

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 30 年度

受付番号 201860777

氏 名 柳下陽子

(氏名は必ず自署すること)

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: シアトル (国名: 米国)

2. 研究課題名(和文) ※研究課題名は申請時のものと違わないように記載すること。

スルフォラフェンによる炎症病態を標的とした新たな糖尿病予防および治療法開発

3. 派遣期間: 平成・令和 30 年 11 月 1 日 ~ 令和 3 年 1 月 31 日

4. 受入機関名及び部局名

受入機関名: Fred Hutchinson Cancer Research Center

部局名: Translational Research Program, Public Health Sciences Division

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)**

(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)

(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。

【要約】

脂肪炎症は、肥満を中心として発症する代謝異常の基盤病態として近年注目されている。本研究計画では、酸化ストレス応答において中心的な生体防御機構を発揮する Keap1-Nrf2 系が、脂肪炎症抑制を介した代謝疾患予防及び治療の標的となる可能性を、動物実験及びヒト臨床試験サンプル解析の二つのアプローチから検討することを最終目標とした。特に、「基礎(Bench)から臨床へ(Bedside)」の橋渡し研究と表現されるトランスレーショナルを目指した本研究計画を実施するにあたり、ブロッコリーあるいはその新芽(スプラウト)に高濃度で含まれるスルフォラフェン(Sulforaphane)が Keap1-Nrf2 系を誘導することに着眼し、スルフォラフェン投与による肥満誘導性脂肪炎症抑制効果とその治療応用への可能性を検討することを目指した。初年度は、動物実験実施のための環境整備、過去に実施されたスルフォラフェン臨床試験で得られた検体を用いた予備解析、さらに文献計量学的解析によるヒト及び動物実験におけるスルフォラフェンの投与量の検討を行った。2年目には、肥満マウスモデルを用いたスルフォラフェン投与試験、2019年12月に中国啓東市で実施されたスルフォラフェン臨床試験の検体解析を予定していた。しかしながら、新型コロナウイルス感染症の拡大による著しい研究活動の制限から、当初の研究計画の遂行が困難な状況に直面した。よって、当初の計画どおりに研究を進めることはできなかったが、解析アプローチや実験モデルに変更を加え、本研究テーマに基づいた研究成果達成を目指した。以下に具体的な研究内容とその実施状況及び成果発表の詳細について示す。

【研究の概要】

1) 動物モデル研究とヒト臨床研究におけるスルフォラフェン投与量の検討

トランスレーショナル研究においては、対象薬剤の投与量の最適化は最も重要な検討項目の一つである。特に本研究計画における肥満誘導性モデルマウスへのスルフォラフェン投与実験の実施にあたり、臨床応用への実現可能な投与量を検討することが非常に重要であると判断した。そこで、1994年から2019年に実施された動物モデル研究(マウス及びラットを使用した報告、全250報)、及び

ヒト臨床試験（合計 87 報）を対象とし、そこで報告されたスルフォラフェンの投与量を文献計量学的に解析した。その結果、動物モデル研究において投与の効果が認められたと報告されるスルフォラフェン投与量の中央値は、経口投与では 175 $\mu\text{mol/kg}$ body weight、腹腔内投与では 113 $\mu\text{mol/kg}$ body weight であることがわかった。非常に興味深いことに、実際にマウス研究で設定されたスルフォラフェンの投与量は、報告により最大で約 10,000 倍の大きな違いがあることが分かった（図 1）。さらに、体表面積に基づきマウスまたはラットを用いた研究で報告されたスルフォラフェンの投与量をヒトへの投与量として換算し、実際にヒト臨床試験で使用された投与量と比較検討を行った。その結果、動物モデルとヒトへの投与量には 10 倍以上ものひらきがあることが明らかとなった（図 1）。スルフォラフェンはその安全性から、Nrf2 誘導材の中でも特に臨床応用が期待されている天然化合物であるが、疾患予防や治療への応用を視野に入れた基礎研究を行ううえでは、その投与量の最適化が今後の非常に大きな課題であることが浮き彫りとなった。当研究業績は、Molecules 誌に掲載された（Yagishita *et al.*, Molecules, 2019）。

