

「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 28 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：4 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。上記選考を経た課題の内、H23 年度において大挑戦型審査会(書類選考会議)へ 1 課題を推薦した。

選考	書類選考	面接選考	採択数		
			14 件	内訳	3 年型
H23 年度 対象数	201 件	29 件			14 件
			5 年型	4 件(1 件)*	

()内は大挑戦型としての採択数。

* H28 年度事後評価対象者。

備考:

平成 28 年度の事後評価対象 4 件は、いずれも平成 23 年度採択の 5 年型で、通常型が 3 件、大挑戦型が 1 件である。

5. 研究実施期間

平成 23 年度採択 5 年型/通常型および大挑戦型

平成 23 年 10 月～平成 29 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 28 年 12 月	評価会開催
平成 29 年 1 月	研究総括による事後評価
平成 29 年 2 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

今年度は、平成 23 年 10 月から研究を開始した 5 年型の研究者 4 名の研究期間が終了し、本研究領域の全研究課題が終了することになる。内容は、リンパ濾胞にホーミングする制御性 T 細胞の機能と光依存的遺伝子組換え配列を用いた生体内細胞追跡法を確立、脳梗塞の脳組織壊死巣拡大に関与する DAMPs の発見とそれを排除して炎症性変化を収束させるメカニズムの解析、炎症を悪化させる因子と考えられていた IL-33 やマスト細胞の自己免疫様慢性大腸炎抑制に働くメカニズムの解析、癌の転移予定部位における転移前の炎症性変化の実験的解析とヒト臨床検体での検証といった、いずれも時間と労力を要する挑戦的な研究課題であった。期間内に論文として発表できなかったものもあるが、いずれも研究の幹となるデータを既に取得しており、今後の発展が期待できる。各研究者の研究成果とそれに対する事後評価を、以下に個別に記載する。

1. 岡田峰陽 研究者「免疫・炎症研究におけるオプトジェネティクスの創生」(5 年型)

リンパ濾胞にホーミングする制御性 T 細胞(Treg 細胞)を選択的に消失する遺伝子改変マウスを独自に作出した。そのマウスでは、生後 6 週齢以降に脾腫と骨髄炎を伴う致死性の血球細胞が減少し、それが原因が自己抗体産生と T 細胞の活性化に起因することを見出している。リンパ濾胞にホーミングする Treg 細胞による抗体産生の制御は理解しやすいが、T 細胞の活性化制御にどのようなタイプの Treg 細胞が関与するのか現在追求中である。本研究成果は自己免疫性の血球細胞破壊性疾患の理解につながる知見である。また、免疫・炎症研究に利用可能な光照射によって細胞に遺伝子改変を加える方法(オプトジェネティクス)で、生体内細胞追跡法を確立することを目指し、光依存的遺伝子組換え配列(Opt-Cre)に各種改良を重ねて骨髄細胞に導入し、その細胞により骨髄キメラマウスを作製した。その結果、in vivo においてこの方法が一定程度成功することを確認した。しかしながら、全身性に Opt-Cre を発現するノックインマウスではリンパ球の光標識が低効率であるため実用的ではなく、Opt-Cre の発現を高めることが今後の課題として残った。一方、このノックイ

ンマウスの上皮細胞系においては Opt-Cre の発現が高く、表皮角化細胞の光標識は安定して達成できることが分かり、皮膚炎症モデルにおける角化細胞の分化追跡を可能にすると考えられた。

以上のように、本研究においてリンパ濾胞にホーミングする Treg 細胞の新たな役割として、抗体依存/非依存性の慢性炎症性の血球細胞破壊性自己免疫疾患を制御する可能性が示された。現在そのメカニズムの詳細を解析中であり、今後成果を早期に論文化することが期待される。一方、オプトジェネティクスによる生体内細胞追跡法については、当初予定した免疫系細胞における光照依存的遺伝子改変・標識が実用化までに至らなかった。しかしながら、表皮角化細胞分化の追跡に道が開けたことから、日本医療研究開発機構で免疫アレルギー疾患実用化研究分野の事業に採択されている。何れも、当初想定しなかった問題に阻まれる局面もあったが、粘り強い様々な工夫を重ねて成果を上げることができたと評価する。

2. 七田 崇 研究者「脳組織傷害後の慢性炎症における免疫制御機構の解明」(5 年型)

脳虚血モデルにおける脳梗塞巣拡大に関与する DAMPs として、脳虚血誘導 24 時間をピークに強発現する Peroxiredoxin (Prx) を同定した。Prx は細胞死に伴って細胞外に放出され、その α -helix 構造により、周囲に浸潤したマクロファージを TLR2/TLR4 を介して活性化し、IL-23 や IL-1 β のような炎症性サイトカインを産生させて、脳内炎症を引き起こすことを初めて示した。また、Prx 中和抗体を脳梗塞モデルマウスに投与すると、有意に脳梗塞体積を縮小して、神経症状を改善し、神経保護効果が認められた。さらに、脳梗塞後の炎症を惹起する IL-1 β の産生に NLRP3 インフラマソームの活性化が必要であることから、インフラマソームの活性化を阻害する作用のある低分子阻害剤を探索して、BTK 阻害剤であるイブルチニブを見出し、その投与により脳虚血モデルマウスの脳梗塞巣の拡大抑制や運動機能の改善効果を認めた。一方、Prx 放出後において脳虚血後炎症を収束させるキー分子として、Prx 排除に重要な Scavenger 受容体である MSR1 と MARC を同定し、これら分子を欠損するマウスでは、炎症が遷延化し、脳梗塞体積の拡大と共に神経症状が悪化することを明らかにした。そして、転写因子 Mafb が MSR1 の発現を制御することを突き止め、Mafb を介して脳梗塞内で MSR1 の発現を促進する薬剤を探索し、白血病の治療薬として使われているビタミン A 誘導体である Am80 を見いだした。さらに、Am80 の脳梗塞モデルマウスへの投与により病態と症状を改善することを証明した。

以上のように、脳梗塞巣の拡大と神経症状の重篤化を引き起こす脳内自然炎症の発症ばかりか、その収束のメカニズムを分子レベルで解明すると共に、新たな治療標的を決定して、その炎症の抑制と収束を促進する薬物を見いだすという素晴らしい成果を上げ、非常に高いレベルの論文を複数生み出してきたことを高く評価する。また、本研究成果が認められた結果として、平成 29 年 4 月より東京都医学総合研究所にて新規のプロジェクトチームを創設する予定であり、今後のさらなる研究の発展が見込まれる。

3. 中江 進 研究者「炎症誘導因子による炎症抑制機構の解明と慢性炎症制御技術基盤の確立」(5 年型)

炎症を悪化させる因子と考えられていた、IL-33 やマスト細胞の自己免疫様慢性大腸炎における役割を解析するため、IL-33 あるいはマスト細胞を欠損する免疫不全 Rag 欠損マウスにナイーブ (CD4⁺CD45RB^{hi}) T 細胞を移植して慢性の大腸炎を誘導した。そのマウスにおいては、大腸炎発症と死亡が早期に認められた。そこで IL-33 やマスト細胞の大腸炎抑制機構を解析したところ、腸内細菌構成成分によって主にマクロファージが IL-33 を産生し、それが IL-33 受容体を発現するマスト細胞を刺激して TGF- β 産生を誘導し、大腸炎の抑制に必須であることを見いだしている。本研究成果を得るために、大腸炎発症に関与すると考えられる種々の分子の遺伝子欠損マウスを利用し、それらのマウスからマスト細胞を調製、あるいはそれらマウスの骨髄細胞からマスト細胞を培養・増殖させて移植するなど、時間と根気を要する詳細な実験を行っている。数多くの因子や細胞種が関与する中から、多大な努力によって新たな知見を見いだした。

未発表ながら、上記以外にも多くのデータを取得して当初の計画は概ね達成できており、今後における早期の論文化が期待できる。炎症性大腸炎は、近年日本においても年々患者数の増加がみられる原因不明とされている疾患である。中江研究者は、本研究課題と関連する研究において、多数の研究者と共同研究を行い、多くの論文・総説の発表、国内外の招待講演などを行っている。今後炎症性大腸炎の治療戦略を立案するにあたって、本研究成果が重要な示唆を与えうるものと確信する。

4. 平塚(中村) 佐千枝 研究者「癌の転移前診断の確立と治療をめざして」(5 年型大挑戦型)

転移性の癌を移植したマウスにおいて、転移の前に転移予定臓器において血管透過性の亢進が見られることを見出し、転移予定局所における環境の変化と炎症反応を解析した。その結果、移植した原発癌組織よ

り分泌された CCL2 が、将来転移予定部位である肺血管組織において高発現する CCR2 を刺激して S100A8 や SAA3 を発現させ、それらが血管内皮の TLR4/MD-2 複合体に作用して血管透過性を亢進させ、その後の転移巣の形成に重要であることをマウスで見事に示したことは高く評価される。担癌マウスモデルにおいては、血管透過性の亢進が起きている、CCR2 高発現部位ではフィブリノーゲンの発現がみられる。ヒト癌患者の肺組織においても、フィブリノーゲンの発現と一致して CCR2 と S100A8 が発現亢進している部位を見いだし発表した。

本研究は大挑戦型課題であり、癌転移の予防のための転移前診断を目標としている。ヒト患者組織を用いた詳細な分子疫学的な検討を行い、転移予定組織(局所)を利用し、転移に関連する候補遺伝子のスクリーニングを完了し、候補遺伝子の機能を確認するための研究を進めている。現時点では研究課題の最終目標までの到達には道半ばであるが、転移予定組織に関連する遺伝子明らかになれば、転移前診断のマーカーの同定や転移予定局所の消失(転移抑制)が可能になり、対癌療法の新たな武器となる成果となると期待している。

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 28 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 大学院医歯薬学研究部 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
戸邊 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

外部評価者(五十音順。所属、役職は平成 23 年 3 月末時点)

糸山 泰人	(独)国立精神・神経医療研究センター病院 院長
今井 浩三	東京大学 医科学研究所附属病院 病院長/教授
岡田 弘晃	東京薬科大学 薬学部 教授
澁谷 正史	上武大学 副学長
高井 俊行	東北大学 加齢医学研究所 教授
竹縄 忠臣	神戸大学 大学院医学研究科 特命教授
福森 義信	神戸学院大学 薬学部 教授
藤田 禎三	福島県立医科大学 教授
藤田 尚志	京都大学 ウイルス研究所 教授
前田 瑞夫	理化学研究所 基幹研究所 主任研究員
向田 直史	金沢大学 がん進展制御研究所 教授
村上 伸也	大阪大学 大学院歯学系研究科 教授
山本 雅	東京大学 医科学研究所 教授
義江 修	近畿大学 大学院医学系研究科 教授
吉開 泰信	九州大学 生体防御医学研究所 教授

