「炎症の慢性化機構の解明と制御」研究領域 領域活動・評価報告書
－平成 27 年度終了研究課題－

研究総括 高津 聖志

1. 研究領域の概要

本研究領域は、生体防御反応であるにもかかわらず、炎症が慢性化することによって生体に悪影響を引き起こす現象の実体解明に向けた研究、すなわち、炎症の慢性化とその維持機構、および炎症の慢性化が疾患を惹起・進行・重症化する機構の時空間的な解明に挑戦する研究を対象とします。このような研究を推進することにより、炎症の慢性化が関与するさまざまな疾患や臓器不全の予防や治療、創薬につながる新たな医療基盤の創出を目指します。

具体的には、下記の視点をもった研究を推進します。

1） 分子や細胞の階層から迫る研究に加え、組織や臓器の階層から迫る視点
2） 細胞や組織、臓器間の相互作用、個体全体でのダイナミクスなど、慢性炎症を複雑系として捉える視点
3） エピジェネティクスや機能性非コード RNA など、他生命科学分野からの視点
4） 遺伝子産物、生理活性物質、細胞やそれらの動態を検出・測定する技術的な分野からの視点
5） 慢性炎症の制御による関連疾患を標的とした創薬などの医療応用を見据えた視点

2. 事後評価対象の研究課題・研究者名

件数： 15 件（内、大挑戦型 1 件）
※研究課題名、研究者名は別紙一覧表参照

3. 事前評価の選考方針

選考の基本的な考えは下記の通り。

1）選考は、「炎症の慢性化機構の解明と制御」領域に設けた選考委員 11 名の協力を得て、研究総括が行う。
2）選考方法は、書類選考、面接選考及び総合選考とする。
3）選考に当たっては、さきがけ共通の選考基準（URL：http://www.jst.go.jp/pr/info/info825/besshi4.html）に則ると共に、領域の課題達成に向け、3回の選考を通じて幅広い研究課題を採択するように努めた。

4. 事前評価の選考の経緯

一応募課題につき領域アドバイザー・外部評価者3名が書類審査し、書類選考会議において面接選考の対象者を選考した。続いて、面接選考および総合選考により、採用候補課題を選定した。

<table>
<tr><th rowspan="2">選 考</th><th rowspan="2">書類選考</th><th rowspan="2">面接選考</th><th colspan="4">採択数</th></tr>
<tr><td rowspan="3">10件</td><td rowspan="3">内訳</td><td colspan="2">3年型 10件</td></tr>
<tr><td rowspan="2">対象数</td><td rowspan="2">125件</td><td rowspan="2">24件</td><td colspan="2">5年型 0件</td></tr>
</table>

本領域においては、5年型、大挑戦型を公募しなかった。

備考：

1）加えて、以下を今年度の事後評価対象とする。

・有田 誠研究者
大挑戦型として採択され、期間延長審査の結果、2 年間延長したため。

・井垣 達吏研究者、大谷 直子研究者、茂呂 和世研究者
研究期間が 5 年で、今年度終了するため。

・巻出 久美子研究者
ライフイベントにより研究を一時中断し、終了年度がずれるため。

5. 研究実施期間

上記備考の順に記載する。

1）平成 22 年度採択 3 年型/大挑戦型

平成 23 年 4 月～平成 28 年 3 月

2）平成 22 年度採択 5 年型/通常型

平成 23 年 10 月～平成 28 年 3 月

3）平成 23 年度採択 3 年型/通常型（ライフイベント）

平成 23 年 10 月～平成 27 年 7 月

4）平成 24 年度採択 3 年型/通常型

平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月

6. 領域の活動状況

領域会議：10 回

研究報告会：3 回

研究総括（または技術参事）の研究実施場所訪問：研究開始時に研究総括、技術参事、事務参事が各研究室を訪問し、独立前の研究者の上司やメンターには、さきがけ研究が円滑に実施できるよう、適切な協力を依頼した。研究総括からは、さきがけ研究課題のみならず、それを想起するに至った研究経緯・背景をヒアリングすると共に、今後日本を代表する Principal Investigator となるための研究遂行上における倫理面などへの自覚を促した。さらに、研究室、研究設備等を確認し、研究環境の説明を受け、研究実施に支障がないことを確認した。また、研究実施に必要な事務的な手続きについての説明も行った。

7. 事後評価の手続き

研究者の研究報告書を基に、評価会（研究報告会、領域会議等）での発表・質疑応答、領域アドバイザーの意見などを参考に、下記の流れで研究総括が評価を行った。

（事後評価の流れ）

平成 27 年 12 月　評価会開催

平成 28 年 2 月　研究総括による事後評価

平成 28 年 3 月　被評価者への結果通知

8. 事後評価項目

（1）研究課題等の研究目的の達成状況

（2）研究実施体制及び研究費執行状況

（3）研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果（今後の見込みを含む）

（4）大挑戦型についてはさらに、大挑戦型として取り組む挑戦的な研究項目に対する進展についても評価項目とした。

（5）世界レベルの若手研究リーダーの輩出の観点から、本さきがけ研究が、研究者としての飛躍につながったか（今後の期待を含む）。

9. 評価結果

医学全般の分野で「炎症の慢性化」への注目が高まっている中で開始された本領域も終盤を迎え今年度は 15 件の研究課題を事後評価することになった。いずれの課題においても研究者は熱心に質の高い研究を遂行し、全体としては期待以上の成果をあげることができたと考える。自然免疫系における炎症（抑制）因子、発がんに関わる慢性炎症の発現メカニズム、心疾患やメタボリックシンドローム、自己免疫疾患や神経系疾患など研究対象は多岐にわたるが、特記すべき成果を列挙すると次のようである。1）炎症関連脂質に関する最先端のメタボローム解析による炎症収束因子（炎症収束期の好酸球、多数の新規炎症収束性脂質メディエーター）の同定、2）2 型自然リンパ球の非アトピー性喘息とステロイド抵抗性での役割とその制御メカニズムの解明や、高脂肪食誘導性肥満における役割、3）Ras 活性化とミトコンドリア機能障害を起こした細胞の SASP を伴うがん原性炎症性の細胞非自律的な腫瘍悪性化の分子機構の解明、4）肥満による肝がん発症が、肥満に基づく腸内細菌叢の変化に伴う代謝産物の産生亢進により肝星細胞の細胞老化-SASP によること、5）心不全の病態形成・制御における各種免疫系細胞の関与、6）メタボリックシンドロームの病態基盤とし

て脂肪組織や肝臓における慢性炎症性変化の分子機構の解明、7）肥満における炎症反応を誘導してインスリン抵抗性や2型糖尿病の発症に関わるRNA依存性リン酸化酵素PKRがエネルギー代謝性ストレス時に結合する内在性RNAの同定とPKR活性化機構の解明、8）細胞内ウイルスRNAセンサー分子MDA5の遺伝子変異による恒常的な活性化がSLE様症状を引き起こし得ること、9）従来使用されてきたアルツハイマー病（AD）モデルマウスの多くの欠点を克服するAPPノックインマウスを完成させ、AD研究のための新たな世界基準ツールとなったことなどである。

これらの多くは、領域会議等における領域アドバイザーからのアドバイスや討論・情報交換、さらには他のさきがけ研究者との共同研究が行われる中で育まれた成果と考える。一方で、チャレンジングな課題であるために期間内に成果を十分にまとめられなかった課題もあったが、興味深いデータが蓄積されており今後の研究の進展に期待している。研究者別に研究内容と評価を以下に述べる。

1．有田　誠　研究者「炎症の収束機構の分子基盤の確立と慢性疾患への適用」（3年型大挑戦型の2年延長）

炎症を制御する脂質メディエーターのメタボロミクスに関する日本でも有数の研究者の一人であり、EPAやDHAなどのω3系脂肪酸を前駆体として生成される炎症収束性脂質メディエーターを同定し、炎症を収束する細胞として、好酸球を特定した実績がある。本課題研究においては、1）12/15-リポキシゲナーゼ（12/15-LOX）を発現する好酸球が近傍のマクロファージの形質を制御することで好中球性炎症の収束を促進すること、2）12/15-LOXは好酸球のみならず一部のマクロファージにも高発現し、これら亜集団が他に比べて高い貪食能を有することで炎症の制御に関与するという新知見を提供した。とりわけ、3）好酸球に機能多様性（サブセット）が存在する可能性、すなわち炎症収束に関する好酸球はアレルギー性好酸球に比し形態や遺伝子発現パターンが異なることを示し、またヒト重症喘息患者の末梢血好酸球には健常者と比べて明らかな脂肪酸代謝バランスの異常が認められることを見いだした。4）新規の抗炎症性メディエーターとして、心不全モデルマウスの心臓リモデリング（組織線維化）を抑制する18-HEPE、食物アレルギーモデルの症状を緩和する17,18-EpETE、好中球性炎症を強力に抑制するレゾルビンE3、12-OH-17,18-EpETEの同定に成功し、論文発表した。収束期に出現する特異な好酸球やマクロファージ亜集団の特性解析、抗炎症脂質メディエーターの標的分子の解析については、現在も鋭意進行中である。

このように、炎症の収束に関与する脂質メディエーターや細胞とそれらの機能や相互作用を解析することにより、創薬ターゲットの探索に役立つ情報を提供するとともに、ω3系脂肪酸の食品として意義について科学的に証明し、社会的にも注目される成果をあげた。研究目標の一つであった、好酸球亜集団による炎症の収束に関する研究も新しい方向性を見いだし、新規炎症収束性脂質メディエーターを多数見いだすなど、計画以上の進捗を示した。大挑戦型研究として十分な実績をあげたと高く評価したい。新規の抗炎症性メディエーターや脂質メディエーターのメタボロミクス新技術の開発と応用の分野で、他のさきがけ研究者との共同研究や交流を積極的に推進し、研究をさらに加速させるとともに研究者として著しい成長を遂げていると高く評価したい。

2．井垣　達吏　研究者「上皮のがん原性炎症が駆動する非遺伝的腫瘍悪性化の分子基盤」（5年型）

世界に先駆けて構築した、ショウジョウバエ遺伝的モザイク法を駆使した腫瘍悪性化モデルを利用し、さきがけ研究期間の前半で、がん遺伝子Rasが活性化した上皮細胞（良性腫瘍）にさまざまな突然変異を誘導し、周囲の上皮細胞を強く増殖させる突然変異の原因遺伝子としてミトコンドリア呼吸鎖の機能に関わる遺伝子群を見いだしている。Rasが活性化した細胞でミトコンドリア呼吸鎖の機能障害が起こると、がん抑制経路（Hippo経路）を阻害してUpd（炎症性サイトカインIL-6のホモログ分子）などを発現するようになり、周囲の良性腫瘍を悪性化（強い増殖促進や浸潤・転移能を獲得）することを明らかにした。

その後、細胞非自律的な腫瘍悪性化の分子機構をさらに解析し、Ras活性化とミトコンドリア機能障害を起こした細胞は活性酸素種を大量に産生してJNKシグナルを活性化し、JNKシグナルがRasシグナルと協調してHippo経路が不活化した結果Upd産生が誘導されて、これに応答する周辺細胞がJAK/STATシグナル依存的に腫瘍悪性化を引き起こすこと（がん原性炎症と命名）を明らかにした。また、Ras活性化とミトコンドリア機能障害を起こした細胞は、がん抑制タンパク質p53などの活性化により細胞老化の特徴である細胞周期の停止を招来し、それがJNKシグナル活性の増強に必須の役割を果たして、炎症性サイトカインなどを分泌するSASP現象を呈していることを明らかにした。

以上、がん原性炎症を起こした変異細胞が、がんの発生や進展を促す微小環境において重要な役割を果たしている可能性を実験的に示し、本研究課題の当初の目標を十分に達成する成果を収めたと評価する。そ

のメカニズムが哺乳類においても生ずるもので新たながん治療戦略の基盤となり得るものなのか、またその生理的役割は何なのかなど興味が尽きない。本研究者は、その成果により国内外から高く評価され、研究者としても目覚ましく成長したことは誠に喜ばしい。

3. 大谷　直子　研究者 「細胞老化シグナルからみた慢性炎症と癌進展の新しい発症メカニズムの解明」（5年型）

細胞老化は重要な発癌防御機構であるが、老化細胞から炎症性サイトカインなどを持続分泌する現象（SASP）を随伴することから、細胞老化から見た慢性炎症とがんの進展に焦点を合わせ研究を推進している。化学発癌剤 DMBA を塗布されたマウスに高脂肪食を摂餌すると肝がんが高率に発症する系を駆使して、さきがけ研究期間の前半で、高脂肪食摂取や遺伝的な肥満により腸内で増殖した特定のグラム陽性細菌が一次胆汁酸から多量のデオキシコール酸を生成し、それが腸肝循環により肝臓に到達して肝星細胞の細胞老化を誘導し、その肝星細胞から炎症性サイトカインなどを持続分泌する現象（SASP）を引き起こし、結果として肝星細胞の近くの肝細胞で肝がんの発症を促進することを明らかにして論文発表した。その後、SASP 因子の発現が、肥満で増加するグラム陽性腸内細菌の細胞壁成分のリポタイコ酸（LTA）による TLR2 経路の活性化を伴う炎症誘導機構（COX2 の誘導とプロスタグランジンの産生）により亢進することを見いだしている。肥満誘導性肝がんのモデルではグラム陽性菌が著明に増えること、それを標的とするバンコマイシンを投与したマウスでは肥満誘導性肝がんの発生が抑制されることを示している。その他、本研究の過程で副次的ではあるが、皮膚損傷時の組織再生における皮膚筋線維芽細胞の一時的な SASP 現象（増殖因子の分泌）の関与や、新たな個体老化の分子メカニズムとしてがん抑制遺伝子産物 p16 が細胞老化を誘導するだけでなく抗老化遺伝子 α-Klotho の発現を抑制的に制御することを明らかにして発表している。

肥満、腸内細菌、細胞老化と発癌とのダイナミックな関係を示した成果と論文は、広範な研究領域の研究者に対してばかりでなく、国内外においても社会的に大きなインパクトがあった。本研究課題である肥満−細胞老化−がん進展の新たな発症メカニズムの解明の骨子となる成果を示すことができたと高く評価する。今後、研究成果の発表に対しても科学的・社会的な反響を呼ぶものと大いに期待できる。他のさきがけ研究者との共同研究を含む交流が研究進展に重要な要素となったこと、また本研究の成果を通じて研究者として大いに成長したことは、本領域にとっても誇らしい成果でもある。

4. 茂呂　和世　研究者 「IL−33 産生を伴う慢性疾患と加齢や肥満により増加したナチュラルヘルパー細胞が TH1/Th2 バランスの破綻を惹起するメカニズムの解明」（5年型）

現在 2 型自然リンパ球（Group 2 innate lymphoid cell, ILC2）に分類される、Th2 サイトカインを産生するナチュラルヘルパー（NH）細胞を世界に先駆けて同定し、その解析は世界をリードしている。NH 細胞のサイトカイン産生、増殖/分化には転写因子 GATA3 が関与し、NH 細胞の IL−25/IL−33 に対する応答性や IL−33 受容体発現量・ケモカインレセプター発現・生存へのサイトカイン依存性において他の ILC2 との相違点を明らかにした。マウスモデルを用いた疾患研究では、1) IL−33 の気管内投与で誘導する非アトピー性喘息モデルにおける好酸球浸潤に NH 細胞が産生する IL−5 と Eotaxin が必須であること、2) OVA と IL−33 との同時投与による喘息モデルで生じるステロイド抵抗性が OVA 投与により発現が上昇する TSLP に依存し、その TSLP が NH 細胞をステロイド抵抗性にすることを見事に証明した。さらに、TSLP により活性化される STAT5 を阻害する薬剤スクリーニングの結果、既存薬ピモザイドが阻害効果を持つことを見いだし、その投与によりステロイド抵抗性が解除されることを発表した。3）NH 細胞の増殖や 2 型サイトカイン産生を IFNβ、IFNγや IL−27 が STAT1 依存的抑制すること見いだし、寄生虫・真菌感染モデル・IL−33 誘導性喘息モデルにおける NH 細胞による炎症反応を IFN と IL−27 が収束させることを明らかにした。4）パラビオーシスを用いた実験から NH 細胞が組織依存的な細胞であり血行性に移動しない細胞であることを明らかにした。5）高脂肪食誘導性肥満において NH 細胞が肥満やインスリン抵抗性、M1 マクロファージの誘導に重要であることを見いだした。今後の研究展開が楽しみである。

さきがけ研究開始当初は自然リンパ球という言葉すら生まれていなかった中で提案された研究目標の一部は、研究の進捗に伴って NH 細胞の分化などの基礎的なものへ振り向けたが、NH 細胞の Th1/Th2 バランスの破綻を惹起するメカニズムという当初研究課題については、NH 細胞の活性化/抑制機構と各種疾患モデルマウスにおける NH 細胞の役割を解析することにより、大きな成果をあげることができたと評価する。研究者としても独立を果たし、今後の益々の成長を期待している。

5. 巻出　久美子　研究者 「生理活性脂質リゾホスファチジルセリンによる全身性エリテマ トーデス疾患発症

抑制メカニズムの解析」（ライフイベント 4 ヶ月延長）

リゾホスファチジルセリン（LysoPS）産生酵素である PS-PLA1 が全身性エリテマトーデス（SLE）患者で選択的に上昇することを見いだし、SLE のモデルマウスとして汎用されている MRL/lpr マウスに LysoPS を投与すると脾臓及びリンパ節の肥大が顕著に抑制されることなどから、LysoPS シグナルの SLE 病態、さらには慢性炎症疾患への関与について解析することを課題とした。LysoPS 関連分子である、PS-PLA1、受容体の LPS1、LPS2、LPS3 のそれぞれを欠失したノックアウト（KO）マウスを作出し、それと MRL/lprマウスを 10 世代戻し交配し、各系統マウスの SLE 様症状に関する解析を行った。その結果は野生型 MRL/lpr マウスとの間に有意な差が認められず、ループス腎炎における LysoPS の関与に関し、結論できていない。しかし、LPS2-KO と LPS3-KO では MRL/lpr マウスで見られる脾臓やリンパ節の腫脹がさらに亢進し、lpr 細胞の増加が見られた。そこで、LPS2 や LPS3 受容体に対する選択的アゴニストを創製し、MRL/lpr マウスに投与したところ、脾腫やリンパ節腫脹の抑制と lpr 細胞の減少が認められた。研究期間中には、数 nM レベルの LysoPS を検出できる測定系を確立し、急性炎症モデルにおいてマウス血中 LysoPS が上昇することを見いだしている。

以上、研究課題として目指した SLE 病態における LysoPS とその関連分子の役割についての十分な回答は得られなかったが、LysoPS が lpr 細胞のような異常リンパ球の増殖制御に係っていることを明らかにしたこと、また研究の過程で LysoPS 受容体選択的アゴニストの創製、微量 LysoPS 測定系を確立して発表していることは評価したい。それらは今後の LysoPS 関連研究に応用、発展させることができる成果と考える。諸般の事情により研究期間を 4 ヶ月延長し、最善を尽くしたものと評価する。

6. 大塚　基之　研究者 「炎症に伴う microRNA 機能不全が惹起する炎症性発癌の病態解明と制御法の開発」

癌組織における microRNA（miRNA）の全般的な発現低下がしばしば報告されている。本研究者は炎症に伴う生体ストレス（TNF αなどの炎症性サイトカイン刺激）によって miRNA による遺伝子発現抑制機能が阻害されることを明らかにしてきたことから、「遺伝子発現を配列依存的に制御する miRNA の機能を慢性炎症が持続的に阻害し、それによる全般的な miRNA の機能低下によって炎症続発性の癌が惹起される」という仮説のもとに研究を開始した。そこで、miRNA の成熟に必須の Dicer 遺伝子を腸管上皮細胞特異的にノックアウト（KO）したマウスを作出し、実験的に炎症続発性の大腸癌を誘導したところ、野生型やホモ KO マウスに比べ、Dicer 発現量が中等度のヘテロ KO マウスで最も腫瘍形成性が高く、c-Myc や LIN28B などの癌遺伝子の発現も増強されていることを見いだし発表した。現在、この成績に基づき純化した細胞株を用いて、責任遺伝子の in silico 解析を進めている。TNF αなどの炎症性サイトカインは miRNA 機能に関わる APOBEC3G タンパク質の分解を促進することにより Ago2 との結合量が減少し Ago2 関連複合体への miRNA の取り込み量の減少、慢性炎症による miRNA の機能を減弱させることを見いだしている。miRNA の機能を全体的に増強する化合物を探索し、ヒットした ROCK 阻害剤による機能増強作用を解析し結果を発表している。また、miRNA 機能低下を可視化できるレポーターマウスを作出し、炎症続発性大腸癌を誘導したところ、腫瘍発生の経過で miRNA の機能が低下すること、ROCK 阻害剤を投与すると miRNA 機能が回復し腫瘍形成も抑制されたことから、持続炎症続発性腫瘍の発生に miRNA 機能の低下が背景の病態として関与し、その機能増強により腫瘍形成を抑制できるというデータを取得している。

スケールの大きな構想に基づく研究であり、miRNA や責任遺伝子の詳細は不明ながら、既存 ROCK 阻害剤のドラッグリポジショニングを視野に入れた臨床医学の研究者らしいアプローチにも好感が持てる。今後の研究の発展と臨床を視野に入れた今後の展開を期待したい。

7. 加藤　博己　研究者 「慢性腎炎発症マウスモデルを用いた発症機序の解明」

化学変異原 ENU を用いて得られたループス様腎炎を自然発症するマウスを詳細に解析し、腎炎発症の原因が細胞内ウイルス RNA センサーである MDA5 の G821S 変異であることを発見した。また、この変異により MDA5 が構造変化を起こして恒常活性型となることを、原子間力顕微鏡を用いて明らかにした。このマウスでは MDA が恒常的に活性化され、結果として樹状細胞やマクロファージの恒常的な活性化と炎症性サイトカインの発現、とりわけインターフェロン産生の上昇、T 細胞の活性化と B 細胞による自己抗体の産生を引き起こし、抗体、補体を含む免疫複合体が糸球体に沈着することが慢性腎炎の原因であることを示した。このマウスの腎炎の所見はヒト SLE で見られるループス腎炎に似ていることを示し、発表した。最近、ループス腎炎患者においても MDA5 の変異が発見され、このマウスがループス様腎炎などの自己免疫疾患の良いモデルとなることが期待されている。今後、MDA5 変異マウスを用い、ループス様腎炎の予防法や治療薬開発に役立つことを期待している。

本さきがけ研究により、ウイルス核酸センサーの異常活性化が自己免疫疾患を引き起こすことを直接証明している。この詳細な解析と成果は高く評価したい。臨床を含めたさきがけ領域内外のさまざまな研究者との共同研究等により、MDA5 変異マウスを用いループス腎炎の阻害剤の開発研究や治療法の確立など、今後さらなる発展が期待できる。

8. 倉石　貴透　研究者 「内因性リガンドによる進化的に保存された自然免疫活性化機構の解明」

ショウジョウバエを用いて新規の自然免疫活性化機構の解明を目指した本研究課題において、1）Toll 経路の活性化を起こしやすい培養細胞を見いだしてゲノムワイド RNAi スクリーニングを実施し、dMyd88 などのシグナル伝達因子をユビキチン化して Toll 経路のシグナル伝達を活性化する新規シグナル伝達因子 Sherpa を同定して発表した。Sherpa は主に細胞膜に局在し、dMyd88 と共局在し、NF-κB の活性化に関与することを明らかにした。2）ショウジョウバエ幼虫の抽出液中に存在する抗菌ペプチド発現誘導活性がタンパク質性の Toll 受容体の新規内因性リガンドであると推測した。その他に未公開ながら、受容体型グアニル酸シクラーゼ Gyc76C の下流において dMyd88 を活性化する分子機構の解明や、幼虫を用いて容易に無菌的な自然免疫活性化を誘導する方法を確立などの研究も進展しており、今後におけるそれらの成績の発表が期待できる。

研究期間中に複数の異動もあったが、それぞれの研究環境で十分に研究を進展させるとともに、哺乳類を用いたさらなる研究展開もしている。今後、それらの哺乳類での解析を進め、新たな炎症制御法の開発につなげて欲しい。大いに期待している。

9. 幸谷　愛　研究者 「癌細胞由来小分子 RNA による炎症細胞の制御」

EBV 陽性ホジキンリンパ腫の腫瘤中にはわずか 1%程度しか腫瘍細胞が存在せず、腫瘍細胞は大部分を占める周囲の多種多様な炎症細胞の存在下でしか生着できない。本課題ではその腫瘍細胞と炎症細胞との相互作用について分泌性小分子 RNA の観点から検討を行い次のような結果を得ている。1)試験管内とヒトリンパ腫検体において、腫瘍由来分泌性小分子 RNA がエクソソームに内包され単球/マクロファージに特異的に取り込まれること、2)ヒト単球に対する腫瘍由来分泌性小分子 RNA を内包するエクソソームの作用を調べ CD69/IL-10/TNF の発現増強のほか、免疫抑制性の M2 マクロファージで高発現する遺伝子の発現上昇を引き起こし、マクロファージを腫瘍支持性へ変化させること、3)ヒト EBV 陽性びまん性大細胞型リンパ腫患者病理検体における EBV コード miRNA の一つである BART13 の標本全体の発現量や腫瘍細胞あたりの産生量と生存期間が有意に相関し、腫瘍由来小分子 RNA が癌生物学的に極めて重要な機能を持つこと、4)造血系ヒト化 NOG マウスに EBV 感染させる EBV リンパ増殖疾患モデルを確立し、EBV コード miRNA 欠損株と野生型 EBV の作用を検討したところ欠損株において炎症や腫瘍の形成がされにくく、EBV コード miRNA に炎症惹起、腫瘍形成促進作用があることを明らかにした。

今後、エクソソームや特定のマクロファージサブセットを除去するなど、現在有効な治療法のない EBV 関連リンパ腫に対する新たな治療につながること、また腫瘍由来分泌性小分子 RNA—マクロファージ腫瘍随伴化—腫瘍形成維持という軸が他のウイルス感染癌・炎症癌においても一般化できる可能性が期待できる。これまでの研究成果を論文として公表するとともに、この領域をリードする研究者としてさらに成長することを期待している。

10. 斉藤　貴志　研究者 「アルツハイマー病の病態悪性化と炎症反応の相互作用の解明」

本研究では、アルツハイマー病（AD）モデルマウスとして従来使用されてきた Aβを蓄積させる APP 過剰発現マウス（APP-Tg マウス）の欠点である種々の artifact を遺伝子ノックイン（KI）手法により克服し、新規 AD モデルマウス(APP-KI マウス)の開発に成功し論文として発表した。そのインパクトは顕著であり、論文発表からわずか 1 年半で 130 件以上の共同研究に発展しており、APP-KI マウスは AD 研究のための新たな世界基準ツールとなったと言えよう。Swedish 変異と Iberian 変異を導入した第二世代、さらに Arctic 変異も追加導入した第三世代などの APP-KI マウスを作出し、ヒト AD により近似したアミロイド沈着と神経炎症を呈することを確認している。神経炎症がアミロイド病理の下流に位置していることを明らかにしたが、現在さらにタウ病理も再現すべくマウスの改良を目指している。

APP-KI x Caspase-1 KO マウスを解析し、APP-Tg マウス用いた研究で報告された AD のアミロイド病理形成におけるカスパーゼ 1 依存性のインフラマソームの役割を否定できる結果を示し、カスパーゼ 1 非依存的なインフラマソームの存在が示唆された。また、APP-KI マウスの脳内で変動するサイトカイン/ケモカインを網羅的にスクリーニングし、特定した因子の影響を検討中で、これまで未解明であった AD 病理の分子機構の解明につながると強く期待される。

これまでの粘り強い研究と本研究により、AD 研究における新型モデルマウス（APP-KI マウス）を作出、その応用研究の成果は高く評価できる。AD 研究における APP-KI マウスの重要性は広く国内外に認識され始めており、企業等との共同研究を推進し、今後研究者として大きく成長する足がかりを得たと考える。

１１．佐野　元昭　研究者 「炎症の制御に基づく心不全の予防と治療］

本研究で、心不全に至るリスク因子である肥満・高血圧や心筋梗塞、大動脈解離の病態における分子治療標的探索のフィールドとして炎症反応に着目し、各種のマウスモデルを駆使して、次のような目覚ましい成果をあげた。1)心筋梗塞後の創傷治癒過程において樹状細胞がマクロファージの機能を制御することにより治癒過程を促進させて心不全発症を抑制する。一方 γδT 細胞は心臓における主たる IL-17 分泌細胞として心筋梗塞後の炎症の遷延化過程に関与している。2)心筋梗塞急性期に呼吸困難（低酸素血症）を引き起こす肺内の液体成分の貯留に、肺微小循環にトラップされ異常に活性化した好中球による肺の血管内皮細胞傷害が関与する。NK 細胞は IL-10 を分泌し、好中球による肺の血管内皮細胞傷害を抑制する。3)心不全を予防する効果があることが疫学的に証明されている、オメガ 3 脂肪酸の効果として、マクロファージが生成する EPA 由来の 18-HEPE が炎症や線維化を抑制し、心不全に対する予防効果を発揮する。4)大動脈解離発症後に脆弱化した血管壁の伸展により外膜側の細胞において好中球走化性因子 CXCL-1/G-CSF の発現が亢進し、外膜側に浸潤した好中球が IL-6 を産生して血管壁の外から内に向かって血管の炎症を引き起こすが、この現象が急性大動脈解離の患者で共通している可能性があることなどを明らかにし、発表している。

本さきがけ研究で、心不全の病態には神経体液性因子だけでなく免疫系の異常が深く関与していることを明らかにした。臨床医として患者に接しながら、既存の治療薬のターゲットとは全く異なる視点を有する独創性の高い研究成果であり、国内では既に衆目の認めるところである。今後、海外にもさらに研究成果をアピールして、この分野におけるオピニオンリーダーになることを期待している。

１２．菅波　孝祥　研究者 「代謝ストレスによる炎症の慢性化機構の解明」

本課題では、メタボリックシンドロームの病態基盤として脂肪組織や肝臓における慢性炎症性変化と全身への影響について解析し、新しい治療戦略の開発に向けた基盤技術を確立することを目標として、次のような研究成果をあげている。1）飽和脂肪酸が TLR4 を介してマクロファージの炎症性サイトカイン産生を誘導する以外に、TLR4 非依存的に炎症性サイトカイン IL-6 産生を引き起こす機序としてストレス誘導性転写因子 ATF4 を介する経路を見いだし発表した。2）慢性脂肪組織炎症の結果として脂肪組織の線維化が起こり、さらに肝臓等における異所性脂肪蓄積を招来するが、その病態形成においてキーとなる分子として、脂肪組織炎症の核となる crown-like structure (CLS)を構成する炎症促進性 M1 マクロファージに局在し病原体センサーとして知られる Mincle を同定して発表した。脂肪組織局所において CLS を中心として間質の線維化が生じることを初めて明らかにした。3）中枢性の摂食調節に重要なメラノコルチン 4 型受容体 MC4R を欠損するマウスに高脂肪食を負荷することで、肥満やインスリン抵抗性を伴って脂肪肝、非アルコール性脂肪肝炎（NASH）、肝細胞癌を経時的に、ほぼ 100%の確率で発症する新たな疾患モデルを確立した。単純性脂肪肝から NASH を発症する過程の肝組織において肥満脂肪組織の CLS と類似する肝臓 CLS が形成され、ここを起点として線維化が生じることを明らかにした。また、このモデルの病態を ω-3 多価不飽和脂肪酸の EPA 摂餌が抑制することを見いだし、本モデルが評価系として有用であることを見いだした。

基礎から臨床を見据えた広い視野で研究を継続し、メタボリックシンドロームの新たな病態の理解に資する研究成果を得た。短期 NASH モデルの開発の基盤技術の開発研究の発展も見られる。炎症の慢性化とメタボリックシンドロームの研究領域におけるリーダーの一人であり、本研究成果により独立を果たし、研究者としての飛躍につながっている。今後、益々の活躍に期待したい。

１３．中村　能久　研究者 「慢性炎症性疾患おける病因性二重鎖 RNA の解析」

本研究者は、肥満などの代謝性ストレス下で、内在性の二重鎖 RNA（dsRNA）に結合して活性化する PKR (Double-stranded RNA dependent protein kinase)が、肥満における炎症反応を誘導してインスリン抵抗性 2 型糖尿病の発症に関わることを見いだしている。本研究においては、肥満時の代謝性ストレス下で PKR と結合する内在性 RNA を探索し、H/ACA box 型 snoRNA (small nucleolar RNA)などが PKR を活性化することを明らかにして発表した。さらに、PKR が関わる炎症性反応やインスリン抵抗性の誘導機構を詳細に解析し、肥満時の肝臓において PKR は Dicer や TRBP (TAR RNA-binding protein)などのタンパク質と結合しており、ob/ob マウス肝臓の TRBP の発現を抑制すると、肝臓での PKR や JNK の活性低下、炎症性因子の発現減少、インスリンシグナルが亢進して耐糖能が改善することを確認して発表した。今後、代謝性ストレス下で内在性 RNA

が炎症性 dsRNA 結合タンパク質により認識されるようになる分子機構の解明に期待する。

以上のように、2 型糖尿病発症における内在性 RNA の重要性・意義について世界にさきがけて発表し、その一連の病態に関与する治療標的になる可能性のある分子を明らかにしてきたことは高く評価できる。さきがけ採択直後にハーバード大学からシンシナティ小児病院に異動して研究開始がやや遅れたが、さきがけ研究の成果により研究所内で高い評価を得、アメリカ国内での活躍の場も広がり、研究者としてのさらなる飛躍への足場が固まった。

14. 華山　力成　研究者「炎症性マクロファージによるリソソームの開口放出機構」

本課題では、慢性炎症の病態におけるマクロファージの役割を、リソソームの開口放出という観点から明らかにした。まず、リソソームと細胞膜の融合を促進する分子として myoferlin を同定し、myoferlin 欠損マクロファージにおいてリソソームやファゴリソソームの開口放出が阻害されていることを明らかにした。その結果、myoferlin 欠損マクロファージでは、細菌を貪食し消化した後に発生する残渣の開口放出が障害されており、蓄積した残渣がファゴリソソーム内で刺激を入れ続けることによって、IL-6 や IL-1β、TNF-αなどの炎症性サイトカインの発現誘導が長期間増強されることを見いだした。この結果から、マクロファージが細菌を貪食した後にその残渣を適切に放出することが炎症の収束に必須であるという新たな概念を提案した。一方、重度の細菌感染の結果、マクロファージによるリソソームの開口放出が過剰になると、多量のリソソーム酵素が放出され、周囲の健常な細胞や組織の傷害を引き起こすことを見いだした。さらに、myoferlin 以外のリソソームの開口放出に関わる他の分子として、細胞内小胞の輸送と放出に関与する Myosin Va やリソソームに局在するカルシウムチャネル TRPML1 を見いだした。

以上のように、炎症性マクロファージによるリソソームの開口放出が周囲の細胞に対応して傷害性を有すること、その開口放出が myoferlin によって制御されていることなどを明らかにした。今後、開口放出に関与する分子の制御機構を明らかにし、慢性炎症性疾患の予防や治療効果に関する研究展開に期待したい。

15. 丸山　玲緒　研究者「ピロリ菌感染の慢性胃炎において中心的な役割を果たす長鎖 ncRNA の網羅的探索の試み」

本課題では、ピロリ菌感染胃炎から胃癌への発癌過程を研究モデルとして、次世代シークエンサーを用いて実際の臨床検体の分子プロファイルを解析することにより、慢性炎症からの発癌に関与し得る長鎖 ncRNA(lncRNA)を同定し、その機能的意義を明らかにすることを目標とした。上部消化管内視鏡の生検検体から腺管分離法によって得た上皮細胞を用いた ChIPSeq 法を確立して解析を実施した。非癌患者 3 例と担癌患者 4 例の非癌部背景粘膜におけるヒストン(H3K4me3)プロファイルを比較し、担癌患者の非癌部背景粘膜で不活性化している lncRNA を 150 種類、活性化している lncRNA を 50 種類同定した。不活性化している 150 種類の中から、公共データベース TCGA で公開されている胃癌検体の RNASeq データを解析して発現量が癌部で非癌部より有意に低下しているものの一つ（lncRNA1）の機能について検討した。多数の臨床検体で同部位のメチル化を測定したところ、健常者やピロリ陽性胃炎患者に比べ癌患者非癌部で有意に高メチル化を示し、さらに TCGA の各種癌検体 5152 例の DNA メチル化データを解析したところ、この領域は胃癌のみならず、他臓器の各種の癌においても高頻度かつ癌特異的に高メチル化を示し、胃癌患者の背景粘膜に起こるエピゲノム変化とこれらの癌部に起こる変化に何らかの共通性があることが示唆された。また、活性化している上記 50 種類の中の一つ（lncRNA2）は多くの胃癌細胞株で発現亢進が見られ、さらにそのノックダウンにより細胞増殖能や遊走能が低下した。lncRNA2 は、TLR9 シグナルにより発現が誘導されるため自然免疫応答との関連が注目される。

発展途上の研究分野におけるチャレンジングな課題であり、特に lncRNA の機能解析については大変であったことが窺える。詳細な検討を経て本領域の目標の入り口までにはたどり着いたと評価したい。今後、蓄積された技術やデータを論文として公表し、研究のさらなる発展、lncRNA 研究に関する我が国のリーダーの一人として、研究発展の道を切り拓くことを期待する。

10.　評価者

研究総括　高津　聖志　富山県薬事研究所・所長

領域アドバイザー（五十音順。所属、役職は平成 27 年 12 月末現在）

烏山　一　　東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科　教授

佐田　政隆　　徳島大学 大学院ヘルスバイオサイエンス研究部　教授

反町　典子　　国立国際医療研究センター研究所　プロジェクト長
戸邉　一之　　富山大学　医学部　第一内科　教授
長田　重一　　京都大学　大学院医学研究科　教授
福井　宣規　　九州大学　生体防御医学研究所　教授
古市　泰宏　　(株)ジーンケア研究所　取締役会長
三浦　正幸　　東京大学　大学院薬学系研究科　教授
宮坂　昌之*　大阪大学未来戦略機構　特任教授
宮坂　信之　　東京医科歯科大学　名誉教授
宮園　浩平　　東京大学大学院医学系研究科　教授
山村　隆　　国立精神・神経医療研究センター　神経研究所　部長

＊ 平成 27 年 6 月～平成 29 年 3 月まで参画

（参考）

件数はいずれも、平成 27 年 12 月末現在。

（1）外部発表件数

	国　内	国　際	計
論　文	79	133	212
口　頭	266	129	395
その他	0	0	0
合　計	345	262	607

（2）特許出願件数

国　内	国　際	計
6	4	10

（3）受賞等

・井垣　達吏
　第 20 回日本 Cell Death 学会学術集会　最優秀演題賞（H23.7）
　第 11 回日本学術振興会賞（H26.12）
　ナイスステップな研究者 2014（H26.12）
・大谷　直子
　科学研究費審査委員の表彰（H24.10）
　（社団法人）日本女性科学者の会奨励賞（H26.6）
・巻出　久美子
　平成 23 年度新学術領域「脂質マシナリー」若手ワークショップ優秀賞（H24.2）
・倉石　貴透
　上原記念生命科学財団　研究奨励金（H25.3）
　双葉電子記念財団自然科学研究助成（H26.2）
・斉藤　貴志
　日本生化学会奨励賞（H24.10）
　文部科学大臣表彰　若手科学者賞（H25.4）
・佐野　元昭
　日本心不全学会　第 2 回学術賞（H26.10）
　日本臓器保存生物医学会研究奨励賞（H27.11）
・菅波　孝祥
　東京医科歯科大学優秀研究賞（H24.10）
　第 7 回臨床薬理研究振興財団研究大賞（H26.11）
　第 18 回高峰譲吉研究奨励賞（H26.11）

・中村　能久

Cincinnati Children's Hospital Trustee Award（H25.6）

Diabetes Action Research and Education Foundation Grant Award（H26.8）

Digestive Health Center, NIH P30 DK 078392, Pilot and Feasibility Award（H27.3）

・華山　力成

アステラス病態代謝研究会・最優秀理事長賞（H24.11）

大阪大学総長奨励賞（H25.8）

大阪大学総長顕彰（H26.7）

大阪大学総長奨励賞（H27.7）

・丸山　玲緒

第 35 回日本分子腫瘍マーカー研究会学術奨励賞（H27.10）

（4）招待講演

国際　68 件

国内　189 件

別紙

「炎症の慢性化機構の解明と制御」領域　事後評価実施　研究課題名および研究者氏名

（3年型）

研究者氏名 （参加形態）	研　究　課　題　名 （研究実施場所）	現　職（平成 28 年 3 月末現在） （応募時所属）	研究費 （百万円）
巻出　久美子 （兼任）	生理活性脂質リゾホスファチジルセリンによる全身性エリテマトーデス疾患発症抑制メカニズムの解析 （東北大学大学院薬学研究科）	東北大学大学院薬学研究科・ 助教 （同上）	39
大塚　基之 （兼任）	炎症に伴うmicroRNA 機能不全が惹起する炎症性発癌の病態解明と制御法の開発 （東京大学医学部附属病院）	東京大学医学部附属病院・ 特任講師 （同上・ 助教）	40
加藤　博己 （兼任）	慢性腎炎発症マウスモデルを用いた発症機序の解明 （京都大学ウイルス研究所）	京都大学ウイルス研究所・ 准教授 （同上）	44
倉石　貴透 （兼任）	内因性リガンドによる進化的に保存された自然免疫活性化機構の解明 （東北大学薬学研究科）	金沢大学医薬保健学域薬学類・ 准教授 （東北大学薬学研究科・ 助教）	41
幸谷　愛 （兼任）	癌細胞由来小分子 RNA による炎症細胞の制御 （東海大医学部）	東海大医学部・ 准教授 （東海大学創造科学技術研究機構・ 特任准教授）	54
斉藤　貴志 （兼任）	アルツハイマー病の病態悪性化と炎症反応の相互作用の解明 （理化学研究所脳科学総合研究センター）	理化学研究所脳科学総合研究センター・ 副チームリーダー （同上）	40
佐野　元昭 （兼任）	炎症の制御に基づく心不全の予防と治療 （慶應義塾大学医学部）	慶應義塾大学医学部・ 准教授 （同上・ 講師）	45
菅波　孝祥 （兼任）	代謝ストレスによる炎症の慢性化機構の解明 （名古屋大学環境医学研究所）	名古屋大学環境医学研究所・ 教授 （東京医科歯科大学難治疾患研究所・ 准教授）	48
中村　能久 （兼任）	慢性炎症性疾患における病因性二重鎖 RNA の解析 （Cincinnati Children's Hospital Medical Center）	Cincinnati Children's Hospital Medical Center・ Assistant Professor （Harvard School of Public Health・ Research Associate）	42
華山　力成 （兼任）	炎症性マクロファージによるリソソームの開口放出機構 （金沢大学医薬保健研究域医学系）	金沢大学医薬保健研究域医学系・ 教授 （大阪大学免疫学フロンティア研究センター・ 特任准教授）	45
丸山　玲緒 （兼任）	ピロリ菌感染の慢性胃炎において中心的な役割を果たす長鎖 ncRNA の網羅的探索の試み （札幌医科大学医学部）	札幌医科大学医学部・ 准教授 （同上・ 助教）	40

（3年型＋大挑戦型 2 年延長）

研究者氏名 （参加形態）	研 究 課 題 名 （研究実施場所）	現 職（平成 28 年 3 月末現在） （応募時所属）	研究費 （百万円）
有田 誠 （兼任）	炎症の収束機構の分子基盤の確立と慢性疾患への適用 （理化学研究所統合生命医科学研究センター）	理化学研究所統合生命医科学研究センター・チームリーダー （東京大学大学院薬学系研究科・准教授）	64

（5年型）

研究者氏名 （参加形態）	研 究 課 題 名 （研究実施場所）	現 職（平成 28 年 3 月末現在） （応募時所属）	研究費 （百万円）
井垣 達吏 （兼任）	上皮のがん原性炎症が駆動する非遺伝的腫瘍悪性化の分子基盤 （京都大学大学院生命科学研究科）	京都大学大学院生命科学研究科・教授 （神戸大学大学院医学研究科・ 准教授）	106
大谷 直子 （兼任）	細胞老化シグナルからみた慢性炎症と癌進展の新しい発症メカニズムの解明 （東京理科大学理工学部）	東京理科大学理工学部・ 教授 （癌研究会癌研究所・ 主任研究員）	104
茂呂 和世 （兼任）	IL-33 産生を伴う慢性疾患と加齢や肥満により増加したナチュラルヘルパー細胞が Th1/Th2 バランスの破綻を惹起するメカニズムの解明 （理化学研究所統合生命医科学研究センター）	理化学研究所統合生命医科学研究センター・ チームリーダー （慶應義塾大学医学部・ 助教）	72

