令和５年度

がん・心臓病の基礎的・先駆的研究事業報告書

公益財団法人 車両競技公益資金記念財団

はじめに

我が国において、死因の上位を占める疾患の基礎的研究の促進を図り、学術の向上と国民の健康増進に寄与することを目的として、当財団では昭和62年から助成事業の枠に新たに「がん・心臓病の基礎的研究事業」を設定し、更に平成13年度からは「がん・心臓病の先駆的研究事業」も対象に加え、「医療の基礎的、先駆的研究助成事業」として令和5年までの557件のプロジェクトに対し、約4，238百万円の助成を行なってまいりました。

がんの早期発見、心臓病の予防等は現代人の国民生活にとって大変関心の高いものであります。

がん研究を見ると、がん本体の解明とその診断及び治療法の開発等がん制圧のための研究が鋭意進められており、その研究成果も上がり、がんは治る病気といった感を抱かせます。

また心臓病についても分子生物的領域にまで研究が進んできており動脈硬化や心臓病の治療に遺伝子を用いる手法等も行なわれるようになりました。

これらの研究事業を実施された研究者の方々は、3年間以内という限られた期間のうちに少人数で研究を行い、これを取りまとめることは非常なご苦労があったと思います。今回の研究成果は、今までにそれぞれの学会或いは論文により発表されて、それぞれに高い評価を受けておられます。

この研究成果について、より広く社会の各方面に公表することが必要との声もあり、この要請に応え、令和5年度をもって研究が終了し、私どもに提出していただいた研究報告書を抄録としてここに刊行する次第です。がん・心臓病の今後の研究に少しでも役立てば幸いです。

令和6年12月

公益財団法人車両競技公益資金記念財団
理 事 長　田 宮 治 雄

目　　　　次

細胞外分泌小胞中変異タンパク質を用いた膵癌早期診断法開発

所属機関　公益財団法人がん研究会
研究者名　植田　幸嗣

《研究の概要》

本邦において膵癌は部位別がん罹患数で第 7 位、死亡数では第 4 位を占める悪性腫瘍であり、共に顕著な増加傾向を示している。膵癌の早期診断を可能とし、治療成績の向上、死亡数の減少を実現するため、本研究では「膵由来細胞外小胞中変異タンパク質パネル」を利用した簡便な血液検査を開発し、膵癌の早期診断率を向上させることを目標とする。

リキッドバイオプシーは、血液や尿、唾液などの体液を用いて非侵襲的に病状を診断またはモニタリングする方法であり、従来の組織バイオプシーに比べ、患者にとって負担が少なく、リアルタイムで病状を追跡できるという利点がある。細胞外小胞（extracellular vesicles, EVs）を用いたがんリキッドバイオプシーは、近年注目されている非侵襲的な診断およびモニタリング技術の一つである。細胞外小胞は、細胞が分泌する脂質二重膜で囲まれた直径数十～数千ナノメートルの小胞で、産生細胞が持つ DNA、RNA、タンパク質、脂質などを内包している。

本研究では血液中の細胞外小胞から膵癌細胞が発現する体細胞変異タンパク質を検出するため、(1)血中からの膵由来細胞外小胞単離技術の確立と、(2)膵癌細胞由来細胞外小胞中変異タンパク質の同定を経て、(3)血漿サンプルを用いた膵由来細胞外小胞中変異タンパク質パネル診断法の確立を行った。

（1）では膵癌の大部分を占める膵管腺癌の発生母地である膵管上皮細胞に特異的に発現する膜タンパク質群に照準を絞り、血中の全細胞外小胞から膵管上皮細胞由来細胞外小胞を単離する技術を開発した。また、96 連磁性ビーズ処理ロボットを用いたハイスループット自動細胞外小胞精製システムも構築した。(2) ではすでにゲノムシークエンスから保有するドライバー遺伝子変異が判明している 5 種膵癌細胞株をモデルとして、ターゲット質量分析技術である Parallel Reaction Monitoring (PRM)法と安定同位体標識ペプチドスタンダードを用いた各種体細胞変異タンパク質の高感度絶対定量分析系を確立した。(3) では膵癌患者経時採取血漿サンプルについて、特に比較対象となる ctDNA の測定データが存在する症例に絞って細胞外小胞の単離、PRM 分析を実施し、体細胞変異タンパク質の検出能を評価した。

本研究開発の成果となる診断技術が実現すれば、簡便で非侵襲的な血液検査によって早期膵癌の一次スクリーニングが可能となることが期待される。また、血中変異タンパク質を用いた治療効果のモニタリングや再発の検出、予後予測にも応用できる可能性がある。抗体など特別な検出試薬を使用しないことから、コスト増加を伴わず変異タンパク質検出パネルを随時拡大、変更していくことも可能である。最終的に本検査の普及によりがん検診受診率、早期発見率が共に向上すれば、根治的外科手術適応症例の拡大に伴って膵癌の生命予後は劇的に改善し、がん死亡数の減少に貢献できると期待される。

共同研究者の氏名・所属機関
・高橋 祐　公益財団法人がん研究会　がん研有明病院

研究報告
Ⅰ　研究目的

本邦において膵癌は部位別がん罹患数で第7位、死亡数では第4位を占める悪性腫瘍であり、共に顕著な増加傾向を示している。診断時病期別生存率データ(全がん協)では診断時ステージⅠ膵癌症例における2年生存率は55.6%であるが、ステージII、III、IV症例では32.0、17.4、5.2%となり、極めて予後不良である。したがって、膵癌による死亡数を減少させるためにはステージⅠ以前の可能な限り早期にがんを発見し、根治的手術をはじめとした治療を行うことが重要であるが、初回診断時病期分布ではステージIVが79%を占めており（ステージⅠ以前は2%)、早期診断が大変難しい現状である。こうした臨床的背景から、本研究では「膵由来細胞外小胞中変異タンパク質パネル」を利用した簡便な血液検査を開発し、膵癌の早期診断率を向上させることを目標とする。

細胞外小胞を用いたがんリキッドバイオプシーは、がん診断とモニタリングの分野で革新的な技術である。細胞外小胞は細胞が分泌する小さな膜包粒子であり、細胞外小胞、マイクロベシクル、アポトーシス小胞などに分類される。これらの小胞はDNA、RNA、タンパク質、脂質などを含んでおり、細胞間の情報伝達に重要な役割を果たす。リキッドバイオプシーは血液や尿、唾液などの体液を用いてがんを非侵襲的に診断・モニタリングする方法であり、従来の組織バイオプシーに比べ、患者への負担が少なく、リアルタイムで病状を追跡できるという利点がある。細胞外小胞を用いたリキッドバイオプシーの具体的な利点として、非侵襲性が挙げられる。体液サンプルを採取するだけで簡便かつ低リスクで検査が可能である。また、細胞外小胞にはがん細胞由来の特異的な分子が含まれており、これにより高い感度と特異性でがんを検出できる。加えて、治療効果や再発リスクをリアルタイムで評価することができる。実際、現在までに肺癌変異*EGFR* mRNA、*EML4-ALK*融合mRNAを血清細胞外小胞から、前立腺癌特異的3種RNAを尿中細胞外小胞から検出する診断が米国で上市されている(Bio-Techne社)。

我々もこれまでに細胞外小胞のプロテオーム解析を基盤としたがんリキッドバイオプシー技術開発を展開してきた。生存状態のがん組織が直接分泌する細胞外小胞を培養で増幅しつつ採取、解析を行う技法を用いた腎癌部、正常部由来細胞外小胞の解析からは、初めての腎癌特異的血液マーカーとなり得ることが期待されるEV-AZU1や（***Int J Cancer*** (2018);142:607)、細胞外小胞受容細胞中の Akt 増殖シグナルを強力に活性化して腎癌の進展を促進しているLAIR1タンパク質(***Oncol Rep*** (2019);41:1293)が見出された。同様に大腸癌組織由来細胞外小胞において特異的な発現を示すEV-CAT1タンパク質を大腸癌早期診断血液マーカー候補タンパク質として同定し（***Mol Cancer Res*** (2021);19:834)、先のEV-AZU1と共に国内診断薬メーカーにおいて体外診断薬実用化開発が進められている。

これらはがん細胞由来細胞外小胞中で量的に有意な高値を示す有望なバイオマーカーシーズであるが、スクリーニング検査で求められるより高いがん特異性を実現するべく近年は世界に先駆けて変異プロテオゲノミクス解析基盤を構築してきた。これは全エクソーム解析データから患者ごとの変異情報を含むタンパク質アミノ酸配列データベースを構築

し、続く質量分析から変異タンパク質の同定を可能とする系である。

こうした状況を踏まえ、本研究では(1)血中からの高純度、かつハイスループットな膵由来細胞外小胞単離技術の確立と、(2)プロテオゲノミクス解析を用いた膵癌細胞由来細胞外小胞中変異タンパク質の同定（図1）を経て、(3)ターゲット定量質量分析技術と安定同位体標識ペプチドスタンダードを用いた血漿サンプル由来膵由来細胞外小胞中変異タンパク質パネル診断法の確立を目的とする。

本研究開発の成果となる診断技術が実現すれば、簡便で非侵襲的な血液検査によって早期膵癌の一次スクリーニングだけでなく、前がん病変の検出までも可能となることが期待される。本検査の普及によりがん検診受診率、早期発見率が共に向上すれば、根治的外科手術適応症例の拡大に伴って膵癌の生命予後は劇的に改善し、がん死亡数の激減に貢献できると期待される。

Ⅱ　研究計画及び材料と方法

(1)膵由来細胞外小胞単離技術の確立

血液中の細胞外小胞に包含される変異タンパク質を利用した膵癌早期診断バイオマーカーを開発する目的に向けて、細胞外小胞膜上に発現する膵特異抗原の決定、検出系確立と、それを利用した膵由来細胞外小胞の単離精製技術の確立を行った。

細胞外小胞膜上に発現する膵特異抗原の同定に関して、研究代表者研究室で取得した全身43臓器、器官由来mRNA発現データ、およびProtein Atlasなど公的データベースを参照し、99%以上の mRNA 発現が膵臓に限局される遺伝子を膵由来細胞外小胞捕捉標的抗原として選出、さらに、転写翻訳産物が膜貫通ドメインを持ち膜表面タンパク質とされるものに対象を絞り込んだ。次に同タンパク質群に対する市販抗体を入手し、それらを用いて膵癌細胞株の細胞総抽出液から Western blotting による特異的なタンパク質検出、および免疫沈降による回収が可能か否かを検証した。

上記実験において Western blotting や免疫沈降において良好な結果が得られ、膵癌細胞由来細胞外小胞上で発現が確認できた膵特異抗原タンパク質に対する抗体を使用し、血清中膵由来細胞外小胞単離法を構築した。

細胞外小胞の膜表面上には正常な細胞膜上とは異なり、フォスファチジルセリンが表出していることが知られているため、フォスファチジルセリン結合タンパクTim4固相化ビーズ（富士フイルム和光純薬株式会社）により細胞外小胞の単離を行う。（図2)本ステップではカルシウム要求性であるフォスファチジルセリン-Tim4結合をEDTAによ

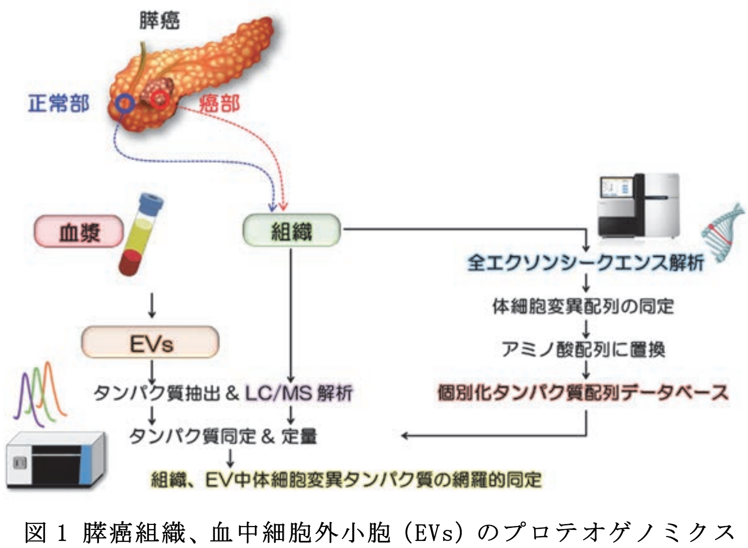


図1 膵癌組織、血中細胞外小胞（EVs）のプロテオゲノミクス解析による体細胞変異タンパク質の同定ワークフロー

るキレート作用でカルシウムを除去することにより解除し、細胞外小胞の構造を保持したまま溶出する。ここから前項で決定した膵特異抗原に対する抗体を用いた免疫沈降によって膵由来細胞外小胞の単離を試みた。膵由来細胞外小胞が回収できたことの確認には、単離に用いた抗体とは異なる膵特異的発現タンパク質に対する Western blotting を実施した。この結果が陽性であれば、膵において特異的に発現する複数のタンパク質が包含された、膵由来細胞外小胞であることが確認できる。また、Orbitrap Fusion Lumos 質量分析システム（Thermo Scientific 社）を用いた網羅的定量プロテオーム解析に供し、膵由来細胞外小胞に含まれるタンパク質の定量的特性分析も実施した。

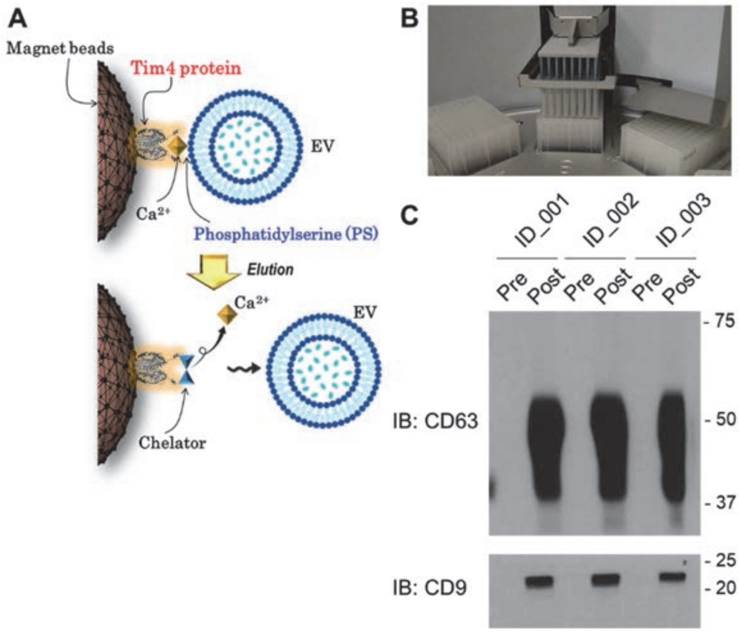


図 2 96 連磁性ビーズ処理ロボットによる血漿検体からのハイスループット細胞外小胞精製技術 (A) Phosphatidylserine 結合性 Tim4 タンパク質固相化ビーズによる細胞外小胞捕捉とカルシウムイオンキレーターによる溶出原理 (B) KingFisher Flex （Thermo Scientific 社）を用いた 96 サンプル同時処理 （C）抗 CD9、CD63 抗体ウェスタンブロットによる細胞外小胞精製効率テスト（Pre：精製前血漿タンパク質１ μg、Post：精製後細胞外小胞タンパク質１ μg）

(2)膵癌細胞由来細胞外小胞中変異タンパク質の同定

これまでに質量分析によって検出した体細胞変異配列を有するペプチド配列データ、及び公的データベース情報から膵癌において特に高頻度の変異を認めることが知られている分子に照準を絞り、KRAS 10 種、BRAF 1 種、HRAS 2 種、PIK3CA 9 種、TP53 6 種、NRAS 1 種、FGFR3 2 種の安定同位体標識標準品ペプチドを合成（**図 3**）、それぞれについてターゲット質量分析技術である Parallel Reaction Monitoring (PRM)法での測定に必要なパラメータの至適化を行った。具体的には気相でペプチドイオンを分画し、標的のペプチドを選択的に透過させてシグなるノイズ比を向上させる Field Asymmetric Ion Mobility Spectrometry （FAIMS）の補正電圧（Compensation voltage）をペプチド個別に最適値を設定した。また、ペプチドの絶対定量に使用するイオンとして、それぞれのペプチドを Orbitrap Fusion Lumos 質量分析装置にて MS/MS 分析に供した際に精製されるフラグメントイオン（ガス衝突時に発生するペプチドの部分配列）のうち最も強い強度で検出されるレポーターイオンを決定した。さらに、これらレポーターイオンの強度が最大となる（感度が最大となる）MS/MS 時衝突エネルギー（Collision energy）を実測値より決定した。以上の細胞外小胞中タンパク質前処理技術、質量分析法を用いて、膵癌細胞株培養上清中

細胞外小胞、および膵癌患者血漿中細胞外小胞の分析を実施した。

(3)膵由来細胞外小胞中変異タンパク質パネル診断法の確立

以上の細胞外小胞中タンパク質前処理技術、質量分析法を用いて、膵癌患者血漿中細胞外小胞の分析を実施した。膵癌患者経時採取血漿 274 症例については比較対象として ctDNA の測定データが存在する 20 症例（治療前後 38 サンプル）について計測を行い、検出能の評価を実施した。PRM 分析による絶対定量では Vanquish nano-flow HPLC と Orbitrap Fusion Lumos with FAIMS-Pro 質量分析計（いずれも Thermo Scientific 社）を使用した。トリプシン消化後のペプチドは Aurora column (C_{18}, 0.075 × 250 mm, 1.7 μm particle, IonOpticks 社)により以下のグラジェント条件にて分離を行った。流速 250 nl/min、溶媒 A（0.1% TFA)、溶媒 B（0.1% TFA in acetonitrile)、2 ステップグラジェント(%B 2-40 20 min、%B 40-95 5 min)。分離されたペプチドは気相で FAIMS-Pro イオンモビリティーイオン源にて分画され、以下の質量分析条件にて分析を行った。Ion spray voltage = 2000 (V)、Mode = tMS2、Full MS scan range = m/z 350-1500、MS resolution = 60,000、MS2 scan range = Auto、MS2 resolution = 15,000、Collision mode = CID、Normalized collision energy = 30。得られた Raw data はオープンソースソフトウェアである Skyline を用いて PRM クロマトグラム定量解析を実施した。

Targeted peptides	Sequence
BRAF_V600E	IGDFGLATEK*
FGFR3_R248C	QTYTLDVLEC(CM)SPHR*
FGFR3_S249C	QTYTLDVLERC(CM)PHR*
HRAS_G13R	LVVVGAGR*
HRAS_Q61K	QVVIDGETC(CM)LLDILDTAGK*
KRAS_A146T	SYGIPFIETSTK*
KRAS_G12A	LVVVGAAGVGK*
KRAS_G12C	LVVVGAC(CM)GVGK*
KRAS_G12D	LVVVGADGVGK*
KRAS_G12R	LVVVGAR*
KRAS_G12S	LVVVGASGVGK*
KRAS_G12V	LVVVGAVGVGK*
KRAS_G13C	LVVVGAGC(CM)VGK*
KRAS_G13D	LVVVGAGDVGK*
KRAS_Q61R	QVVIDGETC(CM)LLDILDTAGR*
NRAS_G13V	LVVVGAGVVGK*
PIK3CA_E542K	AISTRDPLSK*
PIK3CA_E545A	DPLSEITAQEK*
PIK3CA_E545G	DPLSEITGQEK*
PIK3CA_E545K	DPLSEITK*
PIK3CA_H1047R	QMNDAR*
PIK3CA_M1043I	QINDAHHGGWTTK*
PIK3CA_N345K	ILC(CM)ATYVK*
PIK3CA_Q546K	DPLSEITEK*
PIK3CA_Q546R	DPLSEITER*
TP53_R175H	HC(CM)PHHER*
TP53_R249S	SPILTIITLEDSSGNLLGR*
TP53_R273C	NSFEVC(CM)VC(CM)AC(CM)PGR*
TP53_R273H	NSFEVHVC(CM)AC(CM)PGR*
TP53_R273L	NSFEVLVC(CM)AC(CM)PGR*
TP53_R282W	WTEEENLR*

図 3 標的体細胞変異タンパク質に対する合成安定同位体標識ペプチドリスト（CM: Carbamidomethyl、*: 安定同位体標識 Lys または Arg）

Ⅲ 研究成果

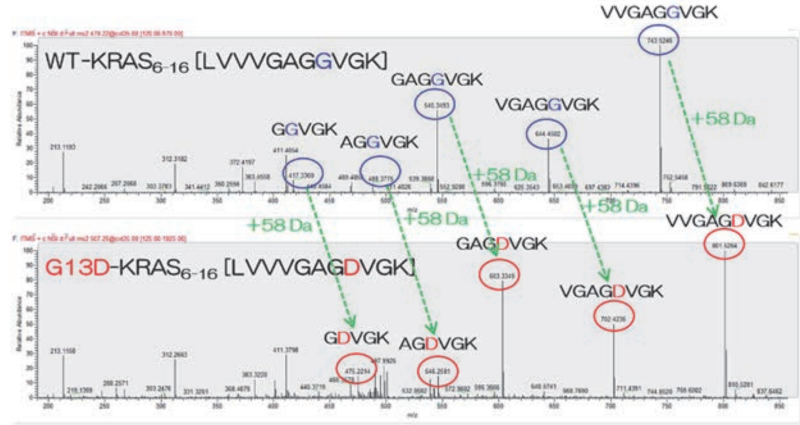
(1)膵由来細胞外小胞単離技術の確立

血中から膵由来細胞外小胞を特異的に免疫捕捉するための標的分子を選定するため、公的遺伝子発現データベースを用いたスクリーニングに加え、*in silico* トポロジー解析に基づいて 1 カ所以上の膜貫通ドメインを持つタンパク質を候補分子として探索した。当スクリーニングの結果、AQP12B、AQP12A、CUZD1、G6PC2 の 4 タンパク質が抽出され、これらはそれぞれ膵臓における mRNA 発現量が全身臓器発現量中の 96.90%、96.88%、93.39%、

83.72%を占めている。

上記 4 タンパク質に対する市販抗体は全て入手可能であり、それらを用いて膵癌細胞株 PK-1、KP-2、QGP-1、KP-3、MIA PaCa-2 の細胞総抽出液から Western blotting による特異的なタンパク質検出、および免疫沈降が可能か否かを検証した。その結果、AQP12B、AQP12A、G6PC2 の 3 タンパク質については市販モノクローナル抗体、またはポリクローナル抗体によって免疫沈降と Western blotting 検出が可能であった。

A



B

	WT peptide	mt peptide
mock	3.95 × 10^5	8.82 × 10^4
KRAS_WT	1.36 × 10^6	8.52 × 10^4
KRAS_mt	6.53 × 10^5	2.14 × 10^6

図 4 変異 KRAS タンパク質の質量分析による定量検出 (A) MS/MS スペクトルによる G13D 変異配列の決定。ガスとの衝突乖離によって生じたペプチドの開裂イオンにおいて、野生型配列（上段）と比して G13D 変異型配列（下段）ではコドン 13 番を含むフラグメントで 58 Da の変化（Gly と Asp の質量差）が検出される。(B) KRAS-G13D ヘテロ変異を持つ細胞株において、未処理（mock)、野生型 KRAS 過剰発現（KRAS_WT)、G13D 変異型 KRAS 過剰発現（KRAS_mt）の細胞から定量質量分析により野生型 KRAS タンパク質（WT peptide)、G13D 変異型 KRAS タンパク質（mt peptide）発現量を定量化した結果。

この結果をもとに、細胞外小胞膜上フォスファチジルセリン特異的磁性捕捉ビーズによって単離した総細胞外小胞中から上記 3 抗体を用いて膵由来細胞外小胞のみを抽出する系の構築と評価を実施した。血清 200 μl から磁性ビーズを用いて総細胞外小胞を回収し、キレート剤により細胞外小胞の形態を保持した状態でマグネットビーズから溶出、3 種抗体をそれぞれ固相化した免疫沈降用磁性ビーズによる二段階精製の条件を至適化した。具体的にはビーズの種類(Protein G セファロースビーズ、またはマグネットビーズ)、抗体固相化量、架橋剤ジメチルピメリミデート（DMP）使用の影響などの条件を多数検討し、免疫沈降に使用したものと同一の抗体による Western blotting を行って免疫捕捉の確認と回収効率の検証を行った。

96 連磁性ビーズ操作ロボットを使用した自動細胞外小胞精製技術の開発について、Tim4 固相化磁性ビーズを用い、51 分間で血漿など任意の液体試料から細胞外小胞を単離、任意の溶媒に溶出可能な自動精製系を完成させた。精製純度の評価は質量分析による細胞外小胞マーカー分子群（テトラスパニンファミリー）の全検出タンパク質中における定量占有率により評価し、非常に高純度な細胞外小胞を 96 サンプル同時にマニュアルによるオペレーションエラーなく得られることを確認した。

この第一段階目精製の結果として、血清 200 μl からタンパク質量として 10-30 μg の総細胞外小胞が回収された。続く 3 種抗体による免疫沈降、Western blotting の結果、AQP12A のみ、DMP 架橋剤の有無にかかわらず十分な強度で同タンパク質の特異的シグナルが得られ、AQP12A 陽性細胞外小胞が免疫捕捉できていることが示唆された。AQP12B につい

