

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19324

研究課題名(和文)体内浸透圧を定量するOsmonitoringマウスの開発と免疫制御理解への応用

研究課題名(英文) Development of genetically modified mice (Osmonitoring mice) that monitor osmotic environment in the body for an understanding of immune regulation

研究代表者

名黒 功 (Naguro, Isao)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・准教授

研究者番号：80401222

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)：研究代表者独自の人工プロモーターをレポーターとした個体内での浸透圧モニタリングのために、当該レポーターの浸透圧特異性、応答感度、継時変化に関する詳細なデータを取得した。これらの結果から、構築したモニタリングシステムは浸透圧に特異性が高く、時間スケールとしては数時間単位の浸透圧環境をモニターできることが明らかになった。このレポーターシステムのトランスジェニックマウスを複数作成したが、遺伝子導入コピー数の不足や、germline transmissionの不全で実際に耐えるマウス系統の確立までは至らなかった。現在も得られた情報を元に継続して作成に取り組んでいる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、これまで不可能であった細胞スケールの局所浸透圧を実際にモニタリングするための独自の新しい方法論の妥当性の検証ができた。残念ながら実際にOsmonitoringマウス系統の樹立には至らなかったが、本研究で得られた情報とリソースをもとに継続して作成を試みる。これにより、炎症やがん局所の微小環境における実際の浸透圧環境の時空間的な広がりと、それによる免疫細胞制御の機序を明らかにできれば、感染防御やがん免疫の強化、過剰炎症の抑制を浸透圧制御の観点からコントロールできる薬剤の開発やその知的財産の取得にもつながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：For in vivo osmo-monitoring, we evaluated our original reporter system which monitors environmental osmolarity via an artificial promotor (on specificity, sensitivity and time course of the reporter). These results suggest that the monitoring system exhibits high specificity to osmotic condition and responsiveness to several hours' osmotic environment. Although we obtained several mice harboring the reporter gene (transgenic mice), we could not establish a mouse line fulfilling the practical use for osmo-monitoring in vivo because of lack of signal intensity or failure of germline transmission. We still continue to establish the osmo-monitoring mouse line.

研究分野：分子生物学

キーワード：浸透圧 NFAT5 遺伝子改変マウス マクロファージ Osmonitoring

1. 研究開始当初の背景

高食塩食や、老化に伴う体内水分量の低下は、高血圧症を筆頭に自己免疫疾患や認知機能低下など様々な慢性炎症が関与する疾患の増悪因子として広く知られている[Oh *et al.*, *Hypertension*, 2016]。また、わずかな量の水の長期的な制限で、寿命の短縮や老化現象の促進が起こることもあり[Allen *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 2019]、体内浸透圧環境の重要性は疫学的な方面を中心に古くから議論されているが、なぜそのような影響があるのか具体的な理由は十分理解されていない。近年、生体内には腎臓など水を輸送する臓器以外においても、リンパ系組織、皮膚、炎症部位、がん組織など局所において周囲と浸透圧の異なる環境が形成されることが報告され注目されている。具体的には、胸腺・脾臓などのリンパ組織や、感染・炎症患部、がん組織では周囲に比べて高浸透圧になる[Go *et al.*, *PNAS*, 2004; Jantsch *et al.*, *Cell Metabol.*, 2015, Ouwerkerk *et al.*, *Breast Cancer Res. Treat.*, 2007]、高食塩食により浸透圧応答分子を介して自己免疫疾患やがん免疫が変化する[Kleinewietgeld *et al.*, *Nature*, 2013; He *et al.*, *Nat. Commun.*, 2020]、などがあげられる。これらの報告は、リンパ組織や炎症部位など局所の浸透圧環境がトリガーとなり、免疫細胞であるマクロファージやT細胞が活性や分化を変化させて働くという斬新なモデル[Müller *et al.*, *Nat. Rev. Immunol.*, 2019]の基礎となっている。この観点から、体内浸透圧環境は免疫細胞の制御を介して疾患や老化に関与する可能性が示唆されている。

研究代表者は、浸透圧に対して特徴的な応答を示す ASK3 というキナーゼを世界に先駆けて報告して以来[Naguro *et al.*, *Nat. Commun.*, 2012]、生体内の浸透圧環境の意義と、細胞による浸透圧感知の分子機構について研究を進めてきた[名黒 功, *生化学*, 2017, Watanabe *et al.*, *Nat. Commun.*, 2021]。特に、ASK3 や NFAT5 など浸透圧応答分子を指標としたゲノムワイド siRNA スクリーニング[Watanabe *et al.*, *Cell Rep.*, 2018]等、独自の技術による解析で、浸透圧応答の分子基盤については世界をリードする知見を得ていた。研究代表者の研究でも、ASK3 ノックアウトマウスが急性臓器炎症に耐性を示すなど、浸透圧応答機構と炎症・免疫の制御の密接な関連を示唆する知見が蓄積していた。

