

令和元年度

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」として令和元年までの494件のプロジェクトに対し、約3,938百万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学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勞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、令和元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2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

老化細胞分泌因子が発がんに関与する分子機構の解析

・・・・・・・・・・・・・・・・・・高橋 暁子・・・・・・ 1

新規ダウン症モデル、ダウン症遺伝子からのがん微小環境動態解明

・・・・・・・・・・・・・・・・・・石原 慶一・・・・・・ 11

がん細胞における亜鉛シグナリングの役割解明：対がん創薬を目指して

・・・・・・・・・・・・・・・・・・深田 俊幸・・・・・・ 23

フレイル合併心不全に対する集学的治療戦略の確立を目指して

・・・・・・・・・・・・・・・・・・新村 健・・・・・・ 35

iPS細胞を介さない心筋直接リプログラミングによる、心機能を改善するための網羅的な遺伝子探索と、重症化心不全患者への生体移植法の確立

・・・・・・・・・・・・・・・・・・山川 裕之・・・・・・ 45

動脈壁と微小血管での慢性炎症が心臓病発生にもたらす病態解明

・・・・・・・・・・・・・・・・・・安 隆 則・・・・・・ 55

老化細胞分泌因子が発がんに関与する分子機構の解析

<< 研究の概要 >>

細胞老化はさまざまな発がんストレスによって誘導される不可逆的な細胞増殖停止状態であり、生体内で働く重要ながん抑制機構であることから、細胞老化を応用したがん治療の可能性が検討されてきた。しかしその一方で、体内の老化細胞が炎症性蛋白質を分泌する **SASP** (**S**enescence-**a**ssociated **s**ecretory **p**henotype) をおこすことで、様々な加齢性疾患を引き起こす副作用があることも知られている。高橋らは、老化細胞で **SASP** がおこる分子メカニズムと老化細胞から分泌される **SASP** 因子の機能を解明することで、細胞老化の発がん抑制機構である細胞増殖停止作用は損なわず、有害な **SASP** のみを制御する方法の開発に繋げることを目指して研究を行った。

老化細胞が分泌する **SASP** 因子の中で、がんの悪性化に関与する因子の探索を行った結果、老化細胞では炎症性蛋白質だけでなく、細胞外分泌膜小胞の一種であるエクソソームの分泌も亢進していることを見出した。そして、老化細胞由来のエクソソームにはがん転移促進因子として知られる **Ephlin-A2** (**EphA2**) が多く含まれ、がん細胞の増殖を促進していることを報告した。この研究の中で、老化細胞においてはリン酸化された **EphA2** が選択的にエクソソームへ取り込まれるという、エクソソームの積荷の選択性を決定するメカニズムを発見した。さらに、老化細胞では **DNA** 分解酵素である **DNase2** と **TREX1** の発現が著しく低下しているために細胞質にゲノム **DNA** 断片が蓄積し、それが細胞質 **DNA** センサー (**cGAS-STING** 経路) の活性化を介して細胞に自然免疫応答を引き起こすことを明らかにした。細胞老化によって誘導される **SASP** 因子の多くは自然免疫応答に関連する炎症性物質であることから、細胞質 **DNA** センサーが活性化することで自然免疫応答が起こり、**SASP** 因子の遺伝子群の発現が誘導され慢性炎症を起因とする発がんの原因となっていることが示唆された。そこで、**STING** のノックアウトマウスで肥満誘導性肝がんモデルの実験を行ったところ、**DNA** センサーである **STING** ノックアウトマウスでは野生型マウスに比べて **SASP** 因子の遺伝子発現が抑制され、肥満誘導性の肝がんの発症が顕著に抑えられていた。これらの研究から、細胞質 **DNA** による自然免疫応答の活性化が肝がんの発症に深く関わることが示された。さらに、**SASP** 因子の一つである細胞外小胞の分泌亢進に関わる経路の探索を行った結果、老化細胞では **DNA** 損傷応答によりセラミド合成経路が活性化することで細胞外小胞の分泌が亢進していることを見出した。

本研究から明らかになった細胞質 **DNA** センサーを介した **SASP** 遺伝子の発現誘導経路やセラミドを介した細胞外小胞分泌経路を選択的に抑制することができれば、炎症性蛋白質や細胞外小胞などの **SASP** 因子を抑制し、がんの進展を抑えられると考えられる。本研究から得られた成果をさらに発展させることで、今後新たな治療法が開発が期待される。

高橋 暁子 公益財団法人がん研究会がん研究所 細胞老化プロジェクト
プロジェクトリーダー
役割 研究の統括と遂行

高橋 元子 公益財団法人がん研究会がん研究所 実験病理部
特任研究員
役割 研究の遂行

研究報告

I 研究目的

細胞老化はさまざまな発がんストレスによって誘導される不可逆的な増殖停止状態であり (Takahashi *et al.*, Nature Cell Biology, 2006; Imai *et al.*, Cell reports, 2006)、生体内で働く重要ながん抑制機構であることから (Collado *et al.*, Nature Review Cancer, 2010)、細胞老化を応用したがん治療の可能性が検討されてきた。しかしその一方で、私たちは老化した細胞が加齢とともに体内に蓄積してゆくことも観察しており (Ohtani *et al.*, PNAS, 2007; Yamakoshi & Takahashi *et al.*, Journal of Cell Biology, 2009)、老化細胞は体内で長期間生存しているだけでなく、炎症性サイトカイン (IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6)、ケモカイン (IL-8、CXCL1)、増殖因子 (bFGF、HGF)、細胞外マトリクス分解酵素 (MMP1, MMP-3, MMP-13) などのさまざまな炎症性蛋白質を細胞外へと分泌するSASP (Senescence-associated secretory phenotype) という表現型を示すことが明らかとなってきた。老化細胞から分泌される炎症性蛋白質 (SASP因子) は、周辺組織に慢性炎症を引き起こすことで、がん・動脈硬化・変形性関節症・慢性閉塞性肺疾患 (COPD)・特発性肺線維症・アルツハイマー病などの様々な加齢性疾患の発症もしくは病態悪化への関与が強く示唆されている (Loo *et al.*, Cancer Science, 2020) (図1)。

高橋らはこれまでに、老化細胞でSASP因子の遺伝子発現が誘導されるエピジェネティックな制御機構の一旦を解明し (Takahashi *et al.*, Molecular Cell, 2012; Eggert *et al.*, Cancer Cell, 2016)、さらに老化細胞が炎症性蛋白質だけではなくエクソソームなどの細胞外小胞を分泌することで、がんの進展を促す微小環境を作りだしていることを明らかにしてきた (Takahashi *et al.*, Nature Communications, 2017)。つまり、加齢に伴って体内に蓄積してゆく老化細胞が、SASPをおこすことでむし

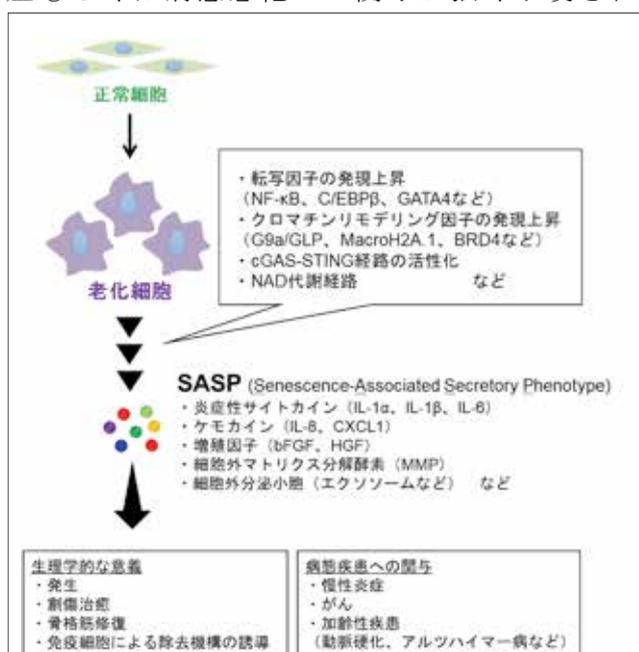


図1 細胞老化と SASP

研究成果6「臨床・免疫・アレルギー科」より

る発がんに関与している可能性が大きい。そこで、有害なSASPを防ぐ方法の開発が強く望まれている。

本研究では、老化細胞でなぜSASP遺伝子群の発現が誘導されるのか、その分子機構の詳細を解明することで、細胞老化の発がん抑制機構である細胞増殖停止作用は損なわず、有害なSASPのみを制御する方法の開発に繋げることを目指して研究を行った。

II 研究計画及び材料と方法

(1) 老化細胞が分泌する SASP 因子の解析 (高橋暁子)

ヒト正常線維芽細胞株 (TIG-3, Hs68, IMR90)、ヒト正常上皮細胞株 (HRPE, NHEK)、マウス正常線維芽細胞株 (MEF) を継代培養するか、もしくはがん遺伝子 (H-RasV12) の過剰発現や X 線照射によって細胞老化を誘導し、あらかじめ超遠心 (120,000g, 16 時間) 処理を行い血清中の細胞外微粒子を除去した培地におきかえ、48 時間培養する。その後培養上清を回収し、超遠心法やシヨ糖密度勾配遠心法を併用してエクソソームを含む分泌膜小胞フラクションを分離し NanoSight を用いて回収したサンプルの粒子径と数を測定すると同時に、透過型電子顕微鏡観察や CD63 抗体を用いた免疫電子顕微鏡法による検証を行った。さらに分泌膜小胞に含まれる蛋白については LC-MS/MS によるプロテオソーム解析を行った。回収した SASP 因子の機能を明らかにするために、正常細胞株や各種がん細胞株の培養液中に老化細胞の培養上清もしくは精製した細胞外小胞を添加し、細胞増殖試験を行い、がん細胞の悪性化に関わる因子の特定を行った。

(2) 老化細胞で SASP が起こる新規分子機構の解明 (高橋暁子・高橋元子)

これまでの研究から、老化細胞においては細胞質にゲノム DNA 断片が多く存在しており、エクソソーム経路によってそれらを細胞外へと分泌していることを報告してきた (Takahashi *et al.*, Nature Communications, 2017)。そこで、細胞質の DNA センサーである cGAS (Cyclic GMP-AMP synthase) -STING (Stimulator of interferon genes) 経路が SASP 因子の遺伝子発現誘導に機能しているのではないかと考え、ヒト正常線維芽細胞を用いて DNA センサーのノックダウンや過剰発現を行い、その関与を検証した。さらに、老化細胞でゲノム DNA 断片が細胞質に蓄積する分子機構を解明するために、細胞老化の誘導前後で RNA シーケンスによる遺伝子発現解析を行い、原因因子の探索と SASP 誘導への関与を解析した。

(3) SASP 因子の分泌経路を標的とした方法の探索 (高橋暁子)

老化細胞は増殖中の若い細胞にくらべて約 30 倍近くの細胞外小胞を分泌しており (Takahashi *et al.*, Nature Communications, 2017)、(1) の研究により老化細胞が分泌する細胞外小胞はがん細胞の増殖を促進する SASP 因子の一つとして働くことが明らかとなったことから、老化細胞において細胞外小胞の分泌を制御する方法を検討した。まず、老化細胞における細胞外小胞の分泌亢進の分子機構を明らかにするために、RNA シーケンスによる遺伝子発現解析を行い、老化細胞で特異的に活性

化している細胞外小胞の産生経路と分泌経路を調べた。さらに、本研究で同定した老化細胞における細胞外小胞の産生や分泌に関わる経路を阻害することで、SASPの制御が可能かどうか検討を行った。

(4) マウスモデルを用いた検証実験 (高橋暁子)

(2)の研究で、DNA センサー経路が SASP を誘導することが明らかとなったので、DNA センサー経路の活性化が SASP を介した発がんに寄与しているかどうかを明らかにするために、*STING* ノックアウトマウスに肥満誘導性の肝がんモデルを応用し (Yoshimoto *et al.*, *Nature*, 2013; Loo *et al.*, *Cancer Discovery*, 2018)、野生型マウスと比較して肝がんの発症率に違いがあるかどうか検証をおこなった。

さらに、(3)の研究で、老化細胞における細胞外小胞の分泌にはセラミド合成経路が関与していることが示唆されたので、各種セラミド経路の阻害剤をマウスに投与して解析を行った。

III 研究成果

貴財団の助成を受けてからこれまでに、老化細胞が分泌するSASP因子の中でがんの悪性化に関与する因子の探索を行い、老化細胞では細胞外分泌膜小胞 (Small Extracellular Vesicle: sEV) の一種であるエクソソームの分泌も亢進していることを観察し報告してきた (Takahashi *et al.*, *Nature Communications*, 2017)。エクソソームは、蛋白質、脂質、核酸のような様々な細胞内分子を他の細胞に伝達することで細胞間コミュニケーションに働いていることが報告され、近年注目を集めている。そしてエクソソーム蛋白質の質量分析の結果から、老化細胞由来のエクソソームにはがん転移促進因子として知られるEphlin-A2 (EphA2) が多く含まれ、がん細胞の増殖を促進していることを見出した。この研究の中で、老化細胞ではリン酸化されたEphA2が選択的にエクソソームへ取り込まれるという、エクソソームの積荷の選択性を決定するメカニズムを発見し報告した (Takasugi *et al.*, *Nature Communications*, 2017)。

過去の報告から、DNA 損傷応答によって生じた細胞質の微小核に細胞質 DNA センサーの cGAS が集積することで自然免疫応答が誘導されることが報告されている (Mackenzie *et al.*, *Nature*, 2017)。さらに、上記の細胞外小胞の研究を行う過程で老化細胞においては細胞質にゲノム DNA が多く存在していることを観察していた。そこで、若い細胞と老化細胞を用いて抗二本鎖 DNA 抗体 (double stranded DNA: dsDNA) と核膜の LaminB1 の抗体で免疫染色を行ったところ、老化細胞では微小核や出芽核など核の形態異常が観察された (図 2)。細胞質 DNA センサーである cGAS は微小核や出芽核に集積し、DNA と結合することでセカンドメッセンジャーである cGAMP を産生し下流の STING

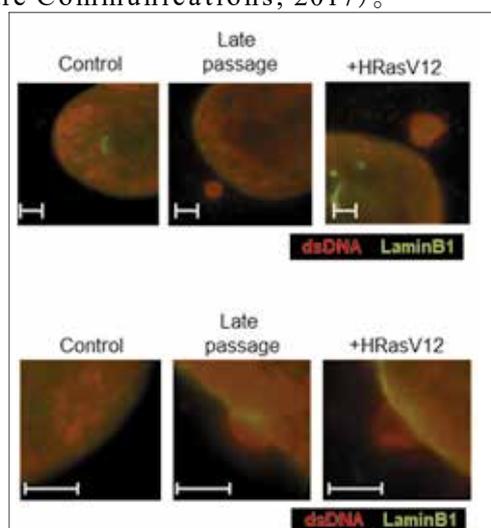


図 2 老化細胞の核形態の観察
上段は、micronucleus(微小核)、
下段は Bud を拡大した像である。

ヘシグナルを伝えることが報告されている (Hatch *et al.*, Cell, 2013)。老化細胞においては、このような細胞質核酸センサー経路が SASP 遺伝子発現に参与しているのではないかと考えた。そこで、その仮説を証明するために、がん遺伝子 (HRasV12) の活性化によって細胞老化を誘導した後に、siRNA を用いて STING もしくは cGAS のノックダウンを行った。その結果、cGAS-STING 経路の下流シグナルである TBK1 (TANK-binding kinase 1) および IRF3 (Interferon regulatory factor 3) のリン酸化量が大幅に減少し、老化細胞において IFN- β 、CXCL10、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8 などのさまざまな SASP 因子の遺伝子発現が抑制された (図 3a, b)。

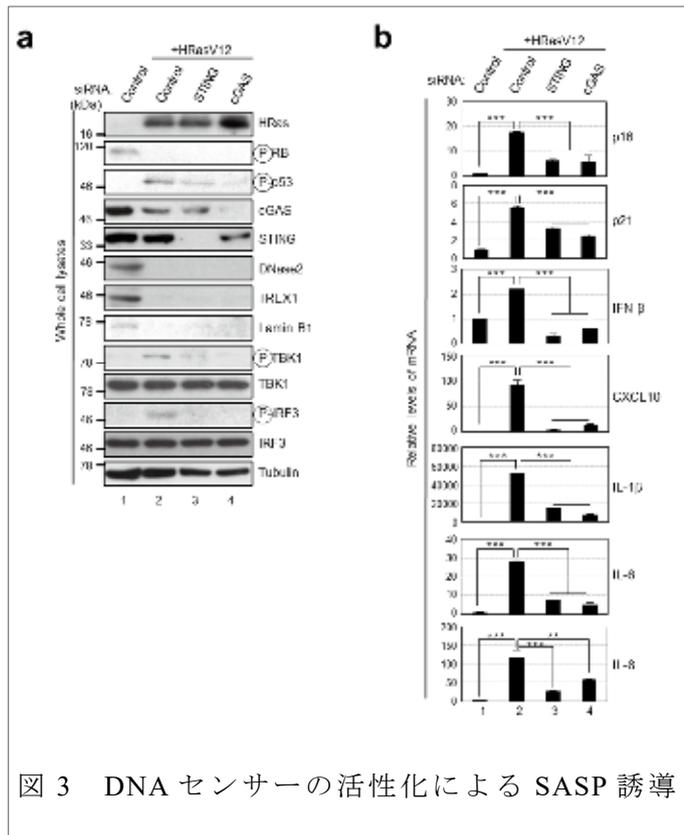


図 3 DNA センサーの活性化による SASP 誘導

この時、細胞周期停止のマーカである RB タンパク質の脱リン酸化は変化せず、細胞周期は停止したままであったことから、細胞老化の誘導自体に影響がないことを確認した (図 3a)。一方で、増殖中の正常線維芽細胞 (TIG-3 細胞) へ IFN- β タンパク質を添加すると、濃度依存的に CXCL10、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8 などの SASP 関連遺伝子の発現が誘導された。さらにこの条件下では、SASP 因子の遺伝子発現誘導に重要な転写因子である NF- κ B のリン酸化が観察されたことから、IFN- β の下流で一連の SASP 因子の発現が誘導されることが示唆された (図 4a, b)。これらの結果は、老化細胞における細胞質 DNA による細胞質 DNA センサー経路の活性化と IFN- β 誘導が、正常細胞における SASP 誘導に重要な役割を果たすことを示唆している。

これまでに得られた結果から、ゲノム由来の DNA 断片が SASP 因子の遺伝子発現誘導に機能することが明らかとなったが、老化細胞においてはなぜゲノム由来の二本鎖 DNA が細胞質に蓄積しているのか、その分子機構は未知であった。正常な細胞においては、余剰な DNA を分解する酵素群が細胞の恒常性維持に機能していることが知られている。特に細胞質における DNA 分解には、リソソームに局在する

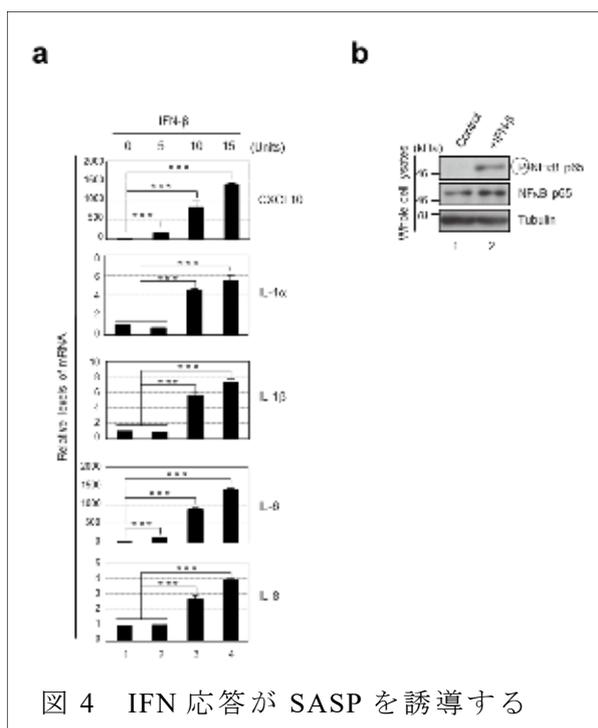


図 4 IFN 応答が SASP を誘導する

DNase2 と細胞質に存在する TREX1 (DNase3) が重要であることが知られている (Ahn and Barber, *Curr. Opin. Immunol.*, 2014)。そこで、これらの DNA 分解酵素に着目して解析を行った。その結果、老化細胞においては DNase2 と TREX1 の両方の蛋白質の発現が著しく低下していることを見出した (図 5a)。そこで、増殖中の正常線維芽細胞 (TIG-3 細胞) において siRNA による DNase2 および TREX1 のノックダウンを行ったところ、細胞質 DNA センサー経路の活性化とそれに続く IFN- β 誘導が観察された (図 5b, c)。一方で、ヒト正常線維芽細胞に DNase2 もしくは TREX1 を過剰発現させた後にがん遺伝子 (HRasV12) の活性化による細胞老化を誘導した場合には、細胞質におけるゲノム DNA の蓄積を大幅に低下させ、細胞質核酸センサー経路の下流のシグナルが減弱し、SASP 関連遺伝子の発現が顕著に抑制されることを見出した (data not shown)。これらの結果をまとめると、正常な細胞においては DNase2 と TREX1 が細胞質に存在するゲノム由来の DNA を分解し細胞質核酸センサー経路の活性化を防いでいるが、老化細胞においては DNase2 および TREX1 の発現が低下しているためにゲノム由来 DNA が細胞質に蓄積し、cGAS-STING 経路を活性化することで SASP 遺伝子の発現を誘導することが示唆された。

次に、上記の研究結果を *in vivo* で検証するために、SASP が発がんに関わることが証明されている肥満誘導性の肝がんマウスモデルで解析を行った。生後まもないマウスに HRasV12 に変異をもたらす化学物質である DMBA (7,12-dimethylbenz[a]anthracene) を塗布後に脂肪食を与えて肥満を誘導すると 100% 肝がんを発症することが報告されている。このマウスでは血清中で腸内細菌代謝産物であるデオキシコール酸の量が増加し、腸肝循環を介して肝星細胞 (HSC: Hepatic Stellate Cell) に細胞老化を誘導し、HSC から IL-1 β な

図 5 老化細胞では DNA 分解酵素の発現が低下し、IFN 応答を活性化している

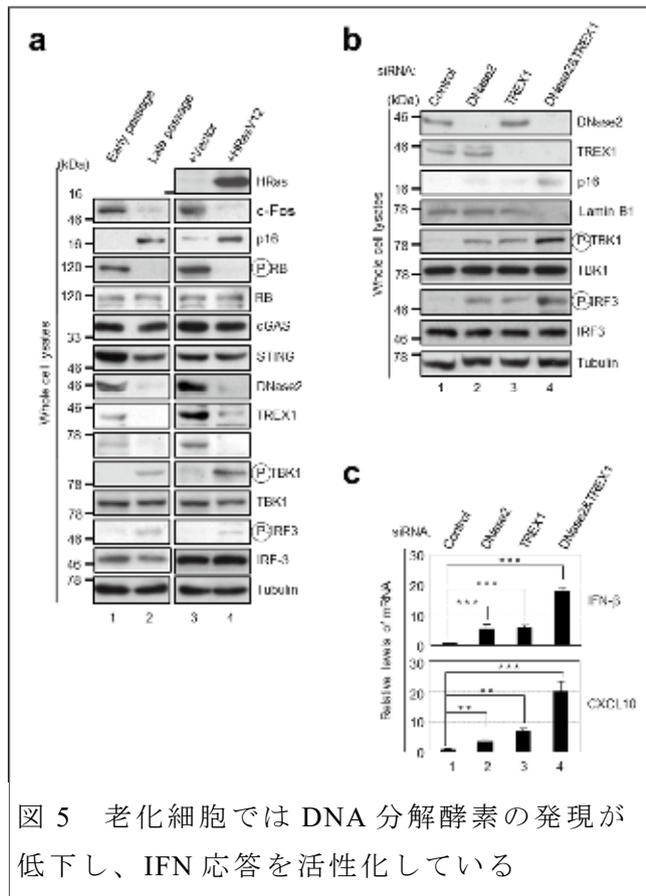


図 5 老化細胞では DNA 分解酵素の発現が低下し、IFN 応答を活性化している

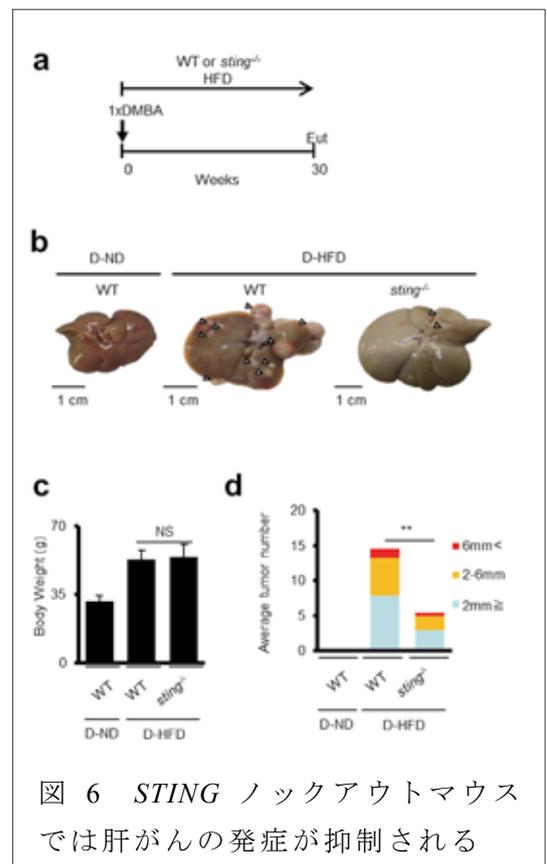
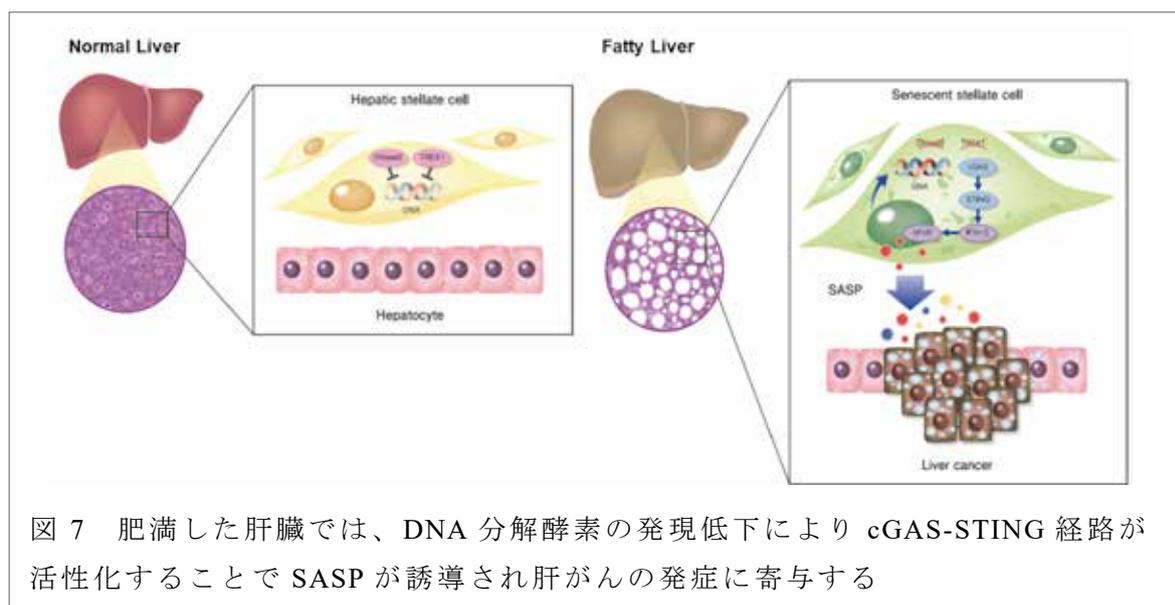


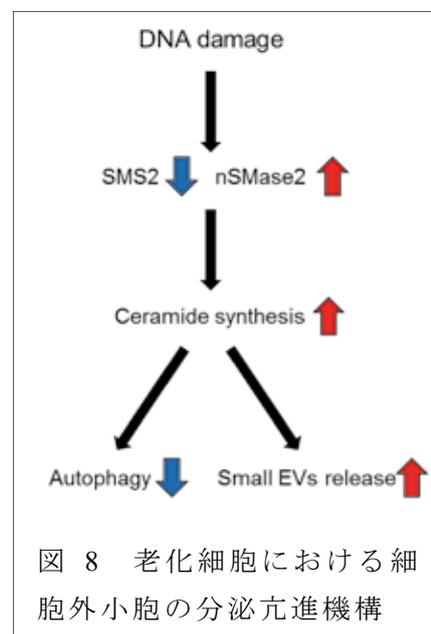
図 6 STING ノックアウトマウスでは肝がんの発症が抑制される

どの SASP 因子が分泌されることで、肝細胞がんの発生を促進することが証明されている (Yoshimoto *et al.*, *Nature*, 2013; Loo *et al.*, *Cancer Discovery*, 2018)。この肥満マウスモデルを用いて、高脂肪食を与えられた肥満マウスでは通常の食餌を与えたコントロールマウスと比較して、細胞老化が誘導された HSC における DNase2 と TREX1 の発現レベルが低下していることを見出した。しかし、DNA センサーである *STING* 遺伝子を欠損したマウスに肥満を誘導した場合には、HSC における SASP 因子の遺伝子発現が大幅に低下し、肝がんの発症頻度も減少することを観察した (図 6)。これらの結果は、肥満という生体に加わるストレスによって生体内で細胞老化が誘導された場合にも、DNase2 および TREX1 の発現低下と、cGAS-STING 経路の活性化を介して SASP 因子の遺伝子発現と発がんに重要な役割を果たしていることが強く示唆された (図 7) (Takahashi *et al.*, *Nature Communications*, 2018)。



