



ムーンショット目標 2

2050 年までに、超早期に疾患の予測・予防をすることができる
社会を実現

実施状況報告書

2024 年度版

恒常性の理解と制御による糖尿病および

併発疾患の克服

片桐 秀樹

東北大学 大学院医学系研究科



1. 当該年度における研究開発プロジェクトの実施概要

(1) 研究開発プロジェクトの概要

AI・数理モデル解析などを活用して、代謝・循環の調節に重要である臓器間ネットワークの機序を包括的に解明する。それに基づき、糖尿病やその併発疾患である心不全などについて、未病期段階の状態をより精密に検出する技術の開発を進める。さらに、未病段階から正常へと改善する手法の開発を目指し、臓器間ネットワークの制御法を開発する。それにより、2050年には、健診で採血を行わなくても、糖尿病や併発疾患についての情報が本人にフィードバックされ、超早期の段階で正常に復することが一般的となる社会の実現を目指す。

(2) 研究開発プロジェクトの実施状況

当該年度は、プロジェクト4年目にあたり原著論文 52 報、そのうち 2 件を JST との共同プレスリリースとして国内外に発信することができた。個体レベルの恒常性について、数理解析を進めつつ、臓器間ネットワーク分子機序の解明や中枢・末梢の神経シグナルを解析するとともに、これらに基づく制御法を提案した。さらに、併発疾患については、心不全に対する骨髄細胞の機序、サルコペニアにおけるケトン体の意義など、機序やターゲットを提案した。特に心不全状態や肝糖取り込み能については、超早期にヒトで検出する手法の開発に成功し、社会実装につなげつつある。また、実際に健常と考えられていたヒトで、寿命に関連する糖代謝状態やその死因が明らかとなり、未病の新たな定義づけにつながるものとなった。

研究開発項目1～5が相互に連携しながら研究開発を推進している。

研究開発項目1では、糖尿病モデルマウスで臓器間ネットワークの制御や膵への迷走神経刺激が糖尿病予防・治療法となる POC が得られたことから、新妻・片桐によるヒト迷走神経刺激装置を埋め込んだてんかん患者での糖代謝解析へと進展した。また、本予防・治療戦略をより一般的なものにするため、臓器連関に関与する求心性神経細胞サブタイプに発現する GPCR リストを作成し、膵β細胞を増殖させるリガンド候補の探索を進めた。中枢神経での統御機構については、視床下部背内側部ニューロンの一次繊毛が加齢に伴い退縮することが加齢性肥満(中年太り)発症の根本的なメカニズムであることを発見し、加齢性肥満から糖尿病発症へ至る機序の解明とその予防技術の開発に大きく貢献すると考えられ、解析を進めた。また、肥満症患者および健常人の糞便サンプルを指標に、腸内細菌種の Ss 菌によりスクロースを基質として産生される菌体外多糖が、宿主の腸内細菌叢を介して短鎖脂肪酸産生による代謝機能改善効果を発揮することを明らかにし、京都大学と JST の共同プレスリリースに繋げた(令和 7 年 1 月 31 日)。

研究開発項目2では、心不全時のストレスが、心臓から求心性神経・脳・遠心性神経を経由して骨髄内の造血幹細胞にエピゲノム変化として蓄積し、心不全の再発や多病の原因となることを明らかにし、東京大学、千葉大学、JST の共同プレスリリースに繋げた(令和 6 年 5 月 25 日)。また、肥満・糖尿病の病態と肥満に伴って脂肪組織に出現する形質芽細胞、形質細胞との関係や糖尿病における脳血管の変容解明の解析を進めた。また、腎局所のケトン体産生低下に伴うサルコペニアの発症予測となりえる臨床指標の探索を

開始した。さらに、マウス多臓器全細胞アトラスを用いた疾患の変容解明に向けてマウス多臓器の透明化プロトコルの確立およびハイスループット化を行い、プレスリリースに繋がった(令和6年12月3日)。

研究開発項目3では、非接触型(カメラ・振動波)および接触型(心電図など)の生体情報デバイスを用い糖尿病および併発疾患(特に心不全)の予測に取り組んだ。遺伝子パスウェイの摂動に基づいた糖尿病臨床サブクラス予測のためのパレットポリジェニックモデルを開発し、合併症リスクの高い糖尿病予備軍を早期に同定できた。また、コホート研究により、正常耐糖能者における糖負荷試験1時間血糖値高値と関連する死因の検討を進め、 $^{13}\text{CO}_2$ 呼気試験で推定される肝臓での糖処理能との関連を検討した。

研究開発項目4では、グルコース-インスリン動態モデルのSAPデータへの適用に関し、数理モデリング手法を確率的な振る舞いを含む定式化に置き換え、確率分布を推定しながらパラメータ同定を行う手法の構築を進めた。循環系、代謝系の数理モデルを密に結合させること、及びそれらを適切に縮約することで、健康状態から未病状態への遷移を表現する作業を継続した。

研究開発項目5では、実験動物やヒトにおいて糖尿病未病・超早期状態や併発疾患の未病臓器間ネットワークにおけるデータセットを蓄積し、数理モデル解析にて臓器別の機能変化の抽出に繋がった。合計500名以上のヒト血液のリピドミクスデータベースから特定のリン脂質が健常人の健康パラメータと関連すること、将来の糖尿病マーカー、死亡マーカーとして有用な可能性が示唆された。機械学習により12誘導心電図および1誘導心電図のみで「超早期段階～糖尿病」を予測するモデルの確立に成功し、特許出願した。

(3) プロジェクトマネジメントの実施状況

東北大学総長の強いリーダーシップの下、代表機関として本研究開発プロジェクトに特化し、強力に支援するための「ムーンショット型研究開発事業戦略室」を設置しPMとの密接な連携によりPMがプロジェクトに専念できる体制で一体的推進を行った。

また、運営会議を設置して重要事項の連絡を随時行い、速やかに判断できる体制を構築した。課題推進者の全体会議や小会議の開催を支援し、情報を蓄積し、進捗状況を把握した。令和6年8月18～19日に仙台の東北大学星陵オーデトリウムにて全体会議を開催した。72名が参加し、26名の各課題推進者の口頭発表に加え、若手研究者による26件のポスター発表が行われ、活発な議論がなされた。また、数理モデル構築について数理科学者と医学・生命科学者が議論する会議(4回実施)の開催を支援した。

さらに、東北大学産学連携機構、技術移転機関の株式会社東北テクノアーチ、東北大学ナレッジキャスト株式会社と連携し、成果が得られた際に遅滞なく事業展開できる体制を構築した。研究における国際連携も積極的に推し進め、アウトリーチ活動としてプロジェクト独自のホームページを用い情報発信を行った。各種メディア(テレビ、新聞、webなど)や高校、大学への出張講義を通じ、高校生、大学生、一般市民への情報発信も積極的に行ってきた。

データマネジメントに関しては、NIIのGakuNin RDMに共有可能なデータの保管を進め、数理モデル構築、包括的データベース構築等への利活用につなげた。

2. 当該年度の研究開発プロジェクトの実施内容

(1) 研究開発項目1:臓器間ネットワークによる恒常性メカニズム解明と治療・診断法の開発

研究開発課題1:末梢臓器情報を中枢に伝達する分子機序解明とその制御法の開発

当該年度実施内容:肝臓からの求心性神経シグナルは迷走神経や内臓神経によって脳に伝達されるが、それぞれの神経束を構成する神経線維(神経細胞)は **heterogeneous** であることが明らかになっており、このことが求心性神経伝達の分子メカニズムの解明を困難にしてきた。

令和4年度に施行した単細胞レベルでの遺伝子発現の網羅的解析(**single cell RNA-seq (scRNA-seq)**)の改良により、既報で示されていなかった分子(特に神経細胞の情報伝達において重要な役割を担う **GPCR** などの受容体)の発現を検出することが可能となり、詳細かつ包括的に求心性迷走神経のサブタイプおよびそれぞれに発現している遺伝子の発現パターンを決定することができた。その結果、求心性迷走神経は **23** のサブタイプに分類可能であり、その中に糖代謝・インスリン分泌と密接な関連がある **Glucagon-like peptide-1 受容体 (GLP-1R)** 陽性のサブタイプを複数見出した。

本年度は、詳細に分類することができた求心性迷走神経のサブタイプのうち、どのサブタイプが肝臓からの求心性神経シグナルの伝達に関与しているのかを、肝臓選択的に遺伝子を導入したモデルマウスなどを用いて解析した。また、求心性内臓神経においても、**scRNA-seq** のデータをもとにサブタイプ別に分類した。特に、膵 β 細胞増殖につながる神経細胞サブタイプの候補の同定を進めた。そのうえで、**scRNA-seq** のデータを元に、迷走神経における **GPCR** の発現カタログの作製を試み、特定の **GPCR** 作動薬によって任意の迷走神経サブタイプを活性化できるかの検討に取り組む計画で、研究を推進した。

本課題は、5 人の課題推進者(山田哲也、青木淳賢、井上飛鳥、土井隆行、片桐秀樹)が連携し役割分担しながら推進している。

① 肝臓などの末梢臓器から脳にいたる臓器連関に関与する求心性神経細胞のサブタイプの同定(山田、青木、項目5の高山)

高山 G との共同研究により、これまでに施行した単細胞レベルでの網羅的遺伝子発現解析の改良により包括的に同定できた **Nodose ganglion** を構成する神経細胞のどのサブタイプが、末梢臓器からの刺激によって活性化するかについて **Fos** の発現増加を神経活性化のマーカーとして同定を進めた。その際、サブタイプの分類は二種類の方法で行った。また、既報にもとづく分類では、**NG14、16** が大きなサブタイプとして分類されたため、更に細かく分類した(**K0~K9**)。迷走神経求心路を活性化する方法は、肝臓への **PPAR γ** 遺伝子導入を用い、コントロールは **LacZ** 遺伝子導入とした。また **Nodose ganglion** はそれぞれについて左右別々に採取し解析に供した。その結果、**PPAR γ** 群で **Fos**

の発現上昇が認められたサブタイプとして K5、K7、P0、P4 が抽出された。これらのサブタイプに発現している GPCR の中で、神経を活性化させる可能性の高い Gq または Gs 共役型のもので、かつ、個体レベルで利用できる作動薬が存在するものを選別した。そこで本年度はまず、青木 G が独自に所有する作動薬について、そのエネルギー代謝に及ぼす影響を検討した。その結果、作動薬の投与によってマウスの体温(直腸温)が低下することが明らかとなった。また、さらに予備的な結果ではあるが、作動薬投与後にマウスの呼吸商および酸素消費量も低下した。別の実験で作動薬投与により Nodose ganglion ニューロンの Fos の発現が上昇することが確認されており、これらの結果をまとめると、迷走神経求心路に存在する GPCR の活性化は、神経ネットワークを介してエネルギー消費を負に制御しているものと考えられた。これは当初想定していた PPAR γ 発現時の表現型(エネルギー消費亢進)とは一致しないものの、迷走神経求心路に発現する GPCR の活性化が、神経ネットワークを介して個体レベルのエネルギー代謝制御に関与するというコンセプトの妥当性を支持するものと思われた。残りの候補 GPCR についても、それぞれのリガンドの投与実験を順次行いエネルギー代謝に及ぼす影響を検証する予定である。

② DREADD システムによる求心性迷走神経における GPCR シグナルの役割の解明(青木)

令和5年度までに4種類の G タンパク質シグナル(G α q, G α s, G α i, G α 12)を特異的に惹起する DREADD (Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drugs)を Phox2b-cre または Wnt-1-cre ドライバーマウスと交配させ、迷走神経(Nodose または Jugular neuron) DREADD マウスを完成させた。そこで本年度はこのマウスを用いてこれらの G タンパク質シグナルが関与しうる機能を網羅的に探索した。以下に新たに見出した知見の中で主要なものを記述する。

まず、Nodose neuron に G α q-DREADD を発現したマウス(NG-GqD)に DREADD リガンドである CNO を投与すると、耐糖能(IPGTT および OGTT)が低下するとともに、空腹時血糖そのものの上昇傾向も認めた。また、G α i-DREADD (NG-GiD)においても類似の傾向が認められた。従って、Nodose 神経はそれらを全体的に活性化・抑制する場合、いずれにおいても耐糖能は低下することが示唆された。一方で、G α s-DREADD (NG-GsD)の場合は、耐糖能に全く影響を与えなかった。これは G α s 共役型 GPCR である GLP1R の機能を考慮すると予想外の結果であり、迷走神経 GLP1R は G α s とは別のメカニズムで耐糖能改善を誘導している可能性が想定された。

CNO を飲水投与することによってそれぞれの G タンパク質シグナルを持続的に(1-2 週間)

惹起し続けた場合の応答についても解析を行なった。その結果、**NG-GqD** マウスでは摂食行動に加え、飲水行動の持続的な低下が認められた。一方で、**NG-GsD** マウスでは摂食行動には変化なく、飲水行動のみが低下した。求心性迷走神経が飲水行動(喉の渇き)を制御することは知られているが、それに関与する **GPCR** の報告はなく、今後、この責任 **GPCR** (**Gαq** まは **Gαs**)を同定することを試みる。また、興味深いことに、**Gαq** シグナルによる摂食行動の抑制応答は、高脂肪食負荷時に顕著に(より低い濃度の **CNO** で)誘導されたことから、迷走神経 **Gαq** シグナルの摂食抑制には餌の嗜好性がある可能性が明らかとなった。

さらに、**Gαs** シグナルに対しては、それ単独での惹起による作用がそれほど強くなかったことから、その他のシグナルとのクロストークについても解析を行なった。**NG-GsD** マウスに **CNO** を事前投与して **Gαs** シグナルを惹起し、そこに様々な迷走神経 **GPCR** 作動薬を投与した際のアウトプットを検証した。その結果、**Gαs** シグナルは **Gαq** 共役型 **GPCR** の作用を増強する可能性を見出した。具体的には、**Gαq** 型迷走神経 **LPA₃** 依存的な薬理応答が、**Gαs** シグナルの惹起によって、より低濃度の **LPA₃** 作動薬濃度で認められるようになった。従って、**Gαs** シグナルは求心性迷走神経活動の **tuning** を行なっていることが示唆された。

最後に、**Jugular neuron** に **Gαq-DREADD** を発現したマウス(**JG-GqD**)の解析から、**Jugular neuron** の活性化は、**Gasp** や **Sigh** として知られる特徴的な吸気呼吸を惹起することを見出した。この応答は頸部迷走神経の外科的切除によって完全に消失することから、確かに迷走神経に依存する応答であることが確認された。近年、**Gasp** が **Nodose neuron** の特定のサブタイプによって惹起されることが報告されたが、**Jugular neuron** における作用はこれまで全く知られていない。そこで、このメカニズムと生理・病理意義を詳細に解明するため、**Jugular neuron** に選択的かつ時期特異的に **Cre** を発現させる新規 **Cre** ドライバーマウス(**Prdm12-cre**)の作製を開始した。

③ 求心性迷走神経における **GPCR** カタログのアップデート(青木)

令和5年度までに求心性迷走神経 **scRNA-seq** の結果を元に、約 30 種類に分類した各種神経サブタイプにおける **GPCR** の発現パターン(**GPCR** カタログ)を作製した。そこで本年度はこのカタログをさらにアップデートする目的で、特定の臓器由来のシグナルを感知する神経サブタイプの **GPCR** を明らかにすることを試みた。具体的には、肝臓に注目し、山田 **G** および高山 **G** と共同で、肝臓に **MEK** または **PPAR_γ**を過剰発現させたマウスの求心性迷走神経を **scRNA-seq** 解析し、神経活性化マーカーが上昇している神経サブタイプの同定、さらに、そのサブタイプに発現している **GPCR** の絞り込みを行った。

さらに、それぞれのサブタイプに発現していた迷走神経 **GPCR** に対して、今後の研究に値するものを以下のクライテリアで選別した。1) 求心性迷走神経 **scRNA-seq** のデータの中には、一部、サテライトマイクログリア由来のデータが混入している可能性が明らかとなった。そこで、**Phos2b** 陽性(求心性迷走神経)であっても、サテライトマイクログリアマーカー陽性が認められた集団の **GPCR** は候補から除外した。2) 薬理的な解析をするにあたって、神経活性化を惹起する **GPCR** が望ましい。したがって、**GPCRdb** や井上 **G**らの結果を参照し、**Gαq** または **Gαs** 共役型のものを選別した。3) 同様に薬理的な解析には、作動薬が必要であることから、安定な内在リガンドを有する、または、選択的なアゴニストが報告されている **GPCR**を選別した。以上の基準から肝臓を支配する可能性のある迷走神経 **GPCR** が複数種類同定された。これらの一部については、実際に作動薬をマウスに投与し、個体レベルでの応答の解析を進めた。

④ ノードーズ神経節に発現する **GPCR** の機能評価法(井上)

青木 **G** と山田 **G** のノードーズ神経節の発現解析の精査から、ノードーズ神経節の特定のサブセットに発現する **GLP-1R** に着目して、培養細胞レベルで受容体活性化を測定する手法の構築を試みた。**GLP-1R** と **cAMP** 発光バイオセンサーを **HEK293** 細胞に一過的に発現させ、**GLP-1R** リガンドで刺激することで、良好な受容体活性化応答を検出することができた。続いて、**GLP-1R** の不活性化機構の特徴を調べた。一般に、**GPCR** はリガンド刺激依存的に内在化し、**GLP-1R** もリガンド刺激による内在化を確認した。種々の内在化関連因子のノックアウト細胞を用いて内在化を調べたところ、**GPCR** キナーゼのノックアウト細胞において顕著な内在化応答の低下が見られた一方、アレスチンのノックアウト細胞では内在化応答が残存していた。従って、**GLP-1R** は多くの **GPCR** とは異なりアレスチン非依存的な内在化経路により受容体が不活性化されることがわかった。今後、リン酸化 **GLP-1R** がどのような分子により認識されるかについて機能解析に取り組む。これらの研究による **GLP-1R** 不活性化機構の理解は、効果的な抗肥満薬・糖尿病治療薬の創製に貢献する。

【当初計画を超える成果】

肝細胞特異的に **G12** 共役型デザイナー **GPCR** を発現させた遺伝子改変マウスを用いて、脂肪肝に対する **G12** シグナル作用を調べた。その結果、肝臓において **G12** シグナルを誘導することで、肝臓への中性脂肪の蓄積を抑制し、肥満による体重増加を抑制することを見出した。その分子機序として、ヘパトカインの **FGF21** の増加がこれらの代謝改善作用を担うことが明らかとなった。肝臓に発現し **G12** シグナルを誘導する **GPCR** が複数存在し、これらが、脂肪肝・肥満治療の創薬標的となることが

期待される。

⑤ GPCR リガンドの合成の実施(土井)

GPCR リガンドの分布について質量分析を用いて検出するために必要な同位体元素を含む内部標準物質の合成を実施した。まず滝田らが報告しているリノール酸を用いて文献既知の方法[(i) 10 mol% Pd(OAc)₂, 20 mol% CsOPiv, toluene/D₂O, 80 ° C, (ii) K₂CO₃, CH₃OD, (iii) 20 mol% Ni(tmhd)₂, CH₃OD, 100 ° C, (iv) NaOD/D₂O/CH₃OD/THF, 0 ° C to rt.] [Angew. Chem. Int. Ed. 2022, 61, e202202779]により、 $\alpha, \alpha, \beta, \beta$ -テトラジュテロリノール酸に変換できることを確認した。次に合成標的となる不飽和脂肪酸を 8-キノリルアミドに化学変換した後、同様の手法を用いて $\alpha, \alpha, \beta, \beta$ -テトラジュテロ不飽和脂肪酸 8-キノリルアミドに導いた。この際、モデルで用いたリノール酸誘導体に比べて反応性がかなり劣ることがわかり、条件検討の結果、パラジウム触媒を等量用い、加熱条件下実施することで、十分な重水素化率を達成することができた。続いてメチルエステルに変換した後、重水中で加水分解を行った。その結果2~4個重水素化された不飽和脂肪酸の合成に成功し、青木 G に 15mg を提供した。青木 G において、このサンプルを用いて脂質に変換後マスイメージング等で生体内分布の分析が実施された。

