

「炎症の慢性化機構の解明と制御」研究領域 領域活動・評価報告書

－平成25年度中間評価実施研究課題－

研究総括 高津 聖志

1. 研究領域の概要

本研究領域は、生体防御反応であるにもかかわらず、炎症が慢性化することによって生体に悪影響を引き起こす現象の実体解明に向けた研究、すなわち、炎症の慢性化とその維持機構、および炎症の慢性化が疾患を惹起・進行・重症化する機構の時空間的な解明に挑戦する研究を対象とします。このような研究を推進することにより、炎症の慢性化が関与するさまざまな疾患や臓器不全の予防や治療、創薬につながる新たな医療基盤の創出を目指します。

具体的には、下記の視点をもった研究を推進します。

- 1) 分子や細胞の階層から迫る研究に加え、組織や臓器の階層から迫る視点
- 2) 細胞や組織、臓器間の相互作用、個体全体でのダイナミクスなど、慢性炎症を複雑系として捉える視点
- 3) エピジェネティクスや機能性非コードRNAなど、他生命科学分野からの視点
- 4) 遺伝子産物、生理活性物質、細胞やそれらの動態を検出・測定する技術的な分野からの視点
- 5) 慢性炎症の制御による関連疾患を標的とした創薬などの医療応用を見据えた視点。

2. 中間評価対象の研究課題・研究者名

件数： 3件(うち、通常型3件)

※研究課題名、研究者名は別紙一覧表参照

3. 研究実施期間

平成23年4月～平成26年3月(※平成28年3月終了予定)

4. 中間評価の手続き

研究者の研究報告書を基に、評価会(領域会議等)での発表・質疑応答、領域アドバイザーの意見などを参考に、下記の流れで研究総括が評価を行った。

(中間評価の流れ)

平成25年12月	評価会開催
平成26年 1月	研究総括による中間評価
平成26年 2月	被評価者への結果通知、研究計画見直し

5. 中間評価項目

- (1) 研究の進捗状況と今後の見込み
- (2) 研究成果の現状と今後の見込み

6. 評価結果

当研究領域では、炎症の慢性化が関与するがん、生活習慣病、自己免疫疾患、アレルギーなど、さまざまな疾患を対象にし、最新のバイオサイエンスの技術を総動員し、さらには新たな技術開発を行いながら、それらの予防や治療、創薬につながる新規医療基盤の創出を目指している。今回中間評価の対象となった3課題は、平成22年度採択となっているが、手続きの関係で実際の研究開始は平成23年4月となり、本評価開始時点までの研究期間は3年に満たない。短い期間ながら、それぞれの研究領域において、新規分子の同定や、がんや喘息などの疾患メカニズムにおける炎症の役割の解明に迫る成果が得られている。(1)腫瘍の悪性化に、組織微小環境中に隣接する他の老化を示す細胞の炎症性反応が関与することの発見について、全く異なる2種類の実験系で明らかにできたことは、大きな成果である。また、(2)2型自然リンパ球によるアレルギー性炎症の発症と増悪化への関与の解明もインパクトの大きな研究成果である。なお、これらの成果には、領域会議などでの議論やさきがけ研究者間での協力も役立っているものと考えている。

1. 井垣 達吏 研究者「上皮のがん原性炎症が駆動する非遺伝的腫瘍悪性化の分子基盤」



ショウジョウバエ遺伝的モザイク法を駆使し、世界に先駆けて構築した腫瘍悪性化モデルを用いた個体レベルでの効率的な解析を行い、多細胞コミュニティの中で炎症性の変化に基づく上皮性腫瘍の悪性化に関する秀逸な論文を発表している。論文では、従来の個別の細胞における遺伝的な変異の蓄積による良性腫瘍の悪性化とは異なり、ミトコンドリアに機能障害を起し、がん抑制経路(Hippo 経路)が阻害された結果 Upd(IL-6 ホモログ分子)などを発現するようになった周囲の他の変異細胞の影響を受け、良性腫瘍が強い増殖促進や浸潤・転移能を獲得することを明らかにした。今後は、このような「がん原性炎症」のメカニズムが哺乳類においても生ずるものなのかを確認すると共に、そのようなメカニズムがどうして生ずるのかを細胞老化と関連づける研究の進展が大変期待できる。さらに、そのメカニズム研究が新たながん治療戦略の基盤となることにも期待したい。

2. 大谷 直子 研究者「細胞老化シグナルからみた慢性炎症と癌進展の新しい発症メカニズムの解明」

高脂肪食摂取や遺伝的な肥満により腸内で増殖したグラム陽性細菌が一次胆汁酸からより多くのデオキシコール酸を生成し、それが腸肝循環により肝臓に到達し肝星細胞の細胞老化とIL-1 β 産生などの炎症性サイトカインを誘導する現象(SASP)が起こるため、新生児期に予め化学発癌物質 DMBA で処理したマウスにおいて、肝星細胞の近くで肝癌の発症が促進することを明らかにした。肥満、腸内細菌、細胞老化と発癌とのダイナミックな関係を示したこの成果と論文は、広範な研究領域の研究者の注目を集めただけでなく、国内外で多数の報道がなされ、社会的にもインパクトのある内容であった。今後は、SASP が発生する詳細の解明、ヒトでも同様に肥満が肝癌発症のリスクと成り得ることの確認、デオキシコール酸産生菌の同定などの研究を通じ、生活習慣病や発癌の予防につながる成果が大いに期待できる。

3. 茂呂 和世 研究者「IL-33 産生を伴う慢性疾患と加齢や肥満により増加したナチュラルヘルパー細胞が Th1/Th2 バランスの破綻を惹起するメカニズムの解明」

現在では2型自然リンパ球に分類されようになった Th2 サイトカインを産生するナチュラルヘルパー(NH)細胞を世界に先駆けて同定し、その解析は世界をリードしている。本研究では、NH 細胞の増殖、分化、サイトカイン産生が GATA3 によって制御されていること、さらに NH 細胞を増殖させる IL-33 と抗原を用いて誘導するステロイド抵抗性のマウス喘息モデルにおいて、重症喘息患者で遺伝子が活性化する TSLP が発現することにより NH 細胞がステロイド抵抗性になること、そのモデルマウスに TSLP 刺激で活性化される細胞内転写因子 Stat5 の阻害剤であるピモジドを投与することにより阻害すると、ステロイド投与の効果を回復させることを示す論文を発表しており、研究は概ね順調に進捗していると評価される。今後は、難航している NH 細胞特異的抗体の作製に期待したい。また、NH 細胞の分化制御や潰瘍性大腸炎や肥満における NH 細胞の役割を明らかにすることが大いに期待できる。

7. 評価者

研究総括 高津 聖志 富山県薬事研究所 所長

領域アドバイザー(五十音順。所属、役職は平成25年3月末現在)

烏山 一 東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 教授
佐田 政隆 徳島大学 大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 教授
反町 典子 (独)国立国際医療研究センター研究所 プロジェクト長
戸邊 一之 富山大学 医学部 第一内科 教授
長田 重一 京都大学 大学院医学研究科 教授
福井 宣規 九州大学 生体防御医学研究所 教授
古市 泰宏 ジーンケア研究所(株) 代表取締役会長
三浦 正幸 東京大学 大学院薬学系研究科 教授
宮坂 信之 東京医科歯科大学 名誉教授
宮園 浩平 東京大学大学院医学系研究科 教授
山村 隆 (独)国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 部長

(参考)

件数はいずれも、平成26年1月末現在。

(1)外部発表件数

	国内	国際	計
論文	13	16	29
口頭	55	24	79
その他			
合計	68	40	108

(2)特許出願件数

国内	国際	計
2	0	2

(3)受賞等

該当なし。

(4)招待講演

国際 12件

国内 38件

別紙

「炎症の慢性化機構の解明と制御」領域 中間評価実施 研究課題名および研究者氏名

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職(平成26年3月末現在) (応募時所属)	研究費(3年間) (百万円)
井垣 達吏 (兼任)	上皮のがん原性炎症が駆動する 非遺伝的腫瘍悪性化の分子基盤 (京都大学大学院生命科学研究科)	京都大学大学院生命科学研究科 教授 (神戸大学大学院医学研究科 特 命准教授)	75
大谷 直子 (兼任)	細胞老化シグナルからみた慢性 炎症と癌進展の新しい発症メカ ニズムの解明 (公財)がん研究会がん研究所	(公財)がん研究会がん研究所 主 任研究員 (同上)	63
茂呂 和世 (兼任)	IL-33産生を伴う慢性疾患と加 齢や肥満により増加したナチュ ラルヘルパー細胞がTh1/Th2バ ランスの破綻を惹起するメカニ ズムの解明 (独)理化学研究所統合生命医 科学研究センター)	(独)理化学研究所統合生命医 科学研究センター 上級研究員 (慶應義塾大学医学部 助教)	63

研究報告書

「上皮のがん原性炎症が駆動する非遺伝的腫瘍悪性化の分子基盤」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年4月～平成28年3月

