まれる反復配列RNA（Major satRNA）の発現変動によりヘテロクロマチンマーカーの挙動が変化した。NPCの休止期から増殖期への移行中にMajor satRNAのノックダウンによって増殖マーカーの低下やDNA損傷マーカーの増加が見られた。Major satRNAは休止期のNPC内に長期間保持され、ヘテロクロマチンと神経幹細胞の機能維持に重要であることが示唆された。

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

一言　今回紹介した論文は成体の脳におけるRNAの長期保持に関するものでしたが、「RNAはゲノムDNAと比べて不安定であり、短期間で消失する」という固定概念のような考えに縛られすぎたら、この研究は始まりもしなかったであろうと想像しています。自分の研究に対する姿勢も含めて、固定概念にとらわれすぎずに新しい洞察を得られる意識を持ち合わせていきたいと思いました。

jose.ichishima@takeda.com

筋緊張改善剤エペリゾン塩酸塩は強力なP2X7受容体拮抗薬である

M.Okada et al., Chem. Pharm. Bull. 72, 345-348(2024),
DOI: 10.1248/cpb.c24-00032

キーワード

- エペリゾン塩酸塩
- 作用機序解明
- P2X7受容体
- ドラッグリポジショニング
- 疼痛

要旨

本研究では、筋弛緩薬であるエペリゾン塩酸塩の作用機序を明らかにするため、P2X受容体アンタゴニストの評価を行いました。その結果、エペリゾン塩酸塩が強力なP2X7受容体アンタゴニストであることが判明しました。この発見は、(エペリゾン–P2X7–疼痛連関)を示し、P2X7受容体が医薬品ターゲットとして有効である可能性を示唆しています。さらに、エペリゾン塩酸塩のドラッグリポジショニングの可能性も示され、既存の適応症(筋緊張の改善および痙性麻痺)に加え、神経障害性疼痛などの新たな適応症への応用が期待されます。

背景

エペリゾン塩酸塩は1983年に日本で上市された筋弛緩薬であり、筋緊張の改善や痙性麻痺の治療に使用されてきました。しかし、その生化学的な作用機序はこれまで不明でした。これまでの研究では、エペリゾンが疼痛に関連する可能性が示唆されていました。また、エペリゾンの構造はP2X受容体拮抗薬の特徴を有していることから、本研究ではエペリゾンとP2X受容体の関連性を検討しました。
さらに、P2X7受容体の阻害が疼痛の軽減に寄与する可能性が示されており、既存のP2X7受容体拮抗薬は神経障害性疼痛や炎症性疼痛の治療において有望視されています。このような背景のもと、エペリゾン塩酸塩のP2X受容体に対する作用を評価し、そのドラッグ・リポジショニングの可能性を探ることを目的としました。

Chemical Biology仮説立案

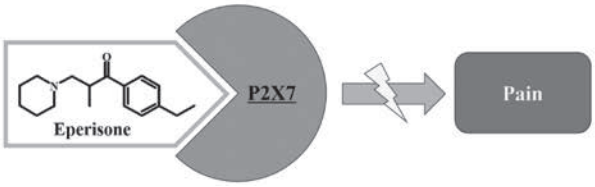
EperisoneがP2X7を標的とするという発見は、「Eperisone–疼痛関連性(Eperisone-pain linkage)」、「P2X7–疼痛関連性(P2X7–pain linkage)」、「Eperisoneと既知P2X受容体拮抗薬の構造的類似性」といった複数の仮説的関連を統合的に説明するものであり、「Eperisone–P2X7–pain linkage」という新たな仮説の成立を支持する結果となりました。特に注目すべきは、Eperisoneが1983年に上市された一方、P2X7受容体は1996年にクローニングされたという事実であり、この時系列的な逆転は、表現型スクリーニング(phenotypic screening)の有用性を示す好例です。

P2Xs受容体パネルアッセイ

Target	Eperisone hydrochloride (IC_{50}, μmol/L)	Positive control substance (IC_{50}, μmol/L)	Eperisone hydrochloride selectivity (human) P2X (1–5)/P2X7
Human P2X1	>10	4.536 (PPNDS)	>794
Human P2X2	>10	0.5904 (PPADS)	>794
Human P2X3	7.158	0.6441 (RO-3)	569
Human P2X4	>10	2.309 (BX430)	>794
Human P2X5	>10	312.6 (PPADS)	>794
Human P2X7	0.01259	0.2701 (A-438079)	1
Mouse P2X7	0.04784	0.09006 (CN-62)	—

Evaluated by double measurement.

エペリゾン–P2X7受容体–疼痛



担当者 岡田 亮 所属 あすか製薬株式会社
専門 メディシナルケミストリー、ケミカルバイオロジー、ドラッグリポジショニング

一言 エペリゾンは1983年に上市されましたが、P2X7受容体は1996年にクローニングされました。受容体の発見前にすでに市場に存在していた薬剤が、その後の研究で有望な標的と関連付けられた事例として、この論文は科学的な意義を持っていると考えます。

okada-m1@aska-pharma.co.jp

代謝性肝疾患の深層：細胞の表現型変化を追う

Gribben et al., Nature, 2024,
DOI: 10.1038/s41586-024-07465-2

キーワード

- 代謝異常関連脂肪性肝疾患（MASLD）
- 分化転換（transdifferentiation）
- 両表現型細胞（biphenotypic cells）
- snRNA-seq/FLASH imaging
- PI3K–AKT–mTOR経路
- オルガノイドモデル（ICO）

要旨

MASLDが進行するにつれ、肝細胞と胆管細胞間の両表現型をもつ細胞が増加することをsnRNA-seqと3Dイメージングで実証した。

肝小葉の微小環境の変化が両表現型の可塑性の誘導を促進する。

SOX4やKRT23などの可塑性マーカーを同定し、ICOモデルでPI3K–AKT–mTOR経路が細胞可塑性に必須であることを機能的に検証した。

今後はインスリン抵抗性との関連やがん化リスク評価などを含む多層的解析が、慢性肝疾患治療の新規戦略に繋がる可能性がある。

背景

肝臓は高い再生能力を有するが、慢性損傷下での再生メカニズムはヒトで未解明である。MASLDは肝細胞内脂肪蓄積→炎症・線維化→肝硬変→肝不全・肝癌へと進行するリスクがあり、成人の約30%が罹患する世界的に増加中の疾患である。動物モデルでは胆管細胞と肝細胞間の可塑性が示唆されていたが、ヒトでの検証は技術的・倫理的制約により困難であった。本研究では47例の肝生検サンプルをシングル核RNA-seq（snRNA-seq）とFLASH imagingで解析し、免疫染色でK7/K19とALBの共発現細胞を観察、ヒト肝の可塑性と微小環境変化を総合的に解明することを目的とした。

snRNA-seqによる、肝疾患進行に伴う細胞変化の解析

本研究では、健康な肝組織から末期MASLDまでの47例の肝生検サンプルを用いて、snRNA-seqを実施した。その結果、肝細胞マーカーと胆管細胞マーカーを同時発現する両表現型細胞が、病態の進行に伴い増加することが明らかとなった。特に、末期MASLDでは、肝細胞が胆管細胞のマーカーを共発現するなど、細胞のアイデンティティが混在する状態が観察された。これにより、肝疾患の進行が細胞の可塑性と関連している可能性が示唆された。

3Dイメージングによる肝組織構造の再編成の可視化

健常肝では局所的な空間的特徴が明瞭で、GLUL（中心静脈域）とASS1（門脈域）がクラスターを形成した。しかしMASLD末期では両マーカー共発現細胞が増加し、酸素利用やエネルギー代謝経路の再プログラムが示唆された。

FLASH imagingで3D再構築を実施。樹枝状胆管樹が肝小葉を横断する構造から、肝細胞結節を取り囲むバスケット状へと大規模再編される様子を可視化した。小胆管末端部位には両表現型細胞が集中し、線維化を担う活性化星状細胞との共局在が観察された。これらの領域ではNotchシグナル経路のリガンドDLL1発現上昇も認められた。組織マッピングと細胞間相互作用推定から、炎症性マクロファージ（CD68＋）が可塑性誘導を助長するサイトカインCXCL12を分泌し、微小環境制御に寄与する可能性が示唆された。

可塑性因子の同定と将来の展望

Pseudotime解析により4つの遺伝子が肝細胞と胆管細胞の間で形質変化のスイッチとして働くことが示された。実組織でこれらの遺伝子は線維化領域付近に特異発現し、RNA velocity解析でも細胞の双方向移行が確認された。ICOモデルではPI3K–AKT–mTOR経路を阻害すると両表現型細胞が70%減少し、活性化すると倍増した。この結果から当該経路が細胞可塑性に必須であることを検証し、今後はインスリン抵抗性やNotch/YAP–TAZ経路との相互作用を解明しつつ、臨床応用を見据えたマーカー開発や他臓器での可塑性検証に取り組む必要がある。これらの知見が慢性肝疾患の新規治療戦略にもつながることが期待される。

担当者 柳瀬 雄太　所属 株式会社ナレッジパレット　専門 RNA-seq、細胞生物学、ラボオートメーション等

一言　現職で主に細胞のトランスクリプトーム解析を専門に行っていますが、培養条件や培地組成のわずかな違いで細胞の表現型が大きく変わることもあり、特にヒトのプライマリーな細胞を扱う際には慎重を要することを実感しています。本論文ではシングル核解析を始めとした手法を組み合わせることで再現性良く精度の高い綺麗なデータセットが得られており、実験設計の厳密さという点でも強い感銘を受けました。

yuta.yanase@knowledge-palette.com

二重阻害アプローチとしてEGFRを標的とするPhosTACは、下流シグナル伝達の差異を明らかにする

Hu et al., Sci Adv., 2024,
DOI: 10.1126/sciadv.adj7251

キーワード

- イベント駆動型薬理（Event-Driven Pharmacology）
- TPDephos（Targeted Protein Dephosphorylation）
- PhosTAC（Phosphorylation Targeting Chimera）
- PROTAC（Proteolysis Targeting Chimera）
- MGD（Molecular Glue Degrader）
- EGFR
- PTPN2

要旨

EGFRとPTPN2を近接誘導するPhosTACにより、EGFRの脱リン酸化が誘導される。

GePhos1（非共有結合型）とAfaPhos1（共有結合型）の2つのタイプのPhosTACがデザインされ、非共有結合型のGePhos1は、EGFRの脱リン酸化を触媒的に誘導する。

PhosTACはがん細胞死を誘導し、チロシンキナーゼ阻害剤（TKI）とは異なる下流シグナルを示す。

背景

イベント駆動型薬理とは、標的タンパク質の持続的占有ではなく、生化学反応への触媒的な介入とその制御を通じて治療効果を得るという考え方である。近年は、標的タンパク質のユビキチン化、それに続くプロテアソームによる分解を誘導するPROTAC/MGDが注目され、精力的に研究開発が行われている。本報告では、「ユビキチン化→タンパク質分解」とは異なり、「近接誘導剤を用いてタンパク質の脱リン酸化を誘導する」ことを試みている。具体的には、脱リン酸化酵素であるPTPN2と上皮成長因子受容体であるEGFRを近接誘導することで、EGFRの脱リン酸化、がん細胞死を誘導できることが分かった。今後、PPI Stabilizerの開拓により、広範なタンパク翻訳後修飾反応への介入が可能となることが期待される。

