

平成 29 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年度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」として平成29年度までの462件のプロジェクトに対し、約3,738百万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、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、29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。

平成30年10月

公益財団法人 車両競技公益資金記念財団  
理事長 深澤 亘



## 目 次

がん特異的紡錘体制御機構の解明と新しいがん治療法開発

・・・・・・・・・・・・・・・・・・八尾 良司・・・・・・1

c-Met Allosteric/Catalytic 部位を標的とした新規 Dual 制癌剤の創製

・・・・・・・・・・・・・・・・・・田沼 靖一・・・・・・11

microRNA が転写因子をレスキューするメカニズム

・・・・・・・・・・・・・・・・・・幸谷 愛・・・・・・23

脂肪由来間葉系前駆細胞を用いた動脈硬化性疾患に対する血管新生療法

・・・・・・・・・・・・・・・・・・福本 義弘・・・・・・31



がん特異的紡錘体制御機構の解明と新しいがん治療法開発



## <<研究の概要>>

がん細胞の紡錘体は、有効ながん治療標的であることが知られており、様々な微小管阻害剤が、がん治療に用いられている。しかし、微小管に直接結合するという作用機序は、がん細胞に対する特異性の向上を困難にしており、さらに静止期の微小管機能も阻害することにより、末梢神経障害などの重篤な副作用が生じることが問題となっている。

紡錘体制御因子 Transforming Acidic Coiled-Coil 3 (TACC3) 遺伝子は、様々ながん組織で過剰発現しているがん関連遺伝子であり、その機能を抑制すると、がん細胞が選択的に細胞増殖を停止する (Yao et al. Oncogene 2014)。重要なことに、正常組織で TACC3 を欠損させても細胞増殖は正常に進行し、細胞分裂、アポトーシスにも変化は見られない。本研究課題では、微小管に直接作用せず、がん細胞の紡錘体形成に関与する微小管制御因子を標的とする新たながん治療戦略の開発を目的として、TACC3 の機能解析を行った。

生化学的解析の結果、TACC3 は、微小管重合促進因子 chTOG と直接結合すること、またその結合は TACC3 の C 末端 240a. a. と chTOG の 143a. a. 領域を介することを見出した。本研究課題では、これらの結果をもとに、ELISA ベースのアッセイ系を作製し、TACC3 を標的とする薬剤探索のための基盤技術を確立した。

TACC3 阻害に対するがん細胞の細胞増殖抑制機構を明らかにするために、様々ながん培養細胞を用いて枯渇実験を行ったところ、一部のがん細胞の増殖が選択的に停止した。これは、染色体微小管と紡錘体微小管とのバランスが崩れ、多極紡錘体が生じた結果、細胞分裂が停止することが原因であった。さらに、消化管腫瘍モデルマウスを用いた解析では、TACC3 の遺伝子破壊により、がん抑制遺伝子 Apc 遺伝子の不活性化により生じるがん幹細胞の増殖が阻害され、腫瘍を抑制することができた。

これらの結果は、TACC3 が、副作用が少ない紡錘体を標的とする新たながん治療法開発の有望な標的分子であることを示す。現在、消化管腫瘍に用いられる分子標的薬は、EGFR 阻害剤や血管新生阻害剤など一部に限定されており、一時的に退縮が認められても、再び増大するケースが多数を占める。現行の薬剤とは異なる作用機構となる標的分子が同定されたことは、多くの症例に対して有効な治療法となる可能性が期待される。

八尾 良司	公益財団法人・がん研究会 がん研究所・細胞生物部・部長	研究立案統括・生化学的解析
小柳 潤	公益財団法人・がん研究会 がん研究所・細胞生物部・特任研究員	培養細胞レベルでの解析
夏目 康子	公益財団法人・がん研究会 がん研究所・細胞生物部・研究補助員	個体レベルでの解析

## 研究報告

### I 研究目的

がん細胞の紡錘体は、有効ながん治療標的であることが知られており、様々な微小管阻害剤が、がん治療に用いられている。微小管阻害剤は、細胞分裂期の紡錘体に直接結合し、その形成を阻害する事により、がん細胞の増殖を停止することが明らかにされている。しかし、微小管に直接結合するという作用機序は、がん細胞に対する特異性の向上を困難にしており、さらに静止期の微小管機能も阻害することにより、末梢神経障害などの重篤な副作用が生じることが問題となっている。

近年の紡錘体形成機構に関する研究の進展により、多数の紡錘体制御因子が同定されている。興味深い事に、それらの分子の多くは、生体内の組織や細胞で、質的、量的に均一ではないことが示されている。申請者はこれまでに、紡錘体制御因子 Transforming Acidic Coiled-Coil 3 (TACC3) 遺伝子が、様々ながん組織で過剰発現していることを見いだした。

また、その機能を抑制すると、がん細胞が選択的に細胞分裂を停止することを報告した (Yao et al. Oncogene 2014)。更に、TACC3 コンディショナルノックアウトマウスを用いた解析を行い、TACC3 の機能を阻害すると、胸腺リンパ腫細胞に細胞分裂停止を誘導し、腫瘍が退縮することを示した。重要なことに、正常組織で TACC3 を欠損させても細胞分裂は正常に進行し、細胞増殖、アポトーシスにも変化は見られなかった (Yao et al. Oncogene

2012)。これらの結果は、TACC3 が有望ながん治療標的分子であることを示しており、

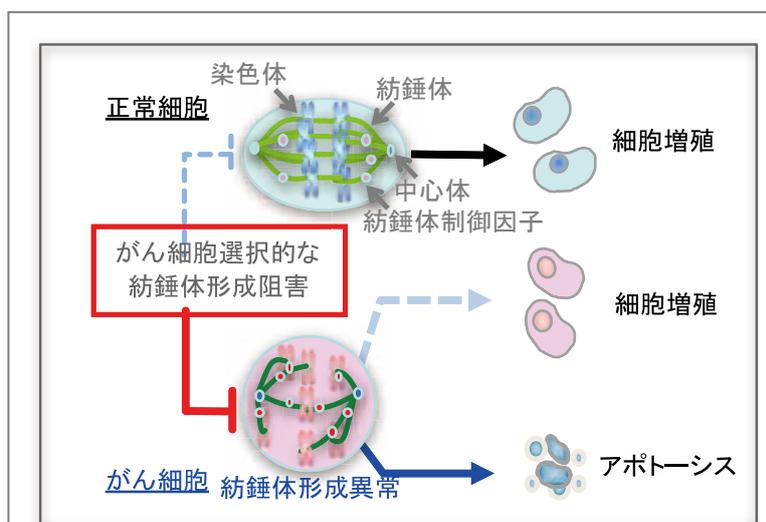


図 1. がん細胞選択的な紡錘体形成機構解明とその阻害による新たながん治療法の開発

分裂期の微小管重合により構成される紡錘体は、様々な制御因子が関与すると考えられる。それらを同定し、その分子機構を明らかにし、さらになんがん細胞選択的な紡錘体形成機構を明らかにする事により、既存の微小管阻害剤よりも副作用が低く、より効果的ながん化学療法の開発が期待される。

その紡錘体形成の分子機構の解明は、新たながん治療戦略の開発に結びつくことが期待される。

本研究課題では、微小管に直接作用せず、がん細胞の紡錘体形成に関与する微小管制御因子を標的とする新たながん治療戦略の開発を目的とする（図1）。

## II 研究計画および材料と方法

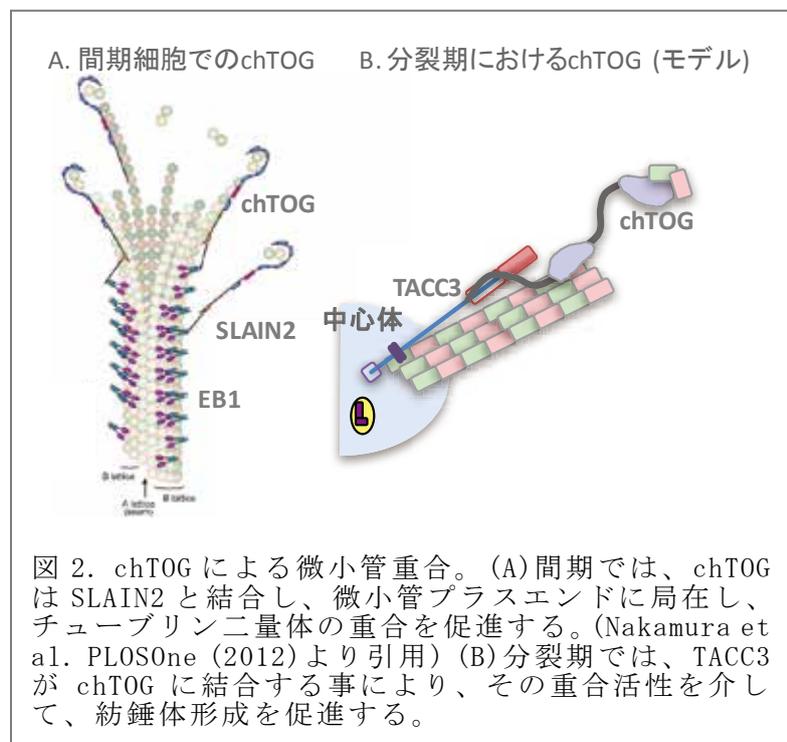
本申請課題では、申請者が自ら見いだした TACC3 阻害によるがん細胞選択的な紡錘体形成異常誘導 (Yao et al. Oncogene 2012) という知見に基づき、紡錘体制御因子を標的とした新たながん治療法の開発を行なった。本研究では、既存抗がん剤や分子標的治療薬の開発、あるいは有効ながん種の同定なども考慮し、TACC3 を介した紡錘体形成機構の解明を行なった。紡錘体の形成過程では、微小管重合制御に加えて、キネトコア、中心体など様々な細胞構造体で働く多数の分子が、協調的に機能する事により、正常な二極紡錘体が形成される。これらの分子との物理的・機能的な相互作用、さらにそれらを阻害することによりもたらされる時間的・空間的な変化を明らかにする事は、がん細胞の紡錘体形成機構を理解する上で重要である。一方、新たながん分子標的治療法の開発という観点からは、TACC3 を介した紡錘体形成機構の組織特異性を理解し、感受性の高いがん種を選定する必要がある。これらの解析を統合的に進めるために、本申請課題では、お互いに関連する以下の3つのアプローチを進めた。

### (1) 生化学的解析

錘体形成においては、chTOG の微小管重合促進活性が中心的な役割を担う。chTOG は、大腸がん・肝がんで過剰発現する遺伝子として単離されたがん関連遺伝子であることも注目している。さらに、線虫では、TACC ファミリーとの相互作用が示唆されている。chTOG は、間期では、SLAIN2 を介して微小管プラスエンドに局在し、チューブリン二量体を微小管に引き寄せる事が知られている（図2A）。

申請者は、これらの報告をもとに、分裂期では、TACC3 が、chTOG との結合

を介して微小管重合を促進するという作業仮説を立てた（図2B）。本申請課題では、このモデルに基づき、TACC3 と chTOG との相互作用について解析を行った。具体的には、



それぞれのタンパク質に異なるタグをつけたのち、293T 細胞に発現させ、pull-down 法により複合体形成を検討した。次に、それぞれの断片を発現させ、結合ドメインを決定した。さらに、一連の精製タンパク質を調整、結合実験を行うとともに、再構成系を用いた検討を行った。

## (2) 細胞レベルでの紡錘体制御機構の解明

申請者は、特定のがん細胞では、TACC3 阻害により多極紡錘体が形成される事を見いだした(Yao et al. Oncogene 2014)。そこで、TACC3 と chTOG との物理的相互作用の紡錘体形成における意義を細胞レベルで検討した。具体的には、TACC3 との結合に必要な領域を欠損する chTOG 発現ベクターを作製し、上記の卵巣がん細胞に発現させ、内因性の chTOG を RNA 干渉法によりノックダウンし、その変化を観察した。

また、紡錘体は、微小管重合や中心体のクラスタリング、動原体と微小管との結合等、時間的・空間的に異なる様々な機能が協調的に機能することにより構築される。このような機能的な相互作用における TACC3 の役割を明らかにした。具体的には、TACC3 阻害により出現した多極紡錘体形成過程において、中心体制御に関わる NuMA や微小管脱重合活性を持つダイニン・ダイナクチンなどの分子と TACC3 との機能的な競合について、蛍光免疫染色やタイムラプスイメージングなどの手法を用いて解析した。

## (3) 遺伝子改変モデルマウスを用いた個体レベルでの解析

申請者は、がん研究会で取得された遺伝子発現解析データを用いて、TACC3 が大腸がんで過剰発現していることを見出した。さらに、TACC3 の結合パートナーである chTOG は、大腸がんで過剰発現する遺伝子として同定されていることから、TACC3 が、大腸がんの治療標的となる可能性が示唆された。そこで、ヒト消化管腫瘍のモデルマウスを用いて、遺伝学的な実証実験を行った。

ヒト大腸がんでは、80%以上に APC 遺伝子に変異が入っており、APC 遺伝子の不活性化が、初期の発がん過程に重要な役割を果たしていると考えられている。マウスで Apc 遺伝子を不活性化させると多数の消化管腫瘍が発生することから、Apc コンディショナルノックアウト (cKO) マウスは、有効ながんモデルマウスである。申請者は、Apc 変異マウス

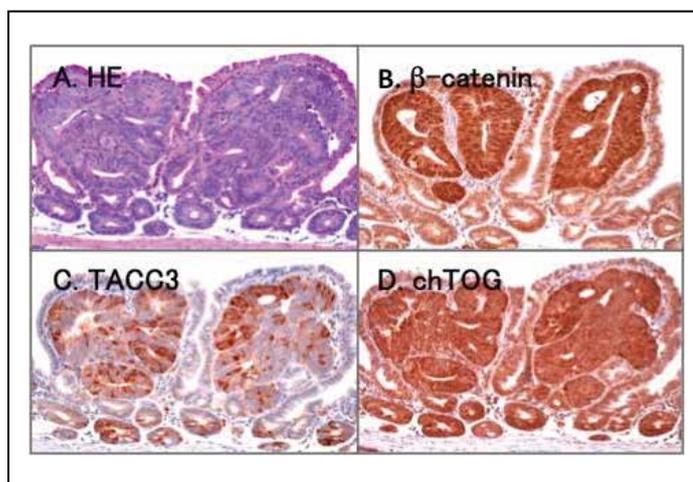


図 3. Apc ノックアウトマウスに発生した腫瘍における Tacc3 と chTOG の発現  
Apc580D マウスに生じた消化管腫瘍では、Wnt シグナルの亢進による b-catenin の蓄積が観察され、また Tacc3 と chTOG も発現が亢進している

