令和４年度

がん・心臓病の基礎的・先駆的研究事業報告書

公益財団法人 車両競技公益資金記念財団

はじめに

我が国において、死因の上位を占める疾患の基礎的研究の促進を図り、学術の向上と国民の健康増進に寄与することを目的として、当財団では昭和62年から助成事業の枠に新たに「がん・心臓病の基礎的研究事業」を設定し、更に平成13年度からは「がん・心臓病の先駆的研究事業」も対象に加え、「医療の基礎的、先駆的研究助成事業」として令和4年までの542件のプロジェクトに対し、約4，138百万円の助成を行なってまいりました。

がんの早期発見、心臓病の予防等は現代人の国民生活にとって大変関心の高いものであります。

がん研究を見ると、がん本体の解明とその診断及び治療法の開発等がん制圧のための研究が鋭意進められており、その研究成果も上がり、がんは治る病気といった感を抱かせます。

また心臓病についても分子生物的領域にまで研究が進んできており動脈硬化や心臓病の治療に遺伝子を用いる手法等も行なわれるようになりました。

これらの研究事業を実施された研究者の方々は、3年間以内という限られた期間のうちに少人数で研究を行い、これを取りまとめることは非常なご苦労があったと思います。今回の研究成果は、今までにそれぞれの学会或いは論文により発表されて、それぞれに高い評価を受けておられます。

この研究成果について、より広く社会の各方面に公表することが必要との声もあり、この要請に応え、令和4年度をもって研究が終了し、私どもに提出していただいた研究報告書を抄録としてここに刊行する次第です。がん・心臓病の今後の研究に少しでも役立てば幸いです。

令和5年12月

公益財団法人車両競技公益資金記念財団
理 事 長　田 宮 治 雄

目　　次

女性がん患者由来モデルに基づく性ホルモン作用の解明と臨床応用

所属機関　埼玉医科大学
研究者名　堀江　公仁子

《研究の概要》

本邦において罹患・死亡数が増加しつつある乳がん・子宮体がん・卵巣がんの女性がんは、生理的作用から変容したがん特徴的な性ホルモン作用を受け、腫瘍増殖・病態増悪をきたすことが知られている。がん病態解析には、従来、細胞株が用いられてきたが、継代中にホルモン作用等の腫瘍本来の特性が欠失しやすく、実臨床を反映する患者由来がんモデルの構築が求められてきた。本研究グループは独自に至適化した培養条件を用いて、臨床がん組織から３次元の患者由来がん培養系とその移植腫瘍系の作製に成功し、樹立したがんモデルは長期継代培養が可能でがん幹細胞性が濃縮しており、がん病態進展機構を検討する上で有用であることをホルモン依存性がん等において明らかにしてきた。

本研究は、女性がん病態における性ホルモン作用とそこからの逸脱機構の解明を進めるため、倫理基準を満たす女性がん臨床検体から樹立した患者由来がん培養系に基づいて、がん病態進行に重要な分子メカニズムを転写制御と転写後調節を中心に解明し、診断・治療標的となる分子を同定して女性がんの新規治療戦略への応用を目指す目的で行った。エストロゲン受容体 (ER) 標的因子である Efp/TRIM25 とその類縁分子 TRIM47、転写後発現調節に関わる RNA 結合蛋白質、性ホルモン受容体作用を調節する長鎖非コード RNA 等に着目し、機能解析を進めた。Efp はホルモン依存性乳がんだけでなく、子宮体がんおよび ER 陰性乳がんの患者由来培養系における発現調節により増殖制御できることを明らかにした。Efp と構造的に近似する TRIM47 は、NF-κB 経路上流のプロテインキナーゼ PKC-ε と PKD3 に TRIM47 が結合することにより蛋白安定化を起こし、NF-κB シグナル活性化と TRIM47 作用の増強により、ホルモン依存性および治療抵抗性乳がんの増殖を促進する機構を明らかにした。また、ショウジョウバエ行動ヒトスプライシング (DBHS) ファミリー RNA 結合蛋白質に注目し、このうち PSPC1 が複合体形成する PSF と共通で ERα遺伝子 *ESR1* と syntaxin ファミリーSCFD2 を標的として転写後調節に関わり、SCFD2 免疫染色性は ER 陽性乳がん患者予後不良と相関し、ホルモン治療抵抗性乳がん *in vivo* モデルにおいて SCFD2 核酸製剤はがん増殖を抑制することを明らかにした。治療抵抗性乳がん増殖に寄与する長鎖非コード RNA として増殖関連の *TMPO-AS1* と独自に同定した *breast cancer associated ESR1 regulating natural antisense transcript 1* (*BNAT1*)、難治性卵巣がん増殖に寄与する長鎖非コード RNA として *ovarian cancer long intergenic noncoding RNA 1* (*OIN1*) について、機能解析を行い、各核酸製剤の *in vivo* モデルにおける治療効果を明らかにした。さらに患者由来がんモデルのエピゲノム制御の特性を調べるため、ヒストン H3K27 アセチル化抗体によるクロマチン免疫沈降シーケンス解析を施行し、Rank Ordering of Super-Enhancers (ROSE) アルゴリズムに基づきスーパーエンハンサー領域を抽出した。その近傍でトランスクリプトーム解析における発現量が高い遺伝子を探索し、公共がんデータベースや文献から、がん病態との関連性が強い分子をがん種別に同定し、機能解析を進めており、新たな女性がん診断・治療標的分子として臨床応用を目指している。

共同研究者の氏名・所属機関
・　堀江　公仁子　埼玉医科大学医学部ゲノム応用医学
・　井上　聡　　東京都健康長寿医療センター研究所システム加齢医学

研究報告

Ⅰ　研究目的

本邦において、罹患数・死亡数共に増加している女性がんの乳がん・子宮体がん・卵巣がんは、生理的作用から変容したがん特徴的なエストロゲン等の性ホルモン作用を受け、腫瘍増殖・病態増悪をきたすことが知られている。特に乳がんに対しては性ホルモン産生や受容体作用を阻害する内分泌療法が行われているものの、ホルモン作用の詳細は未だ明らかではない。従来、女性がんの性ホルモン作用の解析には、臨床がん病理組織におけるエストロゲン受容体 (ER) およびプロゲステロン受容体 (PGR) の発現解析の他、ホルモン応答性がん細胞株を用いて治療薬耐性がんモデルを作製し、遺伝子発現性やエピゲノムの解析が行われてきた。がん細胞株による実験的解析は、再現性を検討できるものの、継代培養を行うにつれ、ホルモン感受性を喪失する等の点から、実臨床から乖離した細胞特性を見ている可能性がある。また、病理学的検討は治療前後などにおけるがん患者の病態変容を検討するには優れているが、実験的に分子メカニズムを再現する系ではない点に問題がある。以上の観点から、再現性が得られハイスループット解析が可能な実臨床を模倣したがんモデルの確立が求められてきた。

我々はこれまでに、ホルモン依存性がんの性ホルモン作用について、がん細胞株とその治療抵抗性モデル、それらの *in vivo* 移植腫瘍モデルを用いて、ホルモン受容体の標的因子の同定と機能解明を進め、新規診断・治療標的の臨床応用を目指している。ホルモン依存性乳がんからエストロゲン応答遺伝子として同定された Efp/TRIM25 は、TRIM (Tripartite Motif) 蛋白質ファミリーに属し、RBCC と呼ばれる TRIM 蛋白質の基本構造である 3 つのドメイン (RING, B-box, Coiled-Coil) と、TRIM 蛋白質の多様性をもたらすカルボキシル末端側の SPRY ドメインから構成されている。Efp は E3 ユビキチンリガーゼとして機能し、細胞周期チェックポイント 14-3-3σ の蛋白分解により細胞周期進行を促すとともに、NF–κB 経路を活性化してがん進行をもたらすことを我々は以前明らかにしてきた [***Nature*** 417: 871, 2002; ***J Steroid Biochem Mol Biol*** 85: 101, 2003]。同じく ERα標的因子の 1 つとして同定した COX7RP については、ミトコンドリア呼吸鎖複合体が超複合体形成する際の促進因子であることを明らかにし [***Nat Commun*** 4: 2147, 2013]、COX7RP 作用の増強が乳がん・子宮内膜がんにおけるエネルギー産生を増やし、がん増殖へ結びつく機構を明らかにした [***Nat Commun*** 10: 4108, 2019]。非コード RNA としてマイクロ RNA の miR-378a-3p および miR-574-3p が乳がんにおいて発現低下し、各々の標的遺伝子である小胞体-ゴルジ体輸送に関与する GOLT1A および被覆小胞のコートの骨格になる clathrin heavy chain (CLTC) の過剰発現が予後不良に関連することを報告し [***Sci Rep*** 5: 13170, 2015; ***Sci Rep*** 5: 7641, 2015]、長鎖非コード RNA の *TMPO-AS1* がエストロゲン受容体の mRNA 安定化を促進し、乳がん増殖に関わることを明らかにしてきた [***Mol Cell Biol*** 39: e00261-19, 2019, highlighted

in ***"Spotlight"*** and ***Cover***]。

近年、臨床がん組織より直接、患者由来がん移植腫瘍モデルを作製する patient-derived xenograft (PDX) 研究が欧米を中心に行われるようになり、米国国立がん研究所においても PDX を用いた薬剤スクリーニングが標準になってきたが、この手法はマウスによる腫瘍継代が必要であり、細胞培養に比して費用とマウス飼育のスペースを要する。一方、患者由来がん３次元培養系を作製する技術が発達し、特に申請者らと共同研究者が至適化したスフェロイド培養法は、腫瘍の親玉細胞となりうる「がん幹細胞様細胞」分画の濃縮が可能であり、がん自律性増殖と薬剤耐性獲得機構の解析に優れたツールとなりうることを報告してきた [***Endocrinology*** 160: 1895, 2019; ***Int J Cancer*** 146: 1099, 2020; ***Cancer Lett*** 489: 79, 2020]。近年の国内外の先進的がん研究により、がんはゲノム変異を有するドライバー因子のみならず、エピジェネティックな変容や転写後調節等により、同じ個体同じ組織からも多彩な細胞系譜により発症・進行し、がん多様性を形成し、クローンごとに治療薬感受性も異なることが明らかになりつつある。従って、実臨床に近い患者由来がんモデルを用いて、各種の女性がんにおける性ホルモン作用とそこからの逸脱機構を含むエピゲノム制御メカニズムを明らかにすることは、女性がんに対する新規治療戦略を開発する上で重要な一歩になると考えられる。

このような背景に基づき、本研究では日本人の臨床女性がん組織から患者由来がん培養系とその移植腫瘍系を作製し、炎症状態や代謝作用の変容等によるエピゲノムおよび RNA 制御機構の変化を中心に、がん病態進行と治療抵抗性に関わる女性がんの性ホルモン作用を明らかにすることを目的とした。女性がん病態進行の分子メカニズムを解析することにより、がん種別の分子標的に基づく新規診断・治療・予防法の開発が可能になり、女性がんの精密医療への応用が期待できると考えた。

Ⅱ　研究計画及び材料と方法

（１） 細胞培養および移植腫瘍の作製

倫理基準を満たした乳がん・子宮体がん・卵巣がん臨床検体からがん細胞を分離し、独自に培養条件を至適化させたスフェロイド培養法 [***Endocrinology*** 160: 1895, 2019] により、長期継代培養が可能な患者由来がん３次元培養系を確立した。患者由来がん培養系は、幹細胞培養用の StemPro hESC SFM 培地 (Invitrogen) をベースに、basic fibroblast growth factor (Invitrogen) と ROCK 特異的阻害剤 Y-27632 (Wako) を添加した培地中で、ultra-low-attachment culture dishes (Corning) を用いて 5%CO_2 下で維持した。スフェロイド塊が巨大化した際には Accumax (Innovative Cell Technologies) を用いた酵素処理により、細分化を行った。得られた患者由来がん培養系は、超免疫不全 NOG (NOD/Shi-scid, IL-2RγKO Jic) マウスに皮下あるいは腹腔内移植をして、患者由来がん移植モデルを作製した。がん細胞株は American Type Culture Collection より購入し、ER 陽性 MCF7 乳がん細胞から 4-hydroxytamoxifen (OHT) 下およびエストロゲン欠乏状態で長期培養することにより、独自に樹立した内分泌治療抵抗モデルである OHTR (OHT-resistant) 細胞 [***Sci Rep*** 5: 7641, 2015] と LTED (Long-term estrogen-deprived) 細胞 [***Sci Rep*** 5: 13170, 2015] も活用した。OHTR 細胞由来の *in vivo* 腫瘍モデルはヌードマウスを用いて作製した。マウス実験は Animal

Research: Reporting of In Vivo Experiments (ARRIVE) guidelines [https://arriveguidelines.org/] を遵守し、機関内動物実験委員会の承認の下で行った。

（２） オミックス解析

確立した患者由来女性がんモデルおよびがん細胞株を用いて、次世代シーケンスまたはマイクロアレイ技術 (Affimetrix GeneChiP) に基づきトランスクリプトーム解析、転写因子・ヒストン修飾ステータスのクロマチン免疫沈降 (ChIP) 解析、RNA 結合蛋白質に対する RNA 免疫沈降 (RIP) 解析を行った。トランスクリプトーム解析から注目される遺伝子発現の validation は ChIP 解析の抗体は、Anti-histone H3 (acetyl K27) (ab4729, abcam)、ERα Antibody (F-10) (sc-8002, Santa Cruz Biotechnology) を使用した。RIP 解析の抗体は、Anti-SFPQ (6D7) (Sigma-Aldrich)、Anti-PSPC1 (sc-374181, Santa Cruz Biotechnology)、Anti-p54 [nrb] (BD Transduction) を使用した。Efp モノクローナル抗体 [***Clin Breast Cancer*** 21: 399, 2021] および TRIM47 ポリクローナル抗体 [***Proc Natl Acad Sci U S A*** 118: e2100784118, 2021] は、我々の研究室で自作したものを使用した。シーケンスデータのバイオインフォマティクスについては、独自に改良を行ってきた解析パイプラインに基づいて行った。パスウェイ解析は Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) [https://david.ncifcrf.gov/] および Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) [https://www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp] に基づいて行った。スーパーエンハンサー解析は、マサチューセッツ工科大学 Young 教授研究室が開発した Rank Ordering of Super-Enhancers (ROSE) [http://younglab.wi.mit.edu/super_enhancer_code. html] アルゴリズムに基づいて行った。

（３） 細胞特性実験

遺伝子発現抑制実験においては、siDirect アルゴリズム [https://sidirect2.rnai.jp/] に基づいた siRNA 配列情報を用いて、siRNA 製剤を Sigma-Aldrich 社にてカスタム合成した。siRNA の陰性対照核酸製剤として siControl (RNAi Inc.) を用いた。細胞への siRNA 導入試薬として Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) を用いた。発現ベクターとルシフェラーゼレポーターの作製には、pcDNA3 (Invitron) と psiCHECK2 (Promega) を用いた。ルシフェラーゼレポーターアッセイは Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いて行った。細胞増殖能は、平面培養系では Hoechst 33258 色素 (Thermo Fisher Scientific) による DNA 染色を行い、355 nm にて蛍光強度を測定した。３次元培養系では、CellTiter-Glo 3D Cell Viability Assay kit (Promega) により、TriStar2 S LB 942 Multimode Reader (Berthold Technologies) を用いて ATP 量を測定した。細胞遊走能は Boyden chamber (Costor) を使用して解析した。細胞周期解析は Propidium Iodide (PI) による核 DNA 染色、アポトーシス解析は FITC annexin V と PI 染色を行い、FACS により染色される細胞分画の割合から細胞周期プロファイルとアポトーシス状態を解析した。

（４） 臨床病理解析

倫理基準を満たした 100 例超の乳がん病理組織を用いて、抗体を用いた免疫組織化学染色および DIG 標識 RNA プローブを用いた *in situ* hybridization（ISH）法を施行し、複数の

病理医の協力を得て判定を行った。患者臨床情報と標的因子の免疫染色性または ISH シグナル有無との相関解析は、臨床部門の協力を得て行った。

Ⅲ　研究成果

（１） SPRY ドメインを有する TRIM 蛋白質による女性がん病態進行メカニズムの解析

本研究では、ER 陰性がんにおいても Efp 発現抑制により細胞増殖・遊走能が低下し、細胞周期進行が抑制されることを患者由来乳がんモデル (triple-negative breast cancer patient-derived cells: TNBC-PDC) および MDA-MB-231 細胞を用いて明らかにした。ER 陰性がんの Efp 発現低下のトランスクリプトーム解析により、細胞周期関連因子の *CDCA7* (*cell division cycle associated 7*) と *HELLS (helicase, lymphoid specific*) の発現低下がもらされることを明らかにした [***Biochem Biophys Res Commun*** 624: 81,2022]。

子宮体がんにおける Efp 作用の解析のため、ホルモン感受性患者由来子宮体がん培養系 (endometrial cancer patient-derived cells: EC-PDC) を用いて、エストロゲン刺激により発現変動する TRIM 蛋白質をトランスクリプトーム解析により検討したところ、TRIM ファミリー蛋白質の中で Efp が最も発現増加していた。我々が樹立したホルモン感受性 EC-PDC 培養系は、唯一ホルモン感受性を示す子宮体がん細胞株として知られてきた Ishikawa 細胞と同等の著明な Efp 発現上昇が認められ、さらに EC-PDC 培養系では Efp 発現性が持続することから、ホルモン応答性を検討できる子宮体がんモデルとしての優位性が示された。Efp は遺伝子 3’-非翻訳領域 (3’-UTR) に位置するエストロゲン応答エレメント (ERE) により、ERαによる転写制御を受けることから、Efp プロモーター下流にルシフェラーゼ遺伝子、さらにそのすぐ下流に Efp の 3’-UTR ERE を組み込んだレポーターベクターを作製し Ishikawa 細胞に導入したところ、エストロゲン刺激によるプロモーター活性の上昇が認められ、ERE に変異を組み込んだレポーターベクターにおいては活性上昇しないことが見出された。ChIP 解析により、EC-PDC 培養系と Ishikawa 細胞ともにエストロゲン受容体結合性は、特にエストロゲン刺激 90 分後で濃縮することが認められた。EC-PDC において特異的 siRNA により Efp 発現を抑制したところ、細胞周期進行に重要な *CDK6* や炎症/免疫作用に関わる *IL10RA*、*IL26* や *IL6ST* の RNA 発現抑制が認められた [***Biochem Biophys Res Commun*** 548: 204, 2021]。

Efp と同様に C 末端側の SPRY ドメインを有し、Efp に構造的に近似する TRIM47 蛋白質について、NF-κB 経路上流のプロテインキナーゼである PKC-εと PKD3 に TRIM47 が結合することにより蛋白安定化を起こし、NF-κB シグナル活性化と TRIM47 自身への正のフィードバックにより、ホルモン依存性乳がんとタモキシフェン耐性乳がんの細胞レベルおよび動物レベルの増殖を促進するメカニズムを明らかにした。臨床的にも、術後タモキシフェン治療を行ったホルモン依存性乳がん症例において、TRIM47 免疫組織化学染色性が高い症例では患者予後不良と有意に相関しており、TRIM47 のホルモン治療予後予測の診断マーカーとしての有用性を示した [***Proc Natl Acad Sci U S A*** 118 : e2100784118, 2021]。

Efp は近年、SPRY ドメインを介して RNA 結合蛋白質として機能する報告がなされていることから、Efp とその類縁分子である TRIM47 について、特異的抗体を用いて女性がん患者由来がん培養系と細胞株での RNA 免疫沈降シーケンス解析を行い、TRIM 蛋白質の新

たな標的分子の探索とその機能解析を進めている。

（２） DBHS ファミリーRNA 結合蛋白質による転写後調節メカニズムの解析

本研究に先立ち、我々は、ショウジョウバエ行動ヒトスプライシング (DBHS) ファミリーRNA 結合蛋白質である PSF/SFPQ がホルモン依存性乳がんにおいて、ERα遺伝子 *ESR1* と結合してエストロゲンシグナルを増強し、ホルモン感受性および内分泌治療抵抗性乳がんの増殖と進行に関与することを明らかにしてきた [***Cancer Res*** 80: 2230, 2020]。PSF は *ESR1* と共に、膜融合や細胞外分泌に関与する syntaxin ファミリー蛋白質の 1 つ *SCFD2* (sec1 family domain containing 2) も標的 RNA していた。本研究において、同じ DBHS ファミリーの PSPC1 (paraspeckle component 1) が *ESR1* と *SCFD2* を標的としてこれらの転写後調節に作用し、ホルモン感受性および内分泌治療抵抗性乳がんの増殖、増悪に寄与することを示した [***Sci Rep*** 12: 9495, 2022]。PSPC1 と共に、PSPC1 標的因子の SCFD2 自体も乳がんの診断マーカーとして、免疫組織化学における強染色性が患者予後不良と正に相関することを明らかにした。さらに、SCFD2 発現抑制によるトランスクリプトーム解析により、その下流遺伝子として抗アポトーシス因子である *DDIAS* (*DNA damage induced apoptosis suppressor*) と転写因子 *MYBL1* (*MYB proto-oncogene like 1*) を同定し、SCFD2 はタモキシフェン治療抵抗性 *in vivo* 腫瘍モデルにおける治療標的になりうることを示した。DBHS ファミリーの各 RNA 結合蛋白質に対しても、女性がん患者由来がん培養系と細胞株での RNA 免疫沈降シーケンス解析を行い、新たな標的分子の探索とその機能解析を進めている。

（３） 長鎖非コード RNA による性ホルモン作用調節メカニズムの解析

ホルモン依存性乳がんにおいて、ERαはリガンド依存性転写因子として、性ホルモン作用に関わる様々な標的遺伝子の転写を調節し、がん増殖・進展に関わっている。米国の複数の研究グループにおいて、ERαが結合し、かつクロマチン転写活性化を示すヒストン H3K27 アセチル化する領域は、アクティブなエンハンサー領域として、ホルモン依存性乳がんの病態に重要であることが示されてきた。我々は、このアクティブなエンハンサー領域が集簇する *COL18A1* 遺伝子の転写開始点近傍から、エストロゲン刺激後早期に発現上昇し、ホルモン感受性 MCF7 細胞よりもタモキシフェン耐性 MCF7 細胞において高発現を示し、さらに ERα蛋白質自体に結合して ERαの転写作用を活性化し、正のフィードバック作用により ERαの RNA 発現も増強するホルモン依存性の新規長鎖非コード RNA として、*breast cancer associated ESR1 regulating natural antisense transcript 1* (*BNAT1*) を同定した。*BNAT1* 特異的 siRNA は *in vivo* 内分泌治療抵抗性乳がんモデルにおいて有意な治療効果をもたらし、ER 陽性乳がん臨床検体における *in situ* hybridization 法での *BNAT1* 陽性は患者予後不良と正に相関していたことから、*BNAT1* はホルモン依存性乳がんの新規診断・治療標的となりうることを示した [***Cells*** 11: 3610, 2022]。

我々は以前、核蛋白質 thymopoietin(TMPO)のアンチセンス RNA の *TMPO-AS1* が、米国がんデータベース The Cancer Genome Atlas (TCGA) の乳がん RNA シーケンスデータにおいて、増殖マーカーである Ki-67 の RNA 発現性と強く相関し、ホルモン依存性がんにおいて *ESR1* RNA の安定性に寄与してエストロゲンシグナルを持続・増強させ、ホルモン依存性および内分泌治療抵抗性乳がんを増殖・進行させることから、乳がんの新たな診断・治

療標的となることを示してきた[***Mol Cell Biol*** 39: e00261-19, 2019]。TCGA 乳がんデータにおいて、basal-like タイプ乳がんにも高い発現性が認められるため、本研究では *TMPO-AS1* が ER 陰性乳がんの進行に関わるかについて検討を行った。*TMPO-AS1* の発現抑制は ER 陰性乳がん細胞の増殖を抑制すると共に、トランスクリプトーム解析により、*TMPO-AS1* の発現抑制は transforming growth factor-β シグナルと E2F 増殖関連シグナルを低下させた。さらに、共同研究者（長崎大学・佐々木均教授、東京大学・宮田教授および片岡名誉教授）が開発したナノテクノロジーのドラッグデリバリーシステムを用いることにより、ER 陰性乳がんの *in vivo* 皮下腫瘍モデルと転移腫瘍モデルにおいて、*TMPO-AS1* 特異的 siRNA は効率よく導入されて腫瘍増殖抑制の治療効果が認められ、*TMPO-AS1* はホルモン応答性だけでなく、ホルモン不応性乳がんの診断・治療標的になりうることを明らかにした [***Cancer Sci*** 111: 2440, 2020]。

我々は卵巣がん臨床検体において、正常卵巣組織よりも著明に発現量が高い新規 RNA を RNA シーケンス解析に基づいて同定し、*OIN1* (*ovarian cancer long intergenic noncoding RNA 1*) と命名した。*OIN1* は 10 番染色体上の遺伝子間隙に存在し、特異的 siRNA により高発現卵巣がん細胞において発現抑制すると細胞増殖が低下しアポトーシスの増加が認められた。*OIN1* が発現抑制する候補標的遺伝子として、腫瘍抑制因子の *RASSF5* (*Ras association domain family member 5*) とアデノシン受容体の 1 つである *ADORA1* (*adenosine A1 receptor*) を同定し、卵巣がん移植モデルにおいて *OIN1* 特異的 siRNA により腫瘍形成が抑制され、候補標的遺伝子の発現は増加することを明らかにした [***Int J Mol Sci*** 22: 11242, 2021]。*OIN1* を標的とする siRNA 核酸製剤は新規卵巣がん治療への臨床応用が考えられ、特許出願中である [PCT/JP2021/029473]。

（４） 女性がんのスーパーエンハンサー解析

我々が樹立した患者由来女性がんの３次元スフェロイド培養系は長期継代が可能であり、がん幹細胞性が濃縮した細胞分画が得られるため [***Endocrinology*** 160: 1895, 2019]、実臨床における難治性がんのエピゲノム制御機構を解析する上で優れたツールになると考えられる。患者由来女性がん培養系を用いて、ヒストン H3K27 アセチル化領域の同定のために ChIP シーケンスを行い、米国マサチューセッツ工科大学 Young 教授研究室が開発した Rank Ordering of Super-Enhancers (ROSE) アルゴリズムを用いて、各細胞固有のマスター転写制御領域と考えられる数百か所のスーパーエンハンサーを抽出した。同定したスーパーエンハンサーの中には、がん幹細胞性に関与する転写因子等が含まれるほか、女性がん以外のがん種において、我々が治療抵抗性への関与を明らかにした転写調節因子が含まれていた。現在、各がん種の候補ドライバー因子について、細胞特性に対する影響や転写調節作用、がん臨床検体における免疫染色性と患者予後との関連性について検討を進めており、そのうちの一部については令和５年度中に学会発表を予定している。

Ⅳ　考察

本研究により、患者由来がんモデルを用いて、Efp の ER 陰性がんと子宮体がんにおける新たな標的因子が見出された。ER 陰性がんにおいて Efp の標的因子として同定された

CDCA7 は細胞周期 G1-S 期に発現上昇する転写制御因子にて、DNA メチル化に作用するクロマチンリモデリング蛋白質の HELLS と複合体を形成することが報告されている。CDCA7 は、エピゲノム制御に重要な EZH2 のプロモーター領域に結合して転写を活性化させることから、Efp は CDCA7–HELLS を介して EZH2 による転写制御に寄与し、がん進行に関わる作用が考察された。子宮体がんにおいて Efp の標的因子として同定された CDK6 は細胞周期促進因子であり、CDK4/6 阻害薬はホルモン依存性乳がん等において臨床実装されている。また、IL10RA、IL26 や IL6ST は炎症/免疫作用に関わる因子であり、子宮体がん増殖・進行における Efp の炎症/免疫作用への寄与を示すものとして注目される。Efp の類縁蛋白質である TRIM47 については、本研究でホルモン依存性乳がんにおいて PKC-ε と PKD3 プロテインキナーゼの蛋白を安定化し、NF-κB 経路を活性化して内分泌治療抵抗性獲得に寄与するメカニズムを明らかにしたが、家族性円柱腫 (cylindromatosis) の原因遺伝子で炎症応答やがん化に関連するシグナル伝達経路を制御する重要な分子である脱ユビキチン化酵素 CYLD 等も標的としていることが最近報告されている [Ji et al., ***Nat Med*** 24: 213, 2018]。CYLD は TRAF2 を脱ユビキチン化して NF-κB 経路を抑制する機能なども報告されており [Trompouki *et al.*, ***Nature*** 424: 793, 2003]、乳がん臨床検体において CYLD の低免疫染色性は ER 陰性と Ki-67 の高発現性と相関し、患者予後不良と相関する知見も得られていることから [Hayashi *et al.*, ***Breast Cancer Res Treat*** 143: 44, 2014]、TRIM47 はホルモン作用を逸脱した乳がん、さらに他の女性がんにおいても病態進行に重要な役割を果たしている可能性が考えられ、その分子メカニズムを患者由来がんモデルを用いて明らかにしていきたい。

