

神奈川工科大学

健康生命科学研究所

研究報告

第 15 号

2024 年度

研究推進機構

目次

- ・ 超高齢化に向けた聴こえフレイル予防に関する研究

上田麻理

- ・ リンパ管の可塑性を制御する生理活性物質の疾患治療への応用

馬嶋正隆

- ・ 老化を抑制する鍵となる細胞外マトリクス(ECM)の探索と、
コラーゲントリペプチドによる老化抑制機序の解析

井上英樹

- ・ Sema3A をターゲットとしたアルツハイマー病の早期診断法や
予防法の確立に向けた医療基盤研究

山下直也

- ・ 近赤外蛍光タンパク質の植物細胞への適用

村田隆

- ・ マウスに対する自由運動と δ -トコフェロールの同時負荷によるレプチンへの影響

井上英樹

- ・ Sema3A をターゲットとしたアルツハイマー病の早期診断法や
予防法の確立に向けた医療基盤研究

清瀬千佳子

- ・ 極限環境哺乳動物のクリプトクロムに関する研究 ほか

広井賀子

超高齢化に向けた聴こえフレイル予防に関する研究

研究者名：上田麻理

1. 研究の目的（以下タイトルは、11 ポイント、MS ゴシック）

本申請研究では、引き続き超高齢化社会対策を行う。国が特に重点的課題とする「孤独死防止」対策に取り組むことを目的とする。孤独死の原因となる認知症の予防を行う。認知症の最大の原因である「難聴」の早期発見方法の提案と難聴者対策を行う。さらに、眼鏡やコンタクトのように市民権を得にくい、聴覚(聴こえとその環境)の重要性について実市民行動の促進(社会システムの構築)を併せて行うことである。

2. 研究の必要性及び従来の研究

認知症を含む高齢者の数は世界的に増加している。認知症高齢者の増加は社会保障費の増加、労働人口比率の低下、パンデミック時の医療問題など国力の低下を加速させる深刻な問題である。2020 年に医学論文誌 THE LANCET 誌において、難聴が最大の認知症のリスクであると報告された。日本補聴器工業会の発表（21 年）によると、国内の推定難聴者数は約 1994 万人、全人口の 15.2%と試算されている。このうち自分の聴力が衰えていることに気づいている人はほぼ半数の 53%に過ぎないと言われている。難聴は、初期段階で治療すれば治る可能性は高く、進行も食い止められる可能性がある。また「歳だから仕方ないだろう」と放置しておくと、加速度的に聴力は落ちていくことが示唆されている。難聴及び、聴こえに関する研究は多くなされている。しかしながらそのほとんどが、医師らによる前述の「治療」を目的とした聴覚生理学的研究・臨床研究である。LANCET の論文(前述)をキックオフとして疫学的な研究も始まりつつあるが、医師或いは言語聴覚士(ST)の視点によるものが多くデータサイエンスのような情報学的な視点(具体的には分析スキル)や、音響分析や計測等の工学的視点が不足していることが問題となっており、申請者らの工学及び、情報学の立場での研究が求められている。

3. 期待される効果

わが国が特に重点的課題とする「孤独死防止」対策のために、孤独死の原因となる認知症の予防が本申請研究で最も期待される効果の一つである。認知症の最大の原因である「難聴」の早期発見方法の提案と難聴者対策を行う。さらに、眼鏡やコンタクトのように市民権を得にくい、聴覚(聴こえとその環境)の重要性について実市民行動の促進(社会システムの構築)も研究成果から得られる効果である。

4. 研究の経過及び結果・評価

難聴スクリーニングに有用とされる 12 kHz を超える高周波音は、ヘッドホンやスピーカの非線形性により低調波歪が生じやすい、音波が回折しにくいいため音圧校正が困難など、聴力測定には不向きな音響特徴を持つ。申請者らがこれまでに得た高周波音曝露に関するスキルを活かし、適切な信号処理を行うことで高周波音を用いた聴力検査システムの開発と測定誤差の評価・補正を行っている。通常の聴力検査に必要な周波数帯域の聴力測定システムは現在までに開発済みである。また、耳鼻科での聴力測定を行い、多くのデータ数を取得して難聴予測データモデルを作成する。聴力測定には、音場の影響を受けにくいヘッドホン再生が望ましいが、提示音のレベルの校正が問題となる。人工耳や IEC カプラを用いる方法が考えられるが、それらは高周波音帯域でのカプラレスポンスが実耳レスポンスとは異なる。22 年度から引き続き、実耳レスポンスデータから高周波音領域に対応した音圧構成システムを構築する。1/4 inch. マイクロホン及び、カプラの製作には 3D プリンタを用いる。

5. 今後の計画

難聴スクリーニングに高周波帯域の音が有用とされているが、聴こえのメカニズムは未だ明らかになっていない。また、子どもや 20 歳程度までの若齢者は高齢者に比べて高周波帯域の音が可聴可能である。子どもや様々な成人の耳介モデルを構築し、そのシミュレーションを行うことで高周波帯域の音に対する聴こえの違いや難聴との関連を明らかにするための基礎データを得る。2021 年より申請者らが開発した聴力測定システムを用いて、厚木市荻野地区の高齢者に対する聴こえ計測とデータベース構築を行っている。本申請研究によって開発予定の高周波音難聴スクリーニングシステムにより、分担者である医師の神崎らとともに難聴スクリーニングを実施する。研究開始初年度は、厚木市民に対して聴こえ講座・聴こえ相談を開設し、聴こえの重要性や難聴早期発見の重要性・予防と対策等について知識を深めるための活動を地域連携で行う。

6. 研究成果の発表

・Yamato Hiratsuka, Kazuki Kuga, Takahiro Miura, Tetsuo Tanaka, Mari Ueda *,

Sounds and Natures Do Often Agree: Prediction of Esports Player' s

Performance in Fighting Games Based on the Operating Sounds of Game

Controllers, Applied Sciences, applsci-3324283(2025, 1, 9 accepted)

・藍原直大, 宮崎剛, 田中博, 上田麻理,

画像変換を用いた複合音識別の高精度化とヒトの聴こえによる識別評価, 画像電子学会誌

IIEEJ-D-24-00012R1(2025, 1, 9 採録決定)

・M. Ueda et al., Personal Spaces for Security Guard Robots in a Campus, IIAI AAI 2024 winter(2024)

・M. Hiroe et al., Recent investigation on VHF sound exposure sources around us, InterNoise 2024(2024).

・M. Ueda et al., Survey on sound exposure for musician using a noise dosimeter,

InterNoise 2024

- M. Ueda et al., Issues and recent research on VHF sound exposure with consideration for young people's hearing perception, InterNoise 2024
- T. Miyazaki et al., Fundamental study on ambient noise reduction for analysis of hitting sound of professional baseball players, InterNoise 2024,
- T. Tanaka et al., Development of auditory training application for volleyball players, InterNoise 2024,
- K. Harusawa et al., Acoustic measurement around the pinna in the VHF region using a dummy head, InterNoise 2024,
- M. Ueda, et al., Development of a convenient hearing test system for the prevention of frailty, IIAI AAI 2024 Proc., 6pages, 2024.
- T. Tanaka, EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS OF READING ALOUD A PROGRAM CODE IN LEARNING PROGRAMMING BASED ON BRAIN-ACTIVITY MEASUREMENTS, CELDA 2024 Proc., pp.83-89, 2024
- M. Ueda, et al., DEVELOPMENT OF TWO APPLICATIONS FOR ACOUSTIC EDUCATION FOR ARCHITECTURAL DESIGNERS, CELDA 2024, pp.265-271, 2024
- T. Tanaka, Predicting the Academic Performance of Programming Students Using Logs from an Online Learning System: Toward Providing Timely Guidance and Feedback to Students, In Pedro Isaias, Demetrios G. Sampson, Dirk Ifenthaler (eds), Artificial Intelligence for Supporting Human Cognition and Exploratory Learning in the Digital Age, Springer, pp. 139-157, 2024

