

## 第30回昭和大学学術会シンポジウム

「バイオメディカルサイエンスの最前線」

2021年8月28日(土)～9月6日(月)

オンデマンド配信にて開催

### 1. レドックス感受性アダプター分子の疾患発症における役割

金山 朱里

昭和大学医学部生化学講座

○金山 本日は貴重な機会を頂きまして、学術会運営委員の先生方はじめ、関係者の皆さまに感謝申し上げます。この演題では、私たちが継続的に解析を続けている、アダプター分子について紹介させていただきます。まず研究背景です。左は組織の細胞の顕微鏡写真で、右は細胞が産生した細胞外マトリックスが経時的に色分けされ、表示された写真です。細胞外マトリックス、以下ECMと呼ばせていただきますが、ECMは多細胞生物を構成する細胞を取り巻いて存在する、さまざまな物質の総称で、主要な成分としてコラーゲンが挙げられます。古くは細胞同士をつなぎとめる、ただの糊のように考えられていましたが、現在では細胞の増殖、分化や癌の転移、免疫反応といったさまざまな生命現象に関わる、生理活性物質であることが認識されています。

血管壁の細胞を例にとって見てみます。細胞はこのようにECMの中に存在しますが、このECMと細胞間の相互作用に重要な細胞側のゲートがインテグリンを軸として形成される細胞接着斑装置です。この装置を介して、細胞側のアクチン骨格と細胞外のコラーゲンなどのマトリックスがつながっていることが知られています。私たちは、この接着斑に局在するHic-5というアダプター分子について解析を行ってまいりました。Hic-5を接着細胞で染色すると、左の写真のような染色像を示します。赤いドットの1つ1つが細胞接着斑装置で、その1つを拡大して示したのが右の図です。接着斑装置は、コラーゲン受容体であるインテグリンを軸として複数の分子の会合により形成されていることが分かります。

Hic-5は、Hydrogen peroxide-inducible clone5の

略で、そもそも過酸化水素で発現誘導される遺伝子として同定されました。またTGF- $\beta$ でも発現誘導されるため、TGF- $\beta$ 111という別名があります。生体内では、通常平滑筋細胞や線維芽細胞に発現しています。またHic-5は、通常細胞接着斑と核をシャトルしていると考えられ、さらに活性酸素ストレス存在下では核に蓄積し、遺伝子発現制御に関わることも分かっています。この分子は酵素活性を持たず、接着斑、核内、細胞骨格上で、さまざまな分子を引き寄せ反応の場をつくりだすアダプターとして機能します。

私たちはまず、Hic-5の全身欠損マウスを作成しました。その結果、Hic-5欠損マウスは、メンデルズムにしたがって誕生し、成長、生殖、寿命は野生型マウスと何ら差が見られないことが分かりました。しかし、さまざまな疾患を発症させるストレスをこのマウスに付加したところ、複数の疾患の発症が抑制されるという現象が見つかってまいりました。このスライドに示します疾患リストは、欠損マウスで発症抑制が見られたものですべて報告済みです。本日は青字で示す3つの疾患について簡単に結果を解説させていただきます。

まず大動脈瘤に関してです。Apoe変異を背景に持つマウスにアンジオテンシンIIを持続投与することで、腹部大動脈瘤が発症することが知られています。そこでApoe変異マウスにHic-5欠損背景を持ち込み、アンジオテンシンII投与したところ、Hic-5欠損背景を持つマウスでは動脈瘤の発症が著しく抑制されることが見出されました。また動脈瘤のラプチャーによる死亡率も抑制されることが確認出来ております。

そのメカニズムとして、Hic-5はアンジオテンシンII下流で発生するROSに反応して、JNK IIのリン酸化反応の足場となることで最終的にMMPの発現制御に関わるということが分かりました。リン酸化反応

の足場となる Hic-5 が存在しないことで、その下流の MMP 活性が抑制され、最終的に動脈瘤発症が抑制されると想定されます。また、この Hic-5 の ECM 分解制御メカニズムの解析途中で、ECM 合成の関与も見出されました。そこで ECM の過剰産生が、その病態の原因である繊維症に着目し、次に Hic-5 の肝繊維化への関与について検討しました。

まず Hic-5 の欠損マウスを用いて、四塩化炭素投与や胆管結紮といったマウス肝繊維化モデルを作成しました。その結果、両方のモデルで、野生型マウスと比較し Hic-5 欠損マウスでは肝繊維化が抑制されることが分かりました。さらに Hic-5 欠損マウスでは、肝繊維化の原因とされるコラーゲンの発現が抑制されていました。そこでヒトおよびマウスの肝臓における Hic-5 の発現を確認しました。正常な肝臓では、Hic-5 の発現はほとんど見られませんでした。ヒト肝繊維化組織と 2 種類のマウス肝繊維化モデルでは、Hic-5 の発現が上昇していることが確認出来ました。さらにこの免疫染色の結果から、Hic-5 陽性細胞は活性型星細胞マーカーである  $\alpha$ SMA と一致していることが明らかとなりました。

肝星細胞は、肝障害時に活性化されミオファibroblast 様の形態を示します。そして活性化した肝星細胞はコラーゲンや TGF- $\beta$  を産生して、肝臓の繊維化において中心的役割を担うことや、がんの微小環境において肝がんを増大させることが報告されています。

そこで次に、マウス肝臓より星細胞、クッパー細胞、類同内皮細胞、肝実質細胞をそれぞれ分離培養し、肝臓内の Hic-5 高発現細胞を確認したところ、ここにお示ししますように Hic-5 はやはり肝星細胞に発現していることが明らかとなりました。これはマウス肝臓より分離培養した星細胞の 2 時間後から 15 日後の結果です。Hic-5 は培養 2 時間後にすでに発現が認められ、 $\alpha$ SMA よりも早い段階で発現が上昇することが分かっております。また培養ヒト星細胞および肝組織においても同様に、Hic-5 は星細胞に高発現していることが確認出来ています。

他のグループから、星細胞の培養活性化過程において発現誘導される遺伝子や、タンパク群の網羅的解析結果が報告されていますが、われわれの結果と同様に星細胞の活性化過程で Hic-5 の発現が誘導されることが報告されています。そこで肝星細胞の活

性化制御に注目しました。培養星細胞を用いて検討したところ、Hic-5 の欠損により肝星細胞の活性化マーカーである  $\alpha$ SMA の発現や、コラーゲン I、III の発現が抑制されることや、またそのメカニズムとして、Hic-5 欠損マウス由来肝星細胞では Smad の活性化に対して抑制的に働く Smad7 のベースレベルが上昇しており、このことにより、TGF- $\beta$  による Smad II のリン酸化が抑制されていることが明らかとなりました。

また興味深いことに、線維化病変を誘導後に Hic-5siRNA を 3 週間投与した結果、線維化病変の改善が観察されるという結果が得られています。さらに結果はお示しませんが、この際、星細胞の活性化およびコラーゲン産生が抑制されることも確認出来ております。

以上の結果から、Hic-5 が Smad 経路を介してコラーゲン産生を促進していることや、星細胞の活性化制御に関わることが分かってまいりました。また病変誘導後であっても、Hic-5 を阻害することで星細胞の活性化およびコラーゲン産生が抑制出来、線維化病態が改善される可能性があることから肝繊維化制御の新たな標的分子が同定されたと考えております。ECM は線維化だけでなく、がんの制御にも関与することが知られております。1990 年代には、すでにミナ・ビッセル等が、乳がん細胞を正常な ECM 中で培養することで、がん細胞の増殖を抑制することが可能であることを示しています。

そこで次に、Hic-5 ががん組織の ECM 制御に関与するか検討しました。まずヒト大腸がん組織を用いて Hic-5 の免疫染色を行ったところ、Hic-5 ががん間質内に高発現していることが明らかになりました。またこの結果は、ESTIMATE というがん間質に発現していることを示す stromal score を産出できるアルゴリズムを用いて、公開された複数の数百人規模の遺伝子発現データからも確認出来ています。