研究者: 井垣 達吏

1. 研究のねらい

近年、がんの発生や進行に微小環境中の炎症反応が重要な役割を果たしていることが明らかとなり、基礎研究のみならず新たながん治療標的として臨床応用研究においても注目されている。これらの研究は、これまで主にがんの発生・悪性化の過程で引き起こされる上皮由来がん細胞と間質細胞（炎症細胞、免疫系細胞、線維芽細胞など）との相互作用に焦点を絞って進められてきた。しかし、種々の間質細胞と同様にがん組織に含まれる上皮細胞（正常上皮細胞および変異上皮細胞）同士の相互作用に関しては、種々の実験事実からその重要性が強く示唆されているものの、その分子基盤はほとんど不明である。我々は、多細胞コミュニティの中で引き起こされる上皮の腫瘍悪性化を生体レベルで理解するため、ショウジョウバエ遺伝的モザイク法を駆使した腫瘍悪性化モデルを世界に先駆けて構築してきた。さらに、本ショウジョウバエモデルを利用して、がん遺伝子 Ras を活性化した上皮細胞クローンに様々な突然変異を導入するパイロットスクリーニングを実施し、これら変異細胞クローン自身ではなくその周辺の上皮細胞に対して強い増殖促進や浸潤・転移能を誘発する一連の突然変異を見いだした。興味深いことに、この周辺上皮細胞に対するがん原性作用は、変異細胞において持続的に発現誘導される炎症性サイトカインによって引き起こされていることが分かった。すなわちこの現象は、がん原性の上皮細胞に引き起こされる“oncogenic inflammation（がん原性炎症）”と捉えることができ、がんの発生・進展を駆動する上皮細胞同士のがん原性相互作用の生体モデルとなると考えられた。予備的解析により、ミトコンドリア呼吸鎖の機能障害をはじめとする一連の突然変異が Ras シグナルと協調して上皮の“がん原性炎症”を誘発することが明らかとなっている。そこで本研究では、3段階からなるショウジョウバエ遺伝学的スクリーニングを根幹として、遺伝学的解析、ライブイメージング解析、および哺乳類培養上皮細胞系を用いた解析を展開することで、がん遺伝子の活性化が様々な突然変異と協調して引き起こす“がん原性炎症”の実体を明らかにしてその概念を確立するとともに、それによって引き起こされる“非遺伝的”な腫瘍悪性化の分子基盤を生体レベルで明らかにすることを目的とする。

2. 研究成果

(1) 概要

がんの悪性化は、多段階的な突然変異の蓄積による“遺伝的”な変化のみならず、突然変異を誘発することなく細胞間相互作用を介して引き起こされる“非遺伝的”な変化がその進展に重要な役割を果たすと考えられる。このような細胞間の相互作用を介したがん制御機構を生体レベルで理解するため、ショウジョウバエ上皮をモデル系とした腫瘍成長・悪性化機構

の遺伝学的スクリーニング系を構築した。ショウジョウバエ成虫原基の上皮組織にがん原性 Ras (RasV12) を発現する体細胞クローンを誘導すると、これらの細胞群は過剰に増殖して良性腫瘍を形成する。この良性腫瘍にさらなる突然変異を導入し、変異細胞自身ではなくその周辺の正常細胞の増殖が強く促進される一連の突然変異体 (*non-autonomous growth*, *nag* 変異体) を単離した。これら *nag* 変異体の責任遺伝子を解析した結果、ミトコンドリア呼吸鎖複合体のコンポーネントをコードする一連の遺伝子群が同定された。これらの結果は、Ras シグナルの活性化とミトコンドリア呼吸鎖の機能障害が同時に起こるとその周辺細胞の増殖が促進されることを意味している。さらに、このような Ras 活性化とミトコンドリア機能障害を同時に起こした変異細胞が Ras 活性化のみを起こした良性腫瘍の近傍に出現すると、良性腫瘍は悪性化して浸潤・転移能を獲得することが分かった。このような細胞非自律的な腫瘍悪性化の分子機構を解析した結果、Ras の活性化とミトコンドリアの機能障害を起こした細胞は活性酸素種を大量に産生し、これが JNK シグナルを活性化することが分かった。さらに、活性化した JNK シグナルは Ras シグナルと協調してがん抑制経路 Hippo 経路を不活化し、これにより炎症性サイトカイン Unpaired (IL-6 ホモログ) の産生を誘導して周辺細胞の JAK/STAT シグナルを活性化することで腫瘍悪性化を引き起こすことが明らかとなった。ヒトのがん組織においてミトコンドリアの機能障害が高頻度に認められるが、その意義はこれまでほとんど不明であった。これらの結果は、ミトコンドリアの機能障害が細胞間コミュニケーションを介してがんの進展を駆動する可能性を示唆している。

(2) 詳細

がんは多段階的な突然変異の蓄積によって発生・進展すると考えられる。例えば、ある一つの上皮細胞ががん原性の突然変異 (がん遺伝子の活性化やがん抑制遺伝子の不活性化) を蓄積することで増殖能や浸潤・転移能を獲得し、がん化していく。一方で、実際のがんの発生・進展過程においては、このような細胞の“遺伝的”な変異の蓄積のみならず、細胞同士の相互作用を介した“非遺伝的”な変化も重要な役割を果たしていることが近年分かってきた。例えば、上皮由来がんの周辺には上皮細胞以外にも間質細胞 (線維芽細胞、免疫系細胞、炎症細胞など) が存在するが、上皮がん細胞はこれらの細胞と相互作用することによっても増殖能や浸潤・転移能を獲得・促進すると推察されている。また、ヒトのがん組織は一つの変異細胞に由来した均一な遺伝的背景をもつわけではなく、異なる遺伝的背景を持ったヘテロな細胞集団であることも分かってきた。これらの事実は、異なる性質をもった細胞同士の相互作用が、がんの発生・進展に重要な役割を果たしていることを示唆している。しかし、そのような細胞間相互作用がいかにがんの発生・進展に寄与するのか、その分子機構はいまだほとんど不明である。その原因の一つとして、生物個体内で引き起こされる細胞非自律的な影響をシステムティックに解析できる優れたモデル系が存在しなかったことが挙げられる。そこで本研究では、この問題を克服しうるショウジョウバエ遺伝的モザイク・クローン法を用いた腫瘍悪性化モデルを利用して、細胞間コミュニケーションを介した腫瘍悪性化機構の遺伝学的解析を行い、以下のような成果を得た。

1. Ras 活性化とミトコンドリア機能障害が同時に起こると周辺細胞の増殖が亢進する

細胞間コミュニケーションを介した腫瘍悪性化の分子基盤を解析するため、ショウジョウバエ上皮をモデル系とした遺伝学的スクリーニングを行った。具体的には、ショウジョウバエ3齢幼虫の複眼原基の上皮組織にがん遺伝子 Ras を活性化した細胞 (Ras^{V12} 発現細胞) のクローンを誘導すると、これらの細胞は過剰に増殖して良性腫瘍を形成する。この良性腫瘍にさらに突然変異を導入してその表現型の変化をスクリーニングした結果、突然変異が導入された Ras^{V12} 発現細胞自身ではなく、その周辺の野生型細胞が非自律的に増殖を亢進するという興味深い突然変異体 (*non-cell autonomous growth*, *nag* 変異体と命名) が多数単離された。これら一連の *nag* 変異体の責任遺伝子を解析した結果、興味深いことにミトコンドリア呼吸鎖複合体の構成タンパク質、あるいはその合成に関わるミトコンドリアリボソームタンパク質をコードする遺伝子群に突然変異が集中していることが明らかとなった。すなわち、Ras シグナルの活性化とミトコンドリアの機能障害が同時に起こると、その周辺の正常細胞が過剰に増殖することが分かった。ヒトのがん組織においてはミトコンドリアの機能障害が高頻度で起こっていることが知られており、本結果は生物学的・医学的に重要な意味を持つものと考えられたため、さらなる解析を進めることとした。

2. Ras/*mito*^{-/-} による周辺細胞の増殖促進は Upd-JAK/STAT シグナルを介して起こる

Ras シグナル活性化とミトコンドリア機能障害を同時に起こした細胞 (Ras/*mito*^{-/-} 細胞) が周辺細胞の増殖を促進するメカニズムを明らかにするため、この現象を起こすのに必要な遺伝子群の遺伝学的スクリーニング (2次スクリーニング) を行った。具体的には、一連のショウジョウバエ染色体欠失系統ライブラリーを用い、Ras/*mito*^{-/-} 細胞クローンが誘導する細胞非自律的増殖を抑制あるいは亢進する染色体欠失領域を探索した。その結果、本スクリーニングによって単離されたサプレッサー染色体欠失領域の中に、*stat92E* 遺伝子が含まれていることが分かった。Stat92E はショウジョウバエ JAK/STAT 経路において機能する転写因子であり、リガンドである炎症性サイトカイン Upd (IL-6 ホモログ分子) がその受容体 Domeless に結合することによって活性化されて細胞増殖を促進する。解析を進めた結果、Ras シグナルの活性化とミトコンドリアの機能障害を起こした変異細胞では Upd の発現が誘導され、これを受けとった周辺細胞が JAK/STAT 経路を活性化して増殖を亢進することが分かった。

3. Ras/*mito*^{-/-} 細胞は JNK の活性化を介して Upd を発現誘導する

Upd の発現は JNK (c-Jun N-terminal kinase) シグナルや Notch シグナルによって制御されることが報告されている。そこで、Ras/*mito*^{-/-} 細胞において JNK シグナルを抑制したところ、Upd の発現誘導が抑制され非自律的な増殖促進も起こらなくなることが分かった。実際に、Ras/*mito*^{-/-} 細胞では JNK シグナルが強く活性化されていることが分かった。一方で、Notch シグナルを抑制してもこのような効果はみられなかった。以上の結果から、Ras/*mito*^{-/-} 細胞では JNK シグナルが活性化し、これにより Upd の発現が誘導されていると考えられた。

4. Ras/*mito*^{-/-} 細胞は ROS の産生を介して JNK シグナルを活性化する

次に我々は、Ras/*mito*^{-/-} 細胞において JNK シグナルが活性化するメカニズムを解析した。JNK シグナルは、様々な細胞内ストレスによって活性化されることが知られている。細胞