研　究　報　告　書

「炎症の収束機構の分子基盤の確立と慢性疾患への適用」

研究タイプ：大挑戦型（延長有／増額有）
研究期間：　平成２３年４月～平成２８年３月
研　究　者：　有田　誠

１．　研究のねらい

炎症反応は外傷や感染に対する重要な生体防御系である。一方、一旦生じた炎症は適切に収束する必要があり、この制御が破綻すると慢性炎症や組織障害を伴う病態へと発展してしまう。すなわち、炎症の遷延化および慢性化の分子機構の一つとして、炎症の収束機構の障害の可能性が示唆されている。我々はこれまでに、炎症収束性の脂質メディエーターを同定し、これらがエイコサペンタエン酸（EPA）やドコサヘキサエン酸（DHA）などのω3 系脂肪酸を前駆体として体内で生成する事を明らかにした。さらに、炎症が収束に向かうタイミングで出現し、収束を促進する機能をもつ細胞を特定し、これが好酸球であることを見いだした。そこで本研究では、炎症の収束に関わる細胞やメディエーターの解析をさらに進め、生体が兼ね備えている能動的な炎症収束能力について分子レベルで明らかにする。その結果、炎症の収束に関わる鍵分子の実体および作用機構を明らかにし、「治らない炎症」を基盤病態とする慢性疾患の病態解明、および新しい治療戦略への展開を目指す。

２．　研究成果

（1）概要

炎症の収束に関わる脂肪酸代謝系として、12/15-リポキシゲナーゼ（12/15-LOX)を発現する好酸球が、炎症の収束期において好中球数の減少および所属リンパ節の肥大化に関わるという知見を得た。炎症収束性メディエーターの作用機構の解明につながることが期待される。また、炎症収束期の好酸球はアレルギー性好酸球や骨随由来好酸球に比べて形態や遺伝子発現パターンに違いが認められ、収束期の好酸球が機能的サブセットである可能性が示唆された。さらに、収束期に出現するマクロファージの中に 12/15-LOX を高発現する細胞集団が存在し、高い貪食能により炎症の収束に寄与する細胞集団であると考えられた。慢性疾患と脂肪酸代謝系との関連性については、重症喘息、インフルエンザウイルス感染などの病態おいて、体内の脂肪酸代謝系の異常が病態の進行に影響することを見いだし、活性代謝物を標的とした新たな治療の可能性を示した。さらに、EPA や DHA などのω3脂肪酸が体内で活性代謝物に変換され、積極的に抗炎症作用や炎症収束促進作用を発揮していることを明らかにした。とくにメタボローム解析の成果として、心臓の線維化を抑制する活性を有する 18-HEPE、抗アレルギー作用を有する 17,18-EpETE、好中球性炎症を強力に抑制するレゾルビン E3、12-OH-17,18-EpETE など新規の活性代謝物の同定に成功した。今後はこれら内因性の炎症制御物質をうまく利用することで炎症を基盤病態とする様々な疾患の病態解明および治療法の開発につながることが期待される。

（2）詳細

研究テーマA「炎症収束性細胞についての解析」

これまでに、マウス腹膜炎において好酸球が炎症収束期に集積して炎症の収束に寄与すること、またその作用が 12/15-LOX 活性依存的であることを明らかにしてきた。なお 12/15-LOX はリポキシン A4、プロテクチン D1 などの抗炎症性メディエーターの産生に関わる酵素である。そこで、好酸球のエフェクター機能の作用点を解析する目的で、収束期マクロファージの遺伝子発現に及ぼす影響について検討した。その結果、好酸球は 12/15-LOX 活性依存的にケモカイン CXCL13 の発現を誘導することが明らかになった。また、マクロファージの CXCL13 発現は炎症収束期に特徴的に上昇し、抗 CXCL13 抗体の投与で炎症収束の遅延が認められた。さらに、好酸球欠損マウスあるいは抗 CXCL13 抗体の投与で炎症収束期の所属リンパ節の肥大化が減弱し、リコンビナント CXCL13 を投与することで回復した。以上より、12/15-LOX を発現する好酸球が、ケモカイン CXCL13 の発現誘導を介して炎症の収束における炎症局所・所属リンパ節間のコミュニケーションに関わるという、予想外の事実が明らかになった（図1，論文3）。これらの研究の進展により、今後炎症収束性メディエーターの新しい活性評価系および作用機構の解明につながることが期待される。

炎症収束期の好酸球が特異なサブセットである可能性について検討した。その結果、急性腹膜炎の収束期に現れる好酸球が、アレルギー性好酸球や骨随由来好酸球に比べて細胞内顆粒が少ないなど、形態に違いが認められた。また、遺伝子発現について解析を行った結果、収束期の好酸球は、他の好酸球と遺伝子発現パターンが大きく異なることが明らかになった。収束期の好酸球が特異なサブセットである可能性が新たに示唆された（論文準備中）。

収束期において好酸球以外の 12/15-LOX 発現細胞につい

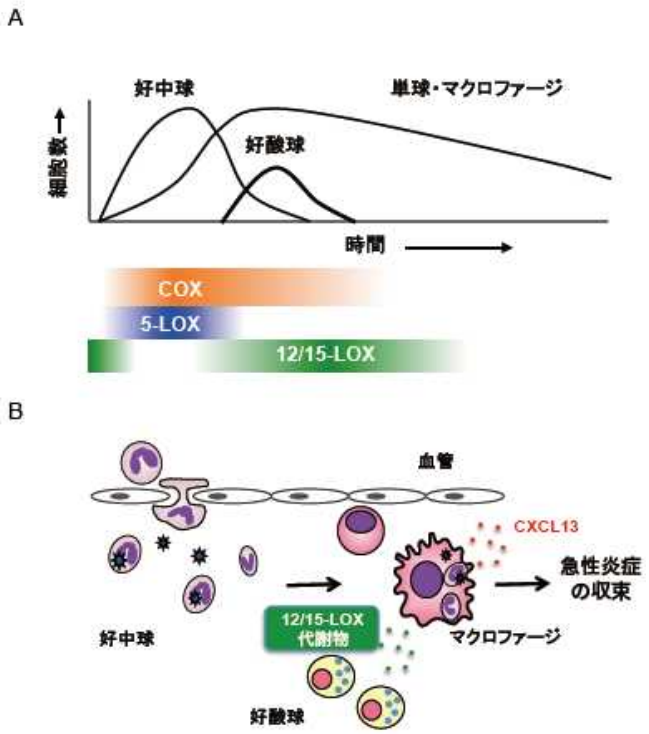


図1　炎症の収束に関わる脂肪酸代謝系
（A）COX、5-LOX 系の代謝物の多くは炎症の初期相に強く発現し、一方で 12/15-LOX 系の代謝物は炎症の初期相で減少し、その後収束期に増加する。
（B）炎症の収束期に現れる好酸球は、12/15-LOX 系の脂質メディエーターを必要なタイミングで産生して周囲の細胞（マクロファージなど）に作用し、炎症が適切に収束する組織変化を誘導していると考えられる。

て解析した結果、一部のマクロファージサブセットが 12/15-LOX を高発現し、しかも周囲のマクロファージに比べてアポトーシス細胞の貪食能が高いことが明らかになった。さらにこの高い貪食能は 12/15-LOX 欠損マウスでは大幅に低下しており、これらのマクロファージは 12/15-LOX から生成する内因性の脂肪酸代謝物により活性調節を受けて異物のクリアランスに寄与するユニークな細胞集団である可能性が考えられた（論文準備中）。

ヒト重症喘息患者の末梢血好酸球では健常人と比べて12/15-LOX活性の著しい低下が認められ、質的に異なっていることを示した（論文6）。好酸球の脂肪酸代謝異常と喘息の重症化との関係性について、これまでにない新しい問題提起がなされた。また、腸管粘膜層は恒常的に好酸球が多く存在していることが知られているが、好酸球を欠損したマウスでは、デキストラン硫酸で誘導される腸炎が大幅に悪化することを見出した。その際にプロテクチン D1 など 12/15-LOX 代謝物の量が大幅かつ選択的に低下しており、そこにプロテクチン D1 を投与することで、腸炎および生存率の大幅な改善が認められた（Gut 64, 1236 (2015)）。腸管の恒常性維持に好酸球が寄与していることが強く示唆された。

研究テーマB「炎症収束性メディエーターの代謝と作用機構の解析」

好酸球が炎症の収束に関わる脂質メディエーターを産生することが我々の以前の研究から示唆されていた（FASEB J. 25, 561 (2011)）。そこで、好酸球が産生するメディエーターについて LC-MS/MS を用いたメタボローム解析を行った結果、新しい抗炎症性代謝物レゾルビンE3（RvE3）を同定し、さらに 12-hydroxy-17,18-epoxy-ETE (12-OH-17,18-EpETE)を同定した（論文 4,7）。これらの新規代謝物はナノモルレベルで好中球の遊走を抑制する内因性の抗炎症性代謝物であり、その活性は既存の抗炎症化合物を凌ぐものであった。また、これら化合物の立体異性体をそれぞれ有機合成し、生体内で生成する天然型の立体構造を決定した。構造活性相関の検討から、抗炎症作用は天然型に強い構造特異性が認められ、生体内に特異的受容体が存在することが強く示唆された。今後、炎症の収束に対する作用や慢性疾患モデルへの適用を図り、創薬標的となりうる機能作用点の特定を目指す。

EPA 代謝物のメタボローム解析に加え、炎症部位における DHA 代謝物の包括的メタボローム解析を行った。その結果 14,20-dihydroxy-DHA が、好酸球から 12/15-LOX 依存的に生成する主要な DHA 代謝物の一つとして新たに見いだされた。有機合成による構造決定から、天然型は 14S 体であることが明らかとなり、in vivo に投与すると好中球性炎症を抑制する活性が認められた（J. Biochem. 156, 315 (2014)）。

研究テーマC「慢性炎症性疾患モデルへの適用（創薬への展開）」

メタボローム解析から、ヒト重症喘息患者の好酸球では健常人と比べて12/15-LOX活性が大幅に低下しており、その結果リポキシン A4、プロテクチン D1 などの抗炎症性メディエーターの産生が著しく減弱していることを明らかにした (論文 6)。さらに、12/15-LOX 欠損マウスでは気道上皮組織のリモデリングをはじめ喘息症状が著しく悪化することを見いだした（論文準備中）。すなわち、12/15-LOX 由来の脂肪酸代謝物が内因性の喘息抑制因子であり、その活性の低下は重症喘息の原因となる可能性が示唆された。

インフルエンザウイルス感染症において 12/15-LOX 代謝系およびプロテクチン D1 が内因性の制御因子であることを見いだした（論文 5、特許1）。プロテクチン D1 には従来抗炎症作

用が示されていたが、今回インフルエンザウイルス感染に対する有効性が認められた。さらにその作用機構として、ウイルス RNA が核内から細胞質へ移行する過程を阻害するという、従来の治療薬にはない新規の作用点であることが明らかになった。

ω3脂肪酸合成酵素 Fat-1 トランスジェニックマウスが、圧負荷による心肥大・心不全モデル（TACモデル）において心機能低下や心筋組織の線維化に対して強い抵抗性を示す事を明らかにした（論文2、図2）。この効果は、Fat-1トランスジェニックマウスの骨髄由来細胞（主にマクロファージ）に依存していることを、骨髄移植の実験により明らかにした。Fat-1 トランスジェニックマウスのマクロファージが生成する脂肪酸代謝物についてメタボローム解析を行った結果、EPA 由来の 18-HEPE の産生の顕著な増加が認められた。18-HEPE は心臓の線維芽細胞の活性化を低濃度で抑制し、in vivo に投与しても TAC モデルにおける心機能低下や心筋組織の線維化が大幅に改善した。ω3脂肪酸の抗炎症作用・心機能保護作用について、間質系細胞（マクロファージ）が生成する活性代謝物の投与により、慢性炎症の特徴である臓器のリモデリング（線維化）を抑制することができる可能性を示した（論文2）。

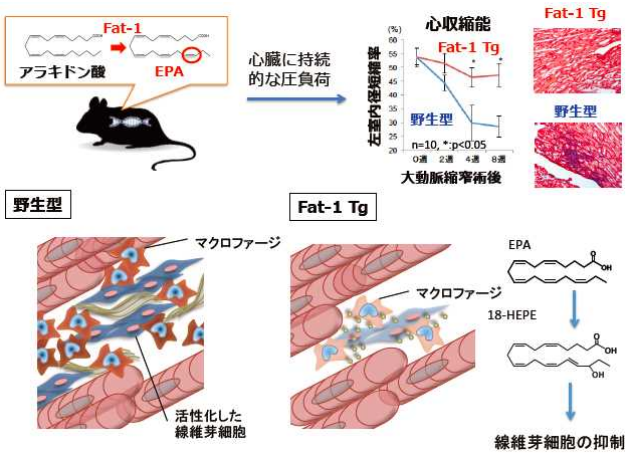


図2 ω3脂肪酸の心不全抑制作用
ω3脂肪酸の心臓保護効果にはマクロファージの機能が重要であることが、ω3脂肪酸合成酵素（Fat-1）トランスジェニックマウスを用いた研究から明らかになった。骨髄より動員されたマクロファージが心臓局所で産生する 18-HEPE が、持続的な圧負荷による慢性炎症および線維化を抑制し、心機能を改善すると考えられる。

ω3脂肪酸を多く含む食用油によって食物アレルギーの発症や進展が制御できることを見いだした（論文 1）。具体的にはαリノレン酸（18:3n-3）が豊富な亜麻仁油を投与した群では、リノール酸(18:2n-6)が豊富な大豆油を投与した群に比べてオボアルブミン感作による食物アレルギーの発症や進展が著しく抑制される。この時の腸管における脂肪酸代謝についてメタボローム解析を行ない、その中でも量が多く変化率も高い脂肪酸代謝物 17,18-EpETE の投与実験を行ったところ、食物アレルギー症状に対する強い予防・治療効果が認められた（論文1、特許 2）。

2. 脂質代謝系による炎症の抑制機構の解析

12/15-LOXによる脂質代謝系によって、腸管の免疫恒常性が維持される機構が存在することを見出した。具体的には、12/15-LOX欠損マウスにおいて炎症性腸疾患が自然発症することを見出した。12/15-LOX 欠損マウスにおける炎症は大腸に限局し、好酸球やマクロファージの大量

浸潤を特徴とするなど、ヒト潰瘍性大腸炎と類似の病態を反映しており、これまで類を見ないユニークな疾患モデルと言える。本観察結果は、12/15-LOXによって生成する何らかの脂質代謝物が、何らかの機序で腸管において腸内細菌への過剰な免疫応答を抑制していることを示唆するものである。

喘息など好酸球性炎症の発症に関わる細胞として、自然リンパ球の一種であるgroup 2 innate lymphoid cell (ILC2)の役割が注目されている。我々は、約 150 種類の脂肪酸代謝物のライブラリーを用いた解析から、プロスタグランジン E2(PGE2)が ILC2 の新しい制御因子であることを明らかにした。PGE2 は IL-33 刺激による ILC2 の活性化および IL-5 産生を強く抑制し、その作用は PGE2 の受容体である EP2/EP4 を介することを明らかにした。また、PGE2 の生合成を阻害するシクロオキシゲナーゼ阻害剤(アスピリン)をマウスに投与すると、IL-33 誘導性気道炎症が大幅に増悪化した。さらに、EP2/EP4 アゴニストを投与することで、アスピリン投与による気道炎症の増悪が抑制された。

3. 今後の展開

研究テーマA「炎症収束性細胞についての解析」

好酸球サブセットの存在の検証と、炎症の収束に関わる好酸球のエフェクター機能の解明は、炎症収束の分子メカニズムを明らかにして新しい創薬標的を見いだす上で必要不可欠である。そこで、炎症収束に関わる好酸球サブセットの存在を検証し、これを制御する環境因子および細胞内シグナルを明らかにする。各種好酸球サブセットを単離し、それぞれに特徴的な遺伝子発現パターンを明らかにしており、これを制御する環境因子および細胞内シグナルを解析する準備は整っている。また、12/15-LOX を発現する好酸球が炎症の収束における炎症局所・所属リンパ節間のコミュニケーションに関わるという興味深い知見を得ているが、好酸球の 12/15-LOX 活性がどのように所属リンパ節の肥大化に関わっているのか、その分子機構の解明を目指す。

12/15-LOX 陽性マクロファージについても、その高い貪食能や特徴的な遺伝子発現パターンの多くが 12/15-LOX の発現依存的であることが明らかになっている。細胞内の脂肪酸代謝系が一体どのようにしてマクロファージの細胞機能を調節しているのか、とくに遺伝子発現の制御の観点から分子メカニズムを明らかにする。

研究テーマB「炎症収束性メディエーターの代謝と作用機構の解析」

本研究で見出された 18-HEPE、17,18-EpETE など内因性の炎症制御分子について、その産生に関わるボトルネック酵素の同定を目指す。また、炎症を収束に導く活性を有する代謝物については、その作用機構を細胞、受容体レベルで明らかにすることが、創薬への展開には不可欠である。そこで、RvE3 をはじめとする抗炎症活性化合物が構造特異的に作用する細胞に対して、細胞内シグナルの解析、および放射標識化合物による結合実験等を行い、受容体の同定を目指す。

研究テーマC「慢性炎症性疾患モデルへの適用(創薬への展開)」

これまでに同定した炎症の収束に関わる細胞やメディエーターが、一般に慢性疾患にも有効であるかどうかを検証する必要がある。そこで、炎症収束性メディエーターを慢性炎症モデルに適用し、組織リモデリングや機能不全を指標にそれぞれ予防効果や治療効果について検討を行

ない、新しい創薬シーズとしての可能性を探る。とくに好酸球欠損あるいは 12/15-LOX 欠損マウスで症状が悪化する病態モデルを優先的に検討する。また、本研究で見出されたレゾルビン E3、12-OH-17,18-EpETE 、18-HEPE、17,18-EpETE、14,20-diHDHA などの炎症制御分子のスケールアップ合成を進めており、これらを用いた疾病予防、治療効果について検討を進める。

4. 評価

（1）自己評価

（研究者）

炎症反応は感染症などに対する重要な生体防御機構であるが、一方で生物は炎症を積極的に収束させるシステムを兼ね備えている。炎症の収束に関わる細胞やメディエーターを網羅的に特定し、生体が本来兼ね備えている能動的な炎症収束能力について分子レベルで明らかにする事を目的とした本研究は、当初の計画通り順調に進んでいる。とくに、急性腹膜炎の収束期に生じる細胞や組織変化についての解析から、12/15-LOX を発現する好酸球が炎症の収束における所属リンパ節の肥大化に関わることを見いだした。好酸球が 12/15-LOX 活性を介してどのように所属リンパ節の肥大化に関わっているのか、その分子機構の解明を目指すことにより、炎症を積極的に収束させる機序を明らかにしたい。収束期の好酸球が特異なサブセットである可能性については、生体から単離した好酸球から純度の高い RNA を得るための方法を最適化し、現在までにトランスクリプトーム解析で特徴的な遺伝子発現パターンが認められている。現在定量プロテオミクス解析、およびメタボローム解析を通してさらに精度の高い性状解析を進行中である。また、炎症収束期には 12/15-LOX を発現するマクロファージが存在し、これらが他のマクロファージに比べてアポトーシス細胞の貪食能が非常に高いことを見出した。さらに、この高い貪食能は 12/15-LOX 依存的であることも明らかにした。延長期間を含めこれら挑戦的課題の進展により、脂肪酸代謝バランスをコントロールすることで標的として炎症を制御できる可能性を明示することができた。

また、脂肪酸から生成する活性代謝物について包括的なメタボローム解析により、これまで 5 種類の新規の炎症抑制因子の同定に成功した。今後炎症の収束に対する作用や慢性疾患モデルへの適用を図り、創薬標的となりうる機能作用点の特定を目指す。さらに、これまで栄養学的に広く認知されていたω3脂肪酸の健康増進作用について、ω3脂肪酸合成酵素 Fat-1 トランスジェニックマウスを用いた遺伝学的解析とω3脂肪酸の代謝物を網羅するメタボローム解析とを組み合わせることにより、心機能保護作用や抗アレルギー作用について分子的根拠を示すことができた。これら一連の成果により、平成 26 年から理研 IMS での独立ポジションを得ることができ、さらに平成 27 年度発足の新学術領域研究「リポクオリティ」の領域代表を務めることになった。多くの論文掲載および国内外の招待講演が増え、「炎症の制御における脂質代謝系の役割」の分野でトップランナーの一人として注目されるようになり、研究者としての飛躍につながった。

（2）研究総括評価（本研究課題について、研究期間中に実施された、年２回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った）。

（研究総括）

炎症を制御する脂質メディエーターのメタボロミクスに関する日本でも有数の研究者の一人

であり、EPAやDHAなどのω3系脂肪酸を前駆体として生成される炎症収束性脂質メディエーターを同定し、炎症を収束する細胞として、好酸球を特定した実績がある。本課題研究においては、1）12/15-リポキシゲナーゼ（12/15-LOX）を発現する好酸球が近傍のマクロファージの形質を制御することで好中球性炎症の収束を促進すること、2）12/15-LOXは好酸球のみならず一部のマクロファージにも高発現し、これら亜集団が他に比べて高い貪食能を有することで炎症の制御に関与するという新知見を提供した。とりわけ、3）好酸球に機能多様性（サブセット）が存在する可能性、すなわち炎症収束に関する好酸球はアレルギー性好酸球に比し形態や遺伝子発現パターンが異なることを示し、またヒト重症喘息患者の末梢血好酸球には健常者と比べて明らかな脂肪酸代謝バランスの異常が認められることを見いだした。4）新規の抗炎症性メディエーターとして、心不全モデルマウスの心臓リモデリング（組織線維化）を抑制する18-HEPE、食物アレルギーモデルの症状を緩和する17,18-EpETE、好中球性炎症を強力に抑制するレゾルビンE3、12-OH-17,18-EpETEの同定に成功し、論文発表した。収束期に出現する特異な好酸球やマクロファージ亜集団の特性解析、抗炎症脂質メディエーターの標的分子の解析については、現在も鋭意進行中である。

このように、炎症の収束に関与する脂質メディエーターや細胞とそれらの機能や相互作用を解析することにより、創薬ターゲットの探索に役立つ情報を提供するとともに、ω3系脂肪酸の食品として意義について科学的に証明し、社会的にも注目される成果をあげた。研究目標の一つであった、好酸球亜集団による炎症の収束に関する研究も新しい方向性を見いだし、新規炎症収束性脂質メディエーターを多数見いだすなど、計画以上の進捗を示した。大挑戦型研究として十分な実績をあげたと高く評価したい。新規の抗炎症性メディエーターや脂質メディエーターのメタボロミクス新技術の開発と応用の分野で、他のさきがけ研究者との共同研究や交流を積極的に推進し、研究をさらに加速させるとともに研究者として著しい成長を遂げていると高く評価したい。

5. 主な研究成果リスト

（1）論文（原著論文）発表

1. *Kunisawa J, *Arita M, Hayasaka T, Harada T, Iwamoto R, Nagasawa R, Shikata S, Nagatake T, Suzuki H, Hashimoto E, Kurashima Y, Suzuki Y, Arai H, Setou M, Kiyono H. Dietary ω3 fatty acid exerts anti-allergic effect through the conversion to 17,18-epoxyeicostetraenoic acid in the gut. ***Sci Rep*** 5, 9750 (2015)

2. Endo J, Sano M, Isobe Y, Fukuda K, Kang JX, Arai H, *Arita M. 18-HEPE, an n-3 fatty acid metabolite released by macrophages, prevents pressure overload-induced maladaptive cardiac remodeling. ***J Exp Med*** 211, 1673-1687 (2014)

3. Tani Y, Isobe Y, Imoto Y, Segi-Nishida E, Sugimoto Y, Arai H, *Arita M. Eosinophils control the resolution of inflammation and draining lymph node hypertrophy through the proresolving mediators and CXCL13 pathway in mice. ***FASEB J*** 28, 4036-4043 (2014)

4. Kubota T, *Arita M, Isobe Y, Iwamoto R, Goto T, Yoshioka T, Urabe D, Inoue M, Arai H. Eicosapentaenoic acid is converted via omega-3 epoxygenation to anti-inflammatory

metabolite 12-hydroxy-17,18-epoxyeicosatetraenoic acid. ***FASEB J*** 28, 586-593 (2014)
5. Morita M, Kuba K, Ichikawa A, Nakayama M, Katahira J, Iwamoto R, Watanabe T, Sakabe S, Daidoji T, Nakamura S, Kadowaki A, Ohto T, Nakanishi H, Taguchi R, Nakaya T, Murakami M, Yoneda Y, Arai H, Kawaoka Y, Penninger JM, Arita M, *Imai Y. The lipid mediator protectin D1 inhibits influenza virus replication and improves severe influenza. ***Cell*** 153, 112-125 (2013)
6. Miyata J, Fukunaga K, Iwamoto R, Isobe Y, Niimi K, Takamiya R, Takihara T, Tomomatsu K, Suzuki Y, Oguma T, Sayama K, Arai H, Betsuyaku T, Arita M, *Asano K. Dysregulated synthesis of protectin D1 in eosinophils from patients with severe asthma. ***J Allergy Clin Immunol*** 131, 353-360 (2013) 7. Isobe Y, *Arita M, Matsueda S, Iwamoto R, Fujihara T, Nakanishi H, Taguchi R, Masuda K, Sasaki K, Urabe D, Inoue M, Arai H. Identification and structure determination of novel anti-inflammatory mediator resolvin E3: 17,18-dihydroxyeicosapentaenoic acid. ***J Biol Chem*** 287, 10525-10534 (2012)

（2）特許出願

研究期間累積件数： 2 件

1.

発　明　者： 今井由美子、久場敬司、有田誠、Josef Penninger

発明の名称： インフルエンザウイルス感染症の治療におけるプロテクチン D1 の有効性

出　願　人： 秋田大学、東京大学、IMBA

出　願　日： 2013/3/6

出 願 番 号： 特願 2013-044813

2.

発　明　者： 國澤純、清野宏、有田誠

発明の名称： アレルギー性疾患の予防または治療のための医薬組成物

出　願　人： 東京大学

出　願　日： 2013/4/9

出 願 番 号： 特願 2013-081548

（3）その他の成果（主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等）

➢ **学会発表**

1. Makoto Arita: Lipidomic approach to uncover anti-inflammatory properties of omega-3 polyunsaturated fatty acids :14th International Conference of Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation and Related Diseases：2015/07/15 （Budapest, Hungary）
2. Makoto Arita: Genetic and lipidomic approach for the anti-inflammatory properties of omega-3 fatty acid: 55th International Conference on the Bioscience of Lipids: 2014/06/24 (Aberdeen, Scotland)
3. Makoto Arita: Emerging roles of eosinophils and eosinophil-derived lipid mediators in controlling inflammation and resolution: 13th International Conference on Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation and Related Diseases: 2013/11/14 (San Juan, Puerto Rico)
4. Makoto Arita: Eosinophils control the resolution of inflammation through the

12/15-lipoxygenase pathway: 9th Biennial Symposium of International Eosinophil Society: 2013/07/16 (Oxford, UK)

- **プレスリリース**

1. 「魚油に多く含まれるオメガ3脂肪酸が心臓を保護する仕組みを解明」(2014 年 7 月)
   http://www.jst.go.jp/pr/announce/20140721-2/index.html

研　究　報　告　書

「上皮のがん原性炎症が駆動する非遺伝的腫瘍悪性化の分子基盤」

研究タイプ：通常型
研究期間：　平成 23 年 4 月～平成 28 年 3 月
研　究　者：　井垣　達吏

1.　研究のねらい

近年、がんの発生・進展に炎症反応が重要な役割を果たしていることが明らかとなり、基礎研究のみならず新たながん治療標的として臨床応用研究においても注目されている。これらの研究は、主にがんの発生・悪性化の過程で引き起こされる上皮由来がん細胞と間質細胞（炎症細胞、免疫系細胞、線維芽細胞など）の相互作用に焦点を絞って進められてきた。しかし、種々の間質細胞と同様にがん組織に含まれる上皮細胞（正常上皮細胞および変異上皮細胞）同士の相互作用に関しては、その重要性が強く示唆されているものの、分子基盤はほとんど不明である。我々は、遺伝的に不均一な多細胞コミュニティーの中で引き起こされる上皮の腫瘍悪性化を生体レベルで理解するため、ショウジョウバエ遺伝的モザイク法を駆使した腫瘍悪性化モデルを世界に先駆けて構築してきた。さらに、このショウジョウバエモデルを利用して、がん遺伝子 Ras を活性化した上皮細胞クローンに様々な突然変異を導入するパイロットスクリーニングを実施し、これら変異細胞クローン自身ではなくその周辺の上皮細胞に対して強い増殖促進や浸潤・転移能を誘発する一連の突然変異を見いだした。興味深いことに、この周辺細胞に対するがん促進作用は、変異細胞において持続的に発現誘導される炎症性サイトカイン（IL-6 ホモログ分子）によって引き起こされていることが分かった。すなわちこの現象は、がん原性の上皮細胞に引き起こされる“oncogenic inflammation（がん原性炎症）”と捉えることができ、がんの発生・進展を駆動する上皮細胞間のがん原性相互作用の生体モデルとなると考えられた。この“がん原性炎症”を誘発する因子として、ミトコンドリア呼吸鎖の機能障害とRasシグナルの活性化が協調することが重要であることが分かった。そこで本研究では、大規模なショウジョウバエ遺伝学的スクリーニングを根幹として、遺伝学的解析やイメージング解析を中心としたアプローチを展開し、がん遺伝子の活性化が様々な突然変異と協調して引き起こす“がん原性炎症”の実体を明らかにしてその概念を確立するとともに、それによって引き起こされる“非遺伝的”な腫瘍悪性化の分子基盤とその生理的役割を生体レベルで明らかにすることを目的とする。

2.　研究成果

（1）概要

がんの悪性化は、多段階的な突然変異の蓄積による“遺伝的”な変化のみならず、突然変異を誘発することなく細胞間相互作用を介して引き起こされる“非遺伝的”な変化がその進展に重要な役割を果たすと考えられる。このような細胞間の相互作用を介したがん制御機構を生体レベルで理解するため、ショウジョウバエ上皮をモデル系として、細胞間コミュニケーションを介した腫瘍成長・悪性化に関わる因子の遺伝学的スクリーニングを行った。具体的には、ショウジョウバエ成虫原基の上皮組織にがん原性 Ras（RasV12）を発現する体細胞クローンを誘導すると、これらの細胞群は過剰に増殖して

良性腫瘍を形成する。この良性腫瘍にさらなる突然変異を導入し、変異細胞自身ではなくその周辺の正常細胞の増殖を強く亢進する一連の突然変異体（*non-autonomous growth*; *nag* 変異体）を探索した。単離された多数の *nag* 変異体の責任遺伝子を解析した結果、驚くべきことにミトコンドリア呼吸鎖複合体のコンポーネントをコードする一連の遺伝子群が共通して同定された。これらの結果は、Ras シグナルの活性化とミトコンドリア呼吸鎖の機能障害が同時に起こるとその周辺細胞のがん化が促進する可能性を示唆している。さらに、このような Ras 活性化とミトコンドリア機能障害を同時に起こした変異細胞が Ras 活性化を起こした良性腫瘍の近傍に出現すると、良性腫瘍は悪性化して浸潤・転移能を獲得することが分かった。この細胞非自律的な腫瘍悪性化の分子機構を解析した結果、Ras 活性化とミトコンドリア機能障害を起こした細胞は活性酸素種を大量に産生して JNK シグナルを活性化し、この JNK シグナルが Ras シグナルと協調することでがん抑制経路 Hippo 経路が不活化し、これにより炎症性サイトカイン Unpaired（Upd; IL-6 ホモログ分子）の産生が誘導されて、これを受け取る周辺細胞が JAK/STAT シグナル依存的に腫瘍悪性化を引き起こすことが明らかとなった（“がん原性炎症”）。さらに、このような“がん原性炎症”を起こした変異細胞が細胞老化を起こしていることを見いだし、Upd 発現誘導による腫瘍悪性化という現象が、細胞老化に伴う SASP（Senescence-Associated Secretory Phenotype）を介したものであることが分かった。さらなる遺伝学的解析により、細胞老化の特徴である細胞周期停止が JNK シグナル活性の増強に必須の役割を果たしていることを見いだし、細胞老化と“がん原性炎症”を結ぶ分子基盤を明らかにした。現在、“がん原性炎症”の生理的役割を探索するため、ショウジョウバエ正常発生過程における細胞老化（プログラム細胞老化）および SASP の遺伝学的解析を進めている。

（2）詳細

がんの発生・進展過程において、細胞間の相互作用が重要な役割を果たしていることが近年分かってきた。しかし、一つ一つの細胞間コミュニケーションがいかにしてがんの発生・進展に寄与するのか、その分子基盤についてはいまだ不明な点が多い。その原因の一つとして、生体内で引き起こされる細胞非自律的ながん促進機構をシステマティックに解析できる優れたモデル系が存在しなかったことが挙げられる。そこで本研究では、この問題を克服しうるショウジョウバエ遺伝的モザイク・クローン法を用いた腫瘍悪性化モデルを利用して、細胞間コミュニケーションを介した腫瘍悪性化機構の遺伝学的解析を行い、以下のような一連の成果を得た。

【1】Ras 活性化とミトコンドリア機能障害により引き起こされる“がん原性炎症”が周辺組織のがん化を促進する分子機構

細胞間コミュニケーションを介した腫瘍悪性化の分子基盤を解析するため、ショウジョウバエ上皮をモデル系とした遺伝学的スクリーニングを行った。具体的には、ショウジョウバエ3齢幼虫の複眼原基の上皮組織にがん遺伝子 Ras を活性化した細胞（RasV12 発現細胞）のクローンを誘導すると、これらの細胞は過剰に増殖して良性腫瘍を形成する。この良性腫瘍にさ

らなる突然変異（一連のＰ因子挿入変異）を導入してその表現型の変化をスクリーニングした結果、突然変異が導入されたRasV12発現細胞自身ではなく、その周辺の野生型細胞が増殖を亢進する突然変異体（*nag* 変異体）が多数単離された。これら一連の *nag* 変異体の責任遺伝子を解析した結果、興味深いことにミトコンドリア呼吸鎖複合体の構成タンパク質、あるいはその合成に関わるミトコンドリアリボソームタンパク質をコードする遺伝子群に突然変異が集中していることが明らかとなった。すなわち、Ras シグナルの活性化とミトコンドリアの機能障害が同時に起こると、その周辺の正常細胞が過剰に増殖することが分かった。

そこで、Ras 活性化とミトコンドリア機能障害を同時に起こした細胞（Ras/*mito*$^{-/-}$ 細胞）が周辺細胞の増殖を促進するメカニズムを明らかにするため、この現象を起こすのに必要な遺伝子の遺伝学的スクリーニング（２次スクリーニング）を行った。具体的には、一連のショウジョウバエ染色体欠失系統ライブラリーを用い、Ras/*mito*$^{-/-}$ 細胞クローンが誘導する細胞非自律的増殖を抑制あるいは促進する遺伝子変異を探索した。その結果、ショウジョウバエ JAK/STAT 経路の下流で機能する転写因子 *stat92E* 遺伝子の機能を欠失させると、周辺細胞の増殖促進が強く抑制されることが分かった。ショウジョウバエ JAK/STAT 経路は、リガンド分子である炎症性サイトカインUpd（IL-6ホモログ分子）がその受容体Domelessに結合することで活性化され、細胞増殖を促進する。解析を進めた結果、Ras/*mito*$^{-/-}$ 細胞では Upd の発現が強く誘導され、これを受けとった周辺細胞が JAK/STAT 経路を活性化して増殖を亢進することが分かった。さらに、この Ras/*mito*$^{-/-}$ 細胞における Upd 発現誘導メカニズムを解析した結果、Ras 活性化とミトコンドリア機能障害が同時に起こると細胞内で活性酸素種（ROS）が大量に産生され、これが JNK（c-Jun N-terminal kinase）シグナルを活性化し、さらに JNK シグナルと Ras シグナルが同時に活性化することで細胞内 F-actin が高度に集積してがん抑制経路 Hippo 経路が不活化することが分かった。Hippo 経路は進化的に保存されたリン酸化カスケードで、通常、転写コアクティベーターYokie（Yki；Yap ホモログ分子）をリン酸化して抑制することで細胞増殖を負に制御している。興味深いことに、我々が本研究を進めている過程で、*upd* が Yki の転写ターゲット遺伝子の一つであることが複数の研究グループより報告された。すなわち、Ras/*mito*$^{-/-}$ 細胞は Hippo 経路の不活化を介した Yki 活性化により Upd の発現誘導を引き起こしている可能性が考えられた。これを検証した結果、まさにその通りであることが遺伝学的に証明された。加えて、Yki のターゲット遺伝子の一つである分泌性増殖因子 Wingless（Wg；Wnt ホモログ分子）の発現も Ras/*mito*$^{-/-}$ 細胞内で発現誘導され、周辺細胞の増殖促進に貢献していることが明らかとなった。

以上の解析により、Ras/*mito*$^{-/-}$ 細胞は周辺の正常細胞の増殖を ROS-JNK-Hippo 経路を介して促進することが分かったが、実際のヒトのがん組織の状況を考えてみると、このような Ras/*mito*$^{-/-}$ 細胞の周辺には、正常細胞のみならず Ras を活性化した良性腫瘍細胞が存在すると想定される。そこで、そのような状況をショウジョウバエ複眼原基の上皮組織において再現してその表現型を解析した。その結果、驚くべきことに、Ras シグナルを組織全体で活性化した複眼原基内にミトコンドリア機能障害を起こした細胞群（Ras/*mito*$^{-/-}$ 細胞群）をモザイク状に誘導すると、その周辺に存在する Ras 活性化細胞群が浸潤・転移能を獲得することが分かった。すなわち、Ras/*mito*$^{-/-}$ 細胞は、その周辺の良性腫瘍を悪性化する能力をもつことが明らかとなった。さらなる解析により、この周辺良性腫瘍細胞の悪性化は Ras シグナルと JAK/STAT シグナルが協調することによって引き起こされることが分かった（図１）（Ohsawa *et*

al., *Nature*, 2012）。このような“がん原性炎症”を介した非遺伝的な腫瘍悪性化機構が、ヒトのがん組織における細胞間コミュニケーションを介したがん進展に寄与している可能性が考えられる。

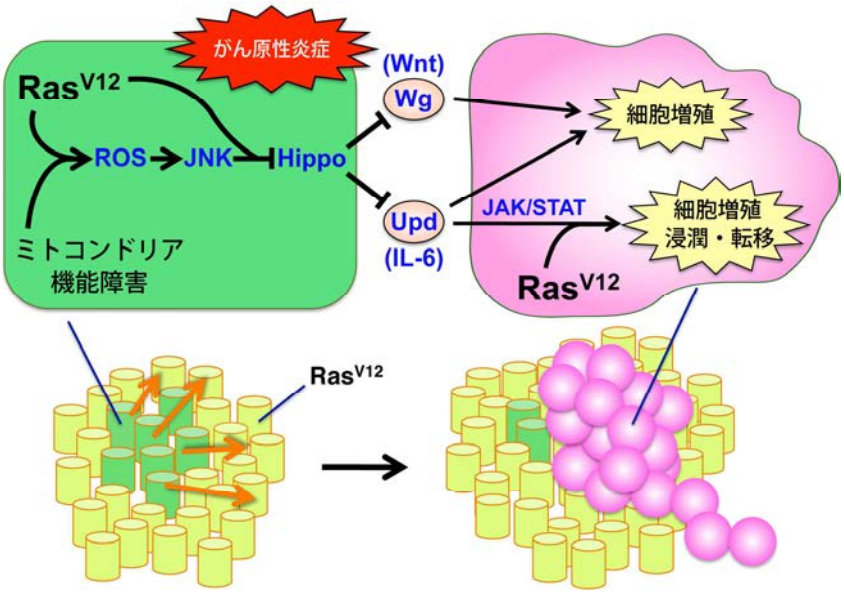


図１　Ras 活性化とミトコンドリア機能障害による周辺細胞のがん進展メカニズム

【2】Ras 活性化とミトコンドリア機能障害による細胞老化および SASP 誘導の分子機構

上記の解析の過程で、Ras/*mito*$^{-/-}$ 細胞は周辺細胞に Upd を分泌しつつ自身も Upd を受容しているが、Ras/*mito*$^{-/-}$ 細胞自身はなぜか細胞増殖を亢進していないことが分かった。その原因を解析した結果、Ras/*mito*$^{-/-}$ 細胞は細胞周期を停止させ、SA-β-gal 活性の上昇、CDK 阻害タンパク質 Dacapo (p21/p27 ホモログ)の発現上昇、核 DNA のヘテロクロマチン化、DNA 損傷応答(DDR)、そして SASP（炎症性サイトカイン Upd の発現誘導）といった、一連の細胞老化マーカーを発現していることを見いだした。これらは、無脊椎動物において初めて細胞老化現象を捉えたデータにもなった。興味深いことに、Ras 活性化のみを起こした細胞クローンは SA-β-gal の活性上昇や Dacapo の発現上昇は起こるものの、細胞周期停止および SASP は誘導されないことが分かった。これらの結果は、少なくともショウジョウバエの生体内においては、Ras 活性化のみでは細胞周期停止を引き起こすのに十分な DNA 損傷等の細胞ストレスが誘導されず、これにミトコンドリア機能障害が加わることで ROS の産生やそれに伴う DNA 損傷が増強され、細胞周期停止および SASP が引き起こされるという可能性を示している。

さらに、Ras^{V12}/*mito*$^{-/-}$変異細胞の細胞老化誘発メカニズムを解析した結果、細胞周期の停止はがん抑制タンパク質 p53 および p21-CycE-Rb 経路の活性化により引き起こされていることが分かった。また、JNK シグナル活性化と細胞周期停止は互いを増強し合うポジティブフィードバックループを形成し、これにより恒常的な JNK 活性化が実現することで強い Upd 発現誘導（SASP）が引き起こされることが分かった（図２）（Nakamura *et al.*, *Nat Commun*, 2014）。

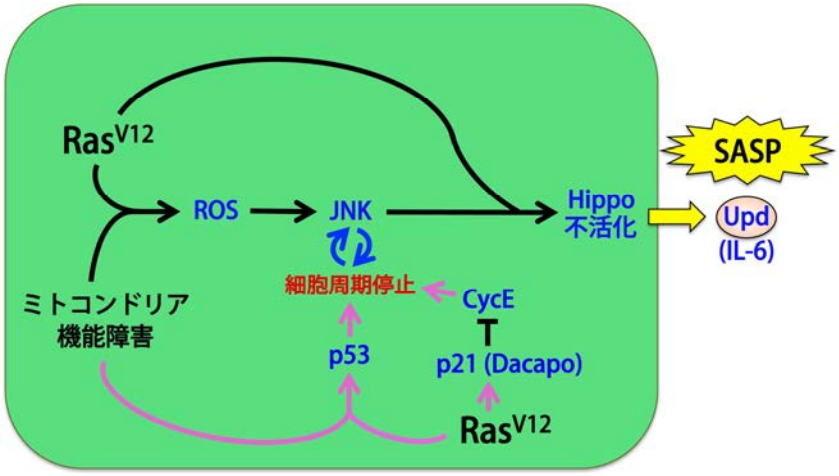


図2　Ras 活性化とミトコンドリア機能障害による SASP 誘導メカニズム

3.　今後の展開

ショウジョウバエを用いた本研究での一連の遺伝学的解析により、Ras 活性化とミトコンドリア機能障害によって引き起こされる“がん原性炎症”に伴う細胞老化とSASP 誘導、またこれを起点とした細胞間コミュニケーションを介した腫瘍悪性化の分子メカニズムの大枠が明らかとなった。このような“がん原性炎症”を起こした変異細胞は、がんの発生や進展を促す微小環境における「がんニッチ細胞」として重要な役割を果たしている可能性が考えられる。一方で、このようなドラスティックな細胞増殖／悪性化を引き起こしうる“がん原性炎症”の生理的役割は不明である。現在、ショウジョウバエ正常発生過程におけるプログラム細胞老化および SASP の解析を進めており、これにより“がん原性炎症”の生理的意義を明らかにするとともに、その人為的制御法を確立することで“がん原性炎症”に着目した新たながん制御法の基盤構築を目指す。また、ショウジョウバエで得られた知見を哺乳類培養細胞系を用いて検証していくことで、その普遍性／多様性を明らかにしていく。

4.　評価

（1）自己評価

（研究者）

本研究期間において、がん遺伝子 Ras の活性化とミトコンドリア機能障害が協調することで上皮組織に引き起こされる“がん原性炎症”の分子メカニズムを明らかにするという当初の目的を達成することができた。また、“がん原性炎症”を起こした細胞が SASP を伴う細胞老化を起こすことでその恒常的ながん促進作用を発揮していることを見いだし、そのメカニズムの大枠を明らかにすることができた。これらの成果は、今後慢性炎症を起点とした細胞間相互作用を介したがんの発生・進展メカニズムを理解していく上での重要な知見を提供するものと期待される。一方で、現時点ではまだがん原性炎症の普遍性を検証できるまでには至っておらず、今後の研究課題である。

（2）研究総括評価（本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った）。

（研究総括）

世界に先駆けて構築した、ショウジョウバエ遺伝的モザイク法を駆使した腫瘍悪性化モデルを利用し、さきがけ研究期間の前半で、がん遺伝子 Ras が活性化した上皮細胞（良性腫瘍）にさまざまな突然変異を誘導し、周囲の上皮細胞を強く増殖させる突然変異の原因遺伝子としてミトコンドリア呼吸鎖の機能に関わる遺伝子群を見いだしている。Ras が活性化した細胞でミトコンドリア呼吸鎖の機能障害が起こると、がん抑制経路（Hippo 経路）を阻害して Upd（炎症性サイトカイン IL-6 のホモログ分子）などを発現するようになり、周囲の良性腫瘍を悪性化（強い増殖促進や浸潤・転移能を獲得）することを明らかにした。

