公益財団法人　寺岡記念育英会

2020 年度　研究活動費助成事業　研究活動報告書一覧

慢性肉芽腫症の新規治療戦略シーズ創生
川崎医科大学　生化学教室　生化学 助教　宮野佳　・・・ 1

糖尿病性腎症進展における糸球体内皮 Glycocalyx の恒常性破綻の分子機序の解明
川崎医科大学　腎臓・高血圧内科学　慢性腎臓病、糖尿病性腎臓病
講師　角谷裕之　・・・ 6

モデル生物を利用した遺伝性腎疾患治療薬探索系のプラットフォーム構築
重井医学研究所　細胞制御部門　分子生物学　主任研究員　古家野孝行　・・・ 11

単細胞解析を用いた骨髄系細胞リプログラミングによる脳腫瘍に対する
効果的な免疫療法の開発
岡山大学病院　脳神経外科　脳腫瘍　医員　大谷理浩　・・・ 14

低酸素誘導因子による腸管低酸素環境の維持及び組織寛容性導入に着目した
移植片対宿主病の新規予防・治療法の開発
岡山大学病院　血液・腫瘍内科　骨髄移植　助教　藤原　英晃　・・・ 18

※対象者の所属・職位は、本助成事業への応募当時のものです。

慢性肉芽腫症の新規治療戦略シーズ創生

川崎医科大学生化学教室,自然科学教室

宮野 佳

白血球の一種である好中球は、生体に侵入してきた病原体を貪食し、それを殺菌する。その際、強力な殺菌剤として活性酸素が用いられる。活性酸素は、NADPH オキシダーゼ 2（NOX2）酵素複合体により生成される。本酵素複合体の重要性は、その構成成分の遺伝的欠損または変異が、好中球の殺菌能を失わせ、幼少期より重篤な感染症を繰り返す慢性肉芽腫症（CGD, chronic granulomatous disease）の発症することにより示される。NOX2 酵素複合体の重要な構成タンパク質である P22PHOX のアミノ酸置換を伴う点変異は、CGD を引き起こすことが知られているが、そのメカニズムは不明な点が多く残されたままであった。本研究で、P22PHOX のアミノ酸置換はタンパク質を不安定化し分解を促進してしまうこと、分解経路への誘導に小胞体関連分解経路 ERAD（ER-associated degradation）構成タンパク質 Derlin-1 が関与していることを見出した。本研究成果は、将来的に CGD 治療法の新しい選択肢として Derlin-1 を標的とした P22PHOX 分解系阻害剤の投薬の可能性を提案するものである。

１．研究開始当初の背景

重篤な感染症を繰り返す慢性肉芽腫症（CGD, chronic granulomatous disease）は、遺伝性疾患で、殺菌剤である活性酸素を生成する NOX2 酵素複合体の機能不全による（図 1）。CGD 症例の 6%は、NOX2 構成タンパク質因子 P22PHOX（CYBA 遺伝子）の常染色体劣性遺伝である。対処療法として、抗生剤や INF γの投与が行われているが無菌室での生活を余儀なくされる。また、造血幹細胞移植が唯一の根治療法であるが、そのハードルは高い。

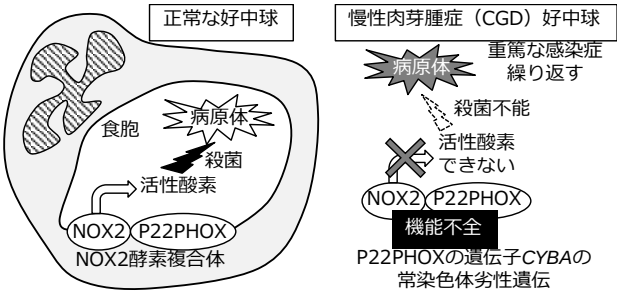


図 1. 好中球による殺菌と CGD

２．研究の目的

私は、CYBA-CGD 症例の中でも、アミノ酸置換が生じた P22PHOX 変異タンパク質が不安定で分解され、その結果CGD を発症することを見出している(図2)。

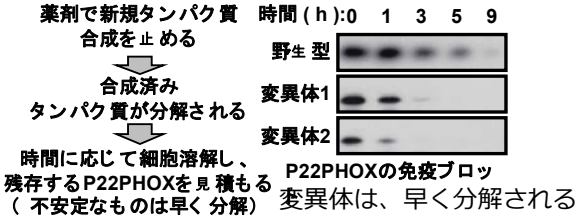


図 2. 点変異と P22PHOX 不安定化

そこで、変異型 P22PHOX を分解経路からエスケープさせれば、CGD 発症を抑えられると考えた（図 3）。

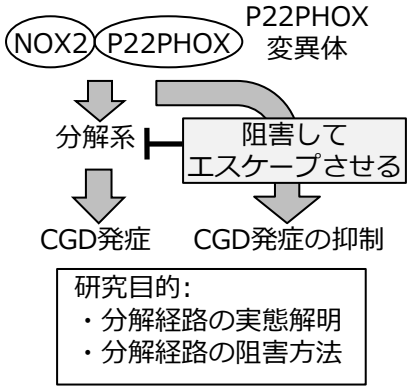


図 3. P22PHOX 分解回避による CGD 発症の抑制不安定化

本研究では、P22PHOX の分解系の実態を明らかにし、それを抑制することによる新規 CGD 治療戦略のシーズを生み出すことを目的とする（図 3）。

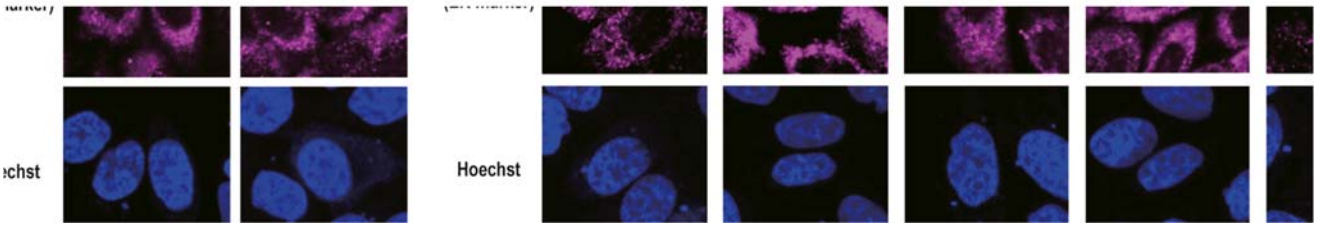


図 4. *CYBA*（P22PHOX 遺伝子）の exon3 のアミノ酸置換をともなう点変異の集中

３．研究の方法

CYBA（P22PHOX 遺伝子）の exon3 は、タンパク質分解を促進する変異が集中していることから、分解系の認識・結合領域と考えられる（図 4）。次の項目に焦点を絞り、本研究を実施した。

① P22PHOX 変異体タンパク質の細胞内局在
② アミノ酸置換による分解促進の実証
③ NOX2 との結合実験
④ Derlin-1 との結合実験
⑤ Derlin-1 のノックダウン実験

これらの項目は、動物培養細胞（CHO-K1 細胞および HeLa 細胞）での再構成系で実施した。野生型 P22PHOX タンパク質および変異体 P22PHOX タンパク質、および NOX2 の cDNA をタンパク質発現ベクターpcDNA3 に組み込んだ。上記プラスミドベクターは、プラスミド導入試薬使用し、動物培養細胞へ導入し、タンパク質を強制発現させることにより、P22PHOX-NOX2 系を再構成した。また、Derlin-1 のノックダウンは、RNA 干渉法により実施した。具体的には、Thermo Fisher Scientific 社の stealth RNAi を使用した。さらに、タンパク質発現レベルは、免疫ブロット法により見積もった。

４．研究成果

細胞膜に局在する膜タンパク質は、小胞体（ER, endoplasmic reticulum）で生合成され、Golgi 体を経由して形質膜（PM, plasma membrane）へ輸送される。CGD を引き起こす P22PHOX のアミノ酸置換は、P22PHOX 自身を不安定化し、ER でのタンパク質品質管理機構により選別され、異常高次構造をもつタンパク質の除去機構の小胞体関連分解経路 ERAD（ER-associated degradation）により分解経路へと導かれると考えられる（図 3）。本研究では、培養細胞で外来性 P22PHOX タンパク質を強制発現さている。そこでまず、発現させた P22PHOX が正しく ER に局在しているかどうかを調べた。野生型 P22PHOX と exon3 の変異体 P22PHOX タンパク質は、いずれも ER 局在マーカーである PDI タンパク質と共局在した（図 5）。このように、外来性 P22PHOX タンパク質を発現する CHO 細胞は、ER における P22PHOX 変異体タンパク質の特性を明らかにするために有用なシステムであることがわかった。

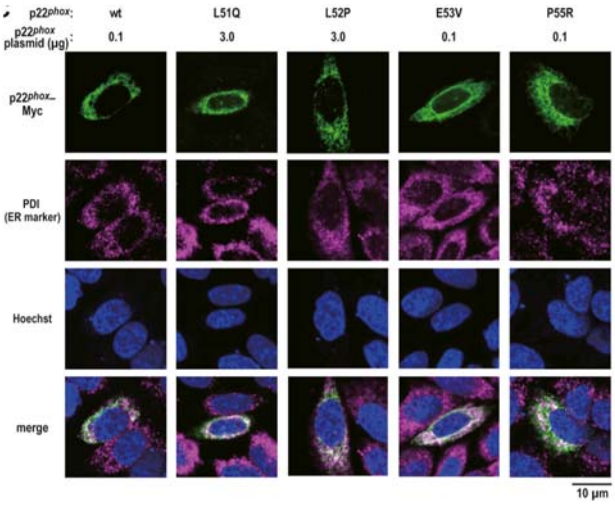


図 5. P22PHOX 変異体タンパク質の細胞内局在
（主な発表論文１より引用・図改変）

続いて、CHO 細胞に外来性に発現させた P22PHOX タンパク質の ER におけるタンパク質レベルでの安定性について検討した。変異導入により異常な高次構造を持つタンパク質は、ERAD により速やかに分解経路に誘導されるため、タンパク質レベルでの存在時間が短くなる（＝不安定なタンパク質）。P22PHOX を発現させた CHO 細胞をシクロヘキシミド（CHX,

cycloheximide）で処理した。CHX は、新規のタンパク質合成の阻害剤である。CHX 処理後、すでに生合成されていたタンパク質は、不安定であればあるほど（異常な高次構造を持つ）、速やかに分解される。図 6 は、CHX 処理から一定時間経過後、各変異体 P22PHOX タンパク質の残存タンパク質の量を免疫ブロットで見積もった結果である。

