

[035]九州大学生体防御医学研究所年報 : 2020年

<https://hdl.handle.net/2324/6617898>

出版情報 : 九州大学生体防御医学研究所年報. 35, pp.1-, 2021. Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University

バージョン :

権利関係 :



個 体 機 能 制 御 学 部 門
Department of Immunobiology and Neuroscience

免疫遺伝学分野

Division of Immunogenetics

教授：福井 宣規

Professor : Yoshinori Fukui, M.D., Ph.D

免疫系は「自己」と「非自己」を識別し、非自己成分（微生物、変異タンパク質）をすみやかに生体より排除し、その恒常性を維持するために構築されたシステムである。免疫系が真に生体にとって有益な監視システムとして機能するには、免疫系独自に進化した細胞高次機能の存在が不可欠である。例えば、外来異物やアポトーシス細胞の貪食、リンパ球やマクロファージの遊走、抗原認識といった細胞高次機能は免疫監視機構の根幹をなすものであり、それらはいずれも細胞骨格の再構築により巧妙に制御されている。私達はこれまでに免疫系特異的に発現する CDM ファミリー分子として DOCK2 を同定し、この分子がリンパ球や好中球の遊走や活性化において極めて重要な役割を演じることを明らかにした。本分野では、DOCK2 及びその関連分子を中心に、各種受容体刺激から細胞骨格再構築に至るシグナル伝達を解明し、免疫系の発生、分化、構築や機能発現における各シグナル伝達系の意義を明らかにすると共に、その理解に立脚して、自己免疫疾患、移植片拒絶など現代医学が抱える難治性疾患の新しい治療法、予防法を開発することを目指し、研究を進めている。

今年度から、廣谷賢一郎が博士課程大学院生として新たに研究室に参加した。

A. CDM ファミリー分子を介したシグナル伝達機構の解明とその機能解析

突然変異体を用いた遺伝学的解析より、*Caenorhabditis elegans*（線虫）において生殖巣の形成に重要な遠端細胞（distal tip cell）の移動に関与するいくつかの分子が同定されている。CED-5 もその 1 つであり、ヒトにおける DOCK180 および *Drosophila melanogaster*（ショウジョウバエ）における Myoblast City (MBC) と相同性を示すことより、これらの分子は現在その頭文字をとって CDM ファミリー分子とよばれている。これら分子はいずれも Rac の上流で機能することで細胞骨格の再構築に関与すると考えられており、細胞運動以外にも CED-5 はアポトーシス細胞の貪食、MBC は筋芽細胞の融合といった種々の細胞機能制御に関与することが知られている。私達は、マウス胸腺 cDNA ライブラリーよりこの CDM ファミリーに属する新しい遺伝子として *DOCK2* を単離し、ノックアウトマウスを作製することで、この分子が Rac 活性化を介してリンパ球の遊走および免疫シナプス形成を制御することを明らかにすると同時に (Nature 412:826-831, 2001; Immunity 19:119-129, 2003; Immunity 21: 429-441, 2004), その欠損によりアロ移植心臓の長期生着が可能になることを実証し (J. Exp. Med. 22:1121-1130, 2005), その低分子阻害剤として CPYPP を開発した (Chem. Biol. 19:488-497, 2012)。また、DOCK2 が好中球の遊走や活性酸素産生

において重要な役割を演じること実証すると共に (J. Cell Biol. 174:647-652, 2006; Science 324:384-387, 2009), アレルギー反応や形質細胞様樹状細胞による I 型インターフェロン産生の制御分子として機能することを明らかにした (Nature Immunol. 8:1067-1075, 2007; J. Exp. Med. 207:721-730, 2010). 哺乳類において, 全部で 11 種類の DOCK ファミリー分子が発現しているおり, これらはその構造や低分子量 G タンパク質に対する特異性から 4 群に分類される. 以上の知見をふまえ, 今年度は以下のような研究を行った.

a. DOCK1 とがん細胞の浸潤・転移・生存

Ras はヒトにおいて最初に同定されたがん遺伝子であり, その変異は, がん全体の 3 分の 1 に及ぶにも関わらず, いまだに有効な治療薬はない. 私達は, DOCK1 を発現できないように遺伝子操作したがん細胞では, Ras に変異があっても, 低栄養条件下での生存性および浸潤能が著しく低下することを見だし, DOCK1 の選択的阻害剤として TBOPP を開発した (Cell Rep. 19:969, 2017). TBOPP は, DOCK2 の機能を阻害することなく, DOCK1 に依存したがん細胞の浸潤やマクロピノサイトーシス, 低グルタミン環境下での生存応答をブロックした. さらに, TBOPP をマウスに投与すると, 変異 Ras を有するがん細胞の増殖および転移が抑制できることから, TBOPP は変異 Ras を有するがんを治療するための新たな創薬リードになると期待される. この知見を基に, DOCK1 欠損によって引き起こされるシグナル伝達に関して解析を進めた.