さらに、SASP 因子の一つである細胞外小胞の分泌亢進に関わる経路の探索を行った結果、老化細胞では DNA 損傷応答の継続的な活性化により、スフィンゴミエリン合成酵素 2 (sphingomyelin synthase 2: SMS2) の発現が低下し中性スフィンゴミエリナーゼ (neutral sphingomyelinase 2: nSMase2) の発現が上昇することで、セラミド合成経路が活性化し細胞外小胞の産生と分泌が亢進していることを見出した (図 8)。また、セラミド合成経路の阻害剤をマウスに投与することで、生体内で細胞外小胞の分泌を抑制できることを報告した (Hitomi *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.*, 2020)。

このように本研究から、老化細胞では細胞外小胞の分泌が亢進しており、がん微小環境においてがん細胞の増殖を促進する SASP 因子の一つとして機能することが明らかとなった。そして、これらの研究成果をまとめて総説を執筆し発表した (Loo *et al.*, *Cancer Science*, 2020; Misawa *et al.*, *Geriatr. Gerontol. Int.*, 2020)。



IV 考察

本研究により、老化細胞においては微小核や出芽核のような核の形態異常がおり、ゲノム DNA が細胞質に存在することで、細胞質 DNA センサーである cGAS-STING 経路を活性化し、SASP 因子の遺伝子発現に働くことが明らかとなったが、時期を同じくして同様の結論を得た 3 本の論文が報告された。2017 年に Dou らは細胞老化で細胞質に蓄積したゲノム由来のクロマチンフラグメントが cGAS-STING 経路の活性化を介して SASP を誘導することを報告した (Dou *et al.*, *Nature*, 2017)。同様に、Glück らは酸化的ストレスによる細胞老化で細胞質に蓄積したクロマチンフラグメントが cGAS-STING 経路を介して SASP を誘導することを報告した (Glück *et al.*, *Nature Cell Biology*, 2017)。Yang らは cGAS が細胞老化の維持に重要であることを、cGAS ノックアウト MEF を用いた解析から証明した (Yang *et al.*, *PNAS*, 2017)。これらの一連の研究によっても、SASP 誘導における DNA センサー経路の重要性が証明されたが、老化細胞では何故細胞質にゲノム DNA が存在するのか、その分子メカニズムは依然不明であった。しかし本研究により、老化細胞においては DNA 分解酵素である DNase2 と TREX1 の発現低下によって、細胞質にゲノム DNA フラグメントが蓄積してしまうことを見出した。さらに、老化細胞における TREX1 の発現低下が cGAS-STING 経路の活性化と SASP の誘導に重要であることは最近、他のグループからも報告された (De Cecco *et al.*, *Nature*, 2019)。

近年、老化細胞を選択的に殺すことを目的とした Senolytic Drug の開発が盛んに進められている。しかし、本研究から明らかになった細胞質 DNA センサーを介した SASP 遺伝子の発現誘導経路は、肥満誘導性の肝がんの発症にも関与していることから、この経路を選択的に抑制することができれば SASP を抑制しがんの進展を抑えられると考えられる。近年、cGAS や STING に対する阻害剤が自然免疫応答の抑制に働くことが報告されていることから、今後、細胞質 DNA センサーを標的とした SASP の制御法の開発が期待される。さらに本研究では、老化細胞でセラミド合成経路の活性化によって細胞外小胞の分泌が亢進していることを新たに見出した。そこで、炎症性蛋白質や細胞外小胞といった有害な SASP 因子を標的とすることで、Senolytic Drug を用いずとも、がんの発症や進展を制御できることが示唆された。このように本研究から得られた成果をさらに発展させることで、今後新たな治療法の開発へと繋げることが期待される。

最後に、本研究を遂行するにあたり多大なるご支援を承りました、公益財団法人車両競技公益資金記念財団にこの場をお借りして深く感謝申し上げます。

V 研究成果の発表

1. **Takahashi, A.**, Loo, T.M., Okada, R., Kamachi, F., Watanabe, Y., Wakita, M., Watanabe, S., Kawamoto, S., Barber, G.N., Ohtani, N., Hara, E.
Downregulation of nuclear DNases plays key roles in the onset of SASP in senescent cells.
Nature Communications, 9, 1249 (2018)

2. **Takahashi, M.** and Hirota, T.
Dynamics of sister chromatids through the cell cycle: Together and apart.
Journal Cell Biology, 217(6), 1887-1889 (2018).
3. 宮田憲一、**高橋暁子**
細胞老化とがん化
腫瘍内科 21, 206-211 (2018)
4. 岡田 遼、**高橋暁子**
老化におけるエクソソーム
最新医学 73(9), 1177-1183 (2018)
5. **Takahashi, M.**, Hirota, T.
Folding the genome into mitotic chromosomes
Curr. Opin. Cell Biol., 60, 19-26 (2019)
6. 宮田憲一、**高橋暁子**
老化とがんにおける SASP の役割とメカニズム
臨床・免疫・アレルギー科 72, 214-219 (2019)
7. Loo, T.M., Miyata, K., Tanaka, Y., **Takahashi, A.**
Cellular senescence and senescence - associated secretory phenotype via the cGAS -
STING signaling pathway in cancer.
Cancer Science, 111, 304-311 (2020)
8. Hitomi, K., Okada, R., Loo, T.M., Miyata, K., **Takahashi, A.**
DNA damage regulates senescence-associated extracellular vesicle release via the
ceramide pathway to prevent excessive inflammatory responses.
International Journal of Molecular Sciences, 21(10), 3720 (2020)
9. Misawa, T., Tanaka, Y., Okada, R., **Takahashi, A.**
Function of small extracellular vesicles secreted from senescent cells as SASP factors.
Geriatrics & Gerontology International. 20(6), 539-546 (2020)
10. Nozawa, R., Yamamoto, T., **Takahashi, M.**, Tachiwana, H., Maruyama, R., Hitrota, T.,
Saito, N.
Nuclear microenvironment in cancer: control through liquid-liquid phase separation.
Cancer Science, in press.

新規ダウン症モデル、ダウン症遺伝子からのがん微小環境動態解明

<<研究の概要>>

ヒト 21 番染色体 (HSA21) が 3 本 (トリソミー) になることで発症するダウン症候群 (DS) は、日本では約 750 人に 1 人の割合で生じる最も高頻度な染色体異常症として知られる。現在の少子高齢化の社会情勢に応じ、高齢出産の増加が原因と予想される DS の出生率も増加傾向にあるが、未だ根本的な治療の道筋すらたっていないアンメットメディカルニーズの最たるものである。また、疫学的エビデンスから、若年性アルツハイマー病を含む神経疾患や白血病のリスクは高いにも関わらず、固形がん罹患率や進行性動脈硬化の危険性が同世代健常人に比べ際立って少ないことが知られている。特に、DS 患者の固形がん低罹患率に関しては、HSA21 遺伝子である *Dscr1* および *Ets2* の遺伝子量の増加が原因であることが報告されており、DSCR-1 に関しては腫瘍血管形成不全を介した抑制効果が示されている。しかし、ヒト DS ではがん種によって発生頻度が異なることが示されており、様々な固形がんでの検討および詳細解析は、将来の DS に対する創薬標的や緩和手法の顕在化のみならず、直接的な抗がん戦略に直結することも期待される。申請者らは、これまでに DS モデルマウスとして、HSA21 と相同なマウス 16 番染色体の一部を部分トリソミーとして持つ Ts1Cje マウスを樹立し解析を行っているが、本マウスは遺伝子操作中に偶発的に樹立されたことから一部の染色体がモノソミー化している。そこで、本研究では既存の突然変異由来の DS モデルに加え、CRIPR/Cas9 と Cre/LoxP 遺伝子編集技術を組み合わせた標的選定型新規 DS モデルを構築し、白血病や発がん、更には固形がん増殖遅延や転移防護における分子機構を包括的に解明することを目的とする。

本研究課題では、膠芽腫、胞巣状軟部肉腫、滑膜肉腫および白血病を対象疾患とし、Ts1Cje マウスを用いた研究を行った。また、並行して、新規 DS モデルマウスの作製に着手した。膠芽腫の発がんモデルでは、Ts1Cje マウスで腫瘍細胞増殖活性の低下が見られ、末梢単球の浸潤増加も見られた。一方、胞巣状軟部肉腫および滑膜肉腫の肉腫においては、Ts1Cje マウスへの移植によって野生型 (WT) と同様の増殖活性が見られた。白血病に関しては、DS 患者の急性巨核球性白血病で TRIB1 遺伝子の機能獲得型変異 (TRIB1 R107L) を発症促進因子候補として同定していることから、Ts1Cje マウスで変異 *Trib1* と野生型 *Trib1* による発症促進を検証した。結果、Ts1Cje マウスでの白血病発症促進効果が見られた。さらに、DS 遺伝子の *Erg* 遺伝子に着目し、*Erg* および類似遺伝子である *Fli1* によるのノックダウンにより腫瘍の進展を制御する内皮間葉移行が誘導されることや、*Erg* 遺伝子の 3 コピー化が炎症性細胞の脳浸潤を促進するといった知見を得たことから、DS でのがん進展における *Erg* 遺伝子の重要性を提示できたと考えている。最後に、新規モデルマウスの作製については難航しており、まだ完成まで至っていない。問題点が幾つか浮上してきたことから、ES 細胞での薬剤選択マーカーの入れ替えなどを行いながら引き続き行っていく予定である。

石原 慶一	京都薬科大学 病態生化学分野 准教授	ダウン症モデルマウスでの膠芽腫発育 に関する解析と血管形成解析
田中 美和	公益財団法人・がん研究会 発がん研究部 研究員	ダウン症モデルマウスを用いた骨軟部 肉腫形成と白血病発症に関する解析
南 敬	熊本大学 生命資源研究支援セ 教授	新規ダウン症モデルマウスの作製とダ ウン症因子の腫瘍血管動態解析

研究報告

I 研究目的

ダウン症候群 (DS) は、21 番染色体 (HSA21) が 3 本 (トリソミー) となることで生じる染色体異常症であり、700 人に 1 人と高頻度の出生率である。現在の少子高齢化の社会情勢に応じ、高齢出産の増加が原因と予想される DS の出生率も増加傾向にあるが、未だ根本的な治療の道筋すらたっていないアンメットメディカルニーズの最たるものである。また疫学的エビデンスから、若年性アルツハイマー病を含む神経疾患や白血病のリスクは高いにも関わらず、固形がん罹患率や進行性動脈硬化の危険性が同世代健常人に比べ際立って少ないことが知られている。本研究グループの構成員の石原らは、DS モデルマウスを用いた病態解析を行っており、これまでに DS モデルマウスの胎生期脳での細胞増殖の異常活性を見だし報告している [Ishihara et al., *Cereb Cortex* 20:1131-43 (2010); Isihara et al., *Neuroscience* 281:1-15 (2014)]。また、田中らは、発がん要因となる融合遺伝子の研究を継続して進め、原がん遺伝子 ETS 転写因子の融合変異である EWS-FLI1, EWS-ERG の形成を特徴とするユーイング肉腫のモデルを開発することに成功してきた [Tanaka et al., *J Clin Invest.* 124:3061-74 (2014)]。また、田中の所属するがん研究会発がん研究部では、DS 者血液を用いた解析から白血病関連遺伝子である *Trib1* の gain-of-function 変異を報告している [Yokoyama et al., *Blood* 119:2608-11 (2012)]。南らは、DS 関連分子である DSCR-1 が血管新生や炎症時に内皮細胞で一過性に強く誘導され、本因子を安定発現させることで VEGF-calcineurin-NFAT シグナルカスケードを強くフィードバック阻害し、病的な血管新生や炎症、がん増殖・転移が抑制され、DS 患者の固形がん罹患率減少や抗がん増殖・抗転移活性に深く寄与することを報告してきた [Baek et al., *Nature* 459:1126-30, 2009; Minami et al., *J Clin Invest.* 119:2257-70 (2009); Minami et al., *Cell Rep.* 4:709-23 (2013)]。一方 Reeves らは、大腸がん自然発がんモデル *Apc^{Min/+}* マウスと DS モデルマウスを用いた研究で、21 番染色体上の *Ets2* 遺伝子の 3 コピー体化が DS での低い発がん罹患率に重要であることを示しているが [Nature 2008]、他の *Trp53* および *Nf1* 遺伝子のヘテロ接合体である複雑ながんモデルでは DS モデルマウスによる予防効果は見られなかったと報告しており [Yang et al., *Cancer Res* 2011]。DS 遺伝子による低がん罹患の機構が非常に複雑であることが示唆される。そこで、本研究では、*Ts1Cje* マウスや新規の DS モデルマウスを作製し、発がんやがんの発育に関して検証し、この複雑性の一端の解明を試みた。

II 研究計画及び材料と方法

大規模疫学調査から、DS 者では固形がんの罹患率が低く、白血病の罹患率が高いことが

示されている。そこで、HSA21 上に位置する遺伝子の発現亢進が、発がんや悪性化にどのような影響を及ぼすのかを明らかにするため、既存の DS モデルマウス (Ts1Cje) と野生型マウス (WT) を用いて、膠芽腫、骨軟部肉腫および白血病の発症と悪性化の比較解析を行った。

また、既存の DS モデルマウスである Ts1Cje マウスを用いた研究に加え、新規のトリソミー領域を自在可変に設定できる DS モデルマウスの作製も同時並行して行った (図 1)。

(1) 脳腫瘍および肉腫の移植研究と発がん研究 (石原, 田中)

膠芽腫に関する解析は石原班が行った。既存 DS モデルマウスである Ts1Cje マウスおよびその同腹の WT マウスに、C57BL/6J (B6) マウスの新生仔の脳室に発がん遺伝子を導入することで発生させた膠芽腫から単離したがん細胞を移植し、膠芽腫の増殖に及ぼす DS 遺伝子の影響を調べた、また、発がんに関する検討では、Ts1Cje マウス新生仔の脳室に変異がん遺伝子を導入することで発がん誘導を行なった。ただし、発がん実験において、マウスの遺伝背景が B6 の場合、高確率で水頭症を発症し生後致死であることから、Ts1Cje マウスを 6 世代 BALB/c に戻し交配し、遺伝背景を変えたもので実験を行った。これらの実験により、DS モデルマウスにおける膠芽腫の増殖についての検討を行った。移植あるいは発がん実験で増殖する腫瘍は Luciferase 遺伝子を組み込んでおり、IVIS による検出が可能である。

骨軟部肉腫の解析は田中班が行い、胞巣状軟部肉腫と滑膜肉腫を対象疾患とした。胞巣状軟部肉腫は、血管形成が豊富で高転移能を有する若年発生のがんである。滑膜肉腫は、間葉系の肉腫細胞にしばしば上皮様細胞が混在し、高浸潤性で主に若年成人に発症する。本実験では、DS モデル Ts1Cje マウスと WT マウスの皮下に、田中らが樹立したマウス胞巣状軟部肉腫と滑膜肉腫を移植し、増殖能・血管形成能・転移能・遺伝子発現パターンを比較した。田中らはこれまでに、胞巣状軟部肉腫は転移の際に血管周皮細胞に包まれた状態で血中を移動して転移すること、胞巣状軟部肉腫の原因融合遺伝子 ASPL-TFE3 は造腫瘍能だけでなく血管形成能も有していること、ASPL-TFE3 の標的遺伝子である GPNMB は腫瘍の血管内侵襲に重要であることを明らかにしている [Tanaka M et al., *Cancer Res*, 77(4), 897-907 (2017)]。一方滑膜肉腫は、肉腫細胞がマイクロ RNA (miR-214) の発現亢進を介して cell-non autonomous にサイトカインの産生を惹起し腫瘍増殖を加速させることや、滑膜肉腫患者における miR-214 の発現と予後との相関を見出している [Tanaka M et al., *Cancers*, 12(2):324, (2020)]。このことから、Ts1Cje と WT マウスで腫瘍増殖能・血管形成能に差が認められた場合は、Ts1Cje と WT マウスの微小環境 (血管や間質細胞) と腫瘍を結ぶ相互因子を同定すると共に、微小環境の変化とがんの悪性化の評価を計画した。

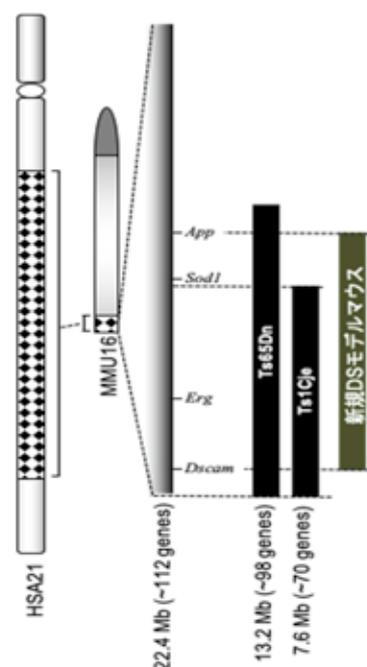


図 1. DS モデルマウスのトリソミー領域. ヒト 21 番染色体 (HSA21) と相同のマウス 16 番染色体 (MMU16) の一部を 3 コピー有するマウスである Ts65Dn や Ts1Cje マウスは既存の DS モデルマウスであるが、HSA21 以外の領域の重複や欠損などの欠点を有する。これら欠点をもたない新規 DS モデルを本研究にて作製を目指す。

(2) DS 脳発達遅滞における分子メカニズム解析と血管形態解析 (石原)

石原らは、Ts1Cje マウスの胎生期大脳皮質での神経新生の低下を見出しており [Ishihara et al., *Cereb Cortex* 20:1131-43 (2010)]、また最近、血管形成と神経新生は密接に関わっていることが明らかにされつつあることや、DS における腫瘍血管新生の抑制が報告されていることから [Baek et al., *Nature* 459:1126-30]、DS 脳発達遅滞における血管形成低下による神経新生低下を想定した。石原らは、本仮説の是非について、胎生 14.5 日目 (E14.5) の Ts1Cje マウス脳における発現変動転写産物をマイクロアレイによる同定を試み、その分子メカニズムにおける血管関連遺伝子の関与の可能性について調べた。また、胎生期 Ts1Cje マウス脳での血管形態について免疫染色により解析した。

(3) DS 遺伝子 Erg のがん低形成における役割検討 (南)

DS トリソミー領域にコードされる Erg 遺伝子において特にがんの特化した研究計画を加え、これら因子の活性化血管(腫瘍血管内皮)におけるゲノムワイドな発現制御への関与を詳細に解析することとした。DS 遺伝子 Erg は最も相同性の高い Fli1 とその違いについては殆ど解明されていない。血管内皮で共に発現することから、免疫沈降や組織染色が可能な ERG, FLI1 高機能抗体を探し、これら転写因子抗体での内皮細胞 HUVEC を用いた ChIP-seq とヒストンマップを組み合わせた。ERG/FLI1 結合領域がエピゲノム上開いているところに限定されているのか、あるいは閉じた領域をヒストン修飾因子と共役して空けていく pioneer ファクターの機能を有するのか検証する。また HUVEC を用い、これら ERG/FLI1 を siRNA にてノックダウンし、その DNA マイクロアレイからゲノムワイドに下流標的を探索する。得られた下流標的候補が逆にどの程度 ERG/FLI1 ロスによる EndMT 様事象を再現しうるのか解析し、がん微小環境における動態との関連を検証することとした。

(4) DS モデルマウスにおける白血病発症能の解析と DS 白血病で変異がある TRIB1 の解析 (田中)

Ts1Cje および WT マウスの骨髄から造血幹・前駆細胞を分離し、これまでに DS 白血病で変異を同定した Trib1 遺伝子(野生型及び機能獲得変異型)を、レトロウイルスベクターを用いて導入した。導入した骨髄細胞は、致死量の X 線を照射した Ts1Cje または WT マウスの骨髄に移植し、白血病の発症促進効果の検討と、網羅的遺伝子発現解析を行った(図 2)。我々は、白血病の発症促進因子

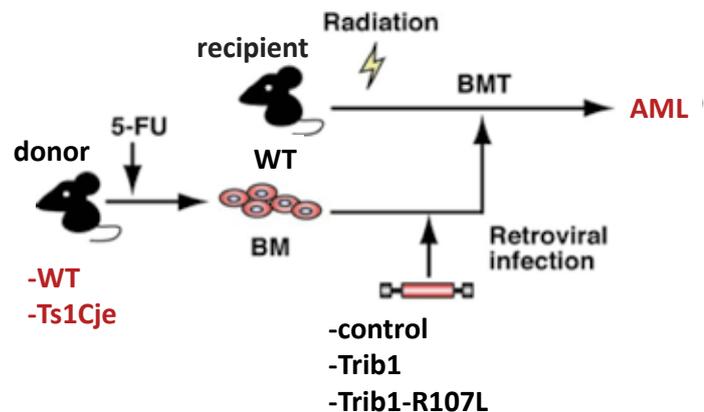


図2. DSモデルマウスを用いた白血病発症実験

として DS 患者の急性巨核球性白血病で TRIB1 遺伝子の機能獲得型変異 (TRIB1 R107L) を同定している。TRIB1 は白血病原因遺伝子であるが、R107L 変異により ERK リン酸化およ

び C/EBP α 分解を顕著に促進することで、急性骨髄性白血病 (AML) の発症を加速させる [Yokoyama et al., *Blood*, 119(11):2608-11, (2012)]. さらに、Trib1 の過剰発現により、細胞増殖や細胞周期の亢進と *in vivo* での白血病発症速度の促進を認め、アレイ解析と ChIP-seq 解析から、Trib1 は Hoxa9 の転写制御を修飾し、その結果トリソミー関連遺伝子である Erg の発現上昇を来たして、白血病の悪性化に繋がることを見出している [Yoshino S et al, 投稿中].

(5) 新規 DS モデルマウスの作製 (南)

トリソミー領域を自在可変に設定できる新規 DS モデルマウスの構築を計画した (図 3)。先ず始めに DS 領域での 5' 端としてアミロイド β 前駆体 (App) 遺伝子、3' 端として Dscam 遺伝子までの約 13 メガベースをトリソミー化することを狙い、これら目的領域の両アレルに順番に LoxP 配列を組み込んだ ES 細胞を樹立後、Cre タンパクを導入し片側アレルに標的 locus の diploid 化を行った後にマウスを個体化、更に WT マウスと交配することでトリソミーとモノソミーモデルマウスを最終的に同時に作出する計画とした。

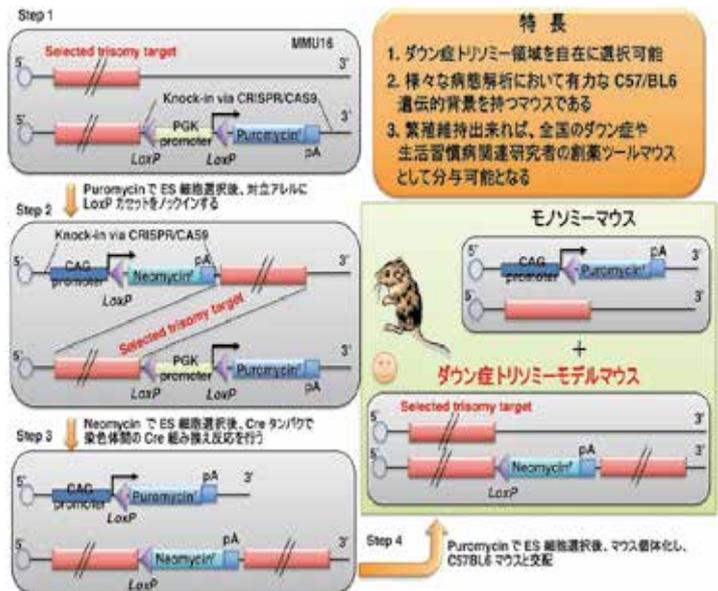


図 3. 新規 DS モデルマウスの作製計画.

III 研究成果

(1) 脳腫瘍および肉腫の移植研究と発がん研究 (石原, 田中)

石原らは、固形がんとして膠芽腫を対象疾患とした。B6 マウスの新生仔の脳室に変異がん抑制遺伝子を導入することで作製した脳腫瘍から単離した無限増殖能を有する膠芽腫細胞を WT (n=4) および Ts1Cje マウス (n=4) の線条体に移植し、DS 遺伝子の膠芽腫成長に及ぼす影響を検討したところ、がんの成長に顕著な差は認められなかったが、生育した膠芽腫内に漏出した末梢由来の単球の浸潤が Ts1Cje マウスで多かった (図 4)。また、Ts1Cje マウスの新生仔脳室に変異がん抑制遺伝子を導入することで、発がんにおける DS 遺伝子の影響を調べたところ、Ts1Cje マウスでは発がん率が低く生育も遅延した (図 5)。また、血管の形態においては、両遺伝型間での差は

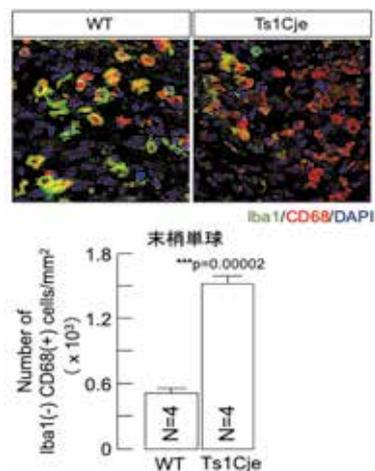


図 4. Ts1Cje マウスでの活性化末梢単球の浸潤増加. WT および Ts1Cje マウスに膠芽腫幹細胞を移植し、末梢単球 (赤) とマイクログリア (緑) を検出した。

見られなかったが、前述の移植実験結果と同様、Ts1Cje マウスに発生した膠芽腫では末梢からの単球の浸潤が多い結果であった。今後は、浸潤した単球由来のマクロファージ（腫瘍関連マクロファージ， TAM）が M1 型であるか M2 型であるかを精査し、DS 遺伝子による TAM の極性化制御について検証する。

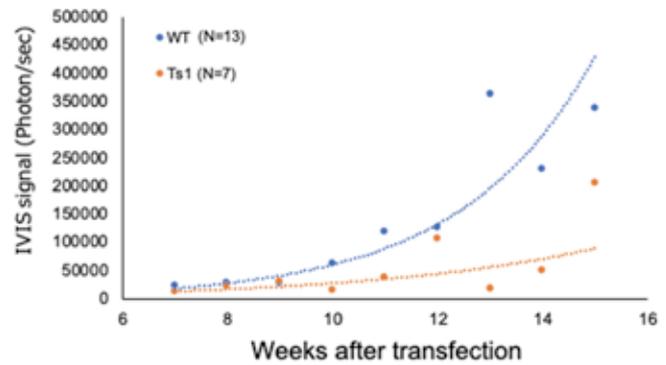


図 5. Ts1Cje マウスでの膠芽腫増殖の遅延

田中らは、胞巣状軟部肉腫と滑膜肉腫を対象疾患とし、Ts1Cje と WT マウスに移植して発症と悪性を比較した。Ts1Cje マウス (n=22) 及び WT マウス (n=22) の皮下に胞巣状軟部肉腫細胞を 10^6 個移植した結果、増殖速度・病理組織像ともに明らかな差は見られなかった (図 6 左)。腫瘍内血管形成は、CD31 (血管内皮) と α -SMA (血管周皮) 抗体を用いて免疫組織化学染色を行い、腫瘍面積あたりの陽性率を計測した結果、両者に有意な差は認められなかった (図 6 右)。さらに、マイクロアレイ解析では、Ts1Cje 及び WT マウスの胞巣状軟部肉腫初期病変の遺伝子発現の変化を調べた。両者とも共通してサイトカイン関連遺伝子の発現亢進が見られたものの、Ts1Cje と WT 間の違いは見出せなかった。一方、Ts1Cje マウス (n=8) 及び WT マウス (n=8) への滑膜肉腫細胞移植実験においても、腫瘍増殖能に有意な差は認められなかった (図 7)。

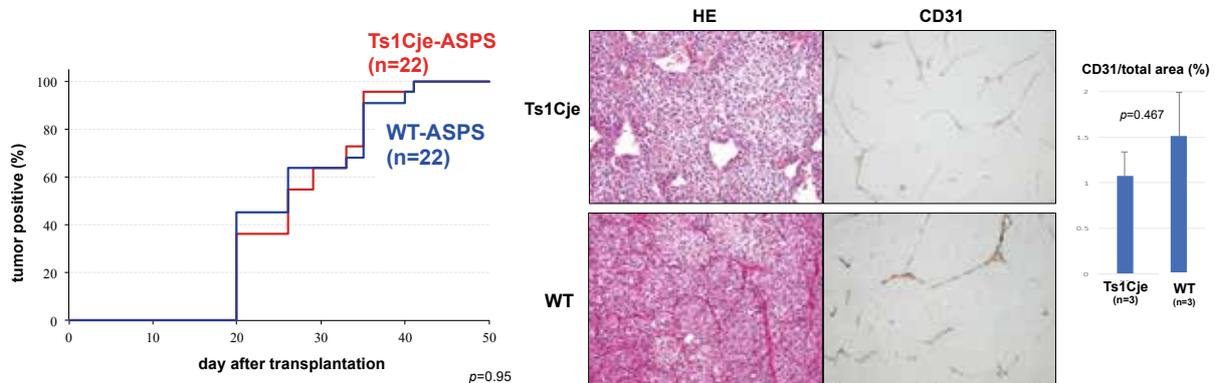


図6. 胞巣状軟部肉腫 (ASPS) の皮下移植実験と血管形成の評価

(2) DS 脳発達遅滞における分子メカニズム解析と血管形態解析 (石原)

