

令和 5 年 5 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15100

研究課題名（和文）メタボライトと神経細胞を基軸とした遠隔的組織修復制御機構の解明

研究課題名（英文）Metabolite- and neuron-based remote tissue repair regulatory mechanisms

研究代表者

櫻尾 宗志朗（Kashio, Soshiro）

東京大学・大学院薬学系研究科（薬学部）・助教

研究者番号：40823307

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：ショウジョウバエ幼虫の遺伝的組織修復システムを用いて、Gタンパク質共役受容体（GPCR）の遺伝子スクリーニングを行い、組織修復を遠隔制御する経路を探索した。その結果、進化的に保存されている神経炎症性受容体であるタキキニン様受容体86C（TkR86C）が同定された。TkR86Cを神経特異的にノックダウンすると、正常発生に影響を与えることなく修復が遠隔的に阻害された。組織修復の媒介因子として自身が見出したキヌレニン（Kyn）経路の関与について検証したところ、TkR86Cの神経特異的ノックダウンは、傷害依存的な脂肪体および体液中のKyn代謝産物の変化を阻害し、修復を抑制していることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、修復能力を左右する体内環境の理解を深めることを目指し、神経におけるTk-TkR86Cシグナルが脂肪体のKyn代謝を介して組織修復に寄与するという新たな修復制御機構を見出した。既存の研究では、神経投射を介した組織修復には着眼されてきたが、投射非依存的な代謝を介した修復制御は類を見ない。今後、傷害による中枢脳のTk-TkR86Cシグナルの制御機構および、TkR86C発現神経による脂肪体Kyn代謝制御機構が解明されることによって、新たな修復制御、ひいては新たな治療戦略に影響を与える端緒となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Using a genetic tissue repair system in *Drosophila* larvae, we performed genetic screening of G-protein-coupled receptors (GPCRs) to search for signal mediatory systems for remote tissue repair. An evolutionarily conserved neuroinflammatory receptor, tachykinin-like receptor at 86C (TkR86C), was identified as a candidate receptor. Neuron-specific knockdown of TkR86C impaired disc repair without affecting normal development. We investigated the humoral metabolites of the kynurenine (Kyn) pathway regulated in the fat body because of their role as tissue repair mediating factors. Neuronal knockdown of TkR86C hampered injury-dependent changes of the fat body and humoral Kyn metabolites. Our data indicate the involvement of TkR86C neurons upstream of Kyn metabolism in non-autonomous tissue regeneration.

