

# 【研究活動報告】

# 1. 心外膜への作用を介して冠状血管の発生に影響を及ぼすシグナル分子の探索

石井泰雄<sup>1</sup>、小山紗璃<sup>2</sup>、浦瀬香子<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>統合教育学修センター・基礎科学 (生物学)、<sup>2</sup>医学部第3学年)

〔目的〕 胚期心臓の心外膜は、冠状血管の発生に不可欠である<sup>1)</sup>。心外膜は心臓が現れた時から心臓にあるわけではなく、発生のある時期に心外膜原基という前駆細胞集団が心臓の外から進入し、心筋表面を覆うことで生じる(図1)。形成直後の心外膜は単層上皮様の薄いシートにすぎないが、やがて間葉転換により肥厚し、冠状血管の発生の主要な場となる。心臓の部位によって心外膜の厚さが異なることから、心外膜の部位特異的なふるまいが冠状血管系の形成に重要である可能性がある。2022年度の研究の目的は、その可能性を実験的に検証するのに必要な基盤を構築することである。

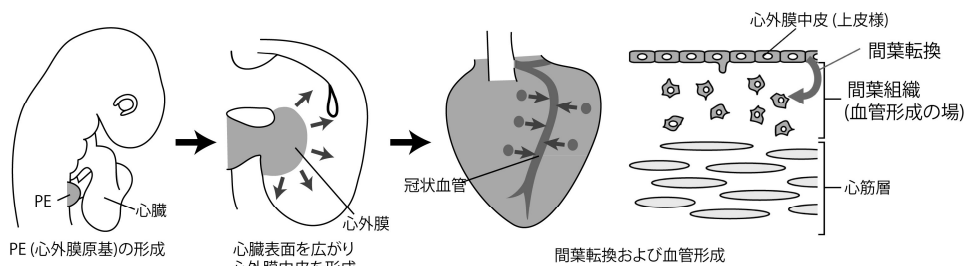


図1 心外膜の発生と冠状血管形成

〔方法〕 培養条件下の心外膜の間葉転換を促すシグナル因子<sup>2)</sup> VEGF-A、PDGF-B、FGF-2、FGF-4、TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2 を発現する Tol2 トランスポゾンベクター<sup>3)</sup>を作成した。これらをエレクトロポレーション法<sup>4)</sup>を用いてウズラ (*Coturnix coturnix japonica*) 胚心外膜原基に導入し、無血清培地中で2日間培養した。この解析で効果を示した VEGF-A および FGF-4 の発現ベクターを、in ovo リポフェクション法<sup>2)</sup>により卵殻内のニワトリ (*Gallus gallus domesticus*) 胚の心外膜原基 (および心筋) に導入した。7日間ふ卵したのち心臓を取り出し、ホールマウント観察および免疫染色<sup>4)</sup>を行った。

〔結果〕 心外膜原基を単離し培養すると、細胞同士の接着を保ちつつ培養皿の表面を広がり、形成直後の心外膜に似た細胞シートを形成する(図1A,D)。エレクトロポレーション法を用いて VEGF-A または FGF-4 の発現ベクターを導入したところ、細胞の遊走(図1B,C)やタイトジャンクションマーカの消失(図1E,F)といった、間葉転換を示唆する影響が見られた。なお、コントロールや他の因子の発現ベクターには、そのような効果は見られなかった。

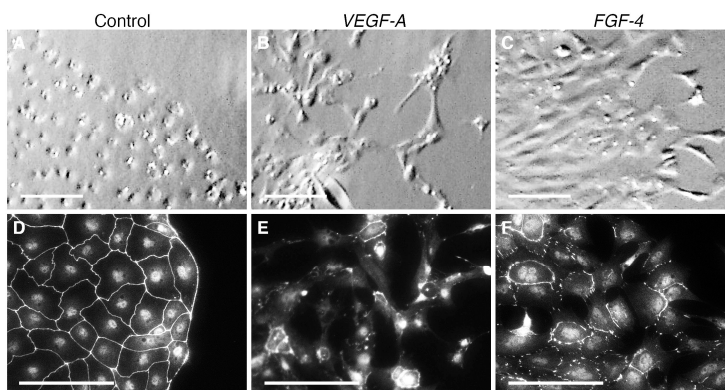


図2 In vitro 培養系における VEGF-A および FGF-4 強制発現の影響。(A-C) 明視野像。(D-F) ZO-1(タイトジャンクションマーカ)に対する免疫染色。

VEGF-A および FGF-4 の発現ベクターを、in ovo リポフェクション法を用いて卵殻内のニワトリ 2.5 日胚の心臓組織に導入し、胚を発生させた。FGF-4 ベクターを導入した胚は、翌日までにすべて死亡した。VEGF-A ベクターを導入した心臓の導入部位には、血液を含む隆起が観察された(図3A-C)。免疫

染色の結果、(1) 心外膜層の肥厚、(2) 異所性の胞状構造の形成、(3) 平滑筋層および血液で満たされた内腔の形成が確認され (図 3D,D',E,E')、異所性の血管様構造の形成が示唆された。遺伝子は心筋にも導入されていたが、これらの部位には上記の構造は認められなかった (図 3F,F')。FGF-2、PDGF-B、TGF-β1、TGF-β2 を発現させた心臓にも異常は見られなかった。

〔考察〕 心外膜に作用し、その間葉転換を促すシグナル因子の探索に、*in vitro* 系での遺伝子導入のアプローチが有効であることが示された。*In vitro* での導入実験で効果の見られた2種類 (VEGF-A と FGF-4) の発現ベクターは、*in ovo* 導入実験においても明確な影響を及ぼした。一方、*in vitro* での導入実験で効果の見られなかった他のベクターは、*in ovo* 導入実験

においても効果を示さなかった。*In ovo* 実験において、心外膜で VEGF-A を強制発現させると、異所性の血管様構造が形成された。この結果は、正常な冠状血管系の発生に、VEGF シグナルの適切な制御が必要であることを示している。またこの構造は、VEGF-A が心外膜細胞に直接作用した結果生じたものと考えられる。心臓進入前に単離された心外膜も VEGF-A の影響を受けること (図 2B,E)、心筋で強制発現させても上記の異常は見られないこと (図 3F,F') が、その根拠として挙げられる。さらなる解析が必要なものの、本研究から得られた結果は、心外膜の部位特異的なふるまいが冠状血管のパターンの成立に関わっているという考えを支持していると言えよう。

〔結論〕 (1) *In vitro* 遺伝子導入法は、*in vivo* における心外膜細胞のふるまいに影響を与える発現ベクターの探索に有効である。(2) 心外膜で VEGF-A を強制発現させると、平滑筋に囲まれた血管様の胞状構造が生じる。(3) 心筋で VEGF-A を強制発現させても明確な異常は見られない。

