



第2回 千里 LF 産学学術交流会

発表資料集

コーディネーター：

審良 静男

千里ライフサイエンス振興財団 理事長

竹田 潔

大阪大学免疫学フロンティア研究センター 拠点長

日時：2024年12月19日（木）13：30

会場：千里ライフサイエンスセンタービル5F

サイエンスホール 研究紹介

5Fロビー

ポスター展示、懇親会

主催：公益財団法人 千里ライフサイエンス振興財団

プログラム

研究紹介 13:30~16:05 @サイエンスホール

13:30~13:35

はじめに 千里ライフサイエンス振興財団 理事長 審良 静男

13:35~13:50

演題 1 腸管病原菌による宿主細胞死制御機構の解明4
東京科学大学 (旧 東京医科歯科大学) 大学院医歯学総合研究科
細菌感染制御学分野 准教授 芦田 浩

13:50~14:05

演題 2 生物発光を利用したバイオイメーjing技術の開発6
宮崎大学テニュアトラック推進室 テニュアトラック講師 岩野 智

14:05~14:20

演題 3 T細胞疲弊・終末分化に関わる分子機構の理解に基づく CAR-T細胞の改変8
慶應義塾大学 医学部 先端医科学研究所 がん免疫研究部門 教授 籠谷 勇紀

14:20~14:35

演題 4 血管周囲細胞の新規肺保護メカニズムの解明10
大阪大学免疫学フロンティア研究センター
免疫機能統御学 寄付研究部門 准教授 姜 秀辰

14:35~14:50

演題 5 心筋の代謝と再生をつなぐメカニズム12
理化学研究所 生命機能科学研究センター
心臓再生研究チーム チームリーダー 木村 航

14:50~15:05

演題 6 有機色素分子を基盤とした光捕集超分子による光線力学療法14
大阪大学大学院工学研究科 応用化学専攻 分子創成化学講座 講師 重光 孟

15:05~15:20

演題 7 老化幹細胞制御機構解明と骨再生薬剤展開16
新潟大学大学院医歯学総合研究科
高度口腔機能教育研究センター 准教授 前川 知樹

15:20～15:35

演題 8 脳回路形成における同期的神経活動の役割18

熊本大学国際先端医学研究機構

多次元生体イメージング研究室 特任准教授

水野 秀信

15:35～15:50

演題 9 抗体産生細胞の長寿命化機構の解明20

理化学研究所生命医科学研究センター 分化制御研究チーム 研究員 小池 拓矢

15:50～16:05

演題 10 ファージ由来溶菌酵素エンドライシンによる疾患制御法の開発22

大阪公立大学大学院医学研究科

ゲノム免疫学/メタゲノム解析研究センター 准教授 (研究教授)

藤本 康介

16:05～16:10

研究紹介の締め 大阪大学免疫学フロンティア研究センター 拠点長

竹田 潔

ポスター展示と懇親会 16:15～17:45 @5F ロビー

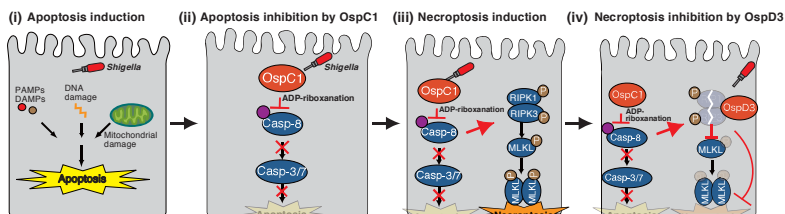
Shigella prevents host cell death by delivering T3SS effector proteins

Summary

In response to bacterial infection, epithelial cells undergo cell death, such as apoptosis, necrosis, pyroptosis, and necroptosis, to terminate bacterial infection as host defense systems. The sacrifice of infected cells plays an important role in clearance of damaged cells, elimination of pathogens, and presentation of bacteria-derived antigens to the adaptive immune system.

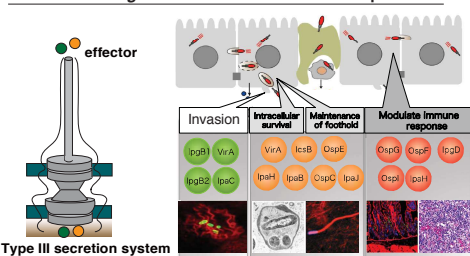
However, *Shigella* seems to prevent epithelial cell death by delivering a subset of virulence proteins (effectors) via the type III secretion system, because it prefers these cells as a replicative niche, spread to neighboring cells, and evasion of immune cells. As a result, *Shigella* is able to efficiently colonize the intestinal epithelium.

In this study, we have identified *Shigella* OspD3 and OspC1 effector prevent host epithelial cell death during *Shigella* infection. Characterization of the cell death type has shown that Δ ospD3 mutant induced necroptotic cell death, whereas Δ ospC1 mutant induced apoptotic cell death. To prevent caspase-8-mediated apoptosis, *Shigella* delivers OspC1 and inhibits caspase-8 activation via its ADP-ribosylation activity but also inducing necroptosis. To further counteract necroptosis, *Shigella* delivers OspD3 effector, which has protease-like activity, and cleaves RHIM domain of RIPK1 and RIPK3, both of which are essential factor of necroptosis induction, thereby inhibiting necroptosis.



Introduction

A model for *Shigella* infection of the intestinal epithelium



Type of host cell death induced by bacterial infection

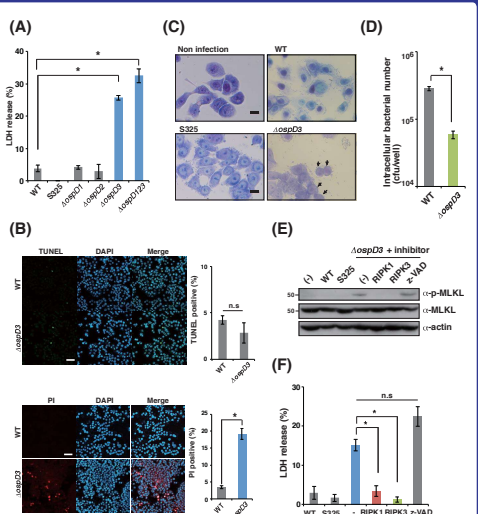
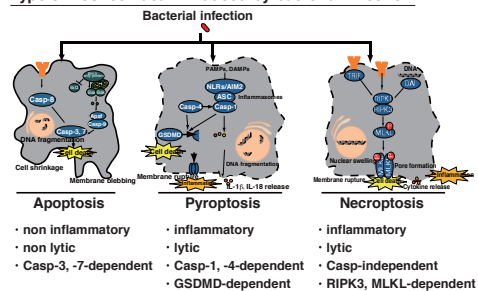


Figure 1. *Shigella* OspD3 effector inhibits necroptotic cell death.

(A) (E) HT29 cells were infected with *Shigella* WT, S325 (T3SS deficient mutant) or series of *ospD* gene deletion mutant and incubated for 8 h. Cellular supernatants were subjected to cytotoxicity assay or immunoblotting. (B) HT29 cells were infected with *Shigella* WT or Δ ospD3 mutant. Infected cells were subjected to TUNEL and PI staining. Positive cells were quantified and shown in right graph. (C) HT29 cells were infected with *Shigella* WT or Δ ospD3 mutant. Infected cells were subjected to Giemsa staining. Arrows indicate cells whose cytoplasm disappeared. (D) HT29 cells were infected with *Shigella* WT or Δ ospD3, and incubated for 12 h. After incubation, intracellular bacteria were quantified using a gentamicin protection assay.

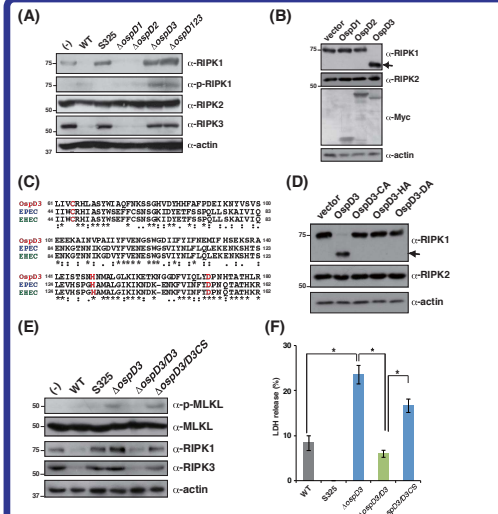


Figure 2. OspD3 inhibits necroptosis by degradation of RIPK1 and RIPK3.

(A) HT29 cells were infected with indicated *Shigella* strains, and cell lysates were subjected to immunoblotting. (B) 293T cells were transfected with Myc-tagged *ospD3* expressing plasmids. After 24 h, cells were harvested and subjected to immunoblotting. (C) A multiple sequence alignment of OspD3 family. The conserved amino acids are indicated by asterisks. A typical protease catalytic sites are boxed in red. (D) 293T cells were transfected with series of *ospD3* point mutants expressing plasmids. After 24 h, cells were harvested and subjected to immunoblotting. (E) HT29 cells were infected with *Shigella* WT, S325, Δ ospD3, Δ ospD3/ Δ ospC1 (OspD3 WT) or Δ ospD3/ Δ ospC1 (protease deficient) complement strains, and cell lysates and cellular supernatants were subjected to immunoblotting (E) or cytotoxicity assay (F) respectively.

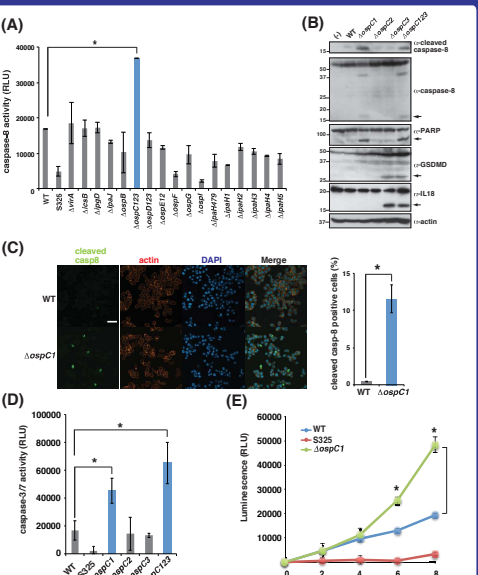


Figure 3. *Shigella* OspC1 inhibits caspase-8 dependent apoptosis.

(A) HT29 cells were infected with the indicated *Shigella* strains and incubated for 8 h. Cells were harvested and subjected to measurement of caspase-8 activation. (B) HT29 cells were infected with indicated *Shigella* strains, and cell lysates were subjected to immunoblotting. (C) HT29 cells were infected with indicated *Shigella* strains and incubated for 8 h. Infected cells were then fixed and stained with cleaved caspase-8 (green), rhodamine-phalloidin (red), and DAPI (blue). Percentages of positive cells are shown in the graph at right. Scale bar: 100 μ m. (D) HT29 cells were infected with the indicated *Shigella* strains and incubated for 8 h. Cells were harvested and subjected to measurement of caspase-8 activation (D) or Annexin V activity assay to detect apoptosis (E).

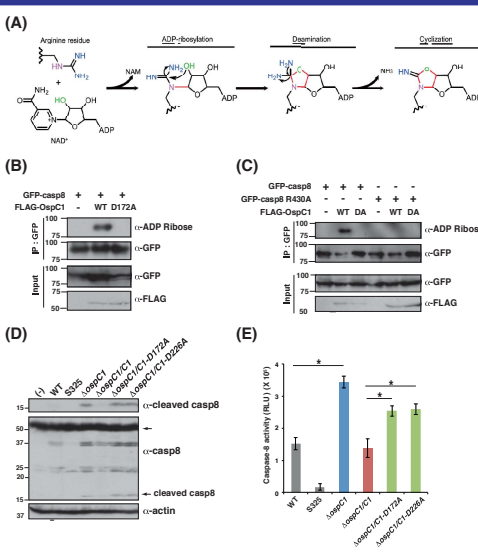


Figure 4. OspC1 inhibits caspase-8 via its ADP-ribosylation activity.

(A) Scheme of arginine ADP-ribosylation. (B) (C) 293T cells were transfected with indicated plasmids. After 24 h, cells were harvested and subjected to immunoprecipitation and immunoblotting. (D) (E) HT29 cells were infected with the indicated *Shigella* strains and incubated for 8 h. Cells were harvested and subjected to immunoblotting (D) or measurement of caspase-8 activation (E).

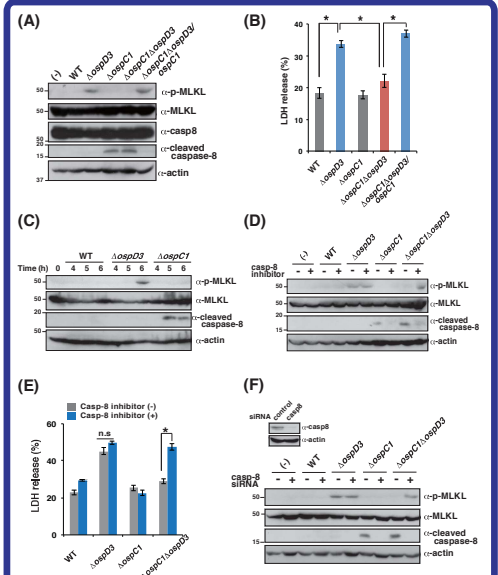
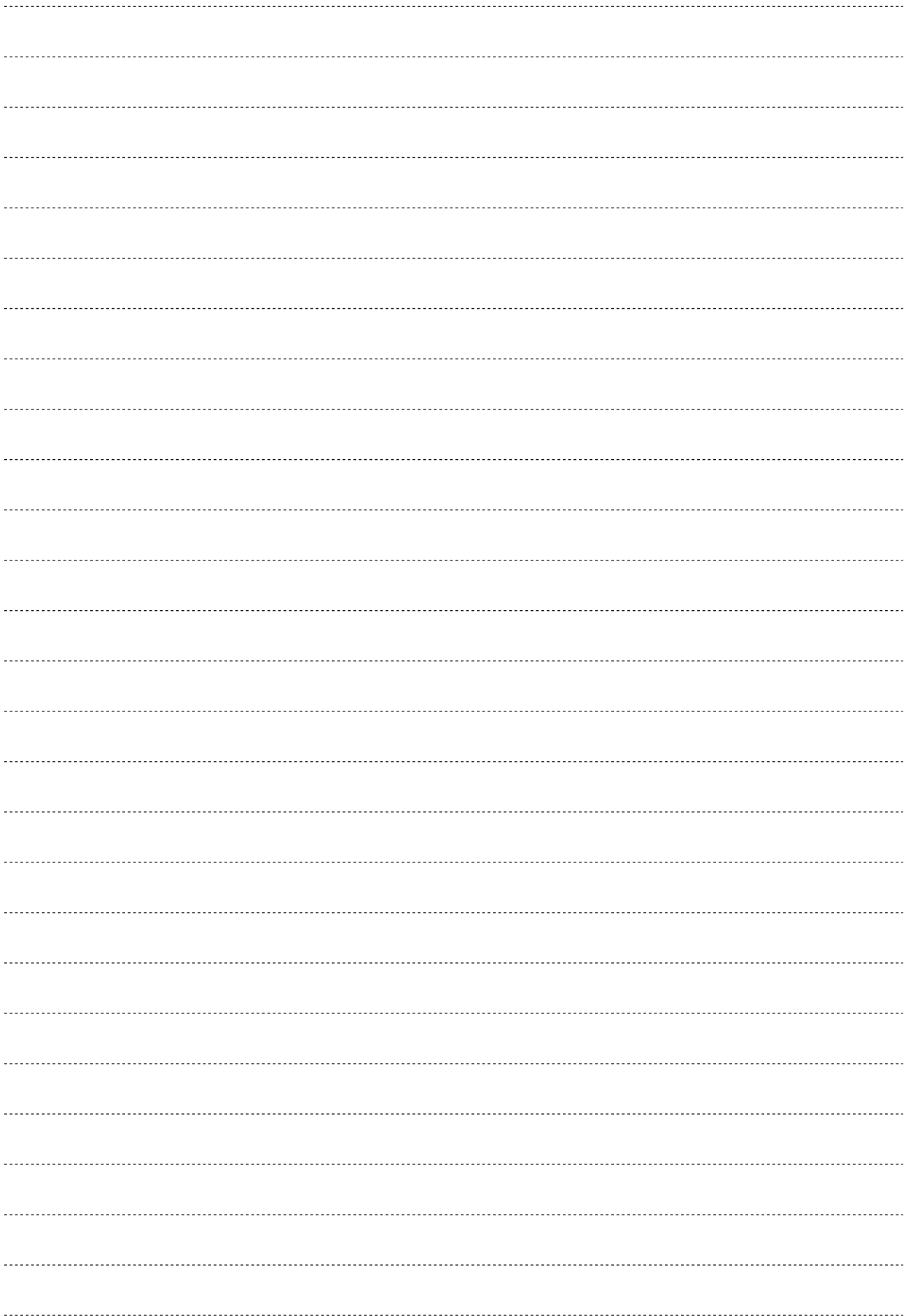


Figure 5. OspC1-mediated caspase-8 inhibition triggers necroptosis.