リンパ管の可塑性を制御する生理活性物質の疾患治療への応用

研究者名：馬嶋正隆（臨床工学科・教授）

1. 研究の目的

リンパ管およびその所属リンパ節を含むリンパ組織は、血管系とともに生体内の恒常性の維持や免疫応答など生理的に重要な役割を担っているだけでなく、肥満や浮腫などの病的状態にも関与している重要な器官である。病態時にはリンパ管およびリンパが流入する所属リンパ節において、ダイナミックな構造および機能変化が見られ、神経系が外界の刺激などによって機能的、構造的な変化を起こすのと同様に、リンパ組織においてもいわゆる『可塑性』が認められる。後述するように、リンパ組織の機能変調が原因となる疾患は多く、『可塑性』を制御することが有力な治療介入になることを繰り返し報告してきた(Tips 2019、P & T 2022 等の総説参照)。リンパ管は末梢組織において血管から漏れ出た組織液（間質液）を汲み出して静脈へと還流することで、体液の恒常性維持を担っており、その破綻はリンパ浮腫を引き起こす。また、リンパ管は免疫担当細胞の体内動態の経路であり、臓器障害やその後引き起こされる炎症反応では生体防御上重要な器官である。さらに、脂肪の多くは小腸上皮細胞においてカイロミクロンという大きなリポタンパク質となり、絨毛の乳糜管（リンパ管）から吸収され、静脈角を経由して全身へ運ばれる。乳糜管の脂肪吸収の亢進が肥満につながる事が推定され、乳糜管からの脂肪吸収の制御が肥満が基盤として存在する成人疾患の新規治療法となる可能性がある。

現代の医療の進歩はめざましく、人類は多くの疾患を克服してきた。しかし、今般の COVID-19 で経験したように今でも治療に難渋する疾患が存在する。これらの治療抵抗性疾患の克服には、斬新な切り口の治療アプローチが必須である。本研究では、リンパ管の機能失調に起因する疾患群に対し、同組織の可塑性を制御する生体内活性物質の一つである神経ペプチド(CGRP)を対象として、新規治療法を開発することを目的とした。

これまで申請者は、生理活性脂質、ペプチドが病態時のリンパ管を含む脈管新生を制御することを明らかにしてきた。本研究では、『リンパ組織の可塑性を制御することが治療介入になるか?』、『生理活性脂質、ペプチドが治療ツールとなるか?』を検討する。具体的には、リンパ管機能異常に立脚する疾患モデルを対象に、生理活性脂質・ペプチドあるいは生体内での有効性を高めたそれらのアナログ物質がリンパ組織可塑性を制御するか否かを解析し、治療抵抗性疾患の新規治療法開発への基盤研究を展開する。特に 2024 年度では、CGRP の肥満抑制効果について、乳糜管の脂肪吸収機能を調べて検討した。

2. 研究の必要性及び従来研究

医療の高度化が進む現代においてもなお、多数の国民が難治性疾患に苦しんでいる。生命維持の基本は細胞周囲の環境の恒常性の維持にある。この細胞周囲の環境の構成因子であるリンパ管は、体液循環に関与し、リンパ管の機能不全はリンパ浮腫を引き起こす。がん治療時のリンパ節郭清に伴う 2 次性リンパ浮腫は極めて治療に抵抗性であり浮腫に悩む患者は多い。リンパ浮腫指導管理料、四肢のリンパ浮腫治療のための弾性着衣などに係る療養費が、平成 20 年度診療報酬改定に伴って保険適用が認められるようになった。多くのリンパ浮腫患者が存在することを端的に表している。これまで進めてきた研究の成果は、多くのリンパ浮腫患者の福音となる。

さらに現代社会においては肥満が原因となる生活習慣病の患者数は多く、保険医療を圧迫している。最近、腸上皮細胞において、絨毛の乳糜管（リンパ管）に付属する平滑筋の収縮がリンパ管を介した脂肪吸収を制御することが報告された。申請者らは生理活性脂質および神経ペプチド CGRP の消化管での機能調節機構を長年調べてきた (Gastroenterology 2001, AJP 2010 等)。生理活性脂質、神経ペプチドによる乳糜管の可塑性制御、機能制御が代謝疾患の画期的な治療法になる可能性が高い。これまで乳糜管機能に注目し肥満治療を目指したものはなく、本年度の成果は社会のニーズに応えるものである。

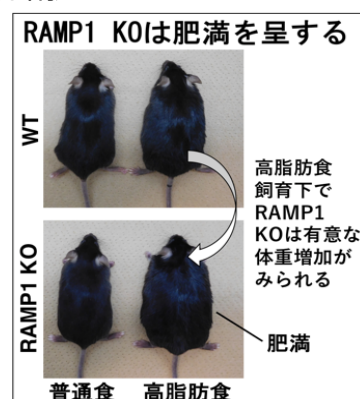
3. 期待される効果

本研究では極めて適時性の高い標的を設定している。リンパ管に関する研究の歴史はまだ浅く、これまで軽視されたリンパ管の生体内機能に焦点をあて、リンパ管の機能失調に起因する疾患発症メカニズムを解析し、治療的介入について産学連携研究を進めることは意義が大きい。疾患に悩む人々への多大な波及効果が期待される。特に肥満症に悩む患者は多く今回の成果は新規治療につながるものとして、医療上のインパクトが極めて大きいと考えられる。

4. 研究の経過及び結果・評価

1) CGRP 受容体ノックアウトマウス高脂肪飼育下での肥満増強

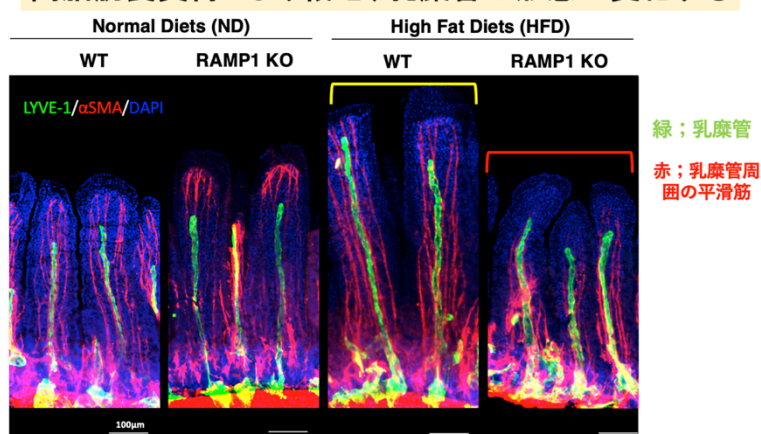
4週令の雄性 CGRP 受容体ノックアウトマウス (RAMP1 ノックアウトマウス、RAMP1 KO) に高脂肪食を与え、体重増加を経時的に評価した。同週令の雄性野生型マウス (WT) を対照として評価した。一般食 (クレア CE2) で飼育した限りでは、RAMP1 KO と WT では、体重増加に有意な差は認められなかった。高脂肪食を与えると著しい体重増加が RAMP1 KO、WT で認められたが、RAMP1 KO ではその増加傾向が強く、4週目の8週令の時点で有意な体重増加が認められた (右図)。このことは、CGRP が体重増加に対し抑制的に作用していることを明確に示している。



2) CGRP 受容体ノックアウトマウスの乳糜管構造の変化

免疫染色で乳糜管の構造を評価すると高脂肪食飼育時に RAMP1 KO では、WT で観察された絨毛の丈の増加、乳糜管の伸長が抑制されたことが確認された (4週間の高脂肪食飼育後、右図)。乳糜管の構造変化が脂肪吸収に関与していることが示唆された。