b. DOCK2 と免疫特権

免疫応答は生体にとって感染に対する必須の防御機構であるが, 過剰な免疫応答は, 正常組織を攻撃するリスクをもはらんでいる. このため, 生体には免疫監視機構が発動しにくい組織や空間が存在しており, これらを「免疫特権部位」と呼ぶ. 眼もその一つであり, これまでにいくつかのタンパク質が免疫回避に働くことが報告されているが, その詳細は依然として不明である. DOCK2 は, 主に免疫細胞に発現する Rac 特異的なグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) である. DOCK2 は白血球の活性化と遊走に不可欠な分子で, 免疫監視に重要な役割を演じており, その変異はヒトにおいて重篤な免疫不全症を引き起こす. 私達は, DOCK2 を介した Rac の活性化と白血球の遊走が, コレステロール硫酸 (CS) によって効果的に阻害されるが, コレステロールやその他の硫酸化ステロイドによっては阻害されないことを見出した. CS は DOCK2 の触媒ドメインに結合し, その Rac GEF 活性を抑制した. 質量分析を用いた定量解析の結果, CS は, 涙の油層を形成する脂質を供給するハーダー腺 (ヒトのマイボーム腺に相当) において, 最も大量に産生されることが明らかになった. コレステロールの硫酸化は, 硫酸基転移酵素 SULT2B1b を主体とし, 一部 SULT2B1a によっても仲介されるが, これらの酵素は, 同一遺伝子から選択的スプライシングによって生成される. 私たちは, *Sult2b1* 遺伝子を不活化することにより CS を産生できないように

したマウスでは、紫外線および抗原によって誘導される眼内炎症が増強され、それが、CSを含有する点眼剤を投与することで抑制されることを示した。したがって、CSは生体内に初めから存在する天然のDOCK2阻害因子であり、眼における免疫特権環境の形成に寄与していることが示唆された (Science Signaling 11:541, 2018)。この知見を基に、がん免疫におけるCSの役割に関して研究をスタートさせた。

c. DOCK8 とアトピー性皮膚炎 (IL-31 の産生制御機構)

アトピー性皮膚炎は国民の7~15%が罹患している国民病であり、「痒み」に伴い生活の質が著しく損なわれることから、その対策は急務となっている。IL-31は、アトピー性皮膚炎発症に重要な痒み物質で、主にヘルパーT細胞から産生されるが、その産生制御機構は不明であった。私達は、DOCK8を欠損した患者さんが重篤なアトピー性皮膚炎を発症することに着目し、このタンパク質の機能を解析した。その結果、DOCK8が発現できないように遺伝子操作したマウス (DOCK8欠損AND Tgマウス) では、IL-31の産生が著しく亢進し、重篤な皮膚炎を自然発症することを見いだした。さらにそのメカニズムを詳細に解析したところ、DOCK8の下流でEPAS1が作動し、IL-31産生を誘導していることを発見した。EPAS1はARNTという分子と協調して低酸素応答を制御することが知られているが、EPAS1によるIL-31の産生誘導にARNTは必要ではなく、別のSP1という分子が関与していた。一方、EPAS1は細胞質から核に移行して機能するが、DOCK8はMST1という分子を介して、EPAS1の核への移行を抑制していることを突き止めた。このことから、DOCK8の下流でEPAS1が作動し、EPAS1がIL-31産生に重要な役割を演じることが明らかになった。そこで、ヒトヘルパーT細胞におけるEPAS1の重要性につき検討を行った。アトピー性皮膚炎患者さんの血清では、健常者に比べてIL-31の濃度が高値であり、患者さんのヘルパーT細胞を刺激すると、大量のIL-31が産生される。しかしながら、このIL-31の産生は、EPAS1の発現を抑制することで、著減した。以上より、EPAS1およびそれに至る経路は、アトピー性皮膚炎の痒みを根元から断つための新たな創薬標的になることが期待される (Nature Commu. 8:13946, 2017)。そこで、EPAS1をinducibleに発現するIL-31レポーターシステムを構築し、EPAS1-IL-31経路を標的とした化合物スクリーニングを実施した。その結果、T細胞のviabilityを損なうことなく、1-2 μ Mという比較的低用量で、DOCK8欠損マウスのヘルパーT細胞における*IL31*の遺伝子発現を産生を抑制する化合物を同定した。同様の抑制効果は、ヒトアトピー患者さん由来のヘルパーT細胞においても認められた。約250の類縁化合物を合成し、構造活性相関を検討すると共に、その情報に基づき、より薬効の強い化合物の開発に成功した。

d. DOCK8 と腸管免疫

M細胞は、小腸パイエル板に存在する特殊な抗原取り込み細胞である。私達は、DOCK8欠損

マウスではM細胞が著減し、経口免疫に伴う抗原特異的IgA抗体産生が消失することを見いだした。このメカニズムを詳細に解析することで、がんの転移を促進するタンパク質として知られているS100A4が、M細胞への成熟・分化に必要不可欠であることを発見した。実際、DOCK8を欠損したマウスでは、遊走障害の結果、パイエル板のSED領域（上皮下ドーム領域）内でのS100A4産生細胞が著減し、その結果M細胞の成熟が障害された。小腸オルガノイド培養系にS100A4タンパク質を添加すると成熟M細胞への分化が促進されたが、一方*S100a4*遺伝子を欠損させたマウスでは成熟M細胞の形成が障害された。以上のことから、M細胞の成熟・分化を制御する新規因子を明らかにした(Cell Rep. 29:2823, 2019)。加えて新たに、DOCK8欠損により腸管における3型自然リンパ球が著減することを見出し、そのメカニズムの一端を解明した。

e. DOCK8 DHR-1 ドメインの機能解析

DOCKファミリー分子は、いずれもDHR-1ドメイン及びDHR-2ドメインという構造を有しており、DHR-2ドメインがGTP-GDP交換反応を触媒するのに対して、DHR-1ドメインは局在制御に関わっていると考えられている。私たちは、これまでにDOCK2のDHR-1ドメインがPI(3,4,5)P3と会合し、形質膜への移行を制御していることを明らかにしているが(J. Cell Biol. 174:647-652, 2006; Science 324:384-387, 2009)、DOCK8 DHR-1ドメインの機能は不明であった。今年度私たちは、DOCK8 DHR-1ドメインがPI(4,5)P2と特異的に会合し、この会合が樹状細胞の遊走に重要な役割を演じることを実証した。