(A) (B) HT29 cells were infected with indicated *Shigella* strains and incubated for 8 h. Cell lysates and aliquots of cellular supernatants were subjected to immunoblotting (A) and cytotoxicity assay (B), respectively. (C) HT29 cells were infected with *Shigella* WT, Δ ospD3, or Δ ospC1. Cell lysates obtained at the indicated time points were subjected to immunoblotting. (D) (E) HT29 cells treated with DMSO or caspase-8 inhibitor were infected with indicated *Shigella* strains and incubated for 8 h. Cell lysates and aliquots of cellular supernatants were subjected to immunoblotting (D) and cytotoxicity assay (E), respectively. (F) HT29 cells treated with the control or caspase-8 siRNAs were infected with the indicated *Shigella* strains and incubated for 8 h. Cell lysates were subjected to immunoblotting. The knockdown efficiency of the indicated siRNAs was assessed by immunoblotting.



生物発光を利用したバイオイメージング技術の開発

宮崎大学テニュアトラック推進室 テニュアトラック講師 岩野 智

E-mail; s.iwano0326@gmail.com, satoshi_iwano@med.miyazaki-u.ac.jp

蛍光と生物発光の違い

蛍光

蛍光を出すためには強い光が必要 (励起光)

二光子蛍光顕微鏡

蛍光内視鏡

動物に針(光ファイバーなど)を突き刺して、近づける事で蛍光観察する方法

nVista, inncopix社WebSiteより引用

侵襲的、断続的、局所的

生物発光

生物発光は化学反応で発光する(酵素反応)

C1=NC(=C2C(=N1)N(C)C(=O)O2)C(=O)O + O₂, ATP, Mg²⁺ → C1=NC(=C2C(=N1)N(C)C(=O)O2)C(=O)O + H₂O + hν (λ_{max} = 565 nm)

実験のイメージ図

マウスに移植

ホタルルシフェリンを投与

発光イメージング画像

非侵襲的、経時的、連続的な観察が可能

高感度in vivo生物発光イメージング技術AkaBLI ~基質と酵素の共進化によって開発~

人工基質

市販済 AkaLumine-HCl

人工酵素 Akaluc

(富利団体) 要ライセンス契約 (非営利) 理研BRC, Addgene

λ_{max} = 650 nm

人工基質AkaLumine

1. 生体透過性の高い近赤外発光

2. 基質の細胞膜透過性

D-luciferin AkaLumine

人工酵素 Akaluc

AkaLumine Fluc Akaluc

暗い! 明るい!

従来技術と比較

肺のイメージング

脳深部のイメージング

D-luciferin F-luc AkaBLI

D-luciferin F-luc AkaBLI

小型霊長類の非侵襲・自由行動下での脳深部イメージングを実現

超高感度なBioLuminescence Imaging(BLI) system

AkaLumine × Akaluc = AkaBLI

AkaBLIに基づくリソース・技術の紹介

Cre依存的Venus-Akaluc発現マウス

Creドライバーマウスとの交配で、Akalucを発現可能。理研BRCから配布 (RBRC10858)

Emx1 Cre mice x Floxed Venus-Akaluc mice

Akaluc expression site: Cortex, limb

Nakashiba T, Ogoh K, [Iwano S](#), et al, *Lab Animal*, 52(10), 247-257 (2023)

コロナウイルス感染動態の可視化

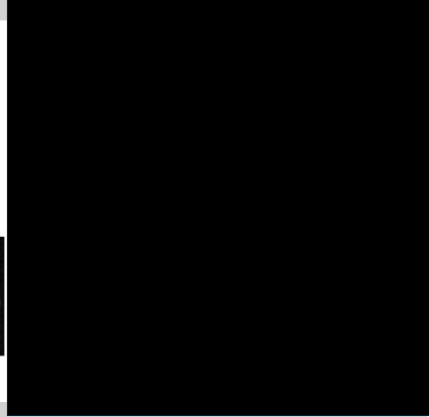
SARS-CoV-2 B.1.1-AkalucCO

Codon-optimized Akaluc (AkalucCO)

コドン最適化Akalucをハムスターに感染させて、その感染の様子を非侵襲的に観察

Syrian hamster

北海道大学 福原 崇介先生、田村 友和先生との共同研究 Tamura T et al, *iScience*, 2024



新規近赤外発光基質AkaSuke (近日市販予定)

論文投稿中

最も一般的なFluc(luc2)で強い近赤外発光を示す

高水溶性、肝臓での非特異的発光を大幅に低減

C1=NC(=C2C(=N1)N(C)C(=O)O2)C(=O)O

日本女子大学 齋藤亮平博士、自治医科大学 口丸高弘博士との共同研究

発光スペクトル Fluc(luc2)

D-luciferin (λ_{max} ≈ 565 nm)

AkaLumine (λ_{max} ≈ 650 nm)

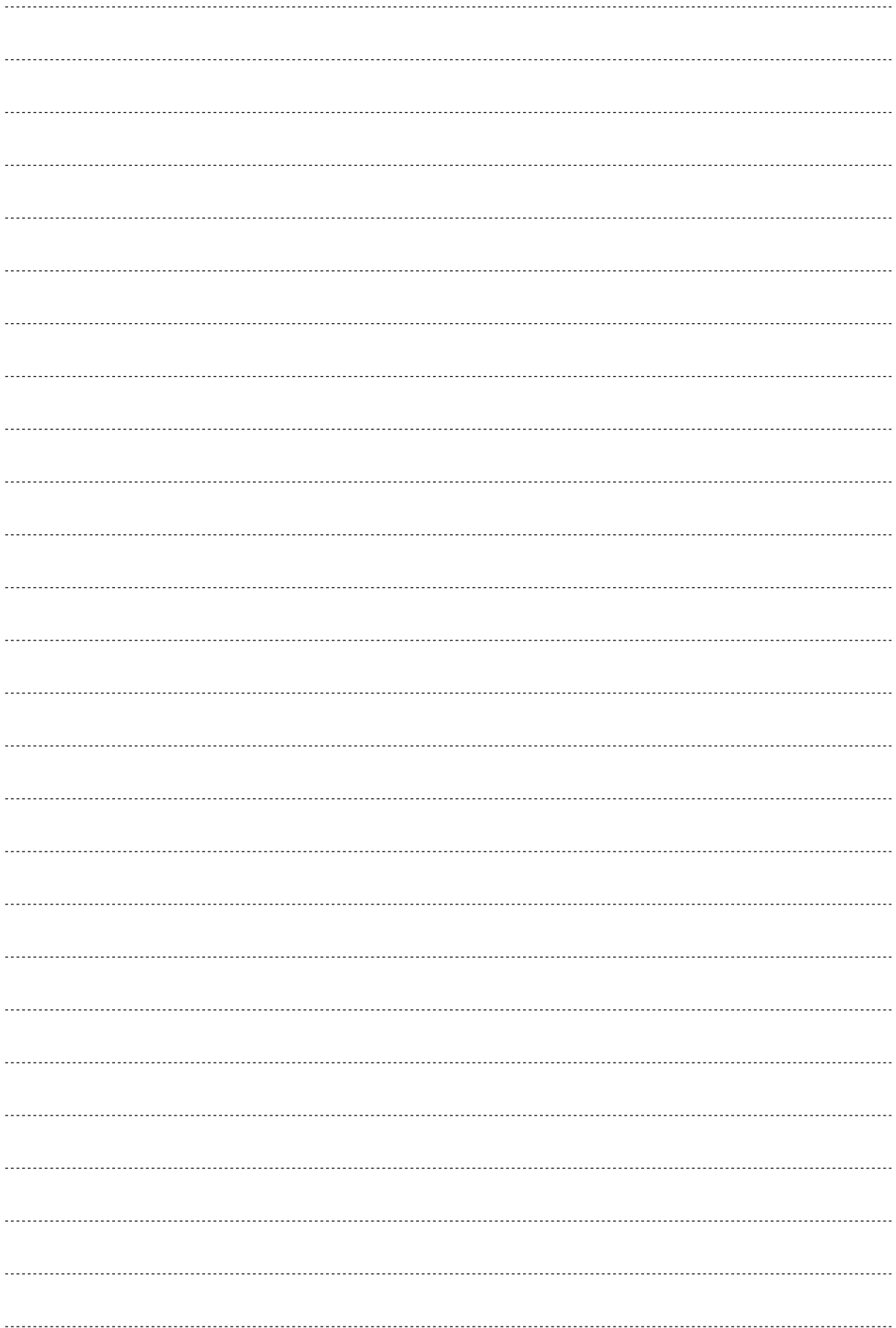
AkaSuke (λ_{max} ≈ 680 nm)

肺転移モデル Fluc(luc2)

Photon flux [photons/s] × 10⁹

× 8





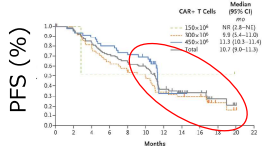
難治がんに対するCAR-T細胞療法の研究開発

慶應義塾大学医学部 先端医科学研究所がん免疫研究部門
籠谷 勇紀

がんに対するCAR-T細胞療法の課題

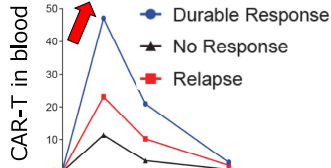
① 持続的な治療効果

ide-cel for multiple myeloma



(Munshi et al. NEJM 2022)

高い再発率



(Locke et al. Blood Adv 2021)

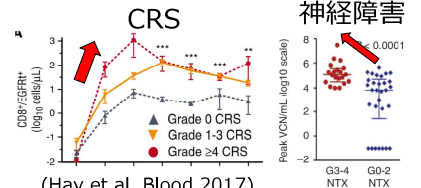
T細胞の増殖・長期生存
∞治療効果

② T細胞活性化に伴う重篤な副作用

CD19 CAR-T cell

	≥Grade 3
CRS	46 %
Neurotoxicity	13 %

(Maude et al. NEJM 2018)



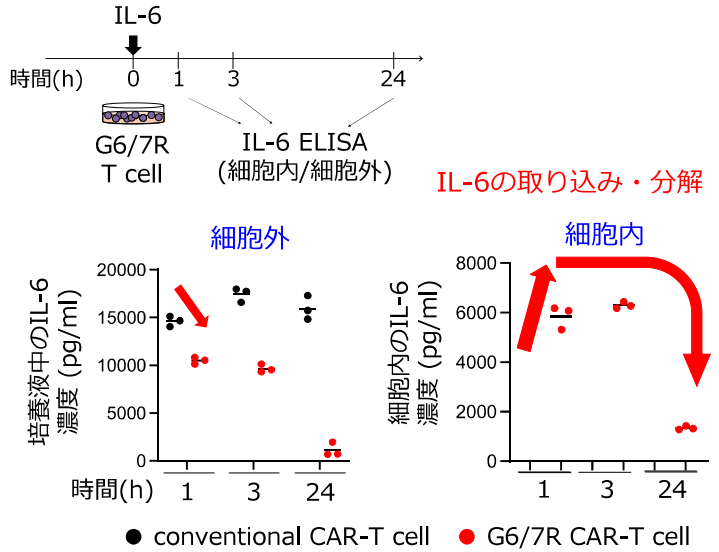
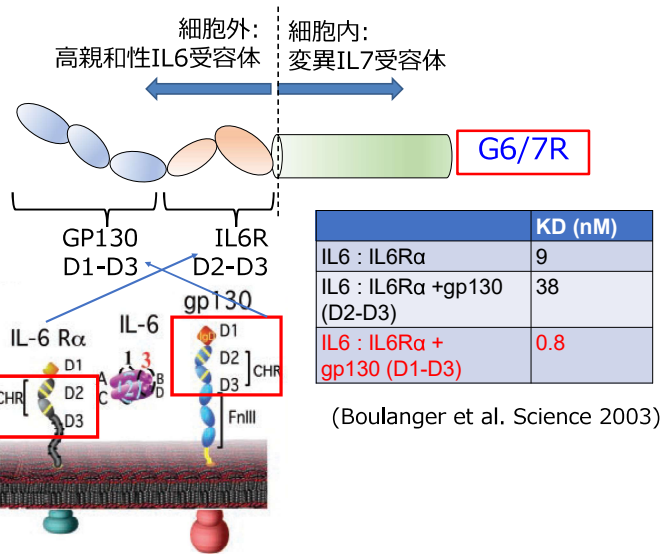
(Hay et al. Blood 2017)

(Santomasso et al. Cancer Discov 2018)

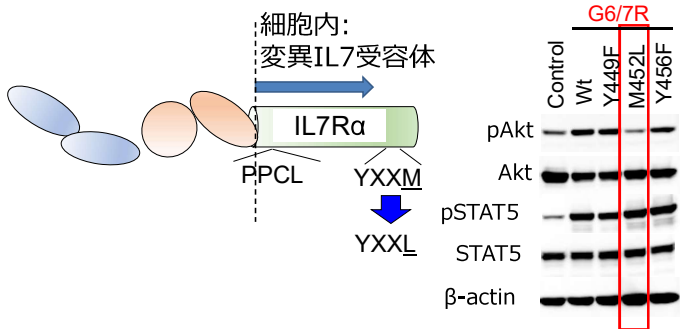
T細胞増殖∞発症リスク

→T細胞機能強化と副作用低減を両立させる技術が必要

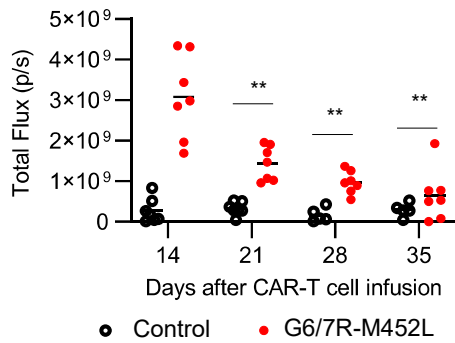
炎症性サイトカインIL-6をT細胞の長期生存シグナルに変換するサイトカイン受容体開発



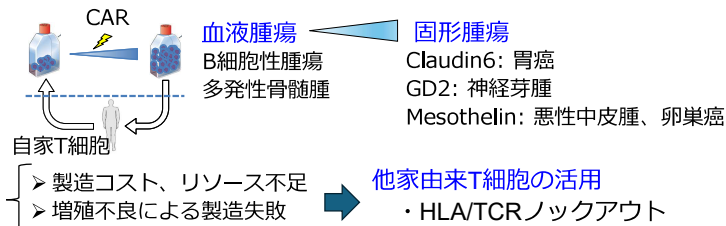
選択的なJAK-STAT経路活性化→長期生存能の獲得



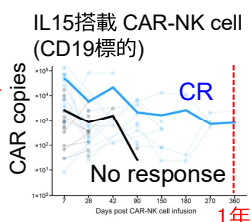
腫瘍モデル：生体内で長期生存



CAR-T細胞/NK細胞療法の開発状況

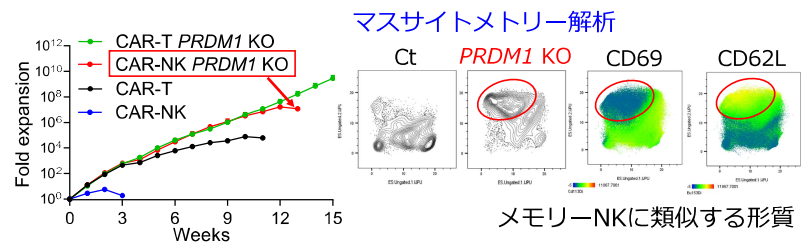


	CAR-T細胞	CAR-NK細胞
製造	確立されている	増殖能が低い
持続性	長期生存	短命
副作用	CRS/ICANS	リスク低い
他家細胞活用	TCR抑制が必要	GVHDは弱い



