

公益財団法人 寺岡記念育英会

2018 年度 研究活動費助成事業 研究活動報告書一覧

| | |
|-----------------------------------------------------------------------|-------|
| 去勢抵抗性前立腺癌における新規 Androgen シグナル制御機構の解明 岡山大学病院 泌尿器科 助教 定平卓也 | ・・・ 1 |
| ヒトフィラリア症関連リンパ浮腫の超早期画像診断法の確立 岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 人体構成学分野 助教 品岡玲 | ・・・ 3 |
| 腎臓成体幹細胞由来エクソソームの腎臓再生機序の解明 岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 腎・免疫・内分泌代謝内科学 助教 辻憲二 | ・・・ 7 |
| 血液・血球-血管内皮細胞インターフェイスの恒常性維持機構と網羅的新規創薬 岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 薬理学 講師 和氣秀徳 | ・・・11 |
| エピスタシス効果による新型インフルエンザウイルスの出現予測 川崎医科大学 微生物学教室 助教 内藤忠相 | ・・・15 |
| 糖代謝阻害剤封入 PLGA ナノ粒子による新規腫瘍免疫活性化機序解明 川崎医科大学 肝胆膵内科学 講師 仁科惣治 | ・・・20 |

※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。

去勢抵抗性前立腺癌における新規 Androgen シグナル制御機構の解明

岡山大学病院 泌尿器科

定平 卓也

研究成果の概要

我々は近年、癌抑制遺伝子REIC/Dkk-3の発現そのものが癌化を根源的に抑制する機能を有し、特に発癌の過程においてその発現低下が極めて重要な因子になることに着目してきた。REIC/Dkk-3の発現そのものが生体内において直接的にRasシグナリングを介した発癌を抑制している。一方で、REIC/Dkk-3に結合するタンパク質としてSGTAとTCTX-1を発見し、それらの相互作用が未熟なAR複合体の成熟および核内輸送を制御している可能性を見出した。これらの知見を踏まえ、本研究では前立腺癌における悪性形質およびAndrogen不応性の一元的制御機構の実態を明らかにし、その分子メカニズムに焦点を当てて研究を行った。

1. 研究開始当初の背景

我々は、正常線維芽細胞に比較して不死化ヒト線維芽細胞において発現が消失ないし著しく低下している遺伝子群を網羅的に検索し、世界に先駆けて癌抑制遺伝子REIC/Dkk-3を同定した。我々は近年、REIC/Dkk-3の発現そのものが癌化を根源的に抑制する機能を有し、特に発癌の過程においてその発現低下が極めて重要な因子となりうることに着目し、強い癌化作用を有する活性化Rasタンパク質 (Oncogenic Ras) に対してREIC/Dkk-3の発現動態がどのように影響するのかを解析し、REIC/Dkk-3の発現そのものが、生体内において直接的にRasシグナリングを介した発癌を抑制している可能性を見出している。こういった背景の中、近年、ヒト前立腺癌 cDNA ライブラリーを用いたYeast two-hybrid assayを実施し、REIC/Dkk-3に結合するタンパク質として、SGTAを発見した。SGTAは細胞質内で未成熟なAndrogen Receptor (AR) 複合体と結合し、ARの核内移行を抑制する。また、SGTAは自身のN末端で2量体を形成し、AR複合体の一部としてARを細胞質内で安定化させ核内移行を抑制している。実際にAndrogen除去療法抵抗性前立腺癌では、SGTAの活性が亢進していることも報告されて

いる。また、SGTAとは別のREIC/Dkk-3相互作用分子として、分子モーターDynein複合体の軽鎖サブユニットであるTctex-1を同定した。一方で、ヒト前立腺癌細胞PC3を用いた先行研究により、REIC/Dkk-3がSGTAによるARシグナル抑制を完全に回復させることを証明した。REIC/Dkk-3とSGTAおよびTctex-1との相互作用が、未成熟なAR複合体の成熟および核内への輸送を制御している可能性が極めて高い。加えてTctex-1が輸送分子adaptorとして機能するDyneinモーターは、Ras活性化因子であるRas-GRPをEndoplasmic Reticulum周囲にリクルートし、Oncogenic RasであるRas-GTPを誘導することが示唆されている。このことからREIC/Dkk-3、SGTA、Tctex-1間の結合は、Dyneinモーターを介したRas制御因子の輸送に直接的に作用し、細胞内のOncogenic Rasレベルを制御していると考えられる。また、これらの3分子の相互作用はDyneinモーター機能のみでなく、各種Heat shock proteinの機能にも影響を与える可能性が高い。これらの知見を踏まえ本研究においては、前立腺癌における悪性形質およびAndrogen不応性の一元的制御機構の実態を明らかにし、その分子メカニズムに焦点を当てて研究を進めた。

2. 研究の目的

癌抑制遺伝子である REIC/Dkk-3 の細胞内発現の減少により、AR シグナルへの不応性が誘導され、かつ、Oncogenic Ras が活性化された、Androgen 除去療法抵抗性前立腺癌細胞 (去勢抵抗性前立腺癌) が出現するかどうか、について検証を行った。さらに、REIC/Dkk-3 による AR シグナルの制御機構および REIC/Dkk-3 による Ras 活性化の制御機構のそれぞれについて分子メカニズムを解析した。

3. 研究の方法

去勢抵抗性前立腺癌細胞が如何に発生・出現するのかを、REIC/Dkk-3 と SGTA および Tctex-1 との相互作用の観点から解析した。具体的には、これら 3 つのタンパク質の発現状態および結合状態が、AR シグナルの制御機構および Ras 活性化の制御機構にどのように影響するか、その分子メカニズムを *in vitro* 細胞実験系で検討した。さらに、我々が樹立した REIC/Dkk-3 ノックアウト (KO) マウスを用いる実験系において、様々な生体内 Androgen の状態 (正常、過剰、欠如) 下に発癌誘導実験およびマウス前立腺癌細胞の移植を行い、得られた腫瘍および癌細胞について悪性形質および Androgen 不応性の状態を分析した。また、これらの結果を踏まえ去勢抵抗性前立腺癌の発生抑制機構の実態を明らかにした。

4. 研究成果

REIC/Dkk-3 を中心とした SGTA および Tctex-1 の 3 分子に基づく、去勢抵抗性前立腺癌の発生抑制機構の実態を明らかにすることが可能となった。右図に示した仮説の通り、REIC/Dkk-3 の細胞内発現の減少により、AR シグナルへの不応性が誘導され、かつ、Oncogenic Ras が活性化された、去勢抵抗性前立腺癌が出現することが明らかとなった。REIC/Dkk-3 の癌治療遺伝子としての臨床応用は近年脚光を浴びており、現在、岡山大学を中心としたグループにより、複数の難治性固形癌 (前立腺癌、悪性胸膜中皮腫、肺癌、肝臓癌、膵臓癌、悪性グリオーマ等) への癌遺伝子治療への応用が進められている。国際的にみて REIC/Dkk-3 に関連する一連の研究は岡山大学での独創的研究である。これまでに REIC/Dkk-3

の癌抑制遺伝子としての重要性を指摘する論文が相次いで報告されてはいるものの、今回の新知見についての報告は一切存在せず、本研究の成果は国際的に大きな注目を浴びる可能性が高い。従来、Androgen 除去療法に抵抗性を獲得した前立腺癌に対する新規治療法の開発は喫緊の課題であり、その発生に関しても未だ明らかになっていない点が多い。本研究では、Androgen 除去療法抵抗性前立腺癌の発生抑制因子としての REIC/Dkk-3 の基盤解析がなされる。これら基礎研究・臨床研究の両サイドから得られる知見は、難治性前立腺癌に対する新規治療法開発の展開基盤となるものであり、本研究の重要性と意義は計り知れない。

5. 主な発表論文等

① 原著論文

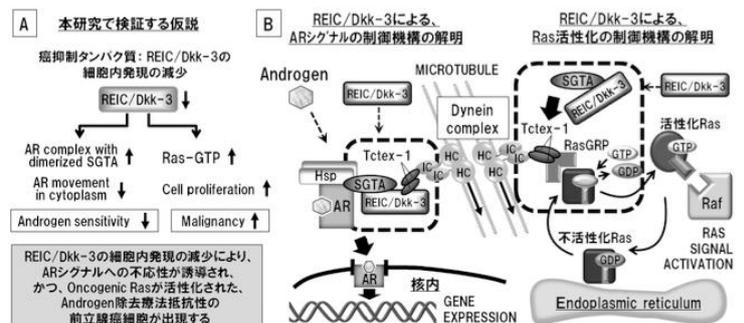
Tumor suppressor REIC/DKK-3 and its interacting protein SGTA inhibit glucocorticoid receptor nuclear transport. Iwata T, Sadahira T, Ochiai K, Ueki H, Sasaki T, Haung P, Araki M, Watanabe T, Nasu Y, Waranabe M. *Exp Ther Med*. 2020. In press.

(雑誌論文: 1 件)

② 学会発表

Tumor suppressor REIC/Dkk-3 and its co-chaperone SGTA: Their interaction and role to control castration-resistant prostate cancer by the release from androgen independence and malignancy. Sadahira T, Maruyama Y, Mitsui Y, Wada K, Edamura K, Kobayashi Y, Araki M, Watanabe M, Watanabe T, Nasu Y. *European Urology Supplements*. 2019;18:e68-e69.

(国際学会発表: 1 件)



ヒトフィラリア症関連リンパ浮腫の超早期画像診断法の確立

岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 人体構成学分野

品岡 玲

(研究成果の概要)

本研究は岡山大学ががん関連リンパ浮腫診療で培った診断技術と、本邦発のリンパ管造影機器(PDE カメラ)をフィラリア症関連リンパ浮腫の診断に応用する試みである。

本研究はフィラリアが蔓延しているミャンマーの地方にて疫学研究をする必要があるため、本年度はその準備に費やした。まず、ミャンマー国側のカウンターパートナーを決定し、研究の実行の同意と大まかな研究のデザインを決定した。また研究場所である地方を訪問し、現地の状況確認と研究実施の協力の同意を得た。現在、双方の倫理委員会申請準備中である。

(本文)

1. 研究開始当初の背景

ヒトフィラリア症は全世界で1億人以上(2000年)が感染し9.4億人が感染リスクに曝される寄生虫感染症である(WHO report 2016)。感染者は東南アジア、インド、アフリカ、南米など熱帯・亜熱帯地域に広がっており、発展途上国に多い。著明な症状は少ないが、感染が長期にわたると、四肢や陰部などのリンパ浮腫をきたす。これは、関節の動きを制限し、醜悪な見た目など社会的な問題を引き起こす。



図1
図説人体寄生虫学
第7版p137より引用。
本邦における陰囊
リンパ浮腫

患である。そのためWHOは2000年から撲滅を目指し感染域の住民に対する集団投薬を中心としたMDAプログラム(Mass Drug Administration Program)を進行させており、2016年時点、10カ国以上で撲滅が確認、2020年までに世界での撲滅が目指されている。また、MDAプログラムと同時に、撲滅後に残されるリンパ浮腫患者の現状評価とケアシステムの構築を行い、悪化防止を目指すMMDPプログラム(Morbidity management and disability prevention Program)も行われている。

