

令和元年度医学部奨学賞・東北医学会奨学賞・医学部学生奨学賞

授与式並びに第 402 回東北医学会例会

日 時：令和 2 年 1 月 16 日（木）午後 1 時 00 分から

場 所：東北大学医学部大会議室（1 号館 2 階）

1 開 会

2 挨拶

3 審査報告

4 医学部奨学賞（金賞・銀賞）授与

【金賞受賞者】

虚血性心疾患における冠循環機能障害に関する研究

循環器内科 講師 高橋 潤

Keap1-Nrf2 システムによる生体機能制御機構の解明

医化学分野 講師 田口 恵子

肺構成細胞及び細胞外小胞の単離解析から迫る難治性呼吸器疾患の病態解明

呼吸器内科 助教 山田 充啓

【銀賞受賞者】

iPS 細胞を用いた筋萎縮性側索硬化症の軸索病態の解明

脳神経内科 助教 秋山 徹也

迷走神経-マクロファージ-肝細胞連関による肝臓再生メカニズムの解明

糖尿病代謝科 助教 井泉 知仁

TNF 受容体型補助刺激分子による炎症性免疫疾患の発症制御機構の解明

免疫学分野 助教 奥山 祐子

5 東北医学会奨学賞授与

【奨学賞 A 受賞者】

腸内細菌に着目した糖尿病性腎臓病の新規マーカーならびに治療法の研究

病態液性制御学分野 菊地 晃一

がん抑制分子 BRCA1 によるゲノム安定性の維持機構の解明

腫瘍生物学分野 吉野 優樹

腎臓エリスロポエチン産生制御機構の解明

分子血液学分野 平野 育生

【奨学賞 B 受賞者】

形質細胞様樹状細胞における TRAF5 の役割

免疫学分野 小林 周 平

肺高血圧症における呼気ガス分析を用いた新たな非侵襲的評価法の開発

内部障害学分野 木 村 三 奈

アルドステロン産生腺腫における 18-オキシコルチゾール産生機序と KCNJ5 体細胞性変異の影響

腎・高血圧・内分泌学分野 手 塚 雄 太

6 医学部学生奨学賞授与

【受賞者】

Hydrogel-Based Organic Subdural Electrode with High Conformability to Brain Surface

最優秀賞 5 年 織 部 峻太郎

細胞内 SAM 濃度レポーターに基づいたスクリーニング系による新規 MAT2A 阻害剤の同定

優秀賞 5 年 奈 良 和 樹

Beneficial Effects of Drug-eluting Stents With Bioabsorbable Polymer Coating on Coronary Hyperconstricting Responses and Adventitial Vasa Vasorum Formation in Patients With Angina Pectoris — An Intracoronary OCT Study —

優秀賞 5 年 光 石 清 人

CD45/CD326 Doubly-Positive Cells Exist in Non-Small Cell Lung Cancer : A Possible Predicting Factor for Patient Prognosis

優秀賞 4 年 山 中 美 慧

肺扁平上皮癌における S100A10 の高発現は予後不良と相関する

奨学賞 6 年 青 木 献 広

漢方エビデンスレポートからみえる漢方薬の臨床研究の現状と変遷

奨学賞 6 年 乙 竹 秀 明

機能画像を用いた高齢女性の骨密度低下とアルツハイマー型認知症の脳血流低下領域に関する研究

奨学賞 6 年 関 俊 樹

魚摂取量と認知症発生リスクの関連：大崎コホート 2006 研究

奨学賞 6年 鶴 蒔 望

糖代謝異常を有する妊婦と新生児出生体重に関する検討

奨学賞 6年 山 中 慎 也

Mechanisms of ABCB1 in Acquisition of Taxane Resistance in Cancer Cells

奨学賞 5年 伊 藤 一 真

膵神経内分泌腫瘍における SSTR2 および各種ホルモンの定量解析とその関係

奨学賞 4年 井 手 理 央 子

アルドステロン産生腺腫における KCNJ5 免疫組織学的評価方法の均霑化

奨学賞 4年 蛭 名 広 貴

2012 年から 2017 年の日本人原発性アルドステロン症手術例 125 の体細胞遺伝子変異の頻度と病理組織学的所見との相関関係

奨学賞 4年 小 野 寺 啓

Characteristics, behavior and role of biomarkers in metastatic triple-negative breast cancer

奨学賞 4年 後 藤 裕 太 郎

膵癌に対する術前補助療法後に遺残する腫瘍細胞の分子病理学的解析

奨学賞 4年 佐 藤 稔 久

東北大学病院における入院中患者に処方された漢方薬の調査報告

奨学賞 3年 菊 川 柚 奈

7 祝 辞

8 受賞者講演（金賞・銀賞）

9 閉 会

虚血性心疾患における冠循環機能障害に関する研究

高 橋 潤

東北大学大学院医学系研究科 循環器内科



はじめに

近年、胸痛精査のため冠動脈造影が施行された症例の40%ほどにおいては有意な器質的狭窄病変は認められず、心表面の太い冠動脈の機能的障害による冠攣縮性狭心症（VSA）や、冠微小循環の機能的・器質的障害を原因とする微小血管狭心症が原因であることが多い。特にわが国は、欧米に比較して冠攣縮の有病率が高いことが知られており、日本人の虚血性心疾患診療において冠攣縮は極めて重要な病態であるといえる。

本研究では現代におけるVSA患者の実態について疫学的検討を行う一方、カテラボにおいて一例ずつ包括的に冠動脈機能を評価し、虚血性心疾患における冠動脈機能異常の病態解明を試みた。

冠攣縮性狭心症の疫学（冠攣縮研究会 観察研究から得られたエビデンス）

冠攣縮研究会は、冠攣縮に関して基礎的、臨床的見地から最先端の研究を行うことを目的として、東北大学循環器内科下川宏明教授を代表として2006年4月に設立され、国内85施設、海外6施設が参加し、VSA患者の世界規模のレジストリー研究を行ってきた。筆者は事務局長として登録データを解析し、VSAの疫学的エビデンス確立に努めてきた。

後ろ向き観察研究に登録された1,429例のVSA症例うち、35例（2.4%）が院外心停止からの蘇生の既往を有していた。生存解析において、院外心停止既往例は5年間の複合心イベント発生率が非院外心停止例に比して著しく高率（28 vs. 8%, $P < 0.001$ ）であり、Cox 比例ハザードモデルによる多変量解析で、院外心停止の既往はVSAの有意な予後規定因子（ハザード比3.27；95%信頼区間1.37-7.85； $P < 0.01$ ）であることが初めて示された¹⁾。さらに「院外心停止の既往」とその他の予後規定因子である、「喫煙」、「安静時胸

痛」、「器質的有意狭窄」、「多枝攣縮」、「発作時ST上昇」、「β遮断薬の使用」の全7項目にそれぞれ重みづけを行い点数化し合計すると、その合計点が大きくなるほど将来心血管イベントを発生する可能性が高くなることが分かった（図1²⁾。この新たなリスクスコアはVSA診療の有用なツールとして今後実地臨床で広く使用されることが期待され、日本循環器学会ガイドラインにも記載されている。また、VSA患者における硝酸薬の長期予後に及ぼす影響をプロペンシティマッチング法、多変量Coxモデルを用いて検討した。プロペンシティマッチング前後で、硝酸薬使用群と非使用群に長期予後の差は認めなかったが、多変量Coxモデルでは、複数の硝酸薬使用が心イベント発生と有意に相関しており、特にニコランジルとニトログリセリンの併用が不良な予後と有意な関連を示した³⁾。その他、後ろ向き観察研究からは、冠攣縮誘発試験の検査所見及び不整脈合併症と予後との関係に関する検討と冠攣縮狭心症における性差の検討を行い論文発表した^{4,5)}。

後ろ向き観察研究に続けて行われた前向き登録研究では日本人1,460症例、欧米人201症例の合計1,661症例が登録され、前向きに追跡した。VSA患者の人種的な差異については未だ不明の点が多く、同じ診断基準で診断された欧米人患者と日本人患者の臨床像や長期予後を前向きに比較検討する研究はこれまでなく、非常に学術的意義の大きい研究といえる。日本人の胸痛発作出現時間は、冠攣縮性狭心症に特徴的な夜間から早朝にかけて多かったのに対し、欧米人の胸痛発作に好発時間は認められず、終日発作が断続的に発生する症例が多かった。治療薬に関しては日本人ではVSA治療の第一選択薬であるカルシウム拮抗薬が全症例の96%で使用されていたのに対し、欧米人では86%にとどまり、代わって硝酸薬やスタチン、ACE阻害薬、β遮断薬の処方率が高いという特徴が認められた。日本人に比して欧米人で冠攣縮発作による不安定狭心症入院や心臓死がより多く発生しており、前述した冠攣縮研究会（JCSA）リスクスコアは日本人のみならず欧米人においても長期予後を明確に予測した⁶⁾。