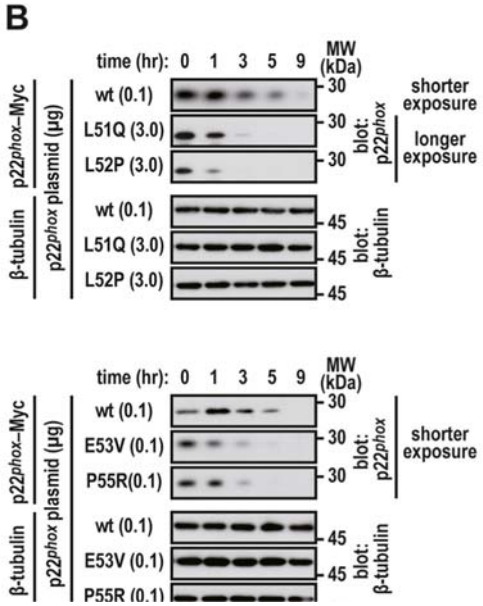


図 6. P22PHOX タンパク質の残存量
（主な発表論文 1 より引用・図改変）

野生型の P22PHOX に比べて、CHX 処理後 3 時間で、いずれの変異体 P22PHOX のタンパク質の量が大幅に減少していた。この結果は、これらのアミノ酸置換が、P22PHOX の高次構造に異常をきたし、タンパク質レベルで不安定になっていることを示唆する。

P22PHOX は、酵素活性中心を持つ NOX2 と複合体を形成する。複合体形成は、NOX2 が殺菌剤である活性酸素を生成するために必須である。私は P22PHOX のアミノ酸置換が、P22PHOX のタンパク質レベルでの不安定化を導いただけでなく、NOX2 との結合能にも影響しているのではないかと考えた。野生型または変異型 P22PHOX を発現させた CHO 細胞に NOX2 を共発現させ、NOX2 と P22PHOOX 間に結合が形成されているかどうかを免疫沈降法により調べた（図 7）。

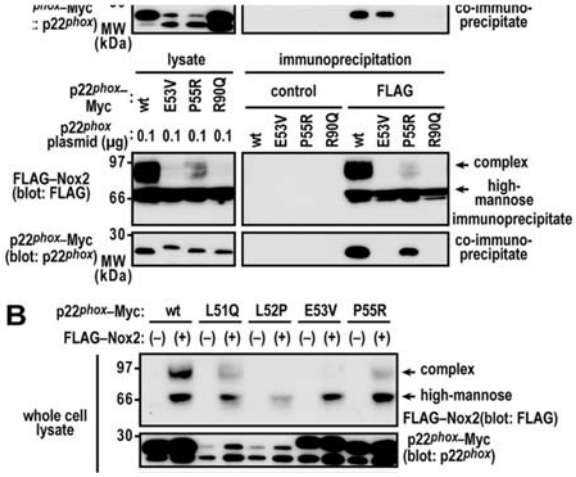


図 7. P22PHOX と NOX2 の結合
（主な発表論文 1 より引用・図改変）

NOX2 タンパク質を免疫沈降させると、P22PHOX（L51Q）と P22PHOX（P55R）変異体タンパク質は、野生型 P22PHOX と同等に共沈降した。一方、P22PHOX（L52P）と P22PHOX（P55R）タンパク質は、共沈降しなかった。この結果は、52 番目の Leu と 55 番目の Pro が NOX2 との結合に関わっていることを示唆する。こうして、L^{51}-L^{52}-E^{53}-P^{55} 配列は、P22PHOX のタンパク質安定性だけでなく NOX2 との複合体形成においても重要な役割を果たしている。

異常高次構造をもつタンパク質は、ERAD により分解経路へと導かれる。ERAD は、異常タンパク質を認識し、ER から逆行輸送させる。これらの過程は、ERAD を構成する複数のタンパク質に依存する。ERAD 構成タンパク質の Derlin-1 は、異常膜タンパク質の認識に関わっていることが知られている。次に私は、実際に変異体 P22PHOX タンパク質が Derlin-1 により認識されているかどうかを検討した。

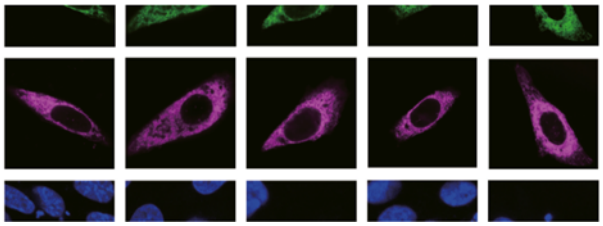


図 8. P22PHOX と Derlin-1 の結合
（主な発表論文 1 より引用・図改変）

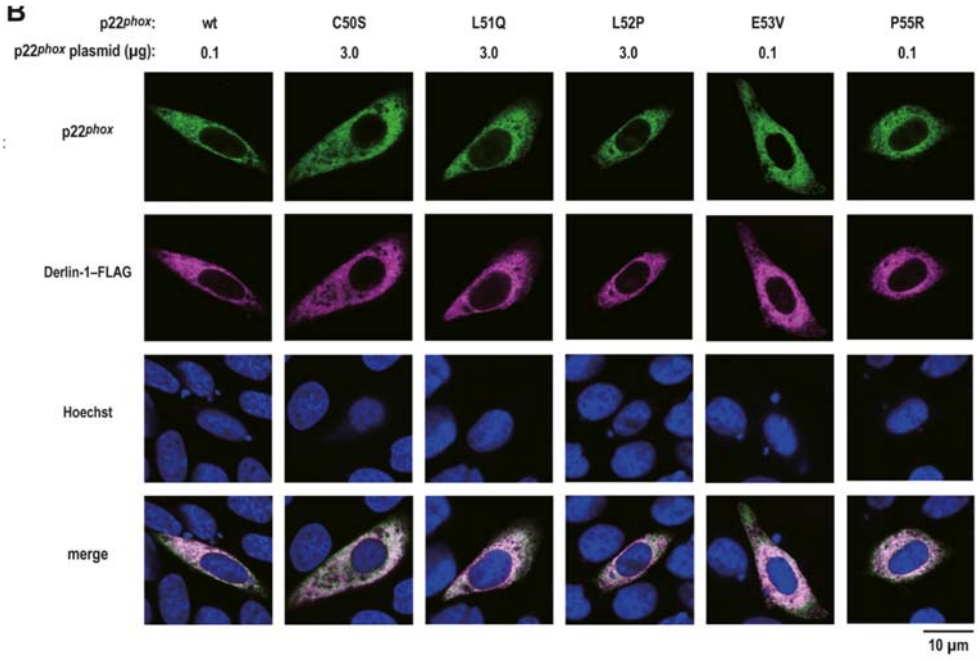


図 9. P22PHOX と Derlin-1 の局在（主な発表論文 1 より引用・図改変）

野生型または変異型 P22PHOX を発現させた CHO 細胞に Derlin-1 を共発現させ、免疫沈降法により Derlin-1 と P22PHOX 間に結合が形成されているかどうかを調べた。野生型 P22PHOX と比べて、いずれの P22PHOX 変異体タンパク質は、Derlin-1 と強く結合していることが分かった（図 8）。また、いずれの変異体タンパク質も ER において Derlin-1 と共局在していた（図 9）。これらの結果は、アミノ酸置換により異常構造をきたした P22PHOX タンパク質が、ERAD 構成タンパク質 Derlin-1 により認識されていることを示唆する。

次に私は、Derlin-1 を抑制すれば、P22PHOX 変異体タンパク質の分解を抑制できるのではないかと考えた。そこで、P22PHOX 変異体タンパク質を発現させた細胞の内在性 Derlin-1 のノックダウンを行った。興味深いことに、Derlin-1 をノックダウンしたところ、いずれの変異体タンパク質も発現量が増加した（図 10）。さらに、Derlin-1 のノックダウンは、P22PHOX 変異体タンパク質の分解速度を抑制した（図 11）。これらの結果は、P22PHOX 変異体タンパク質が ERAD 構成タンパク質 Derlin-1 により認識され、分解経路に誘導されていることを示唆する。

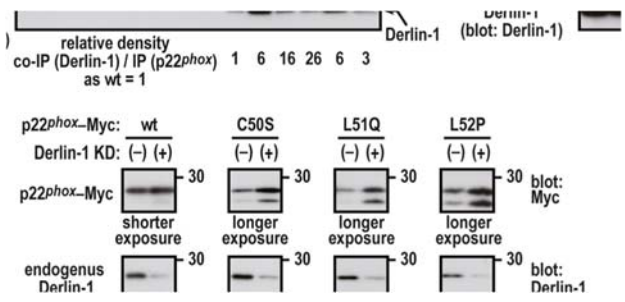


図 10. Derlin-1 の KD による P22PHOX 発現量の変化（主な発表論文 1 より引用・図改変）

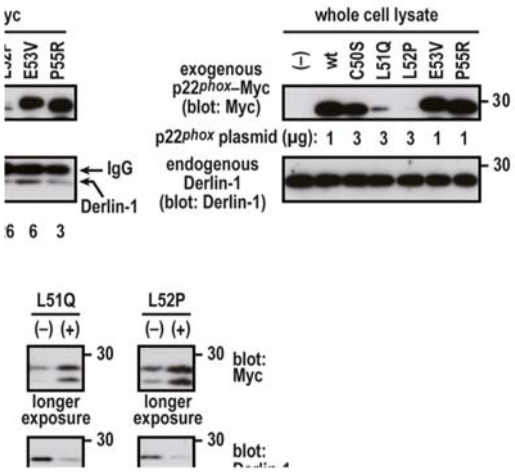


図 11. Derlin-1 の KD による P22PHOX の分解抑制（主な発表論文 1 より引用・図改変）

本助成の支援を受けた研究により、アミノ酸置換をともなう点変異が、

① P22PHOX の安定性を失わせること

② NOX2 との結合能を失わせること

がわかった。さらに、ERAD 構成タンパク質 Derllin-1 は、P22PHOX 変異体タンパク質を認識し、分解経路へ誘導することを見出した。本研究成果は、将来的に CGD 治療法の新しい選択肢として Derlin-1 を標的とした P22PHOX 分解系阻害剤の投薬の可能性を提案するものであり、その意義は大きい。今後は、得られた研究成果をシーズとして AMED（国立研究開発法人日本医療研究開発機構）との連携により特許を取得し、その後製薬会社との創薬につなげることにより、日本国内外へと広く発信することを目指す。

５．主な発表論文等

(1)Miyano, K., Okamoto, S., Kajikawa, M., Kiyohara, T., Kawai, C., Yamauchi, A., & Kuribayashi, F. (2022). Regulation of Derlin-1-mediated degradation of NADPH oxidase partner p22phox by thiol modification. Redox biology, 56, 102479.

