

# 【研究活動報告】

## 1. 腸特異的平滑筋層の形成に及ぼす周囲環境の影響

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)

〔目的〕 消化管を構成する組織が発生の過程で正しく配置されることが、ヒトを含めた動物にとって重要であることは言うまでもない。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。平滑筋層は、消化管壁の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。この器官間の違いは器官形成期に既に見られることから、発生の早い時期から段階的に進行していく消化管の領域化と深く関係していると思われる。

消化器官の発生においては、内胚葉性の上皮と中胚葉性の間葉の相互作用が重要である。特に上皮の分化に対する間葉の影響については、数多くの報告がなされている<sup>1),2)</sup>。しかし、間葉由来の平滑筋の器官特異性をもたらすしくみに関する知見は乏しい。

チロシンキナーゼ受容体および膜結合型リガンドをコードする *Eph/ephrin* 遺伝子群の発現解析により、我々は *EphA3* 遺伝子の発現が腸 (小腸・大腸) の輪走筋で特異的に見られることを発見した (図 1A)。本研究では、*EphA3* の発現を指標とし、胚期消化管における器官特異的平滑筋の形成に周囲環境がどのような影響を及ぼすかを実験発生学的解析により調べた。

〔方法〕 ニワトリ (*Gallus gallus domesticus*) 胚およびウズラ (*Coturnix Japonica*) 胚を用いて、移植実験を行った。1.5~5 日間孵卵したウズラ胚 (2~5 日胚, ドナー) から消化器官もしくはその原基を取り出し、0.03% コラゲナーゼ処理により上皮と間葉に分けたのちに、卵殻内のニワトリ 1.5 日胚 (ホスト) に移植した (図 1B)。

9 日胚になるまで移植胚を発生させ、移植片を取り込んだ消化器官を固定、凍結切片を作成し、ウズラ細胞に対する特異抗体 (QCPN) および平滑筋に対する特異抗体 (抗 SMA) を用いた免疫染色、*EphA3* mRNA に対するプローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。

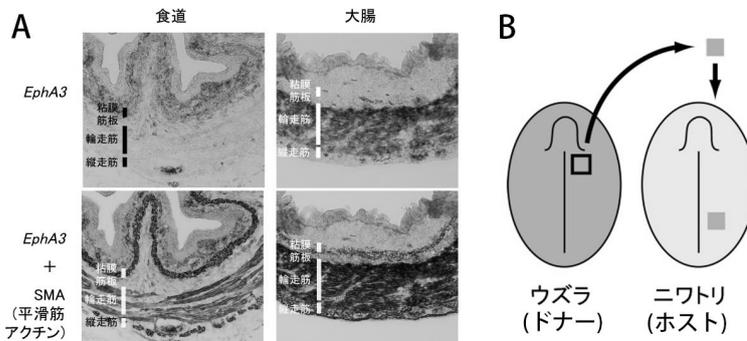


図 1. ニワトリ 14 日胚食道と大腸における *EphA3* の発現(A) および移植実験(B)

〔結果〕 以下 3 つの実験を行った。

### 実験 1: 小腸間葉を小腸に移植 (同所性移植)

小腸間葉あるいはそのもととなる臓側中胚葉をウズラ 1.5~5 日胚から単離し、ニワトリ 1.5 日胚の予定小腸領域に移植した。発生を進めたのち凍結切片を作成し、QCPN 抗原、SMA、*EphA3* mRNA に対する染色を行った。移植に成功した 3 個体すべてで、QCPN 陽性のドナー組織の一部に SMA 陽性の平滑筋層が観察された (3/3)。この平滑筋層は、近傍のホスト由来の平滑筋層と同様、消化管壁の内腔から離れた領域に位置し、両者は切れ目なくつながっていた。また、*EphA3* の発現が、ホスト由来の平滑筋層と同様、ドナー由来の平滑筋層でも検出された。このように、同所性移植において、移植した小腸

間葉が本来の発生運命に従い *EphA3* 陽性の平滑筋層を形成することが明らかとなった。組織構築にも明らかな異常は見られず、この実験手法を用いてさらなる解析を行うこととなった。

#### 実験 2: 早い時期の小腸間葉を食道や胃に移植 (異所性移植)

消化「管」形成前のウズラ 1.5~2 日胚の予定小腸中胚葉を、ニワトリ 1.5 日胚の予定食道-胃領域に移植し、実験 1 と同様の解析を行った。実験 1 と同様、ドナー組織からも平滑筋層が生じたが、そこに *EphA3* の発現が検出されることはなかった (0/8)。早い時期の小腸間葉は、食道や胃の環境の中では *EphA3* 陽性の平滑筋層を形成しないことがわかった。

#### 実験 3: より発生の進んだ小腸間葉を食道や胃に移植 (異所性移植)

一般に、発生が進行するにつれて、胚の各細胞が何に分化するかが決まっていく。小腸間葉の発生運命が定まる時期を明らかにするため、さまざまな時期のウズラ胚から小腸間葉を単離し、ニワトリ 1.5 日胚の予定食道-胃領域に移植した。3 日胚の小腸間葉を移植した場合、実験 2 と同様、ドナー由来の平滑筋は常に *EphA3* 陰性であった (0/5)。一方、4~6 日胚の小腸間葉を移植した場合、多くの移植胚でドナー由来の *EphA3* 陽性の平滑筋が確認された (5/8)。

〔考察〕 本研究では、鳥類胚の組織移植の技術を用いて、*EphA3* 陽性の腸特異的平滑筋層の形成に及ぼす周囲環境の影響を解析した。その結果、(1) 少なくとも 3 日胚以前は小腸間葉の発生運命が完全に定まっていないこと、(2) *EphA3* 陽性の平滑筋の形成には適切な周囲環境が必要であることが明らかになった。早い時期の小腸間葉は、小腸に移植した場合には *EphA3* 陽性の平滑筋層を形成したが、食道や胃に移植した場合には *EphA3* 陰性の平滑筋層を形成した。後者の平滑筋層は、筋層の厚さや細胞の密度といった点で分化した食道や胃の平滑筋層に似ており、発生運命の変更の結果生じた可能性が高い。これについては、*ephrinB1* (胃の平滑筋の一部で強く発現)や *Wnt5a* (胃の間葉で発現)などの発現解析から、今後さらなる情報が得られるであろう。本研究により、平滑筋層の形成に影響を及ぼす器官特異的な周囲環境の存在が明らかになった。この周囲環境を提供する組織としては、初期の内胚葉や神経堤細胞などが考えられる。培養実験などを駆使し、今後検証を進めていく予定である。

〔結論〕 3 日胚以前の小腸間葉の発生運命は完全には定まっていないこと、*EphA3* 陽性の腸特異的平滑筋が腸固有の周囲環境に依存して形成されることが示唆された。

#### 〔文献〕

- 1) Yasugi S. and Mizuno T. (2008) Dev. Growth Differ. 50 Suppl 1: S79-96
- 2) Ishii Y., Rex M, Scotting PJ, et al. (1998) Dev. Dyn. 213: 464-475

#### 〔学会発表〕

- 1) 石井泰雄、浦瀬香子、藤本聖恵、他. ニワトリ胚期消化管における *EphA* および *ephrinA* 遺伝子群も発現. 日仏生物学会第 193 回例会、オンライン、2020/12
- 2) 石井泰雄、芦田航、満友陽子、他. (2021) 鳥類胚消化管における器官特異的平滑筋層の形成. 第 92 回日本動物学会大会、オンライン、2021/9