一方で、体内における浸透圧環境がどのような時空間的広がりを持ち、高食塩食負荷、老化などの環境要因や、がん・炎症など病態患部においてどう変化するかという課題については、微小領域における浸透圧定量の難しさから世界的に解析が進んでいなかった。そこで、研究代表者はこれまでの浸透圧感知の分子機構に関する独自の研究知見を活かし、分子生物学に基づく革新的な体内浸透圧モニタリング系を開発し、個体内に実在する浸透圧環境のプロファイリングと、その環境が炎症・免疫機構に及ぼす影響を明らかにしようと考えた。特に浸透圧応答を示すことが報告され、かつ ASK3 が発現するマクロファージに注目することとした。

2. 研究の目的

浸透圧は、半透膜の細胞膜を持つ細胞にとって誕生と同時に宿命づけられた物理的ストレスであるが、かつてはヒトなど多細胞生物では腎臓など水の輸送を行う臓器を除いて、体内浸透圧はどこも一定(300 mOsm 程度)に維持されているとされ、体内における浸透圧ストレスの重要性はほとんど注目されてこなかった。しかし近年、生体内の局所で浸透圧は想像以上に変化しており、上述したように、特に炎症に関わる免疫系細胞の制御という文脈で積極的に環境情報として利用されるという事例が報告され始め、この点に関する研究が進み始めている。

しかしながら、これまでの研究は体外に取り出した免疫細胞に浸透圧を負荷する、高食塩食時の血中免疫細胞を解析するなど、免疫細胞が実際に働く体内局所の浸透圧環境の空間的広がりや時間的推移を十分解析しないまま現象論的記述に留まっている。これは、生体内のどこの細胞がどの程度の時間、どの程度の強さの浸透圧変化に晒されているのか、実測できていないことが大きな要因である。そのため、実際の体内浸透圧環境に存在し、機能する免疫細胞がどのような種類・性質のものか正確には明らかになっていない。従って、がんや炎症部位など局所で起こる浸透圧変化を時空間的にモニターしつつ、その場で働く特定の免疫細胞を明らかにできれば、炎症・免疫の関与する疾患の理解と治療に大きく貢献できると考えた。

本研究の目的は、研究代表者が長年取り組んできた哺乳類細胞の浸透圧応答に関する独自の知見を手掛かりに、マウス体内局所の浸透圧をモニターする方法(Osmonitring)を開発しつつ、その浸透圧環境が炎症・免疫という文脈で免疫細胞にどのような影響を与えるか明らかにすることである。

3. 研究の方法

これまで体内浸透圧環境が注目されながら、局所の浸透圧変化の時空間的広がりに関する情報が乏しい原因として、細胞スケールの分解能を持つ浸透圧定量が非常に難しいことがあった。浸透圧は一般的に凝固点降下など溶液の物理的性質として実測されるが、この方法では個々の細胞の周囲など微小環境には適用できない。そこで本研究では、細胞自身の浸透圧応答を利用して、浸透圧をモニターする方法を開発し、マウス個体に導入することで、体内微小環境の浸透圧の時空間的定量が可能な Osmonitoring マウスの作成を目指した。

(1) 浸透圧モニタリングシステムの構築と検証

哺乳類の NFAT5 という転写因子は、高浸透圧依存的に特定のプロモーターに結合し、遺伝子発現を担う。また、他の NFAT ファミリーの NFAT1 から 4 までと異なり Ca^{2+} 濃度上昇には応答しないなど浸透圧に刺激特異性をもつ特殊な転写因子である [Cheung *et al.*, *J. Mol. Signal.*, 2013]。従って、NFAT5 依存的プロモーター下で蛍光タンパク質 (DsRed Ex2) を発現する遺伝子を導入すれば、細胞周囲の浸透圧に応じた蛍光強度が観察できる。研究代表者は NFAT5 に関する独自のゲノムワイド siRNA スクリーニングや [渡邊ら, *実験医学*, 2014; 名黒, *実験医学増刊*, 2015]、トランスクリプトーム解析から [Ryuno *et al.*, *bioRxiv*, 2022]、NFAT5 を介して効率的に発現制御される Bgt1 プロモーターには Hes1 結合部位が隣接することを見出しており、この最小配列 (31 bp) をタンデムに複数回つないだ人工プロモーターが非常に高感度の浸透圧応答性を示すことを発見した。そこで、まずこの人工プロモーターについて、培養細胞を用いて浸透圧特異性や強度依存性のプロファイルを取得した。酸化ストレス、還元ストレス、一酸化窒素、炎症ストレスなど浸透圧以外の変化に攪乱されないことの確認や、どの程度の浸透圧変化を検出できるか、刺激後の応答の時間推移の確認を行った。