に発生した消化管腫瘍においても、chTOG と Tacc3 の発現が高い事を見いだしている(図 3)。本研究課題では、Villin プロモーターの下流で Cre 組換え酵素を発現するド

ライバーマウス (Villin-Cre) を用いて、Apc 遺伝子と Tacc3 遺伝子を同時に不活性化するモデルマウスを作製し、Tacc3 の消化管腫瘍における機能を明らかにした。さらに、初期病変に関するさらに詳細な解析を行うために、Lgr5CreERT2 マウスを用いて、誘導的かつ幹細胞特異的に Apc 遺伝子と Tacc3 遺伝子を不活性化するモデル動物を作製し、がん組織の細胞階層性における役割を検討した

これらの個体レベルの解析に加え、さらに詳細にメカニズムを明らかにするために、ROSA26 遺伝子座に CreERT2 遺伝子が挿入されたアリルを導入し、3次元培養オルガノイドを作製し、*in vitro*での分子機構の解明を行った。

### III 研究成果

#### (1) 生化学的解析

TACC3 と chTOG との物理的相互作用を検討し、その結合ドメインを同定するために、それぞれのフラグメントの発現ベクターを作製し、293T 細胞にトランスフェクションを行い、免疫沈降法による結合解析を行った。

TACC3 の結合ドメインを同定するために、d1、d3、d4 の 3つのフラグメントを作製し、HA タグを導入した後、細胞に発現させ、HA 抗体により免疫沈降を行い、それに結合する内因性の chTOG タンパク質を検出した (図 4)。その結果、240aa からなる TACC3-HA-d4

フラグメントのみが内因性 chTOG との結合を認めた。この領域は、種を超えて保存されている TACC ドメインを含む。

chTOG は、F1 から F4 の 4つの断片とし、それぞれの N 末端に 3xFLAG タグを付加し、それに結合する内因性の TACC3 タンパク質を検出したその結果、C 末端の 530aa のみを含む TOG-FLAG-F4 フラグメントのみが TACC3 と結合する事が明らかになった (図 5)。TOG-FLAG-F4 フラグメントをさらに 3分割し、同様の実験を行ったところ、C 末端 143aa まで短くしても TACC3 と結合する事が明らかになった。この領域は、これまでに特徴的な配列は同定されておらず、新しいモチーフを持つ可能性を示唆する。これらの結果から、TACC3 と chTOG との結合が、それぞれ C 末端に存在する短い領域が必要十分であることが明らかになった。

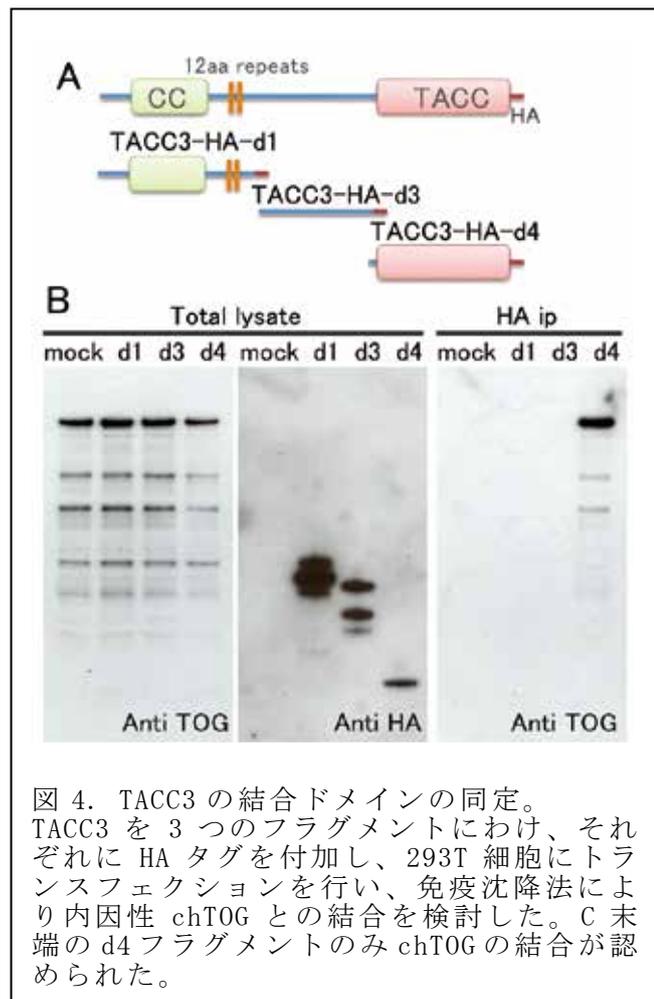


図 4. TACC3 の結合ドメインの同定。  
TACC3 を 3つのフラグメントにわけ、それぞれに HA タグを付加し、293T 細胞にトランスフェクションを行い、免疫沈降法により内因性 chTOG との結合を検討した。C 末端の d4 フラグメントのみ chTOG の結合が認められた。

TACC3 と chTOG は直接結合するのか、あるいは他の分子を介するのかを明らかにするために、TACC3 の C 末端 240 アミノ酸からなるフラグメントの GST 融合タンパク質を大腸菌で発現させ、glutathione ビーズに固定した。TOGp の C 末端に存在する 143 アミノ酸断片に加え、N 末端側の 74 アミノ酸、C 末端側の 77 アミノ酸からなるフラグメントに HIS タグをそれぞれ付加し、それぞれのタンパク質を精製した。これらを TACC3 フラグメントが固定された glutathione ビーズと反応させたところ、143 アミノ酸断片で結合が確認されたことから、TACC3 と TOGp との結合は、他の分子を介さない直接の結合である事が明らかになった。これらの結果に基づき、ELISA ベースのアッセイ系の確立に成功した。

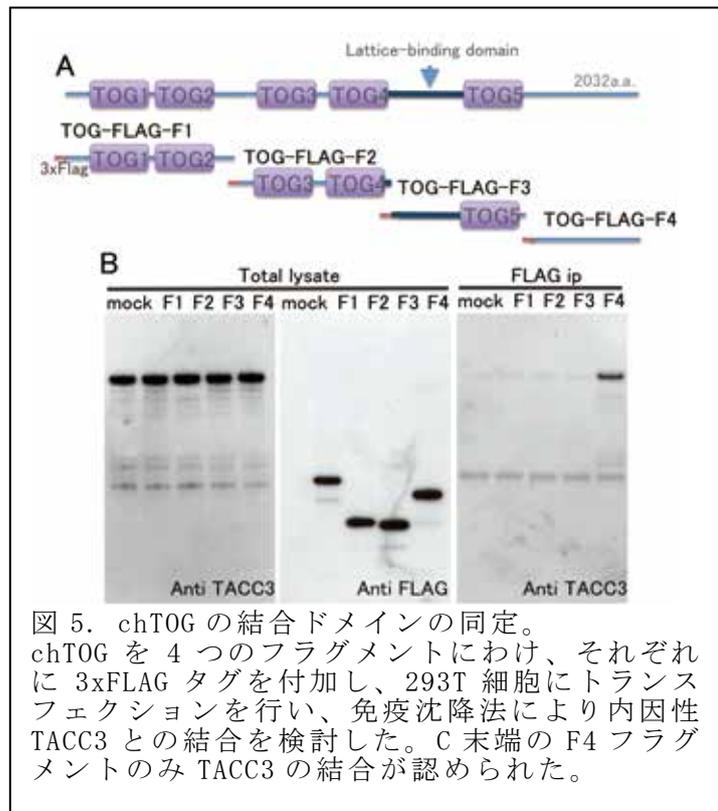


図 5. chTOG の結合ドメインの同定。  
chTOG を 4 つのフラグメントにわけ、それぞれに 3xFLAG タグを付加し、293T 細胞にトランスフェクションを行い、免疫沈降法により内因性 TACC3 との結合を検討した。C 末端の F4 フラグメントのみ TACC3 の結合が認められた。

## (2) 細胞レベルでの紡錘体制御機構の解明

細胞レベルでの TACC3 の機能解析を行うために、各種のがん細胞で siRNA を用いた枯渇実験を行なった。その結果、TACC3 の枯渇により、細胞分裂が極度に阻害される 2 系統の卵巣がん細胞が同定された。分裂期の紡錘体の蛍光免疫染色による検討では、2 つの細胞ともに多極紡錘体が形成されている事が明らかになった。これらの細胞は、chTOG 枯渇によっても細胞分裂が阻害されたが、そのうち 1 ラインでは、TACC3 枯渇と同様の多極紡錘体が形成されていたのに対し、もう 1 つのラインでは、単極紡錘体が形成されていた。さらに、TOGp の全長および TACC3 との結合領域 143 アミノ酸の欠損タンパク質を発現させたところ、TOGp の局在および紡錘体の形態には明らかな変化は認められなかった。これらのことから、TACC3 の機能には TOGp 依存的、非依存的な二つの機能の存在が示唆された。

TACC3 の紡錘体形成における機能解明を目的として、微小管マイナス端の安定化や架橋に関わる分子の関与を検討した。その結果、NuMA を欠損させると、多極紡錘体の形成が抑制され、2 極紡錘体となること、さらに細胞分裂の停止も解除されることが明らかになった。また、モータータンパク質であるダイニン・ダイナクチンを枯渇させることによっても多極紡錘体を抑制することができた。これらの結果から、TACC3 枯渇により生成する異所性の極は、中心体微小管と染色体微小管との均衡が崩れることが大きな要因となっており、その過程では、微小管マイナス端による極の生成速度が重要な意義を持つことが明らかになった。

(3) 遺伝子改変モデルマウスを用いた個体レベルでの解析

Apc 遺伝子のヘテロ接合体マウスは、Loss of heterozygosity (LOH) により正常アリルが欠損することにより、消化管腫瘍を発生する。消化管腫瘍の発生における Tacc3 の役割を動物個体レベルで明らかにするために、Apc コンディショナルノックアウトアリル (Apc<sup>f1/f1</sup>)/Villin-Cre を持つ消化管腫瘍モデルマウスに Tacc3 コンディショナルアリル (Tacc3<sup>f1/f1</sup>) を導入した。このモデルシステムでは、腫瘍発生時に Tacc3 を欠損させることができ、初期病変に

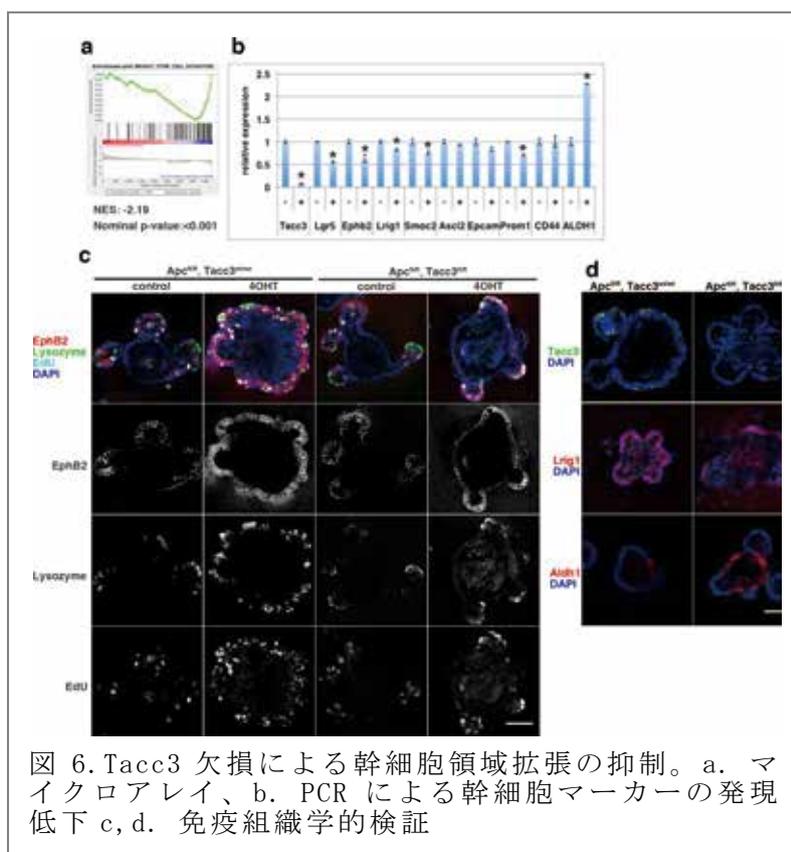


図 6. Tacc3 欠損による幹細胞領域拡張の抑制。a. マイクロアレイ、b. PCR による幹細胞マーカーの発現低下 c, d. 免疫組織学的検証

における役割を明らかにすることができる。その結果、Tacc3 を欠損させることにより、腫瘍数と腫瘍サイズが減少し、さらにマウス個体の生存率が向上した。重要なことに、Apc アリルに変異がないマウスにおいては、Tacc3 を欠損させても、組織学的な変化は生じず、またマウスの生存率にも影響がなかったことから、Tacc3 は Apc 遺伝子を欠損した腫瘍細胞で選択的かつ必須の機能を持つことが明らかになった。これらの結果は、Tacc3 が消化管腫瘍の有望な治療標的分子である可能性を示している。

消化管腫瘍発生における Tacc3 のさらに詳細な機能解析を行うために、3次元培養オルガノイドを樹立し、*in vitro* での細胞生物学的な解析を行なった。Apc 遺伝子変異により生じる初期の変化を解析するために、Apc<sup>f1/f1</sup> マウスの ROSA 遺伝子座に Cre-ERT2 遺伝子を挿入し、さらに Tacc3 コンディショナルノックアウトアリルを導入したマウスを作製した。これらの正常消化管から 3次元培養オルガノイドを樹立し、培養液に 40HT を添加し、遺伝子変異を導入した(図 6)。Apc 遺伝子を単独で欠損させた後、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行なったところ、消化管幹細胞の過剰増殖をしめす遺伝子シグネチャーが得られた。さらに、qPCR 解析でも Lgr5、Ascl2 などの幹細胞マーカーの亢進が確認され、樹立された実験系が生体内で Apc 遺伝子欠損により生じる幹細胞の過剰増殖(stem cell expansion)を再現することが示された。さらに、オルガノイドの形態も Apc 遺伝子欠損腫瘍の特徴であるスフェロイド様に変化するとともに、幹細胞領域の増大が認められた。興味深いことに、Tacc3 を同時に欠損す