⑥ 求心性神経のシグナル伝達の分子メカニズムの解明(片桐)

膵 β 細胞増殖につながる臓器間ネットワークを活性化させるため、恒常活性型 MEK をコードしたアデノウィルスを用いた肝への遺伝子導入を行った際に cFos が発現する Dorsal root ganglion に核を持つ求心性ニューロンについて、前年度までに、Taq-Seq を活用した scRNA-seq 解析での詳細な発現データをもとに *in silico* で検討した。本年度は、青木淳賢(東京大学)との連携により、DRG に核を持つニューロンのサブタイプ別の受容体カタログを作製し、膵 β 細胞増殖モデルで活性化している神経に発現する受容体の候補を同定した。さらに、cFOS 陽性神経を含むクラスターが複数にわたることを見出し、それぞれが選択的に発現するアゴニスト投与を進め、それらの効果を確認できた。

⑦ 求心性神経に発現する受容体のリガンド探索(片桐、山田)

情報交換を推進し、連携研究の基盤を構築

⑥の DRG ニューロン側からの解析と並行し、肝臓への遺伝子導入などにより膵 β 細胞が増殖するモデルを用い、肝臓での遺伝子変化を網羅的に検討する。これにより、膵 β 細胞が増殖するモデルでの、⑥の受容体や人工リガンドとの組み合わせを考慮に入れ、肝臓から分泌される内因性リガン

ドの候補を探索した。複数の受容体に対し、内因性にリガンド自体、あるいは、その生成酵素の発現が増加するものが認められ、内因性リガンドの候補として同定できた。

課題推進者：山田哲也(東京科学大学)、青木淳賢(東京大学)、井上飛鳥(東北大学)、土井隆行(東北大学)、片桐秀樹(東北大学)

研究開発課題2: 中枢における情動-自律神経連関の神経回路解明とその制御法の開発

当該年度実施内容: 脳内で情動やストレスを処理する皮質辺縁系と生体調節を担う自律神経制御系とが連関する神経回路メカニズムの解明やその神経回路を制御する手法の開発を進めた。特に、 β 細胞の増殖につながる臓器間ネットワークを仲介する中枢神経回路の同定を目的として研究を推進した。当該年度は、神経回路の同定や機能解明に向け、介入に着手した。化学遺伝学などの手法を駆使して、 β 細胞増殖すべく肝を刺激した際に活性化する脳内の神経群を刺激する手法の開発を進め、前倒しで β 細胞の増殖の司令塔の候補脳部位を同定した。また、ヒトを対象として、fMRIによる脳活動の計測系を確立するため、適した実験系の確立を進めた。

また、前年度までに特定した心理ストレスや情動によって活性化される皮質辺縁系と自律神経制御系のニューロン群の活動を薬物の微量注入によって抑制しながら、心理ストレスや情動に対する自律生理反応への影響を調べることで、前年度までに特定した脳領域の心身相関反応における機能を特定した。また、前年度に作製技術を確認したウイルスを用いて、皮質辺縁系から自律神経制御系への神経伝達を担う投射ニューロンへ選択的に光感受性イオンチャネルを発現させ、その発現を組織化学的に確認することで、この神経伝達路の制御技術を確認できた。また、研究開発課題1で得られた知見などを活かしながら、末梢臓器から脳への内受容感覚信号によって活性化される脳領域と神経細胞群を、組織透明化技術、網羅的解析手法、組織化学的手法などを用いて同定を進めた。さらに、心理ストレスや情動に対する自律生理反応の発現に関わる皮質辺縁系と自律神経制御系脳領域に関する動物実験で得た知見と、ヒトで非侵襲的に計測した脳活動との類似点と相違点を明確にすることによって、ヒトの代謝調節機能や循環調節機能を制御する技術開発の手がかりを探索した。加えて、課題1や3の求心性・遠心性神経の研究者との連携や、項目4の数理研究者との情報交換を継続して行った。

本課題は、3人の課題推進者(中村和弘、西村幸男、片桐秀樹)が連携し役割分担しながら推進している。

① 実験動物の心身相関神経回路の解明(中村)

実験動物(マウス、ラット)の脳内において、情動やストレスを処理する皮質辺縁系から自律神経制御系へ情動信号やストレス信号を伝達し、全身の代謝調節や循環調節に影響を与える中枢神経回路メカニズムを、*in vivo* 生理学や神経解剖学的手法などを用いて解明する目標の達成のため、今年度は、特定の脳領域へ薬物を微量注入する手法を駆使して、心理ストレスや情動によって活性化される皮質辺縁系と自律神経制御系のニューロンの活動を抑制することで、心理ストレスや情動に対する自律生理反応への影響を調べることにより、前年度までに特定した脳領域の心身相関反応における機能を特定した。

② 実験動物の心身相関神経回路の制御(中村)

実験動物において、皮質辺縁系と自律神経制御系とを連関させる神経回路の活動を人為的に抑制あるいは活性化する技術を確認し、全身の代謝調節機能や循環調節機能を長期的に制御する手法を開発する目標の達成のため、今年度は、前年度に作製技術を確認したウイルスを用いて、皮質辺縁系から自律神経制御系への神経伝達を担う投射ニューロンへ選択的に光感受性イオンチャネルを発現させ、その発現を組織化学的に確認した。

③ 実験動物の感覚-効果器連関に関わる脳領域の解明(中村)

実験動物において、脳が末梢臓器からの感覚情報を処理し、遠心路を通じて末梢臓器・器官を制御する、感覚-効果器連関メカニズムに関わる脳領域を明らかにする目標の達成のため、今年度は、研究開発課題1「末梢臓器情報を中枢に伝達する分子機序解明とその制御法の開発」で得られた知見などを活かして、末梢臓器から脳への内受容感覚信号によって活性化される脳領域と神経細胞群を、組織透明化技術、AI 等を活用した網羅的解析手法、組織化学的手法などを用いて同定を進めた。こうした解析から派生して、レプチン-メラノコルチンシグナル(飽食シグナル)が視床下部背内側部を介して褐色脂肪熱産生や代謝亢進を駆動することを見出し、そのシグナルを担う視床下部背内側部ニューロンの形態が加齢によって変容することが加齢性肥満(中年太り)の発症の根本的なメカニズムであることを発見し、論文発表した(Oya *et al.*, *Cell Metabolism* 36:1044-1058.e10, 2024)。肥満は糖尿病の未病段階と位置づけられることから、この発見が糖尿病発症機序の解明とその克服に大きく貢献すると考えられ、引き続き解析を進めている。

④ ヒトの fMRI 計測による心身相関神経回路の解析(中村)

ヒトを用いた fMRI 等の非侵襲的脳活動計測によって、皮質辺縁系の情動処理メカニズム

と視床下部-脳幹系の自律神経制御メカニズムについての知見を得るとともに、実験動物での知見とあわせて、ヒトの代謝調節機能や循環調節機能を人為的に制御する技術開発の手がかりを得る目標の達成に向けて、今年度は、本課題推進者(中村)が動物実験から得る心理ストレスや情動に対する自律生理反応の発現に関わる皮質辺縁系と自律神経制御系脳領域に関する知見を提供し、西村幸男(東京都医学総合研究所)らがヒトで非侵襲的に計測した脳活動との類似点と相違点を明確にすべく解析を行った。

⑤ ヒト fMRI による視床下部脳幹系の自律神経制御メカニズム解明(西村)

大きな自律神経応答を惹起させるためには、モード(肯定的)や傷ついた人物(否定的)など強い情動を喚起する写真刺激を使用する必要がある。そのため、グローバルスタンダードな情動喚起刺激である **Nencki Affective Picture System** (Marchewka et al., 2014; Wierzbica et al., 2015)および **Open Affective Standardized Image Set** (Kurdi et al., 2017)を受動的に観ている間に、自律神経応答としての心拍数と脳活動を同時に計測した。現時点で1名を対象として、1000 枚の写真刺激を3回ずつ計3000枚見ている間に、心拍数・呼吸・皮膚電気活動・脳活動を計測し、解析を進めている。

⑥ ヒトでの自律神経活動の自己制御(西村)

心的イメージによる自律神経応答の自己制御中の脳活動について検討を行った。自らの目標を達成して高揚感を得る場面をイメージ(情動イメージ)することで、心拍数が自発的に増大させられることを明らかにした。さらに、情動イメージ中の機能的 **fMRI** 計測により、前中部帯状皮質と線条体という辺縁系とドーパミンニューロンが存在する腹側中脳が、情動イメージによって強く賦活することが分かった。情動イメージ中の腹側中脳・線条体・視床下部の活動量は、心拍数変化と正の相関関係を示した。以上の結果から、中脳辺縁系が心拍数の自己制御に関連する脳領域であることが示唆される。

⑦ 非侵襲的ヒト臓器情報モニタリング法の開発(西村)

T2 スター強調画像を用いた経時的計測により、脾臓と肝臓の **T2** スター値を経時的に計測することに成功している。今後の展開を見据えて、脾臓と肝臓の計測値の時系列相関を解析中であり、臓器間の機能的連関を非侵襲計測により定量化する方法を検討している。

⑧ 脳深部刺激による恒常性の制御法の開発(西村)

脳深部刺激による行動・自律神経活動評価系を開発するべく、自律神経応答として心電図・瞳孔径・血中飽和酸素濃度・皮膚抵抗を同時計測できる環境を

構築した。さらに次年度の計画実施に必要となるモデル動物に対して適切な脳部位での刺激を可能とするべく、記録電極を刺入して神経応答が見られた箇所を調べることで脳部位のマッピングを進めている。

⑨ 肝からの求心性神経シグナルによる中枢経路の解明とその制御による臓器代謝に及ぼす影響の解明(片桐)

恒常活性型 **MEK** をコードしたアデノウィルスを用いた肝への遺伝子導入により、膵 β 細胞が増殖する独自の系を用い、その際の、中枢神経経路の解明を目指している。前年度までに、項目2の課題推進者松本桂彦と連携し、**FOS-TRAP** マウスの透明化脳の解析を行い、目的のタイミングで、脳内での活性化している部位を定量的に解析する検出法を確立し経時的な解析を進め、時間的空間的に中枢神経が活性化される様子を明らかとすることに成功した。本年度は、これらの候補部位について、活性化した脳内の神経を、後から刺激する手法の開発に着手し、前倒しで複数の脳部位について、肝の恒常活性型 **MEK** の遺伝子導入時に脳で活性化した神経を後から刺激することに成功した。

⑩ ヒトでの中枢経路の解明と制御(片桐)

ヒトでの中枢機能の検討を進める西村と連携し、⑨で見いだされた経路について、**fMRI** を用いてヒトでの検討を開始した。まずは、肥満や摂食などの状況下での変化の検討を進めている。

課題推進者: 中村和弘(名古屋大学)、西村幸男(東京都医学総合研究所)、片桐秀樹(東北大学)

研究開発課題3: 遠心性神経による臓器機能調節の実態解明とニューロン制御法の開発

当該年度実施内容: 心臓血管系機能及び血糖を司る自立神経系を制御する人工神経接続システムの開発を開始した。また、健常人で経脊椎磁気刺激による血糖制御に対する **POC** を樹立した。

頸部迷走神経活動は脳と臓器の間をつなぐ求心性と遠心性情報を混合しており、神経活動の生理学的評価には求心性活動と遠心性活動を弁別し、その活動変化を評価することが必要である。当該年度は、1) 頸部迷走神経活動計測部位より末梢側を局所麻酔薬(レボブピバカイン)で神経ブロックし、遠心性と求心性神経活動を弁別する方法を継続検討した。この弁別方法を基にして、**GLP-1** 受容体刺激による求心性迷走神経活動、腎及び腰部交感神経活動の応答を同時に連続記録し、相互関係を検討した。2) また、**Streptozotocin(STZ)** 投与により血糖値が急性に上昇する過程での、頸部迷走神経活動、腎及び腰部交感神経活動と心電図の動的な変化を長期連続記録した。特に、心電図が

高血糖状態の変化を示すバイオマーカーになる可能性を検討した。
3) 得られたデータは **GakuNin** データベースを介して数理チームと共有し、自律神経活動による血糖値調節の不安定性を示す数理的表現を探索した。

マウスなどの動物モデルを対象として交感神経および副交感神経活動性を経時的に計測する技術の開発を継続した。膵臓を標的臓器とし、多点になるように取り付けられた複数の電極から生体電気信号を取得し、その中に含まれる自律神経活動に起因する成分を分離抽出する技術開発を進めた。このためには、膵臓から取得した生体電気信号の中から自律神経活動性を示す成分を特定するための参照データと、最適化のために事前の詳細なデータの分析と特徴抽出が必要であるため、継続してデータの分析を実施した。令和 5 年度までに膵臓から取得された生体電気信号のうち、心電図成分と独立した成分を見出していたが、令和 6 年度においては、膵臓から得られた生体電気信号に対して、心電図計測から得られる **RR** 間隔のピーク成分、および膵臓信号に見られるピーク成分 (**Pancreas Peak** 間隔:**PP** 間隔)を参照信号として、独立成分分析法を使用して膵臓由来の生体電気信号成分の分離抽出を行い、それぞれに対応する独立の成分の抽出に成功した。

また、発達を追った恒常性の理解による糖尿病と併発疾患の病態解析を進める目的で、胎児期に遺伝的要因あるいは環境的要因を持つ糖尿病モデルマウスを用いて、心拍変動による胎児の自律神経活動の評価、ならびに神経炎症と生後の肥満、糖尿病、自閉スペクトラム症 (**ASD**) 様行動の評価を行った。胎児期に高脂肪食に曝露されたマウスは、生後に肥満や糖尿病、**ASD** 様行動を呈することが示唆され、胎児期から生じた自律神経活動の低下が超早期状態としてこれらの異常に関与する可能性が考えられた。

さらに、ヒトでの実証に向け、迷走神経刺激患者における臨床研究、ならびに頭蓋内脳波埋め込み患者における臨床研究の両方において、データの収集を行った。データが十分に蓄積した段階で詳細な解析に移る予定である。

本課題は、4 人の課題推進者(西村幸男、吉本光佐、笠原好之、新妻邦泰)が連携し役割分担しながら推進している。

① 臓器機能調節に適した人工神経接続システムの開発(西村)

心臓血管系機能を司る自立神経系を制御する人工神経接続システムとして、当該年度は連続血圧データからオンラインで最高血圧、最低血圧、中間血圧、心拍数などのパラメータを抽出し、それによって経脊椎磁気刺激を制御する人工神経ソフトウェアの開発に着手した。血糖を司る自律神経系を制御する人工神経接続システムに関しても同様に開発を開始し、

測定した血糖値をもとに適切な刺激に変換するためのシステムの開発を開始した。

② 臓器機能の遠心性制御法の開発(西村)

ヒトでの非侵襲的な臓器機能制御法の開発

ヒト対象研究において、経脊椎磁気刺激によって血糖を司る自律神経系の臓器機能制御の実験を行った。健常成人に対して **CGM (Continuous Glucose Monitoring)**を行い、**75gOGTT (Oral Glucose Tolerance Test)**のみのコントロール群、**75gOGTT** 前後に経脊椎磁気刺激を行う介入群の2群に分けて血糖値の推移を評価した。**75gOGTT** 前後で経脊椎磁気刺激を行い、コントロール群と比較して糖負荷後 90 分での血糖値が下がる結果を得た。また、経脊椎磁気刺激の適切な刺激部位を探索する目的で下部胸髄、下部腰髄に対しての磁気刺激実験を行った。下部胸髄磁気刺激ではコントロール群と比較して血糖値が減少する傾向を認めたのに対し、下部腰髄磁気刺激ではコントロール群と同様の血糖値の推移を示した。本結果より、ヒト脊髄磁気刺激により、ヒトでの脊髄刺激による臓器機能制御の **POC** が示された。

③ 副交感神経活動の測定技術の開発(吉本)

本年度は、遠心性迷走神経活動と求心性迷走神経活動の弁別法の確立を目的として、継続的な検討を行った。具体的には、**GLP-1 (glucagon-like peptide-1)**を静脈内、門脈内、および腹腔内にそれぞれ投与し、迷走神経活動の変化を記録した。さらに、遠心性と求心性の神経活動を弁別する手法として、電極留置部位より末梢側にマイクロカテーテルを慢性留置し、意識下ラットに局所麻酔薬レボブピバカイン (**30 μ L**)を投与することで、求心性迷走神経活動の遮断を試みた。

その結果、**GLP-1** 投与により、静脈内および門脈内では投与約 3 分後に迷走神経活動が最大 **75 spikes/sec** 増加したが、局所麻酔薬による末梢側ブロックによりこの増加は消失した。これにより、マイクロカテーテルによる求心性迷走神経活動の選択的ブロックが有効であることが示された。

また、有意差は得られなかったものの、**GLP-1** 投与後には遠心性迷走神経活動が低下する傾向も観察され、本手法がその評価にも有用である可能性が示唆された。本方法では、局所麻酔薬による神経活動の抑制は約 1 時間以内に可逆的に回復するため、1 時間以内の神経応答解析に有効であることが明らかとなった。

この成果を踏まえ、現在は新規の方法として、迷走神経活動を **10kHz** のサンプリング周波数で連続記録し、スパイク波形を主成分分析 (**PCA**) やテンプレートマッチング等により分類することで、遠心性と求心性の活動を同時に分離・解析する手法の確立に取り組んでいる。これに向けて、**MATLAB** や **Python** による解析ソフトウェアの開発を進めている。

加えて、同時に記録した腎および腰部交感神経活動、心拍数、動脈圧との同期性を検討した結果、迷走神経活動と同期する期間としない期間が存在することが確認され、両者の因果関係についての解析も進行中である。

以上、当初目標としていたマイクロカテーテルを用いた局所麻酔薬による求心性迷走神経活動の弁別は達成された。本方法を基盤に、今後、さらに新規の弁別手法の開発を継続する。

④ 交感神経と迷走神経活動を介した糖尿病・併発疾患への影響実態の解明の実施(吉本)

本年度は、ストレプトゾトシン(STZ)投与により膵 β 細胞を破壊し、I型糖尿病モデルラットを作製したうえで、高血糖状態における迷走神経および交感神経活動を8日間にわたり連続測定した。実験にはWistar系雄ラット24匹を用い、頸部迷走神経、腎交感神経、腰部交感神経、心電図、脳波、筋電図、動脈圧、間質液糖濃度を、慢性電極およびセンサーにより、意識下で連続記録した。

STZ投与後、血中インスリン濃度は急激に低下し、約12時間後には間質液糖濃度が350 mg/dLに達し、高血糖状態が成立した。この間、頸部迷走神経活動に顕著な変化は見られず、血糖値の変化を感知はするものの、活動としては持続的な変化を示さず、交感神経活動などの変化を直接的に誘導する役割は果たしていないと考えられた。すなわち、迷走神経は血糖上昇に対してパーミッシブな応答をしていることが明らかとなった。

一方、腰部交感神経活動はSTZ投与2日目以降に有意に増加し、対照期に比べて約40%上昇した。この変化は、インスリン低下による筋肉へのグルコース取り込みの減少と、それに伴う筋内エネルギー低下が中枢に伝えられた結果、非インスリン依存的な血糖補償機構として交感神経活動が促進された可能性があると考えられる。腎交感神経活動には有意な変化が見られず、高血糖に伴う利尿に対して腎交感神経が腎臓に与える影響は限定的であることが示唆された。

さらに、心拍数はSTZ投与後に徐々に低下し、5日後には約330 bpmまで減少したが、この変化は迷走神経および交感神経活動の変化とは一致しなかった。このことは、心拍数低下には心筋自体の機能変化など、他の要因が関与している可能性を示唆している。

以上の結果から、STZ誘導性高血糖モデルにおいて、迷走神経および交感神経活動は臓器ごとに異なる時間的かつ機能的な応答を示すことが明らかとなった。特に以下の4点が示唆された。