〔文献〕

- 1) Pennisi DJ, Ballard VL, et al. (2003) *Dev. Dyn.* 228: 161-172
- 2) Ishii Y, Garriock RJ, et al. (2010) *Dev. Cell* 19: 307-316
- 3) Sato Y, Kasai T, et al. (2007) *Dev. Biol.* 305: 616-624
- 4) Ishii Y, Weinberg K, et al. (2009) *Development* 136: 2579-2589

〔学会発表〕

- 1) 小山紗璃、小西博郷、石井泰雄、他. 心外膜への作用を介して冠動脈形成を促すシグナル分子の探索. 日仏生物学会第 198 回例会、2023/5

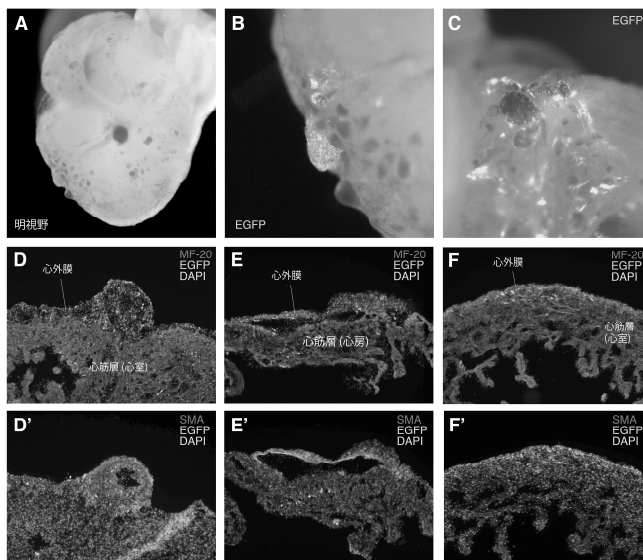


図3 VEGF-A 強制発現の影響。(A-C) VEGF-A を心外膜で強制発現させた心臓のホールマウント像。EGFP (緑) は遺伝子導入部位を示す。(D-F) 心筋マーカーMF-20 (赤) に対する免疫染色。(D'-F') 平滑筋マーカーSMA (赤) に対する免疫染色。遺伝子が導入された細胞 (緑) は、心室の心外膜 (D,D')、心房の心外膜 (E,E')、心室の心筋 (F,F') に由来する細胞。

※巻末にカラー図掲載

## 2. ドロップキャスト法により作成した光受容膜タンパク質薄膜の非接触膜厚測定

辻野賢治<sup>1</sup>、田邊賢司<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>統合教育学修センター・基礎科学 (物理学)、<sup>2</sup>総合医科学研究所)

〔目的〕 光受容膜タンパク質であるバクテリオロドプシン (Bacteriorhodopsin、bR) は、その環境耐性の高さから、受光素子としてさまざまな工学応用が検討されている。bR は、内部のレチナル分子が光を吸収することで光異性化をおこし、その結果として最終的に細胞外へプロトンを送る、プロトンポンプの役割をはたす。bR を工学的に応用する場合、このプロトンの移動を電気的なシグナルとして読み出す必要があり、bR 薄膜を電極上に生成することが必須となる。

薄膜生成の方法はいくつかあるが、我々はドロップキャスト法を用いている。この方法は非常に簡便であり、洗浄したガラス電極上に bR 懸濁液を滴下し、乾燥させることで薄膜を生成することができる。難点としては、温度や湿度などの環境が大きく影響することから、複数の同一な厚さの膜厚を作成することが難しいことがあげられる。そこで作成後に非接触で膜厚を測定する技術が必要となる。

今回、光を用いた非接触膜厚測定実験系を構築し、我々が用いているドロップキャスト法により、どの程度の厚さの薄膜が生成されているか、測定をおこなった。

〔方法〕 非接触膜厚測定の方法として、反射干渉分光法<sup>1)</sup>を用いた。薄膜に単色光を垂直入射すると、薄膜表面での反射光とガラス電極との境界での反射光が干渉する。この時の干渉の強弱は薄膜の厚さに依存する。ただし単色光を用いるだけでは、干渉の強弱が光の波長のオーダーで繰り返されるため、膜厚を推定することはできない。そこで、単色光ではなく、白色光を用いることで波長の情報も駆使し、膜厚を推定する手法が反射干渉分光法である。

構築した測定系を図 1 に示す。ドロップキャスト法により生成した bR 薄膜に白色光を入射し、かつ、反射干渉光を検出できるように、ファイバーバンドルを用いている。bR 薄膜からの反射干渉光は分光器に送られ、波長ごとの干渉データを収集する。収集した干渉データと、物理法則から導かれる理論式をフィッティングさせることで、膜厚を推定した。なお、あらかじめ bR 薄膜のないガラス電極のみを測定し、背景光の影響は取り除いている。

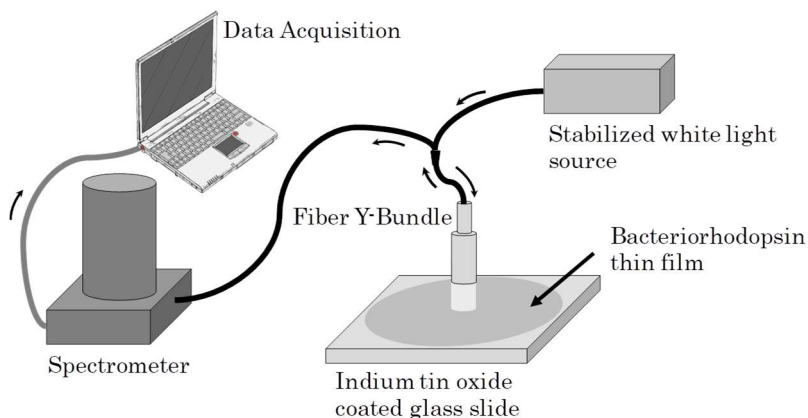


図 1. 構築した測定系の概念図

〔結果〕 図 2 に得られた干渉パターンとそのフィッティング結果を示す。横軸に波長を示しており、縦軸は反射干渉光の強度である。干渉の影響として約 550 nm 付近にて、出力が弱め合っていることがわかる。このサンプルのデータを理論式とフィッティングした結果、膜厚は 180 nm と見積もられた。合計 6 つのサンプルを確認したところ、膜厚は 170 nm から 229 nm に分布していた。この 6 つのサンプルはすべて同じ環境で作成されており、我々の方法では少なくとも膜厚に約 60 nm の違いがあることが明らかとなった。

〔考察〕 反射干渉分光法では、例えばある波長で光が弱められれば、その波長の 2 倍、3 倍の波長でも同様に光が弱められることになる。この干渉による強弱のパターンを理論式とフィッティングさせて膜厚を推定するのだが、今回は弱め合う場所が 550 nm 付近の一か所しかない。他のサンプルにおいても同じ傾向であり、作成されたサンプルの厚さが、反射干渉分光法で測定できる限界に近いものであることが明らかとなった。より精度よく膜厚を非接触で測定するためには、分光エリプソメータや干渉顕微鏡が必要となるであろう。