DBHS ファミリーRNA 結合蛋白質は、PSPC1 と PSF、また PSF と NONO と、互いに複合体形成して、がん病態進行において協調的に作用することが考えられている。本研究により、PSPC1 と PSF がホルモン依存性乳がんにおいて、共にエストロゲン受容体遺伝子を標的とすること、膜分泌を関わりうる SCFD2 遺伝子も標的とし、SCFD2 自体もその発現性が乳がんの患者予後不良と相関することが見出され、*in vivo* 内分泌治療抵抗性乳がんモデルにおいても SCFD2 特異的 siRNA が治療効果をもたらすことから、SCFD2 が新規がん診断・治療標的となることが明らかになった。RNA 結合蛋白質による転写後調節は、がんの多様性に寄与する重要な分子メカニズムであり、今後さらに様々な治療抵抗性がんモデルにおいて、DBHS ファミリー蛋白質、さらに Efp や TRIM47 等の TRIM 蛋白質に結合する標的 RNA の探索に基づいて、新規がん診断・治療標的の同定と機能解析を進めていきたいと考えている。

本研究で、乳がんの性ホルモン作用に重要な役割を担うと考えられる長鎖非コード RNA として *BNAT1* と *TMPO-AS1* に注目して解析を進めてきたが、ホルモン応答性の子宮体がんにおいても、*BNAT1* や *TMPO-AS1* 等のエストロゲンシグナルを調節する長鎖非コード RNA の働きについて明らかにし、臨床応用の可能性についても検討していきたいと考えている。また、卵巣がんについては、発見時に既に病期が進行し、腹腔内転移する症例が多く、本研究では患者腹水から樹立した患者由来がん培養系から、マウスにおける腹水産生がんモデルの作製に成功した。今後、この系を活用して、核酸製剤の腹腔内投与によるがん制御への臨床応用を目指していきたいと考えている。

最後に本研究事業を遂行するにあたり、公益財団法人車両競技公益資金記念財団より多大なるご支援を賜りましたことを、ここに深く感謝申し上げます。

V　研究成果の発表

1. Kobayashi A, Azuma K, Takeiwa T, Kitami T, **Horie K**, Ikeda K, Inoue S. A FRET-based respirasome assembly screen identifies spleen tyrosine kinase as a target to improve muscle mitochondrial respiration and exercise performance in mice. ***Nat Commun*** 14: 312, 2023.
2. **Horie K**, Takagi K, Takeiwa T, Mitobe Y, Kawabata H, Suzuki T, Ikeda K, Inoue S. Estrogen-inducible lncRNA *BNAT1* functions as a modulator for estrogen receptor signaling in endocrine-resistant breast cancer cells. ***Cells*** 11: 3610, 2022.
3. Kitayama S, Ikeda K, Sato W, Takeshita H, Kawakami S, Inoue S, **Horie K**. Testis-expressed gene 11 inhibits cisplatin-induced DNA damage and contributes to chemoresistance in testicular germ cell tumor. ***Sci Rep*** 12:18423, 2022.
4. Yoh K, Ikeda K, Nagai S, **Horie K**, Takeda S, Inoue S. Constitutive activation of estrogen receptor α signaling in muscle prolongs exercise endurance in mice. ***Biochem Biophys Res Commun*** 628: 11-17, 2022.
5. Sato W, Ikeda K, Gotoh N, Inoue S, **Horie K**. Efp promotes growth of triple-negative breast cancer cells. ***Biochem Biophys Res Commun*** 624: 81-88, 2022.
6. Takeiwa T, Ikeda K, Suzuki T, Sato W, Iino K, Mitobe Y, Kawabata H, **Horie K**, Inoue S. PSPC1 is a potential prognostic marker for hormone-dependent breast cancer patients and modulates RNA processing of *ESR1* and *SCFD2*. ***Sci Rep*** 12: 9495, 2022.
7. Kamada S, Takeiwa T, Ikeda K, **Horie K**, Inoue S. Emerging roles of COX7RP and mitochondrial oxidative phosphorylation in breast cancer. ***Front Cell Dev Biol*** 10: 717881, 2022.
8. Nagasawa S, Ikeda K, Shintani D, Yang C, Takeda S, Hasegawa K, **Horie K**, Inoue S. Identification of a novel oncogenic fusion gene *SPON1-TRIM29* in clinical ovarian cancer that promotes cell and tumor growth and enhances chemoresistance in A2780 cells. ***Int J Mol Sci*** 23: 689, 2022.
9. Kamada S, Ikeda K, Suzuki T, Sato W, Kitayama S, Kawakami S, Ichikawa T, **Horie K**, Inoue S. Clinicopathological and preclinical patient-derived model studies define high expression of NRN1 as a diagnostic and therapeutic target for clear cell renal cell carcinoma. ***Front Oncol*** 11: 758503, 2021.
10. Takeiwa T, Mitobe Y, Ikeda K, Hasegawa K, **Horie K**, Inoue S. Long intergenic noncoding RNA *OIN1* promotes ovarian cancer growth by modulating apoptosis-related gene expression. ***Int J Mol Sci*** 22: 11242, 2021.
11. Azuma K, Ikeda K, Suzuki T, Aogi K, **Horie-Inoue K**, Inoue S. TRIM47 activates NF-κB signaling via PKC-ε/PKD3 stabilization and contributes to endocrine therapy resistance in breast cancer. ***Proc Natl Acad Sci U S A*** 118: e2100784118, 2021.
12. Kamada S, Namekawa T, Ikeda K, Suzuki T, Kagawa M, Takeshita H, Yano A, Okamoto K,

Ichikawa T, **Horie-Inoue K**, Kawakami S, Inoue S. Functional inhibition of cancer stemness-related protein DPP4 rescues tyrosine kinase inhibitor resistance in renal cell carcinoma. ***Oncogene*** 40: 3899-3913, 2021.

13. Takeiwa T, Ikeda K, **Horie-Inoue K**, Inoue S. Mechanisms of apoptosis-related long non-coding RNAs in ovarian cancer. ***Front Cell Dev Biol*** 29: 641963, 2021.
14. Shiba S, Ikeda K, **Horie-Inoue K**, Azuma K, Hasegawa T, Amizuka N, Tanaka T, Takeiwa T, Shibata Y, Koji T, Inoue S. Vitamin K-dependent γ-Glutamyl carboxylase in Sertoli cells is essential for male fertility in mice. ***Mol Cell Biol*** 41: e00404-20, 2021.
15. Yang C, Ikeda K, **Horie-Inoue K**, Sato W, Hasegawa K, Takeda S, Itakura A, Inoue S. Transcriptomic analysis of hormone-sensitive patient-derived endometrial cancer spheroid culture defines Efp as a proliferation modulator. ***Biochem Biophys Res Commun*** 548: 204-210, 2021.
16. Murayama T, Takeuchi Y, Yamawaki K, Natsume T, Li M, Marcela RN, Nishimura T,Kogure Y, Nakata A, Tominaga K, Sasahara A, Yano M, Ishikawa S, Ohta T, Ikeda K, **Horie-Inoue K**, Inoue S, Seki M, Suzuki Y, Sugano S, Enomoto T, Tanabe M, Tada KI, Kanemaki MT, Okamoto K, Tojo A, Gotoh N. MCM10 compensates for Myc-induced DNA replication stress in breast cancer stem-like cells. ***Cancer Sci*** 112: 1209-1224, 2021.
17. Namekawa T, Kitayama S, Ikeda K, **Horie-Inoue K**, Suzuki T, Okamoto K, Ichikawa T, Yano A, Kawakami S, Inoue S. HIF1α inhibitor 2-methoxyestradiol decreases NRN1 expression and represses *in vivo* and *in vitro* growth of patient-derived testicular germ cell tumor spheroids. ***Cancer Lett*** 489: 79-86, 2020.
18. Yang C, Ota-Kurogi N, Ikeda K, Okumura T, **Horie-Inoue K**, Takeda S, Inoue S. MicroRNA-191 regulates endometrial cancer cell growth via TET1-mediatedepigenetic modulation of APC. ***J Biochem*** 168: 7-14, 2020.
19. Takeiwa T, Ikeda K, Mitobe Y, **Horie-Inoue K**, Inoue S. Long Noncoding RNAs involved in the endocrine therapy resistance of breast cancer. ***Cancers*** (Basel). 12: 1424, 2020.
20. Mitobe Y, Ikeda K, Sato W, Kodama Y, Naito M, Gotoh N, Miyata K, Kataoka K, Sasaki H, **Horie-Inoue K**, Inoue S. Proliferation-associated long noncoding RNA, *TMPO-AS1*, is a potential therapeutic target for triple-negative breast cancer. ***Cancer Sci*** 111: 2440-2450, 2020.

染色体動態解析によるがんの発生過程のゲノム不安定性の解明

所属機関　公益財団法人がん研究会がん研究所実験病理部
研究者名　野澤　竜介

<研究の概要>

がん細胞のゲノム不安定性はがんのヘテロ性の獲得に直結する、がんの発生・進展に関わる重要な要素の１つである。ヒトのがん発生過程には、臓器ごとに異なる様々な前がん状態が存在することが知られている。つまり前がん病変は、多段階発がん途上のがん化中間新生物であるか、ゲノム不安定性が上昇した状態（がん化好発状態）であるか、あるいは両者の共存状態であると考えられる。しかし、これまでにこうした前がん病変やがんの悪性化とゲノム不安定性との関連性についての明快な説明は未だなされていない。

そこで本研究では、染色体動態に着目し、発がん過程や前がん病変の進展における、ゲノム不安定性の関与を明らかにすることを目的とした。具体的には、神経膠腫細胞の発がん細胞系を用いて、巨視的・微視的なレベルでの染色体動態を観察し、分裂のたびに染色体数が変動し、ゲノムの不安定化に寄与する「染色体不安定性」が発がん過程でどのように変化していくのかを検討した。その結果、発がん過程が進行するとともに、染色体分配エラーの頻度が高くなり、細胞は染色体異数体化に寛容性を示した。また染色体異数性を獲得した細胞をクローン化し核型の変化を追跡したところ、細胞は染色体の数の増減を繰り返しながら、より多様な核型をもつ細胞集団となった。これらの観察結果から、染色体動態の異常により生じた核型の変化がさらに、次の染色体分配における染色体の安定性に影響を与えることが見出され、がん細胞の染色体不安定性は変動しうることが示唆された。がん細胞は、染色体不安定性の程度を変化させ、遺伝的多様性を獲得し、増殖に有利な細胞内環境を作り出しながら進展すると推察された。

さらに、こうした観察結果を踏まえて、ハイリスク群のヒトパピローマウィルス（HPV）が関与する子宮頸がんの前がん状態である子宮頸部異形成における染色体動態に着目した。これまでに我々は、子宮頸部異形成の細胞の中に、中心体近傍に染色体が引き寄せられた特徴的な染色体の整列異常を発見し、ECAC（Ectopic Chromosome Around Centrosome）と名付けた。この染色体動態異常であるECACの病理学的意義の解明を目指し、ヒト培養細胞を用いてECACがいかに引き起こされるのかその分子機構について解析した。その結果、HPVがコードする遺伝子であるE6の発現に依存的に、動原体タンパク質の機能阻害が誘導され、微小管と動原体の結合異常が引き起こされることが見出された。また興味深いことにECACによって染色体分配エラーがある頻度で観察され、ECACが染色体分配異常を誘導することが明らかとなった。これまで、HPV E6のがん化への寄与としてp53の不活性化が知られているが、本研究からp53の不活性化を背景として引き起こされる染色体不安定性が、子宮頸部異形成の進展を促進する原動力となる可能性が見出された。

本研究により、発がん過程の進行や異形成の進展とゲノム不安定性との関連性が見出され、がんの病勢のインディケーターとして染色体不安定性の有用性が示唆された。特にECACはその病理学的意義を明らかにすることで、子宮頸がんにおける異形成の進展や発がん機構についての本質的な理解を可能にし、その科学的基盤に基づいた、子宮頸部異形成の取扱いについて確度の高い指標を提供できると期待される。

共同研究者の氏名・所属機関
・趙　民知　　公益財団法人がん研究会　がん研究所　実験病理部
・古田　玲子　北里大学　医療衛生学部　臨床細胞学
・河口　徳一　公益財団法人がん研究会　がん研究所　細胞生物部

研究報告

I 研究目的

遺伝情報を担う染色体の分配機能の破綻は、染色体の異数体化を招き、ゲノムの不安定性を増大させ、また細胞間のゲノムの不均一性を増幅させる。この細胞病態は「染色体不安定性」と呼ばれ、がん細胞に共通して観察され、治療抵抗性や予後と相関することが知られている。しかし、染色体不安定性がいかにがん細胞の悪性化に関与するのかについては未だによくわかっていない。

本研究グループの古田らはこれまでに、ハイリスク群のヒトパピローマウィルス（HPV）が関与する子宮頸がんの前がん状態である子宮頸部異形成の細胞の中に、中心体近傍に染色体が引き寄せられた特徴的な染色体の整列異常（ECAC: Ectopic Chromosome Around Centrosome, 図 1）を発見した（Furuta R *et al.* Int. J. Cancer 2003）。子宮頸部異形成は、その病変の程度によって、軽度異形成（Cervical Intraepithelial Neoplasia; CIN1）、中等度異形成（CIN2）、高度異形成（CIN3）と病理学的に分類されるが、ECAC は異形成の初期段階 CIN1 において最も出現頻度が高く、発がん後はその割合は低下する傾向にある。しかし ECAC が高リスク病変の特徴であることから、ECAC が出現する細胞の状態は、異形成の進展やがんへの移行を促進する特異的な細胞病態であると考えられる。ECAC の病理機構とその意義に、がんの悪性化と染色体不安定性との関連性を問う端緒が開かれている。

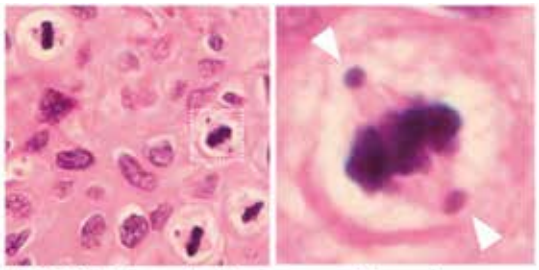


図1 ECAC (Ectopic Chromosome Around Centrosome): 子宮頸部異形成の分裂中期細胞の中心体近傍に染色体が観察された。

そこで本研究では、染色体動態に着目し、前がん病変の進行や発がん過程における染色体不安定性の関与を明らかにすることを目的とした。具体的には、神経膠腫細胞の発がん細胞系を用いて、巨視的・微視的なレベルでの染色体動態を観察し、発がん過程で染色体動態がどのように変化していくのかを検討した。そしてその観察結果を踏まえ、ECAC の異形成進展や発がんへの病理学的意義を理解することを目指し、ヒト培養細胞を用いて ECAC がいかに引き起こされるのかその分子機構について解析した。

II 研究計画及び材料と方法

（研究項目 1）神経膠腫細胞の発がん系を用いた分裂期染色体動態の解析

神経膠腫細胞の発がん系を用いて、発がん過程で染色体動態や染色体構造がどのように変化しているのかを検討する。神経膠腫細胞系列は、1） マウスの脳の神経幹細胞 （Neural Stem Cells: NSC）、2） その細胞に H-Ras G12V タンパク質を含むレトロウィルスを感染により作製した起始細

胞 (Ras-NSCs: RAS)、3) その前がん状態の細胞をマウスの脳に移植し、形成された悪制度の高い腫瘍から樹立した神経膠腫細胞 (Tumor Stem Cells: TS) の 3 種類の細胞株で構成される (図 2)。神経膠腫細胞の発がん系は慶應大学のサンペトラ博士、佐谷秀行博士よりご提供いただいた。

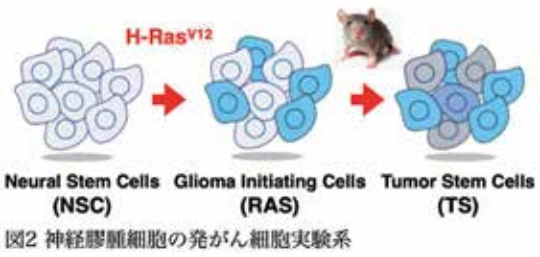


図2 神経膠腫細胞の発がん細胞実験系

a. 染色体動態と染色体構造の解析

神経膠腫細胞の発がん過程における染色体動態を解析するために、染色体異数化の原因と考えられる染色体分配を観察した。染色体分配の異常について、不均等分配を示すラギング染色体や、染色体構造の異常を示す染色体ブリッジに着目し、その発生率を解析した。また並行して、染色体構造の変化を調べるために、染色体スプレッド法により分裂期染色体を可視化し解析した。また、染色体異数性の定量化には、DNA-FISH (Fluorescence in situ hybridization) により 1 番染色体と 2 番染色体を標識し、その染色体の数から Heterogeneity score を算出した (Bakker B et al Genome Biology 2016)。

b. Aurora B キナーゼ活性の解析

染色体分配の失敗がなぜ引き起こされるのかを調べるために、セントロメアに局在し、微小管と動原体との正確な結合を誘導する役割を担う Aurora B の活性について免疫染色により検討した。Aurora B の活性は、CREST に対する、Aurora B の基質である DNS1 の 100 番目のセリンのリン酸化 (DSN1 pS100) の輝度の割合を算出し評価した。抗 DSN1 pS100 抗体は、コロラド州立大学の Jennifer G. DeLuca 博士からご提供いただいた。

(研究項目 2) 染色体動態異常 ECAC の分子機構の解明

高リスク HPV (human papilloma virus)の感染のある子宮頸部の異形成において、特異的に出現する ECAC (Ectopic Chromosome Around Centrosome)に着目し、ECAC はいかなる機序によって引き起こされるかについて明らかにする。HPV の 16 型 (HPV16) は、最も高頻度に検出される子宮頸がんの原因ウィルスの 1 つであり、HPV がコードする遺伝子のうち E6 と E7 はそれぞれ、p53 や pRB を不活性化することが知られている。そこで、E6 や E7 の細胞内での発現が ECAC の出現に寄与するかどうかについて検討する。

a. HPV16 E6 あるいは E7 のヒト発現誘導細胞の樹立

Doxycycline (Dox) の添加により目的遺伝子の発現を誘導できる、正常二倍体ヒト培養細胞を作製するために、Tet Operator に結合し目的遺伝子の転写を抑制する TetR 遺伝子を、Piggybac システムにより hTERT-RPE1 (Retinal Pigment Epithelial) 細胞に導入し、細胞株を得た (TetON RPE1 細胞)。この TetON RPE1 細胞に対して、再び Piggybac システムを用いて、CMV promoter、Tet Operator、そしてその下流に 3xFLAG を付加した HPV16 E6 あるいは E7 の遺伝子の DNA 断片を導入した。HPV16 E6、E7 を発現する RPE1-67R 細胞は、E6、E7、H-Ras G12V そして $p16^{INK4a}$ shRNA をレトロウィルスによって導入することで作製され、Jennifer G. DeLuca 博士からご提供いただいた。

b. 生細胞観察

E6 あるいは E7 を細胞内で発現させた時の染色体動態を観察するために、生細胞観察を行った。細胞をガラス底プレートに播種し、Dox 存在下で 24 時間培養した。撮影の 1 時間前に、SiR-DNA（Cytoskeleton, Inc.）を最終濃度 100 nM になるように添加し、DNA を蛍光標識した。生細胞観察には、共焦点定量イメージサイトメーター CellVoyager CQ1（YOKOGAWA）を用い、640 nm レーザーにより DNA を可視化し、3 分おきに 1 視野につき Z 軸に 1.5 μm の間隔で 7 枚の画像を取得し、Maximum intensity projection により、Z スタックした。

c. 標的タンパク質を薬剤条件的に分解可能な培養細胞系の確立

CENP-E を薬剤添加条件的に急速に分解できる細胞を作製するために、RPE1 細胞に AID2（Auxin-inducible degron）システムを導入した。AID2 は、オーキシンの類似体である 5Ph-IAA を添加することで、ユビキチン E3 ライゲースである OsTIR1 が、mAID タグを付加した標的タンパク質を認識し、プロテアソーム系を介して分解を誘導するシステムである（図 3）。実際に、RPE1 細胞に OsTIR1 を安定に発現する細胞株を作製し、その細胞株の CENP-E 遺伝子の両アリルの 5’末端に mAID と mCherry をコードする DNA 断片をエレクトロポレーションにより挿入した。CENP-E の分解は、mAID-mCherry-CENP-E 細胞に対して、CDK1 阻害剤である RO3306 を最終濃度が 8 μM になるように細胞に処理し細胞周期を G2 期に同調した状態で、5Ph-IAA を最終濃度が 1 μM になるように 4 時間処理し CENP-E の分解を誘導した。CENP-E を分解した時の生細胞観察は、RO3306 を加えていない培地と交換し細胞周期をリリースした後に行った。

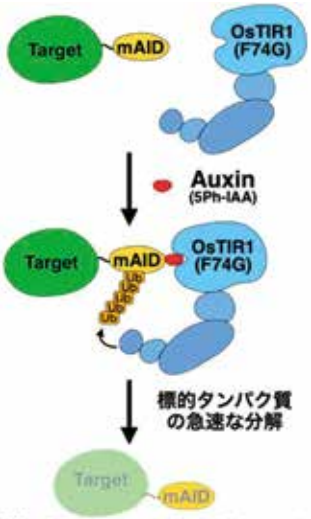


図3 AID2 (Auxin-inducible degron) システムの概略図。

d. 動原体タンパク質の局在解析

E6 の発現が、動原体タンパク質の動原体への局在に影響を与えているかどうかを調べるために、免疫染色とその定量解析を行なった。Dox 存在下、あるいは非存在下で 24 時間培養した、E6 発現誘導細胞に対して、微小管との結合に重要な動原体の外層を構成するタンパク質である、CENP-E、CENP-F、Spindly、Zw10、Mad2、HEC1、および動原体の基部に位置する CENP-C を蛍光標識し、CENP-C に対する動原体外層タンパク質の相対的な蛍光輝度の割合を算出した。画像取得は、共焦点レーザー顕微鏡 LSM880（ZEISS）を用い、1 細胞につき Z 軸に 0.3 μm の間隔で 12～15 枚の画像を取得し、Maximum intensity projection により Z スタックした。

III 研究成果

（研究項目 1）神経膠腫細胞の発がん系を用いた染色体動態の解析

神経膠腫細胞の発がん実験系である、NSC（Neural Stem Cells）、RAS（Ras-NSCs）、そして TS（Tumor Stem Cells）は、がん細胞で共通してみられる細胞病態である染色体不安定性を獲得しているかどうか調べるために、染色体の分配異常の頻度を検討した（図 4A）。特に不均等分配を示すラギング染色体や、染色体構造の異常を示す染色体ブリッジに着目し解析したところ、がんの進行度につれてどちらもその頻度が高くなることを見出した。続いて、これらの細胞の染色体異数性を直接評価するために、染色体スプレッド法を用いてそれぞれの細胞の染色体の数を解析し

た（図 4B）。その結果、NSC では 80%以上の細胞がマウスの正常 2 倍体を示す 40 本の染色体を持っていたが、RAS では染色体を数本獲得または消失した細胞の割合が増加していた。これは染色体の不均等分配に起因するものと考えられる。さらに興味深いことに、TS では、近 2 倍体から全ゲノム倍数化を示す近 4 倍体までの様々な核型を示す細胞が混在していた。全ゲノム倍数化は、がんで広く観察されている現象であり、特に核型の多様化に寄与すると考えられ、また予後の悪化との関連も指摘されている。これらの結果から、TS に着目することで染色体の異数性が、細胞の増殖度、幹細胞性、そして染色体分配の確度といった細胞の性質にいかなる影響を与えるかについての手がかりが得られるものと考えられた。

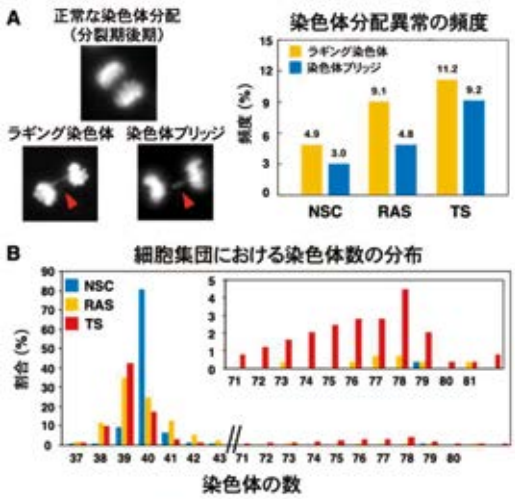


図4 (A) 神経膠腫細胞の発がん細胞系であるNSC、RAS、TSで観察された染色体分配異常の頻度。(B) NSC、RAS、TSの細胞集団における染色体数の分布。

そこで、TS の細胞集団に対してクローン化を行い、TS と同様な核型の細胞（Parent-like）と、近二倍体の細胞（Diploid）、そして多倍体の細胞（Hyperploid）を 3 クローンずつ得た（図 5A）。これらの各クローンにおいて、DNA-FISH 法により 16 週間の期間で 2 週間おきに特定の染色体を標識し、その数の変動を解析した（図 5B）。その結果、Diploid の染色体数に大きな変化はなかったが、Parent-like と Hyperploid の染色体数は、増減を繰り返しながら、より多様な核型をもつ細胞集団となった。そこで、染色体分配異常の割合を解析し、染色体不安定性の程度を解析した（図 5C）。その結果、Diploid では染色体分配の異常を示す細胞の割合には大きな変化はなかったが、Parent-like と Hyperploid では 16 週間の培養を経て顕著に高くなった。続いて、Aurora B の機能を評価するために、Aurora B の基質である動原体タンパク質の DSN1 の分裂期におけるリン酸化を定量した（図 5D）。その結果、Parent-like と Hyperploid は Diploid と比較して Aurora B の活性が低下しており、染色体分配異常の頻度とよく一致していた。これらの結果から、染色体不安定性の増加と Aurora B 機能の低下との間に相関があることが見出された。また、染色体不安定性により生じた核型の変化がさらに染色体不安定性を誘導することが明らかとなり、がん細胞の染色体不安定性は変動しうることが考えられた。

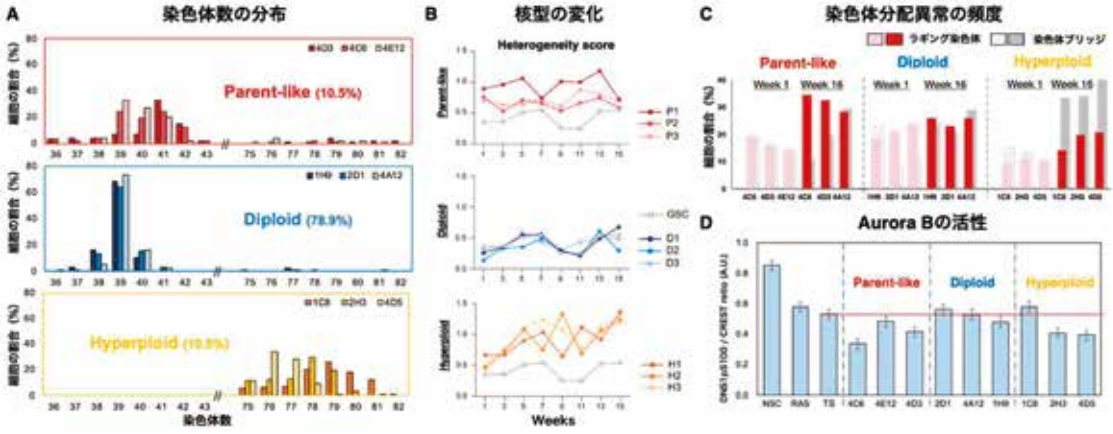


図5 (A) TSの細胞集団をクローン化し、TSと同様な核型の細胞（Parent-like）と、近二倍体の細胞（Diploid）、そして多倍体の細胞（Hyperploid）の3クローンずつについて、細胞の染色体数を数えた。(B) 長期間培養により各クローンの核型の変化を追跡した。(C) 各クローンの染色体分配異常の頻度を解析した。(D) 各クローンにおけるAurora Bの活性を解析した。

