

国際稀少疾患シンポジウム 2022

at Ritsumeikan University

(International Symposium for Rare Diseases

2022 at Ritsumeikan University)

プログラム集

(Program)

国際稀少疾患シンポジウム 2022 at Ritsumeikan University

[開催日時] 2022年9月1日(木)、2日(金)

[開催場所] 立命館大学びわこ・くさつキャンパス、滋賀県草津市
野路東 1-1-1

講演：カラーニングハウス I, C301

口頭発表：カラーニングハウス I, C301

ポスター：サイエンスコア南棟演習室 2階 202 と 3階 303

9月1日(木)

9:00~9:05 開会のご挨拶 (Opening Remarks)

服部 尚樹 立命館大学 薬学部 教授/学部長

Naoki Hattori, Professor and Dean, College of Pharmaceutical Sciences, Ritsumeikan University

9:05~10:05 (Web 配信限定)

座長：中谷 仁

「小児のヒト神経遺伝性疾患のメカニズム」

“Mechanisms of early human neurogenetic disorders”

Anthony Wynshaw-Boris

Professor, Department of Genetics and Genome Sciences, Case Western Reserve University School of Medicine

(以下、現地開催とWEB配信のハイブリッド形式)

10:30~11:30

座長：伊藤 将弘

「スプライス部位形成変異に着目した遺伝性疾患の原因変異の探索」

須山 幹太 先生

(九州大学 生体防御医学研究所 情報生物学分野 教授)

“Searching for causative mutations of genetic disorders focusing on splice-site-creating mutations”

Mikita Suyama

Professor, Division of Bioinformatics, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University

11:30~12:30

座長：萬年 太郎

「非コード RNA による細胞内構造と遺伝子発現の制御メカニズム」

廣瀬 哲郎 先生

(大阪大学・大学院生命機能研究科 / 先導的学際研究機構 教授)

“Regulatory mechanism of intracellular architecture and gene expression by long noncoding RNAs”

Tetsuro Hirose

Professor, Graduate School of Frontier Biosciences, Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives (OTRI), Osaka University

昼休憩

(Lunch time)

13:30~14:30

座長：谷浦 秀夫

「眼外傷後や緑内障患者の視神経細胞保護と視神経軸索再生を目指した治療戦略の構築」

桑島 孝明 先生

(ピッツバーグ大学 医学部 眼科 助教授)

“Development of therapeutic strategies for neuroprotection and optic nerve regeneration after ocular trauma and in glaucoma”

Takaaki Kuwajima

Research Assistant Professor, Department of Ophthalmology, the University of Pittsburgh School of Medicine

14:30～15:30

座長：正木 聡

「ケミカルバイオロジーによる希少疾患標的薬の探索～神経新生から神経炎症まで～」

小林 亜希子先生

(京都大学 医学研究科 形態形成機構学教室 助教)

“Targeting Neurogenesis and Neuroinflammation for incurable diseases”

Akiko Nakano-Kobayashi

Assistant Professor, Kyoto University

16:00 から 学内限定 口頭発表:6 題

会場：カラーニングハウス I , C301

*詳細は、プログラム集の後半に記載

1 日目終了

9月2日(金)

9:00~10:00 (Web配信限定)

座長：浅野 真司

「常染色体優性多発性嚢胞腎：新しいシグナル伝達経路と治療ターゲット」
“Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: New Signaling Pathways and
Therapeutic Targets”

Michael J. Caplan

Professor, Yale University School of Medicine

(以下、現地開催とWEB配信のハイブリッド形式)

10:30~11:30

「気管多繊毛同調運動における繊毛基底小体の規則的配列構築メカニズム」
月田 早智子 先生

(帝京大学 先端総合研究機構 教授)

“Multiciliary Basal Bodies Align by Apical Cytoskeletons for the Coordinated Ciliary
Beating in Trachea”

Sachiko Tsukita

Professor, Advanced Comprehensive Research Organization (ACRO), Teikyo
University

11:30 閉会のご挨拶 (Closing Remarks)

早野 俊哉 生命科学部 教授

Professor, College of Life Sciences, Ritsumeikan University

昼休憩

(Lunch)

13:00 から 学内限定 ポスター発表

会場：サイエンスコア南棟演習室2階202と3階303

*詳細は、プログラム集の後半に記載

特別講演要旨

Investigation of the pathophysiology of human neurodevelopmental disorders using isogenic induced pluripotent stem cell models

Shuai Fu^{1,2}, Luke Bury¹, Jaejin Eum¹, **Anthony Wynshaw-Boris**¹

¹ *Department of Genetics and Genome Sciences, Case Western Reserve University, Cleveland, OH 44106;* ² *Department of Molecular Medicine, Cleveland Clinic Lerner College of Medicine, Cleveland, OH, 44195*

Although mouse models with mutations in genes responsible for neurodevelopmental disorders such as autism (ASD) or brain malformation such as lissencephaly have been developed and studied, to study the pathophysiology of human neurodevelopmental disorders, including autism and lissencephaly, it is necessary to employ human systems. However, the defects responsible for these neurodevelopmental disorders occur in utero during midgestational fetal development. We have employed human induced pluripotent stem cell (iPSC) and embryonic stem cell (hESC) models. We have taken advantage of CRISPR-Cas9 genome editing tools to produce isogenic lines that allow us to precisely identify the effect of mutant genes and genetic backgrounds in cellular phenotypes. We have established methodology to investigate two-dimensional cell cultures consisting of uniformly differentiated neuronal cell types, as well as three-dimensional cerebral organoid models that more faithfully represent early human brain development. We employ a range of quantitative assays to functionally characterize molecular and cellular phenotypes to evaluate neurogenesis, neuronal migration, specification of various neuronal and glial cell types, neural networks, as well as synaptogenesis. A novel lineage tracing system has been developed that enables us to precisely examine the consequences of neurogenesis and specification. Our findings with some of these models will be discussed.

ヒト iPS 細胞や ES 細胞を用いたヒト神経発達障害の病因の探究

Shuai Fu, Luke Bury, Jaejin Eum and Anthony Wynshaw-Boris

ケースウエスタンリザーブ大学

神経発達障害として数えられる自閉症スペクトラム症候群 (ASD) や、大脳表面のしわである脳回が消える疾患である滑脳症 (lissencephaly) は、今まで多くの遺伝学的な変異マウスによって研究がなされてきた。これからは、ヒトで研究を進めて行くことが望ましい。しかしながら子宮内で起こっている神経発達障害をヒトで調べるのは倫理上の問題もあり非常に困難である。そこで我々はヒト iPSC (induced pluripotent stem cell) と hESC (human embryonic stem cell) に CRISPR-Cas9 のゲノム改変技術を用いて、特定の遺伝子の変異がどのような神経発達に於ける表現形を引き起こすか、正確に調べる実験系を立ち上げた。具体的には、二次元細胞培養系で均一に神経に誘導し、三次元細胞培養系で大脳皮質のオルガノイドを作成することで、できるだけ正確にヒト脳の発達段階に於ける特定遺伝子の変異とそのもたらす障害を調べた。この実験系に於いて神経誘導、神経遊走、特定の神経やグリアへの分化、神経ネットワークの形成、そしてシナプス形成と言った実際の脳発達で起こっている現象の定量的解析を行った。これらの実験系を用いてヒトに於ける神経誘導や神経分化を可能な限り正確に調べることができる様になった。我々が行っているいくつかの例を紹介したいと考えている。

Searching for causative mutations of genetic disorders focusing on splice-site-creating mutations

Mikita Suyama, Professor, Division of Bioinformatics, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University

The search for causative mutations in human genetic disorders has mainly focused on mutations that disrupt coding regions or existing splice sites. Recently it has been reported that mutations creating splice sites can also cause a range of genetic disorders. However, such splice-site-creating mutations (SCMs) have only been sporadically reported as being involved in genetic disorders to date. Hence, the overall picture of the extent to which SCMs are involved as a cause of genetic disorders is still unclear. To address this question, we sought to identify SCMs that could be involved in various genetic disorders using SpliceAI and the variant information registered in the gnomAD database. We identified 5,656 candidate SCMs, of which 3,942 are likely to be pathogenic, in 4,054 genes responsible for genetic disorders. We estimate that, by focusing on SCMs, the increase in diagnosis rate is approximately 5.9-8.5% compared to the number of already known pathogenic variants. This finding suggests that SCMs are mutations worth focusing on in the search for causative mutations of genetic disorders.

