

公益財団法人  
薬理研究会

# 助成研究報告

第 61 集

2023 年度

## 序

本財団では、1999 度から「薬物治療に関する基礎的研究並びに実地応用上の研究」をテーマに研究助成者を公募してきました。

2023 年度には 41 件の応募をいただき、本財団の選考委員会において厳正に審査を行った結果、次の 7 名の研究者に研究助成金を支給しました。

慶應義塾大学 医学部先端医科学研究所	籠谷 勇紀	教授
東京大学 医学部附属病院	田中 真司	助教
広島大学 大学院医系科学研究科	中津 祐介	准教授
東京大学 医学部附属病院	早河 翼	講師
島根大学 医学部医学科	藤田 幸	教授
東京大学 大学院薬学系研究科	松本 信圭	助教
横浜市立大学 大学院生命医科学研究科	李 勇燦	助教

ここに、上記 2023 年度に研究助成を受けられた方々による研究成果を、助成研究報告第 61 集として刊行するものです。なお、2022 年度研究助成を受けられた筑波大学の佐々木哲也助教の研究成果は、研究期間延長のため本集に併せて掲載します。

本財団の研究助成によって、薬理学、薬学に係わる基礎的研究が着実に進められていることは、誠に悦ばしいことであります。

研究助成を受けられた方々におかれては、本財団の設立の趣旨を体し一層のご精進を期待しております。

2024 年 12 月

公益財団法人 薬理研究会  
理事長 飯野 正光

## 目 次

- |   |   |        |                                       |      |
|---|---|--------|---------------------------------------|------|
| 1 | 細胞による薬剤製造・分泌を活用した抗体医薬品の局所送達法の開発         | 籠谷 勇紀  | 慶應義塾大学<br>医学部先端医科学研究所<br>がん免疫研究部門     | p.1  |
| 2 | インターロイキン 17A を標的とする自閉スペクトラム症治療薬の探索      | 佐々木 哲也 | 筑波大学医学医療系<br>生命医科学域<br>解剖学・神経科学       | p.4  |
| 3 | 神経伝達物質を標的とした慢性腎臓病新規治療法の開発               | 田中 真司  | 東京大学<br>医学部附属病院<br>腎臓・内分泌内科           | p.6  |
| 4 | プロリン異性化酵素 Pin1 を介した NASH 発症機序の解明と治療法の創成 | 中津 祐介  | 広島大学<br>大学院医系科学研究科<br>医化学講座           | p.10 |
| 5 | ムチン・糖鎖変化を有する胃癌に特徴的な増殖機構の解明と新規標的治療開発     | 早河 翼   | 東京大学<br>医学部附属病院<br>消化器内科              | p.13 |
| 6 | 神経変性疾患のメカニズム解明と薬物治療法開発への応用              | 藤田 幸   | 島根大学<br>医学部医学科<br>発生生物学               | p.18 |
| 7 | メラトニン受容体作動薬による海馬の神経活動の調節機構の解明           | 松本 信圭  | 東京大学<br>大学院薬学系研究科<br>薬品作用学            | p.21 |
| 8 | クライオ電子顕微鏡を用いた尿酸輸送体の構造薬理学の開拓             | 李 勇燦   | 横浜市立大学<br>大学院生命医科学研究科<br>生体膜ダイナミクス研究室 | p.26 |

## 1. 細胞による薬剤製造・分泌を活用した抗体医薬品の局所送達法の開発

籠谷 勇紀

慶應義塾大学医学部先端医科学研究所がん免疫研究部門

### 【背景・目的】

がんに対する治療薬として、特定の分子標的に対する抗体医薬品の開発が盛んである。特に近年では抗体そのものだけでなく、直接的な細胞傷害作用のある化合物を融合させた抗体-薬物複合体の開発も行われている。しかし、*in vitro* 試験で有望な細胞傷害効果が得られた場合でも、固形腫瘍に対する著効例は少なく、薬剤の腫瘍部位への送達の高効率性ゆえに十分な局所濃度が得られないことが原因として指摘されている。この点で、腫瘍組織への遊走性、局所での自律的な増殖能を備えた“living drug”として、細胞療法の有効性が臨床においても実証されている。特に抗原を抗体により特異的に認識・攻撃させるキメラ抗原受容体（chimeric antigen receptor : CAR）T細胞療法は、一部の造血器腫瘍に対して高い治療効果を示した。しかし、固形がんに対するCAR-T細胞療法は今のところ持続的な治療効果が示されていない。腫瘍組織へのCAR-T細胞の浸潤・集積は見られるものの、T細胞の機能低下(疲弊)に伴いエフェクター機能が減弱することなどが原因としてわかっている。

そこで本研究では、治療に用いる抗体医薬品を遺伝子レベルでCAR-T細胞に組み込み、腫瘍局所で製造・分泌させることで、抗体医薬品の送達性を著しく高めることを目標とした。T細胞への導入効率、タンパク質としての分泌効率を*in vitro*で評価しながら、最適な抗体遺伝子の設計、機能評価を行った。

### 【方法・結果】

本研究のproof-of-conceptを示す最初のモデルとして、B細胞性抗原CD19を標的として、これに対する抗体製剤をT細胞に分泌させる実験系を用いて、分泌効率や有効性について試験的検証を行うこととした。CARでも用いられている抗CD19抗体（クローンFMC63）に対する単鎖可変領域（single chain variable fragment: scFv）のN末端にシグナルペプチド、C末端に細胞傷害性タンパク質Aを付加して、細胞外に分泌させた。腫瘍細胞に対する細胞傷害活性は、腫瘍細胞側にEGFP遺伝子を導入しておき、一定時間経過後に生存しているEGFP陽性細胞数をフローサイトメトリーにより定量することで計測した。

高い分泌効率が高有効性の観点で最も重要となることから、抗体遺伝子のN末端に付加するシグナルペプチドを、これまでに申請者がCAR-T細胞の作成で検討してきた結果に基づき検討した。図1に示すように、シグナルペプチドCを付加することで、抗体遺伝子による細胞傷害活性が顕著に高まることが示されたことから、以後同ペプチド配列を組みこむこととした。

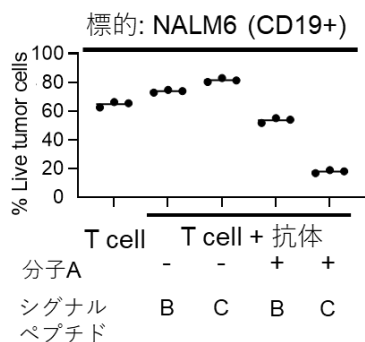


図 1. 抗 CD19 抗体分泌型 T 細胞を NALM-6 細胞株と共培養して、NALM-6 の生存細胞数を定量した。シグナルペプチド C の付加により細胞傷害作用が向上したことから、効率的な分泌が示唆された。

次に、CAR 遺伝子と分泌型抗体遺伝子を同時に遺伝子導入することで、CAR-T 細胞から抗体分子を放出させて、付加的な細胞傷害効果が生じるかについて検証した。図 2 に示すように、肺癌細胞株 A549 や、口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-3 を標的細胞として細胞傷害効果を検討したところ、抗体分子そのものでも有意な細胞傷害効果が誘導されたが、CAR-T 細胞に搭載することで、さらにその効果が増強することが示され、本研究開発の狙い通り、相加的な治療効果が期待された。

ここで、CAR と分泌抗体はそれぞれ異なる抗原を標的としていることから、固形がんに対する免疫療法で課題となる、がん細胞の不均一性による抗原回避にも資することが推測された。また、抗原認識に用いる抗体配列として、可変領域を一本鎖でつないだ single chain variable fragment や、ラクダ科由来 VHH 抗体 (nanobody)、及び標的分子に対するリガンドそのものなど、様々な形態を検討したが、標的分子や標的細胞の性質によって分泌効率や抗腫瘍効果にばらつきが多く、一般的な事象としては定義できなかった。

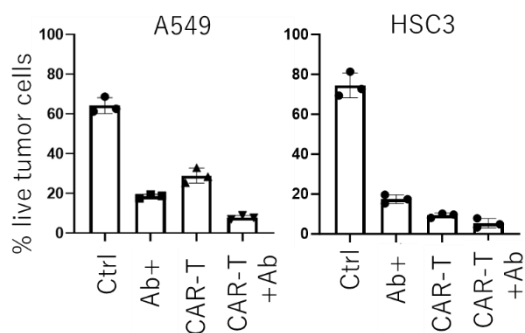


図 2. CAR-T 細胞に分泌型抗体分子を遺伝子導入した上で、標的がん細胞と共培養して細胞傷害効果を定量したところ、CAR、抗体分子の相加的効果が複数の細胞株で確認された。

#### 【考察及び今後の研究計画】

CAR-T 細胞からの抗体分子の分泌は、例えば二重特異性抗体や免疫チェックポイント分子 PD-1 に対する阻害抗体の分泌による治療効果の増強効果が示されており、有望な治療モダリティである (1, 2)。本研究ではシグナルペプチドや抗体分子の設計を変更することで分泌効率や細胞への取り込まれ方が大きく変わり、かつ標的ごとに異なる傾向を示したことから、分子ごとに設計を検討する必要があることがわかる。現在、*in vitro* で有効性が示された組合せについて *in vivo* での検証を進めており、臓器

毒性などにも注目した解析が求められる。

一方、T細胞そのものの腫瘍局所での長期生存能も本モダリティを活用するには重要である。我々は以前に PRDM1 ノックアウトやサイトカインシグナルの誘導により CAR-T 細胞の長期生存能が顕著に向上することを示しており (3, 4)、これらの技術と組み合わせることでさらに有効性が高まることが期待される。

**【参考文献】**

1. Choi et al. Nat Biotechnol. 37, 1049–1058 (2019).
2. Rafiq et al. Nat Biotechnol. 36, 847-856 (2018).
3. Yoshikawa et al. Blood. 139, 2156-2172 (2022).
4. Yoshikawa et al. Cell Rep Med. 5, 101526 (2024).

