

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「細胞外微粒子に起因する生命現象の解
明とその制御に向けた基盤技術の創出」
研究課題「細胞外微粒子への生体応答と発がん・
動脈硬化症との関連の解析」

研究終了報告書

研究期間 2019年10月～2025年03月

研究代表者：豊國 伸哉
(名古屋大学 大学院医学系研究科
教授)

§2 研究報告

(1) 実施概要

1980 年代以降、日本人死因はがんと動脈硬化症が主病因である。本研究の目的は、特に外因性の細胞外微粒子が、がんならびに動脈硬化症の発症や進展に及ぼす影響を明らかにすることである。同時に、外因性微粒子と内因性微粒子を結びつける分子機構を探索し、その解明を行った。外因性細胞外微粒子は産業の発展と密接に関連しており、原料・製品・産業廃棄物の 3 段階に分類される。原料として今でも多くの発展途上国で使用される纖維性鉱物アスベスト(石綿)、製品として米国で卵巣癌との関連性が社会的問題となったタルク、産業廃棄物として広汎な産業活動に起因する PM2.5、中途よりマイクロプラスチックにも着目して研究を実施した。異物処理には鉄代謝が深く関与することが知られる。細胞外小胞(EV)と鉄代謝がヒトで CD63 を基軸として共役していることを世界で初めて明らかにし、タルクが卵巣癌の原因となりうることを示した。動脈硬化症の解析では、多層カーボンナノチューブ NT50 の曝露経路で影響が異なることを明らかにし、PM2.5 の影響はマクロファージが鍵を握ることが判明した。また、次世代のウェアラブル素材のナノ材料を多量に合成し評価することに成功した。これらの技術は、口腔内に注目した研究と併せて COVID-19 感染制御に役立つ可能性がある。マクロファージのカーボンナノチューブ受容体を同定し、炎症との関連を明らかにした。Epstein-Barr ウィルスの発がん性に関して、発がん性ウィルスのみに存在するウイルス遺伝子産物 BNRF1 が EV に内包され、放出されることを見出した。また、ヒト大腸がんと関連する腸内細菌 *Fusobacterium nucleatum* が高い還元力を持つ膜小胞を分泌することを見出し、電気化学的・生物学的解析を実施した。

このように 6 グループが柔軟にかつ有機的に協力しながら多数の成果を生み出した。戦略的な分業として、豊國グループは免疫染色を含む病理形態解析をすべての他のグループ分も担当し、室原・佐藤グループは single cell RNA sequencing の解析を強力に後押しした。また、北浦・大町グループは合成自体に価値がありウェアラブル素材として期待される新規ナノマテリアルを豊國・室原グループの解析に多量に供給した。

(以下、豊國チーム全体の特筆すべき成果を箇条書きで示す。)

- エクソソームマーカー CD63 が IRP/IRE 制御を受け、鉄代謝の一部を構成することを発見
- 石綿貪食でフェロトーシスを起こしたマクロファージが放出する EV の発がん関与を発見
- フェロトーシス検出に優れた抗体 HNEJ-1 を開発し、生理的なフェロトーシスを発見
- *Brcal* 変異が白石綿による中皮腫や過剰鉄による腎癌を促進し、フェロトーシス抵抗性確立が鍵であることをラットで示した。*Brcal/2* 変異が男性・女性不妊の原因となることを発見
- タルク・アスベストなど細胞外微粒子が卵巣癌の原因となることをラットで証明
- COVID-19 において、ヒト舌の侵入経路として ACE2 より TMPRSS2 の発現が高いこと、飲酒と性別(女性)がリスクであることを発見。COVID-19 関連マウスモデルで低温プラズマの舌照射により免疫応答が変化することを発見
- フェロトーシスが重症 COVID-19 肺病変ならびにトキソプラズマ眼症に関わることを発見
- マイクロプラスチックは、卵巣癌の前癌病変でもある子宮内膜症を重症化することを発見
- 創傷治療応用が期待されるマキシンの簡便な分散液合成法を確立
- ナノマテリアルを用いたフレキシブルおよびストレッチャブルデバイス応用を実現
- カーボンナノチューブを認識するヒト受容体として Siglec-14 を同定、炎症との関連を解明
- 細胞基質からミトコンドリアへ鉄を運搬する新たなメカニズムとして sideroflexin-3 を同定
- 腫瘍ウィルスである Epstein-Barr ウィルスは、BNRF1-IFI27 axis によりエネルギー産生を制御して、B 細胞を効率的に不死化することを発見
- がん組織上への細菌集積を促進する FadA がヘミン添加で促進されることを発見