胎生 14.5 日目 (E14.5) の Ts1Cje マウス脳における発現変動転写産物をマイクロアレイにより解析した。その結果、炎症性細胞のマーカー分子の増加を見出し、フローサイトメトリー解析によって炎症性細胞の浸潤が Ts1Cje マウス胎児脳で増加していることを明らかとした。

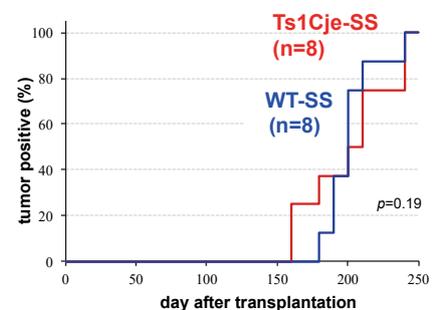


図7. 滑膜肉腫 (SS) の皮下移植実験

この炎症性細胞の増加の原因 DS 遺伝子に関しては、既に炎症に関連する転写因子とし

て知られている ETS ファミリーの *Ets2* および *Erg* 遺伝子と推定した。原因遺伝子であるかの検討は、まずこれらの欠損マウスを準備し、そのヘテロ欠損マウスと Ts1Cje マウスを交配させることで得た各 ETS ファミリー遺伝子のみが正常の 2 コピーとなった Ts1Cje マウスの炎症関連遺伝子の発現増加の改善によって判断した。その結果、*Ets2* ではなく *Erg* 遺伝子が 3 コピーとなることが、炎症遺伝子の増加を引き起こしていることが明らかとなり (図 8)、Ts1Cje-*Erg*(+/+/mld2) マウスでは炎症細胞の浸潤も抑制されていた。また、この Ts1Cje-*Erg*(+/+/mld2) マウスでは、Ts1Cje マウスでみられた胎生期大脳皮質における神経新生の減少が改善されたことから、*Erg* の 3 コピー化が神経新生減少の原因であることが明らかとなった。*Erg* は血管内皮細胞で発現していることから *Erg* の 3 コピー化が Ts1Cje マウスにおける血管形成の異常を引き起こし、神経新生減少が惹起される可能性を考え、Ts1Cje マウス胎仔脳での血管形態について検証したが、WT と変わらなかった。今後は、血管の機能の違い、すなわち Ts1Cje マウスの血管の方が炎症性細胞をより脳内に漏出させることを想定した血管機能の比較を行う必要がある。

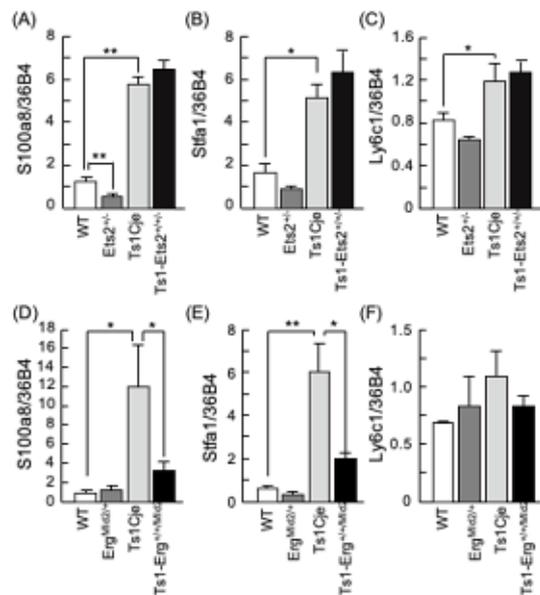


図 8. *Ets2* ではなく *Erg* 遺伝子の 3 コピー化による Ts1Cje 胎仔脳での炎症関連遺伝子の発現増加。Ets2 (A-C) あるいは *Erg* 遺伝子 (D-F) のみが 2 コピーとなった Ts1Cje マウス (Ts1Cje-*Ets2*^{+/+/-} および Ts1Cje-*Erg*^{+/+/Mld2}) での炎症関連遺伝子の発現を real time RT-PCR 法にて定量した。

(3) DS 遺伝子 *Erg* のがん低形成における役割検討 (南)

3-1 内皮細胞での ERG と FLI1 の共通のノックダウンは EndMT を引き起こした。

Erg 遺伝子において特にがんの特化した研究計画を加え、これら因子の活性化血管(腫瘍血管内皮)におけるゲノムワイドな発現制御への関与を詳細に解析した。まず、siRNA を用い、HUVEC に ERG, FLI1 単独及び共通のノックダウンからゲノムワイド解析を行った。ERG は内皮マーカーとしてもよく使われており、ノックダウンにより間葉系マーカーの発現亢進と内皮マーカー遺伝子の減少、内皮炎症関連遺伝子の発現上昇を引き起こす一方、FLI1 ノックダウンだけでは CD31 や VE-cadherin などの幾つかの内皮マーカーの発現減少以外有意な遺伝子の変化は認められない結果を得た。興味深いことに ERG/FLI1 の共通のノックダウンでは、ERG 単独ノックダウンよりも顕著な EndMT を引き起こし、ほぼ全ての内皮マーカーの喪失と EMT, EndMT を引き起こす転写因子 SNAI2 の発現亢進、ERG ノックダウンでみられた内皮での炎症関連遺伝子とは異なる通常内皮では発現しない炎症関連遺伝子 (図 9 中クラスター3-1) の発現増加が初期(ノックダウン 3 日目)にみられ、EndMT が完結する時期、ノックダウン 7 日目では多くの間葉系マーカーの発現亢進が認められた (図 9)。発現クラスターにおいて、GO 解析を行ったところ、ERG/FLI1 siRNA

により最も発現低下するもの（クラスター1）は血管形成、血管新生に関する内皮マーカーで専有しており、逆に ERG/FLI1 siRNA により最も発現上昇するもの（クラスター3-2）では創傷応答や感染防護、炎症などに関する間葉系遺伝子が有意に濃縮される結果となった。また EndMT の兆候は細胞染色や FACS データでも確認された。

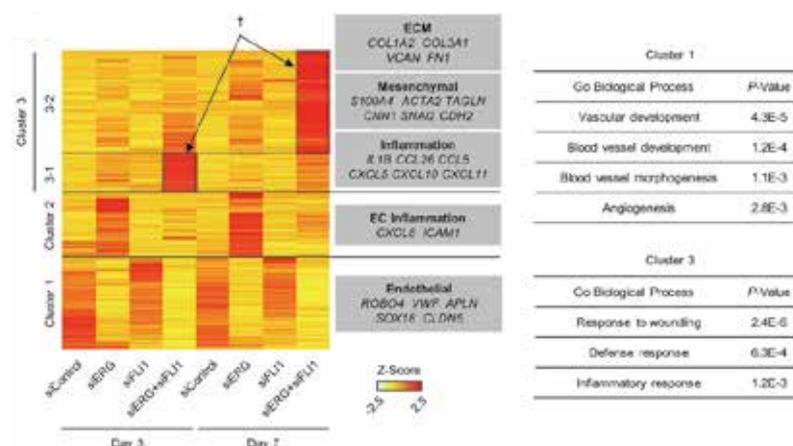


図 9. Erg および/あるいは FLI1 をノックダウンした HUVEC のゲノムワイド解析

3-2 内皮細胞での ERG や FLI1 は共に overlap した Ets 結合領域に結合し、内皮特異的発現様式を有する遺伝子発現促進に寄与した。

ERG, FLI1 抗体を用いた ChIP-seq を各々2回行い、ERG 濃縮領域 77,467 ピークと FLI1 濃縮領域 47,002 ピークを得た。これらのうち多く（45,767 ピーク）は overlap が認められ、転写開始点（TSS）から 1Mb 以内の top 2000 ピークを基にゲノム上では遺伝子間イントロン領域、遠位遺伝子間領域、プロモーター領域の順に濃縮が認められた。また結合ピークを有する遺伝子をもとに GO 解析を進めると、ERG/FLI1 siRNA での発現アレイと同様に、血管形成・血管新生に関わる内皮発現遺伝子が有意に存在する結果となった。次に内皮でのヒストンプロファイルと合わせて観察したところ、ERG/FLI1 共に H3K4me3 プロモーターマークや H3K27Ac エンハンサーマークの濃縮している転写活性可能なところに結合しており、H3K27me3 サイレンサーマークの濃縮している抑制クロマチン領域には結合していない結果となった。また ERG/FLI1 siRNA 処理により、活性化クロマチンにおける H3K4me3, H3K27Ac の濃縮ピークが有意に減少することから、内皮を規定する転写因子 ERG と FLI1 は共に転写可能なクロマチンに結合し、その内皮マーカー遺伝子の発現上昇に寄与するが、それ自身転写が抑制されたクロマチンに結合し、クロマチン状態を変換させうる pioneer 因子にはなり得ないこと、受動的な転写活性化因子であることが判明した。

3-3 ERG, FLI1 の下流標的である SMAD1、マイクロ RNA (miR-216) は ERG/FLI1 欠損依存性の EndMT を防護した。

ではその ERG/FLI1 の下流標的で重要な遺伝子は存在するのか？我々はまず①ERG/FLI1 の結合領域が遺伝子制御領域に認められること②その結合ピークがエンハンサーマーク H3K27Ac と overlap していること③si-ERG/FLI1 にてその H3K27Ac の濃縮量が減少すること④si-ERG/FLI1 にて発現量が 70%以上減少すること⑤si-ERG/FLI1 での発現減少量が各々の si-RNA 単独処理に比べ有意に大きいこと、これら 5つのクライテリアで絞り込み、293 個の遺伝子を同定した。このうち SMAD1 は EMT, EndMT に強く関与する TGF-β2 や calponin1 の発現制御領域に結合し、その SMAD1 発現抑制によってこれら EndMT が促進する結果を得た。但し、本解析中に Anna Randi 博士らにより、BMP-SMAD1 経路が TGF-β-SMAD3 経路の EndMT を防護する報告がなされた (Dufton, N. et. al Nat. Commun.

2017)。そこで、我々は新たな標的として miRNA に着目した。上述 5 つのクライテリアに miRNA のターゲット scan のデータも交え、miR-216 が最も ERG/FLI1 の下流標的になり得ることを見出した。miR-216 は同じく内皮特異的発現を有する EGFL7 遺伝子のイントロン 7 に存在する non-code RNA である。miR-216 mimic を加えることで、ERG/FLI1 ノックダウンによる VE-cadherin や CD31 の減少効果や間葉系マーカーである ACTA2, COL1A1, SNAI2 の発現上昇を部分的に阻害し、かつ、miR-216 inhibitor の投与は VE-cadherin の減少や COL1A1, SNAI2 の発現上昇をもたらした。これらのことから ERG/FLI1 の下流標的である miR-216 がその部分的な EndMT に少なくとも有意に関与することが判明した。

3-4 ERG, FLI1 はがん微小環境において血管内皮での発現が低下した。

がん微小環境での EndMT についてさらに検証するため、実際の腫瘍環境下で腫瘍血管内皮に発現する ERG, FLI1 が正常血管内皮に比べその発現量が変化するか免疫染色して確認した。その結果、皮膚での正常血管内皮では ERG, FLI1 共に内皮層の核内に連続して発現するのに対し、B16F10 メラノーマにおいては、極めて内皮での発現が低下しており、patchy に内皮核内に染色像がみられるだけであった。内皮細胞全体にて定量した結果でも 50%以上の有意な低下が認められた(図 10)。また B16 メラノーマや E0771 乳がん細胞、3LL 肺がん細胞での培養上清を用いた condition media を加えることでも ERG, FLI1 の発現量は低下すること、そのがん由来の condition media により ERG/FLI1 欠損のマーカー遺伝子である ACTA2, COL1A1, TAGLN, SNAI2 の発現が有意に上昇することが明らかとなった。このことから、がん微小環境下、血管内皮上での ERG, FLI1 が発現低下し、EndMT 様の状態を引き起こすことが示唆された。

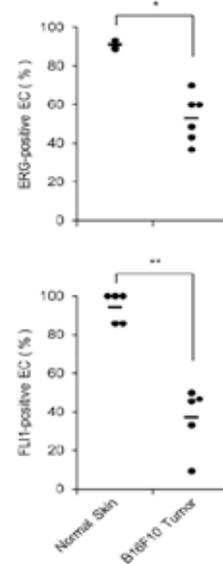


図 10. がん微小環境での ERG および FLI1 の発現減少

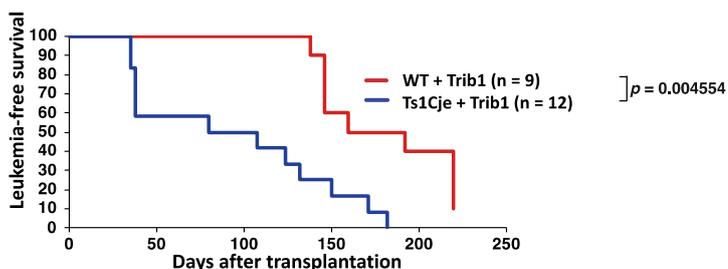
次にがん転移において原発巣での血管状態がどのように影響するのか、EndMT 自体が転移を促進する結果となるのか、それを防護する mouse Erg 及び Fli1 の内皮特異的安定発現マウスの作製に取り組んだ。そこで Erg/Fli1 の cDNA を Rosa locus に Flox-stop-Flox を導入した場所の下流に guide RNA を用いて knock-in したマウスを作製することとした。Fli1 は未完成であるが、Erg は VE-cadherin promoter-CreERT2 を交配し、タモキシフェン投与することで内皮での mRNA やタンパクが内因性発現の 8 倍増大することを確認した。現在 COVID-19 のためマウス解析が滞っているが、解消してから今後研究を展開していく予定にしている。

(4) DS モデルマウスにおける白血病発症能の解析と DS 白血病で変異がある TRIB1 の解析 (田中)

急性骨髄性白血病(AML)の解析は、ドナーとなる Ts1Cje 及び WT マウスの骨髄細胞に Trib1 を導入して、レシピエントの WT マウスに骨髄移植した。その結果、Ts1Cje/Trib1(n=9) が WT/Trib1(n=12)と比べて有意に AML の発症を促進した(p<0.01)。さらに、Ts1Cje 及び WT マウス骨髄細胞に Trib1 R107L を導入して、レシピエントの WT マウスに移植すると、

Ts1Cje/Trib1 R107L (n=11) が WT/Trib1 R107L (n=9) と比べて有意に AML の発症を促進した ($p < 0.01$) (図 11)。次に Ts1Cje/Trib1 と WT/Trib1 の AML 細胞について遺伝子発現プロファイルを比較した。Gene Set enrichment 解析では、微小管のチューブリン複合体合成に必要な遺伝子群と相関が見られた。一方、WT/Trib1 と比べて Ts1Cje/Trib1 の AML で、アルデヒド脱水素

Trib1



Trib1 R107L

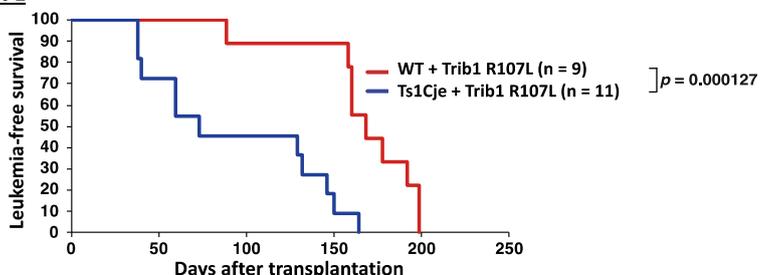


図11. Ts1Cjeマウスにおける白血病発症能の比較

酵素 2 型の Aldh2 とポリコームタンパク質の Suz12 の顕著な発現低下が見られた。

(5) 新規 DS モデルマウス樹立 (南)

新規 DS モデルマウス開発では、開始 2 年目までにステップ 3 まで到達した B6 由来の組み換え ES 細胞を樹立できたが、この ES line 4 独立クローン全て個体化に至らなかった。ES 培養の継代数や CRISPR/Cas9 系を繰り返すことでの ES 細胞のダメージが原因と判断した。そこで、当初の予定通り 3' 側に loxP を導入したマウスを得、かつ本マウスから組み換え ES 細胞を再度樹立した。しかし、その後 Neomycin での最適条件が見出せず、5' 側の loxP 導入が滞る結果となった。この用いた B6 由来 ES 細胞が特殊で Puromycin での薬剤選択スクリーニングには有効であるが、Neomycin を用いた選択には実績がないことが判明し、元々の ES 細胞として TT1 など Neomycin 耐性スクリーニングに実績のある系でやり直した方がいい結論に至った。現在 COVID19 の影響を受け、熊大マウス施設が理研同様閉じているので、回復を見越して再開する予定である。

IV 考察

DS は、人類遺伝学上最も高頻度に生じる染色体疾患であるが、その病態は早期アルツハイマーなどの神経疾患だけでなく、血球系の一過性増殖 (TAM) から一部は巨核芽球性白血病 (DS-AMKL) を引き起こす造血系での際だった異常を呈すること、心臓中隔欠損などの循環器系での新生児異常や胎児期でのリンパ浮腫など広範に知られている。一方、新生児や小児期での医療の格段の進歩に伴い、DS 患者の長寿化が進行した結果、成人期においては極めて興味深い固形がんへの抵抗性や高血圧や動脈硬化が進行しないといった血管病に対する新たな知見が多く得られてきた。また小児期で極めて高い白血病の罹患リスクが成人期以降では同世代健常人に比べ強い抵抗性をもつ非線形的なデータも報告されている。本研究ではグループ型研究として、固形がんとは異なる特徴を有する軟部腫瘍でのがん増殖との関与や、血球系と血管内皮細胞において異なる機能をもつ DS 転写因子 ERG の存在が明らかとなった。DS 患者では多くの臓器において上皮由来の腺がん・扁平上皮がんでの罹

がん細胞における亜鉛シグナリングの役割解明：対がん創薬を目指して

患率が健常人に比べ下がっている一方、生殖器がんでは逆に DS のほうが悪性化傾向にある。今回、腫瘍内の豊富な血管網構築を有する膠芽腫細胞や胞巣状軟部肉腫細胞と、IL8 などのサイトカインの産生を促す滑膜肉腫細胞について検証を行ったが、膠芽腫においてのみその増殖抑制が見られた。

ERG は EWS と融合することで前立腺がんなどにおいて強いエピゲノムスイッチ機能と転写活性化能をもち、がん悪性化に関与することが知られている。しかし内皮細胞の環境下では ERG はマスター転写因子として内皮規定性に関わり、がん微小環境下では炎症性サイトカインなどの液性因子の影響を受け、腫瘍血管内皮での発現が下がり、それが EndMT に直結することが明らかとなった。更に内皮では DS での病的血管新生を抑制することがモデルマウスでも示されており (Reynolds, L. et.al. Nature 2012)、がんに対する保護因子として結論づけられる。他方、血球増殖や血液を介した炎症に ERG は促進的に働く報告も複数出てきており、この機能的相違は ERG に結合する複合体やエピゲノム修飾因子によるものである可能性がある。実際内皮細胞で ERG は FLI1 と直接相互作用を持つ一方、パイオニア因子としてエピゲノム環境を変化させうる能力を示さなかった。ERG 自体での転写活性化能は高くなく、融合遺伝子などの機能獲得変化が血球系ではどのようになるのか、ヒストンマップなどを組み合わせ、今後詳細に解明していくことが重要と思われる。

また、本研究において Erg 遺伝子が 3 コピーになることが、正常な脳形成に必要な神経新生を抑制することが明らかとなった。ERG は血管内皮細胞や造血幹細胞での発現が確認されていること、また、神経新生において血管が重要な役割を果たしていることが明らかになりつつあることから、ERG の増加による血管形態異常を介した神経新生減少を考えたが、Ts1Cje マウスでの血管形態は WT マウスと同様であった。今後は、血管機能の異常について検証し、本仮説について明らかにしたいと考えている。

本研究では、DS 患者における白血病の高発症リスクと、固形がんの低罹患率の理由を明らかにすることを目標とし、特に、HSA21 がトリソミーになることで生じる遺伝子の発現変化が発がんや悪性化にどのような影響を及ぼすのかに着目した。固形がんの解析には、腫瘍内の豊富な血管網構築を有する胞巣状軟部肉腫細胞と、IL8 などのサイトカインの産生を促す滑膜肉腫細胞について、DS マウス (Ts1Cje) をレシピエントとして移植実験を行い、*in vivo* での腫瘍増殖能の比較解析を行った。HSA21 には、がん抑制遺伝子や血管形成を負に制御する遺伝子が存在しているため、Ts1Cje マウスでの発症の遅延や血管新生の阻害を期待したが、胞巣状軟部肉腫と滑膜肉腫に関しては WT とほぼ変わらない結果であった。今後は、南らが開発中の Ts1Cje マウスの欠点を克服した新規の DS モデルマウスを利用し肉腫での検証に取り組みたい。白血病の解析では、白血病原因遺伝子 (Trib1) を骨髄移植した Ts1Cje マウスで有意に白血病発症促進効果が認められた。このことは、Ts1Cje マウスの造血幹/前駆細胞が、Trib1 の白血病形成能に対して高い感受性を持っていることや、Trib1 が改変する C/EBP α 転写機能や MAPK シグナルに対してトリソミー遺伝子 (群) が何らかの協調作用を有していることを示唆している。Ts1Cje/Trib1 白血病の遺伝子発現解析では、アルデヒド脱水素酵素 2 型の Aldh2 と、ポリコームタンパク質の Suz12 の顕著な発現低下がみられた。Garaycoechea らは、Aldh2 と Fanconi 貧血の原因遺伝子の一つ Fancd2 のダブルノックアウト Aldh2^{-/-}Fancd2^{-/-}マウスが、ヒト Fanconi 疾患をよく反映し、特に造血幹細胞において DNA 損傷の集積やアポトーシス活性の上昇が観察され、全骨髄細胞の減少

や、加齢に伴う白血病の誘発を報告している[Garaycoechea JI et al., *Nature* 2012]。また、吉田らの報告では、DS 白血病 (DS-AMKL) の発症に、コヒーシン関連遺伝子・CTCF・ポリコームを含むエピジェネティクス関連遺伝子の深い関わりを明らかにしている[Yoshida K et al., *Nat Genet* 2013]。今後は、Trib1 によるヒストン修飾の変化と、Aldh2 や Suz12 のノックアウトや過剰発現がもたらす白血病発症や悪性化への影響についても明らかにしたい。

V 研究成果の発表

[学術論文](謝辞掲載分)

1. Nagai N, Ohguchi H, Nakaki R, Matsumura Y, Kanki Y, Sakai J, Aburatani H, Minami T. Downregulation of ERG and FLI1 Expression in Endothelial Cells Triggers Endothelial-To-Mesenchymal Transition. *PLoS. Genet.* 14, e1007826 (2018).
2. 田中美和, 中村卓郎. 「肉腫モデルの創出と発がん過程の解析」, 医学のあゆみ: 肉腫治療の最前線, 271:327-333 (2019)
3. Ishihara K, Shimizu R, Takata K, Kawashita E, Amano K, Shimohata A, Low D, Nabe T, Sago H, Alexander WS, Ginhoux F, Yamakawa K, Akiba S. Perturbation of the Immune Cells and Prenatal Neurogenesis by the Triplication of the Erg Gene in Mouse Models of Down Syndrome. *Brain Pathol.* 30, 75-91 (2020).

[学会発表]

1. 第 41 回日本分子生物学会年会 (2018 年) ワークショップ「がん微小環境の制御に関わるトリソミー関連遺伝子」南・田中が企画開催
2. 田中美和 「Down syndrome model to explore the mechanisms of tumorigenesis and malignant progression」ワークショップ 第 41 回日本分子生物学会年会 (2018 年)
3. 石原慶一, 清水涼平, 河下映里, Warren S Alexander, 左合治彦, 山川和弘, 秋葉 聡 「ダウン症モデルマウスにおける炎症性細胞数異常および大脳皮質発達遅延とその原因遺伝子の同定」ワークショップ 第 41 回日本分子生物学会年会 (2018 年)
4. 石原慶一 「ダウン症モデルマウスにおける血管新生調節転写因子の 3 コピー化による胎生期ニューロン新生異常」シンポジウム 日本薬学会第 139 年会 (2019 年)

所属機関：徳島文理大学薬学部

研究者名：深田俊幸

研究の概要

亜鉛は生命維持に必須であり、亜鉛の摂取量の低下は免疫不全・皮膚脆弱化・成長遅延・骨粗鬆症等を主訴とする亜鉛欠乏症をもたらす。世界で約 20 億人が亜鉛欠乏症に罹患しているとされ、特に乳児期の亜鉛欠乏は重篤な成長遅延や易感染を初めとする異常をもたらし、毎年約 80 万人の子供が落命している。一方、高齢者では全身の亜鉛量が低下すること、この加齢を伴う亜鉛減少が骨粗鬆症・関節リウマチ・二型糖尿病・アルツハイマー型認知症などの病態形成に関与すること、これらの治療に供するキレート作用を持つ医薬品の併用によって、亜鉛欠乏が相乗的に惹起されることが明らかにされている。

近年、不規則な生活や偏ったダイエットによっても亜鉛欠乏がもたらされることが判明し、亜鉛の恒常性異常と多様な病気の発症には密接な関係があるとの認識が形成されつつある。しかしながら、亜鉛がどのように健康維持と病態形成に関わるのか、その詳細な分子メカニズムはまだ明らかにされていない。特にがんは、現代人の QOL に大きな影響を及ぼす。超高齢化社会を迎えている日本では、がん病態の分子機序の解明と、その分子機序を調整して改善することができる治療戦略の開発：すなわち対がん創薬研究に注目が集まっている。

生体における亜鉛の恒常性は、亜鉛輸送体膜タンパク質（亜鉛トランスポーター）が制御している。代表研究者らの研究グループは、亜鉛トランスポーターが輸送する亜鉛イオンがシグナル因子（亜鉛シグナル）として作用すること、この亜鉛シグナルが健康と病気に深く関わることを明らかにした。最近では、多様ながん組織に亜鉛トランスポーターが多く発現していることを見出している。これらの先行研究に基づき、亜鉛トランスポーターに着目してがんにおけるその意義を解明し、亜鉛シグナルを制御することに基づく抗がん剤を開発することによって、がん生物学の理解とその治療戦略に新たな知見をもたらすことを、本研究の目標として設定した。

今回の一連の研究によって、亜鉛シグナルの上皮性組織の恒常性における役割、がん細胞における意義、亜鉛トランスポーター発現細胞の系譜解析に適用可能なマウスモデルの構築等に関する成果を得た。さらに、関連研究としてがん悪液質における亜鉛シグナルの関与も見出した。当該研究で得られた知見と資材をさらに当該研究に用いることによって、がん病態の理解と、亜鉛トランスポーターおよび亜鉛シグナルの制御に基づく対がん創薬研究に新たな展開がもたらされると考えている。

共同研究者の氏名・所属機関名

深田 俊幸：徳島文理大学薬学部	教授	研究統括（代表研究者）
井村 穰二：富山大学大学院	教授	腫瘍病理学的研究
森山 光彦：日本大学医学部	教授	消化器内科学・腫瘍学的研究
美島 健二：昭和大学歯学部	教授	分子病理学的研究
入江 太郎：岩手医科大学	教授	分子病理学的研究
浅川 義範：徳島文理大学	教授	創薬探索研究
姫野誠一郎：徳島文理大学薬学部	教授	細胞生物学的研究
葛原 隆：徳島文理大学薬学部	教授	細胞生物学的研究
木村 徹：杏林大学医学部	講師	分子生物学的研究
原 貴史：徳島文理大学薬学部	講師	薬理学的研究
土方 敦司：長浜バイオ大学バイオサイエンス学部	講師	バイオインフォマティクス解析
大橋 若奈：富山大学大学院	助教	生化学的研究

研究報告

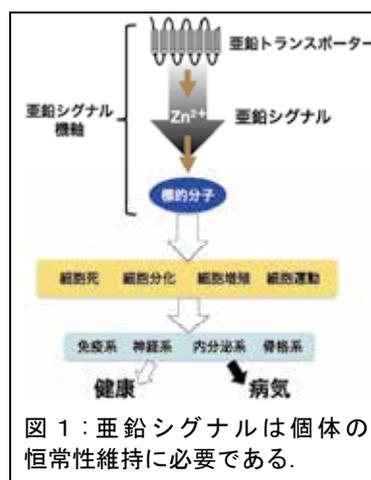
I 研究目的

I-1：研究開始当初の背景

亜鉛は生命維持に必須であり、その欠乏は免疫不全・皮膚脆弱化・成長遅延・骨粗鬆症等を主訴とする亜鉛欠乏症をもたらす。最近になって、高齢者では全身の亜鉛量が低下すること、加齢を伴う亜鉛減少が骨粗鬆症・関節リウマチ・二型糖尿病・アルツハイマー型認知症などの病態形成に関与すること、これらの病気の治療に供するキレート作用を持つ医薬品の併用によって、亜鉛欠乏が相乗的に惹起されることが明らかにされている。一方、不規則な生活や偏ったダイエットによっても亜鉛欠乏がもたらされることが判明し、亜鉛の恒常性異常と病気の発症には密接な関係があるとの認識が形成されつつある。しかしながら、亜鉛がどのように健康維持と病態形成に関わるのか、その詳細な分子メカニズムはまだ明らかにされていない。特にがんは、現代人の QOL に大きな影響を及ぼす。超高齢化社会を迎えている日本では、がん病態の分子機序の解明と、その異常を調整して改善することを目指す創薬研究に注目が集まっている。