その後、細胞非自律的な腫瘍悪性化の分子機構をさらに解析し、Ras 活性化とミトコンドリア機能障害を起こした細胞は活性酸素種を大量に産生して JNK シグナルを活性化し、JNK シグナルが Ras シグナルと協調して Hippo 経路が不活化した結果 Upd 産生が誘導されて、これに応答する周辺細胞が JAK/STAT シグナル依存的に腫瘍悪性化を引き起こすこと（がん原性炎症と命名）を明らかにした。また、Ras 活性化とミトコンドリア機能障害を起こした細胞は、がん抑制タンパク質 p53 などの活性化により細胞老化の特徴である細胞周期の停止を招来し、それが JNK シグナル活性の増強に必須の役割を果たして、炎症性サイトカインなどを分泌する SASP 現象を呈していることを明らかにした。

以上、がん原性炎症を起こした変異細胞が、がんの発生や進展を促す微小環境において重要な役割を果たしている可能性を実験的に示し、本研究課題の当初の目標を十分に達成する成果を収めたと評価する。そのメカニズムが哺乳類においても生ずるもので新たながん治療戦略の基盤となり得るものなのか、またその生理的役割は何なのかなど興味が尽きない。本研究者は、その成果により国内外から高く評価され、研究者としても目覚ましく成長したことは誠に喜ばしい。

5. 主な研究成果リスト

（1）論文（原著論文）発表

1. Enomoto M, Kizawa D, Ohsawa S, Igaki T. “JNK signaling is coverted from anti- to pro-tumor pathway by Ras-mediated switch of Warts activity” *Developmental Biology* (2015) 403, 162-171
2. Nakamura M, Ohsawa S, Igaki T. “Mitochondrial defects trigger proliferation of neighbouring cells via a senescence-associated secretory phenotype in *Drosophila*” *Nature Communications* (2014) 5, 5264
3. Takino K, Ohsawa S, Igaki T. “Loss of Rab5 drives non-autonomous cell proliferation through TNF and Ras signaling in *Drosophila*” *Developmental Biology* (2014) 395, 19-28
4. Enomoto M, Igaki T. “Src controls tumorigenesis via JNK-dependent regulation of the Hippo pathway in *Drosophila*” *EMBO Rep.* (2013) 14, 65-72

5. Ohsawa S, Sato Y, Enomoto M, Nakamura M, Betsumiya A, Igaki T.
"Mitochondrial defect drives non-autonomous tumour progression via Hippo signalling in *Drosophila*"
Nature (2012) 490, 547-551

（2）特許出願

研究期間累積件数:0 件

（3）その他の成果（主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等）

1. Enomoto M, Vaughen J, Igaki T.
"Non-autonomous overgrowth by oncogenic niche cells: cellular cooperatrion and competition in tumorigenesis"
Cancer Science (2015) in press (review)

2. Ohsawa S, Takemoto D, Igaki T.
"Dissecting tumor heterogeneity in flies: genetic basis of interclonal oncogenic coorperation"
J. Biochem. (2014) 156, 129-136 (review)

3. Igaki T, Miura M.
"The *Drorosophila* TNF ortholong Eiger: Emerging physiological roles and evolution of the TNF system"
Semin. Immunology (2014) 26, 267-274 (review)

4. Kunimasa K, Ohsawa S, Igaki T.
"Cell competition: The struggle for existence in multicellular communities"
In: Kondoh H, Kuroiwa A, eds. *New Principles in Developmental Processes* (2014) 27-40 (Springer) (review)

5. Ohsawa S, Sugimira K, Takino K, Igaki T.
"Imaging cell competition in *Drosophila* imaginal discs"
Methods in Enzymology (2012) 506, 407-413 (review)

6. 第11回日本学術振興会賞 （2014 年 12 月受賞）

7. ナイスステップな研究者 2014（科学技術への顕著な貢献 2014）
（文部科学省 科学技術・学術政策研究所）（2014 年 12 月受賞）

8. プレスリリース
1)"細胞間の相互作用で良性腫瘍ががん化する仕組みを解明" （2012 年 10 月 1 日）
http://www.jst.go.jp/pr/announce/20121001/index.html
2)" 老化した細胞ががん化を促進する仕組みをハエで解明" （2014 年 10 月 27 日）
http://www.jst.go.jp/pr/announce/20141027-2/index.html

研　究　報　告　書

「細胞老化シグナルからみた慢性炎症と癌進展の新しい発症メカニズムの解明」

研究タイプ：通常型（5年型）
研究期間：　平成23年4月～平成28年3月
研　究　者：　大谷　直子

1．　研究のねらい

正常細胞に癌遺伝子の活性化や酸化的ストレスなどによる DNA 損傷が加わると、不可逆的増殖停止である「細胞老化」が誘導される。細胞老化はアポトーシスとならぶ重要な発癌防御機構であり、申請者はこれまで細胞老化の誘導機構の詳細を明らかにしてきた（Ohtani et al. Nature 2001, Takahashi, Ohtani et al. Nature Cell Biol 2006）。またさらに細胞老化反応を生体内で検出できるイメージングマウスを開発し（Ohtani et al PNAS 2007, Yamakoshi et al. J Cell Biol. 2009）、細胞老化の生体における役割を明らかにしてきた。

しかしアポトーシスとは異なり、細胞老化をおこしても細胞が死滅せず長期間生存し続けることから、細胞老化は、初期には癌抑制機構として働くが、長期的には生体になんらかの不利益な影響を及ぼす可能性があると考えられる。最近、細胞老化をおこすと、様々な炎症性サイトカインやケモカイン、細胞外マトリクス分解酵素等が大量に分泌されることが明らかになり、この現象は SASP（senescence-associated secretory phenotype)と呼ばれている。これらの SASP 因子が、炎症の慢性化や癌の進展を引き起こしている可能性が考えられるが、SASP 因子の分泌維持機構や、SASP が引き起こす病態については、十分には明らかになっていない。

そこで本研究では、これまで考えられていなかった細胞老化や SASP の維持機構から慢性炎症を解析し、慢性炎症や慢性炎症を素地とするがん進展の新たなメカニズムの解明を目指す。特に本研究では慢性炎症を素地とする病態として、肥満や加齢という病態に着目した。肥満はがんのリスクファクターであることが疫学的に示唆されているが、なぜ肥満によりがんが促進されるのか、そのメカニズムは十分にはわかっていない。肥満によるがん促進に細胞老化や SASP が関与しているのではないかと考え、解析を行い、肥満により SASP を介した肝がん促進的ながん微小環境を形成することが肝がん発症の一因であることを中間報告までに明らかにした（Yoshimoto et al. Nature 2013）。さらに残りの研究期間を使って、SASP 因子誘導の分子機構と SASP 因子によるがん進展の分子機構について研究を進めている。同時に個体老化と SASP の関連について早老症マウス klotho を用いた解析を試みていたが、細胞老化誘導因子 p16 により、SASP 誘導とは別経路の、klotho の発現抑制を介した、新しい個体老化の誘導機構を明らかにすることができた（Sato et al. Nature Commun 2015）。また、共同研究で皮膚の組織修復時における SASP の生理作用を明らかにした（Demaria et al. Dev Cell 2014）。

2. 研究成果

（1）概要

肥満はがんのリスクファクターであることが疫学的に示されているが、その分子メカニズムは十分には明らかになっていない。今回我々は、化学発癌物質 DMBA を塗布する全身性の発癌モデルマウスを用いて、30 週後には肥満により肝癌の発症が著しく増加することを見出した。肝癌促進のメカニズムとして、肥満で増加したグラム陽性腸内細菌代謝物のデオキシコール酸が、腸肝循環により門脈を通じて肝臓に到達し、肝臓の間質に存在する筋線維芽細胞である肝星細胞に作用して細胞老化を誘導することがわかった。その結果 SASP 因子と呼ばれる様々な炎症性サイトカインやプロテアーゼ等が持続的に分泌され、腫瘍促進性の高いがん微小環境を形成することが肝がん進展の原因であることが明らかになった。特に IL-1beta がサイトカイン産生の上流因子として重要であることが明らかになった。さらに肥満マウス糞便中の腸内細菌の 16SrRNA 遺伝子の配列を次世代シークエンサーで調べたところ、既知の 2 次胆汁酸産生菌の類縁菌が、肥満マウスで著しく増加していることが明らかになり、この菌がデオキシコール酸を産生している可能性が示唆された。さらに、ヒトにおいても、脂肪肝をベースに発症する NASH(non-alcohlic steatohepatisis)肝炎に伴う肝癌症例において、肝星細胞の細胞老化と SASP が検出され、同様の機構がヒトの肝癌においても働いている可能性が示唆され、中間報告までに論文を発表することができた（Yoshimoto et al. Nature 2013）。この論文はサイエンス誌の選ぶ Breakthrough of the Year 2013 で内容が紹介され、高い評価を得た。研究期間の後半では、同じ肥満誘導性肝癌のモデルシステムを用いて、SASP 因子の誘導機構と SASP 因子によるがん進展の分子機構について研究を進めている。研究期間の初期から上述した肥満とがんの研究と同時に、個体老化と SASP の関連について、早老症マウス klotho を用いた解析を試みていたが、細胞老化誘導因子 p16 により、細胞老化や SASP 誘導とは別経路の、klotho の発現抑制を介した、新しい個体老化の誘導機構を明らかにすることができた（Sato et al. Nature Commun 2015）。また、共同研究で皮膚の組織修復時における SASP の生理作用を明らかにした（Demaria et al. Dev Cell 2014）。

（2）詳細

中間報告以降の研究成果

1. SASP 因子の発現誘導機構：TLR を介する炎症シグナルの関与

他グループからの過去の報告では、グラム陰性菌の外膜成分、リポポリサッカライド（LPS）をリガンドとする TLR4 のノックアウトマウスで、四塩化炭素による肝がん形成が抑制されるという報告があった（Dapito et al. Cancer Cell 2012）。そのため、我々も SASP 因子の誘導機構として、以前から TLR を介する経路に着目し解析を行っていた。この報告と同様に TLR4 ノックアウトマウスを用いて肥満誘導性肝癌誘発実験を行ったところ、逆に TLR4 ノックアウトマウスにおいてはむしろ、肝腫瘍形成数が増加することが明らかになった。しかし、我々の肥満誘導性肝癌誘発実験では、グラム陽性腸内細菌が著しく増加していることから、グラム陽性菌の細胞壁成分のリポタイコ酸（LTA）をリガンドとする TLR2 を介する炎症シグナルが、SASP 因子の誘導に関与する可能性を考え、TLR2 ノックアウトマウスを用いて現在研究を進めている。

2. 皮膚損傷治癒過程における SASP 因子の生理作用の解明 （米国 Judith Campisi らのグループとの共同研究）

細胞老化反応をイメージングするツールとして、マウス p16 遺伝子座に、ルシフェラーゼと赤色蛍光タンパク RFP、および単純ヘルペスウイルス・チミジンキナーゼ（HSV-TK）の3つの遺伝子産物を融合させたトリプルフュージョンタンパクの cDNA を挿入した組み換え BAC を作製してマウスの p16 遺伝子座に導入し、p16 の発現時にこのトリプルフュージョンタンパクが発現するマウスモデルシステムを、米国の Judith Campisi らのグループが開発した。このマウスを用いると、生体で細胞老化が誘導されている部位を発光と蛍光でイメージングすることが可能であり、かつ、抗ヘルペスウイルス剤である GCV の投与により、HSV-TK を発現する老化細胞を死滅させることができる。つまり、生体内で細胞老化を起こした細胞を同定し、かつ、その老化細胞を除去できるシステムである。このマウスを用いると、皮膚の損傷部位で細胞老化が検出され、皮膚線維芽細胞が細胞老化を起こすと筋線維芽細胞に変化し、この細胞が一時的に SASP 因子を産生することが明らかになった。さらに興味深いことに、損傷部における細胞老化を起こした細胞の除去によって、皮膚の損傷治癒が遅延することもわかった。詳細を調べると、細胞老化を起こした筋線維芽細胞が分泌する SASP 因子のひとつ、PDGF-AA が損傷治癒に重要な因子であることが示された。細胞老化が起こりにくい p16 と p21 のダブルノックアウトマウスを用いて損傷治癒を解析する実験を大谷が担当し、p16 と p21 のダブルノックアウトマウスにおいても皮膚の損傷治癒が遅延することがわかり、その場合も PDGF-AA を投与すると、治癒が促進されることが明らかになった。以上の実験から、皮膚の損傷時には皮膚の筋線維芽細胞において一時的に SASP が生じ、増殖因子の分泌によって組織再生を促す生理作用があることが明らかになった（Demaria, Ohtani et al. Dev Cell 2014）。

3. 細胞老化誘導因子 p16 は転写因子 E2F を介して抗老化因子 klotho の発現を抑制し個体老化を促進する

我々は以前開発した細胞老化誘導因子 p16 の発現イメージングマウスを用いた実験で、加齢個体においては細胞老化を起こした細胞が蓄積することを明らかにしていた。また、加齢個体の組織では様々な炎症性サイトカインの発現が上昇しているため、加齢個体では老化細胞蓄積と SASP の亢進が生じており、それが加齢における慢性炎症の原因であるかもしれないと考え、本さきがけ研究でその解明を目指すことを課題として挙げていた。この目的のため、細胞老化や SASP を生じにくい条件にするために、p16 を欠失させた背景としたマウスで、マウスを加齢させたいところであるが、p16 は同時に重要ながん抑制因子であるため、p16 ノックアウトマウスはがんを生じ、寿命を全うしないまま死亡する。そこで、早老症マウスである klotho マウスを用いて p16 が欠失した背景のマウスを作製し、個体老化と慢性炎症の関連について調べることとした。klotho マウスは gene trap 法により、α-klotho 遺伝子の発現制御領域にDNA断片が挿入されており、そのため抗老化因子であるα-Klotho の発現が著しく低下した hypomorphic mutant で、平均寿命が 12 週程度という短命の早老症モデルマウスである。このマウスを用いて、p16 を欠失させた背景にしたところ、klotho マウスに通常みられる骨粗しょう症や肺気腫、皮下脂肪の菲薄化などの老化表現型が著しく回復しただけでなく、寿命も klotho マウスに比べ、著しく延長した。解析の結果、驚くべきことに、この老

化表現型の回復は、細胞老化を起こした細胞の数が減ったためではなく、もともと著しく低下していたα-Klotho 遺伝子の発現が、p16 の欠失によって回復したことに起因することがわかった。つまり p16 がα-Klotho 遺伝子の転写制御を担っていることが示唆された。p16 は RB を介して E2F 転写因子を負に制御することが知られている。生体においてα-Klotho を発現するのは腎臓の尿細管細胞であることがわかっているが、この細胞を使ってα-Klotho 遺伝子のプロモーター領域の解析を進めたところ、ヒト、マウスとも、α-Klotho 遺伝子プロモーターにおいて、転写因子 E2F ファミリーの結合部位が存在していた。クロマチン免疫沈降やプロモーターアッセイの結果、p16 はE2F の転写活性を抑制することでα-Klotho 発現を制御していることが判明した。さらに興味深いことに、ヒトのα-Klotho 遺伝子のプロモーター領域には SNPs（1塩基多型）部位があり、ちょうど E2F 結合部位に一致していた。この SNPsをもつ人は骨粗しょう症の傾向があることが示されていたが、このSNPs 変異により、α-Klotho 遺伝子のプロモーター活性は有意に抑制された。よってこのSNPs 部位の変異をもつ人は、α-klotho の発現が低くなる可能性が示唆された。

以上の klotho マウスを用いた解析結果から、がん抑制遺伝子産物 p16 は、細胞老化を誘導するだけでなく、転写因子 E2F を介して抗老化遺伝子α-Klotho の発現を抑制的に制御することで、個体の老化を制御するという、新たな個体老化の分子メカニズムが示唆された（Sato et al. Nature Commun. 2015）（図1）。

加齢個体における慢性炎症のメカニズムを探る目的で開始した研究であったが、klotho マウスを用いたことで、意外な方向に研究が展開した。副次的に得られた成果であるが重要なさきがけ研究の成果と考えている。今後、本来の目的である SASP に着目した加齢個体における慢性炎症のメカニズムについては、α-klotho に依存しない別の早老症マウス、例えば DNA 修復異常マウスや p53 過剰発現マウス等を用いて、解明を目指したい。

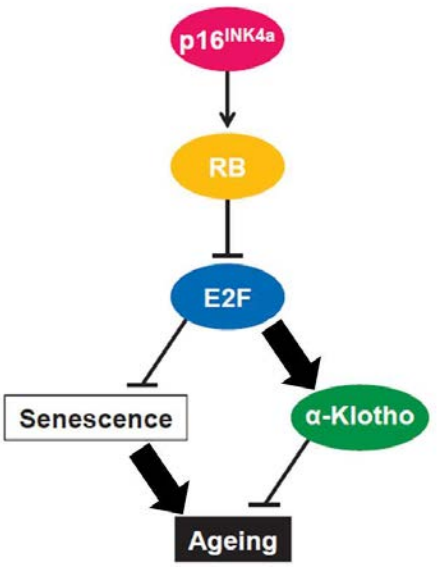


図１　本研究の概要：p16 が E2F を介して klotho の発現を抑制することで、個体老化が促進するという新しい個体老化のメカニズムを明らかにした。

3.　今後の展開

1　SASP 因子の発現誘導機構　－TLR2を介する炎症シグナルの関与に着目して－

研究成果の詳細1で記載したように、TLR2 を介するシグナルが肥満誘導性肝がんの形成に促進的に働く可能性を考え研究を進めている。今後、TLR2を活性化し腫瘍を促進するリガンドやその活性化機構、また、TLR2 経路を介してどのような下流遺伝子が発現誘導され、腫瘍形成に作用するのか、解明を目指したい。さらに TLR2 のシグナルと抑制するアンタゴニストを見出すことで、がん予防にもつなげたい。

2　肥満誘導性肝癌発症に対する運動負荷の効果

肥満により肝がんの発症が促進されることが明らかとなったが、この発症を予防する策の可能性として、運動負荷をマウスに与える試みを行っている。運動負荷により、生体でどのような遺伝子発現動態や代謝物が変化するのか、分子レベルまで解明していきたい。

3　SASP因子による肥満誘導性肝癌の促進機構の解明

肥満誘導性肝がんの腫瘍部において、肝星細胞の細胞老化やSASPが生じるが、SASP因子がいったいどのようなメカニズムでがんを進展させるのか、その機構はわかっていない。そこで腫瘍部の肝星細胞で高発現するサイトカインに注目し、がん細胞の増殖やがん進展に関わるかどうか検討する。

4.　評価

（1）自己評価

（研究者）

1）研究目的の達成状況、研究の進め方（研究実施体制及び研究費執行状況）

［研究目的の達成状況］

研究課題申請時には以下の 3 つの課題に取り組むことを挙げていた。

1　生体において、細胞老化による炎症性サイトカイン分泌が発癌を促進するのか？

2　細胞老化による炎症性サイトカイン分泌（SASP）がどのようなメカニズムで起こるのか？

3　加齢による慢性炎症に SASP が関与するのか？

1～3では達成できたのは1と、2のメカニズムのひとつ（腸内細菌代謝物による）を明らかにできたと考えている。2について、さらなる解析を現在続けている状況である（TLR2 を介する経路）。3については研究成果の3で述べたように、早老症マウスで試みたが、研究が別の方向に発展した。これ以外にも SASP 因子がどのようなメカニズムで癌を進展させるのかという重要な点について現在、研究を進めている。この実験系で様々なことが明らかになりつつあるが、同時に解明すべき課題も増えている。

［研究の進め方］

さきがけに採択されてから、半独立態勢でグループを組み、自由に研究を行うことができた。研究費のおかげで、効率的に研究を進めていくことができた。昨年度から東京理科大学に異動し完全に研究室を主宰できるようになったが、さきがけ採択後の半独立態勢は、PI としてのよいトレーニングになった。また、異動時もさきがけ研究費のおかげで、研究継続に支障がなかった。

2）研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果（今後の見込みを含む）

ウイルス性肝がんの減少にかわって、肥満誘導性肝がんは現在、増加の一途をたどっているがんであり、予防法や治療法の確立が急務である。今後本研究を通じて明らかにできたことを、将来、予防法や治療法の実現に役立てたい。

（2）研究総括評価（本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での

評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った）。

（研究総括）

細胞老化は重要な発癌防御機構であるが、老化細胞から炎症性サイトカインなどを持続分泌する現象（SASP）を随伴することから、細胞老化から見た慢性炎症とがんの進展に焦点を合わせ研究を推進している。化学発癌剤 DMBA を塗布されたマウスに高脂肪食を摂餌すると肝がんが高率に発症する系を駆使して、さきがけ研究期間の前半で、高脂肪食摂取や遺伝的な肥満により腸内で増殖した特定のグラム陽性細菌が一次胆汁酸から多量のデオキシコール酸を生成し、それが腸肝循環により肝臓に到達して肝星細胞の細胞老化を誘導し、その肝星細胞から炎症性サイトカインなどを持続分泌する現象（SASP）を引き起こし、結果として肝星細胞の近くの肝細胞で肝がんの発症を促進することを明らかにして論文発表した。その後、SASP 因子の発現が、肥満で増加するグラム陽性腸内細菌の細胞壁成分のリポタイコ酸（LTA）による TLR2 経路の活性化を伴う炎症誘導機構（COX2 の誘導とプロスタグランジンの産生）により亢進することを見いだしている。肥満誘導性肝がんのモデルではグラム陽性菌が著明に増えること、それを標的とするバンコマイシンを投与したマウスでは肥満誘導性肝がんの発生が抑制されることを示している。その他、本研究の過程で副次的ではあるが、皮膚損傷時の組織再生における皮膚筋線維芽細胞の一時的な SASP 現象（増殖因子の分泌）の関与や、新たな個体老化の分子メカニズムとしてがん抑制遺伝子産物 p16 が細胞老化を誘導するだけでなく抗老化遺伝子 α-Klotho の発現を抑制的に制御することを明らかにして発表している。

肥満、腸内細菌、細胞老化と発癌とのダイナミックな関係を示した成果と論文は、広範な研究領域の研究者に対してばかりでなく、国内外においても社会的に大きなインパクトがあった。本研究課題である肥満-細胞老化-がん進展の新たな発症メカニズムの解明の骨子となる成果を示すことができたと高く評価する。今後、研究成果の発表に対しても科学的・社会的な反響を呼ぶものと大いに期待できる。他のさきがけ研究者との共同研究を含む交流が研究進展に重要な要素となったこと、また本研究の成果を通じて研究者として大いに成長したことは、本領域にとっても誇らしい成果でもある。

5. 主な研究成果リスト

（1）論文（原著論文）発表

1. Yoshimoto S, Loo TM, Atarashi K, Kanda H, Sato S, Oyadomari S, Iwakura Y, Oshima K, Morita H, Hattori M, Honda K, Ishikawa Y, Hara E, Ohtani N. Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome.. **Nature** 499,97-101 (2013)
2. Demaria M, Ohtani N, Youssef SA, Rodier F, Toussaint W, Mitchell JR, Laberge R-M, Jan Vijg J, Van Steeg H, Dollé MET, Hoeijmakers JHJ, de Bruin A, Hara E, Campisi J. An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. **Dev Cell** 31,722-33.(2014)
3. Imai Y, Takahashi A, Hanyuu A, Hori S, Sato S, Naka K, Hirao A, Ohtani N, Hara E. Crosstalk between the RB-pathway and AKT signaling forms a Quiescence-Senescence switch. **Cell Reports** 7:194-207, (2014)

4. Sato S, Kawamata Y, Takahashi A, Imai Y, Hanyu A, Okuma A, Takasugi M, Yamakoshi K, Sorimachi H, Kanda H, Ishikawa Y, Sone S, Nishioka Y, Ohtani N (co-corresponding), Hara E. Ablation of the p16^{INK4a} tumour suppressor reverses ageing phenotypes of *klotho* mice. **Nature Commun** 6, 7035. doi: 10.1038/ncomms8035 (2015)
5.

（2）特許出願

研究期間累積件数：2 件

1.
発　明　者：原　英二、大谷直子、吉本　真、羅　智文
発 明 の 名 称：食品成分及び食品組成物のスクリーニング方法
出　願　人：公益財団法人　がん研究会
出　願　日：2013.2.12
出 願 番 号：PCT/JP2014/053047
公開番号：WO 2014126043 A1

2.
発　明　者：原　英二、大谷直子、吉本　真、羅　智文
発 明 の 名 称：発がんリスクの検査方法
出　願　人：公益財団法人　がん研究会
出　願　日：2013.2.12
出 願 番 号：PCT/JP2014/053048
公開番号：WO2014126044 A1

（3）その他の成果（主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等）

主要な学会発表：

1. Ohtani N, Hara E. Obesity-induced Gut Microbial Metabolite, DCA, Promotes Liver Cancer Through Senescence Secretome.　Ketstone Symposia: Gut Microbiota Modulation of Host Physiology: The Search for Mechanism. March 2, 2015 Keystone USA（招待講演）

2. Naoko Ohtani, Shin Yoshimoto, Tze Mun Loo, Eiji Hara. The role of gut microbiota in obesity-associated hepatic carcinogenesis. The 37th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan Symposium　:Gut Microbiota on the Host Physiology and Pathology, November 25, 2014 Yokohama, Japan（招待講演）

3. Naoko Ohtani. Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence-associated secretome. The 1st International Symposium on Mucosal Immunity and Vaccine Development 2014,　October 21, 2014. Tokyo, Japan（招待講演）

4. Naoko Ohtani, Shin Yoshimoto, Tze Mun Loo, Hiroaki Kanda, Seidai Sato, Yuichi Ishikawa &

Eiji Hara. Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer via senescence secretome. Welcome Trust scientific conference. Cell Senescence in Cancer and Aging, July 22, 2013, Cambridge, UK （一般演題、口頭発表に選出）

5. Naoko Ohtani, Shin Yoshimoto, Tze Mun Loo, Hiroaki Kanda, Seidai Sato, Yuichi Ishikawa & Eiji Hara. Senescence-Associated Secretory Phenotypes (SASPs) Promote Obesity Associated Hepatocarcinogenesis. Keystone Symposia Aging and Dideases of Aging, October 25, 2012 Tokyo, Japan（一般演題、口頭発表に選出）

受賞:
第 19 回 日本女性科学者の会 奨励賞 受賞 (2014.6.22)

プレスリリース:
肥満に伴う腸内細菌の変化が肝がんの発症を促進する(2013.6.27)
公益財団法人がん研究会, 科学技術振興 (JST) 共同発表
論 文 名 : Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer via senescence secretome. Nature 499, 97-101 (2013)

研　究　報　告　書

「IL-33 産生を伴う慢性疾患と加齢や肥満により増加したナチュラルヘルパー細胞が Th1/Th2 バランスの破綻を惹起するメカニズムの解明」

研究タイプ：通常型
研究期間：　平成 23 年 2 月～平成 28 年 4 月
研 究 者：　茂呂　和世

1.　研究のねらい

上皮細胞や血管内皮細胞が産生する IL-33 は生体の最前線で生体の異常を感知するセンサーとしての役割を持つ。IL-33 はアトピー患者の皮膚、潰瘍性大腸炎患者の腸管、喘息患者の肺など、様々な疾患、多様な臓器で発現が認められる。当研究室で同定されたナチュラルヘルパー（NH: Natural Helper）細胞は新しい自然免疫系のリンパ球で、IL-33 に反応することで多量の 2 型サイトカインを産生する。NH 細胞は他のリンパ球と異なりリンパ節には存在せず、脂肪組織や、腸管、肺などに多く存在することから IL-33 関連疾患において炎症局所で重要な役割を持つことが示唆されていた。

IFN などの 1 型サイトカインがウィルスや細菌の細胞内感染防御に働くのに対し、2 型サイトカインは寄生虫や真菌感染に働くことが古くから知られており、2 型サイトカインの過剰な産生はアレルギー性疾患を誘導する事が分かっていた。新生児の体内は 2 型に偏向しているが、生後まもなく様々な感染を経験することで 1 型へのシフトが起きる。ところが、加齢と共に生体内は再度 2 型へと偏向していくことが知られている。加齢による 2 型への偏向は 2 型疾患の誘導のみならず、1 型応答の減弱による感染防御力への低下につながる。そこで本研究では、2 型への偏向の原因が NH 細胞にあるのではないかと考え、NH 細胞の活性化を誘導する IL-33 依存的な疾患に着目し解析を行った。

NH 細胞は 2010 年に報告した細胞であったため、本研究開始当初はこの細胞がいつどこでどのような制御を受けて分化し、どこでどのような役割を持ち、どのように抑制することができるのか何も分からない状態であった。これらの疑問を解決すべく、本研究では NH 細胞の分化機構、制御機構、活性化機構、機能を明らかにし、抑制法を検討することで 1 型/2 型サイトカインバランスと NH 細胞について追究した。

2.　研究成果

（1）概要

本研究では NH 細胞の分化経路と転写因子発現、増殖や 2 型サイトカイン産生制御機構、IL-33 および IL-25 による活性化機構、アレルギー性疾患、特に喘息における機能と喘息に伴うステロイド抵抗性における役割、さらに肥満における役割と 1 型サイトカインによる NH 細胞の抑制機構を明らかにした。

（2）詳細

1. GATA3 による NH 細胞の分化およびサイトカイン産生制御機構

RORαが Nuocyte のマスター遺伝子として報告されたことから、同じ Group2 ILC である NH

細胞の分化やサイトカイン産生にも RORαが重要であることが予想された。しかしながら、RORα欠損マウスでは Nuocyte が出現しなくなるのに対し、NH 細胞は脂肪組織で数は減るものの存在し、この NH 細胞を分離し IL-33 存在下で培養した結果、野生型と変わらない 2 型サイトカイン産生をすることが明らかになった。そこで、RORα以外のどのような分子が NH 細胞の機能に重要かを明らかにする為に、IL-33 シグナル伝達経路における分子機構解明を試みた。その結果、IL-33 受容体下流には NF-κB 経路と MAPK 経路が存在し、MAPK 経路は p38 と JNK を介したものが存在することが明らかになり、中でも p38 を介した経路が NH 細胞の IL-5、IL-13 産生には必須であることが明らかになった。さらに、p38 下流で、GATA3 が転写因子として働き、サイトカイン産生だけでなく、増殖と分化にも関わることが明らかになった。

2. NH 細胞と他の Group2 ILC

NH 細胞の報告後、Nuocyte と MPP^{type2} と名付けられた Th2 サイトカイン産生細胞が相次いで報告された。MPP^{type2} はミエロイド系細胞への分化能を持つことから NH 細胞とは明らかに異なる細胞であることが分かったが、IL-25 投与によってリンパ節に出現する Nuocyte は表現型とサイトカイン産生が NH 細胞と良く似ていた。NH 細胞と Nuocyte が同一の細胞なのか、異なる細胞なのかを明らかにする為に解析を行った結果、NH 細胞が IL-25、IL-33 の両方に反応する細胞なのに対し、Nuocyte は IL-33 受容体の発現が低く、IL-33 投与ではそもそも腸間膜リンパ節への出現が見られないことが分かった。また、NH 細胞の移植実験から、NH 細胞は末梢組織や脂肪組織には出現するが、リンパ節へは出現しない細胞であることが明らかになった。リンパ節への移動には CCR7 や CXCR5 などのケモカインレセプター発現が必要であるが、NH 細胞ではこれらのケモカインレセプター発現が見られない。さらに、各細胞の増殖能を比較したところ、NH 細胞は IL-2、IL-2+IL-25、IL-33 存在下で長期にわたって維持できる細胞であるのに対し、Nuocyte は IL7+IL-33 存在下で最大 9 日間しか生存しない細胞であることも明らかになった。これらの結果から、どちらの細胞も Group2 ILC に分類されるものの、その表現型や機能、存在部位は異なることが明らかになった。

3. 喘息における NH 細胞の 2 型免疫反応

NH 細胞が喘息における好酸球浸潤に重要な細胞かを明らかにするために野生型マウス、T 細胞と B 細胞を欠損する $Rag\text{-}2^{-/-}$マウス、T 細胞、B 細胞、NK 細胞、NKT 細胞に加え NH 細胞を欠損する $\gamma_c^{-/-}Rag\text{-}2^{-/-}$マウス、さらに野生型マウスの腸間膜から得た NH 細胞を $\gamma_c^{-/-}Rag\text{-}2^{-/-}$マウスへと移植したマウスを用い、IL-33 の気管内投与実験を行った。野生型マウス、$Rag\text{-}2^{-/-}$マウス同様、NH 細胞を移植した $\gamma_c^{-/-}Rag\text{-}2^{-/-}$マウスでは肺への NH 細胞の出現と共に著明な好酸球浸潤が認められた。一方、移植をしていない $\gamma_c^{-/-}Rag\text{-}2^{-/-}$マウスでは NH 細胞の出現はもちろんのこと、好酸球浸潤は全く認められなかった。また、NH 細胞は *in vitro* だけでなく、*in vivo* でも IL-2+IL-25 および IL-33 投与後の肺においても好酸球の分化増殖に必須とされる IL-5 を多量に産生していることが明らかになった。さらに、好酸球の遊走には Eotaxin が重要であることが知られていたが、IL-2+IL-25 または IL-33 刺激により NH 細胞が Eotaxin を産生することが明らかになった。

NH 細胞は IL-33 だけでなく、IL-25 投与によっても肺胞洗浄液内に出現した。*In vitro* の実験から NH 細胞は IL-25 単独には反応せず、IL-2 と IL-25 の共刺激にのみ反応し、増殖や Th2 サイトカイン産生が誘導されることが分かっていた。そこで、何故 IL-25 の単独投与でも肺へ NH 細胞が出現するのかを明らかにするために T 細胞を欠損する $Rag\text{-}2^{-/-}$マウスに対し IL-25、IL-2+IL-25、IL-33 投与を行った。その結果、IL-25 単独投与では NH 細胞の肺胞洗浄液への出現は見られなくなった。これは T 細胞によって IL-2 が産生されることにより結果的には NH 細胞が IL-2+IL-25 刺激を受け取り 2 型サイトカイン産生が誘導されることを示していた。

4. NH 細胞による重症喘息におけるステロイド抵抗性獲得機構

重症喘息におけるステロイド抵抗性の発症機序を明らかにする為に、まずステロイド抵抗性が起きる条件を検討した。これまでの多くの喘息に関する研究は OVA 投与によって病態を

誘導してきた。OVA 投与では、主に T 細胞を主体とした反応が起きると考えられている。一方、非アトピー性喘息のような、自然免疫を主体とした喘息は IL-33 投与によって誘導できる。そこで、野生型マウスに対し、OVA 投与または、IL-33 投与または、OVA+IL-33 同時投与を行い、デキサメタゾン投与を行った。その結果、OVA 投与、IL-33 投与ではステロイドによって NH 細胞浸潤、IL-5/IL-13 産生、好酸球浸潤、杯細胞過形成が全て消失したのに対し、OVA+IL-33 投与では全ての残存が見られ、ステロイド抵抗性が誘導されたことを示した。IL-33 単独では起きないステロイド抵抗性が OVA 投与のどのような因子によって抵抗性に変わるのかを明らかにする為に、IL-33 とデキサメタゾン存在下で培養した NH 細胞に様々なサイトカインを加えた。その結果、IL-2、IL-7、TSLP を IL-33 と供に加えたときのみ NH 細胞の増殖がステロイドによって抑制されず、ステロイド抵抗性になることが示された。これらのサイトカインは全て STAT5 アクチベーターであることが分かったが、中でも TSLP は重症喘息患者での遺伝子発現上昇が報告されており、OVA 投与によって気管支での発現が上がることが明らかになったことから、IL-33 と TSLP をデキサメタゾンと共に野生型マウスに投与したところ、IL-33＋OVA 同様のステロイド抵抗性が示された。TSLP 受容体欠損マウスではステロイド抵抗性が起きない事も確認した。培養系で NH 細胞のステロイド抵抗性を誘導したサイトカインが全て STAT5 アクチベーターだったことから、NH 細胞の STAT5 発現を確認したところ、TSLP 刺激による発現上昇が見られた。さらに、重症喘息の新しい治療法を確立するために、ステロイドと共に STAT5 阻害薬を投与することで NH 細胞のステロイド抵抗性が解除され、ステロイドによる治療が可能になるのではないかと考え、承認薬の中で STAT5 阻害効果を持つ薬品をスクリーニングした。向精神薬として用いられているピモザイドが STAT5 阻害薬として有効であることがわかったことから、IL-33+TSLP によってステロイド抵抗性になったマウスに対し、ステロイドと共にピモザイドの投与を行ったところ、NH 細胞浸潤、IL-5/IL-13 産生、好酸球浸潤、杯細胞過形成の全てが消失し、ピモザイドが重症喘息の治療薬として有効であることが示された。

5. NH 細胞による肥満の誘導機構

NH 細胞は脂肪組織に存在することから脂肪細胞と何らかの相互作用をもつことが予想されてきたが、本研究からすべてのリンパ球を欠損する $\gamma_c^{-/-}$Rag-2$^{-/-}$マウスが野生型マウスや T、B、NKT 細胞を欠損する Rag-2$^{-/-}$マウスに比べ高脂肪食負荷による肥満に対し著明な抵抗性を示すことが明らかになった。$\gamma_c^{-/-}$Rag-2$^{-/-}$マウスは NH 細胞だけでなく、NK 細胞や LTi 細胞も欠損することから、NK 細胞を欠損する IL-15$^{-/-}$マウスや LTi 細胞を欠損する ROR $\gamma t^{GFP/GFP}$マウスへの高脂肪食負荷を行ったところ、IL-15$^{-/-}$マウスは抵抗性を示さず、LTi 欠損マウスで肥満への抵抗性がやや見られたがその程度は $\gamma_c^{-/-}$Rag-2$^{-/-}$マウスに比較すると弱かった。そこで NH 細胞を欠損する GATA3 コンディショナルノックアウトマウスを用いて高脂肪食負荷実験を行ったところ、NH 細胞欠損マウスでは著名な肥満への抵抗性を呈したことから NH 細胞が肥満への抵抗性へ関与することが示唆された。$\gamma_c^{-/-}$Rag-2$^{-/-}$マウスへ脂肪組織から分離した NH 細胞を移植しても肥満は誘導されないが、腸管から分離した NH 細胞を移植することで太ることから、高脂肪食依存的に起こる肥満は小腸粘膜固有層に存在する NH 細胞によって制御されている可能性が考えられる。

6. NH 細胞の分化機構

NH 細胞の分化について、転写因子や前駆細胞に関する報告はなされている。しかしながら、その前駆細胞にどのような外的因子が働くことで転写因子が発現し成熟 NH 細胞への分化が開始されるのかについては明らかになっていない。これまでに Nuocyte の分化には Notch シグナルと IL-33 が必要であると報告されていたが、NH 細胞の分化に IL-33 は必要なく、また、IL-7 の濃度、Notch シグナルの強さ、Notch シグナルの長さによって T 細胞、B 細胞と運命を分かつことが明らかになった。また、NH 細胞は骨髄のリンパ球前駆細胞 CLP から分化することが知られているが、骨髄内で最終分化をするのかどうかについては明らかになっていない。NH 細胞は骨髄形成が完了する前の胎児の脂肪組織にも存在することが明らかに

なったことから、NH 細胞の最終分化は末梢で起きることが示唆されている。骨髄、胸腺、脂肪組織の Notch リガンド発現の強さを比較した実験からもこの結果は支持されている。

7. NH 細胞特異的遺伝子の同定と特異的ノックアウトマウスの作製

NH 細胞特異的欠損マウスを作製するために、特異的遺伝子の検索を行った。まず、様々な免疫細胞（29 種類）から RNA を抽出し、RNA シークエンス解析から NH 細胞で特異的に発現していると思われる遺伝子を 62 遺伝子抽出した。次に、NH 細胞と役割やサイトカイン産生、表現型が類似する細胞（10 種類）から RNA を抽出し、cDNA を合成後、リアルタイム PCR の SYBR assay で 62 種の特異性の確認を行った。62 種のうち 12 遺伝子が NH 細胞特異的であると考えられたため TaqMan プローブを用いた特異性と発現量の確認を行った。その結果、特に発現量が多かったものに 2 遺伝子について DTR マウス作製することができた。

8. IFN γと IL-27 による NH 細胞の制御機構

NH 細胞は肺、脂肪組織、腸管、皮膚など様々な組織に存在するが、パラビオーシスマウスを用いた研究から ILC2s は各組織に常駐し、血行性に移動しない細胞であることが明らかになった。このことは、定常状態、IL-33 依存的炎症のどちらに置いても確認されたことから、NH 細胞による炎症の収束はどのようにして起こるのかについて精査した。まず、NH 細胞が IL-10、IL-12、IFN α/β、IFN γ受容体発現を発現することが明らかになったことから *in vitro* の系で NH 細胞の増殖を誘導する IL-2、IL-2+IL-25、IL-33 刺激時に IL-10、IL-12、IFN β、IFN γを添加したところ、IFN β、IFN γが NH 細胞の増殖を抑制することが明らかになった。この増殖抑制は IL-2、IL-2+IL-25、IL-33 いずれによる増殖も抑え、生存には影響を与えなかった。次に IL-2+IL-25、IL-33 によって誘導される NH 細胞の 2 型サイトカイン産生に対する IL-10、IL-12、IFN β、IFN γの影響を調べた。その結果、増殖同様、IFN β、IFN γ存在下では NH 細胞の IL-5 および IL-13 産生がほとんど見られなくなった。これらの結果から NH 細胞は I 型、II 型 IFN の両方によって生体内での働きが抑制される可能性が示唆された。I 型、II 型 IFN はどちらも STAT1 依存的に NH 細胞を抑制したことから STAT1 を介するシグナルとして知られる IL-27 を精査したところ、IFN だけでなく IL-27 も NH 細胞の増殖、サイトカイン産生を抑制することが明らかになった。

IFN や IL-27 が生体内でどのような役割を担っているかを調べるために寄生虫感染モデルマウス、真菌感染モデルマウス、IL-33 誘導性喘息モデルマウスを使用して解析を行った結果、IFN および IL-27 は NH 細胞による 2 型免疫反応を収束させ、Th2 細胞による反応へと移行させるために重要であることが明らかになった。これらの結果は、獲得免疫機構において Th1 細胞と Th2 細胞がそれぞれ IFN γと IL-4 を出すことでそれぞれの分化を抑制し、Th1/Th2 バランスを保つことが明らかになっていることと同様に、自然免疫機構でも 1 型サイトカインと 2 型サイトカインがバランスを取り合って、過剰な炎症の誘導を抑制することを示している。

3. 今後の展開

2 型サイトカインを主体とする疾患はアレルギーや寄生虫感染、真菌感染だけでなく様々存在する。これらの 2 型疾患はこれまで Th2 細胞を 2 型サイトカインの産生源として解析と治療法の開発が進められてきた。しかしながら、本研究から NH 細胞の重要性が示されたことから、今後はこれらの 2 型疾患に関する研究・開発を NH 細胞の存在を加味した上で再検討すべきだと考えている。また、NH 細胞が肥満を誘導する事が明らかになった事から免疫疾患だけでなく、糖尿病などの代謝疾患における NH 細胞の重要性も示していきたい。さらにアレルギー性疾患については臨床応用に結びつくような治療法の開発を試みていく予定である。

4. 評価

（1）自己評価

（研究者）

1）研究目的の達成状況、研究の進め方（研究実施体制及び研究費執行状況）

さきがけ研究の機会を得て、1 方向の研究ではなく多方向から NH 細胞というターゲットに対する研究を行うことができた。また、さきがけ研究が始まった当初は自然リンパ球という言葉すら生まれていなかったが、3 年前から日本免疫学会で Innate lymphoid cell というセッションが開始され、昨年は International innate lymphoid cell という国際学会も開始した。6 年前には誰も知らなかった細胞がこれほど認知されるようになるとは予想以上の成果だったと考えている。また、さきがけ研究を通して領域内の研究者と様々な共同研究を開始できたことも大きな成果の 1 ついえる。

2）研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果（今後の見込みを含む）

NH 細胞が注目され、分野の拡大につながった背景には様々な疾患に関与する細胞であった点が大きな要因として挙げられる。現在はまだ世界的に基礎研究対象の段階であるが、次の 5 年で臨床での治療ターゲットとなることが予想されている。

3）その他領域独自の評価項目に基づく評価

慢性炎症という言葉の意味を真に理解して研究が始まったわけではなかったが、5 年という与えられた期間内に慢性炎症の定義や意味が自分自身の中でも社会的にも理解され、認められて、現在では当たり前の理念として定着した。その一翼を担えた事が非常に有意義であった上に今後の研究への力になったと思っている。

（2）研究総括評価（本研究課題について、研究期間中に実施された、年２回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った）。

（研究総括）

現在2型自然リンパ球（Group 2 innate lymphoid cell, ILC2）に分類される、Th2サイトカインを産生するナチュラルヘルパー（NH）細胞を世界に先駆けて同定し、その解析は世界をリードしている。NH細胞のサイトカイン産生、増殖/分化には転写因子GATA3が関与し、NH細胞のIL-25/IL-33に対する応答性やIL-33受容体発現量・ケモカインレセプター発現・生存へのサイトカイン依存性において他の ILC2との相違点を明らかにした。マウスモデルを用いた疾患研究では、1) IL-33の気管内投与で誘導する非アトピー性喘息モデルにおける好酸球浸潤にNH細胞が産生するIL-5とEotaxinが必須であること、2) OVA とIL-33との同時投与による喘息モデルで生じるステロイド抵抗性がOVA投与により発現が上昇するTSLPに依存し、そのTSLPがNH細胞をステロイド抵抗性にすることを見事に証明した。さらに、TSLPにより活性化されるSTAT5を阻害する薬剤スクリーニングの結果、既存薬ピモザイドが阻害効果を持つことを見いだし、その投与によりステロイド抵抗性が解除されることを発表した。3）NH細胞の増殖や2型サイトカイン産生をIFNβ、IFN γやIL-27がSTAT1依存的抑制すること見いだし、寄生虫・真菌感染モデル・IL-33誘導性喘息モデルにおけるNH細胞による炎症反応をIFNとIL-27が収束させることを明らかにした。4）パラビオーシスを用いた実験からNH細胞が組織依存的な細胞であり血行性に移動しない細胞であることを明らかにした。5）高脂肪食誘導性肥満においてNH細胞が肥満やインスリン抵抗性、M1マクロファージの誘導に重要であることを見いだした。今後の研究展開が楽しみである。

さきがけ研究開始当初は自然リンパ球という言葉すら生まれていなかった中で提案された

研究目標の一部は、研究の進捗に伴ってNH細胞の分化などの基礎的なものへ振り向けたが、NH細胞のTh1/Th2バランスの破綻を惹起するメカニズムという当初研究課題については、NH細胞の活性化/抑制機構と各種疾患モデルマウスにおけるNH細胞の役割を解析することにより、大きな成果をあげることができたと評価する。研究者としても独立を果たし、今後の益々の成長を期待している。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Moro K, Kabata H, Tanabe M, Koga S, Takeno N, Mochizuki M, Fukunaga K, Asano K, Betsuyaku T, Koyasu S. Interferon and IL-27 antagonize the function of group 2 innate lymphoid cells and type 2 innate immune responses. Nature Immunology, in press
2. Morita H, Arae K, Unno H, Miyauchi K, Toyama S, Nambu A, Oboki K, Ohno T, Motomura K, Matsuda A, Yamaguchi S, Narushima S, Kajiwara N, Iikura M, Suto H, McKenzie AN, Takahashi T, Karasuyama H, Okumura K, Azuma M, Moro K, Akdis CA, Galli SJ, Koyasu S, Kubo M, Sudo K, Saito H, Matsumoto K, Nakae S. An Interleukin-33-Mast Cell-Interleukin-2 Axis Suppresses Papain-Induced Allergic Inflammation by Promoting Regulatory T Cell Numbers. Immunity. 2015 Jul 21;43(1):175-86.
3. Vasanthakumar A, Moro K, Xin A, Liao Y, Gloury R, Kawamoto S, Fagarasan S, Mielke LA, Afshar-Sterle S, Masters SL, Nakae S, Saito H, Wentworth JM, Li P, Liao W, Leonard WJ, Smyth GK, Shi W, Nutt SL, Koyasu S, Kallies A. The transcriptional regulators IRF4, BATF and IL-33 orchestrate development and maintenance of adipose tissue-resident regulatory T cells. Nat Immunol. 2015 Mar;16(3):276-85.
4. Kabata H, Moro K, Fukunaga K, Suzuki Y, Miyata J, Masaki K, Betsuyaku T, Koyasu S, Asano K. Thymic stromal lymphopoietin induces corticosteroid resistance in natural helper cells in the inflamed airways. Nat Commun. 2013;4:2675.
5. Motomura Y, Morita H, Moro K, Nakae S, Artis D, Endo TA, Kuroki Y, Ohara O, Koyasu S, Kubo M. Basophil-derived interleukin-4 controls the function of natural helper cells, a member of ILC2s, in lung inflammation. Immunity. 2014 May 15;40(5):758-71.

