

細胞質交換法を用いた「病態モデル細胞」創成と解析技術の開発

研究代表者

村田昌之 東京大学大学院総合文化研究科 教授

共同研究者

加納ふみ 東京工業大学科学技術創成研究院 准教授



1. 研究の背景と達成目標

正常及び病態の網羅的マイクロアレイ解析やプロテオーム解析によって抽出される遺伝子・タンパク質の数は膨大であり、創薬・診断研究の現場では、動物個体を使用した前臨床研究におけるコストと時間の増大のため、リード化合物のスクリーニングやその副作用・作用機序研究における「細胞アッセイ」の重要性はますます増大してきている。しかし、実際に供給され解析対象となる細胞の多くは「正常な」培養細胞であることが多く、これでは、遺伝子やタンパク質の発現変動解析で絞り込まれてきた多くの疾患関連遺伝子(産物)の「病態環境下」での作用機序、病態改善に関わる薬剤のスクリーニングやその細胞機能の解析は難しいのが現状である。

本研究では、代表的な生活習慣病である糖尿病を標的疾患とし、セミインタクト細胞リシール技術(図 1)と糖尿病モデルマウスの臓器から調製した「病態細胞質」を用いて、均一で良質の「糖尿病モデル細胞」を大量に、簡便に、しかも再現性良く作成するシステムを開発する。次いで、その病態モデル細胞をチップまたは 96 ウェルプレート上にアレイした「糖尿病モデル細胞」アレイを作成し、代表的な糖尿病発現時の細胞フェノタイプ(膵β細胞においては、グルコース依存的インスリン分泌能またはアポトーシス耐性の脆弱化、肝細胞においてはインスリン抵抗性など)を検出できることを検証する。作成した「糖尿病モデル細胞」アレイを用い、検出された糖尿病態の改善と増悪を指標に低分子化合物ライブラリーのスクリーニングを実践し、本病態モデル細胞アレイを用いた化合物スクリーニングシステム全体を評価する。本研究で構築する「糖尿病モデル細胞」アレイスクリーニングシステムをプロトタイプとし、あらゆる細胞病態の研究に応用できる汎用性の高い創薬・診断支援システムを確立することを目指す。

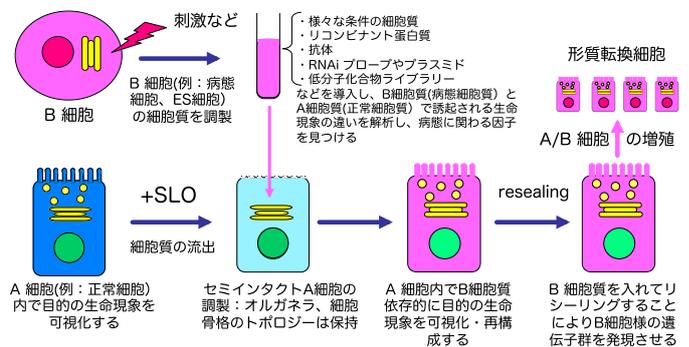


図1 セミインタクト細胞リシール法概念図

2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

- ・ セミインタクト細胞リシール法を用い、糖尿病モデルマウスの肝臓より調製した「病態細胞質」を導入した「糖尿病膵βあるいは肝臓モデル細胞」を構築した。これらの細胞では糖尿病態特有のインスリン分泌阻害やインスリン抵抗性が検出され、本病態モデル細胞が疾患メカニズム研究や創薬スクリーニングのプラットフォームとして有用であることが示された。
- ・ 肥満を伴う糖尿病患者で増加することが報告されているアミノ酸の一種・L-システインが膵β細胞のグルコース依存的なインスリン分泌を可逆的に阻害することを発見した。更に、L-システインはピルビン酸キナーゼPKM2の活性を直接阻害し、グルコースからのピルビン酸やATP産生阻害を引き起こすというメカニズムまでを明らかにした。これらの成果は論文発表と同時に新聞や雑誌などのメディアにも取り上げられた。
- ・ インスリン抵抗性という典型的な糖尿病態が細胞レベルで再現された糖尿病膵臓モデル細胞アレイを用いて、インスリンシグナル伝達の鍵キナーゼの活性化(リン酸化)を指標に化合物ライブラリーのスクリーニングを行い、病態進行・改善に関わる化合物をそれぞれ3つを抽出することに成功した。