スプライス部位形成変異に着目した遺伝性疾患の原因変異の探索

須山 幹太先生、九州大学 生体防御医学研究所 情報生物学分野 教授

遺伝性疾患の原因変異の探索は、主にコーディング領域や既存のスプライス部位を破壊する変異に焦点が当てられてきました。これらに加え、近年、スプライス部位を形成する変異 (splice-site-creating mutation; SCM) が様々な遺伝性疾患の原因となることが報告されるようになりました。しかし、SCMは、これまで遺伝性疾患の原因として散発的な報告にとどまっており、遺伝性疾患全般においてそれらの原因としてどの程度関与しているのか、その全体像は未だに明らかになっていませんでした。そこで、私たちのグループは、様々な遺伝性疾患に関与している可能性のある SCM の網羅的な同定を試みました。具体的には、ヒトのバリエーションのデータベースである gnomAD を用い、そこに登録されているバリエーションに対しスプライス部位予測法である SpliceAI を適用することで、SCM を探索しました。その結果、遺伝性疾患の原因となることが知られている 4,054 遺伝子において、5,656 個の SCM 候補を同定し、そのうち 3,942 個が病原性を有する可能性があることを明らかにしました。SCM に注目することで、既に知られている病原性バリエーションの数と比較して、診断率の向上は約 5.9~8.5% と推定されます。この結果は、遺伝性疾患の原因変異を探索する上で SCM は注目すべき変異であることを示しています。

Regulatory mechanism of intracellular architecture and gene expression

by long noncoding RNAs

Tetsuro Hirose, Professor, Graduate School of Frontier Biosciences, Institute for Open and Transdisciplinary Research Initiatives (OTRI), Osaka University

More than 98% of the human genome is noncoding. At the beginning of this century, tens of thousands of long noncoding RNAs (lncRNAs) were discovered to be produced from these regions, and their potential as regulators of complex biological phenomena emerged. Since then, a variety of functions of lncRNAs have been gradually revealed, and lncRNAs have been recognized as a significant class of regulators, however, their mechanisms of action remain largely unknown. We discovered lncRNAs that act as the scaffold of intracellular structures and termed them architectural RNAs (arcRNAs). In eukaryotic cells, there are membraneless organelles that act as sites for the regulation of various gene expressions. Recently, membraneless organelles have been shown to have the properties of phase-separated droplets, and it has been proposed that the phase-separated space functions as a "reaction crucible," a "mooring site for regulatory factors," and a "nuclear hub". The arcRNAs are thought to aggregate multiple proteins with intrinsically disordered regions and induce phase separation around the RNA to form membraneless organelles to control the regulatory functions above. Thus, the arcRNA sequence dictates all processes from the formation to the operation of the membraneless organelles. We succeeded in identifying multiple arcRNA domains involved in the formation of membraneless organelles by combining genome editing and super-resolution imaging, and demonstrated that lncRNAs have a modular structure similar to that of proteins. As for the operating mechanism, the membraneless organelles formed by heat-inducible arcRNAs sense temperature change and incorporate enzymes such as a protein kinase and an RNA methylase into the phase-separated space, thereby efficiently modifying proteins and RNAs sequestered in the organelles. This "crucible" mechanism enables temperature-sensitive splicing regulation of target mRNAs. This arcRNA possesses the repeat sequence found in the toxic RNA that causes spinocerebellar degeneration and can serve as a model system for studying the intractable disease. Indeed, our recent collaborative study revealed that a small molecule compound that directly binds to the repeat RNA can modulate the organelle formation and function. In this talk, I will introduce the latest findings on intracellular structures via phase-separation induced by arcRNAs, and discuss the possibility of applying them to pharmaceutical applications.

非コード RNA による細胞内構造と遺伝子発現の制御メカニズム

廣瀬 哲郎 先生

大阪大学大学院生命機能研究科 教授

ヒトゲノムの98%以上は、タンパク質情報を含まない非コード領域で占められる。今世紀初めにこれらの領域から数万種類もの長鎖ノンコーディング RNA (lncRNA) が産生されていることが発見され、複雑な生命現象の制御役としての可能性が浮上した。その後、多彩な働きが徐々に明らかにされ、今日では lncRNA は重要な制御因子群として認知されている。しかしそれらの作用機構は未だほとんど明らかになっていない。我々は、こうした中から、細胞内構造体の骨格として働く lncRNA を発見し、architectural RNA (arcRNA) と命名した。真核細胞には、膜を持たない非膜オルガネラが存在し、様々な遺伝子発現制御の場として働くことが知られている。近年、非膜オルガネラは相分離した液滴の性状を持つことが示され、その相分離空間が「生化学反応のるつぼ」「制御因子の係留場」「核内構造ハブ」として機能していることが提唱されている。我々が発見した arcRNA は、天然変性領域を持つ複数のタンパク質を集約して周囲に相分離を誘発して、特定の形状と内部構造を持つ非膜オルガネラを形成し、上記のような制御機能を統御していると考えられる。つまり非膜オルガネラの形成から作動に至る全ての過程をコントロールする情報が arcRNA 配列に刻まれているわけである。我々は、ゲノム編集による変異解析と超解像イメージングを組み合わせて、非膜オルガネラ形成に関わる複数の arcRNA ドメインを同定することに成功し、lncRNA がタンパク質と同様にモジュール構造をとっていることを示した。一方、作動機構については、熱ストレス誘導性の arcRNA が形成する非膜オルガネラが、温度変化を感知してプロテインキナーゼや RNA メチラーゼといった酵素をオルガネラ内に取り込むことによって、そこに濃縮されているタンパク質や RNA を効率よく修飾し、その結果、特定の mRNA 群の温度依存的スプライシングを制御していることを明らかにした。この arcRNA は、脊髄小脳変性症を引き起こすリピート RNA と同様の配列を有しており難治性疾患研究のモデル系となりうる。現に、このリピート RNA に直接結合する低分子化合物を用いた共同研究によって、化合物によって非膜オルガネラの機能を制御できる可能性が示された。本講演では、arcRNA が先導する相分離誘導を介した細胞内構造構築に関する最新知見を紹介し、それを標的とした創薬研究への展開の可能性についても言及したい。

Development of therapeutic strategies for neuroprotection and optic nerve regeneration after ocular trauma and in glaucoma

Takaaki Kuwajima

Research Assistant Professor, Department of Ophthalmology, the University of Pittsburgh School of Medicine

Millions of people worldwide suffer from blindness due to optic nerve degeneration and retinal ganglion cell (RGC) death after ocular trauma and in optic neuropathies such as glaucoma. However, human RGCs lack capacity for regeneration so that they do not recover from damage. Moreover, there are no clinical therapies that halt optic nerve degeneration, RGC death and/or promote axon regeneration. Thus, our long-term goal is to establish therapies enhancing neuroprotection, axon regeneration and recovery of visual functions, which are clinically applicable after ocular trauma and optic neuropathies.

Toward establishing the therapeutic strategies, we have been currently focused on two different aspects. First, the reduction of retinal axon layer thickness and loss of RGCs does occur not evenly in the whole retina but is instead localized to specific retinal regions after ocular trauma and in glaucoma. However, the molecular underpinnings of region-specific RGC death are largely unknown. We recently discovered that using optic nerve crush (ONC) mouse model, the peripheral ventrotemporal (VT) retina in mouse is most vulnerable to optic nerve injury. Furthermore, our recent study identified VT region-specific molecules that inhibit VT RGC survival and axon regeneration. Second, there are no treatments or clinically-approved drugs that maintain the optic nerve and RGCs and/or promote optic nerve regeneration. Among 50,000 compounds, we successfully identified a clinically-approved HMG-CoA reductase inhibitor, statin as the most effective drug for promoting axonal outgrowth on the inhibitory substrate for axon regeneration, myelin-associated glycoprotein. Using optic nerve crush rodent model, statin promoted optic nerve regeneration, while the neuroprotective effects were minimal. Currently, we have been establishing the new combination therapy using statins and the extracellular matrix to induce more robust RGC survival and axon regeneration when compared to either statins or the extracellular matrix alone.