## 2. 光受容タンパク質のプロトン輸送を検出する電荷積分アンプの作成

辻野賢治<sup>1</sup>、田邊賢司<sup>2</sup>、山口俊夫<sup>1</sup>、松本みどり<sup>1</sup>、木下順二<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>統合教育学修センター・医学部基礎科学 (物理)、<sup>2</sup>総合研究所・研究部)

〔目的〕 光受容タンパク質であるバクテリオロドプシン (bacteriorhodopsin, **bR**) は、吸収した可視光のエネルギーを利用し、細胞外にプロトンを輸送する働きをする。この輸送効率を、入射する光パルス形状により制御できることが明らかとなっている。これは **bR** 中のレチナール分子が光励起されることで生じるコヒーレンスな挙動が起因していると考えられているが、詳細は明らかになっていない。

この現象を解明するために必要な、プロトン輸送を検出する装置の作成を行った。先行研究では、**bR** のプロトン輸送の際に発生する電気的な信号を読み出す技術が開発されており、太陽電池などへ利用する研究<sup>2)</sup>が活発に行われている。我々はこれまでに数エレクトロンレベルの微弱な電流を読み出すことを可能とするアンプの開発<sup>3)</sup>に成功しているため、この技術を活かし、究極的には光子レベルの光強度を照射したときのプロトン輸送を検出できる装置の開発を目指している。

〔方法〕 作成した装置の概略を図 1 に示す。装置は、接合型電界効果トランジスタ (JFET) を入力段に用意し、アナログアンプ (A250) により増幅する構成となっている。帰還容量として 2 pF のコンデンサーを取り付ける。したがって、本装置の電荷を電圧に変換するゲインは、理想的には 1 クーロンの電荷を 80nV に変換するものとなっている。2 枚の透明ガラス電極を用意し、一方に **bR** を固着している。この 2 枚の透明ガラス電極を向かい合わせ、内部に電解質溶液を満たした「**bR** 光セル」を準備した。この **bR** 光セルに対して、光強度を矩形状に整形した可視領域 (波長 532nm) のレーザーを照射し、プロトン輸送の検出を試みた。

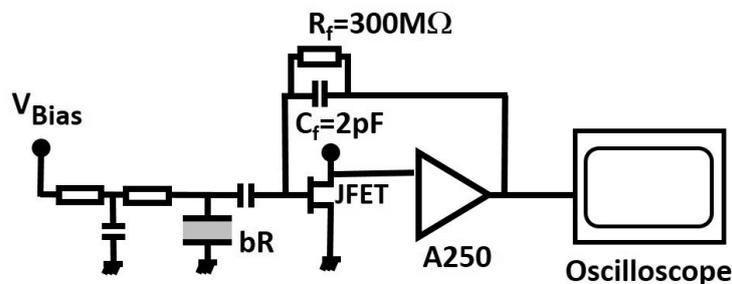


図 1. 作成したプロトン輸送検出装置の概略

〔結果〕 図 2 に結果を示す。これは検出装置からの出力をオシロスコープに接続し、時間的に変化する出力電圧を記録したものである。レーザー光が照射されている場合を「ON」、レーザー光が照射されていない場合を「OFF」と表示している。ON と OFF の時間はともに 0.05 秒である。ON から OFF の切り替わりで信号が立ち上がり、OFF から ON の切り替わりで信号が立ち下がっている。また、レーザーが OFF、または、ON の間はそれぞれ、最大値・最小値から緩やかに 0V に近づいていく。レーザーを連続的に照射、および、レーザーを照射しない場合は、出力信号は 0V となった。

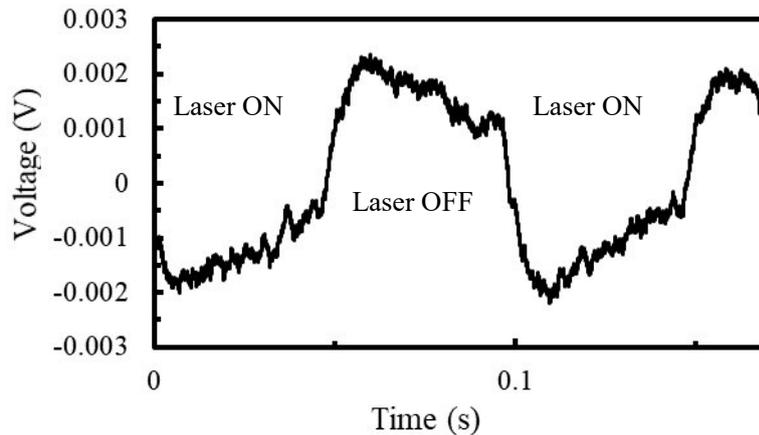


図 2. 波長 532nm のレーザー光を矩形波に整形して照射した際の、検出装置からの出力結果

〔考察〕 観測された信号波形は、**bR** のプロトン輸送の時間的な特徴を表している。今回作成した検出装置では、透明ガラス基板近傍のプロトン濃度変化を検出できる仕組みとなっている。**bR** は透明ガラス基板に固着されているが、ドロップキャスト法を用いているため、その向きはランダムであると考えられる。そのため、透明ガラス基板に向けてプロトンを輸送するものもあれば、その逆の向きにプロトンを輸送するものもあり、光を照射しても信号は発生しないように思える。確かに、レーザーを照射し続けている状況では、透明ガラス電極側へプロトンを輸送する量と、透明ガラス電極側から離れるようにプロトンを輸送する量が釣り合い、信号は確認できなくなると説明できる。

一方で、プロトン輸送の順序として①プロトンを **bR** 外に放出し、その後、②プロトンを **bR** 内に取り込んでいるが、①が始まるのは光照射後  $4\mu\text{s}$  程度なのに対して、②が始まるのは光照射後  $5\text{ms}$  程度と約 1000 倍違う。したがって、レーザー照射を ON から OFF へ、および、OFF から ON へ切り替えた時には、プロトン輸送の時間的な特徴から、信号を確認することができると説明できる。

これらのことから、本検出装置は、**bR** のプロトン輸送を検出できていると考えられる。

〔結論〕 **bR** のプロトン輸送の検出装置を作成した。動作確認のために、**bR** 光セルを準備し、光強度を変調した可視領域のレーザーを照射した。その結果、プロトン輸送の時間的な特徴を示す出力波形が観測された。

〔文献〕

- 1) V. I. Prokhorenko, A. M. Nagy, S. A. Waschuk et al. (2006) Science 313(5791) : 1257-1261
- 2) Yu-Tao Li, Ye Tian, He Tian et al. (2018) Sensors 18(5): 1368
- 3) K. Tsujino, M. Akiba and M. Sasaki (2009) IEEE Electron Device Letters 30(1): 24-26

〔学会発表〕

- 1) 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
- 2) 辻野賢治、田邊賢司、山口俊夫、他. バクテリオロドプシン薄膜作成のためのドロップキャスト法の開発. 第 68 回応用物理学会春季学術講演会、オンライン開催、2021/3

3. 網膜傷害後のフォスファチジルセリンの認識は Müller グリアの細胞周期進入と進行に必須である

蔀池かおり、藤枝弘樹

(解剖学 (神経分子形態学分野))

〔目的〕 網膜の主要なグリア細胞である Müller グリア<sup>1),2)</sup>は、網膜の傷害に応答して増殖し、網膜を再生する能力を持っている。我々はこれまでに、網膜視細胞傷害後、死細胞の露呈する“eat-me”シグナルであるフォスファチジルセリン (PS) の認識が、Müller グリアの網膜傷害への応答である死細胞の貪食や増殖などを引き起こす事を報告した<sup>3)</sup>。しかし、PS の認識が Müller グリアの増殖を制御する詳細なメカニズムについては不明である。本研究の目的は、ラットの N-methyl-N-nitrosourea (MNU) 誘発視細胞傷害モデルにおいて、PS の認識が Müller グリアの細胞周期への進入を制御するのか、細胞周期の進行を制御するのかについて明らかにすることである。