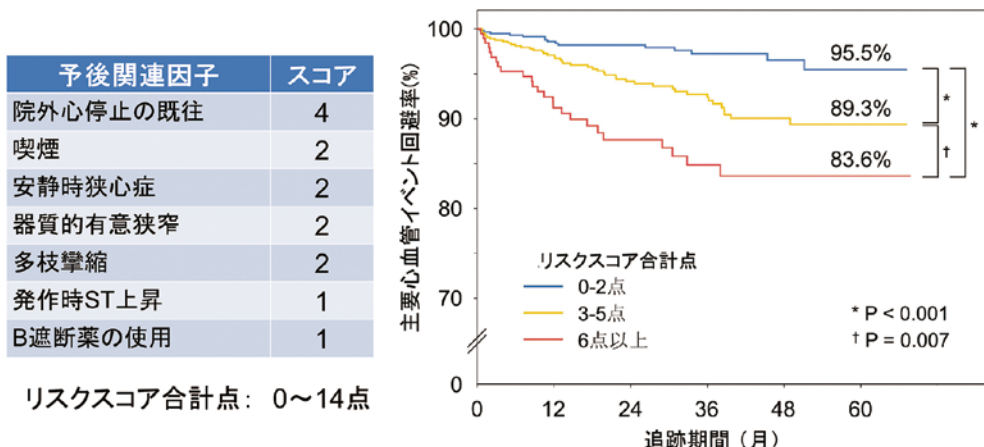


図 1. 冠攣縮研究会リスクスコア

冠攣縮と Rho キナーゼ活性

我々は冠攣縮発生のメカニズムとして血管平滑筋内の Rho-kinase 活性が極めて重要な役割を担っていることを基礎研究や臨床研究を通じて明らかにしてきた。さらに近年、末梢血白血球中 Rho-kinase 活性が VSA 患者では有意に亢進しており、VSA の診断に有用であることを報告した⁷⁾。また、VSA 患者で東日本大震災直後は Rho-kinase 活性の亢進が認められ、震災から 1 年後には震災前レベルまで改善した。震災前からの Rho-kinase 活性変化率は PTSD スコアと有意に相関があり、震災による心理的ストレスが Rho-kinase 活性を亢進させた可能性が示唆された⁸⁾。続いて末梢血白血球中 Rho-kinase 活性の日内変動について検討したところ、早朝に活性が亢進しており、冠攣縮の発作が早朝に発生しやすいという臨床的特徴との関与が示唆された⁹⁾。以上から末梢血白血球中 Rho-kinase 活性は、VSA の病勢診断マーカーとしても有用であるといえる。また、Rho-kinase 活性が高値である VSA 患者は、低値である患者や胸痛症候群患者と比較して、心血管イベントが有意に多く発生していた。さらに VSA 重症度指標となる JCSA リスクスコアに、この末梢白血球中 Rho-kinase 活性の測定結果を組み合わせることで、VSA 患者の予後を明確に層別できることを見出した¹⁰⁾。以上から、末梢白血球中 Rho-kinase 活性は、VSA の診断・疾患活動性評価・長期予後予測を可能にするバイオマーカーであることが明らかになった。

冠微小血管障害の重要性

近年、古典的な心筋虚血のメカニズム（動脈硬化性、冠攣縮）に加えて、冠微小循環障害が、虚血性心疾患に関連する第 3 の機序として注目されている。しかしながら、これまで微小血管狭心症に対して明確な診断方法は確立されておらず、我々は微小血管狭心症における診断バイオマーカーの探索を行った。狭心症が疑われ、冠動脈造影上有意狭窄を有さず冠動脈機能異常の関与を疑い、アセチルコリン負荷試験を施行した 198 症例を対象とした。我々はアセチルコリン負荷試験において、心表面冠動脈に有意な冠攣縮を認めないにも関わらず再現性のある胸部症状、虚血性心電図変化、そして心筋内乳酸産生によって心筋虚血が証明された症例を微小血管狭心症と診断し、対象となった 198 症例中 66 症例 (33%) が微小血管狭心症を有していた。我々は強力な血管収縮作用と血小板凝集作用を有する血管作用物質であるセロトニンに着目し、微小血管狭心症患者では血漿セロトニン濃度が有意に上昇していることを明らかにした¹¹⁾。また微小血管障害の臨床的な指標の一つである TIMI frame count とセロトニンの間にも有意な正の相関関係があることを明らかにし、さらに血漿セロトニン濃度 9.55 nmol/L 以上は微小血管狭心症の診断に有用であることを示した。

冠動脈機能異常には心表面冠動脈および冠微小血管の過収縮反応と拡張障害に大別されるが、これまでこれら 2 種類の機能異常を同一患者で包括的に評価した報告はほとんど無い。そこで我々は心臓表面冠動脈に狭窄や閉塞が見られなかった患者に対し、アセチルコ

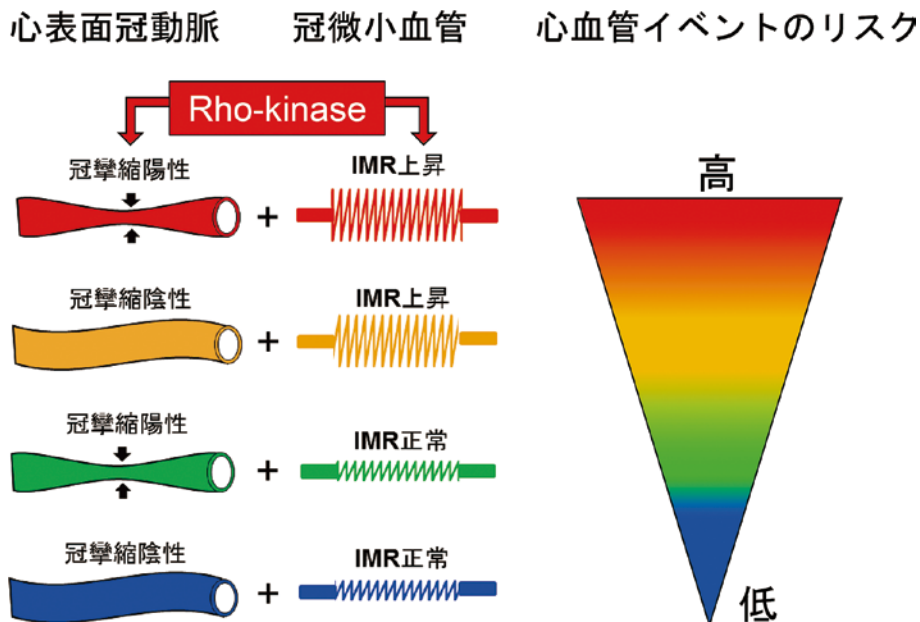


図 2. 冠動脈機能異常の包括的評価の重要性

リン負荷試験による心表面冠攣縮と微小血管攣縮などの過収縮反応の評価、冠血流予備能 (Coronary flow reserve, CFR) と微小血管抵抗指数 (Index of microcirculatory resistance, IMR) による拡張障害の評価を行い、長期予後との関連を検討した¹²⁾。合計 187 例が両方の検査を受け、うち 128 名 (68%) が VSA と診断された。冠動脈拡張障害の評価としては、CFR の低下が見られた症例が 66 名 (35%)、IMR の上昇が見られた症例が 70 名 (37%) であり、84 名 (45%) の症例では冠動脈機能異常のうち 2 つ以上を合併していた。また冠攣縮性狭心症の有無と IMR の高低から患者を 4 群に分けて長期治療経過を観察したところ、冠攣縮性狭心症と IMR 高値を合併した患者群は他の群と比較し、不安定狭心症発症や心臓死がより多く発症した (図 2)。さらに、選択的 Rho キナーゼ阻害薬であるファスジルを冠動脈内に投与すると、VSA と IMR 高値を合併した患者群において IMR が有意に改善し、VSA と IMR 高値の共通の機序として Rho キナーゼの活性化が関与していることが明らかになった。

おわりに

冠攣縮に関する疫学的検討と、1 症例ずつ丁寧にカテラボで病態を検討した臨床研究から我々が明らかにしたエビデンスを概説した。現在、我々は冠動脈機能

異常に造詣が深い世界の研究者らと国際共同研究チームを作り、冠微小血管狭心症患者の国際前向き登録研究を進めている。今後も冠攣縮・冠循環機能異常に関する新たなエビデンスを世界に向けて発信するべく、精進を重ねていきたい。

謝 辞

歴史ある東北大学医学部奨学賞金賞を授与いただき、心より感謝申し上げます。以上の研究の機会を与您にいただき、親身に指導して下さった下川宏明教授と、研究を共に遂行してくれた大学院生・同僚の先生方に心より御礼申し上げます。

文 献

- 1) Takagi, Y., Yasuda, S., Tsunoda, R., et al. (2011) Clinical characteristics and long-term prognosis of vasospastic angina patients who survived out-of-hospital cardiac arrest: multicenter registry study of the Japanese Coronary Spasm Association. *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.*, 4, 295-302.
- 2) Takagi, Y., Takahashi, J., Yasuda, S., et al. (2013) Prognostic stratification of patients with vasospastic angina: a comprehensive clinical risk score developed by the Japanese Coronary Spasm Association. *J. Am.*

