

【研究活動報告】

1. 心外膜由来の FGF-4 が心臓発生に及ぼす影響

石井泰雄¹、矢野和佳²、小山紗璃²、浦瀬香子¹

(¹統合教育学修センター・基礎科学 (生物学)、²医学部・研究プロジェクト)

〔目的〕 心臓に血液を供給する冠状血管の分布には、多少の個人差はあるものの一定のパターンが存在する。このパターンはどのように決まるのだろうか。「心外膜由来の間葉組織の不均一な分布が冠状血管形成の鋳型として機能する」という古くからある仮説¹⁾を、遺伝子導入法を用いて検証した。

〔方法〕 心外膜の間葉転換を促進するとされているシグナル分子の遺伝子を組み込んだ Tol2 トランスポゾンベクター²⁾を、エレクトロポレーション法³⁾およびリポフェクション法⁴⁾を用いてニワトリ胚の心外膜に導入し、影響を調べた。

〔結果〕 われわれは、昨年度の *in vitro* 遺伝子導入によるスクリーニングにおいて、VEGF-A (血管内皮細胞増殖因子 A) および FGF-4 (線維芽細胞増殖因子 4) の発現ベクターが、培養条件下の心外膜の間葉転換を促進することを明らかにした。また、ニワトリ胚心外膜に VEGF-A ベクターを導入すると、導入された部位に心外膜由来の間葉組織の肥厚が生じ、その内部に内皮と平滑筋に囲まれた内腔を持つ血管様構造が形成されることを見いだした。

本年度は、毒性が高く解析が困難であった FGF-4 ベクターの導入条件の検討を行った(図 1A)。その結果、孵卵開始後 5 日以降の胚がこのベクターの導入に対する十分な耐性を持つことが判明し、FGF-4 強制発現の心臓発生に及ぼす影響を解析することが可能となった。解析の結果、導入部位の間葉組織が著しく肥厚し、内部に赤血球を蓄積した隆起が形成されることが明らかになった。興味深いことに、VEGF-A 強制発現の結

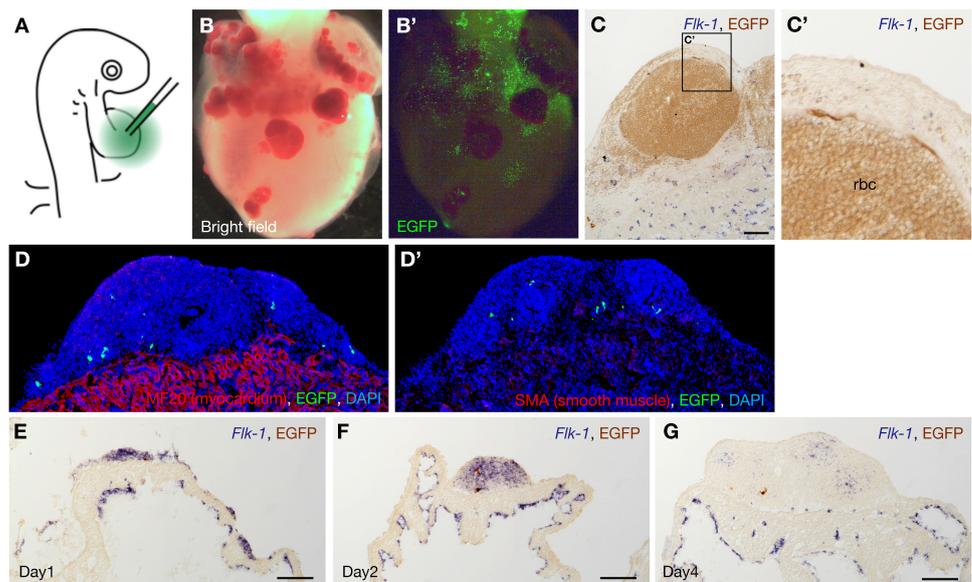


図 1. FGF-4 強制発現により生じる異所性の血管形成を伴わない間葉組織の肥厚。バー:100 μ m。(A) *In ovo*リポフェクション法による遺伝子導入。FGF-4 の発現ベクターをEGFPベクターとともにリポフェクション試薬と混ぜ合わせ、孵卵5日目のニワトリ胚心膜腔に注入した。ベクターは心臓表面を覆う心外膜に導入される。(B,B') 導入6日後の心臓。EGFP (B', 緑)は遺伝子が導入された部位を示す。(C,C') 導入部位の切片像。血管内皮マーカーFlk-1(青紫)とEGFP(茶)の二重染色。C'はCの四角で囲まれた部分を拡大したもの。肥厚内部に蓄積された赤血球(rbc)の周囲に、Flk-1陽性の血管内皮は見られない。(D, D') 心筋マーカーMF20および平滑筋マーカーSMAに対する免疫染色。FGF-4は心筋を覆う間葉組織を著しく肥厚させるが、そこに異所性の平滑筋は見られない。(E-G) 導入後の経時変化。導入1日後(E)、2日後(F)、4日後(G)の心房。導入翌日には既に間葉組織の肥厚の兆しが見られる。Flk-1の発現は、導入2日後までは肥厚の広い範囲に見られ、以後消失する。

果とは異なり、蓄積された赤血球の集団のまわりに血管内皮マーカーや平滑筋マーカーの発現が検出されることはなかった（図 1B-D）。導入後の経時変化を調べたところ、血管内皮マーカーの発現が肥厚を開始した間葉組織の広い範囲に一時的に検出されるものの、やがて消失することがわかった（図 1E-G）。

〔考察〕 冠状血管の形成には心外膜が不可欠である。遺伝学的あるいは物理的な手法を用いて心外膜の形成を阻害すると、冠状血管が形成されず、胚は発生途中で死に至る⁴⁾。冠状血管の平滑筋の主な起源が心外膜であることを示す一連の細胞運命解析の結果も⁵⁾、血管形成における心外膜の重要性を裏付けている。一方、心外膜由来の細胞のふるまいと冠状血管の分布パターンとの関係については、これまで実験に基づく検証が十分になされてこなかった。

昨年度までの研究で、われわれは心外膜由来の間葉組織の不均一な分布と冠状血管形成の間の関連を示唆するいくつもの証拠を得てきた。VEGF-A の心外膜における強制発現が、間葉組織の局所的な肥厚とともに異所性の血管形成を促すことも、そのような証拠の一つである。本年度は、FGF-4 の強制発現が、異所性の血管形成を伴わない間葉組織の肥厚をもたらすことを明らかにした。間葉組織の形成と血管形成が実験的に分離可能であることを示すこの結果は、両者の間に直接的な因果関係が存在しない可能性を示唆している。この結果は、FGF-4 が心外膜の間葉転換を促進する作用を持ちながら、血管形成を抑制する作用も持つと仮定すれば一応の説明はつく。しかし、FGF-4 は一般に血管新生を促進する因子として知られており⁶⁾、少なくとも現時点では FGF-4 がこのような抑制作用を持つとは考えにくい。