〔結論〕 ドロップキャスト法により作成された bR 薄膜を、反射干渉分光法を用いることで、非接触で測定することが可能となった。

〔文献〕

1) Fumiya Nemoto, (2021) Spectroscopy Letters 54(9): 707-714

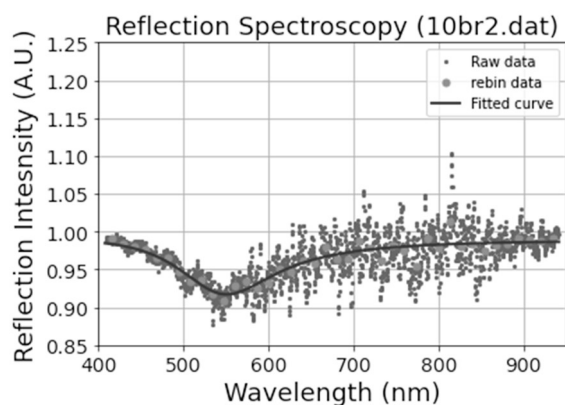


図 2. 測定された反射干渉光

### 3. アルキル化剤の違いによる傷害後の網膜における *Fgf2* の遺伝子発現の比較

蔭池かおり、藤枝弘樹

(解剖学 (神経分子形態学分野))

〔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おり、特に Sigma 社製の MNU (MNU-S) は古くから利用されている<sup>1) -2)</sup>。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ミュラーグリアの増殖性応答について詳細に検討してきた<sup>3) -4)</sup>。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ミュラー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した。その結果、①錐体視細胞が MMS 投与ラットで最も長く生残すること、②ミュラーグリアの S 期への進行が MMS 投与ラットで最も早いことを明らかにした。以上の結果は、視細胞変性とミュラーグリアの増殖応答において、MNU の製造社間での効果の差異は殆どなく、MNU 投与モデルと MMS 投与モデル間では差異があることを示している。本研究ではさらに、ミュラーグリアの増殖応答に関与することが報告されているサイトカインと成長因子 (*Tnf*, *Lif*, *Edn2*, *Fgf2*, *Igf1*) の網膜内における発現について、上記モデル間で差異があるか明らかにすることを目的とした。

〔方法〕 5 週齢、オスの Wistar ラットへ MNU-S (70mg/kg)、MNU-T (110mg/kg)、MMS (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から RNA を抽出し、*Tnf*, *Lif*, *Edn2*, *Fgf2*, *Igf1* の遺伝子発現について real-time PCR 法を用いて検討した。

〔結果〕 *Fgf2* の発現が MMS 投与ラットで MNU 投与ラットよりも有意に増加していた。

〔考察〕 錐体視細胞の生残時間と *Fgf2* の発現の差がミュラーグリアの増殖応答に関与している可能性が示唆された。

〔結論〕 MNU 投与モデルと MMS 投与モデル間で、*Fgf2* の遺伝子発現に差異があることが明らかになった。

〔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. Fgf2 とミューラーグリアの増殖応答の関連性：アルキル化剤による比較、第128回日本解剖学会総会・全国学術集会、仙台、2023/3

#### 4. Replication stress increases mitochondrial metabolism and mitophagy in FANCD2 deficient fetal liver hematopoietic stem cells

Makiko Mochizuki-Kashio<sup>1</sup>, Noriko Otsuki<sup>2</sup>, Kota Fujiki<sup>3</sup>, Sherif Abdelhamd<sup>4</sup>, Peter Kurre<sup>5</sup>, Markus Grompe<sup>6</sup>, Atsushi Iwama<sup>7</sup>, Kayoko Saito<sup>2</sup> and Ayako Nakamura-Ishizu<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Department of Microscopic and Developmental Anatomy, <sup>2</sup>Institute of Medical Genetics, <sup>3</sup>Department of Hygiene and Public Health, <sup>4</sup>Department of Pathology, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN, United States, <sup>5</sup>Children's Hospital of Philadelphia, Comprehensive Bone Marrow Failure Center, Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, United States, <sup>6</sup>Pape 切 Family Pediatric Research Institute, Oregon Stem Cell Center, Oregon Health & Science University, Portland, OR, United States, <sup>7</sup>Division of Stem Cell and Molecular Medicine, Center for Stem Cell Biology and Regenerative Medicine, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo)

[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 may be present earlier during prenatal or neonatal stages. We previously showed through a murine FA model (*Fancd2*<sup>-/-</sup>) that FA gene deletion confers to physiological replication stress (RS) during HSC development<sup>1</sup>). 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 HSCs<sup>2</sup>).

[Methods] We employed *Fancd2*<sup>-/-</sup> mice and analyzed *Fancd2*<sup>-/-</sup> 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*<sup>-/-</sup> FL HSCs exhibited a significant increase in MMP but comparable level of mtROS. Mitophagy was upregulated in *Fancd2*<sup>-/-</sup> FL HSCs. Mitochondrial areas were enlarged and concentrated in *Fancd2*<sup>-/-</sup> FL HSCs compared to *Fancd2*<sup>+/+</sup> 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

[Article]

- 1) Mochizuki-Kashio M, Otsuki N, Fujiki K, Abdelhamd S, Kurre P, Grompe M, Iwama A, Saito K, Nakamura-Ishizu A. Replication stress increases mitochondrial metabolism and mitophagy in FANCD2 deficient fetal liver hematopoietic stem cells. *Frontiers in Oncology*. 2023

[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. Fanconi Anemia-related replication stress increases cytosolic activity. 64th ASH
- 3) Mochizuki-Kashio M, Nakamura-Ishizu A. Mitochondria activity transition in Fanconi Anemia. The 27<sup>th</sup> Hematopoietic Malignant Research Group meeting

## 5. 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、倉田厚

(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異常 (ヒストン H3 異常) 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。ヒストン H3 異常としては、抑制性のヒストンマークである H3 p.K27me3 (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が代表的だが<sup>1)</sup>、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、ヒストンメチル化の減少 (H3 p.K27me3 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<sup>2)</sup>、DMG の病態解明を目指すことを目的とする。

〔方法〕 ヒストン H3 遺伝子変異により H3 p.K27me3 の減少を示す DMG 細胞株 (GDC129) を樹立し、本実験に用いた。DMG 細胞株の GDC129 を、ヒストンメチル化 (H3 p.K27me3) 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変動を示す代謝産物をメタボローム解析で同定した。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。