次に、ヒト大腸がん組織で Hic-5 ががん間質内のどの細胞に発現しているかを同定するために、さまざまな細胞マーカーと Hic-5 の免疫染色を行いました。その結果、Hic-5 ががん間質内のがん関連線維芽細胞 (Cancer-associated fibroblasts) CAFs に高発現していることが明らかになりました。そこで次に、CAFs をヒト大腸がんサンプルより分離培養しました。コントロールとして、同一患者さんの非が

ん部より Normal fibroblast を分離し、発現量を比較したところ、すべての症例において、Normal fibroblast よりも CAFs で Hic-5 の発現が誘導されていることが確認出来ました。

そこで次に、CAFs 内の Hic-5 ががん細胞増殖においてどのような機能を有するか調べる目的で、Hic-5 ノックダウン Normal fibroblast 株を樹立し、大腸がん細胞株と共培養アッセイを行い、がん細胞の増殖率を検討確認しました。その結果、Hic-5 が発現誘導される Normal fibroblast と比較して Hic-5 発現誘導を抑制した Normal fibroblast との共培養では、大腸がん細胞株の増殖が抑制されることが分かりました。

また、この共培養した細胞を Hic-5 染色したところ、がん細胞に隣接して存在する fibroblast で特に Hic-5 発現が著しく誘導されていることが分かりました。この染色パターンは、ヒトがん組織でも同じ傾向が観察されています。このがん細胞に隣接した fibroblast での Hic-5 発現誘導は、がん細胞由来の液性因子によるものか、直接的ながん細胞の接触が必要なのか詳細な解析を行うために、がん細胞の培養上清を用いて Normal fibroblast の培養を行い、Hic-5 の発現変化を検討しました。

その結果、がん細胞の培養上清による培養により Hic-5 の発現誘導が見られました。そこでがん細胞由来の液性因子として知られている TGF- $\beta$ 、PDGF などのサイトカインで、Hic-5 の発現変化が見られるか検討を行いました。その結果、さまざまな液性因子、特に TGF- $\beta$  で Hic-5 の誘導が観察されました。

次に Hic-5 の下流で、どのような分子が制御されているか過去の知見に基づいて検討したところ、コラーゲンの発現および、コラーゲンやエラスチンを架橋して細胞外マトリックスの強度を上昇させるリシルオキシダーゼ、LOX の発現変化が見つかりました。これは大腸がん細胞株と Hic-5 ノックダウン Normal fibroblast 株を共培養し、コラーゲンと LOX を染色した写真です。通常の Hic-5 が誘導される fibroblast との共培養では、特に隣接した fibroblast でコラーゲンや LOX の発現が誘導されているのが見て取れます。その一方で、Hic-5 ノックダウン Normal fibroblast 株では、これら分子の発現が抑制されていることが分かりました。

そこで次に Hic-5 を患者さん由来の Normal fibro-

blast に強制発現させ、これら分子の発現変化を検討しました。その結果、Hic-5 発現誘導により、LOX とコラーゲンの発現も誘導されるという結果が得られました。またこれら分子の発現誘導は、Normal fibroblast を TGF- $\beta$  刺激した際にも見られ、さらに Hic-5 ノックダウン株ではその抑制が確認出来ています。さらに Hic-5 がどうやってこれら分子の発現制御を行っているか、そのメカニズムを調べる目的で患者さん由来のノーマルファイブロブラストを TGF- $\beta$  刺激した際の Hic-5 細胞内局在を見てみました。その結果、TGF- $\beta$  刺激による Hic-5 の核局在が観察されました。この局在変化は、タンパク質の核外移行阻害剤であるレプトンマイシン B の処理により、一層顕著になるという結果も得られています。

次に核内に局在する Hic-5 が、LOX 発現を制御しているか確認するために、核局在型の Hic-5 を強制発現させ LOX の発現誘導が起きるかを検討しました。その結果、核局在型の Hic-5 を発現させた細胞では、LOX の発現が誘導されることが確認出来ました。

最後に重要な点として、Hic-5 が最終的に *in vivo* で、大腸がん発症制御に関わる分子であるかを明らかにするために、Hic-5 欠損マウスに発がん物質であるアゾキシメタン投与を行い、大腸がんのマウスモデルを作成しました。その結果、野生型マウスと比較して、Hic-5 欠損マウスでは大腸におけるアゾキシメタン誘導性大腸がん発症が抑制されるという結果が得られました。

以上の結果をまとめます。がん細胞が産生する液性因子、中でも特に TGF- $\beta$  に応答して、がん細胞に隣接する線維芽細胞の中で Hic-5 の発現や核移行が起き、転写共役因子としての機能も報告されている核内 Hic-5 が、コラーゲンや ECM リモデリングに関与する LOX の発現を誘導することで、がん細胞の増殖に有利な微小環境の一つである固い ECM を作り出し、がん細胞増殖に寄与していると考えられます。このがんのホールマークの一つである、固い間質に関して、本学歯科理工学の柴田教授を介してシドニー大航空宇宙工学科のエンジニアと、がん組織の力学的特性変化について、数理モデルを用いた共同研究が進行しています。がん組織の剛性が上昇した ECM は、免疫細胞の浸潤阻害や、抗がん剤の浸透阻害といった治療抵抗性の原因とな

るだけでなく、がん幹細胞のニッチ形成という側面からもその重要性が認識されています。

そこで、これまで主に工学分野で用いられてきた物理的パラメーターを生物分野に応用し、解析することで、画像データからの超早期悪性腫瘍診断や、がん免疫療法における免疫細胞の浸潤性予測などへの応用を将来的な目標として解析を進めており、最近面白いことが分かり始めたところです。

また私たちは現在、実際にヒトでこの標的分子を抑制することが可能な阻害剤の開発を行っています。従来の創薬ターゲットは、増殖因子やサイトカイン、またそれらに関与する受容体やキナーゼなどが中心であり、酵素活性を一体持たないアダプター分子を標的とした創薬は困難でした。しかし、次世代創薬技術である核酸医薬品技術を用いることでそれが可能になります。また、開発モダリティであるアンチセンス核酸は、すでに遺伝性疾患を対象とする複数の承認医薬品で治療効果が得られています。特に肝臓への移行性が高いことから、このプロジェクトが予定通り進めば繊維症治療薬として実際に臨床開発につながるリード化合物の創出が可能になります。この研究は、本学医学部生化学講座、宮崎章研究室にて行われました。本日お話ししたデータ収集に関してお力をお貸しくださった先生方です。この場をお借りして改めてお礼申し上げます。

最後のスライドです。現在は少人数で多くの実験を臨機応変にこなしていますが、大変うれしいことにそのような状況でもチームの先生方が各自研究代表者として科研費を獲得してくれ、現在複数の関連テーマが並走しています。このスライドにあります有志竟成は、実験室に貼ってある言葉で、一見不可能に思えることでも、志を強く持って事に当たれば、必ず成し遂げられるという意味です。この数年間のチームのゴールは、臨床開発に上げるための阻害剤の最適化ですが、本当のゴールは治療法のない疾患で絶望の淵にいる患者さんをもう一度笑顔にすることだと考えています。もし研究にご興味のある方は、どうぞご連絡いただけましたらと思います。

以上です。ありがとうございました。

## 2. 生活習慣病に潜むタンパク質分解異常

宮崎 拓郎

昭和大学医学部生化学講座

○宮崎 まず、このような発表の機会を与えていただきまして、オーガナイザーの先生方に心より御礼申し上げます。本日はこちら、「生活習慣病に潜むタンパク質分解異常」についてお話ししていきたいと思います。

