

**「疾患における代謝産物の解析および代謝制御に基づく
革新的医療基盤技術の創出」
研究領域 領域活動・評価報告書
－2018年度終了研究課題－**

研究総括 小田 吉哉

1. 研究領域の概要

本研究領域は創薬・診断・予防といった医療応用を見据え、生体内化合物の動態解析を出発点とした、疾患を反映する代謝産物等の探索およびその情報に基づく標的分子の分析を加速する技術の創出を目的とします。

具体的には、新規疾患関連因子の発見につながる超高感度検出技術、見出された因子の同定技術・定量計測技術、そしてこれらのスループットを飛躍的に高める技術や多種因子同時分析技術、各種情報技術等を開発します。また、既知の生理活性化合物が作用する代謝産物やタンパク質、代謝経路の特定を通じて、医療応用につなげるための標的分子を解析する一連の技術群の開発・高度化もあわせて行います。これらの成果により技術的アプローチを多様化し、医療応用を目指す上で標的となりうる生体内分子を核としたヒト疾患制御の概念実証に貢献します。

本研究領域ではナノテクノロジー、合成化学、工学等の分野とライフサイエンスの融合研究を積極的に支援し、イノベーションの源泉を涵養します。また、対応する CREST「疾患における代謝産物の解析および代謝制御に基づく革新的医療基盤技術の創出」研究領域(以下「CREST 対応領域」と表記。2015年4月1日付けで国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED)に移管)とは緊密に連携して運営します。そのため、独立した研究者として各研究課題を担うさきがけ研究者には、CREST 研究領域と有機的なつながりを持ったバーチャル・ネットワーク型研究所の一員としての活躍にも強く期待します。

2. 事後評価対象の研究課題・研究者名

件数：8件

※研究課題名、研究者名は別紙一覧表参照

3. 事前評価の選考方針

選考の基本的な考えは下記の通り。

- 1) 選考は、「疾患における代謝産物の解析および代謝制御に基づく革新的医療基盤技術の創出」領域に設けた選考委員10名の協力を得て、研究総括が行う。
- 2) 選考方法は、書類選考、面接選考及び総合選考とする。
- 3) 選考に当たっては、さきがけ共通の選考基準
(<http://www.jst.go.jp/pr/info/info1128/sankou2.html>)
の他、以下の点を重視した。

研究構想の意義、研究計画の妥当性と独創性、準備状況と提案課題の実現性、ブレークスルーを感じさせるもの、世界での競争力のあるものを考慮し、またさきがけの趣旨に照らして、研究課題とその実施体制の独立性、ならびに新課題への挑戦性などを重視した。特に、研究領域名にある「疾患における代謝産物」は、大腸菌や酵母等ではなく「ヒトの疾患における代謝産物」という点を念頭において選考した。

4. 事前評価の選考の経緯

一応募課題につき領域アドバイザーの内3名が書類審査し、書類選考会議において面接選考

の対象者を選考した。続いて、面接選考および総合選考により、採用候補課題を選定した。

選考	書類選考	面接選考	採択数
対象数	173件	20件	8件

5. 研究実施期間

2015年10月～2019年3月

(押海研究者は2015年11月～2019年3月)

6. 領域の活動状況

さがけ単独領域会議:6回

CREST・さがけ合同領域会議:5回

研究総括(または技術参事)の研究実施場所訪問:

研究開始後に、研究総括と技術参事(さらに可能であれば領域担当)が研究実施場所を訪問し、さがけ研究課題の設定に至った経緯、研究の進捗状況、研究体制(学生や研究補助者)、実験施設や機器類などについてヒアリングを行った。また、法令等の遵守と安全衛生の確保の観点からも、研究費の適切な執行や試薬管理方法の確認を行い、スプリンクラーや消火器の設置場所、地震対策などについても注意を喚起した。上司と会見出来た場合には、さがけ研究の実施についての協力依頼も行った。

SciFoS(Science for Society)活動:

2016年度に本領域の研究者2名が参加した。

報告書:https://www.jst.go.jp/kisoken/presto/research/scifos28_2.pdf

7. 事後評価の手続き

研究者の研究報告書を基に、評価会(研究報告会、領域会議等)での発表・質疑応答、領域アドバイザーの意見などを参考に、下記の流れで研究総括が評価を行った。

(事後評価の流れ)

2019年2月 研究総括による事後評価

2019年3月 被評価者への結果通知

8. 事後評価項目

- (1) 研究課題等の研究目的の達成状況
- (2) 研究実施体制及び研究費執行状況
- (3) 研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)
- (4) 世界レベルの若手研究リーダーの輩出の観点から、本さがけ研究が、研究者としての飛躍につながったか(今後の期待を含む)

9. 評価結果

いずれの研究課題も、独創性や挑戦性、さらには社会的課題への対応等の観点から、所期の

目的を達成できたと思われる。

オリジナリティが高く、成果(技術)の社会実装が見込める野心的な課題という観点から、伊藤研究者の研究課題である「代謝産物によるユビキチンリガーゼ制御工学の確立」においては、化合物が結合したセレブロンが基質をどのように認識するのかについて構造基盤を解明し、タンパク質分解を制御する化合物による創薬という新たな地平を開拓しつつあり、国際的にも極めて高い評価を得ている。本さがけの成果を含む論文の引用数は、ある調査で 2,000 を超えるに至っている。本さがけの評価対象課題のうちで、「代謝制御に基づく革新的医療基盤技術の創出」という本さがけ領域の目的に照らして、特に顕著な成果と思われる。

疾患に関連する代謝産物に焦点を当て、それらの分析法の開発や関連因子(タンパク質、tRNA、マイクロ RNA 等)の解析技術に関する研究開発の観点から、魏研究者の研究課題である「RNA モドミクスの確立及び神経・精神疾患への応用」においては、トリプル四重極質量分析計を導入し、ヒトに存在する 50 種類以上の RNA 修飾を標的に高感度かつ迅速で汎用性の高い RNA 修飾解析法を確立した。次に同方法を用いた精神遅滞の発症に関わる Ftsj1、ミトコンドリア脳筋症の発症に関わる Mtu1 や Mto1 などの酵素について RNA 修飾の探索を行ない tRNA の修飾様式を明らかにした。開発された技術は他大学病院からの引き合いが多数ある。ミトコンドリア脳筋症における脳卒中様発作の抑制に効果があるタウリン散剤が 2019 年 1 月に承認された。この薬剤の普及には、今回のさがけの成果が必須になると予想される。

同様に解析技術に関する研究開発の観点から、押海研究者の研究課題である「エクソソーム RNA 解析によるインフルエンザの予防・診断・治療基盤技術の創出」においては、インフルエンザワクチンの副反応に焦点を絞り、副反応が生じるメカニズムを解明することで、副反応リスクを予測する検査方法を開発することを目的として研究を進めた。自然免疫応答に関する Zyxin タンパク質の機能、細胞外小胞や microRNA の機能について新たな発見があり、社会的にも大きな問題となっている「ワクチン接種後の副反応リスク」を予め調べる検査キットの開発につながる事が期待される。

新課題への挑戦性の観点から、加藤研究者の研究課題である「ヒト shRNA と微生物 cDNA を利用した機能的ゲノミクス・スクリーニングに基づく新しい代謝標的がん治療開発技術の創出」においては、ヒトがん細胞の代謝ホメオスタシスに揺さ振りを仕掛けて、がん細胞の増殖を抑制するという大胆な発想が基礎段階として成功しつつある。精力的に研究し、エレガントな新しい機能的ゲノミクス・スクリーニング法を開発できたことが飛躍につながった。「代謝制御に基づく革新的医療基盤技術の創出」という本さがけ領域の目的に照らして、顕著な成果と思われる。

ブレークスルーを感じさせる研究開発という観点から、北研究者の研究課題である「LA-LDI MS を用いた標的タンパク質の結合位置解析法の開発」においては、新規なピレン誘導体を創成し「マトリクス不要のレーザー脱離イオン化質量分析法(LA-LDI MS)」を用いて、標的タンパク質とリガンドの結合位置を著しく高精細に解析出来るようになった。この手法は、分子メカニズムの基礎研究は勿論のこと、創薬のための有用な情報取得のためにも極めて重要である。また、神経毒リガンドの作用メカニズムの研究もおこなっており、将来的には創薬につながる成果も期待される。

わが国では精神疾患が最も主要な疾患となった。そこで、林(高木)研究者の研究課題である「ストレス応答代謝産物を基軸としたシナプス病態解析技術の創出」においては、シナプス変性症という疾患に着目し、世界で初めての優れた併存症マウスモデル(精神疾患と糖尿病)が開発された。また、統合失調症モデルとして確立している *in vitro* 病態モデルにつき、培養条件検討を徹底的に行い、創薬スクリーニングに耐えうる優れた培養系を確立した。このスクリーニング培養系を利用し、既知活性化合物ライブラリ(1,280 化合物)から 1 次、2 次のスクリーニングにより、シナプス保護効果があり終末糖化産物を軽減する 18 化合物を得た。現在、3 次スクリーニングが進行中である。またスクリーニング系の高効率化のため、細胞全体の表現系を自動定量するための、AI(人口知能)創薬手法の確立も試みている。

腸内細菌叢やその代謝産物のバランスが一度破綻すると、様々な疾患に繋がることが知られているが、細菌叢由来の代謝産物の詳細な産生経路は不明な点が多い。福田研究者の研究課

題である「腸内代謝産物を標的とした疾患予防・治療基盤技術の創出」においては、腸内細菌叢由来の代謝物質に着目し、腸管内におけるそれらの産生量を自在に制御するための方法論の確立を、マイクロ流体デバイス技術や、メタボロミクス(キャピラリー電気泳動-質量分析計による)とメタゲノミクス(16S rRNA 遺伝子を標的としたアンプリコンシーケンスによる)を組み合わせたメタボロゲノミクスアプローチにより試みた。この成果により、腸内環境を標的とした創薬による疾患治療や、食を介した腸内環境の調節のための革新的な健康基盤技術の創出が可能になると期待される。

薬剤による代謝ネットワークへの影響は殆どわかっていない。柚木研究者の研究課題である「トランスオミクス解析による多剤併用療法の合理的設計と多因子代謝疾患の制御」においては、まず第1のステップとして「地図」となる多階層代謝制御ネットワークを再構築し、次いで第2のステップとして、得られたネットワーク情報に基づいて多因子標的を同定し、この多因子標的を制御する最適な薬剤組合せを探索するアプローチを目指した。マウス肝臓に2型糖尿病薬メトホルミンを投与する系を確立し、多階層代謝制御ネットワーク再構築の準備が整った。また、改良型トランスオミクス解析の手法開発、3階層(トランスクリプトーム階層、リン酸化プロテオーム階層、メタボローム階層)統合ソフトウェアの開発などもおこない、ウェット系とドライ系の両面から創薬基盤技術の確立を目指した。

本さがけ疾患代謝領域の単独領域会議やAMED-CREST 疾患代謝領域との合同領域会議において、第2期生の研究者8名は研究総括、領域アドバイザー、第1期生7名、CREST 対応領域の研究者と活発に議論を行った。またこれらの領域以外の研究者とも積極的にコンタクトし、多くの共同研究につながり、また成果発表も精力的に行ったことは高く評価できる。

以上のように、2期生の採択は8名であったが、革新的医療基盤技術の創出につながると期待される重要な成果が多数得られたと評価している。一部の研究課題では、既に国内外のアカデミアや産業界の診断・医療などの分野の研究者との連携が始まっており、今後のさらなる研究展開や社会実装が効率的に展開することを期待している。

1. 伊藤 拓水 研究者「代謝産物によるユビキチンリガーゼ制御工学の確立」

伊藤研究者が以前にサリドマイド結合因子として単離・同定したタンパク質であるセレブロン(CRBN)は、サリドマイドや代謝物などの結合リガンドに応じて基質が切り替わるというユビキチンリガーゼとして機能することがわかってきており、世界的にも注目を集めている。結合リガンドを工夫すれば「壊したいタンパク質を、自在に分解する薬剤」の開発も可能になると期待されている。例えば、がん細胞のタンパク質を特異的に壊す薬剤の開発も考えられる。

本課題では、セレブロンに結合する天然物・関連化合物リガンドの探索を行い、新たな結合化合物を発見した。また、既知の結合化合物であるグルタルイミドについてフタルイミドやイソインドリノンなどの基質認識モイエティについての分析を行った。さらに、セレブロン結合化合物は接着剤として機能することで、基質とセレブロンの結合を仲介することを明らかにした。セレブロン(Cereblon)とCC-885, GSPT1との結合のX線結晶構造解析は特に顕著な成果である。

サリドマイドの右手側(R体)は左手側(S体)の6-10分の1程度の強さでセレブロンに結合することも明らかとなった。基質認識能についてもS体の方が強く、R体の活性は弱い、催奇性も存在しており、光学分割しても有用な作用と副作用を分けることはできないことが判明した。このように科学的・技術的な観点から大きな貢献があった。

社会的・経済的な観点からも、セレブロン結合因子の解析から新たな薬剤開発および用途を見出すことも成功し、セレブロンユビキチンリガーゼの制御の理解は大幅に進んだ。現在開発が行われているセレブロン制御系薬剤(セレブロンモジュレーター・CRBN-based PROTACs)といった次世代タンパク質分解創薬において大きな貢献をした。産業界との連携も行われている。今後様々な疾患について、ユビキチンリガーゼ制御工学を展開することを期待する。

2. 魏 范研 研究者「RNA モドミクスの確立及び神経・精神疾患への応用」

(1)トリプル四重極質量分析装置を用いたハイスループットRNA修飾解析法の確立、(2)同解

析法を用いて神経・精神疾患と関連する RNA 修飾の同定ならびに RNA 修飾破綻による疾患発症の分子メカニズムの解明、(3) RNA 修飾欠損に起因する神経・精神疾患に対して新規診断法の確立、以上3項目について研究開発を行なった。

具体的には、トリプル四重極質量分析計(Shimazu LCMS8050)を導入し、ヒトに存在する 50 種類以上の RNA 修飾を標的に測定パラメーターの最適化や試料処理法の最適化を図り、高感度かつ汎用性の高い RNA 修飾解析法を確立した。次に同方法を用いた精神遅滞の発症に関わる Ftsj1、ミトコンドリア脳筋症の発症に関わる Mtu1 や Mto1 などの酵素について RNA 修飾の探索を行ない tRNA の修飾様式を明らかにした。

次に、それぞれの酵素を欠損したマウスを作製して解析し、神経細胞におけるタンパク質翻訳の低下による記憶学習障害(Ftsj1 欠損)、ミトコンドリアのタンパク質翻訳の低下による肝障害や心不全の誘発(Mtu1 欠損や Mto1 欠損)が見られた。これらの遺伝子欠損マウスは、ヒトの神経・精神疾患の症状と類似することから、ヒトにおいても同様な機序で疾患が発症すると推察されたのは興味深い。

次に、tRNA 修飾を標的とする新規診断法の開発として、タウリン修飾を含有するミトコンドリア tRNA に変異を持つミトコンドリア病患者を対象に尿検体を収集し、タウリン修飾ヌクレオシドを RNA Modomics システムを用いて測定した。その結果、健常人と比較して、ミトコンドリア病患者では尿中タウリン修飾が有意に低下していた。よって、RNA 修飾がタンパク質翻訳に必要不可欠であり、その破綻が神経・精神疾患の発症原因となることが示唆された。本研究で確立した RNA Modomics システムはミトコンドリア病の非侵襲的な診断に有用であることが明確に示された。今後、様々な疾患と tRNA 修飾との関連が明らかになることを期待する。

このように科学的・技術的な観点から大きな貢献があった。また、他にも未公表の興味深い成果がいくつかあり、今後の展開が期待される。

従来の RNA 修飾の解析は、極細キャピラリーや超精密質量分析計によって行われてが、試料の準備が煩雑で、また一回の分析が非常に時間を要するため、臨床検査への応用が困難であった。そこで、本研究では、実用的な RNA 修飾分析法の実現を目標とし、普及しつつあるトリプル四重極質量分析計を導入し、システムの最適化を行った。まず、超高速液体クロマトグラフィーの最適化により、一回の分析を 15 分で完了することに成功し、多検体の迅速な処理が可能となった。また、質量分析については修飾 RNA ヌクレオシドの標準品を用いて多重モニタリング法(MRM)のパラメーター最適化を行い、fmol レベルのヒト tRNA 修飾の検出に成功した。さらに、生体試料についても前処理の最適化を実施し、処理ステップの削減など、汎用性の高い分析法の確立に成功した。本技術は他大学病院からの引き合いが多数ある。また、細胞質の障害を克服できる薬剤候補の発見にも成功しており、創薬への展開が期待される。このように社会的・経済的な観点からも大きな貢献があった。

本さがけ研究の成果や領域内外での交流の成果により、国際学会の招待講演が増え、研究者としての飛躍につながった。

3. 押海 裕之 研究者「エクソソーム RNA 解析によるインフルエンザの予防・診断・治療基盤技術の創出」

インフルエンザワクチンの副反応に焦点を絞り、副反応が生じるメカニズムを解明することで、副反応リスクを予測する検査方法を開発することを目的として研究を進めた。

自然免疫のメカニズムとして、Zyxin と呼ばれていたタンパク質が、I 型インターフェロンや IL-6 などの炎症性サイトカイン産生に重要な役割をすることを発見し、そのメカニズムを解明した。また、自然免疫応答に影響を与える新たな因子としての細胞外小胞に着目し、肝細胞から放出される細胞外小胞がマクロファージによる NK 細胞活性化を制御することを発見した。

このような細胞外小胞が自然免疫を制御するメカニズムとして、microRNA が重要な役割をすることを発見した。ヒトの血液中に含まれる microRNA について網羅的に解析したところ、miR-451a と呼ばれる microRNA が豊富に存在し、これが、数ヶ月をかけてゆっくりと変動すること、また、細胞外小胞内の miR-451a が生体内でのマクロファージの自然免疫応答の強さを制御することを発

見した。

このように科学的・技術的な観点から大きな貢献があった。また、他にも未公表の興味深い成果がいくつかあり、今後の展開が期待される。

これらの発見をもとに、インフルエンザワクチンを含む不活化ワクチンによる副反応を予測する方法として、血中の細胞外小胞内 microRNA をバイオマーカーとできることを発見し特許を出願した。ワクチン接種後の副反応リスクを予め調べる検査キットにつながることを期待される。このように社会的・経済的な観点からも大きな貢献があった。

4. 加藤 洋人 研究者「ヒト shRNA と微生物 cDNA を利用した機能的ゲノミクス・スクリーニングに基づく新しい代謝標的がん治療開発技術の創出」

ヒトがん細胞の代謝ホメオスタシスに揺さ振りを仕掛ければ、がん細胞の増殖を抑制出来るのではないかという大胆な発想のもと、大腸菌 cDNA とヒト代謝関連遺伝子 shRNA の網羅的レンチウイルスライブラリを作製して機能ゲノミクス・スクリーニングの手法を開発し、解析をおこなった。

その結果、同じヒトがん細胞株を用いた大腸菌 cDNA スクリーニングとヒト shRNA スクリーニングで、同様の代謝経路に関連する遺伝子が共通してがん細胞の増殖を抑制する候補として同定されていることも多くみられた。この興味深い結果により、ある種のがん症例に対して特異的な代謝経路に介入するようながん治療法の有用性が改めて示唆された。

このように、発がん分子メカニズムの本態解明に繋がるような新規標的遺伝子、あるいは新しいがん治療標的の候補となる代謝産物や代謝経路の探索に成功した。また、他にも未公表の興味深い成果が多数あり、今後の論文発表や研究展開が大いに期待される。これからも新しいがん治療の展開に繋がるような研究を推進してほしい。このように挑戦が成功し、科学的・技術的な観点から大きな貢献があった。

開発された新しい機能的ゲノミクス・スクリーニングは共同研究などによりさらに改良され、アカデミアや産業界の様々な研究分野で利用される可能性を秘めている。また、がん細胞の代謝ホメオスタシスに揺さ振りを仕掛ける本手法は「代謝制御に基づく革新的医療基盤技術の創出」という本さきがけ領域の目的にも合致している。このように社会的・経済的な観点からも大きな貢献があった。

5. 北 将樹 研究者「LA-LDI MS を用いた標的タンパク質の結合位置解析法の開発」

生理活性を有する化合物(リガンド)が結合する標的タンパク質の同定やその結合様式の解明は、分子メカニズムの基礎研究としてまた創薬のための情報としても重要である。結合様式の解析には、X線やNMRが頻用されるが、これらの手法の適用が困難な場合は、リガンドに反応性官能基と検出基を導入した誘導体(ケミカルプローブ)を用いる手法がある。本研究は特に検出基の開発に注力することで、従来にないピレン誘導体の創成とラベルペプチドの検出の顕著な高度化を達成したものである。この高度化とは、マトリックス不要のレーザー脱離イオン化質量分析法(LA-LDI MS)を用いて、標的タンパク質とリガンドの結合位置を著しく高精細に解析するものである。実験手法において時として試料の脱塩が困難で、その後の解析が困難になる場合があるが、地道な努力で効率的な脱塩法も開発し、目的を達成できた。

また、リジン残基-プローブ間で共有結合させた中間体に基づく covalent-Dock 計算により、プローブでラベル化されたアミノ酸残基の情報から、もとのリガンドの結合様式を精密に決定する手法も開発した。

さらに、有毒哺乳類ブラリナトガリネズミの麻痺性神経毒 BPP1,2 の全アミノ酸一次配列を決定し、BPP 類の3つのジスルフィド結合の結合様式を推定するなど、研究は広範囲に展開している。

また、現時点で未発表の顕著な成果も多数有り、そのどれもが将来の発展を期待させるものである。

このように優れたアイデアが結実し、科学的・技術的な観点から大きな貢献があった。

本さきがけ研究の顕著な成果が認められ、国際学会の招待講演が増え、本分野のトップランナーの一人として注目されるようになり、研究者としての飛躍につながった。今後は、優れたアイデ

アを駆使して、アプシロニン A のアクチン・チューブリンとの三元複合体の解析など、より困難な課題にも精力的に挑戦して先駆的成果を継続して達成して欲しい。

これまでの優れた研究成果や現時点で未発表の顕著な成果により、新規プローブや LA-LDI MS による解析手法について知的財産を確保出来る可能性が高いと思われる。また、新規プローブの開発と LA-LDI MS 解析により、炎症や痛みの特異的に働く神経毒リガンドの作用メカニズムを解明することにより、創薬につながる成果も期待される。このように社会的・経済的な観点からも大きな貢献があった。

6. 林(高木) 朗子 研究者「ストレス応答代謝産物を基軸としたシナプス病態解析技術の創出」

わが国では精神疾患が最も主要な疾患となった。脳機能は全身性の細胞応答が大きくかわるという、“臓器連関”(もしくは“病態連関”)という概念が提唱され始めている。体の状態と心の状態が相互作用するという事は、例えば精神疾患と糖尿病の併存症は、双方向性に両疾患を増悪させることが良く知られている。

そこで本研究では、併存症モデルマウスを作成し、その増悪メカニズムを調べるために、縦断的行動解析、各種代謝産物の測定と *in vivo* 2 光子励起イメージングを併用した。慢性ストレス下では、活動期である暗期の活動量が低下し、糖尿病モデルでは、高血糖誘導とともに概日リズムが障害される個体も観察された。このように、2 光子励起イメージングという有力な解析法も活かし、代謝異常や慢性ストレスなどの摂動の前後での活動量を観察する世界で初めての優れた併存症マウスモデルが開発された。このように優れたアイデアと粘り強い努力により、科学的・技術的な観点から大きな貢献があった。また、他にも未公表の興味深い成果が多数あり、今後の展開が期待される。

また、精神疾患の原因の一つと考えられるシナプトパチー(シナプス変性症)については、単一の分子に着目した創薬戦略には限界があり、細胞の表現型(シナプトパチーおよび糖化ストレス産物の細胞内蓄積)に着目したドラッグスクリーニングの技術開発が有効と考えた。統合失調症モデルとして確立している *in vitro* 病態モデルにつき、培養条件検討を徹底的に行い、スクリーニングに耐えうる優れた培養系を確立した。また、興奮性シナプス後部である樹状突起スパインの一部にペントシジンが蓄積しており、シナプスにおける局所的な糖化ストレスをはじめて示した例であり興味深い。

このスクリーニング培養系を利用し、既知活性化化合物ライブラリ(1,280 化合物)から 1 次、2 次のスクリーニングにより、シナプス保護効果があり終末糖化産物を軽減する 18 化合物を得た。このうちの約半数は、既に神経保護作用がある(又は保護作用があることが薬理的に想定される)化合物であったが、残り約半数は神経科学領域においてほぼ無名の化合物であった。現在、3 次スクリーニングが進行中である。またスクリーニング系の高効率化のため、細胞全体の表現系を自動定量するための、AI(人工知能)創薬手法の確立も試みているとのことで、この大規模スクリーニング系が確立すれば様々な創薬研究に展開できると期待される。このように社会的・経済的な観点からも大きな貢献があった。今後は知的財産の確保にも注力してほしい。

本さがけ研究の成果や領域内外での交流の成果により科研費新学術領域「マルチスケール精神病態の構成的理解」(代表)の採択に至り、国際学会の招待講演が増え、研究者としての飛躍につながった。

7. 福田 真嗣 研究者「腸内代謝産物を標的とした疾患予防・治療基盤技術の創出」

腸内細菌叢由来の代謝物質が消化管内にどのように局在し、どのような腸内細菌の代謝で産生されるのかの情報は少ない。そこで、無菌マウスおよび腸内細菌叢を有する SPF (specific pathogen free) マウスの消化管内の腸内細菌叢プロファイルおよび代謝物質プロファイルの網羅的解析をおこない、アミノ酸や糖質などの分布が消化管各部位で大きく異なり、それらと関連し腸内細菌叢プロファイルも変化することが明らかとなった。腸内環境の調節のための重要な基本情報と思われる。

また、腸内環境評価手法として、腸内細菌叢のメタゲノム解析と腸内代謝物質のメタボローム解析を組み合わせたメタボロゲノミクス(メタボロミクス+メタゲノミクス)を新たに考案した。本手法で、モデル実験系として SPF マウスへの欧米食摂取試験を実施したところ、短鎖細胞酸の一つである酪酸の産生量と酪酸産生遺伝子、および酪酸産生菌の割合が相関することが明らかとなった。また、慢性腎臓病についても、マウスモデルで腸内細菌叢由来の尿毒症物質を複数同定した。さらに、腸内細菌叢由来の代謝物質中には、慢性腎臓病を増悪する尿毒症物質に加えて、腎機能を保護する代謝物質も同時に存在する可能性が示唆された。

腸管感染症と腸内細菌叢との関係においても、新生仔マウス由来の腸内細菌叢から産生されるコハク酸が、腸管内の酸素濃度を低下させることで、クロストリジウム目細菌群の腸内環境への定着を促し、結果として腸内細菌叢が成熟化することで腸管感染症への抵抗性が高まることが明らかとなった。腸管感染症に対する新たな予防・治療戦略につながる事が期待される。

このように、新たに考案したメタボロゲノミクスにより、宿主-腸内細菌叢間の相互作用、宿主恒常性維持、疾患発症に関わる分子機構の一端が明らかとなり、科学的・技術的な観点から大きな貢献があった。また、他にも未公表の興味深い成果が多数あり、今後の展開が期待される。

メタボロゲノミクスの手法開発とともに、マイクロ流体デバイス技術の開発と応用についても、本さきがけ領域内外の共同研究を積極的におこなった。また、疾患の早期診断につながる技術開発においても未公表の興味深い成果が多数あり、今後の権利化や社会実装の取り組みが期待される。このように社会的・経済的な観点からも大きな貢献があった。