本研究で明らかになったように、FGF-4 強制発現の影響は、異所性の血管形成を伴わない点で VEGF-A 強制発現の影響とは明確に異なる。ベクターの導入時期の違いもあり、この差異の原因を特定するためにはさらなる解析が必要であるが、今後、心外膜や他の血管前駆細胞の FGF-4 と VEGF-A に対する応答を細胞レベルあるいは遺伝子発現レベルで解析し比較することで、冠状血管パターン形成のメカニズムの解明につながる重要な手がかりが得られることが期待される。こうして得られる知見は、心疾患の予防法や治療法の新たな開発に貢献しうるものかもしれない。

〔結論〕 心外膜の間葉転換と血管形成は VEGF-A によってともに促進されるものの、FGF-4 は間葉転換のみを促進することから、両者の間に直接的な因果関係はないと考えられる。

〔文献〕

- 1) Little CA, Piquet DM, et al. (1989) *Anat. Rec.* 224: 417-425
- 2) Sato Y, Kasai T, et al. (2007) *Dev. Biol.* 305: 616-624
- 3) Ishii Y, Weinberg K, et al. (2009) *Development* 136: 2579-2589
- 4) Ishii Y, Garriock RJ, et al. (2010) *Dev. Cell* 19: 307-316
- 5) Quijada PQ, Trembley MA, et al. (2020) *Circ. Res.* 126: 377-394
- 6) Presta M, Dell'Era P, et al. (2005) *Cytokine Growth Factor Rev.* 16: 159-178

〔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、東京、2023/5

2. 医学教育における網膜シミュレータの応用に関する研究

辻野賢治

(統合教育学修センター・基礎科学 (物理学))

〔目的〕 医学教育において、学修を効果的にするための方法として、シミュレーションが推奨されている¹⁾。シミュレーション教育の具体的な利点は、例えば注射・採血などの基本的手技を身につけるための訓練を、人工的な環境を用意することで繰り返し行うことができる、といったものである。一方、基礎医学の領域では、人体で実際に起きている現象をシミュレータにより再現することで、理解をサポートする役割もある。本研究ではシミュレーション教育として後者の役割を期待し、具体例として、網膜でどのような情報処理が行われているかを理解するために、網膜シミュレータの活用が可能かを検討した。

〔方法〕 網膜シミュレータとして、PRANAS (Platform for Retinal Analysis and Simulation)²⁾を用いた。このソフトは視細胞とそれ以降の神経節細胞などで行われている信号処理を模倣し、最終的に脳に送られるスパイク信号を生成する。ただし、各細胞のはたらきを一対一で実現したシミュレータではないため、個々の細胞のはたらきを確認できない限界がある。

ユーザーは視細胞を刺激する画像や動画を用意することで、最終的に網膜で発生するスパイク列をシミュレートできる。また設定により、マウスや猫といった、ヒト以外の網膜のシミュレーションも可能である。PRANASの実行ファイルとソースコードは公開されており³⁾、研究目的であれば、ダウンロード日から1年間はソフトウェアを無償で使用することができる。OSはWindowsとLinuxに対応している。

今回は網膜のはたらきを確認するために、白と黒の2色からなるシンプルな画像(図1左パネル参照)を見たときに、網膜がどのようなスパイク信号を出力するかを確認した。また、その応用としてヘルマングリッド(図1右パネル参照)錯視がシミュレーション可能かも確認した。

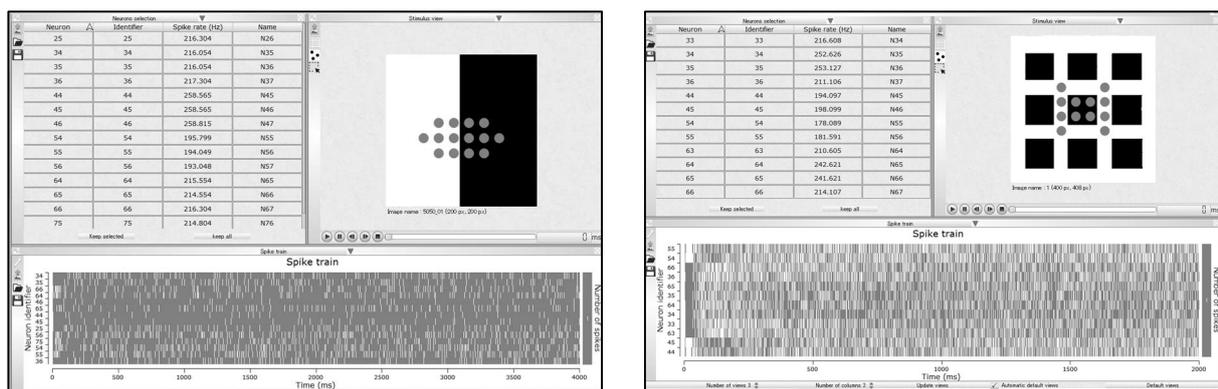


図1. PRANAS でシミュレートした視細胞の刺激パターンが各パネルの右上に表示されている。左のパネルでは白と黒のシンプルなパターン、右のパネルではヘルマングリッドと呼ばれる格子パターンが示されている。パターン上の丸印の位置のスパイク列情報が、各パネルの左上と下に表示されている。

〔結果〕 結果を図2に示す。図2の左図がシンプルな白と黒のパターン刺激があったときの網膜からのスパイク列を画像化したものであり、白と黒の境界部分が強調されていることが分かる。図2の右図はヘルマングリッドのパターン刺激のシミュレーション結果である。格子模様だけでなく、その交点も強調されていることが分かる。