〔方法〕 5 週齢オスの Wistar ラットへ、視細胞特異的にアポトーシスを誘導するアルキル化剤である MNU を腹腔内投与し、その 2 日後に網膜を摘出し器官培養を行った。G0 期の Müller グリアが存在する培養 1 日目の網膜 (Day1 explant)、G1 期の Müller グリアが存在する培養 2 日目の網膜 (Day2 explant) を S 期の細胞が取り込む EdU と共に器官培養し、PS の認識を阻害する L-serine-O-phosphate (L-SOP) の効果を免疫組織化学的に検討した。

〔結果〕 Day1 explant では、培養直後は G0 期であった Müller グリアは 1 日後 G1 期へ進入し、2 日後には EdU を取り込み S 期へ進行した。Day2 explant では、培養直後 G1 期であった Müller グリアは 1 日後 EdU を取り込み S 期へ進行した。培養時に培地へ L-SOP を添加した Day1 explant では、細胞周期のマーカーであるリン酸化 pRB 抗体は培養 1 日後、2 日後において陰性であり、Day2 explant では培養 1 日後において EdU の取り込みが抑制された。

〔考察〕 Müller グリアが網膜視細胞傷害後に死細胞の PS を認識し増殖することを報告している<sup>3)</sup>が、PS の認識が細胞周期進入のトリガーとなるのか、または細胞周期の進行を制御するのかは不明であった。本研究では、網膜傷害後、静止期の Müller グリア、もしくは G1 期の Müller グリアが存在する網膜を L-SOP と共に培養し、PS の認識は細胞周期の進入と進行の双方に必須であるという結果を得た。これらのことから、Müller グリアは貪食能の活性化に必要とされる PS の認識を行うことで網膜の変性を感知し、死細胞を貪食すると共に PS 受容体の下流となる因子が細胞周期への進入とその進行を制御している可能性が示唆された。

〔結論〕 ラットの MNU 誘発視細胞傷害モデルにおいて、PS の認識は Müller グリアの細胞周期への進入と、G1 期から S 期への進行の双方に必須である。

〔文献〕

1) Bringmann A., Pannicke T., Grosche J., et al. (2006) Prog. Retin. Eye Res. 25: 397–424

- 2) Reichenbach A. and Bringmann A. (2013) *Glia* 61: 651–678
- 3) Nomura-Komoike K., Saitoh F. and Fujieda H. (2020) *Sci. Rep.* 10(1): 1488

[学会発表]

- 1) 蔣池かおり、藤枝弘樹. Phosphatidylserine recognition is required for the cell cycle reentry of Müller glia. 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会、オンライン、2021/3

#### 4. Replication stress accelerates differentiation through the activation of mitochondrial OXPHOS in hematopoietic stem cells

Makiko Mochizuki-Kasho and Ayako Nakamura-Ishizu

(Department of Anatomy and Developmental Biology, Division 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<sup>-/-</sup>) that FA gene confer to physiological replication stress (RS) during HSC development. 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.

[Methods] We cultured highly purified murine HSCs with and without low dose aphidicolin (APH) in cytokine containing medium. Flow cytometry (CytoFlex) and imaging flow cytometry (FlowSight) were used to analyze changes in HSC phenotype and metabolic state.

[Results] APH did not alter in vitro HSC expansion or HSC colony formation potential yet significantly increased HSC myeloid differentiation. APH-treated HSCs exhibited significant increase in mitochondrial OXPHOS activity measured through tetramethyl rhodamine ethyl ester (TMRE) staining after 16 hours of culture.

[Discussion] Based with this result we need to investigate the mitochondrial and organelle status of FA HSC in future.

[Conclusions] RS increases HSC differentiation through the upregulation of mitochondrial OXPHOS ex vivo.

[Article]

- 1) [Mochizuki-Kashio M](#), Yoon Y, Menna T, Grompe M, Kurre P. FANCD2 alleviates physiologic replication stress in fetal liver HSC. *BioRxiv*. 2020

[Conference Presentation]

- 1) [Mochizuki-Kashio M](#), Nakamura-Ishizu A. Replication stress accelerates myeloid-bias through the activation of mitochondrial OXPHOS in hematopoietic stem cells. JSH 2021



## 5. mTOR 複合体によるエピジェネティクス制御機構の解明

増井憲太、原地美緒、柴田亮行  
(病理学 (病態神経科学分野))

〔目的〕 がんの病態には、DNA の塩基配列変化を伴わない遺伝子発現制御システムであるエピジェネティクスが重要性とされる。その制御機構は不明な点が多いが、がんの **emerging hallmark** である細胞内代謝の変化が、エピジェネティクス変化と密接に関連することが示唆されている<sup>1)</sup>。我々は、細胞内代謝の制御に中心的な役割を果たす mTOR (mammalian target of rapamycin) 複合体が、悪性脳腫瘍の代謝を活性化し、エピジェネティクス変化の一つであるヒストンアセチル化を促進することを報告した<sup>2)</sup>。これらの背景を基に、本研究では、mTOR 複合体により誘導される代謝の活性化が、もう一つの重要なエピジェネティクス変化であるヒストンメチル化に与える影響について解析を行った。

〔方法〕 悪性脳腫瘍である膠芽腫細胞株 (U87-MG 細胞株) を用いて、多くのがん種で異常が知られるヒストンメチル化 (H3K27me3 : 27 番目リジン残基のトリメチル化) を、mTOR 複合体が制御する可能性を、分子生物学的手法および OMICS 解析を用いて検討した。ヒストンメチル化の制御酵素については、転写産物およびタンパク質発現を分子生物学的手法で解析し、エピジェネティクス変化を介して制御されるがん原性の遺伝子群を、ChIP-seq および RNA-seq に基づく網羅的手法で評価した。

〔結果〕 がんのヒストンメチル化 (H3K27me3) は、修飾酵素および基質の両面から、mTORC1 と mTORC2 の両者により協調的に制御されていた。mTORC1 は H3K27 特異的メチル化酵素である EZH2 (enhancer of zeste homolog 2) の翻訳を制御し、mTORC2 はメチル化ドナー基質である S-adenosylmethionine (SAM) の産生を促進することで、H3K27me3 を増加させた。H3K27me3 の亢進は、細胞周期関連遺伝子 (p21) を調節し、がん細胞の増殖を促進すると同時に、マウスモデルでは mTORC1 と mTORC2 の両阻害により、ヒストンメチル化と腫瘍の成長が抑制された (図 1)。