まず、細胞内のタンパク質はプロテアーゼによる品質管理を受けています。このように、プロテアーゼがタンパクを切っていくことによって、不要なタンパク質が分解され、常にターンオーバーするという考えであります。これが、ストレスや加齢によって支障をきたしてきますと、タンパク分解が低下して、ジャンクなタンパク質ですとか、場合によっては未切断なタンパク質が増えてきます。その結果、タンパク質の恒常性が喪失され、コンホメーション病が発症します。これはよくあるスキームであります。これを担当しておりますタンパク質分解機構としましては、オートファジーですとか、ユビキチン・プロテアソームなどが有名であります。こういったものがタンパク質の恒常性を調節しているのはよく聞かれますけど、私たちが着目しているのはわりとニッチな機構で、カルpain系というものに現在注目しております。このプロテアーゼシステムは、こちらのように、哺乳類では15のホモログからなるスーパーファミリーで構成されています。細胞内に局在するカルシウム・ディペンデントなプロテアーゼで、特に1番2番が従来型と呼ばれております。これらが非常に有名なアイソザイムであります。カルpainというと、これらを指す場合が多いです。従来型カルpainの分子構造としましては、こちらのように、ヘテロダイマー型の構造をしておりまして、カルpain 1番2番というのが触媒サブユニットで、これに対して制御サブユニットが結合して機能するということになります。もう1つ重要な因子として、こちら、カルpastatinという内因性の阻害因子というものが存在しております。これはカルpainの分子構造ですが、ここに紫のカルpastatinがこのように巻き付いています。この結合によって、活性が負に制御されバランスが取られておりシステムとして機能しております。カ

ルパインはスーパーファミリーですので多くのアイソザイムが存在するんですけど、元々、1番2番が発見されたのが1970年代ということで、かなり歴史のある分子であります。いろんなアイソザイムのノックアウトマウスが作られて、このように病態と関わってくるということがわかってきております。特に私たちは生活習慣病ですとか、血管病に着目しております。動脈硬化ですとか、病的な血管新生ですとか、あとは、場合によっては創傷治癒にかかる線維症なんかを解析してまいりました。本日はこの辺りをご紹介していきたいと思っております。特に生活習慣病を紹介してまいります。

まず、ストラテジーとして、多くの実験で遺伝子改変動物を用いております。たとえば、コンディショナルなTgマウスを作出しまして、こちらはTie2プロモーター下流でドライブする、コンディショナルなTgマウスでして、これにCreリコンビネースが働きますと、内皮細胞を主体としてカルパスタチンの発現が誘導されるような構成になっております。こういった形で、内皮細胞にカルパスタチンを導入し、酸素誘発性の網膜症を誘導しますと、カルパインの下方制御によって、このように血管が正常化します。こういった、団子のような血管が正常化しているのがおわかりいただけると思っております。同じように、ルイス肺ガンの移植モデルをやっていると、このように、ガン血管が縮小する。要するに、抑制の方向に働かしまして、腫瘍自体も抑制されるということで、これはおそらくガン血管の退縮が効いているんだということがわかりました。このように、カルパインはいわゆるストレスが掛かったような、負荷されたような状態で血管の機能に何らかの影響をおよぼしているということがおわかりいただけると思っております。こちら、ヒトでも同じようなことが言えるかということで、ガンの腫瘍組織と正常組織で比較してまいりました。そうしますと、通常の血管ですと、このように血管にカルパスタチンが発現しているのがおわかりいただけると思っておりますが、同じように腫瘍血管を染めていきますと、ほとんど染まって来ませんので、この辺りですね、血管はあるんですけど染まらないので、確かにガン血管、アクティブに血管新生をしているような血管ですと、カルパイン系が脱抑制を受けていることがわかります。

これが、*In vitro*の系で再現されるかどうか、培養内皮細胞を使って検討しました。そうしますと、血管新生の刺激であるVEGF, EGF, IGFを加えていきますと、確かにカルパスタチンの脱抑制が見られましたので、こういった血管新生をしている内皮細胞ではカルパインが常に活性化の状態になっているということが示唆されます。ここでメカニズムの検証をするということを考えました。考え方としましては、正常血管と病的血管の違いに着目してまいりました。正常血管は主にVEGFの働きで、こういうふうに血管網が形成されてきますけど、病的血管ですと、これに加えてサイトカインですとか、炎症性のメディエーターなんかも血管新生を促進するような活性をもっていますから、これがリダンダントに効いており、この辺が正常血管とは違うというふうに考えました。次に、siRNAを用いてカルパスタチンをノックダウンして、カルパインを活性化するという方法で、それぞれのサイトカインに対する応答性を見ていきました。そうしますと、IL-6に対してポジティブな反応が得られまして、このようにカルパインの活性がIL-6の応答をエンハンスするということがわかりました。じゃあ、IL-6の下流に関わるような分子がカルパインによって修飾されているんじゃないかと考えまして、このように、*In Silico*の解析でIL-6の下流の分子のカルパイン感受性を予測しました。そうしますと、SOCSというJAK/STAT経路の内因性阻害因子になるんですけど、こういったものにスコアが非常に高いということがわかりました。これを検証するというので、SOCSの変異体を作っていこうというふうに考えました。これはSOCS分子構造ですね、内皮細胞が一番たくさん発現しているのはSOCS3なんですけど、感受性を予測していきますと、この辺りですね、PESTシーケンスに非常にスコアが高いということがわかりまして、この部位に対応する変異体を作りました。実際に、これは変異体を精製してきて、カルパインで切っていったんですけど、*In vitro*でこういうふうに切断をしていきますと、確かに、先ほどの変異体でカルパイン耐性になっているのがおわかりいただけると思っております。これは実際に、SOCS3がカルパインによって分解されるということの裏付けになると考えております。

まとめてみますと、カルパインは外からのストレ

スで脱抑制を受けて顕在化すると、これが機能タンパクを切断するので、細胞本来の機能が異常をきたしている。そういったことがわかりました。

次に、こういった従来型カルパインがいわゆる動脈硬化病変に関わるかどうかということで、検討してまいりました。生活習慣病の一種ですね。同じようにストラテジーとしてはマウスを使っておりまして、これは典型的な動脈硬化モデルマウスの LDL 受容体ノックアウトマウスを使って、これに高コレステロールダイエットを負荷して検証してまいりました。こういったモデルを作って、動脈を取ってきて、発現を見ていきますと、確かにカルパインの 2 番が発現誘導されており、従来型カルパインが増えているということがわかりました。これ以外にも、6 番とか 9 番とか、他の、要するに従来型ではないカルパインも増えてきますけど、これは後述いたします。まずは従来型を検討するというので、免染で血管におけるカルパインの分布を見ていきました。そうしますと、確かにここ、動脈硬化のプラークなんですけど、この上に一層に染まっているのがおわかりいただけると思います。これは内皮細胞と考えられまして、やはり内皮の発現が強いということがわかりました。ヒトでも同じようなことがわかりまして、確かに通常の血管にはカルパインはあんまり発現していないんですけど、これが動脈硬化病変で内皮細胞にかなり強い発現が見られるということで、やはり内皮に異常をきたしているだろうと考えました。こちらは先ほどと同様のマウスですね、これはコンディショナルなカルパスタチンの Tg マウスで、内皮細胞にターゲティングしていくというストラテジーを取りましたところ、確かに、この動脈硬化病変が抑制されるということがわかりました。この原因をいろいろ調べていったんですけど、どうも、内皮細胞のバリア機能に影響があるんじゃないかということがわかりました。こちらは、いわゆる末梢の内皮細胞の透過性を司っている VE-cadherin という内皮細胞間の接着分子の染色像でございます。これが発現がチャウダイエットに比べて高脂肪食、高コレステロール食で、こういうふう完全に壊れてしまう、ズタズタになってしまうというのがおわかりいただけると思います。これはマウスの実験なんですけど、マウスにカルパインの阻害剤を投与していきますと、このように細胞間の結合がリカバリー