業績目録

原著論文

1. Koga T., Sasaki F., Saeki K., Tsuchiya S., Okuno T., Ohba M., Ichiki T., Iwamoto S., Uzawa H., Kitajima K., Meno C., Nakamura E., Tada N., Fukui Y., Kikuta J., Ishii M., Sugimoto Y., Nakao M., Yokomizo T. (2020, Oct)
Expression of leukotriene B4 receptor 1 defines functionally distinct DCs that control allergic skin inflammation.
Cell Mol Immunol. doi: 10.1038/s41423-020-00559-7. *in press*.
2. Sakurai T., Kukimoto-Niino M., Kunimura K., Yamane N., Sakata D., Aihara R., Yasuda T., Yokoyama S., Shirouzu M., Fukui Y., Uruno T. (2021, Feb)
A conserved PI(4,5)P2-binding domain is critical for immune regulatory function of DOCK8.
Life Sci Alliance. 4:e202000873.
3. Aihara R., Kunimura K., Watanabe M., Uruno T., Yamane N., Sakurai T., Sakata D., Nishimura F., Fukui Y. (2021, Mar)

DOCK8 controls survival of group 3 innate lymphoid cells in the gut through Cdc42 activation.

Int Immunol. 33:149-160.

4. Kamikaseda Y., Uruno T., Kunimura K., Harada A., Saiki K., Oisaki K., Sakata D., Nakahara T., Nakahara-Kido M., Kanai M., Nakamura S., Ohkawa Y., Furue M., Fukui Y. (2021, Mar)
Target inhibition of EPAS1-driven IL-31 production by a small-molecule compound.
J Allergy Clin Immunol. *in press.*

学会発表

1. 福井 宣規, 坂田 大治, 中原 剛士, 古江 増隆. (2020, 12/22-24)
IL-31 の産生と痒み伝達の分子基盤.
第 50 回日本皮膚免疫アレルギー学会総会学術大会, 高知.

脳機能制御学分野

Division of Neurofunctional Genomics

教授：中別府 雄作

Professor : Yusaku Nakabeppu, D.V.M., D. Sc.

生物にとって、その遺伝情報を担うゲノム DNA を細胞から細胞へ、親から子へと正確に伝え維持することは最も基本的な生物学的機能であるが、ゲノム DNA やその前駆体であるヌクレオチドは、酸素呼吸の過程で必然的に発生する活性酸素や生体防御のために生体が能動的に産生する活性酸素によって酸化される危険に常に曝されている。活性酸素に曝された DNA やヌクレオチドは様々な酸化的化学修飾を受けるが、このような酸化損傷は修復、除去されないと突然変異を引き起こすことで細胞のがん化の原因となり、あるいは細胞死を引き起こすことでさまざまな変性疾患の原因となる。

本分野では、活性酸素による非増殖性細胞の障害として「脳・神経細胞死」に、また増殖性細胞の障害として「突然変異と発がん」、さらに「神経新生の異常」に注目して「活性酸素によるゲノム障害とその防御機構」の解明を目指している。神経細胞はその個体の生涯を通して生存し機能する必要があるが、分裂能を欠くため加齢に伴う活性酸素等による障害により変性脱落する運命にある。そのため成体においても神経幹細胞からの新たな神経細胞の供給など神経回路網を保持する機構が幾重にも用意されていると考えられる。成体脳における神経新生は脳虚血や神経興奮毒性などに伴い脳障害が引き起こされた際に著しく亢進する。さらに本分野では、脳における酸化ストレス応答遺伝子として前初期遺伝子群の *Jun*, *Fos* ファミリー遺伝子とその下流で発現が制御される遺伝子群に注目して、「成体脳における脳・神経細胞の運命決定機構」の制御機構の解明を進めている。

令和2年度の人事異動は次の通りであった。3月に大学院生の沖田絢子が学位取得の上博士課程を修了した。

A. MTH1 と OGG1 は協調して脳ゲノムにおける 8-oxoguanine の蓄積を低く抑え、アルツハイマー病の進展を抑制する

主要な酸化塩基である 8-オキシグアニン (8-oxoG) は、アルツハイマー病 (AD) 患者の病態の進行に伴って脳ゲノムに高度に蓄積することが知られている。我々は、ゲノム DNA への 8-oxoG の蓄積は MTH1 と OGG1 によって低く抑えられることを明らかにしてきた。MTH1 は 8-oxo-dGTP 分解活性を有し、8-oxo-dGTP を 8-oxo-dGMP に加水分解することで 8-oxo-dG の DNA への取り込みを回避する。OGG1 は 8-oxoG DNA グリコシラーゼ活性により、DNA 中のシトシンに対合している 8-oxoG の塩基除去修復を開始し、DNA 中の 8-oxoG の蓄積を最小限に抑える。MTH1 と OGG1 の発現レベルが、孤発性 AD 患者

の脳で顕著に低下していることから、MTH1 と OGG1 の機能低下が AD 患者脳における 8-oxoG の蓄積を引き起こし、AD 病態の進行に関与する可能性が示唆される。