適切な遺伝子改変により持続性を高められる

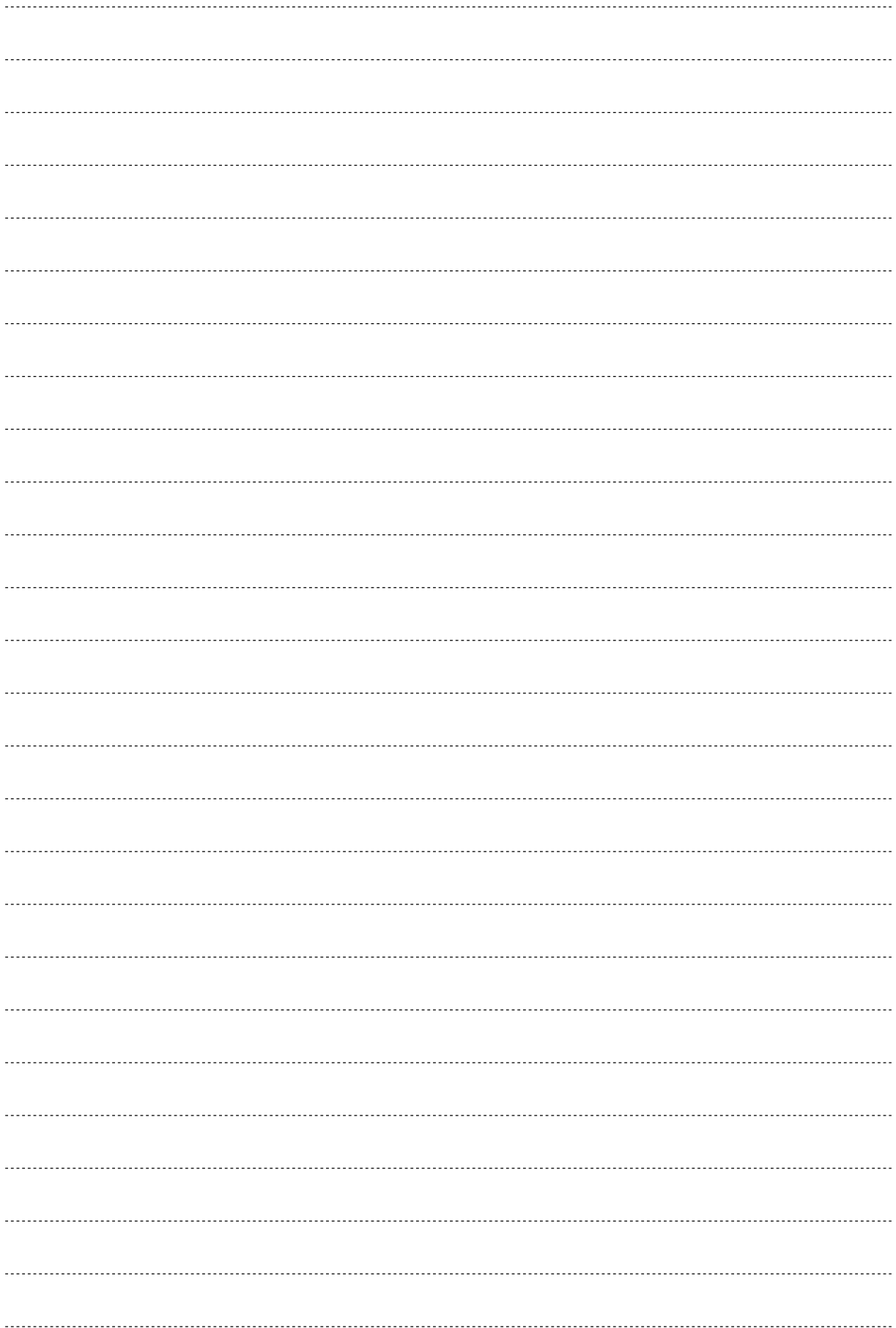
PRDM1遺伝子ノックアウトによるメモリーNK細胞誘導



細胞傷害活性を維持しながら、抗原刺激に対する高い増殖能を獲得

メモリーT細胞に類似した形質・遺伝子発現プロファイル

→CAR-NK療法の機能強化に応用できる可能性



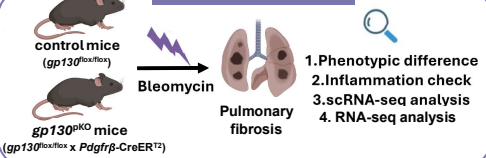
Gp130 signaling in pericytes protects from pulmonary fibrosis

¹Laboratory of Immune Regulation, Immunology Frontier Research Center, University of Osaka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

²Department of Immune Regulation, Center for Infectious Disease Education and Research, University of Osaka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

Pulmonary fibrosis (PF), a condition characterized by inflammation and collagen deposition in the alveolar interstitium, causes dyspnea and fatal outcomes. Glycoprotein130 (gp130) signaling is an important mediator that involves in PF development. Depends on different cell types, roles of gp130 signaling on the pathogenesis of PF are waiting to be explored. Here, we found a protective role of gp130 signaling in pericytes, the vascular mural cells that work to promote angiogenesis and maintain vascular homeostasis, which inhibit development of lung fibrosis via regulating neutrophil_X and interstitial macrophage function.

Methodology



1. Deletion of gp130 in pericytes accelerated lung fibrosis

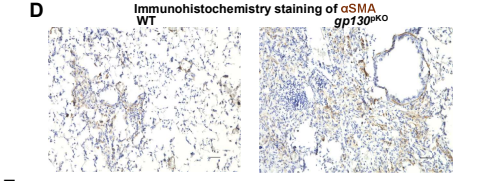
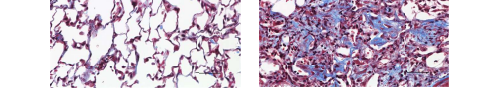
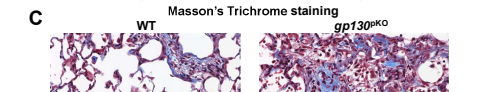
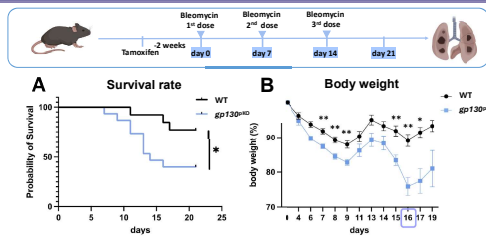


Figure 1. Deletion of gp130 in pericytes accelerated lung fibrosis (A) Survival rate test was performed in gp130^{PKO} mice and control mice after bleomycin injury. (B) Body weight change in two groups was shown at different time points. (C) WTC-stained images were shown using lung tissue sections of bleomycin-treated gp130^{PKO} mice and control mice on day 21. (D) Representative graphs of IHC staining in bleomycin-induced two groups were shown on day 16. α-Smooth muscle actin was used as the marker of myofibroblasts. (E) Expression level of fibrosis-associated genes in two groups were quantified by RT-qPCR. (F) Pathophysiology assessment was performed in gp130^{PKO} mice and control mice after bleomycin injury. Quantification of SP-D levels in the serum of two groups was tested by Elisa. Quantification of the absolute number of whole BALF cells in two groups was detected by flow cytometry. Data presented as mean ± SEM. *p < 0.05, **p < 0.01. T-test analyses were performed.

2. Proportion of cell populations in fibrosis-induced lung tissue of gp130PKO mice

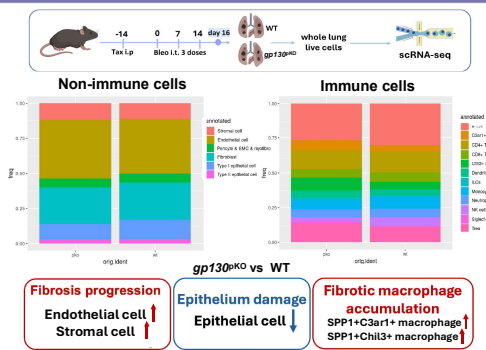


Figure 2. Proportion of cell populations in fibrosis-induced lung tissue of gp130^{PKO} mice. Single cell RNA-seq (scRNA-seq) was performed using bleomycin-injured whole lung cells of gp130^{PKO} group and control group on day 16. Cell population of each cluster was shown in stacked percentage column charts of non-immune cells or immune cells separately. Labels refer to clusters: SMC: smooth muscle cell; myofibro: myofibroblast; ILCs: innate lymphoid cell.

I declare no conflict-of-interest.

3. Initial study of gp130-deficient pericytes in pulmonary fibrosis

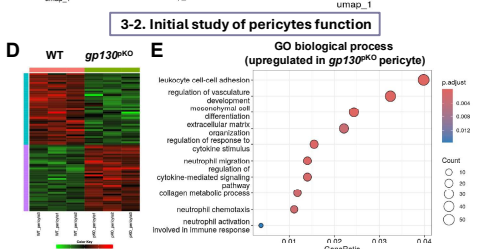
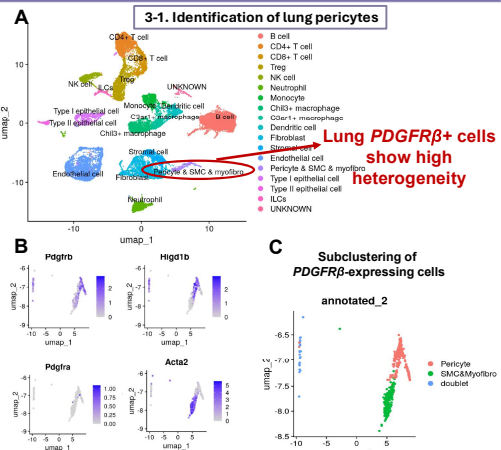


Figure 3. Initial study of gp130 deficient pericyte in pulmonary fibrosis (A) UMAP of all cell clusters combined in bleomycin-treated gp130^{PKO} mice and control mice. (B) Representative genes expression in the subcluster of Pericyte & SMC & myofibro. Cluster of pericyte was clearly separated from SMCs & myofibro. (C) UMAP of re-annotated subcluster of Pericyte & SMC & myofibro. Cluster of pericyte was clearly separated from SMCs & myofibro. (D) RNA-seq shows differentially expressed transcription profiles in lung pericytes of two groups visualized by heat maps. (E) Gene ontology enrichment analysis showed the upregulated signaling pathway in pericyte of bleomycin-treated gp130^{PKO} mice compared to the control (fold change>0.25, p<0.1).

4. Neutrophil_X were highly increased in bleomycin-induced gp130PKO mice lung

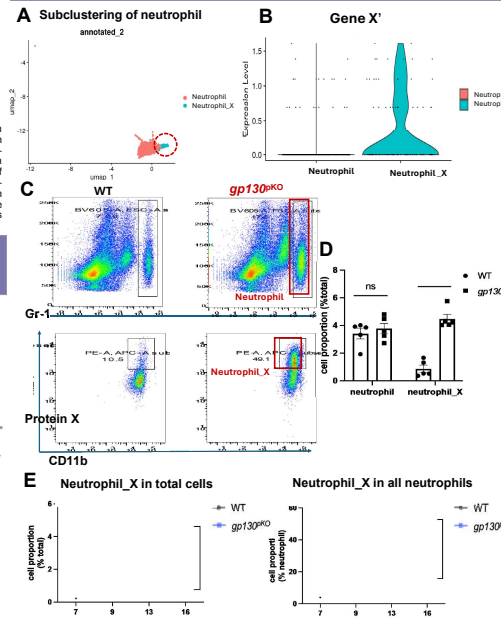


Figure 4. Neutrophil_X were highly increased in lung tissue of bleomycin-induced gp130^{PKO} mice (A) UMAP of subcluster of neutrophil from whole lung scRNA-seq. Cluster of neutrophil_X was clearly distinguished from neutrophil. (B) Violin plot of gene X' expression in neutrophil and neutrophil_X cluster was shown. (C) Representative flow cytometry plots of neutrophil_X in bleomycin-treated lung tissue of gp130^{PKO} mice and control mice on day 16. Neutrophil_X was gated as Gr-1⁺ CD11b⁺ protein X⁺ cells. (D) Quantification of cell proportion in total lung cells was tested in two groups. (E) Proportion of neutrophil_X in total lung cells, or in all neutrophils were tested at different time points after bleomycin injury. Data presented as mean ± SEM. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001. T-test analyses were performed.

5. Pulmonary neutrophil_X in gp130PKO mice showed pro-inflammatory function

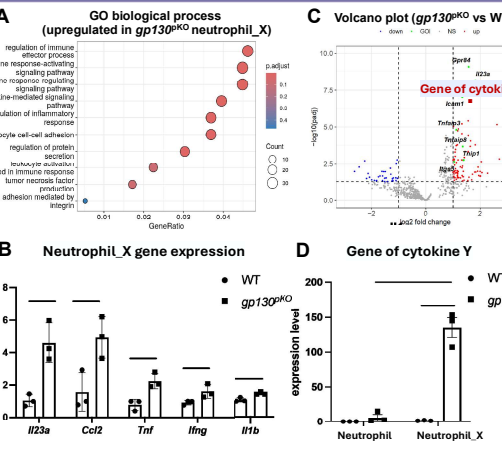


Figure 5. Pulmonary neutrophil_X in gp130^{PKO} mice showed pro-inflammatory function (A) In RNA-seq, gene ontology enrichment analysis showed the upregulated signaling pathway in neutrophil_X of bleomycin-treated gp130^{PKO} mice compared to the control (fold change>0.25, p<0.1). (B) Genes of pro-inflammatory cytokines that associated with neutrophil functions were tested by RT-qPCR. (C) Volcano plot showed differentially expressed genes in neutrophil_X of bleomycin-injured gp130^{PKO} group compared to the control. (log2 fold change>1 or <-1). Gene of cytokine Y was upregulated in gp130^{PKO} group and highlighted in red. (D) Expression level of gene of cytokine Y in neutrophil or neutrophil_X was quantified by RT-qPCR. Data presented as mean ± SEM. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001. T-test analyses were performed.

