

令和2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2年までの512件のプロジェクトに対し、約3,948百万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2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3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

トリプルネガティブ乳がんにおけるエピゲノム不均一性の解明丸 山 玲 緒.....	1
レクチン様酸化 LDL 受容体-1 の全身性がん転移制御機構の解明丸 義 朗.....	11
炎症・再生シグナル伝達経路を標的とする新規がん治療方法の研究谷 口 浩 二.....	21
メカノストレス解除モデルを用いた心不全病態治癒過程の解明仙 波 宏 章.....	33
加齢性心機能低下・心不全の病態解明と新規治療法開発松 下 健 一.....	41
心臓利尿ペプチドの断片化に基づく動脈硬化機序解明とその臨床応用相 澤 健 一.....	51
心不全における心腎連関の病態解明とその制御岩 永 善 高.....	59
心筋細胞内カルシウム動態の破綻による心疾患の新しい薬物治療上 原 明.....	71

トリプルネガティブ乳がんにおけるエピゲノム不均一性の解明

《研究の概要》

トリプルネガティブ乳がん(TNBC)は全乳がんの10-15%を占め、一部の症例では化学療法が奏功するものの抵抗性を示す症例も多く、全体としての予後は悪い。未だ明確な治療標的を同定できていないことが最大の問題であるが、その要因の一つはTNBCがヘテロな疾患群であることにある。まずは、より精密な症例の層別化と各々の病態の理解が必要である。これまで乳癌においてはトランスクリプトームに基づく層別化の有用性が示されてきたが、未だ改善の余地が残されている。各腫瘍の特性をより精細に記述するためには、ゲノムやトランスクリプトームには現れない情報を収集すること、かつ腫瘍は多様な細胞集団から構成されているためそれを正確に評価すること、この2点が重要であると考えている。すなわち腫瘍を構成する各細胞のエピゲノム様式を知ることができれば、腫瘍全体の特性、応答性、可塑性をも加味した、より精密な層別化が可能となるのではないかという仮説のもと、本研究を立案した。

本研究ではATAC-seq解析ならびにシングルセルATAC-seq解析手法の確立と改良を行い、実際の乳がん臨床検体のデータを収集し解析することで、TNBCの症例間でのエピゲノムの多様性を正確に評価し、臨床的特徴との関連を明らかにすることを目的とした。さらに同一症例の腫瘍組織内に存在するがん細胞にエピゲノムの多様性は存在するかについても検討を行った。

乳がん細胞株23種類、乳がん臨床検体47症例のATAC-seq解析と、臨床検体16症例のシングルセルATAC-seq解析を実施した。特にシングルセル解析は腫瘍の生物学的特性の多様性の記述に有用であり、①腫瘍組織を構成する細胞種の種類と構成割合を同定・定量し、②エピゲノムの視点から見た腫瘍間でのがん細胞の特徴の違いや③腫瘍内でのがん細胞の不均一性を明確に記述することが可能であった。TNBC症例では、オープンクロマチン領域のモチーフ解析等から、がん細胞においてアクティブに機能している転写因子群が症例ごとに異なることが明らかとなり、背景にある病態や一義的な原因が多様であることが示唆された。研究期間内に十分な数のTNBC症例を解析することができなかったため、臨床的特徴との関連の検証や症例の層別化には至らなかったが、本研究を通じて、臨床検体をシングルセルATAC-seqで解析することの有用性は十分に実証できたと考えている。本研究で構築できた解析体制や基盤技術を用いて、今後も継続して多くの症例を解析していくことで、乳がんの病態の多様性のより深い理解と臨床応用につなげていきたい。

共同研究者の氏名・所属機関

- ・堀井 理絵 がん研究会有明病院病理部
- ・上野 貴之 がん研究会有明病院乳腺外科
- ・楊 麗英 がん研究会がん研究所がんエピゲノムプロジェクト

研究報告

I 研究目的

トリプルネガティブ乳がん(TNBC)は全乳がんの10-15%を占め、一部の症例では化学療法が奏功するものの抵抗性を示す症例も多く、全体としての予後は悪い。未だ明確な治療標的を同定できていないことが最大の問題であるが、その要因の一つはTNBCが heterogeneous な疾患群であることにある。すなわち「未分化」という見た目に共通性はあるものの、その根底にある異常や病態が症例毎に異なるため、治療標的の探索や新薬の臨床試験が有効になされていない可能性がある。治療標的の同定を目指した真に有効な研究を遂行するためには、現状の「3種類のマーカーが全て陰性」という診断のみでは明らかに不十分であり、まずは個々の病態の違いを正確に把握し、それに基づいてTNBC症例を正確に分類することが重要であると考えられる。そのうえで個々の病態の違いを正確に把握するよう努めるべきである。

これまでゲノム異常やトランスクリプトームによるTNBCの層別化が複数試みられているが、未だ不十分な状況にあり、実臨床での応用や個々の病態解明にまでは至っていない。その原因として①見ているものが違うこと、②腫瘍の構成細胞の種類と割合を無視していることの2点の可能性を考慮し、①に関してはエピゲノムを指標とすることで、②に関しては新鮮検体から腫瘍成分のみ単離し解析する、あるいはシングルセル解析を行うことで解決しようと考え、本研究を着想した。細胞の機能的特性に関する情報はエピゲノムに含まれている。外界からの刺激あるいは内的調節因子の変動に対する細胞の応答性や可塑性の違いは、エピゲノムによって規定されている。実際にTNBC細胞では未分化な表現型や遺伝子発現パターンは共通するものの細胞間でエピゲノム様式(特にsuper-enhancer)に多様性が認められることを見出している(Cell Rep. 2015)。すなわち腫瘍を構成する各細胞の機能的特性をエピゲノムの視点から評価し、腫瘍をそれらの総和として捉えることにより、腫瘍の病態、応答性の違いなどをより正確に評価することができるのではないか、この発想が本研究の基盤となっている。

本研究では、①TNBCの症例間でのエピゲノムの多様性を正確に評価し、臨床的特徴との関連を明らかにすること、を第一の目的とする。さらに②同一症例の腫瘍組織内に存在するがん細胞にエピゲノムの多様性は存在するか、それが存在する場合腫瘍内エピゲノム不均一性を評価することに臨床的意義があるかについても検討も行う。

これまでもTNBCを細分類する試みは多く行われてきたが、未だに臨床現場に還元できるような成果は得られていない。ほとんどの研究がゲノム異常あるいはmRNAの発現様式に着目したものであり、エピゲノムは調べられていない。また腫瘍内の不均一性は全く考慮されていない。本研究では、単一細胞レベルでエピゲノム状態を評価することにより、これまでの手法では捉えられなかった腫瘍間の病態の相違を見出すことができる可能性がある。

各症例における病態を正確に評価し、その情報を元にした症例の層別化が可能となれば、各個人に合わせた最適な治療戦略を提供できるようになる。挑戦的ではあるが、乳がん診療の発展に必要なステップとなると信じている。

II 研究計画及び材料と方法

1. 微量検体を用いた ATAC-seq 法のプロトコールの確立

本研究では ATAC-seq 法を用いて微量のがん検体のエピゲノム解析を行う。これは比較的簡便にオープンクロマチン領域をゲノム網羅的に同定できる手法 (Buenrostro JD. Nat Methods, 2013) であり、本研究で本法を採用する理由は、1) 手法がシンプルであるため微量の細胞からも安定してかつ低コストで施行可能であること、2) transcriptome 解析よりも細胞種の違いをより鋭敏に反映すること、の 2 点である。原法を改良した Omni-ATAC 法 (Corces MR, Nat Method, 2017) をもとに、臨床検体での施行が可能となるようプロトコールの最適化を試みた。

2. 臨床生検・手術検体の処理システム構築と単一細胞分離の過程の最適化

ATAC-seq 法を施行するためには、新鮮な生検・手術検体を即座にかつ丁寧に処理し分子解析を行う必要がある。共同研究者を中心に乳腺外科、病理部の全面的な協力を得て、そのためのワークフローを構築した。具体的には外科手術時に摘出された腫瘍に対し Core needle biopsy を実施し、そこから得られた針生検検体から単一細胞浮遊液を取得し、生細胞の状態で凍結保存し、後日細胞を融解し ATAC-seq 解析を実施した。腫瘍組織からの単一細胞分離に関しては、MACS tumor dissociation kit ならびに gentleMACS Dissociator (ともに MiltenyBiotec) を用いた。

3. シングルセル ATAC-seq 法の実施

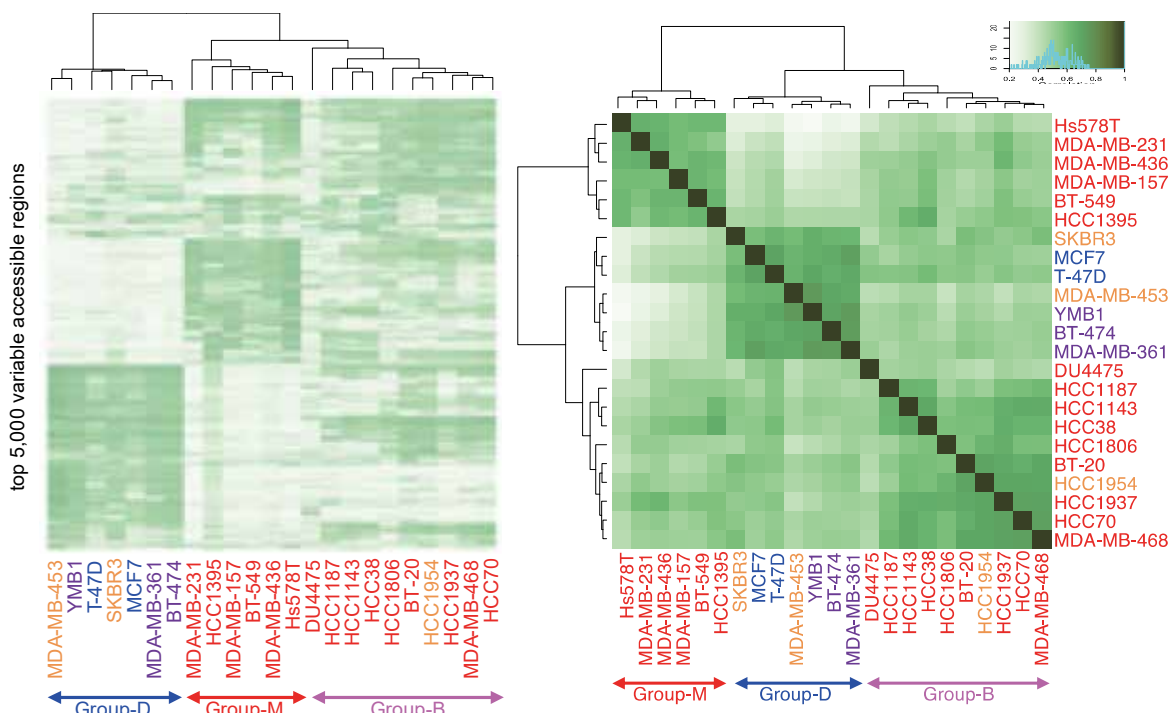
ddSEQ single-cell 解析システム (BioRad) を用いて、droplet ベースの single-cell ATAC-seq 解析 (scATAC-seq) を実施した。パイオインフォマティクス解析では、いくつかの scATAC-seq 用解析ツールを用いて解析を実施し、得られる結果の精度を比較した。最終的には「ArcheR」解析パッケージを用いることが最も有効にデータから情報を抽出できると判断し、以後 ArcheR を用いて高次解析を実施した。ゲノム上の 500bp を bin とし、各 bin の ATAC シグナルを二値化したのち、LSI を用いてクラスタリングを行い、UMAP で可視化した。その後、細胞種特異的なマーカーの gene score (推定遺伝子発現量) を計算し、各クラスターの細胞種を推定した。各クラスターに特異的に発現していると思われる遺伝子、集積している DNA 結合モチーフ、遺伝子シグネチャーなどを計算し、各細胞種の生物学的特性を推定した。また T 細胞と思われる細胞集団には、擬似時間解析を実施し、各種 T 細胞の特性を表すマーカーの推移を記述した。これらの解析により、各症例に由来する腫瘍において、どの細胞種がどの程度の割合で存在するかを定量し、その情報と臨床情報との関連を検証した。

III 研究成果

1. ATAC-seq 法の確立と乳がん細胞株の ATAC-seq 解析

改良版 Omni-ATAC-seq 法 (Corces, Nat Methods, 2017) のプロトコールを基盤とし、さらなる改良と最適化を行い、微量細胞 (1000 細胞) でも施行可能な ATAC-seq 法を確立した。また TCGA のサンプルを ATAC-seq 法により解析した論文 (Corces MR, et al. Science, 2018) を参考に、ATAC-seq データを精密に解析するための解析パイプラインを構築した。

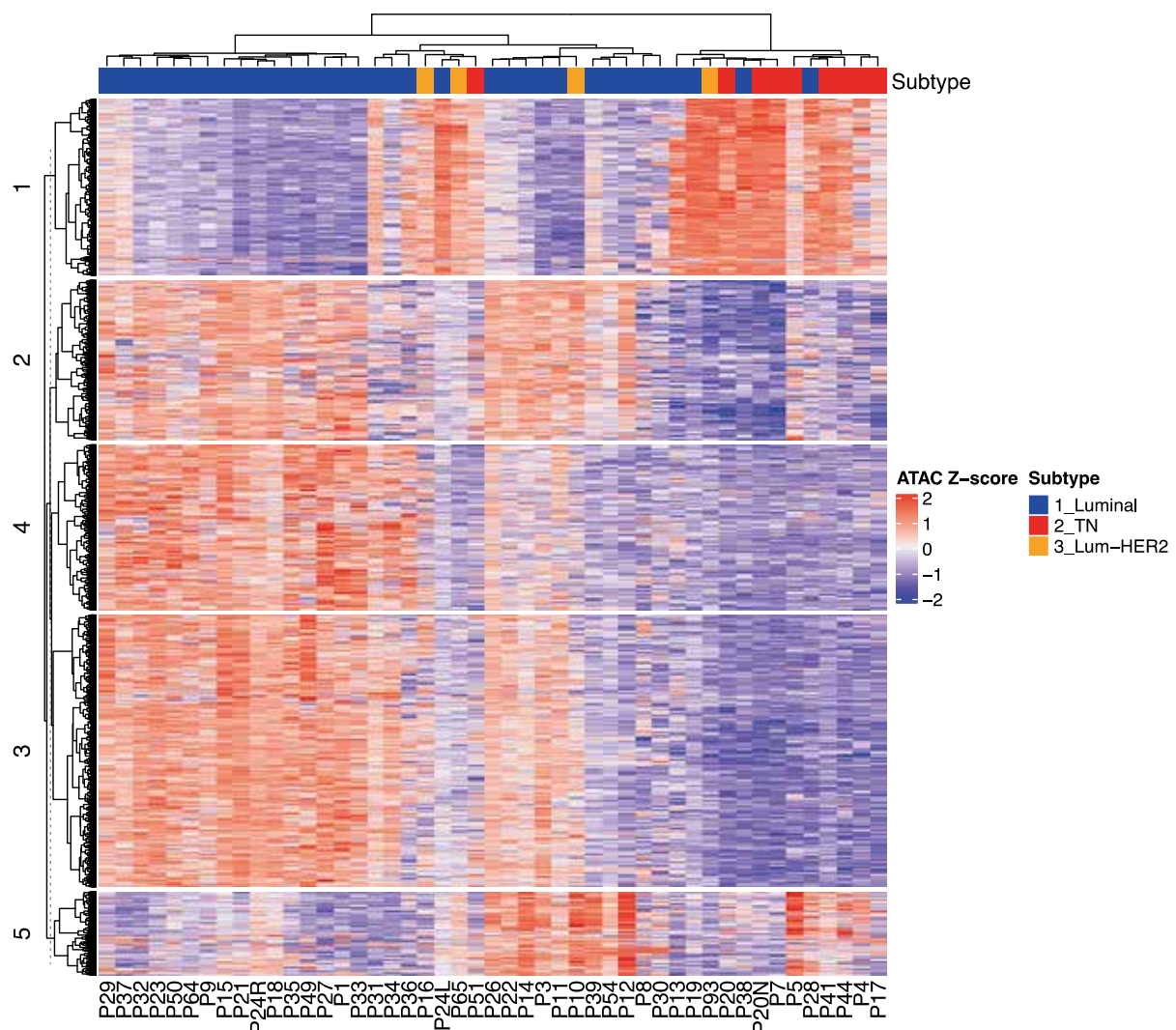
上記のプロトコールと解析パイプラインを用いて、Luminal 型、HER2 型、TNBC 型の各種乳癌細胞株 23 株を用いて ATAC-seq 法を施行し、オープンクロマチン領域のプロファイリングを行なった。ゲノムワイドなオープンクロマチン領域による層別化では、ER 陽性あるいは HER2 陽性細胞は均一なパターンを示したのに対し、TNBC 株のそれは多様なパターンを呈した (下図)。その多様性を解明すべく、次にオープンなエンハンサー領域のモチーフ解析を施行したところ、各サブタイプや各細胞株に固有な転写因子モチーフを同定することができた。さらにそれら転写因子やエピゲノム因子のノックダウンと ATACseq 解析を組み合わせることで、転写制御機構の細胞株ごとの多様性や各領域での多様性の一部を明らかにすることができた。これらの過程で同定された転写因子 GRHL2 に関しては、公共データの TNBC 症例の解析において発現量と予後との相関が認められたことから、TNBC の層別化に有用なマーカーとなりうる可能性が示唆された (楊、論文投稿準備中)。



2. 臨床検体の bulk ATAC-seq 解析の結果

上記 1 で確立した微量検体を用いた ATAC-seq プロトコールを用いて、合計 47 検体で ATAC-seq 解析を実施し、chromatin accessibility profile によるサンプルの層別化、各サンプルの open chromatin region (intron / intergenic のみ) のモチーフ解析、層別化されたグループ間での differentially accessible region の同定、サロゲートマーカーの

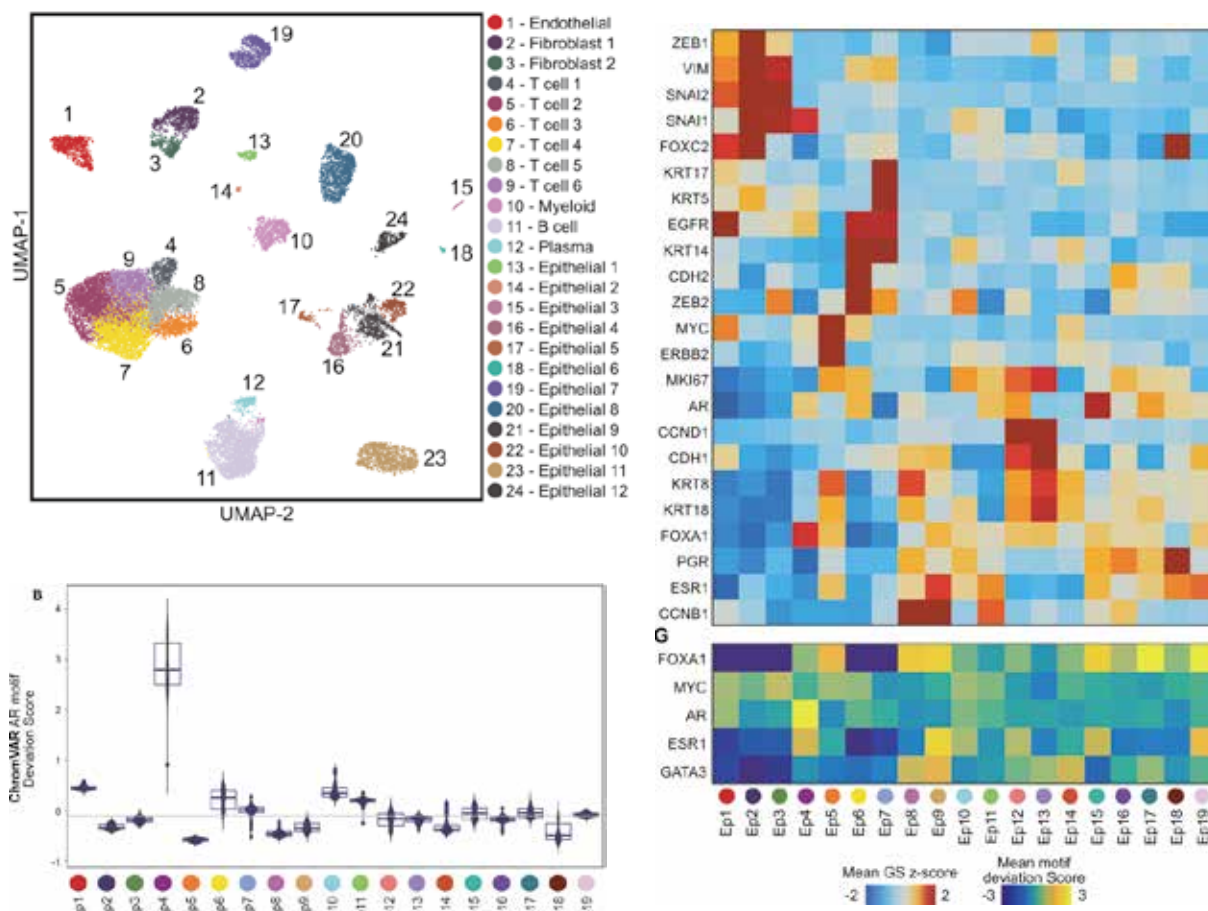
同定等を試みた。chromatin accessibility profileに基づくクラスタリングにより、症例は3群に層別化された(下図)。グループ1は16症例全例がER陽性乳がん、グループ2はER陽性14症例、HER2陽性3症例、TNBCが1症例と多様な集団を示し、グループ3はER陽性4症例、HER2陽性1症例、TNBC8症例であった。グループ1,2は典型的なLuminal型乳がんが、グループ3にはTNBC様の乳がんが集積していると思われたが、興味深いことにグループ3に分類されるER陽性乳がんや、グループ2に分類されるTNBC症例があり、これらの症例は典型的な症例とは異なる生物学的特性を有している可能性が示唆された。



differentially accessible region (DAR)の同定とモチーフ解析を行い、グループ3ではETS, RUNX, IRF, OCT4, NFkBなどのモチーフが、グループ1ではFOXA, TGATA, GRHL2, AP2gなどのモチーフが集積しており、それぞれTNBC、Luminal乳がんで重要な役割を果たすものが検出された。また、いくつかの転写因子結合モチーフはTNBC腫瘍間で大きな差を認め、TNBCの層別化に有用である可能性が示唆された(高橋、論文投稿準備中)。これらの遺伝子は層別化のサロゲートマーカーとして利用できる可能性があり、免疫染色での検証実験を計画している。

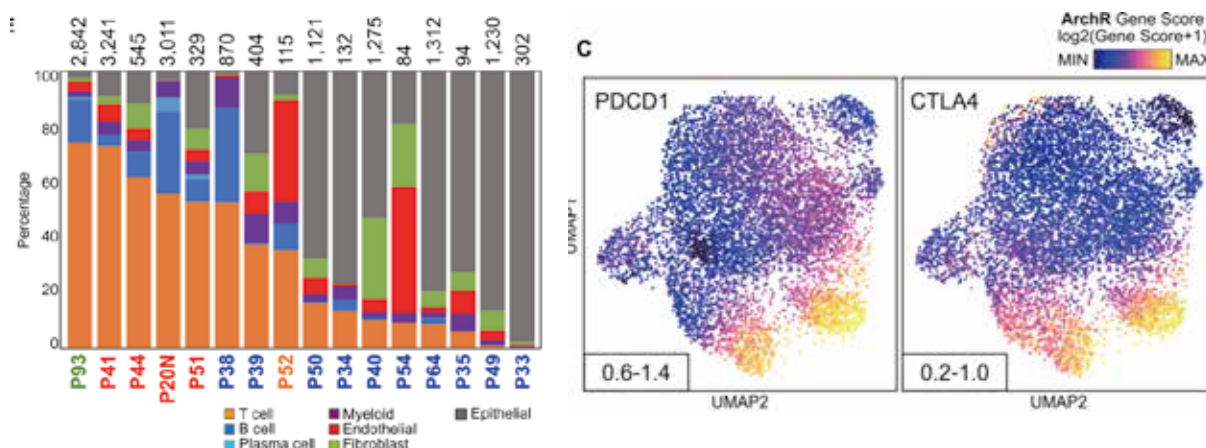
3. 臨床検体のシングルセル ATAC-seq 解析の結果

がん細胞成分のみに着目した解析や腫瘍内不均一性の評価を目的とし、シングルセル ATAC-seq 解析を実施した。16 症例の検体から合計 17,573 細胞の質の高い scATAC-seq データを取得した。LSI クラスタリングにより 24 の細胞種に分類され、各種マーカー遺伝子の推定発現量や転写因子モチーフ解析から、がん細胞、線維芽細胞、内皮細胞、単球、T 細胞、B 細胞、形質細胞の細胞種を明確に分類・同定できた。さらにはがん細胞成分のみを詳細に解析するべく、がん細胞 4,722 細胞のみを抽出しクラスタリングしたところ、19 種類の細胞種に分類された。大変興味深いことに、ほとんどが単一の症例由来であった。このことは、エピゲノムの視点から見ると、症例間の多様性の方が、腫瘍内の不均一性よりも、はるかに大きいことを示唆しており興味深い。各種がん関連遺伝子の発現パターンやモチーフ解析から、これら 19 種類のがん細胞クラスター間の生物学的特性の違いを推測しえた。特に TNBC 症例由来のがん細胞クラスター間でも、ZEB1 や SNAI が発現している症例と KRT5, KRT17, EGFR の発現する症例など違いが認められた。モチーフ解析でも同様に、TNBC 症例間での多様性を認めた。さらに興味深いことに、Ep4 のがん細胞クラスターは TNBC 症例由来であり ESR1 の発現は低い、FOXA1 高発現、VIM 低発現と Luminal 様の特徴を示した。そこで AR のモチーフ解析を行ったところ、Ep4 では特に高度に AR モチーフが集積しており、いわゆる Luminal-AR とよばれる TNBC の一群であることが推測された。このように、シングルセル解析によるがん細胞成分のみの抽出と ATAC-seq によるモチーフ解析を組み合わせることで、TNBC の腫瘍間の特性の違いを鋭敏に検出することができると思われた。



また ER 受容体とその標的領域、標的遺伝子群に焦点を当て腫瘍内不均一性に着目した解析を実施すると、腫瘍内で ER シグナル（推定遺伝子発現量、ER 標的遺伝子群の発現量、ER 結合モチーフの集積度）の強弱に不均一性がある腫瘍を 4 症例で同定できた。さらに Basal-like 様の特徴を一部有する細胞が含まれる症例と含まれない症例が存在することが明らかとなった（糸川、論文投稿準備中）。これらの腫瘍内不均一性はホルモン療法等の耐性に関与する可能性があり、さらなる検証を行う必要があると思われた。

一方で間質細胞・免疫細胞に着目した解析では、合計 7,899 細胞の T 細胞が検出されたが、マーカー遺伝子の発現やモチーフ解析により、疲弊 T 細胞や制御性 T 細胞などの各細胞の特性を明確に区別し得た。既報通り、TNBC 症例ではリンパ球の存在割合が高く、今後これらの T 細胞の特性による層別化も可能と思われた。



以上より、本研究を通じて、scATAC-seq 解析により腫瘍を構成する細胞の種類や割合、その特性に関する情報を取得できることは、少なくとも実証できた。またがん細胞のみのデータを抽出し解析することで、症例間のがん細胞特性の多様性や、腫瘍内のがん細胞不均一性をより明確に記述することが可能となり、シングルセル解析は有用であると思われた。今後、より多くの症例を解析することで臨床的意義を見出すことができると考えている。

IV 考察

本研究では乳がん臨床検体の ATAC-seq 解析並びにシングルセル ATAC-seq 解析を実施することで、腫瘍の持つ生物学的特性をより精密に予測し、TNBC 症例のより精細な層別化を行うことを試みてきた。技術的な問題（新鮮凍結検体でプロトコールが機能せず、新鮮検体のみで解析せざるを得なかったこと）や検体収集体制の問題（手術時に十分な大きさの腫瘍が残る症例のみが対象となったこと）等もあり、十分な数の TNBC 症例の検体を得ることができず、層別化やサロゲートマーカーの同定までには至らなかった。しかし本研究を通じて、シングルセル解析、特に scATAC-seq 解析の有用性を示すことはできたと考えている。研究期間前半では臨床検体のバルクの ATAC-seq 解析を実施しており、Luminal 症例と TNBC 症例をその profile が大きく違っていたが、中には Luminal と TNBC の中間のパターンを示す様な腫瘍が存在した。その際に、①腫瘍内に Luminal 様のがん細胞と TNBC 様のがん細胞が混在しているのか（不均一性があるのか）、あるいは②両者の中間の性質を持つ様

ながん細胞が存在するのか、という点にアプローチすることができず、バルクのおミックス解析の限界と思われた。シングルセル解析はその点を検証することができる、非常に有用な手法である。実際に scATAC-seq 解析を実施してみると、②のような中間の性質を持つがん細胞は存在し、それが①のように典型的な Luminal 様がん細胞の中に混在しているケースを見出した。16 症例のみの検討ではあるが、腫瘍の多様性の一旦を垣間見ることができた。今後、より多くの症例を解析し、データを積み上げていくことで、乳がん多様性の全貌が明らかとなり、その情報をもとにより精密な層別化ができるようになると考えている。

本研究では、臨床検体を解析する際の scATAC-seq 解析の有用性を実感した。現在、シングルセル解析の多くは scRNA-seq 解析であるが、scRNA-seq 解析は実験コスト（シーケンスコスト）が高いことや、技術的な要因によるデータのばらつき、バッチエフェクトが多いという問題があり、特に多くの臨床検体を解析し比較する上では障壁となる。それに対して scATAC-seq 解析は、そのシンプルな実験原理ゆえに、実験操作が少なく得られるデータも安定しており、バッチエフェクトも全く見られなかった。また scATAC-seq ではクロマチンが開いているか閉じているかというバイナリデータが基本となるため、ダイナミックレンジの広い scRNA-seq データよりも、必要なシーケンスリード数が圧倒的に少ない。より少ないシーケンス量でより多くのデータが得られ、その点だけを取っても、scATAC-seq は大変有用であると思われた。もちろん、transcriptome では見えないエピゲノムの深い情報を scATAC-seq は含んでおり、その視点からがん細胞の特性を評価しようという意味でも価値のある手法であると思われた。本研究を通じて構築することができた体制や基盤技術を用いて、今後もより多くの乳がん検体の scATAC-seq 解析を実施していきたい。そして、乳がんの生物学的特性の多様性を明らかにし、病態に基づく精密な層別化や治療戦略の考案などの臨床応用につなげていきたいと考えている。

謝辞: 本研究の遂行にあたり、多大なるご支援を頂い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謝いたします。

V 研究成果の発表

1. **Horii R**, Nitta H, Nojima M, **Maruyama R**, **Ueno T**, Ito Y, Ohno S, Banks B, Kanda H, Akiyama F. Predictive significance of HER2 intratumoral heterogeneity, determined by simultaneous gene and protein analysis, for resistance to trastuzumab-based treatments for HER2-positive breast cancer. *Virchows Arch.* online ahead of print.
2. Fujita R, Yamamoto T, Arimura Y, Fujiwara S, Tachiwana H, Ichikawa Y, Sakata Y, Yang L, **Maruyama R**, Hamada M, Nakao M, Saitoh N, Kurumizaka H. Nucleosome destabilization by nuclear non-coding RNAs. *Commun Biol.* 2020; 3:60.

3. Johmura Y, Maeda I, Suzuki N, Wu W, Goda A, Morita M, Yamaguchi K, Yamamoto M, Nagasawa S, Kojima Y, Tsugawa K, Inoue N, Miyoshi Y, Osako T, Akiyama F, **Maruyama R**, Inoue J, Furukawa Y, Ohta T, Nakanishi M. Fbxo22-mediated KDM4B degradation determines selective estrogen receptor modulator activity in breast cancer. *J Clin Invest.* 2018;128:5603–5619.

