

公益財団法人 寺岡記念育英会

2021 年度 研究活動費助成事業 研究活動報告書一覧

小胞体ストレス応答による脂質メディエーター産生制御機構の解明とがん治療への応用 川崎医科大学 薬理学 生物系薬学 助教 北風圭介	・・・ 1
肺癌幹細胞と腫瘍微小環境を標的とした革新的腫瘍免疫療法の開発 岡山大学病院 呼吸器・アレルギー内科 胸部悪性腫瘍 研究准教授 大橋圭明	・・・ 5
人工知能(AI)による敵対的生成ネットワークを用い難治性大腸癌の治療標的となる AI バイオマーカーを探索する 川崎医科大学 臨床腫瘍学 消化器癌 助教 矢野修也	・・・ 9
小児脳腫瘍腫瘍診断困難例に対するマルチオミクス解析を駆使した precision medicine の確立 岡山大学 脳神経外科 脳腫瘍、小児疾患 助教 石田穰治	・・・ 14
ゲノム編集を用いた腎臓病の病態解明と治療法の開発 重井医学研究所 分子遺伝部門 分子生物学 副主任 難波真澄	・・・ 17
非アルコール性脂肪肝炎にサルコペニアを併発する際の腸内細菌叢の変化 岡山大学 学術研究院保健学域 病態検査学 助教 山元修成	・・・ 21
マルチオミクス解析によるヒト肢芽形成の理解 岡山大学 医歯薬学総合研究科 バイオインフォマティクス 助教 大曽根達則	・・・ 27

※対象者の所属・職位は、本助成事業への応募当時のものです。

小胞体ストレス応答による脂質メディエーター産生制御機構の解明とがん治療への応用

川崎医科大学 薬理学教室

北風圭介

(研究成果の概要)

小胞体ストレス応答 (UPR) は細胞の適応応答機構であり、がん細胞では UPR が恒常的に活性化し、がんの悪性化に関与している。一方でリゾホスファチジン酸や環状ホスファチジン酸は、がんの悪性化に関与する脂質メディエーターである。本研究では脂質メディエーター産生酵素であるグリセロホスホジエステラーゼ GDE4 および GDE7 と UPR との関連を解析した。また、乳がん細胞株において GDE7 が産生した環状ホスファチジン酸は PPAR γ 経路を抑制していたことから、乳がんの悪性化に関与することが示唆された。

(本文)

1. 研究開始当初の背景

小胞体ストレス応答 (unfolded protein response; UPR) は細胞の恒常性を維持する適応応答機構である。がん細胞では UPR が恒常的に活性化し、低酸素・低栄養ながん微小環境下における生存を促進することでがんの悪性化に関与することが知られている。UPR はがん化シグナルや一部の分子標的薬によっても活性化されることから、創薬標的としても注目されている。

一方で、脂質メディエーターは細胞の情報伝達を担う脂質分子の総称であり、様々な疾患の発症・進展に関与することから、その受容体や代謝酵素は創薬標的として期待されている。リゾホスファチジン酸 (LPA) と環状ホスファチジン酸 (cPA) は、真核生物の組織や血漿に存在する脂質メディエーターである。LPA は G タンパク質共役型受容体を介して、発生、生理機能、病態進行などを制御している。LPA は主に血中のオートタキシン (ATX) によってリゾホスファチジルコリン (LPC) 等から産生される。一方、cPA は、ATX 阻害を介してがんの浸潤と転移を阻害し、LPA 受容体の活性化を通じてヒアルロン酸の生合成を促進する。また、ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 γ (PPAR γ) のアンタゴニストとしても作用する。PPAR γ の活性化は、悪性乳がんの増殖と進行を抑制することが報告されていることから、

cPA による PPAR γ 抑制は乳がんの悪性化に関与する可能性がある。

近年、グリセロホスホジエステラーゼ (GDE) ファミリーのメンバーである GDE4 と GDE7 は小胞体膜に局在するリゾ PLD 型酵素であり、ATX と同様に LPA を産生することが報告された。さらに細胞内において cPA を生合成する可能性も示唆されている。

以上の背景から、GDE4 あるいは GDE7 は細胞ストレスに応答して cPA レベルを上昇させ、PPAR γ を抑制し、がんの進行を促進する可能性があると考えられる (図 1)。本研究では、GDE4 あるいは GDE7 が (i) UPR により制御されるか、(ii) cPA を細胞内で産生するか、(iii) 産生された cPA が脂質メディエーターとして機能するかについて検討を行った。

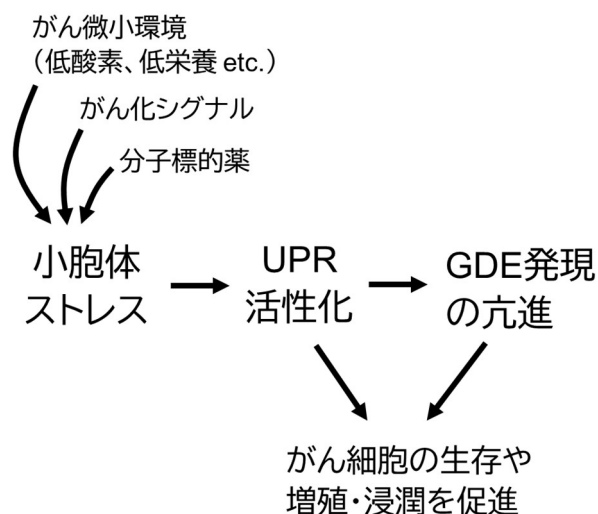


図 1. 本研究の概要

2. 研究の目的

本研究では、小胞体膜上に局在するリゾホスホリパーゼ D 型酵素である GDE4 および GDE7 に着目し、これらの脂質メディエーター産生酵素と UPR との関連および、がんの悪性化に GDE がどのように関与するかについて明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(i) 小胞体ストレスによる GDE4/GDE7 発現の亢進
内在性 GDE4 の発現が高いヒト前立腺がん細胞株 LNCaP を用い、小胞体ストレス誘導剤であるタプシガルギンを 200 nM, 2 時間あるいは 6 時間処理した。その後、TRIzol 試薬を用いて RNA を単離し、逆転写酵素 (PrimeScript RT reagent kit, TaKaRa Bio) により cDNA を合成した。その後、TB Green Premix Ex Taq II (TaKaRa Bio) を用いた qPCR により UPR 関連因子および GDE4, GDE7 の遺伝子発現を定量した。次に、UPR の主要な 3 経路である PERK, IRE1 α , ATF6 に対する阻害薬 (1 μ M GSK2606414, 100 μ M STF-083010, 2 μ M PF-429242) をそれぞれ LNCaP に処理し、同様に qPCR で UPR 関連因子および GDE4, GDE7 の遺伝子発現を定量した。

(ii) LPA および cPA 生成活性測定
組み換え GDE4 あるいは GDE7 による LPA および cPA 生成活性の測定には、ヒト GDE4、ヒト GDE7 あるいはマウス GDE7 をレンチウイルスベクターにより過剰発現させた COS-7 細胞株を用いた。また、内在性 GDE7 による cPA 生成活性の測定には GDE7 発現が高いヒト乳がん細胞株 MCF-7 を用い、CRISPR-Cas9 系で GDE7 ノックアウト細胞株 (KO) を樹立し、野生型 (WT) と比較検討した。また、KO 株にマウス GDE7 を強制発現させたレスキュー細胞株 (RE) についても評価した。各細胞をスクレーパーで剥離した後、50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 中で 3 秒間ずつ 3 回超音波処理した。その後、105,000 $\times$ g, 4°C で 1 時間超遠心して得られた膜画分を酵素源とした。酵素アッセイは、2 mM CaCl₂ および 100

μ M オルトバナジン酸ナトリウムを含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) 中で、25 μ M [¹⁴C]LPC (20,000 cpm, 5 μ L のエタノールに溶解) と膜画分を 37°C で 30 分間インキュベートした。クロロホルム/メタノール/1 M クエン酸 (8:4:1) およびクロロホルム/メタノール (17:3) で脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィーで展開した (クロロホルム/メタノール/28%アンモニア水=60/35/8)。画像の取得は Cytiva 社の Typhoon 9400 で行った。

細胞内の LPA および cPA は細胞ペレットから Bligh & Dyer 法により抽出し、Applied Biosystems の 4000 Q TRAP および 1100 liquid chromatography system を用いた LC-MS/MS により定量した。

(iii) GDE7 が産生する cPA の PPAR γ 抑制活性
MCF-7 の野生型、GDE7 ノックアウトおよびレスキュー細胞株を用い、それぞれの細胞株を 0.2% ウシ血清アルブミン (fatty acid-free) を含む無血清培地で 20 時間培養した。その後、(i) と同様に RNA を単離し、cDNA 合成および qPCR により PPAR γ および下流因子の遺伝子発現を定量した。

4. 研究成果

(i) 小胞体ストレスによる GDE4/GDE7 発現の亢進
小胞体ストレス誘導剤であるタプシガルギン処理により代表的な UPR 関連因子である XBP1s, DDIT3, HSPA5 等の発現が顕著に増加した。この時、GDE4 および GDE7 の発現レベルも経時的に増加していた (図 2)。また、タプシガルギンと同時に PERK 阻害薬を加えると DDIT3 発現が抑制され、IRE1 α 阻害薬あるいは ATF6 阻害薬を加えると HSPA5 発現が有意に抑制されることを確認した。GDE4 および GDE7 の発現レベルは PERK 阻害薬を加えた場合にのみ抑制されたことから、PERK 経路の転写因子により GDE4 および GDE7 の発現レベルが制御されていることが示唆された。

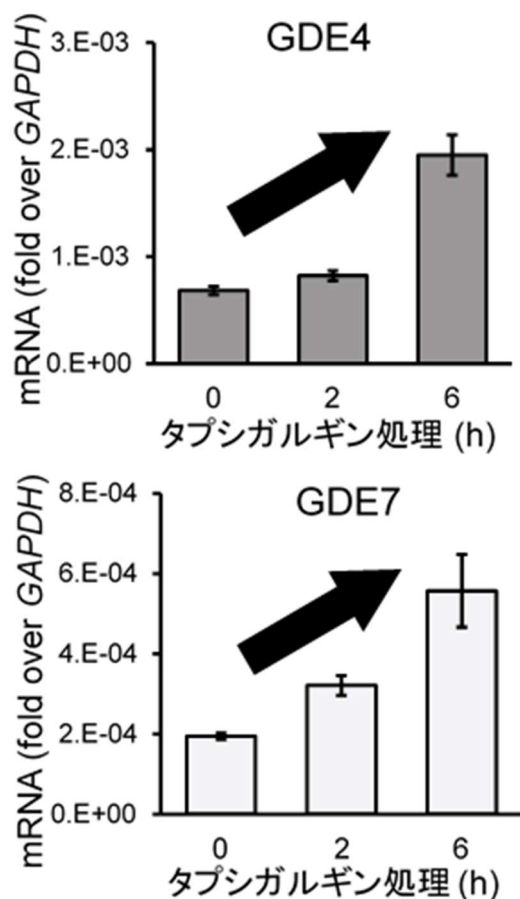


図 2. 小胞体ストレス誘導剤の処理により GDE4 および GDE7 の発現レベルが亢進する

(ii) LPA および cPA 生成活性測定

組み換え GDE4 あるいは GDE7 を酵素源とした場合、ヒト GDE7 およびマウス GDE7 は LPA および cPA を産生することが明らかとなった。一方でヒト GDE4 は LPA のみを産生した。また、内在性 GDE7 を酵素源とした場合、MCF-7 の野生型に比べ、GDE7 KO では cPA の産生が低下した。また、マウス GDE7 のレスキューにより cPA 産生は回復した。これらの結果より、GDE4 は主に LPA を産生するのに対し、GDE7 は LPA と cPA の両方を産生することが明らかとなった (図 3)。

次に細胞内の LPA および cPA を定量した結果、ヒト GDE7 の過剰発現により LPA および cPA が増加した。また、MCF-7 の野生型に比べ、GDE7 KO では LPA および cPA 量が低下しており、これはマウス GDE7 のレスキューにより回復した (図 4)。

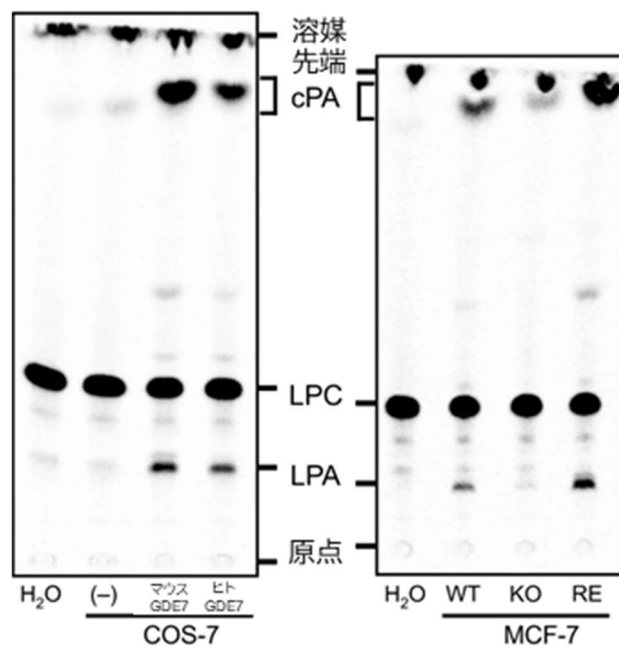


図 3. マウスあるいはヒト GDE7 による LPA および cPA の産生 (主な発表論文 1 より引用・図改変)

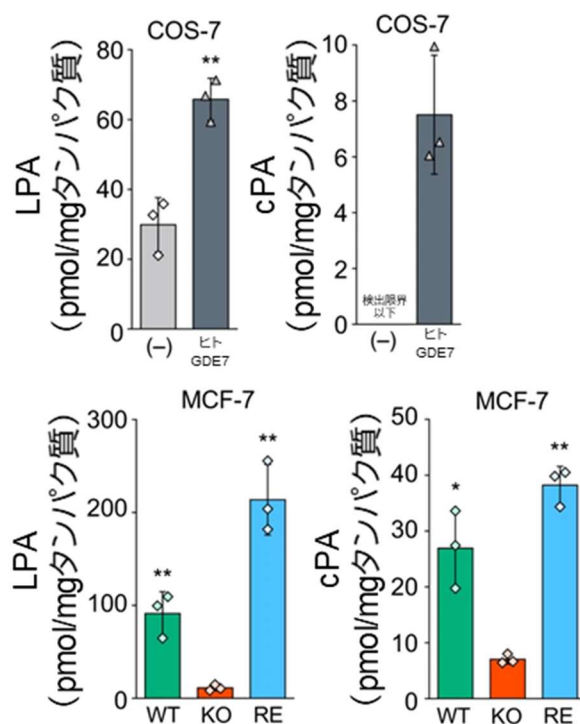


図 4. 組み換えあるいは内在性ヒト GDE7 による LPA および cPA の細胞内産生 (主な発表論文 1 より引用・図改変)