6. Interstitial macrophages showed fibrotic phenotype in bleomycin-induced gp130PKO mice

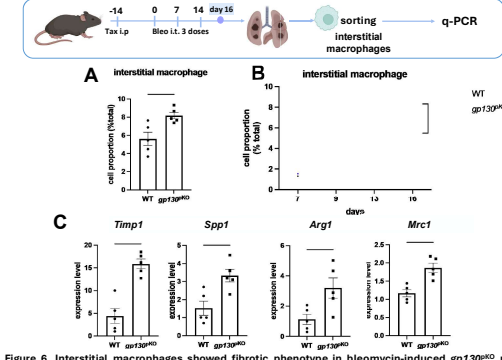


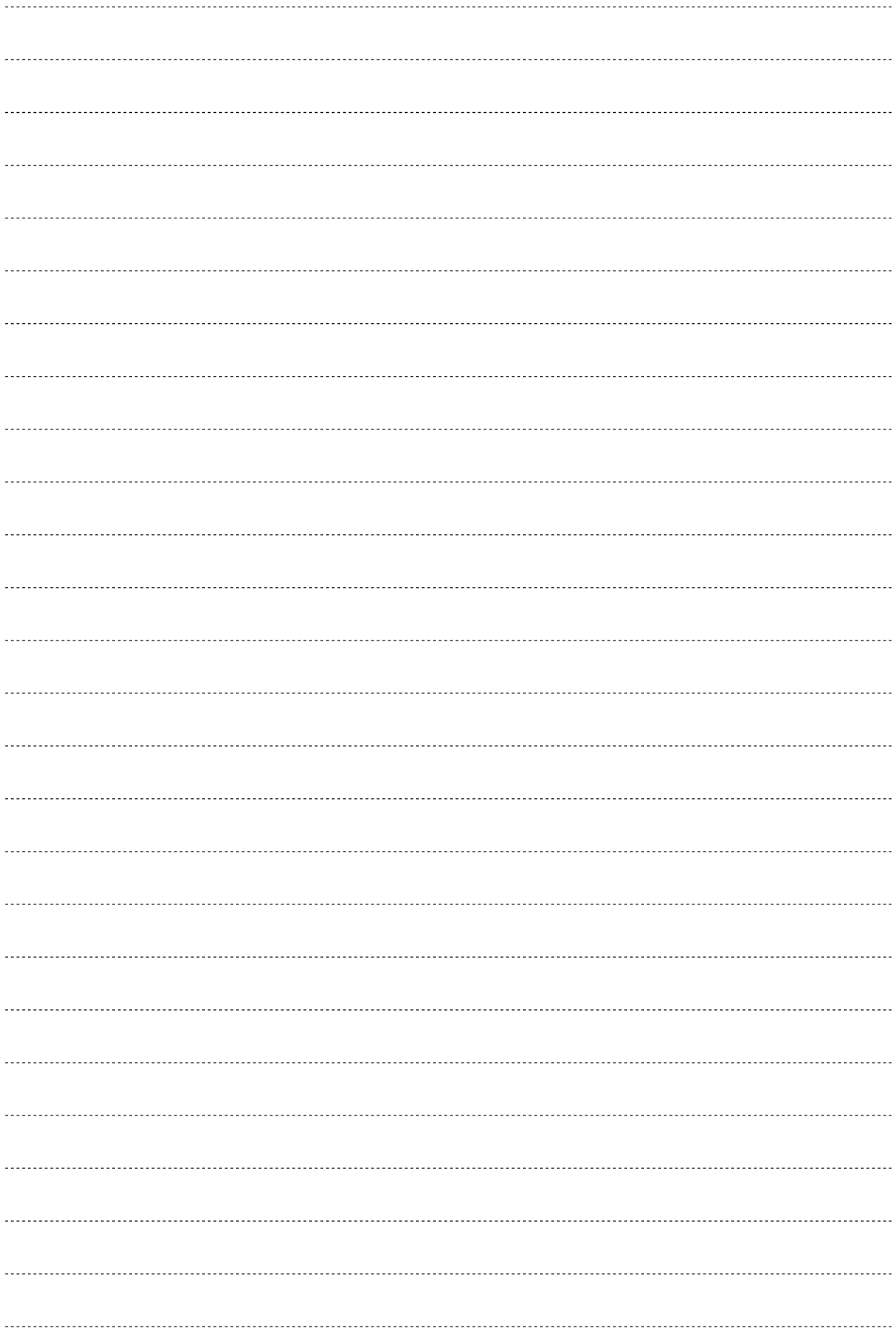
Figure 6. Interstitial macrophages showed fibrotic phenotype in bleomycin-induced gp130^{PKO} mice (A) Quantification of cell proportion of interstitial macrophages in total lung cells was tested in bleomycin-treated gp130^{PKO} mice and control mice on day 16. (B) Proportion of interstitial macrophages in total lung cells was tested at different time points in two groups after bleomycin injury. (C) Expression level of fibrosis-associated genes in interstitial macrophages of two groups were tested by RT-qPCR. Data presented as mean ± SEM. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001. T-test analyses were performed.

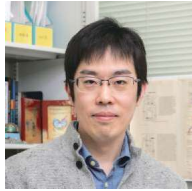
Summary

1. Deficiency of gp130 signaling in pericytes facilitated bleomycin-induced pulmonary fibrosis.
2. Lung pericytes were clearly identified in the subcluster of lung PDGFRβ-expressing cells. Bleomycin-induced gp130^{PKO} pericytes showed a potential role in regulating immune cell function.
3. Higher population of neutrophil_X were found in the lung tissue of bleomycin-treated gp130^{PKO} mice compared to the control. Neutrophil_X showed up at the early stage of lung fibrosis in gp130^{PKO} mice. Increasing number of neutrophil_X was positively correlated with disease development.
4. After bleomycin treatment, neutrophil_X showed hyper-activated immune responses in gp130^{PKO} group compared to control group via elevation of cytokine Y.
5. In the late stage of pulmonary fibrosis, interstitial macrophages of gp130^{PKO} group showed an increasing population and a pro-fibrotic phenotype compared to the control.

We are trying to explore:

- How does gp130 signaling affect pericyte function in pulmonary fibrosis?
- What's the major role of novel neutrophil_X in pulmonary fibrosis?
- What's the mechanism of bleomycin-induced gp130^{PKO} pericyte regulating neutrophil_X and interstitial macrophage function?





チームリーダー
木村 航
Wataru Kimura PhD

心筋の代謝と再生をつなぐメカニズム

理化学研究所 生命機能科学研究センター
心臓再生研究チーム



要旨

哺乳類の成体の心臓は心筋梗塞などで障害を受けた際の再生能力を欠いている。これが虚血性心疾患が長年にわたって世界の人類の死因の第一を占める主因である。対照的に、胎児期や出生直後の新生児期の哺乳類は、ゼブラフィッシュやイモリなどのように心筋細胞増殖を介した心筋再生能を持つ。しかし哺乳類では出生後すぐに心筋細胞が増殖を停止し、同時に心筋再生能も失われる。我々は出生後の心筋細胞増殖停止のメカニズムを明らかにし、それをエンジニアリングすることで成体において心筋細胞の細胞周期再エントリー、そして心筋再生を誘導することを目指した研究を行っている。

我々はマウスを用いて、出生後に酸素に富む空気をを使った肺呼吸を開始することで心筋細胞においてミトコンドリア代謝が活性化し、それによって生じる酸化ストレスが細胞周期停止を誘導していることを示した (Figure 1)。さらに成体マウスを長期間低酸素に曝露することで心筋細胞のミトコンドリア代謝および酸化ストレスを抑制でき、それによって心筋細胞の細胞周期再エントリーと心筋再生を誘導できることを示した (Figure 2)。

現在、ミトコンドリア代謝による心筋細胞の細胞周期停止を誘導する分子機構の探索を行っている。我々は有袋類であるオポッサムは出生後にも心筋再生能を長期間維持することを見出し、マウスとオポッサムとの比較によって AMPK シグナルが哺乳類での出生後の心筋細胞の増殖停止と心筋再生能喪失を制御することを見出した。さらに同様に異種間メタボローム比較を行うことで、出生後にヌクレオチド分解経路が活性化することでキサンチンオキシダーゼ (XO) を介した酸化ストレスが生じること、アロプリノールによって XO を阻害することで心筋再生が誘導できることを示した (Figure 3)。

出生後に心筋再生能が喪失するメカニズム

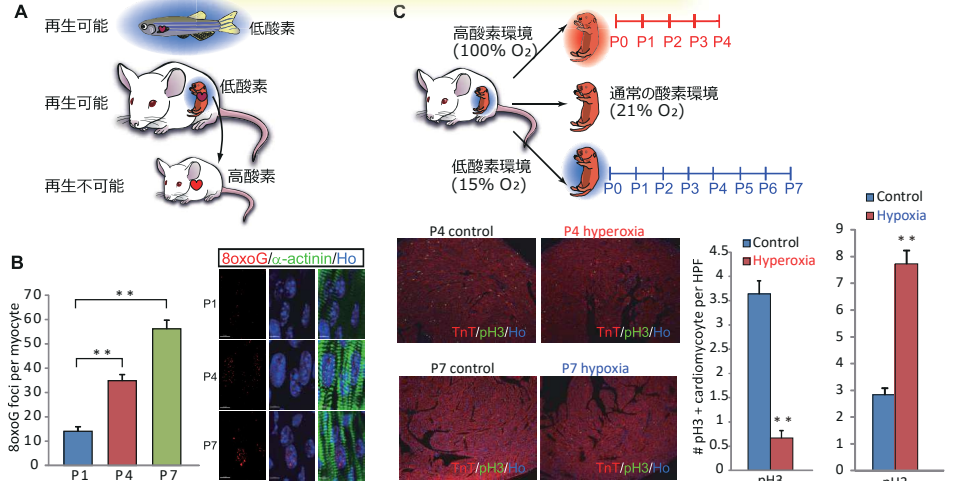


Figure 1. 出生後に心筋細胞は大気中の酸素を利用してミトコンドリア代謝を活性化し、増殖を停止する。(A) 心臓再生可能であるゼブラフィッシュやマウス胎児は低酸素環境に生息しており、心臓再生ができない出生後の哺乳類は大気中の酸素を使う。(B) 酸化 DNA 損傷 (8oxoG) は出生後のマウス心筋細胞で増加する。これはミトコンドリア代謝の活性化によるものである。(C) 高酸素環境 (100% O₂) で飼育されたマウス新生児は心筋細胞増殖停止が早まり、低酸素環境 (15% O₂) で飼育された新生児は細胞周期停止が遅れる (*Cell* 157, 565-579 (2014))

低酸素曝露による心臓再生

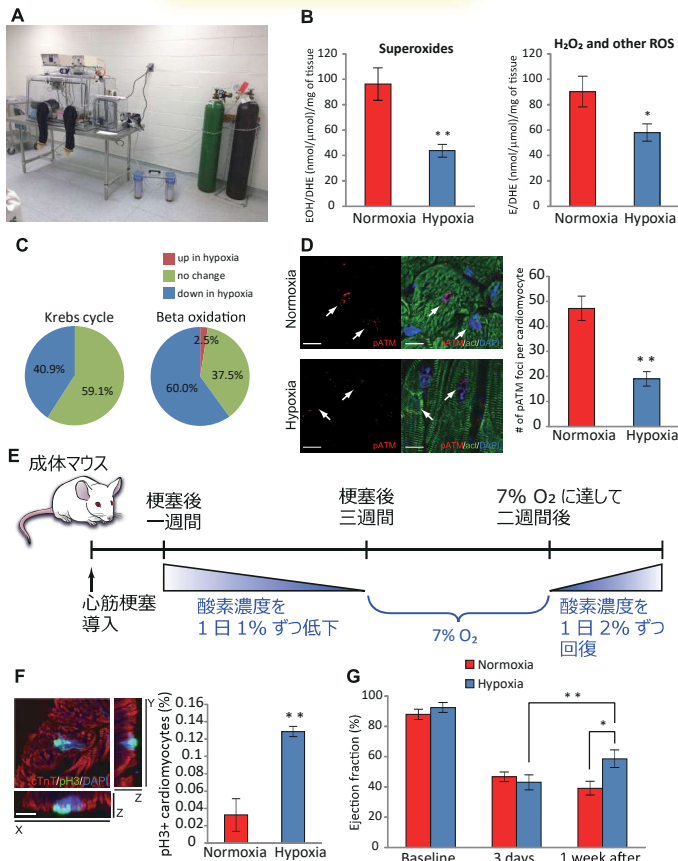


Figure 2. 長期低酸素曝露は成体マウスの心筋細胞増殖と心筋再生を誘導できる。(A) マウス低酸素曝露用チャンセセット。(B) HPLC による心臓の ROS レベル測定。(C) 質量分析によるミトコンドリア代謝 (Krebs cycle)、脂肪酸β酸化に関わる酵素の定量。低酸素曝露後の心臓でコントロールと比較し増加 (up)、変化なし (no change)、減少 (down) で評価。(D) 長期間低酸素曝露により心筋細胞の酸化ストレスが減少する。(E) 心筋梗塞後に 7% 酸素環境に長期間曝露するプロトコル。(F) 低酸素曝露により成体マウスにおいて心筋細胞増殖が誘導される。(G) 低酸素曝露により心機能が回復する (*Nature* 541, 222-227 (2017))。

哺乳類種間比較による分子機構の探索

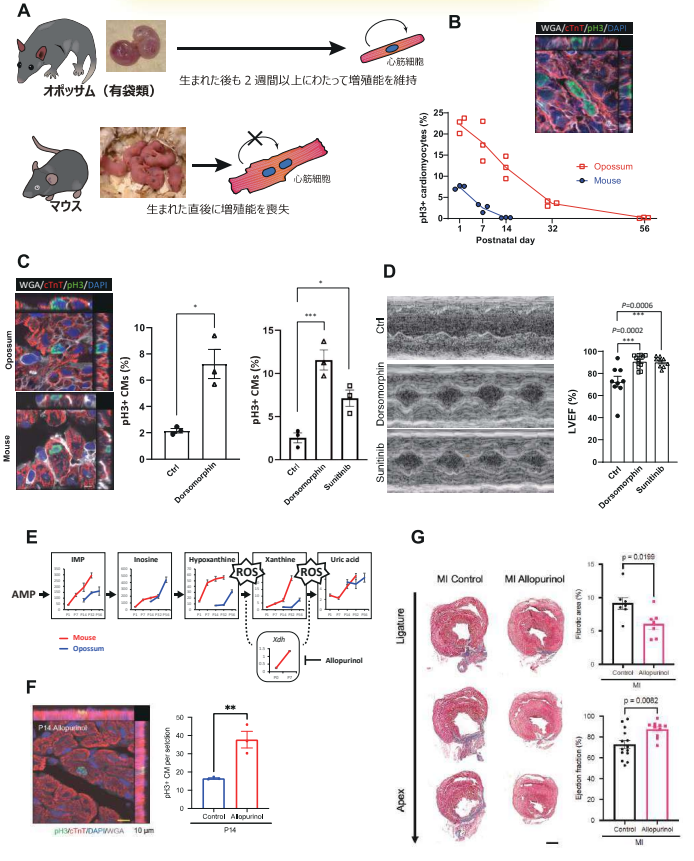
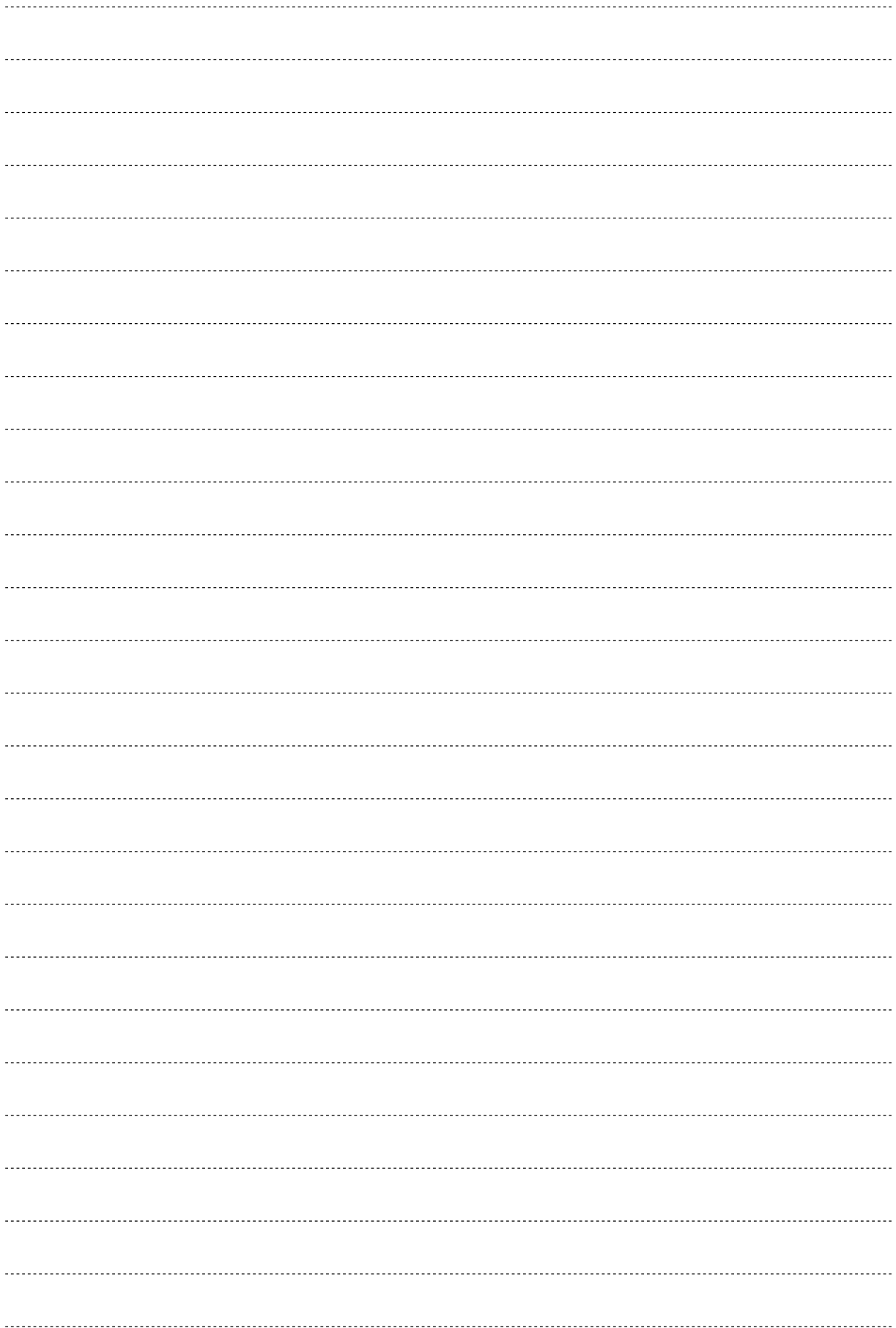