(参考)

件数はいずれも、平成 28 年 11 月 17 日現在。

(1)外部発表件数

	国内	国際	計
論文	44	74	118
口頭	43	31	74
合計	87	105	192

(2)特許出願件数

国内	国際	計
0	0	0

(3)受賞等

・七田 崇

第 7 回日本免疫学会研究奨励賞(H24.12)

第 85 回日本生化学会大会 鈴木紘一メモリアル賞(H24.12)

第 37 回日本心臓財団草野賞(H25.3)

文部科学大臣表彰 若手科学者賞(H25.4)

日本インターフェロン・サイトカイン学会第 10 回奨励賞(H25.5)

・中江 進

トムソン・ロイター Highly Cited Researchers 2014(H26.6)

トムソン・ロイター Highly Cited Researchers 2015(H27.9)

(4)招待講演

国際 22 件

国内 27 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

(5年型通常型)

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職(平成29年3月末現在) (応募時所属)	研究費 (百万円)
岡田 峰陽 (兼任)	免疫・炎症研究におけるオプトジェネティクスの創生 (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 (理化学研究所 免疫・アレルギー科学総合研究センター ユニットリーダー)	93
七田 崇 (兼任)	脳組織傷害後の慢性炎症における免疫制御機構の解明 (慶應義塾大学医学部)	慶應義塾大学医学部 講師 (同上、助教)	106
中江 進 (兼任)	炎症誘導因子による炎症抑制機構の解明と慢性炎症制御技術基盤の確立 (東京大学医科学研究所)	東京大学医科学研究所 システム疾患モデル研究センター 准教授 (同上)	98

(5年型大挑戦型)

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職(平成29年3月末現在) (応募時所属)	研究費 (百万円)
平塚(中村) 佐千枝 (兼任)	癌の転移前診断の確立と治療をめざして (東京女子医科大学医学部)	東京女子医科大学医学部 准教授 (同上)	95

研究報告書

「免疫・炎症研究におけるオプトジェネティクスの創生」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 岡田 峰陽

1. 研究のねらい

免疫応答の異常は多種多様な炎症性疾患の原因となる。例えば、自己の身体の組織や細胞を構成する分子(自己抗原)や、生活環境に存在する無害な物質(環境抗原)を標的とする抗体が異常に産生されると、自己免疫性疾患や、アレルギー性疾患の発症につながる事が知られている。しかしこのような免疫疾患の発症が、どこで開始し、どのように進行するかについては、詳細が分かっていない場合が多い。これを理解するためには、疾患の原因となる免疫細胞の臓器間移動を追跡することが重要となるが、この追跡を可能にする手段がないのが現状である。

一方、制御性 T 細胞と呼ばれる T 細胞の亜集団には、自己抗原や環境抗原に対する免疫応答を抑制する重要な働きがある。遺伝子変異によって、制御性 T 細胞に必須の転写因子である FoxP3 の機能が損なわれると、皮膚、脾臓、肝臓、肺、腸などの様々な臓器に重篤な炎症が起こり、死に至ることが知られている。制御性 T 細胞は FoxP3 に加えて様々な別の転写因子を発現し、これらの転写因子の種類によって、抑制する炎症の種類や場所が異なると言われている。しかしその実態やメカニズムについては、まだ不明な部分が多い。

近年、抗体産生応答に深く関わる事が知られている転写因子が、制御性 T 細胞の一部にも発現していることが明らかとなってきた。本研究では、この転写因子を発現する制御性 T 細胞の自己免疫疾患の発症抑制における役割を明らかにしたい。また増殖する免疫細胞を、光を用いて特定の場所で永続標識する方法を構築し、自己応答性の免疫細胞の臓器間移動を追跡することで自己免疫疾患の開始点と進行機序を理解することを狙う。

2. 研究成果

(1) 概要

抗体産生応答に深く関わる事が知られている転写因子を、制御性 T 細胞において選択的に欠損させたマウスを作製して解析した。その結果、このマウスは生後9週前後から致死性の疾患を発症することが明らかとなった。解析を進めていくと、少なくとも一部のマウスにおいては、ある血球細胞に結合する自己抗体が産生されていることが分かった。また驚いたことに、活性化した T 細胞が脾臓および骨髄で異常に増殖し、骨髄で血球前駆細胞を破壊している可能性が示唆された。この活性化 T 細胞の増殖は脾臓でまず起こり、それに続いて骨髄で起こっているようであった。脾臓における細胞局在を調べたところ、制御性 T 細胞が B 細胞濾胞に見られなくなっているだけでなく、T 細胞領域においても制御性 T 細胞の局在変化が見られた。さらにこの炎症疾患の発症には、上記の転写因子の欠損だけでなく、制御性 T 細胞のホールマーク転写因子である FoxP3 の、部分的な発現減弱が重要な役割を果たしていることが示唆された。これらの結果から、上記の転写因子は脾臓における制御性 T 細胞の局在を制御しており、この局在制御の異常と FoxP3 発現の部分的減弱が同時に起こると、血球細胞抗原に

対して応答性を持つ T 細胞や B 細胞が活性化され、自己抗体産生や骨髄炎が引き起こされると考えられた。

また、炎症性疾患を引き起こす T 細胞などのリンパ球の、脾臓から骨髄へ移動を検証するために、光によって細胞に改変を加える方法(オプトジェネティクス)を用いて、生体内細胞追跡法を確立することを目指した。植物由来の光反応性タンパク質と融合させた Cre recombinase 断片(Opt-Cre)を、レトロウイルスによってリンパ球に発現させ、生きたマウスに光照射を行うことによって、特定のリンパ節において増殖しているリンパ球の一部を永続標識することが可能であることを確認した。この方法を疾患モデルマウスに適用するために、Opt-Cre を全身性に発現するノックインマウスを作製した。残念ながら、このノックインマウスでは、リンパ球の光標識の効率が非常に低く、リンパ球において Opt-Cre の発現を高めることが課題として残った。一方、このノックインマウスでは上皮細胞系において発現が高く、表皮角化細胞の光標識はある程度安定して達成できることが分かり、皮膚炎症モデルにおける角化細胞の分化追跡を可能にすると考えられた。

(2) 詳細

研究テーマ A「新規の自己免疫性炎症疾患モデルの確立」

制御性 T 細胞のホーミング転写因子 FoxP3 の遺伝子座に Cre 遺伝子を挿入したマウスと、抗体産生応答において重要なことが知られている転写因子の遺伝子に loxP を導入したマウスを交配することにより、制御性 T 細胞で選択的にこの転写因子を欠損するマウスを作製した。こ

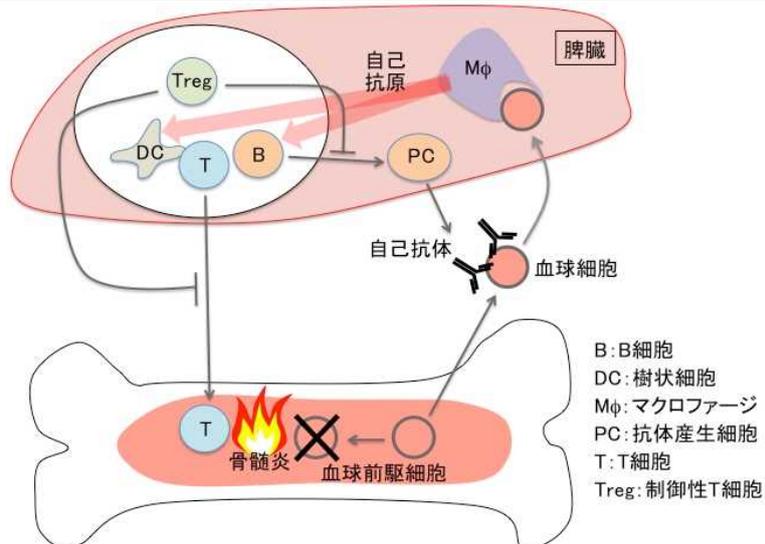


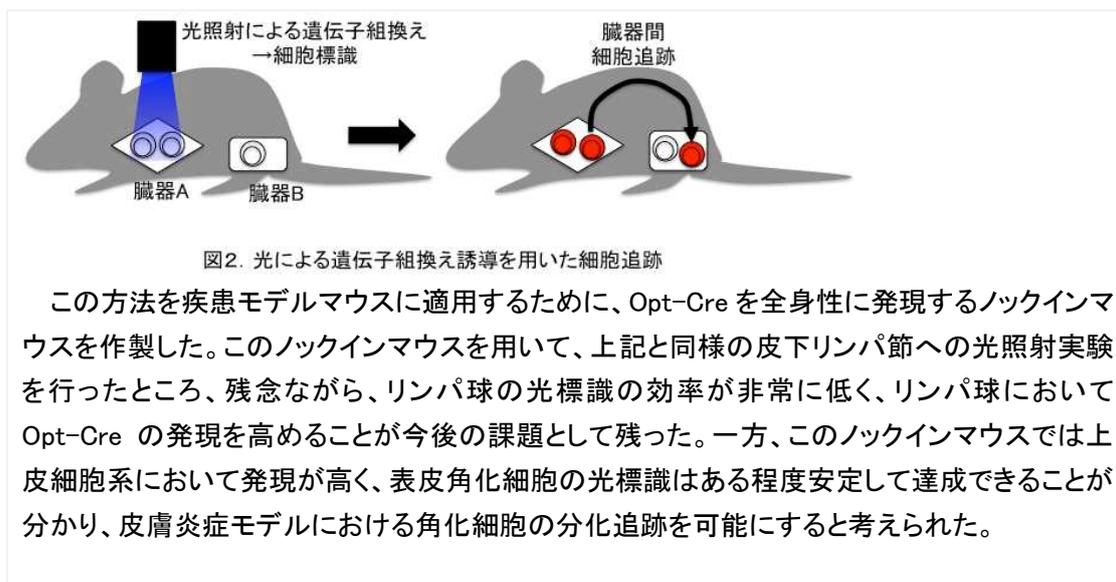
図1. 脾臓の制御性T細胞による自己免疫性炎症の制御

このマウスの脾臓等の細胞を解析したところ、制御性 T 細胞の総数はほとんど野生型と変わりがなかったが、B 細胞濾胞にホーミングするタイプの制御性 T 細胞が、期待通り消失していた。このマウスは、生後6週齢以降に致死性の疾患を発症する事が分かった。各臓器の病理切片解析を行ったところ、殆どの組織においては異常が観られなかったが、脾腫と骨髄炎が顕著に起こっていることが分かった。またある血球細胞のみが激減しており、これが死因であることが示唆された。この血球細胞に対する自己抗体の産生が検出されたマウスも見出され、病態形成メカニズムの一部は自己抗体産生による血球細胞の傷害であることが示唆された。しかしながら半数以上のマウスは、自己抗体が検出されないにも関わらず死に至ることが分かり、それ以外のメカニズムも病態形成に関わっていることが示唆された。これについて調べるために、遺伝学的手法で B 細胞を欠損させたところ、発症の遅れと生存期間の延長が見ら