- Coll. Cardiol.*, **62**, 1144-1153.
- 3) Takahashi, J., Nihei, T., Takagi, Y., et al. (2015) Prognostic impact of chronic nitrate therapy in patients with vasospastic angina : multicentre registry study of the Japanese coronary spasm association. *Eur. Heart J.*, **36**, 228-237.
 - 4) Takagi, Y., Yasuda, S., Takahashi, J., et al. (2013) Clinical implications of provocation tests for coronary artery spasm : safety, arrhythmic complications, and prognostic impact : Multicentre Registry Study of the Japanese Coronary Spasm Association. *Eur. Heart J.*, **34**, 258-267.
 - 5) Kawana, A., Takahashi, J., Takagi, Y., et al. (2013) Gender differences in the clinical characteristics and outcomes of patients with vasospastic angina. *Circ. J.*, **77**, 1267-1274.
 - 6) Sato, K., Takahashi, J., Odaka, Y., et al. (2019) Clinical characteristics and long-term prognosis of contemporary patients with vasospastic angina : Ethnic differences detected in an international comparative study. *Int. J. Cardiol.*, **291**, 13-18.
 - 7) Kikuchi, Y., Yasuda, S., Aizawa, K., et al. (2011) Enhanced Rho-kinase activity in circulating neutrophils of patients with vasospastic angina : a possible bio-marker for diagnosis and disease activity assessment. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **58**, 1231-1237.
 - 8) Nihei, T., Takahashi, J., Kikuchi, Y., et al. (2012) Enhanced Rho-kinase activity in patients with vasospastic angina after Great East Japan Earthquake. *Circ. J.*, **76**, 2892-2894.
 - 9) Nihei, T., Takahashi, J., Tsuburaya, R., et al. (2014) Circadian variation of Rho-kinase activity in circulating leukocytes of patients with vasospastic angina. *Circ. J.*, **78**, 1183-1190.
 - 10) Nihei, T., Takahashi, J., Hao, K., et al. (2018) Prognostic impacts of Rho-kinase activity in circulating leukocyte in patients with vasospastic angina. *Eur. Heart J.*, **39**, 952-959.
 - 11) Odaka, Y., Takahashi, J., Tsuburaya, R., et al. (2017) Plasma concentration of serotonin is a novel biomarker for coronary microvascular dysfunction in patients with suspected angina and unobstructive coronary arteries. *Eur. Heart J.*, **38**, 489-496.
 - 12) Suda, A., Takahashi, J., Hao, K., et al. (2019) Coronary functional abnormalities in patients with angina and non-obstructive coronary artery disease. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **74**, 2350-2360.

Keap1-Nrf2 システムによる生体機能制御機構の解明

田 口 恵 子

医学系研究科 医化学分野 准教授



はじめに

我々は日常さまざまな内因性・外因性ストレスに曝されている。一方で、それらに対する防御機能も保持している。これまでの 30 年に及ぶ研究から、Keap1-Nrf2 システムは生体防御機構のひとつとして、環境化学物質や活性酸素種による酸化還元バランスの攪乱に対して防御に働くことが分かってきた。本システムでは、Keap1 タンパク質が酸化ストレスを感知し、転写因子である Nrf2 を活性化して、多くの生体防御遺伝子群の発現を誘導する。これら分子の発見以来、Keap1-Nrf2 システムに関する論文は指数関数的に増加しているが、その大半は遺伝子改変マウスが貢献している。マウスは比較的発生工学の技術が容易であったために大きく発展し、様々な病態モデルが作製されてきた。一方で、マウスは身体が小さいため外科手術モデルなどに適さなかったり、代謝様式が異なるためにヒト病態を再現できない場合がある。昨今のゲノム編集技術の発展により、マウス以外の動物でも遺伝子改変が容易になったので、新たに遺伝子改変ラットを導入して、Keap1-Nrf2 システムの生体機能制御機構の解析に挑んだ。

1. Keap1-Nrf2 システム

Nrf2 は核内において小 Maf 群因子とヘテロ二量体を形成して CNC-sMaf 結合エレメント (CsMBE) に特異的に結合する転写因子である¹⁾。Nrf2 の下流遺伝子の産物には、NAD(P)H キノン酸化還元酵素 1 (Nqo1) に代表される解毒代謝酵素や抗酸化酵素が多く含まれているため、Nrf2 は生体防御に働く転写因子であるとみなされてきた。Nrf2 は通常、Cullin3 型ユビキチン E3 リガーゼのアダプター分子である Keap1 に結合し、26S プロテアソームにより細胞質において分解される。そのため、定常状態では Nrf2 の活性は低く保

たれ、その機能は最小限に抑えられている。この Keap1-Nrf2 システムの特徴は、Keap1 が酸化ストレスセンサー分子として機能して Nrf2 の活性を制御する点にある。つまり、Keap1 が有する反応性の高いシステイン残基が親電子性物質や酸化ストレスを感知して、Keap1-Nrf2 結合が減弱すると、分解を免れた Nrf2 タンパク質が安定化して核内に蓄積する。これにより Nrf2 は転写因子として下流遺伝子の発現を誘導して、生体防御機能を発揮する。親電子性物質や酸化ストレスによる Nrf2 の活性は一過的で、次第に定常状態へ戻る。一方で、Keap1 や Nrf2 の体性変異²⁾ や Keap1-Nrf2 結合の阻害タンパク質³⁾ が異常に蓄積した多くのがん細胞では、Nrf2 が恒常的に活性化して、がんの生育促進に寄与することが分かってきた⁴⁾。

2. Nrf2 欠失ラット：マウスでは解析できなかった肝毒性モデルの適用

まず初めに、ゲノム編集技術を用いて Nrf2 欠失ラットを作出した。Nrf2 誘導剤を投与した野生型ラットでは核内に Nrf2 が蓄積し、下流の遺伝子の発現が上昇するが、Nrf2 欠失ラットではこの応答が見られない⁵⁾。マウスと同様に、ラットにおいても定常状態における Nrf2 欠失は、生存には大きな影響を与えずに生育した。このような Nrf2 に関する制御機構ははすでにマウスで示されている結果と一致した。

ところで、アフラトキシン B1 (AFB1) は食品に付着したカビが産生する毒物で、ヒトの体内で代謝されたエポキシド体が DNA に結合して遺伝子変異を引き起こし、肝臓がんを引き起こす。AFB1 の解毒代謝経路には、主にグルタチオン S-転移酵素群 (GST) とアルド-ケト還元酵素群 (AKR) が関与する。マウスでは GST が高発現しているために AFB1 の解毒代謝が促進され、ヒトの肝臓がんを再現することができない。そのため、AFB1 肝臓がんモデルにはマウスではなくラットが用いられてきた。そこで、Nrf2 欠失ラットを用いて、マウスでは検証できない AFB1 の解毒代謝における Nrf2 の関与を調べた。Nrf2 欠失ラットは

AFB1 に対して脆弱で、野生型ラットでは毒性を發揮しない低濃度の AFB1 に対して致死性を示した⁵⁾。

さらに、古典的な Solt-Farber 肝臓がんモデルを改変した、発がんイニシエーター物質ジエチルニトロサミンとコリン-メチオニン欠乏食のモデルを Nrf2 欠失ラットに適用して、肝臓がんにおける Nrf2 の関与を調べた⁶⁾。この実験モデルでは、GSTP1 や γ -グルタミル転移酵素 (GGT) を前がん病変マーカーとしてよく利用する。GSTP1 や GGT は Nrf2 の標的遺伝子産物であるため、Nrf2 欠失ラットではがんは形成されないのか、もしくは Nrf2 欠失ラットではがんが形成されやすいのか、2つの仮説が考えられた。実験してみると、Nrf2 欠失ラットでは GSTP1 陽性の前がん病変は検出されず、野生型ラットではみられない線維化や肝再生を伴う肝硬変様の病態を示した。Nrf2 欠失細胞は AFB1 による毒性に対して脆弱で生存できない。がんを形成するためには Nrf2 を活性化させて環境に適応することが重要であると言えるだろう。

3. Keap1 欠失ラット：マウスでは顕在化しなかった新たな表現型の発見

Nrf2 欠失ラットに続いて作出した Keap1 欠失 (K0) ラットは、Keap1 欠失マウスでは顕在化しなかった黄疸の症状を示し、生後直後に死亡した。0 日齢の肝臓を調べてみると、驚くことに肝内胆管がまったく形成されていなかった。Keap1 欠失による Nrf2 の活性化がその原因であることを示すために、Keap1 と Nrf2 の二重欠失 (Keap1^{-/-} : Nrf2^{-/-}; K0N0) ラットを作出してみると、K0 ラットの表現型は回避できた。しかし、Nrf2 が部分活性化した、Keap1 欠失と Nrf2 ヘテロ二重欠失 (Keap1^{-/-} : Nrf2^{+/-}; K0N1) ラットの半数は 1 週齢のうちに黄疸を呈して死亡した。よって、K0 ラットにおける黄疸は Nrf2 の活性化に依存することを強く示唆している。また、K0 マウスには黄疸の症状はないので、ラットに特徴的な表現型である。

さらに、授乳期の致死を回避した K0N1 ラットは少なくとも 30 週齢まで生育したが、離乳前には成長遅延が明らかであった。8 週齢までに、K0N1 ラットの肝臓は門脈周囲に肝内胆管の増生や肝細胞の傷害が見られ、顕著な多飲と多尿で腎盂の拡張が観察された。K0N0 ラットでは野生型と同様に正常なので、K0N1 ラットにおける Nrf2 の活性化は、K0 ラットに比べて半減しているが、肝臓だけではなく腎臓にも傷害をもたらすことが明らかとなった。Nrf2 の活性化がなぜこのような病態をもたらしたのか、また、肝臓や腎臓