高脂肪食負荷により絨毛、乳糜管の形態が変化する



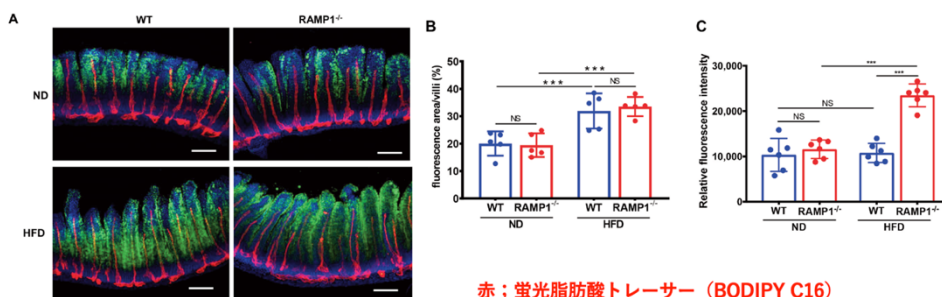
3) CGRP 受容体ノックア

ウトマウスでの腸管での脂肪吸収の増強

蛍光脂肪酸トレーサーをマウスに投与して、脂肪吸収の動態を高脂肪食負荷 4 週目で RAMP1 KO、WT で比較した（下図）。

高脂肪食を負荷した RAMP1 KO において、乳糜管およびそれに続くリンパ管への蛍光脂肪酸トレーサー

高脂肪食負荷時に血中への脂肪吸収がRAMP1 KOで増大



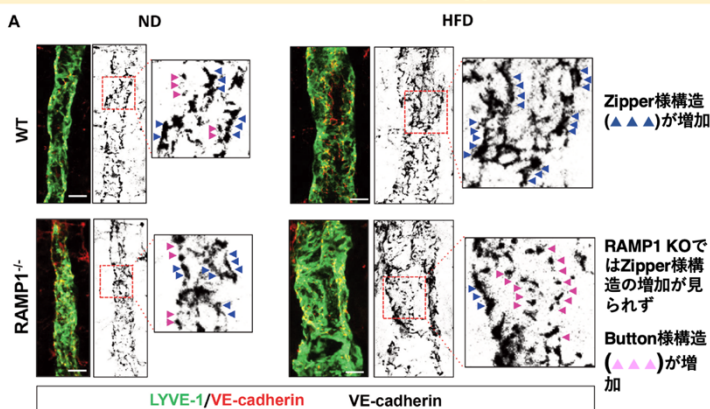
の移行が有意に増強していること（上図、パネル C）が確認できた。

4) CGRP 受容体ノックアウトマウスの乳糜管リンパ内皮接合状態の変化

高脂肪食負荷 4 週目で RAMP1 KO、WT の乳糜管のリンパ管内皮接着状態を接着分子 VE-cadherin に注目して評価した（右図）。

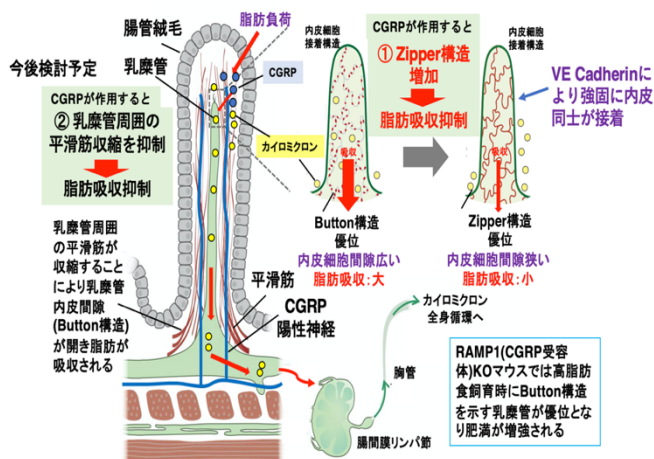
高脂肪食で飼育した RAMP1KO では、WT で認められた乳糜管内皮同士が比較的密に接着した

高脂肪食負荷時、CGRPにより乳糜管Zipper様構造が増加する



Zipper 様の構造が観察されず、内皮間隙が開いた Button 様の構造が WT に比べ増加していることが判明した。これにより RAMP1KO で脂肪吸収が増強することが示唆された。

CGRPにより乳糜管のZipper様構造が増加し脂肪吸収が抑制される



5) 成果のまとめ（右図）

本年度の成果として、RAMP1 KO を用い、高脂肪食負荷時に CGRP が乳糜管の Zipper 様構造を増加させ、脂肪吸収を抑制することが明らかになった。CGRP 作動薬（アナログ）が新規肥満治療のツールとなる可能性が考えられた。

5. 今後の計画

イーライリリーなど、CGRP のアナログの開発を進める製薬企業との連携研究を展開する予定である。また、片頭痛の新規治療薬として CGRP あるいは CGRP 受容体に対する抗体薬が開発が進んでいる。これらの抗体薬の有害事象について、これまで血管新生抑制による皮膚の創傷治癒、消化管の潰瘍治癒の遅延を提唱してきたが(Tips 2019 総説など)、CGRP 抑制による肥満誘導も考える必要があろう。これについても情報発信をしていく所存である。

6. 研究成果の発表

1: Tanabe M, Hosono K, Yamashita A, Ito Y, **Majima M**, Narumiya S, Kusano C, Amano H. Deletion of TP signaling in macrophages delays liver repair following APAP-induced liver injury by reducing accumulation of reparative macrophage and production of HGF. *Inflamm Regen*. 2024 Oct 3;44(1):43. doi:10.1186/s41232-024-00356-z. PMID: 39363292; PMCID: PMC11451145.

2: **Majima M**, Matsuda Y, Watanabe SI, Ohtaki Y, Hosono K, Ito Y, Amano H. Prostanoids Regulate Angiogenesis and Lymphangiogenesis in Pathological Conditions. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2024 Dec 2;14(12):a041182. doi: 10.1101/cshperspect.a041182. PMID: 38565267; PMCID: PMC11610754.

3: Hosono K, Yamashita A, Tanabe M, Ito Y, **Majima M**, Tsujikawa K, Amano H. Deletion of RAMP1 Signaling Enhances Diet-induced Obesity and Fat Absorption via Intestinal Lacteals in Mice. *In Vivo*. 2024 Jan-Feb;38(1):160-173. doi: 10.21873/in vivo.13422. PMID: 38148085; PMCID: PMC10756442.

4: Furue A, Hattori K, Hosono K, Tanabe M, Sato E, Honda M, Sekiguchi K, Ito Y, **Majima M**, Narumiya S, Kato K, Amano H. Inhibition of TP signaling promotes endometriosis growth and neovascularization. *Mol Med Rep*. 2023 Oct;28(4):192. doi: 10.3892/mmr.2023.13079. Epub 2023 Sep 1. PMID: 37654213; PMCID: PMC10502949.

5: Mishima T, Hosono K, Tanabe M, Ito Y, **Majima M**, Narumiya S, Miyaji K, Amano H. Thromboxane prostanoid signaling in macrophages attenuates lymphedema and facilitates lymphangiogenesis in mice : TP signaling and lymphangiogenesis. *Mol Biol Rep*. 2023 Oct;50(10):7981-7993. doi: 10.1007/s11033-023-08620-0. Epub 2023 Aug 4. PMID: 37540456; PMCID: PMC10520203.

6: **Majima M**, Hosono K, Ito Y, Amano H, Nagashima Y, Matsuda Y, Watanabe SI, Nishimura H. A biologically active lipid, thromboxane, as a regulator of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Biomed Pharmacother*. 2023 Jul;163:114831. doi: 10.1016/j.biopha.2023.114831. Epub 2023 May 8. PMID: 37150029.