生体における亜鉛の恒常性は、亜鉛輸送体膜タンパク質（亜鉛トランスポーター）が制御している。代表研究者のグループ

は、亜鉛トランスポーターが輸送する亜鉛イオンがシグナル因子（亜鉛シグナル）として作用すること、この亜鉛シグナルが健康と病気に深く関わることを明らかとした（図1）。最近では、多様ながん組織に特定の亜鉛トランスポーターが多く発現していることを見出している。これらの事象を背景として、亜鉛トランスポーターに着目してがんにおけるその意義を解明し、亜鉛シグナルの制御に基づく抗がん剤を開発することによって、がん病態の理解とその治療戦略に新たな知見をもたらすことを本研究の目標として設定した（図2）。



I-2：研究目的

研究開始当初において、がん病態における亜鉛シグナルの役割は十分に解明されていなかった。そこで、亜鉛の恒常性を司る亜鉛トランスポーターを分子モデルとして、がんにおける亜鉛シグナルの役割を解明するために本研究を開始した。研究目的の設定に至る先行研究の概要を以下に記す。

リンパ球における亜鉛シグナルの関与

亜鉛は生命維持に必須であり、その摂取量の低下は免疫不全等を呈する亜鉛欠乏症をもたらす（参考図書1, 2）。超高齢化社会を迎えている日本を含む先進諸国では、悪性腫瘍がQOLに大きな影響を及ぼすため、加齢に伴う免疫応答の制御異常に関する分子機序の解明と、その異常を調整して改善することを目指す様々な研究が展開されている。代表研究者は、亜鉛トランスポーターZIP10がBリンパ球に多く発現すること、ZIP10の亜鉛シグナルがBリンパ球の初期発生に密接に関与し、Bリンパ球前駆細胞の生存とBリンパ球の正常な抗原応答に必須であることを先行研究で見出した（Miyai et al, *PNAS* 2014; Hojyo et al, *PNAS* 2014）。これらの結果によって、亜鉛シグナルが獲得免疫を担うBリンパ球の恒常性の維持と機能に必要であることが示された。

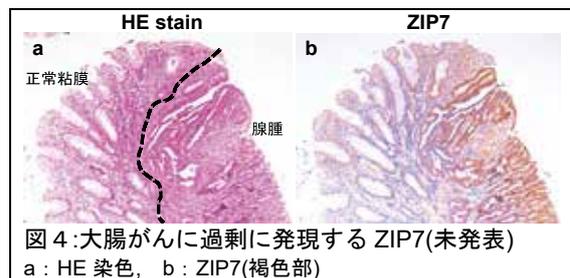
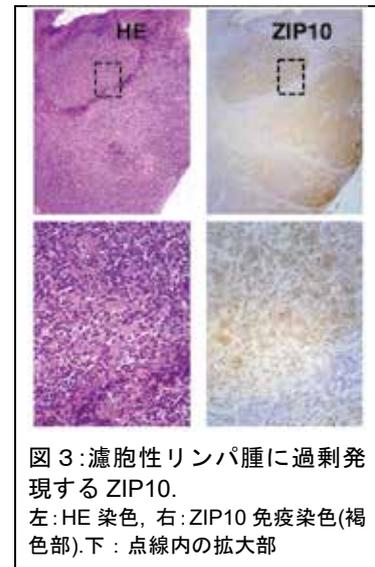
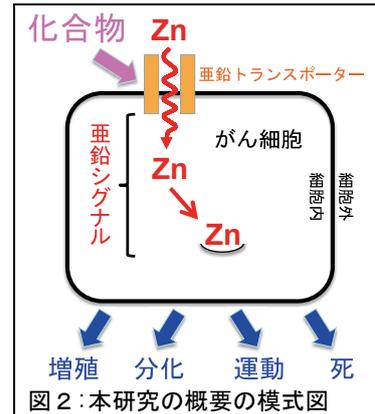
がん組織に発現する亜鉛トランスポーター

一方、代表研究者は、がん組織で亜鉛トランスポーターの発現が亢進していることを見出した。ZIP10の亜鉛シグナルがBリンパ球の生存維持に必要であることが判明したため、リンパ球等の血球系の恒常性破綻に起因する悪性腫瘍におけるZIP10の発現を精査した。その結果、急性骨髄性白血病や急性リンパ性白血病由来のがん細胞において、ZIP10の発現が有意に増加していること、濾胞性リンパ腫においてZIP10の顕著な発現上昇が認められた（図3：Miyai et al, *PNAS* 2014）。

また、小胞体ストレスの制御を介して皮膚真皮や腸管形成に関与する亜鉛トランスポーターとして発表したZIP7（参考論文2）が、大腸がんの病巣部に多く発現していることを見出した（図4：未発表）。これらの結果から、がん細胞の生存や増殖等において、亜鉛トランスポーターの関与が示唆された（発表論文3, 4）。

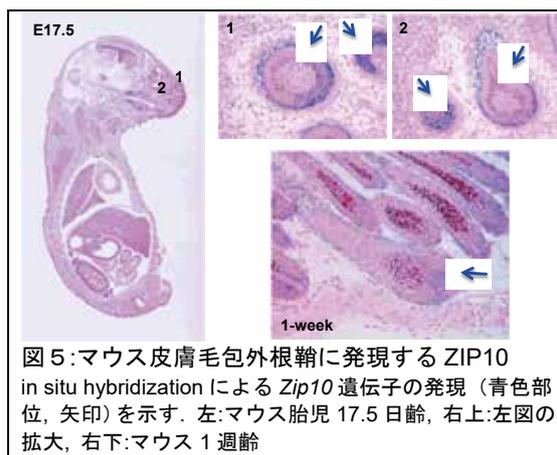
上皮性組織に発現する亜鉛トランスポーター

上記のリンパ球やがんにおけるZIP10の役割を研究する過程において、ZIP10が皮膚毛包等の上皮性組織に限局的に発現することを発見した（図5）。研究開始以前において、上皮性組織の形成や機能に直接関与する亜鉛トランスポーターに関する報告はなく、上皮系細胞は上皮間葉転換を介してがん病態と深く関連することから、上皮性組織における亜鉛トランス



ポーターと亜鉛シグナルの役割解明は、がんに関する研究として意義があると思われた。

上述した一連の先行研究の結果は、亜鉛トランスポーターおよび亜鉛シグナルが、がん病態および上皮性組織の恒常性を理解するための重要な研究対象であることを示唆するものである。一方、研究開始以前において、亜鉛シグナルとがん病態および上皮性組織の恒常性との関連性について、多くの未解決な問題が残されていた。そこで代表研究者は、がん病態等の病気や上皮性組織の恒常性における亜鉛シグナルの役割解明を当面の目標として、当該研究を開始した。具体的には、(1)がんにおける亜鉛トランスポーターの役割解明、(2)亜鉛トランスポーターを制御する分子群の同定、(3)亜鉛トランスポーターを制御する方法の確立を究明する観点から、亜鉛トランスポーターと亜鉛シグナルの制御に基づく対がん創薬研究を遂行した。以下に実験内容を記す。



具体的には、(1)がんにおける亜鉛トランスポーターの役割解明、(2)亜鉛トランスポーターを制御する分子群の同定、(3)亜鉛トランスポーターを制御する方法の確立を究明する観点から、亜鉛トランスポーターと亜鉛シグナルの制御に基づく対がん創薬研究を遂行した。以下に実験内容を記す。

II 研究計画および材料と方法

(1). がんにおける亜鉛トランスポーターの役割解明

代表研究者らは、がん組織に特定の亜鉛トランスポーターが多く発現していることを見出した(図3, 図4)。がん細胞における亜鉛トランスポーターと亜鉛シグナルの役割を明らかにするために、がん細胞株を用いて亜鉛トランスポーターの遺伝子をノックダウンし、細胞増殖・細胞分化・細胞運動・細胞死への影響を精査した。遺伝子ノックダウンによって特異的な表現型が現れた場合は、免疫不全マウスに各種ノックダウン細胞を移植して、様々ながん細胞における亜鉛トランスポーターの役割を個体レベルで検証することを計画した。

(2). 亜鉛トランスポーターを制御する分子群の同定

遺伝子ノックダウンによってがん細胞に変化を及ぼした亜鉛トランスポーターについて、それぞれの亜鉛トランスポーターを介する亜鉛シグナルがどのような分子マシナリーとメカニズムに影響を与えているのか、以下の3点による検討を計画した。

1 : 亜鉛トランスポーターは、どのようなシグナル経路の制御に関わるのか？

亜鉛トランスポーターを遺伝子ノックダウンして生じる遺伝子発現の差異を、RNA-sequence によって解析することを計画した。具体的には、亜鉛トランスポーターをノックダウンすることによって細胞機能に変化が生じたがん細胞について、遺伝子ノックダウンしたがん細胞と対照がん細胞から RNA を抽出し、亜鉛トランスポーターの欠損によって影響を受けた遺伝子群をバイオインフォマティクスによって網羅的に解析して、それぞれの亜鉛トランスポーターを介する亜鉛シグナルがどのようなシグナル経路の制御に関わるのか解析するものである。

2 : それぞれの亜鉛トランスポーターは、どの分子と特異的に結合するのか？

各亜鉛トランスポーターがどのようにがん細胞の運命を制御するのか、その特異性の分子メカニズムを解明することを計画した。具体的には、それぞれの亜鉛トランスポーター

の発現が亢進しているがん細胞由来の cDNA を用いて Yeast two hybrid system (Y2H) 用の cDNA library を調製し、ベイトには亜鉛トランスポーターの細胞内と細胞外の領域を用いて、亜鉛トランスポーターに結合するタンパク質をスクリーニングした。単離した候補分子は、免疫沈降を行って分子間結合を検証した。

3：亜鉛トランスポーター結合分子は、どのような役割を演じるのか？

上記の方法で同定された亜鉛トランスポーター結合分子や関与分子は、siRNA や CRISPR-Cas9 システム法で遺伝子ノックダウンして、亜鉛トランスポーターが制御する細胞機能やシグナル経路への関与について精査することを計画した。さらに、これらの分子がどのように亜鉛トランスポーターの機能制御に関わるのか検証するために、ノックダウンした細胞における亜鉛トランスポーターの亜鉛輸送能やタンパク質安定性を調べる。特定の亜鉛トランスポーターの機能への関与が確認された分子については、遺伝子欠損マウスの解析を行うと同時に、必要に応じてヒト疾患への関わりについてもその表現形が相関する疾患の病理臨床サンプルを用いて検討して、病態形成における意義を明らかにするものとして計画した。

(3). 亜鉛トランスポーターを制御する方法の確立：亜鉛シグナル創薬

前述した(1)と(2)の実験結果を考慮して、亜鉛トランスポーターの制御に基づく対がん創薬研究を行うことを計画した。具体的には、ヒトの亜鉛トランスポーターを誘導的あるいは安定的に発現させた細胞株を用いて、亜鉛輸送能とがん細胞の表現形を指標にして、それぞれの亜鉛トランスポーターおよび亜鉛トランスポーター結合分子の機能に影響を与える化合物のスクリーニングを行うものである。もし、特定の化合物が、亜鉛トランスポーターの亜鉛輸送能の変化と相関して、がん細胞の機能(増殖・分化・死・遊走等)に対して効果を示した場合は、皮膚がん・白血病・リンパ腫・あるいはこれらの転移モデルを初めとする様々ながんのモデルマウスを用いてその効果を検証するとともに、それらの薬理的な分子機序を解析することを計画した。

III 研究成果

上述した研究計画に基づいて、(1)がんにおける亜鉛トランスポーターの役割解明、(2)亜鉛トランスポーターを制御する分子群の同定、(3)亜鉛トランスポーターを制御する方法の確立の観点から、亜鉛トランスポーターと亜鉛シグナルの制御による対がん創薬研究を遂行した。以下に研究結果を記す。

1. がん組織における亜鉛トランスポーターの発現と役割解明

1a. がん組織における亜鉛トランスポーターの発現

がん患者由来の種々のがん組織を用いて、どのようながん組織やがん細胞に、どの亜鉛トランスポーターの発現が上昇あるいは低下しているのか検討した。その結果、悪性リンパ腫における ZIP10 の過剰発現や(Miyai et al, *PNAS* 2014)、大腸がんにおける ZIP7(図4)の過剰発現に加えて、皮膚がんの一種である毛包系腫瘍(毛芽腫)における ZIP10 の発現亢進を認め、さらにこれらの ZIP10 陽性細胞における転写因子 p63 の発現上昇を確認した(図6:未発表)。我々は、毛包において ZIP10 と p63 が協調的に上皮性組織の発生を制御することを見出しており(後述:発表論文7)、上記の結果は皮膚がんの病態形成における ZIP10 の重要な

役割を示唆している。現在、皮膚がん・大腸がん・肝がんにおける ZIP10 と ZIP7 の役割解明を進めると同時に、他のがん組織における亜鉛トランスポーター発現の状況についても検討している。

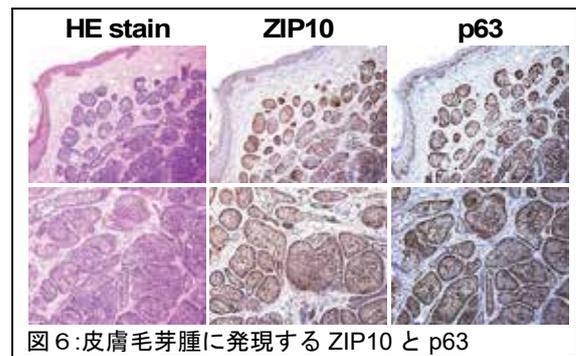


図6:皮膚毛芽腫に発現する ZIP10 と p63

1b. 上皮系細胞における亜鉛トランスポーターの発現と役割

リンパ球に関する ZIP10 の先行研究(Miyai et al, *PNAS* 2014)において、皮膚毛包に限局的に発現することを見出した。皮膚毛包における ZIP10 の役割を解明するために、*Keratin14* 遺伝子を発現する上皮系細胞で *Zip10* 遺伝子が欠損する遺伝子改変マウス (*Zip10*-cKO マウス)を作製し、*Zip10* 遺伝子の欠損による影響を精査した。

その結果、*Zip10* 遺伝子が欠損したマウスでは、表皮の形成不全を伴う著明な菲薄化と毛包の減少が生じ、加えて皮膚バリア機能の損失も認められた(図7. A-C)。さらに、毛や表皮などの上皮性組織の発生に重要な転写因子 p63 の活性が ZIP10 によって亢進すること、p63 は亜鉛依存的に転写活性が上昇することを確認し、ZIP10 が p63 の転写能の活性化に重要な役割を果たしていることが示された。すなわち、毛や表皮などの上皮性組織の発生段階において、ZIP10 はこれらの組織を構成する細胞の亜鉛量を調節し、p63 の転写活性を適正化することで、毛や表皮などの上皮性組織の形成に関与していることが明示された(図7:発表論文7)。

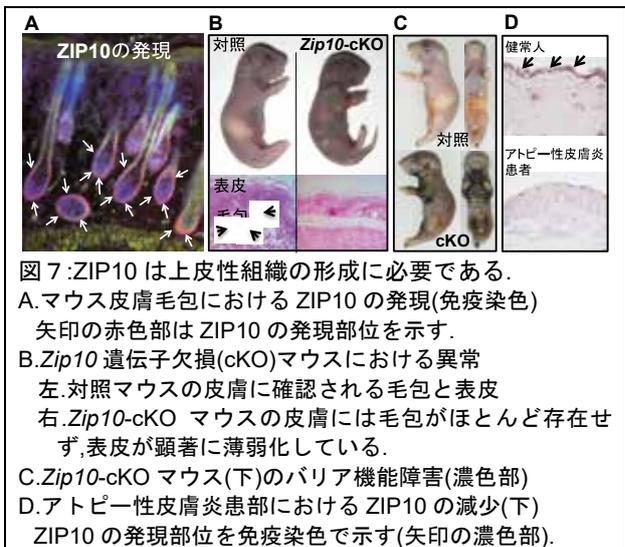


図7:ZIP10 は上皮性組織の形成に必要である。

A.マウス皮膚毛包における ZIP10 の発現(免疫染色)

矢印の赤色部は ZIP10 の発現部位を示す。

B. *Zip10* 遺伝子欠損(cKO)マウスにおける異常

左.対照マウスの皮膚に確認される毛包と表皮

右. *Zip10*-cKO マウスの皮膚には毛包がほとんど存在せず、表皮が顕著に薄弱化している。

C. *Zip10*-cKO マウス(下)のバリア機能障害(濃色部)

D.アトピー性皮膚炎患者部における ZIP10 の減少(下)

ZIP10 の発現部位を免疫染色で示す(矢印の濃色部)。

一方、上記に記した研究の過程において、皮膚がんにおける ZIP10 の発現が皮膚がんによって亢進していることを見出した(図6:未発表)。また、ZIP10 が表皮バリア機能の形成に必要であることに着目して(図7. C)、アトピー性皮膚炎患者の患部における ZIP10 の発現を精査した。その結果、アトピー性皮膚炎発症患者の表皮では、ZIP10 の発現が顕著に減少していることを見出した(図7. D:発表論文2)。これらの知見は、ZIP10 の適正な発現制御が皮膚の恒常性維持に必要な亜鉛トランスポーターであり、表皮関連の疾患において ZIP10 が創薬標的分子となる可能性が示唆された(発表論文5, 8)。

1c. 細胞増殖抑制因子として機能する亜鉛トランスポーター-ZIP13

代表研究者らは、亜鉛トランスポーターZIP13 の遺伝子欠損マウス (*Zip13*-KO マウス)と ZIP13 の機能喪失型変異を有する脊椎手掌異形成型エーラス・ダンロス症候群 (Ehlers-Danlos syndrome, spondylodysplastic type 3; EDSSPD3, Fukada et al, *PLoS One* 2008) の患者由来の細胞を用いた検討過程において、ZIP13 が細胞増殖を抑制する作用があることを見出した。現時点において、ZIP13 が p53 や微小管形成の制御分子である可能性を示唆する結果が得られている(未発表)。ZIP13 と p53 との機能の関連性に着目して、double-KO

マウスを作成しており、p53 の失調による腫瘍発生における ZIP13 の関与とその分子機序の解明を目指している。一方、*Zip13*-KO マウスと EDSSPD3 患者由来の線維芽細胞から iPS 細胞を作製しており、ZIP13 発現細胞の増殖と分化過程における ZIP13 の役割について、iPS 細胞を適用した解析も実施している。iPS 細胞を適用した研究手法は、未分化状態の細胞における ZIP13 の役割や、ZIP13 による細胞周期の制御機構のメカニズムの解明に寄与することが期待され、がん細胞における ZIP13 の生理的意義の解明に貢献すると考えている。

1d. 脂肪細胞における亜鉛トランスポーターの発現と役割

Zip13 遺伝子欠損マウスと EDSSPD3 患者は脂肪量が少ないことに着目し (Fukada et al, *PLoS One* 2008)、脂肪組織における ZIP13 の役割に着目して解析した。その結果、*Zip13* 欠損マウスは、皮下脂肪組織においてベージュ脂肪細胞が増加していること、エネルギー消費量が増加していること、高脂肪食給餌による体重上昇が対照マウスと比較して抑制されていることを見出した。さらに、ZIP13 を欠損した細胞では、ベージュ脂肪細胞の分化過程で C/EBP- β 蛋白質の蓄積が持続し、脂肪細胞の褐色化進展に重要な PRDM16 タンパク質が増加して、脂肪細胞の褐色化が亢進していることが示唆された。すなわち、ZIP13 が、脂肪細胞の褐色化にブレーキをかけている調節因子であること、さらに生活習慣病治療の標的分子となる可能性が示された (発表論文 6)。

1e. 亜鉛欠乏の遺伝子発現制御への影響

がんをはじめとする様々な疾患の成因には、エピジェネティクスの破綻による遺伝子発現の制御の異常が示唆されている。我々は、亜鉛の欠乏がエピジェネティクスによる遺伝子発現を攪乱し、細胞の機能を障害することを明らかにした (発表論文 1)。本結果は、亜鉛がエピジェネティクスの制御に関わる新たな環境因子であることを示しており、体内の亜鉛量を調整してエピジェネティクスを正しく制御する薬剤が開発され、亜鉛欠乏症に対する新しい治療方法が確立されることが期待される。

2. 亜鉛トランスポーターを制御する分子群の同定

主要な研究対象とした亜鉛トランスポーター ZIP7, ZIP10, ZIP13 について、Y2H によって複数の亜鉛トランスポーター結合分子候補を単離した (表 1 : 未発表)。これらの亜鉛トランスポーター結合候補分子について、それぞれの遺伝子をノックダウンすることにより、候補分子が結合する各亜鉛トランスポーターの機能にどのような影響を与えるのか検討している。現時点で、ZIP13 が PIAS3 のタンパク質レベルの調節に必要であることを確認しており (未発表)、がん細胞株や脂肪細胞分化系を適用して、その分子メカニズムの解明を目指している。

研究対象とした 亜鉛トランスポーター	単離された結合候補分子	関与が予想される現象
ZIP7	Calpain, Calreticulin HSP70, HSP90	小胞体におけるシャペロン機能, 小胞体 ストレス応答
ZIP10	ATG4D	オートファジー
ZIP13	PIAS3	サイトカイン情報伝達, 細胞死, 蛋白質 分解系

表 1. 各亜鉛トランスポーターの結合候補分子とそれらに関する情報を示す。

3. 亜鉛トランスポーターを制御する方法の確立

3a. ZIP10 に関する実験系

前述の研究結果から、ZIP10 の発現制御の解明と ZIP10 発現細胞の特徴解析は、がん病態の理解に多くの知見をもたらすと思われた。実際に、ZIP10 が肺がん細胞株の細胞死の抑制に関与していることを見出している(図8:未発表)。現在、ヒト ZIP10 を誘導的に発現させる細胞株について、293 細胞を用いて作製しており、ヒト ZIP10 の機能に影響を与える化合物スクリーニングに適用する。

また、ZIP10 の発現制御の解明と、ZIP10 発現細胞の系譜等の特徴を解析するために、*Zip10* 遺伝子プロモーターの下流に EGFP をノックインしたマウス (*Zip10*-EGFP-KI マウス) を作製した(図9:未発表)。現在、*Zip10*-EGFP-KI マウスを用いて *Zip10* 遺伝子の発現機構と ZIP10 発現細胞の特徴を解析すると同時に、皮膚がんにおける ZIP10 の役割解明と、他のがん組織における発現について検討している。

3b. ZIP13 を適用した実験系

1c で述べたように、ZIP13 が細胞増殖を抑制する働きがある可能性を見出した。ZIP13 の発現制御の解明と ZIP13 発現細胞の特徴解析のために、*Zip13* 遺伝子プロモーターの下流に EGFP を KI したマウス (*Zip13*-EGFP-KI マウス) を作製して完成した(図10.未発表)。加えて、化合物スクリーニング系を構築するために、ヒト ZIP13 を薬剤添加誘導的に発現させる細胞株を作製している。

3c. ZIP14 を適用した実験系

化合物をスクリーニングするプロトタイプ実験として、亜鉛以外にも鉄や、マンガンの様々な金属を透過する ZIP14 を適用して、化合物スクリーニングのアッセイ系の構築に着手した。既に、薬剤依存的にヒト ZIP14 を発現誘導する細胞株を樹立しており、この細胞株を用いてスクリーニング系の

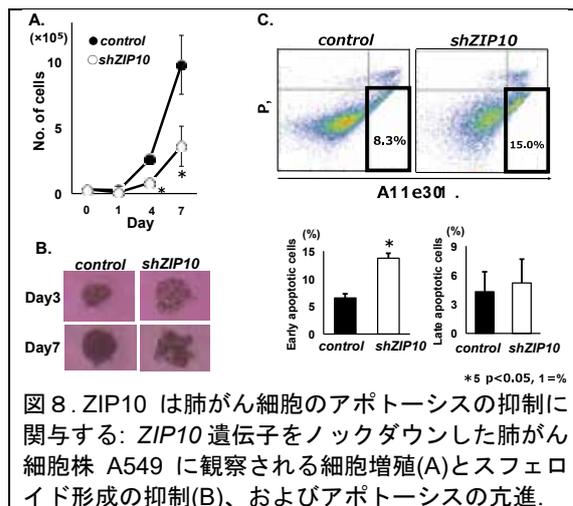


図8. ZIP10 は肺がん細胞のアポトーシスの抑制に関与する: ZIP10 遺伝子をノックダウンした肺がん細胞株 A549 に観察される細胞増殖(A)とスフェロイド形成の抑制(B)、およびアポトーシスの亢進。

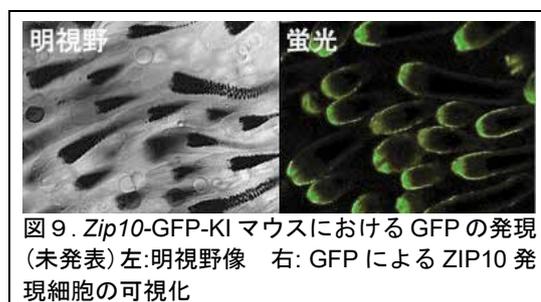


図9. *Zip10*-GFP-KI マウスにおける GFP の発現(未発表)左:明視野像 右: GFP による ZIP10 発現細胞の可視化

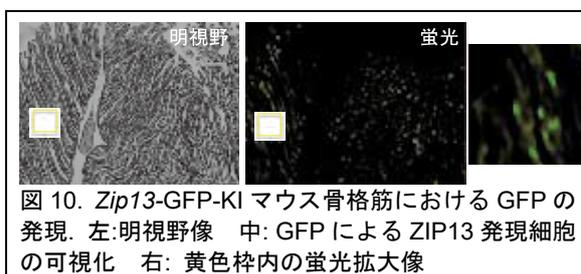


図10. *Zip13*-GFP-KI マウス骨格筋における GFP の発現. 左:明視野像 中: GFP による ZIP13 発現細胞の可視化 右: 黄色枠内の蛍光拡大像

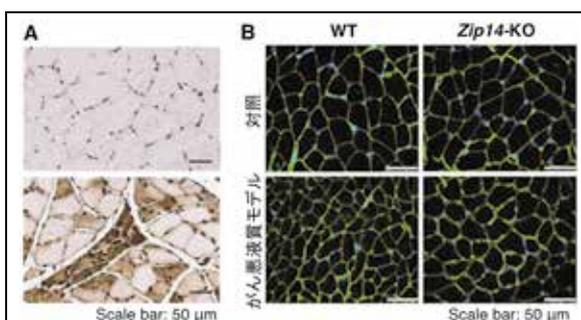


図11. ZIP14 は筋萎縮を促進する

A.がん悪液質患者における ZIP14 の発現上昇
上:対照として用いた非がん悪液質がん患者の骨格筋における ZIP14 の発現(免疫染色)
下:がん悪液質罹患患者の骨格筋における ZIP14 の発現の上昇(濃色部)
B.がん悪液質マウスモデルを用いた実験
野生型(WT)マウスのがん悪液質モデルで見られる筋萎縮(左下)は、*Zip14*-KO マウスを用いたモデル実験では観察されない(右下)。

構築を始めている。

一方、転移性がんを罹患した患者の多くは、筋萎縮を伴うがん悪液質を発症する。がん悪液質患者由来の検体や疾患データベース、および *Zip14* 遺伝子欠損マウスを用いて検討した結果、がん悪液質における骨格筋萎縮の発症に、ZIP14 が促進的に関与することを見出した（図 11. 参考論文 1）。本結果は、ZIP14 を介する亜鉛シグナルが、骨格筋の形成と維持に対して抑制的に作用することを示しており、がん悪液質治療の創薬標的として ZIP14 が有用であることを示唆している。

IV 考察

亜鉛トランスポーターと亜鉛シグナルのがん病態への関与を究明するために開始した本研究は、多くの共同研究者の協力によって多彩な知見を得ることができた。特に今後の発展が期待される内容について以下に記述する。

上皮性組織の恒常性と亜鉛シグナルについて：亜鉛トランスポーターZIP10の研究から、亜鉛の恒常性変化と皮膚機能の低下には密接な関連があることが示された。具体的には、毛包外毛根鞘に ZIP10 が限局的に発現すること、ZIP10 の亜鉛シグナルが表皮バリア機能に必須であることを見出した。一方、表皮バリア機能における ZIP10 発現細胞の役割と、ZIP10 を介する亜鉛シグナルの分子メカニズムについては、まだ十分に解明されていない。上皮性組織はがん病態の形成および変化と密接に関与している。また、超高齢化社会を迎えた日本では、健康面と審美的な観点から、皮膚を健康的に維持する方法の開発が求められている。今後の研究によって、上皮性組織の形成と異常における亜鉛シグナルの分子基盤の解明し、ZIP10 を標的とする新たな上皮性組織の恒常性の制御物質の同定が期待される。