(2) 浸透圧モニタリングマウスの構築

(1) で最適化した人工プロモーターのトランスジェニックマウスを作成し、全身性に自発的に発する蛍光強度により浸透圧環境をモニターするマウス (Osmonitoring マウス) の作成を試みた。腎臓など浸透圧環境の存在する組織を灌流固定し、組織切片の蛍光観察により目的とする Osmonitoring マウスが作成できたか検証した。

(3) 単離マクロファージに対する浸透圧刺激による遺伝子発現の確認

WT および Osmonitoring マウスから単離した腹腔マクロファージに対して、人為的に浸透圧刺激を行い、マクロファージで浸透圧の変化に従った蛍光強度が得られるか検討した。また、浸透圧依存的に発現の変化する遺伝子の網羅的特定を RNA-Seq により行い、浸透圧モニタリングと同期して発現変化する遺伝子の特定を試みた。

4. 研究成果

(1) 浸透圧モニタリングシステムの構築と検証

方法で記載した高浸透圧に感度良く応答し、DsRed を発現する独自の人工プロモーターを導入した stable 細胞は性質の異なる複数ラインを作成していたことから、ハイコンテンツ画像解析を利用して浸透圧に対する応答性の良い細胞株を特定した。この細胞に対して、酸化ストレス、還元ストレス、一酸化窒素、炎症性ストレスなど浸透圧と異なるストレスを負荷し蛍光強度を観察したところ、高浸透圧刺激の場合と違って蛍光強度の上昇は見られず、少なくともこれらの刺激に対して当該プロモーターは反応せず、浸透圧特異性を持つことが明らかになった。NFAT5 のノックダウンを行ったところ、高浸透圧依存的な蛍光シグナルの増強が完全に消失したことから、このプロモーターは浸透圧特異的な転写因子に非常に強く依存するレポーターであることを確認できた。高浸透圧ストレスの程度に対する蛍光強度の変化も検討し (dose response) 350 mOsm から 450 mOsm までは浸透圧強度に従った蛍光強度が観察されることが明らかになった。蛍光発現の時間的プロファイルを知るために、共焦点レーザー顕微鏡を用いて 24 時間までタイムラプスを取得したところ、蛍光の発現は高浸透圧刺激後約 5 時間程度から観察され 20 時間程度で安定することが明らかになった。この細胞の 24 時間までタイムラプス画像を Image J で自動解析するプログラムを開発し、それを利用することで多数の細胞からシングルセル情報を得ることが可能になった。この解析により、蛍光発現のオンセットは個々の細胞で大きく変わらず、個々の細胞においても 5-20 時間の間で蛍光強度が増強するため、定量的な安定性を得るためにはある程度の時間が必要であるというレポーター特性が分かった。

(2) 浸透圧モニタリングマウスの構築

実際に人工プロモーターを導入したマウスを作成するために、polyA 付加配列などを含む発現用プラスミドを大量に精製し、大学内の施設の協力を得てマウスの受精卵に導入した。数回のトライアルを経て、ゲノムに目的の配列が導入されたトランスジェニックマウスを 1 ライン取得することに成功した。このマウスについて whole genome sequencing を行うことで、目的の人工プロモーターが 13 番染色体に 2 回直列につながった形で導入されていることを確かめた。しかしながら、このマウスから単離した腹腔マクロファージに対して浸透圧刺激を *in vitro* で行っても DsRed の蛍光の増加を認めることができず、改めてトランスジェニックマウスを構築する必要があると判断した。この原因としては、レポーター遺伝子の導入コピー数が少なく、蛍光強度が十分でないことや、導入された locus が転写を活性化できる active な位置でない可能性が考えられた。この結果を受けて専門家に遺伝子導入を依頼する必要があると考え、新たに創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム (BINDS) が提供する「疾患モデル動物提供」(薬効・安全性評価ユニット) に応募し採択された。BINDS の協力のもと Tol2 トランスポゼースを利用したトランスジェニックマウスの作成を試みた。人工プロモーターの挿入がゲノム PCR で確認できたマウスが得られ、腎臓組織における蛍光シグナルの検出が弱いながらもできた。しかしながら、このマウス系統は次世代でのゲノムへの人工プロモーターの挿入が確認できなかったことから、改めて同 BINDS の協力のもと CRISPR/Cas9 や PiggyBac トランスポゼースを利用した遺伝子導入のシステムも使ってトランスジェニックマウスの作成に再度挑戦している。PiggyBac トランスポゼースを利用したもので人工プロモーターの挿入がゲノム PCR で確認できたマウスが得られた。以上の経緯から、残念ながら研究期間中に Osmonitoring マウス系統の確立に至らなかったが、本研究期間で得られた知見、リソースを活用して今後も継続して作成を続ける予定である。