In the symposium, I will show the results of these two studies and the molecular mechanisms. These studies could lead to the identification of the therapeutic intervention after acute ocular trauma and in glaucoma.

眼外傷後や緑内障患者の視神経細胞保護と視神経軸索再生 を目指した治療戦略の構築

桑島 孝明 先生

ピッツバーグ大学医学部 眼科 助教授

近年、眼外傷後や緑内障による視神経の変性や視神経の形成を担う網膜神経節細胞死により世界中で多くの人々が失明や視覚障害に苦しんでいる。しかし、ヒトを含めた哺乳類の網膜神経節細胞は再生する能力はなく、自然に回復することは不可能である。さらに、視神経の変性や視神経細胞死を阻害、もしくは視神経再生を促進する臨床的治療はまだ確立されていない。そこで、私たちの長期目標として、眼外傷後や緑内障患者における視神経細胞保護と視神経軸索再生、そして視覚機能を回復させる臨床的治療法の確立を目指している。

現在、私たちは二つのプロジェクトを行なっている。一つ目は、以前の様々な報告から眼外傷後や緑内障の初期段階の視神経の変性や網膜神経節細胞死は、眼全体で起こるのではなく局所的に始まり、後に全体に広がることわかってきている。私たちは、マウス視神経挫滅モデルを用いてどの領域の網膜神経節細胞が最も早く死滅し、局所的細胞死分子メカニズムが存在しているかを調べた。解剖学的視点からマウス視神経挫滅後、腹側の網膜神経節細胞死が最も早く起こることがわかり、さらにこれらの網膜神経節細胞に特異的に発現する分子を同定し、腹側の神経細胞死や視神経軸索再生を抑制することが明らかになった。二つ目のプロジェクトは、視神経軸索再生を促進する医薬品はまだ存在しないため、ドラッグスクリーニングを行なった。神経軸索再生阻害分子である Myelin-associated glycoprotein (MAG) を発現した細胞上に、神経細胞を培養すると神経軸索の成長が阻害されることは広く知られている。この共培養系を用いて5万個のドラッグの神経軸索促進能を調べたところ、医薬品としてすでに承認されているスタチンを候補として同定した。さらにマウス視神経挫滅モデルを用いて、生体内でスタチンが視神経軸索再生を促進することも明らかになった。しかし、スタチンは細胞保護能が弱いため、細胞保護能を促進する細胞外マトリックスを用い、現在は、細胞外マトリックスとスタチンを同時に使用することで視神経細胞保護と視神経軸索再生の両者を促進することに成功している。シンポジウムでは、これら二つのプロジェクトの詳細なデータと分子メカニズムを紹介し、これらの結果が臨床治療薬の確立に寄与できると考えている。

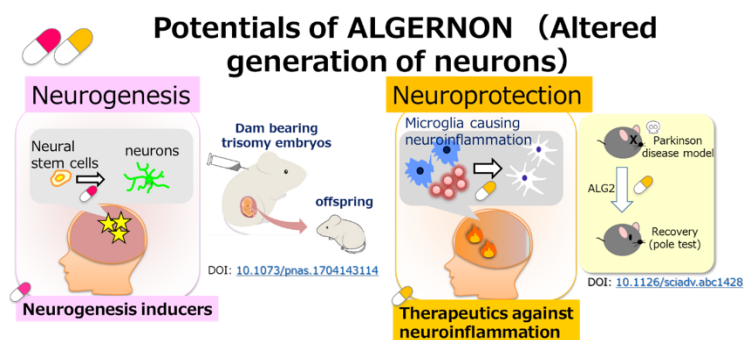
Targeting Neurogenesis and Neuroinflammation for incurable diseases

Akiko Nakano-Kobayashi, Assistant Professor, Kyoto University

Down syndrome (DS) is the most frequent chromosomal arrangement affecting approximately one in 700-1,000 newborns in the world. DS can be now prenatally diagnosed but no cure is available yet. I will talk about the chemical compound 'ALGERNON' which can rescue the impaired cognition in DS mice and introduce further discovery of its new function targeting neuroinflammation.

DS is caused by the extra copy of chromosome 21 and exhibits some level of intellectual disability. Accumulating evidence shows that neurogenesis, the event where neurons are produced from neural stem cells (NSCs), is impaired in DS/DS models. It has been reported that the proliferation of NSCs are delayed, therefore it is suggested that the reduced number of neurons are supplied in DS/DS models. To rescue this delayed neurogenesis, we screened the compounds that enhance the proliferation of NSCs and identified new growth inducer ALGERNON (altered generation of neurons). ALGERNON enhanced neurogenesis and corrected the reduced proliferation observed in DS-induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived NSCs. Moreover, administration of ALGERNON to pregnant dams rescued aberrant cortical formation in DS mouse embryos and prevented the development of abnormal behaviors in DS offspring. These data suggest that the neurogenic phenotype of DS can be prevented by ALGERNON prenatal therapy.

We next asked whether ALGERNON is effective in adult brains for the realization of therapeutics. We obtained ALGERNON2 with better distribution and retention in brain. We unexpectedly found that ALGERNON2 suppressed the production of proinflammatory cytokines and rescued neurodegeneration in a Parkinson's disease model. Notably, ALGERNON2 enhanced neuronal survival in other neuroinflammatory conditions such as the transplantation of iPSC-derived dopaminergic neurons into murine brains. In conclusion, ALGERNON presents the potentials chemical biology that can reveal unexpected functions and open the possibility of the therapeutics for incurable diseases. chemical biology that can reveal unexpected functions and open the possibility of the therapeutics for incurable diseases.



ケミカルバイオロジーによる希少疾患標的薬の探索

～神経新生から神経炎症まで～

小林 亜希子 先生 京都大学医学研究科 助教

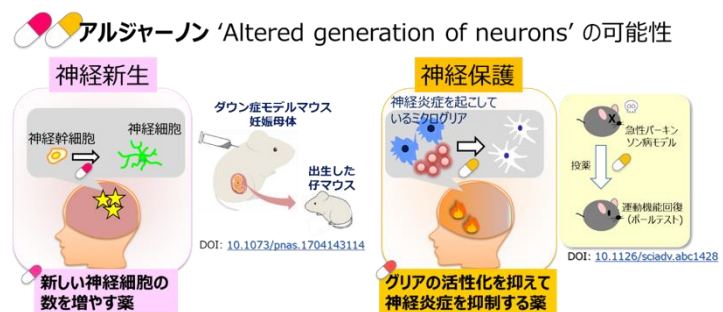
ダウン症候群(21トリソミー)はヒト21番染色体が1本多いことにより引き起こされる最も多い染色体異常である。現在出生前診断が可能であるものの、その治療法はまだないのが現状である。本講演ではダウン症の出生前治療の可能性を示す「アルジャーノン」の取得経緯と、その後の研究展開により新しく見出した神経炎症抑制の機能について紹介したい。

正常な脳発達過程では、神経幹細胞が分裂・増殖し、神経細胞へと分化する神経前駆細胞を生み出している。一方、ダウン症モデルマウス脳では神経幹細胞の増殖が低下していることが報告されている。つまり、ダウン症脳では神経細胞の供給源である神経幹細胞の増殖が遅く、脳発達期に産生される神経細胞が少なくなるため、脳形成不全に至ると考えられた。そこで私たちは神経幹細胞の増殖を促進する化合物を探索し、「アルジャーノン」を取得した。アルジャーノンは神経幹細胞の増殖を促進し神経新生を促すことから altered generation of neuron; ALGERNON (アルジャーノン) と命名された。アルジャーノンはダウン症 iPS 細胞由来神経幹細胞の増殖を改善し、脳発達時期の投与によりダウン症マウスの認知機能を改善することができた。この結果はダウン症の出生前治療の可能性を示唆している。