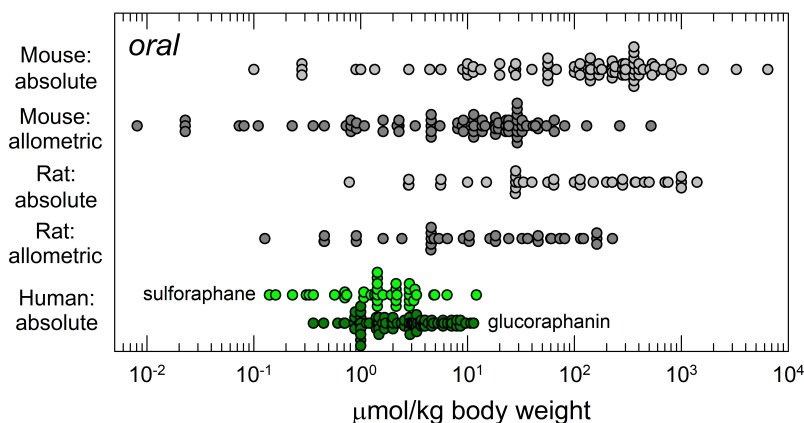


図 1 マウス、ラット及びヒトへのスルフォラフェン経口投与量の比較

2) 肥満モデルマウスにおける Nrf2 活性化による脂肪炎症抑制効果の検討

上記に示した通り、新型コロナウイルス感染症の拡大による研究活動の制限から、2 年目に実施予定であった肥満誘導性脂肪炎症モデルマウスへのスルフォラフェン投与実験の中止を余儀なくされた。そこで、本研究計画の予備解析で得られた検体をより詳細に解析することにより、Nrf2 シグナルの活性化が脂肪炎症を抑制する可能性に迫ることとした。当予備実験は主に、2016 年、当時の所属先であった東北大学医学系研究科において実施されたものである。共同研究者の協力のもと、得られた検体を派遣先研究機関へ輸送し、以下に示す解析を実施した。

肥満誘導性脂肪炎症に着眼した本解析では、高脂肪食誘導性モデルマウス及び遺伝子改変肥満モデルマウス（*db/db* マウス）の二つのモデルを採用し、さらに Nrf2 を活性化する手段として、Nrf2 誘導剤の一つである CDDO-Im の投与、及び遺伝子改変による Nrf2 活性化を導入した。まず脂肪組織における炎症評価として炎症性反応に関連した遺伝子発現を解析した。その結果、遺伝子改変による全身性 Nrf2 活性化マウスは、対象群（野生型）マウスと比較して白色脂肪組織における *F4/80*, *Cd68*, *Ccl2* 遺伝子の発現が著しく低いことがわかった（図 2）。また *db/db* マウスに CDDO-Im を短期間（7 日間）あるいは長期間（12 週間）投与した結果、CDDO-Im の長期投与により *db/db* マウス脂肪組織における *Ccl2* 遺伝子の発現が低下することが分かった。以上から、Nrf2 シグナルの活性化が肥満により誘導された脂肪炎症を抑制する可能性が示された。さらなる分子メカニズムの解明を目指し、組織特異的な遺伝子改変マウスの解析を行った。肥満により脂肪炎症が生じる過程では、主に（1）脂肪細胞の肥大化、（2）肥満脂肪組織へのマクロファージの浸潤の二つが重要な因子であると考えられている。そこで、Nrf2 活性化がこれら二つの因子に関連して脂肪炎症を抑制する可能性を検討する目的で、2 種類の組織特異的な Nrf2 活性化遺伝子改変マウス、すなわち（1）脂肪細胞特異的な Nrf2 活性化マウス、（2）マクロファージをはじめとした myeloid 細胞特異的な Nrf2 活性化マウスを樹立し、解析を行った。高脂肪食投与により脂肪炎症を誘導したところ、両モデルマウスは対象群マウスと比較し、脂肪組織における *F4/80* 遺伝子の発現、および脂肪組織へ浸潤した *F4/80* 陽性マクロファージの数が有意に低いことが明らかとなった（図 3）。これらの結果から、脂肪細胞及び myeloid 細胞で発現する Nrf2 活性化シグナルが、脂肪炎症抑制作用における分子機序に直接関与する可能性が示された。論文投稿に必要な解析は全て終えており、現在論文投稿へ向けた準備の最終段階である。

