

令和6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6年までの571件のプロジェクトに対し、約4,334百万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6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8年4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

RNA の視点から挑む新たな白血病治療戦略の開発	1
.....井上 大地.....	
微小核による核酸認識経路の活性化機構解明とがん免疫療法への応用	9
.....北嶋 俊輔.....	
胃内共生細菌による胃がん幹細胞の発生制御機構の解明	19
.....津川 仁.....	
難病指定疾患・肺動脈性肺高血圧症における 最新ゲノム診断技術を駆使した分子遺伝学的発症基盤解明研究	29
.....片岡 雅晴.....	

RNAの視点から挑む新たな白血病治療戦略の開発

《研究の概要》

急性骨髄性白血病（AML, Acute Myeloid Leukemia）は、造血幹細胞（HSC, Hematopoietic stem cell）に蓄積する遺伝子異常と加齢に伴うクローン性造血を背景に発症し、超高齢社会の進展に伴い今後さらなる増加が予想される。近年、疾患ゲノム解析により予後予測や分子標的治療の開発が進む中で、RNA 転写後修飾を含むエピトランスクリプトームの異常が、白血病発症とその治療抵抗性に深く関与することが明らかとなりつつある。RNA の化学修飾である N6-メチルアデノシン（m⁶A）は、RNA のスプライシング、輸送、翻訳効率、安定性を制御する可逆的な質的生物情報として機能し、がん、発生、分化などの多様な生物学的現象に密接に関与している。なかでも m⁶A 修飾酵素である METTL16 は単なる修飾酵素を超えて、細胞内のメチル基供与ネットワーク全体を制御し、メチル化恒常性を担う中枢分子として注目されているが、その分子標的、関与する細胞内パスウェイの解明は進んでいない。

本研究では、ヒトがん細胞を用いた網羅的 CRISPR スクリーニングと新規に樹立した *Mettl16* 欠損マウスモデルを用いて、正常造血幹細胞において METTL16 の欠損は自己複製能の低下、幹細胞性の喪失とを引き起こし、この因子が HSC の機能維持に不可欠であることを示した。さらに、AML 細胞において METTL16 の喪失は速やかに細胞死を誘導し、腫瘍特異的な依存性も示されており、METTL16 は「造血幹細胞の維持因子」であると同時に、「白血病細胞の治療上の脆弱性を露呈させる分子スイッチ」であることが示唆される。現在、METTL16 を標的とした小分子阻害剤の初期化合物を同定し、さらに最適化を進めており、METTL16 の生物学的意義の全容解明に向けた新たなツールとして期待している。本研究は、METTL16 を介したメチル化代謝の統合機構を明らかにし、生体内メチル化ネットワークの動的制御に新たな視点を提供し、さらには AML 治療と造血制御を結ぶ新たな戦略の基盤となることが期待される。

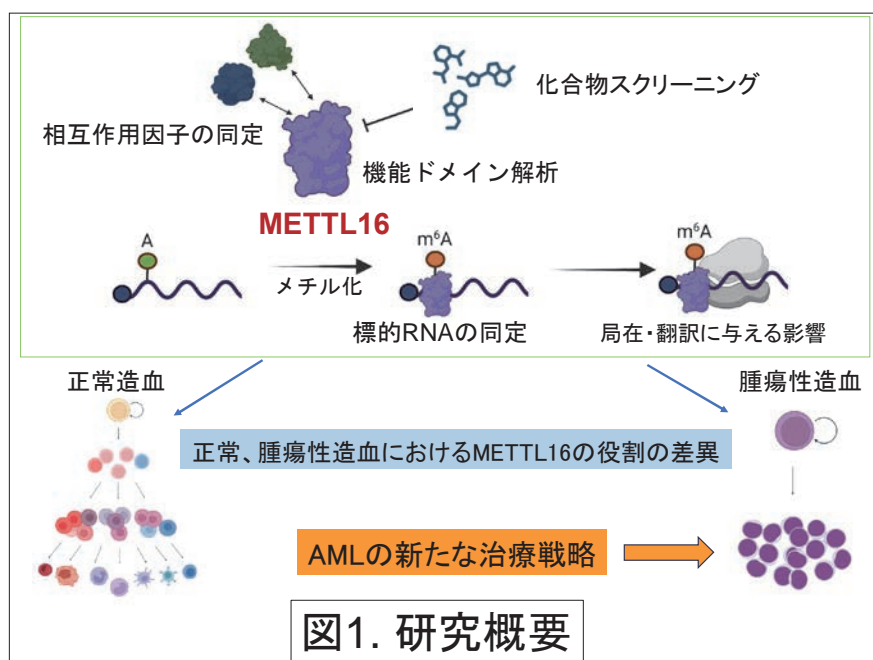
共同研究者の氏名、所属機関名

- 西村耕太郎 公益財団法人神戸医療産業都市推進機構
- 小沼剛 横浜市立大学生命医科学研究科
- 浴本亨 横浜市立大学生命医科学研究科

I 研究目的

近年、RNA レベルでの転写後制御機構についての研究は「エピトランスクリプトーム」として目覚ましい発展を遂げ、RNA スプライシング・RNA 化学修飾・RNA 塩基編集等による様々な制御機構の存在が知られるようになった。RNA スプライシング以外にも、mRNA メチル化などの化学修飾は RNA 分子の安定性、核外輸送とそれに続くリボソームでの翻訳開始調節など RNA ライフサイクルの様々な転写後制御ステップに重要であることが近年の研究により明らかとなっている。

急性骨髄性白血病 (AML, Acute Myeloid Leukemia) は、加齢と共に増加するクローン性造血を背景とし、移植療法が困難な 65 歳以上では極めて予後不良である。近年、遺伝子変異を基に予後予測が進み、変異遺伝子を標的とした分子標的薬の開発も急速に進んでいる。造血幹細胞 (HSC, Hematopoietic Stem Cell) レベルでのクローナルな遺伝子変異を特徴とする骨髄異形成症候群 (MDS, Myelodysplastic Syndrome) や AML では、RNA スプライシングを司る遺伝子の変異が高頻度に同定されるなど、腫瘍細胞特異的な転写後制御機構の異常も想定されるようになった。しかし、RNA の視点から見た包括的理解は不十分なままであり、特に造血細胞ヒエラルキーという多分化・多細胞システムの中での RNA ライフサイクルの制御機構は未解明な点ばかりである。本研究の出発点として、AML 細胞株網羅的な全ゲノム CRISPR スクリーニングを行い、AML 細胞は RNA レベルでの転写後制御機構に関わる様々な因子 (RNA メチル化酵素など) に強く依存し、遺伝的な脆弱性が存在することを明らかとしてきた (未発表)。本研究課題で注目する RNA のメチル化・N6-メチルアデノシン (m⁶A) 修飾酵素 METTL16 は、胚発生に必須な因子であり (Mendel et al. *Mol Cell*. 2018)、ほぼ全ての AML 細胞株が METTL16 に遺伝的依存性を示している。これまでの研究により、AML 細胞を含む多くの腫瘍細胞の生存は METTL16 に強く依存することを突き止めているが、METTL16 の標的 mRNA や協調して RNA メチル化を制御する METTL16 相互作用因子、造血細胞分化や腫瘍化に寄与する分子機構の詳細については全く解明されていない。



ない。METTL16の構造解析は進展しているものの、AML治療標的として研究が先行しているMETTL3に比して、活性を阻害する小分子化合物の同定・開発には至っていない。そこで本研究では、METTL16機能の生物学的意義、造血幹細胞の分化における役割、標的手法を解明するとともに、AMLにおける新規治療戦略の創生を目的とし、前臨床データを着実に積み重ねていく（図1）。

II 研究計画及び材料と方法

研究計画

本研究では、m⁶A修飾酵素であるMETTL16に着目しAMLの新たな治療戦略を目指していく。AML細胞はMETTL16に対して極めて強い依存性を有するものの、造血細胞分化やAML発症・維持に関連する標的mRNAや協調してRNAメチル化を制御する相互作用因子についての詳細な分子機構は未解明のままである。先行研究ではMETTL16活性を阻害する化合物の同定・開発には至っておらず、以下の3項目の研究計画を進める。

研究計画 1. METTL16の造血細胞におけるメチル化標的の同定と翻訳における機能評価

METTL16を介したm⁶A修飾標的を明らかにするため、ロングリードRNAシーケンスを用いたRNAワイドなm⁶Aメチル化RNAの同定を行う。新規に樹立した造血細胞特異的Mettl16ノックアウト(KO)マウスの骨髄から採取したHSC分画や、マウス初代AML細胞、ヒトAML細胞株より樹立したMETTL16 KO細胞、METTL16のノックダウン(KD)またはKO細胞を用いた解析により、正常細胞と比較したAML細胞特異的なm⁶Aメチル化RNAアトラスをRNAワイドに作成する。

METTL16は細胞核内におけるRNAメチル化以外にも翻訳開始を制御することが近年報告されており、細胞質での翻訳機能への影響を解析する目的で、活性型モノソームを単離後に翻訳中のRNAを抽出することが可能なりボソームプロファイリング(Ribo-seq)を施行する。さらに、従来のpolyA選択RNA-seqの結果と比較し、転写後と翻訳中のRNAを直接的に比較する。

研究計画 2. 近位標識法によるMETTL16変異体相互作用因子の探索、細胞内マッピング

正常造血細胞、AML細胞におけるMETTL16との相互作用タンパクや標的因子の同定に向けて、マウス骨髄細胞、AML細胞の幹細胞分画を単離し、APEX2分子によるビオチン化近位標識法を用い質量分析によりMETTL16の標的RNAや相互作用分子を同定する。相互作用分子の細胞内局在による影響とMETTL16自身の局在依存的機能解明に向けて、ヒトAML細胞株より樹立しMETTL16 KO細胞、METTL16の各機能ドメイン変異体発現細胞を用いた解析を行う。

研究計画 3 METTL16阻害剤候補化合物の評価

共同研究者浴本亨助教（横浜市立大学）により、約735万種類からなる小分子化合物ライブラリーを利用した、*in silico*ドッキング解析を用いたスクリーニングの結果を元に、METTL16補酵素サイトへの結合可能性のある76化合物、RNA結合サイト25化合物の合計101化合物を同定した。まずは計算上で結合スコアの良い化合物をそれぞれの結合サイトで順位づけし、さらに溶解度を考慮して実験の実施が可能と考えられる化合物を絞り込む。これらの化合物について、METTL16に対する結合活性を*in vitro*で検証す

る。スクリーニングされた低分子化合物の METTL16 に対する結合活性は、共同研究者である小沼剛准教授（横浜市立大学）により高純度に精製された METTL16 を用いサーマルシフトアッセイで評価する。さらに、精製 METTL16 を RNA、SAM と共に *in vitro* で反応させ、化合物のメチル化活性の阻害効果を定量する。

材料と方法

1. *Mettl16* 条件付きノックアウトマウスの樹立

Mettl16 条件付きノックアウトマウスは、METTL16 のメチル化活性ドメイン（エクソン 3-8）の両端に loxP 部位を挿入した *Mettl16* flox マウスを用いて樹立した。胚性幹細胞に対する遺伝子改変後、キメラマウスを経て生殖系列への伝播を確認し、血球細胞特異的 pIpC 誘導性または全身性タモキシフェン誘導性 Cre リコンビナーゼ発現マウスと交配させることで特定組織または時期での *Mettl16* 欠失を誘導した。遺伝子型は PCR 法により確認した。

2. 細胞培養

HEK293T および Plat-E 細胞は、Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) に 10% ウシ胎児血清 (FBS) を添加した培地で培養した。白血病細胞株 (MOLM13、K562、TF-1) は、RPMI-1640 培地に 10% FBS を加えた培地で培養した。マウス初代骨髄細胞は StemPro-34 SFM (Invitrogen) に 2 mM グルタミン、100 μ M 2-メルカプトエタノール (2-ME)、5 ng/mL IL-7、5 ng/mL SCF を添加した培地で培養した。MA9 細胞は、RPMI-1640 に 10% FBS、MEM 非必須アミノ酸溶液 (Gibco)、2 mM グルタミン、50 μ M 2-ME を加えた BM 培地に、2 ng/mL IL-3、2 ng/mL IL-6、5 ng/mL SCF を添加して維持した。すべての培地には、100 U/mL ペニシリンおよび 100 μ g/mL ストレプトマイシン (Gibco) を添加した。

3. レトロウイルス、レンチウイルスの作製

ウイルスは、X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent (Roche) を用いて、トランスファーウイルスベクターをパッケージング細胞株 (293T, Plat-E) にトランスフェクションすることで作製した。ウイルス上清を細胞に添加し、KD、KO 細胞または cDNA 導入細胞を作成した。

4. ロングリードシーケンス (Direct RNA シークエンス)

Oxford Nanopore Technologies 社のプロトコルに従い、total RNA から polyA+ RNA を精製後、ライブラリを作製し、MinION を用いて Direct RNA シークエンスを行った。

5. DART-seq

APOBEC1 酵素と YTH ドメイン (m^6A 認識モジュール) を融合させたリコンビナントタンパク質を細胞内で発現させ、 m^6A 近傍の C 残基における C \rightarrow U 変異を導入した。ライブラリを作製して次世代シーケンスを行った。得られたリードをゲノム上にマッピング後、C \rightarrow U 変換の発生位置から m^6A 修飾の推定を行った。

6. Ribo-seq

細胞からスクロースグラジエントにより抽出したリボソームをサイクロヘキシミド存在下で固定し、RNase Iで部分消化し、リボソーム保護フラグメント (RPF) を単離した。RPFはリボソーム精製後、RNA抽出、リン酸化処理、アダプターライゲーション、逆転写を経てライブラリを調製し、次世代シーケンサーで解析した。得られたリードはリファレンスゲノムにマッピングされ、リボソームのフレームごとの分布、翻訳効率、開始・停止コドン周辺のプロファイルなどを評価した。

7. APEX2 近位標識

改変型アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APEX2) を融合させた標的タンパク質を細胞内で発現させ、ビオチン-フェノールおよび H₂O₂ を添加して近接タンパク質のビオチン標識を行った。標識タンパク質はストレプトアビジンビーズを用いて精製し、質量分析 (LC-MS/MS) により同定した。

8. *In vitro* MTase アッセイ

精製 METTL16 タンパク質および合成 RNA 基質を用いて、S-アデノシルメチオニン (SAM) 存在下で反応を行い、m⁶A 修飾反応を MTase-Glo™ Methyltransferase Assay (Promega) により測定した。

III 研究成果

研究計画 1

METTL16 を介した m⁶A 修飾標的を明らかにするため、ロングリード RNA シーケンス用いた RNA 網羅的な m⁶A メチル化 RNA の同定を試みた。m⁶A データの精度向上のため、別の m⁶A 同定技術である DART-seq も並行して実施した。ロングリード RNA シーケンスを実施し、m⁶A 部位同定の *in silico* 解析をロングリードデータからの m⁶A 同定には、機械学習により開発され推奨されている複数の手法 (xPore、Tombo など) を統合し、精度の向上を図っている。DART-seq についてもデータ取得は完了しており、m⁶A 部位の解析および同定は完了している。

METTL16 欠損による造血細胞への影響を評価するために、造血細胞特異的 *Mettl16* KO マウスの骨髄から採取した造血幹細胞 (HSC) の解析を行なった。造血細胞特異的 *Mettl16* KO マウスの骨髄移植実験により、METTL16 は HSC の自己複製能の維持に重要であることを解明した。また AML 細胞の解析では、正常細胞に比べ AML 細胞が METTL16 欠損に対してより感受性であることを見出した。加えて、METTL16 の翻訳機能への影響を解析する目的で、活性型モノソームの解析、リボソームプロファイリング (Ribo-seq) を施行した。リボソームプロファイリングにより METTL16 が翻訳開始複合体に存在し、複数のノンコーディング RNA に結合していることを同定した。

研究計画 2

正常造血細胞、AML 細胞における METTL16 との相互作用タンパク質や標的 RNA の同定に向けて、ビオチン化酵素 AirID と *METTL16* の融合遺伝子を作成、AML 細胞に導入しビオチン化近位標識を用い質量分析により METTL16 の標的相互作用分子の探索を実施した。

AirID-METTL16 融合タンパク質を AML 細胞に発現、ビオチン化分子を LC/MS 質量分析により解析中である。これにより、METTL16 の相互作用分子の同定を進めている。METTL16 の未知の機能についても解析を進め、METTL16 はマウス骨髄細胞、ヒト白血病細胞株で細胞核よりむしろ細胞質に有意に発現することを明らかにした。