PhosTACは、EGFRとPTPN2を近接誘導し、EGFRの脱リン酸化を誘導する

EGFRバインダーとPTPN2バインダーをリンカーでつないだキメラ化合物であるPhosTACを構築した。EGFRバインダーには、ゲフィチニブ（GePhos1）、もしくは、アファチニブ（Afaphos1）が使用された。既知のPTPN2バインダーはなかったので、$FKBP12^{F36V}$バインダーを用いて間接的な近接誘導を試みた（PTPN2に$FKBP12^{F36V}$を融合）。In vitro脱リン酸化アッセイでは、GePhos1がEGFRの脱リン酸化を誘導することが分かった。一方、$FKBP12^{F36V}$への結合能を喪失したエピマー体では、脱リン酸化能は消失した。$FKBP12^{F36V}$-PTPN2を発現させたHeLa細胞株をGePhos1で処理すると、EGFRの主要なリン酸化部位であるY1068、Y845などで顕著な脱リン酸化が確認された（DpC_{50}: 13nM、IC_{50}: 0.38nM）。さらに、下流のタンパク質（STAT3、SHC、GAB1、MEK1/2、ERK1/2、AKT）のリン酸化の抑制も確認された。GePhos1はエピマー体と比べて顕著なリン酸化抑制能を示すことから、ゲフィチニブのリン酸化阻害能に、PhosTACによる脱リン酸化能がアドオンしていると考えられる（二重阻害）。EGFRに共有結合するAfaPhos1は、GePhos1に比べて効果が下回った。これは、触媒的な脱リン酸化反応の関与を示唆するものである。

PhosTACは、チロシンキナーゼ阻害剤（TKI）とは異なる下流シグナルを示す

$FKBP12^{F36V}$-PTPN2 HeLa細胞をGePhos1で処理したものを、DIA-MSを用いてプロテオミクス解析した。GePhos1はゲフィチニブに比べて、EGF/EGFRシグナル、成長因子応答、RHO GTPase関連シグナルへの影響が大きかった。またエピマー体とは異なり、GePhos1はチロシンだけではなく、セリンやトレオニンの脱リン酸化も同時に誘導した。EGFRシグナルとの関連は複雑であり、詳細な解析については今後の課題となった。

PhosTACは、がん細胞死を誘導する

GePhos1やAfaPhos1は、HeLaやH1975がん細胞株において、EGFRの脱リン酸化を誘導し、中程度の活性で細胞死を誘導した。

担当者 山口 龍一　所属 ラクオリア創薬株式会社　専門 創薬化学、有機合成化学、計算化学

一言　生化学反応に介入し、その反応をモジュレートする「イベント駆動型の薬理作用」に注目が集まっています。近年は、標的分子のユビキチン化を誘導して分解に導くTargeted Protein Degraderに注目が集まり、PROTAC/MGDが精力的に研究されていますが、それ以外の広範なタンパク翻訳後修飾反応にも介入できることが示されつつあります。その触媒的な薬理作用形式は、有機分子触媒分野との概念的な関連を想起させます。ターゲット分子の枯渇は創薬における課題の一つですが、従来の「占有駆動型の薬理作用」とは異なる戦略をとることで、アンドラッガブル・ターゲットを標的化できる可能性が期待されます。新規モダリティによる同コンセプトの展開を含め、興味が尽きない分野です。

ryuichi.yamaguchi@raqualia.com

ヒット化合物と臨床候補化合物の組み合わせ比較

Dean G. Brown, J. Med. Chem. 2023,
DOI: 10.1021/acs.jmedchem.3c00521

キーワード

- リード化合物
- 臨床候補化合物
- 比較研究
- Rule of five（Ro5）

要 旨

本研究では、2018年から2021年にJournal of Medicinal Chemistry誌に掲載された臨床候補化合物を対象に、ヒット化合物から候補化合物に至るまでのリード創出戦略と物理化学的変化を解析した。結果、創薬において「公知情報の活用」と「情報共有の促進」が極めて重要であることが判明した。また、ヒットから臨床候補に至る過程では、構造や物性の最適化に一定の指針が存在し、特にライブラリの質（低分子量・低脂溶性）と多様性が成功率を左右することが明らかになった。

背景

低分子医薬品の創出は、リード化合物を同定することから始まる。リード化合物の創出には、化合物が結合するポケットの性質の理解、リード生成戦略やスクリーニング戦略、化合物スクリーニングライブラリの構成戦略など、重要な要因がいくつか存在している。リード創出戦略を理解するため『Journal of Medicinal Chemistry』に掲載された156件の臨床候補化合物について、リード創出戦略の分析を実施した。

既知化合物を出発点とした臨床候補化合物が半数以上

既知化合物（研究グループや企業の知見に基づくレガシーデータ、文献情報、特許情報からの情報）由来の候補化合物が59%と一番多いことが判明した。続いて、ランダムスクリーニングが21%であった。これまでの報告と同様の傾向であり、どの組織でも同じようなトレンドと思われる。ターゲットクラスの情報に基づき化合物を選択したライブラリをスクリーニングするダイレクトスクリーニングが11%、フラグメントスクリーニングは7%であった。バーチャルスクリーニングやDELスクリーニングは1%程度である。ターゲットクラスはキナーゼ、酵素がともに3割程度と多い、GPCRは10%前後であり、エピジェネティックなターゲットは減少し、イオンチャネルが増加している。領域は、がん、CNS、免疫、感染症が多い。SBDDは65%で活用されていた。

ヒットと候補化合物でΔclogPは0、ΔMWは+80

既知化合物出発の80例とランダムスクリーニングから見出された30例について、ヒット化合物と臨床候補化合物の間でのclogPの変化を調べた。結果、ヒット化合物から臨床候補化合物になる過程で疎水性に大きな変化は見られない。一方、分子量の変化には顕著な違いが見られた。既知化合物出発の化合物のΔMWは+30g/mol、ランダムスクリーニングから出発した化合物では+80g/molと、ランダムスクリーニングを出発点とした場合の方が分子量変化は大きい。

Rule of fiveを破っている臨床候補化合物は4割弱

経口投与を狙ってデザインされた臨床候補138のうち79件（57%）はRo5を守っていた。43件（27%）は1つの違反、11件（8%）は2つの違反、5件（4%）は3つ以上違反。MW＞500を破っているのは39件、ClogP＞5が24件、HBA＞10を破っているのが17件であった。一方、経口薬でHBD＞5を破っているものは0件であり、Rule of fiveの中でも経口薬でのドナーの数の制約が重要であることがわかった。

ヒット化合物と候補化合物の構造比較

多くの臨床候補化合物はヒットから大きく構造が変化したが、ファーマコフォアは保存されていた。活性向上のため、分子量を増やしつつ脂溶性を減らすためNやOの数が増えている。F原子の数は1–3個増加しているが、Cl、Sの数は変わらない。F原子の候補化合物創出における有用性が示唆される。

担当者 佐藤 歩 所属 Axcelead Drug Discovery Partners 株式会社 専門 メディシナルケミストリー

一言 ヒット化合物から臨床候補化合物を出すには数年もの努力と巨額の費用が掛かります。その部分をできるだけ短縮、コストを最小にするために、公知情報や、AI等使えるものは使っていきたいと思っています。

ayumu.sato@axcelead.com

妊娠中の悪心および嘔吐におけるGDF15の役割

Fejzo et al., Nature. 2024
DOI: 10.1038/s41586-023-06921-9

キーワード

- GDF15
- 悪心・嘔吐
- 妊娠悪阻
- 胎盤
- 受容体脱感作

要 旨

GDF15受容体であるGFRALは脳幹の嘔吐中枢である延髄最高野（AP）に発現し、悪心・嘔吐に関与する。

妊婦では胎盤から母体血中にGDF15が大量に分泌され、悪心・嘔吐や妊娠悪阻（つわりの極端な型）を引き起こす。

妊娠悪阻リスクと相関するGDF15バリアントは、非妊娠時の血中 GDF15レベルをむしろ低下させる。これにより受容体の脱感作レベルが低下し、結果として妊娠中のGDF15感受性が上昇すると考えられる。

妊娠前の血中GDF15の基礎レベルが高いとGDF15 受容体が脱感作し、妊娠中の悪心・嘔吐に対して抑制的に働く。

背景

GDF15はTGFβsuperfamilyに属するストレス応答性サイトカインで、2017年に受容体（GFRAL）が同定されるとともに、近年ではミトコンドリア病のバイオマーカーとしてPMDA承認されるなど注目を集めている。GDF15には様々な生理機能が報告されているが、そのひとつとして延髄最高野（AP）に存在するGFRALを介した摂食抑制や悪心・嘔吐の惹起がある。さらに最近、GDF15が妊娠中の悪心・嘔吐や妊娠悪阻（つわりの極端な型）に関与する可能性が指摘された。妊娠中は血中GDF15レベルが上昇すること、胎盤においてGDF15が高発現することから、胎盤由来のGDF15がAPを介して妊娠中の悪心・嘔吐を誘導する可能性がある。

妊娠時の悪心・嘔吐（NVP）や妊娠悪阻（HG）を有する妊婦では循環血中GDF15レベルが上昇している

妊娠15週においてNVPを有する妊婦は、そうでない妊婦に対して有意な血中GDF15高値を示した。また妊娠中にHGを発症した妊婦はさらに高い血中GDF15レベルを示した。このことから妊娠中の高GDF15レベルはNVPおよびHGのリスクと相関すると考えられた。

胎盤が母体血中GDF15の主要な供給源である

母体と胎児由来組織で異なるGDF15のSNPsを有する被験者の解析から、妊娠中の血中GDF15の99%以上は胎盤に由来することが判明した。妊婦では胎盤から大量のGDF15が母体側に分泌され、APのGFRALを介して悪心・嘔吐が惹起されると考えられた。

高HGリスクと相関するGDF15バリアントは血中GDF15レベルをむしろ低下させる

高HGリスクと相関するGDF15バリアントを解析したところ、非妊娠時の血中GDF15レベルをむしろ低下させることが判明した。稀なHGリスクバリアントである$GDF15^{C211G}$を解析すると、変異型ペプチドは細胞内に留まり細胞外へ分泌されないことが分かった。このパラドキシカルな結果から、妊娠前のGDF15レベルが低いとGDF15受容体の脱感作レベルが低下し、妊娠中のGDF15に対する感受性が上昇する可能性が考えられた。

妊娠前のGDF15の基礎レベルが高いとGDF15受容体が脱感作し、妊娠中の悪心・嘔吐に対して抑制的に働く

マウス試験から、GDF15の投与はGDF15受容体を脱感作し得ること、逆にGDF15-KOは受容体の感受性を高めることが確認された。また非妊娠期に血中GDF15高値を示すβサラセミア患者の妊婦は、NVPリスクが有意に低かった。以上の結果から、HGに対する治療戦略として、GDF15作用のブロックに加え、GDF15受容体脱感作の誘導が考えられた。ただし、胎児の成長に対する潜在的な副作用について慎重に評価する必要がある。

担当者 丸山 穣 所属 武田薬品工業株式会社 専門 神経科学、ミトコンドリア創薬、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を担当しています。Drug developmentフローの中で特にtarget identificationに興味があります。Scientificなブレークスルーを通じて新しい価値を見出すような創薬がしたいと思っています。
好きな言葉：「Focus on out of focus」

minoru.maruyama@takeda.com

三者複合体を指向した低分子タンパク質間相互作用誘導剤開発のための合理的スクリーニング

Liu et al., J. Am. Chem. Soc. 2023,
DOI: 10.1021/jacs.3c08307

キーワード

- DEL（DNA-encoded library）
- Molecular glue
- Ternary Complex（三者複合体）
- Cooperativity
- Affinity selection
- Hook効果