本さきがけ研究の成果や領域内外での交流の成果により、国際学会の招待講演が増え、研究者としての飛躍につながった。

8. 柚木 克之 研究者「トランスオミクス解析による多剤併用療法の合理的設計と多因子代謝疾患の制御」

薬剤治療において多剤併用の合理性を予測することは困難な場合が多い。なぜなら、日本国内で承認されている化合物ベースの薬剤約 1,500 種類のうち、分子間相互作用ネットワークのグローバルな応答として薬理作用が理解されているものは残念ながらほとんど存在しないからである。

そこで本課題では多因子代謝疾患のメカニズムを解明し、疾患制御につなげるために、マウス肝臓に 2 型糖尿病薬メトホルミンを投与し、生理的応答である血糖値上昇抑制および生化学的応答である肝臓における AMPK リン酸化亢進の両者をマウスにおいて測定できる実験系を確立した。本実験系の確立には本さきがけ領域内の他の研究者の有益な助言も貢献している。調製されたマウス肝臓サンプルについては順次品質評価を行い、2018 年 12 月現在、オミクス計測に供する準備段階にある。メトホルミンの薬剤応答ネットワークは 2019 年 3 月頃の再構築完了を目指しているとのことで、その成果が期待される。

また、トランスオミクス解析の拡張・改良として、これまでのメタボロームデータの代わりに炭素 13 で標識した同位体メタボロームデータを用いる改良型トランスオミクス解析の手法開発、RNA など比較的変動が遅い遺伝子発現のオミクス階層による階層縦断的代謝制御を対象とする拡張版トランスオミクス技術などを開発した。このように、未経験の分野に挑戦し、科学的・技術的な観点から大きな貢献があった。また、他にも未公表の興味深い成果が多数あり、今後の展開が期待される。

さらに、メタボロームおよびリン酸化プロテオームデータの解析ソフトウェア開発として、アカデミアや産業界の研究者がトランスオミクス解析を実施しやすくするために、グラフィカル・ユーザー・インターフェースにより解析を実行するソフトウェアの開発もおこなった。トランスクリプトーム解析ソフトウェアおよび 3 階層(トランスクリプトーム階層、リン酸化プロテオーム階層、メタボローム階層)統合ソフトウェアの開発もおこなった。このように社会的・経済的な観点からも大きな貢献があった。今後はソフトウェアの活用・普及と知的財産の確保にも注力してほしい。

ドライ分野出身である柚木研究者にとって、ウェット分野の実験系を立ち上げて軌道に乗せるには多大の困難があったと思われるが、本さきがけ研究で、それをやり遂げたことは今後の研究

展開のために貴重な経験になったと思われる。また、本さきがけ研究の成果や領域内外での交流の成果により林(高木)研究者が代表の科研費新学術領域「マルチスケール精神病態の構成的理解」への参画に至り、研究者としての飛躍につながった。今後もドライ系とウェット系の両方が分かる研究者として活躍の場を広げていくことが期待される。

10. 評価者

研究総括 小田 吉哉 エーザイ(株) 筑波研究所 執行役員・シニアディレクター／
東京大学大学院医学系研究科 リポドミクス社会連携講座 特任教授

領域アドバイザー(五十音順。所属、役職は2019年3月末現在)

飯田 順子 (株)島津製作所 分析計測事業部 ライフサイエンス事業統括部 シニアマネージャー

石濱 泰 京都大学大学院薬学研究科 教授

上杉 志成 京都大学化学研究所／物質-細胞統合システム拠点 教授

浦野 泰照 東京大学大学院薬学系研究科／医学系研究科 教授

北野 宏明 システム・バイオロジー研究機構 会長／

沖縄科学技術大学院大学 教授

澤田 拓子 塩野義製薬(株) 取締役副社長

清水 孝雄*1 国立国際医療研究センター 脂質シグナリングプロジェクト長／

東京大学大学院医学系研究科 特任教授

曾我 朋義 慶應義塾大学先端生命科学研究所 教授

富澤 一仁 熊本大学大学院生命科学研究部 教授

福崎 英一郎 大阪大学大学院工学研究科 教授

眞野 成康 東北大学病院 教授・薬剤部長

*1 2017年6月～2019年3月まで参画

(参考)

件数はいずれも、2019年3月末現在。

(1)外部発表件数

	国内	国際	計
論文	23	91	114
口頭	209	33	242
その他	18	5	23
合計	250	129	379

(2)特許出願件数

国内	国際	計
10	4	14

(3)受賞等

・伊藤 拓水

東京医科大学 佐々記念賞(2017.6)

日本分子生物学会 ポスター賞(2016.12)

・魏 范研

日本生理学会 日本生理学会奨励賞(2016.3)

熊本医学会 熊本医学会奨励賞(2017.3)

・北 将樹

筑波大学 2016 年度ベストファカルティメンバー(2017.2)

・福田 真嗣

バイオインダストリー協会 第 1 回バイオインダストリー奨励賞(2017.10)

安藤スポーツ・食文化振興財団 第 21 回安藤百福賞発明発見奨励賞(2017.3)

文部科学省科学技術・学術政策研究所 科学技術への顕著な貢献 2015(2016.2)

(4)招待講演

国際 21 件

国内 165 件

別紙

「疾患における代謝産物の解析および代謝制御に基づく革新的医療基盤技術の創出」領域
事後評価実施 研究課題名および研究者氏名

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職(2019年3月末現在) (応募時所属)	研究費 (百万円)
伊藤 拓水 (兼任)	代謝産物によるユビキチンリガーゼ制御工学の確立 (東京医科大学ナノ粒子先端医学応用講座)	東京医科大学ナノ粒子先端医学 応用講座 准教授 (同上 講師)	40
魏 范研 (兼任)	RNA モドミクスの確立及び 神経・精神疾患への応用 (熊本大学大学院生命科学研究部)	熊本大学大学院生命科学研究部 准教授 (同上 講師)	55
押海 裕之 (兼任)	エクソソーム RNA 解析による インフルエンザの予防・診断・ 治療基盤技術の創出 (熊本大学大学院生命科学研究部)	熊本大学大学院生命科学研究部 教授 (北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター 准教授)	50
加藤 洋人 (兼任)	ヒト shRNA と微生物 cDNA を 利用した機能的ゲノミクス・ スクリーニングに基づく新しい 代謝標的がん治療開発 技術の創出 (東京医科歯科大学難治疾患 研究所)	東京医科歯科大学難治疾患研 究所 助教 (同上)	43
北 将樹 (兼任)	LA-LDI MS を用いた標的タン パク質の結合位置解析法 の開発 (名古屋大学大学院生命農 学研究科)	名古屋大学大学院生命農学研 究科 教授 (筑波大学数理物質系 准教授)	41
林(高木) 朗子 (兼任)	ストレス応答代謝産物を基 軸としたシナプス病態解析 技術の創出 (群馬大学生体調節研究 所)	群馬大学生体調節研究所 教授 (東京大学大学院医学系研究科 特任講師)	40
福田 真嗣 (兼任)	腸内代謝産物を標的とした 疾患予防・治療基盤技術の 創出 (慶應義塾大学政策・メディ ア研究科)	慶應義塾大学政策・メディア研 究科 特任准教授 (同上)	40
柚木 克之 (兼任)	トランスオミクス解析による 多剤併用療法の合理的設 計と多因子代謝疾患の制御 (理化学研究所統合生命医 科学研究センター)	理化学研究所統合生命医科学 研究センター 上級研究員 (東京大学大学院理学系研究科 助教)	40

研究報告書

「代謝産物によるユビキチンリガーゼ制御工学の確立」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015年10月～2019年3月

研究者: 伊藤 拓水

1. 研究のねらい

近年、薬剤開発の進歩は目覚ましくキナーゼ阻害剤など分子標的薬が次々と生み出されている。核酸医薬の開発も努力されている。しかしながら、神経変性疾患など異常タンパク質が蓄積することにより引き起こされる疾患については、mRNA レベルの抑制よりもタンパク質レベルで分解を誘導することができればより効果的と考えられるが、「壊したいタンパク質を、自在に分解する薬剤」の開発は未だ進んでいないのが現状である。そんな中、本研究者が以前にサリドマイド結合因子として単離・同定したタンパク質であるセレブロン(CRBN)は、サリドマイドや代謝物などの結合リガンドに応じて基質が切り替わるユビキチンリガーゼとして機能することがわかってきた。セレブロンの C 末領域にはリガンド結合ポケットがあり、ウリジンおよび関連代謝産物が結合することも分かった。しかしながら、この結合およびその後の基質認識など下流が明らかにされているリガンドは人工のものがほとんどであり、セレブロンが本来どのような構造のリガンドの結合親和性が高く、それらを介していかなる生体内反応の変化・調節を担うのかについては未だ殆どが謎に包まれている。セレブロンはリガンドと結合することで新しい基質認識能を獲得できることから、その機能および生体内リガンド(代謝産物)の単離・解析研究は、疾患原因タンパク質を自在に分解する革新的医療法への応用につながる。本研究では、主にリガンド応答性ユビキチンリガーゼであるセレブロンの有する代謝物・関連化合物結合活性に焦点を当てる。本因子の代謝経路における生化学的役割および、セレブロンに結合するリガンド(代謝産物・関連化合物)の結合法則や基質切り替わりのルールを明らかにすることにより、最終的には代謝産物など化合物によるユビキチンリガーゼ制御工学の基盤確立を目指す。また本研究では既存のセレブロン結合薬剤(サリドマイドなど)の効果に対する代謝産物の影響も検証する。ユビキチンリガーゼ制御工学の確立は、タンパク質分解系を能動的に代謝産物・関連化合物でコントロールすることに基づき、様々な疾患に対する医療基盤導出に貢献することが期待される。

2. 研究成果

(1) 概要

サリドマイド標的因子であるセレブロンに結合する天然物・関連化合物リガンドの探索を行い、新たな結合化合物を発見した。また既知の結合化合物であるグルタルイミドについてフタルイミドやイソインドリノンなどの基質認識モイエティについてのリンカーの分析を行った。グルタルイミドの C3 カーボンがセレブロンとの結合に影響はないが、シクロヘキシミドなど C4 カーボンの場合、立体障害を起こすことが構造解析などの結果により判明した。またグルタルイミド含有化合物が結合したセレブロンが基質をどのように認識するのかの構造解析を行い、セレブロン結合化合物は接着剤として機能することで、基質とセレブロンの結合を仲介することを明らかにした。その際には、基質認識モイエティにおいてベンゼン環が必要であることが判明した。サリドマイドなどセレブロン結合リガンドの中には光学異性体を有する場合もあるが、こちらについて構造解析を行い、左手側(S体)がセレブロンとエネルギー的に安定に結合する一方で、右手側(R体)においては立体障害を防ぐために構造的に不安定な形でS体の 6-10 分の1程度の強さでセレブロンに結合することを明らかにした。また基質認識能についても生化学的に解析を行ったが、どの活性についてもS体の方が強く、R体の活性は弱いことが判明した。また天然物・関連化合物・薬剤など多数のセレブロン結合リガンド存在下における、セレブロン結合因子の網羅的探索を行い、新しい属

性を有する因子、また新基質群を発見した。さらに化合物によって解離する因子も明らかにすることができた。これらのセレブロン結合因子の解析から新たな薬剤開発および用途を見出すことも成功した。研究全体を通して、セレブロンユビキチンリガーゼの制御の理解は大幅に進み、現在開発が行われているセレブロン制御系薬剤(セレブロンモジュレーター・CRBN-based PROTACs)といった次世代タンパク質分解創薬において大きな貢献を果たせたと言える。

(2) 詳細

研究テーマ A 「ウリジン類が誘導する基質群を Chemical Proteomics で単離・同定する」
 関連テーマ「化合物が結合したセレブロンによる基質認識の構造基盤の解明」

様々なウリジン誘導体とセレブロンの結合を試験し、UDP-Glucose や UDP-GlcNac が結合することを明らかにした。ただし、様々な細胞組織からセレブロンに結合する基質群の探索を行ったが、基質は発見されないという想定外の問題が生じた。代わりに、既にセレブロンに結合しているタンパク質 CY-1, CY-2 が発見され、こちらがウリジンなどの天然物やサリドマイドなど既知の化合物群によって解離することが判明した。ウリジン類がセレブロンに結合しながら基質をリクルートできない理由は当初は不明であったが、関連テーマとして米国セルジーン社との共同研究で進めていた AML (Acute Myeloid Leukemia, 急性骨髄性白血病) に効果のある新規セレブロン結合化合物(CC-885)とセレブロン、そして独自に明らかにした CC-885 が誘導する基質 GSPT1 (G1 to S phase transition 1) の構造解析を行ったところ、サリドマイドや CC-885 といったセレブロン化合物で基質をセレブロンにリクルートできる化合物は、グルタルイミド(セレブロン認識モイエティ)に加えて、ベンゼン環を持つ基質認識モイエティ(フタルイミドなど)を有していることが判明した。基質は特殊な surface-turn structure を形成しており、特定の Glycine を有することが判明した。Glycine をアラニンなど他のどのアミノ酸と置換してもセレブロンとの結合が失われることも明らかとなった。セレブロンは基質認識において化合物のベンゼン環を用いて達成するために、UDP-Glucose などのウリジン類は既存の結合因子の解離は促しても、基質をリクルートできるような活性が無いことが判明した。CC-885 の成果は Nature 誌の Article に本研究者を共同筆頭著者とする形で掲載され、本研究者が所属する東京医科大学よりプレスリリースも行った。また日経産業新聞にその成果が紹介された。また分子生物会で報告したがポスター賞をもらい、また東京医科大学における最優秀研究に送られる佐々記念賞も受賞した。ウリジン類についても成果について現在論文投稿準備を行っている。

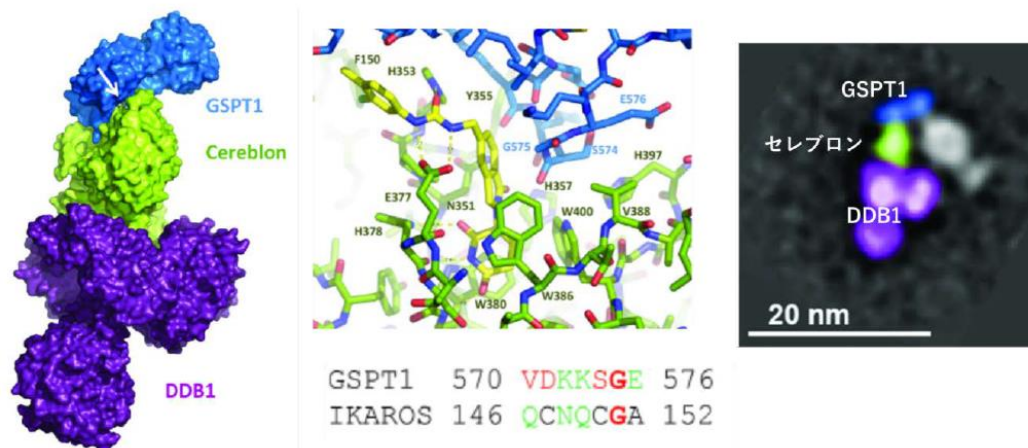


図1 セレブロン(Cereblon)と CC-885, GSPT1 との結合の構造基盤。

(左) X線結晶構造解析から明らかになった cereblon-CC-885-GSPT1 の構造。(中央)GSPT1 のような化合物で誘導される基質は surface-turn 構造をもっており、特定のグリシンを持つ。CC-885 におけるベンゼン環はセレブロンと GSPT1 の間で接着剤の役割を果たす。(右)ネガティブ染色電子顕微鏡によるセレブロン GSPT1 の結合の像。Nature 535:252-7 (2016)。

研究テーマ B 「セレブロン結合する新規代謝物の探索および標的基質の解析」

関連テーマ「サリドマイド光学異性体とセレブロン結合の構造基盤」

まず既知の知られているセレブロン結合の天然リガンド候補から解析を行った。シクロヘキシミドのようなグルタリミド包含天然化合物は、一見セレブロン結合可能に見えたが、全く結合が見られなかった。その理由は、並行して行っていた関連テーマである、奈良先端科学技術大学院大学の箱嶋敏雄教授と共同でおこなったサリドマイド光学異性体とセレブロン結合の X 線結晶解析から判明した。シクロヘキシミドはグルタリミドの C4 カーボンに結合しているが、その場合立体障害が生じることが判明した。サリドマイドやアミノグルテチイミドのような C3 カーボンに結合する化合物のみセレブロンとの結合が許容されることが判明した。また本研究からスクシンイミドが新たな結合化合物として得られた。加えてサリドマイドの二つの光学異性体のうち S 体の方がセレブロンに強く結合することや基質リクルート能が強い事などを解明した。ただし R 体にもセレブロン結合能は 6-10 分の一と弱いながら残っており催奇性も存在しており、光学分割しても有用な作用と副作用を分けることはできないという結論が得られた。それに加えて、化合物存在下でセレブロンに結合するタンパク質群を網羅的に解析した。そして新しい性質をもった因子群を得た。グルタリミドのリンカーおよびサリドマイド光学異性体に関わる本研究成果は Scientific Reports に掲載された(本研究者は共同筆頭著者)。

研究テーマ C 「代謝産物により誘導されるセレブロンの制御機構の一連の流れの解明」

研究テーマ A からセレブロン結合代謝物処理時には CY-1, CY-2 が解離し、基質がリクルートされるわけではないことが判明し、CY-1, CY-2 が解離した場合の基質分解への影響を当初の予定のように解析することは叶わなかった。そこで研究テーマ B で明らかにした因子のいくつかを解析した。その結果新たに発見した NS-1 はサリドマイドなどのベンゼン環を持つ化合物によって結合が誘導されるが、分解されないことが判明した。また DLBCL (diffuse large B-cell lymphoma、びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫) や血管新生阻害に効果のあるピリミジノ骨格を有する新化合物存在下では新たなセレブロン結合基質である ZNFX1, ZPOZ1 タンパク質が見つかったが、こちらの基質認識について新たなルールを見つけることができた。また血液がんにおいてこれらの因子は別のタンパク質と融合している場合もあるが、新化合物はこれらについてセレブロンを介して分解することを明らかにし、新たな治療薬としての用途を見出すことができた。成果については現在投稿準備中である。

研究テーマ D 「セレブロン結合代謝物および既知のリガンド(サリドマイドおよび誘導体)の間にある metabolite-drug relationship の検証」

関連テーマ「サリドマイド催奇形性に関係する新たな基質の発見」

ウリジンなど天然のセレブロン結合代謝物のセレブロンへの影響はかなり少ないことが判明した。一方で、肝臓などで代謝されるサリドマイド代謝物においてはサリドマイド原体より強いものも発見された。昔からの問題でサリドマイドは原体が起こすのか、または代謝物が起こすのかについて議論が生じていたが、並行して行っていたサリドマイド催奇性を担う新たな基質候補である LD1 においてはいずれも分解したので、催奇形性は原体・代謝物両方が引き起こすことが結論づけられた。LD1 については現在すでに論文を投稿中である。

研究テーマ E 「セレブロン結合化合物の一般則およびユビキチンリガーゼ制御の見出し」

本テーマは研究 A から D までの成果を全部総合して、制御モデルの構築を図り、またそれを応用することを目的としていた。こちらの成果を応用した、セレブロンベースの PROATCs (Proteolysis Targeting Chimeras) の合成を名古屋工業大学の柴田哲男教授と行い、壊したいタンパク質(POI)の分解を達成しつつ、オフターゲット因子である LD1 は既存の SALL4 などの分解を排除するような調整を行った。本成果は本さきがけ以後のプロジェクトに引き継がれ、知財や論文としての成果をまとめることを予定している。

(追加テーマ) NQO1によるTLRを介したIKBと分解によるサイトカイン産生制御

こちらの研究は国際医療センター木村彰宏博士との共同研究で、低分子化合物標的因子単離ツールである磁性アフィニティ微粒子を用いた天然化合物のターゲット探索を補助し、自然免疫における新たな機構を明らかにすることに貢献した。成果は *J Exp Med* (2018)に掲載された。

3. 今後の展開

本研究によりセレブロン、化合物、基質の相互作用の構造基盤が分かり、また薬剤開発において有用な情報をいくつも得られたことから、これらの知見に基づいて新たなセレブロン結合低分子薬剤の開発および、セレブロンをベースとした PROTACs (Proteolysis Targeting Chimera, タンパク質分解誘導キメラタンパク質)の開発も行う。また成果の部分で述べたように、新たな ZNFX1 および ZPOZ1 が融合遺伝子をつくり血液がんの癌化を促すが、これらの増悪を促す融合タンパク質の分解を新化合物で達成することが可能となっている。こちらについては臨床研究なども視野に入れて継続していきたい。また LD1 と既知の催奇性候補基質である SALL4 を除外するような化合物の構造を見出していきたいと考えている。先に述べた ZNFX1 を分解する新化合物はこれら催奇性基質の分解活性が弱いことからその化合物構造の解析を探求していきたい。

4. 自己評価

本さがけ研究によって本研究者は、化合物が結合したセレブロンが基質をどのように認識するのかについて構造基盤を解明し、その成果を共同筆頭著者として *Nature* の Article に掲載させた。この成果は日経産業新聞で取り上げられ、さらにはその成果が元で日経新聞の記者より取材を受け「次世代の先導者」としてこちらの日経産業新聞で取り上げられた。またセレブロン結合化合物であるグルタルイミドのリンカー部分の解析などを通して、サリドマイド光学異性体の長年の謎も明らかにして論文として *Scientific Reports* 誌に共同筆頭著者として報告した。現在、Google Scholar Citations によると本申請者の論文引用数は 2,000 を超えるに至った。一つ想定外だったのが当初の予定では代謝産物が基質をリクルートしてくるものと考えていたが、実際には既存の結合因子の解離に留まるという結果が得られたことである。とはいえ研究全体を通して、セレブロンユビキチンリガーゼ制御の理解は大幅に進み、POI(分解したいタンパク質)を壊す薬剤開発への大きな貢献が果たせた点は一定の評価を得られるものと考えている。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Matyskiela ME, Lu G, Ito T (co-1st author), Pagarigan B, Lu CC, Miller K, Fang W, Wang NY, Nguyen D, Houston J, Carmel G, Tran T, Riley M, Nosaka L, Lander GC, Gaidarova S, Xu S, Ruchelman AL, Handa H, Carmichael J, Daniel TO, Cathers BE, Lopez-Girona A and Chamberlain PP A novel cereblon modulator recruits GSPT1 to the CRL4(CRBN) ubiquitin ligase. *Nature* 535:252-257 (2016)
2. Mori T, Ito T (co-1st author), Liu S, Ando H, Sakamoto S, Yamaguchi Y, Tokunaga E, Shibata N, Handa H and Hakoshima T Structural basis of thalidomide enantiomer binding to cereblon. *Sci Rep* 8:1294 (2018).
3. Kimura A, Kitajima M, Nishida K, Serada S, Fujimoto M, Naka T, Fujii-Kuriyama Y, Sakamoto S, Ito T, Handa H, Tanaka T, Yoshimura A and Suzuki H NQO1 inhibits the TLR-dependent production of selective cytokines by promoting IkappaB-zeta degradation. *J Exp Med* 215:2197-2209 (2018).

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件(公開前の出願件名については件数のみ記載)

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 主要な学会発表

日本薬学会(招待講演)(2018.3)

2. 受賞

佐々記念賞(東京医科大学)(2017.6)

「A novel cereblon modulator recruits GSPT1 to the CRL4CRBN ubiquitin ligase」

ポスター賞(日本分子生物学会大会 2016.12)

「急性骨髄性白血病に効果を示す新規のセレブロンモジュレーター」

3. 著作物

伊藤拓水、半田宏「サリドマイドの標的ユビキチンリガーゼ“セレブロン”とその機能」医学のあゆみ Vol.256, No.8 医歯薬出版株式会社(2016) 891-895

伊藤拓水、山本淳一、半田宏「免疫調節薬[IMiDs (immunomodulatory drugs)]による抗骨髄腫効果の機序」日本臨牀, Vol 74, 増刊号 5 日本臨牀社(2016) p.152

伊藤拓水、半田宏「抗がん作用を持つ新たなセレブロンモジュレーターの開発」ファルマシア、Vol. 53, No. 4 公益社団法人日本薬学会(2017) p. 328-332

4. プレスリリース

「急性骨髄性白血病に効果の期待できる新しいタイプの薬の開発 およびその作用機構の解明」東京医科大学 HP より

<http://www.tokyo-med.ac.jp/160624nanoPress2.pdf>

研究報告書

「RNA モドミクスの確立及び神経・精神疾患への応用」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015年10月～2019年3月

研究者: 魏 范研

1. 研究のねらい

最近の研究で RNA に大量の転写後修飾が存在し、RNA の機能を巧妙に制御することが明らかになってきている。RNA 修飾は、メチル化や水酸化など化学的にバリエーションに富んだ様々な修飾体が現在知られている。さらに、これらの RNA 修飾は、修飾酵素の発現量や基質となるメタボライトの濃度でダイナミックに変化し、RNA エピジェネティクスという革新的な分野が展開されようとしている。

哺乳動物において RNA の種類が非常に豊富であり、RNA 修飾についてはほとんど解明されていない状況にある。ここ数年、私は世界に先駆けてマウスやヒトにおいて新規 RNA 修飾を見出した。さらに、その修飾の破綻が糖尿病やミトコンドリア病といった疾患の原因になることを報告し、RNA 修飾は疾患実態を反映する新しい代謝物であることを提示した。最近私は、RNA 修飾活性を有する酵素群が神経・精神疾患領域のうち、罹患者数が多いのにもかかわらず診断法・治療法が確立していない精神遅滞やミトコンドリア脳筋症の発症に関わることを新たに見出している。これらの新規修飾酵素による RNA 修飾は、今後神経疾患領域における創薬や診断に応用されることが期待されている。しかし、マイクロアレイや次世代シーケンサーに代表されるこれまでの RNA 解析技術は、RNA の配列情報のみを解析する技術であり、修飾情報を捉えることが困難であった。RNA 修飾に関わる疾患の原因解明及び診断法開発を進めるために、RNA 修飾情報を効率よく検出・解析する技術が今後必要とされている。

そこで、私は質量分析法を用いた微量 RNA 修飾解析法を応用・発展させることで、ハイスループット RNA 修飾解析法である RNA Modomics (Modification+Omic) を確立し、哺乳動物における新規 RNA 修飾を探索し、診断及び創薬に実装できる基盤技術の創出を目指す。さらに、同解析法を用いて精神遅滞やミトコンドリア脳筋症において新規診断法の確立を目指すとともに、RNA 修飾がどのようにこれらの疾患の進行に関わるかを解明することで、同技術が新たな治療法開発の基盤となることを示す。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究は、(1)質量分析装置を用いたハイスループット RNA 修飾解析法の確立、(2)同解析法を用いて神経・精神疾患と関連する RNA 修飾の同定ならびに RNA 修飾破綻による疾患発症の分子メカニズムの解明、(3)RNA 修飾欠損に起因する神経・精神疾患に対して新規診断法の確立、以上3項目について研究開発を行なった。

具体的には、トリプル四重極質量分析計 (Shimazu LCMS8050) を導入し、ヒトに存在する 50 種類以上の RNA 修飾を標的に測定パラメーターの最適化や試料処理法の最適化を図り、高感度かつ汎用性の高い RNA 修飾解析法を確立した。次に同方法を用いた精神遅滞の発症に関わる Ftsj1、ミトコンドリア脳筋症の発症に関わる Mtu1 や Mto1 などの酵素について RNA 修飾の探索を行なった。その結果、Ftsj1 は 7 種類の細胞質 tRNA を基質 tRNA として認識し、32 位と 34 位の塩基のリボースをメチル化することを見出した。また、Mtu1 はミトコンドリア DNA に由来する 2 種類の tRNA を認識し、34 位ウリジンをチオール化する。Mto1 はミトコンドリア DNA に由来する 5 種類の tRNA を認識し、34 位ウリジンをタウリン化することを見出した。次に、それぞれの酵素を欠損したマウスを作製し、解析を行なった。その結果、Ftsj1 による tRNA 修飾を欠損したマウ