れたが、最終的には同様の病態を形成してしまうことが明らかとなった。つまり、やはりB細胞や抗体に依存しない病態形成メカニズムがあることが強く示唆された。そこで次に、損傷される血球細胞の形成の場である骨髄において、様々な分化段階の前駆細胞をコロニー形成アッセイ等により解析し、どの分化段階において損傷を受けているか特定することが出来た。骨髄と脾臓の炎症細胞を詳細に解析したところ、発症したマウスではある種のエフェクターT細胞が特に増加していることが明らかとなった。さらに発症する前のマウスの脾臓でもこのエフェクターT細胞の増加は見られたが、骨髄では顕著ではなかった。このエフェクターT細胞に対する中和抗体を生後3~4週齢のマウスに投与し続けると、発症がほぼ完全に抑制されることが分かり、このエフェクターT細胞が病態形成において重要な役割を果たしている事が示唆された。脾臓における細胞局在を調べたところ、制御性T細胞がB細胞濾胞に見られなくなっているだけでなく、T細胞領域においても上記のエフェクターT細胞の分化を促す場所から、制御性T細胞が減っていることが分かった。さらにこの炎症疾患の発症には、上記の転写因子の欠損だけでなく、制御性T細胞のホールマーク転写因子であるFoxP3の、部分的な発現減弱が重要な役割を果たしているとし唆された。これらの結果から、上記の転写因子は脾臓などのリンパ性組織における制御性T細胞の局在を制御しており、この局在制御の異常とFoxP3発現の部分的減弱が同時に起こると、血球細胞抗原に対して応答性を持つT細胞やB細胞が活性化され、特定の血球細胞に発現する自己抗原に反応する抗体の産生やエフェクターT細胞の活性化が起こり、この血球細胞やその前駆細胞を傷害するという病態形成メカニズムが示唆された。

研究テーマB「光を用いた組織選択的な遺伝子組換え法の確立」

光活性化型 Cre (シロイヌナズナの光感受性タンパク質CRY2と、その光依存的結合相手のタンパク質CIBの断片を、分割したCre断片に融合させたタンパク質)について、これまで報告されたものに、スペーサーや核移行シグナル配列の挿入など様々な改変を試み、培養細胞における発現系で試験した。その結果、SV40由来の核移行シグナル配列をN末に核移行配列を挿入したものが、これまで報告されていたものに比べて、1.5倍程度高い効率で光依存的遺伝子組換えを示した。この光活性化型 Cre の遺伝子を、Rosa-flox-stop-tdTomato マウスの骨髄細胞にレトロウイルスによって導入し、γ線照射したコンジェニックマウスに移植することで骨髄キメラを作製した。得られた骨髄キメラマウスに皮下免疫をして、10日後に皮下リンパ節を露出させて光照射を行い、縫合して2日後にイメージングおよびフローサイトメトリーを行ったところ、胚中心B細胞において約5%の細胞が光刺激依存的にtdTomatoを発現していた。一方、胚中心B細胞に比べると、ナイーブリンパ球での光刺激依存的なtdTomato発現率は低かった。このことから光活性化型 Cre を強く発現させれば、増殖中の細胞においては、遺伝子組換えがin vivoにおいても光によって誘導できることが分かった。



3. 今後の展開

ヒトゲノム研究者との連携を深め、今回注目した転写因子と FoxP3 転写因子の両方の発現減弱が起きているような、遺伝子多型について探索する。今回の研究に用いたものよりも、光誘導組換え効率の高いオプトジェネティクスツールの開発や、生体内導入を継続して進めていく。今回可能となった生体内での皮膚角化細胞の光誘導遺伝子組換え技術を用いて、皮膚慢性炎症における、角化細胞の分化異常の追跡を行う。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

一部の制御性 T 細胞は抗体産生応答に重要な転写因子を発現しているが、これらの制御性 T 細胞は自己抗体産生を抑制しているだけでなく、抗体非依存的な病態形成も抑制していることを明らかにすることができた。この病態は、ヒトで知られている稀少疾患に非常に類似しており、この疾患の初めてのモデルマウスとなる可能性があることから、非常に重要な成果であると考えている。しかし、この病態形成メカニズムは、予想外な種類のエフェクター T 細胞が関与し、また FoxP3 の発現減弱という追加条件があることなど、非常に複雑であることが明らかになった。そのため、その解析に当初の想定よりもはるかに長い時間を要してしまった。また、光誘導組換えの効率を向上させるための in vitro の試験に多くの時間を費やしたが、最終的に、生体内でリンパ球の光誘導組換えを安定して行えるトランスジェニックマウス等の樹立を、研究期間内に達成できなかったことが残念である。しかし、生体内で皮膚角化細胞の光誘導組換えが可能となったことや、領域内の他の研究者との交流を契機に、生体イメージングを用いた慢性癢痒皮膚炎の研究を開始し、これについて国立医療研究開発機構の免疫アレルギー疾患実用化研究分野の事業に採択された。

(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)

リンパ濾胞にホーミングする制御性T細胞(Treg細胞)を選択的に消失する遺伝子改変マウスを独自に作出した。そのマウスでは、生後6週齢以降に脾腫と骨髄炎を伴う致死性の血球細胞が減少し、それが原因が自己抗体産生とT細胞の活性化に起因することを見出している。リンパ濾胞にホーミングするTreg細胞による抗体産生の制御は理解しやすいが、T細胞の活性化制御にどのようなタイプのTreg細胞が関与するのか現在追求中である。本研究成果は自己免疫性の血球細胞破壊性疾患の理解につながる知見である。また、免疫・炎症研究に利用可能な光照射によって細胞に遺伝子改変を加える方法(オプトジェネティクス)で、生体内細胞追跡法を確立することを目指し、光依存的遺伝子組換え配列(Opt-Cre)に各種改良を重ねて骨髄細胞に導入し、その細胞により骨髄キメラマウスを作製した。その結果、in vivoにおいてこの方法が一定程度成功することを確認した。しかしながら、全身性にOpt-Creを発現するノックインマウスではリンパ球の光標識が低効率であるため実用的ではなく、Opt-Creの発現を高めることが今後の課題として残った。一方、このノックインマウスの上皮細胞系においてはOpt-Creの発現が高く、表皮角化細胞の光標識は安定して達成できることが分かり、皮膚炎症モデルにおける角化細胞の分化追跡を可能にすると考えられた。

以上のように、本研究においてリンパ濾胞にホーミングするTreg細胞の新たな役割として、抗体依存/非依存性の慢性炎症性の血球細胞破壊性自己免疫疾患を制御する可能性が示された。現在そのメカニズムの詳細を解析中であり、今後成果を早期に論文化することが期待される。一方、オプトジェネティクスによる生体内細胞追跡法については、当初予定した免疫系細胞における光依存的遺伝子改変・標識が実用化までに至らなかった。しかしながら、表皮角化細胞分化の追跡に道が開けたことから、国立医療研究開発機構で免疫アレルギー疾患実用化研究分野の事業に採択されている。何れも、当初想定しなかった問題に阻まれる局面もあったが、粘り強い様々な工夫を重ねて成果を上げることができたと評価する。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Okada T, Takahashi S, Ishida A, Ishigame H. In vivo multiphoton imaging of immune cell dynamics. Pflugers Arch (2016) Epub ahead of print.
2. Shinnakasu R, Inoue T, Kometani K, Moriyama S, Adachi Y, Nakayama M, Takahashi Y, Fukuyama H, Okada T, Kurosaki T. Regulated selection of germinal-center cells into the memory B cell compartment. Nat Immunol (2016) 17, 861-869.
3. Kitano M, Yamazaki C, Takumi A, Ikeno T, Hemmi H, Takahashi N, Shimizu K, Fraser SE, Hoshino K, Kaisho T, Okada T. Imaging of the cross-presenting dendritic cell subsets in the skin-draining lymph node. Proc Natl Acad Sci USA (2016) 113, 1044-1049.
4. Moriyama S, Takahashi N, Green JA, Hori S, Kubo M, Cyster JG, and Okada T. Sphingosine-1-phosphate receptor 2 is critical for follicular helper T cell retention in germinal centers. J Exp Med (2014) 211, 1297-1305.
5. Okada T, Moriyama S, and Kitano M. Differentiation of germinal center B cells and follicular

helper T cells as viewed by tracking Bcl6 expression dynamics. Immunol Rev (2012) 247, 120-132.

(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:

日本免疫学会総会・学術集会(2011、2013、2015)、日本分子生物学会年会(2012)、日本アレルギー学会学術大会(2011)、日本細胞生物学会大会(2015、2016)、International Congress of Histochemistry and Cytochemistry(2012)、Annual Mouse Molecular Genetics Conference(2012)、Gordon Research Conference: T follicular helper cells(2013)、RIKEN IMS-JSI International Symposium on Immunology(2014)、Naito Conference: Bioimaging—a paradigm shift for the life sciences(2014)、Australasian Society for Immunology Annual Scientific Meeting(2014)等、20件。

著作物:

1. Kitano M, Okada T. Four-dimensional tracking of lymphocyte migration and interactions in lymph nodes by two-photon microscopy. Methods Enzymol 506:437-54, 2012.
2. 岡田峰陽、免疫学 Update:分子病態の解明と治療への展開(編集:審良静男、熊ノ郷敦、竹田潔):第19章 ライブイメージングによる免疫動態の解明、南山堂
3. 岡田峰陽、標準免疫学 第3版(監修:谷口克、編集:宮坂昌之、小安重夫):第8章 外来性抗原に対する反応:D 免疫細胞の動態免疫細胞の動態、医学書院

プレスリリース:

1. 抗体を産生する免疫応答に重要なT細胞の動きを制御する仕組みを解明—脂質メディエーターの受容体(S1PR2)によるT細胞の局在(2014年6月9日)
http://www.riken.jp/pr/press/2014/20140609_1/
2. キラーT細胞に重要な樹状細胞の生体内可視化に成功(2016年1月12日)
http://www.riken.jp/pr/press/2016/20160112_1/