ると、顕著な増殖抑制が生じた。これは、幹細胞の過剰増殖における細胞分裂の異常により生じており、紡錘体の形成異常が原因であると考えられた。このような紡錘体形成異常による幹細胞の増殖抑制は、Apc 遺伝子を欠損しない正常なオルガノイドでは認められなかった。これらの結果は、Tacc3 ががん抑制遺伝子・Apc の不活化にともなうがん幹細胞の過剰増殖において、特異的かつ必須の機能を有していることを示しており、紡錘体を標的とした新しい消化管腫瘍の治療標的分子であることを示唆する。Apc 遺伝子変異に伴う幹細胞の過剰増殖の抑制を生体組織で検討するために、Apc<sup>f1/f1</sup>、Lgr5-CreERT2 に Tacc3 コンディショナルアレルを導入した。その結果、Tacc3 を欠損させると幹細胞領域の進展が顕著に抑制され、その結果腫瘍数とサイズが減少し、さらに生存率の顕著な延長が見られた。これらの結果は、Tacc3 の治療標的としての有効性を実証することに加え、がん幹細胞を標的とした治療法開発において有望な治療標的分子であることを示唆する。

#### IV 考察

近年の分子標的治療薬の急速な開発に伴い、新たな化学療法が導入されたことにより、がんの治療成績は大幅に改善されている。一方、がん種あるいはがんのサブタイプによっては、現行の分子標的治療薬では十分な治療効果を得ることができず、古典的な化学療法に頼らざるを得ないケースが存在する。例えば、大腸がんの標準的な化学療法には、核酸代謝拮抗剤のウルオロウラシルやアルキル化剤の白金製剤を用いた古典的な抗がん剤が用いられる。分子標的治療薬としては、EGFR 阻害剤(セツキシマブ)や VEGF 阻害剤(ベバシズマブ)など限られた選択枝しか無いのが現状である。この課題を克服するために、がんの発生・進展をより深く理解し、新たな治療標的分子を同定することは、意義深いと考えられる。

本研究課題では、紡錘体制御因子 TACC3 遺伝子が、様々ながん組織で過剰発現していること、また、その機能を抑制することにより、がん細胞が選択的に細胞分裂を停止するという申請者自身の発見に基づき、治療標的分子としての有効性の検討を行った。具体的には、TACC3 の結合分子である chTOG との相互作用を解析し、TACC3 ドメインと呼ばれる特徴的な領域が、chTOG の C 末端 143 アミノ酸と物理的に直接結合することを見出した。さらに、ELISA ベースでもこの結合を検出することに成功しており、この解析系は、例えば TACC3 と chTOG との結合に影響する低分子化合物のスクリーニング系に応用することができることから、プロテイン相互作用を作用機序とする TACC3 阻害剤の開発に応用することが可能であると考えられる。

細胞レベルでの解析では、卵巣がん細胞では、TACC3 を阻害すると、多極紡錘体が形成され、細胞分裂が停止することを見出した。同様の表現系は、chTOG の枯渇でも観察された。興味深いことに一部の卵巣がん細胞では、異なる形態の異常紡錘体を生じることから、chTOG の紡錘体形跡機構には TACC3 に依存的な機構に加え、非依存的メカニズムが存在する可能性が示された。TACC3 枯渇による多極紡錘体の形成は、中心体微小管と染色体微小管との均衡が崩れることにより、異所性の中心体が生成されることが原因であり、NuMA やダイニン・ダイナクチンなどの微小管制御因子が関わる。これらの

細胞依存的な量的・機能的な違いが、TACC3 と chTOG の阻害による表現系の違いを生じると考えられる。この表現系の違いを規定する因子の同定は、TACC3 を標的分子としたがん治療法開発を考える上で、重要な意義を持つと考えられる。

本研究課題では、消化管腫瘍モデルマウスを用いた解析により、TACC3 を阻害すると消化管腫瘍が顕著に抑制され、生存率が大幅に向上することを示した。重要なことに正常な消化管で TACC3 を欠損させても、明らかな異常は認められない。これらの結果は、TACC3 のがん細胞特異的な機能を示し、動物個体レベルでの、がん治療標的分子としての有効性を示す。さらに 3 次元培養オルガノイドを用いた詳細な解析では、APC 遺伝子変異の直後に生じるがん幹細胞の過剰増殖を抑制することが明らかになった。これらの結果は、がん幹細胞を標的とする治療法の開発に TACC3 が有望な治療標的分子となりうることを示す。

本研究課題では、生化学的な解析による分子レベルの機能解析、細胞レベルでの紡錘体形成機構、個体レベルでのがん治療標的分子としての POC 取得という 3 つのお互いに関連する解析を、異なるアプローチで行った結果、TACC3 が有望ながん治療標的分子であり、消化管腫瘍がそのターゲットの一つであることを示すことができた。これらの研究をさらに推進することにより、優れたがん治療法の開発が期待される。

## V 研究成果の発表

<学術論文(謝辞掲載分)>

\*Yao, R., Oyanagi, J., Natsume, Y., Kusama, D., Kato, Y., Nagayama, S., and Noda, T. (2016). Suppression of intestinal tumors by targeting the mitotic spindle of intestinal stem cells. *Oncogene* 35, 6109-6119.

Sakahara, M., Okamoto, T., Oyanagi, J., Takano, H., Natsume, Y., Yamanaka, H., Kusama, D., Fusejima, M, Tanaka, N., Mori, S., Kawachi, H., Ueno, M., Sakai, Y., Noda, T., Nagayama, S. and \*Yao, R. Genetic variations in IFN/STAT signaling control tumorigenesis and drug response in colorectal cancers. 投稿中

<学会発表>

八尾良司、小柳潤、長山聡、野田哲生 家族性大腸腺腫症オルガノイドを用いた発がん機構解明 第76回日本癌学会 2017年

八尾良司、小柳潤、長山聡、野田哲生 消化管幹細胞の紡錘体を標的とした消化管腫瘍の抑制 第75回日本癌学会 2016年

Ryoji Yao Developing the novel cancer therapeutics targeting a mitotic protein, TACC3 RIKEN-MAX Plank Joint Research Center for Systems Chemical Biology, The 5th symposium 2016年

Ryoji Yao, Tetsuo Noda The Cellular hierarchy of intestinal tumors American association for cancer research AACR Annual meeting 2015, 2015年



c-Met Allosteric/Catalytic 部位を標的とした  
新規 Dual 制癌剤の創製



所属機関 東京理科大学薬学部  
研究者名 田沼靖一

## 《研究の概要》

本創薬研究の分子標的であるc-Met遺伝子産物は、Tyrosine Kinase型の細胞膜レセプターであり、そのリガンドであるHGF/SF (Hepatocyte GrowthFactor/Scatter Factor)が結合すると細胞増殖関連シグナルを経膜的に細胞内に伝達する。このc-Metは、腫瘍の増殖、原発巣からの遊走、浸潤、転移、定着、転移巣での血管新生など、癌の発育進展に重要な全てのステップに関与するマスター的なシグナル伝達タンパク質分子として注目されている。癌の生物学的理解に重要な位置を占めるc-Metは、多くの癌種において、その発現が悪性度や予後不良と相関性のあることが示されており、その全貌解明が待たれている。私共もすでに、卵巣癌や胃癌の予後とc-Met発現とに有意な相関性を確認している。よって、c-Metは新たな癌治療法及び制癌剤開発の極めて重要な標的分子となっている。

私共は、c-Met の二量体化を阻害するdominant negativeMet・Decoy Met の有用性及び、Met RNAi によるc-Met 発現抑制がリガンド非依存性の腫瘍に対しても著効を示すことを明らかにした(米国特許取得07872117)。また、私共が開発したhuman-HGF/SF 過剰発現トランスジェニックマウスを用いた研究で、高HGF/SF 環境は悪性度の強い肝細胞癌を早期に発症させ、B 型肝炎ウイルスのHBs 抗原トランスジェニックマウスにおける発癌も早めることを示した。このような癌は悪性度が高く、未治療のマウスモデルでは予後不良をもたらすが、興味深いことにc-Met 分子標的治療には高い感受性を示した。従って、より有効なc-Met標的治療薬を開発することが求められている。

私共はこれまでに、c-Metを標的とした新規低分子制癌剤開発のためのリード化合物の創製研究をコンピュータシミュレーション技術を駆使して進めてきた。その研究途上で、c-Met のATP 結合部位(Kinase Catalytic 部位)とは別のアロステリック (Allosteric) 部位に結合して、Kinase活性を抑制する新規ペプチド(Vpep)を見出し、さらに私共が開発した*in silico*創薬手法(COSMOS法：特許第4612270号)を用いて、Vpep ミメティック低分子化合物(Ai: Allosteric Inhibitor)を2種類創製することに成功した。さらに、このAllosteric 部位へのVpep 及びAi の結合様式をコンピュータシミュレーション技術を用いて、予測複合体モデルを構築した。

本研究では、このc-Met Allosteric 部位を標的とした阻害剤 (Ai) とCatalytic阻害剤 (Ci) とを連結したこれまでにない特異性の高いDual Inhibitor を創製を進めてきた。現在、新規Ciの創製を行い、さらに、最終的なAiとのDual Inhibitorの創製に向けて、予測複合体構造の解析から、詳細な分子設計を検討している。

田沼 靖一	東京理科大学薬学部 教授	新規 c-Met Dual Inhibitor の <i>in silico</i> 分子設計
四ノ宮成祥	防衛医科大学校 教授	新規 c-Met Dual Inhibitor の担癌動物での薬効評価
内海 文彰	東京理科大学薬学部 教授	新規 c-Met Dual Inhibitor の作用機序解析
高澤 涼子	東京理科大学薬学部 講師	新規 c-Met Dual Inhibitor の Kinase 阻害活性解析
佐藤 聡	東京理科大学薬学部 講師	新規 c-Met Dual Inhibitor の癌細胞での薬効評価

## 研究報告

### I 研究目的

近年、癌化学療法としてがん細胞選択的な分子標的に対する制癌剤の開発が進められている。その中でも特に Kinase を分子標的とした阻害剤の開発が注目されている。しかし、その阻害剤の大部分は、ATP 結合(Catalytic)部位への結合能を有する阻害剤であり、その特異性の面から他の Kinases への阻害効果を見逃すことができないという問題が生じている。そのため、これらの Catalytic 部位を標的とした Kinase 阻害剤の制癌剤には、種々の思わぬ臨床的副作用が生じているのが現状である。

このような背景のもとに本研究は、癌の発育進展の全ステップに関与するマスター的シグナル伝達分子である細胞膜レセプター型 Tyrosine Kinase の c-Met を分子標的として、特異性の高い新規制癌剤リード化合物を創製することを目的とした。ここでデザインしようとしている c-Met Kinase 特異的阻害剤創製の独創的な点は、1) c-Met Kinase の Allosteric 部位に結合能を有する特異的新規 Allosteric Inhibitor (Ai)を創製する; 2) Catalytic 部位に結合する Kinase Inhibitor (Ci)と Allosteric 部位に結合する Ai を連結させることで、特異性向上と Dual 阻害効果を有する新規 Dual 制癌剤を創製する、という 2 点である(図 1)。もし、Ai-Ci Tethering による 1 分子化 Dual Inhibitor の創製が困難な場合には、2 剤合剤化による克服策を実施する。

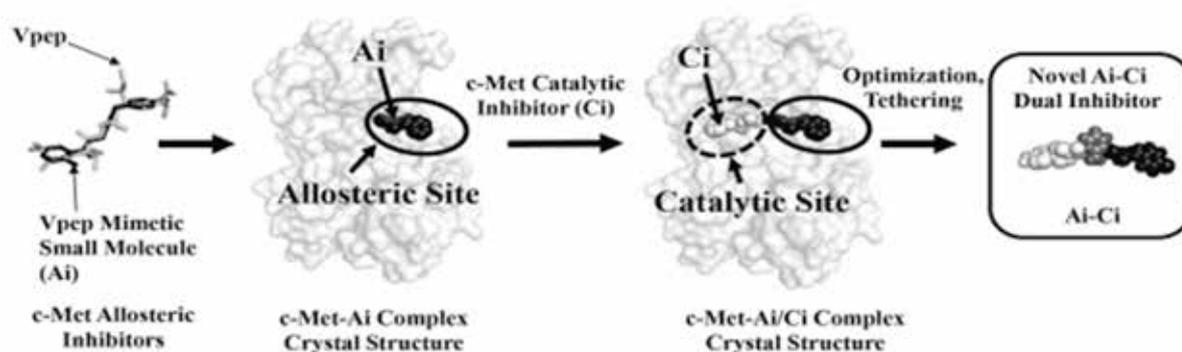


図 1 Dual inhibitor 型新規 c-Met 分子標的制癌剤の *in silico* 分子設計(概略図)

本研究ではまず、c-Met の Allosteric 部位に結合する抑制性制御タンパク質と c-Met とその相互作用解析から、c-Met Kinase 阻害ペプチド (Vpep) を設計する。この Vpep は、Catalytic 部位に結合する既存阻害剤(Ci)に対して相乗的な阻害効果を発揮することを検証する。また、私共が開発した *in silico* 創薬手法(COSMOS 法：特許第 4612270 号)を用いて、Vpep ミメティック低分子化合物(Ai:Allosteric Inhibitor)を分子設計する。この Allosteric 部位への Vpep 及び Ai の結合様式を、高エネルギー加速研究機構の支援より X 線結晶構造解析から理解する。さらに、Catalytic 阻害剤 (Ci) として、新規母核を持つ c-Met 阻害化合物を探索する。

最終的には、c-Met-Ai/Ci 複合体の *in silico* 予測構造モデルの構築及び X 線結晶構造解析を基に、c-Met Allosteric 部位を標的とした新規低分子阻害剤 (Ai) と Catalytic 阻害剤 (Ci) とを連結した これまでにない Dual Inhibitor を創製することを目標とし(図 1)、その抗腫瘍効果を細胞及び動物レベルで検証したい。