スでは、神経細胞におけるタンパク質翻訳が低下し、記憶学習障害が生じた。一方、Mtu1 や Mto1 によるミトコンドリア tRNA の修飾を欠損したマウスでは、ミトコンドリアにおけるタンパク質翻訳が著しく低下し、ミトコンドリアの呼吸活性が障害され、肝障害や心不全が誘発された。上記の遺伝子欠損マウスは、ヒトの神経・精神疾患の症状と類似することから、ヒトにおいても同様な機序で疾患が発症すると推察された。次に、tRNA 修飾を標的とする新規診断法の開発に取り組んだ。具体的には、タウリン修飾を含有するミトコンドリア tRNA に変異を持つミトコンドリア病患者を対象に尿検体を収集し、尿に含まれるタウリン修飾ヌクレオシドを RNA Modomics システムを用いて測定した。その結果、健常人と比較して、ミトコンドリア病患者では尿中タウリン修飾が有意に低下した。

以上の結果から、RNA 修飾がタンパク質翻訳に必要不可欠であり、その破綻が神経・精神疾患の発症原因となることが示唆された。また、本研究で確立した RNA Modomics システムはミトコンドリア病の非侵襲的な診断に有用であることが示された。

(2) 詳細

研究テーマ A「RNA モドミクスの確立」

従来の RNA 修飾解析は、極細キャピラリーや超精密質量分析計によって行われてきた。しかし、試料の準備が煩雑であり、また一回の分析が非常に時間を要するため、臨床検査といった実社会での応用が困難であった。そこで、本研究は、実社会の使用に堪えられる RNA 修飾解析法の実現を目標とした。具体的には、普及しつつあるトリプル四重極質量分析計である LCMS(Shimadzu LCMS8050)を島津製作所より導入し、システムの最適化を行った。まず、超高速液体クロマトグラフィーの最適化により、一回の分析を 15 分で完了することに成功し、多検体の迅速な処理が可能となった。また、質量分析については修飾 RNA ヌクレオシドの標準品を用いて多重モニタリング法(MRM)のパラメーター最適化を行い、fmol レベルのヒト tRNA 修飾の検出に成功した。さらに、生体試料についても前処理の最適化を実施し、処理ステップの削減など、汎用性の高い分析法の確立に成功した。

研究テーマ B「神経・精神疾患と相関する RNA 修飾の同定ならびに RNA 修飾破綻による疾患発症の分子メカニズムの解明」

・X 染色体連鎖性精神遅滞

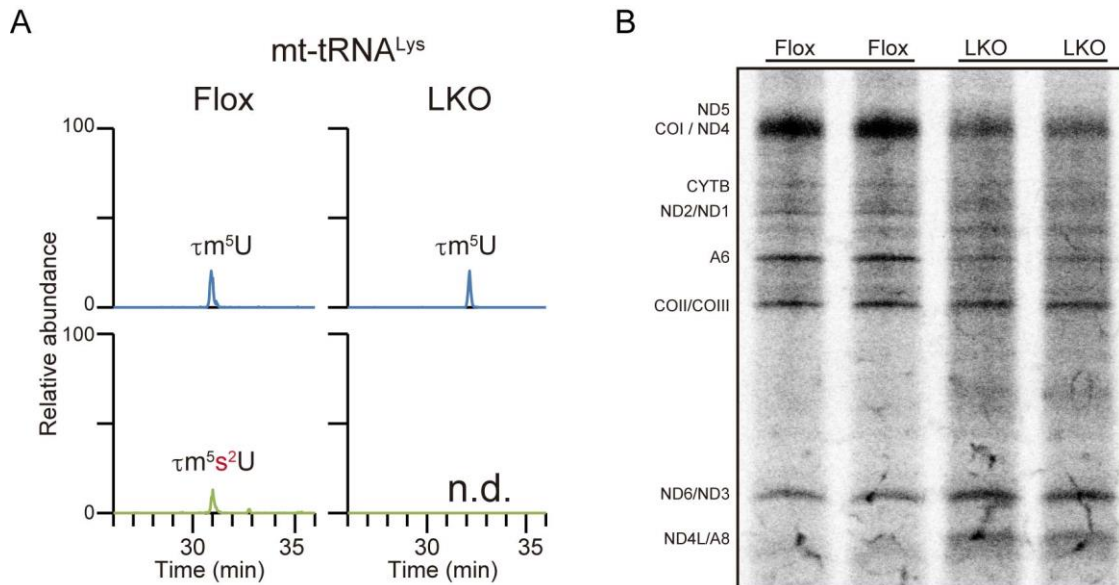
X 染色体連鎖性精神遅滞は、主に X 染色体上の遺伝子変異に起因する難病である。本研究は日本や中国での家系調査によって明らかになった危険遺伝子の一つである Ftsj1 について検討を行なった。Ftsj1 は tRNA 修飾を行う酵素領域を有するが、その詳細な分子機序が不明であった。本研究は、野生型マウスと Ftsj1 欠損マウスの臓器から各種 tRNA を精製し、RNA Modomics により tRNA 修飾の一斉分析を行なった。その結果、Ftsj1 は細胞質 tRNA のうち、少なくとも 7 種類の tRNA を認識し、32 位と 34 位の塩基をメチル化することが明らかになった。一方、Ftsj1 による tRNA のメチル化修飾の役割を検討するために、Yale 大学の研究チームと共同で Ribosomal Profiling を実施し、翻訳への影響を詳細に検討した。その結果、Ftsj1 による tRNA 修飾のメチル化を欠損すると、tRNA による mRNA の読み取りが障害されることがわかった。Ftsj1 欠損マウスでは、神経細胞の機能維持に重要なタンパク質が翻訳されなくなった結果、神経細胞間の情報伝達が低下し、最終的に記憶学習といった高次機能が障害された。以上の結果から、Ftsj1 欠損を伴う X 染色体連鎖性精神遅滞の発症は tRNA のメチル化修飾の欠損によるものであることが実証された。上記の研究成果に対して 2017 年日本生理学会奨励賞が与えられた。

・小児急性肝障害

ミトコンドリアに局在する Mtu1 遺伝子は小児急性肝障害の原因遺伝子であるが、その発症機序は明らかになっていなかった。本研究では、Mtu1 の肝臓特異的な欠損マウスを作製し、肝臓よりミトコンドリア tRNA を精製した。RNA Modomics を用いて基質 tRNA および RNA 修飾を検討

した結果、Mtu1 はミトコンドリア DNA 由来の tRNA^{Gln} および tRNA^{Lys} を認識し、34 位ウリジンをチオール化することを見出した。Mtu1 を欠損した肝細胞ではミトコンドリアにおけるタンパク質翻訳が顕著に低下していた(図1参照)。また、Mtu1 の肝臓特異的欠損マウスでは、肝機能が著しく低下していた。以上のことから、Mtu1 異常を伴う小児肝障害はミトコンドリア tRNA のチオール化修飾の欠損によるものであることが示された。同研究結果は、2016 年に PLoS Genetics 誌に掲載された(PLoS Genet., vol. 12, no. 9, e1006355)。

図1 ミトコンドリア tRNA のチオール化修飾によるミトコンドリアタンパク質翻訳制御



(A) Mtu1 の肝臓特異的欠損マウス(LKO)および野生型マウス(Flox)の肝組織から RNA を抽出し、RNA 修飾を質量分析で検討した。LKO のミトコンドリア tRNA^{Lys}(mt-tRNA^{Lys})では、チオール化修飾(s²U)が消失した。(B) LKO マウスの肝細胞におけるミトコンドリアタンパク質翻訳が、Flox マウスと比べて顕著に低下した。

・ミトコンドリア脳筋症

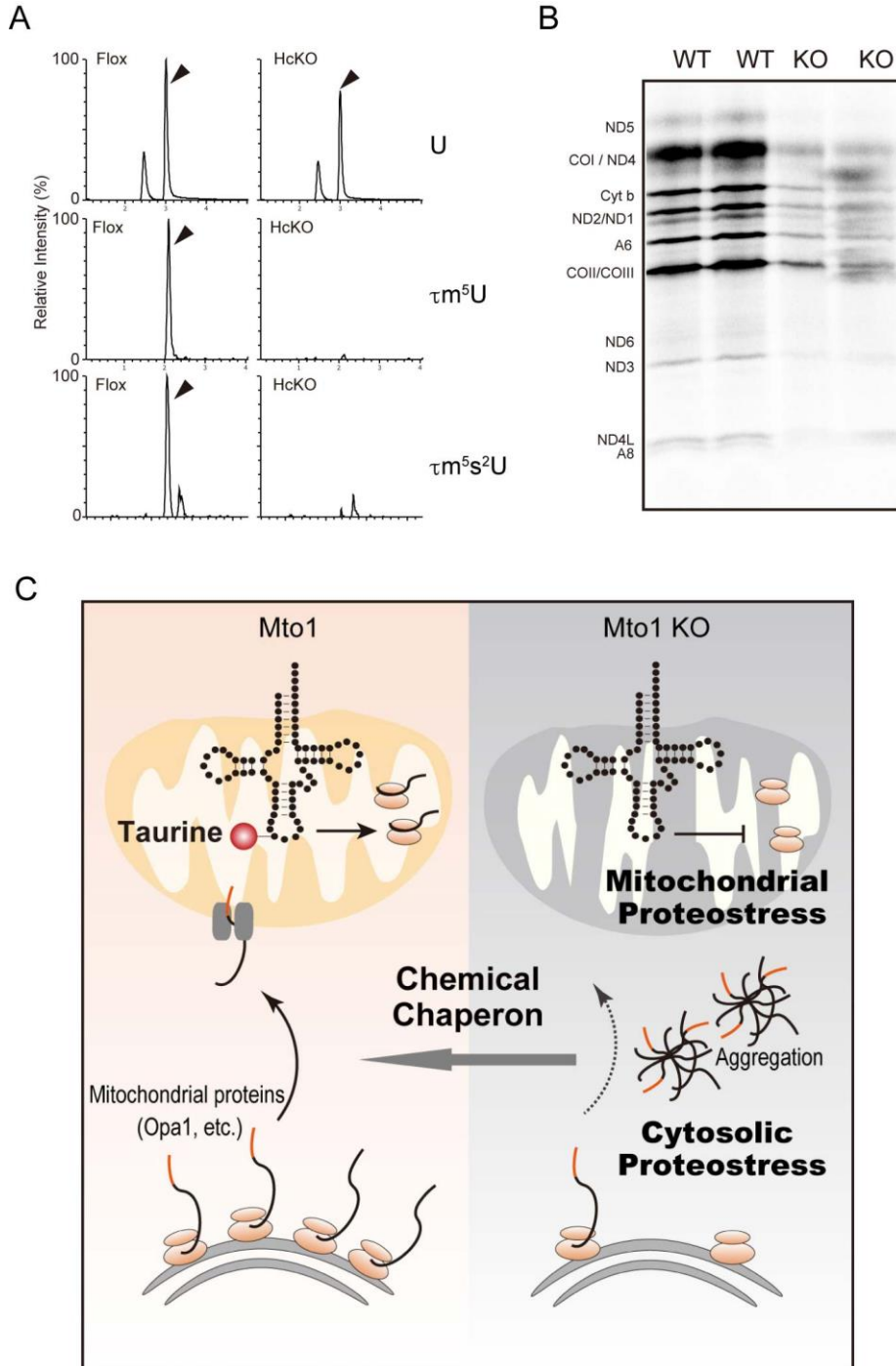
ミトコンドリア脳筋症は、脳卒中や心筋症など多彩な病態を示す重篤な神経疾患であり、ミトコンドリア病の中でも特に頻度の高い病態である。ミトコンドリアに局在する酵素である Mto1 はミトコンドリア脳筋症に関連するタンパク質の一つであるが、その分子機能および Mto1 異常によるミトコンドリア脳筋症の発症機序が不明であった。本研究では、Mto1 の全身欠損マウスや心臓特異的欠損マウスを作製し、RNA Modomics を用いて解析を行なった。その結果、Mto1 がミトコンドリア DNA に由来する5種類の tRNA を認識し、34 位ウリジンをタウリン修飾することがわかった(図2参照)。Mto1 欠損細胞では、ミトコンドリア tRNA のタウリン修飾が完全に消失し、ミトコンドリアにおけるタンパク質翻訳が著しく障害された(図2参照)。その結果、ミトコンドリアの電子伝達系を構成するタンパク質が不足し、ミトコンドリアのエネルギー代謝が大幅に低下した。これらの結果から、タウリン修飾がミトコンドリアのタンパク質翻訳を制御することで、ミトコンドリアを中心とするエネルギー代謝に重要であることが示された。

興味深いことに、ミトコンドリア tRNA のタウリン修飾を欠損した細胞では、細胞質側で異常なタンパク質の蓄積が頻繁に見られた。これら異常タンパク質の蓄積が結果的に小胞体ストレスを誘発し、細胞増殖をはじめとする細胞機能を障害した。さらに、異常タンパク質の蓄積は、心臓特異的 Mto1 欠損マウスと肝臓特異的 Mto1 欠損マウスでも観察された。近年、異常タンパク質凝集体の蓄積を抑制する候補化合物が開発され、その中の1つが TUDCA(ウルソデオキシコール酸)である。Mto1 欠損細胞や Mto1 肝臓特異的欠損マウスに TUDCA を投与した結果、細胞内の凝集体が消失し、小胞体ストレスが低下し、細胞や肝臓の組織機能も改善された(図2参

照)。

以上の結果から、ミトコンドリア tRNA のタウリン修飾はミトコンドリアでのタンパク質翻訳に不可欠であり、タウリン修飾の欠損がミトコンドリア脳筋症の原因であることが示された。また、本研究により、TUDCA がミトコンドリア病に対して効果的な治療薬となる可能性が示唆された。本研究成果は、2018 年に Cell Reports 誌 (vol. 22, no. 2, pp. 482-496) に掲載された。また、TUDCA の効果については、特許出願を行なった(ミトコンドリア病治療薬: 特願 2017-246492)。

図2 ミトコンドリア tRNA のタウリン修飾によるミトコンドリアタンパク質翻訳制御

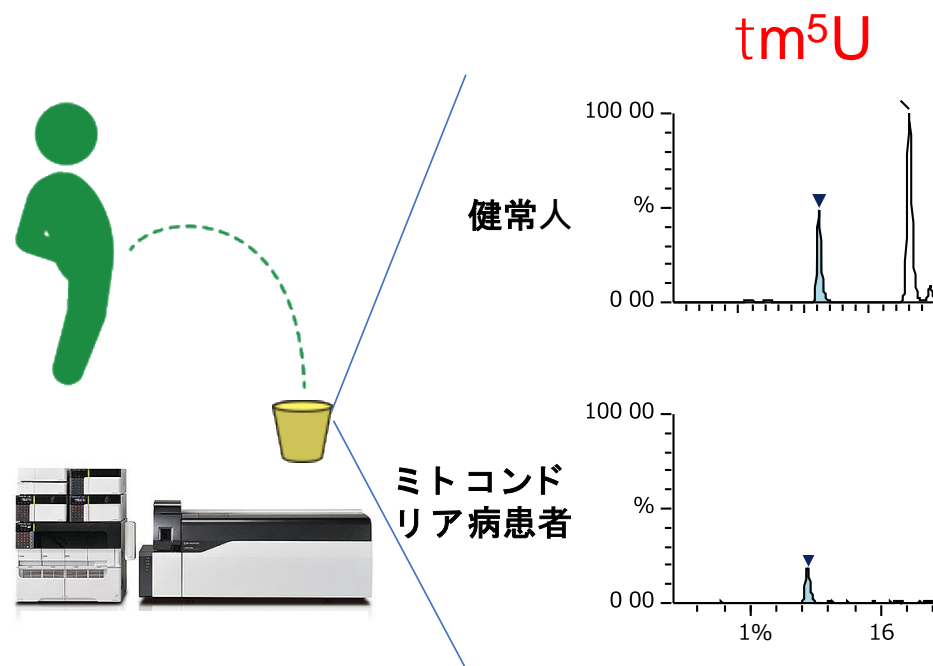


(A) Mto1 の心臓特異的欠損マウス(HcKO)および野生型マウス(Flox)の心筋から RNA を抽出し、RNA 修飾を質量分析で検討した。HcKO のミトコンドリア tRNA では、タウリン修飾(tm^5U と tm^5s^2U)が消失した。(B) HcKO マウス由来の ES 細胞におけるミトコンドリアタンパク質翻訳が、Flox マウス由来の ES 細胞と比べて顕著に低下した。(C) タウリン修飾欠損による細胞障害およびケミカルシャペロンによる機能改善の分子機序

研究テーマ C「RNA 修飾欠損に起因する神経・精神疾患に対する新規診断法の確立」

ミトコンドリア病のうち、ミトコンドリア DNA の $tRNA^{Leu}$ 遺伝子に A3243G 変異をもつ患者が多い。従来のミトコンドリア病診断法は、患者からの筋組織の採取や A3243G を検出する遺伝子診断が必要であり、肉体的な負担のみならず、遺伝情報の告知による精神的な負担も大きい。また、ピルビン酸や乳酸といった検査項目もミトコンドリア病の発症機序を反映しないため、ミトコンドリアの診断はこれまで非常に煩雑であり、専門医による精密な診断が必要であった。興味深いことに、 $tRNA^{Leu}$ は通常タウリン修飾を含んでおり、A3243G 変異を有する $tRNA^{Leu}$ ではタウリン修飾が低下することが知られている。タウリン修飾の低下がミトコンドリア病の発症原因であることが本研究で明らかになったため、タウリン修飾がミトコンドリア病の診断バイオマーカーとして有用であるが示唆された。そこで、本研究では、様々な体液を RNA Modomics で解析し、タウリン修飾ヌクレオシドの測定を行なった。その結果、尿中にタウリン修飾ヌクレオシドが大量に存在することを突き止めた。次に、健常人および MELAS (Mitochondrial myopathy Encephalopathy, Lactic Acidosis, Stroke-like episodes:ミトコンドリア脳筋症・乳酸アシドーシス・脳卒中様発作症候群)患者由来の尿検体で比較検討したところ、MELAS 患者の尿ではタウリン修飾ヌクレオシドの存在量が顕著に低下していた(図3参照)。本結果により、RNA Modomics によるミトコンドリア病の非侵襲的な検査が可能であることが示された。RNA Modomics によるミトコンドリア病の検査については、特許出願を行なった(ミトコンドリア tRNA 修飾の検出法: PCT/JP2017/047099/2017/12/27)。

図3 尿を用いた非侵襲的ミトコンドリア病診断法の開発



健康人およびミトコンドリア病患者(MELAS)から採取した尿の分析結果を示す。MELAS 患者の

尿に含まれるタウリン修飾塩基($\tau\text{m}^5\text{U}$)が健常人と比べて顕著に低下した。

追加研究テーマ D「活性硫黄による RNA 修飾制御」

本研究は、本さがけ領域の西田研究者および東北大学の赤池教授との共同研究である。本共同研究により、ミトコンドリアに局在する CARS2(ミトコンドリア局在型システイン tRNA 合成酵素)が活性硫黄分子の一種であるシステインパースルフィドを産生する酵素であることが見出された。システインパースルフィドは、様々な分子に活性硫黄を転移する活性を有する生体活性分子である。RNA に存在する化学修飾のうち、硫黄を含む修飾が多数存在するため、活性硫黄による RNA 硫黄修飾の制御機構を追加テーマとして検討を行なった。培養細胞に活性硫黄を添加すると、tRNA 中の硫黄修飾が顕著に増えた。一方、活性硫黄の産生を抑制したマウスモデルでは、tRNA 中の硫黄修飾も低下し、高脂肪食条件において耐糖能障害を呈した。これらのことから、活性硫黄は RNA 修飾を制御することが示された。これらの研究成果は、*Nat. Communications* 誌 (vol. 8, no. 1, 1177, 2017) および *Nucleic Acids Research* 誌 (vol. 45, no. 1, pp. 435-445, 2017) に掲載された。

3. 今後の展開

- ・本研究で確立した RNA Modomics 法は高感度かつ汎用性が高く、様々な生体試料における RNA 修飾の測定に応用できる。特に、本研究でその機能が明らかになったミトコンドリア tRNA のタウリン修飾やチオール化修飾は、ミトコンドリアの翻訳を直接的に制御する化学修飾であるため、ミトコンドリア活性を反映するバイオマーカーとして有用であると考えられる。今後は、パーキンソン病やアルツハイマー病などミトコンドリア障害を有する疾患由来の検体で RNA Modomics を応用し、バイオマーカーとしての RNA 修飾の可能性を追求していく予定である。
- ・これまでの研究により、尿検体を用いたタウリン修飾ヌクレオシドの測定がミトコンドリア病の非侵襲的な診断に有用であることが示された。今後は健常人における尿中タウリン修飾ヌクレオシドの基準値の算出や、尿検体の測定方法の標準化を行うことで、本方法の実用化に向けて展開していく予定である。
- ・本研究結果から、TUDCA がミトコンドリア tRNA のタウリン修飾欠乏に起因する細胞障害に対して改善効果を有することが明らかになった。TUDCA が日本では未認可であるため、関連各所と連携を図り、治療薬としての実用化につなげていきたい。

4. 自己評価

RNA 修飾という一般的に測定困難な生体分子に着眼した研究であったが、質量分析計を用いた高感度かつ汎用性の高い測定システム(RNA Modomics)の構築をきっかけに、精神遅滞、急性肝障害やミトコンドリア脳筋症といった神経・精神疾患のメカニズムの解明に成功した。また、研究期間中にこれらの研究成果を論文化することにより、RNA 修飾病という概念を打ち出すことに成功した。特に、ミトコンドリア病については、ミトコンドリア tRNA のタウリン修飾の欠乏がミトコンドリア機能のみならず、細胞質側の機能にも大きな障害を与えるという新たな現象を発見した。さらに、細胞質の障害を克服できる薬剤候補の発見にも成功しており、今後のトランスレーショナルリーサチに橋渡しできる成果であると考えられる。本研究で構築した RNA Modomics 法はミトコンドリア病の非侵襲的な検査・診断を可能にする技術であり、患者の負担軽減に大きく貢献できると考える。本技術を学会等で紹介してから、他大学病院からの引き合いが多数あり、ミトコンドリア病の非侵襲的な診断に実際成功している。したがって、以上の成果は、社会への実装という本さがけ領域の目標に合致するものであり、当初の目標が十分に達成されたと考える。RNA 修飾については、多くの疾患のバイオマーカーとなる可能性を秘めており、今後のコンパニオン診断技術の発展への寄与が見込まれる。

5. 主な研究成果リスト

- (1)論文(原著論文)発表

<p>1. #M. Fakruddin, #F.-Y. Wei, T. Suzuki, K. Asano, T. Kaieda, A. Omori, R. Izumi, A. Fujimura, T. Kaitsuka, K. Miyata, K. Araki, Y. Oike, L. Scorrano, T. Suzuki, and K. Tomizawa. "Defective Mitochondrial tRNA Taurine Modification Activates Global Proteostress and Leads to Mitochondrial Disease," (#共同第一著者) <i>Cell Rep.</i>, vol. 22, no. 2, pp. 482–496, 2018.</p>
<p>2. N. Takahashi, F.-Y. Wei, S. Watanabe, M. Hirayama, Y. Ohuchi, A. Fujimura, T. Kaitsuka, I. Ishii, T. Sawa, H. Nakayama, T. Akaike, and K. Tomizawa. "Reactive sulfur species regulate tRNA methylthiolation and contribute to insulin secretion," <i>Nucleic Acids Res.</i>, vol. 45, no. 1, pp. 435–445, 2017.</p>
<p>3. T. Akaike, #T. Ida, #F.-Y. Wei, #M. Nishida, Y. Kumagai, M. M. Alam, H. Ihara, T. Sawa, T. Matsunaga, S. Kasamatsu, A. Nishimura, M. Morita, K. Tomizawa, A. Nishimura, S. Watanabe, K. Inaba, H. Shima, N. Tanuma, M. Jung, S. Fujii, Y. Watanabe, M. Ohmuraya, P. Nagy, M. Feelisch, J. M. Fukuto, and H. Motohashi. "Cysteinyl-tRNA synthetase governs cysteine polysulfidation and mitochondrial bioenergetics," (#共同第二著者) <i>Nat. Commun.</i>, vol. 8, no. 1, 1177, 2017.</p>
<p>4. Y. Wu, F.-Y. Wei, L. Kawarada, T. Suzuki, K. Araki, Y. Komohara, A. Fujimura, T. Kaitsuka, M. Takeya, Y. Oike, T. Suzuki, and K. Tomizawa. "Mtu1-Mediated Thiouridine Formation of Mitochondrial tRNAs Is Required for Mitochondrial Translation and Is Involved in Reversible Infantile Liver Injury.," <i>PLoS Genet.</i>, vol. 12, no. 9, e1006355, 2016.</p>
<p>5. M. Fakruddin, F. Y. Wei, S. Emura, S. Matsuda, T. Yasukawa, D. Kang, and K. Tomizawa. "Cdk5rap1-mediated 2-methylthio-N6-isopentenyladenosine modification is absent from nuclear-derived RNA species," <i>Nucleic Acids Res.</i>, vol. 45, no. 20, pp. 11954–11961, 2017.</p>

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 2 件 (公開前の出願件名については件数のみ記載)

(3) その他の成果 (主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表:

1. 招待講演 (国際学会)

題名: tRNA modification in mitochondria disease

学会名: 15th Conference of the Asian Society of Mitochondrial Research and Medicine (2018)

2. 招待講演 (国際学会)

題名: Taurine-modification of mitochondrial tRNA regulates proteostatic network and contribute to the quality of embryonic stem cells

学会名: 1st International Mitochondria Meeting (2018)

3. 招待講演 (国内学会)

題名: RNA 修飾の生理学

学会名: 第5回 和光ライフサイエンスフォーラム (2017)

4. 招待講演 (国内学会)

題名: RNA 修飾による生体機能制御および酸素応答とのクロストーク

学会名: 第27回 フォーラム・イン・ドージン (2016)

受賞:

1. 第 17 回 日本生理学会奨励賞(2016 年 3 月)
「tRNA 修飾異常による X 染色体連鎖性精神遅滞の発症分子メカニズムの解析」
2. 熊本医学会奨励賞(2017 年 3 月)
「tRNA 修飾の生理学研究」

プレスリリース:

難病「ミトコンドリア病」発症の原因解明～治療薬の開発に道筋～
<https://www.kumamoto-u.ac.jp/whatsnew/seimei/20180110>

研究報告書

「エクソソーム RNA 解析によるインフルエンザの予防・診断・治療基盤技術の創出」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015 年 11 月～2019 年 3 月

研究者: 押海 裕之

1. 研究のねらい

季節性インフルエンザは毎年流行し、一年あたり、わが国で数千人の死亡に繋がる深刻な感染症の一つである。その予防のために毎年ワクチンが接種されている。現在の日本で使われているインフルエンザワクチンは、ウイルスの HA タンパク質画分を精製したスプリットワクチンである。これは、予防効果あまり高くないことが知られている。そのためワクチンを接種したにも関わらずインフルエンザを発症し、亡くなるケースも多い。

インフルエンザワクチンには、現行のスプリットワクチンの他に、ウイルス粒子全体をホルマリンなどで固定した不活化全粒子ワクチンが存在する。これは、スプリットワクチンと比較すると予防効果が格段に高いことが知られている。そのため、2009 年の新型インフルエンザの流行時には、この全粒子ワクチンが予防のために作成された。日本では、全粒子ワクチンは 1960 年代頃まで使用されていたが、副反応の頻度が高いために、スプリットワクチンへと切り替えられた。

このような副反応が原因となりワクチンが切り替えられたり使用が見送られたりすることは、これまでも繰り返されている。最近のケースでは、子宮頸がんの予防のために開発された Human papillomavirus (HPV) ワクチンでは、副反応への恐怖心から定期接種であるにも関わらず、接種率が 1% に満たない状況になっている。