さらにマウス初代 AML 細胞、ヒト AML 細胞株より樹立した METTL16 K の各機能ドメイン変異体発現細胞（細胞質局在型（NLS 変異型）および細胞核局在型（NLS 付加型））を用いた解析を行った。METTL16 KD 白血病細胞株は有意な増殖抑制が見られるが、METTL16 野生型、細胞質局在型（NLS 変異型）cDNA の戻し実験により増殖が回復したが細胞核局在型（NLS 付加型）ではレスキュー作用が認められなかった。以上より METTL16 欠損による細胞死の誘導には、METTL16 の細胞質における機能が重要であること示した。

研究計画 3

In silico ドッキング解析を用いた化合物スクリーニングの結果をもとに、METTL16 補酵素サイトへの結合可能性のある 76 化合物、RNA 結合サイト 25 化合物の合計 101 化合物に対し結合スコア、溶解度を計算し化合物を順位づけした。さらに各化合物について、METTL16 に対する結合活性をサーマルシフトアッセイにより解析した。*in vitro* メチル化活性の測定実験により METTL16 酵素活性阻害効果を評価し、3 つの化合物を初期阻害剤候補化合物群として同定した。

さらに阻害効果の高い化合物の同定のため、3 化合物に対し、構造類似度（タニモト係数）に基づき、各化合物の類縁体を *in silico* で探索、合計 300 種を同定した。これらの類縁体化合物に対してもサーマルシフトアッセイおよび *in vitro* メチル化活性の測定実験を実施し、METTL16 に有意に結合し、酵素活性を阻害する化合物群（9 種類）を同定した。現在、AML 細胞株の細胞増殖、細胞死への影響についての解析が進行中である。

IV 考察

近年、次世代シーケンシング（NGS）および Omics 技術の進展により、mRNA の化学修飾に関する理解が大きく進み、これまで不明であった転写後制御の全貌が徐々に明らかになりつつある。中でも、N6-メチルアデノシン（m⁶A）は、真核生物において最も広く認められる RNA 修飾であり、細胞種や組織、環境に応じてその分布や機能に変化することが報告されている。一方で、m⁶A 修飾が静的で変動しないという報告も存在し、その動的制御機構や機能的意義は依然として重要な未解決課題である。

急性骨髄性白血病（AML）の病態形成においては、複数の m⁶A 制御因子が発がんの各段階で関与していることが報告されている。例えば、METTL3 や METTL14 は白血病幹細胞（LSC）の自己複製・生存を促進し、WTAP や RBM15-MKL1 融合タンパクも白血病細胞の増殖や形質転換に寄与することが示されている。さらに、脱メチル化酵素である FTO や ALKBH5、修飾塩基を認識する Reader 分子 YTHDF2 も、LSC への形質転換や白血病細胞の維持に必要であるとされている。

本研究では、m⁶A 修飾酵素の一つである METTL16 に着目した。METTL16 は、従来の mRNA 修飾機構に加え、翻訳制御機能を有する可能性が報告されており（Su et al., *Nat Cell Biol.* 2022; Wei et al., *Nat Cell Biol.* 2022）、我々の解析結果からも、AML 細胞や造

血幹細胞において METTL16 が m⁶A 修飾に加えて細胞質局在下で翻訳開始に関与していることが示唆された。特に、METTL16 と同じファミリーに属する METTL5 が rRNA メチル化を介して翻訳を制御していることを踏まえると、METTL16 が果たす翻訳制御の意義は大きいと考えられる。

我々は、METTL16 の機能的多様性を明らかにするため、Ribo-seq を用いた翻訳中 RNA の網羅的解析、および APEX2 近位標識法による相互作用因子の同定を行った。これにより、METTL16 が細胞質において特異的な mRNA 群やタンパク質複合体と関わること、またその機能が細胞分化や白血病維持に密接に関連する可能性が示された。今後は、これらの標的候補遺伝子に対して、造血細胞特異的 Cas9 ノックインマウスを用いた遺伝子ノックアウト解析を行い、個別の HSC 分画における分化能や細胞周期、細胞死への影響を詳細に検証する予定である。これにより、AML の発症・維持に不可欠な分子ネットワークの同定を目指す。

また、AML 細胞や造血幹細胞がきわめて不均一な細胞集団で構成されることを考慮し、単一細胞レベルでの翻訳制御解析も進めている。MNase を用いて rRNA を保護しながら行う scRibo-seq により、METTL16 の欠失が与える分化段階特異的な翻訳効率への影響を評価し、造血細胞運命制御における METTL16 の役割を一層明らかにすることを目指している。

一方、薬剤開発の観点からは、*in silico* ドッキング解析により同定された METTL16 阻害候補化合物 101 種のうち、複数が *in vitro* において阻害活性を示した。しかし、細胞膜透過性および生体内安定性の面で改善の余地があり、今後の最適化が必要である。具体的には、化合物のリポフィリシティの調整による膜透過性の向上、プロドラッグ化による一時的な脂溶性付加、代謝酵素による分解回避のための構造修飾（フッ素化やエステル→アミド結合化）などが考えられる。さらに、DDS（ドラッグデリバリーシステム）技術の活用により、血中安定性や臓器選択性の向上も期待できる。

本研究を通じて、METTL16 が AML における RNA 修飾と翻訳調節の中核的因子である可能性が明らかとなった。今後、METTL16 の分子機構を基盤とした精密治療標的としての有効性を高めるため、構造最適化・薬効評価をさらに進めることで、RNA メチル化機構を標的とする新たな AML 治療戦略の確立に貢献できることが期待される。

V 研究成果の発表

学会・シンポジウム講演

1. 転写後制御機構の破綻による発がん機構の解明と治療応用, 井上大地. 第 11 回 AiT Web Seminar, 2024/5/8, 国内, 口頭
2. 転写後制御機構に基づく発癌機構の解析と治療応用, 井上大地. 小林がん学術振興会研究助成贈呈式, 2024/6/15, 国内, 口頭
3. 「がん」の新しい病態理解を目指して, 井上大地. 消化器外科セミナー, 2024/7/9, 国内, 口頭
4. 転写後制御機構の破綻による発がん機構の解明と治療応用, 井上大地. 第 35 回高遠分子細胞生物学シンポジウム, 2024/8/27, 国内, 口頭

5. マウスモデルを利用した血液がんの理解と治療応用, 井上大地. AdAMS 先端モデル動物若手支援技術講習会, 2024/8/29, 国内, 口頭
6. ゲノム編集スクリーニングを用いたがんの新しい病態理解と治療応用, 井上大地. 第 41 回 関西ライフサイエンスリーディングサイエンティストセミナー, 2024/9/4, 国内, 口頭
7. 転写後制御機構の破綻による発がん機構の解明と治療応用, 井上大地. 第 83 回日本癌学会学術総会, 2024/9/21, 国内, 口頭
8. 基礎研究を通じた血液がんの新しいメカニズムの解明, 井上大地. 第 35 回 山口血液疾患研究会, 2024/12/17, 国内, 口頭
9. 臨床から研究へ～卒後 20 年で得た「がん」の理解～, 井上大地. 令和私塾, 2025/1/16, 国内, 口頭
10. 基礎研究を通じた血液がんの新しいメカニズムの解明, 井上大地. 第 38 回 臨床血液セミナー, 2025/1/24, 国内, 口頭
11. 血液がん研究が拓く生物学の未来, 井上大地. 愛知県立がんセンターセミナー, 2025/1/31, 国内, 口頭
12. 転写後制御機構を中心としたがんの病態理解と治療応用, 井上大地. 第 34 回泌尿器科分子・細胞研究会, 2025/2/28, 国内, 口頭

微小核による核酸認識経路の活性化機構解明とがん免疫療法への応用

<研究の概要>

これまでに研究代表者は、特定のがん種において細胞質内に蓄積した二本鎖 DNA (dsDNA) を認識する STING 経路が不活性化されていること、またその結果、がん細胞の抗原提示能や細胞傷害性 T 細胞の腫瘍内浸潤が減少することで免疫チェックポイント治療 (ICI) 抵抗性に寄与することを明らかにした。そこで、がん細胞自身の STING 経路の再活性化が、ICI 治療抵抗性を克服するための戦略として有効であると考え、効率的に STING 経路を活性化し免疫細胞依存的に抗腫瘍活性を示す薬剤を探索した。その結果、紡錘体形成チェックポイントの最上流因子である Monopolar Spindle Kinase 1 (MPS1) に対する阻害剤が、効率的に dsDNA 認識経路および下流の抗腫瘍免疫経路を活性化し、生体内において免疫細胞依存的に抗腫瘍効果を示すことを明らかにした。さらに、MPS1 阻害剤投与による微小核形成に伴って dsDNA 認識経路のみならず細胞質内二本鎖 RNA (dsRNA) 認識経路も同時に活性化されることを明らかにしたが、その分子機構は不明である。

非コード領域から転写される Non-coding RNA の一部は、二本鎖 RNA 構造を形成し、ウイルス感染に似た自然免疫応答を引き起こす。このような免疫原性の高い Non-coding RNA をがん細胞特異的に誘導することで抗腫瘍免疫を活性化できる可能性がある。しかし、類似した配列を持ちゲノム全体を覆う非コード領域の中において、特にどのゲノム領域から免疫原性の高い Non-coding RNA が高頻度に産生されるかは明らかになっていない。そこで本研究では、MPS1 阻害剤投与に伴い形成される微小核の制御機構および微小核形成に伴う dsRNA 産生亢進の分子機構解明を目指した。また、これまでに研究代表者が作製した肺がんマウスモデルを用いて、MPS1 阻害剤投与に伴う dsRNA 認識経路の活性化が抗腫瘍免疫に与える影響を解析した。

まず初めに、STING に加えて細胞質内 dsRNA センサーである MAVS を欠損させた細胞を用いて、MPS1 阻害剤投与による二本鎖 RNA 認識経路依存的に変動する遺伝子を抽出した。その結果、染色体不分離に伴い、二本鎖 DNA センサーである STING と二本鎖 RNA センサーである MAVS が協調して自然免疫経路を活性化することを明らかにした。また dsRNA 特異的な抗体を用いて微量な内因性の dsRNA を免疫沈降 (IP) により濃縮し、次世代シーケンサーを用いて染色体不分離に伴い産生される二本鎖 RNA の由来となるゲノム領域を特定した。その結果、イントロン領域やインタージェニック領域を含む様々な非コード領域から二本鎖 RNA が産生されることが示唆された。さらに、MAVS を遺伝子編集により欠損させた肺がんマウス細胞を作製し、動物モデルを用いて MPS1 阻害剤投与に伴う抗腫瘍効果を解析した。その結果、MAVS 欠損細胞は MAVS 野生型細胞と比較して MPS1 阻害剤に対して治療抵抗性を示した。一方で、MAVS 欠損細胞に MAVS を再構成すると MPS1 阻害剤に対して再度感受性を示し、腫瘍内浸潤 T リンパ球の割合や細胞傷害性 T 細胞の活性化マーカーであるグランザイム B の発現も亢進した。

本研究を通じて、紡錘体形成阻害薬を「免疫原性核酸の蓄積」という観点から再評価し、紡錘体形成阻害薬投与に伴う抗腫瘍免疫の活性化機序の一端を明らかに出来れば、今後の適正な患者選択に対しても多大なメリットが生まれる。また、染色体不安定性を蓄積した細胞を異常細胞として免疫細胞が排除するという、自然免疫が担う本来の生理的作用に関する分子機序の理解にも繋がる。

共同研究者の氏名・所属機関

- ・北野 滋久 公益財団法人がん研究会 有明病院 先端医療開発センター
- ・坂原 瑞穂 公益財団法人がん研究会 がん研究所 細胞生物部

研究報告

I 研究目的

1-1、研究背景

これまでに研究代表者らは、KRAS 変異型非小細胞肺癌 (NSCLC) 患者の 1/3 を占めるサブクラスの 1 つである KRAS;LKB1 変異 (KL) 型 NSCLC において、細胞質内二本鎖 DNA (dsDNA) センサーである STING の発現が抑制されていることを明らかにした。さらに、dsDNA 認識経路の不活性化に伴い、腫瘍細胞の抗原提示能や腫瘍領域内への細胞傷害性 T 細胞の浸潤度が減少することから、LKB1 変異による STING の発現抑制が、KL 型 NSCLC の免疫原性低下および PD-1 阻害薬に対する治療抵抗性に寄与することを明らかにした。

これらの研究背景から、KL 型 NSCLC において dsDNA 認識経路の再活性化が、免疫チェックポイント阻害薬に対する抵抗性を克服するための治療戦略として有効であると考えた。そこで、KL 型 NSCLC 細胞株を用いて dsDNA 認識経路を活性化する薬剤をスクリーニングにより探索した。その結果、紡錘体形成チェックポイントの最上流因子である Monopolar Spindle Kinase 1 (MPS1) に対する阻害剤が、効率的に dsDNA 認識経路および下流の抗腫瘍免疫経路を活性化し、生体内において免疫細胞依存的に抗腫瘍効果を示すことを明らかにした。

2、研究目的と期待される成果

dsDNA 認識経路が活性化する分子機構として、MPS1 阻害剤存在下では、がん細胞が紡錘体形成不全を許容したまま細胞周期が進行し、細胞質内 DNA として認識される微小核 (Micronuclei) が大量に発生することを明らかにした。一方で、MPS1 阻害剤投与による微小核形成に伴って dsDNA 認識経路のみならず細胞質内二本鎖 RNA (dsRNA) 認識経路も同時に活性化されることが明らかになったが、その分子機構は不明である (図 1)。MAVS を中心とした dsRNA 認識経路は、STING と共通の下流細胞内シグナル伝達経路を有しており、MAVS の活性化により、STING 活性化と同様に抗腫瘍免疫で中心的な役割を担うサイトカインや MHC クラス 1 などの発現が誘導される (図 2)。dsDNA 認識経路に加えて、がん細胞において機能抑制が見られない dsRNA 認識経路の活性化を標的とすることで、dsDNA 認識経路が不活性化したがん細胞に対しても抗腫瘍免疫を活性化できるため、より広範な種類のがん種に対して治療効果が期待できる。しかし、dsRNA はレトロトランスポゾン領域など特定のゲノム領域から産生されることが報告されているものの、その

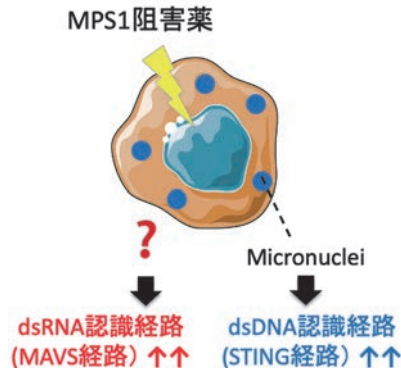


図1. MPS1 阻害薬による細胞内核酸認識経路の活性化

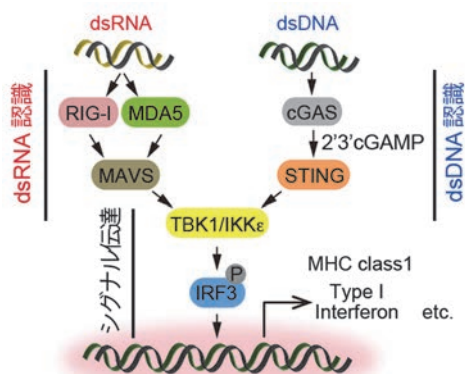


図2. 細胞内 dsRNA および dsDNA 認識経路の概要

発現制御機構には未だ不明な点が多い。そこで本研究では、まず MPS1 阻害剤投与に伴い形成される微小核の分解制御機構解明と微小核形成に伴う dsRNA 産生亢進の分子機構解明を目指す。次に、これまでに研究代表者が作製した KL 型 NSCLC マウスモデルを用いて、微小核の分解機構や dsRNA 認識経路の活性化が抗腫瘍免疫に与える影響を解析する。これらの研究成果を基盤として、従来の免疫チェックポイント阻害薬に対して治療抵抗性を示すがん種に対しても有効な新規がん免疫療法の開発を目指す。

II 研究計画及び材料と方法

1、MPS1 阻害剤による dsRNA 認識経路活性化の検証

これまでに MPS1 阻害剤投与による抗腫瘍免疫関連サイトカインの分泌亢進が MAVS 欠損株において抑制されることを明らかにした(図3)。様々なグループから、lncRNA を含む様々な Non-coding RNA がゲノム安定性に寄与することが報告されているが、染色体不安定性の増大に伴う dsRNA の産生に関しては、これまでに全く報告されていない。そこで、これらの分子機構を追求することで、紡錘体チェックポイントや細胞内 dsRNA の産生に関する基礎的発見に繋がると考えられる。