染色体異常により生じるダウン症候群の脳発達不全は出生前から始まるため、治療介入は早い方が望ましいと提案されている。一方で、妊産婦への投与は安全性の確保など、実用化への壁は高い。そこで、より安全性が高く体内動態に優れ脳組織移行性の良いアルジャーノン2を開発した。神経幹細胞の増殖が盛んである脳発達期と比較するため、成体マウスにおけるアルジャーノン2の薬効を調べたところ、驚くべきことにアルジャーノン2は神経炎症を抑える機能を有していた。「神経炎症」とは脳に存在するグリア細胞の過剰な活性化が原因であり、アルツハイマー病やパーキンソン病などの進行性神経変性疾患に共通して観察される特徴の一つである。実際に、アルジャーノン投与により、急性パーキンソン病モデルマウスにおけるドパミン神経脱落が抑制され、運動機能が改善される結果が得られた。

このようにケミカルバイオロジーという研究分野から生まれた「アルジャーノン」は、生体内の思わぬ反応や機能を発見させてくれた。未だに治療薬が存在しないダウン症や神経炎症を

呈するアルツハイマー病・パーキンソン病などの神経変性疾患に対して、アルジャーノンはアカデミアにおけるケミカルバイオロジー/神経薬理学研究が創薬に貢献できる可能性を示している。



ADPKD: New Signaling Pathways and Therapeutic Targets

L. Onuchic, N.P. Gresko, V. Padovano, G. Schena, V. Rajendran, K. Dong, S. Somlo, X. Shi, H. Shen and **M.J. Caplan**

Professor, Dept. of Cellular and Molecular Physiology, Yale School of Medicine, New Haven, CT, USA

Polycystin-1 (PC1) and polycystin-2 (PC2) localize to primary cilia, where they may participate in mechano-sensation and other sensory processes. PC1 is a large transmembrane protein that undergoes N and C-terminal cleavages. C-terminal cleavage generates fragments (PC1-CTT) that translocate to mitochondria and nucleus. We found that PC1-CTT expression in an inducible ADPKD mouse model suppresses cystic phenotype and we elucidated mechanisms involved in this effect. We generated BAC transgenic mice expressing a Flox-Stop 2HA-PC1-CTT inserted in the Rosa26 locus and crossed it with an inducible ADPKD mouse model on the C57BL/6N and J backgrounds. Doxycycline induction of these mice leads to PC1-CTT expression in renal epithelial cells that lack full-length PC1. Compared to PC1 KO mice, PC1 KO mice expressing PC1-CTT on the C57BL/6N background have 3-fold lower kidney weight/body weight ratio, with both groups presenting comparable gender distributions. BUN levels in PC1-CTT-expressing ADPKD mice are comparable to those in WT controls. We show that PC1-CTT interacts with mitochondrial enzyme Nicotinamide Nucleotide Transhydrogenase (NNT) and confirm the importance of this interaction by examining the effects of PC1-CTT expression in PC1 KO mice on the NNT-deficient C57BL6/J background. These mice do not exhibit an improved cystic phenotype. We detected a 20% decrease in NNT enzymatic activity in "N" cystic mice compared to "N" WT controls. Interestingly, CTT expression in "N" cystic mice rescued NNT enzymatic activity to the same level observed in the healthy "N" controls. Finally, the PC1-CTT's ability to rescue the ADPKD metabolic profile is tied to the presence of NNT. Thus, expression of PC1-CTT and its interaction with NNT significantly suppresses ADPKD renal phenotype. Considering its small size, PC1-CTT could open the door to the exploration of gene therapy approaches for ADPKD.

The N-terminal autocatalytic cleavage of PC1 occurs at a G Protein Coupled Receptor (GPCR) Proteolytic site near the junction between the extracellular N terminus (NTF) and the first transmembrane domain. Recent studies show that PC1 can function as an atypical GPCR and that it binds to Wnt ligands. We and others have shown that removal of the PC1 NTF exposes a tethered agonist (TA) peptide that activates the intrinsic adhesion GPCR-like function of PC1.

Activation of GPCRs in the cilia induces their trafficking out of the cilium in association with their ligand-induced desensitization. We find that localization of PC1 to cilia is similarly regulated by its GPCR activity. A constitutively active PC1 construct lacking the NTF (PC1 Δ NTF) is absent from the primary cilia, whereas a constitutively inactive PC1 construct lacking the NTF and the TA (PC1 Δ NTF Δ TA) resides in the primary cilia. Addition of a soluble form of the TA peptide to cells expressing PC1 Δ NTF Δ TA results in redistribution of the PC1 Δ NTF Δ TA protein out of the cilium. Blocking β -arrestin-mediated receptor desensitization with barbadin prevents removal of PC1 Δ NTF and of TA peptide-treated PC1 Δ NTF Δ TA from the cilium. Full length PC1 co-expressed with PC2 localizes to the cilium. Extended exposure to the Wnt9b ligand or to mechanical stimuli lead to reduced quantities of PC1 in the cilium, and this redistribution is blocked by barbadin. Our data show that PC1 ciliary localization is regulated by physiological stimuli including ligand binding and mechanical stress and, like GPCR regulation, is subject to receptor desensitization processes. Our findings indicate that the GPCR activation state of PC1 can be observed by examining the distribution of PC1, suggesting new approaches through which PC1 activity can be assessed *in vivo* and in the context of drug discovery.

ADPKD: New Signaling Pathways and Therapeutic Targets

L. Onuchic, N.P. Gresko, V. Padovano, G. Schena, V. Rajendran, K. Dong, S. Somlo, X. Shi, H. Shen and M.J. Caplan

Professor, Dept. of Cellular and Molecular Physiology, Yale School of Medicine, New Haven, CT, USA

Polycystin-1 (PC1) と Polycystin-2 (PC2) は一次線毛に局在して、機械感覚や感覚受容プロセスに関わるとみられる。PC1 は大きな膜貫通タンパク質 (*4,304 個のアミノ酸からなる 11 回膜貫通型タンパク質) で、N-末端側、C-末端側で切断を受ける。そのうち、C-末端側での切断にともなって生じた断片 (PC1-CTT) (*200 アミノ酸残基) は、ミトコンドリアや核に移行する。私達は、誘導性の常染色体優性多発性嚢胞腎 (ADPKD) モデルマウスに PC1-CTT を発現させると、嚢胞の形成が抑制されることを見出し、PC1-CTT の作用メカニズムについて検討を行った。BAC 法を用いて Rosa26 部位に挿入した Flox-Stop 2HA-PC1-CTT を発現するトランスジェニックマウスを作製し、C57BL/6N と J バックグラウンドでこれを誘導型の ADPKD マウスと交配した。このマウスをドキシソルビシンで誘導をかけると、全長の PC1 を発現しない腎上皮細胞で PC1-CTT の発現が認められた。C57BL/6N バックグラウンドにおいて、コントロールの PC1 ノックアウト (PC1 KO) マウスと比較して、PC1-CTT を発現した PC1 KO マウスでは、雌雄の差はなく、体重に対する腎臓の重量比が 1/3 に減少した。PC1-CTT を発現した ADPKD マウスの腎機能マーカーである BUN (血中尿素窒素) は野生型のコントロールマウスと差がなかった。さらに私達は、PC1-CTT がミトコンドリア酵素であるニコチンアミドヌクレオチドトランスヒドロゲナーゼ (NNT) と相互作用することを示した。そして、PC1-CTT と NNT との相互作用が重要であることを、NNT-欠損 C57BL6/J マウスにおける PC1-CTT 発現によるレスキュー効果を検証することによって確認した。NNT を欠損させた PC1 KO マウスでは、PC1-CTT を発現させても、嚢胞形成には改善が見られなかった。また、” N” 嚢胞マウスでは、” N” 野生型マウスと比較して、NNT 酵素活性が 20%低下することを見出した。さらに、” N” 嚢胞マウスに CTT を発現させると、NNT 酵素活性が健康な” N” コントロールレベルまでレスキューされた。したがって、PC1-CTT が ADPKD における代謝プロファイルをレスキューするためには、NNT との結びつきが必要であることがわかる。このように、PC1-CTT の発現や、PC1-CTT と NNT の相互作用は ADPKD にともなって腎臓に見られる嚢胞形成などのフェノタイプを抑制した。PC1-CTT は分子として (*全長 PC1 と比較して) 小さいことから、ADPKD の遺伝子治療のアプローチのドアを開くことになるかも知れない。