我々は、脳ゲノムにおける 8-oxoG の蓄積が AD の発症と進展にどのように関与しているかを解明する目的で、3xTg-AD モデルマウスに *Mth1* と *Ogg1* 遺伝子の二重欠損を導入した新しい AD マウスモデル (ADH・TO-DKH) を樹立し、解析した。ADH・TO-DKH マウス脳では、4~5 ヶ月齢で核ゲノムへの 8-oxoG 蓄積が 3xTg-AD マウス脳に比べて顕著に増加し、程度は低いもののミトコンドリアゲノムへの蓄積も増加していた。4~5 ヶ月齢の 3xTg-AD マウスでは認知機能障害や AD 病理像はまだ認められないが、ADH・TO-DKH マウスは顕著な認知機能障害を示し、海馬と大脳皮質においてミクログリアの活性化と神経細胞の脱落を認めた。ADH・TO-DKH マウスにミノサイクリンを投与しミクログリアの活性化を阻害すると、ミクログリアの核ゲノムにおける 8-oxoG の蓄積が顕著に低下し、ミクログリオシスの軽減とともに神経細胞脱落も抑えられた。海馬における遺伝子発現のプロファイリングから、MTH1 と OGG1 は、トランスサイレチンをはじめとする Aβ と Tau に起因する AD 病態の進行を抑えるさまざまな遺伝子の発現誘導を介して、AD 病態の進行を効率的に抑制することが明らかになった。今回の発見は、脳ゲノムにおける 8-oxoG の蓄積を抑えることで AD の発症や進展をコントロールできることを示しており、新たな治療法の開発が期待される。

B. MUTYH の欠損は非アルコール性肝炎マウスモデルにおける肝がんの発症に関与する

非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) 患者の肝がん発生のメカニズムは不明であり、NASH 関連肝細胞がんの予防を目的とした対策はまだ確立されていない。酸化ストレスは、肝臓がんを含むさまざまながんの発症の危険因子の 1 つであると考えられている。以前我々は、酸化ストレスによって引き起こされた DNA 損傷を修復する酵素の 1 つである MUTYH の機能不全が C 型肝炎ウイルスによって誘発される肝発がんに関与することを報告した。しかしながら、NASH 患者の肝発がんにおける MUTYH の機能不全の関与についてはこれまで報告はない。そこで我々は、NASH 関連肝発がんにおける MUTYH の機能不全の関与を検討した。*Mutyh* 遺伝子のヘテロ (*Mutyh*^{+/-}) およびホモ (*Mutyh*^{-/-}) 欠損マウスに、高脂肪・高コレステロール (HF・HC) 食または HF・HC + 高鉄食を給餌し、体重、血清 ALT レベル、肝鉄濃度、肝腫瘍の発生率、および肝臓の組織病理像を比較解析した。さらに、マイクロアレイを用いて、肝腫瘍を発症しなかった野生型マウスと肝腫瘍を発症した *Mutyh* 欠損マウスの非腫瘍部の肝組織における遺伝子発現プロファイルを比較解析した。HF・HC 食給餌群と HF・HC + 高鉄食給餌群においてはコントロール群よりも有意に体重と血清 ALT レベルが高かった。肝腫瘍の発生率は、他のグループよりも HF・HC + 高鉄食を給餌した *Mutyh*^{-/-} マウスで有意に高か

った。免疫組織化学的な解析から、HF・HC + 高鉄食を給餌したマウスにおいて酸化ストレスマーカーの有意に高い発現が明らかになり、*Mutyh*^{-/-}マウスでの酸化的 DNA 損傷修復欠損の結果として肝腫瘍が発症することが示唆された。Gene set enrichment analysis (GSEA) から、*Mutyh* 欠損マウスの肝組織における Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路の活性化が明らかになり、Wnt シグナル伝達の標的遺伝子である *c-Myc* の発現増加が確認された。今回の発見から、MUTYH の機能欠損が NASH 患者の肝発がんに関連することが強く示唆される。

本研究は、札幌医科大学の加藤淳二教授のグループとの共同研究の成果である。

C. MUTYH欠損はブレオマイシンで誘導される肺線維症を軽症化させる

特発性肺線維症 (IPF) は、病因が不明で生存期間が限られている進行性の不可逆性肺疾患である。IPF の発症率と有病率は加齢とともに大幅に増加するが、これは加齢に伴う酸化的 DNA 損傷の蓄積に関連すると考えられている。MUTYH は鋳型 DNA 中の 8-oxoG に誤って取り込まれたアデニンを切除し、塩基除去修復経路により突然変異を抑える。本研究では肺線維症発症における MUTYH の役割を明らかにする目的で、ブレオマイシン誘発肺線維症の発症と進展における MUTYH 欠損の影響を解析した。

予期せぬことに、MUTYH 欠損マウスでは肺線維症の病変が野生型マウスよりも顕著に軽度であった。この結果は、モデル動物の肺組織における TGF- β 1 と 2 つの線維症マーカーである α -SMA とビメンチンのタンパク質レベルの解析結果からも確認された。MUTYH 欠損マウスでは、肺組織細胞のゲノム DNA への DNA 一本鎖切断 (SSB) の蓄積が低下するとともにミトコンドリア DNA が安定に維持されていた。さらに、ブレオマイシン処理した MUTYH 欠損マウスの肺組織でミトコンドリアの出芽の調節に関わる DRP1 の発現とマイトファジーの制御に関わる PINK1 の発現増加が検出され、肺上皮細胞のアポトーシスが減少する可能性が示唆された。今回の結果は、MUTYH の欠損が重度の酸化ストレス下で肺組織の保護反応を誘発する可能性を示唆している。

本研究は、Nanjing University School of Medicine, Nanjing, China の Yaping Wang 博士のグループとの共同研究である。