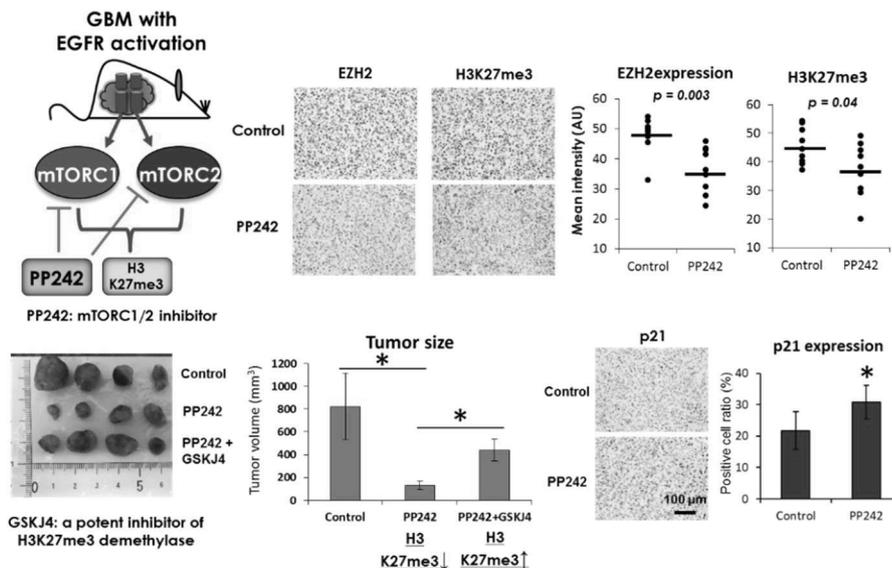


図1. mTOR 複合体(mTORC1, mTORC2)の両阻害が H3K27me3 と腫瘍の成長を抑制する

※巻末にカラー図掲載

〔考察〕 種々の遺伝子変異が、がん特異的なエピジェネティクス変化を誘導する可能性が報告されている。本研究では、遺伝子変異に基づく異常な細胞内シグナルが、1) ヒストン修飾酵素の翻訳制御と、2) エピジェネティクス基質となる中間代謝産物の産生亢進という、エピゲノム状態を規定する両輪を制御することで、がん細胞の生存を促進するヒストンメチル化がダイナミックに調節されることが示された。また、悪性脳腫瘍の一群では、H3K27me3 のグローバルな減少が腫瘍細胞の生存に寄与することが知られていたが、本研究では、mTOR 複合体依存的に H3K27me3 がゲノムワイドに亢進することが、腫瘍細胞の生存に繋がることが明らかとなった。すなわち、がんのエピジェネティクス変化は、単純に亢進または減少している事に着目するのみならず、正常細胞のエピゲノム状態から“逸脱”した状態を、如何に定常状態に回復させるかという視点が治療学的には重要であろう。

〔結論〕 2 種類の mTOR 複合体が、がんのヒストン修飾をダイナミックに制御する新規の病態が明らかとなると同時に、mTORC1 と C2 の両阻害による、がんのエピゲノムを標的とする戦略が、悪性脳腫瘍の有望な新規治療の一つとなる可能性が示された。

#### 〔文献〕

- 1) Masui K., Harachi M., Cavenee W.K., et al. (2020) Acta Histochem. Cytochem. 53(1): 1-10
- 2) Masui K., Harachi M., Ikegami S., et al. (2019) J. Biol. Chem. 294(51): 19740-19751

#### 〔発表論文〕

- 1) Harachi M., Masui K., Honda H., et al. (2020) Dual Regulation of Histone Methylation by mTOR Complexes Controls Glioblastoma Tumor Cell Growth via EZH2 and SAM. Mol. Cancer Res. 18(8): 1142-1152

#### 〔学会発表〕

- 1) 増井憲太, 原地美緒, Paul S. Mischel, 柴田亮行. 代謝とヒストン修飾からみる悪性脳腫瘍の病態. 第 109 回日本病理学会 Web 総会、福岡、2020/7
- 2) 増井憲太, 原地美緒, 村垣善浩, Paul S. Mischel, 柴田亮行. IDH 野生型膠芽腫におけるヒストンメチル化 (H3K27me3) の新規制御機構とその意義. 第 38 回日本脳腫瘍学会、広島、2020/11-12

## 6. 細胞外基質完全性の抑制はラット初期大動脈中膜石灰化を軽減する

宇都健太<sup>1,2</sup>、吉澤佐恵子<sup>1,2</sup>、青木千春<sup>1</sup>、西川俊郎<sup>2</sup>、小田秀明<sup>1</sup>

(1 病理学 (実験病理学分野)、2 病理診断科)

〔目的〕 血管石灰化形成機序は骨代謝機序に類似している。また、血管石灰化と血管細胞外基質完全性制御の関連性について報告されてきているが、詳細な機序は不明である。我々は、これまでに大動脈瘤・解離病変<sup>1)</sup>、大動脈中膜石灰化病変<sup>2)</sup>、腎性骨異常栄養症病変<sup>3)</sup>などについて研究を進め、大動脈中膜病変、骨病変および細胞外基質変性の関連性を、実験動物を用いて解析してきた。本研究では、血管細胞外基質代謝、特に collagen 代謝の血管石灰化病変形成への関与について検討した。

〔方法〕 実験的血管石灰化は、warfarin および vitamin K1 (WVK) 含有食餌を、雄性 5 週齢 Sprague-Dawley ラットに投与して誘発した (WVK 群)。さらに、collagen 架橋形成に重要な酵素である lysyl oxidase (LOX) を阻害するため、β-aminopropionitrile (BAPN) を投与した (BAPN 群)。大動脈検体は、alizarin red (AR) 染色、免疫組織化学、透過型電子顕微鏡 (電顕) および μCT を用いて包括的に解析した。

〔結果〕 WVK 投与ラットは、投与時間に比例して大動脈中膜石灰化が増加した。大動脈検体を半透明化した後、AR 染色を施行したところ、石灰化の分布と程度が容易に可視化された (図 A)。一方、3 次元 μCT 画像では、石灰化体積の定量化が簡便に施行できた (図 B)。電顕像では、大動脈中膜石灰化の初期病変で、collagen 線維内に石灰化が認められた (図 C)。石灰化は WVK 群と比較して BAPN 群で減少していた (図 D)。免疫染色では LOX および collagen I が石灰化部位の周辺に認められ、免疫染色陽性領域は BAPN 群で減少していたが、qPCR による解析では、LOX および collagen 発現に有意な差はなかった。

〔考察〕 血管石灰化病変の形成には、骨代謝と同様に、collagen 増生・架橋が重要な役割を持つ。一方 LOX の阻害剤である BAPN は、動物において血管中膜の脆弱化を惹起し、大動脈瘤・大動脈解離、骨粗鬆症などの病変をきたすことが知られている。しかし、血管石灰化病変では collagen 架橋の進行に伴って、石灰化が進行していくと考えられているため、逆説的に BAPN によって collagen 架橋を抑制することが石灰化制御に有効であると考えられる。一方、血管石灰化の定量評価には、組織学的手法や生化学的手法を用いることが多いが、本検討では血管の半透明化と AR 染色を併用することで、動脈中膜の石灰化病変の局在が明瞭となり、石灰化面積が簡便に測定可能となった。さらに 3 次元構築した μCT 画像データを用いることで、微小石灰化が詳細に可視化され、石灰化体積が簡便に測定できることを明らかにした。

〔結論〕 BAPN による LOX の抑制は、血管石灰化を軽減した。そして、collagen 代謝は血管石灰化の初期病変形成において重要な役割をもつと考えられる。

[文献]

- 1) Nagashima H., Uto K., Sakomura Y., et al. (2002) *J. Vasc. Surg.* 36: 818-823
- 2) Yoshizawa S., Uto K., Honda K., et al. (2011) *Atherosclerosis* 215: 43-51
- 3) Aoki C., Uto K., Honda K., et al. (2013) *Lab. Invest.* 93: 1170-83

[発表論文]

- 1) Uto K., Yoshizawa S., Aoki C., et al. (2021) Inhibition of extracellular matrix integrity attenuates the early phase of aortic medial calcification in a rodent model. *Atherosclerosis* 319: 10-20