4. Wu W, Rokutanda N, Takeuchi J, Lai Y, **Maruyama R**, Togashi Y, Nishikawa H, Arai N, Miyoshi Y, Suzuki N, Saeki Y, Tanaka K, Ohta T. HERC2 promotes BLM and WRN to suppress G-quadruplex DNA. *Cancer Res.* 2018;78:6371–6385.

レクチン様酸化 LDL 受容体-1 の全身性がん転移制御機構の解明

<<研究の概要>>

我々はこれまでに、外来病原体センサーのうち、エンドトキシン(LPS; Lipopolysaccharide)の受容体である Toll 様受容体 4(TLR4)の内因性リガンドとして S100A8 及び血清アミロイド A3(SAA3)が存在することを証明した。がんの転移過程において、がん細胞が肺に転移する前に(転移前肺)、S100A8-SAA3-TLR4 システムにより転移先の肺に予め骨髄球形細胞が動員され、転移前ニッチが形成されることを明らかにしてきた。SAA3 はヒトでは pseudogene であると考えられているが、ヒトがん細胞では SAA2-SAA3 のキメラ mRNA が存在すること、ヒト SAA3 エクソン内の 1 塩基挿入のためフレームシフトが起こり、このキメラはユニークな 12 アミノ酸を C 端に有すること、このユニークなアミノ酸配列にヒトのレクチン様酸化 LDL 受容体-1 (LOX-1; lectin-like oxidized LDL receptor-1)が結合することなどを見出した。LOX-1 は血管内皮細胞に特異的に発現する酸化 LDL (Ox-LDL)の受容体として最初発見されたが(Nature 386, 73, 1997)、がんの転移における宿主 LOX-1 の役割は未だ不明である。そこで LOX-1 ノックアウト (LOX-1-KO)マウスにおいて B16 メラノーマの肺転移実験をしたところ、肺だけでなく肝、腎、骨など全身性に転移が抑制された。LOX-1 を介したがんの転移機構に関与する新規内因性リガンドの同定を試みたところ、E3 リガーゼの Pellino-1 を同定した。Pellino-1 は細胞内において c-Rel をユビキチン化して T 細胞の活性化の抑制に関与する。しかし、がんの転移における Pellino-1 分子の役割や Pellino-1 の細胞外分泌の可能性は未だ明らかとされていない。そこで本研究では Pellino-1-KO マウスを作製し、がんの全身性転移における宿主 Pellino-1 の役割を明らかとすると共に、さらに Pellino-1-EGFP-HiBiT ノックインマウスも作製し、Pellino-1 の細胞外放出の可視化についても検討した。

研究報告

I 研究目的

我々はこれまでに、外来病原体センサーのうち、エンドトキシン(lipopolysaccharide; LPS)の受容体である Toll 様受容体 4 (TLR4)の内因性リガンドとして S100A8 及び血清アミロイド A3 (SAA3)が存在することを証明した。がんの転移過程において、がん細胞が肺に転移する前に (転移前肺)、S100A8-SAA3-TLR4 システムにより転移先の肺に予め骨髄球形細胞が動員され、転移前ニッチが形成されることを明らかにしてきた。SAA3 はヒトでは pseudogene であると考えられているが、ヒトがん細胞では SAA2-SAA3 のキメラ mRNA が存在すること、ヒト SAA3 エクソン内の 1 塩基挿入のためフレームシフトが起こり、このキメラはユニークな 12 アミノ酸を C 端に有すること、このユニークなアミノ酸配列にヒトの LOX-1 が結合することなどを見出した (PLoS One 10, e0118835, 2015)。LOX-1 は血管内皮細胞に特異的に発現する Ox-LDL の受容体として最初発見されたが (Nature 386, 73, 1997)、がんの転移における宿主 LOX-1 の役割は未だ不明である。

LOX-1-KO (ノックアウト) マウスにおいて B16 メラノーマの肺転移実験をしたところ、肺だけでなく肝、骨、腎など全身性に転移が抑制される確証を得た。LOX-1 を介したがんの転移機構に関与する新規内因性リガンドの同定を試みたところ、E3 リガーゼの Pellino-1 を同定した。これまで Pellino-1 は細胞内分子として働くと思われていた。他の研究者の報告では、T 細胞では c-Rel のユビキチン化を亢進して、T 細胞の活性化を抑制すること、Pellino-1 欠損マウスではリンパ節の腫脹や抗核抗体の増加など自己免疫疾患様の病変を呈するという (Nat Immunol 12, 1002, 2011)。すなわち、Pellino-1 は免疫や炎症に関与する、という結論に止まっており、細胞外に放出されることやがん転移への関与は全く議論されていないため、我々は他研究者との競争を回避して独自に Pellino-1-KO マウスを作製した。我々は骨髄マクロファージにおいて LPS と nigericin の刺激により pyroptosis を誘発すると、Pellino-1 が細胞外へ放出されることを見出した。また、我々は慢性骨髄性白血病の原因遺伝子チロシンキナーゼ p210BCR-ABL をテトラサイクリン制御下で過剰発現するマウス骨髄前駆 32D 細胞では p210BCR-ABL 依存性に細胞死と顆粒球系骨髄由来抑制細胞 (G-MDSC) への分化の促進と共に IL-1 β 、TNF- α 、S100A8/A9 の分泌の亢進を特徴とする、新規の細胞死 myeloptosis が引き起こされることを提唱し (Oncotarget 9, 31682, 2018)、32D/TetOff-p210 細胞でも Pellino-1 が細胞外へ放出されることを見出した。これらは転移前肺において骨髄球系細胞が TLR4 の内因性リガンド S100A8 によって pyroptosis を起こした場合に Pellino-1 が細胞外へ放出される可能性を想起させる。さらに我々は、転移前肺には第 X 凝固因子を発現する特殊な抗転移性 NK 細胞が動員されることも見出した (EMBO Mol Med 10, e8643, 2018)。NK 細胞の標的細胞殺傷様式は apoptosis と信じられてきたが、現在では pyroptosis や necrosis など多様な様式をとることが明らかになってきている (Clin Cancer Res 21, 5047, 2015 ; Nature 535, 153, 2016 ; J Biol Chem 293, 16348, 2018)。以上から、本研究の目的は、第 1 に LOX-1 および Pellino-1 のがん転移における役割の解明、第 2 に転移前後における細胞死と Pellino-1 放出の個体内可視化、第 3 に Pellino-1・LOX-1 系を標的とする創薬への挑戦である。この学術的にも医療上も重要な目的達成の必要性は高い。

II 研究計画及び材料と方法

(1) 遺伝子組換えマウスの作出

Pellino-1-KO マウスはマウス Pellino-1 のエキソン3またはエキソン4を標的とする crRNA を設計し、CRISPR-Cas9 系によるゲノム編集により作出した。また、Pellino-1-EGFP-HiBiT ノックイン (Pellino-1-EGFP-HiBiT-KI) マウスはマウス Pellino-1 のエキソン7を標的とする crRNA およびエキソン7の停止コドンの直前に、EGFP 配列と HiBiT 配列をタンデムに挿入した ssODN をそれぞれ設計し、CRISPR-Cas9 系によるゲノム編集により作出した。

(2) がんの全身転移モデルの解析

がんの全身転移モデルはマウス悪性黒色腫B16メラノーマ細胞をC57BL/6系マウスの尾静脈に移入して作製した。がん細胞の移入後18日目に肺、肝臓、腎臓、大腿骨、頸骨を摘出し、臓器表面の黒色の転移結節の計数により転移を定量化した。また、Pellino-1-KO マウスにおけるB16細胞の全身転移モデルの表現型解析を行い、LOX-1-KO マウスで認められた表現型と比較検討した。

(3) がんの転移前モデルの解析

がんの転移前モデルはマウス Lewis 肺がん LLC 細胞を野生型あるいは LOX-1-KO マウスの背部皮下に移入して皮下腫瘍を形成させて作製し、がん細胞の移入から14日後に肺を摘出して酵素分散法により肺由来細胞を調製し、CD45、CD11b、CD11c、NK1.1、B220、TCR β 、CD4、CD8、CD115、Ly6C、Ly6G、F4/80に対する抗体でそれぞれ染色し、フローサイトメトリーにより取得したデータを Premium Cytobank (Nat Biotechnol, 29, 886, 2011) の tSNE 解析法に供して免疫細胞のポピュレーション解析を行った。免疫細胞のポピュレーション解析に用いた表面抗原マーカーは次に示す通りである、CD11b⁺細胞: CD45⁺CD11⁺、NK細胞: CD45⁺ NK1.1⁺、B細胞: CD45⁺ B220⁺、ヘルパーT細胞: CD45⁺ TCR β ⁺ CD4⁺ CD8⁻、キラーT細胞: CD45⁺ TCR β ⁺ CD4⁻ CD8⁺、単球: CD45⁺ CD11b⁺ CD115⁺ Ly6C⁺、肺泡マクロファージ: CD45⁺ CD11c⁺ F4/80⁺ CD11b⁻、間質マクロファージ: CD45⁺ CD11c⁺ F4/80⁺ CD11b⁺、樹状細胞: CD45⁺ CD11b⁺ CD11c⁺、顆粒球: CD45⁺ CD11b⁺ Ly6G⁺、G-MDSC: CD45⁺ CD11b⁺ Ly6G⁺ Ly6C⁺、単球系骨髄由来抑制細胞(M-MDSC): CD45⁺ CD11b⁺ Ly6G⁻ Ly6C⁺。転移前肺におけるS100A8、IL-1 β のmRNA発現はRT-qPCR法により調べた。担がんマウスより、血漿を採取し、Pellino-1タンパク質レベルをELISA法により定量化した。

(4) 細胞死誘導と Pellino-1 細胞外分泌の解析

マウス骨髄マクロファージにおいて、staurosporine 処理による apoptosis、TNF- α と cycloheximide の併用処理による necroptosis、LPS と nigericin の併用処理による pyroptosis など様々な細胞死を誘導し、培養上清中に Pellino-1 タンパク質が分泌されるか否かをウェスタンブロット法により調べ、Pellino-1 が細胞外に分泌される細胞死の様式の特特定を行った。LOX-1-KO あるいは Pellino-1-KO マウス由来の骨髄マクロファージにおいて pyroptosis を誘導し、培養上清中の Pellino-1 分泌や pyroptosis 関連分子の動態をウェスタンブロット法により調べ、野生型マウス由来の骨髄マクロファージと比較検討した。また、Pellino-1-EGFP-HiBiT-KI マウス由来の骨髄マクロファージ培養系においては、培養上清中の HiBiT 発光検出により、Pellino-1 の細胞外放出を定量化した。

(5) LOX-1 発現細胞における組換え Pellino-1 の細胞内取り込み実験

マウス LOX-1 を安定発現する CHO(CHO/mLOX-1)細胞の培養系に AlexaFluor647 ラベルの組換え Pellino-1 タンパク質を添加して培養し、LOX-1 の免疫蛍光染色を行い、Pellino-1 の細胞内への取り込みと LOX-1 の局在について共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。組換え Pellino-1 タンパク質は全長分子 (1-418)に加え、C末端欠損変異体(1-193)を用いた詳細な解析も行った。組換え Pellino-1 タンパク質は大腸菌で GST 融合タンパク質として発現させた後に精製し、GST タグの切断後、Detoxi-Gel™によりエンドトキシンを除去したものを実験に供した。

(6) 細胞内酸化ストレスに対する Pellino-1 の解析

細胞内酸化ストレスに対する Pellino-1 の影響はマウス骨髄マクロファージに Ox-LDL や組換え Pellino-1 タンパク質を添加して、活性酸素 (ROS) を CellROX® Deep Red 試薬により染色し、フローサイトメトリーにより解析した。その際、同時に SYTOX® Blue Dead Cell Stain 試薬により死細胞の染色も行い、生細胞と死細胞を区別して ROS 産生の検出を行った。マウス骨髄マクロファージはマウスより骨髄細胞を単離し、M-CSF 存在下で培養して分化させた接着性の細胞を実験に用いた。

(7) Pellino-1 による LOX-1 発現細胞の機能解析

Pellino-1 の LOX-1 を介した細胞機能への影響はマウス骨髄マクロファージ培養系を用いて調べた。マウス骨髄マクロファージ培養系に Ox-LDL や組換え Pellino-1 タンパク質を添加して、1 時間培養し、細胞内シグナル伝達分子である p38 MAP キナーゼのリン酸化をウェスタンブロット法により調べた。これら実験系においては Ox-LDL と組換え Pellino-1 の併用処理も行い、Ox-LDL が引き起こす細胞応答に対する Pellino-1 共存の影響も調べた。

III 研究成果

(1) 遺伝子組換えマウスの作出

マウス Pellino-1 のエクソン 3 またはエクソン 4 を標的とする crRNA を設計し、CRISPR-Cas9 系によるゲノム編

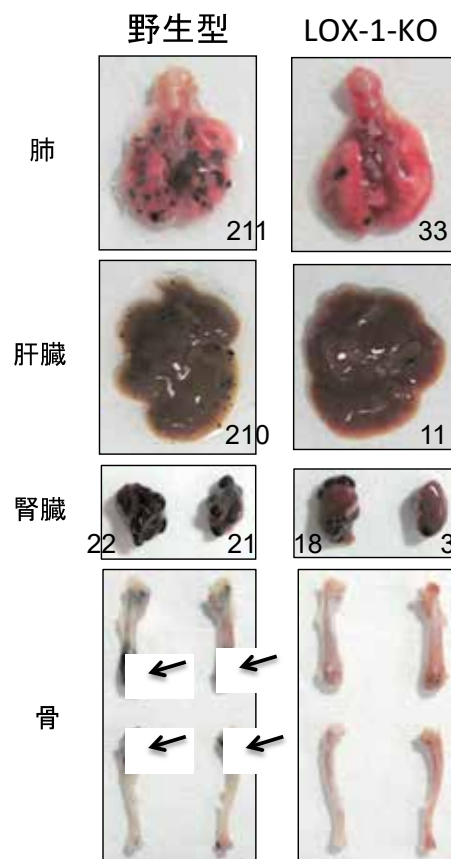


図 1. LOX-1-KO マウスにおけるがんの全身転移
パネル下の数字は転移結節数、矢印は骨転移巣を示す。

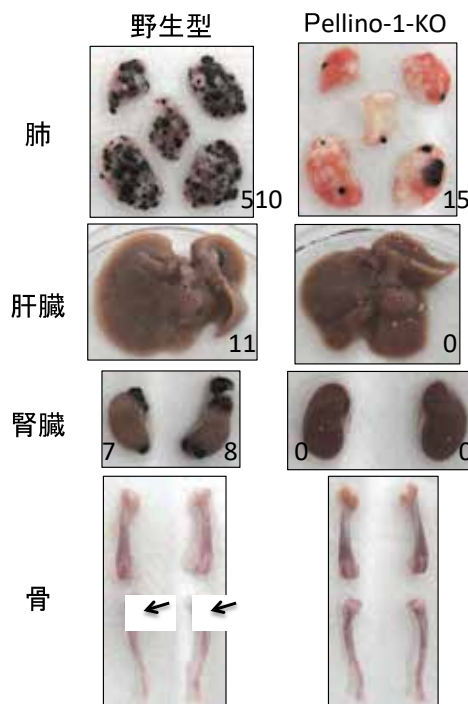


図 2. Pellino-1-KO マウスにおけるがんの全身転移
パネル下の数字は転移結節数、矢印は骨転移巣を示す。

集により Pellino-1-KO マウスの作出を試みたところ、産仔のゲノム DNA シークエンス解析によりエキソン 4 では 2 塩基欠損あるいは 5 塩基欠損が、エキソン 3 では 1 塩基挿入により、いずれも N 末端数十アミノ酸で停止コドンが生じるフレームシフト変異が起きていることが判明した。このうち、エキソン 4 の 5 塩基欠損型の変異マウスについて C57BL/6 系マウスと戻し交配を行った後、heterozygous 同士を交配させて得た homozygous を以降の実験に供した。マウス Pellino-1 のエキソン 7 を標的とする crRNA およびエキソン 7 の停止コドンの直前に、EGFP 配列と HiBiT 配列をタンデムに挿入した ssODN をそれぞれ設計し、CRISPR-Cas9 系によるゲノム編集により Pellino-1-EGFP-HiBiT-KI レポーターマウスの作出を試みたところ、目的とする F1 ヘテロ KI マウスを得ることが出来、C57BL/6 系マウスと戻し交配を行った後、heterozygous 同士を交配させて得た homozygous を以降の実験に供した。

(2) がんの全身転移モデルの解析

B16 細胞を LOX-1-KO マウスの尾静脈に移入してがんの全身転移モデルを作製したところ、野生型マウスに比べ、肺、肝臓、腎臓の表面における転移結節数の減少と大腿骨および脛骨における骨転移の抑制が認められた(図 1)。さらに、B16 細胞を Pellino-1-KO マウスに移入して同様にがんの全身転移モデルを作製した場合においても、野生型マウスに比べ、肺、肝臓、腎臓の表面における転移結節数の減少と大腿骨および脛骨における骨転移の抑制が認められた(図 2)。従って、B16 細胞の全身性転移には宿主の LOX-1 および Pellino-1 の双方の必要性が示唆された。

(3) がんの転移前モデルの解析

LLC 細胞を LOX-1-KO マウスの背部皮下に移入して皮下腫瘍を形成させ、がんの転移前モデルを作製した。担がんマウスの肺由来細胞を血球細胞の表面抗原マーカーの抗体で多重染色してフローサイトメーターで解析し、tSNE 解析法により免疫細胞のポピュレーション解析を行ったところ、野生型マウスでは担がんにより CD11b⁺、顆粒球、G-MDSC、M-MDSC の細胞集団の割合が

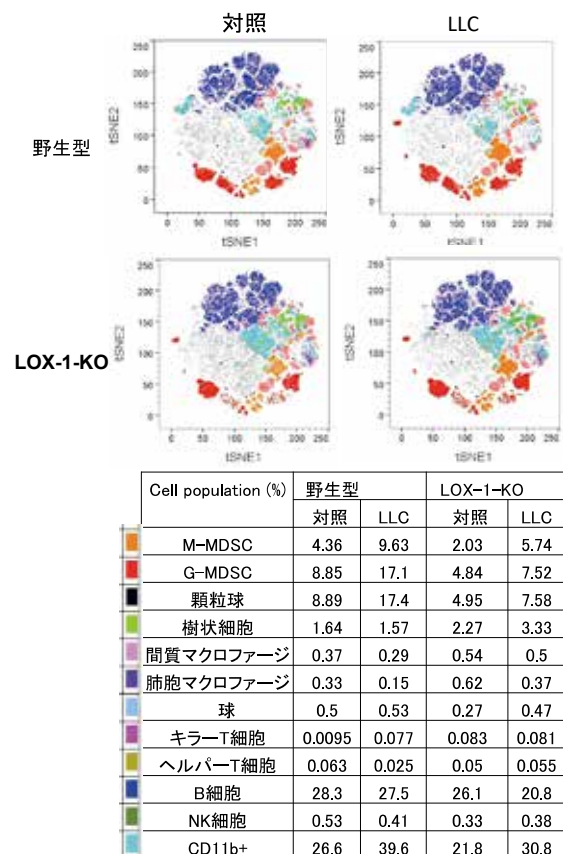


図 3. LOX-1-KO マウスの転移前肺における免疫細胞のポピュレーション解析

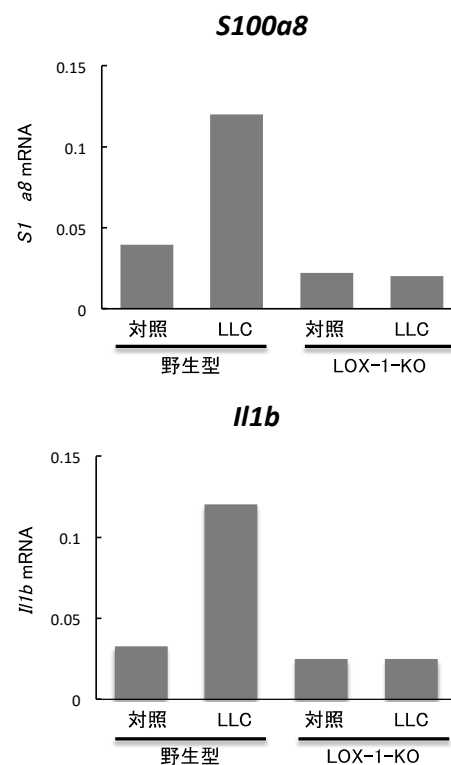


図 4. LOX-1-KO マウスの転移前肺における S100A8 および IL-1β mRNA 発現解析

それぞれ増加した (図 3)。一方、LOX-1-KO マウスにおいても担がんにより CD11b⁺、顆粒球、G-MDSC、M-MDSC の細胞集団の割合が増加したが、それぞれの細胞集団の割合は野生型マウスに比べいずれも減少していた (図 3)。担がんマウスより、転移前肺を摘出し、S100A8 および IL-1 β mRNA の発現を調べたところ、野生型マウスでは対照マウスに比べ S100A8 および IL-1 β の mRNA 発現が亢進したが、LOX-1-KO マウスでは担がんにしてもこれらの発現亢進が認められなかった (図 4)。さらに、担がんにした野生型マウスから、血漿を採取し、ELISA 法により Pellino-1 タンパク質を定量したところ、Pellino-1 タンパク質レベルが対照マウスに比べ亢進していた (図 5)。これらの結果より、LOX-1-KO マウスでは担がんにしても肺において転移前土壌を形成しない可能性が示唆された。

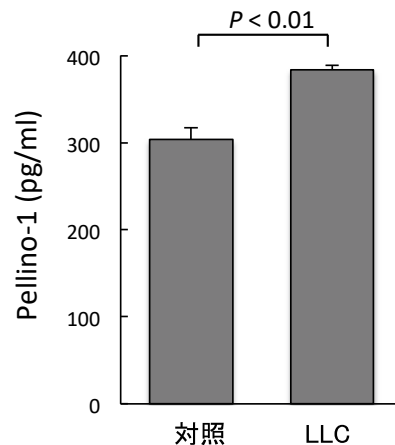


図 5. 担がんマウスにおける血漿中 Pellino-1 レベルの増加

(4) 細胞死誘導と Pellino-1 細胞外分泌の解析

野生型マウスおよび LOX-1-KO マウス由来の骨髄マクロファージに LPS と Nigericin を段階的に処理すると、いずれのマウス由来の骨髄マクロファージにおいても NLRP3 インフラマソームの活性化により、caspase-1 が活性化され、gasdermin D の分解に伴い、細胞膜に pore 形成を伴う細胞死 pyroptosis が引き起こされ、培養上清中に IL-1 β と共に Pellino-1 が放出された (図 6A)。細胞ライセートにおける Pellino-1 および LOX-1 発現は LPS 処理により誘導され、LOX-1 発現は LPS と Nigericin の段階的処理により、相乗的に亢進した (図 6A)。さ

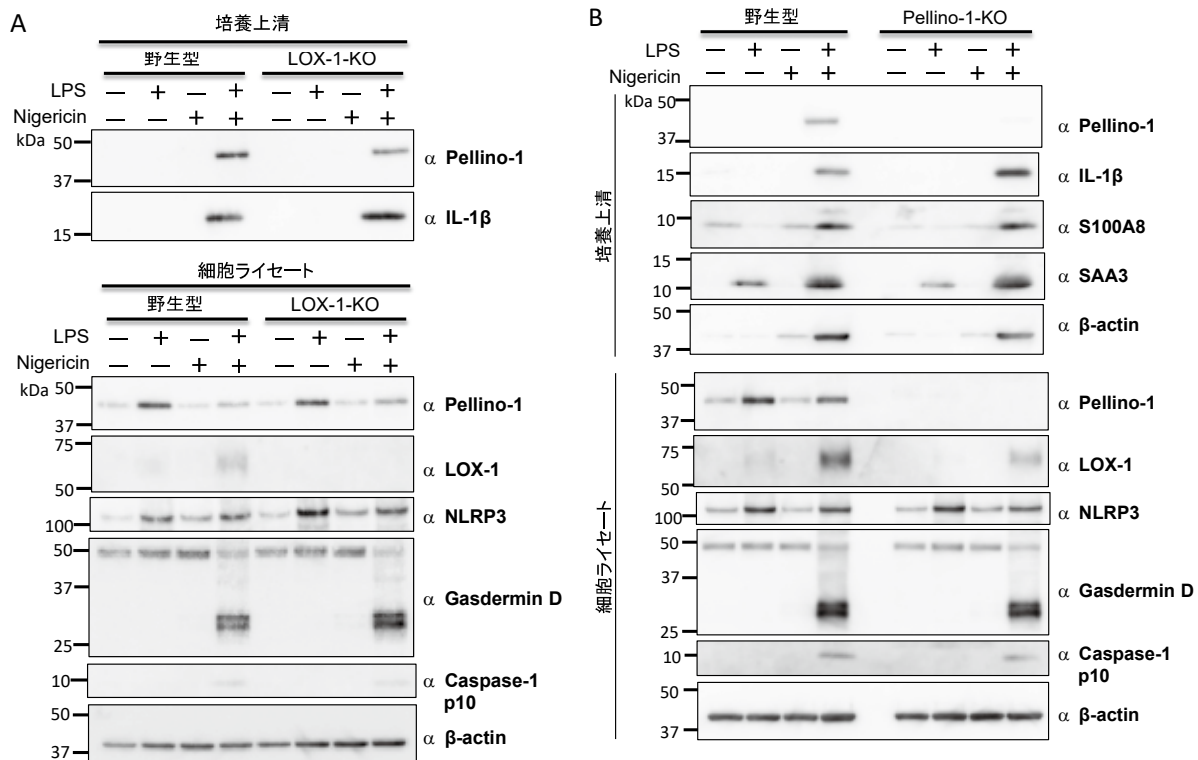


図 6. マウス骨髄マクロファージにおける pyroptosis に伴う Pellino-1 の細胞外放出と pyroptosis 関連分子の解析

A. LOX-1-KO 由来骨髄マクロファージ、B. Pellino-1-KO 由来骨髄マクロファージ

らに野生型マウスおよび Pellino-1-KO マウス由来の骨髄マクロファージに LPS と nigericin を段階的に処理すると、野生型マウス由来の骨髄マクロファージでは NLRP3 インフラマソームの活性化により、caspase-1 が活性化され、gasdermin D の分解に伴い、細胞膜に pore 形成を伴う細胞死 pyroptosis が引き起こされ、培養上清中に pellino-1、IL-1 β 、S100A8、SAA3 が放出された (図 6B)。一方、Pellino-1-KO マウス由来の骨髄マクロファージでは、Pellino-1 タンパク質発現が認められず、LPS と nigericin の段階的処理により NLRP3 と caspase-1 の活性化により、gasdermin D の分解が亢進し、pyroptosis が引き起こされたものの、培養上清中への IL-1 β 放出は野生型に比べ増強していた (図 6B)。さらに、野生型マウス由来のマクロファージでは、LOX-1 発現が著しく誘導されたが、Pellino-1-KO マウス由来の骨髄マクロファージでは、LOX-1 の発現誘導は野生型に比べ、減弱していた (図 6B)。これらの結果から、pyroptosis に伴う IL-1 β 放出における Pellino-1 の抑制性制御と LOX-1 発現誘導における Pellino-1 の必要性が示唆される。

Pellino-1-EGFP-HiBiT-KI マウス由来の骨髄マクロファージ培養系を用い、培養上清中の Pellino-1 の発光検出を行ったところ、LPS と nigericin の段階的処理による pyroptosis を引き起こすことにより、著しい HiBiT 発光強度の増大が認められたが、TNF と CHX の併用処理による necroptosis や staurosporine 処理による apoptosis では HiBiT 発光強度の増大はほとんど認められなかった (図 7)。本結果より、骨髄マクロファージにおいて Pellino-1 は pyroptosis 特異的に細胞外に放出されることが示唆され、細胞外に放出された Pellino-1 タンパク質の高感度かつ定量的な検出が可能となった。

(5) LOX-1 発現細胞における組換え Pellino-1 の細胞内取り込み実験

CHO/mLLOX-1 細胞の培養系に組換え Pellino-1 全長タンパク質 (1-418) を添加すると細胞内取り込みと LOX-1 との共局在が認められた (図 8A)。一方、C 末端欠失変異体 (1-193) を添加した場合には細胞内取り込みが著しく減弱していた (図 8B)。従って、Pellino-1 の C 末端領域 (194-418) が LOX-1 への結合に必要であることが示唆された。

(6) 細胞内酸化ストレスに対する Pellino-1 の解析

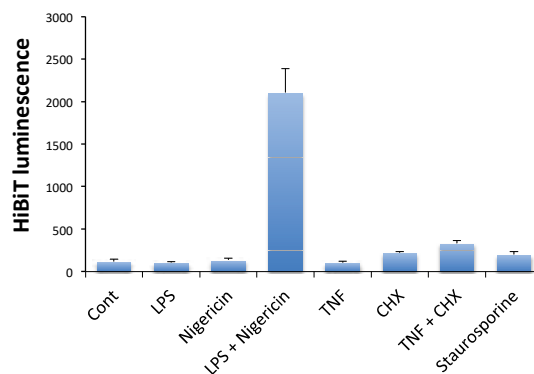


図 7. 細胞外に放出された pellino-1 の HiBiT 発光検出

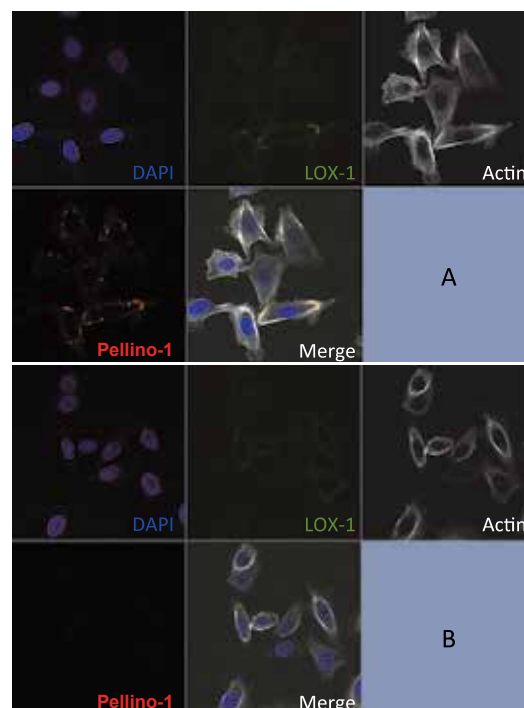


図 8. LOX-1 発現細胞における組換え Pellino-1 の細胞内取り込み
 A. Pellino-1 全長 (1-418) 添加、
 B. Pellino-1 C 末端欠失変異体 (1-193) 添加

細胞内酸化ストレスに対する Pellino-1 の影響を調べるため、マウス骨髄マクロファージ培養系を用い、ROS 産生を検討したところ、Ox-LDL によって亢進した ROS 産生は組換え Pellino-1 タンパク質の前処理により部分的に抑制された (図 9)。従って、Ox-LDL により誘導される細胞内 ROS 産生に対して Pellino-1 は抑制的に作用することが示唆された。

(7) Pellino-1 による LOX-1 発現細胞の機能解析

Pellino-1 タンパク質による LOX-1 を介した細胞応答を調べるため、野生型マウス由来の骨髄マクロファージ培養系に組換え Pellino-1 タンパク質または Ox-LDL をそれぞれ添加したところ、いずれも p38 MAP キナーゼのリン酸化が亢進した (図 10)。さらに、これら両者を併用添加すると、p38 MAP キナーゼのリン酸化は単独添加に比べ、相加的に亢進した (図 10)。本結果から、Pellino-1 タンパク質は骨髄マクロファージに作用し、p38 MAP キナーゼのリン酸化を亢進してシグナルを伝達することが示唆された。

IV 考察

近年、ヒト前立線がん細胞株では LOX-1 が高発現しており、Ox-LDL の処理により、上皮間葉転換が亢進し、ヌードマウスにおける皮下腫瘍形成の促進が報告されている (Cancer Lett