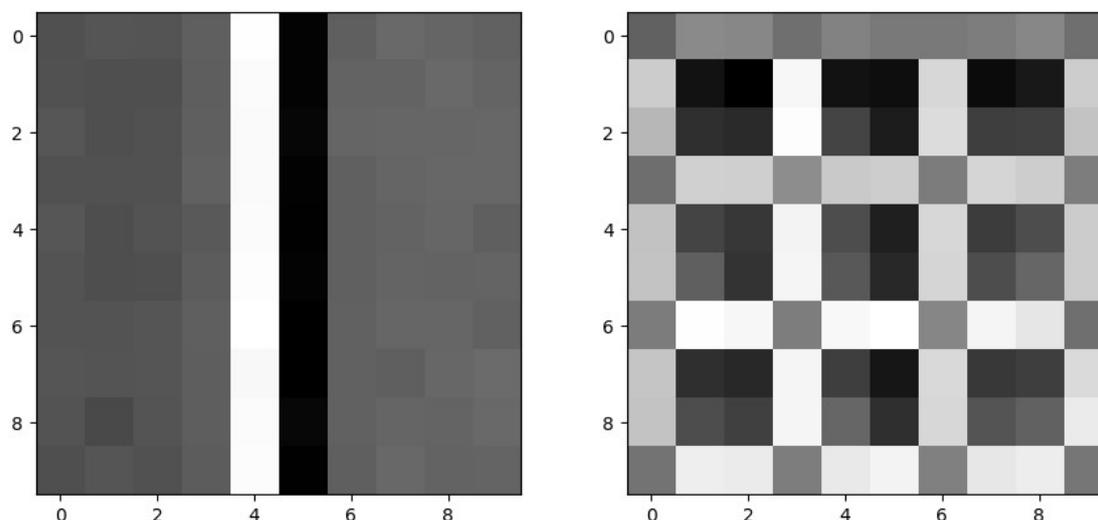


図2. PRANAS によりシミュレートされた、網膜から出力されるスパイク列のパターンを画像化したもの。左図がシンプルな白と黒のパターン刺激に対するスパイク列であり、右図がヘルマングリッド刺激で発生したスパイク列である。

〔考察〕 網膜にある様々な細胞のはたらきにより、刺激をうけた視細胞とその周辺の視細胞が逆の応答を示す中心周辺型の特徴を示すため、我々はコントラストが明瞭であれば物体や画像の輪郭を認識することが可能となる。結果から、このようすを再現できていることが分かる。また、この網膜の特徴により、実際にはないものを認識してしまう「錯視」を引き起こすことが明らかになっており、ヘルマングリッド錯視をシミュレートすることにも成功した。

〔結論〕 PRANAS を用いることで、教科書だけでは理解することは難しいと考えられる網膜のはたらきや、その応用として「錯視」をシミュレートすることができた。マウスや猫の網膜を用いずとも、これらの機能を確認できることは医学生の理解を深めることにつながると期待される。また、疾患のある網膜を PRANAS 上で設定可能になれば、患者の疑似体験や臨床応用にも期待ができる。課題は、実際の教育効果の測定であり、網膜シミュレータを用いた教育プログラムの開発が重要となる。

〔文献〕

- 1) 医学教育モデル・コア・カリキュラム 令和4年度改訂版
https://www.mext.go.jp/content/20240220_mxt_igaku-000028108_01.pdf
最終確認日 2024/11/14
- 2) B. Cessac, P. Komprobst, S. Kraria, et al. (2017) Technology Report, 11(49) : 1-14
- 3) <https://team.inria.fr/biovision/pranas-software/> 最終確認日 2024/11/14

3. p38による網膜の組織修復阻害

蔣池かおり、藤枝弘樹

(解剖学 (神経分子形態学分野))

〔目的〕 魚類の網膜では神経細胞に変性が起こると主要なグリアであるミュラー細胞が脱分化して増殖し、新しい神経細胞へ再分化することで網膜を完全に再生する^{1)・2)}。一方、哺乳類の網膜ではミュラー細胞による再生は起こらない。我々はこれまでに、視細胞特異的な細胞変性を誘導するアルキル化剤 (methyl-methanesulfonate: MMS) をラットへ腹腔内投与して視細胞変性モデルを作製し³⁾、ミュラー細胞が、変性視細胞のフォスファチジルセリンを認識することを引き金として貪食能を獲得し、変性細胞のクリアランスと同時に増殖すること⁴⁾、増殖とともにDNA損傷を起こし、DNA損傷応答として知られるp53-p21経路が活性化して細胞死を起こすことを見出した⁵⁾。また、その過程で、ミュラー細胞においてMAPKファミリーに属するp38が活性化することを明らかにした。p38は細胞外の刺激を核内の転写制御機構へ伝達するシグナル分子で、DNA損傷などのストレスにより活性化され、DNA損傷応答、貪食、増殖など様々な機能と関係していることが知られている。本研究では、ラット視細胞変性モデルのミュラー細胞におけるp38の機能について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MMSを腹腔内投与して2日目に網膜を摘出し、p38の阻害剤であるSB203580の存在下、非存在下で器官培養して免疫組織化学的な解析を行った。

〔結果〕 p38の機能阻害により、変性細胞のクリアランスの促進、ミュラー細胞増殖の促進、およびミュラー細胞においてp53とp21の発現低下がみられた。

〔考察〕 p38は変性細胞のクリアランスとミュラー細胞の増殖の抑制、およびp53-p21経路の活性化を介して、ミュラー細胞による網膜の組織修復を抑制していることが示唆された。

〔結論〕 p38は、ミュラー細胞による網膜の再生を抑制している可能性がある。

〔文献〕

- 1) Bernardos RL, Barthel LK, Meyers JR, et al. (2007) *J. Neurosci.* 27: 7028-7040
- 2) Fausett BV, Goldman D. (2006) *J. Neurosci.* 26:6303-6313
- 3) Nomura-Komoike K., Nishino R., Fujieda H. (2024) *Sci. Rep* 14: 61
- 4) Nomura-Komoike K., Saitoh F., Fujieda H. (2020) *Sci. Rep.* 10: 1488
- 5) Nomura-Komoike K., Saitoh F., Komoike Y., et al. (2016) *Invest. Ophthalmol. Vis.Sci.*57 (3) : 1169-1182

〔発表論文〕

- 1) Nomura-Komoike K., Nishino R., Fujieda H. (2024) Effects of different alkylating agents on photoreceptor degeneration and proliferative response of Müller glia. *Sci. Rep* 14: 61

[学会発表]

- 1) 蔣池かおり、藤枝弘樹. 視細胞変性に伴うミュラー細胞の増殖とミクログリアの関与による細胞死.
vision science forum2023、沖縄、2023/10
- 2) 蔣池かおり、藤枝弘樹. 視細胞変性後のミュラー細胞の細胞死とミクログリア/マクロファージの役割.
第 129 回日本解剖学会総会・全国学術集会、沖縄、2024/3

4. Notch の活性化による傷害網膜の Müller 細胞の増殖機構の解明

齋藤文典、藤枝弘樹

(解剖学 (神経分子形態学分野))

〔目的〕 魚類などの下等脊椎動物は、網膜の Müller 細胞が内在性の幹細胞として組織の修復に関わることが知られている。哺乳類の Müller 細胞も網膜傷害後に増殖し、神経細胞に再分化することが報告されているが、その再生能力は極めて乏しい。また、同じ哺乳類でもラットの Müller 細胞は網膜傷害後に増殖能が見られるが、マウスでは見られない¹⁾。Notch は Müller 細胞神経幹細胞の未分化性の維持に必要な転写制御因子であるが、魚類では Notch シグナルを阻害すると Müller 細胞の増殖が亢進することが報告されている。一方、Ascl1 や Lin28 などの初期化因子を導入したマウスでは、Notch シグナルを阻害しても網膜傷害後の Müller 細胞増殖の亢進は見られないことが報告されており²⁾、その機能は不明な点が多い。本研究は、網膜傷害時のラットとマウスの Müller 細胞の増殖能の違いに着目して、哺乳類の網膜再生に関与する Notch シグナルを解析した。