D. イノシン三リン酸分解酵素 (ITPA) の欠損は難病の早期乳児てんかん性脳症 (EIEE35) の原因である

イノシン三リン酸ピロホスファターゼ (ITPA) は、イノシン三リン酸 (ITP) およびその他の脱アミノ化プリンヌクレオシド三リン酸をヌクレオシドーリン酸に加水分解する。近年、ヒトでは *ITPA* 欠損変異がてんかん発作、小頭症、および発達遅滞を伴う重度の脳症を引き起こすことが報告されてきた。

本研究では、神経幹細胞特異的コンディショナル *Itpa*-ノックアウト (*Itpa*-cKO) マ

ウスを樹立し、ITPA 欠損が神経系に及ぼす影響を解析した。 *Itpa*-cK0 マウスは成長遅延を示し、出生後 3 週間以内に死亡した。 *Itpa*-cK0 マウスでは小頭症は観察されなかったが、雌のみで副腎形成不全が観察された。我々は、 *Itpa*-cK0 マウスが尾懸垂時に四肢を前面で交差させる表現形を示し、さらに自発的なてんかん発作と聴原性てんかん発作を示すことを見出した。さらに、脳スライスを用いた嗅内皮質神経細胞からの全細胞パッチクランプ記録により、コントロールマウスと比較して *Itpa*-cK0 マウスにおける静止膜電位の上昇、活動電位発火の増加、自発的ミニチュア興奮性シナプス後電流の頻度と振幅の増加、そしてミニチュア抑制性シナプス後電流の頻度の増加を明らかにした。神経細胞内に蓄積した ITP またはその代謝物（環状イノシン酸など）、あるいはイノシンを高度に蓄積した RNA が、神経細胞の脱分極および過興奮を引き起こし、てんかん発作を含む ITPA 欠損マウスの表現型を誘発する可能性が示唆される。

本研究は、名古屋大学の豊國伸哉教授、日本大学の林良憲准教授、安田女子大学の中西博教授との共同研究である。

E. PCBP1とPCBP2は高度に酸化されたRNAに特異的に結合し、酸化ストレスによるアポトーシスを拮抗的に制御する

ポリ (C) 結合タンパク質 (PCBP) ファミリーのメンバーである PCBP1 は、高度に酸化された RNA に結合する能力を持っているため、酸化ストレスに対する細胞応答に関与し、アポトーシスの誘導を促進的に制御する。PCBP ファミリーには、PCBP1~4 および hnRNPK の 5 つのメンバーが存在するが、それぞれが同様の役割を果たすかどうかは不明であった。本研究では、まず隣接した 2 つの 8-oxoG 残基を持つ RNA 鎖に対する結合能を 5 つのメンバーで比較検討した。

我々は、PCBP2 のみが PCBP1 と同様に 2 つの 8-oxoG 残基をもつ RNA に選択的に結合することを明らかにした。対照的に、PCBP3、PCBP4 および hnRNPK は、8-oxoG 残基の有無にかかわらず RNA に結合し、8-oxoG をもつ RNA への結合がわずかに増加した。PCBP2 の保存された RNA 結合ドメインに変異を導入すると、8-oxoG をもつ RNA への結合能は失われた。遺伝子編集によって PCBP2 遺伝子を破壊した変異型 HeLa S3 株は、酸化ストレス下でカスパーゼ 3 活性と PARP1 切断の増加を伴い、アポトーシスの亢進を示した。このような表現形は、野生型の PCBP2 の発現によって抑制されたが、結合活性を欠く変異型 PCBP2 では抑制されなかった。対照的に、PCBP1 欠損細胞は、酸化ストレス下で野生型細胞よりも顕著に低いカスパーゼ 3 活性と PARP1 の切断を示し、アポトーシスも顕著に抑制された。以上の結果は、PCBP2 は PCBP1 と同様に高度に酸化された RNA に結合するが、PCBP2 は PCBP1 に拮抗して酸化ストレス下でアポトーシスを抑制する可能性が示唆された。

本研究は、福岡歯科大学の石井健士博士のグループとの共同研究である。

業績目録

原著論文

1. Oka S., Leon J., Sakumi K., Abolhassani N., Sheng Z., Tsuchimoto D., LaFerla F.M. and Nakabeppu Y. (2021, Mar)
MTH1 and OGG1 maintain a low level of 8-oxoguanine in Alzheimer's brain, and prevent the progression of Alzheimer's pathogenesis.
Sci Rep. 11:5819.
2. Sakamoto H., Miyanishi K., Tanaka S., Ito R., Hamaguchi K., Sakurada A., Sato M., Kubo T., Osuga T., Murase K., Takada K., Nakabeppu Y., Kobune M., Kato J. (2021, Feb)
MUTYH is associated with hepatocarcinogenesis in a non-alcoholic steatohepatitis mouse model.
Sci Rep. 11:3599.
3. Hu Y., Yang C., Amorim T., Maqbool M., Lin J., Li C., Fang C., Xue L., Kwart A., Fang H., Yin M., Janocha A.J., Tsuchimoto D., Nakabeppu Y., Jiang X., Mejia-Garcia A., Anwer F., Khouri J., Qi X., Zheng Q.Y., Yu J.S., Yan S., LaFramboise T., Anderson K.C., Herlitz L.C., Munshi N.C., Lin J., Zhao J. (2021, Feb)
Cisplatin-mediated upregulation of APE2 binding to MYH9 provokes mitochondrial fragmentation and acute kidney injury.
Cancer Res. 81:713-723.
4. Akamine S., Okuzono S., Yamamoto H., Setoyama D., Sagata N., Ohgidani M., Kato T.A., Ishitani T., Kato H., Masuda K., Matsushita Y., Ono H., Ishizaki Y., Sanefuji M., Saitsu H., Matsumoto N., Kang D., Kanba S., Nakabeppu Y., Sakai Y., Ohga S. (2020, Dec)
GNAO1 organizes the cytoskeletal remodeling and firing of developing neurons.
FASEB J. 34:16601-16621.
5. Koga Y., Tsuchimoto D., Hayashi Y., Abolhassani N., Yoneshima Y., Sakumi K., Nakanishi H., Toyokuni S., Nakabeppu Y. (2020, Nov)
Neural stem cell-specific ITPA deficiency causes neural depolarization and epilepsy.
JCI Insight. 5:e140229.
6. Sun Q., Chen J., Xu L., Kang J., Wu X., Ren Y., Nakabeppu Y., Wang Y. (2020, Oct)
MUTYH Deficiency Is Associated with Attenuated Pulmonary Fibrosis in a Bleomycin-Induced Model.

