

【研究活動報告】

1. 消化管間葉の器官特異性と周囲環境の影響

石井泰雄、浦瀬香子、満友陽子

(統合教育学修センター・基礎科学 (生物学))

〔目的〕 口から摂取した食物は、消化管壁に分布する平滑筋の運動によって肛門側へと運ばれる。一般に消化管の平滑筋層は、内腔に近い側から粘膜筋板、輪走筋、縦走筋の3種類に分類されるが、その分布は器官ごとに少しずつ異なる。この器官特異的な配置が、内胚葉あるいはその他の環境要因によって決定されている可能性を検証するため、2020年度にわれわれはウズラ胚から単離した将来腸壁を形成する予定腸中胚葉を初期のニワトリ胚に移植する実験を行った。その結果、食道や胃の環境に置かれた予定腸中胚葉は、本来形成するはずの腸固有の *EphA3* 陽性の平滑筋層を形成しないことが明らかになり、平滑筋の器官特異性が周囲環境の影響を受けることが示唆された。この周囲環境の影響を詳しく調べるため、2021年度は平滑筋分化が起こる前の消化管で器官特異的に発現する遺伝子のクローニングおよび発現解析を行った。

〔方法〕 実験にはニワトリ胚 (*Gallus gallus domesticus*) およびウズラ胚 (*Cortunix japonica*) を用いた。消化管間葉で器官特異的に発現するとされる調節遺伝子 *Barx1*、*Six2*、*Wnt5a*、*Hoxa5*、*Nkx2.3*、*Bmp2*、*Hoxc8*³⁾⁴⁾ を、ニワトリ3日胚 cDNA を鋳型とする RT-PCR によってクローニングし、RNAプローブを合成した。正常胚および移植胚の凍結切片に対して *in situ* ハイブリダイゼーション⁵⁾ を行い、各遺伝子の mRNA を検出した。本研究で用いた移植胚は、ウズラ1.5日胚の予定腸中胚葉を卵殻内のニワトリ1.5日胚の胃形成領域に移植し、3日間孵卵したものである。移植片の検出には、ウズラ細胞に対する特異抗体である QCPN を用いた。

〔結果〕 平滑筋層がまだできていないニワトリ5日胚の消化器官における上記遺伝子の発現を、*in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて解析した (図1)。*Barx1* の発現は前胃と砂囊の両方 (胃のほぼ全体) で、*Six2* の発現は砂囊 (胃の後半部) で、*Wnt5a* と *Hoxa5* の発現は前胃 (胃の前半部) および小腸の一部で、*Nkx2.3* の発現は小腸で検出された。*Bmp2* および *Hoxc8* の発現に関しては、明確な器官特異性は認められなかった。次いで、ウズラ予定腸中胚葉をニワトリ

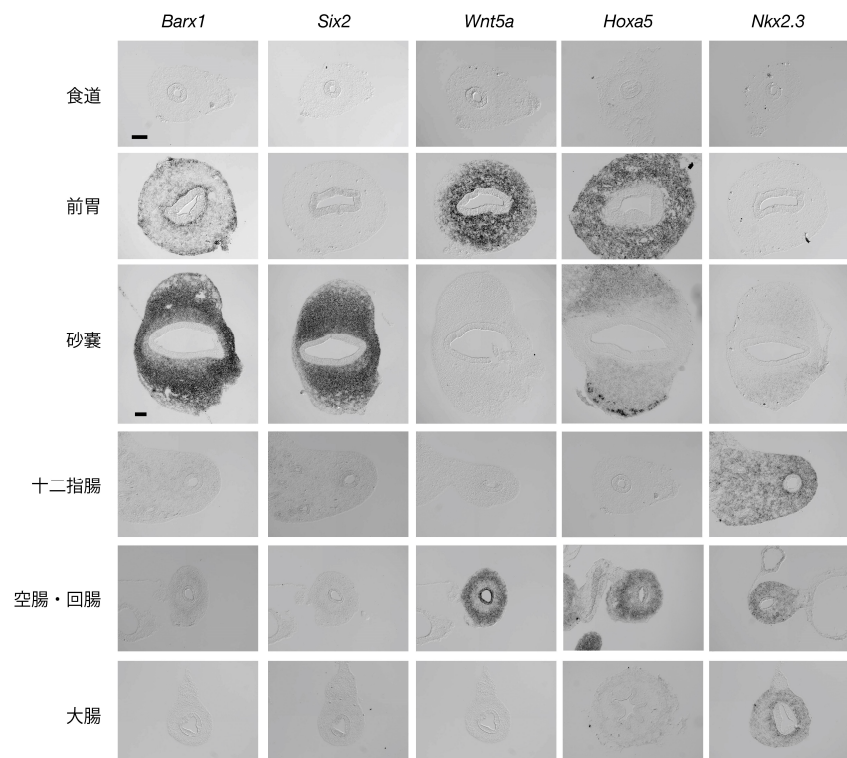


図1. ニワトリ5日胚の各消化器官における遺伝子発現。

胃形成領域に移植した移植胚 (図 2A)の解析を行った。砂嚢に移植した予定腸中胚葉には、本来発現しない *Barx1* や *Six2* の発現が認められた (図 2B-D)。前胃に移植した予定腸中胚葉には、本来発現しない *Barx1* の発現 (図 2F)および *Wnt5a* や *Hoxa5* の発現(図 2G,H)が認められた。

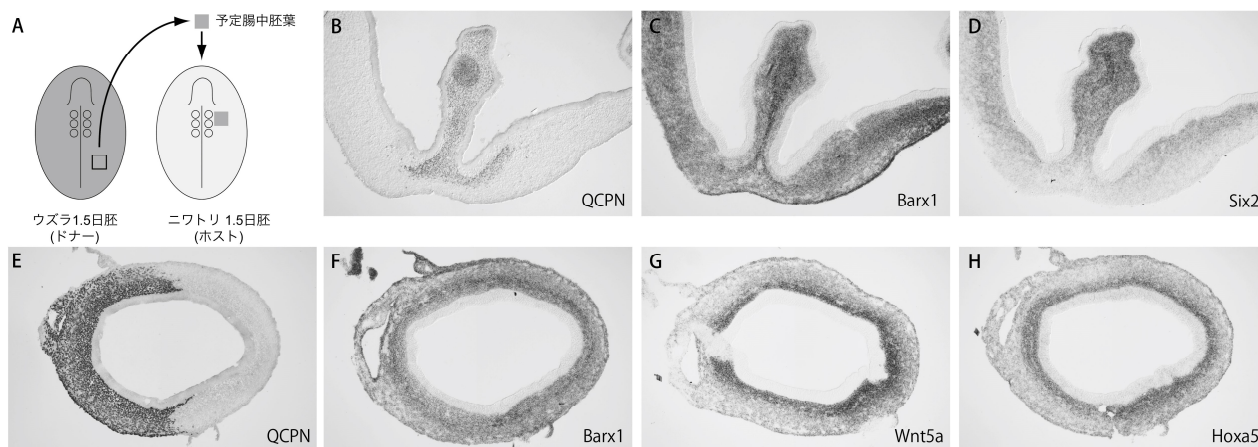


図 2. 移植実験。(A)ウズラ予定腸中胚葉のニワトリ胚胃形成領域への移植。(B-D) 砂嚢への移植。移植片(B)で本来発現しない *Barx1*(C)および *Six2*(D)の発現が認められる。(E-H) 前胃への移植。移植片(E)で本来発現しない *Barx1*(F)の発現および *Wnt5a*(G)および *Hoxa5*(H)の発現が認められる。