（表題）糖尿病性腎症進展における糸球体内皮 Glycocalyx の恒常性破綻の分子機序の解明

（所属）川崎医科大学　腎臓・高血圧内科学

（氏名）角谷　裕之

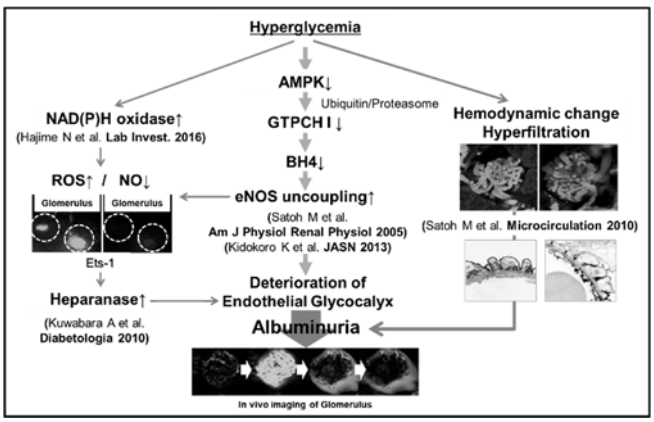
（研究成果の概要）

糖尿病性腎臓病(DKD)は国民の健康寿命延伸の阻害要因であり、その基盤病態の解明と有効な予防・治療法開発が喫緊の課題である。本研究で、DKD の病態進展において腎糸球体内皮表層の glycocalyx の質的・量的破綻が、アルブミン尿出現の一機序である可能性が示唆された。また、その病態には、CD44 陽性 leukocyte が重要な役割を担っていることを生体 in vivo imaging 技術を用いて検証した。DKD 発症・進展において glycocalyx の恒常性破綻と炎症細胞浸潤との関連性が示唆された。

（本文）

1. 本研究の学術的背景

慢性腎臓病（CKD）は末期腎不全患者数の増加のみならず、脳卒中、心血管病、認知機能障害の独立した、かつ強力なリスク因子であり国民の健康寿命延伸を阻んでいる。特に糖尿病性腎臓病（DKD）は透析導入の主要な原疾患であり、有効な治療法開発が喫緊の課題である。私共は、これまでに糖尿病、高血圧、加齢などに共通して随伴する**内皮障害が糸球体障害の発症・進展に関与する**ことを明らかにしてきた（Satoh M et al. ***Am J Physiol Renal Physiol.*** 2005、Satoh M et al. ***Microcirculation.*** 2010、Kuwabara A et al. ***Diabetologia.*** 2010、Kidokoro K et al. ***J Am Soc Nephrol.*** 2013、Nagasu H et al. ***Lab Invest.*** 2016)。特に腎糸球体内皮細胞表層に存在



するglycocalyxがアルブミン尿の出現に関与し、酸化ストレスがglycocalyx層を破綻させ、DKD発症を加速することを報告してきた。Glycocalyxは、プロテオグリカンやグリコプロテイン等から構成され、膜結合部分（コアタンパク）に結合した糖鎖構造や、直接細胞膜に結合しないヒアルロン酸（**hyaluronan, HA**）で構成されている。DKDの病態形成にglycocalyxが関与することが多くの研究により報告されている。しかしながら、糖鎖研究が遅延していることもあり、glycocalyxをターゲットとした創薬研究は不十分であった。私共は、**glycocalyxの重要な構成要素の一つであるHA**に注目した。HAは、白血球表面蛋白あるCD44のリガンドであり、HA-CD44の相互作用は、炎症部位の内皮細胞へのリンパ球の一次接着に関係している。私共は、先行研究において、in vivo imaging技術を駆使して、病態腎糸球体へのCD44（＋）白血球の浸潤を可視化解析することに成功している（Kadoya H et al. ***JCI Insight.*** 2020)。

糖尿病状態の腎糸球体における HA-CD44 陽性白血球の相互作用研究に応用し、さらにその分子機序を解明することができれば、臨床的意義は高いと考えられる。

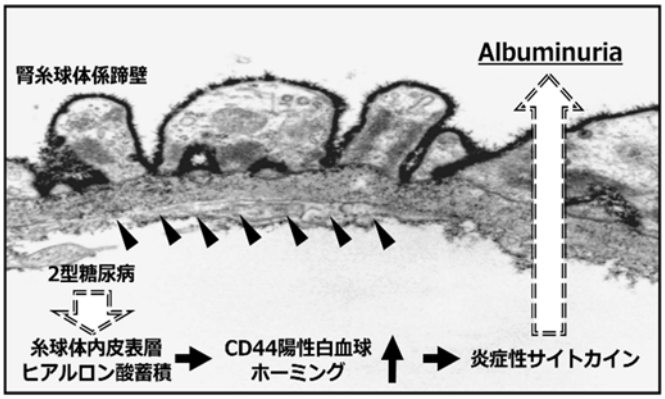
【目的】アルブミン尿が CKD の早期病態であり、HA が内皮構成成分としてアルブミン尿出現に関与し、HA の保持が CKD 発症予防につながる可能性がある。以上より、本研究の仮説として「**糖尿病性腎臓病においては、糸球体内皮 glycocalyx の構成因子である HA が蓄積した結果、CD44 陽性白血球のホーミング数が増加し局所に炎症を惹起し腎症が進展する**」との仮説を立て研究を行う。DKD における糸球体内

皮 HA の役割、治療介入について検討することを本研究の目的とする。それにより現在、臨床的に重要視されている先制医療のターゲットを明確化することができる。

2. 具体的な目的

アルブミン尿がDKDの早期病態であり、糸球体内皮glycocalyxの恒常性の破綻がアルブミン尿出現に関与している。

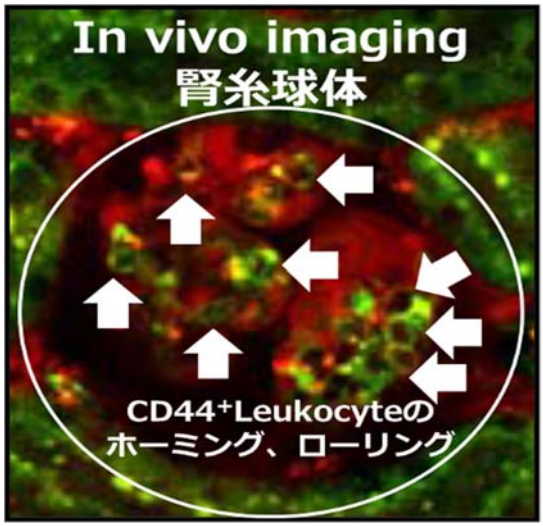
「糖尿病性腎臓病では、糸球体内皮Glycocalyxの恒常性の破綻（質的・量的異常）により、HAが過剰に蓄積した結果、CD44陽性白血球の糸球体内皮へのホーミングが増加し局所に炎症を惹起し腎症が進展する」との仮説証明を通して、DKDにおける糸球体内皮HA-CD44陽性白血球の相互作用および治療法開発を検討し、DKD治療戦略立案に資することを目的とする。



3. 研究の方法

1) 生体マウスにおいて腎糸球体を可視化し、ヒアルロン酸-CD44 陽性細胞の相互作用を in vivo imaging 技術を用いて評価する

共焦点レーザー顕微鏡を用いると、励起波長が短く光毒性が低いため、深部まで低侵襲にて長時間観察可能である。時間・空間分解能が高く、蛍光標識した小分子の生体内挙動が３次元的に動画で記録可能である。野生型マウス（WT; C57BL/6J）、内皮障害モデルマウスとして eNOS 欠損マウス（eNOSKO）を使用する。糖尿病モデルを作成するため eNOSKO マウスおよび WT マウスに Streptozocin（STZ）の投与を行い、糖尿病を発症させ腎症の進展時期（初期、中期、末期）に応じて in vivo imaging にて腎糸球体への CD44 陽性 Leukocyte のホーミング数、ローリング、遊走、接着について評価する。既に一部のデータは取得済であり、eNOSKO-STZ の腎糸球体においては、CD44 陽性 Leukocyte のホーミング数が WT マウスに比較して顕著に増加していることを確認している。Alexa594 で蛍光標識した bovine serum albumin（BSA）を同マウスに経静脈的投与することで血管を赤色にリアルタイムに可視化し、次に FITC（Fluorescein isothiocyanate）488 でラベリングした anti-mouse CD44 antibody を経静脈的投与することで循環血中の CD44 陽性 Leukocyte を緑色で可視化している（下図は、Kadoya H et al. *JCI Insight*. 2020 より引用）。