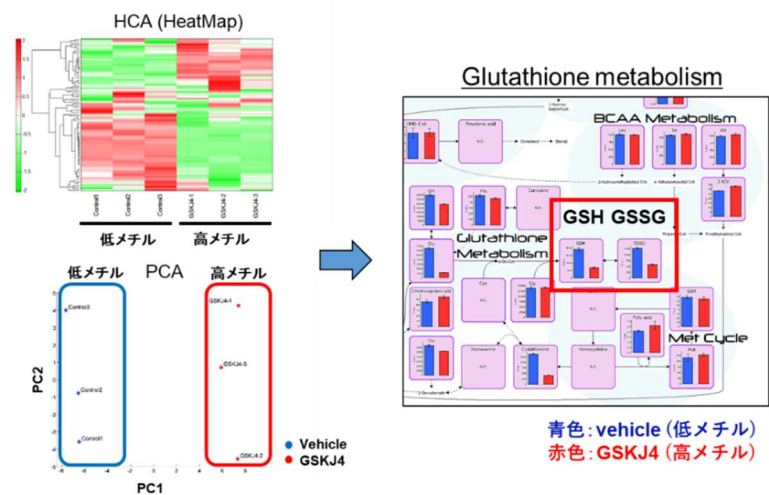


図 1. H3 p.K27me3 により制御される代謝経路の網羅的解析

※巻末にカラー図掲載

〔結果〕 これまでの研究では、H3 p.K27me3 の減少を示す GDC129 細胞を用いたメタボローム解析により、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) では、H3 p.K27me3 の減少と酸化ストレス (活性酸素種) の除去に働くグルタチオンの産生が有意に相関していることが明らかとなった (図 1)。続いて、H3 p.K27me3 依存的なグルタチオンの産生増加に関わる遺伝子群を探索した。解析の結果、GDC129 のヒストン低メチル化群では、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ンナーゼ 2 (GLS2) 遺伝子において、プロモーター領域で H3

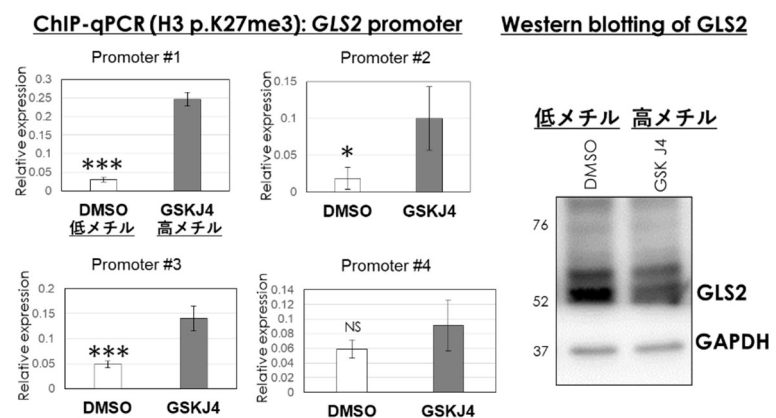


図 2. DMG における GLS2 遺伝子エピジェネティック制御

p.K27me3 が有意に減少し、同時に GLS2 のタンパク発現が有意に増加していた (図 2)。これらは、グルタチオン代謝に関わる GLS2 の遺伝子発現が、DMG ではエピジェネティック制御を受けている事を示している。更には、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死が誘導される事が分かり (図 3)、同機序が DMG の生存に関わっていることが示唆された。

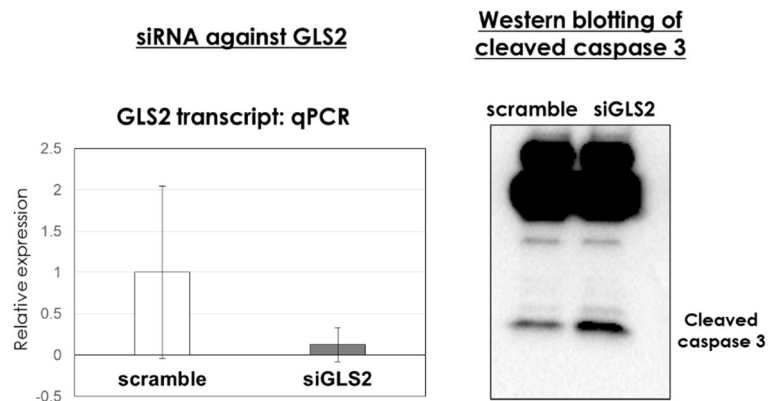


図 3. DMG 細胞における GLS2 遺伝子ノックダウンの効果

〔考察〕 ヒストン H3 遺伝子変異により H3 p.K27me3 の減少を示す DMG 細胞 (GDC129) の網羅的オミクス解析により、ヒストンメチル化 (H3 p.K27me3) 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繋ぐ遺伝子として 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、他のがん種では腫瘍形成に関与するとも報告されており、本研究結果も 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., Mischel P.S. (2023) Metabolic and epigenetic reprogramming in the pathogenesis of glioblastoma: Toward the establishment of "metabolism-based pathology". Pathol Int. 73(11): 533-541

〔学会発表〕

- 1) 増井憲太. 膠芽腫の分子病態—代謝が規定するがん細胞の phenotype—. 第 68 回日本病理学会秋期特別総会、岩手、2022/11

## 6. *Fusobacterium nucleatum* 亜種間の相互作用がバイオフィーム形成に与える影響

大坂利文<sup>1</sup>、中川隼輔<sup>2</sup>、常田聡<sup>2</sup>、柳澤直子<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>微生物学免疫学、<sup>2</sup>早稲田大学大学院・先進理工学研究科)

〔目的〕 *Fusobacterium nucleatum* は、口腔や腸内における常在細菌であり、歯周病や大腸がんの病態形成に関与することが知られている。*F. nucleatum* は、細胞表面のタンパク質を介して他の共存細菌との相互作用し、バイオフィームの形成に大きく寄与している。*F. nucleatum* は5種類の亜種が同定されているが、各亜種間でバイオフィーム形成能などの表現型に差異がある<sup>1)</sup>。そこで本研究では、*F. nucleatum* の亜種の共存が各菌の表現型に与える影響を評価した。

〔方法〕 本研究では、*F. nucleatum* subsp. *polymorphum* (JCM12990) および *F. nucleatum* subsp. *fusiforme* (JCM11024) を使用した。FnF および FnP の培養菌液を THINCERT®細胞培養インサート・12 ウェルプレート (ポリカーボネート製半透膜、ポア半径 0.4 μm, Greiner Bio-one) に播種した。インサート下の容器には、ポリリジンコートのカバーガラスを設置した。半透膜が底面に張られているインサートを各ウェルに設置した。72 時間の静置培養後 (37°C、嫌気環境下)、カバーガラスに付着したバイオフィーム形成量をクリスタルバイオレット溶液で染色し、OD<sub>595</sub> の値を測定した。また、カバーガラス上に形成されたバイオフィームを走査電子顕微鏡 (SEM) で撮影した (東京女子医科大学・総合医科学研究所・SEM 観察委託サービス)。

〔結果〕 各菌株を単独培養した場合、FnF はカバーガラス上にバイオフィームを形成するのに対して、FnP はバイオフィーム形成能が著しく低かった。一方、FnP と共培養すると、FnF のバイオフィーム形成能が著しく低下した。また、FnF 由来のバイオフィームの SEM 解析の結果、単独培養時には細胞表面に遊離前の膜小胞が確認されたが、共培養時には膜小胞の形成が認められなかった。

〔考察〕 培養インサートを介した *F. nucleatum* 亜種の共培養による FnP のバイオフィーム抑制は、FnP 由来の代謝産物が関与していることが示唆された。我々は、*F. nucleatum* 亜種間において、バイオフィーム形成能や増殖能に影響を与える情報伝達物質の産生能が異なることを見出しており、FnP 由来の情報伝達物質が FnF のバイオフィーム形成因子に影響を与えている可能性が考えられた。

〔結論〕 *F. nucleatum* 亜種間の代謝産物を介した相互作用は、バイオフィーム形成に影響を及ぼす。

〔文献〕

1) Muchova M., Balacco D.L., Grant M.M., et al. (2022) *Front. Oral. Health* 3:853618.