Figure 3. マウスと有袋類オポッサムとの種間比較。(A) 有袋類は出生後に他種哺乳類よりも長期間心筋再生能を維持している。(B) オポッサム新生児は出生後 2 週間以上心筋細胞増殖が継続する。(C) 種間比較により同定した AMPK シグナルが新生児の心筋細胞増殖を停止させる。(D) AMPK 阻害により心筋再生が誘導される (*Circulation* 146, 125-139 (2022))。(E) マウス・オポッサムの出生後心臓でヌクレオチド分解が活性化し、キサンチンオキシダーゼ (XO) を介して ROS が発生する。(F) アロプリノールによる XO 阻害で心筋細胞増殖が誘導される。(G) アロプリノールで心筋再生が誘導される (*Redox Biol. in press*, 特許出願 2024-112591)。





Development of an Effective Type I Photosensitizer by the Self-Assembly of Dimethoxy Quinacridine for Photodynamic Therapy

Hajime Shigemitsu

Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka University

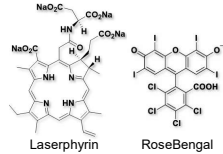
Introduction

Photodynamic Therapy (PDT)

A cancer treatment using light and photosensitizer (PS)

- Administration of photosensitizer
- Photoirradiation
- ROS generation
- Lesion destruction

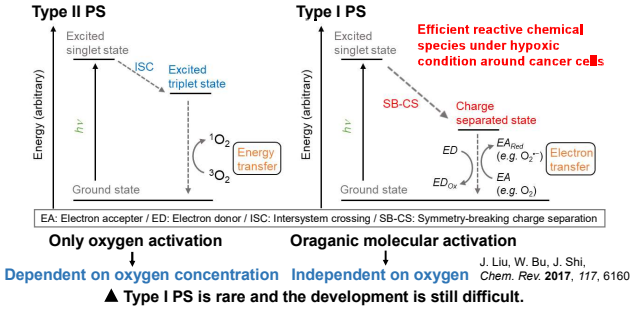
Light
Photosensitizer (PS)
Minimally invasive
Area selectivity



Challenges : PDT effect is suppressed in hypoxic condition around tumor cells.

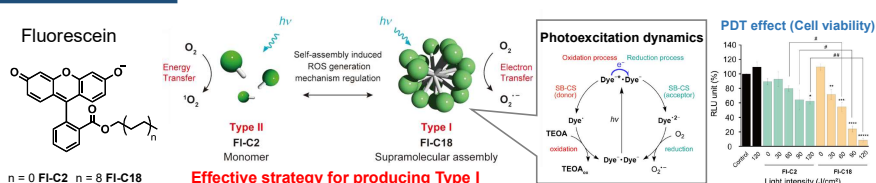
T. Pham, J. Yoon et al., Chem. Rev. 2021, 121, 13454.

Photosensitizer (PS)



Previous work

Supramolecular Type I PS : Induced CS state by self-assembly of fluorescein

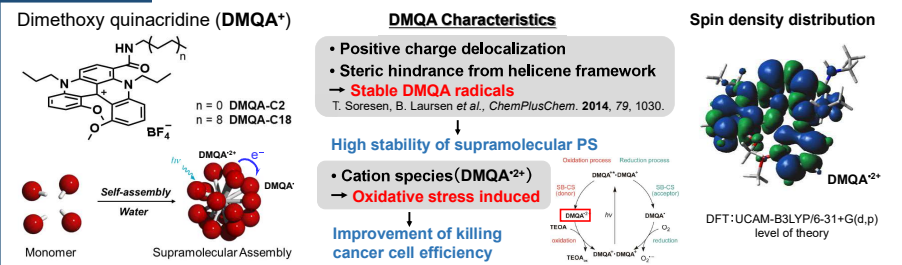


▲ Insufficient PDT effect (High light intensity required)

▲ Low stability of supramolecular PS

This work

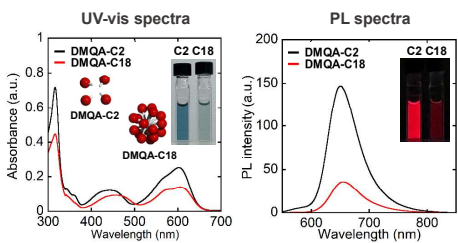
Effective and stable DMQA supramolecular Type I PS for PDT



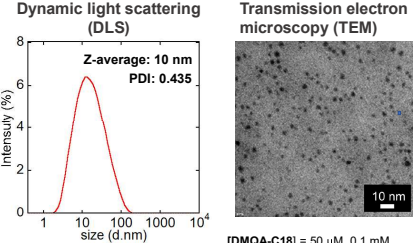
Results and Discussion

1. Self-assembly properties of the DMQA in water

Photophysical Properties of Self-assembly State in Water



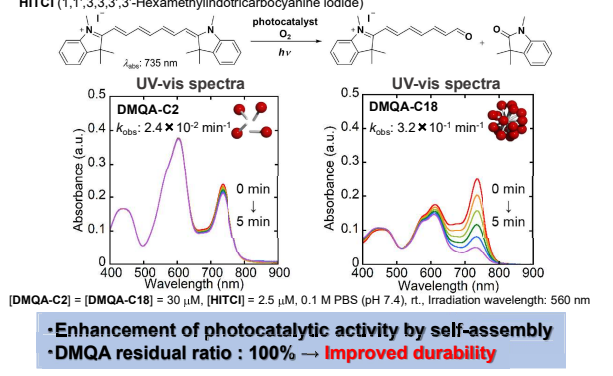
Morphology of Supramolecular Assembly



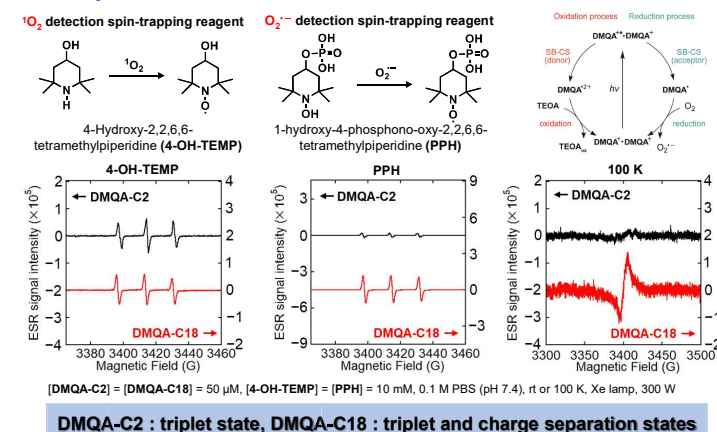
Compound	Solvent	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	Φ_f	τ_f (ns)	k_f (s ⁻¹)	k_{sp} (s ⁻¹)
DMQA-C2	PBS	450, 602	650	0.096	4.3	2.2×10^7	2.1×10^8
DMQA-C18	PBS	455, 606	653	0.034	2.4	1.4×10^7	4.0×10^8

DMQA-C18 forms a spherical supramolecular assembly.

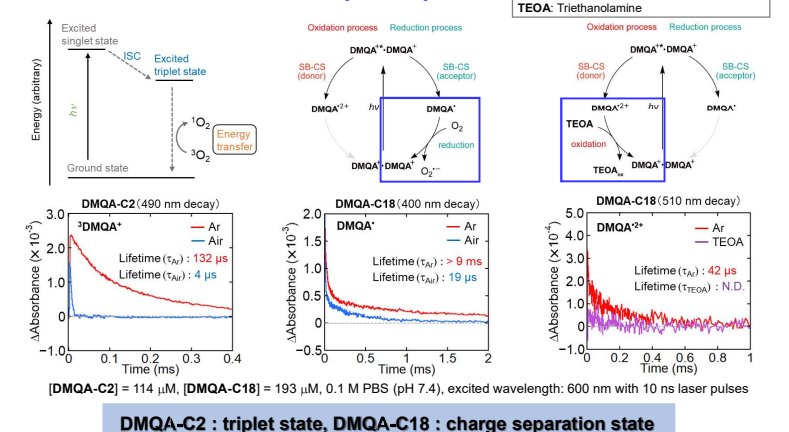
2. Photocatalytic activities of the DMQA in water



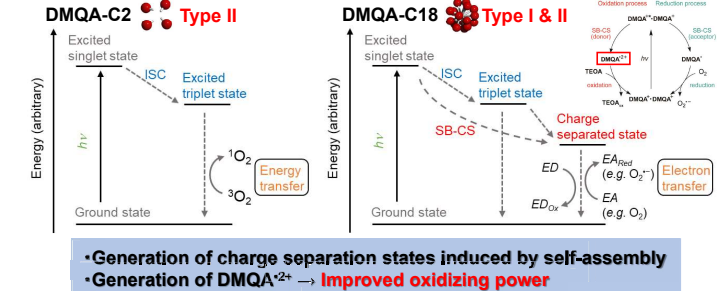
3. Photosensitization mechanism of DMQA-C2 and DMQA-C18 (ESR spectra)



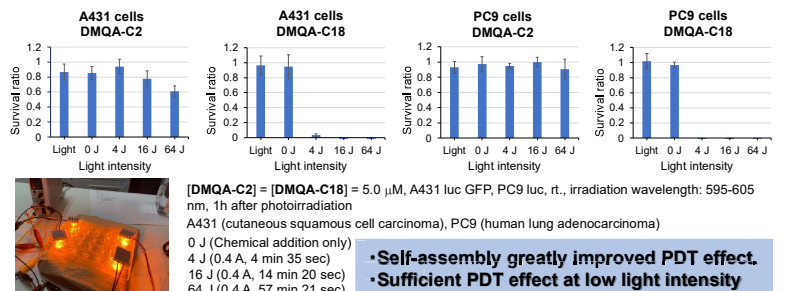
4. Photosensitization mechanism of DMQA-C2 and DMQA-C18 (Nanosecond transient absorption spectra)



5. Proposed photosensitization mechanism



6. PDT effects of DMQA-C2 and DMQA-C18

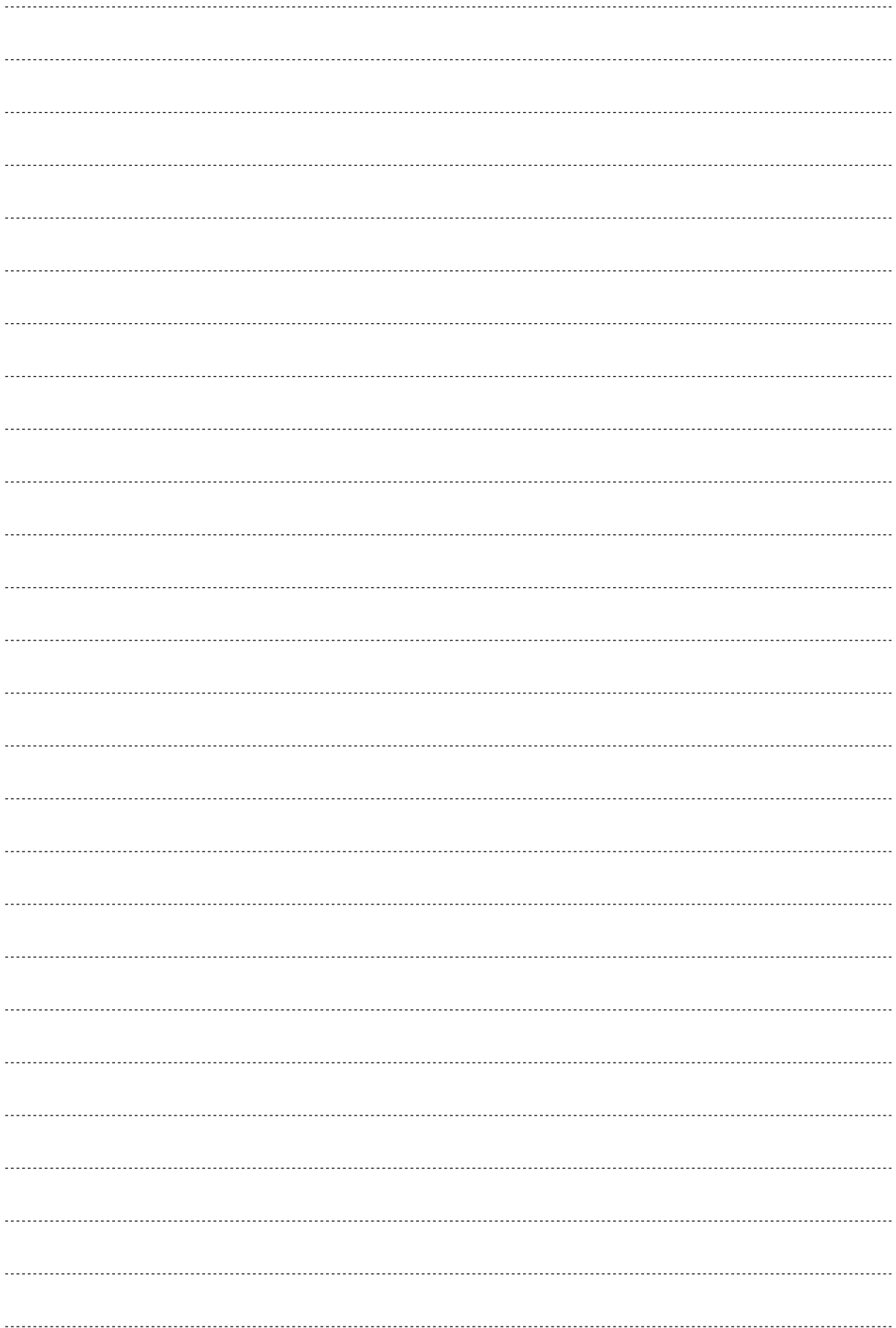


Conclusion

- Supramolecular photosensitizer of an amphiphilic DMQA was successfully developed.
- Photosensitizing mechanism change induced by self-assembly of DMQA was elucidated.
- DMQA-C18 showed an excellent PDT effect on cancer cells.