がん悪液質と亜鉛シグナルについて：がん悪液質の病態形成に、ZIP14 の亜鉛シグナルが関わることを見出した。成人の総亜鉛量の約 60% が骨格筋に存在し、その量は加齢に伴って減少して、亜鉛の減少とサルコペニア等の老齢性疾患との関連性が報告されている。しかしながら、「亜鉛シグナリングはどのように骨格筋の維持に貢献し、その異常はどのように病気を発症させるのか」については、まだ十分に解明されていない。一方、がん細胞そのものに対する研究が急速に進む昨今において、転移がんの代表的な病態であるがん悪液質については十分に研究が進んでおらず、有効な予防法や治療法がないのが現状である。本研究をさらに展開することにより、がん悪液質の筋萎縮における亜鉛シグナルの分子基盤を解明し、がん悪液質に対する新しい治療方法の開発が期待される。

本研究は、がん研究に亜鉛シグナルという従来にはないアプローチから挑むことを目標とした。貴研究助成のご支援のもとで実施した一連の研究と、亜鉛シグナルの関連研究によって、亜鉛シグナルが、がんの理解とその病態の制御のみならず、皮膚、骨格筋、遺伝子制御、細胞の増殖制御等に重要に関与することが明示された（発表論文 9）。これらの成果は、高齢化が進む日本が抱える多様な諸問題の解決に対しても、本研究の可能性と将来性を示すことができたと考えている。本研究から派生した知見と研究資材を活用して、がん病態の解明と治療戦略の構築に対して、今後も亜鉛シグナリングの観点から挑みたい。

V 研究成果の発表

発表論文 (当該研究と直接関連する研究論文, ※ **corresponding author**)

1. Lee MG, Chae S, Nakajima K, Ibi M, Sano H, **Hara T**, Jo H, Takagishi T, Cha B, Baek H, Yoshigai E, Ohashi T, Irie T, Ssano S, Lee J, ※**Fukada T**, Bin BH., Implication of the zinc-epigenetic axis in epidermal homeostasis. *Journal of Dermatological Science*, 2020
2. Nakajima K., MG. Lee, BH. Bin, **T. Hara**, T. Takagishi, S. Chae, S. Sano, ※**T. Fukada**. Possible involvement of zinc transporter ZIP10 in atopic dermatitis *The Journal of Dermatology* 47: 51-53, 2020
3. **Ohashi W.**, ※**T. Fukada**. Contribution of zinc and zinc transporters in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Journal of Immunology Research (Guest editor for special issue)*, vol. 2019, Article ID 8396878, 2019
4. **Ohashi W.**, **T. Hara**, T. Takagishi., K. Hase, ※**T. Fukada**. Maintenance of intestinal epithelial homeostasis by zinc transporters. *Digestive Diseases and Sciences* 64: 2404-2415, 2019
5. Bin BH, S. Hojyo, J. Seo, **T. Hara**, T. Takagishi, **K. Mishima**, ※**T. Fukada**. The Role of the Slc39a Family of Zinc Transporters in Zinc Homeostasis in Skin. *Nutrients* 10, 219, 2018
6. Fukunaka A, **T. Fukada**, J. Bhin, L. Suzuki, T. Tsuzuki, Y. Tkamine, BH. Bin, T. Yoshihara, N. Ichinoseki-Sekine, H. Naito, T. Miyatsuka, S. Takamiya, T. Sasaki, T. Inagaki, T. Kitamura, S. Kajimura, H. Watada, Y. Fujitani. Zinc transporter ZIP13 suppresses beige adipocyte biogenesis and energy expenditure by regulating C/EBP- β expression. *PLoS Genetics* 13, e1006950, 2017
7. Bin BH, J. Bhin, M. Takaishi, K. Toyoshima, S. Kawamata, K. Ito, **T. Hara**, T. Watanbe, **T. Irie**, T. Takagishi, SH. Lee, HS. Jung, S. Rho, J. Seo, DH. Choi, D. Hwang, H. Koseki, O. Ohara, S. Sano, T. Tsuji, **K. Mishima**, ※**T. Fukada**. Requirement of zinc transporter ZIP10 for epidermal development: Implication of the ZIP10-p63 axis in epithelial homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114, 12243-12248, 2017
8. Hojyo S., Bin BH, ※**T. Fukada**. Dysregulated zinc homeostasis in rare skin disorders *Expert Opinion on Orphan Drugs* 5, 865-873, 2017
9. Takagishi T, **T. Hara**, ※**T. Fukada**. Recent Advances in the Role of SLC39A/ZIP Zinc Transporters *In Vivo*. *International Journal of Molecular Sciences* 18, 2708, 2017

参考論文 (当該研究とは独立して実施した関連研究論文, ※ **corresponding author**)

1. Wang G, A. Biswas, W. Ma, M. Kandpal, C. Coker, P. Grandgenett, M. Hollingsworth, R Jain, K Tanji, S Lopez-Pintado, A. Borczuk, D. Hebert, S. Jenkitkasemwong, S. Hojyo, R. Davuluri, M. Knutson, **T. Fukada**, S. Acharyya. Metastatic cancers promote cachexia through ZIP14 upregulation in skeletal muscle. *Nature Medicine* 24:770-781, 2018
2. Bin BH, J. Bhin, J. Seo, SY. Kim, E. Lee, K. Park, DH. Choi, T. Takagishi, **T. Hara**, D. Hwang, H. Koseki, Y. Asada, S. Shimoda, **K. Mishima**, ※**T. Fukada**. Requirement of Zinc Transporter SLC39A7/ZIP7 for Dermal Development to Fine-Tune Endoplasmic Reticulum Function by Regulating Protein Disulfide Isomerase. *Journal of Investigative Dermatology* 137, 1682-1691, 2017

参考図書 (発表論文を記載した英文図書, ※ **corresponding author**)

1. **Zinc Signaling, second edition** (edited by **Fukada T**, and T. Kambe), Springer Nature, Singapore, 2019; 編集者
執筆章: ※**Fukada T.**, Opening the Second Era of Zinc Signaling Study (*corresponding author)
執筆章: Bin BH, MG Lee, **T. Hara**, T. Takagishi, ※**T. Fukada**, Zinc Transporters and Zinc Signaling in Skin Formation and Diseases
2. **Zinc Signals in Physiology and Pathogenesis** (edited by **Fukada T**, and T. Kambe), MDPI, Basel, 2018; 編集者
執筆章: ※**Fukada T.**, T. Kambe. Welcome to the World of Zinc Signaling
執筆章: Takagishi T., **T. Hara**, ※**T. Fukada**. Recent Advances in the Role of SLC39A/ZIP Zinc Transporters *In Vivo*

発表論文に関するプレスリリース：計3件

1. 2010年5月25日 徳島文理大学, 亜鉛の欠乏は、エピジェネティクスを攪乱する。-亜鉛欠乏症がもたらす細胞障害の原因を発見 -アトピー性皮膚炎に関わる新たな分子を発見
2. 2019年12月26日 徳島文理大学, アトピー性皮膚炎に関わる新たな分子を発見
3. 2017年10月26日 徳島文理大学, 毛や皮膚の形成における亜鉛の新たな役割を解明

謝辞

当該研究への貴重なご支援により、当初計画していたがん病態に関する研究を実施することができ、多くの成果を得ることができました。さらに、当初の想定にはなかった新たな領域へも、研究を展開することができました。加えて、新しい遺伝子改変マウス等の研究資材を開発し、それらの使用によって既に新たな発見と疑問が生まれております。当該研究の将来性と今後の展開に大いに期待しており、貴財団のご支援にあらためまして本紙面を借りて心よりお礼申し上げます。

フレイル合併心不全に対する集学的治療戦略の確立を目指して

《研究の概要》

本研究の目的は、フレイル・サルコペニアを合併した心不全に対する予防的及び治療的介入の根拠となる、心不全・サルコペニア・フレイルに共通した分子生物学的病因を解明し、臨床前介入研究に有用なフレイル合併心不全マウスモデルを確立することであった。

新村、江口は、老化促進マウス (Senescence accelerated mouse =SAM) において胸部大動脈縮窄 (TAC) または心筋梗塞 (MI) を作成し、フレイル心不全マウスモデルの確立を目指した。促進老化・短寿命を示す SAM prone (SAMP)8 と正常老化の SAM resistant (SAMR)1 を7ヶ月齢で購入し、8ヶ月齢で大動脈縮窄術 (TAC) または sham 手術を、別の一群では、冠動脈結紮による急性心筋梗塞 (AMI) 作成または sham 手術を実施した。解析の結果、7ヶ月齢 SAMP8 はフレイル・サルコペニアモデルとして妥当と考えられたが、TAC による圧負荷に対しては逆説的に抵抗性を示した。その原因として、術前の SAMP8 心では、Sirt1 機能低下といった促進老化と、NPPA 発現亢進などの代償機転の活性化が生じており、それらが圧負荷に対する適応性を高めた可能性を考察した。一方、MI 作成モデルでは、SAMP8 で MI 後左室 remodeling の程度が強く、学習機能障害やサルコペニアもより顕著に進行した。よってこのモデルはフレイル合併心不全モデルとして有望と結論した。

矢野は、mTORC1 活性化がネクロプトーシスを誘導する分子機構の解明を目指した。

ネクロプトーシスは、receptor-interacting protein (RIP) 1 及び RIP3 の活性化によって誘導されるプログラムネクロシスであり、心不全病態形成における関与が示唆されている。矢野らは心筋細胞において mTORC1 の恒常的活性化がネクロプトーシスを誘導することを明らかにしたが、その分子機構は不明だった。そこで H9c2 ラット心筋芽細胞を用いた *in vitro* 実験系において、mTORC1 活性化とネクロプトーシス誘導シグナルとの関連を解明した。Rapamycin による mTORC1 活性抑制は、RIP1 の抑制的リン酸化による活性低下を介して TFEB を活性化し、TNF/zVAD によるオートファジー障害を修復し、心筋細胞のネクロプトーシスを軽減した。よって骨格筋肥大を目的とした mTOR1 シグナル活性化は、不全心筋においてはネクロプトーシスを増加させる危険を伴うため、RIP1 を標的とした治療手段を併用することで、より安全な治療戦略となる可能性が推測された。

内藤は、サルコペニア心不全における鉄代謝動態の解明を目標とした。鉄は生体に不可欠な元素だが、鉄過剰は酸化ストレスの原因となる。基礎研究において萎縮骨格筋における鉄濃度増加や骨格筋量と筋組織鉄含有量の負相関が報告され、骨格筋萎縮における鉄の関与が示唆された。そこで本研究では、心不全によるサルコペニアにおける鉄および細胞内鉄取り込み受容体 Transferrin Receptor 1 (TfR1) の関与を、TfR1 ヘテロノックアウトマウスを用いた TAC 及び下肢虚血モデルにおいて検討した。TAC による圧負荷心不全モデルでは、心肥大や心筋間質の線維化形成に TfR1 は関与したが、骨格筋変化への関与は認めなかった。その理由として、TAC モデルでは心不全によるサルコペニア進行が不十分であったことが考察された。次に下肢虚血モデルを用いて検討したところ、虚血後萎縮骨格筋における局所細胞内鉄代謝がその病態に関与すること、TfR1 を介した細胞内鉄取り込みとそれに引き続くミトコンドリア機能制御が、その病態に重要な役割を担うことが明らかにされた。よって心不全に伴うサルコペニア進行において、鉄代謝、特に TfR1 を介する細胞内への鉄取り込みに対する介入手段が、新たな治療戦略となる可能性が推測された。

共同研究者の氏名、所属機関

矢野 俊之、札幌医科大学循環器・腎臓・代謝内分泌内科学 講師

内藤 由朗、兵庫医科大学循環器内科・冠疾患内科 講師

江口 明世、兵庫医科大学内科学循環器内科・冠疾患内科 助教

研究報告

I 研究目的

超高齢社会の到来とともに、高齢者の循環器疾患に対する治療戦略の見直しが必要となっている。今後、後期高齢者人口は増加し続けることから、高齢循環器疾患患者はますます増加する。とりわけ高齢者では心不全の罹患率が高いだけでなく、標準的な治療下における致死率は若年者より高く、再入院率も極めて高い。その結果、治療・介護にかかるコストは膨大になるため、高齢心不全患者に対する包括的な対策の確立が急務である。

近年、高齢心不全患者の予後を予想する上では、心機能指標だけでなく、高齢者の心身機能評価が極めて有用であることが明らかとなった(J Am Coll Cardiol 2014;63:747, Eur Heart J 2014;35:1726)。すなわち高齢者では、暦年齢ではなく、個々の老化度を反映する身体的指標を評価することがその予後予測において重要となる。このような背景から、加齢に伴う機能変化や生理的な予備能力の低下によりストレスに対する耐性が低下し、容易に健康障害を招きやすい状態を表す、フレイル(frailty)は、広く注目を集めている。フレイルの診断法は確立していないが、その代表として Fried らが提唱した Cardiovascular Health Study や Rockwood らが提唱した frailty index がある。これらの定義に則った臨床研究では、老化に伴うフレイル(1 次性フレイル)は、高齢期における自立度低下、要介護状態に陥る原因であるばかりが、心不全の発症率が極めて高い。一方、心不全患者においては、フレイルの合併が予後不良の重要な要因であり、心不全患者に合併するサルコペニア(筋肉減少症)は、生命予後に強いインパクトを与えていた。そこでこのような心不全に併存するフレイル(2 次性フレイル)に対する適切な介入法開発の必要性が認識されつつあるが、介入法の裏付けとなる基礎医学的事実は極めて乏しかった。そこで本研究では、フレイル合併心不全に対する予防的及び治療的介入の根拠となる基礎的研究を推進し、フレイルの病態生理に基づいた新規介入法を開発することを目標とした。

フレイル・サルコペニアの成因として、慢性炎症、ホルモン異常、酸化ストレス増大、細胞老化促進が推測されている。さらに臨床研究からは、動脈硬化の進展や認知機能低下がフレイル・サルコペニア発症と密接に関連している可能性が高い(J Cachexia Sarcopenia Muscle 2017;8:557)。フレイル・サルコペニアへの介入法として①栄養学的介入、②運動療法、③薬理的介入が提案されている。これらは1 次性フレイルを対象とした研究から得られた介入手段であり、心不全合併フレイルにおいてもそれらが有効かは未だ不明である。またそれらの介入が心機能に及ぼす影響は評価されていなかった。

加齢に伴うサルコペニアを引き起こす分子機序としては、インスリン・IGF-1 シグナル異常や性ホルモン分泌低下の結果、タンパク異化同化の不均衡が生じ、筋肉減少が誘発されている可能性が高い。インスリン・IGF-1 シグナルは哺乳類ラパマイシン標的蛋白質(mTOR)の制御によって、筋肉合成(同化)と筋肉分解(異化)のバランスを保っている。

よって骨格筋の同化に関連する重要な細胞内シグナル、mTOR の心不全における心筋細胞や骨格筋細胞での役割を解明することは、サルコペニアへの介入法の開発において極めて有望と考えた（矢野グループ）。

骨格筋における慢性炎症、酸化ストレス増大の分子機序の一因として、骨格筋における鉄代謝異常が何らかの役割を担う可能性は高い。よって様々な心血管疾患や虚血時の骨格筋鉄代謝動態異常を解明することは、フレイル・サルコペニアとの関連を解明する上でも興味深いテーマと考えた（内藤グループ）。さらに鉄代謝への介入は、慢性炎症や酸化ストレス増大を軽減することを目的としたフレイル・サルコペニアへの介入手段としても有望と推測された。

フレイルの病態に基づいた心不全に対する新規介入手段の確立を達成するには、第一にフレイル心不全モデルの確立が必須である。我々は本研究助成の支援の下、老化促進マウス (Senescence accelerated mouse =SAM) において急性心筋梗塞 (AMI) や胸部大動脈縮窄 (TAC) を作成し、フレイル心不全モデルの確立を目指した (新村・江口グループ)。このフレイル心不全マウスモデルは、今後、心臓への直接的治療だけでなく、骨格筋を標的とした新規のフレイル・サルコペニア治療法を検討し、確立していく上で極めて有用な動物モデルとなると期待される。

II 研究計画及び材料と方法

① 代表研究者 新村 健、共同研究者 江口明世：フレイル心不全モデルの確立

フレイルの病態に基づいた心不全に対する新規介入手段の確立を達成するには、第一にフレイル心不全モデルの確立が必須である。我々は老化促進マウス (Senescence accelerated mouse =SAM) において心筋梗塞 (MI) や胸部大動脈縮窄 (TAC) を作成しフレイル心不全モデルを確立することを目指した。SAM とは京都大学竹田らが開発した早期老化を示す近交系マウスである。本研究では促進老化・短寿命を示す SAM prone (SAMP) 8 と正常老化を示す SAM resistant (SAMR) 1 を対照マウスとして用いる。SAMP8 は早期の学習・記憶障害、免疫機能不全、概日リズムの異常を呈し、8 カ月齢からサルコペニアが進行するとこれまでに報告されている。

実験 (1) 7 ヶ月齢の SAMR1、SAMP8 を購入し、心エコー、筋力測定を測定した。一部のマウスでは通常飼育時の生存状態を 19 カ月齢まで 1 年間、観察した。一部のマウスは 8 カ月齢で sacrifice し、心臓、肺などの臓器重量、心筋組織を用いた病理組織学的検討（心筋肥大、間質線維化）、心筋遺伝子発現解析、さらに大腿四頭筋、腓腹筋、ヒラメ筋重量計測と骨格筋組織を用いた病理組織学的及び遺伝子発現解析を行い、両群間で比較、検討した。

実験 (2) 7 ヶ月齢の SAMR1、SAMP8 を購入し、心エコー、筋力測定を実施後、8 ヶ月齢で TAC または sham 手術を実施した。術後 3 カ月間生存を追跡し、心エコー、筋力測定を定期的に行った。評価項目は、体重変化、生存率に加え心エコーによる心機能評価、sacrifice 時の心臓、肺などの臓器重量、心筋組織を用いた病理組織学的検討（心筋肥大、間質線維化）、心筋遺伝子発現解析、さらに大腿四頭筋、腓腹筋、ヒラメ筋重量計測と骨格筋組織を用いた病理組織学的及び遺伝子発現解析とし、両群間で比較、検討した。

実験 (3) 7 ヶ月齢 SAMR1、SAMP8 を購入し、心エコー、筋力測定、モーリス水迷路を実施

後、8ヶ月齢で冠動脈結紮による(AMI)作成または sham 手術を実施した。術後3カ月間生存を追跡し、心エコー、筋力測定、モーリス水迷路を定期的に行った。評価項目は、(1)と同じ内容を両群間で比較、検討した。

②共同研究者 矢野俊之：mTORC1 活性化がネクロプトーシスを誘導する分子機構の解明

ネクロプトーシスは、receptor-interacting protein 1 (RIP1) 及び RIP3 の活性化によって誘導されるプログラムネクロシスであり、心不全病態形成における関与が示唆されている。申請者らは心筋細胞において mTORC1 の恒常的活性化がネクロプトーシスを誘導することを報告したが、その分子機構は不明だった。本研究の目的は、mTORC1 活性化とネクロプトーシス誘導シグナルの関連を解明し、心不全と高頻度に合併するサルコペニアに対する治療法を確立することであった。

[実験 1] mTOR/p70s6 kinase (p70s6K) 阻害薬がネクロプトーシスに与える影響の検討
H9c2 ラット心筋芽細胞に溶媒 (vehicle)、TNF (50 ng/ml) と pan-caspase 阻害薬である zVAD (20 μ M、TNF/zVAD) を添加した。Vehicle あるいは TNF/zVAD 添加と同時に mTORC1 阻害薬 (rapamycin、10 nM)、mTORC1/2 阻害薬 (Ku-0063794 [Ku]、1 μ M) あるいは p70s6K 阻害薬 (PF-4708671 [PF]、30 μ M) を添加し、24 時間後に培養液を回収し LDH 活性を測定した。

[実験 2] mTORC1 阻害薬が RIP1 リン酸化及び RIP1-RIP3 結合に与える影響の検討

Vehicle あるいは TNF/zVAD 添加と同時に rapamycin を添加し、4 時間後における RIP1-Ser166、RIP-Ser320 のリン酸化量及び RIP1 と RIP3 の結合量を定量した。

[実験 3] mTORC1 及び RIP1 阻害薬が TNF/zVAD によるオートファジー抑制に与える影響の検討

tandem RFP-GFP-LC3 プラスミドを導入し、24 時間後に vehicle、rapamycin、RIP1 活性阻害薬である necrostatin-1、TNF/zVAD、TNF/zVAD+rapamycin、あるいは TNF/zVAD+necrostatin-1 を添加した。薬剤添加 4 時間後に LC3 のドット量を蛍光顕微鏡で観察した。

[実験 4] mTORC1 阻害薬によるネクロプトーシス軽減における TFEB の役割の検討 1) Vehicle、TNF/zVAD 添加と同時に necrostatin-1 あるいは rapamycin を添加し、4 時間後に、TFEB の細胞内局在を、蛍光免疫染色法と分画ウエスタンブロット法により評価した。2) TFEB siRNA 導入後に vehicle、TNF/zVAD、TNF/zVAD+rapamycin、あるいは TNF/zVAD+necrostatin-1 を添加し、4 時間後の LC3 のドット量を蛍光顕微鏡で観察し、24 時間後の LDH 活性を測定した。

③ 共同研究者 内藤由朗：サルコペニア心不全における鉄代謝動態の解明

鉄は生体に不可欠な元素であるが、鉄過剰は酸化ストレスの原因となり、慢性的な鉄過剰状態は循環器疾患・動脈硬化の原因にもなる。基礎研究においては萎縮骨格筋における鉄濃度増加や骨格筋量と筋組織鉄含有量の負相関が報告され、骨格筋萎縮における鉄の関与が示唆されている。しかし、その詳細な機序や心不全によるサルコペニアにおける鉄の関与については明らかにされていない。本研究では、心不全によるサルコペニアにおける

鉄および細胞内鉄取り込み受容体 Transferrin Receptor 1 (TfR1) の関与、萎縮骨格筋における TfR1 の関与を基礎実験から検討し、サルコペニア発症の予防・治療に貢献するための研究基盤の確立を目指した。

実験 1: TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウスを用いて大動脈縮窄術(transverse aortic constriction: TAC)による圧負荷心不全モデルを作成し、骨格筋・心臓の構造・機能変化を解析し、心不全・サルコペニアの形成過程における鉄、TfR1 の役割を検討した。

実験 2: 本マウスを用いて下肢虚血モデルを作成し、萎縮骨格筋形成における TfR1 の役割を解析した。

III 研究成果

① 代表研究者 新村 健、共同研究者 江口明世：フレイル心不全モデルの確立

実験(1) 12 ヶ月の観察期間中、SAMR1 では死亡例がなかったが、SAMP8 では 5 例が自然死した(各群 n=10)。7 ヶ月齢、11 ヶ月齢時点で、心エコーでの心機能指標には両群間で有意差を認めなかった。しかし脛骨長径で補正した心重量、肺重量は 8 ヶ月齢 SAMP8 で有意に大きかった。心臓標本の病理学的検討では両群間に心筋サイズ、間質繊維化において明らかな差を認めなかった。RT-PCR では、8 ヶ月齢 SAMP8 心で NPPA 発現が亢進している一方、Sirt1 発現には差を認めなかった。Western immunoblotting では 8 ヶ月齢 SAMP8 心で Sirt1 発現が低下し、Sirt1 活性も有意に低下していた。7 ヶ月齢、11 ヶ月齢の時点ともに筋力、筋肉量は SAMP8 で有意に低値だった。RT-PCR では、8 ヶ月齢 SAMP8 骨格筋で Sirt1 発現が亢進していた。

実験(2) 7 ヶ月齢の SAMP8 は、筋力低下、筋肉量減少、身体活動量低下、学習能力低下からサルコペニア・フレイルと診断された。TAC 後の生命予後は両群間に差を認めなかったが、TAC 後の左室拡大、左室重量増加、左室収縮機能低下は SAMR1 でより早期から認められた。病理学的検査では TAC 後の心筋細胞サイズ増大と左室線維化は SAMR1 でより顕著で、RT-PCR 検査でも心肥大、心不全、繊維化関連遺伝子の発現は SAMR1 が SAMP8 より高値だった。また TAC 後 SAMP8 では術前と比べ筋量、筋力の増加・改善が観察された。

実験(3) AMI 後の生命予後は両群間に差を認めなかったが、MI 後左室 remodeling の進展、RT-PCR 検査での心肥大、心不全、繊維化関連遺伝子の発現は SAMP8 で顕著だった。AMI 作成後、SAMP8 ではサルコペニア、学習能力の低下がさらに進行した。

② 共同研究者 矢野俊之:mTORC1 活性化がネクロプトーシスを誘導する分子機構の解明

[実験 1] TNF/zVAD による細胞死は rapamycin あるいは Ku 添加により軽減したが、PF 添加は影響を与えなかった。

[実験 2] TNF/zVAD は RIP1-Ser166 のリン酸化を増加させたが、RIP1-Ser320 のリン酸化に影響を与えなかった。Rapamycin 添加により TNF/zVAD による RIP1-Ser166 のリン酸化レベルが部分的に低下し、RIP1-Ser320 のリン酸化レベルが増加した。さらに rapamycin は TNF/zVAD による RIP1 と RIP3 の結合増加を抑制した。

[実験 3] TNF/zVAD 添加 4 時間後にオートファゴソーム LC3 が有意に増加したが、全 LC3 量に対するオートファゴソーム LC3 量の割合は vehicle 群と同様であった。Rapamycin は、

TNF/zVADの有無にかかわらず、全LC3量に対するオートファゴソームLC3量の割合を低下させた。一方で、necrostatin-1はTNF/zVAD存在下において、全LC3量に対するオートファゴソームLC3量の割合を低下させた。

[実験4] TNF/zVADにより減少した核分画のTFEBは、necrostatin-1により回復した。rapamycinはTNF/zVADの有無にかかわらず、核分画のTFEBを増加した。TFEB発現抑制は、necrostatin-1あるいはrapamycinによるオートファジー進行抑制改善効果を遮断した。さらにTFEB発現抑制は、Rapamycinによるネクロプトーシス軽減効果を遮断した。以上の結果より、RapamycinによるmTORC1活性抑制は、RIP1の抑制的リン酸化による活性低下を介してTFEBを活性化し、TNF/zVADによるオートファジー障害を修復し、心筋細胞のネクロプトーシスを軽減することが明らかとなった。

③ 共同研究者 内藤由朗：サルコペニア心不全における鉄代謝動態の解明

実験1：TfR1遺伝子ヘテロノックアウトマウスを用いてTACによる圧負荷心不全モデルを作成し、骨格筋・心臓の構造・機能変化を解析した。その結果、野生型マウスに比べ、TfR1遺伝子ヘテロノックアウトマウスは、圧負荷後に認める心肥大や心筋間質の線維化の程度が減弱することがわかった。一方、骨格筋重量や骨格筋鉄含有量は両群間で有意差を認めなかった。

実験2：萎縮骨格筋におけるTfR1の役割を解析するために、下肢虚血モデルを作成した。その結果、マウス虚血後萎縮骨格筋では細胞内鉄貯蔵蛋白であるフェリチン発現が非虚血肢に比べ亢進し、TfR1発現は低下することが明らかになった。萎縮骨格筋におけるTfR1発現低下と骨格筋の関係を検討するために、TfR1遺伝子ヘテロノックアウトマウスを用いて下肢虚血モデルを作成し、虚血肢の血管新生を含めて検討した。その結果、TfR1遺伝子ヘテロノックアウトマウス虚血骨格筋におけるフェリチン発現は、野生型マウスに比べ減弱し、血管新生も低下することが明らかになった。鉄はミトコンドリアにおけるエネルギー産生に利用されるため、次に虚血骨格筋におけるミトコンドリア複合体発現を評価した。その結果、TfR1遺伝子ヘテロノックアウトマウス虚血骨格筋におけるミトコンドリア複合体I発現が、野生型マウスに比べ減弱することが確認された。

IV 考察

新村・江口の研究成果から、7ヶ月齢SAMP8はフレイル・サルコペニアモデルとして妥当と考えられたが、急性圧負荷に対して抵抗性を示した。この結果は、フレイル併存は心疾患の予後を悪化させるとの予想に対して、逆説的なものであった。その原因として、7ヶ月齢時点でのSAMP8では、心筋Sirt1機能低下といった促進老化と、心筋NPPA発現亢進などの代償機転の活性化が同時に生じており、それが中等度の圧負荷に対する適応性を高めた可能性を考察した。さらにSirt1の圧負荷時における心臓での役割に関しては、Sirt1は心肥大、心不全の進展に対し促進的に働くことから、Sirt1の抑制やSirt1部分的欠損では、むしろ圧負荷に対して抵抗性を示したという報告もある(Cell Metab 2011;14: 598-611, Cell Cycle 2012;11:856-864.)。よって本研究の結果は、それらの報告とも一致し、心臓老化とは圧負荷に対する適応機転亢進としての側面も有する状態と考察した。

一方、SAMP8 における AMI 作成では、SAMP8 群の方が心筋梗塞後左室 remodeling の程度が強く、学習機能障害やサルコペニアもより顕著に進行した。よってこのモデルはフレイル合併心不全モデルとして有望と結論した。サルコペニアへの介入治療の効果を明らかにする研究において、本モデルの使用は適切と考察され、本研究助成による成果によってフレイル・サルコペニアへの介入に基づく新規心不全治療戦略の確立への新たな道を切り開くことができた。