414, 34, 2018)。また、Pellino-1 は通常細胞内分子として働き、T 細胞において c-Rel のユビキチン化を亢進して、T 細胞の活性化を抑制すること、Pellino-1-KO マウスではリンパ節の腫脹や抗核抗体の増加など自己免疫疾患様の病態を呈することが報告されている (Nat Immunol 12,1002, 2011)。また、マクロファージにおいては TLR4 シグナルの TRIF 依存性経路で、RIP1 ユビキチン化や NF- κ B 核移行の促進により、TNF- α や IL-6 の産生が亢進することが報告されている (Nat Immunol 10,1089, 2009)。本研究では LOX-1-KO および Pellino-1-KO マウスの双方を用いた解析により、がんの全身性転移における宿主の LOX-1 と Pellino-1 の両者の必要性が明らかとなった。また、本研究では LOX-1-KO マウスを用いたがんの転移前モデルの解析から、担がんマウスでは血漿中の Pellino-1 タンパク質が増加すること、LOX-1-KO マウスでは野生型マウスに比べ、転移前肺への骨髄由来細胞 (CD11b+, 顆粒球, G-MDSC, M-MDSC) の集簇が減少すること、LOX-1-KO マウスでは担がんにしても肺における S100A8 および IL-1 β mRNA 発現の亢進が認められず、転移前土壌を形成しない可能性を見出した。さらに、骨髄マクロファージ培養系を用いた解析より、pyroptosis を引き起こすと Pellino-1 が細胞外に分泌されること、分泌された Pellino-1 は C 末端領域 (194-418) を介して LOX-1 に結合して細胞内に取り込まれ、p38 MAP キナーゼのリン酸化を亢進してシグナルを伝達する他、Ox-LDL 誘導性の ROS 産生を減弱させることを見出した。また、本研究において作出に成功した Pellino-1-EGFP-HiBiT-KI マウスは、細胞外に放出された Pellino-1 を蛍光・発光の双方でトレースすることが出来、本マウス由来の骨髄マクロファージにおいて細胞外に

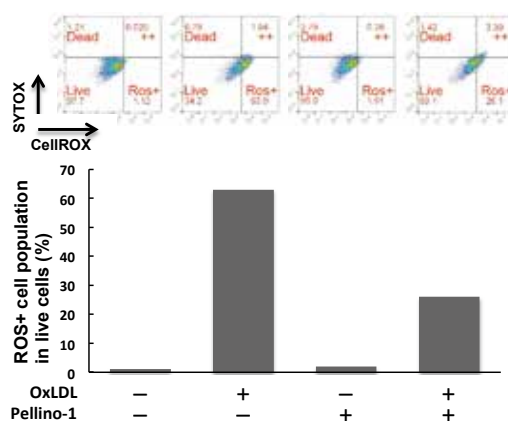


図 9. 骨髄マクロファージにおける細胞内 ROS 産生に対する Pellino-1 の影響

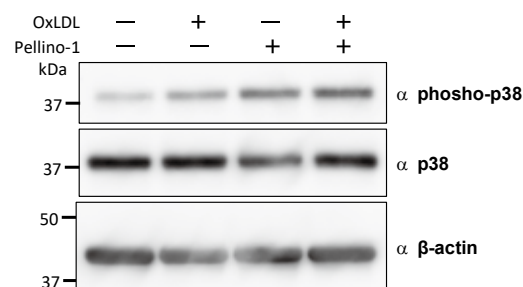


図 10. 骨髄マクロファージにおける p38 MAP キナーゼのリン酸化に対する組換え Pellino-1 の影響

放出された Pellino-1 の高感度かつ定量的な検出が可能となった。今後は Pellino-1-EGFP-HiBiT-KI マウスを用いて Pellino-1 の生体内可視化を検討し、*in vivo*における pyroptosis に伴う Pellino-1 放出を証明する予定である。

Pellino-1 と相同性が高い分子として Pellino-2 が存在し、これまでに Pellino-2-KO マウスでは LPS と nigericin の段階的処理による NLRP3 の活性化が抑制され、pyroptosis に伴う IL-1 β の放出が抑制されることが報告されている (Nat Commun 9, 1560, 2018)。我々の解析では Pellino-1-KO マウス由来の骨髄マクロファージでは野生型マウスと同等に NLRP3-caspase-1 系が活性化され、gasdermin D の分解による pyroptosis が引き起こされ、IL-1 β の放出が亢進することを明らかとしており、pyroptosis におけるこれら Pellino ファミリー分子間での機能的な役割分担の可能性が考えられる。

今後の展望として、LOX-1-Pellino-1 系を標的とする創薬開発に向け、Pellino-1 の C 末端領域 (194-418) に存在し、LOX-1 との結合に関わるペプチド領域の絞り込みを行い、作成したペプチドライブラリーから候補ペプチドを取得する。取得できたペプチドについて LOX-1 への結合活性や Ox-LDL と LOX-1 の結合阻害活性を指標としてスクリーニングを行い、候補ペプチドを取得し、最終的には B16 細胞の全身転移モデルに候補ペプチドの投与を行い、がんの全身性転移が抑制されるか否かを検討し、創薬開発を目指す予定である。LOX-1 は全身に分布している血管とマクロファージに発現しているので、Pellino-1 ペプチドは転移臓器やがんの種類に無関係に有効な転移を阻害する分子標的薬としての応用が期待される。

V 研究成果の発表

[学術論文]

1. Takita M, Omori T, Mishima T, Honda H, Sawamura T, Maru Y. Pyroptosis-derived Pellino-1 serves as a ligand for oxidized LDL receptor LOX-1 and regulates metastasis. (作成中)
2. Tomita T, Kato M, Mishima T, Matsunaga Y, Sanjo H, Ito KI, Minagawa K, Matsui T, Oikawa H, Takahashi S, Takao T, Iwai N, Mino T, Takeuchi O, Maru Y, Hiratsuka S. Extracellular mRNA transported to the nucleus exerts translation-independent function. Nat Commun 12: 3655. 2021.
3. Ieguchi K, Tomita T, Takao T, Omori T, Mishima T, Shimizu I, Tognolini M, Lodola A, Tsunoda T, Kobayashi S, Wada S, Maru Y. Analysis of ADAM12-mediated ephrin-A1 cleavage and its biological functions. Int J Mol Sci 22: 2480. 2021.
4. Ieguchi K, Maru Y. Eph/Ephrin signaling in the tumor microenvironment. Adv Exp Med Biol 1270: 45-56. 2021.
5. Maru Y. Premetastasis. Cold Spring Harb Perspect Med 10: a036897. 2020.
6. Tomita T, Ieguchi K, Deguchi A, Takita M, Tsukahara F, Hiratsuka S, Maru Y. Lung tumor cell recruitment assay. J Vis Exp 2019. doi: 10.3791/53172.
7. Ieguchi K, Maru Y. Roles of EphA1/A2 and ephrin-A1 in cancer. Cancer Sci 110: 841-848. 2019.
8. Takita M, Tsukahara F, Mishima T, Ieguchi K, Yamada M, Honda H, Maru Y. Paradoxical counteraction by imatinib against cell death in myeloid progenitor 32D cells expressing p210BCR-ABL. Oncotarget 9: 31682-31696. 2018.
9. Tomita T, Ieguchi K, Takita M, Tsukahara F, Yamada M, Egly JM, Maru Y. CID is not directly involved in the repair of UV-damaged DNA but protects cells from oxidative stress by regulating gene expressions in human cell lines. J Biochem 164:415-426. 2018.

10. Hiratsuka S, Tomita T, Mishima T, Matsunaga Y, Omori T, Ishibashi S, Yamaguchi S, Hosogane T, Watarai H, Omori-Miyake M, Yamamoto T, Shibata N, Watanabe A, Aburatani H, Tomura M, High KA, Maru Y. Hepato-entrained B220⁺CD11c⁺NK1.1⁺ cells regulate pre-metastatic niche formation in the lung. *EMBO Mol Med* 10: e8643. 2018.

[学会発表]

1. Maru Y. Immuno-thrombotic regulation of pulmonary pre-metastatic niche by liver. Lecturer (Speaker), EACR-AACR-ISCR Conference, The Cutting Edge of Contemporary Cancer Research, 11 October 2018, Jerusalem, Israel

炎症・再生シグナル伝達経路を標的とする新規がん治療方法の研究

< 研究の概要 >

インターロイキン (IL)-6 ファミリーサイトカインには IL-6 や白血病阻止因子 (Leukemia inhibitory factor; LIF) などが含まれるが、炎症の際に誘導され、多くのがん種においてがん進展に重要な役割を果たすことが知られている。IL-6 ファミリーサイトカインは、共受容体である glycoprotein130 (gp130) を介して主に Janus kinase (JAK)-Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) 経路を活性化することが報告されている。我々はさらに IL-6 が、Src family kinase (SFK)-Yes-associated protein (YAP) 経路を活性化することも明らかにしてきた。本研究では、LIF を高発現するヒト食道扁平上皮がんにおけるオートクライン LIF の役割を検討した。LIF ノックダウンにより、遺伝子発現の変化、細胞増殖と遊走/浸潤およびスフェア形成の抑制、アポトーシスの誘導など、がん細胞に様々な影響が出ることを認められた。IL-6 と同様に、LIF は JAK-STAT3 経路だけでなく SFK-YAP 経路を活性化することが確認された。LIF により誘導された YAP の活性化は、LIF により誘導された STAT3 の活性化よりもがん細胞の増殖に重要であり、YAP と STAT3 を同時に活性化することで、ヒト食道扁平上皮がんの増殖における LIF の機能が代償された。また、食道扁平上皮がん臨床検体において SFK 活性化と LIF 発現が YAP 活性化と相関していた。さらに、SFK-YAP 経路および JAK-STAT3 経路を同時に阻害することで、単一阻害よりも細胞増殖の抑制に効果的であり、*in vivo* においても LIF シグナルがヒト食道扁平上皮がん細胞株の増殖を促進した。以上より LIF-SFK-YAP 経路が、ヒト食道扁平上皮がんの新規治療標的になる可能性が示唆された。

共同研究者 なし

研究報告

I 研究目的

食道がんは、世界で8番目に多いがんであり、がんによる6番目に多い死因である。外科手術、化学療法、放射線療法、免疫療法などの集学的療法が最近進歩しているが、食道がん患者の予後は、依然として不良である。日本では、食道扁平上皮がん（ESCC）がすべての食道がんの組織型の約90%を占めている。ESCCでは、初期段階でもリンパ節転移や隣接臓器への腫瘍浸潤を頻繁に示し、その事が予後不良の一因となっている。

炎症は、細胞の損傷や感染に起因する細胞の損傷に対する複雑な生物学的反応であり、免疫系が損傷を与える刺激を排除し、組織の治癒と再生の過程を誘導する。また、炎症は腫瘍の発生、促進、進展および転移を含むがんの全ての過程において極めて重要な役割を果たしている。IL-6、IL-11、IL-27、IL-31、白血病阻止因子（LIF）およびオンコスタチンMを含むインターロイキン（IL）-6ファミリーメンバーは、細胞増殖、生存、炎症、および代謝に影響を与える最も代表的ながん関連サイトカインの1つである。ほとんどのIL-6ファミリーメンバーは、共通のシグナル伝達受容体サブユニットであるgp130を介して、JAK-STAT3、SHP-2-Ras-Raf-MEK-ERK、PI3K-AKT経路、およびSFK-YAP経路を活性化する。IL-6-STAT3シグナル伝達経路は、ESCCで活性化され、上皮間葉転換（EMT）につながるカスケードを誘導することが示されている。YAPはヒトESCCで高頻度に活性化されており、一部のESCCではYAP増幅が見られるが、その活性化のメカニズムは不明である。

LIFはIL-6ファミリーサイトカインであり、胚性幹細胞の自己複製と全能性の維持に重要な役割を果たす。LIFの効果は細胞の種類によって異なり、細胞増殖の促進または抑制が見られる。がん細胞では、LIFはさまざまな腫瘍で増殖を促進、分化を阻害し、転移を誘発することが示されている。ヒト食道腺がん（EAC）では、LIFの発現が治療抵抗性と関連していると報告されている。LIFの発現はヒトEAC組織で観察され、LIFのサイレンシングはヒトEAC細胞株の細胞生存率を低下させる。しかし、ヒトESCCの進行におけるLIFの病態生理学的役割は不明である。

以上の背景を踏まえて、本研究では、ヒトESCCにおけるLIFの役割を明らかにすることを目的とした。その結果、ヒトESCC細胞株では、LIFノックダウンにより、細胞増殖、遊走/浸潤、スフェア形成がよく抑制され、アポトーシスが誘導された。IL-6と同様に、JAK-STAT3経路に加えて、LIFはSFKを介して、YAPの安定性と細胞内局在の調節、およびその後のYAP標的遺伝子の転写を調節することが示された。LIFは、ヒトESCC切除サンプルでも発現上昇していることが明らかとなった。SFK-YAPおよびJAK-STAT3経路の同時阻害は、ヒトESCCの革新的な治療法となる可能性がある。

II 研究計画及び材料と方法

本研究計画では、ヒト ESCC 細胞株とヒト ESCC 臨床サンプルの両方を使用して、ESCC 発生における LIF の病態生理学的役割の研究を行った。

1. 患者と組織マイクロアレイ

2008 年から 2012 年に九州大学大学院医学研究科で食道切除を受けた 136 人の患者のうち、治癒的切除を受け、がん組織が病理学的に確認された ESCC 患者 111 人が本研究に含まれている。すべての患者またはその保護者から書面によるインフォームドコンセントが得られ、すべての検体は、九州大学病院（福岡、日本、承認番号：29-444）の倫理委員会および施設内審査委員会の承認を得て収集された。この研究はヘルシンキ宣言の規定に準拠している。96 例のヒト ESCC を含む ESCC 組織マイクロアレイは、US Biomax（米国メリーランド州）から入手した。

2. マウス実験

雌の SCID ベージュマウスをチャールズリバーラボラトリーズジャパン株式会社（神奈川県）から購入し、慶應義塾大学の SPF 施設で飼育した。200 μ L のリン酸緩衝生理食塩水（PBS）-マトリゲル（1：1）混合液中の shRNA による LIF またはコントロールノックダウンを伴う TE-11 細胞（ 1×10^7 細胞）を、26G 針を使用して 6 週齢 SCID ベージュマウスに皮下注射した。腫瘍の大きさは、ノギスで 2 日ごとに測定した。腫瘍を有するマウスを注射後 5 週間で安楽死させ、腫瘍組織を採取し、4%パラホルムアルデヒド（PFA）（ナカライテスク）で固定し、組織学的解析に使用した。ヘマトキシリン-エオシン（H&E）染色は、Tissue-Tek ヘマトキシリン 3G およびエオシン（Sakura Finetek Japan）を製造元の指示に従って使用して実施し、画像は BZ-X810 顕微鏡（KEYENCE）を使用して撮影した。動物実験は、日本学術会議の動物実験の適切な実施に関するガイドラインに厳密に従って実施された。マウスを使用したすべての実験は、慶應義塾大学の動物倫理委員会（承認番号：08004）によって承認され、動物倫理委員会のガイドラインに従って実施された。

3. 試薬

組換えヒト IL-6 および LIF は PeproTech から入手し、腫瘍移植用のマトリゲルは Corning から入手した。マイトマイシン C は協和キリンから入手した。SFK および JAK 阻害剤である AZD0530 および AZD1480 は、Selleck Chemicals から入手した。YAP 阻害剤である CIL56 および verteporfin は、Cayman Chemicals から入手した。

4. 免疫組織化学

免疫組織化学（IHC）は、厚さ 5 μ m のパラフィン包埋組織切片を使用して実施した。切片をキシレンで脱パラフィンし、100%から 70%の範囲の一連のエタノール濃度で脱水した。抗原を賦活化するために、クエン酸緩衝液（pH 6.0）またはターゲット回収溶液（pH 9.0）中の検体を、オートクレーブ内で 110° C またはマイクロ波で 99° C で 15 分間加熱した。内因性ペルオキシダーゼを不活性化するために、切片を 3%過酸化水素中で 30 分間インキュベートした。Blocking One Histo（Nacalai Tesque）で抗体の非特異的結合をブロ

ックした後、検体を一次抗体とともに 4℃で一晩インキュベートした。抗体標識は、DAKO EnVision 検出システム (Dako) または HRP 標識二次抗体を使用して行った。切片を DAB と反応させ、ヘマトキシリンで対比染色し、ブルーイングのために 0.2%アンモニア水に浸し、封入した。画像は、NanoZoomer (浜松ホトニクス株式会社) と BZ-X700 または BZ-X810 顕微鏡 (KEYENCE) を使用して撮影した。以下の一次抗体を使用した: YAP (Cell Signaling Technology、# 14074、1:200)、phospho-Src ファミリー (Tyr416) (Cell Signaling Technology、# 2101、1:100)、LIF (R&D Systems、# AF-250-NA、1:100)、Ki67 (Cell Signaling Technology、# 9449、1:200)、および Cleaved Caspase-3 (Cell Signaling Technology、# 9661、1:200)。

5. 細胞株と培養

ヒト ESCC 細胞株 TE-1、TE-5、TE-8、および TE-11 は、東北大学細胞資源センターから入手し、HEK293T 細胞は、ATCC から入手した。マイコプラズマテストは、MycoAlert マイコプラズマ検出キット (Lonza) または BioMycoX マイコプラズマ PCR 検出キット (CellSafe) を使用し、この研究で使用されたすべての細胞株はマイコプラズマ陰性であることを確認した。すべての細胞株は、タカラバイオ社が実施した STR プロファイリングによって認証した。細胞は 5 継代以内に使用され、実験は解凍後 2 か月以内の細胞を使用して実施した。

6. siRNA ノックダウン

LIF 特異的 siRNA は Sigma-Aldrich によって合成された siRNA を購入した。LIF 特異的な siRNA は、SASI_Hs01_00130401 および SASI_Hs01_00130402 MISSION siRNA を使用した。MISSION siRNA Universal Negative Control #1 (siNC) (SIC-001、Sigma-Aldrich) をコントロール siRNA として使用した。細胞を 6 ウェルプレートに播種し (1 ウェルあたり 2.0×10^5 細胞)、Lipofectamine RNAiMAX トランスフェクション試薬 (Thermo Fisher Scientific) を使用して、製造元の指示に従って 50nmol の LIF siRNA または siNC を reverse transfection した。

7. レンチウイルスの産生

レンチウイルス産生のために、レンチウイルスパッケージングプラスミド psPAX2 (Addgene プラスミド #12260) および pMD2.G (Addgene プラスミド #12259) を、ヒト LIF 特異的 (TRCN0000058587、TRCN0000058585、および TRCN0000058586、Sigma-Aldrich)、ヒト LIFR 特異的 (TRCN0000058772 および TRCN0000058770、Sigma-Aldrich)、またはヒト YAP 特異的 pLK01 shRNA プラスミド、FLAG タグ付き YAP5SA (YAP の活性型) 発現プラスミド、または FLAG タグ付き STAT3C (STAT3 の活性型) を発現するプラスミドと co-transfection した。ホタルルシフェラーゼを標的とするルシフェラーゼ shRNA (shLuc) をコントロール shRNA として使用した。HEK293T 細胞へのトランスフェクションは、ポリエチレンジアミン MAX (PEI MAX、Polysciences) を使用して行い、トランスフェクションの 24 時間後、培地を交換してトランスフェクション試薬を除去した。ウイルス含有培地は、最初のトランスフェクションの 48 時間後と 72 時間後に回収した。細胞への形質導入のために、ウイルス含有培地を濾過し (孔径 0.45 μm)、次に 8 $\mu\text{g} / \text{ml}$ ポリブレン (ナカライテスク) を加え

て感染させた。ウイルス感染細胞は、使用前に puromycin (InvivoGen) または G418 (Nacalai Tesque) を使用して selection した。

8. ウェスタンブロット分析

各サンプルからの等量の総タンパク質、核または細胞質タンパク質を、SDS-PAGE を使用して分離し、PVDF 膜にブロットした。NE-PER 核および細胞質抽出試薬 (Thermo Fisher Scientific) を使用して、核および細胞質のタンパク質画分を別々に抽出した。タンパク質ブロットを、示された目的の一次抗体とハイブリダイズさせ、続いて HRP 結合二次抗体とハイブリダイズさせ、続いて Chemi-Lumi One L または Chemi-LumiOne Super (Nacalai Tesque) および FUSION 化学発光イメージングシステム (VILBER) で検出した。以下の一次抗体を使用した: YAP (Cell Signaling Technology, # 14074, 1:1000)、phospho-YAP (Ser127) (Cell Signaling Technology, # 4911, 1:1000)、phospho-Src family (Tyr416) (Cell Signaling Technology, # 2101, 1:1000)、Src (Cell Signaling Technology, # 2110, 1:1000)、phospho-STAT3 (Tyr705) (Cell Signaling Technology, # 9145, 1:1000)、STAT3 (Cell Signaling Technology, # 9132, 1:1000)、CTGF (Cell Signaling Technology, # 10095, 1:1000)、CYR61 (Cell Signaling Technology, # 39382, 1:1000)、phospho-YAP (Tyr357) (Abcam, # ab62751, 1:3000)、 α -チューブリン (Sigma-Aldrich, # T9029, 1:1000)、ラミン B1 (Invitrogen, # 33-2000, 1:1000)、および FLAG (DYKDDDDK) (Wako Chemicals, # 019-22394, 1:1000)。

9. 免疫蛍光染色

Lab-Tek チャンバースライド (Thermo Fisher Scientific) に播種した接着細胞を、PBS で洗浄し、4%PFA で 15 分間固定した。スライドは、PBS 中の 5% ヤギ血清および 1% ウシ血清アルブミンで 1 時間ブロックした。一次抗体を細胞に加え、4°C で一晩インキュベートしました。Alexa Fluor 546 ヤギ抗ウサギ抗体 (Thermo Fisher Scientific, 1:300) を二次抗体として使用しました。次に、DAPI の入った VECTASHIELD Mounting Medium (Vector Laboratories) を使用して、カバースリップをスライドにマウントした。一次抗体には、YAP (Cell Signaling Technology, # 14074, 1:100) および phospho-STAT3 (Tyr705) (Cell Signaling Technology, # 9145, 1:100) に対する抗体を使用した。

10. mRNA の調製と定量的リアルタイム PCR

RNAiso Plus (Takara Bio Inc.) を使用して total RNA を抽出し、High-Capacity cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) を使用して逆転写した。定量的リアルタイム PCR 分析は、CFX Connect リアルタイム PCR 検出システム (Bio-Rad) および SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad) を使用して実行した。すべてのプライマーセットは、予想されるサイズの単一 product を生成した。相対的な発現レベルは 18SrRNA で正規化した。

11. ELISA

培地への IL-6 および LIF 分泌を調べるために、ヒト IL-6 ELISA キット (Thermo Fisher Scientific) およびヒト LIF ELISA キット (Thermo Fischer Scientific) を使用した。測

定は製造元の指示に従って行った。

12. 細胞増殖アッセイ

細胞増殖能は、96 ウェルプレートに 1 ウェルあたり 2000 細胞の初期密度で細胞を播種して測定した。4~6 日間播種してから 24 時間ごとに、10 μ l の Cell Count Reagent SF (Nacalai Tesque) を細胞培養液に 1~2 時間添加し、各ウェルの吸光度を 450nm の波長で iMark マイクロプレートリーダー (Bio-Rad) を用いて測定した。

13. アポトーシスアッセイ

FITC 結合アネキシン V とヨウ化プロピジウム (PI) で二重染色した後、アネキシン V-FITC アポトーシス検出キット (BioVision) を使用してアポトーシスを解析した。アネキシン V はホスファチジルセリンが露出したアポトーシス細胞に結合するが、PI は膜損傷を伴う後期アポトーシス細胞および壊死細胞に結合する。染色はメーカーの指示に従って行った。染色された細胞は FACS Canto II (BD Biosciences) で解析し、データは Diva (BD Biosciences) および FlowJo (Tree Star) ソフトウェアを使用して解析した。

14. 創傷治癒アッセイ

細胞を 6 ウェルプレートで 100%コンフルエンスに達するまで培養した。次に、マイクロピペットチップを使用して単層に引っかき傷を付けて「傷」を作り、細胞をマイトマイシン C (3 μ g / ml) で 1 時間処理した。創傷領域の顕微鏡写真は、BZ-X700 顕微鏡 (KEYENCE) を使用して、「傷」を作ってから 0、24、および 48 時間後に撮影された。Image J ソフトウェアを使用して、創傷閉鎖の割合を定量化および解析した。

15. 細胞遊走アッセイ

Falcon permeable supports for 24-well plate with 8.0-mm Transparent PET Membrane を 24 ウェルプレートに置き、インサートあたり 5000 個の細胞を基本培地に播種した。下部チャンバーは、走化性物質として 10%FBS を添加した基本培地で満たした。細胞を 24 時間移動させた後、Diff-Quik (Sysmex) を使用して固定および染色した。遊走した細胞の顕微鏡写真を BZ-X700 顕微鏡 (KEYENCE) を使用して撮影し、10 倍の視野あたりの遊走した細胞をカウントして解析した。

16. 細胞浸潤アッセイ

Corning BioCoat Matrigel Invasion Chambers with 8.0-mm PET membrane を上部チャンバーに配置し、インサートあたり 5000 個の細胞を基本培地に播種した。下部チャンバーは、走化性物質として 10%FBS を補充した基礎培地で満たした。細胞を 24 時間移動させた後、Diff-Quik (Sysmex) を使用して固定および染色した。遊走した細胞の顕微鏡写真を BZ-X700 顕微鏡 (KEYENCE) を使用して撮影し、10 倍の視野あたりの浸潤細胞をカウントして解析した。

17. スフェア形成アッセイ

スフェア形成を評価するために、TE-11 細胞を、3D Tumorsphere Medium XF (PromoCell) を使用して 24 ウェル未処理プレート (Thermo Fisher Scientific) に 5×10^4 の密度でプレーティングしました。腫瘍球の顕微鏡写真は、5~7 日後に BZ-X700 または BZ-X810 顕微鏡 (KEYENCE) を使用して撮影され、10 倍の視野あたりの腫瘍球の数がカウントおよび解析した。

18. 統計分析

すべての統計分析、データ処理、およびグラフ作成は、GraphPad Prism 6.0 または 8.0 を使用して実行された。すべての値は、平均±平均の標準誤差 (SEM) として表されている。Student t 検定を使用して、2つのグループを比較したが、他のすべての比較では、ANOVA 多変量分析を実行しました。統計的有意性は、 $P < 0.05$ とした。全生存期間 (OS) は、手術日から死亡日または直近のフォローアップ受診までの時間として定義した。カプランマイヤー曲線を使用して OS の分布を推定し、ログランク検定を使用して統計的有意性を決定し、カイ 2 乗検定とピアソン相関法を使用して IHC の結果を比較した。

III 研究成果

1. ヒト ESCC 細胞では STAT3、SFK、および YAP が活性化し、IL-6 および LIF が発現する

まず、リン酸化タンパク質と総タンパク質の発現、および YAP 標的の発現を検討することにより、STAT3、SFK、および YAP が TE-1、TE-5、TE-8、および TE-11 ヒト ESCC 細胞株で活性化指定るかどうかを調べた。これらの分子の活性化と CCN2 / CTGF、CCN1 / CYR61、AREG、JAG1 などの YAP 標的遺伝子発現を確認した。次に、定量的リアルタイム PCR を使用して、ヒト ESCC 細胞株における IL-6 ファミリーサイトカインの発現を測定した。IL6 / IL-6 および LIF は、4つの食道がん細胞株すべてでさまざまなレベルで発現していたが、IL11 / IL-11 および IL22 / IL-22 はほとんど検出されなかった。リアルタイム PCR の結果と一致して、IL-6 タンパク質と LIF タンパク質の両方が、ヒト ESCC 細胞株の培養上清で ELISA によって検出された。IL-6 ファミリーサイトカインの共通受容体である IL6ST / gp130、および IL-6 受容体 (IL6R) と LIF 受容体 (LIFR) も、ヒト ESCC 細胞株で発現しており、IL-6 が LIF は、ヒト ESCC で機能的なオートクラインループを形成する可能性が示唆された。ヒト ESCC 細胞株は、IL-6 および LIF 刺激後の STAT3 活性化 (STAT3 のリン酸化および核移行) をモニタリングすることにより、外因性 IL-6 および LIF に応答できることを確認した。以上のデータは、IL-6 および LIF がヒト ESCC 細胞株においてオートクライン様式で機能する可能性があることを示唆している。

2. LIF はヒト ESCC 細胞の SFK-YAP 経路を活性化する

ヒト ESCC 細胞株におけるオートクライン LIF の役割を調べるために、LIF に対して 2つの異なる siRNA または 3つの異なる shRNA を使用して ESCC 細胞で LIF をノックダウンし、定量的リアルタイム PCR によってノックダウン効率を確認した。LIF ノックダウンは YAP1 / YAP とその標的遺伝子の発現を抑制し、YAP と STAT3 の両方の核移行も抑制した。外因

性 LIF 刺激は、SFK および STAT3 の活性化、YAP チロシンリン酸化 (Y357)、YAP の蓄積、および核移行を促進したが、外因性 LIF 刺激は、Hippo シグナル伝達経路コンポーネント Lats1 および Lats2 によってリン酸化される YAP のセリンリン酸化 (S127) に影響を与えなかった。LIF によって誘導された YAP 核移行は、SFK 阻害剤である AZD0530 の添加によって阻害された。これらの結果は、ヒト ESCC 細胞において LIF が Hippo 経路に依存しないメカニズム、つまり SFK 活性化を介して YAP を活性化していることを示唆している。

3. LIF は、ヒト ESCC 細胞の細胞増殖を促進し、アポトーシスを阻害する

次に、ヒト ESCC 細胞の増殖とアポトーシスにおける LIF の役割を調べた。LIF ノックダウンは、ESCC 細胞の増殖と、CCND1 / Cyclin D1、MYC / c-Myc、MKI67 などの増殖関連遺伝子の発現を抑制した。LIF ノックダウン実験の結果と一致して、LIFR のノックダウンも ESCC 細胞増殖を抑制した。さらに、LIF ノックダウンは ESCC 細胞アポトーシスを誘導し、BCL2 / Bcl-2 や BCL2L1 / Bcl-XL などの抗アポトーシス遺伝子の発現を低下させた。これらのデータは、LIF がヒト ESCC 細胞の増殖とアポトーシスに強く関与することを示唆している。

4. LIF は、ヒト ESCC 細胞の細胞移動、浸潤、およびスフェア形成を促進する

また、細胞の遊走と浸潤における LIF の役割についても検討した。LIF ノックダウンは、創傷治癒アッセイで細胞遊走を抑制し、トランスウェルアッセイで細胞遊走と浸潤を抑制し、SNAI2 / SLUG、SNAI1 / SNAIL、TWIST1 / TWIST などの EMT 関連転写因子の発現を抑制した。これらの発見は、LIF が細胞増殖とアポトーシスに加えてヒト ESCC 細胞の遊走と浸潤の調節に重要な役割を果たしていることを示唆している。興味深いことに、LIF の発現はスフェア形成条件下で誘導され、LIF ノックダウンはヒト ESCC 細胞のスフェア形成も阻害し、ESCC で発現するがん幹細胞マーカーである SOX2 の発現を抑制した。これらのデータは、がん幹細胞における LIF の重要な役割を示唆している。

5. YAP と STAT3 の同時活性化は、ヒト ESCC 細胞増殖における LIF 機能を完全に代償する

LIF に対する siRNA と YAP および STAT3 の活性化型の過剰発現を使用して、YAP と STAT3 のどちらが LIF の下流でより重要であるかどうかを検討した。その結果、LIF 誘導性の YAP 活性化が、ヒト ESCC 細胞における LIF 誘導性の STAT3 活性化よりもがん細胞の増殖により重要であることが明らかとなった。さらに、LIF ノックダウン TE-8 細胞で共発現された恒常的活性化型 YAP と STAT3 は、細胞増殖を完全に代償することができた。これらのデータは、LIF-SFK-YAP 経路がヒト ESCC の成長に重要な役割を果たし、SFK-YAP 経路が LIF シグナル伝達の下流での細胞増殖のために JAK-STAT3 経路と協調して機能することを示唆している。