研究分野：代謝生理学

キーワード：キヌレニン代謝 組織修復・組織再生 ショウジョウバエ タキキニン受容体 組織間相互作用

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

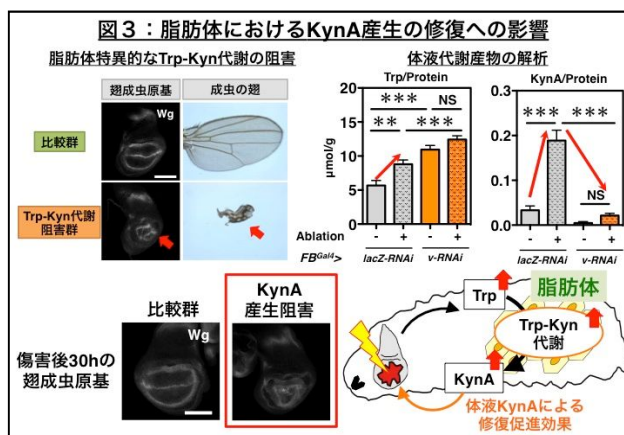
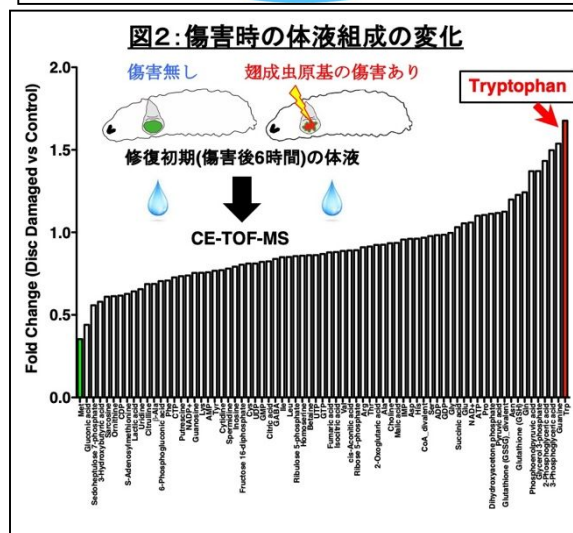
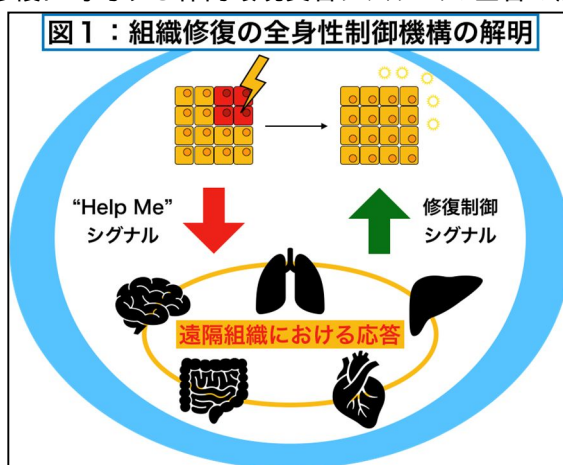
生体は絶えず内部環境や外部環境の変化に晒されており、多細胞生物における恒常性維持機構は個々の細胞・組織のみならず、循環系・内分泌系・神経系などによる組織間相互作用によって、個体全体として制御されている。さまざまな恒常性維持機構の中でも、組織傷害時に生起する現象として組織修復が挙げられる。組織修復の機構解明は、医学的にも生物学的にも意義のある課題であると言えるが、組織修復に関する組織自律的な分子機構の解析と比較して、組織非自律的な因子、体内環境についての理解は依然として立ち後れている。組織修復を支える組織非自律的な制御として、たとえば、老齢個体と若齢個体のマウスの血液循環を外科的につなぐことによって、老齢個体のマウスの筋肉や肝臓の増殖能力が回復することが挙げられる。傷害部位から全身へのシグナル、そしてそのシグナルを感知して修復を制御するメカニズムの解明は創薬的な観点からも重要であるにも関わらず、組織修復に寄与する体内環境受容システムの全容の解明には至っていない(図1)。

申請者はこの課題に取り組むため、ショウジョウバエの遺伝学を用い、一過的な組織傷害と並行して非傷害組織における遺伝学的解析を行える系を構築した(Kashio *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A, 2016)。ショウジョウバエ幼虫には翅成虫原基と呼ばれる、変態を経て成虫の翅になる組織が存在している。この組織は再生能を有するため古くから修復のモデルとして用いられてきた。この組織で遺伝学的に温度感受性ジフテリア毒素(DtA^{ts})を発現して温度変化によって傷害を誘導する一方で、傷害部位とは離れた組織で遺伝子操作を行うことにより、修復に遠隔的に寄与する因子の探索を行うことが可能となる。

具体的な遠隔因子の同定のため体液のメタボローム解析を行ったところ、修復初期(傷害後6時間)の傷害個体の体液で必須アミノ酸の1種であるトリプトファン(Trp)量が高くなっていった(図2)。Trpの大半は哺乳類において肝臓でキヌレン(Kyn)に代謝されるが、ショウジョウバエにおいては哺乳類の肝臓と白色脂肪組織に機能的に相当する脂肪体と呼ばれる器官で同様に代謝される。そこで、DtA^{ts}を用いた遺伝学的解析によって脂肪体でのみ Trp-Kyn 代謝律速因子 *TDO/vermilion* の遺伝子発現を抑制したところ、翅成虫原基の修復に脂肪体での Trp-Kyn 代謝が必要であることが明らかになった(図3)。加えて、下流のキヌレン酸(KynA)が傷害個体の体液で上昇すること、*TDO/vermilion* のノックダウンによる修復不全個体の体液では KynA の量が低下していること、KynA 特異的な産生阻害で修復阻害が起こることが明らかになった(図3、Kashio and Miura, *iScience*, 2020)。Kyn 代謝は哺乳類で免疫応答や神経活性の制御に寄与していることが報告されてきた。

しかしながら、組織再生への寄与に関して Kyn 代謝の上流および下流の分子メカニズムの同定には未だ至っていない。

KynA の既知の受容体として bHLH-PAS ドメインを持つ aryl hydrocarbon receptor (AHR) や、N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) が報告されているが、修復への関与は示されなかった。そこで申請者は低分子に応答性のある G protein-coupled receptor (GPCR) に着目し、翅成虫原基を含む全ての成虫原基でシ