してきますので、確かにカルパインが、こういった VE-cadherin のこういうディスオーガナイゼーションに関わっているのではないかと考えました。ウエスタンプロットで同じことを検証していきまして、動脈硬化を誘発しますと、このように 90kDa にフラグメントが検出されました。これが阻害剤の作用によって消失しているのがおわかりいただけると思います。さらに、これは酵素実験で検証したもので、VE-cadherin のリコンビナントを取ってきて、これはカルパインのリコンビナントで切断するということを試験管内で行いました。そうしますと、確かにカルパインの 2 番が VE-cadherin を切るということがわかりました。これら一連の結果は、内皮細胞のカルパインがこういったふうに顕在化すると、内皮細胞間のジャンクション、VE-cadherin を切断して壊してしまうので、結果的にマクロファージですとか、そういった動脈硬化性の物質が血管の内膜に溜まりやすいということを示唆しています。

ここまで、カルパインが動脈硬化の発症に関わるということがわかってきたんですけど、こういった高コレステロール血症の条件下で、どのようにしてカルパインが顕在化するかというのはわかっておりませんので、これを、最近も検証しておりまして、LDL 受容体ノックアウトマウスの実験で、どうも、脂質代謝異常の下流でカルパインが活性化しているんじゃないかというエビデンスを得ました。こちらは東京大学医学系研究科疾患生命工学センターの村上誠先生・武富芳隆先生のご協力でリピドミクスを全身的に行った結果になります。そうしますと、いわゆるリゾリン脂質が結構偏りがありまして、比較的量の少ない LPI, LPG, LysoPS, LPA などの、こういったリゾリン脂質がリンパ環境にたくさんあって、いわゆるコレステロール血症で増えてくるというようなことがわかりました。培養細胞の実験で、このように LPI, LPG, LysoPS, LPA, こういったリゾリン脂質が、どうもカルパインを活性化する働きがあるということがわかってきております。

ここまでまとめていきますと、カルパインは細胞外からのストレスによって活性化します。その活性化因子としましては、成長因子ですとか、リゾリン脂質があげられます。これが、要するに、細胞内の機能タンパクを切断することによって、細胞機能が

変化すると、こういったことがわかります。これはまあ、いわゆる、われわれも含めたカルパイン研究者がよく描くスキームなんですけど、最近、これ以外にもカルパインが、体の機能を制御するような仕組みがあるんじゃないかということがわかってまいりました。こちらの検討は、大学院生の赤須里沙子さんによって検討されている肥満マウスの検討になります。マウスで食餌誘発性の肥満を起こしますと、肝臓で脂肪肝が起こることがわかっております。これはカルパインをノックアウトすることによって抑制されるということがわかっております。しかもこれはコンディショナルで、内皮細胞のカルパインをノックアウトしております。それで九州大学基幹教育院自然科学実験系部門生物資源環境科学府 Vishwajit S. Chowdhury 先生のご協力で肝臓内でアミノ酸の分布を測っていきますと、このように、ロイシンですとかイソロイシン、この場合グリシンも下がってくるんですけど、これが低下してくるということがわかっております。カルパインはタンパクを分解していきますので、これが分解されたプロダクトは、要するに、肝臓内のアミノ酸、遊離アミノ酸ですね、これに影響しているんじゃないかということを想像させるような結果になっております。これを検証する目的で、培養内皮細胞でカルパインを活性化していきますと、実際に細胞の培養上清でアミノ酸がリリースされてくるということがわかりました。これを、実際にこういったリリースされてくるアミノ酸が細胞機能に関わるかということで、条件培地の実験を行いました。内皮細胞のカルパインを活性化してリリースされたコンディションド・メディウムを、HepG2の肝細胞に付加してインスリンで刺激するという実験を行いました。そうしますと、確かにコンディションド・メディウム中でインスリン刺激すると、肝細胞の中性脂肪の増加が見られるんですけど、これはアミノ酸トランスポーターのインヒビターですとか、こちらはアミノ酸センサーのmTORの阻害剤であるラパマイシンを負荷していきますと抑制されてきますので、確かに、この条件培地中のアミノ酸がリピッドの増加に関わっているということを示唆しております。この結果は、単純にカルパインというのはタンパク質を分解するだけじゃなくて、環境中のアミノ酸のバランスの制御をしているんじゃないかということを示唆

すると考えられます。これは今後検討をしていきたいと思っております。

ここまで、主にいわゆる従来型のカルパインについてお話してまいりまして、動脈硬化ですとか、病的な血管新生に関わってくるということを明らかとしてみまいりました。途中でお話しした、LDL受容体ノックアウトマウスの結果で、従来型以外のカルパインも動脈硬化で増えているんじゃないかということをお話ししてまいりました。そこで、この6番、9番に関しても検討していこうということで検討を行っております。6番、9番のノックアウトマウスは既に作られておりまして、こちらの東京都医学総合研究所カルパインプロジェクト秦勝志先生が9番を作っていますし、こちら東京大学大学院医学系研究科代謝生理化学教室礪波一夫先生が6番作っております。これを分与していただきまして、Ldl受容体ノックアウトマウスと掛けて検討しました。そうしますと、9番に関してはあまり影響なかったんですけど、6番をノックアウトすると動脈硬化が抑制されるという表現型が見出されました。この6番というのは非常に特殊なカルパインでして、こちら通常の、先ほどお示したカルパインの構造なんですけど、6番というのは、活性中心のシステイン残基がリジンに置換されているものであります。その結果、この6番というのは、タンパク分解活性を持たない特殊なカルパインになりますということです。発現もユニークでして、胎児期に骨格筋、心筋に発現しているんですけど、これが成長するにしたがって発現が低下して、基本的に胎盤以外では発現していない分子というふうに言われております。これは、これがどのように動脈硬化を制御するかというのは、当初はわからなかったということです。まず、発現を見ていこうということで、6の発現を、これはマウスのモデルで見ていきますと、どうもこのカルパイン6は動脈硬化病変で、マクロファージに局在していそうだということがわかりまして、他のカルパインと違って、内皮には発現していないですし、平滑筋にも発現は認められないということがわかりました。このマクロファージの発現をヒトでも見ていきますと、正常血管で認められなかったんですけど、比較的グレードの高い動脈硬化病変で、どうもマクロファージに発現が増えてきているということがわかりました。マクロファージは生体内で

骨髄細胞に由来しておりますが、これが、単球として血中をパトロールして、炎症が起こるとそこでマクロファージに分化誘導されます。動脈硬化の場合、これが LDL を取り込むので、泡沫化して、病変が大きくなるということが知られております。カルパイン 6 は一連のマクロファージの細胞系列の中で、どの段階で増えてくるかということを検討しました。まず、骨髄細胞の段階では、カルパイン 6 はほとんど発現していませんでした。これを、M-CSF の存在下で分化誘導しますと、どうもこの TNF- $\alpha$  の添加によって、3, 4 日すると誘導されてくるということがわかりました。確かにこれは、カルパイン 6 はマクロファージで機能するということの裏付けになると思います。

動脈硬化とマクロファージということで見えていきますと、やはり、マクロファージは先ほど申し上げたように、コレステロール代謝が重要であると考えられます。これはマクロファージのコレステロールの取り込みについてまとめた図なんですけど、このように、マクロファージが LDL コレステロールを取り込む場合は、受容体依存的なパスウェイと非依存的なパスウェイがあります。これをノックアウトマウス由来のマクロファージで網羅的に検討していきますと、このような形になりました。時間の関係でポジティブなものだけご紹介しますと、こちらの飲作用、要するに受容体非依存的なネイティブ LDL の取り込みが増えているということがわかりました。一方、受容体依存的経路に関してはあまり増えていないということがわかりました。メカニズムを検討したいということで、マイクロアレイ解析を行いましたけど、上記現象を遺伝子発現で合理的に説明できるような結果が得られませんでした。カルパイン 6 はプロテアーゼ活性を持っておりませんので、何らかのタンパク間の相互作用によってこういった表現型が発現しているんじゃないかと考えました。こちらは、歯学部の高見正道先生に分与いただいた細胞なんですけど、J744 細胞にカルパイン 6 のリコンビナントタンパク質を発現させまして、いわゆる免疫沈降物の質量分析でプロテオミクス解析をおこないました。その結果、カルパイン 6 と相互作用するようなタンパク質がいくつか出てきてまして、この中で特にこの CWC22 という分子に着目しました。こちらは、いわゆるスプライシングファクター