内酸化ストレスについて解析を行ったところ、ミトコンドリア機能障害のみ、あるいは Ras 活性化のみを単独で起こした細胞では活性酸素種の産生や酸化ストレスは認められなかったが、Ras/*mito*^{-/-} 細胞では活性酸素や過酸化水素が大量に産生されて強い酸化ストレスが起こっていることが明らかとなった。さらに、Ras/*mito*^{-/-} 細胞において抗酸化酵素を発現させて酸化ストレスを軽減させると、JNK シグナルの活性化が抑制され、また周辺細胞の増殖も抑制された。これらの結果から、ミトコンドリアの機能障害と Ras の活性化は協調的に ROS の産生を誘導し、これが JNK シグナルを活性化して Upd の発現誘導を起こすと考えられた。

5. Ras/*mito*^{-/-} 細胞は Hippo 経路の不活化を介して Upd と Wg の発現を誘導する

上述の解析により、Ras/*mito*^{-/-} 細胞における JNK 活性化が周辺細胞の増殖促進に必須であることが分かったが、JNK シグナルの活性化だけでは Upd の発現誘導が起こらないことも明らかとなった。解析を進めた結果、JNK シグナルの活性化と Ras シグナルの活性化の両者が同時に起こることが Upd の発現誘導に必要十分であることが分かった。そのメカニズムとして、Ras シグナルと JNK シグナルの活性化が同時に起こるとがん抑制経路 Hippo 経路が不活化し、これにより Upd の発現誘導が起こることが明らかとなった。Hippo 経路は進化的に保存されたがん抑制経路であり、転写コアクティベーター Yokie (Yki; Yap ホモログ分子) をリン酸化して抑制することで細胞増殖を負に制御している。我々が本研究を進めている過程で、*upd* が Yki の転写ターゲット遺伝子の一つであることが複数の研究グループより報告されたことから、JNK シグナルと Ras シグナルを同時に活性化した細胞は Yki を介して Upd の発現誘導を引き起こしている可能性が考えられた。これを検証した結果、まさに JNK シグナルと Ras シグナルを同時に活性化した細胞では Yki の転写ターゲット遺伝子 (*expanded*, *cyclin E*, *daip1* など) の発現が強く誘導されていることが分かった。同様に、Ras 活性化とミトコンドリア機能障害を同時に起した細胞においても、Yki ターゲット遺伝子の発現が強く誘導されていた。さらに、このような Yki ターゲット遺伝子の発現は、Hippo 経路の活性化 (Yki の不活性化) を誘導したり Yki の発現を阻害したりすることで強く抑制されることも分かった。加えて、Yki のターゲット遺伝子の一つである分泌性増殖因子 Wingless (Wg; Wnt ホモログ分子) の発現も Ras シグナルと JNK シグナルの活性化により誘導されること、また、Wg の発現誘導も Ras/*mito*^{-/-} 細胞による周辺細胞の増殖促進に貢献していることが明らかとなった。以上の結果から、Ras/*mito*^{-/-} 細胞は Hippo 経路の不活化を介して Yki を活性化して *upd* と *wg* の発現を誘導し、これらの分泌性増殖因子が周辺細胞の増殖を促進すると考えられた。

6. Ras/*mito*^{-/-} 細胞は周辺の良性腫瘍を悪性化する

以上のように、Ras/*mito*^{-/-} 細胞は周辺の正常細胞の増殖を ROS-JNK-Hippo 経路を介して促進することが分かったが、実際のヒトのがん組織の状況を考えると、このような Ras/*mito*^{-/-} 細胞の周辺には、正常細胞のみならず Ras を活性化した良性腫瘍細胞が存在すると想定される。そこで、そのような状況をショウジョウバエ上皮において再現してその表現型を解析した。ショウジョウバエ複眼原基の組織全体で Ras シグナルを活性化すると、細胞は過剰に増殖するものの、これらの細胞は浸潤・転移しない。一方で、Ras シグナルを組織全体で活性化した複眼原基においてミトコンドリア機能障害を起こした細胞群 (Ras/*mito*^{-/-} 細胞群) をモザイク状に誘導すると、その周辺に存在する Ras 活性化細胞群が浸潤・転移能

を獲得して隣接する組織・器官へと動いていくことが分かった。すなわち、Ras 活性化とミトコンドリア機能障害を同時に起こした細胞は、その周辺の良性腫瘍を悪性化する能力をもつことが明らかとなった。さらなる解析により、この周辺良性腫瘍細胞の悪性化は Ras シグナルと JAK/STAT シグナルが協調することによって引き起こされることが分かった(図1)(Ohsawa et al., *Nature*, 2012)。

今回ショウジョウバエで明らかとなった Ras 活性化とミトコンドリア機能障害により誘発される“がん原性炎症”を介した非遺伝的な腫瘍悪性化は、ヒトのがん組織における細胞間コミュニケーションを介したがん進展機構に寄与している可能性が考えられる。現在、がん原性炎症における「細胞老化」の役割とその機構、さらにはその普遍性と多様性の解析を進めており、これらを通じて本現象の包括的理解を目指す。

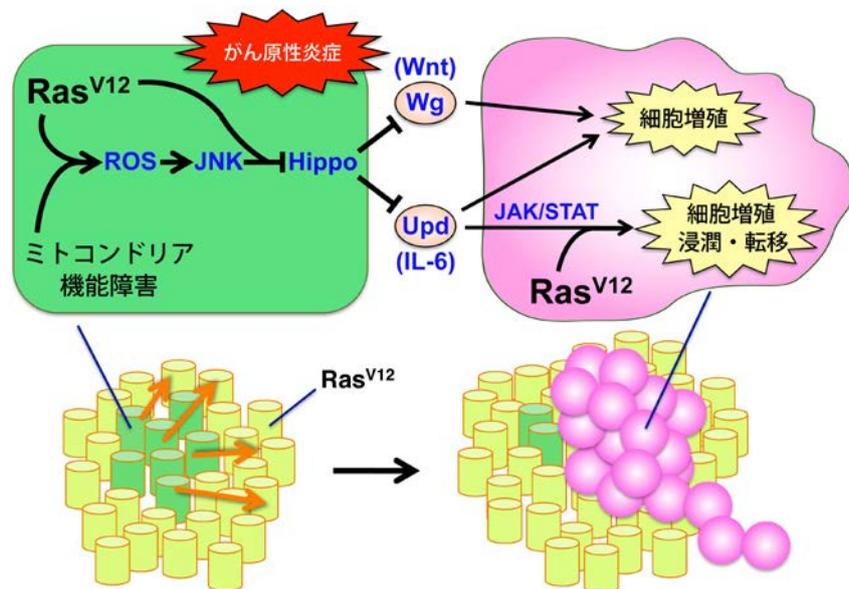


図1 “がん原性炎症”による周辺細胞の非遺伝的な悪性化機構

3. 今後の展開

これまでの3年間で、Ras 活性化とミトコンドリア機能障害によって引き起こされるがん原性炎症のメカニズムの大枠が明らかとなった。残りのさきがけ研究期間では、がん原性炎症の分子メカニズムの詳細を明らかにすることで現象の包括的理解を目指すとともに、本現象の普遍性と多様性を解析していく。具体的には、がん原性炎症を引き起こす一連の突然変異(ミトコンドリア機能障害以外の細胞変化を起こす変異)の動作機序を明らかにすることでメカニズムの普遍性/多様性を明らかにするとともに、同様の現象が哺乳類においても起こるかどうかを培養上皮細胞系を用いて解析する。一方、がん原性炎症における細胞老化の役割とその分子基盤を明らかにし、その人為的制御ターゲットを見いだすことで、がん原性炎症を介した腫瘍悪性化機序を標的とした新たながん治療戦略の基盤構築を目指す。

4. 評価

(1) 自己評価

がん遺伝子の活性化が様々な突然変異と協調して引き起こす“がん原性炎症”のメカニズムを明らかにするという点で、これまでの研究期間における目標はほぼ達成できたといえる。今後は、がん原性炎症の普遍性と多様性、さらにはその生理的意義の解明を目指したい。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、中間評価を行った)。

ショウジョウバエ遺伝的モザイク法を駆使し、世界に先駆けて構築した腫瘍悪性化モデルを用いた個体レベルでの効率的な解析を行い、多細胞コミュニティの中で炎症性の変化に基づく上皮性腫瘍の悪性化に関する秀逸な論文を発表している。論文では、従来の個別の細胞における遺伝的な変異の蓄積による良性腫瘍の悪性化とは異なり、ミトコンドリアに機能障害を起こし、がん抑制経路(Hippo 経路)が阻害された結果 Upd(IL-6 ホモログ分子)などを発現するようになった周囲の他の変異細胞の影響を受け、良性腫瘍が強い増殖促進や浸潤・転移能を獲得することを明らかにした。今後は、このような「がん原性炎症」のメカニズムが哺乳類においても生ずるものなのかを確認すると共に、そのようなメカニズムがどうして生ずるのかを細胞老化と関連づける研究の進展が大変期待できる。さらに、そのメカニズム研究が新たながん治療戦略の基盤となることにも期待したい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

- | |
|---|
| 1. Ohsawa S, Sato Y, Enomoto M, Nakamura M, Betsumiya A, Igaki T
“Mitochondrial defect drives non-autonomous tumour progression via Hippo signalling in <i>Drosophila</i> ”
<i>Nature</i> (2012) 490, 547-551 |
| 2. Enomoto M, Igaki T
“Src controls tumorigenesis via JNK-dependent regulation of the Hippo pathway in <i>Drosophila</i> ”
<i>EMBO Rep.</i> (2013) 14, 65-72 |

(2) 特許出願

該当なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. Ohsawa S, Sugimira K, Takino K, Igaki T
“Imaging cell competition in *Drosophila* imaginal discs”
Methods in Enzymology (2012) 506, 407-413
2. Enomoto M, Igaki T
“Deciphering tumor-suppressor signaling in flies: Genetic link between Scribble/Dlg/Lgl and the Hippo pathways”
J. Genet. Genom. (2011) 38, 461-470
3. 大澤志津江、井垣達吏