7: Amano H, Eshima K, Ito Y, Nakamura M, Kitasato H, Ogawa F, Hosono K, Iwabuchi K, Uematsu S, Akira S, Narumiya S, **Majima M**. The microsomal prostaglandin E synthase-1/prostaglandin E2 axis induces recovery from ischaemia via recruitment of regulatory T cells. *Cardiovasc Res*. 2023 May 22;119(5):1218-1233. doi: 10.1093/cvr/cvac137. PMID: 35986688; PMCID: PMC10411941.

老化を抑制する鍵となる細胞外マトリクス (ECM) の探索と、 コラーゲントリペプチドによる老化抑制機序の解析

応用化学生物学科 井上 英樹

1. 研究の目的

本研究の目的は、老化を抑制する鍵となる細胞外マトリクス (ECM) 構成タンパク質を明らかにすることである。ECM は細胞の足場としての役割に加え、組織の恒常性維持や老化制御にも関与する重要な構造体である。加齢に伴う ECM のリモデリング機能の低下や損傷の蓄積は、老化や加齢性疾患の進行に深く関与している。申請者はこれまでに、コラーゲントリペプチド (CTP) が線虫やヒト細胞において ECM 産生を促進し、老化を抑制することを見出しているが、老化抑制に直接関与する ECM 構成タンパク質の同定には至っていない。本研究では、線虫とヒト培養細胞を用いた種横断的な解析により、CTP 刺激や老化によって変動するマトリソーム (ECM プロテオーム) 遺伝子を網羅的に解析し、老化抑制に寄与するタンパク質を同定・機能解析することを目指す。

2. 研究の必要性及び従来研究

高齢化社会の進展に伴い、老化のメカニズム解明と健康寿命の延伸は重要な課題である。ECM は老化や加齢性疾患の進行に深く関与しており、そのリモデリング機構の破綻が疾患の発症にもつながることが報告されている。従来研究では、ECM の構成要素や老化との関係が一部明らかにされてきたが、老化抑制に直接関与する ECM 構成タンパク質の全体像は未解明である。これまでに、若い細胞由来の ECM が老化した細胞を若返らせ、ECM の健康維持が老化抑制に重要であることが報告された (*Aging Cell* 10:148, 2011)。また、申請者は、線虫を用いた研究により、CTP が p38 MAPK-SKN-1 経路を介してコラーゲン産生を促進し、老化を抑制することを明らかにしてきた (*BBRC* 505:1168, 2018)。この機構はヒト細胞においても同様の経路が存在することも示唆され、これらの成果は ECM の若さを保つことが老化抑制に有効であることを示唆している。本研究は、これまでの知見を発展させ、老化抑制に寄与する ECM 構成タンパク質の同定と機能解明を行う点で、学術的にも社会的にも高い意義を持つ。

3. 期待される効果

本研究により、老化抑制に関与する ECM 構成タンパク質が明らかになれば、老化の分子機構の理解が進むとともに、加齢性疾患の予防や治療に向けた新たな戦略の構築が可能

となる。特に、CTPのような外部刺激によってECMの若さを維持できることが示されれば、食品や医薬品としての応用も期待される。また、線虫とヒト細胞を用いた種横断的な解析により、得られた知見の汎用性が高く、他のモデル生物やヒトへの応用が可能である。さらに、老化関連マトリソーム遺伝子の同定とその機能解析は、将来的に「マトリオタイプ (Matreotype)」という新たな老化指標の確立にもつながる可能性がある。これにより、個人の老化状態を分子レベルで評価し、予防的介入を行うための基盤が築かれることが期待される。

4. 研究の経過及び結果・評価

本研究は線虫および哺乳動物培養細胞を用いた種横断的な解析によって、老化を抑制する鍵となる ECM(細胞外マトリクス)構成タンパク質を明らかにすることである。ECMは、組織の構築や細胞の足場だけでなく多くの生物学的機能を担っている。ECMは構成分子の合成/分解を介したリモデリングによって動的に維持されるが、加齢に伴うリモデリング能の低下によって老化の促進や加齢依存性疾患につながる。そこで、ECM 遺伝子が保存された線虫とヒト培養細胞を用い、老化進行や CTP によって発現が変化するマトリソーム遺伝子の網羅的解析と、生化学的および遺伝学的な解析によって課題を解決する。2024 年度は線虫を用いてマトリソーム遺伝子の網羅的解析、および CTP による細胞老化進行抑制と、関与するシグナル伝達系の検証を行った。線虫を用いた研究では、公共データを用い、各日齢(4日目、8日目、12日目、16日目、20日目、24日目)の線虫における遺伝子発現を比較した。その結果、4日目(若い線虫)と16日目(老齢線虫)では、タンパク質分解に関連する遺伝子発現が増加傾向にある一方、コラーゲンやリソソーム慣例遺伝子の発現は減少した(図1A)。次に RNA-seq を行い、CTP 投与/非投与線虫間での遺伝子発現について網羅的解析を行い Gene Expression Omnibus (GEO)と比較するとともに CTP によって発現が変動し、かつ加齢に伴い遺伝子発現がみられるマトリソーム遺伝子を探索した。その結果、遺伝子発現の変動が2倍以上に増加した遺伝子が71、0.5倍以下に減少した遺伝子が340遺伝子であった(図1B)。この多くがマトリソーム遺伝子であり、このうち CTP によって発現が増えた遺伝子のうち *cllec-265* (C型レクチン)、*col-94* (コラーゲン)、*nas-3* (Zinc メタロプロテアーゼ)を、発現が減った遺伝子のうち *cpr-2* (カテプシン B)、*cht-1* (キチナーゼ)の発現を実際にリアルタイム PCR で測定した。その結果、*cllec-265*, *col-94*, *nas-3*は加齢に伴い発現が減少し、その発現を CTP によって回復させることができた。一方、*cpr-2*, *cht-1*は加齢に伴い発現が増加し、その発現を CTP によって低下させることができた(図1C)。これらの結果から、老化によって発現が変動するマトリソーム遺伝子は CTP によって発現を調節させることができると考えられ、これら遺伝子が老化の調節に関与する ECM 因子であることが考えられる。