ては架橋剤無しの条件においてのみ同タンパク質の Western blotting シグナルは得られたが、強度は細胞総抽出液のポジティブコントロールに比して弱く、AQP12B 抗体による免疫沈降効率が低い、または血清中に AQP12A に比して AQP12B 陽性細胞外小胞の含有量が低いことが示唆された。また、G6PC2 陽性細胞外小胞に関しては Western blotting による確認が出来ず､更なる免疫捕捉条件の検討や使用血清量の増加が必要と考えられた。AQP12A、AQP12B 陽性細胞外小胞については、Western blotting と LC/MS 分析による網羅的プロテオーム解析を行い､細胞外小胞マーカータンパク質として知られる CD9、CD63、CD81、CD82、TSG101、Alix などが同時に同定されていたことから確かに細胞外小胞という構造体で膵由来細胞外小胞が捕捉できていることが示唆された。

(2)膵癌細胞由来細胞外小胞中変異タンパク質の同定

図 3 に示した 31 種標的ペプチドは､質量分析前処理に必要となるトリプシン消化(Lys、Arg の C 末側でペプチド鎖を切断）を行った際に生成されるペプチド断片のうち体細胞変異部位を含む部分のペプチド配列として設計した。また、C 末端の Lys、または Arg はそれぞれ $^{13}C_6{}^{15}N_2$、$^{13}C_6{}^{15}N_4$ から構成される+8 Da、+10 Da の安定同位体標識アミノ酸を使用し（Heavy peptide)、質量分析上で生体内の同配列ペプチド（Light peptide）と識別できるように設計した。

これら Heavy peptide をスタンダードとして用い、複数細胞株を用いて各種体細胞変異タンパク質が細胞外小胞に内包されて分泌されうるかどうか、それら体細胞変異タンパク質を質量分析によって定量的に同定可能かを検証した。図 4 では KRAS-G13D 変異をヘテロに保有する細胞株を用い､未処理､野生型 KRAS 強制発現、G13D 変異型 KRAS 強制発現の各種細胞について培養上清から図 2 の手法で細胞外小胞を単離し､LC/MS 分析を実施した。その結果、コドン 13 が Asp である KRAS アミノ酸番号 6-16 ペプチドが細胞外小胞中から検出可能であり、野生型と変異型が 1：0.22 の定量比で存在していることが分かった。また、細胞

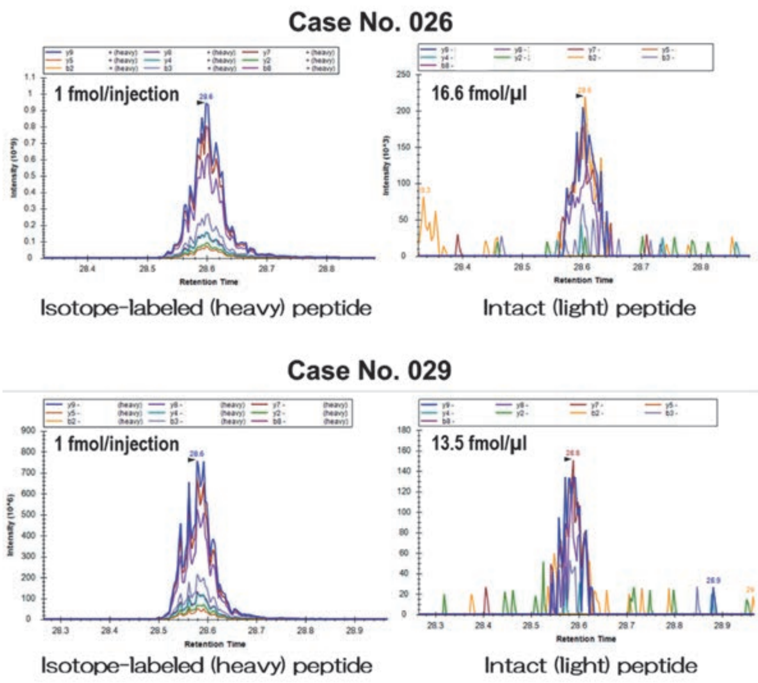


図 5 血漿細胞外小胞中体細胞変異タンパク質の絶対定量検出
（上段左、下段左）1 解析あたり 1 フェムトモルの安定同位体標識標準ペプチドをスパイクして分析した PRM クロマトグラム。（上段右、下段右）患者血漿中細胞外小胞から検出された標準ペプチドと同一アミノ酸配列の体細胞変異タンパク質部分配列。左上数値は絶対濃度。（各パネル上部 y、b：それぞれペプチドをガスと衝突させて生じた C 末側フラグメント､N 末側フラグメント。y9 は C 末側 9 アミノ酸のフラグメントイオン強度を時間軸に沿ってモニターしたもの。）

内でそれぞれの強制発現を行うと細胞外小胞内においても同比が 1 ： 0.06、1 ： 3.28 と変動することが確認された。他の標的体細胞変異タンパク質部分配列についても同様に細胞外小胞内から検出されることや同定精度の確認を行った。

(3)膵由来細胞外小胞中変異タンパク質パネル診断法の確立

以上の細胞外小胞中タンパク質前処理技術、質量分析法を用いて、膵癌患者血漿中細胞外小胞の分析を実施した。膵癌患者経時採取血漿の測定について、ctDNA の測定データが存在する 20 症例（各症例治療経過に沿って 1～4 タイムポイント、合計 38 サンプル）について計測を行い、検出能の評価を実施した。血漿 200 μl より前述の細胞外小胞自動精製ロボットを用いて細胞外小胞の精製を行い、トリプシン消化後 31 種類体細胞変異タンパク質パネル検出系にて分析に供した結果、2 症例の術前採取血漿中細胞外小胞より同一の体細胞変異タンパク質が検出された（図 5)。血中濃度は各症例それぞれ 16.6 fmol/μl、13.5 fmol/μl であった。

Ⅳ　考察

近年のセルフリーDNA（cfDNA）を用いたリキッドバイオプシー診断技術の発展に伴い、cfDNA による包括的ゲノムプロファイリング（CGP）検査が保険適用になるなど社会実装も急速に進んでいる。膵癌に対しても cfDNA による各種診断応用への試みが多数行われてきたが、原理的に癌細胞内の DNA が遊離して血流に入るのは Late stage とされ、早期診断のためには別の有望な診断モダリティが必要とされていた。本研究では膵癌細胞が発現する体細胞変異タンパク質が細胞外小胞に包含されて分泌されていることを明らかにし、一部が血液中からも検出可能であることを示した。このことは今後の膵癌リキッドバイオプシー技術開発において cfDNA とは生合成経路が全く異なる変異検出技術が追加されうることを意味し、相補的に利用することでより広い診断カバレッジ、より高い検出感度を実現できる可能性がある。

一方で、本研究における研究開発項目（3）で使用した膵癌血漿検体 20 症例の cfDNA 測定結果においては APC（1 例）、CTNNB1（1 例）、ERBB2（1 例）、FBXW7（3 例）、KRAS（6 例）、PIK3CA（1 例）、SMAD4（2 例）、TP53（12 例）といった、既報に近い頻度での変異 DNA が検出されている。これらと比して現時点では変異タンパク質検出可能症例が少数に限られることが分かったが、これは今回解析に供した 20 症例の中で、分析系を構築した 31 種の体細胞変異のパネルに合致する患者数が少ないことが主因と考えられた。本研究結果を通して膵癌患者血液中から体細胞変異タンパク質を検出する、原則的に癌特異度 100％の診断法が新たなリキッドバイオプシーとして実現可能であることが示唆されたが、今後さらに対象とする変異タンパク質パネルの種類を拡充し、より広い患者層に適用可能な技術として確立していく必要があると考えられる。

Ⅴ　研究成果の発表

1. Extracellular vesicle proteome unveils cathepsin B connection to Alzheimer's disease pathogenesis. Yuyama K, Sun H, Fujii R, Hemmi I, Ueda K, Igeta Y, ***Brain*** (2024);147:627-36
2. Fibulin-4 as a potential extracellular vesicle marker of fibrosis in patients with cirrhosis. Kumagai M, Tsuchiya A, Yang Y, Takeda N, Natsui K, Natusi Y, Tomiyoshi K, Yamazaki F, Koseki Y, Shinchi H, Imawaka N, Ukekawa R, Nishibu T, Abe H, Sasaki T, Ueda K, Terai S, ***FEBS Open Bio*** (2024)
3. Extracellular vesicles secreted from bone metastatic renal cell carcinoma promote angiogenesis and endothelial gap formation in bone marrow in a time-dependent manner in a preclinical mouse model. Takeda M, Sakamoto H, Shibasaki N, Fukui T, Magaribuchi T, Sumiyoshi T, Utsunomiya N, Sawada A, Goto T, Kobayashi T, Ueda K, Yamasaki T, Ogawa O, Akamatsu S, ***Front Oncol*** (2023);13:1139049
4. Prospective exosome-focused translational research for afatinib (EXTRA) study of patients with nonsmall cell lung cancer harboring EGFR mutation: an observational clinical study. Takata S, Morikawa K, Tanaka H, Itani H, … , Ueda K, Togashi A, Matsutani N, Seki N, ***Ther Adv Med Oncol*** (2023);15:17588359231177021
5. Identification of Novel Senescent Markers in Small Extracellular Vesicles. Misawa T, Hitomi K, Miyata K, Tanaka Y, Fujii R, Chiba M, Loo TM, Hanyu A, Kawasaki H, Kato H, Maezawa Y, Yokote K, Nakamura AJ, Ueda K, Yaegashi N, Takahashi A, ***Int J Mol Sci*** (2023);24
6. Protein profiling of extracellular vesicles from iPSC-derived astrocytes of patients with ALS/PDC in Kii peninsula. Kobayashi H, Ueda K, Morimoto S, Ishikawa M, Leventoux N, Sasaki R, Hirokawa Y, Kokubo Y, Okano H, ***Neurol Sci*** (2023);44:4511-6
7. Frontiers in mass spectrometry-based clinical proteomics for cancer diagnosis and treatment. Haga Y, Minegishi Y, Ueda K, ***Cancer Sci*** (2023);114:1783-91
8. YBX1 Regulates Satellite II RNA Loading into Small Extracellular Vesicles and Promotes the Senescent Phenotype. Chiba M, Miyata K, Okawa H, Tanaka Y, Ueda K, Seimiya H, Takahashi A, ***Int J Mol Sci*** (2023);24
9. Identification of plexin D1 on circulating extracellular vesicles as a potential biomarker of polymyositis and dermatomyositis. Uto K, Ueda K, Okano T, Akashi K, Takahashi S, Nakamachi Y, Imanishi T, Awano H, Morinobu A, Kawano S, Saegusa J, ***Rheumatology (Oxford)*** (2022);61:1669-79
10. Urinary extracellular vesicles signature for diagnosis of kidney disease. Takizawa K, Ueda K, Sekiguchi M, Nakano E, Nishimura T, Kajiho Y, Kanda S, Miura K, Hattori M, Hashimoto J, Hamasaki Y, Hisano M, Omori T, Okamoto T, Kitayama H, Fujita N, Kuramochi H, Ichiki T, Oka A, Harita Y, ***iScience***

(2022);25:105416

11. Plasma exosomal DOK3 reflects immunological states in lung tumor and predicts prognosis of gefitinib treatment. Ochiai R, Hayashi K, Yamamoto H, Fujii R, Saichi N, Shinchi H, Ishida T, Honda T, Shimizu T, Matsutani N, Seki N, Kawamura M, Ueda K, *Cancer Sci* (2022);113:3960-71
12. Differential ion mobility mass spectrometry in immunopeptidomics identifies neoantigens carrying colorectal cancer driver mutations. Minegishi Y, Kiyotani K, Nemoto K, Inoue Y, Haga Y, Fujii R, Saichi N, Nagayama S, Ueda K, *Commun Biol* (2022);5:831
13. CD14 and lipopolysaccharide-binding protein as novel biomarkers for sarcoidosis by proteomics of serum extracellular vesicles. Futami Y, Takeda Y, Koba T, Narumi R, … , Adachi J, Tomonaga T, Ueda K, Kumanogoh A, *Int Immunol* (2022)
14. Liquid Biopsy Targeting Monocarboxylate Transporter 1 on the Surface Membrane of Tumor-Derived Extracellular Vesicles from Synovial Sarcoma. Yokoo S, Fujiwara T, Yoshida A, Uotani K, Morita T, Kiyono M, Hasei J, Nakata E, Kunisada T, Iwata S, Yonemoto T, Ueda K, Ozaki T, *Cancers (Basel)* (2021);13
15. Azurocidin is loaded into small extracellular vesicles via its N-linked glycosylation and promotes intravasation of renal cell carcinoma cells. Naito T, Jingushi K, Ueda K, Tsujikawa K, *FEBS Lett* (2021);595:2522-32
16. Colorectal Cancer-Derived CAT1-Positive Extracellular Vesicles Alter Nitric Oxide Metabolism in Endothelial Cells and Promote Angiogenesis. Ikeda A, Nagayama S, Sumazaki M, Konishi M, Fujii R, Saichi N, Muraoka S, Saigusa D, Shimada H, Sakai Y, Ueda K, *Mol Cancer Res* (2021);19:834-46
17. Exploration of the Proteomic Landscape of Small Extracellular Vesicles in Serum as Biomarkers for Early Detection of Colorectal Neoplasia. Chang LC, Hsu YC, Chiu HM, Ueda K, Wu MS, Kao CH, Shen TL, *Front Oncol* (2021);11:732743

がん患者検体を活用したリガンド探索プラットフォームと治療法の開発

所属機関　杏林大学医学部　肉眼解剖学教室
研究者名　大石篤郎

〈研究の概要＞

G タンパク質共役型受容体（GPCR）はヒトゲノム中最大の膜タンパクファミリーで、現在日米で承認されている薬の約30%はGPCRをターゲットとしているが、約400ある非嗅覚GPCRのうち、現在約100のGPCRが未だにリガンド（受容体に特異的に結合する物質）が見つかっていないOrphan受容体である。オーファン受容体のリガンド発見は直接的な創薬につながりうるが、近年新たなリガンド発見の報告は乏しい科学的難題である。多くのオーファンGPCRはそのリガンドが未知のため、生理的役割などがよくわかっておらず、オーファンGPCRとそのリガンドの異常がまだわかっていない病気の原因となっている可能性が考えられる。

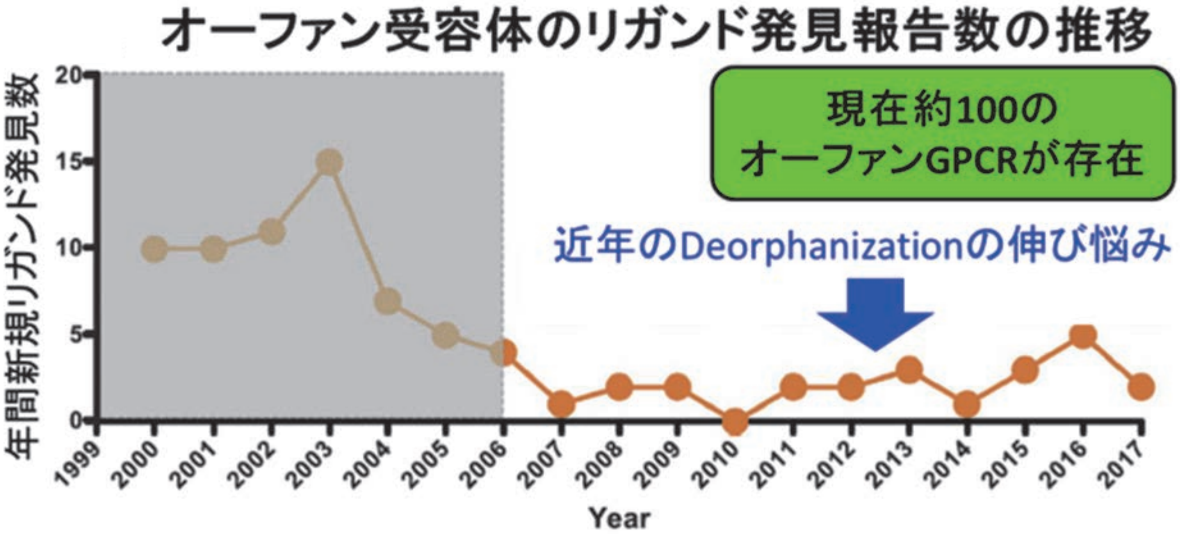
本研究では、多種類のがん患者の血漿を用いることにより、Orphan受容体のリガンドの同定を試みる。がん患者由来の検体を用いたOrphan受容体のリガンド同定(deorphanization)の報告はなく、未だにリガンドが同定されていないOrphan受容体の中には、がんにおいて特異的に[リガンド―受容体]システムが亢進しているものがあるのではないか（それ故にこれまでdeorphanizationがなされなかった）と仮説を立て、今回の患者血漿を用いたハイスループットスクリーニングの実施を着想した。

本研究では、多種類のがん患者の血漿を用いることによって、現在約 100 種類存在するOrphan受容体（リガンドが同定されていない受容体）の新規リガンドの同定を試みる。そのためには、我々のグループが新規開発するバイオセンサー群を用いたスクリーニングを実施し、ヒットするがん種と受容体の組み合わせを決定し、分画した血漿蛋白質の Mass spectrometryによりリガンドを同定した上で、化学合成したリガンドを用いて、Orphan受容体のリガンドであることを確認する。さらに、同定したリガンドが受容体に結合することによるがん細胞内の下流シグナルを解析し、がんにおける同受容体の役割を明らかにし、将来的に抗体創薬を目指すとともに、抗体創薬の可能性や、同定した[受容体―リガンド]の腫瘍マーカーとしての有用性を検討する。

具体的に本研究では、Orphan受容体のリガンド同定に際して、シグナル感知の漏れをなくすため、以下のように独自に開発するものを含め、複数のバイオセンサーを用いてハイスループットスクリーニング系を構築した。本研究では血漿を用いるため、血漿中の非特異的因子が目的の受容体以外を活性化する擬陽性を生じやすく、既存の転写因子などを利用したスクリーニングアッセイシステムが使いにくい。そこで下記の感度または特異度が高い複数のバイオセンサーを用いて Orphan 受容体スクリーニングプラットフォームを作成し、GPCR 下流のGs/Gi/Gq/G12の4つのGタンパク質経路とarrestin経路の2つのシグナルの両者を漏らさずに検出するよう計画した。またリガンドスクリーニングと並行し腫瘍増殖に重要な役割を担っているオーファン受容体の選定を行い、実際に癌治療標的となるオーファン GPCR の抽出を試みた。

共同研究者の所属・氏名
吉見昭秀　国立がん研究センター研究所
牛久哲男　東京大学 病理学教室
後藤悌　　国立がん研究センター中央病院呼吸器内科

研究報告
Ⅰ　　研究目的
　G タンパク質共役型受容体（GPCR）はヒトゲノム中最大の膜タンパクファミリーで、FDA 承認薬の約 30%は GPCR を標的としている。約 400 ある非嗅覚 GPCR のうち現在約 100 種がリガンド（受容体に特異的に結合して活性化する物質）が未知のオーファン（孤児）受容体で、そのリガンド発見は新たな創薬へつながるイノベーションである。しかし全 GPCR 発見後 20 年以上たつ今、オーファン GPCR のリガンド発見は停滞している（下図）。

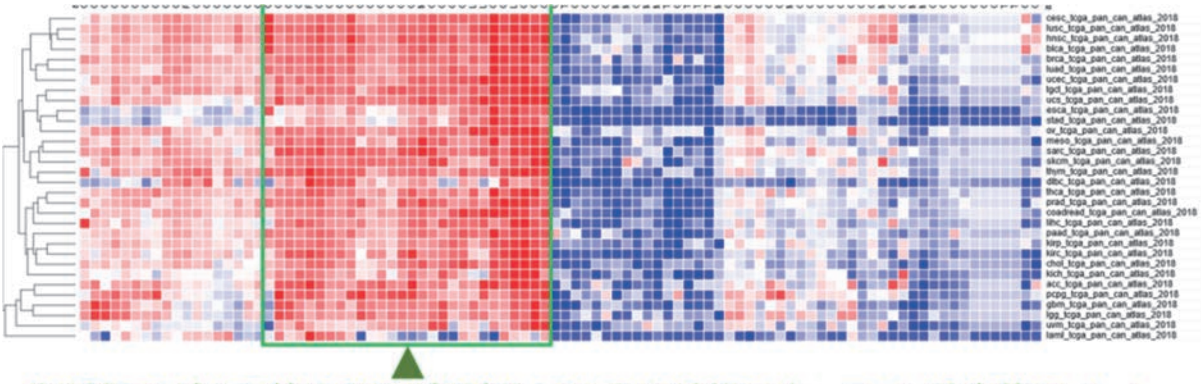


　本研究は、①独自のオーファン受容体のリガンドスクリーニングプラットフォームを構築し、②多種類のがん患者の血漿を①のシステムでスクリーニングすることで、オーファン受容体の新規リガンド発見を第一の目的とする。さらに③同定した新規リガンドとオーファン受容体ががんに与えるメカニズムを解明し、④新たながん治療の構築と新規バイオマーカーへの応用を第二の目的とする。

Ⅱ　研究計画及び材料と方法

本研究課題は「**オーファン GPCR のリガンド発見**」と「**新規がん治療**」という 2 つの目標達成のため、次の 6 つの STEP に従って推進する。
項目①オーファン GPCR のリガンドを含む期待が高いがん種の選定:オーファン受容体のリガンド同定の試みはこれまで正常組織のみを用いて失敗していること、特殊な病態である種の GPCR のリガンドが高濃度となり受容体を活性化している事実（例；高血圧におけるアンジオテンシン II の上昇）などをヒントに、我々は正常環境ではなく特異な病態モデルで高濃度となっているリガンドを検出することを着想した。病態モデルとして 32 種類のがん種計 10,967 例における各オーファン受容体の発現パターンを解析したところ、下図のように**多種類のがんで特に発現が亢進している 28 種類のオーファン受容体の** cluster を同定した。また進化上リガンド・受容体ペアは対で保存/消失しているという報告(Foster et al. *Cell* 2019)か

ら、受容体の存在がリガンド存在の必要条件と考えられ、がんで高発現している受容体はがんという特殊な環境でオーファン受容体とリガンドが機能的に働いている＝「リガンドが高濃度で存在する」と考えた。これらオーファン GPCR が高発現するがん患者血漿中に存在し



多種類のがんで特に発現が更新している28種類のオーファン受容体のcluster

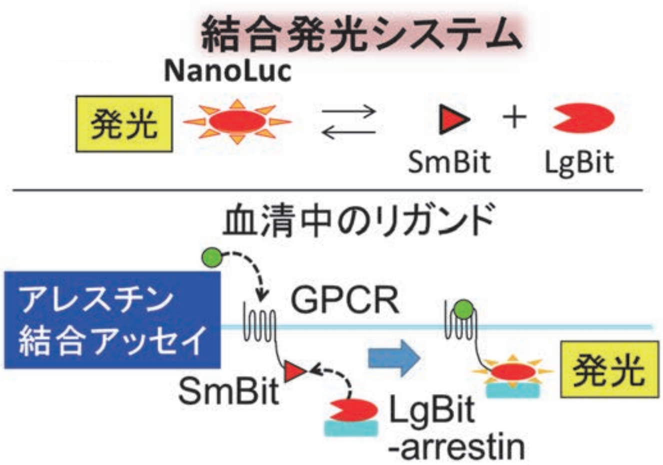
うるリガンドを発見すべく、項目③でがん患者血漿のスクリーニングを行う。

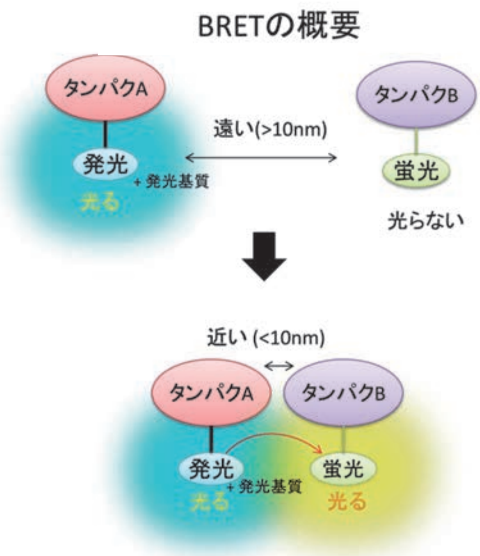
項目②スクリーニングプラットフォームの構築：オーファン GPCR のリガンド同定の難しさは、リガンドの存在を検出するアッセイ系の選択にもある。GPCR は Gs/Gi/Gq/G12 の四つの G 蛋白系のいずれかを活性化した後、アレスチンと結合し細胞膜からエンドソームへ移行する。GPCR ごとに活性化する経路が異なるため、cAMP アッセイだけではリガンドが受容体に結合しても cAMP 経路を活性化する受容体しか検出できず、リガンドの存在を見逃しうる。また本計画は血漿を用いるため、既存の転写因子を利用したスクリーニングシステムでは血漿中の非特異的因子が目的の受容体以外を活性化する擬陽性が生じやすい。そこで我々は以下の**独自に開発した複数のバイオセンサーを用いて漏れのないハイスループットスクリーニング系を構築する**。

上記バイオセンサーは二つのタンパクが近寄ると光を発する結合発光システム（下図左）を応用しており、このシステムに合わせ GPCR の C 末に SmBit を付加した 100 種のオーファン GPCR プラットフォームを構築する。例としてアレスチンの場合（下図左下）、血漿中のリガンドが GPCR を活性化し、アレスチンと GPCR が結合すると「GPCR の C 末に付いた SmBit」と「アレスチンに付いた LgBit」が結合し NanoLuc が完成し発光する。

