

論文の内容の要旨

論文題目 脂肪体キヌレニン代謝による遠隔的組織修復制御機構の解明

氏 名 樫尾 宗志朗

【序論】

組織修復は個体が損傷した際に発動される生体防御システムであり、傷害部位からの壊疽や感染、臓器の機能不全、ひいては個体死を防ぐ上で不可欠な恒常性維持機構である。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・神経系を始めとした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。組織間相互作用が組織修復にも寄与するという報告はあるものの、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や体内環境についての理解は依然として立ち後れている。組織間を繋ぐ媒介として体液が挙げられるが、体液に含まれる代謝産物は体内環境を理解する上で重要な指標となる。代謝は生命を生命たらしめる要素の一つであり、代謝経路はすべての生物で広く保存されている。代謝産物は菌や植物において、細胞間コミュニケーションを担う媒介因子としても用いられていることから、組織間のやり取りを担うことが期待される。しかしながら、組織修復を全身性の代謝という切り口から捉えた研究はほとんどなく、未だその全貌は明らかになっていない。そこで本研究では、ショウジョウバエにおける組織修復の系および代謝産物の解析と遺伝学とを組み合わせることによって、全身性の代謝制御がどのように組織修復に寄与するのか、その分子機構の解明を目指した。

【方法と結果】

1. 組織修復初期においてトリプトファン-キヌレニン代謝の変化が脂肪体で誘導される

組織非自律的な分子メカニズムの解明には、「どの組織で」「どのような物質が」「どのように働くか」を明らかにする必要がある。そのためには、組織傷害と独立した非傷害組織特異的な機能解析を体液性因子に関して網羅的に行うことが望ましい。しかしながら、傷害部位と異なる組織特異的な遺伝学的操作は、これまでほとんど行われていないのが実情である。その理由の一つとして、系の構築が難しいことが指摘できる。たとえばイモリやゼブラフィッシュなどの高い再生能を示す個体において組織修復の研究が行われているが、組織特異的な遺伝子操作は容易ではない。また、組織傷害の誘導は組織の切除といった実

験者の手技に依存する場合がほとんどである。以上のような研究状況を鑑み、私は本学修士課程において温度感受性ジフテリア毒素 A ドメイン(DtA^{ts})とショウジョウバエ翅成虫原基を用い、温度変化による一過的な組織傷害の系を確立した⁽¹⁾。幼虫に存在する翅成虫原基は再性能を持つ事が古くから知られ、組織修復の研究に用いられてきた。翅成虫原基は変態を経て成虫における翅となり、修復の度合いを原基や翅の形態を指標に簡便に検討できる。この組織における遺伝学的傷害を QF/QUAS システムによって誘導し、非傷害組織特異的な遺伝学的解析を Gal4/UAS システムを用いて行うことによって、遠隔的な組織修復に寄与する組織と遺伝子の機能解析が可能となる。

組織修復に寄与する体液性因子を同定するため修復初期の個体から体液を回収し CE-TOF-MS によるメタボロミクス解析を行った。その結果 192 の代謝産物が検出され、特にアミノ酸に着目したところ、必須アミノ酸の一種であるトリプトファン(Trp)の量が傷害を受けた個体の体液中で高くなっていることが判明した。哺乳類において Trp の多くは肝臓でキヌレニン(Kyn)に代謝され、キヌレン酸(KynA)やヒドロキシキヌレニン(3-HK)を産生する。Trp-Kyn 代謝経路の産物は神経や免疫、がんの増殖など、様々な生命現象に寄与することが報告されている。しかしながら、組織修復の文脈における報告はなされていない。ショウジョウバエにおいては、脂肪体と呼ばれる組織が肝臓と白色脂肪組織と同様の役割を担っている。Trp-Kyn 代謝の律速酵素である *vermilion* (*v*)の遺伝子発現は脂肪体で高く検出され、これは哺乳類の orthologue である Tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO)の肝臓における発現の高さと一致する。*vermilion* の発現量を脂肪体内で調べたところ、傷害後 6 時間において傷害を受けた個体で高いレベルを示した。これらの結果より、体液中の Trp レベルと脂肪体 Trp-Kyn 代謝の状態が翅成虫原基における修復初期の段階で変化していることが示された。