以外の臓器には影響を与えないのか今後調べる予定である。

おわりに

ヒト疾患を対象とした Nrf2 誘導剤として、多発性硬化症に Tecfidera (ジメチル fumarate) が処方されており、バルドキシロンメチル (CDDO-Me) は日本で慢性腎臓病を対象に臨床試験中である。このように Nrf2 誘導剤の開発も進み、臨床応用されているが、その薬効メカニズムは未解明の点も多い。より安全で効果の高い Nrf2 誘導剤の開発に、我々が作出した Keap1 欠失や Nrf2 欠失マウス/ラットの利用が有効であると期待する。今後は本ラット系を用いて新たな Nrf2 の制御分子機構の解明に取り組む。本研究は、Keap1-Nrf2 システムの分子メカニズムの解明に貢献し、分子標的薬の臨床応用に大きく貢献するものと期待される。

謝 辞

本研究は東北大学大学院医学系研究科医化学分野において行ないました。ご指導をいただきました山本雅之教授および研究室の皆さま、また、共同研究者である小松雅明教授 (現 順天堂大学)、真下知士教授 (現 東京大学)、本橋ほづみ教授 (加齢医学研究所)、Amedeo Columbano 教授 (伊 カリアリ大学)、Antonio Cuadrado 教授 (西 マドリッド自治大学)、Thomas W. Kensler 教授 (米 Johns Hopkins 大学)、に心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) Taguchi, K. and Yamamoto, M. (2017) The KEAP1-NRF2 system in cancer. *Front. Oncol.*, **7**, 85.
- 2) Taguchi, K., Shimada, M., Fujii, S., et al. (2008) Redox cycling of 9,10-phenanthraquinone to cause oxidative stress is terminated through its monoglucuronide conjugation in human pulmonary epithelial A549 cells. *Free Radic. Biol. Med.*, **44**, 1645-1655.
- 3) Komatsu, M., Kurokawa, H., Waguri, S., et al. (2010) The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat. Cell Biol.*, **12**, 213-223.
- 4) Mitsuishi, Y., Taguchi, K., Kawatani, Y., et al. (2012) Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming. *Cancer Cell*, **22**, 66-79.

- 5) Taguchi, K., Takaku, M., Egner, P.A., et al. (2016) Generation of A New Model Rat : Nrf2 Knockout Rats Are Sensitive to Aflatoxin B1 Toxicity. *Toxicol. Sci.*, **152**, 40-52.
- 6) Orru, C., Szydłowska, M., Taguchi, K., et al. (2018) Genetic inactivation of Nrf2 prevents clonal expansion of initiated cells in a nutritional model of rat hepatocarcinogenesis. *J. Hepatol.*, **69**, 635-643.

肺構成細胞及び細胞外小胞の単離解析から迫る 難治性呼吸器疾患の病態解明

山 田 充 啓

東北大学病院 呼吸器内科 講師



はじめに

肺はガス交換を目的に発達した器官であり、液相と空気層のガス交換を可能にするため、気道を細かく分岐させ、肺胞という構造を中心に形成されている。肺胞は上皮・内皮・間葉系細胞が基本構造を成し、さらに肺胞マクロファージなどの骨髄由来細胞が肺胞内に存在している。これまで、モデル動物やヒト疾患肺における遺伝子や蛋白の発現動態を解析は、全肺組織を用いた解析報告が主流であったが、実際の病態では、個々の細胞種の役割&反応が異なることが予想され、全肺を用いた解析ではその複雑な反応を個別に解析することができず、実際に病態解明につながっていない状況があった。この状況を打開するために本研究では、肺を構成する多様な細胞を単離し、個々の細胞種の動態を解析する必要があると考え、モデル動物及びヒト疾患肺での細胞種ごとの分離法を確立し、個々の細胞種の遺伝子・蛋白発現解析による難治性呼吸器疾患の病態解明を目的とした(図1)。本稿では本研究による、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、急性呼吸窮迫症候群(ARDS)等の難治性呼吸器疾患の病態解明につながる成果について、3つの項目に分け概説する。

急性肺損傷後の肺修復における 骨髄由来細胞の役割解明

肺胞は、効率的なガス交換と同時に、大気と直接交通していることから、血管系と肺胞腔の間のバリア機能を両立した構造になっており、その複雑さゆえ、再生能力の低い臓器と考えられていた。しかしながら、動物実験等の結果により、一見静的に見える肺も常に動的に反応して変化していることが示唆されるようになり、肺は気道から恒常的に侵入する、大気汚染物質

やタバコ煙、微生物による刺激暴露による、損傷を受けており、その恒常性を維持するためには速やかな損傷修復が行われていると考えられるようになっていた。我々は、この肺の損傷修復のメカニズムを明らかにするため、骨髄由来細胞に着目した。骨髄由来細胞は本来肺傷害を惹起する細胞であるが、骨髄由来間葉系細胞の多分化能など組織修復能が注目されていた。そこで、我々はGFP陽性骨髄キメラマウスを作成、LPS肺損傷モデルにて解析し、骨髄由来細胞を放射線照射にて抑制すると傷害後の修復不全が生じることを発見した¹⁾。また骨髄由来血管内皮前駆細胞(EPC)に着目し解析した結果、肺炎急性期患者の血中EPC数は増加し、血中に動員されるEPC数が少ない群は修復遅延が認められた²⁾。以上の成果は骨髄由来細胞が肺組織修復に必要であることを明らかにし、骨髄由来細胞を用いた細胞治療の可能性を示す根拠となった。

急性肺損傷・細菌性肺炎における IFN- γ , SDF-1の役割解明

我々は、急性肺傷害、細菌性肺炎における、傷害のメカニズムの解析も進めた。IFN- γ は細胞性免疫に重要な因子であるが、急性肺損傷・細菌性肺炎におけるIFN- γ の役割は不明であった。候補者は、IFN- γ 欠損マウスを用いて、高濃度酸素誘発肺損傷の増悪にIFN- γ が関与していることを解明した³⁾。また、急性肺損傷時の肺好中球動員の解析を行い、SDF-1/CXCR4シグナルが好中球の遊走、集積、生存を促進することを明らかにした⁴⁾。さらに本研究を留学中に発展させ、細菌性肺炎において好中球がIFN- γ を産生しneutrophil extracellular trapsの産生促進を介して感染防御に寄与していることを解明した⁵⁾。

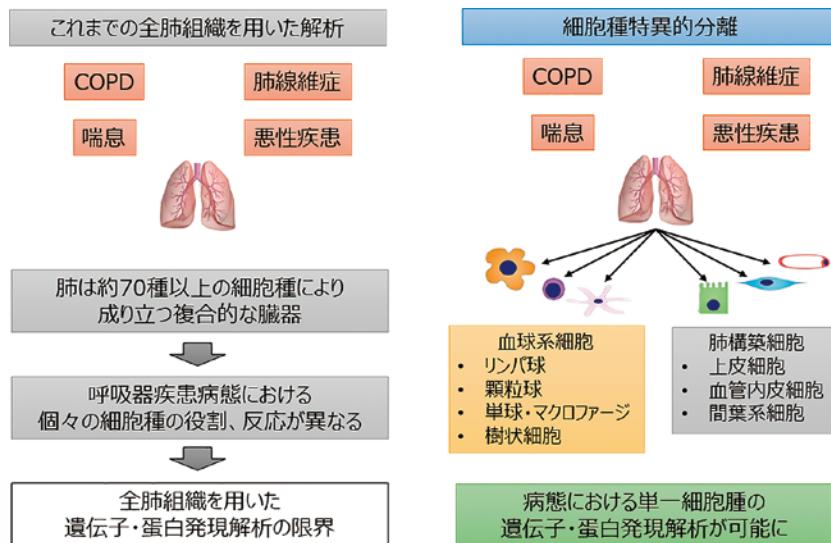


図 1. 肺構成細胞の単離解析と難治性呼吸器疾患の病態解明

肺細胞の単離技術確立と肺細胞及び細胞外小胞動態解析による呼吸器疾患病態の解明

我々は、さらに、慢性閉塞性肺疾患（COPD）や喘息、肺線維症といったより難解な病態を解析するため、モデル動物やヒト疾患肺における、遺伝子や蛋白の発現動態を解析することを試みた。我々はまず、フローサイトメトリーによるマウス及びヒトにおける、独自の肺上皮・内皮・間葉系細胞の単離技術を確立した（図2）^{6,7)}。確立した肺細胞分離技術を用い、まず難治性肺疾患の一つである肺線維症の病態をモデル動物及びヒト肺線維症患者由来の肺を用いて解析を行った。肺線維症モデル肺及びIPF患者肺にてII型肺胞上皮細胞のmiR-200cの減少とmiR-21の増加を認め、両microRNAが上皮間葉移行に関与していることを明らかにした⁶⁾。COPDについては、抗老化液性因子であるGDF11が、気道上皮細胞及び肺線維芽細胞にて低下しており、モデル動物における解析も含め、このGDF11の産生減少がCOPDにおける、肺構築細胞における細胞老化と老化関連炎症に関与することが明らかになった⁸⁾。また気道基底細胞に発現しているAxl受容体チロシンキナーゼがアポトーシス細胞を認識し、気道上皮細胞の増殖、過形成に関与していることを明らかとなった⁹⁾。以上の結果も含め、肺実質細胞の単離技術を用いた研究手法により難治性呼吸器疾患の解明と新規治療標的分子の抽出が進捗した¹⁰⁻¹³⁾。