2) 糖尿病状態における糸球体内皮細胞表層ヒアルロン酸蓄積について検討する

ヒアルロン酸のコアタンパクに接する G2 domain に特異的に結合する peptide を Alexa594 で蛍光標識し、糖尿病状態の腎糸球体にヒアルロン酸が蓄積しているかどうかを検討する。さらにヒト腎生検標本を使用し糖尿病性腎症の患者の糸球体でも同様のことが生じしているかどうかを検討する。

3) ヒアルロン酸の蓄積もしくは、CD44 陽性 Leukocyte に対する治療介入意義を検討する

In vivo 実験でヒアルロン酸の分解酵素である hyaluronidase を WT-STZ、eNOSKO-STZ に慢性投薬

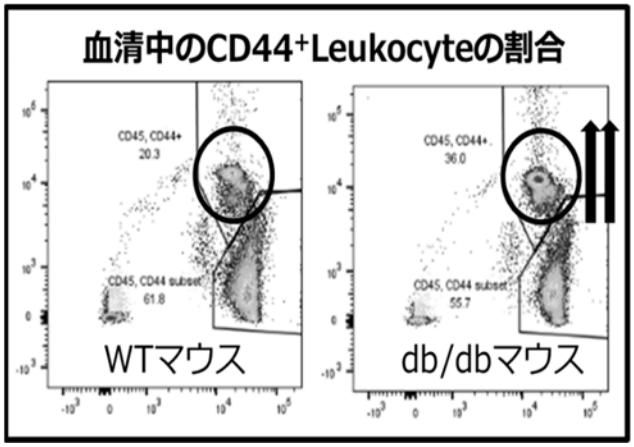
(4 週間) することで腎症進展を抑制できるかどうかを検討する。もしくは、CD44 をターゲットにした阻害薬を投与することで、腎症進展を抑制できるかどうかを検討する。適宜、畜尿、血圧等の評価を行う。Sacrifice 時に腎臓を採取し、糸球体変化を PAS 染色で評価する。同時にアルブミン尿、腎機能(血清クレアチニン、血清尿素窒素)、炎症性サイトカインの発現量をタンパクレベルで評価する。

4) 糸球体内皮細胞における高血糖条件下でのヒアルロン酸の蓄積機序について検討する

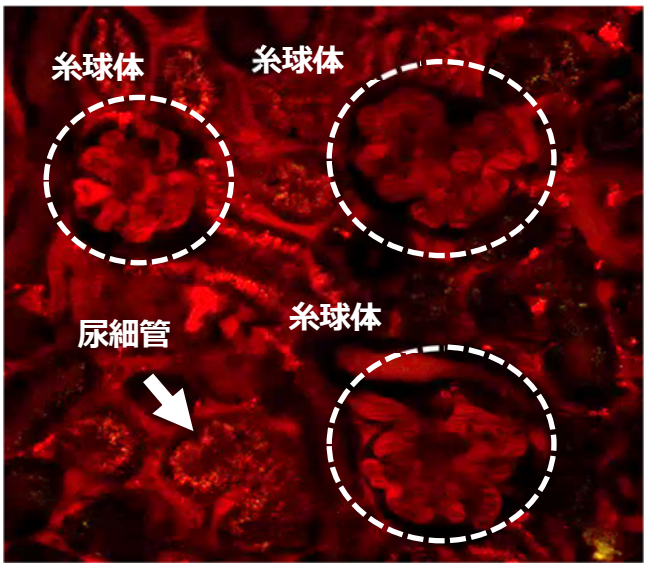
In vitro でヒト糸球体内皮細胞を使用する。ヒアルロン酸の合成酵素である、hyaluronic acid synthase (HAS1, 2, 3) が高糖濃度条件下で増加するかどうかをタンパクレベルで評価する。同時に、高糖濃度条件下でヒアルロン酸の分解酵素である hyaluronidase が減少しているかどうかも検討する。さらにそれらの分子機序について詳細に検討する。

4. 研究成果

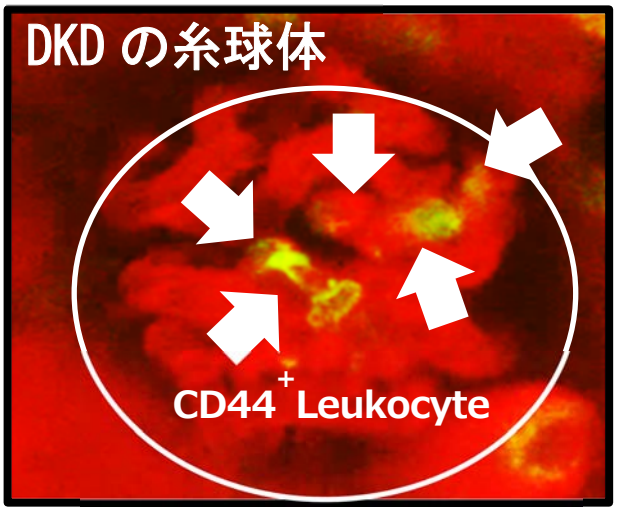
まず、循環血中の CD44 陽性 Leukocyte 数が糖尿病進展に伴い増加しているのかどうかを検討した。WT マウス、db/db マウス、eNOSKO-db/db マウスの 5 週齢、10 週齢、15 週齢における血清を採取してフローサイトメトリーで評価した。結果、WT マウスと比較して db/db マウス、eNOSKO-db/db マウスで顕著に増加していた (下図参照、WT マウス v.s db/db マウス)。



次に腎糸球体におけるCD44陽性Leukocyteのホーミングについて評価した。まず生体マウスの腎糸球体を可視化した (右上図参照)。



腎糸球体を可視化後、抗CD44抗体を経動脈投与した。結果、糸球体への同Leukocyteのホーミング数は、WTマウスと比較してeNOS-/-STZおよびeNOS-/-db/dbマウスで顕著に増加していた (下図参照)。

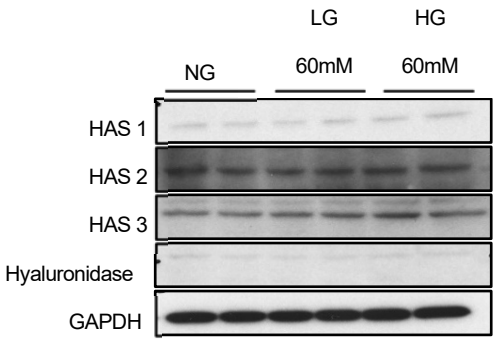


CD44陽性Leukocyteの一部は、内皮細胞上をローリングしており、time lapse imagingで動画を撮影することに成功している。

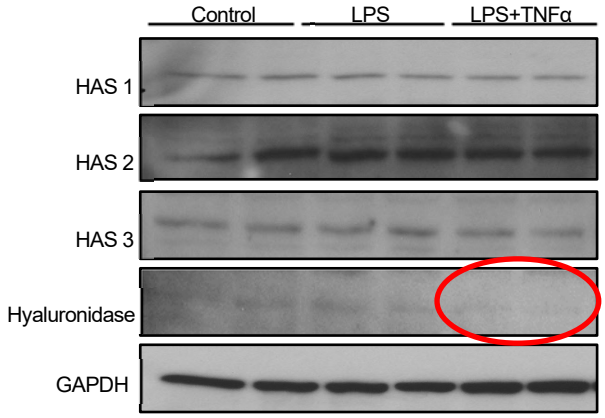
また、CD44と相互作用を有するヒアルロン酸の評価については、その検出法に難渋しており、現在、評価中である。

In vitro実験については、ヒト糸球体内皮の培養細胞 (human glomerular endothelial cell; hGEC) を使用した。まず、High glucose (30mM、60mM) 刺激でヒアルロン酸の合成酵素の発現量を評価した。

結果、同刺激のみでは変化を認めなかった。
（下図参照）



そのため、刺激条件を変更した。炎症を誘導するLPS+TNFα刺激を行い再度、検討を行った。結果、ヒアルロン酸の合成酵素は同刺激で蛋白レベルでの発現量に変化を認めなかった。しかし、ヒアルロン酸の分解酵素であるhyaluronidaseについては、LPS+TNFα刺激で蛋白レベルの発現量が低下していた（下図参照）。



そのため、現在、hyaluronidase の発現を低下させる詳細な分子機序についてさらに検討をすすめている。

考察と結論

内皮機能障害はCKDの基盤病態であり、私共は内皮機能障害がDKDの病態進展に重要な役割を果たしていることを報告している。とりわけ糸球体内皮細胞は有窓性であり、アルブミン等の macromolecule の透過性制御への関与は少ないと見なされてきた。しかし、近年、内皮細胞はglycocalyx層で被覆されていることがわかり、同構造を target とした研究が報告されている。多くの研究は、プロテオグリカンやグリコプロテインを標的に検討されているが、有効な創薬開発には結びついてない。本研究は、糸球体内皮表層の Glycocalyx の重要な構成要素であるHAに注目し、最先端の in vivo imaging 技術を応用し、同構造の質的・量的変化がDKD進展に関与しているかどうかを検討した。そのため、極めて独創性・新規性に富む研究内容である。

まず、糖尿病の進展に伴い循環血中の CD44 陽性 Leukocyte が増加傾向にあった。この結果は新知見である。その原因については現時点でははっきりしないが、少なくとも同Leukocyteが糖尿病性腎症進展に関与している可能性はあると考えられる。現在、30 週齢まで長期間飼育し、循環血中の CD44 陽性 Leukocyte の数を評価する予定である。また、同CD44陽性Leukocyteが実際に糖尿病状態の腎糸球体にホーミングしている状態を評価することができた。また、WTマウスと比較してそのホーミング数は顕著に増加していた。

この結果より、腎糸球体局所にホーミングしたCD44陽性Leukocyteが炎症性サイトカインを放出し、炎症を惹起している可能性が考えられる。現在、マウスの糸球体を単離し、炎症性サイトカインの発現量をWTマウス、db/dbマウス、eNOS-/-db/dbマウスで評価中である。なぜ、CD44陽性Leukocyteがホーミングしているのかどうかについては、仮説としては、glycocalyx の重要な構成因子の一つであるヒアルロン酸が蓄積している可能性を考えているが、同構造を実際に in vivo imaging 法でリアルタイムに可視化することに現時点で成功していない。技術的な問題があるため、今後、評価方法を変更し検討していく予定である。