2. 脂肪体内における Trp-Kyn 代謝の抑制は翅成虫原基の修復を阻害する

脂肪体における *vermilion* の発現量差の生理的な意義を検証するために、脂肪体特異的なノックダウンを組織傷害と並行して行った。傷害を受けていない個体は正常な翅の形態を示した一方、傷害を受けた個体では *vermilion* のノックダウンによって翅の異常な表現型が見られた。これらの結果より、脂肪体特異的な Trp-Kyn 代謝の抑制は翅の正常発生に対して明らかな影響は与えないものの、組織修復を阻害することが分かった。加えて翅成虫原基を観察したところ、傷害後 0 時間では顕著な差は見られなかったが、30 時間後には脂肪体特異的な *vermilion* のノックダウンによって翅成虫原基のモルフォゲン Wingless (Wg)の再構築の不全が観察された。さらに、Trp-Kyn 代謝抑制による修復阻害の際にどのような変化が翅成虫原基において起こっているかを調べるため、組織染色による観察を死細胞や細胞

骨格について行った。その結果、活性型実行カスパーゼ Dcp-1 によって標識される死細胞が基底側から排除されることなく、組織内に蓄積されることが判明した。加えて修復不全が見られる翅成虫原基において、F-actin で示される上皮組織の湾曲などの形態異常が見られた。これは、Trp-Kyn 代謝が死細胞の排除様式もしくは組織のリモデリングに影響を与えていることを示唆する。以上より、脂肪体特異的な Trp-Kyn 代謝の制御が遠隔的に翅成虫原基の修復に寄与することが明らかになった。

3. 脂肪体における KynA の産生が翅成虫原基の修復に寄与する

組織修復における責任因子の同定のために、LC-MS/MS を用いて体液中の Trp-Kyn 代謝産物を測定した。結果、体液中の KynA の量が傷害後 6 時間で高くなっていることが判明した。KynA は Trp-Kyn 代謝の最終産物の一つであり、哺乳類では神経活動の抑制や免疫細胞の機能に影響を与える因子として知られている。KynA の修復への寄与を検証するために、脂肪体特異的な KynA の産生抑制を産生酵素である CG6950 遺伝子のノックダウンによって行ったところ、*vermilion* のノックダウン同様に Wg の再構築に異常が見られた。

さらに、Trp-Kyn 代謝の修復への寄与が組織非自律的なものであるかを確認するために、傷害部位において代謝酵素のノックダウンを行った。その結果、傷害部位における Kyn、3-HK、KynA の産生酵素に対する RNAi は翅の正常発生に影響を与えず、また傷害を受けた個体においても翅の表現型を悪化させるものではなかった。以上より、脂肪体特異的な KynA 産生の制御が遠隔的に翅成虫原基の修復に寄与することが判明した。

【まとめと考察】

本研究ではショウジョウバエ遺伝学と代謝産物の解析を基に、脂肪体で産生された KynA が体液中に分泌され、遠隔的に翅成虫原基の修復に寄与することを明らかにした。これは局所的な組織傷害を離れた組織が感知し修復過程を支えるという、全身性の制御機構の存在を支持するものである。既存の研究において KynA は、前述した免疫や神経への関与の他に、虚血時の心臓への傷害を緩和する保護作用を有することがマウスを用いた研究で報告されている。本研究において、KynA は組織の保護作用にとどまらず、傷害後の修復への寄与することが新たに明らかになった。一方、KynA がどのように修復に寄与するのかという具体的な分子メカニズムは未だ解明されていない。KynA は NMDA 受容体、 $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine ($\alpha 7$ -nACh) 受容体、aryl hydrocarbon 受容体、orphan GPCR の一種である GPR35 に結合することが報告されており、今後受容体をターゲットとしたさらなる研究が必要であると言える。加えて、KynA の代謝経路は哺乳類においても保存されているため、同様の修復制御機構が種を超えて機能している可能性も期待される。また無脊椎動物における脂

肪体や脊椎動物における肝臓は、代謝や解毒などの様々な機能を司る臓器であることが知られているが、本研究は肝臓の新たな生理学的重要性を開拓する端緒となるであろう。以上の成果は、体内環境が組織修復に寄与する分子機構の一端を解き明かしたものであり、修復に寄与する普遍的な全身性制御機構の解明のみならず、患者の術後の予後の向上や治療力の理解を深め、創薬への応用可能性を有するものであると期待される。

【参考文献】

- (1) Kashio, S. *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A. 113(7):1835-40. 2016