さらに、個々の細胞だけではなく、個々の細胞種よ

り放出される細胞外小胞に着目し、病態の解明、そして新規バイオマーカーの同定を試みました。細胞外小胞は種々の細胞より放出された脂質2重膜に包まれた小胞である。細胞外小胞はサイズ、構成成分及び生成過程に基づいて分類されており、主な集団としてエクソソーム、マイクロパーティクル、アポトーシス小体が存在している。近年、細胞外小胞は新たな細胞間コミュニケーションツールとして注目を集めており、各種疾患病態への関与が示唆されていた。我々は肺線維症モデルマウス及びヒト特発性線維症患者血清を解析し、血清エクソソームmiR-21-5pは特発性肺線維症で上昇しており、かつ、その発現レベルは予後マーカーとなることを明らかにした¹⁴⁾。我々はさらに、細胞傷害時に細胞膜表面より出芽する細胞外小胞マイクロパーティクルにも注目し、肺血管内皮細胞、ARDSマウスモデル、ARDSを発症した敗血症患者の解析を進めた結果、肺血管内皮由来マイクロパーティクルがアンジオテンシン変換酵素陽性であり、が肺毛細血管内皮傷害を反映しARDSの診断、発症予測マーカーとなることを明らかにした（図3）¹⁵⁾。

おわりに

以上のように、本研究により、独自の肺細胞の単離技術確立による細胞及び細胞外小胞の遺伝子発現及び動態解析により、難治性肺疾患の病態解明及び病態マーカーの確立につながる成果を得た。今回の成果・

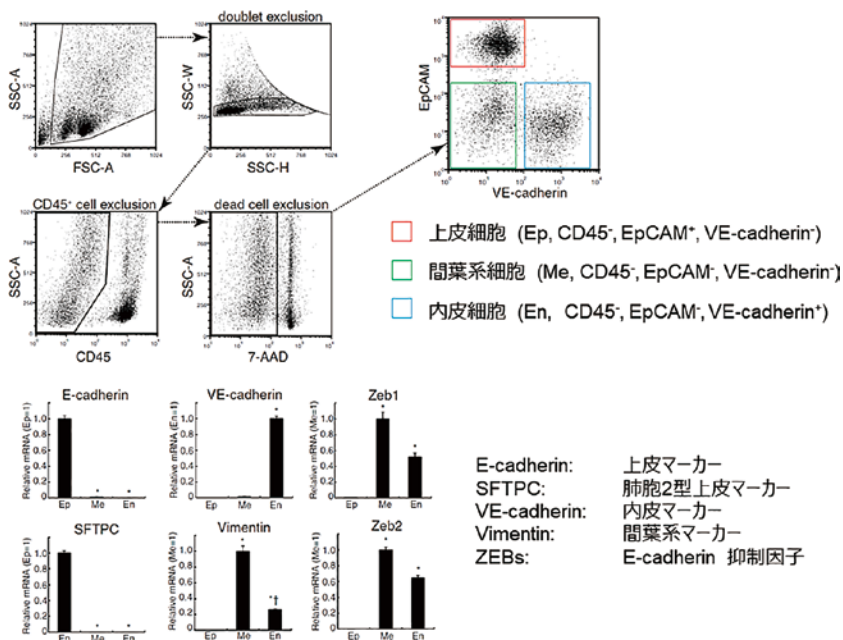


図 2. 肺上皮・内皮・間葉系細胞の単離

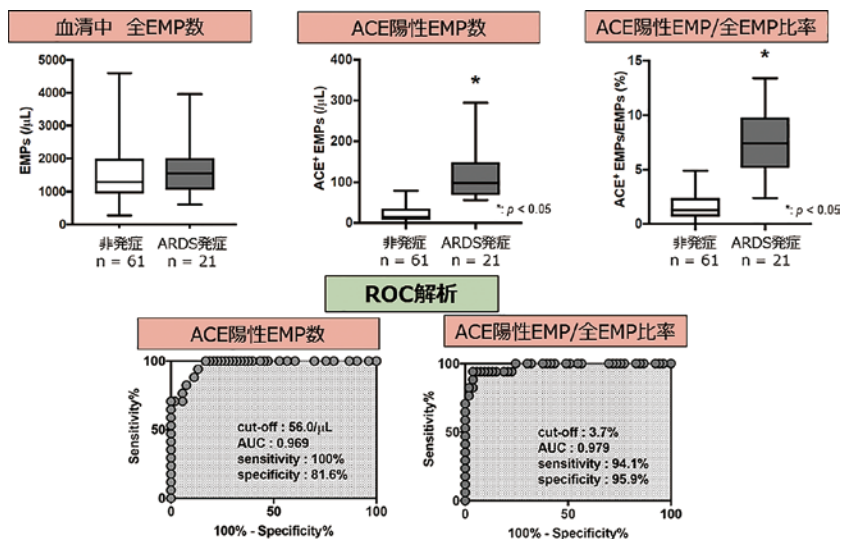


図 3. 血清 ACE 陽性 EMP による敗血症患者の ARDS 発症予測

限界をふまえ、今後の展開について最後に述べる。細胞種特異的分離法の確立により、個々の細胞種の発現解析、オミックス解析は可能になった。しかしながら、臓器全体を視点に考えれば、実際の病態は多様な細胞腫が複合的に相互作用し病態を形成しており、病態に関する複合的なシグナル経路を単一細胞種レベルの解析により解明することは困難である。その問題を克服

するには、バイオインフォマティクスの技術も利用し、病態に關与する遺伝子、分子群の相互作用を系統化し、相互作用アトラスを構築することが必要と考えられる(図 4)。さらには、細胞間相互作用を加味した病態關連分子の解明の後、疾患コホートによる検証を行い、さらに確証が取れた分子に関しては、創薬のターゲットとして臨床応用を追求し、難治性肺疾患への治療法

ヒト細胞間相互作用アトラス

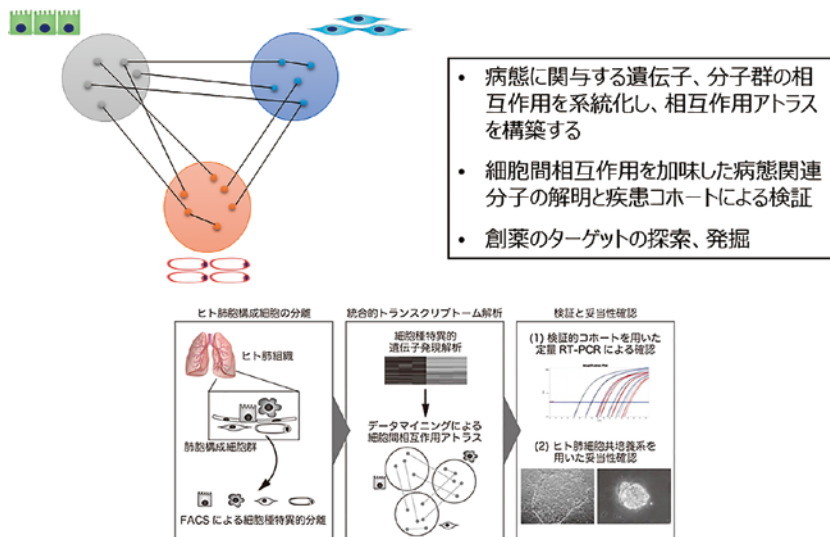


図 4. 細胞間相互作用アトラスの構築と創薬標的の探索

進歩につなげたいと考える。今後、本成果をもとに、さらなる病態の解明と同時に、診断・治療法の開発を念頭にした研究を進めていく所存である。

謝 辞

名誉ある東北大学医学部奨学賞金賞を受賞させていただきましたこと、心より感謝を申し上げます。本研究を実施するにあたり、多大なご指導、ご支援を賜りました呼吸器内科学分野 一ノ瀬正和 名誉教授、杉浦久敏 教授に深謝申し上げます。本研究に多大なご貢献をいただきました、共同研究者の先生方、呼吸器内科学分野の皆様我心より感謝を申し上げます。

文 献

- 1) Yamada, M., Kubo, H., Kobayashi, S., et al. (2004) Bone marrow-derived progenitor cells are important for lung repair after lipopolysaccharide-induced lung injury. *J. Immunol.*, **172**, 1266-1272.
- 2) Yamada, M., Kubo, H., Ishizawa, K., et al. (2005) Increased circulating endothelial progenitor cells in patients with bacterial pneumonia: evidence that bone marrow derived cells contribute to lung repair. *Thorax*, **60**, 410-413.
- 3) Yamada, M., Kubo, H., Kobayashi, S., et al. (2004) Interferon-gamma: a key contributor to hyperoxia-induced lung injury in mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, **287**, L1042-L1047.
- 4) Yamada, M., Kubo, H., Kobayashi, S., et al. (2011) The increase in surface CXCR4 expression on lung extravascular neutrophils and its effects on neutrophils during endotoxin-induced lung injury. *Cell. Mol. Immunol.*, **8**, 305-314.
- 5) Yamada, M., Gomez, J.C., Chugh, P.E., et al. (2011) Interferon-gamma Production by Neutrophils during Bacterial Pneumonia in Mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **183**, 1391-1401.
- 6) Yamada, M., Kubo, H., Ota, C., et al. (2013) The increase of microRNA-21 during lung fibrosis and its contribution to epithelial-mesenchymal transition in pulmonary epithelial cells. *Respir. Res.*, **14**, 95.
- 7) Fujino, N., Kubo, H., Ota, C., et al. (2012) A Novel Method for Isolating Individual Cellular Components from the Adult Human Distal Lung. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **46**, 422-430.
- 8) Onodera, K., Sugiura, H., Yamada, M., et al. (2017) Decrease in an anti-ageing factor, growth differentiation factor 11, in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*, **72**, 893-904.
- 9) Fujino, N., Brand, O.J., Morgan, D.J., et al. (2019) Sensing of apoptotic cells through Axl causes lung basal cell proliferation in inflammatory diseases. *J. Exp. Med.*, **216**, 2184-2201.
- 10) Kyogoku, Y., Sugiura, H., Ichikawa, T., et al. (2019)