〔学会発表〕

1) 中川隼輔、塩崎有彩、常田聡、他. (2023) 細菌間コミュニケーションによる *Fusobacterium nucleatum* の動態変化の解析. 第 106 回日本細菌学会関東支部総会、千葉、2023/12



## 7. 神経ガイダンス因子セマフォリン 3A によるホスファチジルセリン表在化に関与する受容体とシグナル経路の特定

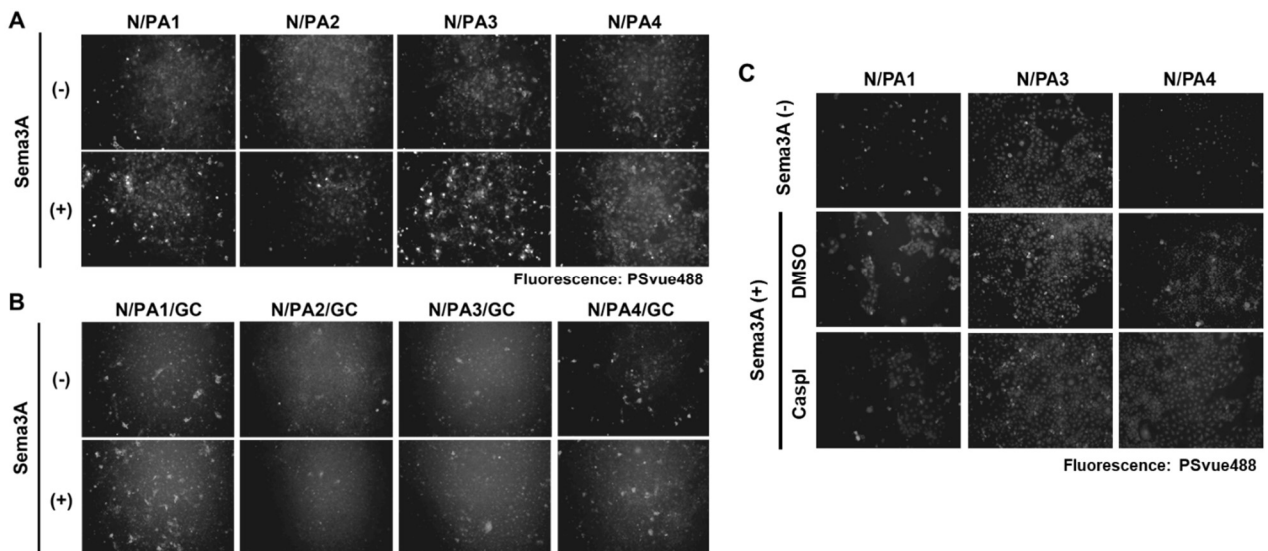
新敷信人<sup>1</sup>、土井蒔子<sup>1,2</sup>、中村史雄<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>生化学、<sup>2</sup>医学部第3学年)

〔目的〕 細胞膜のホスファチジルセリン (PS) は、通常脂質二重層の内層に限局しているが、細胞の機能を発揮する際、または細胞自死の際に外層へ表在化する<sup>1)2)</sup>。この PS 表在化を引き起こす細胞内シグナルとして、Ca<sup>2+</sup>濃度上昇、およびカスパーゼ経路の活性化が挙げられる<sup>1)</sup>。神経ガイダンス因子セマフォリン 3A (Sema3A) は、神経細胞に対して軸索退縮、樹状突起伸長、シナプス形成促進作用を示し、神経発達段階において重要な役割を果たす<sup>3)4)</sup>。最近我々は、Sema3A が初代大脳皮質神経細胞において PS を表在化させることを新たに見出し、その分子メカニズムや生理的機能に興味をもって研究を行っている。本研究は、Sema3A 受容体として知られる Neuropilin (NRP)/Plexin 複合体のうち、NRP1/Plexin A 複合体の Plexin A サブタイプ 1~4 について、どれが PS 表在化に関与しているかを特定すること、さらに Ca<sup>2+</sup>とカスパーゼのどちらを介しているか明らかにすることを目的とした。

〔方法〕 COS-7 培養細胞に NRP1 と共に Plexin A1~4 を一過性に発現させ、Sema3A (10 U/ml)を 37°C で 30 分作用させた。表在化した PS を染色するため、5 μM となるように PSvue488 を添加し 37°C で 5 分静置した。その後培養上清を取り除き、リン酸緩衝液で調製した 4%パラホルムアルデヒドを添加し、室温で 30 分細胞を固定した。PSvue488 の蛍光は、Nikon Ti2E (総合研究所 4F、現巴研究教育棟 2F) を用いて、対物 20 倍で観察・撮影した。細胞内 Ca<sup>2+</sup>の検出は、Ca<sup>2+</sup>が結合した際に蛍光が増強する GCaMP6s を受容体複合体と同時に強制発現させ、Sema3A 処理後の蛍光を撮影することにより行った。カスパーゼの阻害は、Sema3A 添加 30 分前に Caspase-3 inhibitor を 2 μM となるように加え、37°C で 30 分間行った。

〔結果〕 Sema3A による PS の表在化は、NRP1 と PlexinA3 の共発現 (*N/PA3*) で最も強く、次いで PlexinA1、PlexinA4 の発現で検出されたが、PlexinA2 の共発現では検出されなかった (図 1A)。細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇を表す GCaMP6s の蛍光の増強は、PlexinA1 (*N/PA1/GC*) と PlexinA4 (*N/PA4/GC*) の発現系でのみ認められ、その他ではほとんど認められなかった (図 1B)。また、カスパーゼを抑制すると (+*CaspI*)、PlexinA3 を介した PS 表在化は Sema3A を添加しないもの (*Sema3A (-)*) と同レベルまで強く抑制し、A1、A4 を介したものは部分的な抑制に留まった (図 1C)。