ヒアルロン酸の合成酵素、分解酵素の発現量の変化については、in vitro で検討を行った。当初は、糖尿病状態においてヒアルロン酸の合成酵素の発現量が増加しているのではないかと考えたが、実際には合成酵素の発現量には変化を認めず、ヒアルロン酸の分解酵素であるhyaluronidaseの発現量が低下していた。そのため、糖尿病状態では、ヒアルロン酸の分解酵素が低下するため、ヒアルロン酸が糸球体内皮細胞上に蓄積する可能性が考えられるが、確証を得るまでには至っていない。また、なぜヒアル

ロン酸の分解酵素が減少したのかどうかについては、今後さらなる検討が必要である。

本研究を遂行するにあたり、貴財団からの助成金を有効に活用させて頂きました。重ねて御礼申し上げます。誠にありがとうございました。今後も引き続き腎障害の分子機序解明に全力で取り組んでいく所存です。

5. 主な発表論文等

＜学会発表＞

1. 角谷 裕之, 長洲 一, 岸 誠司, 佐々木 環, 柏原 直樹. ESKD 患者における慢性炎症　腎疾患進展におけるインフラマソーム活性化の意義. 第65回日本腎臓学会総会 2022年6月10日(金)～12 日(日)

＜学術論文＞

1. Wada Y, Umeno R, Nagasu H, Kondo M, Tokuyama A, **Kadoya H**, Kidokoro K, Taniguchi S, Takahashi M, Sasaki T, Kashihara N. Endothelial Dysfunction Accelerates Impairment of Mitochondrial Function in Ageing Kidneys via Inflammasome Activation. *Int J Mol Sci.* 22(17):9269, 2021
2. Kondo M, Kidokoro K, Uchida A, **Kadoya H**, Umeno R, Tokuyama A, Wada Y, Nagasu H, Kanda E, Sasaki T, Kashihara N. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor linagliptin reduces urinary albumin excretion through the protection of glomerular endothelial function. *Kawasaki Medical Journal* 47; 131－141, 2021

モデル生物を利用した遺伝性腎疾患治療薬探索系のプラットフォーム構築

重井医学研究所　細胞制御部門

古家野　孝行

研究成果の概要

常染色体顕性多発性嚢胞腎（ADPKD）は最も頻度の高い遺伝性腎疾患である。疾患の原因遺伝子の一つである*PKD2*はPolycystin-2（PC-2/Pkd2）をコードしている。PC-2はTransient Receptor Potentialファミリーに属するカチオンチャネルであるが、その機能については不明な点が多い。本研究では、ヒト*PKD2*遺伝子と相同な遺伝子を有する分裂酵母（*Schizosaccharomyces pombe*）をモデル生物とし、相同遺伝子の機能解析を行った。また、分裂酵母において、ヒト*PKD2*遺伝子が機能するかどうかについて検討した。

１．背景

慢性腎不全には根本的な治療は存在しない。国内には約 35 万人の透析患者がいるが、患者の負担軽減のため、さらに、今後の健康長寿社会および持続可能な社会実現のためにも、治療薬の開発は大きな社会的意義がある。創薬には、臨床やモデル動物研究のみならず、基盤となる細胞・分子レベルでの病態の理解が不可欠である。本研究は、遺伝性腎疾患の一つ、常染色体顕性多発性嚢胞腎（ADPKD）に焦点をあて、原因遺伝子 *PKD2* の詳細な細胞内機能の解明とその知見を利用した新規治療薬探索系のプラットフォーム構築を目指している。

ADPKDは腎臓に嚢胞が形成され、腎臓の肥大化を伴い機能が低下する疾患である。ADPKD の原因遺伝子の一つとして*PKD2*が20年以上前に同定されている。近年、Pkd2の構造解析から、特徴的な構造とそこから類推される機能、患者に見られる変異のホットスポットの存在などが明らかにされつつあるが、細胞内および生体内での機能については不明な点が多い。特に、尿細管の一次繊毛に局在するとされるPkd2がシグナルをどのように感知し、下流へどのように情報を伝達しているか、そのシグナル伝達経路については未知である。また、ADPKD の病態悪化にはカルシムが関わり、Pkd2は細胞内カルシウム濃度の調節をしていると考えられているが、その実体は不明である。

一方、単細胞真核生物である分裂酵母は、分子生物学的および遺伝学的実験の容易さに加え、ヒトの遺伝子やシグナル伝達経路の多くが保存されていることから、モデル生物として利用され、がんなどの病態の理解に大きく貢献してきた。*PKD2*のホモログ遺伝子は分裂酵母にも保存されており、Pkd2の細胞内機能の解明、さらに、ADPKD の病態における新規の制御シグナル経路を同定するために適したモデル生物であると考えられるが、分裂酵母を利用した研究はない。

２．目的

本研究の目的は、ヒト*PKD2*の分裂酵母ホモログ遺伝子の分子遺伝学的な解析を通し、全く新奇なアプローチ（酵母モデル細胞）から明らかにする、ADPKDの病態分子制御機構の解明とハイスループット治療薬探索系の基盤構築である。

３．方法

分裂酵母（*Schizosaccharomyces pombe*）を用いて実

験を行った。標準的な分裂酵母の生育方法、実験手法を用いた。ヒト PKD2 の cDNA は Horizon Discovery 社より購入した（MHS6278-211688893)。蛍光タンパク質の観察は IXplore Pro（オリンパス）で行い、画像処理は CellSens（オリンパス）を用いた。

４．成果

分裂酵母 *pkd2* 遺伝子の過剰発現は細胞質カルシウムレベルを活性化させる

分裂酵母 Pkd2 は細胞内カルシウム濃度の調節に関わることが示唆されていた。分裂酵母 Pkd2 は９個の膜貫通領域を有し、N 末端側を細胞質外に、C 末端側に細胞質に向ける構造をしている。細胞内でのカルシウム制御における Pkd2 の機能を調べるため、様々な部分欠損 Pkd2 または Pkd2 の一部分のみを分裂酵母内において過剰発現した。細胞内カルシウムレベルの挙動の確認には、CDRE（Calcineurin Dependent Response Element）レポーターシステムを用いた。その結果、全長の Pkd2 の過剰発現では、細胞質カルシウムシグナルが活性化されていた（図 1)。また、N 末端および C 末端部位を欠損させても、全長と同様に活性化が確認された。さらに、N 末端および C 末端部位のみを過剰発現しても、カルシウムシグナルの活性化は見られなかったが、膜貫通領域を含む中側の領域の過剰発現により、活性化顕著な活性化が確認された（図 1)。したがって、膜貫通領域が Pkd2 のカルシウム制御の機能に重要なことが示唆された。

Pkd2 の機能をさらに解析するため、膜貫通領域を、５つ含む N 末端側と４つ含む C 末端側に分割し、それぞれ過剰発現を行った。その結果、C 末端側の過剰発現では、全長と同様にカルシウムシグナルの活性化が見られたが、N 末端側の過剰発現では、わずかな活性化しか見られなかった（図 1)。これらの結果より、４つの膜貫通領域を含む C 末端側が細胞質カルシウム濃度の調節に関わることが示唆された。

一方、全長 Pkd2 の過剰発現により、増殖が抑制されるが、興味深いことに、これらのカルシウムシグナルの活性化と増殖抑制に関連が認められた。

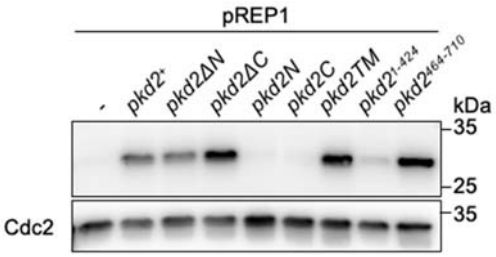


図１ 過剰発現による CDRE の動態

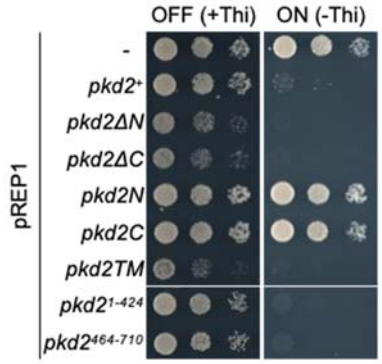


図２ 過剰発現による増殖への影響

分裂酵母 Pkd2 は小胞体に局在する

分裂酵母 Pkd2 の細胞内の分布調べるため、N 末端側に GFP を融合し（GFP-Pkd2)、細胞内での局在を観察した（図 2)。その結果、小胞体のマーカーである Pmr1 と共局在を示したことから、分裂酵母 Pkd2 は小胞体に局在することが示唆された。

図３ 分裂酵母 Pkd2 の細胞内局在

C 末端側の欠損により細胞形態の異常、$CaCl_2$感受性を示す

Pkd2 の各領域の機能を調べるため、一部分だけを欠損させた株の構築を行った。さらに、N 末端側に GFP を融合し、その細胞内局在も調べた。興味深いことに、N 末端側を欠損した株（Pkd2ΔN170, Pkd2ΔN424）では局在、形態、増殖には影響を与えなかった（図

４）。一方で、C 末端側を欠損した株（Pkd2ΔC577）では、細胞膜近傍での小胞体の局在が弱まり、細胞分裂異常を含む形態異常を示した（図４）、さらに $CaCl_2$ に対して感受性を示した（結果は示さない）。