6. YAP 活性化は、ヒト ESCC 臨床サンプルにおける SFK 活性化および LIF 発現と相関する

次に、これらの所見がヒトの臨床 ESCC サンプルで再現できるかどうかを検討した。ヒト ESCC 臨床サンプルを免疫染色することにより、YAP 活性化 (核内 YAP) と SFK 活性化 (リン酸化 SFK) の関係、および食道がん細胞における YAP 活性化と LIF 発現を検討した。SFK

活性化はヒト ESCC サンプルの YAP 活性化と関連しており、YAP 活性化を伴う ESCC の患者は予後不良を示した。LIF の発現レベルは、ESCC 患者のヒト組織アレイにおける YAP の活性化レベルと正の相関がありましたが、弱い相関であり、LIF シグナル伝達とともに、IL-6 シグナル伝達が、*in vivo* での YAP 活性化にも関与している可能性が示唆された。以上のデータは、ヒト ESCC 臨床サンプルにおける LIF-SFK-YAP 経路の重要性を示唆している。

7. YAP の活性化は、ヒト ESCC 細胞の細胞増殖とスフェア形成を促進する

YAP に対する shRNA または YAP 阻害剤のいずれかを使用して、ヒト ESCC 細胞における YAP の役割を検討した。以前の報告と一致して、YAP ノックダウンは LIF ノックダウン実験でも観察されたようにヒト ESCC 細胞の増殖を抑制した。また 2 つの YAP 阻害剤 (CIL56 と verteporfin) もヒト ESCC 細胞の増殖を抑制した。これらのデータは、ヒト ESCC 治療の標的候補としての YAP の重要性を示唆している。

8. SFK と JAK の同時阻害は、ESCC 細胞の増殖を相加的に抑制する

次に、SFK および JAK 阻害剤による SFK-YAP および JAK-STAT3 経路の同時阻害の治療効果を検討した。予想通り、これらの経路の同時阻害は、単一経路阻害と比較して、ヒト ESCC 細胞株における細胞増殖および増殖関連遺伝子の発現を効果的に抑制した。さらに、ヒト ESCC の標準治療である 5-フルオロウラシル (5-FU) は、これらの阻害剤と組み合わせて、細胞増殖を相加的に抑制しました。これらの発見は、SFK-YAP 経路と JAK-STAT3 経路の両方を標的とすることが、ヒト ESCC の新しい治療となる可能性を示唆している。

9. オートクライン LIF シグナル伝達は、*in vivo* でのヒト ESCC 増殖の主要な誘導因子として機能する

最後に、マウスの LIF はヒト LIFR を活性化できないため、*in vivo* 腫瘍増殖中のオートクライン LIF シグナルの役割を調べた。TE-11 細胞に皮下移植し、shRNA による LIF ノックダウン効果を SCID ベージュマウスで検討した。LIF ノックダウン TE-11 細胞は、SCID ベージュマウスにおいてコントロール細胞よりもゆっくりと増殖した。この結果と一致して、腫瘍組織学的分析は、増殖性 (Ki67 陽性) 腫瘍細胞およびアポトーシス性 (Cleaved-Caspase-3 陽性) 腫瘍細胞が少なく、LIF ノックダウン腫瘍における YAP 活性化が少ないことが明らかとなった。以上のデータは、オートクライン LIF シグナル伝達が *in vivo* での ESCC 増殖の主要な誘導因子として機能することを示唆している。

IV 考察

ヒト ESCC 細胞で高度に発現しているオートクライン LIF の役割を検討した。LIF ノックダウンは、増殖、遊走/浸潤、スフェア形成を抑制し、がん細胞のアポトーシスを誘導した。LIF は JAK-STAT3 経路の活性化に加えて SFK を介して YAP を活性化し、LIF が誘導する YAP の活性化は、LIF が誘導する STAT3 の活性化よりもがん細胞の増殖に重要であることを示した。さらに、SFK の活性化と LIF の発現がヒト ESCC 組織の YAP 活性化と相関し、オート

クライン LIF シグナル伝達が *in vivo* でのヒト ESCC の増殖を促進することを明らかにした。したがって、LIF-SFK-YAP axis は、ヒト ESCC 療法の新しい標的となる可能性がある。

LIF はサイトカインの IL-6 ファミリーのメンバーであり、胚性幹細胞の自己複製と多能性の維持において極めて重要な役割を果たす。LIF の発現は、我々の研究ではスフェア形成条件下でも誘導され、がん幹細胞の維持における LIF の重要性を示唆している。さらに、LIF はさまざまながんにおいてオートクラインまたはパラクライン様式で腫瘍の発生を促進する。LIF はオートクライン様式で機能し、いくつかのタイプのがん細胞は変異を獲得した後に LIF を発現すると報告されている。ただし、転写因子、シグナル伝達経路、および/またはがん細胞における LIF 発現の誘導に関するエピジェネティックな変化は不明なままである。LIF が gp130 を介して JAK-STAT3 経路を活性化できることはよく知られている。本研究では、IL-6 と同様に、LIF もがん細胞の SFK-YAP 経路を活性化し、SFYK-YAP および JAK-STAT3 経路の同時阻害が ESCC の増殖を効果的に抑制することを示した。現在、JAK 阻害剤と SFK 阻害剤は他の疾患の治療に使用されているため、早期の臨床応用が期待される。さらに、STAT3 および YAP の活性化は化学療法抵抗性と密接に関連しており、5-FU への JAK および SFK 阻害剤の添加は ESCC 細胞の増殖を相加的に抑制した。

また、SFYK-YAP 経路は、JAK-STAT3 経路よりもヒト ESCC 細胞増殖において重要であることを明らかにした。JAK 阻害剤は、STAT3 活性を抑制するために臨床的に使用されている。しかし、それらを長期間使用すると免疫不全につながる可能性があり、悪性腫瘍や感染症のリスクを高める可能性がある。したがって、場合によっては、SFYK-YAP 経路のみを標的とすることが望ましいと考えられる。

LIF と IL-6 の関係に関する研究では、これらのサイトカインが卵巣がんの促進に同様の効果を示すことが報告されている。我々の結果は、IL-6 がまだ発現しているにも関わらず、LIF ノックダウンが重度の表現型を誘導したため、IL-6 が ESCC 細胞における LIF の役割を補うことができないことを示している。LIF と IL-6 は、JAK-STAT3、Ras-ERK、PI3K-Akt、SFYK-YAP 経路などの同様の下流シグナル伝達経路を活性化する。したがって、IL-6 がヒト ESCC 細胞の LIF を代償できない理由を明らかにするには、さらなる研究が必要である。

我々の研究は、ヒト ESCC 細胞における LIF の発現とその重要性を明らかにした。LIF は STAT3 と YAP を活性化することにより腫瘍を促進し、STAT3 と YAP は、それぞれ JAK 阻害剤と SFK 阻害剤によって抑制される。JAK 阻害剤による全身の STAT3 活性化阻害は、免疫抑制をもたらす。したがって、詳細な LIF の下流のシグナル伝達経路を解明することは、LIF を標的としたがん治療にとって重要な検討事項である。

V 研究成果の発表

Kawazoe T, Saeki H, Oki E, Oda Y, Maehara Y, Mori, M, Taniguchi K*. Autocrine leukemia inhibitory factor promotes esophageal squamous cell carcinoma progression via Src family kinase-dependent Yes-associated protein activation. (*corresponding author) Molecular Cancer Research. 18(12):1876-1888. 2020

メカノストレス解除モデルを用いた心不全病態治癒過程の解明

《研究の概要》

近年、心不全患者は増加の一途を辿り、本邦では約 200 万人にも及ぶとされている。このような心不全患者の急増は「心不全パンデミック」と呼ばれ、より良い心不全治療の開発は世界的な重要課題として位置づけられている。高血圧症は、心肥大・心不全（心臓リモデリング）を引き起こす重要な基礎疾患であり、これまで降圧剤を中心とした血圧コントロールによって心肥大・心不全の発症の予防を目指す治療が広く行われてきた。しかしながら、既に心不全を発症してしまった症例は爆発的に増加し続けており、一旦低下した心機能の回復（リバースリモデリング）を進める新規治療法の確立が臨床の現場では切望されている。

心不全の動物実験モデルとして、これまではマウス横行大動脈縮窄モデル（Transverse Aortic Constriction, TAC）が心筋細胞肥大・心臓線維化という心不全病態の「進展プロセス」を理解するために大きく貢献してきた。しかしながら心肥大・心不全病態発症プロセスを逆行させても心機能が回復する訳ではなく、心肥大・心不全の「回復プロセス」を直接的に検証する新たな実験モデルの開発が切望されてきた。

今回我々は、TAC 実施後に圧負荷を解除することにより一旦発症した心不全を回復させる独自の実験モデル reverse TAC を新たに樹立し、回復過程の解析を行なった。結果、TAC モデルによる圧負荷で心肥大・心不全が発症する過程では炎症惹起型の M1 マクロファージが心臓組織で活性化しているのに対して、圧負荷解除後の心臓組織には炎症抑制型の M2 マクロファージが集積し、心機能回復過程に必須の役割を果たしていることが明らかとなった。また M2 マクロファージは、低酸素誘導型転写因子 HIF-2 α 依存的に固有の細胞機能が調整されており、新たに探索した HIF-2 α の標的遺伝子 X は心機能の回復に寄与することが示唆された。

本研究で得られた研究成果は、臨床の現場で求められているリバースリモデリング治療の開発に直接的に貢献し得る基盤的知見であり、これまで真の治療介入が困難であった多くの心不全症例にとって大きな福音となるものと考えられる。

共同研究者の氏名・所属機関

武田憲彦 東京大学医学系研究科 循環器内科 特任講師

松谷大輔 東京慈恵会医科大学 糖尿病・代謝・内分泌内科 大学院生

I 研究目的

日本人の3人に1人は高血圧に罹患している。高血圧は、心血管病・脳卒中・慢性腎臓病など、あらゆる疾患の罹患リスクを増悪させ、高血圧に起因する死亡者は年間10万人にも及ぶ。そして驚くべきことに、高血圧罹患者のうちで実際に高血圧の治療を受けているのは約5割だけであり、血圧が正常範囲にコントロールされているのはさらにその4割に過ぎない。すなわち、ほとんどの高血圧患者では、適切な治療・管理がなされず、全身の臓器が過剰な血圧負荷に曝され続けているというのが現状である。

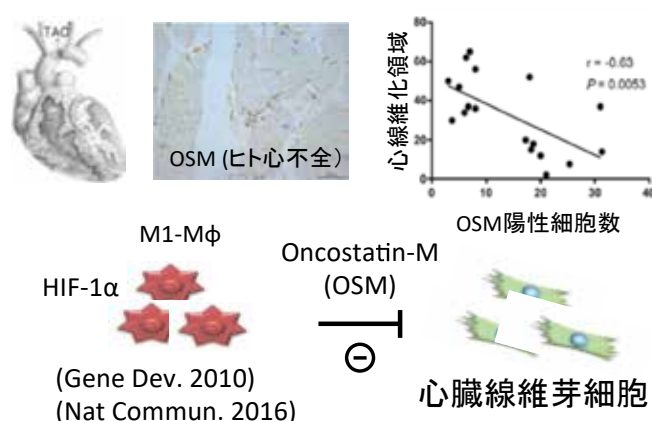
高血圧による圧負荷が心臓に持続的に加わると、心筋細胞の肥大・変成・脱落や間質の線維化を伴って、左室拡張能・収縮能が低下していく。この過程は心臓リモデリングと呼ばれ、心不全発症の病態基盤と考えられている。この心臓リモデリングの発症過程を反映する動物実験モデルとしてこれまでマウス横行大動脈縮窄モデル (Transverse Aortic Constriction, TAC) が広く用いられ、心不全の発症過程を規定する因子の研究、すなわち「心不全の発症予防につながる研究」が進められてきた。しかし残念ながら、高血圧症患者の多くは管理不十分な状態であり、循環器内科を受診する時点で既に心臓リモデリングが発症・進展した状態に陥っている。よって、臨床の現場で真に求められているのは、心不全にならないための「予防」ではなく、リモデリングした心臓を正常化する「治療」であると考えられる。既存の降圧薬・心保護薬を用いた高血圧・心不全の治療では、必ずしも心機能の正常化は得られないことが分かっている。よって、心機能正常化 (リバースリモデリング) の分子機構を詳細に明らかにし、心機能正常化療法という新規心不全治療法を確立することが、我々循環器内科医にとっての急務である。

我々はこれまで、マクロファージを介する炎症プロセスが組織のリモデリング・線維化の進展において重要な役割を果たすことを明らかにしてきた (Nature 2008, PNAS 2010, Cancer Res.

2012, etc)。組織マクロファージには、炎症惹起型(M1)と抑制型(M2)の亜集団があることが近年知られているが、我々は M1 の活性化には低酸素誘導型転写因子 HIF-1 α を介する低酸素シグナルが必須であることを報告した (Gene Dev. 2010, Nat Commun. 2016)。さらに TAC モデルを用いた解析から、心不全の心臓組織では低酸素領域に M1 が集積し、Oncostatin-M (OSM) を分泌することで心臓線維化を抑制することを見出している (Nat Commun. 2019)。

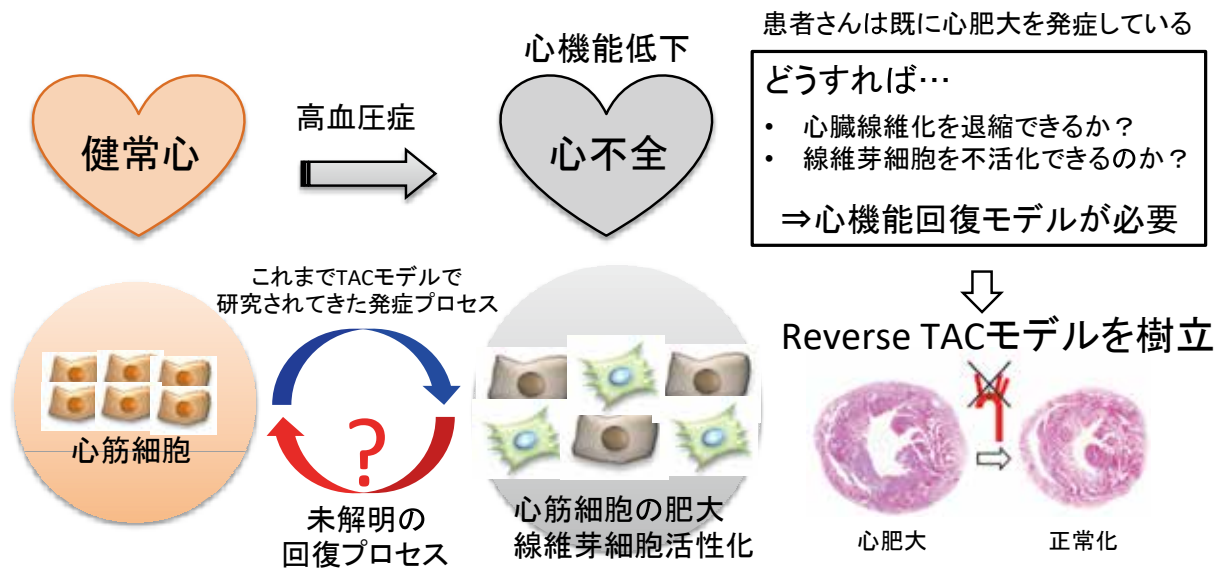
これまで申請者が明らかにしたこと

心肥大進展過程でM1-M ϕ が線維化を抑制する



本研究にあたり、我々は上記 TAC モデルを独自に改良し、上行大動脈縮窄のメカノストレスを解除することで心機能の回復過程を観察できる病態モデル(reverse TAC)を立案した。reverse TAC モデルを用いて、これまで我々が行ってきた心筋細胞・心臓線維芽細胞・心臓マクロファージの細胞間相互作用、および低酸素シグナルと炎症プロセスの協調という切り口から心機能回復過程のプロセスを解明し、臨床の現場における真のニーズである心不全病態回復療法の開発につながる基盤的知見の新規取得を目指していくのが、本研究の主たる目的および内容である。

心機能回復のプロセス解明に対する強い臨床的ニーズ



II 研究計画および材料と方法

これまで我々は TAC モデルを用いた解析から、心不全を来した心臓組織の低酸素領域には炎症惹起型の M1 マクロファージが集積し、心臓線維化に対し抑制的に働くことを明らかにしてきた。本研究では、施した上行大動脈縮窄のメカノストレスを解除することによって心機能の回復過程を観察できる病態モデル(reverse TAC)を確立し、臨床の現場における真のニーズである心機能回復過程を検証した。

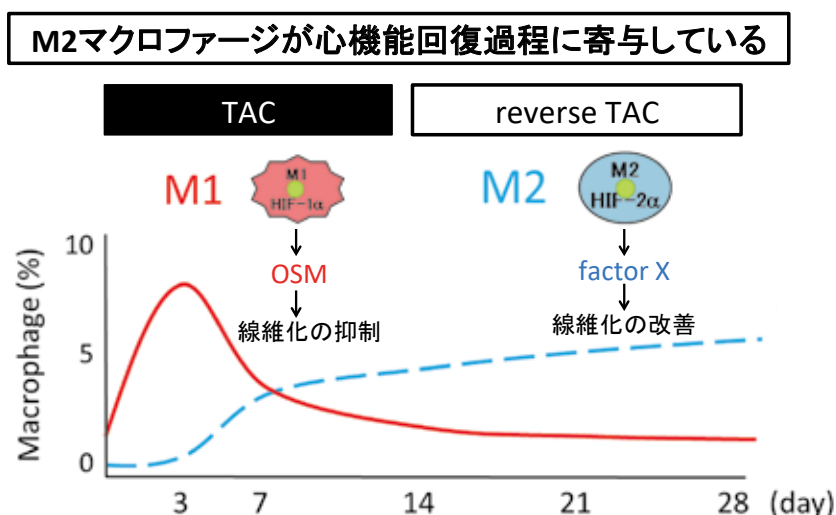
さらに興味深い事に、これまでの予備的実験から、心機能回復期においては M1 マクロファージのみならず炎症抑制型の M2 マクロファージも重要な役割を果たしていることが示唆されていた。そこで本研究では Clodronate Liposome を用いたマクロファージ除去や、M2 マクロファージの機能が低下した STAT6 欠損マウス・HIF-2 α 欠損マウス (Lysm-HIF-2 α KO) を用いた実験により、M2 マクロファージによる心肥大退縮・心臓線維化消退のメカニズムを検証した。

また M1・M2 マクロファージはそれぞれ HIF-1 α ・HIF-2 α によって機能的制御を受けている。そこで我々はさらに、HIF 欠損マウスを用いた低酸素刺激下におけるマクロファージの網羅的遺伝子発現解析(transcriptome)を行い、マクロファージ由来のいかなる因子が心臓線維化回復の役割を果たしているか、その同定を進めた。

III 研究成果

心機能回復過程には M2 マクロファージが寄与している

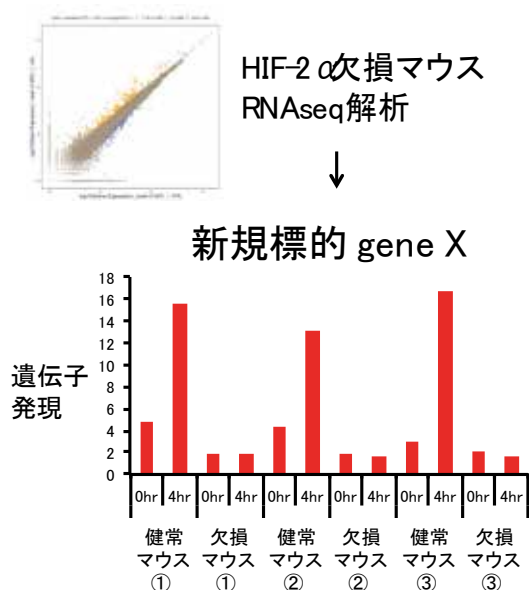
本研究で我々は、従来の実験モデルである TAC に加えて、TAC を中途解除する reverse TAC を樹立・実施し、reverse TAC を用いた実験により、解除後に心肥大の退縮・心機能の回復が得られることを確認した。さらに興味深いことに、回復期の心臓組織には炎症抑制型 M2 マクロファージが集積しており、clodronate liposome 投与による M2 の除去、あるいは前述の欠損マウスにおける M2 マクロファージの機能障害を呈した状態では、心機能の改善が得られなくなることを確認した。これまでに我々は TAC を用いた解析により、心臓に圧負荷がかかっている心不全発症過程においては炎症惹起型 M1 マクロファージがサイトカイン OSM を分泌し、線維化の進展に抑制的にはたらくことを示してきたが、本研究によりさらに圧負荷解除後である心不全回復過程においては別の亜集団である M2 マクロファージも重要な役割を果たしていることが示唆された。



新規 HIF-2 α 標的遺伝子の同定

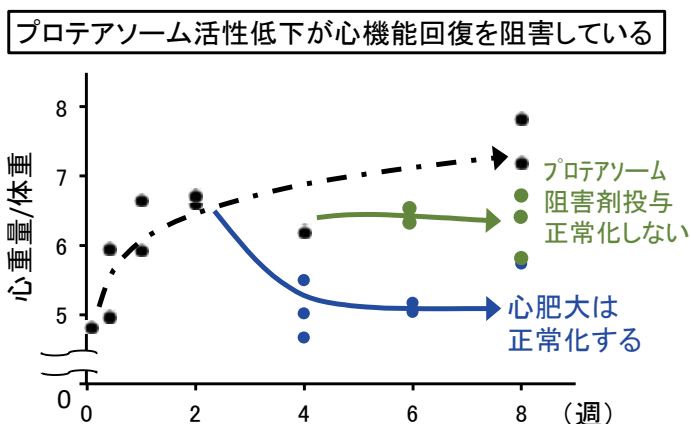
我々は、炎症惹起型 M1 マクロファージ・抑制型 M2 マクロファージは、それぞれ低酸素誘導型転写因子 HIF-1 α ・HIF-2 α によって固有の細胞機能が制御されることを示してきた (Gene Dev. 2010, Nat Commun. 2016)。さらに上記の実験結果から、M2 マクロファージが圧負荷解除後の心機能回復に重要であることが示されたため、我々は HIF-2 α 欠損マウスを用いて低酸素刺激下におけるマクロファージの網羅的遺伝子発現解析(transcriptome)を行い、マクロファージ由来のいかなる因子が心臓線維化回復の役割を果たしているかを検討した。結果、新規の HIF-2 α 標的遺伝子群を見出すことに成功した。低酸素刺激下に HIF-2 α 依存的に発現するこれらの遺伝子群は、すなわち心機能回復過程の key factor の重要な候補であり、現在同因子に対して薬理的あるいは遺伝学的介入を加えて心機能回復メカニズムの分子機構の解析を進めるとともに、候補選定のため後述の実験も実施している。

新規 HIF-2 α 標的遺伝子の探索



心肥大・心機能の回復とプロテアソーム系の関連

我々は心肥大・心機能が回復する過程の心筋細胞可塑性に着目し、TAC/reverse TACの実験系にプロテアソーム阻害薬を加え実験を行なった。その結果、投与群においては心肥大・心機能の回復が抑制されることが示された。プロテアソーム系は細胞サイズの調節において重要な役割を果たしており、その活性は細胞内 ATP レベルによって制御されている。以上のプロテアソーム・細胞内 ATP という観点と前述の HIF-2 α 標的遺伝子群のデータを merge させることによって、心機能回復因子の候補選定を推進している。



ヒト臨床検体における OSM 発現の解析

我々は今回の基礎研究遂行中に、平行して種々の臨床研究も実施してきた(後述成果参照)が、実際の臨床病態においては圧負荷と圧負荷解除が分断して生じるわけではなく、連続的あるいは混在した状態であると考えられる。そこで発現的解析として、我々がこれまでに明らかにしてきた心肥大・心臓線維化の発症抑制因子である OSM についても、ヒト臨床検体を用いてさらなる解析を進めてきた。

我々はヒト重症心不全の症例について、心筋組織の OSM 発現が線維化と逆相関を示すことを既に報告してきた。さらに慢性心房細動症例の左心耳組織においても、組織リモデリングと OSM 発現は逆相関することを示した。またヒト重症心不全症例の血清サンプルにおける OSM 濃度を測定し、high OSM を呈する症例群の存在を確認した。現在、血清 OSM 濃度と臨床像の関連性から、その臨床的意義を解析している。

(以上の研究成果は未発表データであり、現在論文投稿中である。)

IV 考察

未曾有の高齢化に伴い、本邦の心血管疾患症例は増加している。特に近年、心不全患者は増加の一途を辿り、本邦では約 200 万人にも及ぶとされている。当研究所付属病院も参画する東京都 CCU

ヒト臨床検体の OSM 発現解析

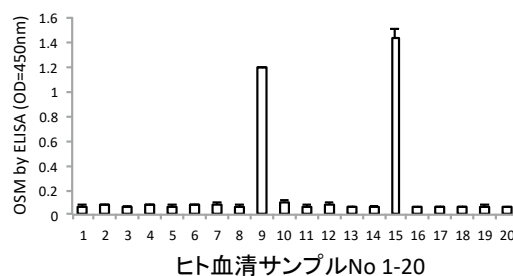
ヒト心臓組織における OSM 陽性細胞



重症心不全症例
左室心筋組織
OSM免疫染色

心房細動症例
左心耳組織
OSM免疫染色

ヒト血清サンプルにおける OSM 濃度



ネットワークから出された近年の報告によれば、心不全の搬送者数は既に急性心筋梗塞の搬送者数を上回っているという(年間約 5000 例 vs 4500 例)。このような心不全患者の急増は「心不全パンデミック」と呼ばれ、心不全診療は現代医療の重要課題のひとつとして位置づけられている。

高血圧症は本邦で最も有病率の高い生活習慣病の1つであり、持続的な高血圧は心肥大・心不全(心臓リモデリング)を引き起こすため、心不全の重要な基礎疾患である。現在まで降圧剤を中心とした血圧コントロールによって、心肥大・心不全発症の予防を目指す治療が広く行われてきた。しかし残念ながら、既に心不全を発症してしまった症例は前述のごとく現在爆発的に増加し続けている。よって、一旦低下した心機能の回復(リバースリモデリング)を目指した新たな治療アプローチが臨床的に強く求められているが、残念ながら降圧剤など心肥大発症予防治療法は必ずしもリバースリモデリングに有効では無かった。つまり、“病気になること(発症の予防)”を望まない人はいないが、臨床の現場では“病気を治すこと(障害の回復)”がより強く求められているのが現実であった。

このような心不全の動物実験モデルとして、これまでは TAC モデルが心筋細胞肥大・心臓線維化という心不全病態の進展プロセスを理解するために大きく貢献してきた。しかしながら心肥大・心不全病態発症プロセスを逆行させても心機能が回復する訳ではなく、心機能回復プロセスを検証する新たな病態モデル開発が切望されてきた。

今回我々は TAC モデル後に圧負荷を解除することにより、発症した心不全を回復させる独自の実験モデル reverse TAC を樹立し解析を行なった。結果、圧負荷解除後の心臓組織には炎症抑制型の M2 マクロファージが集積し、心機能回復過程に必須の役割を果たしていることが明らかとなった。また M2 マクロファージは HIF-2 α 依存的に固有の細胞機能が調整されており、新たに探索した HIF-2 α の標的遺伝子 X は心機能の回復に寄与することが示唆された。本研究で得られた研究成果は、臨床の現場で求められているリバースリモデリング治療の開発に直接的に貢献し得る基盤的知見であり、これまで真の治療介入が困難であった多くの心不全症例にとって大きな福音となるものと考えられた。

*謝辞

3年間の本研究の遂行にあたり、多大なる御支援を賜りました公益財団法人車両競技公益資金記念財団にこの場を借りて深謝致します。また、研究実施にあたり御指導・御協力をいただいた公益財団法人心臓血管研究所の山下武志所長、ならびに研究所スタッフの皆様に深く御礼申し上げます。

V 研究成果の発表

1. Okada K., Mori D., Makii Y., Nakamoto H., Murahashi Y., Yano F., Chang S. H., Taniguchi Y., Kobayashi H., **Semba H.**, ...& Saito, T. (2020). Hypoxia-inducible factor-1 alpha maintains mouse articular cartilage through suppression of NF- κ B signaling. *Scientific reports*, 10(1), 1-11. 1.

2. Harada M., Nagai J., Kurata R., Cui X., Isagawa T., **Semba H.**, ... & Yonezawa T. (2021). Establishment of Novel Protein Interaction Assays between Sin3 and REST Using Surface Plasmon Resonance and Time-Resolved Fluorescence Energy Transfer. *International journal of molecular sciences*, 22(5), 2323.
3. Harada M., Nagai J., Kurata R., Shimizu K., Cui X., Isagawa T., **Semba H.**, ... & Yonezawa T. (2020). Establishment of Novel High-Standard Chemiluminescent Assay for NTPase in Two Protozoans and Its High-Throughput Screening. *Marine drugs*, 18(3), 161.
4. Kurata R., Shimizu K., Cui X., Harada M., Isagawa T., **Semba H.**, ... & Yonezawa T. (2020). Novel Reporter System Monitoring IL-18 Specific Signaling Can Be Applied to High-Throughput Screening. *Marine drugs*, 18(1), 60.
5. Abe H., Takeda N., Isagawa T., **Semba H.**, ... & Komuro I. (2019). Macrophage hypoxia signaling regulates cardiac fibrosis via Oncostatin M. *Nature Communications*, 10, 2824.
6. Kato Y, Suzuki S, Uejima T, **Semba H.**, ... & Yamashita T. (2019) Relationship between age and maximal heart rate in atrial fibrillation. *European Journal of Preventive Cardiology*, 2047487318823109.
7. Suzuki S, Yamashita T, Sakama T, Arita T, Yagi N, Otsuka T, **Semba H.**, ... & Yajima J. (2019) Comparison of risk models for mortality and cardiovascular events between machine learning and conventional logistic regression analysis. *PLoS ONE*, 14(9): e0221911.
8. Arai R, Kano H, Suzuki S, **Semba H.**, ... & Yamashita T. (2019) Myocardial bridging is an independent predictor of positive spasm provocation testing by intracoronary ergonovine injections: a retrospective observational study. *Heart and Vessels*, 1-13.
9. Kumagai A, Shimizu K, Kurata R, Cui X, Isagawa T, Harada M, Nagai J, Yoshida Y, Ozaki K, Takeda N, **Semba H.**, Yonezawa T. (2019) Establishment of Novel Cells Stably Secreting Various Human IL-18 Recombinant Proteins. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 20(1), 47-55.
10. Arai R, Suzuki S, **Semba H.**, ... & Yamashita T. (2018) The predictive role of E/e' on ischemic stroke and atrial fibrillation in Japanese patients without atrial fibrillation. *Journal of Cardiology*, 72.1: 33-41.
11. Kato Y, Suzuki S, Uejima T, **Semba H.**, Yamashita T. (2018) Variable prognostic value of blood pressure response to exercise. *Journal of Cardiology*, 71.1: 31-35.
12. Numao Y, Suzuki S, Kano H, Yajima J, Oikawa Y, Matsuno S, Arita T, Yagi N, **Semba H.**, ... & Yamashita T. (2018) Eleven-year temporal trends of clinical characteristics and long-term outcomes in patients undergoing percutaneous coronary intervention for acute coronary syndrome in the Shinken database. *Heart and Vessels*, pp1-9.
13. Kato Y, Suzuki S, Uejima T, **Semba H.**, ... & Yamashita T. (2018) Relationship between the

prognostic value of ventilatory efficiency and age in patients with heart failure. *European Journal of Preventive Cardiology*, 25.7: 731-739.