そこで本計画では、細胞質内 DNA センサーである STING に加えて細胞質内 RNA センサーである MAVS 欠損細胞、さらに STING/MAVS 二重欠損細胞を用いて、RNA-sequence やウエスタンブロットなどにより MPS1 阻害剤投与による染色体不分離に伴い二本鎖 DNA/RNA 認識経路依存的に変動する遺伝子群やシグナル伝達因子を抽出する。

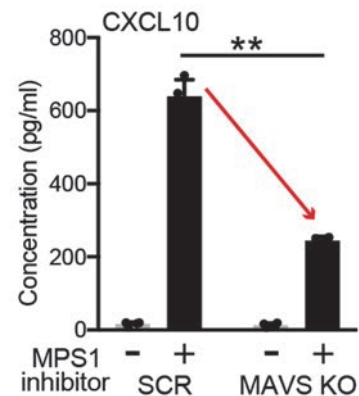


図3. MAVS 欠損による MPS1 阻害剤投与後の下流サイトカイン分泌低下

2、MPS1 阻害剤による産生する dsRNA の検出

MPS1 阻害剤投与に伴い産生される細胞質内 dsRNA 検出系確立を目指す。本研究で想定される微量な内因性の dsRNA を免疫染色で定量的に解析することは困難である可能性があり、dsRNA を特異的に認識する抗体 (clone rJ2) を用いて細胞内フローサイトメトリーによる 1 細胞レベルでの安定した dsRNA 検出系確立を目指す。また、これまでに染色体不安定性の亢進と dsRNA 産生亢進を関連付ける報告がほとんど存在しないため、抗体を用いた免疫沈降により、細胞質内に蓄積した dsRNA を濃縮精製し、次世代シーケンサーにより配列を決定することで dsRNA の由来となるゲノム領域を特定する (dsRNA-seq)。

3、Ex vivo/In vivo モデルを用いた抗腫瘍効果の解析

研究代表者がこれまでに確立したマイクロ流体装置を用いたヒト由来がん細胞スフェロイドとヒト由来免疫細胞の 3 次元共培養系および KL 型 NSCLC マウスモデルを用いて、MPS1 阻害剤投与に伴う dsRNA 産生が免疫-腫瘍細

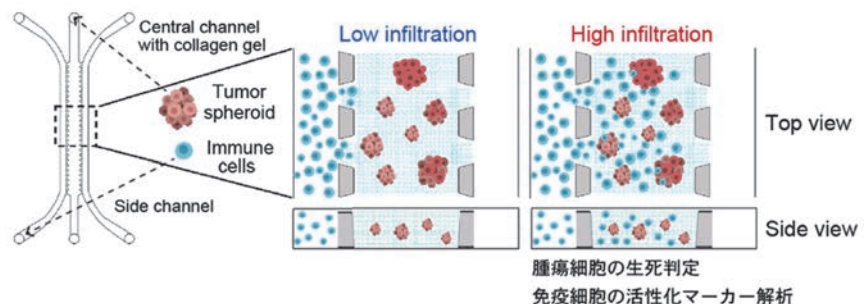


図4. マイクロ流体装置を用いたヒト免疫細胞-がん細胞 3 次元共培養系

胞の相互作用および抗腫瘍免疫に与える影響を解析する。

マイクロ流体装置を用いた実験系では、NK 細胞株 NK-92 および MHC クラス 1 の安定化に必要な B2M を欠損させた腫瘍細胞を用いることで、薬剤処理に伴う免疫細胞の遊走と同時にがん細胞との相互作用を解析することが出来る (図 4)。そこで MAVS を欠損させたヒト KL 型 NSCLC 株を作製し、本 3 次元共培養系を用いて、MPS1 阻害剤投与に伴う dsRNA 産生亢進が免疫細胞の腫瘍細胞領域への遊走等に与える影響等を解析する。

また研究代表者はこれまでに抗腫瘍免疫を解析するための KL 型 NSCLC マウスモデルを作製した (図 5)。これまでに本マウスモデルが、ヒト KL 型 NSCLC と同様に、STING の発

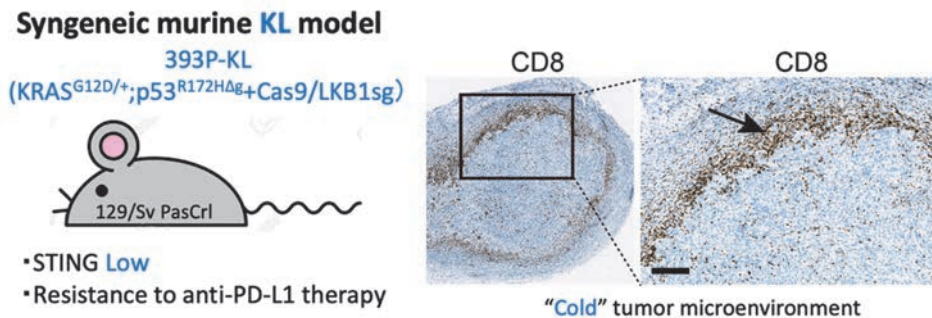


図 5. 抗腫瘍免疫を解析可能な KL 型 NSCLC マウスモデル。腫瘍辺縁部に CD8 陽性 T 細胞が集積し、免疫チェックポイント阻害薬に治療抵抗性を示す典型的な免疫微小環境(Cold tumor microenvironment)を示す。

現減少や PD-L1 に対して治療抵抗性を示すことを確認している。そこでまずは、MPS1 阻害剤投与に伴う、dsDNA/dsRNA 認識経路の下流シグナルを標的とした薬力学試験の実施、体重減少を主とした副作用を評価し、最適な投薬スケジュールの検討を行う。次に、MAVS 欠損細胞を作製して、MPS1 阻害剤投与が dsRNA 認識経路依存的に腫瘍増殖や免疫微小環境に与える影響をフローサイトメトリー、single cell RNA-sequence などを駆使して解析する。また、中和抗体により CD8 陽性 T 細胞や NK 細胞を除去することで、MPS1 阻害剤投与による免疫細胞を介した抗腫瘍活性を解析する。さらに、抗 PD-L1 抗体や STING アゴニストなど抗腫瘍免疫を活性化する既存薬との併用投与を行い、dsRNA 認識経路の活性化依存的に相乗効果を示すか検討する。

III 研究成果

3-1、染色体不分離により産生される二本鎖 RNA 認識経路の活性化

まず初めに、細胞質内核酸センサーである STING/MAVS 欠損細胞を用いて、RNA-sequence により MPS1 阻害剤投与による染色体不分離に伴い二本鎖 RNA 認識経路依存的に変動する遺伝子を抽出した。その結果、染色体不分離に伴い、二本鎖 DNA センサーである STING と二本鎖 RNA センサーである MAVS が協調

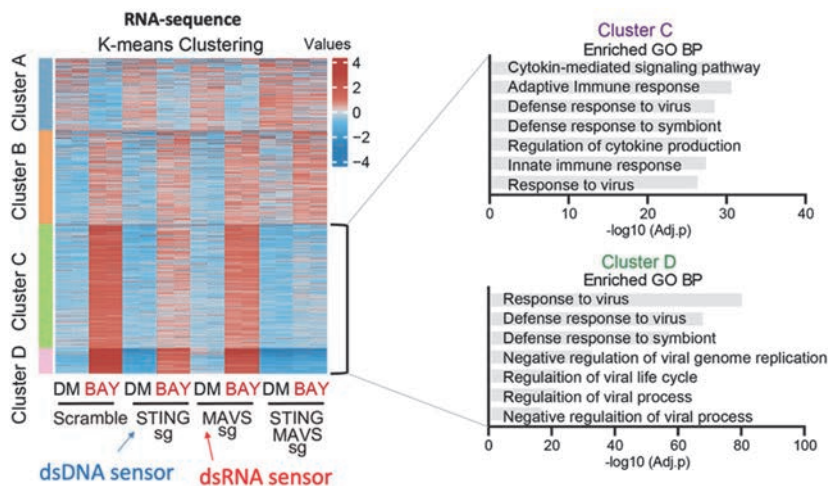


図 6. MPS1 阻害に伴う MAVS 依存的な自然免疫経路の活性化

して、1型インターフェロン分泌やT細胞遊走に関与する自然免疫経路を活性化することを明らかにした(図6)。

3-2、染色体不分離により産生される二本鎖RNAの由来となるゲノム領域の特定

まず初めに、細胞内フローサイトメトリーにより細胞内dsRNAを定量した結果、MPS1阻害剤処理に伴って内因性のdsRNAが細胞内に蓄積することを明らかにした(図7)。

また研究計画に記載したdsRNA-seqを実施することで、染色体不分離に伴い産生される二本鎖RNAの由来となるゲノム領域を特定した。その結果、葉酸代謝阻害時と同様に、イントロン領域やインタージェニック領域を含む様々な非コード領域から二本鎖RNAが産生されることが示唆された。また該当するゲノム領域の配列特異的なプライマーを用いることで、実際にこれらの領域からMPS1阻害剤投与に伴い二本鎖RNAが産生されることを実証した(図8)。さらに、細胞質画分を分離精製した後に、RNAを抽出してPCRにより測定することで、実際に細胞質内にこ

これらの二本鎖RNAが蓄積することを明らかにした。また、オープンクロマチン領域を特定す

るATAC-seq解析の結果等と統合解析を行なった結果、ゲノム全体に広範囲に存在する散在性反復配列の中で、比較的遺伝子領域に近くATAC-seqによりオープンクロマチン領域として検出される非コード領域の周辺に存在する散在性反復配列から二本鎖RNAが産生される傾向があり、クロマチンの立体構造が散在性反復配列の転写活性に影響を与えている可能性があることを見出した。一方で、クロマチンが閉じている不活性領域が新たに開いて二本鎖RNAが産生するというような領域は少なく、薬剤投与前の基底状態からすでにクロマチン構造がある程度開いておりクロマチンアクセシビリティが高い領域から、薬剤投与に伴って二本鎖RNAが産生されることを明らかにした(図9)。今後は、MPS1阻害剤以外の薬剤で染色体不分離を誘導した際に産生される二本鎖RNAあるいは葉酸代謝阻害により産生される二本鎖RNAの由来となるゲノム領域にどの程度の共通性あるいは相違性があるか検討する計画である。

MPS1 inhibitor

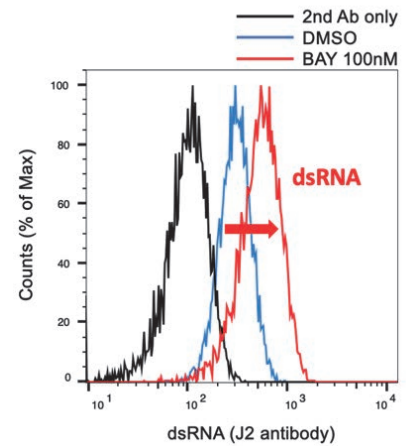


図7. MPS1阻害剤処理に伴うdsRNAの産生亢進

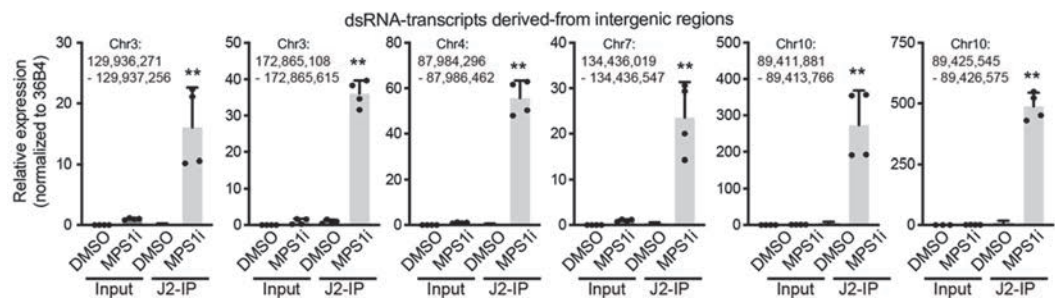


図8. MPS1阻害による産生される二本鎖RNAの由来となるゲノム領域

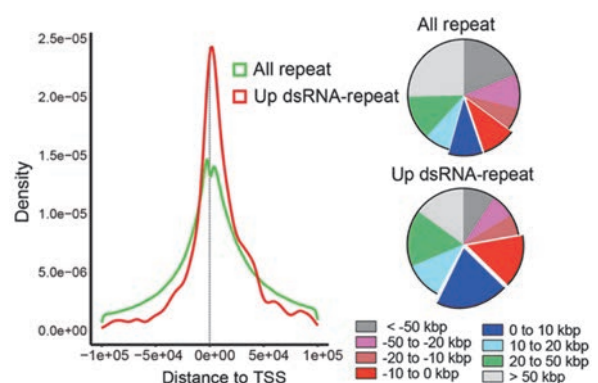


図9. 遺伝子領域周辺非コード領域からの二本鎖RNAの産生

3-3、染色体不分離に伴い誘導される微小核からの内因性二本鎖 RNA の産生機序の解析

本研究では、非自己性を帯びた二本鎖 RNA の発生源として、特に、染色体の不均等な分配の結果として生じる「微小核」に焦点を当て、染色体不分離に伴う免疫原性核酸の発生機構を探った。近年、断片化した染色体フラグメントのみで構成される微小核において、深刻な

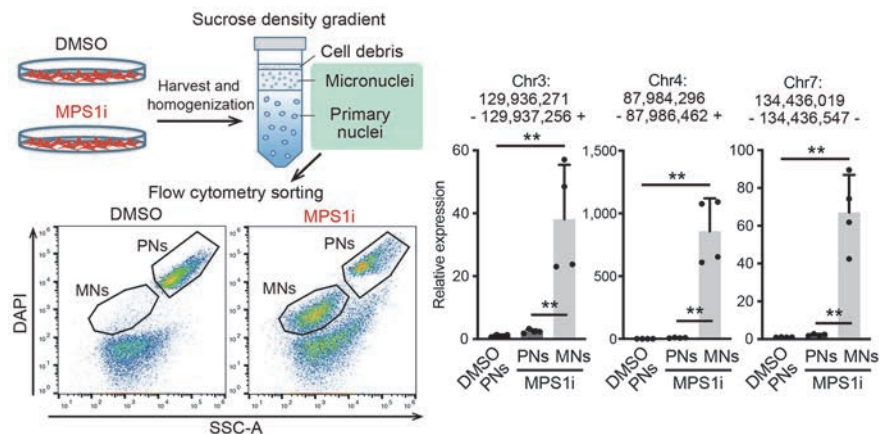


図10. 微小核内の非コードゲノム領域からの転写亢進

エピゲノム異常、転写異常が観察されることが報告されている。実際に、MPS1 阻害剤処理後のがん細胞を用いて、スクロース密度勾配遠心法およびフローサイトメトリーにより微小核画分を分離した後に、RNA を抽出して発現解析を実施した結果、がん細胞内の核(Primary nuclei)と比較して、微小核内に存在する非コードゲノム領域から、特に顕著に二本鎖 RNA 構造を形成する転写産物が産生されることを明らかにした(図10)。

3-4、染色体不分離に伴うインターフェロン依存的な二本鎖 RNA の産生機序の解析

MPS1 阻害剤投与による染色体不分離誘導時に IFNAR1 正常あるいは欠損細胞内に蓄積する二本鎖 RNA の配列を解析した結果、インターフェロン依存的あるいは非依存的、つまり MPS1 阻害剤投与に伴い、インターフェロン投与によっても誘導され、かつ IFN 受容体の欠損により抑制される二本鎖 RNA と、インターフェロン経路には無関係な二本鎖 RNA の2群に明確にわかれることが明らかになった(図11)。

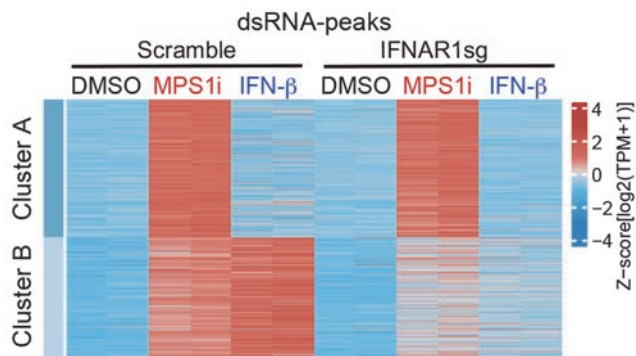


図11. MPS1 阻害剤投与に伴う IFN 依存的な二本鎖 RNA の産生

3-5、がん-免疫細胞 3次元共培養系を用いた抗腫瘍効果の解析

研究代表者らがこれまでに確立したマイクロ流体装置を用いたヒト由来がん細胞スフェロイドとヒト由来免疫細胞の3次元共培養系を用いて、MPS1 阻害剤処理に伴う dsDNA および dsRNA 認識経路の活性化が免疫細胞の腫瘍領域への遊走に与える影響を解析したマイクロ流体装置を基盤とした3次元共培養系を用いて免疫細胞と腫瘍細胞の相互作用を解析した結果、MPS1 阻害剤処理に伴い免疫細胞の腫瘍領域への遊走が亢進すること、およびそれらの現象は dsDNA および dsRNA 認識経路の活性化に依存することを明らかにした(図12)。