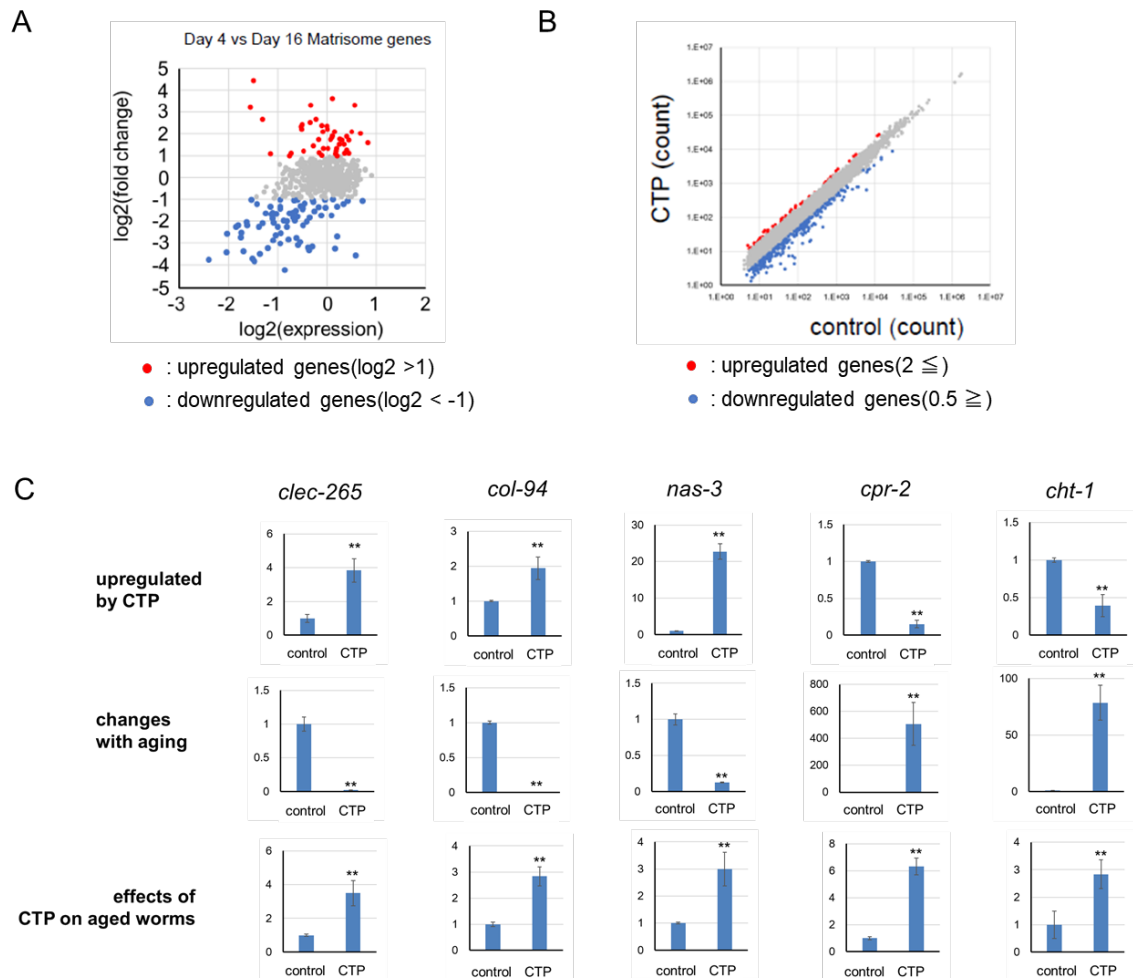


図 1 : 線虫を用いた CTP によるマトリソーム遺伝子の発現

A) マイクロアレイデータ (GSE12290) を利用し、4 日齢と 16 日齢の線虫におけるマトリソーム遺伝子発現の Mean difference plot。The Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID) を用いた解析により、タンパク質分解に関与する遺伝子の発現が増加した一方、コラーゲンおよびリソソーム関連遺伝子の発現は減少した。B) CTP 投与線虫における RNA-seq を用いた遺伝子発現解析。C) RNA-seq 結果のうち、マトリソーム遺伝子に着目し、CTP によって発現が増加、もしくは減少した遺伝子についてのリアルタイム PCR による発現解析。

ヒト細胞を用いた研究では、ヒト正常線維芽細胞およびヒト肺胞基底上皮腺癌細胞をブレオマイシンや D-ガラクトース等で人工的に老化誘導した細胞にコラーゲントリペプチド(CTP)を投与すると SA-β-gal の発現、および老化マーカー等の発現の観点から老化状態の改善がみられた。CTP は Gly-Pro-X (任意のアミノ酸) で構成されているが、このうち Gly-Pro-Hydroxyproline (GPHyp) および Gly-Pro-Arg (GPR) からなるトリペプチドにおいて老化マーカーの発現抑制が最も高かった。また、ヒトがコラーゲンを摂取すると血漿中にトリペプチドだけでなくジペプチド濃度も増加する。このジペプチドにおいても老化

抑制作用を検証した結果、血漿に最も多く含まれるジペプチド Pro-Hydroxyproline (PHyp) も老化マーカーの発現抑制作用を示した (図 2A)。また、ブレオマイシンが誘導する老化に対する老化マーカー p16, p21 の発現抑制はリアルタイム PCR によっても確認された (図 2B)。次に、誘導老化に対する CTP の作用機序を生化学的に調べた結果、ブレオマイシンが誘導する AKT (protein kinase B) のリン酸化を CTP が抑制することが示唆された (図 2C)。AKT 活性化は酸素消費量の増加による細胞内 ROS の増加、および FOXO 下流の ROS スカベンジャーの発現阻害を引き起こすことで早期老化を誘導すると考えられる。CTP は抗ストレス経路の活性化によって老化抑制に寄与することが示唆される。

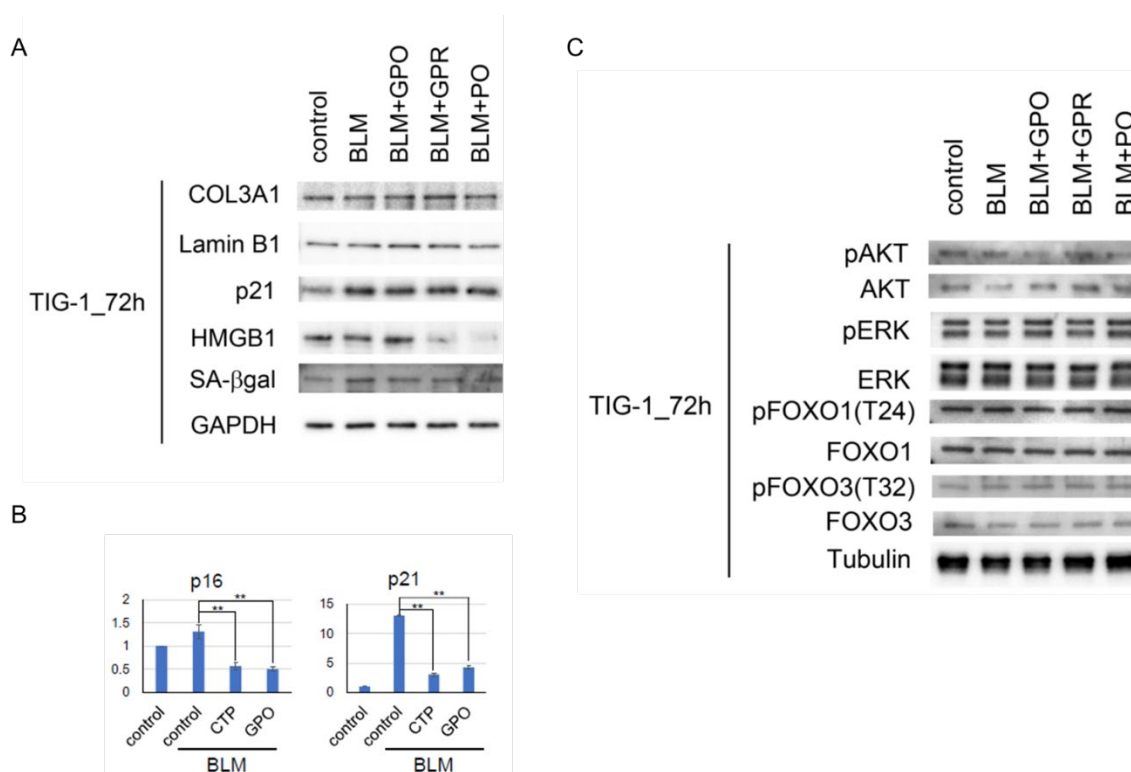


図 2：細胞を用いた誘導老化に対する CTP の抑制効果

A) ヒト正常線維芽細胞 (TIG-1) をブレオマイシンによって誘導老化し、各 CTP を投与した後の ECM および老化関連遺伝子の発現を各抗体を用いたウェスタンブロッティングによって解析した。B) TIG-1 を誘導老化し、各 CTP を投与した後の老化マーカー p16 および p21 の mRNA 転写状態。ブレオマイシンによる老化マーカーの転写上昇は CTP および GPO によって抑制された。C) TIG-1 を誘導老化し、各 CTP を投与した後の AKT、ERK、および FOXO タンパク質リン酸化の評価。AKT のリン酸化はブレオマイシンによって増加し、各 CTP によって抑制された。