ヨウジョウバエにおける全 GPCR 111 遺伝子のノックダウンを行い、再生に寄与する GPCR の RNAi スクリーニングを行った(図4)。そして成虫の翅のサイズを翅成虫原基の再生の指標として観察した結果、ノックダウンで翅の修復が阻害される GPCR が複数得られた。中でも、Tachykinin-like receptor at 86C (TkR86C)は二つの異なる RNAi 系統で翅の損傷した表現型が観察された。

TkR86C の作用点を調べるために、傷害・再生時の *TkR86C* の発現部位を観察した結果、傷害を受けた翅成虫原基では、予想に反して *TkR86C* の発現が少数細胞に局限していた。一方、データベース(FlyBase)上で発現が高いことが示されている脳で発現が確認された(図5)。そこで神経組織の関与を考慮に入れ、RNAi スクリーニングで用いた成虫原基で遺伝子発現を誘導するドライバーの発現パターンを精査したところ、中枢神経での発現が一部確認された(図5)。TkR86C の神経での寄与を検証するために神経特異的なドライバーを用いて、傷害・再生時に神経特異的に *TkR86C* をノックダウンしたところ、翅の再生阻害が観察された(図5)。また、翅成虫原基には神経が投射していないことから、TkR86C は非傷害組織である神経において遠隔的に再生に寄与する機能を持つことが示唆された。

図4：修復に寄与するGPCRスクリーニング

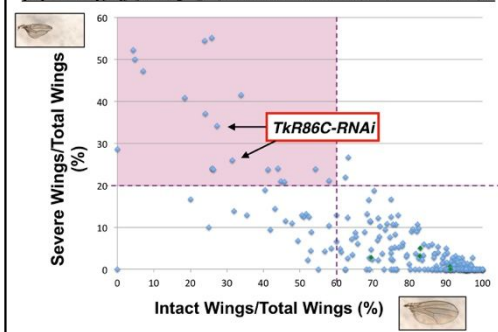
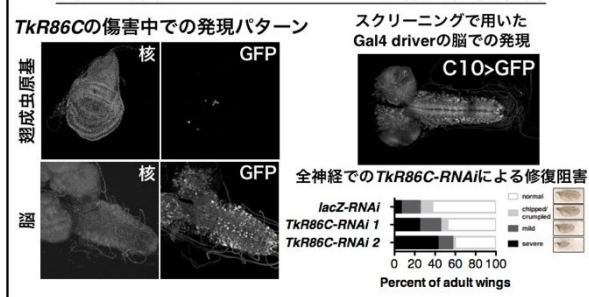


図5：神経におけるTkR86Cの遠隔的修復制御



2. 研究の目的

本研究は、多細胞生物における組織間相互作用に関わる代謝産物とその受容メカニズムを明らかにすることで、修復を制御する全身性応答の理解を深めることを目的とした。

具体的には、「KynA と TkR86C 発現神経を基軸とした多臓器連関による組織修復の遠隔制御機構の解明」を目的とした。

3. 研究の方法

上述の、*DtA^{ts}* を用いた一過的な傷害と遠隔組織での遺伝子操作を行う系をベースに、因子の詳細な機能解析や代謝産物測定、組織染色、遺伝子発現解析などを用いて研究を展開した。

4. 研究成果

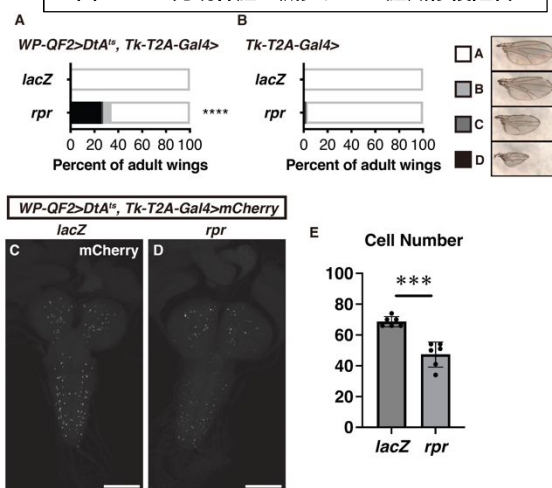
TkR86C の修復への関与を補強するために、TkR86C のリガンドである Tk についても検証を行った。Tk 発現細胞におけるアポトーシス誘導(*Tk-T2A>rpr*)による Tk 発現細胞の減少に伴う翅表現型の悪化により、TkR86C のリガンドである Tk の関与を検証し、TkR86C シグナルの修復における重要性が確認された(図6)。