(iii) GDE7 が産生する cPA の PPAR γ 抑制活性

GDE7 が産生する cPA が PPAR γ を抑制する脂質メディエーターとして機能するかどうか検討した。PPAR γ の下流因子である CD36 と CYP27A1 の

mRNA 発現量を MCF-7 細胞で調べた。その結果、これらの発現レベルは、野生型と比較して GDE7KO ではともに増加しており、KO における mGDE7 の発現によって有意に抑制された。

以上の結果より、GDE7 は小胞体ストレスによって誘導され、細胞内で PPAR γ を抑制する脂質メディエーターとしての cPA を産生することが明らかとなった。このことから GDE7-cPA 経路は乳がんの新規治療標的としても期待される。

5. 主な発表論文等

①雑誌論文 (1 件)

1. GDE7 produces cyclic phosphatidic acid in the ER lumen functioning as a lysophospholipid mediator. Kitakaze K, Ali H, Kimoto R, Takenouchi Y, Ishimaru H, Yamashita A, Ueda N, Tanaka T, Okamoto Y, Tsuboi K. *Communications Biology* 6 524 2023 年 5 月

②学会発表 (4 件)

1. 前立腺がん細胞において小胞体ストレス応答はリゾリン脂質メディエーター産生酵素の発現を亢進する. 北風圭介, 鶴飼悠, 高峯大典, Jirapat Namkaew, 濱田良真, 竹之内康広, 坪井一人, 親泊政一, 岡本安雄. 第 96 回日本生化学会大会 2023 年 10 月 31 日
2. グリセロホスホジエステラーゼ 7 が産生する環状ホスファチジン酸は PPAR γ を抑制する脂質メディエーターとして機能する. 北風圭介, 坪井一人, Hanif Ali, 木本来希, 竹之内康広, 石丸浩靖, 山下純, 上田夏生, 田中保, 岡本安雄. 第 64 回日本生化学会中国・四国支部例会 2023 年 5 月 28 日
3. グリセロホスホジエステラーゼ 7 による環状リン脂質メディエーターの細胞内産生. 北風圭介, Hanif Ali, 木本来希, 竹之内康広, 石丸浩靖, 山下純, 上田夏生, 田中保, 岡本安雄, 坪井一人. 第 96 回日本薬理学会年会 2022 年 12 月 1 日

4. グリセロホスホジエステラーゼ 7 は小胞体内腔における環状ホスファチジン酸の産生酵素である. 北風圭介, 坪井一人, Hanif Ali, 木本来希, 竹之内康広, 石丸浩靖, 山下純, 上田夏生, 田中保, 岡本安雄. 第 95 回日本生化学会大会 2022 年 11 月 11 日

(表題)

肺癌幹細胞と腫瘍微小環境を標的とした革新的腫瘍免疫療法の開発

(所 属) 岡山大学病院 呼吸器・アレルギー内科 准教授

(氏 名) 大橋 圭明

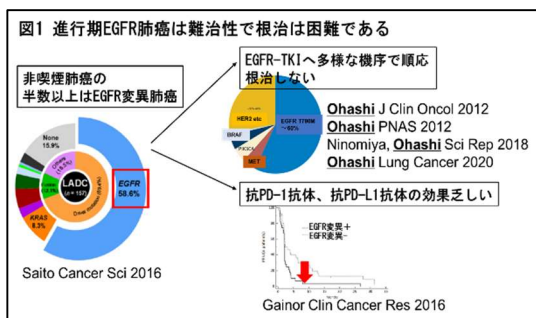
(研究成果の概要)

EGFR 変異を有する肺癌 (EGFR 肺癌) は、日本人の非喫煙者に発生する肺癌の半数以上を占める重要な疾患であるが、薬物療法では根治できない。その難治性に癌幹細胞が重要な役割を果たすとされるが、EGFR 肺癌の癌幹細胞の存在は十分確立しておらず、また癌幹細胞マウスモデルも樹立されていない。本研究は、マウス 2 型肺癌上皮細胞に Egfr 遺伝子を変異的に発現させた EGFR 肺癌マウスから、癌幹細胞を抽出し、in vivo 癌幹細胞モデルの樹立、また治療標的を探索する

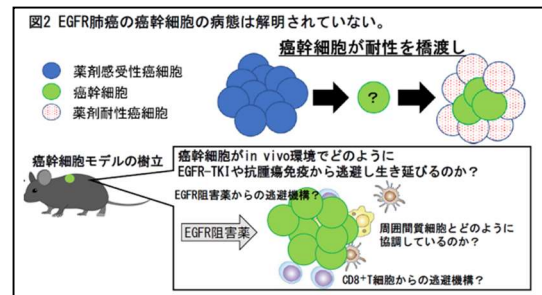
(本文)

1. 研究開始当初の背景

進行期肺癌は癌死亡数が最も多い難治癌の代表である。その中で、上皮成長因子受容体 (EGFR) 遺伝子変異を有する肺癌 (EGFR 肺癌) は、日本人の非喫煙者に発生する肺癌の半数以上を占める非常に重要な疾患である (図 1)。EGFR チロシンキナーゼ阻害薬 (TKI) は、発癌の原因である EGFR シグナルを阻害し、EGFR 肺癌を一過性に制御するが、耐性化は避けられない (Ohashi PNAS 2012, Ohashi J Clin Oncol 2012)。また EGFR 肺癌に対し、抗 PD-1 抗体など免疫チェックポイント阻害薬の効果は乏しい。そのため、根治的な効果をもたらす新規治療戦略の開発が強く求められている。



多剤薬剤耐性をもつ癌幹細胞 (cancer stem cells: CSCs) が根治の障壁として重要な役割を担っていると考えられているが、CSCs の病態は確立していない。また、CSCs の in vivo モデルは確立しておらず、CSCs と腫瘍微小環境 (tumor microenvironment: TME) に存在する間質細胞、免疫細胞との相互関係についても未解明である (図 2)。



2. 研究の目的

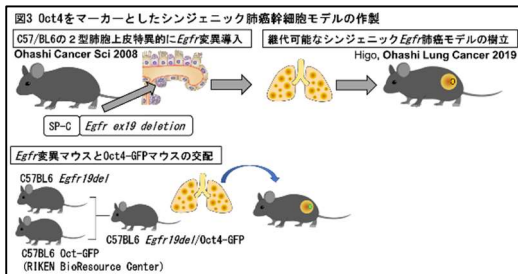
CSCs に対する革新的治療法の開発に向けた基礎データを確立するため、下記 1-3 を「本研究の目的」とする。

1. 免疫能が保持された C57/BL6 に生着するシンジュニック CSCs マウスモデルを樹立する
2. CSCs と TME の相互作用を含めた病態の解明、新規治療標的の同定を行う
3. CSCs と TME の双方を標的とした革新的な治療戦略を CSCs マウスモデルで検証する

3. 研究の方法

本研究のためマウス 2 型肺癌上皮 (AT2) 細胞へ特異的に Egfr 変異を発現させた肺癌マウスモデル (C57BL/6 Egfr ex19del Ohashi Cancer Sci 2008) 及び皮下移植により継代可能なシンジュニック肺癌マウスモデル (Higo Lung Cancer 2019) を樹立した (図 3)。CSCs 分離のた

め幹細胞のマスタ転写因子の一つである Oct4 に着目し、Oct4 発現を GFP で標識した遺伝子改変マウス (RBRC00821, C57BL/6 Oct4-GFP) を RIKEN バイオリソースセンターより導入した。C57BL/6 Egfr ex19del と交配し、新たに C57BL/6 Egfr/Oct4-GFP を作成した。



このマウス肺腫瘍を皮下移植し、継代できるシンジエニックマウスを作製し、以下の解析を行う。

1. シンジエニック CSCs マウスモデルの確立

セルソーティングを行い、Oct4+癌細胞を分離し、in vivo で癌幹細胞の特徴(自己複製能, 多分化能, 転移能, 多剤薬剤耐性)を検証する(図4)。

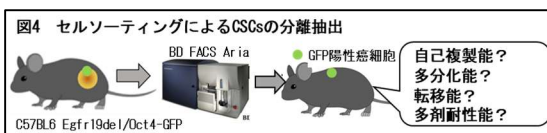
1-1 生着能: 100-1,000 個など少ない細胞数の植え付けでの生着能を検証する。(親株モデルは安定した移植に数十万個程度の細胞数が必要)

1-2. 多分化能: Oct4+癌細胞から Oct4-癌細胞が発生するか? を検証する。

1-3. 転移能: Oct4+癌細胞の転移能を検証する。(親株モデルは遠隔転移能を有さない)

1-4. 薬剤耐性能: 肺癌で承認されている抗がん剤への多剤耐性能を検証する。

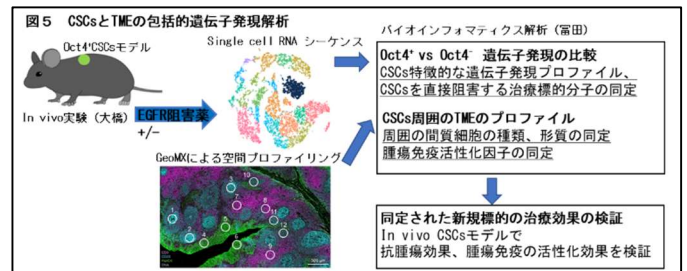
1-5. 表面 CSCs マーカーによるソーティング: Oct4のみで CSCs の形質が完全でない場合、CD44 など別の表面マーカーを用い、さらに細胞集団を絞り込み、CSCs の形質を確立する。



2. CSCs モデルを用いた新規治療標的の同定とその阻害効果の検証

岡山大学ゲノム医療総合推進センターで空間的発現解析器である GeoMX システム 及び single

cell(sc) RNA シーケンスライブラリーを作成する Chromium Controller が稼働している。GeoMx による CSCs と TME の空間情報を保持した状態での遺伝子、蛋白発現プロファイリングと scRNA シー



ケンスによる 1 細胞レベルでの包括的な遺伝子発現解析を行う(図5)。

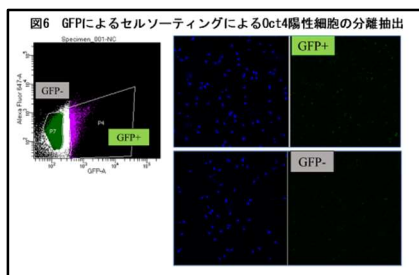
2-1. Oct4+CSCs をターゲットとした新規治療標的候補の探索: Oct4+癌細胞と Oct4-癌細胞の比較解析を行い、CSCs と TME に特徴的な発現プロファイル, 治療標的を同定する。

2-2. Oct4+CSCs および間質細胞がどのような協調関係にあるか?: 空間的解析により CSCs 及び周囲 TME の「どの細胞(CSCs or 免疫細胞・間質細胞)」に「どのような分子(腫瘍生存シグナルに関与する分子 or 免疫チェックポイント分子)」が発現しているのか? を評価する。2-1, 2-2 で同定された分子は、免疫染色, フローサイトメトリーで確認する。

2-3. 同定された標的の阻害効果: 抗腫瘍効果, 抗腫瘍免疫の活性化を in vivo で検証する。

4. 研究成果

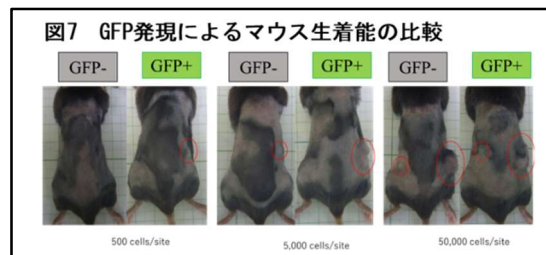
C57BL/6 Egfr/Oct4-GFP から樹立した皮下移植腫瘍を用い、FACSaria によるセルソーティングを行った。GFP 陽性細胞と陰性細胞を選別するゲーティングの設定を調整し(図6)、マウスの皮下へ GFP 陽性細胞、陰性細胞をそれぞれ 500, 5000, 50000 個植え付け生着能を比較した(図7)。GFP 陽性細胞の生着能が高い傾向を認めた。また本来は奏功するはずの EGFR-TKI に耐性の傾向をしました。しかし結果にはばらつきがあり、ゲーティングのより厳密な調整、また CD44 など他の表面マーカーを追加した Oct4 単独ではないゲーティングの設定などさらなる調整を行っている。



今後、安定して CSCs 様の細胞が分離され、生着能など CSCs としての形質が確認できれば、研究計画の2を行う予定であり、資材の準備など並行して行っている。

EGFR 肺癌における CSCs の病態は十分解明されておらず、CSCs を根絶する治療戦略は確立していない。現在、CSCs と TME の間質細胞・免疫細胞がどのように協調しているかを評価することができるシンジエニック CSCs モデルは樹立されていない。そのため、CSCs が TME とどのように協調、どのように薬剤や抗腫瘍免疫から逃避しているか？については、未解明である。シンジエニック CSCs モデルの樹立は、CSCs の病態を再定義し、新たな治療標的、治療アプローチの創造に繋がる。TME との相互作用つまり CSCs の生存に重要な間質細胞・免疫細胞および成長因子・ケモカインを同定できれば、CSCs を直接傷害する治療標的のみならず、間接的に CSCs を傷害する治療標的が新たに同定される。さらに、CSCs が腫瘍免疫から逃避する機構を有しているとするれば、CSCs および TME に発現する免疫チェックポイント分子を探索することで、CSCs に対する抗腫瘍免疫を活性化させる治療標的を同定できる可能性がある。つまり、CSCs を抗腫瘍免疫で根絶するという新しい治療アプローチを検証できる。

幹細胞様の機能がある AT2 細胞を起源とするシンジエニック EGFR 肺癌マウスモデルは世界で我々のみ保有している。ヒト型でなくマウス型 Egfr 変異を導入しているため、ヒト型 EGFR 蛋白に対するマウスの免疫応答を考慮する必要がない強みもある。本申請は EGFR 肺癌マウスモデルの希少性、独自性もあり、類似の研究が全く行われていない非常に挑戦的な研究と考える。CSCs マウスモデルの確立、新規治療標的のスクリーニング、また CSCs に対する根治的な



抗腫瘍免疫の誘導が確認できた場合、進行期肺癌に対する革新的な治療戦略開発の基盤となり、肺癌治療全体に大きな波及効果が期待できる。

5. 主な発表論文等

① 雑誌論文

1. Nakasuka T, Ohashi K, Nishii K, Hirabae A, Okawa S, Tomonobu N, Takada K, Ando C, Watanabe H, Makimoto G, Ninomiya K, Fujii M, Kubo T, Ichihara E, Hotta K, Tabata M, Kumon H, Maeda Y, Kiura K. PD-1 blockade augments CD8+ T cell dependent antitumor immunity triggered by Ad-SGE-REIC in Egfr-mutant lung cancer. Lung Cancer. 2023 Apr;178:1-10.
2. Nishii K, Ohashi K, Tomida S, Nakasuka T, Hirabae A, Okawa S, Nishimura J, Higo H, Watanabe H, Kano H, Ando C, Makimoto G, Ninomiya K, Kato Y, Kubo T, Ichihara E, Hotta K, Tabata M, Toyooka S, Udono H, Maeda Y, Kiura K. CD8+ T-cell Responses Are Boosted by Dual PD-1/VEGFR2 Blockade after EGFR Inhibition in Egfr-Mutant Lung Cancer. Cancer Immunol Res. 2022 Sep 1;10(9):1111-1126.