(3) 単離マクロファージに対する浸透圧刺激による遺伝子発現の確認

トランスジェニックマウスの取得が遅れたため、WT マウスのみではあるがマウス腹腔マクロファージを単離して低・高浸透圧刺激をかけた際の RNA-Seq を行い、マクロファージの中で浸透圧依存的に発現変化する遺伝子の同定を行った。このうち数百遺伝子は、低・高浸透圧刺激で逆方向に発現量が変化するものであることが明らかになり、浸透圧環境とマクロファージ遺伝子発現の興味深い関連性が明らかになった。今後、Osmonitoring マウスの作成を完遂し、個体内のマクロファージが浸透圧環境に晒されている部位において、これらの遺伝子発現がどうなっているか解析していく予定である。

本研究によって、これまで不可能であった細胞スケールの局所浸透圧を実際にモニタリングし、免疫細胞に対する影響を分子レベルで解析するための独自の新しい方法論の妥当性の検証ができた。残念ながら実際に Osmonitoring マウス系統の樹立には至らなかったが、本研究で得られた情報とリソースをもとに継続して作成を試みる。これにより、炎症やがん局所の微小環境における実際の浸透圧環境の時空間的な広がり、それによる免疫細胞制御の機序を明らかにできれば、感染防御やがん免疫の強化、過剰炎症の抑制を浸透圧制御の観点からコントロールできる薬剤の開発やその知的財産の取得にもつながる可能性がある。長期的には老化や高食塩食負荷など慢性的な浸透圧環境変化の影響について、免疫細胞だけでなく、他の実質細胞等に対する影響も明らかにすることで、未だ満足いく治療法が確立されていない炎症・免疫関連疾患において、浸透圧場の存在と重要性を提唱したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Morishita, K., Watanabe, K., Naguro, I., and Ichijo, H.	4. 巻 42
2. 論文標題 Sodium ion influx regulates liquidity of biomolecular condensates in hyperosmotic stress response	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Rep.	6. 最初と最後の頁 112315
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2023.112315	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 Ikizawa Takeshi, Ikeda Kazutaka, Arita Makoto, Kitajima Shojiro, Soga Tomoyoshi, Ichijo Hidenori, Naguro Isao	4. 巻 299
2. 論文標題 Mitochondria directly sense osmotic stress to trigger rapid metabolic remodeling via regulation of pyruvate dehydrogenase phosphorylation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102837 ~ 102837
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2022.102837	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 名黒 功、一條 秀憲
2. 発表標題 浸透圧ストレスはミトコンドリアで直接感知されPDKを介して糖代謝を迅速・可逆的に変化させる
3. 学会等名 第75回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 名黒 功、一條 秀憲
2. 発表標題 浸透圧ストレス受容モジュールASK3 condensateの形成と流動性制御
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 足立 浩輝、立野 浩輝、名黒 功、一條 秀憲
2. 発表標題 マクロファージの高浸透圧ストレス応答におけるNFAT5制御分子としてのHES1の機能解析
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 名黒功
2. 発表標題 哺乳類細胞が備える両方向性の浸透圧ストレスシグナル伝達
3. 学会等名 第9回お茶の水サイエンス倶楽部（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 名黒 功
2. 発表標題 哺乳類細胞における浸透圧の感知と応答を担う分子機構
3. 学会等名 第6回日本臨床薬理学会中国・四国地方会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 名黒 功、一條 秀憲
2. 発表標題 キナーゼシグナルが制御する両方向性の浸透圧ストレス応答
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 足立 浩輝、立野 浩輝、名黒 功、一條 秀憲
2. 発表標題 高浸透圧ストレスにおけるNFAT5制御分子としてのHES1の機能解析
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 名黒 功
2. 発表標題 浸透圧ストレスの細胞応答機構
3. 学会等名 第7回日本メカノバイオロジー学会学術総会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京大学大学院薬学系研究科細胞情報学教室 https://saijyou.f.u-tokyo.ac.jp/index.html</p>
--

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			
ドイツ	Institute for Medical Microbiology	Immunology and Hygiene	University of Cologne	