研究報告書

「脳組織傷害後の慢性炎症における免疫制御機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 七田 崇

1. 研究のねらい

アルツハイマー病、多発性硬化症、脳卒中などの神経疾患において炎症の慢性化が病態と密接に関係する。炎症に伴って脳内に浸潤した免疫細胞（マクロファージやT細胞）は、何らかの脳内因子によって修飾を受けて炎症に寄与すると考えられる。本研究では、免疫細胞を活性化させて炎症促進に働く脳内因子として、Peroxisome oxidoreductin (Prx) を新たに同定した。Prxのマクロファージ活性化機構を解明し、さらにPrxを中和除去することで慢性炎症の悪循環を断ち切る治療法を開発する。一方で炎症の慢性期には、免疫細胞の一部はむしろ組織修復に働くと考えられているが、その分化メカニズムや機能は明らかになっていない。本研究ではこのような修復性の免疫細胞と脳内因子に着目して詳細な免疫学的・分子生物学的解析を行うと共に、組織修復に働く機能を解明する。本研究では脳内の免疫細胞が、脳内因子によって制御されることによって炎症を促進し、そして収束に至るという仮説を検証し、炎症が関与する神経疾患の新たな治療法を見出す。

2. 研究成果

(1) 概要

様々な神経疾患の病態に炎症が関与する。脳は無菌的な臓器であり、免疫系を活性化する病原体が存在しない。したがって脳組織に存在する内因性の炎症惹起因子 (Danger-associated molecular patterns : DAMPs) が炎症を制御していると考えられる。

まず、脳組織に存在する主な DAMPs の同定を試みた。脳抽出液を樹状細胞に添加することによって、DAMPs が含まれる脳抽出液の分画を決定し、その分画を質量分析によって解析した。その結果、得られた候補タンパクの中から Peroxisome oxidoreductin (Prx) を DAMPs として見出した。Prx は脳内に浸潤したマクロファージを TLR2、TLR4 依存的に活性化し IL-23 や IL-1 β のような炎症性サイトカインを産生させていた。IL-1 β は直接的に神経細胞を傷害し、IL-23 は IL-17 産生性 T 細胞を脳内に誘導することにより炎症を慢性化させる。Prx 抗体を脳虚血モデルマウスに投与すると、脳梗塞体積を有意に縮小させ、神経症状を改善した。

Prx が脳組織に存在し続けると炎症を慢性化させる可能性があるが、Prx は脳虚血誘導 4 日後には脳組織から概ね排除されている。したがって、Prx などの DAMPs を損傷した脳組織から積極的に排除するメカニズムが存在するものと考えられた。Prx などの DAMPs を蛍光標識して、脳梗塞巣から抽出したマクロファージやミクログリアに添加すると、蛍光標識した DAMPs がこれらの細胞に取り込まれてリソソームに運ばれ、分解排除されることが判明した。

次に、マクロファージの細胞株を用いてランダム変異を導入することにより、蛍光標識した Prx を取り込むことができない変異株を単離した。マイクロアレイ解析によって変異を起こした遺伝子群を検索した結果、Scavenger 受容体の一種である MSR1、MARCO と、マクロファージ

の分化に重要な働きを持つ転写因子 Mafb の、3 つの遺伝子が DAMPs の取り込みに重要であることを発見した。MSR1 や MARCO は脳梗塞巣に浸潤したマクロファージが強く発現しており、DAMPs を積極的に排除して炎症を収束させる働きをもつことが明らかとなった。転写因子 Mafb はマクロファージにおける MSR1 の発現を制御しており、やはり脳梗塞後の炎症の収束に重要な機能を有していた。Mafb を介して MSR1 の発現を上昇させる薬剤としてビタミン A 誘導体の 1 つであるタミバロテン (Am80) を見出し、新規の脳梗塞治療剤となり得ることを証明した。

以上のように、神経組織における炎症の慢性化を阻止するための、内在性の炎症収束メカニズムを解明することに成功し、新たな治療戦略を開発することができた。

(2) 詳細

研究テーマ A「脳組織における炎症が惹起されるメカニズムの解明」

1. 脳抽出液の強力な炎症惹起因子 (DAMPs) は Prx family タンパクである。
脳組織のホモジネート (脳抽出液) を培養樹状細胞に添加すると、IL-23、TNF α 、IL-1 β といった炎症性サイトカインの産生を誘導した。脳抽出液を熱処理、タンパク分解酵素処理すると、この活性が消失することから、活性物質はタンパク質であると考えられた。さらに脳抽出液を分画し、最終的にシヨ糖濃度勾配によって分子量で分けると、15~25kDa の分画に活性が認められた。この分画の質量分析の結果から得られた候補タンパクについてリコンビナントタンパクを作製し、樹状細胞に添加した。その結果、peroxiredoxin (Prx) family タンパクが強力に炎症性サイトカインの産生を誘導することが明らかとなった。
2. Prx は Toll 様受容体 (TLR2、TLR4) を介して浸潤マクロファージを活性化する。
Prx タンパクの変異体を作製した結果、Prx の α 3-helix 構造が Toll 様受容体 (TLR2 と TLR4) を介して、マクロファージや樹状細胞に炎症性サイトカインの産生を誘導することが判明した。Prx 中和抗体を脳虚血モデルマウスに投与すると、有意に脳梗塞体積を縮小、神経症状を改善し、神経保護効果を示した。Prx 中和抗体は虚血脳内でマクロファージが産生する IL-23 を減少させたことから、IL-23 によって虚血脳内で誘導される IL-17 産生性 T 細胞 (主に $\gamma\delta$ T 細胞) による脳虚血後炎症の遷延化にも、Prx が寄与しているものと考えられた。
3. Prx は脳梗塞発症 24 時間後に虚血脳内で産生され、浸潤マクロファージを活性化する。
脳梗塞組織における Prx 発現の経時変化を検討すると、Prx は虚血壊死に陥った組織で脳虚血誘導 24 時間をピークに強く発現していた。虚血ストレスに伴って脳細胞内で産生された Prx は、細胞死 (主にネクローシス) に伴って細胞外に放出され、周囲に浸潤したマクロファージを活性化するものと考えられ、細胞外に存在する Prx が脳に浸潤したマクロファージと接触する様子が多数観察された。
4. インフラマソームを介した炎症惹起メカニズムの解明
IL-1 β の産生にはインフラマソームの活性化が重要であるが、インフラマソームの活性化を阻害する作用のある低分子阻害剤を探索し、ブルトン型チロシンキナーゼ (BTK) の阻害剤であるイブルチニブを見出した。イブルチニブは、NLRP3 インフラマソームを阻害し、IL-1 β の産生および放出を抑制することが明らかとなった。イブルチニブを脳梗塞モデルマウスに投与した結果、脳梗塞領域の拡大抑制や運動機能の改善が認められた。

以上の成果によって、Prx が脳梗塞後の炎症の遷延化に寄与していることが明らかとなった。脳虚血モデルにおける検討では虚血誘導後 4 日目前後には、脳梗塞組織においても Prx の発現が見られなくなることから、Prx は何らかの機序で脳内から排除されているものと考えられた。Prx などの DAMPs の排除は、炎症の慢性化を防ぎ組織修復を始めるために必要な生体防御のメカニズムであろうと予想し、次に DAMPs の排除メカニズムの解明に挑んだ。

研究テーマ B「脳組織における炎症が収束に至るメカニズムの解明」

1. DAMPs は Scavenger 受容体によって処理される

脳梗塞巣に存在する細胞を Percoll によって抽出し、蛍光標識した Prx の取り込みを評価したところ、マクロファージが主な取り込み細胞であった。マクロファージ細胞株 (RAW264.7) を用いて、ENU (N-Nitroso-N-methylurea) 処理することによって DNA に高効率なランダム突然変異を導入し、Prx の取り込みが見られない変異 RAW 細胞株を樹立した。さらにマイクロアレイによる遺伝子発現解析した結果、Prx などの DAMPs のエンドサイトーシスに Scavenger 受容体として知られる MSR1、MARCO が重要であること、さらに転写因子 Mafk が MSR1 の発現を制御することを突き止めた。

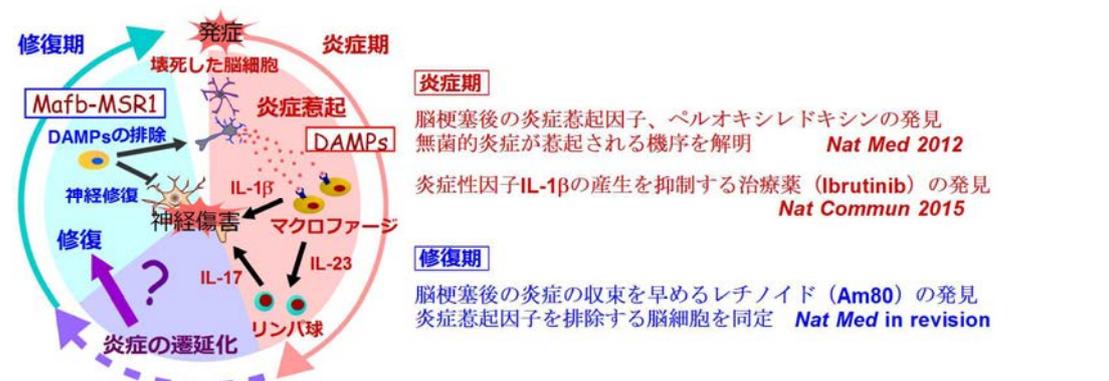
2. DAMPs 処理機構を阻害すると脳梗塞の病態が悪化する

Msr1/Marco-double KO マウスを用いて脳虚血モデルを作製すると、脳梗塞巣における Prx の排除が遅れ、炎症が遷延化し、脳梗塞体積が拡大、神経症状が悪化することが明らかとなった。MSR1 を高発現するマクロファージは炎症収束期に脳内に出現し、DAMPs を効率的に排除して神経栄養因子を産生する修復担当細胞であることが判明した。Mafk は MSR1 を高発現するマクロファージの誘導に重要な転写因子であった。

3. Am80 は Mafk を介して脳梗塞後の炎症収束を早める薬剤である。

以上の発見を新規治療法の開発に応用するため、Mafk を介して脳梗塞内で MSR1 の発現を促進する薬剤を探索した。その結果、ビタミン A 誘導体が Mafk の発現を促進することが判明した。Am80 は本邦では白血病の治療薬として使われているビタミン A 誘導体であるが、脳虚血モデルマウスに投与すると脳内では Mafk 依存的にマクロファージに作用して MSR1 の発現を促進することにより、DAMPs の排除を促進して炎症の収束を早め、梗塞体積の縮小、神経症状を軽減することを発見した。

以上のように、脳神経組織が損傷した場合に、炎症を惹起するメカニズムと炎症を収束させるメカニズムが脳に備わっており、炎症の慢性化を阻止することが解明できた。いずれも分子レベルでの解明を実現しており、脳梗塞における新たな治療標的を決定することができた。