(2)特許出願

該当なし

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

招待講演

1. Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2013
2. Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2014
3. Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2015

プレスリリース

1. 「重症喘息のメカニズム解明」薬事日報(2013 年 11 月)

2. 「重い喘息、仕組み解明」朝日新聞（2013 年 11 月）
3. 「抗炎症薬の無効経路解明」日刊工業（2013 年 10 月）

研　究　報　告　書

「生理活性脂質リゾホスファチジルセリンによる全身性エリテマトーデス疾患発症抑制メカニズムの解析」

研究タイプ：通常型
研究期間：　平成２３年１０月～平成２７年７月
研　究　者：　巻出　久美子

１．　研究のねらい

リゾリン脂質はグリセロール骨格、もしくはスフィンゴシン骨格に、リン酸基と一本の脂肪酸を有する脂質の総称である。近年、リゾホスファチジン酸（LPA）やスフィンゴシン 1 リン酸（S1P）などのリゾリン脂質が生理的・病理的に重要な役割を担っていることが明らかとなるとともに、S1P 受容体を標的とした薬（Fingolimod）が上市され、創薬ターゲットとしてもリゾリン脂質メディエーターが注目されている。

我々は、リゾリン脂質の一種であるリゾホスファチジルセリン（LysoPS）の産生酵素であるホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼ A_1（PS-PLA_1）が全身性エリテマトーデス（SLE）患者で特異的に上昇することを見出した。SLE は自己抗原に対する多彩な自己抗体産生を特徴とし、全身性の炎症を伴う難治性の自己免疫疾患である。これまでに、LysoPS はマスト細胞の脱顆粒促進活性など様々な細胞応答を引き起こすことが知られていたが、生体内でどのような役割を担っているかについてはほとんどわかっていなかった。我々は、既知の LysoPS 受容体 GPR34/LPS_1 に加え、新規 LysoPS 受容体として P2Y10/LPS_2、GPR174/LPS_3 を同定した。そこで、本研究では LysoPS 産生酵素 PS-PLA1 および LysoPS 受容体の KO マウスを用い、LysoPS シグナルの SLE 病態、さらには慢性炎症疾患への関与について解析することを目的とした。

２．　研究成果

（1）概要

今回我々は、SLE モデルマウスとして汎用されている MRL/MpJ-*Fas*$^{lpr/lpr}$ マウス（以下、MRL/lpr マウス）を用いた。MRL/lpr マウスはアポトーシス誘導因子である Fas が欠損しており、自己反応性のリンパ球が除去されない結果、自己抗体産生やそれに伴う腎炎など多彩な自己免疫現象を発現することが知られている。C57BL/6 系統の PS-PLA_1、LPS_1、LPS_2、LPS_3 KO マウスをそれぞれ MRL/lpr 系統に約 10 世代かけ戻し、MRL/lpr 系統の LysoPS 関連分子 KO マウスを作出した。各マウスについて、抗 dsDNA 抗体、腎障害マーカーとなる血中クレアチニン量、血中窒素量、腎臓の組織学的解析を行ったが、自己抗体や腎障害に顕著な差が認められる KO マウスはなかった。よって、本モデルマウスを用いてループス腎炎における LysoPS の関与について結論を得ることは出来なかった。

一方、MRL/lpr マウスに認められる異常リンパ球の蓄積において、LysoPS 関連分子 KO マウスで顕著な差が認められた。MRL/lpr マウスは元来、リンパ節腫脹を発症する突然変異マウスとして樹立されたマウスである。3-4 ヶ月齢になると、$CD4^-CD8^-B220^+$T 細胞（DN T 細胞）の異常リンパ球集積によるリンパ節腫脹を示す。MRL/lpr-WT マウスに比べ、MRL/lpr-LPS_2

KO マウスおよび MRL/lpr−LPS_3 KO マウスは脾臓やリンパ節が肥大化することがわかった。細胞ポピュレーションの解析により、この肥大化は DN T 細胞によるものであることが明らかとなった。また、本研究内で創製した LPS_2 アゴニストもしくは LPS_3 アゴニストを MRL/lpr マウスに連続投与することにより、リンパ節腫脹が抑制された。よって、LysoPS は LPS_2、LPS_3 を介して異常なリンパ球の蓄積を抑制していることが明らかとなった。

（2）詳細

1. MRL/lpr 系統 LysoPS 関連分子 KO マウスの表現型

SLE 病態を解析する目的で、MRL/lpr 系統の LysoPS 関連分子 KO マウスを作出した。PS−PLA_1、LPS_1、LPS_2、LPS_3 の全ての KO マウスにおいて、自己抗体産生および腎障害が MRL/lpr−WT マウスと顕著な差を認められるものはなかった。一方、MRL/lpr−WT マウスに比べ、MRL/lpr−LPS_2 KO マウスおよび MRL/lpr−LPS_3 KO マウスは脾臓やリンパ節が肥大化することがわかった。フローサイトメーターによりポピュレーション解析を行った結果、B 細胞、CD4T 細胞、CD8T 細胞は野生型マウスと同様であったが、$CD4^-CD8^-B220^+$T 細胞（DN T 細胞）が KO マウスで顕著に増加していた。

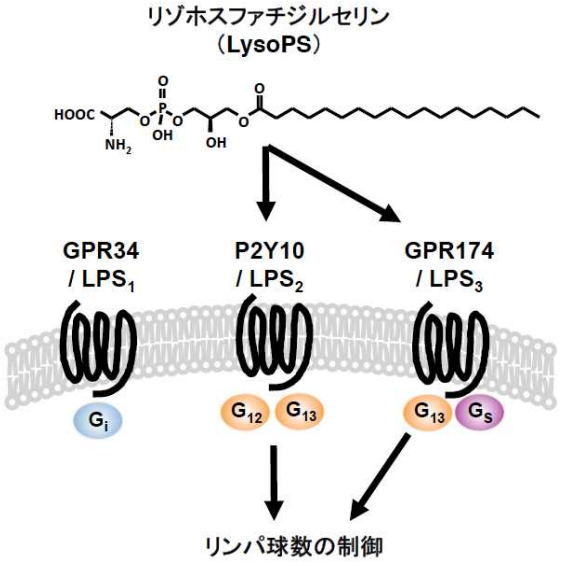
MRL/lpr KO マウスの表現型	LPS_1/GPR34	LPS_2/P2Y10	LPS_2/P2Y10	PS−PLA_1
自己抗体、腎障害	変化なし	変化なし	変化なし	変化なし
異常リンパ球の蓄積	変化なし	KO で増加	KO で増加	KO で減少

2. LysoPS 受容体アゴニストの創製

東京大学大和田先生との共同研究により有機化学的に合成した LysoPS 誘導体の受容体への活性化能を評価することにより、LysoPS 受容体アゴニストの創製を行った。その結果、受容体への選択性および親和性についての構造活性相関、および受容体選択的アゴニストを得ることができた（*J. Biochem.* 2015、*J. Med. Chem.* 2015）。

3. MRL/lpr マウスにおける LysoPS 受容体アゴニストの効果

上記で得られた LPS_2 アゴニスト（deoxy LysoPS）を MRL/lpr マウスに約 9 週間投与し、LysoPS 受容体にシグナルを入れた時の解析を行った。Vehicle 投与群に比べ、アゴニスト投与群では脾腫やリンパ節腫脹が顕著に抑制されていた。ポピュレーション解析の結果、DN T 細胞が顕著に減少していた。また、LPS_3 アゴニストについても同様の結果が得られた。よって、LysoPS は LPS_2 および LPS_3 を介して異常リンパ球の蓄積を抑制することが明らかとなった。



4.　生体内における LysoPS の検出

受容体 KO マウスで表現型が認められたことから、少なくとも MRL/lpr マウスではリガンドである LysoPS が機能しうる量存在していることが示唆される。そこで、我々は液体クロマトグラフィーとマススペクトロメトリーを用いて、LysoPS の各分子種、脂肪酸結合部位（*sn*-1 位、*sn*-2 位）を含め、数 nM レベルの LysoPS を検出できる測定系を確立した（*J. Lipid Res.* 2014）。本測定系を用いて様々なマウスサンプルを解析した結果、LysoPS は通常状態のマウス血漿中にはごく微量しか存在しないのに対し、炎症惹起時に顕著に上昇することが明らかとなった。LysoPS の産生は、SLE モデルや EAE などの慢性炎症モデルよりも創傷モデルや Con A 誘発性肝炎モデルなど急性炎症モデルでより顕著に上昇していた。現在はまだ血液や炎症滲出液、臓器全体などサンプル全体での量しか測定できていないため、今後イメージング MS などを利用して、組織上で LysoPS が産生される局所的な部位、および LysoPS 受容体発現細胞に受け渡される場所をより詳細に解析していきたい。

3.　今後の展開

本研究から、LysoPS/LPS_2・LPS_3 シグナルがリンパ球数の制御に関与することが明らかとなった。*In vitro* の解析から、LysoPS が T 細胞の増殖やサイトカイン産生、細胞遊走を負に制御するという知見を得ており、LysoPS が作用する T 細胞の種類、関与する受容体、関与するシグナルについて明らかにすることが今後の課題である。また、LysoPS がどのような病態・炎症時に産生されるかについて、イメージング MS を用いることでリガンド産生側からも解析を進めていきたい。

4.　評価

（1）自己評価

（研究者）

MRL/lpr 系統の産生酵素・受容体 KO マウスはループス腎炎に繋がる病態について顕著な差を示さなかったことから、SLE 病態に対して、LysoPS シグナルがどのような役割を担っているか、という課題に対して一切答えを出すことができなかった。本モデルマウスでも血中 PS-PLA_1 が上昇することは確認していたが、研究当初に認められていた MRL/lpr マウスにおける LysoPS の病態（ループス腎炎）抑制効果の再現性が得られず、結果的にはモデルマウスの選定という段階に問題があった。ただし、思いがけずリンパ球数の制御に LysoPS シグナルが関与するという結果を得ることができた。また、LysoPS 受容体選択的なアゴニストが得られ、これらが異常リンパ球を抑制する創薬のリード化合物となるものと期待される。また、LysoPS の高感度測定系を確立したことにより、今後 LysoPS の測定を通じて LysoPS が関与する疾患の探索に繋げていきたい。

（2）研究総括評価（本研究課題について、研究期間中に実施された、年２回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った）。

（研究総括）

リゾホスファチジルセリン（LysoPS）産生酵素であるPS-PLA1が全身性エリテマトーデス（SLE）患者で選択的に上昇することを見いだし、SLEのモデルマウスとして汎用されている

MRL/lprマウスにLysoPSを投与すると脾臓及びリンパ節の肥大が顕著に抑制されることなどから、LysoPSシグナルのSLE病態、さらには慢性炎症疾患への関与について解析することを課題とした。LysoPS関連分子である、PS-PLA1、受容体のLPS1、LPS2、LPS3のそれぞれを欠失したノックアウト(KO)マウスを作出し、それとMRL/lprマウスを10世代戻し交配し、各系統マウスのSLE様症状に関する解析を行った。その結果は野生型MRL/lprマウスとの間に有意な差が認められず、ループス腎炎におけるLysoPSの関与に関し、結論できていない。しかし、LPS2-KOとLPS3-KOではMRL/lprマウスで見られる脾臓やリンパ節の腫脹がさらに亢進し、lpr細胞の増加が見られた。そこで、LPS2やLPS3受容体に対する選択的アゴニストを創製し、MRL/lprマウスに投与したところ、脾腫やリンパ節腫脹の抑制とlpr細胞の減少が認められた。研究期間中には、数nMレベルのLysoPSを検出できる測定系を確立し、急性炎症モデルにおいてマウス血中LysoPSが上昇することを見いだしている。

以上、研究課題として目指したSLE病態におけるLysoPSとその関連分子の役割についての十分な回答は得られなかったが、LysoPSがlpr細胞のような異常リンパ球の増殖制御に係っていることを明らかにしたこと、また研究の過程でLysoPS受容体選択的アゴニストの創製、微量LysoPS測定系を確立して発表していることは評価したい。それらは今後のLysoPS関連研究に応用、発展させることができる成果と考える。諸般の事情により研究期間を4ヶ月延長し、最善を尽くしたものと評価する。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Inoue A, Ishiguro J, Kitamura H, Arima N, Okutani M, Shuto A, Higashiyama S, Ohwada T, Arai H, Makide K, Aoki J. TGFα shedding assay: an accurate and versatile method for detecting GPCR activation. *Nat. Methods* (2012) 9, 1021-1029
2. Kitamura H, Makide K, Shuto A, Ikubo M, Inoue A, Suzuki K, Sato Y, Nakamura S, Otani Y, Ohwada T, Aoki J GPR34 is a receptor for lysophosphatidylserine with a fatty acid at the sn-2 position. *J.Biochem.* (2012) 151, 511-518
3. Okudaira M, Inoue A, Shuto A, Nakanaga K, Kano K, Makide K, Saigusa D, Tomioka Y, Aoki J. Separation and quantification of 2-acyl-1-lysophospholipids and 1-acyl-2-lysophospholipids in biological samples by LC-MS/MS. *J. Lipid Res.* (2014) 55, 2178-2192
4. Uwamizu A, Inoue A, Suzuki K, Okudaira M, Shuto A, Shinjo Y, Ishiguro J, Makide K, Ikubo M, Nakamura S, Jung S, Sayama M, Otani Y, Ohwada T, Aoki J. Lysophosphatidylserine analogues differentially activate three LysoPS receptors. *J Biochem.* (2015) 157, 151-160
5. Ikuno M, Inoue A, Nakamura S, Jung S, Sayama M, Otani Y, Uwamizu A, Suzuki K, Kishi T, Shuto A, Oshiguro J, Okudaira M, Kano K, Makide K, Aoki J, Ohwada T. Structure-activity relationships of lysophosphatidylserine analogs as agonists of G-protein-coupled receptors GPR34, P2Y10, and GPR174. *J. Med. Chem.* (2015) 58, 4204-4219

（2）特許出願

研究期間累積件数:1 件

1.

発　明　者: 大和田智彦、尾谷優子、井久保仁也、中村翔、ジョンセジン、青木淳賢、巻出久美子、井上飛鳥

発明の名称: リゾホスファチジルセリン受容体機能調節活性を有する化合物

出　願　人: 東京大学、東北大学

出　願　日: 2013/1/31

出 願 番 号: 特願 2013-17817

（3）その他の成果（主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等）

学会発表

日本免疫学会学術集会、内藤コンファレンス、日本脂質生化学会、日本生化学会、International Conference on Phospholipase A_2 and Lipid Mediators

著作物

1. Kumiko Makide, Junken Aoki
   GPR34 as a lysophosphatidylserine receptor (review)
   J. Biochem. 153, 327-329 (2013)

2. 雪浦弘志、奥平真一、巻出久美子、青木淳賢
   リゾリン脂質の産生経路
   最新生理活性脂質研究-実験手法、基礎的知識とその応用- 24: 154-（2014） メディカルドゥ

3. Kumiko Makide, *et al.*
   Novel lysophopholipid receptors: their structure and function (review)
   J. Lipid Res. 55, 1986-1995 (2014)

4. 巻出久美子、青木淳賢
   リゾリン脂質と免疫制御-基礎から応用へ-②リゾホスファチジルセリン
   炎症と免疫 23(2): 177-181 (2015) 先端医学社

5. Kuniyuki Kano, Kumiko Makide *et al.*
   Lysophospholipid Meditors: Their receptors and synthetic pathways
   Bioactive Lipid Mediators pp 109-126 (2015) Springer Japan

研　究　報　告　書

「炎症に伴う microRNA 機能不全が惹起する炎症性発癌の病態解明と制御法の開発」

研究タイプ：通常型
研究期間：　平成２４年１０月～平成２８年３月
研　究　者：　大塚　基之

１．　研究のねらい

ヒトの臨床、特に消化器系分野では、慢性炎症に続発する癌（悪性腫瘍）が多発することが問題になっている。特に、慢性肝炎・慢性胃炎・潰瘍性大腸炎などの炎症性腸疾患に続発する腫瘍がそれに該当すると考えられる。従来、このような炎症続発性腫瘍の発生については、ある種の炎症性サイトカインが原因として挙げられることも多いが、それがなぜ癌化を惹起させるのか詳細な機構は不明なままであった。また、従来から、疾患の原因検索として疾患特異的遺伝子が存在することを前提として　それを同定しようとする試みに多くの力が注がれているが、必ずしもすべての疾患で原因遺伝子の異常が同定されているわけではなく、ゲノムシークエンスの結果を見ても、持続炎症に続発して起きる消化器癌では高頻度で特異的な遺伝子異常の集積の報告は乏しい。非コードRNAの一種であるmicroRNAは、細胞内での遺伝子発現を配列依存的に制御しているが、これまでの検討で、microRNA　の全般的な発現低下が癌組織でしばしば観察されることが報告されている。私たちは、「microRNA（miRNA）による遺伝子発現抑制機能が、炎症にともなう生体ストレス（TNF αなどの炎症性サイトカイン刺激）によって阻害される」ことを、in　vitro　の実験で明らかにしてきた。そこで本研究では、「慢性炎症に伴う持続的なmicroRNA機能の阻害の結果、microRNAの全般的な発現低下と類似の状態を惹起し、その結果、炎症続発性の癌が惹起されるのでは」という仮説を立てた。この炎症性発癌の病態形成における miRNA 機能低下が果たす役割についての検証をするために、まず　microRNA の発現低下が発癌の原因となっているのかを microRNA の成熟に必須の分子である　Dicer　遺伝子のノックアウトマウスを用いて検討をすすめる。次に、in　vivo でmiRNAの機能を観察できるreporter mouseを樹立し、これを用いて炎症性腫瘍の形成過程におけるmicroRNA機能の変化を検討する。さらに、「炎症ストレスによるmicroRNAの機能不全」をキャンセルする化合物をスクリーニングしてその分子機構を解明したうえで　上記の仮説の　in　vivo　での検証に利用する。これらの検討を統合して「持続炎症に伴う　miRNA　の機能異常」の結果で生じる疾患の制御法の開発、特に持続炎症に伴って生じる発癌の制御法開発、につなげることを目的とする。

２．　研究成果

（1）概要

microRNA　の生成に必須の分子である Dicer 遺伝子の腸管上皮細胞特異的なノックアウトマウス・ヘテロノックアウトマウス・通常のマウスの　3　群で大腸における炎症続発性腫瘍の形成能を観察すると、Dicer　蛋白の発現量が中程度に低下しているヘテロノックアウトマウスで最も腫瘍形成性が認められる、という結果であった。この時、Dicer　蛋白の発現量が中等度に

低下している群ではmicroRNAの生成量も半分程度であった。この結果は、microRNAの発現量（あるいは機能）が通常の半分程度に低下していると、腫瘍形成の原因となることを示唆するものと考えられた。次に慢性炎症を惹起する種々の炎症性サイトカインが、microRNA の機能を低下させることを確認した。これは、炎症性サイトカイン、特に TNF αによって APOBEC3G 蛋白の分解が亢進し、その結果、microRNA が機能を発揮する際に重要な Ago2 との結合量が減ったうえで、Ago2 関連複合体への microRNA の取り込み量が減ることが一因と考えられた。さらに、大腸での炎症が慢性的に続くと、腸上皮での microRNA 機能が低下することが示された。生体で microRNA の機能を見るためのレポーター遺伝子を組み込んだマウスで大腸炎を惹起すると、炎症持続に伴い腸上皮で microRNA 機能が減弱し腫瘍が形成された。ここに、microRNAの機能を増強する化合物として同定した薬剤（ROCK 阻害剤）を投与すると、腸上皮での microRNA の機能が回復するとともに腫瘍形成も抑制された。これらの結果を総合すると、慢性炎症続発性腫瘍の病態生理として、慢性持続炎症の刺激があると当該臓器での microRNA 機能が低下し、その結果、Dicer のヘテロノックアウトマウスでの microRNA 機能が減弱した状態と類似の状況を呈し腫瘍形成能が増すという事象が背景にあると考えられた。さらに、この制御法として、microRNA の機能を増強する作用のある ROCK 阻害剤は、炎症続発性腫瘍の予防法として効果的である可能性が示唆された。

（2）詳細

慢性炎症に伴う腫瘍形成の原因として microRNA の全般的な機能低下があるのかを検討するために、1) microRNA の全般的な発現低下が癌の原因になるのかどうかを Dicer のノックアウトマウスで検討し、2) 炎症性サイトカイン刺激による microRNA 機能の減弱機構を明らかにし、3) microRNA 機能を増強する化合物をスクリーニングしてその機序を解明するとともに、4) マウスでの炎症続発性腫瘍モデルを用いて炎症性腫瘍形成の過程における microRNA 機能の検討と、microRNA 機能増強化合物による腫瘍形成の抑制能を検討した。

1) Dicer 遺伝子はヘテロノックアウトで最も腫瘍形成能が高い

Villin promoter で発現する Cre recombinase を用いた Dicer 遺伝子の腸管上皮特異的ノックアウトマウスと AOM-DSS（Azoxymethane－Dextran Sulfate Sodium）による炎症続発性腫瘍形成モデルを用いて、Dicer 遺伝子の欠損による microRNA 成熟不全を介した腫瘍形成能について検討を進めた。その結果、Dicer の遺伝子欠損のアレル数に応じて Dicer 蛋白の発現・microRNA のプロセッシングが進むことが示された。すなわち、Dicer のヘテロノックアウトマウスでは、野生型で発現している Dicer 蛋白量の半分くらいの Dicer 蛋白発現量であり、成熟型の microRNA の発現も、調べた限りでは、ホモノックアウトと野生型の半分くらいの量となっていた。この条件下で、炎症続発性腫瘍を惹起すると、野生型とホモノックアウトマウスで約 10 個程度の腫瘍が検出されたのに対して、ヘテロノックアウトマウスで 20 個弱程度と最も腫瘍が多く形成された（次ページ 図 1）。この結果から、Dicer 遺伝子は「obligate haploinsufficiency」性と呼ばれる、特殊な癌抑制性の機能を持つことが同定された。組織内の各種遺伝子発現を見ると、c-Myc や LIN28B などのいわゆる癌遺伝子の発現は hetero knockout で最も増強されており、p53 などの遺伝子の発現量には野生型・ヘテロ・ホモノックア

ウトで変動が無く、各遺伝子に依存した発現量変化をとることが示唆された。

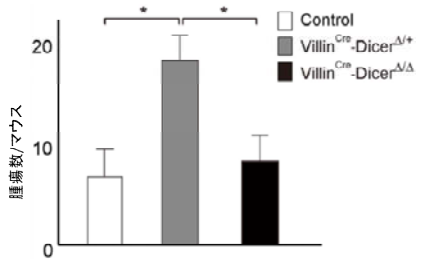


図 1. 腸管特異的 Dicer 遺伝子ヘテロ欠損マウスでの易腫瘍形成性

次に、Dicer のノックアウトによる global な遺伝子発現量変化を正確に定量するために、ヒト大腸癌細胞株の Dicer 遺伝子をノックアウトしたものを Vogelstein lab から供与いただき、そこにテトラサイクリンによる Dicer 蛋白の発現量調節系を組み込んで、野生型とノックアウトの中間程度の Dicer 蛋白発現量を持つ状態を作り、ノックアウト・野生型・中間の 3 者の培養細胞を用いて cDNA アレイに供した。その結果、「中間の発現量を持つ細胞で最も発現量が多くなる、あるいは少なくなる遺伝子群」、「ノックアウトから野生型にかけて単調に発現が増える、あるいは減少する遺伝子群」がそれぞれ抽出された。この結果を踏まえて、今後 in silico で遺伝子群の特徴を抽出し 責任遺伝子群の同定を進めている。いずれにせよ、Dicer 蛋白あるいは全般的な microRNA 量の中間的な減少は、易腫瘍形成の原因になることが示された（*PLoS One* 2013;8(9):e71969）。

2) TNF α・IL1 α・IL1 βは APOBEC3G の分解を促進し Ago2 関連複合体への microRNA の取り込みを抑制する

炎症に関与するサイトカインのうち microRNA 機能に影響を及ぼすサイトカインを各種スクリーニングしたところ、TNF α・IL1 α・IL1 βが microRNA の機能を減弱させることが確認された。その機構を検討するために、microRNA 経路に関わる蛋白（Dicer, Ago2, TRBP, MOV10, DND1, APOBEC3G, GW182, TRIM65, HuR）の発現変化を検討したところ、microRNA 機能に関わる TNF α・IL1 α・IL1 βでのみ発現量が変わる蛋白として APOBEC3G を見いだした。これらの炎症性サイトカインは APOBEC3G 蛋白の発現量を減少させるが、その作用は APOBEC3G のプロモーター活性や mRNA 安定性に関与するのではなく、APOBEC3G 蛋白の分解に関与することが示された。この作用はプロテアソーム阻害剤でキャンセルされるため、ユビキチン－プロテアソーム系の活性化に依存していることが示唆された。APOBEC3G はもともと microRNA と標的 mRNA との相互作用のポイントで働く可能性が報告されていたが、本研究の検討で Ago2 蛋白と結合し、その結合が Ago2 関連複合体(RISC)への microRNA の誘導に寄与していることが示された。すなわち、TNF αで刺激した細胞内での microRNA の Ago2 関連複合体への誘導量はコントロールに比べて減少し、この効果は APOBEC3G の過剰発現でキャンセルされたため、APOBEC3G は microRNA の Ago2 関連複合体への誘導に補助因子的に働いていることが示唆された。ヒト APOBEC3G のマウスでのホモログは APOBEC3 であるが、APOBEC3 のノックアウトのマウス線維芽細胞では microRNA の機能が減弱していること、DSS で炎症を惹起した大腸から単離した腸上皮内では APOBEC3 蛋白が減少しており、Ago2 関連複合体内の microRNA の量も減少していることが示された。これらの結果から、炎症性サ

イトカインのうち TNF αなどは、APOBEC3G 蛋白の発現量を減らし、その結果、Ago2 関連複合体への microRNA の誘導量を減らすことで microRNA の機能を減弱させる作用があることが示された（投稿中）。

3) ROCK 阻害剤は ROCK1 の核内移行を誘導し PAIP2 の発現増加を介して microRNA の標的 mRNA の分解を促し microRNA の機能を増強する

microRNA の全体的な機能増強をする化合物 1,280 種類を搭載する化合物ライブラリーを用いて探索したところ、ROCK 阻害剤がヒットした。続く検討によって、ROCK 阻害剤の添加によって、ROCK1 が核内に移行し、かつ 転写因子 HNF4 と結合して、PolyA binding protein interacting protein 2 (PAIP2)のプロモーター領域に働いてその発現を増やすことが示された。PAIP2 は microRNA の標的 mRNA の polyA 長を短縮することでその mRNA の不安定性を高める働きが報告されていたが、実際に、PAIP2 のノックダウン細胞では ROCK 阻害剤のこの効果がキャンセルされた。これらの結果から、ROCK 阻害剤は PAIP2 の発現増強を介して、microRNA 依存的な mRNA の分解を促進し、microRNA の機能を全般的に高める作用があることが示唆された（*Nucleic Acids Res.* 2015;43(15):7577-89）。

4) 炎症続発性腫瘍の発生には microRNA 機能の減弱が背景にある

GFP 遺伝子の 3' UTR に microRNA の標的配列を組み込んだコンストラクトを持つ reporter transgenic mouse を作製し、このマウスで AOM-DSS による腸管での炎症性腫瘍を惹起させると、炎症の程度は変わらないものの、腫瘍発生の経過で microRNA の機能が低下することが示唆された。一方、ここに microRNA 機能を増強する上記の ROCK 阻害剤を投与していると、microRNA 機能が回復し、かつ腫瘍形成も抑制された（図 2)。この腫瘍抑制作用は Dicer のノックアウトマウスでは認められず、かつ APC の変異マウスにおける非炎症性の腫瘍形成には作用が見られなかったことから、microRNA 依存性であり、かつ、遺伝子変異に伴う細胞増殖を抑えているわけではないと考えられた。

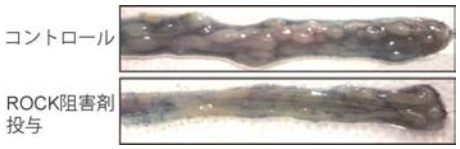


図 2. 上段がコントロールマウスの腸、下段が ROCK 阻害剤投与マウスの腸（いずれも AOM-DSS 10 週）

これらの結果は、持続炎症続発性腫瘍の発生には慢性炎症に伴う microRNA 機能の低下が背景の病態として関与しており、それを抑えれば腫瘍形成も抑制されることを示唆するものと考えられた （次ページ 図 3)（投稿中）。

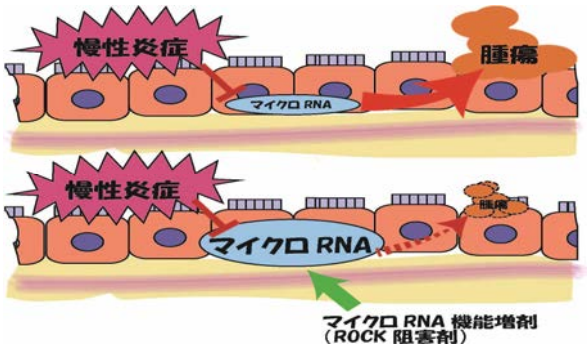


図 3. 慢性炎症に伴う microRNA 機能低下による腫瘍形成とその制御法

3.　今後の展開

1) microRNA 全般の機能低下に伴う腫瘍形成の分子メカニズムについて

microRNA 全般の機能低下（あるいは発現低下）に伴う腫瘍形成メカニズムについて、その責任分子（あるいは責任遺伝子セット）を解明するべく、まず純化した細胞株の系で検討を進める。すでに microRNA の発現低下における遺伝子発現変化についての cDNA アレイの結果は得られているが、そこから腫瘍形成に関わる既知の遺伝子群などとのリンクなどを含め、in silico での解析を進める。

2) 他臓器での炎症続発性腫瘍の発生メカニズムへの演繹について

本研究で見られた炎症続発性腫瘍形成のメカニズムおよびその介入法が、他臓器でも認められるかかどうか、まずマウスモデルを用いて検証する。

3) ヒト検体での評価について

本研究で用いたモデルは、ヒトにおいては 潰瘍性大腸炎に続発する大腸癌のモデルであるが、実臨床においてはいわゆる大腸ポリープ（腺腫）症例のほうが圧倒的に多いため、将来の臨床研究を念頭において、ヒト大腸ポリープでの microinflammation の有無とその病態において本研究で明らかにした機構が働いているか、ヒト検体を用いて検証する。

それが明らかになれば、ROCK 阻害剤の大腸ポリープ（ひいては大腸癌）発生予防法としての効果を検証する臨床研究を迅速に展開できると考えている。

4.　評価

（1）自己評価

（研究者）

本研究では慢性炎症に続発する腫瘍の発生メカニズムとして、慢性炎症刺激に伴う microRNA 機能の低下があることを示した。炎症性サイトカインの刺激で癌ができるという報告は従来から多々あるが、本研究によってその先の病態生理の一端を明らかにすることができたと考える。それだけでなく、炎症性サイトカインによる microRNA 機能低下のメカニズムとして Ago2 と結合する蛋白の分解促進が起きること、microRNA 機能を増強する可能性のある化合物として ROCK 阻害剤を同定しその分子機構を明らかにしたことで、ROCK1 の従来知られて

いなかった機能を明らかにすることができた。これらの結果は、当初の目的である症例数の多い「慢性炎症を母地とした腫瘍発生」のメカニズムの解明とその制御法の開発につながるだけでなく、microRNA の機能とそれを取り巻く分子機構の解明にも貢献する成果になったと考える。いっぽうで、microRNA 全般の機能低下から腫瘍形成に至る分子機構の解明が、今後注力すべき点として明確になった。

（2）研究総括評価（本研究課題について、研究期間中に実施された、年２回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った）。

（研究総括）

癌組織におけるmicroRNA（miRNA）の全般的な発現低下がしばしば報告されている。本研究者は炎症に伴う生体ストレス（TNF αなどの炎症性サイトカイン刺激）によってmiRNAによる遺伝子発現抑制機能が阻害されることを明らかにしてきたことから、「遺伝子発現を配列依存的に制御するmiRNAの機能を慢性炎症が持続的に阻害し、それによる全般的なmiRNAの機能低下によって炎症続発性の癌が惹起される」という仮説のもとに研究を開始した。そこで、miRNAの成熟に必須のDicer遺伝子を腸管上皮細胞特異的にノックアウト（KO）したマウスを作出し、実験的に炎症続発性の大腸癌を誘導したところ、野生型やホモKOマウスに比べ、Dicer発現量が中等度のヘテロKOマウスで最も腫瘍形成性が高く、c-MycやLIN28Bなどの癌遺伝子の発現も増強されていることを見いだし発表した。現在、この成績に基づき純化した細胞株を用いて、責任遺伝子のin silico解析を進めている。TNF αなどの炎症性サイトカインはmiRNA機能に関わるAPOBEC3Gタンパク質の分解を促進することにより Ago2との結合量が減少しAgo2 関連複合体へのmiRNAの取り込み量の減少、慢性炎症によるmiRNAの機能を減弱させることを見いだしている。miRNAの機能を全体的に増強する化合物を探索し、ヒットしたROCK阻害剤による機能増強作用を解析し結果を発表している。また、miRNA機能低下を可視化できるレポーターマウスを作出し、炎症続発性大腸癌を誘導したところ、腫瘍発生の経過でmiRNAの機能が低下すること、ROCK阻害剤を投与するとmiRNA機能が回復し腫瘍形成も抑制されたことから、持続炎症続発性腫瘍の発生にmiRNA機能の低下が背景の病態として関与し、その機能増強により腫瘍形成を抑制できるというデータを取得している。

スケールの大きな構想に基づく研究であり、miRNAや責任遺伝子の詳細は不明ながら、既存ROCK阻害剤のドラッグリポジショニングを視野に入れた臨床医学の研究者らしいアプローチにも好感が持てる。今後の研究の発展と臨床を視野に入れた今後の展開を期待したい。

5. 主な研究成果リスト

（1）論文（原著論文）発表

1. Yoshikawa T, Wu JF, Otsuka M, Kishikawa T, Ohno M, Shibata C, Takata A, Han F, Kang YJ, Chen CY, Shyu AB, Han J, Koike K. ROCK inhibition enhances microRNA function by promoting deadenylation of targeted mRNAs via increasing PAIP2 expression. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(15):7577-89.
2. Yoshikawa T, Otsuka M, Kishikawa T, Takata A, Ohno M, Shibata C, Kang YJ, Yoshida H,

Koike K. Unique haploinsufficient role of the microRNA-processing molecule *Dicer1* in a murine colitis-associated tumorigenesis model. *PLoS One* 2013;8(9):e71969. doi:10.1371/journal.pone.0071969

（2）特許出願

研究期間累積件数：0件

（3）その他の成果（主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等）

■その他の主要な論文

1. Kang Y, Bang BR, Han KH, Hong L, Shim EJ, Ma J, Lerner R, Otsuka M. Regulation of NKT cell-mediated immune responses to tumors and liver inflammation by mitochondrial PGAM5—Drp1 signaling. *Nat Commun.* 2015;6:8371.
2. Shibata C, Otsuka M, Kishikawa T, Ohno M, Yoshikawa T, Takata A, Koike K. Diagnostic and therapeutic application of noncoding RNAs for hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol.* 2015;7(1):1-6.
3. Otsuka M, Kishikawa T, Yoshikawa T, Ohno M, Takata A, Shibata C, Koike K. The role of microRNAs in hepatocarcinogenesis: current knowledge and future prospects. *J Gastroenterol.* 2014 Feb;49(2):173-84.

■主な学会発表

1. Motoyuki Otsuka, Takeshi Yoshikawa, Kazuhiko Koike
   Inflammation and carcinogenesis of digestive organs
   Functional impairment of microRNAs by chronic inflammation is a cause of inflammation-associated tumorigenesis in mice
   The 2nd JSGE international topic conference 2013.3.22. Kagoshima
2. 大塚基之
   ノンコーディング RNA に着目した消化器癌の診断・介入法の開発
   第 12 回 KAMOGAWA Cardiovascular Conference 2014.10.31. 京都
3. 大塚基之
   炎症を標的とした疾患発症メカニズムの解明
   「慢性炎症が惹起する microRNA 機能不全に伴う肝発癌機構の解明」
   第 15 回 日本抗加齢医学会総会 2015.5.29. 福岡

研　究　報　告　書

「慢性腎炎発症マウスモデルを用いた発症機序の解明」

研究タイプ：通常型
研究期間：　平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月
研　究　者：　加藤　博己

1．　研究のねらい

細胞内ウイルス RNA センサーである MDA5 は、ウイルス感染の際、複製産物である二本鎖 RNA を認識して抗ウイルスインターフェロン応答を誘導する。この MDA5 による抗ウイルス応答が正常に機能しない場合、ウイルス感染に非常に弱くなってしまう。一方、最近我々は MDA5 が変異により恒常活性型となったマウスを得る事が出来た。この変異マウスは、ウイルス感染に強くなるのではなく、慢性腎炎などを含む自己免疫疾患を自然発症する事が明らかとなった。解析の結果、MDA5 の恒常活性化が樹状細胞やマクロファージの恒常的な活性化およびインターフェロン産生を誘導し、T 細胞の活性化を介し B 細胞からの自己抗体（抗 dsDNA 抗体や抗核抗体など）を含む過剰抗体産生を引き起こすことが慢性腎炎の原因である事が明らかとなった。またこのマウスの腎炎の所見がヒトの病気であるループス腎炎に類似する事が明らかとなった。実際のループス腎炎患者においても MDA5 の変異が最近発見され、このマウスがループス様腎炎の良いモデルとなる事が期待される。今後、この MDA5 変異マウスを用いてループス腎炎の予防、診断、治療法の確立を目指しさらに研究を進める。また、抗ウイルスインターフェロン応答を含めた自然免疫機構の異常活性化が引き起こす自己免疫疾患に関して、幅広く研究を展開すること考えている。

2．　研究成果

（1）概要

化学変異原 ENU を用いて得られた慢性腎炎を自然発症するマウスに、ウイルス RNA センサーMDA5 の恒常活性型変異が存在する事を明らかにした。この変異により、MDA5 が構造変化を起こし、活性型となることが原子間力顕微鏡を用いた蛋白質の形状解析により明らかとなった。また、腎炎の病態解析の結果、MDA5 の恒常活性化が樹状細胞やマクロファージの恒常的な活性化およびインターフェロン産生を誘導し、T 細胞の活性化を介し B 細胞からの自己抗体（抗 dsDNA 抗体や抗核抗体など）を含む過剰抗体産生を引き起こし、さらに免疫複合体が糸球体に沈着することが慢性腎炎の原因である事が明らかとなった。このマウスの腎炎の所見がヒトの病気であるループス腎炎に類似する事も明らかとし、MDA5 変異マウスのループス様腎炎に関して 2014 年 2 月 Immunity 誌に報告し（論文発表欄 5 参照）、次ページの図の様に、ウイルス核酸センサーの異常活性化が自己免疫疾患を引き起こす事を直接証明する事が出来た。最近、実際のループス腎炎患者において、MDA5 の変異が発見され、このマウスがループス様腎炎の良いモデルとなる事が期待される。この MDA5 変異マウスを用いて、薬剤を用いたループス腎炎治療法の確立に現在取り組んでいる。

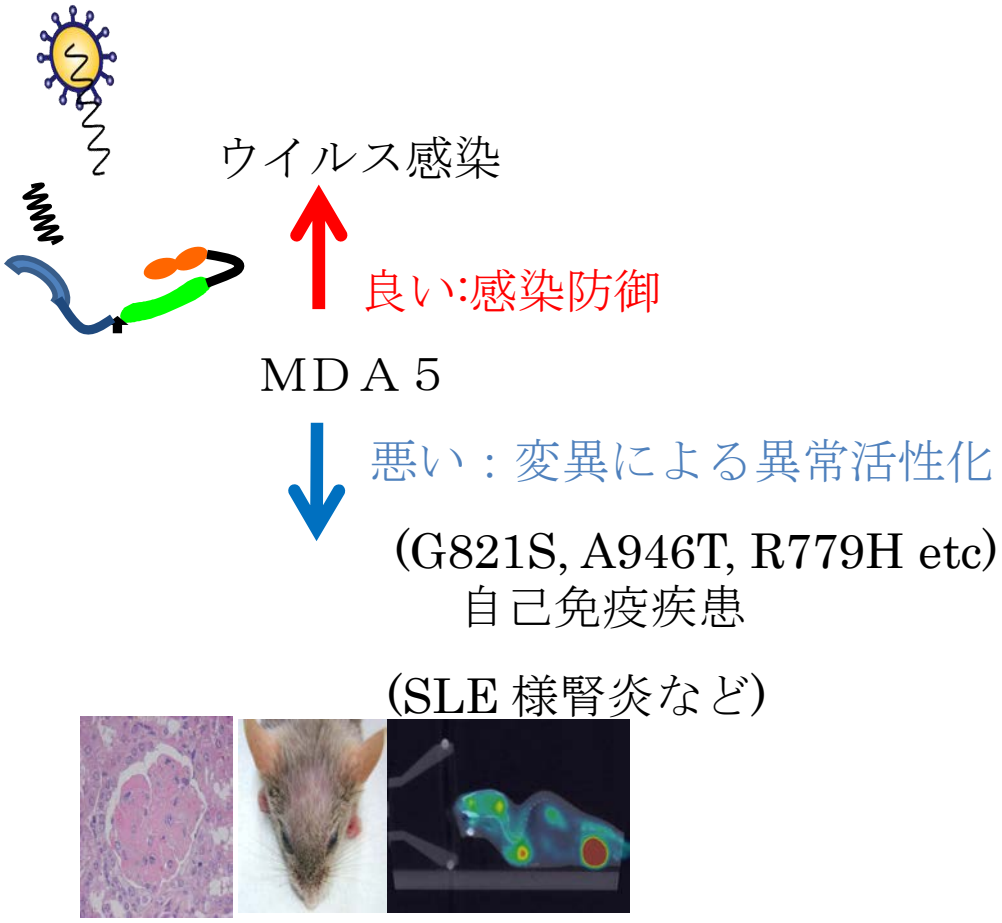


図　ウイルス RNA センサーMDA5 は、正常に働く場合我々の体をウイルス感染から防御してくれるが、変異などにより異常活性化すると自己免疫疾患を引き起こす

（2）詳細

主に3つのテーマ、マウスの病態解析、マウスの作製、治療法の確立に関して、研究を遂行してきた。詳細は以下の通りである。

1）マウスの病態解析

腎炎の病態および発症メカニズムに関して、2014 年 2 月 Immunity 誌に報告した。ループス様腎炎であることが明らかとなり、現在特定の自己抗体の与える影響を中心に解析している状況である。

2）マウスの作製

MDA5 変異マウスが持つ変異 G821S を、細胞特異的に発現する conditional knock-in マウスを作製している。現在、色々な細胞種で発現させるために、各細胞種特異的なプロモーターで cre を発現するマウスとの掛け合わせている段階である。

また、ループス腎炎患者で発見された MDA5 の変異体を発現するトランスジェニックマウス

を現在作製中である。

3）治療法の確立

変異マウスを用いて、様々な薬剤を投与し、腎炎に与える影響を検討している。MDA5 からのシグナルを抑制する薬剤の中で、腎炎を軽減するものが見つかってきている段階である。

各研究テーマに関して、さきがけ研究期間中にすべてを完了させることは出来なかったが、研究テーマがより興味深く広がってきていることもあり、期間内に Immunity 誌に1報論文を報告できた事を考慮すると、期間中の研究目的は概ね達成できたと考えている。今後も1−3のテーマを中心に研究を進め、研究論文として報告して行きたい。

3．　今後の展開

MDA5 変異マウスの腎炎の所見が、ヒトの病気であるループス腎炎に類似する事が解析により明らかとなってきた。実際のループス腎炎患者においても MDA5 の変異が最近発見され、このマウスがループス様腎炎の良いモデルとなる事が期待される。そこで、この MDA5 変異マウスを用いて様々な薬剤、特に MDA5 のシグナル伝達を阻害できるような薬剤を投与することにより、この変異マウスの病態が軽減できるかを詳細に検討する。また、治療法だけでなくMDA5が関与する一部のループス腎炎の予防、治療法の確立を目指しさらに研究を進めていく。

4．　評価

（1）自己評価

（研究者）

本さきがけ研究内に、MDA5 変異マウスのループス様腎炎に関して 2014 年 2 月 Immunity 誌に報告する事が出来た（論文発表欄 5 参照）。この内容が新聞4誌にプレスリリースされた事により、一般のループス腎炎患者の方からメールを直接頂くなど、反響の大きさを実感するとともに、研究をさらに進め治療法開発への責任感を強く感じている。また、この研究内容が認められ、それから 2 年程度の間に、MDA5 と自己免疫疾患に関するレビューの執筆を 3 報（論文発表欄 1、2、4 参照）行い、また 2015 年 10 月には国際学会にて招待講演を行う事が出来た。これまでの、ウイルスに対する免疫応答機構という自然免疫の研究分野から、さらに自然免疫と自己免疫疾患との関わりという新たな分野において注目されるようになり、研究者としての飛躍を実感し自信にも繋がっている。さきがけ研究を通じ、さきがけ領域内外の様々な研究者との共同研究が増え、特に京都大学小児科、眼科や膠原病内科など臨床の先生方との連携が強まっている現在の共同研究状況、さらに MDA5 に変異を持つ自己免疫疾患患者からの臨床サンプルを提供頂けている研究環境に感謝している。

領域会議を通じ、さきがけ研究のおかげでヒトへの応用というものをより強く意識するようになった。期間内に論文として報告できたのは研究成果の一部だが、今後もさらに研究が発展し、最終的にループス腎炎やその他の自己免疫疾患への予防、治療、診断法の確立に繋がることを望んでいる。研究における意識と遂行能力の大いなる飛躍があったこと、多くの研究者との連携が取れている現況を考慮し、能力を十分発揮できたと自己評価したい。

（2）研究総括評価（本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での

評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った）。

（研究総括）

化学変異原ENUを用いて得られたループス様腎炎を自然発症するマウスを詳細に解析し、腎炎発症の原因が細胞内ウイルスRNAセンサーであるMDA5の G821S変異であることを発見した。また、この変異によりMDA5が構造変化を起こして恒常活性型となることを、原子間力顕微鏡を用いて明らかにした。このマウスではMDAが恒常的に活性化され、結果として樹状細胞やマクロファージの恒常的な活性化と炎症性サイトカインの発現、とりわけインターフェロン産生の上昇、T細胞の活性化とB細胞による自己抗体の産生を引き起こし、抗体、補体を含む免疫複合体が糸球体に沈着することが慢性腎炎の原因であることを示した。このマウスの腎炎の所見はヒトSLEで見られるループス腎炎に似ていることを示し、発表した。最近、ループス腎炎患者においてもMDA5の変異が発見され、このマウスがループス様腎炎などの自己免疫疾患の良いモデルとなることが期待されている。今後、MDA5変異マウスを用い、ループス様腎炎の予防法や治療薬開発に役立つことを期待している。

本さきがけ研究により、ウイルス核酸センサーの異常活性化が自己免疫疾患を引き起こすことを直接証明している。この詳細な解析と成果は高く評価したい。臨床を含めたさきがけ領域内外のさまざまな研究者との共同研究等により、MDA5変異マウスを用いループス腎炎の阻害剤の開発研究や治療法の確立など、今後さらなる発展が期待できる。

5. 主な研究成果リスト

（1）論文（原著論文）発表

1. Kato H and Fujita T.
Cytoplasmic viral RNA sensors: RIG-I-like receptors.
Encyclopedia of Immunology, in press

2. Kato H and Fujita T.
RIG-I-like receptors and autoimmune diseases.
Curr Opin Immunol. 2015 Oct 27;37:40-45

3. Oda H , Nakagawa K, Abe J, Awaya T, Funabiki M, Hijikata A, Nishikomori R, Funatsuka M, Ohshima Y, Sugawara Y, Yasumi T, Kato H, Shirai 5, Ohara O, Fujita T, Heike T.
Aicardi-Goutieres syndrome is caused by IFIH1 mutations.
Am J Hum Genet. 2014 Jul 3;95(1):121-5

4. Kato H and Fujita.T.
Autoimmunity caused by constitutive activation of cytoplasmic viral RNA sensors.
Cytokine Growth Factor Rev. 2014 Dec;25(6):739-43.

