

Annual Report 2016

東京医科歯科大学難治疾患研究所

東京都文京区湯島1-5-45

電話 03-5803-4504

<http://www.tmd.ac.jp/mri/>

Medical Research Institute Tokyo Medical and Dental University

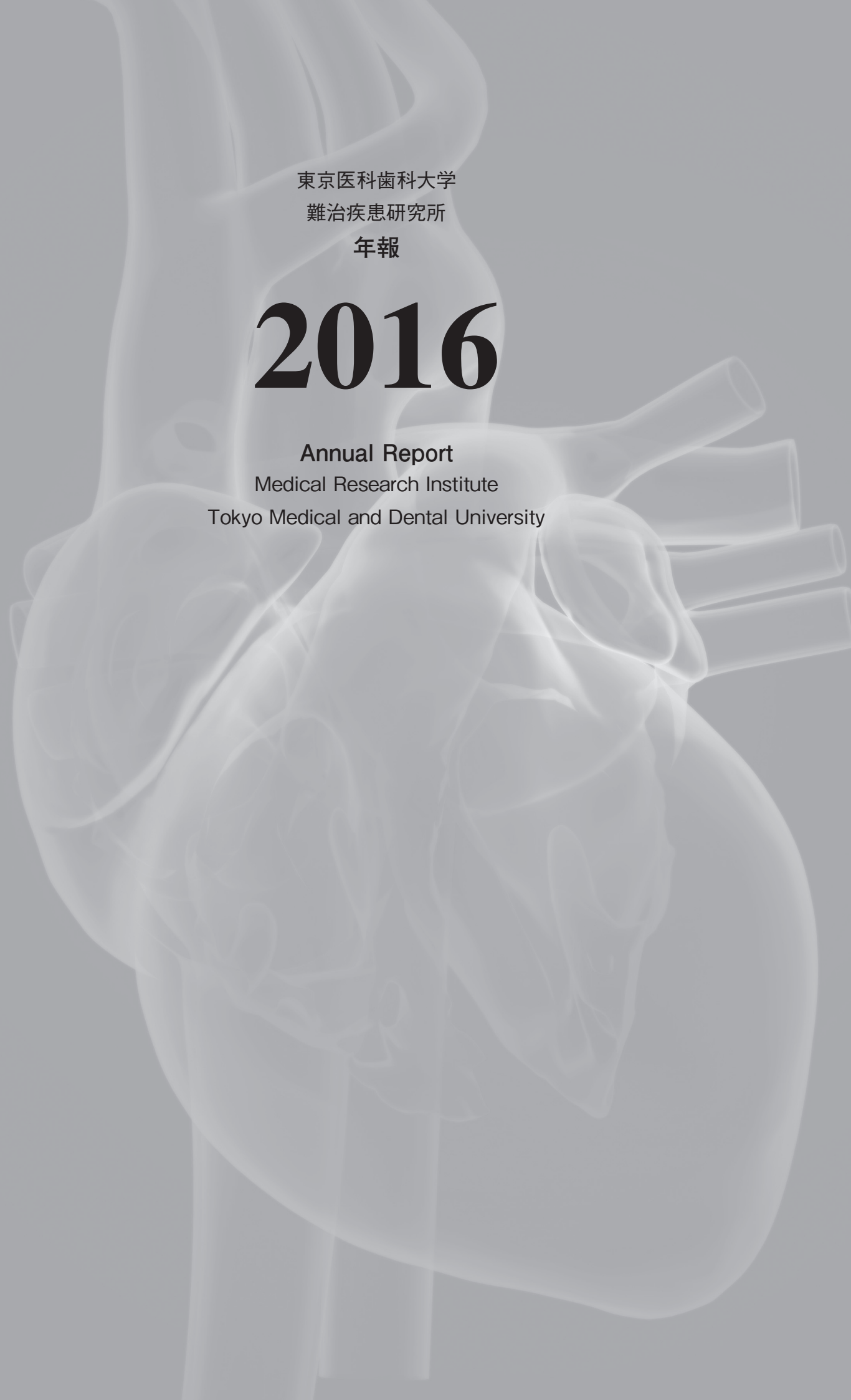
1-5-45 Yushima Bunkyo-ku Tokyo 113-8510 Japan

Tel +81-3-5803-4504

年報

東京医科歯科大学難治疾患研究所





東京医科歯科大学
難治疾患研究所
年報

2016

Annual Report
Medical Research Institute
Tokyo Medical and Dental University

まえがき

本年報は、国立大学法人東京医科歯科大学難治疾患研究所における2015年1月から12月までの研究と教育などに関わる活動報告です。本研究所では「病因・病態が明らかにされていないために未だ有効な診断法、治療法、予防法が確立されていない疾患」を難治疾患と定義し、その克服のため基礎から応用まで幅広い研究活動を繰り広げております。本研究所は、平成21年に文部科学大臣に全国共同利用・共同研究拠点「難治疾患共同研究拠点」に認定されましたが、その活動状況も記載しています。平成28年度からは、第二期の拠点活動が始まります。この期に難病基盤・応用研究プロジェクトも新たな課題を選択してスタートします。また、九州大学生体防御医学研究所、熊本大学発生医学研究所、徳島大学先端酵素学研究所とネットワークを組み、トランスオミクス医学研究活動の支援も開始します。各支援室についても、学内他センター群との連携で、支援体制を強化し、利用者の方により機能的にご利用いただけるよう制度改革を進めて行くつもりです。

最先端の研究活動で生み出した成果を、拠点活動により多くの方に利用していただけるよう、これからも鋭意活動を続けて行きたいと考えておりますので、宜しくお願い致します。

難治疾患研究所長 石野史敏

Contents

1. 所在地	3
2. 組織	4
3. 職員及び学生数	5
4. ハイライト	6～11
5. 難治疾患共同研究拠点	12～15
6. 学位取得者	16
7. 難研セミナー	17

難治疾患研究所

先端分子医学研究部門

1. 分子薬理学分野 20～21
2. 分子細胞生物学分野 22～23
3. 分子神経科学分野 24～25
4. 生体防御学分野 26～27
5. 生体情報薬理学分野 28～29
6. 幹細胞制御分野 30～31
7. 分子構造情報学分野 32～33
8. フロンティア研究室 低酸素生物学 34～35
9. テニユアトラック研究室 細胞分子医学分野 36～37

難治病態研究部門

1. 神経病理解分野 40～41
2. 病態細胞生物学分野 42～43
3. 発生再生生物学分野 44～45
4. 幹細胞医学分野 46～47
5. 免疫疾患分野 48～49
6. 分子病態分野 50～51

ゲノム応用医学研究部門

1. 分子細胞遺伝学分野 54～55
2. 分子遺伝学分野 56～57
3. 分子疫学分野 58～59
4. 遺伝生化学分野 60～61
5. ゲノム病理学分野 62～63
6. エピジェネティクス分野 64～65
7. 医科学数理分野 66～67
8. フロンティア研究室 遺伝子発現制御学 68～69
9. プロジェクト研究室 70

- ・ 難病基盤・応用研究 プロジェクト室 72～74
- ・ 大学院教育研究支援 実験施設 75～77

職員学生名簿	79～83
諮問委員名簿	84
案内図	85

湯島地区

〒113-8510
東京都文京区湯島1-5-45
電話 (03)5803-4504(代表)

難治疾患研究所

分子細胞生物学分野、分子神経科学分野、生体情報薬理学分野、幹細胞制御分野、分子構造情報学分野、神経病理解分野、発生再生生物学分野、免疫疾患分野、分子病態分野、分子細胞遺伝学分野、分子遺伝学分野、エピジェネティクス分野、病態細胞生物学分野、幹細胞医学分野、生体防御学分野、ゲノム病理学分野、医科学数理分野、フロンティア研究室低酸素生物学、フロンティア研究室レドックス応答細胞生物学、テニユアトラック研究室細胞分子医学分野、プロジェクト研究室、事務部