本研究の c-Met を分子標的とした新規 c-Met Kinase 特異的 Dual Inhibitor の創製は、私共のこれまでの作用機序解析により、低分子 c-Met 阻害剤に感受性を持つ癌とそうでない癌との遺伝子的な鑑別が示唆されたことから(Xie, et al. *Genes & Cancer* 2013 ; Uchiumi, et al. *Sci.Rep.*2015;Uchiumi, et al. *J. Biochem.*2015)、より個別的な癌の特性に応じた新たな分子標的癌治療戦略を提供できるものと期待される。よって、c-Met Allosteric 部位を主標的とした新規 Dual 制癌剤の創製研究は、極めて新規性及び独創性に富み、癌患者の送別化治療の面から独自性のある研究であり、学術的にも社会的にも重要な意義を持つと考えられる。

## II 研究計画及び材料と方法

私共はこれまでに、c-Met の Catalytic (ATP 結合) 部位ではなく、Allosteric 部位に結合するとペプチド(Vpep)のミメティック低分子化合物(Ai)を、COSMOS 法により分子設計した。また、c-Met-Ai 複合体予測構造モデルを構築した。本研究では、c-Met-Ai/Ci 複合体 X 線結晶構造解析を行うと共に、新規 Dual Inhibitor を創製することを目標とし、以下の 6 項目を順次実施することによって、c-Met を分子標的とした新たな癌治療戦略を提供することを目指す。

まず、Dual inhibition 効果を持つ新規 c-Met 阻害剤の開発スキーム(図 1)に従って、1)~4)までの実験を行い新規 Dual Inhibitor のリード化合物を創製する。

### 1)Ai-c-Met 複合体構造による c-Met Catalytic Inhibitors の創製 (高澤、田沼)

Vpep(Ai)が既存の c-Met Catalytic Inhibitor (Ci) の作用を増強する(図 2)ことから、これまでに報告がある種々の c-Met キナーゼ阻害剤 (Ci) (図 3)との併用による阻害効果の変化を詳細に解明する。さらに、Ai-c-Met 複合体予測構造モデルを用いて、Catalytic 部位に対して、Virtual screening を実施することによって新たな Ci を得て、Ci の最適化設計を行う。

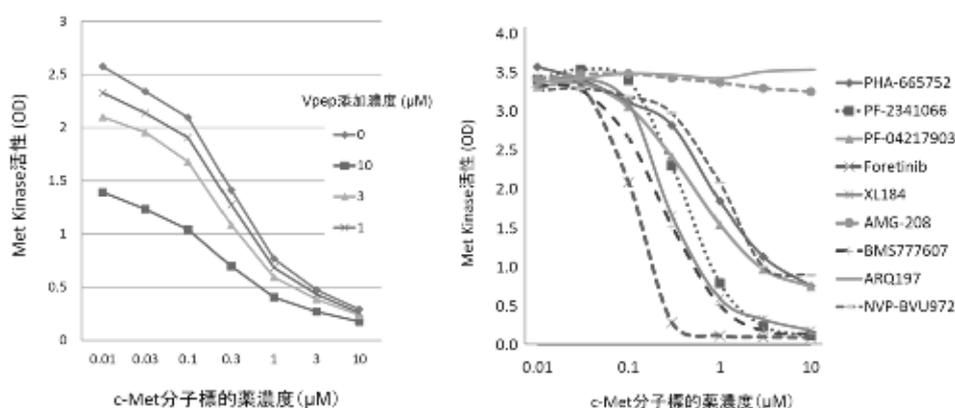


図 2 Vpep の c-Met 分子標的薬の増強作用 図 3 既知の c-Met Kinase 阻害剤の活性比較

## 2) X 線結晶解析による Ai/Ci Dual 結合様式の決定 (田沼、湯本)

1)の詳細な *in vitro* c-Met Kinase 阻害実験の結果と、それらの阻害剤の c-Met Allosteric 及び Catalytic 部位への結合様式を基に、Ai と Ci を選定する。この Ai/Ci Dual 結合様式を、高エネルギー加速研究機構の支援の下に、複合体結晶構造解析により決定する。

### 3)Ai/Ci-c-Met 複合体結晶構造を基にした Ai/Ci の最適化 (高澤、田沼)

2)で新たに決定された Ai/Ci-c-Met 複合体結晶構造の解析を基に、この独自の配座を用いて、Ai 及び Ci の最適化設計を行い、c-Met Kinase 阻害活性を評価する。

### 4) Tethering 設計による新規 Dual Inhibitor の創製 (田沼、佐藤)

3)で最適化された Ai 及び Ci を用いて Tethering 設計を行う。(i) Ai と Ci が近傍に位置する場合は、2 つの分子を Tethering 手法で連結し、1 剤として特異性と親和性を有する Dual Inhibitor を創製する。(ii) Ai と Ci が離れている場合は、2 剤併用(合剤)における特異性と親和性を評価する(2 drug-combination)。

次に創製した新規 Dual Inhibitor について生物学的活性を評価する。

## 5) c-Met Dual Inhibitor の培養癌細胞系による増殖・浸潤抑制及びアポトーシス誘導効果の検証 (高澤、四ノ宮)

前年度に創製した新規 c-Met Dual inhibitor が実際の腫瘍細胞培養系において制癌効果を発揮することを検証する。特に、c-Met に特異的な働きとして、MDCK 細胞での scattering や SK-LMS-1 細胞での matrigel invasionなどを指標として、HGF/SF 依存性の c-Met 活性化の状態を、そのリン酸化レベルとともに検証する。また、構成的に c-Met が活性化を受けている細胞株(MKN45 や Okajima)と HGF/SF の刺激を受けて活性化状態に移行する細胞株(MKN7 や MKN27 など)との比較を行い、それぞれの c-Met 活性化の状態に対する薬剤効果を確認する。さらに、細胞レベルにおける生物学的変化として、PI3-Kinase/Akt 経路を介したアポトーシスが起きるか否かについても、TUNEL assay や caspase 3 活性化を指標に検証する。

## 6) 新規 c-Met Kinase Dual Inhibitor の抗腫瘍効果の検証 (佐藤、四ノ宮)

細胞レベルでの有効性が確認できた c-Met Dual Inhibitor について、マウス腫瘍移植モ

デルを用いてその有効性を評価する。静脈内投与時の薬剤の臓器分布、毒性、代謝動態(血中での濃度推移)について確認して適用量を定めた後、既に申請者らが確立したいくつかの動物モデル(DA3 マウス乳癌皮下移植モデル、B16 黒色腫静脈内注射による肺転移モデル、SKOV3ip 卵巣癌細胞腹膜播種モデル)を用いて抗腫瘍効果の判定を行う。判定に際しては、移植部や転移臓器での増殖能、血管新生、細胞接着分子の発現などに着目した病理解析を行う。

### 研究体制の全体像

本研究計画は、研究統括者と研究協力者が共同して立案・作業に当たり、相互の連携を緊密に保ちつつ進める。研究協力者としては、特に薬剤設計分野で(株)理論創薬研究所の研究員の協力を得る。また、連携研究者(海外共同研究者)として米国 Van Andel 研究所の Qian Xie 博士を、研究顧問として同研究所の George F. VandeWoude 博士(Met 遺伝子のクローニング者)を置き、随時適切な助言等を仰ぐ。c-Met kinase の X 線結晶構造解析に関しては、高エネルギー加速研究機構(湯本史明特任准教授)に研究協力いただける万全の態勢を取っている。

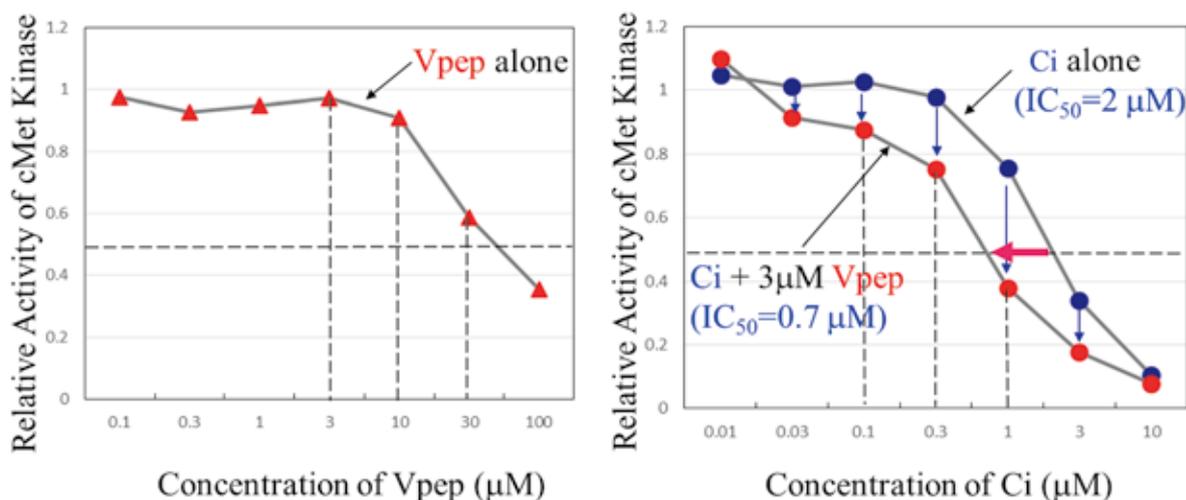
### III 研究成果

分子標的制癌剤として、これまで多くの腫瘍特異的 Kinase の活性を阻害する低分子化合物が開発されてきた。しかし、そのほとんどは ATP 結合(Catalytic)部位への結合活性を有する阻害剤であり、他の Kinases への影響を低減することは困難であった。そのため、これらの制癌剤には、種々の思わぬ臨床的副作用が生じてきており、何らかの方策による特異性の高い Kinase 阻害剤の開発が求められている。

これまでに私共は、c-Met を標的とした新規分子標的薬のリード化合物の創製研究を独自に開発した *in silico* 創薬手法(COSMOS 法:特許第 4612270 号)を活用して進めてきた。その途上で、c-Met に結合し、その活性を抑制する新規抑制性制御タンパク質を見出し、さらにその結合領域解析から、Allosteric 部位に結合する新規抑制性ショートペプチド(Vpep)を設計した。

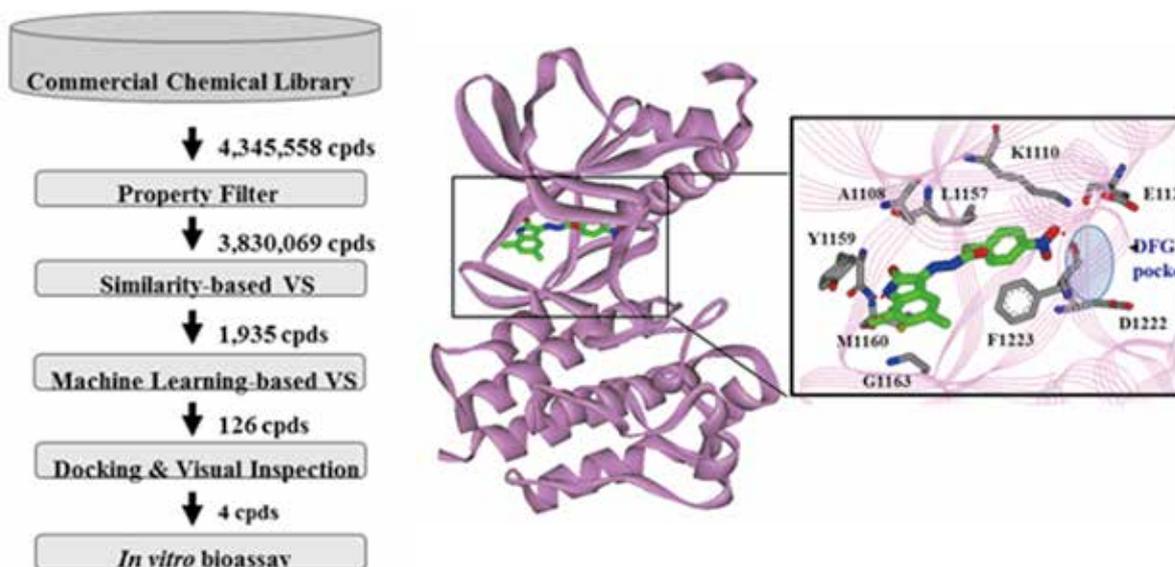
#### 1) c-Met Allosteric Inhibitor(Ai)/Catalytic Inhibitor(Ci)の相乗効果の解析

Vpep は、c-Met の Allosteric 部位に結合するが、それ単独でも弱い阻害効果がみられ、IC<sub>50</sub> は約 30  $\mu$  Mであった(下図, 左)。次に Vpep 単独では阻害効果を現わさない 3  $\mu$  M を添加した後に、Catalytic Inhibitor(Ci)の PHA の濃度依存的阻害効果を調べた(下図, 右)。興味深いことに、PHA 単独の IC<sub>50</sub> は 2  $\mu$  Mであるのに対して、3  $\mu$  M Vpep 存在下での IC<sub>50</sub> は 0.7  $\mu$  Mと阻害増強作用が認められた。また、1  $\mu$  M PHA 単独での c-Met 阻害は 20%程度であるのに対して、3  $\mu$  M Vpep 存在下では 60%阻害率を示した。さらに、Vpep 存在下では、PHA 単独では阻害効果の見られない濃度 0.03 - 0.3  $\mu$  Mで阻害効果が認められた。以上の結果から、Vpep は Ci に対して相乗効果を発揮することが明らかとなった。



## 2) 新規 Catalytic Inhibitors の創製

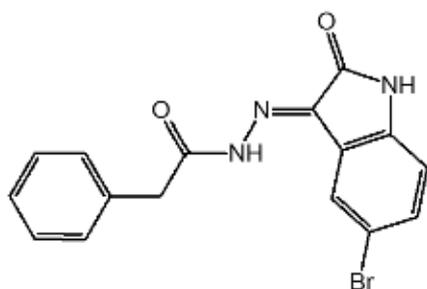
次に、新規 Ci の創製を目的として、新規母核となる Ci を化合物ライブラリーより *in silico* 創薬手法を用いて探索した（下図左）。



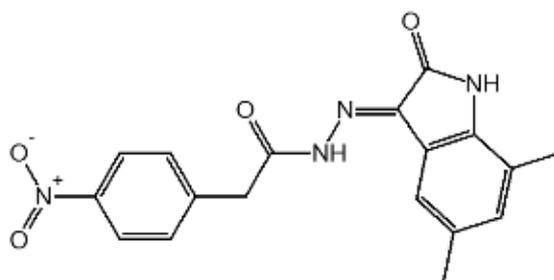
その結果、新規 Catalytic Inhibitors として、これまでにない母核として oxindole 骨格を見出し、その誘導体として阻害活性を有する化合物 (OX-1) を得た。しかし、まだそれらの阻害活性が PHA に比べて低いことから、現在、最適化を進めていると同時に、更なる新規母核の探索を行った。