〔考察〕 胃形成領域に移植した予定腸中胚葉において、*Barx1*、*Six2*、*Wnt5a*、*Hoxa5* の発現が検出された。胃形成領域には胃のアイデンティティを誘導する固有の周囲環境が存在すると考えられる。今後の課題として、周囲環境と平滑筋の分化の関係、周囲環境が作用する時期や領域、周囲環境を支える組織や分子の解明などが挙げられる。

〔結論〕 *Barx1*、*Six2*、*Wnt5a*、*Hoxa5*などの調節遺伝子が未分化な消化管間葉において器官特異的発現パターンを示すこと、これらの遺伝子の発現が周囲環境の影響を受けることが明らかとなった。

〔文献〕

- 1) Roberts D.J. (2000) Dev. Dyn. 219: 109-120
- 2) Aubin J., Déry U., Lemieux, M. et al. (2002) Development 129: 4075-4087
- 3) Smith D.M., Grasty R.C., Theodosiou N.A. et al. (2000) Evol. Dev. 2 (6): 348-359
- 4) Narita T., Saitoh K., Kameda T. et al. (2000) Development 127: 981-986
- 5) Ishii Y., Rex M., Scotting P.J. et al. (1998) Dev. Dyn 213: 464-475

〔学会発表〕

- 1) 石井泰雄、芦田航、満友陽子、八杉貞雄. 鳥類胚消化管における器官特異的平滑筋層の形成. 日本動物学会第 92 回大会、オンライン、2021/9

2. 光受容膜タンパク質の薄膜生成に関する研究

辻野賢治¹、田邊賢司²

(¹統合教育学修センター・基礎科学 (物理学)、²総合医科学研究所)

〔目的〕 バクテリオロドプシンは (bR) は、光照射後にプロトンポンプとして動作する光受容タンパク質であり、様々な工業応用が提案されている¹⁾。

これまで我々は bR 薄膜を透明電極に固着した微弱光検出器の開発²⁾を進めているが、入射する平均光子数が同じにもかかわらず、作成した検出器によって出力される光信号のばらつきが大きいことが問題となっている。この原因が、bR 薄膜の生成時に生じた、膜厚の不均一性にあると考えている。今回、不均一性の解消のための手法として、O リングを設置して薄膜生成する方法を提案し、膜厚の評価を行った。

〔方法〕 洗浄したガラス基板 (25mm×25mm) に内径 17mm の O リングを設置したものと、O リングを設置していないものを準備し、bR 懸濁液を滴下し、同じ条件で自然環境させた (図 1)。バクテリオロドプシン懸濁液の濃度は 1mm の光路長で吸光度が 1 となるように調整した。

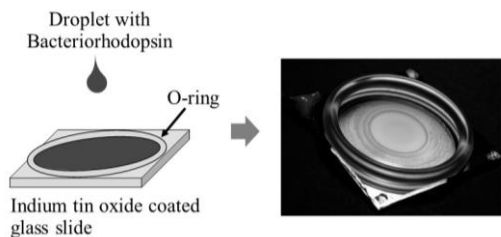


図 1. O リングを用いた薄膜生成

〔結果と考察〕 O リングを設置したガラス基板と O リングを設置していないガラス基板へ、bR 懸濁液を $50\mu\text{l}/\text{cm}^2$ となるように滴下した。その後、自然乾燥させ、サンプル中心部の透過率を測定した (図 2)。O リングなしの場合に比べて、O リングありの方が、透過率のばらつきが少ないことがわかる。O リングの存在により、O リング付近に bR 懸濁液が集まり、中央部の懸濁液は常に周囲から張力がはたらくため、均一な膜生成が可能となったと考えられる。一方で、O リングなしの場合は、対流などの影響により、bR がガラス基板上を自由に移動するため、O リングがある場合に比べて均一な膜の生成には至らなかったと考えられる。

ただし、透過率自体は O リングなしの場合の方が低い、つまり、より光を吸収する結果となった。O リングがある場合は、O リングの周りに bR 懸濁液が集まり、中央部の bR 懸濁液の量が少なくなるために、薄膜自体は O リングなしの場合に比べて薄くなっていると考えられる。

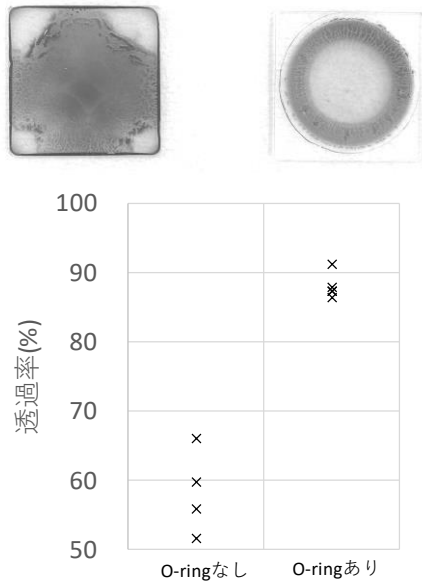


図 2. (上段)生成した bR 薄膜。左が O リングなし、右が O リングあり (下段)作成した bR 薄膜の透過率比較

O リングを設置することで均一な膜生成が可能であるが、一方で、吸収率が低くなる。検出器応用としては光吸収率を高めたいため、多層膜化を試みた。滴下量は同じとして、一度自然乾燥させたサンプルに再び同量の bR 懸濁液を滴下する。滴下回数を 2 回とすることで、透過率の減少、つまり、光吸収量の増加が認められたが、ばらつきは大きい結果となった。また、1 回の滴下による透過率は約 95% であるため、薄膜が 2 層になった場合は、約 90% の透過率となることが期待されるが、予想を超える透過率の低下を示した。ガラス表面での bR 懸濁液の乾燥と、bR 薄膜上での乾燥では、条件が異なる可能性がある。

〔結論〕 O リングを設置した bR 懸濁液の自然乾燥による薄膜生成法について検証実験を行った。その結果として、O リングを設置することで、均一な膜が再現性よく生成できることが明らかとなった。一方で、その透過率は約 95% と高く、入射した光子を効率よく吸収することはできない。そこで、吸収率の向上をめざし、懸濁液の滴下回数を変えて実験を行い、透過率の減少をみとめたが、いずれもばらつきが大きく、均一性の高い薄膜形成には至らなかった。

引き続き、吸収率が高く均一な膜生成の実現に取り組んでいく。

〔文献〕

- 1) Yu-Tao Li, Ye Tian, He Tian et al. (2018) A Review on Bacteriorhodopsin-Based Bioelectronic Devices, Sensors 18(5) : 1368
- 2) 辻野賢治、田邊賢司、山口俊夫、他. バクテリオロドプシンから生成される光電流測定のための電荷積分アンプのノイズ低減. 第 81 回応用物理学会秋季学術講演会、オンライン開催、2020/9

〔学会発表〕

- 1) 辻野賢治、田邊賢司. バクテリオロドプシン薄膜生成のためのドロップキャスト法の開発 II. 第 82 回応用物理学会秋季学術講演会、オンライン開催、2021/09