3. 今後の展開

本研究によって脳神経組織における炎症の惹起と収束のメカニズムが明らかとなった。しかしながら、炎症後に脳組織がどのように修復されるのかはまだ十分に解明されていない。さらに修復と炎症は一体どのような関係にあるのだろうか？ 本研究の成果はこの命題に挑むための足掛かりになるものであり、今後は修復のメカニズムを詳細に解明する必要がある。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

脳神経組織の損傷後に起こる炎症の惹起と収束メカニズムを解明した。研究開始時に計画していた課題は概ね達成することができた。本さきがけ研究課題は終了となるが、今後、脳内における炎症後の修復メカニズムを詳細に解明する必要性についても明確となった。したがって、本研究課題をさらに発展させる形で研究を継続するため、平成 29 年 4 月より東京都医学総合研究所にて新規のプロジェクトチームを創設することとなった。本さきがけ研究の成果が認められた結果として、新規プロジェクトのリーダー(principal investigator)に採用されており、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)

脳虚血モデルにおける脳梗塞巣拡大に関与するDAMPsとして、脳虚血誘導24時間をピークに強発現するPeroxisome oxidoreductin (Prx)を同定した。Prxは細胞死に伴って細胞外に放出され、その α 3-helix構造により、周囲に浸潤したマクロファージをTLR2/TLR4を介して活性化し、IL-23やIL-1 β のような炎症性サイトカインを産生させて、脳内炎症を引き起こすことを初めて示した。また、Prx中和抗体を脳梗塞モデルマウスに投与すると、有意に脳梗塞体積を縮小して、神経症状を改善し、神経保護効果が認められた。さらに、脳梗塞後の炎症を惹起するIL-1 β の産生にNLRP3インフラマソームの活性化が必要であることから、インフラマソームの活性化を阻害する作用のある低分子阻害剤を探索して、BTK阻害剤であるイブルチニブを見出し、その投与により脳虚血モデルマウスの脳梗塞巣の拡大抑制や運動機能の改善効果を認めた。一方、Prx放出後において脳虚血後炎症を収束させるキー分子として、Prx排除に重要なScavenger受容体であるMSR1とMARCOを同定し、これら分子を欠損するマウスでは、炎症が遷延化し、脳梗塞体積の拡大と共に神経症状が悪化することを明らかにした。そして、転写因子MafkがMSR1の発現を制御することを突き止め、Mafkを介して脳梗塞内でMSR1の発現を促進する薬剤を探索し、白血病の治療薬として使われているビタミンA誘導体であるAm80を見いだした。さらに、Am80の脳梗塞モデルマウスへの投与により病態と症状を改善することを証明した。

以上のように、脳梗塞巣の拡大と神経症状の重篤化を引き起こす脳内自然炎症の発症ばかりか、その収束のメカニズムを分子レベルで解明すると共に、新たな治療標的を決定して、その炎症の抑制と収束を促進する薬物を見いだすという素晴らしい成果を上げ、非常に高いレベルの論文を複数生み出してきたことを高く評価する。また、本研究成果が認められた結果

として、平成29年4月より東京都医学総合研究所にて新規のプロジェクトチームを創設する予定であり、今後のさらなる研究の発展が見込まれる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Shichita T, Ito M, Morita R, Komai K, Noguchi Y, Ooboshi H, Koshida R, Takahashi S, Kodama T, Yoshimura A. Mafk prevents excess inflammation after ischemic stroke by accelerating clearance of danger signals through MSR1. *Nat Med.* in revision
2. Ito M, Shichita T, Okada M, Komine R, Noguchi Y, Yoshimura A, and Morita R. Bruton's tyrosine kinase (BTK) is an essential component for NLRP3 inflammasome activation and a potential therapeutic target for inflammation after ischemic brain injury. *Nat Commun.* 6: 7360 (2015)
3. Shichita T, Ito M, Yoshimura A. Post-ischemic inflammation regulates neural damage and protection. *Front Cell Neurosci.* 8:319 (2014)
4. Shichita T, Hasegawa E, Kimura A, Morita R, Sakaguchi R, Takada I, Sekiya T, Ooboshi H, Kitazono T, Yanagawa T, Ishii T, Takahashi H, Mori S, Nishibori M, Kuroda K, Miyake K, Akira S, Yoshimura A. Peroxiredoxin family proteins are key initiators of post-ischemic inflammation in the brain. *Nat Med.* 18(6): 911-917 (2012)

(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)

・招待講演

1. Shichita T, Yoshimura A: The resolution of cerebral post-ischemic inflammation. 学会名: MMCB2016 場所: Tokyo, Japan 年月: 2016 Jun
2. 七田 崇, 吉村昭彦: 脳梗塞の炎症の収束メカニズム 学会名: 第 89 回日本生化学会大会 場所: 仙台国際センター 年月: 2016 年 9 月
3. Shichita T, Yoshimura A: Regulation of post-ischemic inflammation by DAMPs and immune cells. 学会名: 10th World Congress for Microcirculation 場所: 京都国際会館 年月: 2015 Sep
4. 七田 崇, 伊藤美菜子, 吉村昭彦: 脳梗塞の炎症とその収束 学会名: 第 36 回日本炎症再生学会 場所: 虎ノ門ヒルズフォーラム 年月: 2015 年 7 月
5. 七田 崇, 大星博明, 吉村昭彦: DAMPs による脳梗塞後の炎症とその終焉 学会名: 第 26 回脳循環代謝学会 場所: 岡山 年月: 2014 年 11 月

・受賞

1. 「循環器学研究振興基金賞」(2014)

2. 「科学技術分野の文部科学大臣表彰若手科学者賞」(2013)
3. 「日本脳卒中学会賞」(2013)
4. 「日本免疫学会研究奨励賞」(2012)

・プレスリリース

1. 脳梗塞後の炎症が悪化するメカニズムを解明 ～白血病治療薬が脳梗塞の治療にも使える可能性～(2015年6月)
<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20150610/index.html>
2. 「脳梗塞を悪化させる新規メカニズムを発見」(2012年5月)
<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20120521/index.html>

研究報告書

「炎症誘導因子による炎症抑制機構の解明と慢性炎症制御技術基盤の確立」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 中江 進

1. 研究のねらい

「炎症」は病原体からの生体防御に必要な免疫応答であるが、アレルギー疾患や自己免疫疾患はいうまでもなく、癌や糖尿病等の疾病の発症や慢性化においても「炎症」が関与する。したがって、「炎症誘導因子」の同定と機能解析は、その因子の機能阻害が炎症抑制剤の開発への可能性をもつことから、難治性慢性炎症疾患の治療法の確立にとって重要な位置を占める。事実、その研究成果から抗体医薬等の治療薬が生まれ、各種疾患の治療への有効性が示されている(ただし、後述するが万能ではなく副作用が問題視されている)。しかしながら、本申請では、そのような「炎症誘導因子」による炎症誘導作用に焦点をあてた難治性疾患の発症機構の解明、いわば、正攻法的な戦略ではなく、「炎症誘導因子」による「炎症の“鎮静・抑制化”」という従来の概念とは正反対の視点にたった、難治性慢性炎症疾患の炎症誘導制御機構の解明計画を提案する。

「炎症誘導因子」による「炎症の鎮静・抑制化」に注視する意義は何か？正常な個体では、炎症が起きた組織では、免疫細胞によってその炎症を惹起した原因が取り除かれ、その後、自然に炎症が消失する(「自然に(副作用なく)」ということが重要である)。その自然に炎症を鎮静・抑制化させるためには、「炎症誘導因子」自体が必要であることを、申請者らは証明した(Nat Immunol, 8, 1095, 2007)。つまり、ある種の「炎症誘導因子」は、炎症誘導(アクセル)と鎮静化(ブレーキ)の両特質を併せ持つ。そこで、本研究では、マウス大腸炎モデルを用いて、炎症誘導因子である IL-33 による炎症の沈静・抑制化機構について個体・細胞・分子レベルでの解明を目的とする。炎症誘導因子による炎症誘導(アクセル)と鎮静化(ブレーキ)のスイッチは、どのようにして切り替わるのか、その分子機構を明確にすることより、「炎症誘導因子」による炎症を鎮静化するブレーキスイッチを選択的に作動させる事で、副作用のない、より自然な炎症抑制方法をデザインすることが可能となることが期待され、難治性慢性炎症疾患に対する新しい治療法の開発基盤の確立に寄与できることが期待される。

2. 研究成果

(1) 概要

クローン病や潰瘍性大腸炎に代表される炎症性大腸炎は国内に約 15 万人の患者がおり、厚生労働省より特定疾患に指定される原因不明の慢性炎症疾患である。治療法としてステロイドや免疫抑制剤が有用であるが根治に至らないことが多い。

IL-33 をマウスに投与した場合、肺と腸管に炎症が誘導される。クローン病や潰瘍性大腸炎の患者の標本では、健常者の標本と比較して、IL-33 や IL-33 受容体の発現が高いことが

知られている。また、海外では、クローン病や潰瘍性大腸炎の患者の IL-33 や IL-33 受容体遺伝子に多型 (SNP) があることが報告されており、その SNP の有無と大腸炎の重症度の間に相関があることが報告されている。したがって、IL-33 は、大腸炎の発症に関わり、症状の悪化を引き起こすサイトカインであることが推測された。しかしながら、大腸炎の発症および病態の形成における IL-33 の役割については不明であったため、マウスの大腸炎モデルを用いて、大腸炎の発症機序における IL-33 の機能解析を行った。

マウス大腸炎には、飲料水にデキストランを混ぜて摂取させることにより誘導するデキストラン大腸炎、トリニトロベンゼンスルホン酸やオキサゾロンなどの化学物質を用いたハプテン誘導性大腸炎、IL-10 欠損マウスなどの遺伝子改変マウスで見られる自然発症型大腸炎、T 細胞が存在しないマウス (scid や Rag 欠損マウス) へのナイーブ (CD4⁺CD45RB^{hi}) T 細胞の移植による大腸炎 (CD4⁺CD45RB^{hi} T 細胞大腸炎) などが知られている。デキストラン大腸炎とハプテン大腸炎は、T 細胞が存在しない Rag 欠損マウスでも発症する。一方で、ヒトの慢性大腸炎では、炎症局所に T 細胞の浸潤が認められるため、本研究では、T 細胞依存的に発症する CD4⁺CD45RB^{hi} T 細胞大腸炎を採用した。

Rag 欠損マウスと IL-33 欠損 Rag 欠損マウスに CD4⁺CD45RB^{hi} T 細胞大腸炎を誘導したところ、IL-33 欠損 Rag 欠損マウスでは Rag 欠損マウスよりも早く大腸炎が発症し、死亡する結果が得られた。したがって、IL-33 は大腸炎を誘導するのではなく、むしろ、抑制する働きがあることが明らかになった。現在、IL-33 は、これまでに知られていない免疫機構によって、大腸炎の抑制に関わることが明らかになりつつある。