要旨

DELを用いたスクリーニングによって、高いCooperativityを示す化合物を同定することに成功した。

高いPresenter ratioを示すことが、Cooperativity、さらには細胞におけるタンパク質分解誘導活性に重要であることが分かった。

高いPresenter ratioは、Cooperativityのみならず、高選択性（高特異性）を示した。

Molecular glueをrationalに探索する新規手法として利用できると期待される。

背景

Molecular glueは、低分子ながらタンパク質間相互作用の誘導、阻害、活性化などを引き起こし、近年とりわけタンパク質分解剤としての活用に多くの注目を浴びている。一方、これまでに発見されたMolecular glueの多くは、作用機序解明の末に偶然見つかったものである。その理由として、Molecular glueは三者複合体（ternary complex、タンパク質–タンパク質–低分子）を特異的に形成する必要があり、その探索難易度が高いことが挙げられる。今回著者らは、DELを活用した親和性ベースのMolecular glueの合理的探索スクリーニング法を提唱しており、実際にBRD9-VCBに特異的に結合する低分子を発見するに至った。

VHLリガンドを有するBRD9を標的としたDELを作成した

DNA-tag導入部位を有するVHLリガンドと、三種のビルディングブロック（Cy1、Cy2、Cy3）が結合したトリアジン誘導体を連結させたDELをデザインした。Cy1は両者をつなぐリンカーとして機能し、13種が選別されており、合計約100万種からなるライブラリーが構築された。

Affinity selection（AS）によりHook効果が回避された化合物を選別した

VHLおよびBRD9共存下、またはBRD9のみの場合で、上記で作成したDELのASを実施した。また、いくつかの化合物についてはoff-DNA体を合成し、AlphaScreenアッセイにより活性評価も実施した。その結果、前者で観測されたカウント数（特定の化合物が出現する頻度）を後者で観測されたカウント数で割ったpresenter ratioを指標とすることで、AlphaScreenアッセイにおいてHook効果の回避された化合物を取得することに成功した（Presenter ratio=34、EC50=340nM）。なお、presenter ratioが低い化合物はHook効果を示すことが分かり、presenter ratioとCooperativity（三者複合体に特異的な結合を示す指標）には緩やかな相関があることも判明した。なお、presenter ratioはリンカーの種類によって大きく変化することも明らかとなり、二種のタンパク質を適切な距離や向きでつなぐことが重要であることを示唆している。

選別された化合物は高いタンパク分解活性と高い選択性を示した

上記で見出された化合物は、細胞を用いたアッセイにおいて、高いタンパク質分解活性を有していた（DC50=108nM by HiBiT）。また、BRD7に対する高い選択性も有しており、presenter ratioが高いものほど選択性を有している傾向にあった。これは、本スクリーニング手法が、特定の三者複合体に特異的に結合する化合物の選別にも優れた手法であることを示唆している。

担当者 杵渕 政彦 所属 Axcelead Drug Discovery Partners株式会社 専門 メディシナルケミストリー

一言 専門はメディシナルケミストリーですが、創薬に関連する様々な分野に興味があります。目標は、自身の専門性を高めつつ、他分野の方と連携して質の高い薬を作ること!! そして新たな技術にも目を向けて、良いものを見極められる目利き力、そしてそれを受け入れる柔軟な対応力を養っていけるよう日々精進して参ります。

masahiko.kinebuchi@axcelead.com

SPR顕微鏡による膵臓癌細胞のmucin-4を標的とする結合作用のグリカン依存的なヘテロジェネイティの特定

Aguilar Díaz de león et al., PLoS One. 2024
DOI: 10.1371/journal.pone.0304154

キーワード

- セルベースSPR計測
- 膜タンパク質
- リガンド分子結合
- 細胞膜環境
- ヘテロジェネイティ
- アビディティ

要旨

細胞表面の糖鎖を除去前/除去後に、レクチンタンパクおよび抗膜タンパク質抗体の結合特性の解析を行った。

糖鎖除去により、親和性（K_D）だけでなく結合様式のヘテロジェネイティも変化した。

細胞表面の結合標的と作用分子の結合特性には細胞膜環境が関与している。

SPR顕微鏡は、細胞膜環境と外部因子との相互作用のヘテロジェネイティとアビディティのパラメータを取得する。

背景

従来のSPRは精製タンパク質と作用因子との1対1結合モデルでの相互作用解析であるため、膜タンパク質をリガンドとする解析において、細胞膜環境（糖鎖、脂質二重膜などの細胞膜構造、細胞応答）による結合反応への影響が反応条件に含まれていない。そのため、本来の機能環境下にある膜タンパク質との相互作用の測定・解析を行うことは難しい。
SPR顕微鏡は細胞をセンサーチップ上で培養し、細胞表面の結合標的との結合反応イベントを非標識・リアルタイムで計測することができるため、本来の機能状態にある膜タンパク質との相互作用解析が可能である。また高分解能二次元SPR計測により細胞表面の不均質性を反映したシングルセルの相互作用解析が可能である。

細胞表面Nグリカンの部分除去によるレクチン結合反応に対する影響の評価

酵素処理によってNグリカンを部分除去することによって人為的な糖鎖異常環境を作り出し、Nグリカン特異的に結合するConAレクチンの結合特性に対する影響を確認した。その結果、親和性がやや低下したことに加え、元は1種類のK_D値の結合様式（1対1の相互作用反応）であったのが、3種類の結合様式（ヘテロジェネイティ）が見られるようになった。このことから糖鎖異常が起こっている細胞では、正常な細胞とは糖鎖に対する作用特性が結合様式レベルで変化している可能性が考えられる。

細胞表面Nグリカンの完全除去による膜タンパク質ー抗体間の相互作用特性に対する影響の評価

Oグリカンが結合している糖タンパク質（MUC4）に対するHPAレクチンおよび抗MUC4抗体の結合特性に対するNグリカン完全除去の影響を確認した。HPAレクチンは除去処理前のSPR顕微鏡解析により4種類のK_D値の結合反応が確認され、従来考えられていたN-acetelyllactosamine残基への特異的な結合でなく、複数エピトープを結合標的としていると考えられる。抗MUC4抗体は、除去処理前は2種類のK_D値の結合様式が見られたが、除去処理後は一方の結合様式が消えて全ての結合反応が1種類の結合様式に収束された。これらの結果から、細胞膜上の結合標的と作用因子との相互作用のヘテロジェネイティに糖鎖が関わっていることが考えられる。

細胞表面環境依存的な結合様式のヘテロジェネイティ検出、アビディティ解析と細胞解析

SPR顕微鏡は膜タンパク質と作用因子との親和性解析だけでなく、細胞表面環境に依存的な結合様式のヘテロジェネイティの検出、詳細なアビディティ情報の取得が可能である。この特性を利用して、機能解析（IC50）・阻害試験（Ki）・毒性評価などの細胞解析系のパラメータ値と近似なK_D値を取得できることが、海外製薬企業から報告されている。

担当者 上畠 雄一郎 所属 キコーテック株式会社 専門 相互作用解析、蛍光イメージング、プロセスカラム

一言 今回紹介した論文は、SPR顕微鏡の商用化に世界で初めて成功したBiosensing Instrument社からの報告です。細胞表面における結合標的と作用因子との相互作用を非標識リアルタイムで測定することで、複雑な構造・機能を有する細胞膜表面が外部因子をどのように受容しているのかを数値化できる技術が大変興味深い。医薬開発だけでなく、感染の仕組みや防御機構の解明、アビディティで複雑化しているシグナル受容の解析などライフサイエンス基礎研究での活用にも期待しています。

uehata@kiko-tech.co.jp

Transient stealth coating of the liver sinusoidal wall enables selective organ targeting of nanomedicines

Dirisala et al., Science Advances, 2020,
DOI: 10.1126/sciadv.abb8133

Key words

- Liver scavenger sinusoid
- Poly(ethylene glycol)-conjugated
- oligo(L-lysine) (PEG-OligoLys)
- Polyplex micelle
- Adeno-associated virus(AAV)

Synopsis

We addressed nonspecific capture of nanomedicines by the liver.

One-and two-arm-PEG-OligoLys selectively coat liver sinusoids. Two-arm-PEG-OligoLys was cleared from sinusoids to the bile, whereas one-arm-PEG-OligoLys persisted in the sinusoidal walls.

Two-arm-PEG-OligoLys coating prevented liver capture of gene carriers, boosting their transfection efficacy in the target organs.

Background

Nonspecific liver uptake remains a major challenge for nanomedicine delivery, resulting in a substantial reduction in delivery efficiency to target organs. To address this, we developed an *in situ* PEG coating to the liver sinusoidal scavenger walls. Our study explored the selective and transient coating behavior of one-and two-arm-PEG-Oligo(L-lysine), focusing on their differential retention and clearance from the sinusoidal wall. Finally, we investigated the potential of coating to retarget DNA nanomedicines to tumors and viral vectors to cardiac and skeletal muscles, effectively redirecting them from the liver.

Selective and transient stealth coating of liver sinusoidal wall with two-arm-PEG-OligoLys

Both one-and two-arm-PEG-OligoLys rapidly attached to the liver sinusoidal walls, but not to the other connective tissue endothelia. In contrast, non-PEGylated OligoLys bound to the blood vessels of all tissue endothelia, confirming the selective coating of PEGylated OligoLys. This selectivity is attributed to the anionic scavenger receptors and proteoglycans on the sinusoidal cells that capture oligocations. Notably, two-arm-PEG-OligoLys formed a transient coating, gradually eliminated into the bile within hours, while one-PEG-OligoLys persisted. Therefore, we selected two-arm-PEG-OligoLys for liver coating to redirect the nanomedicines from the liver to other tissues.

Retargeting DNA-nanocarriers from the liver sinusoidal wall to the tumor

Two-arm-PEG-OligoLys precoating prevented the clearance of DNA-loaded polyplex micelle(PM), thereby dramatically improving blood retention and tumor bioavailability. This resulted in a 10-fold increase in luciferase expression in the tumor compared with the PM injection without coating.

Redirecting viral gene carriers from the liver sinusoids to their target tissues

Liver sinusoidal capture of viral vectors hinders their ability to reach target tissues, requiring high viral doses and posing safety concerns. Our strategy prevented sinusoidal capture of AAV8, increasing its delivery to the heart by 4.3-fold and to skeletal muscle by 2.3-fold in protein expression.