MDAによる集団投薬は、血中にあるマイクロフィラリアを減少させ、蚊を媒体とした感染が広がらないようにすることを目的としている。しかし、すでに感染している場合は、投薬されても、成体は数年間患者の中で生き延びる。これは徐々にリンパ系にダメージを与え、撲滅後も残されたリンパ浮腫患者を発生させる。そのためMMDPプログラムにて、撲滅後に残された患者群を継続的にケアしていくことは、真にフィラリア症を撲滅していくという意味で重要である。

戦後、本邦でも撲滅されたように撲滅が可能な疾

またリンパ浮腫の発症機序は十分解明されておら

ず、一度失われたリンパ機能を取り戻すことが難しい。そのため、リンパ浮腫を悪化させないためには、リンパ浮腫を超早期に発見し、治療を開始すること、継続的にケアを行うことが最も基本である。これはフィラリア関連リンパ浮腫だけでなく、本邦で問題になっている癌関連リンパ浮腫でも同様である。

我々は症状がない超早期リンパ浮腫を発見すべく、近赤外線イメージングによるリンパ管造影法を行っている。そのために、新規リンパ系解剖技術を開発し(Shinaoka et al. 2018)、正常人のリンパ系解剖詳細を微細なパターンまで明らかにした(Shinaoka et al. in press)。またそれをコンスタントに造影する方法を独自に標準化した(米国特許出願済み)。この方法はリンパ系の微小な変化を四肢全体で明らかにできるので、癌関連リンパ浮腫患者の早期発見と治療に福音をもたらしている。

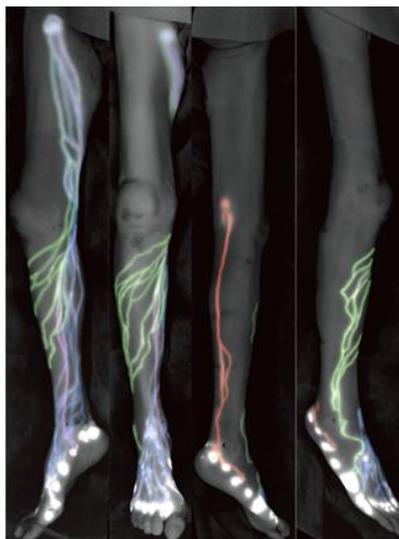


図2 下肢リンパ管4分類。解剖学的に4つのルートに分類される。

世界では発展途上国を中心にフィラリア症関連リンパ浮腫で苦しむ患者が多く存在している。それも早期診断し、治療を開始することで症状進行を食い止めることができることがわかっている。ただ、ポータブルの機器で早期診断するための技術がなく、十分に対応できていない。

そこで我々は、本邦発でポータブル可能な近赤外リンパ系イメージング装置と我々が標準化した検査法をフィラリア症に応用することとした。特にフィ

ラリア症が多いのは東南アジアであり、岡山大学病院は10年以上にわたってミャンマーで医療活動しているため、そこで本研究を行うこととした。



図3 PDEカメラ。ICGが可視化できる。

2. 研究の目的

本研究の主な目的は本格的なサーベイを行う前のプレサーベイを行うこととする。具体的には以下の2つである。

- ・フィラリア症関連リンパ浮腫が癌関連リンパ浮腫の検査所見と何が同様であり、異なるが明らかにすること。
- ・他検査法(抗体検査やメジャー法)との優位性をあきらかにすること。

本研究により、安価でポータブル可能な近赤外線イメージング法のフィラリア症への応用は、世界で1億人を超える患者へ福音をもたらす。また、癌関連リンパ浮腫とは発症機序が異なるリンパ浮腫を検査・診断することで、リンパ浮腫発症機序解明につながり、本邦のリンパ浮腫患者へ還元されることも期待する。

近赤外イメージングは本邦発の技術であり、国内では広く使われているが、海外では普及は進んでいない。対象疾患を広げることで、本邦のイメージング技術と我々の検査テクニックを世界に広げることを目指す。

3. 研究の方法

サーベイを円滑に行うために以下のように段階的に研究を進めていった。

- ①カウンターパートナーの決定

ミャンマー国内で円滑に研究を進めるため、政府の公衆衛生機関(Department of Public Health)と教育研究機関の Department of Medical Research の2つのグループをミャンマー側のカウンターパートナーにお願いした。また、現地における情報はWHOが把握しているため、WHO Myanmar Office のメンバーも補助的に参加していただいた。

②ミャンマーにおける現状把握

現地の状況、カウンターパートナーの考え方など、状況によって研究計画が大きく変わるので、まずは現地にてカンファレンスを行い、次に実際の研究を行う local fieldにて現地調査を行った。

③研究デザインの決定と倫理申請

調査後、オンライン上にてカウンターパートナーと研究デザインについて討議を行った。

4. 研究の成果

①現地研究協力者との打ち合わせ

・現地研究協力者たちと面談した。岡山大学側の技術、浜松ホトニクス社の技術など説明し、ミャンマー側からは現地の状況を説明していただいた。我々が提案する研究計画は可能であること、研究の目的に同意を頂いた。本研究はミャンマー側が first で日本側は補助的に進めていくことに同意した。



図4
ヤンゴン会議。2020/1/15

②現地の状況確認

現地の状況を視察した。インフラ・研究環境などを調査した。

現地の研究協力者 Nay が報告しているフィラリア症の有病率地図(Nay Yi Yi et al, Infectious

Disease of Poverty 2018)を参考に、候補地は Yaysagyo township (Antigenicity 11.58) と Chauk township (Antigenicity 6)に絞り現地を訪れインフラ、検査環境などを視察した。



図5 ミャンマー地図
青丸はヤンゴン、
赤丸が候補地。

両候補地ともに、MDA は進行しているが、ミャンマーの中ではフィラリアの駆逐は遅れており、村の中で 100 名抗体検査をすると、陽性率は Chauk は 7%、Yasagyo は 20%であった。

両候補地ともに、研究は可能であり、最低限の医療施設しかないが、ICG 蛍光リンパ管造影の撮影環境は可能であった。重症患者は病院では認識できていないが、地域に隠れているとのことであった。



図6 Yasagyo Town Hospital
Townの人口は21万人。
唯一の病院で50床。常勤
医師1名。

③研究デザインの決定と倫理申請

先行研究と現地の有病率より研究をデザインした。以下のように決定した。有病率の高さより Yasagyo 地区において研究することを決定した。

・現地にボランティア 100~200 名を募集する。そのうち浮腫の症状がある群 10 名を抽出する。また浮腫がない群のうち ICT カードによる抗原抗体検査により感染がある群を 10 名、感染がない群 10 名を抽出し、計 3 群を登録する。

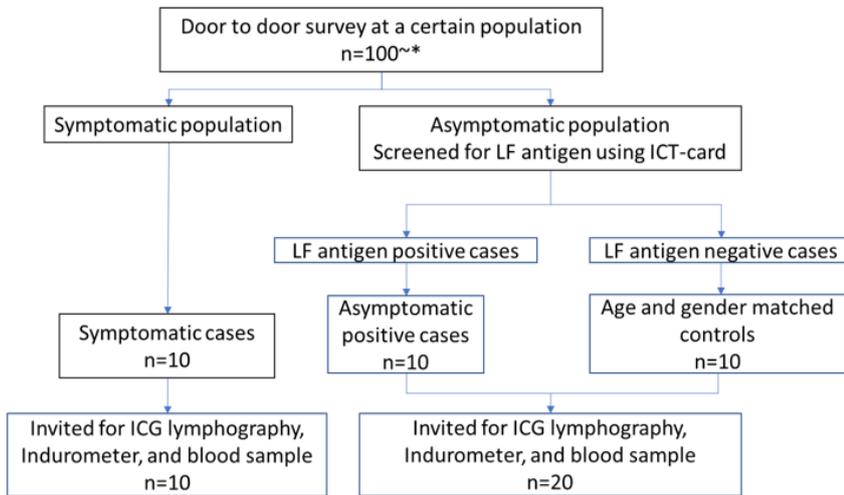


図7 Proposal flow diagram
Asymptomaticのみならず
Symptomaticのcaseも研究
にとり入れるデザインに
なっている。

- ・ 3群に ICG 蛍光リンパ管造影法、indurometer による浮腫検出、血液検査、エコー検査を施行する。
- ・ endpoints は ICG 蛍光リンパ管造影法によるリンパ系画像変化所見の抽出、ICG 蛍光リンパ管造影法と他検査の感度得意度の比較、その地域におけるリンパ浮腫保有率の疫学的結果とする。

リンパシンチグラフィの先行研究により、フィラリア症感染者のうち 70%にリンパ機能低下の所見が見られることなどよりパワー計算 (power: 80%, α : 5%, mean value: 17.9, and SD: 9) を行なったところ Positive case が最低 10 症例必要となった。また共同研究者の Nay Yi Yi の報告により流行地の ICT カードによる陽性率は 20%であり、100-200 症例が必要と計算した。

これらの内容で倫理申請を進めているが、コロナの影響で研究が中断している。コロナ終息後に速やかに再開する予定である。

5. 2019 年度の発表論文等

①雑誌論文 (英文査読あり 7 件)

1. **Shinaoka A**, et al. Lower limb lymphatic drainage pathways and lymph nodes: a three-dimensional CT lymphangiography cadaver study. *Radiology*. 2020 ;294:223-229. (8 人中 1 番目)
2. **Shinaoka A**, et al. Correlations between tracer injection sites and lymphatic pathways in the leg: a near-infrared fluorescence lymphography study. *Plast Reconstr Surg*.