さらに、傷害個体と非傷害個体の中枢脳(Brain および Ventral Nerve Cord)における Tk の発現量を抗体染色によって傷害前(BA)から傷害後 0,12,24 時間(AA0, 12, 24)にかけて観察した。結果、非傷害個体での時間経過に伴う Tk のシグナル低下に比べ、傷害個体では AA0 以降での Tk シグナルの低下幅が抑制されていた(図7)。これは、傷害によって Tk の中枢脳におけるシグナル強度が維持されることで、TkR86C を介した修復制御がなされていることを示唆する。

当初、KynA の受容体候補として TkR86C が同定されたが、KynA と TkR86C との関与を検証するために、GPCR シグナルを Ca^{2+} シグナルに変換する $G\alpha_{15}$ と Ca^{2+} プローブ Fluo-4 による *in vitro* binding assay をプレートリーダーを用いて行ったところ、KynA または Kyn 単体投与による応答は検出されず、内在性のリガンドである Tk-6 に加えて KynA および Kyn を添加した際のアロステリック効果も検出されなかった(図8)。

そこで、当初の体液中の KynA が TkR86C 神経に影響するという仮説から変更し、TkR86C 発現神経が脂肪体の Kyn 代謝に影響を与えているかを検証した。傷害によって脂肪体で上昇する Kyn 代謝律速酵素 v の発現が神経特異的な *TkR86C* のノックダウンによって抑制され、その結

図6：Tk 発現神経の減少による組織修復阻害



果、脂肪体および体液で上昇している KynA 量の増加も抑制されていることが判明した(図9)。

さらに KynA の TkR86C の下流における再生への寄与を検証するために、KynA の経口投与を行ったところ、神経特異的な *TkR86C* のノックダウンによって悪化していた翅の表現型が、KynA 投与によってレスキューされることも明らかとなった(図10)。

以上の結果から、翅成虫原基の局所的な傷害に対して、神経の Tk-TkR86C シグナルが働くことにより、脂肪体 Kyn 代謝が上昇し、体液中の KynA を介して組織修復を制御するという、「KynA と TkR86C 発現神経を基軸とした、多臓器連関による組織修復の遠隔制御機構」の一旦が解明された(図11)。

既存の研究では、神経投射を介した組織修復には着眼されてきたが、投射非依存的な代謝を介した修復制御は類を見ない。今後、傷害による中枢脳の Tk-TkR86C シグナルの制御機構および、TkR86C 発現神経による脂肪体 Kyn 代謝制御機構が解明されることによって、新たな修復制御、ひいては新たな治療戦略に影響を与える端緒となることが期待される。

図7：中枢脳における Tk シグナルの傷害と発生による変化

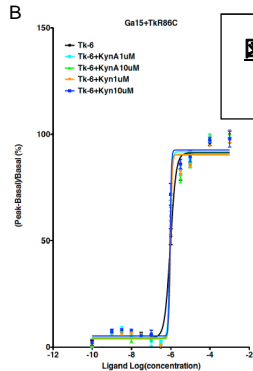
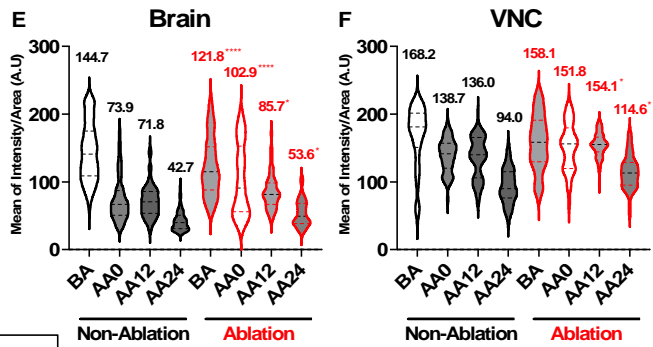
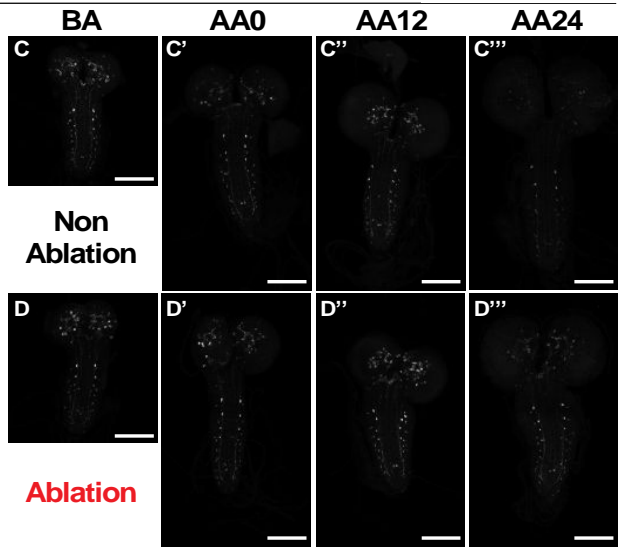