2つの心疾患モデルでの SAMP8 の反応性の違いを図 1 に示す。

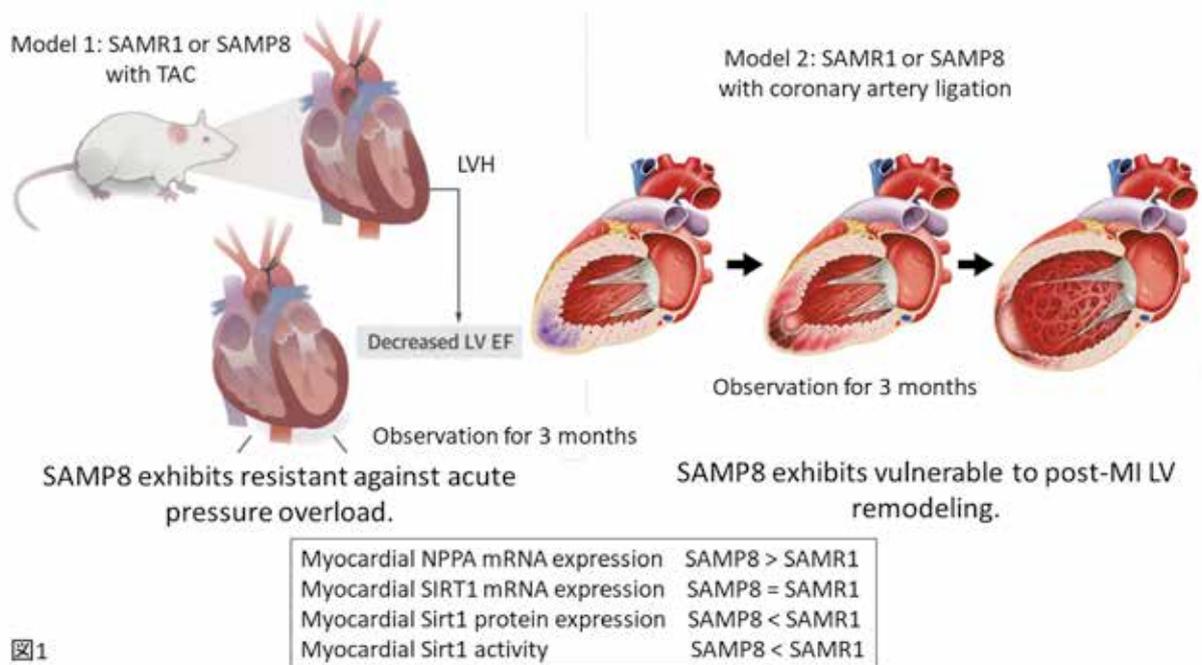


図1

矢野らの研究成果から、Rapamycin による mTORC1 活性抑制は、RIP1 の抑制的リン酸化による活性低下を介して TFEB を活性化し、TNF/ α VAD によるオートファジー障害を修復し、心筋細胞のネクロプトーシスを軽減することが明らかとなった。よって骨格筋肥大を目的とした mTOR1 シグナル活性化は、不全心筋においてネクロプトーシスを増加させる危険を伴うため、RIP1 を標的としたオートファジー・ネクロプトーシス間のバランス制御治療を併用することが、効率的な治療戦略となりうると考察された。

心筋細胞における RIP1 を介するオートファジー・ネクロプトーシス制御機構について図 2 に示す。

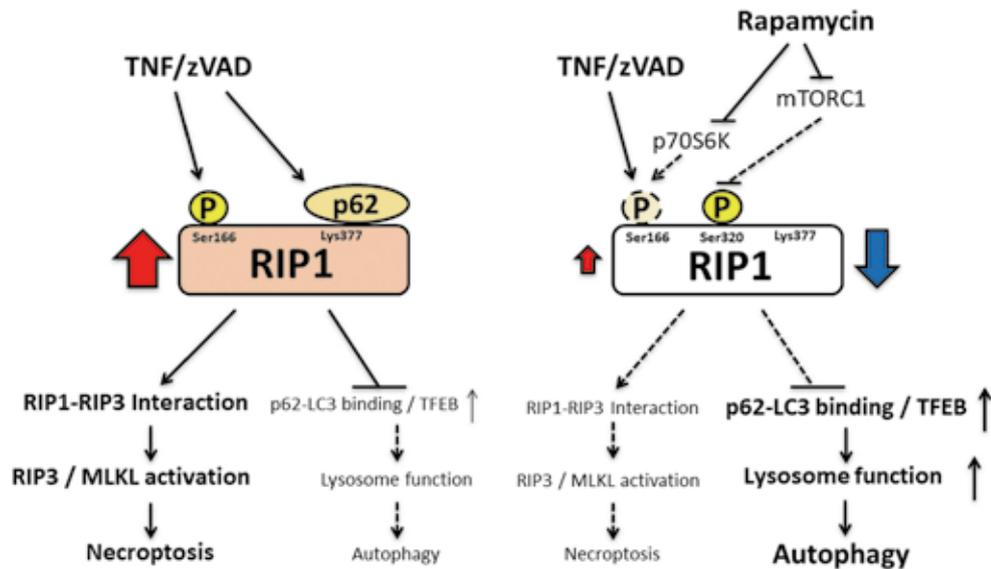


図2

内藤らの研究成果から、TAC による圧負荷心不全モデルにおける検討では、心肥大や心筋間質の線維化形成に鉄取り込み受容体 TfR1 が関与することが示されたが、骨格筋の変化は両群間で有意差を認めなかった。その理由として、TAC による心不全モデルでは心不全によるサルコペニア形成が十分ではなかったことが考察された。

次に萎縮骨格筋における鉄、TfR1 の関与を検討するために、下肢虚血モデルを用いて検討したところ、虚血後萎縮骨格筋における局所細胞内鉄代謝がその病態に関与すること、特に TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウスを用いた検討により、TfR1 が虚血後萎縮骨格筋の病態に関与することが明らかにされた。TfR1 は各細胞にユビキタスに発現している。TfR1 遺伝子ヘテロノックアウトマウス虚血後萎縮骨格筋で認めた結果が、骨格筋細胞や血管内皮細胞などどの細胞に依存するかは現時点では不明であり、今後のさらに検討していく予定である。本研究の成果から、相対的虚血がその病態に関与していると予想される心不全に伴うサルコペニア進行において、鉄代謝、特に TfR1 を介する細胞内への鉄取り込みに対する介入が、新たな治療戦略となりうることを示唆された。

虚血後萎縮骨格筋における TfR1 の役割を図 3 に示す。

本研究助成による成果は、新規のフレイル心不全合併動物モデルの確立、心筋及び骨格筋における mTOR シグナルの解明、虚血下肢におけるサルコペニア進展における鉄代謝関与の発見といった形で結実し、今後、フレイル・サルコペニア合併心不全に対する集学的治療戦略を構築していく上での重要な基礎的知見となると期待される。

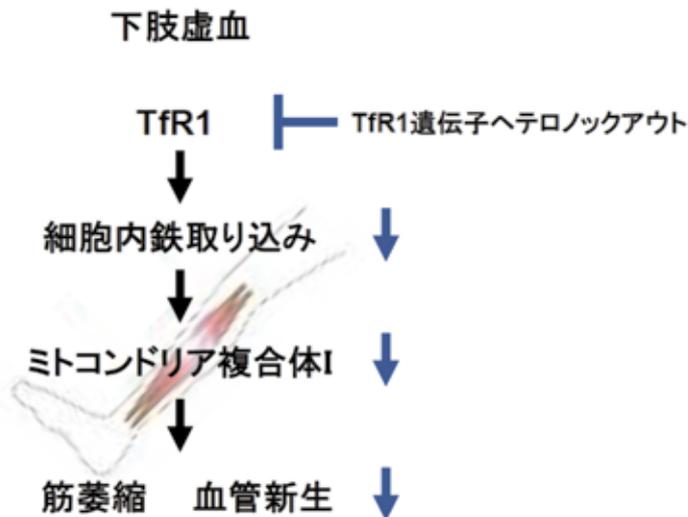


図 3

V 研究成果の発表

1. Yamamoto T, Shinmura K. Targeting sirtuins to modulate energy metabolism in heart disease. *Sirtuin Biology in Medicine*. (eds. Maiese K) Elsevier Science Publishing Co Inc., (印刷中) 2021/2/1 発刊予定
2. Shinmura K. Frailty, heart failure, and cognitive impairment: a triangle in elderly people. *Heart Metab* 76:8-12, 2018.
3. Abe K Yano T, Tanno M, Miki T, Kuno A, Sato T, Kouzu H, Nakata K, Ohwada W, Kimura Y, Sugawara H, Shibata S, Igaki Y, Ino S, Miura T. mTORC1 inhibition attenuates necroptosis through RIP1 inhibition-mediated TFEB activation. *Biochem Biophys Acta Mol Basis Dis* 1865:165552, 2019.
4. Yasumura S, Naito Y, Okuno K, Sawada H, Asakura M, Masuyama T, Ishihara M. Effects of heterozygous transferrin receptor 1 deletion in pathogenesis of renal fibrosis in mice. *Hypertension*. 75: 413-421, 2020.
5. Okuno K, Naito Y, Yasumura S, Sawada H, Asakura M, Masuyama T, Ishihara M. Haploinsufficiency of transferrin receptor 1 impairs angiogenesis with reduced mitochondrial complex I in mice with limb ischemia. *Sci Rep*. 9: 13658, 2019.
6. Okuno K, Naito Y, Yasumura S, Sawada H, Oboshi M, Nishimura K, Asakura M, Ishihara M, Masuyama T. Influence of dietary iron intake restriction on the development of hypertension in weanling prehypertensive rats. *Heart Vessels*. 33: 820-825, 2018.
7. Naito Y, Sawada H, Oboshi M, Okuno K, Yasumura S, Okuhara Y, Eguchi A, Nishimura K, Soyama Y, Asakura M, Ishihara M, Tsujino T, Masuyama T. Altered expression of intestinal duodenal cytochrome b and divalent metal transporter 1 might be associated with cardio-renal anemia syndrome. *Heart Vessels*. 32: 1410-1414, 2017.

iPS細胞を介さない心筋直接リプログラミングによる、心機能を改善するための網羅的な遺伝子検索と、重症化心不全患者への生体移植法の確立

《研究の概要》

重症拡張型心筋症の患者は、心筋細胞が広範囲に障害を受けると、心筋細胞が線維芽細胞に置換され、心臓の収縮能力が低下してしまう。根本的な治療は、心臓移植や人工心臓などが必須であるが、近年はドナー不足や合併症などの課題が散見される。近年、ES/iPS 細胞が注目されてきており、心臓の収縮能力を改善するために、心筋再生医療が次世代の究極的な治療のひとつとして注目されている。

Ieda らは iPS 細胞を介さず、線維芽細胞から直接心筋細胞 (Induced Cardiomyocyte:iCM と略す) を誘導する画期的な方法を発見し、全世界で初めて報告をした (Ieda M et al. Cell, 2010)。心臓発生に重要な 3 つの心筋特異的転写因子 (Gata4, Mef2c, Tbx5:以降 GMT と略す) を遺伝子導入し、iPS 細胞を介さずに約 20%の線維芽細胞が直接心筋様細胞に転換する事を確認した。しかし、線維芽細胞から誘導心筋細胞 (iCM 細胞) への誘導は 20%程度であり、さらに収縮能力を有する iCM 細胞は約 1%も満たさず、心筋再生のためには十分な細胞数が得られない。

本研究では 2 万個もあるというヒトの転写因子から、網羅的にスクリーニングを行い心筋成熟転写因子の選定する手法を構築する。その転写因子の中から、新たな心筋誘導転写因子 (Z 因子と名付ける) の候補を特定し、重症心不全モデルマウスに注入することで心機能改善することを目的とする。

我々は、本研究の目的を成功させるために、今までの基礎研究の結果を踏まえ、2 つの課題へ還元することが出来る。(1) 新規の心筋成熟転写因子の同定と、直接誘導による心筋細胞の機能評価 (2) 心不全モデルマウスにおける、生体内での直接リプログラミングによる心筋誘導 (移植実験)。

(1) 新規の心筋成熟転写因子の同定と、直接誘導による心筋細胞の機能評価

これまでの研究成果として、我々は 2 万個もあるというヒトの転写因子から、網羅的にスクリーニングを行い、拍動を有するように心筋を成熟させるような「心筋成熟誘導転写因子」の候補を同定する。

ある Z 因子が、細胞膜に関連することに注目すると、メカニカルストレスと関係するものであった。生体内組織の硬さによるメカニカルストレスを培養皿上に再現するために、アクリルアミドゲルに 6-アクリルアミドヘキサ酸 (ACA) を加え、様々な硬さの ACA ゲルを開発した。この ACA ゲル上で心筋リプログラミングを行った結果、足場の柔らかさ依存的に心筋マーカーの発現や拍動する心筋細胞数が増加し、心筋の硬さである 8 kPa において最も効率が改善されることがわかった。上記の研究成果を踏まえて、有名一流雑誌に再投稿中である。

上記の研究成果を踏まえて、有名一流雑誌に再投稿中である。

(2) 心不全モデルマウスにおける、生体内での直接リプログラミングによる心筋誘導 (移植実験)

まずは、新規の遺伝子編集技術を樹立するために、Fabry 病心筋症モデルマウスで生体外 (ex vivo) での遺伝子編集技術を樹立した。今後、生体外での遺伝子編集技術を樹立する予定である。

【共同研究者】

・ 五島 直樹 産業技術総合研究所バイオメディカル情報研究センター 主任研究員

研究報告

1. 研究の目的

世界保健機関(WHO)が発表した心疾患による年間死亡数は、生活習慣病の中で1位である。さらに、高齢化が進む2030年には2500万人に増加すると予測される。心臓で死亡する場合の50%以上は、心不全死である。特に、重症心不全では、薬剤では治療できず、心臓移植や人工心臓などが必須である。しかし、ドナー不足や合併症などの課題が散見される。2000年代に入り、細胞工学の発達により、ES/iPS細胞からの心筋細胞への分化誘導が可能となり、重症心不全への治療への応用が注目されている。しかし、ES/iPS細胞から心筋細胞を得るまで数か月を費やす事、ガン化問題など克服すべき問題があった。

重症拡張型心筋症の患者は、心筋細胞が広範囲に障害を受けると、心筋細胞が線維芽細胞に置換され、心臓の収縮能力が低下してしまう。根本的な治療は、心臓移植や人工心臓などが必須であるが、近年はドナー不足や合併症などの課題が散見される。近年、ES/iPS細胞が注目されてきており、心臓の収縮能力を改善するために、心筋再生医療が次世代の究極的な治療のひとつとして注目されている。

我々はiPS細胞を介さず、線維芽細胞から直接心筋細胞(Induced Cardiomyocyte:iCMと略す)を誘導する画期的な方法を発見し、全世界で初めて報告をした(Ieda M et al. Cell, 2010)。心臓発生に重要な3つの心筋特異的転写因子(Gata4, Mef2c, Tbx5:以降GMTと略す)を遺伝子導入し、iPS細胞を介さずに約20%の線維芽細胞が直接心筋様細胞に転換する事を確認した。しかし、線維芽細胞から誘導心筋細胞(iCM細胞)への誘導は20%程度であり、さらに収縮能力を有するiCM細胞は約1%も満たさず、心筋再生のためには十分な細胞数が得られない(図1)。

2010年にIedaらが発表してから、世界中で色々な報告されている。著名な研究室であるOlson研究室、Srivastava研究室から(Nature, 2012など)、相次いで報告された。2013年に当研究室のWadaらは、ヒトの心臓線維芽細胞からiCMを作成することを報告している(Wada R, Yamakawa H et al. PNAS, 2013)。

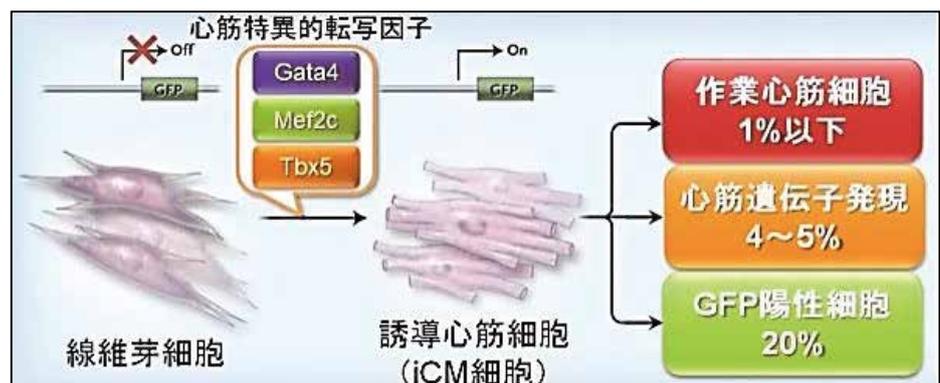


図1 心筋線維芽細胞からの心筋直接プログラミングでは作業心筋細胞は少ない(N Eng J Med. 2011, 364(2)を改編)

このように心臓再生医療の実現のため、本研究を含め全世界で心筋直接リプログラミング研究の激しさが増している。この重症心不全モデルマウスに対するiCM細胞のリプログラミング技術が確立すれば、ヒトへの応用も可能である。よって、重症心不全患者における再生医療の新たな可能性が期待できる。

本研究では 2 万個もあるというヒトの転写因子から、網羅的にスクリーニングを行い心筋成熟転写因子の選定する手法を構築する。その転写因子の中から、新たな心筋誘導転写因子 (Z 因子と名付ける) の候補を特定し、重症心不全モデルマウスに注入することで心機能改善することを目的とする。

II 研究の計画および材料と方法

(1) 研究計画・概要

我々は、本研究の目的を成功させるために、今までの基礎研究の結果を踏まえ、2 つの課題へ還元することが出来る(図 2)。

(1) 新規の心筋成熟転写因子の同定と、直接誘導による心筋細胞の機能評価 (図 2 方法 1)

(2) 心不全モデルマウスにおける、生体内での直接リプログラミングによる心筋誘導(移植実験)

(図 2 方法 2)

これまでの研究成果として、我々は 2 万個もあるというヒトの転写因子から、網羅的にスクリーニングを行い、拍動を有するように心筋を成熟させるような「心筋成熟誘導転写因子」の候補を同定した。

具体的には、心筋細胞に強発現しているが、誘導心筋細胞 (iCM 細胞) や線維芽細胞で弱発現の転写関連遺伝子を、アレイデータから網羅的に検索し 1221 個の転写因子を抽出した。産業技術総合研究所バイオメディカル情報研究センター 五島直樹主任研究員の研究グループとの共同研究を行い、120 個の新規の

心筋誘導転写因子の候補プラスミド提供を受け、「心臓ペースメーカー誘導転写因子」のスクリーニングを行った(図 3)。さらに当研究室で開発した心筋成熟転写因子特定システムを活用し、3 種の心筋成熟誘導転写因子の候補を同定した。

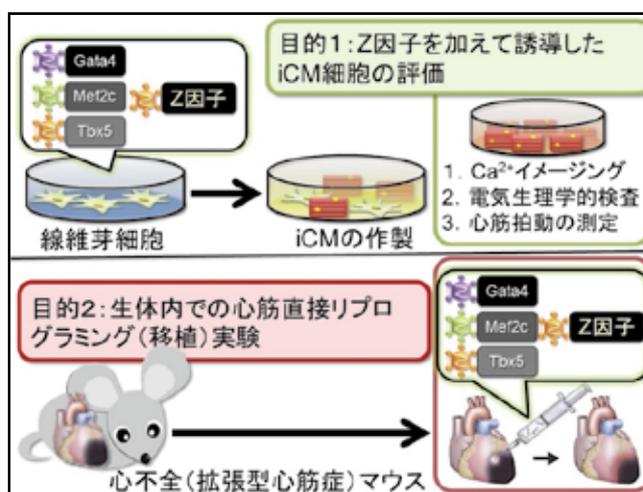


図 2 心不全(拡張型心筋症)モデルマウスへの誘導心筋細胞 (iCM)の移植実験は、2 つで実現する

(2) 研究計画・方法(詳細)

(2)-1 新規の心筋成熟転写因子の同定と、直接誘導による心筋細胞の機能評価(図 2 方法 1)

本研究を始めるにあたり、我々は新たな心筋分化誘導促進化合物を同定するため、心筋細胞に強発現しているが、誘導心筋細胞 (iCM 細胞) や線維芽細胞で弱発現の転写関連遺伝子を、アレイデータから網羅的に検索し 1221 個の転写因子を抽出した(図 3)。

今までの実験により、1221 個の転写因子の中から、iCM 細胞をさらに機能を有する「心筋成熟誘導転写因子」と考えられる 120 個の候補を選出し、さらに当研究室で開発したシステムを活用し、3 種類の心筋成熟を促

進する誘導転写因子の候補を同定した。

その候補因子の中で、1つの転写因子(「Z 因子」と名付ける)に、leda から特定した 3 つの転写因子 (GMT)に加えて線維芽細胞に遺伝子導入し、さらに培養条件を調整すると誘導心筋細胞が、約 30 倍多く拍動する細胞を得ることが出来た(図 4、図 5 左図)。さらに、残りの 2 種の候補転写因子についても検討中である。

免疫染色でも心筋関連タンパクが、「Z 因子」を加えることで増加している(図 5 左図)。GMT+Z 因子にて誘導した、誘導心筋細胞の遺伝子発現を検討すると、Actn2、NPPA、RyR2、cTnT が GMT による誘導心筋細胞より発現していることが分かった(図 5 右図)。Actn2、NPPA、RyR2、cTnT は、心臓の拍動機能を上昇させているので、Z 因子による効果と考えられる。

現在、GMT+Z 因子から誘導された誘導心筋細胞(iCM 細胞)について、Ca²⁺イメージングによる心筋収縮の評価、パッチクランプ法による電気生理学的な解析を進行中である。

GMT+Z 因子で誘導した iCM 細胞と、GMT から誘導した iCM 細胞を DNA アレイ解析することで、Z 因子における心筋細胞成熟化する分子生物学的機構を検討する。

また、クロマチン免疫沈降(ChIP)解析をすることで、Z 因子における時期特異的クロマチンリモデリング制御を検討し、ゲノムワイドに分子生物学的制御機構を明らかにする。

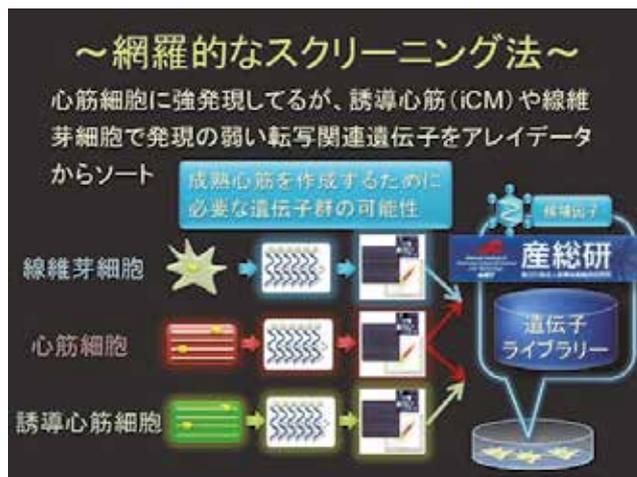


図 3 網羅的な心筋成熟転写因子スクリーニング法



図 4 GMT(3 因子)に Z 因子をくわえることで拍動心筋細胞を数多く得ることが出来る

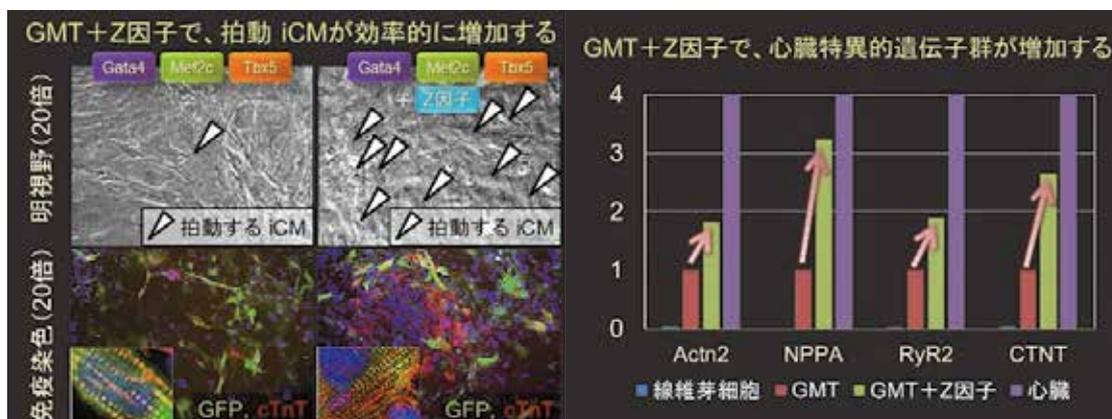


図 5 GMT に Z 因子を加えると iCM 細胞が 30 倍得ることが出来た (左図:免疫染色像、右図:心臓特異的遺伝子)

(2)-2 心不全モデルマウスにおける、生体内での直接リプログラミングによる心筋誘導(図 4 方法 2)

我々は、今までの研究で、心筋梗塞モデルマウスを使用し Gata4、Mef2c、Tbx5 の 3 因子を 1 遺伝子上につないだポリシストロニックベクターを開発し、成熟心筋の誘導が 2 倍に改善した(図 6) (Inagawa K, Yamakawa H, Ieda M et al, Circulation Research, 2012)。しかし、GMT を心筋梗塞巣に注入した心機能を改善させるには至らなかった。

本研究で発見した新規の心臓ペースメーカー誘導転写因子(Z 因子)を GMT に付加することで、試験管内での実験では 10~30 倍の拍動する成熟した心筋細胞が得られたため、生体内での実験でも心機能を改善できるまで誘導心筋細胞を十分量得られる可能性がある。

図 8 を参考に、GMT を 1 遺伝子上につないだポリシストロニックベクターにさらに Z 因子をつなげたベクターを作製する。心不全モデルとして大動脈縮窄術(TAC:transverse aortic constriction)の長期 Phase のマウスを使用し、上記のベクターを用いて心筋へ注入し、生体内での心筋直接リプログラミングを行う。

GMT に Z 因子を加えたポリシストロニックベクターを、心筋内に注入することで心筋細胞を生成することを証明するため、心臓切片を切り出し免疫染色を行う。また、心臓 MRI、ランゲンドルフ、心エコーなどによる心機能評価、および移植心筋細胞の評価を行う。また、心筋細胞を単離し、生体内でリプログラミングをした心筋細胞をセルソーターで回収し、定量的 PCR、DNA アレイ解析による遺伝子発現や、パッチクランプによる電気学的生理学的検査を行う。



図 6 GMT を 1 遺伝子につないだポリシストロニックベクター
(Inagawa K, Yamakawa H et al, Circulation Research, 2012 より)

III 研究成果

(1) 新規の心筋成熟転写因子の同定と、直接誘導による心筋細胞の機能評価

ある Z 因子が、細胞膜に関連するしかし心筋リプログラミングを臨床応用するためにはさらなる効率改善と分子機序の解明が必要である。Z 因子は、生体内のメカニカルストレスに関係するものであることが分かった。そこで、Z 因子を活用し、心筋リプログラミングを促進できるのではないかと考えた。

実際に、受精卵の生体内での分化・成熟は、iPS 細胞などを用いた培養皿上での分化、成熟と比べ、圧倒的にスピードが速く、精度が良い。その理由として、in vitro では再現されていない3次元空間的な影響や伸展刺激、圧刺激などのメカニカルストレスが関与している可能性が考えられる。Ruan らは、コラーゲンゲルを用いて心臓前駆細胞を2次元、3次元環境下でそれぞれ分化させた (Ruan JL, et al. Stem Cells 33:2148-2157, 2015.)。その結果、2次元環境下では、平滑筋細胞への分化が促進され、一方3次元環境下では心筋細胞への分化が

促進された。さらに、伸展刺激は心臓マーカー (β MHC, cTnT) の発現を促進することで、心筋細胞の成熟を促進することを見出した (Ruan JL, et al. Stem Cells 33:2148-2157, 2015.)。

まず生体内組織の硬さによるメカニカルストレスを培養皿上に再現するために、アクリルアミドゲルに 6-アクリルアミドヘキサン酸 (ACA) を加え、様々な硬さの ACA ゲルを開発した。この ACA ゲル上で心筋リプログラミングを行った結果、足場の柔らかさ依存的に心筋マーカーの発現や拍動する心筋細胞数が増加し、心筋の硬さ