と呼ばれるものの一種で、こちらも詳しいことは割愛しますが、要するに eIF4AIII という、いわゆるデッドボックスヘリカーゼを未成熟な mRNA に導入するような、そういったローディングファクターとして知られております。重要なことは、この CWC22 を細胞でノックダウンしていきますと、このようにスプライシングの効率が変わるということが知られております。つまり、この CWC22 というのは、mRNA の成熟に必須であると考えられます。マイクロアレイの結果というのは、要するに、成熟 mRNA の総量しか見ておりませんので、この成熟のプロセスに何かしら変化が起こることによって、マクロファージの形質が変化するんじゃないかと、そういったことを考えました。まずは、CWC22 の挙動について検討して見ました。これは、先ほど骨髄由来マクロファージの、CWC22 の発現分布を見ていったものなんですけど、野生型マクロファージに比べまして、明らかにカルパイン 6 をノックアウトしたマクロファージは、この CWC22 が核に局在する割合が増えていました。このようにきれいに核に行くようになりました。これは、実際に動脈硬化のモデルマウスでも同じことが言えまして、これで、動脈硬化病変のマクロファージを免染で見えていきますと、明らかに、マクロファージの核に CWC22 が局在しているということがわかりました。これは確かにこのカルパイン 6 によって CWC22 の細胞内挙動が影響を受けていることを示しております。じゃあ、機能はどうかということで見えてきました。これは先ほどのマクロファージで CWC22 の発現を、こちらは siRNA でノックダウンしてマクロファージの分化誘導を行いました。そうしますと、先ほどの、コレステロールの取り込みに関わる分子で Rac1 というのがあるんですけど、この分子のスプライシング効率が低下してくるということがわかりました。タンパク質発現に関しても、このように低下してくるということがわかりました。さらに飲作用活性を見ていったんですけど、カルパイン 6 のノックアウトによって、いったんこれが減少するんですけど、このように CWC22 のノックダウンでリカバリーしてくるということがわかりました。この結果は、カルパイン 6 は CWC22 の機能とインタラクションしていることを示していて、このインタラクションによって、マクロファージの表



現型が影響を受けているということを示しているということになります。

一連の結果をスキームにまとめますと、まず動脈硬化病変の形成される初期の段階で炎症性刺激によってマクロファージが誘導されてくるわけなんですけど、同時に細胞内で飲作用が増えてくるんですね。細胞内では何が起きているかということ、細胞質でCWC22とカルパイン6がこのように相互作用を起こしまして、これの核局在を抑制すると、その結果、いわゆるターゲット遺伝子でありますRac1の発現が下がってくる現象が起きます。この結果、飲作用が増えるということですね。これが認められたということが一連の結果となっております。

ここまでJournal of Clinical Investigation誌に報告したんですけど、最近この話をもっと進展がありまして、カルパイン6とCWC22の異常というのは、どうも動脈硬化に留まらないということがわかっていきます。ヒト動脈硬化病変のマクロファージを見ていきましたところ、マウスと同様に重症度が増えるとCWC22の核局在が減って、同じような兆候がヒトの糖尿病ですとか肝硬変の肝臓でも検出されています。あとは、肥満でも同じようなことが言えておりまして、BMIが増えるにしたがって、内臓脂肪組織のマクロファージの核からCWC22が排泄される様子がおわかりいただけると思います。サントリー生物有機化学研究所の佐竹炎先生のほうと共同研究をやっておりまして、RNAseqによってスプライスバリエーションの解析をしておりますけど、例えばエンドサイトーシスに関わるような分子ですとか、あと、mRNAスプライシング自体に関わるような分子のスプライスバリエーションが検出されておりますので、こういった形で、何らかのスプライシング異常によって病態が形成されているのではないかと考えて、目下検討中でございます。一連の結果から新しいコンセプトに至ったと考えておりまして、すなわちストレス誘導性スプライセオパシーということになります。一般的にスプライセオパシーといいますと、遺伝性の疾患を指す場合が多いんですけど、いわゆる遺伝子のミューテーションによって、スプライシングがうまくいかなくなると、スプライスバリエーションの構成が異常をきたします。その結果、遺伝的な病変が誘発されます。もう1つ、よく報告されているのがガンでありまして、いわゆる発ガンの

過程で、遺伝子異常が起こって、同じようにスプライシング異常をきたしてガンの形成に至ります。これがいわゆる典型的なスプライセオパシーということになってきます。我々は、これらのスプライシング異常が後天的に、可逆的な状態で起きているんじゃないかということを考えております。ストレスによってカルパイン6が誘導されますが、同分子がスプライシングファクターと一時的に相互作用することによって、スプライシング異常が起こると考えられます。その結果として発症する非遺伝的な疾患、たとえば動脈硬化や肥満なんかも後天的なスプライセオパシーの範疇に入るのではと考えて、目下検討を進めているところでございます。

一連の結果は、多くのコラボレーターの先生方の協力によって達成することができました。この場を借りて、深く御礼申し上げます。ご清聴ありがとうございました。

### 3. 脳オルガノイド技術を用いた多能性幹細胞による3次元唾液腺の誘導

田中 準一

昭和大学歯学部口腔病態診断科学講座  
口腔病理学部門

○田中 本日はこのような発表の機会を与えていただき、座長の宮崎先生、美島先生にこの場を借りて感謝申し上げます。

昭和大学歯学部口腔病理学部門の田中です。本日はオルガノイド技術を用いた多能性幹細胞による3次元唾液腺組織の誘導についてお話しさせていただきます。

近年、ES細胞やiPS細胞などの多能性幹細胞から、胎生期の発生過程を*in vitro*でトレースすることにより、さまざまな臓器のオルガノイドが誘導されています。代表的なものと小腸オルガノイド、腎臓オルガノイドや、大脳オルガノイドなど報告されているオルガノイドの分化誘導方法は三胚葉に渡っております。われわれの研究対象である唾液腺については、非神経系の外胚葉に分類され、この非神経系の外胚葉領域では、眼杯オルガノイドや、下垂体オルガノイドの分化誘導方法が開発されています。しかしながら、唾液腺、乳腺、涙腺などを含む外分泌腺オルガノイドについては、多能性幹細胞

からの誘導については報告されていなかったのが現状でございました。

ここで、マウスの唾液腺発生についてですが、マウスの唾液腺発生は胎生期の原始口腔粘膜を母組織として原始口腔粘膜の肥厚、伸張および分子形態形成により唾液腺組織が形成されます。ここでわれわれが着目した研究としては、下垂体オルガノイドの分化誘導方法の報告に着目しました。下垂体の発生は、唾液腺発生と類似した部分があり、原始口腔粘膜と胎生期中枢神経のインタラクションにより、原始口腔粘膜がラトケポーチとして落ち込み、下垂体前葉が形成されます。実際にこの報告でも、マウスの ES 細胞から原始口腔粘膜を解して、下垂体オルガノイドが分化誘導されていることが報告されています。

そこでわれわれは、マウス ES 細胞から唾液腺オルガノイドの誘導モデルとして、下垂体オルガノイドの分化誘導方法を改変して、マウス ES 細胞から効率よく口腔粘膜組織を誘導できれば、そこに唾液腺特異的な転写因子群を遺伝子導入することで、唾液腺オルガノイドが分化誘導可能なのではないかと考えました。しかしながら、唾液腺初期発生については未だに不明な部分が多く、その発生に重要な転写因子の同定から本研究をスタートし、その同定した転写因子を用いてマウス ES 細胞から、唾液腺オルガノイドの誘導方法の開発を行いました。