Author information Dirisala Anjaneyulu, Innovation Center of Nanomedicine, Nanomedicines

Acknowledgment Nonspecific clearance of systemically administered nanomedicines by liver sinusoidal cells poses a significant barrier to effective delivery to target tissues. Our study addressed this issue by coating liver sinusoidal cells with PEG and rerouting the nanomedicines to their target organs.

dirisala-a@kawasaki-net.ne.jp

視床下部弓状核における神経線維症の抑制が代謝疾患を改善する

Beddows, C.A., Shi, F., Horton, A.L. et al.,
Nature, 2024
DOI: https://doi.org/10.1038/s41586-024-07922-y

キーワード

- Metabolic disease
- ECM: extracellular matrix
- Perineuronal nets（PNNs）
- Neurofibrosis
- agouti-related peptide（AgRP）
- neuron
- Insulin-resistance
- Inflammation

要旨

代謝性疾患モデルマウスにおいて、視床下部弓状核（ARC: arcuate nucleus）内のペリニューロナルネット（PNN）の過剰な蓄積が代謝異常を引き起こした。

抗炎症治療やフルオロサミンの使用がこれを抑制し代謝機能を改善した。

代謝性疾患モデルでは視床下部弓状核（ARC）に位置するAgRP neuronへのインスリン取り込みが抑制され、これにより本来抑制されるはずの食欲が制御されず、代謝異常を悪化させていることが示唆された。

背景

肥満や2型糖尿病などの代謝性疾患の特徴としてインスリン抵抗性がある。インスリン抵抗性は、末梢組織における細胞外マトリックス（ECM）のリモデリングと密接に関連しており、過剰なECMの沈着は線維化と呼ばれる現象で、インスリンの作用とシグナル伝達を障害することが知られていた。従来、線維化は末梢組織でのみ起こると考えられてきた。しかし、脳内のECMのリモデリングは、急性脳損傷後やいくつかの神経疾患で観察されている。また、代謝調節に重要な視床下部弧状核（ARC）内の細胞は、代謝性疾患の進行中にインスリン抵抗性となるが、そのメカニズムは完全には解明されていなかった。本文献ではARCニューロンを取り囲むペリニューロナルネット（PNN）と呼ばれる特殊な細胞外マトリックスの役割を調べた。

ARCにおけるECMのリモデリングが代謝異常を引き起こす

高脂肪高糖質食を与えた肥満モデルマウスにおいて、ARCへのPNNの異常な蓄積と分解の抑制が観察された。PNN分解酵素の投与によりPNNの異常蓄積が改善するのに伴い、体重増加などの代謝異常も改善した。

AgRP分泌ニューロンにおけるインスリンシグナルの阻害が代謝異常を悪化させる

インスリンはAgRPニューロンに対し抑制的に作用し、食欲などを制御するAgRPペプチドの分泌を抑制すると考えられている。肥満モデルマウスにPNN分解酵素を与えると代謝異常の改善がみられるが、AgRPニューロン特異的なインスリンレセプター（IR）のKOによりこの効果が抑制された。この結果は、PNN分解酵素による代謝改善の効果が、AgRPニューロンにおけるインスリンシグナルの働きによるものであるということを示唆する。つまり、ARC領域におけるECMのリモデリングがAgRPニューロンにおけるインスリン抵抗性の原因となり、代謝異常につながることが明らかとなった。

ARCにおける抗炎症治療やフルオロサミンの経鼻投与はEMCの沈着と代謝機能を改善した

代謝性疾患では脂肪細胞や肝臓における慢性炎症がよく知られている。ARCにおけるECMリモデリングと代謝異常が炎症と関連があるか検証するため、抗炎症AAVベクター（TNFR1αおよびTGFβRの可溶性受容体を発現）をARCにInjectionし解析した。その結果、ECM蓄積の改善と代謝機能の改善が観察された。また、PNNの主成分であるCSPGの合成を阻害する低分子として知られているフルオロサミンをマウスに経鼻投与することで、同様にECM蓄積の改善と代謝機能の改善がみられた。これらの結果は、代謝性疾患の創薬ターゲットとして、中枢における炎症やECMのリモデリングといった新しい選択肢を示した。

担当者 松木 泰子　所属 武田薬品工業株式会社　専門 神経系疾患、バイオマーカー

一言 今回は代謝性疾患と中枢をつなぐメカニズムに迫る論文を選びました。代謝性疾患が中枢細胞に影響を与えること、また細胞外マトリックスの変化により細胞の機能が制御されることが非常に興味深かったです。

yasuko.matsuki@takeda.com

多感覚ガンマ刺激はグリンパティックシステムを介したアミロイドのクリアランスを促進する

Murdock et al., Nature, 2024,
DOI: 10.1038/s41586-024-07132-6.

キーワード

- グリンパティックシステム
- 動脈拍動
- 水チャネルのアクアポリン4（AQP4）
- 40Hz刺激（ガンマ刺激）
- 多感覚ガンマ刺激（光と音の刺激）
- アミロイド
- VIP（vasoactive intestinal peptide）

要旨

多感覚ガンマ刺激は脳内のアミロイド蓄積を減少させ、グリンパティック排出を促進する。

多感覚ガンマ刺激は動脈拍動を促進して、アストロサイト終足を調節する。

VIPニューロンは多感覚ガンマ刺激による排出を調節する。

背景

グリンパティックモデルによると、動脈の拍動により脳脊髄液（CSF）が脳内の血管を取り囲む血管周囲腔の相互接続ネットワークに沿って流れる。また、アストロサイトの終足に局在するAQP4が、CSFと間質液間の交換を促進する。グリンパティックシステムは、アミロイドなどの病原性タンパク質を含む脳実質内の代謝物の除去に関与している。一方、これまで、非侵襲的な40Hz感覚刺激は、マウスの動物実験と臨床試験において前頭前皮質を含む複数の脳領域で40Hzの神経活動を促進する事、またアルツハイマー病モデルマウスにおいて脳内アミロイド蓄積を軽減する事が示されていた。しかしながら、40Hzガンマ刺激がグリンパティック経路を介して脳内アミロイド蓄積を軽減しているかどうかは不明であった。

多感覚ガンマ刺激はグリンパティック排出を促進する

6ヶ月齢のアルツハイマー病モデル（5XFAD）マウスにおいて、40Hz刺激は、無刺激、8Hz刺激、および80Hz刺激と比較して、脳内アミロイド蓄積の減少を示した。アミロイド除去がグリンパティック排出と関連しているかを検証するため、CSFの動態を観察したところ、多感覚40Hz刺激後に皮質へのCSFトレーサーの蓄積が増加した。さらに、AQP4の阻害剤TGN020は40Hz刺激によるアミロイド除去効果を抑制した。

多感覚ガンマ刺激は動脈拍動を促進して、アストロサイト終足を調節する

動脈血管運動はCSFの動きを制御しており、ガンマリズムの包絡線によって同調されている。覚醒マウスの動脈脈動がガンマ刺激によって増加するかどうかを評価するために、1時間多感覚刺激を与え、動脈血管運動を画像化して、動脈血管運動のピークを定量化した。多感覚40Hz刺激は、40Hz以外のコントロール刺激と比較して、動脈脈動を増加させることが分かった。

さらに、ガンマ刺激によってアストロサイトの終足に沿ったAQP4の極性化が増加する可能性を探るため、6ヶ月齢の5XFADマウスに1時間の多感覚ガンマ刺激を与え、免疫組織学的にAQP4を評価した。AQP4陽性終足の垂直セグメントに沿った分極分析を行い、多感覚刺激40Hzは、コントロールと比較して、アストロサイト終足に沿ったAQP4の分極の増加を示した。

VIPニューロンは多感覚ガンマ刺激による排出を調節する

ガンマリズム中に放出される可溶性因子が血管およびグリア細胞に作用してグリンパティックによるアミロイド排出を促進するかどうかを検討した。神経ペプチドは周波数依存的に放出されることが知られており、持続的な細胞応答を媒介する候補となる。シングル核RNAシークエンス解析の結果から、特にVIPに着目した。VIP-Cre 5XFADマウスにおいてVIPニューロンをガンマ刺激前に化学遺伝学的に抑制したところ、hM4Di CNOのみのコントロールと比較して、アミロイド除去効果が減弱し、動脈拍動も減少した。これらの結果から、多感覚40Hz刺激は、動脈拍動の変化を一因として、グリンパティック排出を誘導するペプチドシグナルの活性化に寄与する可能性が示唆された。

担当者 荒川 佑一 所属 ラクオリア創薬株式会社 専門 in vivo薬効薬理、神経系疾患創薬

一言 今回は、MITのTsai教授の研究グループによる最新の研究成果を紹介しました。多感覚ガンマ刺激がアミロイドβの減少を引き起こすメカニズムに、グリンパティックシステムが関与していることが示されました。すでにTsai教授らは、マウスで得られた成果をもとに、光と音によって脳活動を“同調”させ、アルツハイマー病の疾患修飾を目指した治療法の確立に向けて、臨床試験を実施しています。今後の臨床研究の進展が大いに期待されます。

yuichi.arakawa@raqualia.com

アンチセンスオリゴを用いた環状RNA生合成のアップレギュレーション

Lu Ni et al., Sci. Rep., 2024,
DOI: 10.1038/s41598-024-58663-x

キーワード

- RNA創薬
- ノンコーディングRNA
- 環状RNA(circRNA)
- バックスプライシング
- アンチセンスオリゴ
- RNA結合性低分子

要旨

環状RNA(circRNA)は、5'末端および3'末端を持たない、共有結合で閉じた一本鎖RNAで、特殊な「バックスプライシング」と呼ばれる機構で生合成される。

本研究では、バックスプライシングのメカニズムに基づき、イントロン間相互作用を増強してバックスプライシングを促進するアンチセンスオリゴ(CLIP-ON)をデザインした。モデルpre-mRNAを一過性発現するモデル細胞系を構築し、CLIP-ONの投与により標的の環状RNAが選択的に増大することを確認した。

背景

ヒトゲノムの75%以上を占めるノンコーディングRNAは、次世代の創薬標的として注目されています。その一つである環状RNA(circRNA)は、末端を持たない環状構造によって高い生体内安定性を持ち、マイクロRNA(miRNA)スポンジングなどの特有の生体内機能を発揮します。近年、がんや神経疾患など様々な病気におけるcircRNAの役割が示唆される論文が多数報告されており、創薬標的としての期待が高まっています。しかし、多様なcircRNAの各疾患への関与の詳細なメカニズムは未解明であり、今後の研究による機能解明が革新的な診断・治療法の開発に繋がる可能性があります。

環状RNA(circRNA)とバックスプライシング

circRNAはノンコーディングRNAの一つで、細胞機能や疾患において重要な役割を果たす一本鎖RNAである。circRNAは、前駆体mRNA(pre-mRNA)のエクソンから「バックスプライシング」という特殊なスプライシング機構によって生成される。バックスプライシングではブランチポイントのアデノシンの下流の5'ssへの攻撃から一連のスプライシング反応がスタートすることで、通常発生しない3' to 5'方向のスプライシングが起きることでエキソンが環状化する。バックスプライシングの駆動力は環状化するエキソンの上流と下流のイントロン同士の相互作用で、具体的には2つのイントロン間に逆相補配列(reverse complementary sequence:RSC)が存在すると環状RNAが生成される。

CLIP-ONのデザインコンセプト

本研究では、CircuLarIzation Promoting OligoNucleotide(CLIP-ON)と名付けた新規設計のオリゴヌクレオチドを用いて、細胞内でのcircRNA生合成が増強するか検証した。CLIP-ONは具体的にはRSCの上流と下流のイントロン配列と相補配列を有する25量体程度の長さを有する一本鎖RNAで、生体内安定性を獲得するためホスホロチオエート・2'-Oメチル化学修飾を施している。CLIP-ONは細胞内のpre-mRNAと結合してイントロン間相互作用を増強することでバックスプライシングを加速し、標的とする環状RNAの生合成を促進できると考えた。

モデル細胞を用いたCLIP-ONの実証実験

まず特定のcircRNA(circZKSCAN1)を発現するプラスミドをデザインし、それをHeLa細胞にトランスフェクションした。さらにデザインしたCLIP-ONを、作成したモデル細胞に投与したところ、CLIP-ON濃度の変化をRT-qPCRで確認した。特定のcircRNAの増大はcircRNAに特徴的な3'-to-5'の結合(Back-splicing junction)で定量することができ、投与したCLIP-ONの濃度に依存的な標的circRNAの選択的増大を確認した。またCLIP-ONの構造活性相関も行い、上流と下流のイントロンとそれぞれ12量体分は相補性があること、それらの相補部位は1bp以上の長さのリンカーが必要であることが確認された。