## 3) 新規 Catalytic Inhibitors (Ci) の最適化

これまでに c-Met 阻害剤としては報告されていない新たな母核を有する oxindole 化合物 OX-1 を見出した（下図左）。その誘導体として阻害活性を有する化合物として、OX-2 を得た（下図右）。OX-01 と OX-02 の阻害効果は、それぞれ  $IC_{50}$  が約 230 と 50 µM であった。現在、OX-02 のさらなる最適化を行っている。興味深いことに、Ai1 5 µM 存在下での OX-02 の  $IC_{50}$  は、1.1 µM となり、約 50 倍の増強効果が認められた（表）。



**OX-01**



**OX-02**

Compound	IC <sub>50</sub> (μM)
OX-01	230
OX-02	50
OX-02/Ai1(5μM)	1.1

#### 4) Ai1/OX-02 複合体予測構造の解析

Allosteric Inhibitor の Ai1 と Ci として OX-02 を用いた時の結合様式を理解するために、その複合体予想構造をコンピュータシミュレーションにより解析した。この新規 Ci 化合物は、コンピュータシミュレーションによる複合体予測構造モデルから、c-Met の活性中心を形成するアミノ酸残基と特異的な水素結合及び疎水結合を形成することが判明した（上図右）。また、Ai1 の結合部位と近接していることから、OX-02 と Ai1 を連結することは可能であると推察される。

#### IV 考察

私共は本研究において、c-Met の ATP 結合部位ではなく、Allosteric 部位に結合する新規抑制性ペプチド(Vpep)を、c-Met 抑制性制御タンパク質の相互作用解析から設計し、その変換ミメティック低分子化合物(Allosteric Inhibitors, Ai)を、COSMOS 法により得た。また、c-Met-Ai 複合体予測構造モデルを構築すると共に、c-Met-Ai/Ci 複合体 X 線結晶構造解析を行い、新規 Dual Inhibitor を創製することを目的とし、c-Met を分子標的とした新たな癌治療戦略を提供することを目指してきた。

特に、1)Vpep 存在下での既存 c-Met Catalytic Inhibitors (Ci)の阻害効果の変化の詳細な解析、2)新規 Ai 及び Ci 化合物の探索・創製、3) c-Met-Ai/Ci-複合体予測構造を基にした Ai/Ci の最適化、及び 4) Tethering 設計による新規 Dual Inhibitor の創製、の順に実験を実施してきた。その結果、新規母核をもつ Ci 化合物として OX-02 を見出した。OX-02 の c-Met に対する IC<sub>50</sub> は、単独では 50 μM ではあるが、5 μM Ai1 存在下では 1.1 μM となり、約 50 倍阻害効果が増強されることが判明した。また、その複合体予測構造モデルを

用いた解析は、Ai1 の Allosteric 部位結合に伴う c-Met のコンフォメーション変化が、OX-02 の阻害効果を相乗的に増強することを示唆している。このことから、Ai と Ci による相乗効果による c-Met を標的とした特異性の高い Dual Inhibitor の創製が期待される。このような Allosteric 効果を有する化合物は、これまでに報告はなく、極めて独創性に富んだ研究成果と言える。現在、c-Met-Ai/Ci Dual 結合様式を、高エネルギー加速研究機構の支援の基に複合体 X 線結晶構造解析を行い、Ai と Ci との Tethering による Dual Inhibitor 創薬へと研究を進めていく予定である。そして、新規 Dual Inhibitor による c-Met を分子標的とした新たな癌治療戦略の確立に貢献したいと考えている。

## V 研究成果の発表

1. Shimada N, Takasawa R, **Tanuma S**. Interdependence of GLO I and PKM2 in the *Metabolic shift* to escape apoptosis in GLO I-dependent cancer cells. *Arch Biochem Biophys*, 638, 1-7, 2018. doi: 10.1016/j.abb.2017.12.008. Epub 2017 Dec 8.
2. Yoshimori A, **Tanuma S**. Molecular designing of small-molecule inhibitors for apoptosis regulation. *Regulation of Signal Transduction in Human Cell Research* [Curr Hum Cell Res and Appl] (eds. by Shinomiya N, Kataoka H, Xie Q), Springer-Verlag, in press.
3. Ogino Y, Sato A, Uchiumi F, **Tanuma S**. Cross resistance to diverse anticancer nicotinamide phosphoribosyltransferase inhibitors induced by FK866 treatment. *Oncotarget*, 9(23), 16451-16461, 2018, doi: 10.1248/bpb.b18-00075. [Epub ahead of print]
4. Takihara Y, Sudo D, Arakawa J, Takahashi M, Sato A, **Tanuma S**, Uchiumi F. Nicotinamide adenine dinucleotide ( NAD<sup>+</sup>) and cell aging. *New Research on Cell Aging*, NOVA Science Publishers, in press.
5. El-Far AHAM, Munesue S, Harashima A, Sato A, Shindo M, Nakajima S, Inada M, Tanaka M, Takeuchi A, Tsuchiya H, Yamamoto H, Shaheen HME, El-Sayed YS, Kawano S, **Tanuma SI**, Yamamoto Y. *In vitro* anticancer effects of a RAGE inhibitor discovered using a structure-based drug design system. *Oncol Lett*. 2018 Apr;15(4):4627-4634. doi: 10.3892/ol.2018.7902. Epub 2018 Jan 29.
6. Ohsaki A, Miyano Y, Tanaka R, **Tanuma SI**, Kojima S, Tsukimoto M. A novel mechanism of  $\gamma$ -irradiation-induced IL-6 production mediated by P2Y11 receptor in epidermal keratinocytes. *Biol Pharm Bull*. 2018 Mar 16. doi: 10.1248/bpb.b18-00075. [Epub ahead of print]
7. Nozaki Y, Tamori S, Inada M, Katayama R, Nakane H, Minamishima O, Onodera Y, Abe M, Shiina S, Tamura K, Kodama D, Sato K, Hara Y, Abe R, Takasawa R, Yoshimori A, Shinomiya N, **Tanuma S**, Akimoto K. Correlation between c-Met and ALDH1 contributes to the survival and tumor-sphere

- formation of ALDH1 positive breast cancer stem cells and predicts poor clinical outcome in breast cancer. *Genes Cancer*, 8(7-8), 628-639, 2017. doi: 10.18632/genesandcancer.148
8. Oyama T, Yoshimori A, Takahashi S, Yamamoto T, Sato A, Kamiya T, Abe H, Abe T, Tanuma S. Structural insight into the active site of mushroom tyrosinase using phenylbenzoic acid derivatives. *Bioorg Med Chem Lett*, 27(13), 2868-2872, 2017. doi: 10.1016/j.bmcl.2017.04.074. Epub 2017 Apr 26
  9. Noma N, Fujii G, Miyamoto S, Komiya M, Nakanishi R, Shimura M, Tanuma S, Mutoh M. Impact of Acetazolamide, a Carbonic Anhydrase Inhibitor, on the Development of Intestinal Polyps in Min Mice. *Int J Mol Sci*, 18(4), E851, 2017.
  10. Takasawa R, Akahane H, Tanaka H, Shimada N, Yamamoto T, Uchida-Maruki H, Sai M, Yoshimori A, Tanuma S. Piceatannol, a natural *trans*-stilbene compound, inhibits human glyoxalase I. *Bioorg Med Chem Lett*, 27(5), 1169-1174, 2017.
  11. Hisamatsu Y, Suzuki N, Masum AA, Shibuya A, Abe R, Sato A, Tanuma S, Aoki S. Cationic Amphiphilic Tris-Cyclometalated Iridium(III) Complexes Induce Cancer Cell Death via Interaction with Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin Complex. *Bioconjug Chem*, 28(2), 507-523, 2017.
  12. Shindo M, Sato A, Yamamoto Y, Arai T, Akasaki Y, Ichimura K, Tanuma S. Establishing a screening system for new O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase inhibitors to develop combination chemotherapy for temozolomide-resistant glioblastoma. *Tokyo Jikeikai Medical Journal*, 131(5), 141-147, 2016.
  13. Tanuma S, Sato A, Oyama T, Yoshimori A, Abe H, Uchiumi F. New insights into the roles of NAD<sup>+</sup>-poly(ADP-ribose) metabolism and poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *Curr Protein Pept Sci*, 17(7), 668-682, 2016.
  14. Oyama T, Takahashi S, Yoshimori A, Yamamoto T, Sato A, Kamiya T, Abe H, Abe T, Tanuma S. Discovery of a new type of scaffold for the creation of novel tyrosinase inhibitors. *Bioorg Med Chem*, 24(18), 4509-4515, 2016.
  15. Takasawa R, Shimada N, Uchiro H, Takahashi S, Yoshimori A, Tanuma S. TLSC702, a Novel inhibitor of human glyoxalase I, induces apoptosis in tumor cells. *Biol Pharm Bull*, 39(5), 869-873, 2016.
  16. Uchiumi F, Arakawa J, Iwakoshi K, Ishibashi S, Tanuma S. Characterization of the 5' -flanking region of the human DNA helicase B (*HELB*) gene and its response to *trans*-Resveratrol. *Sci Rep*, 6, 24510, 2016.
  17. Uchiumi F, Arakawa J, Iwakoshi K, Ishibashi S, Tanuma S.

- Characterization of the 5' -flanking region of the human DNA helicase B (*HELB*) gene and its response to *trans*-Resveratrol. *Sci Rep*, 6, 24510, 2016.
18. Uchiumi F, Shoji K, Sasaki Y, Sasaki M, Sasaki Y, Oyama T, Sugisawa K, **Tanuma S**. Characterization of the 5'-flanking region of the human *TP53* gene and its response to the natural compound, Resveratrol. *J Biochem*, 159(4), 437-447, 2016.
  19. Uchiumi F, Larsen S, **Tanuma S**. Possible roles of a duplicated GGAA motif as a driver cis-element for cancer-associated genes. *Understand Cancer - Research and Treatment*, iConcept Press Ltd., Hong Kong, pp. 1-25, 2016
  20. Noda S, Takahashi A, Hayashi T, **Tanuma S**, Hatakeyama M. Determination of the catalytic activity of LEOPARD syndrome-associated SHP2 mutants toward parafibromin, a *bona fide* SHP2 substrate involved in Wnt signaling. *Biochem Biophys Res Commun*, 469(4), 1133-1139, 2016.
  21. Larsen S, Kawamoto S, **Tanuma S**, Uchiumi F. The hematopoietic regulator, ELF-1, enhances the transcriptional response to Interferon- $\gamma$  of the *OAS1* anti-viral gene. *Sci Rep*, 5, 17497, 2015.
  22. Sakagami H, Shimada C, Kanda Y, Amano O, Sugimoto M, Ota S, Soga T, Tomita M, Sato A, **Tanuma S**, Takao K, Sugita Y. Effects of 3-styrylchromones on metabolic profiles and cell death in oral squamous cell carcinoma cells. *Toxicology Reports*, 2, 1281-1290, 2015.
  23. Uchiumi F, Larsen S, **Tanuma S**. Transcriptional regulation of the human genes that encode DNA repair- and mitochondrial function-associated proteins. *Advances in DNA Repair* (ed. by Chen C), InTech-Open Access Publisher, Inc., pp. 129-167, 2015. \_
  24. **Tanuma S**. Development of Novel Anti-Cancer Combination Chemotherapy Targeting Warburg Effect. *ILSI Japan*, 121, 8-15, 2015.
  25. Kobayashi T, Suzuki M, Morikawa M, Kino K, **Tanuma S**, Miyazawa H. Transcriptional regulation of *Tal2* gene by all-*trans* retinoic acid (atRA) in P19 cells. *Biol Pharm Bull*, 38(2), 248-256, 2015.
  26. Yoshimori A, Oyama T, Takahashi S, Abe H, Kamiya T, Abe T, **Tanuma S**. Structure-activity relationships of the thujaplicins for inhibition of human tyrosinase. *Bioorg Med Chem*, 22(21), 6193-6200, 2014.
  27. Uchiumi F, Ohi H, **Tanuma S**. Application of DEAE-dextran method to an efficient gene transfer system. *Seikagaku*, 86(4), 532-537, 2014.
  28. Kobayashi T, Komori R, Ishida K, Kino K, **Tanuma S**, Miyazawa H. *Tal2* expression is induced by all-*trans* retinoic acid in P19 cells prior to acquisition of neural fate. *Sci Rep*, 4, 4935, 2014.
  29. Nakayama M, Ishibashi T, Ishikawa HO, Sato H, Usui T, Okuda T, Yashiro H,

- Ishikawa H, Taikou Y, Minami A, Kato K, Taki M, Aigaki T, Gunji W, Ohtsu M, Murakami Y, Tanuma S, Tsuboi A, Adachi M, Kuroda J, Sasamura T, Yamakawa T, Matsuno K. A gain-of-function screen to identify genes that reduce lifespan in the adult of *Drosophila melanogaster*. *BMC Genet*, 15, 46, 2014.
30. Uchiumi F, Larsen S, Tanuma S. Application of DEAE-dextran to an efficient gene transfer system, *Dextran: Chemical Structure, Applications and Potential Side Effects* (ed. by Figgs GP), Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge, NY, pp. 143-156, 2014.
31. Uchiumi F, Fujikawa M, Miyazaki S, Tanuma S. Implication of bidirectional promoters containing duplicated GGAA motifs of mitochondrial function-associated genes. *AIMS Molecular Science*, 1(1), 1-26, 2014.



microRNA が転写因子をレスキューするメカニズム



## 《研究の概要》

細胞の運命は、ゲノムに直接結合して mRNA の転写を引き起こす「転写因子」という蛋白によって決定される、と考えられてきた。一方、急性白血病の発症には、転写因子の異常によって運命決定やその後の分化が障害される「脱分化」が深く関与する。我々は、小分子 RNA の一つ、miR-126 が転写因子を介さず、白血病細胞の脱分化を正常化し、B 細胞に分化させたこと (Okuyama PNAS 2013) を端緒に、正常造血において、miR-195 が転写因子 EBF1 欠損による脱分化を補完し、正常な初期 B 細胞を誘導することを見出した。しかし、採取される細胞が少量である、長期培養を要する、細胞数が減少する、などの問題のため、miR-195 導入 EBF 欠損 B 細胞の解析が初期 B 細胞に限られた。そこで、本研究では上記の問題点を克服し、miR-195 導入 EBF 欠損 B 細胞の分化能や機能を、全 B 細胞分化段階で示すことによって、**転写因子 EBF1 の欠損を、miR-195 が、完全に補完するのか、を明らかにすることをねらいとした**。更に、各分化段階において、従来転写因子が必須と考えられてきた細胞の特徴を決定づける遺伝子の発現制御を miRNA がどのように行うか、その詳細な機序を明らかにすることを研究目的とした。