5. Funabiki M, Kato H , Miyachi Y, Toki H, Motegi H, Inoue M, Minowa O, Yoshida A, Deguchi K, Sato H, Ito S, Shiroishi T, Takeyasu K, Noda T, Fujita T.
Autoimmune disorders associated with gain of function of the intracellular sensor MDA5.
Immunity. 2014 Feb 20;40(2):199-212

（2）特許出願

研究期間累積件数：0 件

（3）その他の成果（主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等）

◎2014年2月15日　読売新聞（夕刊7面）「膠原病の原因物質発見」

◎2014年2月15日　京都新聞（27面）「膠原病の原因遺伝子特定」

◎2014年2月14日　朝日新聞（7面）「エリテマトーデス原因遺伝子を確認」

◎2014年2月19日　日刊工業新聞（21面）「全身性エリテマトーデス原因遺伝子を発見」

上記４誌に主要論文 5.（Autoimmune disorders associated with gain of function of the intracellular sensor MDA5）の内容が掲載された。

また、2014 年の日本免疫学会および 2015 年 10 月 13 日の国際学会 11th annual meeting of Oligonucleotide Therapeutics Society （オランダ　ライデン）にて、Autoimmunty caused by constitutive activation of cytoplasmic viral RNA sensors RIG-I like receptors のタイトルで、招待講演を行った。その他、学会の口頭発表や海外を含む大学でのセミナーも多数行った。

研　究　報　告　書

「内因性リガンドによる進化的に保存された自然免疫活性化機構の解明」

研究タイプ：通常型
研究期間：　平成２４年１０月～平成２８年３月
研　究　者：　倉石　貴透

１．　研究のねらい

炎症反応は、感染症や自己免疫疾患だけでなく、がん・肥満・動脈硬化などの生活習慣病においても病態に深く関与していることがわかってきている。炎症は、自然免疫経路の活性化により産生される炎症性サイトカインによって惹起されるが、どのようにして自然免疫経路が活性化されるか、充分に理解されているとはいえない。特に、微生物由来因子に依存せず、内因子のリガンドによる自然免疫経路の活性化（無菌炎症）のしくみについては、まだ明らかでない点が多い。そこで本研究では、哺乳類と類似する自然免疫経路を有するショウジョウバエを用いて、以下の４点について解析を行うことで、内因性リガンドによる自然免疫活性化のメカニズム解明を目指した。

①ショウジョウバエ Toll 経路の細胞内シグナル伝達経路解明

ショウジョウバエの Toll 経路は、内因性リガンドである spz によって活性化される。活性化された Toll 受容体には、未知の機構によりアダプター分子である dMyd88, Tube が集積し、未知のメカニズムにより IκB が不活化され、NF-κB が活性化して抗菌ペプチド発現を誘導する。これら未知の分子メカニズムを明らかにするため、ゲノムワイド RNAi スクリーニングにより Toll 経路の細胞内シグナル伝達経路に関わる新規因子を同定する。

②ショウジョウバエ幼虫の抽出液中に存在する抗菌ペプチド発現誘導活性の解析

私たちは、培養細胞とショウジョウバエ幼虫より調製した抽出液を共培養することで、培養細胞において抗菌ペプチド遺伝子の発現が誘導されることを見出している。抽出液中に含まれる″内因性リガンド″の実体を明らかにする。

③ショウジョウバエ Toll 細胞内シグナル伝達を活性化する cGMP 依存経路の解析

私たちは、受容体型グアニル酸シクラーゼ Gyc76C が、cGMP 依存性キナーゼ DG2 を介して、dMyd88 を介して NF-κB を活性化させることを見出している。しかし、DG2 がどのように dMyd88 を活性化するのか、まだよくわかっていないため、その分子機構を明らかにする。

④野生型ショウジョウバエを用いて無菌炎症を誘導できる新規実験系の確立

野生型ショウジョウバエを用いて、無菌的に自然免疫を活性化する方法はまだ見出されていないため、本研究では、″無菌炎症″をショウジョウバエで誘導する方法を確立する。

２．　研究成果

（1）概要

本研究では、ショウジョウバエを用いて内因性リガンドによる自然免疫活性化のメカニズムを解析し、以下の成果を得た。

1）ショウジョウバエ Toll 経路の細胞内シグナル伝達経路解明

ショウジョウバエの Toll 受容体は、感染依存的に体液中に生じる内因性リガンド spz によって

活性化される。私たちは、Toll 経路の活性化を起こしやすい培養細胞を探索し、DL1 細胞と呼ばれる培養細胞がこの経路のシグナル伝達の解析に適していることを見いだした。この DL1 細胞を用いることで、ショウジョウバエが持つ約 15,000 遺伝子から Toll 経路活性化に関わる遺伝子を網羅的に探索し、新規シグナル伝達因子 Sherpa を同定した。

Sherpa を失ったショウジョウバエは、カビなどの微生物に対抗するための物質である抗菌ペプチドを充分に作ることができず、微生物の感染に対して脆弱性を示した。どのようにして Sherpa が Toll 経路を活性化しているのか調べた結果、Sherpa を欠損した細胞では、シグナル伝達時に細胞膜近傍に局在すべき dMyd88 が細胞膜に局在できなかった。

このことから、Sherpa は dMyd88 などのシグナル伝達因子をユビキチン化することで Toll 受容体周辺の細胞膜へと局在させ、Toll 経路のシグナル伝達を活性化していると考えられた。ヒトやマウスにも Sherpa と類似した遺伝子が存在しているが、自然免疫の誘導における生理学的意義は明確になっていない。本研究成果をもとに、ヒトやマウスの Sherpa 遺伝子による、自然免疫系の新たな活性化メカニズムが明らかになることが期待できる。

2）ショウジョウバエ幼虫の抽出液中に存在する抗菌ペプチド発現誘導活性の解析

ショウジョウバエの幼虫を酸性条件下でホモジナイズして作成した抽出液には、DL1 細胞での抗菌ペプチド発現を誘導する活性が存在する。分子実体を解明するため、性状解析を行った。その結果、活性成分は水溶性で、有機溶媒と熱処理に耐性であり、C18 逆相カラムに吸着し、プロテーゼ処理により失活することから、タンパク質であることが推測された。活性画分を用いて DL1 細胞を用いたゲノムワイド RNAi スクリーニングを行ったところ、Toll 受容体の新規内因性リガンドであることが推測された。

（2）詳細

1）ショウジョウバエ Toll 経路の細胞内シグナル伝達経路解明

Toll 細胞内シグナル伝達経路を明らかにするため、私たちはまず Toll 経路の活性化測定に適した in vitro 実験系の構築を試みた。ショウジョウバエの培養細胞株として良く用いられている S2 細胞は、Toll 経路活性化の刺激に対する応答性が低い。そこで、さまざまな培養細胞株について Toll 経路の応答性を調べ、後期胚由来の培養細胞株 DL1 が非常に高い Toll 経路応答性を示すことを見出した。dMyd88 の過剰発現によって誘導した Toll 経路活性化は、上流にある Toll 受容体のノックダウンでは抑制されず下流の Pelle のノックダウンでは抑制されるなど、これまで知られている Toll シグナル伝達経路の因子とその作用順序が DL1 細胞では維持されていることを確認した。

次に、Toll 細胞内シグナル伝達経路に関与する新規因子を同定するため、”包括的ゲノムワイド RNAi スクリーニング”を行った。このスクリーニングでは、4つの方法で Toll 経路を活性化し、そのそれぞれについて in vitro ゲノムワイド RNAi スクリーニングを行った。Toll 経路の活性化は、dMyd88 の過剰発現、Pelle の過剰発現、Cactus の RNAi によるノックダウン、Dif の過剰発現の4つにより誘導した。4つのゲノムワイド RNAi スクリーニングのデータを解析したところ、既知 Toll 経路因子の RNAi による活性抑制効果が確認され、一方で IMD 経路因子の RNAi は抑制効果を示さなかったため、スクリーニングは良好に行われたと判断した。

スクリーニングデータのバイオインフォマティクス解析の結果、キナーゼ関連因子・E3 リガーゼ関連因子・転写制御関連因子など、およそ 100 個程度の新規 Toll 経路制御因子の候補が得られた。特に、dMyd88 の過剰発現による Toll 経路活性化を抑制し、Pelle 過剰発現による活性化は抑制しない因子として、HECT 型 E3 リガーゼの CG9153/Sherpa (SUMO-related HECT-domain and RCC-repeat Protein for Toll pathway Activation)に注目して解析を進めた。

まず始めに、Sherpa のショウジョウバエ個体での Toll 経路への関与を検証した。Sherpa 発現量が野生型の 20%程度である loss-of-function 変異体成虫を用い、グラム陽性菌を感染させて生存率を評価し、Drosomycin 発現量を定量的 PCR 法により測定した。その結果、感染後の生存率は spz 変異体と同様に増悪し、Drosomycin 発現量も顕著に低下したことから、Sherpa がショウジョウバエ成虫での細菌感染時の Toll 経路活性化に必要であることが考えられた。

培養細胞を用いた分子機構解析のため、まず始めに、RNAi スクリーニングの結果を別の dsRNA によるノックダウンによっても再現した。次に、ノックダウンによる Toll 経路活性化抑制は Sherpa の過剰発現でレスキューされることを示し、Sherpa は Pelle の上流で働く Toll 経路因子であることを確認した。次に、この in vitro レスキュー実験系を用いて Sherpa の機能に必要なドメイン解析を行った。Sherpa は、N 末端側に RCC repeat と呼ばれる β-プロペラ構造ドメインと、C 末端側に E3 リガーゼ活性をもつとされる HECT ドメインをもつ。RCC repeat と、分子間相互作用や脂質結合を担いユビキチン E3 リガーゼに散見される WD40 repeat は、立体構造的に相同なドメインである。ドメイン欠損体を用いたレスキュー実験の結果、HECT ドメインと RCC repeat の双方が、共に Toll 経路活性化に必要であることが示された。

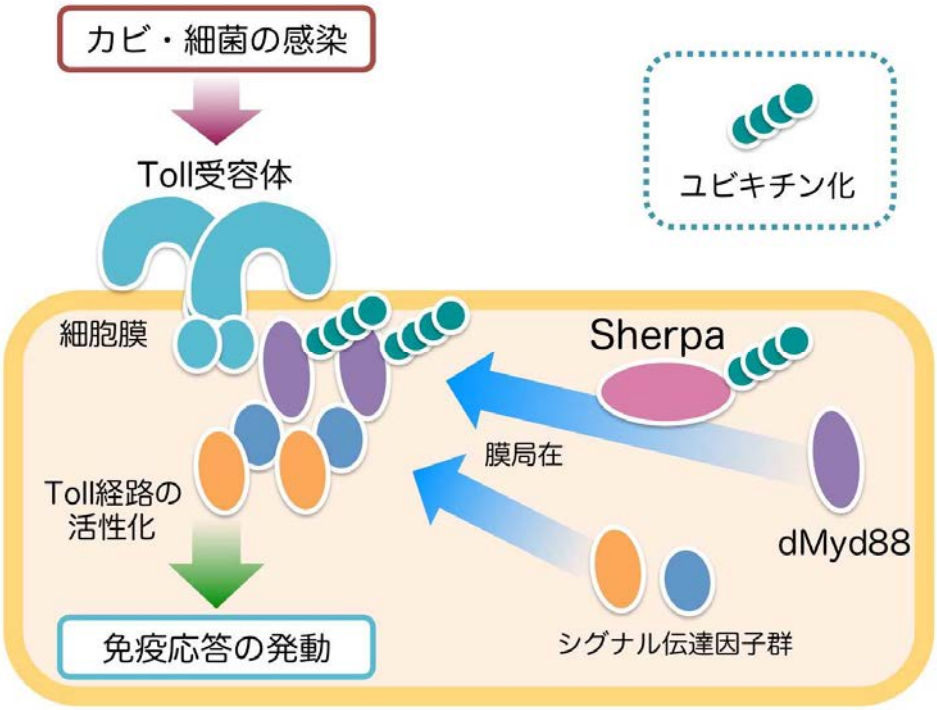
dMyd88 過剰発現によるスクリーニングでは、Sherpa と同様に dMyd88 の過剰発現による Toll 経路活性化に関わる因子として、ユビキチン様修飾分子である SUMO のショウジョウバエホモログがヒットしていた。タンパク質の SUMO 化修飾は、修飾を受けたタンパク質の細胞内局在や安定性を変化させることが知られており、シグナル伝達の制御に関わる可能性が考えられる。SUMO は、ユビキチンと同様に、活性化酵素(E1)、結合酵素(E2)、転移酵素(E3)を介して標的タンパク質に共有結合する。Sherpa と同様に、SUMO-E1 である Aos1、Uba2、SUMO-E2 である Ubc9、そして SUMO のノックダウンにより、dMyd88 過剰発現によって誘導される Toll 経路活性化は抑制され、一方、Pelle 過剰発現による活性化は抑制されなかった。すなわち、SUMO 関連因子も Pelle の上流で働くことが示唆された。

次に、Pelle の上流因子である dMyd88 が Sherpa のターゲットであると予想し、タグを付加した dMyd88 と Sherpa を過剰発現した DL1 細胞から dMyd88 の免疫沈降を行い、Sherpa と dMyd88 の分子間相互作用とユビキチン化などの翻訳後修飾を調べた。その結果、Sherpa と dMyd88 は複合体を形成しており、Sherpa 共発現時の dMyd88 にはユビキチン化が認められた。また、Sherpa 自身にも同様にユビキチン化が認められた。これらの結果から、Sherpa は自己ユビキチン化などを介して活性化し、dMyd88 にユビキチンを転移させていることが示唆された。

これまでに、dMyd88 からのシグナル伝達を制御する重要なメカニズムとして、dMyd88 の細胞膜局在が知られており、下流因子を介した NF-κB 活性化に必須であることが分かってい

る。そこで、dMyd88 の細胞内局在を免疫染色により検討することで、Sherpa の作用機序について調べた。過剰発現した dMyd88 は細胞膜近傍へと局在したが、Sherpa または SUMO のノックダウンによって dMyd88 は細胞質へ移行した。また、過剰発現した Sherpa は主に細胞膜に局在し、dMyd88 と共局在した。このことから、Sherpa は SUMO 化を介して dMyd88 の細胞膜局在を誘導することで、Toll 受容体からのシグナル伝達に寄与していることが示唆された。

研究成果を簡潔に示した図



以上の研究成果は、Science Signaling 誌に発表した。

Kanoh H†, Tong L-L†, Kuraishi T†*, Suda Y, Momiuchi Y, Shishido F, Kurata S*.
"Genome-wide RNAi screening implicates the E3 ubiquitin ligase Sherpa in mediating innate immune signaling by Toll in Drosophila adults." Sci. Signal. 400, ra107 (2015)
*co-corresponding authors
†These authors contributed equally to this work

2）ショウジョウバエ幼虫の抽出液中に存在する抗菌ペプチド発現誘導活性の解析

ショウジョウバエ幼虫の抽出液中に存在する抗菌ペプチド発現誘導活性はタンパク質であると推測された。この活性は、spz を欠損するショウジョウバエ幼虫を用いて抽出液を作成しても失われないことから、spz とは異なる新規内因性リガンドであることが示唆された。

この抽出液を C18 逆相カラムにより部分精製し、Toll 経路を活性化する内因性リガンドとして用いたゲノムワイド RNAi スクリーニングを行った。その結果、Toll 受容体のノックダウンにより抗菌ペプチド発現が強く抑制され、Gyc76C 受容体のノックダウンでは抑制されなかったこと

から、新規内因性リガンドは Toll 受容体の新規リガンドであることが示唆された。さらに、スクリーニングデータを項目1のスクリーニング結果と合わせて解析し、Jumonji-like transcription factor である Jarid2 に注目して解析を進めた。

RNAi あるいは変異体により Jarid2 の発現が低下したショウジョウバエを作成し、グラム陽性菌の感染実験を行った。Jarid2 の発現低下により、グラム陽性菌感染後の抗菌ペプチド発現が低下し、生存率が野生型より増悪したことから、Jarid2 は Toll 経路に関与する新規核内因子であることが示唆された。

以上の成果は、Biochemical and Biophysical Research Communications 誌に発表した。
Kanoh H†, Kuraishi T†*, Tong L-L, Watanabe, Nagata S, Kurata S*
"Ex vivo genome-wide RNAi screening of the Drosophila Toll signaling pathway elicited by a larva-derived tissue extract" BBRC 467, 400-406 (2015)
*co-corresponding authors
†These authors contributed equally to this work

3）ショウジョウバエ NF-κB 経路である IMD 経路に関与する新規因子の同定

前述したように、ショウジョウバエの NF-κB 経路には、Toll 経路とは独立した IMD 経路が存在する。自然免疫活性化メカニズム解明のため、補助的なプロジェクトとして、IMD 経路に関わる新規因子の解析を進めた。

抗菌ペプチドの発現誘導を指標とした機能獲得型スクリーニングにより、ショウジョウバエ IMD 経路により制御されている抗菌ペプチド Diptericin の発現を誘導する因子として Droj2 同定した。Droj2 RNAi 個体を用いた細菌感染実験により、Droj2 は IMD 経路の活性化に必要な因子であることを明らかにした。さらに、Droj2 のほ乳類ホモログである DnaJA3 に着目し、哺乳類培養細胞系における DnaJA3 の NF-κB 経路への関与を解析した。DnaJA3 の RNAi を行った HEK293 細胞では、フラジェリン刺激による NF-κB レポーター活性が低下し、IκB のリン酸化が抑制された。また、DnaJA3 の RNAi により、IKK 過剰発現による RelA のリン酸化が抑制された。これらの結果は、DnaJA3 が NF-κB 経路の活性化において、IκB のリン酸化に必要な因子であることを示唆しており、ショウジョウバエからヒトまで進化的に保存された新規自然免疫活性化因子を同定したことを示している。

以上の結果は、Journal of Biological Chemistry 誌に発表した。
Momiuchi Y†, Kumada K†, Kuraishi T†, Takagaki T, Aigaki T, Oshima Y, Kurata S
"Role of phylogenetically conserved co-chaperone protein Droj2/DNAJA3 in NF-κB signaling." J. Biol. Chem. 290, 23816-23825 (2015)
†These authors contributed equally to this work

3. 今後の展開

1）ショウジョウバエ Toll 経路の細胞内シグナル伝達経路解明

ショウジョウバエ Toll 経路の新規シグナル伝達因子として、E3 リガーゼの Sherpa を同定した。Sherpa は、Toll 受容体のアダプター分子である dMyd88 の細胞膜局在を制御していることが示唆

された。哺乳類の MyD88 は自然免疫や炎症性サイトカインによるシグナルにおいて極めて重要な分子であり、哺乳類にも Sherpa と相同性の高い分子（以下、mSherpa と記す）が存在する。興味深いことに、mSherpa は通常はどの組織でもあまり発現していないが、LPS 処理を行った腹腔マクロファージにおいて発現が強く誘導されることがわかった（未発表データ）。mSherpa もショウジョウバエの Sherpa と同様に MyD88 の制御に関わっているのであれば、LPS などにより炎症が惹起されたあとの炎症の慢性化に関与する可能性がある。そこで現在ノックアウトマウスを作出中であり、今後の解析により mSherpa の慢性炎症への関与が解明されることが期待できる。

包括的ゲノムワイド RNAi スクリーニングにより、Sherpa 以外にも新規 Toll 経路因子の候補を複数同定している。今後、ショウジョウバエ個体を使った解析や分子機構の解析を進め、ショウジョウバエ Toll シグナル伝達経路の詳細が解明されることが期待できる。

2）ショウジョウバエ幼虫の抽出液中に存在する抗菌ペプチド発現誘導活性の解析

ショウジョウバエ幼虫の抽出液には、Toll 受容体の新規リガンドが存在していることがわかった。今後、種々のクロマトグラフィーなどにより、リガンド活性を精製して同定する。それにより、新たな自然免疫活性化機構の一端が明らかになることが期待できる。

3）ショウジョウバエ Toll 細胞内シグナル伝達を活性化する cGMP 依存経路の解析

未公開ながら、受容体型グアニル酸シクラーゼ Gyc76C の下流において、dMyd88 を活性化する分子機構が明らかになってきた。また、そのシグナル伝達経路は進化的に保存されていることも示唆された。今後は、cGMP 依存経路がどのような生理的・病理的条件下で NF-κB の制御に関わっているか明らかにする必要がある。同時に、Gyc76C のリガンドを同定することが必要である。

4）野生型ショウジョウバエを用いて無菌炎症を誘導できる新規実験系の確立

未公開ながら、野生型幼虫を用いて、容易に無菌的な自然免疫活性化を誘導する方法を確立した。前述の forward genetic screening を進めることで、無菌炎症を誘導する新規シグナル伝達経路が解明されることが期待される。

4．　評価

（1）自己評価

（研究者）

本さきがけ研究においては、「ねらい」に示した四つのプロジェクトを提案して推進した。「1．ショウジョウバエ Toll 経路の細胞内シグナル伝達経路解明」では、新規遺伝子 Sherpa を同定し、自然免疫シグナルにおける dMyd88 の局在制御という新しいメカニズムを提唱することができた。さらに、その他多くの新規シグナル伝達因子の候補も同定できた。哺乳類の MyD88 は急性炎症および慢性炎症において重要な役割を果たす分子である。現時点ではショウジョウバエのみであるが、MyD88 の新たな制御メカニズムを見出したことは炎症研究の今後の展開において重要な成果であったと考えられる。哺乳類での解析が進めば、新たな炎症制御法の開発などにより、社会・経済への波及効果も期待できる。したがって、研究目的は充分に達成されたと判断する。

「2. ショウジョウバエ幼虫の抽出液中に存在する抗菌ペプチド発現誘導活性の解析」では、抽出液中のリガンド活性は同定できなかったものの、リガンドの生化学的性状を明らかにし、また、Toll 受容体の新規リガンドであることもわかったため、不充分ながらもある程度研究目的は達成された。

「3. ショウジョウバエ Toll 細胞内シグナル伝達を活性化する cGMP 依存経路の解析」では、Gyc76C のリガンドを同定することはできなかったが、cGMP 依存性キナーゼ DG2 の下流でプロテインフォスファターゼ 2A（PP2A）が機能することを個体レベルで明らかにした。さらに、Gyc76C, DG2, PP2A による NF-κB の制御は、ヒトにまで保存されていることを示した。以上から、研究目的はおおむね達成されたと判断する。

「4. 野生型ショウジョウバエを用いて無菌炎症を誘導できる新規実験系の確立」では、非常に簡単な方法でショウジョウバエ幼虫に無菌的に炎症を誘導できる新たな実験系を確立し、未知のシグナル伝達経路の関与を示唆した。研究目的は充分に達成されたと判断する。

本さきがけ研究は、年度あたり1、2名の学生と、最終年度のみ研究補助者として1名を雇用して、少人数で行われた。研究費の執行という観点から効率よく進めることができ、最終年度に潤沢にあった研究費を用いて解析委託を利用してスピードアップをはかることができた。

本さきがけ研究の領域会議での交流を通じて、ショウジョウバエ研究者として注目され、東北大学助教から慶應大学医学部専任講師へと異動し、本さきがけ研究を哺乳類を用いて展開でき、さらにショウジョウバエを用いた腸内細菌研究を進める機会を得ることにより、研究者としての飛躍につながった。

（2）研究総括評価（本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った）。

（研究総括）

ショウジョウバエを用いて新規の自然免疫活性化機構の解明を目指した本研究課題において、1）Toll経路の活性化を起こしやすい培養細胞を見いだしてゲノムワイドRNAiスクリーニングを実施し、dMyd88などのシグナル伝達因子をユビキチン化してToll経路のシグナル伝達を活性化する新規シグナル伝達因子Sherpaを同定して発表した。Sherpaは主に細胞膜に局在し、dMyd88と共局在し、NF-κBの活性化に関与することを明らかにした。2）ショウジョウバエ幼虫の抽出液中に存在する抗菌ペプチド発現誘導活性がタンパク質性のToll受容体の新規内因性リガンドであると推測した。その他に未公開ながら、受容体型グアニル酸シクラーゼGyc76Cの下流においてdMyd88を活性化する分子機構の解明や、幼虫を用いて容易に無菌的な自然免疫活性化を誘導する方法を確立などの研究も進展しており、今後におけるそれらの成績の発表が期待できる。

研究期間中に複数の異動もあったが、それぞれの研究環境で十分に研究を進展させるとともに、哺乳類を用いたさらなる研究展開もしている。今後、それらの哺乳類での解析を進め、新たな炎症制御法の開発につなげて欲しい。大いに期待している。

5. 主な研究成果リスト

（1）論文（原著論文）発表

1. Momiuchi Y†, Kumada K†, **Kuraishi T†**, Takagaki T, Aigaki T, Oshima Y, Kurata S "Role of phylogenetically conserved co-chaperone protein Droj2/DNAJA3 in NF-κB signaling." J. Biol. Chem. (2015) 290, 23816-23825 †These authors contributed equally to this work
2. Kanoh H†, **Kuraishi T†***, Tong L-L, Watanabe, Nagata S, Kurata S* "Ex vivo genome-wide RNAi screening of the Drosophila Toll signaling pathway elicited by a larva-derived tissue extract." BBRC (2015) 467, 400-406 *co-corresponding authors †These authors contributed equally to this work
3. Kanoh H†, Tong L-L†, **Kuraishi T†***, Suda Y, Momiuchi Y, Shishido F, Kurata S*. "Genome-wide RNAi screening implicates the E3 ubiquitin ligase Sherpa in mediating innate immune signaling by Toll in Drosophila adults." Sci. Signal. (2015) 400, ra107 *co-corresponding authors †These authors contributed equally to this work

（2）特許出願

研究期間累積件数：0件

（2）その他の成果（主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等）

英文総説

1. **Kuraishi T†***, Kenmoku H†, Kurata S*.
"From mouth to anus: functional and structural relevance of enteric neurons in the Drosophila melanogaster gut."
Insect Biochemistry and Molecular Biology (in press)
*co-corresponding authors
†These authors contributed equally to this work

2. **Kuraishi T†**, Hori A†, Kurata S.
"Host-microbe interactions in the gut of Drosophila melanogaster."
Frontiers in Physiology 4: 375. 2013
†These authors contributed equally to this work

日本語総説

1.　見目裕之、堀亜紀、**倉石貴透**、倉田祥一朗
『神経系によるショウジョウバエ腸管の構造と機能の制御』
蚕糸昆虫バイオテック　84 巻 3 号 (2015.12) accepted

2. **倉石貴透**、狩野裕孝、倉田祥一朗
『内因性リガンドによって活性化されるショウジョウバエの Toll 経路』
別冊 BIO Clinica（バイオクリニカ）慢性炎症と疾患　第 4 巻第 2 号 16-21 (2015.5)

招待講演

1. Takayuki Kuraishi
"Neuronal control of gut integrity in Drosophila adults" (Invited)
2014 Epitheliome meeting, University of Glasgow, Scotland, April 22, 2014

国外学会

1. **Takayuki Kuraishi**, Aki Hori, Hiroyuki Kenmoku, Shoichiro Kurata
"Damage-induced innate immune response in Drosophila larvae: a novel model system for analyzing a mechanism that governs sterile inflammation"
Cold Spring Harbor Asia conferences, Suzhou, China, September 2, 2014

2. Takayuki Kuraishi, Aki Hori, Shoichiro Kurata
"Damage induced expression of antimicrobial peptides via the Imd pathway in Drosophila larvae"
55th Annual Drosophila Research Conference, Town & Country Resort & Conference Center, San Diego, March 26, 2014

プレスリリース

1. 平成27年10月28日
東北大学，科学技術振興機構（JST）
自然免疫応答を発動する新分子「Sherpa」を発見
昆虫モデルから見えた新たな免疫制御メカニズム
http://www.jst.go.jp/pr/announce/20151028/index.html

研　究　報　告　書

「癌細胞由来小分子 RNA による炎症細胞の制御」

研究タイプ：通常型
研究期間：　平成24年10月～平成28年3月
研 究 者：　幸谷　愛

1．　研究のねらい

EB ウイルスが引き起こす癌では、ウイルス感染に伴う炎症が癌発生に深く関与する。炎症細胞がないと腫瘍細胞は生存できない。元来ウイルス感染細胞を排除しようと集まった炎症細胞が、いつの間にかウイルス感染癌細胞を支持するように変化するが、そのメカニズムは未だ明らかではない。そこで、新しい細胞間コミュニケーターである「分泌性小分子 RNA」からそのメカニズムの解明を試みた。

2．　研究成果

（1）概要

EBV 関連リンパ腫は化学療法抵抗性の難治症例が多く新規治療が必要である。EBV 関連リンパ腫は腫瘍組織内にも多数の炎症細胞の浸潤を認め、EBV 陽性ホジキンリンパ腫は腫瘤の 99%以上は非腫瘍性炎症細胞であり、腫瘍細胞は全体のわずか 1%程度を占めるにすぎず、腫瘍細胞は炎症細胞の存在下でしか生着できない。

炎症細胞は元来 EBV 腫瘍細胞を排除するために集積したものだが、EBV の潜伏化とこれに伴う炎症の遷延化によってニッチと化すと考えられる

一方、最近遺伝子をコードしないゲノム領域から生成される小分子EBVが、エキソソームに抱合されて分泌され、細胞間伝達物質として働くことが明らかとなった。

「EBV の潜伏化・炎症慢性化の過程で感染細胞により分泌される小分子 RNA が炎症細胞に対してどのような影響を与えるのか？」

この問いに答えを見出すために、試験管内、マウス生体内において EBV 感染細胞由来分泌性小分子 RNA の機能を解析した。

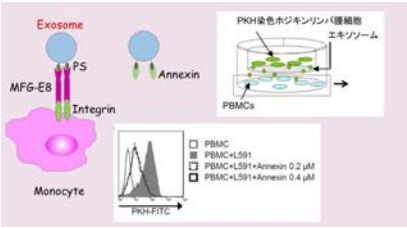
その結果、単球/マクロファージが選択的にEBV感染リンパ腫細胞由来の小分子RNAを取り込むこと、その結果、単球が増殖し、サイトカインプロファイルが腫瘍関連マクロファージ様に変化することを見出した。マウス生体内においては、これらの小分子 RNA を欠損する株と、野生型の株を比較して、これら小分子 RNA が炎症の遷延化、そしてリンパ腫発生に必須であることが明らかになった。更に、小分子 RNA を欠損する EBV を感染させたマウスに、これらの小分子 RNA を豊富に含むエクソソームを導入したところ、マクロファージの貪食能が極めて高いリンパ腫が発生したが、これらからマクロファージを除去することにより、EBV 陽性細胞の完全消退を誘導できた。腫瘍由来エクソソームをマクロファージが特異的に取り込む機序としては、エクソソーム上のリン脂質、フォスファチジルセリンに依存することを明らかにした。最後にヒト EBV 関連リンパ腫においてこれらの小分子 RNA の発現を検討したところ、腫瘍細胞あたりの産生量の高低で著しい生存期間の差を認め、EBV にコードされる miRNA の生物学的重要性に加え、診断的意義も高いことが示された。

以上からを EBV 感染腫瘍細胞由来分泌性小分子 RNA は炎症細胞、単球/マクロファージを制御して EBV 感染細胞が引き起こす炎症の遷延化をもたらし、最終的には腫瘍発症、進展に深く関与することが明らかとなった。

（2）詳細

研究テーマ1

腫瘍由来エクソソームがマクロファージに特異的に取り込まれるメカニズム



腫瘍由来分泌性小分子 RNA がエクソソームに内包され、単球/マクロファージに特異的に取り込まれることを、試験管内、ヒトリンパ腫検体において明らかにした。

その特異性を決定する機序について、長田重一領域アドバイザーのアドバイスを基に、アポトーシス細胞がマクロファージに特異的に取り込まれる際に用いられる分子の関与を調べた。その結果、フォスファチジルセリン(PS)-MGF-E8-Integrin という、上記に必須分子が、腫瘍由来エクソソームがマクロファージに取り込まれる際にも必須である事を明らかにした。

研究テーマ2

腫瘍由来分泌性小分子 RNA のマクロファージでの機能解析と標的遺伝子の同定

Upregulated genes

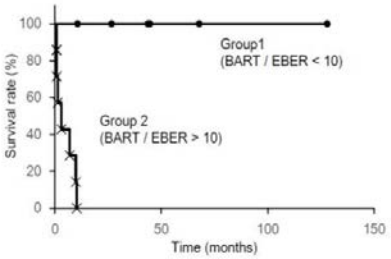
Gene	Fold change
ARG1	15.12
VEGFA	2.23
TNF	2.20
IL23A	2.02
CCL2	2.28

腫瘍由来分泌性小分子 RNA を内包するエクソソームは、小分子 RNA 依存的にヒト単球は CD69, IL-10, TNF の発現を増強した。そこで、腫瘍由来分泌性小分子 RNA による遺伝発現変化の網羅的解析、および、小分子 RNA の標的遺伝子の同定のために、ヒト単球系白血病由来細胞株 THP1 に対して、EBV コード miRNA である BART miRNAs (20 種類)をテトラサイクリン依存的に発現誘導する細胞株を樹立した。これを用いて、EBVmiRNA によって発現変化する遺伝子として、Arg1(15 倍)をはじめとし、VEGF, TNF, IL23A, CCL2 等、免疫抑制性マクロファージ M2 において高発現している遺伝子の発現上昇を認め，腫瘍由来小分子 RNA がマクロファージを腫瘍支持性へ変化させることを明らかにした。標的遺伝子としては MEF2、CD1c を同定した。

研究テーマ 3

ヒト EBV リンパ腫における EBV コード miRNA と予後との関係性

ヒト EBV 陽性びまん性大細胞型リンパ腫(DLBCL)患者病理検体に対して、EBV コード miRNA の一つである BART13 の発現を、in situ hybridization 法を用いて検討した。その結果、標本全体の発現量と生存期間が統計学的有意差（P<0.05）をもって、相関した。更には、腫瘍細胞あたりの BART13 の産生量を算出し、生存期間との相関を解析したところ、極めて強い相関を認めた。（P<0.001）（右図）

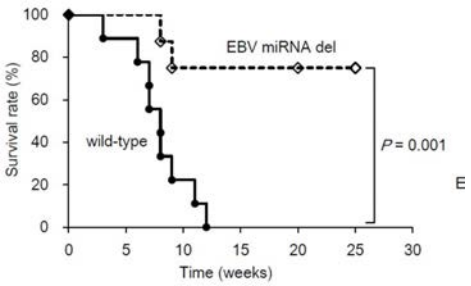


この結果はヒトのリンパ腫において、腫瘍由来小分子 RNA が、癌生物学的に極めて重要な機能を持つことを示唆した。

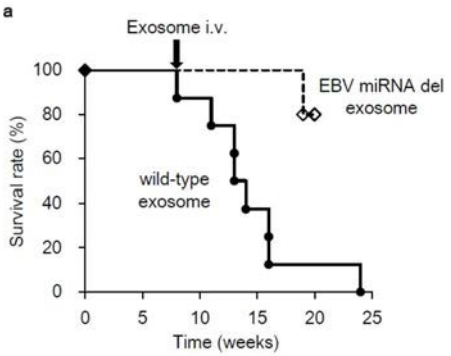
研究テーマ 4

「EBV リンパ増殖疾患マウスモデルにおける、腫瘍由来小分子RNAを内包するエクソソームの腫瘍形成における生物学的意義について」

EBV は霊長類にしか感染しない。そこで、超免疫不全マウス NOG マウスにヒト臍帯血より分離した CD34 陽性細胞を静注し、造血系ヒト化マウスを作製した。その 5 か月後 EBV を感染させ、リンパ増殖疾患を誘導する EBV リンパ増殖疾患モデルを確立した。この際 EBV コード miRNA 欠損株と野生型を用いて炎症や腫瘍形成に差があるか検討した。その結果欠損株において炎症、腫瘍が共に形成されにくく、EBV コード miRNA に炎症惹起、腫瘍形成促進作用があることが示唆された。（右図上）



上記の結果が分泌性 EBV コード miRNA によるものであるかを検討するため、野生型 EBV を感染させたリンパ球株から採取したエクソソームを、リンパ増殖疾患を発症しない EBVmiRNA 欠損株を感染させたマウスに投与した際の腫瘍形成について検討したところ、全例においてリンパ増殖疾患の発症を認めた。（右図下）更に発症したリンパ増殖疾患に対して、クオドロネートリポソームを用いてマクロファージを除去すると、腫瘍の完全消退が認められた。本腫瘍におけるマクロファー制御の重要性が示された。



３．　今後の展開

以上からをEBV感染腫瘍細胞由来分泌性小分子RNAは炎症細胞、単球/マクロファージを制御して EBV 感染細胞が引き起こす炎症の遷延化をもたらし、最終的には腫瘍発症、進展に深く関与することが明らかとなった。マクロファージが腫瘍形成維持におけるKey playerであることは、多くの研究によって明らかにされている。腫瘍由来エクソソームがこのマクロファージを制御して腫瘍形成維持に不可欠な機能を持つことを本研究が初めて明らかにした。更に、エクソソームの取り込みを阻害する、特定のサブセットを除去するなど、マクロファージを標的とする治療法が、現在有効な治療法のない EBV 関連リンパ腫に対して、新たな治療になり得ることが示唆された。

今後はこれまで得られた知見を、患者さまに届けるためのTranslational Researchを進めていくと共に、本研究から新たに見出された Question、1．取り込みは同じ機序である死細胞とエクソソームのマクロファージ細胞内運命の劇的な差は、何によって規定されるのか。2．本研究が世界で初めて明らかにした「腫瘍由来分泌性小分子 RNA—マクロファージ腫瘍随伴化—腫瘍形成維持」という軸が他のウイルス感染癌、炎症癌において、一般化できる可能性について取り組みたい。

４．　評価

（1）自己評価

（研究者）

1）研究目的の達成状況、研究の進め方（研究実施体制及び研究費執行状況）

当初の研究目的はほぼ達成された。研究実施体制については、研究開始当初、1人ですすめていたが、さきがけによる充実した研究費により、2 人に増員でき、飛躍的に研究が進展した。しかしながら、論文化が遅れており、この点を今後迅速に行いたい。

2）研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果（今後の見込みを含む）

本研究により、EBV 関連リンパ腫という一疾患に対する知見を得たが、今後本研究から得られた腫瘍由来分泌性小分子 RNA を内包するエクソソーム—マクロファージによる特異的な取り込み—マクロファージの腫瘍支持性変化—腫瘍形成維持というスキームが他炎症癌などに応用できれば、エクソソーム制御、マクロファージ制御による抗腫瘍治療開発という高い波及効果が得られる。

EBV リンパ腫自体は頻度の低いリンパ腫であるが（10 万人に数人）、東アジアに多いという特徴があり、欧米で開発された現治療が無効である現状を踏まえると、本研究による知見は即、新規治療につながる可能性が高いと考える。

本さきがけ研究により、独立直後の研究室の活動性が安定しラボ運営が軌道に乗った。更に、日本を代表する研究者で構成される領域アドバイザーによる適切なアドバイスに加え、アドバイザーの研究室における詳細な指導により、研究の発展が大いに認められた。その結果、国際学会で講演が著しく増加し、招待講演も受け、本分野の日本のトップランナーの一人として目されるようになり、研究者としての飛躍につながった。

本研究領域での脂質関連研究者との交流から、本研究に新たな方向性が付与され、AMED-PRIME 採択、および製薬会社との共同研究締結に至った。

（2）研究総括評価（本研究課題について、研究期間中に実施された、年２回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った）。

（研究総括）

EBV 陽性ホジキンリンパ腫の腫瘤中にはわずか 1%程度しか腫瘍細胞が存在せず、腫瘍細胞は大部分を占める周囲の多種多様な炎症細胞の存在下でしか生着できない。本課題ではその腫瘍細胞と炎症細胞との相互作用について分泌性小分子 RNA の観点から検討を行い次のような結果を得ている。1)試験管内とヒトリンパ腫検体において、腫瘍由来分泌性小分子 RNA がエクソソームに内包され単球/マクロファージに特異的に取り込まれること、2)ヒト単球に対する腫瘍由来分泌性小分子 RNA を内包するエクソソームの作用を調べ CD69/IL-10/TNF の発現増強のほか、免疫抑制性の M2 マクロファージで高発現する遺伝子の発現上昇を引き起こし、マクロファージを腫瘍支持性へ変化させること、3)ヒト EBV 陽性びまん性大細胞型リンパ腫患者病理検体における EBV コード miRNA の一つである BART13 の標本全体の発現量や腫瘍細胞あたりの産生量と生存期間が有意に相関し、腫瘍由来小分子 RNA が癌生物学的に極めて重要な機能を持つこと、4)造血系ヒト化 NOG マウスに EBV 感染させる EBV リンパ増殖疾患モデルを確立し、EBV コード miRNA 欠損株と野生型 EBV の作用を検討したところ欠損株において炎症や腫瘍の形成がされにくく、EBV コード miRNA に炎症惹起、腫瘍形成促進作用があることを明らかにした。

今後、エクソソームや特定のマクロファージサブセットを除去するなど、現在有効な治療法のない EBV 関連リンパ腫に対する新たな治療につながること、また腫瘍由来分泌性小分子 RNA—マクロファージ腫瘍随伴化—腫瘍形成維持という軸が他のウイルス感染癌・炎症癌においても一般化できる可能性が期待できる。これまでの研究成果を論文として公表するとともに、この領域をリードする研究者としてさらに成長することを期待している。

５．　主な研究成果リスト

（1）論文（原著論文）発表著者．発表論文タイトル．掲載誌名．発行年，巻号，始頁-終頁，その他

1.Kazuki Okuyama, Tomokatsu Ikawa, Bernhard Gentner, Katsuto Hozumi, Ratanakanit Harnprasopwat, Jun Lu, Riu Yamashita, Daon Ha, Takae Toyoshima, Bidisha Chanda, Toyotaka Kawamata, Kazuaki Yokoyama, Shusheng Wang, Kiyoshi Ando, Harvey F. Lodish, Arinobu Tojo,Hiroshi Kawamoto, and *Ai Kotani miR-126-mediated control of cell fate in B cell-myeloid progenitors as a potential alternative to transcriptional factors Proc Natl Acad Sci U. S.A. 2013 Aug 13; 110(33):13410-5. （IF10）
2. Kazuaki Yokoyama, Nozomi Yokoyama, Kiyoko Izawa, Ai Kotani, Akira Harashima, Katsuto Hozumi, and *Arinobu Tojo In vivo leukemogenic potential of an interleukin-7 receptor α chain mutant in hematopoietic stem and progenitor cells

	BLOOD. 2013 Dec 19; 122(26):4259-63. (IF10)
3.	Natsuko Yamakawa, Kazuki Okuyama, Jun Ogata, Akinori Kanai, Aleksandra Helwak, Masako Takamatsu, Ken-ichi Imadome, Koh-hei Takakura, Chanda Bidisha, Natsumi Kurosaki , Haruna Yamamoto, Kiyoshi Ando, Hirotaka Matsui , Toshiya Inaba,* Ai Kotani Novel functional small RNAs are selectively loaded onto mammalian Ago1 Nucleic Acids Res. 2014 Apr; 42(8):5289-301. (IF9)
4.	Haruna Yamamoto, Jun Lu, Shigeyoshi Oba, Toyotaka Kawamata, Akihide Yoshimi, Natsumi Kurosaki, Kazuaki Yokoyama, Hiromichi Matsushita, Mineo Kurokawa, Arinobu Tojo, Kiyoshi Ando, Kazuhiro Morishita, Koko Katagiri, and Ai Kotani* miR-133 regulates Evi1 expression in AML cells as a potential therapeutic target Scientific Reports minor revised

（2）特許出願

研究期間累積件数：0件

（3）その他の成果（主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等）

<u>学会発表</u>

2012.12 EBV-Specific Micro-RNA Via Exosome: A Key Inter-Cellular machinery between EBV+ Tumor and Tumor-Surrounding Immune Cells?
American Society of Hematology 54th Annual Meeting, Atlanta (Oral Presentation)

2013.12 A Single Micro-RNA Can Completely Rescue B-Cell Differentiation Arrest Due To EBF1 Deficiency: Can Micro-RNA Control Cell Fate As a Potential Alternative Of Transcriptional Factor?
54th Annual Meeting of American Society of Hematology New Oleans (Oral Presentation)

2013.11 EBV 関連リンパ腫から放出される分泌性 EBV コード小分子 RNA の炎症性ニッチ形成における役割
第 61 回日本ウイルス学会 神戸（シンポジウム招待講演）

2013.10 治療標的としての AID
The 75th Annual Meeting of JSH (Japanese Society of Hematology) 札幌（シンポジウム招待講演）

2013.10 Tumor derived small RNA regulates “inflammatory niche”
The 72th Annual Meeting of JCA201 (Annual meeting of Japan Cancer Association) 横浜 (International Session 招待講演)

2013.12 miRNA は細胞運命制御において転写因子をレスキューできる
第 36 回分子生物学会年会 神戸（ワークショップ指定講演）

2014.4 A single micro-RNA can completely rescue B-cell differentiation arrest due to EBF1 deficiency—Can micro-RNA control cell fate as a potential alternative of transcriptional factor?