駿河台地区

〒101-0062
東京都千代田区神田駿河台2-3-10

難治疾患研究所

分子疫学分野、フロンティア研究室遺伝子発現制御学、プロジェクト研究室

難治疾患研究所



職員及び学生数

●学生数

平成28年3月1日現在

部局名	研究部門名	分野名等	大学院生			大学院 研究生	
			修士	博士 医歯学	博士生命		
難治疾患研究所	先端分子医学研究部門	分子代謝医学分野	0	0	0	0	
		分子薬理学分野	2	1	0	0	
		分子細胞生物学分野	2	0	0	0	
		分子神経科学分野	3	1	1	0	
		生体防御学分野	2	2	0	0	
		生体情報薬理学分野	5	4	0	0	
		幹細胞制御分野	4	5	0	0	
		分子構造情報学分野	1	0	0	0	
		フロンティア研究室	0	0	0	0	
		テニュアトラック研究室	0	0	0	0	
		難治病態研究部門	神経病理学分野	2	2	0	0
			病態生化学分野	0	0	0	0
			病態細胞生物学分野	2	3	0	0
	発生再生生物学分野		4	2	5	0	
	幹細胞医学分野		0	1	0	0	
	免疫疾患分野		5	0	3	0	
	分子病態分野		0	1	0	2	
	プロジェクト研究室		0	0	0	0	
	ゲノム応用医学研究部門		分子細胞遺伝学分野	2	4	0	0
			分子遺伝学分野	4	1	1	0
		分子疫学分野	3	7	3	3	
		遺伝生化分野	2	3	1	0	
		ゲノム病理学分野	1	0	0	0	
		エピジェネティクス分野	0	2	1	0	
		医科学数理分野	0	0	0	0	
	フロンティア研究室	0	0	0	0		
	プロジェクト研究室	0	0	0	0		
	計			44	39	15	5

●職員数

難治疾患研究所

平成28年3月1日現在

区分	教 員					その他職員				合計
	教 授	准教授	講 師	助 教	計	行(一)	行(二)	旧事務官	計	
現 員	20	20	4	21	65	3	1	5	9	84

ハイライト

高効率を実現した遺伝子改変技術の開発 —生体の遺伝子をより自在に操る新たな手法—

【ポイント】

- 極めて簡便な遺伝子改変技術を開発しました。
- 従来困難であった、数千塩基の長さの人工遺伝子を正確に挿入したマウスの作製に、50%もの高い効率で成功しました。
- 基礎医学・生物学研究から、創薬・遺伝子治療・品種改良による食料生産の効率化・バイオエタノールの効率的な生産等のエネルギー資源に至るまで広い分野での研究開発を加速すると期待されます。

分子神経科学分野の田中光一教授と相田知海助教の研究グループは、広島大学、慶應義塾大学、株式会社ファスマックとの共同研究で、遺伝子改変生物を極めて簡便に、かつ高効率で作製する技術を開発しました。この研究は文部科学省脳科学研究戦略推進プログラムの一貫として実施され、また文部科学省科学研究費補助金、東京医科歯科大学学長裁量優秀若手研究者奨励賞、東京医科歯科大学難疾患研究所・難治疾患に対する研究助成、同・難治疾患共同研究拠点の支援の下でおこなわれたもので、この研究成果は、国際科学誌 *Genome Biology* (ゲノムバイオロジー) に、2015年4月29日午前1時(英国時間)にオンライン版で発表されました。

従来型CRISPR/Casシステム



改良型CRISPR/Casシステム

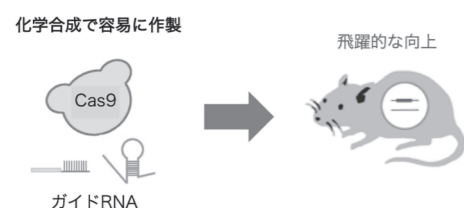


図 改良 CRISPR/Cas システムによる遺伝子改変マウスの作製方法

【研究の背景】

1989年にノックアウトマウス(2007年ノーベル賞)が作製されて以来、遺伝子改変生物は基礎研究から遺伝子治療に至るまで、生命科学の発展の原動力となってきました。しかしながら、その作製には長い時間、多大な労力、多額の費用が必要でした。さらにそのような生物の作製は、マウス等、ごく一部の生物に限られてきました。2013年に開発されたゲノム編集技術の一つ、CRISPR/Cas(クリスパー/キャス)システムは、この状況を一変させ、生命科学に革命をもたらしました。既に、多くの生物で、容易に迅速に遺伝子を破壊したノックアウト生物を作出する事が可能になっています。しかし、より技術レベルが高く、広い応用が期待される、遺伝子の置換や外来遺伝子の挿入(ノックイン)は、困難な状況のままです。今回、研究グループは従来のCRISPR/Casシステムを改良し、ノックイン生物を極めて高い効率で簡便に作製するシステムの開発に成功しました。

【研究成果の概要】

CRISPR/Casシステムを用いた遺伝子改変には、改変する場所を決めるための核酸(ガイドRNA)と、その場所でDNAを切断するためのハサミ(Cas9)の2つの部品を用います。従来、これらの部品は、大腸菌での遺伝子組換え操作により作製されてきました。研究グループはまず従来法を用いて、蛍光タンパク質遺伝子を含む長い遺伝子を目的の場所に正確に挿入したノックインマウスの作製を試みましたが、意図したとおりのマウスはほとんど得られませんでした。

そこで研究グループは、従来のCRISPR/Casシステムを改良しました。ガイドRNAをより自然界に近い状態にするため、2つに分割し、化学合成により作成しました。2つに分割したガイドRNAをDNAの切断に必要なCas9タンパク質および蛍光タンパク質遺伝子を含む長い遺伝子と共に受精卵に注入したところ、この長い外来遺伝子が意図したとおりに挿入されたノックインマウスの作成効率は50%に上昇しました。さらにノックインされた遺伝子カセットは、全て次世代に安定に引き継がれる事も分かりました。

改良型CRISPR/Casシステムの利点は、ノックインマウスの作成効率を飛躍的に上昇させたこと、またガイドRNAを2分割したことにより、化学合成が可能になり、ガイドRNAの作成を簡便化した点にあります。

今回の研究成果は、改良型CRISPR/Casシステムを用いる事で、生体の遺伝子を極めて簡便・高効率・自在に改変可能になる事を示唆しています。

【研究成果の意義】

わずか2年余りで生命科学に劇的な革命をもたらしたCRISPR/Casシステムを巡り、現在、CRISPR狂騒と称される程の、産学入り乱れた激しい開発競争が世界中で繰り広げられています。効率的なノックイン法の開発は、その最も重要な課題でしたが、今回開発された改良型CRISPR/Casシステムが決着させる事になります。また改良型CRISPR/Casシステムは1980年代から続く、遺伝子改変技術の一つの到達点であり、日本発の世界標準技術となる事が期待されます。CRISPR/Casシステムが大きな注目を集める理由は、動物にかぎらずあらゆる生物のあらゆる遺伝子を改変可能である事から、その影響が基礎医学・生物学研究のみならず、極めて多くの分野にわたるためです。簡便で高効率の改良型CRISPR/Casシステムは、創薬・遺伝子治療から品種改良による食料生産の効率化、バイオエタノールの効率的な生産等のエネルギー資源に至るまで幅広い分野での研究開発を加速する事が期待されます。

(分子神経科学分野 田中光一)

3D臓器形成遺伝子の同定

—扁平メダカから判明した脊椎動物の新しい臓器形成機構— Porazinski S, Wang H, Asaoka Y et al., YAP is essential for tissue tension to ensure vertebrate 3D body shape. *Nature* 521, 217-221 (2015)