② 学会発表

1. 西井和也, 大橋圭明, 富田秀太, 中須賀崇匡, 平生敦子, 大川祥, 西村淳, 安東千裕, 槇本剛, 二宮貴一郎, 加藤有加, 久保寿夫, 市原英基, 堀田勝幸, 田端雅弘, 豊岡伸一, 鶴殿平一郎, 前田嘉信, 木浦勝行 EGFR 阻害が誘導する Egfr 肺癌に対する抗腫瘍免疫を逐次的 VEGFR-2/PD-1 阻害が増強する 第 63 回日本肺癌学会学術集会, 2022 口演

2. 中須賀崇匡, 大橋圭明, 西井和也, 平生敦子, 大川祥, 高田健二, 西村淳, 栗林忠弘, 安東千裕, 西達也, 森田絢子, 榎本剛, 二宮貴一郎, 藤井昌学, 市原英基, 堀田勝幸, 田端雅弘, 前田嘉信, 木浦勝行. Egfr 変異陽性肺癌に対する Ad-SGE-REIC と抗 PD-1 抗体併用による抗腫瘍免疫賦活効果 第 63 回日本肺癌学会学術集会, 2022
3. 大川祥, 大橋圭明, 中須賀崇匡, 平生敦子, 高田健二, 西村淳, 栗林忠弘, 安東千裕, 西達也, 森田絢子, 二宮貴一郎, 榎本剛, 藤井昌学, 市原英基, 堀田勝幸, 田端雅弘, 前田嘉信, 木浦勝行. osimertinib が誘導する抗腫瘍免疫は M2 マクロファージの抑制により増強される 第 63 回日本肺癌学会学術集会, 2022 口演
4. 西村淳, 大橋圭明, 栗林忠弘, 森田絢子, 西達也, 大川祥, 高田健二, 安東千裕, 中須賀崇匡, 西井和也, 平生敦子, 二宮貴一郎, 榎本剛, 藤井昌学, 市原英基, 堀田勝幸, 田端雅弘, 前田嘉信, 木浦勝行. CD8 陽性細胞抵抗性 Egfr 肺癌に対する STING agonist による抗腫瘍免疫の誘導 第 63 回日本肺癌学会学術集会, 2022

(表題)

人工知能(AI)による敵対的生成ネットワークを用い難治性大腸癌の治療標的となる

AI バイオマーカーを探索する

(所 属) 川崎医科大学 臨床腫瘍学

(氏 名) 矢野修也

(研究成果の概要)

The Cancer Genome Atlas (TCGA)によると、大腸癌の発症は5つのシステムの異常に基づく。治療薬の選択において、RAS/RAF の遺伝子変異と MSI-H の有無からなる遺伝子変異分類が使用される。さらに、分子生物学的には mRNA による遺伝子発現分類も定義された。これらの分類は煩雑なため、我々は、高・中分化型、粘液型、低分化型に、間質の量も癌を構成する成分と定義すると、これら遺伝子情報分類と病理分類を統合出来ることを見出した。この分類は患者の予後とも関連があることを確認した。深層学習を使用して病理画像の特徴を抽出し、Semantic Segmentation を行うことで、精密な病理組織の評価が可能となった。遺伝子情報との関連性を評価するため、遺伝子発現やシグナルパスウェイのクラスター分析を行ったところ、AI による病理分類と一致する結果が得られた。これらの分析から、予後不良群に特有のシグナルパスウェイが明らかとなり、新しい治療戦略の開発の可能性が示された。

背景

1. 人工知能は医療にとって必要なツールになる

2023 年は、技術革命の中心に AI が位置していた年と言える。特に、chatGPT などの生成型 AI の登場はあらゆる産業を根本的に変える可能性を秘めている。

また、AI による画像認識技術の普及も著しい。この技術は、2D から 3D までの画像解析を可能とし、出入境の際の顔認証や、車の運転支援など、多くの場面での実用化が進められている。

医療分野でも、AI の影響は大きく、その進化は驚異的である。電子カルテの導入や、MRI や CT などの医療画像のデジタル化により、AI による診断の効率化や精度向上が実現されようとしている。さらに、病理画像もデジタル化され、バーチャルスライドとして保存・分析することができるようになったことも AI 化を後押ししている。例えば、前立腺癌では PANDA challenge という画像認識を応用した AI 病理診断が、早期癌を診断し、Gleason スコアと呼ばれる悪性度までも診断出来るようになった (Nat. Med, 2022)。そのため米国 FDA は前立腺癌の AI 病理診断を認可した。さらに早期乳がんを発見するマンモグラフィでの AI 診断 (Nat. Med., 2021) が可能になった。また、我が国でも、内視鏡画像診断支援ソフトウェア EndoBRAIN、医用画像画像解析ソフ

トウェア EIRL aneurysm、肺結節検出プログラムなど AI 画像認識技術が開発中で、早期癌の診断は早晚人間から AI に置き換わる。がん以外にも、COVID19 肺炎画像認識プログラムなど、画像に関しては AI が全てを診断出来る日が迫っている。

2. 大腸癌分類に AI をどのように活用するか？

Precision Medicine は分子サブタイプに応じた適切な分子標的薬の使用である。The Cancer Genome Atlas が全遺伝子解析の結果、大腸癌は5つのシステムの異常により発生し、各システムの強弱でサブタイプが決まることを報告した(図1; TCGA, Nature, 2012)。包括的遺伝

図1. 大腸癌は5つのシステムの異常で生じる

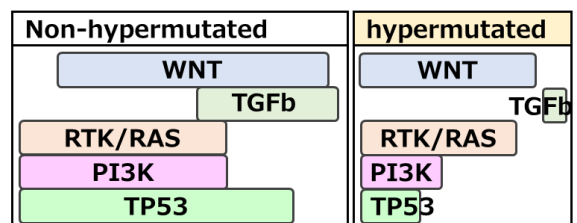


図2. 遺伝子変異分類と治療指針

MS status	KRASwt BRAFWt	KRASmt	BRAFmt
MSS	殺細胞剤 + 分子標的薬		分子標的薬
MSI	I-III	免疫チェックポイント阻害薬	
	IV	免疫チェックポイント阻害薬	

子パネル検査(CGP)もこのシステム異常で起こる遺伝子変異に基づいている。臨床では、治療薬の適応から、これらを単純化した RAS/RAF 遺伝子変異の有無と MSI-H の有無からなる遺伝子変異分類が頻用される(図2)。さらに、分子生物学的には mRNA による遺伝子発現分類(CMS 分類)も定義された(Guinney, *Nat. Med.*, 2015 図3)。この網羅的遺伝子発現の解析で、遺

図3. 遺伝子発現分類(CMS分類) と臨床的特徴

CMS1 未分化腺癌 右側 MSI-H BRAFmt 再発したら 予後不良	CMS2 高分化腺癌 KRASwt APCmt TP53mt 予後良好	CMS3 高分化腺癌 KRASmt 転移しにくい 予後良好	CMS4 間質増生 左側 EMT Stage 3/4 予後不良
--	---	--	---

伝子変異分類にはない、予後不良な間葉型(CMS4)というサブタイプが定義された。

このシステム異常分類に遺伝子変異分類も遺伝子発現分類も包括されるが、病理分類との関係を調べた報告はない。私たちは、従来の病理組織分類である高・中分化型、粘液型、低分化型に、間質の量も癌を構成する成分と定義すると、分子生物学的分類と病理分類を統合出来、予後とも相関することを見出した(図4)。

図4. 各分類法を統合

病理組織像	KRASwt BRAFmt	KRASmt	BRAFmt
分化型腺癌	CMS2 WNT/PI3K	CMS3 RTK/RAS/PI3K	
未分化型/粘液型	CMS4 WNT/TGFb	MSS; CMS3 MSI-H; CMS1	MSI-H; CMS1 MSS; CMS4
間質優位型	CMS4 WNT/TGFb	CMS4/CMS2 WNT/TP53	CMS4 WNT/TGFb RTK/RAS

そこで、図4の項目ごとの病理画像の特徴を抽出、深層学習により AI 遺伝子病理画像分類を構築し、さらに構成する成分を1ピクセル毎に Semantic Segmentation して定量化すれば、AI で詳細な大腸癌分類が可能になると予想した。

目的

大腸癌病理組織像に対し AI が画像分類可能になる分類方法を構築し、AI 画像分類に分子生物学的な意味づけを行い、AI 遺伝子画像検出モデルを構築する。さらに、分類ごとに遺伝子情報をフィードバックすることで組織別バイオマーカー群を構築する。

材料と方法

(1) パブリックデータベース

The Cancer Genome Atlas (TCGA)のデータベースから、597 人分の H.E.染色画像 1960 枚、遺伝子変異、遺伝子発現分類(CMS1-4)、を入手した。the Human Protein atlas から 19760 種類の遺伝子発現データを入手した。UCSB Xena から 1800 種類のシグナルパスウェイデータを入手した。

(2) 深層学習を用いた人工知能による画像検出

H.E.染色画像から高中分化腺癌・低分化腺癌・粘液癌、間質、筋組織、脂肪組織の各々224*224 ピクセルを計 15000 枚用意した(図)。また、これら画像ごとに色付け=mask 画像を用意した(図)。深層学習プログラムは、Python を使い VGG19 をベースとした。学習用コンピュータは、CPU はインテル社製 Core i9 12900、GPU は NVIDIA RTX3090 ti 24GB モデルで構成されたものを用いた

(3) 機械学習を用いた遺伝子情報の解析

深層学習を用いた AI 大腸癌分類に従い、遺伝子発現、シグナルパスウェイを、JMP17 を用いてクラスター解析を行った。

結果

(1) 大腸癌病理画像をVGG19を用いて深層学習させ、Semantic segmentation の基盤作りを行う

まず、H.E.染色画像から高中分化腺癌・低分化腺癌・粘液癌、間質、筋組織、脂肪組織の各々224*224 ピクセル 700 枚を、それぞれの領域ごとに色付けを行い、mask 画像を作成した。VGG19 を用いて HE 画像とマスク画像を深層学習させた(図5、図6)。

図5. トレーニングデータセットの用意とアノテーション

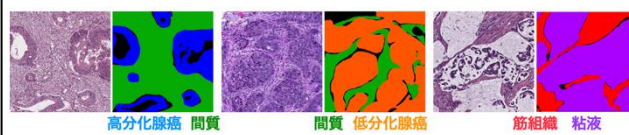
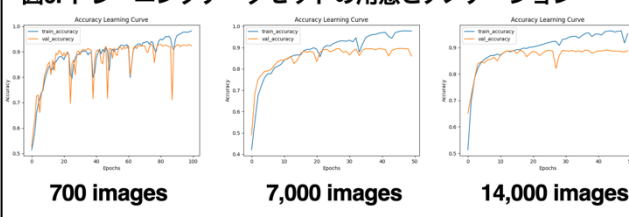


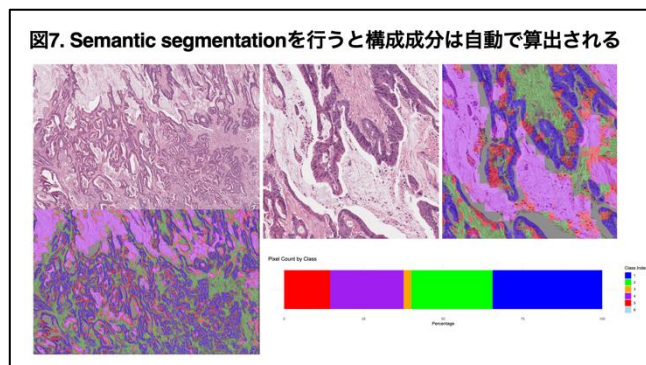
図6. トレーニングデータセットの用意とアノテーション



Accuracy にばらつきを認めたため、7000 枚、14000 枚と画像を増やし深層学習を行なった。Accuracy は 82%でプラトーとなった(図6)。

(2) 大腸癌病理画像を Semantic segmentation する

14000 枚学習させた重み付けされた AI 病理画像プログラムを用いて、HE 画像を Semantic segmentation させると図7のようになる。粘液癌の H.E.画像であり、