14. Arai R, Suzuki S, Semba H, ... & Yamashita T. (2018) The predictive role of E/e' on ischemic stroke and atrial fibrillation in Japanese patients without atrial fibrillation. *Journal of Cardiology*, 72.1: 33-41.

15. Aihara K, Kato Y, Suzuki S, Arita T, Yagi N, Semba H, ... & Yamashita T. (2018) Prognostic value of the heart rate profile during exercise in patients with atrial fibrillation. *European Journal of Preventive Cardiology*, 25.15: 1634-1641.

16. Kato Y, Suzuki S, Uejima T, Semba H, Yamashita T. (2018) Variable prognostic value of blood pressure response to exercise. *Journal of Cardiology*, 71.1: 31-35.

加齢性心機能低下・心不全の病態解明と新規治療法開発

<研究の概要>

現代の高齢化社会において、心不全患者に高齢者の占める割合は高く今後益々増加が予想されるにもかかわらず、これまで施行されてきた多くの心不全の臨床試験において高齢者が除外基準とされており、高齢者の心不全についての臨床特性に不明な点が多いということが問題となっている。特に、比較的新たな概念である加齢性の心臓拡張機能の低下、加齢性左室収縮能保持性心不全については、現在有効性が証明された治療法は皆無である。高齢者は一般的に 65 歳以上と定義されるが、同定義による高齢者群はヘテロな集団である。現在急速に進行している高齢化から、高齢者の中でもさらに高年齢の、例えば 85 歳以上の超高齢者の割合は上昇傾向である。したがって、加齢性左室収縮能保持性心不全の中でも年齢による病態の相違は重要な研究テーマである。加齢性の心臓拡張機能の低下、加齢性左室収縮能保持性心不全の治療へとつながる病態解明には個々の症例に対する掘り下げた詳細な検討が必要不可欠と考えられる。一方、基礎研究においてはエピジェネティクスの分野で microRNAs (miRNAs) と心不全の関連が注目されているものの、未だ不明な点も多い。また、幹細胞研究の分野は進歩が著しいものの急性心不全に対する臨床応用には至っていない。

本研究では、加齢性の心臓拡張機能の低下から発症すると考えられている加齢性左室収縮能保持性心不全を 65-84 歳群と 85 歳以上の超高齢者群に分け、臨床像を詳細に解析した。その結果、85 歳以上の超高齢者群は全体の 42%と多くを占め、65-84 歳群と比べて臨床特性に重要な差違が認められた。85 歳以上の超高齢者群は 65-84 歳群と比べて心不全入院の既往率、入院時の血漿 B-type natriuretic peptide 値が有意に高いことからよりリスクが高いことが示唆され、院内死亡率も高かったことから高リスクが確認された。加齢性左室収縮能保持性心不全の病態には合併症の関与の重要性が指摘されているが、2 群の比較では 65-84 歳群で脂質異常症、糖尿病、冠動脈疾患の合併率および喫煙率が高く、85 歳以上の超高齢者群では高血圧症の合併率が高かったことから、両群の加齢性左室収縮能保持性心不全の病態の差違が示唆された。さらに、30 日以内の院内予後規定因子の 2 群間の比較では、慢性閉塞性肺疾患の合併が 85 歳以上の超高齢者群でのみ有意な院内予後規定因子となるという興味深い結果が得られ、加齢性左室収縮能保持性心不全における合併肺疾患の予後への影響が年齢とともに増す可能性が示唆された。

また、研究が進歩しているものの未だ実用化には達していない間葉系幹細胞治療と加齢性心不全との関連についての調査研究、ならびに今後の間葉系幹細胞治療の発展に寄与すると期待されている miRNA 研究と間葉系幹細胞治療との関連についての調査研究を施行した結果、加齢による全身性炎症からフレイル、加齢性心不全へとつながる一連の流れに間葉系幹細胞の治療効果が期待できることが示された。さらに、miRNA 修飾による間葉系幹細胞のパラクライン治療効果を改善させる研究が進んでいることから、現在安全性についてはほぼ確立されたものの治療効果が不十分な点が問題とされている間葉系幹細胞治療の進歩が予想され、未だ有効な治療法の無い加齢性左室収縮能保持性心不全に対する将来の治療として間葉系幹細胞治療の発展が考えられた。

研究報告

I 研究目的

現代の高齢化社会において、心不全患者に高齢者の占める割合は高く今後益々増加が予想されるにもかかわらず、これまで施行されてきた多くの心不全の臨床試験において高齢者が除外基準とされており、高齢者の心不全についての臨床特性に不明な点が多いということが問題となっている。特に、比較的新たな概念である加齢性の心臓拡張機能の低下、加齢性左室収縮能保持性心不全については、現在有効性が証明された治療法は皆無である。救急外来での初期診療においては病態の迅速かつ的確な評価が必要なため、非侵襲的に血行動態を把握する Nohria/Stevenson 分類や初回収縮期血圧による患者層別化が提唱され、急性心不全の治療戦略に重要な役割を果たしてきた。しかし、急性心不全では救急外来で激しい呼吸困難を呈している患者に無作為化比較試験を実施することは現実的に困難であり、十分なエビデンスに基づいた治療法の確立は難しい可能性が指摘されている。加齢性の心臓拡張機能の低下、加齢性左室収縮能保持性心不全の治療へとつながる病態解明には個々の症例に対する掘り下げた詳細な検討が必要不可欠と考えられる。

高齢者は一般的に 65 歳以上と定義されるが、同定義による高齢者群はヘテロな集団である。現在急速に進行している高齢化から、高齢者の中でもさらに高年齢の、例えば 85 歳以上の超高齢者の割合は上昇傾向である。したがって、加齢性左室収縮能保持性心不全の中でも年齢による病態の相違は重要な研究テーマである。また、高齢者は合併症が多いことでも知られており、加齢性左室収縮能保持性心不全において高血圧症、肥満、糖尿病、慢性閉塞性肺疾患等の合併症が心不全の病態に関与していることも知られているが、未だ十分な研究はなされていない。

一方、基礎研究においてはエピジェネティクスの分野で microRNAs (miRNAs) と心不全の関連が注目されているものの、未だ不明な点も多い。また、幹細胞研究の分野は進歩が著しいものの急性心不全に対する臨床応用には至っていない。

本研究は、加齢性の心臓拡張機能の低下から発症すると考えられている加齢性左室収縮能保持性心不全の詳細な臨床像を 65-84 歳群と 85 歳以上の超高齢者群に分けて解析し、両群を比較検討することを目的とした。加えて、加齢性左室収縮能保持性心不全における 65-84 歳群と 85 歳以上の超高齢者群の院内予後規定因子の相違についても比較検討することを目的とした。さらに、研究が進歩しているものの未だ実用化には達していない間葉系幹細胞治療と加齢性心不全との関連、および今後の間葉系幹細胞治療の発展に寄与すると期待されている miRNA 研究と間葉系幹細胞治療との関連についても調査研究を施行することを目的とした。

II 研究計画及び材料と方法

(1) 加齢性左室収縮能保持性心不全における 65-84 歳群と 85 歳以上の超高齢者群の臨床像の相違についての研究

東京都 CCU 連絡協議会との多施設共同研究により、2012～2015 年の期間に入院となった 65 歳以上の高齢者急性心不全症例のうち、維持透析例と急性冠症候群例を除き入院中の心エコーによる左室駆出率が解析可能で左室駆出率 $\geq 50\%$ と確認された連続 4,305 例の加齢性左室収縮能保持性心不全を 65-84 歳群と 85 歳以上群の 2 群に分け、臨床像を比較検討した。連続変数は Shapiro-Wilk test により正規性の検定を施行した。正規分布に従わない変数は中央値と四分位範囲で表示し、Mann-Whitney U test を用いて 65-84 歳群と 85 歳以上群の比較を行った。カテゴリ変数はパーセントで表示し、期待度数 5 未満のセルの割合に応じてカイ二乗検定もしくは Fisher exact test を用いて 2 群間の比較を行った。 Kaplan-Meier 生存曲線とログランク検定により、65-84 歳群と 85 歳以上群の 30 日以内の院内予後を比較検討した。 $P < 0.05$ を統計学的有意と判定した。

(2) 加齢性左室収縮能保持性心不全における 65-84 歳群と 85 歳以上の超高齢者群の院内予後規定因子の相違についての研究

(1) のコホートの各群において、30 日以内の院内死亡に対する単変量 Cox 回帰分析で $P < 0.10$ となる因子を 30 日以内の院内予後を規定する候補因子として抽出した。同候補因子に対して変数増加法多変量 Cox 回帰分析を施行し、 $P < 0.05$ の因子を有意な院内予後規定因子として同定した。65-84 歳群と 85 歳以上群の院内予後規定因子を比較検討した。

(3) 加齢性心不全と間葉系幹細胞治療との関連および miRNAs と間葉系幹細胞治療との関連についての調査研究

研究が進歩しているものの未だ実用化には達していない間葉系幹細胞治療と加齢性心不全との関連について調査研究を施行した。さらに、今後の間葉系幹細胞治療の発展に寄与すると期待されている miRNA 研究と間葉系幹細胞治療との関連について調査研究を施行した。

III 研究成果

(1) 加齢性左室収縮能保持性心不全における 65-84 歳群と 85 歳以上の超高齢者群の臨床像の相違

全 4305 例の加齢性左室収縮能保持性心不全において、65-84 歳群は 2,495 例で 58% を占め、85 歳以上の超高齢者群は 1,810 例で全体の 42% であった¹⁾。85 歳以上の超高齢者群は 65-84 歳群と比べ、心不全入院の既往、高血圧症の有病率、入院時の血漿 B-type natriuretic peptide (BNP) 値が有意に高かった (表 1)。一方、85 歳以上の超高齢者群では男性の割合、脂質異常症、糖尿病、冠動脈疾患、喫煙率が 65-84 歳群よりも有意に低かった。さらに、85 歳以上の超高齢者群では body mass index (BMI)、入院時の心拍数、白血球数、血中ヘモグロビン値も 65-84 歳群と比べて低いという結果であった。なお、心房細動・粗動、慢性閉塞性肺疾患、入院時の収縮期血圧、血清クレアチニン値、血清 C-reactive protein 値、左室駆出率は両群で有意差を認めなかった (表 1)。

表 1 患者背景

Variable	All patients (n = 4305)	HFpEF patients aged ≥85 (n = 1810)	HFpEF patients aged 65-84 (n = 2495)	P value	Missing data for all patients (aged ≥85, aged 65-84)
Age, y	83 (77-88)	89 (87-92)	78 (73-82)	<.001	0
Male, %	41	30	48	<.001	0
Body mass index, kg/m ²	21.6 (19.0-24.2)	20.6 (18.3-23.2)	22.3 (19.6-25.0)	<.001	459 (253, 206)
Prior HF hospitalization, %	30	33	28	<.001	0
Atrial fibrillation/Flutter, %	46	48	45	.143	97 (41, 56)
Hypertension, %	66	68	65	.018	0
Hyperlipidemia, %	22	19	25	<.001	0
Diabetes mellitus, %	28	21	34	<.001	0
Coronary artery disease, %	18	16	19	.034	0
COPD, %	7	7	8	.208	200 (95, 105)
Smoking, %	26	19	32	<.001	283 (104, 179)
Systolic blood pressure, mm Hg	147 (124-173)	147 (125-172)	146 (123-174)	.973	61 (27, 34)
Heart rate, bpm	90 (74-110)	89 (72-107)	90 (75-110)	.006	99 (45, 54)
White blood cells, × 10 ⁹ /L	7.8 (5.8-10.4)	7.3 (5.5-9.7)	8.1 (6.0-10.9)	<.001	83 (49, 34)
Hemoglobin, g/L	111 (96-125)	109 (95-121)	113 (97-129)	<.001	28 (15, 13)
Creatinine, μmol/L	90 (67-133)	90 (67-131)	89 (67-133)	.669	36 (17, 19)
C-reactive protein, mg/L	7 (2-28)	7 (2-27)	8 (2-29)	.744	111 (43, 68)
B-type natriuretic peptide, ng/L	530 (275-908)	573 (300-942)	504 (258-875)	.001	1,191 (473, 718)
Left ventricular ejection fraction, %	60 (55-67)	60 (55-67)	60 (55-66)	.096	0

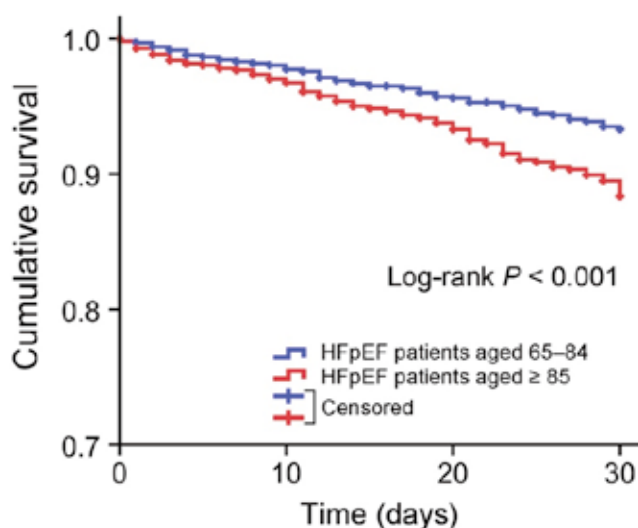
Data are given as the median (interquartile range) or as percentages. The P values are for comparisons between HFpEF patients aged 85 and older and those aged 65 to 84 years.

Abbreviations: COPD, chronic obstructive pulmonary disease; HF, heart failure; HFpEF, heart failure with preserved ejection fraction.

(Matsushita et al. J Am Geriatr Soc. 67. 2123-2128. 2019. John Wiley & Sons, Inc. より, 許諾を得て一部改変し転載)

解析対象全症例の 30 日以内の院内死亡率は 5.2%であった。図 1 に示すとおり、85 歳以上の超高齢者群は 65-84 歳群と比べて有意に院内死亡率が高かった (log-rank, $P < 0.001$)¹。

図 1 65-84 歳群と 85 歳以上の超高齢者群のカプランマイヤー生存曲線



Abbreviation: HFpEF, heart failure with preserved ejection fraction.

(Matsushita et al. J Am Geriatr Soc. 67. 2123-2128. 2019. John Wiley & Sons, Inc. より, 許諾を得て一部改変し転載)

(2) 加齢性左室収縮能保持性心不全における 65-84 歳群と 85 歳以上の超高齢者群の院内予後規定因子の相違

85歳以上の超高齢者群では、単変量 Cox 回帰分析の結果、年齢 ($P = 0.019$)、男性 ($P = 0.044$)、BMI 低値 ($P = 0.091$)、心不全入院の既往 ($P = 0.034$)、非糖尿病 ($P = 0.024$)、慢性閉塞性肺疾患合併 ($P = 0.043$)、入院時収縮期血圧低値 ($P < 0.001$)、心拍数高値 ($P = 0.042$)、血清クレアチニン高値 ($P = 0.001$)、白血球数高値 ($P = 0.006$)、血清 C-reactive protein 高値 ($P < 0.001$) が 30 日以内の院内予後を規定する候補因子であった (表 2) ¹。

表 2 30 日以内の院内死亡に対する単変量 Cox 回帰分析

Variable	HFpEF patients aged ≥ 85		HFpEF patients aged 65-84	
	HR (95% CI)	P value	HR (95% CI)	P value
Age	1.06 (1.01-1.11)	.019	1.04 (.997-1.08)	.069
Male	1.45 (1.01-2.09)	.044	1.26 (.851-1.87)	.249
Body mass index	.954 (.903-1.01)	.091	.927 (.878-.978)	.005
Prior HF hospitalization	1.47 (1.03-2.11)	.034	1.14 (.745-1.74)	.549
Atrial fibrillation/flutter	1.11 (.775-1.59)	.570	.994 (.666-1.49)	.978
Hypertension	.791 (.549-1.14)	.209	.610 (.412-.903)	.014
Hyperlipidemia	.695 (.416-1.16)	.163	.736 (.447-1.21)	.230
Diabetes mellitus	.537 (.313-.923)	.024	1.11 (.739-1.67)	.612
Coronary artery disease	.869 (.527-1.43)	.583	1.18 (.722-1.93)	.509
COPD	1.78 (1.02-3.12)	.043	1.09 (.547-2.16)	.813
Smoking	1.32 (.862-2.01)	.202	1.07 (.701-1.64)	.748
Systolic blood pressure	.987 (.982-.993)	<.001	.984 (.978-.990)	<.001
Heart rate	1.01 (1.00-1.01)	.042	.995 (.988-1.00)	.189
Creatinine	1.30 (1.12-1.51)	.001	1.18 (1.06-1.31)	.002
White blood cell	1.00 (1.00-1.00)	.006	1.00 (1.00-1.00)	.055
Hemoglobin	.954 (.871-1.05)	.315	.944 (.869-1.03)	.175
C-reactive protein	1.05 (1.03-1.08)	<.001	1.03 (1.00-1.06)	.030
B-type natriuretic peptide	1.00 (1.00-1.00)	.729	1.00 (1.00-1.00)	.278
Left ventricular ejection fraction	1.00 (.981-1.02)	.836	1.00 (.978-1.03)	.923

Abbreviations: CI, confidence interval; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; HF, heart failure; HFpEF, heart failure with preserved ejection fraction; HR, hazard ratio.

(Matsushita et al. J Am Geriatr Soc. 67. 2123-2128. 2019. John Wiley & Sons, Inc. より, 許諾を得て一部改変し転載)

同候補因子に対して変数増加法多変量 Cox 回帰分析を施行した結果、入院時収縮期血圧低値 (ハザード比 0.988; 95%信頼区間 0.981-0.995; $P < 0.001$)、血清クレアチニン高値 (ハザード比 1.34; 95%信頼区間 1.13-1.58; $P = 0.001$)、慢性閉塞性肺疾患合併 (ハザード比 2.01; 95%信頼区間 1.06-3.80; $P = 0.032$) が有意な院内予後規定因子であった (表 3)。

表 3 85 歳以上の超高齢者群における 30 日以内の院内予後危険因子

Variable	HR (95% CI)	P value
Systolic blood pressure	.988 (.981-.995)	<.001
Creatinine	1.34 (1.13-1.58)	.001
COPD	2.01 (1.06-3.80)	.032

Multivariate Cox regression analysis with forward selection (likelihood ratio) was conducted in HFpEF patients aged ≥ 85 years. Significant risk factors were defined as those variables for which $P < .05$.

Abbreviations: CI, confidence interval; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; HFpEF, heart failure with preserved ejection fraction; HR, hazard ratio.

(Matsushita et al. J Am Geriatr Soc. 67. 2123-2128. 2019. John Wiley & Sons, Inc. より, 許諾を得て一部改変し転載)

65-84 歳群では、単変量 Cox 回帰分析の結果、単変量 Cox 回帰分析の結果、年齢 ($P = 0.069$)、BMI 低値 ($P = 0.005$)、非高血圧 ($P = 0.014$)、入院時収縮期血圧低値 ($P < 0.001$)、血清クレアチニン高値 ($P = 0.002$)、白血球数高値 ($P = 0.055$)、血清 C-reactive protein 高値 ($P = 0.030$) が 30 日以内の院内予後を規定する候補因子であった (表 2)。同候補因子に対して変数増加法多変量 Cox 回帰分析を施行した結果、入院時収縮期血圧低値 (ハザード比 0.987; 95%信頼区間 0.980-0.993; $P < 0.001$) と BMI 低値 (ハザード比 0.935; 95%信頼区間 0.885-0.988; $P = 0.016$) が有意な院内予後規定因子であった (表 4) ¹。

表 4 65-84 歳群における 30 日以内の院内予後危険因子

Variable	HR (95% CI)	P value
Systolic blood pressure	.987 (.980-.993)	<.001
Body mass index	.935 (.885-.988)	.016

Multivariate Cox regression analysis with forward selection (likelihood ratio) was conducted in HFpEF patients aged 65 to 84 years. Significant risk factors were defined as those variables for which $P < .05$.

Abbreviations: CI, confidence interval; HFpEF, heart failure with preserved ejection fraction; HR, hazard ratio.

(Matsushita et al. J Am Geriatr Soc. 67. 2123-2128. 2019.

John Wiley & Sons, Inc. より, 許諾を得て一部改変し転載)

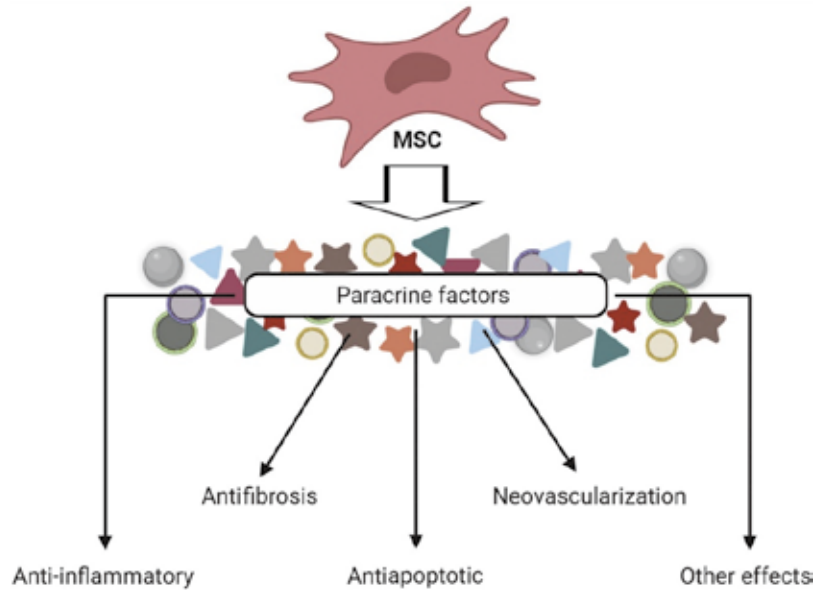
(3) 加齢性心不全と間葉系幹細胞治療との関連および miRNAs と間葉系幹細胞治療との関連についての調査

特異的な臓器疾患を有さなくても加齢は全身性炎症を惹起する方向へ誘導する²。炎症は加齢によるフレイル (虚弱: frailty) に重要な役割を果たしており、加齢性心不全とフレイルには密接な関連があると考えられる。米国で施行された加齢性のフレイルに対する間葉系幹細胞治療の第 II 相試験では間葉系幹細胞の経静脈投与が身体活動度と炎症性マーカーを有意に改善したと報告された。加齢に伴い内因性の幹細胞産生および機能は低下することが知られているが、間葉系幹細胞治療によるフレイルおよび加齢性心不全の改善効果が提唱されてきている²。

現在、加齢性心不全を含めた心血管疾患の病態生理におけるエピジェネティクスの役割が重要と考えられている。特に、DNA メチル化やヒストン修飾といったエピジェネティクスの古典的な制御機構に加えて miRNA 修飾が注目され、miRNA 修飾による間葉系幹細胞の治療改善効果が報告されている。例えば、miRNA-126 (miR-126) はもともと内皮細胞における血管新生の制御因子として知られていたが、miR-126 を高発現させた間葉系幹細胞は低酸素環境下で vascular endothelial growth factor や basic fibroblast growth factor 等の血管新生因子の発現を亢進させ、マウスの急性心筋梗塞のモデルに投与すると虚血心筋における血管新生を増強させると報告された。また、心不全患者の心臓組織において高発現である miRNA-34 (miR-34) は幹細胞に対して悪影響であるが、miR-34 family members (miR-34a, -34b, -34c) の抑制は大動脈弓結紮によるマウスの圧負荷モデルにおいて血管新生を亢進し、心筋線維化を抑制して心機能改善と肺うっ血の軽減をもたらすことも報告された。間葉系幹細胞投与による治療効果の主要な機序は、投与された細胞自体の分化増殖ではなく、その細胞から産生される増殖因子やサイトカインなどを介するパラクライン

作用によると考えられている (図 2)。

図 2 間葉系幹細胞のパラクライン作用

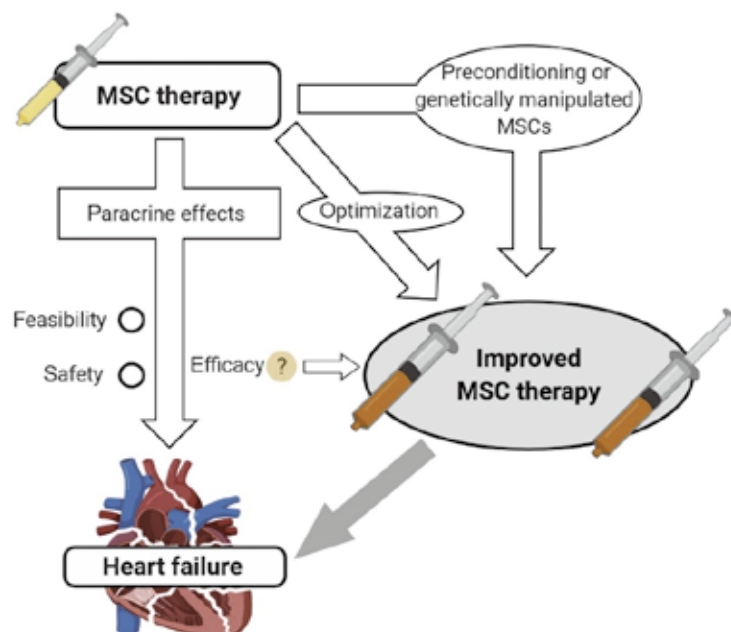


Abbreviation: MSC, mesenchymal stem cell.

(Matsushita. Trends Mol Med. 26. 369-379. 2020. Elsevier より, 許諾を得て一部改変し転載)

心不全に対する間葉系幹細胞治療は安全性についてはほぼ確立されたものの、治療効果が不十分な点が問題である (図 3)。

図 3 心機能低下・心不全に対する間葉系幹細胞治療 — 現在の概要および将来の展望



Abbreviation: MSC, mesenchymal stem cell.

(Matsushita. Trends Mol Med. 26. 369-379. 2020. Elsevier より, 許諾を得て一部改変し転載)

治療効果改善のためにはさらなる進歩が必要であり、間葉系幹細胞治療における miRNA 研究は未解明な点も多いものの、今後の発展が期待される分野と考えられた²。

IV 考察

本研究により、加齢性の心臓拡張機能の低下から発症すると考えられている加齢性左室収縮能保持性心不全の臨床像と院内予後規定因子が、65-84 歳群と 85 歳以上の超高齢者群で異なることが明らかとなった。特に、慢性閉塞性肺疾患の合併は 85 歳以上の超高齢者群でのみ有意な院内予後規定因子であり、加齢性左室収縮能保持性心不全における合併肺疾患の予後への影響が年齢とともに増す可能性が示唆された。

高齢者の心不全において大きな割合を占めるのが左室収縮能保持性心不全であるが、その病態は未解明であり、多くの研究が施行されているものの未だ予後の改善は認められていない。高齢者群の中でも年齢の上昇に伴い左室収縮能保持性心不全の割合が増えることが知られており、超高齢者における同病態の重要性が指摘されている。しかしながら、多くの臨床試験では高齢者、特に超高齢者は除外基準に含まれることが多く、高齢者・超高齢者の客観的データは不足しているのが現状である。本研究では、加齢性左室収縮能保持性心不全において 85 歳以上の超高齢者群は全体の 42%と多くを占め、65-84 歳群と比べて臨床特性に重要な差違が認められた。85 歳以上の超高齢者群は 65-84 歳群と比べて心不全入院の既往率、入院時の血漿 BNP 値が有意に高いことからよりリスクが高いことが示唆され、院内死亡率も高かったことから高リスクが確認された。加齢性左室収縮能保持性心不全の病態には合併症の関与の重要性が指摘されているが、2 群の比較では 65-84 歳群で脂質異常症、糖尿病、冠動脈疾患の合併率および喫煙率が高く、85 歳以上の超高齢者群では高血圧症の合併率が高かったことから、両群の加齢性左室収縮能保持性心不全の病態の差違が示唆された。

慢性閉塞性肺疾患は左室収縮能保持性心不全と同様に高齢者で発症率の高い疾患である。高齢者における心疾患と肺疾患の連関は注目されてきており、加齢性左室収縮能保持性心不全で肺機能低下やガス交換障害が報告されたことから、加齢性左室収縮能保持性心不全患者における肺疾患治療も提唱され、その効果が期待されている。慢性閉塞性肺疾患と左室収縮能保持性心不全はいずれも高齢者で罹患率・死亡率が高く、生活の質を下げることからそれぞれ研究が進められているが、高齢者の予後における両疾患の関連をテーマとした研究は少なく、不明な点が多い。慢性閉塞性肺疾患が新たな心血管リスク因子と考えられるようになった一方で、一般心不全患者において慢性閉塞性肺疾患が独立した予後規定因子となるかについては議論が分かれている。心不全における慢性閉塞性肺疾患と死亡率の関連を示した研究と、関連性を認めなかった研究が混在しており、結論はでていない。しかし、心不全、特に左室収縮能保持性心不全の患者群は非常にヘテロな集団であり、患者背景・病態の差違から、各研究の結果の解釈には十分な注意が必要である。本研究では、85 歳以上の超高齢者群では前者の研究と一致した結果であり、65-84 歳群では後者の研究と同様の結果であった。慢性閉塞性肺疾患と左室収縮能保持性心不全の関係は、局所性因子と全身性因子の両者の影響を受けている複雑な機序が考えられ、さらにその複雑な機序の中に年齢の影響を受けるものがあることも十分に考えられる。本研究の結果からは、

慢性閉塞性肺疾患は加齢性左室収縮能保持性心不全において年齢とともに予後への影響が増す可能性が考えられた。慢性閉塞性肺疾患と加齢性左室収縮能保持性心不全との関係は重要だが未解明な点が多く、今後さらなる研究が必要と考えられる。

今回の調査研究により、間葉系幹細胞のパラクライン作用による心不全治療の研究が進歩していること、加齢による全身性炎症からフレイル、加齢性心不全へとつながる一連の流れに間葉系幹細胞の治療効果が期待できることが示された。さらに、miRNA 修飾による間葉系幹細胞の治療改善効果の研究が進んでいることから、現在安全性についてはほぼ確立されたものの治療効果が不十分な点が問題とされている間葉系幹細胞治療の進歩が予想され、未だ有効な治療法の無い加齢性左室収縮能保持性心不全に対する将来の治療として間葉系幹細胞治療の発展が考えられた。

謝辞

本研究の遂行にあたり、ご支援を賜りました公益財団法人車両競技公益資金記念財団に感謝致します。

V 研究成果の発表

1. Matsushita K, Harada K, Miyazaki T, Miyamoto T, Kohsaka S, Iida K, Yamamoto Y, Nagatomo Y, Yoshino H, Yamamoto T, Nagao K, Takayama M. Younger- vs Older-Old Patients with Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. J Am Geriatr Soc. 2019; 67 (10): 2123 - 2128. doi: 10.1111/jgs.16050.
2. Matsushita K. Heart Failure and Adipose Mesenchymal Stem Cells. Trends Mol Med. 2020; 26 (4): 369 - 379. doi: 10.1016/j.molmed.2020.01.003.