3. *FOXD3/4* 線虫オルソログは逃避行動の最適化に必要

堀沙耶香¹、三谷昌平^{2,3}

(¹統合教育学修センター・基礎科学、²生理学 (分子細胞生理学分野)、³総合医科学研究所)

〔目的〕 逃避行動最適化に関わる *FOXD* (*Forkhead box D*) 転写制御遺伝子群の解明を目的とする。

〔方法〕 *Forkhead box D* (*FOXD*) オルソログを1遺伝子のみ持つモデル生物線虫 *C. elegans* を利用する。我々はこれまでに、光遺伝学を活用した遺伝子スクリーニングにより、*FOXD3/4* (*Forkhead box D*) の線虫オルソログの *unc-130* 欠損変異体では、逃避行動が低下する結果を得ていた¹⁾。先行研究では、*unc-130* は古典的 *Wnt* 経路で制御されるとされていたが²⁾、我々の解析では変異体の逃避行動選択は正常であり、新たな発現制御経路の関与が示唆されていた。本年度は、線虫変異体を用い、侵害刺激強度に対応した逃避行動最適化への影響の分子・シナプス機序を多角的に解析した。

〔結果〕 *FOXD3/4* 線虫オルソログの *unc-130* 変異体は、強い刺激に対する強い逃避行動 (ターン) が低下する、「感覚鈍麻型」の表現型を示すことがわかっていた。本年度は、*unc-130* 変異体の AIB 神経での *nca-2* (*Novel Channel type/putative Nematode Calcium channel*) が発現低下していた。同様に、*nca-2* 変異体も強い刺激に対する強い逃避行動 (ターン) が低下することを示し、AIB 神経選択的に *NCA-2* を発現させることで、*nca-2* 変異体、および *unc-130* 変異体の逃避行動パターンが正常に戻ることを示した。一方で、電気シナプス構成因子である *inx-1* の発現は正常であるなど、これまでに我々が明らかにしてきた転写因子¹⁾とは異なる分子制御機能を持つことを示した。

〔考察〕 *FOXD3/4* 線虫オルソログは、ターン行動の鍵となる神経の正常な応答に必要な *nca-2* 遺伝子の発現制御を通じて、逃避行動最適化に寄与することが明らかとなった。

〔結論〕 *FOXD3/4* オルソログの逃避行動最適化への寄与を示す初の結果である。*nca-2* 遺伝子の詳細な神経応答は不明であり、今後の解析によって、機能がより一層明らかになることが期待される。

〔文献〕

- 1) Sayaka Hori, Shigekazu Oda, Yuji Suehiro, Yuichi Iino, Shohei Mitani. (2018) OFF-responses of interneurons optimize avoidance behaviors depending on stimulus strength via electrical synapses. PLoS Genet, Jun 25;14(6):e1007477
- 2) Amanda L Zacharias, Travis Walton, Elicia Preston, John Isaac Murray (2015) Quantitative Differences in Nuclear β -catenin and TCF Pattern Embryonic Cells in *C. elegans*. PLoS Genet, 2015, 11, e1005585

〔発表論文〕

- 1) Sayaka Hori, Shohei Mitani (2022) The transcription factor *unc-130/FOXD3/4* contributes to the biphasic calcium response required to optimize avoidance behavior. Sci Rep. Feb 3;12(1):1907

[学会発表]

- 1) Hori, S., Mitani, S., Contribution of a FOXD3/4 ortholog to optimization of avoidance behavior mediated by pre- and postsynaptic gene expression for a biphasic calcium response, 23rd International *C. elegans* Conference (Online), 2021
- 2) 堀沙耶香、三谷昌平、フォークヘッドボックス転写因子は強度依存性感覚処理回路のシナプス前特異性とシナプス伝達効率を決定する、第 92 回日本動物学会オンライン米子大会、2021

4. 視細胞変性と Müller グリアの増殖性応答：アルキル化剤による比較

蔭池かおり¹、西野玲子²、藤枝弘樹¹

(¹解剖学 (神経分子形態学分野)、²眼科学)

〔目的〕 アルキル化剤である N-methyl-N-nitrosourea (MNU) は、網膜の視細胞特異的にアポトーシスを誘導することから、視細胞変性症モデルとして広く利用されている。特に Sigma 社製の MNU (MNU-S) は古くから利用されており¹⁾、60mg~70mg/kg の MNU-S を単回腹腔内投与することで網膜全域に視細胞変性を誘導することが知られている²⁾。しかし、MNU の製造社間での効果の差異や、他のアルキル化剤である Methyl Methanesulfonate (MMS) との差異を比較検討した報告は殆どない。我々はこれまで、MNU-S を 70mg/kg ラットへ投与し視細胞変性を誘導した後、網膜のグリア細胞である Müller グリアの増殖性応答について詳細に検討してきた^{3),4)}。そこで、Toronto Research Chemicals 社の MNU (MNU-T)、Nacalai 社の MMS により誘発される視細胞変性と Müller グリアの増殖性応答について、我々が従来用いてきた MNU-S モデルとの差異を比較検討することを目的として本研究を行った。

〔方法〕 5 週齢、オスの Wistar ラットへ MNU-S (70mg/kg)、MNU-T (70mg/kg、90mg/kg、110mg/kg)、MMS (45mg/kg、60mg/kg、75mg/kg) をそれぞれ単回腹腔内投与し、経時的に採取した網膜における視細胞変性と Müller グリアの増殖性応答について免疫組織化学的、分子生物学的に検討した。

〔結果〕 MNU-T、MMS 投与ラットで MNU-S と同程度の視細胞変性を誘導する濃度はそれぞれ 110mg/kg、75mg/kg であった。投与 0.5 日後、桿体視細胞マーカーの遺伝子発現は全てのラットで有意に減少したが、錐体視細胞マーカーの遺伝子発現は残存し、MMS 投与ラットで最も顕著であった。また、錐体視細胞の細胞マーカーを用いて免疫染色し生残錐体視細胞をカウントすると、遺伝子発現の結果同様 MMS 投与ラットで最も多かった。投与 1 日後には全てのラットでどちらの視細胞マーカーの遺伝子発現も有意に減少し、2 日後に殆ど消失した。さらに、投与 2 日後、MG の G1/S 期への移行は MMS 投与ラットで最も早かった。

〔考察〕 錐体視細胞の生残時間が最も長い MMS 投与ラットにおいて Müller グリアの S 期への進行が最も早かったことから、錐体視細胞の生残時間と Müller グリアの増殖性応答に関連性があることが示唆された。

〔結論〕 同じアルキル化剤でも、製造社間、あるいは試薬種によって視細胞変性の過程と Müller グリアの増殖性応答に差異があることがわかった。

〔文献〕

1) Herrold K. (1967) JAMA Ophthalmol. 78(5): 650-653

2) Wan J., Zheng H., Zu-Lin C., et al. (2007) Vision Res. 48(2): 223-234

3) Nomura-Komoike K., Saitoh F., Komoike Y., et al. (2016) IOVS 57(3): 1169-1182

4) Nomura-Komoike K., Saitoh F., Fujieda H. (2020) Sci Rep 10(1): 1488

[学会発表]

- 1) 蔣池かおり、藤枝弘樹. 視細胞変性と Müller グリアの増殖性応答の時間的関連性：アルキル化剤による比較 第 127 回日本解剖学会総会・全国学術集会、オンライン、2022/3