今から約1世紀前に英国の数理生物学者D'Arcy Thompsonは、「地球上の生物の形は重力の影響を強く反映している」と予言しました。しかしながら、生物がどのようにして重力に抗って三次元的な組織形態を生み出すのかについては依然として謎に包まれています。また、体の各組織は整然と配置されることにより初めて正常な機能を発揮することができます。例えば眼の発生においては、レンズが網膜との協調的な形態形成を通じて網膜の中心に正しく配置されることにより、初めて我々は物を視ることが可能となります。こうした三次元的な器官構築の場には、細胞増殖・分化をはじめとして細胞張力など多くの細胞応答の関与が知られていますが、その詳細な分子機構は不明です。

こうした背景のもと、1998年にERATO近藤誘導分

化プロジェクトが立ち上がり、国内外の約10の研究グループが、メダカを用いた大規模変異体スクリーニングを実施しました。私たちの研究グループは、これまでの発生メカニズムでは説明がつかないような、体全体が扁平のユニークな表現型を呈する変異体を見出し、これをヒラメ *hirame* (*hir*) 変異体と命名しました。*hir* 変異体は発生の進行とともに組織が扁平になっていきます。ポジショナルクローニングの結果、*hir* 変異体の原因遺伝子は転写共役因子YAPをコードしていることが判明しました。YAPは核において細胞増殖関連の遺伝子群を発現誘導することにより、臓器サイズや発がんを制御をすることで注目されています。しかしながら、*hir* 変異体の表現型は細胞増殖や細胞死では説明できないものでした。

約10年の歳月をかけて、1) *hir* 変異体ではアクトミオシンを介した組織張力が低下し、重力に耐えきれず、組織が扁平化すること、また、2) YAPはアクトミオシンの活性制御を通じて、フィブロネクチンの重合化を誘導し、眼のレンズと網膜の正常な組織配置を制御すること、さらに、3) YAPはRho GAPを介して組織張力とフィブロネクチンの重合化を制御することを明らかにした。重力に抗って3次元的臓器構築を実現する分子機構を初めて明らかにすることに成功しました。

本研究成果は、本学と英国バース大学、オーストリアISTが同時にプレスリリースを行い、関連記事が、毎日新聞、日刊工業新聞、時事通信、サイエンスポータル、natureダイジェストなどで紹介されました。また、筆頭著者の浅岡洋一は、第37回日本比較生理生化学会で発表論文賞(大会委員長賞)を受賞しました。

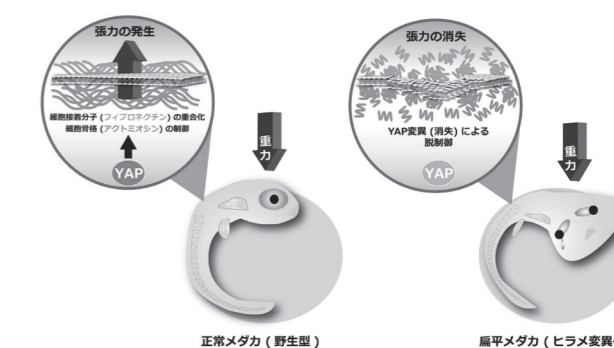


図1 大規模スクリーニングによって単離された扁平メダカ *hirame* 変異体 (発生再生生物学分野 仁科博史)

**運動中の突然死に関連する新たな遺伝子の同定
—哺乳類が心機能強化のために持つ仕組み His-Purkinje 系が不整脈の新たな起源と判明—
Koizumi A, Sasano T et al., Genetic defects in a His-Purkinje system transcription factor, *IRX3*, cause lethal cardiac arrhythmias. *Eur. Heart J. Epub Sep. 29, 2015.***

心臓には静脈から血液を受け取る心房と動脈に血液を送り出す心室があります。心房は下方に位置する心室に血液を送るため電気信号が上から下に伝わりますが、心室は上方にある大動脈・肺動脈に血液を送り出すためこれが逆転して下から上に伝わります。この電気信号伝達の逆転を可能にしているのが心室に特異的に存在する細胞集団 His-Purkinje 系です。His-Purkinje 系はヒトへつながらる生物の進化系列では、哺乳類になってから初めて出現したシステムです。多くの臨床データが、致死的な不整脈の発症に His-Purkinje 系が関与することを示唆していますが、その機序はほとんど分かっていませんでした。私たちは致死的不整脈と His-Purkinje 系の関係を明らかにするため、His-Purkinje 系に選択的に発現する遺伝子 *IRX3* と不整脈の関連性を検討しました。その結果、*IRX3* の遺伝子異常がマウス・ヒトの両方で一見正常な心臓でみられる致死的不整脈に関与すること、極めて興味深いことに致死的不整脈は運動などの交感神経の緊張が高まったストレス下で生じることが明らかになりました。

マラソン大会などの運動中に約 1 万人に 1 人の頻度で突然死が発生します。その原因として、肥大型心筋症などの遺伝性疾患の関与が知られていますが、それらは稀な疾患で運動時突然死のごく一部を説明するにすぎません。また、心臓に一見異常がない人でも運動時の突然死は同程度の頻度で見られますが、その原因はほとんど分かっていません。本研究は、ある種の運動中・ストレス下の致死的不整脈・突然死は哺乳類に特徴的にみられる事態で、これに関与する遺伝子として *IRX3* を世界で初めて明らかにしたものです。

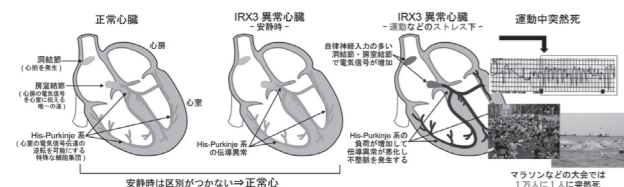


図 1 IRX3 遺伝子異常が運動時突然死をもたらすメカニズム (生体情報薬理学分野 古川哲史)

第 14 回駿河台国際シンポジウム、第 6 回難治疾患共同研究拠点シンポジウムの開催

第 14 回駿河台国際シンポジウム「BIG-DATA DRIVEN BIOLOGICAL & MEDICAL SCIENCES」が平成 27 年 11 月 26 日、鈴木章夫記念講堂にて開催された。国内外よりシンポジストを招待した講演会では、ゲノム・エピゲノム・トランスクリプトーム・プロテオーム・メタボローム・フェノームなどから得られた多階層オミクスのビッグデータ統合解析から発掘される生命医学基盤情報とこれを活用した新次元医療展開の可能性について活発な議論が行われた。引き続き、文科省支援の全国共同利用・共同研究拠点「難治疾患共同研究拠点」事業の一環として第 6 回難治疾患共同研究拠点シンポジウムが開催され、同事業で取り組まれている難治疾患克服に向けた着実な研究の成果の一端が披露された。

シンポジストならびに講演タイトルは以下の通りである。

◆第 14 回駿河台国際シンポジウム

Dr. Shumpei Ishikawa (Medical Research Institute, TMDU)

「Genomic Profile of Diffuse-type Gastric Carcinoma」

Dr. Tatsuhiko Tsunoda (Medical Research Institute, TMDU)

「Omic big data drives personalized/preemptive medicine」

Dr. Yoshio Miki (Medical Research Institute, TMDU)

「Research & Clinical Activities for Hereditary Breast and Ovarian Cancer in Japan」

Dr. Koichi Takeda (IBM Research - Tokyo)

「IBM Watson Question-Answering System and its Medical Applications」

Dr. Shinya Kuroda (Graduate School of Science, The University of Tokyo)

「Transomic Analysis of Insulin Action」

Dr. Richard Weinshilboum (Mayo Medical School, Mayo Clinic)