(2)顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. EV が鉄代謝・発がん病態に関わる機構を解明(外因性微粒子・内因性微粒子の関連の発見)

概要:細胞外小胞(EV)と鉄代謝の関する新原理を明らかにした。EV の代表的マーカーCD63 が、ヒトにおいて鉄代謝の特徴である転写後の mRNA レベルの制御システム IRE/IRP の制御下にあり、鉄過剰状態で細胞が鉄を充填したフェリチンを EV として分泌することを初めて明らかにした。これは、自らの他の細胞のみと鉄を安全にシェアするという機構である一方、アスベスト纖維を貪食しフェロトーシスを起こすマクロファージも同様の EV を放出し、発がんの標的である中皮細胞で酸化的 DNA 傷害を起こす負の作用も報告した。(Blood 誌、Redox Biology 誌)

2. ウィルスによる細胞の不死化に重要な機構を発見

概要:Epstein-Barr ウィルス(EBV)は約 50 年前に発見されたヒト腫瘍ウィルスで、リンパ腫・咽頭癌・胃癌などの原因となる。これまでの EBV の oncogene として EBNA-2 や LMP1 が知られていたが、本研究では BNRF1 遺伝子産物も B 細胞の不死化やその維持に重要であることを明らかにした。BNRF1 は宿主のミトコンドリアタンパク質 IFI27 の発現を誘導し、エネルギー産生の際に生じる活性酸素種の産生を抑え、感染細胞の安定した増殖を保証していた。この効果は遺伝子組換えウイルスを使用したマウスゼノグラフトモデルでも確認された(PLOS Pathogens 誌)。

3. 動脈硬化症の新たなリスク因子としてカーボンナノチューブ呼吸器系曝露を発見

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1. カーボンナノチューブ受容体の発見

概要:ヒトでの安全性が懸念されるカーボンナノ材料を今後より発展させていくためにはその毒性発現メカニズムの理解とその克服が重要である。私たちはカーボンナノチューブを認識するヒト受容体として Siglec-14 を発見し、それがカーボンナノチューブの毒性発現の一端を担っていることを初めて明らかにした。この知見は、毒性発現を回避するカーボンナノ材料の設計に有用であり、かつ健康被害が生じた際の治療方法の確立にも応用可能である。

2. マキシンの大量合成法の開発と導電材料・熱電材料応用

概要:マキシンの大量分散液合成法(Front Chem 2022)をベースにして、様々な用途開発を実施し、ストレッチャブル透明導電フィルム(APEX 2023)をはじめとした導電材料を中心とする成果が得られた。新たな応用展開として、樹脂材料への混合を容易にする化学修飾法の開発した

3. 次世代ナノマテリアル効率的合成の開発と応用

概要:ナノマテリアルの社会実装に向けて、十分量を供給できる信頼性の高い合成手法の確立に取り組んだ。ゲル濾過法による半導体型カーボンナノチューブの効率精製法(APEX 2021)、遷移金属カルコゲナイトのポストドーピング法(ACS Nano 2022)、化学剥離によるマキシンの分散液合成法(Front. Chem. 2022)を確立した。また、社会実装に向けてナノマテリアルの応用として、グラフェンのバッテリー電極応用(Angew Chem, Int Ed 2020)、ストレッチャブル透明導電フィルム応用(APEX 2023)や COVID-19 センサー(Nanoscale 2023)を開発した。

<代表的な論文>

1. Yanatori I, Richardson RD*, Dhekne HS, Toyokuni S*, Kishi F (*co-corresponding authors). CD63 is regulated by iron via the IRE-IRP system and is important for ferritin secretion by extracellular signals. *Blood*;138(16):1490-1503, 2021. doi: 10.1182/blood.2021010995.

概要:血清フェリチン値は鉄貯蔵のマーカーとしてヒト臨床で広く使用されているが、その分泌機構は不明であった。今回、細胞外小胞を規定する分子の1つ CD63 がヒトにおいて鉄代謝に特徴的な IRP/IRE による転写後制御を受けていることを初めて明らかにした。細胞内に鉄が十分にあると CD63 の翻訳が開始され、鉄搭載フェリチンが細胞外に分泌される。こうして、余分な鉄は安全なかたちで近接のまたは遠隔にある自らの細胞のみとシェアされるのである。(Blood 誌掲載号の表紙となり、Editorial で紹介された。)

2. Ito F, Kato K, Yanatori I, Murohara T, Toyokuni S. Ferroptosis-dependent extracellular vesicles from macrophage contribute to asbestos-induced mesothelial carcinogenesis through loading ferritin. *Redox Biology* 2021 Oct 21;47:102174. doi:10.1016/j.redox.2021.102174.