（研究項目 2）染色体動態異常 ECAC の分子機構の解明

HPV がコードする E6 や E7 の発現と ECAC の出現との間に関連性があるかどうかを調べるために、正常二倍体ヒト RPE1 細胞に対して、ハイリスク型である HPV16 の E6 と E7 が恒常的に発現している 67R 細胞を用いて、分裂期における染色体動態を解析した。その結果、67R 細胞で、分配期中期に赤道面に整列しない染色体が高頻度に観察され、それに伴った分裂期中期の進行の顕著な遅延が観察された（図 6A と B）。また、整列していない染色体は紡錘体の極の近傍に観察された（図 6C）。これらの観察から、67R 細胞は、恒常活性化型 RAS を発現し、また染色体異数性をすでに獲得した状態であるという点で RPE1 とは異なるが、E6 と E7 の発現が、ECAC と非常によく似た分裂期の染色体動態の異常が引き起こすという可能性が考えられた。

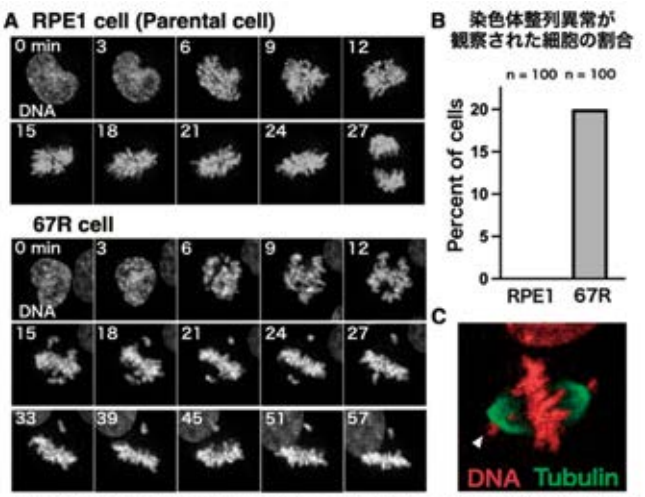


図6 (A) E6とE7を発現した67R細胞でECAC様の染色体整列異常が観察された。(B) 染色体整列異常が観察された細胞の割合。(C) 整列していない染色体は紡錘体の極の近傍に観察された。

そこで、FLAG タグを付加した HPV16 型の E6 あるいは E7 を、Doxycycline（Dox）の添加により発現誘導できる RPE1 細胞をそれぞれ作製し、生細胞観察により分裂期の染色体動態を解析した。その結果、FLAG-E6 を発現誘導した細胞で、38.3%の細胞で分裂期の染色体整列異常が観察され、67R 細胞の観察結果と一致するように、分裂期中期の進行の遅延が観察された（図 7A-C）。これらの結果から、E6 の発現が ECAC 様の染色体動態異常を引き起こす主な要因であることが見出された。また、赤道面に整列しない染色体が紡錘体の両極に対照的に観察された細胞の割合は 5.3%であり、そのほとんどが対照的に観察された臨床検体の病理切片の観察と比較すると頻度は低く、E6 の発現量あるいはその他の要因が、対称的な ECAC の出現に寄与していることが予想された。加えて、染色体整列異常が観察された細胞では、染色体分の不均等分配を示すラギング染色体や、染色体ブリッジが観察され、E6 が誘導する染色体動態異常が、染色体の異数性を引き起こす要因となることが示唆された。

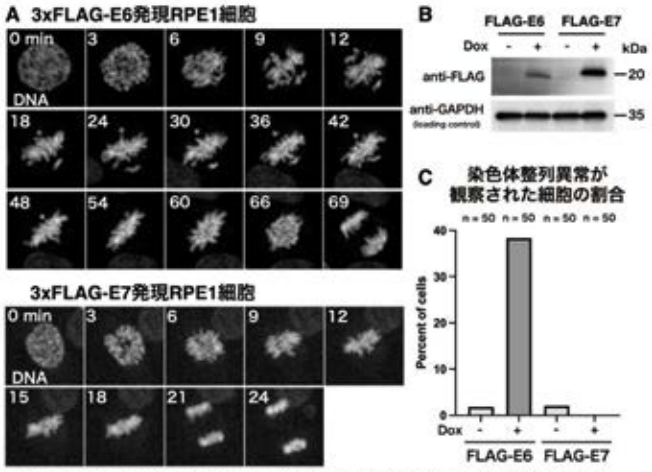


図7 (A) 3xFLAG-E6を発現したRPE1細胞で染色体整列異常が観察された。(B) 3xFLAG-E6、あるいは3xFLAG-E7はDoxycycline（Dox）の添加に依存して発現した。(C) 染色体整列異常が観察された細胞の割合。

正確な染色体分配は、細胞の両極から伸びる微小管と動原体とが正しく結合することで成立するため、分裂期染色体の動態異常である ECAC は、微小管と動原体との結合不全によって引き起こされることが予想された。そこで、E6 を発現誘導した時の動原体構成タンパク質の動原体への局在を検討した。特に微小管との結合に直接的に寄与する、動原体の外層を構成するタンパク質群に着目して解析したところ、それら多くはその局在に大きな変化はなかったが、CENP-E の局在が

特異的に、そして著明に減少して観察された(図 8A と B)。CENP-E は、微小管と結合して染色体を赤道面に運ぶ活性を持つことが知られている。このことを踏まえると、E6 の発現によって CENP-E の機能が阻害されることで、ECAC 様の染色体動態異常が引き起こされるのではないかと予想された。

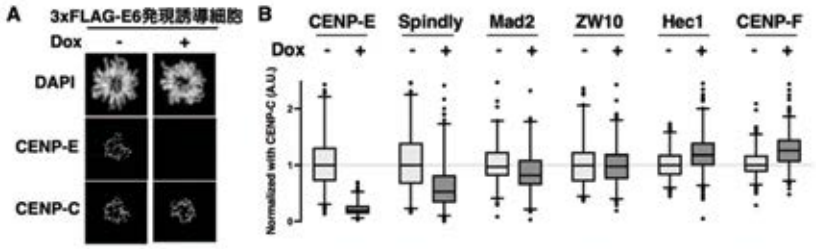


図8 (A) 3xFLAG-E6を発現誘導したRPE1細胞でCENP-Eの動原体局在が著明に減少した。(B) 動原体の外層を構成するタンパク質群の分裂期前中期における動原体への局在を定量した。

そこで、CENP-E の機能阻害が ECAC 様の染色体整列異常を引き起こすかどうかを調べるために、AID2 (Auxin-inducible degron) システムを用いて細胞内の CENP-E を急速に分解し、分裂期の染色体動態を観察した。その結果、79.5%の細胞で、分配期染色体の整列異常とそれに伴った分裂期の進行の顕著な遅延が観察された (図 9A-D)。これらの結果から、CENP-E の機能阻害が ECAC 様の染色体動態異常を誘導することが見出された。

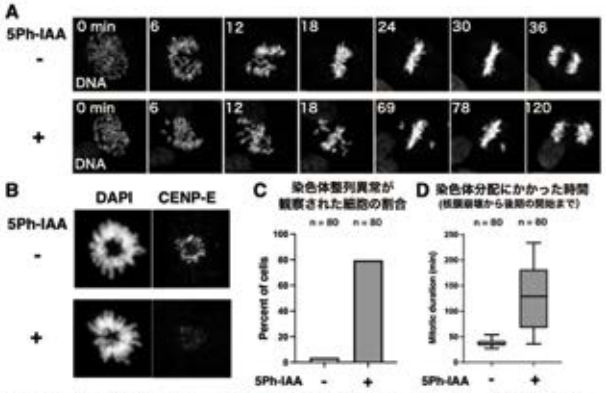


図9 (A) 5Ph-IAAの添加によりCENP-Eの分解を誘導したところ、分裂期染色体の整列異常が観察された。(B) 5Ph-IAAの添加により、細胞内のCENP-Eの分解が誘導された。(C) CENP-Eの分解によって染色体整列異常が観察された細胞の割合。(D) CENP-Eを分解した時の染色体分配にかかった時間。

E6 は、ユビキチン付加酵素 (E3 ライゲース) の E6AP と複合体を形成し、p53 を含む標的タンパク質をユビキチン化することで、プロテアソーム系を介したタンパク質分解を誘導することが知られている (図 10A)。このことから、CENP-E もまた E6 によって分解されることが予想された。そこで、HPV16 E6 の発現を誘導し、細胞内のタンパク質量を解析したところ、E6 の発現依存的に p53 に加えて CENP-E のタンパク質量が顕著に減少した (図 10B)。さらに、HPV16 E6 に加えて、低リスク HPV6、HPV11 あるいは、高リスク HPV18 がコードする E6 の発現を誘導したところ、これまでの知見と一致して p53 は高リスク HPV16 および 18 の E6 の発現に依存して分解されたが、興味深いことに CENP-E の分解は HPV16 E6 特異的に誘導された (図 10B)。これらの結果から、ECAC は、HPV16 E6 が特異的に誘導する CENP-E の分解によって引き起こされるという分子機構が想定された。

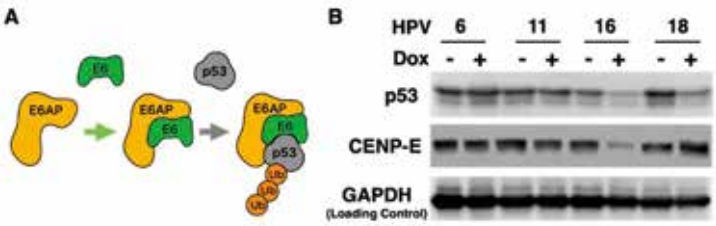


図10 (A) p53によるユビキチン化を介したE6の不活性化機構のモデル。(B) HPV6型、HPV11型、HPV16型、あるいはHPV18型のE6の発現をDox添加により誘導し、p53や CENP-Eのタンパク質量を比較した。

IV 考察

本研究では、発がん過程や、前がん病変進展へのゲノム不安定性の寄与について、染色体不安定性に着目し検討した。神経膠腫発がん細胞系を用いた解析では、発がん過程が進行するとともに、染色体分配エラーの頻度が高くなり、細胞は染色体異数体化に寛容性を示した。この観察結果と合うように、正確な染色体分配の進行に必須な Aurora B の機能は、染色体分配エラーの頻度が高い細胞集団ほど低下しており、Aurora B の機能低下は、細胞の染色体不安定性を定量的に反

映していると考えられる。この発がん細胞系において、実際のがんで広く観察されているゲノム倍数化の表現型を示した TS（Tumor Stem Cells）の細胞集団に着目し、核型によって分類、クローン化、そして長期間培養により核型の変化を追跡したところ、興味深いことに染色体異数性を獲得していた細胞クローンは染色体の数の増減を繰り返しながら、より多様な核型をもつ細胞集団となった。これらの観察から、染色体不安定性により生じた核型の変化がさらに、次の段階の染色体不安定性に影響を与えることが見出され、がん細胞の染色体不安定性は変動しうることが示唆された。がん細胞は、染色体不安定性の程度を変化させ、核型の過度な変化を抑えることで増殖に有利な形質へと変化し、また周囲の状況に応じて遺伝的多様に有利な細胞環境を作り出しながら進展していくと推察される。

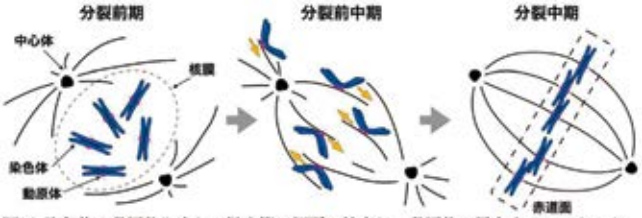


図11 染色体は動原体を介して微小管の側面に結合し、動原体に局在するモータータンパク質群によって微小管の側面をスライドするように移動分裂中期において赤道面に整列する。

また本研究により、子宮頸部異形成で観察された染色体動態異常である ECAC は、ハイリスク型 HPV16 の E6 が誘導する CENP-E の分解が寄与していることが見出された。CENP-E は、分裂前中期から中期にかけて動原体の外層において微小管を捉え、自身のモーター活性により染色体を赤道面へと運ぶ機能を持つ（図 11)。こういった役割を担うモータータンパク質は CENP-E の他にも存在するため、E6 による CENP-E の機能阻害は細胞にとって致死的ではない。しかし、分裂期の遅延に伴って、微小管と動原体の結合エラーによって生じるラギング染色体がある頻度で観察されたため、CENP-E の機能阻害は染色体分配エラーを引き起こし、細胞が染色体異数性を獲得する要因となることが考えられた。HPV E6 のがん化への寄与は p53 の不活性化であるとこれまで説明がなされてきているが、p53 の不活性化を背景とした染色体動態の異常が、子宮頸部異形成の進展を促進する原動力となるという仮説が導き出された。

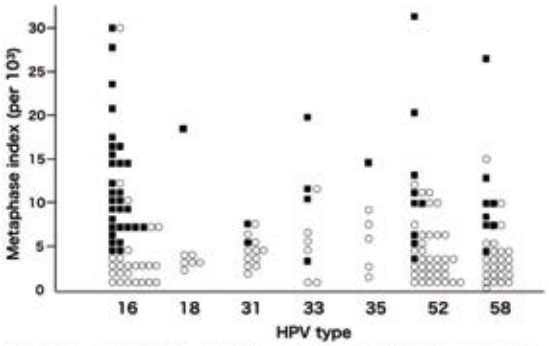


図12 高リスク型HPV陽性の病理切片におけるECACの出現頻度。ECACが観察された切片は■、観察されなかった切片は○、で示した。1000個の細胞のうちMetaphase（分裂中期）の細胞の個数をMetaphase Indexとした。
(Furuta R et al 2003 Int. J. Cancerからグラフを引用)

CENP-E の機能阻害は、16 型 E6 によって特異的に誘導され、HPV18 型 E6 では観察されなかった。この結果は、臨床検体の病理組織で ECAC の出現頻度が HPV18 型と比較して HPV16 型の陽性で顕著に高いという、本研究グループの古田らの観察結果とよく一致する（図 12)。子宮頸がんの 60-70%がハイリスク HPV16 型と HPV18 型によるとされるが、HPV16 型が扁平上皮癌で、HPV18 型が腺癌で高頻度に検出されるということ､そして異形成が進展する期間が 18 型では著明に短いという病理学組織学的な知見と合わせて考えると、HPV16 型と 18 型が引き起こす発がんへの病理機構は異なると予想される。

本研究により、発がん過程の進行や異形成の進展とゲノム不安定性との関連性が見出され、がんの病勢のインディケーターとして染色体不安定性の有用性が示唆された。特に ECAC はその病理学的意義を明らかにすることで、子宮頸がんにおける異形成の進展や発がん機構についての本質的な理解を可能にし、その科学的基盤に基づいた、子宮頸部異形成の取扱いについて確度の高い指標を提供できると期待される。

V 研究成果の発表

(論文)

1) Hara M., Ariyoshi M., Sano T., **Nozawa R.S.**, Shinkai S., Onami S., Jansen I., Hirota T., Fukagawa T. (2023) Centromere/kinetochore is assembled through CENP-C oligomerization. Mol. Cell. (In press)

2) Kamakura N., Takahashi M., **Jo M.** (2023) The toxicity of dysregulated Plk1 activity revealed by its suppressor mutations. Genes Cells. (In press)

3) Kitajima S., Tani T., Springer B. F., Campisi M., Osaki T., Haratani K., Chen M., Knelson E. H., Mahadevan N. R., Ritter J., Yoshida R., Köhler J., Ogino, A., **Nozawa R.S.**, Sundararaman S. K., Thai T. C., Homme M., Piel B., Kivlehan S., Obua B. N., Purcell C., Yajima M., Barbie T. U., Lizotte P. H., Jänne P. A., Paweletz C. P., Gokhale P. C., Barbie D. A. (2022) MPS1 inhibition primes immunogenicity of KRAS-LKB1 mutant lung cancer. Cancer Cell. 40: 1128-1144.

4) Naughton C., Huidobro C., Catacchio C.R., Buckle A., Grimes G.R., **Nozawa R.S.**, Purgato S., Rocchi M., Gilbert N. (2022) Human centromere repositioning activates transcription and opens chromatin fibre structure. Nat Commun. 24;13(1):5609.

5) *Negoto T., ***Jo M.**, Nakayama I., Morioka M., Takeuchi K., Kawachi H., and Hirota T. (2022) Profiling chromosome-level variations in gastric malignancies. Cancer Science. 00: 1-13. DOI:10.1111/cas.15544 (*co-first author)

6) **Jo M.**, Kusano Y., and Hirota T. (2021) Unraveling pathologies underlying chromosomal instability in cancers. Review. Cancer Sci. 112: 2975-2983.

7) Matsui S., and **Nozawa R.S.** (2021) RNA impacts formation of biomolecular condensates in the nucleus. Biomed. Res. 42: 153-160.

8) **Nozawa R.S.**, Yamamoto T., Takahashi M., Tachiwana H., Maruyama R., Hirota T., and Saitoh N. (2020) Nuclear microenvironment in cancer: control through liquid-liquid phase separation. Cancer Sci. 111(9): 3155-3163.

9) Yoshizawa T., **Nozawa R.S.**, Jia Z.T., Saio T., Mori E. (2020) Biological Phase Separation: Cell Biology Meets Biophysics.Biophys. Rev.12(2): 519-539.

10) Boteva L., **Nozawa R. S.**, Naughton C., Samejima K., Earnshaw W. C., Gilbert N. (2020) Common fragile sites are characterized by faulty condensin loading after replication stress. *Cell Rep.* 32 (12) 108177.

11) Kinjo K., Nagasaki K., Muroya K., Suzuki E., Ishiwata K., Nakabayashi K., Hattori A., Nagao K., **Nozawa R. S.**, Obuse C., Miyado K., Ogata T., Fukami M., Miyado M. (2020) Rare variant of the epigenetic regulator SMCHD1 in a patient with pituitary hormone deficiency. ***Sci. Rep.*** 10 (1): 10985.

（著書・和文創設）

1) **古田玲子**. (2023) HPV 関連子宮頸癌. 病理と臨床感染症と腫瘍 -最新の知見- 3 月号, 41, (3), 230-239.

2) **野澤竜介**, 小布施力史. (2021) 相分離メカニズムと疾患 : ヘテロクロマチンの形成メカニズム. 実験医学 39 (10): 143-148.

3) **野澤竜介.** (2020) 第 II 部 相分離メガネのかけ方 : 核マトリックスと核メッシュ. 相分離生物学の全貌（白木賢太郎編集）東京化学同人 p. 104-107

4) **野澤竜介.** (2020) 超解像顕微鏡とクラスター解析機能を用いた RNA ポリメラーゼ I の局在解析.Nikon Application Note.

5) **野澤竜介**, 原　幸大, 丁　大橋. (2020) 液-液相分離を介したクロマチン構造と機能の制御. 生物工学会誌 98(5): 228-254.

がん微小環境標的薬の開発と新規創薬標的の同定

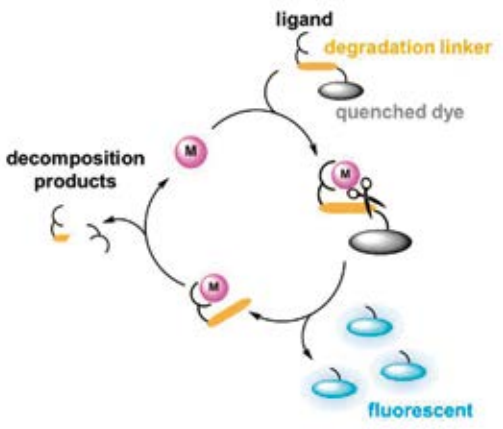
所属機関 神戸薬科大学
研究者名　奥田　健介

＜研究の概要＞

低酸素・低栄養などの固形がん固有の劣悪な環境におけるがんの生存戦略を明らかにする研究が進展するに伴い、従来の分子標的戦略に替わってがん細胞の特異標的として単一のタンパク質ではなく、がんの悪性形質転換によって獲得されたシグナル伝達系を標的とする創薬戦略に今日がん創薬研究は移行しつつある。がん特異的なシグナル伝達系を阻害するこのような治療薬は、がん細胞への選択性が高いものと考えられ、次世代のがん治療薬として期待されている。

そこで、がんの栄養飢餓耐性解除能に着目した arylidene-thiazolidinedione（および rhodanine）誘導体の構造活性相関に基づく創薬化学研究を本申請研究での主課題として開始した。その結果、１）アリール部位に関する構造活性相関としては、アリール上の置換基としては強力な電子供与基は許容されないものの様々な置換基が許容されること、２）アリール部位とヘテロ五員環部位とをつなぐ電子欠損性オレフィンは活性に重要な役割を持つこと、３）環内に酸素または硫黄原子を含むヘテロ環の構造ならびに酸性 NH の存在が低栄養選択毒性に必須であることを明らかとした。また、がん細胞の獲得した栄養飢餓耐性解除能を有することで注目を集める天然物(-)-uvaridacol L に着目し、世界初のラセミ体全合成を達成した。さらに、安価な D-glucose のベンゾイル化によって得られる β-1,3,6-*O*-tribenzoyl-D-glucose が(-)-uvaridacol L と立体構造が類似している点に着目し、期待通りにがん細胞が獲得した栄養飢餓耐性の解除能を β-1,3,6-*O*-tribenzoyl-D-glucose が有することを見出した。

これらの創薬化学研究と並行して、がんとの関連性が注目されている必須微量元素である亜鉛（Zn）や銅（Cu）の動態を高感度に可視化する蛍光イメージングプローブの開発にも取り組んだ。細胞内で微量に存在する遊離 Zn や Cu はシグナル伝達物質として機能し、いずれもがん微小環境におけるシグナル経路に関わることも知られている。高感度化を達成するべく、これまでに多く開発されてきた Zn や Cu との錯形成によって蛍光変化を生じる「認識型」のプローブとは異なった戦略として、金属とプローブとの反応後に金属が放出され、解離した金属はさらに別のプローブ分子と反応し、1 当量の金属が多数のプローブ分子と反応して蛍光シグナルを増強する「反応型」のプローブ開発に取り組むこととした（右下図参照）。まず、所望の Zn 選択的な触媒反応を活用した発蛍光応答が進行するようにプローブを論理的に設計し、合成ならびに評価検討を行った結果、既存の「認識型」Zn 蛍光プローブが検出できない細胞内低濃度 Zn を可視化する「反応型」蛍光プローブである Dpa-LBC の開発に成功した。続いて同様な原理に基づいて、既存の「認識型」Cu 蛍光プローブが検出できない細胞内低濃度 Cu を可視化する「反応型」蛍光プローブである BETEA-LABTG および BETEA-LABTM の開発にも成功した。

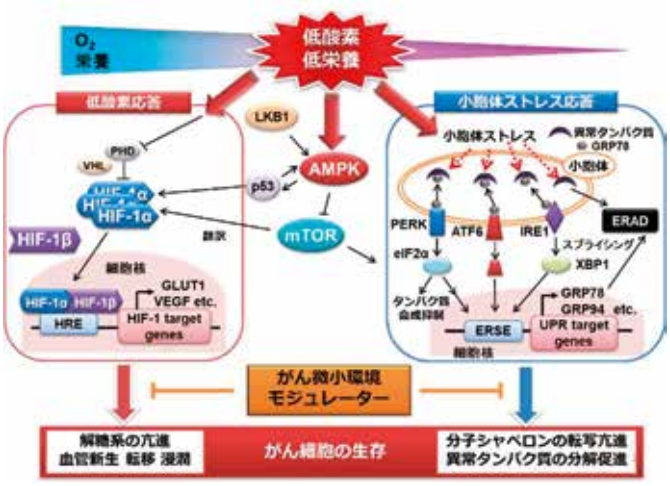


共同研究者の氏名・所属機関
高木　晃　　神戸薬科大学
高嶋　一平　神戸薬科大学（現所属：東北大学 多元物質科学研究所）

研究報告

I 研究目的

近年のがん罹患率の上昇と患者の高齢化に伴い、予後の改善や再発予防を考慮した治療戦略が強く求められている。固形がんに存在するがん微小環境（TME）は低酸素・低栄養・アシドーシスを特徴とし、がん細胞はこのような劣悪な環境に適応するために低増殖性（休眠状態）となる。その結果、治療抵抗性、転移・浸潤能、血管新生誘導能などを獲得し、がんの難治化、再発を招く要因として従来から問題とされてきた（右図）。近年がん微小環境に関する分子レベルの研究が進展し、そのような劣悪な微小環境に適応して生存するがん細胞に注目が集まっている。また、がん微小環境は腫瘍の種類によらず固形腫瘍に普遍的な標的と考えられ、非常に魅力的ながんの創薬標的と言える。中でも、低酸素誘導因子（HIF)-1、および小胞体（ER）ストレス応答の unfolded protein response（UPR）を司る IRE1, ATF6, PERK は、がん微小環境における重要な適応機構をつかさどる転写因子であることが示され、難治性のがん細胞で特に活性化している。その結果、がん細胞とそれを取り巻くがん微小環境との相互作用は、がん細胞の増殖、浸潤・転移能に深く関わっている。



創薬標的としてのがん微小環境における
シグナル経路

このようにがんの生存戦略を明らかにする研究が進展するに伴い、今日がん創薬研究は、従来の分子標的戦略に替わって、がん細胞の特異標的として単一のタンパク質ではなく、がんの悪性形質転換によって獲得されたシグナル伝達系を標的とする創薬戦略に移行しつつある。がん特異的なシグナル伝達系を阻害するこのような治療薬は、がん細胞への選択性が高いものと考えられ、次世代のがん治療薬として期待されている。

以上のような背景のもと、本研究は培養細胞系を使用する *in vitro* 評価系を駆使して、がん微小環境における細胞ストレス応答を標的とする微小環境モジュレータの開発を行う。セルベースのスクリーニング評価系により得られたリード化合物の構造展開・合成、独自の評価系による活性評価、標的タンパク質分子の絞り込みへと一貫して展開し、first in class のがん治療薬の創薬へとつなげる。このようながん治療薬は、先に詳述したようながん微小環境におけるダイナミックな適応応答を修飾することで、がん細胞の生存戦略を阻み増殖を抑制し、浸潤・転移能を制御できる cytostatic drug の開発を目指すものである。さらに微小環境モジュレータは、活発に増殖する腫瘍細胞に対する従来の cytotoxic ながん治療薬を補完する効果を有し、全く新しいがん治療戦略を提供するものでもある。

すなわち、ストレス環境に適応したより悪性度の高いがん細胞に対して特異的に作用し、転移・再発の予防や予後の改善をもたらすことが期待されることから「患者にやさしい」がん治療薬といえる。このような創薬研究は、患者の高齢化や再発癌の増加というがん治療における今日の問題を克服する上で、非常に重要と考えられる。

上述したような創薬化学研究と並行して、がんとの関連性が注目されている必須微量元素である亜鉛（Zn）や銅（Cu）の動態を高感度に可視化する蛍光イメージングプローブの開発も研究目的として取りあげた。細胞内で微量に存在する遊離 Zn や Cu はシグナル伝達物質として機能し、これら遊離 Zn や Cu を解析するために Zn や Cu との錯形成によって蛍光変化を生じる「認識型」のプローブが今まで多く開発され、培養細胞や組織レベルでのイメージングに活用されてきた。しかし、これら「認識型」のプローブは、グルタチオン（GSH）などの Zn や Cu の捕捉分子が高濃度（mM オーダー）に存在する細胞内の夾雑環境では感度が著しく低下する。Zn や Cu は ER ストレス応答や HIF-1 応答を制御することも知られており、既存の蛍光プローブでは検出できない低濃度の細胞内 Zn や Cu を検出するプローブの開発は、本研究にふさわしいと考えられる。

II 研究計画及び材料と方法

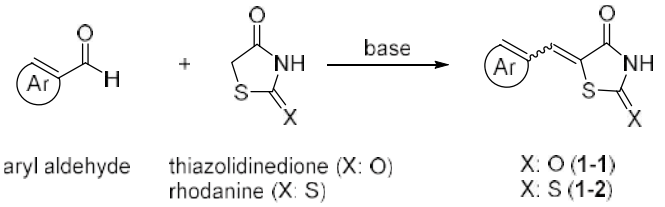
（研究項目１）がんの栄養飢餓耐性解除能に着目した arylidene-thiazolidinedione（および rhodanine）誘導体の構造活性相関に基づく創薬化学研究