「細胞競合：状況依存的な細胞死と代償性増殖」
医学のあゆみ 246, 426-431 (2013) 医歯薬出版

4. 大澤志津江、井垣達吏
「ミトコンドリア機能障害は周辺組織のがん化を促進する：“がん原性炎症”による非自律的な腫瘍悪性化」

細胞工学 HOT Press 32 450-451 (2013) 秀潤社

5. 井垣達吏

「死にゆく細胞による増殖制御」

実験医学 29, 1342-1350 (2012) 羊土社

6. 大澤志津江、井垣達吏

「ミトコンドリアの機能障害は Hippo 経路を介し周辺組織の腫瘍悪性化を引き起こす」

ライフサイエンス新着論文レビュー (2012)

7. 井垣達吏

プレスリリース「細胞間の相互作用で良性腫瘍ががん化する仕組みを解明」

2012年9月28日(JST, 神戸大学)

URL: <http://www.jst.go.jp/pr/announce/20121001/>

8. Tatsushi Igaki

Beatson Workshop “Cold-blooded Cancer” Beatson Institute/Cancer Research UK, Glasgow

“Non-autonomous tumor progression by ‘oncogenic inflammation’ in *Drosophila*” (Invited)

研究報告書

「細胞老化シグナルからみた慢性炎症と癌進展の新しい発症メカニズムの解明」

研究タイプ: 通常型(5年型)

研究期間: 平成23年4月～平成28年3月

研究者: 大谷 直子

1. 研究のねらい

正常細胞に癌遺伝子の活性化や酸化ストレスなどに起因する DNA ダメージが加わると、不可逆的増殖停止である「細胞老化」が誘導される。細胞老化はアポトーシスとならぶ重要な発癌防御機構であり、申請者はこれまで細胞老化の誘導機構の詳細を明らかにしてきた(Ohtani et al. Nature 2001, Takahashi, Ohtani et al. Nature Cell Biol 2006)。またさらに細胞老化反応を生体内で検出できるイメージングマウスを開発し(Ohtani et al PNAS 2007, Yamakoshi et al. J Cell Biol. 2009)、細胞老化の生体における役割を明らかにしてきた。

しかし、アポトーシスとは異なり、細胞老化をおこしても細胞が死滅せず長期間生存し続けることから、細胞老化は、初期には癌抑制機構として働くが、長期的には生体になんらかの不利な影響を及ぼす可能性があると考えられる。最近、細胞老化をおこすと、様々な炎症性サイトカインやケモカイン、細胞外マトリクス分解酵素等が大量に分泌されることが、申請者らを含む複数の研究から明らかになり、この現象は SASP (senescence-associated secretory phenotype)と呼ばれている。体の中では長期間生存する細胞老化を起こした細胞から分泌され続けるこれらの SASP 因子が、炎症の慢性化や癌の進展を引き起こしている可能性が考えられる。しかし、細胞老化における炎症性サイトカイン等の分泌維持機構や、生体内において細胞老化による炎症性サイトカイン分泌等が引き起こす病態については、ほとんど明らかになっていない。

そこで本研究では、これまで考えられていなかった細胞老化や SASP の維持機構から慢性炎症を解析し、慢性炎症や慢性炎症を素地とする発癌の新たなメカニズムの解明を目指す。特に本研究では慢性炎症を素地とする病態として、肥満という病態に着目した。肥満はがんのリスクファクターであることが疫学的に示唆されているが、なぜ肥満の病態において発癌が促進されるのか、そのメカニズムは十分にわかっていない。肥満病態においては IL6 や PAI1 など、SASP 因子としても知られる因子が、体内で増加することが知られている。そこで、この病態にも細胞老化や SASP が関与しているのではないかと考え、解析を行った。

2. 研究成果

(1) 概要

肥満はがんのリスクファクターであることが疫学的に示されているが、その分子メカニズムは十分には明らかになっていない。今回我々は、化学発癌物質 DMBA を塗布する全身性の

発癌モデルマウスを用いて、肥満により肝癌の発症が著しく増加することを見出した。肝癌促進のメカニズムとして、肝癌腫瘍部においては、肥満により肝臓の間質に存在する線維芽細胞である肝星細胞が細胞老化を起こし、SASP 因子と呼ばれる様々な炎症性サイトカインやプロテアーゼ等を持続的に分泌し、腫瘍促進性の高いがん微小環境を形成することが原因であることが明らかになった。次に肥満により肝星細胞の細胞老化が誘導される機構の解明を目指した。肥満により様々な生体動態が変化するが、今回、肥満により腸内細菌のプロファイルが著しく変化することを見出した。そこで腸内細菌の変化に着目し、肝星細胞が細胞老化を起こす腸内細菌由来の代謝産物を検索した結果、肥満により体内において、2次胆汁酸であるデオキシコール酸量が増加し、それが腸管循環を介して肝臓に到達し、肝星細胞に DNA 損傷を与えることで、細胞老化を起こすことがわかった。そしてグラム陽性菌を標的とするバンコマイシン投与により、血中デオキシコール酸の量が著しく減少したことから、グラム陽性腸内細菌がデオキシコール酸を産生している可能性が示唆された。また肥満マウス糞便中の腸内細菌の 16SrRNA 遺伝子の配列を次世代シーケンスの手法で調べたところ、既知の2次胆汁酸産生菌の類縁菌が、肥満マウスで著しく増加していることが明らかになり、この菌がデオキシコール酸を産生している可能性が示唆された。さらに、ヒトにおいても、脂肪肝をベースに発症する NASH(non-alcoholic steatohepatitis)肝炎に伴う肝癌症例において、肝星細胞の細胞老化と SASP が検出され、同様の機構がヒトの肝癌においても働いている可能性が示唆された。本研究成果は Nature 誌に受理され 2013.7.4 付け(電子版 2013.6.26 付け)で発表された(Yoshimoto et al. **Nature** 499, 97-101, 2013)。

(2) 詳細

1. 肥満は肝癌発症と肝星細胞の細胞老化・SASP を促進する

生後 4~5 日の新生仔マウスに化学発癌物質 DMBA を塗布する全身性の発癌プロトコールを用いて、高脂肪食摂取群と普通食摂取群に分け、30 週後に解析したところ、高脂肪食摂取群にのみ 100%のマウスに肝癌が発症することが明らかになった。同じプロトコールを遺伝的肥満マウスである ob/ob マウスに施したところ、やはり、100%の肥満マウスで肝癌が発症

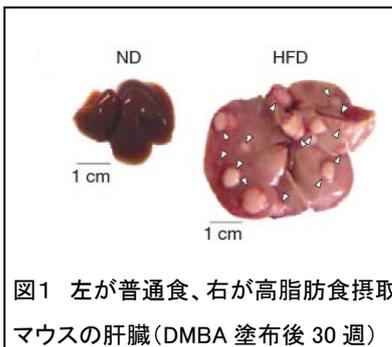


図1 左が普通食、右が高脂肪食摂取マウスの肝臓(DMBA 塗布後 30 週)

したことから、高脂肪食という餌ではなく、肥満病態が肝癌を促進することが明らかになった。肝癌腫瘍部においては、肥満により肝臓の間質に存在する線維芽細胞である肝星細胞が細胞老化を起こし、SASP 因子と呼ばれる様々な炎症性サイトカインを持続的に産生していることが明らかになった。

2. 肝星細胞(肝 stellate 細胞)が高脂肪食摂取による肝癌を促進する

肝星細胞の細胞老化と肝星細胞からの炎症性サイトカイン分泌(SASP)が本当に肝癌促進の原因となっているのかどうかを明らかにするため、肝星細胞の除去を試みた。方法として、肝臓では肝星細胞に特異的に発現する HSP47 というシャペロンタンパクの発現を、HSP47 に対する siRNA を静脈注射することによりノックダウンすることにより行っ

た。この方法により肝星細胞のアポトーシスを誘導することができることが過去に報告されている(Sato Y et al. Nat Biotechnol 2008)。HSP47 の *in vivo* ノックダウンにより肝星細胞の数が減少し、高脂肪食による肝癌形成がコントロールの20%程度まで減少することを確認できた。このことから、やはり肝星細胞の細胞老化と肝星細胞からの炎症性サイトカイン分泌が、高脂肪食による肝癌促進の原因となっている可能性が示唆された。

3. IL-1 β が肥満による肝癌促進に関与する

肝星細胞の細胞老化により、SASP が生じることが明らかになったが、SASP により分泌されるどのようなサイトカインが肝癌を促進するのかについて検討を行った。以前、肝癌促進能が報告されている IL6 に着目し(Park et al. Cell 2010)、IL6 ノックアウトマウスを用いて検討したが、肝癌の形成はあまり抑制されなかった。そこで次に IL-1 ファミリーのサイトカインに着目した。IL-1 ファミリーのサイトカインは、サイトカインカスケードの上流に位置し、様々なサイトカインの産生を促すことが知られている。肥満により形成された肝癌部では、IL-1 ファミリーのサイトカインのうち IL-1 β の発現が顕著に上昇していた。そこで、IL-1 β のノックアウトマウスを用いて DMBA+高脂肪食による実験系を行ったところ、肝癌形成が著しく抑制された。このことから IL-1 β が肥満による肝癌を促進することが強く示唆された。このとき、肝臓の肝星細胞に細胞老化は生じていたが、様々な SASP 因子の発現が抑制されており、やはり、IL-1 β が様々なサイトカインの産生を促し、肝癌に促進的に働くと考えられた。