「Breast Cancer Pharmacogenomics」

Dr. Jun Inoue (Medical Research Institute, TMDU)

「The potential of autophagy-based cancer therapy」

Dr. Seiya Imoto (The Institute of Medical Science, The University of Tokyo)

「Dynamic Network Analysis for Predicting Cancer Prognosis based on Transcriptome Data」

Dr. Yukinori Okada (Graduate School of Medical and Dental Sciences, TMDU)

「Statistical Genetics for Drug Discovery」

Dr. Makoto Suematsu (Japan Agency for Medical Research and Development)
「AMED: Mission and Perspectives」

◆第 6 回難治疾患共同研究拠点シンポジウム

寺井 崇二 (新潟大学 大学院医歯学総合研究科 消化器内科学分野)

「進行性肝疾患に対する病態解明と治療戦略 -メダカモデルを用いた解析および再生医療-」

久保田 俊郎 (本学 大学院医歯学総合研究科 生殖機能協同学分野)

「ヒト体外受精胚の遺伝子発現解析」

青木 大輔 (慶應義塾大学 医学部 産婦人科学教室)

「遺伝性乳癌卵巣癌の婦人科臨床上の課題と個別化予防・治療法にむけた試み」

石谷 太 (九州大学 生体防御医学研究所 細胞統御システム分野)

「動物組織の構築・維持を支える Wnt/ β -catenin シグナル制御機構」

田中 雅嗣 (東京都長寿健康医療センター研究所 健康長寿ゲノム探索研究チーム)

「ミトコンドリア病に対する治療薬と体外診断用医薬品の同時開発」

安達 三美 (帝京大学医学部 生化学講座)

「食事依存性クッシング症候群の病態の解析」

(報告者：角田達彦、石川俊平、稲澤譲治)

第 34 回札幌国際がんシンポジウムの開催

オーガナイザー：東京医科歯科大学難治疾患研究所 教授 稲澤譲治

この度、第 34 回札幌国際がんシンポジウムを 2015 年 6 月 25-27 日、ロイトン札幌ホテルで開催させて頂きました。今回のテーマは、「Discovering Cancer Biomarkers, Molecular Targets and Therapeutics through Integrative Omics」として、シカゴ大学教授の中村祐輔先生、北京ゲノムセンター (BGI) 所長の



第 34 回札幌国際がんシンポジウム
Discovering Cancer Biomarkers, Molecular Targets and Therapeutics through Integrative Omics

Jun Wang 博士、ヘルシンキ大学 Olli-P Kallioniemi 博士をはじめ国外より 10 名、国内からは 11 名の、現役で活躍されている著名ながんゲノム・エピゲノム研究者を招待し、「がんオミクス研究の最前線」の研究成果を披露していただきました。ロアからは活発な質問が多く出され、熱のこもったディスカッションとともに、この領域の成熟と今後の更なる発展を参加者の全員が実感するシンポジウムとなりました。一般公募のポスターセッションでは若手研究者を中心に 23 課題の応募がありました。会期中の参加者数は 119 名と盛会を催しました。

日本人類遺伝学会第 60 回大会を開催して

大会テーマ：ゲノムの情報を通して人々の幸せに貢献する
Contributing to our happiness through genomic information

日本人類遺伝学会第 60 回大会会長

東京医科歯科大学難治疾患研究所分子細胞遺伝・教授 東京医科歯科大学疾患バイオリソースセンター・センター長 稲澤譲治

このたび、「ゲノムの情報を通して人々の幸せに貢献する」をテーマに、日本人類遺伝学会第 60 回大会を学会の「Fork in the road」と位置づけ、2015 年 10 月 14-17 日、京王プラザホテル (新宿) で開催させていただきました。1956 年に設立された当学会は、その後、人類遺伝学の急速な発展にともない、会員数も 5000 人を超える学術団体に成長しています。還暦となる今回の第 60 回大会は、稲澤譲治が大会長を、石川俊平教授が副大会長を、さらに三木義男教授が総務幹事を務めました。市民公開講座を含めて 2100 名と記録的な数の参加者となり盛会のうちに無事閉幕しました。



各種受賞

発生再生生物学分野 浅岡洋一

第37回日本比較生理生化学会発表論文賞(大会委員長賞)
YAP is essential for tissue tension to ensure vertebrate 3D body shape. *Nature* 521, 217-221, 2015.

テニュアトラック研究室細胞分子医学分野 大石由美子
第4回 万有医学奨励賞
マクロファージの動的恒常性の変容による生活習慣病の分子機構

ゲノム病理学分野 石川俊平
第2回 ヤマト科学賞
ゲノム病理学による難治疾患の発症メカニズムの解明

日本癌学会 奨励賞
びまん型胃癌におけるゲノムプロファイリングとドライバー遺伝子の同定
日本病理学会 学術研究賞
がんの包括的ゲノミクスによるゲノム病理学の研究

生体防御学分野 小内伸幸
平成27年東京医科歯科大学優秀研究賞
川村俊輔

第44回日本免疫学会学術集会ベストプレゼンテーション賞
Identification of cMoP and bona fide GMP in human umbilical cord blood. Shunsuke Kawamura, Nobuyuki Onai, and Toshiaki Ohteki.

幹細胞制御分野 マハ アナニ
2015年 Development Growth & Differentiation 誌 奨励賞
Sox17 as a candidate regulator of myeloid restricted differentiation potential. Dev. Growth Differ., 56, 469-479, 2014

生体情報薬理学分野 杉山浩二
第8回 Asia Pacific Heart Rhythm Society YIA
Oxidative Stress Induced Ventricular Arrhythmia and Impairment of Cardiac Function in *Nos1ap* Deleted Mice

分子薬理学分野 伊豆弥生
中富健康科学振興財団、研究助成奨励賞
武田科学振興財団、医学系研究奨励(基礎)賞
金原一郎記念医学医療振興財団、基礎医学研究賞

東京医科歯科大学、学長裁量優秀若手研究者奨励賞
川崎真希理
米国骨代謝学会 2015、Plenary Poster Award
Bardet-Biedl Syndrome 3 is involved in the development of cranial base.

2015年難治疾患研究所優秀論文賞

最優秀論文賞
相田知海(分子神経科学分野)
Cloning-free CRISPR/Cas system facilitates functional cassette knock-in in mice
Genome Biology

小泉章子(生体情報薬理学分野)
Genetic defects in a His-Purkinje system transcription factor, IRX3, cause lethal cardiac arrhythmias
European Heart Journal

優秀論文賞
入江将仁(エピジェネティクス分野)
Cognitive Function Related to the Sirh11/Zcchc16 Gene Acquired from an LTR Retrotransposon in Eutherians
PLOS Genetics

藤原直人(分子細胞遺伝学分野)
miR-634 Activates the Mitochondrial Apoptosis Pathway and Enhances Chemotherapy-Induced Cytotoxicity
Cancer Research

平成27年度大学院生研究発表会・若手研究者研究発表会(平成28年3月3日開催)受賞者

大学院生
1位
高橋寛吉(分子細胞遺伝学分野)
オートファジー阻害による急性リンパ性白血病の新たな治療戦略の確立
2位
杉山 浩二(生体情報薬理学分野)
Oxidative Stress Induced Ventricular Arrhythmia and Impairment of Cardiac Function in Nos1ap Deleted Mice
3位
高橋 健太郎(生体情報薬理学分野)
High-Fat Diet Increases Vulnerability to Atrial Arrhythmia by Conduction Disturbance via miR-27b

難治疾患研究賞
Daniela Tiaki Uehara(分子細胞遺伝学分野)
SNP array screening of copy number variants in 450 Japanese subjects with intellectual disability (ID) and multiple congenital anomalies (MCA) unveiling rare small variants