Oxid Med Cell Longev. 2020:4828256.

7. Ishii T., Igawa T., Hayakawa H., Fujita T., Sekiguchi M., Nakabeppu Y. (2020, Aug)
PCBP1 and PCBP2 both bind heavily oxidized RNA but cause opposing outcomes, suppressing or increasing apoptosis under oxidative conditions.
J Biol Chem. 295:12247-12261.
8. Kvandova M., Filippou K., Steven S., Oelze M., Kalinovic S., Stamm P., Frenis K., Vujacic-Mirski K., Sakumi K., Nakabeppu Y., Bagheri Hosseinabadi M., Dvinova I., Epe B., Munzel T., Kroller-Schon S., Daiber A. (2020, Apr)
Environmental aircraft noise aggravates oxidative DNA damage, granulocyte oxidative burst and nitrate resistance in *Ogg1*(-/-) mice.
Free Radic Res. 54:280-292.

総説

1. Murakami Y., Nakabeppu Y., Sonoda K.H. (2020, Sep)
Oxidative Stress and Microglial Response in Retinitis Pigmentosa.
Int J Mol Sci. 21:7170.
2. Nakabeppu Y. (2020, Dec)
アルツハイマー病を脳の糖尿病として捉える
Medical Science Digest. 46:8-21.

学会発表

1. 中別府 雄作. (2021, 3/4-5)
アルツハイマー病とその危険因子：糖尿病，酸化ストレス，性差.
第一回レドックス R&D 戦略委員会 公開シンポジウム ―レドックスホメオスタシスと認知症・生活習慣病― (Online).
2. 土本 大介. (2020, 2/2)
神経幹細胞特異的イノシン三リン酸分解酵素ノックアウトマウスは脳神経細胞脱分極とてんかん発作を示す.
2020 年度先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会(東京国際フォーラムと Web 配信ハイブリッド開催).
3. Guianfranco Mazzei, Nona Abolhassani, Ryohei Ikegami, Naoki Haruyama, Kunihiko Sakumi, Takashi Saito, Takaomi C. Saido, Yusaku Nakabeppu. (2021, 1/11-13)
High-fat diet aggravates the hippocampal Alzheimer disease pathology in the *App*^{NL-F/NL-F} mouse model.
SfN Global Connectome (A virtual event) .

4. Yuri Mizuno, Takashi Saito, Takaomi C. Saido, Yusaku Nakabeppu. (2020, 12/2-4)
Deficiency of MTH1 and/or OGG1 increases accumulation of 8-oxoguanine in brain of *App*^{NL-G-F} knock-in mouse model of Alzheimer's disease, accompanied by accelerated microgliosis and anti-anxiety behavior.
第 43 回日本分子生物学会年会 (MBSJ2020 Online) .
5. 沖田 絢子, 村上 祐介, 下川 翔太郎, 池田 康博, 中別府 雄作, 園田 康平. (2020, 10/2-4)
NMDA 網膜神経節細胞障害モデルにおけるゲノム酸化損傷とその応答機構の役割.
第 31 回日本緑内障学会 (Web 配信による開催).
6. 中別府 雄作. (2020, 9/16)
活性分子種による核酸の化学修飾に起因する病態とその防御機構.
日本遺伝学会 第 92 回大会 (中止, プログラム・予稿集の発行のみ).
7. 土本 大介, 古賀 祐一郎, 林 良憲, アボルハッサニ ノナ, 米嶋 康臣, 作見 邦彦, 中西 博, 豊國 伸哉, 中別府 雄作. (2020, 7/29-8/1)
Neural stem cell-specific *Itpa* knockout causes depolarization, epileptic seizure and early death in mice.
第 43 回日本神経科学大会 (Stream 配信).

病態生理学分野

Division of Pathophysiology

准 教 授：今野 大治郎

Associate Professor : Daijiro Konno, Ph.D.