(2) 詳細

正常の Rag 欠損マウスの大腸と比較して、CD4⁺CD45RB^{hi} T 細胞大腸炎を誘導した Rag 欠損マウスの大腸では、IL-33 mRNA の発現レベルの増強が認められた。免疫染色解析により、大腸病変部で IL-33 を発現している細胞は主に、マクロファージの一部とマスト細胞であることが明らかになった。これらの結果より、CD4⁺CD45RB^{hi} T 細胞大腸炎の発症に、IL-33 が何らかの関わりがある可能性が示唆された。

そこで、Rag 欠損マウスと IL-33 欠損 Rag 欠損マウスに CD4⁺CD45RB^{hi} T 細胞大腸炎を誘導したところ、IL-33 欠損 Rag 欠損マウスでは Rag 欠損マウスよりも早く大腸炎が発症し、死亡する結果が得られた。Rag 欠損マウスと比較して IL-33 欠損 Rag 欠損マウスの大腸組織では、炎症細胞の浸潤が多く認められ、病理学的な評価においても重症化していることが明らかになった。これに相関して、大腸組織における炎症誘導因子 IL-1 β 、IL-6 や IFN- γ mRNA 発現も亢進していた。以上より、IL-33 は、T 細胞依存的な自己免疫様大腸炎の発症及び病態の形成を抑制する働きがあることが明らかになった。

CD4⁺CD45RB^{hi} T 細胞大腸炎の炎症局所において、IL-33 は大腸のマクロファージとマスト細胞で発現していることが明らかになっている。マクロファージは腸内細菌構成成分である LPS の刺激によって IL-33 を発現し、マスト細胞は IL-33 の刺激により、IL-33 を発現することが知られている。正常の大腸では、常在マクロファージは存在するが、マスト細胞はほとんど見られないため、最初に腸内細菌構成成分 LPS の刺激によってマクロファージが活性化して IL-33 を発現することが予期された。LPS によって活性化されたマクロファージは、IL-33 と同

時に、マスト細胞遊走因子を産生して、大腸の炎症部位にマスト細胞を引き寄せ、引き続き、マクロファージからの IL-33 によってマスト細胞が刺激されることにより、マスト細胞が大腸炎の抑制に関わるという可能性が考えられた。しかしながら、T 細胞依存的な自己免疫様大腸炎の発症におけるマスト細胞の関与については現時点で報告がなされていない。そこで、マスト細胞が T 細胞依存的な自己免疫様大腸炎の発症に関与するかどうかを明らかにするため、Rag 欠損マウスとマスト細胞欠損 ($Kit^{W-sh/W-sh}$) Rag 欠損マウスに $CD4^+CD45RB^{hi}$ T 細胞大腸炎を誘導した。その結果、IL-33 欠損 Rag 欠損マウスと同様に、マスト細胞欠損 Rag 欠損マウスでは Rag 欠損マウスよりも早く大腸炎が発症し、死亡する結果が得られた。Rag 欠損マウスと比較して、マスト細胞欠損 Rag 欠損マウスの大腸病変部位では、炎症細胞の浸潤増強、炎症誘導因子 RNA の発現増強が認められた。

マスト細胞欠損 Rag 欠損マウスに、野生型マウスのマスト細胞あるいは IL-33 欠損マウスのマスト細胞を移植し、これらのマウスに $CD4^+CD45RB^{hi}$ T 細胞大腸炎を誘導した。その結果、両群間での大腸炎の発症率や重症度に差は認められなかった。これらの結果から、マスト細胞が産生する IL-33 は $CD4^+CD45RB^{hi}$ T 細胞大腸炎の抑制には無関係であることが明らかになった。

一方で、マスト細胞欠損 Rag 欠損マウスに、野生型マウスのマスト細胞あるいは IL-33 受容体欠損マウスのマスト細胞を移植し、これらのマウスに $CD4^+CD45RB^{hi}$ T 細胞大腸炎を誘導した場合は、IL-33 受容体欠損マウスのマスト細胞を移植した群では、大腸炎が重症化することが明らかになった。これらの結果から、マクロファージなどが産生する IL-33 がマスト細胞を活性化することが $CD4^+CD45RB^{hi}$ T 細胞大腸炎の抑制に重要であることが明らかになった。

IL-33 によって活性化されたマスト細胞はどのような機序で大腸炎の抑制に関わるのか？ In vitro でマスト細胞を IL-33 で刺激を行うと、マスト細胞は炎症誘導因子である IL-6 や TNF を産生するだけでなく、IL-1 受容体アンタゴニスト (IL-1Ra) や TGF- β 1 といった抗炎症性サイトカインを産生する。これら抗炎症性サイトカインの遺伝子欠損マウスは大腸炎を自然発症することが知られていることから、マスト細胞が産生するこれら抗炎症性サイトカインが大腸炎の抑制に関わっている可能性が考えられた。そこで、マスト細胞欠損 Rag 欠損マウスに野生型マウスのマスト細胞、IL-10 欠損マウスのマスト細胞、IL-1Ra 欠損マウスのマスト細胞、および、TGF- β 1 欠損マウスのマスト細胞を移植し、マスト細胞でのみ、これらサイトカインが産生されないマウスを用意した。これらマウスに $CD4^+CD45RB^{hi}$ T 細胞大腸炎を誘導した結果、大腸炎誘導後の生存率は、(Rag 欠損マウス = 野生型マスト細胞移植群 = IL-10 欠損マスト細胞移植群 = IL-1Ra 欠損マスト細胞移植群) > (TGF- β 1 欠損マスト細胞移植群 = マスト細胞欠損 Rag 欠損マウス) となった。したがって、マスト細胞が産生する TGF- β 1 が大腸炎の抑制に必須であることが明らかになった。

3. 今後の展開

TGF- β 1 欠損マウスでは、大腸炎を自然発症することが知られている。したがって、TGF- β 1 が大腸炎の抑制に重要であることが明らかになっているが、どのような機序で大腸炎の抑制に関わるのかは明確になっていない。大腸内の樹状細胞や 3 型自然リンパ球が大腸炎の炎症誘導に関わっていることが報告されている。そこで、マスト細胞が産生する TGF- β 1 が樹状細胞や 3 型自然リンパ球の活性化の抑制に関わるのかどうか、明確にする。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究では、大腸炎の抑制機序の解明を目指して、マウスの慢性大腸炎モデルを採用した。慢性大腸炎の誘導にはマウスであっても長い時間を必要としたが、概ね、計画通りに遂行できたが、進めていくうちに、解析の幅が広がり、期間内に論文として公開できなかった点は反省すべき点と考えている。本研究の成果の一つに、大腸炎の抑制に IL-33 がマスト細胞を刺激することが重要であることを新しく見出した点が挙げられる。本研究は、IL-33 がいかにして大腸炎の抑制に働くのか、その機序についての基礎的な理解の研究であるため、その成果は大腸炎の治療にすぐに利用できるものではないが、今後、IL-33 を標的とした創薬の開発への基礎的な知識の提供には大きな意味を持つと見込んでいる。

この研究から派生した様々な研究を学術誌に複数公表することができ、その成果が認められ、国内外の多くの研究者からの共同研究の申し込みがあり、また、国内外の招待講演、著名な科学雑誌の総説執筆や査読依頼、海外研究機関の研究費申請書の査読依頼が増えるようになり、当該分野の一研究者として認知されるようになった。

(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)

炎症を悪化させる因子と考えられていた、IL-33 やマスト細胞の自己免疫様慢性大腸炎における役割を解析するため、IL-33 あるいはマスト細胞を欠損する免疫不全 Rag 欠損マウスにナイーブ(CD4+CD45RBhi) T細胞を移植して慢性の大腸炎を誘導した。そのマウスにおいては大腸炎発症と死亡が早期に認められた。そこで IL-33 やマスト細胞の大腸炎抑制機構を解析したところ、腸内細菌構成成分によって主にマクロファージが IL-33 を産生し、それが IL-33 受容体を発現するマスト細胞を刺激して TGF- β 1 産生を誘導し、大腸炎の抑制に必須であることを見いだしている。本研究成果を得るために、大腸炎発症に関与すると考えられる種々の分子の遺伝子欠損マウスを利用し、それらのマウスからマスト細胞を調製、あるいはそれらマウスの骨髓細胞からマスト細胞を培養・増殖させて移植するなど、時間と根気を要する詳細な実験を行っている。数多くの因子や細胞種が関与する中から、多大な努力によって新たな知見を見いだした。

未発表ながら、上記以外にも多くのデータを取得して当初の計画は概ね達成できており、今後における早期の論文化が期待できる。炎症性大腸炎は、近年日本においても年々患者数の増加がみられる原因不明とされている疾患である。中江研究者は、本研究課題と関連する研究において、多数の研究者と共同研究を行い、多くの論文・総説の発表、国内外の招待講演などを行っている。今後炎症性大腸炎の治療戦略を立案するにあたって、本研究成果が重要な示唆を与えうるものと確信する。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. 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, <u>Nakae S</u> . An Interleukin-33-Mast Cell-Interleukin-2 Axis Suppresses Papain-Induced Allergic Inflammation by Promoting Regulatory T Cell Numbers. <i>Immunity</i> . 2015, 43(1):175-186.
2. Morita H, Arae K, Unno H, Toyama S, Motomura K, Matsuda A, Suto H, Okumura K, Sudo K, Takahashi T, Saito H, Matsumoto K, <u>Nakae S</u> . IL-25 and IL-33 Contribute to Development of Eosinophilic Airway Inflammation in Epicutaneously Antigen-Sensitized Mice. <i>PLoS One</i> . 2015;10(7):e0134226.
3. Shibui A, Takamori A, Tolba EMT, Nambu A, Shimura E, Yamaguchi S, Sanjoba C, Suto H, Sudo K, Okumura K, Sugano S, Morita H, Saito H, Matsumoto K & <u>Nakae S</u> . IL-25, IL-33 and TSLP receptor are not critical for development of experimental murine malaria. <i>Biochem Biophys Rep</i> . 2016, 5:191-195.
4. Nakanishi W, Hiraishi Y, Yamaguchi S, Takamori A, Morita H, Matsumoto K, Saito H, Sudo K, Yamasoba T and <u>Nakae S</u> . TSLP receptor is not essential for house dust mite-induced allergic rhinitis in mice <i>Biochem Biophys Rep</i> . 2016, 7:119-123.
5. Morita H, Saito H, Matsumoto K, <u>Nakae S</u> . Regulatory roles of mast cells in immune responses. <i>Semin Immunopathol</i> . 2016, 38(5):623-629.