5. ミュラーグリアにおける転写因子および細胞周期制御因子の年齢および細胞周期に関連した発現パターン

加藤万季^{1,2}、蔦池かおり¹、飯田知弘²、藤枝弘樹¹

(¹解剖学 (神経分子形態学分野)、²眼科学)

〔目的〕 哺乳類のミュラーグリアは、網膜前駆細胞の機能に必須な転写因子や細胞周期制御因子を発現しており^{1)~3)}、潜在的な神経発生能力があることを示しているが、これらの役割は不明である。そこで我々は、ミュラーグリアの初期化反応を制御するメカニズムを明らかにするため、マウスおよびラットのミュラーグリアにおける転写因子および細胞周期制御因子の発現を、年齢および細胞周期に関連した発現パターンに着目して解析した。

〔方法〕 マウス (C57BL/6J Jcl) の発生期、およびマウス、ラット (Wistar) の N-methyl-N-nitrosourea (MNU) を用いた網膜傷害モデル⁴⁾および、マウスの初代培養を用いて、転写因子 (Pax6、Vsx2、Nfia) および細胞周期制御因子 (Cyclin D1、D3) の発現を免疫染色を用いて確認を行った。

〔結果〕 *In vivo* におけるマウスのミュラーグリアでは、発達過程で Pax6、Vsx2、Nfia、サイクリン D3 の発現が増加し、サイクリン D1 の発現は減少した。MNU による視細胞の損傷は、ラットでは Vsx2 の、ラットマウスともにサイクリン D1 の細胞周期に関連した増加を引き起こすが、Pax6、Nfia、サイクリン D3 の発現は増加しなかった。

初代培養では P10 マウスのミュラーグリアでは、細胞周期に伴う Pax6 と Vsx2 の増加が観察されたが、P21 マウスのミュラーグリアでは観察されなかった。Nfia のレベルは EdU の取り込みと高い相関があり (図 1)、S 期進行中に活性化されることが示唆された。Cyclin D1 と D3 は G1 期で一過性に発現が上昇し、S 期に入ってから低下した。

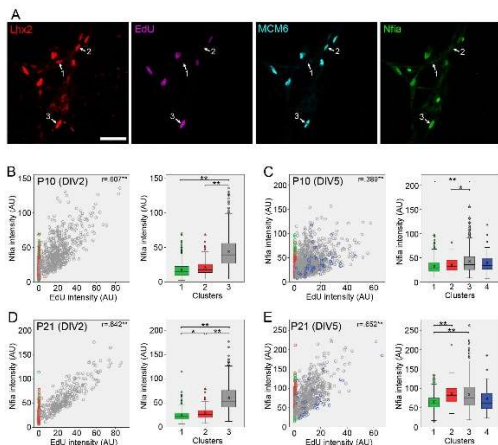


図 1. P10、P21 マウス網膜の初代培養 (培養 2 日目、培養 5 日目) における Nfia 発現の定量的解析

Lhx2 陽性ミュラーグリアにおける EdU、MCM6、Nfia ラベルの強度を画像解析により定量し、4 つのクラスター (クラスター 1; EDU-MCM6⁻、クラスター 2; EDU-MCM6⁺、クラスター 3; EDU+MCM6⁺、クラスター 4; EDU+MCM6⁻) に分類したミュラーグリアにおける Nfia レベルを散布図および箱ひげ図で示した。Nfia のレベルは EdU の取り込みと高い相関があった。

※巻末にカラー図掲載

〔考察〕 Pax6 と Vsx2 は、発達過程でミュラーグリアが成熟するにつれて発現が増加する一方で、視細胞損傷（ラット）や初代培養でミュラーグリアを強制的に増殖させると細胞周期進行中に発現が増加することから、ミュラーグリアの分化に重要な役割を果たすが、ミュラーグリアが増殖可能な状態に再プログラムされると増殖を促進するように働くことが示唆された。

Nfia は発達過程で発現の増加がみられる一方、視細胞傷害や初代培養でミュラーグリアを強制的に増殖させると Nfia の発現は増加し、かつ P10 網膜とくらべ P21 網膜において Nfia と S 期進行との相関が高かったことから、成熟哺乳類の網膜におけるミュラーグリア増殖のグリオジェニックな性質にこの因子が関与している可能性が示唆された。また初代培養において増殖中のミュラーグリアにおける Nfia の発現と EdU 取り込みとの間に強い相関は、Nfia の発現が、S 期における DNA 複製に依存した形で活性化されている可能性を示唆している。

発達過程で、Cyclin D1 の発現が減少し CyclinD3 の発現が増加することは既報と一致していた⁵⁾。また、発達過程とは異なり、両者とも初代培養などを用いて強制的にミュラーグリアを増殖させると G1 期で一過性に発現が上昇し S 期に入ってから低下することも、既報と一致していた^{6)~8)}。同じ CyclinD 群ではあるが、発達過程と、増殖可能な状態に再プログラムされた状態とで、発現の仕方が変化しており、これは今後さらなる検討が必要であると考えらる。

〔結論〕 我々はこれまで知られていなかったミュラーグリアにおける網膜前駆細胞制御因子の年齢および細胞周期に関連した発現パターンを同定した。

〔文献〕

- 1) Blackshaw S., et al. (2004) PLoS Biol. 2: E247
- 2) Roesch K., et al. (2008) J. Comp. Neurol. 509: 225-238
- 3) Nelson B R. et al. (2011) PloS ONE. 6: e22817
- 4) Nomura-Komoike K., Saitoh F., Fujieda H., et al. (2016) Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 57: 1169-1182
- 5) Das G., Clark A M., Levine E M. (2012) Dev. Dyn. 241: 941-952
- 6) Hitomi M., Stacey D W. (1999) Curr. Biol. 9: 1075-1084
- 7) Guo Y., et al. (2005) Oncogene. 24: 2599-2612
- 8) Dyer M A., Cepko C L. (2000) Nat. Neurosci. 3: 873-880

6. Replication stress increases mitochondrial metabolism and mitophagy in Fanconi anemia fetal liver hematopoietic stem cells

Makiko Mochizuki-Kasho and Ayako Nakamura-Ishizu
(Department of Microscopic and Developmental Anatomy)

[Purpose] Fanconi anemia (FA) is caused by the mutation of FA genes which results in the attrition of hematopoietic stem cells (HSC). FA patients are usually diagnosed around school age, but initial symptoms maybe present earlier during prenatal or neonatal stages. We previously showed through a murine FA model (*Fancd2*^{-/-}) that FA gene deletion confers to physiological replication stress (RS) during HSC development¹⁾. However, how RS relates to the pathophysiology of FA remains elusive. To further understand the mechanism, we investigated whether and how mitochondrial metabolism was affected in FA HSCs²⁾.

[Methods] We employed *Fancd2*^{-/-} mice and analyzed *Fancd2*^{-/-} fetal liver (FL) HSCs for their mitochondria membrane potential (MMP), mitochondrial reactive oxygen species (mtROS) and mitophagy by flow cytometry. To analyze mitochondrial morphology, HSCs were stained with Tomm20 antibody and subsequently analyzed by confocal imaging.

[Results] *Fancd2*^{-/-} FL HSCs exhibited a significant increase in MMP but comparable level of mtROS. Mitophagy was upregulated in *Fancd2*^{-/-} FL HSCs. Mitochondrial areas were enlarged and concentrated in *Fancd2*^{-/-} FL HSCs compared to *Fancd2*^{+/+} FL HSCs.

