

|           |                                                          |       |         |     |
|-----------|----------------------------------------------------------|-------|---------|-----|
| 学 校 名     | 岩 手 医 科 大 学                                              | 研究所名等 | 共 同 研 究 |     |
| 研 究 課 題   | 抗炎症性血球細胞ニッチ誘導による抗粥状硬化症新規治療法の開発<br>—革新的細胞治療による抗動脈硬化療法の開発— |       | 研究分野    | 医 学 |
| キ ー ワ ー ド | ①歯周病 ②動脈硬化症 ③M2マクロファージ ④間葉系幹細胞 ⑤ニッチ ⑥細胞治療<br>⑦アテローム硬化    |       |         |     |

○研究代表者

| 氏 名   | 所 属   | 職 名 | 役 割 分 担    |
|-------|-------|-----|------------|
| 石 崎 明 | 歯 学 部 | 教 授 | 研究の計画、研究全般 |

○研究分担者

| 氏 名     | 所 属   | 職 名   | 役 割 分 担              |
|---------|-------|-------|----------------------|
| 八 重 柏 隆 | 歯 学 部 | 教 授   | 研究の計画、研究全般           |
| 原 田 英 光 | 歯 学 部 | 教 授   | 研究の計画、組織学的実験         |
| 佐 原 資 謹 | 歯 学 部 | 教 授   | 研究の計画、動物学的実験         |
| 加 茂 政 晴 | 歯 学 部 | 准 教 授 | 細胞培養実験・分子生物学的実験      |
| 客 本 齊 子 | 歯 学 部 | 研 究 員 | 細胞培養実験・分子生物学的実験      |
| 帖 佐 直 幸 | 歯 学 部 | 准 教 授 | 細胞培養実験・分子生物学的実験      |
| 滝 沢 尚 希 | 歯 学 部 | 助 教   | 細胞培養実験・動物実験・分子生物学的実験 |
|         |       |       |                      |
|         |       |       |                      |
|         |       |       |                      |

# 抗炎症性血球細胞ニッチ誘導による 抗粥状硬化症新規治療法の開発 — 革新的細胞治療による抗動脈硬化療法の開発 —

## 1. 研究の目的

- (1) アテローム硬化症の発症や進行には炎症性マクロファージ (M1-MΦ) のプラーク周囲への浸潤が著明であり炎症巣としての病変は明らかであるが、炎症症状を抑制する機能を有する抗炎症性マクロファージ (M2-MΦ) の集積は少ない。また、他の研究グループによる動物実験で明らかとされたエビデンスにより、多くの M2-MΦ をプラーク周囲に集積させ、その抗炎症機能を強く発現させればアテローム硬化症は治癒に向かうことは間違いないと考えられる。しかし、自己の M2-MΦ を *ex vivo* で大量に増殖させる技術や、プラーク周囲に M2-MΦ を選択的に集積させる技術は確立されていない。加えて、プラーク周囲への歯周病菌の感染が、どのようにアテローム硬化症の発症の誘導に関わるかは分子レベルで不明である。
- ① これまでの我々の調査により明らかとなった抗炎症性血球細胞ニッチとしての間葉系幹細胞と M2-MΦ あるいはその前駆細胞との細胞間相互作用による M2-MΦ の活性化機構について、分子生物学レベルで明らかとする。
- ② ① で明らかとされた間葉系幹細胞による M2-MΦ の活性化機構を応用した *ex vivo* M2-MΦ 大量培養系を確立し、間葉系幹細胞と M2-MΦ との併用による革新的な細胞治療基盤を動物実験レベルで樹立する。
- ③ 間葉系幹細胞と M2-MΦ との相互作用によるアテローム硬化治癒機構に歯周病がどのように関わるかについて分子生物学レベルで明らかとする。

## 2. 研究の計画

- (1) M2-MΦ 増殖・分化を制御する液性因子と接着性因子のさらなる同定を継続する。
- ① 前年度 (平成29年度) には、M2-MΦ 大量培養キーマスター分子としての液性因子 macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) ならびに接着装置としての intercellular adhesion molecule (ICAM)-1/lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1 系を同定した。今後も、細胞単独培養、非接着性共培養ならびに接着性共培養の間で比較した際に各々の培養条件で発現頻度差を有する上記以外の分子の同定を継続して実施する。これらの研究によりさらなるモデル遺伝子のピックアップと、それらの中からの M2-MΦ 大量培養キーマスター遺伝子の同定を完了し、「間葉系幹細胞による M2-MΦ の活性化機構を応用した *ex vivo* M2-MΦ 大量培養系を確立」のための準備を完了する。
- (2) 間葉系幹細胞による M2-MΦ の活性化機構を応用した *ex vivo* M2-MΦ 大量培養系を確立する：本件急で同定した液性因子や接着因子を用いて M2-MΦ を *ex vivo* で大量培養できる培養法を確立する。
- ① 同定された液性因子、接着因子が新規のタンパク質であった場合には、ほ乳類細胞でのタンパク質発現系を構築しそれぞれリコンビナントタンパク質を得た後、接着因子はシャーレ上にコーティングし、この上に骨髄由来 Lin<sup>+</sup> (血球細胞) を播種する (既知のタンパク質であった場合には市販のリコンビナントタンパク質を利用する)。加えて、既に我々が明らかとしている M2-MΦ 前駆細胞への増殖促進作用のある M-CSF とともに、新たに同定された液性因子を培地に添加させて M2-MΦ 前駆細胞の増殖・分化誘導効果を調査し、M2-MΦ が大量に培養される液性因子と接着因子の組み合わせを検討する。
- ② マウスの尾静脈から採血し、これを①で確立した条件下にて培養し M2-MΦ 前駆細胞の増殖能と M2-MΦ 分化マーカーの上昇を確認する。かくして、末梢血由来血球系細胞を用いた、*ex vivo* における間葉系幹細胞に頼ることのないタンパク質成分のみによる M2-MΦ の大量培養法を確立する。

### 3. 研究の成果

- (1) M2-M $\phi$  前駆細胞の増殖・分化を促進する因子(液性因子)の候補となるさらなるモデル因子(遺伝子)のピックアップに成功した。
  - ①マウス脛骨髄より骨髓細胞を採取し我々の確立した独自の条件下で、間葉系幹細胞とM2-M $\phi$  前駆細胞としての血球細胞(Lin+細胞)との共培養を行った細胞をLineage Depletion Kitを用いて間葉系幹細胞とLin+細胞に分離し、これらの細胞間で発現頻度差を示す遺伝子について、プライマーアレイ法を用いてmRNAレベルで網羅的に調査した。その結果、昨年度までにLin+細胞(M $\phi$  前駆細胞)の増殖を促進する効果のある間葉系幹細胞由来の液性因子としてのM-CSFに加え、とくに間葉系幹細胞から発現している液性因子としてのCXC motif chemokine 12 (CXCL12)/stromal cell-derived factor (SDF)-1を見出した。また、興味深いことに、このCXCL12の受容体であるCXC chemokine receptor 4 (CXCR4)はとくにLin+細胞で多くの発現が認められた。加えて、LC-MS/MS装置によるタンパク質レベルでの網羅的な解析でも、間葉系幹細胞からのCXCR4の発現が確認された。これらの結果から、間葉系幹細胞より分泌されるCXCL12がLin+細胞の増殖やM2-M $\phi$  分極化に影響を及ぼすことが予測されたため、まずはCXCL12がLin+細胞の増殖活性に影響するかどうかについてalamarBlue法(代謝活性の測定法)を用いて調査した。その結果、CXCL12はLin+細胞の増殖活性を濃度依存的に増強する効果を有することが明らかとなった。

### 4. 研究の反省・考察

- (1) M2-M $\phi$  前駆細胞の増殖・分化を促進する因子(液性因子・接着因子)の同定作業の遅れが生じており、これらの因子を利用した *ex vivo* における M2-M $\phi$  大量培養系の確立にも遅れが生じている。
  - ①前年度(平成29年度)までにM2-M $\phi$  前駆細胞の増殖・分化を促進する因子としてM-CSFやICAM-1/LFA-1系を同定したものの、その後のさらなる同因子の同定は捗っておらず、上記の通りに間葉系幹細胞由来のCXCL12がLin+細胞の増殖を促進するという発見をしたに留まっている。現在までに、このCXCL12がM-CSFと同様にM $\phi$  前駆細胞の増殖を促進するのか、あるいはM1あるいはM2に分極化した後のM $\phi$  の増殖を促進するのかについて明らかとされていない。従って、CXCL12とM-CSFとの相乗効果によりM2-M $\phi$  前駆細胞の増殖を誘導するかどうかは確かめられておらず、*ex vivo* におけるM2-M $\phi$  大量培養系確立のために役立てられるかどうかの判断がなされていない。
- (2) 今後の本研究の方向性について：M2-M $\phi$  前駆細胞の増殖・分化を促進する因子の同定作業を進めてM2-M $\phi$  大量培養系の確立を早期に完了し、間葉系幹細胞とM2-M $\phi$  との同時移植によりアテローム硬化を治癒させる動物モデルを樹立したい。さらにこの動物モデルを利用して、アテローム硬化に歯周病がどのように関わるのかについて分子レベルで明らかとする。
  - ①間葉系幹細胞とM2-M $\phi$  (現在開発中の*ex vivo* における大量調整法を利用する)をアテローム硬化症モデルマウス(市販の自然発症アポE欠損マウスを利用する)の尾静脈に注入し、冠動脈におけるアテローム硬化症の抑制効果を病理組織学的に調査する。このとき用いる間葉系幹細胞は緑色蛍光強発現TGマウスより分離し、一方、M2-M $\phi$  は赤色蛍光強発現TGマウス抹消血より大量調整し、それぞれの細胞が異なる蛍光色でトレース可能になるようにする。そして、アテローム硬化部位に集積する間葉系幹細胞が抗炎症性血球細胞ニッチとしてM2-M $\phi$  のプラーク周囲への集積を促進しうることを病理組織学的に明らかとする。
  - ②①により確立されたアテローム硬化症の細胞治療モデルマウスの口腔内に歯周病菌(*P. gingivalis*や*A. actinomycetemcomitans*)を投与し、プラーク周辺部における間葉系幹細胞とM2-M $\phi$  との相互作用にどのような影響を及ぼすか調査する。歯周病菌投与マウスと非投与マウスそれぞれのプラーク周囲組織切片から緑色・赤色蛍光を指標として間葉系幹細胞とM2-M $\phi$  をそれぞれマイクロダイセクション装置(既に本学に設置済み)で切離し、mRNAを抽出後、歯周病菌の作用により各細胞で変化する遺伝子発現頻度差を捉える。とくに間葉系幹細胞ではM2-M $\phi$  ニッチとして重要な液性因子や接着因子(初年度の研究で明らかとしたもの)の発現低下、M2-M $\phi$  ではM2-M $\phi$  分化マーカー(CD206等)や抗炎症性サイトカイン(IL-10やTGF- $\beta$ 等)の発現低下に注目して調査する。
  - ③①と②の研究成果により、間葉系幹細胞とM2-M $\phi$  との併用による革新的なアテローム硬化症の細胞治療基盤を動物実験レベルで樹立したいと考えている。

## 5. 研究発表

### (1) 学会誌等

- ① Kim, E. J., Yoon, K. S., Arakaki, M., Otsu, K., Fukumoto, S., Harada, H., Green, D. W., Lee, J. M., Jung, H. S. Effective differentiation of induced pluripotent stem cells into dental cells. *Dev. Dyn.* 248: 129-139, 2019.
- ② Ohta, M., Chosa, N., Kyakumoto, S., Yokota, S., Okubo, N., Nemoto, A., Kamo, M., Joh, S., Satoh, K., and Ishisaki A. IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  suppress TGF- $\beta$ -promoted NGF expression in periodontal ligament-derived fibroblasts through inactivation of TGF- $\beta$ -induced Smad2/3-, and p38 MAPK-mediated signals. *Int. J. Mol. Med.*, 42: 1484-1494, 2018.
- ③ Ohta, M., Nemoto, A., Chosa, N., Kyakumoto, S., Yokota, S., Kamo, M., Shibata, S., Joh, S., Satoh, K., Ishisaki, A. Toll-like receptor 4-mediated signaling activated by lipopolysaccharide suppresses transforming growth factor-beta-induced nerve growth factor expression in periodontal ligament-derived fibroblasts. *Dent. J. Iwate Med. Univ.*, 43: 61-73, 2018.
- ④ Mototani, Y., Okamura, T., Goto, M., Shimizu, Y., Yanobu-Takanashi, R., Ito, A., Kawamura, N., Yagisawa, Y., Umeki, D., Nariyama, M., Suita, K., Ohnuki, Y., Shiozawa, K., Sahara, Y., Kozasa, T., Saeki, Y., Okumura, S. Role of G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 3 (GRIN3) in  $\beta$ -arrestin 2-Akt signaling and dopaminergic behaviors. *Pflügers Arch.* 470: 937-947, 2018.
- ⑤ 石崎 明、客本 齊子、横田 聖司、加茂 政晴、帖佐 直幸、間葉系幹細胞を利用した再生医療における新たな戦略、*お茶の水医学雑誌*、66巻、247-258頁、2018年

### (2) 口頭発表

- ① 横田 聖司、帖佐 直幸、松本 識野、客本 齊子、加茂 政晴、佐藤 和朗、石崎 明、顎関節由来線維芽細胞様滑膜細胞におけるプリン体作動性シグナルの役割、第41回日本分子生物学会年会（横浜）、2018年11月
- ② 松本 識野、横田 聖司、帖佐 直幸、菊池 恵美子、木村 仁迪、加茂 政晴、佐藤 和朗、石崎 明、細胞外ヌクレオチドが顎関節由来線維芽細胞様滑膜細胞に与える影響について、第41回日本分子生物学会年会（横浜）、2018年11月
- ③ Fukami, H., Sahara, Y. fMRI connectivity analysis of sensory effect on jaw tapping associated brain network in elderly. 第41回日本神経科学学会（神戸）、2018年7月
- ④ Otsu, K., Harada, H. Oxygen levels regulate cell fate of mouse dental epithelial stem cells via RhoA signaling. International society for stem cell research (ISSCR) 2018 annual meeting（メルボルン）、2018年6月
- ⑤ 滝沢 尚希、鈴木 啓太、伊東 俊太郎、村井 治、佐々木 大輔、客本 齊子、石崎 明、八重柏 隆、*in vitro*で培養された抗炎症マクロファージの歯周病治療への応用、第61回春季日本歯周病学会学術大会（東京）、2018年6月

### (3) 出版物

なし

|           |                                                                               |       |         |     |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------|-------|---------|-----|
| 学 校 名     | 東 北 医 科 薬 科 大 学                                                               | 研究所名等 | 共 同 研 究 |     |
| 研 究 課 題   | C型肝炎ウイルスCoreタンパク質の変異によるC型肝炎病態への影響                                             |       | 研 究 分 野 | 医 学 |
| キ ー ワ ー ド | ①Hepatitis C virus(HCV) ②肝病態(肝硬変・肝がん) ③Coreタンパク質 ④小胞体ストレス応答<br>⑤小胞体関連分解(ERAD) |       |         |     |

○研究代表者

| 氏 名     | 所 属   | 職 名 | 役 割 分 担         |
|---------|-------|-----|-----------------|
| 久 下 周 佐 | 薬 学 部 | 教 授 | 研究計画の立案・推進・取り纏め |

○研究分担者

| 氏 名     | 所 属   | 職 名 | 役 割 分 担                  |
|---------|-------|-----|--------------------------|
| 猪 瀬 敦 史 | 薬 学 部 | 講 師 | 研究の推進・取り纏め「平成31年3月31日退職」 |
| 佐 藤 賢 一 | 医 学 部 | 教 授 | 臨床研究の推進・取り纏め             |
| 小 暮 高 之 | 医 学 部 | 講 師 | 臨床検体・データの取り纏め            |
|         |       |     |                          |
|         |       |     |                          |
|         |       |     |                          |
|         |       |     |                          |
|         |       |     |                          |
|         |       |     |                          |
|         |       |     |                          |