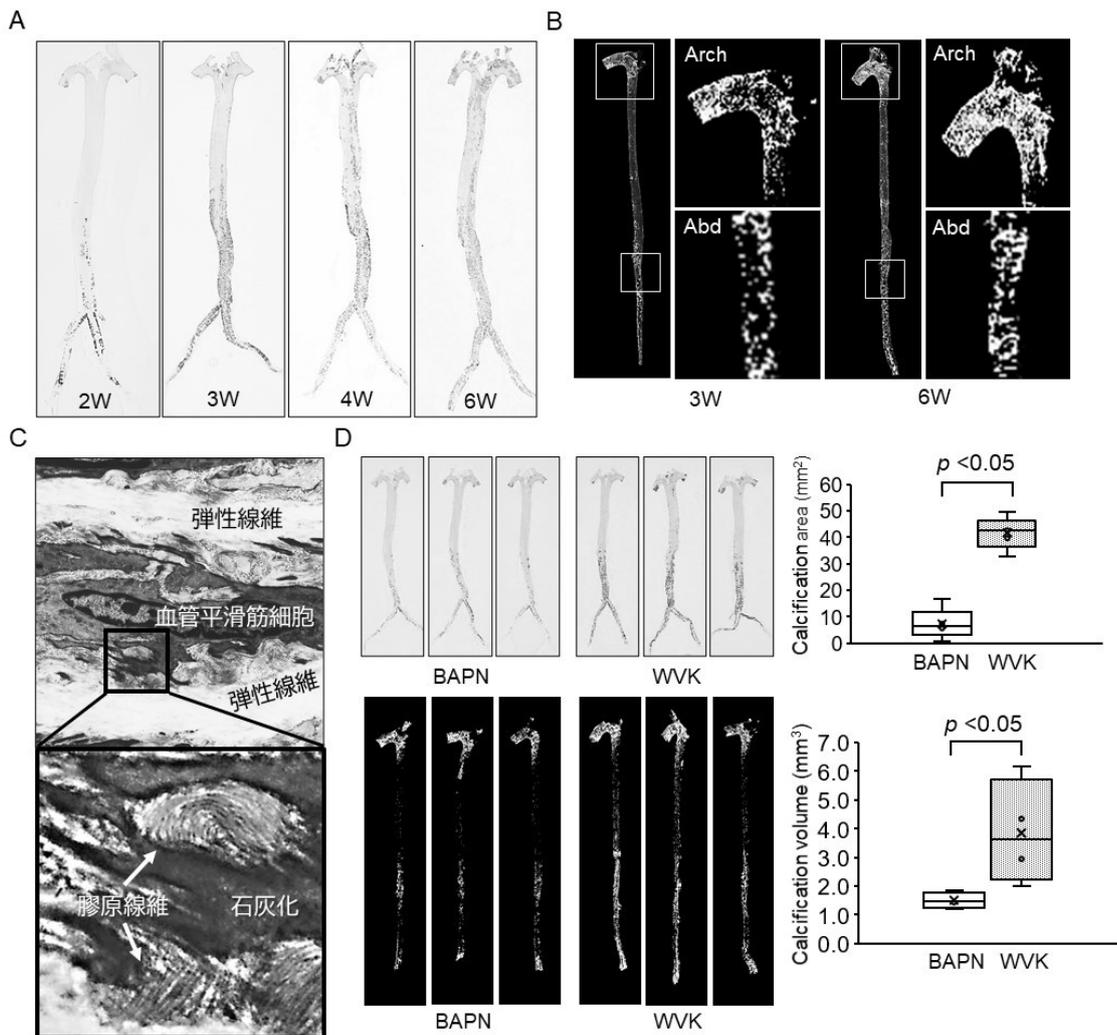


図. A. Warfarin 負荷(2 週, 3 週, 4 週および 6 週)ラット大動脈標本(ホルマリン固定・alizarin red 染色・透明化処理). 負荷週数に比例して、alizarin red 染色陽性領域の増加がみられる. B.  $\mu$ CT 所見(中性緩衝ホルマリン固定). Warfarin 負荷 3 週および 6 週とも、微細な石灰化領域まで描出されている. 弓部大動脈(Arch)および腹部大動脈(Abd)とも、3 週に比べ 6 週の方が石灰化領域が目立つ. C. Warfarin 負荷(3 週)ラット大動脈血管壁の透過型電子顕微鏡所見. 血管平滑筋細胞周囲に、弾性線維(elastic fiber)に接するように膠原線維(collagen fiber)がみられ(上段), 膠原線維部分が石灰化している(下段). D.  $\beta$ -aminopropionitrile (BAPN)による血管石灰化の抑制. Warfarin 負荷 3 週群(WVK 群)と、負荷中に連続 10 日間 BAPN を投与した群(BAPN 群)とを比較した. 上段, alizarin red 染色による血管石灰化面積の定量評価. 下段,  $\mu$ CT による血管石灰化体積の定量評価. 発表論文の図表より抜粋・改変.

## 7. CRMP1 の 504 チロシンリン酸化による Sema3A 依存性的大脑皮質樹状突起伸長

實木-高橋葵、瀧澤光太郎、中村史雄  
(生化学)

〔目的〕 CRMP1 は神経ガイド分子 Sema3A を媒介するリン酸化タンパク質である。CRMP1 は Fyn チロシンキナーゼから 504 番目のチロシン残基 (Y504) にリン酸化を受ける<sup>1)</sup>。そこで前年度に続き Sema3A 情報伝達への CRMP1-Y504 リン酸化への関与を検討した。

〔方法〕 胎生 16 日 C57BL6/J マウス胚より初代大脳皮質分散培養を作製し、培養後 5～7 日後に Sema3A で刺激を行い、樹状突起の pCRMP1 Y504 リン酸化レベルを共焦点顕微鏡 (LSM710) にて撮像、解析した。分散培養に CRMP1 野生型、あるいは非リン酸化型変異体 Y504F 変異体を導入し、Sema3A による突起伸長を計測した。妊娠 14-15 日目 ICR マウス胚の大脳皮質錐体細胞に子宮内電気穿孔法を用い、CRMP1 野生型あるいは Y504F を TdTomato と共に導入した。5 週齢で安楽死後、4% パラホルムアルデヒドにて灌流固定し、ビブラトームにて 50 μm 厚の薄切片を作製した。切片を共焦点顕微鏡 (LSM710) で撮像し Tdtomato 導入細胞を指標に大脳皮質 5 層錐体細胞の樹状突起形態形成の解析を行った。CRMP1-Y504 リン酸化のシグナル特異性を決めるため、海馬の初代培養に CRMP1 野生型、あるいは Y504F を導入し、Sema3A と Sema3F による退縮応答を評価した。

〔結果〕 皮質初代培養細胞にて Sema3A 刺激 2 分後に pCRMP1 Y504 のリン酸化が増加した。また、CRMP1 野生型を導入した皮質神経細胞は Sema3A 刺激に伴い神経突起を伸長したが、Y504F 導入細胞は伸長しなかった (図 1A, B)。子宮内電気穿孔法では CRMP1 野生型導入細胞と比べ Y504F 変異体導入細胞では基底樹状突起が短くなった (図 1C, D)。また基底樹状突起の分枝数も CRMP1 Y504F 導入細胞で減少していた。海馬軸索の成長円錐は Sema3A、Sema3F 両方に反応し退縮応答する。CRMP1 野生型の導入は影響を与えなかったが Y504F 導入は Sema3A の応答を抑制した (図 1E, F)。一方、Sema3F の退縮応答には影響しなかったことから、CRMP1 Y504 のリン酸化は Sema3A 情報伝達を特異的に媒介することが示された。

〔考察〕 Sema3A 刺激による樹状突起伸長が CRMP1-Y504F 変異体で抑制される結果は、CRMP1 の Y504F リン酸化が Sema3A 情報伝達に関与すること、また、in vivo において CRMP1 Y504F 導入細胞の基底樹状突起伸長の抑制は、CRMP1 Y504 のリン酸化が基底樹状突起の発達形成に関与することを示す。さらに CRMP1-Y504F 変異体は、Sema3A による海馬軸索・成長円錐の退縮応答のみを阻害し、Sema3F は阻害しないことから、CRMP1 の Y504 リン酸化は Sema3A の細胞内情報伝達を特異的に媒介すると考えられた。

