

令和 3 年 10 月 26 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 31 年度

受付番号 201970031

氏 名 川野 裕子

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。
なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地：ニューヨーク州ロチェスター（国名：アメリカ合衆国）
2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。
老化と発癌のメカニズム－骨髄内炎症と環境制御が造血機能に及ぼす影響
3. 派遣期間：平成・令和 31 年 4 月 1 日 ～ 令和 3 年 9 月 30 日（914 日間）
4. 受入機関名及び部局名
受入機関名： University of Rochester
部局名： Department of Medicine, Division of Endocrine/Metabolism
5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**
【記載事項】
 - ・ 研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等
 - ・ 新型コロナウイルス感染症の影響にかかる特例措置のうち、国内採用開始・採用期間延長・翌年度渡航のいずれかの適用を受けた場合は、当該措置の適用による影響等(注)「6. 研究発表」以降については様式 10－別紙 1～4 に記入の上、併せて提出すること。

1. 研究の背景と目的

当該研究員は、大学院博士課程の研究活動において、白血球上昇作用や造血幹細胞の動員（普段末梢血中に現れない造血幹細胞が末梢血に現れる現象）作用も持つため臨床において広く用いられている Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) の造血幹細胞動員のメカニズムの研究を行ってきた。その過程において、G-CSF の副反応である発熱や骨痛、動員があまり起こらず移植に必要な十分な造血幹細胞が採取できない poor mobilizer の存在など臨床上の問題点に着目し、発熱や疼痛を来す炎症物質である prostaglandin E2 (PGE2) が G-CSF により惹起された交感神経刺激を受けた骨髄内好中球により産生されることで発熱をきたし、さらに骨芽細胞上で動員の抑制因子として機能するオステオポンチンを誘導することを明らかにし、poor mobilizer の原因の一端を示した (Kawano, Blood 2016)。交感神経はストレスにより惹起されるため、この現象はストレス刺激により骨髄内に強い非感染性の炎症が起きることを示唆している。一方、大腸癌や乳癌は、PGE2 の産生を抑えるアスピリンの長期投与により発生が抑制されることが報告されており (Rothwell PM, Lancet 2012)、炎症と癌の関連性が注目されてきた。骨髄異形成症候群 (myelodysplastic syndrome :MDS) や白血病等の難治性造血器腫瘍は高齢者に多く発生することが知られており、その原因として加齢によるダメージの蓄積が遺伝子的なエラーの積み重ねとなり、ニッチ細胞や造血幹細胞の機能不全を起こすことが考えられているが、詳細は未だ明らかではない。これらのことから研究員は、ストレスなどによる慢性的な炎症が加齢に伴う癌の増加につながると考え、ストレスな

どから起こる骨髄内炎症が、どのように加齢に伴う難治性造血器腫瘍増加に関わっているかを追究し、その機序を明らかにしていくことで新たな治療法の開発につなげることを目的として当初の研究計画を設定した。

2. 研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況

上記で述べたように当初計画では、老化や様々なストレス負荷に伴う造血器悪性腫瘍発生率の上昇は、骨髄内無菌性炎症とそれに伴う骨髄内微小環境変化により起こっている可能性を追究することを主目的としていた。当初研究計画遂行の過程で、本研究員は骨髄に対するストレス負荷のうち、局所放射線照射が、骨髄に炎症性変化と骨髄内微小環境変化を引き起こすことを突き止め、またそれは老齢に伴う変化と類似していることに気が付いた。そのため、そのメカニズムを解析する上で良いモデルあることに注目し、局所放射線照射による免疫応答と骨髄内微小環境へのその影響、造血機能への影響を調べた。