2019;144:634-642. (7 人中 1 番目)

3. Matsumoto H, **Shinaoka A**, et al. Detailed Vascular Anatomy and Flap Harvest Technique of the Serratus Anterior/Rib Composite Flap. *Plast Reconstr Surg*. 2019;143:115-124. (4 人中 2 番目)
4. Matsumoto K, **Shinaoka A**, et al. Exercise-Loaded Indocyanine Green Fluorescence Lymphangiography for Diagnosing Lymphedema. *J Reconstr Microsurg*. 2019;35:138-144. (4 人中 2 番目)

②学会発表 (国際学会 3 件 国内学会 3 件)

1. **Shinaoka A**. Correlations between Lymphatics in the Lower Extremity and Tracer Injections Sites for Lymphography Refinement: a Near-Infrared Fluorescence Lymphography Study in a multi-Cadaver Model. ISL2019 (Buenos Aires)
2. **品岡玲**. ICG-LG より始まる最新リンパ系マクロ解剖とリンパ障害の評価, リンパ浮腫治療学会 2019 (兵庫)

③図書 (1 件)

1. Suami H, **Shinaoka A**. Anatomy and Structural Physiology of the Lymphatic System. Principles and Practice of Lymphedema Surgery 2nd Edition. Editors: Ming-Huei Cheng, David W. Chang, and Ketan M. Pate. Elsevier. In press

④産業財産権 (0 件)

(表題) 腎臓成体幹細胞由来エクソソームの腎臓再生機序の解明

(所属) 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 腎・免疫・内分泌代謝内科学

(氏名) 辻 憲二

(研究成果の概要)

急性腎障害は長期入院や高い致死率に相関し、新たな治療法の開発が急務である。近年、幹細胞から分泌される液性因子、特にエクソソームに含有される蛋白及び RNA が細胞相互作用の媒体として組織再生、免疫制御、癌の発生・進行など多彩な役割を持つことが報告され注目されている。本研究では KS 細胞の細胞上清及びエクソソームを抽出し、虚血再灌流による急性腎障害ラット及び培養腎臓構成細胞に投与し、その効果を解析を行うことにより、腎臓幹細胞由来の液性因子並びにエクソソームによる腎臓再生誘導効果を解明した。

(本文)

【研究開始当初の背景】

急性腎障害は長期入院や高い致死率に相関し、新たな治療法の開発が急務である。これまで間葉系幹細胞による急性腎障害の改善効果が報告されてきたが、その機序はいまだに不明な点も多い。近年、幹細胞から分泌される液性因子、特にエクソソームに含有される蛋白及び RNA が細胞相互作用の媒体として組織再生、免疫制御、癌の発生・進行など多彩な役割を持つことが報告され注目されている。

腎疾患における間葉系幹細胞 (MSC) 由来のエクソソームによる治療効果は Bruno らによって最初に報告され、グリセオール誘発性急性腎障害マウスに対して MSC 由来エクソソームの mRNA を介した腎上皮細胞の増殖促進及びアポトーシス抑制を介した腎保護効果が報告された (Bruno et al, J. Am. Soc. Nephrol, 2009)。その後、虚血再灌流腎障害ラット、シスプラチン腎症マウス、5/6 腎摘ラット等の腎疾患においても MSC 由来エクソソームによる急性及び慢性腎障害の改善効果が報告されてきた。一方で、エクソソームの網羅的解析による保護因子の特定に関する報告は少なく、依然として治療応用には至っておらず、エクソソーム内の保護的因子及び腎臓再生機序の解析が臨床応用のためには重要と考えられる。さらに腎疾患におけるエクソソーム研究のほとんどは MSC を用いて行われており、実際の腎障害時において腎上皮細胞再生に重要であることが示唆されている腎臓組織幹細胞由来のエクソソームに関する研究

報告は非常に少ない。

これまで我々は ラット成体腎臓より増殖能・分化能を持つ細胞株 (成体腎臓幹/前駆細胞: KS 細胞) を樹立し、急性腎障害モデルへの移植により生着・分化を伴った再生誘導を報告した (Kitamura Set al, FASEBJ, 2005)。KS 細胞を左腎被膜下に投与した腎障害モデルにおいて、右腎にも左腎と同様の保護的な効果が観察されたことから、KS 細胞による液性因子を介した間接的な腎保護効果があることが示唆された。

以上より、本研究では、KS 細胞由来の液性因子その中でも特にエクソソームの急性腎障害における腎臓再生誘導効果及び再生機序の解明を目指す。さらに KS 細胞由来エクソソームに含有される ncRNA の網羅的解析を行い、腎保護的な ncRNA の解明も目指す。

【研究の目的】

本研究では KS 細胞分泌の細胞上清及び、その中からエクソソームを抽出し、虚血再灌流による急性腎障害ラット及び培養腎臓構成細胞に投与し効果を解析することによって、腎臓幹細胞由来の液性因子並びにエクソソームによる腎臓再生誘導効果を評価し、さらにその機序の解明を行う。

また、腎臓幹/前駆細胞分泌エクソソーム含有 ncRNA を含む small-RNA を次世代 RNA シークエンシングを用いて網羅的に発現評価し、その結果を解析することによって、腎臓再生誘導因子となる ncRNA の特定

を行い、さらに特定した ncRNA を阻害することにより腎臓再生が阻害されるかについての検討も目指す。

【研究の方法】

(1) 成体腎臓幹/前駆細胞の形質評価

ラット成体腎臓幹/前駆細胞 (KS 細胞) 及びマウス腎臓近位尿細管上皮細胞 (mProx24 細胞) を用いて、蛍光免疫染色法を行い細胞形質及び成長因子の分泌の有無の評価を行う。

(2) 成体腎臓幹/前駆細胞由来液性因子の抽出

ラット成体腎臓幹/前駆細胞及びラット腎臓構成細胞 (NRK52E 細胞) の細胞上清を回収し、蛋白濃縮キットを用いて 40 倍に濃縮を行う。また、上記細胞の細胞上清を採取し、エキソソーム抽出キットを用いて抽出し、エキソソーム特異的マーカー (CD81、CD9) によるウエスタンブロッティング及び電子顕微鏡によるエキソソームの評価を行った。

(3) 成体腎臓幹/前駆細胞由来液性因子の急性腎障害ラットモデルに対する治療効果解析

6 週齢雄性 SD ラットを用いて、腎臓虚血再灌流障害 (I/R) を誘発し、150 μ g の KS 細胞あるいは NRK52E 細胞由来の濃縮細胞上清を単回投与を行う群と対象群に分け第 2 病日及び第 4 病日に屠殺し、腎機能・尿細管障害、尿細管上皮細胞のアポトーシス、細胞増殖、炎症細胞浸潤の程度を免疫染色・定量 RT-PCR ならびにウエスタンブロッティングにより評価し、細胞由来の液性因子の治療効果及び機序を解析する。

(4) 成体腎臓幹/前駆細胞由来液性因子及びエキソソームの *in vitro* に対する治療効果の解析

リアルタイム細胞解析装置 (ECIS) を用いて NRK52E 細胞培養及び KS 細胞培養を行い、KS 細胞由来の液性因子あるいはエキソソーム及び NRK52E 細胞由来液性因子あるいはエキソソームの治療効果を経時的に評価する。

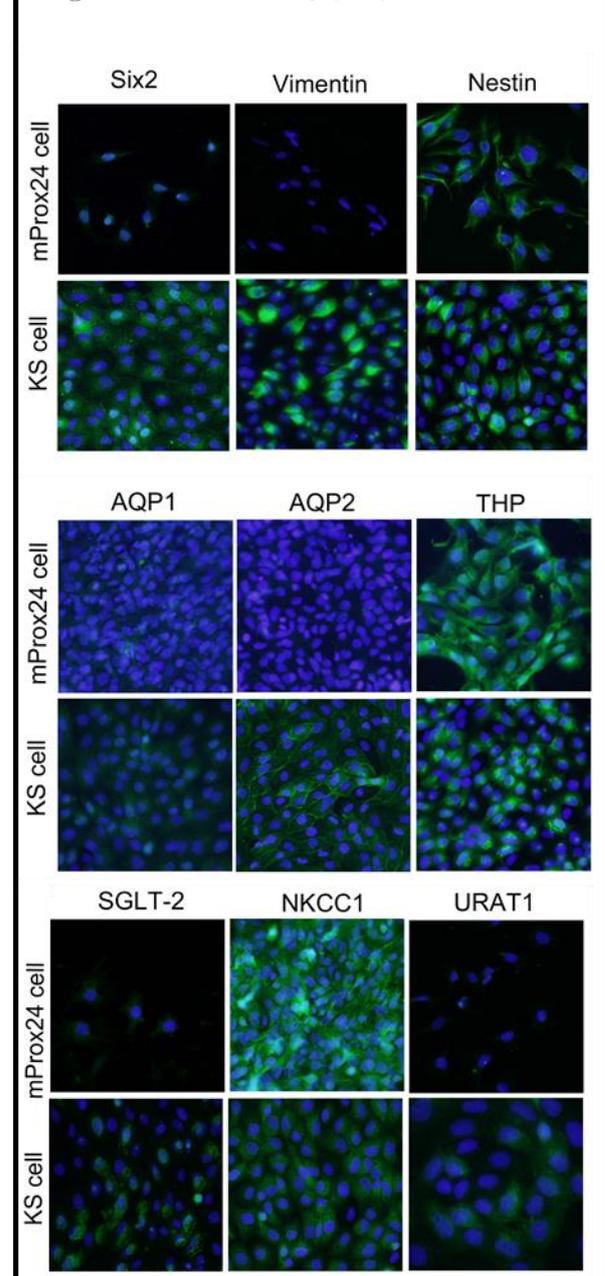
さらに各細胞由来因子投与後の腎臓構成細胞の細胞形態及び形質評価を免疫染色及びウエスタンブロッティングにて行い、保護的因子の細胞保護の機序解明を行う。

【研究成果】

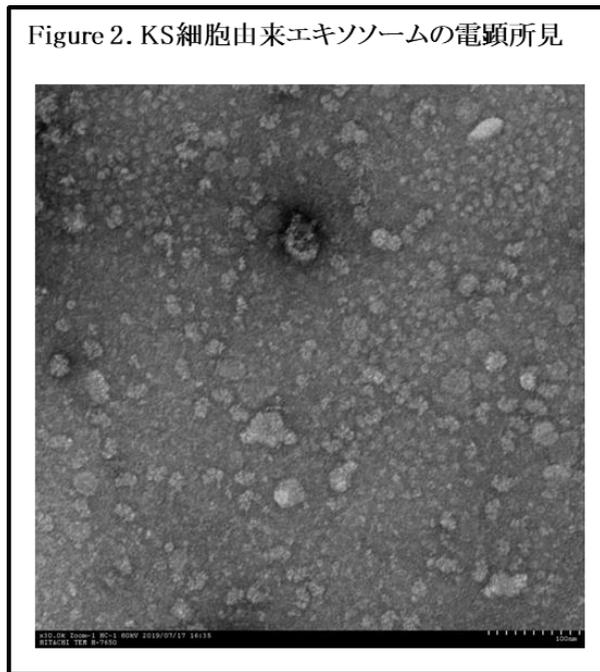
(1) 成体腎臓幹/前駆細胞の形質評価

KS 細胞の蛍光抗体染色によって、KS 細胞は Six2、Vimentin、Nestin などの幹細胞マーカーを強発現し、さらに腎臓構成細胞に特異的な蛋白発現として、近位尿細管細胞の AQP1、集合管細胞特異的な AQP2、遠位尿細管細胞特異的な Tamm-Horsfall protein (THP) を発現し、さらに SGLT2、NKCC1、URAT1 などの腎臓特異的な蛋白発現を認めた (Figure 1)。さらに成長因子として HGF、EGF、IGF1、エリスロポエチン (Epo) の発現も認められており多彩な保護因子を分泌することが示された (data not shown)。

Figure 1. KS細胞形質評価



(2) 成体腎臓幹/前駆細胞由来液性因子の抽出
 ラット成体腎臓幹/前駆細胞及びラット腎臓構成細胞 (NRK52E 細胞) の細胞上清を回収し、蛋白濃縮キットを用いて 40 倍に濃縮を行い、ウエスタンブロッティングを行い、HGF, EGF, IGF1, Epo の発現を確認した (data not shown)。また、上記細胞の細胞上清を採取し、エキソソーム抽出キットを用いて抽出し、エキソソーム特異的マーカー (CD81, CD9) によるウエスタンブロッティング (data not shown) 及び電子顕微鏡により評価を行い、エキソソームの存在を確証した。(Figure 2)。