担当者 山田 剛史 所属 東京科学大学 専門 有機化学、核酸医薬、RNA標的低分子

一言 担当者は本論文のセカンドオーサーです。本論文はアンチセンスオリゴ(ASO)を用いていますが、担当者はこれまでASO・siRNA・ヘテロ核酸・RNA結合性低分子など様々なモダリティでRNA標的ケミカルバイオロジーに取り組んで来ております。現在は東京科学大 核酸・ペプチド創薬治療研究センター(TIDEセンター)に所属し、本邦発祥の核酸医薬であるヘテロ核酸の実用化に向けた研究開発に取り組んでいます。週の半分以上はアイパークで仕事をしておりますので見かけたら気軽に声をかけてください。X(旧twitter)もやってます。(たけ@YamTke)

yamada.takeshi@tmd.ac.jp

AIを用いた創薬/バイオマーカー探索

Takamochi et al., BMC Cancer, 2016,
DOI: 10.1186/s12885-016-2792-1
Rodriguez et al., Nat Commun, 2021,
DOI: 10.1038/s41467-021-21330-0

キーワード

- 非小細胞肺がん
- CAGE
- SPATS2
- ST6GALNAC1
- アルツハイマー病
- ドラッグリポジショニング
- ランダムフォレスト
- JAK-STAT

要 旨

AI(machine learning)を用いて非小細胞肺がんの腺がんと扁平上皮がんを鑑別するバイオマーカーを腫瘍細胞の遺伝子発現データから探索

従来のマーカーの精度は70%だったが97%以上の精度のマーカーを検出

既存の他の疾患治療薬からアルツハイマー病の治療にも効果が期待できるものをAIと遺伝子発現データを用いて検出

検出された候補薬はJAK阻害剤が多かった

背景

肺の非小細胞がんには主に腺がんと扁平上皮がんがあり、治療方針が異なることから精確な鑑別が必要です。従来の鑑別マーカーの精度は70%でそれほど高いとは言えないため、新規に精度の高いバイオマーカーを探索することになりました。
近年、既存薬を転用して新たな疾患の治療薬として開発するドラッグリポジショニングに注目が集まっています。ドラッグリポジショニングは費用や期間の面から開発コストの削減が期待でき、アルツハイマー病のようなメカニズムが未だ明確でない疾患でも開発が期待できます。先行研究の知見と公開遺伝子発現データからAIを用いたアルツハイマー病にも治療効果が期待できる既存薬の探索を行いました。

SPATS2とST6GALNAC1の組み合わせにより97%以上の精度でがん種別を鑑別

すべての分化度の腫瘍細胞を一括して扁平上皮がんと線がんの遺伝子発現レベルを比較しても有効なマーカーは検出できなかった。分化度の高い細胞と低い細胞では遺伝子発現パターンが大きく異なり、また分化度の低い細胞では鑑別がより困難であることから、分化度の低い細胞に絞って扁平上皮がんと線がんを比較した。有意に発現差が見られた遺伝子の発現データを決定木に入力してマーカーの探索を行った。その結果、SPATS2とST6GALNAC1を組み合わせたカクテルマーカーによって97%以上の精度で扁平上皮がんと線がんを鑑別することができた。

複数のJAK阻害剤がアルツハイマー病にも治療効果が期待できるとして検出された

ROSMAPやMSBBなど公開されているアルツハイマー病患者の脳細胞の遺伝子発現データをrandomforestに入力して既存薬からアルツハイマー病にも治療効果が期待できる治療薬を探索した。可能性が高い既存薬はJAK阻害剤が多かった。ドラッグリポジショニングの評価が高いJAK阻害剤はJAKのbinding affinityも高く、インターフェロン誘導性遺伝子の発現を強く阻害していることが分かった。AIを用いたドラッグリポジショニングはゲノム全体を解析対象とするため先行研究などから得られるバイアスを除外できる一方、アルツハイマー病などの治療では血液脳関門を通過するかどうかなどの追加の検証が必要となる。

担当者 大宮 寛子 所属 武田薬品工業株式会社 専門 バイオインフォマティクス、量的遺伝学、神経系疾患

一言 今回紹介した肺がんの論文は実際に解析を担当した研究で、創薬の世界ではバイオロジーの視点からAIを応用した成功例がまだ少ないため紹介させていただきました。近年2型糖尿病治療薬がアルツハイマー病にも予防的効果が期待できるという報告があり、実際にドラッグリポジショニングの成功例が出てくるかもしれません。

hiroko.ohmiya@takeda.com

新規pH応答性タンパク質の構造予測に基づく設計と特性評価

Shen et al, Nature Nanotechnology. 2024 Jul;19(7):1016-1021.

キーワード

- タンパク質の構造予測
- *De novo*デザイン
- pH応答性タンパク質

要旨

生物はpHの変化を利用してタンパク質の構造や機能を制御する。この研究では、pH応答性のタンパク質フィラメントを*de novo*デザインし、環境に適応するナノ構造を作り出すことを目指した。

His残基を介したタンパク質内の水素結合ネットワークの設計により、pH変化で水素結合の様式、さらにタンパク質の構造が変化するように設計した。

筆者らが過去に構築したRosetta HBNetを始めとした複数のモデルを用いて、タンパク質フィラメントを設計し、pHによってフィラメント構造が変化するタンパク質を生み出すことに成功した。

背景

近年、計算機を用いたタンパク質の*de novo*設計技術は飛躍的に発展しており、特定の構造や機能を持つタンパク質を原子レベルの精度で設計することが可能になっている。これにより、天然には存在しない新しい機能性タンパク質を創出する道が開かれている。

先行研究では、pH応答に依存して構造を変化するタンパク質およびそのオリゴマーの構造予測・デザインを行っており、His残基を介した水素結合ネットワークの予測に、Rosetta HBNetを用いることでタンパク質のデザインが可能であることを示している。

本研究では、より高次のマイクロメートルスケールに及ぶヘリカル構造体であるフィラメントを、pH変化に応答して可逆的に自己集合・解離するように*de novo*設計することを目的としている。

pH応答性タンパク質からなるフィラメントの設計

先行研究で取得していたpH応答性オリゴマーを形成するタンパク質pRO-2に対して、オリゴマーがフィラメント形成する際に重要な対称性の削減を目的に、新規のタンパク質pRO-2.3を設計した。このpRO-2.3が形成するオリゴマー同士が超螺旋構造を形成するように、オリゴマー界面のデザインを行い、そのオリゴマーを形成するタンパク質を設計すべく、Rosettaを用いて配列最適化を実施した。これらの最適化により候補となるフィラメントを18デザインに絞り込むことに成功した。

設計したタンパク質フィラメントの実際の構造解析

18デザインのうち、実際に発現させたタンパク質がフィラメントを形成したのは、2つのみであった。そのうち、DphF18は実際のフィラメントのクライオ電顕像と、計算上で設計されたフィラメントが良い一致を示し、*de novo*デザインの妥当性を示した。またDphF18が形成するフィラメントは、オリゴマー同士の予期せぬ疎水性相互作用により、オリゴマーが形成する2重鎖が逆平行であったが、この疎水性相互作用をキャンセルするような変異を入れることで、平行な2重鎖を形成するDphF19を取得した。

設計したタンパク質フィブリルのpH応答性評価

DphF18を始めとした3種類のタンパク質からなるフィブリルのpH依存的な長さを評価したところ、pH3-3.5を境にフィブリル長が変化し、さらに低pH条件で一度分解したフィブリルが再度高pH条件に戻すとフィブリルが形成されることが確認された。またpH変化によるフィブリル長の変化は数ms程度の短い時間で起きること、数nm程度の局所的なpH変動に応じて構造変化が起きることが示唆された。

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 2024年にノーベル賞を取得したDavid Baker博士のラボから出ている論文をとりあげました。今回のようなタンパク質骨格が比較的剛直なものであれば、pHに依存して構造を変化するタンパク質・およびその多量体であるフィラメントを*De novo*設計できることを確認した報告で、分野外ながら面白く拝読させていただきました。

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

LLMが睡眠および活動を調節する分子シグネチャの発見を促進する

Peng et al., Nat. Commun. 2024,
DOI: 10.1038/s41467-024-48005-w

キーワード

- LLM(Large Language Model)
- 動物行動解析
- 社会活動
- 行動
- 睡眠

要 旨

睡眠、運動および社会活動の基盤となる遺伝子をショウジョウバエで探索した。ハエの行動パターンの分析と全ゲノムスクリーニングにより758の関連遺伝子が特定された。

LLM-reasoningに基づき、これらの関連遺伝子間のネットワークをモデル化し、睡眠、運動および社会活動を制御する包括的なモデルを提示した。

背景

近年様々な課題がAIにより解決されるようになってきた。特にLLMは自然言語による複雑なタスクを解くことができ、その性能が注目されている。一方で、LLMが科学研究を促進するためにどのように活用できるかはほとんど明らかにされていない。また、動物にとって不可欠な行動である睡眠、移動および社会活動とこれらの相互関係およびその基礎となるメカニズムは、その複雑さもあって十分に理解されていない。本研究ではLLMを利用することで、これらの活動のメカニズムや相互関係を明らかにすると同時に、LLMの科学研究における有用性を検証する。

LLM(GPT3.5)は追加学習なしにショウジョウバエの遺伝子名とその機能を把握していた

LLMの持つ知識を確認するためにショウジョウバエから知られている約4万のアイソフォーム名をLLMに尋ね、各アイソフォームが睡眠、移動および社会活動の調節に潜在的にどのように関わっているかを説明させた。その結果、LLMはタンパク質の機能が既知かどうかを判断できた。この際の偽陰性率は20%程度、擬陽性率は10%程度だった。偽陰性率は高いが偽陽性率は低く、文献検索や要約においてLLMの有用性を支持する結果となった。

集団飼育したショウジョウバエの行動を観察することで、睡眠等の行動を制御する新規の遺伝子を発見した

睡眠、移動および社会活動に関わる遺伝子を探索するため、ショウジョウバエのトラッキング用の装置を開発し、約7千の変異系統の行動を記録した。この際、同じプレート内に同系統の複数個体を入れ、睡眠、移動および社会活動のパターンが他と著しく異なる系統を探した。その結果、758の関連遺伝子が特定され、同種他個体の存在時のみ睡眠時間が長くなる現象とその原因遺伝子(*mre11*)や、新たな睡眠制御遺伝子(*NELF-B*)を発見した。また、これら2遺伝子の作用機序を実験により明らかにした。

LLMを利用することで、発見された新規の遺伝子を含む遺伝子間相互作用のネットワークを再現することができた

行動解析によって行動を制御することが分かった遺伝子間の相互作用を探索するため、これらのすべての遺伝子の組に関して潜在的な相互作用があるかどうかをLLMに質問し、その解答をもとにネットワーク図を作成した。今回新規に作用機序が明らかになった2遺伝子もその相互作用する遺伝子が推定され、実験によりこの相互作用が裏付けられた。これらの相互作用は従来知られておらず、LLMの能力を裏付ける結果となった。

担当者 茶木 慧太 所属 エルピクセル株式会社 専門 動物行動解析、進化生物学、ゲノミクス

一言 近年発展が著しいLLMを実験やその結果の解釈に利用した論文を紹介しました。この発表をした後もLLMの性能は上昇していますので、ここで紹介された以上のことができるようになっているものと思われます。一度自分のデータでいろいろと試してみるのも面白いかもしれません。

keita.chagi@lpixel.net

小脳のゼブリン-II細胞サブタイプの調節異常がポリグルタミン失調症で確認された

Luke C. Bartelt *et al.*, Sci Transl Med. 2024, DOI: 10.1126/scitranslmed.adn5449