図8：TkR86C に対する Tk-6, KynA の binding assay

図10：KynA 経口投与による神経 TkR86C ノックダウン時の翅表現型の回復

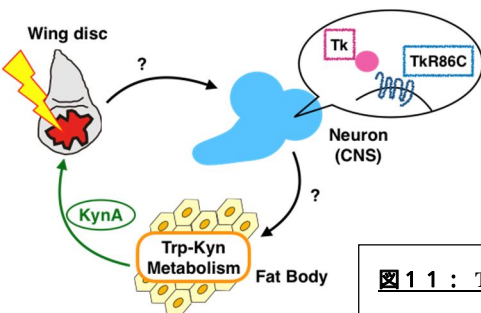
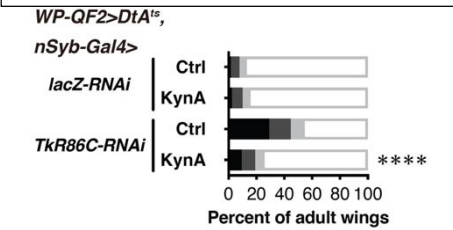
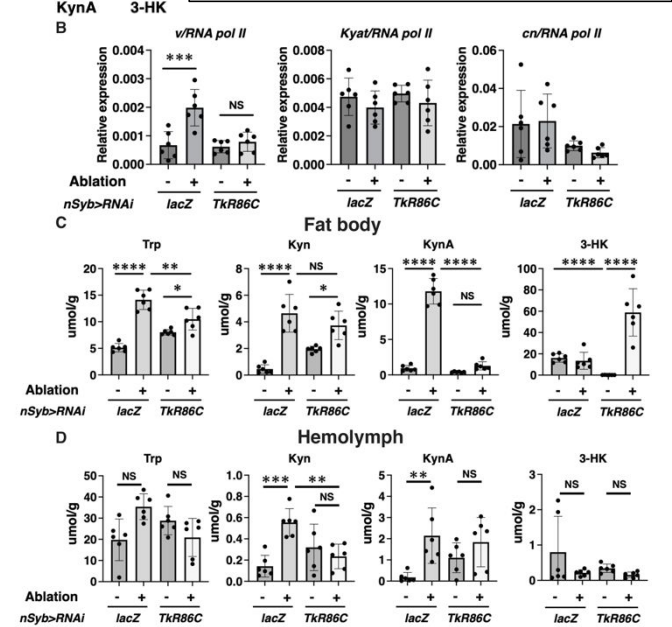


図11：TkR86C 神経による脂肪体 Kyn 代謝制御を介した遠隔の組織修復制御機構

図9：神経特異的な TkR86C のノックダウンによる脂肪体の Kyn 代謝酵素発現、脂肪体および体液 Kyn 代謝産物量の変化



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 榎尾宗志朗、三浦正幸
2. 発表標題 ストレスに応じた脂肪体トリプトファン-キヌレニン代謝が司る組織恒常性制御機構の解明
3. 学会等名 第29回日本Cell Death学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 榎尾 宗志朗、益田 周、吉田 豊、三浦 正幸
2. 発表標題 非傷害組織のリモートワークによる再生制御
3. 学会等名 第三回 再生学異分野融合研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kashio, S. and Miura, M.
2. 発表標題 Metabolic shifts in the fat body influence on damage resistances in Drosophila
3. 学会等名 14th Japanese Drosophila Research Conference
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 榎尾宗志朗、益田周、樋川直人、三浦正幸
2. 発表標題 組織変容に遠隔作用するショウジョウバエ脂肪体キヌレニン代謝
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 Kashio, S. and Miura, M.
2. 発表標題 S-adenosylmethionine metabolic homeostasis via regulation of conSAMption by Glycine N-methyltransferase in Drosophila fat body
3. 学会等名 15th Japanese Drosophila Research Conference
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

本研究課題の成果は現在投稿中である。

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