謝辞：本研究のご支援をいただいた公益財団法人薬理研究会に深謝申し上げます。

## 2. インターロイキン 17A を標的とする自閉スペクトラム症治療薬の探索

佐々木 哲也

筑波大学医学医療系生命医科学域・解剖学神経科学研究室 准教授

精神疾患の原因と病態に免疫系の変調が関与しているという知見が集まっている。特にヘルパーT細胞 17(Th17 細胞)による免疫反応は、自閉スペクトラム症(ASD, 自閉症)、統合失調症、うつ病などの精神疾患の病態に関与することが多くの臨床研究から示唆されている。これらの疾患患者の脳皮質ではニューロンの配列や層構造の異常、シナプス密度・形態変化などが認められ、その機能異常の基盤となっていると考えられる。しかし、免疫反応がどのような過程で神経系に器質的変化を引き起こすのか不明な点が多く、Th17 細胞の寄与については理解が十分に進んでいない。

炎症性サイトカインのインターロイキン(interleukin; IL-)17A 産生細胞である Th17 細胞は、腸管の粘膜固有層に多く存在しており、細菌や真菌の感染に対する防御反応、関節リウマチや多発性硬化症などの炎症性自己免疫疾患に関与する。IL-17A は、IL-17RA と IL-17RC のヘテロ二量体からなる受容体に結合し、NF $\kappa$ B、MAPK、C/EBP を含む下流経路を活性化させ、標的細胞の炎症応答を誘導する。

自閉症は、コミュニケーションの障害や常同的行動パターンが見られ、3 歳までに発症する発達障害である。自閉症の環境要因のひとつに母体免疫活性化 (maternal immune activation; MIA)がある。MIA は細菌・ウイルス感染によって母体免疫が一過性に活性化される現象である。MIA により母体内で誘導された IL-17A が胎盤を通過し、胎仔脳に作用して ASD 病態を引き起こす可能性が示されている。また自閉症患者では血中 IL-17A 濃度が上昇しており、IL-17A レベルと重症度が相関することが報告されている。しかし、血中 IL-17A の慢性的高値が中枢神経系に対してどのような影響を与えるかは不明である。中枢神経系における IL-17A とその受容体の分布は複数の研究グループから報告されているが、一貫性がなく、現在も議論が続いている。本研究では、①発達期におけるマウス脳の *Il17ra* と *Il17rc* の mRNA 発現を *in situ* hybridization (ISH)により調査し、②それぞれの分子を発現している細胞種を検討した。さらに③MIA 自閉症モデルの中枢神経系で両者の発現・分布の変化が観察されるのか検討を行った。

### (1) 動物と脳切片作製

本実験には、生後(Postnatal day; P)0, 7, 14, 21, 28, 35 日目、成体の C57BL/6J マウス *Mus musculus* を用いた。所属研究室の先行研究に従い、MIA 自閉症モデルは、妊娠 12.5 日目の雌マウスに 20 mg/kg のポリイノシン酸-ポリシチジル酸[poly(I:C)]を投与し、生まれた仔を自閉症モデルとした。コントロール群には PBS を投与した。

マウスを開胸し、1×PBS で脱血後、4% PFA/0.1MPB で灌流固定した。抜脳後、4% PFA/0.1MPB 中で一晩浸漬固定した。スライディングマイクロームを使用して脳切片を作製した。

### (2) *in situ* hybridization (ISH)

浮遊法で ISH を行った。*Il17ra* と *Il17rc* の CDS 内に 2 個ずつ(5' 側と 3' 側)RNA プローブを設計した。シグナルを増強するため、二つのプローブを混ぜて脳切片と反応させた。抗 DIG 抗体と NBT/BCIP でシグナルを検出した。

### (3) 免疫組織化学染色

IL17 受容体を発現する細胞種を同定するために、NeuN(ニューロン)、GFAP(アストロサイト)、IBA1(ミクログリア/マクロファージ)の抗体染色と ISH の蛍光二重染色を行った。mRNA のシグナルは FastRed(赤色)で検出し、各細胞マーカーを Alexa488 標識抗体(緑色)で検出した。

#### (4) 画像取得と統計解析

医学共通機器室に設置されているオールインワン型顕微鏡 BZX-980 (keyence)で写真撮影し、Photoshop (Adobe)を用いて画像処理を行った。JMP (SAS institute)で統計解析を行った。

P0, P7, P14, P21(離乳期), P28, P35, 成体の脳で *Il17ra* と *Il17rc* mRNA の発現を調査した。P7 以降は、*Il17ra* は大脳皮質 V-VI 層、特に VIa, VIb 層に強く発現していた。調査した発達段階の中では P14 で ISH シグナルが最も強く、成体にかけて低下していた。一方、*Il17rc* は調査したすべての発達段階において II-VI 層に分布していた。*Il17rc* は新生仔期(P0~P7)で発現が高く、成体にかけてシグナルが低下する傾向を示した。*Il17ra*, *Il17rc* ともに明確な領野特異性は示さず、大脳皮質全体に分布していることが確認された。

IL17 受容体を発現する細胞種を同定するために、各種細胞マーカーとの二重染色を行った。*Il17ra* は NeuN 陽性の第 VI 層ニューロンの約 60%に発現していることがわかった。Iba1 陽性ミクログリアや GFAP 陽性アストロサイトの一部の集団にも発現が観察された。*Il17rc* は、中枢神経系に広く分布していることや、IL17RA 以外の複数種の IL17 受容体とも複合体を形成するという報告を合わせて考えると、細胞種特異性は低く、多様な IL17 シグナル経路に関与するのかもしれない。現在、*Il17ra* が皮質-視床投射ニューロンに特異的に発現しているのか検討するとともに、*Il17ra* と *Il17rc* の double ISH を実施し、両者を共発現する細胞の同定を行っている。MIA 自閉症モデルマウスでは、コントロール群と比較して、*Il17rc* の発現レベルおよびその分布パターンに大きな変化は認められなかった。一方、*Il17ra* は P14 で顕著な発現低下が観察された。*Il17ra* は、生後の神経回路再編成が盛んな新生仔期から乳児期にかけて発現が強く、成体にかけて発現レベルが低下することと、自閉症モデルで乳児期に *Il17ra* の発現低下が顕著であることから、自閉症の顕在化に関与している可能性がある。

#### 謝辞

本研究の推進にあたり、神谷沙羅、中村賢佑、樋口浩輝、久保明澄、左中彩恵、坂本智佳子、岩田卓(筑波大学医学医療系解剖学・神経科学研究室)の各氏の支援をいただいた。研究のご支援をいただいた公益財団法人 薬理研究会に心より感謝申し上げます。

Kamiya S, Kubo A, Higuchi K, Nakamura K, Kishi K, Sasaki T. Maternal immune activation and abortion: The Role of IL-17A. *Reproductive Immunology and Biology*. 2024-12. 39(1): 41-50.

Kamiya S, Sasaki T. Fetal Environment and Neurodevelopment: The Role of Maternal Immune System and Microbiota in Autism Spectrum Disorder. *Reproductive Immunology and Biology*. 2024-12. 39(1): 51-59.

Kubo A, Kamiya S, Sasaki T. Effects of Maternal Immune Activation and IL-17A on Abortion. *BIO Clinica*. 2024-09. 39(10): 38-40.

Kamiya S, Sanaka S, Kubo A, Higuchi K, Kishi K, Sasaki T. IL-17: A Bridge from Psoriasis to Autism. *Precision Medicine*. 2024-09. Vol.7 No.11. 35-36.

Kamiya S, Sanaka S, Kubo A, Higuchi K, Kishi K, Sasaki T. Psoriasis and ASD: Revolutionary Insights into Disease Mechanisms through IL-17. *The Allergy in Practice*. 2024-10. Vol. 44 No.12. 70-71.

### 3. 神経伝達物質を標的とした慢性腎臓病新規治療法の開発

田中 真司

東京大学医学部附属病院 腎臓・内分泌内科

#### 【背景・目的】

全世界人口の約 10%が有する慢性腎臓病（CKD）は、進展すると末期腎不全に至る他、心血管病の強い危険因子でもある。腎移植数が伸び悩む日本において、ほとんどの末期腎不全患者は生涯にわたって透析を行うしかない。現在本邦に約 35 万人存在する透析患者は年々増加し、近年では毎年約 4 万人が透析を導入されている。このように CKD は喫緊の臨床課題であるが、現在の治療戦略は血圧管理など非特異的なものがほとんどであり、末期腎不全への進行抑制効果は限定的である。

本研究では、新規 CKD 治療戦略として神経-腎臓連関に注目する。腎臓を支配する神経は 2 種類あり、脳から腎臓に情報を伝える交感神経（遠心性）と腎臓から脳に情報を伝える感覚神経（求心性）からなる。腎神経を直接標的とした治療戦略としては、難治性高血圧に対する腎除神経術が臨床の場で行われている。これは腎動脈に挿入したカテーテルを用いて、血管内膜側から発生させた高周波などにより外膜側に存在する腎神経を焼灼するものである。腎臓の炎症が高血圧の進展に寄与すること、動物実験で腎除神経により高血圧に伴う腎臓の炎症が改善したことから、炎症の持続がその進展に重要な役割を果たす CKD においても腎除神経が保護的に働くことが期待され、最近の動物実験の報告もそれを支持するものであった (1)。

ここで注目したい点は、これまでのほとんどの動物実験・ヒト臨床試験では、腎神経全体（交感神経+感覚神経）がアブレーションされているということである。腎神経はいくつかの束に分かれて腎動脈に沿って走行しており、それぞれの束の中では 2 種類の神経が混在していることが多いため、両者を物理的に分けて選択的に除神経または刺激することは不可能であった。最近、高濃度のカプサイシンを腎神経に直接塗布することで感覚神経だけを除神経するという方法が開発され（腎臓の感覚神経の軸索にカプサイシン受容体である TRPV1 が発現しており、交感神経には発現していないことを利用）、それ以来、腎臓の感覚神経の選択的除神経は、腎神経全体の除神経と変わらない高血圧改善効果を持つことが報告されてきた (2)。

すなわち、これまで高血圧の成立・進展に腎交感神経が特に重要な役割を果たしていると考えられてきたが、感覚神経の関与も大きく注目されるようになってきた。上述のように、CKD に対して腎神経全体の除神経が保護的に働くことが最近報告されたが、感覚神経・交感神経それぞれがCKD 進展にどのように関与しているかは現時点では不明である。本研究では、最新の技術を用いてこれら2種の神経を独立して操作（除神経、抑制、刺激）し、CKD 進展に与える影響を検討すること、そしてその結果に基づき神経伝達物質のアンタゴニストをCKD 新規治療薬として検証することを目的とした。

### 【方法・結果】

(a) 腎感覚神経選択的除神経：高濃度のカプサイシンを野生型マウスの腎神経に塗布することにより、感覚神経のみの除神経を試みた。図1に示すように、この手法を用いることにより腎感覚神経が選択的に除神経されることを確認できた。