萌芽賞
王 文茜(幹細胞制御分野)
Iron-dependent decrease of intracellular protoporphyrin IX in glioma stem cells (GSCs): implications for GSC detection and elimination

若手研究者
1位
毛利 泰彰(幹細胞医学分野)
ニッチ由来の因子がストレス下にある色素幹細胞の運命を制御する

特許申請

分子神経科学分野
田中光一・相田知海・和田悠作
「簡便で高効率に遺伝子改変非ヒト哺乳類動物の作製方法」
出願番号:PCT/JP2015/78259(平成27年10月6日出願)

免疫疾患分野
特許番号:5243269号
出願番号:特願2008-551076
発明者:鏑田武志 小野寺大志
発明の名称:B細胞におけるCD22機能を抑制することから成る免疫応答の促進方法
特許権者:独立行政法人・科学技術振興機構
出願日:2007.12.21
登録日:2013.4.12

国際出願番号:PCT/JP2007/74634
欧州:07851040.1 米国:12 / 516.134
発明者:鏑田武志 小野寺大志
発明の名称:B細胞におけるCD22機能を抑制することから成る免疫応答の促進法
出願人:独立行政法人・科学技術振興機構
出願日:2007.12.21
出願国:日本・米国・欧州

国際出願番号:PCT/JP2010/054406
発明者:鏑田武志 木曾真 石田秀治 Abdu-Allah Hajjaj Hassan Mohamed
発明の名称:CD22分子に対する高親和性を有しB細胞

の増殖を増強する化合物
出願人:独立行政法人・科学技術振興機構 国立学校法人・岐阜大学
出願日:2009.7.31
出願国:日本・米国

幹細胞医学分野
日本特許出願番号:特願2015-230477
出願日:2016年1月12日
発明の名称:『脱毛および白毛化を抑制もしくは改善するための組成物ならびにその使用』
発明者:西村栄美 松村寛行
特許出願人:国立大学法人 東京医科歯科大学

分子細胞遺伝学分野
<特許取得-国内>
2015年3月6日、特許第5704545号、「甲状腺癌の検出方法」、稲澤譲治・井本逸勢・石原孝也・津田均、国立大学法人東京医科歯科大学・富士フィルム株式会社、特願2008-184982
2015年6月26日、特許第5765841号、「核酸マイクロアレイの品質検査方法」、氏原大・稲澤譲治・井本逸勢、国立大学法人東京医科歯科大学・富士フィルム株式会社、特願2010-118362

<特許取得-海外(US)>
2015年5月19日、特許第9034796号、「核酸マイクロアレイのデータ補正方法」、稲澤譲治・井本逸勢、国立大学法人東京医科歯科大学・富士写真フィルム株式会社、12/994,718
2015年7月28日、特許第9090942号、「食道癌の検出方法及び抑制剤」、稲澤 譲治・小松 周平・井本 逸勢・小崎 健一・津田 均、国立大学法人東京医科歯科大学・富士写真フィルム株式会社、12/730,919、

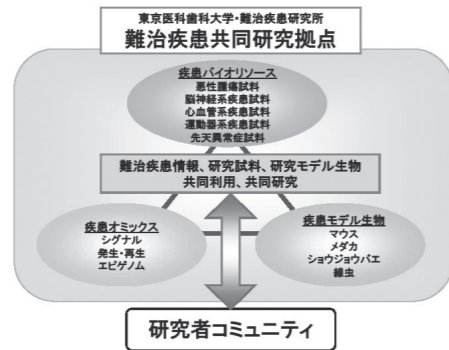
<特許取得-海外(EP)>
2015年12月25日、特許第2297337号、「核酸マイクロアレイデータの補正方法(Method for Analysis Using Nucleic Acid Microarray)」、 稲澤譲治・井本逸勢、国立大学法人東京医科歯科大学・富士フィルム株式会社、09754854.9

難治疾患共同研究拠点

東京医科歯科大学難治疾患研究所は、平成 21 年 6 月 25 日に、文部科学大臣により、全国共同利用・共同研究拠点「難治疾患共同研究拠点」に認定され、平成 22 年 4 月 1 日より難治疾患に関する研究を行っておられる研究者コミュニティの方々と共に本拠点のミッションにより、共同利用・共同研究を推進しております。

拠点のミッション

- ・難治疾患の病因・病態形成機構解明と診断・予防・治療法開発の基盤形成に資する共同利用・共同研究拠点構築を目的とする。
- ・「疾患バイオリソース」、「疾患モデル動物」、「疾患オミックス」の3つの難治疾患研究リソースを活用した公募型の戦略的難治疾患克服共同プロジェクトを推進する。
- ・国内外の研究者に、上記のリソース群へのアクセスや現有する先端解析支援施設の利用機会の提供を行ない、本邦の難治疾患研究の広範な発展に貢献する。
- ・難治疾患研究に携わる若手研究者の育成・支援システムを整備する。
- ・シンポジウム等の開催により、難治疾患研究の啓発と最先端情報の発信に努める。



平成 27 年度の主な成果

主な研究者	研究成果	論文名及び掲載雑誌名
田中 謙二 特任准教授(慶應義塾大学医学部) 田中 光一 教授(分子神経科学分野)	高効率を実現した遺伝子改変技術の開発	Cloning-free CRISPR/Cas system facilitates functional cassette knock-in in mice. <i>Genome Biology</i> , 2015 Apr 29;16:87.
石野 知子 教授(東海大学健康科学部看護学科) 石野 史敏 教授(エピジェネティクス分野)	脳の認知機能に重要なレトロトランスポゾン由来の獲得遺伝子を発見	Cognitive Function Related to the Sirh11/Zcche16 Gene Acquired from an LTR Retrotransposon in Eutherians. <i>PLoS Genetics</i> , 2015 Sep 24;11(9):e1005521.
三浦 直行 教授(浜松医科大学) 古川 哲史 教授(生体情報薬理学分野)	運動中の突然死に関連する新たな遺伝子の同定	Genetic defects in a His-Purkinje system transcription factor, IRX3, cause lethal cardiac arrhythmias. <i>European Heart Journal</i> , 2015 Oct 1. pii: ehv449.
永森 収志 准教授(大阪大学医学系研究科) 黒川 洵子 准教授(生体情報薬理学分野)	アミノ酸シスチンを取り込む輸送タンパク質を発見	Novel cystine transporter in renal proximal tubule identified as a missing partner of cystinuria-related plasma membrane protein rBAT/SLC3A1. <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> , 2016 Jan 19;113(3):775-80.
岡本 伸彦 主任部長(大阪府立母子保健総合医療センター) 稲澤 謙治 教授(分子細胞遺伝学分野)	原因不明の日本人先天異常症 645 例のマイクロアレイ解析により、155 例 (24.0%) に疾患原因となるゲノムコピー数異常 (CNV) を検出	SNP array screening of cryptic genomic imbalances in 450 Japanese subjects with intellectual disability and multiple congenital anomalies previously negative for large rearrangements. <i>Journal of Human Genetics</i> , 2015 Feb 9.