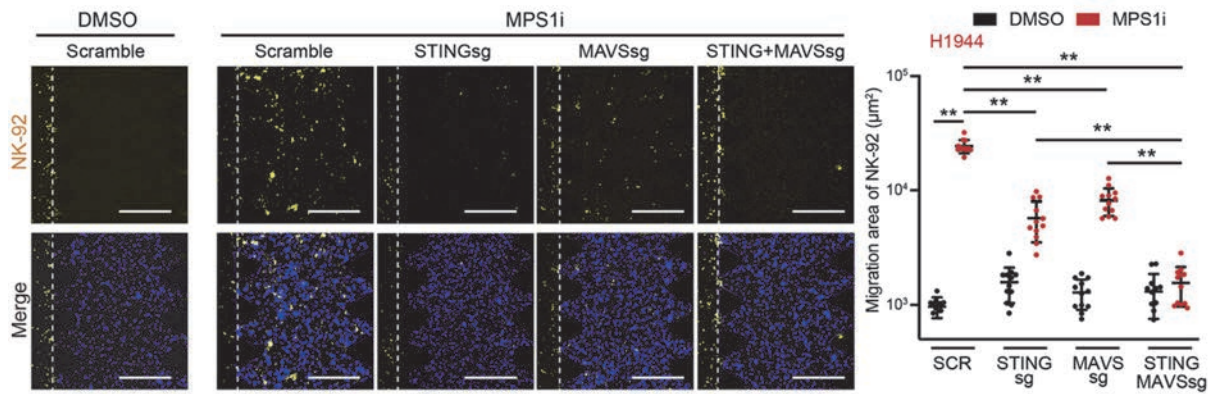


図12. 細胞質内核酸認識経路 (STING/MAVS 経路) 依存的な免疫細胞の遊走亢進

3-6、シンジェニックマウスモデルを用いた二本鎖 RNA 依存的な抗腫瘍効果の解析

これまでで作成したマウス肺癌細胞を基盤として、二本鎖 RNA 認識経路で中心的な役割を担う MAVS を遺伝子編集により欠損させた肺癌マウス細胞を作製し、同系マウスへの皮下移植により腫瘍が生着した後に、MPS1 阻害剤投与に伴う抗腫

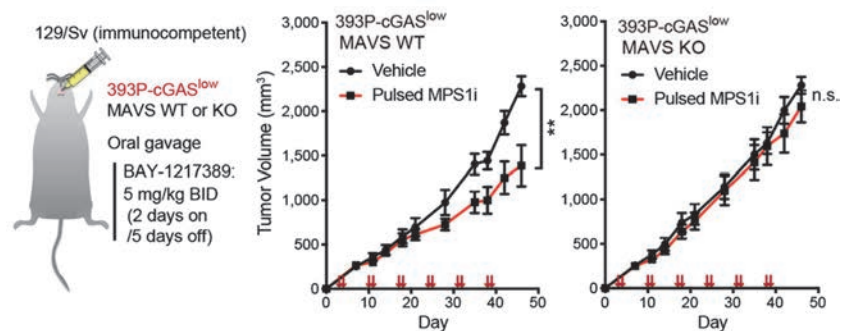


図13. MPS1 阻害剤処理に伴う二本鎖 RNA 依存的な抗腫瘍効果

瘍効果を解析した。薬力学試験の結果から、マウスへの MPS1 阻害剤の投与は、5mg/kg BID 2days ON/ 5days Off の条件で実施した。その結果、MAVS 欠損細胞は MAVS 野生型細胞と比較して MPS1 阻害剤に対して治療抵抗性を示した (図 13)。一方で、MAVS 欠損細胞に MAVS を再構成すると MPS1 阻害剤に対して再度感受性を示し、腫瘍内浸潤 T リンパ球の割合や細胞傷害性 T 細胞の活性化マーカーであるグランザイム B の発現も亢進した (図 14)。しかし免疫不全マウスに皮下移植された腫瘍に対しては、MAVS を再構成した細胞に対しても MPS1 阻害剤は抗腫瘍効果を示さなかった。これらの結果から、生体内で MPS1 阻害剤が、少なくとも一部は dsRNA 認識経路依存的な抗腫瘍免疫活性化を介して治療効果を発揮することが示された。

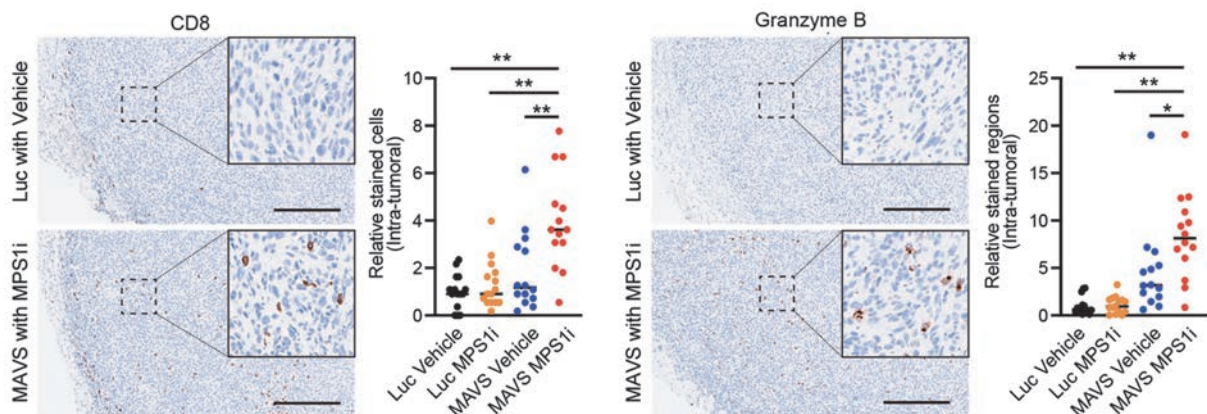


図14. MPS1 阻害剤処理に伴う二本鎖 RNA 依存的な腫瘍免疫微小環境のリモデリング

IV 考察

本研究においては、紡錘体形成チェックポイント制御因子 MPS1 の阻害によって誘導される染色体分配異常が、内因性 dsRNA の細胞質内への蓄積を引き起こすことを明らかにした。蓄積した dsRNA は細胞質内の dsRNA センサーを介して I 型インターフェロン経路を活性化し、T 細胞ケモカインをはじめとするサイトカイン・ケモカインの分泌を促進することで、腫瘍局所への免疫細胞浸潤を誘導することが示された。さらに、これらの dsRNA 依存的自然免疫応答は、微小核や染色体ブリッジを介して活性化される cGAS/STING 経路とも協調的に機能し、生体内における抗腫瘍免疫応答の誘導に寄与することが示唆された。これらの知見は、染色体不安定性 (CIN) を有する異常細胞に対する自然免疫系の監視・排除機構の分子基盤を明らかにするとともに、これまで十分に理解されてこなかった紡錘体形成阻害薬の新たな抗腫瘍免疫賦活メカニズムを提示するものである。

近年、cGAS/STING 経路は多くのがん種で機能不全に陥っていることが報告されており、腫瘍免疫回避機構の一因と考えられている。このような背景から、dsRNA 蓄積経路の理解とその薬理的制御は、cGAS/STING 経路の機能不全を示すがん細胞に対しても免疫原性を誘導する新たな治療戦略となる可能性がある。実際、がん細胞は自己免疫疾患を回避する過程を利用し、細胞質内の dsDNA や dsRNA を分解する酵素群 (TREX1、DHX9、ADAR、RNaseH2 等) を高発現させることで、過剰な自然免疫応答を抑制していることが知られている。これらの分解酵素の機能を抑制することで、dsDNA および dsRNA センサー経路を介した自然免疫活性化を促進し、ICI との併用による治療効果の向上が期待される。また、dsRNA 構造を分解する酵素である ADAR や RNaseH2 の機能異常は、Aicardi-Goutieres 症候群と呼ばれる遺伝性自己炎症疾患の原因となることが知られている。Aicardi-Goutieres 症候群は、胎生期あるいは出生直後から自然免疫系の過剰な活性化によって無菌性炎症を呈する疾患であり、これは dsRNA 分解機構が破綻すると内因性の核酸が自然免疫センサーによって非自己と誤認され、炎症反応を惹起することを示している。このような現象は、特に胎生期などの急速な細胞増殖・分化やエピゲノム再編が活発に行われる発生段階において、本来転写が抑制されるべき反復配列や内在性レトロウイルス配列が一過性に活性化されることで顕在化すると考えられている。通常、正常細胞ではエピゲノム修飾や転写抑制機構がこれら非自己様の転写産物胎生期の発現を厳密に抑制しており、dsRNA の産生や蓄積は最小限に抑えられている。しかし、がん細胞においては、長期間にわたる遺伝子変異やエピゲノム異常の蓄積により、こうした遺伝子発現制御機構が破綻傾向にあり、結果として、胎生期の細胞と同様に、免疫原性の高い dsRNA が産生されやすい状態であるといえる。本研究の結果から、このようながん細胞

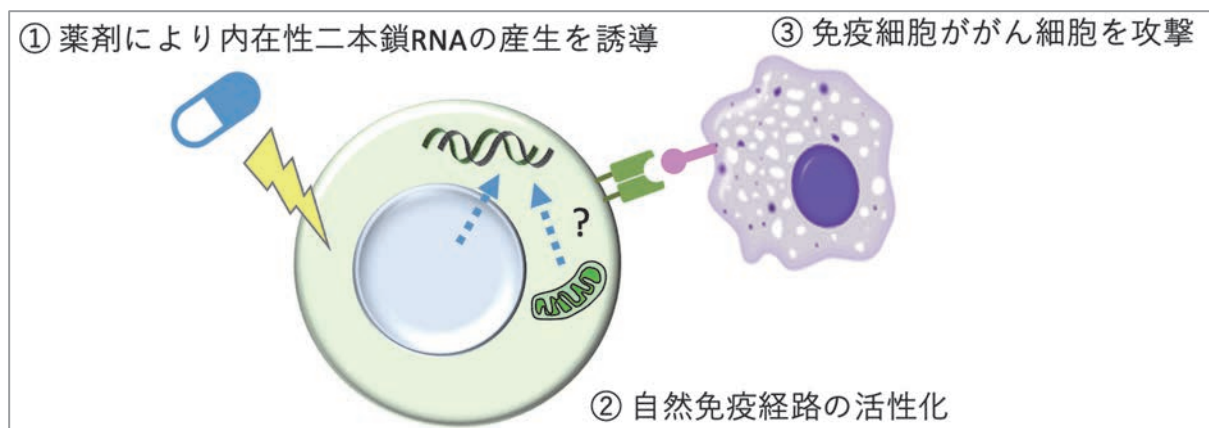


図15. 薬剤による内在性二本鎖 RNA 産生誘導およびがん免疫療法への応用

胞特有の転写・エピゲノム制御の脆弱性を標的にして、内因性の免疫原性核酸、特に dsRNA の細胞内蓄積を薬理的に促進することで、抗腫瘍免疫経路を活性化できることが示唆された (図 15)。

有糸分裂阻害を介した抗腫瘍効果を示す薬剤として、従来から使用されてきたタキサン系薬剤やビンカルカロイド系薬剤に加え、近年では MPS1 のみならず、Aurora kinase A/B、Polo-like kinase 1、CENP-E、Bub1 など紡錘体形成に関与する複数の分子を標的とした分子標的薬が開発されている。これらの薬剤は前臨床試験において、主に免疫不全マウスモデルや in vitro モデルを用いた検証で一定の抗腫瘍効果が報告されているものの、生体内における自然免疫活性化を介した免疫依存的抗腫瘍効果の詳細な分子機序については未だ十分に解明されていない。本研究の成果は、紡錘体形成阻害によって誘導される染色体分配異常が、dsDNA および dsRNA といった免疫原性核酸の細胞質内蓄積を介して自然免疫経路を活性化し、免疫細胞依存的な抗腫瘍効果を誘導し得ることを示唆している。今後、これらの知見をさらに深めることで、紡錘体形成阻害薬の治療効果が期待される患者群の選定に資するバイオマーカーの同定や、より精密な患者層別化戦略の構築につながることを期待される。

V 研究成果の発表

(論文)

1. N. Sasaki, M. Homme, T. Murayama, T. Osaki, T. Tenma, T. An, Y. Takegami, T. Tani, PC. Gedeon, Y. Kobayashi, I. Cañadas, DA. Barbie, R. Yao, and **S. Kitajima***. “RNA sensing induced by chromosome missegregation augments anti-tumor immunity.”

Molecular Cell, 85(4):770-786, 2025 * Corresponding author

2. T. Tani, H. Mathsyaraja, M. Campisi, S. Miriyala, ZH. Li, K. Haratani, CG. Fahey, K. Ota, NR. Mahadevan, Y. Shi, S. Saito, K. Mizuno, TC. Thai, N. Sasaki, M. Homme, CF. Byusuf, A. Kashishian, J. Panchal, M. Wang, B. Wolf, TU. Barbie, CP. Paweletz, PC. Gokhale, D. Liu, R. Uppaluri, **S. Kitajima***, J. Cain*, and DA. Barbie*. “TREX1 inactivation unleashes cancer cell STING-interferon signaling and promotes anti-tumor immunity.”

Cancer Discovery, 14(5):752-765, 2024 * Corresponding author

3. C. Noyes*, **S. Kitajima***, F. Li, Y. Suita, S. Miriyala, S. Isaac, N. Ahsan, EH. Knelson, A. Vajdi, T. Tani, TC. Thai, D. Xu, J. Murai, N. Tapinos, C. Takahashi, DA. Barbie, and M. Yajima. “The germline factor DDX4 contributes to the chemoresistance of small cell lung cancer cells.”

Communications Biology, 18;6(1):65, 2023 * Equal contribution

4. **S. Kitajima***, T. Tani, BF. Springer, M. Campisi, T. Osaki, K. Haratani, M. Chen, EH. Knelson, NR. Mahadevan, J. Ritter, R. Yoshida, J. Köhler, A. Ogino, RS. Nozawa, SK. Sundararaman, TC. Thai, M. Homme, B. Piel, S. Kivlehan, BN. Obua, C. Purcell, M. Yajima, TU. Barbie, PH. Lizotte, PA. Jänne, CP. Paweletz, PC. Gokhale, and DA. Barbie*. MPS1 inhibition primes immunogenicity of KRAS-LKB1 mutant lung cancer.

Cancer Cell, 40(10): 1128-1144, 2022. * Corresponding author

5. R. Yoshida, M. Saigi, T. Tani, BF. Springer, H. Shibata, **S. Kitajima**, NR. Mahadevan, M. Campisi, W. Kim, Y. Kobayashi, TC. Thai, K. Haratani, Y. Yamamoto, SK. Sundararaman, EH. Knelson, A. Vajdi, I. Canadas, R. Uppaluri, CP. Paweletz, JJ. Miret, PH. Lizotte, PC. Gokhale, PA. Jänne, and DA. Barbie. “MET-Induced CD73 Restrains STING-Mediated Immunogenicity of EGFR-Mutant Lung Cancer”
Cancer Research, 82(21): 4079-4092, 2022

(主な学会発表)

1. 第 83 回日本癌学会学術総会、International Session #IS03-6
RNA sensing induced by micronuclei formation augments anti-tumor immunity.
2. 第 82 回日本癌学会学術総会、Symposium 21
Priming the immunogenicity of KRAS-LKB1 mutant lung cancer through STING activation.
3. 第 81 回日本癌学会学術総会、Oral Session #-1051
MPS1 inhibition primes immunogenicity of KRAS-LKB1 mutant lung cancer.
4. 第 61 回日本癌治療学会学術集会、特別企画シンポジウム
Priming the immunogenicity of KRAS-LKB1 mutant lung cancer through STING activation.