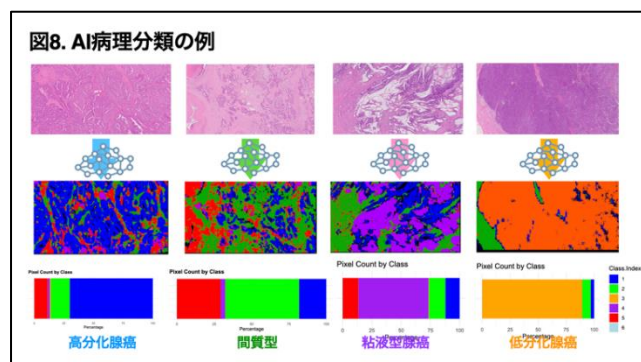


粘液を裏打ちする癌細胞は分化型と分類した。後述するように、粘液癌には分化型癌が粘液を産生するタイプと、未分化癌の一部が粘液を産生するタイプがある。このように、AIはすべての領域に対して分類、検出してくれるので非常に有用であることが示された。

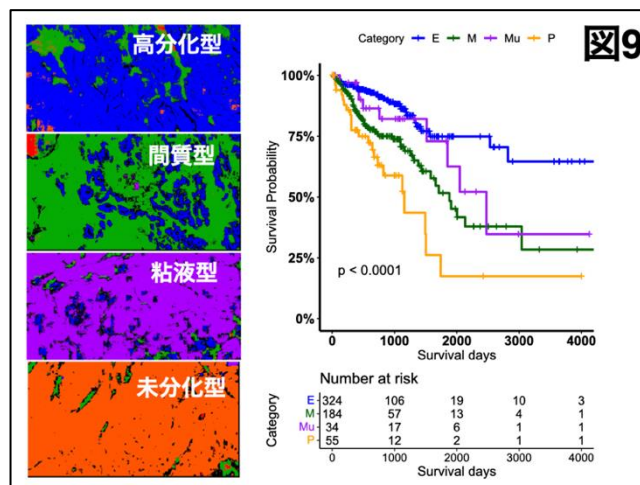
また、同時にピクセル数をカウントするだけで領域の面積が算出されるので、どの組織型が優位なのか、また先進部はどの組織型なのか、など任意の場所での分類が瞬時に可能となる。

(3) AI 大腸癌分類

同様に、分化型腺癌、間質、粘液型癌、低分化腺癌の代表的な Semantic Segmentation の例を示す(図8)。以下の分類は、最も有意に多い構成成分を採用することとした。

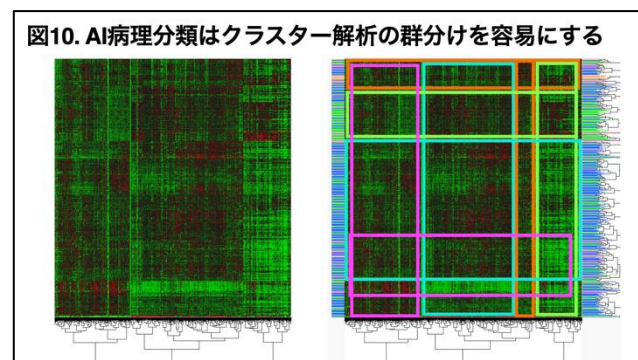


これらの分類でTCGAに収載されている597例の生存曲線は図9となる。高分化型が最もよく、低分化型が最も予後不良で、間質型は中間であった。



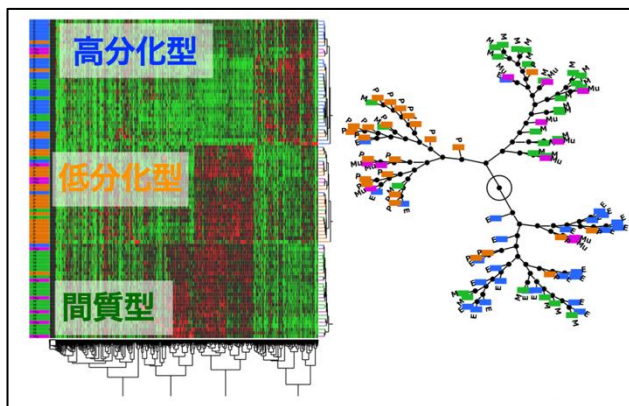
(4) AI 大腸癌分類はクラスター解析をより分かりやすくする

the Human Protein Atlas に収載されている 16000 種類の mRNA のクラスター解析を行うと、図10左になる。クラスター解析は、発現の高低を機械的に分けただけである。図10左だけでは、どのような群になっているかは判断できない。図10右にあるようにAI病理分類ごとに当てはめてみると、AI病理分類とクラスター解析は相関していた。発現の高低を機械的に分けた分類と、AI病理分類が一致するということは、遺伝子発現=AI病理分類となるので、遺伝子発現の結果が病理組織像になるのではないかと、という仮説がここに証明された。



さらに簡略化すると、図11左のようになる。そしてこれを元に、系統樹を描くと(図11右)、まず分化型と間質型・低分化型に分かれて、次に、間質型と低分化型に分かれる。遺伝子発現を機械学習させたクラスター分類と、深層学習による AI 病理画像分

類を組み合わせるだけで、予後も加味された図11右のような分類が可能になった。



(5) AI 大腸癌分類とシグナルパスウェイは一致する

さらに、シグナルパスウェイのクラスター分類を AI 病理分類で説明できるかを試みた。遺伝子発現のクラスター分類よりも、シグナルパスウェイのクラスター分類の方が病理組織を説明可能であった。すなわち、分化型癌では、細胞周期、DNA/RNA 合成が亢進し、また c-Myc 系も亢進していた。一方、間質型は、TGF β シグナル、FGF シグナル、matrix metallo protease (MMP) シグナルが亢進し、また血管新生シグナルも亢進していた。低分化型・粘液型癌では、TNF- α 、Fas signal、また代謝にかかるシグナルが亢進していた。

考察

我々は深層学習を使用して、大腸癌の病理組織像に対する Semantic Segmentation を実現するプログラムを開発した。このプログラムにより、各ピクセルに分類ラベルが割り当てられる。病理組織の範囲は、ピクセルカウントを基に定量的に評価することができる。この AI 病理分類法を用いて、組織像が分化型、間質型、粘液型、または低分化型のどれであるかを自動的に判別することが可能となった。

TCGA の 597 例を基に、Kaplan-Meier 法で描かれた予後曲線は、この AI 病理分類法との間で強い相関を示していた。

さらに、遺伝子発現とシグナルパスウェイのクラスター解析により判明したサブタイプは、AI による病理分類で明確に区分されることが確認された。

深層学習による画像分類を行うには、AI が判断しやすい教師画像を用意する必要がある。AI が分類するために特徴的な所見を必要とするからである。ただし、ここで過学習に注意する必要がある。一つの分類に多くの特徴を詰め込んだ多彩な教師画像を用意すると、AI

は過学習をしてしまい逆に正答率が下がってしまう現象がある。しかし、この教師画像を用意するには試行錯誤しかないため、build and scrap で応じるしかない。

そのため、分類方法にも工夫が必要である。我々は、臨床で汎用されている RAS/RAF/MS status、4000 例の次世代シーケンサーによる大規模な遺伝子発現分類(CMS 分類)も結局は、病理組織分類と大腸癌を引き起こす 5 つのシステム異常の組み合わせで説明できることを見出した。CMS 分類の一番の意義は間質の多いタイプ＝間質型(mesenchymal type もしくは EMT 型)を創出したことである。我々はこの点に着目し、間質も大腸癌を構成する成分になる、と考えた。こうすることで、遺伝子情報と病理分類を統合できる分類法(図4)となり、分類法ごとの教師用病理画像も用意できることを見出した。

世にある AI 画像分類、検出は 10 億枚、少なくとも数百万枚で学習されたプログラムである。今回は畳み込み(Convolution)のみでの VGG19 の AI プログラムを使用したため、1 万数千枚の教師画像で GPU メモリを全て消費した。しかし、VGG19 での正確度は 84%程度とされるが、今回我々の教師画像では正確度は 82%であったので、VGG19 の精度で AI プログラムの構築は完成とみる。さらに精度を高めるためには、より多くの教師用画像を用い、さらに精度の良い deepLab V3 plus での深層学習が必要かも知れない。

がんのバイオマーカーとは、サブタイプ特異的な遺伝子変異、遺伝子発現、タンパク質などを見つけることである。クラスター解析とは、関係の強い数字をまとめ、グループ化することに他ならない。このグループごとの特徴を見出すのが困難である。今回我々は、クラスター解析での群と AI 病理分類の群が一致していることを見出した。これこそが、遺伝子変異、発現の結果が病理組織を創り出す証左と言える。さらに、シグナルパスウェイのクラスター解析を行ったところ同様であった。つまり、シグナルとは 5 つのシステム異常に相当するので、この 5 つのシステム異常の強弱で病理組織が決定するということである。我々の施設でのコホートを用いて遺伝子発現、シグナルパスウェイでも同様のことが再現できるか現在準備中である。

今回、深層学習による AI 大腸癌病理画像分類法の構築、Semantic segmentation による大腸癌病理自動検出法の確立と、機械学習による遺伝子発現、シグナルパスウェイのクラスター解析により、大腸癌新

分類を構築した。他のコホートでの再現性を行い、バイオマーカーの構築にさらに研究を続けて行きたい。

主な業績

論文発表：0（投稿中:1）

学会発表：3 件

1. 矢野修也 重安邦俊 母里淑子 岸本浩行 永坂岳司 高度進行大腸癌に対する骨盤内臓全摘術は KRAS 野生型かつ分化型腺癌のみに効果的である 第 60 回日本癌治療学会学術集会 臓器別ワークショップ 神戸 2022 年
2. 矢野修也 重安邦俊 母里淑子 岸本浩行 永坂岳司 さらに大腸癌 Precision Medicine を目指した深層学習による画像分類と機械学習による遺伝子発現分類に基づいた AI 大腸癌分類 第 123 回日本外科学会定期学術集会 ワorkshop 東京 2023 年
3. 矢野修也 重安邦俊 母里淑子 岸本浩行 永坂岳司 深層学習による画像分類と機械学習による遺伝子発現分類に基づいた難治性消化器癌の AI 分類 第 78 回日本消化器外科学会定期学術集会 シンポジウム 函館 2023 年

(表 題)

小児脳腫瘍腫瘍診断困難例に対するマルチオミクス解析を駆使した precision medicine の確立

(所 属)

岡山大学学術研究院 医歯薬学域 脳神経外科

(氏 名)

石田 穰治

(研究成果の概要)

小児脳腫瘍は死亡率が高い難治疾患であるものの、日本の現状では保険診療範囲内での診断は困難であるため、手術後の治療方針の決定に悩むことが多い。本研究では、DNA メチル化パターンから腫瘍型を同定する手法を用いて小児脳腫瘍の診断解析を行った。さらに診断に応じた個別化治療を目指すため、小児悪性グリオーマから樹立した初代培養細胞に対する新規治療薬による治療実験を行い、一定の効果が示された。

(本文)

背景

原発性脳腫瘍は約 130 種類以上の診断名が存在すること、希少がんであることも相まって、診断が困難な症例を経験する。その中でも小児例は特に希少であるため、診断困難に行き当たることが少なくない。悪性脳腫瘍は小児がんのうち死亡率が最も高い難治疾患であり、治療成績の改善が喫緊の課題である。

近年、DNA メチル化というエピゲノムの状態を網羅的に解析することで、特定のパターンから腫瘍型を同定するゲノムワイドメチル化解析による診断技術の開発が進んでいる。2021 年 CNS 腫瘍 WHO 分類第 5 版の改訂後、半数以上の疾患でゲノムワイドメチル化解析が必須もしくは推奨となり、診断に基づく治療が求められる (Pickles JC et al., Lancet Child Adolesc Health, 2020)。しかしながら本邦ではゲノムワイドメチル化解析が保険償還されていないために、臨床研究としてメチル化解析を実施して個別診断行

う必要がある。

2021 年に当院で小児を含む脳腫瘍に対してゲノムワイドメチル化解析を行った病理診断困難例のうち、約 7 割は既存のゲノムワイドメチル化解析リファレンスデータを用いて診断に至らなかった。このようにゲノムワイドメチル化解析によっても診断困難例も存在するため、これらに対してはマルチオミクス解析を追加する必要がある。

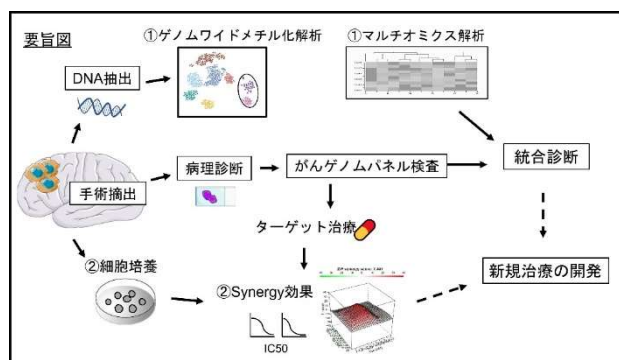
また小児脳腫瘍の中でも paediatric-type diffuse high-grade gliomas に属する diffuse midline glioma, H3 K27-altered で、脳幹 (橋) 発生のものは DIPG (diffuse intrinsic pontine glioma) と呼ばれ、非常に悪性度の高い脳腫瘍である。現在までのところ、有効とされる化学療法は存在しないが、近年の網羅的ゲノム解析により基礎研究では効果を示す薬剤が報告されており、今後の臨床応用への発展が期待されている。

目的

1) 小児脳腫瘍の臨床症例に対してゲノムワイドメ

チル化解析を行い、診断精度を高める。

2)有効な化学療法がない小児グリオーマに対する新規治療薬を模索する。個々の腫瘍に対するターゲット薬剤の効果および機序を検証することで、precision medicine (精密医療) の確立を目指す(要旨図)。



方法

1) 病理診断困難例に対するゲノムワイドメチル化解析

当院で解析を行った症例を Web ベースのリファレンスデータ(2800例以上)と比較し、t-SNEやUMAP等の次元削減法を用いて診断する。この方法では診断が行えなかった症例に対しても、既存のリファレンスデータに依存しない解析を追加することで、更に詳細に細分類を行った。

2) 患者由来脳腫瘍細胞株に対する治療標的の探索と precision medicine の確立

小児を含む若年世代の脳腫瘍は、成人に一般的な driver 遺伝子とは異なる遺伝子変異を有していることが多く、治療標的となる変異が発見されることも多い。このため、①で得られたデータを元に、論文あるいは Web 上のデータベースからターゲット薬剤を検索し、患者由来脳腫瘍細胞株に対する治療効果を in vitro で検討した。