心臓利尿ペプチドの断片化に基づく動脈硬化機序の解明とその臨床応用

《研究の概要》

冠動脈狭窄症の治療として年間 20 万件以上実施されている心臓カテーテル治療では約 1 割の症例において、施術後の約半年以内に再狭窄が生じることが、治療上の限界となっている。B 型ナトリウム利尿ペプチド (BNP) は負荷のかかった心臓から分泌されるホルモンであり、心不全のバイオマーカーとして広く臨床で用いられている。しかし、虚血性心疾患の診断における有用性は未知数である。近年、末梢血中にはプロセッシングを受けた複数の BNP フラグメントが存在することが報告された。最近、我々は質量分析技術を用いて BNP フラグメントを特異的に検出する方法を確立し、その比 (BNP(5-32)/BNP(3-32)) は再狭窄の有無を診断する有用なバイオマーカーとなる可能性を明らかにした。

本研究では、我々が開発した「質量分析技術を用いた冠動脈狭窄症の血液検査法」の臨床的有用性を検証した。自治医科大学附属病院において心臓カテーテル治療を受けて約 6 ヶ月経過した時点でカテーテルによる冠動脈造影の再検査を受ける予定の患者を対象に、本バイオマーカーを測定し、再狭窄の存在および予測についての診断性能の横断および縦断研究を行った。具体的には、カテーテルを実施する際のハイリスク (カテーテルによる血管障害の既往、腎機能障害、放射線皮膚炎等) 患者を対象に本診断法 (血液検査法) を実施し、カテーテル検査に代用可能か否かを明らかにする。特異抗体を用いて血液中の血管特異的タンパク質 BNP ならびにそのプロセッシング産物を濃縮し、質量分析計で特定のプロセッシング産物を検出、その比 (BNP(5-32)/BNP(3-32)) を算出する方法を用いて分析した。その結果、対象とした患者について再狭窄群と非狭窄群の両群において、通常の臨床検査における BNP 値はほぼ同じ値を示したにもかかわらず、本方法による分析では、冠動脈治療後の再狭窄の有無に応じて、検出された BNP フラグメントのシグナル強度比が異なっていた。再狭窄が生じていた患者 22 検体においては、その中央値が 1.19 (四分位範囲、1.11-1.34) であり、一方、再狭窄を生じていなかった患者 83 検体では、その中央値が 1.43 (同、1.22-1.61、 $p=0.001$) と、有意な高値を示した。また、薬物溶出性冠動脈ステントの薬物ごとに、BNP のプロセッシングを評価した。BNP のプロセッシングの抑制が高いステント開存率と相関していることが明らかになった。

冠動脈カテーテル治療後の再狭窄の診断において、心臓カテーテル検査を受ける必要性について、低侵襲な血液検査で容易に検出可能となり、身体への負担 (カテーテルによる血管障害の既往、腎機能障害、放射線皮膚炎等) を回避可能な新しい低侵襲の検査方法となることが期待される。

共同研究者の氏名、所属機関名

- ・鈴木 亨 レスター大学医学部
- ・今井 靖 自治医科大学医学部
- ・藤田 大司 自治医科大学医学部

研究報告

I 研究目的

虚血性心疾患の治療として心臓カテーテル治療は年間 20 万件以上実施されている。しかし、その後の約 1 割の症例において、施術後半年以内に再狭窄が生じることが、今なおその治療上の限界である。再狭窄を予知する方法がないため、治療半年後に検査目的で、再度心臓カテーテル検査を実施し再狭窄の有無を評価する必要があるが、安全性また医療費の面からも血液検査等の代替法の開発が急務である。B 型ナトリウム利尿ペプチド (BNP) は負荷のかかった心臓から分泌されるホルモンであり、心不全のバイオマーカーとして広く臨床で用いられている^{1,2}。しかし、虚血性心疾患における診断における有用性は明らかではない^{3,4}。近年、末梢血中にはプロセッシングを受けた BNP が存在することが海外から報告されてきている (図 1)⁵⁻⁷。我々は質量分析技術を用いて BNP フラグメントを特異的に検出する方法 (後述するイムノマス法) を確立し、そのフラグメント比 (BNP (5-32)/BNP (3-32)) は再狭窄の有無を診断する有用なバイオマーカーとなる可能性を示した (図 2)。そこで、我々はこのプロセッシングを受けた BNP が心臓カテーテル治療後の再狭窄を診断するのに有用であるという仮説を立てた。

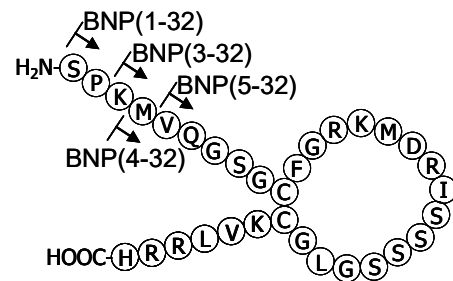


図 1) BNP の分子構造と N 末端プロセッシング

本研究では我々が開発した質量分析技術を用いた開発中の次世代型新規心疾患バイオマーカーの開発を目的とし、その臨床的有用性を検討した。具体的には、血液中の血管特異的タンパク質 BNP ならびにその産物 (複数のプロセッシング産物が存在する) を特異抗体で選択的に濃縮し、質量分析計で特定のプロセッシング産物を検出する方法 (イムノマス法) を用いて、虚血性心疾患等の心血管疾患の早期診

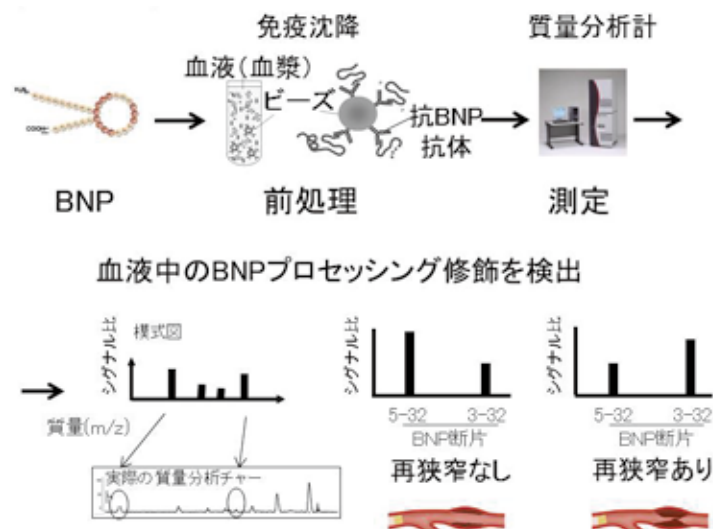


図 2) 開発した免疫沈降と質量分析を用いた測定原理 (イムノマス法)

断のためのバイオツールの開発を目指す。診断バイオマーカーとしての有用性に関する予備検討は実施済みである。質量分析計を用いた血管特異的タンパク質のプロセッシング産物を測定する系はすでに開発済みであり、特許も出願済みである（PCT/JP2008/65444、血液試料を用いて心筋虚血を評価する方法）。具体的には、特異抗体を用いて血液中の血管特異的タンパク質 BNP ならびにそのプロセッシング産物を濃縮し、質量分析計で特定のプロセッシング産物を検出する方法（イムノマス法）である（図2）。本方法により臨床検体（血液）を分析した結果、本来の分子形態である 32 アミノ酸からなる BNP 以外に、それとは異なる 3 種類の BNP（N 末端のアミノ酸が 2、3、4 個プロセスされた分子形態）を検出した。その異なった分子形態の BNP が冠動脈狭窄、特に心臓カテーテル治療後の再狭窄診断の新しいバイオマーカーとしての有用性を検討する。

II 研究計画及び材料と方法

心臓カテーテル検査を受ける予定の患者全員に対し、医師が本研究について説明した。このうち同意の得られた患者から、心臓カテーテル検査時に、カテーテルシースからカテーテル挿入前に血液採取した（図3）。採血後の採血管は速やかに氷上、もしくは4度冷蔵庫にて保存した。採血後6時間以内に血漿分離を行い、分析を行うまでマイナス80度超低温冷凍庫にて保存した。その血液（血漿）から磁気ビーズと BNP 抗体により BNP を分離濃縮し、溶出後、質量分析を行った。磁気ビーズから溶出した全量を質量分析用 MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization (マトリックス支援レーザー脱離イオン化法)) ターゲットプレートに滴下した。風乾後、すみやかに MALDI-TOF MS (Time of Flight Mass Spectrometry (飛行時間型質量分析法)) 型質量分析計 (AXIMA-Confidence, 島津製作所) を用いて分析を行った。また、全症例について患者情報のデータマイニングを行い、カテーテル検査による冠動脈狭窄および治療デバイスの使用状況、内服治療薬の処方状況プロファイルを得た。統計解析には JMP ver. 14.2 (SAS 社) を用いた。

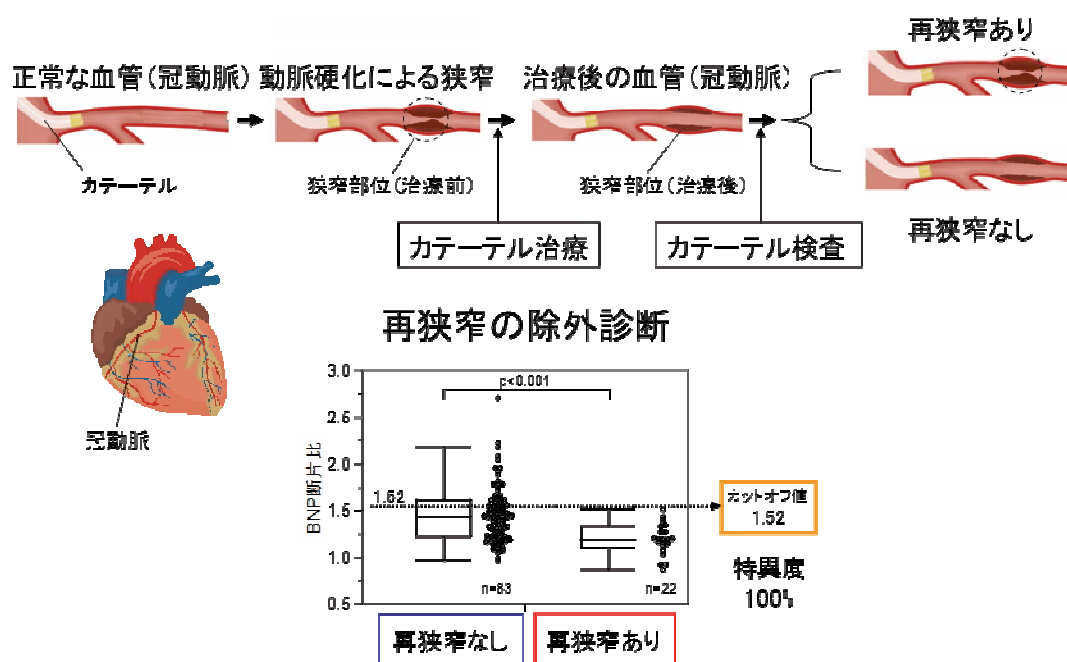


図3) 本研究の流れ。カテーテル検査ないし治療と採血のタイミング

III 研究成果

冠動脈治療後の確認造影検査を受けた患者から、その造影検査時に血液を採取した。その血液から抗体により BNP を分離濃縮し、溶出後、質量分析を行った。対象とした患者について再狭窄群 (Restenosis) と非狭窄群 (No restenosis) の臨床背景比較を行った結果、両群において有意な差は認められなかった (表 1)。

Characteristics	Factors Associated with Restenosis (Cross-sectional Study)			p Value*
	Total (n = 105)	No-stenosis (n = 83)	Restenosis (n = 22)	
Age, yrs	70 (63–76)	71 (63–77)	69 (66–72)	0.41
Male gender	66 (63)	55 (66)	11 (50)	0.21
Coexisting conditions				
Hypertension	90 (86)	73 (88)	17 (77)	0.30
Diabetes mellitus	65 (62)	52 (63)	13 (59)	0.81
Smoking	71 (68)	56 (67)	15 (68)	1.00
Laboratory values				
Total BNP, pg/mL	51.9 (37.5–83.7)	54.0 (37.5–90.8)	48.1 (31.1–71.3)	0.29
Creatinine, mg/dL	0.83 (0.70–0.94)	0.84 (0.71–0.96)	0.78 (0.65–0.89)	0.15
CRP, mg/L	0.5 (0.3–1.2)	0.5 (0.3–1.2)	0.6 (0.3–1.2)	0.50
Ratio of total cholesterol to HDL cholesterol	3.1 (2.6–3.9)	3.1 (2.5–3.9)	3.1 (2.8–3.8)	0.34
Total cholesterol, mg/dL	170.5 (152.5–190.5)	169.0 (153.9–189.3)	176.0 (149.0–197.0)	0.82
HDL cholesterol, mg/dL	53.2 (44.5–68.6)	53.3 (44.5–68.9)	50.5 (41.5–65.0)	0.63
Triglycerides, mg/dL	134.0 (85.5–184.8)	135.0 (89.0–189.0)	117.0 (77.0–178.5)	0.39
LDL cholesterol, mg/dL	88.5 (78.3–103.5)	87.0 (76.0–102.0)	96.0 (84.0–107.5)	0.09
Systolic blood pressure, mm Hg	128.0 (115.0–140.0)	128.0 (112.8–140.0)	128.0 (116.0–142.0)	0.90
Diastolic blood pressure, mm Hg	68.0 (60.0–78.5)	68.0 (60.0–78.0)	66.0 (58.0–80.0)	0.58
BNP(5–32)/BNP(3–32)	1.35 (1.19–1.55)	1.43 (1.22–1.61)	1.19 (1.11–1.34)	<0.001
%DS by QCA, %	14.43 (10.26–25.54)	12.68 (9.18–17.14)	65.52 (59.22–70.54)	<0.001
Lesion length, mm	17.20 (12.58–22.45)	17.47 (13.42–21.89)	14.02 (11.12–24.83)	0.28
Lipid-lowering agents	84 (77)	65 (78)	19 (86)	0.55
Anti-hypertensive treatment	93 (90)	72 (88)	21 (100)	0.21
Drug-eluting stent	79 (75)	69 (83)	10 (45)	<0.001

表 1) 対象患者の背景比較

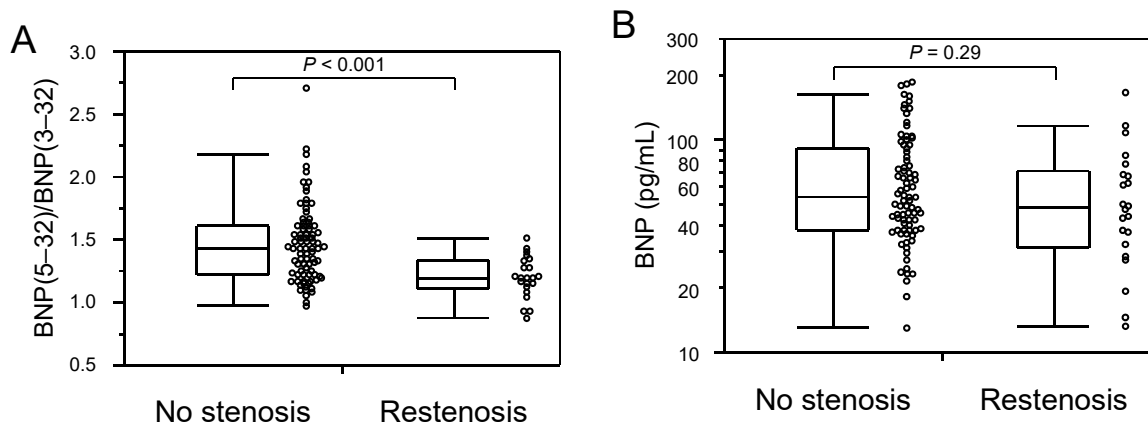


図 4) 再狭窄との相関

再狭窄における BNP (5–32) / BNP (3–32) 比および BNP の全レベル。断面研究における代表的な再狭窄患者 (B) における CAG および BNP (5–32) / BNP (3–32) 比 (A) および BNP の全レベルによって診断された再狭窄との関連性。狭窄なし、n = 83; 再狭窄、n = 22。ボックスは四分位範囲を表し、各ボックスの水平線は中央値を表す。

本方法により分析した結果、通常の臨床検査による BNP 検査でほぼ同じ値になった検体であるにもかかわらず (図 4 B)、その冠動脈治療後の再狭窄の有無に応じて、検出された BNP フラグメントのシグナル強度比が異なっていた (図 4 A)。再狭窄が生じていた患者 22 検体においては、その中央値が 1.19 (四分位範囲、1.11-1.34) であり、一方、再狭窄を生じていなかった患者 83 検体では、その中央値が 1.43 (同、1.22-1.61、 $p=0.001$) であった (表 1)。なお、 $AUC=0.775$ 、カットオフ値=1.41 において、感度=91%、特異度=54%、陽性尤度比=1.99、陰性尤度比=0.17 であった。多変量解析の結果、この比と薬剤溶出型ステントの不使用という因子の 2 つだけが診断にかかわる独立した因子であり、そのオッズ比は 0.63 (95%CI, 0.45-0.83) であった (表 2)。

Variables	Univariate analysis		Multivariate analysis*	
	Odds Ratio (95%CI)	p Value	Odds Ratio (95%CI)	p Value
Age, yrs	0.99 (0.94-1.05)	0.74		
Male gender	0.51 (0.19-1.33)	0.17		
Hypertension	0.47 (0.14-1.65)	0.22		
Diabetes mellitus	0.86 (0.33-2.31)	0.76		
Smoking	1.03 (0.39-2.98)	0.95		
BNP, pg/mL	0.99 (0.98-1.00)	0.23		
Creatinine, mg/dL	0.09 (0.004-1.28)	0.08		
CRP, mg/L	0.99 (0.86-1.08)	0.91		
Ratio of total cholesterol to HDL cholesterol	1.17 (0.69-1.93)	0.55		
Total cholesterol, mg/dL	1.00 (0.98-1.01)	0.53		
HDL cholesterol, mg/dL	0.99 (0.96-1.02)	0.70		
Triglycerides, mg/dL	1.00 (0.99-1.00)	0.26		
LDL cholesterol, mg/dL	1.01 (0.99-1.03)	0.44		
Systolic blood pressure, mm Hg	1.00 (0.97-1.03)	0.90		
Diastolic blood pressure, mm Hg	0.99 (0.95-1.03)	0.65		
BNP(5-32)/BNP(3-32), per 0.1 unit increase	0.60 (0.43-0.78)	<0.001	0.63 (0.45-0.83)	<0.001
Lesion length, mm	0.97 (0.91-1.03)	0.39		
Lipid-lowering agents	1.75 (0.52-8.05)	0.38		
Anti-hypertensive treatment	3.21 (0.57-60.32)	0.21		
Drug-eluting stent not used	5.91 (2.16-16.80)	<0.001	4.20 (1.40-12.99)	0.011

表 2) 再狭窄に関与する臨床的諸因子の検討

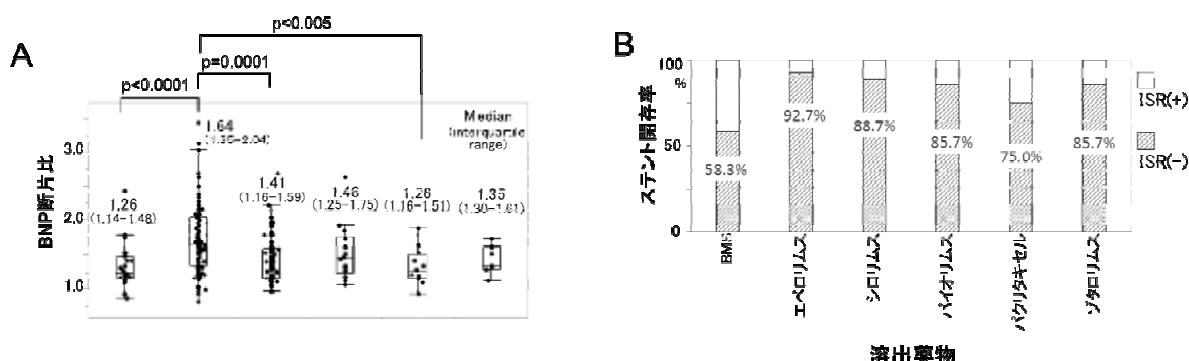


図 5) 薬物溶出性冠動脈ステントと再狭窄との相関

(B) 冠動脈ステント溶出薬物別の BNP のプロセッシング (A) および冠動脈ステント溶出薬物別のステント開存率

さらに、冠動脈治療後の確認造影検査を受けた連続 206 名の患者から、その検査時に血液を採取した。その血液から抗体により BNP を分離濃縮し、溶出後、質量分析を行った。薬物溶出性冠動脈ステントの薬物ごとに、BNP のプロセッシング (BNP5-32 断片比の増加) を評価したところ、金属ステントのみ (BMS) と比較し、エベロリムス溶出ステントでは BNP のプロセッシングが抑制されており (図 5 A)、ステント開存率も高いことが明らかになった (図 5 B)。同様に他の薬物溶出ステント (シロシリムス、バイオリムスパクリタキセル、ゾタロリムス) においても、BNP のプロセッシングの抑制が高いステント開存率と相関することが明らかになった。

IV 考察

本検査法は冠動脈疾患のバイオマーカー、とりわけ再狭窄の予測マーカーは、冠動脈インターベンション時に再狭窄を発症しそうないわゆるハイリスク症例の特定に役立つ。薬剤溶出ステント全盛期の現在でも、未だ 1 割以上の症例でみられる再狭窄はインターベンション療法の限界の一つであり、診断ならびに予測支援に用いることが可能なバイオマーカーの開発は急務である。現在、酸化 LDL (マロンジアルデヒド修飾)⁸ や Lp(a) が冠動脈疾患の予測バイオマーカーとして保険収載されているが、現状の診断性能では臨床の場ではまだ不十分である。本検査法はそれらと比べて診断確度が高く、画期的といえる。

これまで、臨床で用いられている診断マーカーの測定法は、免疫学的手法であり、感度良く、また再現性良く測定可能である一方、その原理上、抗体を用いるため抗原認識部位が同じである複数の対象物を区別できていないという欠点がある。すなわち、血液中において、目的とする診断マーカーはその成熟体の他に、成熟体になる前の前駆体、また、成熟後にプロセッシングを受けたものや、いわゆる翻訳後修飾されたものが含まれており、これらは場合によって、同じ抗原認識部位を持つと考えられる。これらのさまざまな形状は身体の生理学的な状態、すなわち疾患を反映していると考えられるため、区別して分析できることが望ましいと考えられる。この区別は、質量そのものを分析することで可能になると考えられる。我々の検討においても、これらの区別が診断の向上につながるという知見を得ている。そのため、この区別、すなわち質的变化を測定する質量分析計を用いて、新規な測定法の開発が急務である。

一方、従来、質量分析計は主に基礎研究用として使用されてきた。測定対象物質の質量を直接計測するものであり、これまで測定が困難であった対象物質、特にタンパク質のプロセッシングや翻訳後修飾といった質的变化を測定することが可能となる装置である。この装置としての特徴を活かし、臨床現場において、従来その存在量を測定することが中心であった診断マーカーの質的变化を測定する計測法を開発する点が独創的と考えられる。

さらに、薬物溶出性冠動脈ステントの薬物ごとに、BNP のプロセッシングを評価した結果、BNP のプロセッシングの抑制が、高いステント開存率と相関していることが明らかになった。このことから、BNP のプロセッシングを司るペプチダーゼを同定し、その反応を抑制することが可能であれば、冠動脈ステント治療後再狭窄を抑制することが可能になると考えられる。

また、BNPのプロセッシングと急性心不全後のイベント予測の相関をみた研究では、BNPの分子形(特にBNP5-32)が予後予測に有用であることも明らかになった⁹⁾。

今後、薬剤感受性の有無についてのメカニズムに迫り、他の病態への適応拡大に繋がる期待もあり、臨床への貢献はさらに大きくなるものと期待している。

なお、2020年8月末にノバルティスファーマと大塚製薬は慢性心不全治療薬アンジオテンシン受容体ネプリライシン阻害薬(ARNI)のエンレスト®錠を発売し、注目を集めている。エンレストはネプリライシン(NEP)阻害薬とバルサルタンの機能部位を1:1のモル比で含む単一の結晶複合体である(図6)。既にヨーロッパにおける大規模臨床試験(PARADIGM HF)で心血管死または心不全による入院を20%も低下させたことで期待されているが、そのメカニズムは十分に明らかでない¹⁰⁾。NEP阻害剤はBNPの分解を抑制することで心保護作用を発揮すると想定されている。現在のBNP診断薬はBNPフラグメントを全て検出するため、NEP阻害剤によりBNPは高値を示す。このため、現在臨床検査で用いられているBNP値は心不全のバイオマーカーとして役に立たない。BNPフラグメントパターンを検出可能な本分析系を用いることにより、エンレスト投与下で増加し、心保護作用を有するBNPフラグメントを同定することが可能である。エンレスト導入患者で断片BNP(5-32)が薬効評価マーカーになる可能性がある。このように、BNP(5-32)の臨床的需要も非常に高まっており、本研究手法がエンレストの薬効評価に有用である可能性があり、将来の臨床応用が期待される。

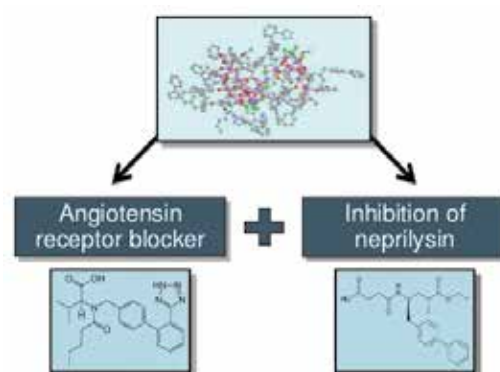


図6) エンレストの構造と機能

参考文献

1. Levin ER, Gardner DG, Samson WK. Natriuretic peptides. *N Engl J Med.* 1998;339(5):321-328.
2. Suzuki T, Yamazaki T, Yazaki Y. The role of the natriuretic peptides in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res.* 2001;51(3):489-494.
3. Sabatine MS, Morrow DA, de Lemos JA, et al. Acute changes in circulating natriuretic peptide levels in relation to myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44(10):1988-1995.
4. Morrow DA, de Lemos JA, Sabatine MS, et al. Evaluation of B-type natriuretic peptide for risk assessment in unstable angina/non-ST-elevation myocardial infarction: B-type natriuretic peptide and prognosis in TACTICS-TIMI 18. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41(8):1264-1272.
5. Semenov AG, Tamm NN, Seferian KR, et al. Processing of pro-B-type natriuretic peptide: furin and corin as candidate convertases. *Clin Chem.* 2010;56(7):1166-1176.
6. Niederkofler EE, Kiernan UA, O'Rear J, et al. Detection of endogenous B-type

- natriuretic peptide at very low concentrations in patients with heart failure. *Circ Heart Fail.* 2008;1(4):258-264.
7. Brandt I, Lambeir AM, Ketelslegers JM, Vanderheyden M, Scharpe S, De Meester I. Dipeptidyl-peptidase IV converts intact B-type natriuretic peptide into its des-SerPro form. *Clin Chem.* 2006;52(1):82-87.
 8. Suzuki T, Kohno H, Hasegawa A, et al. Diagnostic implications of circulating oxidized low density lipoprotein levels as a biochemical risk marker of coronary artery disease. *Clin Biochem.* 2002;35(5):347-353.
 9. Suzuki T, Israr MZ, Heaney LM, Takaoka M, Squire IB, Ng LL. Prognostic Role of Molecular Forms of B-Type Natriuretic Peptide in Acute Heart Failure. *Clin Chem.* 2017;63(4):880-886.
 10. McMurray JJ, Packer M, Desai AS, et al. Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure. *N Engl J Med.* 2014;371:993-1004.

V 研究成果の発表

1. Yazaki Y*, Aizawa K*, Israr M*, Negishi N, Salzano A, Saitoh Y, Kimura N, Kono K, Heaney L, Cassambai S, Bernieh D, Lai F, Imai Y, Kario K, Nagai R, Ng L, Suzuki T. Ethnic differences in association of outcomes with trimethylamine N-oxide in acute heart failure patients. *ESC Heart Fail.* 2020; 7: 2373-2378.
(* equal first)
2. Tomida S, Aizawa K, Nishida N, Aoki H, Imai Y, Nagai R, Suzuki T. Indomethacin prevents aortic dissection and rupture by inhibiting macrophage accumulation in the aorta. *Scientific Reports.* 2019;9:10751.
3. Fujita D, Preiss L, Aizawa K, Asch F, Eagle K, Suzuki T. Circulating interleukin-6 (IL-6) levels are associated with aortic dimensions in genetic aortic conditions. *PLoS One* 2019;14(3):e0214084.
4. Nagano T, Ushijima K, Taga N, Takeuchi M, Kawada M, Aizawa K, Imai Y, Fujimura A. Influence of aldehyde dehydrogenase 2 polymorphism on the vasodilatory effect of nitroglycerin in infants with congenital heart disease and pulmonary arterial hypertension. *European Journal of Clinical Pharmacology.* 2019;75(10):1361-1367.
5. Mizushina Y, Karasawa T, Aizawa K, Kimura H, Watanabe S, Kamata R, Komada T, Mato N, Kasahara T, Koyama S, Bando M, Hagiwara K, Takahashi M. Inflammasome-independent and atypical processing of IL-1 β contributes to acid aspiration-induced acute lung injury. *J Immunol.* 2019;203(1):236-246.