**図 1. COS-7 細胞強制発現系による PS 表在化シグナル経路の解析** A; NRP1 と PlexinA1~4 を共発現させ (N/PA1~4)、Sema3A を添加して表在化した PS を蛍光染色した。B; NRP1 と PlexinA1~4 に加え、Ca<sup>2+</sup>によって蛍光が増大する GCaMP6s も同時に発現させ (N/PA1~4/GC)、Sema3A を添加して蛍光観察した。C; NRP1/PlexinA の共発現系に対し、Sema3A 添加前に Caspase-3 inhibitor (Casp1) 処理を行い、表在化した PS を蛍光染色した。

〔考察〕 Sema3A による PS の表在化作用は、PlexinA3 を介したカスパーゼを活性化する経路で最も強く、PlexinA1、PlexinA4 では弱いものの、Ca<sup>2+</sup>濃度上昇とカスパーゼ活性化の両経路によって引き起こされているものと考えられた。今後は本結果を基に、実際に神経細胞においてどの受容体、どの経路で PS が表在化しているのか検討していきたい。

〔結論〕 神経ガイダンス因子 Sema3A による PS 表在化は、NRP1/PlexinA3 受容体複合体からカスパーゼ活性化に至る経路で最も強く誘導され、NRP1/PlexinA1、および NRP1/PlexinA4 受容体複合体では Ca<sup>2+</sup>濃度上昇とカスパーゼ活性化の両方の経路で誘導されることが明らかとなった。

〔文献〕

- 1) Bevers, EM. et al. *Physiol Rev* (2016) 96:605-645
- 2) Arashiki, N. et al. *Curr Opin Hematol* (2017) 24(3):167-172
- 3) Morita, A. et al. *J Neurosci* (2006), 26(11):2971-2980
- 4) Nakamura, F. et al. *J Neurosci* (2017), 37(30):7125-7139

〔学会発表〕

- 1) 神経ガイダンス因子セマフォリン 3A による細胞膜リン脂質非対称性崩壊の解析 ○新敷信人、中村史雄 第 95 回日本生化学会大会 名古屋 2022 年 11 月

## 8. 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〕 前年度に引き続き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：発表論文1）を用いてスフェロイド<sup>1),2)</sup>の内部構造を観測し、その機械的特性を直接計測する技術（文献3、発表論文2および投稿準備中）の開発を進めた。

〔方法〕 ヒト肝がん由来細胞株 **HepG2** を低吸着プレートで4日間培養し調製したスフェロイド（直径 180  $\mu\text{m}$ ）をガラスボトムディッシュに移し、レーザースキャン共焦点顕微鏡（総合医科学研究所 LSM710）で観察した。その際培養液 200 $\mu\text{L}$  に親水性蛍光色素(AlexaFluor647)を 30 $\mu\text{L}$  添加した。得られたスフェロイド断層像には網目状の蛍光シグナル（細胞間隙）に囲まれた個々の生細胞（暗い小区画）が観察できた（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し、スフェロイドと個々の細胞の変形を観測した（図1右）。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、NIS elements 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2）。また主要な細胞外マトリクス（ECM）タンパク質であるフィブロネクチン（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、野生株と比較した（図3）。さらにヒト大腸がん由来細胞株 DLD-1 およびヒト腎がん由来細胞株 293T についても同様の操作をおこない、HepG2 とのやわらかさのちがいを比較した（図4）。

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）を用いた（図5）。昨年度からの改良点として、スフェロイドはグルタルアルデヒド固定のちエタノール脱水、t-ブチルアルコール置換し凍結乾燥し、メスで断面を出したのちオスミウム蒸着を施した。

〔結果〕 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。また生きたスフェロイド内部の個々の細胞の変形や移動をリアルタイムに観測した（図1）。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、それぞれのスフェロイドの応力ひずみ曲線は野生株に対し緩やかな傾きとなり、野生

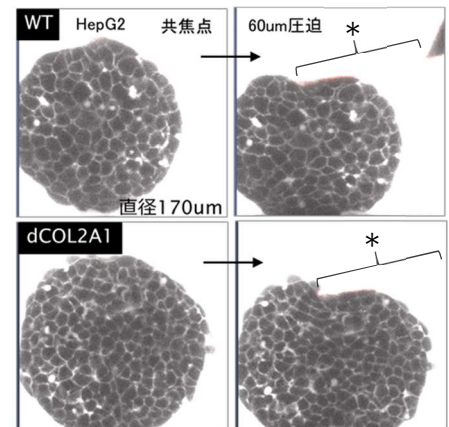


図1. カンチレバーによるスフェロイドの圧迫。上：HepG2 スフェロイド野生株。下：COL2A1 ノックダウン株。（いずれも共焦点を利用したライブイメージング（陰性造影法）。レバー（\*）を 1  $\mu\text{m}/\text{秒}$  で動かし圧迫した（右）。スフェロイド、内部細胞およびレバーの変形を観測できた。

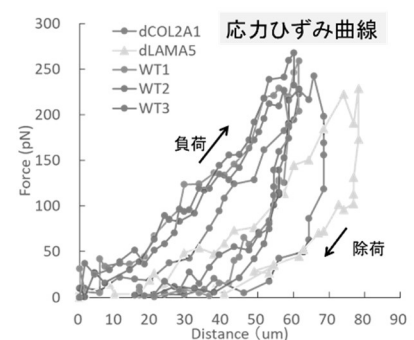


図2. HepG2 スフェロイドの応力ひずみ曲線。野生株3個(WT1-3)、LAMA5 ノックダウン(dLAMA5)、COL2A1 ノックダウン(dCOL2A1)。ノックダウンによってカーブの傾きが緩やかになり、スフェロイドが軟化したことがわかる。



株に比べて柔軟であることが明らかになった (図2)。さらにこのカーブは細胞株ごとに特徴的な形状を示した (図3)。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。

また同スフェロイドについて SEM による構造観察を行った。スフェロイドの断面には細胞サイズのくぼみが確認され、細胞間隙に沿った分割がおこなわれたと考えられた (図4)。断面の表層には繊維状構造が観察され、そのサイズからコラーゲン繊維であると考えられた。HepG2 の FN1 ノックダウンおよび COL2A1 ノックダウンスフェロイドのコラーゲン繊維は野生株に対し粗でありかつ短縮しているように見受けられた。現在は数値化を検討している。