# C型肝炎ウイルス Core タンパク質の変異による C型肝炎病態への影響

## 1. 研究の目的

C型肝炎ウイルス (HCV) は高頻度で持続感染し、数十年を経て肝炎、肝硬変、肝がんと肝病態を増悪化する。HCVは細胞質で複製するプラス鎖 RNA ウイルスで、がん遺伝子は持たないことから肝がん発症機構は未解明である。HCVの複製において重要な役割を果たす細胞内器官は小胞体である。小胞体は大量に合成される分泌タンパク質の品質管理の場であり、HCV感染がその機能に影響を与える可能性がある。正確な折りたたみがなされないタンパク質が蓄積した場合に、小胞体はその状況を検知してシャペロンタンパク質の合成を促進したり、タンパク質合成そのものを抑制したり、変性タンパク質を細胞質に輸送してユビキチンプロテアソームシステムに乗せて分解するなどして小胞体ストレスを回避する。しかし、小胞体が過剰なストレスにさらされるとカルシウムイオンが流出すると、さらに小胞体ストレスが増強し活性酸素種 (ROS) 産生を誘導する。また、タンパク質の小胞体の酸化還元酵素の制御異常によっても ROS が産生される。この過剰な ROS 産生が持続すると遺伝子変異を誘発して多発的ながんの誘発につながる可能性が考えられる。

ではHCVのどのタンパク質が小胞体ストレスに寄与しているのだろうか？HCVキャリアが持つウイルスの変異と肝がん発症の解析がなされ報告されてきた。特に日本人のキャリアの70%を占めるゲノタイプ1b型の臨床解析の結果から、HCV粒子の核を形成するCoreタンパク質の70番目のアミノ酸のアルギニンがグルタミン (R70Q変異) に置換した場合に肝がん発症と予後のリスクが増強することが指摘されている。しかし、これまでにR70Q変異が細胞に与える影響とその機構は解明されていない。また、この変異を持たないHCVのキャリアからも肝がんが発症するケースもある。そこで、R70Qの変異Core (Core(R70Q)) がヒト培養細胞の小胞体の恒常性維持に与える影響を非変異Core 70Rと比較しながら解析することで肝がん発症機構の糸口をつかむことを目的とした。本研究では次の2つの点に着目して研究を進めた。

(1) Core (R70Q) 変異体の性状とこの変異体が細胞に与える影響を解析した。

本研究ではこれまでにCoreタンパク質を発現細胞に小胞体ストレスを与えること、Core (R70Q) は非変異Core (70R) と異なった影響を与えることを示唆してきた。そのメカニズムの解析を目指した。

(2) 病原性に寄与する可能性のあるR70Q以外のCoreの変異の同定を目指した。

## 2. 研究の計画

(1) Core (R70Q) 変異タンパク質小胞体への影響を観察する目的で、小胞体関連分解 (ERAD) への影響をERADで分解されていることが報告されているNHKタンパク質の分解速度を指標にした。また、小胞体→ゴルジ体の小胞輸送に与える影響を観察する目的で細胞培養液中の分泌型ルシフェラーゼ Gluc の分泌量へのCore発現の影響を観察した。

(2) 本学附属病院のHCVのキャリアで肝がんを発症した患者よりインフォームドコンセントを取得して、検査目的で採取された血清を用いてウイルスゲノム解析を行い、Coreの変異の同定と特定の変異による細胞影響を解析した。

## 3. 研究の成果

(1) Core (R70Q) 変異体の細胞影響

小胞体関連分解 (ERAD) への影響を観察するため、小胞体内腔で変性しERADで分解される基質として使用されるNHKタンパク質の分解は、Core発現細胞において阻害されたが、その作用は非変異Core (70R) よりもCore (R70Q) 発現細胞において顕著であった。さらに分泌型ルシフェラーゼ Gluc の培養液中への分泌もCoreの発現により抑制されたが、逆にCore (70R) の方がCore (R70Q) に比べて強く阻害した。さらに、小胞体シャペロン Bip の誘導はCore (R70Q) の方が高かった。

(2) R70Q以外のCoreの変異同定と細胞影響

- ① 凍結保存血清より RNA を分離して逆転写反応後に特異プライマーを用いた PCR により増幅した HCV ゲノムの Core 部分を直接シークエンスおよびクローニング後に塩基配列を解析した。その結果、解析した約半数の Core は 70R であった。その他の共通した Core 変異を洗い出した結果、Core の中盤のアミノ酸の変異に直目した。この変異を導入した Core は一部 R70Q 変異と同様の性質を示すことが示唆された。
- ② また、70R で C 末端付近に特徴的な変異がある Core が患者一例より見出した。この変異と同様な変異が報告されているか、文献およびデータベースより HCV ゲノム (Core) 配列情報を得て解析した結果、この変異は複数の肝がん発症例で見いだされていたが着目されてこなかった。しかし肝生検サンプルのがん部、非がん部における解析例では、がん部にこの変異を持つ HCV が優位に存在する例も報告されており、発がんに寄与する可能性があると考えて解析を進めた。

Core は HCV ゲノムにコードされるポリプロテインの N 末端に位置する 191 アミノ酸長のタンパク質である。Core の C 末端の 178-191 領域は次に続く E1 タンパク質のシグナル配列として機能し、E1 が小胞体に分泌した後にシグナルペプチダーゼにより 191/192 の間で E1 と切り離され生成する。次に Core の C 末端に残存したシグナル配列は同じく小胞体膜酵素のシグナルペプチドペプチダーゼ (SPP) で切断され 177 アミノ酸長の Core に成熟する。

前述した Core の C 末端領域の変異 (C 末端変異) は、発現細胞内で未成熟型の分子量の Core が成熟型と同等に存在することから、成熟過程、すなわち SPP による切断が遅い可能性が示唆された。次にこの Core を持つ HCV が増殖可能かを検証した。HCV は唯一の培養細胞—ウイルス感染・増殖系がある。ヒト肝がん Huh7 細胞とゲノタイプ 2a 型の JFH1 の感染系である。JFH1 に 1b 型 Core および C 末端変異 Core を導入した組換えウイルスを作成して Huh7 細胞に感染させた結果、ウイルスとして増殖するが、感染細胞内の Core の成熟過程が遅延していることが判明した。さらに、C 末端変異 Core を培養細胞に高発現すると顕著に小胞体ストレス (ATF6 転写活性を指標とした) を上げることが判明した。

## 4. 研究の反省・考察

### (1) Core の R70Q 変異体の細胞影響

Core タンパク質の高発現は小胞体の機能に影響を与えることが判明したが、Core (70R) と Core (R70Q) 変異体の方が小胞体内腔の変性タンパク質の ERAD をより阻害したことから、これにより小胞体ストレス応答を誘導し Bip の発現誘導を起こした可能性が考えられた。

### (2) R70Q 以外の Core の変異同定と細胞影響

肝がんを発症した患者の臨床分離株より得られた C 末端付近の変異 Core は非常に強く小胞体ストレスを誘導した。

以上の結果は、複数の Core の変異が小胞体の恒常性に影響を与え小胞体ストレス応答をかく乱する可能性が示唆された。今後、これらの Core の変異が ROS の産生誘導に違いがあるのか等、発がんにつながる過程への影響を解析する必要がある。

## 5. 研究発表

### (1) 学会誌等

- ① Methylmercury enhances cytotoxicity through inhibition of its activity by a decrease in PTEN solubility. Kobayashi T, Toyama T., Lee J.Y, Miura N, Kuge S, Naganuma A, Hwang G.W, 2018, BPB Reports (1, 1) pp1~5.
- ② Methylmercury induces the expression of chemokine CCL4 via SRF activation in C17.2 mouse neural stem cells. Kim MS, Takahashi T, Lee JY, Toyama T, Hoshi T, Kuge S, Fujiwara Y, Naganuma A, Hwang GW, 2018, Nature Publishing group, Scientific Reports 9, 4631. doi: 10.1038/s41598-019-41127-y

### (2) 口頭発表

- ① 活性酸素種により誘導されるピルビン酸キナーゼ M2 型 (PKM2) の酸化型システイン残基の解析、色川 隼人, 沼崎 賢史, 加藤 慎, 高橋 庄太, 久下 周佐、第 91 回日本生化学会大会 (全国学会、口頭発表)、京都、2018 年 9 月、演題番号 3P-167 (3T13a-07)

- ② チオール-ジスルフィド交換反応による過酸化水素感知機構、久下周佐、日本薬学会東北支部第40回東北薬学セミナー（地方学会、招待講演）、仙台、2018年12月、特別講演
  - ③ 酸化ストレス負荷時のピルビン酸キナーゼM2（PKM2）を介した糖代謝制御、色川隼人、久下周佐、日本薬学会第139年会（全国学会、口頭発表）、幕張、千葉、2019年3月、一般シンポジウムS46-2
- (3) 出版物
- ① 糖代謝とレドックス制御、久下周佐、色川隼人、実験医学増刊Vo136 No5 羊土社 ISBN 978-4-7581-0369-5, 2018

|           |                                                                         |       |         |     |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------|-------|---------|-----|
| 学 校 名     | 埼 玉 医 科 大 学                                                             | 研究所名等 | 共 同 研 究 |     |
| 研 究 課 題   | ドーパミン受容体シグナルを介した好中球性炎症の制御<br>—マウス乾癬モデルを用いて—                             |       | 研 究 分 野 | 医 学 |
| キ ー ワ ー ド | ①自己免疫疾患 ②好中球性炎症 ③乾癬 ④ドーパミン ⑤ドーパミン受容体アンタゴニスト<br>⑥T helper 17 ⑦IL-8 ⑧ILC3 |       |         |     |

○研究代表者

| 氏 名     | 所 属   | 職 名   | 役 割 分 担 |
|---------|-------|-------|---------|
| 川 野 雅 章 | 医 学 部 | 准 教 授 | 総括      |

○研究分担者

| 氏 名       | 所 属   | 職 名 | 役 割 分 担  |
|-----------|-------|-----|----------|
| 中 村 晃 一 郎 | 医 学 部 | 教 授 | 組織学的評価   |
| 高 木 理 英   | 医 学 部 | 助 手 | 実験・データ整理 |
|           |       |     |          |
|           |       |     |          |
|           |       |     |          |
|           |       |     |          |
|           |       |     |          |
|           |       |     |          |
|           |       |     |          |
|           |       |     |          |

# ドーパミン受容体シグナルを介した好中球性炎症の制御 —マウス乾癬モデルを用いて—

## 1. 研究の目的

- (1) 本研究で我々は、好中球性炎症疾患に有効な薬剤の作用メカニズムを解明し、新規治療を提供することを目的とした。これまでの研究で我々は、ドーパミンやそのアゴニスト、アンタゴニストがサイトカインの分泌を制御することを示し、特に、モデルマウスを用いた実験でドーパミンの D1 受容体アンタゴニストが様々な炎症性自己免疫疾患の病態を改善することを示した。本研究では、薬剤として、パーキンソン病の治療薬でもある D2 受容体アゴニスト、を取り上げ、その好中球性の炎症性疾患における有効性を解析した。好中球性炎症疾患における有効性を解析するためのモデルとしては、まず乾癬を用いた。マウスモデルで乾癬発症後にパーキンソン病の治療薬を投与し、その有効性を解析した。
- (2) さらに、これまでの研究で我々は天然物化合物の探索を行い、漢方薬の成分でもあるベルベリンが、ドーパミン D1 および D2 受容体のアンタゴニストであり、消炎効果を有することを示し、マウスにおいて腸炎の誘導を改善することを示した。本研究ではさらに D2 受容体アゴニスト活性がある天然物化合物の探索を行い、その免疫細胞におけるサイトカイン分泌の制御、および、炎症疾患に対する効能を解析した。

## 2. 研究の計画

- (1) パーキンソン病治療薬のドーパミン D2 受容体アゴニストが既に発症した好中球性炎症を伴う自己免疫疾患に対して効能があることを示すために、以下の実験を計画した。自己免疫疾患のモデルマウスとして TLR7/8 リガンドであるイミキモドの皮膚塗布による乾癬発症モデルマウスを用いた。
  - ① 活性化T細胞から産生される好中球遊走因子であるIL-8の分泌をパーキンソン病治療薬のドーパミンD2受容体アゴニストが抑制することを解析した。
  - ② C57BL/6マウスにイミキモドを塗布し、乾癬を誘導した後、パーキンソン病治療薬のドーパミンD2受容体アゴニストを含む軟膏を塗布してその効能を皮膚の状態から評価した。
  - ③ 乾癬の組織切片を作製し、組織染色で免疫細胞の浸潤を解析した。パーキンソン病治療薬のドーパミンD2受容体アゴニストの投与でその浸潤が抑制されることを解析した。
- (2) ドーパミンの D2 アゴニスト活性を有する天然物化合物を探索し、その免疫細胞におけるサイトカイン分泌の制御、および、炎症疾患に対する効能を解析するために以下の実験を計画した。
  - ① Lipopolysaccharide (LPS) 刺激したマウス脾臓細胞からのIFN- $\gamma$ 放出を抑制する漢方薬の成分を探索した。
  - ② 同定した漢方薬の成分がドーパミン受容体に作用することを解析した。
  - ③ 活性化T細胞から産生される好中球遊走因子であるIL-8の分泌を同定したドーパミン受容体に作用する漢方薬の成分が抑制することを解析した。
  - ④ 同定したドーパミン受容体に作用する漢方薬の成分の乾癬に対する効能を評価した。
  - ⑤ 同定したドーパミン受容体に作用する漢方薬の成分の投与でその浸潤が抑制されることを解析した。
  - ⑥ 同定したドーパミン受容体に作用する漢方薬の成分が種々の炎症疾患に効能があることを、腸炎誘導マウス、および、歯周病誘導ラットを用いた実験を用いて解析した。

## 3. 研究の成果

- (1) パーキンソン病治療薬のドーパミン D2 受容体アゴニストである、プラミペキソール、および、ロピニロールを用いて既に発症した好中球性炎症を伴う自己免疫疾患に対して効能が

あること解析し、以下の成果を得た。

- ① プラミペキソール、および、ロピニロールは活性化T細胞から産生される好中球遊走因子であるIL-8の分泌を抑制した。
  - ② マウス腸炎モデルにおいて、飲水によるロピニロールの投与は、マウスの体重減少を抑制した。
  - ③ マウス好中球性気道炎症モデルにおいて、プラミペキソール、および、ロピニロールの投与は、マウス肺への好中球の遊走を抑制した。
- (2) ドーパミン D2 受容体アゴニスト活性を有する天然物化合物の探索を行い、以下の成果を得た。
- ① 漢方薬成分であるタンニン酸 (TA, tannic acid) がLPS刺激によってマウス脾臓細胞から産生されるIFN- $\gamma$ 放出を抑制した。
  - ② TAはドーパミンD2受容体のアゴニストであり、また、ドーパミンD4およびD5のアゴニストでありアンタゴニストであることを示した。
  - ③ TAは特徴的な構造としてガロイル基を5つ有するが、同じくガロイル基を有するエピカテキンガラート、エピガロカテキンガラートもドーパミンD2受容体アゴニストであることを示した。
  - ④ TAは活性化T細胞から産生される好中球遊走因子であるIL-8の分泌を抑制した。
  - ⑤ TAおよびガロイル基である没食子酸の塗布はマウス乾癬モデルにおいて乾癬発症による耳介腫脹を抑制した。
  - ⑥ マウス乾癬モデルにおいて組織学的解析において、TAの塗布は、リンパ球の浸潤、表皮層の腫脹、過角化、真皮乳頭の延長、表皮下微小膿瘍の症状を抑制した。
  - ⑦ マウス腸炎モデルにおいて、飲水によるTAの投与は、マウスの体重減少を抑制し、腸の収縮、腸上皮の破壊、および、好中球の浸潤を抑制し、抗CD3/28抗体によるマウス腸間膜リンパ球のIL-17産生を優位に抑制した。
  - ⑧ ラット歯周病モデルにおいて、TAの塗布は、歯周病誘導による歯茎の退縮を抑制した。