また蛍光蛋白と発光蛋白の近接を検出する BRET(Bioluminescence Resonance Energy Transfer)システム（下図右）を利用したバイオセンサーも開発する。

本計画では各種バイオセンサーを安定発現させた HEK293 細胞を樹立、同細胞株に①各オーファン





文献2より一部改変

GPCR を一過高発現させスクリーニングに使用する。

項目③ スクリーニングによるリガンド同定)：申請者が外来研究員として所属する国立がん研究センターには**9 万検体を超えるがん患者の血漿を集積したバイオバンク**があり、①で構築したスクリーニングプラットフォームを用い、**約 10,000 検体を用いたハイスループットスクリーニングを実施**する。いずれの系も 500μl の血漿で 96 ウェルプレート 1 枚を 1 分以内に検出可能で、多検体での計画実効性が非常に高い。スクリーニングでヒットを得た後は、成功例に倣い同がん種の血漿を分画しマススペクトロメトリーでリガンドを同定する。

項目④リガンドの Validation：同定したリガンドの合成・蛍光ラベリングが可能なら、合成リガンドが受容体を介して細胞内シグナルを惹起するかを確認、非放射性蛍光ラベリング結合でリガンドと受容体の結合を確認する。

項目⑤リガンド結合によるがん細胞応答の解明：同定したリガンドが受容体に惹起するがん細胞内下流シグナルを解析、がんにおける同受容体の役割を明らかにする。(1) 対象がん種の細胞株で受容体を CRISPR-Cas9 システムでノックアウトし、リガンドを投与した際の細胞内転写プログラム・シグナル伝達の変化を RNA シークエンスにより対照細胞と比較する。また同がん種内、またはその他のがん種も含めたビッグデータを解析し、受容体の発現量と同定した転写プログラム・シグナルが相関するかを検討する。(2) 同定した下流転写プログラムやシグナル伝達を遺伝学的、または薬理学的に阻害し、リガンド投与の効果が消失するかを確認し、同時に生物学的形質変化を観察する。(3) (2)の阻害手段による抗腫瘍効果を in vivo で検証する。免疫不全マウスを用いた異種移植モデルで治療効果評価を行い、がん治療に応用可能か検討する。

項目⑥抗体創薬とバイオマーカー：同定した［受容体-リガンド］ペアが④でがん細胞応答に影響した場合、受容体を活性化・非活性化するモノクローナル抗体の開発を行う。開発した抗体の in vivo における抗腫瘍効果を上記の動物モデルで検証し、**Proof-of-concept の獲得を目指す。**また、リャマやアルパカなどのラクダ科の動物が持つ軽鎖がなく重鎖だけからなる小型の 1 本鎖抗体ナノボディ(2012 年ノーベル化学賞の key テクニックの一つ)は GPCR のリガンド結合部位を認識できるため、マウス抗体の不成功時はナノボディ開発を検討する。また既にスクリーニングプラットフォームを開発し有効なシグナル経路・リガンド構造も判明している段階であり、東京大学創薬機構ケミカルライブラリーを利用した有効な薬剤スクリーニングも行う。同定したリガンドが臨床的にバイオマーカーとして活用可能かを臨床検体や臨床情報を用いて検証する。

項目⑦ヒトがん病理検体における治療標的オーファン GPCR の発現評価：⑥で開発する抗体創薬のヒトへの臨床応用を視野に入れ、実際にヒトがん組織におけるオーファン GPCR の発現量評価を TMA (Tissue Microarray) で行う。

発見したリガンドとそのアンタゴニスト、開発した抗体医薬が有望な場合、各種がんの動物モデルで前臨床試験を行った後、再発・難治性がん患者を対象とした Phase I study を計画する。

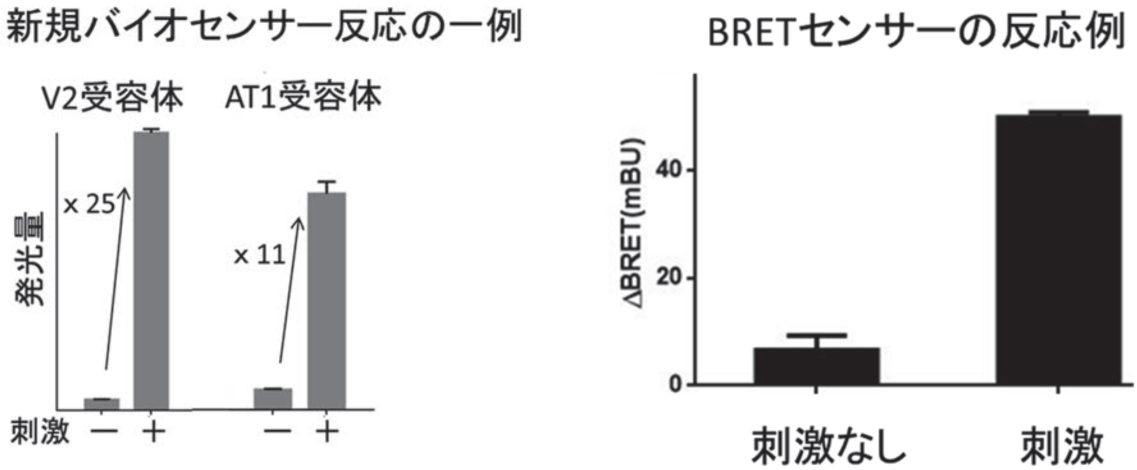
III 研究成果

本研究では、Orphan 受容体のリガンド同定に際して、シグナル感知の漏れをなくすため、以下のように独自に開発するものを含め、複数のバイオセンサーを用いてハイスループットスクリーニング系を構築した。本研究では血漿を用いるため、血漿中の非特異的因子が目的

の受容体以外を活性化する擬陽性を生じやすく、既存の転写因子などを利用したスクリーニングアッセイシステムが使いにくい。そこで下記の感度または特異度が高い複数のバイオセンサーを用いて Orphan 受容体スクリーニングプラットフォームを作成し、GPCR 下流のGs/Gi/Gq/G12 の 4 つの G タンパク質経路と arrestin 経路の 2 つのシグナルの両者を漏らさずに検出するよう計画した。

車両競技公益資金記念財団の助成を得て、①バイオセンサー・スクリーニングプラットフォームの完了、②倫理審査承認を受けスクリーニングを開始。リガンドスクリーニングと並行し③「がん細胞株における依存性解析」を行い肺癌で GPCR-A 依存性を見出した。④オーファン GPCR のがん病理検体での発現解析を実施し一部の肺癌と乳癌で GPCR-A の発現上昇を確認した。⑤がん細胞における GPCR-A 下流シグナル解析のため RNA シークエンスを行った。

①-1. 新規バイオセンサー開発とスクリーニングプラットフォームの構築：バイオセンサー開発と全オーファン GPCR のクローニング及び C 末端への SmallBit タグを付加したスクリーニングプラットフォーム構築が終了した。また予定していた結合発光システムを利用する G 蛋白センサー（下図左）や BRET センサー（下図右）についても開発に成功した。特に独自開発した世界初ハイスループット対応高感度発光 G タンパクセンサーは、特許申請を準備中である。スクリーニング用(A)G タンパクセンサー およびアレスチンセンサーの安定発現細胞株の樹立に成功し、安定した反応を得てスクリーニングに使用した。

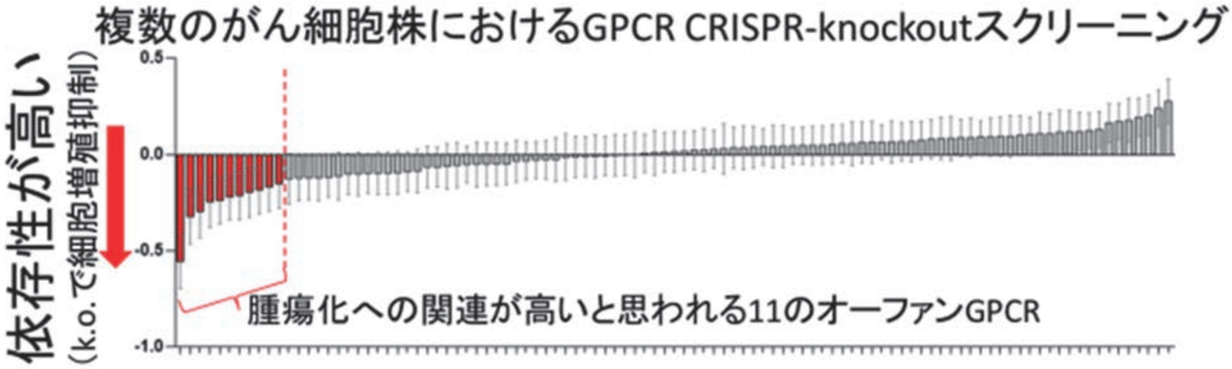


②.倫理委員会によるヒト検体を用いる当該研究への倫理審査の承認：本研究課題は国立がん研究センターバイオバンクのがん患者血漿使用のため国立がん研究センター倫理委員会(研究課題番号 2021-017、研究課題名：がんにおけるオーファン受容体の観察研究)および杏林大学倫理委員会（研究課題番号 R03-081、課題名同上）にて倫理委員会の承認を得た。

③がん患者血漿スクリーニングの実施：②上記倫理審査承認に基づき、国立がん研究センター研究所バイオバンク保管のがん患者血漿を用いて、①で作成したスクリーニングプラットフォームの利用によるリガンドスクリーニングを実施した。

④.CRISPR-CAS9 ノックアウトスクリーニングによる高依存性オーファン GPCR の発見：オーファン GPCR の腫瘍化への貢献の評価をリガンドスクリーニングに先立って解析した。複数の細胞株においてオーファン GPCR を一つずつ CRISPR-CAS9 でノックアウトしたとき、発現を欠

失させると細胞増殖が抑制されるか､即ち腫瘍の生存はオーファン GPCR に依存しているかを評価し、腫瘍化への依存度が高い 11 のオーファン GPCR を見出した（下図)。この中には、最近肉腫において治療標的となることが報告された GPR20 も含まれており（Iida et al. ***Cancer Discov.*** 2021)、本 CRISPR スクリーニングの結果が有望であると期待できる。この中で肺癌細胞において高い依存性を示した GPCR-A を見出したため､⑤において腫瘍細胞・病理標本における GPCR-A の評価を行った。



また、ノックアウトマウスの表現型解析などを通じて、各オーファン GPCR が果たす生理的役割を分類することに成功した（文献１)。

⑤.がん組織におけるオーファン GPCR 発現の評価：がん細胞株における依存性が最も高い GPCR-A のがん組織での実際の発現を評価するため、東京大学医学部病理学教室牛久哲男教授との共同研究を開始、各腫瘍組織における GPCR-A の発現の TMA（Tissue Microarray）による評価を開始した。実際に肺癌と乳癌の一部に GPCR-A の高発現を認め、がん治療標的となりうることが期待された。CRISPR スクリーニングと TMA の結果を合わせ、現在肺がんと乳癌での治療効果が高い可能性を考慮している。

⑥GPCR-A のがん細胞シグナルの評価；肺がん細胞において GPCR-A の CRISPR-Cas9 によるノックアウト細胞の RNA シークエンスを解析したところ、GPCR-A が ERK pathway を活性化することを見出した。小分子ライブラリーを用いた GPCR-A に対する小分子リガンドスクリーニングを行ったが有効な分子の発見には至っていない。

IV　考察

臨床で現在のところオーファンGPCRを標的とした薬剤は臨床でほとんど使用されておらず、その原因として①リガンドが未知のためオーファンGPCRの生理的機能がよくわかっておらず、受容体の活性化・不活化というstrategyでの治療目標が定めにくい　②オーファンGPCRまたはリガンドの異常による疾患がわかっていない、　という2点があげられる。

文献１で示したように、ノックアウトマウスの表現型解析などを通じていくつかのオーファンGPCRが果たす生理的役割を分類したが、これによって今後オーファンGPCRが治療標的となった際の副作用の予防など重要な臨床的貢献を果たすことが期待される。

一方現在のところがん患者血漿からのオーファンGPCRのリガンド発見にはつながっていない。これはがん患者血漿独特のハンドリングのし難さや、血漿全体から有効成分を絞り出す

ためには多数のポジティブ/ネガティブ検体の比較を行う必要があること、など複数の要因が挙げられる。今後こうした課題を克服することでリガンド発見に結び付けたい。

本課題の成果であるがん増殖に関与すると考えられるGPCR-Aの発見は今後新たながん治療標的となる可能性があり、GPCR-Aを標的とする抗体や小分子のスクリーニングを今後行っていくことで、新たながん治療に結びつくことが期待される。

V　研究成果の発表

1. **Oishi A**, and Jockers R. Recent advances in orphan GPCRs research and therapeutic potential. ***GPCRs as Therapeutic Targets*** 2022, 1, 20-59, DOI; https://doi.org/10.1002/9781119564782.ch2
2. **Oishi A**, and Jockers R. Measuring Protein-protein interactions of Melatonin Receptors by Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET). Methods in Molecular Biology 2022, 2550:207-18, PMID: 36180695 DOI: 10.1007/978-1-0716-2593-4_26)

【謝辞】

本研究の共同研究者は、東京大学 病理学教室の牛久哲男教授・国立がん研究センター中央病院後藤悌先生と国立がん研究センター研究所の吉見昭秀先生、です。また、本研究の遂行は車両競技公益資金記念財団からの助成金により初めて可能になりました。ここに深く感謝いたします。

デザイナー幹細胞を用いた腫瘍溶解性ウイルス送達システムの開発

所属機関　日本医科大学　分子遺伝学
研究者名　宮川　世志幸

〈研究の概要〉

現在、既存のがん治療法に取って代わる新規治療技術として、腫瘍溶解性ウイルスを用いた治療法に世界中の医療関係者が高い関心を寄せている。腫瘍溶解性ウイルスは、がん細胞のみで複製し高い殺傷性を示す一方、正常細胞においてはほとんど複製ができないため、極めて安全性が高い。またがん細胞を破壊する際に、がんに対する体内の免疫反応を誘発することで全身性の抗腫瘍免疫を惹起することができる。実際、腫瘍溶解性ウイルス療法は臨床試験において有意な持続的奏功を認めている。しかし、一方で転移巣に対しては期待するような抗腫瘍効果は認められておらず、今後の本治療法の課題として、原発巣のみならず遠隔転移した腫瘍にも有効な改善法が求められる。本研究では、腫瘍溶解性ヘルペスウイルス（oHSV）と腫瘍集積性を有する間葉系幹細胞（MSC）をキャリア細胞として併用した革新的がん遺伝子細胞治療法の治療効果増強を目的として、キャリア細胞に遺伝子改変を導入することにより、従来のがん治療では治療が困難な遠隔巣の腫瘍にも治療が行き届く“デザイナー幹細胞”を樹立し、次世代のがん遺伝子細胞治療技術開発を行う。

まずデザイナー幹細胞開発のソースとして、いずれの組織由来間葉系幹細胞（MSC）が適当か調べることを目的として、まずヒト骨髄、脂肪、臍帯血、子宮内膜由来 MSC を胆管がん由来オルガノイド・膵がん由来スフェロイドを用いた 2 次元及び 3 次元培養系において各 MSC を共培養し、その遊走能を解析した。その結果、いずれの腫瘍細胞に対しても、MSC は高い遊走性を示したが、起源により遊走性に差があることが判明した。次に、各組織由来 MSC の oHSV キャリア細胞としての機能を解析するために、oHSV に対する感受性解析を進めた。その結果、いずれの hMSCs も oHSV に高い感受性を示したが、特に骨髄由来 MSCs は oHSV に対する耐性が低いことが判明した。興味深いことに、ADMSCs は oHSV 感染に対してやや抵抗性であったことから、脂肪由来 MSCs の組織特異的機構が hMSCs の oHSV に対する感受性に影響を及ぼすことが示唆された。以上の結果から、MSC の供給源は oHSV に対する感受性に大きく影響することが示唆された。

次に、デザイナー幹細胞の複製スイッチとして有用な MSC 遊走性や腫瘍溶解活性に関連する遺伝子群・シグナル経路を特定することを目標として、*in vitro* 3 次元共培養系における膵がん由来スフェロイドおよび各ヒト組織由来 MSC を sorting により単離し、各細胞群の遺伝子発現解析を実施した。本解析により、腫瘍への遊走性が高い骨髄由来 MSC にて有意に発現が亢進している 30 の遺伝子群を特定した。また oHSV 搭載 MSC と腫瘍細胞の *in vitro* 3 次元共培養系において、腫瘍細胞およびヒト組織由来 oHSV 搭載 MSC の動態を解析するために、定量的なイメージング解析を進め、oHSV 搭載 MSC においては、oHSV 単独感染と比較し oHSV が速やかに腫瘍内に伝播すること、腫瘍細胞を効率的に殺傷することが明らかとなった。また MSC 起源間における oHSV 伝播性および腫瘍殺傷性ついて比較検討を行なったところ、oHSV 伝播性および腫瘍殺傷性いずれの能力についても特定の組織由来 MSC が有意に優れていることが判明した。以上の結果より、oHSV と MSC を併用したがん遺伝子細胞治療におけるデザイナー幹細胞開発について、その MSC 起源の重要性が明らかとなり、さらに oHSV 複製を制御するために有用なシグナル経路を特定することに成功した。

共同研究者の氏名・所属機関

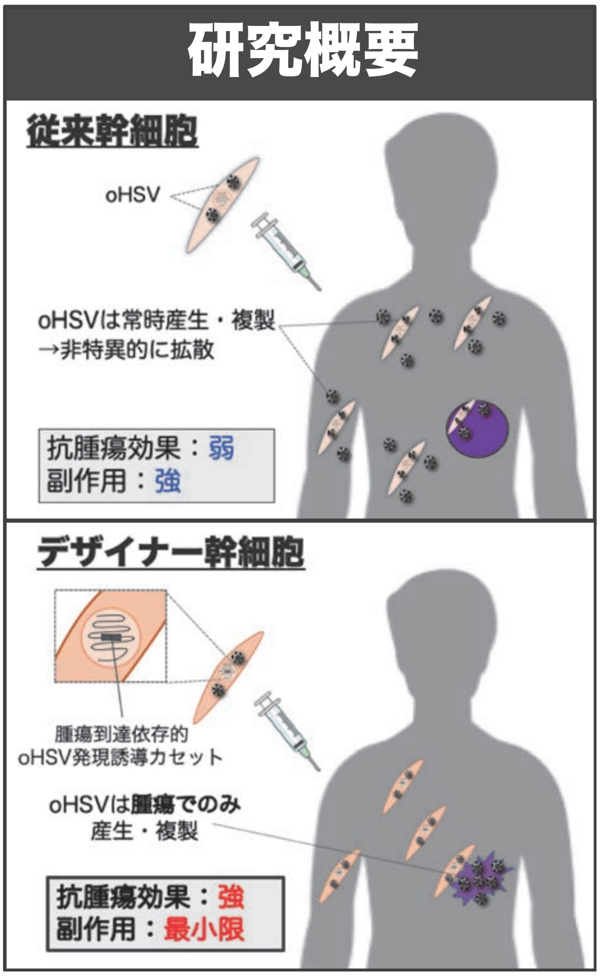
酒井　真志人	日本医科大学 分子遺伝医学
梅澤　明宏	国立成育医療センター
Joseph C. Glorioso III	University of Pittsburgh
笠原　優子	東京大学　分子遺伝医学
黒田　誠司	日本医科大学 分子遺伝医学
助川　誠	日本医科大学 分子遺伝医学

研究報告

Ⅰ　研究目的

本研究では、がん細胞のみを破壊し高い抗腫瘍活性を持つ腫瘍溶解性ウイルスのキャリアとして、ゲノム編集技術を駆使した “デザイナー幹細胞”を開発し、遠隔部の腫瘍を標的化することで効率的に腫瘍を死滅させる画期的治療システムの開発に挑む。

現在、既存のがん治療法に取って変わる新規治療技術として、腫瘍溶解性ウイルスを用いた治療法に世界中の医療関係者が高い関心が寄せている。腫瘍溶解性ウイルスは、がん細胞のみで複製し高い殺傷性を示す一方、正常細胞においてはほとんど複製ができないため、極めて安全性が高い。またがん細胞を破壊する際に、がんに対する体内の免疫反応を誘発することで全身性の抗腫瘍免疫を惹起することができる。近年アメリカ米国食品医薬品局（FDA）において、腫瘍溶解性ヘルペスウイルス療法薬 Talimogene laherparepvec（T-VEC）が承認されて以来、世界中の臨床研究者が挙って本薬を用いた臨床研究に取り組んでいる。実際、T-VEC はメラノーマの患者に対する臨床試験においてコントロール群（2%）と比較し、有意な持続的奏功（16%）を認めた。しかし、一方で転移巣に対しては期待するような抗腫瘍効果は認められなかった。従って、今後の本治療法の課題として、原発巣のみならず遠隔転移した腫瘍にも有効な改善法が求められる。



申請者グループは、T-VEC のベースとなるヘルペスウイルス（HSV）ベクターの研究に長年勤しみ、数々の遺伝子治療用及びがん治療用 HSV ベクターの開発に成功している（Miyagawa *et al*, PNAS 2015; WO2015/009952A1; Han, Miyagawa *et al*. J Virol. 2018; Miyagawa *et al*. Mol Ther Methods Clin Dev. 2017; Verlengia*, Miyagawa* *et al*. Sci Rep 2017 他多数）。近年では、本邦で単離された有望な腫瘍溶解性 HSV（oHSV）である Canerpaturev （C-REV）の開発に取り組んでいる。C-REV は既に臨床応用が進んでおり、米国と本邦にてメラノーマや膵臓がんに

対して良好な結果が得られている。申請者らは上述の課題解決を目指して、C-REV と腫瘍に対するホーミング活性のある間葉系幹細胞（MSC）との併用療法を提案し、研究を進めている（宮川,医学のあゆみ,2020）。oHSV を MSC に搭載することで、がん遺伝子治療の治療効果低下の一因である免疫機構による oHSV の不活化を回避し、遠隔転移巣まで oHSV を送達することが可能となる。本治療法をさらに精度の良い治療技術にするための課題点として、oHSV の複製・伝播の制御が挙げられる。従来の幹細胞では oHSV が常時複製し産生されるため、MSC のホーミング機能の低下や非特異的なウイルスの伝播が起こり、不必要な免疫応答が誘導され、結果的に標的の腫瘍に到達する MSC/oHSV はわずかとなり、抗腫瘍効果が著しく減弱される（右上図上）。そこで本研究ではこの課題点を克服するために、ゲノム編集技術を駆使して幹細胞に遺伝子改変を施し、oHSV の複製を活性化させる「スイッチ」をつけることで MSC が腫瘍に到達した時点で oHSV の複製が開始されるような発現カセットを組み込む（右上図下）。このデザイナー幹細胞は腫瘍に到達した時のみ oHSV を産生し、効率的に腫瘍を破壊し、抗腫瘍免疫のみを惹起できる。従って、本プラットフォームが完成すれば、極めて安全性かつ治療効果の高いがん治療が提供でき、本邦のがん遺伝子治療発展に大きく貢献するものと想定される。

II　研究計画及び材料と方法

1.ヒト間葉系幹細胞（hMSC）、腫瘍細胞、その他培養細胞、腫瘍溶解性ヘルペスウイルス（oHSV）

hMSCs は、骨髄、脂肪組織、臍帯血および子宮内膜由来の不死化 MSC は、細胞バンクに寄託されており、数多くの研究で使用され、品質が証明されているものを使用した（https://cellbank.nibiohn.go.jp）。骨髄由来の初代培養 hMSCs は、タカラバイオ社より購入した。ヒト線維芽細胞（fHDF/TERT166；#CHT-031-0166）は、Evercyte 社から入手した。ヒト胆管がんオルガノイドは、福島国際研究センターより調達した。Vero 細胞は、American Type Culture Collection（ATCC）より購入した。PANC-1、fHDF/TERT166、HEK293T、Vero 細胞は、10％ウシ胎児血清（FBS）および1％ペニシリン／ストレプトマイシンを添加したダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)で培養した。hMSCs には AcGFP を発現するレンチウイルスを導入し、PANC-1 細胞には mCherry を発現するレンチウイルスを導入した。oHSV 及び mCherry 搭載 oHSV ストックは Vero 細胞で増殖させ、精製された。ウイルスは精製後、タイターを測定し-80℃に保管した。

2. *in vitro* 腫瘍モデルの構築

2 次元遊走性解析は、24 ウェルプレートに 2 ウェル細胞培養インサート（#80209, Ibidi, Martinsried, Germany）を用いて行った。hMSC を培養インサートの片側に播種し、37℃で一晩培養した。翌日、胆管がんオルガノイドをマトリゲルに懸濁して、細胞培養インサートを静かに取り出し、hMSC の遊走性を評価した。また 24 ウェルプレートに 8mm 孔のポリカーボネートフィルターインサートを装着したトランズウェルチャンバーを用いて、垂直遊走性解析を行った。hMSCs をインサートに播種し、下部チャンバーに PANC-Conditioned Medium（PANC-CM）を満たした。MSC を 37℃で 24 時間遊走させた後、Hoechst 33342 で染色した。染色された細胞は、蛍光顕微鏡を用いて、チャンバーごとにランダムに 5 つの高倍率フィールドでカウントした。PANC-1 および fHDF/TERT166 スフェロイドは、以下のようにして作製した：細胞を、96 ウェル U 底プレートに播種し、1,000xg で 10 分間遠心した。37℃で 3 日間培養した後、スフェロイドを 3 次元モデルに用いた。3 次遊走性解析は、hMSCs を 5％マトリゲル/MSC 基礎培地に懸濁して、低付着性 96 ウェル