結果、長期培養を可能とする細胞培養システムを構築した。更に、miR-195 導入 EBF 欠損 B 細胞の解析が初期 B 細胞において、TGF $\beta$  経路の抑制と、上流経路の抑制による FOXO3 の活性化によって、EBF1 欠損機能を補完していることを明らかにした。更には、正常 B 細胞分化においては、miR-195 と EBF 1 は相互作用は存在せず、各々が独立的に発現制御を受けていることが明らかとなった。

本研究により、従来の、転写因子のみが決定因子であるという古典的な細胞運命決定機構が刷新され、転写因子が無くとも、miRNA など他の因子が、細胞運命を決定し分化を誘導するという、新しい細胞運命決定機構が提唱される。それとともに、白血病における転写因子異常による脱分化を、miRNA で正常化するという新しい治療法を提案された。

幸谷 愛	東海大学医学部 教授	miR-195 の EBF1 欠損造血細胞機能解析 および統括
伊川 友活	理化学研究所 研究員	EBF1 欠損造血細胞樹立
河本 宏	京都大学再生医科学研究所 教授	B 細胞運命制御の解析
大塚 正人	東海大学医学部 准教授	miR-195 欠損マウス作製
穂積 勝人	東海大学医学部 教授	EBF1 欠損マウス供与

## 研究報告

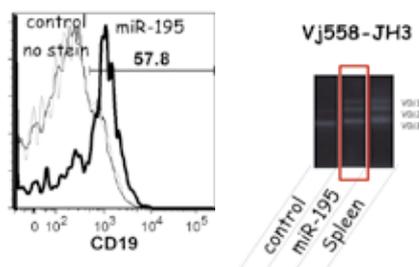
### I 研究目的

細胞運命の決定と維持に、DNA のメチル化やクロマチンの構造変化が関与するとの報告が増加しているが、未だ、最も重要で必須であるのは、ゲノムに直接結合して、標的遺伝子の mRNA の転写を開始する蛋白、言い換えれば、遺伝子発現のスイッチをオンにする蛋白である「転写因子」と考えられている。

miRNA は哺乳類では 2000 年に発見された約 22 塩基の遺伝子をコードしない小さな RNA である。miRNA は標的遺伝子 mRNA の 3' UTR に結合しその発現を mRNA レベル、蛋白翻訳レベルで抑制する。1 つの miRNA は数百の標的遺伝子を持ち、これまでに生物学的な重要性が多数報告されている。しかし、細胞運命決定における役割は、既に転写因子によって運

命決定された細胞において、他細胞の関連遺伝子の残存発現を「Shut off」するに過ぎないという、**運命決定そのものには関与せず、補助的な作用のみをしめす**

Figure1 miR-195 は EBF1 欠損前駆細胞



「Fine Tuner」と考えられてきた。我々は、予後不良 MLLAF4 急性リンパ性白血病 (ALL) 細胞において、白血病細胞をリンパ球の B 細胞へ分化誘導する miRNA として、miR-126 を同定した。興味深いことに、miR-126 は B 細胞分化に必須転写因子と考えられてきた E2A, EBF1, PAX5 の発現上昇を全く伴わずに、

MLLAF4ALL 細胞を B 細胞へ分化させた。この予想外の結果に着想を得て、「miRNA は、細胞運命決定や分化において単なる”Fine Tuner”ではなく、条件によっては、転写因子と同等の能力を有するのではないか？」との問いを持つに至った。そこで、3 つの転写因子の中で他の二つの転写因子の欠損をほぼ完全に補完する EBF1 に着目し、未分化な状態で分化が停止している EBF1 欠損造血前駆細胞 (HPCs) に miR126 を導入し B 細胞運命決定の有

無を観察した。驚くことに、miR126 を導入した EBF1 欠損 HPCs は、B 細胞関連遺伝子と B 細胞関連マーカー B220 の発現を上昇し、不完全ではあるが、B 細胞運命決定を示した。

(Okuyama et al PNAS 2013)

そこで、更に B 細胞誘導能が高い miRNA を探索したところ、miR-195 が上記 EBF1 欠損 HPCs に完全な B 細胞運命決定、つまり、**表面マーカー CD19 の発現と、分子生物学的マーカー VDJ 組み換えを (Fig1) を誘導した**。本現象の発見は転写因子が必須と考えられてきた**古典的細胞運命決定概念を覆すものであり**、国際学会で賞賛を得た。(CSHL Meeting 2014 Talk ASH 2013 Oral Keystone symposium 2014 2015 invited speaker) ただ、更なる解析のためには克服すべき問題が存在する。EBF1 欠損ホモマウスが不妊であるため、研究材料の確保が大変困難であること、CD19、VDJ 組換えの誘導に時間がかかること、miR-195 導入細胞は、細胞増殖が遅いため長期培養が不可能、などにより、運命決定以降の中期～後期 B 細胞分化の有無を観察できない事である。

そこで、本研究では上記の問題点を、以下の方法で克服し、miR-195 導入 EBF1 欠損 HPCs が最終 B 細胞への分化能力、正常な B 細胞機能を有し、**miR-195 が全 B 細胞分化段階において、EBF1 を完全に補完する**ことができるのかという点を明らかにする。

具体的には、EBF1 欠損 HPCs を十分量得るシステムの構築、B 細胞運命決定の最適誘導条件による初期 B 細胞誘導時間の短縮によって、miR-195 導入 EBF1 欠損 B 細胞運命決定細胞の長期培養、マウス生体内での長期観察を可能とする。以上から、miR-195 導入 EBF1 欠損 HPCs が、B 細胞運命決定以降、中期～最終 B 細胞まで分化する能力を有するのかを明らかにし、分化能力を認めたら、各分化段階の B 細胞リンパ球機能を測定し、正常 B 細胞と比して、どの程度のリンパ球機能を有するのか明らかにする。加えて、**B 細胞分化、B 細胞機能において、miR-195 が EBF1 欠損を補完する分子機序を解明**する。並行して、上記分子機序の解明に、重要な手がかりを与える miR-195 の生理的条件下での機能を、miR-195 欠損マウスの表現型の解析によって明らかにする。最後に、本研究課題で得られた知見を治療へ応用するため、**EBF1 機能不全変異、発現低下を認める造血腫瘍に miR-195 を導入し、脱分化の正常化、薬剤感受性の増加等の治療効果の有無を検討**する。

## II 研究計画及び材料と方法

miR-195 を導入した EBF1 欠損 HPCs が B 細胞運命決定後、どの段階まで分化し得るのか、分化した際、正常な B 細胞機能を有するのか、つまり、EBF1 欠損下において **miR-195 がより完全な B 細胞を誘導する能力を持つ**のかという点を明らかにするために、EBF1 欠損 HPCs を大量に得るシステムを構築した後、miR-195 を導入した EBF1 欠損 HPCs が最も効果的に短期間で B 細胞運命決定を誘導する条件を探索する。これにより B 細胞運命決定以後の分化の観察が可能となれば、細胞培養、マウスへの導入実験における、分化の有無、分化した細胞の機能を解析する。最後に、B 細胞運命決定、運命維持において、miR-195 が EBF1 欠損を補完した分子機序を、標的遺伝子の同定、その機能解析、相乗効果の検討から、包括的に解明する。

本研究を遂行する上での律速段階は、研究項目 2 の、miR-195 導入 EBF1 欠損 HPCs を B

細胞運命決定細胞に効果的に短時間で誘導する条件を見出す事である。不可能な場合は、コンディショナルノックアウトマウスを導入することによって実現する大量培養、もしくは、細胞増殖が遅い上記細胞に抗アポトーシス作用を付与する bcl2 を導入し、長期分化誘導培養、B 細胞を欠損する Rag1/2 欠損マウス生体内での長期観察を可能とする。研究項目、期間全体の予定、研究実施体制は以下の通りである。

## [研究項目]

### 1) EBF1 欠損 HPCs を十分量得るためのシステム構築

EBF1 コンディショナル欠損マウスと造血系特異的 Vav1-Cre マウスを交配し、妊娠可能なマウスを作出し、造血系特異的 EBF1 ホモ欠損マウスを維持飼育する。

### 2) B 細胞運命決定細胞誘導最適条件の決定

現状、miR-195 導入 EBF1 欠損 HPCs を、CD19 陽性 VDJ 組換え陽性である B 細胞運命決定細胞に誘導するのに、4 週間もの長期培養が必要であり、研究の進行に大きな障害となっている。そこで、各種フィーダー細胞、サイトカインの組み合わせを検討して、上記を 2 週間程度に短縮する B 細胞運命決定細胞誘導最適条件を探索する。

### 3) B 細胞系列決定後の分化誘導

1) 2) により miR-195 導入 EBF1 欠損 HPCs の運命決定以後の分化の観察が可能となれば、成熟 B 細胞、形質細胞など、中期~後期 B 細胞への分化の有無を長期培養、および、B 細胞欠損を示す Rag1/2 欠損マウスへ導入して、マウス生体内での分化誘導を試みる。分化が認められれば、B 細胞受容体 (BCR) 編集などの B 細胞機能を誘導細胞が有するか検討する。B 細胞運命決定までの培養時間を短縮できない場合、EBF1 欠損 HPCs に bcl2 を導入し、抗アポトーシス効果を付与し上記を検討する。

### 4) EBF1 欠損を miR-195 が補う機序の解明

EBF1 は B 細胞運命決定のみならず、維持にも必須である。2) で miR-195 が EBF1 欠損細胞を成熟 B 細胞に誘導した場合は、B 細胞運命決定維持双方、しなかった場合は、B 細胞運命決定における miR-195 が EBF1 欠損を補った機序を明らかにする。

### 5) 生理的条件下における miR-195 の機能解析

上記を解明する上で miR-195 の生理的条件下での機能が重要な手がかりとなるため、並行して、miR-195 欠損

マウスの造血系における機能を解析する。

### 6) EBF1 機能不全変異、発現低下を認める造血腫瘍における miR-195 分化誘導治療効果

上記造血腫瘍に miR-195 を導入した際、分化の正常化、薬剤感受性の増加等の治療効果が認められるか検討する。

### III 研究成果

#### 1) EBF1 欠損 HPCs を十分量得るためのシステム構築

EBF1 コンディショナル欠損マウスと造血系特異的 Vav1-Cre マウスを交配し、妊娠可能なマウスが作出され、造血系特異的 EBF1 ホモ欠損マウスが飼育されている。

#### 2) B 細胞運命決定細胞誘導最適条件の決定

Feeder cells としては、従来の Tst4 に加え、OP9、TD7 などを用い、サイトカインの容量種類も各種検討し、最適条件を検討したが、B 細胞マーカー表出までの培養期間は、目標の 2 週間には届かず、3 週間の培養であり、従来 4 週間から 1 週間の短縮を認めるのみであった。

#### 3) B 細胞系列決定後の分化誘導

上記より B 細胞運命決定までの培養時間が 1 週間と、不十分なため、EBF1 欠損 HPCs に bc12 を導入し、抗アポトーシス効果を付与し上記を検討を行った。しかしながら、原因は不明であるが、miR-195 を導入した細胞の生存期間の優位な延長は認められなかった。

#### 4) EBF1 欠損を miR-195 が補う機序の解明

一つには TGF $\beta$ -ta 経路の抑制が B 細胞分化を誘導するキープクターであることを見出した。加えて、B 細胞の分化に重要な機能を示す転写因子 Foxo1 が、抑制因子を miR-195 が直接的に標的として発現抑制することによって、活性化される機序が見出された。

#### 5) 生理的条件下における miR-195 の機能解析

上記の細胞をマウスに移植し、その分化能について現在、検討中である。

#### 6) EBF1 機能不全変異、発現低下を認める造血腫瘍における miR-195 分化誘導治療効果

ホジキンリンパ腫は転写因子の異常により、系列不明という、性質を示すが、近年遺伝学的な手法により B 細胞由来腫瘍であることが明らかになった。ホジキンリンパ腫においては、EBF の発現が低下していることが報告されていたため、ホジキンリンパ腫由来細胞株に miR-195 を導入した際の B 細胞マーカーの発現変化を調べた。結果 CD19 などの代表的な B 細胞マーカーの上昇が miR-195 によってもたらされることが明らかとなった。

### IV 考察

以上から、miR-195 による EBF1 欠損の補完機能について、リンパ腫細胞を用いた系でも再現された。よって、上記作用は一般的な作用と考えられる。また miR-195 が治療標的としても誘導であることが示された。

その作用機序に関しても TGF $\beta$  と FOXO1 という B 細胞分化に多大な影響を及ぼす経路が miR-195 によって制御されていることが明らかになった。

初期分化について作用機序、他のシステムでも同様の結果が得られたことにより、論文化の方向で進めている。

B 細胞分化段階どこまで補完し得るという点については、まだ検討の余地があり、マウス個体を用いて今後明らかにしていきたい。

## V 研究成果の発表

### [論文掲載]

1. Yamakawa N, Higuchi H, Imadome K-I, Yahata T, Fujita K, Lu J, Ogata J, Kotaki R, Yokoyama K, Okuyama K, Sato A, Takamatsu M, Kurosaki N, Mohamad Alba S, Azhim A, Horie R, Watanabe T, Kitamura T, Ando K, Kashiwagi T, Matsui T, Okamoto A, Kuroda M, Nakamura N, Handa H, \*Kotani A. EBV establishes the tumor microenvironment by exosome-mediated delivery of miRNA to macrophages. **Blood**. 2018 Apr 22. pii: blood-2017-07-794529.
2. Kotaki R, Higuchi H, Ogiya D, Katahira Y, Kurosaki N, Yukihiro N, Ogata J, Yamamoto H, Mohamad Alba S, Azhim A, Kitajima T, Inoue S, Morishita K, Ono K, Koyama-Nasu R, \*Kotani A. Imbalanced expression of polycistronic miRNA in acute myeloid leukemia. **Int J Hematol**. 2017;106(6):811-9.
3. Kotaki R, Koyama-Nasu R, Yamakawa N, \*Kotani A. miRNAs in Normal and Malignant Hematopoiesis. **Int J Mol Sci**. 2017;18(7):1495.
4. Kishikawa T, Otsuka M, Yoshikawa T, Ohno M, Yamamoto K, Yamamoto N, Kotani A, \*Koike K. Quantitation of circulating satellite RNAs in pancreatic cancer patients. **JCI Insight**. 2016;1(8):e86646.
5. Yamamoto H, Lu J, Oba S, Kawamata T, Yoshimi A, Kurosaki N, Yokoyama K, Matsushita H, Kurokawa M, Tojo A, Ando K, Morishita K, Katagiri K, \*Kotani A. miR-133 regulates Evf1 expression in AML cells as a potential therapeutic target. **Scientific Reports**. 2016;6:19204.