- Nitrosative stress in patients with asthma-chronic obstructive pulmonary disease overlap. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **144**, 972-983.
- 11) Numakura, T., Sugiura, H., Akaike, T., et al. (2017) Production of reactive persulfide species in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*, **72**, 1074-1083.
 - 12) Hirano, T., Kikuchi, T., Tode, N., et al. (2016) OX40 ligand newly expressed on bronchiolar progenitors mediates influenza infection and further exacerbates pneumonia. *EMBO Mol. Med.*, **8**, 422-436.
 - 13) Fujino, N., Kubo, H., Ota, C., et al. (2013) Increased Severity of 2009 Pandemic Influenza A Virus Subtype H1N1 Infection in Alveolar Type II Cells From Patients With Pulmonary Fibrosis. *J. Infect. Dis.*, **207**, 692-693.
 - 14) Makiguchi, T., Yamada, M., Yoshioka, Y., et al. (2016) Serum extracellular vesicular miR-21-5p is a predictor of the prognosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir. Res.*, **17**, 110.
 - 15) Takei, Y., Yamada, M., Saito, K., et al. (2019) Increase in circulating ACE-positive endothelial microparticles during acute lung injury. *Eur. Respir. J.*, **54**, 1801-188.

iPS 細胞を用いた筋萎縮性側索硬化症の軸索病態の解明

秋 山 徹 也

東北大学東北メディカル・メガバンク機構 神経内科学分野



はじめに

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、選択的な運動ニューロン障害により発症から3年程度で呼吸不全を呈する脳神経内科領域における代表的な難病で、病態解明・治療法開発が切に望まれている。ALSのうち約10%が家族性(遺伝性)で20以上の原因遺伝子が発見されているが、病態は未解明で根本的治療法は存在しない。ALSでは神経細胞に特徴的な構造である「軸索」(遠位)から変性が始まり、「Dying Back」により細胞死(近位)に至ることが知られており、軸索病態は、ALSの初期病態解明の糸口として注目されてきた。しかし、患者の病変組織の生検(神経生検)は困難で、運動ニューロンは増殖能を欠くことから、培養細胞による実験も困難であった。近年の人工多能性幹細胞(iPS細胞)の発見は、患者由来の目的細胞(運動ニューロンなど)を大量に培養することを可能とし、ALSなどの神経変性疾患研究のブレークスルーとなった。さらに、工学技術の発展から、マイクロ流体デバイスと呼ばれる軸索のみを分離可能なデバイスの発達も合わさり、軸索に特化した解析も可能となりつつある。今回、iPS細胞とマイクロ流体デバイスを組み合わせることでALSにおける軸索形態異常を明らかにしており、その内容を紹介する。

軸索病態解明のため、FUS変異ALS患者由来iPS細胞を用いた

原因遺伝子変異が明らかとなっている家族性ALSは病態解明のために重要である。東北大学神経内科では長年にわたり家族性ALSの家系を集積・遺伝子解析を行っており、*fused in sarcoma* (FUS)が日本人の家族性ALSの原因遺伝子の2番目に多いこと、若年/頸髄領域の発症が多く罹病期間が短いという臨床遺伝

学的な特徴を見出してきた^{1,2)}。FUSは世界的にも主要なALS原因遺伝子として知られ、ALSの病態として注目されるRNA代謝や異常凝集蛋白に関わることが知られる。さらに、FUSはRNA結合能を介した軸索での物質輸送や局所翻訳を担っており、軸索病態に注目する上でFUSに注目することは重要である。そこで慶應義塾大学生理学教室(岡野研)との共同研究により、当科で見出したFUSに変異を持つ家族性ALS患者よりiPS細胞を樹立し、病態解析を行った³⁾。その過程で、ALS患者由来の運動ニューロンでは、神経細胞死の前に神経突起長が短縮するという病理学的特徴を反映した細胞表現型を見出した。さらに、このような細胞表現型を指標とし、薬剤スクリーニングによる新規治療候補薬の同定してきた。しかし、軸索から変性が始まる機序は未解明であった⁴⁾。そこで、同研究室で培った技術を元に東北大学でのiPS細胞を用いた研究基盤を立ち上げ、軸索に注目した病態解明を推進することとした。

ALSの運動ニューロンではFos-Bを介して軸索の分岐が増えるという新規病態を見出した

神経細胞を培養し、単細胞の状態をプレート上に播種すると、神経突起はランダムに、複数の神経突起を伸長するため、単一の「軸索」を同定することは困難である。また、iPS細胞を分化誘導しても、運動ニューロンの誘導効率は70%程度であり、他の神経細胞や、神経以外の細胞の混入が避けられない。そこで、運動ニューロン特異的なプロモーター(Hb9)下に蛍光蛋白を発現するレンチウイルス、及び培養方法を工夫し、運動ニューロンだけの軸索末端を観察可能な培養系を構築した。この方法を用いて健常者及びALS患者由来運動ニューロンの軸索末端を観察したところ、ALS患者由来運動ニューロンにおいては軸索の分岐が増えているという新規細胞表現型を同定した(図)。

さらに、FUS変異を有する運動ニューロンで軸索

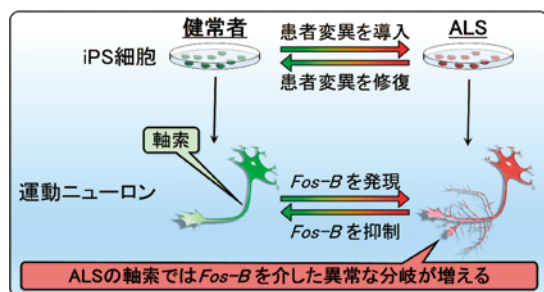


図. 文献5 (東北大学プレスリリースより抜粋:
<https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2019/07/press-20190702-Aoki-Okano.html>)

の分岐が増える機序を解明するため、FUSがRNA代謝に関わることに注目し、軸索のRNAの変動を網羅的に解析することとした。軸索のみを回収するため、Nerve organoid deviceと呼ばれる、目視でも確認可能な軸索の束を作成できるマイクロ流体デバイスを用いて培養を行った。健常者及びFUS変異を有するiPS細胞由来運動ニューロンを、同デバイスを用いて培養し、軸索を回収、RNAシーケンスを組み合わせることで軸索のRNA変動を解析し、軸索形態異常に関連する因子としてFos-Bを同定した。Fos-Bを人工的に発現させると、健常なiPS細胞由来の運動ニューロンだけでなく、ゼブラフィッシュの運動ニューロン軸索も異常に分岐することから、生体内におけるFos-Bの機能の重要性も示した。またFos-Bの抑制により、FUS変異を有する運動ニューロン軸索の形態を改善できることを示し、新規治療標的としての可能性を見出した(図)。

さらに、このような軸索形態異常、Fos-Bの増加を、FUS以外のALS原因変異を有するiPS細胞由来運動ニューロン及び孤発性ALS患者由来の患者剖検切片を用いて確認した。その結果、TARDBP、SOD1変異を有するiPS細胞由来運動ニューロンでも軸索の分岐が増加していること、孤発性ALS患者剖検切片において、Fos-B蛋白が神経細胞に異常蓄積していることを見出した。このことから、軸索形態異常及びFos-Bの増加はFUS変異に限らず、ALSに共通する病態である可能性を見出した。

ま と め

以上のように、FUS変異ALSにおける臨床遺伝学的特徴という臨床的な側面、及びiPS細胞を用いたALSの病態解明を通じ、ALSの治療候補薬の同定・軸索形態異常という新規病態の報告を行ってきた。ALSでは軸索輸送の機能障害が病態と関わっているという仮説もあり、現在軸索形態異常と軸索輸送障害との関連性の解明や、動物モデルを用いた新規治療薬の可能性の追求を継続している。

謝 辞

歴史ある東北大学医学部奨学賞銀賞の受賞、心より感謝申し上げます。本研究を行うにあたり、多大なご指導を賜りました東北大学神経内科の青木正志教授、鈴木直輝助教、割田仁院内講師、また、iPS細胞培養・技術指導を行っていただきました慶應義塾大学生理学教室の岡野栄之教授、石川充特任助教、RNAシーケンスを行っていただきました東北大学細胞増殖制御分野の舟山亮助教をはじめ、共同研究者の先生方に厚く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Akiyama, T., Warita, H., Kato, M., et al. (2016) Genotype-phenotype relationships in familial amyotrophic lateral sclerosis with FUS/TLS mutations in Japan. *Muscle & Nerve*, **54**, 398-404.
- 2) Nishiyama, A., Niihori, T., Warita, H., et al. (2017) Comprehensive targeted next-generation sequencing in Japanese familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Aging*, **53**, 194 e191-194 e198.
- 3) Ichianagi, N., Fujimori, K., Yano, M., et al. (2016) Establishment of In Vitro FUS-Associated Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis Model Using Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*, **6**, 496-510.
- 4) Fujimori, K., Ishikawa, M., Otomo, A., et al. (2018) Modeling sporadic ALS in iPSC-derived motor neurons identifies a potential therapeutic agent. *Nature Medicine*, **24**, 1579-1589.
- 5) Akiyama, T., Suzuki, N., Ishikawa, M., et al. (2019) Aberrant axon branching via Fos-B dysregulation in FUS-ALS motor neurons. *EBioMedicine*, **45**, 362-378.