(3) 成体腎臓幹/前駆細胞由来液性因子の急性腎障害ラットモデルに対する治療効果解析

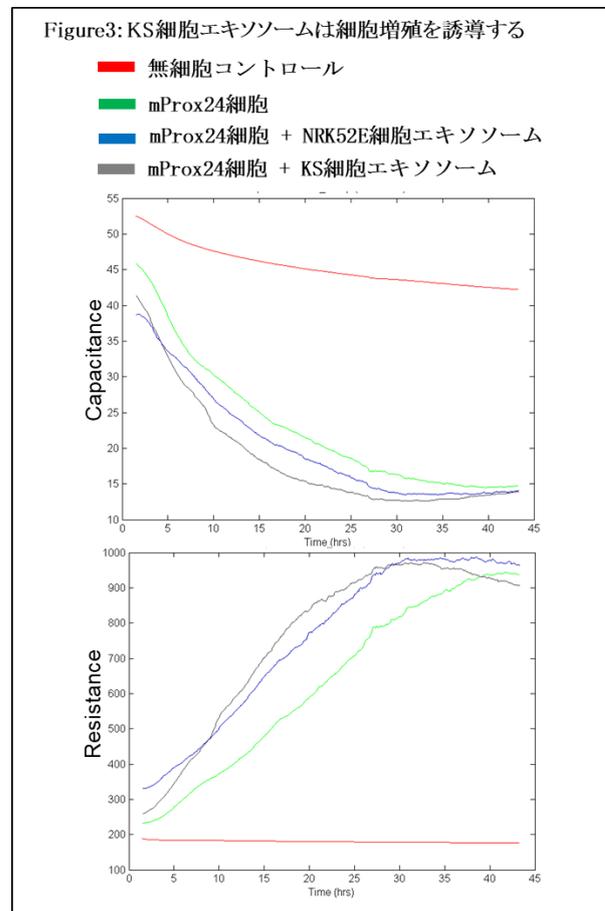
腎臓虚血再灌流障害 (I/R) を誘発した群では、第 2 病日で Control 群と比較して血清 Cr 及び BUN の上昇を認め、第 4 病日では改善を認めた。一方で KS 細胞由来上清投与群では、血清 Cr 値及び BUN の第 2 病日の上昇は有意に抑制され、尿細管障害マーカーの尿中 NAG も同様に有意な低下を認めた。免疫染色法にて評価したところ、KS 細胞上清投与群では、無投与群及び NRK52E 細胞由来細胞上清投与群と比較して、TUNEL 染色にて評価する尿細管上皮細胞のアポトーシスは、有意に減少し、F4/80 染色によるマクロファージ浸潤も有意に減少した。さらに p-histone-H3 染色により評価される細胞増殖は KS

細胞上清投与群で有意に増加を認めた。以上より、KS 細胞上清治療によって、多彩な液性因子を介して腎保護あるいは腎臓再生能が促されることが示唆された。

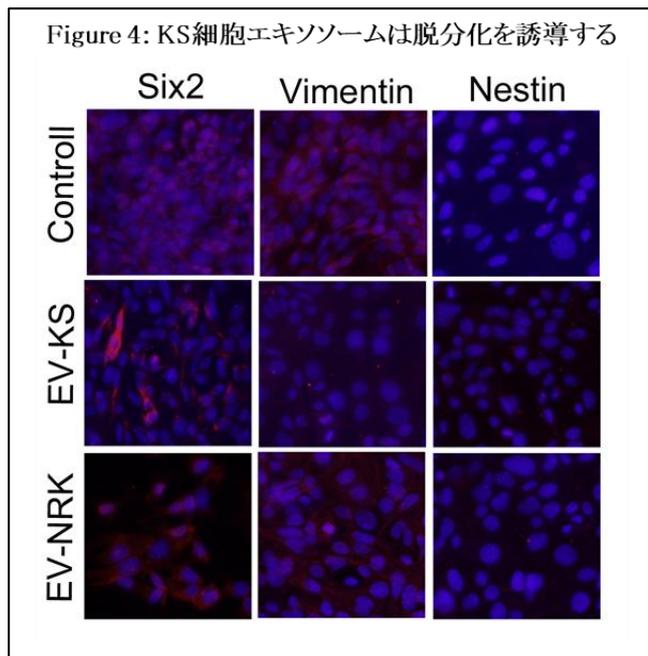
さらに、KS 細胞上清投与群では、Nestin 陽性細胞の有意な増加を認めたことより、近位尿細管上皮細胞の de-differentiation (脱分化) が誘導されることにより腎臓再生が促される可能性が示唆された (data not shown)。

(4) 成体腎臓幹/前駆細胞由来液性因子及びエキソソームの in vitro に対する治療効果の解析

リアルタイム細胞解析装置 (ECIS) を用いて近位尿細管上皮細胞 (mProx24) に KS 細胞あるいは NRK52E 細胞由来のエキソソームの添付の有無で細胞増殖能及び細胞接着能をリアルタイムで評価したところ、KS 細胞由来エキソソーム付加した細胞は他のグループと比較して細胞増殖及び細胞接着が誘導される傾向が認められ (Figure 3)、エキソソーム内に含有される何らかの因子が関与している可能性が示唆された。



次に、上記のエキソソーム投与した細胞群を蛍光免疫染色法にて評価したところ、KS細胞由来のエキソソーム投与群（EV-KS）においてSix2陽性の未分化細胞マーカーの有意な増加が認められ、NRK52E細胞由来のエキソソーム投与群（EV-NRK）では認められなかったことから、KS細胞中のエキソソームに含有される何らかの因子が、近位尿細管細胞の脱分化に関与している可能性が示唆された（Figure 4）。



（得られた成果の位置づけ）

これまでの間葉系幹細胞エキソソームによる再生誘導機序と類似の効果が期待されるとともに、腎臓組織幹細胞に特異的な再生機序の可能性も期待され**新たな腎臓再生機序の解明につながる可能性**も考えられる。さらに今後 microRNA シークエンシング解析によって、再生誘導をおこす再生因子の特定を目指す。これまで明らかにされてこなかった**腎臓組織幹細胞によるエキソソーム含有のncRNAを介した急性腎障害への新たな治療法の確立に大きな前進をもたらすもの**と考えられる。

これらの再生因子が急性腎障害治療の新たな治療戦略と理解されれば、これまでの急性腎障害における対症保存的治療とは異なる、新たな治療戦略をもたらさうと考えられる。

（今後の展望）

本研究においては、成体腎臓幹/前駆細胞由来エキソソーム内の何らかの因子が再生誘導に寄与することが示されたが、特定の因子までは特定できておらず、今後はncRNA解析などを行い、保護因子の特定及びそれによる革新的治療法の開発を目指す。

【主な発表論文等】

- ① 雑誌論文：0件。
- ② 学会発表：合計4件。
 - 1 [Yizhen Sang](#), [Kenji Tsuji](#), [Kazuhiko Fukushima](#), [Kensaku Takahashi](#), [Shinji Kitamura](#), Jun Wada. Semaphorin3A-inhibitor, SM-345431 Ameliorates Doxorubicin-induced Podocy Injury. The 10th Chronic Kidney Disease Frontier Meeting Feb 15th, 2020, Nagoya, Japan.
 - 2 [辻憲二](#), [Yizhen Sang](#), [福島和彦](#), [高橋謙作](#), [喜多村真治](#), [和田淳](#). Semaphorin3Aを介したポドサイト障害機序の解明. 第10回腎不全研究会 2019年12月7日, 東京
 - 3 [Yizhen Sang](#), [Kenji Tsuji](#), [Kazuhiko Fukushima](#), [Shinji Kitamura](#), Jun Wada. Semaphorin3A-inhibitor ameliorates renal fibrosis in unilateral ureter obstruction mice. Kidney week 2019, Nov 5-10, 2019, Washington DC, USA.
 - 4 [Yizhen Sang](#), [Kenji Tsuji](#), [Akiko Inoue-Torii](#), [Kazuhiko Fukushima](#), [Shinji Kitamura](#), Jun Wada. Semaphorin3A-inhibitor ameliorates podocytopathy in doxorubicin-induced renal injury. 第63回日本腎臓学会学術総会 6月26日-28日, 2019, 横浜.
- ③ 図書：0件。
- ④ 産業財産権：0件。

血液・血球-血管内皮細胞インターフェイスの 恒常性維持機構と網羅的新規創薬

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科薬理学

和氣 秀徳

研究成果の概要

敗血症において、血中 HRG レベルの急激な低下により、HRG が通常担っている血球-血管内皮恒常性維持作用が失われ、細胞の異常な活性化や障害が進行する。これまで、HRG の血球-血管内皮恒常性維持作用機序はほとんど明らかになっていなかったが、本研究において、その作用機序として、HRG は様々な CLEC ファミリー分子を介して血球細胞や血管内皮細胞の活性を制御していることを明らかにした。この研究成果により、敗血症治療において、HRG の補充療法だけでなく、CLEC ファミリー分子を新たなターゲットとした創薬が可能となる。

1. 研究開始当初の背景

我々は、世界的に年間 2000~3000 万人が新規発症し、約 25% のヒトがそのために命を落としている敗血症の病態生理に関する研究を実施し、致死性の高い呼吸不全 (ARDS)、循環系ショック、播種性血管内凝固症 (DIC) に至る生体反応の最上流のイベントとして、血漿タンパク Histidine-rich glycoprotein (HRG) の低下があることを突きとめた (Wake et al. EBioMedicine, 2016)。HRG は血中の生理的濃度で、好中球の正球形態を維持し、自発性活性酸素 (ROS) 産生の低い基底状態に保つ働きと、血管内皮細胞を保護する作用、さらに赤血球の凝集抑制作用 (Zhong et al. J Pharmacol Sci, 2018) を合わせ持ち、血管外での好中球による細菌貪食は促進する。敗血症病態では、血漿中 HRG の急激な低下によって上記の HRG 作用が失われるため、好中球の血管内皮細胞への強い接着をきっかけとする免疫血栓が肺血管床で形成され、ARDS の病態となる。また、好中球と血管内皮細胞の強い相互作用と好中球産生性 ROS のため、血管内皮細胞機能が障害され、細動脈血管緊張が維持できずショックの病態となる。血漿 HRG の著

明な低下は、敗血症モデルマウスのみならず ICU 内敗血症患者でも同程度低下が確認され (Kuroda et al. Crit Care Med, 2018)、その補充により救命率を向上できる可能性が示唆されている。

2. 研究の目的

HRG によるヒト好中球の正球化活性は、典型的シグモイド形状の用量作用曲線を描き、その効果が受容体介在性の反応であることが強く示唆された。そこで、HRG の受容体探索・同定を試み、候補分子を 2 種類同定した。同定された HRG 受容体候補分子の 1 つである CLEC1A には、ファミリータンパクが存在し、それらは正負の方向に細胞機能を変化させると推定しているが、内因性リガンドを含め殆どその機能は明らかになっていない。そこで本研究では、CLEC1A や、そのファミリー分子を介した血球-血管内皮細胞インターフェイスの恒常性維持機構の解明を目的とし、以下の研究を実施した。