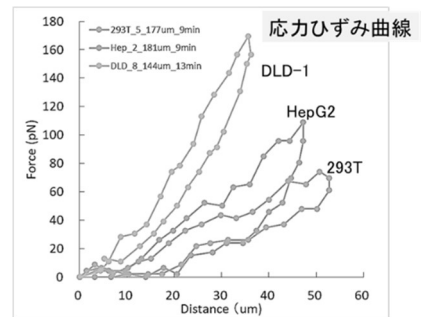


図3. 異なる細胞株より調製したスフェロイドの応力ひずみ曲線。DLD-1 は HepG2 よりも急勾配であり硬く、傾きの緩い 293T は軟らかい。

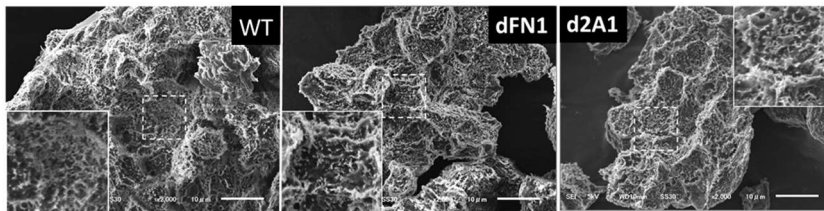


図4. SEM によるスフェロイド内部の細胞外マトリクスの観察。細胞サイズのくぼみの中に繊維状の構造が見える。野生株 (WT) に比べノックダウン (dFN1、d2A1) の繊維構造は粗であり短い。挿入: 破線の拡大図。バー: 10μm

〔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<sup>3)</sup>、この点が本研究の優位な点である。今後はノックダウン効率を段階的に変更し、ノックダウンとスフェロイドやわらかさの間の定量的な相関関係を明らかにしたい。

〔結論〕 前年度に開発した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深化させた。本技術はやわらかさと遺伝子発現および細胞構造の関係を明らかにするのに好適な技術である。

〔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

〔学会発表〕

- 1) 田中正太郎, 中村史雄. 3D 培養されたモデル組織の機械的特性に対するフィブロネクチンの貢献. 第 54 回日本結合組織学会学術大会、大阪、2022/6

## 9. 腎性貧血患者の赤血球におけるフリッパーゼ活性の測定

関桃子<sup>1,2</sup>、新敷信人<sup>1</sup>、星野純一<sup>2</sup>、土谷健<sup>3</sup>、中村史雄<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>生化学、<sup>2</sup>腎臓内科学、<sup>3</sup>血液浄化療法科)

〔目的〕 慢性腎臓病患者の多くで腎性貧血を合併する。腎性貧血の原因として腎臓におけるエリスロポエチン産生の低下がよく知られており、現在腎性貧血の治療にはエリスロポエチンを直接補充する赤血球造血刺激因子製剤 (ESA) が使用されている。しかし一部の患者では ESA 抵抗性や ESA による副作用が問題となることがある。

腎性貧血が生じる機序として赤血球寿命の短縮も以前から指摘されており、その程度としては約 60 日間と正常の半分程度とする報告もある<sup>1)</sup>。その機序として、健常人の赤血球が寿命を迎える機序に関与しているホスファチジルセリン (PS) 表在化が示唆されているが<sup>2,3)</sup>、明らかになっていない。PS の局在は、赤血球膜に存在するフリッパーゼ及びスクランブラーゼにより制御されており、フリッパーゼは ATP を消費して能動的に PS を外層から内層へ輸送し、一方スクランブラーゼは濃度勾配に従って PS を拡散輸送する。これまでに我々は健常人の赤血球において、比重で分離した寿命に近い“老化した”赤血球ではフリッパーゼ活性が低下することで PS が表在化しやすくなることを示した<sup>4)</sup>。

本研究では、「腎性貧血を呈している患者では健常人と同様に、老化した赤血球においての PS が表在化しており、老化現象が産生されてから早期の赤血球で出現することによって赤血球寿命が短縮する」という仮説をたて、腎性貧血患者の老化赤血球を分離し PS が多く表在化しているか、PS が表在化していればその機序を明らかにすることを目的とした。

〔方法〕 東京女子医科大学病院血液浄化療法科で血液透析を施行されている患者の、定期採血の残余血液を用いた (倫理委員会承認番号 4822-R2)。血液透析施行前に EDTA-2Na 入りの 2mL スピッツ (TERUMO 社製) へ採血され、検査が行われた後の残余血液を用い、1~2 日後以内に解析を行った。血液は 3000 rpm, 4°C, 5 分で遠心分離し、リン酸緩衝食塩水 (PBS; 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) で 3 回洗った。Percoll 液 (90%~75.8% Percoll, 250mM Sucrose, 10mM Tris-HCl pH 7.4, 120mM KCl) を比重の重い順 (d=1.154~1.130) に重層した上に血球を添加し、3500 rpm, 4°C, 30 分で遠心分離し、赤血球を Light fraction (LF) と Heavy fraction (HF) へ分離した。それぞれの血球 1 $\mu$ L を 1 mL の Annexin 用緩衝液 (5 mM CaCl<sub>2</sub> in TBS; 150 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, pH 7.4) へ混合し、1 $\mu$ L の Annexin V-FITC を添加し転倒混和後にセルアナライザ Beckman CytoFLEX S (巴研究棟 2F: 統合医科学研究所所有) で Annexin V-FITC の蛍光量を測定した。

スクランブラーゼは PS, ホスファチジルコリン (PC) の両者を輸送するが、フリッパーゼは PS を輸送するが PC は輸送しないことを利用して、NBD-PC の輸送速度をスクランブラーゼ活性、(PS の輸送速度-PC の輸送速度) をフリッパーゼ活性とした。輸送速度は以下のように測定した; ①血球 3  $\mu$ L を 30  $\mu$ L の PBSG 溶液 (PBS+20 mM Glucose) へ混合し、NBD 標識した PS, PC をそれぞれ添加する。②外層に漂着した PS/PC は脂質二重層の外層から内層へ輸送される。③経時的に 1%BSA を添加することで内層へ運ばれず外層に残った PS/PC を取り除き、その時点までに内層に輸送された蛍光量をセルアナライザで測定し、PS/PC 輸送の初速度を輸送速度とした。

〔結果〕 遠心分離により図 A のように腎不全患者の赤血球を分離できた。比重の大きい老化した赤血球では PS がより多く表在化していた (図 B)。比重の大きい赤血球では比重の小さい若い赤血球と比較して、NBD-PS の輸送速度が低下していたが NBD-PC の輸送速度は変化していなかった (図 C, D)。

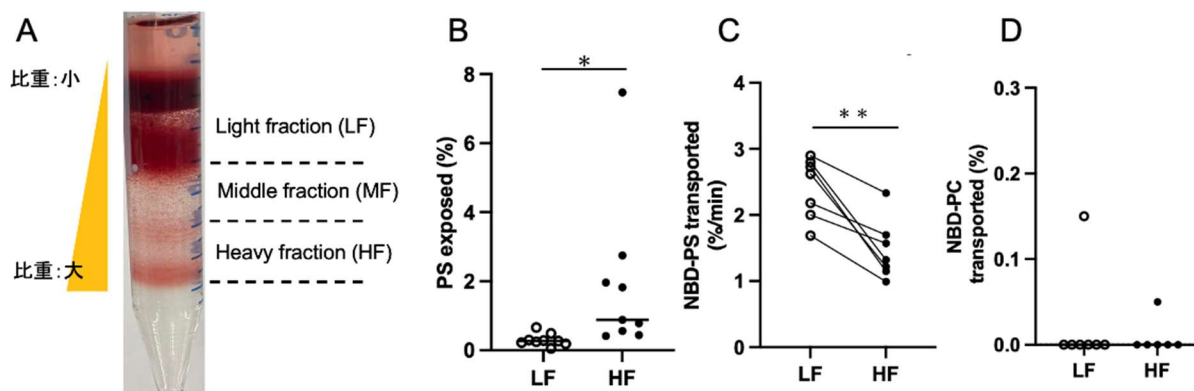


図 1. 比重による腎不全患者の赤血球の分離とセルアナライザによる PS 表在化率及びフリッパーゼ活性の測定 A: 比重により分離した赤血球 (LF; 若, HF; 老化), B: 分離した赤血球における PS 表在化率, C: 分離した赤血球における NBD-PS の輸送速度, D: 分離した赤血球における NBD-PC の輸送速度