以上の結果より、C 末端側が Pkd2 の局在および機能、特に細胞内カルシウムの調節に重要な役割を持つことが示唆された。

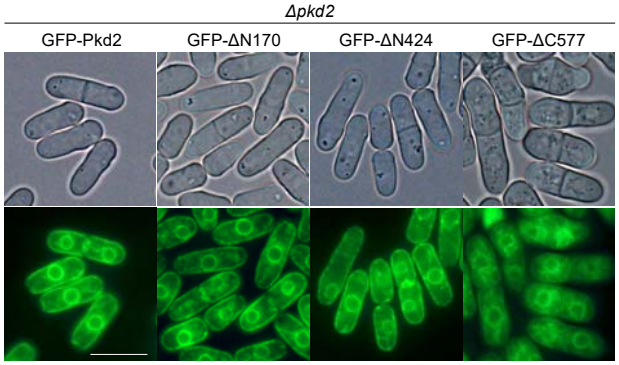


図４ Pkd2 変異体の細胞内局在および細胞形態

ヒト *PKD2* 遺伝子は分裂酵母 *pkd2* 欠損を相補する

Pkd2 の機能がヒトと分裂酵母の間で保存されているかどうかは不明である。ヒト *PKD2*（*hpkd2*）が分裂酵母 *pkd2* の機能を相補できるかどうかを調べるため、*pkd2* 欠損株（*Δpkd2*）において GFP を融合した hPkd2 を発現させた。分裂酵母 *pkd2* は必須遺伝子であるため、*Δpkd2* は生育できないが、hPkd2 を発現している株では、Pkd2 を発現している場合と同様に生育できた（図５）。また、hPkd2-GFP、GFP-hPkd2 共に小胞体への局在が観察され、機能的なタンパク質が発現していることが認められた（図６）。以上のことより、ヒト *PKD2* は分裂酵母 *pkd2* を機能的相補しうることがわかり、Pkd2 の機能は分裂酵母とヒトの種間を超えて、高度に保存されていることが示唆された。

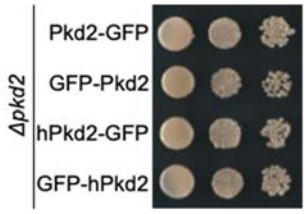


図５ ヒト Pkd2 発現分裂酵母の生育

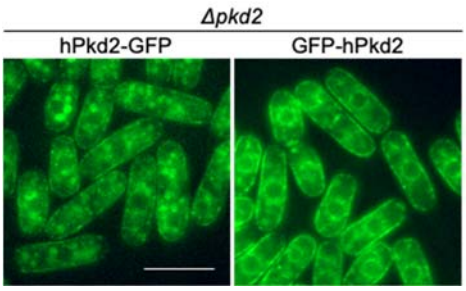


図６ ヒト Pkd2 の分裂酵母内での局在

本研究から、分裂酵母 Pkd2 は、細胞内のカルシウムレベルを調節する機能を持つことが示唆された。また、その機能は主に C 末端側が担っていることが示唆された。さらに、ヒト *PKD2* は分裂酵母 *pkd2* の欠損を完全に相補しており、Pkd2 の機能は種間を超えて高度に保存されていることが示された。ヒト *PKD2* 発現型分裂酵母は、Pkd2 の細胞内機能を今後解析する上で、非常に有用であると考えられる。また、Pkd2 の機能を調節する生理活性物質のスクリーニング系として大いに期待できる。

５．主な業績

論文発表：0（投稿中：１）

学会発表：3 件

1. 古家野孝行、大西香織、久米一規、登田隆、嚢胞腎原因タンパク質ホモログ分裂酵母 Pkd2 の機能解析、第 55 回酵母遺伝学フォーラム研究報告会、 2022 年 9 月、沖縄
2. 古家野孝行、真鍋康二、松山誠、福島正樹、分裂酵母をモデル生物とした ADPKD 原因遺伝子 PKD2 の解析、第 65 回日本腎臓学会学術総会、2022 年 6 月、神戸
3. 古家野孝行、久米一規、松山誠、福島正樹、登田隆、分裂酵母 Pkd2 は細胞内 Ca^{2+} 調節に関わる、第 44 回日本分子生物学会年会、2021 年 12 月、横浜

（表　題）

単細胞解析を用いた脳腫瘍に対する効果的な免疫療法の開発

（所　属）岡山大学病院病院　脳神経外科

（氏　名）大谷　理浩

（研究成果の概要）

腫瘍溶解ヘルペスウイルス(oncolytic HSV, oHSV)療法は、2021 年に世界に先駆けて本邦で膠芽腫に対して条件・期限付き承認となった新規免疫療法であり、その効果が期待されている。我々は oHSV 投与後に NOTCH 経路が活性化することを報告したが、本研究ではマクロファージにおける NOTCH 活性化が CCL2 を介して Myeloid-Derived Suppressor Cell (MDSC)の浸潤に関与することを示した。さらに NOTCH 阻害薬を併用することで、MDSC による免疫抑制が改善し、腫瘍浸潤リンパ球の増加および oHSV 治療効果の増強につながることを示した。

（本文）

背景

脳腫瘍である膠芽腫は本邦の急速な高齢化に伴い患者数が増加しているが、生存期間中央値は 2 年未満と予後不良な疾患である。新規治療法の開発が急務であるが、近年の single cell technology の進歩により、がん細胞と腫瘍微小環境 (Tumor microenvironment, TME)を含む tumor ecosystem という概念が報告され、これを標的とした治療が提唱されている。腫瘍溶解ヘルペスウイルス(oncolytic HSV, oHSV)療法は遺伝子改変ウイルスを投与することで、感染した腫瘍細胞が死滅する直接的効果に加え、死滅した腫瘍細胞から放出される腫瘍抗原を周囲の免疫細胞等が認識し抗腫瘍免疫を獲得するという、tumor ecosystem を打破する新たな免疫療法として期待されている。2015 年に悪性黒色腫に対して米国 FDA に承認となり、欧州や豪州でも認可された。膠芽腫に対しても臨床試験が行われ、その有用性が報告されるなど、非常に有望な治療法であり、本邦では世界に先駆けてテセルパツレブが条件・期限付き承認となった。

我々は膠芽腫に対する oHSV 研究を行い、マクロファージや T 細胞等の役割を研究してきた (Kurozumi K et al., J Natl Cancer Inst, 2007; Tomita Y, **Otani Y** et al., Mol Ther, 2019; Yoo JY, **Otani Y** et al., Neuro Oncol, 2019; Nair M, **Otani Y** et al., Cancers, 2020)。oHSV 療法は膠芽腫に対しても安全性や有効性が示されている一方で、膠芽腫は他の癌と比較してもリンパ球浸潤が少ないこと、免疫抑制型のマクロファージや単球などの浸潤が多いことが報告されており(Uneda A, **Otani Y** et al., Acta Neuropathol, 2021)、他の癌よりも免疫抑制型の TME を有する。我々は oHSV 療法によって NOTCH 経路が誘導されることを見出した（**Otani Y** et al., Clin Cancer Res, 2020)。NOTCH 経路は TME の形成や膠芽腫の治療抵抗性に関与する重要な経路であるが、oHSV 療法においてはその役割は研究されていない。

目的

本研究では oHSV 投与後に起こるダイナミックな TME 変化、特に免疫細胞浸潤における NOTCH 経路の役割を解明することを目的とした。

材料と方法

1)　TCGA データ解析

The Cancer Genome Atlas (TCGA)に登録された膠芽腫 416 症例の発現解析データを入手した。NOTCH score を用いて NOTCH 高発現群、低発現群に分類し、免疫細胞浸潤について CIBERSORT (https://cibersortx.stanford.edu/)および Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)を用いて解析を行っ

た。

2) 動物

4-6 週齢 C57Bl/6J マウスの右基底核に 2×10⁵ 個のマウス膠芽腫細胞(GL261N4)を移植した。投与 10 日後に oHSV(2×10⁵pfu)もしくは PBS を腫瘍内投与した。NOTCH 阻害群では γ-secretase 阻害薬(GSI)である RO4929097(10mg/kg, Selleckchem)を、非阻害群では carrier を、oHSV 投与 2 日前から連日経口投与した。

3) フローサイトメトリー

oHSV 投与 2 日後および 7 日後のマウス右大脳半球を摘出し、gentleMACS Dissociator、Tumor Dissociation Kit、Debris removal solution (いずれも Miltenyi Biotec)、ACK buffer (Lonza)を用いて処理を行った。細胞は anti-CD16/CD32(Invitrogen)で処理後に、抗体で染色を行った。Cytoflex(Beckman Coulter)および FlowJo を用いて解析を行った。

単球の機能解析目的に mouse myeloid-derived suppressor cell isolation kit(Miltenyi Biotec)を使用し単離を行った。

4) 発現解析

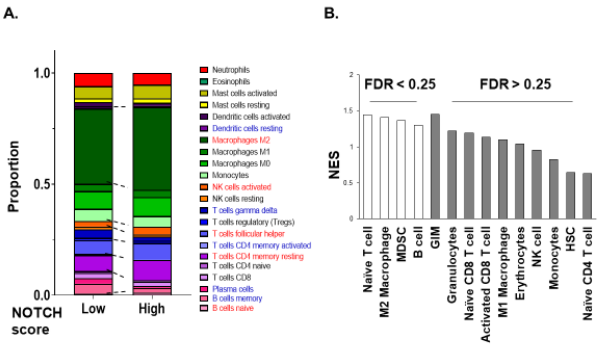
RNeasy kit および RNase-free DNase set(Qiagen)を用いて total RNA を抽出した。リアルタイム PCR は、High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems)を用いて cDNA を作成後、SYBR Green Master Mix を用いて定量解析を行った。解析した RNA-sequencing (RNA-seq)データは Gene Expression Omnibus (GSE183221)へ登録した。

結果

1) 膠芽腫における NOTCH score 上昇は免疫抑制型 TME の構築に寄与する

膠芽腫における NOTCH 経路の役割を解明するために、TCGA データセットを用いた解析を行った。CIBERSORT 用いた digital cytometry 解析では、NOTCH score 高値群で M2 マクロファージの有意な増加を認めた(図 1A)。また、GSEA 解析では、NOTCH score 高値群で M2 マクロファージや Myeloid-Derived Suppressor Cell (MDSC)等の免疫抑制型細胞が増加していた(図 1B)。

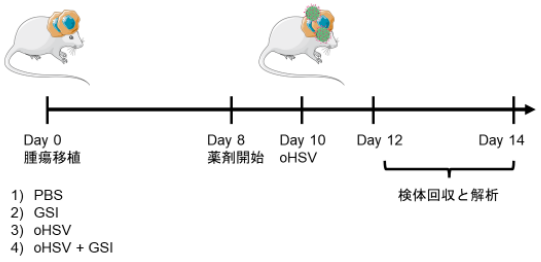
図1.