3. 研究の方法

a) CLEC1A-Fc 融合タンパクの HRG 好中球正球

化作用中和活性

CLEC1A-Fc 融合タンパクを COS 発現系で作製し、精製した。融合タンパクを HRG のヒト好中球正球化アッセイ系に添加し、中和活性を評価した。

b) CLEC1A 細胞内シグナル解析

CLEC1A 発現 HEK293T 細胞とそのドミナントネガティブ (DN) 細胞を作成し、細胞内シグナルを解析した。非刺激の培養条件から得られた細胞から電気泳動サンプルを調製し、ウエスタンブロットにより、代表的なリン酸化酵素とその活性化リン酸化フォームを検出した。対照として、Green Fluorescent Protein (GFP) を発現する細胞を用いた。また、培養系に HRG (1 μ M) を添加し、その後に細胞内のタンパクリン酸化の変化をチロシン、セリン、スレオニン残基を認識する異なった抗体で検出した。

c) HRG の血管内皮細胞 HMGB1 トランスロケーション抑制に対する CLEC1A 遮断抗体の効果

HRG の効果を再現性よく検出する細胞系として、培養血管内皮細胞 (EA.hy926) を用いた HMGB1 トランスロケーションのアッセイ系がある。LPS による血管内皮細胞の核から細胞外への HMGB1 トランスロケーションを HRG は抑制するが、そこにさらに CLEC1A 抗体を添加することで、その HRG 作用を遮断できるか検討した。

d) HRG 活性に寄与する CLEC ファミリー分子の同定

膜1回貫通受容体型 CLEC タンパクに対するそれぞれの特異的抗体 (約 30 種類) を用いて、HRG の 3 つの作用 (好中球正球化、ROS 産生抑制、貪食能亢進) に対する各抗体の遮断活性を調べた。

4. 研究成果

a) CLEC1A-Fc 融合タンパクの HRG 好中球正球化作用中和活性

CLEC1A-Fc 融合タンパクは、 $\sim 30 \mu\text{g/ml}$ ま

での濃度でヒト好中球の細胞形態にいかなる作用も及ぼさなかったが、0.25 μM の HRG で誘導された正球化を、この濃度範囲で濃度依存的に抑制した。このことから、CLEC1A の細胞外ドメインと HRG の結合が間接的に証明された。

b) CLEC1A 細胞内シグナル解析

CLEC1A 発現細胞と DN 細胞では、ERK1/2, P38, AKT 等のリン酸化酵素の発現量に差がなく、また、それらの活性化リン酸化体のレベルにも変化がないことが分かった。これらの細胞を HRG により刺激すると複数のバンドのタンパクリン酸化の亢進が検出された。DN 細胞では一致するバンドサイズに変化は認められなかったため、このようなリン酸化変化は CLEC1A 刺激特異的な反応と結論した。

c) HRG の血管内皮細胞 HMGB1 トランスロケーション抑制に対する CLEC1A 遮断抗体の効果

血管内皮細胞は、100ng/ml の LPS で刺激されると、核内 HMGB1 を細胞質内さらには細胞外に放出し、放出された HMGB1 は炎症反応を惹起する。この LPS 誘発反応は 1 μM の HRG の添加でほとんど完全に抑制されるが、HRG の効果は抗 CLEC1A 抗体 (10 $\mu\text{M/ml}$) の添加で部分的に抑制された。このことから、血管内皮細胞に対する HRG の作用には、少なくとも CLEC1A 受容体が関与すると考えられた。

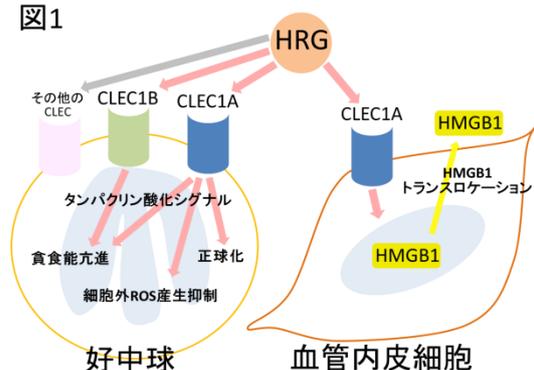
d) HRG 活性に寄与する CLEC ファミリー分子の同定

これまでの予備的研究から、3 つの作用 (好中球正球化、ROS 産生抑制、貪食能亢進) に関与する受容体は、それぞれ異なっていることが予想されていたので、抗体による遮断活性のプロファイリングを実施した。例えば、抗 CLEC1A 抗体では HRG の 3 つすべての作用を遮断するが、抗 CLEC1B 抗体では HRG による貪食亢進を強く抑制し、その他 2 つの活性遮断作用は弱かった。

以上の結果より、HRG は CLEC1A を介して好中球や血管内皮細胞にシグナルを入力し、細

胞障害や過剰な活性化を抑制していることが明らかとなった。また、CLEC ファミリー分子は多数存在しており、CLEC1A だけでなく他の CLEC 分子もこれらの反応に関与していることが示唆された(図1)。

図1



この研究成果により、HRG は血球-血管内皮細胞インターフェイスの恒常性維持機構に CLEC ファミリー分子を介して関与していることが明らかとなり、今後、CLEC をターゲットとした新たな敗血症治療薬の創出に寄与できると考えられた。

5. 主な発表論文等

論文(3件)

1. Wake H. Histidine-rich Glycoprotein Modulates the Blood-vascular System in Septic Condition. *Acta medica Okayama*. 73(5):379-82, 2019.

doi: 10.18926/AMO/57366. Review.

2. Nishimura Y, Wake H, Teshigawara K, Wang D, Sakaguchi M, Otsuka F, Nishibori M. Histidine-rich glycoprotein augments natural killer cell function by modulating PD-1 expression via CLEC-1B. *Pharmacol Res Perspect*. 7(3):e00481, 2019. doi:10.1002/prp2.481.

3. Gao S, Wake H, Gao Y, Wang D, Mori S, Liu K, Teshigawara K, Takahashi H, Nishibori M. Histidine-rich glycoprotein ameliorates

endothelial barrier dysfunction through regulation of NF- κ B and MAPK signal pathway. *Br J Pharmacol*. 176(15):2808-24, 2019.

doi:10.1111/bph.14711

学会発表(10件)

1. Histidine-rich glycoprotein regulates neutrophil condition in sepsis (学会中止による誌上発表). Wake H, Mori S, Takahashi H, Wang D, Teshigawara K, Nishibori M. 第93回日本薬理学会年会(横浜). 2020/3, 国内.

2. Novel roles of histidine-rich glycoprotein in physiological placental development and in prevention of hypertensive disorders of pregnancy (学会中止による誌上発表). Teshigawara K, Liu K, Wake H, Wang D, Mori S, Takahashi H, Nishibori M. 第93回日本薬理学会年会(横浜). 2020/3, 国内.

3. The effects of histidine-rich glycoprotein on neutrophil-like differentiated cell lines (学会中止による誌上発表). Yoshii Y, Wake H, Teshigawara K, Wang D, Liu K, Takahashi Y, Nishibori M. 第93回日本薬理学会年会(横浜). 2020/3, 国内.

4. Functional Evaluation of Neutrophils Spheroidized by HRG (学会中止による誌上発表). Takahashi Y, Wake H, Teshigawara K, Wang D, Nishibori M. 第93回日本薬理学会年会(横浜). 2020/3, 国内.

5. HRG の作用により球状化したヒト好中球の機能評価(口頭). 高橋陽平, 和氣秀徳, 吉井將哲, 王登莉, 勅使川原匡, 西堀正洋. 第32回創薬・薬理フォーラム岡山(岡山). 2019/12/21, 国内.

6. Histidine-rich glycoprotein inhibits high mobility group box 1-mediated pathway in vascular endothelial cells (Poster).

Gao S, Wake H, Sakaguchi M, Wang D, Mori S, Liu K, Teshigawara K, Gao Y, Takahashi H, Nishibori M. 第9回 国際 DAMPs と Alarmins シンポジウム (岡山) . 2019/11/6-8, 国内.

7. HRG の作用により球状化したヒト好中球の貪食能解析(口頭). 高橋陽平, 和氣秀徳, 吉井將哲, 阪口政清, 劉克約, 勅使川原匡, 高橋英夫, 森秀治, 西堀正洋. 第135回日本薬理学会近畿部会 (岐阜) . 2019/6/21, 国内.

8. 好中球様細胞における Histidine-Rich Glycoprotein (HRG) の影響(口頭). 吉井將哲, 和氣秀徳, 高橋陽平, 王登莉, 勅使川原匡, 西堀正洋. 第135回日本薬理学会近畿部会 (岐阜) . 2019/6/21, 国内.

9. 周産期における高ヒスチジン糖タンパク (HRG) の生理的役割の解析 (口頭). 勅使川原匡, 劉克約, 和氣秀徳, 王登莉, 高橋英夫, 森秀治, 西堀正洋. 第135回日本薬理学会近畿部会 (岐阜) . 2019/6/21, 国内.

10. 高ヒスチジン糖タンパク遺伝子欠損マウスにおける妊娠高血圧、及び、胎盤形成異常の解析 (口頭) . 勅使川原匡, 劉克約, 和氣秀徳, 王登莉, 高橋英夫, 森秀治, 西堀正洋. 第92回日本内分泌学会学術総会 (仙台) . 2019/5/9, 国内.