Acknowledgment

Assessment of the PDT effect
Prof. Kazuhide Sato – Nagoya University Graduate School of Medicine



老化幹細胞制御による再生能力 賦活化機構解明と創薬展開



前川 知樹 (Tomoki Maekawa)

新潟大学大学院医歯学総合研究科高度口腔機能教育研究センター

Introduction

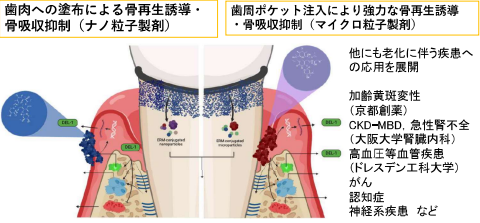
- 老化にともなう組織柔軟性および臓器の再生能力低下によるフレイルは、長寿社会における健康寿命の延伸において解決すべき課題である。生体の優れた治癒および環境への適応能力は老化とともに低下し、容易に外傷や感染症による疾患発症を伴う。加えて老化生体において、疾患治療による十分な組織修復や再生能力が認められない。これら老化に伴う再生と修復機構の破綻メカニズムは未だ不明であり、適切な老化マーカーも存在しない。
- 内因性の抗炎症因子であるDevelopment endothelial locus-1 (DEL-1) は、生体内で恒常的に発現が認められる。
- このDEL-1が、炎症の寛解と組織修復と再生、老化した幹細胞の若返りを促す機能を持つこと、生体作用機構(下左図)を明らかにし、老化性疾患である歯周炎とリウマチ性関節炎および肺炎の病態解明と疾患治療への展開を目指してきた(*Sci Transl Med* 2015, *Nat Commun* 2015, *J Clin Invest* 2017, *JCI Insight* 2020, *J Biol Chem* 2020, 2023, *iScience*, 2024, *Nat Commun*, 2024)。
- DEL-1は若齢において高発現であるが顕著な表現系はなく、ストレスや外傷に対して抵抗性を示す。しかしその発現は老化とともに減少し、老化細胞の蓄積と組織修復再生に対する柔軟性が失われる。
- そこで本研究開発では、老化とともに減少するDEL-1の生体内での機能解明を行うとともに、生体内で安全にDEL-1を誘導できる薬剤を開発し、老化除去および骨再生剤としての展開を試みる。
- これまでに、DEL-1はマクロライド系抗菌薬が誘導することを明らかにしてきた。そこで、抗菌作用を除去したマクロライド系抗菌薬を使用した新しい骨再生剤を開発する。
- 老化に伴う組織の変化とその再生に与えるDEL-1の効果、老齢マウス、サルを使用して解明する。本項目はAMED事業Interstellar Initiativeや外傷に対して抵抗性を示す。しかしその発現は老化とともに減少し、老化細胞の蓄積と組織修復再生に対する柔軟性が失われる。



マイクロ・ナノ粒子化による徐放効果

対象疾患：歯周病などの炎症性骨吸収疾患、老化生体における再生能力賦活化も期待される
対象：ヒトおよび犬・猫などの動物医薬

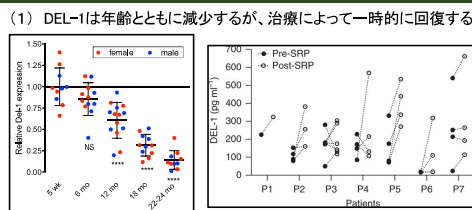
歯肉への塗布による骨再生誘導・骨吸収抑制(ナノ粒子製剤) / 歯肉ポケット注入により強力な骨再生誘導・骨吸収抑制(マイクロ粒子製剤)



Methodology

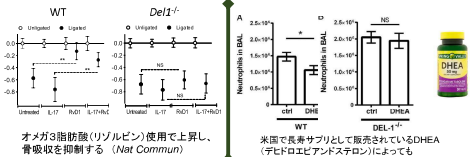
- 14または15員環マクロライド系抗菌薬
 - エリスロマイシン(ERM)
 - クラリスロマイシン(CLR)
 - アジスロマイシン(AZM)
 - マウス: C57BL/6N male mic, Pdx1^{Cre}/Deltflox^{flx}/VE-Cadherin^{Cre}/Deltflox^{flx}, EC-Del-1-Tg, CD73KO, CD73^{Ec-Del-1-Tg}
 - マウス: C57BL/6J male mice
 - 77-80 Weeks: Aged mice
 - Wild-type: Intraperitoneal injection (IP) of macrolides
 - Del1^{-/-}: Intraperitoneal injection (IP) of macrolides
 - 77-80 Weeks: Daily IP injection of macrolides for 9 days
 - 90 Weeks: Euthanization & sample collection
- Sample collection: Dry maxillae, Gingiva, Maxillae, Extracted molars, Femurs
- (1) Bone analysis: Measure distance from cementoenamel junction (CEJ) to alveolar bone crest (ABC)
 - (2) RT-PCR: DEL-1 gene expression, Osteogenic gene expression
 - (3) Immunofluorescence
 - (4) Staining
 - (5) Osteogenic differentiation: Primary mouse PDL cells (PDLc)
 - (6) Osteoclastogenesis assay: Primary mouse osteoclast precursors

Results



マウスの骨髄中のDEL-1発現は年齢とともに減少する(J Biol Chem)

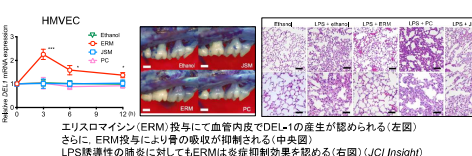
歯髄のDEL-1は治療(SRP)によって改善が認められる(Nat Immunol)



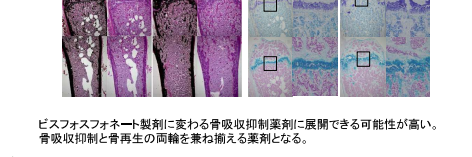
DEL-1の発現誘導は・・・??

オメガ3脂肪酸(リポリン)使用で上昇し、骨吸収を抑制する (Nat Commun)

しかし誘導効率はそれほど高くなかった。そこで免疫調整作用のあると言われているマクロライド系抗菌薬を試みたところ・・・



エリスロマイシン(ERM)投与にて血管内皮でDEL-1の産生が認められる(左図) 同時に、ERM投与により骨の吸収が抑制される(中央図) LPS誘導性の肺炎に対してもERMは炎症抑制効果をもつ(右図)(*JCI Insight*)



ビスフォスフォネート製剤に変わる骨吸収抑制剤に展開できる可能性が高い。骨吸収抑制と骨再生の両輪を兼ね備える薬剤となる。

AMED-BINDS

18種類の効果の高い誘導薬を同定

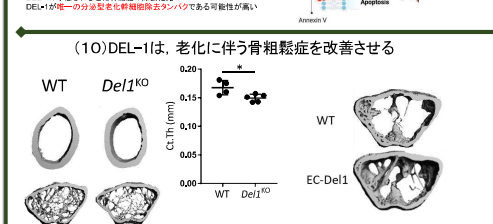
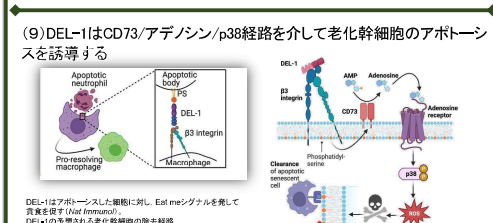
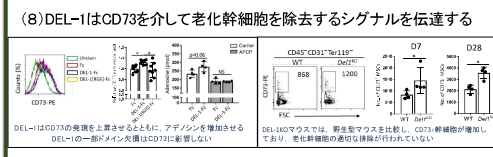
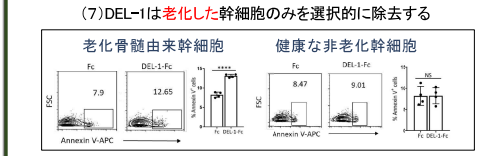
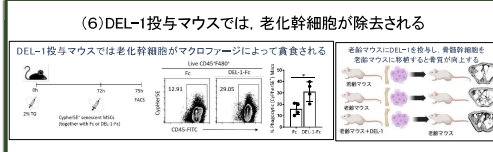
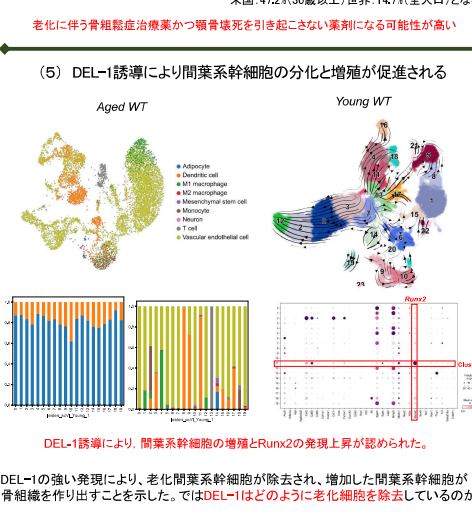
- A薬: 骨再生に特に強い効果を持つ
- B薬: 骨吸収抑制に特に強い効果をもつ
- C薬: 骨代謝にマイルドな効果をもつ

破骨細胞にアポトーシスを引き起こすことで骨の吸収を抑制する薬剤であり、骨形成促進ではない。骨粗鬆症への治療で第一選択薬。他にも抗RANKL抗体のデキサメタゾンや副甲状腺ホルモン(PTH)製剤のデリパラチドがあるが、使いにくい。

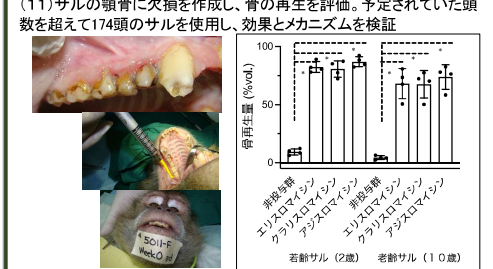
腎臓への負担が大きい。抜歯等による顎骨壊死が起きる。

歯周病は国内に398万人、骨粗鬆症は1280万人に及ぶ。海外患者数も多く、全世界、米国、EUなど：リウマチ関節炎は人口の0.6~1.0%程度。歯周病は米国：47.2%(30歳以上)世界：14.7%(全人口)となる。

老化に伴う骨粗鬆症治療から顎骨壊死を引き起こさない薬剤になる可能性が高い



DEL-1は、上記経路を活性化することで、老化間葉系幹細胞を生体内から除去し、加えて間葉系幹細胞の増殖と骨芽細胞への分化を促進する。



DEL-1は、上記経路を活性化することで、老化間葉系幹細胞を生体内から除去し、加えて間葉系幹細胞の増殖と骨芽細胞への分化を促進する。

Conclusion

健康寿命の増進・組織の再生・再生修復能力の増強

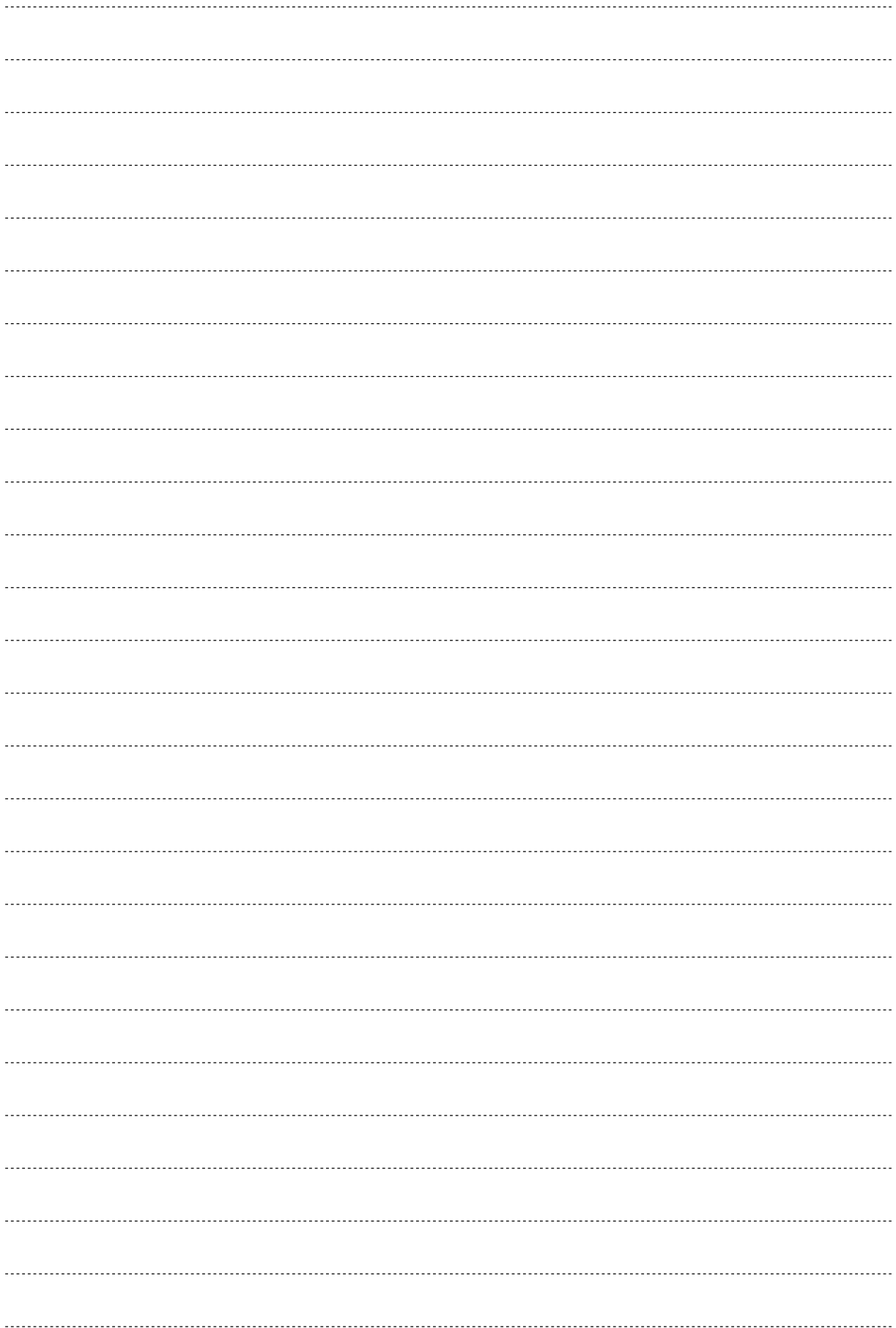
老化 再生修復能力の低下、老化幹細胞の増加、フレイルの拡大、組織柔軟性の低下

若返り 再生修復機構賦活化

- 短期的骨吸収抑制もしくは長期的骨再生など用途に応じた使用方法が可能
- 世界初の歯周病治療用動物医薬品となる可能性
- BRONJなどの顎骨壊死を引き起こさない
- 既存の再生療法(IPSや組織幹細胞移植等)の効果を高める
- 既存の再生療法を老化生体においても機能させることができる
- 若齢の健康体ではDEL-1は常時発現しているため、誘導薬によるDEL-1誘導への明らかな副作用はない
- 組織特異的に老化幹細胞を除去できる可能性が高い

Macrolide-Del-1 Driven Bone Regeneration: A Novel Research Insight

The discovery of the novel macrolide-Del-1 with aid of the development of novel treatment strategies for bone loss disorders



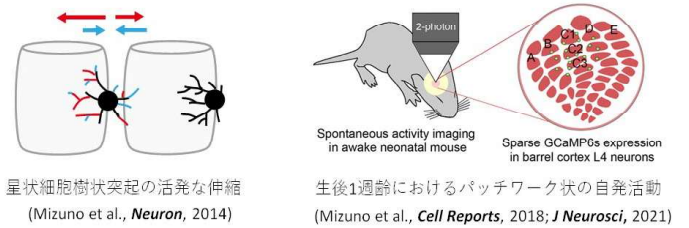
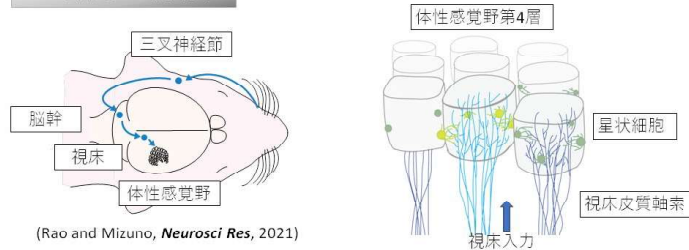
1. 要旨

発達期の脳神経回路形成においては、外界の入力によらない神経活動（自発活動）が重要な役割を果たしている。しかし、どのようなパターンの自発活動が神経回路形成に関わるかは未だ不明な点が多い。これを解明するため、自発活動パターンと樹状突起の成熟過程の関連を調べた。