〔方法〕 C57BL/6J マウスおよび Wistar ラットの腹腔内にメチルメタンスルホン酸 (MMS) を投与して網膜傷害を誘導した。Müller 細胞に目的遺伝子を導入するために、Müller 細胞と親和性が高い shH10 をキャプシドとして用い、GFAP プロモーター下で目的遺伝子を発現するアデノ随伴ウイルス (AAV)、または U6 プロモーター下で目的遺伝子の shRNA の発現を誘導する AAV を作製した。作製した AAV は硝子体内に投与し、Müller 細胞で目的遺伝子を発現するマウスを作製した。網膜傷害後に BrdU を投与して増殖細胞をラベルし、網膜を回収後に凍結切片を作製し、蛍光免疫組織染色法を用いて解析した。

〔結果・考察〕 網膜傷害後のラット Müller 細胞では Notch の発現が誘導された (図 1)。Notch の shRNA を発現誘導する AAV を投与したラットの網膜では、網膜傷害後の Müller 細胞における Notch の発現が抑制され、Müller 細胞の増殖も抑制された (図 1)。この結果から、網膜傷害後の Müller 細胞の増殖には Notch シグナルが必要であることが明らかになった。さらに、網膜傷害時のラットとマウスの網膜で発現が変動する Notch の標的遺伝子の比較解析を行い、Müller 細胞の増殖に関与する Notch シグナルの標的因子として cyclin D1 を同定した。Notch の活性化ドメインを過剰発現したマウス網膜では、Cyclin D1 が強く発現誘導された (図 2)。さらに、cyclin D1 を過剰発現したマウスの網膜では、網膜傷害後に Müller 細胞が増殖することが明らかになった (図 3)。これらの結果から、MMS 投与による網膜傷害モデルにおいて、Notch の活性化による cyclin D1 の発現誘導が Müller 細胞の増殖に必要であることが明らかになった。今後、Notch による Cyclin D1 の発現制御機構、Cyclin D1 による増殖制御機構の解析を継続していく予定である。

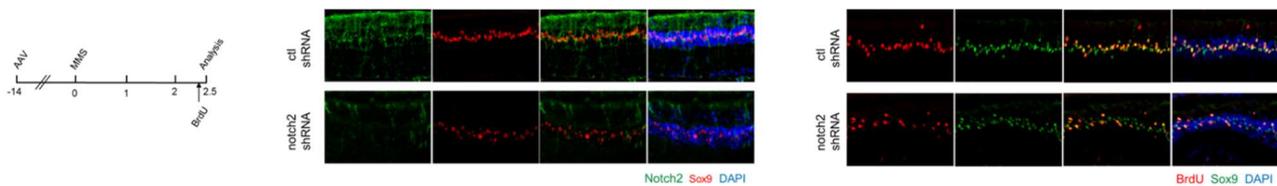


図 1. Notch の shRNA を発現誘導する AAV をラットの硝子体内に注入した。2 週間後に MMS の投与により網膜変性を誘導し、増殖細胞を BrdU でラベルした。図は Notch、BrdU または Sox9 の免疫組織染色。Sox9 は Müller 細胞のマーカースとして用いた。

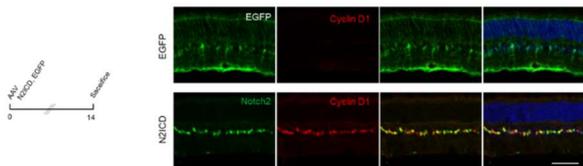


図 2. Notch の活性化ドメインを発現する AAV をマウスの硝子体内に注入したマウスにおける、2 週間後の Notch および Cyclin D1 の免疫組織染色。コントロールとして EGFP を発現する AAV を用いた。

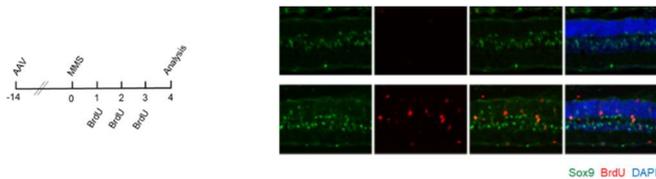


図 3. Müller 細胞に Cyclin D1 を発現させたマウスの傷害網膜における BrdU および Sox9 の免疫組織染。

〔文献〕

- 1) Nomura-Komoike K., Saitoh F., et al. (2016) IOVS 57(3): 1169-82.
- 2) Elsaiedi F., Macpherson P., et al. (2018) J. Neurosci. 38(9) : 2246-61
- 3) Wu Z., Liao B., Ying J., et al. (2024) eLife. 100904

〔発表論文〕

- 1) Motoyoshi A., Saitoh F., Iida T., Fujieda H. Nestin regulates Müller glia proliferation and microglia infiltration after retinal injury. (2023) IOVS 64(14) : 8

〔学会発表〕

- 1) 本吉 絢、齋藤 文典、飯田 知弘、藤枝 弘樹. ネスチンは網膜損傷後のミュラーグリア増殖とミクログリア浸潤を制御する. 第 62 回日本網膜硝子体学会総会、横浜、2023/11
- 2) 齋藤 文典、藤枝 弘樹. Notch の活性化による傷害網膜の Müller 細胞の増殖機構の解明. 第 46 回日本分子生物学会年会、神戸、2023/12

5. Described Fanconi Anemia associated developmental failure of hematopoietic stem cell by conditional knockout mouse system

Makiko Mochizuki-Kashio, Tomomasa Yokomizo, Ayano Yahagi and Ayako Nakamura-Ishizu
(Department of Microscopic and Developmental Anatomy)

[Purpose] To describe the mechanism of hematopoietic failure with Fanconi Anemia (FA), 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*^{-/-}) that FA gene deletion caused HSC decrease during embryogenesis with increased replication stress and metabolism, including mitochondrial oxidation. We found TUDCA treatment or haploinsufficiency of interferon α rescued the phenotype¹. However, the main cause of the phenotypes is unrevealed.

[Methods] We established *Fancd2* conditional knockout mouse (*Fancd2*^{fl/fl}) and utilized that for specific *Fancd2* deletion in definitive hematopoiesis (*Tie2-Cre* or *Vav1-Cre*), erythropoiesis (*EpoR-Cre*) and fetal hepatocyte (*Alb-Cre*). Conditional knockout mice were analyzed at embryonic day 14.5 and fetal liver HSC number was analyzed.

[Results] Unexpectedly, both intrinsic and extrinsic deletion of *Fancd2* were unchanged the HSC number. To think about the comprehensive effects of FA gene deletion, we crossed *Fancd2*^{fl/fl}; *Tie2-Cre* and *Fancd2*^{fl/fl}; *Alb-Cre* and that hybrid mice exhibited HSC deletion at E14.5.