a. 局所放射線照射による早期免疫応答と骨髄内微小環境の変化

悪性腫瘍診療において今や欠かすことのできない放射線療法は局所照射で行われることがほとんどである。放射線照射による腫瘍縮小効果のメリットは計り知れないが、それと同時に最小限にデザインされた局所照射においても、予期されない遷延する深刻な血球減少や二次発癌など、様々な副反応を惹起することも知られている。しかし、そのメカニズムに関しては未だ明らかではない。また腫瘍縮小効果に関しても、直接的な組織障害のみならず、放射線によって惹起された免疫反応による抗腫瘍効果が近年注目されているが、それに関しても、腫瘍特異抗原による免疫誘導などが報告されているものの、放射線そのものによる免疫応答のメカニズムは未だに明らかにされていない部分が多い。そこで我々はそれらのメカニズムを明らかにすべく、small animal radiation research platform(SARRP)を用いたマウスの片側脛骨照射モデルを確立し、骨髄、骨髄内微小環境における変化の詳細な解析を行った。まず、マウスの片側脛骨をターゲットとして15Gy単回局所照射(targeted irradiation:TR)を行い、照射後2, 6, 48時間後と1, 3週間後に照射側(TR)と反対側(contralateral side:CONT)の脛骨両方を取り出し、骨髄、Collagenase-1処理骨細胞(digested bone)のフローサイトメトリーによる表面マーカー解析と骨髄細胞外液(bone marrow extracellular fluid:BMEF)におけるサイトカイン解析を行った。それにより、照射後超早期、2時間後にはすでにIL-1b, IL-18, CXCL2, CCL2/3といった炎症性のサイトカインやケモカインの上昇が見られ、6時間後をピークとして48時間後には定常レベルへ戻ることを突き止めた。(図1)それと同時に好中球やマクロファージといった骨髄球系細胞の上昇がTR側のみならず、CONT側でも認められ、これらの超早期炎症反応が全身に及んでいることを示唆した。また、6時間後をピークとした免疫応答は骨髄球系細胞などの自然免疫系にとどまらず、T細胞、特にCD8陽性の細胞障害性T細胞の一過性の上昇が両側において認められた。(図2)これはT細胞上に主に発現し、細胞障害性T細胞への分化を促進するCXCR4のリガンドであるCXCL9/10の骨髄内での上昇と一致しており、放射線照射によるこれらのケモカインの上昇がT細胞の応答を惹起していると考えられた。これらの細胞障害性T細胞の劇的な上昇は、今まで腫瘍特異抗原依存性と考えられていたT細胞による抗腫瘍効果が放射線照射そのものによって起こっていることを示唆しており、非常に重要な所見と考えられた。またそれに続く48時間後には、両側において骨髄内の環境側細胞、MSC(mesenchymal stem cell)やMSCの幼若な分画であるPaS(Sca-1/PDGFa

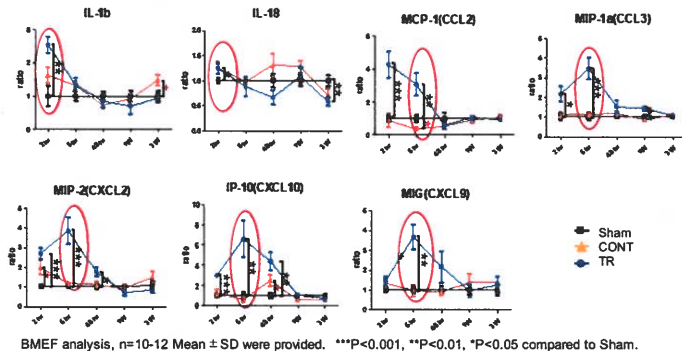


図1. 局所放射線照射(単回、15Gy)による時間経過に伴うBMEFサイトカイン解析
早期2時間後に前炎症性のサイトカインではすでに上昇がみられ、ほとんどのサイトカインが6時間後にピークに達する

陽性分画)、Paav (CD51/PDGFa 陽性分画) の劇的な増加が認められた。(図2) これらにより局所放射線照射は、非常に迅速な炎症反応とそれに続く骨髓微小内環境の劇的変化を全身性に起こすことが示された。これらの現象から当該研究員は、以前に自らが行った研究における骨髓内無菌性炎症反応との類似性を見出し、これらの迅速な炎症反応がカテコラミンによって惹起されている可能性を考えた。そこで、BMEF 中のエピネフリン (EP) /ノルエピネフリン(NE)濃度を測定したところ、早期応答性の免疫反応がピークを迎える6時間後に一致して、特にCONT側において優位なNEの上昇が認められた。このことより、放射線照射による全身性の免疫応答に対し骨髓局所のカテコラミン産生の関与が示唆された。これらの結果は、2019年 Radiation Research Society(RRS), American Society of Hematology(ASH)の年次総会にて学会発表を行い、ASHにおいてはAbstract achievement awardを受賞した。