迷走神経 — マクロファージ — 肝細胞連関による 肝臓再生メカニズムの解明

井 泉 知 仁

東北大学病院 糖尿病代謝科



はじめに

生体はその需要に応じた臓器・組織量を確保することは恒常性維持にとって極めて重要であるが、その調節機構は十分に解明されていない。当研究室では、肥満時に起こる代償性膵β細胞増殖に着目して研究を進め、肝臓—内臓神経求心路—中枢神経—迷走神経遠心路を介して膵β細胞増殖が誘導されることを見出した^{1,2)}。この迷走神経シグナルによる細胞増殖が生体の恒常性維持の鍵を握っている可能性を考え、他臓器での検討を着想した。肝臓は再生能が旺盛な臓器として知られており、ヒト、げっ歯類含めて肝臓部分切除後に速やかな肝細胞増殖が誘導されるが、げっ歯類で肝臓に分布する迷走神経を切断しておくとも早期の肝細胞増殖が強く抑制されると報告されていた。しかしその詳細な分子機序は不明であった。今回、そのメカニズムの検討を行い、肝臓切除後には迷走神経—マクロファージ—肝細胞連関による再生が起こることを明らかにしたので、その研究内容を紹介する。

迷走神経シグナルによる速やかな肝臓再生は、 個体生存に重要である

まずマウスに対して 70% 肝臓部分切除と肝臓に分布する迷走神経の切断を同時に行ったところ、術後早期の肝細胞増殖が顕著に抑制され、同時に術後 3 日以内という急性期の死亡率が増加していた。この結果は早期の肝細胞増殖による肝臓再生が術後の個体生存に重要であり、そこに迷走神経シグナルが深く関与していることを示唆するものであった。

肝臓切除後に迷走神経シグナルにより肝臓での FoxM1 経路が活性化される

次に、迷走神経シグナルによる肝細胞増殖の分子メカニズムの解明を進めた。当研究室では以前に、迷走神経シグナルにより膵島で Forkhead box M1 (FoxM1) 経路が活性化することで膵β細胞増殖が誘導されることを見出しており、さらに他研究室の報告により肝臓切除後の肝細胞増殖には、膵β細胞と同様に FoxM1 経路が重要であることが既に知られていた。そこで肝臓部分切除+迷走神経切断後の肝臓での FoxM1 とその標的遺伝子の発現を見たところ、本来強く誘導されるこれらの遺伝子の発現が迷走神経切断により高度に抑制されていた。また、補充実験としてアデノウイルスベクターを用いて肝細胞に FoxM1 遺伝子を強制発現させた状態のマウスに肝臓部分切除と迷走神経切断を行ったところ、迷走神経切断による肝細胞増殖抑制効果、死亡率の上昇はいずれも消失した。以上より、迷走神経シグナルは FoxM1 依存性に肝細胞増殖を誘導することで、肝臓切除後の個体生存に寄与していることが示された。

迷走神経 — マクロファージ — 肝細胞連関による 肝臓再生機構

続いて、迷走神経シグナルが肝臓の FoxM1 発現を誘導するメカニズムについて検討した。肝臓に分布する迷走神経の末端からはアセチルコリンが主に放出されていることが知られていたため、ムスカリン受容体拮抗薬であるアトロピンをマウスに全身投与したところ、迷走神経切断と同様に肝臓切除後の肝細胞増殖抑制効果が認められた。しかし肝細胞に対して培養下でコリン作動薬を作用させても、FoxM1 遺伝子の発現や細胞増殖は誘導されなかった。この結果の解釈として我々は、迷走神経シグナルは肝細胞に対して直接作用するのではなく、肝臓内の他の細胞が介在している

という可能性を考えた。そこで着目したのが肝臓内に豊富に存在するマクロファージである。インターロイキン 6 (IL-6) 欠損マウスや肝臓内マクロファージ除去マウスを用いた検討により、肝臓切除後にマクロファージが分泌する IL-6 が肝臓再生に重要であることが既に明らかにされている。この知見に基づき、肝臓切除後早期の肝臓での IL-6 の発現をみたところ、迷走神経切断やアトロピン全身投与により IL-6 の発現増加が著明に抑制されていた。また、単離マクロファージに対して培養下でコリン作動薬を作用させると、ムスカリン受容体シグナル依存性に IL-6 遺伝子の発現が誘導された一方、IL-6 が単離肝細胞に対して FoxM1 依存性に増殖を誘導することも明らかになった。さらに、IL-6 中和抗体を投与したマウスでは肝臓切除後の肝臓での FoxM1 発現が抑制され、肝臓のマクロファージを除去したマウスでは迷走神経切断と同様に IL-6、FoxM1 の発現低下を伴い肝細胞増殖が抑制されており、このマウスでは迷走神経切断による更なる増殖抑制効果は認めなかった。これらの結果は、肝臓切除後の迷走神経シグナルは肝臓内のマクロファージを主要なターゲットとしていることが示すものであり、肝臓切除後には迷走神経-マクロファージ-肝細胞連関により肝細胞増殖が誘導されることが明らかになった³⁾。

おわりに

なぜ肝臓再生において、迷走神経シグナルがこのような多段階を経る必要があるのかについては、肝臓内の迷走神経の分布に一つの理由があると考えられる。肝臓に到達した迷走神経は門脈とともに肝門部から侵入するが、その分布は門脈域までに留まり肝実質深くまでは分布していない。しかし、肝臓切除という重大な侵襲に対しては残された肝臓全体の肝細胞が速やかに

に増殖することで回復を図ることが個体生存に重要である。そのため肝臓内の類洞壁に豊富に存在するマクロファージを介在させることで、限局する迷走神経線維からのシグナルを肝臓全体に有効に伝達するという増幅機構が、この迷走神経-マクロファージ-肝細胞連関という多段階メカニズムの生物学的意義ではないかと想定している。さらに本研究の成果は本稿の冒頭に記載した膵β細胞増殖機構と合わせて、迷走神経シグナルが生体内の本来の位置で細胞増殖を誘導して臓器の機能を維持し、恒常性維持に積極的に関与していることを示すと同時に、どのように臓器の量が調整されているかという生物学における本質的な問いの解明に資するものと期待される。

謝 辞

本研究の遂行にあたり糖尿病代謝科の片桐秀樹教授、今井淳太准教授をはじめ、医局員、技術、事務補佐員各位より多大なご指導、ご協力を賜りました。厚く感謝申し上げます。

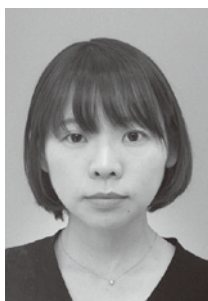
文 献

- 1) Imai, J., Katagiri, H., Yamada, T., et al. (2008) Regulation of pancreatic beta cell mass by neuronal signals from the liver. *Science*, **322**, 1250-1254.
- 2) Yamamoto, J., Imai, J., Izumi, T., et al. (2017) Neuronal signals regulate obesity induced beta-cell proliferation by FoxM1 dependent mechanism. *Nat. Commun.*, **8**, 1930.
- 3) Izumi, T., Imai, J., Yamamoto, J., et al. (2018) Vagus-macrophage-hepatocyte link promotes post-injury liver regeneration and whole-body survival through hepatic FoxM1 activation. *Nat. Commun.*, **9**, 5300.