病態生理学分野では、効果的な治療が存在しない病態や原因不明の疾患に対する新規治療法の確立を研究課題とし、マウスを中心とした疾患モデル動物の解析により病態形成に関わる分子や細胞、炎症反応や線維化の役割などについて研究を行っている。特にここ数年は、中枢神経系における各種外傷後の修復機構に共通する知見やグリア細胞の役割に焦点を当て、難治性疾患の代表である脊髄損傷に対する新規治療法の開発を中心に実験を行なっている。またこれらの研究と並行して、中枢神経系の発生・発達に焦点を当て、神経幹細胞の分化状態や位置情報を制御する分子・細胞メカニズムの解明を試みている。これらの研究は、幹細胞移植を用いた再生医療研究における基盤技術の確立に欠かせないものであり、当分野の目指す新規治療法開発の一翼を担うものと期待される。

令和2年度は岡田誠司（教授）、今野大治郎（准教授）、田中正剛（助教）の3名の教員に加え、大学院博士課程学生5名、技能補佐員1名、事務補佐員1名の計10名により研究・教育活動を行った。また令和2年12月末で岡田が退職したことから、その後は今野を中心として研究・教育体制を維持した。

令和2年度は革新的先端研究開発支援事業（AMED-PRIME）（岡田）、科研費基盤研究B（岡田）、新学術領域研究（今野）、基盤研究C（今野）、若手研究（田中）などの補助金による支援を受けた。

A. 慢性期損傷脊髄におけるミクログリアとアストロサイトの相互作用

脊髄損傷後慢性期の脊髄では、損傷部周辺にグリア瘢痕が形成されて軸索再生が阻害されているため、運動機能回復が起こらない。これまでに我々は、脊髄損傷後亜急性期マウスの脊髄内に抗 $\beta 1$ インテグリン抗体を投与することで、アストロサイトの瘢痕化が阻害され、脊髄損傷後慢性期マウスの運動機能回復が起こることを報告した（Nat Med 2017）。そこで今回は、抗 $\beta 1$ インテグリン抗体が、グリア瘢痕、特にミクログリアとアストロサイト間の相互作用に与える影響について詳細に解析した。その結果、in vivo 及び in vitro のいずれにおいても、損傷後亜急性期のアストロサイトはグリア瘢痕内のミクログリアに作用し、炎症性サイトカイン $\text{TNF}\alpha$ の発現を亢進させること、また抗 $\beta 1$ インテグリン抗体によってミクログリアの $\text{TNF}\alpha$ 発現が有意に抑制されることを見出した（JNI 2021）。本研究結果は、脊髄損傷後慢性期の脊髄における炎症を有意に抑制できる効果も示していることから、近年注目されている損傷後慢

性期患者に対する iPS 細胞由来幹細胞移植などの治療法と併用することで、治療効果の相乗作用や、詳細なメカニズムの解明に寄与することが期待される。

B. 慢性期損傷脊髄での痙攣性と下肢機能

慢性期脊髄損傷に於いては、体幹や下肢の不随意的な痙攣により日常生活活動(ADL)が損なわれることがしばしば認められるため、皮下ポンプによる持続的な GABA 作動薬バクロフェンの持続髄注療法が広く行われている。これまで痙攣性は単に ADL を障害する中枢神経外傷後の合併症と認識されていたが、我々はバクロフェン療法により一過性の筋力低下や立位保持困難を呈する症例を散見したため、痙攣の機能的な利点を証明しようと試みた。まず、車椅子からの自立起立や平行棒歩行が可能であった慢性期脊髄損傷患者に minimum dose のバクロフェンを投与した結果、一過性の起立不能を呈する症例を提示した。次に、正常マウスにおいてはバクロフェン投与による下肢運動機能への影響は見られなかったことを確認した後、マウス脊髄損傷モデル慢性期にバクロフェンを投与した結果、痙攣の改善とともに歩行機能が低下することから、痙攣が歩行機能の維持に寄与していることを証明した (Spinal Cord 2020)。これらの結果は、脊髄損傷患者の一部では痙攣を利用して ADL を維持していることを示すものであり、徒に痙攣を軽減させるのみが患者の ADL 向上へ繋がるものではないことを提唱している。

C. 胎生期大脳神経幹細胞にける位置情報制御の分子メカニズム

哺乳類における大脳皮質の発生過程において、神経幹細胞は“大脳皮質”としての運命 (アイデンティティ) を獲得した後、非対称細胞分裂を繰り返すことで適切な種類のニューロンを、適切な数、適切な場所に正確に生み出すことが知られている。今回我々は、胎生期大脳皮質神経幹細胞に特異的に発現する Zinc finger 型転写因子である Dmrt3, Dmrt2, Dmrt1 が相互補完的に機能し、大脳神経幹細胞において「位置情報」に依存した細胞アイデンティティの制御分子として機能することを見出した (Development 2019, Dev Dyn 2020)。これらの結果は、大脳皮質神経幹細胞における Dmrt ファミリー転写因子群の発現獲得が、哺乳類における大脳皮質獲得の主要因であることを意味している。そこで我々は、ES 細胞を用いた大脳オルガノイド培養法を用いた解析により Dmrt 遺伝子群の発現を惹起するメカニズムを探索した。その結果、一過性 Wnt シグナルが神経外胚葉細胞に“大脳皮質”神経幹細胞としての細胞記憶を授けることを見出した (投稿準備中)。また、これらオルガノイド培養法と少数細胞でのエピゲノム解析を可能とする Omni-ATAC-seq 法を組み合わせることにより、大脳皮質神経幹細胞における遺伝子発現の記憶を形成・維持するために必須のゲノム領域を見出した。これらの成果は、幹細胞が如何にして組織特異的なアイデンティティを