胃内共生細菌による胃がん幹細胞の発生制御機構の解明

研究の概要

【研究背景と目的】

H. pylori 感染は胃がんの主たるリスク因子であるが、実際に胃がんを発症するのは感染者の 3% 程度に過ぎず、感染者の中からどのような分子理由で胃がん発症者が選択されているのか、その胃がん選択の分子メカニズムは不明である。胃がんモデルマウスを用いた研究により、*H. pylori* 感染に伴う胃がんの発症には胃内の特定の共生細菌が必須であることを明らかにされている。本研究の主たる目的は、これまでの研代表者の知見に基づいて *H. pylori* 感染胃粘膜において CD44v9 陽性胃がん幹細胞の発生を制御する胃内共生細菌の役割を解明し、*H. pylori* 感染者の中から胃がん発症者が選択される分子理由を提示することにある。

【研究成果】

① 短鎖脂肪酸 (short-chain fatty acids : SCFAs) の HDAC 阻害活性による CAPZA1 過剰発現を介した CD44v9 陽性細胞の発生

：胃上皮細胞株 (AGS 細胞) にプロピオン酸又は酪酸を投与すると、CAPZA1 の過剰な発現が誘導され、プロピオン酸又は酪酸存在下で *H. pylori* が感染すると細胞内に装填された CagA の細胞内での蓄積と CD44v9 の発現上昇が確認された。SCFAs はヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 活性を阻害し CAPZA1 プロモーター領域のヒストンアセチル化を亢進することで CAPZA1 発現を亢進させることが明らかとなり、さらに、CAPZA1 発現の亢進は CagA 分解性オートファジーを阻害する結果、装填された CagA が AGS 細胞内で安定化することを明らかとした。細胞内で安定化した CagA シグナルは CD44v9 の発現を顕著に誘導することを示した。

② SCFAs による *H. pylori* 感染マウス胃粘膜上皮での CD44v9 陽性細胞の誘導

：抗菌薬を投与した SPF マウスへ SCFAs 投与下での *H. pylori* 感染は、CAPZA1 発現の誘導を介して CD44v9 陽性細胞を発生させた。特に CD44v9 陽性細胞の発生は胃前庭部において強いことが明らかとなった。

③ 胃オルガノイドを用いた解析により、SCFAs が CD44v9 陽性細胞の幹細胞化

：マウス胃オルガノイドを用いた *H. pylori* 感染実験でも SCFAs 存在下で CagA 蓄積と CD44v9 発現が促進され、CD44v9 陽性細胞の幹細胞化シグナルが胃体部と胃前庭部で大きく異なることが明らかとなった。

④ 臨床検体を用いた胃液内 SCFAs 濃度と胃がん発症との関連性

：胃液中 SCFAs 濃度は *H. pylori* 感染非胃がん患者に比べて *H. pylori* 感染胃がん患者で高値を示し、胃がん患者では SCFAs 産生性の *Streptococcus* 属細菌の相対的存在量の増加が示された。これらの結果は、胃内 SCFAs が *H. pylori* 感染との協調により胃がんリスクを高めると因子であると考えられた。

【今後の展望】

本研究は、*H. pylori* 感染下における SCFAs 産生性の胃内共生細菌の存在、又は、細菌叢組成が SCFAs 産生性細菌へ濃縮されていくような胃内環境が、CD44v9 陽性胃がん幹細胞の発生を誘導し胃がん発症に繋がることを示した。今後、本研究成果を基盤に SCFAs 産生性胃内共生細菌を標的とした胃がんリスク診断や発がん予防法の開発研究への応用が強く期待される。

共同研究者の氏名、所属機関名

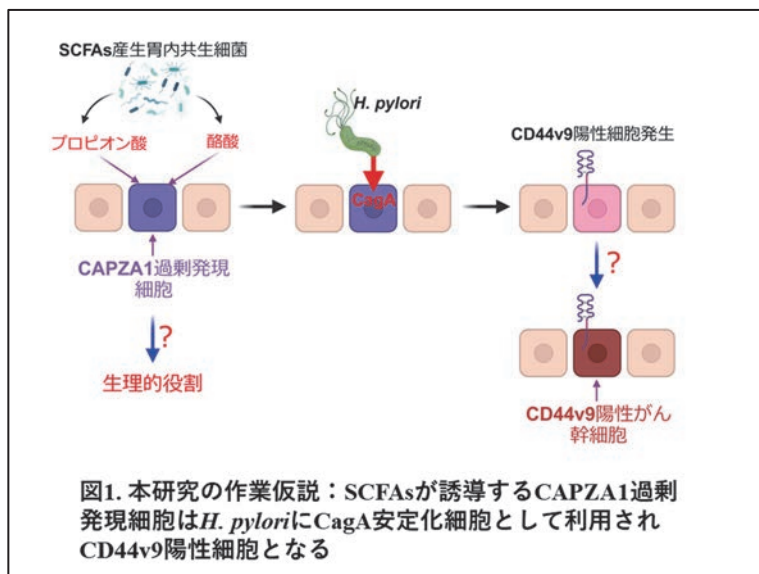
- ・鈴木 秀和 東海大学医学部 消化器内科学
- ・今井 仁 東海大学医学部 健康管理学
- ・杉山 栄二 名城大学薬学部 分析化学研究室

研究報告 本文

I 研究目的 (3~11 ページ)

H. pylori 感染は胃がんの決定的なリスク因子であるが、実際に胃がんを発症するのは *H. pylori* 感染者のなかでも 1~3%程度であることが明らかとされ (*Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 15:458–460, 2018)、胃がん発症者は多数の *H. pylori* 感染者の中から何らかの理由で選択されていると考えられている。しかし、*H. pylori* 感染者の中からどの様な理由で胃がん発症者が選択されてくるのかは明らかにされていない。胃がん発症モデルマウス (INS-GAS マウス) へ SPF (specific-pathogen-free) 条件下 (消化管内に常在細菌が共生している状態) で *H. pylori* を感染させると胃がんを発症するのに対し、INS-GAS マウスを無菌化し *H. pylori* を感染させると胃がんを発症しないことが報告された (*Gastroenterology*, 140:210–220, 2011)。つまり、胃がんは、*H. pylori* の単独感染によって発症するのではなく、特定の胃内共生細菌と *H. pylori* の共感染によって発症すると示唆されている。これらの報告を受け、今日までヒト胃がん患者由来検体を対象とした次世代シーケンス解析により、胃発がんに関わる特定の胃内共生細菌の探索研究が世界中で活発化しているが、これまでに *H. pylori* と協調して胃がんの発症に関わる特定の共生細菌の分子的理由も含めた明確な同定には至っていない。申請者は、*H. pylori* 感染胃粘膜で CD44v9 陽性細胞が発生すると胃がんの再発率が有意に高まること (*Br. J. Cancer*, 109(2):379-386, 2013)、CD44v9 陽性細胞は *H. pylori* の産生するがん蛋白質 CagA を細胞内に安定化させることを明らかにした (Tsugawa H., *et al.*, *Cell Host Microbe*, 12(6):764-777, 2012)。これらの結果は、*H. pylori* 感染胃粘膜で CD44v9 陽性細胞の発生が胃発がんリスクを亢進させる重要な宿主特性となることを示している。さらに申請者は、ヒト胃がん組織を用いた解析から、「CD44v9 陽性細胞は、アクチン重合の制御タンパク質 CAPZA1 の過剰発現細胞で *H. pylori* のがん蛋白質 CagA が安定化することで発生する」ことを見出し、*H. pylori* 感染胃粘膜では CAPZA1 の過剰発現細胞が CD44v9 陽性がん幹細胞の前駆細胞となること報告した (Tsugawa H., *et al.*, *Autophagy*, 15(2): 242-258, 2019,

Tsugawa H., *et al.*, *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.*, 8(3): 319-334, 2019)。これらこれまでの申請者の研究成果から、*H. pylori* 感染胃粘膜において CAPZA1 の過剰発現細胞の発生の有無が *H. pylori* 感染者の中でも胃がん発症者となるリスクを規定すると仮説できる (図 1)。これまでに代表者は、CAPZA1 の mRNA 発現はヒスト



ンアセチル化によって制御されていることを明らかにしている (Tsugawa H., *et al.*, *Autophagy*, 15(2): 242-258, 2019)。そこで本研究では、HDAC 阻害活性を示す短鎖脂肪酸 (SCFAs) に注目し、*H. pylori* 感染胃粘膜における CAPZA1 過剰発現細胞の発生機構解明を目的とした。

II 研究計画及び材料と方法

①胃液内および胃がん組織内の SCFAs 濃度の測定：*H. pylori* 感染胃がん患者及び *H. pylori* 感染胃炎患者を対象に十分なインフォームドコンセントと文書同意を得たのち、胃液および胃生検組織(がん部・非がん部)を採取する。採取した胃液検体内の SCFAs 濃度を液体クロマトグラフィー・マスマスペクトロメトリー (LC-ESI-MS/MS) により測定し、胃がん患者の胃内 SCFAs 濃度を定量的に測定する。

②胃がん患者の胃内に特異的に共生する SCFAs 産生細菌の同定：胃がん患者由来胃液検体より 16SrRNA を PCR 増幅し TA cloning により 16SrRNA をクローン化し胃内共生細菌の 16SrRNA ライブラリーを構築する。構築したライブラリーからピックアップした単一クローンの 16SrRNA シーケンスをサンガーシーケンスにより解析し細菌種を同定する。同定された細菌種についてその相対的存在量が胃炎患者に比べ胃がん患者で亢進しているかを定量的 real-time PCR にて確認する。この手法を繰り返し胃がん患者特異的にその相対的存在量が亢進している SCFAs 産生細菌を同定する。

③SCFAs 存在下の *H. pylori* 感染による CD44v9 陽性がん幹細胞発生機序の解明：申請者が既に構築している胃オルガノイド由来 Mucosoid を用いて SCFAs 存在下での *H. pylori* 感染モデルを用いて、CAPZA1 の発現変動、CagA の蓄積性、CD44v9 陽性化に加えて、CD44v9 陽性細胞のステム化を評価し SCFAs 存在下における *H. pylori* 感染による CD44v9 陽性がん幹細胞の誕生過程を明確化する。

④CAPZA1 過剰発現誘導に関わる SCFAs 受容体同定：SCFAs の HDAC 阻害活性発現には、宿主細胞の Monocarboxylate transporter 1 (MCT1) 及び GPR41/43 が受容体として要求される。加えて、近年申請者は、SCFAs の新規標的分子として apoptosis-associated speck-like プロピオン酸 tein (ASC) を同定した (Tsugawa H., *et al.*, *PLoS Biology*, 18(9): e3000813, 2020)。本研究では、*H. pylori* 感染マウス及び Mucosoid を用いて胃粘膜における SCFAs 受容体蛋白質の発現レベル解析から CD44v9 陽性がん幹細胞の発生に関与する SCFAs 受容体を同定する。

⑤ヒト胃がん患者胃内に共生する SCFAs 産生細菌と *H. pylori* の共感染モデル：16SrRNA ライブラリー解析にて同定した細菌の ATCC 株を利用し *H. pylori* の共感染モデルを AGS 細胞、Mucosoid を用いて構築し、共感染に伴う CD44v9 陽性細胞の発生度の変化を分子レベルで明らかにする。

III 研究成果

1) SCFAs は HDAC 活性を阻害することで胃上皮細胞における CAPZA1 発現を誘導し *H. pylori* 感染下で CD44v9 の発現を亢進させる

胃上皮細胞株 AGS 細胞を用いて、CAPZA1 発現に対する SCFAs の効果を検討した。AGS 細胞にプロピオン酸または酪酸を投与すると用量依存的に CAPZA1 発現が有意に増加した。プロピオン酸及び酪酸はヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤としてよく知られており、また、CAPZA1 の mRNA 発現はプロモーター領域のアセチル化によって制御されているという我々のこ

れまでの知見から、プロピオン酸または酪酸による CAPZA1 の発現誘導はプロモーター領域のヒストンのアセチル化によるものと推察された。そこで、AGS 細胞においてアセチル化ヒストン H3 に対する抗体を用いた ChIP 法により、プロピオン酸または酪酸が CAPZA1 プロモーター領域のアセチル化を調節しているかを検討した。結果、AGS 細胞における HDAC 活性はプロピオン酸および酪酸処理により有意に低下し、また、CAPZA1 プロモーター領域のアセチル化ヒストン H3 レベルはプロピオン酸または酪酸処理により有意に上昇した。CAPZA1 発現の亢進は LAMP1 発現を抑制することでリソソーム形成を阻害し、CagA 分解性オートファジーが抑制されることから、酪酸処理下で CagA 分解性オートファジーが阻害されているかを検討した。結果、*H. pylori* 感染 AGS 細胞におけるリソソームマーカー LysoTracker Red 染色の亢進は酪酸処理により顕著に抑制された。さらに、AGS 細胞内の CagA レベルは酪酸処理濃度依存的に上昇し、特に、5 mM 以上の酪酸処理では、LAMP1 発現の低下とそれに伴う CAPZA1 発現の増加が観察された。我々はこれまでに、CAPZA1 過剰発現細胞における細胞内 CagA の蓄積が CD44v9 発現を誘導することを報告している。そこで我々は、*H. pylori* 感染 AGS 細胞において、プロピオン酸または酪酸処理が CD44v9 発現を誘導するかどうかを解析した。酪酸またはプロピオン酸処理は *H. pylori* 感染 AGS 細胞において CD44v9 の発現を誘導したが、CagA 欠失変異株 (*H. pylori* Δ cagPAI) 感染細胞では誘導しなかった。これらの結果を総合すると、AGS 細胞において、CAPZA1 プロモーター領域のアセチル化ヒストンを促進することで CAPZA1 の過剰発現を誘導する SCFAs は、*H. pylori* 感染下で CagA の蓄積を介して CD44v9 の発現を促進することが胃上皮細胞株 AGS 細胞を用いた解析で明らかになった。この発がんにつながるシグナルカスケードが正常な胃粘膜上皮でも確認されるかを、マウス感染モデル並びに胃オルガノイドモデルを用いて再考する必要性が示された。

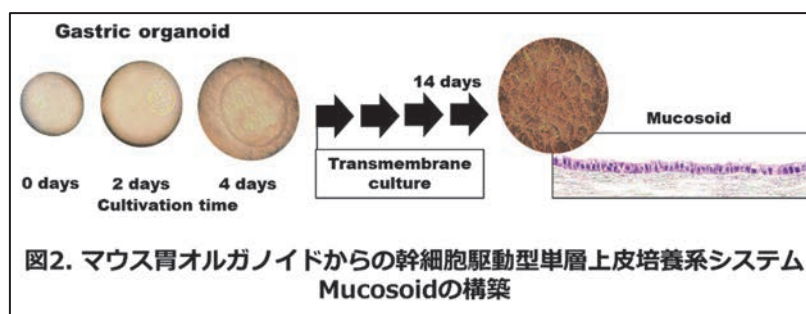
2) SCFAs は *H. pylori* 感染マウス胃粘膜で CD44v9 陽性化を促進させる

H. pylori 感染下における SCFAs による CD44v9 陽性細胞の発生過程を *in vivo* モデルで解析するために、SPF マウスへ内因性の SCFAs の影響をキャンセルさせるために抗生物質 (1 g/L アンピシリン、1 g/L メトロニダゾール、1 g/L ネオマイシン、0.5 g/L バンコマイシン) を 4 週間飲水投与した後、*H. pylori* の経口感染の 1 週間前から 300 mM プロピオン酸又は酪酸を自由飲水投与した。興味深いことに、抗生物質の投与は胃体部および胃前庭部における CAPZA1 の免疫染色レベルを有意に低下させ、プロピオン酸または酪酸投与は両領域において CAPZA1 の染色レベルを上昇させた。これらの結果は *in vivo* モデルにおいても CAPZA1 発現が SCFAs に応答して亢進することを示している。プロピオン酸または酪酸投与マウスでは、胃粘膜の基底部分から小窩まで、胃粘膜上皮全体に CAPZA1 の強い染色シグナルが観察された。次に、酪酸投与マウスの胃粘膜における HDAC 活性の変化、および CAPZA1 近位プロモーター領域のアセチル化ヒストンレベルを調べた。その結果、抗生物質投与は HDAC 活性を有意に上昇させたが、抗生物質投与マウスへの酪酸投与は HDAC 活性を SPF マウスのレベルまで有意に低下させた。同様に、CAPZA1 近位プロモーター領域のアセチル化ヒストンのレベルは抗生物質の投与によって著しく減少し、その後、抗生物質を投与したマウスに酪酸を投与すると、ヒストンのアセチル化が SPF マウスと同じレベルまで有意に上昇した。これらの知見は SPF マウスで認められる内因性の SCFAs はその HDAC 活性を介して宿主上皮細胞の遺伝子発現を調節し得ることを示しており、CAPZA1 はそのうちのひとつであると考えられ、SCFAs が粘膜上皮細胞の遺伝子発現を制御し胃粘膜のホメオスタシスの維持に