一方、PC1 の N-末端における自己切断は、細胞外に存在する N-末端部位 (NTF) と一番目の膜貫通ドメインの間に位置する GPCR 切断部位で起こる。最近の研究から、PC1 は非定形型 GPCR として働き、Wnt リガンドと結合することが示されている。PC1 から PC1NTF を除くと、PC1 に内在的に存在する接着 GPCR 様の機能を活性化するテザーアゴニスト (TA) ペプチドを露出させることになる。

線毛の GPCR を活性化すると、リガンドによる脱感作にともなって、GPCR は線毛外へと搬送されることが知られている。私たちは PC1 の線毛への局在もこれと同じように PC1 がもつ GPCR の活性によって調節されることを見出した。NTF を欠損した常在的な活性化型の PC1 (PC1 Δ NTF) は一次線毛には発現しない。その一方、NTF と TA を同時に欠損した常在的な不活性化型の PC1

(PC1 Δ NTF Δ TA) は線毛に局在する。PC1 Δ NTF Δ TA を発現する細胞に、可溶性の TA ペプチドを加えると、PC1 Δ NTF Δ TA タンパク質は線毛外へと再分布する。 β -アレスチンによる受容体の脱感作を (* β -アレスチンと β 2-アダプチン相互作用阻害剤である) barbadin によってブロックすると、PC1 Δ NTF や、TA ペプチド処理した PC1 Δ NTF Δ TA の線毛外への再分布を阻害する。PC2 と共発現させた全長の PC1 は線毛に局在するが、長時間の Wnt9b リガンドとの反応や、機械刺激によって線毛における PC1 量が減少する。この PC1 の再分布は barbadin によって阻害される。私たちの結果は、PC1 の線毛への局在は、リガンド結合や機械的なストレスのような生理的な刺激によって調節を受けることや、GPCR の調節のように受容体の脱感作のプロセスを受けることを示した。また、PC1 の GPCR としての活性化状態は、PC1 の (*線毛内外における) 分布を計測することによって観察できることを示しており、創薬に関わって PC1 活性を in vivo 条件で評価するという新たなアプローチを提案する。

Multiciliary Basal Bodies Align by Apical Cytoskeletons for the Coordinated Ciliary Beating in Trachea

Sachiko Tsukita

Professor, Advanced Comprehensive Research Organization (ACRO), Teikyo University

Multiciliated cells (MCCs) promote fluid flow through coordinated ciliary beating, which requires properly organized basal bodies (BBs). Airway MCCs have large numbers of BBs, which are uniformly oriented and, as we show here, align linearly. The mechanism for coordination of BB orientation and BB alignment, the dysfunction of which leads to airway diseases, is unexplored. To study this mechanism, we developed a long-term and high-resolution live-imaging system and used it to observe fluorescence labels for BB-BFs in live. It is shown that during MCC differentiation, the BB array (including BB orientation and BB alignment) adopts stereotypical patterns. In this respect, we especially notice on the apical cytoskeleton. On the plane of an epithelial cell sheet that is exposed to the outer environment, the cells' apical membranes are regarded as a continuous surface connected by TJs; notably, this continuous apical surface is critical for the epithelial barrier and possesses features that relate to its specific role in the biological functional system. We recently identified a three-layered apical cytoskeletal system consisting of actin and intermediate filaments and microtubules, which exists just below the apical membrane of epithelial cell sheets including tracheal multi-ciliated MCCs. We will discuss the role of apical cytoskeleton in coordinated BB orientation and BB alignment in MCCs for mucociliary transport of tracheas.

気管多繊毛同調運動における繊毛基底小体の規則的配列構築メカニズム

月田 早智子 先生

帝京大学 先端総合研究機構 教授

多線毛細胞（MCCs）が協調的な線毛の波打ち運動をおこして体液を流動させるためには、適切に組織化された基底小体（BBs）が必要である。気道の多線毛細胞には多数の基底小体が存在し、それらが均一に配向し、直線的に整列する。こうした基底小体の方向性や整列を調節するメカニズムが機能しなくなると呼吸器疾患に繋がるが、そのメカニズムは未だ明らかにされていない。このメカニズムを研究するために、私たちは長時間での高解像度のライブイメージングシステムを開発し、BB-BFの蛍光標識をライブで観察するのに用いた。その結果として、多線毛細胞の分化過程を通じて、基底小体の配列（BBの方向性や整列を含む）は、ステレオタイプ（定型）のパターンを示した。この点において、私たちは特にアピカル側の細胞骨格に着目した。外部環境に面した上皮細胞シートの平面上では、細胞のアピカル膜はタイト結合（TJ）で連結された連続的な表面としてみなされる。特にこの連続的なアピカル表面は上皮バリアにとって非常に重要であり、生物学的な機能システムにおける特異的な役割と関係した特性を有する。最近、私たちはアクチン、中間径フィラメント、微小管からなる三層のアピカル細胞骨格システムを同定した。それらは気管支の多線毛細胞を含む上皮細胞シートのアピカル膜直下に存在する。ここでは、気管支の粘液線毛輸送にかかわる多線毛細胞における組織化されたBBの方向性や整列におけるアピカル細胞骨格の役割について紹介する。

学内発表(口頭及びポスター)の要旨

Prader-Willi syndrome とシナプス形成におけるスパインの役割

○森岡実央、添田修平、谷浦秀夫

立命館大学大学院 薬学研究科 神経化学研究室

【目的】 Prader-Willi syndrome (PWS) は低身長、肥満、筋緊張低下、知的障害等を主症状とする先天性の疾患で、第 15 番染色体 11-13 領域の遺伝子発現欠損が発症に関わる。PWS において健常者と比較した場合、ニューロン単位での形態や機能の違いがはっきりとは分かっていなかった。よって、本研究室では、PWS-iPS 細胞を用い、神経分化の初期段階での分化障害について報告した。本研究では、ニューロンの機能について健常者との違いがあるのかを調べるため、シナプス形成、細胞膜電位に着目して解析を進めた。

【方法】 WT-iPS、MAGEL2 (PWS 責任領域内遺伝子) KO-iPS、M-iPWS (第 15 番染色体メチル化異常 PWS 患者 iPS) 細胞のそれぞれから分化させた神経幹細胞 (NSC) をさらに 7 日、14 日、もしくは 28 日間ニューロン分化させた。まず、ニューロン分化の最適な条件を探するため、14 日間分化は CultureOne サプリメント・アスコルビン酸が添加されたもの、28 日間は、従来のニューロン分化メディウムを使用し、ニューロン・シナプスマーカーの発現を RT-リアルタイム PCR で解析した。

その後、WTneuron, MAGEL2KOneuron の β -III Tubulin (neuron marker) ・ PSD95 (synapse marker) 発現及び局在を蛍光顕微鏡下で観察した。さらに、Neuron 上の PSD95 の局在を詳細に調べるため Z-stack によって $1\mu\text{M}$ 間隔で 10 枚ほど断層像を撮影し、3D 合成し解析した。最後に、Fluovolt membrane potential kit を用い、ニューロンに KCl 刺激後、細胞膜脱分極を蛍光測定した。ニューロン脱分極に必要なナトリウムチャンネル (SCN2-4) の発現を RT-リアルタイム PCR により解析した。

【結果】 WTneuron の 14 日間分化 (CultureOne サプリ) において十分シナプス形成がされていた。蛍光顕微鏡下でニューロン上の PSD95 は、MAGEL2KOneuron の方で密度が少なかった。より詳細に解析した 3D 画像 (コントロールのみ) では、ニューロンに沿って PSD95 がシャフト状で局在していることがわかった。最後に、KCl 刺激後 WT-Neuron は顕著に脱分極されているが、ネガティブコントロールである WTiPS 細胞 (未分化) は、蛍光発現上昇せず、遺伝子欠損 (NDN KO, MAGEL2 KO) ニューロン細胞、M-iPWS ニューロンは、蛍光はわずかに上昇した。ナトリウムチャンネルの発現は、SCN2・4 は NDN KO, MAGEL2 KO で発現が低く、SCN3 については、NDN KO, MAGEL2 KO, M-iPWS ニューロンにおいて若干コントロールより低い発現上昇率であった。