【背景】

Tunicamycin 存在下での ER ストレスに起因する細胞毒性を、arylidene-thiazolidinedione 誘導体（**1-1**（Ar: *p*-methoxyphenyl））が増強することを以前に我々は見出している。そこで、本研究では **1-1** を起点とした様々な類縁化合物群を合成し、それらの構造的特徴とがん細胞の獲得した栄養飢餓耐性解除能の発現との構造活性相関研究を行うことにより、さらに高活性な化合物を創製するための知見を得ることを本研究の目的とした。

【分子設計】

定法に従って、各種 aryl aldehyde と thiazolidinedione あるいは rhodanine とを塩基存在下に脱水縮合反応に付して **1-1** および **1-2** から構成される化合物ライブラリーを構築した（Scheme 1-1）。さらに、アリール部位とヘテロ五員環部位とをつなぐ電子欠損性オレフィン部位を還元した誘導体、ならびにヘテロ五員環部位の構造を他の環状部位に変換した誘導体群をも定法に従って合成した。



Scheme 1-1. arylidene-thiazolidinedione (**1-1**) および arylidene-rhodanine (**1-2**) の合成

【培養細胞を用いた *in vitro* 評価】

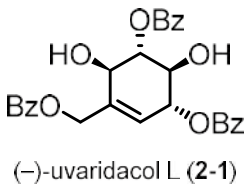
PANC-1 細胞および HT-29 細胞に対する栄養飢餓耐性解除能の評価は、WST-8 assay を用い、以下の手順に従って行った。各細胞は、96 well plate（2.0×10^4 cells in 100 µL medium/well）にて 10% FBS 含有通常培地で 24 時間前培養を行い、PBS（100 µL）にて洗浄後、各種培地（10% FBS 含有通常培地および栄養飢餓培地（NDM, c.f. Izuishi, K. *et al. Cancer Res.* **60**(21), 6201–6207 (2000).）にて被験物質（1% DMSO）の共存下にさら

に 24 時間培養を行った。次いで、WST-8 試薬を 10 µL、10% FBS 含有通常培地を 90 µL 添加してさらに培養を行い、試薬添加後 2〜4 時間でプレートリーダーを用いて 650 nm と 450 nm の吸光度を測定し、その差の値を培地単独での値から引いた数値を細胞の増殖活性とみなした。相対的な細胞生存性は被験物質非存在下での値を 100%として求めた。

（研究項目２）栄養飢餓耐性解除能を有する(±)-uvaridacol L（**2-1**）の全合成［原著論文 (2)］

【背景】

(-)-uvaridacol L（**2-1**）は近年 Awale らによって単離された天然物であり、栄養飢餓耐性を有するヒトすい臓がん細胞株 PANC-1 に対してがん微小環境を模倣した NDM にて選択的な毒性を示すことから注目を集めている（Figure 2-1, c.f. Awale, S., *et al. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **27**(9), 1967-1971 (2017).）。我々は **2-1** とその類縁体の構造活性相関に興味を持ち、**2-1** の全合成を目指した。

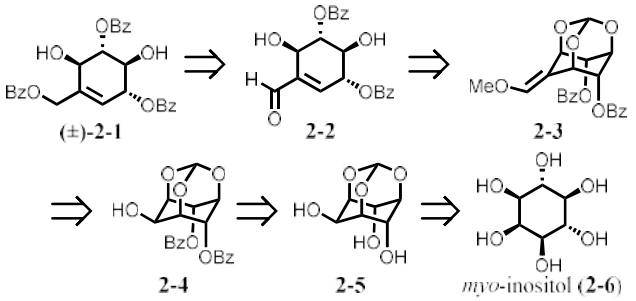


(–)-uvaridacol L (**2-1**)

Figure 2-1

【逆合成解析】

はじめに(±)-**2-1** の逆合成解析を Scheme 2-1 に示した。**2-1** の 1 級ベンゾイル基は合成の最後に導入できるとし、その前駆体であるアルコール誘導体は不飽和アルデヒド **2-2** に対する Luche 還元によって得ることができると考えた。不飽和アルデヒド **2-2** はメトキシオレフィン **2-3** の酸によるオルトエステル部の開裂とシクロヘキセン環の一挙構築によって得ることとした。Wittig 反応によりメトキシオレフィン **2-3** を合成するため、対応するケトンをオルトギ酸エステルによって保護されたジベンゾイルアルコール **2-4** から合成することとした。目的のジベンゾイル体 **2-4** は今回の合成の鍵反応であるアキシアル位選択的な **2-5** のジベンゾイル化によって達成することとした。鍵反応の基質 **2-5** の調製は *myo*-inositol（**2-6**）を既知の手法にてオルトエステル保護することとした。



Scheme 2-1. 2-1 の逆合成解析

【培養細胞を用いた *in vitro* 評価】

PANC-1 細胞および HT-29 細胞に対する栄養飢餓耐性解除能の評価は、(研究項目 1) と同様に WST-8 assay により行った。さらに、NDM に被験化合物を添加して HT-29 細胞を 24 時間培養した後に、生細胞・死細胞ともに細胞核を染色する Hoechst 33342 および死細胞の細胞核のみを染色する propidium iodide (PI) を添加して二重蛍光染色を行い、蛍光顕微鏡を用いて細胞の形態評価と併せて細胞死の評価を行った。

（研究項目３）がん微小環境を標的とした栄養飢餓耐性解除能を有する β-1,3,6-*O*-tribenzoyl-D-glucose（**3-1**）の開発［原著論文 (3)］

【背景および分子設計】

（研究項目２）にて報告したように、栄養飢餓耐性を有するヒトすい臓がん細胞株 PANC-

1 に対して強力な栄養飢餓耐性解除能を有する天然物として知られる(-)-uvaridacol L (**2-1**, Figure 2-1) のラセミ体全合成を我々は世界に先駆けて達成している。しかし、(-)-**2-1** は入手困難な天然物であり、そのラセミ体の化学合成も市販の *myo*-inositol (**2-6**)より 7 工程を要するものであるために **2-1** を起点とする創薬化学研究は迅速性の観点からはふさわしいとは言えない。その一方、(-)-**2-1** が持つ水酸基の立体化学が β-D-glucopyranose と類似していることに着目し、(-)-**2-1** と同様の置換様式を有するグルコース類縁体 β-1,3,6-*O*-tribenzoyl-D-glucose (**3-1**)、加えて過少ベンゾイル化誘導体 **3-2**～**3-7** ならびに過剰ベンゾイル化誘導体 **3-8** および **3-9** を、市販試薬である α-D-glucopyranose (**3-10**) および **3-10** より 1 工程で得られる市販試薬である 1,2,5,6-di-*O*-isopropylidene-α-D-glucofuranose (**3-11**) より短工程にて合成し、がん細胞の獲得した栄養飢餓耐性解除能を評価することとした。これらの構造活性相関の結果より、**3-1** の持つ 3 つのベンゾイルエステルと 2 つの水酸基の相対的な立体配置からファーマコフォアを抽出して、**2-1** と対比させた観点から低栄養環境を標的とするバイオプローブの創製をめざした研究を迅速に行うことができると考えた。

【培養細胞を用いた *in vitro* 評価】

PANC-1 細胞および HT-29 細胞に対する栄養飢餓耐性解除能の評価は、(研究項目 1)、(研究項目２）と同様に WST-8 assay により行った。細胞の形態評価と併せた細胞死の評価は（研究項目２）と同様に行った。

（研究項目４）触媒反応を活用した微量の細胞内亜鉛を検出可能な蛍光プローブの開発[原著論文 (1)]

【分子設計】

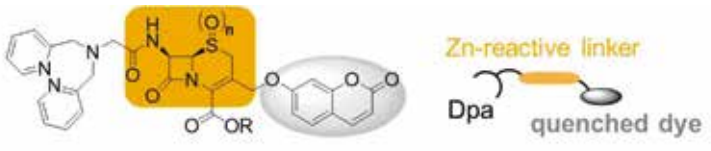
亜鉛錯体が有する加水分解活性に着目した「反応型」の Zn 蛍光プローブを開発するべく、Dpa-SoxLC (Figure 4-1, **4-1**) の設計・合成を行った。本プローブは、① Zn を認識する配位子部位 (2,2'-dipicolylamine (Dpa))、② 加水分解反応が進行する基質部位 (cephem 骨格)、③ 加水分解反応に伴って脱離する蛍光色素部位 (umbelliferone)、から成り立っている。反応後に Zn が放出され、解離した Zn はさらに別のプローブ分子と反応し、1 当量の Zn が多数のプローブ分子と反応して蛍光シグナルを増強でき、細胞内環境においても Zn 捕捉分子による干渉を回避しつつ微量の Zn を検出可能であると期待した。

【緩衝液中での金属応答性の評価】

得られた **4-1** の各種金属に対する蛍光応答性の評価を行った。続いて、既存の「認識型」プローブである ZnAF-2 との比較評価を行った。

【培養細胞を用いた *in vitro* 評価】

さらに、細胞膜透過性を付与した Dpa-LBC (**4-2**) の設計・合成を行った。Hela 細胞を用いて **4-2** の細胞内 Zn 検出能を既存の「認識型」細胞膜透過性プローブである ZnAF-2 DA と比較して共焦点蛍光顕微鏡にて評価を行った。



Dpa-SoxLC (**4-1**) R = H, n = 1
Dpa-LBC (**4-2**) R = *p*-acetoxybenzyl, n = 0

Figure 4-1.

（研究項目５）触媒反応を活用した微量の細胞内銅を検出可能な蛍光プローブの開発

【分子設計】

銅錯体が有する加水分解活性に着目した「反応型」の Cu 蛍光プローブを開発するべく、**4-1** に倣って BETEA-LC（**5-1**）および異なる蛍光波長色素に拡張した BETEA-LTG（**5-2**）、BETEA-LTM（**5-3**）の設計・合成を行った。これらのプローブは、1 当量の Cu が多数のプローブ分子と反応して蛍光シグナルを増強でき、細胞内環境においても Cu 捕捉分子による干渉を回避しつつ微量の Cu を検出可能であると期待した。

【緩衝液中での金属応答性の評価】

得られた **5-1**～**5-3** の各種金属に対する蛍光応答性の評価を行った。続いて、既存の「認識型」プローブである Coppersensor 3（CS3）との比較評価を行った。

【培養細胞を用いた *in vitro* 評価】

さらに、それぞれ細胞膜透過性を付与した BETEA-LABC（**5-4**）、BETEA-LABTG（**5-5**）、BETEA-LABTM（**5-6**）の設計・合成を行った。Hela 細胞を用いて **5-4**～**5-6** の Cu 検出能を既存の「認識型」プローブである CS3 と比較して蛍光顕微鏡にて評価を行った。

III 研究成果

研究項目１および５に関しては現在、さらに詳細なデータを取得しつつ投稿準備中の段階であるために簡略な報告にとどめる。その一方、原著論文としてまとめることのできた研究項目２～４での成果について以下に詳述する。

（研究項目１）がんの栄養飢餓耐性解除能に着目した arylidene-thiazolidinedione（および rhodanine）誘導体の構造活性相関に基づく創薬化学研究

【結果】

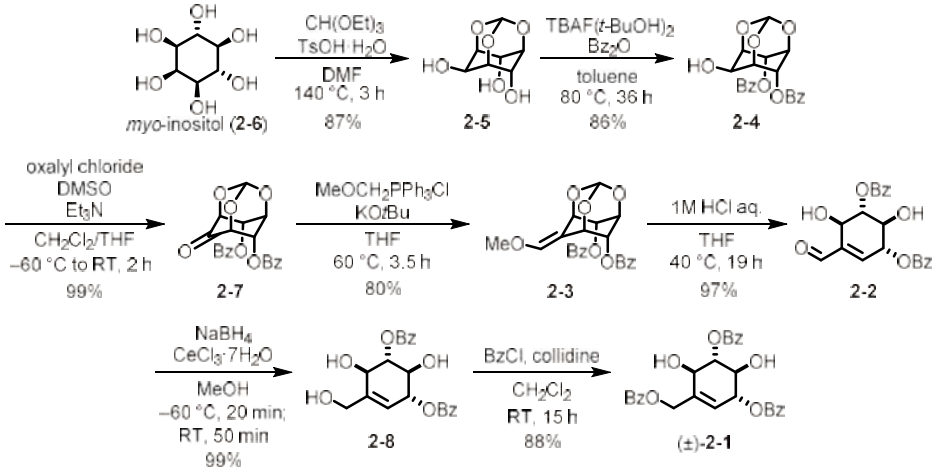
アリール部位に関する構造活性相関としては、アリール上の置換基としては強力な電子供与基は許容されないものの様々な置換基が許容されることが明らかとなった。アリール部位とヘテロ五員環部位とをつなぐ電子欠損性オレフィン部位を還元した誘導体では活性が大幅に減弱したことから、この二重結合部位は活性に重要な役割を持つことも示唆された。さらに、環内に酸素または硫黄原子を含むヘテロ環の構造ならびに酸性 NH の存在が低栄養選択毒性に必須であることも明らかとすることができた。

（研究項目２）栄養飢餓耐性解除能を有する(±)-uvaridacol L（**2-1**）の全合成　[原著論文 (2)]

【(±)-uvaridacol L（**2-1**）の全合成】

myo-inositol（**2-6**）にオルトギ酸エステルを用いて水酸基を保護した **2-5** に対し、TBAF(*t*-BuOH)$_2$ を用いたジベンゾイル化を開発して位置選択的に **2-4** を得ることに成功した。その際本鍵反応は、グラムスケールでの合成にも適用可能であることを確認した。その後、Swern 酸化によってエクアトリアル位水酸基をケトンへと変換し、続く Wittig 反応により **2-3** 得た。**2-3** に対して酸処理を行うことによりオルトエステルの開裂とシクロヘキセン環の構築を一挙に行い不飽和アルデヒド **2-2** を得た。**2-2** を Luche 還元によってア

ルコールへと誘導し、最後に 1 級水酸基を選択的にベンゾイル化することで(±)-**2-1** を全 7 工程、総収率 50%で達成した（Scheme 2-2)。



Scheme 2-2. (±)-**2-1** の全合成

【uvaridacol L 誘導体の構造活性相関】

合成した(±)-**2-1** とその前駆体 **2-8** の PANC-1 細胞に対する低栄養選択毒性評を評価したところ、(±)-**2-1** の NDM における PC_{50} 値が 19.9 μM である一方、通常栄養培地での細胞毒性は最高濃度(30 μM)まで認められなかった。一級水酸基を有する **2-8** では通常栄養培地ならびに NDM いずれも顕著な細胞毒性は見られず、(±)-**2-1** と比較して大幅な毒性の低下が見られた。以上の結果より、1 級水酸基のベンゾイルエステルが細胞毒性それ自体並びに NDM での選択毒性の両者の増強に重要な役割を果たしているファーマコフォアであることが明らかとなった。さらに、NDM に(±)-**2-1** を 20 μM 添加して 24 時間培養後での HT-29 細胞への影響を Hoechst 33342 および PI による蛍光二重染色により評価したところ、観察したすべての細胞で Hoechst 33342 に由来する青色蛍光とともに PI に由来する赤色蛍光、ならびに細胞の収縮と細胞膜の崩壊が観察され、完全に細胞死が引き起こされていることが判明した。その一方、単に NDM で 24 時間培養した HT-29 細胞では青色蛍光のみが観察され、細胞の形態に異常は認められなかったことから、(±)-**2-1** による NDM 選択的な細胞死の誘導が明らかになった（Figure 2-2)。

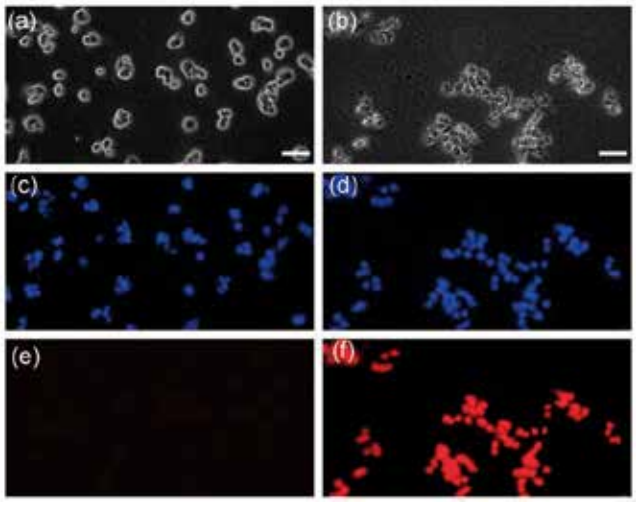


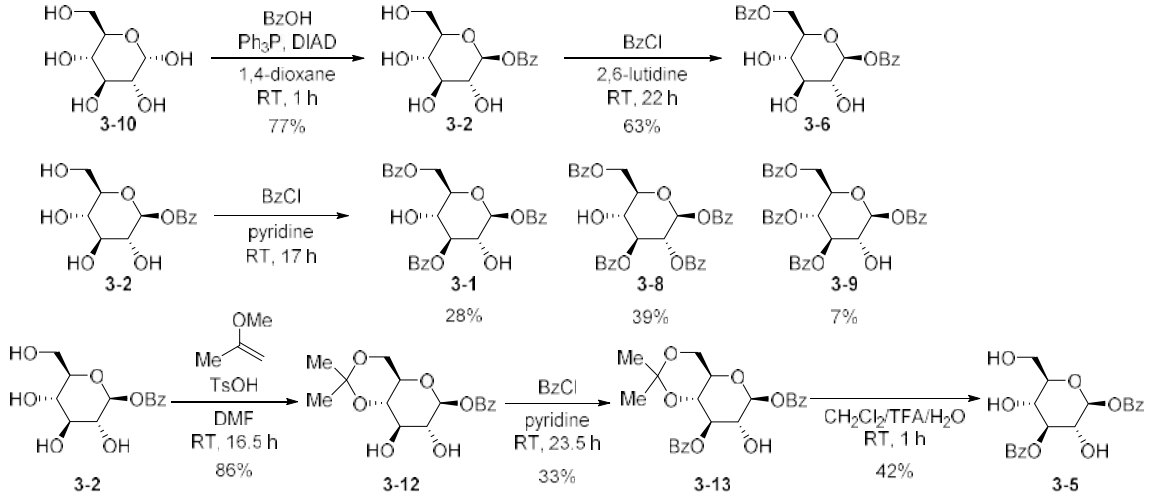
Figure 2-2. NDM 中 HT-29 細胞に(±)-**2-1** を 0 あるいは 20 μM にて処理を行い 24 時間後に Hoechst 33342 ならびに PI 染色した位相差および蛍光顕微鏡画像, (a) (±)-**2-1** 非存在下での位相差像, (b) (±)-**2-1** 添加での位相差像, (c) (±)-**2-1** 非存在下での Hoechst 33342 染色像, (d) (±)- **2-1** 添加での Hoechst 33342 染色像, (e) (±)-**2-1** 添加での PI 染色像. (f) (±)- **2-1** 添加での PI 染色像, スケール・バー: 50 μm.

ところで、キラルな天然物(−)-**2-1** の PC_{50} は 20.1 μM と報告されており（c.f. Awale, S., *et al. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **27**(9), 1967-1971 (2017).）、我々が合成したラセミ体(±)-**2-1** の PC_{50} 値とほぼ変わらないことに興味を持った。キラル化合物とその対掌体とでは、生物活性の標的となる生体分子も通常はキラルであることから、生物活性は両者間で大きく異なることが通例である。そこで(±)-**2-1** の光学分割をキラルカラムを用いた HPLC にて行い、得られた(−)-**2-1** および(+)-**2-1** の低栄養選択毒性を評価したところ、PC_{50} はそれぞれ 14.2, 20.1 μM となりその活性の違いはわずかなものであった。この結果より、(±)-**2-1** を起点とするがんの栄養飢餓耐性解除能に着目した創薬化学を展開するにあたっては不斉合成によりキラル体を合成してから評価を行うのではなく、より容易に合成を達成できるラセミ体合成により迅速に誘導体ライブラリーを構築して評価する戦略のほうが望ましいことも明らかとなった。

（研究項目３）がん微小環境を標的とした栄養飢餓耐性解除能を有する β-1,3,6-*O*-tribenzoyl-D-glucose（**3-1**）の開発 ［原著論文 (3)］

【ベンゾイル化グルコース誘導体の合成】

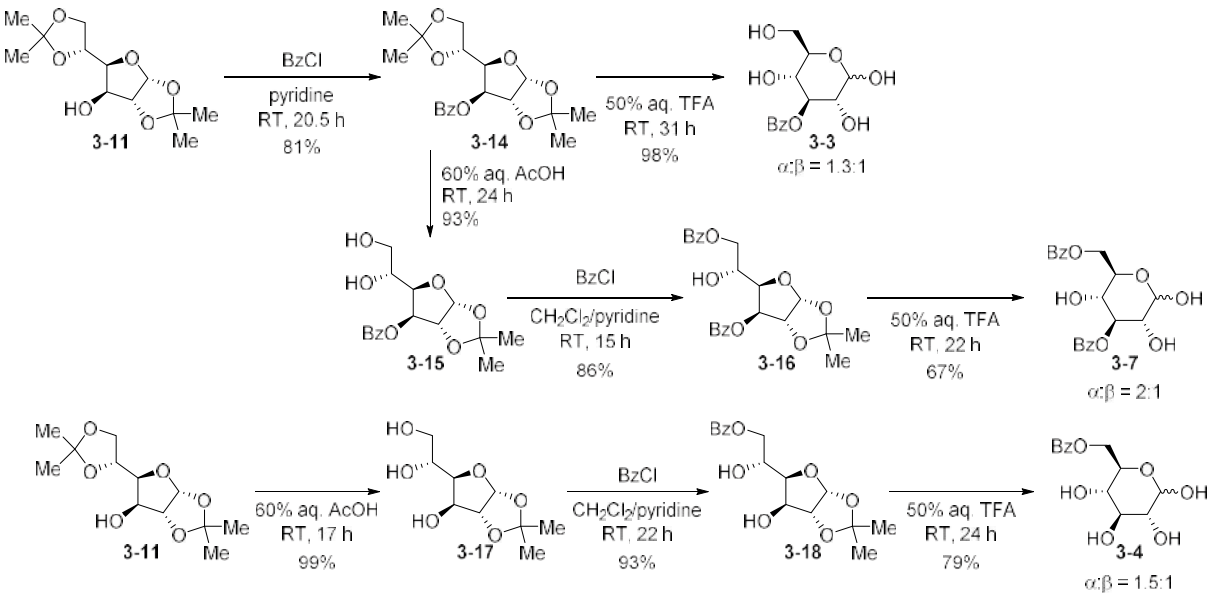
グルコースのベンゾイル化によって得られる β-1,3,6-*O*-tribenzoyl-D-glucose（**3-1**）、過少ベンゾイル化誘導体 **3-2**～**3-7** ならびに過剰ベンゾイル化誘導体 **3-8** および **3-9** は、市販試薬である α-D-glucopyranose（**3-10**）および **3-10** より 1 工程で得られる市販試薬である 1,2,5,6-di-*O*-isopropylidene-α-D-glucofuranose（**3-11**）から出発し、保護基を駆使して合成を行った（Scheme 3-1 および 3-2（次ページ））。



Scheme 3-1. α-D-glucopyranose (**3-10**) より得られるベンゾイル化 D-グルコース (**3-1**, **3-2**, **3-5**, **3-6**, **3-8** および **3-9**) の合成

【ベンゾイル化グルコース誘導体の評価】

モノベンゾイル化体（**3-2**～**3-4**）はいずれの培地でも最高 1 mM まで毒性を示さなかった。次いで、ジベンゾイル化体（**3-5**～**3-7**）では NDM における低栄養選択毒性がみられたもの、その PC_{50} 値は 342–369 μM と高く、活性は弱いものであった。(−)-uvaridacol L（**2-1**）と同様の置換形式を有するトリベンゾイル化体（**3-1**）の PC_{50} 値は 30.2 μM であり、(−)-**2-1** の PC_{50} 値（14.2 μM）にはやや及ばないもののジベンゾイル化体に比べて活性は 1



Scheme 3-2. 1,2,5,6-di-*O*-isopropylidene-α-D-glucofuranose (**3-11**) より得られるベンゾイル化 D-グルコース (**3-3**, **3-4** および **3-7**) の合成

桁向上していた。その一方、テトラベンゾイル化体（**3-8** および **3-9**）はいずれも最高 500 μM（通常培地）および 100 μM（NDM）まで毒性を示さなかった。これらの結果より、**2-1** ならびに **3-1** の持つ 3 つのベンゾイルエステルと 2 つの水酸基のすべてがファーマコフォアであることが示唆された。

さらに、NDM に **3-1** を 70 μM 添加して 24 時間培養後での HT-29 細胞への影響を Hoechst 33342 および PI による蛍光二重染色により評価したところ、観察したすべての細胞で Hoechst 33342 に由来する青色蛍光とともに PI に由来する赤色蛍光、ならびに細胞の収縮と細胞膜の崩壊が観察され、完全に細胞死が引き起こされていることが判明した。その一方、単に NDM で 24 時間培養した HT-29 細胞では青色蛍光のみが観察され、細胞の形態に異常は認められなかったことから、**3-1** による NDM 選択的な細胞死の誘導が明らかになった (Figure not shown)。これらの結果より、安価に入手可能な D-glucose より短工程にて合成可能な **3-1** は、低栄養環境を特徴の一つとするがん微小環境を標的とするリード化合物として有用であることを明らかにすることができた。

（研究項目４）触媒反応を活用した微量の細胞内亜鉛を検出可能な蛍光プローブの開発 [原著論文 (1)]

【Dpa-SoxLC（**4-1**）の合成】

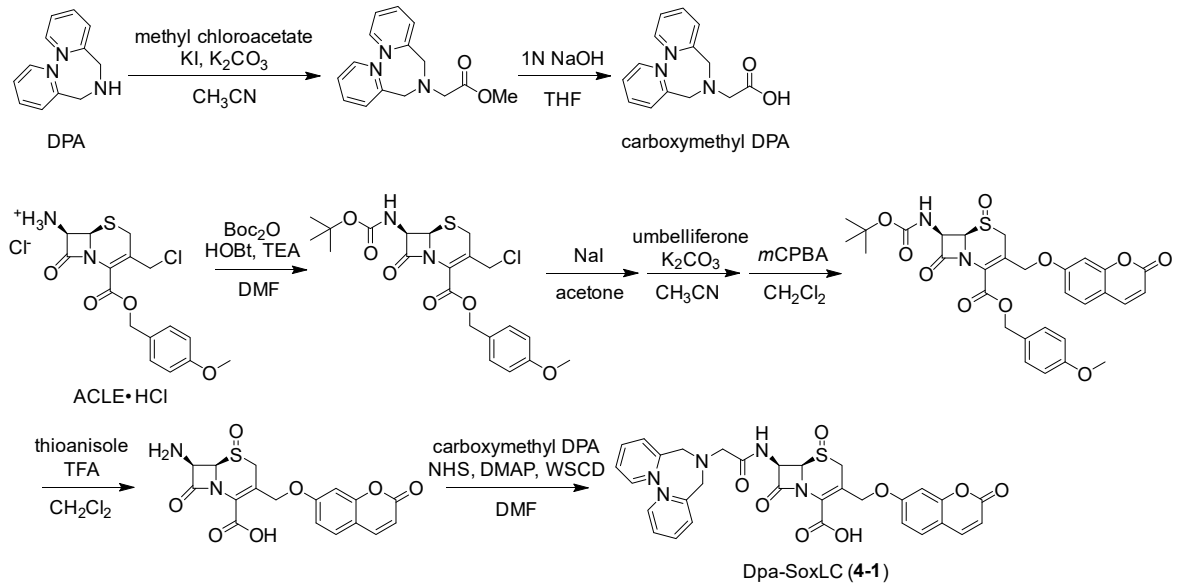
市販の DPA および ACLE 塩酸塩より出発し、計 8 工程にて Dpa-SoxLC（**4-1**）の合成を行った (Scheme 4-1)。

【緩衝液中での金属応答性の評価】

細胞内環境を模した GSH 共存下にて **4-1** の各種金属イオンに対する蛍光応答選択性を評価したところ、選択的に Zn に対する強い蛍光応答が認められた (Figure 4-2)。さらに、Zn と **4-1** との反応による分解生成物の構造も決定し、本系における反応機構を明らかにした。

次に既存の「認識型」プローブ ZnAF-2 との比較評価を行ったところ、ZnAF-2 では Zn に

対する蛍光応答性が GSH 共存下では顕著に低下する一方、**4-1** では ZnAF-2 をしのぐ蛍光応答性を示し、さらに GSH 共存下でも期待通りその応答性がよく維持されていた。



Scheme 4-1. Dpa-SoxLC (**4-1**) の合成

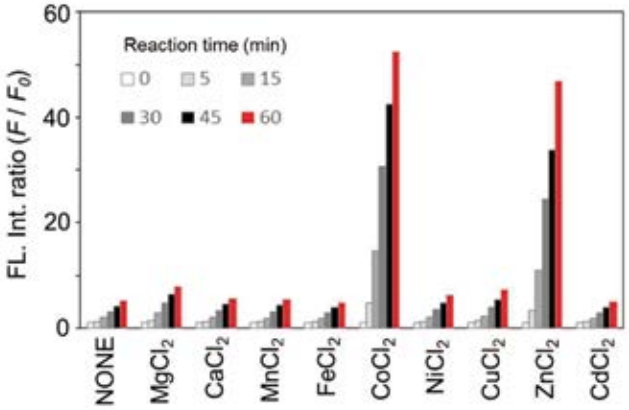


Figure 4-2. 2 mM GSH 存在下での各種 2 価金属イオンに対する Dpa-SoxLC (**4-1**, 10 μM) の蛍光応答 (50 mM HEPES buffer (pH 7.4) at 37 °C). なお、500 μM $MgCl_2$ および 2 mM $CaCl_2$ を除く金属塩濃度はすべて 10 μM にて評価を行った.