〔結論〕 大脳皮質第 5 層錐体細胞の基底樹状突起形成、特に Sema3A による樹状突起の伸長機構に CRMP1 の 504 番目のチロシンリン酸化が重要であることが明らかになった。

※ この研究成果は J Neurochemistry に掲載された。

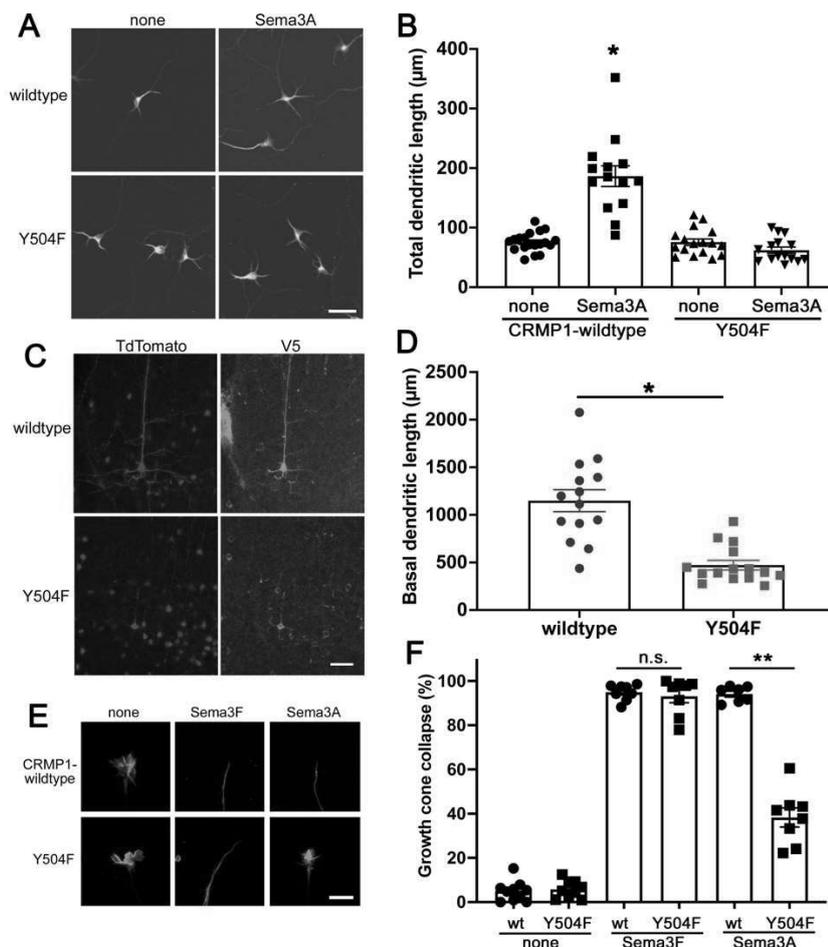


図1. CRMP1-Y504F 変異体を導入した神経細胞の Sema3A 応答

A) CRMP1 野生型を導入した皮質神経細胞は Sema3A 刺激に伴い神経突起を伸長する。Y504F 導入細胞は伸長しない。scale bar=50μm B) 定量グラフ。\*, P<0.05.

C) 皮質の CRMP1 野生型導入細胞と比べ Y504F 変異体導入細胞では基底樹状突起が短くなる。scale bar=50μm。D) 定量グラフ 平均±標準誤差 n=15. \*p < 0.05

E) 海馬神経突起は Sema3A、Sema3F 両方に反応し退縮応答する。CRMP1 野生型の導入は影響を与えなかったが Y504F 導入は Sema3A の応答を抑制した。Sema3F の退縮応答には影響しなかった。これは CRMP1 Y504 のリン酸化が Sema3A 情報伝達を特異的に媒介することを示す。scale bar=10μm。F) 定量グラフ \*\*p < 0.01

[文献]

- 1) Buel GR., Rush J., Ballif BA., (2010) *J. Cell Biochem.* 111: 20-28. Fyn promotes phosphorylation of collapsin response mediator protein 1 at tyrosine 504, a novel, isoform-specific regulatory site.
- 2) Yamashita N., Ohshima T., Nakamura F., et al (2012) *J Neurosci.* 32: 1360-1365. Phosphorylation of CRMP2 (Collapsin Response Mediator Protein 2) Is Involved in Proper Dendritic Field Organization.

[発表論文]

- 1) Kawashima T., Jitsuki-Takahashi, A., Takizawa K., et al. (2021) *J Neurochem.* 157: 1207-1221. Phosphorylation of Collapsin Response Mediator Protein 1 (CRMP1) at Tyrosine 504 residue regulates Semaphorin 3A-induced cortical dendritic growth.

## 8. スフェロイドをモデルとした組織の外圧応答と遺伝子発現パターンとの相関性の解明

田中正太郎、中村史雄  
(生化学)

〔目的〕 組織の柔軟性と外圧応答に関する情報は、義肢やペースメーカーのような埋め込み型デバイスの開発及び快適な運用において重要である。しかしヒト生体組織におけるこれらの計測は容易でない。そこで我々は三次元培養された細胞集団塊（スフェロイド）<sup>1),2)</sup>をモデルとして、対象組織の遺伝子発現パターンと機械的特性（粘弾性など）、細胞および細胞外基質の構造、変形、細胞応答の対応性を明らかにする。これによって将来的に、体内内奥部の組織についてこれらの情報を直接計測することなく、遺伝子発現解析だけによって推測できるようにしたい。

〔方法〕 市販の低吸着培養プレートで調製したヒト肝がん細胞株 **HepG2** によるスフェロイドは、観察直前にガラスボトムディッシュに移した。その際培養液に細胞膜非浸透性の蛍光色素を添加し、スフェロイドの細胞間隙に拡散させた。このスフェロイドを共焦点顕微鏡（総研 Zeiss LSM510）で撮影した。得られた断層像には細胞間隙を示す蛍光シグナルが観察され、それに囲まれた暗い領域を細胞体と見なすことで、個々の細胞の構造情報を得ることができる（陰性造影法）。さらにマイクロマニピュレーター（総研 Injectman）を用いてスフェロイドを直接圧迫し、その際の応力と構造変化を観察した。原子間力顕微鏡で用いられる弾性係数の明らかなカンチレバーをマニピュレーターの先端に垂直に固定し、水平面を手前方向に  $10\ \mu\text{m}$  ずつ移動させてスフェロイドを段階的に圧迫していき、同時に共焦点顕微鏡で断層像を撮影した（図 1A-C）。

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 **NeuroLucida**（総研）および **Fiji** を利用して行った。同時にカンチレバーのたわみを観測し、これから応力を計測した。これらの情報を基に変形と応力の関係のグラフを作成した（図 1D）。また本スフェロイドの遺伝子発現解析（RNA シーケンス）により細胞外マトリクス（ECM）の主要構成要素であると明らかになったフィブロネクチンの遺伝子 **FN1** 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。

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総研 SEM（JSM-6610LA）を用いて撮影した（図 2）。グルタルアルデヒド固定のちエタノール脱水した上記スフェロイドは、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〕 図 1 に結果の一例を示す。スフェロイドは自重で培養