〔考察〕 NBD-PS と PC の輸送速度の結果から、腎不全患者の老化赤血球ではスクランブラーゼ活性は変化ないがフリッパーゼ活性が低下しており、PS 表在化は健常人と同様にフリッパーゼ活性が低下することが原因であることが示唆された。また比重分離した際の赤血球の分布は、以前に実施した健常人の赤血球を分離したものと同様であった<sup>4)</sup>ことから、産生されてから早期に赤血球の比重が増加し PS が表在化しやすくなることで赤血球寿命が短縮していることが示唆された。

〔結論〕 血液透析を受けている腎不全患者の赤血球のうち比重が大きい老化赤血球では、フリッパーゼ活性が低下することによって PS を表在化している赤血球が増加しており、腎不全患者の赤血球寿命短縮の一因であると推測することができた。

#### 〔文献〕

- 1) Mario Bonomini et al. American Journal of Kidney Diseases, 38: 807-814, 2002
- 2) Shu-Hong Bi et al. Renal Failure, 28: 573-576, 2006
- 3) Rosi Bissinger et al. Kidney and blood Pressure Research, 41: 966-977, 2016
- 4) Momoko Seki et al. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 24: 13991-14000, 2020

#### 〔学会発表〕

- 1) 「Phosphatidylserine exposure and shortened life span of erythrocytes in renal anemia」 関桃子、嵐機信人、星野純一、土谷健、中村史雄、ヨーロッパ腎臓学会 (イタリア)、2023 年 6 月 15 日
- 2) 「腎性貧血におけるホスファチジルセリンの赤血球寿命短縮への関与について」 関桃子、嵐機信人、星野純一、土谷健、中村史雄、日本腎臓学会 (横浜)、2023 年 6 月 9 日
- 3) 「腎性貧血における赤血球寿命短縮と赤血球膜のフリッパーゼ活性について」 関桃子、嵐機信人、星野純一、土谷健、中村史雄、日本生化学会 (福岡)、2023 年 11 月 1 日

## 10. 子宮内電気穿孔法を用いた *in vivo* 樹状突起伸長機構の解析

瀧澤光太郎、中村史雄

(生化学)

〔目的〕 Semaphorin3A(Sema3A)は大脳皮質錐体細胞の基底樹状突起伸長を促進する。Sema3A 情報伝達では複数のリン酸化経路が活性化される。我々は新たにいくつかのリン酸化基質を同定したが、これら全てのノックアウト/ノックインマウスの作成は現実的でない。一方で神経細胞の形態解析のみであれば、子宮内電気穿孔法(iUE)を用いることで *in vivo* の解析は可能である。そこで今回は、昨年度立ち上げた iUE で実際に神経細胞に変異体を導入し、形態の観察・解析を行った。

〔方法〕 胎生 14 日の ICR マウス側脳室にプラスミド DNA を injection しエレクトロポレーションした。生後 4 週で還流固定、切片を作成し、共焦点レーザー顕微鏡(LSM710)で撮像した。Sholl 解析によって樹状突起の発達を評価した。

〔結果〕 撮像された神経細胞を図 1 に示す。Filler として用いた GFP の蛍光が大脳皮質 II/III 層に確認された。Sholl 解析によって樹状突起の発達を評価した(図 1A, B)。野生型の基質(WT)と比較して非リン酸化変異体(Y501F)では樹状突起の発達が悪く、Sholl 解析のスコアも有意に減少した。全基底樹状突起長も同様に減少した(図 1C)。

〔考察〕 Y501F 変異体ではリン酸化/脱リン酸化のどちらが重要なのか判断出来ない。また既知のリン酸化基質との関連性も不明であり、今後検討を進めていきたい。

〔結論〕 同定した基質のチロシンリン酸化/脱リン酸化が Sema3A による大脳皮質神経樹状突起発達に必要である。

〔発表論文〕

1) Ethiraj Ravindran, Nobuto Arashiki, Lena-Luise Becker., et al. (2022) elife.

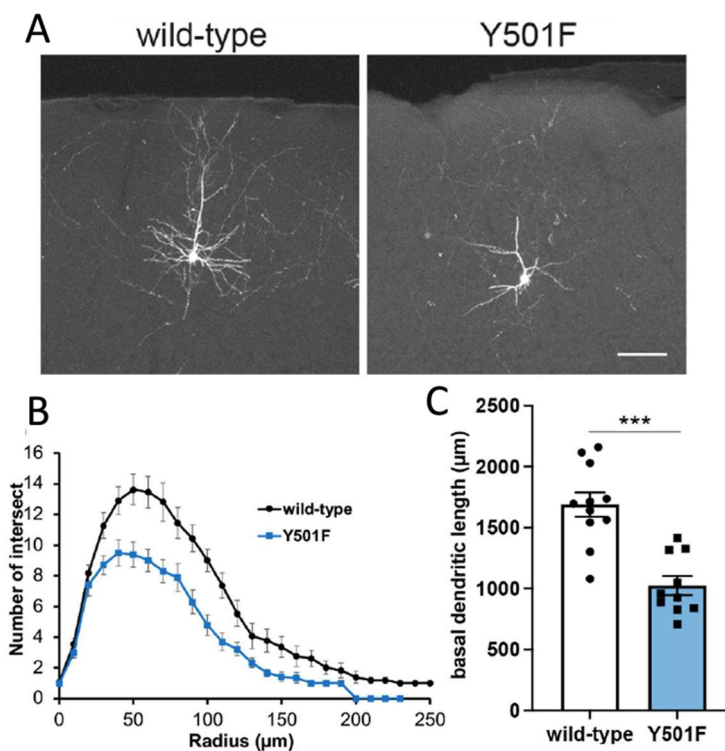


図 1. 非リン酸化変異体の過剰発現は樹状突起発達を抑制する (A) Wildtype および非リン酸化変異体 Y501 を過剰発現させた大脳皮質神経細胞。(B,C) Sholl 解析のスコアと全基底樹状突起の長さ (μm)。