(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)

招待講演・学会発表等

1. Nakae S. "IL-17 family cytokines in allergy." The Centre for Allergy Research Seminar: this year's PhARF awardees, Karolinska Institute, Sweden. Oct 20, 2011
2. Nakae S. "Role of IL-33 in allergy." The 22nd World Allergy Congress, Cancun, Mexico. Dec 5, 2011
3. Nakae S. "Role of IL-33 in allergy." The 29th Symposium of the Collegium Internationale Allergologicum, Jeju, Korea. Oct 17, 2012.
4. Nakae S. "IL-33 in Inflammation." The 12th Biennial International Endotoxin & Innate Immunity Society Meeting, Tokyo. Oct 24, 2012.
5. Nakae S. "Role of IL-33 in innate-type immune cells in allergy." WAO Symposium on Immunology & Biologics, Chicago. Dec 14, 2013.

受賞

1. 2011年11月 第21回 アボットジャパン・アレルギー学術奨励賞(公益財団法人日本アレルギー協会)
2. 2014年9月 Highly Cited Researchers(トムソン・ロイター)

3. 2015年9月 Highly Cited Researchers(トムソン・ロイター)

著作物

(英文総説)

1. Ohno T, Morita H, Arae K, Matsumoto K, Nakae S. Interleukin-33 in allergy. *Allergy* 2012, 67; 1203-14.
2. Nakae S, Morita H, Ohno T, Arae K, Matsumoto K, Saito H. Role of interleukin-33 in innate-type immune cells in allergy. *Allergol Int* 2013, 62; 13-20.
3. Ikutani, M., Tsuneyama, K., Nakae, S. and Takatsu K. Emerging roles of IL-33 in inflammation and immune regulation. *Inflammation and Regeneration*, 2015; 35(2), 69-77.
4. Morita H, Saito H, Matsumoto K, Nakae S. Regulatory roles of mast cells in immune responses. *Semin Immunopathol.* 2016 Sep;38(5):623-9.

(日本語総説)

1. 大野建州、東 みゆき、中江 進:IL-33 と慢性アレルギー炎症。実験医学、2012年、第30巻第6号、918-925頁。
2. 大野建州、東 みゆき、中江 進:IL-25、IL-33 と自然リンパ球～感染防御、アレルギー疾患へのかかわり～。実験医学、2012年、第30巻第19号、3062-3071頁。
3. 新江 賢、森田英明、大野建州、松本健治、中江 進:IL-33 とアレルギー。最新医学、2013年、第68巻第3号、552-567頁。
4. 海野浩寿、森田英明、新江 賢、大野建州、斎藤博久、松本健治、中江 進:細胞死によるアレルギー疾患への影響—IL-33、HMGB-1などのDAMPsによる免疫応答。実験医学増刊、2013年、第31巻第17号、105-112頁。
5. 鈴川真穂、中江 進:IL-33。標的分子の基礎医学的 pursuit。アレルギーの臨床、2014年、第34巻、1239-1242頁。
6. 森田英明、松本健治、中江 進:IL-33 とマスト細胞を介した新規気道炎症抑制機構、感染 炎症 免疫、2016年、第46巻第2号、68-70頁。羊土社

著書

1. Ishigame, H., Nakae, S. The roles of IL-17A and IL-17F in infection and inflammatory disorders. In “Cytokine Frontiers” (ed. Y. Yoshimoto & Y. Yoshimoto). Springer Science + Buisness Media, LLC, New York, NY, p 79-101, 2014.

プレスリリース

1. 科学新聞(2015年7月31日):気管支喘息抑える新たなメカニズム
2. 日刊工業新聞(2015年7月22日):東大など、「気管支ぜんそく」抑える生体内の新しい仕組み発見
3. 日経プレスリリース(2015年7月22日):東大など、気管支喘息を抑える新しい免疫応答機構を解明

研究報告書

「癌の転移前診断の確立と治療をめざして」

研究タイプ: 大挑戦型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 29 年 3 月

研究者: 平塚(中村) 佐千枝

1. 研究のねらい

がんは、昭和56(1981)年から我が国の死亡原因の第1位である。がんの統計(財団法人がん研究振興財団)によると男性、女性ともに、おおよそ2人に1人が一生のうちにがんと診断され、男性ではおおよそ4人に1人、女性ではおおよそ6人に1人ががんで死亡すると言われている。がんは、発生した場所(原発巣)に留まっているならば比較的治療しやすいが、悪性化した癌は、原発巣から離れて、血管を通過して他の組織へ転移する特徴があり、これが癌治療を難しくしている。現在は、転移してしまった癌そのものに対する治療が中心である。

癌細胞が転移するにあたって、転移しやすい臓器があることは古くから知られた現象である。しかし、癌細胞は転移先をどのように選ぶのかについてはよく分かっていない。古典的に主な原因は、解剖学的な血行動態によるものと考えられてきた。近年、癌が転移する前に、すでに遠隔の臓器に転移に有利な土壌が形成されることが明らかになってきた。原発癌よりのサイトカイン、ケモカインなどの液性蛋白の分泌、低酸素誘導蛋白、エクソソーム、核酸によって、肺、肝臓、リンパ節などにおいて炎症類似反応が引き起こされ、転移前に転移予定先に、転移に有利な土壌を作り出す現象-転移前土壌が形成される。この血中の液性因子は、転移予定臓器の血管を網羅的に流れて、刺激することが予想されるが、実際の癌の転移は、1つの臓器の中でも数個にとどまり、数えきれないほどの転移形式をとらない。このことより、転移前の臓器では、1つの臓器の中でも転移しやすい局所部位(focal area)があり、それは転移する前に決定されていることをマウス担癌モデルを用いて最近発見した。さらに、focal area では透過性が亢進しており、炎症様である。この部位の炎症反応関連遺伝子を同定して抑制し、focal area を消失させることが転移の抑制につながることをマウスを用いた動物レベルでめざす。また大挑戦型として、ヒトのレベルでの本現象の解明を最終目標としている。癌を有する患者さんにおいて、転移前あるいは微小転移の段階で、マウスと同様に肺に炎症類似反応が認められるか、限局性なのか、検出するための指標を何にするのか、転移前に制御可能なのかを含めた転移前診断、治療をめざす。

2. 研究成果

(1) 概要

癌が転移する前の時点で、離れた他の臓器の局所に、転移するのに有利な“転移予定地”を形成することが、マウスを用いた研究で明らかになってきている。しかしマウスの実験レベルでも、癌の転移がなぜ臓器の特定の局所におきるのか、そのメカニズムの詳細は不明であった。さらにこれまで、そのような“転移予定地”が形成される現象がヒトにおいて確

認められたことはなかった。

現在までに我々は、担癌マウス(皮下や乳腺組織などに癌を実験的に移植して定着させたマウス)に青色の色素を静脈内投与すると、局所の血管から血管内の青色色素が漏れ出す現象(血管透過性の亢進)が起き、転移前の肺の局所に濃い青色のスポットが形成され、その部位に転移が起こることを見出している。今回この現象がどのような分子メカニズムにより生じているのか確かめるため、スポット形成した部位とそうでない部位より、RNA をそれぞれ抽出して網羅的に遺伝子発現を比較した。発現に差があった遺伝子の中で、血管透過性の亢進による炎症様反応に関係すると考えられる受容体 CCR2 という分子に着目した。CCR2 と、CCR2 に結合するリガンドである CCL2、それぞれの遺伝子欠損マウスを用いて担癌マウスを作製し、血管透過性の上昇をみたところ、両方の遺伝子欠損マウスの肺では、スポット状の濃い青色となった部位は殆ど見られなかった。次に、血管透過性の亢進と癌の転移に関係があるかを調べた。野生型(遺伝子の正常な型)の担癌マウスに、蛍光色素で標識した癌細胞を静脈から入れると、肺の血管透過性が亢進している局所に一致して癌細胞が集まるのが観察されたが、そのような現象は CCL2 や CCR2 の遺伝子欠損した担癌マウスでは認められず、結果として癌の転移は抑制された。そして S100A8 と SAA3 が CCL2-CCR2 システムの調節を受けていることを見だし、このカスケードの最下流で、自然免疫反応で中心的な役割を果たしている TLR4/MD-2 複合体の MD-2 遺伝子が欠損した担癌マウスでも、血管透過性の亢進抑制を伴った、癌細胞の転移抑制が認められた。さらに、転移を伴う悪性の癌で亡くなった患者さんの肺の転移のない部分に、担癌マウスでみられた“転移予定地”と大変良く似た炎症性反応が起きている局所が存在する可能性を見いだした。今後、ヒトにおいて、癌転移の予測や予防的な治療の可能性につながることを示唆された。

(2) 詳細

研究テーマ A (マウスレベルにおける“転移予定地の形成のメカニズムの解明)

1. CCL2-CCR2 システムは転移前の肺に透過性亢進部位をつくりだす

担癌マウスに青色の色素(EB:エバンスブルー)を静脈内投与すると、転移が起きる前の肺の局所に、血管透過性亢進部位である青色のスポットが形成される。今回その現象がどのような分子メカニズムにより生じているのか確かめるため、スポット形成した部位とそうでない部位より、RNA をそれぞれ抽出して網羅的に遺伝子発現を比較した。そして、発現に差があった遺伝子の中で、血管透過性の亢進に関与している可能性の高い炎症反応に関係すると考えられる受容体分子である CCR2 に着目した。そしてこの CCR2 と、CCR2 のリガンドである CCL2 それぞれの遺伝子欠損マウスを用いて担癌マウスを作製した。そして、それらの担癌マウスの静脈内に青い色素を注射し血管透過性を見たところ、野生型(遺伝子の正常な型)では局所性の血管透過性亢進部位を認めたが、CCL2 と CCR2 遺伝子欠損担癌マウスの肺では、透過性スポットはほとんど認められなかった。

2. CCL2-CCR2 システムによりコントロールされている透過性亢進部位に癌細胞は好んで集まりやすい

血管透過性亢進部位と、癌細胞の転移に関係があるかを調べた。野生型の担癌マウスに、蛍光色素で標識したがん細胞を静脈から入れると、肺の血管透過性が上昇している局所に一致してがん細胞が集まるのが観察された。しかし、この現象は CCL2 や CCR2 の遺伝子欠損担癌マウスでは認められず、結果として癌の転移は抑制された。