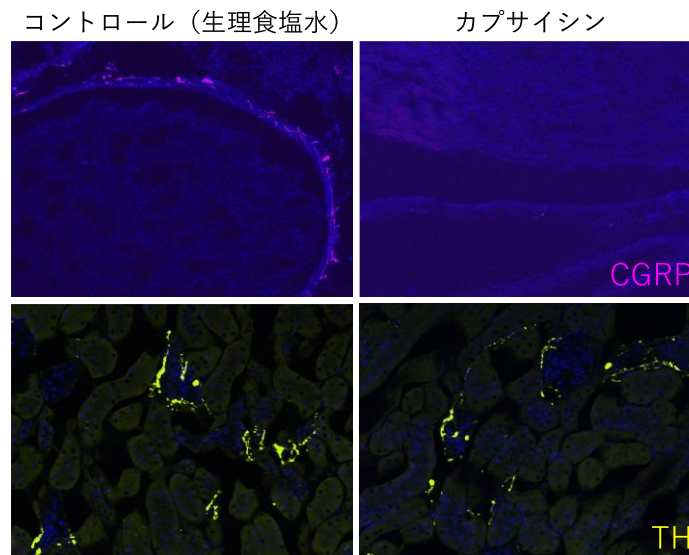


図1：カプサイシン塗布による腎感覚神経選択的除神経の確認  
野生型マウスの腎神経にカプサイシンまたは生理食塩水を直接塗布し、7日後に免疫組織染色で感覚神経（CGRP陽性）および交感神経（TH陽性）を検出した。カプサイシン塗布により感覚神経のみが選択的に除神経されていることがわかる。

## (b) 腎感覚神経・交感神経選択的抑制・刺激：Trpv1Cre・DbhCre マウス

の腎に、Cre 依存性の抑制性 (Gi)・興奮性(Gq/Gs)の DREADD を組み込んだ retrograde AAV を微小注射し、4-6週後に CNO を腹腔内投与することで、腎感覚神経・交感神経をそれぞれ選択的に抑制する計画であった。AAV 注射の前に、どのような微小注射プロトコルを用いれば効率

的に腎感覚神経に到達できるかを検証するため、まずは逆行性トレーサーである CTB を腎に微小注射し、感覚神経の細胞体が存在する脊髄後根神経節 (DRG) で CTB を観察する方針とした。DRG の切片での観察では観察できる範囲が限られてしまい、信頼性の高い結果が得られない

ため、DRG を透明化しホールマウントで観察したいと考え、まず図 2 のように透明化 DRG のホールマウント観察の手法を確立した。次に腎への微小注射プロトコルを最適化するため、様々な微小注射プロトコルを検証し、プロトコルを確立した (図 3)。

### 【考察・展望】

腎臓感覚神経の選択的除神経および labeling に成功した。今後は、CTB で確立したプロトコルを用い AAV を腎臓に微小注射し、腎臓感覚神経・交感神経の選択的抑制・刺激を行う。そしてこれらの選択的操作の効果を、確立されたマウス CKD (腎線維化) モデルである片側尿管閉塞、片側腎虚血再灌流、葉酸投与において検証する。腎線維化の程度は、腎機能 (血清クレアチニン、尿素窒素)、腎における線維化関連分子の発現 (Acta2, Col1a1, Col3a1 など)、腎組織 (Picrosirius red/Masson's trichrome staining で定量評価も行う)、で評価を行う。以上の実験結果に基づき、CKD に対する新規薬物療法の探索として、アドレナリン選択的受容体拮抗薬 ( $\alpha$

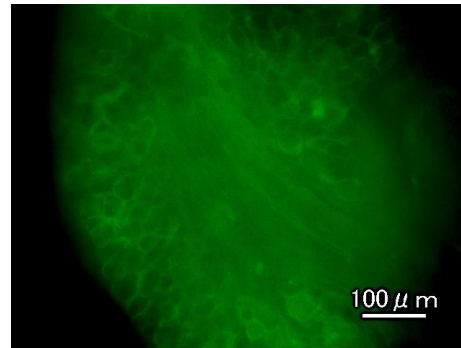


図 2：透明化脊髄後根神経節 (DRG) のホールマウント観察  
感覚神経レポーターマウス (*Trpv1Cre-EYFP*) のDRGを透明化し、ホールマウントでEYFP蛍光を直接観察した。LittermateのCre陰性のマウスでは緑色蛍光は観察されなかった。

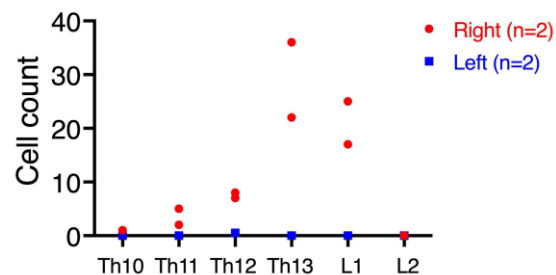


図 3：腎臓感覚神経のlabeling

逆行性トレーサーであるCTBを野生型マウスの右腎のみに微小注射し、ホールマウントで脊髄後根神経節を観察した。

1/ $\alpha$ 2/ $\beta$ 1/ $\beta$ 2 ブロッカー) や感覚神経伝達物質 (サブスタンス P や CGRP) の選択的受容体拮抗薬が有効性を示すか検討する (3)。

#### 【謝辞】

本研究遂行にあたりご支援いただきました公益財団法人薬理研究会に深く感謝申し上げます。

#### 【参考文献】

1. Li Q, Deng Y, Liu L, Zhang C, Cai Y, Zhang T, Han M, Xu G. Sympathetic Denervation Ameliorates Renal Fibrosis *via* Inhibition of Cellular Senescence. *Front Immunol.* 2022 Jan 24;12:823935. doi: 10.3389/fimmu.2021.823935. PMID: 35140713; PMCID: PMC8818683.
2. Foss JD, Wainford RD, Engeland WC, Fink GD, Osborn JW. A novel method of selective ablation of afferent renal nerves by periaxonal application of capsaicin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2015 Jan 15;308(2):R112-22. doi: 10.1152/ajpregu.00427.2014. Epub 2014 Nov 19. PMID: 25411365; PMCID: PMC4297859.
3. Udit S, Blake K, Chiu IM. Somatosensory and autonomic neuronal regulation of the immune response. *Nat Rev Neurosci.* 2022 Mar;23(3):157-171. doi: 10.1038/s41583-021-00555-4. Epub 2022 Jan 7. PMID: 34997214; PMCID: PMC9539447.

#### 4. プロリン異性化酵素 Pin1 を介した NASH 発症機序の解明と治療法の創成

中津 祐介

広島大学大学院医系科学研究科

##### 「背景・目的」

非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH)は、肝脂肪蓄積・炎症・線維化等の特徴とするが、一部が肝臓へと移行するため、早期の発見・治療は重要である。しかしながら、NASHの発症機序については未だ不明な点が多く、本邦において承認されている治療薬も存在しない。従って、新規発症機序に基づいた治療薬の開発は、喫緊の課題であるといえる。

プロリン異性化酵素 Pin1 は、様々な標的蛋白に結合し、プロリンのシストランズ異性化を行うことで標的蛋白の立体構造を変化させ、機能を調節している酵素である。申請者は、Pin1 がインスリン受容体基質や AMPK 等、様々な因子に結合することで、生体の代謝調節に重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた (1)。

今回、Pin1 と NASH との関係を明らかにするために、肝細胞特異的 Pin1 KO マウス (H-Pin1 KO)を作成し、高脂肪・高コレステロール食 (HFHC)負荷による NASH 発症に対する影響を調べたところ、H-Pin1 KO マウスは、肝脂肪蓄積や肝線維化が WT マウスと比較して軽度であり、NASH 発症に対して抵抗性を示すことが明らかとなった。そこで、肝臓を用いて RNA-seq を行ったところ、Pin1 欠損により様々な経路が活性化していることが認められた。

そこで、本研究では、RNA-Seq の結果を基に①PPAR $\alpha$  pathway②Hippo pathway③分子シャペロンに対する Pin1 の役割を明らかにする。

##### 「結果」

###### ①PPAR $\alpha$ 経路における Pin1 の役割

まず、Pin1 と PPAR $\alpha$ の結合について調べるために、293T 細胞に Pin1 と PPAR $\alpha$ を過剰発現させ免疫沈降を行ったところ、両者の結合が確認できた (Fig.1A)。また、proximity ligation assay により内在性の両者の結合も確認できた。

次に、PPAR $\alpha$ 転写活性に対する影響を検討した。肝細胞 AML12 細胞において Pin1 ノックダウン後に、PPAR $\alpha$  agonist である WY14643 を添加し、遺伝子発現量を検討した。WY14643 の効果は非常に弱かったが、Pin1 ノックダウンにより CPT-1 や FGF21 などの PPAR $\alpha$ 標的遺伝子の発現量が有意に増加または増加傾向になった (Fig.1B)。

そこで次に、PPAR $\alpha$ の転写活性について検討した。293T細胞を用いて Luciferase assay を行ったところ、Pin1 過剰発現により転写活性は抑制され、イソメラーゼ活性がない Pin1 変異体を過剰発現させた場合は、その抑制が軽度であった (Fig.1C)。これらのことから、Pin1 はイソメラーゼ活性依存的に PPAR $\alpha$ の転写活性を抑制していると考えられた。

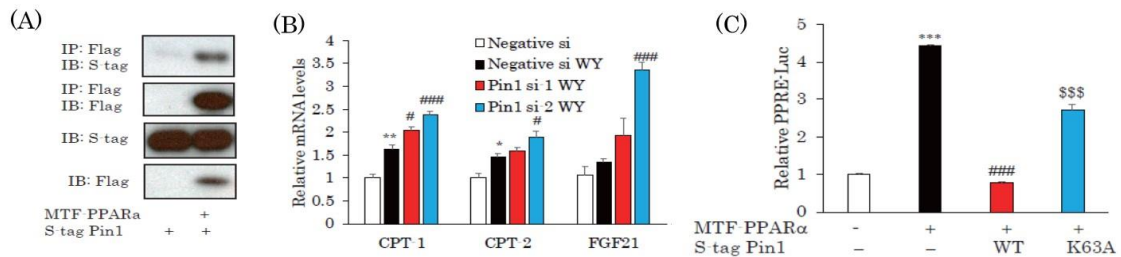


Fig.1 PPAR $\alpha$ 経路に対するPin1の影響

(A) 293T細胞にPin1とPPAR $\alpha$ を過剰発現させ、免疫沈降を行った。

(B) AML12細胞でPin1 siRNA処理後、WY14643を24時間添加し、RNA抽出を行った。その後、Real time PCRにより各種遺伝子の発現量を検討した。