【考察】 MAGEL2 KO ニューロンは、ニューロン・シナプスマーカーの発現が低いことから、成熟度合いが低いと考えられる。蛍光顕微鏡下では、ニューロン上の PSD95 の密度が低い可能性が示唆された。このデータを定量化するために、これからは、3D 合成した画像で解析していく。PSD の発現や局在との相関は今のデータでは言えないが、KCl 刺激に対する細胞膜脱分極は遺伝子欠損、PWS の病態の影響を受けていることを示唆できた。

Analysis of adipocytes differentiation and functions in Prader-Willi syndrome

Shuhei Soeda, Urara Kishimura, Maki Harada, Hideo Taniura
College of Pharmaceutical Sciences, Ritsumeikan University,
Neurochemistry Laboratory

【Background】Prader Willi-syndrome (PWS) is a complex epigenetic disorder caused by the deficiency of paternally expressed genes in the chromosome 15q11-q13. PWS is characterized by hypotonia, hyperphagia resulting in obesity, short stature, and so on. PWS has two nutritional phases. Phase 1 ranges from birth to early infancy (6-9 months) when infants with PWS show severe hypotonia and a poor ability to suck. Phase 2 begins between 2 and 4 years with the onset of obesity and hyperphagia. However, recent progress in early diagnosis has revealed more complex nutritional phase. Indeed, between 18 and 36 months of age, body weight and body mass index increase excessively without a significant increase in calorie intake or any change in eating behavior. Then, we try to reveal whether PWS adipocytes have unique features including differentiation, accumulation of lipid droplets, and functions compared with healthy individual.

【Methods】Control iPS (Nips) cell was made from nasal epithelial cells of healthy individual and iPWS cell was constructed from skin cells with PWS patient (genes deletion in 15q11-13). Nips and iPWS cells were differentiated into adipocytes with embryoid body (EB) formation. After EB attachment, differentiated cells (15, 21, and 27 days) were sampled and analyzed with RT-realtime PCR. To check the accumulation of lipid droplets in adipocytes, we performed oil red O staining and flowcytometry.

【Results & Discussion】 PWS and control adipocytes showed highly increased expression of early adipocyte markers especially PPAR γ and C/EBP α with RT-realtime PCR. PWS adipocytes showed lower expression of aP2 gene, which helps function of hormone sensitive lipase to degrade lipid droplets. AdipoQ and TNF- α , which improves and enhances insulin-resistance, were low expression of AdipoQ and highly expressed TNF- α in PWS adipocytes. This data suggested PWS adipocytes whoud have an insulin-resistance. Indeed, glucose uptake of PWS adipocytes is lower than control adipocytes. Flowcytometry data showed PWS adipocytes have highly expressed lipid droplets in PPAR γ positive cells. These results suggest that PWS adipocytes contained high concentration of lipid droplets and lack the ability of glucose uptakes with lower expression of AdipoQ and higher TNF- α .

Model mice with chromosome 15q11-13 duplication show severe developmental abnormalities.

Nakatani Jin¹, Toyoda Futoshi², Go Yasuhiro³, Horike Shin-ichi⁴, Koyama Natsu⁵, Hitoshi Seiji⁵, Takumi Toru⁷, Tooyama Ikuo⁶, Morikawa Shigehiro⁶, Inubushi Toshiro⁶, Sawano Toshinori¹, Tanaka Hidekazu¹

¹Dept Pharmacology, Ritsumeikan Univ

²Dept Cell Physiology, Shiga Univ of Medical Science

³Dept Brain Sciences, National Institute of Natural Sciences

⁴Advanced Science Research Center, Kanazawa Univ

⁵Dept Integrative Physiology, Shiga Univ of Medical Science

⁶Molecular Neuroscience Research Center, Shiga Univ of Medical Science

⁷Center for Brain Science, RIKEN

Autism spectrum disorder (ASD) is categorized as a neurodevelopmental disorder and the patients do not recover from their devastated states throughout life. Etiology of most cases with ASD remains unknown. We had already established model mice (Dp) that contain mouse chromosome 7 duplication, corresponding to human chromosome 15q11-13 duplication that is known as one of the most recurrent chromosomal abnormalities seen in patients with ASD. These mice showed impaired social interaction, behavioral inflexibility, anxiety, and so on. Many of these behaviors are considered to correspond to symptoms of ASD in human.

Here we have generated homozygotes (DpDp) by crossing above heterozygotes (Dp). DpDp mice have two extra copies of 15q11-13, and it is expected that DpDp show more prominent biological features than heterozygote Dp. 80% of DpDp mice were lethal after birth. Magnetic resonance imaging (MRI) studies revealed DpDp have developmental abnormality in heart. The rest of 20% also showed developmental abnormalities including low body weight. DpDp mice showed developmental abnormalities including low body weight. Electrophysiological studies showed DpDp had severe cardiac rhythmic defects related with autonomic nerves system. This method was recorded by non-invasive way, so it can be applicable for the future diagnostic application in human ASD patients.

Roles of ezrin on the morphogenesis and regulation of movement of airway cilia

Kotoku Kawaguchi, Daichi Saito, Kasane Yasuoka, Shinji Asano

College of Pharmaceutical Sciences, Ritsumeikan University,

Molecular Physiology Laboratory

【Background】 The mucociliary clearance is the first line of defense in the airway. The function is given by the beating cilia on the surface of ciliated cells cooperating with the protective mucous layer. The beating cilia plays removing inhaled particles and pathogens (viruses, bacteria and fungi). F-actin plays central roles in expansion of apical surface of multiciliated cells (MCCs) and basal body (BB) distribution. Ezrin, an F-actin binding protein, is associated with BBs throughout the apical region of MCCs, and is possible to be required for anchoring of BBs to the apical cytoskeleton. In addition, ezrin functions as a general cross-linker between apical membrane proteins and the actin cytoskeleton. Especially, ezrin may play the important role of apical localization of β_2 -adrenergic receptor (β_2 AR) in multiciliated cells. Here we examined roles of ezrin in the regulation of ciliary beating in lung multiciliated cells by using ezrin-knockdown (*Vil2^{kd/kd}*) mice.

【Methods】 We used isolated airway ciliary cells of mice, which cells were isolated by elastase treatment, and mouse trachea. To evaluate ciliary morphology and basal body orientation, we used super-resolution fluorescence microscopy and scanning electron microscopy. To evaluate ciliary function, we analyzed ciliary beat frequency (CBF) and ciliary bend angle (CBA). We performed immunofluorescence microscopy analysis to evaluate the localization of β_2 AR, Na^+/H^+ exchanger regulatory factor (NHERF) 1. In addition, we also performed biotinylation assay to analyze the expression level of cell surface β_2 AR.

【Results & Discussion】 The trachea and airway ciliary cells of *Vil2^{kd/kd}* mice represented normal morphology and basal body orientation. These results suggested that ezrin is not directly involved in development and planer cell polarity of cilia. Procaterol, which is a selective β_2 AR agonist, stimulates ciliary beating (CBF and CBA) *via* β_2 AR in the airway ciliary cells. In the *Vil2^{kd/kd}* mice, airway ciliary beating stimulated with procaterol was partly inhibited. In addition, the cell surface expression of β_2 AR in *Vil2^{kd/kd}* mice was significantly lower than in WT mice. In airway ciliary cells in *Vil2^{kd/kd}* mice, the localization of NHERF1 and β_2 AR in subapical region was disturbed. These results suggest that ezrin regulates the beating of airway ciliary cells by promoting the apical surface localization of β_2 AR without morphological changes.