研究題目 エピスタシス効果による新型インフルエンザウイルスの出現予測

所属：川崎医科大学 微生物学教室

氏名：内藤 忠相

研究成果の概要

インフルエンザ市中流行株である A (H1N1) pdm09 ウイルスから HA 遺伝子および NA 遺伝子をクローニングし、低忠実性 PB1 ポリメラーゼ実験室株に組込むことで、増殖活性が多様なウイルス集団である「流行株の主要抗原に由来する変異ウイルスライブラリー」を作製した。本ライブラリーから免疫逃避株（抗原変異株）の候補ウイルスを複数単離した。本研究結果から、低忠実性ポリメラーゼウイルスを利用することで、迅速かつ高率に抗原変異株を単離できるスクリーニングシステムの開発が可能であると考えられた。

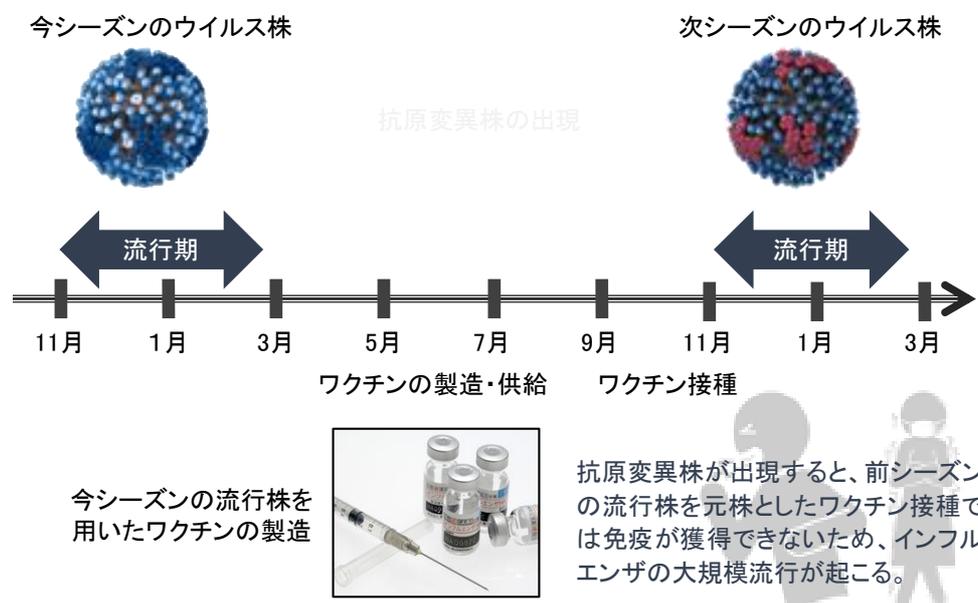
本文

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルスのゲノムは 8 本に分節化された 1 本鎖 RNA であり、ウイルス由来の RNA ポリメラーゼである PB1 蛋白質により複製されるが、合成された RNA ゲノム内には 1 万塩基あたり約 1 個の頻度で変異が生じる。この高い変異導入効率により、季節性インフルエンザウイルスは頻繁に抗原変異を起こし、流行予測から選定されたワクチン株と市中流行株との間で抗原性が一致せず、ワクチンによる重症化阻止効果が著しく低下する場合がある（図 1）。

そこで、ワクチン株と市中流行株との間の抗原性を一致させるため、次シーズン以降の流行株に起きる抗原変異部位を予測する研究成果が報告されている (Selection of antigenically advanced variants of seasonal influenza viruses, Nature Microbiology, 2016)。しかし、従来技術で予想可能な変異部位は、全ウイルス抗原のうちヘマグルチニン (Hemagglutinin: HA) の主要抗原領域に限定されており、全長の HA や他の主要抗原であるノイラミニダーゼ (Neuraminidase: NA) を含めた全ウイルス蛋白質について予測可能なシス

図1 インフルエンザワクチン開発における問題点



テムではない。そのため、抗原決定基となりうる「全ウイルス蛋白質」の「全領域」を対象にしたアミノ酸置換の多様性を把握できれば、抗原変異を伴う未来流行株を高精度に予測可能になる。

また現在、臨床現場でインフルエンザ感染者を迅速に特定する手段として、インフルエンザウイルス抗原診断キットが使用されている。診断キットにはイムノクロマト法が採用されており、判定時間はわずか数分であり、有用な診断法である。しかし、2009年に出現した新型パンデミックウイルス“A(H1N1)pdm09株”の流行当時においては、診断キットを用いた陽性検出率は約50%であり、インフルエンザであっても陽性にならない「偽陰性」と判定された患者が数多く存在していた。イムノクロマト診断キットでは、インフルエンザウイルスが持つヌcleoプロテイン(NP)と呼ばれる蛋白質を認識する抗NPモノクロナール抗体が使われている(図2)。

将来流行するインフルエンザウイルスにおいてNP蛋白質に変異が起こり、既存診断キットの抗NP抗体では認識されない可能性があるため、感染していても陰性と判定されて早期の治療機会を失う恐れがある。実際に2009年当時の診断キットを用いたA(H1N1)pdm09株の検出感度は、NP蛋白質の変異による抗原部位の構造変化のため、抗体による認識感度が100倍ほど低下していた。

未来流行株の予測が可能となれば、感染防御効果の高いワクチン開発研究に加えて、新規インフ

ルエンザ診断キットの開発にも応用が期待できる。

2. 研究の目的

申請者は、野生株よりも変異が入りやすい低忠実性ポリメラーゼ導入ウイルスPB1-Y82C株(Tyr-82残基をCysに置換:Tyr82 amino acid mutation in PB1 polymerase induces an influenza virus mutator phenotype, Journal of Virology, 2019)およびPB1-K471H株(Lys-471残基をHisに置換:特許出願中)を世界で初めて単離した。本研究ではPB1-Y82C株およびPB1-K471H株を用いて、次シーズン以降の流行株に起きる抗原変異部位を予め推測できるインフルエンザウイルス未来流行株予測システムを開発する。そして、新規抗原変異株の性状解析を行うことで、毎年の流行株と抗原性が一致したワクチン株選定を可能にできる基盤情報を蓄積する。

さらに本システムにより、従来のスクリーニング系では単離が不可能であった多分節ゲノム間の多塩基変異(エピスタシス効果)に由来する新型インフルエンザウイルスの出現を予測し、現流行株の進化方向性と遺伝的多様性を網羅的に解析する(図3)。

3. 研究の方法

これまでに、遺伝子組換え技術を用いて人為的にインフルエンザウイルス実験室株(A/Puerto Rico/8/1934株:PR8株)を改変し、野生株と比較

図2 インフルエンザウイルスの構造とNP蛋白質

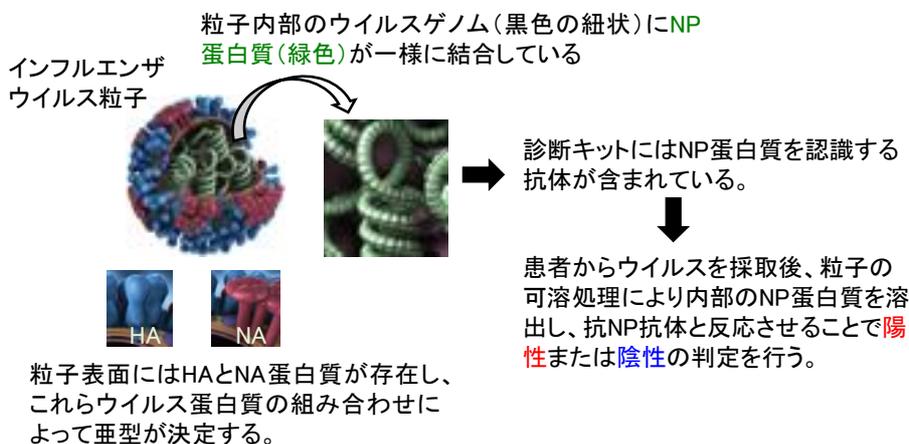
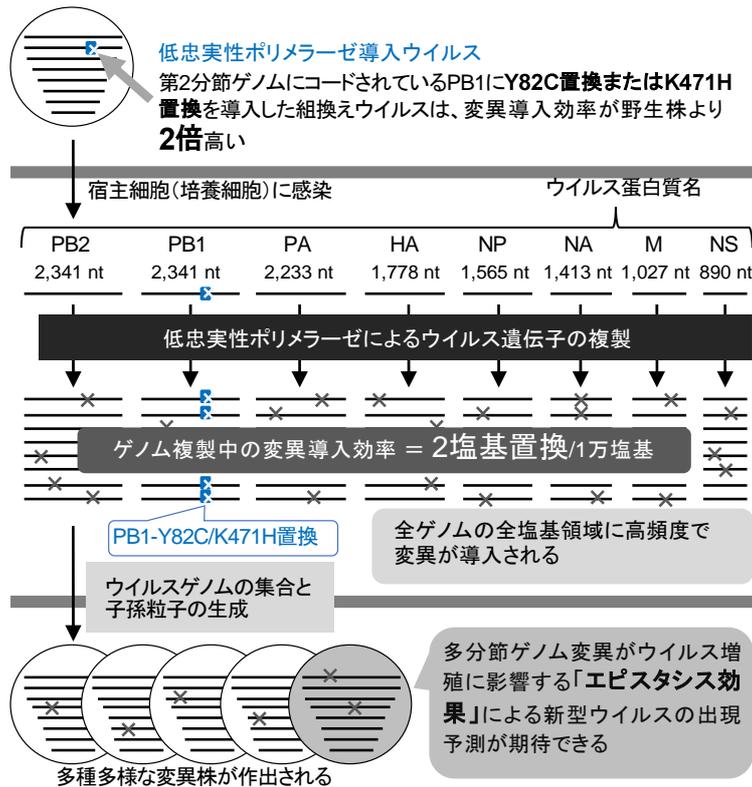


図3 低忠実性ポリメラーゼによるエピスタシス効果と
新型ウイルスの出現予測



して変異が入りやすい“低忠実性ウイルス株”の単離に成功している。低忠実性ウイルス株は、ゲノム複製を担うウイルスポリメラーゼのPB1蛋白質の82番目または471番目のアミノ酸を人為的に改変しており、野生株と比較して2倍の頻度でウイルス遺伝子に変異が挿入される。この低忠実性ウイルス株を用いれば、現在のインフルエンザ流行株を元株とした変異ウイルスライブラリー（変異ウイルスの集合体）が作製可能である。そのライブラリーの中には、将来流行する新規抗原変異株が含まれる可能性がある。

そこで、現在の市中流行株であるインフルエンザウイルス A(H1N1)pdm09 株から HA 遺伝子および NA 遺伝子をクローニングし、PR8 株を母体とした低忠実性ウイルスに組込むことで、流行株の主要抗原に由来する変異ウイルスライブラリーを作製する。そして、ウイルスライブラリーを用いたプラークアッセイ実験により、主要抗原である HA 蛋白質や NA 蛋白質に変異が導入された新規抗原変異株の単離を試みる。同様に、診断キットのウイルス抗原となる NP 蛋白質にアミノ酸置換が導入された新規変異株が単離できるかどうか検討する。

図4 A(H1N1)pdm09株の主要抗原をコードする低忠実性ポリメラーゼ導入ウイルスの作製

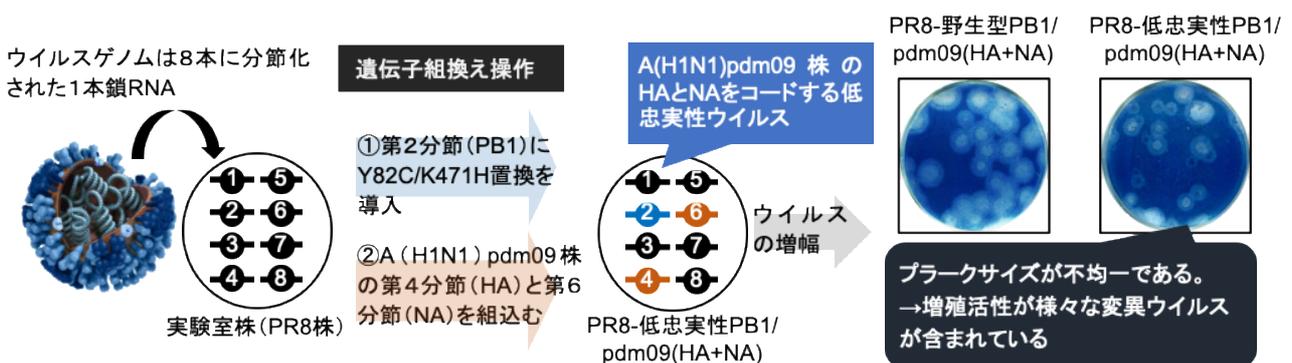
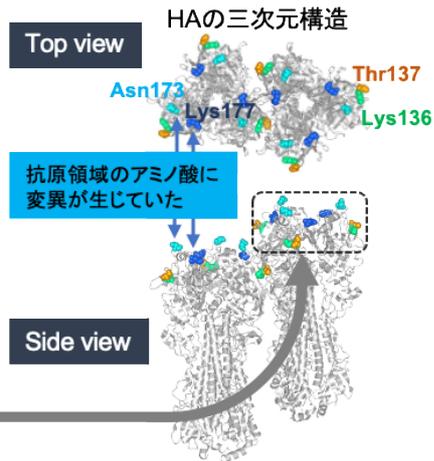