[Discussion] Previous reports showed impaired mitophagy in cells deficient of FA genes. Our data showed that FA-deficient FL HSC upregulates mitochondrial metabolism and mitophagy. Further analysis is necessary to delineate the relationship between RS and metabolism in FL HSCs.

[Conclusions] Mitochondrial metabolism and mitophagy are upregulated in FA deficient FL HSC.

[Reference]

- 1) Mochizuki-Kashio M, Yoon Y, Menna T, Grompe M, Kurre P. FANCD2 alleviates physiologic replication stress in fetal liver HSC. *BioRxiv*. 2020
- 2) Mochizuki-Kashio M, Shiozaki H, Suda T, Nakamura-Ishizu A. Mitochondria Turnover and Lysosomal Function in Hematopoietic Stem Cell Metabolism. *Int J Mol Sci*. 2021. 28;22(9):4627. doi: 10.3390/ijms22094627

[Conference Presentation]

- 1) Mochizuki-Kashio M, Nakamura-Ishizu A. Fanconi Anemia-related replication stress increases metabolic activity in fetal liver hematopoietic stem cells. Stem Cell Symposium 2022
- 2) Mochizuki-Kashio M, Nakamura-Ishizu A. Replication stress accelerates myeloid-bias through the activation of mitochondrial OXPHOS in hematopoietic stem cells. Japan Society of Hematology Annual Meeting 2021

7. 悪性脳腫瘍における代謝とエピジェネティクス制御機構の解明

増井憲太、鬼塚裕美、柴田亮行

(病理学 (人体病理学・病態神経科学分野))

〔目的〕 びまん性正中グリオーマ (DMG: diffuse midline glioma) は、ヒストン蛋白をコードする遺伝子の変異 (H3K27M) に基づき診断される、近年確立された genotype 指向型の悪性脳腫瘍である。特記すべき点は、H3K27M 変異が存在すると、抑制性のヒストンマークである H3K27me3 (27 番目リジン残基のトリメチル化) がゲノムワイドに減少する事だが¹⁾、このダイナミックなエピゲノム変化が DMG の病態に及ぼす影響は不明である。本研究では、ヒストン遺伝子の変異に基づくヒストンメチル化の減少 (H3K27me3 の減少) が、がん細胞の生存に重要な代謝活動に影響を与えるとの仮説のもと²⁾、DMG の病態解明を目指すことを目的とする。

〔方法〕 H3K27M 変異を有する DMG 細胞株 (GDC129) を樹立し、H3 野生型グリオーマ細胞株 (GBM6、GBM39) を比較対象として解析を行った。DMG 細胞株の GDC129 を、ヒストンメチル化 (H3K27me3) を回復させる薬剤 (GSK J4: ヒストン脱メチル化酵素阻害剤) で処理し、ヒストンメチル化を変化させた際に、相関して変動を示す代謝産物をメタボローム解析により解析した。続いて、代謝の変動を制御している遺伝子群を、RT-qPCR や ChIP-qPCR の手法で探索した。

〔結果〕 H3 野生型グリオーマ細胞株である GBM6、GBM39 と比較して、H3K27M 変異を有する GDC129 細胞では H3K27me3 が有意に減少しており、本研究に適した細胞株である事を確認した (図 1)。この GDC129 細胞を薬剤処理することで、ヒストン低メチル化群 (DMSO 処理群) と高メチル化群 (GSK J4 処理群) に分け (図 1)、メタボローム解析を行った結果、H3K27me3 の減少と相関する中間代謝産物として、酸化ストレス (活性酸素種) の除去に働くグルタチオン

が有意に増加していることが明らかとなった (図 2)。続いて、H3K27me3 の減少に伴うグルタチオンの産生増加に関わる遺伝子群を探索した結果、グルタチオン合成に必要なグルタミン酸を供給するグルタミナーゼ 2 (GLS2) 遺伝子が、H3K27me3 の減少によりエピジェネティック制御を受けていた。更には、DMG 細胞における GLS2 の機能解析として、GDC129 細胞で GLS2 をノックダウンすると、細胞生存が抑制された。

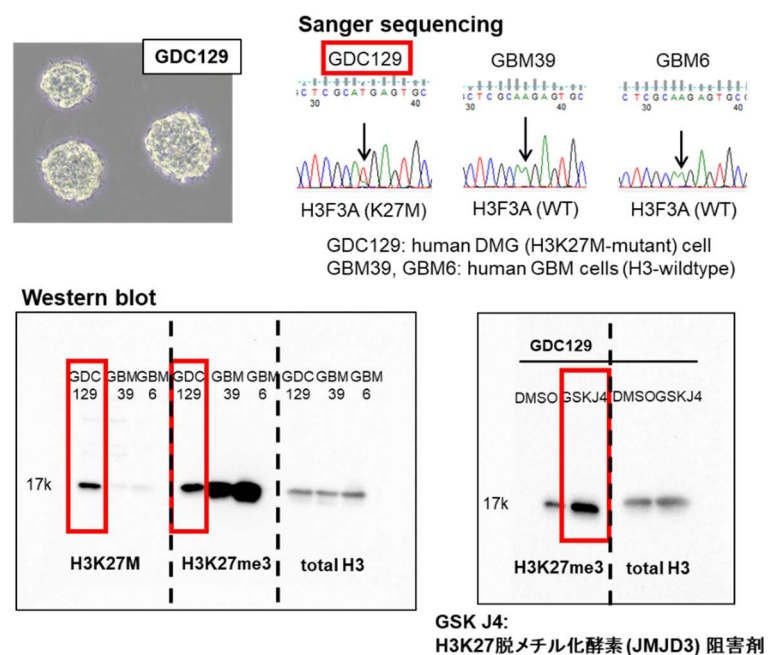


図 1. H3K27M 変異を有するヒト DMG 細胞株の樹立と解析

〔考察〕 H3K27M 変異を有する DMG 細胞 (GDC129) の網羅的 OMICS 解析により、ヒストンメチル化 (H3K27me3) の減少が特異なグルタチオン代謝を亢進させる新規知見を見出した。また、ヒストンメチル化とグルタチオン代謝をリンクさせる遺伝子として GLS2 を同定し、DMG 細胞では GLS2 がエピジェネティックに制御されるとともに、細胞生存に関与することを明らかとした。GLS2 はグルタミンをグルタミン酸に変換する酵素であるが、乳がんでは腫瘍形成に関与すると報告されており、本研究結果も