#### 4. 研究の反省・考察

- (1) 本研究は、好中球性炎症疾患に有効な薬剤の作用メカニズムを解明し、新規治療を提供することを目的とした。実際、好中球性炎症疾患に有効な薬剤として、ドーパミン D2 受容体アゴニストである、プラミペキソール、および、ロピニロールを取り上げ、薬剤の作用メカニズムとしては、プラミペキソール、および、ロピニロールは活性化T細胞から産生される好中球遊走因子であるIL-8の分泌を抑制することを示し、プラミペキソール、および、ロピニロールの薬剤の作用メカニズムの一端を解明した。IL-8は好中球の遊走を誘導する因子であることから、プラミペキソール、および、ロピニロールは炎症部位からのIL-8分泌を抑制することで、好中球の炎症部位への浸潤を抑制すると予想された。実際、マウス好中球性気道炎症モデルにおいて、プラミペキソール、および、ロピニロールの投与は、マウス肺への好中球の遊走を抑制し、また、マウス腸炎モデルにおいて、ロピニロールの飲水による投与は、マウスの体重減少を抑制した。このことから、ドーパミン D2 受容体アゴニストが好中球の炎症部位への浸潤を抑制することで、好中球性炎症疾患に有効であることが提案できた。
- (2) また、本研究では、ドーパミン D2 受容体アゴニスト活性がある天然物化合物の探索を行い、その免疫細胞におけるサイトカイン分泌の制御、および、炎症疾患に対する効能を解析することを目的とした。実際、ドーパミン D2 受容体アゴニスト活性がある天然物化合物として、漢方薬の成分である、タンニン酸 (TA, tannic acid)、を同定し、TAの構造の特徴であるガロイル基を有する、エピカテキンガラート、および、エピガロカテキンガラートもドーパミン D2 受容体アゴニストであることを示した。これらの化合物はLPS刺激によってマウス脾臓細胞から産生されたIFN- $\gamma$ 放出を抑制した。さらにTAは、TAおよびガロイル基である没食子酸の塗布はマウス乾癬モデルにおいて乾癬発症による耳介腫脹を抑制し、リンパ球の浸潤、表皮層の腫脹、過角化、真皮乳頭の延長、表皮下微小膿瘍の症状を抑制した。また、マウス腸炎モデルにおいて、飲水によるTAの投与は、マウスの体重減少を抑制し、

腸の収縮、腸上皮の破壊、および、好中球の浸潤を抑制し、抗 CD3/28 抗体によるマウス腸間膜リンパ球の IL-17 産生を優位に抑制した。さらに、ラット歯周病モデルにおいて、TA の塗布は、歯周病誘導による歯茎の退縮を抑制した。このことから、本研究の目的であった、ドーパミン D2 受容体アゴニスト活性がある天然物化合物の探索を行い、その免疫細胞におけるサイトカイン分泌の制御、および、炎症疾患に対する効能の解析、は達成されたと考えられる。

(3) 一方、ドーパミン受容体への作用が免疫細胞からのサイトカイン分泌を制御する分子機構は今回の研究では明らかにできなかった。この分子機構を解明することで、ドーパミン受容体アゴニストおよびアンタゴニストが炎症性疾患に有効である理由が明らかになるものと期待されるので、ドーパミン受容体への作用によるサイトカイン分泌制御の詳細なメカニズムの解析が待たれる。

(4) また、本研究では、生体外からドーパミン D2 受容体のアゴニストを添加することで、免疫細胞のサイトカインの分泌を制御し、炎症性疾患に有効であることを解析したが、生体内で神経伝達物質であるドーパミンが免疫細胞のサイトカインの分泌を制御するために用いられているかどうかは不明である。このことを解明するためには、神経細胞と免疫細胞との間の相互作用を解析するための系を構築し、神経細胞からのドーパミン分泌が免疫細胞のサイトカイン分泌制御に利用されていることを解析する必要があると考えられる。

## 5. 研究発表

### (1) 学会等

- ① Dopamine regulates cytokine secretion during innate and adaptive immune responses. Kawano M., Takagi R., Saika K., Matsui M., Matsushita S. *Int. Immunol.*, 査読有り, 30:591-606, 14 Nov. 2018.
- ② IL-8 produced by T cells is under the control of dopamine signaling. Matsuyama T., Kawano M., Takagi R., Nakagome K., Chikamatsu K., Matsushita S. *Clin. Exp. Neuroimmunol.*, 査読有り, 9:251-257 21 June 2018
- ③ Protein kinase C activation via serotonin receptor induces IL-8 in antigen-presenting cells stimulated with diazinon. Nishizawa K., Takagi R., Kawano M., Matsushita S. *Curr. Topics Toxicol.*, 査読有り, 14:41-52, 2018. 8 Sep 2018

### (2) 口頭発表

- ① Tannic acid affects dopamine receptors, regulates immune responses, and ameliorates experimentally induced colitis. Kawano M., Takagi R., Saika K., Matsui M., Matsushita S. 第47回日本免疫学会学術集会 福岡 2018年12月
- ② 中村晃一郎。アトピー性皮膚炎におけるあらたな治療（生物的製剤を中心に）。第67回日本アレルギー学会学術大会（幕張）。2018.6.24
- ③ 中村晃一郎。アトピー性皮膚炎の新しい治療と期待。第82回日本皮膚科学会東京支部学術大会。シンポジウム。（東京）。2018.12.02
- ④ 中村晃一郎。ベーチェット病の皮膚粘膜病変の臨床と診断。第2回日本ベーチェット病学会（横浜市）2018.12.14。
- ⑤ Koichiro Nakamura, Kyohei Miyano, Tetsuya Tsuchida. Susceptibility of single nucleotide polymorphism of interleukin17A concerned with intestinal symptoms in Behcet's disease. 18<sup>th</sup> International Conference on Behcet's disease. (Rotterdam) 2018.9.13.

### (3) 出版物

- ① ロドデノール誘発性脱色素斑は自己免疫機序により生じる。土田 哲也、中村 晃一郎、高木 理英、川野 雅章、松下 祥。「What's new in 皮膚科学」宮地良樹編，メディ

- カルレビュー社（東京），44-45，2018（2018年4月16日、第1版）.
- ② 高木理英、松下祥：ロドデノールによって誘発された白斑発症のメカニズムと今後の化粧品開発 COSMETIC STAGE 13:54-58, 2018.
  - ③ 中村晃一郎、岩田洋平 浅井純 川上民裕 常深祐一郎 金子史男。ベーチェット病の皮膚粘膜病変診療ガイドライン。日本皮膚科学会雑誌2018, 128(10); 2087-2100.
  - ④ 中村晃一郎。保湿剤の種類と特徴。丈夫な皮膚をつくる 正しい保湿剤の使い方。WOC Nursing（医学出版）2018, 16（8），7-22.
  - ⑤ 中村晃一郎。アトピー性皮膚炎の新規治療。アレルギーの臨床。（北陵館）。2018, 38（11），1039-1042.
  - ⑥ 中村晃一郎。手湿疹。小児科（金原出版）。2018, 59(9), 1325-1329.
  - ⑦ 中村晃一郎。カラーアトラス。皮膚症状110症例でみる内科疾。Sweet病。日本医事新報社。（編集、出光俊郎） 2018, 16-17.
  - ⑧ 中村晃一郎。皮脂欠乏性皮膚炎。皮膚病診療<sup>®</sup>ワラップ。中山書店。2018, 93-96.

|           |                                                                   |       |         |     |
|-----------|-------------------------------------------------------------------|-------|---------|-----|
| 学 校 名     | 北 里 大 学                                                           | 研究所名等 | 共 同 研 究 |     |
| 研 究 課 題   | iPS細胞を用いた遺伝性パーキンソン病の創薬研究<br>－iPS細胞移植によるin vivoモデルの病態解析－           |       | 研 究 分 野 | 医 学 |
| キ ー ワ ー ド | ①パーキンソン病 ②iPS細胞 ③LRRK2 ④ゲノム編集 ⑤神経幹細胞移植<br>⑥免疫不全マウス ⑦PD病態モデル ⑧創薬研究 |       |         |     |

○研究代表者

| 氏 名     | 所 属         | 職 名 | 役 割 分 担 |
|---------|-------------|-----|---------|
| 太 田 悦 朗 | 医 療 衛 生 学 部 | 講 師 | 研究代表者総括 |

○研究分担者

| 氏 名       | 所 属   | 職 名   | 役 割 分 担       |
|-----------|-------|-------|---------------|
| 永 井 真 貴 子 | 医 学 部 | 講 師   | 実験・論文作成・データ整理 |
| 江 島 耕 二   | 医 学 部 | 准 教 授 | 実験・データ整理      |
|           |       |       |               |
|           |       |       |               |
|           |       |       |               |
|           |       |       |               |
|           |       |       |               |
|           |       |       |               |
|           |       |       |               |
|           |       |       |               |

# iPS細胞を用いた遺伝性パーキンソン病の創薬研究 — iPS細胞移植による *in vivo* モデルの病態解析 —

## 1. 研究の目的

- (1) 優性遺伝パーキンソン病 (PD) の原因分子 LRRK2 に変異をもつ患者は、臨床症状や発症年齢が孤発性 PD 患者と類似した特徴を示す。そのため、LRRK2 に起因した病態の解析は、孤発性 PD の発症機序解明の鍵となる。申請者は、日本の優性遺伝 PD 家系 (相模原家系) の I2020T 変異 LRRK2 をもつ PD 患者 2 名から iPS 細胞 (LRRK2-iPSC) を樹立し、解析を進めてきた。その結果、LRRK2-iPSC 由来神経細胞を用いて、患者脳内における病態を再現し、ドーパミン放出異常やリン酸化タウの増加など PD 発症メカニズムの一端を明らかにした。そこで本研究は、PD のさらなる病態解明を目指し、iPSC 由来神経幹細胞移植マウスにおける *in vivo* の PD 病態モデルの作製および遺伝子修復 iPSC の樹立と創薬研究を展開する。

## 2. 研究の計画

- (1) iPSC 由来神経幹細胞 (iPSC-NS) 移植マウスにおける *in vivo* PD 病態モデルの作製
  - ① 使用した iPSC は、慶應義塾大学との共同研究で樹立の I2020T 変異 LRRK2 をもつ相模原家系内 PD 患者 2 名の iPSC 2 株と健常者 1 名の iPSC 1 株を用いる。また、本研究で樹立したゲノム編集で I2020T 変異を修復した PD 患者 iPSC (ゲノム編集 iPSC) も使用する。分化誘導法は、iPSC から神経幹細胞 (NS) を形成させて神経細胞に分化誘導する。また、低分子化合物を用いた神経細胞への分化誘導法も検討する。
  - ② iPSC-NS 移植マウスを作製するために、8~22 週齢の雄性 SCID マウスまたは雄性 RAG2-KO マウスを使用し、ソムノペンチル麻酔下で脳定位固定装置に固定し切開後、マイクロシリンジを用いて右線条体 (Br; 0.0 mm, L; 2.0 mm, D; 3.0mm) に iPSC-NS 懸濁液を  $4 \times 10^5$  cells/4  $\mu$ l ずつ移植する。また Injection control として、NS 用培地を移植する。
  - ③ 移植マウスにおける運動機能および行動異常を調べるために、シリンダーテスト、オープンフィールド、ロータロッドテスト、飲水量や摂食量の測定を行う。
  - ④ 移植マウスにおける iPSC-NS の生着および分化を評価するため、脳を灌流固定後、凍結切片を作製して HE 染色および免疫組織化学染色を行う。
  - ⑤ 一部の移植マウスは、解剖時に右および左線条体領域を摘出して RNA を抽出し、炎症関連シグナル伝達分子および炎症性サイトカイン群の mRNA 発現レベルを定量的 PCR で調べる。さらに、摘出した線条体または中脳について、HPLC を用いて脳内モノアミンの測定を行う。
- (2) 遺伝子修復 iPSC の樹立および薬剤スクリーニングによる神経保護効果薬の探索
  - ① TALEN を用いたゲノム編集によって LRRK2-iPSC における I2020T 変異を遺伝子修復する。
  - ② 多能性マーカー発現および正常な染色体核型解析などの characterization を行って、遺伝子修復した PD 患者 iPSC (TALEN-iPSC) を樹立する。
  - ③ LRRK2-iPSC と TALEN-iPSC から分化誘導させた各神経細胞を用いて、神経突起長や酸化ストレス抵抗性について解析を行う。
  - ④ PD 患者 iPSC およびゲノム編集 iPSC 由来神経細胞に対して、薬剤スクリーニングによる神経保護効果薬の探索を行う。神経保護効果の指標は、酸化ストレスに対するアポトーシスの抑制、神経突起や軸索の伸長について評価する。
- (3) I2020T-LRRK2 トランスジェニックマウスにおける遺伝子修復 iPSC の細胞治療
  - ① 申請者の研究室が作製の I2020T-LRRK2 トランスジェニックマウス (LRRK2-TG マウス) は、23 および 34 週齢において運動機能異常を示すことを報告している (Molecular Neurodegener 2012)。LRRK2-TG マウスを繁殖させ、移植に備えて 20 週齢および 30 週齢まで育成する。
  - ② 樹立ゲノム編集 iPSC-NS を実験 I と同様の方法で線条体に移植する。移植後、細胞治療による治療効果として、運動機能テストを行い、運動機能異常の改善がみられるかどうかを評価する。
  - ③ 移植マウスは、免疫組織化学染色による形態学的解析と HPLC による生化学的解析を行い、

病態の改善がみられるかどうかを評価する。

### 3. 研究の成果

#### (1) iPSC 由来神経幹細胞 (iPSC-NS) 移植マウスにおける *in vivo* PD 病態モデルの作製

- ①胚様細胞塊を介した神経細胞への分化誘導においては、神経前駆細胞やグリア前駆細胞が含まれるため、分化させた細胞を免疫細胞化学染色で評価した。その結果、80%以上が神経細胞（そのうち約7%がドーパミン作動性神経細胞）で、約5%がアストロサイトであることを確認した。また、低分子化合物を用いた神経細胞への分化誘導においては、60%以上が神経細胞であり、そのうち約20%がドーパミン作動性神経細胞であった。
- ②移植後33週の長期移植におけるPD患者iPSC-NS移植SCIDマウスから作製した脳凍結切片を用いて、HE染色を行った。その後、ヒト特異的抗体STEM121（細胞質タンパク質）およびSTEM123（アストロサイトGFAPタンパク質）を用いて免疫組織化学染色を行った結果、移植側の線条体において、iPSC-NS由来の神経細胞およびアストロサイトの生着を確認した。さらに、STEM121抗体陽性神経細胞がTH抗体と共局在していることを確認した。また、移植後31週のPD患者iPSC-NS移植SCIDマウスにおいては、ヒト特異的抗体STEM101（核タンパク質）、STEM121、STEM123にそれぞれ陽性を示す細胞を多数確認した。さらに、STEM121抗体がヒト神経細胞特異的なhMAP2抗体と共局在していることを確認した。同様に、移植後33週のPD患者iPSC-NS移植RAG2-KOマウスにおいても、STEM121抗体陽性神経細胞がTH抗体と共局在していることを確認した。また、移植後36週および39週のPD患者iPSC-NS移植RAG2-KOマウスにおいても、STEM121抗体陽性神経細胞を確認した。
- ③移植したPD患者iPSC-NS由来細胞がマウスミクログリアに及ぼす影響を調べるために、Iba1抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。その結果、移植後33週のSCIDマウスにおける移植側の線条体ミクログリアは、非移植側に比べ、形態学的な変化や細胞数に差異はみられなかった。しかし、移植側の線条体ミクログリアは、細胞質が肥大したPD患者iPSC-NS由来アストロサイトの周囲に多数存在していた。
- ④iPSC-NS移植による運動機能の差異を調べるため、移植後3日から195日間におけるPD患者iPSC-NS移植SCIDマウス群とInjection control SCIDマウス群について、シリンダーテストを行った。その結果、PD患者iPSC-NS移植SCIDマウス群では、Injection control SCIDマウス群に比べ、立ち上がり時の前肢がシリンダー壁内に触れる回数に増加傾向がみられた。また、前肢がシリンダー壁内に触れる回数に左右差はみられなかった。また、移植後36日から181日までの期間におけるPD患者iPSC-NS移植SCIDマウス群とInjection control SCIDマウス群について、飲水および摂食テストを行った結果、PD患者iPSC-NS移植SCIDマウス群において、飲水量および摂食量が減少している傾向がみられた。iPSC-NS移植SCIDマウス群の運動学習機能を評価するために、移植後133~136日および移植後167~170日においてロータロッドテストを行ったが、健常者およびゲノム編集、PD患者iPSC-NS移植SCIDマウス群に運動学習機能の差異はみられなかった。オープンフィールドテストにおいて、不安の指標となる中心領域滞在率を解析したところ、PD患者iPSC-NS移植マウスの中心領域滞在率は、健常者およびゲノム編集iPSC-NS移植マウスに比べ増加傾向がみられたことから、マウスの情動性への影響が示唆された。
- ⑤移植した健常者およびゲノム編集、PD患者iPSC-NS由来細胞がマウスミクログリアに及ぼす影響を調べるために、健常者およびゲノム編集、PD患者iPSC-NS移植SCIDマウスを作製した。移植後3週、10週、20週、31週の各iPSC-NS移植SCIDマウスにおける脳凍結切片を作製し、免疫組織化学染色を行い、現在解析中である。
- ⑥ iPSC-NS移植細胞が誘発するミクログリアの活性化について明らかにするために、移植後20週および31週の健常者およびゲノム編集、PD患者iPSC-NS移植SCIDマウス群の線条体におけるmRNA発現レベルを調べた。mRNA発現解析の結果、移植後20週のPD患者iPSC-NS移植SCIDマウス群では、健常者およびゲノム編集iPSC-NS移植SCIDマウス群に比べ、ERK1、p38、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ のmRNA発現レベルが増加していた。さらに、移植後31週のPD患者iPSC-NS移植SCIDマウス群では、p38、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、iNOS、RelAのmRNA発現レベルが増加していた。