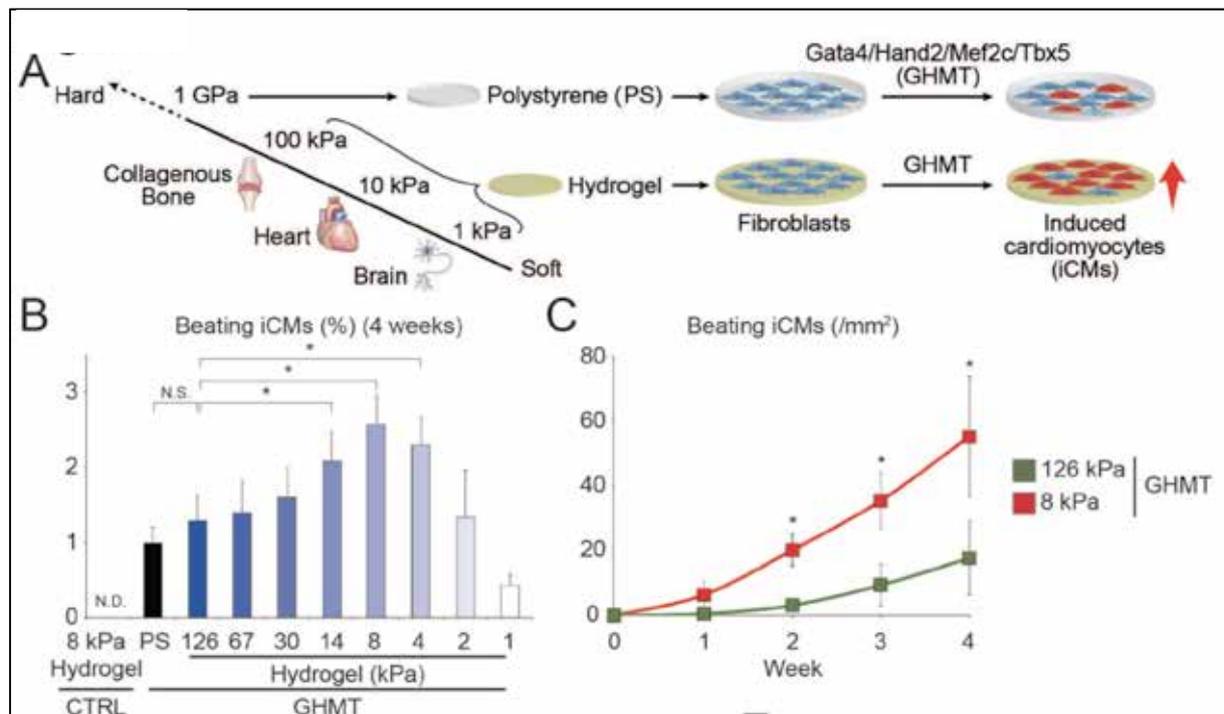


図 7 8kPa ACA ゲルが、誘導心筋細胞を効率的に拍動することが可能であった。

である 8 kPa において最も効率が改善されることがわかった (図 7)。

次に分子機序を解明するために、柔らかい ACA ゲル上で誘導した心筋細胞と硬い ACA ゲル上で誘導した心筋細胞の網羅的な遺伝子発現を比較した。その結果、柔らかい ACA ゲル上で誘導した心筋細胞では心臓関連遺伝子が上昇し、細胞増殖や遊走などの線維芽細胞関連遺伝子が低下することがわかった。

ある Z 因子が、細胞膜に関連するしかし心筋リプログラミングを臨床応用するためにはさらなる効率改善と分子機序の解明が必要である。

細胞は硬い足場に接着するとシグナル A を介して細胞増殖や遊走を促進する。そこで、Z 因子に対する shRNA を用いて、硬い ACA ゲル上で Z 因子を抑制し心筋リプログラミングを行った。その結果、心筋マーカーの発現や拍動する心筋細胞数が増加し、心筋リプログラミングが促進されることがわかった。またシグナル A の阻害剤を用いた場合も同様に、心筋リプログラミングが促進されることがわかった。以上の結果から、柔らかい足場上ではシグナル A が抑制されることで、線維芽細胞関連遺伝子の発現が抑制され、心筋リプログラミングが促進されるという新たな分子機序を解明した。

この結果をふまえて、Stem Cell Reports に、再投稿中である。

(2) 心不全モデルマウスにおける、生体内での直接リプログラミングによる心筋誘導(移植実験)

心不全モデルマウスとして、TAC(transverse aortic constriction)モデルマウスを使用する予定であった(図8)。しかし、生体内心筋直接リプログラミング(移植)実験を行うためには、TACモデルマウスでは、マウスの週齢や、大動脈径の個体差、手術での外科的侵襲などの欠点があり、実験系は安定しなという欠点がある。そのため移植実験の系マウスを変更する必要があった。

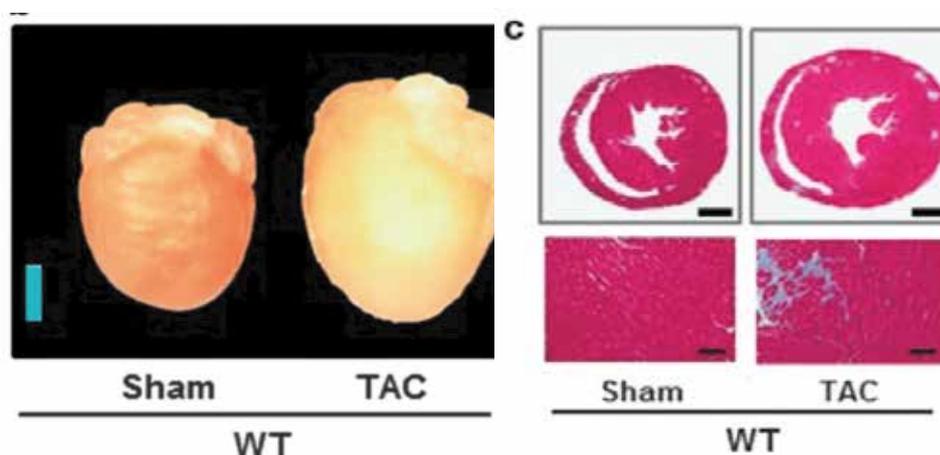


図 8 心不全(心筋症)モデルマウスとして、TAC(transverse aorticconstriction)モデルマウスへの使用

その中での変更点は、以下のようになる。

(2)-1 心不全モデルマウスとして、Fabry 病のモデルマウスを使用する

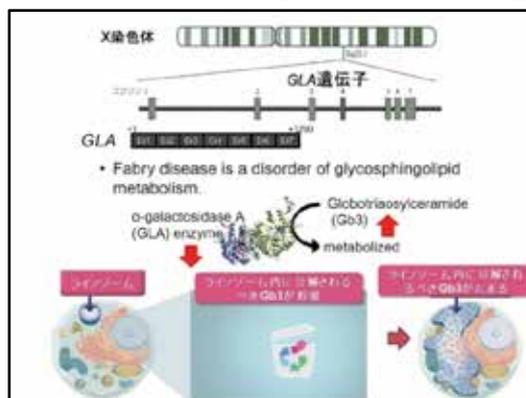
(2)-2 生体内直接リプログラミングとして、日本独自で開発した遺伝子編集(GSE technology)を行い心筋リプログラミングを行う

(2)-1 心不全モデルマウスとして、Fabry 病のモデルマウスを使用する

本研究では、Fabry 病モデルマウスを使用することが1つ目の変更内容である。Fabry 病とは、リソゾームの酵素(α -ガラクトシダーゼ(以降、 α GAL))が欠損することで、細胞に不必要な糖脂質(グロボトリアオシルセラミド(以降、Gb3))が溜まるための全身疾患である。

そこで、病気が悪くなると腎臓、心臓、脳などに臓器障害を来し、突然死することもある(図9)。原因遺伝子は、X染色体に存在しているGLA遺伝子である。Fabry病は希少疾患の1つであり、10万人に1人程度であると言われている。治療は2週間に1度の酵素補充療法しかなく、しかも、年に2500万円程度かかる。現在も、新しい治療を樹立することは急務となる。

Fabry 病モデルマウスは、GLA 遺伝子のノックアウトモデルマウスである。Fabry 病モデルマウスは、心臓にも症状が現れ心肥大を呈し、長期的には心不全と言われている。



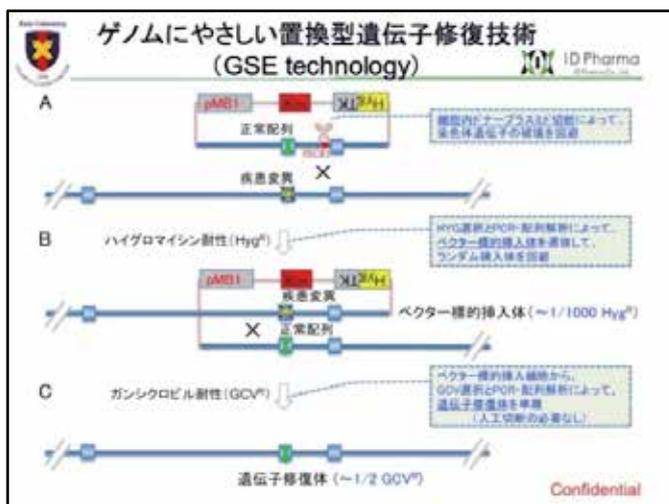
(図9) ファブリー病とは、GLA 遺伝子の単一遺伝性疾患である

Fabry 病モデルマウスは、GLA 単一遺伝子をノックアウトしたものであるため、マウス自体の個体差も少なく、実験系としても安定している (Ohshima T, Kulkarni AB et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Mar 18;94(6):2540-4.)。

(2)-2 生体内直接リプログラミングとして、日本独自で開発した遺伝子編集 (GSE Technology) を行い心筋リプログラミングを行う

本研究では、Fabry 病のモデルマウスに対する、日本独自で開発した遺伝子編集治療を行うことである。特に、この研究で特徴的で、重要であるのが ID ファーマ社草野らが 2019 年 3 月に特許を取得した日本独自の新規遺伝子編集技術 (ゲノムに優しい遺伝子編集技術 (A New technique for Genome Safety Editing、以降 GSE technology)) を活用し新規遺伝子編集治療法をの確立する (図 10)。

GSE technology を使用し、Fabry 病のターゲットとなる遺伝子 GLA を作成に成功した。



(図 10) ゲノムにやさしい置換型遺伝子修復技術 (A New technique for Genome Safety Editing: GSE technology) のシエーマ

IV 考察

(1) 新規の心筋成熟転写因子の同定と、直接誘導による心筋細胞の機能評価

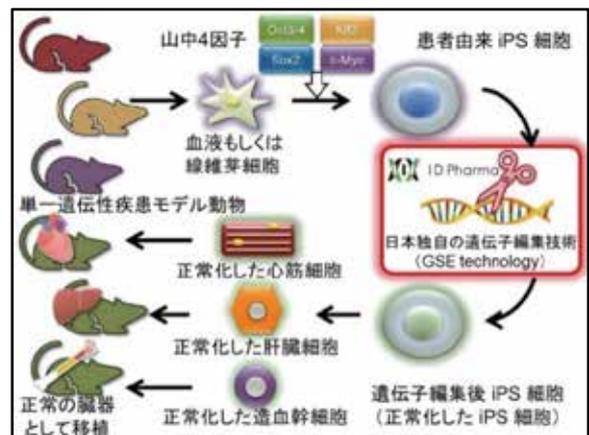
ある Z 因子が、細胞膜に関連するしかし心筋リプログラミングを臨床応用するためにはさらなる効率改善と分子機序の解明が必要である。

細胞は硬い足場に接着するとシグナル A を介して細胞増殖や遊走を促進する。そこで、Z 因子に対する shRNA を用いて、硬い ACA ゲル上で Z 因子を抑制し心筋リプログラミングを行った。その結果、心筋マーカーの発現や拍動する心筋細胞数が増加し、心筋リプログラミングが促進されることがわかった。またシグナル A の阻害剤を用いた場合も同様に、心筋リプログラミングが促進されることがわかった。以上の結果から、柔らかい足場上ではシグナル A が抑制されることで、線維芽細胞関連遺伝子の発現が抑制され、心筋リプログラミングが促進されるという新たな分子機序を解明した。

この結果をふまえて、Stem Cell Reports に、再投稿中である。

(2) 生体内直接リプログラミングとして、日本独自で開発した遺伝子編集 (GSE Technology) を
行い心筋リプログラミングを行う

究極的には、生体内での遺伝子編集を行い直接リプログラミングが目的である。その実現化はハードルが非常に高い。生体内での直接リプログラミングをする前に、体外 (Ex Vivo) にて遺伝子編集した iPS 細胞を、心筋細胞、肝臓細胞、造血幹細胞へ誘導し、移植をする研究を行う (図 11)。さらに、今研究が必要となる。



(図 11) 動物レベルでの GSE technology を用いた
遺伝子編集治療による移植術の確立 (Ex Vivo)

V 研究成果の発表

上記の研究成果として、Stem Cell Reports で、再投稿中である。さらに、図 13 の如く日本の遺伝子編集技術を樹立し、研究論文を執筆する予定である。

動脈壁と微小血管での慢性炎症が心臓病発生にもたらす病態解明

《 研究の概要 》

動脈硬化疾患は慢性炎症を基盤とした病態であり、白血球や白血球と血小板の相互作用は動脈硬化において重要な役割を持つ。安は、微小循環での白血球活性化を評価するシステムを開発し、糖尿病や急性冠症候群症例でその評価システムを試用した。今回、心筋微小血管を模したシリコン微細加工を利用したマイクロチャネルアレイ回路による新しい微小血管モデルを開発した。このモデルでは血液細胞の動きが全血のまま無染色で観察可能である。赤血球や白血球が一時的に毛細血管を通過する際に、変形し、凝集するのが観察でき、マイクロチャネルの直径が段階的に減少するため、血小板の活性化が少ない利点がある。新しく作成したマイクロチャネルアレイ回路による微細血管モデルを用いて、流動中の白血球活性化の指標を検討した。

佐田は、生活習慣病によって慢性炎症が惹起される新しい機序の解明と治療法の開発をめざした。

動脈硬化は動脈壁、メタボリックシンドロームは脂肪組織における慢性炎症を基盤にしたという概念が確立している。しかし、生活習慣病によって、動脈壁や脂肪組織に如何に慢性炎症が惹起されるのか不明な点が多い。一方、動脈硬化巣内の細胞がアポトーシスやピロトーシス、ネクローシスといった細胞死を起こしており、動脈硬化の進展に関与したことが示唆されている。また、肥満で大型化した脂肪細胞に細胞死が生じており、cell free DNA (cfDNA) といった遊離核酸断片を放出して、マクロファージを脂肪組織へリクルートして活性化していることを申請者は見出した。そこで、本研究では、動脈や脂肪組織において、生活習慣病によって誘導される細胞死と慢性炎症の関連ならびにその分子機序の解明、さらにはそれに基づく治療法の開発を目指した。

平田は、川崎病血管炎における慢性炎症の病態解明を目的に実験を行った。川崎病は、何らかの感染の関与が強く疑われるが現在も病因不明である。最近では、細菌やウイルスなどの病原体に反応する自然免疫受容体は、崩壊した自己細胞由来成分などの内因性物質にも反応し、過剰な炎症反応を呈することで慢性炎症を基盤とする病態において重要な役割を果たすことが明らかとなっている。特に、壊死細胞由来成分である HMGB1 (high mobility group box1) は、川崎病血管炎との関連の可能性が示唆されている。川崎病血管炎と自然免疫の関連を明らかにするため、HMGB1 の受容体の一つである Toll 様受容体 (Toll-like receptor:TLR) に着目して実験を行った。今までの研究で確立した、野生型マウス (C57BL/6) の腹腔内に CAWS (Candida albicans water soluble fraction) を投与して冠動脈血管炎病変を再現する川崎病モデルマウスを用いて、TLR2、4、9 欠損マウスに CAWS を投与し、冠動脈血管炎病変の形成を野生型マウスと比較した。

安 隆則	獨協医科大学日光医療センター 心臓・血管・腎臓内科教授	動脈硬化性疾患における微小循環の評価
佐田 政隆	徳島大学大学院医歯薬学研究部 循環器内科学教授	動脈壁と周囲脂肪組織における慢性炎症の病態解明
平田陽一郎	東京大学医学部附属病院 小児科講師	川崎病血管炎における慢性炎症の病態解明

《 研究報告 》

I 研究目的

高齢化ならびに生活習慣病の蔓延により、本邦においても動脈硬化性疾患が急速に増加している。しかし、生活習慣病のような冠動脈危険因子によって、どのようにして動脈壁や微小血管で慢性炎症が惹起されるのか、不明な点が多い。微小血管を流れる白血球と血小板は相互に影響しながら、動脈硬化の進展、そしてプラーク破綻に基づく心血管イベント発症まで深く関与する。しかし臨床現場で使用できる白血球と血小板の活性化の指標はほとんどない。また、川崎病は5歳以下の小児に好発する急性の全身性血管炎をきたす症候群であり、巨大冠動脈瘤の合併は時に致命的となる。その病因は不明なままであり、有効な治療法は存在しない。動脈壁と微小血管での慢性炎症が心臓病発生にもたらす。

そこで、本研究では、動脈壁と微小血管での慢性炎症が心臓病発生にもたらすプロセス解明を目指す。三研究者が、それぞれの側面から動脈硬化性疾患を研究し、相互に情報交換を行い、新しい診断法、治療法の開発を目指す。

安は、工学系研究者との共同研究で、単純な毛細血管モデルであるマイクロチャネルアレイ回路による血液流動性測定装置を用いて長年研究を続けた結果、血液流動性を有用なスクリーニングならびに治療評価バイオマーカーとして提唱してきた。マイクロ流路加工技術の高度化に基づき、より生体に近い微小血管マイクロ流路(DKAMCM1-60-7-4.5D)を作成し、このマイクロ流路を通過する血球の挙動が観測可能な装置に組み込んで、血液流動性測定の再現性を高め、かつ新しい白血球と血小板の活性化の指標を開発し、国内特許を申請した(特開2017-104095)。血液流動性は、微小循環血行動態に大きく影響を与え、動脈硬化性疾患をはじめ様々な疾患の病態生理において重要な役割を演じており、心血管イベントの強力な予測因子でもある。本研究では、健常者・糖尿病患者・虚血性心血管患者を対象として、マイクロ流路による白血球の活性化と血液流動性の測定と微小循環観察用ハンドヘルド暗視野顕微鏡での舌下微小循環観察画像と対比する横断+縦断研究を行い、それらの測定意義を検討し、運動療法の微小血管での慢性炎症に与える効果を明らかにし、その成果に基づく動脈硬化疾患に最適な運動様式の開発を目指す。

佐田は、動脈壁と周囲脂肪組織における慢性炎症の病態解明を図る。動脈硬化は動脈壁、メタボリックシンドロームは脂肪組織における慢性炎症を基盤にするという概念が確立している。しかし、生活習慣病によって、動脈壁や脂肪組織に如何に慢性炎症が惹起されるのか不明な点が多い。一方、動脈硬化巣内の細胞が細胞死を起こしており、動脈硬化の進展に関与することが示唆されている。また、肥満で大型化した脂肪細胞に細胞死が生じており、cell free DNA (cfDNA)といった遊離核酸断片を放出して、マクロファージを脂肪組織へリクルートして活性化していることを申請者は見出した。そこで、本研究では、動脈や脂肪組織において、生活習慣病によって誘導される細胞死と慢性炎症の関連ならびにその分子機序の解明、そして、その成果に基づく動脈硬化やメタボリックシンドロームに対する治療法の開発を目指す。

平田は、川崎病血管炎における慢性炎症の病態解明を図る。川崎病の病因は、疫学調査の結果などから何らかの感染の関与が強く疑われるが、これまで半世紀の研究でも不明の

ままである。近年の免疫学研究の発展により、個別の病原体特異的な獲得免疫系ではなく、包括的な自然免疫系の病原体センサーに関する知見が蓄積されてきた。これまで病原体センサーは、病原体だけを特異的に認識し自己成分は認識しないと考えられてきたが、自然免疫に関係する Toll 様受容体 (Toll-like receptors :TLRs) などのセンサーは自己由来内因性リガンドにも応答し、過剰な炎症反応を呈することにより、慢性炎症を基盤とする腫瘍や動脈硬化などのさまざまな病態において重要な役割を果たすことが明らかとなっている。これらのことから、本研究においては、川崎病血管炎における自然免疫系の果たす役割を明らかにし、病態生理の解明および新たな治療法の開発に貢献することを目的とする。

II 研究計画及び材料と方法

安は動脈硬化性疾患における微小循環を主にヒトを対象にして研究する。佐田はアテローム動脈硬化症、平田は川崎病血管炎における慢性炎症の病態を基礎的ならびに臨床的に検討する。各研究者間でデータの交流を行い、動脈硬化性疾患の病態を把握し、診断や治療法の開発に役立てる。個々の研究者の計画、方法は以下のとおりである。

動脈硬化性疾患における微小循環の評価 (安担当)

1) 微小循環と血液流動性に関する横断+縦断研究

健常者・糖尿病患者・虚血性心血管患者を対象(目標症例数：各群 100 例)として、新しく開発したマイクロ流路を Microchannel flow analyzer に組み込んで血液流動性と白血球の活性度の測定を行い、微小循環観察用ハド[®]ハド[®]暗視野顕微鏡での舌下微小循環観察画像と対比する断面研究、ならびにその 1 年後に同検査を繰り返しその変化を観察する。また、1 年ごとに 3 年間追跡して心血管イベント予後調査を行う。微小循環観察用ハド[®]ハド[®]暗視野顕微鏡で記録した舌下微小循環観察画像はコンピューターシステムに連続記録され、オフライン解析で停滞白血球の頻度と血流状態、毛細血管のグライコカリックス傷害の定量評価を Vink ら (J Appl Physiol 2008) の方法にしたがって行う。この舌下微小循環指標とマイクロ流路による白血球・血小板の活性化や血液流動性を対比し検討する。

2) 高強度インターバル運動療法の微小循環と白血球流動性に及ぼす影響の解明

高強度インターバルトレーニングは、時間の短い無酸素運動と、負荷の低い回復時間を交互に繰り返すトレーニング方法であり、運動能力を向上させ、かつ糖代謝を改善し脂肪を燃焼させる。近年、心疾患患者において、有酸素運動単独よりも最大酸素摂取量を増加させ、心血管イベントリスク発生を有意に減少させることが報告された。高強度インターバル運動療法が、白血球活性化をおさえ、血液流動性と微小循環を改善して、運動耐容能を向上させるかを、明らかにするために、40 歳以上 80 歳以下の慢性心不全、心筋梗塞症、末梢動脈疾患患者で運動療法を行う意志があり、5 ヶ月間週 1 回以上外来心臓リハビリテーションに通院可能かそれに準じる運動療法を自宅で実施できる患者を対象として、通常リハビリテーション群と高強度インターバルトレーニング群に無作為に分け比較研究を実施する。(目標症例数：46 例、両側検定で有意水準 5%、検出力 80%を保持するのに必要な標本の大きさを計算)

動脈壁ならびに血管周囲脂肪組織での慢性炎症の病態解明 (佐田、平田担当)

1) 動脈壁ならびに血管周囲脂肪組織に生じる慢性炎症の病態の観察

動物モデルならびに臨床材料を用いて動脈硬化における慢性炎症の病態を把握する。特に、動脈硬化病変と血管周囲脂肪における相互作用を検討する。また、脂肪ならびに動脈硬化病変での細胞死と慢性炎症との関連を詳細に検討する。自己由来遊離核酸断片 cf DNA をはじめとして細胞死と関連する炎症惹起分子をピックアップする。

2) 肥満による脂肪組織慢性炎症における自己由来遊離核酸断片と TLR 9 の役割の解明

野生型マウスと TLR9 欠損マウスに、高脂肪高スクロース食負荷後、経口ブドウ糖負荷ならびに腹腔内インスリン負荷を行い、インスリン抵抗性の推移を検討する。皮下ならびに内臓脂肪組織、血液を採取し、脂肪細胞死、マクロファージ浸潤の多寡や活性化の程度を比較する。また、抗ペリリン染色や TUNEL 染色を行い、脂肪細胞ならびに浸潤した炎症細胞の傷害度とアポトーシスを評価する。さらに、二重鎖 DNA や一重鎖 DNA に

対する抗体を用いた免疫電子顕微鏡を行い、脂肪細胞の死、マクロファージの浸潤、cfDNAの局在を観察する。また、炎症惹起物質としての cfDNA の血中濃度を測定する。

cfDNA が慢性炎症を惹起する標的となる細胞を明らかにするために、野生型マウス (WT) と TLR9 欠損マウス (TLR9KO) 間で骨髄移植を行う。4 週齢において 9Gy の X 線照射を行い、①WT→WT, ②TLR9KO→WT, ③WT→TLR9KO, ④TLR9KO→TLR9KO の骨髄移植を行う。8 週齢から高脂肪高スクロース食を開始して、インスリン抵抗性、脂肪細胞での慢性炎症における骨髄由来細胞の TLR9 の役割を明らかにする。

3) 動脈硬化における慢性炎症における自己由来遊離核酸断片と TLR9 の役割の解明

動脈硬化惹起刺激による血管細胞死と自己由来遊離核酸断片である cfDNA への影響を検討する。動脈硬化モデルである ApoE 欠損マウスと TLR9 欠損マウスを交配することで TLR9/ApoE 2 重欠損マウスを作成する。西洋型食餌を 8 週齢から 20 週齢まで与え、大動脈の en face sudanIV 染色ならびに大動脈基部の Oil Red O 染色、sirius red 染色を行い、病変の進行や不安定化を比較検討する。

野生型マウス (WT) と TLR9/ApoE 2 重欠損マウス間で骨髄移植を行い、動脈硬化の進展と不安定化への骨髄由来細胞の TLR9 の役割を検討する。

4) 組織特異的 DNAase 欠損マウスを用いての検討

理化学研究所から DNAaseII-flox マウス (B6.129-Dnase2a) と、LysM-Cre ノックインマウスならびに aP2-Cre トランスジェニックマウスの分与を受け、交配によりマクロファージもしくは脂肪細胞特異的に DNaseII を欠損するマウスを現在、作製中である。このマウスに高脂肪食を投与して脂肪組織での炎症を評価する。また、ApoE 欠損マウスと交配し、動脈硬化病変の広がりや不安定化に対する自己由来 cfDNA の役割を検討する。このような解析から、メタボリックシンドロームや動脈硬化において、死細胞が放出する cfDNA の役割を検討する。

5) 自己由来遊離核酸断片・TLR9 を標的とした新規生活習慣病治療法の開発

細胞死により遊離される物質とその受容体をブロックすることにより、慢性炎症を標的とした新規の生活習慣病対策を考案する。具体的には、TLR9 をブロックすることが可能かどうかを検証する。予備実験においては、inhibitory オリゴヌクレオチド iODN2088 (5' -tcc tga gct tga agt-3') が CpG-ODN によるマクロファージならびにマウス細胞株 RAW264.7 の活性化を有効にブロックすることを確認している。そこで、iODN2088 を db/db 肥満マウスの腹腔内へ投与 (150 μg を週三回) して、脂肪組織での炎症細胞浸潤やインスリン抵抗性が改善されるかどうかをコントロールオリゴヌクレオチドと比較検討する。ApoE 欠損マウスに iODN2088 ならびにコントロールオリゴヌクレオチドを腹腔内へ投与 (150 μg を週三回) して、動脈硬化の進展と不安定化を抑制するかどうかを検討する。

川崎病血管炎での慢性炎症の病態解明 (平田担当)

1) マウス川崎病モデルの確立

野生型マウス (C57BL/6) において *Candida albicans* water soluble fraction (CAWS) を腹腔内に投与することで、冠動脈瘤を伴う川崎病類似の血管炎が生じることが報告された (Immunopharmacol Immunotoxicol. 2004;26(4):527-43.)。この方法を再現して、経時的に血管炎病変の範囲・重症度を計測する。病理切片を用い、マクロファージ・リンパ球などの病変への免疫担当細胞の浸潤と各種の自然免疫関連の受容体の発現を、免疫染色を用いて検討する。

2) 遺伝子改変マウスをもちいての病変検討

CAWS を各種 TLR 欠損マウス、および TLR の下流に位置する MyD88 欠損マウスに投与し、病変形成の変化を観察する。これらのマウスの血清を経時的に採取し、各種炎症性サイトカインの血中濃度を測定して病態の変化を検討する。

3) 川崎病血管炎における炎症惹起機構の探索

詳細な機構を明らかとするため、RAW264.7 cell および各種欠損マウスより採取した腹腔内マクロファージの培養液中に、TLR のリガンドおよび中和抗体を添加し、炎症性サイトカ

インの発現の変化を解析する。

III 研究成果

安は、微小循環での白血球活性化を評価するシステムを開発し、糖尿病や急性冠症候群症例で測定し、全身骨格筋電気刺激の影響をそのシステムで評価した。

1. 全血での流動中における白血球活性化の指標の検討： 新しいマイクロチャンネルアレイ回路の構成は、長さ、幅、深さが 60, 7, 4.5 μm の 40 の毛細血管を模したキャピラリーアレイユニット、4つのキャピラリーアレイユニットでマイクロサーキュレーションユニット、さらに 42 個のマイクロサーキュレーションユニットを動脈から静脈に接続する構造とした。作成した疑似血管よりも赤血球や白血球は大きく、毛細血管で一時的に変形する様子が確認された。(図 1)