[Discussion] To think about the molecular mechanism of the result, we focused on the essentiality of bile acid for HSC development². We plan the experiment to measure the concentration by using the conditional mice fetal liver.

[Conclusions] FA genes are essential for both intrinsic and extrinsic HSC development.

[Reference]

- 1) Kovuru N, Mochizuki-Kashio M, Menna T, Jeffery G, Hong Y, Yoon Y, and Zhang Z, Kurre P. Deregulated Protein Homeostasis Constrains the Fetal HSC Pool Expansion in Fanconi Anemia. *Nature Commun.* 15:1852 2024
- 2) Valgardur Sigurdsson, Hajime Takei, Svetlana Soboleva, Visnja Radulovic, Roman Galeev, Kavitha Siva, L M Fredrik Leeb-Lundberg, Takashi Iida, Hiroshi Nittono, Kenichi Miharada. Bile Acids Protect Expanding Hematopoietic Stem Cells from Unfolded Protein Stress in Fetal Liver. *Cell Stem Cell.* 2016 Apr 7;18(4):522-32.

[Conference Presentation]

- 1) Mochizuki–Kashio M, Takizawa K, Nakamura F, Nakamura-Ishizu A. “PTPδ regulates bone development and hematopoiesis” ISEH, 2023
- 2) Mochizuki-Kashio M, Yahagi Y, Yokomizo T, Nakamura-Ishizu A. “TPO agonist rescued developmental hematopoietic stem cell” 3rd Regional Symposium on Myelodysplastic Syndromes, 2024

6. ココナッツオイルの摂取が脂肪組織の炎症性マクロファージ浸潤に及ぼす影響

飯塚讓¹、北川千夏子²、田村永遠²、上芝秀博¹、平子哲史³、大坂利文¹、金賢珠⁴、柳澤直子¹
(¹微生物学免疫学、²医学部、³人間総合科学大学、⁴東洋大学)

〔目的〕 ココナッツオイルは健康食品として着目されているが、2型糖尿病の予防に対する有用性は確立されていない。2型糖尿病はインスリンの作用不足に起因し、通常量のインスリンで期待される血糖低下作用が得られない状態である「インスリン抵抗性」が原因の1つとして考えられている。特に内臓脂肪型肥満は、炎症性M1マクロファージをはじめとする免疫担当細胞が内臓脂肪組織に浸潤することで、慢性炎症を引き起こしインスリン抵抗性が惹起される¹⁾。また、ヘパトカインの一種である Fetuin-A は、肥満状態で発現が増加し、脂肪組織の慢性炎症およびインスリン抵抗性に対する増悪因子となることが見出されているが²⁾、ココナッツオイルの摂取が Fetuin-A の産生に及ぼす影響は明らかになっていない。そこで本研究は、肥満・2型糖尿病モデルマウスを用いて、ココナッツオイルの摂取が肝臓における Fetuin-A の産生と脂肪組織のM1マクロファージ浸潤に抑制的に作用するかを検討し、ココナッツオイルの有用性について基礎的エビデンスを得ることを目的とした。

〔方法〕 肥満・2型糖尿病モデルマウスである KK/TaJcl マウス（以下、KK マウスとする）と非肥満の対照マウスとして C57BL/6JJcl マウス（以下、BL6 マウスとする）を用いた。実験飼料は総脂肪エネルギー比を 25 とし、脂肪源をラードとサフラワー油（4:6）とした LSO 食、LSO 食の脂肪エネルギー比 20 分をココナッツオイルで置き換えた CO 食を各系統のマウス（7 週齢、雄性）に与え、それぞれ LSO 群、CO 群とした。8 週間の飼育後に解剖を行い、血糖値、血漿中のインスリンおよび Fetuin-A 量、肝臓の Fetuin-A と脂肪組織の M1 マクロファージマーカー（CD68、CD11c）、Monocyte chemotactic protein 1（MCP-1）に対するタンパク質発現の解析を行った。また、脂肪組織の免疫染色により CD68 と CD11c の陽性細胞数を確認した。

〔結果〕 CO 群の KK マウスは、LSO 群と比較して血糖値、血漿中 Fetuin-A 量が有意に低値を示した。また、肝臓の Fetuin-A タンパク質発現および脂肪組織における CD68、CD11c、MCP-1 のタンパク質発現が有意に低下した。脂肪組織の免疫染色を行ったところ、CO 群では CD68 と CD11c の陽性細胞数が LSO 群と比べて減少する傾向があった。これらの血漿中および肝臓のパラメータにおいて、BL6 マウスは群間で有意な変化が認められず、脂肪組織の CD68 と CD11c 陽性細胞は検出されなかった。さらに、血糖値と血漿中インスリン値からインスリン抵抗性の指標である HOMA-IR を算出したところ、各系統においてココナッツオイルの摂取による有意な変化は確認されなかった。

〔考察〕 Fetuin-A とケモカインである MCP-1 はマクロファージの遊走因子であるため、ココナッツオイルを摂取した KK マウスは肝臓 Fetuin-A 発現の低下に伴って血漿中レベルが減少し、くわえて脂肪組織の MCP-1 産生が抑制されたことで、脂肪組織に浸潤する M1 マクロファージが少なくなったと推察された。しかしながら、8 週間のココナッツオイル摂取では HOMA-IR が有意に低下するまでには至らなかったため、インスリン抵抗性の改善効果を得るためには、摂取期間の延長といった検討が必要であると考えられる。

〔結論〕 ココナッツオイルの摂取は、KK マウスの血漿中 Fetuin-A 量と肝臓のタンパク質発現量を低下させ、脂肪組織における炎症性マクロファージの浸潤を減少させた。

〔文献〕

- 1) Pal D., Dasgupta S., Kundu R., et al. (2012) Nat Med. 18(8): 1279-1285
- 2) Zatterale F., Longo M., Naderi J., et al. (2020) Front Physiol. 10: 1607

〔発表論文〕

- 1) Iizuka Y., Kitagawa C., Tamura T., et al. (2024) Dietary coconut oil lowered circulating fetuin-A levels and hepatic expression of fetuin-A in KK/TaJcl mice. J Clin Biochem Nutr. Advance online publication

7. 神経ガイダンス因子セマフォリン 3A による大脳皮質神経細胞のホスファチジルセリン表在化部位と受容体発現部位の解析

新敷信人¹、土井蒔子^{1,2}、中村史雄¹

(¹生化学、²医学部第4学年)