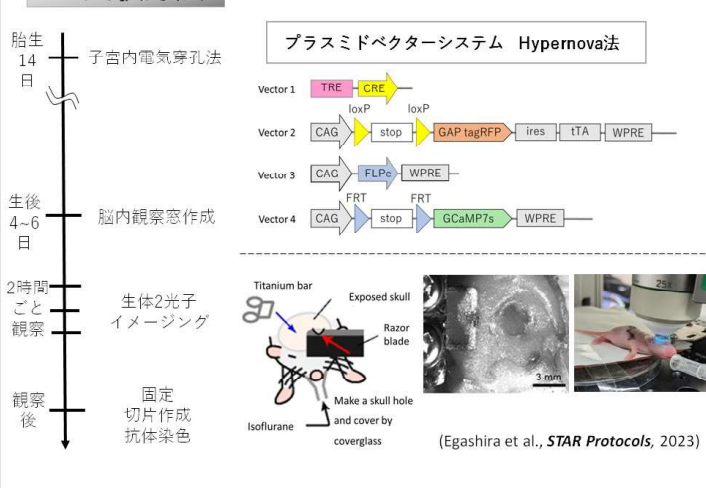
実験では、回路発達モデルとして広く用いられている生後1週齢の体性感覚野バレル領域を解析した。自発活動パターンと樹状突起伸縮を同時観察するため、遺伝的カルシウムインディケータGCaMPと赤色蛍光蛋白質RFPを発現し、生体2光子顕微鏡タイムラプスイメージングを行った。

その結果、自発活動の頻度が高い細胞では、樹状突起が安定する傾向が得られた。以上は、大脳皮質神経回路形成に適切な神経活動パターンに関わる可能性を示している。

2. 研究の背景

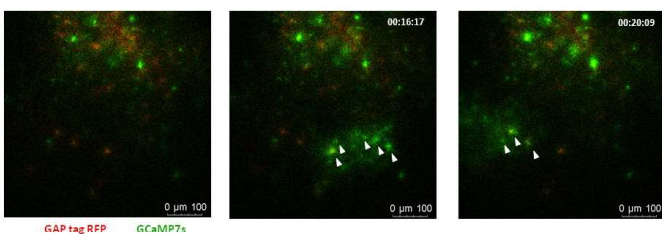


3. 実験方法

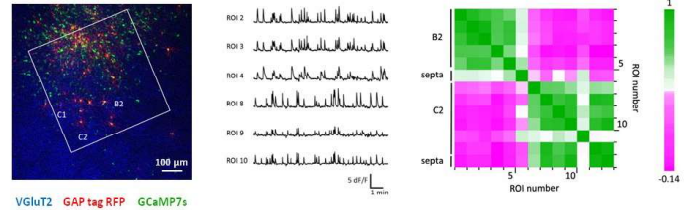


4. 結果

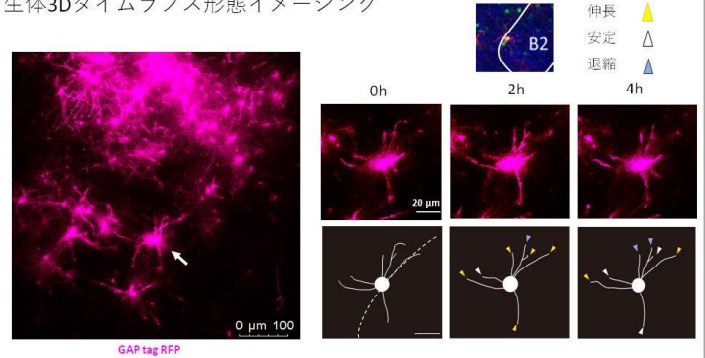
Hypernova法で標識された星状細胞の生体カルシウムイメージング



GCaMP7s シグナルの解析



生体3Dタイムラプス形態イメージング

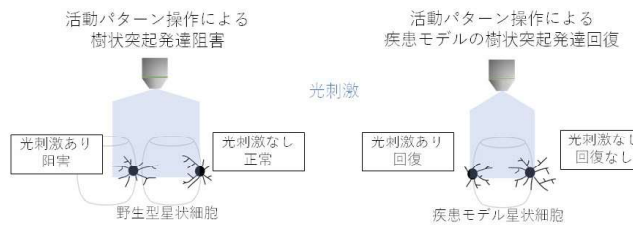


神経活動パターンと樹状突起発達の相関



5. 今後の研究

光遺伝学を用いた活動パターンの制御による因果関係の解明



6. まとめ

- Hypernova法により異なる疎らな細胞群に任意の遺伝子を発現できる。
- 大脳皮質第4層における神経活動と形態変化の同時生体2光子イメージングに成功した。
- 活動量の高い星状細胞では樹状突起形態が安定化する。

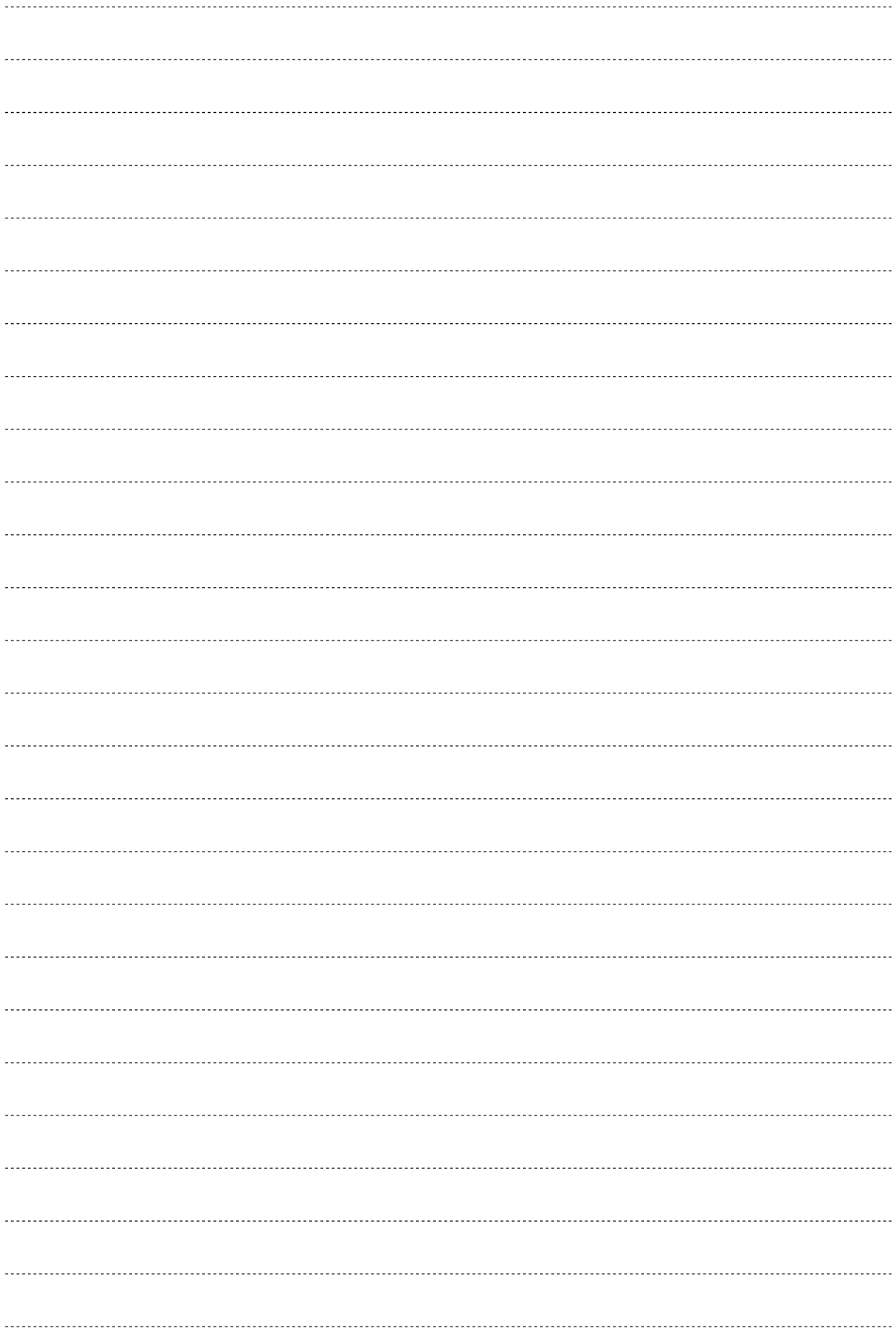
謝辞・COI

・ Senri Life Science Foundation
 ・ Transformative Research Areas (B) (22H05094) ・ KAKENHI (16H06143, 20K06876, 24K03266) ・ Naito Foundation ・ Takeda Science Foundation ・ Uehara Memorial Foundation ・ Kato Bioscience Foundation ・ Kowa Life Science Foundation ・ Research Foundation for Opto-Science and Technology ・ Ichiro Kanehara Foundation ・ Narishige Neuroscience Research Foundation
 Dr. Carl Petersen in EPFL and Dr. Keita Tamura in Univ. Cambridge for in vivo optogenetics.



令和4年度 文部科学省 学術変革領域研究(B)
 「脳多元自発活動の創発と遷移による脳のデザインビルド」
 Grant-in-Aid for Transformative Research Areas (B)
 "Design-build of Brain by Multidimensional Spontaneous Activity"

I have no COI with regard to the presentation.



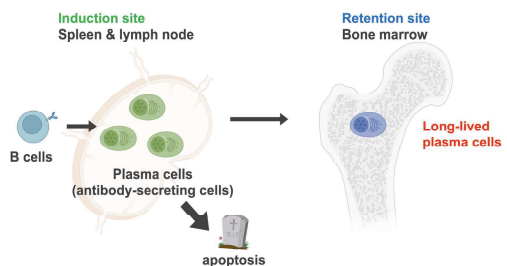
Plasma cell KLF2 expression at the induction site directs migration to the bone marrow

Wataru Ise*, Takuya Koike*, Nozomi Shimada, Hiromi Yamamoto, Yuki Tai, Taiichiro Shirai, Ryoji Kawakami, Mana Kuwabara, Chie Kawai, Takeshi Inoue, Nozomi Hojo, Katsuyuki Shiroguchi, Kazuhiro Suzuki, and Tomohiro Kurosaki

*equal contribution

IFReC, CiDER, and CAMaD (Osaka University)
IMS (RIKEN)
UTOPIA (The University of Tokyo)

Introduction



The question of what are the key determinants of plasma cell longevity remained unanswered.

Results

Fig. 1 Plasma cell subsets in secondary lymphoid organs can be distinguished by the expression of integrin $\beta 7$

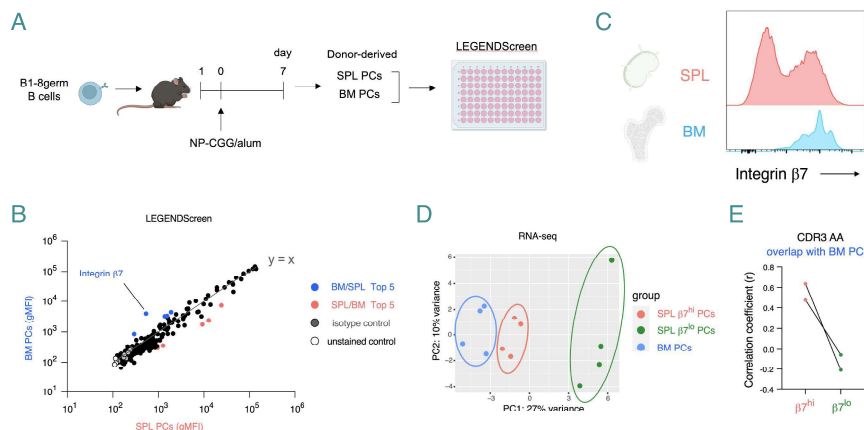


Fig. 3 S1PR1 is a downstream effector molecule of KLF2 for plasma cell egress

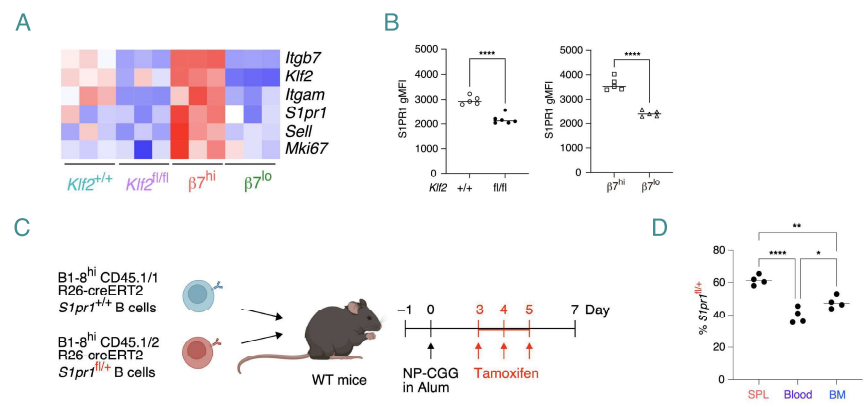
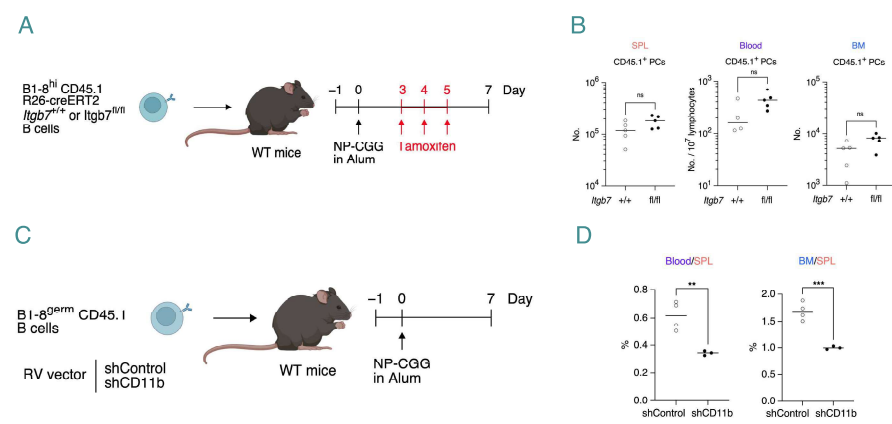


Fig. 5 CD11b contributes to plasma cell egress from spleen.



Conclusion

Integrin $\beta 7^{\text{hi}}$ marks plasma cells prone to home to the bone marrow, whereas integrin $\beta 7^{\text{lo}}$ cells remain in secondary lymphoid organs.

Integrin $\beta 7^{\text{hi}}$ plasma cells had a higher expression of the KLF2 transcription factor, the loss of which resulted in defective egress by down-regulating S1PR1 and CD11b.

Disruption of plasma cell egress results in defective antibody durability, thereby making mice more susceptible to influenza re-infection.

The instructions for plasma cell longevity are, at least in part, set at their induction site.

Ise*, Koike* et al., *J. Exp. Med.*, in revision.