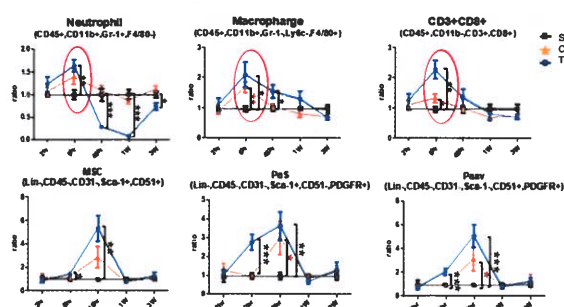


図2. 局所放射線照射による免疫細胞とそれに引き続く骨髓環境側細胞の全身性の増加

b. 放射線照射による早期免疫応答のメカニズムの検討

【1】 in vitro 培養系での放射線照射による免疫応答の解析

放射線照射による早期免疫応答、その背後にカテコラミンの局所産生増加が関わっている可能性を考え、in vitro 細胞培養系において in vivo の現象を再現し、メカニズムを検討することとした。ウィルス感染や化学療法などで惹起されるサイトカインストームに骨髓球系細胞からのカテコラミン産生が大きく寄与していることが報告されており (Staedtke et al, Nature, 2018)、そのことから骨髓環境を骨髓球系細胞条件で再現することが可能な M-LT-BM (Myeloid-Long-term bone marrow culture: Katayama et al, Immunity, 2003) を用いて放射線照射の影響を検討した。その結果 5Gy の放射線直接照射によりカテコラミン産生、それに伴う炎症性サイトカインの上昇が認められた。これらはタイミング (6 時間後)、上昇するサイトカイン

(CXCL2, CCL2/3, CXCL9/10) とも in vivo の現象をほぼ再現するものであった。(図3) さらに同培養系で放射線照射後の細胞を免疫学的に magnetic beads を用いて CD11b 陽性骨髓球系細胞と CD11b 陰性細胞 (この培養系ではほぼ間葉系細胞) に分離し、RNA 抽出を行って qPCR を施行したところ、アドレナリンレセプター (ADR) β 受容体 RNA は、CD11b+でのみ $\beta 2$ の上昇が見られ、 $\beta 3$ も CD11b+細胞で上昇傾向が見られた。しかし、ADR $\alpha 1$ は CD11b+/-両方で上昇が認められ、むしろ CD11b-側の上昇のほうが顕著であった。(図4) 先に述べた nature の論文では、カテコラミン産生刺激は ADR $\alpha 1$ 刺激を通じて起こることが示されており、骨髓球系にのみ着目した解析であったが、これらの結果を踏まえれば、骨髓内環境では骨髓球系細胞のみならず、骨髓環境側の細胞、すなわち間葉系細胞も大きくカテコラミン産生に寄与していることが示唆された。次に、カテコラミンの実際のサイトカイン産生への影響を調べるため、同様の培養系にてカテコラミン刺激とその受容体の阻害薬による検討を行った。その結果、主にサイトカインの産生刺激に寄与していると考えられるのは、ADR $\beta 2$ 刺激であり、一部 $\beta 3$ 受容体刺激の可能性も示唆された。しかし、これらのサイトカイン上昇を NE により惹起した際、それらは $\beta 1/2$ 選択的阻害薬であるプロプラノロールにてほぼ完全にブロックされたことより、qPCR の結果と考え合わせると、放射線刺激は、ADR $\alpha 1$ を介して骨髓球系、間葉系細胞療法でカテコラミン産生刺激を起こすが、同時に ADR $\beta 2$ が骨髓球系でのみ発現上昇し、主にサイトカイン産生の刺激を担っていると考えられた。しかし、実際にプロプラノロールを作用させた後に同様の培養系で放射線照射を施行すると、逆に NE 濃度の上昇とともにサイトカインレベルの著