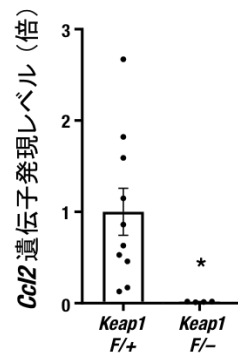


図 2 全身性 Nrf2 活性化マウス脂肪組織における *Ccl2* 遺伝子発現

Keap1 F/+ : 対照群マウス、*Keap1* F-/- : 全身性 Nrf2 活性化マウス

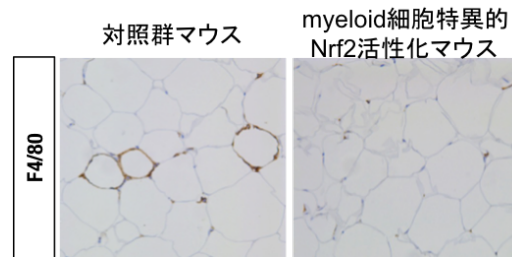


図 3 白色脂肪組織におけるマクロファージマーカー F4/80 陽性細胞

3) Nrf2 誘導剤を用いた臨床研究における実用的なバイオマーカー利用の検討

トランスレーショナル研究においては、バイオイメージングや薬物動態・薬力学解析などいくつかの鍵となる解析手段があるが、中でもバイオマーカーは最も重要なアプローチである。本研究では、スルフォラフェンを用いた臨床試験検体の炎症バイオマーカーを解析し、スルフォラフェンがヒト脂肪炎症抑制作用を示す可能性を検討することを目指とした。初年度には、受け入れ先研究者であるケンスラー先生により中国啓東市で実施されたスルフォラフェン第Ⅱ相臨床試験（2018 年実施、完了済）で得られた血漿検体を用いた予備解析を行った。2 年目では、同じくケンスラー先生主導のもと 2019 年 12 月に実施された 10 日間のスルフォラフェン投与第Ⅱ相臨床試験で回収された血液および尿検体を解析対象とし、網羅的な炎症性サイトカイン解析、血球細胞の遺伝子発現解析を計画していた。しかし上記記載の理由に加え、アメリカ国外からのヒト検体の搬入が規制され、当研究計画の遂行が不可能となった。

そこで研究計画を変更し、文献に基づいた計量分析により Nrf2 誘導剤を用いたヒト臨床研究における実用的なバイオマーカー利用の検討を行うこととした。本解析では、スルフォラフェン以外にも Nrf2 誘導剤として実際に臨床試験で使用されているフマル酸ジメチル、バルドキシロンメチル、オルティプラッツを加えた合計 4 つの化合物を用いた臨床試験を分析対象とした。1982 年から 2020 年に行われた合計 152 件の報告から実際に解析されたバイオマーカーを抽出し、有効なバイオマーカーの検索ならびにその利用の最適化について検討した。その結果、Nrf2 誘導剤の臨床研究において多く採用されているバイオマーカーは図 4 に示す 6 つのカテゴリー、(1) Nrf2 標的遺伝子発現変化、(2) (1) 以外の薬剤作用機序に関連した遺伝子発現変化、(3) 炎症関連バイオマーカー、(4) 酸化ストレス関連バイオマーカー、(5) 発ガン性関連バイオマーカー、(6) 代謝関連バイオマーカーに分類できることがわかった。特に Nrf2 標的遺伝子発現と炎症に関連したバイオマーカーは、proof of concept の取得と臨床試験で対象とされた疾患との関連から、最も多く採用されていることがわかった。また興味深いことに、それぞれのバイオマーカーを用いた報告のうち約半数近い報告では、Nrf2 誘導剤による介入によりこれらバイオマーカーが統計学的に有意な変化を示さないことが報告されていることも明らかとなった（図 4）。1982 年以来蓄積されてきた Nrf2 誘導剤の臨床研究を網羅的かつ総合的に解析する試みはこれまでなされてこなかったことから、今回の解析を通し、今後の Nrf2 誘導剤臨床試験の展望を示すことができたと考える。当解析結果は、Antioxidants 誌に掲載され、カバーアーティクルとして採用された（Yagishita *et al.*, Antioxidants, 2020）。

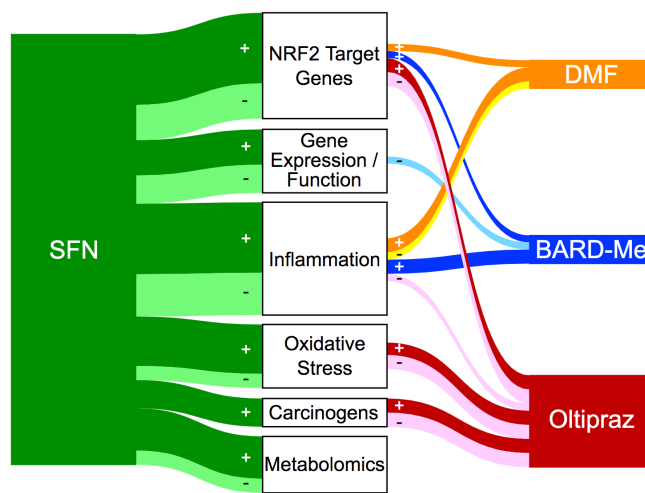


図4 Nrf2 誘導材臨床試験で用いたれたバイオマーカーとその結果の統計学的有意性

+:統計学的に有意 (p<0.05) な変化を示した報告、-:統計学的に有意でない変化を示した報告

SFN:スルフォラフェン、DMF:フマル酸ジメチル、BARD-Me:バルドキシロンメチル、Oltipraz:オルティプラッツ

【成果の発表、関係学会への参加状況】

派遣期間内には、研究内容 1) 及び 3) に関連した 2 本の論文を投稿した。研究内容 2) に関しては、現在論文投稿の最終段階であり、派遣期間終了後数ヶ月以内には投稿を完了する予定である。また研究の各段階において関係学会に参加し、国際学会で 2 度の口頭発表を行った（うち 2020 年 3 月に開催予定であった国際学会は新型コロナウイルスの影響で、アブストラクトのみ公表のみとなった）。また 2019 年 10 月に行なわれた研究機関内部でのセミナー発表 (Translational Research Program Seminar Series) では、自身の研究内容について周知できただけでなく、異なる研究分野の研究者との交流を深める有意義な機会となった。