2) oHSV 投与後の NOTCH 経路活性化はマクロファージおよび単球浸潤を誘導し、T 細胞浸潤を抑制する

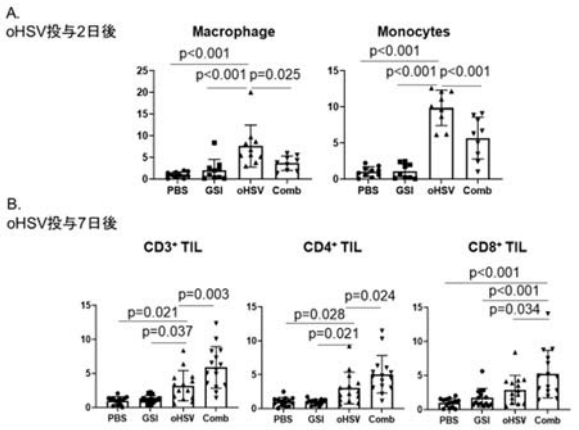
膠芽腫における oHSV 投与後の NOTCH 経路活性化の役割を解明するために、担腫瘍マウスモデルを用いたフローサイトメトリーを行った(図 2)。

図2.



PBS 群、GSI 群、oHSV 群、併用群(oHSV と GSI を投与)を用いて解析を行ったところ、PBS 群と比較し oHSV 群では、oHSV 投与後 2 日目で有意なマクロファージおよび単球の浸潤を認め、7 日目では CD3 陽性 T 細胞の増加を認めた。一方、oHSV 群と比較し併用群では、投与後 2 日目のマクロファージおよび単球浸潤は減少し、7 日目の CD3 および CD8 陽性 T 細胞の増加を認めた(図 3A-B)。

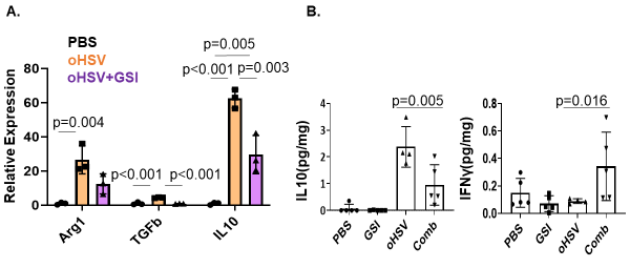
図3.



3) oHSV 投与後の NOTCH 経路活性化は免疫抑制型 TME の構築に寄与する

oHSV により誘導される単球の機能解析を行うために免疫抑制マーカーである Arginase1、TGFβ、IL10 の発現を比較した。oHSV 群では強い Arginase1、TGFβ、IL10 発現を認めたが、併用群では発現が低下していた(図 4A)。さらに担腫瘍マウスから得られた大脳半球組織を細胞懸濁しサイトカイン測定を行ったところ、併用群では免疫抑制型サイトカインである IL10 が低下し、細胞傷害性サイトカインである IFNγ の上昇を認めた (図 4B)。以上より、oHSV 投与後の NOTCH 経路活性化は免疫抑制型 TME の構築に寄与すると考えられた。

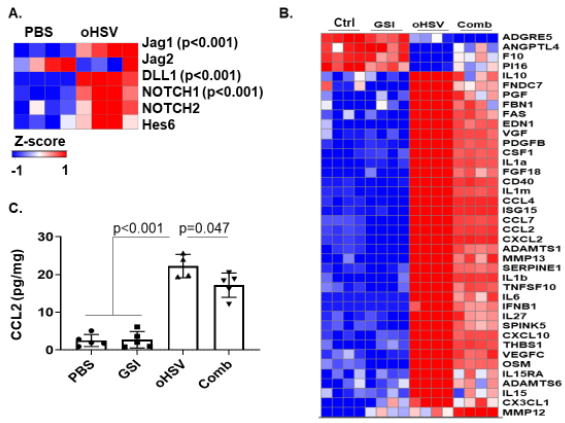
図4.



4) マクロファージにおける NOTCH 経路活性化と CCL2 による免疫抑制型 TME の構築

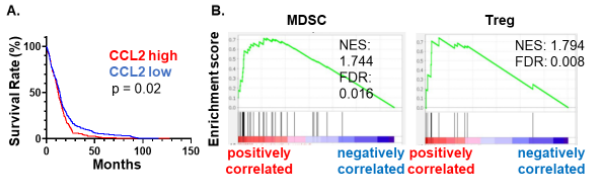
末梢血由来の単球の浸潤に関与する因子を探索するために、マクロファージの遺伝子発現解析を行った。担腫瘍マウスから単離したマクロファージにおける NOTCH 関連遺伝子についてリアルタイム PCR による測定を行ったところ、oHSV 群では NOTCH ligand (Jag1、DLL1)、NOTCH receptor (NOTCH1)の発現上昇を認めた(図 5A)。さらに RNA-seq による網羅的発現解析を行い、特に secretome に着目したところ、PBS 群と比較し oHSV 群では CCL2 の発現が上昇し、oHSV 群と比較し併用群では CCL2 の発現が低下していた(図 5B-C)。

図5.



TCGA データを用いた GSEA 解析でも、CCL2 は MDSC や Treg などの免疫抑制型免疫細胞浸潤に関与しており、CCL2 高発現群は予後不良であった。

図6.



研究成果

oHSV 投与後に NOTCH 経路が活性化する機序は我々が初めて報告したメカニズムである。本研究では、oHSV によるマクロファージにおける NOTCH 経路の活性化が CCL2 発現を誘導し、さらに免疫抑制型単球の浸潤、細胞傷害性 T 細胞の活性低下につながることを解明した(1) (2)。米国で進行中の膠芽腫に対する oHSV 療法に関する臨床試験検体を用いた解析でも CCL2 と IL10 の発現は相関しており、我々の研究成果を支持する結果であった。現在、我々のグループでは担腫瘍マウスモデルを用いた単細胞解析を実施し、個々の免疫細胞におけるシグナル経路の役割をより詳細に解析している (Hong B, **Otani Y**, et al., in submission)。

主な発表論文など

① 雑誌論文：2 報

1. Otani Y, Yoo JY, Lewis CT, et al. (2022) NOTCH-Induced MDSC Recruitment after oHSV Virotherapy in CNS Cancer Models Modulates Antitumor Immunotherapy. Clin Cancer Res.28(7):1460-1473. (1/22 番目)

2. Otani Y, Yoo JY, Shimizu T, et al. (2022) Implications of immune cells in oncolytic herpes simplex virotherapy for glioma. Brain Tumor Pathol. (1/6 番目)

② 学会発表

大谷理浩、NOTCH 経路阻害による腫瘍微小環境の改善と抗腫瘍免疫療法の効果増強、第 39 回日本脳腫瘍学会学術集会

③ 図書：なし

④ 産業財産権：なし

（表　題）

低酸素誘導因子による腸管低酸素環境の維持及び組織寛容性導入に着目した移植片対宿主病の新規予防・治療法の開発

（所　属）岡山大学病院　血液・腫瘍内科

（氏　名）藤原　英晃

（研究成果の概要）

免疫性細胞性組織障害において、組織障害のうち腸管組織障害は致死的合併症となり治療失敗につながりうる重大な組織であり、免疫抑制剤を用いた免疫細胞の抑制を行なっても不十分なことが多い。このため、本研究では、腸管組織特異的免疫細胞性組織障害における組織環境因子である低酸素誘導因子（HIF）に着目した組織寛容性導入を検討した。免疫細胞性組織障害発症時には組織恒常性を維持する腸管 HIF の発現が低下しており組織障害の一因となっていることが明らかとなり、今後の介入標的として検討に値すると思われる。

（本文）

１．研究開始当初の背景

高齢者社会に伴い血液悪性疾患の患者は増加の一途をたどるが、根治療法である同種造血幹細胞移植は治療に伴う重篤な合併症、特に移植片対宿主病（GVHD）のため高齢患者への適応はごく一部に限定されている。このため、負担を軽減した安全な移植法の開発が望まれる。GVHD に関しては細胞障害を引き起こす T 細胞の抑制療法が確立され一定の予防効果が得られたものの、T 細胞の抑制は白血病の再発や感染症の重篤化につながっている。近年、腸内細菌叢の乱れ（以下 dysbiosis）が GVHD の発症に関わることが国内外から報告されるも、その発症機序は不明である。**申請者は腸管上皮細胞のミトコンドリア機能異常による過剰な活性化酸素が、GVHD による組織傷害の増悪を引き起こすこと、dysbiosis 発症の一因であることを報告している（*Fujiwara H, Nature Immunology 2021*）。**ここから、**ミトコンドリア異常→酸素消費量減少→組織酸素濃度上昇→低酸素誘導性因子（HIF）抑制→組織恒常性破綻→免疫細胞に対する脆弱性→GVHD 発症・増悪という病態**を想定している。**組織における HIF 発現に着目した「免疫反応への組織脆弱性」を解明することで、GVHD の新規予防・治療法を開発し、従来の免疫抑制療法とは異なる安全な移植療法を確立することで、高齢化社会のニーズに答えたい。**従来の T 細胞機能抑制を主眼とした国内外の研究とは異なり、組織恒常性を高めることで免疫細胞による組織傷害を低減させる点が高い独自性・創造性を有している（図1）。