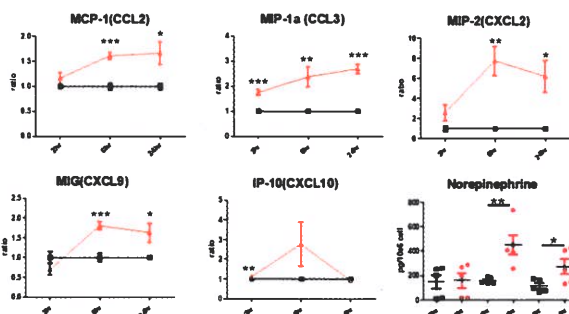


図3. 長期骨髓培養 (LT-BM) における直接放射線照射によるノルエピネフリンの上昇と同期したサイトカイン上昇は、in vivo での反応をほぼ再現している

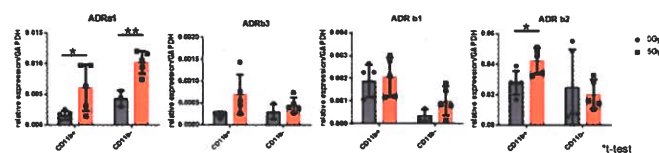


図4. 長期骨髓培養 (LT-BM) における直接放射線照射ではアドレナリン受容体 (ADR) の発現調整が見られ、ADR $\alpha 1$ は CD11b+/-両方、ADR $\beta 2$ は CD11b+のみで発現上昇が認められる

球系にのみ着目した解析であったが、これらの結果を踏まえれば、骨髓内環境では骨髓球系細胞のみならず、骨髓環境側の細胞、すなわち間葉系細胞も大きくカテコラミン産生に寄与していることが示唆された。次に、カテコラミンの実際のサイトカイン産生への影響を調べるため、同様の培養系にてカテコラミン刺激とその受容体の阻害薬による検討を行った。その結果、主にサイトカインの産生刺激に寄与していると考えられるのは、ADR $\beta 2$ 刺激であり、一部 $\beta 3$ 受容体刺激の可能性も示唆された。しかし、これらのサイトカイン上昇を NE により惹起した際、それらは $\beta 1/2$ 選択的阻害薬であるプロプラノロールにてほぼ完全にブロックされたことより、qPCR の結果と考え合わせると、放射線刺激は、ADR $\alpha 1$ を介して骨髓球系、間葉系細胞療法でカテコラミン産生刺激を起こすが、同時に ADR $\beta 2$ が骨髓球系でのみ発現上昇し、主にサイトカイン産生の刺激を担っていると考えられた。しかし、実際にプロプラノロールを作用させた後に同様の培養系で放射線照射を施行すると、逆に NE 濃度の上昇とともにサイトカインレベルの著

しい上昇が認められた。これらの結果から、カテコラミン産生刺激という観点で見ると、 $ADR\alpha 1$ 刺激は産生増加とそれに伴う auto-amplification を惹起するが、 $ADR\beta 2$ 刺激は逆にカテコラミンの産生をベースラインで抑制していることが示唆される。

これらを証明するため、現在 $ADR\alpha$ ブロッカーであるプラゾシンを用い、カテコラミン刺激によるサイトカイン上昇効果（上昇をブロックできないと予想される： $ADR\beta 2$ 作用であるため）、放射線刺激によるカテコラミン産生阻害効果とそれとともなうサイトカインの産生増加阻害（カテコラミン産生をブロックし、サイトカインの上昇を抑制すると予想される）を検討するため、*in vitro* での実験系を準備中である。

【2】 遺伝子改変モデルマウスを用いたメカニズムの証明

以上に述べた放射線照射による骨髓内造血細胞及び環境側形成細胞の早期免疫応答におけるカテコラミン仮説を証明するため、我々は現在以下のモデルマウスを導入、それらによる *in vitro/in vivo* 両方の解析を予定している。

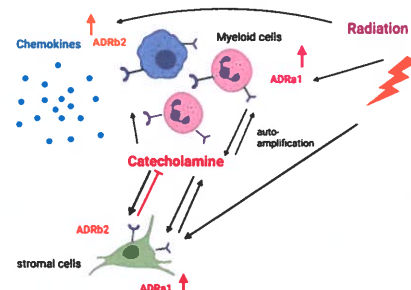
LysM-Cre/Th flox: LysM-Cre は、ミエロイド系細胞に特異的に存在するリゾチームをコーディングする遺伝子に Cre リコンビナーゼを導入したモデルマウスであり、Lox-P システムを用いた Th flox (Tyrosine hydroxylase fl/fl) と交配することによりミエロイド系細胞選択的にカテコラミン産生の起点酵素である tyrosine hydroxylase を knock down し、ミエロイド系細胞におけるカテコラミン産生を阻害できる。LysM-Cre マウスについては当該施設ですでに導入・維持されており、Th flox マウスは作成者であるワシントン大学より導入済みで、維持・繁殖を進めている。