1. 迷走神経は受容的な役割を果たす。
2. 腰部交感神経は筋代謝を反映した補償機構として持続的に増加する。
3. 腎交感神経は尿量調節のため抑制的に保たれる。
4. 心拍数の変化は、交感神経活動および迷走神経活動の変化を反映していない。

以上は、糖尿病発症時における自律神経系の役割の解明と、自律神経指標に基づく糖尿病や肥満の早期モニタリング技術の開発に資する基盤データとなる。

⑤ 「数理モデル解析による恒常性の理解と応用」との連携(吉本)

数理研究者とラットの交感神経活動などの時系列データを共有し、正常から疾患状態への遷移における動的応答を数値解析することで、「動的恒常性 (dynamic homeostasis)」の制御機構の理解を深め、時間変数を取り入れた疾病予測モデルの構築に貢献することを目的としている。

数理系の先生方と令和 6 年 8 月に直接意見交換を行う機会を得、また別途 Zoom 会議でも意見交換を行った。我々の保有する時系列データが、どのように数理モデル構築に寄与できるかについて討論した。

まずは、データ点数が比較的少ない血糖値の時系列データを共有することから開始した。STZ 投与による I 型糖尿病発症の過程では、血糖値が投与後 2 時間で一度ピークに達し、その後一時的に低下したのち、12 時間以降に持続的な高血糖状態に至ることが観察された。この血糖値データは長山教授と共有した。また水藤教授とは、遅延座標埋め込みによる解析の可能性と、多変数間の相互因果関係を数量的に評価する方法について議論した。

今回のやり取りを通じて、データ提供者として、時系列データを効果的に活用するには、共通の問題意識を持つこと、そしてデータの取り扱いが容易であることが重要であると実感した。

以上より、Zoom ミーティングでは I 型糖尿病発症に関する時系列データを数理チームの教授陣に紹介し、討論を行った。血糖値データは長山教授による数理モデル解析に供され、その他のデータについても今後の解析方法を含め、数理モデル化に向けて引き続き議論を重ねていくこととなった。

⑥ 自律神経活動を経時的に計測する技術の開発と応用(笠原)

マウスなどの動物モデルを用いて交感神経および副交感神経活動を経時的に計測する技術の開発を引き続き実施した。このために、マウス生体に多点となるように取り付けられた複数の電極から生体電気信号を取得し、得られた電気信号の中から目的信号である自律神経活動を反映する成分を抽出する方法を考案した。特に副交感神経活動を直接に計測し目的の信号を抽出することは、技術的に難易度が高く、新規計測システム・アルゴリズムの開発が必要である。取得した多点由来の生体電気信号の中から自律神経に由来する成分を抽出するためには、1) 複数の電極から生体電気信号を取得する技術、および2) 取得した多点由来の生体電気信号から自律神経の信号を抽出するためのアルゴリズムや AI 技術、の大きくふたつの技術開発が必要である。これまで、AI 開発の専門家と協議を重ねながら、1) および2) の技術開発を

相互フィードバック的に進めてきた。1)に関しては、膵臓を標的臓器とし、多点(現在は3点)から生体電気信号を得ることに成功している。また、2)に関して、開発中のアルゴリズムやAI技術の特徴は、ノイズの中から目的の信号を抽出できることである。多点から得られた生体電気信号には多数のノイズが含まれており、ノイズの中から目的とする自律神経由来の信号を抽出するために、我々の研究グループの木村芳孝名誉教授が考案・開発した参照系AI(特願2020-567349、令和5年8月14日登録)を応用することとした。参照系AIは、複数の電極から得られた複数の時系列データから、ノイズと信号を分離し、目的とする信号を抽出し再構成することができるアルゴリズムであるが、この最適化のためには事前に詳細なデータの分析と特徴抽出が必要である。また、この技術を用いて取得した生体電気信号の中から自律神経の信号を抽出するためには、自律神経活動の指標(参照)となるシグナルが必要である。現在、この指標となるシグナルに、これまで開発を進めてきた、3)心電図計測から間接的に自律神経活動を評価する方法、を応用している。膵臓から計測した生体電気信号には、心電図由来の成分と膵臓由来の成分が含まれていることが確認できた。以上より、抽出された成分は心臓および心電図から独立した膵臓の自律神経応答成分である可能性が示唆されたが、この信号がどのような特徴を有する信号成分であるかについて、薬剤や遺伝子改変マウスを利用するなどして慎重に検証を進める必要がある。

⑦ 発達を追った恒常性の理解による糖尿病と併発疾患の病態解析(笠原)

糖尿病や肥満は多くの疾患と併発しそれには自閉スペクトラム症(ASD)などの発達障害や神経精神疾患も含まれる。これらの疾患には遺伝的要因に加え環境要因が重要であるとされ、特に近年では胎児期の環境要因が生後の疾患リスクに大きく影響するという概念が提唱されている(Developmental Origin of Health and Disease: DOHaD)。妊娠中の母体の低栄養あるいは肥満は、胎児の出生後、将来の肥満や糖尿病リスクを有意に引き上げることが明らかになっているが、そのメカニズムは不明であり、早期診断や治療の妨げになっている。当研究室で開発したマウス胎児心電図計測技術は他に類を見ない胎児期の生理学的評価を可能とする技術である。この技術を用いて胎児期から成体期に至るまで、自律神経の機能と発達に着目した糖尿病および発達障害などの併発疾患の病態の解明を行った。胎児期に高脂肪食に曝露されたマウスは、生後に肥満や糖尿病、ASD様行動を呈することが示唆された。胎児期から生じた自律神経活動の低下が超早期状態として作用し、これらの異常に関与する可能性が考えられた。現在、これらの生後の表現型の解析に関する実験は例数を増やし、精査を進めている段階である。

一方で、db/db マウスを用いて⑥の項で開発した手法による膵臓由来の生体電気信号の計測・データ収集を開始した。

⑧ 迷走神経刺激療法および迷走神経刺激装置埋め込み患者の研究(新妻)

まず、最初に患者の負担軽減を企図し、臨床試験のプロトコル改変を行った。迷走神経刺激に関する研究は、研究名称「迷走神経刺激による臓器調節の実態解明とその制御法の開発に関する前向き観察研究」として承認されているが、迷走神経刺激装置植え込み前、植え込み後半年、1年、2年とデータを収集するが、1年後は入院検査を基本とする方針となっていた。しかしながら、てんかんが改善し社会復帰している患者が1年後に入院するのが難しいケースがあること、また、検査項目の負担も大きいことなどを考慮し、患者負担軽減目的で、フォローアップの検査は外来で施行可能なものに限り、入院検査を不要とするプロトコル改訂を行った。

また、迷走神経刺激により β 細胞が増加するなどの結果が得られた場合には、より積極的な糖尿病治療の臨床試験に進むべきであり、てんかん患者での調査研究は患者負担も考えて早期中止できることが望ましいと考えられた。従って、中間解析を30例の段階で行う方針とし、 β 細胞量の有意な増加を認めた場合には試験を早期中止するプロトコルに改変し、倫理委員会の承認を得た。

本年度は迷走神経刺激5例の患者登録を行い、頭蓋内電極留置も5例の登録を行った。また、頭蓋内脳波による睡眠ステージ判定に関する筑波大学との共同研究を施行中であり、論文投稿を予定している。

上記のように、当該年度には迷走神経刺激と頭蓋内電極留置を合わせて10例の臨床データ収集を行い、予定以上に進捗している状況であるが、更なる情報収集を目指し、患者組み入れ率の向上を図る。試験の早期終了を組み込んだプロトコルが承認されたことにより、より早く成果が得られる可能性がある。

課題推進者: 西村幸男(東京都医学総合研究所)、吉本光佐(奈良女子大学)、笠原好之(東北大学)、新妻邦泰(東北大学)

研究開発課題4: 腸-肝臓-脳相関による自律神経反射を介した糖尿病・併発疾患の病態解明と新規治療法の確立

当該年度実施内容: 本研究課題では、メタボリックストレスによって変化する「腸-肝臓-脳軸」が、糖尿病および併発疾患の発症進展に果たす役割を明らかにする。腸脳相関が動物の糖嗜好形成に重要であることが明示されているが、宿主の糖嗜好形成における腸内細菌の役割は明確でなかった。本事業内の解析により、無菌マウスもしくは腸管除菌マウスが糖嗜好を示さないことが明確になった。さらに、糖嗜好形成関連細菌の全ゲノム解析

を実施した結果、これら細菌は糖を基質として酢酸を合成する特性を有していることが明確となった。本年度の事業計画は、これら細菌が、腸管内のどの領域に棲息し、どのように神経を活性化させているのか具体的な機序を明確にすることを目的とする。

本課題は、課題推進者、寺谷俊昭が推進している。

① 宿主の糖嗜好性形成に関わる腸内細菌が腸管構成細胞に果たす役割について

令和 5 年度の解析により、マウス糖嗜好関連細菌は、微好気(酸素濃度(0.4~3%程度)の微好気環境下で酢酸を合成しながら急速に増殖する特性を有していた。そのため、これら糖嗜好関連細菌は、小腸上部から肛門にかけて、広く分布していることが想定された。そこで、本年度の研究では、まず、十二指腸から肛門までのどの腸管領域で糖がセンスされることが糖嗜好形成に重要であるのか明示し、これら腸管の糖センスによる神経活性化機構に対して、糖嗜好関連細菌がどのような役割を担っているのかを明確にしていく。

グルコースをマウスに経口投与し、マウス腸管コンパートメントごとの消化管内容物に含まれるグルコース濃度を経時的に測定した。小腸上部内容物においては、内容物中に残存する糖は投与後 10 分にピークに達し、以降 30 分まで残存し、それ以降は消失した。小腸下部および大腸においては、経口投与前後で内容物中の残存グルコースを検出できなかった。前年度までに糖嗜好に関わる消化管ホルモンとして **GLP1** を同定した。そこで、**Photo activatable Cre** システムを用いて、小腸上部もしくは小腸下部の **GLP1** 欠損したマウスを作製した。小腸上部の **GLP1** を欠損したマウスにおいて、糖嗜好が消失したのに対して、小腸下部の **GLP1** が欠損したマウスにおいては、糖嗜好が形成された。さらに、小腸上部と小腸下部に存在する腸内細菌が糖嗜好に果たす役割を明確にするため、小腸上部もしくは小腸下部にカテーテルを設置し、各カテーテルよりバンコマイシンを投与した。小腸上部よりバンコマイシンを投与されたマウスでは、糖嗜好が確認できないのに対して、小腸下部よりバンコマイシンを投与したマウスにおいては糖嗜好の形成を認めた。以上の結果より、糖吸収・**GLP1** の機能サイト・腸内細菌の活動領域のいずれにおいても、糖嗜好における小腸上部の重要性を示していた。

② 迷走神経刺激療法の開発と糖尿病改善効果の非臨床 **POC** の取得

これまでの解析により、迷走神経肝臓枝電気刺激法(**VHNS**)は、視床下部・扁桃体など様々な脳領域が活性化することで、糖尿病病態を改善することが示唆された。さらに、我々は、糖応答性求心性迷走神経および脂質応答性迷走神経を、**AAV** および **FosTRAP** マウスを組み合わせることで、それぞれ欠失させた。脂質応答性迷走神経が脱落したマウスにおいて、高脂

肪食負荷による耐糖能異常および非アルコール脂肪性肝炎病態をさらに増悪を認めた。そこで、本年度の研究は、**VHNS** 応答性および脂質応答性迷走神経の遺伝学的特徴を理解して、これら神経活性を利用した糖尿病治療法の開発に繋げることを目的とする。

【扁桃体など各脳領域が **VHNS** の耐糖能異常改善効果に果たす役割】

VHNS によって活性化を受けた脳領域のうち扁桃体に着目した解析を実施した。扁桃体を構成する神経細胞のうち **Pkcd** 陽性細胞のみを欠損させると腸管内の制御性 **T** 細胞の増加を認めたが、他の **Sst** 陽性細胞もしくは **Crh** 陽性細胞を欠損させても腸管免疫に影響を及ぼすことはなかった。これらマウスに通常食を与えて、長期間飼育(24 週間)を実施した。いずれのマウスにおいても、耐糖能異常を示さなかった。現在、高脂肪食負荷を与えて、肥満モデルマウスにおける扁桃体の役割を検討している。

【個別の迷走神経細胞の遺伝学的特性を理解するためのプラットフォームの確立】

VHNS で活性化を受ける求心性迷走神経の遺伝的特徴を明確にするため、刺激後の神経を対象としたシングルセル解析を実施した。まず、領域内の東京科学大学 山田哲也先生のご指導のもと、シングルセル解析のプラットフォームを確立した。次に、**FosTRAP2 x Ai14** マウスで **VHNS** を実施し、これらマウスより求心性の迷走神経を回収し、シングルセル解析を実施した。当該年度内にシーケンスを実施し、現在、データを解析している。

課題推進者: 寺谷俊昭(慶應義塾大学)

研究開発課題5: **GPCR** リガンドによる早期診断・予防治療法の開発

当該年度実施内容: 令和5年度までに、**GPCR** のリガンドとなりうる脂質分子の探索を糖尿病モデルマウスに対して実施し、パルミチン酸など特定の脂肪酸を含む、リゾリン脂質・リン脂質分子種の変動が観察された。さらにアディポネクチン受容体 **AdipoR1** および **R2** が飽和型(パルミチン酸など)リン脂質に対する選択的ホスホリパーゼ **A2** として機能し、リン脂質脂肪酸バランスを規定することで、特に **AdipoR2** が飽和脂肪酸による細胞ストレスを緩和させることを見出した。そこで当該年度は、**AdipoR1**、**R2** のノックアウト(KO)マウスを樹立し、そのリン脂質脂肪酸バランス制御機構の個体レベルでの機能と意義を明らかにするべく研究を実施した。その結果、これまで *in vitro* または細胞レベルで確認されていた **AdipoR1**、**R2** によるリン脂質バランスの変化が、個体レベルでも確認された。さらに、**AdipoR2** は精子形成に必須の役割を担うこともわかった。さらに、**AdipoR1**、**R2** が属する **PAQR** ファミリー(**PAQR5-11**)に注目し、これらの **PLA** としての機能を培養細胞レベルで解明した。

また、項目1課題1の研究結果を元に、各迷走神経 **DREADD** マウスで観察された薬理効果を担う内因性の **GPCR** の探索に取り組んだ。また、肝臓 **PPAR γ** 作動性の求心性迷走神経を制御しうる内因性 **GPCR** についても探索を開始した。その結果、一部の **GPCR** の作動薬が耐糖能や代謝パラメータを変化させることを新たに見出した。

また、**cAMP Glosensor** アッセイを高度化し、**G** タンパク質選択を高精度に評価する実験手法を構築すると共に、**GPCR** の改変を最小限に留めた転写レポーター**BERKY** 法の開発に取り組んだ。

さらに、**GPCR** の人工リガンドや食由来代謝物を用いた糖尿病や併発疾患の治療法開発に向けた研究を展開した。当該年度において、**GPCR** を介した食・栄養シグナルに関しては、現在までの複数の知見を論文として公表するに至った。食由来代謝物群については、新規生体恒常性制御物質同定に至った。恒常性制御物質群の組み合わせに関しては、細胞レベルでの各種脂肪酸受容体への親和性評価が完了した。

本課題は、4 人の課題推進者(青木淳賢、井上飛鳥、土井隆行、木村郁夫)が連携し役割分担しながら推進している。

① 糖尿病モデルにおける **AdipoR2 (PAQR2)** の役割解明(青木)

本年度は **AdipoR2 KO** マウスを用い、そのリン脂質組成の変動と糖尿病発症および進行との関連性を解析することを試みた。**AdipoR2 KO** マウスを **CRISPR-Cas9** システムによって作製したが、得られた **F0** 個体が雄のみであり、これらの **KO** 個体は精子形成異常に起因する雄性不妊であることが判明した。従って、**AdipoR2** によるリン脂質脂肪酸バランス制御機構は精子形成に必須であることがわかった。一方で、これらの **F0** 個体は交配・体外受精はいずれも不可能であったことから、代替案として **AdipoR2 hetero KO** 胚を **Jackson lab** から導入し、これを用いて改めて **AdipoR2 KO** マウスの作製に至った。このように **KO** マウスの樹立に時間がかかったため、**AdipoR2 KO** マウスに対する糖尿病モデル(高脂肪食負荷)の適用は現在進行中である。一方で、通常食における **AdipoR2 KO** マウスの全身臓器のリピドミクスを先行して行ったところ、肝臓や脂肪組織を含む様々な臓器で飽和型ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミンが増加しており、令和5年度までに見出した **AdipoR2** が飽和型リン脂質を基質とする **PLA** であることを裏付ける結果が得られた。また予想外の結果として、**AdipoR2** の欠損によって、肺でホスファチジルグリセロールおよびそのリゾリン脂質体が劇的に増加する知見が得られ、肺において何らかの異常が起きている可能性を見出した。

② **PAQR** 分子の脂肪酸リモデリング応答と糖尿病病態への関与(青木)

令和5年度までの研究より、PAQR5-11 はすべて PLA2 活性を有することが予測された。この知見に基づき、令和6年度は PAQR5-11 の基質探索を行った。HEK293 細胞に PAQR5-11 の各分子を過剰発現させ、その細胞のリピドミクスを行なったところ、PAQR5,6,8,9 発現細胞では顕著なリゾホスファチジルセリン (LysoPS) の蓄積が、PAQR7,10,11 発現細胞では顕著なリゾホスファチジレイノシトール (LPI) の蓄積が観察された。蓄積したリゾリン脂質はいずれも sn-1 に脂肪酸を持つリゾリン脂質であったため、PAQR5-11 はホスファチジルセリン (PS)、PAQR7,10,11 はホスファチジレイノシトール (PI) に対して PLA2 活性を発揮することが強く示唆された。また、PAQR5,6,8,9 発現細胞では PS の脂肪酸分子種が、PAQR7,10,11 発現細胞では PI の脂肪酸分子種が大きく変動していた。

興味深いことに、PAQR5,6,8 発現細胞ではドコサヘキサエン酸 (DHA)、エイコサペンタエン酸 (EPA) などのオメガ3脂肪酸を含有する PS のレベルが大きく減少し、逆に、アラキドン酸、リノール酸などのメガ6脂肪酸を含有する PS のレベルが大きく増加していた。このことから、PAQR5,6,8 はオメガ3とオメガ6脂肪酸を識別する初めての PLA2 であり、PS 分子中のオメガ3とオメガ6脂肪酸を調節する働きを持つことがわかった。このうち、PAQR5 リコンビナントタンパク質は *in vitro* で DHA 含有 PS 選択的な PLA2 活性を持つことがわかった。PAQR5 は腎臓の尿細管に高発現していたが、PAQR5 KO マウスの腎臓では、オメガ3脂肪酸 (DHA, EPA) 含有 PS レベルが顕著に増加し、アラキドン酸含有 PS も含め、その他の PS 分子種のレベルが減少していた。KO マウスは腎臓が肥大傾向にあり、血中カルシウムイオンの変動が観察され、腎臓に何らかの異常を持つことが示唆された。PAQR5,6,8 と対照的に、PAQR9 は短鎖型の PS に対する PLA2 活性を有し、PS の脂肪酸を長鎖化することがわかった。

PAQR7,10,11 に関しても、PAQR10,11 は短鎖型の PI に対する PLA2 活性を有し、PI の脂肪酸を長鎖 (主に、アラキドン酸) 化することがわかった。逆に、PAQR7 は PI の脂肪酸を短鎖化した。

PAQR5,7,9,10,11 に対しては KO マウスを作製し、主に、リン脂質塑性に関する解析を進め、上述したように、いずれも *in vitro* の培養細胞レベルでの結果を支持する結果であった。令和7年度は糖尿病モデルも含め、KO マウスの解析を進める。

③ 迷走神経機能を調節する内因性 GPCR リガンドの同定と迷走神経制御 (青木)