治療効果は 96 well プレートを用い、治療濃度別に cell viability assay を行い、治療効果解析した。複数の治療標的薬に対して、数学的相乗効果解析アプリケーション(SynergyFinder; <https://synergyfinder.fimm.fi>)を用いて薬剤相乗効果について検討した。

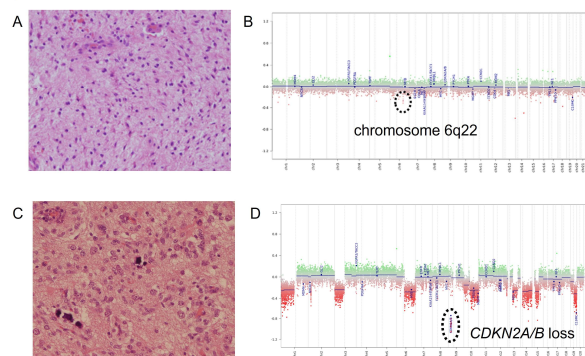
結果

1) 小児脳腫瘍のうち、病理診断可能例と病理診断困難例に対してゲノムワイドメチル化解析を 2 例に対して行った。

症例1: 頭痛で発見された10歳代の視床腫瘍。手術摘出にて低悪性度グリオーマである pilocytic astrocytoma, WHO grade 1 と病理診断が確定した。Infinium MethylationEPIC arrays [Illumina, Inc., San Diego, CA, USA] を用いてゲノムワイドメチル化解析を追加し、Molecular Neuropathology Classifier (MNP, <https://www.molecularneuropathology.org/msp/>) version 12.5にて、スコア0.88824で pilocytic astrocytoma にマッチし、統合診断でも pilocytic astrocytoma, WHO grade 1 と確定した。ROS1 遺伝子座を示す6q22染色体領域の欠失が示された (図1A, B)。ROS1 変異を示す低悪性度グリオーマは過去の大規模データから0.4%の頻度と稀であるが (Ryall S et al., Cancer Cell, 2020)、本解析により将来的にターゲット治療薬の対象となる可能性が示唆された。

症例 2: 頭痛で発見された 10 歳代の側頭葉腫瘍。手術摘出にて high-grade glioma, NOS, WHO grade 4 相当と診断された。症例 1 と同様にゲノムワイドメチル化解析を追加して行ったが、スコア 0.15683 と解析可能範囲の疾患にマッチしなかった (図 1C, D)。Cancer gene panel 診断により、FGFR::TACC3 fusion が判明した。統合診断は glioblastoma, IDH-wild type, NEC, WHO grade 4 となった。ゲノムワイドメチル化解析だけでなく、マルチモダリティによる解析が小児脳腫瘍の診断と治療に貢献する可能性が示唆された。

図1

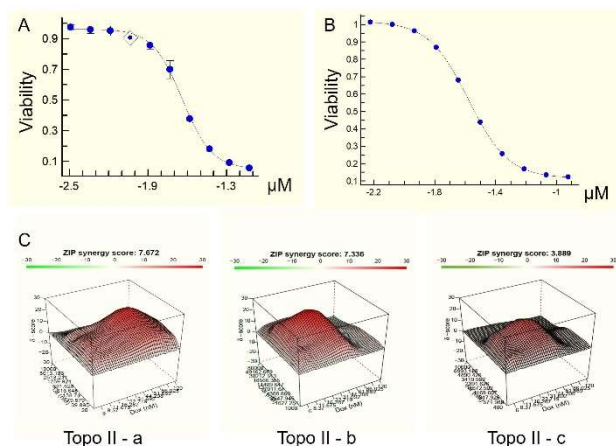


2) 患者由来脳腫瘍細胞株に対する薬剤スクリーニングと数学的相乗効果解析

研究期間中に患者由来小児脳腫瘍細胞株として適切な症例が無かったため、すでに樹立されている小児 DIPG 患者由来細胞株を用いて *in vitro* で薬剤治療実験を行った。

Lin らの報告から、DIPG 細胞に効果を示す可能性の高い薬剤を抽出した (Lin et al., Sci Transl Med, 2019)。細胞株 DG-A および DG-B に対して、topoisomerase II 阻害薬を投薬し、cell viability assay を行ったところ、それぞれ 0.023 μ M、0.027 μ M と低い IC50 を示した (図 2A, B)。さらに薬剤 a, b, c を用いて濃度勾配別に薬剤を併用し、SynergyFinder アプリケーションにて解析した。ZIP (zero interaction potency) analysis により、いずれもピーク値 15 を超える高い相乗効果を示した (図 2C)。

図2



研究成果

小児脳腫瘍は希少かつ難治性疾患であるが、近年のゲノム解析による病態の解明により、precision medicine に関する期待の高い疾患といえる。実臨床に成果を得るまでに依然多くのステップを要し、継続して研究行う必要がある。今回少数のみでの研究であるが、本研究によりゲノムワイドメチル化解析が確定診断に寄与し、分子標的治療等の候補薬剤選択の可能性につながる成果を得ることができた。今後、国内外の臨床および基礎研究と連携して継続することで、疾患病態の解明と新規治療へつながることが期待できる。

主な発表論文など

雑誌論文: 2 報

1. Otani Y, Satomi K, Suruga Y, Ishida J et al. Utility of genome-wide DNA methylation profiling for pediatric-type diffuse gliomas. Brain Tumor Pathol. 2023 Apr;40(2):56-65. (4 番目/7 人)
2. Makino K, Otani Y, Fujii K, Ishida J et al. Utility of Comprehensive Genomic Profiling for Precise Diagnosis of Pediatric-Type Diffuse High-Grade Glioma. Acta Med Okayama. 2023 Jun;77(3):323-330. (4 番目/12 人)

学会発表

石田穰治ら、当院における小児グリオーマ診療についてーがんゲノム医療時代における変遷ー 第 51 回日本小児神経外科学会 (2023.6)

図書:なし

産業財産権:なし

(表題) ゲノム編集を用いた腎臓病の病態解明と治療法の開発

(所属) 重井医学研究所 分子遺伝部門

(氏名) 難波 真澄

(研究成果の概要)

アルポート症候群は、糸球体基底膜の異常を特徴とする進行性遺伝性腎疾患である。本疾患は、*Col4a3*、*Col4a4*、または *Col4a5* の変異により発症する。本研究では、rGONAD 法を用いて *Col4a5* を欠損させたラットを作製し、新規のアルポート症候群モデルラットを作製した。*Col4a5* 欠損ラットのヘミ変異体雄は、血尿、蛋白尿、高濃度 BUN、Cre を示し、18-28 週齢で死亡した。腎臓切片を顕微鏡下で観察すると、糸球体・尿細管の線維化、基底膜の菲薄化や緻密板の分裂・断片化など、異常が認められた。以上のことから、*Col4a5* 欠損ラットは、アルポート症候群の病態を再現しており、アルポート症候群モデルラットとして有用であることが示唆された。

(本文)

1. 研究開始当初の背景

アルポート症候群 (Alport syndrome) は予後不良の進行性遺伝性腎疾患である。その病態の原因は、IV 型コラーゲンの異常である。アルポート症候群は X 染色体連鎖型と常染色体型に分類され、その約 8 割が X 染色体連鎖型で最も多く、X 染色体を 1 本しか持たない男性の場合、病態は重篤なもので 10 代後半から 20 代前半で末期腎不全へと進行する。

実験用ラット (*Rattus norvegicus*) は、哺乳類の中でよく使用される実験モデル動物であり、例えば Wistar Kyoto (WKY) ラット系統は、腎炎感受性があることが知られている。

ラットはマウスと比較して、体が大きく、尿量も多いなど、実験を行う上で取り扱いが容易であり利点が多い。しかし、遺伝子改変技術という点においては、マウスより作製が困難で、近年までノックアウトラットの作製は積極的に行われてこなかった。CRISPR/Cas9 の登場により、ノックアウトラットの作製は以前に比べれば格段に容易になったが、その敷居は未だに高く、胚操作や生体外でのマニピュレーションなど、高価な装置や高度な技術を要することが大きな障壁となっていた。

そこで今回は、負担のかかる実験ステップを省略し、かつ高効率にノックアウトラットを作製できる、rGONAD (Genome-editing via Oviductal Nucleic

Acids Delivery) 法 (図 1) を使ってノックアウトラットを作製した。rGONAD 法は、Cas9 タンパク、ガイド RNA、一本鎖 DNA (ssDNA) を含む溶液を卵管に直接注入し、その後、エレクトロポレーションを行うことでノックアウトラットを作製する。rGONAD 法を処置された母親ラットを利用すれば、妊娠から出産、そして育児まで、通常通りの飼育方法で繁殖させることが可能である。

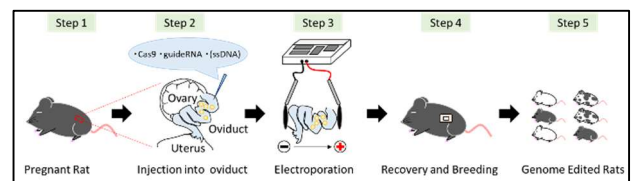


図 1. rGONAD 法

2. 研究の目的

本研究では、腎炎感受性のある WKY ラット系統において、rGONAD 法を用いて *Col4a5* 欠損ラットを作製し、アルポート症候群モデルとして有用となりうるか検討した。モデルラットが作製できれば、病態の進行メカニズムを解明する手がかりとなり、また投薬などの治療法探索にも有力な候補となりうる。

3. 研究の方法

1 実験動物

WKY ラットを Charles River 社から購入した。12:12h の明暗時間で、自由飲水・自由給餌で飼育し

た。

2 *Col4α5* 欠損ラットの作製

CRISPR/Cas9 溶液を、Alt-RTM CRISPR-Cas9 system (IDT 社) の取扱説明書に従って作製した。ガイド RNA の配列を CHOPCHOP ホームページ (<https://chopchop.cbu.uib.no/>) のアルゴリズムを利用して作製した(図 2)。

交配後 0.75 日の雌ラットの卵管に、調整した CRISPR/Cas9 溶液を注入し、NEPA21 (ネッパジーン社) を使用してエレクトロポレーションを行った。

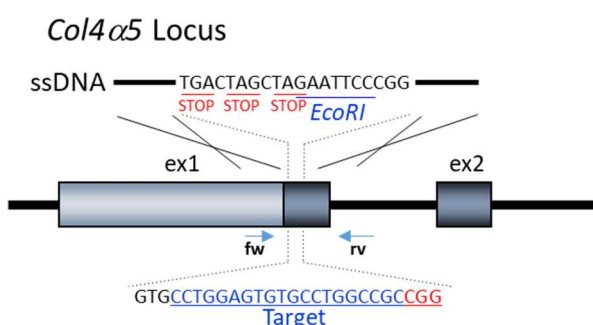


図 2. *Col4α5* 欠損ラットのゲノム編集

3 PCR による遺伝子判別

ラットの耳または尻尾から DNA を単離し、PCR とシーケンスにより遺伝子変異を確認した。ジェノタイプピングでは、以下のプライマーを使用した: rCol4α5-fw、(5'-GCTCTTCCCAATAACCCCT-3')、rCol4α5-rv、(5'-CAATTTGACTTCCCTGGCCA-3')。

4 尿および血清による腎機能評価

尿は、ラットを個別に代謝ケージに入れ、16 時間畜尿を行うことで回収した。尿蛋白は、3% スルホサリチル酸を用いて吸光度を測定し、蛋白量を計算した。

血清は、ラット尾静脈から血液を採取し、3000rpm で 5 分間遠心分離したのち上清を回収することで得た。

血清中の血中尿素窒素 (BUN) は Colorimetric Detection Kit (Arbor Assays 社) を用いて測定した。血清または尿中のクレアチニン (Cre) 濃度は、Jaffe 法 (富士フイルム和光純薬社) を用いて測定

した。クレアチニンクリアランスは、(尿クレアチニン [mg/dl] × 尿量 [dl]) / 血清クレアチニン [mg/dl] で算出した。測定はすべて、メーカー推奨のプロトコルに従って実施した。

5 免疫染色

ラット腎臓を OCT コンパウンドに浸し、液体窒素中で凍結させた。その後、5 μm の厚さで凍結切片を作製した。アセトンで固定後、5 % ロバ血清を用いて室温でブロッキングし、その後一次抗体と反応させた。PBS で洗浄後、二次抗体と室温で 1 時間反応させた。共焦点顕微鏡 (オリンパス、FV1200) を用いて観察・撮影を行った。

4. 研究成果

rGONAD 法で、*Col4α5* 欠損ラットを作製した。作製した *Col4α5* 欠損ラットは通常繁殖が可能で、その産子はメンデルの法則に従って産まれることが確認できた。しかし、生存週齢において、ラットは通常 2-3 年生存するのに対し、X 染色体を 1 本しか持たないヘミ変異体雄は 18 週齢から 28 週齢で死亡した (n=58)。また、ヘテロ変異体雌は 35 週齢から 100 週齢で死亡し、100 週を超えても生存している雌は全体の約 30% にとどまった。 (n=33)。Col4α5 欠損ラットは寿命が正常ラットより短く、特に X 染色体を 1 本しか持たないヘミ変異体雄では短命となることがわかった(図 3a)。

次に、腎機能を評価するため、Col4α5 欠損ラットの尿を検討した。ヘミ変異体雄では生後 21 日から血尿となり、6 週齢までに尿蛋白が認められた (約 6.0 mg/16 時間)。また、ヘテロ変異体雌では生後 4 週から血尿が認められた。12 週齢以降はヘミ変異体雄の全て (n=35) で、16 週齢ではヘテロ変異体雌の 62% (n=28/45) で尿蛋白量が 20.0 mg/16 時間以上に増加した。一方、正常ラットでは、雄雌に関わらず、いずれの週齢でも血尿・蛋白尿は検出されなかった (図 3b)。

続いて、体重変動と尿量変化について検討した。ヘミ変異体雄は、正常な雄と比べ、体重が減少し、尿量が増加した (図 3c, d)。血中尿素窒素 (BUN) お

よび血清クレアチニン(Cre) 濃度は、ヘミ変異体雄で20週齢になると顕著に上昇した(図3e, f)。ヘミ変異体雄の蛋白/クレアチニン比はで8週齢から高値となり、クレアチニンクリアランスは20週齢までに有意に低下した(図3g, h)。