#### (2) 遺伝子修復 iPSC の樹立および薬剤スクリーニングによる神経保護効果薬の探索

- ①低分子化合物を用いて、樹立したゲノム編集iPSCから神経細胞を分化誘導した。分化誘導

効率を調べた結果、70%以上が神経細胞であり、そのうちドーパミン作動性神経細胞が15-20%程度であった。

- ②神経突起長について解析を行った結果、TALEN-iPSC由来神経細胞および健常者iPSC由来神経細胞に比べ、PD患者iPSC由来神経細胞の神経突起長は短いことがわかった。また、酸化ストレスに対する脆弱性について解析を行った結果、TALEN-iPSC由来神経細胞の酸化ストレスに対する脆弱性は、健常者iPSC由来神経細胞と同程度であり、PD患者iPSC由来神経細胞では、酸化ストレスに対する脆弱性が亢進していた。
  - ③5種の既存化合物を用いた解析から、アポトーシスの抑制、神経突起や軸索の伸長を示すCompound Xを見出した。現在、詳細を解析中である。
- (3) I2020T-LRRK2 トランスジェニックマウスにおける遺伝子修復 iPSC の細胞治療
- ①細胞治療実験には、申請者の研究室が作製した23週齢および34週齢において運動機能異常を示すLRRK2-TGマウスを使用した。20週齢のLRRK2-TGマウスに、遺伝子修復iPSC-NSを実験Iと同様の方法で線条体に移植した。LRRK2-TGマウスはC57BL/6系統のため、定期的に免疫抑制剤を腹腔内に投与した。細胞治療による運動学習機能を評価するために、移植後6日から15日までのLRRK2-TGマウス移植群と非移植群において、ロータロッドテストを行った。その結果、全群において、日を追うごとに落下するまでの歩行時間にある一定の増加傾向がみられ、運動学習機能を確認した。LRRK2-TGマウス移植群では、非移植群に比べ、運動学習機能の改善がみられ、non-TGマウス群に近い歩行時間を示す傾向があった。また、免疫組織化学染色による形態学的解析とHPLCによる生化学的解析については、現在解析中である。

#### 4. 研究の反省・考察

- (1) iPSC 由来神経幹細胞 (iPSC-NS) 移植マウスにおける *in vivo* PD 病態モデルの作製
  - ①PD患者iPSC-NS移植SCIDマウスのシリンダーテストにおいて、移植後76日以降で両群に差異が生じ始める傾向を確認したため、現在、ビームテストやオープンフィールドテストなどの行動解析を進めている。また、行動実験を評価する上で、injectionコントロールSCIDマウスではなく、健常者およびゲノム編集iPSC-NS移植SCIDマウスを作製し、病態解析を現在進めている。
  - ②PD患者iPSC-NS移植SCIDマウスにおいて、ヒト由来移植細胞の正着を確認し、非移植側に比べ、移植側のマウス由来ミクログリアの活性化を予測する形態学的な変化を見出したため、ミクログリアを含めた脳内環境に神経炎症を惹起するかどうかを調べる予定である。
  - ③移植後20週の PD患者iPSC-NS移植SCIDマウス群では、健常者およびゲノム編集iPSC-NS移植SCIDマウス群に比べ、炎症性サイトカインが増加していたため、今後マイクロアレイなどによる網羅的な解析が必要である。
- (2) 遺伝子修復 iPSC の樹立および薬剤スクリーニングによる神経保護効果薬の探索
  - ①樹立したゲノム編集iPSCから低分子化合物を用いて神経細胞へと分化させた結果、高効率で神経細胞になり、分化誘導効率は、PD患者iPSCと比べて差異はみられなかった。また、病態解析を行った結果、PD患者iPSC由来神経細胞でみられた神経突起の異常短縮や酸化ストレスに対する細胞脆弱性が、ゲノム編集iPSC由来神経細胞では、健常者iPSC由来神経細胞と同程度まで回復することを確認した。
  - ②今回のゲノム編集iPSC由来神経細胞が健常者と同じ正常な表現型を示したことは、病態解析のコントロールだけでなく、将来的に細胞治療にも応用できる可能性を示している。③既存化合物を用いた解析から、アポトーシスの抑制、神経突起や軸索の伸長を示すCompound Xを見出したため、今後詳細や作用機序について解析を必要がある。
- (3) I2020T-LRRK2 トランスジェニックマウスにおける遺伝子修復 iPSC の細胞治療
  - ①遺伝子修復iPSC-NSを用いたLRRK2-TGマウスの細胞治療実験では、を行った。LRRK2-TGマウス移植群のロータロッドテストにおいて、運動学習機能の改善がみられ、表現型における治療効果を示す結果が得られた。今後、免疫組織化学染色による形態学的解析とHPLCによる生化学的解析によって、移植による治療効果の詳細を調べる必要がある。

#### 5. 研究発表

- (1)学会誌等

- ①Kubo KY, Suzuki A, Iinuma M, Sato Y, Nagashio R, Ohta E, Azuma K. Vulnerability to stress in mouse offspring is ameliorated when pregnant dams are provided a chewing stick during prenatal stress. *Arch Oral Biol* 97,150-155, 2019
- ②服部精人、太田悦朗、曾根岳史、三好浩之、新田龍人、Andrew Yoo、川村俊彦、岡野栄之「microRNAを用いた遺伝性パーキンソン病患者iPS細胞の病態解析」第18回日本再生医療学会総会、2019年3月
- (2) 口頭発表  
なし
- (3) 出版物
- ①服部信孝（企画）、太田悦朗、川村俊彦（分担執筆）：「日本臨床 増刊号 パーキンソン病（第2版）－基礎・臨床研究のアップデート－」（担当箇所：LRRK2）、日本臨床社、76巻、pp. 65-72、2018
- ②高橋良輔（企画）、太田悦朗（分担執筆）：別冊「医学のあゆみパーキンソン病の新展開－発症の分子機構と新規治療」（担当箇所：LRRK2 (PARK8) の病態）、医歯薬出版株式会社、1巻、pp. 10-15、2018

|           |                                              |       |         |     |
|-----------|----------------------------------------------|-------|---------|-----|
| 学 校 名     | 慶 應 義 塾 大 学                                  | 研究所名等 | 共 同 研 究 |     |
| 研 究 課 題   | 腸内細菌による自己免疫応答制御作用の解明<br>－超高齢化社会に向けた自己免疫疾患制御－ |       | 研 究 分 野 | 医 学 |
| キ ー ワ ー ド | ①腸内細菌 ②自己免疫疾患 ③酪酸 ④関節リウマチ                    |       |         |     |

○研究代表者

| 氏 名     | 所 属   | 職 名 | 役 割 分 担      |
|---------|-------|-----|--------------|
| 長 谷 耕 二 | 薬 学 部 | 教 授 | 自己免疫疾患モデルの評価 |

○研究分担者

| 氏 名   | 所 属   | 職 名 | 役 割 分 担      |
|-------|-------|-----|--------------|
| 金 倫 基 | 薬 学 部 | 教 授 | 腸内細菌叢と代謝物の解析 |
|       |       |     |              |
|       |       |     |              |
|       |       |     |              |
|       |       |     |              |
|       |       |     |              |
|       |       |     |              |
|       |       |     |              |
|       |       |     |              |

# 腸内細菌による自己免疫応答制御作用の解明 —超高齢化社会に向けた自己免疫疾患制御—

## 1. 研究の目的

### (1) 研究背景：腸内細菌の異常による疾患形成

- ① ヒトの大腸には 100 兆個以上もの腸内細菌が定着しており、消化液では分解できない食物繊維などを腸内発酵により分解し、生体にとって有用な短鎖脂肪酸に作り替える働きをしている。短鎖脂肪酸は大腸上皮の重要なエネルギー源である。短鎖脂肪酸以外にも、糖・脂質代謝の補酵素となるビタミン B 類なども腸内細菌叢によって産生されている。一方、宿主は腸内細菌叢の存在を許容し、食物残渣やムチンを発酵基質として提供することで、生物種間における trade-off が成立し相利共生関係が維持されている。
- ② しかしながら、遺伝的素因や老化といった宿主側の要因や、薬剤やストレス、偏った食生活などの環境要因により、ひとたび腸内細菌叢のバランスに異常をきたすと、炎症性腸疾患や大腸癌などの消化器疾患に加えて、アレルギーや自己免疫性疾患、さらには精神性疾患や生活習慣病といった全身性の疾患が誘導されることが示唆されている。つまり腸内共生バランス失調は各種疾患の発症に関わる鍵因子であると想定されているが、その病態メカニズムは不明である。
- ③ 興味深いことに、炎症性腸疾患、関節リウマチ、肝硬変、メタボリックシンドロームなど炎症反応を伴う疾患で共通して見られる異常の一つは、酪酸産生菌種の減少である。申請者はこれまで、酪酸が腸内で多く産生された際に、炎症やアレルギー反応を抑制する制御性 T 細胞が増加する現象を見出した (Furusawa et al., *Nature* 2013)。制御性 T 細胞は宿主にとって無害な食品成分や腸内細菌に対する免疫寛容を誘導することで、炎症・アレルギー反応を抑制する。よって、酪酸は、制御性 T 細胞を誘導することで、大腸における炎症を未然に防いでいる。さらに興味深いことに、腸内の酪酸濃度を高めることで、全身性の自己免疫疾患であるコラーゲン誘導性関節炎の病態が緩和する事実を見出している。

### (2) 研究目的

- ① 以上の研究背景から、腸内で産生された酪酸（あるいはその影響を受けたリンパ球）は循環血に移行し、全身における炎症応答の抑制に寄与することが示唆される。すなわち、『腸内細菌叢の変容によって、腸内における酪酸産生が低下することが、炎症の惹起や増悪に繋がっている』との作業仮説が成り立つ。そこで本研究では、下記の項目を実施し本仮説の検証を試みる。
- ② コラーゲン誘導性関節炎モデルにおける、酪酸による自己免疫制御メカニズムを検討する。
- ③ 関節リウマチ患者と健常人の糞便中の短鎖脂肪酸濃度を測定により、酪酸の低下と病態の発症との関連を明らかにする。

## 2. 研究の計画

### (1) 酪酸による自己免疫制御メカニズムの解明

- ① 腸内代謝物である酪酸が腸管以外の臓器における炎症制御にも関わると推定した。そこで、そのメカニズムを検証した。まず、免疫病理学的解析として、炎症局所の滑膜ならびに所属リンパ節より細胞を取得し、病態形成に関わる自己応答性17型ヘルパーT(Th17)細胞と、炎症を制御する制御性T (Treg) 細胞の存在比率をフローサイトメトリーにより検出する。

- ② さらに、自己抗体であるコラーゲン特異的IgG産生量をELISAにより定量した。これより酪酸の標的細胞候補を試みた。

(2) 関節リウマチ患者検体における酪酸濃度の解析

- ① これまで関節リウマチ患者では、腸内細菌叢の異常として*Prevotella copri*の増加が報告されている。さらにあまり注目されていないものの、健常人と比較して酪酸産生菌種を多く含むLachnospiraceae科細菌の減少が認められることから、酪酸産生が低下している可能性が考えられる。これを検証するため、関節リウマチ患者と健常人より糞便および血液サンプルを取得し、酪酸およびその他の腸内代謝物の濃度を分析した。

### 3. 研究の成果

(1) 酪酸による自己免疫制御メカニズムの解明

- ① 対照群にコラーゲンを2回免疫すると、2週間以内に100%のマウスが関節炎を発症したが、酪酸化スターチを摂取させ大腸内酪酸濃度を高めることで、関節炎の発症率が有意に低下した。さらに関節炎のスコアにおいても、酪酸化スターチ摂取群で有意な改善が認められた。μCTによるイメージングでは、対照スターチ群では骨破壊が顕著であったが、酪酸化スターチ群では骨破壊は軽度にしかな認められなかった。以上の観察結果より、酪酸は自己免疫性関節炎の発症を抑制する作用があることが判明した。
- ② 免疫学的性状解析を実施した。炎症部位である関節の滑膜、所属リンパ節、および、脾臓より細胞を取得し、病態形成に関わる17型ヘルパーT細胞(Th17細胞)と、炎症を抑制する制御性T細胞(Treg細胞)の存在比率をフローサイトメトリーにより検出した。その結果、酪酸化スターチ群では対照スターチ群と比べてわずかにTreg細胞の増加が認められた。Th17細胞については両群で差が認められなかった。
- ③ 続いて、血清中のコラーゲン特異的IgG価を測定した結果、酪酸化スターチ群において抗体価の低下が観察された。興味深いことにコラーゲン免疫によって大腸リンパ組織の胚中心反応が活性化して、肥大が認められた。酪酸はこの大腸リンパ組織の胚中心反応を抑制する事が判明した。

(2) 関節リウマチ患者検体における酪酸濃度の解析

- ① 健常人および初発かつ未治療の関節リウマチ患者の便中において、各種有機酸量を測定した結果、酪酸濃度が有意に減少していることが判明した。一方で、酢酸やプロピオン酸には有意な変化は認められなかった。さらに、腸内細菌組成と酪酸の相関解析を実施し、関節リウマチ患者では*Facalibacterium*属細菌とunclassified Lachnospiraceae科細菌の減少が酪酸産生の低下に繋がっていることが示唆された。