獲得・維持するのかという幹細胞制御研究における最重要課題の解明に繋がるものであり、今後の展開が期待される。

業績目録

原著論文

1. Okuno H., Ogino H., Ihara E., Nishioka K., Tanaka Y., Chinen T., Kohjima M., Oono T., Tanaka M., Goya T., Fujimori N., Iboshi Y., Gotoda T., Ogawa Y. (2021, Feb)
Discriminant equation using mucosally expressed cytokines and transcription factor for making definite diagnosis of inflammatory bowel disease unclassified.
BMC Gastroenterol. 21(1):73.
2. Suzuki H., Kohjima M., Tanaka M., Goya T., Itoh S., Yoshizumi T., Mori M., Tsuda M., Takahashi M., Kurokawa M., Imoto K., Tashiro S., Kuwano A., Kato M., Okada S., Nakamuta M., Ogawa Y. (2021, Feb)
Metabolic Alteration in Hepatocellular Carcinoma: Mechanism of Lipid Accumulation in Well-Differentiated Hepatocellular Carcinoma.
Can J Gastroenterol Hepatol. 2021:8813410.
3. Yoshizaki S., Tamaru T., Hara M., Kijima K., Tanaka M., Konno D.J., Matsumoto Y., Nakashima Y., Okada S. (2021, Jan)
Microglial inflammation after chronic spinal cord injury is enhanced by reactive astrocytes via the fibronectin/ β 1 integrin pathway.
J Neuroinflammation. 18(1):12. doi: 10.1186/s12974-020-02059-x.
4. Matsumoto Y., Saiwai H., Iida K., Okada S., Endo M., Setsu N., Fujiwara T., Kawaguchi K., Nakashima Y. (2021, Jan)
Shape Factor of the Spinal Cord: A Possible Predictor of Surgical Outcome for Intradural Extramedullary Spinal Tumors in the Thoracic Spine.
Global Spine J. 2192568220982571. doi: 10.1177/2192568220982571. *in press.*
5. Saiwai H., Okada S., Hayashida M., Harimaya K., Matsumoto Y., Kawaguchi K.I., Iida K.I., Kobayakawa K., Yokota K., Maeda T., Tsuchiya K., Arizono T., Saito T., Nakaie K., Iwamoto Y., Nakashima Y. (2021, Jan)
Long-term outcomes of spinal meningioma resection with outer layer of dura preservation technique.
J Clin Neurosci. 83:68-70.
6. Hata K., Suetsugu K., Egashira N., Makihara Y., Itoh S., Yoshizumi T., Tanaka M., Kohjima M.,

Watanabe H., Masuda S., Ieiri I. (2020, Dec)

Association of lenvatinib plasma concentration with clinical efficacy and adverse events in patients with hepatocellular carcinoma.

Cancer Chemother Pharmacol. 86(6):803-813.

7. Gotoh N., Saito Y., Hata S., Saito H., Ojima D., Murayama C., Shigeta M., Abe T., Konno D., Matsuzaki F., Suzuki T., Yamamoto T. (2020, Jul)

Amyloidogenic processing of amyloid β protein precursor (APP) is enhanced in the brains of alcadein α -deficient mice.

J Biol Chem. 295(28):9650-9662.

8. Xu L., Ihara K.I., Yoshimura S., Konno D., Tachibana A., Nakanishi T., Tachibana T. (2020, Jun)
Generation of the Rat Monoclonal Antibody Against the Extracellular Domain of Human CD63 by DNA Immunization.

Monoclon Antib Immunodiagn Immunother. 39(3):74-76.

9. Kikkawa T., Sakayori N., Yuuki H., Katsuyama Y., Matsuzaki F., Konno D., Abe T., Kiyonari H., Osumi N. (2020, Jun)

Dmrt genes participate in the development of Cajal-Retzius cells derived from the cortical hem in the telencephalon.

Dev Dyn. 249(6):698-710.

10. Yoshizaki S., Yokota K., Kubota K., Saito T., Tanaka M., Konno DJ., Maeda T., Matsumoto Y., Nakashima Y., Okada S. (2020, May)

The beneficial aspects of spasticity in relation to ambulatory ability in mice with spinal cord injury.

Spinal Cord. 58(5):537-543.

11. Yahiro K., Matsumoto Y., Yamada H., Endo M., Setsu N., Fujiwara T., Nakagawa M., Kimura A., Shimada E., Okada S., Oda Y., Nakashima Y. (2020, May)

Activation of TLR4 signaling inhibits progression of osteosarcoma by stimulating CD8-positive cytotoxic lymphocytes.

Cancer Immunol Immunother. 69(5):745-758.

学会発表

1. 井浦 広貴, 岡田 誠司, 畑 和宏, 田丸 哲弥, 中島 康晴. (2020, 10/15-16)
関節拘縮に於けるペリオスチンの役割.
第 35 回日本整形外科学会基礎学術集会, 東京. (口頭)
2. 春田 陽平, 小野 玄太郎, 井浦 広貴, 田丸 哲弥, 畑 和宏, 岡田 誠司, 中島 康晴. (2020, 10/15-16)

圧挫症候群（クラッシュシンドローム）の早期診断におけるペントラキシン 3（PTX3）の有用性.

第 35 回日本整形外科学会基礎学術集会，東京．（ポスター）

3. 田丸 哲弥，岡田 誠司，畑 和宏，井浦 広貴，春田 陽平，中島 康晴． (2020, 10/15-16)
アストロサイト移植による慢性期グリア瘢痕の病態解明．

第 35 回日本整形外科学会基礎学術集会，東京．（口頭）

4. Konno D. (2020, 5/20-22)

Transient activation of Wnt signaling confers epigenetic memory of cell identity to neural stem cells in developing cerebral cortex.

53rd JSDB meeting (2020 JSDB-APDBN meeting), Kumamoto, Japan. (poster)