インフルエンザワクチンや HPV ワクチンなどのように、ウイルスの一部のタンパク質やウイルス粒子全体を用いた、いわゆる不活化ワクチンについて、よく現れる共通した副反応は、接種局所での発赤・疼痛・腫脹に加えて、全身の発熱である。しかし、ワクチンの副反応は全ての人に現れるわけではなく個人差がある。しかし、この個人差の原因は解明されていない。

副反応の問題は深刻であるにも関わらず、現在、副反応を未然に防ぐための方策としては、接種当日の体温測定や医師による問診のみであり、副反応リスクを調べる検査などの科学的な方法は全く存在しない。このような現状は、ワクチンの副反応についての懸念を解消して欲しいとの社会的要請を全く無視するものである。

そこで、本研究では、特に、インフルエンザワクチンの副反応に焦点を絞り、副反応が生じるメカニズムを解明することで、副反応リスクを予測する検査方法を開発することを目的として研究を進めた。

2. 研究成果

(1) 概要

ワクチンの副反応として知られる局所での炎症・発赤・疼痛と全身の発熱は、ワクチンの成分に対する自然免疫応答が原因である。特に、マクロファージなどが産生する炎症性サイトカインは、血管透過性を亢進したり、あるいは、内因性発熱物質として働いたりすることで副反応を誘導する。実施に、臨床試験でも副反応が現れる人では、血中の炎症性サイトカイン産生が上昇することが観察されている。

このような自然免疫のメカニズムとして、Zyxin と呼ばれていたタンパク質が、I 型インターフェロンや IL-6 などの炎症性サイトカイン産生に重要な役割をすることを発見し、そのメカニズムを解明した (Kouwaki T et al., Scientific Reports 2017)。また、自然免疫応答に影響を与える新たな因子としての細胞外小胞に着目し研究を進めたところ、肝細胞から放出される細胞外小胞がマクロファージによる NK 細胞活性化を制御することを発見した (Kouwaki T et al.,

Front. Immunol 2016)。

このような細胞外小胞が自然免疫を制御するメカニズムとして、microRNA が重要な役割をすることを発見したことから(Fukushima Y et al., BBRC 2018)、ヒトの血液中に含まれる microRNA について網羅的に解析をしたところ、miR-451a と呼ばれる microRNA が豊富に存在すること、これが、数ヶ月をかけてゆっくりと変動すること、また、細胞外小胞内の miR-451a が生体内でのマクロファージの自然免疫応答の強さを制御することを発見した(Okamoto M et al., JBC 2018)。これらの発見をもとに、インフルエンザワクチンを含む不活化ワクチンによる副反応を予測する方法として、血中の細胞外小胞内 microRNA をバイオマーカーとできることを発見し特許を出願した。

このような発見は、ワクチン接種後の副反応リスクを予め調べる検査キットとして今後臨床応用可能であると期待される。一方で、炎症性サイトカインはオプジーボなどのような抗腫瘍免疫の効果にも非常に重要であることを我々は発見しており(Tsukamoto H et al., Cancer Reports 2018)、がん免疫療法にも、我々の成果を応用していけると期待される。

(2) 詳細

「インフルエンザ感染とワクチン投与後のエクソソーム RNA の網羅的解析」

マウス動物モデルを用いたインフルエンザ感染実験では、感染群と非感染群のマウス血清から細胞外小胞を精製し、細胞外小胞内の microRNA を RNA-Seq 法により網羅的に解析したところ、感染により発現が変動する microRNA 群を同定した。また、健常人の血清から細胞外小胞を抽出し、その microRNA をマイクロアレイ法により網羅的に解析した。これらの網羅的な解析結果から、miR-451a として知られる microRNA がヒト血清に非常に豊富に存在すること、これが、インフルエンザ感染やインフルエンザワクチンの成分に反応して発現が変動することを発見した。また、この miR-451a は、普段の生活では殆ど変動しないが、数ヶ月をかけて非常にゆっくりと変動し、その変動幅は、10 倍程度であることを明らかとした。

「エクソソーム内 RNA を指標とした新たなバイオマーカーの同定」

ワクチン成分に反応した炎症性サイトカインの産生量について、ヒト血清とマクロファージ細胞を用いて、その相関関係を上記の網羅的解析データを基に比較したところ、miR-451a が、マクロファージが産生する炎症性サイトカイン量と統計的に有意に相関することを発見した。また、miR-451a 以外の microRNA として、miR-5100, miR-7704 などが、炎症性サイトカイン産生量と非常に強い相関を示すことを明らかとした。

健常人6人の血清細胞外小胞内microRNAのマイクロアレイ解析

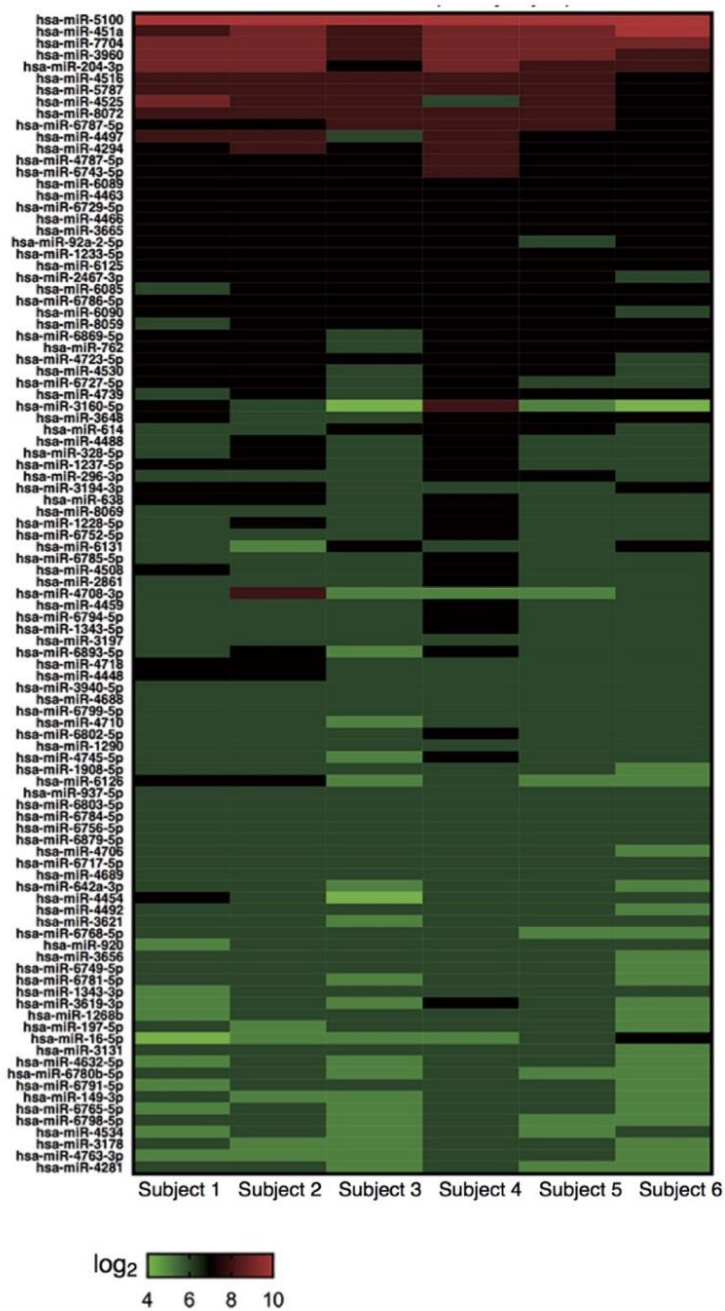
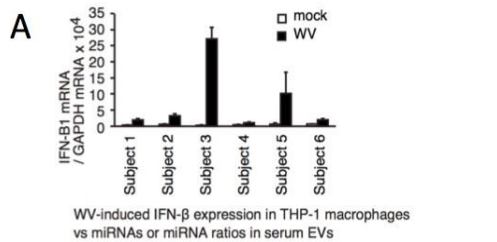


図 血中細胞外小胞内microRNAのマイクロアレイ解析

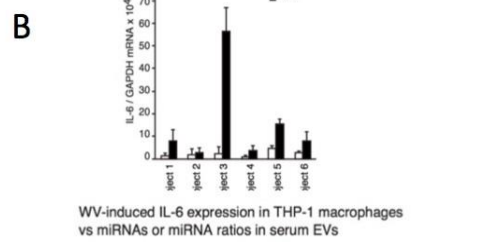
健常人6人から採血し、血清を調整後に細胞外小胞を調整した。細胞外小胞内のRNAを抽出し、microRNAを網羅的にマイクロアレイ法で解析した。



□ mock ■ WV
 □ negative correlation (p < 0.05) ■ negative correlation (p < 0.01)
 □ positive correlation (p < 0.05) ■ positive correlation (p < 0.01)

Pearson correlation coefficient (r)

Name of microRNA	Global normalization		miRNA ratio		(target/miR-16)		(target/miR-7704)	
	r	p value	r	p value	r	p value	r	p value
hsa-miR-5100	0.34	0.51	-0.16	0.76	0.36	0.09	-	-
hsa-miR-451a	-0.14	0.79	-0.69	0.13	0.36	0.48	-	-
hsa-miR-7704	-0.83	0.04	-0.53	0.28	-	-	-	-
hsa-miR-3960	-0.76	0.08	-0.43	0.40	0.85	0.03	-	-
hsa-miR-204-3p	-0.75	0.08	-0.56	0.25	-0.66	0.16	-	-
hsa-miR-4516	-0.03	0.96	-0.23	0.66	0.80	0.06	-	-
hsa-miR-5787	-0.35	0.50	-0.32	0.54	0.99	0.00	-	-
hsa-miR-4525	0.45	0.37	-0.00	1.00	0.81	0.05	-	-
hsa-miR-8072	-0.33	0.53	-0.32	0.53	0.96	0.00	-	-
hsa-miR-6787-5p	0.43	0.39	-0.16	0.76	1.00	0.00	-	-
hsa-miR-4497	-0.80	0.05	-0.56	0.25	-0.70	0.12	-	-
hsa-miR-4294	-0.59	0.22	-0.51	0.30	0.09	0.86	-	-
hsa-miR-4787-5p	-0.77	0.07	-0.45	0.37	0.87	0.02	-	-
hsa-miR-6743-5p	-0.08	0.88	-0.28	0.59	0.99	0.00	-	-
hsa-miR-6089	-0.46	0.36	-0.34	0.51	0.80	0.06	-	-
hsa-miR-4463	-0.23	0.67	-0.28	0.59	0.92	0.01	-	-
hsa-miR-6729-5p	-0.09	0.87	-0.26	0.62	0.99	0.00	-	-
hsa-miR-4466	0.10	0.86	-0.22	0.68	0.99	0.00	-	-
hsa-miR-3665	-0.14	0.79	-0.29	0.58	0.96	0.00	-	-
hsa-miR-92a-2-5p	0.03	0.96	-0.16	0.76	0.75	0.09	-	-



□ mock ■ WV
 □ negative correlation (p < 0.05) ■ negative correlation (p < 0.01)
 □ positive correlation (p < 0.05) ■ positive correlation (p < 0.01)

Pearson correlation coefficient (r)

Name of microRNA	Global normalization		miRNA ratio		(target/miR-16)		(target/miR-7704)	
	r	p value	r	p value	r	p value	r	p value
hsa-miR-5100	0.33	0.53	-0.09	0.87	0.99	0.00	-	-
hsa-miR-451a	-0.17	0.75	-0.66	0.16	0.35	0.50	-	-
hsa-miR-7704	-0.83	0.04	-0.48	0.34	-	-	-	-
hsa-miR-3960	-0.79	0.06	-0.37	0.47	0.85	0.03	-	-
hsa-miR-204-3p	-0.73	0.10	-0.50	0.31	-	-	-	-
hsa-miR-4516	-0.08	0.88	-0.18	0.73	0.79	0.06	-	-
hsa-miR-5787	-0.34	0.51	-0.25	0.64	0.97	0.00	-	-
hsa-miR-4525	0.48	0.34	0.07	0.89	0.84	0.03	-	-
hsa-miR-8072	-0.35	0.49	-0.26	0.62	0.96	0.00	-	-
hsa-miR-6787-5p	0.32	0.53	-0.10	0.85	0.99	0.00	-	-
hsa-miR-4497	-0.78	0.07	-0.50	0.31	-0.64	0.17	-	-
hsa-miR-4294	-0.67	0.14	-0.50	0.31	-0.01	0.98	-	-
hsa-miR-4787-5p	-0.84	0.03	-0.40	0.44	0.81	0.05	-	-
hsa-miR-6743-5p	-0.15	0.77	-0.22	0.67	0.94	0.01	-	-
hsa-miR-6089	-0.46	0.36	-0.28	0.59	0.82	0.04	-	-
hsa-miR-4463	-0.19	0.73	-0.21	0.69	0.96	0.00	-	-
hsa-miR-6729-5p	-0.11	0.83	-0.19	0.71	0.96	0.00	-	-
hsa-miR-4466	0.05	0.93	-0.16	0.76	0.96	0.00	-	-
hsa-miR-3665	-0.17	0.74	-0.22	0.67	0.96	0.00	-	-
hsa-miR-92a-2-5p	0.18	0.74	-0.06	0.91	0.84	0.04	-	-

図 血中細胞外小胞内microRNAと炎症の強さとの相関

前の図のマイクロアレイ解析に用いた6人の健康人サンプルについて、その血清を用いてマクロファージを2日間培養した。マクロファージの培養液に、季節性インフルエンザ全粒子ワクチン (wv) を添加し、マクロファージから産生されるI型インターフェロン量(A)、IL-6量(B)を測定した。それぞれのサイトカインの産生量と、マイクロアレイで求めた血中細胞外小胞内microRNA量との相関を調べた。赤は正の相関を、青は負の相関を示す。Global normalizationは、全RNA量で、個々のmicroRNA量を補正した値。miRNA ratioは、miR-16またはmiR-7704との相対的な発現量を示す。(r:相関係数)

これらの相関が、生体内でも生じるかを調べるために、マウス動物モデルを用いて調べてみた。ワクチン接種前日にマウス尾静脈より採血し、血中細胞外小胞内 microRNA 量を測定した。その後、マウスにインフルエンザ全粒子ワクチンを接種し、接種後の炎症の強さを、IP-10量を指標として観察した。結果、血中細胞外小胞内 miR-451a 量は、副反応の原因となる炎症性応答の強さと有意に相関することを発見した。これは、血中の細胞外小胞内 microRNA が副反応を予測する検査のバイオマーカーとして有効であることを示唆する。

現在は、季節性インフルエンザワクチン接種について、ヒトでの臨床試験を実施中である。臨床試験に於いては、季節性インフルエンザワクチン接種前に採血し、血中細胞外小胞内 microRNA を測定する。そして、ワクチンを接種した後の副反応の有無と、microRNA 量との相関を調べる。

このような副反応リスクを検査する方法を体外診断用医薬品として承認を得るためには、そのメカニズムの解明が重要である。そこで、このメカニズムの解明に取り組んだ。

細胞外小胞は、microRNA を細胞から細胞へと伝達し、細胞間情報伝達を担う。そこで、血中の細胞外小胞が microRNA を生体内の細胞へと伝達できるかどうかを調べたところ、細胞外小胞はマクロファージや樹状細胞の細胞質内へと RNA を伝達できることを発見した。その

ため、マウス個体に於いて、血中細胞外小胞内 miR-451a 量は、脾臓の樹状細胞内の miR-451a 量と強く相関した。これは、血中の細胞外小胞が、miR-451a を脾臓の受容細胞内へと伝達することを示唆する。

miR-451aは14-3-3ζをターゲットとして、その機能を抑制しサイトカイン産生を抑制することが知られている。実際に、miR-451a が、ワクチン成分に反応したマクロファージ

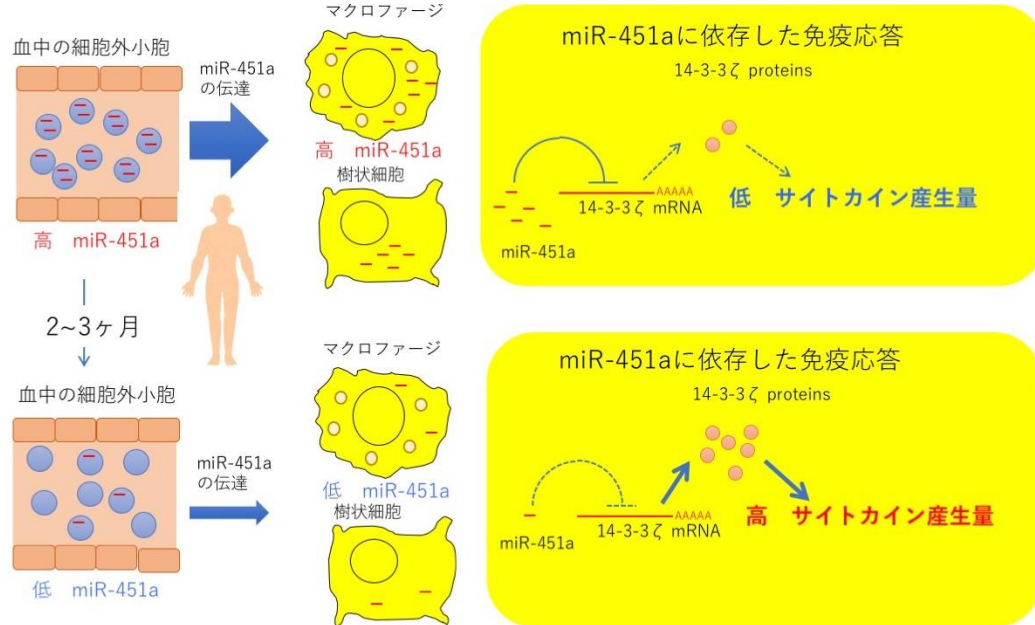


図 血中の細胞外小胞が炎症性サイトカイン産生量を制御するメカニズム

血中には多量の細胞外小胞が存在し、miR-451aを含む。このmiR-451a量は緩やかに変化する。細胞外小胞はmiR-451aを生体内の樹状細胞やマクロファージへと運ぶため、血中の細胞外小胞内miR-451a量に依存して、樹状細胞やマクロファージ内のmiR-451a量も変化する。取り込まれたmiR-451aは14-3-3ζの発現を制御し、炎症性サイトカイン産生量を制御する。

の炎症性サイトカイン産生を抑制したことから、血中の細胞外小胞が miR-451a を生体内のマクロファージや樹状細胞に運ぶことで、運ばれた miR-451a が 14-3-3ζ の発現抑制を介して炎症性サイトカイン産生を抑制することが示唆された。

血中の細胞外小胞のその他の microRNA である miR-5100 や miR-7704 についても、標的分子は未同定であるが、インフルエンザワクチンの成分に反応した炎症性サイトカイン産生を制御することが明らかとなった。

これらのことから、血中の細胞外小胞が、microRNA を介してマクロファージや樹状細胞などの炎症性サイトカイン産生を制御すること、そのため、これらの microRNA をバイオマーカーとして、炎症性サイトカインが原因となる副反応の有無を予測できると考えられる。

「インフルエンザ重症化メカニズムの解明」

インフルエンザの重症化の原因やメカニズムについては不明であるが、インフルエンザ感染により誘導される炎症性サイトカインによるサイトカインストーム説が提唱されている。インフルエンザウイルスは細胞内へと侵入すると RIG-I と呼ばれるウイルス認識センサーにより認識される。RIG-Iはミトコンドリア外膜上に存在するアダプター分子である MAVS を介してI型インターフェロンや炎症性サイトカイン産生の発現を誘導する。我々は、この RIG-I と MAVS との結合を仲介する分子として Zyxin 分子を発見した。Zyxin はインフルエンザウイルス感染時の炎症性サイトカインの産生を亢進した。このことから、インフルエンザの重症化には Zyxin 遺伝子の SNP(Single Nucleotide Polymorphism)などが関与する可能性も考えられる。

3. 今後の展開

今回の研究から、ワクチン接種後副反応の原因となる過剰な炎症について、血中の細胞外

小胞内 microRNA が有用なバイオマーカーとなることを発見した。これを踏まえて、副反応を予め予測する診断法や検査キットを開発するために、現在臨床試験を実施中である。ワクチンとしては、現在普及している HA スプリットワクチンを用いているが、来年度以降は、HPV ワクチンなどの他の不活化ワクチンにも対象を広げ臨床試験を実施する予定である。これらの臨床試験で、副反応リスクが予測できることを実証することで、副反応のリスクを事前に予測する検査キットの開発や診断法の開発を行う。

HPV ワクチンによる副反応への懸念は、ワクチン接種率を大きく減少させている。HPV ワクチンの予防効果は 50%程度と推定されており、年間 1,000 人ほどの女性の命を救い、5,000 人ほどの子宮頸がんの発症を予防できると期待されている。しかし、接種率が 1%未満にまで低下しており、これら救われるべき人たちが取り残されている。そのため、本研究で得られた成果を HPV ワクチンなどの他のワクチンにも応用することで、副反応への懸念が無くなり、安全に安心してワクチンが接種できる時代が来ると期待される。

自動車などでは事故での怪我を防ぐためにチャイルドシートやシートベルトが義務化されている。ワクチンは感染症の予防のために非常に重要であるが、ある一定の割合で副反応が現れるのも事実である。ワクチンの副反応を予め予測できるようになれば、副反応リスクを予測する検査を推奨又は義務化することで、副反応頻度を減少させ、安全に安心してワクチンが接種できる時代が来ると期待される。

ワクチンを安全で安心して接種できる社会

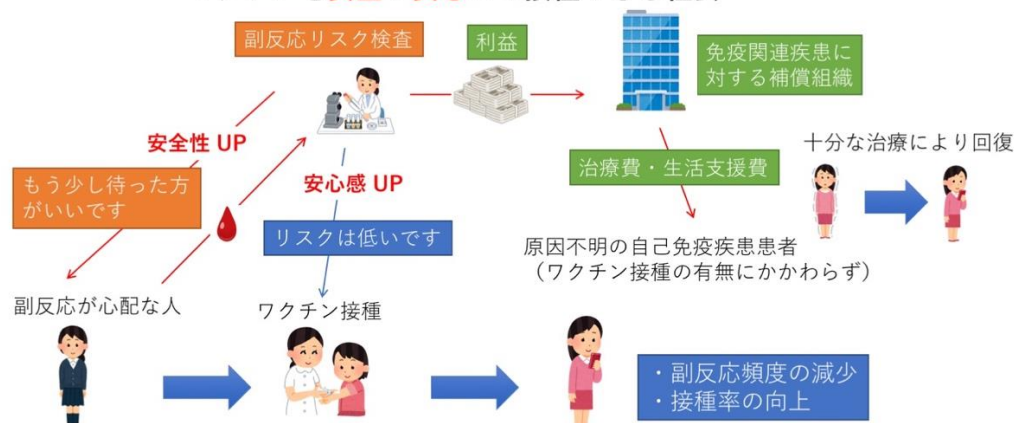


図 将来のワクチン行政への提言

インフルエンザワクチンやHPVワクチンなど、副反応への懸念から接種率が低下し、感染症による健康被害の増加が繰り返されている。副反応に対する懸念を解消して欲しいとの社会的要請に応えるため、副反応が生じるリスクを予め検査する方法を開発する。副反応への懸念がある人は、副反応リスクを予め検査し、リスクが高いと判断されれば接種を延期することができる。また、リスクが殆どないことが分かれば安心して接種できる。このような検査で得られたリスクを、原因不明の自己免疫疾患様の症状に苦しむ患者への支援にあてることで、十分な治療を受けることが可能となりより早い社会復帰が可能となる。

4. 自己評価

血液中の細胞外小胞内 microRNA の働きについては研究者の中でも意見が大きく分かっている。例えば、細胞外小胞が microRNA を細胞から細胞へと伝達することは既に広く唱えられているが、少なくない数の研究者が、そのような現象が存在しないと否定している。

本研究では、血中の細胞外小胞に焦点を絞り、miR-451a が非常に多量に含まれることを網羅的解析から明らかとした。一方で、細胞内には miR-451a が非常に少ないため、血中の細胞外小胞が、miR-451a を細胞内へと運ぶことで、細胞内の miR-451a 量を上昇させることを示した。しかし、このような現象は、細胞内に多く含まれ、細胞外小胞内には少ない miR-21 では観察されない。これは、例え細胞外小胞が miR-21 を細胞内へと運んだとしても、細胞内には既に多量の miR-21 が存在するために、細胞内 miR-21 量を変動させることができないことを意味する。これは、細胞外小胞が microRNA を細胞内へと伝達することが事実だとする研究者と事実でないとする研究者の一見した矛盾を説明できる。つまり、細胞外小胞は、上記の理由から、特定の

microRNAだけを運んでいるように見えるためである。これは細胞外小胞の研究の発展にとって非常に重要な概念になる。

ワクチンの副反応は、過剰な免疫応答と考えられてきた。過剰な免疫応答としては過敏反応（アレルギー）が知られる。過敏反応はゲル・クームスの分類による4種類の反応に分類されるが、何れも獲得免疫応答である。獲得免疫応答は抗原特異的な反応である。そのため、ワクチン接種当日から現れる接種局所での腫脹・発赤・疼痛を説明するには、ワクチン成分に対するIgEなどの特異抗体を予め持っていたとしか説明できない。しかし、ワクチンは未知の抗原、つまり初めての抗原を接種するのであり、上記の副反応が数%の人に現れることは全く説明できない。本研究では、自然免疫応答に着目し、1) 血中の細胞外小胞内のmicroRNAが、ワクチン成分に対する自然免疫応答に強い影響を与えること、2) このmicroRNA量は日々の生活で緩やかに変動すること、3) このmicroRNAの変動量は、ワクチン成分に対する自然免疫応答の強さを変えること、を明らかにした。このことから、血中の細胞外小胞内のmicroRNAがワクチン成分に対する自然免疫としての炎症応答の強さに影響を与えると考えることで、ワクチン接種当日から現れる副反応に個人差があることを説明できる。現在、人での臨床試験を実施中であり、この仮説が正しいと検証できれば、ワクチン接種後の局所で生じる副反応が説明できるようになり、学術的な重要性は高い。

ワクチンに関する臨床試験を今年度実施しており、血中の細胞外小胞内のmicroRNAにより副反応を予測できるかどうかを検証することが可能である。当初の予定では、インフルエンザ全粒子ワクチンを用いる予定であったが、ワクチンメーカーなどの事情もあり、現状のHAワクチンでまず実証し、来年度以降に、全粒子ワクチンや、HPVワクチンなどの他のワクチンでも検証する予定である。

当初計画では、細胞外小胞内のRNAだけでなく、細胞外小胞のタンパク質成分との関連も調べる予定であったが、計画途中に、RNA成分が非常に重要であることが明らかとなったことから、タンパク質成分の比較は実施しなかった。

また、ワクチン接種後の重大な副反応であるギラン・バレー症候群などの発症予測については、未発表であるが、予測をする目処を得ており、今後、軽微な副反応と重大な副反応のリスク検査方法が開発できると期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Okamoto M, Fukushima Y, Kouwaki T, Daito T, Kohara M, Kida H, Oshiumi H. MicroRNA-451a in extracellular, blood-resident vesicles attenuates macrophages and dendritic cell responses to influenza whole-virus vaccine. *J. Biol. Chem.* 2018 293: 18585-18600.
2. Tsukamoto H, Fujieda K, Miyashita A, Fukushima S, Ikeda T, Kubo Y, Senju S, Ihn H, Nishimura Y, Oshiumi H. Combined Blockade of IL6 and PD-1/PD-L1 Signaling Abrogates Mutual Regulation of Their Immunosuppressive Effects in the Tumor Microenvironment. *Cancer Res.* 78: 5011-5022. (IF = 9.13)
3. Fujikura D, Muramatsu D, Toyomane K, Chiba S, Daito T, Iwai A, Kouwaki T, Okamoto M, Higashi H, Kida H, Oshiumi H. *Aureobasidium pullulans*-cultured fluid induces IL-18 production, leading to Th1-polarization during influenza A virus infection. *J. Biochem* 2018 163: 31-38.
4. Kouwaki T, Okamoto M, Tsukamoto H, Fukushima Y, Matsumoto M, Seya T, Oshiumi H. Zyxin stabilizes RIG-I and MAVS interactions and promotes type I interferon response. *Sci. Rep.* 2017, 7: 11905
5. Kouwaki T, Fukushima Y, Daito T, Sanada T, Yamamoto N, Mifsud EJ, Leong CR, Tsukiyama-Kohara K, Kohara M, Matsumoto M, Seya T, Oshiumi H. *Front. Immunol.*