プレートに播種した。PANC-1 または HDF 由来スフェロイドを各ウェルの中心に注意深く播種し、共焦点顕微鏡を用いて遊走性を解析した。

3.遺伝子発現・シグナル解析

3 次元遊走性解析における hMSCs は、FACSAria Fusion セルソーターを用いて FACS で回収した。60 ユニットの RNaseOUT（Invitrogen）を添加した単細胞溶解バッファー（Takara Bio）を用いて細胞を溶解した。RNAClean XP beads（Beckman Coulter, Brea, CA, USA）を用いて全 RNA を精製した。RNA シークエンシングライブラリーは、SMART-seq HT Plus Kit（タカラバイオ）を用いた。シーケンシングは HiSeqX（Illumina, San Diego, CA, USA）プラットフォームで行い、2x150-bp リードを作成した。fastp を用いてアダプター配列と低品質リードを除去した後、ペアエンドリードをデフォルトパラメーターで STAR を用いて mm10 ゲノムにマッピングした。HOMER の analyzeRepeats.pl ツールを用いて、-condenseGenes -count exons -noadj パラメータで転写産物を定量した。DEG は DESeq2 を用いて、調整 p 値<0.05 および fold change >2 に基づいて評価・同定した。

4. oHSV 搭載 MSC の作製と共培養モデルの確立

2 次元培養を用いて oHSV の殺細胞能力を測定するために、hMSCs を mCherry 発現 oHSV に感染させ（oHSV-hMSCs）、PANC-1 細胞の上に播種した。蛍光顕微鏡写真を撮影し、ウイルス感染率・細胞生存率を算出した。3 次元培養を用いて oHSV の殺細胞能力を測定するために、非標識膵がんスフェロイドに等量の mCherry 発現 oHSV を感染させるか、あるいは oHSV-hMSC を播種し、37℃で 2 時間回転培養した。回転培養後、膵がんスフェロイドを静かに回収し、96 ウェル低付着性プレートに播種し、膵がんスフェロイドへの oHSV の感染率・細胞生存率を算出した。

5. *in vivo* 腫瘍モデルの作製

本研究に用いる *in vivo* 腫瘍モデルとして、膵臓がん細胞株である MIA PaCa 細胞を免疫不全マウスに投与し、作製する。oHSV 搭載幹細胞が実際に腫瘍組織に集積し oHSV を産生するか調べるために、同モデルに対して oHSV 搭載 hMSCs を接種後、oHSV 搭載 hMSCs の腫瘍組織への集積性及び oHSV 産生量を解析した。

III 研究成果

ヒト各組織由来 MSC 遊走性の比較

デザイナー細胞の候補として hMSCs の特性を比較するために、代表的な間葉系マーカーである CD73、CD90、CD105 を発現する、骨髄（BMMSCs）、脂肪（ADMSCs）、臍帯血（UCBMSCs）、子宮内膜（EPCMSCs）由来の不死化 hMSCs を調製した（図 1）。2 次元培養系における hMSC の遊走性をモニタリングするため、hMSC をレンチウイルスによる遺伝子導入により Aequorea coerulescens green fluorescent protein （AcGFP）で標識した。AcGFP 導入による間葉系マーカー発現レベルの変化は認められなかった。がん細胞に対する hMSCs の遊走能を評価するため、まずトランズウェルを

用いて２次元培養下における遊走性解析を行った（図 2)。予想通り、4 種類の hMSCs はいずれもトランズウェル中で膵がん細胞調整培地（PANC-CM）へ遊走した。興味深いことに、遊走した細胞の数は hMSCs の種類によって異なっていた。BMMSC は有意に高い遊走能を示したが、EPCMSC は他の MSC と比較し、遊走能が低いことがわかった。次に、ヒト胆管がんオルガノイドに対する MSC の遊走性を経時的にモニタリングするため、水平遊走性解析を行った。全ての hMSC はオルガノイドが存在しない場合でも遊走を認めたが、がんオルガノイドへの遊走は極めて顕著であり、hMSC はがんオルガノイドに特異的に遊走することが示唆された。トランズウェルを用いた遊走性解析の結果と一致し、BMMSCs は最も高い遊走性を示した。これらの結果から、2 次元培養系において、がん細胞に対する hMSCs の遊走能は、その供給源が影響することが示された。

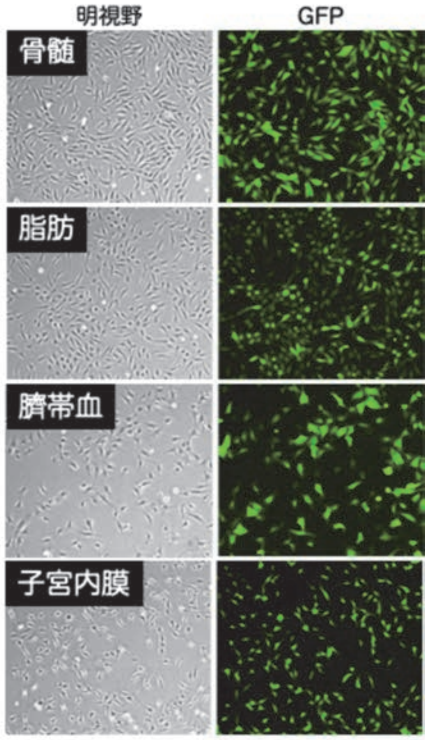


図1.様々なヒト組織由来MSC

次に、がん微小環境における hMSC の特性を比較するために、３次元共培養モデルを確立した（図 3)。がん細胞に対する hMSC の遊走能をモニタリングするため、ヒト膵臓がん細胞株 PANC-1 由来の mCherry 発現がんスフェロイドを低接着プレートの各ウェルの中央に置き、そこに hMSC を播種した。陰性対照としてヒト線維芽細胞由来スフェロイドを用いた。この培養系では、hMSC の３次元動態を経時的に定量的にモニタリングすることができる。hMSC は膵がんスフェロイドに向かって著しく移動したが、線維芽細胞由来スフェロイドへの遊走はわずかであった。このことは、hMSC の遊走が３次元培養環境においてもがん特異的であり、由来組織に依存しないことを示唆している。注目すべきは、がんスフェロイド周囲への hMSCs の集積パターンが、その供給源によって大きく異なることである。例えば、BMMSCs はスフェロイドに向かって遊走し、がんスフェロイドの周囲に集積する前に、速やかに小さな凝集塊を形成した。一方、ADMSCs は凝集塊を形成することなく遊走した。BMMSCs は他の hMSCs よりもスフェロイドに向かってより速く遊走した。これらの結果から、BMMSCs は２次元培養システムだけでなく 3 次元培養システムにおいても、他の hMSCs よりも強いがんトロピズムを示すことが明らかとなった。

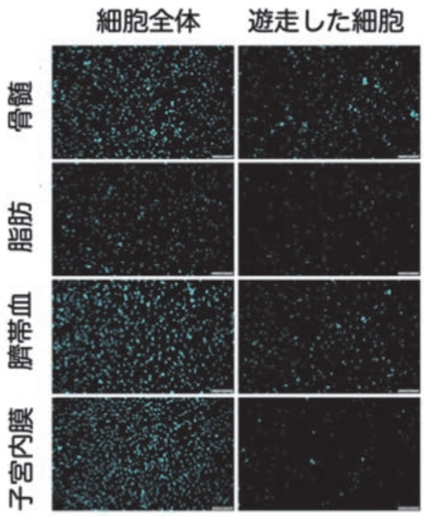


図2. 2D培養におけるhMSC遊走性

3 次元共培養モデルにおける hMSCs 遺伝子発現解析

デザイナー幹細胞を開発するにあたり、腫瘍細胞依存的に発現が変動する遺伝子群・シグナルの同定は極めて重要である。上記の研究成果から、３次元共培養モデルにおいて、hMSCs の起源ががんトロピズムに影響を与えることが示唆されたことから、hMSCs の起源により腫瘍細胞に対する反応性が異なることが想定された。そこで、その分子機序を調べるため、4 種類の hMSC を用い

た３次元共培養モデルについて、RNA-seq を用いた包括的な遺伝子発現解析を行った（図 4）。RNA-seq により、hMSCs から合計 47,919 遺伝子が検出された。発現変動遺伝子は、2 倍以上の変化と 0.05 の偽発見率カットオフに基づいて同定した。Gene ontology（GO）解析を行ったところ、hMSC-PANC1 と hMSC-HDF スフェロイド共培養間の発現変動遺伝子は、「細胞遊走」と「サイトカイン応答」の 2 つのシグナル経路が有意に関係していることが明らかとなった。これらのパスウェイは約 2,000 遺伝子を包含していた。これらのうち、約 1,300 遺伝子は BMMSC-PANC1 において正規化発現値が 1 以上であった。これらの遺伝子の中から、BMMSC-膵がんスフェロイド共培養において、他の hMSCs-膵がんスフェロイド共培養と比較して発現が 5 倍以上増加した遺伝子を選び出し、30 遺伝子を得た。この中には、細胞運動に関連受容体の遺伝子が含まれていた。これらの結果から、BMMSCs は特定の遺伝子の発現を調節することで、がん細胞への遊走能力を高めている可能性が示唆された。具体的には、これら抽出した遺伝子がこのプロセスにおいて極めて重要な役割を果たす可能性がある。

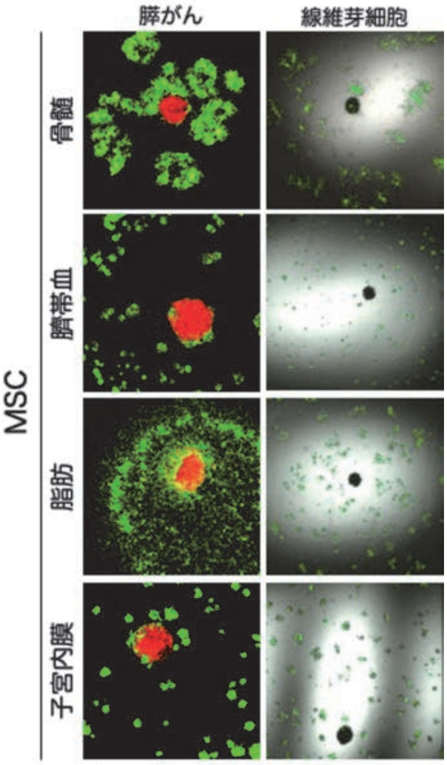


図3.MSCの腫瘍特異的集積

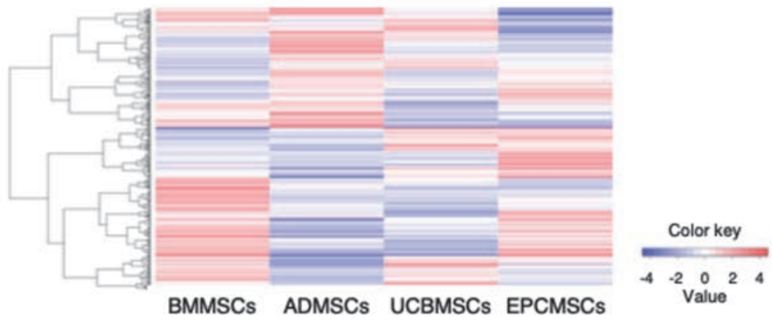


図4.3次元培養下でのhMSC遺伝子発現解析

hMSCs の oHSV 感受性

デザイナー幹細胞開発において、oHSV に対する感受性はソースを決定する上で重要なファクターと言える。そこで、各組織由来 hMSCs の oHSV に対する感受性を解析した（図 5）。いずれの hMSCs も oHSV に非常に感受性が高く、48 時間以内に急速に細胞死を起こしたが、BMMSCs は oHSV に対する耐性が有意に低かった。興味深いことに、ADMSCs は oHSV 感染に対してやや抵抗性であったことから、ADMSCs の由来が hMSCs の oHSV に対する感受性に影響を及ぼすことが示唆された。感受性の原因を明らかにするために、hMSCs 間の oHSV の感染効率を比

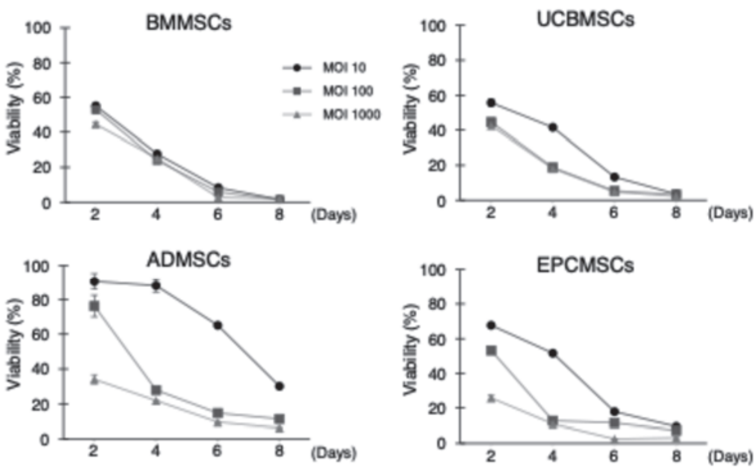


図5.hMSCのoHSVに対する感受性

較したが、顕著な差は認められなかった。また、oHSV感染後のhMSCsからの oHSV の放出効率も評価した。oHSVを感染させた BMMSCs は、oHSV を感染させたUCBMSCsおよびoHSV を感染させたEPCMSCsと比較して、有意に培養上清中にoHSVが放出されたことから、oHSVの高放出がoHSVに対する BMMSC の感受性に寄与していることが示唆された。しかし、oHSV の放出効率については、BMMSCs と ADMSCs の間に大きな差は認められなかった。この結果から、ADMSC の oHSV 感受性の低さは、感染・複製効率とは相関せず、組織特異的なメカニズムに影響されている可能性が示された。

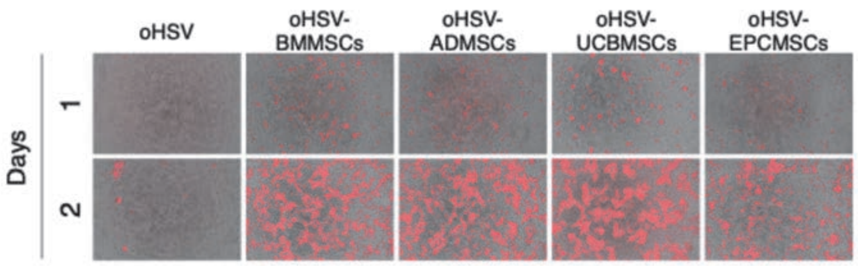


図6. 2次元培養下でのoHSV-hMSC腫瘍殺傷性

oHSV搭載hMSCsの腫瘍殺傷性

本デザイナー幹細胞開発において、oHSV を効率的にがん細胞に送達する能力は極めて重要である。そこで次に、hMSCsをoHSVのキャリア細胞として用いることで、がん細胞へのウイルス伝播および殺傷活性が増強されるかどうか 2 次元共培養モデルを用いて検討した（図 6)。mCherry を発現するoHSVまたはoHSV-hMSCsをPANC-1細胞と2次元環境下で共培養し、細胞内でのウイルス感染について測定した。oHSV単独感染群では、2日目にmCherry陽性を示したPANC-1細胞はほとんどなかったが、oHSV-hMSCs播種群では、ほとんどのPANC-1細胞が丸い形をしており、mCherry を発現していたことから、oHSV が細胞全体に広がっていることが示唆された。次に、2 次元共培養モデルを用いて、PANC-1細胞に対するoHSV-hMSCsの細胞毒性を評価した。5日目には、oHSV単独感染では90%以上のPANC-1細胞が生存していたが、oHSV-EPCMSCsを除くoHSV-hMSCsでは50%以上のPANC-1細胞が死滅した。oHSV-UCBMSCsで処理したPANC-1細胞は、3日目、4日目、5日目において生存率が最も低かったが、oHSV-EPCMSCsは最も低い殺傷能力を示した。これらのデータから、hMSCsは2次元共培養モデルにおいて、oHSVの効率的な伝播と抗腫瘍活性を促進することが示唆された。次に、生体内の腫瘍環境を模倣した3次元共培養モデルを用いて、oHSV-hMSCsのがん細胞への感染および殺傷能力を検討した（図 7)。oHSV-hMSCs を膵がんスフェロイドに効率よく接着させるために、oHSV-hMSCsと膵がんスフェロイドを用いて回転共培養を行い、接着を促進させた。oHSV-hMSCsを膵がんスフェロイドに接着させた後、3次元培養に播種し、膵がんスフェロイド内での oHSV の感染性を調べた。

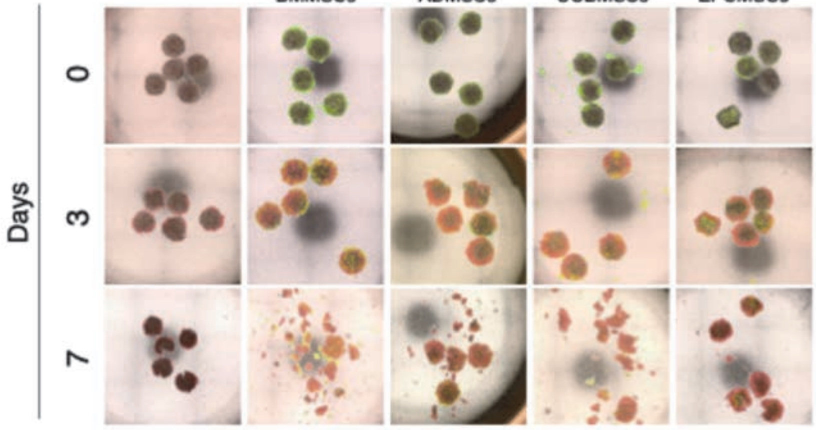


図7. 3次元培養下でのoHSV-hMSC腫瘍殺傷性

mCherry シグナルは時間とともにがんスフェロイド内で伝播していることから、3 次元共培養条件下で oHSV が膵がんスフェロイド内で伝播しうることが示唆された。mCherry の伝播は、oHSV-hMSCs でも oHSV 単独でも観察されたが、BMMSCs と UCBMSCs をキャリア細胞として用いた場合、伝播は著しく促進された。4 種類の oHSV-hMSCs の中で、oHSV-BMMSCs は膵がんスフェロイドにおける oHSV の伝播効率を高める優れた能力を示した。次に、3 次元共培養モデルにおけるがん細胞の生存率を調べた。3 日目には、oHSV 群と oHSV-hMSCs 群の両方で、膵がんスフェロイドの形態に目立った変化は見られなかった。しかし、7 日目には、特に oHSV-hMSCs 群でスフェロイドが崩壊し始めた。oHSV 群と oHSV-EPCMSCs 群では 90%以上の膵がんスフェロイドが生存していたが、oHSV-BMMSCs 群では 60%以下であった。この結果は、キャリア細胞として BMMSCs を用いると抗腫瘍活性が高まることを示唆した。これらの結果から、EPCMSCs を除く hMSCs は、3 次元共培養モデルにおいて、oHSV の伝播および抗腫瘍活性の促進に有益であることが示された。

in vivo モデルにおける hMSCs の遊走性・腫瘍殺傷性

ここまでの研究でがん細胞に対する hMSCs の遊走能は、その由来組織に強く影響することが示された。そこで *in vitro* 共培養モデルで見られた結果が、*in vivo* でも再現されるか調べるために、膵がん細胞株を用いた担がんモデルを作製し、これに各組織由来 hMSCs を投与して腫瘍への集積性を評価した。その結果、いずれの組織由来 hMSCs についても腫瘍に対する集積が認められ、*in vitro* 同様に hMSC のがんトロピズムが観察された。現在、各組織由来 hMSCs 間で腫瘍集積性に差が認められるか解析するとともに、腫瘍殺傷性についても解析を急いでいる。

IV 考察

本研究では、oHSV を効率的に主要に運ぶためのデザイナー幹細胞開発を最終目標として、そのソースとなる各ヒト組織 hMSCs の特性を詳細に評価し、いずれの組織由来 hMSCs がデザイナー幹細胞として有用か評価を進めた。同時に、oHSV 搭載 hMSCs の動態を *in vitro* 共培養モデルを作製して詳細に解析し、いずれの時期に複製を開始するスイッチを発動すべきか解析を進めた。我々の研究から、MSC の起源が oHSV に対する感受性に影響を及ぼすことが示され（図 5）、ウイルスキャリア細胞としての機能性において重要な因子である可能性が示唆された。MSC は、いくつかのヘルペスウイルス属に対する数多くの受容体抗原を発現しており、HSV-1、水痘帯状疱疹ウイルス、サイトメガロウイルスに感染しやすい。さらに、MSC は一般的に HSV 感染に感受性があり、HSV 感染受容体である Nectin-1、Herpesvirus entry mediator (H-VEM)、3-O-硫酸化ヘパラン硫酸を発現している。しかし、興味深いことに、hMSCs の oHSV に対する感受性は、その由来によって異なることが示唆された。例えば、ADMSCs は比較的抵抗性であったが、BMMSCs は oHSV 感染に対して脆弱であった（図 5）。さらに、がんスフェロイドにおける oHSV の伝播効率は、hMSCs によって大きく異なっていた（図 6 および 7）。HSV の放出過程では、HSV ヌクレオカプシドは感染細胞の細胞質内にてテグメントで覆われたカプシドに包まれる。HSV ビリオンの細胞膜への輸送および放出は、ダイニンモーター複合体、キネシンモータータンパク質、および Rab GTPase を含む宿主因子によって制御されている。最近の研究では、細胞因子 PTP1B が HSV の細胞間伝播に関連していることが報告されている。従って、がん遺伝子治療に hMSCs を使用する際には、hMSCs の供給源を注意深く考慮すべきである。

デザイナー幹細胞開発において、適切な hMSC ソースの選択と同じく重要なことは、ウイルス

の複製を制御するために有用な遺伝子群・シグナル経路を特定することである。これらの因子抽出を目的として、本研究では、３次元培養下において腫瘍細胞存在下で各ヒト組織 hMSCs の遺伝子発現を詳細に解析した（図 4)。MSC は、CCR2、3、4、7、10、CXCR4、5、6 などのケモカインレセプターを発現しており、その遊走と局在化に関与している。特に CXCR4 は、造血幹細胞を含む体性幹細胞のホーミングや遊走を制御するのに重要である。しかし、TNF-α や IL-1β などの炎症性サイトカインで刺激すると、MSC 上の CXCR4 発現は増強される。重要なことに、CXCR4 産生が増強されるように遺伝子操作された MSC は、前臨床試験において、ホーミング能と遊走能の改善を示している。注目すべきは、CCR2、3、4、7、10、および CXCR4、5、6 の発現に、4 種類の hMSC 間で有意差は認められなかったことである。そこで、MSC の遊走性に関連する因子の同定を試みたところ、２つのシグナル経路「細胞遊走」「サイトカインに対する応答」に関連する発現変動遺伝子が有意に関連していることが明らかとなった。この中には遊走性に関与する受容体遺伝子の発現が BMMSC において有意に上昇した。キャリア細胞としての hMSCs の特性を完全に理解するためには、さらなる研究が必要である。

以上、本研究では、デザイナー細胞開発に適切な供給源及びウイルス複製のスイッチとして有用なシグナル経路について、極めて重要な知見を蓄積することができた。今後、本知見を基づいてデザイナー幹細胞を用いた腫瘍溶解性ウイルス療法の開発を進め、本システムの有用性を証明していきたいと考えている。

謝辞

3 年間本研究に多大な御支援を賜りました公益財団法人車両競技公益資金記念財団に深く御礼申し上げます。また研究実施にあたり御指導・御意見いただいた横浜総合病院 貴島孝先生に深く御礼申し上げます。

V 研究成果の発表

〈論文発表〉

1. Makoto Sukegawa, Yoshitaka Miyagawa*, Seiji Kuroda, Motoko Yamamoto, Kumi Adachi, Nobuhiko Taniai, Hiroshi Yoshida, Akihiro Umezawa, Mashito Sakai, Takashi Okada. Mesenchymal stem cell origin contributes to the antitumor effect of oncolytic virus carriers. Mol Ther Oncolytics. In press.

〈学会発表〉

1. Makoto Sukegawa, Yoshitaka Miyagawa, Seiji Kuroda, Motoko Yamamoto, Kumi Adachi, Nobuhiko Taniai, Hiroshi Yoshida, Akihiro Umezawa, Mashito Sakai, Takashi Okada. Impact of tissue origin on the functionality of human mesenchymal stem cells as carrier cells for oncolytic virus. The 46th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (MBSJ2023). November 30, December 5-8. Kobe, Japan.

2. Makoto Sukegawa, Yoshitaka Miyagawa, Seiji Kuroda, Motoko Yamamoto, Kumi Adachi, Nobuhiko Taniai, Hiroshi Yoshida, Akihiro Umezawa, Mashito Sakai, Takashi Okada. Functional Analysis of Human Mesenchymal Stem Cells as Oncolytic Virus Carrier Cells

in Three-Dimensional Culture. The Japanese Society of Gene & Cell Therapy 2023, September 11-13, 2023, Osaka.

3. Makoto Sukegawa, Yoshitaka Miyagawa, Seiji Kuroda, Motoko Yamamoto, Kumi Adachi, Nobuhiko Taniai, Hiroshi Yoshida, Akihiro Umezawa, Mashito Sakai, Takashi Okada. The functional analysis of human mesenchymal stem cells for cancer gene therapy. The 45th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (MBSJ2022). November 30 - December 2. Makuhari, Japan. November 30-December 2. Makuhari, Japan.