### 4. 研究の反省・考察

(1) 酪酸による自己免疫制御メカニズムの解明

- ① 近年、関節リウマチ患者において腸内細菌の異常(ディスバイオーシス)が報告されている。関節リウマチ患者ディスバイオーシスの特徴として*Prevotella copri*の増加が最もよく知られている。*P. copri*はTh17細胞誘導作用があることが知られている。Th17細胞は滑膜細胞からのRANKL発現を促す。RANKLは、破骨細胞の分化と活性化を促し、炎症性サイトカインを分泌させるため、骨破壊と炎症を促進する。無菌化したSKGマウス(関節リウマチ自然発症マウス)に関節リウマチ患者由来の腸内細菌を移植すると、健常人由来の糞便を定着させた場合に比べて、関節炎の病態スコアが悪化する。SKGマウスはTh17細胞依存的に発症するモデルである。
- ② 一方、今回の研究で解析したコラーゲン誘導性関節炎モデルは、細胞性免疫であるTh17細胞の活性化に加えて、液性免疫であるコラーゲン特異的抗体の産生も関節炎の発症に関与している。酪酸は、滑膜や所属リンパ節におけるTh17細胞を抑制する作用は認められなかったが、これは血清中の酪酸濃度が低いことから腸管外組織におけるTreg誘導作用は少ないためと思われる。酪酸は腸上皮の主要なエネルギー源であり、また肝臓においても代謝されるため、腸から全血への移行は少ない。酪酸は自己抗体の産生を抑制したが、これは腸管関連リンパ組織における胚中心応答を抑制したと想定されるが、現在、その詳細なメカニズムを検討中である。

## (2) 関節リウマチ患者検体における酪酸濃度の解析

- ① 既報では、関節リウマチ患者において *P. copri* の増加と、酪酸産生菌が多く含まれる Lachnospiraceae の低下が認められることが報告されてきた。我々の解析においても、関節リウマチ患者において unclassified Lachnospiraceae 科細菌の減少が確認できた。さらにもっともメジャーな酪酸産生菌として知られる *Faecalibacterium* 属細菌の低下も観察された。以上の結果より、関節リウマチ患者では腸内細菌の異常により酪酸産生が低下することが判明した。自己免疫応答のブレーキ役として機能する酪酸の産生低下が、関節リウマチ病態の悪化を促している可能性が示唆された。ただし、今回の解析では血液パラメーターは調べておらず、酪酸低下とリウマチ因子などとの相関解析を行うことで、臨床における酪酸減少の重要性がより明確になると思われる。

## 5. 研究発表

### (1) 学会誌等

- ① Kimura S, Kobayashi N, Nakamura Y, Kanaya T, Takahashi D, Fujiki R, Mutoh M, Obata Y, Iwanaga T, Nakagawa T, Kato N, Sato S, Kaisho T, Ohno H, Hase K. Sox8 is essential for M-cell maturation to accelerate IgA response at the early stage after weaning. **J. Exp. Med.** 2019, 216, 831-846, doi: 10.1084/jem.20181604.
- ② Onuki M, Watanabe M, Ishihara N, Suzuki K, Takizawa K, Hirota M, Yamada T, Egawa A, Shibahara O, Nishii M, Fujihara M, Makishima M, Takahashi D, Furusawa Y, Kakuta H, Hase K. A partial agonist for retinoid X receptor mitigates experimental colitis. **Int. Immunol.** 2019, 31:251-262, doi: 10.1093/intimm/dxy089.
- ③ Zai K, Ishihara N, Oguchi H, Hirota M, Kishimura A, Mori T, Hase K, \*Katayama Y. Regulation of inflammatory response of macrophages and induction of regulatory T cells by using retinoic acid-loaded nanostructured lipid carrier. **J. Biomater. Sci. Polym. Ed.** 2019, 30, 1-11, doi: 10.1080/09205063.2018.1493671
- ④ Kato T, Yamazaki K, Nakajima M, Date Y, Kikuchi J, Hase K, Ohno H, Yamazaki K. Oral Administration of Porphyromonas gingivalis Alters the Gut Microbiome and Serum Metabolome. **mSphere.** 2018, 3, e00460-18, doi: 10.1128/mSphere.00460-18.
- ⑤ Zai K, Hirota M, Yamada T, Ishihara N, Mori T, Kishimura A, Suzuki K, Hase K, Katayama Y. Therapeutic effect of vitamin D(3)-containing nanostructured lipid carriers on inflammatory bowel disease. **J Control Release.** 2018, 286, 94-102, doi: 10.1016/j.jconrel.2018.07.019.
- ⑥ Nakamura Y, Kimura S, Hase K. M cell-dependent antigen uptake on follicle-associated epithelium for mucosal immune surveillance. **Inflamm Regen.** 2018, 38, 15, doi: 10.1186/s41232-018-0072-y.
- ⑦ Kikuchi K, Iida M, Ikeda N, Moriyama S, Hamada M, Takahashi S, Kitamura H, Watanabe T, Hasegawa Y, Hase K, Fukuhara T, Sato H, Kobayashi EH, Suzuki T, Yamamoto M, Tanaka M, Asano K. Macrophages Switch Their Phenotype by Regulating Maf Expression during Different Phases of Inflammation. **J Immunol.** 2018, 201, 635-651, doi: 10.4049/jimmunol.1800040.

### (2) 口頭発表

- ① 長谷 耕二, 自己免疫疾患の発症を制御する短鎖脂肪酸. 第 72 回日本栄養・食糧学会大会, 2018/5/13, 岡山.
- ② 長谷 耕二, 腸内細菌による慢性炎症の制御. 第 33 回 日本乾癬学会学術大会, 2018/9/7, 松山.
- ③ Koji Hase, Commensal microbe-derived metabolites shapes host immunity and metabolism. The Korean Society of Food Science and Nutrition 2018, 2018/11/1, Seoul, Korea.

### (3) 出版物

なし

|           |                                               |       |             |
|-----------|-----------------------------------------------|-------|-------------|
| 学 校 名     | 順 天 堂 大 学                                     | 研究所名等 | 共 同 研 究     |
| 研 究 課 題   | iPS細胞を用いた孤発性パーキンソン病の再分類と創薬                    |       | 研 究 分 野 医 学 |
| キ ー ワ ー ド | ①パーキンソン病 ②iPS細胞 ③ドーパミンニューロン ④創薬スクリーニング ⑤神経幹細胞 |       |             |

○研究代表者

| 氏 名     | 所 属                   | 職 名  | 役 割 分 担  |
|---------|-----------------------|------|----------|
| 赤 松 和 士 | 大学院医学研究科<br>ゲノム・再生医療学 | 特任教授 | 研究代表者・総括 |

○研究分担者

| 氏 名     | 所 属   | 職 名   | 役 割 分 担           |
|---------|-------|-------|-------------------|
| 服 部 信 孝 | 医 学 部 | 教 授   | 臨床検体採取・解析手法の提供    |
| 斉 木 臣 二 | 医 学 部 | 准 教 授 | 臨床検体採取・解析手法の提供・実験 |
| 常 深 泰 司 | 医 学 部 | 准 教 授 | 臨床検体採取・解析手法の提供・実験 |
|         |       |       |                   |
|         |       |       |                   |
|         |       |       |                   |
|         |       |       |                   |
|         |       |       |                   |
|         |       |       |                   |
|         |       |       |                   |

# iPS 細胞を用いた孤発性パーキンソン病の再分類と創薬

## 1. 研究の目的

疾患特異的 iPS 細胞は、病変部位へのアクセスが困難な神経疾患の解析ツールとして極めて有用であるが、iPS 細胞樹立・解析クローン選択・分化誘導のステップに要する日数が長く作業量も膨大である。従来の解析方法では単一遺伝子病の数例の解析(平均して1つの研究あたり約3症例)が国内外での既報の研究における現実的な限界であった。しかしながら、パーキンソン病 (PD) や ALS を例にとると、その大半 (~90%) が孤発性であり家族性の症例が占める比率は多いとは言えない。このような神経疾患の孤発性症例の病態再現においては、iPS 細胞で再現される Genetic, Epigenetic な変異だけでなく、環境要因などの要素が含まれる点を考慮すると、その解決策としては従来のスケール (1 研究あたり遺伝性症例を 3-5 症例程度) に比して、極めて多くの症例数 (n>100) の解析を行う必要があるのではないかと考えられる。申請者はこの問題を解決すべく、患者検体からの iPS 細胞の樹立と神経分化誘導システムを小スケール・効率化して 96well プレートで解析する方法を開発してきた。

本研究では、研究代表者が持つこの技術を用いて順天堂大に通院する孤発性 PD 患者 (数百例) において複数の表現型を小スケールで定量的に解析し、各症例が示す表現型から孤発性症例を仮分類する。臨床経過の分析と、細胞機能異常で分類されたそれぞれのグループに対して、申請者が現在同定を進めている薬剤スクリーニングで得られた細胞機能特異的な薬剤を用いてその効果を評価する。これらの結果から孤発性 PD を細胞生物学的表現型によって分類し再定義する。パーキンソン病の病態はドーパミンニューロンの脱落を主とするが、その病態は解明されておらず、治療は主に不足するドーパミンの補充に留まっている。ドーパミン神経脱落を抑え、病気の進行を止める **disease modifying effect** を有する新規治療薬の開発が期待されているが、本研究によってそのような新規治療薬の開発が期待できる。一方、このように大規模に孤発性症例の iPS 細胞の解析を行い結論を得ている報告は世界でも例が無いために、本研究で構築されるシステムが初めての孤発性疾患に対する系統的な iPS 細胞モデルの確立となると思われる。さらにこの方法をモデルとして他の孤発性疾患、多因子疾患の疾患 iPS 研究の大規模化が実現され、疾患病態解明・治療薬探索研究の加速・発展に繋がると期待される。本研究における患者検体の採取と利用は順天堂大学の倫理委員会の承認を得ている (順大医倫第 2015094 号)。

## 2. 研究の計画

### (1) 孤発性 PD 患者からの末梢血の採取とリンパ球のストック

研究開始までに順天堂医院に通院する孤発性 PD 患者・対照約 150 例のリンパ球および一部の症例でリンパ芽球細胞株の樹立を行っている。孤発性患者リクルートと検体採取は継続的に行い、研究期間終了までに 400-500 症例の検体採取を目指す。実際の患者検体は病院外来で末梢血 10ml 程度を採取し、T 細胞を分離培養し順次蓄積する。

### (2) In Cell Analyzer を用いた iPS 細胞樹立・神経分化誘導の改良

申請者はこれまで 96well 中で T 細胞から iPS 細胞を樹立し、分化誘導する手技を確立しつつある。実際に患者から採取された複数の T 細胞を同時に 96well 上で iPS 細胞化しドーパミンニューロンへ分化させるプロトコルを確立する。また既存の誘導法では目的の神経細胞に誘導できなかった細胞が混入するため、アッセイによっては目的細胞の抽出が必要で画像解析プログラムのような画一的評価システムでは異常検出が難しいものも多いため、正確な解析のための高純度な分化誘導方法の確立を目指す。

### (3) 遺伝性 PD-iPS を用いた細胞機能特異的表現型検出法の確立

申請者らはこれまでに自身が樹立した遺伝性 PD のうち PARK2-iPS 細胞を用いて、細胞死・神経突起の脱落・ミトコンドリア機能異常のそれぞれを小スケールで In Cell Analyzer を用いて定量する方法を確立している。さらに、 $\alpha$ シヌクレイン凝集を示す PARK4-iPS 細胞を

用いて Lewy 小体を形成する  $\alpha$  シヌクレインの異常凝集を定量化する。リソソーム異常が病態に関与する PARK9-iPS 細胞では、不要タンパク質分解障害をきたすリソソーム内 pH 異常をすでに再現しており、これを小スケール化する。PARK8-iPS 細胞においては tau のリン酸化異常を示すことが既に明らかであるが、この表現型を小スケール化する。

#### (4) 遺伝性 PD-iPS を用いた細胞機能特異的治療薬候補のスクリーニング

申請者らはこれまでに細胞死・神経突起の脱落・ミトコンドリア機能異常を指標に PARK2-iPS 細胞を用いて、それらの表現型を改善する薬剤をスクリーニングしている。約 200 種類の既存薬ライブラリーをスクリーニングし、すべての表現型を回復させる候補薬剤を同定している。この方法を③で開発する他の遺伝性 PD-iPS の細胞機能特異的表現型を指標にして、それぞれのタイプの遺伝性 PD-iPS 細胞において固有の表現型を回復させる薬剤候補を同定する。

### 3. 研究の成果

#### (1) 孤発性 PD 患者からの末梢血の採取とリンパ球のストック

H30 年度までに順天堂医院に通院する約 450 症例の孤発性症例を中心とするパーキンソン病および正常対照から末梢血検体を採取し、T 細胞もしくは不死化リンパ芽球の状態でゲノム・再生医療センターに細胞をストックした。100 症例程度を iPS 細胞として樹立しその一部を解析した。

#### (2) In Cell Analyzer を用いた iPS 細胞樹立・神経分化誘導の改良

(1) で樹立したリンパ球を小スケールで iPS 樹立し、クローン選択せずに神経分化誘導を行い、同一の Well 上で(3)で開発された表現型解析を行う方法を確立した。この方法で順次孤発性検体の解析を進めている。

#### (3) 遺伝性 PD-iPS を用いた細胞機能特異的表現型検出法の確立

すでに樹立済みの遺伝性パーキンソン病患者由来の iPS 細胞において、細胞死・神経突起進展など共通の表現型と、マイトファジー異常・ $\alpha$  シヌクレイン蓄積など細胞機能特異的な表現型の検出方法を確立し、それぞれの遺伝性症例における各表現型のパネル化をほぼ終了した。

#### (4) 遺伝性 PD-iPS を用いた細胞機能特異的治療薬候補のスクリーニング

PARK2 に関しては全ての表現型を改善する化合物候補を複数同定済み、PARK9 に関して表現型を改善する化合物候補を複数同定済み。PARK1/4 を用いて  $\alpha$  シヌクレイン蓄積以上を改善する化合物をスクリーニングする体制が整った。

### 4. 研究の反省・考察

#### (1) 孤発性 PD 患者からの末梢血の採取とリンパ球のストック

患者検体の収集は予定通りに進行し、特に問題点は無かった。iPS 細胞の樹立効率が低い検体が一定頻度で存在したため、T 細胞のストックまでの方法の改良を続ける。

#### (2) In Cell Analyzer を用いた iPS 細胞樹立・神経分化誘導の改良

①小スケールでの iPS 樹立はプロトコルの改良で改善されつつある。

②神経分化誘導に関して順調に安定して再現出来た。

#### (3) 遺伝性 PD-iPS を用いた細胞機能特異的表現型検出法の確立

PARK14/22 など細胞機能異常の詳細が不明なタイプでは特異的な表現型の検出が今後の課題である。ミトコンドリア関連の表現型の特異度が低く、孤発性症例の分類が難しい。

#### (4) 遺伝性 PD-iPS を用いた細胞機能特異的治療薬候補のスクリーニング

遺伝性症例で同定された化合物が一部の孤発性症例でも有効なことを確認した。

## 5. 研究発表

### (1) 学会誌等

- ① Imaizumi K, Fujimori K, Ishii S, Otomo A, Hosoi Y, Miyajima H, Warita H, Aoki M, Hadano S, Akamatsu W, Okano H. Rostrocaudal Areal Patterning of Human PSC-Derived Cortical Neurons by FGF8 Signaling. *eNeuro*. 2018 Apr 26;5(2). (赤松和土は責任著者)
- ② ☆Ren Q, Ma M, Yang J, Nonaka R, Yamaguchi A, Ishikawa KI, Kobayashi K, Murayama S, Hwang SH, Saiki S, Akamatsu W, Hattori N, Hammock BD, Hashimoto K. Soluble epoxide hydrolase plays a key role in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Jun 19;115(25):E5815-E5823.
- ③ Ueno SI, Saiki S, Fujimaki M, Takeshige-Amano H, Hatano T, Oyama G, Ishikawa KI, Yamaguchi A, Nojiri S, Akamatsu W, Hattori N. Zonisamide Administration Improves Fatty Acid  $\beta$ -Oxidation in Parkinson's Disease. *Cells*. 2018 Dec 29;8(1).
- ④ Nishihara K, Shiga T, Nakamura E, Akiyama T, Sasaki T, Suzuki S, Ko M, Tada N, Okano H, Akamatsu W. Induced pluripotent stem cells reprogrammed with three inhibitors show accelerated differentiation potentials and express 2-cell-stage markers. *Stem Cell Reports* in press IF: 7.181 (赤松和土は責任著者)