図5 A(H1N1)pdm09株のHAに導入されたアミノ酸変異

| pdm09-HAにおけるアミノ酸変異部位 | 単離株数 | 注釈 |
|----------------------|------|-----------------------|
| 変異なし | 7 | |
| Lys136Glu | 12 | ウイルスの高増殖性化に寄与した可能性がある |
| Lys136Thr | 3 | |
| Thr137Asn | 1 | |
| Asn173Asp | 7 | 抗原領域における変異 |
| Lys177Met | 1 | |
| Arg269Lys | 1 | 機能未知(ストーク領域) |

ウイルス粒子の表面側に多くの変異が導入されていた。
→抗原性やレセプター吸着に影響する可能性が高い。



4. 研究成果

市中流行株である A (H1N1) pdm09 株から HA 遺伝子および NA 遺伝子をクローニングし、PR8-低忠実性 PB1 ウイルスに組込むことで、流行株の主要抗原をコードした「PR8-低忠実性 PB1/pdm09(HA+NA) 株」を作出した (図 4)。続いて、PR8-野生型 PB1/pdm09 (HA+NA) 株をコントロールとしてウイルスの増幅を行なった結果、低忠実性 PB1 株を種株とすることで“増殖活性が多様なウイルス集団”、すなわち「流行株の主要抗原に由来する変異ウイルスライブラリー」が作製可能であることを明らかにした。

PR8-低忠実性 PB1/pdm09 (HA+NA) 株を用いたプラークアッセイ実験により 32 個の単一プラークを選択し、プラーク中に含まれるウイルスを単離後、培養細胞を用いてウイルス増幅を行なった。その後、各分離株のウイルス遺伝子解析の結果、免疫選択圧をかけない条件下において増幅させたにも関わらず、変異ウイルスライブラリーの中には多数の「HA 蛋白質の抗原領域にアミノ酸置換が生じた変異株」が含まれていた (図 5)。この結果から、低忠実性ポリメラーゼウイルスを利用することで、迅速かつ高率に抗原変異株を単離できるスクリーニングシステムの開発が可能であると考えられた。

図6 既存の診断キットを用いた新規NP変異株の検出感度の測定

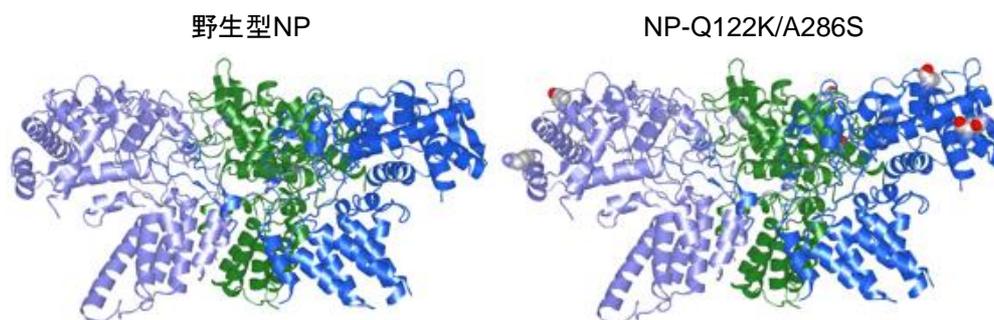


NP変異株表記の説明 (例: R19Hの意味)
NP蛋白質の19番目のアミノ酸残基であるアルギニン (一文字表記: R) が、ヒスチジン (一文字表記: H) に変異している

加えて、同時に他分節ゲノム (NA 遺伝子や NP 遺伝子) にアミノ酸変異が導入された変異ウイルスも単離されており、具体的には、アミノ酸置換を伴う NP 変異株を 5 株単離した (R19H 変異株、E81G 変異株、T6A/S314G 変異株、Q20P/K470R 変異株および Q122K/A286S 変異株)。市販のインフルエンザ診断キットを用いて、それら NP 変異株の検出感度が野生株より低下するかどうか検討した結果、検出感度は野生株とほぼ同程度であった (図 6 : 全ての変異株において、A 型インフルエンザウイルスの検出を示す「赤いライン」が認められた)。

本研究によって得られた NP 変異株に見出されたアミノ酸変異部位は、既存の診断キットに含まれる抗体の結合活性には影響しないことが示唆された。一方で、NP 蛋白質の三次元構造は解読されており、変異アミノ酸部位を構造上にプロットす

図7 NP蛋白質の三次元構造および変異導入部位



NP変異体構造図において、変異した各アミノ酸部位をボール構造で示す

ることが可能である(図7:例としてQ122K/A286S変異株を示す)。アミノ酸変異部位の構造情報から、NP蛋白質において「変異が入りやすい領域」および「変異が入りにくい領域」を同定することができた。本成果は、ウイルス生存において変異を許容するアミノ酸部位を網羅的に調べる新規システムとして応用が可能であり、ウイルス進化を予測する上で重要な基盤情報となる。

また、今回単離したNP変異株の中には、臨床分離株データベースに報告されていない新規のアミノ酸変異も含まれていた。今後は、本研究成果を活用し、未来流行株に導入される変異部位の事前予測システムの確立に取り組む。

5. 主な発表論文等

①雑誌論文(総件数:0)

なし

②学会発表(総件数:2)

1. 内藤 忠相、齊藤 峰輝

低忠実性インフルエンザ株の性状解析とワクチン開発研究への応用

9th Negative Strand Virus-Japan

2020年1月22日

2. 内藤 忠相

新規インフルエンザウイルス Mutator 株を用いた変異ウイルスライブラリー作出技術の開発

BioJapan2019

2019年10月10日

③図書(総件数:0)

なし

④知的財産権(総件数:0)

なし

(表題) 糖代謝阻害剤封入 PLGA ナノ粒子による新規腫瘍免疫活性化機序解明

(所属) 川崎医科大学 肝胆膵内科学

(氏名) 仁科 惣治

(研究成果の概要)

申請者らはグルコース誘導体である 2-Deoxy-D-Glucose (2DG) を封入したナノ粒子である poly (lactic-co-glycolic acid) (2DG-PLGA-NP) による、がん細胞特異的な解糖系阻害剤を開発した。本研究において 2DG-PLGA-NP は、がん微小環境での CD8+T 細胞の相対的グルコース取り込み亢進に加え、乳酸産生低下に伴う IFN γ /JAK-STAT シグナル経路、あるいは AMPK 活性化による epigenetic 経路を介したケモカイン (CXCL9, 10, 11) の発現亢進を介した新規抗腫瘍免疫活性化機構を有することを明らかにした。さらに 2DG-PLGA-NP は、免疫チェックポイント阻害剤との併用により抗腫瘍効果を増強し、同薬剤耐性がんマウスモデルに対しても抗腫瘍効果を発揮した。

(本文)

1. 研究開始当初の背景

がんは日本人の死亡原因の 30%を超えており、まさにがん患者の予後改善は喫緊の課題である。免疫チェックポイント阻害剤の臨床応用はがん治療における画期的な局面を切り開いたがその効果はいまだ限定的であり、がんによる免疫抑制機構に焦点を当てた新たな治療開発が急務である。解糖系に依存したエネルギー産生 (Warburg 効果) はがん細胞の低酸素環境への適応結果と考えられてきたが、近年がんによる免疫抑制機構としても注目されている。

グルコース誘導体 2-Deoxy-D-Glucose (2DG) はがん細胞に蓄積すると、解糖系阻害による ATP 産生抑制、小胞体ストレス亢進に伴う細胞死や細胞増殖抑制等を介して抗がん作用を発揮する。既に固形癌に対する 2DG の抗腫瘍効果が報告されているが、申請者らもマウスを用いた実験で肝癌抑制効果を実証した。しかし、十分な抗腫瘍効果を得るのに必要な 2DG 用量では高血糖、意識障害等の有害事象が出現し、通常の全身投与では安全にかつ十分な抗腫瘍効果を得るのは困難である。

がん組織の血管は未熟で血管外に高分子を漏出しやすく、また薬剤排出経路のリンパ管が未発達なためナノ粒子のような高分子化合物は血管外に漏出し

がん組織に蓄積しやすい (Enhanced Permeability and Retention; EPR 効果)。粒子径 50-150nm 程度のナノ粒子製剤は、enhanced permeability and retention (EPR) 効果を介してがん組織選択的に送達されると言われている。そこで申請者らは、EPR 効果を期待した腫瘍選択的集積性や徐放性に優れた生体適合性高分子である Poly (lactico-glycolic acid) (PLGA) に 2DG を封入した 2DG-PLGA ナノ粒子製剤 (2DG-PLGA-NP) を開発し、がん細胞特異的な糖代謝阻害剤の drug delivery system (DDS) の開発に着手した。

既に申請者らは(株)先端医療開発との共同開発で、2DG-PLGA-NP (平均径 150nm, 2DG 充填率 約 8%) の開発に成功した。肝癌細胞皮下移植ヌードマウスに対する 2DG-PLGA-NP 800mg/kg の週 1 回静注は、2DG 100mg/kg の連日腹腔内注射と比べて、実質的 2DG 総投与量が約 9%程度であったにも係らず、有害事象なく有意な抗腫瘍効果を発揮し、既存の肝癌治療薬との併用でその抗腫瘍効果が増強した。その作用機序として、嫌気性解糖系抑制による ATP 産生低下に加えて、小胞体ストレス亢進によるアポトーシスの誘導が関与することは既に確認していた。

さらに注目すべき点として、免疫応答性肝発癌マウス (STAMTM マウス) に対しては、免疫不全なヌードマウス xenograft の結果と比べ更に低濃度 (80mg/kg

週1回)の2DG-PLGA-NPを投与しても強い抗腫瘍効果を認めたが(図1)、その腫瘍組織で強いCD3陽性T細胞浸潤所見を認め(図2)、2DG-PLGA-NPによる腫瘍免疫活性化という新たながん進展抑制機序を見出した。

図1 正常免疫能を有する肝発癌モデル(STAM™マウス)では、免疫不全モデル(ヌードマウス)と比べて、2DG-PLGAによる肝癌抑制効果がより低用量でも顕著である