に強く関与していると推察された。次に、SCFAs を投与した *H. pylori* 感染マウスで、CD44v9 陽性細胞の発生が促進されるかを検証した。抗生物質を投与したマウスでは、CD44v9 の免疫染色シグナルはほとんど検出されず、一部の CD44v9 陽性染色は胃体部及び胃前庭部ともに小窩領域に限局していた。対照的に、CD44v9 免疫染色シグナルはプロピオン酸または酪酸の投与によって増加し、体部および胃前庭部の小窩部および底部の両方で CD44v9 陽性染色が検出された。本研究結果は、SCFAs が *H. pylori* 感染下において CAPZA1 の発現を亢進させることで、CD44v9 陽性細胞の生成に寄与することを示した。

3) *H. pylori* 感染胃オルガノイドモデルを用いた SCFAs による胃粘膜上皮細胞の CD44v9 陽性化

H. pylori 感染下で SCFAs による CD44v9 陽性細胞の生成につながる正常上皮細胞における細胞応答を解析するため、マウス胃体部および胃前庭部からそれぞれ胃オルガノイドを作製し、その後、オルガノイド培養をトランスウェルインサートを用いた二次元 (2D) 単層培養へと移行させた。得られた 2D 単層培養物はムコソイドと名付けられ正常胃粘膜上皮を再現した単層の幹細胞駆動型培養上皮細胞モデルとして構築される (図 2)。



ノイド培養をトランスウェルインサートを用いた二次元 (2D) 単層培養へと移行させた。得られた 2D 単層培養物はムコソイドと名付けられ正常胃粘膜上皮を再現した単層の幹細胞駆動型培養上皮細胞モデルとして構築される (図 2)。胃体部由来ムコソイドでは、酪酸存在下で *H. pylori* 感染時にのみ細胞内に装填された CagA が検出され、CAPZA1 の発現増加と相関して CD44v9 発現が増強した。一方で、胃前庭部由来のムコソイドでは *H. pylori* 感染後に転座した CagA が検出され、酪酸処理によって細胞内 CagA シグナルと CD44v9 の発現がさらに増強した。これらの結果は、胃体部と胃前庭部では、*H. pylori* を介した上皮細胞への CagA 注入に対する応答性が異なることを示唆している。しかし、プロピオン酸または酪酸存在下での *H. pylori* 感染では、胃体部および胃前庭部由来ムコソイドの両方において CAPZA1 が強く染色される中に CD44v9 陽性細胞が観察されたことから SCFAs は胃体部でも細胞内 CagA の安定性を強く誘導すると考えられた。一方、同条件下で *H. pylori* ΔcagPAI 株を感染させた場合、CAPZA1 が強く染色されるにもかかわらず CD44v9 陽性細胞は検出されなかった。また、酪酸非投与下でも *H. pylori* 感染ムコソイドにおいて CD44v9 陽性細胞はほとんど検出されなかった。これらの結果は、正常胃粘膜上皮細胞においても、SCFAs によって誘導される CAPZA1 の過剰発現を介した細胞内 CagA の安定化が CD44v9 陽性細胞の発生を誘導することを明らかにした。

4) CAPZA1 過剰発現細胞への CagA 蓄積により誘導される CD44v9 陽性細胞は胃前庭部由来オルガノイドでのみ幹細胞特性を示す

CagA 蓄積により誘導される CD44v9 陽性細胞が幹細胞様特性を示すかどうかを明らかにするために胃幹細胞マーカーである LGR5、KLF5、および SALL4 の発現を CD44v9 との二重免疫染色により評価した。酪酸存在下で *H. pylori* に感染した胃前庭部由来ムコソイドにおいて、CD44v9 陽性細胞では幹細胞マーカーの発現が認められたが、*H. pylori* ΔcagPAI 株感染細胞では認められなかった。これらのことから、宿主細胞内での CagA の安定化が胃上皮細胞に幹細胞様特性を付与

する重要な役割をも担っていることが明らかになった。また一方で、酪酸存在下での *H. pylori* 感染胃体部由来ムコソイド中には CD44v9 陽性細胞が検出されるにもかかわらず、CagA 陽性 *H. pylori* 感染および酪酸処理にかかわらず幹細胞マーカーの発現は全く観察されなかった。この結果は、がん幹細胞発生のメカニズム、及び細胞内 CagA のレスポンスが胃体部と胃前庭部で異なることを示唆している。また、CD44v9 陽性細胞の幹細胞化が spasmolytic polypeptide- expressing metaplasia (SPEM) 細胞を背景としているかどうかを確認する目的で SPEM マーカーである TFF2 と CD44v9 の二重染色を行った。SPEM 細胞は胃腺の基部に位置する潜在性前駆細胞から発生する。酪酸処理した *H. pylori* 感染胃体部由来ムコソイドでは TFF2 染色シグナルは検出されなかった。同様に、胃前庭部由来ムコソイドにおいても CD44v9 陽性細胞では TFF2 染色はほとんど検出されなかった。この結果は、CagA 誘導性 CD44v9 陽性細胞が SPEM 細胞の特性を示さないことを示している。これら結果を総合すると、胃オルガノイド由来ムコソイドを用いた感染モデル解析は、SCFAs が CAPZA1 のエピジェネティックな制御を介して細胞内 CagA の蓄積を誘導し、その結果 CD44v9 陽性細胞を発生させるという胃発がんシグナルモデルを支持するものである (図 1)。特に胃前庭部では、CagA 誘導性 CD44v9 陽性細胞は SPEM 細胞とは異なる独立した幹細胞特性を示しており、これら細胞が胃がん幹細胞の起源となる可能性を示唆している。

5) 胃内共生細菌叢組成変化に連動する胃管腔内 SCFAs の濃度変化が *H. pylori* 感染者のなかで早期胃がんを発症するリスクを規定する要因のひとつとなる可能性について

ここまでの、AGS 細胞を用いた *in vitro* 解析、マウス感染モデルを用いた *in vivo* 解析、並びに、胃オルガノイドを用いた *ex vivo* 感染モデル解析から *H. pylori* 感染胃粘膜における SCFAs の存在が間接的に CD44v9 陽性細胞の発生を促し、胃発がんリスクを高める可能性があることを明らかにしてきた。そこで、実際に、臨床検体を用いた *H. pylori* 感染胃発がん患者の胃管腔内の短鎖脂肪酸レベルが発がんに関連したかを *H. pylori* 感染非胃がん患者検体と比較解析することで検証した。これらの臨床検体は東海大学医学部倫理委員会の承認を受けた研究プログラムに準じて実施し、患者に対して十分なインフォームドコンセントを実施した後に採取した胃液検体を用いて実施した。まず、胃がん患者と非胃がん患者由来の胃液検体を用いて SCFAs 濃度と胃内細菌叢組成を比較した。採取した検体は男性 44 人、女性 22 人で合計 66 人を解析対象として登録した。全検体のうち *H. pylori* に感染していない 25 人と胃液中の細菌 DNA が不十分で採取できなかった 9 人を除いた 32 人に対して胃液中の細菌叢解析と SCFAs 濃度の測定を実施した。また同時に患者背景の臨床的特徴を分析した。*H. pylori* 感染者のグループでは (n=41)、平均年齢が *H. pylori* 非感染者のグループ (n=25) よりも高かった。平均 BMI と性別には *H. pylori* 感染及び非感染者のグループ間で統計的有意差はなかった。*H. pylori* 感染者グループでは 10 人が現在感染しており、31 人に除菌歴があった。胃酸分泌抑制剤 (PPI/P-CAB) を服用している人は *H. pylori* 感染及び非感染者のグループ間で差はなかった。次に、*H. pylori* 感染の有無に応じた SCFAs 濃度分析の結果、プロピオン酸と酪酸は *H. pylori* 感染者のグループで高く、特に、プロピオン酸は統計的有意差をもって *H. pylori* 感染者においてその濃度は上昇していた。これらの SCFAs 濃度上昇が胃がんの発症と相関しているかどうかを調べるために、*H. pylori* 感染者のグループから腸上皮化生陽性、又は、胃がん発症の有無で分けて分析した結果、興味深いことに、腸上皮化生の有無で分けたグループ間では、プロピオン酸と酪酸の濃度に差はなかったが、胃がん発症の有無で分けた場合、

胃がん発症者のグループの方が胃がん非発症者のグループよりもプロピオン酸と酪酸の濃度が高くなる傾向があることが明らかになった。さらに、*H. pylori* 陽性者の胃液検体を用いた胃内細菌叢を解析し、SCFAs の変動に関連する細菌種を検討した。まず、胃がん発症者のグループでは、胃がん非発症者のグループと比較して、胃内の細菌叢組成の多様性が減少する傾向が見られた。SCFAs を産生することで知られる *c_Bacilli*、*o_Lactobacillales*、*p_Firmicutes* などの細菌分類群が胃がん発症者のグループで増加していたため、SCFAs 濃度の相違による胃内細菌叢全体の構成を調べる目的で、属レベルでの PCoA 分布 3D プロットによる β 多様性を解析した。結果、胃内細菌叢組成は SCFAs 濃度を指標に A 群と B 群の 2 つのグループに明確に分かれることが明らかになった。PCoA 解析では、B 群の胃内細菌叢組成を保持する患者においてプロピオン酸と酪酸の濃度が A 群よりも高い傾向にあることが明らかになった。A 群と B 群に分類される患者について、萎縮性胃炎患者や *H. pylori* 感染患者は A 群と B 群ともに分布しており、関連する割合に差はなかったが、早期胃がん発症者並びに早期胃がん発症者で上皮化生は示す患者はすべてプロピオン酸と酪酸の濃度が高い傾向にある B 群に分類されていた。一方で、進行胃がん患者の割合は、B 群よりも A 群に有意に多く分類されたことから、胃がんの進行に伴い *H. pylori* が減少し、胃内細菌叢組成が動的な変化を示した結果だと考察された。本年度の臨床医学的解析による研究結果は、胃内細菌叢組成に依存する多様な胃内環境要因が *H. pylori* 感染粘膜における胃発がんリスクを規定しているが、その中でも SCFAs 濃度の上昇は胃発がんリスクを規定する一因となっている可能性を示唆している。

6) *H. pylori* との共感染により胃発がんリスクを亢進させる SCFAs 産生性胃内共生細菌の探索と同定

胃発がんカスケードの進展に関わる胃内共生細菌を、SCFAs 産生性という細菌学的特性を指標に、胃がん患者より採取したヒト胃液検体から抽出した細菌性 DNA を用いて次の方法で特定の細菌探索を行った。ヒト胃液検体から抽出した細菌性 DNA から 16SrRNA を PCR 増幅し TA cloning により 16SrRNA をクローン化し、16SrRNA のサンガーシークエンスから細菌種を同定し、胃炎患者に比べ胃がん患者でその存在量が亢進しているかを定量的 real-time PCR にて評価し、胃がん患者特異的にその相対的存在量が亢進している SCFAs 産生細菌を探索した。その結果、*Streptococcus* 属細菌が同定され、本菌と *H. pylori* の共感染状態により胃発がん性シグナルが惹起されている可能性が示唆された。同定された *Streptococcus* 属細菌の培養上清を HPLC 解析すると、一般大腸菌 (*E. coli* K12 strain) にくらべ培養上清中へのプロピオン酸及び酪酸の産生能が高いことが示された。そこで、*Streptococcus* 属細菌と *H. pylori* の共感染が CAPZA1 の過剰発現細胞の発生を介した CD44v9 陽性細胞の誕生に繋がるかを明らかにする目的で、まず、AGS 細胞に *Streptococcus* 属細菌の培養上清存在下で *H. pylori* を感染させた。その結果、CAPZA1 の過剰発現誘導を介した CD44v9 発現の亢進が確認でき、*Streptococcus* 属細菌と *H. pylori* の共感染が CD44v9 陽性細胞の発生を介して胃発がんリスクを亢進させる可能性が示唆された。

IV 考察

H. pylori 感染者の中でも胃がん発症者は東アジアでも約 3% 程度であり、感染者の中でも極めて限られた患者が胃がん発症者として選択されている。INS-GAS マウスを用いた *in vivo* 感染モデ

ルの結果は、胃がんは *H. pylori* の単独感染によって発症するのではなく、特定の胃内共生細菌と *H. pylori* の共感染によって発症することを示した衝撃的な報告であり、これによって臨床検体を対象とした胃内細菌叢解析が遺伝子解析技術の革新と相まって一気に活発化した。その結果、*H. pylori* 感染や胃酸分泌抑制薬の使用により、胃内細菌叢組成はその多様性を失うことが明らかにされ、またその結果、炎症促進性の細菌が相対的に増加しこれら細菌の増加によって胃発がんリスクが亢進するという結果が報告されている。しかし、*H. pylori* 感染者の中で一様に増加傾向を示す炎症促進性細菌がいる中で、なぜ胃がん発症者は感染者全体の3%にとどまるのかの説明ができない。また、胃がん発症者に対する細菌叢解析の結果は、胃がん発症者では *Lactobacillus*、*Escherichia-Shigella* などの細菌が増加しこれらは発癌性の N-ニトロソ化合物を産生する細菌群に分類されることが報告されている。胃管腔内での N-ニトロソ化合物の増加は胃発がんにつながることで良く知られており、これら報告による胃発がんカスケードも CAPZA1 過剰発現の発生を軸とする CD44v9 陽性幹細胞の発生による発がんカスケードと同様に重要であると考えられる。SPEM 細胞は、胃粘膜損傷により主細胞が再プログラムされることで発生すると考えられている。これは慢性炎症に伴う前がん病変とも関連している。SPEM 細胞の起源については、主細胞由来説が優勢ではあるものの幹細胞由来説も報告されておりその議論は継続中であるが、CAPZA1 過剰発現の発生を軸とする CD44v9 陽性細胞の幹細胞化過程はこれら SPEM 細胞とは異なる細胞内シグナルにより CagA 依存的に誘導されるものであると考えられた。我々の結果は、細胞内で安定化した CagA には強力な幹細胞化シグナルの惹起活性があることを示している。本研究による我々の結果は、*Streptococcus* 属細菌に代表される SCFAs 産生性細菌と *H. pylori* の共存が胃発がんリスクを亢進させ、*H. pylori* 感染者の中から胃がん発症者としてセレクションされる理由の一つである可能性があることを示している。本研究成果を基盤として将来的な胃発がんリスク診断技術の開発や胃がん予防に貢献する胃内細菌叢への介入方法の開発研究への応用が期待できる。

最後に、2022年度から3年間に渡って本研究へのご支援を賜った公益財団法人車両競技財団に衷心より御礼申し上げます。本助成がなければ明らかにすることができなかつたこれら貴重な知見を見出すことができたことは研究者にとっても大変貴重な経験となりました。本研究成果は現在2報の論文として発表すべく原稿を執筆中です。

V 研究成果の発表 c

【原著論文】

1. **Tsugawa H***, Tsubaki S, Tanaka R, Nashimoto S, Imai J, Matsuzaki J, Hozumi K. Macrophage-depleted young mice are beneficial in vivo models to assess the translocation of *Klebsiella pneumoniae* from the gastrointestinal tract to the liver in the elderly. *Microbes Infect.*, 105371, 2024.
2. Tanaka R, Imai J, Sugiyama E, Tsubaki S, Hozumi K, **Tsugawa H***. Cyclic-di-AMP confers an invasive phenotype on *Escherichia coli* through elongation of flagellin filaments. *Gut Pathogens*, 16: 6, 2024.
3. **Tsugawa H***, Ohki T, Tsubaki S, Tanaka R, Matsuzaki J, Suzuki H, Hozumi K. Gas6 ameliorates intestinal mucosal immunosenescence to prevent the translocation of a gut pathobiont, *Klebsiella pneumoniae*, to the liver. *PLoS Pathogens*, 19(6): e1011139, 2023.
4. Matsui H, Rimbara E, Suzuki M, Tokunaga K, Suzuki H, Sano M, Ueda T, **Tsugawa H**, Nanjo S,

Takeda A, Sasaki M, Terao S, Suda T, Aoki S, Shibayama K, Ota H, Mabe K. Development of serological assays to identify *Helicobacter suis* and *Helicobacter pylori* infections. *iScience*, 106522, 2023.

5. Tanaka R, Imai J, **Tsugawa H**, Eap Bil K, Yazawa M, Kaneko M, Ohno M, Sugihara K, Kitamoto S, Nagao-Kitamoto H, Barnich N, Matsushima M, Suzuki T, Kagawa T, Nishizaki Y, Suzuki H, Kamada N, Hozumi K. Adherent-invasive *E. coli* – induced specific IgA limits pathobiont localization to the epithelial niche in the gut. *Frontiers in Microbiology*, 14: 1031997, 2023.