平成 27 年度採択課題

1) 戦略的課題 4 件

代表者	職名	所属機関	研究題目
澤田 賢一	学長	秋田大学	ウイルス感染・骨髄移植後 GVHD における血球貪食の発症機序の解明
田中 謙二	特任准教授	慶應義塾大学医学部	強迫性障害治療を指向した長期間神経活動操作法の開発
湯浅 慎介	講師	慶應義塾大学医学部	MVP を用いた心筋細胞の収縮様式の解析
廣瀬 伸一	教授	福岡大学医学部医学科	乳児期発症てんかん性脳症における疾患原因遺伝子探索

2) 挑戦的課題 4 件

代表者	職名	所属機関	研究題目
寺井 崇二	教授	新潟大学大学院医歯学総合研究科	疾患モデル生物を用いた難治性代謝性肝疾患の病態解明と治療戦略の開発
石谷 太	准教授	九州大学生体防御医学研究所	モデル動物を用いた細胞運命決定を担う分子基盤の解明
山本 雅	教授	沖縄科学技術大学院大学	骨吸収におよぼす CNOT3 遺伝子の作用について
大澤 光次郎	特定助教	京都大学 iPS 細胞研究所	胚性幹細胞および iPS 細胞からの造血幹細胞誘導における AGM 領域の効果

3) 一般的課題 53 件

代表者	職名	所属機関	研究題目
北村 忠弘	教授	群馬大学生体調節研究所	肥満、糖尿病の発症と転写因子 ATF3 の関連
片桐 豊雅	教授	徳島大学疾患プロテオゲノム研究センター	乳がん易罹患性関連遺伝子の機能解析
石田 秀治	教授	岐阜大学応用生物科学部	シアル酸誘導体による免疫応答増強メカニズムの解明
伊東 進	教授	昭和薬科大学	Smad コファクターによる腫瘍化制御機構
安川 孝史	助教	高知大学医学部	転写因子の標的遺伝子探索による神経難病の原因の解明
金児一石野 知子	教授	東海大学健康科学部	LTR レトロトランスポゾン由来の真獣類特異的遺伝子群の解析
小倉 淳郎	室長	理化学研究所バイオリソースセンター	体細胞クローンと ICSI で作成した胚の初期胚の解析
山本 健	教授	久留米大学	自己免疫疾患発症における喫煙感受性エピゲノムサイトの意義の解明
曾根 雅紀	准教授	東邦大学	神経系の機能異常・変性への蛋白質小胞輸送システムの関与
中内 啓光	教授	東京大学医科学研究所	癌幹細胞の発生におけるニッチの役割の解明
岡本 伸彦	遺伝診療科主任部長	大阪府立母子保健総合医療センター	小脳脳幹部低形成を伴う小頭症の包括的な疾患原因解明と病態理解
久場 敬司	教授	秋田大学大学院医学研究科	難治性不整脈の重症化における RNA 安定性制御の役割、意義の解明研究
牧野 伸司	特任准教授	慶應義塾大学医学部	不整脈源性右室心筋症の心筋脂肪変性の病態解明
田中 正人	教授	東京薬科大学生命科学部	多様な細胞死に伴うがん免疫誘導機構の解明
新沢 康英	助教	大阪大学大学院医学系研究科	PLA2G6 遺伝子欠失によるミトコンドリア異常の解明
築地 信	准教授	星薬科大学薬学部	CD83 リガンドの同定と IgM 陽性記憶 B 細胞の分化成熟過程の解析
織田 昌幸	准教授	京都府立大学大学院生命環境科学研究科	免疫系タンパク質の構造機能相関解析
市川 大輔	講師	京都府立医科大学	食道扁平上皮がんの網羅的 DNA メチル化異常解析
青木 淳賢	教授	東北大学大学院薬学研究科	ゼブラフィッシュを用いた生理活性リゾリン脂質の発生学的機能の解明
住本 英樹	教授	九州大学大学院医学研究院	心筋症における FHOD3 変異の検索とその機能的意義
西森 克彦	教授	東北大学大学院農学研究科	上皮性管腔構造形成を制御する Lgr4 遺伝子の解析
楠 進	教授	近畿大学医学部	免疫性神経疾患におけるシグレック遺伝子の解析
安達 三美	准教授	帝京大学医学部	老化細胞におけるクロマチン構造の変化の解析
永森 収志	准教授	大阪大学大学院医学系研究科	定量型質量分析計を用いた網羅的タンパク質間相互作用解析による心筋チャネルパッチ発症機序の解明
田中 雅嗣	部長	東京都長寿健康医療センター	エクソームレアバリアントの網羅的解析による老年病関連遺伝子の同定
松永 達雄	室長	東京医療センター臨床研究センター	耳鳴またはめまいを呈する患者の臨床的特徴と治療効果に関連する遺伝的背景の検討
河崎 洋志	教授	金沢大学医薬保健学域医学類	脳神経疾患モデル生物の新規作成と難治性脳神経疾患の病態解明
蒔田 直昌	教授	長崎大学大学院医歯学総合研究科	遺伝性心臓伝導障害の新規病因の解明
木村 太一	助教	北海道大学	プロテオミクスを用いた滑膜肉腫幹細胞に関わる分子基盤の確立
今井 伸二郎	客員准教授	静岡県立大学大学院	腸管樹状細胞 TGF-β シグナルによる免疫制御機構の解明
青木 大輔	教授	慶應義塾大学医学部	オートファジー活性を指標とした婦人科癌の個別化医療の分子基盤の構築
黒田 裕	准教授	東京農工大学大学院工学研究院	X 線結晶構造解析及び系統的な変異体解析による Dengue ウイルス血清型間における交差反応の分子機構の研究
柏木 太一	助教	東京医科大学	大脳皮質神経幹細胞の分化のプリファレンス遷移機構に関する研究
久保田 俊郎	教授	東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科	ヒト体外受精胚のエピゲノム解析
須藤 カツ子	兼任講師	東京医科大学	胎生初期環境変化を反映する造血幹細胞の遺伝子発現 /DNA メチル化指標の探索
小野寺 大志	主任研究官	国立感染症研究所免疫部	SLE 発症機序における B 細胞記憶化プロセスの関与の解明

学位取得者

分子神経科学分野

崔 万鹏

「Glial dysfunction in the mouse habenula causes depressive-like behaviors and sleep disturbance」

生体情報薬理学分野

小泉 章子

「Genetic defects in a His-Purkinje system transcription factor, IRX3, cause lethal cardiac arrhythmias」

高橋健太郎

「High-fat diet increases vulnerability to atrial arrhythmia by conduction disturbance via miR-27b」

杉山 浩二

「Oxidative Stress Induced Ventricular Arrhythmia and Impairment of Cardiac Function in *Nos1ap* Deleted Mice」

分子構造情報学分野

品川 健朗

「Structural analysis of the B-cell co-receptor molecules」

免疫疾患分野

高田俊太郎

「Role of Endosome in B Cell Antigen Receptor Signaling and Activation by Polysaccharide Antigens」

Mohammad, Aslam

「Study of the regulation of self-reactive B cells using anti-DNA heavy chain transgenic mice」

唐 森

「Role of Endosomal Reactive Oxygen Species in B Cell Antigen Receptor Signaling」

分子薬理学分野

山田 峻之

「 $\beta 2$ adrenergic receptor activation suppresses BMP-induced alkaline phosphatase expression in osteoblast-like MC3T3E1 cells」

守屋 秀一

「PTH regulates $\beta 2$ -adrenergic receptor expression in osteoblast-like MC3T3E1 cells」

分子細胞遺伝学分野

岩館 怜子

「High expression of p62 protein is associated with poor prognosis and aggressive phenotypes in endometrial cancer」

藤原 直人

「miR-634 activates the mitochondrial apoptosis pathway and enhances chemotherapy-induced cytotoxicity」

李 慧

「Exploration of Alternative Mechanism for miR-596-mediated Down-regulation of LGALS3BP in Oral Squamous Cell Carcinoma」

遺伝生化学分野

井上 允

「Identification of Wit target gene ATF3 and its role as a tumor suppressor in human colon cancer」

難研セミナー

平成 26 年度大学院生研究発表会・若手研究者研究発表会
平成 27 年 3 月 6 日

毛 瑩 (神経病理学分野)

Analysis of molecular pathway of TRIAD

森下 真紀 (分子細胞遺伝学分野)

Exploring mechanisms for chromothripsis by irradiation

後藤 佑太 (病態細胞生物学分野)