(C) 293T細胞にPPAR $\alpha$ とともにPin1を過剰発現させ、Luciferase assayを行った。

## ②Hippo pathway 経路の影響

RNA-seq を行ったところ、Pin1 を欠損させた肝臓では、Indian hedgehog(Ihh)の発現量が顕著に低下していた。Ihh は、Hippo pathway の主要因子である TAZ によって誘導され、肝星細胞の活性化に関与することが報告されている (2)。そこで、Pin1 が TAZ を介した Hippo pathway 経路を制御するかについて検討した。

まず、Real time PCR により Ihh の発現が KO マウスで減少しているかを確認したところ、発現の減少が確認できた (Fig. 2A)。また、このとき TAZ の発現は KO マウスの肝臓で減少していた (Fig. 2B)。さらに、Pin1 が TAZ と結合するかを 293T 細胞での過剰発現や HepG2 での内在性の結合を検討したところ、両者の結合が確認できた。

以上の結果より、Pin1 は TAZ との結合を介して Ihh の発現を促進し、肝線維化を誘導していると示唆された。

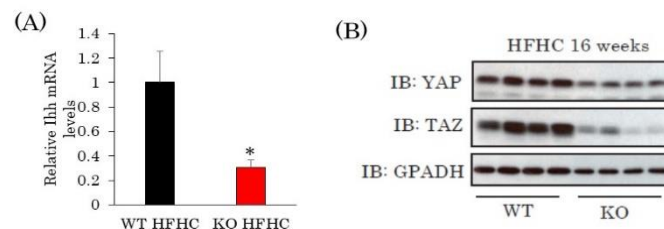


Fig.2 Hippo pathwayにおけるPin1の影響

(A)高脂肪・高コレステロール食を16週間負荷させたマウス肝臓のIhhの発現量変化

(B) 肝臓のYAP/TAZの発現量

### ③分子シャペロンに対する影響

RNA-seqの結果から、各種分子シャペロンの発現がKOマウスで上昇していることが認められた。実際に Real time PCR で確認したところ、KOマウスの肝臓で各種分子シャペロンの発現が高いことが確認できた。

NASH時には、小胞体ストレス応答に関わる XBP1 が核内に移行せず、分子シャペロンの誘導が起きないことが報告されている。そこで、Pin1 と XBP1 との結合について検討したが、現在のところ明確な結合は確認できなかった。従って他の転写因子が関与している可能性を考えている。

#### 「考察」

上記の結果より、Pin1 は複数の経路を調節することにより NASH を進展させていると考えられた。Pin1 は、複数の標的因子をターゲットにしているため、Pin1 を阻害することで強力に NASH を抑制できる可能性が示唆された。

また、肝臓における Pin1 結合蛋白を網羅的に同定することが、Pin1 を介した NASH 発症機序の全容解明に必要であると考えられる。

最後に、本研究を支援してくださった公益財団法人 薬理研究会に深く御礼申し上げます。

#### 「参考文献」

(1) Nakatsu Y, Matsunaga Y, Yamamotoya T, Ueda K, Inoue Y, Mori K, Sakoda H, Fujishiro M, Ono H, Kushiya A, Asano T. Physiological and Pathogenic Roles of Prolyl Isomerase Pin1 in Metabolic Regulations via Multiple Signal Transduction Pathway Modulations. *Int J Mol Sci.* 2016 Sep 7;17(9):1495

(2) Wang X, Zheng Z, Caviglia JM, Corey KE, Herfel TM, Cai B, Masia R, Chung RT, Lefkowitz JH, Schwabe RF, Tabas I. Hepatocyte TAZ/WWTR1 Promotes Inflammation and Fibrosis in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Cell Metab.* 2016 Dec 13;24(6):848-862

## 5. ムチン・糖鎖変化を有する胃癌に特徴的な増殖機構の解明と新規標的治療開発

早河 翼

東京大学医学部附属病院消化器内科 講師

### 概要

本研究では独自に作成した MUC6 ノックアウトマウス (以下 MUC6KO マウス) を用いて、MUC6 変異により胃癌が自然に発癌することを見出し、その発癌経路としてゴルジ体のストレス反応を介した GOLPH3 遺伝子-MAPK 経路の活性化を同定し、それに付随してマンノース異常糖鎖が高発現となる事を示した (図 1)。さらに、この糖鎖に選択的に結合するレクチン薬物複合体を開発し、MUC6 変異胃癌に対する治療効果を確認した。

元来ムチン形質は発癌に付随して変化した結果と考えられてきたが、今回 MUC6 変異自体により直接胃癌が発生することを示した事は新しい胃癌発生メカニズムの発見として重要な意味があり、この研究成果は今後そのほかのムチン形質変化による多種多様な疾患への関与の解析につながる事が期待される。

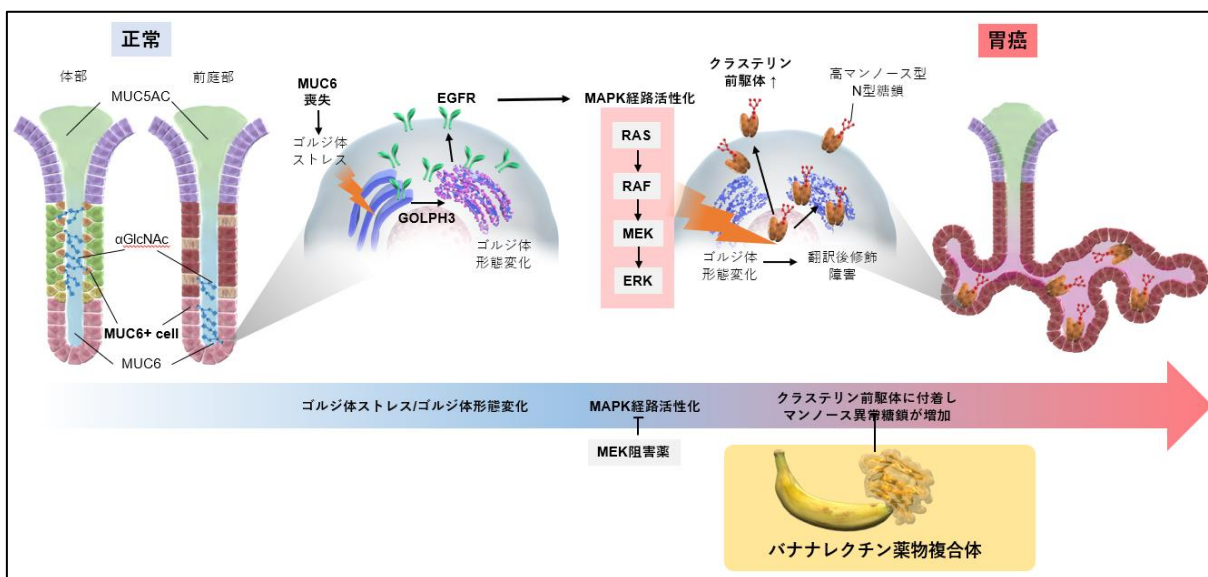


図 1.MUC6 遺伝子変異に伴う胃癌発癌メカニズム、および治療戦略の提案

### 背景

胃癌の原因菌であるピロリ菌の除菌療法の普及・感染率の低下により、胃癌患者数のゆるやかな減少が見られているが、依然として胃癌による死亡者数は癌死亡者数全体の上位を占めている。これは、手術不能の進行胃癌が既存の薬物療法に対し抵抗性を示すことが多いことに起因しており、新規発癌経路の同定、新規治療標的の探索が待たれている。

近年胃癌の全ゲノム解析の結果が報告され、MUC6 遺伝子変異が胃癌の約 10%程度で見られることが分かった。さらに、MUC6 遺伝子変異を有する胃癌は、治療抵抗性を示しやすく、予後不良であることがこれまで報告されてきた。しかしながら、MUC6 遺伝子変異そのものによる胃癌発癌への関与は不明とされてきた。

本研究では、独自の MUC6KO マウスを作成し、MUC6 変異による発癌メカニズムの解析と、新規治療標的の導出、治療薬の開発を目的に解析を行なった。

## 結果

MUC6KO マウスは、3 か月齢程度で胃の前庭部を中心に異形成を示し、半年齢以降全個体で胃癌が観察され、12 か月齢では粘膜下に浸潤する浸潤癌を呈していた。腫瘍部の RNA シークエンスを施行した結果、MUC6KO 腫瘍では MAPK 経路が著明に活性化していることが同定された。MEK 阻害薬の投与実験を行うと MUC6KO 腫瘍が著明に縮小することが判明し、MAPK 経路の活性化が発癌経路として重要であることが分かった (図 2)。