令和5年度までの項目1課題1における研究で、Nodose 神経に対して Gαq シグナルを惹起させると耐糖能が低下する作用が誘導されることを見出した。本年度はこの作用を担う内在性の Gαq 共役型 GPCR を同定すべく研究を行った。項目1課題1で作成した迷走神経 GPCR カタログを参照し、

GLP1R や GPR65、CCKAR 陽性サブタイプのような、これまでの知見から耐糖能低下に関与しないサブタイプを除外し、残ったサブタイプに発現している $G\alpha_q$ 共役型 GPCR を候補とした。それらの GPCR の作動薬をマウスに投与したところ、予備的知見として、PAR3 受容体の活性化が耐糖能を低下させる可能性を見出した。今後、迷走神経依存性を検証するとともに、生理的意義の解明に努める予定である。また、項目1課題1に詳細は記述したが、最近、山田 G と高山 G と共同で、肝臓を支配する PPAR γ 作動性求心性迷走神経の候補サブタイプが推定された。したがって、これらのサブタイプが耐糖能や摂食応答、エネルギー代謝を制御していることが期待された。そこで、本サブタイプに発現している内在性の GPCR に注目し、その機能解析に取り組んだ。その結果、候補 GPCR の1つである LPA₃ 作動薬の投与に伴い、摂食行動の抑制と体温低下、さらには呼吸商および酸素消費量の低下が誘導されることを見出した。従って、LPA₃ の活性化は求心性迷走神経を介し、全身性のエネルギー消費を抑制方向に傾ける可能性が示唆された。

④ 迷走神経 GPCR (リガンド) を測定する系の確立 (青木)

主にヒトの 150 種類の GPCR に対し、TGF α 切断アッセイでリガンド評価系を構築した。

$G\alpha_q$, $G\alpha_{12}$ キメラ G タンパク質を共発現させることにより、GLP1R、CCK1/2、NPY1R も含む約 100 種類の GPCR の活性化を評価することができた。

⑤ シグナル選別計測による cAMP GloSensor アッセイの高度化 (井上)

前年度までの取り組みの成果として、Gs 欠損細胞と Gs 骨格キメラ G タンパク質を用いた GloSensor cAMP アッセイにより、GPCR の G タンパク質共役パターンを計測することができたものの、Gs 骨格キメラ G タンパク質の発現による恒常的な cAMP 増加が生じ、高いバックグラウンドの低減が課題であった。検討の結果、GloSensor cAMP レポーター、テスト GPCR、キメラ G タンパク質に加えて、 $G\beta\gamma$ サブユニットを共発現させることで、GPCR リガンド未刺激時の cAMP レポーターシグナルが低減し、リガンド刺激によるシグナル-バックグラウンド比を大幅に改善することができた。今後は、今回構築した cAMP GloSensor アッセイのシグナル選別計測プラットフォームを用いて、迷走神経に発現する GPCR の解析に取り組む。

GPCR シグナルアッセイの高度化の一環として、GPCR エフェクターセンサーである BERKY コンストラクトと転写因子 rTA を膜アンカーさせたコンストラクトを組み合わせた転写レポーター BERKY 法の開発に取り組んだ。この手法は GPCR の改変が不要で GPCR シグナルを区別して計測可能である特徴を有する。膜アンカー rTA コンストラクト、BERKY-

TEV コンストラクトおよびテスト GPCR を HEK293 細胞に発現させ、GPCR リガンドを添加し、一定時間培養後に、ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、一部の G タンパク質シグナルは良好に検出することが可能であったが、他のアッセイ系と比較してシグナル-バックグラウンド比が低く、安定したアッセイ系として運用するには実験系の改善が必要であることが判明した。

【当初計画を超える成果】

東北メディカル・メガバンク機構の提供する日本人 54,000 人のゲノムデータ(54KJPN)から、GPCR 遺伝子の網羅的なバリエーション解析を実施した。アミノ酸置換によりタンパク質の性質を変えうる差異を2万種類以上アノテーションし、これらの位置をタンパク質の立体構造上の位置と照らし合わせ、アミノ酸置換の影響について予測した。GPCR の DRY モチーフにアミノ酸置換が集積する傾向を見出し、G タンパク質シグナル経路の減弱に対する選択圧の存在が示唆された。この研究は日本人の個別化医療に貢献することが期待される。

⑥ リゾリン脂質 GPCR リガンドの合成の実施(土井)

LPA₅ 受容体に関し、青木 G で考案されたリゾホスファチジン酸(LPA)構造類似体の合成を行った。これまで見出した高活性の骨格改変型作動薬を基にして側鎖を改変した誘導体の合成を試みた。側鎖の 9-cis のオレオイル基を 9-trans 型のエライドイル基、および飽和型のパルミトイル基に置き換えた。また側鎖の二重結合の代わりにベンゼン環を入れたオルト、メタ、パラ置換様式の類縁体、およびオレイルエーテル、パルミチルエーテル等に置き換えた化合物8個を合成した。その結果、LPA₅ に対するアゴニスト活性が EC₅₀ 1.2 nM と元化合物 LPA の 50 倍、かつ他の LPA 受容体とのサブタイプ選択性が 46 倍のリガンドを見出した。

⑦ GPCR を介した食・栄養シグナルによる包括的恒常性維持機構の解明(木村)

当該年度においては、中鎖脂肪酸受容体 GPR84 に関する研究において、GPR84 欠損(GPR84KO)マウスでは高脂肪食による肥満誘導に対し、野生型と比べて低体重、血糖値の急激な上昇、血中インスリン濃度の低下といった糖尿病様の症状が認められた。この表現型の発現には、脂肪組織が関与している可能性が示唆された(Nishida et al. FASEB Bioadv 2024)。

また、難消化性糖質であるフラクトオリゴ糖を妊娠中の母体が摂取することで、腸内細菌叢由来の短鎖脂肪酸の産生に加え、母体内のビフィズス菌群の変化を介して、生まれてくる仔に肥満抵抗性が付与されることが明らかとなった(Miyamoto et al. Mol Nutr Food Res 2024)。

さらに、同課題推進者である青木教授との協働により進めている PAQR 分子の機能解析

では、女性ホルモン・プロゲステロンをリガンドとする PAQR ファミリー分子のひとつ、PAQR9(別名 mPRe)に注目した。妊娠時に増加するプロゲステロンが、母体脂肪組織の mPRe を介してインスリン抵抗性を高め、胎児への栄養供給を優先的に促すことで仔の発達を調節することが示された。加えて、mPRe 欠損マウス(mPReKO)を用いて妊娠糖尿病モデルを作製した結果、インスリン抵抗性の誘導に対して顕著な抵抗性を示すことが確認された(Watanabe et al. Cell Reports 2025)。

⑧ 食由来代謝物・腸内細菌代謝物群からの生体恒常性制御物質同定(木村)

当該年度において、肥満症患者および健常者の糞便サンプルを用いた解析により、腸内細菌の一種である Ss 菌がスクロースを基質として産生する菌体外多糖(SsEPS)が、宿主の腸内細菌叢を介して短鎖脂肪酸の産生を促進し、代謝機能を改善する効果を発揮することが明らかとなった。これにより、宿主が炭水化物の中でも特にショ糖(スクロース)を摂取した際に、体内で Ss 菌が産生する SsEPS が肥満に対する抵抗性を高める役割を果たすことが示唆された。さらに、Ss 菌の存在自体が、肥満の早期バイオマーカーとして活用できる可能性も示された。(Shimizu et al. Nature Commun 2025)

⑨ 恒常性制御物質群の組み合わせによる効果の最適化検討(木村)

当該年度において、各種脂肪酸受容体の安定発現細胞株を用いた GPCR リガンドスクリーニングを実施し、本プロジェクトにより同定された腸内細菌由来の代謝脂肪酸、ポリフェノール代謝物、菌体外多糖(EPS)などの恒常性制御物質群に対して、それぞれ単一リガンドとしての受容体親和性を評価した。一次スクリーニングにより、同一濃度下での各種受容体親和性のデータセットを構築するとともに、複数の高親和性リガンド候補を抽出することに成功した。

課題推進者:青木淳賢(東京大学)、井上飛鳥(東北大学)、土井隆行(東北大学)、木村郁夫(京都大学)

(2) 研究開発項目2:糖尿病における多臓器変容メカニズムの解明と制御

研究開発課題1:多臓器での炎症・ストレス応答機序の解明と制御

当該年度実施内容:糖尿病の主要な併存病態である心血管代謝疾患について、その発症超早期からの病態間相互作用の基盤を解明することを目的に、免疫系と神経系による慢性炎症ならびにストレス応答機序を解析する。

前年度前の研究に引き続き、細胞間相互作用と多臓器連携の機序解析を進めた。マクロファージを中心とする心臓内の細胞間相互作用について、心臓マクロファージが発現するケモカインを軸に解析を進め、これらへの介入によ

り心臓恒常性やストレス応答が破綻することを見いだした。また、心不全が造血幹細胞のエピゲノムを変動させ(ストレスメモリー)、その結果、マクロファージを始めとする子孫免疫細胞の機能を変調させ、心不全を始めとする多臓器の機能障害をもたらすことを見出した。

一方、肥満および糖尿病の慢性炎症性疾患としての側面に着目し、脂肪組織 B リンパ球のサブセットを網羅的に同定するとともに、それらの肥満および糖尿病の病態における役割を明らかにする(脂肪組織 B リンパ球のキャラクターゼーション)。また、自律神経が脂肪組織 B リンパ球の機能に及ぼす影響とそのメカニズムを解明する(自律神経を介する脂肪組織 B リンパ球の機能制御機構の解明)。これらの知見に基づいて、糖尿病の発症予防と病態改善に資する脂肪組織 B リンパ球の制御法の開発を目指す。

令和5年度までの研究において、自己免疫性の炎症に関与することが知られる形質芽細胞が脂肪組織 B リンパ球の中に含まれることが明らかになるとともに、脂肪組織の形質芽細胞をフローサイトメトリーで検出するための細胞表面マーカー分子が同定された。令和6年度は、肥満および糖尿病の病態における形質芽細胞の役割を明らかにするため、脂肪組織の形質芽細胞をマウスにおいて薬理的に除去した場合に、病態にどのような影響が及ぼされるか検討した。また、シングルセル RNA シークエンスを用いて脂肪組織に投射する自律神経の特性を明らかにすることを試みた。

本課題は、2 人の課題推進者(眞鍋一郎、鈴木一博)が連携し役割分担しながら推進している。

① 心不全における心臓・免疫ネットワークの解明の実施(眞鍋)

心臓組織マクロファージに関して、これまでに同定した細胞間相互作用のメディエータについて、ノックアウトマウスならびに薬剤を用いた解析をさらに進めた。また高脂肪食負荷による心臓マクロファージ変化についてシングルセル RNA-seq 解析を進め、亜集団の変化が生じることを見いだした。これまでに見いだしている Amphiregulin 発現亜集団の割合が変化する。また、短期間の高脂肪食負荷の後に横行大動脈結紮を行うと、適応的応答が変調することを見いだしており、マクロファージ変化と心臓の応答との関連性が示唆された。

② 造血・免疫系による多臓器ストレス応答制御(眞鍋)

糖尿病併発症の特徴は、複数の疾患が並列して発症・進行すること、また疾患の間に密接な相互作用が想定されることである。前年までの研究で、多臓器の疾患を関連させる機序として造血-免疫系の変化が重要であることを見いだしたことから、造血-免疫系に着目した解析を行った。心臓圧負荷による心不全で、造血が誘導され、造血幹前駆細胞のエピゲノムが変動すること、このエピゲノムの変動(ストレスメモリー)が、マク

ロファージを始めとする子孫免疫細胞の機能を変調させ、組織恒常性やストレス応答を障害することを明らかにした。

心不全が造血幹細胞にエピジェネティックな記憶(自然免疫記憶)を刻む機構について、交感神経の機能障害に伴うシュワン細胞による TGF- β 活性化の低下が重要であることを見いだしてきた。

③ 造血幹細胞ストレスメモリー消去・阻害薬の開発(眞鍋)

心臓ストレス等が造血幹細胞にストレスに応じたエピゲノム変化(ストレスメモリー)を刻み、将来の心不全等の慢性疾患誘導の基盤となることを見いだした。この知見に基づく臨床展開を目指し、ストレスの記憶を阻害あるいは消去する薬剤開発を行い、未病から病態への進行を抑制する治療法開発を進める。また、薬物スクリーニングにおいて、ストレスメモリーへの作用の指標となるマーカーの同定を目指し、造血幹前駆細胞、末梢や組織の免疫細胞についてのエピゲノム解析を進め、ストレスメモリーマーカーの同定に成功した。

④ 脂肪組織 B リンパ球のキャラクタリゼーション(鈴木)

形質芽細胞および形質細胞の肥満・糖尿病の病態における役割を明らかにするに当たって、肥満マウスにおいてこれらの細胞を薬理的に除去することを試みた。形質芽細胞と形質細胞は、抗体すなわちタンパクを大量に産生する細胞であり、プロテアソームを阻害してタンパク分解を抑制することで、容易に小胞体ストレスが誘導され、アポトーシスを起こす。したがって、プロテアソーム阻害剤により形質芽細胞と形質細胞を体内から選択的に除去することが可能である。そこで、肥満マウスにプロテアソーム阻害剤を投与することにより、脂肪組織の形質芽細胞の数、肥満および糖尿病の病態にどのような影響が及ぼされるか検討した。その結果、脂肪組織の形質芽細胞と形質細胞が減少するのに伴って、体重の減少が認められた。このことは、形質芽細胞および形質細胞が肥満・糖尿病の病態に関与することを示唆している。

令和5年度から令和6年度にかけて、肥満マウスの脂肪組織および各種リンパ組織から単離した形質芽細胞および形質細胞について、B 細胞受容体(B cell receptor, BCR)の遺伝子配列の同一性を解析することにより、脂肪組織の形質芽細胞と形質細胞がどのリンパ組織に由来するのかを明らかにすることを試みた。しかし、BCR 遺伝子配列の多様性の高さから、その同一性に基づいて B 系列細胞のクローンを追跡するには、特定の抗原を認識するクローンに的を絞って解析を進める必要があることが判明した。

⑤ 自律神経を介する脂肪組織 B リンパ球の機能制御機構の解明(鈴木)

ノルアドレナリン作動性神経は、脂肪組織に投射する主要な自律神経である。我々の研究

から、ノルアドレナリン作動性神経からの入力、 $\beta 2$ アドレナリン受容体を介してリンパ球の動態を制御することが示されているため (Nakai et al. J. Exp. Med. 2014; Suzuki et al. J. Exp. Med. 2016)、脂肪組織に投射するノルアドレナリン作動性神経に注目して解析を進めている。最近、脂肪組織に投射するノルアドレナリン作動性神経の脳から脂肪組織に至るまでの経路が解明された (Cardoso et al., Nature 2021)。そこで、この知見に基づいて、脂肪組織に投射するノルアドレナリン作動性神経のシングルセル RNA シークエンスを試みたが、解析に耐えるだけの数の細胞を単離することが困難であったため、実施に至らなかった。

マウスにおいて、リンパ組織あるいは脂肪組織に投射するノルアドレナリン作動性神経の活動を、光遺伝学(オプトジェネティクス)を用いて選択的に操作することは技術的に困難であるため、ノルアドレナリン作動性神経の活動を化学遺伝学的に増強あるいは抑制し得るマウスの作製に着手し、令和6年度までに完了した。

課題推進者: 眞鍋一郎(千葉大学)、鈴木一博(大阪大学)

研究開発課題2: 糖尿病における脳血管の変容解明と制御

当該年度実施内容: 糖尿病を背景とした脳血管の変容メカニズムの解明と制御を解析するため、当該年度においては、血管狭窄/閉塞時の側副血行路発達のメカニズムの解明に関する要素研究を行った。中大脳動脈閉塞モデル、*in vitro* の虚血モデルである oxygen glucose deprivation (OGD)、また、高血糖モデルを用いて、虚血や高血糖に対する脳実質のシグナリングを調査した。特に tRNA 修飾や修飾関連遺伝子が与える影響に着目して、その詳細を検証した。

また、糖尿病を背景とした脳血管の変容メカニズムの解明と制御を解析するためのモデルとして、脳虚血時の側副血行路の発達機能に着目し、糖尿病が脳血管に及ぼすメカニズムの解明と制御法の開発を進めている。当該年度においては、これまでに確立した脳虚血後の側副血行路誘導モデルに関して糖尿病モデルマウスを用いて検討したところ、脳虚血後初期の回復が著名に遅延することがわかった。一方、治療介入の手段として脳内ミクログリアに由来する Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) による修復経路に注目して検討したところ、脳虚血後の血管新生促進を介した著名な修復作用が認められた。これらの知見は糖尿病を背景とした脳虚血時にはミクログリアの機能障害が関与する可能性を示唆した。そこでミクログリアのフェノタイプを *in vivo* で同定分類するための画像解析手法の開発にも取り組んだ。本研究成果として、ミクログリア間の細胞間距離が脳内の局所状態を反映する可能性を見出した。今後、糖尿病を含む様々な病態時のミクログリアの分布と挙

動に注目する。さらに、脳血管の静脈性の機能障害に起因し脳血流の低下が惹起されることが無呼吸症候群のモデルマウスを用いて明らかとなった。これらの知見について現在、論文投稿の準備を進めている。

本課題は、2 人の課題推進者(新妻邦泰、正本和人)が連携し役割分担しながら推進している。

① 血管狭窄/閉塞時の側副血行路発達のメカニズムの解明(新妻、正本)

新妻 G は、*in vitro* の虚血モデルである OGD、およびマウス中大脳動脈閉塞モデル(脳梗塞モデル)において、特定の tRNA 修飾を OGD や脳梗塞に対して投与したところ *in vitro* での神経細胞死抑制や、脳梗塞モデルでの梗塞巣縮小が確認された。脳梗塞予防のための食事療法や、脳梗塞急性期の補充療法などへの応用が期待できると考えられ、さらに詳細を検証する予定である。本研究成果は③の内容も含んでいる。

正本 G は、これまでに脳血管のネットワーク再編において血管周囲の免疫細胞であるミクログリアの関与を明らかにしている。そこで本研究ではミクログリア由来の Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) の関与に注目し、局所脳虚血モデルにおける IGF-1 投与による脳血管修復作用について検討した。その結果、IGF-1 投与群では対照群に比べて虚血後初期の回復が促進される傾向にあることを確認した。さらに、治療介入の一つとして修復効果のある細胞を血中に投与したところ、脳虚血による回復に関して最終的な障害部位の縮小が認められた。

② 糖尿病(高血糖)状態が側副血行路発達に及ぼす影響の解明(新妻、正本)

新妻 G は、マウス糖尿病モデル脳に対する tRNA 修飾の解析を行った。16 週齢の雄性マウスに high fat diet (HF) または normal diet (ND) を負荷し、耐糖能異常、インスリン抵抗性などを確認し、経時的な脳サンプルを得て tRNA 修飾を解析し、HF 群で糖代謝の異常が生じていることが分かった。

tRNA 修飾を時系列で解析したところ、16 週時点で最も顕著な tRNA の低修飾化が観察された。クラスター形成の主要因子解析から、修飾が高血糖性脳病態において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

そこで、HT-22 マウス海馬ニューロンにおいて shRNA を用いたノックダウン (KD) 実験を実施した。KD すると、ミトコンドリア機能関連経路がアップレギュレーションされ、一方で細胞増殖、糖代謝、mRNA 代謝、炎症に関連する経路がダウンレギュレーションされた。これらの変化が糖尿病性神経病態にもたらす影響については、今後検討を進める。

正本 G は、糖尿病モデルマウスに対して、局所脳虚血を作成し脳虚血後の脳血管の修復機能について正常モデルマウスと比較した。その結果、糖尿病モデ

ルマウスでは脳虚血後5日目までの回復が正常群と比べて顕著に遅延することがわかった。今後はこれらの修復にかかる反応時間の違いについて脳血管の修復を司るミクログリアの機能に注目した解析を進める。本研究では修復過程の時間動態に注目するため、*in vivo*でのミクログリアのフェノタイプを解析する必要がある。そこで二光子顕微鏡下で撮像したミクログリアの形態や動態に関する画像データを大規模に解析したところ、細近傍にいるミクログリア間の距離に特徴があることがわかった。