【培養細胞を用いた *in vitro* 評価】

続いて、細胞膜透過性を付与した Dpa-LBC（**4-2**）を設計し、4-acetoxybenzaldehyde ならびに **4-1** より計 4 工程にて合成を行った。ZnAF-2 に細胞膜透過性を付与した類縁体である ZnAF-2 DA と比較して **4-2** の Hela 細胞における Zn 検出能に関して共焦点蛍光顕微鏡を用いて評価を行ったところ、**4-2** の感度は ZnAF-2 DA よりも 5 倍以上高いものであり、ZnAF-2 DA が検出できない細胞内低濃度 Zn の検出が可能であった（Figure 4-3, 4-4（いずれも次ページ））。以上、培養細胞に適用可能な高感度 Zn 蛍光プローブの創製に成功した。

（研究項目５）触媒反応を活用した微量の細胞内銅を検出可能な蛍光プローブの開発

【BETEA-LC（**5-1**）、BETEA-LTG（**5-2**）、および BETEA-LTM（**5-3**）の合成】

市販の bis(2-chloroethyl)amine 塩酸塩および ACLE 塩酸塩より出発し、計 6 工程にて BETEA-LC（**5-1**）の合成を行った。同様の手法により、BETEA-LTG（**5-2**）、および BETEA-LTM（**5-3**）の合成を行った。

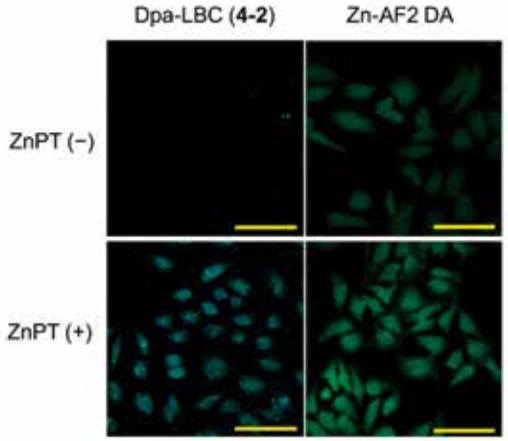


Figure 4-3. Hela 細胞の共焦点蛍光顕微鏡画像. 左上: Zn 非添加での 3 μM Dpa-LBC (**4-1**) による処理, 左下: 50 μM ジンクピリチオン (ZnPT) 添加での 3 μM Dpa-LBC (**4-1**)による処理, 右上: Zn 非添加での 3 μM ZnAF2-DA による処理, 右下: 50 μM ZnPT 添加での 3 μM ZnAF2-DA による処理, スケール・バー: 100 μm.

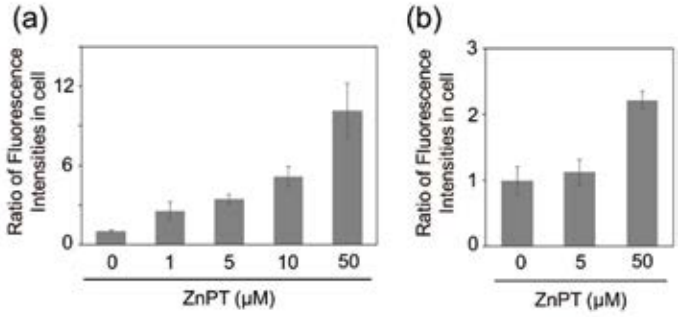


Figure 4-4. (a) 3 μM Dpa-LBC で処理した Hela 細胞に各 ZnPT 濃度を作用した際の蛍光強度比 (n = 5). (b) 3 μM Zn-AF2 DA で処理した Hela 細胞に各 ZnPT 濃度を作用した際の蛍光強度比 (n = 5).

【緩衝液中での金属応答性の評価】

細胞内環境を模した GSH 共存下にて **5-1**～**5-3** の蛍光応答選択性を評価したところ、選択的に Cu に対する強い蛍光応答が認められた。さらに、Cu と **5-1** との反応による分解生成物の構造も決定し、本系における反応機構を明らかにした。

次に既存の「認識型」プローブ CS3 との比較評価を行ったところ、CS3 では Cu に対する蛍光応答性が GSH 共存下では顕著に低下する一方、**5-1**～**5-3** では CS3 をしのぐ蛍光応答性を示し、さらに GSH 共存下でも期待通りその応答性がよく維持されていた。

【培養細胞を用いた *in vitro* 評価】

続いて、細胞膜透過性を付与した BETEA-LABC (**5-4**)、BETEA-LABTG (**5-5**)、BETEA-LABTM (**5-6**)を設計し、4-acetoxybenzaldehyde ならびにそれぞれ **5-1**～**5-3** より計 3 工程にて合成を行った。**5-4** の Hela 細胞における Cu 検出能に関して蛍光顕微鏡を用いて評価を行ったところ、自家蛍光に由来する背景光が強く見られ、Cu の検出に適していないことが明らかとなった。その一方、**5-5** および **5-6** では自家蛍光による干渉は小さいものであり、CS3 と比較したところいずれのプローブも CS3 が蛍光検出できない低濃度の細胞内 Cu を検出することが可能であった。さらに、いずれのプローブも小胞体の Cu をイメージングしていることを細胞小器官マーカーとの共染色により明らかにした。以上、培養細胞に適用可能な高感度 Cu 蛍光プローブの創製に成功した。

IV 考察

本研究において、我々はがん細胞の獲得した栄養飢餓耐性を解除して低栄養選択毒性を有する arylidene-thiazolidinedione (**1-1**) および arylidene-rhodanine (**1-2**) 誘導体を見出すことができた。今後は、絞り込まれた候補化合物より標的分子探索を行うべく、

活性を保持したうえでポリエーテルリンカーなどを介して蛍光団ないしはビオチンなどのタグを結合する。このために、共有結合性ラベル官能基 (diazirinyl 基や alkynyl 基など) を導入したアフィニティプローブの設計･合成をおこなって、分子プローブを開発する。この分子プローブを細胞に処理した後タンパク質抽出液を調製し、光クロスリンク反応およびクリック反応を段階的に行って標的タンパク質と蛍光分子またはビオチンタグの導入を行う。タグを指標に二次元電気泳動を行って精製し、マススペクトルによるプロテオミクス解析を行う。以上の実験により微小環境応答シグナルに関わると予想される新たな標的候補タンパク質の同定を試みる。そのタンパク質立体構造をもとにコンピューターシミュレーションによる分子設計を行い、がん微小環境を標的とするユニークかつ新たな創薬シードへと発展させるとともに、同定された候補タンパク質の抗体や阻害薬を用いた検証を実施し、がん微小環境適応応答における当該タンパク質の役割について解析する。

また、がんの栄養飢餓耐性の解除能を有する天然物 uvaridacol L (**2-1**)のラセミ体の全合成を世界に先駆けて我々は達成した。「研究成果」欄では詳細を割愛したが、本合成を行うにあたり *myo*-inositol オルトエステル (**2-5**) のアキシアル位選択的ジベンゾイル化を見出し、本合成を効率的な合成とすることに成功した。さらに、**2-1** を起点とする創薬化学研究を加速するべく立体構造の類似性に着目し、おおよそ同等の活性を有する β-1,3,6-*O*-tribenzoyl-D-glucose (**3-1**) の開発も行った。今後さらなる誘導体合成を展開し構造活性相関研究を行うとともに高活性誘導体を用いて分子生物学的な評価を行うことにより、アシル化グルコースが有する低栄養選択毒性を発現するメカニズムを解明し、得られた知見をもとにしてより高活性な化合物を創製することが可能になる。

最後に、Zn 選択的な触媒反応を活用する「反応型」蛍光プローブである Dpa-LBC (**4-2**)、ならびに Cu 選択的な触媒反応を活用する「反応型」蛍光プローブである BETEA-LABTG (**5-5**) および BETEA-LABTM (**5-6**) を我々は開発し、既存の「認識型」蛍光プローブでは検出することのできない微量の細胞内 Zn および Cu をそれぞれ検出することに成功した。標的の金属が触媒回転しながらシグナル増強するシステムを改良することでさらなる高感度化が期待できる。また、「認識型」プローブに比べて「反応型」プローブは蛍光応答に時間を要する欠点があるものの、応答速度の改善は配位子部位の構造の調整を行うことにより見込める。これまでにも「認識型」プローブを活用することで Zn や Cu がシグナル伝達物質として様々な現象に関与することが明らかにされてきたが、感度の面で有利な「反応型」の蛍光プローブを有力な解析ツールとして用いることで、さらに低濃度域での Zn や Cu の生体内機能を明らかにすることが可能となる。

なお、(研究項目２) においてはアメリカ化学会からの許諾を得て原著論文 (2) より、(研究項目４) においては英国王立化学会からの許諾を得て原著論文 (1) より、それぞれ図表を一部改変の上で転載した。

V 研究成果の発表

(原著論文)

(1) Takashima, I., Inoue, Y., Matsumoto, N., Takagi, A., **Okuda, K.**, A fluorogenic probe using a catalytic reaction for the detection of trace intracellular

zinc. *Chem. Commun.* **56**(87), 13327–13330 (2020).

(2) Takagi, A., Usuguchi, K., Takashima, I., **Okuda, K.**, Total Synthesis of Antiausterity Agent (±)-Uvaridacol L by Regioselective Axial Diacylation of a *myo*-Inositol Orthoester. *Org. Lett.* **23**(11), 4083–4087 (2021).

(3) Takagi, A., Usuguchi, K., Takashima, I., **Okuda, K.**, Development of 1,3,6-Tribenzoylated Glucose as an Antiausterity Agent Targeting Tumor Microenvironment. *Chem. Pharm. Bull.* in press (2023).

（総説論文）

(1) **Okuda, K.**, Takashima, I., Takagi, A., Advances in reaction-based synthetic fluorescent probes for studying the role of zinc and copper ions in living systems. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **72**(1) 1–12 (2023). (invited review)

（特許申請）

(1) 発明の名称：新規化合物及び該化合物を含有する亜鉛検出用蛍光プローブ
出願番号：特願 2020-135407
出願人：学校法人神戸薬科大学
発明者：奥田健介、高嶋一平

心筋筋小胞体の Ca^{2+} 制御機構の構造基盤の解明と心疾患治療への応用

所属機関　順天堂大学医学部薬理学講座
研究者名　村山　尚

≪研究の概要≫

筋小胞体（SR）は心筋細胞内の Ca^{2+}ストアであり、心筋の収縮弛緩サイクルに中心的な役割を果たしている。SR の Ca^{2+}は Ca^{2+}ポンプである SERCA2 により能動的に取り込まれ、Ca^{2+}遊離チャネルである 2 型リアノジン受容体（RyR2）により細胞質に遊離される。近年の研究から SERCA2 および RyR2 の活性異常が Ca^{2+}サイクリングのバランスを破綻させ、さまざまな心疾患と関連することが明らかとなってきた。これらの輸送体は多様な低分子リガンドや相互作用タンパク質により制御されていることが知られているが、その分子機構については未だ不明な点も多い。また、これらの輸送体の制御異常を是正する薬物は心疾患の治療薬になる可能性を持つと考えられるが、現在までにそのような薬物は存在しない。

本研究は筋小胞体 Ca^{2+}の制御と破綻の分子機構を解明し、病的状態を是正するための新規治療法の開発を目指して行われた。RyR2 変異体の機能解析研究より、カテコラミン誘発性多型性心室頻拍（CPVT）変異はチャネル活性を増大させ、その程度は疾患発症年齢と密接に関連することが明らかとなった。また、糖尿病性心筋症における心保護因子としてのニューレグリン 1（NRG1）機能を発見し、病態生理学的意義を解明した。新規筋小胞体イオンチャネルである TRIC-A、TRIC-B がアニオンチャネルとしても機能し、RyR2 の制御にも関与することを明らかにした。さらに、クライオ電子顕微鏡を用いた構造解析により、RyR2 チャネルの開口機構を解明し、機能喪失変異によるチャネル開口不全の仕組みを明らかにした。これらの成果は、ターゲットタンパク質の遺伝子変異や機能異常が疾患を発症するメカニズムを解明するとともに、動作機構に基づいた薬物開発の道を開くものである。

治療薬開発を目指した大規模スクリーニング系として、小胞体内 Ca^{2+}濃度測定法によるスクリーニング系を構築し、新規の RyR2 阻害薬を同定した。また、新規の SERCA2a/PLB の分子複合体に生じる構造的変化を定量的に可視化検出する新規レポータの開発に成功した。これらのスクリーニング系を活用することで、不整脈疾患や心不全に対する新しい治療薬の開発を強力に推進することが期待される。

共同研究者の氏名・所属機関
赤羽 悟美・東邦大学医学部
竹島 浩・京都大学大学院薬学研究科
小川 治夫・京都大学大学院薬学研究科

研究報告

I 研究目的

筋小胞体（SR）は心筋細胞内の Ca^{2+}ストアであり、心筋の収縮弛緩に中心的な役割を果たしている。SR の Ca^{2+}は Ca^{2+}ポンプである SERCA2 により能動的に取り込まれ、Ca^{2+}遊離チャネルである 2 型リアノジン受容体（RyR2）により細胞質に遊離される。正常な心筋では心拍毎に Ca^{2+}取り込みと Ca^{2+}遊離の規則正しい Ca^{2+}サイクリングが起こる。近年の研究から SERCA2 および RyR2 の活性異常が Ca^{2+}サイクリングのバランスを破綻させ、さまざまな心疾患と関連することが明らかとなってきた。これらの輸送体は多様な低分子リガンドや相互作用タンパク質により制御されていることが知られているが、その分子機構については未だ不明な点も多い。また、これらの輸送体の制御異常を是正する薬物は心疾患の治療薬になる可能性を持つと考えられるが、現在までにそのような薬物は存在しない。

本研究は筋小胞体 Ca^{2+}の制御と破綻の分子機構を解明し、病的状態を是正するための新規治療法の開発を目指して行われた。村山は RyR2 疾患変異によるチャネル活性異常と RyR2 修飾薬の探索を、赤羽は糖尿病性心筋症の発症機構の解明と SERCA2/PLN 複合体をターゲットとしたスクリーニング系の構築を、竹島は新規同定した筋小胞体 Ca^{2+}ハンドリング関連分子である TRIC チャネルの性質と RyR2 活性に対する制御機構の解明を、小川は構造解析による RyR2 および SERCA2 の動作原理と疾患変異による制御異常の分子基盤の解明を目的とした。

II 研究計画及び材料と方法

村山 尚

1. RyR2 疾患変異体の機能解析

カテコラミン誘発性多型性心室頻拍（CPVT）変異を導入した RyR2 cDNA を HEK293 細胞に導入して安定発現株を樹立した。RyR2 チャネル活性は細胞内 Ca^{2+}濃度測定および[^{3}H]リアノジン結合法により定量的に評価した。細胞質 Ca^{2+}は G-GECO1.1、小胞体内 Ca^{2+}濃度は R-CEPIA1er を用いて、共焦点レーザー顕微鏡で測定した。静止状態の Ca^{2+}オシレーションおよびカフェインで刺激した際の変化を観察した。[^{3}H]リアノジン結合は、RyR2 発現 HEK293 細胞から調製したミクロゾームを 5 nM [^{3}H]ryanodine を含む反応液に添加してインキュベーション（25 度、1 時間）後、RyR2 結合画分をフィルターで分離して求めた。

2. 小胞体内 Ca^{2+}濃度測定を利用した RyR2 阻害薬の探索

野生型 RyR2 と R-CEPIA1er を安定発現した HEK293 細胞を樹立した。この細胞の小胞体内 Ca^{2+}濃度を蛍光プレートリーダー（FlexStation3）で継時的に測定した。測定中に東京医科歯科大学保有の機能既知化合物ライブラリ（1,535 化合物）の各化合物を 10 μM 濃度で添加して、蛍光変化を観察した。蛍光が 1.5 倍以上増大したものをヒット化合物とした。ヒット化合物はサブタイプ選択性、[^{3}H]リアノジン結合、単離心筋細胞の Ca^{2+}イメージングにより評価した。

赤羽 悟美

1. ストレプトゾシン誘発1型糖尿病モデルマウスの作製

実験は東邦大学実験動物委員会および遺伝子組み換え実験委員会の承認を得て実施した。C57BL/6J 系統のマウス（8 週齢、雄）にストレプトゾトシン（STZ, 180 mg/kg 体重)を腹腔内投与し、1 型糖尿病モデルを作製した。コントロール群には溶媒（クエン酸緩衝液、pH5.0）を投与した。STZ 投与 4 週間後（STZ-4W）および 8 週間後（STZ-8W）に解析に用いた。

2. SERCA2a/PLB 複合体蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）蛍光レポータの作製と評価

SERCA2a/PLB 複合体 FRET 蛍光レポータは、SERCA2a および PLB と 2 種類の蛍光タンパク質の融合タンパク質として構築し、光学的特性および細胞内での安定性を SERCA2a/PLB 複合体に作用する活性化薬と阻害薬を用いて評価した。

竹島 浩

1. RyR2 誘導発現 HEK 細胞での TRIC チャネル発現系

Flp-In T-REx システム（Life Technologies）を用いて RyR2 を誘導発現する HEK293 細胞を構築し、その細胞にバキュロウイルスを用いて一過性に TRIC-A または TRIC-B チャネルを発現させることで、TRIC チャネルのチャネル活性と RyR2 との相互作用を検討した。(i) RyR2 のみの細胞、(ii) RyR2+TRIC-A 細胞、(iii) RyR2+TRIC-B 細胞のそれぞれについて 150 ㎜ディッシュ 10 枚を用意し、誘導、感染開始 24 時間後に細胞を回収し、PBS で 2 回洗浄した後、液体窒素中で急速冷凍し-80℃で保存した。界面活性剤使用によってチャネルが破壊されることを防ぐために、細胞は破砕後、密度勾配遠心法による粗精製のみでチャネル活性を測定した。

2. 単一チャネル電流解析

膜小胞をホスファチジルエタノールアミンからなる平面脂質二重膜に組み込み K^+チャネル電流を記録した。測定は 210 mM K-PIPES または KCl を含む溶液中で 22±2℃で行った。膜電位は trans チャンバーをゼロとし、cis チャンバーの電位をさまざまに変えた。データは 4 kHz のフィルターをかけた後、20 kHz で取得した。開確率（Po）は保持電位を 15 秒ごとに+30 mV と-30 mV の間で切り替えて 2 分間測定して求めた。

小川 治夫

1. RyR2 疾患変異体および薬物複合体の立体構造解析

野生型の RyR2 と疾患変異に準ずる RyR2 の発現は既に確立しているテトラサイクリンでの発現誘導が可能な HEK293 細胞により行った。発現誘導は終濃度 2 μg/ml のドキシサイクリンで行い、48 時間後に回収し、その後ミクロソーム分画を行った。精製は RyR2 に特異的に結合する FKBP12.6 を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより行った。界面活性剤で可溶化を行った RyR2 に FKBP12.6（N 末に 6His と SBP-tag が付加）を結合させ、RyR2/FKBP12.6 複合体を StrepTrap HP カラムに結合させ、レジンを十分に洗浄後、D-destiobiotin で溶出を行い、精製標品の回収を行った。限外濾過膜を用いて濃縮後、EGTA もしくは $CaCl_2$ を加え、チャネルを閉状態または開状態に固定した。試料は液体エタンによる急速凍結を行い、クライオ EM は東京大学医学系研究科の Titan/Krios を用いて行った。撮影したデータの解析後、分子モデリングを行い、構築した分子の構造精密化を行った。

2. 心筋における PLN リン酸化調節機構の解析

SERCA2a/1a の発現は変異アデノウィルスを用いた発現法で行った。ヒト SERCA2a もしくはウサギ SERCA1a

のN末端にHaloTagを融合した変異アデノウィルスをCOS7細胞へ感染させ、48時間後に細胞を回収し、ミクロソーム分画を行った。発現タンパク質は界面活性剤で可溶化し、HaloLink Resinに結合させ、TEVプロテアーゼにより切断された精製SERCA2aを回収した。その後、加水分解されないATPアナログのAMP-PCPとの複合体を形成させ、E2-ATPに相当する状態での結晶化を行った。高輝度放射光施設SPring-8のBL41XUで回折データを収集し構造決定・分子モデリング後、構造精密化を行った。精製SERCA1aの脂質ナノディスクへの再構成は、精製SERCA1aに脂質とナノディスクの構成タンパク質であるMSP1D1を加え、バイオビーズSM2で界面活性剤を取り除きゲル濾過を行うことで行った。試料は液体エタンによる急速凍結を行い、クライオEMは京都大学医生物学研究所のGlaciosを用いた。

III 研究成果

村山 尚

1. RyR2疾患変異体の機能解析

10種類のカテコラミン誘発性多型性心室頻拍（CPVT）を導入したRyR2を安定発現するHEK293細胞を樹立してチャネル機能に与える影響を定量的に評価した（図1A）。細胞質と小胞体内の同時Ca^{2+}濃度測定では、CPVT変異体は野生型（WT）に比べてCa^{2+}オシレーションの頻度が高く、小胞体Ca^{2+}濃度が低下していた（図1B）。[^{3}H]リアノジン結合法によりチャネル活性を評価した。CPVT変異体は野生型よりチャネル活性が高いが、その程度は変異毎に異なっていた（図1C）。各変異体のチャネル活性と小胞体内Ca^{2+}濃度には逆相関が、オシレーション頻度には正の相関が観察された（図1D）。以上の結果はCPVT変異がRyR2チャネル活性を異常亢進することを示している。興味深いことに、チャネル活性がより高い変異を有する患者はより若年で不整脈を発症していた（図2）。亢進の程度が病態の重症度に相関することが示唆された。

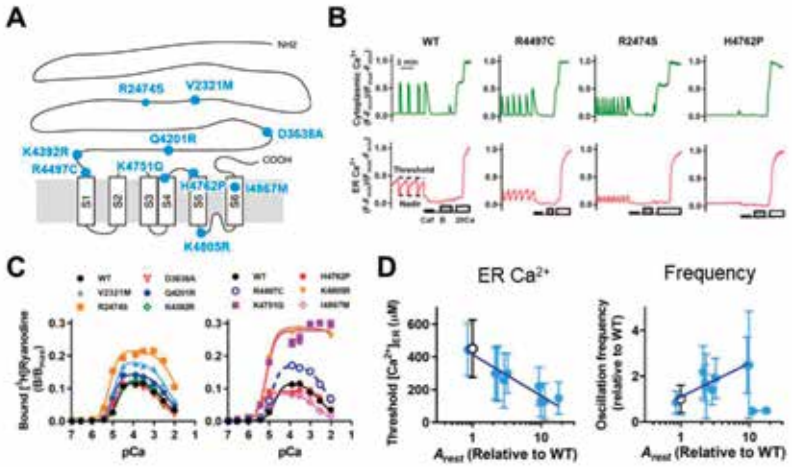


図1. RyR2 CPVT変異体の機能解析。A. 作製したCPVT変異体の変異部位。B. 野生型およびCPVT変異体の細胞質（上段）および小胞体内（下段）Ca^{2+}濃度測定。C. CPVT変異体の[3H]リアノジン結合活性。D. [3H]リアノジン結合活性から求めたチャネル活性（A_{rest}）とER Ca^{2+}濃度（左）およびCa^{2+}オシレーション頻度（右）の関係。Kurebayashi et al. J Gen Physiol, 154: e202112869, 2022から許諾を得て改変。

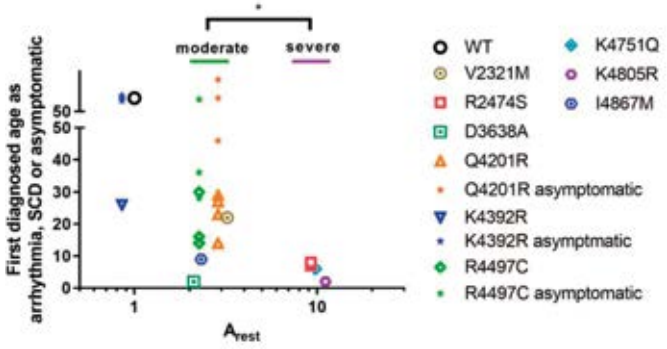


図2. RyR2 CPVT変異体と患者表現型.
各患者の不整脈初発年齢をの変異体のCICR活性（Arest）に対してプロットした。Arestが大きいと初発年齢が低下する。Kurebayashi et al. J Gen Physiol, 154: e202112869, 2022から許諾を得て改変。

2. 小胞体内 Ca^{2+}濃度測定を利用した RyR2 阻害薬の探索

RyR2 の異常活性化を原因とする不整脈性疾患に対する治療薬を探索するため、小胞体内 Ca^{2+}を指標とした RyR2 阻害薬のスクリーニングを行なった。その結果、1,535 種類の機能既知化合物ライブラリから 3 種類のヒット化合物が同定された。いずれも RyR2 の[^{3}H]リアノジン結合を低下させたことから、RyR2 阻害薬であることが確認された。CPVT 変異（RyR2-R420W）を有するマウス単離心筋細胞は電気刺激に応じた Ca^{2+}トランジエントに加えて異常 Ca^{2+}シグナルを発生するが、ヒット化合物は Ca^{2+}トランジエントに影響を与えず、異常 Ca^{2+}シグナルを消失させた。以上の結果から、RyR2 阻害薬は CPVT に対する有効な治療薬になる可能性が示唆された。

赤羽 悟美

1. 糖尿病性心筋症の分子機構の解析

糖尿病性心筋症の発症と進展の抑制に有効な治療標的を明らかにするために、ストレプトゾシン誘発糖尿病モデルマウスの発症早期における細胞内 Ca^{2+}シグナル制御の破綻の機序を解析した。早期ステージに該当する STZ-4W において左室拡張機能障害が、進展期ステージに該当する STZ-8W 週後に左室収縮機能障害が認められた。心保護因子のひとつ Neuregulin-1 (NRG1) の血中濃度が STZ-4W 群で有意に増加していた。STZ-4W 群の心室において血管内皮細胞・心内膜・心外膜で NRG1 発現が上昇し、循環血中の NRG1 レベルが上昇していた。公共データベースを用いて解析したところ、2 型糖尿病の心不全患者において代償的な NRG1/ErbB/Akt 経路の活性化が起こることが示唆された。NRG1 の心機能への影響を明らかにするために、NRG1 の受容体 ErbB2 (HER2) を抗 ErbB2 (HER2) 抗体製剤のトラスツズマブ(TRZ、腹腔内投与)で遮断したところ、TRZ 投与 STZ-4W 群では STZ-4W 群と比較して左室駆出率が有意に低下し、左室収縮機能障害が認められた（図 3)。NRG1/ErbB2/4 シグナル下流の Akt-Ser^{473} のリン酸化レベルが STZ-4W 群で有意に低下し、TRZ 投与 STZ-4W 群でさらに低下していた。心室筋細胞の収縮機能制御に関わる蛋白の局在を免疫染色により解析したところ、TRZ 投与 STZ-4W 群では T 管膜の構造異常、L 型 Ca^{2+}チャネル（$Ca_V1.2$）の T 管膜への集積性の低下と接合膜構造以外への散在が認められたことから、T 管膜構造と $Ca_V1.2$ の局在の制御に NRG1/ErbB2/4/Akt シグナルが明らかとなった（図 4)。

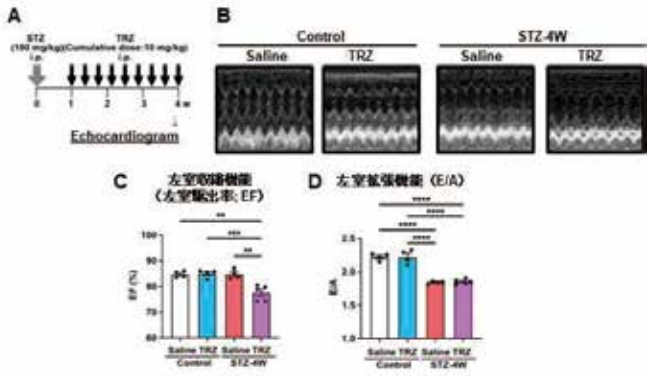


図3. NRG1/ErbB2/4 経路をトラスツズマブによって阻害した際の心機能.
A. 実験のスケジュール。トラスツズマブ, TRZ。**B.** M モードによる心エコー像。**C, D.** 心エコー結果から解析した左室収縮機能の指標である左室駆出率 (C)と左室拡張機能を示す E/A 値 (D)。Mean±SEM, N=4-5, ** p< 0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001.