TNF 受容体型補助刺激分子による炎症性免疫疾患の 発症制御機構の解明

奥 山 祐 子

東北大学大学院医学系研究科 病理病態学講座免疫学分野 助教



はじめに

抗原特異的な獲得免疫系において T 細胞は抗原提示細胞からの特異的抗原刺激を T 細胞受容体で受容し活性化する。この TCR シグナルを補助するシグナルとして、さまざまな補助刺激分子が存在する。CD28 など、抗原提示細胞に発現するそれぞれに対応するリガンドを介し TCR シグナルを促進する促進性受容体と、PD-1, CTLA4 などの抑制性の受容体がある。なかでも TNF 受容体ファミリーに属する分子の多くは促進型で、その下流ではアダプタータンパク TRAF を介し MAPK, AKT, NF- κ B などのシグナル経路が作用する。当研究室では、TNF 受容体型補助刺激分子のこれまでの概念に留まらない新規機能制御機構について多くの成果を挙げてきた^{1,2)}。今回、OX40 と GITR に着目した二つの研究を行ったので、その研究内容を紹介する。

IQGAP1 による OX40 シグナル抑制を 介した T 細胞活性化制御

OX40 は、とくにエフェクター T 細胞に発現し、抗原提示細胞上の OX40L からの刺激により T 細胞の増殖、生存維持、記憶 T 細胞の形成に作用し、さまざまな炎症性疾患に関与する。まず、マススペクトロメトリー解析による OX40 シグナルの新規制御因子の探索より、候補分子 IQGAP1 が同定された。実際に OX40L 刺激依存的に IQGAP1 が OX40 に会合することを確認した。IQGAP1 は高分子の足場タンパク質として多くのタンパク質と相互作用し、細胞活動のさまざまな機能に関与する。そこで本研究は、IQGAP1 による補助刺激シグナル制御機構を明らかにすることを目的とし、研究を行った。

はじめに、*Iqgap1* 欠損マウス脾臓由来 CD4⁺ T 細胞

を *in vitro* で解析した結果、TCR 刺激依存的な細胞増殖、エフェクターサイトカイン IFN- γ , IL-17A の産生は抗 OX40 アゴニスト抗体共刺激により増強し、いずれも *Iqgap1* 欠損 T 細胞で有意に亢進した。さらに OX40 下流のアダプター分子 TRAF2 を欠損した T 細胞株において OX40 と IQGAP1 の相互作用が減弱したことから、TRAF2 を介した結合が示唆され、なかでも TRAF2 のリングドメイン領域が結合に寄与することがわかった。また、*Iqgap1* 欠損 T 細胞株において認められる OX40L 刺激依存的な IL-2 サイトカイン産生の亢進は、IQGAP1 の C 末端側領域の発現導入により抑制された。以上より、IQGAP1 の C 末端領域が OX40 刺激依存的な T 細胞応答を抑制することが明らかとなった。

次に、T 細胞依存的な自己免疫疾患である多発性硬化症のマウス病態モデル EAE (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis) を用い、生体内における機能評価を行った。*Iqgap1* 欠損 CD4⁺ T 細胞移入群において野生型 T 細胞移入群と比較してミエリン抗原の免疫により誘発される EAE の発症が顕著に増悪し、患部中枢神経組織に浸潤する IFN- γ , IL-17 産生ドナー T 細胞が増加した。さらに、この EAE モデルにおいて抗 OX40L 阻害抗体を投与した結果、*Iqgap1* 欠損 T 細胞による EAE の増悪が抑制されたことから、IQGAP1 は OX40 シグナルの阻害を介して EAE を抑制していることが示唆された。

以上より、IQGAP1 は OX40L 刺激依存的に OX40 と会合し、細胞増殖、サイトカイン産生を阻害することで、T 細胞依存的な自己免疫疾患の発症を抑制することが明らかとなった (図 1)³⁾。

GITR シグナルによる 2 型自然リンパ球の活性化 を介したアレルギー性肺炎発症制御

自然リンパ球 (ILC) は、T 細胞、B 細胞と共通のリンパ球系前駆細胞から分化し、自然免疫系を担細胞集団である。獲得免疫系を担う T 細胞とは異なり、

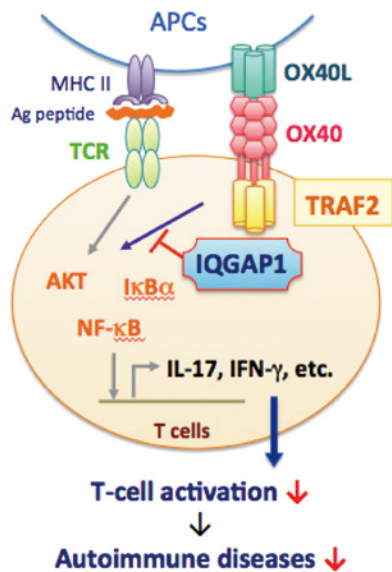


図 1. IQGAP1 による OX40 シグナル制御

抗原受容体を持たず、様々な末梢組織に常在し、早期炎症反応、生体防御に重要な役割を担う。ILC は、大きく 3 つに分類され、なかでも肺や皮膚に存在する 2 型 ILC (ILC2) は、アレルギー性気管支喘息、アトピー性皮膚炎等の病態形成に関与する。肺組織においてアレルゲンの感作、細菌感染により肺上皮細胞が傷害されると IL-33 が分泌される。ILC2 は IL-33 に応答し IL-2, IL-9 を産生し、さらに Th2 サイトカイン IL-5, IL-13 を分泌することで、上皮の粘液産生、好酸球浸潤を誘導し、アレルギー性呼吸器炎症が誘発される。

GITR (Glucocorticoid induced TNF-receptor) は TNF 受容体型 T 細胞補助刺激分子の一つで、GITR-L との相互作用により TCR シグナルを増強し、T 細胞の活性化、生存に寄与する。まず我々はマウス肺組織の ILC2 に GITR が高く発現することを確認した。そこで、アレルギー性肺炎における GITR による ILC2 の活性化制御機構を明らかにすることを目的とし、研究を行った。

はじめに、*Gitr* 欠損マウスにおいてシステインプロテアーゼであるパバイン経鼻投与により誘発される肺炎モデルについて検討した結果、パバイン投与後の肺組織中の ILC2 細胞数、肺胞洗浄液中の好酸球数、IL-5 産生量、および肺上皮細胞の粘液産生がいずれも *Gitr* 欠損マウスにおいて顕著に減少し、肺炎の減弱が認められた。GITR は ILC 以外に T 細胞などに高発現するため、次に、T 細胞、B 細胞を欠損した *Rag2* 欠損 *Gitr* 欠損マウスにおいて、IL-33 の気管内

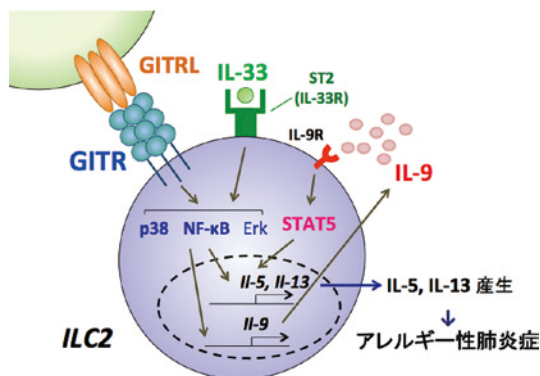


図 2. GITR による ILC2 活性化制御機構

投与による肺炎について検討した。その結果、IL-33 投与後 *Rag2* 欠損 *Gitr* 欠損マウスにおいて *Rag2* 欠損マウスと比較して各炎症所見がいずれも顕著に減少し、肺炎の減弱が認められ、ILC2 細胞内に発現する GITR が肺炎を増悪させることが示唆された。

次に、ILC2 における GITR 作用機序を解明するため、野生型および *Gitr* 欠損マウス肺組織由来 ILC2 を精製し、*in vitro* でサイトカイン刺激を行った。IL-33 刺激により誘導される IL-5, IL-13 産生、IL-9 遺伝子発現は抗 GITR アゴニスト抗体共刺激により顕著に増強した。各サイトカインの関係性を検証した結果、抗 IL-9 中和抗体の添加により GITR 依存的な IL-5, IL-13 産生が抑制された。

そこで、IL-33 と同時に IL-9 を気管内投与し肺炎を検討した結果、IL-33 単独投与で認められた *Gitr* 欠損マウスにおける ILC2、好酸球 IL-5 産生量の減少は、いずれも IL-33 と IL-9 の同時投与により野生型マウスと同程度まで回復した。

以上の結果から、GITR は肺組織の ILC2 において IL-33 シグナルと協調的に作用し、IL-9 の産生とそのオートクライン刺激を介して IL-5, IL-13 の産生を亢進させ、アレルギー性呼吸器炎症を増悪させることが明らかとなった (図 2)⁴⁾。

おわりに

本研究成果により、TNF 受容体型補助刺激分子による新規免疫機能制御機構が明らかとなった。今後これらの機能分子を標的とした自己免疫疾患およびアレルギー疾患の新規治療法への応用が期待される。さらに現在、アレルギー疾患に関して、アトピー性皮膚炎および気管支喘息患者の末梢血中 ILC における補助刺激分子の発現と疾患の関連について、研究を進めて

いる。これらの成果をもとに今後、臨床応用に繋がる研究を進展させていきたい。

謝 辞

この度は令和元年度医学部奨学賞銀賞を拝受頂き心より深謝申し上げます。本研究を行うにあたり、ご指導頂きました免疫学分野石井直人教授、富山大学宗孝紀教授、ならびに共同研究者の先生方、ご協力頂きました免疫学分野教室員の皆様に深く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Nagashima, H., Okuyama, Y., Asao, A., et al. (2014) The adaptor TRAF5 limits the differentiation of inflammatory CD4⁺ T cells by antagonizing signaling via the receptor for IL-6. *Nat. Immunol.*, **15**, 449-456.
- 2) Yamaki, S., Ine, S., Kawabe, T., et al. (2014) OX40 and IL-7 play synergistic roles in the homeostatic proliferation of effector memory CD4⁺ T cells. *Eur. J. Immunol.*, **44**, 3015-3025.
- 3) Okuyama, Y., Nagashima, H., Ushio-Fukai, M., et al. (2020) IQGAP1 restrains T-cell cosignaling mediated by OX40. *FASEB J.*, **34**, 540-554.
- 4) Nagashima, H.^{*}, Okuyama, Y.^{*}, Fujita, T.^{*}, et al. (^{*}equal contribution) (2018) GITR cosignal in ILC2s controls allergic lung inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **141**, 1939-1943.