〔目的〕 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¹⁾²⁾。最近我々は、通常は内層にのみ存在する細胞膜のホスファチジルセリン (PS)³⁾⁴⁾を表在化させる作用が Sema3A に存在することを見出し、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。昨年度は、Sema3A 受容体として知られる NRP1/Plexin A 複合体の Plexin A サブタイプ 1~4⁵⁾のうち、A3 >> A1 > A4 の順に PS を表在化させる作用が強いことを、培養細胞への強制発現系を用いて示した。本年度は、大脳皮質神経細胞において、Sema3A の PS 表在化部位ならびに PlexinA サブタイプの発現部位を詳細に解析し、両者間の関連性を検討することを目的とした。

〔方法〕 動物実験、遺伝子組換え実験、ならびに病原体取り扱い実験は、それぞれの委員会の許可を得て実施した (AE23-082-3, GE23-052-2-B, BE23-222)。胎生 13~15 日の (E13~15) マウスの大脳皮質を採取し、トリプシン処理により細胞を単離して分散培養 (1 x 10⁴ cells/well) を行った。PS の表在化部位解析のため、培養 3 日目に神経細胞の形態評価を目的として赤色蛍光タンパク質 (RFP) を発現する HIV ベクターを感染させ、培養 6 日目に Sema3A (10 U/ml) を添加し 37°C で 30 分間刺激した。その後、PSvue480 を用いて表在化した PS を蛍光染色し、4% PFA で細胞を固定した。PlexinA サブタイプの発現部位は、それぞれの特異的抗体を用いた免疫染色により解析した。この際、樹状突起のマーカーである MAP2 を重染し、発現部位の特定を行った。染色は培養 6 日目に実施した。各シグナルは、蛍光顕微鏡 (Nikon TiE2 ; 総合医科学研究所 巴棟 2F) を用いて観察した。

〔結果〕 大脳皮質神経細胞において Sema3A 刺激により PS が表在化し、特に太い樹状突起様の神経突起先端部や分岐部、神経突起発達時に見られる構造である成長円錐に特に強いシグナルが認められた (図 1)。PlexinA サブタイプのうち、A3, A4 が強く発現しており、A1, A2 はほとんど認められなかった (図 2A)。PlexinA3 は MAP2 とほぼ重染し、樹状突起特異的に発現していること、中でもより先端部で高発現していることがわかった (図 2B)。一方、PlexinA4 は MAP2 で染色されない神経突起にも発現が認められ、樹状突起と軸索両者に一様に存在していることがわかった (図 2B)。PlexinA3 と A4 の重染ではこの分布の違いを反映した結果、すなわち軸索に相当する PlexinA4 のみが発現する神経突起が認められた (図 2B)。

〔考察〕 Sema3A により、神経突起の伸長、退縮、分岐に関与する部位で PS が表在化したことから、Sema3A がもつ神経突起への作用との強い関連性が示唆された。また、PlexinA3, A4 の両者とも PS 表在化部位に一致する分布を示していたが、昨年度の結果も踏まえると、主に PlexinA3 を介して PS 表在化シグナルが活性化するものと考えられた。

〔結論〕 Sema3A は主に PlexinA3 を介して、樹状突起先端部や分岐部、成長円錐において PS を表在化させ、神経発達作用に関与する可能性が示された。

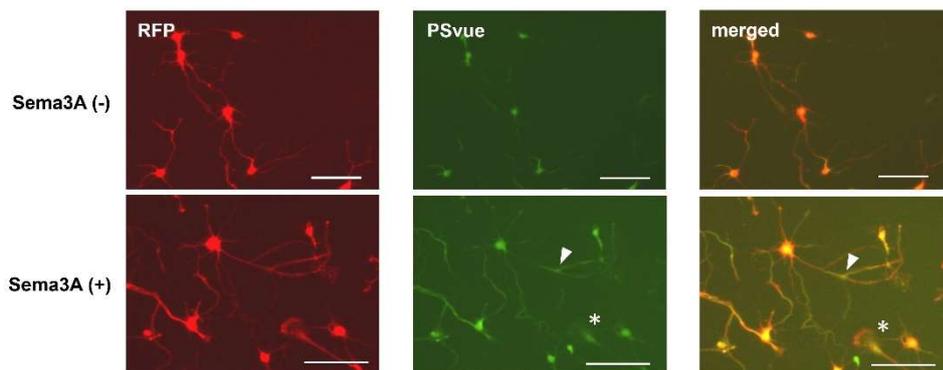


図 1. Sema3A 刺激による PS 表在化部位の解析

E15 マウスより採取した大脳皮質細胞に対し、培養 3 日目に RFP を導入する HIV を感染させ、培養 6 日目に Sema3A 刺激および PSvue 染色を行った。矢頭：神経突起分岐部、*：成長円錐、Bars: 100 μ m

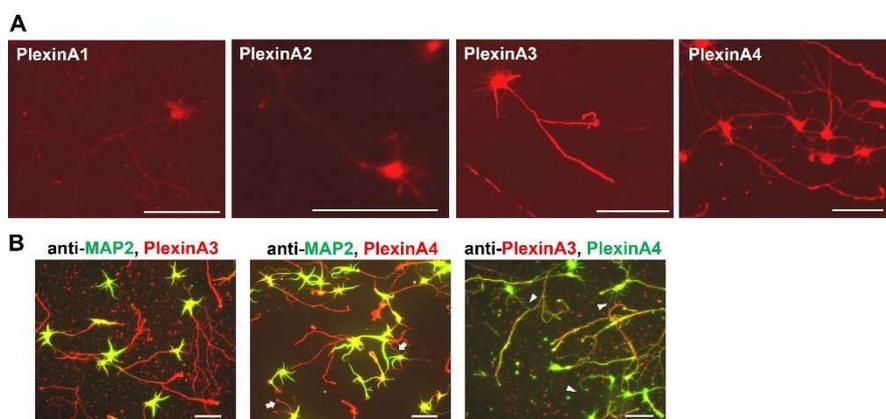


図 2. 大脳皮質神経細胞に発現する PlexinA サブタイプの解析

(A) E15 マウスより採取した大脳皮質細胞に対し、各 PlexinA 抗体を用いた免疫染色を行った。(B) 発現量の多かった PlexinA3 ならびに A4 について、MAP2 との重染および A3 と A4 の重染を行った。矢印：MAP2 非染色性神経突起(軸索)、矢頭：PlexinA4 のみの発現、成長円錐、Bars: 100 μ m

〔文献〕

- 1) Morita, A. et al. *J Neurosci* (2006), 26(11):2971-2980
- 2) Nakamura, F. et al. *J Neurosci* (2017), 37(30):7125-7139
- 3) Bevers, EM. et al. *Physiol Rev* (2016) 96:605-645
- 4) Arashiki, N. et al. *Curr Opin Hematol* (2017) 24(3):167-172
- 5) Takahashi T et al. *Cell* (1999), 99(1):59-69

〔学会発表〕

- 1) 新敷信人、土井蒔子、中村史雄 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のシグナル経路解析 第 96 回日本生化学会大会 2023 年 10 月 福岡