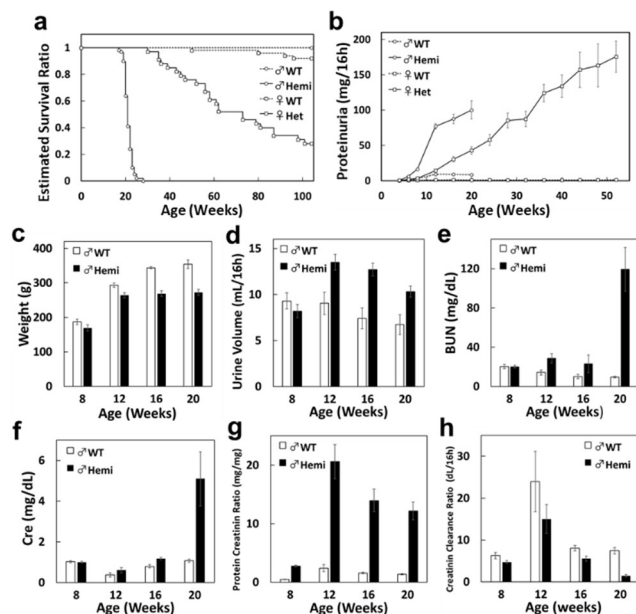


図3. *Col4a5*欠損ラットは早期より尿蛋白・血尿が認められる

(a)生存率 (b)尿蛋白 (c)体重 (d)尿量 (e)血中尿素窒素(BUN)濃度 (f)血清クレアチニン(Cre)濃度 (g)蛋白/クレアチニン比 (h)クレアチニンクリアランス

また *Col4a5*欠損ラットの腎臓において蛍光染色を行ったところ、8-20週齢のヘミ変異体雄ではCOL4 α 5の発現が消失し、ヘテロ変異体雌ではモザイクパターンとなった。また、COL4 α 3、COL4 α 4の発現もヘミ変異体雄では見られず、ヘテロ変異体雌ではモザイクパターンとなった。以上の結果から、*Col4a5*欠損ラットにおいて、IV型コラーゲン α 3/ α 4/ α 5のらせん構造が消失していることが示唆された(図4)。

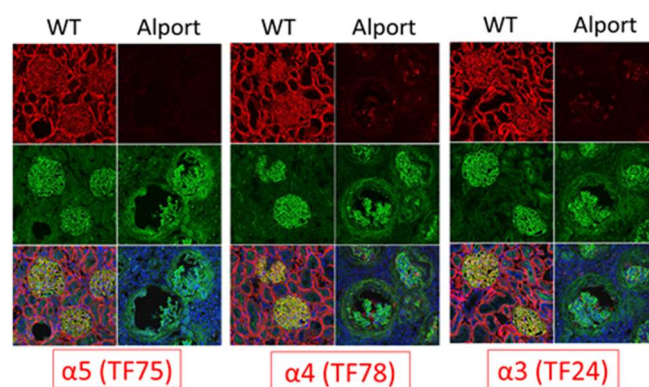


図4. 免疫染色

正常ラット雄と *Col4a5*欠損ラット雄の腎臓におけるCOL4 α 3からCOL4 α 5の発現

本研究で作製した *Col4a5*欠損ラット雄は18週齢から28週齢で死亡し、約95%の個体が20週齢から26週齢の間に死亡した。今後は、この *Col4a5*欠損ラットに対し、薬剤治療や給餌などが寿命にどのように影響するか検討していく予定である。

またラットは血圧測定が可能であり、その数値はマウスに比べて信頼性も高いことが知られている。よって、この *Col4a5*欠損ラットはアルポートモデルラットとして、アルポート症候群のような腎疾患と血圧関連疾患との関係性を研究する上でも、新たな知見をもたらすことが期待される。

以上のことから、*Col4a5*欠損ラットは、腎疾患のメカニズムを解明し、治療標的を特定するためのアルポート症候群モデルラットとして、有力な候補となりうる。

5. 主な発表論文等

〈雑誌論文:1件〉

1. Creation of X-linked Alport syndrome rat model with *Col4a5* deficiency (Namba M, Kobayashi T, Kohno M, Koyano T, Hirose T, Fukushima M, Matsuyama M.) Sci Rep. 2021

〈学会発表:1件〉

1. Namba Masumi, Kobayashi Tomoe, Kohno Mayumi, Koyano Takayuki, Matsuyama Makoto
rGONAD: a new method for germline genome-editing in rats and the creation of rat models

of underlying renal diseases

第 8 回 日本ゲノム編集学会(タワーホール船堀), 2023 年 6 月 6 日(火)～6 月 8 日(木)

非アルコール性脂肪肝炎にサルコペニアを併発する際の腸内細菌叢の変化

岡山大学学術研究院保健学域

山元 修成

(概要)

非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) に、骨格筋が萎縮するサルコペニアが併発することが明らかになった。併発機序はいくつか報告されているが、いまだ有効性が示された報告はなく、未解明の機序の存在が示唆されている。近年、腸内細菌叢が、疾患の発症に関与していることが明らかになり注目されている。本研究では、筆者らが確立した世界的にも珍しい NASH-サルコペニア併発モデルを用い、併発時の腸内細菌叢の変化を解析した。

1. 研究開始当初の背景

ヒトをはじめとする哺乳類の腸内には、多種多様な細菌が共生している。これら細菌からなる生態系は腸内細菌叢と呼ばれ、宿主の免疫系構築・成熟に影響することが知られてる。免疫系により適切に制御された腸内細菌叢は、糖質や脂質のエネルギー代謝や病原細菌の定着抑制など、宿主にとって有益な作用を発揮する (Sybiosis)。しかし、抗生物質の投与や生活習慣の変化、環境要因や遺伝的素因により、この相互関係は破綻することが知られている (Dysbiosis)。この Dysbiosis の状態は、代謝性疾患 (糖尿病など) や消化器疾患 (炎症性腸疾患や大腸がんなど)、神経疾患 (パーキンソン病など) など、種々の疾患の原因になることが報告されている (Clemente JC et al., 2012; Hsiao EY et al., 2013; Sharon G et al., 2014)。

近年、世界的に患者数が増加し注目を集めている非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) でも、腸内細菌叢の変化が報告されている。NAFLD は、飲酒量が乏しいにもかかわらず脂肪肝を呈する慢性肝疾患で、脂肪肝のみを呈する非アルコール性脂肪肝 (NAFL) と、脂肪肝に加え炎症細胞の浸潤および肝線維化を伴う非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) に二分される (Rinella ME, 2015; Nd AM, 2019)。NAFLD/NASH は肝硬変や肝がんへ移行するだけでなく、心血管疾患の発症・死亡率も増加することが明らかにされており、盛んに研究されているが、現

在までに有効な治療方法は確立されていない (Eksted M et al., 2015; Targher G et al., 2016)。この NAFLD/NASH の予後に、加齢や肥満、インスリン抵抗性とは独立して、骨格筋が萎縮するサルコペニアが影響することが近年報告された (Lee YH et al., 2015; Koo BK et al., 2017)。

サルコペニアは元来、加齢に伴い筋肉量が減少し、筋力や歩行速度の低下を伴う疾患と定義されていた (Rosenberg IH, 1989)。しかし現在では、加齢以外の要因、悪液質 (カヘキシア) や糖尿病、慢性腎疾患などの諸疾患や寝たきりになることでもサルコペニアを発症することが明らかにされ、これらを二次性サルコペニア、加齢に伴うものを一次性サルコペニアと区別している (Bauer J et al., 2019)。サルコペニアが進行すると、転倒や活動度低下が生じやすく、フレイル (虚弱。生理的予備能が低下することで、ストレスに対する脆弱性が亢進し、機能障害や要介護状態、死亡など不幸な転機に陥りやすい状態) が進行し、生命予後等を低下させることになるため問題視されている。

NAFLD/NASH にサルコペニアを併発する機序としては、たんぱくエネルギー低栄養などが考えられているが、未解明の機序の存在も示唆されている。このような疾患の機序解明や予防・治療方法の研究には有用なモデル動物が必要になるが、これまでヒトの病態に類似した NAFLD/NASH 併発性サルコペニアモデルは報告されていなかった。筆者らは、

NAFLD/NASH モデル動物である SHRSP5/Dmcr ラットが、高脂肪・高コレステロール (HFC) 食負荷によって NAFLD/NASH にサルコペニアを併発することを見出した。本ラットは、ヒトの病態と共通して、肝線維化の進行に伴いサルコペニアを併発するという特徴がある (Yamamoto S et al., 2023)。

2. 研究の目的

既述のように、NAFLD/NASH 患者で腸内細菌叢の変化が起こっていることはすでにいくつかの報告がある (Zhu L et al., 2013; Raman M et al., 2013; Mouzaki M et al., 2013)。また、腸内細菌叢の変化は加齢によっても起こるため、サルコペニアをはじめとする様々な筋消耗性疾患への関与が示唆されている (Siddharth J et al., 2017; Kang L et al., 2021; Ren X et al., 2021; Wang Y et al., 2022)。しかし、NAFLD/NASH における腸内細菌叢の変化が骨格筋にもたらす影響については、いまだ検証されていない。

そこで本研究では、筆者らが確立した NAFLD/NASH 併発性サルコペニアモデルである SHRSP5/Dmcr ラットを用いて、サルコペニア併発時の腸内細菌叢の変化を明らかにする。

3. 研究の方法

3.1. 実験動物

動物実験は、環境省が公表した「実験動物の飼養及び管理並びに苦痛の軽減に関する基準 (2006 年)」の勧告に厳格に従って実施した。本研究では、すべてのラットを温度 ($24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$)、湿度 ($55\% \pm 2\%$)、12 時間の明暗サイクルがコントロールされている本学動物資源部門の施設内で管理した。本実験は、岡山大学動物実験委員会の承認を得て行っている (承認番号 OKU-2021672)。

雄性の SHRSP5/Dmcr ラット ($n = 10$) は、9 週齢で SHR 等疾患モデル共同研究会 (京都, 日本) から購入した。普通 (SP) 食および HFC 食は、フナバシファーム (千葉, 日本) から購入した。食餌の組成は次の通りである。SP 食: 粗たんぱく質 20.8%, 粗脂質 4.8%, 粗繊維 3.2%, 粗灰分 5.0%, 水分 8.0%, 炭水化物 58.2%, HFC 食: 粗たんぱく質 9.6%, 粗脂質

24.0%, 粗繊維 1.5%, 粗灰分 2.3%, 水分 3.7%, 炭水化物 26.9%, パーム油 25.0%, コレステロール 5.0%, コール酸 2.0% (Kitamori K et al., 2012)。

ラットは、最初の一週間は水と SP 食を自由摂取させて馴化を行った。10 週齢開始時に、摂食量、体重、四肢筋力に有意差が生じないように、SP 食給餌群と HFC 食給餌群の 2 群に群分けし、20 週間の食餌負荷を行った (各群 $n = 5$)。

3.2. 生理学的解析

最終週齢 (30 週齢) 時に、一晩絶食させたラットをペントバルビタールナトリウム (48.6 mg/kg) で麻酔し、長趾伸筋 (EDL; 速筋) およびヒラメ筋 (SOL; 遅筋) それぞれの筋収縮力を測定した。測定は MP100, AcqKnowledge, トランスデューサ TSD125D, アンプ DA100C, 双極鉤電極 UM2-5050, 刺激反应用モジュール STM100C, 刺激アイソレーションアダプタ STMISOC (すべて BIO PAC Systems, Inc., CA, USA) を用いて行った。刺激電圧は $5\text{V}/2 \text{ sec}$, サンプルング周波数は 2000Hz で記録した。各筋肉、それぞれ 10 回分の筋収縮力を測定し、ランダムに 3 回分の測定値を抽出し、平均を取得して比較した (Yamamoto S et al., 2023)。

3.3. 病理学的解析

筋収縮力測定後、全採血による安楽死を行い、解剖を実施した。採血後、肺を摘出し、リン酸緩衝生理食塩水を灌流させた。その後、肝臓と EDL, SOL を摘出し、病理組織学的解析のために切片化した。EDL および SOL は、筋線維の走行に対して垂直に切片化し、10%中性緩衝ホルマリンで 48 時間振盪固定し、断面が観察できるようパラフィン包埋を行った。肝臓に関しても、同様の手順でパラフィン包埋を行った。EDL と SOL は、それぞれ速筋線維 [Myosin (FAST) clone MY-32; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA] と遅筋線維 [Myosin (Skeletal Slow) clone NOQ7.5.4D; Sigma-Aldrich] を免疫組織化学染色で染め分け、線維断面積の解析を行った。肝臓は、Hematoxylin-Eosin (HE) 染色と Masson-Trichrome 染色を岡山大学の共同研究室に依頼した。画像は、蛍

光顕微鏡 (BZ-X700, KEYENCE, 大阪, 日本) を用いて撮影した。解析は Image J Fiji (Image J 1.53u, Java, 1.8.0_322; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いた。

肝臓においては HE 染色像を用いて, NASH の判定に用いられる NAFLD 活性スコア (NAS) を算出した。NAS は, 高脂肪食負荷ラットに適用された NASH Clinical Research Network スコアリングシステムに従って推定されたものである (Kleiner DE et al., 2005; Elias J et al., 2009)。肝脂肪症, 炎症, 細胞の浸潤および肝細胞バラーニングそれぞれの評点の合計が 5 点以上のものを NASH と判定する。

3.4. 16SrRNA 解析

解剖時に, 直腸に滞留している糞便をコレクションチューブに採取し, 凍結保存した。全個体の解剖終了後, 凍結糞便を生物技研 (神奈川, 日本) に送付し, 16SrRNA V3/V4 領域を対象とした解析を依頼した。解析結果は, データベース (SILVA) を使用して菌種を同定した。

得られた SP 食群 (n = 5) および HFC 食群 (n = 5) の計 10 個体の 16SrRNA 菌叢解析データをもとに, 各個体の α 多様性を示す Shannon index と Faith's Phylogenetic Diversity を調べた。検定は Mann-Whitney-U で検定した。また, SP 食群および HFC 食群間での腸内細菌組成の多様性の差 (β 多様性指数) を示す Unifrac 距離を, Unifrac weighted 距離の 2 軸主成分分析 (PCoA), Unifrac unweighted 距離から生成された有意性プロットを用いて評価した。Unifrac unweighted 距離の統計検定には PERMANOVA を使用した。