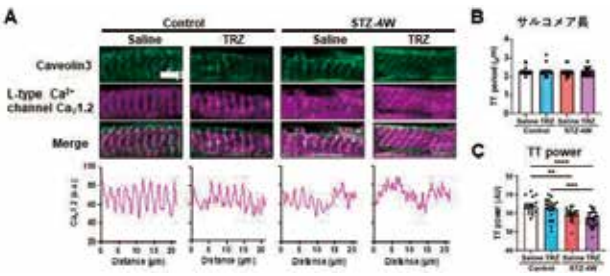


図 4. マウス心室筋における T 管膜構造と Ca^{2+} チャネル $Ca_V1.2$ の局在. A. マウス心室の凍結切片の免疫組織化学。T 管膜に局在する Caveolin3 (緑) と電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャネル $Ca_V1.2$ (マゼンタ)、マージ画像 (白) を示す。下段は $Ca_V1.2$ のシグナル強度をプロットしたグラフ。**B.** Caveolin3 シグナルを元に定量したサルコメア長。**C.** フーリエ変換により T 管膜構造の品質を定量化した TT power 値。値が大きいほど、明瞭かつ規則的な T 管膜構造があることを示す。Mean±SEM, N=16-27, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001

2. SERCA2a/PLB 複合体の構造変化を定量評価する新規蛍光レポータの構築

Ca^{2+}サイクリングに関わる治療薬シーズのハイスループット・スクリーニング系の開発を目的として、SERCA2a/PLB 複合体の新規蛍光レポータの構築を行った。既知の立体構造をもとに YFP-SERCA2a および CFP-PLB との融合タンパク質を作製した。YFP-SERCA と CFP-PLB とを 50 アミノ酸のリンカーで繋いだ１分子型 FRET レポータにおいて小胞体膜上に両者が共局在して近接することがわかった。Thapsigargin (SERCA2a を活性化型構造に固定する SERCA 阻害剤) 存在下で FRET シグナル増加に典型的な蛍光変化が認められた (図 5)。同様の FRET 増加は別の SERCA 阻害剤である cyclopiazonic acid によっても生じ、さらに SERCA2a の活性を促進する caffeine では FRET シグナルの低下が観察された。このレポータの蛍光強度および FRET 変化は十分に大きく、生細胞内で生じる秒オーダーの SERCA2a/PLB の構造変化をリアルタイムに追跡可能であることが明らかになった (図 6)。

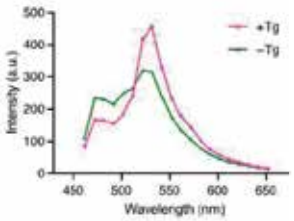


図 5. SERCA2a/PLB レポータの蛍光スペクトル. tsA201 細胞にレポータを発現させた際の蛍光スペクトル。thapsigargin 処置により、CFP ピークに相当する 480nm 付近の蛍光の減少と YFP ピークに相当する 530nm 付近の蛍光の増加が認められた。励起波長は 405nm。

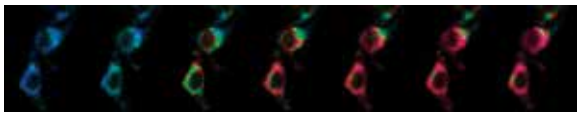


図 6. SERCA2a/PLB レポータのタイムラプス測定. tsA201 細胞にレポータを発現させ、thapsigargin(10 μM)を与えた際の FRET レシオ画像。図中の青色～赤色の変化は ratio1.0-2.0 に相当する。6 sec 毎の画像を示す。

竹島 浩

TRIC チャネルは、2007 年に我々が精製し命名した小胞体からのカルシウム放出を補助すると推察されるタンパク質である。従来のチャネルと構造に類似性が低く、さらに精製の難しさから機能解析は進んでいない。従って、最近は detergent を使った精製をせず解析を行っている。この方法での解析を難しくしているのは、TRIC-A もしくは TRIC-B のみを高発現している組織がないか、あっても少量で実験に使う量が得られないことである。そこで今回 HEK 細胞に (i) RyR2 のみ、(ii) RyR2+TRIC-A、(iii) RyR2+TRIC-B の３種類を強制発現しチャネル活性を比較検討した。

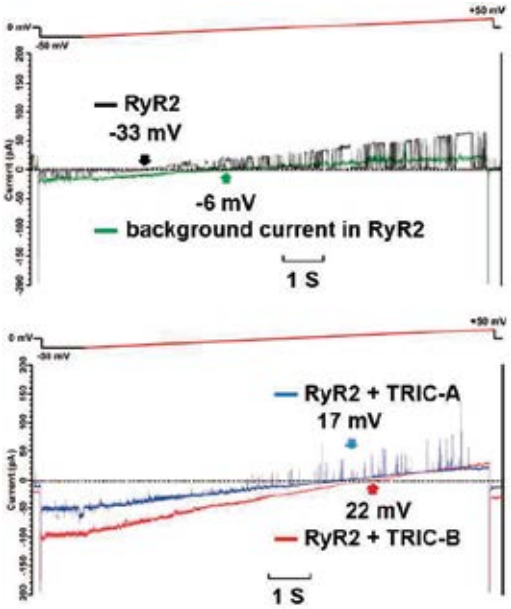


図 7. 電圧ランプで誘起される RyR2 電流に対する TRIC-A または TRIC-B の共発現の影響. TRIC の共発現により逆転電位が正に移動した。TRIC が K^+のみならず Cl^-イオンにも透過性を有することを示す。

1. TRIC チャネルは K^+イオンだけでなく Cl^-イオンも透過させる

電圧ランプ (電圧を連続的に変化させる) プロトコルを用いて、これら細胞群の電流の逆転電位(Erev) 値を計測した。RyR2 のみの場合では RyR2 チャンネルが二重膜に組み込まれ他の電流がない場合、Erev は常に-32 mV 付近であった (図 7 上、黒いトレース)。これは、この条件下での K^+の Erev 値で、RyR2 は理想的に陽イオン選択的であるといえる。内因性チャネルの電流の Erev は様々だが、通常-32 mV より正の値であり、HEK 細胞には少なくとも Cl^-に対する透過性を示すイオンチャネルが存在することがわかる。一方、RyR2+TRIC-A 細胞と RyR2+TRIC-B 細胞から得られた Erev はこの条件での K^+の計算 Erev である-32 mV より正であることで、これは取り込まれた TRIC チャネルは、K^+と共に一部の Cl^-も通過させていることを

示している（図 7 下）。陰イオンと陽イオンの両方の経路として機能する能力は、より多様な細胞タイプに適した、より柔軟なカウンターイオン電流を提供することが期待される。

2. RyR2 は TRIC チャネルとの共存で開口確率が変化する

TRIC チャネルの共存が RyR2 チャネルに影響するかを調べた。電流が内腔から細胞質方向に流れる-30mV において、TRIC-A の存在は、細胞質 Ca^{2+} の Po 増加を著しく増強し、特に細胞質 Ca^{2+} 濃度が 10 μM〜1 mM で顕著であった（図 8）。同様な傾向は TRIC-B でも見られたが、その効果は TRIC-B よりも TRIC-A の方が大きかった。したがって、TRIC-A, -B のいずれかが存在すると、興奮収縮連関時に RyR2 の活性が増強され、SR の Ca^{2+} 放出が増加すると考えられる。この結果は、*Tric-a* KO マウスの心筋細胞で Ca^{2+} スパークの頻度が減少し、Ca^{2+} 過渡現象の開始と過渡現象のピークまでの振幅時間の遅延が観察された Zhou et al 2020 の結果と一致する。

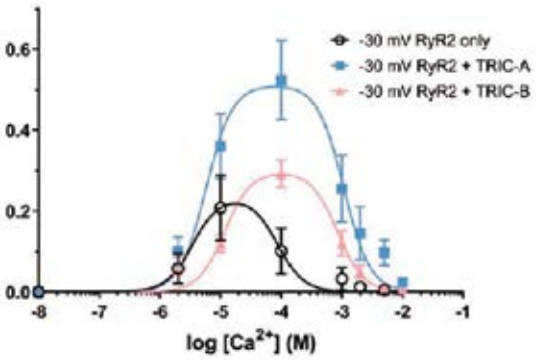


図 8. RyR2 チャネルの開確率の Ca^{2+} 依存性に対する TRIC-A または TRIC-B 共発現の影響.

小川 治夫

1. RyR2 疾患変異体の疾患発生機構の構造的解明

クライオ電子顕微鏡・単粒子解析により、野生型 RyR2 の閉状態（$-Ca^{2+}$）と開状態（$+Ca^{2+}$）の立体構造解析に成功した（図 9）。一連の構造と変異体を用いた徹底的な機能解析実験を組み合わせることで、RyR2 のチャネルのゲーティング機構の解明を行った。さらに loss-of-function 変異体の Ca^{2+} の有無の立体構造を高分解能で構造決定することにも成功した。野生型の構造との比較の結果、Ca^{2+} 非存在下の構造は野生型とほぼ変わらなかった。一方、Ca^{2+} 存在下の構造では Ca^{2+} は結合しているものの、チャネルポアの開口に必須な U-モチーフの回転は起こっておらず、そのためにチャネルポアを構成する膜貫通ヘリックス S6 が開けないことが判明した。これがチャネルの機能欠損を引き起こす原因と考えられた。以上より、ゲーティング機構と疾患変異がチャネル異常を引き起こす機構を原子レベルで明らかにすることに初めて成功した。

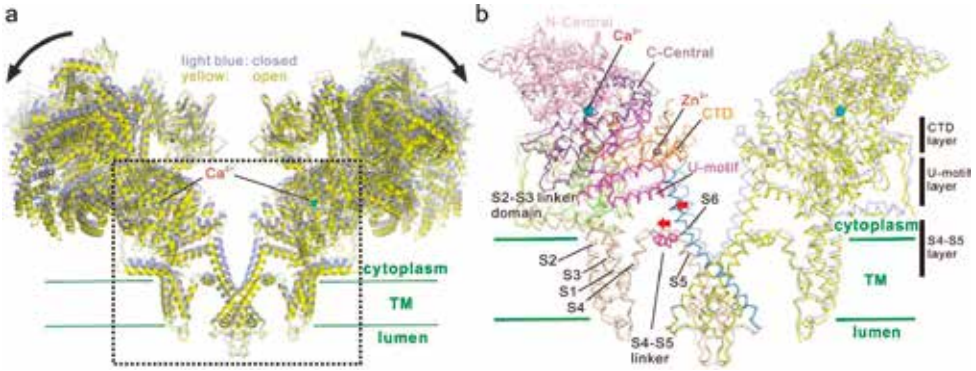


図 9：クライオ EM により決定された RyR2 の閉状態と開状態の構造. (a) 全体構造での比較(紫：閉状態、黄：開状態)と(b)その点線四角部位の拡大図（Kobayashi et al, Nat Commun 13: 2821, 2022)。

2. 心筋における PLN リン酸化調節機構の解明

SERCA2a の立体構造解析

新規構造の E2・ATP 状態の X 線結晶構造解析に成功した。膜内は E2 状態の構造を取る一方、細胞質に着目すると A ドメインは E1 状態の位置に、N ドメインは P ドメインに対して E1・ATP・$2Ca^{2+}$ 状態と同じ位

置をとっていた。即ち、ATP はリン酸化部位に適切に配置されるが、Ca^{2+}が結合していないために γ リン酸の転移は起こりない構造をとっており、ATP が E2 状態に結合することで逆反応によるリン酸化が防止される機構を持っていることを説明できるものであった（図 10a)。

ナノディスクへ再構成した SERCA1a のクライオ EM による解析

SERCA2a と修飾薬の複合体構造を目指し、その前準備として類縁の SERCA1a の脂質ナノディスクへ組み込みを行った。組み込まれた SERCA1 は Ca^{2+}濃度依存的な ATPase 活性を有していたので、このナノディスク試料のクライオ電子顕微鏡による解析を行った。得られたマップの分解能は現在のところ 6 Å 程度であるが、分解能の向上へ向けた指針を得ることができた（図 10b)。今後これを SERCA2a の研究へ応用する予定である。

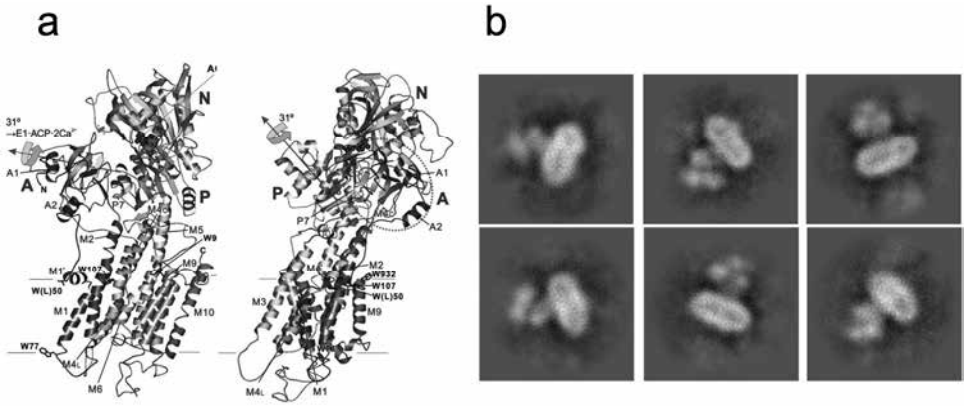


図 10. (a) SERCA2 の E2・ATP 状態の構造. (b) ナノディスクへ再構成した SERCA1a のクライオ EM による解析. いずれも 2D-class 平均像。

IV 考察

本研究は心筋筋小胞体の Ca^{2+}サイクリングの制御機構を解明し、その修飾による治療薬開発の可能性を目指して行われた。RyR2 変異体の機能解析研究より、CPVT 変異はチャネル活性を増大させ、その程度は疾患発症年齢と密接に関連することが明らかとなった。本解析手法は疾患変異の正確な重症度予測に大きく役立つと考えられる。糖尿病性心筋症における心保護因子としての NRG1 の代償的な機能と病態生理学的意義が明らかとなった。糖尿病性心筋症の早期段階での治療法の開発や創薬に貢献するものである。新規筋小胞体イオンチャネルである TRIC-A、TRIC-B は K^+イオンのみならず Cl^-にも透過性を有するイオンチャネルであることがわかった。RyR2 チャネルの制御への関与も示されたことから、心疾患の治療ターゲットとしての可能性が期待される。RyR2 のクライオ電子顕微鏡による構造解析により、チャネル開口の動作機構を解明し、機能喪失変異によるチャネル開口不全のメカニズムを明らかにした。動作機構に基づいた薬物開発の道を開くものである。

治療薬開発を目指したスクリーニング系として、小胞体内 Ca^{2+}濃度測定法による新規の RyR2 阻害薬を同定した。CPVT モデルマウス心筋細胞の異常 Ca^{2+}シグナルを抑制できたことから、不整脈疾患に対する RyR2 阻害薬の有効性を示すとともに今後の薬物開発を強力に推進する可能性を持つ。新規の SERCA2a/PLB の分子複合体に生じる構造的変化を定量的に可視化検出する新規レポータの開発に成功した。SERCA2a/PLB の制御の in vivo イメージングに活用できるとともに、心不全治療薬シーズのスクリーニングに応用可能であると期待される。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、3年間にわたる多大なご支援を賜りました公益財団法人 車両競技公益資金記念財団に心より感謝いたします。

V 研究成果の発表

1. Iyer KA, Hu Y, Nayak AR, Kurebayashi N, Murayama T, Samso M. Structural mechanism of two gain-of-function cardiac and skeletal RyR mutations at an equivalent site by cryo-EM. *Sci Adv*, 6: eabb2964, 2020.

2. Kuroda Y, Nonaka M, Kamikubo Y, Ogawa H, Murayama T, Kurebayashi N, Sakairi H, Miyano K, Komatsu A, Dodo T, Nakano-Ito K, Yamaguchi K, Sakurai T, Iseki M, Hayashida M, Uezono Y. A receptor by a novel, selective receptor antagonist enhances morphine-induced analgesia: Possible functional interaction of dimerized endothelin A and μ-opioid receptors. *Biomed Pharmcother*, 141: 111800, 2021.

3. Kobayashi T, Kurebayashi N, Murayama T. The ryanodine receptor as a sensor for intracellular environments in muscles. *Int J Mol Sci*, 22: 10795, 2021.

4. Sakata K, Matsuyama S, Kurebayashi N, Hayamizu K, Murayama T, Nakamura K, Kitamura K, Morimoto S, Takeya R. Differential effects of the formin inhibitor SMIFH2 on contractility and Ca^{2+} handling in frog and mouse cardiomyocytes. *Genes Cells*, 26: 583-595, 2021.

5. Hu Y, Iyer KA, Nayak AR, Kurebayashi N, Murayama T, Samso M. Purification of recombinant wild type and mutant ryanodine receptors expressed in HEK293 cells. *Bio-protocol*, 11: e4112, 2021.

6. Yamazawa T, Kobayashi T, Kurebayashi N, Konishi M, Noguchi S, Inoue T, Inoue YU, Nishino I, Mori S, Iinuma H, Manaka M, Kagechika H, Uryash A, Adams J, Lopez JR, Liu X, Diggle C, Allen PD, Kakizawa S, Ikeda K, Lin B, Ikemi Y, Nunomura K, Nakagawa S, Sakurai T, Murayama T. A novel RyR1-selective inhibitor prevents and rescues sudden death in mouse models of malignant hyperthermia and heat stroke. *Nat Commun*, 12: 4293, 2021.

7. Itoh H, Murayama T, Kurebayashi N, Ohno S, Kobayashi T, Fujii Y, Watanabe M, Ogawa H, Anzai T, Horie M. Sudden death after inappropriate shocks of implantable cardioverter defibrillator in a catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia case with a novel RyR2 mutation. *J Electrocardiol*, 69: 111-118, 2021.

8. Liu F, Xu L, Nishi M, Ichimura A, Takeshima H. Enhanced Ca^{2+} handling in thioglycolate-elicited peritoneal macrophages. *Cell Calcium*, 96: 102381, 2021.

9. Miyazaki Y, Ichimura A, Kitayama R, Okamoto N, Yasue T, Liu F, Kawabe T, Nagatomo H, Ueda Y, Yamauchi I, Hakata T, Nakao K, Kakizawa S, Nishi M, Mori Y, Akiyama H, Nakao K & Takeshima H. C-type natriuretic peptide facilitates autonomic Ca^{2+} entry in growth plate chondrocytes for stimulating bone growth. *eLife*, 11: e71931, 2022.

10. Iyer KA, Hu Y, Klose T, Murayama T, Samso M. Molecular mechanism of the severe MH/CCD mutation Y522S in skeletal ryanodine receptor (RyR1) by cryo-EM. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 119: e2122140119. 2022.

11. Oyama K, Zeeb V, Yamazawa T, Kurebayashi N, Kobirumaki-Shimozawa F, Murayama T, Oyamada H, Noguchi S, Inoue T, Inoue YU, Nishino I, Harada Y, Fukuda N, Ishiwata S, Suzuki M. Heat-hypersensitive mutants of ryanodine receptor type 1 revealed by microscopic heating. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 119: e2201286119, 2022.

12. Tsuboi Y, Oyama K, Kobirumaki-Shimozawa F, Murayama T, Kurebayashi N, Tachibana T, Manome Y, Kikuchi E, Noguchi S, Inoue T, Inoue YU, Nishino I, Mori S, Ishida R, Kagechika H, Suzuki M, Fukuda N, and Yamazawa T. Mice with R2509C-RYR1 mutation exhibit dysfunctional Ca^{2+} dynamics in primary skeletal myocytes. ***J Gen Physiol***, 154: e202213136, 2022.

13. Murayama T, Kurebayashi N, Numaga-Tomita T, Kobayashi T, Okazaki S, Yamashiro K, Nakada T, Mori S, Ishida R, Kagechika H, Yamada M, Sakurai T. A reconstituted depolarization-induced Ca^{2+} release platform for validation of skeletal muscle disease mutations and drug discovery. ***J Gen Physiol***, 154: e202213230, 2022.

14. Kobayashi T, Tsutsumi A, Kurebayashi N, Saito K, Kodama M, Sakurai T, Kikkawa M, Murayama T, Ogawa H. Molecular basis for gating of cardiac ryanodine receptor explains the mechanisms for gain- and loss-of function mutations. ***Nat Commun***, 13: 2821, 2022.

15. Hirose S, Murayama T, Tetsuo N, Hoshiai M, Kise H, Yoshinaga M, Aoki H, Fukuyama M, Wuriyanghai Y, Wada Y, Kato K, Makiyama T, Kimura T, Sakurai T, Horie M, Kurebayashi N, Ohno S. Loss-of-function mutations in cardiac ryanodine receptor channel cause various types of arrhythmias including long QT syndrome. ***Europace***, 24: 497-510, 2022.

16. Kurebayashi N, Murayama T, Ota R, Suzuki J, Kanemaru K, Kobayashi T, Ohno S, Horie M, Iino M, Yamashita F, Sakurai T. Cytosolic Ca^{2+}-dependent Ca^{2+} release activity primarily determines the ER Ca^{2+} level in cells expressing the CPVT-linked mutant RYR2. ***J Gen Physiol***, 154: e202112869, 2022.

17. Murayama T, Kurebayashi N, Ishida R, Kagechika H. Drug development for the treatment of RyR1-related skeletal muscle diseases. ***Curr Opin Pharmacol***, 69: 102356, 2023.

18. Gao J, Makiyama T, Yamamoto Y, Kobayashi T, Aoki H, Maurissen TL, Wuriyanghai Y, Kashiwa A, Imamura T, Aizawa T, Huang H, Kohjitani H, Nishikawa M, Chonabayashi K, Fukuyama M, Manabe H, Nakau K, Wada T, Kato K, Toyoda F, Yoshida Y, Makita N, Woltjen K, Ohno S, Kurebayashi N, Murayama T, Sakurai T, Horie M, Kimura T. Novel calmodulin variant p.E46K associated with severe catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia produces robust arrhythmogenicity in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. ***Circ Arrhythm Electrophysiol***, 16: e011387, 2023.

19. Matsukawa H, Murayama T. Development of ryanodine receptor (RyR) inhibitors for skeletal muscle and heart diseases. ***Juntendo Med J***, 69: 180-187, 2023.

20. Hu J, Venturi E, Sigalas C, Murayama T, Nishi M, Takeshima H, Sitsapesan, R. The biophysical properties of TRIC-A and TRIC-B and their interactions with RyR2. ***J Gen Physol***, 155: e202113070, 2023.

21. Mikami Y, Iwase F, Ohshima D, Tomida T, Adachi-Akahane S. Compensatory role of neuregulin-1 in diabetic cardiomyopathy. ***J Pharmacol Sci***, 153: 130e141, 2023.

22. Takenaka M, Kodama M, Murayama T, Ishigami-Yuasa M, Mori S, Ishida R, Suzuki J, Kanemaru K, Sugihara M, Iino M, Miura A, Nishio H, Morimoto S, Kagechika H, Sakurai T, Kurebayashi N. Screening for novel type 2 ryanodine receptor inhibitors by endoplasmic reticulum Ca^{2+} monitoring. ***Mol Pharmacol***, in press, 2023.