キーワード

- Cerebellum
- CAG-polyglutamine repeat
- Spinocerebellar ataxias
- zebrin-II

要 旨

ルーク・C・バーテルトらは、SCA7の病態メカニズムを解明するため、プルキンエ細胞の濃縮とSCA7-266Qマウスおよび患者由来単一核RNAシーケンシングを実施した。その結果、ゼブリン-II PCサブタイプにおける遺伝子発現異常が見出され、抑制性シナプスの増加およびPCのスパイキングの減少が確認された。これらの所見は、SCA7ならびに他のポリグルタミン失調症に共通する病理学的特徴として考えられ、さらなる遺伝子解析がポリグルタミン失調症の病態解明に役立つと考えられる。

背景

この研究は、ポリグルタミン病と呼ばれる遺伝性神経変性疾患の一つである**脊髄小脳失調症7型(SCA7)**に焦点を当てている。SCA7は、CAGポリグルタミンリピートの拡張によって引き起こされる疾患で、特に小脳のプルキンエ細胞(PC)の機能に影響を与えることが知られている。プルキンエ細胞は小脳の唯一の出力神経細胞であり、小脳の機能にとって重要だが、その細胞数が全体の数パーセント以下と少ないため、従来のシーケンシング技術ではトランスクリプトームを十分に解析することが困難だった。

ゼブリン-II PCサブタイプの遺伝子異常と症状の発現

研究者たちは、PCの核を濃縮するプロトコルを開発し、SCA7のマウスモデルおよび患者由来の個々の核を抽出した。これにより、SCA7-266Qマウスのシングル核RNAシーケンシング解析を行い、細胞種特異的な遺伝子発現の異常がグリア細胞やPCに影響を与えていることを明らかにした。特に、ゼブラ状に発現しているゼブリン-II PCサブタイプの遺伝子が最も多くの異常を示し、症状の発現と関連していることが分かった。

SCA7の病理学的特徴

この研究は、SCA7の病理学的特徴として、ゼブリン-II PCサブタイプの調節異常が共通していることを示唆しており、ポリグルタミン病の理解と治療に向けた重要な一歩となると考えられる。また、QKI遺伝子の機能回復がグリア細胞の機能改善に寄与する可能性が示唆されている。この知見を基にした治療法の研究が進められる可能性があり、さらなるQKI遺伝子の研究も期待される。

ヒトへの応用

この研究結果から、ゼブリン-II PCサブタイプの調節機構や、SCA7におけるシナプス再編成の具体的なメカニズムを解明するための継続的な研究により、より詳細な病態理解が進み、新たな治療ターゲットが見つかる可能性がある。また、マウスモデルで得られた知見を基に、ヒト患者における同様の現象を確認し、臨床応用への道を探る研究が進められることが期待される。特に、ヒトの小脳組織を用いた研究や、患者由来のiPS細胞を用いた研究の進展が注目される。

早期診断のためのバイオマーカーの探索

ゼブリン-II PCサブタイプの遺伝子発現の変化が早期に観察されることから、これらの遺伝子をバイオマーカーとして利用し、SCA7の早期診断や進行度のモニタリングに役立てる研究が進展する可能性がある。

担当者 下林 悦子 所属 武田薬品工業株式会社 専門 神経系疾患、分子生物学

一言 今回紹介した論文は、脊髄小脳失調症タイプの中でも報告の多いポリグルタミン病の病態メカニズムに焦点を当てています。ハンチントン病なども同様のポリグルタミン病に分類され、ポリグルタミン病は疾患患者数も多く早急に有用な治療法が望まれています。ゼブリン-IIは小脳でパラサジタルストライプ(縦方向の縞模様)を形成するとてもユニークな分子で神経科学や遺伝学の分野で非常に興味深く研究されており個人的にも興味のある分子ですが、ゼブリン-IIはまだ謎も多いのでシングルセルレベルでの解析が期待されます。

etsuko.shimobayashi@takeda.com

近接誘導型核酸デグレーダーを用いた低分子化合物による標的RNAの分解

Mikutis et al., ACS Cent Sci, 2023,
DOI: 10.1021/acscentsci.3c00015

キーワード

- 近接誘導型核酸デグレーダー（PINAD）
- SARS-CoV-2ゲノム
- RNAバインダー
- RIBOTAC
- リボヌクレアーゼL
- G-quadruplex（G4）
- Pseudoknot

要 旨

PINADは低分子で標的RNAを分解する新手法として開発。

SARS-CoV-2のG-quadruplexとpseudoknotを標的とする2種のPINADを設計。

In vitro、in cellulo、in vivoモデルでSARS-CoV-2RNA分解を実証。

RNAバインダーにデグレーダー活性を付加することで従来標的化が困難であった疾患関連RNAに対する創薬の可能性を拡大。

背景

RNAは構造を持つ生体分子であり、特定のRNA構造が疾患に関連する。ヒトゲノムの大部分がRNAに転写されるが、約3%のみがタンパク質に翻訳され、疾患に関連するRNA種はタンパク質より多い可能性がある。天然物由来の治療薬はRNAに結合して作用し、抗生物質（テトラサイクリン等）は16SrRNAに結合して翻訳を阻害するが、変異で耐性が生じる。RNAバインダーを二機能性分子（e.g., RIBOTACs）に変換しRNAを分解する手法が試みられたが、リボヌクレアーゼL濃度や分子量の問題で限界がある。そこで、MikutisらはPINADを開発し、RNAバインダーとイミダゾールを柔軟なリンカーで連結し、SARS-CoV-2RNAを標的として分解効果を実証した。

PINADの設計

PINADの設計では、RNA構造に結合する既存のリガンドを基に、2種類のPINADとコントロール化合物をデザインした。G4に対しては、nM程度で優れた選択性とK_Dを持つpyridostatin（PDS）を選び、pseudoknotには、in silicoスクリーニングで見つかったMTDBを選択した。PDSには2種類の長さの異なるデグレーダーを導入し、リンカーの長さが効果に与える影響を調べた。MTDBのデグレーダーでは効率的なリンカーを使用し、弱いpseudoknotバインダーTDBから弱い誘導体を作成した。

PINADの結合親和性

PINADの結合親和性とデグレーダー機能化の影響を評価した。蛍光消光アッセイを使用し、G4モデルに結合する親和性を調べた結果、PDSは26nMのK_Dで最も強い結合を示した。MTDBはMST法で評価され、56.1μMのK_Dを示し、デグレーダー機能化したMTDB-imi6は16.6μMのK_Dを示し、結合親和性の向上が確認された。デグレーダー単独では、G4やpseudoknotとの結合はmM濃度でのみ観察され、親和性の推定はできなかった。

PINADのin vivoでの活性

PINADの抗ウイルス活性を、SARS-CoV-2に感染したVERO-CCL-81細胞を用いて検討した。PDS-imi6は、1μMのIC50でウイルス複製を抑制したが、細胞の生存率には影響を与えなかった。MTDB-imi6は、SARS-CoV-2 pseudoknotに選択的に結合し、感染後に顕著な抗ウイルス効果を示した。特に、MTDB-imi6は、SARS-CoV-2のアルファおよびデルタ株に対しても有効だった。これらの結果は、PINADがSARS-CoV-2治療薬開発に役立つ可能性を示唆している。MTDB-imi6は、SARS-CoV-2に感染したマウスモデルで肺のウイルス負荷を有意に低下させた。MTDB-imi6（25mg/kg）投与群は、コントロール群に比べてウイルス量が減少し、p38 MAPKのリン酸化レベルも低下した。

担当者 森下 えら 所属 Veritas In Silico 専門 RNA標的創薬、構造生物学、インフォマティクス

一言 今回紹介した論文では、RNA構造をターゲットにしたPINADがSARS-CoV-2の特定のRNA構造を選択的に分解し、抗ウイルス効果を示すことが明らかにされました。特に、MTDB-imi6はアルファおよびデルタ株にも有効であり、今後の治療薬開発において大きな可能性があると感じました。

ecm@vi14si.com

マウスB細胞がIgG-Fcγ受容体を介して、神経障害性疼痛を制御している

Lacagnina et al., Sci. Transl. Med., 2024,
DOI: 10.1126/scitranslmed.adj1277

キーワード

- 神経障害性疼痛
- アロディニア
- 脊髄後角
- 後根神経節(DRG)
- B細胞
- 免疫グロブリンG(IgG)
- 免疫グロブリンFcγ受容体

要 旨

末梢神経損傷後のアロディニア(異痛症)発症にB細胞が関与していることをマウスモデルで示した。

B細胞欠損マウスや抗CD20抗体によるB細胞除去でアロディニアは抑制された。

神経損傷側のDRGおよび脊髄後角でIgGの蓄積が確認された。DRGではマクロファージや感覚神経と、脊髄後角ではミクログリアと共局在していた。

Fcγ受容体を介したIgGの作用が疼痛感受性に関与し、Fcγ受容体欠損マウスではアロディニアが発生しなかった。

背景

末梢神経損傷後に生じる神経障害性疼痛には、神経・グリア・免疫細胞の相互作用を含む神経免疫ネットワークが関与している。これまでマクロファージやT細胞の関与は示されてきたが、B細胞の役割は不明であった。B細胞は抗体産生や抗原提示を通じて自己免疫応答を引き起こすことがあり、神経損傷により免疫寛容が破綻する可能性がある。実際に、神経損傷後には自己抗体の産生やFcγ受容体を介した痛覚過敏が報告されている。そこで本研究では、坐骨神経損傷モデル(CCIモデル)を用いて、B細胞が神経障害性疼痛、特に機械的アロディニアの発症に与える影響を検討した。

B細胞は末梢神経損傷後の機械的アロディニアの発症に関与する

CCI処置後早期(3日目)に抗CD20抗体を投与し、B細胞を除去することで疼痛閾値の低下(機械的アロディニア)が抑制された。一方、遅い(7日目)投与では疼痛閾値は低下したままだった。また、成熟B細胞が欠損したマウスにおいても、CCI処置後の疼痛閾値の低下に対して抵抗性を示した。B細胞が神経障害性疼痛の発症に関与することが示唆された。

神経損傷はDRGと脊髄後角へのIgG蓄積を誘導する

マウスへのCCI処置によってDRGへのIgG沈着が増加した。また、IgGシグナルはマクロファージと神経細胞との共局在を示した。脊髄後角においても同様にCCI処置によってIgG沈着が増加した。特にIgGシグナルはミクログリアと共局在を示した。更にヒト慢性疼痛患者のDRGにおいてもIgGシグナルが増加していることを確認した。

末梢神経損傷後のIgGは疼痛を誘発する

CCI処置後14日目のWild-type(WT)マウス血清からIgGを精製し、CCI処置後の成熟B細胞欠損マウスに髄腔内投与すると疼痛閾値が低下した。一方、無処置のマウス血清から精製したIgGを投与しても疼痛閾値は低下しなかった。更にCCIマウスのIgGを無処置の成熟B細胞欠損マウスに投与しても疼痛閾値の低下は見られないことからPassive transferだけでは機械的アロディニアは生じないことがわかった。