ミトコンドリア指向性を有する低分子化合物の作用機序の解明

北澤 萌恵 (エビジェネティクス分野)

真獣類特異的遺伝子 Peg11 の胎仔・胎盤における役割

浅岡 洋一 (発生再生生物学分野)

胚発生期における Hippo-Yap シグナル伝達系の機能解析

平成 25 年度「難治疾患の研究」を重点課題とする研究助成採択者講演会
平成 27 年 3 月 6 日

中西 祐輔 (難病基盤・応用研究プロジェクト室)

炎症性腸疾患の病態形成を惹起する腸内共生細菌の同定

相澤 秀紀 (分子神経科学分野)

興奮性伝達物質動態の高速測定技術による片頭痛・脳卒中の病態解析

田中 裕二郎 (遺伝生化学分野)

RNA に着目した心筋症と顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーの病態解明

内田 好海 (発生再生生物学分野)

【代理講演：有馬 誉恵】

上市薬剤ライブラリーを用いた薬剤催奇形性の分子機構の解明

相田 知海 (分子神経科学分野)

【代理講演：今橋 里沙】

高度な in vivo ゲノム編集によるホモロジーアームフリー遺伝子カセットノックインマウスの作製

井上 允 (遺伝生化学分野)

ヒト大腸がんにおける Wnt 標的遺伝子 ATF3 の遊走、浸潤、転移抑制機能

平成 26 年度難治疾患研究所優秀論文賞受賞者講演会
平成 27 年 3 月 6 日

塩飽 裕紀、伊藤 日加瑠 (神経病理学分野)

In utero gene therapy rescues microcephaly caused by Pqbp1-hypofunction in neural stem progenitor cells

本田 真也 (病態細胞生物学分野)

Ulk1-mediated Atg5-independent macroautophagy mediates elimination of mitochondria from embryonic reticulocytes

崔 万鹏 (分子神経科学分野)

Glial dysfunction in the mouse habenula causes depressive-like behaviors and sleep disturbance

難研セミナー／難治疾患共同研究拠点セミナー
第 532 回／第 105 回

Gabor Szabo

(Institute of Experimental Medicine, Hungarian Academy of Sciences 教授)

The multi-faced GABA : role of GABA signaling in basic developmental processes in and outside the nervous system

平成 27 年 4 月 1 日

第 534 回／第 107 回

北川 大樹

(国立遺伝学研究所 脳細胞遺伝子学研究分野 特任准教授)

脳神経系の発達における出生の機能的意義

平成 27 年 4 月 24 日

第 535 回／第 108 回

岸 玲子

(北海道大学環境健康科学研究教育センター 特別招聘教授)

環境と子どもの健康に関する出生コホート研究：北海道スタディの成果と課題

平成 27 年 6 月 30 日

第 536 回／第 109 回

佐久間 哲史

(広島大学大学院理学研究科 特任講師)

ゲノム編集の基礎と現状、これから

平成 27 年 6 月 15 日

第 537 回／第 110 回

谷口 俊恭

(Fred Hutchinson Cancer Research Center ハワード・ヒューズ医学研究所 Associate Member)

DNA 修復と癌：Fanconi anemia-BRCA pathway.

平成 27 年 7 月 9 日

第 538 回／第 111 回

吉岡 直寿

(University of California, San Diego, Dowdy 研究室)

合成 RNA レプリコンによる iPS 細胞の作製とその応用

平成 27 年 8 月 4 日

第 539 回／第 112 回

Ulrik Gether

(University of Copenhagen, Molecular Neuropharmacology and Genetics Laboratory 教授)

The dopamine transporter : a key player in psychostimulant addiction and dopaminergic pathol-

ogies

平成 27 年 10 月 23 日

第 540 回／第 113 回

郭 伸

(国際医療福祉大学臨床医学研究センター 特任教授・東京大学大学院医学系研究科 客員研究員・非常勤講師)

ALS の分子病態解析とそれに基づいた治療法の開発

平成 27 年 10 月 23 日

第 541 回／第 114 回

石田 紗恵子

(フランス脳脊髄研究所 (ICM) 研究員)

てんかんの遺伝学とラットモデル

平成 27 年 10 月 29 日

第 542 回／第 115 回

高橋 智

(筑波大学医学医療系生命医科学域・生命科学動物資源センター 教授)

マクロファージの食食機能発現における転写因子 MafB の重要性

平成 27 年 11 月 5 日

第 543 回／第 116 回

田邊 由幸

(横浜薬科大学薬学部薬理研究所 教授)

メカニカルストレスと脂肪細胞機能制御

平成 27 年 11 月 20 日

第 544 回／第 117 回

片岡 直行

(京都大学大学院医学研究科 メディカルイノベーションセンター 悪性制御研究ラボ (DSK プロジェクト) 特任准教授)

「RNA 病」における異常スプライシング

平成 28 年 2 月 19 日

第 545 回／第 118 回

近藤 亨

(北海道大学遺伝子病制御研究所 教授)

新規グリオプラスターマ幹細胞表面膜タンパク質の同定とその機能解析

平成 28 年 2 月 22 日

第 546 回／第 119 回

Gurvinder Kaur

(All India Institute of Medical Sciences Senior Scientist)

インド人集団における HIV/AIDS 疾患感受性を規程する遺伝的要因に関する最新知見について

平成 28 年 2 月 8 日

先端分子医学研究部門

Division of Advanced Molecular Medicine

先端分子医学研究部門内の各分野は、生体の恒常性維持と修復の分子基盤について、細胞、器官、個体の各レベルで取り組んでいる。遺伝子や蛋白質の構造・機能から個体の適応応答に至るまで、種々の異なる視点から推進する研究が、生活習慣病、骨粗鬆症、免疫疾患、神経疾患、循環器疾患、悪性腫瘍などの病因解明や新規治療法・予防法の確立に寄与するべく活動している。本年の成果は以下の通りである。

分子薬理学

- Nck は骨前駆細胞および骨芽細胞の遊走と骨量を制御することを明らかにした。
- 軟骨細胞において TGF- β は Ift88 の発現を転写後性に抑制し、一次繊毛を短縮させることを明らかにした。
- Fucci システムを用いて、交感神経の緊張は骨芽細胞の遊走とこれに付随する細胞周期の移行を制御することを解明した。
- Lgr4 遺伝子は BMP により制御され、BMP の骨芽細胞分化誘導に必須であることを示した。
- Pfn 1 は BMP の新規ターゲットであり、BMP 誘導性の骨芽細胞分化を少なくとも一部は転写を介して抑制することが示唆された。

分子細胞生物学

- WDR26 が Wnt シグナルにおいて β -catenin の分解に関与することを示した。
- WNK シグナル伝達経路が Lhx8 遺伝子の発現を介して神経分化に関与することを示した。

分子神経科学

- CRISPR を用いた高効率なノックインマウス作成法の開発。
- シナプスを覆うグリア突起内の CDC42EP4 セブチン複合体がグルタミン酸輸送体の足場となり、グルタミン酸除去を促進する。

生体防御学

- ヒト単球・マクロファージ前駆細胞を同定した。
- 腸内細菌による炎症性腸疾患誘導メカニズムを明らかにした。
- 細菌由来 c-di-GMP の造血幹前駆細胞及びニッチに対する作用を明らかにした。

生体情報薬理学

- 心室刺激伝導系 His-Purkinje 系特異的転写因子 IRX3 の遺伝子異常が運動時致死的不整脈の原因であることを明らかにした。
- 高脂肪食による不整脈に関係するマイクロ RNA miR-27b を同定した。
- 心臓 3D シミュレータを用いた心臓薬物安全性アッセイシステムを構築した。