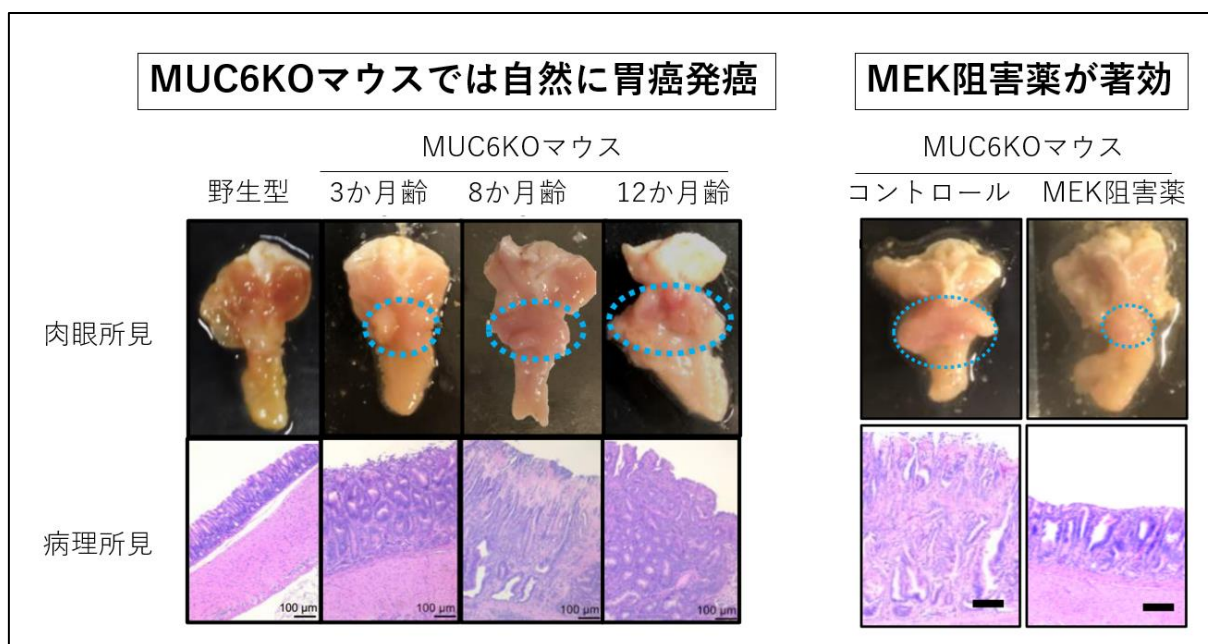


図 2 : MUC6KO マウスにおいて胃癌が自然発癌し、MEK 阻害薬で腫瘍が縮小する。

(左) MUC6KO マウスは 3 か月齢程度で異形成を示し、8 か月齢では発癌、12 か月齢では粘膜下浸潤癌を呈していた。

(右) MEK 阻害薬を投与すると MUC6KO マウスの腫瘍は縮小した。

電子顕微鏡で腫瘍細胞の細胞小器官を観察すると、ゴルジ体の形態変化 (膜同士の距離が広がり全体として膨張) が見られ、それに付随してゴルジ体ストレスマーカーである GOLPH3 遺伝子が高発現している事が判明した。そこで GOLPH3 ノックアウトマウスを MUC6KO マウスと交配させると、GOLPH3・MUC6 ダブルノックアウトマウスでは MAPK 経路活性の低下、腫

瘍縮小が観察されたことから、ゴルジ体ストレスを介した GOLPH3 遺伝子の発現増加が MAPK 経路の活性化を誘導していることが示された (図3)。

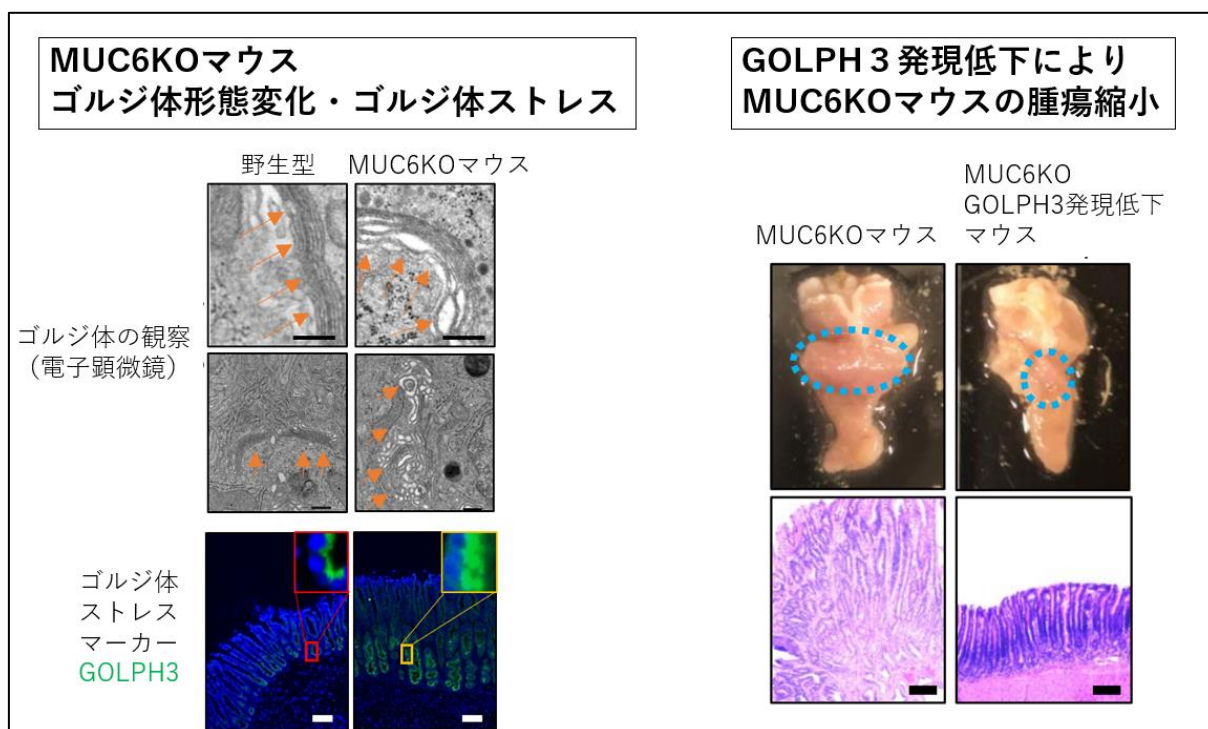


図3 : MUC6KO マウスにおけるゴルジ体形態変化およびゴルジ体ストレス

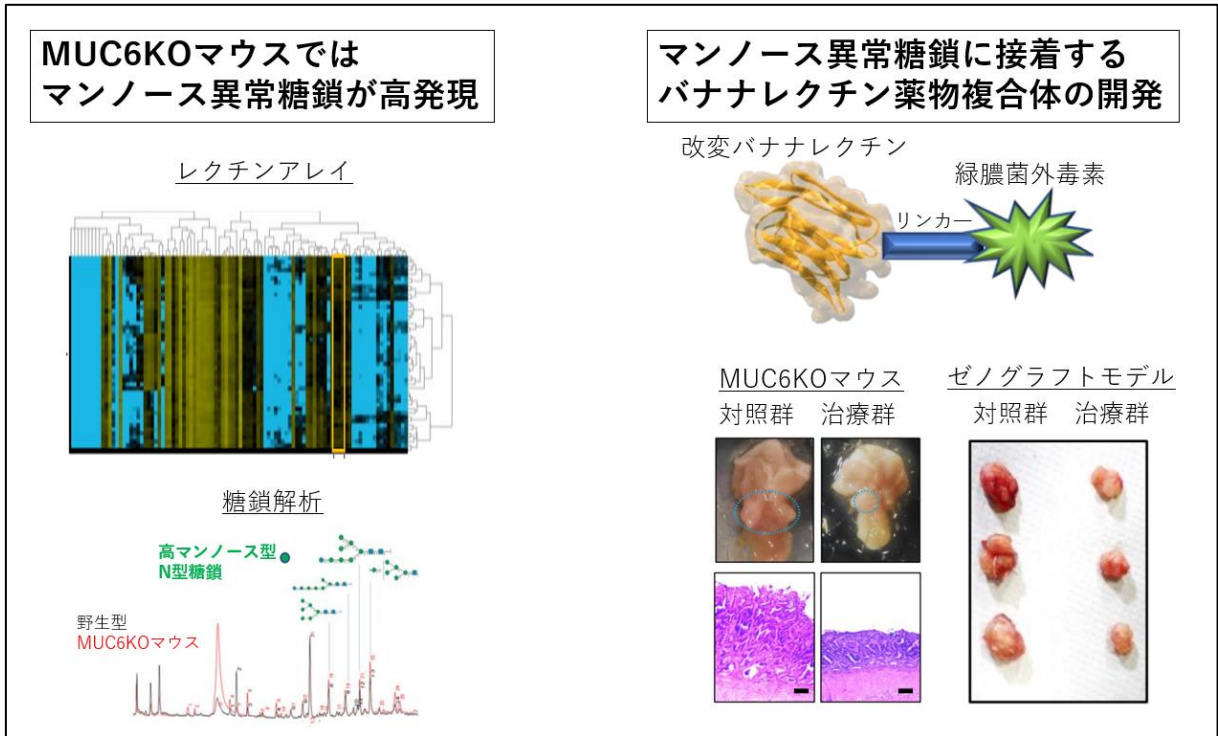
(左) MUC6KO マウスでは、電子顕微鏡で細胞小器官を観察するとゴルジ体の形態変化が観察され、ゴルジ体ストレスマーカーである GOLPH3 遺伝子の高発現を認めた。

(右) GOLPH3 の発現を低下させる、MUC6KO-GOLPH3 ヘテロ マウスを作成すると、腫瘍は縮小した。

さらに、腫瘍組織の網羅的レクチンアレイ解析と糖鎖の質量分析を実施したところ、ゴルジ体ストレスに付随して、MUC6KO マウスにおける腫瘍部分ではマンノースという異常糖鎖が高発現している事が判明した。これらの GOLPH3-MAPK 経路の異常およびマンノースの高発現は、MUC6 発現が低下するヒト胃癌患者の細胞・検体でも確認された。また、質量分析を用い、マンノース糖鎖が付着する糖タンパク質として分泌型クラスチリン前駆体を同定することに成功した。

この癌細胞だけに発現する異常マンノース糖鎖に着目し、マンノースに特異的に接着するバナナ由来のレクチンに遺伝子改変を施し、リンカーを介して緑膿菌外毒素を接着させた、新規レクチン薬物複合体を開発した。遺伝子改変バナナレクチンの投与により、MUC6KO マウスに生じる胃腫瘍形成や、MUC6 変異を有するヒト胃癌細胞株を用いたゼノグラフト腫瘍の形成に対して、著明な腫瘍縮小効果を認めた (図4)。

これらの知見の一部は、国際学術誌 Gastroenterology に掲載された。



**図 4 : MUC6KO マウスにおけるマンノース異常糖鎖の高発現、およびバナナレクチン薬物複合体の開発**

(左) レクチンアレイ、糖鎖解析により、MUC6KO マウスではマンノース異常糖鎖が増加していることが示された。

(右) マンノースに特異的に接着するバナナレクチン薬物複合体を開発し、マウスモデル、ゼノグラフトモデルで治療効果を立証した。

### 考察

以上の研究成果により、MUC6 変異に伴う新しい胃癌の発癌メカニズムとしてゴルジ体ストレスを介した GOLPH3 遺伝子-MAPK 経路の活性化を見出し、さらに治療標的として異常糖鎖に着目したバナナ由来レクチン薬物複合体を提案できた。これまでもムチン遺伝子変異、糖鎖転移酵素遺伝子変異による、種々の臓器における多種多様な疾患に対する関与が示されてきたが、そのメカニズムは不明であった。今回の研究成果により、より幅広い疾患におけるゴルジ体ストレス、GOLPH3 遺伝子の関与の検証がされ、その治療標的として、異常糖鎖に着目したレクチン薬物複合体の活用が期待される (図 5)。