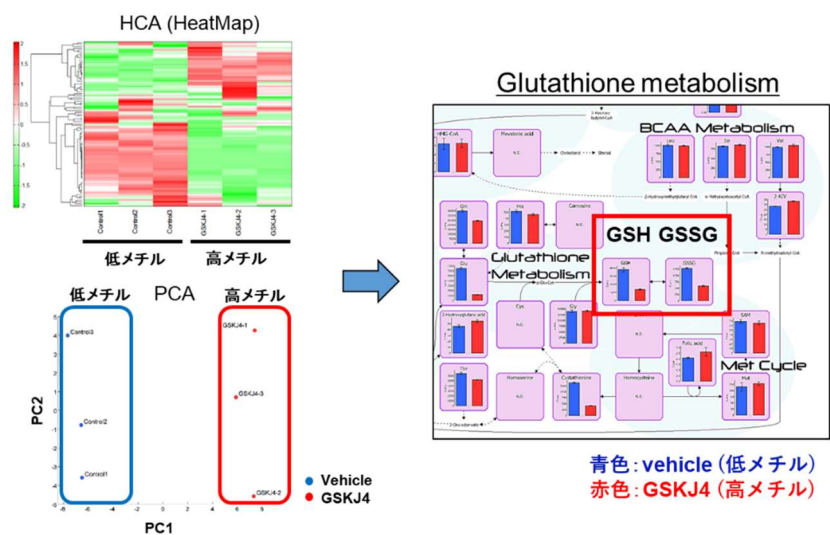


図2. H3K27me3 により制御される代謝経路の網羅的解析

※巻末にカラー図掲載

GLS2 が悪性腫瘍の病態に重要であることを支持する。引き続き、DMG 細胞の生存を促進する GLS2 の効果は、酸化ストレス抵抗性に関わるグルタチオン代謝を介するという仮説の検証に取り組む。更には、同知見をもとに動物モデルを作成し、ヒストンメチル化の回復や、グルタチオン代謝および GLS2 の阻害といった処置が、最悪性度の脳腫瘍である DMG の新規治療法となり得る可能性を検討する。

〔結論〕 ヒストン遺伝子変異を有する DMG で観察されるヒストンメチル化の減少は、GLS2 のエピジェネティック制御と特異的な代謝の亢進を介して、腫瘍細胞の増殖と生存を促進する。

〔文献〕

- 1) Bender S., Tang Y., Lindroth A.M., et al. (2013) Cancer Cell 24(5): 660-672
- 2) Masui K., Harachi M., Cavenee W.K., et al. (2020) Acta Histochem. Cytochem. 53(1): 1-10

〔発表論文〕

- 1) Masui K., Cavenee W.K., Mischel P.S., et al. (2022) The metabolomic landscape plays a critical role in glioma oncogenesis. Cancer Sci. 113(5): 1555-1563

〔学会発表〕

- 1) 増井憲太、小森隆司、村垣善浩、柴田亮行. 脳腫瘍におけるエピジェネティクス異常. 第 62 回日本神経病理学会総会学術研究会、WEB 開催、2021/5

8. 細菌鞭毛タンパク質 FliC が誘引する自己免疫応答の評価

大坂利文¹、上芝秀博¹、大町聡子²、常田聡²、柳澤直子¹

(¹微生物学免疫学、²早稲田大学大学院・先進理工学研究科・生命医科学専攻)

〔目的〕 近交系マウス (C57BL6/J) に加熱殺菌した非病原性大腸菌を腹腔投与することで、IgG4 関連疾患の膵臓病変と考えられている自己免疫性膵炎 (Autoimmune pancreatitis, AIP) に類似した病態を誘導することができる¹⁾。現在までに、AIP を誘引する大腸菌成分の一つとして鞭毛タンパク質 FliC を同定している²⁾。FliC タンパク質は自然免疫受容体と結合する部位 (D0、D1) と血清学的分類指標の H 抗原となる部位 (D2、D3) の4つのドメインで構成される。そこで本研究では、膵臓の炎症・線維化応答における大腸菌鞭毛タンパク質 FliC の各ドメインの役割を評価することを目的とした。

〔方法〕 事前にアラムアジュバンドにより 2 型免疫に偏向させた近交系マウス (C57BL6/J) に、非病原性大腸菌 ATCC25922 株および FliC 欠損株、H 抗原欠損株 (FliC-D2/D3 ドメイン欠損株) を加熱殺菌した菌体を反復投与した (週 2 回、6 週間)。膵臓の炎症応答および線維化応答を評価するために、各実験群の膵組織切片に対して HE 染色およびシリウスレッド染色を行った。各マウス群の血清を用いて、ヒト IgG4 と機能的類似性を持つ IgG1 濃度を ELISA 法により定量した。また、マウス膵臓タンパク質および各群のマウス血清を用いて、膵臓抗原と交差する IgG1 抗体のイムノブロット法により探索した。

〔結果〕 膵臓の病理組織像を比較した結果、FliC の有無および構造に関わらず、いずれの菌体投与群においては炎症細胞の集簇ならびに線維化が確認された。また、菌体投与により IgG1 抗体価も著しく増加していたが、FliC 構造による産生量の違いは確認されなかった。一方、イムノブロット解析においては、大腸菌野生型投与群および H 抗原欠損株投与群においてのみ、膵臓由来のタンパク質と交差する IgG1 抗体の存在を確認した。

〔考察〕 FliC タンパク質の D0/D1 ドメインが膵臓抗原に対する自己抗体 (IgG1) の産生に関与していることが示唆された。しかしながら、アラムアジュバンドによる影響が強く、膵臓の病理像については各実験群間に明確な違いが認められなかったと考えられる。

〔結論〕 大腸菌由来鞭毛タンパク質 FliC の特定ドメインが自己抗体の産生を誘導する。

〔文献〕

- 1) Haruta I, Kikuchi K, Hashimoto E, et al. Long-term bacterial exposure can trigger nonsuppurative destructive cholangitis associated with multifocal epithelial inflammation. *Lab Invest* 90, 577–588 (2010)
- 2) Yanagisawa N, Haruta I, Shimizu K, et al. Identification of commensal flora-associated antigen as a pathogenetic factor of autoimmune pancreatitis, *Pancreatology*, 14(2), 100-106 (2014)

[学会発表]

- 1) 大町聡子、大坂利文、上芝秀博、常田聡、柳澤直子. Role of *Escherichia coli* flagellin protein in the pathogenesis of type 1 autoimmune pancreatitis、第 50 回日本免疫学学会、2021 年 12 月 9 日、奈良（オンライン）

9. スフェロイドの一細胞ライブイメージングと直接圧迫による機械的特性の計測

田中正太郎、中村史雄
(生化学)

〔目的〕 スフェロイドなど3D培養された細胞は、組織モデルとして薬剤探索や毒性評価、分化研究や再生医療への貢献が期待されている^{1),2)}。一方、それ自体の厚み(直径数100 μm)が光透過性の低下や散乱、自家蛍光の原因となり、現状では内部細胞の構造や活動を精度よく観察する技術がない。本年度は、著者が開発した新規ライブイメージング技術(陰性造影法)によりこの問題を解決し、これまで困難であったスフェロイドの機械的特性の計測³⁾を新たな技術の開発によって進展させた。

〔方法〕 ヒト肝がん由来細胞株 HepG2 を低吸着プレートで5日間培養し調製したスフェロイド(直径200 μm)をガラスボトムディッシュに移し、レーザー स्क্যান共焦点顕微鏡(総合医科学研究所 LSM710)で観察した。その際培養液に、細胞膜に浸透しない親水性蛍光色素(AlexaFluor647 など)を1/10量添加した。得られたスフェロイド断層像には細胞間隙を示す網目状の蛍光シグナルが観察された。それらに囲まれた多数の小区画は生細胞であり、個々の細胞の構造情報を得ることができた(陰性造影法、図1)。また同法で連続撮影しながら、マイクロマニピュレーター(総合医科学研究所 eppendorf InjectMan)の先端に固定した原子間力顕微鏡用のカンチレバー(NANOSENSORS)でスフェロイドを水平手前方向に圧迫することで、スフェロイドと個々の細胞の変形を観測した。同時に別波長でカンチレバーの変形も観測した(図2)。

