

令和 6 年 6 月 23 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19523

研究課題名（和文）新規ストレス応答メカニズムに基づく炎症性腸疾患分子標的薬の探索

研究課題名（英文）Search for Molecular Targets in Inflammatory Bowel Disease Drugs

研究代表者

中津 史（Nakatsu, Fubito）

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：50360607

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：炎症性腸疾患（Inflammatory bowel disease: IBD）は、腸管において慢性的な炎症が起こる難治性疾患である。その病因や詳細な発症メカニズムについては依然不明な点が多い。本研究では、最近我々のグループが見いだした細胞内生命応答システムに基づく評価系による分子標的薬探索を試みた。構築した評価系を用いた解析において、種々の刺激や阻害化合物に対する定量測定結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症性腸疾患は、腸管組織に炎症や潰瘍を引き起こす疾患の総称であり、その病因や詳細な発症メカニズムについては依然不明な点が多い。本研究で構築した評価系は、極めて感受性の高いプラットフォームであることが判明したことから、分子メカニズムの探索や病態解明研究などの基礎研究に大きく貢献する可能性が期待される。さらに、様々な応用研究への展開の可能性も期待されることから、社会的にも意義深いと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Inflammatory bowel disease (IBD) is an intractable disease characterized by chronic inflammation of the intestinal tract. Its etiology and pathogenesis remain largely unknown. In the current study, we established an evaluation platform for the discovery of molecular target drugs based on the cellular response mechanism recently identified by our group. We have found that our system is a highly sensitive platform to chemicals that perturb cellular function.

研究分野：細胞生物学

キーワード：炎症性腸疾患

### 1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患は、腸管組織に炎症や潰瘍を引き起こす疾患の総称で、その原因は不明な点が多い。患者数は年々増加しており、治療薬開発は急務である。そのような状況の中、2014年に TTC7A 遺伝子変異が、超早期発症の炎症性腸疾患を引き起こすことが報告された。TTC7A は、PI4K3 $\alpha$  複合体(PI4K3 $\alpha$ /EFR3/TTC7)の構成分子の一つである。PI4K3 $\alpha$  とは、リン脂質の一種であるイノシトールリン脂質のリン酸化酵素であり、細胞膜においてホスファチジルイノシトール 4 リン酸 (PI(4)P)を合成する。したがって、TTC7A の主要な機能は細胞膜における PI(4)P の産生である。

### 2. 研究の目的

細胞膜において、PI4P は様々な生理機能を担う。種々の受容体刺激にともなってホスホリパーゼ C が活性化すると、同じくイノシトールリン脂質の 1 つである PIP2 が分解され、IP3 とジアシルグリセロールが産生される。このとき、PIP2 は分解後に速やかに補充されなければならないが、そのとき

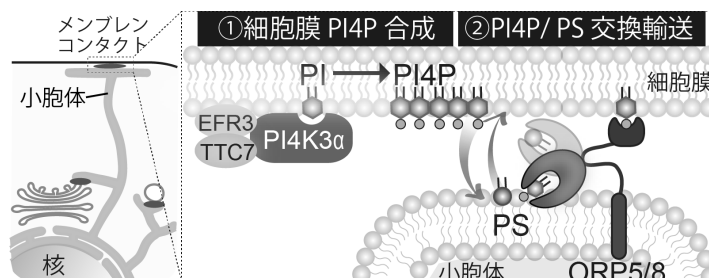


図1：小胞体—細胞膜コンタクトにおける脂質交換輸送

に PI4P が前駆体として必要となることが知られている。また、脂質輸送にも重要な役割を担うことが明らかになりつつある。我々は、細胞膜 PI(4)P が“メンブレンコンタクトを介した脂質交換輸送”を制御することを見いだした (Chung et al., 2015)。これは、小胞体が細胞膜に 10-30nm の距離で近接してメンブレンコンタクトが形成され、細胞膜 PI(4)P と引き換えに、小胞体で合成された脂質が細胞膜へ輸送される仕組みである (図1)。この輸送は、“脂質輸送タンパク質”と呼ばれる脂質輸送体が媒介するが、この脂質輸送タンパク質は、PI(4)P を細胞膜から小胞体へ輸送する力を利用して、逆向きに小胞体から脂質を細胞膜へ輸送する。つまり細胞膜 PI(4)P は、交換輸送を駆動するコインとして機能していたのである。このように、PI4P は様々な重要生理機能を担うため、その制御機構の破綻により様々な変容およびストレスが生ずる。本研究では、最近我々が見出したストレス応答機構に着目し、炎症性腸疾患分子標的薬の探索に挑戦した。

### 3. 研究の方法

培養細胞を用いた種々の解析は、HeLa 細胞および COS7 細胞を用い、共焦点レーザー顕微鏡によりイメージング解析を行った。また、画像定量解析は、Fiji ソフトウェアを用いて行った。