4. 研究成果

4.1. NAFLD/NASH-サルコペニア併発の確認

骨格筋重量は, EDL・SOL とともに HFC 食群で有意に低値となった。筋収縮力は, 速筋である EDL では HFC 食群で有意に低値となったが, 遅筋である SOL では両群に差は認められなかった (図 1A, B)。筋線維断面積も同様の傾向があり, EDL の筋線維 (速筋線維) は HFC 食群で萎縮した線維の割合が増

加したが, SOL の筋線維 (遅筋線維) は両群に差は認められなかった (図 1C, D)。以上のように, 筋重量および筋力の低下が認められたことから, HFC 食を 20 週間給餌した SHRSP5/Dmcr ラットはサルコペ

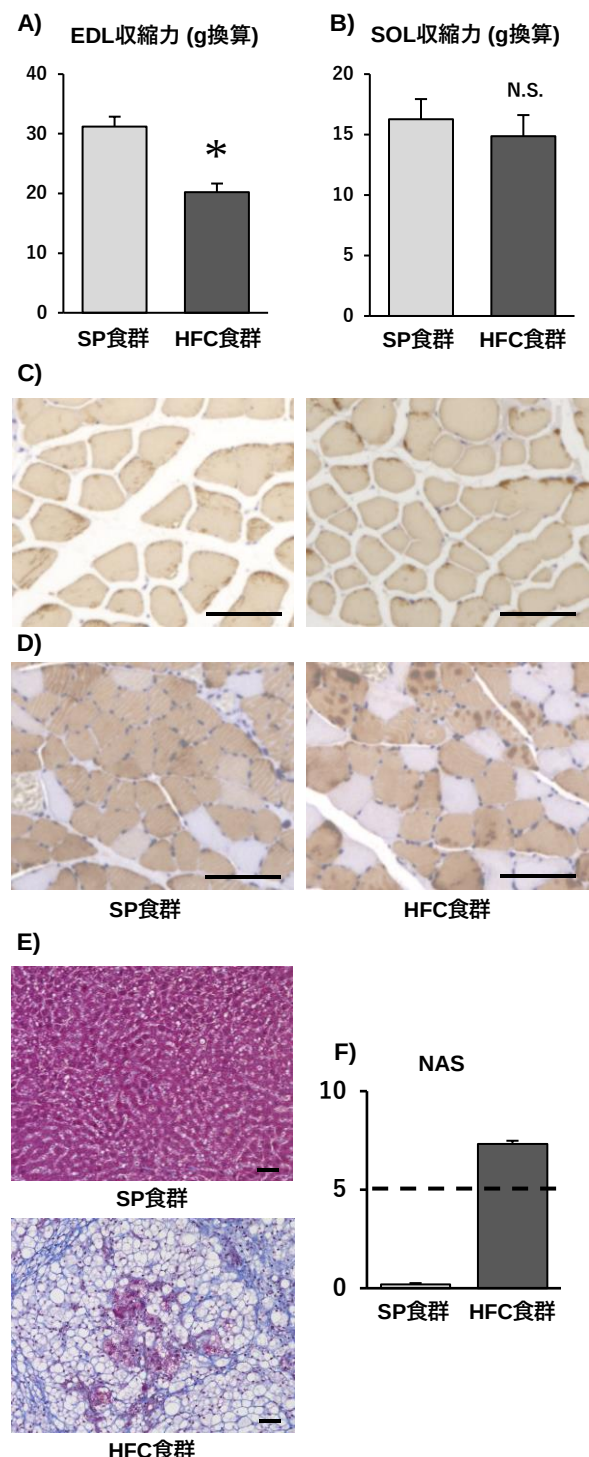


図1. 生理学・病理学的データ

A: 長趾伸筋 (EDL) の収縮力, B: ヒラメ筋 (SOL) の収縮力, C: EDLの免疫組織化学染色像 (速筋線維を染色, Scale bar=100 μ m), D: SOLの免疫組織化学染色像 (遅筋線維を染色, Scale bar=100 μ m), E: 肝臓のMasson-Trichrome染色像 (Scale bar=50 μ m), F: NAS (5点以上をNASHと判定)

ニアを発症していることが示唆される。一方、肝臓の病態は、HFC 食群で脂肪肝および肝線維化が増悪し、NAS も 5 点以上となり、NASH を発症していることが確認できた (図 1E, F)。

4.2. α 多様性

Shannon index (図 2A) および Faith's Phylogenetic Diversity (図 2B) の α 多様性指数は、SP 食群と比較して HFC 食群で有意に低下していた (Mann-Whitney-U-test, $p < 0.05$)。これらの結果は、HFC 食給餌群において、腸内細菌叢の多様性が減少していることを示している。

4.3. 腸内細菌叢の変化

本研究では、腸内細菌叢を形成する細菌として 9 門、65 科、127 属が同定された (図 2C, D)。全サンプルにおいて、腸内細菌叢は主に Firmicutes 門 (58.3%)、Bacteroidetes 門 (25.2%)、Verrucomicrobia 門 (12.2%)、Proteobacteria 門 (2.3%)、Actinobacteria 門 (1.5%)、Tenericutes 門 (0.2%) によって支配されていた。その中でも、Firmicutes 門は、SP 食群と比較して HFC 食群で有意に減少した (68.3% vs. 48.2%)。

科レベルでは、SP 食群と比較して HFC 食群で Akkermansiaceae 科、Bacteroidaceae 科、Tannerellaceae 科が有意に増加した (図 2E-G)。それに対し、SP 食群と比較して HFC 食群で Ruminococcaceae 科、Lactobacillaceae 科が有意に減少した (図 2H, I)。

属レベルでは、SP 食群と比較して HFC 食群で *Akkermansia* 属、*Bacteroides* 属、*Ruminococcus* 属、*Parabacteroides* 属が有意に増加した (図 2J-M)。それに対し、*Lactobacillus* 属は有意に減少した (図 2N)。

4.4. β 多様性

SP 食群および HFC 食群における腸内細菌組成の違いは、 β 多様性指数を用いて示した。この組成の違いは、Unifrac weighted 距離の 2 軸主成分分析 (PCoA)、Unifrac unweighted 距離から生成され

た有意性プロット (PREMANOVA 検定) で示した。SP 食群と HFC 食群において、Unifrac weighted 距離の 2 軸主成分分析は偏りを示した (図 2O)。また、SP 食群と HFC 食群において、Unifrac unweighted 距離は腸内細菌組成の分類学的な距離を示し、2 群間で有意差を示した (図 2P, Q)。

4.5. 総括

ヒトの場合、筋肉重量の減少および筋力の低下を共に示した場合を、サルコペニアと判断している。筆者らは以前の研究で、SHRSP5/Dmcr ラットが、NAFLD/NASH の肝線維化進行に伴いサルコペニアを発症することを明らかにしている (Yamamoto S et al., 2023)。本実験でも、HFC 食を 20 週間給餌した SHRSP5/Dmcr ラットで、NASH とサルコペニアを併発していることが示された (図 1)。

腸内細菌叢と疾患の関係は、現在盛んに研究成果が報告されている。NAFLD/NASH もその一つで、肝線維化が進行すると、*Bacteroides* 属や *Ruminococcus* 属が増加することが報告されている (Boursier J et al., 2016)。これは、本研究結果とも一致するものである。また、Loomba らは、高度線維化症例で *Proteobacteria* 門が増加し、*Firmicutes* 門が減少することを明らかにしているが、こちらも本研究結果と一致している (Loomba R et al., 2017)。また、重篤な肝疾患患者では、腸内細菌叢の多様性減少と肝機能悪化との間に因果関係が示唆されており (Perlin CM et al., 2023)、本研究でも腸内細菌の多様性減少が示されている。肝機能の悪化は、以前の研究で報告済みである (Yamamoto S et al., 2023)。

一方、サルコペニアと腸内細菌叢の関係も近年になり注目を集めている。主に加齢に伴うサルコペニア患者の解析となるが、サルコペニア患者で多様性の低下や *Bacteroides* 属がサルコペニアの重症度と関係しているという報告がある (Park CH et al., 2022; Wang Y et al., 2022)。NASH がさらに重症化すると肝硬変となるが、肝硬変患者における筋力低下患者の腸内細菌叢の調査も行われている。この研究では、*Bacteroides* 属の 3 種のほか、*Escherichia* 属や *Clostridium* 属などの菌種が増加していたと報告され

ている (Ponziani FR et al., 2021; Ren X et al., 2021)。本研究でも、HFC 食群で多様性は減少し、*Bacteroides* 属が有意に増加した。SHRSP5/Dmcr ラットは、サルコペニア併発以前にも、NASH 病態で *Bacteroides* 属が SP 食群より高値となる結果を筆者らは確認している (未発表)。このことから、NAFLD/NASH の発症・進行に伴い *Bacteroides* 属が増加し、それによりサルコペニアを併発している可能性が示唆される。

Lactobacillus 属は、整腸作用など生体にとって良い作用を発揮する共生菌として有名である。近年、マウスモデルを用いた検討で、*Lactobacillus* 属を投与することで NAFLD 病態を改善し、肝線維化改善作用を有することが報告された (Velayudham A et al., 2009; Yu JS et al., 2021)。つまり、*Lactobacillus* 属は NAFLD/NASH の発症を抑制する働きを有している。本研究では、*Lactobacillaceae* 科および *Lactobacillus* 属の菌群は HFC 食群で顕著に減少しており、NAFLD/NASH が発症・進展しやすくなっていることが考えられる。

Tannerellaceae 科や *Parabacteroides* 属は、両疾患と腸内細菌叢に関するこれまでの報告には見られないものであった。これらは、二疾患を併発した場合に認められる変化の可能性もあり、注目される。一方、善玉菌とされる *Akkermansiaceae* 科、*Akkermansia* 属が HFC 食群で著増した。これらは、痩せに関する菌群で、NAFLD/NASH 患者では正常者より減少することが確認されている。しかし、これら報告は肥満患者における解析結果である。本モデルラットは、アジア圏で問題となっている痩せ型 NASH のモデル動物である。痩せ型 NASH 患者に関する腸内細菌の報告は見られず、肥満を呈さない NASH 患者でも同様の結果が得られることが考えられる。しかし、筆者らはなぜこの菌群が増加するのかに対する答えは得られておらず、今後の追究課題となった。

結論として、腸内細菌叢の多様性低下は NASH 病態およびサルコペニア病態にも影響を及ぼし得ることが示唆された。特に、NASH およびサルコペニア患者の腸内細菌叢に関する報告の共通項である *Bacteroides* 属は、NAFLD/NASH にサルコペニアを併発する仲介因子になっている可能性がある。

5. 主な発表論文等

【雑誌論文】なし (投稿中：1)

【学会発表】

- ・ **山元修成**, 福岡威人, 後藤和義, 中山日菜子, 桐原空, 藤井萌, **渡辺彰吾**. 疾患併発性サルコペニアモデル SHRSP5/Dmcr ラットにおける腸内細菌叢の変化. 第 10 回 日本サルコペニア・フレイル学会大会, 2023 年 11 月 2-3 日, 東京.

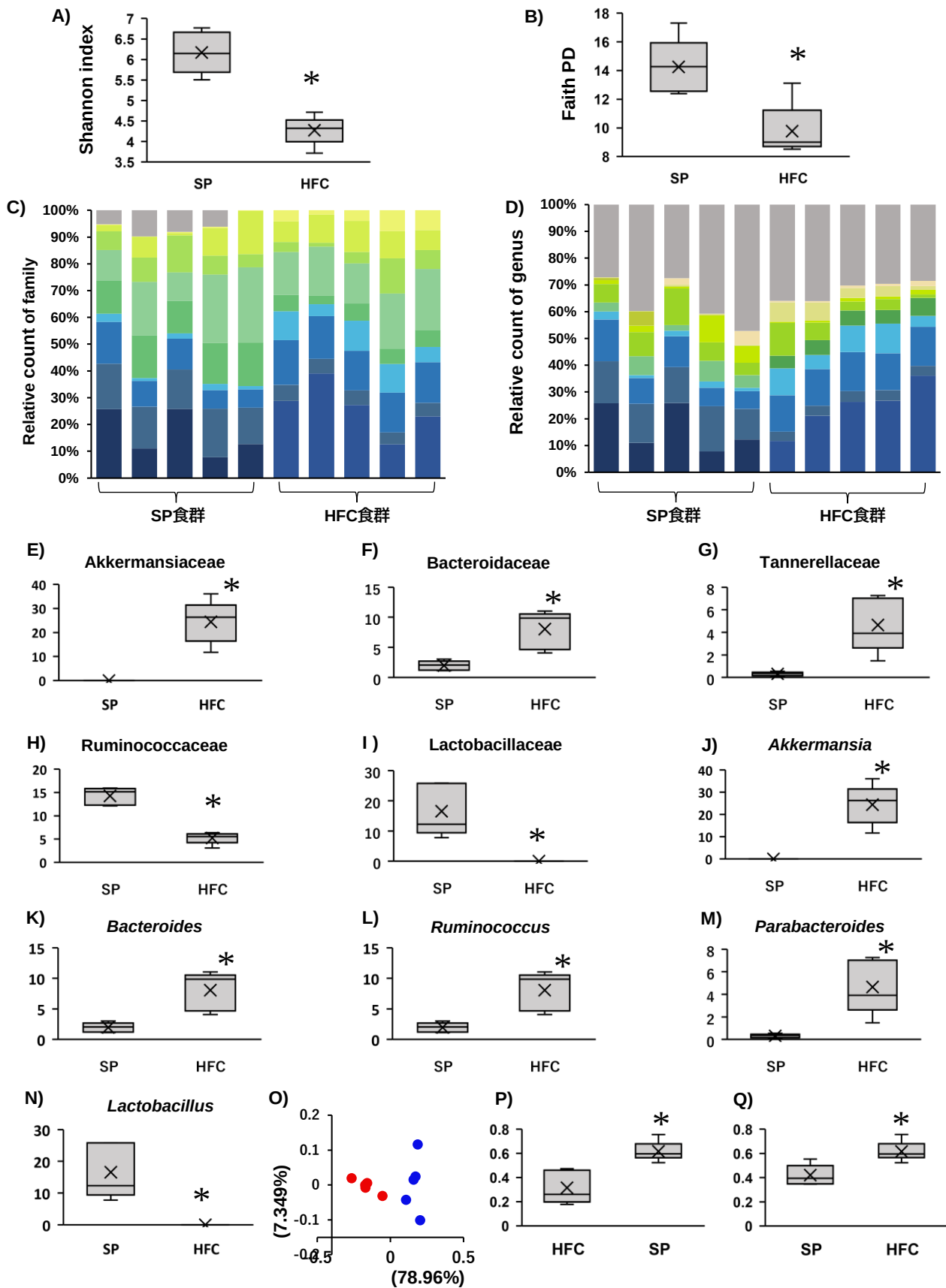


図2. 腸内細菌叢解析結果

A: Shannon index, B: Faith's Phylogenetic Diversity, C: 腸内細菌叢の科レベルの分布, D: 腸内細菌叢の属レベルの分布, E-I: 各科の分布量, J-N: 各属の分布量, O: Unifrac weighted距離の2軸主成分分析 (PCoA), P: Unifrac unweighted距離から生成された有意性プロット (HFC食群との腸内細菌組成の分類学的な距離を表す), Q: Unifrac unweighted距離から生成された有意性プロット (SP食群との腸内細菌叢の分類学的な距離を表す)