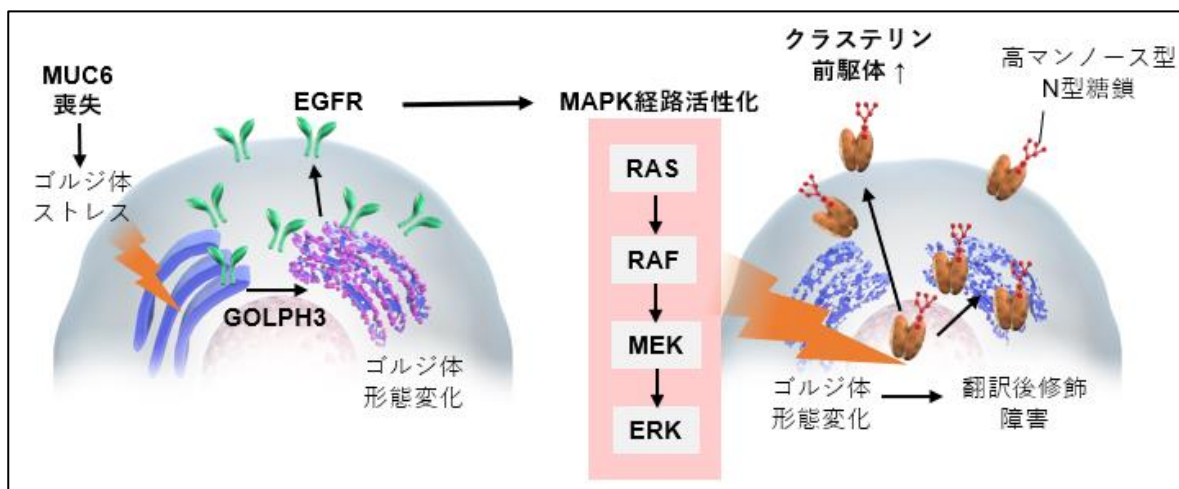


図 5 : MUC6 変異に伴う発癌経路の概略

## 6. 神経変性疾患のメカニズム解明と薬物治療法開発への応用

藤田 幸

島根大学 医学部医学科 発生生物学

### 【背景・目的】

神経細胞は緻密なネットワークを作り、多様な神経機能を制御している。疾患や損傷により、脳や脊髄の神経回路がダメージを受けると、元通りに戻るとはほとんどない。そのため、麻痺などの神経機能障害が長い間残り続けてしまう。ヒトを含む哺乳類において、中枢神経の軸索再生が困難である理由として、中枢神経を取り巻く環境が再生に適していないこと、中枢神経自体の軸索再生能力が弱いことが上げられる。これまでに、神経細胞を取り巻く環境を変化させることで、軸索が再伸長することが示されている。具体的には、中枢神経に存在するグリア細胞であるオリゴデンドロサイトにより、軸索の再生が抑制されていることが報告されている。オリゴデンドロサイトの細胞膜は、神経軸索に渦巻き状に何層にも巻き付き、ミエリンと呼ばれる構造を形成する。軸索が損傷された後も、ミエリンは debris として残存し、この中には、複数の軸索再生阻害因子が含まれる。中枢神経障害からの機能回復には神経回路の再建が不可欠であり、それを実現する手法の開発は、神経変性疾患や損傷に対する治療法として期待され、強く求められている<sup>1</sup>。

壊れた神経回路が再び機能するためには、切断された神経細胞の軸索が標的細胞へ再伸長し、シナプスを形成してネットワークに組み込まれるというステップが必要である。つまり、中枢神経の軸索再生が実現しない限り、機能的な回復は望めない。これまでに私たちは、中枢神経損傷から神経回路修復までの一連の過程を制御するシグナルの解明を目指し、研究を進めてきた。外傷性脳損傷、脊髄損傷、視神経損傷、アルツハイマー病、パーキンソン病、など様々な中枢神経障害モデル動物や細胞を用いて、分子、細胞、組織、行動、など、多角的な解析手法により神経変性のメカニズムの解明に取り組んできた。再生阻害に関わる因子の発現を抑制する手法が、神経回路の修復力を高め、神経症状を改善することを見出してきた。軸索再生阻害に関わる分子の中でも、特に、myelin associated glycoprotein (MAG), Nogo, oligodendrocyte myelin glycoprotein (OMgp) についての研究が進んでいる。これら 3 種類のミエリン由来軸索再生阻害因子は構造が異なるにもかかわらず、Nogo 受容体 (NgR) という共通の受容体を介して軸索再生阻害シグナルを伝える。NgR は細胞内ドメインを持たない GPI アンカー型タンパク質であることから、NgR 単独では細胞内にシグナルを伝えることは不可能であり、他の受容体と複合体を形成することで、細胞内へシグナルが伝達される可能性が示唆された。これまで、NgR を介した軸索再生阻害メカニズムに関しては研究が進み、様々な分子シグナル伝達経路が報告されてきた。その一方で、NgR 欠損マウスの神経細胞を用いた *in vitro* の軸索再生実験において、ミエリン及び Nogo-66 による神経突起の伸長阻害作用はブロックされなかったという報告もあり、この分子機構を見直すべき知見が得られている<sup>2,3</sup>。これにより、NgR 以外に、第二の受容体が存在する可能性が浮かび上がり、PIR-B がミエリン由来軸索再生阻害因子の受容体であることが確認された<sup>4</sup>。

### 【 結果・考察 】

私たちは、PIR-B がどのようなメカニズムで中枢神経の再生を阻害しているかについて、研究を進めた。PIR-B は細胞内に immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs (ITIMs)をもち、この領域がリン酸化を受けると、チロシン脱リン酸化酵素 SHP-1、SHP-2 と結合することが知られていた。私たちは、マウス初代神経培養細胞を用いた培養系で、チロシン脱リン酸化酵素 SHP の発現を抑制することで、PIR-B を介した軸索伸長作用をブロックできることを見いだした<sup>5</sup>。そこで、in vivo で SHP の発現を効果的に阻害することのできる siRNA を作成した。マウス神経障害モデルを用いて、SHP siRNA は、再生阻害作用を阻止するとともに、細胞死抑制効果を有していることをあきらかにした。上記に示した我々の研究結果から、SHP の阻害が、脳や脊髄の障害に効果を示すことがわかった (図 1)。一方で、SHP 阻害による組織学的な修復が、神経機能の回復にどのように貢献しているのか、十分に明らかにできていない。今後、SHP 発現変化の細胞特異性やそのメカニズムについて、研究を展開したい。

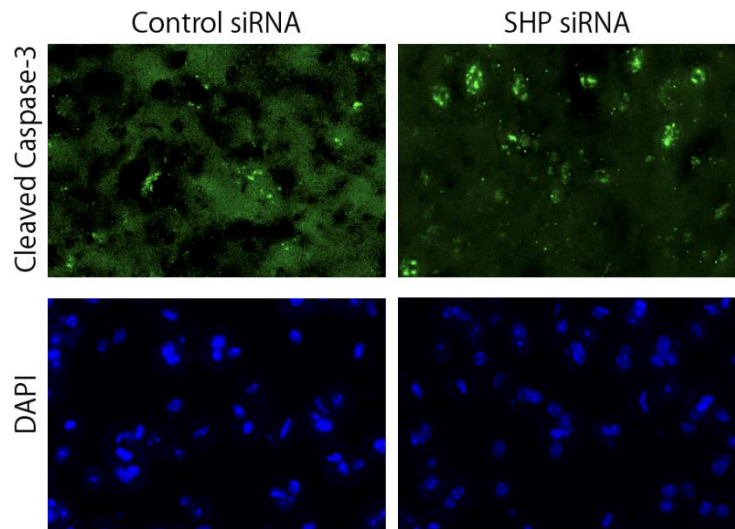


図 1. SHP siRNA による細胞死抑制作用

### 【 謝辞 】

本研究の遂行にあたり、ご支援賜りました公益財団法人 薬理研究会関係者の皆様に、深く感謝申し上げます。

### 【 参考文献 】

1. Fujita Y, Yamashita T. Axon growth inhibition by RhoA/ROCK in the central nervous system. *Frontiers in neuroscience* 2014, **8**: 338.
2. Chivatakarn O, Kaneko S, He Z, Tessier-Lavigne M, Giger RJ. The Nogo-66 receptor NgR1 is required only for the acute growth cone-collapsing but not the chronic growth-inhibitory actions of myelin inhibitors. *J Neurosci* 2007, **27**(27): 7117-7124.
3. Zheng B, Atwal J, Ho C, Case L, He XL, Garcia KC, *et al.* Genetic deletion of the Nogo receptor does not reduce neurite inhibition in vitro or promote corticospinal tract regeneration in vivo.

*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, **102**(4): 1205-1210.

4. Atwal JK, Pinkston-Gosse J, Syken J, Stawicki S, Wu Y, Shatz C, *et al.* PirB is a functional receptor for myelin inhibitors of axonal regeneration. *Science (New York, NY)* 2008, **322**(5903): 967-970.
5. Fujita Y, Endo S, Takai T, Yamashita T. Myelin suppresses axon regeneration by PIR-B/SHP-mediated inhibition of Trk activity. *The EMBO journal* 2011, **30**(7): 1389-1401.