4. グラム陽性腸内細菌による代謝産物デオキシコール酸が肝癌形成を促進する

次に肥満により肝星細胞の細胞老化が誘導される機構の解明を目指した。肥満により様々な生体動態が変化するが、今回、肥満により腸内細菌のプロファイルが著しく変化することを見出した。そこで腸内細菌の変化に着目し、肝星細胞が細胞老化を起こす腸内細菌由来の代謝産物を検索した。腸内細菌による代謝産物として、胆汁酸産生経路に着目した。肝臓から腸に排泄される 1 次胆汁酸はグラム陽性菌を含む腸内細菌により代謝され 2 次胆汁酸となることが知られている。メタボローム解析の結果、高脂肪食摂取マウスの血清中で、2 次胆汁酸のひとつ、デオキシコール酸の濃度が、普通食摂取マウスよりも有意に高まっていることを見出した。

そこで、マウスの血中デオキシコール酸を下げる処置(①オリゴ糖の一種 DFAIII の経口投与によって、腸内のPHを下げ、デオキシコール酸産生酵素の活性を抑制する。②ウルソデオキシコール酸の経口投与によりデオキシコール酸の排泄を促進する。)を行ったところ、肝癌の形成が著しく抑制された。

さらに、抗生剤4剤の投与により腸内細菌をほぼ除去すると肝癌形成は抑制されるが、そこにデオキシコール酸を経口投与すると、血中デオキシコール酸の濃度が高まり、肝癌形成が回復した。このことから、体内で増加したデオキシコール酸が肝癌を促進することが明らかになった。このとき、肝癌部の肝星細胞に細胞老化が生じていた。また、培養肝星細胞にデオキシコール酸を投与すると、細胞老化が誘導された。以上のことから、腸内で増加したデオキシコール酸が腸肝循環を介して、肝臓に到達し、肝星細胞の細胞老化と SASP を誘導すると考えられた。

5. クロストリジウムクラスターXIに属する菌が肥満による肝癌発症マウスで増加する

今回行った DMBA+高脂肪食による実験系で肝癌が形成されたマウスの糞便中の腸内細菌の、16SrRNA 遺伝子の配列を次世代シーケンスにて確認し、系統樹分類を行った。その結果、クロストリジウムクラスターXI に属する単一の菌(OTU-1105 と分類)が有意に増加していた。さらにこの菌は *C.sordellii* というクロストリジウムクラスターXI に属する胆汁酸産生菌の類縁菌であることが明らかになり、この菌がデオキシコール酸産生に関わっている可能性が強く示唆された。

6. ヒトのNASH肝癌症例においても Stellate 細胞の細胞老化と SASP が生じる

次に肝切除を受けた患者の肝癌切除標本を調べたところ、上記に述べた肥満マウスモデルに発症した肝癌と類似した、著しい脂肪蓄積を伴う組織像を呈すNASH肝癌症例を認められた(NASH肝癌症例の3分の1程度)。これらヒトの症例においても肝癌部の肝星細胞において、細胞老化や炎症性サイトカインの発現が認められることを確認できた。このことから、ヒトにおいても同様のメカニズムが働いている可能性があると考えられる。

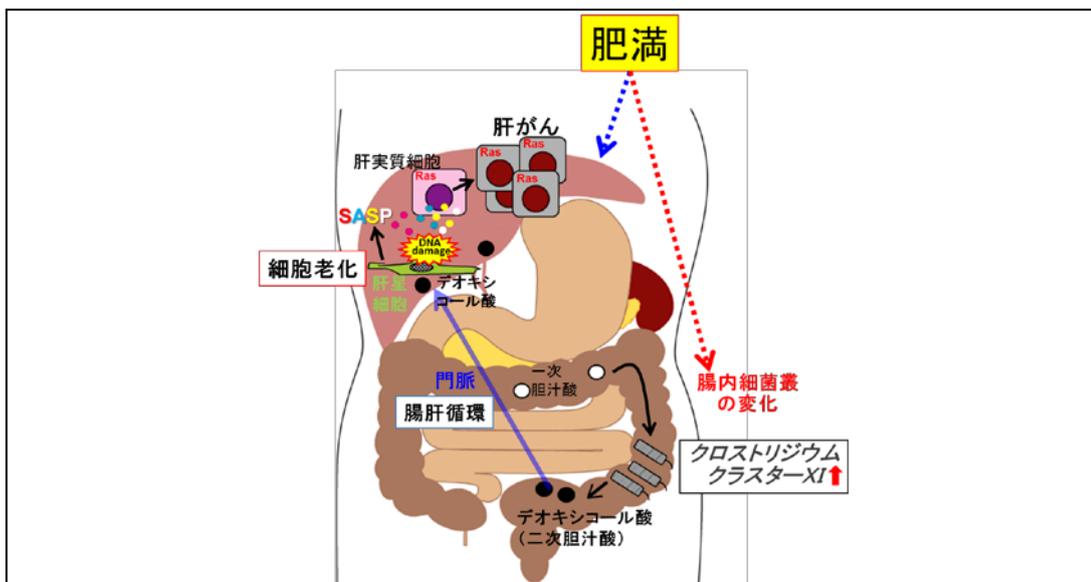


図2(サマリー図): 肥満によって変化する腸内細菌による肝がん促進作用:

肥満により腸内細菌叢が変化し、一次胆汁酸の代謝産物であるデオキシコール酸の濃度が上昇する。デオキシコール酸は腸肝循環により肝臓に到達し、肝臓の間質に存在する肝星細胞の細胞老化を誘発し、それによって分泌された SASP 因子が肝がんを促進する(Yoshimoto et al. Nature 499, 97-101, 2013、Supplementary Figure16 の一部を改訂)。

3. 今後の展開

1. IL-1 β の活性化機構の解明

上述したように、IL-1 β が様々なサイトカインの産生を促し、肝癌に促進的に働くと考えられた。IL-1 β はインフラマソームという機構によって pro-IL-1 β が caspase1 により

cleavage され、活性化することが知られている。本実験系においても、肝腫瘍部においては IL-1 β の cleaved form が認められ、肝星細胞に限局して caspase1 の発現が認められた。インフラマソームによる caspase1 の活性化は様々な Nod-like レセプターを介することが知られている。そこで、本実験系において、肝星細胞におけるインフラマソームの活性化機構を解析する。

2. ヒトにおいても同様に肥満によりデオキシコール酸量が増え肝癌を促進するのか

ヒト NASH 肝癌症例において糞便中の腸内細菌と血中デオキシコール酸量を調べる臨床研究を計画しており、倫理委員会に申請中である。

3. 肥満による肝癌を促進するデオキシコール酸産生菌を同定する

上述したように、クロストリジウムクラスター XII に属する単一の菌 (OTU-1105 と分類) がデオキシコール酸産生に関わっている可能性が強く示唆された。そこで嫌気培養を立ち上げ、肝癌を発症していた肥満マウスの糞便や腸内容物から、デオキシコール酸産生菌の単離同定を目指す。

4. 評価

(1) 自己評価

本研究では肥満に伴う肝癌組織において、細胞老化を起こした肝星細胞が様々な炎症性サイトカインやケモカイン等の SASP 因子を産生し肝癌促進的な癌微小環境を形成することが明らかになった。近年、細胞老化の研究分野では生体における SASP の役割が注目を集めているが、本研究成果により、SASP による肝癌促進という生体における役割の一つを明らかにすることができた。それだけではなく、肝星細胞が細胞老化を起こす原因を追究していったところ、肥満病態で変化する腸内細菌の代謝産物・デオキシコール酸が腸肝循環を介して肝星細胞の細胞老化を起こすことが明らかになり、本研究は慢性炎症や細胞老化の分野だけでなく、生活習慣病学や肝臓病学、腸内細菌学分野にも大きく貢献できる研究成果となった。

(2) 研究総括評価 (本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、中間評価を行った)。

高脂肪食摂取や遺伝的な肥満により腸内で増殖したグラム陽性細菌が一次胆汁酸からより多くのデオキシコール酸を生成し、それが腸肝循環により肝臓に到達し肝星細胞の細胞老化と IL-1 β 産生などの炎症性サイトカインを誘導する現象 (SASP) が起こるため、新生児期に予め化学発癌物質 DMBA で処理したマウスにおいて、肝星細胞の近くで肝癌の発症が促進することを明らかにした。肥満、腸内細菌、細胞老化と発癌とのダイナミックな関係を示したこの成果と論文は、広範な研究領域の研究者の注目を集めただけでなく、国内外で多数の報道がなされ、社会的にもインパクトのある内容であった。今後は、SASP が発生する詳細の解明、ヒトでも同様に肥満が肝癌発症のリスクと成り得ることの確認、デオキシコール酸産生菌の同定などの研究を通じ、生活習慣病や発癌の予防につながる成果が大いに期待できる。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Yoshimoto S, Loo TM, Atarashi K, Kanda H, Sato S, Oyadomari S, Iwakura Y, Oshima Morita H, Hattori M, Honda K, Ishikawa Y, Hara E, Ohtani N.
Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome.
Nature 499, 97-101 (2013)
1. Takahashi A, Imai Y, Yamakoshi K, Kuninaka S, Ohtani N, Yoshimoto S, Hori S, Tachibana M, Anderton E, Takeuchi T, Shinkai Y, Peters G, Saya H, Hara E.
DNA Damage Signaling Triggers Degradation of Histone Methyltransferases through APC/C^{Cdh1} in Senescent Cells
Molecular Cell 45, 123-131 (2012).