### 4. 研究成果

研究計画に沿って分子標的薬の探索のためのスクリーニング評価系の構築を行った。我々が着目しているレポーター分子にルシフェラーゼ遺伝子産物を融合した評価レポーターとして、ルシフェラーゼの位置、リンカーの長さを変えたものを多種類設計した。このとき、評価レポーターとしての活性が失われないよう十分に留意して設計を行った。そして、これらのレポーター候補群を培養細胞に導入し、その発現量、局在、毒性、などについて評価した。さらに、ルシフェラーゼフラグメントを N 末端に配置する場合と C 末端側に配置する場合、そしてそれらをつなぐリンカー配列を様々な組み合わせで評価を行った。リンカーについては長さの異なるフレキシブルリンカーを用いた。また、発光検出に用いる機器に適した培養条件および細胞数の検討等を行ったが、スクリーニングのための評価系として十分な感度を達成できていないことが判明した。

そこで、異なる戦略のスクリーニング方法の樹立に着手した。まず、細胞膜およびオルガネラ膜におけるイノシトールリン脂質を、特異性高く、かつ高感度に検出可能なプローブの開発を行った。我々、および他グループによる先行研究において、脂質輸送タンパク質ファミリー分子群の脂質認識ドメインが細胞膜やオルガネラ膜のイノシトールリン脂質を特異的に認識し結合することを見出している (Kawasaki et al., *J. Cell Biol.* 2022)。そこで、その脂質結合ドメインの局在を解析したところ、細胞膜、ゴルジ体、エンドソーム、リソソームに特異的に局在することが判明した (図2)。特に、細胞膜局在性については、これまで開発されている他のイノシトールリン脂質プローブに比べて高 S/N、かつ高親和性を示した (図3)。

次に、この脂質結合ドメインを利用して、細胞膜におけるイノシトールリン脂質レベルを高感度に定量可能な Förster 共鳴エネルギー移動 (Förster resonance energy transfer : FRET) バイオセンサーの開発を行った。先行研究 (Nishioka et al., 2008) において確立されていた FRET バイオセンサーと同様な戦略により、CFP と YFP の間に当該ドメインを挿入し、C 末端に細胞膜局在シグナルを付加した FRET バイオセンサーを作製した。そしてこの FRET バイオセンサーを安定発現した HeLa 細胞を共焦点レーザー顕微鏡にて生細胞観察し、FRET 効率を定量解析した。イノシトールリン脂質合成酵素の阻害剤処理による細胞膜イノシトールリン脂質レベルの低下にともない、この新規 FRET バイオセンサーによる FRET 効率 (FRET 値/CFP で算出) は顕著に減少した。さらに、より生理的条件下における新規 FRET バイオセンサーの特性を調べるために、G タンパク質共役型受容体の活性化にともなうイノシトールリン脂質レベルの変化の計測を行った。アセチルコリンによりムスカリン性アセチルコリン受容体を活性化させたところ、新規 FRET バイオセンサーによる FRET 測定値の顕著な減少が確認された。これらの結果から、新規 FRET バイオセンサーはダイナミックレンジが広く種々のアッセイに有用である可能性が示唆された。さらに、この新規 FRET バイオセンサーの特徴を生かし、多サンプル対応可能な FRET 測定システムの構築にも成功した。構築した評価系を用いた解析において、種々の刺激や阻害化合物に対する定量測定結果が得られた。

#### <引用文献>

Chung J, Torta F, Masai K, Lucast L, Czapl H, Tanner LB, Narayanaswamy P, Wenk MR, Nakatsu F, De Camilli P. INTRACELLULAR TRANSPORT. PI4P/phosphatidylserine countertransport at ORP5- and ORP8-mediated ER-plasma membrane contacts. *Science*. 2015 Jul 24;349(6246):428-32. doi: 10.1126/science.aab1370. PMID: 26206935; PMCID: PMC4638224.