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 1 件 (公開前の出願件名については件数のみ記載)

(3) その他の成果 (主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 押海裕之 「ワクチン接種後副反応と血液中の細胞外小胞内 microRNA」
平成 30 年 3 月 14 日 4 大学感染症連携研究教育連合シンポジウム 招待講演
2. Oshiumi H and Okamoto M miR-451a in blood-circulating extracellular vesicles controls the innate immune response of macrophages. Keystone Symposium. (Canada) Feb. 20, 2018. Short Talk.
3. 押海裕之 「インフルエンザ全粒子ワクチンに対する自然免疫応答での細胞外小胞の役割」
平成 29 年 6 月 30 日 第 27 回 日本生体防御学会学術集会 シンポジウム招待講演
4. 押海裕之 「B 型肝炎ウイルスに対する自然免疫応答におけるエクソソームの役割」
平成 28 年 5 月 14 日 第 81 回 日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会
シンポジウム招待講演
5. 押海裕之 「ウイルス感染症と自然免疫応答」
平成 27 年 12 月 6 日 皮膚科学会熊本地方会
シンポジウム招待講演

研究報告書

「ヒト shRNA と微生物 cDNA を利用した機能的ゲノミクス・スクリーニングに基づく新しい代謝標的がん治療開発技術の創出」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015 年 10 月～2019 年 3 月

研究者: 加藤 洋人

1. 研究のねらい

この研究計画の狙いは、新しい機能ゲノミクス・スクリーニング法を開発し、それに基づいた新規代謝標的がん治療法の開発技術を樹立することである。

がん細胞が正常細胞とは異なる特徴的な代謝フェノタイプを呈することはよく知られており、これまでに、がん細胞やがん微小環境における特異的な代謝プロファイルが次々と明らかにされている。つまりがんとは代謝異常を包含する疾患であると理解されるようになった。「がん特異的な代謝活性の異常」が存在するという事は、がん細胞がその生存のために強く依存し、あるいは利用している特異的な代謝経路が存在することを示している。重要なことは、そのような「特定の代謝活性に対する依存」という状況に介入することで、新しいがん治療法の開発が可能だという点である。

そのような背景に基づいて、がん細胞でみられる特異的な代謝異常を標的としたがん治療薬の開発が多くの研究者によって試みられているが、そのために通常考えられるアプローチとしては、がん特異的な代謝変化を同定し、それに対する阻害剤を開発するという手法である。しかしながら、この研究計画ではそのような「がん特異的な代謝プロファイリング」といった解析からはいったん離れ、私がこれまでに蓄積していた保有技術（①shRNA ライブラリの構築技術+②cDNA ライブラリの構築技術+③次世代シーケンス技術）を基盤として開発される「仮説なしの新しい網羅的ゲノミクス・スクリーニング法」によって、がん治療の標的となりうる代謝関連分子を一網打尽に同定することができる新しい方法論を確立する。

この研究計画で最もオリジナリティのある点は、微生物 cDNA ライブラリを用いたスクリーニングを行うことである。微生物 cDNA をヒトがん細胞に導入し強制発現させることによって、本来ヒト細胞には存在しない想定外の原始的側副代謝経路・迂回代謝経路を強制的に活性化させ、ヒトがん細胞の代謝ホメオスタシスを揺さ振りを仕掛ける。このような方法論をとることによって、「既知のヒト代謝経路」という枠組みを越えた予想外の新規がん治療標的あるいはがん治療に応用可能な代謝産物を発見することができる独創的な研究を遂行できると考えられる。この研究計画によって樹立される新規スクリーニング法を通して、複数の新規代謝標的がん治療の基盤的方法論が見出されていくことが期待される。

2. 研究成果

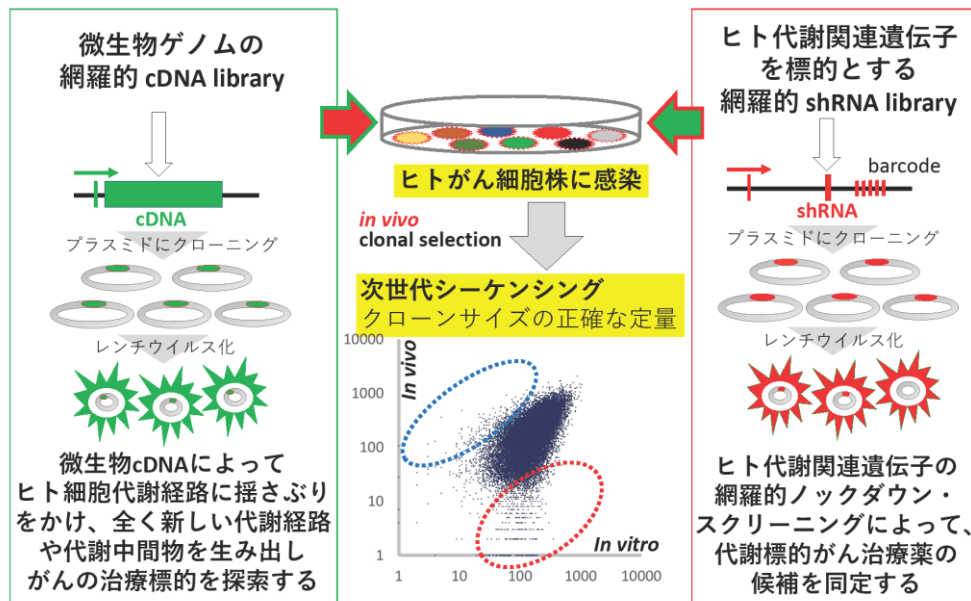
(1) 概要

これまでにない新しい機能ゲノミクス・スクリーニング法を樹立して、がん治療において介入可能な新規代謝関連治療標的を探索することを目的として、微生物 cDNA の網羅的レンチウイルス・ライブラリおよびヒト代謝関連遺伝子の網羅的 shRNA レンチウイルス・ライブラリを構築した。図 1 に示すように、大腸菌の全 cDNA をカバーした cDNA ライブラリをヒトがん細胞に導入して *in vivo* における細胞増殖や細胞死を次世代シーケンサで定量するという新しいスクリーニング法を樹立することに成功し、具体的に新しいがん治療標的としての応用可能性を有する複数の新規代謝関連分子および代謝経路を同定することができた。微生物 cDNA をヒトがん細胞に導入して強制発現させることによって、本来ヒト細胞には存在しない想定外の原始的側副代謝経路・迂回代謝経路を強制的に活性化させ、ヒトがん細胞の代謝ホメオスタシスを揺さ振りを仕掛けるといった方法論はこれまでにない新しいスクリーニング法であり、「既

知のヒト代謝経路」という枠組みを越えた予想外の新規がん治療標的あるいはがん治療に応用可能な代謝産物を発見することができる独創的なスクリーニング法といえる。この研究計画によって樹立された新規スクリーニング法を通して、今後複数の新規代謝標的がん治療の基盤的方法論が見出されていくことが期待される。

また、ヒト shRNA ライブラリを用いたスクリーニングでは、多くの新規治療標的ヒト遺伝子を同定することができただけでなく、大腸菌 cDNA ライブラリによるスクリーニングと表裏を成すようにヒトがん細胞株ごとに両方で類似の代謝経路がヒットしている例も見出された。両スクリーニングの妥当性を示すと同時に、ヒトがん細胞株ごとに特異的な代謝活性の側面をがん治療標的として狙える可能性があることを明らかにすることができた(図 1)。

図1: 本さきがけ研究で樹立したスクリーニング法の全体像



cDNAあるいはshRNAが導入されたヒトがん細胞クローンのマウス *in vivo* におけるクローンサイズを次世代シーケンスによってカウントし、*in vivo*で脱落あるいは増殖を来したcDNA/shRNAを同定する

大腸菌 cDNA を用いたスクリーニングによって抽出された代謝関連遺伝子あるいは代謝経路については、ヒトがん治療へ応用するための介入法を探るためにもその意義づけが今後の重要な研究課題である。メタボローム解析やヒト遺伝子発現解析などの網羅的データを駆使することによって、ヒトには存在しない cDNA のヒト代謝経路における機能ががん治療における細胞生物学的な意義づけの解析を進めていきたい。

(2) 詳細

本さきがけ研究では以下の研究計画(A)(B)(C)を進めた。

(A) 微生物 cDNA ライブラリを用いた機能的ゲノムスクリーニング系の開発

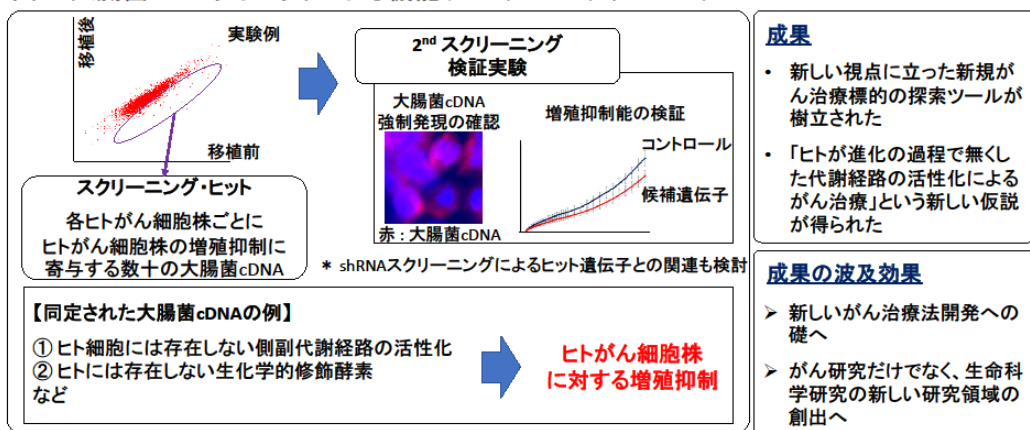
大腸菌 K12 株の全 cDNA 約 4,500 種をヒト細胞で強制発現可能なレンチウイルスプラスミドに網羅的にクローニングし、大腸菌遺伝子の包括的レンチウイルスライブラリを樹立した。幾度かのトライアルアンドエラーを繰り返して、プラスミドライブラリの段階で各 cDNA コピー数が 2 桁のレンジに収まる均質なライブラリの構築に成功した。同時に、ヒトとかけ離れた環境で生存する好熱菌株の全 cDNA を用いたスクリーニングにも興味を持ち、ライブラリ構築を進めた。高温環境に適した GC リッチなゲノム組成のため正確な遺伝子配列を保持したままの包括的クローニングが困難であり、以後のスクリーニングには使用しなかった。完成した大腸菌 cDNA ライブラリについては、複数種のプラスミドについて強制発現後の Immunoblot を実施し、ヒト細胞における強制発現の確認を行った。

胃がん、肝細胞がん、大腸がん、膵がんなどのさまざまなヒトがん株に対して、細胞株ごとに感染細胞数、cDNA レンチウイルス・ライブラリのウイルス濃度、感染後の puromycin 濃度、感染後の細胞死の程度等を詳細に条件検討し、digital PCR 法等を評価系として用いながら、各細胞集団中の細胞1個あたり1種の大腸菌 cDNA がゲノム導入される実験条件を確定した。条件の確定した細胞株から順次、*in vivo* における細胞増殖あるいは細胞死を指標とした機能ゲノミクス・スクリーニングを継続的に進めた。具体的には、*in vivo* 腫瘍を移植する前後における cDNA 感染クローンの増減を次世代シーケンサによって網羅的に数え上げ、腫瘍環境で有意にクローンの減少あるいは増加をきたした cDNA を同定し、細胞株ごとにごがん細胞の増殖や生存に大きく寄与する大腸菌 cDNA の候補を抽出した。

スクリーニングに用いる細胞株はがん種ごとに複数種類を用いることが重要であり、明確な driver mutation を有しない細胞株や代謝プロファイルに特徴を持つ細胞株などといった観点から、可能な限り多彩な細胞株を選ぶように進めた。しかしながら、当初は免疫不全ヌードマウスを用いてスクリーニングを進めたものの、細胞株ごとに *in vivo* 腫瘍の定着率や増殖スピードが極端に異なることが分かった。多種のヒト細胞株を用いたスクリーニングを進めたが、最終的に十分量かつ整合性の良いデータが取得できなかった細胞株は解析から除く方針とした。研究期間後半では、より多彩な細胞株に関するデータを首尾よく取得できるようにすることを目的として、重度免疫不全 NOG マウスを用いた *in vivo* スクリーニング系に移行し、ヌードマウスにおいて十分な定着・増殖が見られなかった細胞株についても *in vivo* 腫瘍環境におけるスクリーニング実験を実施することが可能になった。

結果として、合計12株のヒトがん細胞株を用いたスクリーニング実験を実施できた。腫瘍移植前後の cDNA クローンを次世代シーケンサによってカウントし、*in vivo* 環境で有意にクローンの増減をきたした大腸菌 cDNA を抽出した。がん細胞株ごとに、がんの増殖や生存に寄与する遺伝子候補が約数十遺伝子ずつ抽出された。抽出された遺伝子については、多くのがん細胞に共通して増殖抑制を呈した cDNA、あるいは特定の細胞株に限って明瞭な増殖抑制を呈した cDNA など様々なものがあり、特定の代謝活性プロファイルを有する細胞株に対してのみ強い増殖抑制効果を示すと考えられる cDNA の存在が明らかになった。前者のタイプの cDNA についてはヒト細胞全般に対する毒性が想定され、がん治療法への応用としては、後者のタイプの cDNA が適していると考えた。以後は、そのような cDNA を候補分子として検証実験に移行した。また、ある cDNA と、それと相反する機能を有する cDNA が増殖抑制の観点から真逆の作用を有するペアを探索するなど、機能的に有望な代謝関連経路の探索も進めた。大腸菌 cDNA をヒト細胞に導入することによってがん治療に利用できる代謝関連分子を探索するというスクリーニング法は、これまでに試されたことのなかった手法であり、ここで同定された候補 cDNA はそのいずれもが新規性が高いものと考えられる。大腸菌 cDNA ライブラリを用いた機能ゲノミクス・スクリーニングの全体像を図2にまとめる。

図2：大腸菌cDNAライブラリによる機能ゲノミクス・スクリーニング



研究計画の目標とした微生物 cDNA を用いたスクリーニング系の樹立に成功し、本さきがけ研究の成果によって、微生物 cDNA の網羅的ライブラリを用いた新規スクリーニング法に基づくがん治療法の基盤構築が可能であるという Proof-of-concept が示されたと言える。

(B) ヒト shRNA ライブラリを用いた機能的ゲノミクス・スクリーニング系の開発

ヒトの代謝関連遺伝子約 1,500 種をリスト化し、各々の遺伝子に対して 3~5 種の shRNA 配列を設計することで、全体で約 6,400 種の shRNA からなるヒト代謝関連遺伝子の網羅的レンチウイルス・ライブラリが完成した。プラスミドライブラリの段階で各 shRNA コピー数が 2 桁のレンジに収まるような均質なライブラリを樹立することに成功した。上記の微生物 cDNA ライブラリを用いたスクリーニング法と同様に、胃がん、肝細胞がん、大腸がん、膵がんなどのさまざまなヒトがん株に対して、各細胞集団中の細胞 1 個あたり 1 種の shRNA がゲノム導入される実験条件を確定した。

大腸菌 cDNA ライブラリによるスクリーニングと同期して、ヒト shRNA ライブラリを用いた *in vivo* 機能ゲノミクス・スクリーニングを継続的に進め、次世代シーケンサによって *in vivo* における shRNA 感染細胞のクローンサイズの変化を定量した。結果として、合計 12 株のヒトがん細胞株を用いたスクリーニング実験を実施できた。腫瘍移植前後の shRNA クローンを次世代シーケンサによってカウントし、*in vivo* 環境で有意にクローンの増減をきたした shRNA を抽出した。がん細胞株ごとに、がんの増殖や生存に寄与する遺伝子候補が約数十遺伝子ずつ抽出された。がん種ごとに共通して増殖抑制を呈した遺伝子、あるいは複数のがん種に共通して増殖抑制を呈した遺伝子など、多様な候補 shRNA が同定された。臨床腫瘍の遺伝子発現データなどを用いた遺伝子の絞り込みも併せて進めた。さらに、特定の代謝経路に集中して同定される遺伝子群を検索し、個々の遺伝子の探索だけでなく、がんの治療標的となりうる代謝経路全体の探索も進めた。さらに、上記の大腸菌 cDNA ライブラリと同じ株を用いたスクリーニングを展開していることから、細胞株ごとに、それら両方で類似した代謝経路のヒット遺伝子を抽出するなど、多角的な探索も進めた。

例えば *KRAS* に mutation を有する細胞株や *wnt-β catenin* 経路の活性化が知られる細胞株では *KRAS* や *β catenin* に対する shRNA が増殖抑制を呈するなど、positive control として合致する結果が安定的に得られた一方で、さまざまな代謝経路における新しいがん治療標的遺伝子の候補が同定された。また共同研究によって、抗腫瘍活性を有するもののその機能が明らかでなかった低分子化合物 xanthohumol の分子作用機序に関する新規役割を明らかにすることができた(論文業績を参照)。

(C) スクリーニング系の総合的解析によるがん治療候補分子の探索とその検証

大腸菌 cDNA とヒト代謝関連遺伝子 shRNA の網羅的ライブラリを用いた機能ゲノミクス・スクリーニングの結果を統合的に解析し、発がん分子メカニズムの本態解明に繋がるような新規標的遺伝子、あるいは新しいがん治療標的の候補となる代謝産物や代謝経路の探索を進めた。例えば、同じヒトがん細胞株を用いた大腸菌 cDNA スクリーニングとヒト shRNA スクリーニングで、同様の代謝経路に関連する遺伝子が共通して候補として同定されていることも多くみられ、ある種のがん症例に対して特異的な代謝経路に介入するようながん治療法の有用性が改めて示唆された。

3. 今後の展開

本さきがけ研究で確立された大腸菌 cDNA ライブラリを用いた機能ゲノミクス・スクリーニングは、オリジナリティの高い競争力あるツールであり、継続的にスクリーニングを進めていくことを予定している。あるがん種に絞った上でより多くのヒトがん細胞株に対するスクリーニングを集中して実施するなど、がん治療標的の同定を目指した効率良い研究の展開を予定している。さらに、がん研究に限定せずより多様な生物学的現象を新しい視点で捉え直すための実験ツールとしての応用開発を進めたいと考えている。ヒトには存在しない遺伝子をヒト細胞内で強制発現させることに

よって、これまで実験室で捉えることができなかった細胞生物学的現象に出会うことができる可能性もあり、既知の情報を超えたところで改めて生命現象の新しい側面を認識することが可能になるような研究テーマを模索していきたい。

また、これまでのさきがけ研究期間に同定された大腸菌 cDNA については、メタボローム解析や網羅的ヒト遺伝子発現解析を行うなど、網羅的データベースを統合解析することによってヒト細胞内における機能解析を進め、がん治療としての介入の方法を検討したい。ヒトには存在しない側副代謝経路の利用などを基盤として、新しいがん治療の展開に繋がるような研究を推進していきたいと考えている。

4. 自己評価

本さきがけ研究は、代謝を標的とする新しいがん治療法の探索を目的として、これまでにない新しい機能ゲノミクス・スクリーニング法を樹立することを主要な目標として開始し、結果として微生物 cDNA ライブラリを用いた機能ゲノミクス・スクリーニング法を樹立することができた。微生物 cDNA をヒト細胞内で強制発現させ、進化の中でヒトが無くした原始的代謝経路・側副代謝経路を再獲得させることによって代謝ホメオスタシスに揺さぶりをかけながらがん治療標的を探索するという、研究方針の妥当性すら明らかでなかった状態でのスタートであったが、実際のスクリーニング系を無事に立ち上げたことについては一定程度の評価が許されると思いたい。様々なヒトがん細胞株を用いた *in vivo* スクリーニングによって、ヒトには存在しない側副代謝経路やこれまでがん治療との関連であまり顧みられることのなかった分子が、がん治療における介入ポイントの候補として実際に同定されており、当初思い描いていたような新規スクリーニングツールとしての proof-of-concept は示されたといえる。しかしながら、先行研究としての成果もないゼロからのスタートではあったものの、3年半の期間で主貢献論文の発表を達成できなかったことは大いに反省すべき点と捉えている。

本さきがけ研究期間中に研究費の増額および共同研究 FS(フィージビリティ)支援による追加予算措置を受けることができ、より高いレベルの研究を加速的に推進することができた。研究実施体制は十分であった。

上記のように期間内での主貢献論文の発表は叶わなかったが、本さきがけ研究で確立されたスクリーニング法は、がん治療標的探索に関わる研究コミュニティに対して大きなインパクトのあるものだと自負している。今後はアカデミアと創薬業界の双方に向けて、このスクリーニング法の導出を目指したい。がん治療標的の枯渇が問題とされている現状のなか、新しい視点に立った新規がん治療標的探索ツールとして普及させていくことができれば、我が国の創薬基盤技術の底上げにつながり、科学技術・社会経済へ大きく貢献できることが期待される。さらに、がん研究に限らず広く生命現象一般に対する研究ツールとしての応用性を追求していくことで、生命科学研究の新しい研究領域の創出にも貢献したいと考えている。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Shikata Y, Yoshimaru T, Komatsu M, **Katoh H**, Sato R, Kanagaki S, Okazaki Y, Toyokuni S, Tashiro E, Ishikawa S, Katagiri T, Imoto M. *Protein kinase A inhibition facilitates the antitumor activity of xanthohumol, a valosin-containing protein inhibitor. Cancer Sci.* 2017 Apr;108(4):785-794.

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0件(公開前の出願件名については件数のみ記載)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. **Hiroto Katoh**, Daisuke Komura, Shumpei Ishikawa. *Massively Parallel Synthesis of shRNA*

Library and its Functional Screening Identify Actionable Metabolic Pathway Genes for Cancer Therapy. 2018 Synthetic Biology: Engineering, Evolution & Design (SEED) (Scottsdale, AZ, USA). 2018/6/3 – 2018/6/7.

2. 加藤洋人, 河村大輔, 石川俊平. *Genome-scale Functional Genomics Screening for the Identification of Therapeutic Targets for Gastric Carcinoma*. 第 89 回日本衛生学会学術総会 (愛知県名古屋市). 2019/2/1 – 2019/2/3.
3. 加藤洋人, 山本麻未, 鈴木良平, 石川俊平. *Functional Genomics Screening Using shRNA Library for the Identification of Therapeutic Targets for Gastric Carcinoma*. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (兵庫県神戸市). 2017/12/8 – 2017/12/9.
4. 加藤洋人, 藤橋未希, 佐藤玲子, 鈴木良平, 貴志一樹, 河村大輔, 石川俊平. *Establishment of a Functional Genomics Screening by Combining Global shRNA Library and Next-Generation Sequencing*. 第 75 回日本癌学会学術総会 (神奈川県横浜市). 2016/10/6 – 2016/10/8.

研究報告書

「LA-LDI MS を用いた標的タンパク質の結合位置解析法の開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015 年 10 月～2019 年 3 月

研究者: 北 将樹

1. 研究のねらい

強力な生理活性を有する化合物(リガンド)の標的分子の同定および結合様式の解明は、創薬やケミカルバイオロジーの研究で重要である。標的分子-リガンド複合体の構造は、一般に X 線回折や NMR で解析されることが多いが、その不安定さ・希少さにより適用できない場合も多い。これらの方法を補完する標的分子解析法の一つに、リガンドに反応性官能基と検出基を導入した誘導体(ケミカルプローブ)を用いる手法がある。標的分子がタンパク質の場合、ラベル化後、酵素消化と断片ペプチドの MS 解析あるいはアミノ酸配列分析などにより、標的分子の種類や結合位置を推定できる。一方で、ケミカルプローブを用いる場合、ラベル化反応の効率や検出感度の低さが課題となっており、本手法をより高感度、ハイスループットで実施できる方法の開発が望まれている。そこで本研究では、マトリックスを使用しないラベル支援レーザー脱離イオン化による質量分析法(LA-LDI MS)を用いて、プローブと結合した標的分子由来の断片ペプチドを高選択性かつ高感度で検出できるケミカルプローブを創製し、標的分子におけるリガンド結合部位を高精細に解析する新手法の開発を目指した。

芳香族炭化水素であるピレン基を持つ化合物は LA-LDI MS で選択的に励起、検出される。本研究では、より高感度で検出できるピレン誘導体を開発し、実際にケミカルプローブの検出基として用いて、酵素消化後の反応混合物からラベル化ペプチドの選択的な検出を行うこととした。また、リガンドと検出基の間にラベル化もしくは MS 測定時に切れる結合を導入したりリガンド解離型プローブを開発して、ラベル化ペプチドの検出感度のさらなる向上を目指した。さらに、*in vitro* (精製した生体高分子) および *in situ* (培養細胞や組織標本) の系でも標的分子をラベル化して、血液や組織抽出物など様々な混合物から極微量の標的分子や疾患代謝産物を検出・同定すること、および *in vivo* (動物個体内) でのラベル化と疾患代謝産物の解析にも適用することを目指した。具体的なりガンドとして、細胞骨格タンパク質アクチンとチューブリン間の特異な相互作用を誘導する抗腫瘍性天然物アプシロニン A や、炎症や痛み作用に関わる哺乳動物由来のペプチド神経毒など、標的受容体が未知のもの、もしくはその結合様式が詳しく解明されていないものを選び、本手法での解明を目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、芳香族化合物ピレンを持つケミカルプローブとマトリックス不要のレーザー脱離イオン化質量分析法(LA-LDI MS)を用いて、標的タンパク質とリガンドの結合位置を高精細に解析する手法の開発を目指した。

研究テーマ1「LP プローブの設計・合成と機能評価」: LA-LDI MS において、既存のピレン化合物よりも約 1,000 倍検出感度が高い 6-アミドピレン誘導体を開発した。次いで海洋天然物アプシロニン A の光親和性アミドピレンプローブを合成し、アミドピレン基の共存下でも光反応が進行すること、および LA-LDI MS および MS/MS 解析により、その内部構造を決定できることを示した。またアミドピレン基よりも約 100 倍 LA-LDI MS での検出感度が向上した新規ピレン誘導体の創成にも成功した。

研究テーマ2「標的タンパク質のラベル化および LA-LDI MS による検出」: アミドピレンの

NHS エステル誘導体をタンパク質と反応, ついで酵素消化を行い, ピレン標識ペプチドを選択的に LA-LDI MS で検出できることを示した。ついでアプリーロニン A にアミドピレン基と NHS 基を導入して標的分子アクチンを高効率かつ選択的にラベル化し, LALDI-MS/MS 解析によりラベル化ペプチドの構造を決定した。また, ビオチンとアミドピレンの間に NHS 基を挟んだリガンド解離型 LP プローブを合成し, アビジンにおける選択的なラベル化を達成した。アビジンは構造が非常に強固なタンパク質であり, 酵素消化には高濃度の塩による変性が必要であるが, その脱塩方法が課題であった。検討の結果, ポリスチレン製ゲルろ過樹脂による効率的な脱塩と精製法を開発でき, 取り扱いが難しい標的分子のラベル化とその結合位置の解析を達成できた。また, リジン残基-プローブ間で共有結合させた中間体に基づく covalent-Dock 計算により, プローブでラベル化されたアミノ酸残基の情報から, もとのリガンドの結合様式を精密に決定する手法を開発した。