3. 透過性亢進部位を作り出すのは、S100A8 と SAA3 である

以前、私たちは炎症に関わる S100A8、SAA3 という蛋白が転移前の肺全体において上昇していることを明らかにしてきた。この分子の蛋白発現が透過性亢進部位においてどうなっているかを調べたところ、いずれの分子も透過性亢進部位で発現上昇していた。また S100A8 SAA3 と CCL2-CCR2 との関わりを見るために、担癌マウスにした CCL2 遺伝子欠損マウスの肺を調べたところ、これらのマウスにおいて SAA3 の発現は抑えられていた。このことより、CCL2-CCR2 によって SAA3 の発現調整が行われていることが分かった。次に透過性亢進部位を実際に形成する分子の特定を行った。候補蛋白を哺乳類細胞を用いて作製し、腹腔および肺における透過性を測定した。まずアッセイ系として確立され、見やすい腹腔透過性亢進実験を行うと、ポジティブコントロールである血管内皮細胞増殖因子 (VEGF)と同様以上に S100A8、SAA3 により血管透過性誘導を認めた。一方 CCL2 では強い誘導を認めなかった。このことより、CCL2-CCR2-S100A8-SAA3 の一連の反応の中で、血管透過性を強く誘導したのは S100A8-SAA3 であることが示され、S100A8 と SAA3 は肺に透過性亢進を誘導できることが示された。

4. S100A8-SAA3-MD-2 カスケードは透過性亢進と転移に関与する

このカスケードの下流の SAA3 の受容体である TLR4/MD-2 複合体についても調べた。S100A8 や SAA3 の受容体である TLR4/MD-2 は自然免疫反応で中心的な役割を果たしていることが知られている。SAA3 による透過性誘導に関しては、腹腔透過性システムを用いて調べると、腹腔内 EB の濃度は MD-2 欠損マウスで減弱した。担癌にした MD-2 欠損マウスは、野生型と比べて肺の血管透過性の亢進は抑制され肺では肉眼的にも青色のスポットは認められなかった。最終的に、担癌 MD2 欠損マウスでは静注した癌細胞の肺への集積が抑制された。

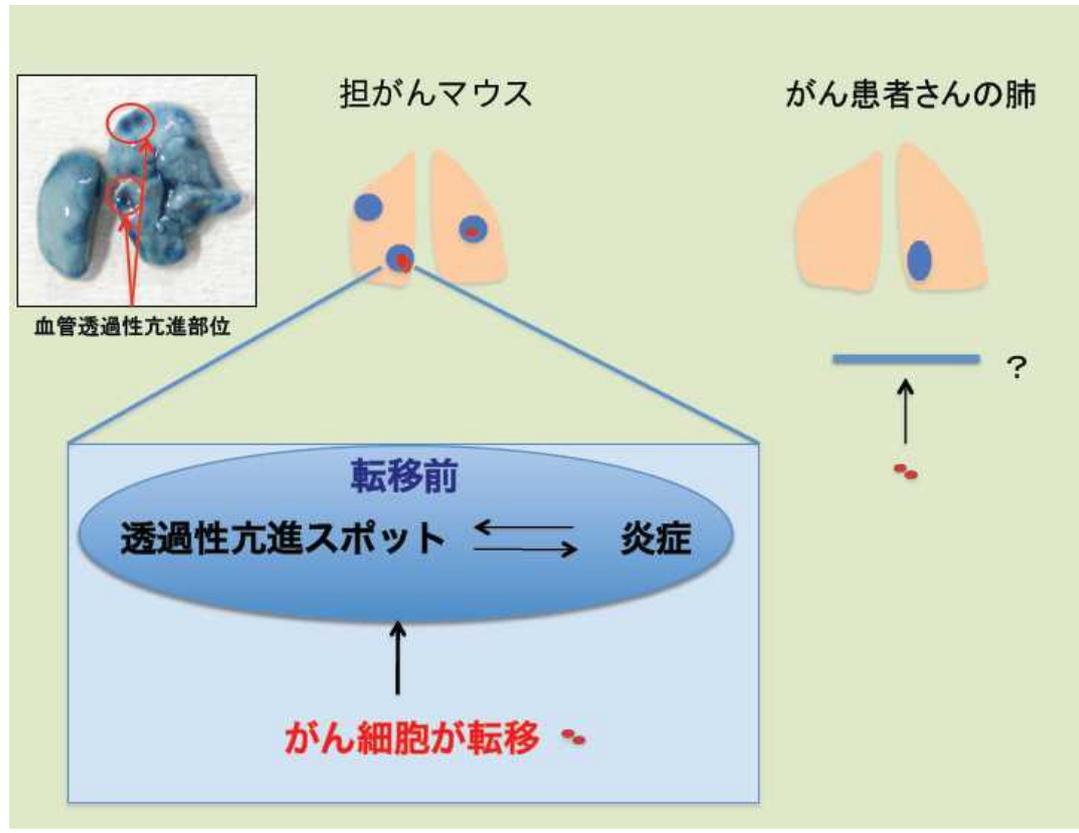
以上のことから、原発癌による CCL2 が血液を介して”転移予定地”で局所的に発現する CCR2 に作用し、その刺激によって産生された S100A8 や SAA3 が TLR4/MD-2 複合体に作用して、血管内皮細胞の血管透過性を局所的に上昇させ、癌の転移を促進するというメカニズムが明らかになった。

研究テーマ B (ヒトレベルでの転移予定地の可能性の検索)―大挑戦項目

5. 担癌の患者さんにおいて、転移前の肺の透過性亢進部位が存在する可能性

マウスの肺の血管透過性の亢進部位では CCR2 の高い発現が認められるが、同時にフィブリノーゲンが検出される。フィブリノーゲンは炎症反応に伴う血管透過性が亢進した部位で産生されることが知られている。そこで、転移を伴う癌で亡くなった患者さんの肺を調

べたところ(13人)、明らかな転移を認めていない肺の局所においても、フィブリノーゲンの発現が認められた血管に一致して、CCR2 と S100A8 の発現が上昇していることを確認した。なお、この臨床材料を用いた研究は、事前に研究倫理審査委員会の承認を受け実施した。



3. 今後の展開

本研究は大挑戦型研究課題であり、最終目標は癌転移の予防である。今回のマウスを用いた研究で、原発癌は自然免疫に関係する因子の力を使用して、離れた場所にある転移前の肺にスポット状の血管透過性の亢進部位を作り出し、この部分に積極的に転移することが分かった。転移を伴う悪性のがんで亡くなった患者さんの転移のない部分に、担癌マウスでみられた“転移予定地”と大変良く似た炎症性反応が起きている局所が存在する可能性を見いだした。そのため、さらにヒトにおいて詳細な分子疫学的な研究を行うことにより、本研究が将来には患者さんにおけるがん転移の予測や、ごく早期の転移の検査を可能とするような、予防的な治療に発展することが期待される。

具体的にはマウスレベルで認めた透過性亢進に関与する分子を指標として、癌の患者さんの肺において上昇している遺伝子をスクリーニングし、感度の良いマーカーとして使用できる分子、生物学的機能を有して治療効果を期待できる分子を検索する。また転移前炎症をおこしている部位の検出方法と消失方法についても検討する予定である。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

- 1) マウスレベルでの転移予定地のメカニズムの解析は一定の到達目標を達成した。具体的には、転移予定地の透過性亢進部位の消失を、関連する遺伝子欠損マウスを用いて確認し、この消失が転移抑制につながる結果を得た。研究の進め方については、マウスレベルでは、複数の遺伝子欠損マウスで転移予定地の消失を確認することができ、ヒトへ応用可能な指標も得た。
- 2) ヒトレベルで転移予定地の存在の可能性の検索、その部位の消失を目指すために、ヒトサンプルを用いた候補遺伝子のスクリーニングは完了した。マウスで確認する為の遺伝子欠損マウス、ヒト化マウスの作製を試みた。マウスからヒトレベルへの移行は大挑戦ではあるが、ヒトへの移行を発展させる必要がある。

(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)

転移性の癌を移植したマウスにおいて、転移の前に転移予定臓器において血管透過性の亢進が見られることを見出し、転移予定局所における環境の変化と炎症反応を解析した。その結果、移植した原発癌組織より分泌されたCCL2が、将来転移予定部位である肺血管組織において高発現するCCR2を刺激してS100A8やSAA3を発現させ、それらが血管内皮のTLR4/MD-2複合体に作用して血管透過性を亢進させ、その後の転移巣の形成に重要であることをマウスで見事に示したことは高く評価される。担癌マウスモデルにおいては、血管透過性の亢進が起きている、CCR2高発現部位ではフィブリノーゲンの発現がみられる。ヒト癌患者の肺組織においても、フィブリノーゲンの発現と一致してCCR2とS100A8が発現亢進している部位を見だし発表した。

本研究は大挑戦型課題であり、癌転移の予防のための転移前診断を目標としている。ヒト患者組織を用いた詳細な分子疫学的な検討を行い、転移予定組織(局所)を利用し、転移に関連する候補遺伝子のスクリーニングを完了し、候補遺伝子の機能を確認するための研究を進めている。現時点では研究課題の最終目標までの到達には道半ばであるが、転移予定組織に関連する遺伝子明らかになれば、転移前診断のマーカーの同定や転移予定局所の消失(転移抑制)が可能になり、対癌療法の新たな武器となる成果となると期待している。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. 1. [Hiratsuka S](#), Ishibashi S, Tomita T, Watanabe A, Akashi-Takamura S, Murakami M, Kijima H, Miyake K, Aburatani H, Maru Y. Primary tumours modulate innate immune signalling to create pre-metastatic vascular hyperpermeability foci. *Nature Communications* (2013) 4, Article number: 1853 doi:10.1038/ncomms2856

(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

平塚 佐千枝, 転移前の肺における局所性転移土壌の解析,
日本がん分子標的治療学会、2016、

平塚 佐千枝、自然免疫シグナルによる転移予定臓器における転移前土壌の形成、第 73 回
日本癌学会学術総会シンポジウム 2014

平塚 佐千枝、転移前の肺における局所透過性亢進部位の解析、第 22 回日本がん転移学
会学術集会総会シンポジウム 2013.

Hiratsuka S. “Innate immune system mediates focal metastasis” (Brisbane) シンポジウム
September, 2012.

著作物

平塚 佐千枝 (2016) 医学のあゆみ 転移のプラットフォーム、転移前土壌を形成するサイト
カイン、医歯薬出版株式会社 (平塚 佐千枝監修)、東京

平塚 佐千枝 (2015) 月刊(細胞)分子細胞生物学講座「血管透過性と癌の転移」
ニュー・サイエンス社、東京

平塚 佐千枝 丸義朗 2014 転移予定臓器の転移前の土壌. がん転移の機構 メディカル・サ
イエンス・ダイジェスト(佐谷 秀行監修)ニュー・サイエンス社

新聞発表

日本経済新聞 がん肺への転移解明 2013.5.15

読売新聞 がん細胞血管に穴あけ転移 2013.5.17