マルチオミクス解析によるヒト肢芽形成の理解

岡山大学 学術研究院 医歯薬学域（医学系） 組織機能修復学分野

大曾根 達則

（研究成果の概要）

本研究では人工ヒト多能性幹細胞から軟骨前駆細胞へと分化する過程において RNA 発現量・オープンクロマチン領域・ヒストン修飾の変化に関して、どのような経時的な変動が起こっているのかを明らかにすることを目的として研究を行った。結果、軟骨前駆細胞へと分化する過程における転写因子のネットワークの候補が明らかになった。また、codingRNA における発現変動相関ネットワークが示され、そのネットワーク上で9つのクラスが存在することが明らかになった。

（本文）

1. 研究開始当初の背景

細胞内の様々な生物学的挙動が明らかになってきた今、効率的に *in vitro* 実験を行うためには、予めシミュレーションが行えると望ましい。しかしながら、現実的には細胞シミュレーションの作成は困難である。その理由としては、膨大な数の分子が存在すること、それらの相互作用が複雑であること、それらの分子全ての機能が明らかになっているわけではないこと、が挙げられる。ヒト細胞シミュレーションに向けた研究に関して、国内ではミトコンドリア、シグナル伝達など機能ごとに開発を行い後で統合する E-Cell プロジェクト、国外では今年初めに報告された約 7000 分子からなる細胞を細胞周期の 20 分間をシミュレーションした研究が挙げられる。前者は Version 4 まで開発が進んでいるものの、全ての機能ごとにモデルが完成しているわけではなく、後者は並列計算に特化したコンピュータを使用して 10 時間かかっている。従って生化学的に厳密なヒト細胞シミュレーションを作成するのは現時点では非常に困難であると言わざるを得ない。

一方、シミュレーションという観点から見ると、他分野でのシミュレーションでは必ずしも対象における挙動を科学的に厳密に再現することを試みているとは限らない。例えば、人の心理のように現時点では数学的に記述することが出来ない分野

を取り扱う行動科学分野などが挙げられる。そのような分野においては、現象を数学的、物理・化学的に再現するのではなく、モデルそのものを別の形で近似することでシミュレーションを行っている。そのためヒト細胞においても、ブラックボックスである細胞内挙動をそのまま再現するのではなく別の形で近似することが出来れば、それは細胞シミュレーションになりうるのではないかと考えられる。

報告者は現象をそのまま再現するのではなく、マイクロ RNA 配列とその発現量から疾患モデルを構築する研究をこれまで行ってきた。本研究では実用的な速度でのシミュレーションが可能となるように、伝令 RNA-非翻訳性 RNA ネットワークの経時変化という、別の形で近似する。これは従来の研究とは異なる新しいアプローチである。

2. 研究の目的

本研究では、最終的な目的である「細胞分化における細胞内挙動の近似モデルを作成する」ために、人工ヒト多能性幹細胞から軟骨前駆細胞へと分化する過程において RNA 発現量・オープンクロマチン領域・ヒストン修飾の変化に関して、どのような経時的な変動が起こっているのかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

3-1. 細胞の分化誘導

用いた細胞株および分化誘導の手順は、申請者が所属する研究室が出した論文 [D. Yamada, et al., Nat. Biomed. Eng., 2021] に全て則って行った。

3-2. マルチオミクス解析

ヒト人工多能性幹細胞 (day0; D0)、D0 から中期原始線条への分化誘導 (MPS)、MPS から側板中胚葉への分化誘導 (day2; D2; LPM)、LPM から肢芽間葉系幹細胞への分化誘導 (day4; D4; LBM)、軟骨前駆細胞 (ExpLBM) の各段階において bulkRNA-Seq 解析、ATAC-Seq 解析、CUT&Tag 解析を行った。なお当初の予定では ChIP-Seq 解析を行う予定であったが、ChIP-Seq 法の改良版であり細胞数が少量でも行うことが可能な CUT&Tag 法へと変更した。

bulkRNA-Seq においては、RNeasy Kits (QIAGEN 社) で RNA 抽出を行い、KAPA RNA HyperPrep Kit with RiboErase (Roche 社) でライブラリ作成を行った。

ATAC-Seq においては、NexteraDNA Sample Prep Kit (illumina 社) でオープンクロマチン領域を抽出し、Nextera Index Kit (illumine 社) でライブラリ作成を行った。

CUT&Tag においては、CUT&TAG-IT Assay kit (Active Motif 社) で取得したいヒストン修飾部位を抽出し、Nextera Index Kit (illumine 社) でライブラリ作成を行った。

各手順はキットのプロトコル準拠である。塩基配列の読み出しは外注した。

3-3. データ解析

取得した塩基配列は不老 Type II (名古屋大学) で解析を行った。

bulkRNA-Seq 解析においては、fastp で品質管理を行い、kallisto で擬似マッピングした。正規化には GeTMM 法を用いた。差次的発現解析は NOISeq で行い、濃縮解析には GSEA を用いた。相関解析では WGCNA と同じ SCAN 法では実行速度の点から現実的ではなかったため、ソーシャ

ルネットワーク解析などで用いられるエッジベースの手法であるコミュニティ検出のうち、Louvain 法を用いて相関関係にある遺伝子のクラスタ分類を行った。

ATAC-Seq および CUT&Tag の解析においては、fastp で品質管理を行い、bowtie2 でマッピングした。その後フラグメント長分布もしくはマッピングされた断片長分布の評価を行った。シグナル分布の可視化のため、deepTools を用いた。またピーク検出には gopeaks を用いた。ピークの可視化には IGV を利用した。

4. 研究成果

4-1. bulkRNASeq 解析

D0、MPS、LPM、LBM、ExpLBM の各段階におけるマーカー遺伝子の発現量を確認した。D0 では NANOG をはじめとした多能性を示すマーカー遺伝子が、ExpLBM では軟骨前駆細胞のマーカー遺伝子である PRRX1 が多く発現しているなど、各分化段階においてそれぞれのマーカー遺伝子が見られることが確認できた (図 1)。



図 1

分化誘導の各段階における
マーカー遺伝子の発現量

4-2. ATAC-Seq 解析, CUT&Tag 解析

ATAC-Seq によってオープンクロマチン領域を、CUT&Tag によって H3K9me3、H3K27me3、H3K9ac、H3K27ac の各ヒストン修飾が存在する領域を取得した。各分化段階のマーカー遺伝子に対して、どの領域が開いているのか、どの領域にどのようなヒストン修飾がされているのかを IGV で確認した。そのうちのひとつとして、PRRX1 を示す (図 2)。PRRX1 では LBM や ExpLBM でクロマチンが開いていることが示された。またヒストン修飾においては、プロモータの非活性化を示す H3K27me3 のピークが PRRX1 のプロモータ領域において day0, MPS, LPM で立っていた。一方、プロモータ領域の活性化を示す H3K9ac や H3K27ac のピークが立っていた。前述したように、PRRX1 は軟骨前駆細胞のマーカー遺伝子であるため、ATAC-Seq 解析および CUT&Tag 解析においても PRRX1 の転写が活性化していることが示された。

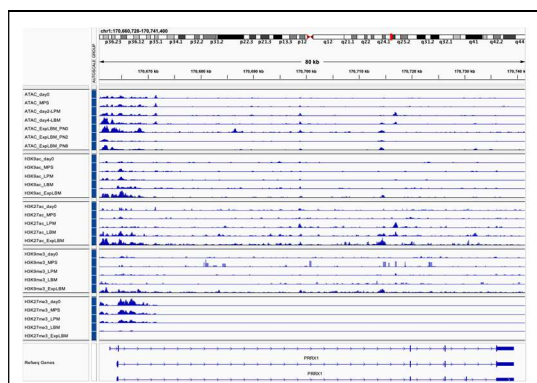


図 2

PRRX1 がコードされている領域の
オープンクロマチン領域および
H3K9me3、H3K27me3、H3K9ac、H3K27ac の
各ヒストン修飾が存在する領域

4-3. 統合解析

軟骨前駆細胞の前後では PRRX1 の発現量が大きく異なることが知られている。ゆえにここでは PRRX1 が LPM 以前と LBM・ExpLBM 以降で PRRX1 の発現が変動する機構に関与する遺

伝子ネットワークに着目したものを報告する。

図 3 で示したように、オープンクロマチン領域に関しては D0・MPS・LPM では PRRX1 のプロモータ領域はあまり開いておらず、LBM や ExpLBM で開いていく。またヒストン修飾という観点でも、D0・MPS・LPM では非活性化を示すトリメチル化されているのに対し、ExpLBM で特に活性化を示すアセチル化されている。転写を活性化・非活性化したい領域にメチル化・アセチル化酵素が引き寄せられるメカニズムは分かっていないが、メチル化に関しては転写が活性化していない部分がメチル化されるという仮説がある [Yiran Guo, et al., *Trends Genet.*, 2021]。そこで本研究ではヒストン修飾ではなく転写因子によるネットワークに着目し、LBM への分化誘導の前後で PRRX1 の転写に関わる転写因子ネットワークがどのように変化しているのかについて調べた。

PRRX1 の転写制御に関して、次の可能性が考えられる。

1. LPM まではエンハンサ領域が不活性化しており、LBM 以降では活性化する
2. LPM まではリプレッサによって転写が抑制されており、LBM 以降ではサイレンサ領域が不活性化することにより転写が活性化する

前者においては、genecards より PRRX1 のエンハンサ領域を取得し各領域を IGV にて確認したところ次の条件を満たす領域は見つけれなかった。

- LPM までは当領域において
 - クロマチンが閉じている
 - メチル化されたヒストンがある
 - アセチル化されたヒストンがあまり見られない
- LBM 以降では当領域において
 - クロマチンが開いている
 - メチル化されたヒストンがあまり見られない

➤ アセチル化されたヒストンがある
後者においては、SilencerDB より PRRX1 のサイレンサ領域を取得した。実験で確かめられたサイレンサ領域は登録されておらず、253 の予測される領域が得られた。各領域を IGV にて確認したところ、8 箇所の候補が以下の条件を満たす領域として抽出された。

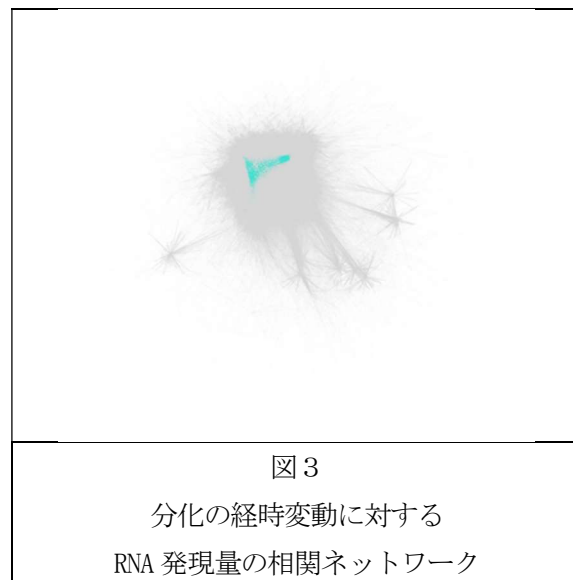
- LPM までは当領域において
 - クロマチンが開いている
 - メチル化されたヒストンがあまり見られない
 - アセチル化されたヒストンがある
- LBM 以降では当領域において
 - クロマチンが閉じている
 - メチル化されたヒストンがある
 - アセチル化されたヒストンがあまり見られない

それぞれの領域に結合しうる転写因子を JASPAR で予測した。その結果、714 の転写因子もしくはその複合体が見つかった。転写因子の種類としては 669 種類であった。それらの転写因子のうち、LPM 以前と LBM 以降を比較した時に LPM 以前で発現が 2 倍以上有意に上昇していた転写因子は 10 あった。さらにその 10 の転写因子のうち、D0 と LPM では有意に発現量が変動しておらず、かつ LBM と ExpLBM でも有意に発現量が変動していない転写因子はなかった。また、同転写因子のうち、D0 から ExpLBM にかけて発現が減少していく転写因子は 4 つ、D0 で十分発現していない転写因子は 5 つであった。D0 と LPM では有意な変動は見せなかったが、LBM から ExpLBM にかけて有意に減少した転写因子が 1 つであった。これらの転写因子に重複は見られなかった。D0 で十分発現していなかった転写因子を除く 5 転写因子について文献調査をしたところ、いずれも発生初期段階で見られる転写因子や椎骨・尾の形成に重要な転写因子など軟骨の発生においても重要であることが示唆される転写因子であることが明らか

となった。これらの転写因子が軟骨への分化において本当に重要なのか、どのような機序で分化へと関与しているのかを、今後の研究で研究する予定である。

4-4. 経時的変動解析

報告時においては、本解析は完了していないが、前準備として D0 から ExpLBM までの各段階における RNA の発現変動に対して相関解析を行った。報告時点では非翻訳性 RNA を含んだ RNA 全体では行えておらず、codingRNA のみでの解析である。codingRNA の相関解析により相関関係にある遺伝子ネットワークが得られた (図 3)。それにより、9 個のクラスターに分けられることが明らかになった。



4-5. 今後の展望

報告時においては、当初の目標であった経時的変動解析までは行えていない。従って、どのように転写物ネットワークが分化に従い変動するのか、そしてそれを数理モデル化することが可能かの検討を行う。

5. 主な発表論文等

現時点では当該研究については雑誌論文並びに学会発表は行っていない。