研究テーマ3「炎症・痛み作用に関わる, 哺乳動物由来のペプチド神経毒の機能解明」:
有毒哺乳類ブラリナトガリネズミの顎下腺から微量単離した麻痺性神経毒 BPP1,2 の全アミノ酸一次配列を決定した。配列の相同性からヒトのオピオイドペプチドの前駆体タンパク質であるシンエンケファリンと類似しており, その二次構造と比較することで, BPP 類の3つのジスルフィド結合の結合様式を推定した。精製した BPP2 には Ca チャネル開口活性がみられ, かつこの活性は N 型 Ca チャネル阻害剤 ω -コトキシンにより阻害されることが分かった。

(2) 詳細

研究テーマ1「LP プローブの設計・合成と機能評価」

LA-LDI MS では, ピレン基などレーザー光で励起されるクロモフォアをもつ化合物のみが選択的に検出されることが以前から報告されていたが, ピレン化合物自身の検出感度はマイクロ~ナノモル量と低く, ラベル化産物の解析を行うには実用性に欠けていた。そこで, レーザー波長や蛍光基としての特徴に注目して, ピレンの 6 位に窒素官能基を導入した 6-アミドピレン誘導体を合成し(図1), これが既存のピレン化合物よりも約 1,000 分の 1 の量で LA-LDI MS で検出できることを発見した。次に, 海洋天然物アプリーロニン A をリガンド, 反応性官能基をジアジリン, 検出基をアミドピレンとした LP (LA-LDI MS-applicable pyrene) プローブを合成した。本プローブは天然物が持つ強力な生物活性(がん細胞の増殖阻害活性, アクチン脱重合活性, および紡錘体形成の阻害活性)を保持していた。標的タンパク質のラベル化反応のモデル実験として, このプローブに 365 nm の紫外光を照射して光反応を行い, ジアジリン基が溶媒分子(水, メタノール)と定量的に反応し, 紫外光を吸収するアミドピレン基が共存してもラベル化できることを明らかにした。さらに, このアミドピレン基を持つ LP プローブの溶媒との反応物を用いた LA-LDI MS および MS/MS 解析により, アミドピレン基から MS 系内でケテンが脱離して生じるアミノピレン基が, 特有のフラグメントイオンを発生させ, ラベル化体の内部構造を詳しく解析することに成功した(主要論文1)。

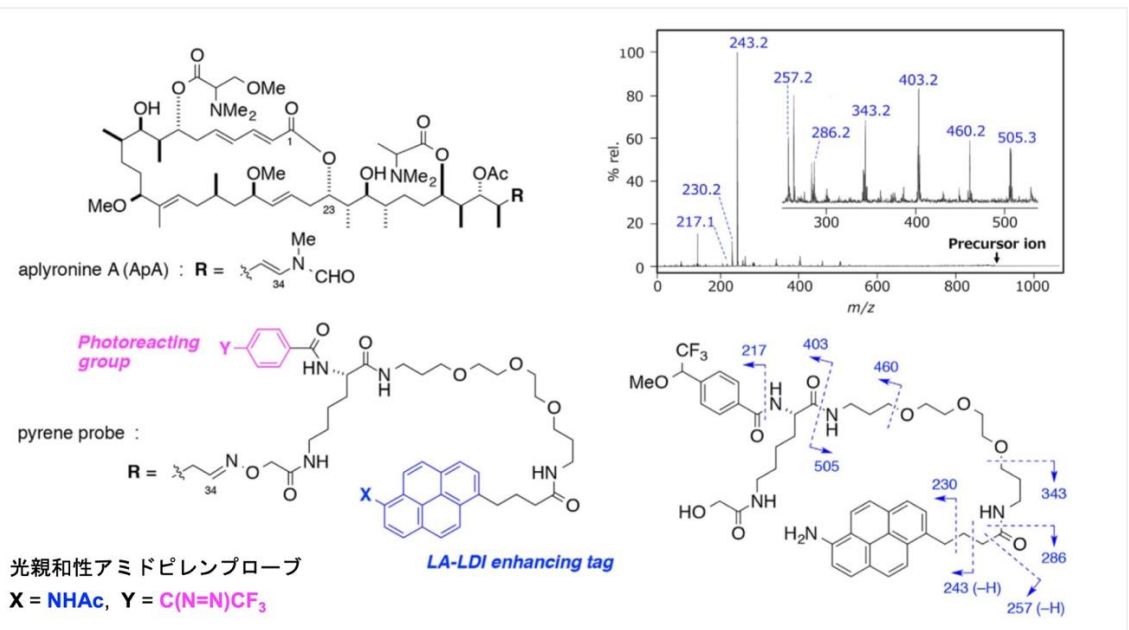


図1 アプリロニン A の光親和性アミドピレンプローブの構造と LA-LDI MS/MS 解析

さらに、アミドピレン基よりも高感度で LA-LDI MS で検出可能な蛍光タグの開発を目指して、誘導体の合成と機能評価を行い、アミドピレン基よりも約 100 倍検出感度が向上した新規ピレン誘導体を創成した(論文執筆中)。また *N*-アルキルピリジニウム化合物など、分子内で電荷を持ち、親水性も高い市販の芳香族化合物 20 種類について、LA-LDI MS 検出タグとしての評価を行った結果、その一種が上記の新規ピレン誘導体に匹敵する高感度で検出されることを見出した。

研究テーマ2 「標的タンパク質のラベル化および LA-LDI MS による検出」

まず、アミドピレンを結合したラベル化ペプチドの LALDI MS での検出を検討した。アミドピレンに *N*-ヒドロキシスクシニル(NHS 基)を結合させた誘導体をアクチンと反応させ、酵素消化で得られたペプチド混合物を解析した結果、MALDI 法ではラベル化体と非ラベル化体が同程度の強度で観測されたのに対し、LA LDI-MS では、ラベル化体がほぼ選択的に検出され、本手法で実際にピレン標識ペプチドを検出できることを実証した(図2)(主要論文2)。

次に、標的分子既知の LP プローブを用いて、in vitro ラベル化とピレン標識産物の MS 解析を行った。アプリロニン A が誘導するアクチン・チューブリン間のタンパク質間相互作用(PPI)について、表面プラズモン共鳴法(装置: Biacore)による2つのタンパク質とリガンド間の相互作用および結合解離定数を解明した(主要論文3)。この知見に基づき、上記で合成したアプリロニン A の光親和性アミドピレンプローブを用いて標的分子のラベル化を検討したが、効率は 1%以下と非常に低く、ラベル化ペプチドの蛍光 HPLC および MS での検出はできなかった。類似の光親和性蛍光プローブを用いた解析より、光ラベル化による反応生成物は主に水分子の付加体であり、これはリガンドがアクチン表面の親水性が高い領域で強く結合することが原因であることがわかった(主要論文4)。そこで、アプリロニン A にアミドピレン基と NHS 基を導入したプローブを合成し、アクチンの定量的な in vitro でのラベル化に成功した。さらに、酵素消化・LALDI-MS および MS/MS を組み合わせることで、ラベル化ペプチドの検出と内部構造の決定に成功した。統合計算化学システム MOE (Molecular Operating Environment)を用いたドッキングシミュレーションにより、プローブが共有結合した Lys 残基の近傍に来る配座が最も安定であり、本手法により、リガンドの標的タンパク質における結合位置を実際に予測できることを示した(主要論文2)。

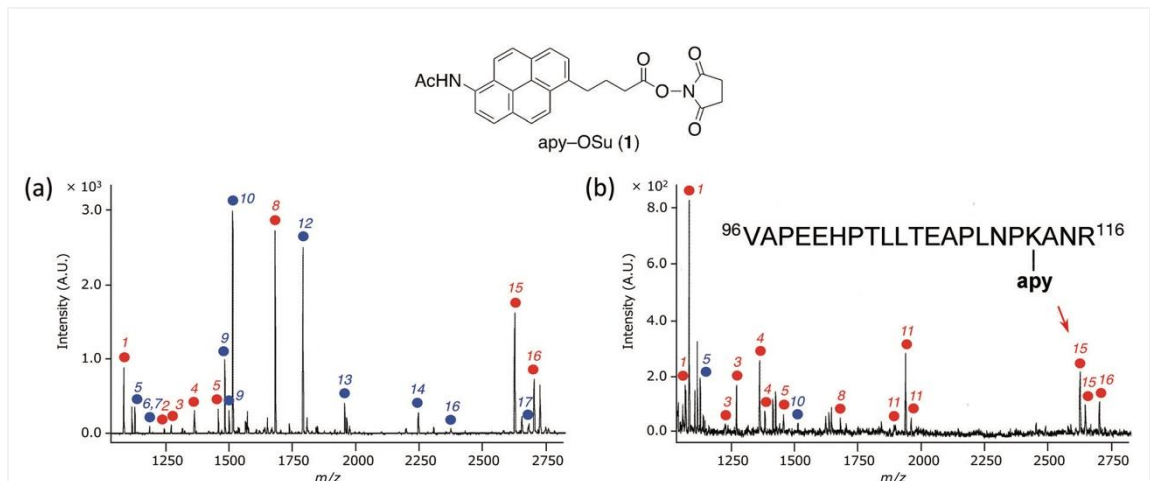
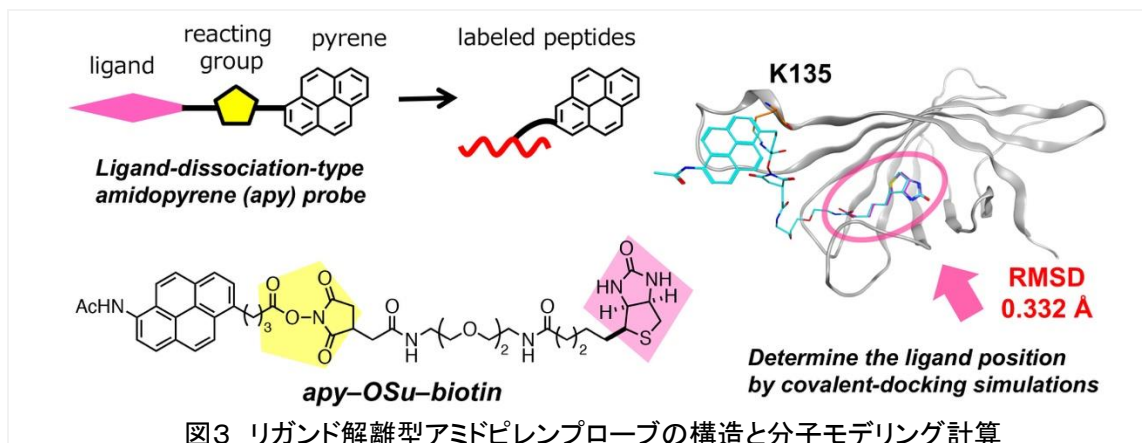


図2 アミドピレンでラベル化されたアクチンの断片ペプチドの(a)MALDI および(b)LA-LDI MS 赤色はアミドピレンが結合したラベル化ペプチド, 青色は非ラベル化ペプチドを指す

さらに、リガンドにピオチン、検出基にアミドピレン基を持ち、反応性官能基 NHS を内包したリガンド解離型 LP (LA-LDI MS-applicable pyrene) プローブを合成し、標的タンパク質アビジンのラベル化と酵素消化後のラベル化ペプチドの MS 解析を行った(図3)。結晶構造をもとに NHS 基とリガンド間の距離を適切に設計することで、リジン残基が1箇所のみ特異的かつ高効率で標的分子のラベル化ができる条件を見出した。一方で、アビジンはアクチンとは異なり、構造が非常に強固なタンパク質である。そのため通常の条件では酵素消化は全く進行せず、 Guanidinium 塩酸塩など高濃度の変性剤を加えて酵素消化する必要があるが、この不揮発性の塩を除かないと LDI MS での検出が困難であった。種々の検討により、ポリスチレン製ゲルろ過樹脂 TSK-G3000S を担体に用いて、水からメタノールの割合を増やして溶出させた結果、非ラベル化ペプチドは 25~75% MeOH 画分で主に溶出されるのに対し、ラベル化ペプチドでは 75% MeOH 画分で主に溶出され、MALDI 法でもピレンラベル化ペプチドを基準ピークとして検出できた。また LA-LDI MS についても、高濃度の不揮発性の塩を含まないサンプルに比べると感度は低いものの、350 pmol 量のアビジンから酵素消化したラベル化ペプチドの分子イオンピークの検出に成功した。当初期待していた LA-LDI MS による高感度なアミドピレンラベル化ペプチドの検出には至らなかったが、本脱塩法を組み合わせることで、取り扱いが難しい標的生体分子のラベル化とその結合位置の解析を達成することができた。また、実際にラベル化された Lys135 残基の ε-アミノ基とプローブの NHS 基との間で共有結合を形成したヘミアセタール中間体の構造に基づく covalent-Dock 計算を検討し、プローブのピオチン基の配座がもとの結晶構造中のリガンドとほぼ一致する (RMSD < 0.4 Å) という結果を得た。これにより、プローブでラベル化されたアミノ酸残基の情報から、もとのリガンドの結合様式を精密に決定する手法を開発できた(主要論文5)。



研究テーマ3 「炎症・痛み作用に関わる、哺乳動物由来のペプチド神経毒の機能解明」

哺乳類由来の特異な神経毒の構造および麻痺活性や炎症、痛み作用に関わる特異なメカニズムの解明を目指して研究を行った。有毒哺乳類ブラリナトガリネズミの顎下腺から微量単離した麻痺性神経毒 BPP1,2(全長 48 aa もしくは 53 aa の一本鎖ポリペプチド)について、トリプシンおよび Glu-C の 2つの酵素を混合して溶液内消化を行い、断片ペプチドの網羅的な MS/MS 解析によりその全アミノ酸一次配列を決定した。配列の相同性からヒトのオピオイドペプチドの前駆体タンパク質であるシンエンケファリンと類似しており、その二次構造と比較することで、BPP 類の3つのジスルフィド結合の結合様式を推定した。

これまでの検討において、トガリネズミの顎下腺抽出物、および単孔目カモノハシの蹴爪に含まれる毒のいずれについても、Caチャネル発現細胞における細胞内Caイオン濃度の上昇作用を見出している。そこで、この麻痺活性物質が作用する標的生体分子を電位依存性イオンチャネルと想定し、今回精製した BPP 類の電気生理学的解析を行った。ヒト神経芽腫細胞 (IMR-32) を BrdU, dbcAMP, Nu-SERUM 添加 DMEM 培地で培養して Caチャネルを発現誘導した。イオンチャネルの発現は蛍光色素 Fluo-4 AM を用いた細胞内 Ca濃度の観測、および Caチャネルのサブタイプ特異的な抗体を用いたウェスタンブロットティングにより確認した。パッチクランプ実験を検討した結果、BPP2 に Caチャネル開口活性がみられ、かつこの活性は N型 Caチャネル阻害剤 ω-コトキシンにより阻害されることが分かった。今回用いた IMR-32 細胞では Cav2.1 (P/Q 型), 2.2 (N 型), および 2.3 (R 型)のいずれも発現していたため、現在、特定のサブタイプの Caチャネルを発現させた培養細胞を用いた解析、および BPP 類の活性を保持した LP プローブの合成と機能評価に向けて検討を進めている。

3. 今後の展開

本研究は、機器分析法の最先端研究をケミカルバイオロジー分野に応用することで、標的分子の結合位置解析法の高度化を目指して実施した。従来の細胞・組織レベルでの解析では困難であった、創薬標的となる機能作用点や代謝経路を解明することで、新たな創薬基盤技術の創出に貢献できる手法の開発を目指してきた。今後は、これまでの in vitro の系から発展させて、in situ ラベル化の手法開発を進めたい。特に、哺乳動物毒ペプチドの未知の標的分子の同定と結合様式を解明するためには、構造活性相関、活性を保持したプローブの合成、および機能評価により構造を最適化するとともに、組織切片や動物個体など、実際の生体での in situ ラベル化による標的分子の同定と機能作用点の解明が重要になると思われる。これまでの知見を統合して、in vivo ラベル化や代謝産物の LA-LDI MS 解析を精密に行い、炎症や痛みの特異的に働く神経毒リガンドの作用メカニズム解明を目指していきたい。

4. 自己評価

研究テーマ1に関しては、通期の研究構想をほぼ達成できた。当初の計画ではアミドピレンに対するモノクローナル抗体を専門業者に委託して作製する予定であったが、新たに開発したピレン誘導体(非公開)が、幸いにも市販のピレン抗体と優れた交叉性を示すことを見出したため実施せず、その分を消耗品費に充てることで、効率よく研究を遂行できた。

研究テーマ2に関しては、標的分子の *in vitro* ラベル化とMS解析、およびモデリング計算を組み合わせリガンドの結合様式を精密に決定するという、一連のコンセプトを達成できた。当初の計画になかった、ピレン基の高い疎水性を活かした新しいアフィニティー精製法を開発できたことは、関連するケミカルプローブの研究や、標的分子解析法の発展に資すると判断される。一方で、*in vitro* では数時間しか安定に存在できないアプリーロニンAのアクチン・チューブリンとの三元複合体の解析など、従来の方法では解析が困難な系や、標的分子やその相互作用の詳しい様式が不明のものを対象とする研究を、期間内にほとんど進めることができなかったのは反省すべき点と言える。

研究テーマ3に関しては、自然界からごく微量しか得られない、哺乳類由来の神経毒ペプチドの構造を決定した点で高い独自性と学術的意義があると判断されるが、そのプローブ化への誘導や標的受容体との反応、さらには *in vivo* や *in situ* でのラベル化まで志向した研究計画案だったのにも関わらず、十分な検討ができなかったのは反省すべき点と言える。応募者独自の生理活性リガンドに拘らずに、検証可能な系で本課題を遂行すべきだったと思われる。

今後、本研究の成果を科学技術及び社会・経済双方に波及させていくためにも、本LA-LDI MS法の汎用化や利便性の向上を図るとともに、標的分子との結合様式に基づく新規リガンド誘導体の創出を目指して研究を進めていきたい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

- | |
|---|
| 1. K. Yoneda, Y. Hu, M. Kita, and H. Kigoshi: Development of an aplyronine A photoaffinity amidopyrene derivative applicable for label-assisted LDI MS. <i>Scientific Reports</i> 2015 , <i>5</i> , 17853 [DOI: 10.1038/srep17853]. |
| 2. K. Yoneda, Y. Hu, R. Watanabe, M. Kita, and H. Kigoshi: Binding position analysis of target proteins with the use of amidopyrene probes as LA-LDI enhancing tags. <i>Organic & Biomolecular Chemistry</i> 2016 , <i>14</i> , 8564–8569 (2016). |
| 3. Y. Hirayama, K. Yamagishi, T. Suzuki, H. Kawagishi, M. Kita, and H. Kigoshi: Analysis of the aplyronine A-induced protein-protein interaction between actin and tubulin by surface plasmon resonance. <i>Bioorganic & Medicinal Chemistry</i> 2016 , <i>24</i> , 2809–2814. |
| 4. M. Kita, K. Yamagishi, K. Tsuchiya, Y. Seguchi, H. Nakane, and H. Kigoshi: Development of photoaffinity derivatives of the antitumor macrolide aplyronine A, a PPI-inducer between actin and tubulin. <i>Bioorganic & Medicinal Chemistry</i> 2017 , <i>25</i> , 6322–6331. |
| 5. R. Watanabe, Y. Hu, K. Iio, K. Yoneda, A. Hattori, A. Arai, H. Kigoshi, and M. Kita: Specific protein-labeling and ligand-binding position analysis with amidopyrene probes as LDI MS tags. <i>Organic & Biomolecular Chemistry</i> 2018 , <i>16</i> , 7883–7890. |

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件(公開前の出願件名については件数のみ記載)

(3) その他の成果(主要な学会発表, 受賞, 著作物, プレスリリース等)

主要な学会発表

1. 北将樹, 「タンパク質-生物活性リガンド相互作用を解析するケミカルプローブの開発」, 第 89 回日本生化学会大会 シンポジウム「生物活性と創薬のケミカルバイオロジー」, 2016 年 9 月 25-27 日, 仙台. (招待講演)
2. M. Kita, “PPI-inducing Marine Macrolide.” 8th US-Japan Symposium, 21st Century Innovations in Natural Products, 2016 年, 2016 年 11 月 14-17 日, 米国ハワイ. (招待講演)
3. M. Kita, “Development of the New Analytical Methods for the Binding Modes of Target Proteins Using LA-LDI MS.” The 5th International Symposium on Transformative Bio-Molecules (ISTbM-5), 2017 年 11 月 19-21 日, 名古屋. (招待講演)
4. 北将樹, 「タンパク質-生物活性リガンド相互作用を解析するケミカルプローブの開発」, 日本農芸化学会 2018 年度名古屋大会シンポジウム・ケミカルバイオロジー研究の最前線, 2018 年 3 月 15-18 日, 名古屋. (招待講演)
5. 北将樹, 武仲敏子, 別所学, Andres D. Maturana, 木越英夫, 大館智志, 上村大輔, 「哺乳類由来の神経毒の化学生物学研究」, 第 60 回天然有機化合物討論会, 2018 年 9 月 26-28 日, 久留米.

研究報告書

「ストレス応答代謝産物を基軸としたシナプス病態解析技術の創出」

研究タイプ: 通常型

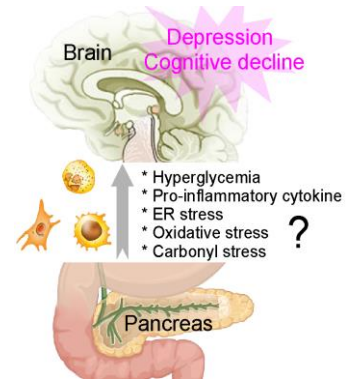
研究期間: 2015年10月～2019年3月

研究者: 林(高木) 朗子

1. 研究のねらい

WHOより、日本における疾病社会負担の指標であるDALY(disability adjusted life years)が報告され、精神疾患が主要な身体疾患を抜いてトップであることが判明した。一方で、脳機能は脳単独で動作原理が制御されているわけではなく、全身性の細胞応答が大きくかわるといふ、いわゆる“臓器連関”もしくは“病態連関”という概念が提唱され始めている(図1)。例えば、2型糖尿病患者が後にうつ病を発症するオッズ比、逆にうつ病患者が後に2型糖尿病を発症するオッズ比はどちらも有意に高く、精神疾患と糖尿病の併存症(以後、併存症)は、双方向性に両疾患を増悪させることも良く知られている。このように併存症は包括的医療において重要な問題であるにもかかわらず、この問題に取り組む基礎研究者は非常に少ないことも問題である。そこで、本申請では縦断的・多軸的に代謝産物を計測し、行動解析を併用することで、体内環境が中枢神経系の機能に如何に影響を及ぼし個体全体としての機能低下を惹起するかを検証した(研究項目1)。

また、上記のような手法を併用したとしても、精神疾患や多臓器円環の病態生理の全貌を掴み、創薬標的を分子レベルで同定することは長い道のりと思われる。脳機能障害の最終表現型の少なくとも一部はシナプトパチーが担うであろうことは正しいと思われるし、また精神疾患の病態生理として糖化ストレスが関与し、前述の糖尿病が各種精神疾患を増悪させることも良く知られている。シナプトパチーの原因は単一因子に起因するものではなく、また患者由来サンプルや疾患動物モデルで蓄積する終末糖化産物などの疾患関連産物は酵素的・非酵素的に複雑な制御を受けるため、単一の分子に着目した創薬戦略には限界があると思われる。そこで、細胞の表現型(シナプトパチーおよび糖化ストレス産物の細胞内蓄積)に着目したドラッグスクリーニングの技術開発が有効と考えた。神経細胞の形態や、有害な終末糖化産物がどのような細胞内局在で蓄積するかなどの複雑な画像情報を細胞全体の表現系として自動定量するためのハイコンテントスクリーニング法の確立である(研究項目2)。以上の2つの研究戦略を相補的に組み合わせることにより、精神疾患の病態生理をシナプスレベルから行動レベルまで因果律に迫るデザインで理解すること、これらの疾患関連代謝産物を軽減する化合物の創薬基盤の開発に挑戦した。



【図1】多臓器円環: 脳は単独で機能するわけではなく、内蔵環境との関連があり、様々な代謝物が関与する。

2. 研究成果

(1) 概要

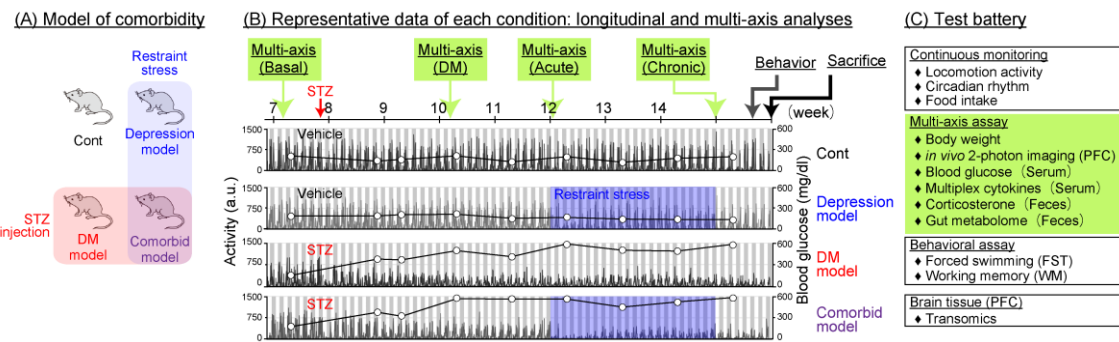
本研究ではうつ病と糖尿病の併存症の病態増悪のメカニズムを調べるために、うつ病モデルとして慢性拘束ストレスモデル、糖尿病モデルとしてストレプトゾトシン単回投与モデル(以後、STZモデル)、上記の2つのモデルを掛け合わせた併存症モデルマウスを作成し、比較検討した(図

2A)。全身性の細胞応答を仮説フリーな網羅的アプローチで計測するために、体重、摂食量、血糖、縦断的 *in vivo* 2 光子励起イメージング、縦断的行動量測定(図 2B)、各タイムポイントでの Multiplex cytokine assay 測定、ストレスレベルの客観的指標の一つであるコルチコステロン測定、同一個体を解剖し前頭野 RNAseq を行った。このように縦断的に同一個体を観察することで(図 2C)、代謝異常や慢性ストレスなどの摂動の前後での活動量を観察する実験系が可能になり、併存症の増悪分子メカニズムについての示唆が得られている。

ハイコンテンツスクリーニングに関しては、統合失調症モデルとして確立している慢性フェンサイクリジン(PCP)モデルを、96 well プレート上でハイコンテンツに自動定量する実験系を構築した。PCP 負荷と同時に、東京大学創薬機構の既知活性化化合物ライブラリ(1280 化合物)を付加し、2 週間培養し、神経細胞の形態(CaMKII)、興奮性シナプス(PSD-95)、終末糖化産物(ペントシジン)の 3 色で多重免疫染色し、ハイコンテンツイメージングを行った。2 段階のスクリーニングの末、18 化合物をヒット化合物とした。そのうちの約半数は、既に神経保護作用があること、もしくは保護作用があることが薬理的に想定される化合物であったが、約半数は、神経科学領域において知名度の低い化合物であった。現在、容量依存性試験、カウンターアッセイなどの 3 次スクリーニングを行っている。使用ライブラリは承認薬などより構成される既知活性化化合物ライブラリであるため、ヒット化合物の個体レベルでの有効性があつた場合、DR(Drug repositioning)へ展開すること、また共同研究のもとで、ヒット化合物を基にした“リード化合物”の創出に挑戦する。

(2) 詳細

(研究項目1)多臓器連関からみた脳機能の解明: 本研究項目ではうつ病と糖尿病の併存症の増悪メカニズムを調べるために、縦断的行動解析、各種代謝産物の測定と *in vivo* 2 光子励起イメージングを併用した。全身的な時空間的ダイナミクス(脳内環境-内臓環境連関)の観点で、併存症の発症や重症化に寄与する神経外因子を探索し、さらには見出された候補因子を操作することで