(2)特許出願

研究期間累積件数: 2件

1. 発明者: 原 英二(40%)、大谷直子(40%)、吉本 真(15%)、羅 智文(5%)
発明の名称: リスクを軽減することのできる食品成分及び食品組成物のスクリーニング方法
出願人: 公益財団法人がん研究会
出願日: 2013.2.12 (非公開希望)
出願番号: 特願 2013-25030
2. 発明者: 原 英二(40%)、大谷直子(40%)、吉本 真(15%)、羅 智文(5%)
発明の名称: がん及び/又は発がんリスクの検査方法、及び医薬のスクリーニング方法
出願人: 公益財団法人がん研究会
出願日: 2013.2.12 (非公開希望)
出願番号: 特願 2013-25031

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 主要な学会発表

- 1 大谷直子、吉本 真、羅 智文、原 英二
細胞老化による炎症とがん
—肥満に伴い増加する腸内細菌の代謝産物による肝がん促進作用—
第36回分子生物学会年会 ワークショップ「生老病死」の分子生物学の最前線
2013. 12. 3 神戸

- 2 大谷直子
肥満により増加する腸内細菌の代謝産物が肝がんを促進する
第41回日本臨床免疫学会総会 シンポジウム「腸内細菌と免疫疾患」
2013. 11. 28 下関
- 3 大谷直子
肥満により増加する腸内細菌の代謝産物DCAは肝がん発症を促進する
第1回がんと代謝研究会 特別講演 2013.10.30 鶴岡
- 4 Naoko Ohtani and Eiji Hara
The role of cellular senescence in obesity-associated hepatic carcinogenesis
第72回日本癌学会総会 シンポジウム「がん研究とモデル動物」
2013.10.5 横浜
- 5 大谷直子
細胞老化による炎症とがん
—肥満により増加する腸内細菌の代謝産物が肝がんを促進する—
第45回北陸実験動物研究会 2013.9.14 金沢
- 6 Ohtani N, Yoshimoto S, Loo TZ, Kanda H, Sato S, Ishikawa Y& Hara E.
Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer *via* senescence-associated secretome (oral presentation).
Welcome Trust scientific conference, Cell Senescence in Cancer and Aging, Cambridge, UK, 2013.7.22.
- 7 大谷直子
細胞老化と炎症
第6回東京アンチエイジングアカデミー 2013.6.27 東京
- 8 大谷直子
細胞老化の二面性 —がん抑制機構とSASP—
Cellular senescence-associated secretory phenotype(SASP) in aging and cancer development.
第65回細胞生物学会 シンポジウム「老化の分子機構」2013. 6. 21 名古屋
- 9 Naoko Ohtani
Senescence-associated inflammatory secretome and cancer development.
JST-CREST International meeting
Frontiers in immunology and inflammation: From molecule to disease
2013.2. 13 Tokyo Japan

- 10 Shin Yoshimoto, Tze Mun Loo, Hiroaki Kanda, Seidai Sato, Yuichi Ishikawa, Eiji Hara & Naoko Ohtani
Senescence-Associated Secretory Phenotypes(SASPs) Promote Obesity Associated Hepatocarcinogenesis (oral presentation).
Keystone Symposia "Aging and Diseases of Aging" Tokyo 2012.10.25
- 11 大谷直子
Cellular senescence-associated inflammation and disease.
第35回日本高血圧学会総会 シンポジウム「ヒトは血管とともに老いる:血管障害とアンチエイジング、Vascular injury and aging」2012. 9. 20 名古屋
- 12 大谷直子
細胞老化による炎症と発がん
千里ライフサイエンスセミナー「炎症の慢性化と疾患」2012.7.27大阪
- 13 大谷直子
老化とがん —そこに潜む共通の分子機構—
第34回日本分子生物学会 市民公開講座 2011.12.16横浜
- 14 Naoko Ohtani, Shin Yoshimoto and Eiji Hara_
Senescence-associated secretory phenotype (SASP) in fatty-liver based hepatic cancer.
第 34 回 日 本 分 子 生 物 学 会 ワークショップ The molecular biology of "Life-Aging-Disease-Death" 2011.12.15 横浜

2. 著作物

日本語総説

- 1 吉本真、大谷直子、原 英二
肥満に伴う腸内細菌叢の変化が肝がんの発症を促進する
実験医学 カレントピックス 31(19): 3103-3106(2013)
- 2 大谷直子、原 英二
マイクロバイオーームとがん
医学のあゆみ 246: 1095-1101 (2013)
- 3 佐藤正大、大谷直子、原 英二
細胞老化による発がん制御—細胞老化の功罪—
実験医学 31: 733-738 (2013)

- 4 大谷直子
細胞老化と慢性炎症
アンチエイジング医学 9 :40-46(2013)
- 5 大谷直子
細胞老化による炎症とがん
細胞 45:462-465(2013)
- 6 大谷直子
細胞老化の生体における役割—細胞老化によるサイトカインの分泌
(senescence-associated secretory phenotype; SASP)に着目して—
内分泌・糖尿病・代謝内科 37: 203-211(2013)

英文総説

- 1 Ohtani N, Hara E. Roles and mechanisms of cellular senescence in regulation of tissue homeostasis.
Cancer Science 104, 525-30 (2013)

3. プレスリリース

・「肥満に伴う腸内細菌の変化が肝がんの発症を促進する」(平成 25 年 6 月 27 日)

URL: <http://www.jst.go.jp/pr/announce/20130627-2/index.html>

プレスリリースに伴うメディア報道

国内

- 2013 年 6 月 27 日 公益財団法人がん研究会、JST 肥満に伴う腸内細菌の変化が肝がんの発症を促進する
- 2013 年 6 月 27 日 日刊工業新聞 がん研究会 肥満で増える腸内細菌 肝臓がん発症に関与
- 2013 年 6 月 27 日 日本経済新聞 肥満で肝がん、細菌が原因 がん研究会など、マウスで発見
- 2013 年 6 月 27 日 日本経済新聞(電子版) 肥満で肝がん、細菌が原因 細胞を老化し発症促す
- 2013 年 6 月 27 日 毎日新聞 腸内細菌増殖で肝がんリスク がん研究所 マウスで実験
- 2013 年 6 月 27 日 河北新報 肥満で肝がん発症は細菌が原因 細胞を老化、がん研解明
- 2013 年 6 月 27 日 NHK おはよう日本「肥満で増える腸内細菌 肝臓がん発症に関与」
- 2013 年 6 月 27 日 TBS 朝ズバ「肥満で増える腸内細菌 肝臓がん発症に関与」
- 2013 年 6 月 27 日 TBS Nスタ「肥満で増える腸内細菌 肝臓がん発症に関与」
- 2013 年 6 月 27 日 47NEWS(web) 肥満で肝がんは細菌が原因 細胞を老化、がん研解明
- 2013 年 6 月 27 日 ニコニコニュース(web) 肥満で肝がん発症か 腸内細菌が変化、マウス実験—がん研
- 2013 年 6 月 27 日 朝日新聞(デジタル) 肥満になると肝がんの恐れ高まる がん研究所など解明
- 2013 年 7 月 1 日 産経新聞 肥満で肝がん、細菌が原因

2013年7月1日 薬事日報 がん研グループ 肥満に伴う肝癌発症機構 2次胆汁酸の働き解明
2013年7月2日 日刊ゲンダイ朝刊 がん研究会の発表で分かった肥満と肝がんの「怖〜い因果関係」
2013年7月5日 読売新聞夕刊 肝臓がん腸内細菌関係 マウスで実験 高脂肪の食事で増加
2013年7月5日 読売新聞(オンライン) 肥満者の肝臓がん、腸内細菌深く関与か
他

海外

2013.6.26 Nature Cancer: An acidic link
2013.6.26 Nature Gut microbes spur liver cancer in obese mice
2013.6.26 Science/AAAS Gut Bugs could explain obesity-cancer link
2013.6.26 The Scientist Magazine Obesity-cancer link detailed
2013.6.26 Los Angeles Times Obesity, cancer and bacteria in the gut: Scientists explore link
2013.6.26 ecancer New clues to obesity related liver cancer
2013.6.27 MedicalXpress Study finds link between liver cancer and gut bacteria in obese mice
2013.6.27 Scientific American Gut microbes spur liver cancer in obese mice
2013.6.29 The Economist A punch in the gut
他、ドイツ、スペイン、アルゼンチン、ブラジル等でも新聞やラジオニュースに取り上げられた。

研究報告書

「IL-33 産生を伴う慢性疾患と加齢や肥満により増加したナチュラルヘルパー細胞が Th1/Th2 バランスの破綻を惹起するメカニズムの解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年4月～平成28年3月

研究者: 茂呂 和世

1. 研究のねらい

上皮細胞や血管内皮細胞が産生する IL-33 は生体の最前線で生体の異常を感知するセンサーとしての役割を持ち、アトピー患者の皮膚、潰瘍性大腸炎患者の腸管、喘息患者の肺など、様々な疾患、多様な臓器での発現が認められている。ナチュラルヘルパー(NH)細胞は新規に同定した自然免疫系のリンパ球で、恒常的に微量の Th2 サイトカインを産生するが、IL-33 に暴露されると多量の Th2 サイトカインを産生する。他のリンパ球と異なり NH 細胞はリンパ節には存在せず、脂肪組織や、腸管、肺などに多く存在する。慢性疾患は抗原非存在下で局所に起こる炎症であることから、炎症局所に存在し、抗原非特異的に IL-33 によって Th2 サイトカインを産生する NH 細胞が Th2 型の慢性疾患に関与する事が示唆されている。

新生児の体内は Th2 型に偏向しているが、生後まもなく様々な感染を経験することで Th1 型へのシフトが起きることが知られている。ところが、加齢と共に生体内は再度 Th2 型へと偏向していくことも知られており、これが加齢に伴い増加する Th2 型疾患の発症の原因であることが予想される。これまでの Th2 サイトカインに関する研究は獲得免疫系の Th2 細胞を中心に行われてきたが、NH 細胞は加齢や肥満によって増加する細胞であることが明らかになったことから、加齢と共に起きる Th2 型への偏向の本質は Th2 細胞ではなく、NH 細胞である可能性が示唆された。Th2 細胞は抗原刺激を受けることで Th2 サイトカインを放出するのに対し、NH 細胞は無刺激でも恒常的に微量のサイトカインを産生する事から、抗原非依存的に起こる慢性炎症では NH 細胞の産生する Th2 サイトカインが Th2 型偏向を誘導することが考えられる。