## 7. メラトニン受容体作動薬による海馬の神経活動の調節機構の解明

松本 信圭

東京大学大学院薬学系研究科

### 【要旨】

ラメルテオンは概日リズム睡眠障害の治療薬である。また、ラメルテオンはメラトニン受容体の特異的アゴニストであり、MT1 および MT2 受容体に対して高い親和性を示す。これまでの研究では、ラメルテオンはモリス水迷路課題や条件付け場所選好課題などのストレスや報酬・罰による行動課題で評価した記憶能力に有意な影響を与えないことが示されていた。一方、私たちは最近、ラメルテオンの投与により報酬や罰のない中立的な状況下で記憶、特に物体認識記憶の獲得を促進することを明らかにした。海馬と内側前頭前皮質 (mPFC) は物体認識記憶に関与していると考えられているが、ラメルテオンの投与がこの 2 つの領域に電気生理学レベルでどのような影響を与えるかは不明である。そこで、この物体認識記憶の向上のメカニズムを調べるため、マウスの海馬と mPFC にニクロム電極を慢性的に留置し、物体認識課題をおこなっているマウスの神経活動を記録した。新奇物体認識課題における記憶成績は弁別比によって評価した。なお、弁別比は、新奇物体周辺と既知物体周辺の探索時間をそれぞれ N と F としたときに、 $(N-F) / (N+F)$  として定義した。次に、デルタ、シータ、ベータ、低ガンマ、高ガンマの周波数帯域の強度の観点から、海馬および mPFC の神経活動を調べた。ラメルテオンの投与により、海馬における既知物体探索中のシータ波と、新奇物体探索中のベータ波の強度が増加した。これらの結果から、ラメルテオンが海馬におけるシータおよびベータ波を調節することで、記憶能力を向上させることが示唆される。

### 【結果・考察】

#### ニクロム線電極を刺入したラメルテオン投与マウスにおいて記憶成績が向上する

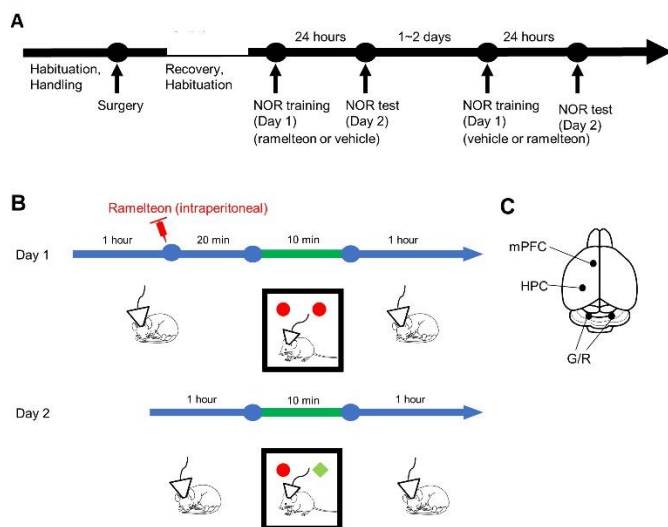
オペから 2,3 日間の回復及び habituation の後、Day 1 (training) と Day 2 (test) の流れで 10 分間ずつ NOR (新奇物体認識) 試験を行った (Fig. 1)。ramelteon または vehicle は Day 1 の training の 20 分前に腹腔内投与した。ImageJ によるトラッキングによりマウスの移動の軌跡を調べ、記憶成績は  $(N-F)/(N+F)$  で定義される弁別比 (Discrimination Ratio; DR) によって評価した。ここで N 及び F はそれぞれ新奇、既存の物体の中心から半径 3 cm (物体の底面積の半径の 2 倍) 以内にトラッキングしたマウスの鼻先が含まれる時間の総和を表す。ラメルテオンの投与により、Day 2 の DR に有意な上昇が見られたことから、ラメルテオンが新奇物体認識記憶の獲得を促進することが示された (Fig. 2)。

ラメルテオンの投与により既存物体探索時には海馬のシータ波が増強し、新奇物体探索時には海馬のベータ波が増強する

ラメルテオン投与が海馬、mPFC の神経活動にどのような影響を及ぼすかを調べるため、マウスの海馬および mPFC に慢性ニクロム線電極を刺入し、NOR 課題中、その前後の睡眠中の神経活動の記録を行った。NOR 試験 Day 2 中において、海馬の局所場電位 (LFP) を、マウスが新奇物体の探索時間、既存物体の探索時間に分けた。探索時間は、ここでは物体の周囲半径 3 cm 以内にマウスの鼻先が含まれていた時間、およびその時間に挟まれた、物体周辺に鼻先が含まれない 1 秒以内の時間をつなげたものとして定義している。また、ramelteon 群および vehicle 群の、新奇物体と既存物体それぞれの探索時間の海馬 LFP についてフーリエ変換を行い、delta (1-4 Hz)、theta (8-12 Hz)、beta (18-25 Hz)、low gamma (30-50 Hz)、high gamma (50-80 Hz) の各周波数帯域における強度を、フーリエ変換を行ったグラフの AUC (曲線下面積) によって求めた (Fig. 3)。

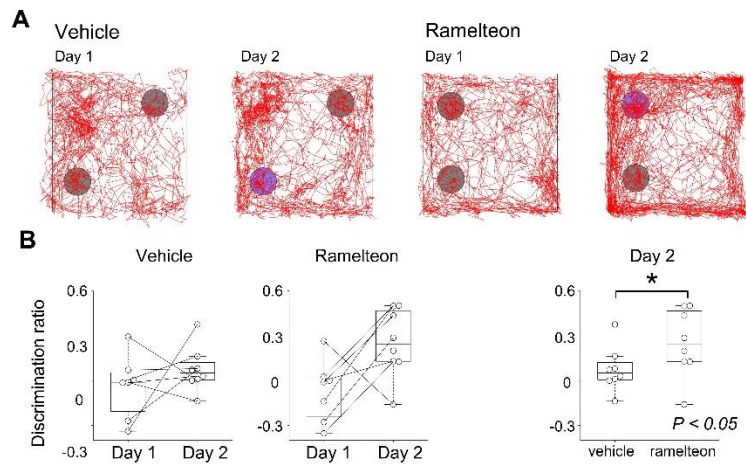
以上の方法で、海馬における、既存物体探索時の各帯域脳波の強度に対する、新奇物体探索時の各帯域脳波の強度の比を求めた。Day 1 のトレーニング時では、海馬や mPFC において、どの周波数帯域においても有意な差は認められなかった (Fig. 3)。

また、Day 2 では、既存物体周辺の探索時にはラメルテオン投与マウスの海馬でシータ帯域の強度が上昇するとともに、新奇物体の探索時には、ラメルテオン投与マウスの海馬でベータ帯域の強度が上昇した (Fig. 3)。これは鼻を介した新奇物体のサンプリングと関連があると考えられる。



**Fig. 1. Study design.**

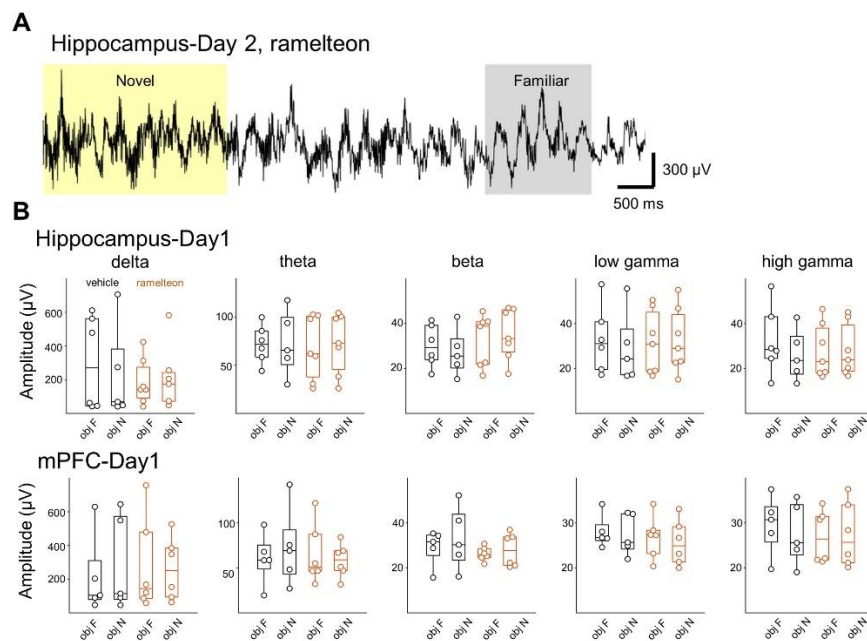
**A-B,** Time course of the experiment. After recovery and habituation after the surgery, the novel object recognition (NOR) test was performed for 10 min each in Day 1 (training) and Day 2 (test). One of the objects placed on Day 1 was replaced with a different object on Day 2. Ramelteon or vehicle was administered 20 minutes before NOR training. **C,** Location of electrodes in the mouse brain. Nichrome wire electrodes were implanted into the hippocampus (HPC) and medial prefrontal cortex (mPFC).

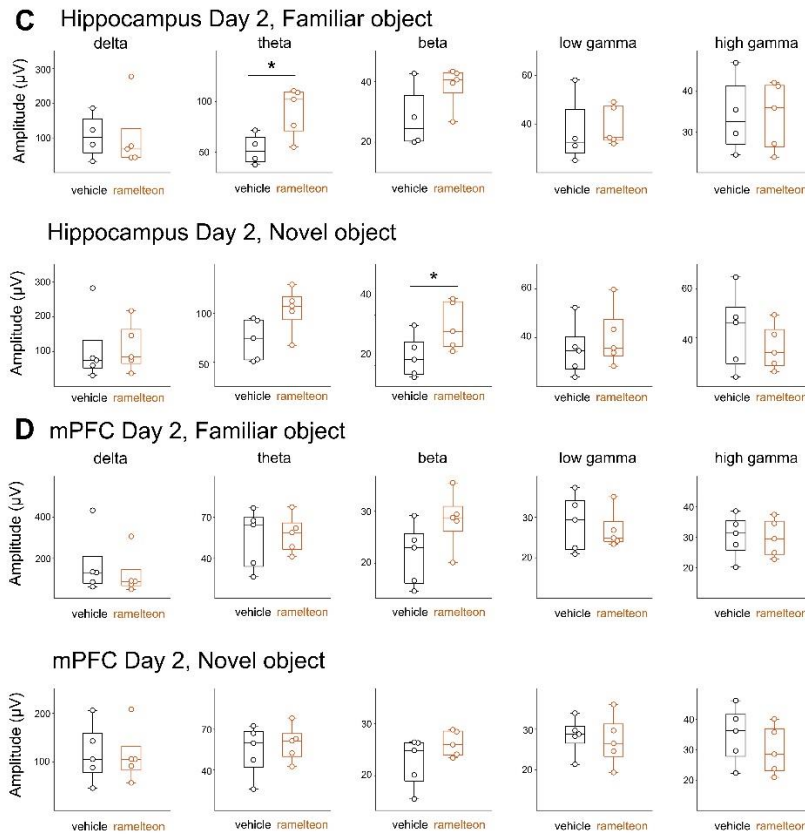


**Fig. 2. Improvement of object recognition memory by ramelteon treatment.**

**A**, Representative trajectories (red) of mice on Day 1 and Day 2. Circles indicate the position of objects. (blue: novel object; black: familiar object)

**B**, Performance of the novel object recognition task was assessed by a discrimination ratio defined as  $(N-F)/(N+F)$ , where N and F represent time spent in areas around the novel and familiar objects, respectively. Memory performance of mice was significantly improved in the ramelteon-treated group.