4. Makoto Sukegawa, Yoshitaka Miyagawa, Seiji Kuroda, Motoko Yamamoto, Kumi Adachi, Nobuhiko Taniai, Hiroshi Yoshida, Akihiro Umezawa, Mashito Sakai, Takashi Okada. The comparison between human mesenchymal stem cells from different sources for oncolytic viral therapy. The 44th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (MBSJ2021). December 1-3. Yokohama, Japan.

5. Makoto Sukegawa, Yoshitaka Miyagawa, Seiji Kuroda, Motoko Yamamoto, Kumi Adachi, Nobuhiko Taniai, Hiroshi Yoshida, Akihiro Umezawa, Mashito Sakai, Takashi Okada. Biological and functional characterization of human mesenchymal stem cells derived from different sources for cancer gene therapy. The 27th Annual Meeting of Japan Society of Gene and Cell Therapy. September 9-October 10, 2021, Online, Japan.

脳内ホルモンと心血管疾患

慶應義塾大学医学部　難治性循環器疾患病態学寄付研究講座
安西　淳

＜研究の概要＞

社会的孤独は、心筋梗塞の発症率や死亡率を上昇させることが報告されているが、孤独がどのように動脈硬化を促進するのか、その分子機序は明らかではない。我々は動脈硬化モデルマウスである ApoE ノックアウト(KO)マウスを単独で飼育することで社会的孤独を再現し、従来通り 1 ケージに 4-5 匹飼育した対照群と比較したところ、孤独群で動脈硬化巣や不安定プラークの増大を認めた。両群間では食事摂取量や体重に違いはなく、さらに末梢血・尿中のコルチコステロン濃度、アドレナリン 3 分画の濃度も変化を認めず、交感神経系の活性化やストレス非依存性に動脈硬化が促進している可能性が示唆された。孤独群で血中コレステロール、中性脂肪が空腹時、随時共に有意に高く、その背景に脂質代謝が関与していることが明らかとなった。

脳視床下部での遺伝子発現パターンを RNA sequencing（RNAseq）により網羅的に解析すると二群間でいくつかの差異を認めたが、特にオキシトシン（Oxt）遺伝子が孤独群で有意に低下していた。血漿オキシトシン濃度も孤独群で有意に低く、孤独群にオキシトシンを継続的に投与したところ、動脈硬化や脂質代謝の改善を認めた。肝臓では肝細胞がオキシトシン受容体（OXTR）を発現しており、網羅的解析によりオキシトシンが胆汁酸合成に関与する Cyp7a1、リポ蛋白リパーゼ（LPL）活性に関与する Angptl4/8 の発現を調整していることを明らかにし、肝細胞にオキシトシンアゴニスト、アンタゴニストなどを振りかける in vitro 実験において、その効果を確認した。さらに肝細胞得意的な OXTR 阻害をコンディショナルノックアウトマウスの作成、アデノ随伴ウィルス（AAV）投与により in vivo で実現し、それらマウスでは孤独マウスの表現型が再現された。

以上より、個体間での社会的繋がりが心血管疾患の発症を予防する機序の背景の一つに、脳視床下部のオキシトシンを介した脳肝連関による脂質代謝の調節が重要である可能性が示唆された。

共同研究者

佐野　元昭　　山口大学大学院医学系研究科器官病態内科学
尾仲　達史　　自治医科大学医学部生理学口座神経脳生理学部門
後藤　信哉　　東海大学医学部　医学科内科学系

＜研究報告＞

I 研究目的

高血圧や脂質異常症など、既知の動脈硬化の危険因子に対する薬物療法や患者教育が普及している今日においても、心筋梗塞・心不全は未だ死因の上位を占め、動脈硬化の残余リスク因子をいかに同定し、新規治療法を模索していくかは我々が解決すべき大きな課題である。社会的孤独は、心筋梗塞の発症率や死亡率を上昇させることが報告されているが（Hakulinen et al. Heart 2018 etc）、"現代のメンタルヘルスの最大の脅威"と言われる孤独が、どのように動脈硬化を促進するのか、その分子機序は明らかではない。また、孤独は社会コストの莫大な増加につながる可能性があり、実際に社会的問題になっている。
申請者らは、マウスにおいて、単独飼育（社会的つながりの「分断」の模倣）が動脈硬化の進行を加速させ、その背景に、肝臓におけるコレステロール代謝異常が存在することを見出した。さらに、単独飼育マウスの視床下部ではオキシトシンが減少しており、オキシトシンを補充することで、これらすべての異常を改善できることを発見した。本研究では、オキシトシンを介する脳末梢連関に焦点を当てて、オキシトシンが肝臓におけるコレステロール代謝に及ぼす影響とその作用機序を探求して、社会的つながりの豊かさがヒトの健康維持や寿命延長につながるメカニズムを解明する。新型コロナウイルスパンデミックが人々に及ぼす影響で、一番の問題は、巣ごもり、自粛生活による社会的つながりの「分断」であり、分断が進んだ先の「孤独」である。社会的つながりの「分断」、孤立が短期間であったなら、アドレナリン、コルチゾールなどの分泌を増やして、ストレスに対する抵抗力を高めることで乗り切れるかもしれない。しかし感染症の終息までの期間が長期にわたり、社会的な孤立の問題が長引いたことで、今後、心血管疾患の発症の大幅な増加につながることが危惧される。本研究では、社会的孤立が動脈硬化リスクを高める機序を、オキシトシン(OXT)を介する脳末梢連関に焦点を当てて、炎症、コレステロール代謝の両面から解析する。本研究成果は、ポストコロナの動脈硬化予防戦略にも一役を買う可能性がある。

II 研究計画及び材料と方法

代表研究者　安西淳 / 共同研究者　佐野元昭

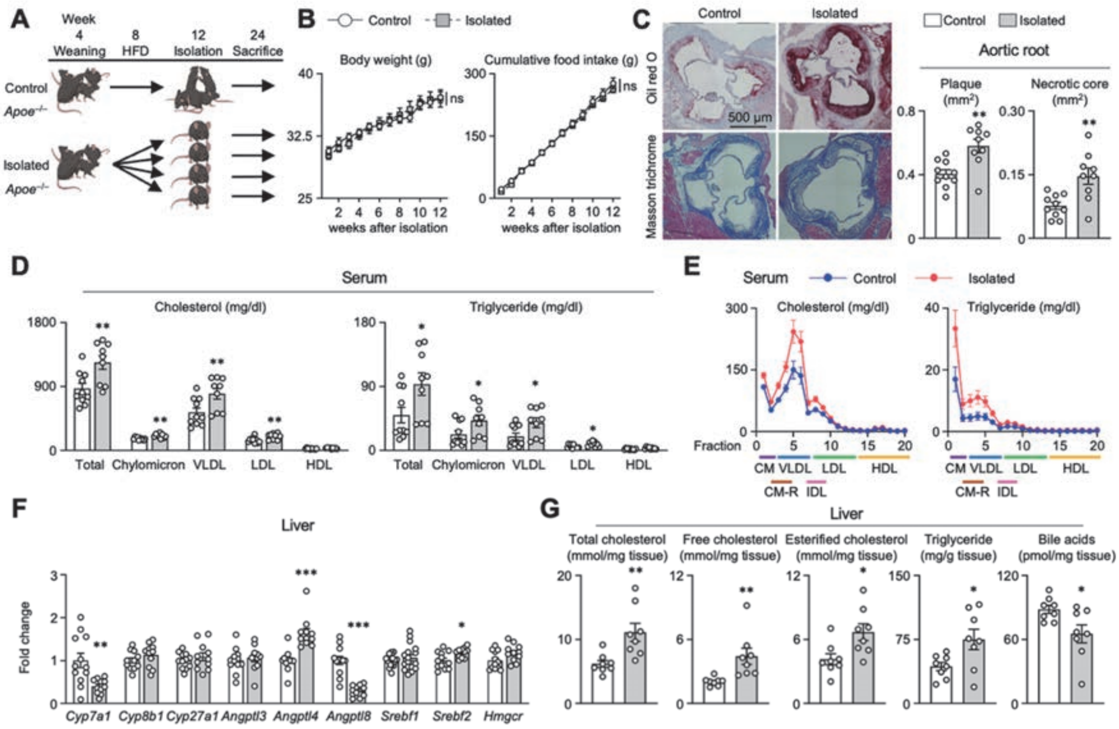
社会的孤独がどのように動脈硬化を促進するのかを検討するため、動脈硬化モデルマウスである ApoE 欠損（KO）マウスに 8 週齢から高脂肪食を負荷、12 週齢から従来通り 1 ケージに 4-5 匹飼育を継続した対照群と、単独飼育した孤独群に無作為に分けて、さらに 12 週間飼育後（24 週齢）に解析を行った。動脈硬化性病変、全身代謝、炎症、ストレス反応を評価するために、組織学的評価、フローサイトメトリー、生化学、遺伝子、およびタンパク質のレベルでの解析を行った。肝細胞およびその後の心臓代謝機能および心臓血管機能へのオキシトシンの効果は、アデノ随伴ウィルスやコンディショナルノックアウトマウスなどを用いた in vivo アプローチ、 および マウス肝臓から単離した肝細胞を用いた in vitro アプローチによって検討した。

副代表研究者　尾仲達史
神経系におけるオキシトシンの働きを解明すること、特に、社会的ストレス負荷時におけるオキシトシンの働きを明らかにすることを目的とした。具体的には、愛着的環境と敵対的環境で社会的ストレス負荷を加え、この時に観察されるストレス反応がオキシトシン系に依存することを解明する計画であった。
社会的に敵対的な状況、あるいは社会的に親和的な状況で、ストレス刺激を加えその時に活動するオキシトシンニューロンとオキシトシン受容体ニューロンの活動をFos蛋白質の発現検討実験で検討した。回路特異的標識には、Cre依存性に標識蛍光蛋白質あるいは人工受容体を発現させる前向性あるいは逆行性ウイルスベクターと、オキシトシン或はオキシトシン受容体発現ニューロン特異的にCre活性を持つマウスを用いた。これらの実験でオキシトシン受容体発現細胞の解剖学的投射を同定した。さらに、特定神経回路に人工受容体を発現させ人工アゴニスト投与により活性化させ、特定神経回路の活動を刺激して、反応が促進されるのか検討しその生理学的機能を同定した。また、局所のオキシトシン受容体をconditional ノックアウト動物を用いて欠損させた。オキシトシン受容体の局所欠損はオキシトシン結合実験で確認した。

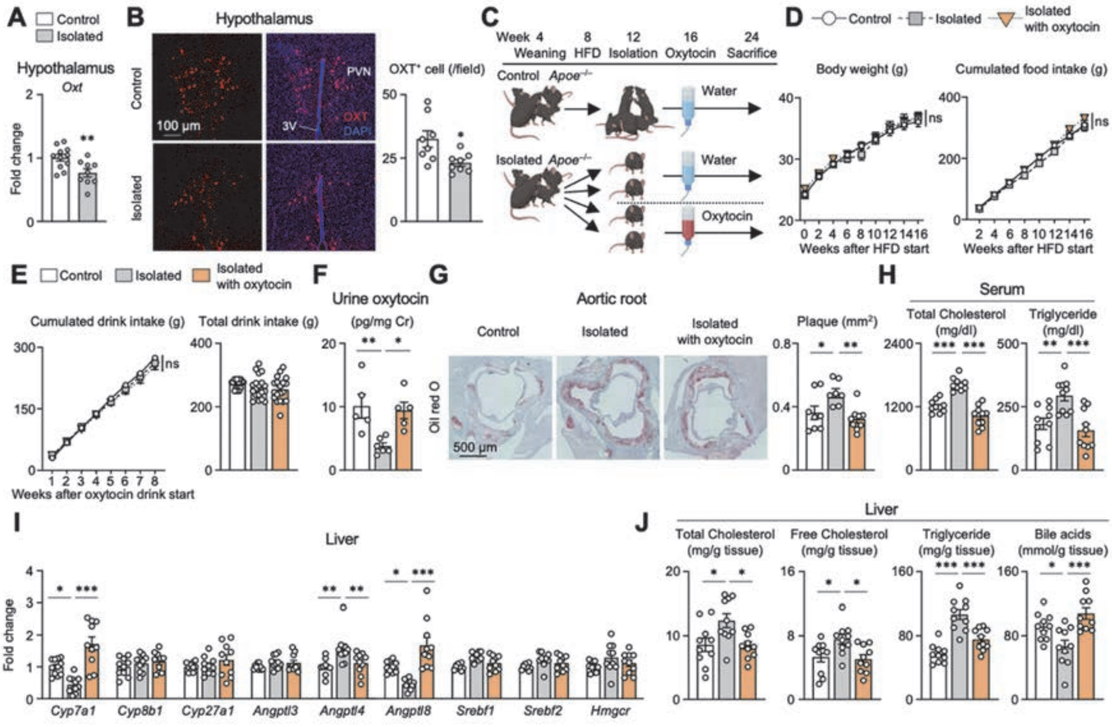
共同研究者　後藤信哉
血小板は活性化すると膜糖蛋白GPIIb/IIIaの細胞外ドメインの高次構造変化が変化するう。
GPIIb/IIIaの活性化構造変化におよぼすホルモンの影響を検討する。
GPIIb/IIIaの細胞内ドメイン・膜貫通ドメイン・細胞外ドメインを連成したモデルを作成する。各ドメインを構成する全ての原子に位置座標を与え、初期構造を作成する。初期構造に任意性があっても原子間の相互作用をフェムト秒ごとに解くことにより安定構造に至る。

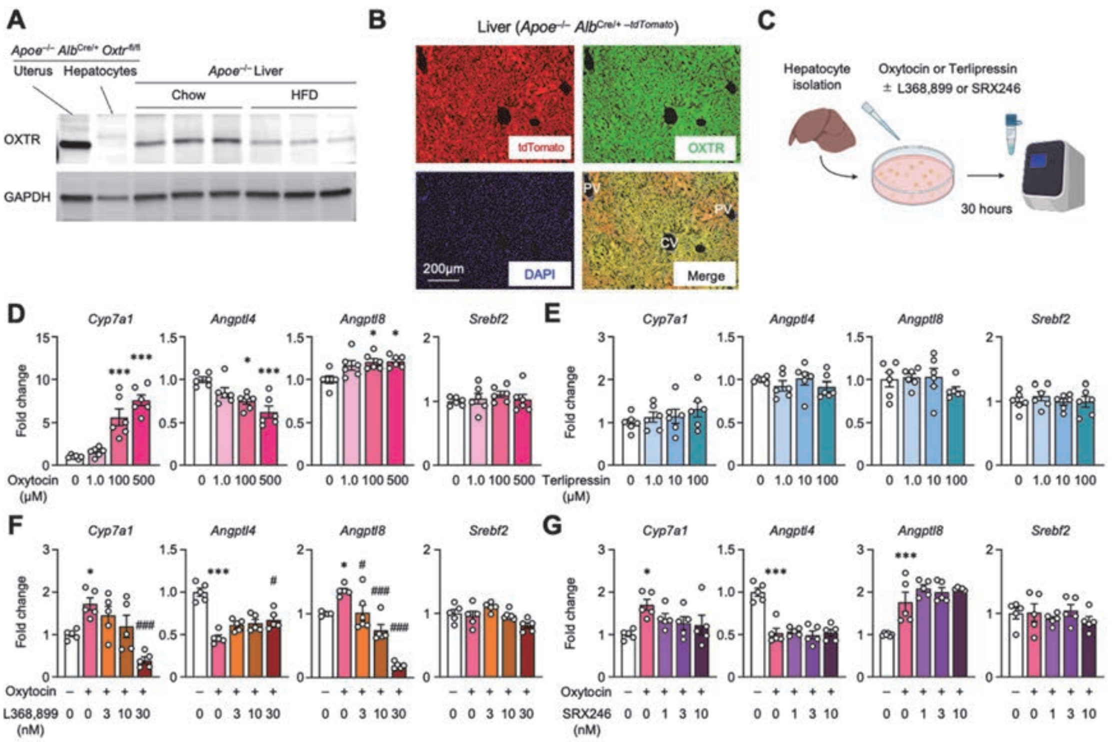
III 研究成果

代表研究者　安西淳 / 共同研究者　佐野元昭
社会的孤独は、心筋梗塞の発症率や死亡率を上昇させることが報告されているが、孤独がどのように動脈硬化を促進するのか、その分子機序は明らかではない。我々は動脈硬化モデルマウスであるApoEノックアウト(KO)マウスを単独で飼育することで社会的孤独を再現し、従来通り1ケージに4-5匹飼育した対照群と比較したところ、孤独群で動脈硬化巣や不安定プラークの増大を認めた。両群間では食事摂取量や体重に違いはなく、さらに末梢血・尿中のコルチコステロン濃度、アドレナリン3分画の濃度も変化を認めず、交感神経系の活性化やストレス非依存性に動脈硬化が促進している可能性が示唆された。研究当初は骨髄造血に注目していたが、研究を進めていくうちに孤独群で血中コレステロール、中性脂肪が空腹時、随時共に有意に高く、その背景に脂質代謝が関与していることが明らかとなった（下図)。



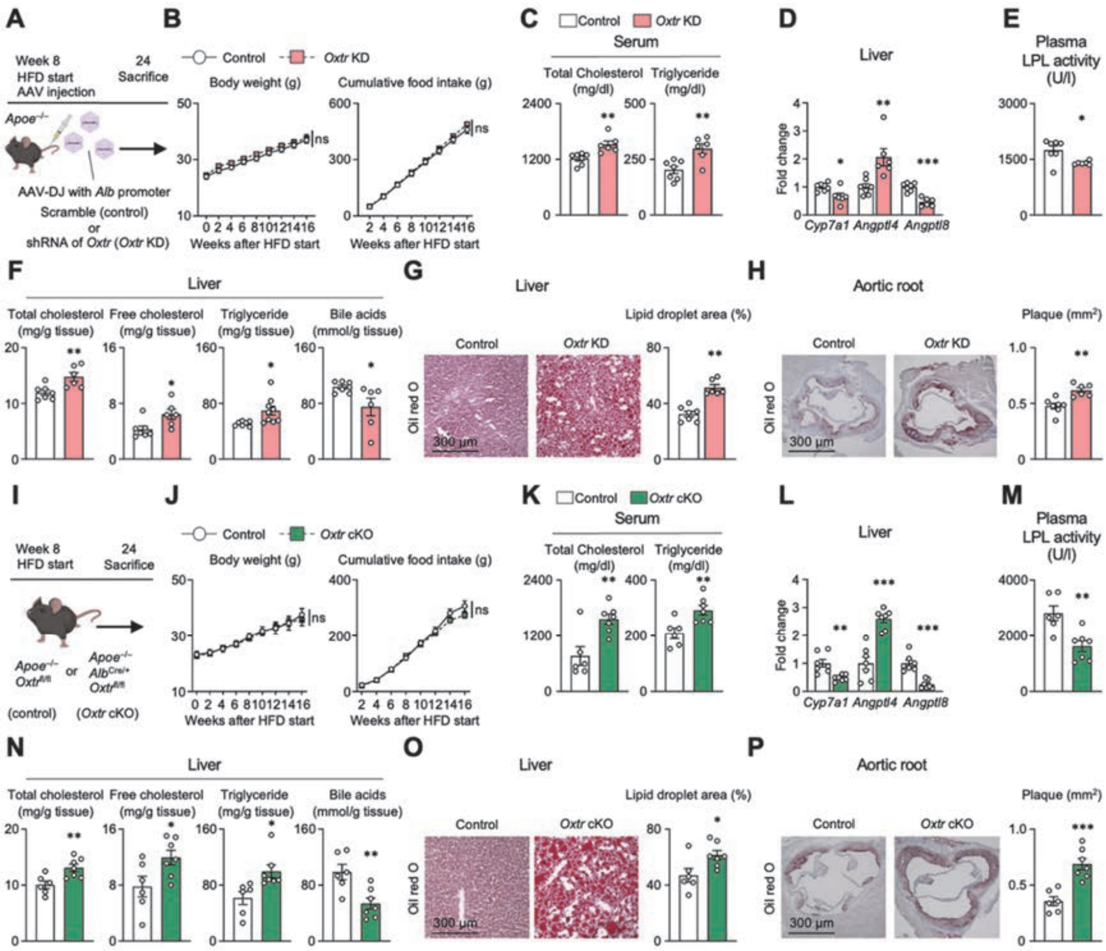
脳視床下部での遺伝子発現パターンをRNA sequencing（RNAseq）により網羅的に解析すると、二群間でいくつかの差異を認めたが、特にオキシトシン（Oxt）遺伝子が孤独群で有意に低下していた。血漿オキシトシン濃度も孤独群で有意に低く、孤独群にオキシトシンを継続的に投与したところ、動脈硬化や脂質代謝の改善を認めた（下図）。


A
Control
Isolated
Hypothalamus
Oxt
Fold change
B
Hypothalamus
Control
Isolated
100 μm
PVN
3V
OXT
DAPI
OXT+ cell (/field)
C
Week 4 8 12 16 24
Weaning HFD Isolation Oxytocin Sacrifice
Control Apoe−/−
Isolated Apoe−/−
Water
Water
Oxytocin
D
Control
Isolated
Isolated with oxytocin
Body weight (g)
Cumulated food intake (g)
Weeks after HFD start
ns
E
Control
Isolated
Isolated with oxytocin
Cumulated drink intake (g)
Total drink intake (g)
Weeks after oxytocin drink start
F
Urine oxytocin
(pg/mg Cr)
G
Aortic root
Control
Isolated
Isolated with oxytocin
Oil red O
500 μm
Plaque (mm2)
H
Serum
Total Cholesterol (mg/dl)
Triglyceride (mg/dl)
I
Liver
Fold change
Cyp7a1
Cyp8b1
Cyp27a1
Angptl3
Angptl4
Angptl8
Srebf1
Srebf2
Hmgcr
J
Liver
Total Cholesterol (mg/g tissue)
Free Cholesterol (mg/g tissue)
Triglyceride (mg/g tissue)
Bile acids (mmol/g tissue)


A
Apoe−/− AlbCre/+ Oxtrfl/fl
Uterus
Hepatocytes
Apoe−/− Liver
Chow
HFD
OXTR
GAPDH
B
Liver (Apoe−/− AlbCre/+ −tdTomato)
tdTomato
OXTR
DAPI
Merge
200μm
PV
CV
C
Hepatocyte isolation
Oxytocin or Terlipressin
± L368,899 or SRX246
30 hours
D
Cyp7a1
Angptl4
Angptl8
Srebf2
Fold change
Oxytocin (μM)
0 1.0 100 500
E
Cyp7a1
Angptl4
Angptl8
Srebf2
Terlipressin (μM)
0 1.0 10 100
F
Cyp7a1
Angptl4
Angptl8
Srebf2
Fold change
Oxytocin
L368,899 (nM)
0 0 3 10 30
G
Cyp7a1
Angptl4
Angptl8
Srebf2
Oxytocin
SRX246 (nM)
0 0 1 3 10

肝臓では肝細胞がオキシトシン受容体（OXTR）を発現しており、網羅的解析によりオキシトシンが胆汁酸合成に関与する Cyp7a1、リポ蛋白リパーゼ（LPL）活性に関与する Angptl4/8 の発現を調整していることを明らかにした。肝細胞にオキシトシンやそのアンタゴニストを投与する in vitro 実験でその効果を確認した（上図）。

さらに肝細胞得意的な OXTR 阻害をコンディショナルノックアウトマウスの作成、アデノ随伴ウィルス（AAV）投与により in vivo で実現し、それらマウスでは孤独マウスの表現型が再現された（下図）。



副代表研究者　尾仲達史

敵対的環境における社会的ストレスには、優位個体からの攻撃による社会的敗北刺激を用いた。優位個体動物のホームケージに劣位マウスを入れると、優位個体は侵入してきた劣位マウスに対し攻撃行動を示す。優位個体に攻撃された劣位マウスは負け姿勢を示す。この時、劣位個体の視床下部室傍核オキシトシン産生細胞ー視床下部腹内側核オキシトシン受容体発現細胞系が活性化された。さらにこの系を実験的に賦活化することで負け姿勢の提示が促進され、オキシトシン受容体をノックダウンすることで負け姿勢の提示が減少した。

親和的状況下における社会的ストレス負荷として、ホームケージ内に社会的敗北を受けたケージメイトを入れるという操作を行った。ホームケージに元からいた動物は、いじめられ戻されてきた仲間動物に慰め様行動である毛繕い行動を示した。この時、毛繕い行動を示している個体の内側扁桃体、島のオキシトシン受容体発現細胞が活性化された。これらのニューロンがより活性化していた個体ほどより長い慰め様行動を示した。オキシトシン受容体がないと慰め様行動が減弱した。また、ラットに発達期にオキシトシン系を活性化する撫で刺激を繰り返し投与すると、ラットは特定の実験者に親和行動を示す。この動物の目の前で他個体を撫でるとという社会的報酬の不公平状況にすると、ラットは特徴的な 31 k Hz 超音波発声を示した。従って、ラットは社会的報酬の不公平の状況を認識できる可能性がある。

共同研究者　後藤信哉
GPIIb/IIIa の細胞内ドメイン・膜貫通ドメイン・細胞外ドメインを連成する基盤モデルの作成に成功した。分子動力学計算により、細胞外ドメインの構造が過去に研究の対象とした GPIba よりも不安定であることを示した。

IV 考察
代表研究者　安西淳 / 共同研究者　佐野元昭
個体間での社会的繋がりが心血管疾患の発症を予防する機序の背景の一つに、脳視床下部のオキシトシンを介した脳肝連関による脂質代謝の調節が重要である可能性が示唆された。

副代表研究者　尾仲達史
敵対的状況下と親和的状況下では異なるオキシトシン系が賦活化され、その状況に応じた適切なストレス対処行動を促進していることが示唆された。

共同研究者　後藤信哉
血小板は活性化すると GPIIb/IIIa の細胞外ドメインの高次構造を変化させてフィブリノーゲンなどとの接着機能を変化させる。分子動力学計算により GPIIb/IIIa の細胞外ドメインの構造的不安定性を示した。各種ホルモンなどの血漿中の小分子が GPIIb/IIIa の高次構造変化に影響を与えることを示唆した。

V 研究成果の発表
代表研究者　安西淳 / 共同研究者　佐野元昭
1. Ko S, Anzai A*, Liu X, Kinouchi K, Ichihara G, Kitakata H, Shirakawa K, Katsumata Y, Endo J, Yoshida M, Nishimori K, Tanaka KF, Onaka T, Sano M, Ieda M. Social connection calibrates oxytocin-mediated hepatic lipid metabolism and protects against atherosclerosis. 2024 under revision (*corresponding author)

副代表研究者　尾仲達史
1. Okabe S, Takayanagi Y, Yoshida M, Onaka T*. Novel 31-kHz calls emitted by female Lewis rats during social isolation and social inequality conditions. ***iScience***; 26: 106243, 2023.
2. Yoshida M*, Saito T, Takayanagi Y, Totsuka Y, Onaka T. Necessity of integrated genomic analysis to establish a designed knock-in mouse from CRISPR-Cas9-induced mutants. ***Sci Rep***; 12: 20390, 2022.