### (2) 口頭発表

- ① 赤松和土「iPS細胞技術を用いた神経疾患解析」第28回日本サイトメトリー学会学術集会 シンポジウム (招待講演、座長) 2018. 5. 26
- ② 赤松和土「iPS細胞を用いたパーキンソン病の病態解明」第53回 TOKYO ニューロサイエンス研究会 (招待講演) 2018. 10. 27

### (3) 出版物

なし

|           |                                                        |       |         |     |
|-----------|--------------------------------------------------------|-------|---------|-----|
| 学 校 名     | 昭 和 薬 科 大 学                                            | 研究所名等 | 共 同 研 究 |     |
| 研 究 課 題   | YAPシグナル制御に基づく分子標的抗がん剤開発の<br>基盤研究                       |       | 研 究 分 野 | 医 学 |
| キ ー ワ ー ド | ①YAP ②中皮腫 ③SNIPER ④IAP ⑤プロテインノックダウン ⑥TMEPAI ⑦TGF-βシグナル |       |         |     |

○研究代表者

| 氏 名   | 所 属   | 職 名 | 役 割 分 担           |
|-------|-------|-----|-------------------|
| 伊 東 進 | 薬 学 部 | 教 授 | 研究総括、TMEPAIに関する研究 |

○研究分担者

| 氏 名     | 所 属   | 職 名              | 役 割 分 担                      |
|---------|-------|------------------|------------------------------|
| 岡 本 巖   | 薬 学 部 | 教 授              | SNIPER化合物合成ルートの検討・合成         |
| 山 崎 龍   | 薬 学 部 | 准 教 授            | 新規化合物のデザイン・合成                |
| 伊 藤 愛   | 薬 学 部 | 助 教              | SNIPER化合物ルートの検討・合成           |
| 福 田 和 男 | 薬 学 部 | 特 任 助 教          | SNIPER化合物ルートの検討・合成           |
| 中 野 なおこ | 薬 学 部 | 助 教              | YAP阻害剤及びSNIPERを用いたin vitro実験 |
| 佐 野 圭 吾 | 薬 学 部 | 平成31年3月<br>31日退職 | YAP阻害剤及びSNIPERを用いたin vivo実験  |
|         |       |                  |                              |
|         |       |                  |                              |
|         |       |                  |                              |
|         |       |                  |                              |

# YAP シグナル制御に基づく分子標的抗がん剤開発の基盤研究

## 1. 研究の目的

本研究では、様々な腫瘍で恒常的に活性化されている転写コアクチベーターYAPの活性を阻害することで腫瘍進展を抑制することを目的としている。その方法として、申請者らが単離し、その機能解析を世界に先駆けて行ってきたTGF- $\beta$ シグナル抑制分子であるTMEMPAIファミリー(TMEMPALとC18orf1)がYAPの活性を抑制する結果を得たことに基づいて、下記(1)~(3)の研究課題を行った

### (1) TMEMPALファミリーによるYAP抑制メカニズムの解明

YAPの恒常的活性化が高頻度で認められる悪性中皮腫でYAPシグナルとTGF- $\beta$ シグナルが協調してがんを悪性化することが報告されている。すでに申請者らが精力的に解析を進めているTMEMPALファミリーがYAPの活性を抑制するので、TMEMPALファミリーがYAPシグナルとTGF- $\beta$ シグナルを共に抑制し、悪性中皮腫の進展を抑制する可能性があると推測し、その分子メカニズムの解明を試みた。特にC18orf1がYAPの分解を介して、YAPシグナルを抑制していることを見出しているため、その分子機構を明らかにする目的で研究を行った。

### (2) YAP阻害剤の探究と分子標的薬の合成展開

YAPは中皮腫以外の様々ながんでも恒常的に活性化されているので、YAPの活性抑制は、がん征圧に繋がる可能性を秘めている。そこで、YAPを標的としたリード化合物の探究及び合成展開を目指した。すでに申請者らは、2万を超える化合物ライブラリースクリーニングでYAP結合化合物を同定し、これらの化合物の中にYAP活性を阻害する化合物Aを見出した。化合物AはYAPのTEAD結合領域を含んだ部位に結合していることをペプチドを用いたピアコアで見出しているが、実際YAPとTEAD間結合を阻害することを確かめられていないので、今回この可能性について検討した。

### (3) YAPを標的としたSNIPER(Specific Non-genetic IAP dependent Protein ERaser)法による分子標的薬の合成・抗がん作用

申請者らは、プロテインノックダウン法の一つであるSNIPER法とよばれる新規概念に基づいた低分子化合物を合成し、YAPタンパク質の発現を抑制することで抗腫瘍活性を持つ分子標的薬の基盤研究を進めるために以下の研究を展開している。SNIPER法とは、E3ユビキチンリガーゼcIAP1に結合する化合物BS(Bestatin-methyl ester)に標的タンパク質に高親和性を持った低分子化合物Xを共有結合した化合物(SNIPER)であり、このSNIPERにより、目的タンパク質を強制的にユビキチン化し、分解する方法である。最近BSよりさらにcIAPに高親和性で結合するLCL161が報告されているので、本研究ではLCL161を用いて合成を行うことにした。すでにYAPに結合するHK-13という低分子化合物を見出しているため、LCL161と共有結合が可能かつYAPと高親和性のSNIPER候補化合物を見出し、実際YAPタンパク質を分解することを明らかにする。

## 2. 研究の計画

### (1) TMEMPALファミリーによるYAP抑制メカニズムの解明

- ①TMEMPALファミリーによってリクルートされ、YAPのユビキチン化を行うE3リガーゼの同定
- ②in vitro腫瘍形成実験を用いたTMEMPALファミリーの中皮腫増殖抑制実験

### (2) YAP阻害剤の探究と分子標的薬の合成展開

- ①化合物Aの中皮腫進展抑制メカニズムの解明
- ②化合物A類似化合物の合成ルートの探究と合成展開

### (3) YAPを標的としたSNIPER法による分子標的薬の合成・抗がん作用

- ①HK13をベースとしたSNIPER合成
- ②SNIPERのin vitro評価

### 3. 研究の成果

#### (1) TMEPAI ファミリーによる YAP 抑制メカニズムの解明

##### ① TMEPAI ファミリーによってリクルートされ、YAP のユビキチン化を行う E3 ユビキチンリガーゼの同定

YAP を分解できる E3 ユビキチンリガーゼとして  $\beta$ -TrCP が知られていたため、C18orf1 が  $\beta$ -TrCP を介して YAP を分解している可能性について検討した。実際 C18orf1 は、YAP を介して  $\beta$ -TrCP と結合していたが、C18orf1 による YAP のポリユビキチン化は、 $\beta$ -TrCP 存在下で増強されず、C18orf1 は他の E3 ユビキチンリガーゼを介して、YAP をポリユビキチン化し、分解している可能性が示唆された。

##### ② in vitro 腫瘍形成実験を用いた TMEPAI ファミリーの中皮腫増殖抑制実験

中皮腫細胞である NCI-H290 細胞に C18orf1、YAP との結合領域を欠失した C18orf1  $\Delta$  PY、Smad2/3 との結合領域を欠失した C18orf1 (4A) を安定的に発現した細胞株を樹立した。これらの細胞株を用いて、軟寒天コロニー形成実験を行ったところ、C18orf1 を発現した NCI-H290 はコロニー形成を抑制したが、C18orf1  $\Delta$  PY と C18orf1 (4A) はコロニー形成抑制が殆ど認められず、中皮腫増殖には C18orf1 が Smad2/3 や YAP に結合する必要性が示唆された。

#### (2) YAP 阻害剤の探究と分子標的薬の合成展開

##### ① 化合物 A 中皮腫進展抑制メカニズムの解明

GST-YAP と細胞内で発現させた TEAD4 の結合を化合物 A は抑制することを見出した。

##### ② 化合物 A 類似化合物の合成ルートの探究と合成展開

化合物 A は天然物由来アルカロイドであり、化合物 A 類似化合物の合成経路について文献等で検討したが、効率良く、収量を確保できる方を見出すことができず、断念した。

#### (3) YAP を標的とした SNIPER 法による分子標的薬の合成・抗がん作用

##### ① HK13 をベースとした SNIPER 合成

YAP 結合活性を有する HK-13 と、cIAP 結合を有する LCL161 との間を長さの異なるポリエチレングリコール鎖 (PEG 鎖) によって結合することにより、SNIPER 活性を発現させることを目指して構造展開を行った。HK-13 にはカルボン酸部位が 1 か所あり、この部位の誘導化によって YAP 結合活性が大きく損なわれないことが確認されている。そのためここからアミド結合を形成することによって、各種の長さを有するリンカーを効率よく合成する手法を確立した。LCL161 誘導体は、若干保護基の変更を要したものの、主として既存の合成方法によって合成した。LCL161 の末端アミノ基部分は BOC にて保護し、cIAP 結合とは離れた部分の末端である芳香環はヒドロキシル基として、ここにリンカーを結合している。リンカーである PEG 鎖を、末端がトシル化された状態で長さを決定してつなぎ、その後アミノ化すると同時に HK-13 またはその誘導体と縮合し、脱 BOC 化することで SNIPER 分子である HK-21~HK-26 を合成した。

##### ② SNIPER の in vitro 評価

YAP に対する SNIPER である HK-21~HK-26 の中で、HK-22、HK-24、HK-25、HK-26 が YAP と結合することをピアコアにより明らかにした。結合した 4 種類の化合物は HK-13 と LCL-161 間のリンカー長のみ相異があり、リンカー長が最も短い HK-22 に比較してリンカー長の最も長い HK-26 が強く YAP に結合していた。特に HK-24 を用いて中皮腫細胞である NCI-HK290 を用いて細胞増殖に対する影響を調べたところ、HK-24 は用量依存的に NCI-H290 の細胞増殖を抑制し、YAP タンパク質発現を阻害した。

### 4. 研究の反省・考察

#### (1) TMEPAI ファミリーによる YAP 抑制メカニズムの解明

##### ① TMEPAI ファミリーによってリクルートされ、YAP のユビキチン化を行う E3 ユビキチンリガーゼの同定

C18orf1 が属する TMEPAI ファミリーが結合することが知られている E3 ユビキチンリガーゼを用いても YAP のユビキチン化を促進することはできなかった。今後は、網羅的に C18orf1 に結合する E3 ユビキチンリガーゼを探索する、又は E3 ユビキチンリガーゼ shRNA ライブラリーを用いて、C18orf1 による YAP のユビキチン化を抑制する shRNA を見出し等の方法から YAP のユビキチン化を行う E3 ユビキチンリガーゼの同定を行いたい。

##### ② in vitro 腫瘍形成実験を用いた TMEPAI ファミリーの中皮腫増殖抑制実験

C18orf1又はその変異体を大量発現させたNCI-H290細胞を用いて、中皮腫がん増殖にC18orf1のPYモチーフとSIM領域が重要であることを見出したが、実際in vivoでの実験まで遂行できなかった。逆にC18orf1をノックダウンさせたNCI-H290細胞を樹立することを試みたが、最近樹立できたところでまだがん化への影響について研究するに至っていない。

(2) YAP 阻害剤の探究と分子標的薬の合成展開

①化合物A中皮腫進展抑制メカニズムの解明

化合物AがYAPとTEAD4間の結合を阻害することを見出したことは大きな進歩である。しかしながら、阻害するために高濃度の化合物Aが必要であり、化合物A自身を創薬として考えることは極めて難しい。

②化合物A類似化合物の合成ルートの探究と合成展開

効率良く化合物A類似化合物の合成経路を探索できなかったことは悔やまれるが、代わりにHKシリーズの合成に集中することができた。

(3) YAP を標的とした SNIPER 法による分子標的薬の合成・抗がん作用

①HK13をベースとしたSNIPER合成

6種類のSNIPERを合成することができたが、YAPに対する高親和性の化合物を合成することができなかった。

②SNIPERのin vitro評価

合成した中でHK-24が最もYAP分解能を有していたが、分解活性は弱かった。また、合成できた収量が少なかったため、in vivo研究を行うことができなかった。

## 5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

- ① 伊藤愛、天木崇真、浅見優希、石井亜椰子、安里まりの、福田和男、山崎龍、岡本巖：  
N-チエニル型およびN-アズレニル型芳香族アミドの立体構造特性 第29回基礎有機化学  
討論会（東京）平成30年9月

(3) 出版物

なし

|           |                                              |       |         |     |
|-----------|----------------------------------------------|-------|---------|-----|
| 学 校 名     | 東 海 大 学                                      | 研究所名等 | 共 同 研 究 |     |
| 研 究 課 題   | がん幹細胞を標的とした革新的がん治療法の確立<br>ーがん幹細胞の治療高感受性化の実現ー |       | 研 究 分 野 | 医 学 |
| キ ー ワ ー ド | ①がん幹細胞 ②白血病 ③分子標的薬 ④幹細胞動態制御                  |       |         |     |

○研究代表者

| 氏 名   | 所 属   | 職 名   | 役 割 分 担            |
|-------|-------|-------|--------------------|
| 八 幡 崇 | 医 学 部 | 准 教 授 | がん幹細胞の性状解析と研究全体の総括 |

○研究分担者

| 氏 名     | 所 属       | 職 名 | 役 割 分 担              |
|---------|-----------|-----|----------------------|
| 安 藤 潔   | 医 学 部     | 教 授 | 白血病の臨床試験と患者検体を利用した解析 |
| 平 山 令 明 | 先進生命科学研究所 | 教 授 | PAI-1阻害剤の最適化と適応拡大    |
| 穂 積 勝 人 | 医 学 部     | 教 授 | がん幹細胞生体モデルの作製        |
|         |           |     |                      |
|         |           |     |                      |
|         |           |     |                      |
|         |           |     |                      |
|         |           |     |                      |
|         |           |     |                      |
|         |           |     |                      |

# がん幹細胞を標的とした革新的がん治療法の確立 ーがん幹細胞の治療高感受性化の実現ー

## 1. 研究の目的

白血病幹細胞はがんの発症起点であり、供給源でもある。抗がん剤は、活動的ながん細胞には作用するが、静止状態にあるがん幹細胞には効果が薄い。つまり、治療によってがん細胞が現在の技術では検出限界以下に至った場合でも、治療抵抗性白血病幹細胞が極僅かに残存してしまうことが再発の原因であり、完治を困難にしている最大の要因である。この幹細胞の静止状態は、ニッチと呼ばれる細胞との緊密な接着により誘導される。したがって、もしがん幹細胞をニッチから離脱させ静止状態を解除できれば、抗がん剤に対する治療抵抗性が減弱し『高感受性化』するので、がん幹細胞の完全な排除を実現する理想的な治療法が確立することが期待出来る。

研究代表者らは、ニッチ因子である TGF- $\beta$  が幹細胞の PAI-1 発現を強力に誘導すること、そしてその PAI-1 が幹細胞に運動能を付与する因子である膜型メタロプロテアーゼ (MT1-MMP) の活性を抑制するため、幹細胞の運動能が制限されることを明らかにした。すなわち、ニッチから離脱しないように幹細胞を繋ぎ止めている主要な因子は PAI-1 であることを突き止めた (Blood, 2017)。本研究は、TGF- $\beta$  が誘導する PAI-1 によって白血病幹細胞がニッチに留まることが治療抵抗性の根本原因であるという仮説に基づき『ニッチからの離脱によるがん幹細胞の治療高感受性化』によりがんの撲滅を実現する斬新で独創的ながん治療コンセプトの確立を目指す。

## 2. 研究の計画

研究代表者らのこれまでの解析から、『PAI-1 阻害剤によりがん幹細胞の運動能が高まり、ニッチからの離脱を促進する。このことにより抗がん剤に対する感受性が高まる』という仮説が成り立つ可能性が高い。そこで、がん幹細胞をニッチに静止させ、抗がん剤が効きにくくする根本原因が PAI-1 であることを *in vitro*, *in vivo* の実験系で実証し、PAI-1 阻害剤の分子レベルでの作用機序を明確にすることを目指して、以下にあげる (1) ~ (3) の課題に取り組んだ。