Prx-Cre/Th flox: Paired related homeobox 1 (Prx) は、胎生期において中胚葉に発現し、筋・骨格系の形成を調整する遺伝子であるが、成年マウスにおいては主に間葉系細胞に発現の局在が確認されるため、Prx-Cre マウスを用いると、loxP との組み合わせにて間葉系細胞特異的に遺伝子の knock down を行えることが報告されている (Agarwal et al, 2016, PNAS)。Prx-Cre マウスはすでに当該施設にて維持・繁殖済みであり、現在 Th-flox マウスとの交配を行っている。LysM-Cre/Th flox マウスは骨髓球系特異的に Th の knock down を行えることが先の nature の論文に報告されているが、現在のところ Prx-Cre/Th flox の組み合わせの報告例はない。しかし上記2系統マウスには、fsROSA26tdTomato が導入された系も同時に維持されており、これにより選択的 depletion の確認はフローサイトメトリーや顕微鏡下にて可能であると考えている。これらのマウスを用いて、*in vitro* 培養系での放射線照射によるカテコラミン、サイトカイン産生への影響、*in vivo* での局所放射線照射による早期免疫応答がこれらの選択的 depletion により軽減・または消失するかを検討し、予想される結果が得られた場合は上記に述べた放射線照射によるカテコラミン産生刺激とそれに伴う免疫応答反応のメカニズムが証明できると考えている。また、*in vitro* の結果からカテコラミン産生は血球・間葉系細胞両方から行われていることが考えられ、Prx-Cre と LysM-Cre の交配による double targeting knock down も計画している。

c. 計画の進行状況のまとめと今後の展望

上記に述べたように、当該研究者は骨髓内微小環境変化の造血への影響をストレス刺激による炎症反応惹起に焦点をおいた研究を計画していた。ストレス刺激として局所放射線モデルを確立し、それによりストレス刺激によるカテコラミン産生増加とそれに伴う炎症反応、続く骨髓内微小環境変化までの詳細メカニズムの解明に成功した。(図5) メカニズムの完全な証明には上記に述べたマウスモデルを含め、未だに完遂されていない実験計画が残されており、その完遂をもって学術誌への投稿を検討している。しかし、当初計画の大筋を解明することができ、完遂までの道筋は整っていることからほぼ目標の達成に近づけたと考えている。当該研究者が解明したストレス応答に対する炎症反応におけるカテコラミン寄与仮説は、解明されればより多様な状況、すなわち老年モデルや MDS などの造血器悪性腫瘍モデルでも同様な遷延性炎症増悪仮説が提唱されていることから、応用が可能であると考えられ、Th 阻害剤（メチロシン）によるカテコラミン産生抑制や、アドレナリン受容体 α 阻害剤（プラゾシン）などが炎症の遷延を防ぎ、長期的な障害発生の予防への新たなツールとなる可能性を示唆している。特筆すべきは、メチロシン

図5. 局所放射線照射による早期免疫応答カテコラミン寄与仮説



やプラズシン等は既存薬としてすでに長く臨床にて使用されており、副作用等の観点から長期投与にも十分に耐え、かつ安価で簡便であることから、もし新たな予防や治療の方法として確立すれば、多くの人にはかりしれないベネフィットをもたらす可能性のあることである。研究員の期間中に完遂することは残念ながら叶わなかったが、上記のメカニズムを証明し、薬剤投与によるベネフィットを明確に示し、学術誌に投稿するために鋭意努力を継続中である。

3. 新型コロナウイルス感染症の影響にかかる特例措置による、採用期間延長の適用による影響等

当該研究員は、新型コロナウイルス感染症の影響にかかる特例措置のうち、6 か月間の採用期間延長の適応を受けた。新型コロナウイルス感染症の影響により、採用期間の後半 6 か月間に多大な遅延の影響を受け、特にメカニズム解明の段階で研究室使用不可や実験に必要な物品が入手困難となる、などで進捗状況に影響がでたが、延長期間中にそれらの状況のかなりの改善がみられ、詳細メカニズムの解析とそれに基づいたマウスモデルの確立までたどり着くことができた。適応期間中に雑誌投稿の段階まで進みたかったが、メカニズムの解析段階で一部予想と異なる結果が出たこと(骨髄球系のみならず間葉系細胞のカテコラミン産生への寄与の判明、アドレナリン受容体の異なる働き)より一部計画の見直しを行ったことからそこまでには至ることができなかった。しかし、延長期間中に十分研究と研究計画の確立に集中できたことから、結果的により大きな成果を得ることができたと考えている。