共同研究者　後藤信哉

1. Nakayama M, Goto S, Goto S. Development of the Integrated Computer Simulation Model of the Intracellular, Transmembrane, and Extracellular Domain of Platelet Integrin α IIb β 3 (Platelet Membrane Glycoprotein: GPIIb-IIIa). TH Open. 2024 Feb 29;8(1):e96-e105.
2. Torii S, Chiang CE, Hong SJ, Goto S, Huang WC, Yee MCY, Kajiya T, Goto S. Asian Perspective on the Recently Published Practice Guideline for Acute Coronary Syndrome by ESC. Eur Heart J Acute Cardiovasc Care, 13: 162-164 2024
3. Goto S, Goto S. Potent antithrombotic treatments in Asian vs. non-Asian patients. Eur Heart J. 2022 Oct 7;43(37):3553-3555. doi: 10.1093/eurheartj/ehac390
4. Nakayama M, Goto S, Sakano T, Goto S. Detection of the Relationship between the Multi-Dimensional Data Sets of Serially Measured Blood Pressure and the Future Risk of Death in Healthy Elderly Japanese Population. J Atheroscler Thromb. 30: 1002-1009, 2022 doi: https://doi.org/10.5551/jat.63798

心臓拡張不全の病態解明と治療法開発

所属機関　自治医科大学
研究者名　口丸　高弘

<研究の概要>

心臓は収縮・拡張を交互に繰り返すことでポンプとして機能し、収縮あるいは拡張機能の障害はそれぞれ収縮不全・拡張不全と呼ばれる心不全病態を引き起こす。近年のカテーテル治療や薬物治療の進歩により、収縮不全に対する治療法は大きく進歩してきた。しかしながら拡張不全に対して有効な治療法は未だ存在しない。高齢化や生活習慣病の増加に伴い、現在拡張不全を発症する症例が急激に増加（心不全パンデミック）しており、その病態解明と治療法開発が循環器臨床において強く求められている。

拡張不全は心筋組織が過剰に線維化することにより引き起こされる。申請者はこれまで心臓線維芽細胞がなぜ過剰に活性化するのか、その病態解明に取り組んできた。この中で組織の酸素空間が線維芽細胞の活性化に深く関わることに気がついた。線維芽細胞は低酸素空間で免疫細胞と近接・相互作用することが判った。酸素は細胞生存に必須であり、心筋細胞は虚血部位で機能低下あるいは壊死する（心筋梗塞)。一方、線維芽細胞はこのような低酸素環境でも生存するのみならず、むしろ積極的に活性化し、コラーゲンなど細胞外マトリクスを産生することが判ってきた。一連の研究から“酸素パラドクス”と呼ぶべき病態、即ち

低酸素・低栄養など一見細胞生存にとって不利な環境でこそ、線維芽細胞はむしろ積極的に活性化すること、の存在が浮き彫りになってきた。

本研究ではこれまでの知見をもとに、以下の未解決かつ重要な 3 つの課題、(1)心臓線維芽細胞はいつ、どこで、どの細胞と近接・相互作用しているのか、(2)心臓線維芽細胞はなぜ虚血空間でも生存し、活性化できるのか、(3)どうすれば心臓線維化を治療できるのか、に取り組んだ。

上記アプローチにより得られた結果は、心臓線維芽細胞が過剰に活性化する分子病態を同定し、心線維化・心臓拡張不全に対する新たな治療法開発へと繋がる。心室拡張不全を発症している症例において大きな福音となると期待される。

共同研究者

砂河　孝行・自治医科大学

研究報告

I 研究目的

心臓は収縮・拡張を交互に繰り返すことで、ポンプとして全身に血液を駆出する。その為、心臓の収縮・拡張機能が低下すると、それぞれ収縮不全・拡張不全と呼ばれる心不全の病態が引き起こされる。カテーテル治療や薬物治療の進歩により、収縮不全の治療法はこれまで大きく進歩してきた。しかしながら拡張不全に有効な治療法は未だ存在しない。高齢化や生活習慣病の増加に伴い、拡張不全を発症する症例が特に増加（心不全パンデミック）しており、その病態解明と治療法開発が循環器臨床において強く求められている。

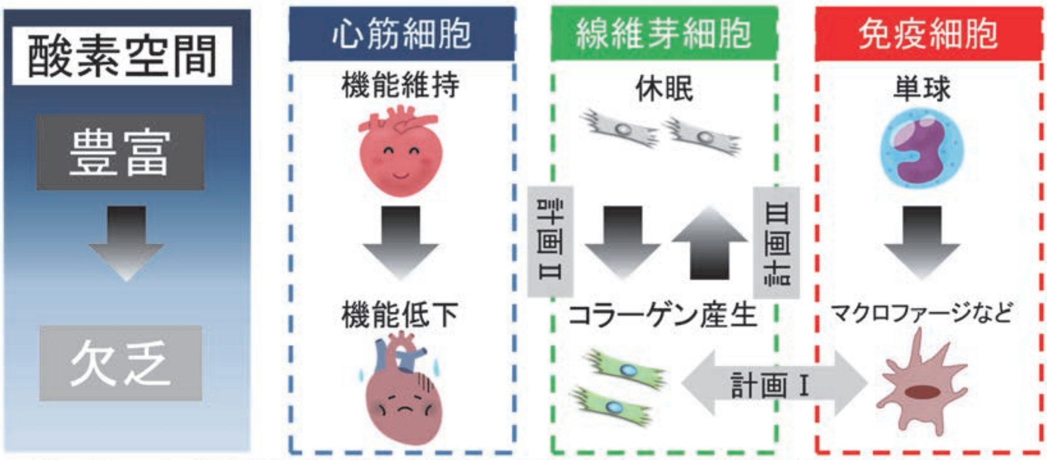
拡張不全は心筋組織が過剰に線維化することにより引き起こされる。申請者はこれまで心臓線維芽細胞がなぜ過剰に活性化するのか、その病態解明に取り組んできた。この中で線維芽細胞が組織の低酸素空間で免疫細胞と近接し、相互の活性を制御していることを見出した(***Nature Commun*** 2019, 10, 2824)。酸素は細胞生存に必須のガス分子であり、虚血環境では心筋細胞の機能低下あるいは細胞死が誘導される。申請者は線維芽細胞が低酸素空間のような飢餓的環境で生存するだけでなく、むしろ積極的に活性化し、コラーゲンを含む細胞外マトリクスを産生することを報告してきた(***Int Heart J*** 2019,60, 958, ***AJRCMB*** 2018, 58, 216)。これら一連の研究から“**酸素パラドクス**”と呼ぶべき現象の存在、即ち低酸素

や低栄養など一見細胞生存にとって不利な環境でこそ、線維芽細胞がむしろ活性化すること、が浮き彫りになってきた。

本研究はこれまでの知見をもとに、下記の未解決かつ重要な課題の解明に取り組んだ(図 1)。

・計画I：心臓線維芽細胞はいつ、どこで、どの細胞と近接し相互作用するのか？
・計画II：心臓線維芽細胞はなぜ虚血空間でも生存し、活性化できるのか？
・計画III：どうすれば心臓線維化を治療できるのか？

心室拡張不全を発症している症例において大きな福音をもたらすべく、上記アプローチにより心臓線維芽細胞が過剰に活性化する分子病態を同定し、心線維化・心臓拡張不全に対する新たな治療法開発の礎を築くことを目指した。



計画Ⅰ：心臓線維芽細胞と近接・相互作用する細胞集団を同定
計画Ⅱ：虚血環境で線維芽細胞が活性化する機構（酸素パラドクス）
計画Ⅲ：心臓線維化の治療に有効な化合物の探索

図 1 本研究において取り組んだ課題

II 研究計画及び材料と報告

計画I；心臓線維芽細胞と近接する細胞を同定する（口丸）

申請者らはこれまで虚血部位で活性化する炎症細胞に着目し、組織リモデリングの病態解明に取り組んできた。その結果、心臓線維芽細胞が心臓に集積する炎症惹起型マクロファージと相互作用することで、過剰な活性化を抑制していることを明らかにしてきた(***Nature Commun*** 2016,7,11635, ***Nature Commun*** 2019, 10, 2824)。計画Iでは心臓線維芽細胞と近接し相互作用する細胞を網羅的に探索し、線維芽細胞が過剰に活性化する分子病態を明らかにする。本研究に先立ち代表研究者である口丸は細胞と細胞の近接を検出する新たな解析技術 sGRAPHIC (secretory GPI anchored reconstitution-activated proteins highlight intercellular connections)の構築に成功した(***Nature Commun*** 2023, 14, 8031)。本解析系では split

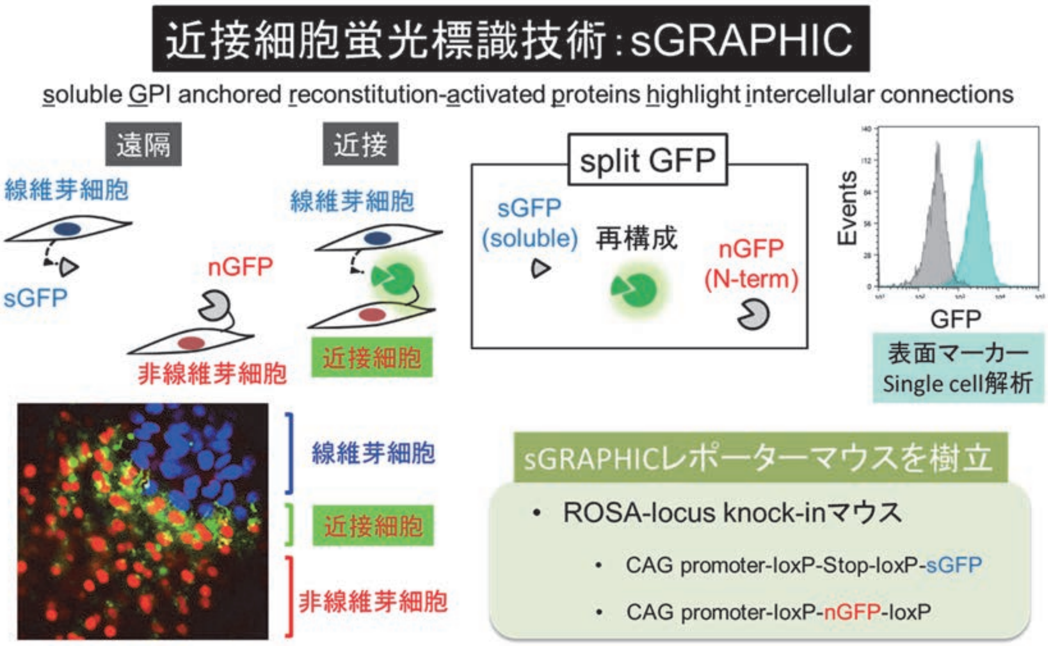


図 2 sGRAPHIC の心組織研究への応用

GFP の技術を応用しており、n 末 GFP 断片(nGFP)を細胞膜上に発現する細胞と、分泌型の c 末端 GFP 断片(cGFP)をそれぞれ発現する細胞同士が近接すると、nGFP 発現細胞において GFP シグナルが検出される。計画Iでは口丸が sGRAPHIC レポーター遺伝子を ROSA locus に導入したノックインマウス(sGRAPHIC マウス)を樹立し（図 2)、心臓拡張不全の病態モデルである横行大動脈縮窄術（Transaortic constriction, TAC）および高脂肪食負荷を行う。計画Iでは sGRAPHIC マウスを用いて、心臓線維芽細胞がいつ、どこで、どの細胞と相互作用（近接）しているのかを明らかにする。本アプローチにより心臓線維芽細胞の活性化を制御する細胞集団を同定し、その分子機構を明らかにすることを目指した。これらの解析により心臓線維芽細胞を不活化し、心線維化を制御する治療法の開発

へと繋げる。

計画II;虚血環境で心臓線維芽細胞が活性化する分子病態を明らかにする(口丸・砂河)

酸素は我々の生存に必要不可欠なガス分子である。虚血部位では ATP 産生が低下し、またニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH)が増加することで酸化ストレスが蓄積する。これまでの研究で、申請者らは線維芽細胞が細胞生存に不適な低酸素空間でも生存し、むしろ活性化することを明らかにしてきた。計画IIでは口丸と共同研究者の砂河が、心臓線維芽細胞がなぜ虚血環境でも生存できるのか、なぜコラーゲンを含む細胞外マトリクスを産生できるのか、その分子機構の解明に取り組んだ。

コラーゲン分子はグリシン、プロリンを含む 3 アミノ酸の繰り返し配列により構成されており、他のペプチドと比較してプロリンを多く含有する(約 22%)。申請者は細胞内プロリン生合成がミトコンドリアで NADH 依存的に行われる同化反応として行われることに注目してきた(図 3)。本研究では心臓線維芽細胞がプロリンを生成することで NADH の過剰な蓄積を回避し、酸化ストレスを軽減することで虚血環境での生存を可能にしているとの仮説を構築している。計画II

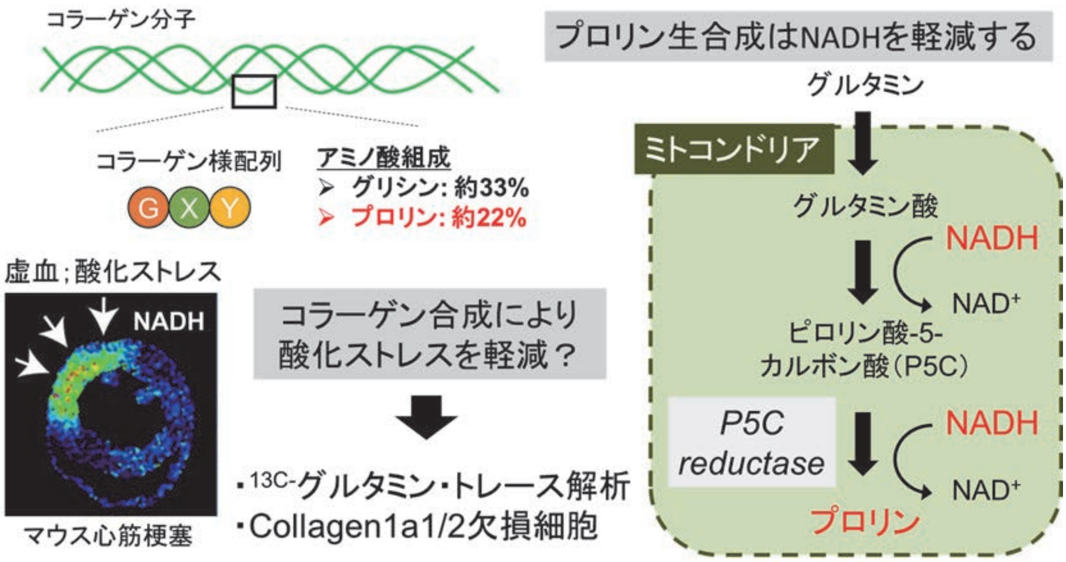


図 3　コラーゲン合成におけるプロリン生合成と NADH の関係性

では蛍光共鳴エネルギー移動 Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)システムを用いて細胞内 ATP・NADH を可視化し（GO-Ateam)、虚血環境における ATP、NADH の挙動を細胞レベルで検証する。更にコラーゲン遺伝子欠損細胞を作成し、プロリン・コラーゲン合成が線維芽細胞の酸素パラドクスにおいて果たす役割を理解する。上記解析により、心臓線維芽細胞がなぜ低酸素環境でも生存できるのか、どのようにコラーゲンをはじめとする細胞外マトリクスを生成しているのか、即ち酸素パラドクスの分子実体の解明を目指した。

計画III；心臓線維化の治療に有効な化合物・代謝物を探索（口丸・砂河）

計画IIIでは心臓拡張不全に対する治療を想定し、線維芽細胞を不活化する化合物および代謝物を探索した。本研究に先立ち、申請者らは心臓線維芽細胞の活

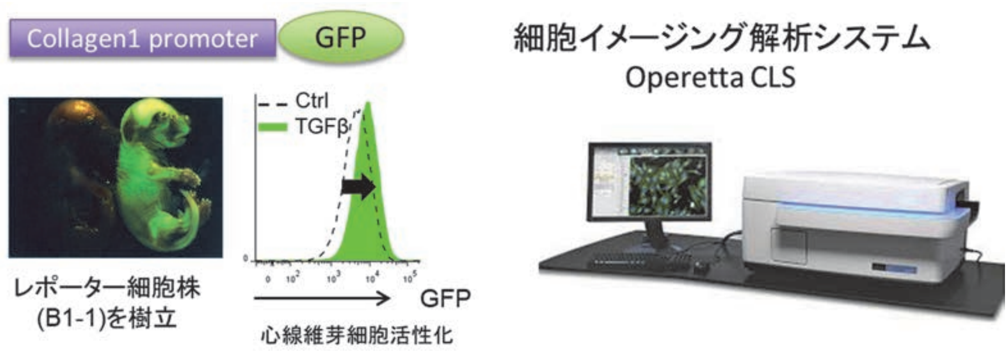


図 4 コラーゲンレポターマウスを使った化合物・代謝物の解析

性を GFP シグナルとして検出できるレポーター細胞株（B1-1）の樹立に成功している。B1-1 細胞はI型コラーゲン遺伝子プロモーター下に GFP を発現するマウスより単離した心臓線維芽細胞を不死化、クローン化した細胞である。計画IIIでは口丸と共同研究者の砂河が協働して細胞イメージング解析システム、化合物ライブラリー(Core library 9600 cmpds, Advanced Core Library 22,400 cmpds)、Metabolite Array を用いて、心臓線維芽細胞を不活化する化合物・代謝物の同定を試みた（図 4)。

III　研究成果

計画I; 心臓線維芽細胞と近接する細胞を同定する

独自に開発した sGRAPHIC 技術を用いて、心臓線維芽細胞と近接する細胞の同定に取り組んだ。研究期間内において、sGRAPHIC 技術がマウスの生体組織において機能すること確認した。具体的には、アデノウイルスを使って、肝組織に nGPF-sGRAPHIC レポーターを遺伝子導入したマウスに、scGFP-sGRAPHIC レポーターを発現する乳がん細胞を血中から移植した。形成された肝転移病巣周辺の GFP 陽性細胞を回収し、1 細胞 RNA-seq 解析した結果、肝転移部の微小環境において、肝細胞が分泌する galectin-3 が腫瘍増殖に関与していることを見出した（図 5、本研究助成の成果として下記論文発表を行った）。さらに、プロモーター特異的な Cre 発現系統のマウスと交配することで、Cre 発現細胞周辺の細胞を GFP 標識可能なレポーター遺伝子を ROSA locus へ導入した sGRAPHIC マウスの作出・維

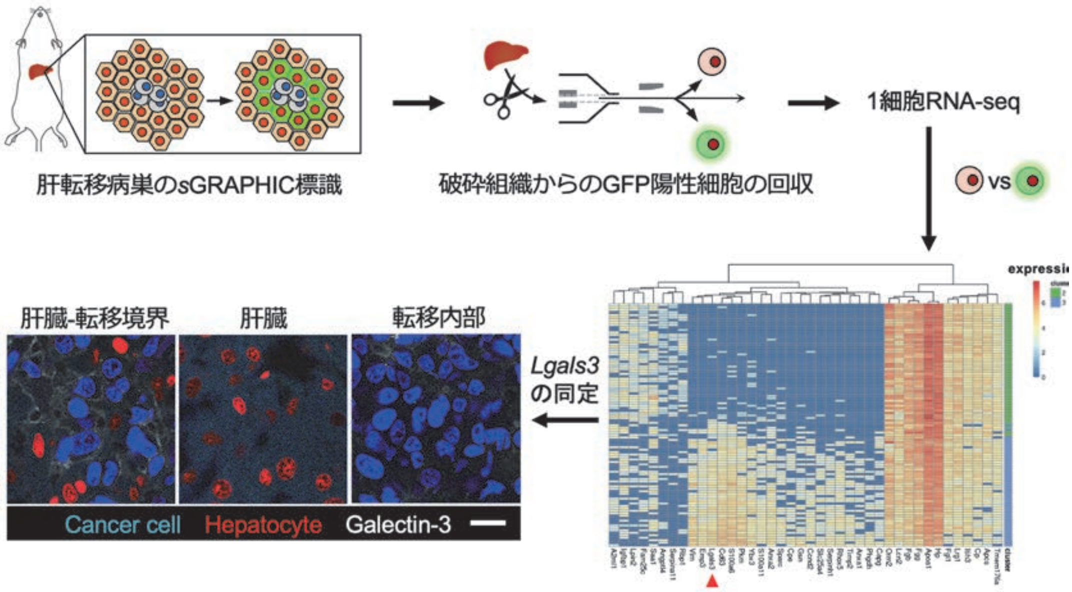


図 5 sGRAPHIC によるマウス肝転移病微小環境の解析

持に取り組み、TAC 後の心組織において sGRAPHIC が機能していることを顕微鏡観察やフローサイトメトリによって確認した。そして、現在、sGRAPHIC 標識と 1 細胞 RNA-seq によって、TAC における心組織微小環境の変化の解析を進めている。

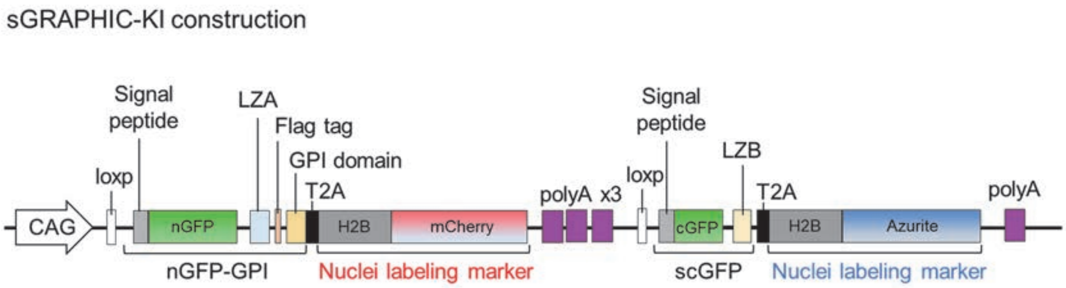


図 6 sGRAPHIC マウスにノックインしたレポーター遺伝子

計画II;虚血環境で心臓線維芽細胞が活性化する分子病態を明らかにする

線維芽細胞活性化における酸素・栄養素環境の役割を検証した。その結果、低酸素環境が線維芽細胞活性化マーカーである α-smooth muscle actin (αSMA)発現

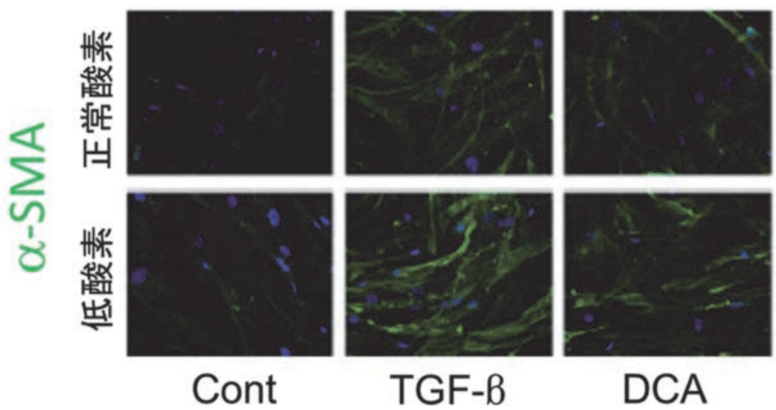


図 7　低酸素の線維芽細胞における αSMA の誘導

を誘導することを確認した（図 7)。これら線維芽細胞の活性化は代謝制御薬である Dichloroacetate(DCA)投与により抑制されることから、虚血環境における線維芽細胞活性化には嫌気的解糖への代謝シフトが重要であることが判った。引き続き解糖系代謝に着目し、虚血環境における心臓線維芽細胞活性化機構の解明に取り組んでいる。また、低酸素･虚血環境における線維芽細胞の挙動を解析した。還元当量である NADH を調節する LbNOX を導入した細胞株を用いて検討したところ、細胞内 NADH が低酸素環境下における線維芽細胞活性化やその虚血耐性機構において重要な役割を果たしていることが浮かび上がってきた。これら研究成果をもとに、*in vivo* 病態モデルを用いて心臓線維化における NADH の役割を検証する取り組みに着手している。これら一連の研究を通じて心臓拡張不全に対する治療標的としての有用性を検証する予定である。