- (1) ニッチ因子 (TGF- $\beta$ ) によるがん幹細胞の PAI-1 発現誘導メカニズムの解明
- (2) PAI-1 によるがん幹細胞の運動性制御メカニズムの解明
- (3) PAI-1 阻害剤によってがん幹細胞がニッチから離脱することの実証

## 3. 研究の成果

- (1) ニッチ因子 (TGF- $\beta$ ) によるがん幹細胞の PAI-1 発現誘導メカニズムの解明
  - ① TGF- $\beta$  はがん幹細胞の治療抵抗性獲得に重要な分子であり、PAI-1 発現を強力に誘導する。TGF-Smad 阻害剤をマウスに投与したところ、PAI-1 が低下し、抗がん剤抵抗性が減弱することを確認した。すなわち、がん幹細胞における PAI-1 の高発現が TGF-Smad シグナル依存的であることを明確にした。
- (2) PAI-1 によるがん幹細胞の運動性制御メカニズムの解明
  - ① PAI-1 の発現量の異なる白血病細胞を作製し、PAI-1 発現量の多寡によって MT1-MMP などの運動性制御因子の発現が制御されていることを確認した。

(3) PAI-1 阻害剤によってがん幹細胞がニッチから離脱することの実証

- ①PAI-1 を高発現あるいは欠損した白血病細胞の抗がん剤抵抗性を検討したところ、PAI-1 高発現型の白血病細胞は治療抵抗性であることを見出した。すなわち、PAI-1 によって抗がん剤に対する抵抗性が制御されていることを確認した。
- ①PAI-1 阻害剤を投与するとがん幹細胞がニッチから離脱することを実証した。

#### 4. 研究の反省・考察

幹細胞は、細胞分裂による機能低下を防ぐために増殖しないように保護されている。その保護作用の基盤がニッチとの相互作用である。現在、幹細胞の静止状態に関しては、細胞が増殖しない仕組みにのみ焦点を当てた研究が先行しており、本研究で着目する幹細胞の動きそのものという視点が全く欠如している。ニッチとの相互作用が幹細胞の保護作用の根幹であるからには、幹細胞がニッチから離脱しないように留めておく仕組みの解明が、がんの撲滅を実現するための重要な課題である。本研究の遂行により、がん幹細胞がニッチに静止するメカニズムを明らかにすることができた。PAI-1 阻害剤のがん治療への適用に向けた理論的基盤が確立しただけでなく、全く新しい研究領域を切り拓く知見が得られたことは大きな成果であると言える。

#### 5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①Higuchi H, Yamakawa N, Imadome KI, Yahata T, Kotaki R, Ogata J, Kakizaki M, Fujita K, Lu J, Yokoyama K, Okuyama K, Sato A, Takamatsu M, Kurosaki N, Alba SM, Azhim A, Horie R, Watanabe T, Kitamura T, Ando K, Kashiwagi T, Matsui T, Okamoto A, Handa H, Kuroda M, Nakamura N, Kotani A. Role of exosomes as a proinflammatory mediator in the development of EBV-associated lymphoma. *Blood*. 2018;131(23):2552-2567.

(2) 口頭発表

- ①八幡 崇「PAI-1 阻害薬の臨床応用に向けて」第13回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム 2019年2月
- ②八幡 崇「PAI-1 活性の阻害による慢性骨髄性白血病幹細胞の治療高感受性化」第80回日本血液学会学術集会 2019年10月
- ③八幡 崇「Blockade of PAI-1 activity increases therapeutic susceptibility of Leukemic stem cells」The 16th Stem Cell Research Symposium 2018年6月

(3) 出版物

なし

|           |                                                          |       |             |
|-----------|----------------------------------------------------------|-------|-------------|
| 学 校 名     | 日 本 大 学                                                  | 研究所名等 | 薬 学 研 究 所   |
| 研 究 課 題   | 糖尿病発症の新たな責任分子としての脂肪組織ダイオキシン受容体<br>—分子基盤の解明と新規糖尿病治療薬への展開— |       | 研究分野<br>医 学 |
| キ ー ワ ー ド | ①ダイオキシン ②糖尿病 ③脂肪細胞                                       |       |             |

○研究代表者

| 氏 名     | 所 属   | 職 名 | 役 割 分 担      |
|---------|-------|-----|--------------|
| 榛 葉 繁 紀 | 薬 学 部 | 教 授 | 総括、マウスの管理・解析 |

○研究分担者

| 氏 名     | 所 属   | 職 名   | 役 割 分 担    |
|---------|-------|-------|------------|
| 内 山 武 人 | 薬 学 部 | 教 授   | リガンドの合成、分析 |
| 和 田 平   | 薬 学 部 | 准 教 授 | マウスの解析     |
|         |       |       |            |
|         |       |       |            |
|         |       |       |            |
|         |       |       |            |
|         |       |       |            |
|         |       |       |            |
|         |       |       |            |
|         |       |       |            |

# 糖尿病発症の新たな責任分子としての 脂肪組織ダイオキシン受容体 — 分子基盤の解明と新規糖尿病治療薬への展開 —

## 1. 研究の目的

### (1) 背景

戦後のわが国におけるライフスタイルの変化は糖尿病をはじめとする生活習慣病の患者数の増加を招いており、その制圧は喫緊の課題であるといえる。糖尿病への罹患要因として、食事性脂肪の過剰摂取や運動不足などが挙げられるが、ダイオキシン類などの内分泌かく乱物質への曝露もそのひとつである。現在、わが国においてダイオキシン類の排出レベルは減少し、高濃度曝露とその急性毒性が問題となる可能性は少ない。しかしながら、近年の国内外における多くの疫学研究によりダイオキシン類に対して職業曝露あるいは事故曝露などが無い一般住民においても体内に微量のダイオキシン類が存在すること、そしてその血中レベルと糖尿病発症との間に正の相関が存在することが示されている。

生体内に取込まれたダイオキシン類は、主に脂肪細胞に貯蔵される。脂肪細胞は、単に過剰な脂溶性物質の貯蔵の場ではなく、様々な生理活性物質の産生・分泌を介して全身の代謝調節を行う。そしてその機能変化がインスリン抵抗性を誘発し、糖尿病の発症へとつながる。細胞内においてダイオキシン類は、その特異的受容体 Ah レセプター(AhR)と結合して毒性の多くを発現する。したがって脂肪組織における AhR の機能解析は、ダイオキシン類の慢性毒性発現機構の解明への主たる戦略である。

以上をふまえ我々は、脂肪細胞特異的 AhR KO(A-AhR)マウスを確立した。本マウスの使用により従来成し得なかった極微量ダイオキシン類の慢性曝露による脂肪細胞の機能かく乱とそれに起因した疾病の発症メカニズム解析を行うことが可能となった。例えば高脂肪食下において飼育した本マウスに対してグルコース負荷試験並びにインスリン負荷試験を課したところ、顕著な耐糖能並びにインスリン感受性の亢進を示した。この結果は、全身の耐糖能並びにインスリン感受性が脂肪細胞における AhR 遺伝子の有無により変化することを示している。すなわち疫学的に示されてきた「極微量ダイオキシンの持続的な曝露による慢性毒性としての II 型糖尿病」において、脂肪細胞 AhR が発症の責任分子であることが強く示唆された。

### (2) 研究期間内に、何をどこまで明らかにしようとするのか

本研究では、脂肪細胞特異的に AhR を欠損したマウスの病的、病態生化学的並びに分子生物学的な解析を通じて、インスリン感受性の制御に関連した脂肪細胞機能（他臓器とのクロストークを含む）の AhR による調節を明らかにする。さらにはこれらの知見を基に AhR アンタゴニストの糖尿病治療・改善薬としての可能性を検証する。

以上の検討により得られた知見は、極微量ダイオキシンの持続的曝露の影響並びに糖尿病の発症といった 2 つの社会的問題の解決において科学的な基盤を提供するものである。

## 2. 研究の計画

### (1) 脂肪組織における炎症関連イベントの解析

肥満に伴い脂肪組織に免疫担当細胞が浸潤し炎症が惹起される。この脂肪組織における炎症により脂肪酸、サイトカイン、活性酸素等が産生・分泌され全身の耐糖能を低下させる。一方、リガンド投与による AhR の活性化は炎症の進行を促すことが多く報告されている (Stockinger et al. *Annu Rev Immunol.* 2014; Hanieh. *Biomed Res Int.* 2014)。前年度に遂行した病理学的解析において、A-AhR KO マウス脂肪組織への免疫担当細胞の浸潤に変化が認められた。さらに各組織の生化学的解析により脂肪組織がインスリン感受性亢進の責任臓器であると同定された。したがって平成 30 年度は以下の検討から脂肪組織における炎症関連イベン

トを解析する。

- ① 脂肪組織中におけるケモカインならびに炎症性サイトカインの遺伝子発現量を測定する。差異が認められた因子に関しては、組織中ならびに血中におけるレベルを ELISA により測定する。
  - ② 炎症性サイトカイン類の発現ならびにシグナル伝達の多くは NF- $\kappa$ B により媒介される。また NF- $\kappa$ B は AhR と直接的な相互作用を示すことが知られている。そこで、①においてサイトカイン量に違いが認められたならば、脂肪組織中抽出液を調製し、それを用いて NF- $\kappa$ B 活性（特異的 DNA 結合活性）を測定する。また NF- $\kappa$ B はリン酸化により活性制御を受けるため、リン酸化の程度ならびにタンパク質レベルでの量的変動を解析する。
- (2) 脂肪組織における活性酸素産生酵素の解析
- ① 脂肪細胞における NADPH oxidase の活性化は活性酸素種の産生が亢進させ、酸化ストレスの増大を介してインスリン抵抗性発症に深く関与している。そこで、精巣上体周囲脂肪組織における NADPH oxidase 活性を測定する。活性に差異があった場合は、各酵素のサブユニットに関して、発現量を解析する。

### 3. 研究の成果

(1) A-AhR KO マウス脂肪組織における炎症関連イベントの解析

- ① 高脂肪食を与えたマウスの精巣上体周囲脂肪組織における炎症性サイトカイン及び抗炎症性サイトカインの遺伝子発現量を解析した結果、A-AhR KO マウスにおいて一連の炎症性サイトカイン、特にインターロイキン(IL-)6 の発現量の有意な低下が示された。この IL-6 発現量の低下は、ELISA によりタンパク質レベルにおいても確認された。一方、抗炎症性サイトカイン IL-10 の A-AhR KO マウスにおける増加が示された。また、高脂肪食を与えた A-AhR KO マウスにおいて、マクロファージのマーカーである F4/80 遺伝子の発現量及び M2 マクロファージのマーカー（CD163）の遺伝子発現量はコントロールマウスと比較して低値を示した。これらの結果から、A-AhR KO マウスで見られた免疫担当細胞の浸潤減少は、M1/M2 マクロファージのバランスの変化よりも、マクロファージの数あるいは活性化によることが推察された。糖および脂質代謝を改善するサイトカイン Fgf21 およびグルコーストランスポーター4 の発現も合わせて解析したが、A-AhR KO マウスとコントロールマウスの間に違いは認められなかった。
- ② 炎症性サイトカイン類のシグナル伝達の多くは NF- $\kappa$ B により媒介される。また NF- $\kappa$ B は AhR と直接的な相互作用を示すことが知られている。そこで、脂肪組織中における NF- $\kappa$ B の活性（特異的 DNA 結合活性）、リン酸化の程度ならびにタンパク質レベルでの量的変動を解析した。リン酸化 p65 は高脂肪食を負荷した群にのみ発現が確認された。さらに、A-AhR KO マウスにおける発現量はコントロールマウスのそれと比較して減少傾向が見られた。一方、高脂肪食を負荷した両群の IR $\beta$  の発現量に差は認められなかった。また NF- $\kappa$ B 活性に関しては、両マウス間で差異は認められなかった。

(2) A-AhR KO マウス脂肪組織における活性酸素産生酵素の解析

- ① 高脂肪食を負荷した A-AhR KO マウスの精巣上体周囲脂肪組織における NADPH oxidase 活性を検討した。その結果、高脂肪食あるいは通常食下のいずれの場合においても両マウス間で違いは認められなかった。

### 4. 研究の反省・考察

昨年度の検討により、高脂肪食下で飼育した A-AhR KO マウスは、コントロールマウスと比較して良好な耐糖能及びインスリン感受性を示すこと、そして脂肪組織におけるマクロファージ浸潤の低下が認められた。本年度の検討により A-AhR KO マウス脂肪組織では、NF- $\kappa$ B の量あるいは活性に変化が見られないものの炎症性サイトカイン量の減少と抗炎症性サイトカインの増加が見られた。これらの結果より、AhR は、炎症性サイトカイン及び抗炎症性サイトカインの発現を NF- $\kappa$ B を介さずに直接的に制御することで炎症を惹起し、その結果、インスリン抵抗性を誘発する可能性が示唆された。

## 5. 研究発表

(1) 学会誌等

なし

(2) 口頭発表

① 和田 平、斎藤 賢宏、榛葉 繁紀「肝臓AhRによるコレステロール排泄制御機構」日本薬学会第139年会 2019/03/23

(3) 出版物

なし

|           |                                                                       |       |             |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------|-------|-------------|
| 学 校 名     | 日 本 医 科 大 学                                                           | 研究所名等 | 共 同 研 究     |
| 研 究 課 題   | 非コードRNAを分子基盤とした包括的がん治療戦略の開発<br>－がんと共生に向けた治療シーケンス探索－                   |       | 研究分野<br>医 学 |
| キ ー ワ ー ド | ①がん ②非コードRNA ③治療シーケンス ④がん性疼痛 ⑤分子標的薬<br>⑥免疫チェックポイント阻害薬 ⑦ウイルスベクター ⑧薬剤耐性 |       |             |

○研究代表者

| 氏 名     | 所 属      | 職 名   | 役 割 分 担                          |
|---------|----------|-------|----------------------------------|
| 鈴 木 秀 典 | 大学院医学研究科 | 大学院教授 | がん医療における疼痛緩和におけるncRNAの役割と治療戦略の開発 |

○研究分担者

| 氏 名     | 所 属      | 職 名             | 役 割 分 担                     |
|---------|----------|-----------------|-----------------------------|
| 清 家 正 博 | 大学院医学研究科 | 大学院教授代行         | 薬剤選択・薬剤耐性化における機能性ncRNAの役割解明 |
| 瀧 澤 俊 広 | 大学院医学研究科 | 大学院教授           | がん浸潤・転移制御lncRNAの同定と機能解析     |
| 岡 田 尚 巳 | 大学院医学研究科 | 令和元年<br>6月30日退職 | ベクター構築と機能検証                 |
| 岩 井 佳 子 | 大学院医学研究科 | 大学院教授           | 免疫チェックポイント阻害薬感受性決定因子の探索     |
|         |          |                 |                             |
|         |          |                 |                             |
|         |          |                 |                             |
|         |          |                 |                             |
|         |          |                 |                             |
|         |          |                 |                             |
|         |          |                 |                             |

# 非コード RNA を分子基盤とした包括的がん治療戦略の開発 —がんとの共生に向けた治療シーケンス探索—

## 1. 研究の目的

がんによる死亡は依然死因のトップであり、その克服は医療上の最大の課題である。近年、がん薬物治療に劇的なパラダイムシフトが起きている。様々な分子標的治療薬が開発され、さらにニボルマブ（抗 PD-1 抗体）に代表される免疫チェックポイント阻害薬が加わった。これらは従来の薬物で有効性が得られなかった一群の患者に著明な効果をもたらしている。しかしながら、こうした新規治療薬の使用選択に関する生物学的基盤あるいは特異的な副作用発症機構とその予防については十分な知見が得られていない。また、がん医療の向上に伴いがん共生する期間が長くなり、薬剤耐性化に伴う再発・進行の解明と克服、がん疼痛の緩和対策も問題となっている。すなわち、新規薬物を含む新たな治療シーケンスの確立においては、患者の状態の向上・維持に力点を置いた包括的ながん基盤研究が喫緊の課題である。一方、従来はジャンクとみなされていたタンパク質をコードしていない非コード RNA (ncRNA)、特に短鎖 ncRNA である microRNA (miRNA) と長鎖 ncRNA (lncRNA) の重要性が明らかにされつつあり、革新的な医療への応用が期待されている。