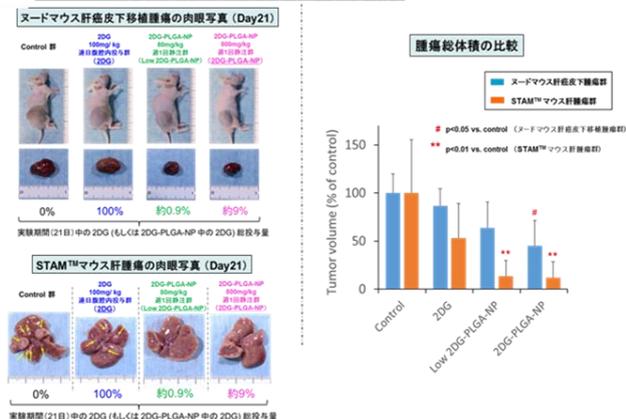
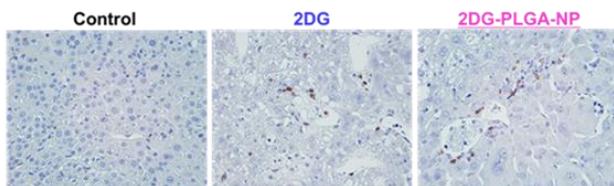


図2 肝発癌マウス(STAM™マウス)の肝癌組織において、2DG-PLGA-NPはT細胞浸潤を亢進させる(CD3免疫染色)



2. 研究の目的

申請者が既に免疫応答性肝発癌モデル(STAM™マウス)において証明した2DG-PLGAによる肝癌抑制効果に対して、解糖系阻害剤2DG-PLGAによる新たなT細胞性腫瘍免疫の活性化に関する分子機構を明らかにし、がん微小環境での免疫機能強化を基軸とする新たながん免疫制御のパラダイム創生を目的とした。

それとともに、既存の分子標的治療薬や現在腫瘍免疫療法として脚光を浴びている免疫チェックポイント阻害剤との併用効果や同薬剤の不応例に対する抗腫瘍効果を明らかにすることを目的とした。

2. 研究の方法

(1) 2DG-PLGAによる腫瘍免疫活性化作用および分子機序解明

1. 肝癌細胞に対する解糖系抑制によるT細胞走化性因子活性化および分子機序解明 (*in vitro*)

ケモカインの一つであるCXCL9, 10, 11は、T細胞受容体であるCXCR3に結合してT細胞の走化性を促進する。一方で、がん細胞からの直接的なCXCL10分泌に対して、Warburg効果に代表されるがん細胞の糖代謝亢進が抑制的に作用すると報告されている(Cell Metab 2018;27)。

そこで、IFN γ + TNF α 刺激による肝癌細胞(Huh7)からの直接的なCXCL9, 10, 11分泌に対して、2DGによる解糖系抑制が亢進させるか否かを検討した。また、2DGによる肝癌細胞からのCXCL9-11分泌促進作用機序として、①肝癌細胞での乳酸産生低下に伴うIFN γ /JAK-STATシグナル経路亢進、あるいは②肝癌細胞でのAMPK活性亢進を介したヒストンメチル化酵素enhancer of zeste homolog 2 (EZH2)のリン酸化によるHistone H3 lysine 27トリメチル化抑制(H3K27me3)によるCXCL9, 10, 11転写活性の亢進についての検討を行った。

2. 2DGがT細胞の走化性に及ぼす影響についての検討 (*ex vivo*)

リアルタイム細胞動態解析装置(EZ-TAXIScan™)を用いて、上記1.の実験にて得られた肝癌細胞培養上清に対するT細胞走化性を観察した。さらには、CXCR3(CXCL9, 10, 11に対するT細胞受容体)中和抗体投与を用いて、2DGによるT細胞走化性に対するCXCL9, 10, 11-CXCR3相互作用の影響を検討した。

3. 肝癌細胞と比較したT細胞の2DG-PLGA取り込み能についての検討 (*ex vivo*)

Transwellを用いて、肝癌細胞(Huh7)±2DG-PLGA-NPに対して、健常人の末梢血由来のCD8陽性T細胞を共培養した。共培養直前の肝癌細胞における乳酸産生量(解糖系最終産物)を測定し、共培養後のCD8

陽性 T 細胞における細胞走化性 (EZ-TAXIScan™) および活性化能 (IFN γ 発現) を解析した。

以上の実験により、肝癌細胞における解糖系抑制 (それに随伴する相対的な T 細胞での解糖系亢進) もしくは乳酸産生抑制が、T 細胞機能に及ぼす効果を解析した。

(2) 2DG-PLGA-NP の抗 PD-1 抗体との併用効果および抗 PD-1 抗体抵抗性モデルに対する有効性解析

4. 免疫応答性肝発癌モデルに対する 2DG-PLGA-NP の効果についての検討 (in vivo)

免疫応答性肝発癌モデル (STAM™ マウス) に対して、抗 PD-1 抗体による抗腫瘍効果に対する 2DG-PLGA-NP の併用効果を検討した。

5. 抗 PD-1 抗体不応性腫瘍モデルに対する 2DG-PLGA-NP の効果についての検討 (in vivo)

2DG-PLGA-NP が抗 PD-1 抗体不応性腫瘍モデル (B16F10 皮下移植 C57BL/6 マウス) に対する 2DG-PLGA-NP の抗腫瘍効果を検討する。また、その作用機序として腫瘍免疫が亢進しているか否かをみるため、CD3 陽性 T 細胞浸潤能を免疫染色にて確認した。

さらに、同マウスにおける 2DG-PLGA-NP による抗腫瘍効果に対して CXCL9, 10, 11-CXCR3 相互作用を介した T 細胞性腫瘍免疫の関与を明らかにするため、2DG-PLGA-NP に抗 CXCR3 中和抗体を併用し抗腫瘍効果がキャンセルされるか否かを確認した。

4. 研究成果

(1) 2DG-PLGA による腫瘍免疫活性化作用および分子機序説明

2DG-PLGA-NP は肝癌細胞から T 細胞走化性ケモカイン CXCL9, 10, 11 の産生を亢進させ、その結果肝癌細胞への CD8 陽性 T 細胞の走化性を亢進させた。

また、2DG によるがん細胞の解糖系阻害は、① 肝癌細胞での乳酸産生低下に伴う IFN γ /JAK-STAT シグナル経路亢進、あるいは ② 肝癌細胞での AMPK 活性化亢進を介したヒストンメチル化酵素 enhancer of

zeste homolog 2 (EZH2) のリン酸化による Histone H3 lysine 27 トリメチル化抑制 (H3K27me3) による CXCL9, 10, 11 転写活性の亢進が考えられた。

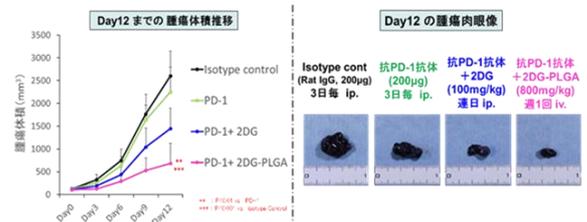
一方で、リアルタイム細胞動態解析装置 (EZ-TAXIScan™) を用いた検討により、肝癌細胞と CD8+T 細胞共培養下において 2DG-PLGA-NP は、肝癌細胞での乳酸産生低下もしくは T 細胞への相対的な糖取り込み亢進により CD8+T 細胞走化性を亢進させた。

(2) 2DG-PLGA-NP の抗 PD-1 抗体との併用効果および抗 PD-1 抗体抵抗性モデルに対する有効性解析

免疫応答性肝発癌マウス (STAM™ マウス) において、2DG-PLGA-NP は抗 PD-1 抗体による抗腫瘍効果を増強させた。

その一方で、抗 PD-1 抗体抵抗性がん細胞 (B16F10) 移植したシンジェニックマウス (C57BL/6) に対する 2DG-PLGA-NP の抗腫瘍効果も明らかにした (図 3)。さらに、抗 PD-1 抗体単独群と比べて抗 PD-1 抗体+2DG-PLGA-NP 併用群の腫瘍組織においては、CD3 陽性 T 細胞浸潤能が亢進しており、腫瘍免疫活性化機序関与が示唆された。同マウスに対して 2DG-PLGA-NP に抗 CXCR3 中和抗体を併用したところ、2DG-PLGA-NP による抗腫瘍効果が部分的ながらキャンセルされた。すなわち、抗 PD-1 抗体抵抗性モデルに対しても、CXCL9, 10, 11-CXCR3 相互作用を介した T 細胞性腫瘍免疫の関与が考えられた。

図3 抗PD-1モノクローナル抗体抵抗性モデル(B16F10皮下移植 C57BL6マウス)に対する2DG-PLGAの抗腫瘍効果



以上の検討結果より、2DG (原体) よりも強力で有害事象を伴わないがん特異的解糖系阻害剤封入ナノ粒子製剤である 2DG-PLGA-NP による抗腫瘍効果の作用機序として、既報の細胞死誘導効果等に加えて、既存の肝細胞癌治療薬とは異なる作用機序による腫

瘍免疫活性化を兼ね備えた作用機序を有することも明らかにした。また、2DG-PLGA-NP は既存の分子標的薬や今後のがん治療で脚光を浴びている免疫チェックポイント阻害剤 (抗 PD-1 抗体) との併用効果以外に、抗 PD-1 抗体抵抗性がんモデルにも抗腫瘍効果を発揮した。

以上の結果を踏まえて、今後は解糖系亢進したがん (FDG-PET 陽性がん) を対象にした同治療薬の臨床応用を目指す。

5. 主な発表論文等

①雑誌論文; なし

②学会発表;

- 佐々木恭、仁科惣治、日野啓輔、「Immuno oncology からみた肝細胞癌に対する 2-deoxyD-glucose 封入 PLGA ナノ粒子の抗腫瘍効果」、第 105 回 日本消化器病学会総会
- 佐々木恭、仁科惣治、日野啓輔、「肝癌細胞の糖代謝抑制によるがん微小環境での腫瘍免疫賦活化作用とその臨床応用」、第 55 回 日本肝臓学会総会
- Kyo Sasaki, Sohiji Nishina, Akira Yamauchi, Yuichi Hara, Kotaro Fukuda, Keisuke Hino. 「Specific inhibition of cancer cell glycolysis enhances antitumor immunity in hepatocellular carcinoma」, The Asian Pacific Association for Study of the Liver (APASL) Single Topic Conference 2019.
- Kyo Sasaki, Sohiji Nishina, Akira Yamauchi, Yuichi Hara, Kotaro Fukuda, Keisuke Hino. 「Antitumor effects of 2-deoxy-D-glucose encapsulated PLGA nanoparticles against hepatocellular carcinoma in terms of tumor immunity」, American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD)-The Liver Meeting 2019.

③図書; なし

④産業財産権 (特許権、実用新案権、意匠権) など;

➤ 出願特許: 特願 2019-048743

発明の名称: 「ケモカイン産生促進剤、免疫チェックポイント阻害剤抵抗性癌治療薬及び抗腫瘍免疫賦活化剤」

出願日: 平成 31 年 3 月 15 日

出願人: 学校法人 川崎学園、株式会社 先端医療開発

出願等の状況: 審査未請求

本開発品との関係: 開発予定の医薬組成物特許 (用途特許)