Cold Springs Harboer laboratory the seventh Cold Spring Harbor meeting;; Gene Expression & Signaling in the Immune System New York USA (Talk)

2014.7　EBV 感染リンパ腫細胞より分泌される小分子 RNA の機能
第 35 回日本炎症・再生医学会 沖縄（シンポジウム招待講演）

2015.3　A single miRNA can rescue B lineage commitment arrest due to EBF1 deficiency
Keystone Symposium The golden anniversary of B cell discovery Banff Canada (Invited Speaker)

2015.10 miRNA が転写因子欠損をレスキューする
第 65 回日本癌学会　名古屋（シンポジウム招待講演）

<u>プレスリリース等</u>

2013.7　白血病細胞の異常を修復するRNAの発見
科学技術振興機構報 第 971 号
http://www.jst.go.jp/pr/info/info971/

研　究　報　告　書

「アルツハイマー病の病態悪性化と炎症反応の相互作用の解明」

研究タイプ：通常型
研究期間：　平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月
研　究　者：　斉藤　貴志

1．　研究のねらい

認知症は、世界レベルで解決すべき喫緊の課題である。先進国の中でも特に日本は、少子高齢化の進行が突出しており、2025 年には、認知症患者数が 500 万人に達するとの試算もあり、急速に社会・経済の疲弊をもたらす事が懸念されている。認知症の約半数を占めるのが、アルツハイマー病（AD）であるが、AD に対する予防法・根本療法は未だ確立されておらず、対症療法に留まっているのが現状である。AD は、患者の剖検脳を用いた病理学的解析から、“老人斑”と“神経原線維変化”という二大病理像を示すことが明らかとなっているが、この病理構造物はそれぞれアミロイドβペプチド（Aβ）と微小管結合蛋白・タウを主体としており、AD 発症の数十年前からすでに脳内で蓄積がはじまっている。すなわち、病因の蓄積から発症までにラグタイムがあるため、AD 病理形成機構の解明が困難であったと言える。一方、非ステロイド性抗炎症薬を服用していたリウマチ患者の AD 発症率が低いという疫学的事例が報告されていた。そのため、“炎症”が、AD 病態を悪性化させる一つの要因として指摘されてきた。実際、AD 剖検脳の解析では、病理構造物の周辺で脳内の免疫担当細胞であるグリア細胞の集積が認められており、神経炎症という概念で研究が進められてきた。しかし、神経炎症との関連も含めて、AD 病態形成機構はいまだ明らかとなっていない。研究成果がいまだに社会へ還元されるに至っていない最大の理由は、AD 研究に用いられてきたモデル動物の妥当性にあると言える。これまでに、病理学的、病態遺伝学的解析から、家族性（遺伝性）AD の原因遺伝子としてAβの前駆体であるアミロイド前駆体蛋白（APP）が同定され、APP を過剰発現させることで脳内にAβを蓄積させる APP 過剰発現マウス（APP-Tg）が作製され研究に用いられてきた。しかし、過剰発現のパラダイムでは、多くの artifacts を誘導することが明らかとなり、APP-Tg の AD モデルとしての妥当性が揺らいできた。事実、APP-Tg を用いた創薬研究はいずれも成功していない。そこで本研究では、AD 病態への蓋然性の高い AD モデルマウスを新たに作製し、モデル妥当性を検証することを第一の目的とする。次いで、新型ADモデルマウスを用いて、AD 病理形成機構とそれに関わる炎症の慢性化機構の関連性を明らかにする。最終的に、AD の予防・治療、もしくは発症遅延に向けた創薬標的を見出すと共に、AD の早期診断法の確立に貢献することを目的とする。

2．　研究成果

（1）概要

病気発症までの時間的プロセスが非常に長い AD の病態を総合的に捉え解析するためには、蓋然性の高い AD モデルマウスが必須である。これまでの AD モデルマウスは、APP-Tg マウスが主流であったが、APP の過剰発現に伴う artifact の要素が極めて大きく、しかも AD 病理を忠実に再現していなかった。これは、APP-Tg マウスを用いて得られた結果の一部が、

実際の AD 病理・病態を反映していないことを示唆している。これら問題を克服するため、我々は、過剰発現法を用いずに、ノックイン手法による新規 AD モデルマウス(APP ノックインマウス：APP-KI マウス)の開発に成功した。APP-KI マウスは、患者のアミロイド病理に忠実で、グリア細胞（アストロサイトおよびミクログリア）の活性化を伴う激しい神経炎症を呈していた。APP-KI マウスは、既存のモデルマウスが有していた様々な問題点を克服しており、AD 研究のための新たな世界基準ツールとなった（図 1）。

APP-KI マウスを得たことで、AD 病態形成機構における炎症反応の役割について解析が可能となった。我々は、AD 病態形成におけるインフラマソームの関与を検討するために、インフラマソームの鍵分子の一つカスパーゼ 1 の欠損マウス(Casp1-KO)との交配を行った。既存の APP-Tg と Casp1-KO との交配マウスによる先行研究では、インターロイキン 1β(IL-1β)が、アミロイド病理形成に重要な役割を果たしていると報告されていたが、APP-KI x Casp1-KO マウスによる解析の結果、その再現性は確認できず、IL-1βとは異なるサイトカイン/ケモカインがインフラマソームに連動していることが明らかとなった。更に、APP-KI マウスの脳内で変動するサイトカイン/ケモカインを網羅的にスクリーニングした結果、既存のモデルマウスを用いた研究では見出せなかったサイトカイン/ケモカインの変動を明らかにし、AD 病態形成機構の解明への新たな糸口を見出した。今後、APP-KI マウスを基軸とした各種交配マウスの解析を進めることで、初めてアミロイドカスケードに沿った AD 病理形成に対する、炎症反応の役割の解析を進めることが可能となり、AD 病理・病態形成機構の全貌が解明できると期待される。

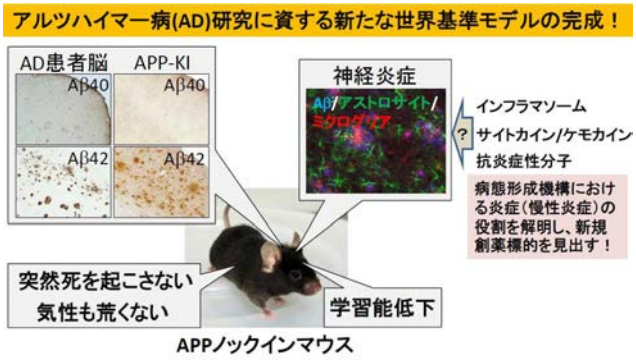


図1.既存のモデルマウスの問題点を克服し、AD患者の病理との蓋然性が高いモデルマウス（APP-KI）の開発に成功。このモデルを用いることで初めて、AD病態形成機構に対する炎症の役割を明確にすることが可能となり、新知見が得られ始めている。

（2）詳細

研究テーマ 1「AD モデルマウスの作製と解析」

既存の AD モデルマウスの問題の基となった、過剰発現系を用いない AD モデルマウスの開発を行ってきた。我々は、APP を過剰発現させずに、ノックイン（KI）技術を用いて、マウス APP のゲノムの Aβ配列周辺の Exon にのみ家族性 AD 変異を一度の変異導入で多重に導入することに成功した。導入した遺伝子変異から命名した APP NL-F KI マウス（Swedish 変異と Iberian 変異を導入）と APP NL-G-F KI マウス（加えて Arctic 変異も導入）の創出に成功した。それぞれを第二世代、第三世代 APP-KI マウスと位置づけた（図 2）。第二、第三世代マウス共に、第一世代である APP-Tg マウスが有していた問題点（病理が患者とかけ離れているだけでなく、通常状態でも気性が荒く、実験期間中に原因不明の突然死を起こす等）を克服し、さらに患者との病理蓋然性（特にアミロイド病理に対する）が高いマウスとして 2014 年に Nature Neuroscience 誌に報告した（論文発表 1,2）。当該モデルマウスは、国内外からの反響が大きく、論文発表からわずか 1 年半ですでに 130 件以上の共同研究（マウスの提供）に発展

しており、当該マウスを用いた論文も発表され始めている（論文発表 3-5）。今後も、AD 研究に資する新しい世界基準モデルとしての有用性が高まるものと期待しており、予想以上の目的達成へと至っている。従って、研究テーマ2以降の解析に滞りなく進むことができた。

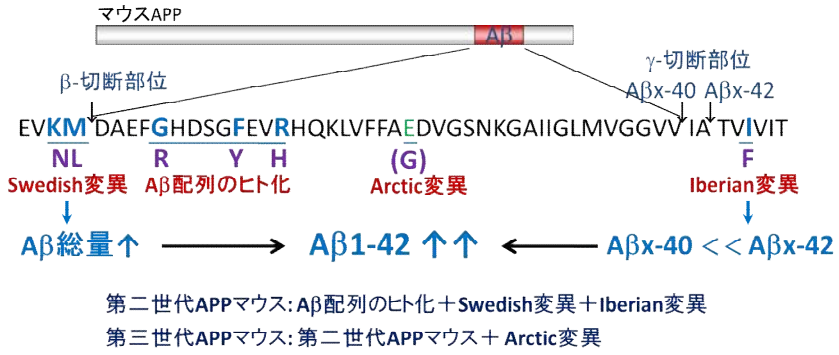


図2. 次世代型アルツハイマー病モデルマウス作製のためのコンセプト
Aβは、酵素の作用により、APPのβ切断部位次いでγ切断部位の順に切断を受け産生される。次世代型アルツハイマー病モデルマウスとして、第二世代APPマウスは、Aβ産生量を増加させるSwedish変異及びAβx-42の産生比率を増加させるIberian変異を導入し、更に、マウスのAβ配列は凝集を示さないため、Aβ配列のヒト化を同時に行ったマウスである。一方、第三世代APPマウスは、上記変異に加えて家族性アルツハイマー病変異の1つであるArctic変異も導入したマウスである。

当初の予定ではさらに、Aβの神経毒性・凝集性が高く神経炎症誘導性が高いと目される Aβ3pE-x 種を産生しやすいコンストラクトを導入した第四世代 APP-KI の創出も試み、2 系統のマウスを取得するに至ったが、どちらのマウスモデルも産生する Aβの脳内半減期が想定外に短く、目的としたアミロイド病理を発症するのに 18 ヶ月以上を要し、モデル妥当性としての意義が低下したため解析の優先順位を下げるに至った。しかし、Aβ3pE-x 種は APP NL-F KI でも APP NL-G-F KI でも産生されていることが明かとなったため、神経炎症誘導における Aβ3pE-x 種の役割の解析については、別の戦略で解析を進めている。その戦略とは、Aβ3pE-x 種の産生に関与すると考えられている、グルタミニルシクラーゼ及びイソグルタミニルイクラーゼそれぞれの欠損マウスと APP-KI を交配した際に、Aβ3pE-x 種の産生量と神経炎症の度合いに変化が認められるか？というものである。交配も順調に進み、現在解析月齢に達するのを待っている状況である。

研究テーマ 2「新規 AD モデルマウスの応用解析・AD 病理形成におけるインフラマソームの役割」

AD 病理形成におけるインフラマソームの役割を解析するために、APP-KI マウスとインフラマソーム構成因子の鍵分子であるカスパーゼ 1 の欠損マウス（Casp1-KO）との交配を行った。2013 年に競合する解析結果が Henekara により Nature へ報告されたが、その解析では APP 過剰発現マウスを用いていた。そこで、APP-KI x Casp1-KO マウスの解析を詳細に進めた結果、Nature で報告された結果の再現性を得る事はできなかった。具体的には、APP-KI x Casp1-KO マウスの脳内では、インターロイキン 1βIL-1βレベルの変動は認められず、アミロイド病理の形成も対照である APP-KI マウスと同等であった。Heneka らの結果の再現性は得られなかったが、インフラマソームが AD 病理形成に関与しない訳ではなく、インフラマソーム構成因子のひとつ ASC の発現増加が APP-KI、APP-KI x Casp1-KO マウスでも同様に認められたため、カスパーゼ 1 非依存的なインフラマソームの存在が示唆された。今後、新たな視点で AD 病態形成におけるインフラマソームの関与について解析を進める必要があると考えら

れる。そして、AD 病態形成における炎症応答の役割を解析するためにはやはり、APP-Tg 系統を用いるよりも APP-KI 系統を用いて研究を行うことが望ましいことが明確になった。

研究テーマ 3「新規 AD モデルマウスにおける炎症関連因子の同定と AD 病態形成における役割」

APP-KI マウスの脳内で変動するサイトカイン/ケモカインを Cytokine profiler(R&D)を用いて網羅的スクリーニングを行った。その結果、既存のモデルマウス（APP-Tg をベースとした過剰発現モデル系）を用いた研究では見出せなかったサイトカイン/ケモカインが APP-KI 脳内で変動していることを明らかにした。研究テーマ 2 の結果と一致して、APP-KI マウスでは、IL-1β の変動も認められなかった。現在、同定因子の遺伝子改変マウスと APP-KI マウスとの交配を行っており、AD 病態形成機構におけるそのサイトカイン/ケモカインの役割について解析を進めている。

3. 今後の展開

新型 APP-KI マウスの創出に成功したことで、既存のモデルマウスを用いた研究では見出せなかったサイトカイン/ケモカインの変動を明らかにし、AD 病態形成機構（炎症の慢性化の役割を含めた）の解明への新たな糸口を見出した。今後、APP-KI マウスを基軸とした各種交配マウスの解析を進めることで、初めてアミロイドカスケードに沿った AD 病理形成に対する、炎症応答の役割について解析を進めることが可能となり、AD 病理・病態形成機構の全貌が解明できると期待される。一方で、タウ病理の再現を完全に果たせていないことが、APP-KI マウスの弱点である。より完全なモデルマウスを創出するためには、APP-KI マウスの脳内でタウ病理を如何に再現させるかが、重要な検討事項となる。本研究成果から、神経炎症が、アミロイド病理の“下流”に位置していることが明らかとなったため、神経炎症の悪性化を加速させる因子の同定が、タウ病理の再現にも繋がると考えられ、AD 病態形成機構の全貌を明らかにする手段とも直結する。このため、研究テーマ3で同定した、サイトカイン/ケモカインの役割を明らかにすることが、最重要検証事項となる。また、研究テーマ2で示唆された、カスパーゼ非依存的なインフラマソームの存在を明かにできれば、炎症研究における新たな炎症制御機構を提示することに繋がる可能性が高い。これらのことからも、本研究成果の延長上に、AD 病態形成機構の解明と、炎症応答の関連性の全貌を明らかにできることが期待される。

4. 評価

（1）自己評価

（研究者）

本研究提案の要であった、新型 AD モデルマウスの完成およびその応用解析は、予定通り達成された。一方、当初の目的の一つであった Aβ3pE-x 種の炎症惹起性の役割の解析が、想定外の要因で遅れはしたが結果を得られるところまで来ている。それ以上に、新型 AD モデルマウスから同定したサイトカイン/ケモカインの役割解明の発端をつかめ、新たな概念の提示、およびその実証への足掛かりとなった点で目標の達成状況は大きなものであったと考える。AD のような老化疾患の解析は、マウスの加齢化などを必要とする長時間を要する提案ではあったが、研究実施体制（マウス飼育・遺伝子型確定のための研究補助者の雇用）および

研究費の支援により可能な範囲で最大限のマウスの交配・維持が行えた。APP-KI マウスの創出そしてその成果が、さきがけ研究からであった点も信頼性を勝ち得る要因の一つとなっており、国内外の AD 研究において、当該マウスの重要性が広く認識されるに至った点、非常に大きな波及効果があった。実際、製薬業界のみならず機能性食品に関わる企業からの問い合わせも多く、今後、当該マウスを用いた結果から、AD の予防・治療に繋がる製品の開発へ貢献することが大きく期待されている。また研究者として、AD 研究分野に広がりのある新たな概念を提示できた意義も大きく、今後独立する上でも研究者としての飛躍に大きくつながった。これら評価から、2015 年より日本認知症学会の代議員にも選出された。さらに、本さきがけ研究領域内外での交流からいくつかの共同研究に発展し、研究者個人としてだけでなく、他分野との“繋ぎ”をできる者として AD 研究内外の研究者からの注目を得ることができたことも研究者としての飛躍につながった。総じて、本さきがけ研究に採択されたことは、今後の研究者人生において、非常に有意義で実りの大きいものであった。

（2）研究総括評価（本研究課題について、研究期間中に実施された、年２回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った）。

（研究総括）

本研究では、アルツハイマー病（AD）モデルマウスとして従来使用されてきたA*β*を蓄積させるAPP過剰発現マウス（APP-Tgマウス）の欠点である種々のartifactを遺伝子ノックイン（KI）手法により克服し、新規ADモデルマウス(APP-KIマウス)の開発に成功し論文として発表した。そのインパクトは顕著であり、論文発表からわずか1年半で130件以上の共同研究に発展しており、APP-KIマウスはAD研究のための新たな世界基準ツールとなったと言えよう。Swedish変異とIberian変異を導入した第二世代、さらにArctic変異も追加導入した第三世代などのAPP-KIマウスを作出し、ヒトADにより近似したアミロイド沈着と神経炎症を呈することを確認している。神経炎症がアミロイド病理の下流に位置していることを明らかにしたが、現在さらにタウ病理も再現すべくマウスの改良を目指している。

APP-KI x Caspase-1 KOマウスを解析し、APP-Tgマウス用いた研究で報告されたADのアミロイド病理形成におけるカスパーゼ1依存性のインフラマソームの役割を否定できる結果を示し、カスパーゼ1非依存的なインフラマソームの存在が示唆された。また、APP-KIマウスの脳内で変動するサイトカイン/ケモカインを網羅的にスクリーニングし、特定した因子の影響を検討中で、これまで未解明であったAD病理の分子機構の解明につながると強く期待される。

これまでの粘り強い研究と本研究により、AD研究における新型モデルマウス（APP-KIマウス）を作出、その応用研究の成果は高く評価できる。AD研究におけるAPP-KIマウスの重要性は広く国内外に認識され始めており、企業等との共同研究を推進し、今後研究者として大きく成長する足がかりを得たと考える。

５．　主な研究成果リスト

（1）論文（原著論文）発表

1. Saito T., Matsuba Y., Mihira N., Takano J., Nilsson P., Itohara S., Iwata N. and Saido TC.: Single APP knockin mouse models of Alzheimer's disease. ***Nature Neuroscience*** 17,

661-663 (2014)
2. Nillson P., Saito T. and Saido TC.: New mouse model of Alzheimer's. ***ACS Chemical Neuroscience*** 5, 499-502 (2014)
3. Hama H., Hioki H., Namiki K., Hoshida T., Kurokawa H., Ishidate F., Kaneko T., Akagi T., Saito T., Saido TC. and Miyawaki A.: ScaleS: An optical clearing palette for biological imaging. ***Nature Neuroscience*** 18, 1518-1529 (2015).
4. Huang Y., Skwarek-Maruszewska A., Horré K., Vandewyer E., Wolfs L., Snellinx A., Saito T., Radaelli E., Corthout N., Lo AC., Van Aerschot L., Callaerts-Vegh Z., Trabzuni D., Bossers K., Verhaagen J., Ryten M., Munck S., D'Hooge R., Swaab D.F., Hardy J., Saido TC., De Strooper B. and Thathiah A.: GPR3 modulation of the amyloid plaque burden and memory in Alzheimer's disease. ***Science Translational Medicine*** 7, 309ra164 (2015)
5. Zhang H., Wu L., Pchitskaya E., Zaharova O., Saito T., Saido TC. and Bezprozanny I.: Neuronal store-operated calcium entry and mushroom spine loss in APP knock-in mouse model of Alzheimer's disease. ***Journal of Neuroscience*** 35, 13275-13286 (2015)

（2）特許出願

研究期間累積件数：0 件

（3）その他の成果（主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等）

＜学会発表＞

1. Alzheimer Association International Conference（シンポジウム）：2013 年 7 月 15 日（Boston, USA）「Update of novel type and more relevant mouse models for Alzheimer's disease」
2. 日本認知症学会（シンポジウム）：2015 年 10 月 4 日（青森）
「アルツハイマー病研究に資するモデルマウスの開発と応用」
3. BMB2015（ワークショップ）：2015 年 12 月 4 日（神戸）：オーガナイザー
「アルツハイマー病における神経炎症制御」

＜受賞＞

1. 文部科学大臣表彰・若手科学者賞（2013 年 4 月 8 日・東京）
「アルツハイマー病の病態発症・促進機構に関する研究」
2. 日本認知症学会・学会賞（2015 年 10 月 3 日・青森）
「アルツハイマー病研究に資するモデルマウスの開発と応用」

＜著作物＞

1. 斉藤貴志「アルツハイマー病に対する創薬」臨床化学 43, 185-190 (2014)
2. 斉藤貴志、西道隆臣「アルツハイマー病研究の今後の展望」基礎老化研究 38, 19-24 (2014)
3. 斉藤貴志、西道隆臣「アルツハイマー病のモデルマウス」日本薬理学会誌 144, 250-252 (2014)

4. 斉藤貴志「アルツハイマー病における慢性炎症制御」別冊 BIO Clinica 慢性炎症と疾患 4, 85-90 (2015)

＜プレスリリース＞

1. 「次世代型アルツハイマー病モデルマウスの開発に成功 ーアルツハイマー病研究に資する新規リソース基盤にー」(2014 年 4 月)http://www.riken.jp/pr/press/2014/20140414_1/
2. JST news 明日へのトビラ「アルツハイマー病の新モデルマウスをつくる」(2014 年 11 月) http://www.jst.go.jp/pr/jst-news/pdf/2014/2014_11.pdf

＜報道媒体への掲載＞

1. 日研産業新聞 「アルツハイマーのマウス 理研が作製 治療・診断法研究に道」(2014 年 4 月 14 日)
2. 毎日新聞 「アルツハイマー病マウス新開発 脳の症状再現 薬研究に期待」(2014 年 4 月 15 日)
3. 日経バイオテク(net) 「理研 BSI が次世代型アルツハイマー病モデルマウス、APP ノックインで AD 患者に近い病理」(2014 年 4 月 14 日)
4. サイエンスポータル 「アルツハイマー病の新しいマウス作製」(2014 年 4 月 14 日) http://scienceportal.jst.go.jp/news/newsflash_review/newsflash/2014/04/20140414_01.html
5. 科学新聞 「次世代型アルツ病モデルマウス開発」(2014 年 4 月 18 日・第一面トップ記事)
6. 日刊工業新聞 「アルツハイマー動物」(2014 年 4 月 22 日)

合わせ多数

研　究　報　告　書

「炎症の制御に基づく心不全の予防と治療」

研究タイプ：通常型
研究期間：　平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月
研　究　者：　佐野　元昭

1．　研究のねらい

医工学技術の進歩にともなって様々な医療機器が開発され、冠動脈疾患や心臓弁膜症に対するカテーテル治療、不整脈に対するペースメーカーや除細動器の植え込みなど、まさにこの分野における循環器病学は成熟期を迎えようとしている。一方で、心不全に対する薬物療法は遅れており、未だ、根治的な治療法が存在しないというのが現状である。心不全とは，“慢性の心筋障害により心臓のポンプ機能が低下し、末梢主要臓器の酸素需要量に見合うだけの血液量を拍出できない状態であり、肺や体静脈系にうっ血を来たした病態”と定義される。労作時呼吸困難、息切れ、尿量減少、四肢の浮腫、肝腫大等の症状の出現により生活の質的低下が生じ、日常生活が著しく障害される。日本には200万人の心不全患者がおり、毎年20万人の心不全患者が亡くなっている。心不全患者の 1 年以内の再入院率は 35%と極めて高い。5 年生存率は、進行癌と同じ程度に悪いというのが現状である。心不全はすべての心疾患の終末的な病態で、その原因疾患は、高血圧、心筋梗塞、肥満・糖尿病、加齢など様々である。現在の心不全治療は、心不全をひとつの疾患として捉えて、心不全の病態を説明する 3 つの概念、体液の貯留、血行動態の異常、神経体液性因子の異常に基づく臓器間コミュニケーション障害に対して、利尿剤、強心薬や血管拡張薬、β受容体遮断薬やレニン・アンジオテンシン系阻害薬、ミネラルコルチコイド受容体拮抗薬が使用されている。これらの治療によって、心不全患者の生命予後は改善されたが、一過性の機能的回復を果たすだけで、決して心不全を治してはいない。癌の治療戦略の最近 10 年間の変化と同様に、心不全治療は、それぞれの病型ごとに分子標的を定めて個別化医療を提供することが求められる時代が来ると考える。我々は、心不全治療の分子標的のひとつとして炎症に着目した。心不全を引き起こす心血管疾患の背景に存在する炎症に関わる細胞、分子機構を明らかにすることによって免疫調節療法の標的を探索し、心不全の予防と治療の開発につながる細胞、分子標的を明らかにすることを目的とした。

2．　研究成果

（1）概要

冠動脈が閉塞すると心筋に血液（酸素）が全く供給されなくなるため、心筋細胞の壊死すなわち心筋梗塞が起こる。心筋梗塞後の創傷治癒過程には様々な免疫細胞が関与するが、炎症が遷延化すれば創傷治癒過程が長引き、心臓のポンプ機能が低下して心不全の病態に陥る。樹状細胞（DC）は、マクロファージの機能を制御する事によって、心筋梗塞後の損傷治癒過程を促進させて心不全発症を抑制する方向に作用すること、一方、γδT 細胞は、心臓における主たる IL-17 分泌細胞として心筋梗塞後の炎症の遷延化過程に関与していることを明らかにした。心筋梗塞急性期に、肺内で液体成分がたまるため肺のガス交換が障害されて、低酸素血症となり、呼吸困難が現れる。これは、心筋梗塞によって左心室から全身へ血液を送り出す力が低下し血

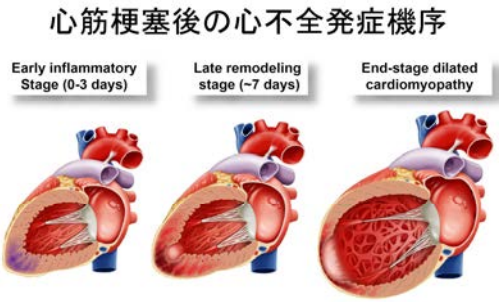
液が肺に過剰に貯留することが原因と考えられてきた。我々は、心筋梗塞後の呼吸困難は、心筋梗塞後に異常に活発になった好中球が、肺微小循環に捕らえられて停滞し、肺の血管内皮細胞を傷害する結果、血液内の液体成分が肺内にしみ出すことも原因となること、肺の中に存在するNK（ナチュラルキラー）細胞はIL-10の分泌を介して、好中球による肺の血管内皮細胞傷害を抑制していることを発見した。以上の結果は、心筋梗塞後の炎症過程の制御が、心不全の発症を予防すること、心不全に伴う呼吸困難を緩和することが可能であることを示唆している。

魚油に多く含まれるエイコサペンタエン酸（EPA）やドコサヘキサエン酸（DHA）などのオメガ 3 脂肪酸は、ヒトを含む哺乳類は体内で生成できず、食べ物から摂取することで心不全を予防する効果があることが疫学的に証明されている。東京大学大学院薬学部衛生化学教室との共同研究で、オメガ 3 脂肪酸の心不全予防効果には心臓に存在するマクロファージの機能が重要であること、また、マクロファージが生成するEPA由来の18-HEPEが炎症や線維化を抑制して、心不全に対する予防効果を発揮していることを明らかにした。

急性大動脈解離とは、大動脈の内側に亀裂が入り、その裂け目から血液が大動脈の壁を裂いて壁内に流れ込む病気で、急性心筋梗塞とならんで、すぐに対処が必要な循環器の救急疾患である。我々は、新規急性大動脈解離モデルマウスを用いて、大動脈解離発症後の血管炎症のしくみを経時的に解析することで、大動脈解離発症後、血管壁の外膜側に浸潤してきた好中球が産生するIL-6を介して大動脈解離発症後に血管壁の構造をさらに傷害し、解離の進展と拡大、破裂を引き起こしていることを発見した。この成果をもとに、好中球表面の CXCR2 受容体を介するシグナルをブロックして骨髄からの好中球動員を抑制するか、IL-6 のシグナルをブロックすることによって、大動脈解離発症後の生存率が改善できた。急性大動脈解離の急性期に血管の炎症を抑える治療は、予後の改善につながることが期待される。

（2）詳細

研究テーマ A　心筋梗塞後の損傷治癒過程における免疫細胞のダイナミックスと役割の解明

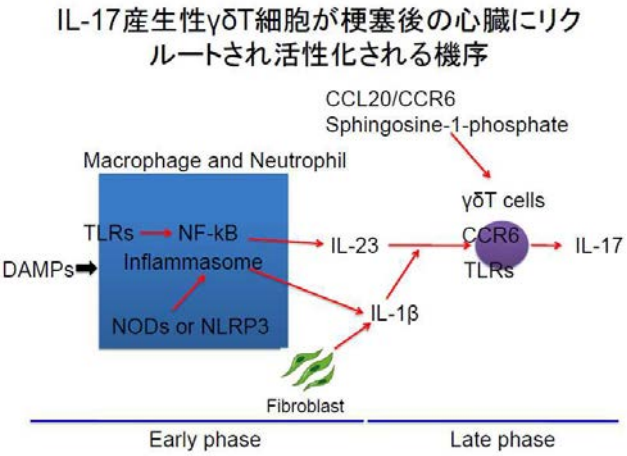


心筋梗塞に対する再灌流療法の発達は、急性期死亡率を劇的に低下させたが、重症例の救命によって梗塞後左室リモデリングによる慢性心不全の有病率をむしろ増加させるというパラドックスを生み大きな問題となっている。心筋梗塞後の組織修復の過程には免疫応答の賦活化とそれに付随した炎症反応が不可欠であるが、これらが一度過剰になると非梗塞部位における炎症性細胞の持続的浸潤を招き、心筋細胞の死、間質の線維化による心臓全体の組織構築の変化を進展させ、心不全を発症させる。我々はこれまで心筋梗塞後に血液中の炎症マーカーである CRP 値が高度上昇を続ける症例は心破裂または心室瘤の予測因子であることを報告してきた（Circulatioin 1997, Cardiology 2003, J Cardiac Fail 2010）。一方では MI 後の炎症をステロイドによって抑制すると、かえって創傷治癒の遅延を招き、心破裂の発生を増加させることも知られている（Am J Cardiol 1987）。MI 後の免疫応答は、組織障害と創傷治癒という二面性を併せ持ち、この二者を制御する機構は未だ不明であり、これらが明らかとなれば、MI 後の心不全を予防する免疫学的治療介入が可能となると考えられる。マウスの冠動脈左前下降枝をしばって血

流を遮断するとMIが完成するが、MI後7-14日以降からMI部の進展に加え非MI部の肥大、拡大、残存心筋の収縮力の低下といった心筋リモデリングが進行してくる。我々は、パーコール密度勾配遠心とFACSを用いて心臓組織内に浸潤している白血球(CD45^{+} 陽性細胞)を効率良く単離する方法を樹立した(J Mol Cell Cardiol. 2013)。

樹状細胞(Dendritic cell:DC)の心筋梗塞後左室リモデリングにおける役割を、ジフテリア毒素(DT)によってCD11c陽性細胞すなわちDCを選択的に除去できるCD11c-DTRマウスの骨髄を放射線照射後の野生型(WT)マウスに移植した骨髄移植モデルを用いて検討した。DTを投与したDC-ablationマウスでは梗塞後心筋にDCの浸潤を認めず、左室リモデリングが増悪し梗塞後28日後の心臓収縮機能の悪化が観察された。DC-ablationマウスではday7の梗塞部位でLy6c^{high} monocyte/macrophageの浸潤が増加し、IL-1β、TNFα、CCL2などの向炎症性サイトカインの発現亢進、MMP-2やMMP-9の活性化が観察され、反対にLy6c^{low} monocyte/macrophageの浸潤が減少し、抗炎症性サイトカインのIL-10の発現は低下していた。DC-ablationマウスに心筋梗塞を作製してWT-BMDC (Bone marrow-derived DC)のadoptive transferを行い、左室リモデリングの増悪がDCを除去したことによることを確認した(Circulation.2012)。

脳や心臓の領域で梗塞後に起こる炎症が梗塞巣の拡大に寄与することが報告されはじめ、トピックスとなっている。研究計画1では炎症過程を終焉に向かわせる機序の解明を進めたが、ここでは、梗塞後亜急性期以降活性化されて梗塞巣の拡大、非梗塞部位の線維化を介して心臓リモデリングに寄与している免疫細胞の検討を行った。その結果、好中球やマクロファージから放出されるIL-23がγδT細胞からのIL-17の産生を誘導して心不全を増悪させることを発見した(J Am Heart Assoc. 2012)。IL-17産生細胞は臓器や病態によってさまざまであるが、心筋梗塞後には90%以上γδT細胞からIL-17が分泌される。IL-17-KOマウスやTCRγδ-KOマウスでは、梗塞後2日目でMMP1,3,9, MCP-1, TNFα, IL-1β, IL-6の発現は野生型マウスと差がない。この結果は、IL-17産生性γδT細胞は梗塞早期の炎症、すなわち損傷治癒機転には影響を及ぼさないことを意味する。一方で、梗塞後7日目以降では、IL-17はCXCL1を介して好中球の浸潤を遷延化させ、マクロファージに対しては、向炎症性(M1)>損傷治癒(M2)へ傾かせ、線維芽細胞に対しては増殖、collagen産生を促進させ、炎症の慢性化、臓器の破壊を促進させる方向に作用している。急性期の炎症反応(＝損傷治癒機転)には影響を及ぼさず、急性期を脱したあとの炎症の遷延化過程に深く関与するIL-17産生性γδT細胞は心筋梗塞後の心不全発症予防の治療標的として非常に有望である。



NKの活性化に必須なNKp46のプロモーターの下流にジフテリア毒素受容体(DTR)を組み込んだ遺伝子改変マウス(NKp46-DTR-EGFPマウス)はジフテリア毒素DTの投与によってNK細胞を選択的に除去できる(Proc Natl Acad Sci U S A. 2007)。NKp46-DTR-EGFPマウスにジフテリア毒素(DT)を投与してNK細胞を除去後(NK-ablationマウスにJ心筋梗塞を作製して検討

を行った結果、NK-ablation マウスは、心筋梗塞後急性期に高率で死亡することが、不整脈による突然死、心破裂は否定的であった。NK-ablation マウスはコントロールマウスと比較して梗塞後の呼吸速迫状態（肺水腫）が遷延することに気づいた。

心筋梗塞後に異常に活発になった好中球が、肺微小循環に捕らえられて停滞し、肺の血管内皮細胞を傷害する結果、血液内の液体成分が肺内にしみ出すために低酸素血症（呼吸困難）を引き起こす。これには、心筋梗塞巣から分泌される IL-1β が関与していた。一方、肺の中に存在するNK（ナチュラルキラー）細胞が、免疫反応を沈静化する抑制性サイトカインIL-10を産生することによって、肺の血管内皮細胞のバリアー機能を維持し、血管内から肺組織への好中球の侵入を抑制していることが明らかにした（Circ Res 2014）。

研究テーマ B　オメガ 3（ω3）脂肪酸の心不全予防効果の分子機序の解明

EPA やドコサヘキサエン酸（DHA）に代表される ω3 脂肪酸は、多くの介入試験によって、心不全や心筋梗塞後の予後を改善し、心血管保護効果があることが示されている。しかし、その作用機構については依然不明な点が多く、我々はこの ω3 脂肪酸が有する心血管保護効果の分子機構の解明を目的とし研究を開始した。

哺乳動物は ω3 脂肪酸を体内で生合成することができないため、過去の研究では食餌として ω3 脂肪酸を与え、体内の脂肪酸バランスを ω3 脂肪酸優位に調節していた。この方法では細胞・組織レベルでの脂肪酸バランスの意義について解析することができず、分子生物学的な介入が困難なため、ω3 脂肪酸の心血管保護機構の研究において大きな障壁となっていた。線虫 *C. elegance* に存在する ω3 脂肪酸合成酵素 fat-1 を全身に発現させた fat-1 Tg マウスは、哺乳動物でありながら ω3 脂肪酸を体内で積極的に生合成することができ、主に炎症性疾患や癌に対して強い抵抗性を示すことが報告されている。この fat-1 Tg マウスを用いることで、ω3 脂肪酸が有する心血管保護効果の分子機構の解明を細胞レベルで解明することを試みた。

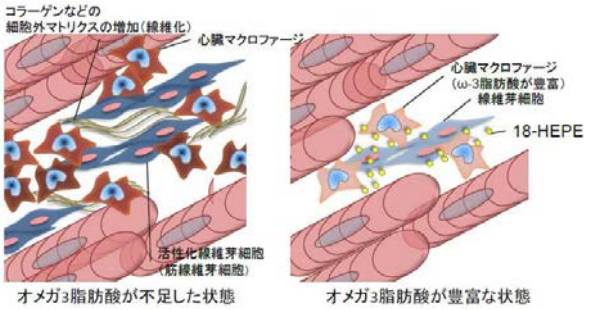
まず、fat-1 Tg マウスに圧負荷心肥大・心不全を誘導する大動脈縮窄術（Transverse Aortic Constriction: TAC）を行ない、経時的に心機能および組織変化を解析した。心筋細胞の肥大化の程度については、野生型マウスと fat-1 Tg マウスの間に有意差は認められなかったが、間質の線維化および炎症細胞（主にマクロファージ）の集積は、fat-1 Tg マウスにおいて野生型に比べ有意に減少しており、それに伴い圧負荷による心機能低下についても fat-1 Tg マウスで顕著に抑制されていた。α-SMA 陽性の筋線維芽細胞（活性化した線維芽細胞）も野生型に比べ fat-1 Tg マウスで明らかに減少しており、IL-6, CCL2, CCL3, CCL5, CX3CL1 といったサイトカイン、ケモカインの産生が亢進も fat-1 Tg マウスでは野生型に比べ減少していた。

fat-1 Tg マウスの心臓が獲得した圧負荷に対する抵抗性は、心筋細胞が ω3 脂肪酸優位になることによるのか、あるいは、圧負荷によって心筋組織内で増加する炎症細胞が ω3 脂肪酸優位になることが重要なのかを明らかにするために、骨髄移植実験をおこなった。野生型、fat-1 Tg マウスをそれぞれドナー、レシピエントにもつ 4 通りの骨髄移植キメラを作成した上で、TAC で圧負荷心不全を誘導し表現型の解析を行なった。その結果、fat-1 Tg マウスの骨髄を野生型に移植したキメラ（fat-1→WT）は、fat-1 Tg マウス(fat-1→fat-1)とほぼ同等の圧負荷に対する抵抗性を獲得しており、反対に野生型の骨髄を fat-1 Tg マウスに移植したキメラ（WT→fat-1）では、野生型マウス（WT→WT）と同等にリモデリングが進行した。すなわち、心筋細胞ではなく、骨髄

由来細胞（主にマクロファージ）がω3 脂肪酸優位になることが心臓保護効果にとって重要であることが明らかになった。

次に心筋組織中のマクロファージが ω3 脂肪酸優位になることによって圧負荷ストレス存在下で心筋線維化が抑制される分子機序について研究を進めた。マクロファージと心臓線維芽細胞を共培養すると、心臓線維芽細胞が活性化されIL-6 産生が亢進する。fat-1 Tg マクロファージのコンディションメディウムは野生型マクロファージのコンディションメディウムと比較して心臓線維芽細胞からの IL-6 産生活性が低かった。野生型マクロファージと fat-1 Tg マクロファージの遺伝子発現様式に差は認めなかったため、野生型マクロファージと fat-1 Tg マクロファージから産生される脂肪酸代謝物を網羅的に解析した。その結果、fat-1 Tg マクロファージ培養上清中に EPA 代謝物 18-hydroxy eicosapentaenoic acid (18-HEPE) が特徴的に増加していることを見出した。fat-1 Tg マウスの心臓組織でも 18-HEPE は野生型の心臓組織と比較し有意に高く、また骨髄細胞が fat-1 Tg マウス由来のキメラの心臓において選択的に 18-HEPE が高いことから、骨髄由来細胞（マクロファージ）が主に 18-HEPE を産生していることが確認できた。18-HEPE は用量依存性に、培養心臓線維芽細胞の IL-6 産生を抑制し、大動脈縮窄術を施した野生型マウスに 18-HEPE を腹腔内投与すると、心臓線維化や心機能低下に対し著明な抑制効果を認めた。以上から、ω3 脂肪酸の心血管保護効果において、心臓マクロファージが ω3 脂肪酸優位になることが重要であり、ω3 脂肪酸優位となった心臓マクロファージから分泌される18-HEPE が「マクロファージと線維芽細胞間の細胞間コミュニケーションを介した心筋線維化機構」を遮断しているというマシナリーが考えられた（図）。興味深いことに、EPA を経口摂取した人の末梢血液中において 18-HEPE が上昇していることが確認された。18-HEPE、あるいは、18-HEPE 受容体アゴニストが、線維化抑制剤として、有望であると考えられた。

ω-3脂肪酸の心臓リモデリング抑制作用のメカニズム



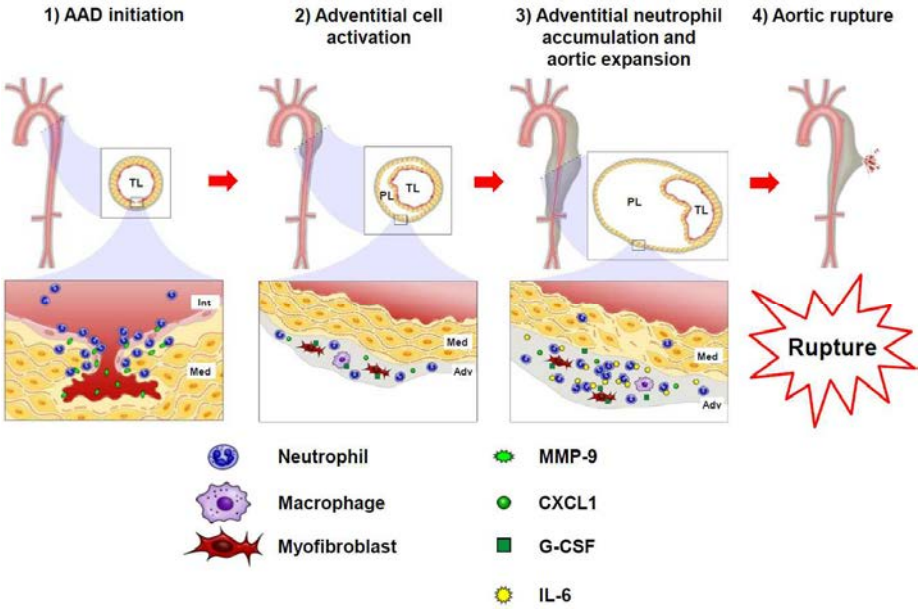
研究テーマ C　急性大動脈解離発症後に解離の進展と拡大、破裂へと導く分子機序の解明

急性A型大動脈解離は、極めて予後不良な疾患で緊急手術、すなわち、内膜に裂け目のある上行大動脈置換術が施行される。一方で、急性 B 型大動脈解離は急性 A 型大動脈解離よりも自然予後が良いため、内科療法が初期治療として選択されることが一般的である。合併症のない急性 B 型大動脈解離の場合、内科療法による 30 日間の死亡率あるいは院内死亡率は約 10%と報告されているのに対して、外科治療の成績も同等であるため、急性期は降圧を中心とした保存的療法で経過をみるのが適切である。しかし、破裂を含めた合併症の危険性はゼロではなく、注意しながら経過観察する必要がある。

我々が用いた大動脈解離モデルは、アンジオテンシンⅡを投与した数時間後に下行大動脈近位部において大動脈解離がはじまり、時間経過とともに遠位側に広がり、解離した下行大動脈径も時間とともに拡大し、アンジオテンシンⅡを投与 48 時間後には、約 70%のマウスが解離した大血管の破裂で死亡した。

この大動脈解離モデルマウスを用いて、大動脈解離発症後の血管炎症のしくみを経時的に解析した。解離後の脆弱化した血管壁の伸展によって、外膜側の細胞において好中球走化性因子 CXCL-1/G-CSF の発現が亢進する。CXCL-1/G-CSF は血液中を流れて骨髄に到着すると、骨髄から末梢血液中への好中球の動員を促す。好中球は、解離した血管の外膜側に浸潤し、局所で IL-6 を産生して血管壁の外から内に向かって血管の炎症を引き起こすことを明らかにした。

CXCR2 は CXCL1 の受容体で、好中球に発現しその炎症性の動員において中心的な役割を担うことが知られている。我々は、中和抗体を用いて、CXCR2 受容体シグナルを遮断することによって、大動脈解離発症後の解離の進展と拡大、破裂を抑制して、生存率を改善できることを大動脈解離マウスモデルにおいて証明した。同様に、全身の IL-6 欠損アウトマウスでも、動脈解離発症後の解離の進展と拡大、破裂を抑制して、生存率を改善できることを確認した。患者においても、大動脈解離後には、外膜側への好中球浸潤や血液中 CXCL8 （マウスの CXCL1 に相当）、G-CSF、IL-6 濃度の上昇が観察されたことから、大動脈解離後の血管炎症の仕組みは、我々のマウス大動脈解離モデルと急性大動脈解離の患者で共通している可能性が示唆された。



3.　今後の展開

心不全の治療は時代とともに変遷を遂げてきた。1940 年代からは臓器のうっ血、1960 年代からは心ポンプ機能不全を標的とした治療が試みられてきたが予後を改善させるには至らなかった。1980 年代からはレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系や交感神経系といった神経体液性因子の過剰な活性化に注目が集まり、これらを遮断する治療が臨床的にも効果を発揮し心不全患者の予後を改善させた。折しも、循環器領域の基礎研究に分子生物学的手法が導入され、神経体液性因子の過剰な活性化が心不全を発症させる分子機序について様々な角度から検証がなされてきた。我々もこれまで神経体液性因子や血行力学的負荷による心筋細胞のシグナル伝達 (Circ Res. 1997,1998, 1999, 2000, 2001)、遺伝子発現制御(Nat Med 2002, Am J Physiol 2009, J Clin Invest 2009)、心筋細胞と非心筋細胞（線維芽細胞、神経細胞）の解剖学的・機能的クロストーク(J Biol Chem 2000, Circulation 2006, Nat Med 2007, J Clin Invest 2010)、レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系の活性化の機序 (Circ Res 2010, Arterioscler Thromb Vasc Biol.