まず、唾液腺発生初期の遺伝子発現プロファイルの作成についてです。胎生 12.5 日のマウス顎下腺組織切片より、レーザーマイクロダイセクションをもちいて、顎下腺の原基部分、その直上の口腔粘膜、離れた口腔粘膜の 3 領域を採取し、それぞれを RNA シークエンスによる網羅的な遺伝子発現解析を行いました。離れた口腔粘膜と比較して、唾液腺顎下腺原基、およびその直上の口腔粘膜で共に発現の高い遺伝子として、120 個の遺伝子が同定されました。また、その 120 個の遺伝子の中には、30 個の転写因子が含まれました。

特に転写因子のなかでも、Sox9, Foxc1 については Single-Copy Fish の結果、唾液腺発生初期から顎下腺原基部分、特異的に高い発現が認められました。この Sox9, Foxc1 を免疫蛍光染色でその局在を各種発生段階で解析してみると、胎生期の顎下腺原基の上皮部分では、ほぼすべての細胞が Sox9, Foxc1,

ダブルポジティブの細胞から構成されていました。また、生後、成獣マウスについても、Sox9, Foxc1 は介在部導管および腺房細胞にその発現が維持されていることが分かります。ではこの 2 つの Sox9, Foxc1 が唾液腺発生について、機能的な因子なのかについての検証を行いました。

この Sox9, Foxc1 の機能解析としては、胎生 13.5 日の顎下腺の器官培養系を用いました。siRNA による Sox9 の抑制、Foxc1 の抑制では、コントロールの siRNA に比べて、器官培養 3 日目で分子形態形成、ブランピングの抑制が Sox9, Foxc1 とともに認められました。これらの解析結果から、Sox9, Foxc1 は唾液腺の形態形成に関与している可能性が考えられ、この 2 つの転写因子を用いてマウス ES 細胞から、唾液腺オルガノイドの誘導方法の開発を行いました。

まず、ES 細胞から口腔粘膜の分化誘導に関してです。口腔粘膜の分化誘導についてはこれまでの報告を参考に TGF $\beta$  のインヒビターや、BMP4 などのリコンビナントタンパクを各種組み合わせで、分化誘導を行いました。使用した培養法としては、SFEBq Culture と呼ばれる ES 細胞の細胞懸濁液を 96 ウェルの非接着性の丸底のデッシュに撒くことで、重力により強制的に凝集塊を形成させる方法を用いました。この SFEBq 法と各種リコンビナントタンパク、インヒビターの組み合わせによって、分化誘導 8 日目には Pan-CK (パンサイトケラチン) ポジティブの上皮組織が ES 細胞の凝集塊の最外層に効率よく分化誘導されることが分かりました。この凝集塊の遺伝子発現解析の結果、分化誘導した ES 細胞の凝集塊では、口腔粘膜マーカーである Pitx2, FGF Receptor2 の発現がコントロール群に比較し、優位に発現が上昇し、口腔粘膜葉の非神経系の上皮組織が、ES 細胞の凝集塊の外層に分化誘導されていることが示唆されました。

次に、ES 細胞から唾液腺オルガノイドの分化誘導方法を開発しました。ES 細胞由来の口腔粘膜に対して、アデノウイルスを用いて先ほどの 2 つの Sox9, Foxc1 の遺伝子導入を行いました。ES 分化誘導 8 日目の ES 細胞由来の口腔粘膜に対して、アデノウイルスを用いて Sox9, Foxc1 を遺伝子導入し、導入された最外層の上皮組織を外科的に単利し、その後、FGF7, 10, 唾液腺の形態形成に重要だとされる FGF7, 10 存在下で浮遊培養を継続し

ました。分化誘導 23 日目には、ES 細胞の凝集塊から外包に吐出する形で、分子形態形成をともなった腺組織葉の構造が効率よく発生することが明らかとなりました。これらの構造は 28 日目、5 日後にはさらに分子形態形成、ブランチングを繰り返し、大きく成長することがわかりました。

この ES 細胞から発生した分子形態形成を持つ組織について、組織学的な解析を行いました。これらの組織は、Pan-CK (パンサイトケラチン) ポジティブの上皮細胞からなり、その上皮細胞はほぼ全ての細胞が Sox9, 陽性細胞から構成されていました。また、唾液腺の導管マーカーであるケラチン 18 が内包に、ケラチン 18 陽性細胞が内包に位置し、唾液腺の腺房マーカーである AQP5 ポジティブの細胞が外包に位置していました。また、 $\alpha$ 唾液腺の筋上皮マーカーである  $\alpha$ -SMA 陽性細胞が、このエンドバッドの最外層をライニングする唾液専用の構造も認められました。これらの構造は、マウス胎生 18 日の顎下腺と非常に類似した組織構築パターンであることが明らかとなり、われわれは、この組織を唾液腺オルガノイド、誘導した唾液腺組織として「iSG」と名付けました。

さらに、詳細な組織学的な解析として、電顕による解析を行いました。腺組織の特徴的な構造である、内腔側のルーメン側に位置するマイクロブライとタイトジャンクションがこの iSG においても、内腔側に位置する部分にマイクロブライと、細胞間にはタイトジャンクションが形成され、腺組織葉の微細構造までもが iSG で誘導されていることが明らかとなりました。

さらに、この唾液腺オルガノイド iSG を、網羅的な遺伝子発現解析を行いました。

遺伝子発現解析では、iSG の部分を単離し、RNA シークエンスによる遺伝子発現プロファイルを取得しました。これらの iSG のプロファイルを各種ステージの胎生期、唾液顎下腺の遺伝子発現プロファイルと比較しました。唾液腺発生プロファイルは胎生 13 日、15 日、18 日、成獣唾液腺と PCA の解析では左下に向かって分化が進んでおりますが、組織学的な解析結果と同様に、この iSG のプロファイルは胎生 15 日と 18 日の顎下腺の間に位置する唾液腺、胎生期唾液腺に非常に類似した遺伝子発現プロファイルが示すことが明らかとなりました。また、この

iSG のプロファイルは胎生 14 日の肺組織、胎生 15 日の脾臓とは全く別の遺伝子発現プロファイルを示し、他の分子形態形成を持つ腺組織とは異なった遺伝子発現プロファイルを示し、唾液腺に類似していることがより強力に示されました。

では、この ES 細胞から誘導した iSG、唾液腺オルガノイドが *in vitro* の時点で機能をもつかどうかの解析として、Calcium release assay を行いました。唾液腺の代表的な機能の一つとして、ムスカリンレセプトへのアセチルコリン刺激により、細胞内カルシウム濃度の上昇がおこり、水分分泌を引き起こすという機能があります。この誘導した iSG においても、ムスカリンレセプター 1, 3 の遺伝子発現が認められたため、カルバコールによるムスカリンレセプター刺激を行いました。細胞内カルシウム濃度については、Fluo-4 のインジケーターにより計測をしております。iSG へのカルバコール刺激により、濃度依存的に細胞内カルシウム濃度の上昇が認められ、さらにこの反応、この細胞内カルシウム濃度の上昇は、アトロピンによるムスカリンレセプターの拮抗により完全にブロックされることから、ムスカリンレセプター依存性な細胞内カルシウム濃度の上昇という唾液腺の機能の一つが、iSG においても再現できることが示されました。

では、この唾液腺オルガノイドが実際に同所的に移植可能なオルガノイドなのかどうかについての解析を行いました。iSG の同所移植については、GFP 陽性の ES 細胞から分化誘導した iSG を用いて、そこにガイド糸を挿入後、耳下腺を排泄部導管部分で完全に切除したマウスにガイド糸ごと同所移植を行いました。移植後 30 日で解析を行っております。