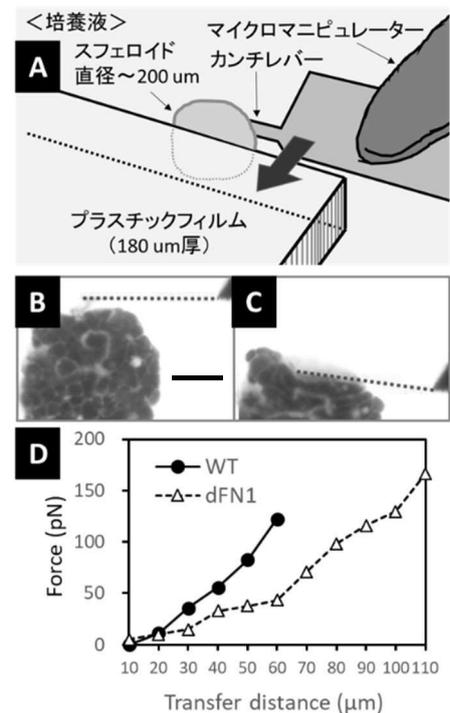


図 1. カンチレバー圧迫によるスフェロイド変形状況の観察 (A)模式図。(B, C)水平方向の圧迫前(B)および圧迫後(C)の共焦点顕微鏡による蛍光断層像。バー:  $50\ \mu\text{m}$ 。破線: カンチレバー。(D)野生型 WT および FN1 ノックダウン細胞スフェロイドにおける圧迫距離と応力の関係のグラフ。

液中を沈降するため、ディッシュを適宜傾けることで、あらかじめ沈めておいた厚さ 180  $\mu\text{m}$  のプラスチックフィルムの切断面に接するように配置することができる。

これとマニピュレーターに設置したカンチレバーを同一顕微鏡視野中央に配置させる。カンチレバーをスフェロイドに接触させたのち、10  $\mu\text{m}$  ずつ水平面上を手前 (y 軸方向) に移動させることで、切断面と挟むようにしてスフェロイドを圧迫する。同時に共焦点顕微鏡でレバーを含む断面像を撮影する (図 1B,C)。レバーはあらかじめ赤色蛍光色素で着色されており、圧迫にともなうたわみを顕微鏡的に計測できる。この数値と既知の弾性係数を用いて応力を算出した。この操作を野生株および FN1 ノックダウン細胞について実施した結果が図 1D のグラフである。両者の傾きは明確に差異があり、ECM の構成が変化することでスフェロイドの構造変化あたりの応力が変わったことを示していた。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。

〔考察〕 本研究により、ECM の構成成分の遺伝子発現を抑制することで、組織の物理的特性 (柔軟性) および構造に明確な変化が生じることが分かった。既存の報告によって、スフェロイド総体としての物理的特性と遺伝子発現の関係性の研究は進められている<sup>3)</sup>。しかし細胞レベルの情報、特に構造変化と細胞応答のリアルタイム観察は行われておらず、この点が本研究の優位な点である。本稿では観測原理の実証にとどまったが、今後最適化と応用展開を進め、遺伝子発現・細胞応答・構造変化・応力計測を同時に観測実行可能な技術として成立させる計画である。

〔結論〕 生きた組織モデル (スフェロイド) の圧迫変形と、対応する応力変化を観測する技術を開発した。遺伝子発現解析および細胞応答観察と組み合わせることで、遺伝子発現情報のみから任意組織の圧力応答を推測できるようになるだろう。

#### 〔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) 論文投稿中: Scientific reports
- 2) 論文投稿中: Journal of Robotics and Mechatronics

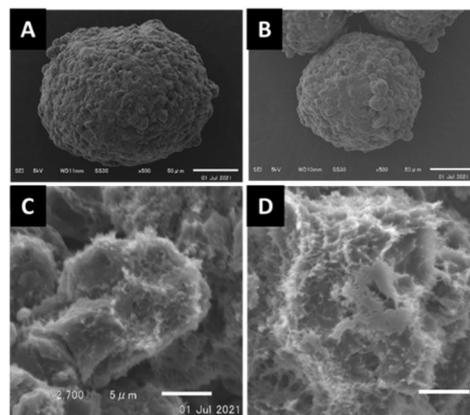


図 2. 走査電子顕微鏡によるスフェロイド内部の細胞外マトリクスの観察 HepG2 スフェロイドの外観(A, B)および内部細胞の露出像。野生型(A, C)およびフィブロネクチンノックダウン細胞(B, D)。バー: 50  $\mu\text{m}$  (A, B)、5  $\mu\text{m}$  (C, D)。

## 9. セマフォリン 3A による神経細胞のフォスファチジルセリンの外層露出

新敷信人<sup>1</sup>、深山智菜<sup>2</sup>、中村史雄<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>生化学、<sup>2</sup>医学部第4学年)

〔目的〕 細胞膜を構成しているリン脂質ホスファチジルセリン (PS) は、普段はフリッパーゼの働きにより細胞膜内層にのみ非対称性に存在し<sup>1)</sup>、何らかのシグナルによりスクランブラーゼが活性化して PS が外層に露出する。スクランブラーゼの活性化は、カスパーゼが関与するアポトーシスや<sup>1,2)</sup>、Ca<sup>2+</sup>濃度上昇が関与する血小板活性化ならびに老化赤血球などで起こり<sup>3,4)</sup>、それぞれ PS を標的にしたマクロファージによる貪食、PS を土台にした凝固カスケードの開始、老化赤血球の正常な除去に寄与している。神経細胞が伸ばす軸索や樹状突起を適切な場所へ誘導し、正常な神経発達を促すことに神経ガイダンス因子セマフォリン 3A (Sema3A) が関与している<sup>5)</sup>。この Sema3A の作用 (樹状突起の伸長、軸索の退縮) には Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇が必要であり<sup>6)</sup>、カルパインが関与する経路が報告されている<sup>7)</sup>。また、Sema3A にはアポトーシスを引き起こす作用が報告され<sup>8)</sup>、退縮した軸索を処理するにはマイクログリアによる貪食が生じている<sup>9)</sup>。以上の事実から、「**Sema3A による神経突起の伸長退縮作用に伴って PS が細胞膜外層に露出しているのではないか**」と仮説を立てた。本研究では、Sema3A の PS 外層露出作用について、Ca<sup>2+</sup>、カルパイン、カスパーゼを介した経路に注目して検証することを目的とした。

〔方法〕 神経細胞の採取と初代培養 (動物実験委員会承認#AE20-088-C) : 胎生 13 日の野生型マウスをイソフルラン過麻酔による安楽殺後、胎子を氷冷 PBS へ取り出した。胎子の頭蓋を剥がして脳を露出させ、傷付けないよう取り出し清浄な氷冷 PBS へ移した。小脳、次いで線条体を切り落とし、軟膜を取り除いた後、大脳皮質部分をピンセットで切り出し細断し、1 ml の PBS へ浮遊させた。トリプシンを用いて組織を融解させ、ピペッティングと遠心により神経細胞を回収した。ポリ L-リジンでコートした 4-well dish に 1×10<sup>4</sup> 個/well となるように細胞を播種し、10%FCS 含有 D-MEM、37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養を開始した。翌日、Neurobasal medium (B-27 supplement, Glutamax, Penicillin/Streptomycin 含有) に置換して、計 12 日間培養を継続した。

神経細胞への薬剤処理 : 精製 Sema3A を 10 U/ml となるように培養液に添加し、37°C 30 分孵置した後、PS 標識剤 (PSvue488; 2 μM) を加え 37°C で 5 分間染色した。阻害剤は、Sema3A 添加前に、カルパインの阻害剤として ALLM (0.12, 0.23 μM)、カスパーゼの阻害剤として Caspase-3 inhibitor (5, 10 μM)、外液の Ca<sup>2+</sup>キレーターとして 5 mM EGTA を培養液へ添加し、37°C で 30 分間作用させた。