2012)、ミトコンドリアバイオジェネシス (EMBO J 2004, Circ Res 2004, Cell Metabolism 2004, 2005, J Biol Chem 2007)、抗酸化ストレス応答のメタボローム解析 (Circ Res 2008, 2009, J Mol Cell Cardiol 2010, Circ J 2010)、心筋再生 (J Clin Invest 1999, Circulation 2001, Nature Methods 2010, Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2010) に関する研究を続けてきた。最近 20 年間の研究で、心筋細胞の肥大、機能不全や死に至る分子機序が解明されてきたが、心不全の予防や治療につながる創薬の実現にまでは至っていない。この結果は、心筋細胞のみを標的とした研究の限界を意味している。本さきがけ研究で実態の一端を明らかにしてきたように、心不全の病態には神経体液性因子だけでなく免疫系の異常な活性化が深く関与しており、ストレス下の心臓における免疫系の過剰な活性化の仕組みを理解する努力を今後も続けて行きたい。併せて、海外での学会で積極的に研究成果をアピールして、この領域におけるオピニオンリーダーになることをめざしたい。

4. 評価

(1)自己評価

(研究者)

心不全はすべての心疾患の終末像であり日本人の主たる死亡の原因となっている。高齢化社会と食生活の欧米化によって心不全患者は増加の一途をたどっている。心不全は生命予後が不良であるだけでなく、肺うっ血による呼吸困難により生活の質(Quality of life)を著しく低下させる。従来の神経体液性因子の阻害、利尿剤だけでは、心不全の予防、治療には不十分であり、免疫学的介入による新規心不全治療法の開発に期待がよせられている。本研究では、まず、心不全の原因として最も重要な心筋梗塞による心不全モデルを用いて、心筋梗塞後の炎症過程を終焉に向かわせ心不全を予防する機序(樹状細胞やマクロファージ)、梗塞後亜急性期以降活性化されて心不全を増悪させる機序 (IL-17 産生 γδT 細胞)、心不全に基づく肺水腫(血液中の水分が肺の血管外に漏れ出して肺胞の中にたまる状態)の制御機構(NK 細胞)を明らかにした。これらの成果は、心筋梗塞後心不全の予防や治療、創薬につながることが期待される。また、ω3 脂肪酸 EPA の代謝産物 18-HEPE が、心臓線維化を抑制する新規の生理活性脂質であることを有田誠さきがけ研究者との共同研究で発見し、生理活性脂質の研究領域の発展にも貢献した。また、内科的治療法が対症療法しかない急性大動脈解離に対しても好中球やサイトカイン (IL-6) を標的とした分子標的療法が合併症の予防に有効である可能性を示すことが出来た。

これまで 20 年間心不全の病態解明に関する研究を、主として心筋細胞に焦点を当てて研究を行ってきたが、このさきがけ研究を通じて、間質での炎症、免疫応答に関する研究体制を構築、成熟させることができ、より多面的な解析が可能になった。

さきがけ研究を通じて、多くの免疫研究の専門家との交流の機会を得て、日本免疫学会、日本臨床免疫学会のシンポジウムで研究成果を発表する機会も得た。

(2)研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

本研究で、心不全に至るリスク因子である肥満・高血圧や心筋梗塞、大動脈解離の病態に

おける分子治療標的探索のフィールドとして炎症反応に着目し、各種のマウスモデルを駆使して、次のような目覚ましい成果をあげた。1)心筋梗塞後の創傷治癒過程において樹状細胞がマクロファージの機能を制御することにより治癒過程を促進させて心不全発症を抑制する。一方 γδT 細胞は心臓における主たる IL-17 分泌細胞として心筋梗塞後の炎症の遷延化過程に関与している。2)心筋梗塞急性期に呼吸困難（低酸素血症）を引き起こす肺内の液体成分の貯留に、肺微小循環にトラップされ異常に活性化した好中球による肺の血管内皮細胞傷害が関与する。NK 細胞は IL-10 を分泌し、好中球による肺の血管内皮細胞傷害を抑制する。3)心不全を予防する効果があることが疫学的に証明されている、オメガ 3 脂肪酸の効果として、マクロファージが生成する EPA 由来の 18-HEPE が炎症や線維化を抑制し、心不全に対する予防効果を発揮する。4)大動脈解離発症後に脆弱化した血管壁の伸展により外膜側の細胞において好中球走化性因子 CXCL-1/G-CSF の発現が亢進し、外膜側に浸潤した好中球が IL-6 を産生して血管壁の外から内に向かって血管の炎症を引き起こすが、この現象が急性大動脈解離の患者で共通している可能性があることなどを明らかにし、発表している。

本さきがけ研究で、心不全の病態には神経体液性因子だけでなく免疫系の異常が深く関与していることを明らかにした。臨床医として患者に接しながら、既存の治療薬のターゲットとは全く異なる視点を有する独創性の高い研究成果であり、国内では既に衆目の認めるところである。今後、海外にもさらに研究成果をアピールして、この分野におけるオピニオンリーダーになることを期待している。

5. 主な研究成果リスト

（1）論文（原著論文）発表

Anzai A, Shimoda M, Endo J, Kohno T, Katsumata Y, Matsuhashi T, Yamamoto T, Ito K, Yan X, Shirakawa K, Shimizu-Hirota R, Yamada Y, Ueha S, Shinmura K, Okada Y, Fukuda K, Sano M.
Adventitial CXCL1/G-CSF expression in response to acute aortic dissection triggers local neutrophil recruitment and activation leading to aortic rupture.
Circ Res. 2015 Feb 13;116(4):612-23.

Endo J, Sano M, Isobe Y, Fukuda K, Kang JX, Arai H, Arita M.
18-HEPE, an n-3 fatty acid metabolite released by macrophages, prevents pressure overload-induced maladaptive cardiac remodeling.
J Exp Med. 2014 Jul 28;211(8):1673-87.

Yan X, Hegab AE, Endo J, Anzai A, Matsuhashi T, Katsumata Y, Ito K, Yamamoto T, Betsuyaku T, Shinmura K, Shen W, Vivier E, Fukuda K, Sano M.
Lung natural killer cells play a major counter-regulatory role in pulmonary vascular hyperpermeability after myocardial infarction.
Circ Res. 2014 Feb 14;114(4):637-49.

Yan X, Shichita T, Katsumata Y, Matsuhashi T, Ito H, Ito K, Anzai A, Endo J, Tamura Y, Kimura K,

Fujita J, Shinmura K, Shen W, Yoshimura A, Fukuda K, Sano M.
Deleterious effect of the IL-23/IL-17A axis and γδT cells on left ventricular remodeling after myocardial infarction.
J Am Heart Assoc. 2012 Oct;1(5):e004408.

Yan X, Anzai A, Katsumata Y, Matsuhashi T, Ito K, Endo J, Yamamoto T, Takeshima A, Shinmura K, Shen W, Fukuda K, Sano M.
Temporal dynamics of cardiac immune cell accumulation following acute myocardial infarction.
J Mol Cell Cardiol. 2013 Sep;62:24-35.

（2）特許出願
研究期間累積件数：3 件

1.
発　明　者：佐野元昭、安西淳
発明の名称：大動脈解離後の全身性炎症反応に対する分子標的療法の開発
出　願　人：慶應大学
出　願　日：2014 年 12 月 9 日
出 願 番 号：PCT/JP2014/083066

2.
発　明　者：佐野元昭、白川公亮
発明の名称：加齢関連疾患の治療のための、PD-1 を標的とする分子標的薬剤
出　願　人：慶應大学
出　願　日：2014 年 3 月 20 日
出 願 番 号：特願 2014-058581

3.
発　明　者：大陽日酸㈱、慶應大学（佐野元昭、林田敬）
発明の名称：医療用水素混合ガス供給装置
出　願　人：大陽日酸㈱
出　願　日：2013 年 8 月 8 日
公 開 番 号：WO2014/024984

大陽日酸㈱が単独で出願を行い、特許登録されたが、慶應の貢献度があり、共同研究契約に基づき共有とした。

（3）その他の成果（主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等）
主要な学会発表
講演1 発表題名　Immunosenescence and immunometabolism “Immunosenescence and Metabolic disorder”
学会・会議・シンポ名称　The Japanese Society for Immunology
実施日　12/10/2014
開催場所　Kyoto, Japan

講演の種類　　招待講演

講演 2 発表題名　　"Near Future of Cardiovascular Medicine
学会・会議・シンポ名称　　Seminer series on nutrition and metabolism
実施日　9/18/2015
開催場所　　Shanghai, China
講演の種類　　招待講演

講演3 発表演題　　Diabetes and Heart Failure ~The Joint Risk~
学会・会議・シンポ名称　　日本循環器病学会学術集会
AHA-JCS Joint Symposium
実施日　4/26/2015
開催場所　　大阪
講演の種類　　招待講演

講演 4 発表演題　　急性大動脈解離後の全身性炎症反応の分子機序の解明
学会・会議・シンポ名称　　日本臨床免疫学会総会
シンポジウム　慢性炎症と自己免疫疾患
実施日　10/22/2015
開催場所　　神戸
講演の種類　　招待講演

講演 5 発表演題　　肥満によって加速される免疫老化の分子機序の解明
学会・会議・シンポ名称　　日本分子生物学会年会
ワークショップ　生活習慣病の基盤にある代謝・免疫・老化クロストーク
実施日　12/3/2015
開催場所　　神戸
講演の種類　　招待講演

受賞

受賞１　心不全学会学術賞（平成 26 年度）
受賞２　日本臓器保存生物医学会研究奨励賞（平成 27 年度）
平成 27 年 11 月 13 日受賞

プレスリリース

2015 年 1 月 7 日
急性大動脈解離発症後の血管炎症のしくみを解明
-解離の進展と拡大、破裂を予防する新たな治療法に期待-

2013 年 12 月 24 日
NK 細胞による肺血管透過性制御機能を発見
　ー心不全患者の呼吸困難を改善する新たな治療法開発へー

2014 年 11 月 24 日
NHK
-心停止後の脳へのダメージ　水素が抑制-

研　究　報　告　書

「代謝ストレスによる炎症の慢性化機構の解明」

研究タイプ：通常型
研究期間：　平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月
研　究　者：　菅波孝祥

1.　研究のねらい

脂肪組織は余剰のエネルギーを中性脂肪として蓄積するのみならず、多くのアディポサイトカイン（アディポカイン）を産生・分泌する内分泌器官として多彩な生命現象に関与する。内臓脂肪型肥満を背景として発症するメタボリックシンドロームの病態形成に炎症性サイトカインや免疫担当細胞が関与することがよく知られているが、肥満の脂肪組織そのものも慢性炎症性変化（脂肪組織炎症）をきたすことが明らかになった。能動的な炎症収束起点が働く急性炎症と異なり、慢性炎症では、種々のストレスに対する実質細胞と間質細胞の複雑な相互作用が持続し、ダイナミックな形態的変化（組織リモデリング）を介して組織機能障害に至る。実際、肥満の脂肪組織では、脂肪細胞の肥大化、血管新生、多彩な免疫担当細胞の浸潤、細胞外マトリックスの過剰産生などが認められ（脂肪組織リモデリング）、動脈硬化における血管壁リモデリングと酷似している。このような脂肪組織炎症の結果、アディポサイトカイン産生調節（内分泌機能）や脂肪蓄積能（代謝機能）が障害され、全身の糖脂質代謝異常や臓器機能不全が生じると想定される。即ち、アディポサイトカインや遊離脂肪酸をメディエーターとする複雑な臓器代謝ネットワークにより、脂肪組織から全身臓器に慢性炎症が波及・拡大すると捉えることができるが、その実態や分子機構は未だ不明の点が多い。

一方、個々の細胞における炎症の慢性化機構も十分に分かっていない。例えば、遊離脂肪酸は脂肪組織に由来する脂質アディポサイトカインであり、特に飽和脂肪酸による慢性炎症が注目されている。しかしながら、脂肪酸の作用は複数の受容体や種々の中間代謝産物を介するなど一様ではない。また、脂肪酸の量的変化のみならず、鎖長や不飽和度などの質的変化がメタボリックシンドロームの病態形成に重要であることも報告されている。本研究では、「遊離脂肪酸の流れ」に注目し、メタボリックシンドロームにおける炎症遷延化の分子機構の解明を目的とする。脂肪酸はメタボリックシンドロームの病態基盤である「脂肪の過剰蓄積」と「慢性炎症」を繋ぐ鍵分子であることより、本研究の成果は、様々な代謝ストレスにより惹起されるメタボリックシンドロームの分子機構の解明のプロトタイプとなり、新しい治療戦略の開発に向けた基盤技術の確立に繋がることが期待される。

2.　研究成果

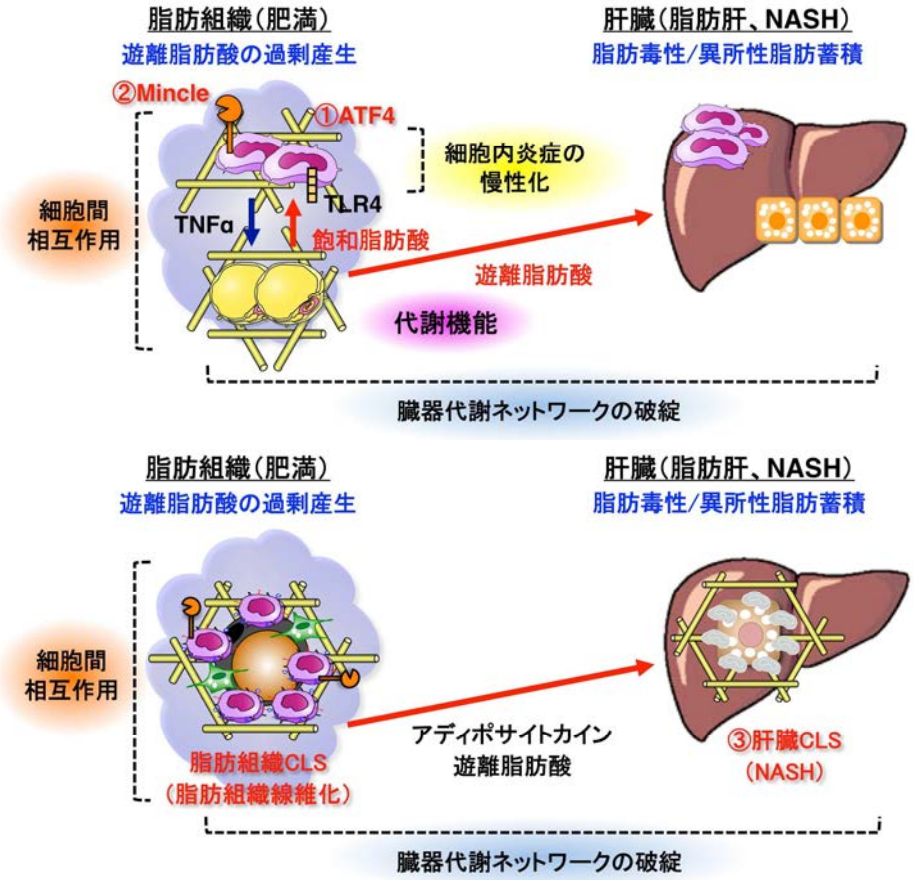
（1）概要

我々は、肥満の脂肪組織における脂肪細胞とマクロファージの細胞間相互作用により脂肪組織炎症が惹起されることを明らかにしてきた。特に、脂肪細胞に由来する飽和脂肪酸がグラム陰性桿菌に対する病原体センサーの Toll-like receptor 4（TLR4）を介してマクロファージの炎症性サイトカイン産生を誘導すること、TLR4 シグナル欠損マウスは脂肪組織炎症が軽減し、アディポサイトカイン産生調節や全身の糖代謝が改善することを見出した。本研究で

は、「遊離脂肪酸の流れ」に注目し、細胞内、細胞間、臓器間それぞれの階層におけるメカニズムが複雑に絡み合って形成されるメタボリックシンドロームの新たな分子機序を検討した。

まず、細胞内炎症の分子機構として、飽和脂肪酸が TLR4 非依存的にストレス誘導性転写因子 activating transcription factor 4（ATF4）を活性化し、炎症性サイトカインの発現を増強することを見出した。ATF4 は、interleukin-6（IL-6）のプロモーター上における直接作用と、NF-κB の核移行を促進する間接作用の両面により、IL-6 の転写を活性化した。次に、脂肪細胞とマクロファージの相互作用により誘導される脂肪組織線維化の分子機構を明らかにした。一般に、慢性炎症は組織線維化を招来するが、肥満の脂肪組織も例外ではない。病原体センサーの Mincle は、脂肪組織炎症の起点となる crown-like structure（CLS）を構成する炎症促進性マクロファージに局在し、脂肪組織線維化の主要な制御分子であることを見出した。さらに、脂肪組織線維化が、脂肪蓄積能を障害することにより遊離脂肪酸の放出を促進し、肝臓への異所性脂肪蓄積をもたらす新たな臓器連関を明らかにした。

このように、本研究において、飽和脂肪酸により誘導される細胞内炎症の慢性化機構、脂肪組織の細胞間相互作用がもたらす持続的な遊離脂肪酸の過剰産生機構、臓器代謝ネットワークの破綻による異所性脂肪の蓄積の分子機構が明らかとなり、代謝ストレスによる炎症の慢性化機構の解明に貢献した（図）。



①飽和脂肪酸-ATF4経路による細胞内炎症の分子機構（*Diabetes* 63:152-161, 2014）
②脂肪組織線維化による異所性脂肪蓄積の分子機構（*Nat. Commun.* 5:4982, 2014）
③肝臓CLSを起点とするNASH発症の分子機構（*PLoS ONE* 8:e82163, 2013）

（2）詳細

我々は、肥満の脂肪組織に浸潤したマクロファージと脂肪細胞の細胞間相互作用に注目して、脂肪組織炎症の分子機構を明らかにしてきた。特に、脂肪細胞とマクロファージが、飽和脂肪酸と tumor necrosis factor-α(TNF α)に代表される液性因子を介して相互作用することにより、vicious cycle を形成して持続的な炎症反応をもたらすことを提唱した（*Arterioscler. Thromb Vasc. Biol.*, 2005）。さらに、飽和脂肪酸がグラム陰性桿菌に対する病原体センサーの TLR4 を介してマクロファージの炎症性サイトカイン産生を誘導すること、TLR4 シグナルを欠損するマウスは脂肪組織炎症が軽減し、アディポサイトカイン産生調節や全身の糖代謝が改善することを見出した（*Arterioscler. Thromb Vasc. Biol.*, 2007）。本研究では、「遊離脂肪酸の流れ」に注目し、細胞内、細胞間、臓器間それぞれの階層におけるメカニズムが複雑に絡み合って形成されるメタボリックシンドロームの病態の新たな理解を目的とした。具体的には、飽和脂肪酸により誘導される細胞内炎症の慢性化機構、脂肪組織の細胞間相互作用がもたらす持続的な遊離脂肪酸の過剰産生機構、臓器代謝ネットワークの破綻による異所性脂肪の蓄積の分子機構を検討し、以下のような成果を得た。

A. ストレス誘導性転写因子 ATF4 による炎症制御機構に関する検討（論文 3）

TLR4 欠損マクロファージにおいても飽和脂肪酸による炎症性サイトカイン産生が認められるため、遺伝子発現アレイ解析を行ったところ、転写因子 NF-κB および ATF4 の標的遺伝子が多く含まれることを見出した。ATF4 は、小胞体ストレスや酸化ストレスな種々の代謝ストレスにより誘導される統合的ストレス応答経路（integrated stress response）の中核を成す。実際、飽和脂肪酸の添加により、ATF4 の上流である eIF2αリン酸化が TLR4 非依存性に誘導され、ATF4 の既知の下流標的である Trib3 や Chop の発現が上昇した。これに対して、一価あるいは多価不飽和脂肪酸は ATF4 経路を活性化せず、むしろ、飽和脂肪酸に拮抗的に作用した。ATF4 ホモ欠損マウスは、著しい骨格系の異常によりほとんど産仔が得られないため、ヘテロ欠損マウスを用いて ATF4 の機能的意義を検討した。ATF4 欠損マクロファージでは、飽和脂肪酸や小胞体ストレス誘導剤による炎症性サイトカインの発現が顕著に抑制されたが、LPS に対する反応は正常に保たれていた。同様の結果は、個体レベルにおいても観察され、代謝ストレスにより誘導される炎症反応において ATF4 が重要な役割を果たすことが示唆された。この分子メカニズムとして、IL-6 のプロモーター上に ATF4 がリクルートされ直接的に転写を活性化させること、ATF4 が NF-κB の核移行を促進することなど複数の機序が存在することを明らかにした。このように、代謝ストレスは ATF4 を介して TLR4 シグナルを増強する可能性があり、メタボリックシンドロームにおける意義が示唆される（図①）。

B. 病原体センサーMincle による脂肪組織線維化の分子機構に関する検討（論文 2）

脂肪組織炎症の新たな制御因子を探索する目的で、脂肪細胞とマクロファージの共培養系を用いて遺伝子発現アレイ解析を施行し、macrophage-inducible C-type lectin（Mincle）に着目した。Mincle は、結核菌や病原性真菌に対する病原体センサーであることが報告されていたが、死細胞を認識する可能性も指摘されていた。しかしながら、非感染性炎症における Mincle の意義は全く不明であった。我々は、肥満マウスおよび肥満症例の脂肪組織において

Mincle の発現が亢進し、特に、CLS を構成する炎症促進性 M1 マクロファージに局在することを見出した。Mincle 発現は飽和脂肪酸-TLR4-NF-κB 経路により誘導され、実際、TLR4 シグナルを欠損するマウスでは Mincle の発現誘導が顕著に抑制された。Mincle 欠損マウスに高脂肪食を負荷して肥満を誘導したところ、マクロファージの細胞数には変化を認めなかったが、CLS 形成や脂肪組織線維化が強力に抑制された。実際、外因性 Mincle リガンドである結核菌の構成成分、trehalose-6,6'-dimycolate（TDM）を用いてマクロファージを刺激すると、炎症性サイトカインやケモカインに加えて、TGF-βや TIMP-1 などの線維化促進分子の発現が誘導された。さらに、非肥満マウスの脂肪組織に TDM を注入したところ、CLS 形成を伴う間質線維化が認められた。従来より、CLS は脂肪組織炎症の起点となることが知られていたが、本研究により、脂肪組織局所において CLS を中心として間質線維化が生じることが初めて明らかになった（図②）。

C. 脂肪組織線維化による異所性脂肪蓄積の新たな分子機構に関する検討（論文 2）

余剰のエネルギーを中性脂肪として蓄積し、栄養欠乏状態には、遊離脂肪酸として全身臓器にエネルギーを供給することは脂肪組織の最も重要な機能（代謝機能）である。これは、主にインスリンによる脂肪合成と交感神経系を介する脂肪分解により巧妙に制御されており、このバランスが破綻すると、肝臓や骨格筋などの非脂肪組織に異所性に沈着して（異所性脂肪蓄積）、臓器の機能障害をきたす（広義の脂肪毒性）。最近、このプロセスに慢性炎症が関与するという知見が集積しつつある。例えば、肥満症例や肥満マウスにおいて、脂肪組織の線維化が異所性脂肪蓄積と正の相関を示すことが報告されている。また、脂肪組織に特徴的な VI 型コラーゲンを欠損するマウスは、高脂肪食負荷により脂肪細胞がより肥大化する一方、異所性脂肪が減少し、糖代謝も良好に保たれるという。従来、脂肪組織線維化の分子機構はほとんど明らかでなかったが、本研究により、Mincle が主要な制御分子であることが示された。実際、Mincle 欠損マウスは、脂肪肝が軽減し、肝臓のインスリンシグナルが改善していた。肝臓に蓄積する脂肪のうち、脂肪組織に由来するものは約 2/3 を占める。本研究により、異所性脂肪蓄積の新たな分子機構が明らかになった（図②）。

D. 非アルコール性脂肪肝炎（NASH）の発症機構に関する検討（論文 1, 4）

NASH はメタボリックシンドロームの肝臓における表現型と考えられ、予後良好の単純性脂肪肝と異なり、一定の割合で肝硬変や肝細胞癌に進行するため、その対策は喫緊の課題である。しかしながら、その発症機構は未だ不明の点が多く、特に、どのような症例が単純性脂肪肝から NASH へと進展するのか、現時点では全く予測できない。最近、我々は、中枢性の摂食調節に重要なメラノコルチン 4 型受容体（MC4R）を欠損するマウスに高脂肪食を負荷することにより、肥満やインスリン抵抗性を背景に、脂肪肝、NASH、肝細胞癌を経時的に、ほぼ 100%の確率で発症する新しい疾患モデルを確立した（*Am. J. Pathol.*, 2011）。本モデルの肝病理組織を解析していたところ、肥満の脂肪組織における CLS と類似の組織像（肝臓 CLS）を同定した。即ち、単純性脂肪肝から NASH を発症する過程において、代謝ストレスにより細胞死に陥った肝細胞をマクロファージが取り囲み、肝臓 CLS を形成すると、ここを起点として、線維化が生じることを明らかにした。肝臓 CLS は NASH 発症に先行して形成されるため、肝臓 CLS

の詳細を明らかにすることにより、病態生理の解明や新規バイオマーカーの同定、新しい治療戦略の開発に資すると考えられる。最近、ω-3 多価不飽和脂肪酸の EPA が MC4R 欠損マウスにおける肝臓 CLS 形成や肝線維化に対して予防および治療効果を示すことを見出し、MC4R 欠損マウスが既存薬や新規薬剤の薬効評価系として有用であることを明らかにした（図③）。

3．　今後の展開

本研究により、メタボリックシンドロームにおける「遊離脂肪酸の流れ」に即して、細胞内、細胞間、臓器間における炎症の慢性化機構を明らかにすることができた。今後の展開における最重要項目の1つは、内因性 Mincle リガンドの同定であり、代謝ストレスにより細胞死に陥った脂肪細胞に由来すると想定している。また、本さきがけ研究において、単純性脂肪肝から NASH に進行する過程においても、肝臓 CLS を起点とする同様の分子機序が関与する可能性を見出した。CLS は、実質細胞と間質細胞の相互作用の場であり、代謝性に誘導される組織リモデリングの駆動エンジンとして働くと考えられる。今後、脂肪組織 CLS と肝臓 CLS との共通性、あるいは組織特異性や病態特異性に注目して検討することにより、慢性炎症を標的とする新たなメタボリックシンドローム治療戦略の開発に貢献したい。

4．　評価

（1）自己評価

（研究者）

遊離脂肪酸に注目して、代謝ストレスにより誘導される炎症の慢性化機構を細胞内、細胞間、臓器間のレベルで明らかにし、メタボリックシンドロームの新たな病態の理解に繋がる研究成果を得た。本研究はほぼ予定通りに進捗しており、短期 NASH モデルの開発など新しい基盤技術の開発や臨床応用に向けた展開など、当初計画していなかった発展も認められる。このような研究成果により、学会や財団から賞を受けるとともに、名古屋大学において独立した研究室を主催するなど、研究者として大いなる飛躍に繋がった。

（2）研究総括評価（本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った）。

（研究総括）

本課題では、メタボリックシンドロームの病態基盤として脂肪組織や肝臓における慢性炎症性変化と全身への影響について解析し、新しい治療戦略の開発に向けた基盤技術を確立することを目標として、次のような研究成果をあげている。1）飽和脂肪酸が TLR4 を介してマクロファージの炎症性サイトカイン産生を誘導する以外に、TLR4 非依存的に炎症性サイトカイン IL-6 産生を引き起こす機序としてストレス誘導性転写因子 ATF4 を介する経路を見いだし発表した。2）慢性脂肪組織炎症の結果として脂肪組織の線維化が起こり、さらに肝臓等における異所性脂肪蓄積を招来するが、その病態形成においてキーとなる分子として、脂肪組織炎症の核となる crown-like structure（CLS)を構成する炎症促進性 M1 マクロファージに局在し病原体センサーとして知られる Mincle を同定して発表した。脂肪組織局所において CLS を中心として間質の線維化が生じることを初めて明らかにした。3）中枢性の摂食調節に重要なメラノコル

チン 4 型受容体 MC4R を欠損するマウスに高脂肪食を負荷することで、肥満やインスリン抵抗性を伴って脂肪肝、非アルコール性脂肪肝炎（NASH）、肝細胞癌を経時的に、ほぼ 100%の確率で発症する新たな疾患モデルを確立した。単純性脂肪肝から NASH を発症する過程の肝組織において肥満脂肪組織の CLS と類似する肝臓 CLS が形成され、ここを起点として線維化が生じることを明らかにした。また、このモデルの病態をω-3 多価不飽和脂肪酸の EPA 摂餌が抑制することを見いだし、本モデルが評価系として有用であることを見いだした。

基礎から臨床を見据えた広い視野で研究を継続し、メタボリックシンドロームの新たな病態の理解に資する研究成果を得た。短期 NASH モデルの開発の基盤技術の開発研究の発展も見られる。炎症の慢性化とメタボリックシンドロームの研究領域におけるリーダーの一人であり、本研究成果により独立を果たし、研究者としての飛躍につながっている。今後、益々の活躍に期待したい。

５．　主な研究成果リスト

（1）論文（原著論文）発表

1. K. Konuma, M. Itoh, *T. Suganami, S. Kanai, N. Nakagawa, T. Sakai, H. Kawano, M. Hara, S. Kojima, Y. Izumi, Y. Ogawa. Eicosapentaenoic acid ameliorates non-alcoholic steatohepatitis in a novel mouse model using Melanocortin 4 receptor-deficient mice. *PLoS ONE* 2015; 10: e0121528.
2. M. Tanaka, K. Ikeda, *T. Suganami, C. Komiya, K. Ochi, I. Shirakawa, M. Hamaguchi, S. Nishimura, I. Manabe, T. Matsuda, K. Kimura, H. Inoue, Y. Inagaki, S. Aoe, S. Yamasaki, *Y. Ogawa. Macrophage-inducible C-type lectin underlies obesity-induced adipose tissue fibrosis. *Nat. Commun.* 2014; 5: 4982.
3. Y. Iwasaki, *T. Suganami, R. Hachiya, I. Shirakawa, M. Kim-Saijo, M. Tanaka, M. Hamaguchi, T. Takai-Igarashi, M. Nakai, Y. Miyamoto, *Y. Ogawa. Activating transcription factor 4 links metabolic stress to interleukin-6 expression in macrophages. *Diabetes* 63: 2014; 152-161. (highlighted in commentary)
4. M. Itoh, H. Kato, *T. Suganami, K. Konuma, Y. Marumoto, S. Terai, H. Sakugawa, S. Kanai, M. Hamaguchi, T. Fukaishi, S. Aoe, K. Akiyoshi, Y. Komohara, M. Takeya, I. Sakaida, *Y. Ogawa. Hepatic crown-like structure: a unique histological feature in non-alcoholic steatohepatitis in mice and humans. *PLoS ONE* 2013; 8: e82163. (F1000Prime recommended)
5. N. Yamakawa, U. Ohto, S. Akashi-Takamura, K. Takahashi, SI. Saitoh, N. Tanimura, T. Suganami, Y. Ogawa, T. Shibata, T. Shimizu, *K. Miyake. Human TLR4 polymorphism D299G/T399I alters TLR4/MD-2 conformation and response to a weak ligand monophosphoryl lipid A. *Int. Immunol.* 2013; 25: 45-52.

（2）特許出願

研究期間累積件数：1 件

（3）その他の成果（主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等）

学会発表

1. T. Suganami, M. Tanaka, M. Itoh, Y. Ogawa
   "Role of parenchymal-stromal cell interaction in obesity-induced chronic inflammation"
   Symposium 2 "Obesity and Inflammation"
   The 8th Asia-Oceania Conference on Obesity 2015.10.2, Nagoya, Japan
2. T. Suganami, M. Tanaka, M. Itoh, Y. Ogawa
   "Obesity-induced adipose tissue remodeling and the metabolic syndrome"
   Symposium "Tissue remodeling and diseases"
   BMB2015 第 38 回日本分子生物学会年会/第 88 回日本生化学会大会 合同大会
   2015.12.1-4 神戸
3. T. Suganami, Y. Ogawa
   "Adipose tissue inflammation and ectopic lipid accumulation"
   International Symposium for the Study of Obesity 2014.10.26 Miyazaki
4. 菅波孝祥、小川佳宏
   「脂肪組織炎症と異所性脂肪蓄積、インスリン抵抗性」
   シンポジウム 臓器連関を介した糖代謝制御機構
   第 91 回日本生理学会 2014.3.16-18 鹿児島
5. 菅波孝祥、小川佳宏
   「脂肪酸代謝と炎症制御」
   シンポジウム 2 脂肪酸の病態栄養学
   第 42 回日本病態栄養学会年次学術集会 2014.1.11-12 大阪
6. 菅波孝祥、小川佳宏
   「メタボリックシンドロームにおける慢性炎症と異所性脂肪」
   シンポジウム 18 臓器間ネットワークによる病態制御
   第 87 回日本内分泌学会 2014.4.24-26 福岡
7. 菅波孝祥、小川佳宏
   「自然炎症の観点から捉えた慢性炎症と肥満症」
   シンポジウム 9 慢性炎症・細胞内ストレスと肥満症
   第 34 回日本肥満学会 2013.10.11-12 東京
8. T. Suganami, Y. Ogawa
   "Adipose tissue inflammation in obesity"
   シンポジウム 11 Molecular and cellular bases of chronic inflammation
   第 42 回日本免疫学会学術集会 2013.12.11-13 千葉

受賞

1. 平成 26 年度 第 7 回臨床薬理研究振興財団 研究大賞
   新しい疾患モデル動物を用いた非アルコール性脂肪肝炎（NASH）の治療戦略の開発に関する研究
2. 平成 26 年度 第 18 回日本心血管内分泌学会 高峰譲吉研究奨励賞

メタボリックシンドロームにおける脂肪組織炎症の分子機構と医学応用

著作物

（日本語総説、著書等）

1. 菅波孝祥、小川佳宏
   肥満・メタボリックシンドローム
   実験医学 増刊号「先制医療へ向かう医学研究」 2015; 33: 58-64.
2. 小川佳宏、菅波孝祥
   脂肪由来ホルモンと疾患
   朝倉内科学 2015; 1719-1720.
3. 菅波孝祥、小川佳宏
   Mincle と肥満関連疾患
   糖尿病学 2015 2015; 58-65.
4. 菅波孝祥、小川佳宏（企画）
   細胞工学「臓器代謝ネットワーク ～分子機構、破綻病態から臨床的意義まで～」
   2015; 33
5. 菅波孝祥、小川佳宏
   炎症疾患としての肥満/メタボリックシンドローム
   実験医学 増刊号「炎症と疾患の新概念」 2015; 32: 201-207.

（英語総説）

1. Y. Ogawa, T. Suganami, M. Tanaka, M. Itoh.
   Parenchymal-stromal cell interaction in metabolic diseases.
   Inflamm. Regen. 2015; 35: 167-171.
2. T. Suganami, M. Tanaka, Y. Ogawa.
   Adipose tissue inflammation and ectopic lipid accumulation.
   Endocr. J. 2012; 59: 849-857.