【図2】多軸的・縦断的評価系: (A) 併存症モデルマウス(B) アクティビティセンサー搭載のホームケージでの活動量計測。このシステムで計測したホームケージ内活動量と、強制水泳試験により評価された無動時間が相関することは確認されており、つまりアクティビティセンサーケージで活動量やうつ病様症状を非侵襲的・縦断的に定量できる。(C) 活動量とともに、*in vivo* 2 光子イメージングとサイトカイン(30 μ lの血清から23種類同時測定)、コルチコステロンなどの多軸的パラメーターを4点で計測した(基礎値、DM期、急性ストレス期、慢性ストレス期)。16週で行動解析(長期記憶、強制水泳)、最後に前頭野を採取しRNAseqを行った。

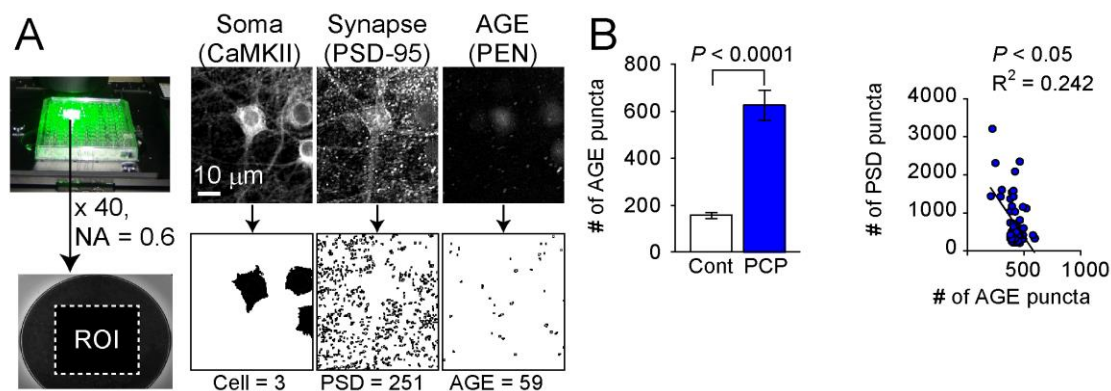
病態責任因子の同定を目指した。使用する動物モデルは、病態生理を惹起するメカニズムが比較的シンプルかつ、その構成性・表現的妥当性が確立されているものを選択した(図 2A)。うつ病モデルとしては社会ストレスモデルとして良く確立している慢性拘束ストレスを、糖尿病のモデルと

してはストレプトゾトシン単回投与モデル(150 mg/kg 単回投与で血糖 300~700 mg/dl の高血糖を誘導。高血糖を呈さない個体は除外:以後、STZモデル)を使用し、STZは脳血管関門を通過せず、膵臓細胞特異的に細胞毒性を発揮しインスリン欠乏を起こす薬理学的モデルである。上記の慢性拘束ストレスと STZ モデルを掛け合わせて併存症モデルマウスを作成し、図 2A の 4 群のマウスを比較検討した。全身性の細胞応答を仮説フリーな網羅的アプローチで計測するために、体重、摂食量、血糖、縦断的 *in vivo* 2 光子励起シナプス、縦断的行動量測定(図 2B)、各タイムポイントでの Multiplex cytokine assay 測定(Bio-Plex, BioRad 社)、ストレスレベルの客観的指標の一つであるコルチコステロン測定、同一個体を解剖し前頭野 RNAseq を行う。図 2B に持続的に 9 週間活動量を測定した 4 匹の例を示す。マウスは 12 時間ごとの明暗サイクルで飼育され、対照マウスでは明期に活動量が低下し、暗期には上昇するという夜行性動物の典型的な概日リズムが観察された(図 2B、最上段、対照マウス)。一方で、慢性ストレス下では、活動期である暗期の活動量が低下し(図 2B、2 段目、うつ病モデル)、糖尿病モデルでは、高血糖誘導とともに概日リズムが障害される個体も観察された(図 2B、3 段目、DM モデル)。このように縦断的に同一個体を観察することで、代謝異常や慢性ストレスなどの摂動の前後での活動量を観察する実験系が可能になった。各データ値や各々の相関図は2*非公開の研究成果に記載した。

(研究項目2)Cell-based ハイコンテンツイメージングによる創薬基盤の創出:研究項目2では、疾患感受性代謝産物である終末糖化産物およびシナプトパチーに着目した Cell-based な低分子化合物スクリーニング系を確立することに注力した(図 3A)。統合失調症モデルとして確立している慢性フェンサイクリジン(PCP)モデルを *in vitro* 病態モデルとして使用した。シナプス保護効果および終末糖化産物を軽減する低分子化合物をスクリーニングするためには、コントロール培養条件と比較した PCP 誘導性の終末糖化産物(ペントシジン、PEN)の蓄積やシナプス障害の程度(Effect size)がスクリーニングに十分なクオリティに到達することが必要である。そこで、培養条件、とりわけサプリメントや微量元素を含む培地組成や分散培養のための条件検討を徹底的に行い、スクリーニングに耐えうる培養系を確立した。ペントシジンの蓄積は多くの神経細胞に同程度蓄積するのではなく、蓄積の程度には細胞により大きな差異があること、また蓄積する細胞内局在にも大きな偏りがあり、一部の樹状突起スパインに高輝度で蓄積していることが観察された。神経細胞内にどのようにペントシジンが蓄積するかは今まで報告がなく、興奮性シナプス後部である樹状突起スパインの一部にペントシジンが蓄積していることは、シナプスにおける局所的な糖化ストレスをはじめと示したと言える。また、ペントシジンの蓄積が多い Well ほど、Well 内の興奮性シナプス数が少ないという負の相関からも(図 3B)、シナプトパチーの一因としての糖化ストレスの関与を示唆している。このようなペントシジン蛍光は、ペントシジンのプレアブソープションで消失することも確認している。

上記のスクリーニング系に、東京大学創薬機構の既知活性化合物ライブラリ(1280 化合物)を付加し、2 週間培養し、神経細胞の形態(CaMKII)、興奮性シナプス(PSD-95)、終末糖化産物(ペントシジン)の 3 色で多重免疫染色し、ハイコンテンツイメージングを行った。1 次スクリーニングでは、興奮性シナプス数(PSD puncta 数)、終末糖化産物(PEN puncta 数)などの定量値を基に判断し、培養神経細胞に良好な効果を有する化合物のうち、+2SD の効果を有する 81 化合物を得た(図6、2*非公開の研究成果に記載)。この中の大部分は擬陽性であることも予想されたが、擬陰性で Hit 化合物を見失うリスクを回避するため、1 次スクリーニングの上位 234 化合物を 2 次スクリーニングにかけたところ、1 次スクリーニングと同様の基準で 79 化合物がヒット基準を満たした

(再現率 34%)。その中でも、もっとも良好なスコアを呈した 18 化合物をヒット化合物とした(ヒット率 1.4%)。そのうちの約半数は、既に神経保護作用があること、もしくは保護作用があることが薬理的に想定される化合物であったが、約半数は神経科学領域においてほぼ無名の化合物であった(非公開)。現在、容量依存性試験、カウンターアッセイなどの 3 次スクリーニングを行っている。



【図 3】Cell-based ハイコンテンツイメージング: (A) 各 well には、統合失調症の *in vitro* 病態モデルとして利用されているフェンサイクリジンおよび既知活性化化合物が添加。自動撮影の後、半自動で目的構造物を自動定量(ROI 一部エリアだけ強拡大)。(B) ペントシジンの蓄積が多い Well ほど、Well 内の興奮性シナプス数が少ないという負の相関が観察され、シナプトパチーの一因としての糖化ストレスの関与を示唆している。

3. 今後の展開

【研究項目1】 上述の予備実験によって、うつ病モデルに糖尿病モデルが併存すると、慢性ストレス解除後も抑うつ状態が遷延し、このようなレジリエンスの障害はうつ病や糖尿病の単独モデルでは観察されないことが確認できており、併存症モデルのレジリエンスを定量的・客観的に解析できる状態であると考えている。ここで見出された病態責任因子の候補に関しては、その因果性を検証するための操作実験も計画している。例えば、特定の代謝物を変動させるための化合物を脳微小循環デバイスを用いて大脳皮質へ直接投与したり、また図 4(非公開項目)で見出されたサイトカインのノックアウトマウスや中和抗体などを併用し、2 光子スパインイメージングや行動解析の結果がどのように変化するか検証していく。このように多軸的・縦断的全身評価系、縦断的 *in vivo* 2 光子励起イメージング、前頭野マルチオミクス解析などの分野横断的な最先端計測系を結集させ、これらの臓器連関を統御する分子・細胞基盤を仮説フリーの網羅的アプローチで解明し、さらにそのメカニズムに立脚した新たな介入戦略開発やバイオマーカーへの探索の基盤となりうる基礎研究を推進する。

【研究項目2】 糖化ストレスとシナプトパチーに着目し、疾患代謝関連産物とシナプトパチーを軽減する化合物を見出すことは、さまざまな精神・神経疾患に対する新規の治療薬として有用と思われる。今回の研究課題で見出されたヒット化合物のヒット・ヴァリデーションを行う。使用ライブラリは承認薬などより構成される既知活性化化合物ライブラリであるため、ヒット化合物の個体レベルでの有効性があった場合、DR(Drug repositioning)へ展開すること、また共同研究のもとで、ヒット化合物を基にした“リード化合物”の創出に挑戦する。

またスクリーニング系の高効率化のため、教師ありの Deep learning 手法を用いて、細胞全体の表現系を自動定量するための、AI 創薬手法の確立を試みている最中である。Deep learning を用

いた自動化画像撮像および解析技術により、目視観察での作業を自動識別のシステムに置き換えることにより、大きなパラメータ空間を現実的にスクリーニングできるようになる。この技術が確立した暁には、他の様々な創薬研究に展開することが期待され、その波及効果は非常に大きなものになると思われる。また、本申請で提唱したハイコンテンツ化合物スクリーニングと、それと対極をなす2光子励起顕微鏡による *in vivo* シナプスイメージング系による化合物効果の実証は、私が運営する研究室で遂行可能であり、このようなアカデミアでの泥臭いムーブメントにおいて何らかの知見や化合物を得ることが出来たならば、手詰まり感を見せている精神疾患創薬フィールドにとって起爆剤になる可能性を秘める。

4. 自己評価

項目1に関しては、うつ病と糖尿病の併存症マウスモデルを世界で初めて確立し、その解析の大部分を終えた。同一個体の末梢血を縦断的に採取し、サイトカインなどの代謝産物を経時的に計測し、行動パラメータと共に解析することで、慢性ストレス負荷後のストレス脆弱性を予測できる予後バイオマーカー候補を幾つか同定した(図4、非公開項目)。これらの末梢由来サイトカインの中には、前頭前野サンプルで行ったRNAseqによる網羅的に導出されたシグナル伝達経路とも整合性があり(図5、非公開項目)、バイオマーカーとしての妥当性をモデルマウスを使って検証していくべきと考えている。妥当性が確認された後の展開としては、併存症増悪の分子メカニズム探索の糸口として生物学的に探究していく方向性、および臨床教室との共同研究のもと臨床研究として患者サンプルで検証していく二つの方向がありうる。全く新しいモデルの確立をゼロから始め3年半でここに至ったことは、論文発表や特許申請こそ今後の課題であるが、申請目標を実質的に達成できたと考えている。

項目2に関しては、Cell-based スクリーニング法に耐えうる培養系の最適化に相当な時間を費やしたものの、大脳皮質初代神経細胞を用いたスクリーニング基盤の確立は達成出来たと考えている。また2段階のスクリーニングにより、18化合物をヒット化合物として見出されており、このうち半数は神経保護効果が想定される化合物であり、ポジティブコントロールがヒット化合物として数多くあがっていることは、スクリーニングが妥当に行われたことを示唆している。今後、ヒット・バリエーションおよび *in vivo* での効果の検証に進行していく。進捗に若干の遅れがあったが、ラボの移転で研究が中断した期間が実質1年間あることも考えれば、目標到達としては十分だと考えている。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Tainaka K, Murakami TC, Susaki EA, Shimizu C, Saito R, Takahashi K, Hayashi-Takagi A, Sekiya H, Arima Y, Nojima S, Ikemura M, Ushiku T, Shimizu Y, Murakami M, Tanaka KF, Iino M, Kasai H, Sasaoka T, Kobayashi K, Miyazono K, Morii E, Isa T, Fukayama M, Kakita A, Ueda HR. Chemical Landscape for Tissue Clearing Based on Hydrophilic Reagents. *Cell Rep*. 2018 Aug 21;24(8):2196–2210.
2. Okazaki H, Hayashi-Takagi A, Nagaoka A, Negishi M, Ucar H, Yagishita S, Ishii K, Toyozumi T, Fox K, Kasai H. Calcineurin knockout mice show a selective loss of small spines. *Neurosci Lett*. 2018 Apr 3;671:99–102.
3. Zhang JC, Yao W, Qu Y, Nakamura M, Dong C, Yang C, Ren Q, Ma M, Han M, Shirayama Y, Hayashi-Takagi A, Hashimoto K. Increased EphA4-ephexin1 signaling in the medial prefrontal cortex plays a role in depression-like phenotype. *Sci Rep*. 2017 Aug

2;7(1):7133.

4. Nagaoka A, Takehara H, Hayashi-Takagi A, Noguchi J, Ishii K, Shirai F, Yagishita S, Akagi T, Ichiki T, Kasai H. Abnormal intrinsic dynamics of dendritic spines in a fragile X syndrome mouse model in vivo. *Sci Rep*. 2016 May 25;6:26651.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件(公開前の出願件名については件数のみ記載)

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

(総説)Hoshiya Y, Wada T, Hayashi-Takagi A (CA). Synaptic Ensemble Underlying the Selection and Consolidation of Neuronal Circuits during Learning. *Front Neural Circuits*. 2017 Mar 2;11:12.

(総説) Shirai F, Hayashi-Takagi A (CA). Optogenetics: Applications in psychiatric research. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2017 Jun;71(6):363-372.

(総説)Hayashi-Takagi A (CA).

Synapse pathology and translational applications for schizophrenia. *Neurosci Res*. 2017 Jan;114:3-8.

(招待講演) Hayashi-Takagi A. Wide-Field Mapping of Hebbian Synaptic Potentiation Using Synaptic Optoprobes
Gordon Research Conference, Lucca, Italy, 2017

(招待講演) Hayashi-Takagi A. Functional connectomics using synaptic optogenetics and an activity-dependent neuronal tracing
Cold Spring Harbor – Asia Meetings, Suzhuo, China, 2016

研究報告書

「腸内代謝産物を標的とした疾患予防・治療基盤技術の創出」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015年10月～2019年3月

研究者: 福田 真嗣

1. 研究のねらい

われわれの腸管内には数百種類以上でおよそ数十～100兆個にもおよぶとされる腸内細菌が生息しており、これら腸内細菌叢は宿主の腸管上皮細胞や粘膜免疫細胞、さらには腸管に局在する神経細胞や内分泌細胞とも複雑に相互作用することで、腸管内における複雑な生態系、すなわち「腸内エコシステム」を形成している。腸内エコシステムは通常はこれら異種生物間の絶妙なバランスの元に宿主の恒常性を維持しているが、そのバランスが一度破綻すると、炎症性腸疾患や大腸がんといった腸管局所の疾患のみならず、自己免疫疾患や代謝疾患といった全身性疾患に繋がることが知られている。近年の報告で、大腸がんや肝臓がんなどのがん疾患や、動脈硬化や慢性腎臓病、さらにはある種の自閉症などの発症や増悪に腸内細菌叢由来代謝産物が深く関わっていることが報告されているが、これは腸内細菌叢のバランスの乱れ(これを *dysbiosis* と呼ぶ)による腸管内での異常代謝が疾患関連代謝産物の産生を促していると考えられているが、それらがどのような化合物を基質とし、どのような腸内細菌がどのように代謝することで産生されるのか、すなわち腸内エコシステムにおける詳細な腸内細菌叢由来代謝産物産生経路は不明な点が多い。本研究のねらいは、生体の恒常性維持や疾患発症に深く関わることが報告されている腸内細菌叢由来代謝物質に着目し、腸管内におけるそれらの産生量を自在に操るための方法論を、マイクロ流体デバイス技術や、メタボロミクスとメタゲノミクスを組み合わせたメタボロゲノミクスアプローチを駆使して確立することにある。本解析手法が確立できれば、最終的には腸内環境を標的とした創薬による疾患治療や、食を介した腸内環境の調節に伴う健康維持・疾患予防に向けた新たな健康維持基盤技術の創出が可能になると考えられる。

2. 研究成果

(1) 概要

腸内細菌叢由来代謝物質がもたらす宿主生体修飾機構の詳細を知るための基盤情報として、マウス消化管内の腸内細菌叢プロファイルおよび代謝物質プロファイルについて網羅的に解析を行った。その結果、アミノ酸や糖質などの分布が消化管各部位で異なり、それらと相関して腸内細菌叢プロファイルも変化することが明らかとなった(論文 1)。次に食と腸内環境との関連を知る目的で、マウスに欧米食を与えた際の腸内環境の特徴について網羅的に解析した。その際の腸内環境評価手法として、腸内細菌叢のメタゲノム解析と腸内代謝物質のメタボローム解析を組み合わせたメタボロゲノミクス(メタボロミクス+メタゲノミクス)を新たに考案した。本手法を用いて解析を行ったところ、短鎖細胞酸の一つである酪酸の産生量と酪酸産生遺伝子、および酪酸産生菌の割合が相関することが明らかとなった(論文 2)。疾患と腸内細菌叢との関連を理解する目的で、既に腸内細菌叢の関与が示唆されている慢性腎臓病についてメタボロゲノミクスアプローチにより解析を行ったところ、腸内細菌叢由来尿毒症物質を複数同定した。この時、腸内細菌叢を持たない無菌マウスに慢性腎臓病を誘導したところ、予想に反して腸内細菌叢をもつ SPF マウスよりもその症状が悪化した。これらの結果から、腸内細菌叢由来代謝物質中には、慢性腎臓病を増悪する尿毒症物質に加えて、腎機能を保護する代謝物質も同時に存在する可能性が示唆された(論文 3, 4)。次に腸管感染症と腸内細菌叢由来代謝物質について、ミシガン大学医学部 Nunez 教授らとの共同研究としてマウスモデルを用いて解析を行ったところ、新生仔マウス由来の腸内細菌叢から産生されるコ

ハク酸が、クロストリジウム目細菌群の腸内環境への定着を促し、結果として腸内細菌叢が成熟化することで腸管感染症への抵抗生が高まることが明らかとなった(論文 5)。以上の結果から、新たに考案したメタボロゲノミクスアプローチにより、宿主-腸内細菌叢間相互作用の詳細が浮き彫りとなり、それらがもたらす宿主恒常性維持や疾患発症に関わる分子機構の一端を明らかにすることができた。本研究成果は、腸内環境に基づく新たな疾患予防・治療基盤技術の創出に繋がることを期待される。

(2) 詳細

研究テーマ A「消化管内代謝物質の網羅的探索」

腸内細菌叢由来代謝物質が、生体恒常性の維持や疾患発症に関与することは明らかであるが、それらが消化管内にどのように局在し、どういった腸内細菌による代謝によって産生されるのかに関する基盤情報は少ない。そこで無菌マウスおよび腸内細菌叢を有する SPF マウスを用いて、各マウスの胃や小腸、盲腸や大腸といった、消化管各部位における代謝物質プロファイルと細菌叢プロファイルについて、メタボローム解析およびメタゲノム解析を用いて網羅的に解析した。その結果、糖質やアミノ酸の組成が消化管各部位において大きく異なることが明らかとなった。また腸内細菌叢の有無によってもこれらのプロファイルが大きく異なることも明らかとなった。特に、マンニトールやソルビトールといった糖アルコールが無菌マウスの下部消化管で蓄積していたのに対し、SPF マウスではほとんど検出されなかったことから、これらの糖アルコールは腸内細菌叢により代謝されることが明らかとなった。一方、ガラクトースやアラビノース、キシロースといった単糖は無菌マウスの上部消化管ではわずかに検出されたものの、下部消化管では検出限界以下だった。しかし SPF マウスでは特に下部消化管でそれらが多量に検出されたことから、食餌由来のこれらの単糖は上部消化管で吸収されるが、下部消化管では腸内細菌叢による多糖の分解により、これらの単糖が産生されていることが示唆された。また興味深いことに、いずれのアミノ酸も SPF マウスの小腸でその濃度が高く、下部消化管ではその濃度が低くなることが明らかとなった。加えて、無菌マウスよりも SPF マウスの方がその傾向が顕著であったことから、腸内細菌叢の存在によりタンパク質分解も促進されている可能性が示唆された。これらの消化管内代謝物質プロファイルと相関する腸内細菌も複数検出されたことから、消化管内代謝物質プロファイルは、宿主の消化吸收機構と細菌叢とが複雑に相互作用した結果であることが示唆された(論文1)。

研究テーマ B「メタボロゲノミクスアプローチの開発」

複雑な腸内環境を適切に評価するためには、腸内細菌叢のメタゲノム解析によりどのような腸内細菌が生息しているか、という点だけでなく、それらの腸内細菌叢からどのような代謝物質が産生されているか、を知ることが重要である。そこで SPF マウスを用いて、腸内細菌叢のメタゲノム解析および腸内代謝物質のメタボ

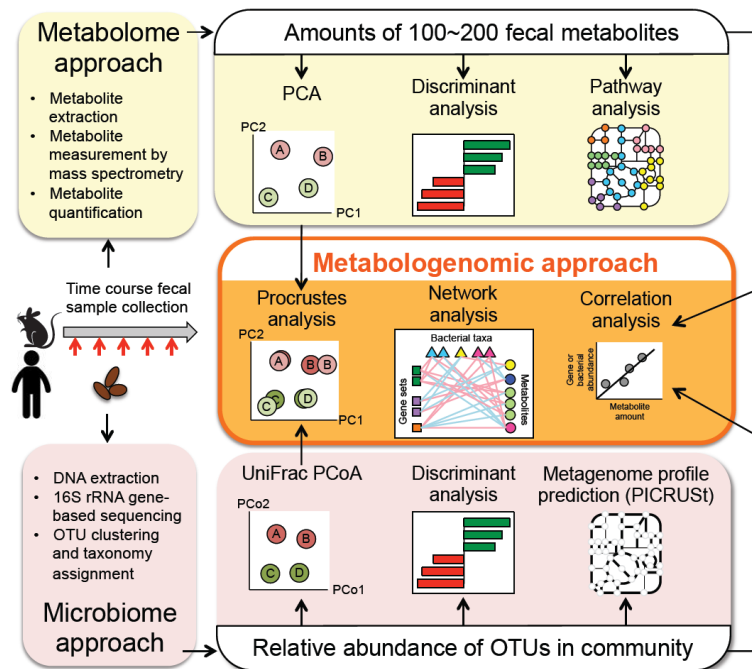


図 1: メタボロゲノミクスアプローチの概要

ローム解析により得られた両データを、バイオインフォマティクスにより統合解析するメタボロゲノミクスアプローチを開発した(図1)。本技術の特色は、①便は非侵襲的に採取可能であるため同一個体から連続情報を取得可能、②腸内細菌叢の16S rRNA 遺伝子を標的としたアンプリコンシーケンスを実施することで、ハイスループットに腸内細菌叢組成情報を得ることが可能、③キャピラリー電気泳動-質量分析計を用いたメタボローム解析を実施することにより、イオン性化合物を網羅的に探索可能、④同一の便からメタゲノム解析およびメタボローム解析を実施するため、関連情報を取得可能、といった点にある。本技術を駆使して、モデル実験系として SPF マウスへの欧米食摂取試験を実施したところ、短鎖脂肪酸の一つであり様々な生体修飾機能を有する酪酸の産生量が増加したことのみならず、酪酸産生量と相関して、酪酸産生菌の割合や酪酸産生経路の遺伝子群も有意に増加することを明らかにした(論文2)。従って本手法は、従来法よりも腸内環境をより詳細に理解することが可能となるため、将来的には腸内環境に基づく新たな医療・ヘルスケアの創出につながることを期待される。

研究テーマ C「慢性腎臓病と腸内細菌叢」

腸内細菌叢由来尿毒症物質が慢性腎臓病の増悪に関わることが示唆されていたが、その詳細は不明であった。われわれはこれまでに、東北大学医学部阿部教授らとの共同研究により、便秘薬の摂取による腸内環境改善が、腸内細菌叢由来尿毒症物質産生量を低下させることで、結果として慢性腎臓病の悪化を抑制できることを明らかにした(Mishima, Fukuda *et al.*, *J. Am. Soc. Nephrol.*, 26: 1787, 2015)。また、糖尿病治療薬として知られているの SGLT2 阻害薬の摂取により、同様に腸内環境が改善され、血中の尿毒症物質量が有意に低下することを明らかにした(論文3)。そこで次に、無菌マウスおよび SPF マウスを用いて慢性腎臓病マウスモデルを作製し、腸内細菌叢由来尿毒症物質の探索を行ったところ、インドキシル硫酸など 11 化合物を腸内細菌叢由来尿毒症物質として同定した。この時、腸内細菌叢を持たない無菌マウスに慢性腎臓病を誘導したところ、腸内細菌叢由来尿毒症物質の量は腸内細菌を有する SPF マウスよりも少ないにもかかわらず、予想に反して無菌マウスでは SPF マウスよりも慢性腎臓病の症状がより悪化することが明らかとなった。これらの結果から、腸内細菌叢由来代謝物質には、慢性腎臓病の増悪に関与する尿毒症物質に加えて、腎臓機能を保護する役割を有する代謝物質も同時に存在する可能性が示唆された(論文 4)

研究テーマ D「腸管感染症と腸内細菌叢」

腸管感染症と腸内細菌叢との関係については様々な報告があるが、われわれはこれまでに、ビフィズ菌由来の短鎖脂肪酸の一つである酢酸が、腸管上皮のバリア機能を高めることで、腸管出血性大腸菌 O157:H7 によるマウス感染死を抑制することを明らかにしている(Fukuda *et al.*, *Nature*, 469: 543, 2011)。本成果は腸

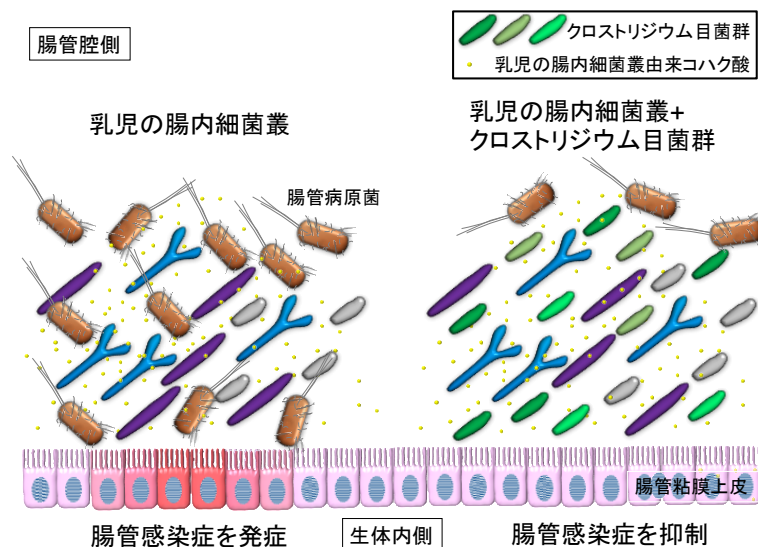


図 2: 乳児腸内細菌叢由来コハク酸がクロストリジウム目菌群の腸管内への定着を促し、腸管感染症を抑制

内細菌叢由来代謝物質が、宿主腸管細胞を介して感染症を抑制するという「宿主-腸内細菌叢間相互作用」を介した事例であったが、同様に乳児感染症でも腸内細菌叢由来代謝物質が重要であることが、ミシガン大学医学部 Nunez 教授らとの共同研究で明らかとなった(図2)。乳児の腸内環境は未成熟であるため、病原性大腸菌やサルモネラ感染に対する抵抗性が低いことが知られている。そこでメタボロゲノミクスアプローチにより乳児および成獣マウスの腸内環境を網羅的に比較解析したところ、乳児腸内細菌叢から産生されるコハク酸が腸管内の酸素濃度を低下させることで、腸内細菌の一種であるクロストリジウム目菌群が腸内に定着可能になることが明らかとなった。この時、クロストリジウム目菌群の定着により乳児腸内細菌叢が成熟化することで、結果として腸管感染症に対する抵抗性が高まることが明らかとなった(論文5)。