移植後 30 日の結果です。移植後 30 日で iSG 移植部分に GFP 陽性の組織が生着していることがわかります。組織学的な解析からも、この移植物は PAS 陽性の粘液産生性の腺組織を構築していることがわかります。これらの組織は全て GFP 陽性細胞から構成されており、ES 細胞由来の iSG 移植物が生着していることが明らかとなりました。さらに GFP 陰性のレシピエントの導管細胞と、この GFP 陽性の iSG 由来の腺組織は、導管部分で完全にコネクする形で移植部位に生着し、唾液の分泌経路を保ったまま生着していることがわかります。この腺組織をさらに解析すると、*in vitro* の時点では発現

していなかった、Mist1 や PSP などの成熟した腺房細胞マーカーが発現し、さらに粘液産生細胞、粘液細胞マーカーである Muc10、漿液性腺マーカーであるアミラーゼについても要製造が認められ、iSG の移植によって腺房細胞の成熟が起きていることが明らかとなりました。

しかしながら、iSG 単独での移植ではその移植物のサイズが少なく、口腔内の唾液分泌というのは検出限界以下でした。そこでわれわれは、この移植した iSG のサイズの増強を目的に、胎生期の唾液腺間葉組織と iSG の同時移植を行いました。iSG と胎生期唾液腺の間葉組織を同時に移植すると、間葉組織が分泌する FGF などのグロースファクターにより iSG 移植 30 日後、移植後 30 日の iSG は、舌下腺とほぼ同様の大きさの移植物を形成しています。組織学的な解析でも、iSG 単独の移植よりも大きな移植物、腺組織を形成していることが分かります。

この iSG と間葉組織移植マウスを用いて、口腔内の唾液分泌量の計測を行いました。唾液腺、三大唾液腺を完全に切除したマウスと比較し、唾液腺切除後に iSG と唾液腺間葉組織を移植したマウスでは、ピロカルピン刺激後に優位な唾液分泌量の回復が認められました。さらに興味深いことに、この移植マウスに対して、クエン酸による舌への酸味刺激を与えると、コントロールの水刺激に加えて、優位な唾液分泌量の上昇が起きました。実際に移植物の iSG の筋上皮細胞の近傍に、レシピエント由来の GFP ネガティブのニューロフィラメント、末梢神経が伸長してきているのがわかります。これらの結果は、舌の味蕾への味刺激が中枢神経を介して唾液腺への神経伝達経路までもが、iSG の移植により再構築されていることを示すものです。

さらに、この移植、iSG 移植マウスから分泌された唾液成分について、LC-MS (エルシーマス) によるタンパク質の解析を行いました。iSG 移植マウスから検出されたタンパクとしては、Mucin-19 や、Alpha-amylase などを含む野生型の唾液と非常に類似した唾液のタンパク構成を持ち、iSG 由来の唾液は野生型の唾液と構成成分が類似していることも示されました。

以上の結果より、われわれは、マウス ES 細胞から転写因子を導入することで、唾液腺オルガノイドが誘導可能であることを示しました。また、このオ

ルガノイドは、単離後、移植することで、機能同所に機能的な唾液腺の再生が可能であることも明らかとなりました。本研究はマウス ES 細胞から、オルガノイドを誘導していましたが、現在はヒト iPS を用いた唾液腺オルガノイドの分化誘導方法の開発を行っています。ヒト iPS 由来の唾液腺オルガノイドが形成分化誘導できれば、再生医療はもちろんです。疾患 iPS 細胞などを用いた疾患メカニズムの解明や、それを用いた創薬スクリーニングに非常に有用なツールになるのではないかと期待しています。

最後に謝辞になります。本研究は、昭和大学歯学部口腔病理学部門、美島教授の教室で行われたものです。他に、理化学研究所の辻先生のグループには、移植実験で共同研究させていただいています。その他にもさまざまな先生のご指導により本研究が形になったことを、この場を借りて御礼申し上げます。以上になります。

#### 4. 最新技術で迫る破骨細胞の真の姿

高見 正道

昭和大学歯学部歯科薬理学講座

○高見 こんにちは。歯科薬理学の高見と申します。この度は、昭和学士会シンポジウムでの発表の機会を与えてくださり、ありがとうございます。それでは「最新技術で迫る破骨細胞の真の姿」というタイトルで、発表させていただきます。

皆さん、ご存知のように、骨の恒常性というのは、多核巨細胞である破骨細胞と、骨形成を担う骨芽細胞のバランスによって、調節されています。破骨細胞は、骨の吸収だけでなく、歯の萌出にも関係しています。たとえば、乳歯が萌出した際は、顎骨内に形成される歯の周りに、破骨細胞が出現し、葉を取り巻く歯槽骨を吸収することによって、歯が萌出することが可能になります。また、永久歯の萌出の過程においても、乳歯の歯根部分を、破骨細胞、これは破骨細胞と同じ機能を持つ細胞なのですが、破骨細胞が吸収することによって、乳歯が脱落します。その後、永久歯が萌出することが出来るようになります。

この写真は破骨細胞を象牙切片の上で培養した時の写真です。真ん中にある、この大きな細胞が破骨細胞で、その後ろに、それまでに吸収した穴、すな

わち、吸収窩が形成されています。この破骨細胞は、徐々に右側に進みながら、さらに骨を吸収していこうという状況にございます。破骨細胞の分化は、インビトロで誘導することも出来ます。このような小さな破骨細胞が、まず形成され、それぞれが融合することによって、多核の大きな破骨細胞になっていきます。少しスピードを上げてみますと、どんどん破骨細胞が融合して、大きくなっていく様子が分かります。そして、最後にはこのように破骨細胞自身が破れ、死滅していきます。

破骨細胞のもう一つの形態的な特徴として、アクチンリングと呼ばれる、アクチンの重合体を形成することが挙げられます。左側は象牙質の切片上に、破骨細胞を置いた時。この時は、このような楕円形のリング状のアクチン構造物をつくります。バイオペレート、すなわちプラスチックプレート上では、もう少し広がって、大きなリング状のアクチン構造物をつくります。これらのアクチンリングは、活性化した破骨細胞の一つの特徴として、捉えられています。

これまで数十年に渡って、破骨細胞の構造や機能は、このような模式図で示されてきました。先ほどのアクチンリングは、明帯という部分に相当し、これがぐるっと破骨細胞の外周を一周することで、その内側に分泌される酸やプロテアーゼの漏出を防ぐというふうにイメージされてきています。この酸は、プロトンポンプやクロライドチャンネルによって分泌されます。また、カテプシン K や MMP も分泌されて、コラーゲンなどを吸収していきます。

しかし、このようなアクチンリングが、酸やプロテアーゼの分泌の漏洩を防ぐ役割をしている、などという研究は、未だ確実な証拠がなく、また、果たして本当に破骨細胞は、このような形態をしているのかということも、良く分かっていません。そこで私たちは、破骨細胞の真の姿、すなわち、微細な細胞構造の研究を行いました。この研究を始めるにあたって、電子顕微鏡室の高木講師から、FIB-SEM という、最新型の電子顕微鏡の仕様を教えてくださいました。FIB-SEM というのは、イオンビームが試料に当たることによって 10 から 150 ナノメートル、切削していくものになります。切削面をセムで 1 回ずつ写真を撮り、この連続画像を、コンピュータを使って三次元的に構築することが出来ます。そこで私たちは、マウスの骨髄から破骨細胞を分化誘導して、象

牙質切片の上で培養します。

この象牙質切片を、樹脂包埋して、FIB-SEM でこのような写真を撮ってみました。これが破骨細胞の、横から、こう、150 nm 毎に削りながら撮った写真の、連続画像になります。このように、破骨細胞の下がえぐれてきて、骨吸収が進んだことが分かります。この連続切片を用いて立体像を作成したのが、この画像になります。この上の部分の赤く大きな細胞が、多核破骨細胞です。下の部分が、下の白い部分が、象牙切片になっていて、この象牙質の部分が破骨細胞によって吸収されている様子が分かります。また、破骨細胞の中には、透明な空胞がたくさんあることも確認出来ました。