3. 研究成果

当研究室が独自に開発したセミインタクト細胞リシール法を用い、糖尿病モデルマウス(db/db マウス)の肝臓より調製した「病態細胞質」を導入した「糖尿病膵βあるいは肝臓モデル細胞」を大量に、再現性良く作成する手法を確立した。そして、その糖尿病態フェノタイプ(糖尿病膵βモデル細胞に対しては、膵β細胞におけるグルコース依存的な二相性のインスリン分泌、糖尿病肝臓モデル細胞に対しては、糖尿病の典型的フェノタイプであるインスリン抵抗性など)をおおのこの細胞レベルで再現することに成功した。この結果より、これら病態モデル細胞を利用して糖尿病態進行または改善に関わる因子(主に、低分子化合物)の探索・同定・検証を行う準備が整った。これらの細胞アレイを用いて様々な条件下での糖尿病フェノタイプ出現解析を行った結果、アミノ酸の一種であるL-システインが、グルコース依存的なインスリン分泌を阻害することを発見した。さらに、その原因が、細胞の代謝酵素であるPKM2タンパク質の四量体形成阻害による機能不全と、それに伴うグルコースからのピルビン酸やATPの産生阻害が引き起こされるというメカニズムまでを明らかにすることができた。これにより、PKM2を標的とした糖尿病予防薬・治療薬の開発や、L-システイン含有サプリメントの安全な使用のための指針づくりに貢献することができた。これらの成果は、東大医学部との共同研究であり、米国PNAS誌に掲載されると共に新聞や多くの雑誌に取り上げられた。また、糖尿病肝臓モデル細胞を用いて、糖尿病態発現に深く関わる細胞内シグナル伝達異常のフェノタイプとして、インスリン刺激によって活性化されるキナーゼの「リン酸化の減少」を検出することに成功した。この細胞系を用い、光学顕微鏡下に観察できる「単一の病態モデル細胞」毎のリン酸化キナーゼの量を指標に、従来よりも高いS/N比で、糖尿病態発現フェノタイプを検出できる化合物可視化スクリーニングシステムを構築した。本システムを利用し、化合物ライブラリースクリーニングを行った結果、3つの阻害剤(病態進行に関わると予想)と3つの活性化剤(病態改善に関わると予想)を抽出することに成功した。

4. 今後の展開

病態時に個体の中で生起する異常現象を細胞レベルで検出し、病態進行・改善の分子メカニズム解析や創薬スクリーニングを可能とする本システムは、幅広い疾患・組織を対象とした医学・生命科学研究に応用できる汎用性の高い細胞アッセイであり、そのまま創薬・診断の支援システムとなり得る。また、今回は細胞を「病態化」する方法を構築したが、逆に病態細胞を「正常化」する方法としての応用も当然可能である。iPS細胞技術や新規ゲノム編集法CRISPR/Cas9システムの発展に伴って、細胞それ自体の治療を目的とした「細胞治療」はますます実現可能となってきたが、本方法はタンパク質因子や化合物などの導入のみでの安心安全な細胞機能編集を可能とする支援ツールとしての波及も期待できる。

リシール細胞技術を利用したこれらの研究成果は、細胞編集工学という新しい産業創生の種となりつつある。本研究で培った技術を基に、共同研究者・加納ふみは、平成28年4月より東工大・科学技術創成研究院の独立准教授として研究室をスタートさせた。また、同じく4月より、研究代表者・村田昌之は、東大・駒場初の社会連携講座を創設し特任教授を兼担している。これら3つのラボは強い連携体制を作り、現在国内外の研究機関や企業との共同研究を実施しており、細胞医薬支援技術開発のための「細胞デザイン拠点」創成を目指している。

5. 発表実績

Nakatsu, D., et al. (2015) L-cysteine reversibly inhibits glucose-induced biphasic insulin secretion and ATP production by inactivating PKM2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 112 (10): E1067-1076. doi: 10.1073/pnas.1417197112.

Taguchi, Y., et al. (2015) Yip1A, a Novel Host Factor for the Activation of the IRE1 Pathway of the Unfolded Protein Response during *Brucella* infection. *PLOS Pathogens.* doi: 10.1371/journal.ppat.1004747.

Sugawara, T., et al. (2014) Rab2A is a pivotal switch protein that promotes either secretion or ER-associated degradation of (pro)insulin in insulin-secreting cells. *Sci. Rep.* 4. Article number: 6952. doi:10.1038/srep06952.

「細胞内生命現象の再構成：病態モデル細胞構築への応用」加納ふみ、村田昌之：生体の科学、65巻5号、494-495。(2014)