5. 今後の計画

本研究では、老化抑制に関与するマトリソーム遺伝子の機能を線虫およびヒト細胞を用いて多角的に検証する。まず、*clec-265*, *col-94*, *nas-3*, *cpr-2*, *cht-1* の5遺伝子について、既知の機能やヒトホモログの有無、老化関連文献を基に優先順位を付け、線虫における機能喪失変異体やRNAiを用いて寿命、運動能力、酸化ストレス耐性などの老化指標を評価する。次に、*clec-265*, *col-94*, *nas-3* のヒトホモログを特定し、NHDF および A549 細胞において過剰発現およびノックダウンを行い、老化マーカーや AKT 経路への影響を解析する。さらに、CTP 由来の GPHyp/GPR 投与による AKT-PI3K-FOXO 経路の活性化や ROS レベルの変化を評価し、シグナル伝達機構を明らかにする。最後に、PDL 進行細胞と若い細胞の RNA-seq を比較し、マトリソーム遺伝子の発現変化と GPHyp による回復効果を検証する。

6. 研究成果の発表

1. 学会発表

Induction of expression of extracellular matrix components by collagen tripeptide (CTP) and involvement in the suppression

of aging. APPW2025 (第 130 回日本解剖学会・第 102 回日本生理学会・第 98 回日本薬理学会合同大会) (ポスター発表、2P-434) 2025 年 3 月 (千葉県・幕張メッセ)

Sema3A をターゲットとしたアルツハイマー病の 早期診断法や予防法の確立に向けた医療基盤研究

研究者名：山下 直也

1. 研究の目的

超高齢化社会に突入した本邦において、アルツハイマー病(AD)のような加齢に伴い発症リスクが増大する疾患の克服は喫緊の課題である。我々は、AD 発症の増悪因子である可能性が示唆されているセマフォリン 3A (Sema3A) に着目して研究している。本研究では、ヒトサンプルにおける Sema3A の定量による AD 発症予測技術の確立と、Sema3A を介した AD 増悪シグナルをターゲットとした AD 発症予防技術の基盤を確立することを目的としている。

2. 研究の必要性及び従来の研究

AD は、認知症の 65%以上を占める疾患であり、その早期診断や重症化を予防する方法の確立は喫緊の課題である。AD の病理に中心的役割を果たすアミロイド β ($A\beta$) は、アミロイド β 前駆タンパク質 (APP) から産生され、脳内に蓄積して神経障害作用を示す。しかしながら、 $A\beta$ 蓄積の開始と AD 発症との間には十数年のギャップがあり、疾患が発症してから介入では効果が限定的である。従って人類が AD を克服するためには、 $A\beta$ 蓄積を引き起こす予兆をとらえ、その改善に努める手法を確立することが必須であるが、このような視点からの開発研究は成功していない。

我々は、神経発生や脳機能制御に関わる分泌型タンパク質である Sema3A に着目し、この難攻不落な課題に対して独創的かつ挑戦的な研究を展開している。Sema3A は、AD 患者の死後脳解析から、AD 発症を増悪する因子として考えられている (Good et al., 2004)。しかしながら、この報告から約 20 年経つが、以降の研究は全く進展していない。この原因として、Sema3A を特異的に認識できる抗体が存在せず、生体内の Sema3A 発現を定量できる技術が存在しないこと、そして、Sema3A シグナルを介した AD 発症制御機構が明らかにされていないことが挙げられている。

3. 期待される効果

すでに AD は、世界規模では死因の第五位に位置づけられており、2050 年には一億人以上の市場規模を持つと想定されている。さらに、AD 患者は神経機能に不可逆的な障害を受けるため、日常的に介護が必要になるなど莫大な社会保障関係費が必要となる。従って、疾患発症リスクを早期に予測し、その予防や重症化の抑制に取り組むことは、健康寿命の延伸による充実した社会を提供するとともに、高い経済効果を示すことが期待される。

AD のような加齢に伴い発症リスクの高まる神経疾患の多くは多因子性であり、疾患を発症する要因は多岐にわたる。従って、個々の発症リスクを予測し、その要因に応じた予防法の開発が必須である。本研究では、今まで手付かずであった Sema3A をターゲットとすることで、AD 克服に向けた全く新しい技術の実現が期待される。

4. 研究の経過及び結果・評価

Sema3A と AD 発症との関連を明らかにするためには、生体 Sema3A 量を測定する技術の確立と、Sema3A シグナルを介した AD 発症の制御機構を明らかにする必要がある。昨年度までに新規 Sema3A 抗体を樹立し、ELISA 法による Sema3A 測定技術の確立に成功した（研究成果 1）。また、Sema3A シグナル分子と A β 前駆タンパク質である APP との相互作用を見出し、これを抑制する分子のスクリーニング系を確立した（研究成果 1）。そこで、これらの知見を基盤として、以下の研究を行った。

まず、確立した Sema3A ELISA システムによる測定と、抗体による抗原認識部位と Sema3A の立体構造との関係から、AD 剖検脳において Sema3A 発現ならびにその生化学的性状が異常になることが分かった。さらに、血清や脳脊髄液といった生体ヒト試料における測定条件も整いつつあり、早期診断法の確立に向けた解析の準備が整いつつある。

一方、Sema3A シグナル分子と APP との相互作用については、昨年度に確立したスクリーニング系を用い、35 種類の生薬由来サンプルを用いたスクリーニングを行った結果、これまでに 3 種類のヒットサンプルを得ることに成功した。

5. 今後の計画

ELISA 法による Sema3A 測定については、剖検脳での測定の例数を増やすとともに、疾患患者から得た血液や脳脊髄液での解析を進め、Sema3A 発現の定量が、AD 早期発見のバイオマーカーになりうる可能性を明らかにしていく予定である。また、Sema3A シグナル分子と APP との相互作用については、スクリーニングを継続して行うとともに、ヒットサンプルからの成分分離を進め、AD の予防や治療につながるヒット化合物の同定を進めていく予定である。

6. 研究成果の発表

- 1) 山下 直也. Sema3A をターゲットとしたアルツハイマー病の早期診断法や予防法の確立に向けた医療基盤研究. 健康生命科学研究 2023 年度研究成果報告書

近赤外蛍光タンパク質の植物細胞への適用

研究者名： 村田 隆（工学部応用化学生物学科）

1. 研究の目的

近赤外蛍光タンパク質は、赤色で励起され近赤外光を発する蛍光タンパク質の総称である。近赤外光蛍光タンパク質で細胞や組織を標識する事により、多標識が可能になり、励起光の侵襲性が低いなどのメリットが考えられる。しかしながら、近赤外蛍光タンパク質で植物細胞を標識し、観察することが可能かはわかっていない。本研究では近赤外蛍光タンパク質 emiRFP670 でタバコ培養細胞を標識可能か否かを検討する。

2. 研究の必要性及び従来の研究

近年、近赤外光領域に蛍光を発する蛍光標識を細胞に導入し、赤～近赤外光を励起光として照射し、近赤外光の蛍光を取得して顕微鏡で画像取得する、いわゆる近赤外光イメージングが注目されている。励起光である赤～近赤外光領域の波長は、ヘモグロビンによる吸収が少ないため、従来用いられてきた青色光や緑色光に比べ、組織の深部まで届くのが特徴である。しかしながら、近赤外蛍光タンパク質は一般的に蛍光が弱いものが多いため、より高性能の近赤外光蛍光タンパク質の開発が続いている。

組織透過性に加えて、近赤外蛍光タンパク質を用いるもう一つのメリットは、多色標識可能になることである。一般的に、細胞や組織を蛍光タンパク質で標識するときは緑色蛍光タンパク質（GFP）と、赤色蛍光タンパク質（RFP）の2色の組み合わせを用いる場合が多い。しかしながら、この組み合わせでは解析したいタンパク質や細胞小器官が2つまでに限定されてしまう。紫外線～紫色で励起され、青色の蛍光を発する青色蛍光タンパク質（BFP）も報告されているが、蛍光が弱いことに加え、励起光の組織透過性の低さや、励起光が細胞にダメージを与えること（光毒性）の問題があるため普及していない。