### [学会発表]

1. Kotani A. EBV 感染腫瘍由来エクソソームはマクロファージを制御し腫瘍形成を促す  
2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017 年 神戸
2. Kotaki R, Higuchi H, Kotani A. Ibrutinib As a Possible Therapeutic Strategy for Epstein-Barr Virus-Positive Lymphoma/Leukemia 第 59 回アメリカ血液学会学術集会 2017 年 米国・アトランタ
3. Koike R, Carreras J, Higuchi H, Imai K, Kotani A. The Humanized EBV-LPD

Recaptilates Human Non GC DLBCL 第 59 回アメリカ血液学会学術集会 2017 年 米国・アトランタ

4. Kotani A. EBV establishes the tumor microenvironment by exosome-mediated delivery of miRNA to macrophages. 2nd Bio-iST Symposium 2016 2016 年 マレーシア・クアラルンプール
5. Kotani A. 転写因子欠損を補完する miRNA による造血運命決定機構と白血病の新しい理解 第 89 回日本生化学会大会 2016 年 仙台
6. Kotani A. EBV establishes the tumor microenvironment by exosome-mediated delivery of miRNA to macrophages 第 75 回日本癌学会学術総会 2016 年 横浜
7. Kotani A. A single miRNAs rescue transcriptional factor deficiency in B cell lineage specification though TGF beta pathway 第 78 回日本血液学会学術集会 2016 年 横浜
8. Kotani A. 転写因子欠損下における miRNA による細胞運命制御 第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年 横浜
9. Kotani A. EBV Establishes the Tumor Microenvironment by Exosome-mediated Delivery of miRNA to Macrophages. 57th Autumn Meeting of the Korean Society of Hematology 2016 年 韓国・大田広域市



脂肪由来間葉系前駆細胞を用いた動脈硬化性疾患  
に対する血管新生療法



《研究の概要》

高齢者の虚血性心血管病は、その加齢性変化に高血圧や糖尿病、脂質異常症などの動脈硬化危険因子が複数加わるため、動脈硬化の病変形態が複雑化し、しばしば難治化する。高齢患者の増加を免れない我が国では、最近注目の“フレイル”を診療プラン構築の際に考慮することも欠かせない。

既存の治療法では改善が見込まれない重症心血管病患者の救済を試みる新たな治療戦略の一つに「血管新生療法」がある。虚血組織へ血液を供給する側副血行路の発達を人工的に促す本治療法の効果と安全性については我々を含む数施設から既に報告されているが、この血管新生療法についても高齢患者への効果的なアプローチ法について検討が必要な時期を迎えている。

本研究では、かつて我々の施設から始まった「骨髄単核球細胞移植による血管新生療法」以上の高い効果が期待されている「皮下脂肪組織由来再生細胞 (adipose-derived regenerative cells: ADRCs) 移植による血管新生療法」を国内多施設共同研究の参加施設として実施し、高齢患者における効果と安全性を将来検証するべく、関連データの集積を行った。本研究期間中に3例へ実施し、いずれも改善効果を認めた。さらにその効果とフレイル要因との関連性を検討し、効果に関する問題点を抽出することで、今後巡り会うであろう効果不十分例に対する打開策を将来検討することができるよう、フレイルの一表現である“筋萎縮”を人工的にもたらした動物モデルの作製を試み、その完成に至った。

筋萎縮動物モデルの下肢に人工的虚血状態を加え、虚血組織救済のための生理的血管新生反応を評価したところ、筋萎縮下肢における血管新生反応はマクロ的にもミクロ的にも低下していた。萎縮筋組織における血管新生関連タンパクの発現低下が観察されたことから、血管新生障害の原因の一つと考えられた。フレイルなどによって筋萎縮を来たした虚血下肢に血管新生療法を行う場合、何らかの前治療で骨格筋細胞の血管新生関連タンパク分泌機能を回復させる必要があることが示唆された。

萎縮した下肢筋肉に対して効果的な下肢レジスタンストレーニングを行うことが血管新生関連タンパク分泌機能の回復に結びつき、血管新生療法効果を高める補完的治療法となるかもしれない。本研究では高齢者にも従来 of 大型トレーニング機器使用効果と同等のレジスタンストレーニング効果 (骨格筋量の増加や筋力の増強) をもたらした簡便かつ低侵襲な「ハイブリッドトレーニングシステムによる下肢筋力トレーニング療法」の血管新生効果について調査した。本研究期間中に閉塞性動脈硬化症2例、閉塞性血栓性血管炎1例に実施し、歩行距離の延長、疼痛軽減、潰瘍改善効果を認め、血管新生効果の介在が示唆された。実施中および実施後6ヵ月間において有害事象は認めなかった。実施数を増やし、血管新生療法の補完的治療法となり得るか否かについての将来検証に繋げてゆく。

福本 義弘	久留米大学医学部 内科学講座 心臓・血管内科部門 主任教授	研究の計画・実施・総括
佐々木 健一郎	久留米大学循環器病研究所 講師	研究の計画・実施 収集データの解析
大塚 昌紀	久留米大学医学部 内科学講座 心臓・血管内科部門 助教	研究の実施・データの収集
佐々木 基起	久留米大学医学部 内科学講座 心臓・血管内科部門 助教	研究の実施・データの収集
石崎 勇太	久留米大学医学部 内科学講座 心臓・血管内科部門 助教	研究の実施・データの収集
片伯部 幸子	久留米大学医学部 内科学講座 心臓・血管内科部門 助教	研究の実施・データの収集
吉川 尚宏	久留米大学医学部 内科学講座 心臓・血管内科部門 助教	研究の実施・データの収集

## 研究報告

### I 研究目的

昨今、我が国では動脈硬化を基盤とする虚血性心血管病（虚血性心疾患・脳血管障害・末梢動脈狭窄または閉塞性疾患など）の罹患率が増加している。その多くは進行性の臓器虚血障害をきたし、それぞれの疾患が合併することも少なくない。虚血性心疾患による慢性心不全患者は些細な契機で急性増悪による入退院を繰り返し、末梢動脈狭窄・閉塞患者は下肢虚血症状（間欠性跛行、安静時疼痛、潰瘍や壊疽形成）によって日常生活動作（activities of daily living: ADL）が高度に制限されるため、患者の生活の質（quality of life: QOL）が著しく低下する。ますます高齢化する我が国において、そのような患者が高齢者層で増加することは、今後の介護支援環境基盤形成を考える上で留意すべき一事項である。さらに最近では、“フレイル”要因の関わりを考慮した診療アプローチに注目が集まっており、動脈硬化を基盤とする虚血性心血管病患者においても例外ではない。

高齢者における虚血性心血管病は、その加齢性変化に高血圧や糖尿病、脂質異常症などの動脈硬化危険因子が複数加わることから、動脈硬化の病変形態が複雑化することが少なくない。それゆえ、従来の薬物療法や運動療法、血行再建術（カテーテルによる血管形成術や外科的バイパス術）では十分な血行改善が得られない難治例となることもしばしばである。このような難治例を救済する新たな治療戦略に「血管新生療法」がある。虚血組織へ血液を供給する“側副血行路”の発達を人工的に促す治療法である。我々の教室はウサギでの動物実験を経て、2000年に世界初の「骨髄単核球細胞移植による血管新生療

法」を重症の閉塞性動脈硬化症患者に実施した。その後、先進医療の認可を受け、その安全性と効果についても報告してきた。そして新たに「皮下脂肪組織由来再生細胞

(adipose-derived regenerative cells: ADRCs) 移植による血管新生療法」を国内多施設共同研究参加施設として実施すべく、その準備を整えてきた。ADRCsによる血管新生療法は、血管新生に関与する細胞数が骨髄単核球細胞内よりも1,000倍近く多いことが動物実験で報告されており、その臨床応用による治療効果に期待が寄せられている。再生医療ではiPS細胞（誘導性多能性幹細胞）の臨床応用に大きな期待が寄せられているが、虚血性疾患への実現の道のりは未だ遠いのが実状である。

以上の背景を踏まえ、本研究では厚生労働省認可の多施設共同研究プロトコールに従ってADRCs移植による血管新生療法を実施し、その安全性と効果を調査するためのデータ集積を行う一方、今後増加を避けることのできない虚血性心血管病高齢患者の難治例に対して確実な効果をもたらす血管新生療法を実施すべく、フレイル動物の下肢虚血モデル実験によって適正アプローチ方法を模索する。フレイル要因の一つでもある加齢性下肢筋肉量の減少や筋力の低下（サルコペニア）は下肢骨格筋の質を低下させ、生理的な血管新生反応に悪影響を及ぼしている可能性がある。事実、閉塞性動脈硬化症による重症下肢虚血例にサルコペニアを多く認める研究結果も報告されている。さらに本研究では、高齢者にも従来の大型トレーニング機器使用効果と同等のレジスタンストレーニング効果（骨格筋量の増加や筋力の増強）をもたらした簡便かつ低侵襲な「ハイブリッドトレーニングシステムによる下肢筋力トレーニング療法」がサルコペニアを改善し、血管新生効果をもたらすか、現在の血管新生療法に補完的な効果をもたらす可能性があるか否かについて検証する。本トレーニング法は久留米大学が新たに開発したユーザーフレンドリーシステムであり、長期間継続実施が期待できる。末梢動脈疾患での実施評価は久留米大学病院でのみ可能である。

## II 研究計画及び材料と方法

### 1. 重症動脈硬化性疾患に対する基礎研究

#### (1) フレイル型下肢虚血マウスモデルの作成と血管新生反応の評価

10~12週齢のマウスの片側下肢を伸展保持させた状態で市販のテープを用いて固定し、飲水および餌摂取可能な行動制限内の環境下で1ヶ月間飼育する。肉眼的な筋萎縮状態の観察評価に加え、大腿部断面HE染色像やシリウス・レッド筋線維断面染色像のコンピューター画像解析ソフトによる断面積算出によって健常下肢よりも統計学的に筋萎縮を来しているか否かについて確認する。次に、筋萎縮下肢の大腿動脈を外科的に凝固結紮し、フレイル型下肢虚血マウスモデルを作製する。術後14日目における虚血肢および非虚血肢の血流をレーザードプラー血流解析機で定量化し、その血流比を算出する。安楽死後、虚血肢および非虚血肢の大腿内側部横断面組織を用いてCD31抗原（血管内皮細胞抗原）と細胞外マトリックスの一つであるlaminin抗原（骨格筋膜抗原）の免疫学的組織染色を行い、骨格筋繊維数で補正した毛細血管密度を算出する。凍結保存した大腿内側および下腿組織をホモジナイズし、ウエスタンブロット解析法で虚血組織および非虚血組織中における血管新生関連タンパクであるvascular endothelial growth factor (VEGF)、stromal cell-derived factor-1 $\alpha$  (SDF-1 $\alpha$ )、interleukin-1 $\beta$ 、basic fibroblast Growth Factor (b-FGF)、

hepatocyte growth factor (HGF)、angiopoietin などの発現状態を評価する。

## 2. 重症末梢動脈疾患に対する臨床研究

### (1) 自家皮下脂肪組織由来再生細胞 (ADRCs) 筋注投与による血管新生療法

#### 【対象者】

- 閉塞性動脈硬化症、バージャー病、膠原病による末梢血管病で「安静時疼痛」や「潰瘍」を認める患者
- 25 歳以上 80 歳未満、性別不問

#### 【除外基準】

- 腹部の超音波・CT 検査などで十分な皮下脂肪組織採取が困難と判断された場合
- インフォームドコンセントの得られない場合
- 他の合併症で余命が 1 年以内と考えられる場合
- 悪性新生物を有する (可能性はある)、もしくは 5 年以内にその既往がある場合
- 虚血性心臓病を有し、血行再建が行われていない場合
- 未治療の重症糖尿病性網膜症を有する場合
- 重大な感染症を有する場合
- 重篤な肝機能障害、腎機能障害を有する場合 (維持血液透析患者は除く)
- 重篤な血液疾患および輸血を必要とする重度貧血を有する場合
- 妊娠中および妊娠の可能性がある場合
- その他、主治医および専門医が不相当と判断した場合

#### 【実施方法】

本臨床研究試験は、多施設共同研究・非盲検・非ランダム化臨床試験であり、対照は従来治療および「骨髄単核球細胞移植による血管新生療法」群をヒストリカルコントロールとする。全身麻酔下に対象者の腹部または大腿内側部から皮下脂肪を 300g 吸引し、専用の遠心分離機器で ADRCs を抽出する。50ml の細胞懸濁液を作製し、患肢に筋注投与する。

#### 【観察および検査項目】

- ① 対象者スクリーニング検査：
  - 問診、理学所見、一般検査：検尿、検便、血算、一般生化学検査、全血球数、単純胸部腹部レントゲン、心電図など通常の入院時諸検査。
  - 悪性疾患スクリーニング：便潜血、腫瘍マーカー、乳腺撮影 (女性のみ)、上部消化管内視鏡、腹部超音波検査、胸部・腹部・骨盤 CT。
  - 糖尿病性網膜症スクリーニング：眼底検査、陽性であればレーザー治療。
  - 血液疾患スクリーニング：全血球数、末梢血液像等。
  - 冠動脈疾患スクリーニング：運動負荷心電図または負荷心筋核医学検査、陽性であれば冠動脈造影および血行再建術。
- ② 実施前後の検査
  - 視診：視診可能な虚血性潰瘍は写真に撮影記録する。部位・深さ・壊死の形状を記録する。潰瘍の大きさは、長軸および短軸方向の最大長で評価する。
  - 6 分間歩行距離測定 (下肢潰瘍の場合で歩行可能な場合) またはトレッドミル (平地歩行・2.4km/h) を用いた最大跛行距離または疼痛出現までの歩行可能距離。