③ 糖尿病状態における脳卒中治療法および予防法の開発(新妻、正本)

正本 G は、生活習慣病の一つである睡眠時無呼吸症候群モデルについて脳血管内皮機能の障害を評価し、治療回復のメカニズムとして酸化ストレスによるエンドセリン-1の関与を明らかにした。間欠性低酸素症(IH)は、低酸素と再酸素に周期的に曝される状態である。長時間の IH への曝露は睡眠時無呼吸症候群(SAS)の主要な特徴であり、脳低灌流を引き起こし、最終的には認知機能の低下を引き起こすことが知られている。IH から認知機能低下へのカスケードには、IH による血管内皮細胞への障害が関与している可能性がある。そこで、実験動物を用いて IH が脳微小循環に及ぼす影響を検討した。先行研究を参考に飼育ケージ内の酸素濃度を 21%から 7%に周期的に日中 6 時間、2 週間繰り返すことで睡眠時無呼吸症候群モデルを作製した。IH 処理前後、皮質表面および実質組織内の血管構造を画像化し、血管の直径を測定し、実質の細動脈または細静脈のそれぞれの枝を通る毛細血管の数を数えた。また、静脈内に注入した蛍光色素の通過時間より、局所の脳血行動態を評価した。さらに、対側のひげに機械的刺激を与え、体性感覚皮質の脳血流の誘発反応(すなわち、神経血管結合)を測定した。その結果、IH に慢性的にさらされると、脳表面の静脈は持続的に収縮したが、動脈は収縮しなかった。脳実質では、毛細血管数の変化は観察されなかったが、毛細血管の静脈側で血管径の有意な減少が観察された(IH 前後でそれぞれ $6.9\mu\text{m}$ と $5.5\mu\text{m}$)。動静脈通過時間で測定した局所血液灌流は、IH 曝露後に有意に減少した。さらに、神経血管結合によって測定される血管機能は、IH 曝露によって一貫して低下した。さらにこれらの血管収縮、拡張機能の低下はエンドセリン1受容体の阻害薬によってレスキューされることを確認した。本成果は、薬理効果による追加実験を行ったうえで論文投稿する。次年度は糖尿病モデルマウスにおいて同様の検討を進めることで糖尿病態(高血糖)が脳血管内皮細胞機能に与える影響について評価する。

課題推進者:新妻邦泰(東北大学)、正本和人(電気通信大学)

研究開発課題3:糖尿病における肝の変容解明とその制御

当該年度実施内容:肝細胞でのインスリン作用や糖取り込み、さらにその協調で行われるグリコーゲン合成を効率よく進め、食事由来のブドウ糖の末梢血流入を減らすことが糖尿病の予防・治療に重要であり、そのメカニズムの障害が糖尿病発症の第一段階とも考えられる。当該年度は、肝での糖取り込み制御に関わるメカニズムの解明を進め、その制御法開発に前倒しで着手した。

本課題は、課題推進者、片桐秀樹が推進している。

① 糖尿病の病態の進展に伴う肝の変容解析

食事由来の栄養素やインスリンなどの膵臓からのホルモンは、直接門脈血中に放出され、肝内に流れ込む。肝細胞へのインスリン作用やブドウ糖の取り込みが開始し、その多くがグリコーゲンとして肝細胞内に蓄積する。この食事やホルモンが肝臓を最初に通過するステップで、インスリンが肝で作用し、大量のブドウ糖が末梢血に流れ出る前に肝臓で処理(グリコーゲンへと合成)される。そこで、独自の仮説を立て、本課題を推進している。

前年度までに、**ex vivo** での評価法の確立を進めた。

当該年度は、**ex vivo** における遺伝子発現解析や阻害剤、遺伝子導入などの手法を駆使して、分子機構の解明を進めた。

② 肝内制御による糖尿病予防・治療法に向けた非臨床 **POC** の検討

本項目は、加速判定による追加予算を活用し、令和 6 年度から前倒しで開始した。上記①での分子メカニズムの解明についての成果に基づき、**in vivo** で制御すべく、リポソームによる **in vivo** 遺伝子導入系のシステムを導入した。さらに前倒しで、高脂肪食負荷による肥満動物における効果を検討している。

課題推進者:片桐秀樹(東北大学)

研究開発課題4:ケトン体を用いた糖尿病併発症への予防・治療法の開発

当該年度実施内容:本課題は、ケトン体を活用した安全かつ有効な糖尿病合併症の予防・治療法の開発を目指し、「病態モデル」を用いて各臓器におけるケトン体代謝の意義を解明することを目的としている。令和 6 年度には、主に以下の成果を得た。

- 1) 腎臓局所のケトン体産生は近位尿細管細胞により制御されており、絶食時の水再吸収の維持および腎皮質―髄質間のエネルギー代謝連関の維持に不可

欠であること、さらに、この機能の破綻がサルコペニアを引き起こすことを示した。

- 2) マウス腎疾患モデルにおいて、ケトン体エステル(1,3-ブタンジオール)の投与が腎保護効果を有することを確認し、その作用機序として、近位尿細管細胞における SCOT (succinyl-CoA:3-ketoacid CoA transferase) を介したケトン体由来のエネルギー産生が重要であることを明らかにした。
- 3) ケトン体がマウス寒冷刺激時の熱産生、および、酸素代謝において新たな役割を担う可能性があることも示唆された。

本課題は、課題推進者、久米真司が推進している。

① 動物実験を用いた、ケトン体代謝の組織修復における役割の全容解明、糖尿病併存疾患の病態に果たす役割の解明

実験1) 腎臓局所におけるケトン体産生の生理学的意義の解明

全身、腎近位尿細管細胞特異的、および肝臓特異的 HMGCS2 欠損マウスを用いて、肝臓および腎臓におけるケトン体産生の生理的意義を検討した。その結果、以下のことを明らかにした。1) 肝臓でのケトン体産生は、絶食時の血中ケトン体濃度の維持に不可欠である。2) 腎臓におけるケトン体産生は、絶食時の腎局所におけるケトン体濃度の維持に重要である。3) 腎臓局所のケトン体産生は、絶食時のナトリウムおよび水の再吸収調節に寄与しており、その機能障害は絶食時の多尿を引き起こす。4) 腎局所のケトン体産生は近位尿細管細胞によって担われており、産生されたケトン体は腎髄質における ATP 供給源として機能しており、この腎皮質―髄質間の代謝連関が破綻すると、代償的に腎皮質での糖新生が亢進し、それに伴って筋分解が促進され、腎臓へのアミノ酸供給が増加する。その結果、全身性のサルコペニアが惹起される。以上より、腎臓局所のケトン体産生が、絶食時の水代謝恒常性維持と腎臓局所エネルギー恒常性維持に寄与するとともに、健康寿命延長に重要であることが示唆された。

実験2) 腎局所におけるケトン体代謝の(糖尿病性)腎臓病進展における役割の解明

全身、腎近位尿細管特異的、肝臓特異的な HMGCS2 欠損マウスおよび、腎近位尿細管細胞特異的 SCOT 欠損マウスに対して腎疾患モデルを誘導し、腎疾患の発症における腎局所でのケトン体産生および利用の役割を検討した。その結果、以下の知見を得た。1) いずれの遺伝子改変マウスにおいても、腎障害の有意な悪化は認められず、内因性ケトン体産生が腎保護に与える影響は限定的である可能性が示唆された。2) ケトン体エステル(1,3-ブタンジオール)の全身投与により腎障害の有意な改善が認められたが、この改善効果は腎近位尿細管細胞特異的 SCOT 欠損マウスでは減弱した。以上より、外因性ケトン体の投与に

よる腎保護効果が確認されるとともに、その作用機序において、腎局所でのケトン体をエネルギー源とする代謝活用が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

実験3) ケトン体-mTORC1 シグナル連関が糖尿病・糖尿病合併症・老化の病態に果たす役割の解明

mTORC1 を抑制する TSC1 の組織特異的欠損マウスを作製し、各組織における mTORC1 活性の過剰亢進モデルを構築した上で、ケトン体エステル (1,3-ブタンジオール) を投与し、ケトン体による mTORC1 抑制効果の組織特異性を検討した。その結果、以下の知見を得た。1) 腎近位尿細管細胞、腎足突起細胞、肝細胞、膵β細胞、骨格筋における mTORC1 過剰亢進マウスを用いて検討した結果、ケトン体による mTORC1 抑制効果は、腎近位尿細管細胞および肝細胞においてのみ認められた。2) 腎近位尿細管細胞特異的 mTORC1 過剰亢進マウスにおいて、ケトン体エステル投与群および非投与群の腎組織に対して scRNA-seq 解析を実施し、ケトン体による mTORC1 関連細胞障害の抑制機構が存在することを確認した。以上の結果より、ケトン体による mTORC1 抑制作用には明確な臓器特異性が存在し、特に腎障害に対する新たな治療標的となる可能性が示唆された。

実験4) 小腸上皮細胞におけるケトン体産生の意義の解明

小腸特異的 HMGCS2 欠損マウスを作製し、表現型解析を進めた。その結果、以下の知見を得た。

- 1) 現時点では、有意な代謝制御機能に関する異常は確認されなかった。
- 2) 腸炎モデルを誘導したところ、小腸特異的 HMGCS2 欠損マウスにおいて病態の有意な悪化が認められた。以上より、小腸におけるケトン体産生は、腸上皮の障害からの防御に寄与する保護的役割を有する可能性が示唆された。

実験5) 膵β細胞におけるケトン体利用の意義の解明

膵β細胞特異的 SCOT 欠損マウスにおいて、絶食下および糖尿病モデル下におけるインスリン分泌能の評価を行った。しかしながら、いずれの条件においても有意な変化は認められなかった。

実験6) 心不全における心臓局所のケトン体代謝の意義の解明

心臓特異的 SCOT 欠損マウス、肝臓特異的 HMGCS2 欠損マウス、ならびに全身 HMGCS2 欠損マウスに対して心不全モデルを誘導し、ケトン体の心保護効果における全身的なケトン体代謝および肝臓由来の血中ケトン体の意義を検討した。しかし現時点では、内因性のケトン体代謝が心不全の進行抑制に寄与することを示す有意な結果は得られなかつ

た。

その他、ケトン体代謝と熱産生・酸素代謝制御との関わりを示唆する新たな知見が得られた。

② 動物実験・ヒト臨床コホートを用いた、ケトン体代謝に着目した疾患予測指標の探索・同定・有用性の評価

実験1)において、腎臓、尿、血漿のメタボローム解析を用い、腎臓局所のエネルギー代謝変容がもたらすサルコペニア発症に寄与する分子の同定を開始した。まだ同定には至っておらず、ヒト臨床コホートを用いた検討には進めていない。

課題推進者:久米真司(滋賀医科大学)

研究開発課題5:糖尿病の臓器変容の解明のための多臓器全細胞アトラスの作製と応用

当該年度実施内容:これまでに作製したマウス多臓器全細胞アトラスとそこで確立した各種臓器の透明化、免疫染色技術を用いて、糖尿病モデルおよびそれに類するモデルマウスの多臓器全細胞解析を実施した。これまでに、STZ 投与した糖尿病モデルマウスでの全脳での神経活動の網羅的解析などを実施し、特徴的に活動の変化している領域を見つけているが、本年度は高脂肪飼料を常時与えたマウスおよび高脂肪飼料から途中でコントロール飼料に切り替えたマウスに見られる睡眠パターンの特徴的な変化から糖尿病が与える睡眠への影響の解析を行った。また、異なる給餌条件下で透明サンプルを取得し、全細胞アトラスを用いて、特に中枢神経系において活動が変化する領域の解析を実施し、変化のある領域を見つけた。また、多臓器の透明化プロトコルの確立および多臓器アトラスの疾患臓器への応用、追加のアトラス作製を実施した。

本課題は、2 人の課題推進者(松本桂彦、山田陸裕)が連携し役割分担しながら推進している。

① マウス多臓器全細胞アトラスを用いた疾患による臓器変容の解明の実施(松本)

本年度はマウス多臓器全細胞アトラスを用いた疾患による臓器変容の解明に向けてマウス多臓器の透明化プロトコルの確立およびハイスループット化を行った。さらに色素の強い眼球においても透明化条件を確立した。これらの詳細なプロトコルを **Nature Protocols** 誌に掲載した(**Nature Protocols, Akiyama et.al., 2024**)。また、マウス肺の疾患解析への応用として、がん細胞の肺転移および薬剤による転移阻害の効果の解析へ応用した。その結果、肺に転移したがん細胞を詳細に可視化、

定量化することに成功した。

また、これまでに雄マウスの多臓器アトラスを作成してきたが、雌マウスの主要臓器および子宮のアトラスの作製を行った。透明化条件や撮影条件はこれまでの雄マウスの条件と同様で実施し、全細胞解析によって点群化を行いアトラスとした。

高脂肪食を投与したマウスの行動解析(担当:山田)と透明化、全脳の神経活動の染色(c-Fos)およびデータ解析を実施した。高脂肪食によって睡眠量の増加および新規環境への応答性の低下などがみられ、それらの脳の神経活動の解析を実施した。さらに、TACモデル(心不全モデルマウス)、高血圧・脳卒中モデル、2型糖尿病モデルマウスの透明化を開始した。

② 糖尿病由来の睡眠覚醒リズム異常の特徴を解析(山田)

昨年度から Streptozotocin(STZ)を用いた1型糖尿病の誘導、および高脂肪飼料を用いた2型糖尿病の誘導を行いながら呼吸波計測による睡眠表現型を計測し、糖尿病状態もしくはその前段階である未病状態において睡眠覚醒リズムに特徴的な睡眠表現型がみられるかどうかを検討していた。これまでに、高脂肪飼料を与えた場合、血糖値は正常範囲ながらも睡眠表現型に変化がみられる条件を確認した。本年度は、見出された給餌条件の中で透明サンプルを取得し、特に中枢神経系において神経活動の全細胞解析を行うことで、睡眠覚醒リズム変容と活動が相関する脳領域を探索した。その結果、高脂肪食を与え続けたマウスにおいて、対照群と比較して優位に神経活動が変化していると見られる脳領域が複数検出され、それらの中には内臓周囲での脂肪蓄積に関わる脳領域や、概日時計や睡眠制御に関わる脳領域、さらには依存性に関わる脳領域などが含まれていた。また、高脂肪食を期間途中で通常食に切り替えたマウスでは検出数が比較的になくなりつつも、依存性に関わるとされる脳領域に有意差がみられることを見出した。

また、マウスの睡眠時の脳波計測データから睡眠ステージ(覚醒、NREM 睡眠、REM 睡眠)を正確に自動判定できるソフトウェアを開発した。

課題推進者:松本桂彦(理化学研究所)、山田陸裕(理化学研究所)

(3) 研究開発項目3:ヒトでの生体情報を簡便に取得する技術の開発とヒトデータ解析

研究開発課題1:接触・非接触生体情報取得デバイスの開発と社会実装

当該年度実施内容:非侵襲的な接触デバイス、カメラや振動波測定による非接触デバイスを用い、糖尿病および糖尿病併発疾患(特に心不全)の発症予測に向け、本年度は、①糖尿病や併発疾患に向けた非侵襲生体情報取得デバイスの少なくとも1つのプロトタイプを作出した。また、②糖尿

病や併発疾患に向け開発した非侵襲生体情報取得デバイスによるヒトからのデータ取得を開始した。

本課題は、課題推進者、藤生克仁が推進している。

本研究は、非侵襲デバイスによる疾患予測と社会実装を最終目標とする。非能動的・負担のない生体情報の取得を可能にする機器(カメラや接触型デバイス)を開発し、深層学習や数理モデルにより解析を行う。動物モデル・ヒト試験を通じて未病状態の“ディープフェノタイプ”を把握し、デバイス性能を評価・改善する。

① 非侵襲デバイスの技術開発

在宅心電図デバイスによる心不全検出アルゴリズムを開発(プロトタイプ 1)。

② ヒト病態での評価

本来令和7年度開始予定のヒトデータ取得を令和4年度から前倒しで実施した。

③ 社会実装に向けた改良

ハイスpek機器で構築したアルゴリズムを、安価なデバイスでも再現可能か検証。

課題推進者:藤生克仁(東京大学)

研究開発課題2:ゲノム解析による臓器間ネットワークの新規モデル生成と糖尿病超早期リスク予測

当該年度実施内容:本年度は、「同定された環境因子およびそれらの相互作用を統合ネットワークにマッピングし、遺伝子パスウェイの摂動に関する知見を深めること」および「遺伝子パスウェイのエンリッチメントを考慮した糖尿病の臨床的サブタイプ予測モデルの開発」の 2 点を主な目標として研究を進めた。前者については、遺伝子ネットワーク内でのコミュニティ形成に関与している可能性のある 12 種類の疾患関連パスウェイ (Smith, K. et al., Nat Med, 2024) および糖尿病の臨床病態を反映したサブタイプ (Ahlgqvist E. et al., Lancet Diabetes Endocrinol, 2018) に注目し、各サブタイプにおける遺伝子パスウェイの摂動の大きさを統計的に明らかにした。後者については、遺伝子パスウェイの摂動情報に基づいて糖尿病リスクを予測する新たな方法論として、糖尿病サブタイプ特異的なポリジェニックリスクモデル「**Palette PRS**」を開発した。本手法は、従来の大規模 **GWAS** 要約統計量に基づく 2 型糖尿病 (T2D) ポリジェニックリスクモデルと比べて高い予測精度を示しており、超早期糖尿病発症リスク予測のための極めて有望なアプローチである。

本課題は、課題推進者、田宮元が推進している。

① 関連遺伝子セットに関する発現組織・臓器の遺伝子ネットワーク構築

東北メディカル・メガバンク計画 (TMM)、国立病院機構 (G-FORCE)、福島県立医科大学 DEM コホート、UK バイオバンクといった国内外の複数のコホートデータを対象に解析を実施した。はじめに、2 型糖尿病の 4 つの臨床サブタイプ (SIDD、SIRD、MOD、MARD) に対し、遺伝子ネットワークにおけるコミュニティ形成に関与するとされる 12 種類の遺伝子パスウェイの寄与を、東アジア集団およびヨーロッパ集団それぞれにおいて統計的に評価した。

次に、これらのパスウェイ情報を活用し、サブタイプ特異的なポリジェニックリスクスコアである「パレット PRS (Palette PRS)」を開発した。本手法は、従来の GWAS 要約統計量をもとに構築される一般的な 2 型糖尿病用 PRS モデルと比較して高精度なリスク予測を実現しており、超早期段階での糖尿病発症リスク予測を実現する極めて有用なアプローチであることが示された。なお、当該予測モデルの開発にあたり、2 型糖尿病患者を臨床サブタイプに分類するための機械学習手法も先行して開発しており、既に論文化に至っている (Tanabe, H., Sato, M., Miyake, A. et al. *Diabetologia*, 2024)。また TMM 検体 500 例の凍結血清サンプルから血液・尿検査のうち必要な項目 (C ペプチド) の測定を実施し、インスリン分泌能およびインスリン抵抗性を示す指標である HOMA2- β および HOMA2-IR を算出した。これらの生化学的指標は、疾患パスウェイのより精緻な推定およびパレット PRS の予測精度向上のために活用している。

② タンパク質相互作用や代謝ネットワーク、症状遺伝子情報との統合解析

タンパク質間相互作用情報や代謝経路情報に加え、Genomics England や IRUD-P 計画に由来する症状・遺伝子ネットワーク情報を収集・整備し、それらを糖尿病関連の分子データと統合するための基盤構築を進めている段階にある。これにあたり、データ形式の違いやアノテーションの整合性など、統合解析に向けた技術的課題を洗い出しつつ、標準化と前処理のプロセスの整備を進めている。