心不全における心腎連関の病態解明とその制御

《研究の概要》

本研究は、心不全および心腎機能障害進展における古典的神経体液性システムおよび新規因子の関与およびクロストークを心腎脳ネットワークの観点より検討し、その修飾による新規治療の可能性を探る目的にて行われた。これまでに古典的な神経体液性因子システムとしての交感神経系、バゾプレッシン系、新規因子としての線維芽細胞増殖因子 23 (FGF23) および microRNA(miR)-33 が心不全の進展に重要な役割を果たしていることを報告、見出していることをもとにして、1) 交感神経系、バゾプレッシン系の寄与する心腎脳連関の解析、2) 線維化促進因子としての FGF23 を介する心腎連関の解析、3) miR-33 を介した心腎脳連関の解析の 3 つの課題を中心として、心不全における心腎連関および心腎脳連関からの更なる病態解明、心腎連関の分子制御に基づく新たな治療法の開発に繋げる研究を目指した。

モデル動物を用いた心不全および心機能障害における心腎脳連関の解析より、バゾプレッシン系は心腎両臓器において、V1a, V1b, V2 受容体を介して異なる役割を果たし、腎臓交感神経切除術による交感神経活性化の修飾が相加的効果をもたらすことが明らかになった。また FGF23 は、慢性腎臓病において何らかの要因で心臓にストレス生じた時、心筋の線維化を促進する要因となることが示され、血清リンの調節だけでなく、線維化を促進させる心腎関連因子としての役割が示された。更に、miR-33b ノックインマウスの心臓に圧負荷をかけた時、心臓の線維化が増悪するとともに、更なる交感神経系の活性化および腎機能の悪化が生じることが明らかになった。miR-33 を介した心腎脳連関が存在するという新しいメカニズムを明らかにした。

今回、心不全および心腎機能障害進展における古典的神経体液性システムおよび新規因子の関与およびクロストークが心腎脳ネットワークの観点よりあきらかになり、その修飾による新規治療の可能性が示唆された。今後、これらの相互連関および更なるメカニズムの解明を推進し、新規治療法へ展開を目指していく必要がある。

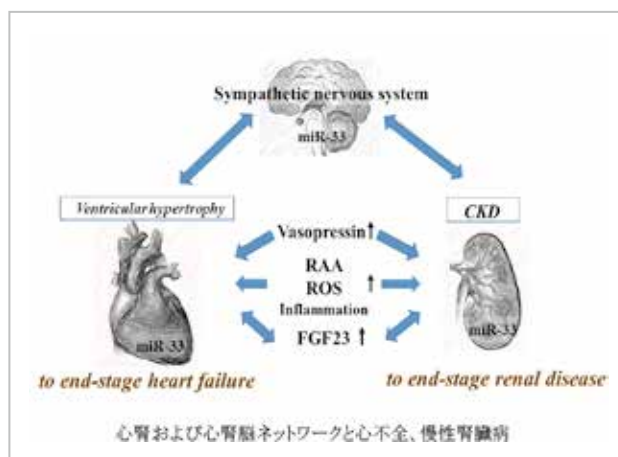
共同研究者の氏名・所属機関
南沢 享 東京慈恵会医科大学
尾野 亘 京都大学大学院医学研究科

研究報告

I 研究目的

我が国では著しい高齢化の進展により、高齢者関連疾患である心不全おは急増しており、医療上のみならず社会経済上も喫緊の課題となっている。心不全とは、心機能障害に起因する全身の臓器障害を伴う症候群であり、他臓器との密接な関わりがその発症および病態進展に強く関与する。近年その中でも、心不全と腎臓病の強い連関(心腎連関)が臨床的に明らかになり、その点をターゲットとした治療戦略が求められているが、現状で成功しているとは言えない。多因子が複雑に関連して病態を形成していると考えられ多くの不明な点が残されており、かつ新規因子の探求も必要な状況である。

本研究は、心不全および心腎機能障害進展における古典的神経体液性システムおよび新規因子の関与およびクロストークを心腎脳ネットワークの観点より検討し、その修飾による新規治療の可能性を探る目的にて行われた。研究者らは古典的な神経体液性因子システムとしての交感神経、バゾプレッシン系(岩永ら)、新規因子としての線維芽細胞増殖因子23(FGF23)(南沢ら)およびmicroRNA(miR)-33(尾野ら)が重要な役割を果たしていることを報告、見出ししており、1)交感神経系、バゾプレッシン系の寄与する心腎連関の解析、2)線維化促進因子としてのFGF23を介する心腎連関の解析、3)miR-33を介した心腎連関の解析の3つの課題を中心とし



て、心不全における心腎連関および心腎脳連関からの更なる病態解明、心腎連関の分子制御に基づく新たな治療法の開発に繋げる研究を目指した。

II 研究計画及び材料と方法

岩永 善高 交感神経系、バゾプレッシン系の寄与する心腎連関の解析

1. マウス敗血症性心腎障害モデルにおける腎臓交感神経切除施行

1) LPS (5mg/kg) を腹腔内投与しマウス敗血症性心腎障害モデルを作成した。心エコーによる心機能の経時的変化とともに、7日間の survival を追跡した。Wild type マウスおよびV1a 受容体欠損マウス、V1b 受容体欠損マウスにおいて比較検討した。

2) Wild type マウスおよび V1a 受容体欠損マウスにおいて、10% phenol を用いて化学的腎臓交感神経切除を両側性に施行した。その 2 週間後に LPS を投与し、同様に心機能および survival の追跡を行った。腎障害に関しては、組織学的および KIM-1 を用いて検討を行った。

2. マウス大動脈縮窄心不全モデルおよびアンジオテンシン持続投与モデルにおける腎障害の検討

1) V1a 受容体および V1b 受容体ノックアウトマウスにおいて、マウス大動脈縮窄心不全モデルおよびアンジオテンシン持続投与モデルを作成し、心機能障害進行および心不全発症の検討を行った。同時に、腎臓機能および組織障害の検討も行った。マウス大動脈縮窄心不全モデルの V1a 受容体ノックアウトマウスに V2 受容体拮抗薬を併用を行う、両受容体の遮断効果も検討した。

2) アンジオテンシン持続投与モデルにおける腎臓交感神経切除効果を、V1a 受容体ノックアウトマウスにおいて検討した。同様に、心機能障害進行および心不全発症の検討を行った。同時に、腎臓機能および組織障害の検討を行った。

南沢 享 線維化促進因子としての FGF23 を介する心腎連関の解析

1. ラット心筋組織での FGF23 発現

1) 右心室圧負荷モデルラットの FGF23 及び FGF23 受容体の発現変化

6週齢のオスの Sprague-Dawley(SD) ラットに対して、肺動脈絞扼術を施行して、右室圧負荷モデルを作成した。対照手術群のラットと比較して、線維化の有無、FGF23 や FGF23 受容体の mRNA 発現変化を RT-PCR 法を用いて調べた。

2) ラット心筋組織における FGF23 と FGF23 受容体の mRNA 発現

6週齢のオスの SD ラットの心室筋から心筋細胞と心筋線維芽細胞を分離して、それぞれの細胞での FGF23 と FGF23 受容体の mRNA 発現を RT-PCR 法を用いて調べた。

2. FGF23 のラット心筋線維芽細胞活性化へ影響

6週齢のオスの SD ラットの心室筋から心筋線維芽細胞を分離培養し、リコンビナント FGF23 (R&D Systems) を作用させ、線維芽細胞の活性化を検討した。さらに心筋線維芽細胞を活性化させることが既に分かっている TGF- β 1 (PeproTech) に対する FGF23 の影響を検討した。

3. FGF23 過剰発現マウスの作成と組織線維化への影響

FGF23 が心臓・腎臓における線維化促進因子であることを in vivo 実験系で検証するため、われわれは CMV プロモーター下流に flox 配列-マウス由来 FGF23cDNA-flox 配列を繋げたトランスジェニックマウス(flox-FGF23TG)を作成した。この flox-FGF23TG マウスに α MHC プロモーター下流に Cre リコンビナーゼを配列したトランスジェニックマウス(CreTG)を掛け合わせて心臓特異的に FGF23 を発現するコンディショナル過剰発現マウスを作出した。このマウスを利用して、心臓特異的に FGF23 を過剰発現させ、組織線維化や心機能への影響を観察した。

尾野 亘 圧負荷の際に生じる miR-33 を介した心腎連関の解析

miR-33b ノックインマウスの心臓に圧負荷をかけると、心臓の線維化が悪化するとともに、更なる交感神経系の活性化および腎機能の悪化が生じることを見出した。

今回、圧負荷の際に生じる miR-33 を介した心腎連関について、下記のような検討を行うとともに、治療応用を見据えた核酸医薬の効果についても検討することとした。

1. miR-33b ノックインマウスと対照マウスにおいて、圧負荷前後の交感神経系での c-Fos 染色の違いを比較する。心臓への圧負荷モデルは8週齢のオスのマウスにおいて、大動脈弓での血管の縮窄によって作成した。圧負荷 3 日後、1 週間において脊髄の中間外側細胞核 (IML) を制御する延髄淡蒼縫線核吻側部 (rRPa) での c-Fos 染色陽性細胞数を検討した。
2. miR-33b^{flox/flox} ノックインマウス (既に作成済み) と DBH-Cre マウス (導入済み) を交配し、圧負荷での腎機能、腎臓組織変化を解析する。交感神経系でのみ miR-33b が働かないマウスを作成するために、上記 2 系統のマウスを交配した。脳、脊髄での miR-33b の発現を調べたところ、視床下部で有意に miR-33b が低下しており、目的とするマウスが作成できたことを確認した。採血や腎臓組織での腎機能の変化を検討する。
3. miR-33a/b 特異的人工核酸の生体での効果を解析し、脳へのドラッグデリバリーシステム (Drug delivery system; DDS) を開発する。架橋型人工核酸を用いて、miR-33a と miR-33b を特異的に抑制することのできる anti-miR-oligonucleotide (AMO) を作成した。それぞれの特異性と効果を検討し、脳への投与方法を検討する。

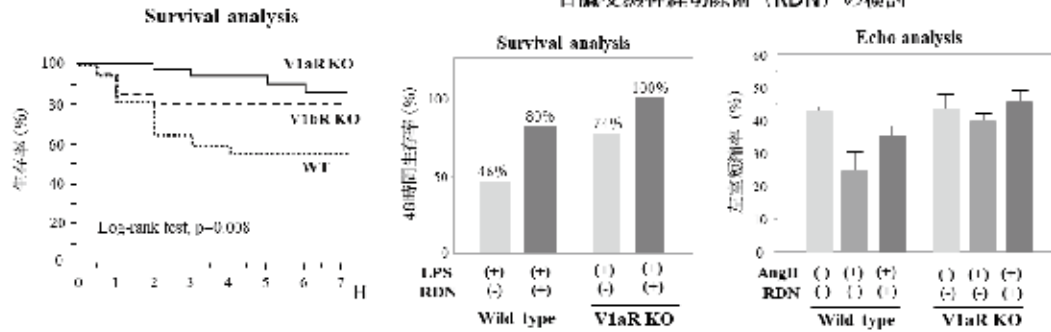
III 研究成果

岩永 善高

1. マウス敗血症性心腎障害モデルにおける交感神経活性化

マウス敗血症性心腎障害モデルに、腎臓交感神経切除を施行し、心機能障害の発現および生命予後が改善されることが明らかになった。同時に V1a 受容体ノックアウトマウスにおいては、敗血症時の心機能障害は抑制され、生命予後は改善された。ただし V1b 受容体ノックアウトマウスにおいては、敗血症時の有意な心機能障害は抑制および生命予後の改善は認めなかった。更にはバゾプレッシン V1a 受容体ノックアウトマウスにおける腎臓交感神経切除術の施行により、更なる心機能改善および生命予後改善が認められた。心筋内の交感神経活性化の抑制と炎症性シグナルの活性化の抑制を伴った。ただし、マウス敗血症性心腎障害モデルにおける腎臓交感神経切除施行により、腎臓のカテコラミン量の抑制はみとめられたものの、腎機能および腎臓組織障害の有意な改善は伴わなかった。

LPS投与敗血症心腎障害モデル



腎臓交感神経切除術 (RDN) の検討

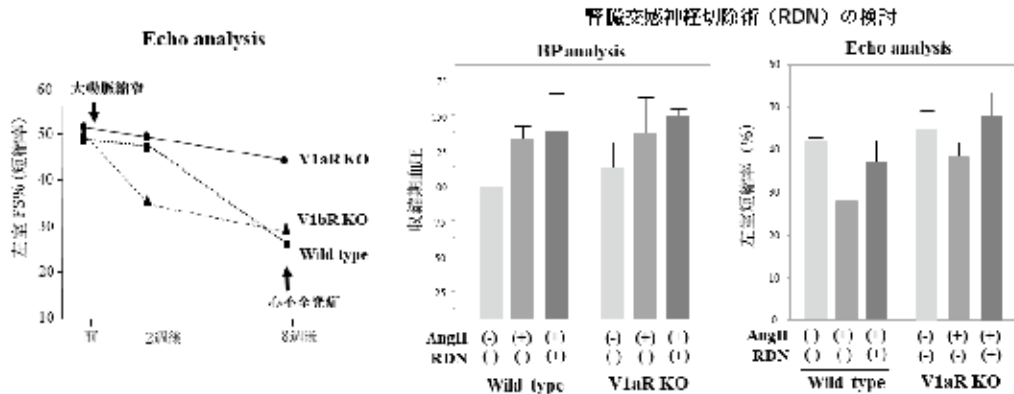
2. マウス大動脈縮窄心不全モデルおよびアンジオテンシン持続投与モデルにおけるバゾプレッシン受容体と心腎障害の関係

マウス大動脈縮窄心不全モデルにおいて、V1a 受容体ノックアウトマウスでは心機能障害進行および心不全発症は抑制されていたが、腎障害に関しては差異を認めなかった。腎臓集合管にのみ作用する V2 受容体拮抗薬を併用した実験では、心不全発症抑制に対する相加効果を認めた。V1b 受容体ノックアウトマウスでは、逆に心機能障害および心筋線維化の促進が認められた。

アンジオテンシン持続投与モデルにおいては、V1a 受容体ノックアウトマウスにおいては、同様の線維化抑制、心機能低下抑制が認められた。腎臓交感神経切除術の施行により、ワイルドタイプ、V1a 受容体ノックアウトマウス共に、心機能低下抑制効果、心筋保護効果を得ることができた。ただし、腎障害の抑制効果については検証予定である。

大動脈縮窄モデル

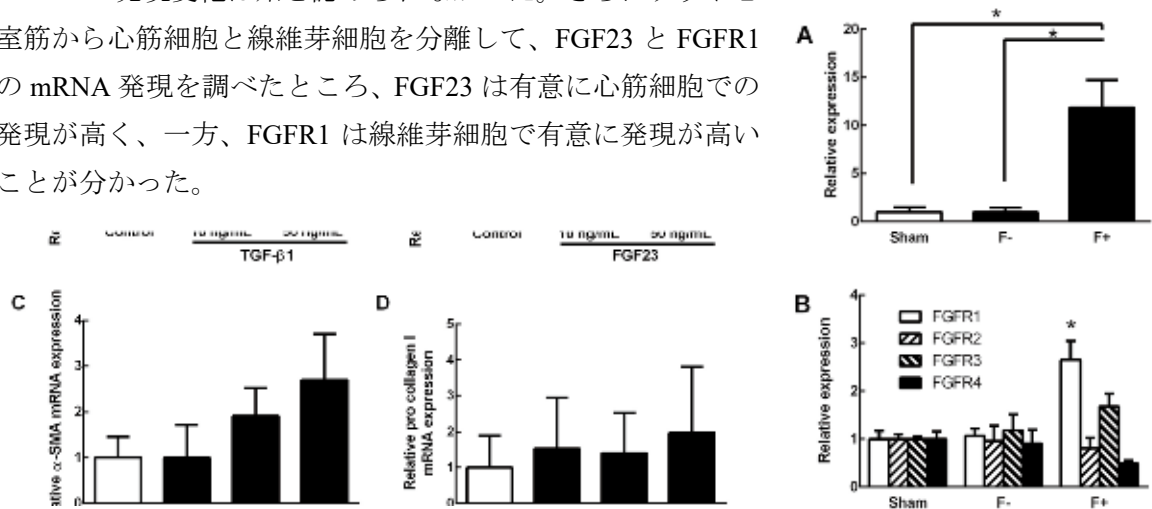
アンジオテンシン (AngII) 持続投与モデル



南沢 享

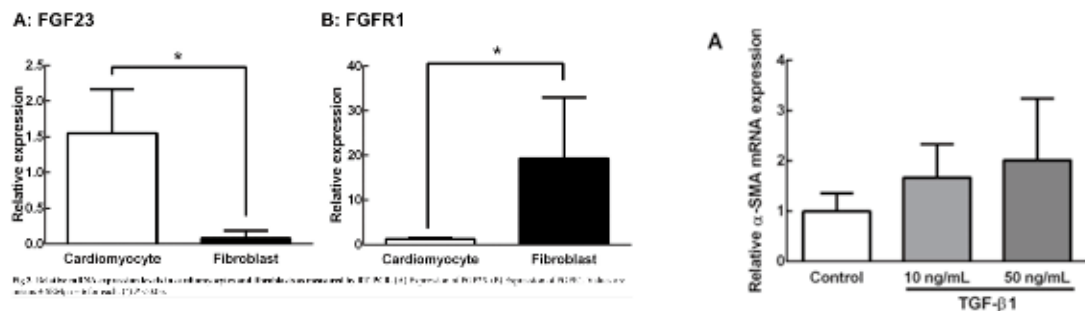
1. ラット心筋組織での FGF23 発現

肺動脈絞扼術を施行した Sprague-Dawley (SD) ラットの右心室乳頭筋組織は、心筋肥大が進行し線維化が著しく進行した群 (線維化群) と心筋肥大が進行しているが線維化を認めないか、軽度の群 (非線維化群) に大別された。線維化群では FGF23 及び FGFR1 の mRNA 発現が、対照手術群や非線維化群よりも有意に増加していた (図)。しかし、FGF23 の腎臓での受容体である Klotho の発現変化は殆ど認められなかった。さらにラット心室筋から心筋細胞と線維芽細胞を分離して、FGF23 と FGFR1 の mRNA 発現を調べたところ、FGF23 は有意に心筋細胞での発現が高く、一方、FGFR1 は線維芽細胞で有意に発現が高いことが分かった。



2. FGF23 のラット心筋線維芽細胞活性化へ影響

ラット心筋線維芽細胞にリコンビナント FGF23 を 50ng/mL 濃度まで増加させても、線維芽細胞の α -smooth muscle actin (α -SMA) の発現は変化せず、線維芽細胞の活性化は認められなかった。しかし、TGF- β 1 と FGF23 を同時に作用させると、FGF23 は TGF- β 1 による線維芽細胞の α -SMA 発現をさらに上昇させ、活性化を増強した。この FGF23 による TGF- β 1 誘導性の線維芽細胞の活性化は、FGFR1 阻害薬 SU5402 や FGFR1 への siRNA の添加によって抑制された。



3. FGF23 過剰発現マウスの作成と組織線維化への影響

flox-FGF23TG マウスに CreTG を掛け合わせて心臓特異的に FGF23 を発現するコンディショナル過剰発現マウスを2系統、作出した。これらのマウスの心室筋では、FGF23mRNA が対照

群と比較して、約 400 倍、約 4000 倍、心室筋に過剰発現していた。しかし、心筋組織の線維化の進行や線維化マーカー遺伝子(TGF- β 1、 α -SMA、CTGF など)の発現変化は認めなかった。

尾野 亘

1. miR-33b ノックインマウスと対照マウスにおいて、圧負荷前後の交感神経系での c-Fos 染色の違い

これまでに、miR-33b ノックインマウスにおいては寒冷刺激において、脊髄の中間外側細胞核 (IML) を制御する延髄淡蒼縫線核吻側部 (rRPa) での c-Fos 染色陽性細胞が増加することが分かっている。そこで、今回は圧負荷前後においても同様の変化がないかどうかを検討した。実際、rRPa の c-fos 陽性細胞の数は miR-33b ノックアウトマウスにおいて有意に増加しており、圧負荷後の交感神経流出の活性化が増大していることがわかった。これらの結果から、miR-33b ノックインマウスでは、圧負荷後の交感神経の活動が上昇していることがわかった。また血中カテコラミンの上昇も認めた。

2. DBH-Cre /miR-33b flox/flox ノックインマウスでの、圧負荷後の腎機能、腎臓組織変化の解析

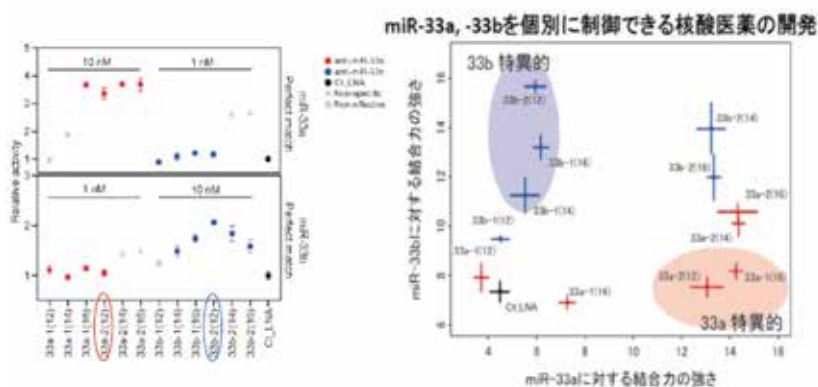
miR-33b flox/flox ノックインマウス (既に作成済み) と DBH-Cre マウス (導入済み) を交配することで、miR-33b が交感神経系で欠損することを確認した。その結果、このマウスにおいては、圧負荷後の交感神経系の活性化が消失することを確認した。圧負荷後には miR-33b ノックインマウスでは血中 Na の上昇を認めたが、DBH-Cre /miR-33b flox/flox ノックインマウスではそのような上昇は無かった。

3. miR-33a/b

特異的人工核酸の生体での効果と、脳へのドラッグデリバリーシステム (Drug delivery system; DDS) の開発

miR-33a および miR-33b のそれ

それを阻害できる 12 種類のオリゴヌクレオチドを設計し(左上)、高濃度(10nM)で有効性が確認できないもの、低濃度(1nM)で特異性が維持できないものを除外する方針でスクリーニングし(上図左)、阻害効率と特異性の高い核酸医薬を選択し、それぞれ anti-miR-33a および anti-miR-33b とした。10mg/kg の濃度において、週に 1 回の皮下注射によって標的遺伝子である ABCA1 の肝臓での増加、さらに血中での HDL-C の増加を認めた。特に anti-miR-33b の効果が高かったことが判明した。髄腔内に注射することで、脳内への投与が可能であることが見いださ



れた。実際、脳での ABCA1 の増加が明らかとなった。

IV 考察

マウス敗血症性心腎障害モデルに、腎臓交感神経切除を施行し、心機能障害の発現および生命予後が改善されることが明らかになった。同時に V1a 受容体および V1b 受容体ノックアウトマウスともに敗血症時の心機能障害は抑制され、生命予後は改善された。さらにはバズプレッシン受容体ノックアウトマウスにおける腎臓交感神経切除術の施行は、更なる心機能改善および生命予後改善をもたらすことも明らかになり、両システムにおいて独立した制御系が存在する可能性が考えられた。本モデルにおいては、腎障害に関しては、有意な差異を認めず、腎障害においては交感神経系の関与は少ないものと考えられた。ただし、本モデルにおいては腎障害のバラツキが大きかったため、別の敗血症モデルにおいて追加実験を行い、検証を計画している。また、マウス大動脈縮窄心不全モデルおよびアンジオテンシン持続投与モデルにおいては、V1a 受容体および V1b 受容体ノックアウトマウスでは心機能障害進行および心不全発症は抑制されていたが、腎障害に関しては差異を認めなかった。また、V1a 受容体ノックアウトマウスに V2 受容体拮抗薬を併用した実験では心不全発症に関して相加効果を認め、腎臓交感神経切除を追加した実験でも心不全発症抑制の相加作用を認めた。腎臓交感神経切除術およびバズプレッシン系の遮断は、心腎脳ネットワークの制御の有用なアプローチである可能性が示唆された。制御メカニズムとして、腎臓での局所交感神経制御にはバズプレッシン系が上流で作用していること、心臓では全身性交感神経過剰反応もまたバズプレッシン系の制御を受け心臓局所の交感神経障害を軽減し、そのことが心機能障害の改善に関与することが明らかになった。

線維化は組織傷害への短期的代償機転として働くが、線維化の進行は心臓での収縮・拡張能を低下させ、腎臓での糸球体・尿細管機能の低下に直結する。線維化は様々な臓器で共通の機序によって促進されると想定されるが、心腎連関において相互の線維化に影響を及ぼす要因の重要性については十分に検討されていない。本研究では圧負荷によって心筋肥大を生じさせた心筋組織において、心肥大は同程度でも心筋線維化の進行する群では、軽症群に比して FGF23 が著しく発現が増加していた。この発現増加は、圧負荷によるストレスによって心筋細胞から FGF23 が分泌されると推定され、それがパラクライン的に心筋線維芽細胞の活性化を促し、線維化を促進させている可能性が考えられた。しかし、培養心筋線維芽細胞を使った実験や FGF23 過剰発現マウスの結果からは、FGF23 は単独では心筋の線維化を進行させる因子とはならないことが判明した。心筋に線維化を促進させる要因(圧負荷や TGF- β 1 の増加など)が生じた際に、FGF23 が線維化を増強させる因子として働くことが推測される。今後、FGF23 過剰発現マウスに対して、心筋へのストレスを加えて、線維化が進行するか否か、検証をする必要がある。なお、慢性腎疾患患者において血中 FGF23 が高値になることが多くみられたため、本研究の結果は、腎機能が悪い患者において何らかの要因で心臓にストレスがかかると、心筋の線維化が促進する要因となる

得ることを示唆しており、血清リンの調節だけでなく、線維化を促進させる心腎関連因子として、FGF23 を捉えてゆく必要があると考えられた。

miR-33b ノックインマウスの心臓に圧負荷をかけると、心臓の線維化が悪化するとともに、更なる交感神経系の活性化および腎機能の悪化が生じることを見出した。miR-33 を介した心臓—脳—腎臓間の連関が存在するという新しいメカニズムを明らかにした。我々はこれまでに、寒冷ストレス下では、脳内の miR-33 が (特に Dbh 陽性ニューロンにおいて)、抑制性 GABA 神経伝達に必要な GABAA 受容体のサブユニットをコードしている Gabrb2 と Gabra4 を抑制することで (GABAA 抑制性ニューロンの伝達を抑制して) 交感神経活動を亢進させることで、褐色脂肪細胞の熱産生と全身代謝の維持に寄与していることを明らかとしてきた。このメカニズムが、心臓への圧負荷においても収縮力の増大や血圧上昇などによって、負荷に対する適応機構として機能している可能性が考えられた。脳内への AMO の投与によって、過剰な適応反応を抑制し、臓器保護を行える可能性がある。

V 研究成果の発表

1. Takase T, Taniguchi M, Hirano Y, Nakazawa G, Miyazaki S, Iwanaga Y. Sex difference in pulmonary hypertension in the evaluation by exercise echocardiography. *Pulm Circ*. 11:1-8, 2021.
2. Okune M, Yasuda M, Soejima N, Kagioka Y, Kakehi K, Kawamura T, Kohei Hanaoka K, Hayato Kaida H, Kazunari Ishi Ki, Gaku Nakazawa G, Miyazaki S, Iwanaga Y. Diagnostic Utility of Fusion 18F-fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography/Cardiac Magnetic Resonance Imaging in Cardiac Sarcoidosis. *J Nucl Cardiol*. 2020 in press.
3. Onishi K, Watanabe H, Kakehi K, Ikeda T, Takase T, Yamaji K, Ueno M, Kobuke K, Nakazawa G, Miyazaki S, Iwanaga Y. Determinants and prognostic implications of instantaneous wave-free ratio in patients with mild to intermediate coronary stenosis: comparison with those of fractional flow reserve. *PLoS ONE*. 15:e0237275, 2020.
4. Kagioka K, Yasuda M, Okune M, Kakehi K, Kawamura T, Kobuke K, Miyazaki S, Iwanaga Y. Right ventricular involvement is an important prognostic factor and risk stratification tool in suspected cardiac sarcoidosis: analysis by cardiac magnetic resonance imaging. *Clin Res Cardiol*. 109:988-998, 2020.
5. Kawamura T, Yasuda M, Okune M, Kakehi K, Kagioka Y, Nakamura T, Miyazaki S, Iwanaga Y. Increased left ventricular trabeculation is associated with increased BNP level and impaired outcomes in non-ischemic cardiomyopathy. *Can J Cardiol*. 36:518-526, 2020.
6. Kishibuchi A, Akaike T, Minamisawa S. Standard-dose gentamicin does not increase risk of patent ductus arteriosus. *Pediatr Neonatol*. 61: 45-50, 2020.
7. Kuga K, Kusakari Y, Uesugi K, Semba K, Urashima T, Akaike T, Minamisawa S. Fibrosis growth factor 23 is a promoting factor for cardiac fibrosis in the presence of transforming growth factor-

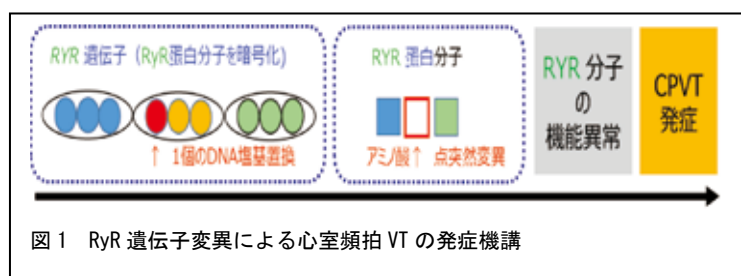
- β1. *PLoS One*. 15:e0231905, 2020.
8. Tanihata J, Fujii T, Baba S, Fujimoto Y, Morimoto S, Minamisawa S. Troponin T amino acid mutation (Δ 210) knock-in mice as a neonatal dilated cardiomyopathy model. *Pediatr Res*. 89: 846-857, 2020.
 9. Liu F, Yao Z, Lü P, Jiao QB, Liu Q, Wu HX, You Y, Minamisawa S. Pathophysiologic role of molecules determining arteriovenous differentiation in adult life. *J Vasc Res*. 57: 245-253, 2020.
 10. Akaike T, Shinjo S, Ohmori E, Kajimura I, Goda N, Minamisawa S. Transcriptional profiles in the chicken ductus arteriosus during hatching. *PLoS One*. 14:e0214139, 2019.
 11. Tanihata J, Nishioka N, Inoue T, Bando K, Minamisawa S. Urinary Titin Is Increased in Patients After Cardiac Surgery. *Front Cardiovasc Med*. 6:7, 2019.
 12. Iwai K, Nagasawa K, Akaike T, Oshima T, Kato T, Minamisawa S. CCN3 Secreted by prostaglandin E2 inhibits intimal cushion formation in the rat ductus arteriosus. *Biochem Biophys Res Commun*. 503:3242-3247, 2018.
 13. Sakuma T, Akaike T, Minamisawa S. Prostaglandin E₂ receptor EP4 inhibition contracts rat ductus arteriosus. *Circ J*. 83:209-216, 2018.
 14. Nakai G, Shimura D, Uesugi K, Kajimura I, Jiao Q, Kusakari Y, Soga T, Goda N, Minamisawa S. Pyruvate dehydrogenase activation precedes the down-regulation of fatty acid oxidation in monocrotaline-induced myocardial toxicity in mice. *Heart Vessels*. 34:545-555, 2018.
 15. Xiong PY, Baba S, Nishioka N, Fujimoto Y, Archer SL, Minamisawa S. Left Atrial Stenosis Induced Pulmonary Venous Arterialization and Group 2 Pulmonary Hypertension in Rat. *J Vis Exp*. 141: e58787, 2018.
 16. Nakamura K, Kojima R, Uchino E, Ono K, Yanagita M, Murashita K, Itoh K, Nakaji S, and Okuno Y. Health improvement framework for actionable treatment planning using a surrogate Bayesian model. *Nature Commun*. 12:3088, 2021.
 17. Horie T, Nakao T, Miyasaka Y, Nishino T, Matsumura S, Nakazeki F, Ide Y, Kimura M, Tsuji S, Ruiz Rodriguez R, Watanabe T, Yamasaki T, Xu S, Otani C, Miyagawa S, Matsushita K, Sowa N, Omori A, Tanaka J, Nishimura C, Nishiga M, Kuwabara Y, Baba O, Watanabe S, Nishi H, Nakashima Y, Picciotto MR, Inoue H, Watanabe D, Nakamura K, Sasaki T, Kimura T, Ono K. MicroRNA-33 maintains adaptive thermogenesis via enhanced sympathetic nerve activity. *Nature Commun*. 12:843, 2021
 18. Ono K, Horie T, Baba O, Kimura M, Tsuji S, Ruiz Rodriguez R, Sawa M, Kimura T. Functional Non-coding RNAs in Vascular Diseases. *FEBS Lett*. 2020 in press.
 19. Kuwabara Y, Tsuji S, Nishiga M, Izuhara M, Ito S, Nagao K, Horie T, Watanabe S, Koyama S, Kiryu H, Nakashima Y, Baba O, Nakao T, Nishino T, Sowa N, Miyasaka Y, Hatani T, Ide Y, Nakazeki F, Kimura M, Yoshida Y, Inada T, Kimura T, Ono K. Lionheart LincRNA alleviates cardiac systolic dysfunction under pressure overload. *Commun Biol*. 3:434, 2020.

20. Kimura M, Horie T, Baba O, Ide Y, Tsuji S, Ruiz Rodriguez R, Watanabe T, Yamasaki T, Otani C, Xu S, Miyasaka Y, Nakashima Y, Kimura T, Ono K. Homeobox A4 suppresses vascular remodeling by repressing YAP/TEAD transcriptional activity. *EMBO Rep.* e48389, 2020.
21. Ide Y, Horie T, Saito N, Watanabe S, Otani C, Miyasaka Y, Kuwabara Y, Nishino T, Nakao T, Nishiga M, Nishi H, Nakashima Y, Nakazeki F, Koyama S, Kimura M, Tsuji S, Rodriguez RR, Xu S, Yamasaki T, Watanabe T, Yamamoto M, Yanagita M, Kimura T, Kakizuka A, Ono K. Cardioprotective Effects of VCP Modulator KUS121 in Murine and Porcine Models of Myocardial Infarction. *JACC Basic Transl Sci.* 4:701-714, 2019.
22. Koyama S, Horie T, Nishino T, Baba O, Sowa N, Miyasaka Y, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M, Nishi H, Nakashima Y, Nakazeki F, Ide Y, Kimura M, Tsuji S, Rodriguez RR, Xu S, Yamasaki T, Otani C, Watanabe T, Nakamura T, Hasegawa K, Kimura T, Ono K. The identification of differential roles of microRNA-33a and -33b during atherosclerosis progression with genetically modified mice. *J Am Heart Assoc.* e012609, 2019.
23. Nakazeki F, Tsuge I, Horie T, Imamura K, Tsukita K, Hotta A, Baba O, Kuwabara Y, Nishino T, Nakao T, Nishiga M, Nishi H, Nakashima Y, Ide Y, Koyama S, Kimura M, Tsuji S, Naitoh M, Suzuki S, Izumi Y, Kawarai T, Kaji R, Kimura T, Inoue H, Ono K. MiR-33a is a therapeutic target in SPG4-related hereditary spastic paraplegia human neurons. *Clin Sci (Lond).* 20133:583-595, 2019
24. Nishino T, Horie T, Baba O, Sowa N, Hanada R, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M, Nishi H, Nakashima Y, Nakazeki F, Ide Y, Koyama S, Kimura M, Nagata M, Yoshida K, Takagi Y, Nakamura T, Hasegawa K, Miyamoto S, Kimura T, Ono K. SREBF1/MicroRNA-33b Axis Exhibits Potent Effect on Unstable Atherosclerotic Plaque Formation In Vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 38:2460-2473, 2018.
25. Baba O, Horie T, Nakao T, Hakuno D, Nakashima Y, Nishi H, Kuwabara Y, Nishiga M, Nishino T, Ide Y, Nakazeki F, Koyama S, Kimura M, Hanada R, Kawahara M, Kimura T, Ono K. MicroRNA 33 Regulates the Population of Peripheral Inflammatory Ly6C(high) Monocytes through Dual Pathways. *Mol Cell Biol.* 38; pii: e00604-17, 2018.