【学会発表】

1. 津川 仁. 細菌から放出されて飛んでいく菌体外膜小胞の疾患への関わり. 日本薬学会第145 年会 シンポジウム S07 生物系薬学部会・微生物シンポジウム ダイバーシティー微生物学研究のシーズの創成と戦略. 福岡国際会議場. 2025.
2. 津川 仁. 消化管内細菌の菌体外膜小胞を介した遠隔臓器での疾患操作. 第 94 回日本寄生虫学会 サテライトシンポジウム. 大阪大学コンベンションセンター. 2025
3. 津川 仁. 腸内共生細菌が放出する菌体外微粒子による宿主攪乱. 日本細菌学会関東支部インターラボセミナー. 法政大学市ヶ谷キャンパス 2024.
4. 津川 仁, 椿 翔吾, 田中里佳, 津々木 博康, 澤 智裕, 松崎 潤太郎. 肺炎桿菌の菌体外微粒子によるマクロファージの機能改変とその病因学的意味. 第 35 回日本生体防御学会学術総会. 北海道大学人獣共通感染症研究センター. 2024.
5. 津川 仁. *Klebsiella pneumoniae* の菌体外膜小胞によるマクロファージのゾンビ化メカニズムとその意義. 第 70 回トキシシンポジウム. 琵琶湖グランドホテル京近江. 2024.
6. 津川 仁. *H. pylori* 感染者が胃がん患者になる分子理由. 第 97 回日本細菌学会総会シンポジウム 9 Bench to Bedside/Bedside to Bench -基礎と臨床、現場をつなぐ-. 札幌コンベンションセンター. 2024.
7. 津川 仁, 椿 翔吾, 田中 里佳, 津々木 博康, 澤 智裕, 松崎 潤太郎. *Klebsiella pneumoniae* の菌体外膜小胞による生体ハイジャックが誘導する細菌転移. 第 97 回日本細菌学会総会ワークショップ 1 細胞外小胞研究最前線. 札幌コンベンションセンター. 2024.
8. Hitoshi Tsugawa, Shogo Tsubaki, Sho Nashimoto, Rika Tanaka, Jin Imai, Takuma Araki, Yusuke Yoshioka, Juntaro Matsuzaki. Gut pathobiont *Klebsiella pneumoniae* translocate to the liver from gastrointestinal tract through induction of M2-like phenotype macrophage by bacterial extracellular vesicles. 第 51 回内藤カンファレンス～Microbiome in Health and Disease～. 札幌シャトレーゼガトーキングダムサッポロ. 2024.
9. Hitoshi Tsugawa, Shogo Tsubaki, Rika Tanaka, Jin Imai, Takuma Araki, Juntaro Matsuzaki. *Klebsiella pneumoniae*-Derived Extracellular Vesicles プロピオン酸 mote the Bacterial Translocation to the Liver from Gastrointestinal Tract by Suppressing No プロピオン酸 duction of Macrophages. American Society for Microbiology 2024 (ASM2024). アトランタ USA. 2024.
10. 津川 仁, 椿 翔吾, 田中 里佳, 津々木 博康, 澤 智裕, 松崎 潤太郎. 肺炎桿菌の菌体外膜小胞によるマクロファージの NO 産生の抑制は本菌の肝臓へのトランスロケーションを達成させる. 第 77 回日本酸化ストレス学会&日本 NO 学会合同学術集会. 神奈川歯科大学. 2024.

11. Sho Nashimoto, Shogo Tsubaki, Juntaro Matsuzaki, Yusuke Yoshioka, Takuma Araki, Hitoshi Tsugawa. *Klebsiella pneumoniae* derived extracellular vesicles facilitate the bacterial translocation from the gastrointestinal tract to the liver via inducing M2-like phenotype of macrophages. International Society for extracellular vesicles 2024 (ISEV2024). Melbourne, Australia. 2024.
12. 津川 仁、椿翔吾、梨本尚、荒木琢磨、吉岡祐亮、松崎潤太郎. *Klebsiella pneumoniae* の生存戦略における菌体外膜小胞の役割. 第 34 回日本生体防御学会学術総会. 京都大学. 2023.
13. 椿翔吾、荒木琢磨、吉岡祐亮、松崎潤太郎、津川 仁. *Klebsiella pneumoniae* の small RNA は菌体外膜小胞で宿主細胞内へ運ばれる. 第 69 回 トキシシンポジウム. 京都. 2023.
14. Hitoshi Tsugawa, Shogo Tsubaki, Rika Tanaka, Juntaro Matsuzaki, Katsutoshi Hozumi. Gas6 ameliorates intestinal mucosal immunosenescence and prevents the bacterial translocation of orally infected *Klebsiella pneumoniae* from the gastrointestinal tract. Cell Symposia: Infection biology in the age of the microbiome. Paris, France. 2023.
15. Shogo Tsubaki, Juntaro Matsuzaki, Yusuke Yoshioka, Takuma Araki, Hitoshi Tsugawa. *Klebsiella pneumoniae*-derived small RNAs are delivered into host cells by bacterial extracellular vesicles. International Society for extracellular vesicles 2023 (ISEV2023). Seattle, USA. 2023.
16. 津川仁、平井美和、上田孝、松崎潤太郎、鈴木秀和. Co-infection with *Streptococcus* sp. and *H. pylori* enhances the risk of gastric carcinogenesis. 第 96 回 日本細菌学会総会. 姫路. 2023.
17. 津川仁. 発がん過程を制御する腸内共生細菌と宿主の生物界間シグナル. 第 56 回 日本無菌生物ノートバイオロジー学会総会. 東海大学. 2023

難病指定疾患・肺動脈性肺高血圧症における
最新ゲノム診断技術を駆使した分子遺伝学的発症基盤解明研究

《研究の概要》

肺動脈性肺高血圧症 (pulmonary arterial hypertension: PAH) は主に思春期以降の女性に発症する指定難病であり、国内認定患者数約 4300 人の希少疾患である。PAH の一部は結合組織病や先天性心疾患を基礎疾患とするが、基礎疾患が明瞭でない特発性症例 (IPAH) がある。2000 年に遺伝性を示す PAH の解析から、代表的な原因遺伝子として BMP2 遺伝子の変異が見出された。我々が保有するバイオバンクを用いた集計では、BMP2 遺伝子の変異は基礎疾患を有しない PAH の約 30-40% (Gamou S, Kataoka M, et al. Clin Genet 2018)、その他の原因遺伝子の変異は各約 1%程度であることが判明しており、我々の最新の上記知見に基づく新規の感受性遺伝子を合わせると、PAH 全体の半数以上が遺伝的背景による発症であると考えられる。しかし、このことはすなわち、未だ半数の特発性 PAH 患者での発症原因は未解明であることを示唆する。よって、本研究では、我々がこれまで 10 年以上に渡って構築してきた国内最大規模の PAH バイオバンクを利用し、以下の研究を実施した。

バイオバンク検体を用いて全エクソーム・トランスクリプトーム解析を実施し、スプライシング及び発現異常の原因となる遺伝子変異を網羅的に検出した。この過程によって見出された重要な発症原因/感受性遺伝子について、患者が実際に保有する遺伝子変異の状態を CRISPR-Cas9 システムによってマウスで再現し、シングルセル解析・マルチオミクス解析を駆使して発症機序の全容解明と新規治療標的の同定を実現するための研究を実施した。具体的には、これまでの我々の研究で見出した新規の PAH 発症関連遺伝子である RNF213 および SOX17 のバリエーションを組み込んだ患者ゲノム再現マウスを作成し、発症病態機序解明と治療法創出のための研究を実施した。

我々は、日本人 PAH 患者特有の発症原因遺伝子候補として Ring finger Protein 213 遺伝子 (RNF213) の病的バリエーション (R4810K) を同定したが、RNF213 R4810K 変化は、日本人肺高血圧症患者の約 1 割に認め、現在使用可能な肺血管拡張薬を複数用いても治療抵抗性を認める患者が多く、PAH の根本的治療法の開発が望まれる患者群であった。また、RNF213 R4810K バリエーションは、PAH 以外にも、もやもや病や末梢性肺動脈狭窄症など、複数の難治性血管病においても発症関連遺伝子として報告されており、RNF213 関連血管病という新規疾患概念が提唱可能と考え、この概念を論文報告した (Hiraide, Kataoka, et al. Life (Basel). 2022)。我々は、RNF213 R4810K バリエーションを CRISPR-Cas9 システムを用いて組み込んだ患者ゲノム再現マウスを作製し、発症分子機序解明研究に取り組んできた。これまでの解析において、RNF213 R4810K バリエーション陽性マウスにおいては、Cxcl12-Cxcr4 シグナルが PAH 誘発マウスにて活性化しており、Cxcr4 の antagonist である AMD3100 を追加投与すると、PAH が軽症になることも確認した。本成果は、2024 年度に論文報告を行った (Hiraide, Kataoka, et al. Sci Rep. 2024)。

共同研究者の氏名・所属機関

- ・勝俣良紀 慶應義塾大学医学部スポーツ医学教室
- ・後藤信一 東海大学医学部総合内科
- ・小崎健次郎 慶應義塾大学医学部臨床遺伝学センター

研究報告

I 研究目的

肺動脈性肺高血圧症 (pulmonary arterial hypertension: PAH) は主に思春期以降の女性に発症する指定難病であり、国内認定患者数約 4300 人の希少疾患である。PAH の一部は結合組織病や先天性心疾患を基礎疾患とするが、基礎疾患が明瞭でない特発性症例 (IPAH) がある。2000 年に遺伝性を示す PAH の解析から、代表的な原因遺伝子として BMPR2 遺伝子の変異が見出された (Nat Genet 2000)。我々が保有するバイオバンクを用いた集計では、BMPR2 遺伝子の変異は基礎疾患を有しない PAH の約 30-40% (Gamou S, Kataoka M, et al. Clin Genet 2018)、その他の原因遺伝子の変異は各約 1%程度であることが判明しており、我々の最新の上記知見に基づく新規の感受性遺伝子を合わせると、PAH 全体の半数以上が遺伝的背景による発症であると考えられる。しかし、このことはすなわち、未だ半数の特発性 PAH 患者での発症原因は未解明であることを示唆する。また一部の結合組織病では 15%ほどで PAH を合併し、心房中隔欠損症等の先天性心疾患でも PAH 合併例が多く存在するが、これら先天性心疾患/結合組織病に合併した PAH において、合併の有無を分ける遺伝的背景は存在するの否か、についても未解明である。

NGS により数多くの疾患で網羅的かつ包括的な遺伝子解析が行われている。全ゲノム解析に比べ全エクソーム解析は注目点が絞られ解析は効率的だが、変異の相当部分を占めると推定されるスプライシングや転写の制御に関しては十分な解析が行なえず、欠落している可能性が高い。近年、全エクソーム DNA データとトランスクリプトーム mRNA データを融合し、ベイズ統計学に基づくスプライシング変異を網羅的に検出する方法 (SAVNet) が開発され、癌のスプライシング変異のメカニズム・全体像の解明に有効性が証明されている。本研究の共同研究者・小崎は、これを独自に発展させ希少未診断疾患の解析に応用している。本研究では、我々が保有している剖検試料を含む PAH 国内最大バイオバンクを材料に、この新規解析法を PAH における網羅的なスプライシング変異と発現異常の原因となる変異の検出に応用する。また、東北メディカルメガバンク ToMMo による高精度の日本人ゲノムリファレンスデータの拡充により、マイクロアレイで同定した約 67 万個の一塩基多型 SNP データから全ゲノム 30 億塩基対を推定し疑似的に再構築する imputation 法が実用化された。SAVNet 解析と併せ疾患関連領域や遺伝子の探索、スプライシングや転写の制御配列の推定に利用可能と考える。

よって、本研究では、我々がこれまで 10 年以上に渡って構築してきた国内最大規模の PAH バイオバンクを利用し、以下の学術的問いの解答を探ることを目的とする。

[問 1] SAVNet 解析、さらにゲノム再構築法を応用し、PAH においてスプライシング異常や発現異常を引き起こす変異の網羅的探索が達成されるか

[問2] 結合組織病や先天性心疾患に合併する PAH において、新たな発症原因/感受性遺伝子や合併の有無を分ける遺伝子は存在するのか

[問3] これら PAH における遺伝学的な分子病態機序の全容を解明し、統合的な遺伝子診断カタログの作成から、早期発症予知や発症予防法の開発に繋げることが出来るか

複雑性難病疾患の発症機構の解明のためには、遺伝子変異の情報のみならず臨床情報、生活環境情報等も必須である。応募者らの研究チームが管理保有するバイオバンクは試料とそれら情報を連結しており、そこから遺伝的背景と相互作用する発症促進要因を抽出評価することは、本研究チームのみ実現可能である。

今後、ゲノム医療をさらに発展させ、癌および難病の各コア領域における個別化医療を実現していくためには、遺伝子情報に加えてその発現に影響する因子を含めた統合的な遺伝子診断カタログの作成と、それに照らし合わせた遺伝子異常の意義や治療法の検討が必須であり、一般臨床への啓発普及に不可欠となる。本研究は、難病指定の循環器疾患において基盤となるモデルを構築する研究であり、発展性と創造性が極めて高い研究と考える。

II 研究計画及び材料と方法

[1] 本研究の具体的な研究計画・方法

研究計画①: バイオバンク拡充・オミクス解析・SAVNet 解析・ゲノム再構築解析の実施

1) 多層オミクス解析とバイオマーカー探索

日本循環器学会等を通じて全国施設へも働きかけ、バイオバンクを強化し、PAH サンプル数を拡張する。本応募者チームは既に IPAH を中心に約 350 検体の全エクソーム解析データを取得しており、本研究では対となるトランスクリプトーム解析を実施する。先天性心疾患/結合組織病合併 PAH にも対象を広げ、全エクソーム・トランスクリプトーム解析を実施する。トランスクリプトームから各疾患概念に特徴的なバイオマーカーを検証する。積極的な治療にも関わらずに残念ながら死亡の転帰を辿り、病理解剖・エクソーム解析された患者検体が本バンクに含まれている。この検体と関連疾患の剖検検体を用い、可能な限り肺以外の組織も含めたより詳細な病理学的解析とトランスクリプトーム解析を施行する。

2) SAVNet 解析を用いた統合解析システムによる新規変異の探索

上記 1) の全エクソームとトランスクリプトームの対のデータを、共同研究者・小崎が構築した SAVNet 解析システムを用いて、従来の解析で見えなかったスプライシング及び発現異常の原因となる遺伝子変異を網羅的に検出する。

また、従来世界的に遺伝子解析は基礎疾患のない IPAH に集中しており、先天性心疾患/結合組織病合併 PAH の疾患原因/感受性遺伝子は注視されていない。しかし、先天性心疾患/結合組織病合併 PAH においても原因/感受性遺伝子の存在が示唆される報告が、我々の報告も含め相次ぐ。我々の保有するバイオバンク試料のさらなる全エクソーム・トランスクリプトーム・SAVNet 解析システムによる解析によって、先天性心疾患/結合組織病合併 PAH に関与する遺伝的変異を、スプライシングや発現異常に関する変異等を含めて網羅的に探索する。

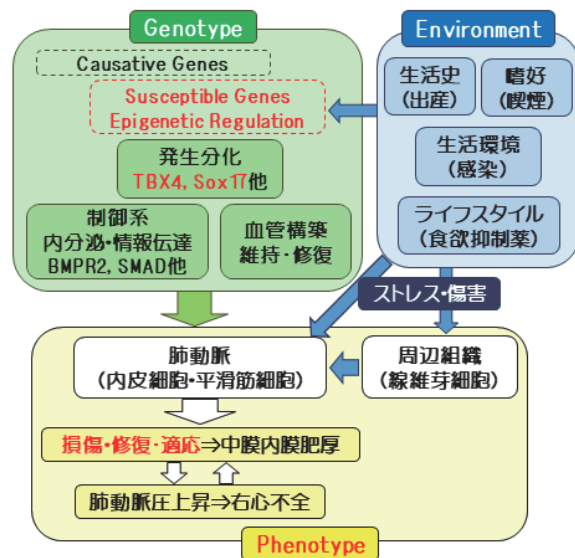
3) 最新日本人レファレンスデータを利用したゲノム再構築解析

近年の世界的なゲノム比較研究によると、日本人は均一性が高く近隣の民族と異なる特徴のゲノムを持つ集団である事が示され、遺伝的変異の解析には日本人に特化したレファレンスデータが必要とされる。本研究では ToMMo のデータに基づき SNP 約 67 万個を搭載し日本人に特化したマイクロアレイを用い、IPAH 及び先天性心疾患/結合組織病合併 PAH 患者試料の SNP を決定、ToMMo の最新日本人ゲノムレファレンスデータを利用した imputation 法によりゲノムを再構築する。SAVNet 解析の結果、日本人健常者集団や公開されている他の疾患データとの比較によって、疾患関連領域の同定と疾患関連遺伝子の探索、さらにスプライシング変異等も含めた網羅的解析を目指す。特に極めて稀な変異のみならず、一般集団での 1%程度に見出される比較的高頻度の多型的な変異にも注目し感受性遺伝子の探索を目指す。すなわち、全エクソーム/トランスクリプトームに新規遺伝子異常検出法の SAVNet 解析とゲノム再構築法を応用し、PAH の遺伝的背景に対する全容解明を行う。