本統合の取り組みでは、①で取り上げた 12 種類の疾患関連パスウェイを起点として、タンパク質間相互作用や代謝ネットワークとの対応関係について探索的な検討を行っている。これにより、各パスウェイが特定の臓器 (膵臓、肝臓、脂肪組織など) におけるネットワーク上の機能的ノードとしてどのように配置されているか、その構造的特性の可視化を試みている段階である。

また、①で開発を進めてきたパレット PRS と連携させる形で、疾患関連遺伝子のネットワーク内中心性指標やモジュール構造についての初期的な評価も行う

ている。

課題推進者: 田宮元(東北大学)

研究開発課題3: 糖尿病超早期段階の予測法の開発と予後予測

当該年度実施内容: 糖尿病の超早期段階を予測するには、糖負荷試験データとその後の長期にわたる追跡データを保有する住民コホートが必要である。さらに、個体レベルでの糖酸化や肝での糖処理を推定できる新たな簡便検査法の開発も重要と考える。前年度までに、30 年の検査データの蓄積がある大迫コホートから、糖負荷試験 1 時間血糖値と生命予後、さらには、心血管死や悪性新生物死が高い **hazard ratio** にて、関連する興味深い結果を得た。そこで、当該年度においては、正常耐糖能者における糖負荷試験 1 時間血糖値高値と関連する死因の検討を進め、 $^{13}\text{CO}_2$ 呼気試験で推定される肝臓での糖処理能との関連を検討した。

本課題は、2 人の課題推進者(片桐秀樹、澤田正二郎)が連携し役割分担しながら推進している。

① 大迫コホートデータ解析による糖負荷試験と予後との関連検討(片桐)

大迫コホートでは、長年にわたる住民データが蓄積されており、糖負荷試験の結果も経時的に追跡できる。前年度までに、糖負荷試験負荷後 1 時間血糖値が余命の間に関連があること、さらにその死因として、心血管死および悪性新生物死が有意に関連していることを示す結果を得た。そこで、当該年度においては、負荷後 1 時間血糖値が余命との関連を示すメカニズムについて、項目2課題3や本課題③と連動させ、種々の因子を補正しつつ総合的に解析を進めたところ、大迫コホートで採取されているすべてのデータの中でも、糖負荷後 1 時間血糖値が最も余命との関連が深いことが明らかとなった。インスリン抵抗性やインスリン分泌、さらには、空腹時血糖値では、はっきりした相関が認められず、これらとは異なる負荷後血糖値の上昇機序を想定する必要がある、さらに、その機序こそが寿命に関わると考えられた。

② 大迫コホートデータ解析による将来の糖尿病発症者の予測(片桐)

正常耐糖能を示した中で、どのような集団が将来糖尿病へと進展するのかを検討し、前年度までに、糖負荷試験や **HbA1c** などの糖尿病に関連する時系列データから、糖尿病発症リスクをもつ正常耐糖能集団を抽出した。そこで、当該年度は、これらの結果をもとに、正常耐糖能を示した者の中で、その後、糖尿病に進展したコホート参加者を、その後も正常耐糖能を示した参加者と比較検討した。パイロットスタディながら、複数の

タンパクが正常耐糖能の段階から上昇していることが見出された。

③ $^{13}\text{CO}_2$ 呼気試験を用いた糖酸化・肝糖処理能の簡便検査の開発(片桐、澤田)

これまで、非侵襲的・簡便に個体レベルでの糖酸化や肝糖処理能をヒトで検討する検査法は開発されていなかった。そこで、本課題では、 ^{13}C グルコースを摂取後の呼気中に排出される $^{13}\text{CO}_2$ を測定することにより、個体レベルでの糖酸化能をヒトにおいて経時的に検討することに成功した。前年度までに、15g の ^{13}C -グルコース負荷を行った参加者において、 $^{13}\text{CO}_2$ 排出と負荷後血糖上昇や肝臓でのインスリン作用との相関を見出した。さらに、75g の ^{13}C -グルコース負荷でのデータを蓄積することで、大迫コホートで得られた寿命との関連データと結びつけることを計画し、倫理申請を進め、改訂版を提出し承認を待つばかりの状況となっている。これにより、大迫コホートなどの大規模なデータとの照合に向けた検討を進めることができると期待している。さらに、肝でのグリコーゲン変換に障害を持つモデルマウスを作製し、 ^{13}C -グルコース負荷を行ったところ、実際に肝でのグリコーゲン変換障害により糖負荷後の呼気 $^{13}\text{CO}_2$ が増加する結果を得、ヒトでの呼気試験が実際に肝での糖処理能を反映していることを動物実験に還元して明らかにした。

課題推進者: 片桐秀樹(東北大学)、澤田正二郎(東北医科薬科大学)

(4) 研究開発項目4: 数理モデル解析による恒常性の理解とその応用

研究開発課題1: 数理モデル解析による恒常性の理解とその応用

当該年度実施内容: 臓器間ネットワークのうち、9 臓器代謝系ネットワークモデルと循環系ネットワークモデルの統合と、測定データと数理モデルを適切に同化させる解析システムの構築を進めてきた。また、他の研究開発項目において展開される動物実験やヒト生体情報に基づくデータを用いて数理モデル中に含まれるパラメータを適切に推定するためのデータ推定の手順を構築した。9臓器モデルについては、血糖値ダイナミクスの詳細な検討を医学・生物学の研究者と行い、糖尿病発症の予兆となるパラメータとそれによる指標候補を選定する議論を継続した。また、構築した循環系数理モデルを、医学系の課題推進者が取り扱っている糖尿病併発疾患の解析に適用し、複数の症例やシナリオに対する再現とメカニズム理解に取り組んだ。今年度は数理モデルをさらに精密にするため、いくつかの部分モデル、特に心臓モデルについて複数の状況を再現する検討を行い、詳細な解析を進めた。状態遷移数理モデルの構築に関しては、9臓器モデルと循環系ネットワークモデルを密に結合し、時間遅延9臓器間ネットワークモデルとして縮約を実現した。神経系モデルについてはそのコンポーネントとなるシ

ナプスモデルを構築したが、それをネットワーク化することは次年度の課題である。SAP データの解析とパラメータ推定については、確率的な振る舞いを考慮する数理モデルの構築を進め、それを用いた解析を実施した。

また、研究開発項目 4 内の他の課題推進者、医学・生物学の研究者と共同して、腸内細菌叢の数理モデルの基盤として共生系と競争系の混合モデルを提案した。

さらに、臓器間ネットワークのうち、主に脳神経、肝臓、すい臓に関わる血糖値やインスリン濃度の数理モデルを構築した。

本課題は、3 人の課題推進者(水藤寛、長山雅晴、千葉逸人)が連携し役割分担しながら推進している。

① 臓器間ネットワーク数理モデルの構築と解析の実施(水藤、長山、千葉)

1) 1次元及び0次元モデルの評価(水藤)

令和5年度までに構築してきた1次元モデルと0次元モデルの組み合わせによる循環系ネットワークモデルを精緻化し、糖尿病併発疾患解析への適用検討を進めた。特に、ループの存在等によって血流の方向が一意に定まらない脳動脈系やその他の部分での血流を求めるため、可能性のあるパスをすべて数え上げ、圧力分布を適切に定めて血流の方向を求めるアルゴリズムを構築した。また、前年度までに進めた並列計算の効率化をさらに追求し、特に計算時間を要する部分については高速化に適した C++言語に書き換えるなどによって計算時間の大幅短縮を実現した。

2) 循環系臓器ネットワークモデルに現れる生理的パラメータについての検討(水藤)

循環系ネットワークモデルを構成するコンポーネントのうち、特に心臓数理モデルに注力し、運動状態による拍出量の変化や心不全の進行に伴う弛緩能の低下の循環動態への影響を再現する検討を進めた。心不全進行の各ステージにおける心室圧-容積曲線の変化を表現し、その挙動と全身の循環系ネットワークのレスポンスを解析するための結合作業を開始した。

3) 血糖値-インスリンモデルの検討(水藤)

令和5年度後半に構築を開始したグルコース-インスリン動態モデルのSAPデータへの適用に関しては、数理モデリング手法を確率的な振る舞いを含む定式化に置き換え、確率分布を推定しながらパラメータ同定を行う手法の構築を進めた。5分おきに取得されている数年分の時系列データという規模を生かして、生体の反応を表現するパラメータ群の値とその時間変動幅などを幅広く捉えることを目指しており、過去のデータを用

いて生体パラメータを推定しながら将来予測をアップデートし続けることで、実際の使用における適切なアラームの発出などが期待できると考えている。令和6年度はこの手法の枠組みに大きな進展があり、知的財産の申請に進むこととなった。

4) モデル統合ソフトウェアの構築(水藤)

複数のモデルを統合してユーザーインターフェースを充実させることの第一歩として、循環系臓器間のユーザーインターフェースを作成し、モデル開発者でなくとも使いやすいようなシステムの構築を進めた。令和6年度までの開発コンポーネントは、全身循環モデル、心肺循環モデル、脳動脈系モデルの解析・表示システムである。今後は循環モデル及び代謝モデル等に加えてSAP解析モデル等のシミュレーションシステムを統合し、ユーザーインターフェースを含めて充実させることで、併発疾患の解析にも役立つようなシステムとして構築し、研究チーム内で解析・議論の効率向上に加えて、成果として外部に発信するためにも役立つものになることを目指す。

5) 9コンパートメントモデルの応用(長山)

今年度は、9 臓器間ネットワークの糖代謝の数理モデルを用いて、食種別マウス経口糖負荷試験の時系列データに対するデータ解析を行った。その結果、実験週数4〜7において高脂肪食摂取マウスと通常食摂取マウスにクラスタリングされることがわかり、骨格筋インスリン感受性が早期段階の指標候補となった(口頭発表 113, 121, 127, 156, 166, 原著論文 114)。データ解析の結果を医学・生命科学の研究者と議論した結果、超早期段階が実験週数1から4にあることが示唆されたため、データの再取得を依頼した。数理モデルをヒト OGTT の時系列データに適用するために、大迫コホートの解析を進めた。C-ペプチドデータがない場合に対して精度の高いデータ解析を行うために、健常者 OGTT データから得られた医学的知見を事前確率分布としてパラメータ推定に取り込む方法を開発した(口頭発表 123, 128, 132, 133, 151, 155, 163)。この手法を用いてヒト OGTT データ解析を行った結果、現時点では、正常糖耐能者と糖耐能異常者、糖尿病判定者を分類することができた。現在、将来糖尿病と判定されたヒトデータと正常耐糖ヒトデータを分類可能か調査している段階である。

6) 膵臓、肝臓と血糖値のネットワークの数理モデル(千葉)

臓器間ネットワーク数理モデルのうち、特に膵臓、肝臓と血糖値のネットワークの数理モデルの数学的な解析を行った。本年度においては膵臓、肝臓と血糖値、インスリン濃度に関する数理モデルを構築し、そのモデルを数学とコンピュータを用いた計算の両面から解析した。その結果、血糖値が時

間に周期的に変動することが解明された。

② 状態遷移数理モデルの構築と解析(水藤、長山)

1) 他の臓器間数理モデルとの結合(水藤、長山)

令和6年度は①1)で実現した並列化による収束計算の結果を用いて、水藤 G で構築した循環系ネットワークモデルと長山 G で構築した9臓器モデルとを結合する作業を継続した。結合においては血液グルコース、インスリン、C-ペプチドの濃度移流について心臓から各臓器への到着時間を循環系ネットワークモデルから計算し、その時間を9臓器間ネットワークモデルに時間遅れ項として取り入れることとした。これにより、時間遅延9臓器間ネットワークモデルとしての結合を実現した。

2) 循環系臓器間ネットワークモデルの縮約(水藤)

前項1)で述べたように、状態遷移数理モデルの構築に関しては長山グループで構築している9臓器モデルと循環系ネットワークモデルを密に結合し、時間遅延9臓器間ネットワークモデルとして縮約を実現した。

③ 未病解析データに対する数理モデルの構築とその解析の実施(長山)

研究開発項目 4 内の他の課題推進者と協力し、腸内細菌叢の遷移過程を表現する数理モデルを下にデータを解釈した結果、初期の生態系形成過程で重要な「先住者効果」が、その後の発症に関わる可能性を見出した。発症防止には先住者(たとえば乳酸菌)の保護、治療には発症に関わる先住者の除去が有効であるため、介入(予防と治療)方法の検討に有効な示唆をあたえることができた。この示唆を具体的に実証するために、比較的細菌叢の種類が少ない膣内細菌叢モデルに展開した。主要な4つの菌叢に注目した数理モデルを解析した結果、健康→発症→寛解へと遷移する菌叢のクラスタリングの間を遷移する疑似時間再構成結果と同様の結果が現れることがわかった。

課題推進者:水藤 寛(東北大学)、長山雅晴(北海道大学)、千葉逸人(東北大学)

(5) 研究開発項目5:糖尿病や併発疾患の未病段階の理解とデータ基盤の構築

研究開発課題1:糖尿病未病・超早期状態におけるデータセットの構築と解析

当該年度実施内容:2型糖尿病に関して、マウスへの高脂肪食負荷時の経時的な代謝関連データを採取し、未病から疾病への移行を観察すべくデータを蓄積した。そのうえで、種々のタイミングで各臓器や血液・糞便などの回収を進め、遺伝子発現やメタボローム、糞便の菌叢のデータを効率よく解析できるようロジスティクスを整備しデータ収集を続けた。また、ヒトコホートデータにアプローチができるよう、倫理申請などの手続きを完了した。ロジスティクスとしては、飼育条件・環境によるばらつきを避

けるため、東北大学で一括してマウスの飼育を行い、高脂肪食負荷による代謝変化の検討を詳細に行った。その結果を見ながら、適切なタイミングで臓器等を採取し、肝・膵については片桐秀樹が、脂肪・副腎については、山田哲也が発現解析等を進めた。心臓・骨髄については、眞鍋一郎が本項目課題2として進めた。糞便については木村郁夫が菌叢解析を行った。肝や脳については、画像解析に向けての臓器の蓄積を進めた。メタボローム解析や臓器質量イメージング解析は青木淳賢が行った。これらの検討に向け、当該年度においても、マウスの高脂肪食負荷飼育と代謝パラメータの採取を継続し、数理モデル構築に向けて、数理研究者たちとのミーティングを頻繁に行い、データの共有を進めるとともに、合原プロジェクトから参画した中岡慎治准教授が両プロジェクトの連携を推進した。

本課題は、6人の課題推進者(片桐秀樹、山田哲也、青木淳賢、木村郁夫、長谷川豊、高山順)が連携し役割分担しながら推進している。

① 高脂肪食負荷による糖尿病発症モデルマウスの作製と時系列の代謝解析(片桐)

本研究課題では、前年度に引き続き、飼育条件・環境によるばらつきを避けるため、東北大学で一括してマウスの飼育を行った。マウスに高脂肪食を負荷した際、どのタイミングで高血糖となるかについて、経時的にデータを収集した。具体的には、経時的に摂食量や体重などの基礎データ、糖負荷試験による血糖値・インスリン値・C-ペプチド値などの詳細な代謝関連データを含む血液生化学データ等を収集した。これらのデータをもとにして代謝状態を判断し、それに裏打ちされたマウスを用い、山田哲也・眞鍋一郎・藤生克仁・青木淳賢・木村郁夫各課題推進者と連携して、各種の解析を進め、情報科学研究者である高山順が解析を進めた。

② 高脂肪食負荷後普通食に戻した際の時系列の代謝解析(片桐)

マウスに高脂肪食を負荷し血糖上昇をきたしたのち普通食に戻した際の経時的に摂食量や体重などの基礎データ、糖負荷試験による血糖値・インスリン値・C-ペプチド値などの詳細な代謝関連データを含む血液生化学データ等を収集。当該年度は、前年度に継続して、回復可能期の不能期の特定に向け、これらのマウスの作製、基礎データの収集を続けている。

③ 高脂肪食負荷による加齢と性差に関する時系列の代謝解析(片桐)

①で記載した高脂肪食負荷による解析を、若年オスマウスのみならず、若年メス、壮年オス、壮年メスのマウスを用いて、経時的に行う。パイロット実験として、これらのマウスではそれぞれ異なる代謝変化を生じる現象がみられており、

詳細な解析につなげるべくデータを蓄積する。具体的には、経時的に摂食量や体重などの基礎データ、糖負荷試験による血糖値・インスリン値・C-ペプチド値などの詳細な代謝関連データを含む血液生化学データ等の収集を継続した。これらのデータをもとにして代謝状態を判断し、④以下の研究にて、それぞれのマウスの代謝変化の違いの決定因子につなげる基盤とすべくデータの蓄積を始めた。

④ 高脂肪食負荷による糖尿病の発症過程での肝・膵島・筋における遺伝子発現データ解析(片桐)

①で確立したマウスモデルを用い、さらに、③での性差や加齢状態が異なったマウスモデルを用い、糖尿病の発症過程(正常→未病→糖尿病状態)での肝・膵島・筋の遺伝子発現解析を進めた。具体的には、それぞれの段階のマウスから肝・膵島・筋を回収し、バルク RNA-seq、ATAC-seq、一細胞 RNA-seq などによって網羅的な遺伝子発現解析を進め、データを蓄積した。さらに、高山と連携しバイオインフォマティクスによる解析を推進した。

⑤ 正常・未病・糖尿病状態における肝の電子顕微鏡解析(片桐)

前年度に継続して①で確立したマウスモデルを用い、さらに当該年度より新たに③で確立したマウスモデルを加え、代謝状態の違いを示す肝を回収する。これらの肝を用いて、走査型電子顕微鏡解析を行い、経時的に、門脈域・肝静脈域の zonation を考慮した肝内の画像解析を進め、画像データを蓄積するとともに、糖代謝変調との関連の検討を継続した。さらに、高山と連携しバイオインフォマティクスによる解析を推進した。本検討結果は項目2課題3の成果に反映されている。

⑥ 正常・未病・糖尿病状態における脳における神経活性化部位の画像解析(片桐)

前年度に継続して①で確立したマウスモデルを用い、正常・未病・糖尿病状態において、脳を回収し、組織透明化を行い、Fos 染色などにより、各病期で活性化している脳内部位に関する画像データの蓄積を継続する。個体間の違いを補正するアルゴリズムを用いて、正確な経時的な比較を進めるとともに、肝への MEK アデノウイルス投与マウスなどの糖代謝に変化があるモデルマウスでの検討も並行して行い、中枢神経活性化部位の比較を進めた。さらに、高山と連携しバイオインフォマティクスによる解析を推進した。本検討結果は、項目1課題2の成果に反映されている。

⑦ 大迫コホートにおけるヒト血漿メタボローム解析(片桐)

大迫コホートでは、経時的なヒト血漿サンプルが保管されている。前年度に、糖負荷試験などの結果をもとに、正常・耐糖能異常・糖尿病の各段階を経る住民

の選別を進めている。倫理申請手続きを完了させ、目的に合致する住民サンプルの抽出・確保を進める。さらに、そのサンプルを活用して、血液生化学解析や **miRNA** 解析に着手するとともに、課題推進者である青木によるメタボローム解析につなげる。加速判定による追加予算を活用し、プロテオーム解析にも着手するとともに、サンプル数を増やして解析を進める。

⑧ 高脂肪食負荷や加齢による白色脂肪組織の遺伝子発現の変化(1細胞レベル) (山田)