心臓電位依存性 K^+ チャネルを標的とした革新的創薬手法の確立

所属機関　慶應義塾大学薬学部
研究者名　大澤匡範

《研究の概要》

ヒト心臓に発現する電位依存性 K^+チャネル hERG は膜電位に応じて構造変化し、K^+の膜透過を制御することで、心臓の正常な機能に関わる。Gating modifier toxin である APETx1 は、hERG の静止状態における電位センサードメイン(VSD)に結合し、hERG を阻害することが知られている。しかしながら、これまでに、膜電位存在下で生じる hERG の静止状態の立体構造は未解明であり、APETx1 の hERG 結合様式は不明である。そこで本研究では APETx1 および hERG の変異体を用いた電気生理学的解析により、APETx1 による hERG 阻害機構の原子レベルでの解明を目的とした。

我々は、これまで報告の無かったリコンビナントでの APETx1 の調製法を確立し、NMR による立体構造解析および電気生理解析を行い、リコンビナント APETx1 が天然体と同等の構造と hERG 阻害活性を有することを確認した。そこで、APETx1 の 1 残基変異体 15 種を調製し、パッチクランプ法により、APETx1 の変異体添加時の hERG 電流を測定した。その結果、hERG 阻害に APETx1 の 4 残基（F15, Y32, F33, L34）が重要な役割を果たすことが分かった。これらの残基は、この APETx1 の分子表面上で局在しており、hERG との直接の結合に関わることが示唆された。

さらに、hERG 変異体に対する APETx1 の阻害活性を電気生理学的に解析した。アフリカツメガエルの卵母細胞に hERG 野生型および変異体 21 種を発現させ、二本刺し膜電位固定法を行い、APETx1 の添加前後で hERG 電流を測定した。その結果、hERG 変異体 21 種のうち、5 種で APETx1 の阻害活性が有意に減少した。hERG 阻害活性が減少した変異部位は、既知の hERG 活性化状態の構造上では互いに離れた位置に存在した。

そこで、hERG-VSD の電位センサーである S4 ヘリックスの位置をシフトさせた複数の立体構造をモデリングし、APETx1 との docking simulation を行ったところ、ヘリックス 1～2 ターン分 S4 を細胞内側にシフトしたモデルで、APETx1 による hERG 阻害が変調を受けた hERG 残基が近接し APETx1 との相補的表面を形成した。この docking　model は、今回の変異体を用いた一連の電気生理学実験結果を矛盾なく説明するものであることから、APETx1 の hERG 阻害様式を反映していることが示唆された。

これらのことから、S4 が down conformation となったときに hERG の変異体解析で同定された F508, E518, I521 が APETx1 の結合部位を形成することが示唆された。この APETx1 による S4 の down conformation の認識機構は、通常の手法では立体構造を明らかにすることができない静止構造の VSD への結合を介して hERG の機能を調節するリガンドを創製する上での構造基盤となることが期待される。

Reference
Matsumura K. et al., "Mechanism of hERG inhibition by gating-modifier toxin, APETx1, deduced by functional characterization" BMC Mol. Cell Biol. (2021)22:3

大澤　匡範	慶應義塾大学薬学部 教授	研究の立案、実施、構造生物学的解析、研究の統括
横川真梨子	慶應義塾大学薬学部 専任講師	試料調製、性状解析、X 線結晶構造解析・NMR による相互作用解析
原田　彩佳	慶應義塾大学薬学部 助教	試料調製、性状解析、電気生理学的解析、NMR による相互作用解析

研究報告

I　研究目的

Human *ether-à-go-go*-related gene (hERG) は心臓や脳、がん細胞に発現する電位依存性カリウムイオンチャネル（K_Vチャネル）である。hERG は細胞膜の脱分極に伴ってカリウムイオン (K^+) を細胞内側から細胞外側へと膜透過させることで、活動電位の再分極過程に関与する。hERG の機能は心臓の正常な拍動に必須であり、その機能低下は QT 延長症候群に伴う致死的な不整脈の原因となる。また、hERG の機能が統合失調症や発がんプロセスとも関与していることや、hERG 阻害剤が膠芽腫患者の生存率を向上させたことが報告されている。これらのことから、リガンドによる hERG 阻害機構を解明することは医学・薬学的に重要な課題である。

hERG は 4 量体を形成して K_Vチャネルとして機能する膜タンパク質である。4 量体のそれぞれのサブユニットは 6 本の膜貫通ヘリックス S1-S6 を有する。S1-S4 は電位センサードメイン (VSD)、S5-S6 はポアドメイン (PD) を形成する。VSD の S4 は正電荷を帯びており、膜電位の変化に応答して構造変化する。静止膜電位下では S4 は細胞内側に引き付けられた down conformation をとり、このとき PD のゲートが閉じた resting state をとる（図

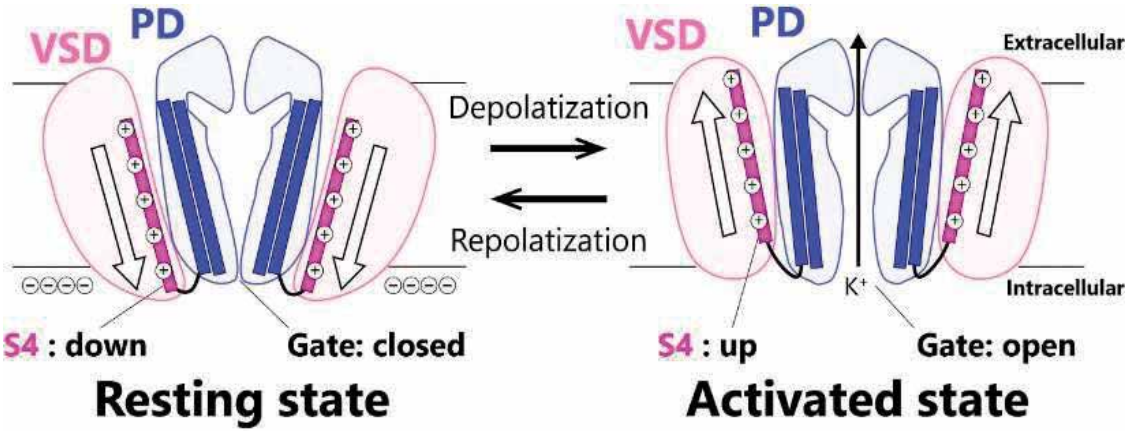


図 1　hERG の膜電位依存的な活性化による構造変化

1 左)。一方で、膜電位が脱分極すると S4 が細胞外側に移動し up conformation をとり、ゲートが開くことで activated state をとる（図 1 右)。従来の立体構造解析では、膜電位を形成させた条件での解析が困難であり、hERG の resting state の構造は明らかとなっていない。

イソギンチャク *Anthopleura elegantissima* が産生する 42 残基のペプチド毒素に APETx1 がある。APETx1 は hERG の VSD に結合し、resting state を安定化することで、hERG の膜電位依存的な活性化を阻害する gating-modifier toxin である。APETx1 による hERG 阻害機構を解明することは、hERG の VSD を標的とし、その機能を調節するリガンドを創製することに繋がると期待される。しかしながら、これまでにリコンビナント APETx1 の調製法は確立されておらず、変異体解析が困難であったことから、APETx1 がいかにして hERG の resting state に結合し、活性化を阻害するのかは解明されていない。そこで本研究では、リコンビナント APETx1 の調製法を確立し、変異体を用いた電気生理学的解析を行うことで、APETx1 による hERG 阻害機構を解明することを目的とした。

なお、以下に報告する研究成果は、下記の論文にて発表済みである。

Matsumura K., Shimomura T., Kubo Y., Oka T., Kobayashi N., Imai S., Yanase N., Akimoto M., Fukuda M., Yokogawa M., Ikeda K., Kurita J., Nishimura Y., Shimada I, and **Osawa M***. "Mechanism of hERG inhibition by gating-modifier toxin, APETx1, deduced by functional characterization" **BMC Mol. Cell Biol.** (2021)22:3

II　研究計画及び材料と方法

- **大腸菌発現系を利用したリコンビナント APETx1 の調製**

APETx1 およびその変異体にはヒスチジン (His) タグを融合し、大腸菌により封入体として発現させた。尿素による変性と可溶化、Ni^{2+}アフィニティカラムでの精製の後、透析により尿素を除去するとともに酸化還元バッファー中でジスルフィド結合の形成を促した。Tobacco etch virus (TEV) プロテアーゼによるタグ切断後、逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) による精製を行った。

- **リコンビナント APETx1 の核磁気共鳴 (NMR) 法による解析**

三重共鳴 NMR スペクトルを利用して、均一 ^{13}C, ^{15}N 標識を施した APETx1 の主鎖と側鎖の NMR シグナルを pH 6.0, 298 K 条件下で帰属した。核オーバーハウザー効果 (NOE) シグナルを利用して、pH 6.0, 298 K 条件下で APETx1 の構造を決定した。得られた立体構造を pH 3.0, 280 K 条件下の天然物の APETx1 の立体構造と比較した。

- **ホールセルパッチクランプ法による APETx1 の変異体解析**

均一 ^{15}N 標識を施した APETx1 の変異体の ^{1}H-^{15}N HSQC スペクトルを測定し、野生型 (WT) のスペクトルと比較することで立体構造が同等であることを確認した。hERG を安定発現した HEK293 細胞を用いたホールセルパッチクランプ法によって、濃度 10 μM の APETx1 の WT および変異体を添加したときの hERG 電流を測定した。

- **二本刺し膜電位固定法による hERG の変異体解析**

hERG の WT または変異体を強制発現させたアフリカツメガエルの卵母細胞の巨視的電流を二本刺し膜電位固定法によって測定した。それぞれの hERG 変異体に対して、濃度 10 μM の APETx1 を添加し、電流測定を行った。

- **APETx1-VSD 複合体の構造モデルの構築**

Rat *ether-à-go-go* gene 1 (rEAG1) の立体構造を鋳型にして、hERG の S4 の up conformation および 2 種の down conformation のモデルを作製し、HADDOCK 2.4 web server を用いたドッキングシミュレーションによって APETx1-VSD 複合体の構造モデルを構築した。

III　研究成果

リコンビナント APETx1 の調製法の確立と NMR 法による構造決定

リコンビナント APETx1 は大腸菌を利用して不溶性の凝集体である封入体として発現させた後、リフォールディングさせることで調製した。調製したリコンビナント APETx1 の立体構造が天然物と同等であることを確認するために、NMR 法による解析を行った。まず、pH 6.0, 298 K 条件下で NMR シグナルを帰属した。先行研究では pH3.0 条件下で APETx1 の立体構造が決定されている。生理的な条件下での APETx1 の立体構造を評価するために、pH 6.0 条件下でリコンビナント APETx1 の NMR 構造を決定し（図 2A）、先行研究の pH 3.0 条件下の天然物の構造と比較した（図 2B）。その結果、両者の立体構造の間では C 末端の向いている方向が僅かにずれていたが、異なる pH 条件下でも全体構造は互いによく一致しており、大きな差がないことが分かった（残基番号 2-41 の主鎖 RMSD 値で 0.7 Å-1.5 Å）。

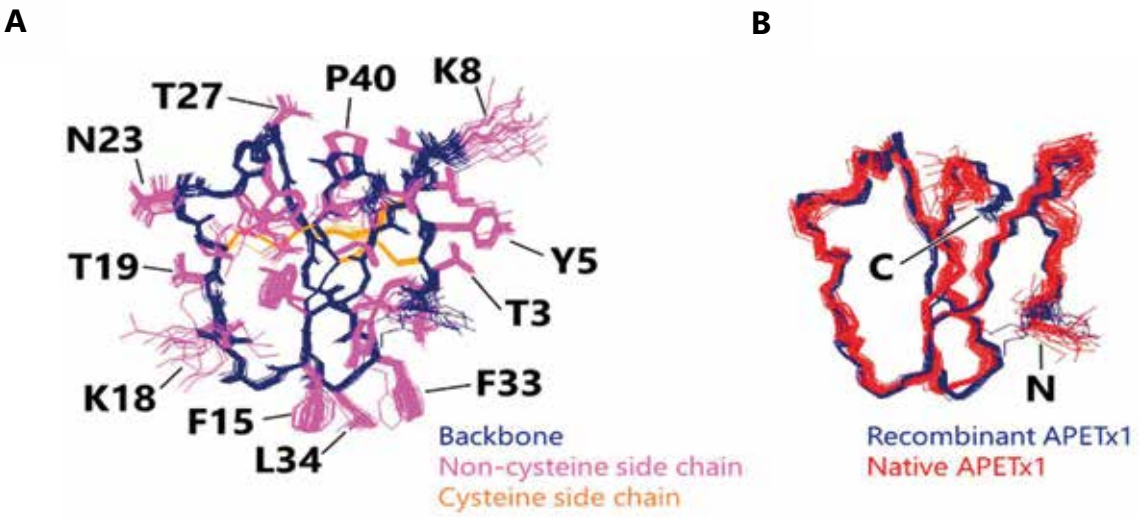


図 2　リコンビナント APETx1 の溶液 NMR 構造

(A) リコンビナント APETx1 の 20 個の構造の重ね合わせ。(B) リコンビナント APETx1 (PDB: 7BWI) と天然物の APETx1 (PDB: 1WQK) の構造の比較。

このことから、天然物と同等の立体構造を有するリコンビナント APETx1 を調製することに成功したと判断した。

APETx1 の変異体解析による hERG 阻害に関わるアミノ酸残基の同定

ホールセルパッチクランプ法によってリコンビナント APETx1 の hERG 阻害活性を調べた。APETx1 は高い脱分極電位のときよりも、低い脱分極電位のときの hERG 電流を強く阻害した（図 3A）。各脱分極電位での hERG 電流を調べたところ、濃度 10 μM の APETx1 は hERG の 50%活性化電位 ($V_{1/2}$) を約 24 mV 高電位側にシフトさせた（$\Delta V_{1/2}$ = 23.9 ± 2.5 mV、図 3B）。このことは APETx1 の添加時に hERG を活性化させるにはより高い電位を与える必要があることを示しており、APETx1 が hERG の活性化前の機能状態である resting state を安定化していることを反映している。

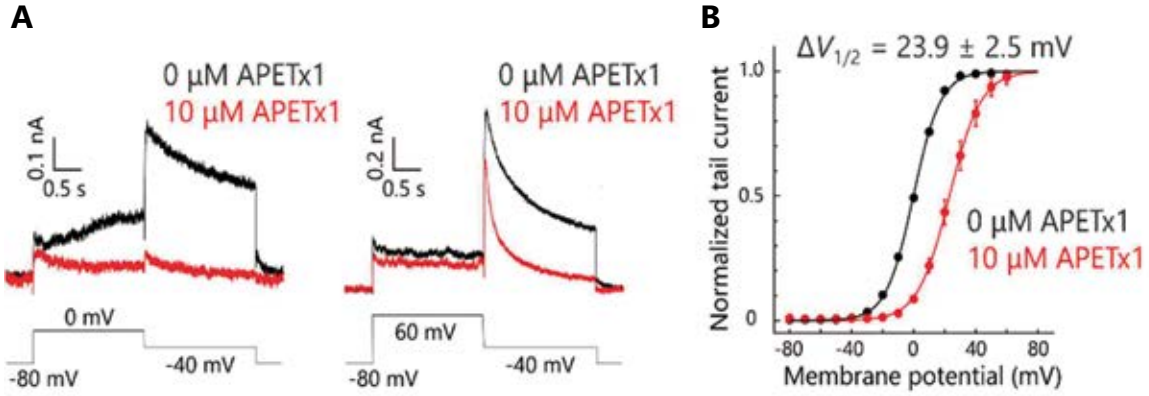


図 3　APETx1 の hERG による hERG 活性化電位のシフト

(A) 脱分極電位 0 mV（左）および+60 mV（右）での hERG 電流。(B) hERG の *G-V* 曲線。

そこで、APETx1 の hERG 阻害活性に関わるアミノ酸残基を同定するため、側鎖が分子表面に露出する 15 個のアミノ酸残基について変異体解析を行うこととした。濃度 10 μM の APETx1 変異体を添加したときの hERG 電流をホールセルパッチクランプ法により測定し、$\Delta V_{1/2}$ の値を評価した。その結果、APETx1 の F15A, Y32A, F33A, L34A の 4 個の変異体で WT と比較して $\Delta V_{1/2}$ の値が有意に減少した（図 4A）。これらの 4 個の疎水性残基は APETx1 の分子表面上で局在し、疎水性パッチを形成していた（図 4B）。そのため、この疎水性パッチが hERG の VSD との相互作用に関与していることが示唆された。

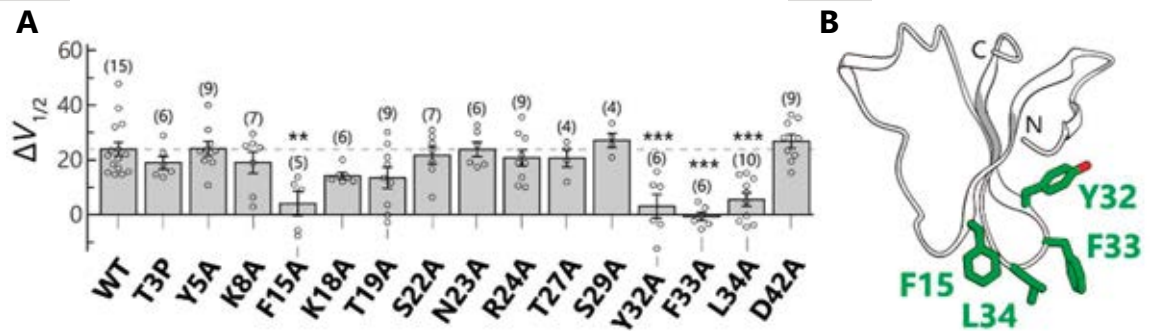


図 4　APETx1 の変異体解析

(A) APETx1 変異体の $\Delta V_{1/2}$ の値。データは平均値±標準誤差で示した。測定回数を括弧内に示した。$\Delta V_{1/2}$ の値を WT と比較した (**, 0.001 < p < 0.01; ***, p < 0.001)。(B) 変異により $\Delta V_{1/2}$ の値に有意な差がみられたアミノ酸残基を構造上にマッピングした (PDB: 7BWI)。

hERG の変異体解析による APETx1 結合部位の推定

先行研究では hERG の VSD の S3-S4 ループ上の G514-E519 の Cys 変異体の解析が行われており、APETx1 による hERG 阻害活性が G514C 変異体で上昇、E518C 変異体で低下することが報告されている。しかしながら、hERG のその他のアミノ酸残基の APETx1 による阻害への寄与は明らかとなっておらず、APETx1 が hERG のどのアミノ酸残基と相互作用し、いかにして resting state を安定化するのかは解明されていない。そこで、hERG の変異体を作製し、それぞれの変異体について APETx1 による阻害活性を評価することとした。変異させるアミノ酸残基には、hERG の S3-S4 ループの残基のうち F508-F513 および L520-L524 を選定した。また、S1 上部の L433 および荷電残基 (K434, E435, E437, E438) と S2 の D456, D460 についても変異体を作製した。

まず hERG の変異体をアフリカツメガエルの卵母細胞に発現させ、二本刺し膜電位固定法により WT と同等の電流が観測されることを確認した。二本刺し膜電位固定法においても、パッチクランプ法のときと同様に濃度 10 μM のリコンビナント APETx1 が hERG の WT の $V_{1/2}$ を高電位側にシフトさせることを確認した ($\Delta V_{1/2}$ = 21.9 ± 1.1 mV)。続いて、それぞれの hERG の変異体における濃度 10 μM の APETx1 での $\Delta V_{1/2}$ の値を評価した(図 5)。その結果、先行研究で報告されている hERG の E518C 変異体に加えて、L433A, D460A, F508A, I521A の 4 個の変異体で $\Delta V_{1/2}$ の値が WT と比較して有意に減少した。さらに、先行研究の G514C 変異体と同様に、I512A, G522A の 2 個の変異体では $\Delta V_{1/2}$ の値が WT と比較して有意に上昇した。これらの残基のうち、S1-S2 領域に存在する L433 と D460 以外のアミノ酸残基は S3-S4 領域に存在する。特に、APETx1 による阻害活性が変異により大きく減少した F508, E518, I521 は hERG の VSD の S3-S4 ループに存在することから、APETx1 がこれらのアミノ酸残基と相互作用することが示唆された。

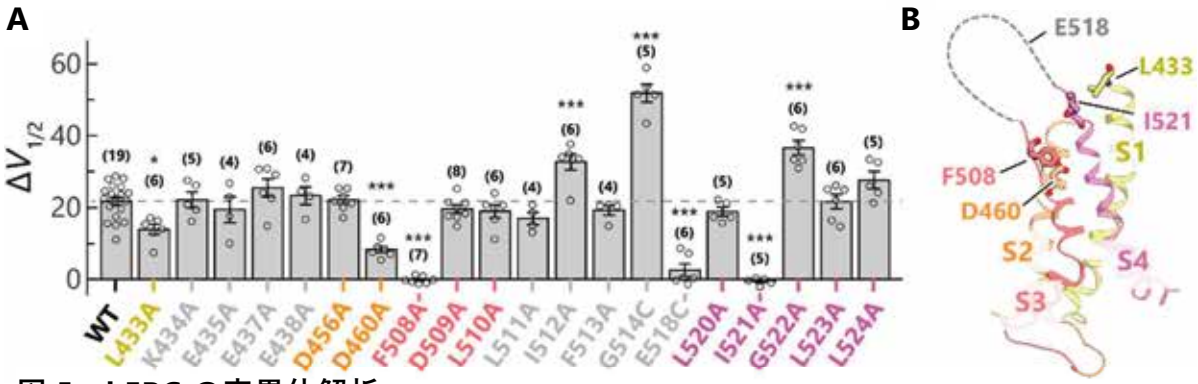


図 5　hERG の変異体解析

(A) APETx1 による hERG 変異体阻害における $\Delta V_{1/2}$ の値。データは平均値±標準誤差で示した。測定回数を括弧内に示した。$\Delta V_{1/2}$ の値を WT と比較した (*, 0.01 < p < 0.05; ***, p < 0.001)。(B) 変異により $\Delta V_{1/2}$ の値に有意な減少がみられたアミノ酸残基を hERG の VSD の構造上にマッピングした (PDB: 5VA2)。

ドッキングシミュレーションによる APETx1-hERG 複合体の構造モデルの検証

最後に、APETx1 と hERG の変異体解析で同定されたアミノ酸残基同士が直接的に相互作用することが可能であるかを検証するために、ドッキングシミュレーションによる複合体の構造モデルの構築を行うこととした。APETx1 が結合することが示唆される hERG の S3-S4 ループは、先行研究の立体構造解析で観測されておらず、構造モデルが存在しない。そのため、rEAG1 の立体構造を鋳型としたホモロジーモデリングにより、hERG の S3-S4 ループ領域の構造モデル（up モデル）を作製した。さらに、APETx1 は hERG の resting state における S4 の down conformation に結合すると考えられるため、S4 を一巻き分、および二巻き分だけ細胞内側に移動させた down モデル（これらをそれぞれ one-helical-turn down model、two-helical-turn down model と記載する。）を作製した。これらのモデルに対して APETx1 のドッキングシミュレーションを行ったところ、up モデルでは変異体解析で同定されたアミノ酸残基同士が相互作用したモデルを得ることができなかった。その一方で、2 種の down モデルでは、APETx1 の疎水性残基の側鎖が hERG の F508, E518, I521 の 3 個のアミノ酸残基で形成された窪みにはまるように結合した複合体の構造モデルを得ることができた（図 6）。これらの複合体モデルは本研究での変異体解析の結果と矛盾しないことが分かった。

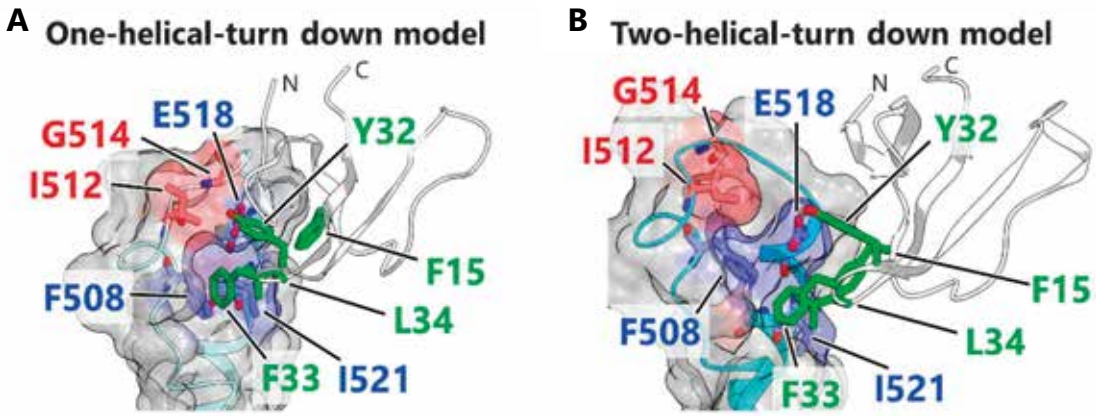


図 6　APETx1-hERG 複合体の構造モデル

(A) One-helical-turn down model に対するドッキング。(B) Two-helical-turn down model に対するドッキング。

【考察】

リコンビナント APETx1 は天然物の APETx1 と同等の立体構造を形成し、hERG の活性化電位を高電位側にシフトさせ、resting state を安定化することが分かった。APETx1 の変異体解析から、APETx1 の分子表面の疎水性パッチが hERG との直接的な相互作用に関与すると考えた。さらにドッキングシミュレーションによる検証では、down モデルを用いたときに APETx1 と hERG の変異体解析の結果を満たす複合体モデルを得ることができた。これらのことから、S4 が down conformation となったときに hERG の変異体解析で同定された F508, E518, I521 が APETx1 の結合部位を形成することが示唆された。この APETx1 による S4 の down conformation の認識機構は、VSD への結合を介して hERG の機能を調節するリガンドを創製する上での構造基盤となることが期待される。

謝辞

本研究事業の遂行にあたり、多大なるご支援を賜りました、公益財団法人車両競技公益資金記念財団に、心より感謝いたします。

V　研究成果の発表

1. Takeru Sagae, Mariko Yokogawa, Ryoichi Sawazaki, Yuichiro Ishii, Nao Hosoda, Shin-ichi Hoshino, Shunsuke Imai, Ichio Shimada, and **Masanori Osawa***. “Paip2A inhibits translation by competitively binding to the RNA recognition motifs of PABPC1 and promoting its dissociation from the poly(A) tail” **J. Biol. Chem.** (2022)298(5), 101844

2. Kazuki Matsumura, Mariko Yokogawa, and **Masanori Osawa***. “Peptide Toxins Targeting KV Channels” Handbook of Experimental Pharmacology. Springer, Berlin, Heidelberg (2021)1-25

3. Kazuki Matsumura, Takushi Shimomura, Yoshihiro Kubo, Takayuki Oka, Naohiro Kobayashi, Shunsuke Imai, Naomi Yanase, Madoka Akimoto, Masahiro Fukuda, Mariko Yokogawa, Kazuyoshi Ikeda, Jun-ichi Kurita, Yoshifumi Nishimura, Ichio Shimada, and **Masanori Osawa***. "Mechanism of hERG inhibition by gating-modifier toxin, APETx1, deduced by functional characterization" **BMC Mol. Cell Biol.** (2021)22:3

4. Yugo Shimizu, Tomoki Yonezawa, Junichi Sakamoto, Toshio Furuya, **Masanori Osawa**, and Kazuyoshi Ikeda*. "Identification of novel inhibitors of Keap1/Nrf2 by a promising method combining protein-protein interaction-oriented library and machine learning" **Sci. Rep.** (2021)7420

5. Yuta Iwahashi, Yuki Toyama, Shunsuke Imai, Hiroaki Itoh, **Masanori Osawa**, Masayuki Inoue, and Ichio Shimada*. "Conformational equilibrium shift underlies altered K+ channel gating as revealed by NMR" **Nat Commun.** (2020) Oct 14;11(1):5168.