計画III;心臓線維化の治療に有効な化合物･代謝物を探索

線維芽細胞活性を GFP シグナルとし検出する細胞株 B1-1 を樹立した。本細胞

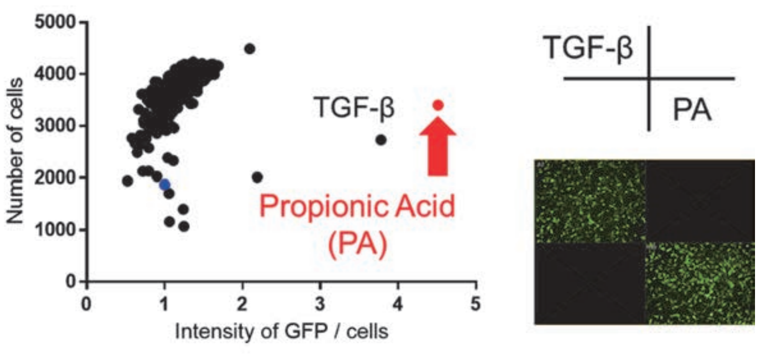


図 8 線維芽細胞活性を制御する代謝物スクリーニング

株を用いて線維芽細胞活性を調節する化合物・metabolite の探索を行うべく、Operetta CLS を用いた Metabolite array でのスクリーニングを実施した。これま

での解析で代謝物の一つプロピオン酸(Propionic Acid, PA)が線維芽細胞を活性化すること（図 8）を見出した。心臓線維化への治療に繋げるべく、引き続き細胞株を用いたスクリーニングを継続すると共に、PA が線維芽細胞活性化を引き起こす分子機構の解明に着手している。計画Iで樹立した解析系を用いて *in vivo* での心臓線維化病態解析に資するべく、sGRAPHIC システムを導入した遺伝子改変マウスを樹立した（図 6）。本研究で樹立した技術を *in vivo* 病態モデルへと展開することで、心臓リモデリングの分子病態への理解が飛躍的に発展すると期待される。

IV 考察

<u>計画I; 心臓線維芽細胞と近接する細胞を同定する</u>

sGRAPHIC は、cGFP 断片を特定の細胞から分泌することで、nGFP 断片を発現する周囲の細胞を蛍光標識するシステムである。線維芽細胞特異的な Cre マウスを含めた様々なマウスと sGRAPHIC マウスを組み合わせることで、多種多様な細胞間相互作用の研究展開が実現する。しかしながら、sGRAPHIC が標識している細胞間相互作用の状態については完全には明らかになっておらず、現在も解析を進めている。開発当初、cGFP がどの程度遠方まで到達するか未知であったが、培養細胞・生体組織において再構成された GFP シグナルを指標に解析した結果、その距離は最大でも 100 μm 程度であった。一方で、この距離は、cGFP の拡散に強く影響され、細胞の密度や組織間質の状態に影響される可能性も示唆された。数百 nM 程度の GFP が検出に必要であることを考えると、sGRAPHIC で標識される距離は、多くの分泌因子-受容体相互作用に伴うシグナルの活性化が誘導されうる距離とも言える。つまり sGRAPHIC システムは、物理的な細胞の近接に加えて、分泌因子を介した機能的な細胞間相互作用を検出している。これまでに、膨大な数の細胞間相互作用に関する知見が蓄積されているが、生体組織における分泌因子を介した細胞間相互作用に関して、分子の発現レベル以外の要因についてほとんど検証されていない。sGRAPHIC を駆使することで、間質の液流や細胞外基質の沈着に伴う分泌因子の拡散状態の変化が、細

胞間相互作用におよぼす影響を評価することが可能になると考えている。

計画II;虚血環境で心臓線維芽細胞が活性化する分子病態を明らかにする

NADH は還元当量として知られており細胞内の代謝プロセスを駆動する役割を担っている。一方、虚血環境では細胞内に NADH が過剰に蓄積し、還元ストレスとして細胞傷害性に働くことが知られている。本研究で行った解析により、虚血環境で線維芽細胞内に蓄積する NADH がプロリン生成を介してコラーゲン産生を引き起こすことが判ってきた。この知見は、“なぜ虚血環境でコラーゲン産生が増加するのか”と言う問いに対する答えを示してると考えられる。更に、別の視点から考えると線維芽細胞はコラーゲンを産生することで、虚血環境における NADH の過剰な蓄積を抑制し、細胞生存に有利な環境を作り出しているともいえる。実際にこれまでの予備的知見において、I型コラーゲン遺伝子に変異を誘導した線維芽細胞株は細胞増殖能が低下、細胞死が増加していることが明らかになってきた。即ち、NADH を介するコラーゲン産生は、“線維芽細胞はなぜ虚血環境でも生存するのか”と言う生物学的疑問に対する理解にも繋がっていると考えられる。

計画III;心臓線維化の治療に有効な化合物・代謝物を探索

計画IIおよびIIIにおいて、いくつかの代謝物が線維芽細胞の活性化を調節する

ことを見出した。特に NADH を標的とした化合物は心臓線維化に対する治療効果が期待できると考えられる。Alpha-ketobutyrate(AKB)は乳酸脱水素酵素を介して NADH を NAD へと酸化する役割を有している。近年、AKB の投与によりモデル動物の寿命が延長するとの知見も報告されている（Nature Commun. 2023. 14. 240）。本研究での知見をもとに、心臓線維化に対する AKB 投与の役割を検証する実験を計画している。

V 研究成果の発表

Minegishi M, Kuchimaru T, Nishikawa K, Isagawa T, Iwano S, Iida K, Hara H, Miura S, Sato M, Watanabe S, Shiomi A, Mabuchi Y, Hamana H, Kishi H, Sato T, Sawaki D, Sato S, Hanazono Y, Suzuki A, Kohro T, Kadonosono T, Shimogori T, Miyawaki A, Takeda N, Shintaku H, Kizaka-Kondoh S, Nishimura S.

Secretory GFP reconstitution labeling of neighboring cells interrogates cell-cell interactions in metastatic niches.

Nature Commun. 2023 Dec 5;14(1):8031.　doi: 10.1038/s41467-023-43855-2.

老化抗原を標的とした個別化循環器疾患治療の開発

所属機関　順天堂大学大学院医学研究科　循環器内科学
研究者名　南野　徹

＜研究の概要＞

加齢に伴う様々な臓器機能不全（病的臓器老化）が、種々の循環器疾患の発症・進展の原因の一つとなっていることが示唆されているが、その機序は不明であった。そこで私は、老化研究を「細胞レベルの老化が個体老化の一部の形質、特に加齢に伴う病的老化形質を担う」という細胞老化仮説に基づいて進め、様々な心血管代謝疾患の発症進展において、心筋、血管内皮細胞、脂肪組織等で p53 シグナルの活性化など通じて細胞老化が誘導され、病態を進展させることを報告してきた。しかしながら、実際には p53 を標的とした抗老化治療はがん化を促進する可能性が高いため、異なった治療のストラテジーの開発が必要である。近年個体から老化細胞を除去する治療法(Senolysis)が開発され、がん化を抑制し、寿命を延長させうることが示された。そこで、私は組織に蓄積した老化細胞を標的としたがん化を促進しない個別化循環器疾患治療法の確立を目指す①「老化細胞特異的抗原 Seno-antigen を標的とした循環器疾患治療法の開発」、および②「臨床応用を見据えた基盤研究の推進」の 2 項目について研究開発を進めた。

前者では公的データベースから老化血管内皮細胞を用いた網羅的解析データを抽出し、老化細胞で発現が増加する「Seno-Antigen」を探索し、その中から GPNMB と称する蛋白に着目した。GPNMB はヒト老化血管内皮細胞のほか、高齢マウスや動脈硬化マウスの大動脈や肺組織から単離した血管内皮細胞においても認められた。種々の検証により GPNMB は細胞膜およびライソゾームへの局在を認め、老化細胞においてライソゾームの機能維持に関与し、老化細胞の生存に寄与することを明らかにした。また、老化細胞は内因性の Senolysis 機構によっても老化細胞が除去されうると考えられており、私は加齢や疾患によって内因性 Senolysis 機能の低下(seno-anergy)が起きていると考えその活性化のために seno-antigen を標的とした老化細胞除去ワクチンを開発した。実施 GPNMB に対する老化細胞除去ワクチンは糖尿病、動脈硬化、早老症の各モデルマウスにおいて有意な病的表現型の改善を示し、加齢マウスにおいても身体機能の改善をもたらした。さらに既存の老化細胞除去薬(Senolytics)と比較し本ワクチンはより持続的に作用し、血球減少などの副作用が少ないことが分かり、新たな老化細胞除去治療として有望なものであった。

後者の研究項目では、ドラッグリポジショニングが可能な既存薬の中から老化細胞除去効果を有する Senolytics を探索し、SGLT2 阻害薬の一種であるカナグリフロジンにその効果があることを見出した。カナグリフロジンの投与により脂肪組織や大動脈における老化細胞除去効果を示し、糖尿病、動脈硬化、早老症、加齢各モデルマウスにおける病的表現型の改善をもたらした。この老化細胞除去効果は内因性の AICAR の産生増加を介した AMPK シグナルの活性化、およびこれに伴う老化細胞上の免疫チェックポイント因子 PD-L1 の発現を抑制によって T 細胞などの免疫細胞による内因性の老化細胞除去機能が促進されることでもたらされることも明らかにした。

両研究成果から、免疫機能を利用した老化細胞除去治療は新たな治療戦略として有望であり、がん治療同様に老化細胞除去治療においても多様な治療戦略の開発を通じてより有効性や安全性を持つ治療法の社会実装の可能性を高める有意義なものになると考えられた。

＜共同研究者＞

学校法人順天堂　順天堂大学医学部内科学教室・循環器内科学講座　勝海悟郎
学校法人順天堂　順天堂大学医学部内科学教室・循環器内科学講座　須田将吉
学校法人順天堂　順天堂大学医学部内科学教室・循環器内科学講座　吉田陽子
国立循環器病研究センター　心血管老化制御部　清水逸平

＜研究報告＞

I　研究目的

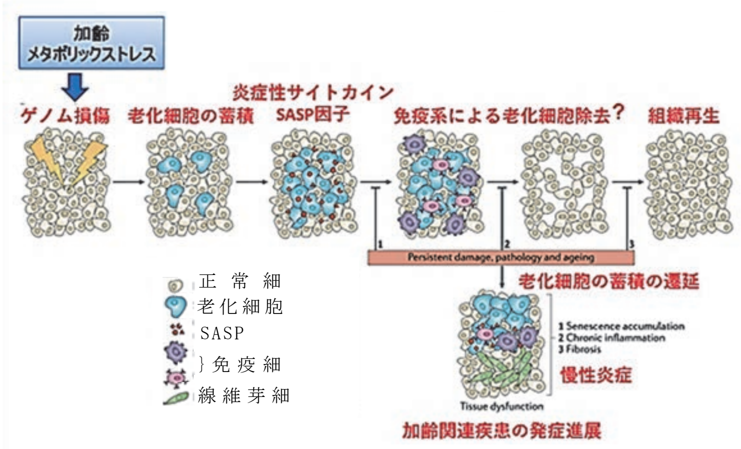
加齢に伴う心不全や動脈硬化などの循環器疾患の罹患率の増加は、健康寿命の短縮に関与している。加齢に伴う様々な臓器機能不全（病的臓器老化）がこれらの循環器疾患の発症・進展の原因の一つとなっていることが示唆されているが、その機序は不明である。そこで私は、老化研究を「細胞レベルの老化が個体老化の一部の形質、特に加齢に伴う病的老化形質を担う」という細胞老化仮説に基づいて進めてきた。その結果、ヒト動脈硬化巣に老化血管細胞の集積が認められること（Circulation 2002)、蓄積した老化血管細胞が様々な血管機能障害の形質（NO 産生の低下や炎症分子の発現の亢進など）を示すことによって、動脈硬化やインスリン抵抗性の発症・進展に関与していることを明らかにした（Circulation 2003, 2006, EMBO J 2004, Cell Rep 2014, JMCC 2019)。また、肥満マウスや 2 型糖尿病患者の内臓脂肪においても老化細胞が蓄積しており、p53/p21 シグナルの活性化とともに Senescence-associated secretary phenotype（SASP）因子による慢性炎症を惹起し、インスリン抵抗性を誘導していた。これらの形質は、脂肪特異的 p53 欠失によって改善したことから、脂肪組織における老化細胞の蓄積が、2 型糖尿病の発症・進展に重要であることが明らかとなった（Nat Med 2009)。さらに、心不全の病態において、心臓組織内の心筋・血管・マクロファージの p53 シグナルの活性化がその発症・進展に関与していること（Nature 2007, JMCC 2015)、心不全に伴って脂肪組織における p53 シグナルの活性化が惹起されることでさらに心機能が負に制御されていること、これらの悪循環は脂肪組織特異的 p53 欠失・抑制により改善することを明らかにしてきた（Cell Metab 2012)。

以上の結果は、p53 依存性老化シグナルの活性化が病的老化に関与しており、その活性化を抑制することによって動脈硬化や心不全などの循環器疾患の発症・進展を抑制できる可能性を示唆する（Circ Res 2007, Nat Rev Cardiol 2008, Cell Metab 2014)。しかしながら、実際には p53 を標的とした抗老化治療はがん化を促進する可能性が高いため、異なった治療のストラテジーの開発が必要である。これに対して Baker らは、p16 陽性老化細胞をアポトーシス誘導により除去しうる遺伝子改変マウスを作製し、老化細胞の除去（Senolysis）が早老症モデルマウスや高齢マウスの様々な老化形質を改善するとともに、がん化を抑制し、寿命を延長させうることを報告した（Nature 2011, Nature 2016, Science 2016)。そこで本研究では、組織に蓄積した老化細胞を標的としたがん化を促進しない個別化循環器疾患治療法の確立を目指すため、下記の項目を実施することを計画した。

1. 老化細胞特異的分子 Seno-antigen を標的とした循環器疾患治療法の開発
2. 臨床応用を見据えた基盤研究の推進

老化細胞がもたらす炎症性 SASP 因子はその個体が持つ免疫機構を活性化するとともに、炎症を惹起し病的老化形質の促進に関与する一方で、内因性 Senolysis 機構によって老化細胞が除去されることに寄与すると考えられている。私は、加齢や疾患によって内因性 Senolysis 機能の低下が生じている可能性があると考え(図 1 に概要図を示す)、その仮説を検証するため、老化細胞移植モデルを確立した。具体的に ARF 遺伝子の BAC clone に DTR-Luciferase 遺伝子を組み込んだ遺伝子改変マウス（ARF-DTR-Luciferase マウス）あるいは CAG-tdTomato マウスから得られた老化細胞を Matrigel を用いて高齢マウスや肥満マウスの組織内に移植し、その消失速度を発光または蛍光活性（生体発光イメージングシステム/FACS）でモニターし、正常若年マウスにおける消失速度と比較することで、内因性 Senolysis 機能を検証した。

図 1. 細胞老化仮説と老化細胞除去



Nat Rev Mol Cell Biol.2014

その結果、老化細胞をマウスに移植すると、高齢マウスや肥満マウスでは若年・健常マウスに比べ、その除去能力が低下していることから、加齢や加齢関連疾患に伴って老化細胞に対するアナジーが生じていることが示唆された。本研究では、先述の 2 項目について免疫機能による内因性の senolysis 機構およびその sen-anergy に着目した 2 つの老化細胞除去治療戦略を開発したためここに報告する。

II　研究計画及び材料と方法

1. 老化細胞特異的分子 Seno-antigen を標的とした循環器疾患治療法の開発

私は、公的データベースから老化血管内皮細胞の遺伝子発現の網羅的解析データを入手し、細胞老化による発現が増加する遺伝子群のなかから transmembrane domain を持ち、"seno-antigen"として細胞膜に局在する可能性のあるものを抽出した。その中から私は、Glycoprotein Nonmetastatic Melanoma Protein B(GPNMB)と称する分子に着目した。本分子の機能解析のため、継代老化により誘導した老化血管内皮細胞ならびに GPNMB の発現が高いことが既知のメラノーマ由来細胞株 SK-MEL-2 を用いて、その局在を mCherry を GPNMB に tandem に結合・発現するレンチウイルスベクターを作成・感染させ検証した。また、私は GPNMB promoter 制御下に DTR および Luciferase を発現する遺伝子改変マウスを作製した。高脂肪食負荷糖尿病モデルマウスおよび動脈硬化マウスモデルマウス(ApoE ノックアウトマウス)において、GPNMB 陽性老化細胞の可視化するだけでなく破傷風毒素(DT)投与による同細胞の除去による疾患表現型を評価した。また脂肪組織などに蓄積する老化細胞を Senescence-associated β-galactosidase(SA-β-gal)染色を持ちちいて評価した。この染色は通常は ph4 付近で活性を有する β-galactosidas が老化細胞では ph6 付近で活性を有するようになる性質を利用した老化細胞の検出方法である。本染色により老化細胞の蓄積の程度を青色で評価することができる。

また、私は大阪大学大学院医学系研究科健康発達医学寄附講座(教授：中神 啓徳)の協力の元、マウス GPNMB に対するペプチドワクチンを開発した。ワクチン用 GPNMB ペプチド 10ug を生理食塩水 50ul に溶解し、等量アジュヴァント(TiterMax Gold)とよく懸濁した後、マウスに皮下投与し、先述の各種モデルマウスの病的表現型への効果を検証した。さらに私は早老症モデルマウスとして Zmpste24（Lamin B1）ノックアウトマウスを導入した、本マウスは 10 週齢ごろより顕著な老化形質を示し 20 週齢前後で個体寿命を迎える。同マウスにワクチンを接種し、個体寿命を計測した。さらに、50 週齢前後の加齢マウスに対してもワクチンを接種し、open-field テスト、ロタロッド走行、握力測定を実施し身体機能を評価した。

2. 臨床応用を見据えた基盤研究の推進

私はドラッグリポジショニング可能な既存薬の中から老化細胞除去効果を持つ化合物の探索を進めていた。その中で、最近新規クラスの senolytics としてカナグリフロジンを同定した。SGLT2 阻害薬は腎近位尿細管に特異的に発現する Sodium-Glucose co-Transporter 2(SGLT2)に作用し、同トランスポーターの持つナトリウムとブドウ糖の再吸収機能を阻害し､糖を尿を通じて体外に排出することにより､糖尿病を治療する薬剤として上市された。その後多数の臨床試験により糖尿病患者のみならず心不全患者や慢性腎臓病患者において心血管イベントの抑制や腎機能低下の抑制を示している。また、以前よりカロリー制限が種々の動物において抗老化効果および寿命延長効果を示すことから､私は SGLT2 がカロリー制限を模倣し、先述の疾患治療効果を超えた抗老化効果を有するのではないかと仮説を立て、本研究を遂行した。カナグリフロジンを 0.03%w/w の濃度で高脂肪食もしくは普通食に混餌し高脂肪食糖尿病負荷マウス、動脈硬化モデルマウス(ApoE ノックアウトマウス)、Zmpste24 ノックアウトマウスおよび加齢マウスに投与し、GPNMB 老化細胞除去ワクチンと同様に各種疾患・老化モデルにおける老化細胞除去効果および病的表現型への効果を測定した。

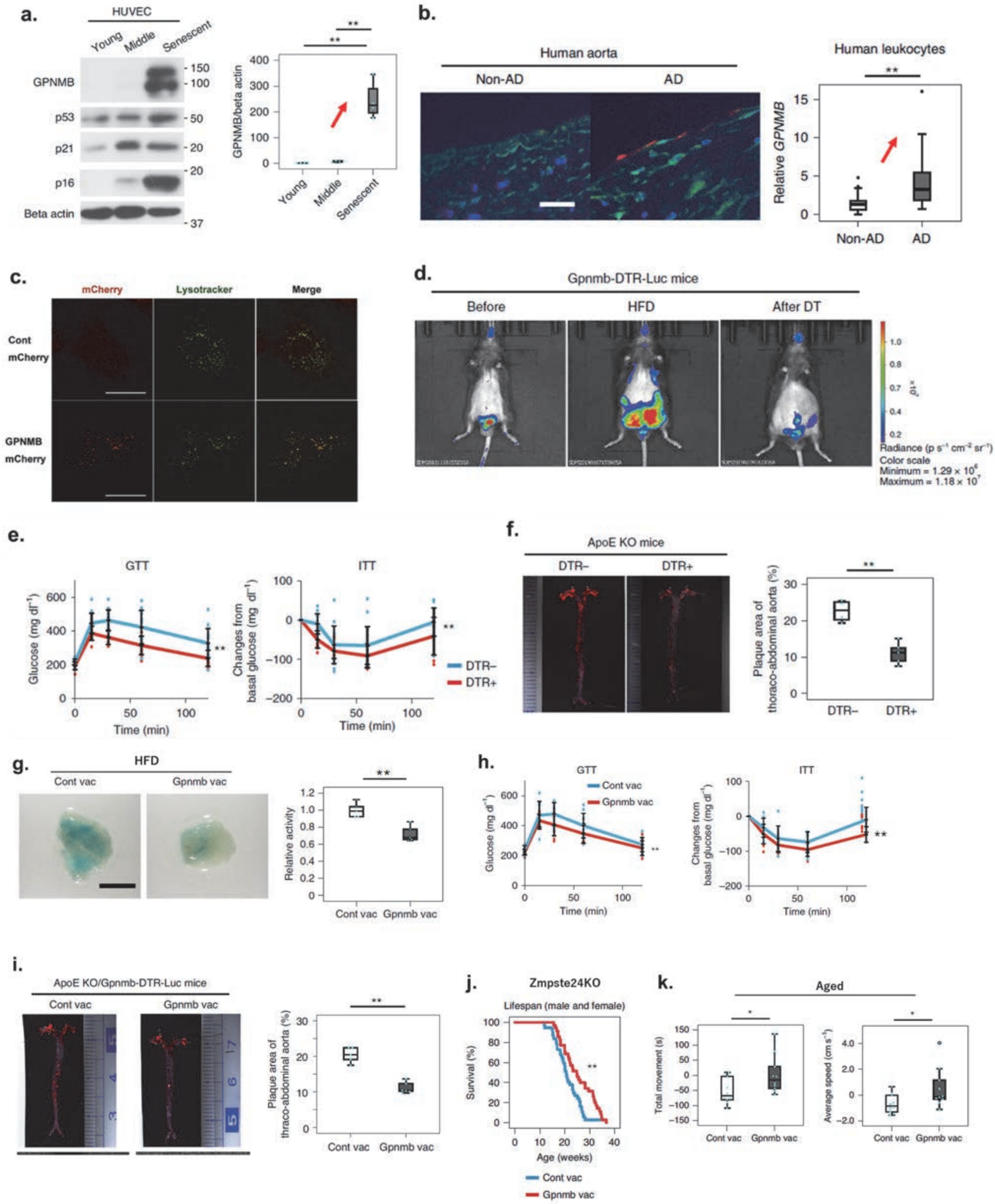
III　研究成果

1. 老化細胞特異的分子 Seno-antigen を標的とした循環器疾患治療法の開発

本分子は、ヒト老化血管内皮細胞において発現が著明に増加していた(図 2a)。また、その発現の亢進は、高齢マウスや動脈硬化マウスの大動脈や肺組織から単離した血管内皮細胞においても観察された。特に加齢マウスにおいては、大動脈だけではなく血管の多い組織や内臓脂肪、骨髄組織においてもその発現の亢進が見られた。動脈硬化のある患者の動脈組織および末梢血中の白血球においてもその発現の亢進は認められた(図 2b)。ヒト血管内皮細胞において GPNMB をノックダウンすると､分裂寿命がむしろ短縮しており､p53 や p21 の発現上昇を伴っていたことから､GPNMB はヒト血管内皮細胞の分裂寿命を正に制御

していることがわかった。局在を検討すると、細胞膜のみならず、細胞内への internalization を認め、その局在はライソゾームであることを lysotracker を用いた検証で明らかにした(図 2c)。GPNMB をノックダウンした細胞では、ライソゾーム機能が低下していることも観察

図 2. Seno-antigen としての GPBNB および同分子を標的とした老化細胞除去値用カナグリフロジンの老化細胞除去治療



された。さらに、GPNMB はライソゾームにおける V-ATPase と結合しており、その V1 サブユニットと Vo サブユニットの結合制御によって V-ATPase 活性を調整していることがわかった。GPNMB の発現制御を調べるために ATAC-seq を行ったところ、老化細胞の GPNMB 遺伝子領域において MITF/TFE の結合領域が活性化していることがわかった。実際、ChIP-PCR にて老化細胞における MITF/TFE の結合の増強を確認した。MITF/TFE の発現は老化細胞において上昇していること、MITF/TFE をノックダウンすると GPNMB の発現が低下すること、ライソゾームストレスを加えると、MITF/TFE の活性化とともに GPNMB の発現が亢進することなどから、GPNMB は老化に伴うライソゾームストレス　によって増された。