通常食と高脂肪食を負荷したマウス鼠径部皮下白色脂肪組織においてシングルセル **RNA** シークエンスを用いて一細胞レベルでの遺伝子発現変化を解析した。脂肪細胞が大型であるために、脂肪細胞から核を抽出して **RNA** シークエンスを行った。また、高脂肪食負荷が白色脂肪組織に及ぼす影響をより詳細に解析することを目的に、寒冷刺激を追加で実施した(寒冷刺激は1週間および2週間行い、それぞれのマウスから鼠径部皮下白色脂肪組織を採取し、比較解析をおこなった)。脂肪細胞、脂肪前駆細胞、免疫細胞、内皮細胞などの集団を同定した。核での解析により、既存のシングルセル **RNA** シークエンスで検出が困難であった脂肪細胞の検出が可能となった。また、脂肪細胞のサブクラスター分析により、4つの異なる脂肪細胞集団を同定した。**Cluster29** は熱産生脂肪細胞のマーカーである **Ucp1** の発現が高くベージュ脂肪細胞と考えられた。特に、高脂肪食負荷マウスでは通常食負荷マウスと比べ **Cluster7** の割合が増加しており、食餌内容により脂肪細胞の構成が変化することが明らかとなった。次に脂肪細胞のクラスター毎の遺伝子発現に着目し、エンリッチメント解析を行ったところ、クラスター毎に遺伝子発現パターンが異なることが判明し、クラスター毎に細胞の特性および機能が異なることが示唆された。さらに、室温条件における高脂肪食負荷が脂肪細胞の遺伝子発現に与える影響を **Over-representation analysis** にて解析した結果、全クラスターに共通したパスウェイ変化に加えて、クラスター毎に特徴的なパスウェイ変化を見出した。加えて、通常食群と高脂肪食群のデータセットそれぞれで擬似系譜解析をおこなったところ、高脂肪食では分化が2方向に分かれ、食餌により、脂肪分化の過程が異なる可能性が示唆された。以上より、脂肪細胞のサブクラスター毎に細胞機能が異なる可能性が示唆された。また、高脂肪食負荷によりクラスター構成に変化が生じ、特に高脂肪食負荷マウスで特異的に増加するクラスター(**Cluster7**)が存在することが明らかとなった。これらの結果は、高脂肪食が白色脂肪組織の機能に与える影響を理解するための重要な手がかりと考えられ、肥満や糖尿病などの代謝疾患の発症メカニズム解明に寄与する可能性があるものと思われた。

さらに、加齢が白色脂肪組織の遺伝子発現に及ぼす影響についても検討を進めた。高齢

マウスでは、脂肪細胞前駆細胞 (APC) の老化により、寒冷など交感神経刺激により白色脂肪組織中に誘導される熱産生脂肪細胞 (ベージュ脂肪細胞) の誘導が著しく減少することが知られている。一方、我々は高齢マウスにおいても「長期 (2週間)」の寒冷曝露を行えば、ベージュ脂肪細胞を誘導することが可能であることを発見したため、そのメカニズムを解明することとした。近年、ベージュ脂肪細胞は均一の細胞集団ではなく、いくつかのサブタイプに分類されること、さらにベージュ脂肪細胞の前駆細胞である APC にもサブタイプが存在することが報告されていることから、高齢であってもベージュ脂肪細胞に誘導可能な APC のサブタイプが存在するのではないかと仮説を立てシングルセル RNA シークエンシングを行った。その結果、これまでに知られていなかった炭酸脱水酵素 (Car) 陽性 APC が存在すること、さらに Car 陽性 APC の数は加齢および寒冷曝露に伴い増加することがあきらかとなった。Car 陽性 APC 細胞のキャラクターを解明すべく Car ノックダウン (KD) 細胞を作製し実験したところ、Car KD 細胞のベージュ脂肪細胞への分化能は著しく低下していた。さらに、Car KD 細胞はグルタチオン経路における遺伝子発現の低下を呈し、実際、活性酸素種 (ROS) に対して脆弱であった。加齢状態では一般に組織中の ROS 産生が亢進していることが知られているが、Car 陽性細胞はその ROS 耐性により老化環境を生き抜き、ベージュ脂肪細胞に分化できることが示唆された。本研究は、加齢に伴うベージュ脂肪細胞誘導の低下のメカニズムの一端を明らかにするだけでなく、Car 陽性細胞が高齢肥満者のエネルギー消費量を増加させ、肥満症の治療標的になり得ることを示唆しているものと思われる。

現在、*in vivo* における Car 陽性細胞の機能や意義を検証すべく、脂肪前駆細胞特異的および脂肪細胞特異的な後天的 Car ノックアウトマウスの解析を進めている。

⑧ 性別、年齢、高脂肪食による副腎の遺伝子発現の変化 (1 細胞レベル) (山田)

若齢または老齢の C57BL/6J マウスに通常食または高脂肪食を与え副腎を採取した。gentleMACS™ Dissociator を用いて核抽出後に BD Rhapsody™ を用いてシングル核 RNA-seq (snRNA-seq) を行ない、Seurat で解析した。まず、若齢-通常食群で解析を進めたところ、副腎皮質球状層 (ZF) で顕著な雌雄差が存在することが明らかとなった。さらに通常食で飼育した加齢マウスにおいて同様の解析を行うと、オスマウスに加齢特有の ZF 集団が出現することがわかった。次に雌雄の若齢マウスに高脂肪食を負荷し、副腎に及ぼす影響をシングルセルレベルで解析した。興味深いことに高脂肪食負荷下のメスマウスで新規副腎皮質集団の出現を認めた。

本知見は副腎皮質が、性、年齢および食事依存的にダイナミックに変動することを示唆す

る。副腎皮質はコルチゾールをはじめとする糖代謝に影響の大きいホルモンを分泌しており、これまで検討されてこなかった観点から、糖尿病ひいてはその超早期段階における新たな病態解明につながる事が期待される。

⑨ 褐色脂肪組織の機能的な雌雄差の分子メカニズムの解明(山田)

褐色脂肪組織(BAT)は熱産生によりエネルギー消費を亢進する独自の機能を有した脂肪組織であり、その機能に雌雄差が存在することがヒトにおいても示されているが、その詳細なメカニズムは不明であった。そこでマウスBATを対象に検討したところ、機能的、組織学的な雌雄差が存在し、さらにメスBATの Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α (PGC-1 α)遺伝子発現がオスに比して高いことを見出した。そこで、後天的脂肪細胞特異的Pgc1aノックアウトマウス(KO)を作製し、BATの雌雄差に及ぼす影響を雌雄の野生型マウス(WT)、KOで比較検討した。WTでは、ノルエピネフリン投与後の酸素消費量や寒冷環境下での直腸温についてメスがオスに比べ高値を示したが、KOではメスのみ低下した。加えて、WTではメスがオスに比べBATミトコンドリアの総クリステ長が有意に長かったが、メスKOでのみ短縮し、その性差が消失した。BATの遺伝子発現の網羅的解析では、メスKOでのみ新規脂肪合成関連遺伝子群の発現が低下した。また、メタボローム解析でTCA回路の代謝産物が、リポドーム解析でミトコンドリア呼吸能に重要な成熟カルジオリピンやエーテル結合ホスファチジルエタノールアミンの比率がメスKOでのみ低下した。さらに、脂肪合成関連遺伝子群の発現を制御する転写因子Carbohydrate responsive element-binding protein β (Chrebp β)のBAT特異的ノックダウン実験をメスWTに行ったところ、メスKOと同様の表現型が再現された。一方、メスWTにエストロゲン受容体拮抗薬を投与すると、PGC-1 α 遺伝子発現の有意な低下は認めなかったが、ノルエピネフリン投与後の酸素消費量の低下、ミトコンドリアクリステの短縮、新規脂肪合成関連遺伝子群の発現低下などが、KO同様にメスのみで認められた。さらにメスそれぞれのコントロールおよびKOマウスのBATについてex vivoでエストロゲン投与実験を行ったところ、メスのみで新規脂肪合成関連遺伝子群の発現が上昇し、その上昇はメスKOマウスから採取したBATでは認められなかった。

メスのBATに比較して少ないものの、オスのBATにもPGC-1 α の発現は相応に検出されており発現量の差異のみでは、メスのBATでのみPGC-1 α ノックアウトでChrebp β の発現が低下した理由は説明できない。そこで、エピゲノム修飾の性差が、PGC-1 α による遺伝子発現制御の性差を規定している可能性を想起し、雌雄のWTおよびPGC-1 α KOマウスのBATについて、オープンクロマチン解析(ATAC (Assay for

Transposase-Accessible Chromatin)-seq)を行った。その結果、オスに比しメス WT で Chrebp β 遺伝子の活性型クロマチン領域が多く、さらに PGC-1 α ノックアウトによりメスのみで、その領域が減少していた。

以上より、メス BAT で高発現する PGC-1 α は、エストロゲンシグナルと協調関連し個体レベルのエネルギー代謝を促進していることが明らかとなった。また、そのメカニズムとして BAT の PGC-1 α が、メスに選択的なエピジェネティックなメカニズムにより Chrebp β を介した脂肪合成を誘導することで、メス BAT のクリステリッチなミトコンドリアの形成に寄与し、ひいてはメスミトコンドリアの高い TCA 回路活性と熱産生機能を司っていることが明らかとなった。

⑪ 未病から2型糖尿病への遷移を心電図から検出するアルゴリズムの作成(ヒト)(山田)

生活習慣や社会環境の変化に伴い糖尿病患者は急増しており、合併症の発症を抑制するためには、糖尿病を超早期段階で診断することがきわめて重要である。例えば、糖尿病は心不全の独立したリスク因子であるが、心不全の発症リスクは境界型糖尿病の段階、すなわち超早期段階からすでに有意に高いことが報告されている(Diabetes Obes Metab 23:1746-1753, 2021)。このことは、糖尿病は超早期段階から心臓に何らかの影響をもたらしていることを想起させるものであり、その影響は心電図に表れる可能性があると考えた。臨床医では認識できない軽微な心電図変化でも機械学習により補足できれば、心電図を用いて糖尿病を超早期段階から診断する手段となり得ると考え以下の検討を行った。

【対象、方法】

2022 年に A クリニックの健診で心電図検査を受けた人のうち、同日に空腹時血糖または HbA1c が測定された人を対象とした。空腹時血糖 ≥ 110 mg/dL、HbA1c $\geq 6.0\%$ 、糖尿病治療中のいずれかを満たす場合を「超早期段階～糖尿病」とした。心電図から特徴量を抽出し、複数の機械学習モデルを用いて教師あり学習を行ない、各々の分類の予測性能を検討した。解析可能な心電図は 16766 で、90%を訓練データセット、10%をテストデータセットとして無作為に割り付けた。健診受診者の平均年齢は47～48歳、平均 HbA1c は 5.52%であった。

【結果】

「超早期段階～糖尿病」の予測性能は LightGBM モデルで最も高く、12 誘導心電図のみを用いた場合、AUROC 0.851、感度 85.7%、特異度 70.0%であった。

次にスマートウォッチなどの活用を念頭に置いて、I 誘導心電図の28の特徴量のみを用い

て複数の機械学習モデルを用いて同様の解析を行った。その結果、予測性能は 12 誘導心電図の特徴量を活用した解析と同様に LightGBM モデルで最も高く、AUROC 0.844、感度 82.3%、特異度 70.2%であり、12 誘導心電図による検討と同様の予測性能が得られた。

＜特許出願済＞

出願番号:特願 2024-166123

出願日:2024 年 9 月 25 日

出願人:国立大学法人 東京科学大学

発明の名称:血糖上昇の有無を予測するための装置

⑩ 糖尿病モデルマウス血漿および臓器に対するリポドミクス・メタボロミクスデータベースの構築と分析(青木)

当該年度は、糖尿病モデルマウスにおいて様々なタイムポイントで血漿を採取しリポドミクス解析を実施し、糖尿病病態と関連する血漿リン脂質分子種を同定する予定であった。先行実験として、db/db 肥満マウス、ストレプトゾトシン投与糖尿病モデルに関して実験を行い、特に、db/db マウスで血漿リン脂質パターンが大きく変動することが判明した。しかし、年度の途中でマウスモデルよりヒト臨床サンプルを優先させて解析するという方針が変わったため、今年度計画したマウス糖尿病モデルのリポドミクス解析は実施しなかった。

⑪ 糖尿病モデルマウス肝臓・腎臓の質量分析イメージングデータベースの構築と分析(青木)

こちらに関しても⑩と同様の理由で経時的なデータ取得は行わず、高脂肪食負荷4週間時点の腎臓の MS imaging データのみ取得し、これまでのデータベースの一部として整備した。

⑫ ヒト血漿に対するリポドミクス・メタボロミクス解析の実施(青木)

本年度の計画は、前年度に予備的データを得た、肥満外科手術を受けた患者の術前・術後血液のリポドミクスを実施し、データ数を増やすことであったが、提供を受ける予定の検体の準備が遅れており、解析が未完了である。そこで代わりに、健常人の血液検体および大迫コホート研究で取得された血液検体のリポドミクスデータ取得とその解析を先行して進めた。これまで青木 G が確立した正確なリポドミクスのための血液取り扱いプロトコルに基づき、質の担保された血漿を取得し、リポドミクスを実施した。前年度までに分析した検体と合わせ、最終的に、約 270 名の健常人の正確なリン脂質リポドミクスデータベースが完成した。これらのデータベースを元に、それぞれの被験者の健康パラメータとの関連性を解析したところ、前年度までに明らかとなった空腹時血糖だけ

でなく、血圧や肝機能パラメータ、中性脂質、尿酸値といった種々のメタボリックパラメータとの相関性を見出した。特に、ドコサヘキサエン酸(DHA)含有リン脂質はこれらのパラメータと有意な逆相関を示した。また、大迫コホートで取得された 210 名余りの血漿についてもリポミクスを行い、各種リン脂質レベルを決定した。この 210 名の被験者はこの採血時点では健常状態であったが、その後、糖尿病発症もしくは死亡するケースがあった。そこで将来の糖尿病発症群、死亡群において特徴的に変化している血中リン脂質を探索した。その結果、糖尿病発症群では、発症前の時点で既にリゾホスファチジン酸(LPA)の各分子種が低下、一方でセラミドの特定の分子種が増加している傾向にあることを見出した。さらに将来の死亡群ではより多くのリン脂質分子種が健常状態の時点で既に変動しており、特にホスファチジルセリン(PS)のほとんどの脂肪酸分子種、さらにそのリゾリン脂質体であるリゾホスファチジルセリン(LysoPS)が有意に低下していた。また、アラキドン酸を代表とする omega-6 系の脂肪酸を含有するリン脂質も、リン脂質の極性頭部を問わず低下傾向にあった。従って、これらの血中リン脂質は糖尿病未病マーカー、死亡マーカーとして使用できる可能性があるとともに、疾患発症に関して何らかの寄与をしていることが想定される。そこで今後、マウスレベルでこれらのリン脂質を変動させ、その影響を解析する予定である。

⑬ 脂質サプリメントを用いた糖尿病病態への介入試験(青木)

⑫で得られた結果に基づき、疾患発症に関与する可能性のあるリン脂質に対し、それをサプリメントとしてマウスに経口投与し、実際に血中および全身臓器のリン脂質レベルを変動させられるかの検討を行った。本年度は、糖尿病およびメタボリックシンドロームに関連する生化学パラメータと逆相関した DHA 含有リン脂質に着目し、DHA-PC を主成分とするイクラオイルをマウスに連続投与した。その結果、イクラオイル2週間の投与によって、血中および骨格筋、肝臓、心臓といったいくつかの臓器で DHA 含有リン脂質の上昇を認めた。また、DHA-PC 投与マウスはホルマリン投与による炎症・疼痛応答が減弱しており、機能的なレベルで DHA 含有リン脂質が変化していることが示唆された。また、将来の死亡患者で低下傾向にあった PS に注目し、こちらについても DHA 型 PS を合成し、マウスに投与した。その結果、DHA-PS の投与によって、予想外にも、DHA-PS 以外の複数の血中 PS 分子種が上昇することが明らかとなった。従って、PS をサプリメントとして摂取することで、死亡マーカーである可能性のある血中 PS レベルに介入できることがわかった。来年度は、これらのサプリメントが糖尿病をはじめとする疾患の発症や進展に抑制効果を示すのかについて検証していく。

⑭ 糖尿病未病・超早期状態から疾病への移行に伴い変動する腸内細菌叢解析の実施(木村)

当該年度においては、SsEPSを産生するSs菌による宿主の糖代謝との連関(Shimizu et al. Nature Commun 2025)を基盤として、肥満症患者および健常者の糞便を対象に、ショットガンメタゲノム解析およびメタトランスクリプトーム解析を実施した。各種EPS(菌体外多糖)合成経路の同定と、それに関わる合成・代謝経路に注目し、EPSの産生に関与する腸内細菌種と、それぞれの産生する糖鎖の種類との相関性について詳細に解析を行った。

さらに、糞便由来の腸内細菌叢を用いた *in vitro* 培養系において、各種糖類を添加した条件下で発現が変動する糖転移酵素群に着目し、相関解析を実施した。その結果、我々がこれまでに同定したEPS産生能をもつ特定の乳酸菌種に加えて、新たに乳酸菌以外の腸内細菌種においても、多様なEPSを合成する可能性が示された。

⑮ ヒト肥満者サンプルを用いた代謝変動に寄与する因子検索(長谷川)

岩手医科大学において減量・代謝改善手術を施行した高度肥満者からのサンプルを活用し、青木淳賢課題推進者と連携して、手術前後の血液サンプル、肝臓生検サンプルのメタボローム解析に着手した。手術前後の血液サンプルより、手術による代謝変動により顕著な変動を示すリン脂質を同定することができた。

減量・代謝改善手術を施行した高度肥満患者および非肥満者から摘出したヒト内臓脂肪組織サンプルよりRNA抽出・cDNA合成を行い、遺伝子発現解析を施行した。

肥満者で発現が高い因子 MCRIP2 を同定し、褐色脂肪で発現が高く、肥満の病態を規定している因子であることを解明できた。

⑯ 脂肪細胞の熱産生を促進する化合物の探索(長谷川)

脱共役蛋白質1(Uncoupling protein 1)の活性を亢進させ、肥満や糖尿病を抑制することが期待できる化合物が同定できているため、それらの化合物の効果と作用機序、安全性の解析を進めた。1つ目の化合物(Drug A)は、中鎖脂肪酸の受容体であるG蛋白受容体(GPR84 および GPR120)を介して脂肪細胞の熱産生を促進させることを同定できた。2つ目の化合物(Drug B)は、細胞毒性作用が非常に少なく、脂肪細胞の熱産生を促進させる化合物であった。脂肪細胞の分化や熱消費に関わる遺伝子の発現を制御する転写コアクチベーターPGC-1 α を活性化させること、Lipolysis を促進させることが解明できた。これらの同定した化合物は、脂肪細胞での熱産生を亢進させる作用が発揮されるため、ヒトにおいては基礎代謝を亢進させることで、肥満の是正ならび

に未病のうちに糖尿病を改善する画期的な治療戦略につながる事が期待される。

⑰ 糖尿病未病データセットの構築とその解明・介入点探索(高山)

糖尿病未病状態および合併症未病状態の解析のため、高脂肪食負荷、寒冷刺激、肝臓での遺伝子発現、心不全負荷などの各種モデルマウスにおける脂肪、 β 細胞、神経節などの各種組織での遺伝子発現データを含む各種データの収集を継続した。遺伝子発現データについては⑱で示すように **scRNA-seq** の情報解析を行い、プロジェクト内のグループと結果を共有している。また、ライブラリ調製後の次世代シーケンシング解析を本課題推進者の研究室が所有するシーケンサーを用いて内製化する体制を整えた。

⑱ 一細胞シーケンシングの情報解析(高山)

データ解析のための環境は糖尿病未病データセット構築と合わせて、ローカルのサーバにおいて前年度より継続して整備した。令和6年度はこれまでの解析を発展させ、東北大学片桐 G、東京科学大学山田 G、東京大学藤生 G よりマウスの膵臓 β 細胞、脂肪細胞、神経節細胞等における **scRNA-seq** データの提供を受け、情報解析を行った。解析パイプラインについては前年度までに作成したパイプラインについてデータ品質管理や遺伝子セットエンリッチメント解析などの段階で改良を加えた。これらのデータを用いて、食餌や温度条件、遺伝子導入、心不全負荷などによる差異発現遺伝子の同定と遺伝子セットのエンリッチメント解析、細胞のトラジェクトリ解析を行い、糖尿病の発症や組織の変化につながると考えられる遺伝子発現変化を抽出した。これらの注目すべきクラスターと遺伝子については実験グループと情報共有し、**qPCR** などを中心に検証を行っている。