この三次元画像を用いると、これまで良く分からなかった構造まで見えるようになりました。これまでは、破骨細胞の形を、ZX 平面、この緑の枠で囲んだ、このような方向からしか観察出来ませんでした。この三次元画像を用いることによって、XY 平面、この水平的な断面が観察出来るようになりました。この断面を見て分かるように、破骨細胞は細胞質が密に存在する部分と、空胞などがたくさん存在する部分に分けられることが分かります。また、この三次元構造の画像を用いて、3D プリンターで実際の破骨細胞をつくりました。それがこの模型です。また、この模型の他にも、さまざまな破骨細胞の模型も作製しました。これらは東京大学の先生が、破骨細胞について、天皇陛下に説明される時に使いたいということで、貸して差し上げたものでございます。

この 3D 画像を、アミラというソフトウェアで解析したのが、この写真になります。これらは破骨細胞の核になります。破骨細胞は融合しますので、多核化しますが、その核が非常にいびつであり、中にはこのように、ドーナツ型のものもあるということが分かりました。また、アミラによって、破骨細胞の中の空隙を解析しました。この空隙は、0.2 マイクロ立方メートル、以上の大きさを色分けしたものです。このように、頭頂部側に大きな空隙があることが分かります。一方、0.2 よりも小さい空隙は、頭頂部よりも骨表面に接着した部分、すなわち、ベアサル側にたくさん存在していることが分かります。このように、破骨細胞の細胞の中というのは、非常に極性化が進んでいるということが、これらの

解析から明らかになりました。

次に私たちが細かく解析した部分は、破骨細胞が骨吸収をしているこの部分です。すなわち、破骨細胞の波状円と、骨基質が密着している部分を、FIB-SEMによって解析を行いました。これが先ほどの部分を、FIB-SEMで解析したのですが、この黒い部分はコラーゲンなどの骨基質です。これらが吸収されて、その一部は細胞の波状円の中に取り込まれていることが解ります。この画像を三次元構築した場合、この青い部分が骨基質になりますが、骨基質の一部がはがれて、このひだ状の波状縁の中に取り込まれていることが分かりました。

次に私たちは、破骨細胞に特徴的な、アクチンリングの機能について解析を行いました。これは象牙切片上で培養した破骨細胞で、これらが破骨細胞になります。この破骨細胞の横にあるのが、骨吸収窩、すなわち溶かされた部分になります。この破骨細胞のアクチンリングを染めたのが、この写真になります。そして先ほどの写真と重ねると、こうなります。たとえば、この破骨細胞を拡大してみます。この破骨細胞は、この部分が破骨細胞の本体で、この部分が、破骨細胞が吸収した吸収窩になります。すなわち、この破骨細胞は、画面で言うと、上の方向に吸収しながら進んでいることになります。そして、この破骨細胞のアクチンと核を染色したのが、この写真になります。これらを重ねると、破骨細胞の本体の中でも、破骨細胞が進んでいく方向にアクチンリングが形成され、まだこのアクチンリングが存在する場所は、ほとんど吸収が進んでいないことが分かります。これは従来の考え方とは、まったく逆の考え方になります。そして、この細胞体の部分に核が多く存在することも分かります。

この破骨細胞も同様に、この部分が吸収窩、そしてこの部分が破骨細胞のアクチンリングになりますが、アクチンリングの存在しているところは、まだ吸収が行われていません。ただ、破骨細胞のアクチンリングは、このように楕円形をしていることが分かります。この破骨細胞も同じような傾向があります。また、破骨細胞の中には、両側に伸びていくものもありまして、その場合は、それぞれの伸びている方向にアクチンリングが形成されているということが認められます。この青い部分が核になります。このアクチンリングと核、これを顕微鏡によって三

次的に解析してみました。すると、この楕円形のアクチンリングの、この部分ですね。すなわち、左側の写真で言うと、この部分になりますが、ちょうど骨吸収窩の最前線というところになります。最前線の部分、この部分のアクチンリングは、骨吸収窩のほうに落ち込んでいるということが分かりました。そこで、破骨細胞の細胞の中のどの部分で、酸が分泌されているのかということ、突き止めようと考えました。

まず行ったのは、破骨細胞が酸を分泌するのに用いるプロトンポンプです。プロトンポンプは、いくつかのサブユニットでつくられていますが、その中でもaサブユニットという、破骨細胞に特異的に発現するサブユニットに、GFPを結合させたマウスを用いました。これが破骨細胞の、緑が破骨細胞のプロトンポンプを示すことになります。このような破骨細胞の形態をしていて、プロトンポンプは意外にも、破骨細胞の全体に見られます。しかし、左側の写真を見ると、全体と言っても、アクチンリングの内側よりも、むしろ外側にあることが分かります。では、本当にこの辺で酸を分泌しているのかということが、次の疑問になります。

この破骨細胞がどこで酸を分泌しているかということ、直接的な証明を得るために、pHプローブを用いました。このpHプローブは、骨基質に吸着し、破骨細胞が分泌する酸によって、pHが低下すると、蛍光がオンになるものです。これがその時、その解析結果ですが、この黄緑色になっている部分が、破骨細胞が酸を分泌し、pHプローブがオンになったものになります。骨吸収窩がこのようにあった時、骨吸収のまさに最前線の部分に、酸が強く分泌されています。

すなわち、この破骨細胞のアクチンリングの、落ち込んでいる部分、ここの部分のプロトンポンプから、主に酸が分泌されているということ。そして、細胞の本体は、このような構造になっているということが推察されました。今の観察結果を新しい破骨細胞の模式図として表したのが、これになります。まず破骨細胞というのは、アクチンリングが存在するポドソームの部分と、核や空胞、それから細胞質、そして波状円などがたくさんある、細胞体に大きく分けることが出来ます。

このアクチンリングは、まだ未吸収の基質のとこ

ろに大半が接着していて、観察したところによると、非常に接着力が強いように見られました。一方、波状円の部分は、コラーゲンなどが吸収されており、接着が弱いと思われます。そして、アクチンリングの、このごく一部のところのプロトンポンプにより、酸性化が起こり、ミネラルが吸収されているということが明らかになりました。これらの形から、まず考えられるアクチンリングの機能ですが、一つは、骨基質への強い接着。これによって不安定な細胞体を安定化しているのではないかと推測します。そして、このアクチンリングが未吸収の部分に広がっているということから、この未吸収の部分は非常に固いため、アクチンリングは、この固さのセンサーであって、破骨細胞が骨を探すのに重要な機能を担っていると考えます。

そして最後に、破骨細胞が動き回りながら、骨を吸収しているところを見ると、このアクチンリングは、おそらくこの細胞体をぐっと牽引する役割も、持っているのではないかと思います。このような、破骨細胞が未吸収の骨を探しながら、そこへ移動す

ることを、Bone taxis, 日本語で、走骨性、と私たちは名前をつけて、この走骨性のメカニズムをさらに詳しく解明しようとしているところでございます。

最後に、共同研究者を紹介します。本研究は、以前、大学院生であった細沼雅弘先生が主に行ったものになります。この研究を技術的に支えてくださったのが、電子顕微鏡室の高木孝士先生、そして細沼雅弘先生のメンバーであったのが、坂井信裕先生です。FIB-SEM は、本学には、現在ございませんので、日本電子株式会社の松島英樹様が支援してくださいました。そして、GFP を標識したマウス、それから pH プローブなどは、大阪大学の菊田順一先生、石井優教授が提供してくださいました。共焦点顕微鏡は、株式会社ニコンの武部明様が指導してくださいました。

これらの皆様のおかげで、これまでの研究を実施することが出来、大変感謝しております。それでは以上で私の発表を終わらせていただきます。ご清聴ありがとうございました。