細胞構造および変形の定量的解析は、画像解析ソフトウェア(Zen、Fiji および総合医科学研究所 Neurolucida)を利用した。同時にカンチレバーのバネ定数と変形(ひずみ)から各時点での応力を計測した。これらの情報を基に応力ひずみ曲線を作成した(図3)。また、本スフェロイドの発現解析(RNAシーケンス)により主要な細胞外マトリクス(ECM)タンパク質であると判明したフィブロネクチン(FN1)、コラーゲン(COL2A1)、ラミニン(LAMA5)をsiRNAによってノックダウンしたスフェロイドについても同様の計測を行い、野生株の結果と比較した(図3)。

スフェロイド細胞間隙のECMの構造を明らかにするために走査電子顕微鏡(SEM、総合医科学研究所 JSM-6610LA)を用いて撮影した(図4)。スフェロイドは界面活性剤処理のちグルタルアルデヒド固定、エタノール脱水、t-ブチルアルコール置換し凍結乾燥、オスミウム蒸着を施し、SEM撮影に供じた。

〔結果〕 観察されたスフェロイド内部の個々の細胞の形状は鮮明であり(図1)、同法がスフェロイドの一細胞ライブイメージングに好

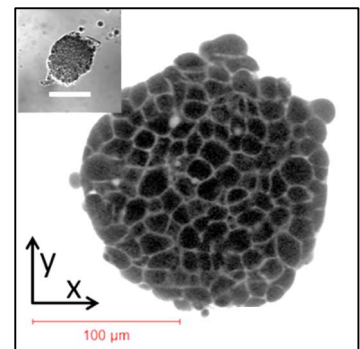


図1. スフェロイドの陰性造影法(共焦点顕微鏡による蛍光断層像)。細胞間隙に拡散した蛍光色素のシグナル(白)が個々の細胞(黒)の輪郭を描出している。挿入:明視野(バー100 μm)。数字は蛍光色素添加後の経過時間。

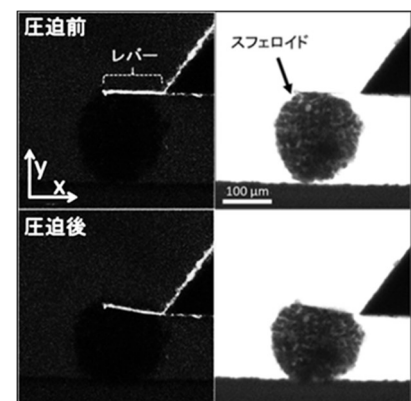


図2. カンチレバーによるスフェロイドの圧迫(二波長蛍光断層像)。左:レバー(赤)。右:陰性造影法(白)。レバーを1 μm /秒でy軸方向に動かし壁に押し付けた。スフェロイド、内部細胞およびレバーの変形を観察できた。

適であることが示された。

次に上述のカンチレバーにてスフェロイドを圧迫し、応力ひずみ曲線を作成した。その結果、野生株スフェロイドの応力ひずみ曲線に対し、フィブロネクチンやコラーゲン、ラミニンをノックダウンした場合のそれぞれの結果は緩やかな傾きを示し、野生株スフェロイドに比べて柔軟であることが明らかになった(図3)。それぞれのカーブの形状には特徴があり、今後の詳細な解析により細胞外マトリクスの構成とスフェロイドの機械的特性の関係を明らかにできるものと考えている。

また同様に調製したスフェロイドについてSEMによる構造観察を行った。FN1 ノックダウンはサイズの現象を伴うものの、表層構造には差異は認められなかった。しかし一部を物理的に破壊し内部細胞を露出させたところ、個々の細胞表層の繊維状構造に違いを確認した。野生型が短く密な分布を示したのに対し、ノックダウン細胞では長く疎な分布であった。現在は数値化を検討している。

〔考察〕 ECM の構成成分の遺伝子発現をノックダウンすることで、組織の機械的特性(やわらかさ)およびECM構造に明確な変化が生じることが分かった。既存の研究では遺伝子発現やECM構造と機械的特性の紐づけは行われておらず³⁾、この点が本研究の優位な点である。今後は技術の最適化を進め、細胞応答観察・構造計測・応力計測を同時に実行可能な技術として確立したい。

〔結論〕 スフェロイドの機械的特性と遺伝子発現を紐づける研究技術を開発した。詳細な解析により組織ややわらかさの成り立ちを明らかにできるだろう。

〔文献〕

- 1) Mueller-Klieser W. (1987) J. Cancer. Res. Clin. Oncol 113: 101-122
- 2) Gunti S., Hoke A. T. K., Vu K. P., et al. (2021) Cancers (Basel). 13: 1-18
- 3) Abidine Y., Giannetti A., Revilloud J., et al. (2021) Cells. 10: 1704

〔発表論文〕

- 1) Tanaka S., Takizawa K., and Nakamira F. (2022) One-step visualization of natural cell activities in non-labeled living spheroids. Scientific Reports. 12(1500): 1-11
- 2) Tanaka S., and Nakamira F. (2022) Exploring the bio-functional break point of living tissue against outside physical pressure. J. Robot. Mechatron. 34(2): 1-2

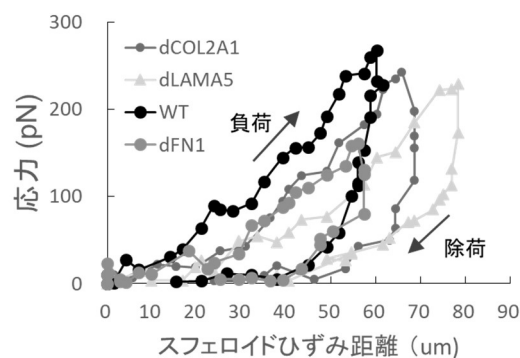


図3. 遺伝子ノックダウン(KD)を施したスフェロイドの応力ひずみ曲線。レバーによる圧迫(負荷)および解除(除荷)過程のスフェロイドひずみと応力の変化をプロットした。生体組織では両カーブが重ならない(ヒステリシス)。WT:野生株、dFN1(フィブロネクチン KD)、dCOL2A1(コラーゲン KD)、dLAMA5(ラミニン KD)。

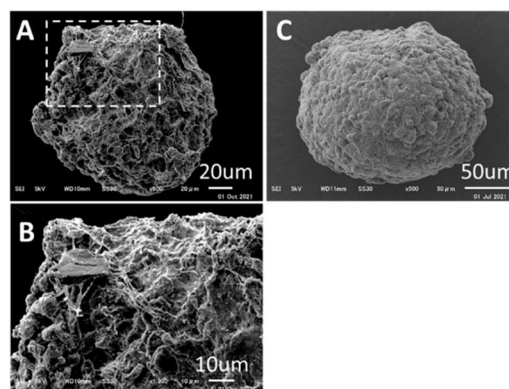


図4. 走査電子顕微鏡によるスフェロイド内部の細胞外マトリクスの観察 界面活性剤処理(A, B)および未処理の HepG2 スフェロイド(C)。

10. マスト細胞分泌顆粒プロテオミクスを活用したアレルギー治療標的候補遺伝子の探索

田中正太郎、中村史雄
(生化学)