Fcγ受容体は末梢神経損傷後の機械的アロディニアと神経細胞の活性化に関与する

FcRγノックアウトマウスはCCI処置後の疼痛発症に抵抗性を示した。更にCCI処置後14日目にDRGから神経細胞を単離し、ホールセルパッチクランプを実施したところ、CCI処置によって神経発火が増加し、FcRγノックアウトマウスではその増加が抑制された。CCI処置後14日目のWTマウス血清からIgGを精製し、CCI処置後のFcRγ欠損マウスに髄腔内投与しても疼痛閾値は変化が見られなかった。

担当者 下田 嵩央 所属 旭化成ファーマ株式会社 専門 in vitro評価、薬理(疼痛、自己免疫疾患)

一言 これまでも慢性疼痛における神経細胞と免疫細胞のクロストークについては報告がされていました。線維筋痛症において自己抗体が慢性疼痛に関与する可能性などが報告されていましたが、今回の研究によってB細胞がFcγ受容体シグナルを介して神経障害性疼痛の発症に関与することがわかりました。この研究によって更に神経障害性疼痛の理解が進み、より良い薬の創出に繋がることを期待したいです。

shimoda.th@om.asahi-kasei.co.jp

クリックケミストリー反応の速度とバイオメディカル応用への適合性の検討

Bioconjugate Chemistry 35.6(2024): 715-731.
DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.4c00084

キーワード

- クリックケミストリー
- 生物医学(Biomedical Application)
- 反応速度
- 生体直交化学
- Inverse Electron Demand Diels–Alder reaction (IEDDA)
- Strain-Promoted Azide–Alkyne Cycloaddition(SPAAC)
- Copper(I)-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition(CuAAC)

要旨

クリックケミストリー反応において、反応速度が応用場面ごとに最適な反応選択に直結する重要因子であることを明確化した。

特にバイオメディカル応用(標識、ドラッグデリバリー、プロドラッグ放出など)においては、単なる速さではなく、目的に応じた適切な反応速度・安定性・副反応回避性が重要であることを示した。

本レビューは、研究者が各応用に最適なクリック反応を合理的に選択するための指針となり、今後の診断・治療技術の設計に貢献することが期待される。

背景

クリックケミストリーは、簡便・高収率・選択性の高さから広く利用され、特にバイオメディカル分野(繊細なバイオ医薬の製造・生体内変化の検出・デリバリーへの応用など)でも応用が拡大している。しかし、これまで「速い反応ほど良い」という単純な基準で反応選択されることが多く、応用の成功率や副反応回避に課題があった。本研究では、クリック反応を反応速度ごとに整理し、それぞれのバイオメディカル分野への応用における適性を系統的に検討・提案している。

クリックケミストリーの反応速度・特性・用途適性の整理(代表的なもの)

Cycloadditions(環化付加反応): CuAAC(速い)、SPAAC(中〜高速)、IEDDA(超高速)
Non-aldol Carbonyl Reactions(非アルドール型カルボニル反応):オキシム・ヒドラゾン形成(遅い)
Additions to C=C multiple bonds(炭素-炭素多重結合への付加):チオール・エン反応(中〜高速)
Staudinger Ligations(シュタウディンガー反応):遅い

反応速度ごとの実際の応用例

高速反応(IEDDAなど)がん標的治療薬のプレターゲティング、生細胞イメージング(例:IEDDAによる脂質可視化)
中速反応(SPAACなど)細胞追跡・長期イメージング(ex.投与細胞の生体内追跡)、DNAラベリング・多重遺伝子検出
低速反応(Staudingerなど)プロドラッグ活性化(例:ドキソルビシンプロドラッグ)、長時間にわたる糖鎖イメージング(例:生体内糖鎖標識)

まとめ

「速ければ良い」わけではない:生体応用では、反応速度と同時に、反応生成物の安定性、副反応回避、ターゲット選択性が重要。例えば早い反応は触媒が必要・脂溶性が高い・安定性が低い・副反応が多いなど、いずれかの欠点を持っている。
用途ごとの最適反応例がある:①即時反応が必要な場合(例:短寿命放射性プローブ合成)→高速クリック(IEDDA)②副反応を抑えた高感度標識が必要な場合(例:細胞追跡)→中速〜低速クリック(SPAAC, Staudinger)③生体内で局所活性化が求められる場合(例:プロドラッグ)→低速クリック(Staudinger)
今後の展望:反応速度と安定性を両立した新規反応の開発も進展しており、クリックケミストリーはさらにバイオメディカル応用の幅を広げると期待される。

担当者 内野 祐次郎 所属 Axcelead Drug Discovery Partners株式会社
専門 メディシナルケミストリー、中分子創薬(ペプチド・核酸)
一言 最近はJMC(Journal of Medicinal Chemistry)でも中分子、抗体、細胞なども絡めた複雑な分子の報告が増えており、メドケムとはなんだろうと考えるようになっております。
yujiro.uchino@axcelead.com

画像と人工知能を応用した動物実験のDX化

Kishi et al., Behav Brain Res, 2025,
DOI: 10.1016/j.bbr.2024.115278
Miyazaki et al., J Pharmacol Sci, 2023,
DOI: 10.1016/j.jphs.2023.08.005
Sakamoto et al., Front Behav Neurosci, 2023,
DOI: 10.3389/fnbeh.2022.1086242
Sakamoto et al., Nihon Yakurigaku Zasshi, 2023,
DOI: 10.1254/fpj.22126
Sakamoto et al., Front Physiol, 2022,
DOI: 10.3389/fphys.2022.939281
Miyazaki et al., J Pharmacol Sci, 2022,
DOI: 10.1016/j.jphs.2022.04.002
Sakamoto et al., Front Behav Neurosci, 2022,
DOI: 10.3389/fnbeh.2022.797860
Kobayashi et al., Sci Rep, 2021,
DOI: 10.1038/s41598-020-79965-w
Kobayashi et al., J Pharmacol Sci, 2020,
DOI: 10.1016/j.jphs.2020.02.003

キーワード

- 動物実験
- 行動解析
- 人工知能（AI）
- 画像解析
- 動物福祉
- DX

要旨

動物実験はライフサイエンス研究の基盤であるが、観察者の主観や労力、再現性、ヒトへの外挿性、動物福祉といった課題が多く存在する。

著者らはこれらを解決するため、画像解析とAIを用いた実験動物の行動解析技術を開発してきた。

本稿では、撮影・データ解析環境の構築、自発運動や部位・表情識別、行動識別、多頭追跡、複合行動検出の技術を紹介し、動物実験のDX化による研究効率と精度の向上を提案する。

背景

動物実験は、ライフサイエンスや医学研究における重要な基盤であり、疾患モデル動物を用いた研究は病態解明や新規治療法の開発に貢献している。しかし、評価が観察者の主観に依存しやすく、再現性や客観性に課題がある。また、長時間の観察が必要となるため、人的リソースやスループット性が制限される点も問題である。さらに、動物とヒトの生理的な違いにより、得られた結果のヒトへの外挿性が低い場合があり、動物福祉の観点からも、苦痛を与える実験手法の見直しが求められている。近年、画像解析や人工知能（AI）の進展により、動物行動や生理状態の客観的かつ高精度な評価が可能となってきた。これらの技術を導入することで、動物実験の再現性や効率性を向上させるとともに、動物福祉に配慮した研究が実現できると期待されている。

動物実験のDX化を可能にする6つの基盤技術

我々は、マウスやラットの行動解析の精度向上と効率化を目的として、6つの技術を開発してきた。

①撮影環境の構築：飼育ケージや照明、カメラシステムを整備し、誰でも高品質な行動データを取得できる撮影システムを確立した。高解像度動画を長時間撮影・転送できるファイル転送システムも構築し、標準化された解析環境を提供できるようにした。

②自発運動評価：ケージ内を自由に動き回るマウスの重心座標を映像から取得し、移動距離や速度、行動リズムを数値化する手法を確立した。これにより、疾患モデルや薬剤投与による行動変化を客観的に評価できるようになった。

③特徴点識別：深層学習を用いてが動物の体の特徴点を、追跡できるようにした。姿勢や四肢の動き、表情を自動検出し、歩容や痛みに伴う表情を解析する技術を開発した。痛み誘発後の表情変化から状態を推定できるため、鎮痛薬の効果評価などに応用している。

④行動識別：ひっかき行動やグルーミング行動などの特定行動を自動で抽出・定量化するシステムを構築した。深層学習による行動分類器を作成した。行動の頻度やタイミング、パターンまで詳細に分析できるため、評価のスループット性と信頼性の向上が実現した。

⑤個体識別：多頭追跡技術を開発し、複数個体を同時に識別・追跡することで、社会的相互作用や個体ごとの行動特性を評価できるようにした。マーカーレス識別技術を活用し、自然な行動環境下でも個体ごとの行動解析が可能となった。

⑥マルチモーダル解析：以上の技術を組み合わせ、複合的な行動の検出を実現している。行動の連続性や個体間相互作用といった複雑な行動パターンを長時間解析することで、微細な行動変化や疾患兆候を捉え、動物行動の全体像を把握することが可能となった。

担当者 村田 幸久　所属 東京大学大学院農学生命科学研究科　専門 免疫学、薬理学、アレルギー学、腫瘍学

一言 以上の自動検出がどなたでも使用できる汎用化システムを近日中に提供できるようになります（と信じています）。先週、盆栽サークルの顧問になりました（未経験）。

amurata@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

脳オルガノイド基盤技術開発と認知症研究への挑戦

Shimada et al., Cell Rep Methods, 2022, DOI: 10.1016/j.crmeth.2022.100289
嶋田, 岡野, 実験医学増刊号, 2024, 42,5, 183-191.

キーワード

- 脳オルガノイド
- FGF2（Fibroblast Growth Factor2）
- アルツハイマー病
- タウオパチー

要旨

ヒト多能性幹細胞（ES, iPS細胞）由来の脳オルガノイドは、ヒトの脳における多様な細胞の相互作用を*in vitro*で模倣しており、病態を従来の細胞モデルよりも高い精度で再現できる可能性がある。

私たちはこれまでに、アルツハイマー病（AD）モデル脳オルガノイド、タウオパチーモデル脳オルガノイドを作製してきた。

しかしながら、より病態を模倣するモデルを構築するには、克服すべき技術的課題がある。そこで現在、アストロサイトを豊富に含む脳オルガノイドの開発や、脳オルガノイドのマウス大脳皮質への移植などの基盤技術を確立している。

様々な脳オルガノイド技術を応用することで、これまでの細胞モデルでは到達できなかった新たな表現型を表出できる可能性があり、認知症発症の分子メカニズムの解明や創薬研究へと発展させたい。

背景

神経、精神疾患研究において、齧歯類モデル動物を用いた研究から、多くの知見が得られてきたものの、齧歯類とヒトでは進化的に大きな隔たりがあり、再現できるヒト病態の様相は限られている。一方、患者の脳組織へのアクセスは限られていることから、認知症を始めとした神経変性疾患や、精神疾患の特徴を再現したヒト細胞モデルの開発は重要な基盤技術となる。ヒト多能性幹細胞（iPS細胞）技術を用いることにより、上述の問題を克服し、患者由来の細胞を用いた疾患モデリングが可能となった。iPS細胞由来のニューロンでは、神経変性が進行している状態を再現できる可能性がある。さらに、iPS細胞由来脳オルガノイドでは、多様な細胞種が存在し、ニューロンの成熟度が高く、従来の動物モデル、細胞モデルよりも、ヒトの病態を反映した新たなモデルの開発が可能になることが期待される。そこで認知症モデル脳オルガノイドの作製を試みた。