神経細胞の固定と蛍光観察 : PBS で 2 回洗浄後、4%パラホルムアルデヒドで 30 分間固定した。PBS で 2 回洗浄後、蛍光顕微鏡 (Nikon Ti2E; 総合研究所 4F) で蛍光画像を取得し、蛍光量を測定した。

〔結果〕 初代大脳皮質神経細胞では、一部の細胞において Sema3A の作用なしに主に細胞体と思われる領域で PS の外層露出が認められた (図 1A ; Sema3A (-))。Sema3A を作用させると、細胞体に加え神経突起においても顕著な PS 外層露出が観察された (図 1A ; Sema3A (+))。Sema3A による PS の外層露出は、外液の Ca<sup>2+</sup>を取り除くと起こらなくなった (図 1A ; Sema3A (+) + EGTA)。各種阻害剤存在下における Sema3A の PS 外層露出作用に関して、神経突起のうち樹状突起のみの蛍光量を測定し、比較した (図 1B)。阻害剤なしでは、Sema3A によって有意に PS が外層に露出し、この PS 外層露出

は、カルパインの活性化、カスパーゼの活性化、Ca<sup>2+</sup>の流入を阻害すると有意に抑制された。

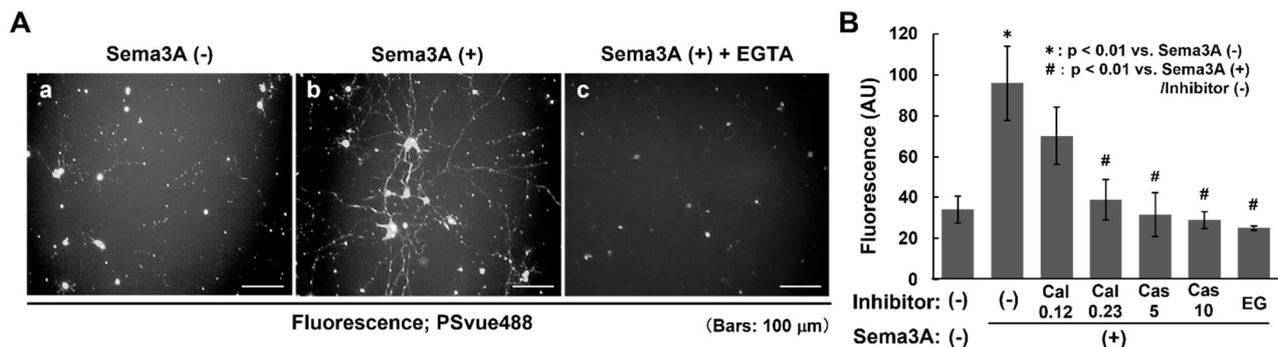


図 1. 神経初代培養細胞を用いた Sema3A 刺激による PS 外層露出の検出

A. 野生型マウス的大脑皮質から神経細胞を採取し、培養 12 日後に Sema3A 刺激を 30 分間行った(b)。培地中の Ca<sup>2+</sup>を除くため、5 mM EGTA を加え同様に刺激を行った(c)。外層の PS を PSvue488 により標識し、緩衝液による洗浄後、パラホルムアルデヒド固定して蛍光顕微鏡で観察した。Sema3A 刺激により明らかな PS の外層露出が認められ、それは細胞外の Ca<sup>2+</sup>に依存的であった。

B. 樹状突起部分の蛍光量を測定 (n = 15)しグラフ化した。シグナル伝達経路の候補であるカルパイン(Cal)、カスパーゼ(Cas)の阻害も同時に実施した。両インヒビターとも PS の外層露出を抑制し、両経路の関与が明らかとなった。インヒビターの濃度はμM。EG; EGTA 5mM, AU; arbitrary unit

〔考察〕 Sema3A には PS の外層露出作用があることが明らかとなった。Sema3A によってスクランブラーゼが活性化しているものと考えられるが、その活性化に至るシグナル経路には、カルパインの活性化、カスパーゼの活性化、Ca<sup>2+</sup>の流入が関与していることが示唆された。Sema3A の作用なしに露出している PS は、おそらく培養の過程で生じた細胞死を反映しているものと推察された。Sema3A によって神経突起の伸長退縮が制御されているが、PS の外層露出がどのように関与しているかについては、現在までほとんど解析されていない。本研究の成果により、神経発達現象に PS の外層露出という新たな視点を加えられた。今後は、詳細なシグナル経路の解析や、どのような現象に PS の外層露出が必要なのか機能的な面の解析を行っていきたい。

〔結論〕 本研究により、Sema3A の PS 外層露出作用が示され、それにはカルパイン活性化、カスパーゼ活性化、Ca<sup>2+</sup>の流入を誘導するシグナル経路の関与が示唆された。

〔文献〕

- 1) Bevers, E. M., Williamson, P. L., 2016. *Physiol Rev.* 96, 605–645
- 2) Suzuki, J., Imanishi, E., Nagata, S., 2016. *Proc Natl Acad Sci USA.* 113, 9509–9514
- 3) Suzuki, J., Umeda, M., Sims, P. J., Nagata, S., 2010. *Nature* 468, 834–838
- 4) Arashiki N, Takakuwa Y., 2017. *Curr Opin Hematol.* 24, 167–172
- 5) Liu, B. P., Strittmatter, S. M., 2001. *Curr Opin Cell Biol.* 13, 619–626
- 6) Yamashita, N., Aoki, R., Chen, S., Jitsuki-Takahashi, A., Ohura, S., Kamiya, H., Goshima, Y., 2016. *Brain Res.* 1631, 127–136
- 7) Vilalta, A., Brown, G. C., 2018. *FEBS J.* 285, 3566–3575
- 8) Kaczmarek, J. S., Riccio, A., Clapham, D. E., 2012. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109, 7888–7892
- 9) Wehner, A. B., Abdesslem, H., Dickendesh, T. L., Imai, F., Yoshida, Y., Giger, R. J., Pierchala, B. A., 2016. *Development* 143, 1560–1570

## 10. PTP $\delta$ はNRP1の糖鎖を認識し機能的な受容体複合体を形成する

瀧澤光太郎、中村史雄

(生化学)

〔目的〕 軸索ガイダンス分子セマフォリン3A(Sema3A)の情報伝達に受容体型チロシンホスファターゼ $\delta$ (PTP $\delta$ )の糖鎖結合領域Kループが関与することを見出した。Sema3A受容体のニューロピリン1(NRP1)は高度に糖鎖修飾を受けるタンパク質であるため、いずれかの糖鎖修飾が複合体形成に必要であると予測された。そこで結合に関与する残基を検討した。

〔方法〕 Site directed mutagenesisによりNRP1の糖鎖修飾を受けうる6残基(N5, S1)をアラニン置換し、糖鎖修飾を受けない変異体をそれぞれ作成した。セルベースのbinding assayおよびSema3Aによるcollapse assayにより相互作用と機能を評価した。

〔結果〕 NRP1のN261、N522のアラニン置換はPTP $\delta$ との結合を減弱させ、両者の変異体(N261A/N522A)ではさらに減弱した。N150Aは逆に増強した。その他の残基は結合に影響しなかった。Collapse assayでは、N150AはWTと同程度の反応を示し、N261A、N522A、N261A/N522Aはcollapseを抑制する傾向を示した。

〔考察〕 PTP $\delta$ ・NRP1の結合の減弱に伴ってSema3Aの反応性が低下する結果は、以前の報告と一致する。複数の糖鎖が結合に関与する結果は興味深く、複合体の構造解析により詳細を明らかにしたい。

〔結論〕 NRP1のN261、N522に付与される糖鎖は、PTP $\delta$ との結合に関与する。