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^{1),2)}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の開発を進めた（文献 3、発表論文 2 および投稿準備中）。本年度は遺伝子改変モデルの調製と計測を試みた。

〔方法〕 ヒト肝がん由来細胞株 HepG2 あるいはヒト腎がん由来細胞株 293T を低吸着プレートで培養し調製したスフェロイド（直径 180 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 および LSM900）で観察した。その際培養液 200 μL に親水性蛍光色素(AlexaFluor647)を 30 μL 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 1A 左列）。また LSM710 にて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 1A）。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、MoveTr2D 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 1B）。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）、の ECM 結合タンパク質結合部位を削除した変異遺伝子を作成し、発現プラスミドに挿入した上で YFP 融合タンパク質として 293T 細胞に一過的に発現させた。この細胞からスフェロイドを調製し、同様に調製した野生型 FN1 発現スフェロイド、およびプラスミドを導入しない未処理スフェロイドとやわらかさの違いを比較した。

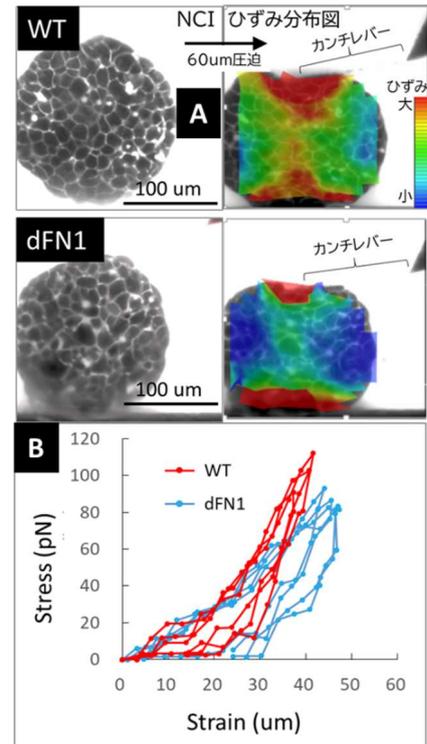


図 1. カンチレバーによるスフェロイドの圧迫。(A) HepG2 スフェロイドの野生株 (WT) とフィブロネクチンノックダウン (dFN1)。いずれも共焦点を利用したライブイメージング（陰性造影法）。カンチレバーを 1 $\mu\text{m}/\text{秒}$ で動かし圧迫した。右は圧迫後のひずみ分布図。レバー接点および反対側の圧迫点でひずみが大きかった。また dFN1 ではパターンが異なった。(B) 応力ひずみ曲線。それぞれ $n=3$ および $n=4$ 。

〔結果〕 上述のカンチレバーにてスフェロイドを圧迫し、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 1A 左）。また画像からひずみ分布図（図 1A 右）および応力ひずみ曲線を作成した（図 1B）。FN1 をノックダウンした場合、スフェロイドの応力ひずみ曲線の傾きは野生株と比較して緩やかに変化しており、組織の軟化が示された（図 1B）。また、スフェロイド内に形成されるひずみの分布も明確に変化していた（図 1A）。

次にこの FN1 発現プラスミドを元に、PCR を利用して次の ECM 結合部位を削除した変異遺伝子を

用意した：①フィブリン結合部位②コラーゲン結合部位③インテグリン結合部位（RGD）（図 2A）。これらをそれぞれ一過的に発現するスフェロイドを用意し、応力ひずみ曲線を作成した。野生型を発現させた場合、未処理のものに比べて傾きは鋭角化した。これに対して上記①～③の部位を欠損した変異型の場合、いずれも未処理の角度に比べて緩やかに変化していた。

〔考察〕 ECM の主要な構成成分である FN1 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）およびひずみ分布に明確な変化が生じた。また FN1 からの ECM 結合部位の削除は、組織の軟化をもたらした。これらは ECM タンパク質の構成や機能が組織のやわらかさを決定しているという従来の考え方を直接実証する結果である。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⁾、この点がスフェロイドを利用する本研究の優位な点である。今後は免疫組織化学の結果と対照しながら、FN1 の構造的役割を明確化していきたい。

〔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利用し、FN1 の ECM タンパク質結合部位とやわらかさの関係を解析した。本技術は遺伝子発現・機能と組織構造・やわらかさの関係を明らかにするのに好適である。

〔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. Contribution of collagen as a structural element of tissue elucidated by new imaging technology. 第 46 回日本分子生物学会年会、兵庫、2023/12
- 2) 田中正太郎、中村史雄. 3D培養細胞の機械的特性および内部ひずみの直接イメージング. 第 96 回日本生化学会大会、福岡、2023/10
- 3) 田中正太郎、中村史雄. ECM タンパク質をノックダウンしたモデル組織（3D培養細胞）の機械的特性および歪みの直接観測. 第 55 回日本結合組織学会学術大会、岡山、2023/6

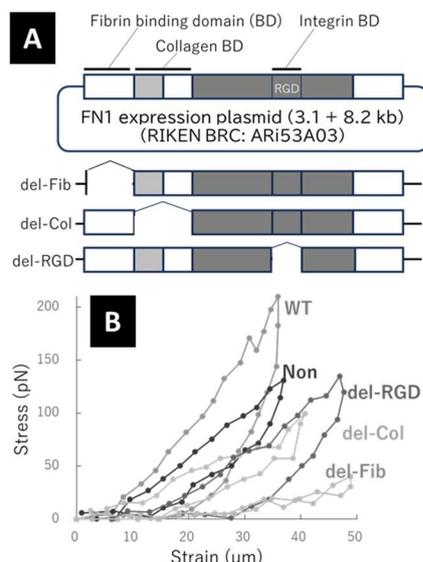


図 2. 変異 FN1 遺伝子の発現。(A) 発現プラスミドおよび ECM 結合部位削除遺伝子の設計。del-Fib: フィブリン結合部位削除、del-Col: コラーゲン結合部位削除、del-RGD: インテグリン結合部位削除。(B) 応力ひずみ曲線。

9. NRP1/PTP δ 複合体形成は Sema3A による皮質神経細胞の樹状突起発達に必須である

瀧澤光太郎、中村史雄

(生化学)

〔目的〕 Semaphorin3A(Sema3A)は軸索ガイダンスや樹状突起発達の促進等、神経回路形成に重要な役割を果たす。Sema3A シグナル経路を媒介するタンパク質として、受容体チロシンホスファターゼ δ (PTP δ)を同定した。PTP δ は Sema3A 依存的に多数の基質を脱リン酸化するが、Sema3A とは直接結合できない。本研究では PTP δ がどのように Sema3A シグナルを受容するか、その分子機構を明らかにする。

〔方法〕 PTP δ 細胞外領域に変異を導入し、タンパク質間相互作用を検討した。得られた変異体を子宮内電気穿孔法(iUE)で胎児大脳皮質に導入し、神経形態を評価した。