低濃度FGF2による、効率良い前脳オルガノイドの作製

iPS細胞の培養にはFGF2が必須であり、フィーダーフリーiPS細胞の培地は高濃度のFGF2を含んでいる。フィーダーフリーiPS細胞の高い増殖能や未分化維持能力が、脳オルガノイドへの分化誘導効率に及ぼす影響を懸念し、培地中のFGF2の濃度を下げてみたところ、脳オルガノイドの前段階にあたる胚葉体の形成効率が安定し、多くの神経上皮様構造の形成が確認され、前脳オルガノイドを効率良く作製することが可能になった。

アルツハイマー病（AD）モデル脳オルガノイド、および、タウオパチーモデル脳オルガノイドの作製

プレセニリン1、または、プレセニリン2に変異を持つAD患者由来iPS細胞から前脳オルガノイドを作製したところ、分化誘導開始から120日目のAD患者由来脳オルガノイドにおいて、Amyloid β（Aβ）プラーク様の構造が観察された。また、培養液中に分泌された凝集性の高いAβ42のAβ40に対する割合が有意に増加していることが明らかとなった。従って、AD患者由来脳オルガノイドでは培養日数に依存して自発的にAβ病理が出現してきたと考えられた。しかしながら、タウ凝集体形成の初期段階の特徴であるリン酸化タウが増加している一方で、タウの病理学的構造変化には至らなかった。そこで、アデノ随伴ウィルス（AAV）を用いて高い凝集能を持つP301L変異が導入されたタウを脳オルガノイドに過剰発現させたところ、免疫染色でタウ凝集体の存在が示され、チオフラビンS染色により、タウ凝集体はクロスβ構造を特徴とするアミロイド構造であること、また、免疫電子顕微鏡解析によりタウ線維構造の形成が確認された。よって、脳オルガノイド内において、タウオパチー患者で観察されるタウ線維構造を持つタウの凝集を再現していることが明らかとなった。

脳オルガノイド技術の今後の展開

脳オルガノイドには、血管系やミクログリアは存在せず、アストロサイトの割合が少ないという問題点がある。私たちは、脳オルガノイドのマウス脳への移植による血管化、共培養によるミクログリアを含有する神経免疫オルガノイドの作製、アストロサイトを豊富に含む脳オルガノイドの開発を行なっている。これらの技術を応用し、既存のモデルでは再現できなかった表現型を顕在化し、認知症発症や進行の分子メカニズムの解明につなげていきたい。

担当者 嶋田 弘子　所属 慶應義塾大学　専門 幹細胞生物学、神経科学

一言 この度は、iPark Science Cafeでの発表の機会をいただき有難うございました。今後も脳オルガノイドの可能性を追求し、発生学研究、精神神経疾患研究に応用していきたいと思っております。ご興味のある方は、ご連絡いただければと思います。

hiroko.z5@keio.jp

プロゲステロンにより転写制御されるB7-H4は、癌及び妊娠免疫寛容に関与する

Yu et al., Cell, 2024,
DOI: 10.1016/j.cell.2024.06.012.

キーワード

- プロゲステロン
- B7-H4
- BRD4
- 癌
- 妊娠
- 免疫チェックポイント
- 免疫寛容

要 旨

シングルセル解析により、B7-H4は複数のヒト癌種及び胎盤組織において高発現しており、マウス妊娠時の胎児再吸収だけでなく発癌にも関与する。

B7-H4の遺伝子発現には、プロゲステロンとその受容体（PR）、更にはp300、BRD4などの転写制御因子が関与する。

PR阻害剤やBRD4分解誘導剤は、B7-H4陽性のマウス乳癌モデルにおいて癌免疫療法の効果を増強する。

背景

胎児の正常な発育には、母体側の免疫系が胎児を攻撃しないよう「免疫寛容」というメカニズムが関与することが知られています。また最近では、癌の発生及びその進行にも免疫寛容が関与し、T細胞が重要な役割を果たしていることも報告されています。今回の報告にあるB7-H4は、抑制性B7ファミリーメンバーの一種で、免疫チェックポイント分子であると考えられています。また、癌患者の中には免疫チェックポイント阻害療法に抵抗性を示す例が知られており、B7-H4の高発現は癌患者の生存期間の短縮と相関するという報告もあります。著者らは、妊娠維持だけでなく発癌にも関与するB7-H4を免疫チェックポイント療法の不応の要因として着目し、本成果につなげています。

B7-H4は婦人科系癌及び妊娠時の免疫寛容に関与する

著者らは、8報のヒト腫瘍微小環境（TME）及び6報の胎盤組織のsingle cell解析を再解析した結果、B7-H4は両組織で高発現しており、中でも乳腺、卵巣、子宮内膜などの女性生殖系の癌で高頻度であった。そこで、B7-H4 KO雌マウス（C57BL/6）と野生型雄マウス（BALB/c）を同種異系交配した結果、KOマウスではWTマウスよりも胎児再吸収が多く、再吸収箇所の胎盤では、活性化型T細胞の浸潤が高頻度で認められた。更にT細胞を欠損させたB7-H4KO雌マウスでは、胎児吸収率はWTと同程度であったため、胎児再吸収（免疫寛容）にはB7-H4が重要な役割を果たしていることが示唆された。また、合成プロゲステロンであるMPAと発癌性物質であるDMBAの併用によるマウス乳癌モデルを用いてB7-H4の影響を検討した。MPA+DMBA併用におけるB7-H4 KOマウスは、WTマウスに比べ腫瘍結節が少なく、その進行が遅く、生存期間も長かった。なお、DMBA単独投与ではWTマウスとの生存率に差は認められず、プロゲステロンとB7-H4が協調的に作用し、癌の発生、増殖を促進していることが示唆された。

B7-H4発現制御にはプロゲステロンシグナルが関与する

B7-H4の遺伝子発現制御には、プロゲステロンとその受容体（PR）を介した転写制御が関与していることを、乳癌細胞株や胎盤関連の細胞で確認した。その発現制御にはPromoter領域よりもEnhancer領域の寄与が大きく、更にp300やBRD4といったヒストン制御因子も転写に関与していることを解明した。

プロゲステロンシグナルの遮断は免疫療法を増強する

前述のMPA+DMBAのマウス乳癌モデルにおいて、PRの阻害剤（RU486）と抗PD-L1の併用は、それぞれの単独療法よりも抗腫瘍効果を増強し、マウスの生存期間を有意に延長した。また、BRDの分解誘導剤（BD-9136）と抗PD-L1の併用においても、同様に増強作用が認められた。現在、抗B7-H4モノクローナル抗体単独での臨床試験では強い抗腫瘍効果は報告されていないものの、PR阻害剤との併用は新たな癌免疫療法の治療戦略になると期待される。

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 自分自身も性ステロイドホルモンを標的とした創薬研究を行ってきましたが、「妊娠維持」と「発癌」という一見関連性がなさそうな領域においても、「免疫寛容」という共通のメカニズムが存在し、そのKey FactorとなるB7-H4因子の発現制御が、女性ホルモンの1つであるプロゲステロンを介していることの奇妙な関連性に驚いています。更に、最新の癌免疫療法の効果を増強する可能性もあり、性ステロイドホルモンは古くて新しい分野で、まだまだ新たな可能性が眠っている領域であると実感いたしました。

korenaga-s@aska-pharma.co.jp

iPark Science Journal 編集委員・iPark Science Café 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
- 中島 康祐（武田薬品工業株式会社）、幹事
- 荒川 佑一（ラクオリア創薬株式会社）、幹事
- 佐藤 歩（Axcelead Drug Discovery Partners株式会社）、幹事
- 内野 祐次郎（Axcelead Drug Discovery Partners株式会社）、幹事
- 吉田 俊介（株式会社ケイファーマ）、幹事
- 岡田 亮（あすか製薬株式会社）、幹事

編集後記

- 2025年2月には純粋なスタイルのサイエンスカフェは200回を数え、岡田さん加入で運営面はさらにパワーアップ（祝^2）。（野上）

- 最近は、皆様で直接集まれる機会も増えてまいりました。対面・オンラインの双方の良さを活かしつつ、この繋がりを一層深めていければと思います。（小笠原）

- 昨年度は「湘南鎌倉総合病院医師と湘南アイパーク研究者とのラウンドテーブルトーク」を開始し、多くの高評価を得て第3回までシリーズ化しました。今年度は「アイパークカジュアルランチ会」とのコラボを実現し、参加者が増えるとともに交流の幅がさらに広がっています。今後のさらなる発展とネットワークの拡大が楽しみです。（中島）

- 最近、生成系AIの活用で作業効率や質の向上を実感しています。最先端ツールを積極的に取り入れ、サイエンスカフェの更なる発展を目指したいです。（荒川）

- 2024年は湘南鎌倉総合病院、殿町キングスカイフロントの先生方等と、病気について深く議論する場面が増えてきました。日頃の論文抄読会から、深いディスカッションまで、研究の輪を広げるお手伝いができればと思っております。（佐藤）

- 活動が広がる中で、iPark外の企業や地域の方々とも交流を持つ機会が増えてまいりました。そうした交流を通じて、創薬ビジネスや新薬がもたらす社会的インパクトについても、これまで以上に意識するようになりました。今後も、サイエンスカフェを通じて築いたつながりを大切にしながら、活動を続けていきたいと思います。（内野）

- 論文紹介をきっかけに各種イベントへチャレンジする機会が増えて、同じように興味をもっている方とのつながりができました。論文紹介という活動を大切にして、もっと気軽にサイエンスの話ができる場を目指していきます！（吉田）

- この度幹事に任命された記念に、iPark Science Journal Vol.8の表紙の色をレインボーカラーに選ばせていただきました。
  レインボーカラーは「多様性」のイメージカラーです。iParkも人種・国籍など多様性が高まってきました。
  多様な考えを尊重してイノベーションに繋げられればと思います。（岡田）

2024年度の湘南アイパークサイエンスカフェの活動

2024年度は前年度から続いたiPark外との交流がさらに活発化して、地元地域・殿町・病院とサイエンスを通して繋がりを増やせた一年となりました。2025年度も引き続きサイエンスを通して、新しい繋がりを増やせたらと考えております。

2024年　4月　　Science café-world cafe合同お花見（4/4）

2024年　5月　　湘南鎌倉総合病院医師とアイパーク研究者とのラウンドテーブルトーク Vol.1
「テーマ：GIST」（5/21）

2024年　7月　　Shonan iPark Science Journal Vol.7 発刊イベント（7/3）

2024年　8月　　しごとてん2024 in鎌倉（鎌倉エフエム主催）に「色でいろいろ遊ぶ科学実験」を題材に参加（8/25）

2024年　9月　　湘南鎌倉総合病院医師と湘南アイパーク研究者とのラウンドテーブルトーク Vol.2
「テーマ：アルツハイマー型認知症」（9/5）
湘南アイパークサイエンスカフェ特別編：殿町キングスカイフロントとの合同企画として、Anjaneyulu Dirisala先生（iCONM）のご発表（9/26）
読売新聞の医療ルネサンスに湘南アイパークサイエンスカフェの取り組みが掲載（9/30）

2025年　2月　　湘南アイパークサイエンスカフェ 開催200回（2/6）
湘南アイパークサイエンスカフェ×湘南鎌倉総合病院×殿町キングスカイフロント コラボレーションセミナー「タイトル：最新のアルツハイマー病の臨床と研究動向」開催（2/14）
湘南鎌倉総合病院医師と湘南アイパーク研究者とのラウンドテーブルトーク Vol.3
「テーマ：徳洲会メディカルデータを活用した創薬応用について」（2/27）







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/

発行元：湘南アイパークサイエンス・プレス
2025.07-E8