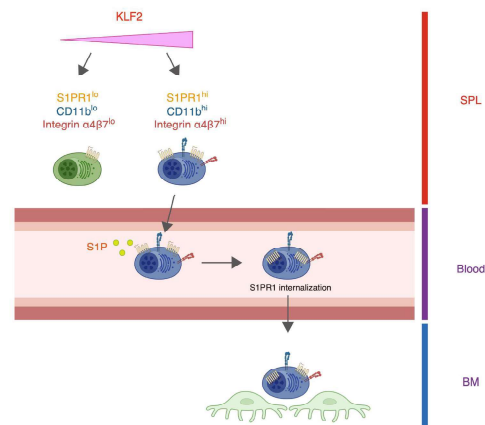


Fig. 2 Requirement for KLF2 in the egress of plasma cells from secondary lymphoid organs

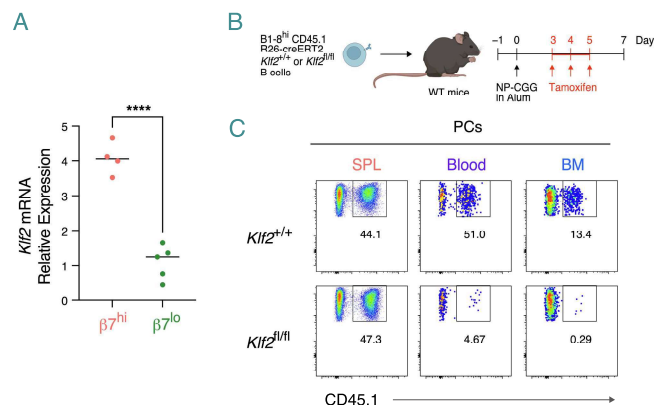


Fig. 4 Klf2 is dispensable for the migration from blood to BM

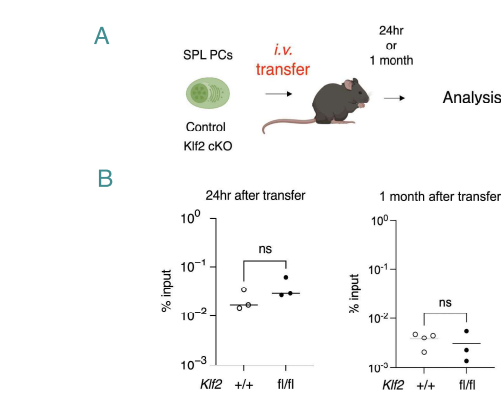
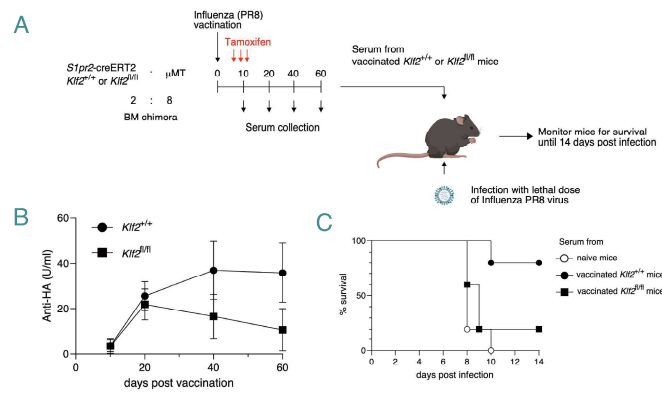
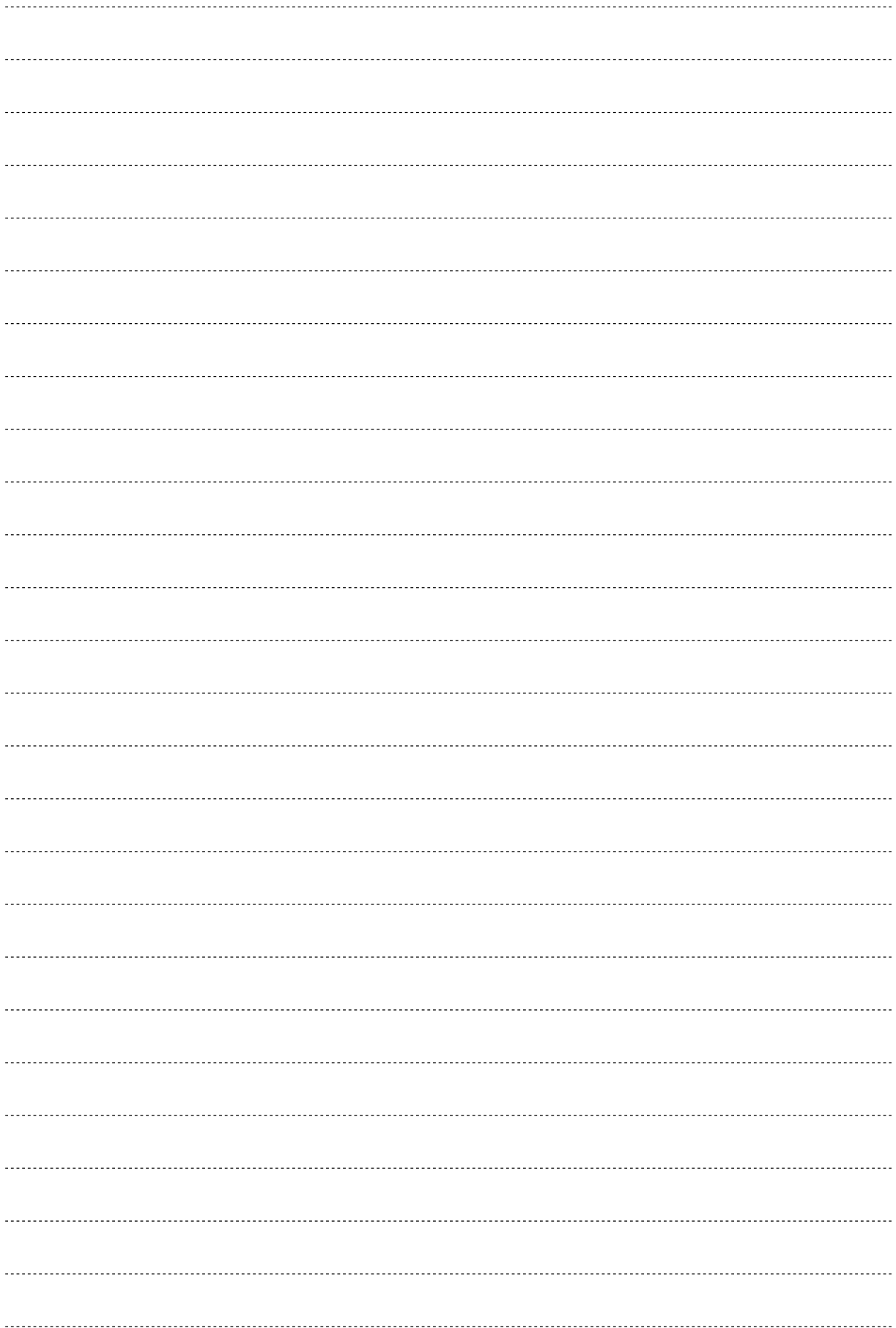


Fig. 6 Biological significance of plasma cell migration to bone marrow





ファージ由来溶菌酵素エンドライシンによる新規疾患制御法の開発

大阪公立大学大学院医学研究科 ゲノム免疫学/メタゲノム解析研究センター
藤本 康介

<研究の背景>

腸内細菌叢研究に対する高まる関心

腸内細菌叢は宿主と共生する微生物の集合体であり、宿主の健康に大きな影響を及ぼす。腸内細菌叢のバランスが崩れると、さまざまな疾患の原因となる。

腸内細菌叢の構成異常 (dysbiosis)

腸内細菌叢の構成異常 (dysbiosis) は、有益な細菌の減少と有害な細菌の増加を特徴とする。これは、腸管免疫の低下や炎症の促進につながる。

腸内共生病原菌 (pathobiont)

腸内共生病原菌 (pathobiont) は、通常は無害な細菌ですが、免疫機能が低下した宿主では有害な作用を示す可能性があります。

腸内細菌叢を標的とした新規治療法の創出

腸内細菌叢を標的とした新規治療法の創出は、ファージを用いた細菌の選択的除去を通じて実現されます。

独自のファージゲノム解析プロトコルを開発

独自のファージゲノム解析プロトコルを開発し、高精度でファージゲノムを解析できるようになりました。

次世代のメタゲノム創薬

次世代のメタゲノム創薬は、メタゲノム解析から新たなファージ由来の酵素やタンパク質を発見し、創薬に活用します。

グラム陽性菌に対する新しいファージ創薬

グラム陽性菌に対する新しいファージ創薬は、これらの細菌に特異的に結合するファージを開発することで実現されます。

<同種移植と腸内細菌について>

同種移植で gut dysbiosis が起こる

同種移植 (ドナー由来) は、受容者の腸内細菌叢を乱れ、腸管免疫を低下させる可能性があります。

腸内の Enterococcus 属細菌が同種移植後に増加する

同種移植後、腸管内の Enterococcus 属細菌の割合が増加し、腸管免疫を抑制する傾向があります。

腸内の Enterococcus 属細菌が増えると GVHD 関連死亡率が増加する

腸内の Enterococcus 属細菌の増加は、GVHD 関連死亡率の向上と強く関連しています。

腸管免疫と症状

腸管免疫の低下は、GVHD の典型的な症状 (皮膚発疹、下痢、肝臓障害) を引き起こす原因となります。

同種移植において、Enterococcus 属細菌を選択的に減らすことで GVHD 発症および GVHD 関連死亡率を減らすことができるのではないかと考えられています。

<移植片対宿主病に対するエンドライシンを用いた新規治療法について>

1. 46 症例の同種移植患者のうち 30 症例で Enterococcus 属細菌が増加

同種移植患者の腸内細菌叢を解析すると、Enterococcus 属細菌の増加が観察されました。

2. 患者糞便由来の E. faecalis の単離

患者の糞便から E. faecalis を単離し、そのゲノムを解析して特徴的な変異を特定しました。

3. 患者糞便由来の E. faecalis は VRE ではない

患者糞便由来の E. faecalis は、Vancomycin 耐性 (VRE) を持たないことが確認されました。

4. 患者由来の E. faecalis (強毒株) は急性 GVHD 関連死亡率を増加させる

患者由来の E. faecalis (強毒株) の存在は、急性 GVHD 関連死亡率の増加と関連しています。

5. E. faecalis 特異的な新規溶菌酵素の同定

E. faecalis 特異的な新規溶菌酵素 (エンドライシン) を同定し、その効果を実験的に検証しました。

6. E. faecalis 特異的な新規溶菌酵素は バイオフィルムを溶解する

E. faecalis 特異的な新規溶菌酵素は、腸管内の E. faecalis バイオフィルムを効果的に溶解します。

7. E. faecalis 特異的な溶菌酵素を投与することで GVHD の死亡率が大幅に改善する

E. faecalis 特異的な溶菌酵素の投与は、GVHD の死亡率を大幅に低下させました。

8. E. faecalis 特異的な溶菌酵素を投与することで GVHD の死亡率が大幅に改善する

個々の患者レベルでも、E. faecalis 特異的な溶菌酵素の投与は生存率向上に寄与しました。

9. E. faecalis 特異的な溶菌酵素を投与することで腸管内の cytotoxin 陽性 E. faecalis (毒性の強い E. faecalis) は減少する

腸管内の毒性の強い E. faecalis (cytotoxin 陽性) の数は、溶菌酵素投与後に減少しました。

<まとめ>

- 造血幹細胞移植患者の腸管内で毒性の強い腸内細菌 (cytotoxin 陽性 E. faecalis) を同定した
- この腸内細菌 (cytotoxin 陽性 E. faecalis) はバイオフィルムを形成し、腸管内で増加していることが明らかとなった
- メタゲノム解析から同定したファージ由来の溶菌酵素 (エンドライシン) は、cytotoxin 陽性 E. faecalis 特異的に溶菌することが明らかとなった
- エンドライシンの投与が移植片対宿主病 (GVHD) の悪化を抑制し、死亡率を大幅に改善すること (約 5 割 → 約 9 割) をマウスモデルで示した
- 現在臨床応用に向けたエンドライシン製剤の開発を進めている
- cytotoxin 陽性 E. faecalis と GVHD の発症率および重症度について大規模な多施設共同臨床研究を行う予定としている

Enterococcus Phage-Derived Enzyme Shows Promising Activity Against Biofilm-Forming Enterococcus faecalis

Acute graft-versus-host disease (aGVHD) is a common immunological reaction to patients who undergo allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HCT).

Study design: Faecal samples (n = 171) of patients after allo-HCT (n = 66) were analyzed for microbial composition and Enterococcus species.

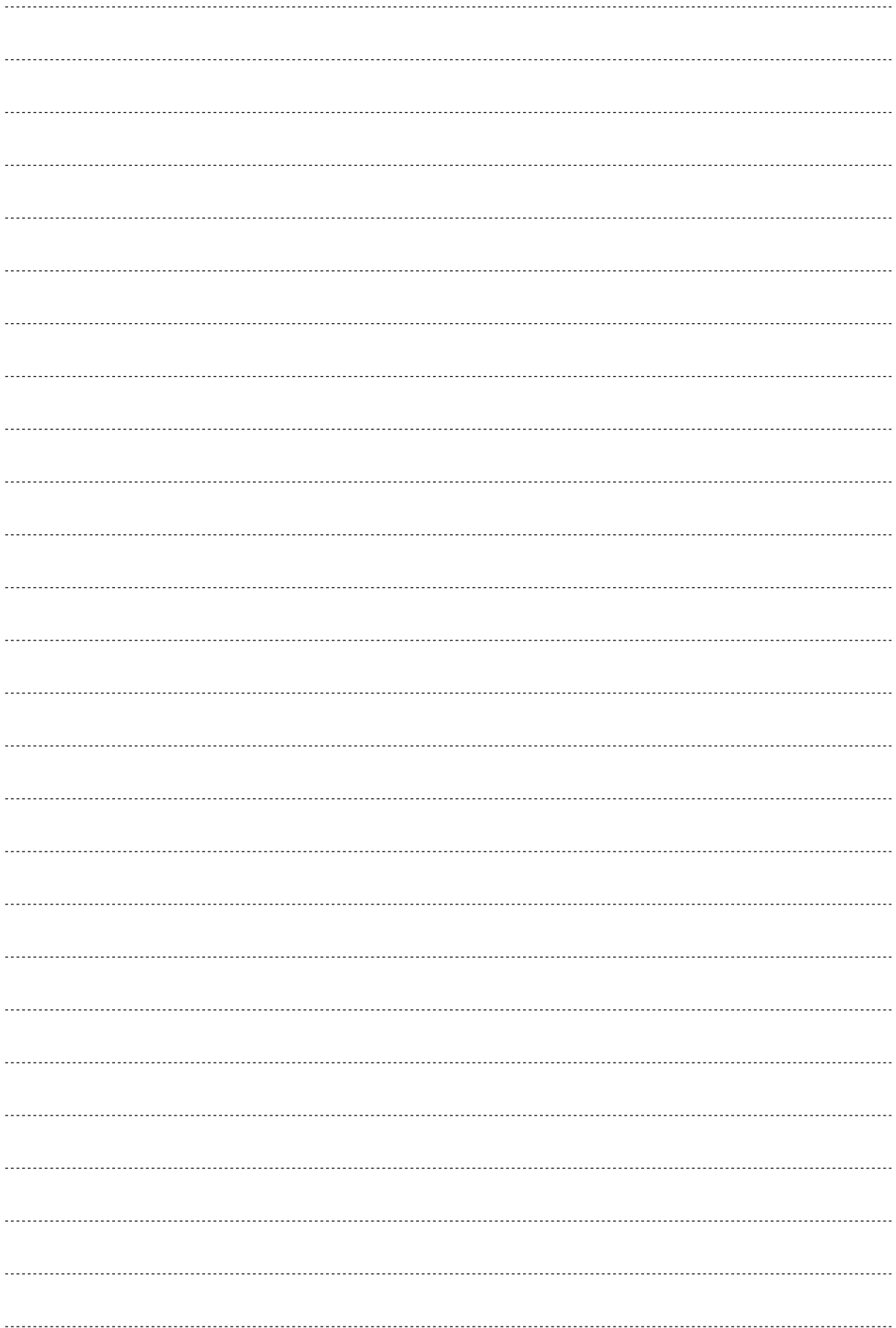
Microbial composition and characterization: 11 strains of E. faecalis and 10 strains of E. faecium were identified. E. faecalis strains were capable of forming antibiotic-resistant biofilms.


Endolysin discovery and activity: Endolysin treatment in Enterococcus faecalis biofilms was effective in reducing bacterial load.

Endolysin treatment in aGVHD mice: Humanized mice capable of forming Enterococcus faecalis-associated biofilms were used to test the efficacy of the phage-derived enzyme.

Endolysin shows promise for treating aGVHD and other antibiotic-resistant infections caused by E. faecalis.

大阪公立大学 東京大学医学部研究科





公益財団法人 千里ライフサイエンス振興財団
〒560-0082 大阪府豊中市新千里東町1-4-2
千里ライフサイエンスセンタービル20階
TEL:06-6873-2006 FAX:06-6873-2002
E-mail: smp-2022@senri-life.or.jp
URL: <https://www.senri-life.or.jp/>