プレスリリース

「肥満に伴う脂肪組織の線維化を招く鍵分子を発見
～メタボリックシンドローム治療の新たな分子標的～」
2014 年 9 月 19 日（JST, 東京医科歯科大学）
http://www.jst.go.jp/pr/announce/20140919-2/

研　究　報　告　書

「慢性炎症性疾患おける病因性二重鎖 RNA の解析」

研究タイプ：通常型
研究期間：　平成 25 年 2 月～平成 28 年 3 月
研　究　者：　中村　能久

1．　研究のねらい

近年、2型糖尿病やアルツハイマー病といった慢性疾患では、炎症・炎症性反応が誘導され、疾患の発症・進行に関わっていることが明らかになっている。このような慢性炎症性疾患では、肥満が危険因子であること、また、エネルギー代謝組織、脳においてインスリン抵抗性が誘導されることなど、共通の特徴が見いだされている。私たちはこれまでに、肥満・2型糖尿病における炎症性反応の生理的意義について研究し、内在性二重鎖 RNA と炎症性二重鎖 RNA 結合タンパク質の役割について新しい発見をしている。本研究では、炎症性反応とインスリンシグナルを手がかりに、内在性二重鎖 RNA の動的変化を追い、2型糖尿病などの慢性炎症性疾患の発症メカニズムを探る。慢性炎症性疾患での内在性二重鎖 RNA を起点とした炎症性反応の誘導機構解析を通し、慢性炎症性疾患に共通する分子基盤解明、および新しい治療戦略への応用を目指す。

2．　研究成果

（1）概要

肥満は、糖尿病や動脈硬化などのメタボリック症候群・生活習慣病の危険因子である。 肥満では、脂肪細胞や肝細胞といったインスリン標的細胞において慢性的な炎症性反応が誘導され、この炎症性反応がインスリンシグナル・糖代謝を阻害し、様々な生活習慣病発症の原因になりうることが明らかになっている。私たちは、内在性の二重鎖 RNA 経路が肥満における炎症性反応の誘導やインスリン抵抗性の発症に関わっていることを明らかにしている。

炎症性反応を誘導するタンパク質には、RIG-I (retinoic acid-inducible gene I)様タンパク質群や PKR (Double-stranded RNA dependent protein kinase)のように、二重鎖 RNA（dsRNA）をリガンドとして認識するものが数多く存在している。以前は、細胞内には内在性の dsRNA がないために、これらの dsRNA 結合タンパク質 (dsRNA-binding proteins: dsRBPs)は、ウィルス由来などの外来性 dsRNA を特異的に認識し、炎症性反応を誘導するものと考えられていた。しかしながら、近年の microRNA (miRNA)の発見からも明らかなように、細胞内に多種多様な dsRNA が存在していることがわかっている。多くの dsRBPs が炎症性であることから、私達は、内在性の dsRNA と dsRBPs のネットワーク変化が細胞内で炎症性反応を誘導するのではと考えた。そして、肥満時にこのような dsRNA ネットワーク変化が誘導され、インスリン抵抗性発症の原因になるのではないかと仮説をたてた。実際、炎症性二重鎖 RNA 結合タンパク質である PKR が、肥満などの代謝性ストレス下で活性化して炎症・炎症性反応を誘導し、インスリン抵抗性・2型糖尿病の発症に関わることを報告している（*Cell*, 2010）。また、この PKR の活性化に、PKR の二重鎖 RNA 結合能が必要であることを見出している。このことは、内在性二重

鎖 RNA の動的変化が、慢性炎症性疾患の分子基盤になっている可能性を示唆する。

本さきがけ研究では、 PKR と二重鎖 RNA とのネットワークに注目し、PKR が認識する内在性病原性 RNA の同定、そして PKR が誘導する肥満性炎症機構の解析を行い、肥満における炎症性反応誘導機構の分子基盤の解明を試みた。

（2）詳細

研究テーマ A 「内在性病原性 dsRNA による PKR の活性化機構」

我々は、PKR が肥満の肝臓や脂肪組織において、発現および活性が上昇していること、更に、炎症作用のあるパルミチン酸を処理した線維芽細胞でも活性化することを見いだしている（図1）。これは、PKR が自然免疫反応のみならず、過栄養状態で誘導される代謝性炎症反応に関わっていることを示唆する。

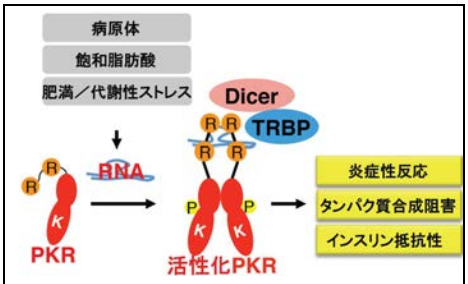


図1：PKR の活性化メカニズムのモデル。PKR は、様々なストレス下、外来性・内在性 RNA の認識、Dicer や TRBP といった dsRNA 結合タンパク質群と結合を通して活性化し、炎症性反応や代謝性疾患を誘導する。

それでは、PKR はどのようにしてパルミチン酸などの代謝性ストレスに反応しているのだろうか。PKR は、二重鎖結合ドメインを持ち、二重鎖 RNA を認識して活性化することから、肥満時には PKR の内在性二重鎖 RNA リガンドが存在していることが考えられる。 我々は、二重鎖 RNA と結合ができない PKR 変異体を作製し、パルミチン酸処理の影響を調べた。興味深いことに、この PKR 変異体は、パルミチン酸で処理をしても活性化しなくなることが観察された（図2A）。このことは、PKR が代謝性ストレス下で生じる内在性 RNA の変化を認識し、活性化する可能性を示唆している。実際、私達は、パルミチン酸処理下での細胞内において、PKR が、dsRNA 結合能依存的に特定の内在性 RNA と結合していることを見出した（図2B）。この中には、H/ACA box 型 snoRNA (small nucleolar RNA)など、二重鎖 RNA 様構造をとる RNA があり、これら内在性 RNA が PKR を活性化することが明らかになった。この結果は、パルミチン酸などの炎症作用のある脂肪酸は、脂質・タンパク質代謝の変化のみならず、RNA ネットワークに影響を及ぼし、PKR のようなセンサー分子がその変化（内在性病原性 dsRNA）を認識し、炎症性反応の誘導に関わっている可能性を示した。

研究テーマ B 「PKR 複合体因子 TRBP の炎症性反応、糖代謝における役割」

PKR が関わる炎症性反応やインスリン抵抗性の誘導機構を更に解析するために、我々は、質量分析法を用いたプロテオーム解析により肥満時の肝臓における PKR のタンパク質複合体を同定した。この複合体タンパク質情報をもとに遺伝子オントロジー解析を行うと、肥満の肝臓での PKR は、RNA の制御・代謝に関わる因子群と強く相関があることが明らかになった（図3A）。興味深いことに、肥満時において PKR は、dsRNA 結合タンパク質であり、RISC (RNA-induced silencing complex)-loading complex (RLC)の構成タンパク質で、miRNA の生合成に中心的な役割を果たす Dicer や TRBP (TAR RNA-binding protein)と強固に結合すること

が明らかになった（図3A）。この結合にはPKRの活性化が関わっており、パルミチン酸を処理した細胞でも結合が誘導される。更に、dsRNA 結合能欠損 PKR 変異体がこれらの因子と結合できないこと、また、TRBP 欠損細胞ではパルミチン酸処理による JNK の活性化が抑制されることから、これらの結合が dsRNA を起点とした炎症性反応の誘導に関わっていることを示唆している。

TRBP と肥満における糖代謝の関係を調べるために、アデノウイルスを用いて TRBP に対する shRNA (short hairpin RNA)を肥満マウスモデルの肝臓特異的に発現させ、TRBP 遺伝子発現抑制下の炎症性反応やインスリンシグナルの解析を行った。TRBP の発現抑制により、*ob/ob* マウス肝臓での PKR、JNK の活性低下や炎症性因子の発現減少、インスリンシグナルの亢進が確認され（図3B）、全身性の耐糖能の改善も見られた（図3C）。これらのことは、TRBP が肥満・2型糖尿病治療の標的になりうることを示すと同時に、内在性二重鎖 RNA を標的にし、TRBP-PKR 経路の活性を抑えるような新しい治療戦略への可能性を示唆するものである。

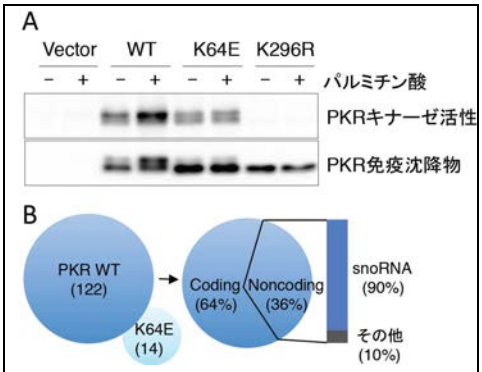


図2：内在性 dsRNA による PKR の活性化機構。(A) パルミチン酸による PKR の活性化。炎症性飽和脂肪酸であるパルミチン酸処理により、細胞内にいて野生型(WT)PKR は活性化するが、dsRNA 結合能を欠失した PKR 点変異体は活性化しない。キナーゼ不活型(K296R)はコントロールとして使用。(B) パルミチン酸処理下において、野生型 PKR は、snoRNA などの内在性 RNA との結合が亢進し、PKR の活性化につながる。

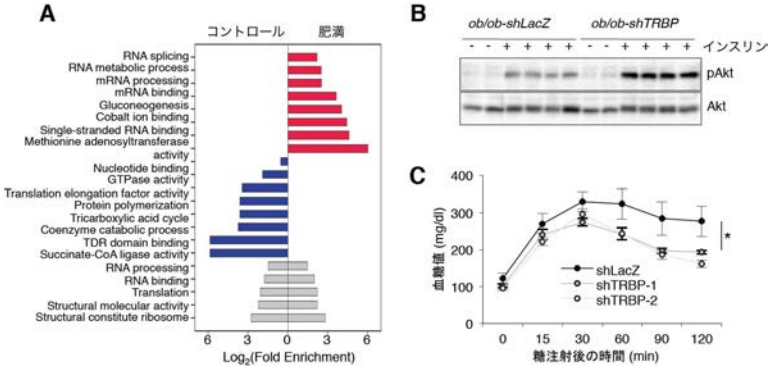


図3：肥満の肝臓での PKR 複合体の解析。(A) コントロールマウス（C57BL/6J）と肥満モデルマウス（*ob/ob*）の肝臓における PKR 複合体情報を用いた遺伝子オントロジー解析。肥満の肝臓では、PKR は RNA の制御や代謝に関わる因子・経路と相関が強い。(B) 肥満時の PKR 複合体の構成因子である TRBP をアデノウイルスを用いた系で肝臓特異的にノックダウンすることにより、インスリンシグナルの亢進が観察される。(C) TRBP のノックダウンすることにより、肥満モデルである ob/ob マウスでの糖代謝の改善が見られる。

3.　今後の展開

本さきがけ研究により、肥満などの代謝性ストレス下において、内在性 RNA が炎症性 dsRNA 結合タンパク質により認識され、炎症性反応を誘導する機構の一端が明らかになった。今後の重要な課題として、これらの内在性 RNA が病原性になる分子機構の解明が急務である。RNA は、メチル化などの RNA 修飾、局在変化、または高次構造の変化などにより、特性が変化する。代謝性ストレス下において、これらの RNA の特性変化が誘導され、RNA を病原性に変化させる可能性を追求し、研究を展開したい。

4.　評価

（1）自己評価

（研究者）

肥満は、メタボリックシンドロームのみならず、癌やアルツハイマー病などの様々な疾患の危険因子であるため、肥満における炎症性反応誘導の分子機構の解明は、非常に重要である。この「慢性炎症」分野の研究により、肥満における2型糖尿病発症における内在性 RNA の重要性・意義について、世界にさきがけて発表できたことについては当初の目的を達成できた。その一方、他の肥満性疾患への応用については、期間および人員が足りず、目標の到達には至らなかった。

しかしながら、本研究が明らかにした、内在性 RNA が特定条件下において病原性に成り得るという知見は、肥満疾患のみならず、癌やアルツハイマー病などの、慢性炎症性疾患の発症機構に共通する可能性がある。その場合、この研究成果が、RNA 研究の加速度的発展を促し、また、それにともなう科学技術の発展に貢献するものと期待される。

なお、さきがけ採択後、シンシナティ小児病院に異動したが、さきがけのサポートもあり良好な環境下で研究が遂行できた。また、本さきがけ研究の成果により、アメリカ国内での講演会が増えるなど、更なる飛躍への足場が固まったと感じている。

（2）研究総括評価（本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った）。

（研究総括）

本研究者は、肥満などの代謝性ストレス下で、内在性の二重鎖 RNA（dsRNA）に結合して活性化する PKR (Double-stranded RNA dependent protein kinase)が、肥満における炎症反応を誘導してインスリン抵抗性 2 型糖尿病の発症に関わることを見いだしている。本研究においては、肥満時の代謝性ストレス下でPKRと結合する内在性RNAを探索し、H/ACA box 型 snoRNA (small nucleolar RNA)などが PKR を活性化することを明らかにして発表した。さらに、PKR が関わる炎症性反応やインスリン抵抗性の誘導機構を詳細に解析し、肥満時の肝臓において PKR は Dicer や TRBP (TAR RNA-binding protein)などのタンパク質と結合しており、ob/ob マウス肝臓の TRBP の発現を抑制すると、肝臓での PKR や JNK の活性低下、炎症性因子の発現減少、インスリンシグナルが亢進して耐糖能が改善することを確認して発表した。今後、代謝性ストレス下で内在性 RNA が炎症性 dsRNA 結合タンパク質により認識されるようになる分子機構の解明に期待する。

以上のように、2 型糖尿病発症における内在性 RNA の重要性・意義について世界にさきがけ

て発表し、その一連の病態に関与する治療標的になる可能性のある分子を明らかにしてきたことは高く評価できる。さきがけ採択直後にハーバード大学からシンシナティ小児病院に異動して研究開始がやや遅れたが、さきがけ研究の成果により研究所内で高い評価を得、アメリカ国内での活躍の場も広がり、研究者としてのさらなる飛躍への足場が固まった。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Nakamura T, Arduini A, Baccaro B, Furuhashi M, Hotamisligil GS. "Small molecule inhibitors of PKR improve glucose homeostasis in obese, diabetic mice." *Diabetes*. 2014 Feb; 63 (2): 526-534
2. Nakamura T*, Kunz RC, Zhang C, Kimura T, Yuan CL, Baccaro B, Namiki, Y, Gygi SP, Hotamisligil GS*. "A critical role of PKR complexes with TRBP in immunometabolic regulation and eIF2α phosphorylation in obesity." *Cell Reports*. 2015 Apr 14;11(2):295-307. *Corresponding authors
3. Youssef OA, Safran SA, Nakamura T, Nix DA, Hotamisligil GS, Bass BL. "A Potential Role for snoRNAs in PKR Activation during Metabolic Stress." *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Apr; 112 (16): 5023-5028

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. **Nakamura T**. "dsRNA in immunometabolism." *Oncotarget*. 2015 Aug; 6 (24) 19940-19941
2. **Nakamura T**. "Molecular mechanism of double-stranded RNA pathway-mediated immunometabolic regulation." *BIO Clinica: Lipid metabolism and signaling*. 2015 Aug; 30 (9) 838-842
3. **Nakamura T**. "Role of double-stranded RNA pathways in immune-metabolic regulation." *BIO Clinica Special Edition: Chronic inflammation in endocrinology and metabolism*. 2015 Feb; 4 (1) 104-108
4. **Nakamura T**. "Molecular basis of chronic inflammatory responses and metabolic diseases in obesity." *Experimental Medicine*. 2014 Feb; 32 (3) 380-385
5. Diabetes Action Research and Education Foundation Grant Award (2014)
6. Digestive Health Center Pilot and Feasibility Program Award (2015)
7. The 46th NIPS International Symposium, invited speaker (2015)

研　究　報　告　書

「炎症性マクロファージによるリソソームの開口放出機構」

研究タイプ：通常型
研究期間：　平成24年10月～平成28年3月
研　究　者：　華山　力成

1.　研究のねらい

慢性炎症の発症において、マクロファージは中心的な役割を担う細胞である。例えば、動脈硬化巣に浸潤したマクロファージは変性 LDL や死細胞を貪食しリソソームで融解するが、これらが過剰にあると融解しきれず蓄積し泡沫細胞へと変化する。血管内膜に蓄積した泡沫細胞は、IL-6 や TNF-αなどの炎症性サイトカインを放出して動脈硬化を悪化させるとともに、多くの蛋白分解酵素を分泌型のリソソームから放出して細胞外マトリックスや線維成分を融解しプラークの破綻を引き起こす。マクロファージなどの炎症性細胞によるリソソーム酵素の放出は他者融解（heterolysis）と呼ばれ、周囲の細胞を壊死させ蛋白質の変性を引き起こす。その結果、更なる炎症が引き起こされ慢性炎症を惹起すると考えられる。しかしながら、この過程を制御する分子機構はこれまでほとんど明らかになっていない。そこで本研究では、炎症性マクロファージの分泌型リソソームに着目し、それらがどのような分子機構によりリソソーム酵素を細胞外へ放出するかを包括的に明らかにすることを目標にしている。更にその分子機構を欠損したマウスを解析することによって、炎症性マクロファージによるリソソームの開口放出が慢性炎症の発症にどのように関与するかを明らかにする。

2.　研究成果

（1）概要

リソソームの開口放出はリソソームと細胞膜が融合することにより制御されている。 私達は、この融合過程を促進する分子として myoferlin を同定した。Myoferlin はリソソームと細胞膜上に局在する膜蛋白質で細胞質側に 6 つの C2 ドメインを持っており、カルシウムイオン依存的に両者の膜リン脂質ホスファチジルセリンと結合する。この結合により、リソソームと細胞膜の融合が引き起こされ開口放出を促進される。私たちは myoferlin 欠損マウスを作製し、実際にマクロファージによるリソソーム酵素の放出が障害されているかを検討した。培養細胞系において、カルシウム刺激による骨髄由来マクロファージからのリソソーム酵素の放出を調べたところ、欠損マウス由来のマクロファージでは野生型に比べ放出が強く障害されていた。さらに生体内での影響を調べる為、大腸菌の死菌を腹腔内に投与し誘導されてくるマクロファージが腹水中に放出するリソソーム酵素の量を比較したところ、欠損マウスで顕著に減弱していることが明らかになった。そこで、リソソーム酵素の放出を介して、myoferlin が他者融解を促進するかを検討した。大腸菌投与後の腹水を濃縮し NIH3T3 細胞の培養液に加えて 3 日後の細胞の生存率を調べたところ、90%もの細胞が死滅するが、myoferlin 欠損マウスから調整した腹水を用いた場合では、細胞がほとんど傷害されないことが明らかとなった。この結果から、myoferlin はリソソーム酵素の放出を介して、他者融解を促進する分子であることが示された。

次に、myoferlin はマクロファージが細菌などの異物を取り込んだファゴリソソーム膜上にも存在する為、細胞膜との融合を介して貪食消化後の残渣の放出を促進するかを電子顕微鏡により検討した。Myoferlin 欠損マクロファージでは、残渣を抱え込んだファゴリソソームが細胞膜周辺に顕著に増加しており、残渣の放出が阻害されていることが明らかとなった。その結果、多数の残渣の蓄積により myoferlin 欠損マクロファージでは刺激が強くかつ長期間入る為、IL-6 や IL-1β、TNF-αなどの炎症性サイトカインの発現誘導が顕著に増強されることが明らかとなった。このことは、マクロファージが細菌を貪食した後に残渣が適切に放出されることが炎症の収束に重要な過程であることを示している。

（2）詳細

研究テーマ A 「Myoferlin によるリソソームの融合機構」

活性化したマクロファージは様々な状況で、リソソーム酵素を放出することが知られている。例えば、動脈硬化巣で活性化マクロファージはリソソーム酵素を放出してコラーゲン線維を分解することにより、血管の脆弱性を引き起こす。また、活性化マクロファージはリソソーム酵素を放出してエラスチン線維を分解することにより動脈瘤を引き起こす。このように、マクロファージによるリソソーム酵素の放出は、組織の破壊を通して様々な病気の原因になると考えられている。最近私達は、マクロファージによるリソソーム酵素の放出を制御する分子として myoferlin という分子を同定した。Myoferlin は細胞質側に 6 つの C2 ドメインを持つ膜蛋白質で、カルシウム依存的にホスファチジルセリンと結合する。私達は myoferlin が細胞膜とリソソーム膜に局在しており、カルシウム刺激で両者の膜リン脂質ホスファチジルセリンと互いに結合することによって、リソソームと細胞膜の融合を促進することを見出した。その結果、リソソーム酵素が放出され、周囲の組織・細胞に傷害を引き起こすと考えられる（図1）。

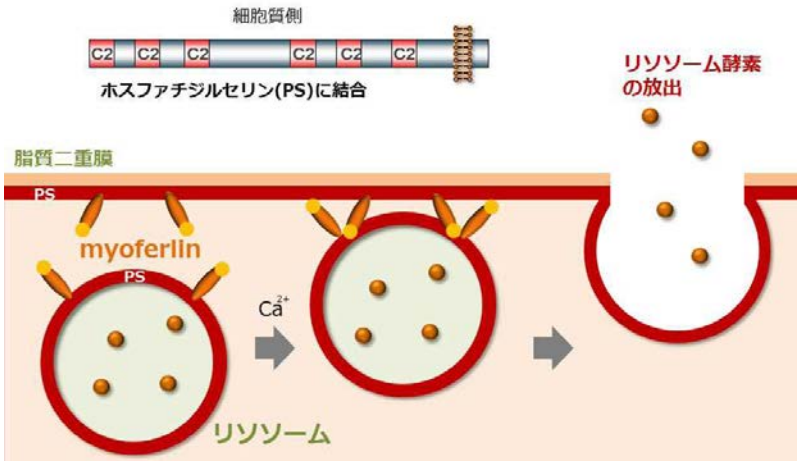


図1. Myoferlin によるリソソームの開口放出機構

私達はまず myoferlin の機能を調べるため、shRNA を用いて myoferlin をノックダウンした NIH3T3 細胞を作製した。これらの細胞を LAMP1 で染色したところ、myoferlin ノックダウン細胞ではコントロール細胞に比べ、リソソームの量が明らかに多いことが判明した。更にこれらの細胞を Lysotracker で染色してリソソームの量を FACS で定量化したところ、myoferlin ノ

ックダウン細胞ではコントロール細胞に比べ、平均値で 3 倍程リソソームの量が多い事が明らかとなった。これらの結果は、myoferlin を減少させるとリソソームが蓄積することを示している。次にこれらの細胞を電子顕微鏡で観察した。myoferlin ノックダウン細胞ではコントロール細胞に比べ、多くのリソソーム小胞の中に残渣と思われる構造物や、何か膜のような構造物が蓄積していることが明らかとなった。この結果は、myoferlin の減少によりリソソームの開口放出が阻害され、その結果、リソソーム内に残渣が蓄積した為と考えられる。そこで、myoferlin が実際にリソソーム酵素の放出を促進するかを検討する為、リソソーム酵素の一つである β-hexosaminidase の放出を定量化した。まず、骨髄由来マクロファージに myoferlin に対する shRNA を導入した。これらのマクロファージにカルシウム透過促進剤である A23187 を作用させ、上清を回収し蛍光基質と反応させて放出された酵素量を定量化した。すると myoferlin をノックダウンした細胞では、コントロールに比べ、放出される β-hexosaminidase の量が有意に減少していることが明らかとなった。次に同様のことが生体内でも起きているかを検討する為、myoferlin KO マウスを作製し、マウスの腹腔内に大腸菌を投与して腹腔内のマクロファージが腹水中に放出したリソソーム酵素の量を定量してみた。すると、野生型マウスでは、大腸菌の投与後、強く増加するのに対し、myoferlin KO マウスではリソソーム酵素の放出が障害されていることが明らかとなった。そこで腹水による細胞傷害性を調べる為、大腸菌投与後の腹水を濃縮し NIH3T3 細胞の培養液に加えた。その後、NIH3T3 細胞の生存率を調べたところ、野生型マウスの腹水ではほとんどの細胞が死滅するが、myoferlin KO マウスの腹水では、殺す活性が顕著に減弱しているのが分かった。このことから、myoferlin はリソソーム酵素の放出を介して、細胞傷害を促進する分子であると考えられる。実際、マウスの腹腔内に大腸菌を大量に投与してみたところ、野生型のマウスでは3日以内にほぼ全てのマウスが死滅するが、myoferlin KO マウスはかなりの抵抗性をもつことが分かった。この結果は、リソソーム酵素の放出が過剰になると、組織傷害によって個体の生存率が低下することを示している。

研究テーマ B「リソソームの開口放出による慢性炎症の発症機構」

Myoferlin はマクロファージが細菌や死細胞などの異物を取り込んだファゴリソソーム膜上にも存在する為、細胞膜との融合を介して貪食後の残渣の放出を促進するかを電子顕微鏡により検討した。Myoferlin 欠損マクロファージでは、残渣を抱え込んだリソソームが細胞膜周辺に顕著に増加しており、残渣の放出が阻害されていることが明らかとなった。同様に、蛍光色素で標識した大腸菌の死菌をマクロファージに貪食させ、残渣が蓄積したままマクロファージが発色し続けるのか、もしくは残渣の放出によりマクロファージが無色に戻るのかを FACS を用いて定量化したところ、myoferlin 欠損マクロファージでは、貪食後 8 時間以降、顕著に残渣が蓄積していることが明らかとなった。その結果、残渣の蓄積により myoferlin 欠損マクロファージでは刺激が強くかつ長期間入る為、IL-6 や IL-1β、TNF-αなどの炎症性サイトカインの発現誘導が顕著に増強されることが分かった。このことは、残渣が適切に放出されることが炎症の収束に重要な過程であることを示していると考えられる（図2）。

図2. Myoferlin 欠損による残渣の蓄積と慢性炎症応答の発症機序

研究テーマ C 「リソソームの開口放出に関わる分子群の包括的同定」

リソソーム酵素の放出には、(1) 分泌型リソソームの発達 (2) 細胞膜への輸送 (3) 細胞膜との融合などの過程が必須であるが、これらの過程を制御する分子機構はほとんど明らかになっていない。そこで私達は、shRNA ライブラリーを用いて、myoferlin 以外にもリソソームの開口放出に関与する分子の探索を行った。分泌型リソソームの発達過程が障害されると、Lysotracker で陽性になるリソソームの数が減少する。逆に、分泌型リソソームの細胞膜への輸送と細胞膜との融合が阻害されると、Lysotracker 陽性のリソソームの数が増加する。このように、Lysotracker 陽性のリソソーム数を指標として、その数に異常をきたす細胞をスクリーニングし、その原因となる遺伝子の同定を試みたところ、myosin Va と TRPML1 が同定された。Myosin Va はこれまでに、細胞内小胞の輸送と放出に関与することが報告されている。一方、TRPML1 は、リソソームに局在しているカルシウムチャネルであり、貪食消化された異物から漏出したカルシウムを細胞質に透過させる。このカルシウム刺激が、myoferlin によるリソソーム酵素の開口放出を促進すると考えられる。

3. 今後の展開

マクロファージによる他者融解は重篤な感染症において生死を決める重要な要因であり、myoferlin の機能を阻害する薬剤を開発し他者融解を抑制することにより、感染症時における生存率を上げうることが期待される。またマクロファージによるリソソーム酵素の放出が、心血管炎症の引き金になっている可能性があり、myoferlin の機能を阻害することにより、動脈硬化や虚血再灌流傷害、動脈瘤など様々な心血管炎症疾患の治療法の開発が期待される。更に今後、MRI などの画像診断を用いて他者融解による組織傷害を可視化する技術の開発が可能になるであろう。また、マクロファージによるリソソームの開口放出機構は、その他にも様々な免疫応答に関与していると考えられる。例えば、MHC による抗原提示はファゴリソソームと細胞膜との膜融合によって制御されている。今後は myoferlin がこれらの膜融合過程を制御するのかを明らかにする必要がある

4. 評価

(1) 自己評価

（研究者）

1）本研究では、マクロファージによるリソソーム開口放出を担う主要分子として myoferlin を同定することに成功した。また、この分子の欠損によりマクロファージによる細菌貪食後の炎症応答が顕著に増強・延長することで慢性炎症応答が引き起こされることを見出した。更に、この分子を介したリソソーム酵素の放出が過剰になると健常組織の傷害を誘発することも明らかにした。これらの結果により、当初予定していた研究目的をほぼ達成することができた。また、予定通りの研究実施体制を整え、研究費の執行も過不足なく効率良く行うことができた。

2）本研究では、リソソームの開口放出機構が異常になることにより、慢性炎症を引き起こすことを明らかにした。今後本研究の成果により、myoferlin を標的にした慢性炎症の治療法を開発することが期待される。Myoferlin 阻害薬を用いることにより、将来、動脈硬化などの慢性炎症性疾患や、虚血後の再灌流傷害を制御することが可能となり、現在多くの日本人が罹患している虚血性心疾患や脳梗塞の治療に大きなインパクトを与えることができると期待している。

3）リソソームの開口放出は、アポトーシス、オートファジーに続く第三のリソソームによる生体恒常性維持機構である可能性を持つと考えている。本研究を基礎として、これまで細胞内消化の中心として研究されてきたリソソームが、実際には細胞外での融解によって様々な生理現象や病理病態に関与する事が示すことが可能となり、今後新たなパラダイムシフトをもたらしうると期待している。

（2）研究総括評価（本研究課題について、研究期間中に実施された、年２回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った）。

（研究総括）

本課題では、慢性炎症の病態におけるマクロファージの役割を、リソソームの開口放出という観点から明らかにした。まず、リソソームと細胞膜の融合を促進する分子として myoferlin を同定し、myoferlin 欠損マクロファージにおいてリソソームやファゴリソソームの開口放出が阻害されていることを明らかにした。その結果、myoferlin 欠損マクロファージでは、細菌を貪食し消化した後に発生する残渣の開口放出が障害されており、蓄積した残渣がファゴリソソーム内で刺激を入れ続けることによって、IL-6 や IL-1β、TNF-αなどの炎症性サイトカインの発現誘導が長期間増強されることを見いだした。この結果から、マクロファージが細菌を貪食した後にその残渣を適切に放出することが炎症の収束に必須であるという新たな概念を提案した。一方、重度の細菌感染の結果、マクロファージによるリソソームの開口放出が過剰になると、多量のリソソーム酵素が放出され、周囲の健常な細胞や組織の傷害を引き起こすことを見いだした。さらに、myoferlin 以外のリソソームの開口放出に関わる他の分子として、細胞内小胞の輸送と放出に関与する Myosin Va やリソソームに局在するカルシウムチャネル TRPML1 を見いだした。

以上のように、炎症性マクロファージによるリソソームの開口放出が周囲の細胞に対応して傷害性を有すること、その開口放出が myoferlin によって制御されていることなどを明らかにした。今後、開口放出に関与する分子の制御機構を明らかにし、慢性炎症性疾患の予防や治療効果に関する研究展開に期待したい。

5.　主な研究成果リスト

（1）論文（原著論文）発表

1.	Song J & Hanayama R. Myoferlin-mediated lysosomal exocytosis regulates cytokine response and cytotoxicity by phagocytes. （改訂論文審査中）
2.	Bahrini I, Song J, Diez D, Hanayama R. Neuronal exosomes facilitate synaptic pruning by up-regulating complement factors in microglia. Sci Rep. (2015) 5, 7989

（2）特許出願

研究期間累積件数：1件

発　明　者：華山　力成
発明の名称：分泌膜小胞エクソソームの精製法
出　願　人：大阪大学
出　願　日：2014/12/6
出 願 番 号：特願 2014-246876

（2）その他の成果（主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等）

1. 大阪大学総長顕彰 (2014)
2. アステラス病態代謝研究会・最優秀理事長賞（2012）

[招待講演]

1. Hanayama R.
Identification of a novel regulator for lysosomal fusion in macrophages.
日本-スウェーデン研究交流会，ワークショップ，東京 2012 年 11 月 29 日

2. Hanayama R.
Identification of a novel regulator for lysosomal fusion in macrophages.
第 2 回 御茶ノ水動脈硬化国際フォーラム，シンポジウム，東京 2013 年 2 月 23 日

3. Hanayama R.
Phosphatidylserine-dependent phagocytosis, digestion and exocytosis by macrophages.
第 86 回 日本生化学会大会，シンポジウム，横浜 2013 年 9 月 12 日

4. 華山　力成
ホスファチジルセリンを介したマクロファージの貪食・消化・放出機構
第 10 回 宮崎サイエンスキャンプ，シンポジウム，宮崎 2014 年 2 月 14 日

5. 華山　力成
マクロファージによる自己血球貪食と他者融解の分子機構
Research PlaNet 2014，シンポジウム，東京 2014 年 5 月 10 日

6. Hanayama R.
Phosphatidylserine-dependent lysosomal fusion in macrophages.
第 87 回 日本生化学会大会，シンポジウム，京都 2014 年 10 月 17 日

7. Hanayama R.
Mechanisms of hemophagocytosis and heterolysis by macrophages.
France-Japan Immunology meeting, シンポジウム, カシス(フランス) 2014 年 10 月 23 日

8. Hanayama R.
Efferocytosis, hemophagocytosis and heterolysis by macrophages.
台北医学大学, 特別講演, 台北(台湾) 2015 年 3 月 26 日

9. 華山 力成
血球貪食症候群と他者融解の分子機構
第 26 回 日本生体防御学会学術総会, シンポジウム, 東京 2015 年 7 月 11 日

10. 華山 力成
貪食細胞による自己炎症疾患の発症機序
第 15 回 Hypertension Conference, 特別講演, 大阪 2015 年 7 月 25 日

11. 華山 力成
血球貪食症候群と他者融解の分子機構
第 2 回 日本リウマチ学会ベーシックリサーチカンファレンス, 次世代リーダーセッション, 東京 2015 年 10 月 3 日

研　究　報　告　書

「ピロリ菌感染の慢性胃炎において中心的な役割を果たす長鎖 ncRNA の網羅的探索の試み」

研究タイプ：通常型
研究期間：　平成 24 年 10 月～平成 28 年 3 月
研　究　者：　丸山　玲緒

1．　研究のねらい

慢性炎症が発癌の母地となりうることは良く知られているが、その詳細な分子機構は未だ不明な点が多い。近年、mRNA と類似の構造を取りながらも、タンパク質に翻訳されることのない長鎖 non-coding RNA (lncRNA)が細胞・生命活動において重要な役割を担っていることが分かってきたが、実際のヒトの慢性炎症組織における lncRNA の生理的・病的意義に関しては、ほとんど分かっていない。本研究ではピロリ菌感染胃炎から胃癌への発癌過程を研究モデルとして、次世代シークエンサーを用いて実際の臨床検体の分子プロファイルを多数解析することにより、慢性炎症からの発癌に関与しうる lncRNA を同定し、その機能的意義を明らかにすることを試みた。

長鎖 ncRNA による炎症の制御とその破綻という新しい視点により、これまで見えなかった慢性炎症からの発癌に関与する新たな分子メカニズムの解明が期待されるとともに、本研究で産生される分子プロファイルと長鎖 ncRNA 候補リストは、この分野の研究コミュニティーに有用なリソースとなると思われる。

2．　研究成果

（1）概要

上部内視鏡検体からヒストン修飾プロファイルを取得し、長期的な慢性炎症により活性が変化するゲノム領域を探索した。解析の結果、担癌患者の非癌部背景粘膜で不活性化する lncRNA を 150 種類、活性化する lncRNA を 50 種類同定した。これらのうち 2 種類の lncRNA に着目し、更なる機能解析を試みた。lncRNA1 は健常者の胃粘膜では常に発現を認めるが、胃癌患者の非癌部、癌部あるいは癌細胞株では DNA メチル化により発現が低下・消失していた。興味深いことに、癌を発症していないピロリ菌陽性慢性胃炎の粘膜では DNA メチル化の程度が低く、lncRNA1 のメチル化は将来の発癌を予測しうる臨床診断マーカーとして有用であると考えられた。胃癌患者の非癌部背景胃粘膜で活性化している lncRNA2 は、多くの胃癌細胞株においても発現が亢進しており、そのノックダウンや過剰発現は癌細胞の増殖能や遊走能に影響を与えることから、lncRNA2 は何らかの機能を有していると考え、その分子機構の解明を試みた。RNA-pull down 実験と質量分析により、3 種類のタンパク質が lncRNA2 と結合することが明らかとなり、これらは複合体を形成し標的となる遺伝子の転写制御に関与する可能性が示唆された。また lncRNA2 が TLR 刺激により発現誘導されること、lncRNA2 のノックダウンが免疫応答に関与する遺伝子群の発現を抑制することが明らかとなり、lncRNA2 が慢性炎症における免疫応答に何らかの形で関わっている可能性が示唆された。

（2）詳細

研究テーマ A「上部内視鏡生検検体のヒストン修飾プロファイリングデータの解析」

初めに内視鏡検査で得られた検体から腺管分離法により上皮細胞成分のみを分離する行程を最適化した。得られた微量の上皮細胞を用いて ChIP 実験と ChIPSeq 実験を行う各過程の条件も検討し、プロトコールの改良を行った。最終的には上部消化管内視鏡の生検検体を用いた ChIPSeq 法を確立し、安定したワークフローの構築を行うことができた。これまでに ChIPSeq 実験を 36 検体（H3K4me3 を 22 検体、H3K27me3 を 14 検体）、RNASeq 実験を 6 検体で施行した。

本解析では非癌患者 3 例（健常者 2 例とピロリ陽性胃炎患者 1 例）と担癌患者 4 例の非癌部背景粘膜におけるヒストン H3K4me3 の比較を詳細に行い、長期的な慢性炎症による変化を検証した。各検体ではおよそ 15,000 から 20,000 カ所のピークをゲノム上に認めたが、そのうち全検体で共通するピークは 11,398 カ所であった。また非癌患者 3 例全例でピークを認めるが癌患者（非癌部背景粘膜）の 2 例以上でピークの消失する領域を 3,140 カ所、逆に非癌患者全例でピークを認めず癌患者の全例でピークを認める領域を 1,512 カ所同定した。

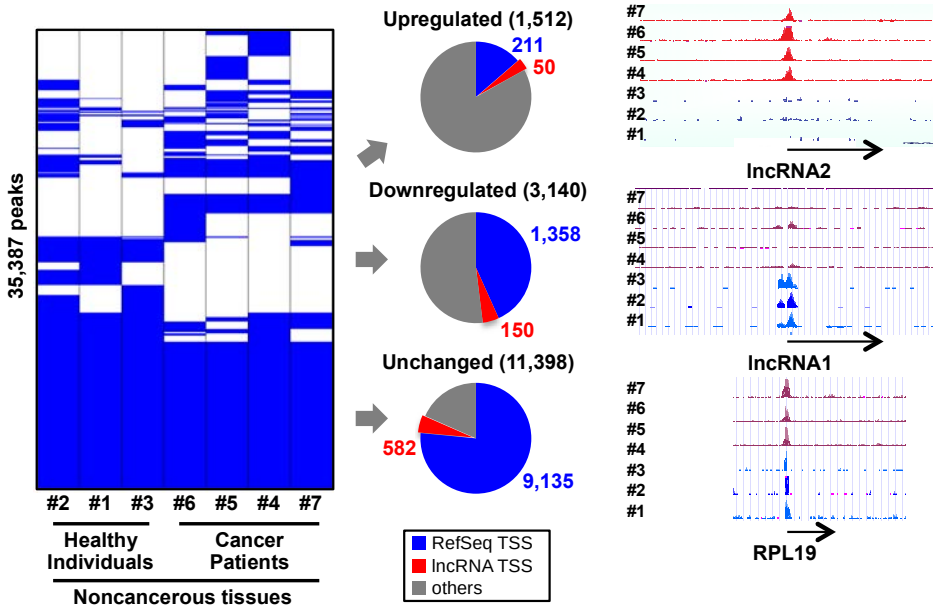


図 1. H3K4me3 データの解析と担癌患者の背景粘膜で変化を認める lncRNA の同定

研究テーマ B「臨床検体による候補 ncRNA の検証と臨床分子マーカーとしての応用」

担癌患者の背景粘膜で H3K4me3 が消失する 3,140 カ所のうち、lncRNA の転写開始点と重なるものが 150 カ所あり、それらに着目し更に解析を進めた。まず発現情報の参考として、大型公共データベース TCGA で公開されている胃癌 175 検体（癌部:148 検体、非癌部:27 検体）の RNASeq データを解析した。上記 150 個の lncRNA のうち、発現量が癌部で非癌部より有意に低下しているものは 8 個あり、そのうちのひとつ lncRNA1 に関して更に解析を行った。lncRNA1 は胃粘膜を含む多くの正常組織で発現が認められたが、検証した胃癌細胞株 21 株全てで発現の低下(1/10～1/1000 程度)が認められた。lncRNA1 プロモーター領域の DNA メチル化レベルを測定したところ、正常胃粘膜では全くメチル化を認めなかったが、測定した全

ての胃癌細胞株で 100%に近いメチル化を認めた。次に多数の臨床検体で同部位のメチル化を測定したところ、健常者やピロリ陽性胃炎患者に比べ癌患者非癌部で有意に高メチル化を示した(図 2)。更に TCGA の各種癌検体 5152 例の DNA メチル化データを解析したところ、この領域は胃癌のみならず、大腸癌・食道癌・頭頸部癌・子宮頸癌・膵癌・肺扁平上皮癌において高頻度かつ癌特異的に高メチル化を示し(図 3)、胃癌患者の背景粘膜に起こるエピゲノム変化とこれらの癌部に起こる変化に何らかの共通性があることが示唆された。

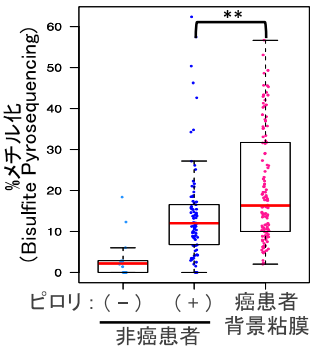


図 2. 上部内視鏡検体における lncRNA1 のメチル化

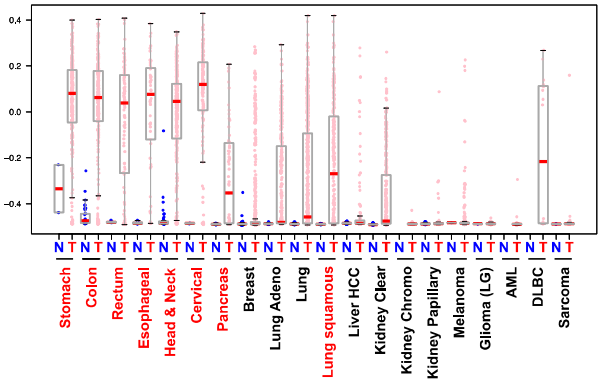


図 3. TCGA にある臓器別癌データ(全 5152 症例)の正常部(N)と癌部(T)における lncRNA1 のメチル化レベル

研究テーマ C「長鎖 ncRNA の慢性炎症からの発現における病的意義の解明」

次に担癌患者の背景粘膜で特異的に活性化している lncRNA 候補について解析した。これらの長鎖 ncRNA 候補について、18 種類の胃癌細胞株と複数の正常胃粘膜 RNA における発現パターンを検証し、癌細胞株で過剰発現している lncRNA2 に着目して機能解析を試みた。lncRNA2 と bidirectional に発現する protein2 は膜タンパクをコードしており、このファミリーに属する遺伝子群はこれまで癌や免疫応答における役割が示されている。この観点から lncRNA2 も同様の機能を持つ可能性を考えた。protein2 のノックダウンは胃癌細胞の増殖能や遊走能を抑制したが、lncRNA2 単独のノックダウンや過剰発現実験においても同様の結果が得られた。よってこの lncRNA は何らかの機能を有していると考え、その分子機構の解明を試みた。まず lncRNA2 と結合するタンパク質を同定する目的で、RNA-pull down 実験と質量分析を複数回施行した。その結果、3 種類のタンパク質が結合タンパクの候補として同定された。この 3 者は複合体を形成し、標的となる遺伝子の転写制御に関与することが既に報告されており、その方向性で解析を進めた結果、その標的候補として EGR2 が同定された。EGR2 は lncRNA2 を含む RNP の標的遺伝子である可能性があり、ChIP 法や ChIRP 実験により検証作業を進めている。また胃癌細胞を TLR9 アゴニストで処理することにより、lncRNA2 の発現が誘導されることが確認された。さらに発現アレイの結果、lncRNA2 のノックダウンにより、インターフェロン応答(特に自然免疫応答)に関与する遺伝子群の発現が有意に低下することを見いだしており、現在これらの機能的意義を解明すべく、種々の実験を試みている。

3. 今後の展開

本研究で同定された lncRNA2 は免疫応答の惹起・維持ならびに癌の発生・進展の両者に関与している可能性を示すデータが得られているが、その詳細な分子メカニズムについては未だ不

明な点が多いので、その解明を目指す。具体的には lncRNA2 と 3 種類のタンパク質複合体がどのように標的遺伝子の転写制御を行うのか、各種実験により明らかにしていく。また lncRNA2 の発現が誘導される機構と自然免疫応答におけるその役割に関して、明らかにしていきたい。

4. 評価

（1）自己評価

（研究者）

研究補助員 2 名と共に、概ね計画通りに研究費を執行し、実験を遂行することはできたと考えている。特に本研究テーマの前半部分、臨床検体のヒストン修飾プロファイルの取得並びにインフォマティクスによる解析は予定通り遂行でき、臨床検体の貴重な分子プロファイルデータを得ることができた。しかし後半部分の lncRNA の機能解析に関しては、多くの新しい実験に挑戦し試行錯誤したが、有意義な結果が得られないことも多く、研究期間内に作用機構を詳細に解明することはできなかった。lncRNA 研究の難しさを痛感したが、それでも本研究を通じて構築できた実験系やノウハウは多くあり、今後も研究を継続していくことで、将来 lncRNA の作用機構の一端を明らかにすることができれば有意義であると考えている。本研究成果の延長として、慢性炎症からの発癌に重要な役割を果たす lncRNA の存在と病的意義を確認できれば、それは基礎医学・臨床医学の両者において大きなインパクトを与えうる。また本研究は臨床検体を研究材料としているので、胃癌発症のリスク予測マーカーとしての応用はもちろん、新しい核酸創薬の分子標的の同定などの臨床応用も視野に入ると考えている。

（2）研究総括評価（本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った）。

（研究総括）

本課題では、ピロリ菌感染胃炎から胃癌への発癌過程を研究モデルとして、次世代シークエンサーを用いて実際の臨床検体の分子プロファイルを解析することにより、慢性炎症からの発癌に関与し得る長鎖 ncRNA(lncRNA)を同定し、その機能的意義を明らかにすることを目標とした。上部消化管内視鏡の生検検体から腺管分離法によって得た上皮細胞を用いた ChIPSeq 法を確立して解析を実施した。非癌患者 3 例と担癌患者 4 例の非癌部背景粘膜におけるヒストン(H3K4me3)プロファイルを比較し、担癌患者の非癌部背景粘膜で不活性化している lncRNA を 150 種類、活性化している lncRNA を 50 種類同定した。不活性化している 150 種類の中から、公共データベース TCGA で公開されている胃癌検体の RNASeq データを解析して発現量が癌部で非癌部より有意に低下しているものの一つ（lncRNA1）の機能について検討した。多数の臨床検体で同部位のメチル化を測定したところ、健常者やピロリ陽性胃炎患者に比べ癌患者非癌部で有意に高メチル化を示し、さらに TCGA の各種癌検体 5152 例の DNA メチル化データを解析したところ、この領域は胃癌のみならず、他臓器の各種の癌においても高頻度かつ癌特異的に高メチル化を示し、胃癌患者の背景粘膜に起こるエピゲノム変化とこれらの癌部に起こる変化に何らかの共通性があることが示唆された。また、活性化している上記 50 種類の中の一つ（lncRNA2）は多くの胃癌細胞株で発現亢進が見られ、さらにそのノックダウンにより細胞増殖能や遊走能が低下した。lncRNA2 は、TLR9 シグナルにより発現が誘導されるため自然免疫応答との関連が注目される。

発展途上の研究分野におけるチャレンジングな課題であり、特に lncRNA の機能解析については大変であったことが窺える。詳細な検討を経て本領域の目標の入り口までにはたどり着いたと評価したい。今後、蓄積された技術やデータを論文として公表し、研究のさらなる発展、lncRNA 研究に関する我が国のリーダーの一人として、研究発展の道を切り拓くことを期待する。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

現時点では該当無し

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

1. Maruyama R, Yamamoto E, Tsuyada A, Suzuki R, Ashida M, Shinomura Y, Suzuki H. Systematic identification of long non-coding RNAs potentially involved in chronic inflammation associated with Helicobacter pylori infection. The 4th Symposium of A3 Foresight Program Recent progress of cancer epigenomics. 2013 年 3 月、韓国

2. 丸山玲緒、山本英一郎、鈴木拓. 胃癌の発生に関与するエピゲノム変化と長鎖非コード RNA の解析. 第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月、名古屋

受賞

第 35 回日本分子腫瘍マーカー研究会学術奨励賞 (2015 年, 10 月)