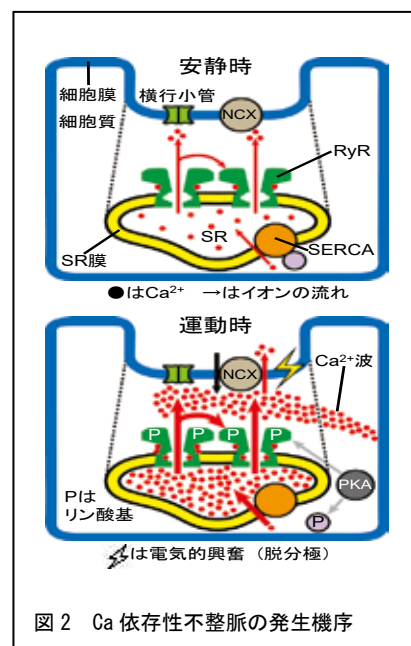
心筋細胞内カルシウム動態の破綻による心疾患の新しい薬物治療

研究の概要

リアノジン受容体 RyR 蛋白分子は、心筋細胞内小器官の小胞体膜に発現し、興奮収縮連関の要として収縮に必須な小胞体貯蔵 Ca イオンを細胞質へリークさせる、生理学的に重要なイオンチャネルである。同チャネルが遺伝子変異等で活性化されると、心筋細胞内カルシウム Ca 動態が破綻し、ヒト患者での致死性心室頻拍 VT 型の Ca 依存性不整脈が起こる (図 1)。筆者らは同不整脈に関する病態生理学的な発生機序 (図 2) を、RyR 分子および RyR 発現培養細胞において明らかにした (Uehara ら 2017)。然しながら、この段階で調べられた不整脈再現系は、非心筋細胞である発現培養細胞レベルに留まっていた。



本研究では第一に、非心筋細胞から歩を進め、動物 (RyR ゲノム編集マウス)、摘出心臓、単離心筋細胞レベルの不整脈再現系を確立し、各レベルで用いる測定技術を確立することを目指した。ヒト心室頻拍発作へ優れた抗不整脈作用を有する有機化合物をマウス単離心臓に投与した時の心筋細胞の膜電位などの光学的イメージングと心電図の同時解析を行った。病態生理学的機序として、電気的興奮伝導速度の低下と房室解離を伴う不整脈が一貫して起こることが判明した。



第二に、RyR 阻害作用を有する不整脈候補薬の開発を目指した。具体的には、RyR を分子標的とする有機化合物群の中から最も優れた抗不整脈薬を開発するために、鋳型のカルベジロール (図 3) から有機化学合成技術を駆使して主鎖や側鎖を様々に修飾した誘導群について、ヒト心室頻拍発作に対する抗不整脈作用が最も優れた化合物を求めて薬理的にスクリーニング検査した。このカルベジロール誘導体の薬理作用は、近年 RyR 分子標的剤として既に臨床の現場で少しずつ使われ始めているフレカイニドのそれと比較し、抗不整脈薬としての優劣を検討した。また、統合計算化学ソフトウェア MOE 解析のシミュレーションを施すことにより、カルベジロール誘導体分子群について、立体構造をモデリングし、RyR 分子とのリガンド結合状態の強さを推定した。

以上の実験から、薬開発に必須な独自の不整脈再現系と測定技術を確立させるとともに、不整脈発生の詳細な発生メカニズムを心臓レベルで解明出来た。また、抗不整脈薬の大規模な最適化に努めた結果、RyR 分子標的剤、抗不整脈薬候補剤としてカルベジロール誘導体が最も優れていると結論付けられた。

共同/協力研究者名

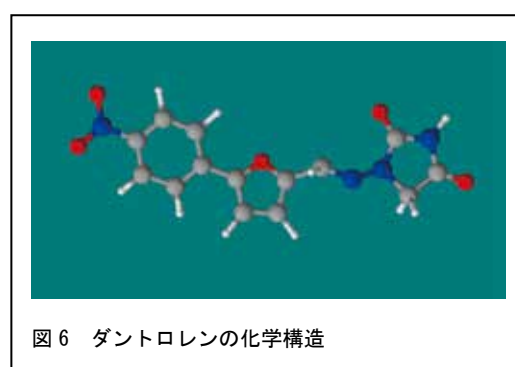
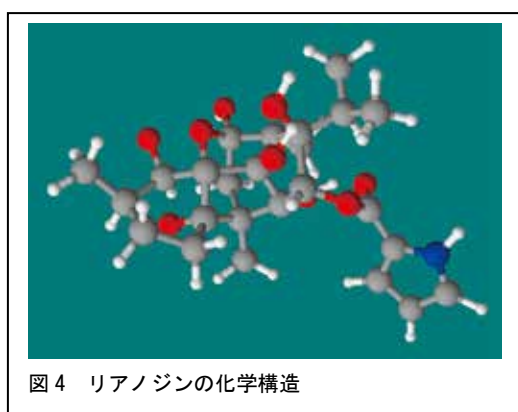
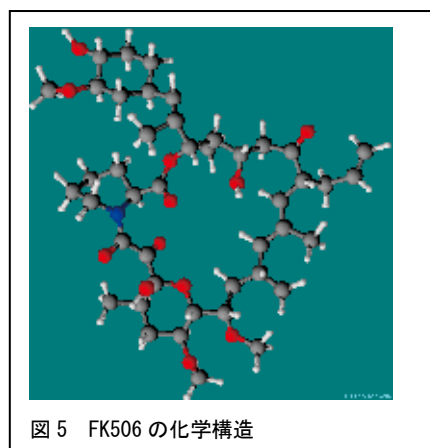
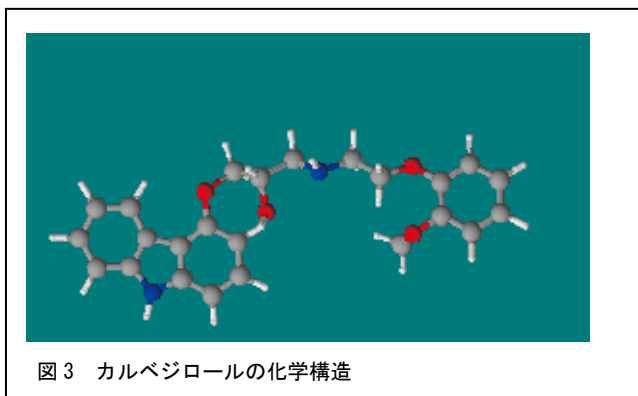
1. Michael Fill
米国 Rush 大学 教授 PhD
研究分担:有機化学合成
2. 高成広起
徳島大学 特任講師 医博
研究分担:膜電位および細胞内 Ca の光学イメージング
3. 藤本 崇弘
京都府立医科大学 病理学 講師 医博
研究分担: RyR 付属タンパク質の遺伝子の改変
ゲノム編集マウスの心臓の組織学的検索
4. 弟子丸正伸
福岡大学 理学部化学 准教授 理博
研究分担: MOE ソフトウェアによる分子動力学計算
5. 入部玄太郎
旭川医科大学 生理学 教授 医博
研究分担: 摘出心臓および単一心筋細胞の伸展

研究報告

I. 研究目的

本研究の第一の目的として、ヒト患者の RyR 変異による Ca 依存性不整脈を、動物（ゲノム編集マウス）、摘出心臓、単離心筋細胞レベルにおいて再現する。それと共に、同再現系における機能測定技術の確立を目指す。また、非心筋細胞の培養細胞において筆者らが提唱した不整脈発生機序を動物、心臓、心筋細胞レベルにおいて検証し、各レベルでの不整脈発生機序をより詳細に探る。

本研究の第二の目的として、RyR の遺伝子変異が原因で起こる Ca 依存性心疾患を抑える選択的な RyR 標的阻害薬を開発する。優れた阻害薬の作製のために、カルベジロール(図 3)、植物アルカロイドのリアノジン(図 4)、FK506(図 5)、ダントロレン(図 6)その他の鑄型有機化合物の線状および環状の炭素骨格に網羅的な構造改変を加えることにより、誘導體群を合成する。また、既存化合物群のライブラリーからも、RyR に強い抑制作用を持つ抵不整脈薬の候補化合物を探索する。



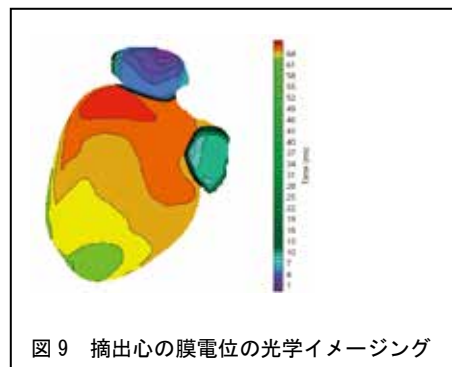
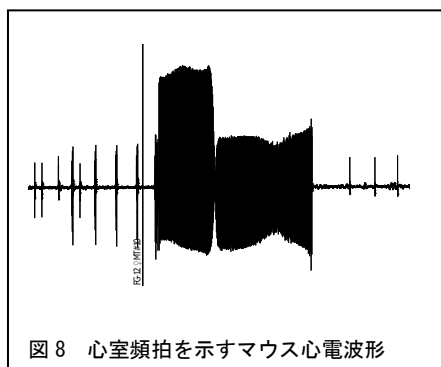
本研究の第三の目的として、RyR 遺伝子変異マウスで認められる拡張型心筋症について、拡張機序の解明と遺伝子治療に挑む。遺伝子治療法として、野生型 RyR を組み込んだアデノ随伴ベクターを拡張型心筋症に罹患する RyR 遺伝子改変マウスに強制注入することで、心臓の拡張が抑制されるように努める。

II. 研究計画及び材料と方法

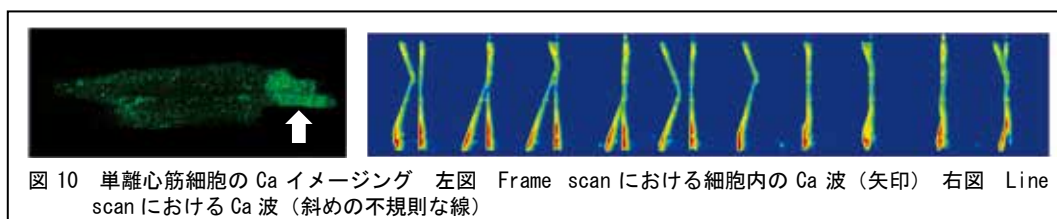
ヒト患者の RyR 遺伝子変異と不整脈を再現するゲノム編集マウスを、Crisper/Cas9 法を用いて作製し(図 7)、長期飼育した。致死性不整脈を再現性良く示す同マウスから、麻酔下個体、摘出心臓、単離心筋細胞などの実験材料を調整し、不整脈の病態生理学的な発生機序解明と抗不整脈薬の開発に努めた。



心室頻拍型の不整脈に関する心電図解析を、個体表面および摘出心表面において施した(図 8)。更に、心筋細胞の膜電位や細胞内 Ca に関する光学イメージング法(高成)を摘出心に適用した(図 9)。個体および摘出心臓レベルにおいても、不整脈を再現することが出来た。



ゲノム編集マウスから単離された単一心筋細胞においても、共焦点レーザー顕微鏡を活用する Ca イメージング法(図 10)を確立した。単一心筋細胞レベルでは、Ca 波という形で不整脈を再現することが出来た。



II. 研究計画及び材料と方法(続き 2)

これらの方法論の追加により、病態生理学的及び創薬的本研究を、RyR 分子から心筋細胞、個体に至る広範囲レベルの不整脈再現系で進められることが可能となった。

RyR 分子を標的にして阻害するカルベジロールを含む様々な有機化学物質群について、線状および環状の炭素骨格の主鎖や側鎖を網羅的に修飾する構造改変を行った(Fill)。作製された同誘導体群については、薬理的スクリーニングを施し、鋳型よりも優れた RyR 作用特異性や力価を示す誘導体群を検索した。その際に用いた不整脈再現系と機能測定技術は、上記の個体および摘出心臓レベルの心電図、膜電位や Ca に関する光学イメージングである。既に確立している組換え RyR タンパク質の単一チャンネル電流を測定する人工脂質膜法を用いることにより、作製した誘導体が RyR 蛋白分子に直接結合する分子標的薬となっていることを確認した。

カルベジロール誘導体については、MOE を用いた分子動力学計算を行うことにより、RyR 分子表面の結合部位と結合様式を推定した(弟子丸)。更に、各リガンド分子の化学基を修飾導入した多種多様な誘導体群のうち、RyR に対し高い親和性と特異性を示すものを MOE を用いたドッキングシミュレーションにより選抜した。

もうひとつの心筋細胞の不整脈再現系として、RyR 点変異を有するヒト iPS 心筋細胞も調製した。同 iPS 心筋細胞において、Ca イメージング法とパッチクランプ法(電気生理学実験)を適用した。

微生物 2 次代謝産物ライブラリーにおける既存の低分子化合物群についても、薬理的スクリーニングを行い、RyR 分子に結合しチャンネル機能を抑制する候補化合物を探索した。

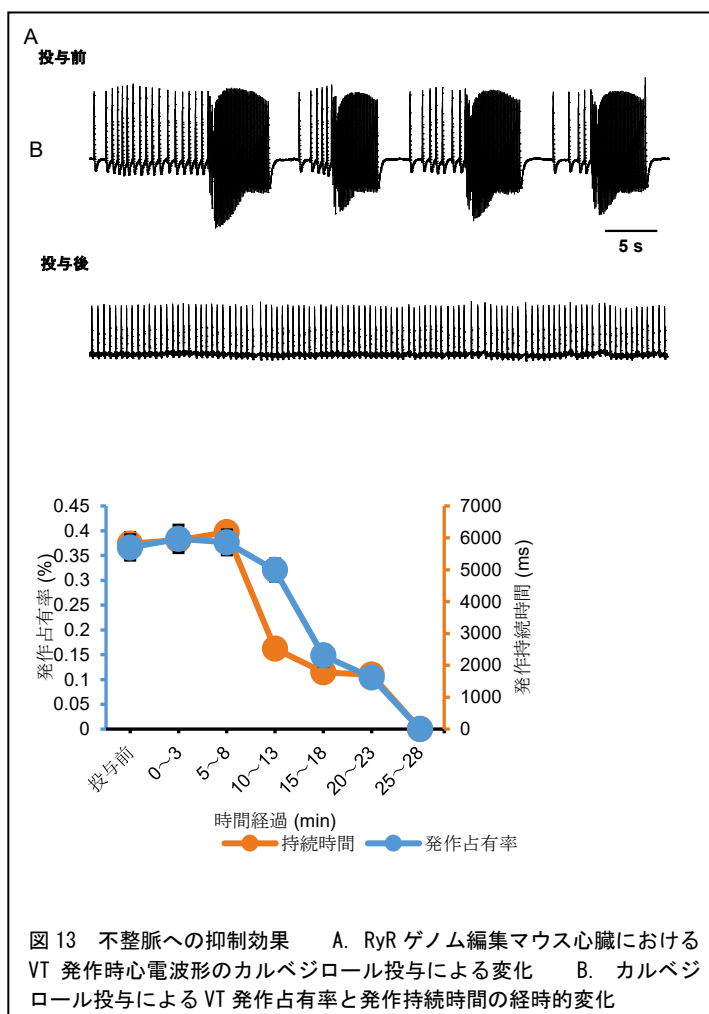
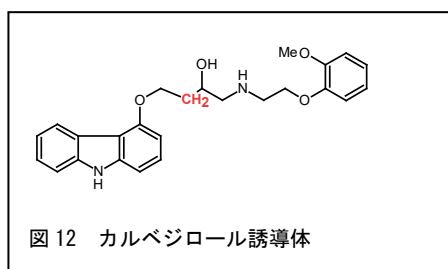
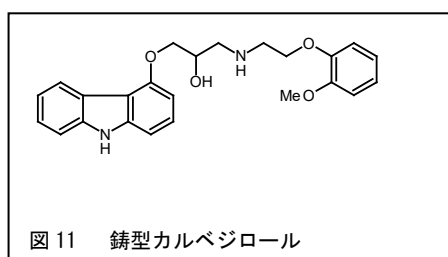
RyR 遺伝子の変異の種類によっては、マウス心臓が野生型に比べて有意に拡張した心筋症を呈することを見出した。この拡張型心筋症を示すマウス心臓について、詳細な組織学的検討を行った(藤本)。これらのマウスに、次世代シーケンサーを活用して、mRNA の発現量を定量評価した。

単離された単一心筋細胞を用いる *In vitro* 実験では、不整脈発生効率が低下してしまう傾向が強い。この欠点の解決策として、単一心筋細胞をカーボン法を用いて伸展させることにより、不整脈の発生を促す実験を行った(入部)。

III. 成果 (その1)

心室頻拍型の不整脈の摘出心臓、動物レベルの再現系を、RyR 遺伝子のゲノム編集マウスにおいて確立することが出来た。また、マウス摘出心臓における光学的イメージングと心電図を同時測定した結果、ここで扱う RyR 遺伝子変異を原因とする不整脈の心電波形は、2方向性または多形性の心室頻拍や房室解離等の特徴を備えることが分かった。これらの測定から、創薬研究に有用な不整脈異常波形の形成メカニズムを明らかにする事が出来た。

カルベジロール、リアノジン、FK506、ダントロレンを含む様々な有機化合物を大規模スクリーニング検査した結果、優れた抗不整脈作用を示す有機化合物として、鑄型カルベジロール(図 11)の黄色の位置にアルキル基を挿入したカルベジロール誘導体(図 12)を超えるものは無かった。特に、カルベジロールにアルキル基を導入した誘導体を 1 μ M の低濃度でマウス腹腔内に投与すると、心室頻拍発作は見事に止まり、心電図は長時間安定して発作を起こさない正常な同調律に完全に戻ることが確認された(図 13)。然しながら、その他の RyR 分子標的化合物の投与では、房心解離などの不整脈症状が多少残り、正常な同調律には完全に戻らなかった。これらの特性から、カルベジロール誘導体だけが、臨床実験(治験)に歩を進められる段階に達した有機化合物と考えられた。



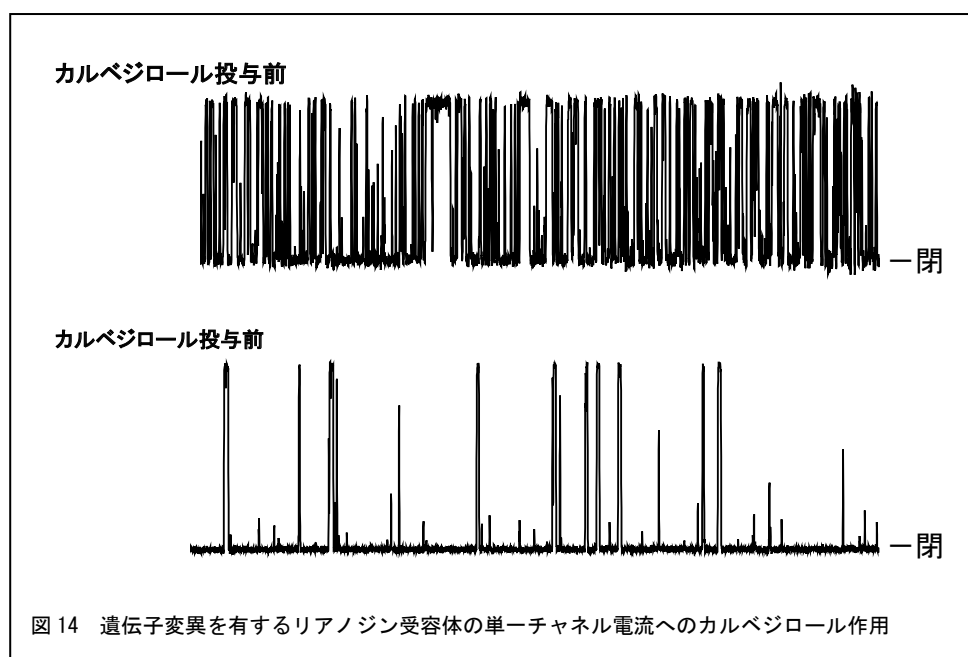
III. 成果(その2)

カルベジロール誘導体群について、立体構造モデリング及び RyR との結合状態に関する MOE 解析によるシミュレーションを行った。その結果、*In vivo* の薬理学的実験において極めて強い抗不整脈作用を示したカルベジロール誘導体では、メチレン基の導入によりリガンド両端部分と RyR の芳香族アミノ酸残基がより安定な π - π 相互作用を形成し、受容体-リガンド相互作用が増強されたことが推察された。これらの知見に基づき、今後も系統的な分子設計を重ねれば、更に優れた高効果かつ実用的な抗不整脈薬の開発が期待できた。

微生物 2 次代謝産物ライブラリー低分子群の薬理学的スクリーニングを行った結果、これらの化合物の中からも抗不整脈作用を示すものが幾つか見つかったが、カルベジロール誘導体のような優れた選択性と力価を示すものは得られなかった。これらを総合的に判断すると、抗不整脈薬としての更なる最適化を行うには、カルベジロール誘導体に絞って進めれば良いと結論付けられた。

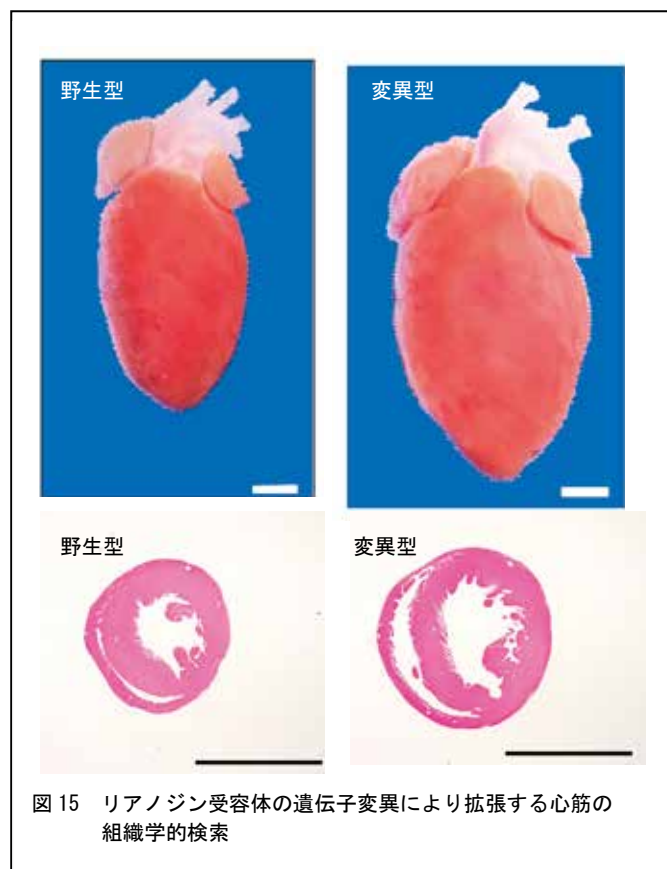
カルベジロール誘導体と既存薬フレカイニドとの間で、抗不整脈薬としての優劣の検討を行った。フレカイニドは、RyR のみならず Na チャネルも阻害することで、心臓内の電氣的興奮伝導速度が低下していた。然しながら、カルベジロール誘導体は、Na チャネルを阻害せず RyR だけを阻害するために心臓内の電氣的伝導も正常に保つことが出来ることから、抗不整脈薬としてより優れていると言えた。

カルベジロール誘導体の単一 RyR 電流への阻害作用(図 14)も検討した。その結果、カルベジロール誘導体は、RyR 分子を標的として直接結合することにより阻害作用を及ぼすことが確認された。



III. 成果(その3)

ゲノム編集マウスにおいて、RyR 遺伝子変異種によっては拡張型心筋症を示すものがあった(図 15)。拡張型を示す心臓の詳細な組織学的検索を行った結果、心臓内に線維化は認められなかった。つまり、この拡張型心筋症でも器質的な変化は起こっておらず、Ca 依存性不整脈という機能異常だけが生じていることが判明した。



この拡張型マウスにおいては、次世代シーケンサー解析による mRNA の発現量も測定した。その結果、心臓が拡張する原因遺伝子群を特定することが出来た。また、遺伝子治療として、野生型(正常型)RyR を組み込んだアデノ随伴ベクターを若いゲノム編集マウスに注入したところ、拡張が有意に抑えられた。この注入法は、拡張型心筋症の根本治療に有望な遺伝子治療と考えられるため、更に工夫を加えたいと考えている。

RyR 遺伝子変異を挿入したゲノム編集マウス心臓の心室から単一心筋細胞を単離し、同細胞に付着させたカーボン線維により伸展させた。その結果、不整脈の発生頻度が有意に高まった。この実験から初めて、これまで不整脈の再現が困難だった単一心筋細胞レベルにおいても、不整脈再現系が確立され、薬物評価を行うことが可能となった。

IV) 考察

本助成研究を遂行することにより、第一に、抗不整脈薬候補剤の薬理作用を検討するために必要不可欠な Ca 依存性不整脈現象を、分子から培養細胞、心筋細胞、心臓、動物にかけて広範囲のレベルに再現させた機能評価系を確立した。第二に、各レベルの不整脈現象に関する病態生理学的な発生機序を詳細に解明し、必要不可欠な機能測定技術を全て完成させた。第三に、大規模な薬理的スクリーニングにより、心室頻拍型の Ca 依存性不整脈に対して実用化出来る抗不整脈薬剤として、カルベジロールを鋳型とする誘導体に絞り込めたと考えている。抗不整脈薬として選択性と力価に優れた RyR 分子標的剤が遂に得られたと確信している。

カルベジロール誘導体を、摘出心臓へかん流投与するのみならず麻酔下マウスの腹腔内に投与しても、心室頻拍型の不整脈を完全に抑制する事が確認されたので、同薬は既に臨床実験（治験）への移行に値するものと考えている。少なくとも、本事業によって選択的 RyR イオンチャネル阻害薬としてのマザーコンパウンド作製は実現したと考えている。今後は、その他の誘導体群の有機化学合成とスクリーニングによる最適化作業を続ける。コロナの終息が見えたら、製薬企業の協力を得た誘導体群作製の大規模化を目指す。最終的には、有効性と安全性、薬物動態においてより優れた真に臨床で汎用可能な製品に完成しようと考えている。更には、非臨床試験の終了段階で物質特許出願を行い、大手の薬品企業と共に治験に臨みたい。また、カルベジロール誘導体を基礎研究用ツールとしての製品化することも念頭に置いており、幾つかの試薬企業に協力を依頼する予定である。

カルベジロール誘導体が医療現場の革新的治療薬になれば、Ca 依存性心疾患に苦しむ世界中の膨大な数の患者が助かる。現在、医療現場の抗不整脈薬は、Na、K、Ca チャネル、 β 受容体等の心筋細胞表面膜のタンパク分子の標的薬に限られ、心筋細胞内膜の RyR チャネルの標的薬は含まれていない。本研究により後者の新規抗不整脈薬が誕生すれば、全ての種類の不整脈に適用される網羅的な薬物治療が可能となる。日本循環器学会、日本小児循環器学会、日本心臓病学会、日本心電学会、日本不整脈学会合同の不整脈薬物治療に関するガイドラインの改訂にも貢献する。また、拡張型心筋症、心不全患者の心筋細胞でも RyR を原因とする Ca 恒常性の破綻が起こっているため、本開発薬は同患者達にも幅広く応用される。未だ確立した RyR の分子標的阻害薬は無いため、本創薬が成れば世界の市場で高い占有率を獲得できる。心疾患治療は癌治療とならび医学界の最重要課題であり、開発薬の関係産業界全体への経済効果は計り知れない。

ヒト iPS 細胞から分化させた心室筋タイプの心筋細胞に患者と同様の RyR 遺伝子変異が挿入された不整脈再現系も機能評価系として魅力なので作製した。然しながら、iPS 由来心筋細胞は心室筋細胞ながらも、静止せずに自動能を有していた。更に、iPS 由来の心筋細胞では、正常な興奮収縮連関の微細構造的な基礎を与える横行小管が、動物の心筋細胞と異なり未発達であった。これらの欠点から、iPS 由来心筋細胞は薬物評価の不整脈再現系としては適していないと判断された。

V. 研究成果の発表

新型コロナウイルス感染症の世界的な大流行が、一昨年以來延々と続いている。運悪く、本助成研究計画の立ち上げから半年くらいでコロナに直撃され、本計画時期の多くがこの流行時期に重なってしまった。筆者ら単独および共同で進める研究実験は、コロナ禍で以前のよう順調な持続展開は困難を極めた。当地福岡において非常事態宣言が複数回発出された前後の期間など、我々の動物実験の自粛を大学から求められ、実験の中断を余儀なくされた。何よりも痛かったのは、抗不整脈薬候補群に関する最適化の最終段階であるカルベジロール誘導体やその他の有機化学合成を推進する共同研究者 Michael Fill 博士（米国 Rush University 教授）と筆者の日米間での往来が、全く出来なくなったことである。深刻なコロナ感染症の蔓延に曝されたシカゴ在住の Fill 博士は、これまで1年間も大学にも行けず自宅でのテレワークを強いられた。今なお、筆者はアメリカ、日本での学会での口頭発表の機会すら奪われた状態にある。新型コロナ流行の終息の目処は立たない現状では残念ながら、本研究の継続的研究計画を福岡大学以外の共同、協力研究者と共に達成して行くことは、実験の性格上難しいと判断した。本研究プロジェクト開始時の予定として、令和三年度も貴財団に追加の継続申請を行い合計3～4カ年の研究期間を通じて完成するつもりであったが、同継続申請も断念することにした。本研究が当初予定通りに進んでいただけに、新型コロナ感染症の大流行が非常に残念である。

実験計画が遅れた結果、研究論文のまとめ作業等も滞り、研究成果の発表は大幅に遅れる展開となった。然しながら、これまで本研究計画の遂行を通じて、数多の貴重な研究データが得られており、決して未発表には出来ない。そこで筆者らは本年5月以来、ゲノム編集技術を駆使して心臓レベルでヒト致死性不整脈を再現した動物実験系において得られた不整脈の病態生理学的な発生メカニズムおよび拡張型心筋症に関する研究データについて、前者と後者の合計2編の論文（Full paper）にまとめる作業に専念している。データの定量解析もまだ残っており、投稿論文として仕上げるにはまだしばらくの時間を要する。3つ目の論文として、カルベジロール誘導体等の RyR 阻害剤の薬理作用や抗不整脈薬としての最適化事業を中心とした薬開発に関しても、Full paper の完成に努めている。いずれにせよ、これらの研究論文を生理学の分野で最も権威ある欧文雑誌に出来るだけ早く発表するつもりである。

[謝辞]

多大な費用と労力がかかる大型プロジェクトの本研究を展開出来たのは、一重に貴財団からの助成の賜物である。多くの人手を必要とする動物実験が本研究に占める割合は高く、その実験補佐および動物の交配飼育を支えるアルバイトの雇用は不可欠であった。もし、その雇用費を支援して頂けなかったならば、本研究は殆ど前に進められなかったと思う。心より感謝申し上げたい。

【禁無断転載】

令和3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 3.12.200