内在心筋 ACh 産生システムの心・非心臓器連関とその不可欠性の解明

日本医科大学　生体統御科学分野
柿沼　由彦

《研究の概要》

研究代表者は世界に先駆けて、心筋細胞自身が保有するアセチルコリン (ACh) 産生システム a non-neuronal (cardiac) cholinergic system NNCCS を 2009 年に報告して以来、その生理学的機能・病態生理学的役割につき報告してきた。非神経性細胞が産生する ACh は、神経系を持たない原核細胞でも既に認められることから、進化の過程上、より原始的時期からこのシステムは心筋細胞にも存在していたと想像される。よって、神経伝達物質としての ACh の登場よりも早い時期から ACh 産生系は存在し、それとは異なる独自の生理機能をもつことも示唆される。我々の研究グループは、この NNCCS 機能を亢進させた遺伝子改変マウス、心筋細胞特異的 ACh 合成酵素 choline acetyltransferase (ChAT)遺伝子トランスジェニックマウス(hChAT Tg)を作製し、その解析から、第一に NNCCS が転写因子 HIF-1α蛋白レベルを制御し心筋細胞での虚血耐性能に関与し、心臓を虚血・低酸素環境から保護する機能をもつこと、第二にその機能亢進は迷走神経求心路を活性化させ、迷走神経刺激時の表現型と同様な高次機能修飾と血液脳関門機能(BBB)増強を惹起すること、つまり当該臓器とその他の非当該臓器の両者の生理機能を制御するという極めて有意義な機能をもつこと、等を明らかにしてきた。しかし、hChAT Tg のみでは NNCCS の生理学的機能のより詳細な解明には不十分であるため、研究グループは心臓特異的に ChAT 遺伝子をノックダウン(hChAT KD)・ノックアウト(hChAT KO)する遺伝子改変モデルを作製した。結果どちらの loss of function モデルでも、以下の共通した表現型が観察された。①心機能低下・心不全症状の出現、②心臓の顕著な活性酸素種暴露、③心筋 NO 産生低下、④心臓糖利用・糖代謝障害によるエネルギー代謝低下等である。その結果、NNCCS が予想以上に心臓機能維持に不可欠である事が明白となった。非心臓臓器である中枢神経系(CNS)での表現型には、①鬱応答増強、②ストレス応答増大、③BBB 機能低下、④脳内炎症惹起、等が認められ、これは hChAT Tg の CNS 表現型とほぼ相反し、よって NNCCS が心臓に加え CNS 機能をも制御するという心脳連関に関係することも明らかとなった。

これまで、NNCCS 由来の ACh の報告は研究代表者以降複数の研究グループからなされ、NNCCS の直接的な生理機能として心臓臓器保護作用という点は、互いに類似していたが、そのターゲットは心臓エネルギー代謝系にあること、さらに NNCCS 機能が CNS での脳内炎症制御さらに BBB 機能制御にも深く関係していることが今回の研究で解明・確認された。ところでこの二点は虚血性心疾患の治療戦略には極めて重要であると考えられる。その理由は、慢性心不全の病態生理に沿った治療介入法を想起する時、その対象を心臓に限るのみでなく、さらに神経性・体液性の心機能制御に深く関わる CNS にも介入することが極めて理に叶っていると考えられるからである。

今回の研究助成を通して、NNCCS の生理学的機能をさらに追及・解明し、これからの加速度的に進行する高齢化社会で患者数がさらに増加すると想定されている循環器疾患の一部に新たな治療戦略の基盤的概念を提唱することができた。今後この概念が臨床において広く応用されることが期待される。

共同研究者

津田　雅之　　高知大学動物実験施設
洲鎌　秀永　　国際医療福祉大学
根本　崇宏　　日本医科大学
眞野　あすか　日本医科大学
竹中　康浩　　日本医科大学

研究報告

I　　研究目的

本研究目的は、non-neuronal cardiac cholinergic system (NNCCS)の心臓および非心臓臓器としての中枢神経系（CNS）における影響および生理機能・病態生理学的役割を明らかにすることである。既に研究グループは、NNCCS の機能を亢進させたモデルマウス、すなわち心臓特異的 ChAT 遺伝子トランスジェニックマウス(hChAT Tg)を用いて、NNCCS が非低酸素下にありながらも HIF-1α蛋白レベルを低酸素下と同様に維持することで虚血耐性能が亢進されることを示してきたが（J Am Heart Assoc 2013; 2(1):e004887)、強制発現系のもつ欠点を完全に否定できないため、loss of function モデルを用いて NNCCS 機能をさらに検討することを目的とした。そのために、二つのモデルを用いた。一つは、心臓特異的に ChAT をノックダウンさせる配列をもつ miRNA を発現させるモデル(hChAT KD)(J Physiol Sci, 2021;71(1):2)、二つ目は、Cre-loxP システムを用いて心臓特異的に ChAT 遺伝子をノックアウトさせるモデル(hChAT KO)である。この二つのモデルは、ともに心臓特異的に ChAT による ACh 産生を低下させる点では同じではあるが、互いに異なる手法を用いて作製されたモデルである。したがって、どちらにおいても、それらの表現型が hChAT Tg のそれと比較して、およそ相反することが確認されれば、NNCCS の生理学的機能が、hChAT Tg が示す表現型に代表されるとおりであると考えられた。

そこで研究グループは、二つの NNCCS における loss of function モデルを作製し、特に以下の点への影響について着目し、検討することを目的とした。すなわち心臓臓器における影響として、①虚血耐性能または心臓機能ホメオスターシス、②心臓エネルギー代謝機能、③心臓 ROS 産生またはその防御系、④心臓 NO 産生能、さらに非心臓臓器として CNS に着目し、⑤その高次機能および BBB 機能への影響、についてである。また、心機能の低下が確認できた場合、その障害部位をより詳細に検討するために、より精密な形態学的検討も行い、心筋細胞における細胞小器官における障害の有無も検討することも目的とした。

II　　研究計画および材料と方法

1) hChAT KD の作製
マウス ChAT mRNA の全長蛋白コード領域の配列をもとに、それと相補的な siRNA として ChAT mRNA 発現を抑制することがすでに Invitrogen 社で確認されている配列を、3 ヶ所選択した。この 3 種類の siRNA を、ヘアピン構造を取りかつ tandem に発現するベクターに一旦サブクローニングし、その後その 3 種 tandem に発現する領域全体を再度切り出した。それに加えて心臓心筋細胞特異的に限局して発現させるためのα-MHC プロモーター領域を用いて、計２つのインサートを、siRNA 発現細胞を GFP で同定するためのバイシストロンシステムをもつ発現ベクターカセットにサブクローニングすることで、最終的に発現ベクターを作製した。これを用いて心臓特異的 ChAT miRNA 発現トランスジェニックマウスを作製し、これを hChAT KD とした。

このhChAT KD マウスは、胎生致死になることも、生後すぐに突然死することもなく、成獣まで発育し通常通りに交配が可能であり、次世代においても問題なく野生型と同様の個体数で得られた。

2) hChAT KO の作製
マウスゲノム DNA 上のエクソン 3 の 5’および 3’側に Cre 酵素が認識する flox 配列を、Crisper-Cas９システムを用いて二段階の相同組換えを介して挿入した。その DNA 配列を確認することで、flox 配列を両端にもつヘテロのマウスを作製した。このマウスと、心臓特異的にすなわちα-MHC プロモーター制御下に、タモキシフェン(Tx)によって誘導される Cre 酵素遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを交配し、flox 配列とそのプロモーター制御下の Cre 遺伝子をもつマウスを得た。その後、このマウスと flox 配列マウスとをさらに交配させて、最終的に flox 配列に挟まれた ChAT 遺伝子エクソン３をホモにもち、かつ Tx により誘導される Cre 遺伝子も同時に発現するトランスジェニックマウスを得た(hChAT KO)。この hChAT KO が設計した通り、α-MHC プロモーターと Tx に応答する ER 配列をもつ Cre 遺伝子、そして flox 配列をホモにもつことを、それぞれの特異的なプライマーを用いて心臓由来のゲノム DNA を用いて PCR で確認した。この hChAT KO も hChAT KD 同様に通常どおりに交配と次世代への継代が行われることを確認した。

3)心臓から心房を除いて心室のみを単離し、心室レベルにおける ACh 含有量を HPLC により測定し、hChAT KD・hChAT KO によって NNCCS が抑制されているかどうかを評価した。さらに単離心臓心室から RNA・蛋白質を抽出し、ChAT を含め、種々のターゲット因子における mRNA 発現・蛋白発現レベルを RT-PCR・ウェスタンブロット(WB)法を用いて評価した。心臓での候補評価項目としては、①エネルギー代謝関連因子、②細胞生存シグナル因子、③NO 産生系、④ROS およびその消去系等である。なお、生化学的評価として、心臓 ATP 量、NO 代謝産物、ROS 代謝産物等はそれぞれの測定用キットを用いて検討した。

4)心機能評価は、これまでの研究グループでの過去に報告した先行研究同様、PV カテーテルシステムを用い、人工呼吸管理下での心尖部アプローチにより行い、各種左心室内圧・容積パラメーターを測定することで行った。また、形態学的評価のために、通常の組

織染色・免疫組織化学的染色を行い、さらに NNCCS 機能抑制によるターゲット因子（細胞内小器官等）の同定を目的として、透過型電子顕微鏡学的観察を行った。

5)個体レベルの高次機能評価を行うために、うつ応答試験として尾懸垂試験・強制水泳試験等を行った。さらに、血液脳関門（BBB）機能を評価するために、BBB 関連蛋白発現レベルを WB 法で検討した。これに加えて、脳凍結損傷モデルを用いて一時的に BBB を緩めたときの応答の違い、すなわち BBB 機能抵抗性を評価するために、エバンスブルー色素を全身投与し、脳凍結損傷後の損傷部位での色素漏洩程度を測定し、NNCCS による BBB 機能への影響を評価した。

III　研究成果

現在、本研究の後半の内容についての論文作成段階に入っているため、個々の詳細なデータの掲載については一部に留めることとし、その結果については具体的というよりもむしろ総論的に示すことにとどめるのでその点についてご了承いただきたい。

1) hChAT KO マウスの心機能は Tx 投与後低下する

hChAT KO における心臓心室における ChAT タンパク発現は有意に低下し、その結果心室で産生される ACh レベルは、コントロール（Tx の溶媒である soybean oil のみを投与しているため、KO は生じていないマウス）と比較し有意に約 59%に低下していた。KO マウスといえども完全に 0%となってはいないことは留意すべき点である。なお、我々がこれより前に作製した hChAT KD においても同様で、やはり心室産生 ACh レベルはコントロールの 50.8%までの低下であった。こちらの低下も有意であった。

この Cre-loxP システムによる hChAT KO においては、コントロールを Tx の溶媒である soybean oil のみ投与とし、これを比較対象として Tx 投与による hChAT KO マウスの心機能を比較した。なお、事前に行われた予備実験において、野生型マウス（WT）と Tx も soybean oil どちらも無処理の hChAT KO（したがって、KO されていないため KO ではない)・その溶媒のみ投与の hChAT KO（これも KO されていない）との間には、統計学的にも、心機能パラメーターには有意差はなく同等であった。

さて、hChAT KO では溶媒のみ投与の非 KO マウスと比較しても、心拍数には有意差がなかったが、hChAT KO では①左室拡張末期容積（EDV）の有意な増加による心拡大、さらに②一回拍出量③駆出率（EF)・④左心室内径短縮率（FS)・⑤左室収縮末期圧（ESP）はいずれも有意に低下が認められた。すなわち有意な心機能低下が示された。また、hChAT KO の全例ではないものの、胸水貯留・呼吸促迫等典型的な心不全を呈するマウスも一定程度必ず認められていた。この状況を踏まえて、hChAT KO の Tx 投与後二週間以内の死亡率（突然死）は 32.4%と有意に高率であった。なお比較対象としての溶媒のみ投与によるコントロールでは 2.3%であるため、hChAT KO での死亡率は極めて高値であった。これは心不全死がその原因と考えられ、ポンプ失調に加

え、致死性不整脈の可能性も考えられた。

hChAT KD も、hChAT KD と比べれば程度はより軽度ではあるものの、有意に心機能低下を示しており、より低率ではあったが突然死を示すものも存在した（J Physiol Sci, 2021)。いずれにおいても、両者のモデルで心機能低下および心不全症状や突然死を示していることから、NNCCS の存在は心機能維持に不可欠であることが確認された。

2) hChAT KO マウス心臓ではエネルギー代謝関連因子タンパク発現が低下する

hChAT KD においても低下が認められたエネルギー代謝関連因子（pAkt/Akt・GLUT4 等）について、hChAT KO 由来の心臓心室（評価用心臓サンプルは、すべて心房を除いた心臓心室のみとしている）をウェスタンブロット法でそのタンパク発現レベルを評価したところ、糖輸送体 GLUT4、そして生存シグナルとして機能する pAkt/Akt 比の減少が hChAT KO で認められた。このことは NNCCS 機能低下により心筋での糖利用が低下すること、さらに NNCCS は心筋細胞生存シグナル維持に寄与していることも示唆している。さらに、解糖系の途中に、その代謝産物 pyruvate から TCA サイクルに入る経路においてミトコンドリア内で acetyl CoA を産生する pyruvate dehydrogenase (PDH)を、抑制性に制御するリン酸化酵素 pyruvate dehydrogenase kinase (PDK)4 のタンパクレベルが顕著に亢進していた。したがって、PDH 機能が hChAT KO では抑制されていること、つまり NNCCS 機能低下は糖利用を抑制するだけでなく、ミトコンドリア内 TCA サイクルを回すために必須な基質自体の利用が低下しているため、エネルギー面からも心筋細胞での十分なエネルギー産生に支障が生じ、エネルギー不足に曝される影響が示唆された。

以上のことは、心臓 ATP 産生量を比較することでも示された。すなわち、コントロールと比較し、hChAT KO 心臓内 ATP 含量は有意に低下していた。このことからも hChAT KO 心臓はエネルギー不足状態であることが明らかとなった。

2) hChAT KO マウス心臓での NO 産生系も低下する

hChAT KD 心臓心室では eNOS の蛋白発現は変わらないのに対して、むしろ nNOS (NOS1)タンパク発現の低下が顕著であり、その結果心室レベルの NO 代謝産物 NO_2 含量は有意に低下しており NNCCS と心臓 NO 産生系が関与することが示されていた（J Physiol Sci 2021)。一方で、これはすでに我々が報告している（Clin Sci (Lond). 2016;130(21):1913-1928)、 NNCCS gain of function モデルである hChAT Tg （心臓特異的 ChAT 遺伝子トランスジェニックマウス）での心室 NO 産生量の有意な増大という結果と相反するものである。したがって、NNCCS による心臓 NO 産生の亢進という機能が示唆された。

では hChAT KO でも同様かどうか、NOS1 蛋白発現レベルを評価したところ、ChAT KD 同様に NOS1 蛋白発現レベルは顕著に低下した。心機能における NOS1 由来 NO の生理学的役割は、これまでの先行研究より、細胞外から内への取り込みに関わる Ca^{2+}チャネルや SERCA への修飾を介した細胞質内 Ca^{2+}制御が報告されている。したがって、以上からも NNCCS は NO 産生系を介した心機能制御に深くかかわることが示唆された。

3) hChAT KO マウス心臓では ROS の影響がより大きく消去系は抑制される

hChAT KO 心臓での ROS 暴露の影響は DNA レベルにおよび、その指標の一つであるγ-H2A タンパク発現は有意に増加し、一方で SOD2 蛋白レベルは低下した。すなわち hChAT KO 心臓はコントロールと比較して、より高度な ROS 暴露状態にあることが示唆された。さらに心室レベルの GSH/GSSG 比は、コントロールと比較して有意に ChAT KO では低下しており、心臓レドックス環境はより KO において悪化していると考えられた。以上から、NNCCS は元来心臓を ROS 暴露から守る機能を持つことが示唆された。なお、これと同様の表現型は hChAT KD でも確認されており、hChAT KD 心臓内での nitrotyrosine 産生増加すなわち NO 系による ROS 暴露、MDA レベル増加すなわち脂肪酸による ROS 暴露、γ-H2A タンパク発現レベルの増加が認められている。したがって、いずれの loss of function モデルから明らかなように、NNCCS には心臓そのものが持つ抗 ROS 作用という機能が備わっていることが明らかとなった。

一方で、我々の先行研究では（J Am Heart Assoc 2013)、先述の hChAT Tg 由来の初代培養系心筋細胞が、酸素依存度はより低く、また低酸素に対して抵抗性をもつこと、また NNA loss of function 細胞では逆に酸素消費量が亢進することを既に報告している（FEBS J 2009; 276(18):5111-5125)。したがって、NNCCS の一機能的役割としては顕著な酸素消費量増加を抑制し、ROS 暴露からの回避を介し、その結果低酸素または虚血耐性を発揮することが明らかとなった。

4) hChAT KO はより全身性炎症応答を示す

hChAT Tg では、我々の先行研究ですでに報告しているように、LPS 全身投与による炎症応答または、局所性炎症モデルとしての脳凍結損傷では、炎症応答を抑制する (Brain Behav Immun 2019; 81:122-137)。したがって、hChAT KO では逆に炎症応答を過剰に惹起するのではという仮説のもと、その脾臓内での IL-6 TNF-α蛋白発現レベルをウェスタンブロット法で検討した。すると、いずれにおいても hChAT KO で両サイトカイン蛋白発現は亢進していた。また、血中 HMGB1 レベルを測定したところ hChAT KO で有意に上昇していた。以上から、NNCCS はその心臓局所においてもその影響を及ぼすが、全身炎症応答に対しても負の調節をしていることが示唆された。すなわち、NNCCS は心臓・CNS のみに限らず、おそらく迷走神経を介して全身の炎症応答にもその影響を及ぼしうることが明らかとなった。

5) hChAT KO 心筋細胞では心筋繊維の正常構造が失われ、錯綜化とミトコンドリアの形態学的異常が認められた

心不全様症状を呈した hChAT KO 心筋細胞内の器質的異常を検討するために透過型電子顕微鏡による形態学的評価を行った。コントロールマウスまた、WT に Tx を投与したマウスいずれにおいても、心筋細胞内での形態学的異常は全く認められなかった。しかし、一方で Tx 投与後 2 週間以内の hChAT KO 心臓においては、Tx 処理により、徐々に筋線維の断裂および錯綜化、また心筋繊維間に局在するミトコンドリアの縦軸長の減少と膨化および異常クリステ構造が顕著になり、断片化したようなむしろ球状のミトコンドリアの増加が

顕著となった。さらに空胞変性のような内腔が空虚な円形状の病変も、筋線維内に多く認められた。Tx 処理後 1–2 週間にその病理学的特徴は完成されることも確認した。以上から、心機能低下の一つの責任細胞内小器官はミトコンドリアであることが示唆された。

6）hChAT KO における非心臓臓器における表現型の解析

① 血液脳関門（BBB）への影響

我々の hChAT Tg を用いた先行研究では、NNCCS 機能亢進によって BBB 構成蛋白のうち claudin-5 蛋白発現レベルが亢進することを報告している。加えて、左頸部迷走神経切除を行うと、この発現亢進した claudin-5 が WT と同程度レベルまで低下することも明らかにした。hChAT Tg においては左側迷走神経活動発火頻度が WT と比較し有意に増加し、かつ迷走神経孤束核での c-Fos 陽性細胞数が有意に増加していることから、このマウスにおいては迷走神経、なかでもその求心路つまり心臓から中枢へ向かう上行路の活性化が起こっていることも明らかにした（Brain Behav Immun 2019）。そこで、hChAT KO ではその相反する現象が起こっている可能性があるという仮説のもと、hChAT KO マウス脳のうち小脳を除いた領域をサンプルとしてウェスタンブロット法で解析を行った。その結果、BBB 構成蛋白である claudin-5 に加え、occludin 蛋白発現が有意に低下していた。このことから NNCCS は迷走神経求心路を介して BBB への影響を及ぼしていることが示唆された。迷走神経の孤束核以降の投射先について、いくつかの神経核を介していることはすでに報告されているが、さらにその先の神経終末が直接的に脳血管または BBB と解剖学的接触をしているかについて、また BBB 構成蛋白発現を制御している因子については、今後の検討が必要と考えている。

② BBB 機能への影響

その構成蛋白が hChAT KO 脳では低下していることにより、実際の BBB 機能も同様に障害されている可能性を評価するために、脳凍結損傷モデルを作製した。頭皮のみを正中切開し直径 4 mm の銅製円柱棒を 5 秒間右頭蓋骨頭頂部に接触させ、その直下にある右大脳半球頭頂部で一過性に BBB 機能を低下させ、それを全身投与したエバンスブルー色素の漏出程度で評価するものである。hChAT KO ではコントロールと比較し、よりエバンスブルー色素の脳実質中への漏出が有意に亢進していた。すなわち、NNCCS 機能低下が非心臓臓器として脳へも影響し、BBB 機能維持に貢献していることが示唆された。

③ 高次中枢機能への影響

我々の先行研究では hChAT Tg マウスはより鬱応答反応が抑制されており、この表現型が迷走神経に依存すること（Clin Sci (Lond). 2016）、一方で hChAT KD では鬱応答反応がより亢進していることを報告している（J Physiol Sci 2021）。そこで、hChAT KO マウスにおいても、尾懸垂試験を行いその鬱応答反応を評価したところ、コントロールと比較して有意に無動（逃避しようともがくことを完全に諦めた状態）の時間が有意に延長した。すなわち、NNCCS 機能低下により鬱応答反応がより顕著になったことが示唆され、NNCCS 機能と中枢神経系との互いの密接な影響しあう関係が明らかとなった。

IV　　考察

1. NNCCS は心臓機能ホメオスターシスに不可欠なシステムである

ChAT 特異的 miRNA 強制発現による hChAT KD および Cre-loxP システムを用いた心臓特異的 hChAT KO、この両者いずれのマウスにおいても、心機能低下が認められた。特に後者では顕著な心不全様症状を呈していたことから、NNCCS による心筋細胞で産生される ACh には、少なくとも心筋細胞機能低下を抑制させる作用があることが確認された。ではそれに関わる責任分子としては具体的には何であろうか。我々の hChAT Tg を用いた先行研究によると、このマウス心臓で産生される ACh 含量は野生型マウス心臓の約十数倍であったが、心拍数にはまったく影響が認められず、また最大・最小血圧も低下しなかった。すなわち、定常状態の心臓において NNCCS 機能を亢進させても血行動態学的にはなんら影響は認められなかった。したがって、NNCCS 機能亢進マウスでは、過剰に産生される ACh によって心拍数が低下するような、β受容体遮断薬（βブロッカー）と類似のメカニズムによって心筋細胞保護を司っていいないことが明らかとなった。では、考えられる因子とは何か。

hChAT Tg の in vivo 心臓では糖輸送体 GLUT4 蛋白発現が亢進し、また生存シグナル PI3K/Akt パスウェイが亢進しリン酸化 Akt レベルが有意に増加していた。これに反して、NNCCS 機能低下マウスではいずれも GLUT4 発現低下と PI3K/Akt パスウェイの抑制が起こっていることから、一因子として、ACh による生存シグナルの活性化であると考えられた。我々の先行研究では、ラット初代心筋細胞および H9c2 細胞は、ACh 処理により PI3K/Akt パスウェイが活性化され、その下流活性化因子として、低酸素環境下ではないものの HIF-1α蛋白レベルが上昇することが報告されている。HIF-1αは低酸素環境に適応しその中で生存し続けるために必要不可欠な転写因子である。つまり NNCCS は恒常的に心筋細胞において ACh を産生し、この転写因子をある一定以上の基礎的レベルに維持していると考えられる。HIF-1α蛋白レベルを増加させるパスウェイには様々なものがあるが、その中にあって ACh は比較的重要度の高いものであることが hChAT KD・hChAT KO によって明らかとなった。

二つ目の因子としては、１つ目と関連するが、HIF-1αは解糖系におけるほとんどの酵素の遺伝子発現を制御しているマスター転写因子でもある。よって、ACh/HIF-1α系の亢進によって糖代謝が亢進することが考えられる。解糖系が有意に亢進する場合、それによる酸素消費量は相対的に低下する。すなわち ACh/HIF-1α系の亢進では酸素需要がより低下するため、特に心筋のような酸素要求度の高い臓器においては、一部でも酸素消費量が低下すれば、低酸素環境暴露には好都合であると考えられる。我々の hChAT Tg 由来の初代心筋細胞では、低酸素 24 時間暴露とその後の通常酸素環境へ戻した場合のエネルギー代謝変化は極めて軽微であるのに対して、野生型マウス由来の心筋細胞では低酸素から通常酸素環境への変化により、そのエネルギー代謝学的変化は有意に顕著であった（J Am Heart Assoc 2013)。このことは、やはり NNCCS 機能亢進は心筋細胞の酸素依存度を有意に抑制することを示していると考えられる。

三つ目の因子として、NNCCS による心臓 NO 産生系への関与である。hChAT KO・hChAT

KD いずれにおいても nNOS (NOS1)蛋白発現が低下した。つまり心臓内で産生された ACh は NOS 特に NOS1 発現も制御していると言える。心筋細胞で産生される NO は、それ自身でも HIF-1α蛋白レベルを正に制御し、また代謝学的にはミトコンドリアでの ATP 産生を抑制する。つまり酸素消費量を抑制性に制御する。さらに NO は心機能においては、その産生量が著しくなければ心筋に対しては保護的に働きうる。また、心臓を養う冠動脈を NO は拡張させることで冠動脈による心臓全体の還流量を増加させうる。また NO による心室コンプライアンスが増加し、より心臓が弛緩しやすくなり拡張能の増大に関与することも期待される。以上より、心臓 NO 産生系を NNCCS が制御することは、心機能保護という観点から重要な点である。

四つ目の因子は、NNCCS 機能における血管新生促進効果である。我々の先行研究でヒト血管内皮細胞 HUVEC を用いた in vitro tube formation アッセイ系では、ACh により tube formation が VEGF・HIF-1α蛋白レベル上昇とともに有意に促進されること (J Mol Cell Cardiol 2010;48(4):680-693)、hChAT Tg 心臓では左冠状動脈前下行枝閉塞による心筋梗塞後、野生型と比較して梗塞周囲に顕著な新生血管が見られた(J Am Heart Assoc 2013)。一方、hChAT KO では hChAT KD 同様心臓 VEGF 蛋白発現が有意に減少していた。hChAT KO での VEGF の蛋白発現量が顕著に低下することにより、自身の血管新生促進能が抑制されること、これも要因の一つであると示唆される。

五つ目の因子は、NNCCS 機能による ROS 消去系の維持である。いずれの NNCCS loss of function モデルでは SOD2 といった ROS 消去系の活性および蛋白レベルの低下が認められた。その結果、心臓での ROS 産生の亢進を示唆する DNA レベルの障害 (γ-H2A 蛋白レベルの増加)、nitrotyrosin レベルの増加(NO 系 ROS の増加)、MDA の増加 (脂質系 ROS の増加) が認められており(J Physiol Sci 2021)。NNCCS は ROS 消去系の制御にも関わっていることが示唆された。しかし、ACh によってどのように SOD2 をはじめ多くの消去系が正に制御されているかについては今後の研究の課題である。

六つ目の因子は、NNCCS 機能と関連するミトコンドリア機能である。心機能低下の原因の一つとして、電子顕微鏡学的検討で hChAT KO では顕著なミトコンドリア形態異常がおこることが明らかとなった。この異常なミトコンドリアでは、おそらく細胞死のトリガーとなりうる種々のマトリックス内分子の細胞質内への漏出が起こっていると考えられる。問題は NNCCS 機能低下による心筋細胞内 ACh 産生低下がどのようにして、ミトコンドリア障害に至るか、そのメカニズムはまだ不明である。しかし、NNCCS の機能としての一つの機能安定化ターゲットはミトコンドリアであることが明確になったことは、今後の研究対象の絞り込みに大きな手掛かりを与えたものと考えられた。

2. NNCCS は迷走神経を介して BBB 機能を強化し、高次機能を修飾し抗ストレス応答を亢進する

我々の先行研究で用いた NNCCS 機能を亢進させた hChAT Tg マウスは、その表現型が頸部迷走神経刺激を行った WT マウスと類似していた。すなわち hChAT Tg は抗不安・抗鬱・抗ストレス・痙攣誘発薬抵抗性という特異な表現型を呈していた。そこで、hChAT KO・ChAT KD で相反する高次機能修飾結果を示すかについて評価したところ、いずれも鬱応答亢進が認められた。このことは、NNCCS が抗鬱効果に関与することを示唆する。この高次機能

が迷走神経に依存することは、左側頸部迷走神経切除によってのみ hChAT Tg 特異的表現型が消失することから明らかではあるが、では NNCCS はどのような分子を介して心臓から中枢へ高次機能修飾を惹起する情報を伝達しているのであろうか。その一つとして NNCCS により産生される ACh の心筋細胞への作用として生じる NO によるものと考えている。なぜなら、ChAT Tg の NOS 阻害剤 L-NMMA 処理により、それら特異な表現型が消失するからである。つまり NNCCS 機能を亢進させると心筋細胞での ACh/NO 産生系が亢進し、その情報が迷走神経求心路を介して脳内での特異な表現型を惹起させていると考えられた。

前述したが、hChAT Tg が全身性炎症を抑制するのに対して、hChAT KO ではその逆で全身性炎症応答を促進させることが明らかとなった。コントロールと比較して hChAT KO 脾臓での IL-6・TNF-α蛋白発現が亢進すること、血中 HMGB1 レベルが有意に高値になることもその根拠である。同様に hChAT KO 脳での BBB 構成蛋白 claudin-5 蛋白レベルは低下していた。これが全身炎症応答亢進によるものか、それとも互いに独立して起きているかについては現在明確ではない。しかし、迷走神経終末由来の ACh にはそれ自体で抗炎症作用が認められているため、hChAT KO では心臓 ACh 産生レベルが低下することで中枢にはより炎症促進シグナルが伝達されうると考えられる。こうした状況自体が BBB 機能蛋白の発現低下の一原因と想定される。一方で、本研究においても未解決ではあるが、迷走神経求心路の終末が何らかの機序で脳血管内皮細胞と相互作用を施しながら claudin-5 蛋白発現を正に制御している可能性もあると考えられる。他の先行研究で、ACh 処理により血管内皮細胞での claudin-5 蛋白発現亢進が報告されており、迷走神経終末と脳血管内皮細胞との間に解剖学的な近接状況が明らかになれば、我々の仮説の正当性が証明されるものと考えている。BBB 機能維持は脳内炎症を制御する重要な部位である。その機能が破綻すれば血液内成分が血管外に漏出し、反応性アストロサイト・ミクログリアの活性化が起こり、炎症のさらなる拡大が起こりうる。一方で、その機能が堅固であればミクログリアの活性化やアストロサイトの応答も抑制されうるからである。

以上のように NNCCS は実は極めて心機能維持・中枢神経機能維持に重要なシステムであることが本研究で明らかとなり、それに向けた介入方法の解明によって、よりこれまでの病態介入を強力に補填しうることが期待される。

研究の成果

Kakinuma Y. Characteristic effects of the cardiac non-neuronal acetylcholine system augmentation on brain functions. Int J Mol Sci. 2021;22(2):545.

Kakinuma Y. Significance of vagus nerve function in terms of pathogenesis of psychosocial disorders. Neurochem Int. 2021;143:104934.

Oikawa S, Kai Y, Mano A, Ohata H, Kurabayashi A, Tsuda M, Kakinuma Y. Non-neuronal cardiac acetylcholine system playing indispensable roles in cardiac homeostasis confers resiliency to the heart. J Physiol Sci. 2021;71(1):2.

（なおｈChAT KOに関しては現在論文準備中）

令和５年１２月発行

がん・心臓病の基礎的、先駆的研究事業報告書

発　行　　公益財団法人車両競技公益資金記念財団
東京都文京区本郷 3-22-5
住友不動産本郷ビル８階
電話 03-5844-3070(代表)　http://www.vecof.or.jp/

発行者　　田宮　治雄

印　刷　　㈱サンワ

印刷 5.12.200