Study on the expression and localization of ACE2 protein in the primary culture of human airway epithelial cells

Kasane Yasuoka, Rina Kamiya, Kotoku Kawaguchi, Shinji Asano
College of Pharmaceutical Sciences, Ritsumeikan University,
Molecular Physiology Laboratory

【Background】Cell entry of SARS-CoV2 depends on binding of the viral spike (S) proteins to angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as the essential host receptor, and on S protein priming by host cell protease, transmembrane serine 2 (TMPRSS2). Immunofluorescent staining (IF) studies have shown expression of ACE2 in ciliated cells of airway epithelium, but these results vary depending on the antibodies. In addition, western blotting (WB) and RT-PCR reported splicing variant of ACE2 that lacks the N-terminal extracellular region in airway epithelium. However, the subcellular localization of ACE2 including this variant in ciliated cells is still unclear. In this study, we investigated the changes in protein expression and subcellular localization of ACE2 during differentiation of Normal Human Bronchial Epithelial cells (NHBE) and ciliated Human nasal epithelial cells (cHNEC) by WB and IF.

【Methods】NHBE and cHNEC were cultured on the Transwell permeable support filter until monolayer was formed, and differentiated by the air-liquid interface (ALI) method. Cilia were observed with an anti-acetylated tubulin antibody. WB and IF were performed using three different antibodies which recognize the N-terminus (HPA000288), the extracellular region (AF933), and the C-terminus (ab15348) of ACE2, respectively.

【Results】 NHBE and cHNEC were differentiated into multi-ciliated cells by 7 days after ALI treatment. Correspondingly, ACE2 expression was absent before ALI, and increased markedly by 7 days in ALI culture. The band pattern of ACE2 differed depending on the antibodies. HPA000288 and AF933 antibodies identified bands at 135 kDa (full length of ACE2), and 100 kDa. The ab15348 antibody identified bands at 135 and 55 kDa (corresponding to the splicing variant). After N-glycosidase treatment, the 135 and 100 kDa bands observed by HPA000288 and AF933 shifted to 97 and 70 kDa, respectively. The 135 kDa band observed by ab15348 was shifted to 97 kDa. However, the 55 kDa band remained unchanged. The 100 kDa band disappeared by the treatment with a TMPRSS2 inhibitor, Camostat. ab15348 stained mainly the apical plasma membrane and intracellularly, whereas HPA000288 staining was mainly observed in the cilia of a single ciliated cell.

【Discussion】ACE2 protein expression markedly increased during differentiation into ciliated cells. ACE2 has multiple variants, including the full length (135 kDa), N-terminal-deficient (55 kDa) and C-terminal-deficient ACE2 (100 kDa). The C-terminus-deficient ACE2 seems to be synthesized by processing by TMPRSS2. Subcellular localization of ACE2 was different between the full-length and N-terminally-deficient ACE2. The full-length ACE2 is expressed on cilia whereas the N-terminally-deficient ACE2 is expressed near the apical plasma membrane.

レット症候群原因遺伝子 CDKL5 の触媒部位内 1 アミノ酸置換による網羅的 *in silico* 機能予測解析

Comprehensive *in silico* functional prediction analysis of the Rett syndrome causative gene, CDKL5 by a single amino acid substitution in the catalytic domain

○吉村 優里、森井 篤、藤野 優希、武内 杏夏、北野 有砂、山下 莉子、上野 支帆、稲津 哲也

立命館大 薬学部・薬学研究科 ゲノム機能学 研究室

【目的】 レット症候群は X 連鎖性疾患であり、てんかんや重度の知的・運動発達遅滞を伴う神経発達障害を引き起こす。原因遺伝子として、*MECP2*、*CDKL5* (*Cyclin-Dependent Kinase-Like 5*) や *FOXG1* が知られている。*CDKL5* は、Ser/Thr リン酸化酵素であり、当該変異が *CDKL5* の機能に影響を及ぼす情報は診断に有益となるが、この変異部位と酵素活性との関係について調べられた例はほとんどない。本研究では *CDKL5* の触媒部位内 1 アミノ酸置換変異について、*CDKL5* 機能への影響を *in silico* で網羅的に解析し、臨床分類と相関を調査し、臨床診断上の有用な情報提供につなげることを目的とした。

【方法】 *in silico* 解析では、*CDKL5* の触媒部位が存在する N 末端の 300 アミノ酸について、野生型のアミノ酸から他の 19 アミノ酸に置換した場合の変異が、*CDKL5* の機能へ影響するかを予測した。*in silico* 解析には PolyPhen-2、PROVEAN、SIFT を用いた。また発表論文の集計結果については、臨床症状変異の意義のある例の分類を集め、*in silico* 解析の結果とこれらの意義の相関を検討した。

【結果】 1 アミノ酸置換変異を解析した結果、有害と判定された変異は、PolyPhen-2 の HumDiv モードでは 95.8 %、PolyPhen-2 の HumVar モードでは 92.3 %、PROVEAN では 82.6 %、SIFT では 88.0 %だった。さらに、臨床報告されている変異のうち十分な根拠のある変異を用いて、各ツールと複数のツールを組み合わせた場合 11 通りの Accuracy、Sensitivity、Specificity、予測が実際の目標値とどの程度相関しているかを表す The Matthews Correlation Coefficient (MCC) を計算した。その結果、75 %以上の変異が正しく判定されたことを表す $MCC \geq 0.5$ を得られたのは 3 つのツールそれぞれと 7 通りのツールの組み合わせだった。その中でも最も高い MCC を示したのは PolyPhen-2 の HumDiv モード、HumVar モード、PROVEAN の組み合わせであった。

【考察】 複数のツールの組み合わせを用いることで、臨床で新規変異が発見された際に、今後はより正確に、その意義を予測することができるようになると考えられる。また、今回の MCC の計算では、Benign と判断された臨床報告例が少なく、MCC が計算できない組み合わせもあった。今後は、Pathogenic、Benign とともに、*in vitro* や *in silico* でさらに多くの変異の意義を判断するとともに、*in silico* 予測の正確性についても検証する必要がある。

The effect of TGF- β 1 on the functional differentiation of multiciliated ependymal cells.

Takuya Hirao, Kim Beak Gyu, Kotoku Kawaguchi, Shinji Asano
(Ritsumeikan University, Molecular Physiology Laboratory)

ポスターP-12

【Background】

Multiciliated ependymal cells (MCCs) lining on the ventricular surface have essential roles in cerebrospinal fluid (CSF) flow. Dysfunction of ependymal cilia causes to CSF retention resulting in hydrocephalus. In recent study, it has been reported that fetal bovine serum (FBS) inhibits the differentiation into MCCs. However, the regulatory factors involved in development of MCCs have not been clarified. In this study, we prepared the primary culture of mouse MCCs using Transwell permeable support filter and demonstrated the effects of TGF- β 1 on the functional differentiation of MCCs.

【Materials & Methods】

Cells prepared from the whole brain of a newborn mouse were treated with DNase I and trypsin, proliferated in the medium containing 10% FBS, and seeded on Transwell permeable support filter. The cells were cultured in the FBS-free (FBS-/+), FBS-containing (FBS+/+), and TGF- β 1-containing conditions. TGF- β 1 (1 ng/mL) was added to the upper chamber (ventricle side). We studied the effects of FBS and TGF- β 1 on the differentiation of MCCs and ciliary movement. MCCs were visualized with an anti-acetyltubulin antibody, and nuclei were visualized by DAPI staining. The percentage of MCCs was calculated by the ratio between the number of MCCs and total cells. The ciliary movement was observed using a microscope equipped with a high-speed camera, and ciliary beat frequency (CBF) was measured as a parameter of ciliary movement.

【Results & Discussion】

The percentages of MCCs were 29% and 60% at 28 days of culture in the FBS+/+ and FBS-/+ conditions, respectively. These results showed FBS inhibited the differentiation into MCCs. In the TGF- β 1-containing condition, the percentage of MCCs was 28% at 28 days of culture. These results showed that TGF- β 1 also inhibited the differentiation into MCCs. Furthermore, we found that the number of MCCs which contain motile cilia decreased after 28 days of culture in the FBS +/+ and TGF- β 1-containing conditions compared with the FBS-/+ condition. In addition, CBF was decreased in the FBS+/+ and TGF- β 1-containing conditions. These results suggested that TGF- β 1 inhibits differentiation into MCCs and impairs the ciliary movement.