〔結果〕 PTP δ は Sema3A 受容体 Neuropilin-1(NRP1)と複合体を形成した。PTP δ 細胞外領域に存在する塩基性アミノ酸リッチな配列の変異は、NRP1 との結合を減少させた。同様に NRP1 の酸性アミノ酸領域の変異では PTP δ との結合が減少した。PTP δ 変異体を導入した神経細胞は、樹状突起発達が低下した。

〔考察〕 PTP δ は NRP1 と複合体形成することで Sema3A シグナルに関与する。PTP δ 変異体と PTP δ ノックアウトマウス(KO)、Sema3A KO の表現型は同様であった。古典的 Sema3A 受容体、シグナル経路は NRP1/PlexinA による低分子量 G タンパク質の活性化が知られている。NRP1 変異体は Sema3A や PlexinA との結合には影響しないようである。したがって、NRP1/PTP δ の結合は NRP1/PlexinA 複合体とは競合せず、むしろ両者によるリン酸化経路と低分子量 G タンパク質の経路の協働が Sema3A による樹状突起発達には必要である。

〔結論〕 PTP δ は NRP1 と複合体となることで、Sema3A シグナルを受容し、樹状突起発達を促進する。

10. 健常人の赤血球におけるフリッパーゼ活性

関桃子^{1,2}、新敷信人¹、星野純一²、中村史雄¹

(¹生化学、²腎臓内科学)

〔目的〕 貧血はさまざまな原因によって生じる病態で、赤血球産生低下または除去の亢進といった、産生と除去のバランスが崩れることで生じると考えられる。除去亢進である赤血球寿命の短縮は腎性貧血や慢性炎症に伴う貧血で示されており、その病態の改善は貧血の治療となりうるが未だ機序は不明である。

健常人において、赤血球は産生されてから 120 日間経つと脾臓のマクロファージに貪食されて寿命を迎える。この機序として、寿命を迎える直前の“老化赤血球”ではリン脂質の一種であるホスファチジルセリン (PS) が脂質二重層の外層へ多く表在化されることで、マクロファージに認識されると考えられている。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 を拡散輸送するが、フリッパーゼ及びスクランブラーゼのどちらが PS 表在化に寄与するかについては不明であった。そこで我々は健常人の赤血球 (n=3~5) において、比重で老化赤血球と若い赤血球に分離し、それぞれにおいてフリッパーゼ活性及びスクランブラーゼ活性を測定し、老化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¹⁾。

今後、赤血球寿命の短縮による貧血の病態を明らかにするために、まずは健常人における個人差を評価することが重要である。本研究では、より多くの健常人においてフリッパーゼ活性及びスクランブラーゼ活性を測定し、健常人におけるこれらの基準値を決定することを目的とした。

〔方法〕 文書による同意を得た健常人より、EDTA-2Na 入りの 2mL スピッツ (TERUMO 社製) に採血を行い (倫理委員会承認番号 2023-0174) , 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 Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄, 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 μL を 1 mL の Annexin 用緩衝液 (5 mM CaCl₂ in TBS; 150 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, pH 7.4) へ混合し、1 μL 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 μL を 30 μL 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 (%/min) とした。

〔結果〕 遠心分離により図 A のように健常人の赤血球を分離した。比重の大きい老化赤血球の PS 表在化率は $1.53 \pm 1.62\%$ ，比重の小さい若い赤血球では $0.21 \pm 0.09\%$ で、老化赤血球で有意に増加していた ($p = 0.0482$, Unpaired t test, 図 B) 。若い赤血球のフリッパーゼ活性は $4.15 \pm 0.42\%/min$ ，スクランブラーゼ活性は $0.009 \pm 0.073\%/min$ ，老化赤血球のフリッパーゼ活性は $2.17 \pm 0.31\%/min$ ，スクランブラーゼ活性は $0.05 \pm 0.019\%/min$ であった (図 C, D) 。

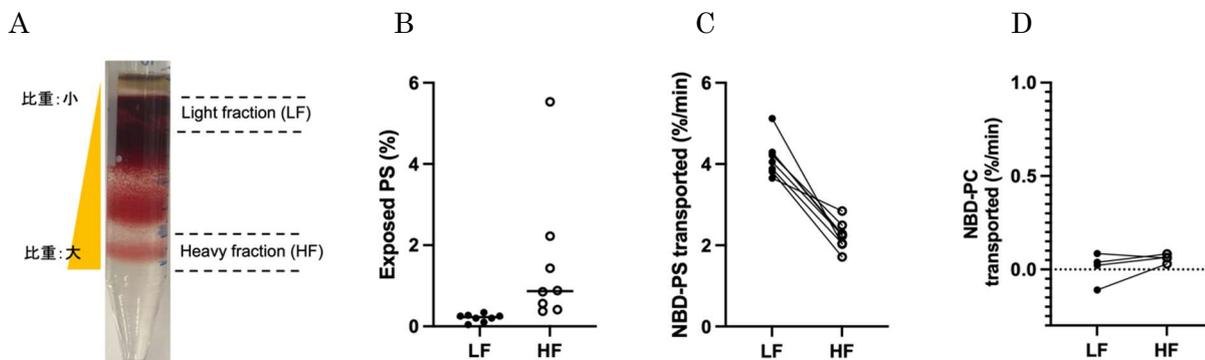


図 1. 比重による健常赤血球の分離とセルアナライザによる PS 表在化率及びフリッパーゼ活性の測定 A: 比重により分離した赤血球(LF; 若, HF; 老化), B: 分離した赤血球における PS 表在化率, C: 分離した赤血球における NBD-PS の輸送速度, D: 分離した赤血球における NBD-PC の輸送速度

〔考察〕 PS 表在化率は個人差が大きいものの、フリッパーゼ/スクランブラーゼ活性の個人差は比較的軽度であった。老化赤血球におけるフリッパーゼ活性は若い赤血球の 39-77%に低下しており、以前のデータ¹⁾ (50-70%) と同程度であった。

〔結論〕 上述の実験系において、健常人の赤血球の PS 表在化率、フリッパーゼ活性及びスクランブラーゼ活性の標準値を測定した。今後さらに n 数を増やして検証していく。

〔文献〕

1) Momoko Seki et al. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 24: 13991-14000, 2020

〔学会発表〕

- 1) 「Reduced flippase activity in the early life of mature erythrocytes is associated with their shortened lifespan in renal anemia」 関桃子、新敷信人、星野純一、土谷健、中村史雄、アメリカ腎臓学会 (アメリカ)、2024 年 10 月 24 日
- 2) 「腎性貧血において、若い赤血球でのフリッパーゼ活性の低下は赤血球寿命を短縮する」 関桃子、新敷信人、星野純一、中村史雄、日本腎臓学会 (横浜)、2024 年 11 月 7 日