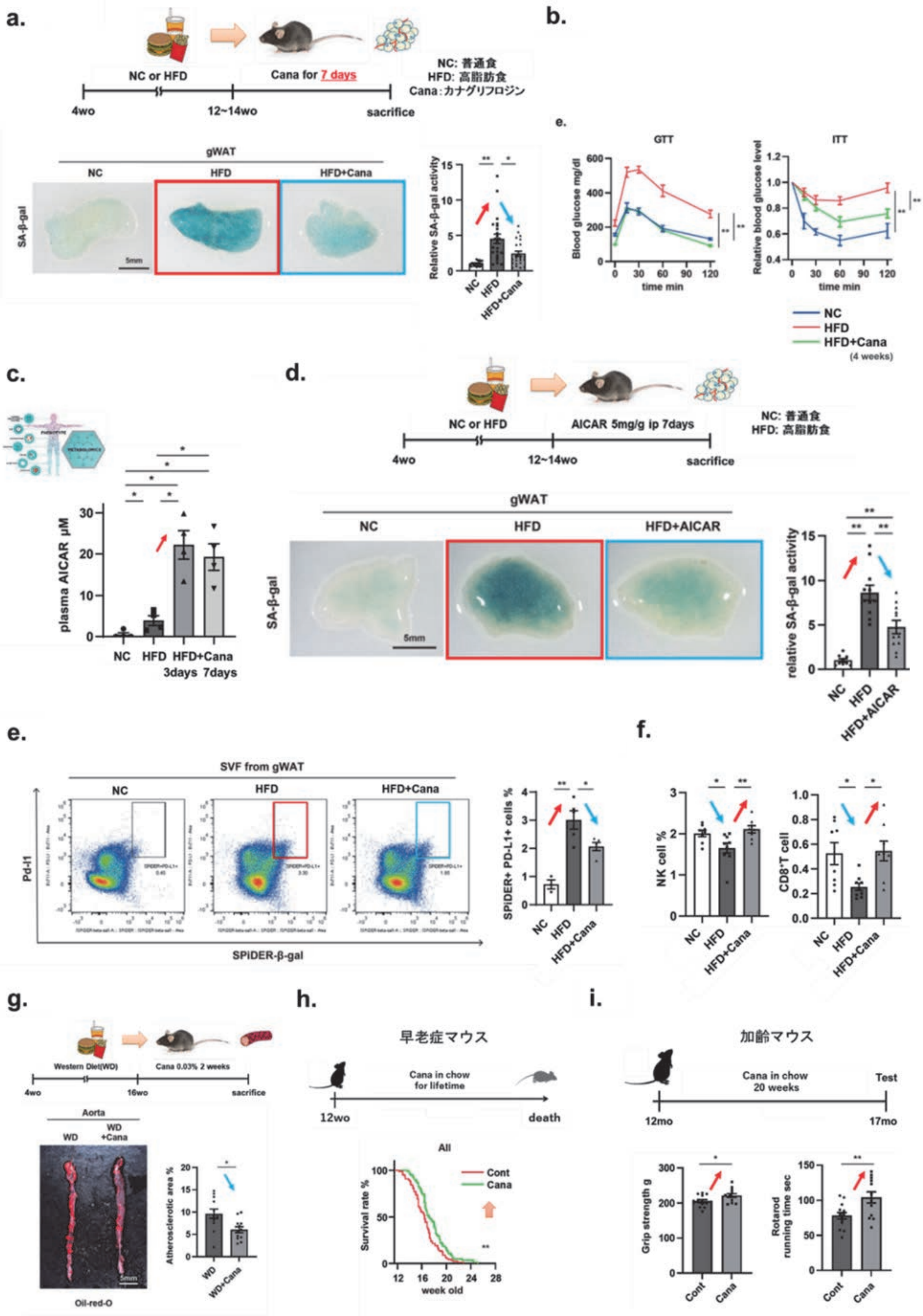
次に、GPNMB が Senolysis の標的になるかどうかについて調べるために GPNMB 陽性老化細胞を標識しつつ、DT 投与により老化細胞を除去できるマウスモデル(GPNMB-DTR-Luc マウス)を作製した。その結果、GPNMB 陽性老化細胞除去によって、高脂肪食負荷に伴うインスリン抵抗性や動脈硬化などが改善することがわかった(図 2d,e,f)。そこで、GPNMB を標的としたワクチンの作成を試みた。その結果、ワクチン接種により ADCC 活性を持った抗体の誘導が確認できた。さらに、高脂肪食負荷に伴って内臓脂肪や動脈硬化巣に蓄積する GPNMB 陽性老化細胞がワクチン摂取により除去されていること、その結果、高脂肪食負荷に伴うインスリン抵抗性や動脈硬化などが改善することが明らかとなった(図 2g,h,i)。これらの効果は GPNMB 欠失マウスでは認められなかった。また、NK/T 細胞を除去することでワクチンの効果が減弱したことから、ワクチンによって誘導される ADCC 活性を持った抗体が作用していることが示唆された。これまでの Senolytics(ABT-263 および Dasatinib + Quercetin)と効果を比較したところ、ワクチンはより持続的に作用し、血球減少などの副作用が少ないことがわかった。さらに、ワクチンによる GPNMB 陽性老化細胞除去は、高齢マウスのフレイルの改善や早老症マウスの寿命の延長といった効果があることも明らかとなった(図 2j,k)。以上より GPNMB は seno-antigen として老化細胞除去の有望な標的となること、また同分子に対する老化細胞除去ワクチンが抗加齢治療に有用と考えられた。(論文 1,2)

2. 臨床応用を見据えた基盤研究の推進

高脂肪食負荷モデルマウスにカナグリフロジンを 1 週間という短期間投与すると内臓脂肪中の老化細胞蓄積が減り(図 3a)、これに伴い耐糖能異常(図 3b)や脂肪炎症が改善することを認めた。インスリン投与や普通食への変更も試み、カナグリフロジンと同様に早期より血糖は低下することは確認したが、カナグリフロジンでのみ老化細胞蓄積を減少することが分かり、同剤に老化細胞除去効果があることが推察された。しかし、カナグリフロジンは老化細胞への直接的な細胞死誘導効果は認めず、間接的に老化細胞除去を誘導していることが示唆された。

そこで、私は網羅的解析として血中のメタボローム解析を行ったところ、カナグリフロジン投与マウスにおいて投血中の AICAR 濃度が有意に増加していることを突き止めた(図 3c)。AICAR は AMPK シグナルの活性化因子として知られており、実際脂肪組織においてカナグリフロジン投与 3 日目に AMPK シグナルの活性化が生じることを突き止めた。

図 3. カナグリフロジンの老化細胞除去効果



実際高脂肪食負荷マウスへの AICAR 投与(500mg/kg、腹腔内投与 7 日間)によっても再現性のある結果が得られ(図 3d)、AMPK 阻害薬である Compound C 投与(10mg/kg、腹腔内投与 7 日間)によりカナグリフロジンの持つ老化細胞上の PD-L1 発現現象および老化除去効果が抑制されることを確認した。また、近年の報告で免疫チェックポイント因子として知られる PD-L1 が老化細胞において発現を増加させ、体内からの除去に対する免疫逃避に寄与すること(Science 2022)、ならびに PD-1 は AMPK シグナルの活性化により発現が負に制御されること(Molecular Cell 2018)が報告されていたため、老化細胞上の PD-L1 の発現がカナグリフロジンで減弱するか検証したところ、老化再簿言う状の PD-L1 の発現量が減少し(図 3e)、CD8 陽性 T 細胞ならびに NK 細胞の脂肪組織への浸潤を増加させ(図 3f)老化細胞が減少することを突き止めた。また CD3 抗体による T 細胞除去によっても老化細胞除去効果が抑制された。以上より、カナグリフロジンは血中 AICAR の産生増加を介して老化細胞上の PD-K1 発現量を減少させ、内因性の老化細胞除去機能を活性化することで同細胞を除去すると考えられた。さらに私は、他の加齢関連疾患モデルマウスにカナグリフロジンを投与し、老化形質の改善がみられるか検証した。カナグリフロジンを動脈硬化モデルマウスに 2 週間投与したところ、大動脈中の老化細胞蓄積が減り、動脈硬化巣の範囲が減少した(図 3g)ほか、早老症モデルにおいては生涯投与により寿命延長が(図 3h)、老齢マウスでは 20 週間の長期投与により握力・Rotarod 走行距離がそれぞれ有意に改善し(図 3i)、カナグリフロジンの老化細胞除去効果はモデルを超えて抗老化効果をもたらすことが分かった。以上の検証結果を論文にまとめ Nature Aging 誌に報告した。(論文投稿し、受理を待っている。本研究の成果はカナグリフロジンが糖尿病・心不全・腎臓病のみならず幅広く抗老化治療に用いることを可能とする重要な基礎的知見になるものと期待している。(論文 3)

IV　考察

老化細胞除去治療は心血管疾患以外にも腎臓病、肺線維症、サルコペニア、骨粗しょう症、認知症など幅広い老化関連疾患に対する治療法として有用であることが動物実験によって明らかにされている。老化細胞除去治療は老化関連疾患のみならず「老化」そのものを横断的に治療が可能で疾患を特定せず個体全体に対して有効な治療戦略であり、これが既存の治療法とは一線を画す魅力的で有望な点である。さらに癌の発生を増加させず、むしろ減少効果を示しながらに抗老化効果をもたらす点も大変魅力的な点である。老化細胞除去治療を通じた老化および老化関連疾患の予防・抑制は健康寿命の延伸に寄与し、社会負担を軽減することが大いに期待される (論文 4)。

これまで、ABT-263(Navitoclax)(Nat Med 2016 など)や Dasatinib + Quercetin の併用療法（Aging Cell 2015 など）、UBX0101(Nat Med 2017)、Fisetin(EBioMedicine 2018) をはじめ 20 種を超える老化細胞除去効果を持つ化合物が導出され、一部は臨床試験が実施されている。現状明確な抗老化効果を示したものはないが今後の進展が期待される。といった化合物はただ、これまで導出された老化細胞除去薬は抗アポトーシス分子を標的とした抗がん剤に似た効果を持ち、正常細胞への影響を始め非特異的な効果がもたらされることが懸念される。実際に血球減少や肝障害などの副作用がマウス実験等で指摘されており、疾患予防としての側面も併せ持つ抗老化治療において重大な副作用が出やすい点は大きな欠点となる。また、一部を除き臨床現場では用いられていない薬剤がほとんどのため、社会実装まで時

間とコストがかかることから、これらを克服しうる多様な戦略の確立が求められている。

この度私が報告した老化細胞除去ワクチンや SGLT2 阻害薬は老化細胞を直接障害するのではなく、元来個体が有すると考えられていた免疫機能による内因性の老化細胞除去機能の活性化を通じた新たな戦略による老化細胞除去治療である。他にも uPAR 蛋白を標的とした老化細胞除去 CAR-T 療法(Nature. 2020)、β2-Microglobulin を標的とした Antigen-Drug-Conjugation 療法（Sci Rep2021）が相次いで報告され、免疫機能を利用した老化細胞除去治療の概念を支持する知見が増えている。がん領域ではすでに癌細胞を直接障害する薬剤の他、がん免疫機能を標的とした治療薬も臨床応用に至っており、薬物治療のみならず免疫機能への介入も重要な治療法として確立している。がん治療のみならず老化細胞除去治療においても多様な治療戦略を開発・提供することは有効性や安全性の向上につながり、社会実装の可能性を高めるうえで重要なアプローチであろうと考えられる。免疫機能も異常な活性化を誘導すると慢性炎症や自己免疫疾患など予期せぬ疾患の誘導につながる可能性は残るため、今後の検証において注意深い検証が必要する。ただ、SGLT2 阻害薬については既に日常診療で広く用いられている薬剤であり、既存薬であれば抗老化治療へのドラッグリポジショニングは他の新規に開発された治療法に比べ社会実装への道のりは幾分か平易なものになると考えられる。

私は今後 GPNMB 老化細胞除去ワクチンの臨床応用に向けた大動物でのワクチン接種試験ならびに、SGLT2 阻害薬を用いた抗老化治療を目的とした臨床試験の計画等を進めている。また、老化細胞を用いた網羅的解析を血管内皮細胞以外の細胞種にも広げて実施しており、GPNMB 以外の複数の候補分子の同定や新たな老化細胞除去ワクチンの開発にも着手している。これらの研究成果を一日も早く社会実装につなげ、多くの方の健康長寿に寄与できることを願い今後も鋭意研究開発に取り組んでいく次第である。

V　研究成果の発表

[論文発表]

1. Suda M*, Shimizu I*, Katsuumi G*, Hsiao CL*, Yoshida Y, Matsumoto N, Yoshida Y, Katayama A, Wada J, Seki M, Suzuki Y, Okuda S, Ozaki K, Nakanishi-Matsui M, Minamino T. Glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B regulates lysosomal integrity and lifespan of senescent cells. ***Sci Rep***.;12(1):6522, 2022. * co-first author
2. Suda M*, Shimizu I*, Katsuumi G*, Yoshida Y, Hayashi Y, Ikegami R, Matsumoto N, Yoshida Y, Mikawa R, Katayama A, Wada J, Seki M, Suzuki Y, Iwama A, Nakagami H, Nagasawa A, Morishita R, Sugimoto M, Okuda S, Tsuchida M, Ozaki K, Nakanishi-Matsui M, Minamino T. Senolytic vaccination improves normal and pathological age-related phenotypes and increases lifespan in progeroid mice. ***Nat Aging***: 1117–1126, 2021.* co-first author
3. Katsuumi G*, Shimizu I*, Suda M*, Yoshida Y, Furihata T, Joki Y, Hsiao CL, Fujiki S, Abe M, Sugimoto M, Soga T, Minamino T. Sodium glucose co-transporter 2 inhibition

eliminates senescent cells and alleviates pathological aging. ***Nat Aging*** 2024 in press. * co-first author

4. Suda M, Katsuumi G, Tchkonia T, Kirkland JL, Minamino T. Potential Clinical Implications of Senotherapies for Cardiovascular Disease. ***Circ J***. 88(3):277-284, 2024.

[学会・シンポジウム講演]

国際学会

1. Minamino T. Targeting senescent cells as a novel treatment of cardiovascular aging. ESC Preventive Cardiology 2021, Healthy cardiovascular aging – Is it possible? 2021/4/17, Web

2. Minamino T. Targeting senescent cells for the treatment of lifestyle-related disease. The 10th international meeting on ageing -Functional phenotype of the aged cardiovascular system, 2021/9/4, Heart Centre University Hospital Halle (Saale), Web

3. Minamino T. Targeting senescent cells for the treatment of lifestyle-related disease. The 6th International Cell Senescence Association (ICSA) Conference, 2021/12/13, Osaka

4. Minamino T. Targeting senescent cells for the treatment of lifestyle-related disease. 23rd Northeastern Asian Symposium, "Cellular senescence: from pathophysiology to treatment" 2022/9/1, Hilton Tokyo

5. Minamino T. Targeting senescent cells as a novel therapeutic strategy for lifestyle-related disease. 7th Taiwan-Japan Academic Research Organization Workshop, 2022/9/15, Web

6. Minamino T. Targeting senescent cells as a novel therapeutic strategy for lifestyle-related disease. The 11th International Congress on Lipid & Atherosclerosis with Asian-Pacific Society of Atherosclerosis and Vascular Disease. Symposium 14 Impact of aging of vascular cells on atherosclerosis & its protection. 2022/9/16, Seoul

7. Minamino T. Targeting senescent cells as a novel therapeutic strategy for age-associated disease. The 29th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension 2022/9/16 Kyoto

8. Minamino T. Targeting senescent cells for the treatment of cardiovascular disease. 22nd International Vascular Biology Meeting Vascular Aging 2022/10/14 San Francisco Bay Area at the Oakland Marriott City Center

9. Minamino T. Targeting senescent cells for the treatment of age-associated disease. International Association of Gerontology and Geriatrics 2023/6/14 Yokohama

10. Minamino T. Seno-antigen/Seno-anergy as a novel target for senotherapeutics. A Wiggers-Bernard Conference—Senescence in vivo 2023/6/15 Vienna

11. Minamino T. Targeting senescent cells for the treatment of age-associated disease. Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress 2023/11/3 Daegu, KOREAMinamino T.

12. Minamino T. Targeting senescent cells for the treatment of age-associated disease. A3 FORESIGHT PROGRAM: Cellular Senescence: from Pathophysiology to Treatment 2024/1/12 Osaka

国内学会

1. Minamino T.　細胞老化を標的とした抗老化治療の開発　第 120 回日本皮膚科学会総会 教育講演 10 アンチエイジング医学: 老化は疾患である　2021 年 6 月 10 日　パシフィコ横浜

2. Minamino T.　抗老化治療として運動を考える　第 27 回日本心臓リハビリテーション学会総会　シンポジウム 6 : 基礎研究を心臓リハビリテーションのエビデンスに活かす（Bench to Bedside)　2021 年 6 月 19 日　幕張メッセ

3. Minamino T.　老化細胞を標的とした生活習慣病治療開発　第 50 回日本心脈管作動物質学会 シンポジウム講演 4　2021 年 7 月 12 日 信州大学 松本キャンパス

4. Minamino T.　老化細胞除去 Senolysis による抗老化治療の開発　第 63 回日本平滑筋学会総会　2021 年 8 月 6 日　Web 開催

5. Minamino T.　Targeting senescent cells for the treatment of lifestyle-related disease　第 38 回国際心臓研究学会日本部会（ISHR）　2021 年 12 月 10 日　Web 開催

6. Minamino T.　糖尿病の多因子介入の重要性について考える～経口 GLP-1 受容体作動薬に期待すること～　第 59 回日本糖尿病学会　関東甲信越地方会　ランチョンセミナー1　2022 年 1 月 22 日　パシフィコ横浜

7. Minamino T. 老化細胞除去 Senolysis による抗老化治療の開発と組織再生の可能性　第 21 回日本再生医療学会総会 シンポジウム 23「細胞の体内環境を考えた再生誘導治療のストラテジー」　2022 年 3 月 18 日 Web 開催

8. Minamino T. 老化細胞を標的としたアンチエイジング　日本抗加齢医学会専門医・指導士認定委員会主催大阪開催/基礎・受験編講習会　2022 年 3 月 20 日　Web 開催

9. Minamino T.　細胞老化を標的とした抗老化治療の開発　第 42 回日本肥満学会 JASSO シンポジウム 10 肥満症医療のイノヴェーション　2022 年 3 月 27 日 パシフィコ横浜　3 階　301

10. Minamino T.　細胞老化を標的とした新規治療開発　第 86 回 日本生化学会 中部支部例会・シンポジウム　2022 年 5 月 21 日　Web（松本市）

11. Minamino T.　Seno-therapeutics の今後の展開　第 51 回日本心脈管作動物質学会　2022 年 7 月 31 日　順天堂大学

12. Minamino T.　老化細胞を標的とした 抗老化治療開発　第 40 回日本美容皮膚科学会総会・学術大会　特別講演 2　2022 年 8 月 7 日　虎ノ門ヒルズフォーラム

13. Minamino T.　老化から心不全や糖尿病の治療方策を考える　第 37 回日本糖尿病合併症学会共催セミナー　2022 年 10 月 22 日　国立京都国際会館

14. Minamino T.　老化から見た生活習慣病の治療方策　日本抗加齢医学会　2022 年度講習会　2022 年 11 月 20 日　日本橋ライフサイエンスハブ

15. Minamino T.　細胞老化を標的とした抗老化治療の開発　第 43 回日本肥満学会/第 40 回日本肥満症治療学会学術集会　2022 年 12 月 2 日　第 3 会場 那覇文化芸術劇場なはーと「大スタジオ」　Web

16. Minamino T.　老化細胞を標的とした生活習慣病治療開発　CVMW2022 心血管代謝週間　2022 年 12 月 17 日　東京ステーションカンファレンス

17. Minamino T.　抗老化治療検証のための老化指標の確立　日本抗加齢医学会　ミーティング　2022 年 12 月 17 日　東京ペニンシュラホテル

18. Minamino T.　加齢関連循環器疾患の病態解明と細胞老化を標的とした新たな治療戦略　第 32 回日本循環薬理学会　特別講演 I　2023 年 1 月 27 日　大田区産業プラザ PiO

19. Minamino T.　老化の観点から生活習慣病を考える　第 267 回日本循環器学会 関東甲信越地方会ランチョンセミナー5　2023 年 2 月 25 日 ステーションカンファレンス東京

20. Minamino T. Seno-therapeutics as a novel therapeutic strategy for vascular aging. 87th ANNUAL SCIENTIFIC MEETING OF THE JAPANESE CIRCULATION SOCIETY　Plenary 8:Phenotypes of vascular aging and non-vascular aging: Their experimental and clinical findings 2023/3/11 Fukuoka

21. Minamino T.　老化細胞を標的とした抗老化治療の開発　第 100 回日本生理学会大会 シンポジウム　細胞老化：臓器の恒常性と寿命における役割　2023 年 3 月 15 日　国立京都国際会館

22. Minamino T. 血管老化を防ぐには？　第 31 回日本医学会総会　マルキューブ：オープンセミナー　2023 年 4 月 21 日　丸ビル

23. Minamino T. 心血管老化を防ぐには？　第 31 回日本医学会総会　「抗老化と生活習慣病の未来を語る」　2023 年 4 月 22 日　ステーションコンファレンス東京

24. Minamino T. 老化細胞を標的とした抗老化治療の開発　2023 年度第 1 回日本抗加齢医学会 WEB メディアセミナー　2023 年 5 月 11 日

25. Minamino T. 老化細胞を標的とした新たな抗老化治療戦略　第 122 回日本皮膚科学会総会 教育講演 63　2023 年 6 月 4 日　横浜パシフィコ

26. Minamino T. 老化制御は可能か？　第 46 回 日本基礎老化学会大会 ランチョンセミナー　2023 年 6 月 18 日　横浜 パシフィコ横浜ノース

27. Minamino T. Seno-therapeutics の新展開　第 55 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 シンポジウム 16　2023 年 7 月 9 日　宇都宮

28. Minamino T. 老化の制御は可能か？　JST 創発　老化の多面的理解に向けた融合の場　2023 年 7 月 28 日　一橋講堂

29. Minamino T.　がん治療における腫瘍循環器診療の意義　～循環器内科医の立場から～　日本腫瘍循環器学会メディアセミナー　2023 年 9 月 7 日　Web

30. Minamino T. 老化の制御は可能か？第 76 回日本自律神経学会総会　教育講演 4　2023 年 10 月 29 日　埼玉会館

31. Minamino T. 老化の制御は可能か？　日本内科学会学術集会　第 51 回 内科学の展望　2023 年 12 月 3 日　那覇文化芸術劇場なはーと（那覇市）

32. 加齢関連循環器疾患の病態解明と細胞老化を標的とした新たな治療戦略　第 32 回日本循環薬理学会　特別講演 I　2023 年 1 月 27 日　大田区産業プラザ PiO

33. Minamino T.　老化の観点から生活習慣病を考える　第 267 回日本循環器学会 関東甲信越地方会ランチョンセミナー5　2023 年 2 月 25 日 ステーションカンファレンス東京

34. Minamino T. Seno-therapeutics as a novel therapeutic strategy for vascular aging. 87th ANNUAL SCIENTIFIC MEETING OF THE JAPANESE CIRCULATION SOCIETY　Plenary 8:Phenotypes of vascular aging and non-vascular aging: Their experimental and clinical findings 2023/3/11 Fukuoka

35. Minamino T.　老化細胞を標的とした抗老化治療の開発　第 100 回日本生理学会大会 シンポジウム　細胞老化：臓器の恒常性と寿命における役割　2023 年 3 月 15 日　国立京都国際会館

36. Minamino T. 血管老化を防ぐには？　第 31 回日本医学会総会　マルキューブ：オープンセミナー　2023 年 4 月 21 日　丸ビル

37. Minamino T. 心血管老化を防ぐには？　第 31 回日本医学会総会　「抗老化と生活習慣病の未来を語る」　2023 年 4 月 22 日　ステーションコンファレンス東京

38. Minamino T. 老化細胞を標的とした抗老化治療の開発　2023 年度第 1 回日本抗加齢医学会 WEB メディアセミナー　2023 年 5 月 11 日

39. Minamino T. 老化細胞を標的とした新たな抗老化治療戦略　第 122 回日本皮膚科学会総会 教育講演 63　2023 年 6 月 4 日　横浜パシフィコ

40. Minamino T. 老化制御は可能か？　第46回 日本基礎老化学会大会 ランチョンセミナー　2023年6月18日　横浜 パシフィコ横浜ノース

41. Minamino T. Seno-therapeuticsの新展開　第55回日本動脈硬化学会総会・学術集会 シンポジウム16　2023年7月9日　宇都宮

42. Minamino T. 老化の制御は可能か？　JST 創発　老化の多面的理解に向けた融合の場　2023年7月28日　一橋講堂

43. Minamino T.　がん治療における腫瘍循環器診療の意義　～循環器内科医の立場から～　日本腫瘍循環器学会メディアセミナー　2023年9月7日　Web

44. Minamino T. 老化の制御は可能か？第76回日本自律神経学会総会　教育講演4　2023年10月29日　埼玉会館

45. Minamino T. 老化の制御は可能か？　日本内科学会学術集会　第51回 内科学の展望　2023年12月3日　那覇文化芸術劇場なはーと（那覇市）

46. Minamino T. 老化は制御可能か？　第6回日本抗加齢医学会 九州地方会 学術総会　2024年1月27日　電気ビル共創館（福岡）

令和６年１２月発行

がん・心臓病の基礎的、先駆的研究事業報告書

発　行　　公益財団法人車両競技公益資金記念財団
東京都文京区本郷 3-22-5
住友不動産本郷ビル８階
電話 03-5844-3070(代表)　 http://www.vecof.or.jp/
発行者　　田宮　治雄
印　刷　　㈱サンワ

印刷 6.12.200