口頭発表：オンラインと対面のハイブリッド形式

【開催日時】2022年9月1日(木)16時開始

【開催場所】カラーニングハウス I, C301

【発表形式】一人の持ち時間15分間（質疑応答も含む）

*学生は優秀発表賞の審査対象になります。

1) 16:00~16:15

Prader-Willi syndrome とシナプス形成におけるスパインの役割

The spine formation in Prader-Willi syndrome and synaptogenesis

○森岡実央、添田修平、谷浦秀夫

立命館大学大学院 薬学研究科 神経化学研究室

2) 16:20~16:35

Prader-Willi syndrome における脂肪細胞分化・機能の解析

Analysis of adipocytes differentiation and functions in Prader-Willi syndrome

○添田修平、岸村うらら、原田真希、谷浦秀夫

立命館大学 薬学部・薬学研究科 神経化学研究室

3) 16:40~16:55

染色体15番11-13領域に重複を持つASDモデルマウスは重篤な発生学上の異常を示した

Model mice with chromosome 15q11-13 duplication show severe developmental abnormalities

○中谷仁¹、豊田太²、郷康宏³、堀家伸一⁴、小山なつ⁵、等誠司⁵、内匠透⁷、遠山育夫⁶、森川茂廣⁶、犬伏俊郎⁶、澤野俊憲¹、田中秀和¹

¹立命館大学 薬理学

²滋賀医科大学 細胞生理学

³生理学研究所 脳科学

⁴金沢大学 疾患モデル総合研究センター

⁵滋賀医科大学 統合臓器生理学

⁶滋賀医科大学 神経難病研究センター

⁷神戸大学 生理学・細胞生物学

休憩 16:55~17:10

4) 17:10~17:25

気道線毛の形態形成および運動調節における Ezrin の役割の検討

Roles of ezrin on the morphogenesis and regulation of movement of airway cilia

○川口高徳、齋藤大地、安岡加紗音、浅野真司

立命館大学 薬学部・薬学研究科 分子生理学研究室

5) 17:30~17:45

ヒト気道初代培養細胞における ACE2 タンパク質の発現変化、発現局在の検討

Study on the expression and localization of ACE2 protein in the primary culture of human airway epithelial cells

○安岡加紗音、神谷莉那、川口高徳、浅野真司

立命館大学大学院 薬学研究科 分子生理学研究室

6) 17:50~18:05

レット症候群原因遺伝子 CDKL5 の触媒部位内 1 アミノ酸置換による網羅的 *in silico* 機能予測解析

Comprehensive *in silico* functional prediction analysis of the Rett syndrome causative gene, CDKL5 by a single amino acid substitution in the catalytic domain

○吉村 優里、森井 篤、藤野 優希、武内 杏夏、北野 有砂、山下 莉子、上野 支帆、稲津 哲也

立命館大学大学院 薬学研究科 ゲノム機能学

ポスター発表:

【開催日時】 2022年9月2日(金)13時開始

【開催場所】 サイエンスコア南棟演習室2階202と3階303

【発表時間】 13:00~14:00 奇数番号(3階303)

14:00~15:00 偶数番号(2階202)

*筆頭の発表者は該当する時間中、ポスターの前に居てください。学生は優秀発表賞の審査対象になります。

P-① 脳梗塞後の自発運動は新生アストロサイトの残存を促進し、遺伝子発現を変化させる

Voluntary running exercise promotes the survival of newborn astrocytes and changes astrocytic gene expression after cerebral ischemia

○山口菜摘、澤野俊憲、中谷仁、田中秀和

立命館大学大学院 生命科学研究科 薬理学

P-② 脳梗塞後の海馬歯状回で誘導される Arcadlin が樹状突起スパイン密度に及ぼす影響

Effect of Arcadlin induction on the dendritic spine density in the hippocampal dentate gyrus after cerebral ischemia

○中澤秀真、井上耀介、井上翔太、山口菜摘、中谷仁、澤野俊憲、田中秀和

立命館大学大学院 生命科学研究科 薬理学

P-③ マウス海馬歯状回におけるデスモプラキンの局在

Localization of Desmoplakin in dentate gyrus of mouse hippocampus

○高山晃行、雑賀智菜実、上村健士郎、小山奈々、飯橋快斗、澤野俊憲、中谷仁、田中秀和

立命館大学大学院 生命科学研究科 薬理学

P-④ CDKL5 ノックインマウスの行動解析

Behavior analysis of *cdkl5* knock-in mice

○武内杏夏、鎌田雅之、稲津哲也

立命館大学大学院 薬学研究科 ゲノム機能学

P-⑤ FRAP 解析による ALS 型 FUS 変異体における相分離制御異常の解明

Characterization of the dyscontrol of phase separation in ALS-linked FUS mutants using FRAP analysis

○柳森美貴¹、萬年太郎¹、吉澤拓也¹、山下暁朗²、早野俊哉¹
¹立命館大 生命科学、²琉球大 医

P-⑥ Barrier-to-autointegration factor (BAF)の塩基除去修復への関与

Possible involvement of barrier-to-autointegration factor (BAF) in base excision repair (BER)

○杉山友菜¹、野間菜実子¹、小野田優¹、岩本大輝¹、近松歩美¹、西良太郎²、萬年太郎¹、早野俊哉¹
¹立命館大 生命科学、²東京工科大 応用生物学

P-⑦ タンパク質の相互作用解析によるがん細胞で形成される Sam68 核内構造体の新規構成因子の探索

Analysis of novel Sam68 nuclear body components in cancer cell line by LC-MS/MS.

○友近愛¹、後藤雅人¹、萬年太郎¹、山下暁朗²、廣瀬哲郎³、早野俊哉¹
¹立命館大 生命科学、²琉球大 医、³大阪大 生命機能

P-⑧ BAF の塩基除去修復への関与

Possible involvement of barrier-to-autointegration factor (BAF) in nucleotide excision repair (NER)

○岩本大輝¹、野間菜実子¹、小野田優¹、近松歩美¹、萬年太郎¹、西良太郎²、早野俊哉¹
¹立命館大 生命科学、²東京工科大 応用生物学

P-⑨ Néstor-Guillermo progeria syndrome (NGPS)治療薬スクリーニングのプラットフォームの構築

トフォームの構築

Construction of a platform to search for a therapeutic drug candidate for Néstor-Guillermo progeria syndrome (NGPS)

○小松千恵、山口千晶、Li Siyao、植野桃花、野間菜実子、萬年太郎、菊地武司、早野俊哉
立命館大 生命科学

P-⑩ Barrier-to-autointegration factor-like protein (BAF-L)の機能解析

Functional analysis of barrier-to-autointegration factor-like protein (BAF-L)

○大高幸也、萬年太郎、早野俊哉
立命館大 生命科学

P-⑪ Prohibitin/Prohibitin2 を介した Emerin の機能解析

Functional analysis of Emerin mediated by Prohibitin/Prohibitin2

○白敷 聖矢、五十嵐遼、阿部貴佳子、萬年太郎、下畑宣行、早野俊哉
立命館大 生命科学

P-⑫ 脳室上衣線毛細胞の分化と機能における TGF- β 1 の影響

The effect of TGF- β 1 on the functional differentiation of multiciliated ependymal cells.

○平尾拓也、川口高德、浅野真司
立命館大学大学院 薬学研究科 分子生理学研究室

P-⑬ 小児と成人において発症する遺伝性稀少疾患遺伝子の比較解析

Comparative analysis of genes for genetic rare diseases that occur in pediatric and adult

○櫻谷卓也、久保田幸彦、伊藤将弘
立命館大学大学院 生命科学研究科

P-⑭ 細胞周期制御における STAT3 スプライシングアイソフォームの機能解析

Elucidation of the function of STAT3 splicing isoforms in the cell cycle regulation

○黄瀬美妃、鈴木健二、正木聡
立命館大学大学院 薬学研究科 生体情報制御学研究室