**Fig. 3. Neural activity in the hippocampus and mPFC during the novel object recognition task.**

**A,** A representative trace of the raw extracellular oscillations in the hippocampus of a ramelteon-treated mouse that explored novel (yellow) and familiar (gray) objects.

**B,** Mean amplitude of each frequency band (delta, theta, beta, low gamma, and high gamma) of hippocampal and mPFC LFPs during object exploration on Day 1. Obj N is the one that is changed into a novel object in Day 2, and obj F is the other one.

**C-D,** Mean amplitude of each frequency band during exploration of novel and familiar object in the LFPs of the hippocampus (**C**) and mPFC (**D**) on Day 2. Ramelteon treatment increased the theta power in the hippocampus during familiar object exploration and beta power during novel object exploration.

#### 【展望】

課題前後の休憩中の脳波も解析し、行動成績を予測できる神経活動を探索する。現在解析を進め、投稿論文を準備中である。

#### 【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、多大なるご支援を賜りました公益財団法人薬理研究会に深く感謝申し上げます。

【参考文献】

- Kudara, M., Kato-Ishikura, E., Ikegaya, Y., **Matsumoto, N.**† Ramelteon administration enhances novel object recognition and spatial working memory in mice. *J Pharmacol Sci.* 152(2): 128-135. 2023.
- Yoshimoto, A., Yamashiro, K., Ikegaya, Y., **Matsumoto, N.**† Acute ramelteon treatment maintains the cardiac rhythms of rats during non-REM sleep. *Biol Pharm Bull.* 44(6): 789-797. 2021.
- Yoshimoto, A., Yamashiro, K., Suzuki, T., Ikegaya, Y., **Matsumoto, N.**† Ramelteon modulates gamma oscillations in the rat primary motor cortex during non-REM sleep. *J Pharmacol Sci.* 145(1): 97-104. 2021.

## 8. クライオ電子顕微鏡を用いた尿酸輸送体の構造薬理学の開拓

李 勇燦

横浜市立大学大学院生命医科学研究科

### 【背景・目的】

ベンズプロマロンやプロベネシドに代表される尿酸排泄促進薬は、腎臓での尿酸再吸収を阻害することで血中尿酸値を下げる薬であり、痛風および高尿酸血症の治療に用いられる。これらの薬剤は、主に URAT1、GLUT9 と呼ばれる 2 つの尿酸輸送体を分子標的とする(図1)。URAT1 は有機アニオン輸送体(OAT; SLC22)に属するタンパク質であり、尿酸と有機酸の交換輸送を行う。一方で、GLUT9 はグルコース輸送体(GLUT; SLC2)に属し、電位依存的な尿酸輸送を行う。その他、ABCG2、NPT1、OAT1、OAT4 など尿酸の排泄および再吸収に関わることが知られている[1]。尿酸排泄促進薬は臨床で広く利用されており、豊富な薬理的知見が蓄積される一方で、各薬剤が各輸送体にどのように結合して阻害するのかは依然として不明である。また、既存薬の中には副作用が指摘されているものもある。したがって、既存薬と同等の薬効を持ちつつも、副作用の少ない尿酸排泄促進薬を開発することが現在も課題となっている。そこで本研究では、尿酸排泄促進薬の構造基盤を明らかにするため、クライオ電子顕微鏡を用いて URAT1、GLUT9 に代表される尿酸輸送体群と各種薬剤との複合体構造を解明することを目指した。

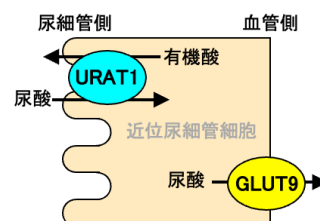


図1 腎臓の主な尿酸輸送体

### 【方法・結果】

構造解析に向けて、ヒトあるいはマウス由来の GLUT9、URAT1、OAT1 各遺伝子をベクターに導入し、HEK293F 細胞に大量発現させた。界面活性剤の検討の結果、URAT1 に関してはジギトニンの代用化合物である GDN にて、GLUT9 と OAT1 に関しては LMNG と CHS の組合せにて安定に精製できることを見いだした。アフィニティクロマトグラフィーにより高純度に精製したタンパク質溶液を電子顕微鏡グリッドに載せ、凍結装置 Vitrobot を用いて高速冷却後、クライオ電子顕微鏡 Titan Krios G4 を用い、それぞれ 6,000 枚から 20,000 枚のデータを撮影した。単粒子解析ソフトウェア RELION、CryoSPARC を用いた解析を行い、2.9 ~ 3.6 Å の高分解能で三次元再構成像を得た。URAT1 は、サイズが小さく構造がフレキシブルであることから、単体での構造解析が困難であった。そこで、既知のバインダー分子である Sybody によって認識可能なループをタンパク質に挿入することで、画像のアライメントに寄与する特徴量を増加させるとともに、タンパク質を安定化することで、構造解析に至った(図 2)。

URAT1、OAT1 は互いに類似した典型的な SLC22 ファミリーのフォールドを持っており、細胞外ドメイン(ECD)、2 つの膜貫通ドメイン(CTD、NTD)、および細胞内のヘリックス(ICH)から構成されていた(図 2)。すべての構造条件において、ポケットは細胞質側に開いており、尿酸および阻害剤は中央のポケットに観察された。興味深いことに、尿酸排泄促進薬の一つであるベリヌラドは、URAT1 と OAT1 においてそれぞれ異なる部位に結合していた。また、ベンズプロマロンとドチヌラドは似た骨格を持つにもかかわらず、結合ポーズが異なっていた。これらの構造同士の比較、および詳細なアミノ酸残基の解析から、選択的 URAT1 阻害のメカニズムが明らかになった[論文投稿準備中]。

GLUT9 は 12 本の膜貫通ヘリックスからなる典型的な GLUT ファミリーフォールドを示し、尿酸は 2 つの膜貫通ドメイン(CTD、NTD)で挟まれた大きな溝に結合していた。尿酸の親水基は周辺のアミノ

酸と水素結合を形成しており、プリン環の平面は疎水性残基により挟まれるように認識されていた。尿酸を認識している残基は、他の糖輸送型 GLUT メンバーと相違があり、それらの残基を糖輸送型メンバーに近づける変異を入れることで、尿酸輸送能が変化することが分かった。構造に基づいた変異マッピングにより、腎性低尿酸血症のメカニズムを明らかにすることができた[2]。

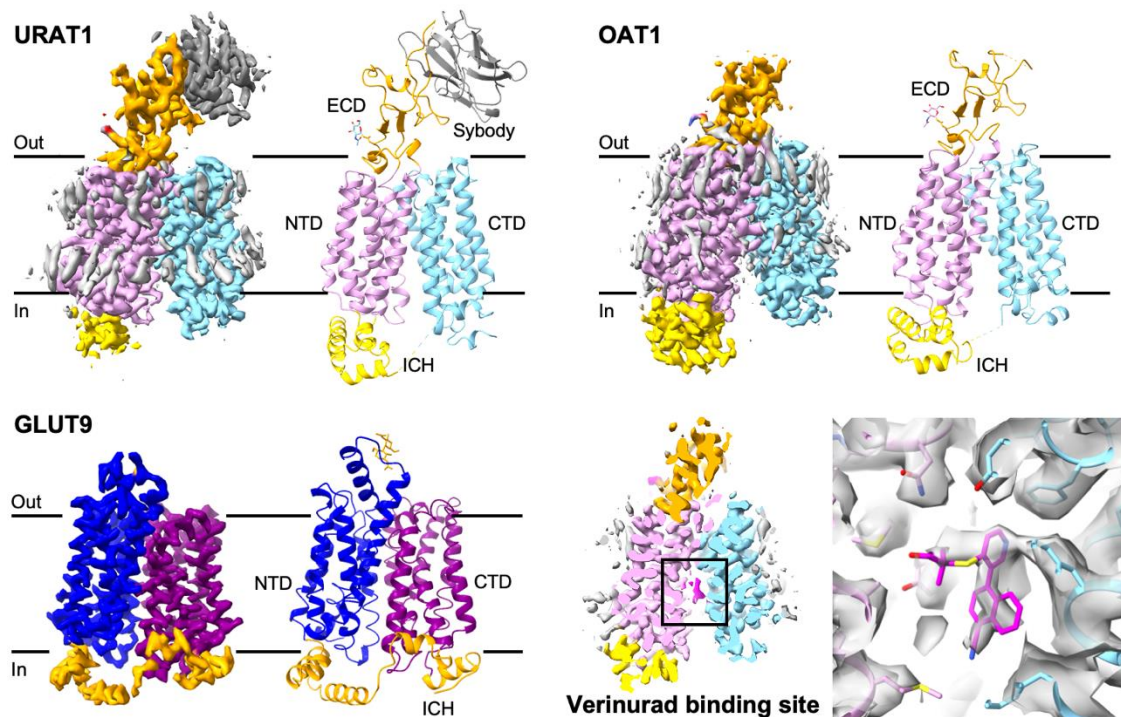


図2 URAT1, OAT1, GLUT9のクライオ電子顕微鏡構造

#### 【今後の展望】

本研究により、尿酸輸送体群の構造がはじめて明らかとなり、尿酸排泄促進薬の結合機序を構造から理解するための土台が得られた。これらの構造情報は、新薬の合理的設計ならびに既存化合物の改良を加速させる枠組みを提供することが期待される。

#### 【謝辞】

本研究を遂行するにあたり助成を賜りました公益財団法人薬理研究会に深く感謝申し上げます。

#### 【参考文献】

1. Dalbeth N, Choi HK, Joosten LAB, Khanna PP, Matsuo H, Perez-Ruiz F, Stamp LK. Gout. *Nat Rev Dis Primers* **5**, 2019.
2. Matsushita D, Toyoda Y, Lee Y, Maeda A, Matsuo H, Takada T, Nishizawa T. Structural basis of urate transport by glucose transporter 9. *Submitted*. 2024

---

2024 年 12 月 6 日発行

編集発行 公益財団法人 薬理研究会

〒113-0033

東京都文京区本郷 2-40-14 山崎ビル 202C

電話 FAX : 03-5842-6308

E-mail : [zaiyakuriken@woody.ocn.ne.jp](mailto:zaiyakuriken@woody.ocn.ne.jp)

<https://www.dislo-koeki.org/08a/00994/index.html>

---