研究計画②：遺伝子診断カタログ作成と臨床的発展

4) 遺伝子診断カタログの作成

PAH の発症に関与する原因/感受性遺伝子の発現は成長成熟の時間軸の中で変化し、内分泌等の内的要因や生活環境に由来するストレス等の外的要因も発現に epigenetic に影響すると考えられる(次ページ図)。発症の基盤となる遺伝子の変異情報とその病原性情報、さらに内的・外的な要因を整理した遺伝子診断カタログを作成することが、一般臨床にも利用可能な遺伝子診断システムの将来的な構築のために必須である。このような遺伝子診断カタログの作成は癌ゲノム領域



では試みが開始されているが、難病疾患領域ではほとんど進んでいない。本研究チームは外部企業(アメリエフ株式会社等)と連携し、PAH 遺伝子診断カタログの作成を行う。

5) 作成したカタログを用いた臨床的発展

上記 1) で作成した PAH 関連遺伝子診断カタログと、治療経過と治療応答性、転帰予後等の臨床情報、家族歴、生活環境、嗜好等の環境・生活情報を精細に収集して統合可視化し再評価することで、PAH 診断の精度向上や治療成績の向上へ繋げる。さらにより広い範囲の先天性心疾患や結合組織病等の他の疾患のデータベースとも互換性を持たせ比較検討の可能性を持たせる事により、医療機関間の情報の共有化はもとより、発症の予防と早期の予知、治療選択肢の拡大、創薬を含めた新規治療の開拓等の臨床的な寄与も期待される。

研究計画③：遺伝学的な分子病態機序解明

5) 患者ゲノム再現動物を用いた分子病態機序解明研究

上記の研究計画①および②において見出された重要な遺伝子がどのように PAH 発症に寄与するか、分子病態機序を解明し、発症予防と創薬に繋げる必要がある。よって、これら見出された遺伝子について、患者が実際に保有する遺伝子変異の状態を CRISPR-Cas9 シス

テムによってマウスで再現し、シングルセル解析・マルチオミクス解析を駆使して発症機序の全容解明と新規治療標的の同定を実現する。また、遺伝学的要因に応じて外的環境調整や同定した治療標的の経路へ介入を行うことで、発症リスクのある人を事前に発症予防する、新規予防治療法を実現する。特に、上記の研究計画②の診断カタログによって導き出される外的要因についても、どのように内的要因と相互作用するのか、その分子機序を解明する。

[2] 本研究の研究チーム体制、及び、副代表研究者・共同研究者の役割分担

本研究では、代表研究者(片岡雅晴)が以下の研究者らと共に、複数の研究分野を内包した研究ユニット体制を構築し、広汎なオミクス解析の基盤を確立して遂行される。

・片岡雅晴(産業医科大学第2内科学・教授)：代表研究者。バイオバンク管理、及び、臨床データとゲノム情報の管理統括、研究計画立案を含む、研究統括。

・勝俣良紀(慶應義塾大学医学部スポーツ医学センター・専任講師)：副代表研究者。臨床遺伝専門医。ゲノム情報と臨床情報の統合解析。

・後藤信一(東海大学医学部総合内科・講師)：共同研究者。ハーバード大学ゲノム解析専門コアラボで研究員として勤務した経験あり。ゲノム情報のアノテーション作業や病原性評価のための *in silico* 構造解析を担当。

・小崎健次郎(慶應義塾大学医学部臨床遺伝学センター・教授)：共同研究者。ゲノム解析研究のスペシャリストで我が国第一人者。日本人類遺伝学会理事長。SAVNet 解析・ゲノム再構築解析を中心にバイオインフォマティクスを協力。本研究のゲノム情報の解析・運用は、小崎の協力により円滑に進行するものとする。

・他、産業医科大学医学部第2内科学大学院生3名(赤司・宮本・柳生)、慶應義塾大学医学部循環器内科大学院生3名(平出・新屋・桃井)、が研究協力者として参画。産業医科大学の大学院生はゲノム解析の補助を、慶應義塾大学の大学院生は動物実験の補助を、それぞれ担当する。

III 研究成果

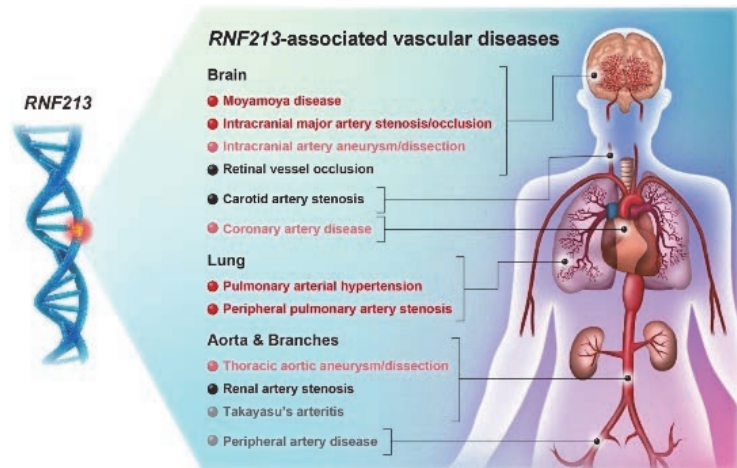
本財団の助成を受けてから、トランスクリプトーム解析を実施し、全エキソーム・トランスクリプトーム解析のデータを用いた SAVNet 解析を進めている。また、同時進行にて患者外的要因も含めた遺伝診断カタログ作成を進めている。さらに、ジャポニカアレイを実施し、imputation 法によるゲノム再構築のための前段階となるデータ解析を日本人 PAH 患者 150 検体において完了した。これらの取り組みの過程において、炎症性サイトカイン TNF- α の血管細胞表面受容体遺伝子ファミリーの一つである TNFRSF13B 遺伝子が新規の PAH 発症原因遺伝子であることを発見した。

また、PAH における遺伝学的な分子病態機序解明のための研究においては、本財団の助成を受けた後に実施した動物実験にて、いくつかの重要な知見を得ることに成功した。まず、我々は、日本人 PAH 患者特有の発症原因遺伝子候補として Ring finger Protein 213 遺伝子(RNF213)の病的バリエーション(R4810K)を同定した。これは、モヤモヤ病や末梢性肺動脈狭窄症においても発症関連遺伝子バリエーションとして報告されており、東アジア圏に多い

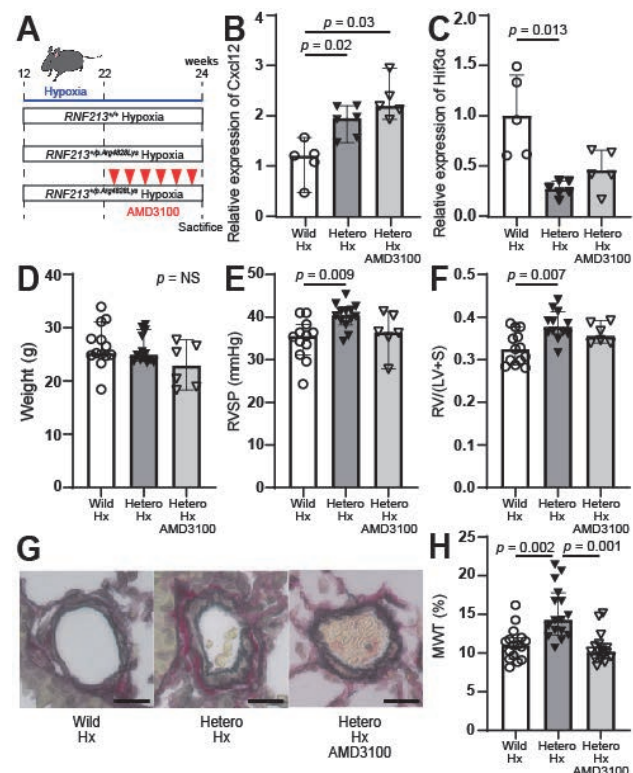
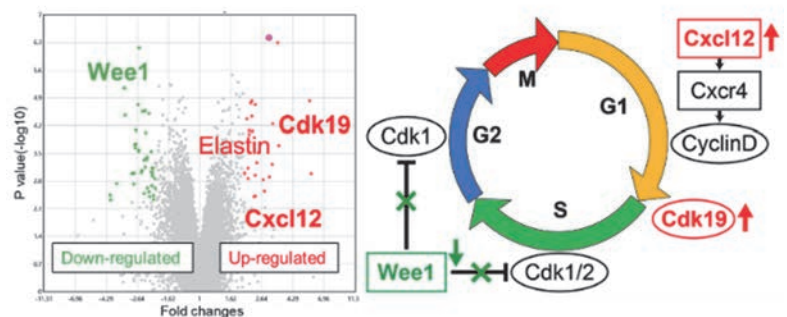
創始者変異であることも判明した。よって、このバリエントを保有することで臓器横断的な難治性血管病を発症することがわかり、RNF213 関連血管病として報告した (Hiraide, Kataoka, et al. Life (Basel). 2022) (右最上段図)。我々は、この RNF213 関連血管病の病態解明と治療薬探索のため、RNF213 R4810K バリエントを CRISPR-Cas9 システムを用いて組み込んだ患者ゲノム再現マウスを作製し、発症分子機序解明研究に取り組んだ。これまでの解析において、RNF213 R4810K バリエント陽性マウスにおいては、Cxcl12-Cxcr4 シグナルが PAH 誘発マウスにて活性化しており (右 2 段目図)、Cxcr4 の antagonist である AMD3100 を追加投与すると、PAH が軽症になることも確認した (右 3 段目図)。Cxcl12 は好中球の老化や細胞障害と関連した因子であるため、RNF213 R4810K バリエントにより好中球を介した血管障害が惹起され、RNF213 関連血管病が惹起されるメカニズムが想定され、また、Cxcl12-Cxcr4 シグナルへの介入がその治療ターゲットとなることが示唆された。

マウスの肺の免疫染色では、低酸素環境で飼育した RNF213 野生型マウスの肺検体では CXCR4 の発現が低かったが、低酸素環境下飼育 RNF213+/p.Arg4828Lys マウスの肺は、外膜および間質性病変のビメンチン陽性紡錘形細胞で CXCR4 の発現が有意であった。ヘテロ接合型 RNF213 p.Arg4810Lys 変異体を有する重度の PAH 患者 2 人の剖検によって得

RNF213 関連血管病の概念図



Rnf213 signal pathway (in vivo)



A) RNF213 R4810K バリエント保有マウスへの低酸素 PAH モデル作成と AMD3100 (Cxcr4 antagonist) 投与プロトコル、B, C) Cxcl12 と Hif3 α の発現量、D, E, F) 体重・右室収縮期圧・左室に対する右室重量比、G, H) 肺動脈毛細血管の免疫染色と中膜肥厚の解析

られたヒト肺標本で検証したところ、両患者肺標本においても CXCR4 の発現が有意に更新していることが確認できた。

また、先天性心疾患に合併する PAH において、SOX17 遺伝子バリエントを有力候補として同定しており、さらなる検証を進めている。さらには、結合組織病に合併した PAH 患者検体での全エキソーム解析では、強皮症等との関連が示唆された複数の遺伝子バリエントを同定し、それらがダブル・トリプルで認められる症例が存在すること、また、そういったバリエントの数や組み合わせが臨床的な重症度とも相関する可能性を掴んでおり、現在鋭意検証を進めている。

IV 考察

本研究では、RNF213 p. Arg4810Lys バリエントを保有するマウスは低酸素飼育により PAH が増悪し、この悪化した PAH は CXCL12/CXCR4 シグナル伝達経路の阻害によって改善されることを示した。CXCR4 の発現は、RNF213 p. Arg4810Lys バリエントを有するマウスおよび患者の肺標本における肺血管で有意に上昇していた。これらの知見は、CXCL12/CXCR4 シグナル伝達経路が RNF213 関連血管病としての PAH 患者に対する新たな治療標的となる可能性を示唆した。

CXCL12/CXCR4 経路は免疫系調節の主要な調節因子であり、白血球の遊走、腫瘍の進行、血管新生に関与していることが報告されている。CXCL12 は、主に血管内皮細胞、間質線維芽細胞、および様々な臓器の骨芽細胞によって発現される恒常性ケモカインである。CXCL12 は、炎症または低酸素環境による細胞損傷によって発現亢進し、膜貫通型 G タンパク質共役受容体である CXCR4 に結合する。活性化された CXCR4 は、G α サブユニットの立体構造変化を促進し、PI3K-AKT-mTOR カスケードに作用する。これらのシグナル伝達経路は、細胞の増殖、遊走、および免疫恒常性の維持に不可欠とされる。

最近では、心血管疾患における CXCL12/CXCR4 シグナル伝達経路の重要性が強調されている。CXCL12/CXCR4 経路の活性化は、モノクロタリン誘発肺高血圧症モデルラットおよび SU5416 投与と低酸素暴露による肺高血圧症モデルラットの発症にも関与することが報告されている。特発性 PAH 患者における CXCL12 の血清中濃度の上昇は、右室機能の低下や患者予後と相関することも報告されている。さらに、もやもや病の患者で CXCL12 発現および CXCR4 陽性末梢細胞の数が増加していることも報告されている。一方、我々の研究では、AMD3100 注射による CXCR4 遮断がマウスモデルの PAH の重症度を改善したことを示した。すなわち、CXCL12/CXCR4 経路が RNF213 p. Arg4810Lys バリエントによる血管障害の発症と密接に関連している可能性を示唆している。

RNF213 は、5207 個のアミノ酸からなる 590kDa のタンパク質をコードし、E3 ユビキチンタンパク質リガーゼ活性を持つリングフィンガードメインと ATPase 関連ドメインの 2 つの領域を含んでいる。過去の報告では、RNF213 が PI3K-AKT 経路、WNT シグナル伝達、および炎症誘発性サイトカインの活性化を介して内皮細胞の増殖と血管新生を調節することが示されている。RNF213 ノックダウン内皮細胞 (EC) と野生型の血管平滑筋細胞 (vSMC) の共培養は、vSMC の増殖と遊走に有意な変化をもたらし、EC 中の RNF213 タンパク質が EC と vSMC の相互作用を調節したことを示唆した。我々の研究では、低酸素環境で飼育された RNF213

p. Arg4828Lys マウスの肺標本で CXCL12 mRNA 発現が上昇していた。また、以前の研究では、CXCL12/CXCR4 シグナル経路の下流である FoxM1 発現の上昇が平滑筋細胞の増殖を促進し、肺血管リモデリングと肺高血圧症をもたらすことも報告されている。よって、CXCL12/CXCR4 経路に関連する分子メカニズムと細胞間相互作用、および PAH の発症には密接な関連があるが、さらに詳細な機序解明のためにはさらなる検証が必要であろう。

本研究の限界は次の通りである。まず、RNF213 p. Arg4828Lys マウスの肺におけるマイクロアレイ解析で有意に変動していた他の分子経路を評価していない。次に、内皮細胞や肺平滑筋細胞など、異なる細胞種に関する分子メカニズムを解明するための RNA シーケンシングを行わなかった。さらに、RNF213 と CXCL12 の間のタンパク質相互作用の評価が行われていない。RNF213 の機能は十分に理解されていないため、免疫沈降質量分析を含むさらなる研究が必要と考える。

本研究の結語として、RNF213 p. Arg4810Lys バリエントと PAH との間には CXCL12/CXCR4 経路を介した因果関係が同定されたこと、また、この経路が RNF213 関連血管病の新規治療標的となりうること、が示唆された。

V 研究成果の発表

1. Hiraide T, Suzuki H, Momoi M, Shinya Y, Fukuda K, Kosaki K, Kataoka M. RNF213-associated vascular disease: a concept unifying various vasculopathies. *Life (Basel)*. 2022;12:555.
2. Hiraide T, Tsuda N, Momoi M, Shinya Y, Sano M, Fukuda K, Shibahara J, Kuramoto J, Kanai Y, Kosaki K, Hakamata Y, Kataoka M. CXCL12/CXCR4 pathway as a novel therapeutic target for RNF213-associated pulmonary arterial hypertension. *Sci Rep*. 2024;14:26604.

【禁無断転載】

令和8年4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3-2-2-5
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 8. 4. 100