概要:アスベスト纖維の中皮腫発がん性に関して、外因性細胞外微粒子と内因性細胞外微粒子を結びつける新たな分子機構を明らかにした。マクロファージはアスベスト纖維を異物として取り込むがフェロトーシスに陥る。その際に、細胞外小胞(EV)を分泌することを発見した。このEVは鉄搭載フェリチンを含むが、発がん標的である中皮細胞はこのEVを受け取ることにより、酸化的DNA傷害を受けることが判明した。これは全く新しい発がん機構である。

3. Yamaguchi SI, Xie Q, Ito F, Terao K, Kato Y, Kuroiwa M, Omori S, Taniura H, Kinoshita K, Takahashi T, Toyokuni S, Kasahara K, Nakayama M. Carbon nanotube recognition by human Siglec-14 provokes inflammation. *Nature Nanotechnology* 2023 Jun;18(6):628-636. doi: 10.1038/s41565-023-01363-w.

概要:タンパク質三次元構造の *in silico* 探索によりカーボンナノチューブ(CNT)を認識する受容体としてSiglec-14を同定し、Siglec-14はCNTを認識するとSyk経路により炎症応答を誘導すること明らかにした。この結果は、Siglec-14がCNTの炎症毒性に関与すること、またその抑制にはSyk阻害剤が有効であることを示唆する。(Nat Nanotechnol誌掲載号のNews & Viewsに取り上げられた。)

§ 2 研究実施体制

(1)研究チームの体制について(*は中途よりのメンバー)

グループ名	研究代表者または主たる共同研究者氏名	所属機関・部署・役職名	研究項目
豊國グループ	豊國 伸哉	名古屋大学大学院医学系研究科・生体反応病理学・教授	ナノ粒子の発がん影響ならびにがん細胞との相互作用
室原グループ	室原 豊明	名古屋大学大学院医学系研究科・循環器内科学・教授	細胞外粒子の動脈硬化影響
大町グループ	大町 遼*(2020年度12月に北浦 良から交代)	和歌山県立医科大学・医学部・准教授(2024年4月に異動)	生体応答に向けたナノマテリアルの作製法の開発と構造解析
中山グループ	中山 勝文*(さきがけより編入)	立命館大学薬学部・免疫微生物学・教授	環境微粒子に対する生体応答分子機構の解明
佐藤グループ	佐藤 好隆*(さきがけより編入)	名古屋大学大学院医学系研究科・ウイルス学・准教授	ウイルス関連腫瘍の発生・進展における細胞外微粒子の理解
岡本グループ	岡本 章玄*(さきがけより編入)	物質材料研究機構・高分子バイオ材料研究拠点	癌誘発細菌が産生する高酸化還元活性膜小胞の生理機能に関する研究

(2)国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

- ・高野裕之チーム: 奥田知明(慶應大)とPM2.5が特に動脈硬化症に及ぼす影響に関して(室原グループ)連携している。
- ・さきがけ「微粒子」 高橋暁子(がん研究会がん研究所)と連携し、病理形態解析に関してcytoglobinの肝星細胞におけるFISH解析を実施し、鍵となるデータを提供した(Igarashi N *et al.* Nat Commun 2022)。→2024年12月に豊國G博士研究員だった伊藤文哉が着任予定
- ・吉森保チーム(大阪大)の作製した遺伝子改変マウスの病理形態解析を実施した。
- ・Marcus Conrad (Helmholz Zentrum München, Germany), Des Richardson (Griffith University, Brisbane, Australia), Brent Stockwell (Columbia University, New York, US)とフェロトーシス・鉄代謝に関してネットワークが形成されており、共著として論文化した (Blood 2021; Redox Biol 2021; Nat Commun 2024)。本研究代表者 豊國伸哉は2022年10月ならびに2024年11月のCold Spring

Harbor Asia の”Iron, Reactive Oxygen Species & Ferroptosis in Life, Death & Disease”のオーガナイザーの1人になっている。