これらの解析は **Seurat v5** パッケージやその他のツールを用いて独自開発したパイプラインを用いて行っており、解析の **R** スクリプトと各段階での実行結果と合わせてデータとして保存している。これにより、情報解析の再現性を担保するとともに、プロジェクト内で新しい組織の一細胞 **RNA** シーケンシングデータを取得したときに共通となる解析を加速することが可能である。

プロジェクト内でのデータ解析に加えて、**scRNA-seq** の公開データを収集し、大規模データから学習することで、基盤モデルの構築・精密化を目指した研究を開始した。**scGPT** や **GeneFormer** などの既存の **scRNA-seq** 基盤モデルをプロジェクト内の糖尿病関連モデルで取得されたデータを用いて精密化し、糖尿病状態への遷移と神経節細胞などのこれまでのアトラスに含まれない細胞の分類を可能とするモデル構築を目指している。

このように令和6年度は **scRNA-seq** の情報解析を行う基盤を構築し、実際に複数の組織の遺伝子発現定量と下流の解析に適用することで、糖尿病による組織の変化の解釈と介入点の探索に必要なデータを作成した。

⑭ 未病から2型糖尿病への遷移に関する数理モデル解析(高山)

プロジェクト内の数理モデル研究者とのミーティング、およびプロジェクト全体のミーティングにおける議論を継続し、本グループで行う各種組織の **scRNA-seq** 解析からどのようなパラメータが臓器間ネットワークの数理モデル解析に応用できるかを引き続き検討した。これまでに膵臓、脂肪細胞、神経節細胞における発現量解析を行っており、糖尿病の臓器間数理モデルにおける臓器ごとのパラメータに影響しうる遺伝子を探索した。

課題推進者: 片桐秀樹(東北大学)、山田哲也(東京科学大学)、青木淳賢(東京大学)、木村郁夫(京都大学)、長谷川豊(岩手医科大学)、高山順(東北大学)

研究開発課題2: 糖尿病併発疾患の未病臓器間ネットワークデータセット構築と解析

当該年度実施内容: 心不全は糖尿病の主要な併発症であり、糖尿病や肥満に伴う臓器間ネットワークの異常がその発症に大きく影響する。一方、一度心不全となると、心不全の再発、慢性腎臓病、サルコペニア、うつ病が発症しやすくなり、糖尿病の併発はさらにこれらの合併症のリスクを高める。

当該年度は、高脂肪食による肥満、横行大動脈縮窄モデル、精神ストレスモデルについて、経時的に、心エコー等の生理データと、造血幹前駆細胞、末梢血、心臓マクロファージについて、シングルセル **RNA-seq**、**CUT&RUN-seq** によるエピゲノム解析データを取得した。これにより、様々なストレスによるシングルセルレベルでのトランスクリプトーム変化ならびにエピゲノム変化のデータセットを構築した。

また、令和 6 年度からは、心不全・糖尿病・肥満患者の末梢血造血幹細胞について、トランスクリプトームおよびエピゲノムの時系列データ取得を開始した。

本課題は、2 人の課題推進者(眞鍋一郎、藤生克仁)が連携し役割分担しながら推進している。

① 心不全と併発症の未病臓器間ネットワークデータセット構築の実施(眞鍋・藤生)

眞鍋 G は、糖尿病と心不全を中心とする併発症の未病臓器間ネットワークについての時系列データ解析として、昨年度に確立したワークフローに従って、心臓免疫細胞、末梢血、骨髓造血幹前駆細胞に関して、フローサイトメトリー解析、シングルセル **RNA-seq** 解析を行った。また、心エコーの経時解析も行った。高脂肪食負荷については投与 1、2、3、10 か月後の心臓免疫細胞ならびに造血幹前駆細胞のシングルセル **RNA-**

seq のデータセットを構築した。時系列解析については、シングルセル RNA-seq データの pseudobulk データを用いた GLM による解析と WGCNA による解析方法を確認した。心臓圧負荷については、圧負荷開始後 1 ならびに 4 週の心臓免疫細胞と造血幹前駆細胞、骨髄ニッチ細胞のシングルセル RNA-seq データセットを構築した。代表的なタイムポイントでの CUT&RUN-seq による H3K27ac, H3K4me1, H3K27me3 のデータを取得した。これらのデータセットについては、GakuNin RDM に登録した。また、ATAC-seq プロトコルの最適化を行い、データ取得の準備を始めた。これらのデータを用い、時系列変化の下で解析した。

藤生 G は、糖尿病・心不全とその併発症に関する未病段階の臓器間ネットワークを、心臓、神経系、骨髄・免疫系などを対象に、トランスクリプトーム・エピゲノムの時系列で解析した。

心不全は単なる心疾患にとどまらず、腎疾患・糖尿病・サルコペニアなど多病性を伴う全身性疾患であり、その再発や併発の仕組みの解明は重要課題である。本研究では、心不全が骨髄内の造血幹細胞 (HSC) にエピゲノム変化を伴う「ストレス記憶 (stress memory)」を刻み、炎症性マクロファージを持続的に生成して多臓器病態を引き起こす新たな疾患軸を明らかにすることを目的とした。

② 未病臓器間ネットワークの空間データセット構築の実施(眞鍋・藤生)

眞鍋 G は、心臓の多種細胞間の相互作用を、シングルセル RNA-seq 解析に基づき行う方法の最適化を進め、TAC や遺伝子変異によって変化する細胞間相互作用を同定した。

Visium HD による解析を始めた。その結果、1 細胞レベルに近い解像度が得られることを確認した。以上のように細胞間相互作用解析を進めるとともに空間解析の準備を行った。

藤生 G は、未病段階の臓器間ネットワークにおける細胞間相互作用を把握するため、空間トランスクリプトーム解析を実施した。心臓などの組織構造と遺伝子発現に関するイメージング技術を最適化し、細胞間ネットワークの可視化を目指した。あわせてオルガノイドを用いた解析も進めた。

課題推進者: 眞鍋一郎 (千葉大学)、藤生克仁 (東京大学)

3. 当該年度のプロジェクトマネジメント実施内容

(1) 研究開発プロジェクトのガバナンス

進捗状況の把握

東北大学総長の強いリーダーシップの下、代表機関として本研究開発プロジェクトに特化し、強力に支援するための「ムーンショット型研究開発事業戦略室」を設置し、福重真一が PM 補佐・URA を担当した。知財戦略や国内外の研究開発動向等についても、「ムーン

ショット型研究開発事業戦略室」と連携し、PMを補佐している。計画通り、PMとの密接な連携のもと、PMがプロジェクトに専念できる体制を整備し一体的に推進している。運営会議を設置して重要事項の連絡を随時行い、速やかに判断できる体制を構築するとともに、課題推進者の全体会議や小会議の開催を支援し、情報を蓄積し、進捗状況を把握している。当該期間中、運営会議は開催していない。

各課題推進者の進捗状況を把握するため、令和6年8月18～19日に仙台の星陵オーディトリウムにて全体会議を開催した。26名すべての課題推進者を含む72名が参加し、貴重な交流の機会となった。会議では、各課題推進者の口頭発表に加え、若手研究者による26件のポスター発表に対し、活発な議論がなされた。また、令和6年10月8日には、PM主催プロジェクト内部年次評価会をZoomにて開催した。

さらに、医学研究者と数理研究者が糖尿病マウスに対する血糖値時系列データ、循環系・代謝系数理モデル、確率微分方程式の適用、大迫コホートデータに対するデータ解析について議論する会議の開催を支援した。

研究開発プロジェクトの展開

本研究開発プロジェクトの目標達成のために、最適な人材をセレクトした。ターゲットとする糖尿病自体を専門とする研究者はむしろチーム内では少数で、多臓器の変容や併発症や臓器変容などについての循環器・腎臓・消化器・脳外科・産科などの医学の研究者はもちろん、神経生理学・循環生理学・医工学・薬学などのバイオの研究者に加え、神経介入法や薬学、さらには、工学・数学など、多領域の学問分野が結集し、それぞれ独自の技術を活用した研究開発を進めている。令和4年度からは、合原PJの中岡慎治との共同研究を開始し、令和5年度には、大規模データの解析を推進するため、課題推進者としてバイオインフォマティクスである高山順が加わった。さらに、ヒトでの解析を推進するため、高度肥満患者の脂肪組織サンプルを豊富に有する長谷川豊も課題推進者として加わり、片桐や青木との共同研究を推進している。

毎年公式の全体会議に加え、そのほかにも非常に頻繁に課題推進者間での議論が各自行われており、先端技術や材料、その成果また研究推進上の問題点をも共有している。これらを通じ、それぞれの課題推進者が行う研究のプロジェクト全体に占める位置づけが明らかとなり、自然発生的に多くの連携が進んでおり、各課題推進者のモチベーションが高まっていることを実感する。ステージゲートについても、PM片桐が頻回のミーティングを通じ全課題の進捗状況を逐一把握し評価をするとともに、必要経費などについても情報交換を行い、最も効率よく研究が進捗するよう調整を進めている。

各課題推進者による国際連携も進んでいる。田宮の実施しているGWAS解析は国際的な他機関連携コンソーシアムによる解析段階に移行している。そのためにはGWAS要約統計量の公開が非常に有効であり、実際に複数の国際共同研究を開始している。糖尿病関連形質のGWAS要約統計量の公開も、実施者自身によって2021年9月30日に行われ、現在も複数の国際連携が進行中である。その他、藤生、中村、吉本、笠原、鈴木、新妻、長山、青木が海外の研究者との共同研究を実際に展開あるいは計画している。

福重、眞鍋、藤生、水藤らがプロジェクトの委員として、ELSIの委員会に参画し、議論を深めている。また、GakuNin RDMへのヒトデータデポジットについて倫理委員会への対応

などが必要になった際の MS 目標 2 の ELSI 支援チームの窓口について確認した。片桐は数理の研究者と定期的にミーティングを行い、数理とバイオの連携を推進している。特に、長山らが項目4で作成したシミュレータを用い、ヒトでの PET のデータと照合した。さらに、大迫研究での一般住民コホートのデータの活用や福島での糖尿病患者データ活用に向けて、倫理審査を進め、いずれも承認を得、数理研究者がこれらのデータにアプローチできる環境を整えた。中村は全身の生体恒常性の維持を担う視床下部から脳幹にまたがる神経ネットワークモデルを世界に先駆けて提示した (Nakamura et al., *Nature Rev Neurosc*, 2022) が、この知見をもとに、現在、数理研究者と共同で、恒常性の中枢神経調節メカニズムの基本動作原理を解明すべく解析を進めている。藤生は水藤の全身循環の数理モデルに対して、藤生たちが所有している血行動態のデータや知識体系を提供し、健常時、心不全時などの数理シミュレーションを行う取り組みを行っている。本研究から心不全の新しい機序の解明、治療における **decision make support** システムへの発展を目指している。また、シングルセル解析については、バイオインフォマティクス・数理担当のチームである高山と新たなムーンショット内共同研究を開始した。吉本は研究項目の1つ「数理モデル解析による恒常性の理解とその応用」で数理チームと連携している。

(2) 研究成果の展開

東北大学産学連携機構、技術移転機関の株式会社東北テクノアーチ、東北大学ナレッジキャスト株式会社との連携を開始し、成果が得られた際に遅滞なく事業展開できる体制を構築した。

研究成果を社会実装するためには、民との連携が必要である。藤生は接触・非接触デバイスの開発に向け、複数の企業と共同研究を進め、知財の確保と企業導出を積極的に推進しているほか、片桐・青木・鈴木・田宮・西村・中村・木村・山田(哲也)も企業との共同研究について契約締結あるいは交渉中であり、東北大学の創生応用医学研究センター(片桐 PM がセンター長)のデジタルメディシナルハブでの産学連携システムを活用できる体制を築いている。

さらに、BioJapan 2024(令和 6 年 10 月開催)に片桐、山田(哲也)、鈴木が参加し、プロジェクトの研究成果を説明するとともに企業との連携に向け、展示会場内での情報収集を行った。

(3) 広報、アウトリーチ

アウトリーチについては、プロジェクト独自のホームページを活用し積極的な情報発信を行った。また、各種メディア(テレビ、新聞、web など)や高校、大学への出張講義を通じ、高校生、大学生、一般市民への情報発信も積極的に行った。

令和6年度は、プロジェクトの多くの研究成果が学術誌に発表(原著論文 52 報)されるとともに、国内外のメディアで広く報道された。

藤生・眞鍋は、本ムーンショット研究の成果発表(心不全の再発と多病のメカニズムを同定—ストレスが血液に蓄積する—)について、東京大学、千葉大学、国際医療福祉大学、JST の共同プレスリリースを行い(令和 6 年 5 月 25 日)、日本経済新聞、福井新聞、日

本海新聞、QLifePro 医療ニュースなど多くのメディアで報道された。

木村は、本ムーンショット研究の成果発表(甘いもの好きの人の肥満を抑える腸内細菌の発見～肥満や糖尿病などの代謝性疾患予防・治療法の開発応用に期待～)について、京都大学と JST の共同プレスリリースを行い(令和 7 年 1 月 31 日)、日本経済新聞、日経バイオテク、日刊工業新聞、QLifePro 医療ニュースなど多くのメディアで報道された。本研究成果は、国会の予算委員会でも取り上げられた他、JSTnews の内容が英語、中国語に翻訳され、Science Japan、客観日本で報道された。

藤生は、令和 6 年 10 月 21-22 日に、東京大学山上会館において、FRONTIERS OF DATA SCIENCE AND LIFE SCIENCE RESEARCH と題したワークショップを主催した。この中で、非接触デバイスによる糖尿病、高血圧検出に加え、心電図を用いた心不全の検出について発表した。国内の数値モデル研究者、臨床系の AI 研究者に対して、ワークショップを開催し、アウトリーチ活動を行った。

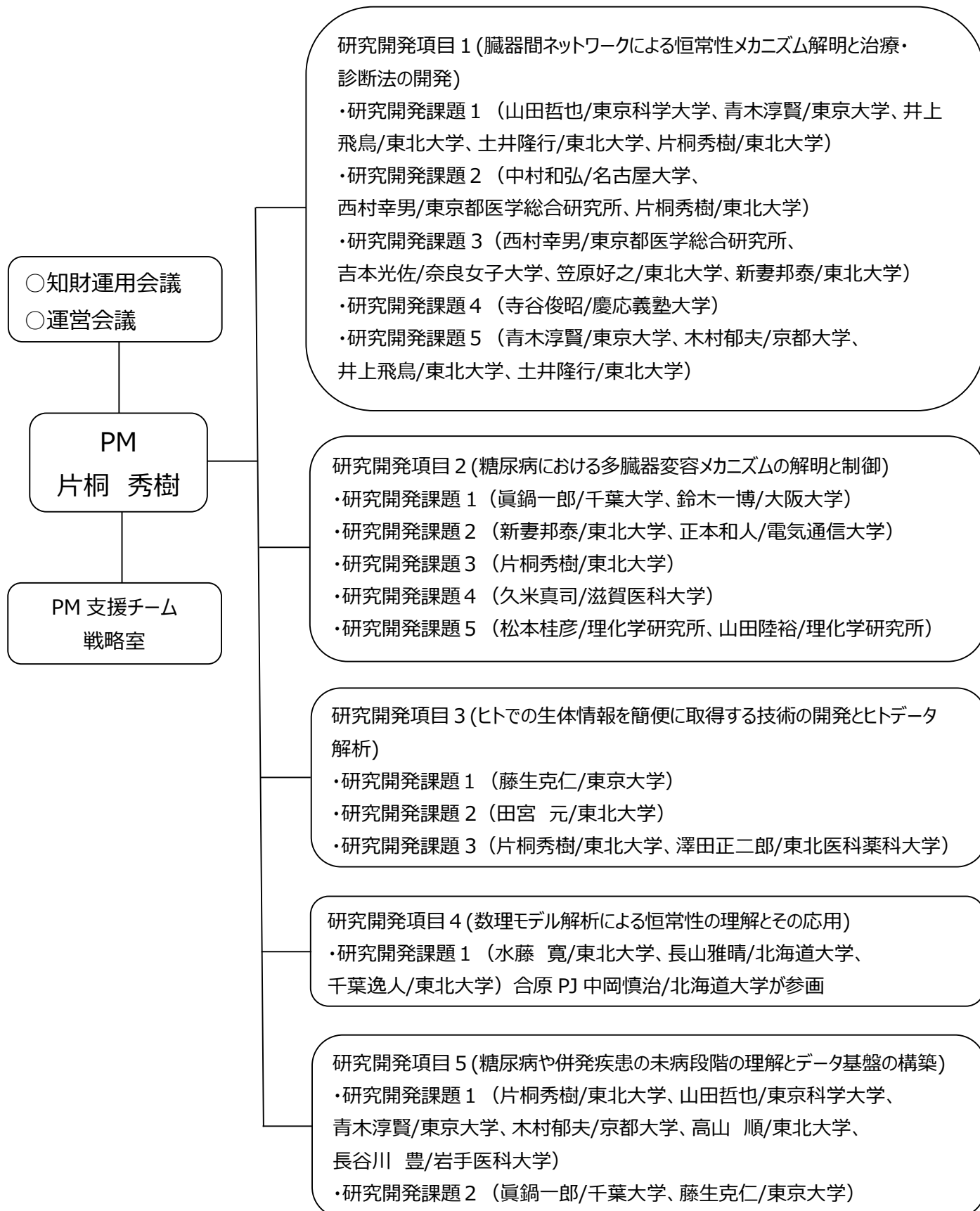
田宮は、GWAS 要約統計量及び GWAS 解析について専用ホームページにより広報活動を継続している。

(4) データマネジメントに関する取り組み

NII(国立情報学研究所)の GakuNin RDM に作成したデータプロジェクト「片桐 PJ データ」に各課題推進者のデータを可能な限り保管し、プロジェクト内でのデータ共有、数値モデル構築に利活用した。特に、項目 5 で得られた未病データは、ムーンショット目標 2 全体での包括的未病データベース構築およびそれらのデータを用いたビッグデータ解析や数値モデル化に必要なため、積極的にデータデポジットをおこなった。現在、GakuNin RDM へのプロジェクト参加者の登録数は 100 名以上で、シングルセル RNA シークエンスのデータを中心に約 1.7TB のデータを保存している。

GakuNin RDM へのデータデポジットに関しては、1ファイルあたりのデータ容量に制限があるため、大きな画像データのデポジットは現在困難であるが、これまで通りのアップロードとさらなる大規模データの蓄積を進める予定である。また、ヒトに関わるデータに関しては、raw data の公開は倫理上困難(同意書の取得ができない)であるが、倫理委員会で認められた研究者間でのデータ共有を GakuNin RDM を用いて開始した。

4. 当該年度の研究開発プロジェクト推進体制図



知財運用会議 構成機関と実施内容

東北大学産学連携機構、技術移転機関の株式会社東北テクノアーチ、東北大学ナレッジキャスト株式会社との連携を開始し、成果が得られた際に遅滞なく事業展開できる体制を構築した。

当該年度、会議は開催していない。

運営会議 実施内容

運営会議を設置して重要事項の連絡を随時行い、速やかに判断できる体制を構築した。

当該年度、会議は開催していない。

5. 当該年度の成果データ集計

知的財産権件数				
	特許		その他産業財産権	
	国内	国際(PCT 含む)	国内	国際
未登録件数	1	2	0	0
登録件数	0	1	0	0
合計(出願件数)	1	3	0	0

会議発表数			
	国内	国際	総数
招待講演	55	16	71
口頭発表	61	13	74
ポスター発表	14	14	28
合計	130	43	173

原著論文数(※proceedings を含む)			
	国内	国際	総数
件数	1	51	52
(うち、査読有)	0	50	50

その他著作物数(総説、書籍など)			
	国内	国際	総数
総説	5	2	7
書籍	1	1	2
その他	0	0	0
合計	6	3	9

受賞件数		
国内	国際	総数
15	0	15

プレスリリース件数
6

報道件数
12

ワークショップ等、アウトリーチ件数
6