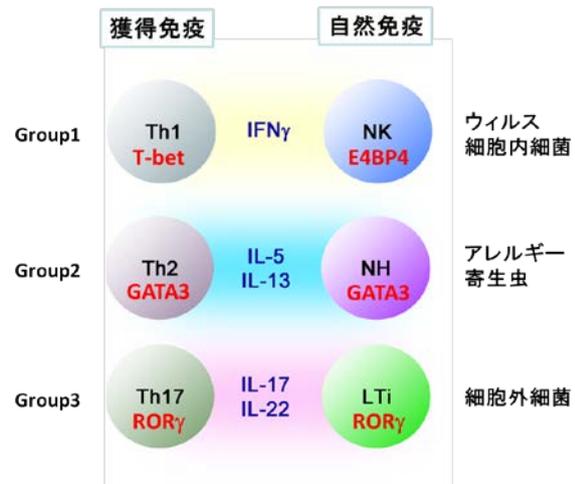
本研究では、NH 細胞の分化や増殖、炎症誘導機構を解明し、NH 細胞がどのような Th2 型慢性疾患に関与するかを明らかにすることで、加齢に伴い好発する Th2 型慢性疾患の発症に NH 細胞がどのように関わっているのかを明らかにする。最終的には、効果的に NH 細胞の働きを抑える方法を開発することで様々な Th2 型疾患の予防や治療が可能になるのではないかと考えている。

2. 研究成果

(1) 概要

1. GATA3によるナチュラルヘルパー細胞の制御(論文リスト3)

サイトカイン産生細胞は Group1、2、3 の 3 グループに大別される。Th1 細胞やナチュラルキラー(NK)細胞は Group1に分類され、IFN γ を産生することで、細胞内細菌感染やウイルス感染において重要な役割を担う。Th17 細胞や LTi(リンパ組織誘導)細胞は Group3 に分類され、IL-17やIL-22を産生することで細胞外細菌感染の排除に働く。Th2 サイトカインを産生するNH細胞はTh2細胞と共に Group2に分類され、アレルギーの悪化や寄生虫感染の排除に働くことが分かっている。免疫は急速で特異性の低い自然免疫と、時間はかかるものの特異的で記憶を兼ね備えた獲得免疫の 2 種類に分けられるが、どの Group にも自然免疫細胞と獲得免疫細胞が存在することが興味深い。NH 細胞の分化は ROR α によって制御されているのではないかと考えられてきたが、本研究から NH 細胞の分化、増殖、サイトカイン産生は ROR α に依存せず、Th2 細胞同様、GATA3 によって制御されていることが明らかになった。また、IL-33 受容体下流では MAPK 経路の p38 が GATA3 依存的な Th2 サイトカイン産生を制御していることが明らかになった。



2. 喘息における NH 細胞の役割(論文リスト1)

喘息は代表的な Th2 型慢性疾患で、IL-5による好酸球浸潤とIL-13による杯細胞過形成に起因する組織破壊と呼吸困難を主症状とする。NH 細胞は発見当初、脂肪組織に特異的に存在する細胞と考えられたが、本研究から NH 細胞は肺や腸管にも存在することが明らかになった。肺の NH 細胞は IL-33 依存的に IL-5 や IL-13 を産生し、喘息症状を悪化させることも明らかになった。喘息の治療はステロイド投与に依存するところが大きい。ほとんどの喘息はステロイド投与により症状の緩和、消失が見られるが、5~10%の患者はステロイドに抵抗性を示し、重症喘息とよばれる。興味深いことに、重症喘息の患者の多くが Th2 サイトカインの中でも IL-5 と IL-13 の産生を伴い、IL-4 産生を伴わない。Th2 細胞は IL-5、IL-13 と共に IL-4 を産生するのに対し、NH 細胞は IL-4 無しで IL-5、IL-13 を産生する事から、重症喘息の発症に NH 細胞が関与する可能性が示唆された。

そこで重症喘息における NH 細胞の役割に着目し研究を行ったところ、NH 細胞は IL-33 と共に TSLP 刺激を受け取ったときに STAT5 が活性化され、抗アポトーシス細胞になるためステロイド抵抗性となることが明らかになった。

(2) 詳細

・ Th1 サイトカインによる NH 細胞の抑制機構

Th1 細胞、Th2 細胞による Th1/Th2 バランスだけでなく、自然免疫系の細胞にも着目し Th1/Th2 バランスを見直し、Th2 型疾患において NH 細胞をどのようにして制御するかを考

えるために、Th1 サイトカインによって NH 細胞の機能が制御されるか否かを明らかにすることは重要であると考え解析を行った。その結果、NH 細胞は IFN β や IFN γ によって増殖と Th2 サイトカイン産生が抑制されることが明らかになった。IFN による抑制は *in vitro* だけでなく、IL-33 誘導喘息モデルマウスにおける肺の NH 細胞や、消化管内寄生虫 *Nippostrongylus brasiliensis* 感染マウスの NH 細胞にも有効であった。

- ・ NH 細胞と他の Group2 ILC

NH 細胞の報告後、Nuocyte と MPP^{type2} と名付けられた Th2 サイトカイン産生細胞が相次いで報告された。MPP^{type2} はミエロイド系細胞への分化能を持つことから NH 細胞とは明らかに異なる細胞であることが明らかになったが、IL-25 投与によってリンパ節に出現する Nuocyte は表現型とサイトカイン産生が NH 細胞と良く似ていた。NH 細胞と Nuocyte が同一の細胞なのか、異なる細胞なのかを明らかにする為に解析を行った結果、NH 細胞が IL-25、IL-33 の両方に反応する細胞なのに対し、Nuocyte は IL-33 受容体の発現が低く、IL-33 投与ではそもそも MLN への出現が見られないことが分かった。また、NH 細胞の移植実験から、NH 細胞は末梢組織や脂肪組織には出現するが、リンパ節へは出現しない細胞であることが明らかになった。リンパ節への移動には CCR7 や CXCR5 などのケモカインレセプター発現が必要であるが、NH 細胞ではこれらのケモカインレセプター発現が見られない。さらに、各細胞の増殖能を比較したところ、NH 細胞は IL-2、IL-2+IL-25、IL-33 存在下で長期にわたって維持できる細胞であるのに対し、Nuocyte は IL7+IL-33 存在下で最大 9 日間しか生存しない細胞であることも明らかになった。これらの結果から、どちらの細胞も Group2 ILC に分類されるものの、その表現型や機能、存在部位は異なることが明らかになった。

- ・ GATA3 による NH 細胞の制御

ROR α が Nuocyte のマスター遺伝子として報告されたことから、同じ Group2 ILC である NH 細胞の分化やサイトカイン産生にも ROR α が重要であることが予想された。しかしながら、ROR α 欠損マウスでは Nuocyte が IL-25 投与により出現しなくなるのに対し、NH 細胞は脂肪組織に数は減るものの存在し、この NH 細胞を分離し IL-33 存在下で培養した結果、野生型と変わらない Th2 サイトカイン産生をすることが明らかになった。そこで、ROR α 以外のどのような分子が NH 細胞の機能に重要な役割を明らかにする為に、IL-33 シグナル伝達経路における分子機構解明を試みた。その結果、IL-33 受容体下流には NF- κ B 経路と MAPK 経路が存在し、MAPK 経路は p38 と JNK を介したものが存在することが明らかになり、中でも p38 を介した経路が NH 細胞の IL-5、IL-13 産生には必須であることが明らかになった。さらに、p38 下流で、GATA3 が転写因子として働き、サイトカイン産生だけでなく、増殖と分化にも関わるということが明らかになった。

- ・ NH 細胞特異的抗体の作製

フローサイトメトリー解析や免疫組織学的解析を遂行するために、NH 細胞特異的抗体の作製は必須である。そこで、脂肪組織からナイーブな NH 細胞を分離し、ラットへの免疫を行ったところ、26 種の NH 細胞特異的クローンができたが、限界希釈後の大量培養の過程でハイブリドーマが増殖しなくなってしまった。そこで、再度 NH 細胞を脂肪組織から分離し IL-2 存在下で培養することにより増殖し、ラットとハムスターへ免疫した。ハムスターからは

陽性クローンが得られなかったが、ラットからは2種類の特異的クローンが得られ、IgG2aとIgG2b抗体であることも明らかになったが、大量培養後、抗体の濃縮を行ったところ、肥満細胞にも反応する抗体であることが明らかになった。そこで、3度目はIL-2培養で増やしたNH細胞をラットにのみ移植し、1次スクリーニングでNH細胞に反応し、肥満細胞を含む全ての血球系細胞に陰性の抗体を108個抽出し、限界希釈後に抗体の濃縮を行ってから2次スクリーニングを行うことで、2種のクローンを得た。この2種はNH細胞特異的抗体で、細胞増殖や抗体産生に問題ないことが確認されているが、濃縮後にProteinGカラムによる精製を行うと失活してしまうため、濃縮法の検討が必要と考えている。