植物の生理機能を知ること、食を通して人間の健康に貢献できると考えられる。しかしながら、近赤外蛍光タンパク質の評価は、これまで動物の培養細胞やマウスの生体標識により行われてきたため、近赤外蛍光タンパク質が植物細胞でも正常に発現し、発色団と結合して蛍光を発するかどうかはほとんどわかっていない。どの近赤外蛍光タンパク質が利用可能か、利用可能な近赤外蛍光タンパク質を用いて3標識以上の蛍光観察が可能かを検証する必要がある。

村田研究室においては、植物細胞を3標識で観察するための取り組みを行ってきた。前年度は近赤外光蛍光タンパク質に着目して、報告されている中で最も明るく褪色が少ないmiRFP680に着目し、細胞核の標識を試みたが、蛍光を発する株を得ることができなか

った。miRFP680 に色素体移行シグナルを繋げた場合、色素体が蛍光を発したので、植物細胞内での発色団合成と結合は正常に行われたが、融合タンパク質の発現は細胞核の機能を阻害したものと考えられた。そこで、本研究では、融合タンパク質にしたときに miRFP680 よりも細胞機能を阻害しないと推測される emiRFP670 (Matlashov et al. Nature Communications, 11:239, 2020) を用いた細胞核の標識を行うことにした。

3. 期待される効果

植物細胞における近赤外蛍光タンパク質の利用可否はほとんど情報がない。現在必要なことは、どの蛍光タンパク質がどのタンパク質と融合タンパク質を作製可能で、顕微鏡によるイメージング可能かを知ることである。また、蛍光タンパク質にどの程度の長さのリンカー配列をつなげば融合するタンパク質の機能を阻害しないかも有益な情報である。本研究は植物における近赤外蛍光タンパク質の利用の基盤となるものである。

4. 研究の経過及び結果・評価

4-1 プラスミド作製と形質転換

植物コドンに最適化した emiRFP670 をコードするプラスミドを委託合成し、このプラスミドを元にして細胞核を標識するプラスミドを作製した。委託合成したプラスミドを大腸菌で増やし、制限酵素で切断して植物細胞への遺伝子導入に用いられるバイナリーベクターに組み込んだ。バイナリーベクターには植物で発現するプロモーター、DNA 結合タンパク質であるヒストン H2B をコードする配列、植物に抗生物質耐性を付与する選択マーカーの配列を含んでいる。まず、emiRFP670 とヒストン H2B の融合タンパク質を発現するプラスミド (H2B-emiRFP short linker) を作製し、次に、emiRFP670 とヒストン H2B のリンカー部分に、側鎖の短いアミノ酸 15 個が連なった配列をコードするリンカー配列を組み込んだプラスミド (H2B-emiRFP long linker) を作製した。これら 2 つのプラスミドをタバコ培養細胞に導入した。

4-2 形質転換細胞の評価

作製した形質転換細胞の細胞形態の正常さと核の蛍光を共焦点顕微鏡 FV3000 を用いて調べた。励起には FV3000 の 640nm レーザーを用いた。H2B-emiRFP short linker を導入した細胞、H2B-emiRFP long linker を導入した細胞、ともに核の蛍光を検出できた。一方、細胞形態は、H2B-emiRFP short linker が野生型に比べて若干大きめの傾向があったので、H2B-emiRFP long linker を導入した細胞で観察を行った。タイムラプス撮影を行い核の挙動を調べたところ、細胞分裂の過程を追跡可能なことがわかった (図 1)。

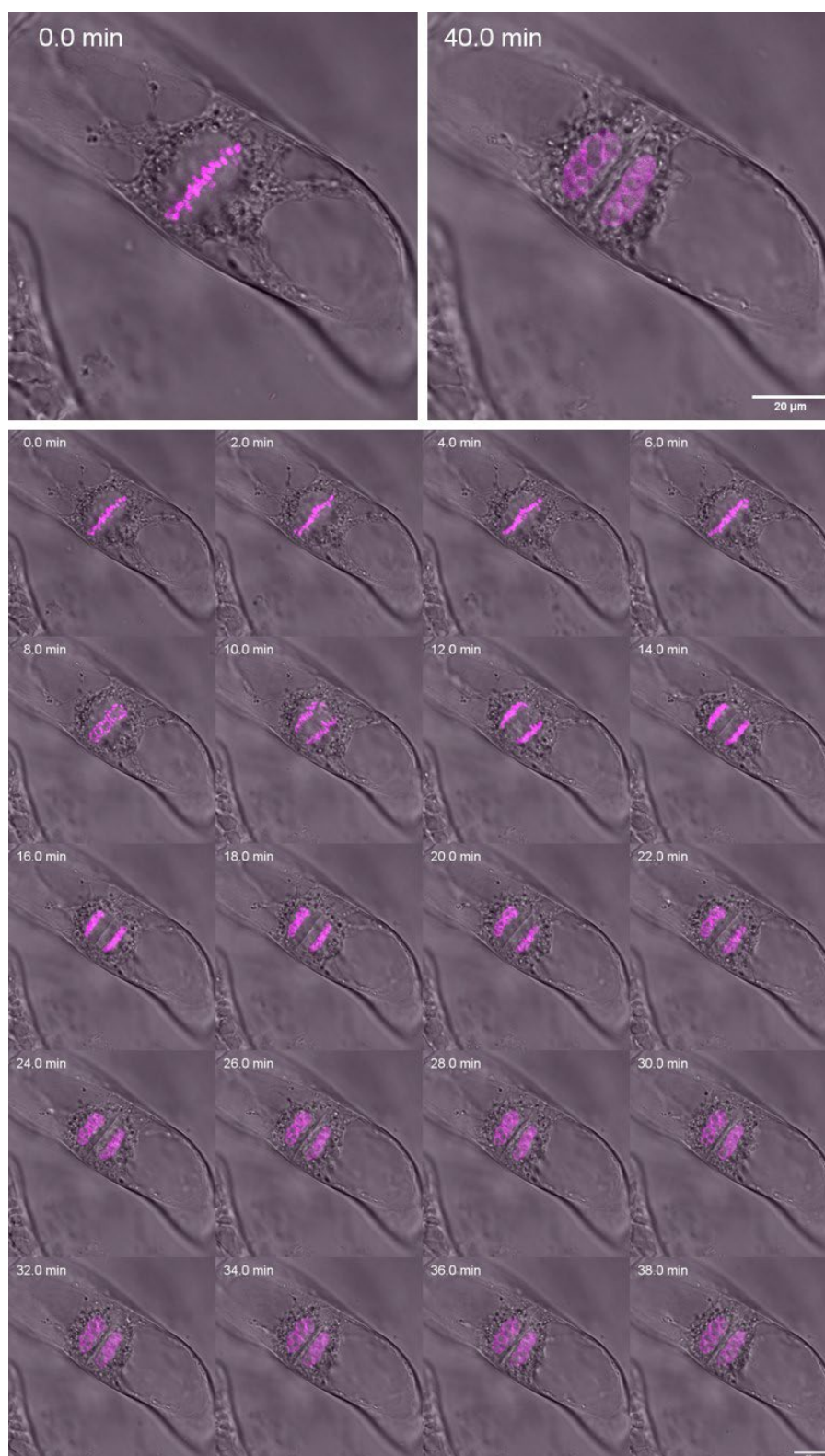


図 1 emiRFP670 を用いた細胞分裂の追跡。上：観察開始時（0 分）と観察終了時（40 分）の細胞。下：2 分間隔の細胞の変化。明視野像（グレー）と蛍光像（マゼンタ）の重ね合わせ像。