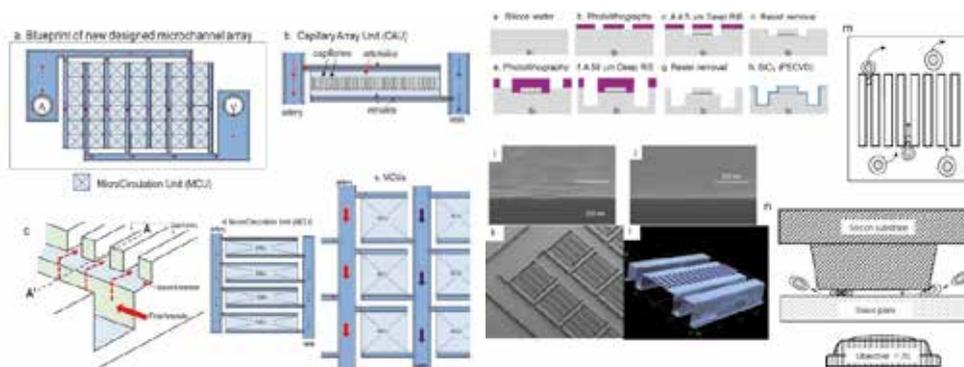


図 1. 新しいマイクロチャンネルアレイ回路の構成と作成行程

対象は、健常者 79 例、糖尿病患者 42 例、急性冠症候群 36 例。安静座位で血液採取を行い、2 種類の抗凝固剤 (ヘパリン, EDTA-2Na) を採血管に注入した。20 分以内に MC-FAN と新しく作成したマイクロチャンネルアレイ回路を用いて測定を行った。

結果：FMLP を投与した全血は、ヘパリン採血管では全血通過時間と接着白血球数は増加したが、ヘパリン+EDTA-2Na 採血管ではわずかにしか増加しなかった。(図 2) 健常者においてヘパリン採血管とヘパリン+EDTA-2Na 採血管を比較すると、補正全血通過時間は有意にヘパリン+EDTA-2Na 採血管において有意に短く、接着白血球数も有意に少なかった。糖尿病患者、急性冠症候群の患者と比較すると、健常者は接着白血球数が少なかった。ヘパリン採血管と (ヘパリン+EDTA-2Na 採血管) の補正全血通過時間の差は、健常者に比べ糖尿病患者、急性冠症候群患者で増加した。MPO 濃度は健常者で低かった。ヘパリン採血管とヘパリン+EDTA-2Na 採血管の補正全血通過時間の差は、MPO 濃度、接着白血球数と正の相関を示した。(図 3)

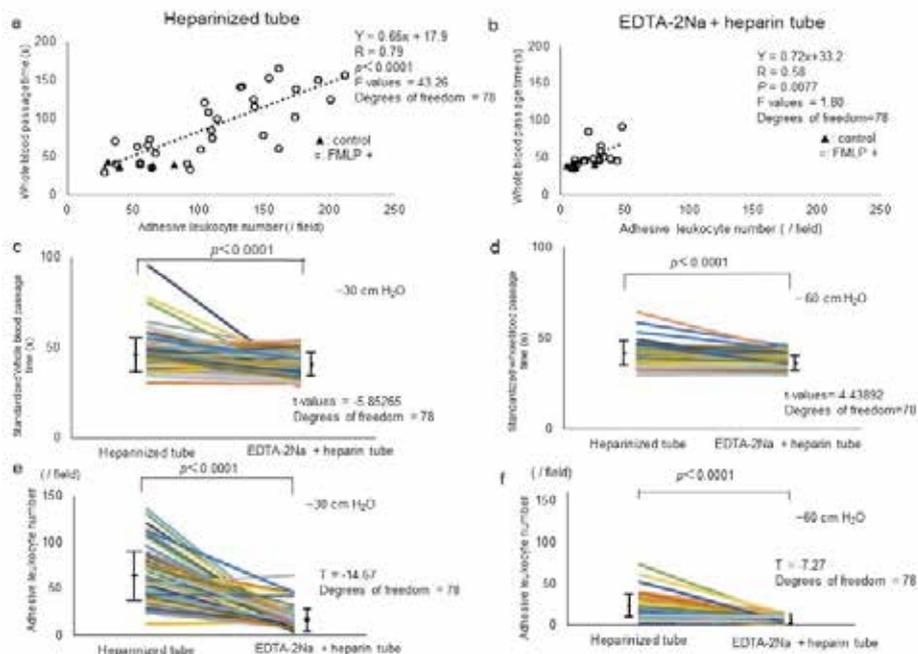


図 2. ヘパリン採血管とヘパリン+EDTA-2Na 採血管での血液流動性検査データ

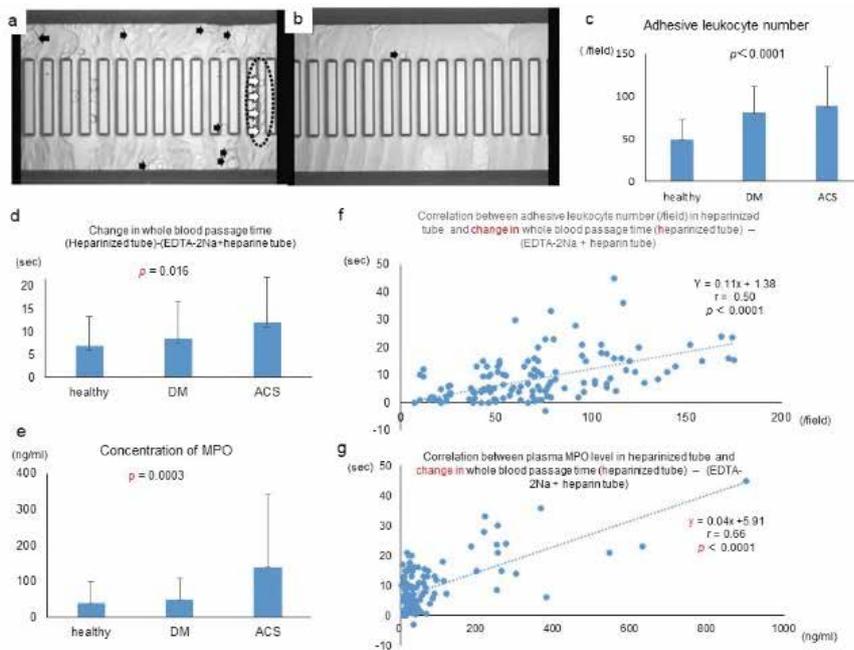


図 3. 健常人、糖尿病患者、急性冠症候群患者の各パラメータ

2. 全身性神経筋電気刺激がマクロとミクロの循環動態へ与える影響についての検討

wearable device による大胸筋を含めた体幹と四肢近位部への電気刺激が、マクロとミクロの循環動態に与える影響を 20 歳～30 歳の健常な男女を対象に、被験者が耐えられる最大の強度で電気刺激を与えた。安静時、骨格筋電気刺激(5 分)、回復期(10 分)に心電図、心臓超音波検査、血中乳酸値、血液流動性を経時的に測定した。ハンドベルドビデオ顕微鏡(Cytocam)を使用し、総血管密度(TVD)、灌流密度(PVD)、マイクロ循環流量指数(MFI)も測定した。電気刺激中ならびに回復期に不整脈は検出されず、心臓超音波検査で左室駆出率や拡張能は全例で維持されたが、1 例のみ軽度僧帽弁逆流を認めた。血糖低下、乳酸上昇、アドレナリンの軽度上昇、酸化ストレスの上昇がみられるなど運動負荷としては十分であったが、血液流動性に影響を与えなかった。また、in vivo 微小循環指標にも負荷前

後で有意な変化は見られなかった。

佐田は、生活習慣病によって慢性炎症が惹起される新しい機序の解明と治療法の開発をめざした。

1. 肥満に伴う脂肪組織における慢性炎症の機序に関する研究

(1) 肥満に伴う脂肪細胞の変性と cfDNA の増加

マウスに高脂肪食(High Fat Diet, HFD)を投与すると、肥大化脂肪細胞が細胞死を起こしていた。また、肥満によって cfDNA としての single strand (ss) DNA, double strand (ds) DNA の濃度が上昇した(図4上段)。ヒトにおいても内臓脂肪の蓄積に伴って血中の ssDNA 濃度が上昇した(図4下段)。

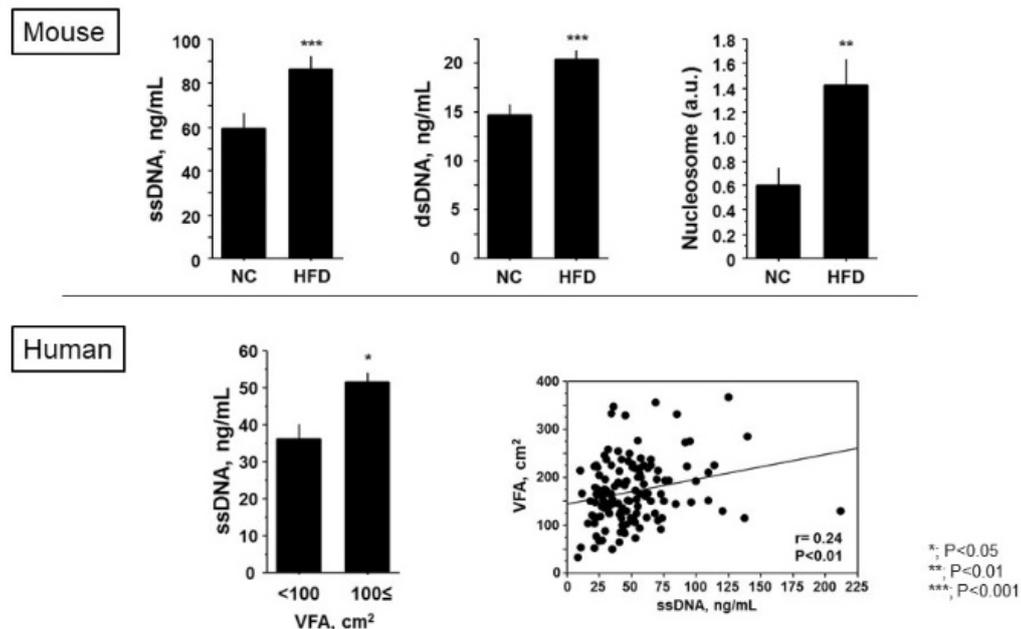


図4. 肥満にともない、cfDNA 濃度が上昇する

(上段) マウスに高脂肪食負荷(HFD)を投与すると、血中の ssDNA, dsDNA, nucleosome の濃度が上昇した。(下段) ヒトにおいても内臓脂肪面積 (VFA) と血中 cfDNA 濃度は相関し、インスリン抵抗性と関連した。

(2) *TLR9* 欠損マウスにおける脂肪組織における炎症の減弱とインスリン抵抗性の減弱

野生型マウスと *TLR9* 欠損マウスに高脂肪食(HFD)を投与したところ、*TLR9* 欠損マウスでは、肥満に伴う脂肪組織へのマクロファージの浸潤とインスリン抵抗性が軽減していた(図5)。また、骨髄移植の実験によって、骨髄由来細胞に発現している *TLR9* が、肥満に伴う、脂肪組織での炎症とインスリン抵抗性の発現に重要であることが明らかになった。

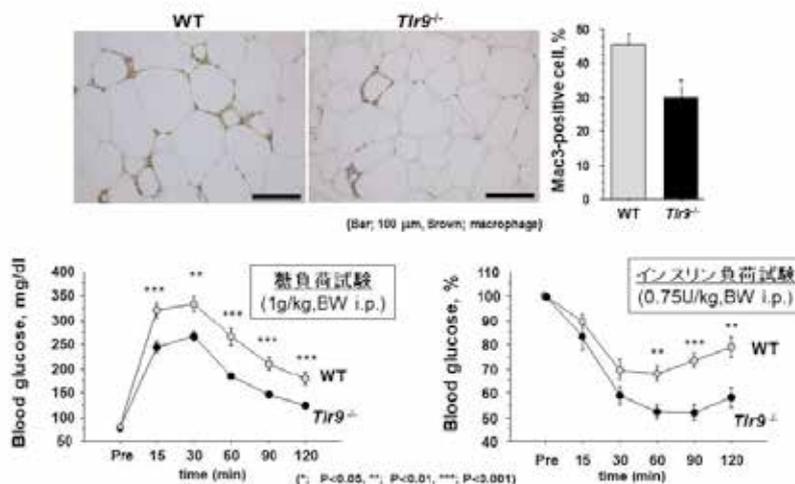


図 5. 肥満に伴う脂肪組織における慢性炎症とインスリン抵抗性に関して、野生型と *TLR9* 欠損マウスの比較

(上段) *TLR9* 欠損マウスにおいては、野生型マウスに比較して、肥満に伴うマクロファージの浸潤が軽減していた。(下段) *TLR9* 欠損マウスにおいては、肥満に伴うインスリン抵抗性が軽減していた。

2. 脂肪細胞由来の cfDNA がマクロファージを活性化する機序の検討

3T3-1 脂肪細胞培養液の上清を、野生型ならびに *TLR-9* 欠損マウス由来のマクロファージに添加すると、炎症性サイトカインの産生が増加した。脂肪細胞を $TNF-\alpha$ で刺激するとその程度は増加した。また、*TLR9* 欠損マウス由来のマクロファージでは軽減していた (図 6)。

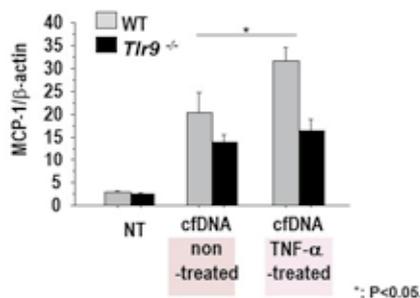


図 6. 3T3L1 脂肪細胞培養上清によるマクロファージの活性化

3T3L1 脂肪細胞培養上清中の DNA を濃縮して、野生型ならびに *TLR9* 欠損マウス由来のマクロファージに添加したところ、MCP-1 の産生が亢進した。脂肪細胞を $TNF-\alpha$ で傷害しておくとその程度が増強した。脂肪細胞培養上清によるマクロファージ活性化作用は、*TLR9* 欠損マウス由来のマクロファージでは減弱していた。

3. 動脈硬化における慢性炎症の機序に関する研究

生活習慣病によってどのようにして慢性炎症が惹起されるのかを検討した。肥満に伴って脂肪組織から自己由来の遊離核酸断片 (cell free DNA, cfDNA) が放出され、本来、病原体由来の DNA 断片を認識する Toll 様受容体-9 (*TLR9*) を cfDNA が活性化し、脂肪組織での慢性炎症ならびにインスリン抵抗性が引き起こされた。

また、アポリポ蛋白 E 欠損 (*ApoE* KO) マウスに Angiotensin II (Ang II) を投与することで、血漿中の 1 本鎖 DNA などの cfDNA が増加した。大動脈において、cfDNA の受容体となりうる *TLR9* の発現が Ang II 投与により有意に増加し、主たる発現細胞はマクロファージであった。*TLR9/ApoE* 2 重欠損 (dKO) マウスを確立し、 Ang II 投与下で誘導される動脈硬化病変を解析した。両群間で体重、血圧、血漿脂質値に差を認めなかったが、*TLR9/ApoE* dKO マウスの動脈硬化病変およびプラーク内脂質量は、*ApoE* KO マウスに比べて有意に少なかった。また、*TLR9/ApoE* dKO マウスの腹部大動脈において、MCP-1 などの炎症性物質の発現やマクロファージの浸潤が減少していた。さらに、骨髄移植実験により、血管壁より骨髄の *TLR9* が重要であることが明らかとなった。また、*TLR9* のアゴニストや Ang II などで傷害を与えた血管内皮細胞を用いてマクロファージを刺激することで、 $NF-\kappa B$ シグナルの活性化が認められ、 $TNF-\alpha$ や MCP-1 などの炎症関連分子の発現が有意に増加した。

以上より、血管傷害により遊離した cfDNA が、マクロファージ *TLR9* を活性化し血管の炎症を惹起し、動脈硬化の進展を促進することが示唆された。

4. *TLR9*/cfDNA をターゲットとした生活習慣病の治療法の開発

(1) 肥満に伴う脂肪組織の炎症とインスリン抵抗性に対する戦略

マウスに、*TLR9* の阻害作用のあるオリゴヌクレオチドを腹腔内に週 3 回注射すると、肥満に伴う脂肪組織へのマクロファージ浸潤とインスリン抵抗性が改善した (図 7)。

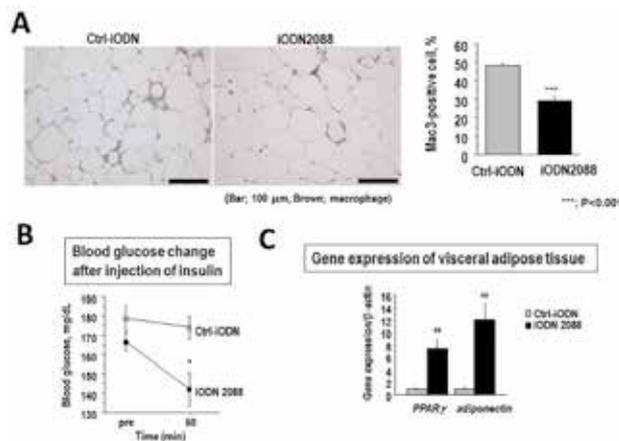


図7. TLR9 阻害オリゴヌクレオチドによる炎症抑制効果

マウスの腹腔内に TLR9 阻害オリゴヌクレオチド iODN2088 を投与したところ、肥満に伴う脂肪細胞の炎症が抑制された (A)。また、iODN2088 の投与は、インスリン抵抗性を改善して (B)、脂肪組織でのインスリン感受性改善遺伝子の発現を増強した (C)。

(2) 肥満に伴う脂肪組織の炎症とインスリン抵抗性に対する戦略

ApoE 欠損マウスに、TLR9 の阻害作用のあるオリゴヌクレオチドを腹腔内に週 3 回注射すると、動脈硬化性病変の進行が抑制された。また、動脈硬化プラーク内へのマクロファージの浸潤が減弱し、脂肪蓄積が抑制された。また、炎症性サイトカインや MMP9 の発現が抑制された。

平田は、川崎病血管炎における慢性炎症の病態解明に関する検討を行った。まずこれまで報告されているように、野生型マウス (C57BL/6) において *Candida albicans* water soluble fraction (CAWS) を腹腔内に投与することで、冠動脈瘤を伴う川崎病類似の血管炎が生じることを再現し病理切片を用いて炎症細胞の浸潤を定量化することまで可能となった。今後は経時的に血管炎病変の範囲・重症度を計測するとともに、マクロファージ・リンパ球などの病変への免疫担当細胞の浸潤と各種の自然免疫関連の受容体の発現を、免疫染色を用いて検討する予定である。また自然炎症を担う Toll 様受容体 (Toll-like receptors :TLRs) などのセンサーの関与を明らかにするため、CAWS を各種 TLR 欠損マウス、および TLR の下流に位置する MyD88 欠損マウスに投与し、病変形成の変化を観察する予定である。

IV 考察

今回心筋モデルに新しいマイクロチャネルチップを作成し、そのモデルを用いて白血球活性化の指標を検討した。白血球は活性化するとカルシウム依存的にミオシン重合し、偽足を形成し、接着分子が増加し、遊走しやすくなる。今回の実験では 2 種類の作用機序の異なる抗凝固剤を用いた。ヘパリンはアンチトロンビン III を活性化させ、凝固能を間接的に阻害するため、白血球や血漿はほぼ *in vivo* の状態を再現している。一方で EDTA-2Na はカルシウムをキレートするため、白血球や血小板のカルシウム依存性の活性化を抑制する。接着白血球数と、MPO 濃度はヘパリン採血管とヘパリン+EDTA-2Na 採血管の補正通過時間の差に相関した。本研究で MC-FAN を用いて全血で検査を行える新しいデザインのマイクロチャネル回路を開発した。ヘパリン採血管とヘパリン+EDTA-2Na 採血管の補正通過時間の差は、白血球活性化指標として臨床応用可能である。

本研究においては、肥満に伴う脂肪組織における慢性炎症とそれに伴うインスリン抵抗性に、肥大した脂肪細胞から放出される自己 DNA が、マクロファージの自然免疫受容体 TLR9 を刺激すること示された。また、TLR9 阻害することが、肥満に伴うインスリン抵抗性の改善に重要であることが明らかになった。同様に、動脈硬化においても、アンジオテンシン II などの動脈硬化惹起物質が、血管細胞のアポトーシスなどの細胞死を誘導して自己 DNA を増加させた。

TLR9 は本来、外来性病原体の DNA を認識する自然免疫に重要な受容体である。最近の報告では、TLR ファミリーの TLR4 が遊離脂肪酸を認識して、脂肪組織での慢性炎症の悪循環

環に関与することが示されている。今回、我々の研究によって、生活習慣病によって、脂肪細胞や血管細胞の細胞死を引き起こし、そこから放出される DNA が自然免疫受容体 *TLR9* を活性化し、慢性炎症を惹起することが明らかとなった。我々の研究によって、生活習慣病によって生じるインスリン抵抗性、動脈硬化を防ぐうえで、自己 DNA/*TLR9* 系がキーとなる経路であることが明らかとなった。今後、自己 DNA/*TLR9* 系を標的として、新たな生活習慣病の合併症治療法の開発が行われることが期待される。

V 研究成果の発表

1. Shimizu R, Fukuda H, Kikuchi Y, Yanaka H, Hata N, Yamazaki M, Nakatani Y, Tamura Y, Yamakoshi S, Kawabe A, Horie Y, Sugimura H, Matsushita Y, Nakamoto T, **Yasu T**. Clinically Feasible method for assessing leukocyte rheology in whole blood. *Heart & Vessels* 2020; 35, 268-277
2. **Yasu T**, Shimoyama M, Wada H, Iwakura T, Toyoda S, Kawabe A, Sugiyama T. Homozygous familial hypercholesterolemia with stenosis of the left anterior descending coronary artery successfully treated with weekly low-density lipoprotein apheresis for 16 years without percutaneous coronary intervention *Clinical Case Reports* 2019 DOI: 10.1002/ccr3.2299
3. **Yasu T**, Mutoh A, Wada H, Kobayashi M, Kikuchi Y, Momomura S, Ueda S. Renin-angiotensin system inhibitors can prevent intravenous lipid infusion-induced myocardial microvascular dysfunction and leukocyte activation. *Circ J* 2018 82(2):494-501.
4. Kudo R, Tamura Y, Tamiya H, Ochiai K, Mochi S, Sudo M, Ehara K, Nagasaka Y, Terashima M, Tsurumi T, Tsuboyama Y, Onozaki C, Yamaguchi K, Hara H, Itakura T, Saito Y, Sugimura H, Horie Y, Ueno A, Hoshiai M, **Yasu T**. Effects of watching favorite video during exercise on exercise economy and autonomic activity: a pilot study with healthy adults. *Total Rehabilitation Research* 2018; 6: 73-82.
5. 落合 香、田村由馬、江原恭介、清水理葉、松下恭、**安 隆則**. 重症下肢虚血を呈す末梢動脈疾患患者へのB-SESを用いたブリッジ療法. *理学療法科学* 33巻3号,545-548.2018
6. Oba K, Maeda M, Maimaituxun G, Yamaguchi S, Arasaki O, Fukuda D, Yagi S, Hirata Y, Nishio S, Iwase T, Takao S, Kusunose K, Yamada H, Soeki T, Wakatsuki T, Harada M, Masuzaki H, **Sata M**, Shimabukuro M: Effect of the Epicardial Adipose Tissue Volume on the Prevalence of Paroxysmal and Persistent Atrial Fibrillation.*Circ J*. 2018; 82;7:1778-1787. doi: 10.1253/circj. CJ-18-0021.
7. Hirata Y, Yamada H, **Sata M**. Epicardial Fat and Pericardial Fat Surrounding the Heart Have Different Characteristics. *Circ J*. 82;10:2475-2476.2018
8. Soeki T, Matsuura T, Tobiume T, Bando S, Matsumoto K, Nagano H, Uematsu E, Kusunose K, Ise T, Yamaguchi K, Yagi S, Fukuda D, Yamada H, Wakatsuki T, Shimabukuro M, **Sata M**: Clinical, Electrocardiographic, and Echocardiographic Parameter Combination Predicts the Onset of Atrial Fibrillation. *Circ J*. 2018; 82; 9: 2253-2258. doi: 10.1253/circj. CJ-17-0758.
9. Hara T, Phuong PT, Fukuda D, Yamaguchi K, Murata C, Nishimoto S, Yagi S, Kusunose K, Yamada H, Soeki T, Wakatsuki T, Imoto I, Shimabukuro M, **Sata M**. Protease-Activated Receptor-2 Plays a Critical Role in Vascular Inflammation and Atherosclerosis in

- Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Circulation*. 138:1706-1719, 2018
10. Ganbaatar B, Fukuda D, Salim HM, Nishimoto S, Tanaka K, Higashikuni Y, **Hirata Y**, Yagi S, Soeki T, **Sata M**: Ticagrelor, a P2Y12 antagonist, attenuates vascular dysfunction and inhibits atherogenesis in apolipoprotein-E-deficient mice. *Atherosclerosis*. 2018; 275:124-132. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2018.05.053.
 11. Hirata Y, Yamada H, **Sata M**: Epicardial Fat and Pericardial Fat Surrounding the Heart Have Different Characteristics. *Circ J*. 2018; 82: 10: 2475-2476. doi: 10.1253/circj. CJ-18-0923.
 12. Tanaka K, **Sata M**: Possible Roles of Epicardial Adipose Tissue in the Pathogenesis of Coronary Atherosclerosis. *Ann Nucl Cardiol*. 2018; 4; 1:5-10.
 13. Hirata Y, Kusunose K, Yamada H, Morita S, Torii Y, Nishio S, Zheng R, Saijo Y, Fukuda D, Yagi S, Soeki T, **Sata M**: Left atrial functional response after a marathon in healthy amateur volunteers, *Int J Cardiovasc Imaging*. 2019 ; 35(4): 633-643. doi: 10.1007/s10554-018-1502-2.
 14. Fukuda D, Nishimoto S, Aini K, Tanaka A, Nishiguchi T, Kim-Kaneyama JR, Lei XF, Masuda K, Naruto T, Tanaka K, Higashikuni Y, **Hirata Y**, Yagi S, Kusunose K, Yamada H, Soeki T, Imoto I, Akasaka T, Shimabukuro M, **Sata M**: Toll-Like Receptor 9 Plays a Pivotal Role in Angiotensin II-Induced Atherosclerosis, *J Am Heart Assoc*. 2019; 8(7): e010860. doi: 10.1161/JAHA.118.010860.
 15. Torii Y, Kusunose K, Yamada H, Nishio S, Hirata Y, Amano R, Yamao M, Zheng R, Saijo Y, Yamada N, Ise T, Yamaguchi K, Yagi S, Soeki T, Wakatsuki T, **Sata M**: Updated Left Ventricular Diastolic Function Recommendations and Cardiovascular Events in Patients with Heart Failure Hospitalization. *J Am Soc Echocardiogr*. 2019; 32(10): 1286-1297 doi: 10.1016/j.echo.2019.06.006
 16. Pham PT, Fukuda D, Yagi S, Kusunose K, Yamada H, Soeki T, Shimabukuro M, **Sata M**: Rivaroxaban, a specific FXa inhibitor, improved endothelium-dependent relaxation of aortic segments in diabetic mice. *Sci Rep*. 2019; 9(1): 11206. doi: 10.1038/s41598-019-47474-0.
 17. Kusunose K, Haga A, Abe T, **Sata M**: Utilization of Artificial Intelligence in Echocardiography. *Circ J*. 2019; 83(8): 1623-1629. doi: 10.1253/circj. CJ-19-0420
 18. Kusunose K, Yamada N, Yamada H, Nishio S, Saijo Y, Hirata Y, Torii Y, Ise T, Yamaguchi K, Fukuda D, Yagi S, Soeki T, Wakatsuki T, **Sata M**: Association between Right Ventricular Contractile Function and Cardiac Events in Isolated Post-capillary and Combined Pre- and Post-capillary Pulmonary Hypertension, *J Card Fail*. 2020;26(1):43-51. doi: 10.1016/j.cardfail.2019.08.021
 19. Kusunose K, Torii Y, Yamada H, Nishio S, Hirata Y, Saijo Y, Ise T, Yamaguchi K, Fukuda D, Yagi S, Soeki T, Wakatsuki T, **Sata M** : Association of Echocardiography Before Major Elective Non-Cardiac Surgery With Improved Postoperative Outcomes- Possible Implications for Patient Care. *Circ J*. 2019; 83(12): 2512-2519 doi: 10.1253/circj. CJ-19-0663
 20. Aini K, Fukuda D, Tanaka K, Higashikuni Y, **Hirata Y**, Yagi S, Kusunose K, Yamada

- H, Soeki T, **Sata M**: Vildagliptin, a DPP-4 Inhibitor, Attenuates Endothelial Dysfunction and Atherogenesis in Nondiabetic Apolipoprotein E-Deficient Mice, *Int Heart J*. 2019; 60(6): 1421-1429; doi: 10.1536/ihj.19-117
21. Rahadian A, Fukuda D, Salim HM, Yagi S, Kusunose K, Yamada H, Soeki T, Shimabukuro M, **Sata M**: Thrombin inhibition by dabigatran attenuates endothelial dysfunction in diabetic mice, *Vascul Pharmacol*. 2019 ;124:106632. doi: 10.1016/j.vph.2019.106632
22. Maimaituxun G, Yamada H, Fukuda D, Yagi S, Kusunose K, Hirata Y, Nishio S, Soeki T, Masuzaki H, **Sata M**, Shimabukuro M: Association of Local Epicardial Adipose Tissue Depots and Left Ventricular Diastolic Performance in Patients With Preserved Left Ventricular Ejection Fraction, *Circ J*. 2020; 84(2): 203-216. doi: 10.1253/circj.CJ-19-0793

【禁無断転載】

令和 2 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 (株)サンワ

印刷 2.12.200