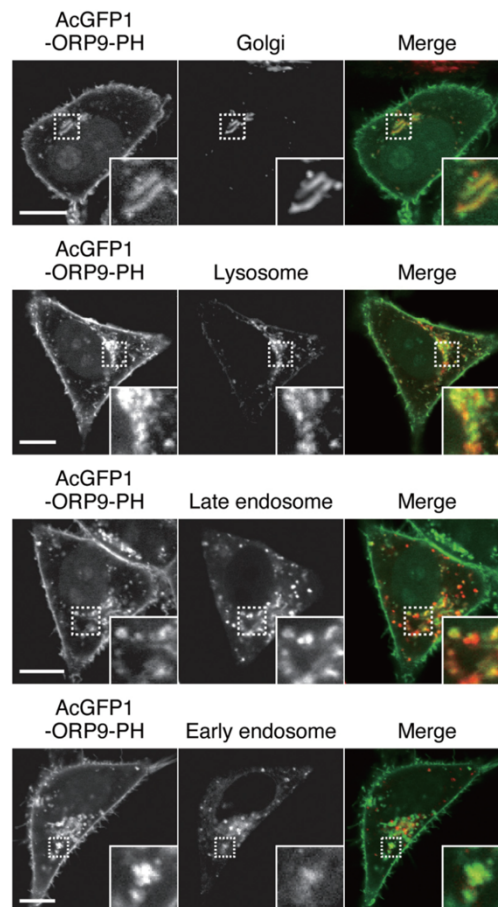


図2：新規 PI4P プローブの樹立

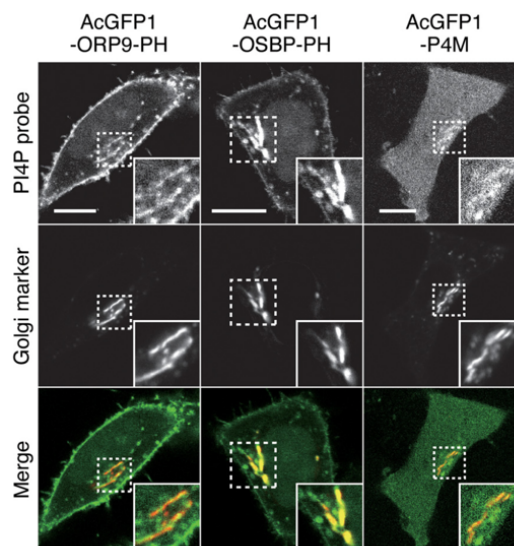


図3：PI4P プローブの比較解析

Kawasaki A, Sakai A, Nakanishi H, Hasegawa J, Taguchi T, Sasaki J, Arai H, Sasaki T, Igarashi M, Nakatsu F. PI4P/PS countertransport by ORP10 at ER-endosome membrane contact sites regulates endosome fission. *J Cell Biol.* 2022 Jan 3;221(1):e202103141. doi: 10.1083/jcb.202103141. Epub 2021 Nov 24. PMID: 34817532; PMCID: PMC8624802.

Nishioka T, Aoki K, Hikake K, Yoshizaki H, Kiyokawa E, Matsuda M. Rapid turnover rate of phosphoinositides at the front of migrating MDCK cells. *Mol Biol Cell.* 2008 Oct;19(10):4213-23. doi: 10.1091/mbc.e08-03-0315. Epub 2008 Aug 6. PMID: 18685081; PMCID: PMC2555955.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 河崎 麻実、中津 史	4. 巻 94
2. 論文標題 小胞体?エンドソーム間のメンブレンコンタクトにおけるPI4P駆動型脂質交換輸送	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 611~615
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14952/SEIKAGAKU.2022.940611	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakatsu Fubito, Kawasaki Asami	4. 巻 9
2. 論文標題 Functions of Oxysterol-Binding Proteins at Membrane Contact Sites and Their Control by Phosphoinositide Metabolism	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 1-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2021.664788	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kawasaki Asami, Sakai Akiko, Nakanishi Hiroki, Hasegawa Junya, Taguchi Tomohiko, Sasaki Junko, Arai Hiroyuki, Sasaki Takehiko, Igarashi Michihiro, Nakatsu Fubito	4. 巻 221
2. 論文標題 PI4P/PS countertransport by ORP10 at ER?endosome membrane contact sites regulates endosome fission	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 1-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1083/jcb.202103141	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nakatsu Fubito, Kawasaki Asami	4. 巻 223
2. 論文標題 Phosphatidylserine turns the gears of phospholipids in B cell lymphoma	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 :e202401047
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1083/jcb.202401047	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Honda Atsuko, Nozumi Motohiro, Ito Yasuyuki, Natsume Rie, Kawasaki Asami, Nakatsu Fubito, Abe Manabu, Uchino Haruki, Matsushita Natsuki, Ikeda Kazutaka, Arita Makoto, Sakimura Kenji, Igarashi Michihiro	4. 巻 42
2. 論文標題 Very-long-chain fatty acids are crucial to neuronal polarity by providing sphingolipids to lipid rafts	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 113195 ~ 113195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2023.113195	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakatsu Fubito, Tsukiji Shinya	4. 巻 73
2. 論文標題 Chemo- and opto-genetic tools for dissecting the role of membrane contact sites in living cells: Recent advances and limitations	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Current Opinion in Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 102262 ~ 102262
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cbpa.2022.102262	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 中津 史	4. 巻 98 (2)
2. 論文標題 脂質交換輸送ゾーンの制御と機能	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 解剖学雑誌	6. 最初と最後の頁 50-53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 中津 史
2. 発表標題 メンブレンコンタクト操作ツールを用いた脂質交換輸送の機能解明
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 阿喰 萌香、吉川 優、中津 史、築地 真也
2. 発表標題 新規蛍光プローブによる細胞膜ホスファチジルイノシトール 4-リン酸の可視化
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中津 史
2. 発表標題 脂質交換輸送ゾーンの制御と機能
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中津 史
2. 発表標題 イノシトールリン脂質・PI4Pによるメンブレンコンタクトを介した脂質交換輸送制御
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中津 史
2. 発表標題 メンブレンコンタクトにおける脂質交換輸送が制御するオルガネラダイナミクス
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中津 史
2. 発表標題 脂質の代謝と交換輸送の接点としての脂質交換輸送ゾーン
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中津 史
2. 発表標題 Lipid countertransport at membrane contact sites
3. 学会等名 第75回細胞生物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Nakatsu F, Kawasaki A	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Academic Press	5. 総ページ数 468
3. 書名 Plasma Membrane Shaping	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------