〔目的〕 マスト細胞は外来抗原に応答して細胞内の分泌顆粒からヒスタミンなどを放出し、様々なアレルギー症状を惹起する(脱顆粒)¹⁾。著者はいまだ詳細が明らかでないこの分子メカニズムを解明すべく、これまで難しかった分泌顆粒の特異的回収技術を確立し、プロテオーム解析を実施した(2017 科研費基盤 C 成果: 図1)。2021 年度はこの研究を伸展させ、マスト細胞から分泌顆粒制御遺伝子を特定し、アレルギー症状の治療に貢献する分子標的候補の探索を行った。

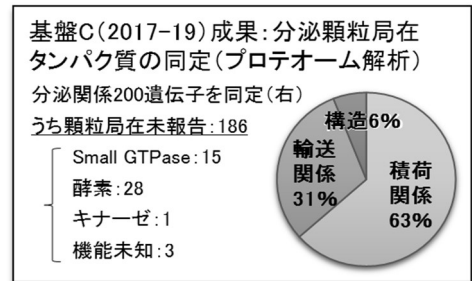


図1. これまでの成果。プロテオーム解析技術の確立。

〔方法〕 著者は効率の良い分泌顆粒調製法を開発してプロテオーム解析を実施することが放出の分子メカニズム解明の糸口であると考え、抗体を標識した磁性ビーズによる分泌顆粒調製法を開発した(図2)。これは、①赤色蛍光タンパク質(RFP)を連結させた既知分泌顆粒マーカータンパク質をラットマスト細胞株 RBL-2H3 に安定発現させる②この細胞破碎液から抗 RFP 抗体を標識した磁性マイクロビーズを利用して上記マーカータンパク質が局在している分泌顆粒のみを特異的に回収する③質量分析によるプロテオーム解析を行うというものである。

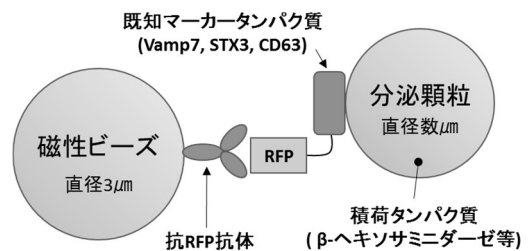


図2. 模式図。タグ標識組換えマーカータンパク質と抗 RFP 抗体標識磁性ビーズを利用した分泌顆粒の分離法

これまでに既知マーカータンパク質 Vamp7 および Stx3、CD63 について解析を行っている。先行した Vamp7 解析では分泌に関係する 200 遺伝子を同定した(図1)。この内 186 遺伝子は分泌顆粒との関わりがこれまで報告されていないものであり、糖鎖合成酵素や糖脂質代謝酵素、Small GTPase 関連遺伝子、キナーゼなど、薬剤開発に重要なものが多く含まれていた(図1)。本年度は、3種の解析結果より特定した、マスト細胞で特に発現が亢進しているタンパク質 34 種についてそれぞれ遺伝子ノックダウンを行い、細胞の形質に与える影響をライブイメージングで観察した。

〔結果と考察〕 3種類のプロテオーム解析の結果、分泌に関わると考えられるタンパク質について図3のベン図を作成することができた。細胞内小胞輸送に関わる Rab タンパク質の多くが3者の共通区画(G)に属していた一方で、脱顆粒への関与が報告されている Rab27A は、分泌顆粒と細胞膜の融合に関わる SNARE タンパク質である STX3 陽性の分泌顆粒(B)にのみ属した。また分泌顆粒の内腔タンパク質として知られる Cathepsin B は CD63 あるいは STX3 陽性分泌顆粒では検出されず、Vamp7 陽性分泌顆粒(F)でのみ検出された。これらの興味深い結果は、分泌顆粒

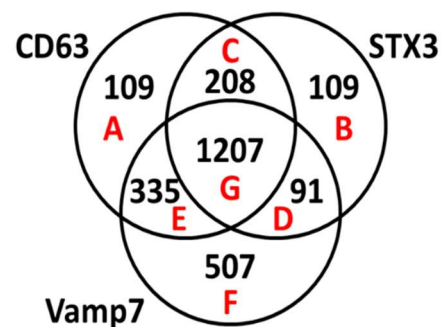


図3. 3種類のプロテオーム解析結果(ベン図)。数字は遺伝子の数。赤字は各セルの名称。

へのタンパク質分布が予想以上に選択的である状況を示唆していた。

同定されたタンパク質のうち、特にマスト細胞で発現が亢進しているタンパク質 34 種類について siRNA を設計した。さらにそれぞれをマスト細胞にエレクトロポレーションによって導入することで遺伝子ノックダウンを行い、分泌顆粒の形状の変化および脱顆粒効率の変化をライブイメージングによって観察した（総合医科学研究所共焦点顕微鏡 LSM710 を使用）。その結果、ノックダウンすることで分泌顆粒の肥大化（1 遺伝子）、断片化・分散化（3 遺伝子）、局在変化（1 遺伝子）を誘導する遺伝子を特定した。さらに脱顆粒効率の低下（2 遺伝子）、脱顆粒後の分泌顆粒の形状変化（5 遺伝子）、分散化（4 遺伝子）を起こす遺伝子を特定した（図 4：分散化の例）。これらには V-ATPase サブユニット、Ras 結合タンパク質、SNARE 結合タンパク質、アミノ酸輸送体が含まれており、いずれも脱顆粒制御を目的とした治療標的として有望と考えられた。

〔結論〕 分泌顆粒の形質・機能に影響を与える新規遺伝子を複数特定できたことから、本研究方針の有効性を確認することができた。今後は詳細な解析を進め、アレルギー症状の治療に貢献する分子標的候補を選定する。また、図 3 の遺伝子局在データと遺伝子データベースに公開されている各遺伝子のデータを整理することで、多様なヘテロ集団である分泌顆粒を体系的に分類できると考えており、現在研究プランを検討している。

〔文献〕

1) Moon T C, Befus A D, Kulka M. (2014) *Front. Immunol.* 5: 569

〔学会発表〕

1) 田中正太郎、中村史雄. マスト細胞分泌顆粒プロテオミクスを活用したアレルギー治療標的候補遺伝子の探索. 第 94 回日本生化学会大会、オンライン、2021/11

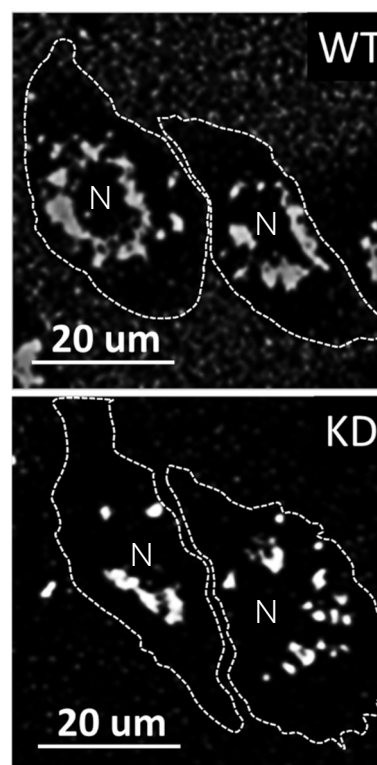


図4. 遺伝子ノックダウン(KD)が脱顆粒後の分泌顆粒の形状・分布に与える影響の例。野生株(WT)細胞(上:破線)内部では分泌顆粒(白シグナル)は核(N)の周りに集合しているが、ある遺伝子の KD 細胞(下)では不規則に分散する。バー: 20um。