このような背景に基づいて、本研究ではがんの浸潤や転移、薬剤耐性、薬剤障害に共通する機能、すなわちがん細胞の形質変化に関与する ncRNA の細胞生物学的機能を包括的に検討することを目的とした。

## 2. 研究の計画

### (1) がん浸潤・転移を制御している機能性 ncRNA の解明

本学で保有するがん症例における再発時再生検体バンク (Re-biopsy Bank) を活用し、肝胆道系・泌尿器系がんを中心に RNA シーケンス解析 (RNA-Seq) を行う。同定した lncRNA について、がん細胞株を用いて CRISPR-Cas9 法で lncRNA を発現抑制および過剰発現させ、細胞浸潤アッセイを行い、がん浸潤を促進・抑制する lncRNA の同定および下流がん浸潤シグナル経路の変動を検証する。

### (2) 薬剤選択・薬剤耐性化における機能性 ncRNA の解明

これまでに樹立した分子標的薬耐性肺癌細胞株とこれらの親株を用いて、分子標的薬耐性関連 lncRNA 候補を網羅的に同定する。

### (3) 免疫チェックポイント阻害薬 (ICI) 感受性決定因子の探索

PD-1 結合能を有する可溶性 PD-L1 (bsPD-L1) を検出する新規 ELISA システムを開発し、肺癌患者検体を中心に bsPD-L1 を測定し、予後や ICI に対する治療効果および副作用との関連について検討を行う。

### (4) がんに関連する神経障害性疼痛の解明

抗がん薬誘発性の神経障害性疼痛モデル動物を用いて、疼痛の発症および維持に関わる一次感覚神経中の lncRNA を RNA-seq により網羅的にスクリーニングし、疼痛との関連を調べる。

### (5) lncRNA の機能解析・治療応用に向けたベクター開発

lncRNA は通常行われる遺伝子導入による強制発現では厳密な全長塩基配列の発現誘導は困難であり、RNA 干渉による発現抑制もしばしば有効でないため、lncRNA 機能スクリーニングに適した CRISPR 搭載ベクターシステムの開発・作製を行う。

## 3. 研究の成果

### (1) がん浸潤・転移を制御している機能性 ncRNA の解明

① 消化器外科学分野と連携し、胆嚢癌症例の RNA-Seq データをバイオインフォマティクス解析し、癌部で有意に変動した ncRNA (miR-192、MEG3 など) を見出した (論文投稿準備中)。

② 男性生殖器・泌尿器科学分野と連携し、転移性前立腺癌に関与する ncRNA の同定と機能解析を行い、骨転移特異的に過剰発現している lncRNA として、HOX クラスターから発現する HOX-AS lncRNA を見出した。HOX-AS の前立腺癌浸潤促進作用を明らかにし、HOX-AS に

よって直接制御される遺伝子、およびその上流で働いている、前立腺癌で発現が高い転写因子を同定した（論文投稿準備中）。

(2) 薬剤選択・薬剤耐性化における機能性 ncRNA の解明

EGFR阻害剤、ALK阻害剤、MET 阻害剤に対する分子標的薬耐性肺癌細胞株を用いて、薬剤耐性に関与するncRNA (miR-200 family) を明らかにするとともに(Nakamichi S et al. Oncotarget, 2018; Takahashi A et al. Sci Rep, 2018)、網羅的lncRNAプロファイリングによって、分子標的薬耐性に共通に関与するlncRNAとしてCRNDEとDGCR5を同定した。さらに、バイオインフォマティクス解析によって、CRNDEパートナー蛋白質としてIRX5を同定した。IRX5は耐性細胞株において有意に発現が上昇していた。耐性細胞株においてCRNDEを抑制するとIRX5発現が低下し、IRX5の抑制によってアポトーシスが誘導された。すなわち、CRNDE-IRX5経路は、耐性克服に向けた新規治療標的となることを明らかにした。

(3) ICI 感受性決定因子の探索

血中に存在する可溶性PD-L1 (soluble PD-L1: sPD-L1) に着目して、PD-1受容体に対する結合能をもったbsPD-L1を検出する新規ELISAシステムを開発した。この新型ELISAを用いて、非小細胞肺癌患者血漿75検体についてbsPD-L1を測定したところ、新型ELISAは従来型ELISAに比べて検出頻度およびシグナル強度が著しく増強し、非小細胞肺癌患者29検体(38.6%)でbsPD-L1が検出された。現在、ICIを投与した肺癌患者血液検体を用いて、治療効果予測におけるbsPD-L1の有用性について検討中であり、有望な結果が得られつつある。

(4) がんに関連する神経障害性疼痛の解明

末梢神経障害を誘発する抗がん薬による神経障害性疼痛モデル動物を用いて、後根神経節における遺伝子発現変化をRNA-seqにより網羅的に捉え、疼痛発症への寄与が考えられるmRNAおよびlncRNAを同定した。さらにバイオインフォマティクスを用いて、これらの遺伝子変化の誘導に関わるシグナル経路を推測し、疼痛治療の標的となりうることを見出した。

(5) lncRNA の機能解析・治療応用に向けたベクター開発

In vivoで使用可能なlncRNA解析用CRISPR搭載ベクターの開発に向けて、無毒化したヘルペスウイルス (HSV) にCRISPR interference (CRISPRi) システムを組み込んだ新規ベクターを開発した。同ベクターの機能性評価を進めるとともに、増幅・精製系を構築し、各研究班に供給する準備を整えた。また、アデノ随伴ウイルス (AAV) のキャプシドに機能性核酸を効率的にパッケージングする技術を考案し(特願2017-014461号)、現在、本システムを用いてがん細胞に機能性核酸を導入する条件検討を進めている。

## 4. 研究の反省・考察

(1) がん浸潤・転移を制御している機能性 ncRNA の解明

前立腺癌の骨転移を制御しているncRNA (HOX-AS lncRNA) を見出すことができたが、個体レベルにおける機能解析およびncRNAを介した癌転移治療薬開発の基盤解析が課題として残された。

(2) 薬剤選択・薬剤耐性化における機能性 ncRNA の解明

今後、Re-biopsy Bankで収集した分子標的薬治療歴のある再生検検体を用いてCRNDEとIRX5の発現を検証する。さらに、CRNDEとIRX5に対する阻害剤をスクリーニングし、in vivoで耐性克服法を検討し、新規治療法開発に繋げていく予定である。一方、ROS-1阻害剤、RET阻害剤に対する肺癌細胞株の樹立には現時点では至っておらず、耐性株樹立に向けて研究を継続中である。

(3) ICI 感受性決定因子の探索

開発したbsPD-L1測定キットについては、2件の特許申請を行った。診断薬の実用化を目指して知的財産権獲得を優先したため、研究成果の公表に制限があり、下記の発表にとどまった。現在、治療効果予測におけるbsPD-L1の有用性について患者血液検体で検討している。

(4) がんに関連する神経障害性疼痛の解明

抗がん薬誘発性神経障害性疼痛の発症に関わるシグナル経路を同定し、治療標的となりうることを見出した。しかしながら、疼痛発症における本シグナル経路の役割は未だ不明であり、今後解明していく必要がある。

(5) lncRNA の機能解析・治療応用に向けたベクター開発

CRISPRiシステムのin vivo遺伝子導入系として無毒化HSVを用いた系を確立した。しかし

無毒化のための遺伝子改変により、生産性が低下しているため、本ベクターの安定的な供給には、効率的かつ大量に生産する技術の開発が今後必要である。AAVに関しては、機能性核酸を封入したAAVキャプシドは組織指向性のある新規の医療用担体として期待されるため、実用化に向けて生体内挙動を検討していく。

## 5. 研究発表

### (1) 学会誌等

- ① Nakamichi S, Seike M, Miyanaga A, Chiba M, Zou F, Takahashi A, Ishikawa A, Kunugi S, Noro R, Kubota K, Gemma A. Overcoming drug-tolerant cancer cell subpopulations showing AXL activation and epithelial-mesenchymal transition is critical in conquering ALK-positive lung cancer. *Oncotarget*. 2018;9:27242-27255.
- ② Takahashi A, Seike M, Chiba M, Takahashi S, Nakamichi S, Matsumoto M, Takeuchi S, Minegishi Y, Noro R, Kunugi S, Kubota K, Gemma A. Ankyrin repeat domain 1 overexpression is associated with common resistance to afatinib and osimertinib in EGFR-mutant lung cancer. *Sci Rep*. 2018;8:14896.
- ③ Takeuchi M, Doi T, Obayashi K, Hirai A, Yoneda K, Tanaka F, Iwai Y. Soluble PD-L1 with PD-1-binding capacity exists in the plasma of patients with non-small cell lung cancer. *Immunol Lett*. 2018;196:155-160.
- ④ Tomono T, Hirai Y, Okada H, Miyagawa Y, Adachi K, Sakamoto S, Kawano Y, Chono H, Mineno J, Ishii A, Shimada T, Onodera M, Tamaoka A, and Okada T. Highly efficient ultracentrifugation-free chromatographic purification of recombinant AAV serotype 9 (rAAV9). *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2018;11:180-190.
- ⑤ Nito C, Sowa K, Nakajima M, Nakamoto Y, Suda S, Nishiyama Y, Nakamura-Takahashi A, Nitahara-Kasahara Y, Ueda M, Okada T, Kimura K. Transplantation of human dental pulp stem cells ameliorates brain damage following acute cerebral ischemia. *Biomed Pharmacother*. 2018;108:1005-1014.
- ⑥ Ikeue R, Nakamura-Takahashi A, Nitahara-Kasahara Y, Watanabe A, Muramatsu T, Sato T, Okada T. Bone-targeted alkaline phosphatase treatment of mandibular bone and teeth in lethal hypophosphatasia via an scAAV8 vector. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2018; 10:361-370.
- ⑦ Sowa K, Nito C, Nakajima M, Suda S, Nishiyama Y, Sakamoto Y, Nitahara-Kasahara Y, Nakamura-Takahashi A, Ueda M, Kimura K, Okada T. Impact of dental pulp stem cells overexpressing hepatocyte growth factor after cerebral ischemia/reperfusion in rats. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2018;10:281-290.
- ⑧ Nakajima M, Suda S, Sowa K, Sakamoto Y, Nito C, Nishiyama Y, Aoki J, Ueda M, Yokobori S, Yamada M, Yokota H, Okada T, Kimura K. AMPA receptor antagonist perampanel ameliorates post-stroke functional and cognitive impairments. *Neuroscience*. 2018; 386:256-264.
- ⑨ Zhang B, Nakata M, Lu M, Nakae J, Okada T, Ogawa W, Yada T. Protective role of AgRP neuron's PDK1 against salt-induced hypertension. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018; 500:910-916.
- ⑩ Yoshizawa T, Mizumoto S, Takahashi Y, Shimada S, Sugahara K, Nakayama J, Takeda S, Nomura Y, Nitahara-Kasahara Y, Okada T, Matsumoto K, Yamada S, Kosho T. Vascular abnormalities in the placenta of *Chst14*<sup>-/-</sup> fetuses: implications in the pathophysiology of perinatal lethality of the murine model and vascular lesions in human *CHST14*/*D4ST1* deficiency. *Glycobiology*. 2018;28:80-89.
- ⑪ Iwasaki Y, Sendo M, Dezaki K, Hira T, Sato T, Nakata M, Goswami C, Aoki R, Arai T, Kumari P, Hayakawa M, Masuda C, Okada T, Hara H, Drucker DJ, Yamada Y, Tokuda M, Yada T. GLP-1 release and vagal afferent activation mediate the beneficial metabolic and chronotherapeutic effects of D-allulose. *Nat Commun*. 2018;9:113.
- ⑫ 坂井 敦、鈴木 秀典. microRNAクラスターmiR-17-92による神経障害性疼痛の制御. *生化学*. 2018;90:524-528.

- ⑬Iwasaki H, Sakai A, Maruyama M, Ito T, Sakamoto A, Suzuki H. Increased H19 long non-coding RNA expression in Schwann cells in the peripheral neuropathic pain. J Nippon Med Sch, in press.
- (2) 口頭発表
- ①高橋宏典、小古山学、石田洋一、大口昭英、瀧澤俊広、松原茂樹：WNT10BによるCD44を介した絨毛外栄養膜の浸潤促進、第70回日本産科婦人科学会学術講演会、2018年5月
- ②坂井敦、丸山基世、岡田尚巳、鈴木秀典：神経障害性疼痛モデルラットの一次感覚神経におけるNeat1長鎖非コードRNAの解析、第40回日本疼痛学会、2018年6月
- ③岡田尚巳：AAVベクターを用いた遺伝子治療、第34回日本DDS学会学術集会シンポジウム『遺伝子細胞治療に用いる DDS』、2018年6月
- ④Motoyo Maruyama, Atsushi Sakai, Takashi Okada, Hidenori Suzuki：Involvement of the long non-coding RNA Neat1 in the neuropathic pain and neurite outgrowth following nerve injury、18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018 Kyoto)、July 2018
- ⑤Atsushi Sakai, Fumihito Saitow, Motoyo Maruyama, Noriko Miyake, Koichi Miyake, Takashi Okada, Hidenori Suzuki：Role of miR-17-92 in the functional changes of primary sensory neurons following nerve injury、18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018 Kyoto)、July 2018
- ⑥丸山基世、坂井敦、福永津嵩、浜田道昭、岡田尚巳、鈴木秀典：神経障害性疼痛及び軸索再生に対するNeat1の関与、第20回日本RNA学会年会、2018年7月
- ⑦吉川明子、清家正博、高橋聡、中道真仁、菅野哲平、武内進、峯岸裕司、野呂林太郎、久保田馨、弦間昭彦：EGFR遺伝子変異を有する肺癌においてアファチニブ・オシメルチブの薬剤耐性とANKRD1過剰発現の関係、第16回日本臨床腫瘍学会学術集会、2018年7月
- ⑧Aya Misawa, Toshihiro Takizawa：Identification and functional analysis of lncRNAs in prostate cancer bone metastasis、第77回日本癌学会学術総会、2018年9月
- ⑨岡田尚巳：AAVベクターを用いた遺伝子治療とゲノム医療、第50回日本臨床分子形態学会総会シンポジウム『ゲノムで見える病態』、2018年9月
- ⑩宮川世志幸、丸山基世、黒田誠治、坂井敦、佐藤優里子、喜納裕美、山本基子、Justus B. Cohen、Joseph C. Glorioso、岡田尚巳：生体内における新規無毒化ヘルペスウイルスベクターの遺伝子発現特性・動態解析、第41回日本分子生物学会年会、2018年11月
- ⑪高橋宏典、小古山学、永山志穂、大口昭英、瀧澤俊広、松原茂樹：WNT10Bによる絨毛外栄養膜の浸潤促進、第33回日本生殖免疫学会総会・学術集会、2018年11月
- ⑫坂井敦、丸山基世、福永津嵩、浜田道昭、岡田尚巳、鈴木秀典：神経障害性疼痛における長鎖非コードRNA Neat1の作動機構の探索、生理学研究所 研究会「生体サバイバル戦略としての痛みの機構と意義」、2018年12月
- ⑬Nakamichi S, Seike M, Miyanaga A, Takahashi A, Noro R, Kubota K, Gemma A. Overcoming drug-tolerant cancer cell subpopulations showing AXL activation and epithelial-mesenchymal transition is critical in conquering ALK-positive lung cancer. 2019 AACR Annual Meeting, March 2019
- ⑭三沢彩、近藤幸尋、武井寛幸、瀧澤俊広：癌の骨転移に関与する lncRNA の分子解剖学的解析、第124回日本解剖学会総会・全国学術集会、2019年3月
- (3) 出版物
- ①瀧澤俊広：12章 受精、妊娠、出産におけるエクソソーム（医療を変えるエクソソーム [落谷孝広、吉岡祐亮（監修）]）、化学同人、2018;92-98.