- ・喘息におけるNH細胞の役割

本研究からNH細胞は脂肪組織だけでなく、骨髄、腹腔浸出液、肺実質、小腸、肝臓などにも存在することが明らかになった。肺にNH細胞が存在したことから、Th2型疾患である喘息に着目した。喘息の中でも非アトピー性喘息はIL-33によって病態が悪化する慢性炎症の1つとして知られている。そこで、肺へのIL-33投与後のNH細胞の動態を調べたところ、定常時には肺実質にしか存在しないNH細胞が、IL-33によって肺胞洗浄液中に出現し、IL-5やIL-13産生を行うことで、喘息の主症状である好酸球浸潤と杯細胞過形成を誘導することが明らかになった。NH細胞を含む全てのリンパ球を欠損する $\gamma^{-/-}$ Rag-2 $^{-/-}$ マウスではIL-33投与による好酸球浸潤や杯細胞過形成が起きないが、T細胞とB細胞を欠損するRag-2 $^{-/-}$ マウスでは両方が誘導されることから、非アトピー性喘息における好酸球浸潤や杯細胞過形成はこれまで誘導細胞と考えられてきたTh2細胞を介さないことが明らかになった。また、NH細胞を $\gamma^{-/-}$ Rag-2 $^{-/-}$ マウスへ移植することで、IL-33による好酸球浸潤や杯細胞過形成が回復することから、NH細胞がIL-5、IL-13を産生する事で、好酸球浸潤と杯細胞過形成を誘導することが明らかになった。

- ・重症喘息におけるステロイド抵抗性とNH細胞

重症喘息におけるステロイド抵抗性の発症機序を明らかにする為に、まずステロイド抵抗性が起きる条件を検討した。これまでの多くの喘息に関する研究はOVA投与によって病態を誘導してきた。OVA投与では、主にT細胞を主体とした反応が起きると考えられている。一方、非アトピー性喘息のような、自然免疫を主体とした喘息はIL-33投与によって誘導できる。そこで、野生型マウスに対し、OVA投与または、IL-33投与または、OVA+IL-33同時投与を行い、デキサメタゾン投与を行った。その結果、OVA投与、IL-33投与ではステロイドによってNH細胞浸潤、IL-5/IL-13産生、好酸球浸潤、杯細胞過形成が全て消失したのに対し、OVA+IL-33投与では全ての残存が見られ、ステロイド抵抗性が誘導されたことを示した。IL-33単独では起きないステロイド抵抗性がOVA投与のどのような因子によって抵抗性になるのかを明らかにする為に、IL-33とデキサメタゾン存在下で培養したNH細胞に様々なサイトカインを加えた。その結果、IL-2、IL-7、TSLPをIL-33と併に加えたときのみNH細胞の増殖が抑制されず、ステロイド抵抗性になっていることが示された。これらのサイトカインは全てSTAT5アクチベーターであるところが興味深い、中でもTSLPは重症喘息患者での遺伝子発現上昇が報告されており、OVA投与によって気管支での発現が上がるということが明らかになったことから、IL-33とTSLPの投与デキサメタゾンと共に野生型マウスに行ったところ、IL-33+OVA同様のステロイド抵抗性が示された。TSLP受容体欠損

マウスではステロイド抵抗性が起きない事も確認した。培養系で NH 細胞のステロイド抵抗性を誘導したサイトカインが全て STAT5 アクチベーターだったことから、NH 細胞の STAT5 発現を確認したところ、TSLP 刺激による発現が見られた。さらに、重症喘息の新しい治療法を確立するために、ステロイドと共に STAT5 阻害薬を投与することで NH 細胞のステロイド抵抗性が解除され、ステロイドによる治療が可能になるのではないかと考え、承認薬の中で STAT5 阻害効果を持つ薬品をスクリーニングした。向精神薬として用いられているピモザイドが STAT5 阻害薬として有効であることがわかったことから、IL-33+TSLP によってステロイド抵抗性になったマウスに対し、ステロイドと共にピモザイドの投与を行ったところ、NH 細胞浸潤、IL-5/IL-13 産生、好酸球浸潤、杯細胞過形成の全てが消失し、ピモザイドが重症喘息の治療薬として有効であることが示された。

3. 今後の展開

- ・ NH 細胞特異的抗体の作製は急務であり、現在、ProgeinG カラムを用いずに精製を可能にするため、無血清培地によるハイブリドーマの培養を検討している。
- ・ NH 細胞は定常状態で様々な組織に存在するが、リンパ節には存在しない。T 細胞や樹状細胞は血管やリンパ管を介して局所とリンパ管を行き来するが、NK 細胞は局所に定住しあまり移動しない細胞であることが知られている。NH 細胞がリンパ管や血管を介して移動可能な細胞か、特異的な組織に定住する細胞かを明らかにする為にパラビオシスマウスを作製し解析を行っている。
- ・ NH 細胞は脂肪組織のリンパ組織、Fat-associated lymphoid cluster (FALC) に最も多く存在するが、FALC の組織学的な解析は報告されていない。そこで、FALC の構造を理解するために血管やリンパ管の走行に着目した解析を行うと共に、NH 細胞の機能発現に重要と考えられる IL-33 が脂肪組織内でどのような細胞によって供給されるかを明らかにする。
- ・ 腸管に存在する NH 細胞は慢性炎症の 1 つである潰瘍性大腸炎に関与している可能性が示唆されているため、潰瘍性大腸炎モデルマウスを作製し、NH 細胞の動態解析を行う。
- ・ NH 細胞は恒常的に Th2 サイトカインし、加齢によって増加する細胞であることから、様々な代謝疾患に関与している可能性が示唆されている。そこで、NH 細胞とメタボリックシンドロームに着目し、肥満に起因する疾患の解析を行う。
- ・ 様々な疾患における NH 細胞の役割を解析するために、NH 細胞がどこでどのような細胞から分化するかを明らかにすることは重要である。そこで現在、NH 細胞の分化培養系を樹立し、NH 細胞特異的前駆細胞の探索を行っている。

4. 評価

(1) 自己評価

これまで T 細胞を主体に考えられてきた Th2 サイトカイン産生機構であるが、本研究から、Th2 細胞だけでなく NH 細胞も Th2 型疾患に重要な役割を持つことが明らかになってきた。Th1 細胞の産生する IFN は Th2 細胞同様、NH 細胞の増殖やサイトカイン産生を負に制御することも明らかになった。喘息や腸炎、メタボリックシンドロームへの NH 細胞の関与も明らかになり

つつあり、喘息については新しい治療法の提案ができたことから、本研究は当初の予想に沿って進行しており、GATA3によるNH細胞のTh2サイトカイン産生の制御やNH細胞の分化についても解析が進んでいることから予想以上の発展をしていると考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、中間評価を行った)。

現在では2型自然リンパ球に分類されようになったTh2サイトカインを産生するナチュラルヘルパー(NH)細胞を世界に先駆けて同定し、その解析は世界をリードしている。本研究では、NH細胞の増殖、分化、サイトカイン産生がGATA3によって制御されていること、さらにNH細胞を増殖させるIL-33と抗原を用いて誘導するステロイド抵抗性のマウス喘息モデルにおいて、重症喘息患者で遺伝子が活性化するTSLPが発現することによりNH細胞がステロイド抵抗性になること、そのモデルマウスにTSLP刺激で活性化される細胞内転写因子Stat5の阻害剤であるピモジドを投与することにより阻害すると、ステロイド投与の効果を回復させることを示す論文を発表しており、研究は概ね順調に進捗していると評価される。今後は、難航しているNH細胞特異的抗体の作製に期待したい。また、NH細胞の分化制御や潰瘍性大腸炎や肥満におけるNH細胞の役割を明らかにすることが大いに期待できる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

- | |
|--|
| 1. Kabata H, Moro K, Fukunaga K, Suzuki Y, Miyata J, Masaki K, Betsuyaku T, Koyasu S, and Asano K. Thymic stromal lymphopoietin induces corticosteroid resistance in natural helper cells in the inflamed airways. Nat Commun. In press. |
| 2. Koyasu S and Moro K. Th2-type innate immune responses mediated by natural helper cells. Ann N Y Acad Sci. 1283, 43-9, 2013 |
| 3. Furusawa J, Moro K, Motomura Y, Okamoto K, Zhu J, Takayanagi H, Kubo M, Koyasu S. Critical role of p38 and GATA3 in natural helper cell function. J Immunol., 191(4), 1818-26, 2013 |
| 4. Koyasu S and Moro K. Role of Innate lymphocytes in infection and inflammation. Frontiers in Immunology. 3:101,1-13, 2012 |
| 5. Koyasu S and Moro K. Innate Th2-type immune responses and the natural helper cell, a newly identified lymphocyte population. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2, 109-14. 2011 |

(2) 特許出願

なし。

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

日本免疫学会総会・学術集会、日本アレルギー学会学術大会、20th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages、Stage Surface Barrier Immunology Group Meeting、日本インターフェロンサイトカイン学会学術集会、International Endotoxin and Innate Immunity Society Meeting、日本眼科学会総会、The congress of Interasma

著作物

- 茂呂和世、古賀諭、小安重夫: ナチュラルヘルパー細胞の寄生虫感染・アレルギーにおける役割、秀潤社、細胞工学、第 30 巻/第 4 号/387-392
- 茂呂和世、小安重夫: 新しい自然免疫リンパ球、ニューサイエンス社、Medical Science Digest、第 37 巻第 1 号、2-4
- 茂呂和世、小安重夫: 自然免疫で活躍するナチュラルヘルパー細胞の役割、羊土社、実験医学、30 巻、第 19 号、3051-3055
- 茂呂和世、古澤純一、小安重夫: GATA3 によるナチュラルヘルパー細胞の制御、最新医学社、最新医学、第 68 巻、第 8 号、1797-1801
- 加畑宏樹、茂呂和世、小安重夫: グループ 2 自然リンパ球とアレルギーの関連、羊土社、実験医学、第 31 巻、第 17 号、2779-2784

プレスリリース

- ・ ステロイドが効かない重症ぜんそくのメカニズムをマウスで解明～Stat5阻害剤投与で重症ぜんそくが改善～(平成25年10月25日)

URL: <http://www.jst.go.jp/pr/announce/20131025/index.html>

新聞報道

- 日刊工業新聞 2013/10/28
- 薬事日報 2013/11/1
- 朝日新聞 2013/11/18