5. 今後の計画

本研究で、emiRFP670 はヒストン H2B と融合タンパク質を作製することにより核の標識を可能とすることがわかった。引き続き emiRFP670 の評価を続け、動原体や微小管など細胞分裂に働く構造の標識が可能かを調べる予定である。動原体標識が可能ことがわかったら、現在保有している核と微小管の 2 標識細胞に導入して 3 色標識が可能かを調べる。

6. 研究成果の発表

なし

「マウスに対する自由運動と δ -トコフェロールの同時負荷によるレプチンへの影響」

管理栄養学科 清瀬 千佳子

【Introduction】

我々はこれまでビタミン E 同族体の新たな機能性を見出す事を目的として検討を行って来た。ビタミン E は天然に4つのトコフェロール類と4つのトコトリエノール類の合計 8 種類が存在するが、その中で α -トコフェロールが最も代表的なビタミン E であり、医薬品や抗酸化剤として広く用いられているが、それ以外の同族体についての研究は行われているもののまだまだ未知数であった。そこで、 δ -トコフェロールの抗肥満効果に着目する事にした。これまで、マウス前駆脂肪細胞である 3T3-L1 細胞の分化時に α -トコフェロールまたは δ -トコフェロールを添加し、PPAR γ 、PGC1 α 、UCP1 の遺伝子発現について検討した所、コントロールに比べて α -トコフェロール添加群で3つとも有意な上昇が見られたが、 δ -トコフェロールに至ってはさらなる上昇が認められ、 α -トコフェロールよりも強い効果がある事を論証した¹⁾。そこで、今回我々は着眼点をレプチンに置き、レプチンに対する効果について検討する事にした。レプチンは脂肪組織から分泌され、血液を介して視床下部にあるレプチン受容体に作用する事で、強力な摂取抑制とエネルギー消費亢進をもたらす抗肥満ホルモンとして知られている。そこで、 δ -トコフェロール摂取が血中のレプチン濃度にどのような影響を与えるか検討した。

【Materials and Methods】

3 週齢 C57BL/6J 系雄マウス 24 匹を自由運動ケージに馴らすために 2 週間予備飼育を行った。その後、体重に差がなく、さらに自由運動を比較的行ったマウスと行わなかったマウスに分けて次の 4 群に群分けした。AIN93G の配合に準拠した餌を与えるコントロール(C)群、同じ餌で自由運動をさせる CE 群、C 群の餌に δ -トコフェロールを餌 1kg あたり 1g 添加した CD 群、CD 群の餌で自由運動をさせる CED 群の 4 群とした (1 群 n=6)。週 1 回体重測定を行い、8 週間飼育を行った。すべての群には α -トコフェロールを餌 1kg 当たり、0.05g 添加した。 δ -トコフェロールは「EmixD」(総トコフェロール量 91%以上、そのうち、 δ -トコフェロール含有量が 81%) を用いた。EmixD は三菱ケミカル(株)より供与して頂いた。なお、 α -トコフェロールは純度 99%以上で、タマ生化学(株)より供与して頂いた。

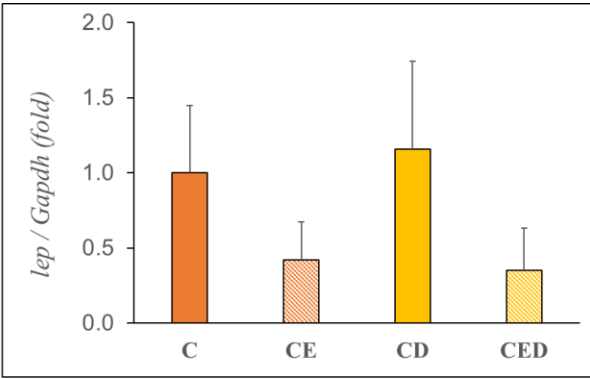
解剖前日に一晩絶食後、イソフルラン麻酔下にて解剖を行い、血液ならびに必要な臓器を採取し、各分析に適切な処理を行った後、-80°Cで保存した。

【Results】

CE 群ならびに CED 群の最終体重は C 群ならびに CD 群に比べて有意に低下した。しかし、C 群ならびに CE 群の最終体重と CD 群ならびに CED 群と比べて差は見られなかつ

た。従って、最終体重は自由運動によって有意に低下したが、 δ -トコフェロール摂取による影響はみられなかった。また、体内の脂肪量についても同様の結果となった。

睪丸周囲脂肪中のレプチン遺伝子発現量に関しては、CE 群ならびに CED 群のレプチン濃度は C 群ならびに CD 群と比べて有意に低下したが、 δ -トコフェロール摂取による影響は見られなかった（図 1）



群	C	CE	CD	CED	自由運動の効果	δ -tocの効果	相乗作用
自由運動	なし	あり	なし	あり	**	n.s	n.s
δ -toc	なし	なし	あり	あり			
レプチン	1.00 $\pm$ 0.45	0.42 $\pm$ 0.25	1.16 $\pm$ 0.59	0.35 $\pm$ 0.28			

Means $\pm$ S.D **: $p < 0.01$ by ANOVA二元配置分散分析法

図 1. 副睪丸周囲脂肪中のレプチンの遺伝子発現量の比較

【Discussion】

血中レプチン濃度と睪丸周囲脂肪量との間の相関を見た所、非常に高い正の相関が得られており、体内の脂肪量が少ない程、血中レプチン濃度も低い事が明らかとなり、脂肪組織中でのレプチンの産生は脂肪量の増加に伴って産生量も増える事が示唆された。これはこれまでの様々な報告の裏付けとなった。しかし、 δ -トコフェロール摂取による影響は見られなかった事から、今回の自由運動負荷が δ -トコフェロール摂取の影響よりもかなり強く影響した事が推察された。

【Reference】

1) R. Tanaka-Yachi, C. Kiyose, et. al., *B.B.R.C.*, **506**, 53, 2017

1. 極限環境哺乳動物のクリプトクロムに関する研究

2023 年 12 月より開始した本研究は、雪原や深海など極限環境に生育する哺乳動物が持つクリプトクロムの機能に関する研究である。

ヨーロッパコマドリが持つ Cry4 の研究で一躍脚光を浴びたクリプトクロムファミリーは、概日リズムタンパク質としての機能の他に磁場センサーとしての機能を持つものがあり、特に極限環境に生育する動物の Cry ファミリーの構造的特徴を調べ、新規に磁場センサー等としての作用を持つものを調査する探索的研究となっている。現在、学内外により専門的な知識を持った共同研究者が増え、より精密な成果に結びつきつつある。

遠藤空、成田一穂、広井賀子 寒冷地および海洋哺乳動物のクリプトクロムの構造比較 第 6 回量子生命科学会 一般口頭発表 2024 年 5 月 早稲田大学、東京

Endo S., Narita K., and Hiroi NF. Comparison of cryptochrome structures among the mammals in the extreme environments . 2024 ISMB, p868, July 2024, Montreal, Canada.

Endo S., Narita K., and Hiroi NF. Estimating the effect of the specific structure of Snow leopard Cry2. Quantum Innovation 2024, P0-SE-39, October 2024, Tokyo, Japan.

2. Immune Digital Twin Project

ヨーロッパの研究チームとともに展開している Immune Digital Twin のプロジェクトが継続、発展している。

Anna Niarakis, Marek Ostaszewski, Alexander Mazein, Inna Kuperstein, Martina Kutmon, Marc E Gillespie, Akira Funahashi, Marcio Luis Acencio, Ahmed Hemedan, Michael Aichem, Karsten Klein, Tobias Czauderna, Felicia Burtscher, Takahiro G Yamada, Yusuke Hiki, Noriko F Hiroi, et al. Drug-target identification in COVID-19 disease mechanisms using computational systems biology approaches. *Frontiers in immunology*, vol 14, 1282859.