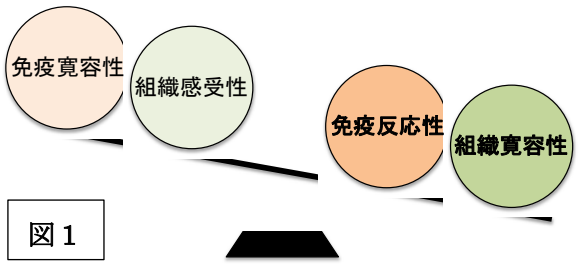


図１

２．研究の目的

本研究は、同種移植後に発生する腸上皮細胞の HIF の異常に伴う組織恒常性が破綻する影響及び機序を解明し、**従来の免疫抑制療法と異なる HIF を**

標的とした組織寛容性をもたらす治療方法を将来的には確立することを目的とする。

３．研究の方法

本研究では、GVHD マウスモデルを用いて、標的細胞におけるミトコンドリア障害による酸素代謝異常が組織環境・遺伝子／蛋白発現に与える影響を検討した。

①　GVHDが与える腸管酸素レベルの検討:

大腸内視鏡下酸素測定器や低酸素組織特異的免疫染色を用いて GVHD マウスの腸管内腔及び腸上皮細胞における酸素濃度変化を、マウスモデルを用いて明らかにする。

②　GVHD 腸上皮細胞の PHD・HIF の遺伝子発現及び蛋白発現の検討:

GVHD によりミトコンドリアが障害され、細胞内外の酸素濃度が上昇している場合、HIF を分解する PHD の活性化と引き続く HIF の不活化による細胞恒常性の破綻が発生すると考えられる。GVHD の標的臓器である小腸・大腸における PHD 及び HIF 発現の動態を、マウス GVHD モデルを用いて遺伝子及び蛋白質レベルで検討する。このため、GVHD マウスの腸管上皮細胞における PHD/HIF の発現変化を検討し、PHD/HIF が今後の治療標的となりうるかどうかを明らかにする。

③　薬理学的 PHD 阻害剤を用いた HIF 発現促進による GVHD 改善の検討(図2):

近年、HIF 発現を高める PHD 阻害薬(roxadustat)が腎性貧血において有効であることが大規模試験で報告され臨床応用されている(*NEJM 2019*)。この PHD 阻害剤を用いて、GVHD マウスにおける HIF 発現を促進させることで組織恒常性を改善し、GVHD の発症予防及び低減に重要であることを生体内で明らかにする。

４．研究成果

①　GVHDが与える腸管酸素レベルの検討:

GVHD マウスモデルである Balb/c(ドナー)マウスから C57BL/6(レシピエント)マウスへ骨髄細胞と T 細胞を移植するモデルを用いた。全身放射線照射したレシピエントマウスにドナーマウスの細胞を投与し、GVHD が発症する 7 日目、完成する 21 日目に大腸内視鏡検査を行った。レシピエントマウスに全身麻酔下を行った後に経肛門的にマウス用硬性鏡を挿入し、GVHD 発症部位における酸素濃度を、プローブを用いて測定した。腸管内腔に近い浅層(A)と腸管上皮細胞に近い深層(B)の2箇所で酸素濃度を測定した(図3)。対象として骨髄移植を行なっていない Naïve マウスと GVHD が発症しない非GVHDマウスを用い同様に内視鏡を用いた酸素濃度測定を行ったところ、GVHD マウスの腸管では移植後 7 日目では浅層では酸素濃度の変化は認められなかったものの、深層では酸素濃度の上昇を認めた。移植後 21 日目では浅層においても酸素濃度上昇を認めたことから、腸管内腔酸素濃度上昇が確認された。

次に、酸素濃度上昇がミトコンドリア呼吸障害による酸素消費量減少に由来するならば細胞内酸素濃度上昇も認められると考えたため、細胞内酸素濃度を測定した。細胞内酸素濃度の測定は困難なことから、低酸

図2

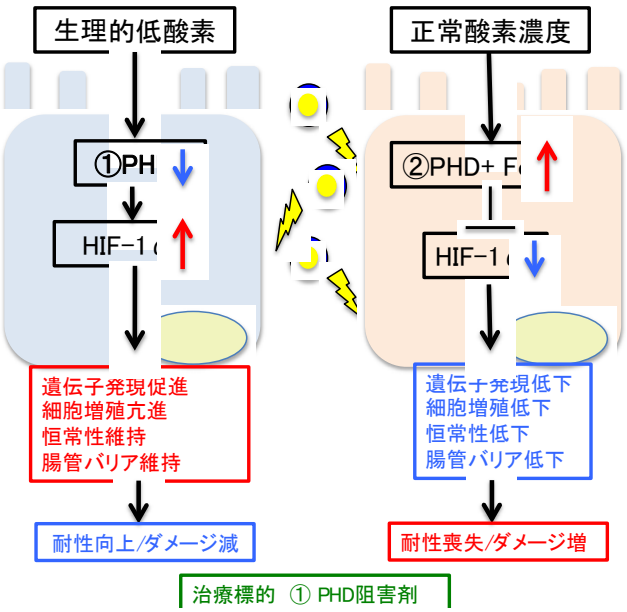
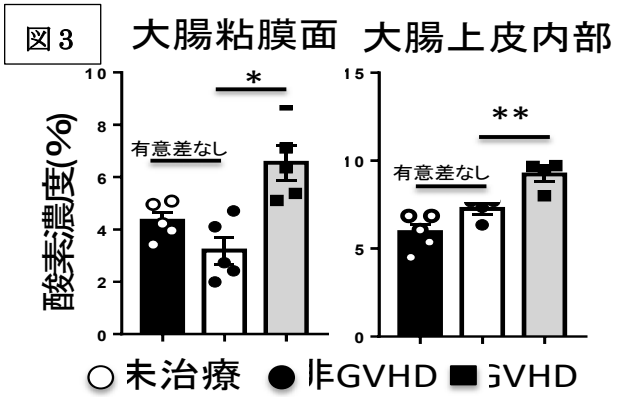
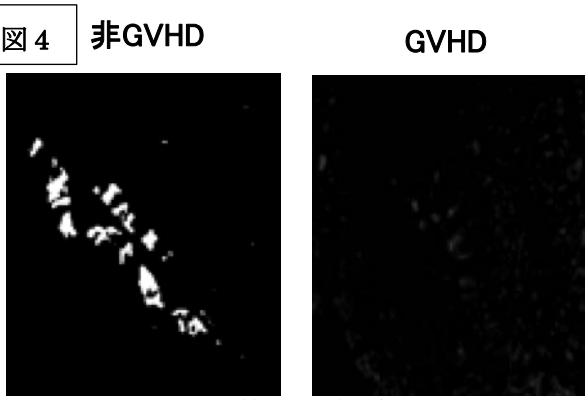


図3



素状態の細胞内に取り込みを認める hypoxyprobe 染色を行った。非 GVHD マウスでは hypoxyprobe 染色での染色を認めたが、GVHD マウスでは染色をほとんど認めなかった(図4)。この結果から GVHD マウスでは腸管上皮細胞の酸素濃度が上昇していることから明らかとなった。

図 4



GVHD腸管上皮細胞は
生理的低酸素状態(白色)を消失する

② GVHD 腸上皮細胞の PHD・HIF の遺伝子発現及び蛋白発現の検討:

次に、腸管上皮細胞に高発現しバリア機能に影響する、酸素濃度依存性に発現調整される遺伝子である HIF の影響を検討した。非 GVHD マウス・GVHD マウスから単離した上皮細胞における遺伝子発現を確認したところ HIF の遺伝子発現は両群において明らかな相違は認められなかった。タンパクレベルでの HIF 発現を確認するため HIF に対する免疫染色を行なったところ GVHD 群において HIF タンパクの低下を認めた。酸素濃度上昇時 HIF タンパクは PHD を介して分解されることで発現調整がなされている。このため、単離腸管上皮細胞における PHD タンパクレベルを Western blotting 法で検討したところ、GVHD 群で有意な増加を認めていた。これらの結果から GVHD においてはミトコンドリア機能不全による細胞内酸素濃度上昇→PHD タンパク活性化→HIF 分解→組織恒常性低下・腸管バリア低下→GVHD の悪化が認められた。

③ 薬理学的 PHD 阻害剤を用いた HIF 発現促進による GVHD 改善の検討:

最後に PHD 活性化→HIF 分解が GVHD の治療標的となりうるかどうかを検討した。 PHD 阻害により HIF の発現を上昇させる PHD 阻害薬(Roxadustat)PHD 阻害剤を用いて、GVHD マウスにおける HIF 発現を促進させることで組織恒常性を改善し、GVHD の改善を試みた。骨髄移植を行なったマウスに Roxadustat を移植後 0 日目から 21 日目まで経口投与した。Roxadustat 投与群では GVHD の軽減、生存率の改善を認めた。この結果から組織における HIF の発現を上昇させる治療法は GVHD の予防・治療法の標的となりうることが示された。

上記一連の解析から、組織酸素濃度上昇に伴う腸管上皮細胞の HIF 発現低下が**「組織脆弱性」**を引き起こしていることを明らかにした。また、**腸上皮細胞の HIF 発現を促進する組織代謝学的観点から介入した「免疫反応に対する耐性」の獲得の試み**は、同種造血幹細胞移植後 GVHD の発症抑制のみならず、T 細胞機能を抑制せず血液悪性疾患の再発リスクを下げる可能性を示唆しており、高齢者においても安全かつより効果的な同種造血幹細胞移植を実現可能とすると考える。

本研究で得られた知見は、組織側要因に着目した未報告のGVHD機序を明らかにし「組織恒常性と免疫寛容」という分野を新たに開拓・創造することにつながる。将来的には、HIF発現を促進することで組織恒常性を改善しT細胞による組織障害を低減すること、免疫抑制を最小限にしつつ抗白血病効果を維持することで、高齢者を含む多くの血液悪性疾患患者に対してより安全かつ効果的な同種骨髄移植法を確立することを期待する。本研究はGVHD研究の枠内におさまらず、T細胞により引き起こされる免疫細胞を介する自己免疫性疾患の機序解明にも応用されることが期待される。得られた結果は今後、関連分野の学術集会、専門誌を通じて発信する予定にしている。

5．主な発表論文等

現時点では当該研究については雑誌論文並びに学会発表は行っていない。