3. 今後の展開

本研究により、腸内細菌叢の機能理解を目的とした新規解析基盤技術として、メタボロゲノミクスアプローチを開発した。本技術を適用することで、腸内細菌叢由来代謝物質が種々の疾患と関連することをマウスモデルを用いて明らかにした。今後は更に、本技術を様々な疾患モデルマウスに適用することで、これまで未解明であった腸内細菌叢由来代謝物質と疾患との関連における分子メカニズムを明らかにする。加えて、本技術は臨床応用も可能であることから、腸管関連疾患患者のみならず、生活習慣病患者や精神疾患患者など、様々な疾患患者の腸内環境について同様にアプローチし、疾患の早期診断につながるバイオマーカー探索や、疾患の予防や治療につながるような標的腸内細菌の同定ならびにその制御法の開発を目指す。

4. 自己評価

腸内細菌叢の機能理解のみならず、その制御による疾患予防・治療基盤技術創出に向けて、腸内細菌叢のメタゲノム解析データと腸内代謝物質のメタボローム解析データを統合解析するメタボロゲノミクスアプローチを開発した。本技術を適用することにより、種々の病態モデルマウスにおいて、腸内細菌叢由来代謝物質がもたらす影響と、それらを産生する腸内細菌の特定に至った。特に腸内細菌叢の制御による疾患予防・治療に向けた実用化研究においては、得られた研究成果の特許出願を精力的に行った。3.5年のさきがけ研究期間内ではこれらの研究成果の全てを論文化するまでには至らなかったことから、今後は特許出願をした研究成果の論文化を順次進める予定である。本研究の実施により、腸内細菌叢由来代謝物質が疾患の発症や増悪に関与することを示すだけでなく、それらの代謝物質を産生する標的腸内細菌を同定し、創薬ターゲット候補とすることもできたことから、当初の研究目標は概ね達成出来たと考えている。今後は、特許化した研究成果の実用化により、腸内環境を標的とした新たな疾患予防・治療技術の確立を目指す。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Yamamoto, Y., Nakanishi, Y., Murakami, S., Aw, W., Tsukimi, T., Nozu, R., Ueno, M., Hioki, K., Nakahigashi, K., Hirayama, A., Sugimoto, M., Soga, T., Ito, M., Tomita, M., *Fukuda, S. A metabolomic-based evaluation of the role of commensal microbiota throughout the gastrointestinal tract in mice. **Microorganisms**, 6: E101, 2018.
2. Ishii, C., Nakanishi, Y., Murakami, S., Nozu, R., Ueno, M., Hioki, K., Aw, W., Hirayama, A., Soga, T., Ito, M., Tomita, M., *Fukuda, S. A metatranscriptomic approach reveals changes in the intestinal environment of mice fed on American diet. **Int. J. Mol. Sci.**, 19: E4079, 2018.
- 3.†Mishima, E., †Fukuda, S., Kanemitsu, Y., Saigusa, D., Mukawa, C., Asaji, K., Matsumoto, Y., Tsukamoto, H., Tachikawa, T., Tsukimi, T., Fukuda, NN., Ho, HJ., Kikuchi, K., Suzuki, C., Nanto, F., Suzuki, T., Ito, S., Soga, T., Tomioka, Y., Abe, T. Canagliflozin reduces plasma uremic toxins and alters the intestinal microbiota composition in a chronic kidney disease

mouse model. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 315: F824–F833, 2018.
4. †Mishima, E., †Fukuda, S., Mukawa, C., Yuri, A., Kanemitsu, Y., Matsumoto, Y., Akiyama, Y., Fukuda, NN., Tsukamoto, H., Asaji, K., Shima, H., Kikuchi, K., Suzuki, T., Tomioka, Y., Soga, T., Ito, S., Abe, T. Evaluation of the impact of gut microbiota on uremic solute accumulation by CE–TOFMS–based metabolomics approach. Kidney Int. 92: 634–645, 2017.
5. Kim, YG., Sakamoto, K., Seo, SU., Pickard, JM., Gilliland, M.G. 3rd, Pudlo, NA., Hoostal, M., Li, X., Feehley, T., Stefka, AT., Schmidt, TM., Martens, EC., Fukuda, S., Inohara, N., Nagler, CR., Núñez, G. Neonatal acquisition of clostridia species protects against colonization by bacterial pathogens. Science 356: 315–319, 2017.

(2)特許出願

研究期間累積件数:12件(公開前の出願件名については件数のみ記載)

1.

発明者: 福田真嗣、石井千晴、富田勝

発明の名称: 糞便試料から物質を抽出する方法

出願人: 学校法人慶應義塾大学

出願日: 2016/9/8

出願番号: PCT/JP2016/004104

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【受賞】

1. バイオインダストリー協会 第1回バイオインダストリー奨励賞「腸内細菌叢機能の包括的理解と腸内デザインによる新規ヘルスケア産業の創出」2017年10月11日
2. 安藤スポーツ・食文化振興財団 第21回安藤百福賞発明発見奨励賞「腸内環境の最先端研究と腸内デザインベンチャーの起業」2017年3月13日
3. 文部科学省科学技術・学術政策研究所 科学技術への顕著な貢献2015(ナイスステップな研究者)「腸内フローラの機能解明を目指した基礎研究成果から、腸内環境デザインによる健康長寿社会を実現するバイオベンチャー企業の設立」2016年2月12日

【プレスリリース】

1. 腸内細菌叢のさらなる解明につながる難培養性腸内細菌培養技術の開発に向けた共同研究を開始 2018年6月21日
<https://www.keio.ac.jp/ja/press-releases/2018/6/21/28-45012/>
2. 腸内細菌叢の成熟化が乳幼児期の腸管感染抵抗性をもたらすことを発見
—特定の腸内細菌の獲得が腸管感染症予防のカギ— 2017年4月21日
<https://www.keio.ac.jp/ja/press-releases/2017/4/21/28-20422/>
3. 「腸腎連関」: 腸内細菌叢のバランス制御が慢性腎臓病悪化抑制のカギ
—腸内細菌叢は腎臓病に対して良い面と悪い面の二面性を持つ— 2017年4月13日
<https://www.keio.ac.jp/ja/press-releases/files/2017/4/13/170413-1.pdf>

研究報告書

「トランスオミクス解析による多剤併用療法の合理的設計と多因子代謝疾患の制御」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015年10月～2019年3月

研究者: 柚木 克之

1. 研究のねらい

細胞は、DNA、RNA、タンパク質、代謝物質など複数のオミクス階層にまたがる分子間相互作用ネットワークによって多彩な機能を発揮するシステムである。代謝と他のオミクス階層をつなぐネットワークの破綻はがんなどの多因子代謝疾患を引き起こすことが知られており、これらに対する薬剤の作用は、標的分子への刺激をきっかけとしてネットワークの破綻を正常化する応答として捉えることができる。しかしながら、日本国内で承認されている化合物ベースの薬剤約1500種類のうち、分子間相互作用ネットワークのグローバルな応答として薬理作用が理解されているものはほとんど存在しない。したがって、多因子代謝疾患のメカニズムを解明し、疾患制御につなげるためには、まず第1のステップとして「地図」となる多階層代謝制御ネットワークを再構築する必要がある。次いで第2のステップとして、得られたネットワーク情報に基づいて多因子標的を同定し、当該多因子標的を制御する最適な薬剤組合せを探索する方法論が必要である。本研究はこれら2つのステップについて手法開発と概念実証を行う。

第1のステップとして、先に開発した「トランスオミクス解析」の方法論を薬剤作用に適用し、各種薬剤を投与した際に細胞内で応答する多階層代謝制御ネットワーク(以下「薬剤応答ネットワーク」)を再構築することにより、いまだ不明な点が多い薬剤応答のグローバルな作用機序をネットワークとして解明する。これと並行して、トランスオミクス解析の方法論をより多くのオミクス階層を対象に拡張する。また、トランスオミクス解析によるネットワーク再構築の自動化を目的として、汎用生命科学オープンプラットフォーム Garuda Platform に準拠したトランスオミクス解析ソフトウェアを開発し、創薬研究者からの要望が根強いトランスオミクス解析の自動化を実現する。

第2のステップとして、得られた薬剤応答ネットワークを「地図」として多因子標的を同定し、当該多因子標的を制御する最適な薬剤組合せを探索する方法論の開発と概念実証を行う。新規に見出した薬剤組合せを用いて、ネットワーク内で密接に関連する多因子標的を正常状態へと誘導するネットワーク中心の代謝疾患制御を目指す。これにより、多因子代謝疾患一般に将来展開可能な創薬基盤技術を確立する。

2. 研究成果

(1) 概要

■ 研究テーマ A: 薬剤応答ネットワークの再構築

◇ 薬剤を投与した培養肝細胞もしくはマウスの肝臓のサンプル調製、オミクスデータ計測

培養肝細胞(ヒト肝がん由来 HuH-7)およびマウス肝臓を用いて2型糖尿病薬メトホルミンの作用を反映したオミクスデータを取得するための実験系構築を試みた。最終的には、メトホルミンの生理的応答である血糖値上昇抑制および生化学的応答である肝臓におけるAMPKリン酸化亢進の両者をマウスにおいて測定できる実験系を確立した。調製したマウス肝臓サンプルについては順次品質評価を行い、平成30年12月現在、オミクス計測に供する準備段階にある。

◇トランスオミクス解析の拡張・改良

これまでのメタボロームデータの代わりに炭素 13 で標識した同位体メタボロームデータを用いる改良型トランスオミクス解析手法を開発した (Krycer, Yugi et al. 2017, Cell Rep.)。また、従来のトランスオミクス解析では取り扱えなかったトランスクリプトーム階層による代謝制御を含む拡張手法を開発した (Sano et al. 2016, Sci. Signal.; Kawata, Hatano, Yugi et al. 2018, iScience)。このほか、リン酸化プロテオーム階層をキナーゼ層(タンパク質をリン酸化する側)と基質層(リン酸化される側のタンパク質)の 2 つに分けて両者の間のネットワークを推定する手法を開発した (Kawata, Yugi et al. 2018, Genes Cells)。

■研究テーマ B: Garuda 準拠トランスオミクス解析ソフトウェアの開発

トランスオミクスに基づく創薬基盤技術の社会実装を目指し、製薬企業等の創薬研究者によるトランスオミクス解析を容易に実施可能にすることを目的としたソフトウェアを開発した。まず、メタボローム階層、リン酸化プロテオーム階層、トランスクリプトーム階層のそれぞれのネットワーク再構築手法を個別にソフトウェア化した。次いで、当該 3 階層間をつなぐ階層間ネットワーク再構築ソフトウェアを開発し、システム・バイオロジー研究機構が提供する Garuda Platform に準拠して、前記 3 階層を個別に解析するソフトウェア群とシームレスなデータ交換を行えることを確認した。

■研究テーマ C・D: 薬剤応答ネットワークに基づく多剤併用療法の設計

上記研究テーマ A によりメトホルミン作用の薬剤応答ネットワーク再構築が完了した時点で行う解析を想定した概念実証研究を行い、ネットワークを用いた併用薬候補探索が現実的に可能であることを示した。

(2) 詳細

■研究テーマ A: 薬剤応答ネットワークの再構築

◇薬剤を投与した培養肝細胞もしくはマウスの肝臓のサンプル調製、オミクスデータ計測

培養肝細胞(ヒト肝がん由来 HuH-7)を用いて、2 型糖尿病薬メトホルミンの作用を反映したオミクスデータを取得するための実験系構築を試みた。当初の実験デザインは、グルカゴン HuH-7 細胞に投与し、一定時間経過後にメトホルミンを投与して応答を測定するというものであった。しかし、想定していたグルカゴンに対する当該培養細胞の応答が見られなかったため、バックアップとして考えていたマウス肝臓サンプルを用いた実験系構築に移行した。マウス肝臓を用いた系では、先行研究 Miller et al. (2013) Nature にてメトホルミン投与時に計測された血糖値応答をほぼ再現することに成功した。さらに、メトホルミン用量を 7 段階変えて試したところ、用量依存的に血糖値低下を示すことを見出した。しかし、メトホルミン投与時の肝細胞における分子レベルのポジティブコントロールとして広く知られている AMPK リン酸化の亢進を確認できなかった。この問題に関しては領域会議における杉浦悠毅研究者からの指摘をヒントに実験条件を変更したところ、AMPK リン酸化の亢進を測定できる実験系の確立に成功した。研究目的達成に向けて、取得した肝臓サンプルの品質評価を行い、血糖値降下と AMPK リン酸化亢進の両方を呈したサンプルを特に選抜してオミクス計測に供する。得られたオミクスデータを研究テーマ B で開発したソフトウェアに入力し、メトホルミンに反応する多階層ネットワークを再構築する。

◇トランスオミクス解析の拡張・改良

シドニー大学の David James 教授と共同で、これまでのメタボロームデータの代わりに炭素 13 で標識した同位体メタボロームデータを用いる改良型トランスオミクス解析の手法開発を行った(Krycer, Yugi et al. 2017, Cell Rep.)。代謝物質およびリン酸化の時定数(=代謝物質濃度またはリン酸化強度が最大値の 1/2 に達する時間)を求めたところ、インスリンで刺激したマウス 3T3L1 脂肪細胞では代謝フラックス増加に先じて代謝酵素リン酸化がパルスウェイの各所で起こる現象を見出し、'metabolic priming' と命名した(図 1)。また、RNA など比較的変動が遅い遺伝子発現のオミクス階層による階層縦断的代謝制御を対象とする拡張版トランスオミクス技術を開発した(Kawata, Hatano, Yugi et al. 2018, iScience)。なおこれに先立ち、当該技術の一部を応用した論文を発表した(Sano et al. 2016, Sci. Signal.)。このほか、トランスオミクス解析の方法論を俯瞰する総説を発表し、同一条件下で調製したサンプルを用いたオミクス計測データに基づくメカ

ニスティックかつ階層縦断的なネットワーク再構築としてトランスオミクスを定義した(Yugi et al. 2016, Trends Biotechnol.; Yugi and Kuroda 2017, Cell Syst.)。

■研究テーマ B: Garuda 準拠トランスオミクス解析ソフトウェアの開発

◇メタボロームおよびリン酸化プロテオームデータの解析ソフトウェア開発

トランスオミクス解析を製薬企業等の創薬研究者が実施するうえで技術的障壁となるのが、複数のデータベースの操作や各オミクス階層特有の ID 体系、データ形式などに精通していなければならないことである。この技術的障壁を解消するため、グラフィカル・ユーザー・インターフェースによりトランスオミクス解析を実行するソフトウェアの開発を開始した(図 2)。

当該ソフトウェアの開発は、システム・バイオロジー研究機構が提供する Garuda Platform に準拠した。これは、同 platform が複数のソフトウェアのシームレスな連動を可能にするデータ交換規格を備えていたことによる。まず、リン酸化プロテオーム階層、メタボローム階層それぞれのデータ解析ソフトウェアを macOS 環境で開発し、動作を確認した。さらに、潜在的な顧客となるであろう企業研究者の要望をヒアリングし、企業研究所に多いネットワークから隔離された Windows 環境に対応した版を開発した。

◇トランスクリプトーム解析ソフトウェアおよび 3 階層統合ソフトウェアの開発

「研究テーマ A」で開発したトランスクリプトーム階層のネットワーク再構築手法を、前記 2 階層同様に Garuda 上で動作する解析ソフトウェア化した。また、これら 3 階層間をつなぐ階層間ネットワーク再構築ソフトウェアを開発し、前記 3 階層を個別に解析するソフトウェア群とシームレスなデータ交換を行えることを確認した。

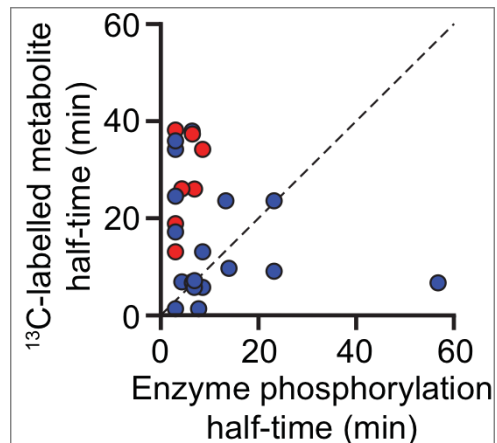


図 1. リン酸化強度および代謝物質濃度の時定数 (Krycer, Yugi et al. 2017, Cell Rep.)

横軸は代謝酵素のリン酸化強度の時定数、縦軸は当該代謝酵素の基質または産物となる代謝物質濃度の時定数である(青: 基質, 赤: 産物)。プロットされた点が 45 度線の上側に有意に偏っており、このことはリン酸化強度が代謝物質濃度よりも有意に時定数が小さい(=速い)ことを示す。



図 2. トランスオミクス解析ソフトウェア試作品の実行例

1) オミクスデータを読み込み、2) 解析開始から数分程度待つと、3) 多階層ネットワークの構造を記述するファイルが出力される。ネットワーク構造の視覚化は既存のソフトウェアを用いる。

3. 今後の展開

■ 研究テーマ A: 薬剤応答ネットワークの再構築

メトホルミンの薬剤応答ネットワークは平成 31 年 3 月頃の再構築完了を目指している。再構築が完了した暁には、諸説あるメトホルミンの作用点それぞれの薬剤作用への寄与を、ネットワークの文脈に位置づけて数理モデル等で評価する。

■ 研究テーマ B: Garuda 準拠トランスオミクス解析ソフトウェアの開発

プロトタイプとなるソフトウェアは概ね動作確認できたので、プロジェクトの目標であるパッケージ化と対外発表が視野に入ってきた。目標達成のため、複数種のデータへの対応や潜在的ユーザーによる試用・改良を実施する。

■ 研究テーマ C・D「薬剤応答ネットワークに基づく多剤併用療法の設計」

薬剤応答ネットワークを用いた併用薬候補探索が現実的に可能であることが示されたので、上記研究テーマ A のメトホルミンの薬剤応答ネットワーク再構築を待って併用薬候補を探索する。

4. 自己評価

薬剤応答ネットワークの再構築に係る技術として、従来カバーしていたメタボローム階層、リン酸化プロテオーム階層のみならずトランスクリプトーム階層やゲノム階層へとトランスオミクス解析技術を拡張したことが代表的成果の一つである。さらに、薬剤応答ネットワークを用いた併用薬候補の最適化手法についても概念実証が済んでいる。これらの技術を容易に利用可能とするソフトウェアは試作品の動作確認を完了している。一方、実験系の確立に難航したため、メトホルミンを題材とした薬剤応答ネットワークの再構築は最終年度までずれ込んだ。いわゆるドライ分野出身である研究者にとって初めての本格的な実験系構築とそのトラブルシューティングに直面したことは今後キャリアを重ねていくうえで貴重な経験となったが、ウェット分野の「引き出し」の不足のために時間を費やしてしまったことは反省材料である。研究実施にあたっては、サンプルの調製から品質評価に至るまでに実施する動物実験、生化学・分子生物学実験の機器・試薬類を整備し、研究補助員を雇用して実験系を立ち上げることができた。データ解析に関しては、計算サーバを購入して手法開発ならびにソフトウェア開発に用いた。なお、本研究で開発した技術は、将来的に前記のソフトウェアを介して創薬研究者に普及を図ることにより、トランスオ

ミクス解析に基づく新規創薬基盤技術として社会実装する。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. †Kawata, K., †Yugi, K., Hatano, A., Kokaji, T., Tomizawa, Y., Fujii, M., Uda, S., Kubota, H., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Kuroda, S., “Reconstruction of global regulatory network from signaling to cellular functions using phosphoproteomic data”, *Genes Cells*, in press († These authors contributed equally).
2. †Kawata, K., †Hatano, A., †Yugi, K., Kubota, H., Sano, T., Fujii, M., Tomizawa, Y., Kokaji, T., Tanaka, K.Y., Uda, S., Suzuki, Y., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Saitoh, K., Kato, K., Ueno, A., Ohishi, M., Hirayama, A., Soga, T., Kuroda, S., “Trans-omic analysis reveals selective responses to induced and basal insulin across signaling, transcriptional, and metabolic networks”, *iScience*, 2018, 7:212–229. (Cover Article; † These authors contributed equally).
3. †Krycer, J.R., †Yugi, K., Hirayama, A., Fazakerley, D.J., Quek, L.E., Scalzo, R., Ohno, S., Hodson, M.P., Ikeda, S., Soji, F., Suzuki, K., Domanova, W., Parker, B.K., Nelson, M.E., Humphrey, S.J., Turner, N., Hoehn, K.L., Cooney, G.J., Soga, T., Kuroda, S., James, D.E., “Dynamic metabolomics reveals that insulin primes the adipocyte for glucose metabolism”, *Cell Rep.*, 2017, 21(12):3536–3547. († These authors contributed equally)
4. Yugi, K. and Kuroda, S. “Metabolism-Centric Trans-Omics”, *Cell Syst.*, 2017, 4(1):19–20.
5. Yugi, K., Kubota, H., Hatano, A., and Kuroda, S., “Trans-Omics: How To Reconstruct Biochemical Networks Across Multiple ‘Omic’ Layers”, *Trends Biotechnol.*, 2016, 34(4):276–290. (Cover Article).

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件(公開前の出願件名については件数のみ記載)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

1. Yugi, K., Krycer, J.R., Kuroda, S., and James, D.E., “Dynamic metabolomics and phosphoproteomics reveals that insulin primes the adipocyte for glucose metabolism”, 19th International Conference on Systems Biology, Lyon, France, 29 Oct. 2018.
2. 柚木克之, James R. Krycer, 平山明由, Daniel J. Fazakerley, Lake-Ee Quek, Richard Scalzo, 大野聡, Mark P. Hodson, 池田五月, 庄司二葉, 鈴木久美, Westa Domanova, Benjamin L. Parker, Marin E. Nelson, Sean J. Humphrey, Nigel Turner, Kyle L. Hoehn, Gregory J. Cooney, 曾我朋義, 黒田真也, David E. James, 「トランスオミクス解析による代謝プライミング現象の発見」, 第 12 回メタボロームシンポジウム, 鶴岡, 2018 年 10 月 19 日.
3. Yugi, K., “Dynamic metabolomics reveals that insulin primes the adipocyte for glucose metabolism”, From Single- to Multiomics: Applications and Challenges in Data Integration, Heidelberg, Germany, 12–14 Nov. 2017.
4. Yugi K. “ Trans-omic analysis reveals fed and fasting insulin signal across phosphoproteome, transcriptome, and metabolome” The 1st International Symposium for Trans-Omics (Tokyo, Japan) November. 2017.
5. Yugi, K., “Trans-omic reconstruction of insulin signal flow in global phosphorylation and

metabolic network”, 6th Conference on Systems Biology of Mammalian Cells, Munich, Apr. 2016.

著作物

1. 柚木克之, 角田達彦, 黒田真也, 「GWAS をトランスオミクスで読み解く」, 遺伝子医学 MOOK 33:127-136, 2018.
2. 柚木克之, 「トランスオミクス解析による薬剤作用機序の網羅的理解」, ファルマシア 53(12):1187-1191, 2017.

タンパク質分解技術で新薬が見えた

伊藤 拓水（東京医科大学 ナノ粒子先端医学応用講座・准教授）

研究課題名：「代謝産物によるユビキチンリガーゼ制御工学の確立」 研究期間：2015.10～2019.3

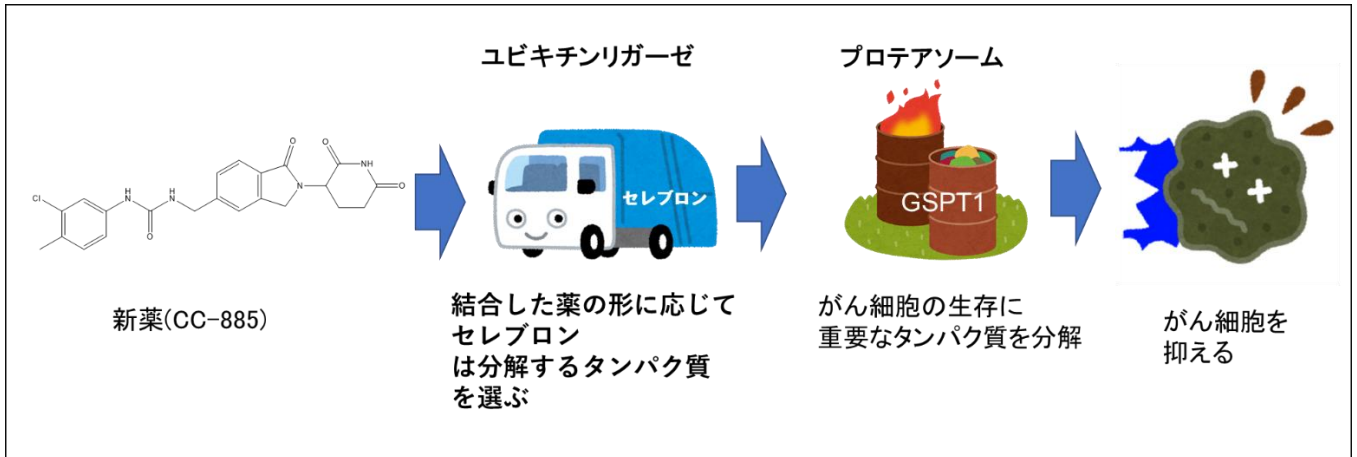


図 タンパク質を壊す新しい薬でがん細胞を倒す

新薬(CC-885)がユビキチンリガーゼという酵素の一種であるセレブロンに結合すると、セレブロンはがんの生存に必要なタンパク質(GSPT1)を見つけってきます(誘導します)。そして誘導されたタンパク質 GSPT1 はプロテアソームという酵素によって分解されます。その結果、生存に必要なタンパク質がなくなってしまうので、がん細胞が退治されます。

本さがけ研究では代謝産物や新規化合物(新薬などを含む)によりセレブロンというタンパク質の制御法を見出すことを目的としていました。60年前に睡眠薬として開発された薬剤であるサリドマイドがセレブロンに結合すると、このセレブロンはタンパク質分解を誘導する特殊な酵素であるユビキチンリガーゼとして働きます(以前、私がこの性質を発見しました)。興味深いことに、セレブロンはこれに結合する薬や天然物の構造によって運んできて分解するタンパク質の種類が変わることが分かってきました。今回、私はCC-885という新しい薬を見出しました。この薬がセレブロンに結合すると、急性白血病の原因となるがん細胞の生存に必要なGSPT1というタンパク質を選んで分解します。そしてがん細胞が増えるのを抑えることが達成できました。この研究成果は世界で最も権威のある学術誌であるネイチャー誌に掲載され、国際的にも高い評価を得ています。

>>参考情報

> 論文

1. Matyskiela, M.E., Lu, G., Ito, T. (共同筆頭著者), et al. *Nature* 535, 252-7, 2016
2. Mori T, Ito T (共同筆頭著者) et al. *Sci Rep* 8, 1294, 2018.

> 受賞

「佐々記念賞」(2017)

> プレスリリース

「急性骨髄性白血病に効果の期待できる新しいタイプの薬の開発 およびその作用機構の解明」 2016年6月24日 <http://www.tokyo-med.ac.jp/160624nanoPress2.pdf>