- 質問票：(Numerical Rating Scale: NRS)：痛み評価スケール 0～10 の 11 段階評価。
- 足関節上腕血圧比 (ABI: ankle-brachial pressure index) 測定。
- 皮膚組織灌流圧 (SPP) 測定またはレーザードップラーによる皮下血流または経皮的組織酸素分圧測定 (TcO<sub>2</sub>) 測定。
- 画像診断：DSA またはその他画像診断による血管新生の評価。
- 血管新生増殖因子測定：末梢血中 CD34 陽性細胞数および末梢血血漿中サイトカイン (VEGF、SDF-1、b-FGF、HGF など) の測定。

## (2) ハイブリッドトレーニングシステムによる下肢筋肉トレーニング療法

ハイブリッドトレーニングシステム (HTS) は、動作時の拮抗筋を電気刺激し、それによって得られる筋収縮を動作抵抗とする運動訓練システムである (Takano et al, Tohoku J. Exp. Med. 2010; 221: 77-85)。運動時に小型かつ簡便な装置を装着する。本研究参加の同意が得られた末梢動脈疾患 (閉塞性動脈硬化症、バージャー病、膠原病性血管炎) 患者に対し、屈伸運動 (左右各 10 回の連続屈伸運動を 1 セット、合計 10 セットを 1 クールとする) を週 3 クール、連続 24 週間に渡り行い、その効果と安全性を検証する。

### 【効果判定】

- 症状変化、身長/体重/握力測定、上腕・大腿・下腿周囲径測定、下肢筋力測定、下肢運動機能評価 (歩行速度算出、timed up& go test、chair stand test など)
- 体組成計による四肢体幹別筋肉量・脂肪量・骨ミネラル量分析、超音波による脚踵部骨密度測定、ABI 検査、pulse wave velocity 検査

### 【安全性評価】

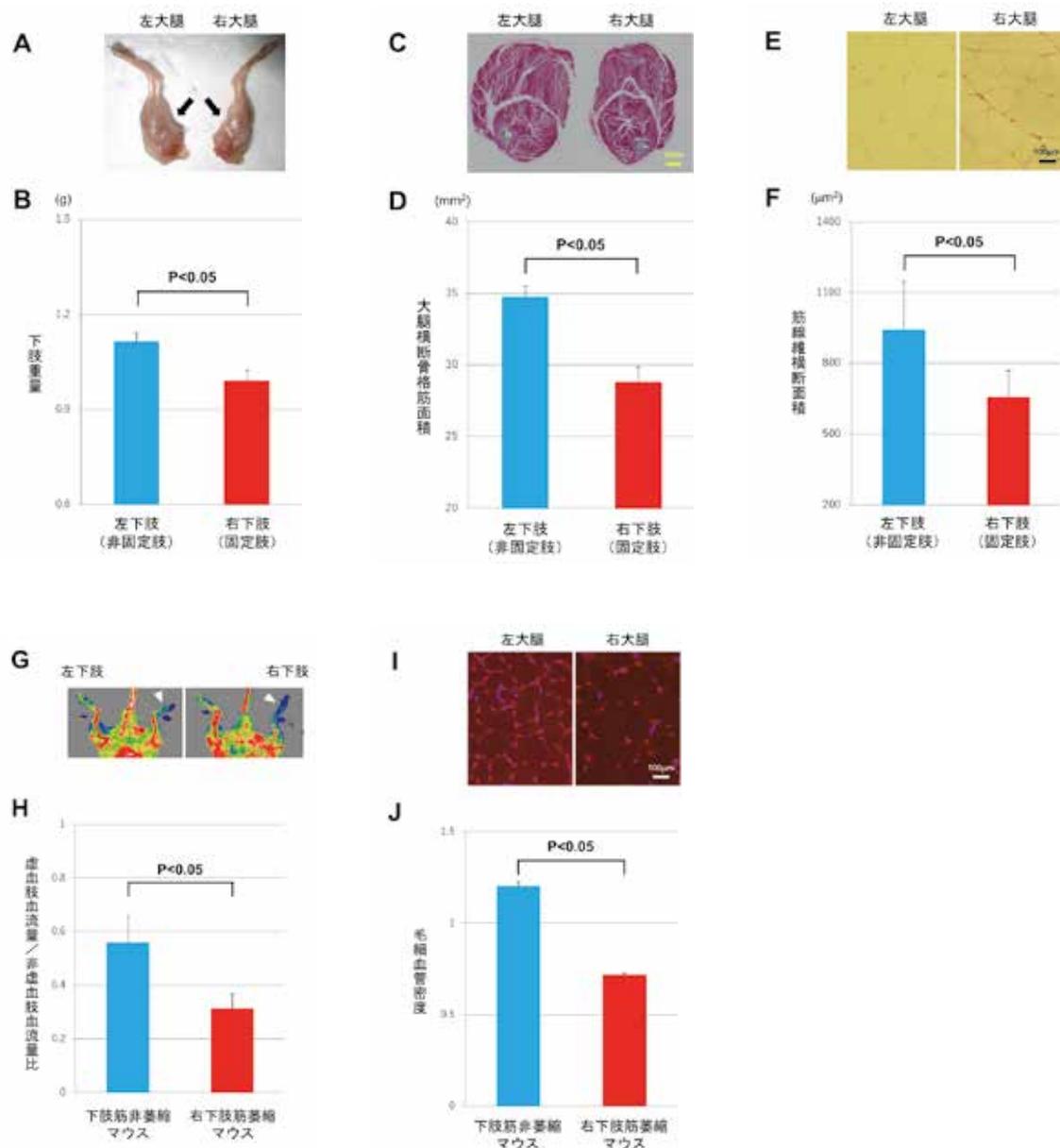
心血管病の病状悪化の有無、HTS 専用パッド装着による皮膚・腱・筋肉傷害の有無

## III 研究成果

### 1. 重症動脈硬化性疾患に対する基礎研究

#### (1) フレイル型下肢虚血マウスモデルの作成と血管新生反応の評価

テープ固定されたマウス片側下肢は非固定肢に比べて肉眼的に有意な筋萎縮を来しており (図 A 黒矢印、図 B)、大腿横断組織 HE 染色像 (図 C、図 D) や骨格筋線維横断シリウス・レッド染色像 (図 E、図 F) でも有意な筋萎縮性変化が確認できた。血液検査ではアルブミン値が有意に低下しており、低栄養状態が示唆された。レーザードップラー血流解析法での両下肢血流比や毛細血管密度による組織評価では、非フレイル型下肢虚血マウスに比べ、血流の回復 (図 G 白矢印 (青色は血流が乏しく、赤色は血流が豊富であることを示す)、図 H) や新生血管における内皮細胞増生反応 (図 I (赤紫色に染色された細胞が内皮細胞を示す、図 J) が障害されており、救肢のための生理的な血管新生反応の有意な低下が確認された。現在までの少数実験結果ではあるが、ウエスタンブロット解析法で虚血下肢組織中における血管新生関連タンパク (VEGF や angiopoietin) の発現低下が観察されたことから、フレイル下肢では虚血骨格筋細胞からの血管新生関連タンパク分泌機構が障害されていることが示唆された。組織虚血状態に対する生理的な血管新生反応低下要因の一つと考えられる。



## 2. 重症末梢動脈疾患に対する臨床研究

### (1) ADRCs 筋注投与による血管新生療法

下肢に難治性の安静時疼痛と皮膚潰瘍を認める膠原病性血管炎患者 2 例、閉塞性動脈硬化症患者 1 例に実施した。全例において疼痛の軽減と使用鎮痛剤の減量効果を認めた。皮膚潰瘍は縮小または癒痕化し、以上の病状改善で歩行可能距離も延長した。実施 1 ヶ月後の下肢血管造影検査では 1 名に可視的血管数の増加が観察された。ABI には明らかな変化を認めなかったが、SPP においては 1 名に上昇が観察された。実施中および実施 1 ヶ月までに明らかな合併症は認めなかった。

### (2) HTS による下肢筋肉トレーニング療法

間欠性跛行または安静時疼痛を認める閉塞性動脈硬化症患者 2 例、安静時疼痛と皮膚潰瘍を認めるバージャー病患者 1 例に実施した。閉塞性動脈硬化症例ではトレーニング後の短時間一過性に症状の軽減効果を認めた。ABI や運動機能評価検査に明らかな改善所見は認

めなかった。一方、バージャー病例では継時的な疼痛軽減と血色改善効果を認め、皮膚潰瘍の縮小と癒痕化を認めた。病状改善によって歩行距離も延長し、使用鎮痛剤の減量および中止が可能となった。実施 6 ヶ月間において ABI が 0.53 から 0.94 へ上昇していた。

#### IV 考察

##### フレイル型下肢虚血マウスモデルの作成と血管新生反応の評価について

我々が独自に作製を試みた片側下肢筋萎縮マウスモデルは、対側健常肢に比べて肉眼的にも組織学的にも有意な筋萎縮性変化を来していた。入院や下肢ギプス固定などによる長期臥床状態は下肢の可動機会を奪い、その結果として下肢に廃用性筋萎縮変化をきたす。テープ固定によって強制的に片側下肢の可動機会を奪うことで筋萎縮性変化をもたらす我々のマウスモデルはこの状態変化に近い。フレイルは複数の心身要因が混在する心身虚弱状態の一表現型であり、本マウスモデルがその全ての要因を満たしているとは限らないが、フレイル擬似マウスモデルの一表現型として次の実験で使用した。

主要栄養血管が閉塞し、その血液灌流域の筋組織が虚血状態に陥ると、生体は組織を救済すべく新たな血液供給血管を求める。いわゆる“側副血行路”を求め、その生体シグナルが全身の関連細胞における血管新生反応を開始させる。その関連細胞の一つが骨格筋細胞であり、周囲の既存血管から“発芽的”または“分割的”に新生血管を増殖・伸長させるべく、その刺激をもたらすタンパクを分泌する。本研究で萎縮した下肢骨格筋に実験強制的に虚血状態をもたらしたところ、血管新生反応はマクロ的にもミクロ的にも障害されており、一方では萎縮筋における血管新生作動タンパクの組織内発現は低下していた。フレイル下肢に閉塞性動脈硬化症やバージャー病などの末梢動脈疾患による虚血状態がもたらされると、骨格筋細胞分泌血管新生タンパクの組織内濃度低下状態が十分な組織救済をもたらさない“不十分な血管新生反応”がもたらされることが示唆された。事実、末梢動脈疾患の重症下肢虚血患者背景にフレイルの表現型の一つ“サルコペニア”を認めることが最近報告されている。フレイル虚血下肢を救済すべく様々な細胞投与によって血管新生療法を実施する際には、より多くの投与細胞を介して十分量の血管新生作動タンパクを分泌・集積させるか、もしくは萎縮筋細胞の血管新生作動タンパク分泌能を回復・増強させることが治療戦略として重要であることが示唆された。

##### ADRCs 筋注投与による血管新生療法について

これまで我々が実施してきた血管新生療法では骨髄単核球細胞を虚血下肢に筋注投与した。ARDCs は骨髄単核球細胞中よりも 1,000 倍相当数の血管新生細胞を含有することが報告されており、細胞投与組織中の血管新生作動タンパク濃度が高濃度であることが期待できる。今回、3 例の対象者に実施し、全例それぞれに効果が認められた。骨髄単核球細胞投与効果との直接比較を同一患者で行うことはできないが、多施設と共同で今後も実施症例数を増やし、骨髄単核球細胞投与効果についての我々の既存報告も参考に、ARDCs による血管新生療法の効果と安全性について将来、検討を加えたい。

##### HTS による下肢筋肉トレーニング療法について

運動刺激によって骨格筋から様々なサイトカイン（マイオカイン）が分泌することが報告

されている。サイトカインの中には血管新生を刺激するものもあり、適性運動が血管新生増強効果・側副血行路増生に貢献する可能性がある。末梢動脈疾患に対する運動療法として世界中で認知され、エビデンスレベルも高い運動方法は“歩行運動”であるが、重症下肢虚血状態では疼痛や潰瘍形成のためを正しく効果的に行うことが非常に困難となることもしばしばである。HTSによる膝伸展屈曲運動は両下肢が床に接することなく、端座位で行うため、通常の歩行運動に比べて運動時の侵襲が少ない。低侵襲性は長期間の運動療法継続において不可欠な要素である。今回実施した3名の対象者は6ヶ月の実施予定期間をほぼ休むことなく来院され、プロコール通りの下肢筋肉トレーニング療法を行うことができた。この結果は本トレーニング法の低侵襲性と長期継続実施性を示唆している。閉塞性動脈硬化例では実施後数時間の急性効果を認めるのみであったが、バージャー病例では1例のみではあるものの、顕著な長期効果が認められた。今後も同様の結果を認めるようであれば、禁煙以外の治療法が確立していないバージャー病の新たな治療法として世界的に注目される可能性がある。

## V 研究成果の発表

第122回日本循環器学会九州地方会（2017年6月24日：福岡）

末梢動脈疾患に対する“ハイブリッドトレーニングシステム”を用いた下肢運動療法の効果と安全性評価

石崎 勇太、佐々木 健一郎、松瀬博夫、家守貴由、牛島茂樹、仲吉 孝晴、大塚 昌紀、佐々木 基起、石松 嵩、佐々木 雅浩、板家 直樹、上野 高史、福本 義弘

久留米心血管病連携の会（2017年7月10日：久留米）

末梢動脈疾患の非薬物的療法

佐々木健一郎

第23回心臓リハビリテーション学会学術集会（2017年7月15日：岐阜）

末梢動脈疾患に対するハイブリッドトレーニングシステムを用いた膝伸展屈曲運動療法の急性効果の検証

石崎勇太、佐々木健一郎、松瀬博夫、家守貴由、牛島茂樹、佐々木基起、橋田竜輝、仲吉孝晴、大塚昌紀、志波直人、福本義弘

第2回Kurume Open Cardiology MeetIng（2017年7月19日：久留米）

末梢動脈疾患の運動療法

佐々木健一郎

第3回心臓リハビリテーション学会九州支部地方会（2017年10月28日：鹿児島）

末梢動脈疾患に対するハイブリッドトレーニングシステムを用いた膝伸展屈曲運動療法の急性効果の検証

石崎勇太、佐々木健一郎、松瀬博夫、家守貴由、牛島茂樹、佐々木基起、橋田竜輝、仲吉孝晴、大塚昌紀、志波直人、福本義弘

【禁無断転載】

平成 30 年 10 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 深 澤 亘

印 刷 (株)サンワ

印刷 30.10.200