幹細胞制御

- 胎生中期の造血の場である AGM 領域において造血幹細胞を包含する細胞塊の維持に転写因子 Sox17 が寄与することを明らかにし、Notch1-Hes1 経路の関与を示唆した。
- 神経発達症群に類する行動異常を示すヒストン脱メチル化酵素遺伝子低発現変異マウスの脳における GFAP 陽性アストロサイトの増加を見出した。
- C6 グリオーマの癌幹細胞支持能を指標に同定した癌幹細胞ニッチ擬態ポリマー PU10 の結合分子として transferrin を同定し、癌の進展における鉄貯蔵性の腫瘍随伴マクロファージの関与を示すなど癌幹細胞自身によるニッチ構築能力を明らかにした。

分子構造情報学

- デングウイルスエンベロープタンパク質の変異体構造を決定した。
- 加齢黄斑変性に関与するタンパク質とその阻害剤との複合体の結晶構造を決定し、その相互作用の詳細を明らかにした。
- プロリン異性化酵素 Pin1 によるアルツハイマー病関連タンパク質（タウタンパク質）の凝集抑制機構の一端を明らかにした。

先端分子医学研究部門 分子薬理学分野

教授：野田政樹 准教授：江面陽一 助教：伊豆弥生
特任助教：Smriti Aryal A.C.

研究内容

本分野の研究は、カルシウム調節の分子機構の解明により、骨粗鬆症をはじめとする骨格系疾患の治療ならびに予防法の確立に寄与する知見の獲得に重点をおいている。

研究紹介

1. 軟骨様細胞株 ATDC5 細胞において TGF-β は Ift88 の発現を抑制する (川崎真希理、他)

一次繊毛は軟骨細胞に存在し、変形性関節症などの軟骨障害では一次繊毛の形態が変化することが知られている。本研究は、変形性関節症の発症に関与する TGF-β が一次繊毛構成因子である鞭毛内輸送蛋白質 88 (IFT88) の発現にどのように影響するか、軟骨用細胞株 ATDC5 細胞を用いて検討した。TGF-β は ATDC5 の *Ift88* mRNA 発現を用量依存的に抑制した。またこの効果はタンパクレベルでも認められた。TGF-β による *Ift88* の mRNA 発現抑制は、転写阻害剤存在下でも認められた。一方、タンパク質合成阻害剤存在下では、この効果は減弱した。したがって TGF-β は新規合成タンパク質を介して *Ift88* を転写後制御することが示唆された。形態学的解析により、TGF-β は一次繊毛の長さを短縮し、一次繊毛を有する細胞数を減少させることがわかった。TGF-β は軟骨細胞に対し細胞外基質蛋白質の分泌を促進するが、siRNA を用いた *Ift88* ノックダウンは、TGF-β による II 型コラーゲンの発現を増強した。このことから、TGF-β による細胞外基質蛋白質の分泌は *Ift88* の発現により制御されることが示唆された。TGF-β による *Ift88* の発現抑制は、初代培養軟骨細胞にも認められた。本研究は、軟骨細胞において TGF-β は *Ift88* の発現を転写後に抑制し、一次繊毛を短縮させることを示した (J. Cell. Physiol., 2015)。

2. β アドレナリン受容体刺激は骨芽細胞において細胞周期移行と関連して細胞遊走を抑制する—FUCCI システムによるライブイメージング解析 (勝村早恵、他)。

骨量は、交感神経やアドレナリン受容体を介したシグナリングにより制御されている。不動性骨粗鬆症モデル

では、交感神経やアドレナリン受容体が障害され、骨量は減少する。しかしながら、β アドレナリン受容体刺激が骨芽細胞の遊走とそれに伴う増殖に影響するかは不明である。本研究は、FUCCI (Fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator) システムを用いて、骨芽細胞におけるイソプロテレノール (ISO) の細胞周期移行と細胞遊走への影響について検討した。ISO は細胞周期の進行を抑制した。ISO はまた、細胞遊走速度を抑制した。これは、G1/S 期および G2/M 期では認められず、G1 期でのみ認められたことから、細胞周期特異的現象であることが明らかとなった。ISO の細胞周期および細胞遊走への効果は、PTH と逆の作用であった。以上のことから、我々は、FUCCI システムを用いることで、交感神経の緊張は骨芽細胞の遊走とこれに付随する細胞周期の移行を制御することを解明した。(J. Cell Physiol. 2016)

3. 骨芽細胞用細胞において BMP-2 は Lgr4 遺伝子発現を増幅する (Chantida Pawaputanon Na Mahasarakham, 他)。

BMP は骨形成において鍵となる重要な制御を担うが、その下流のターゲットは未だ完全に同定されていない。Lgr4 はオーファン受容体であり、骨粗鬆症患者において骨量に関連する遺伝子として同定された。そこで、我々は、BMP2 の Lgr4 の発現への影響について骨芽細胞様細胞 MC3T3E-1 を用いて検討した。Lgr4 mRNA は MC3T3E-1 に発現し、BMP は Lgr4 mRNA 発現を少なくとも一部は転写を介して増加させることがわかった。Lgr4 ノックダウンは、BMP によって誘導されるアルカリフォスファターゼ mRNA 発現および活性を抑制した。BMP により増加した Lgr4 mRNA 発現は FGF により抑制され、デキサメタゾンにより逆の効果を示した。また頭蓋冠由来の初代培養骨芽細胞においても BMP による Lgr4 mRNA 発現増加効果が得られた。これらの結果から、Lgr4 遺伝子は BMP により制御され、BMP の骨芽細胞分化誘導に必須であることが示唆された。(J. Cell. Physiol., 2015)。

4. Profilin 発現は骨芽細胞において BMP により制御される (林婉婷、他)

Profilin 1 (Pfn1) は細胞骨格の再構築や細胞遊走を制御するが、骨芽細胞における機能においては不明である。BMP は骨芽細胞分化に関与する多機能サイトカインであり、骨の再生や修復を促進する。本研究は BMP 誘導性の骨芽細胞分化における Pfn1 の役割について検討した。骨芽細胞様細胞株 MC3T3E-1 細胞において、継時的なアルカリフォスファターゼ (Alp) mRNA 発現増加に伴い、Pfn1 mRNA 発現低下が認められた。

ハイライト

「Nck は骨芽細胞前駆細胞および骨芽細胞の遊走と骨量に影響を与える」(Aryal Smriti A. C., 他)

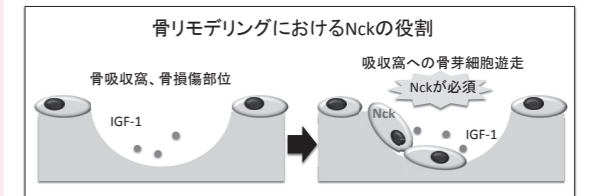
骨芽細胞前駆細胞および骨芽細胞を含む骨芽細胞系譜の遊走は骨形成に影響を与えると考えられてきた。しかしながら、骨芽細胞前駆細胞／骨芽細胞の遊走と骨形成を繋ぐ分子基盤については不明であった。Nck (noncatalytic region of tyrosine kinases; Nck1 と Nck2) は細胞遊走と細胞骨格を制御するシグナルアダプターメンバーであるが、骨芽細胞系譜におけるその機能は不明である。そこで、我々はこれらの細胞における Nck の機能について解析した。Nck は骨芽細胞前駆細胞／骨芽細胞に発現し、Nck ノックダウンは細胞遊走、細胞拡張、および基質への接着を抑制した。反対に、Nck1 の過剰発現は、これを促進した。また、Nck ダブルノックダウンは IGF1 (インスリン様受容体 1) への走化性を抑制した。免疫沈降法により、Nck1 は IRS-1 (インスリン受容体基質 1) と結合すること明らかとなり、Nck による細胞遊走作用には IGF1 が関与することが明らかとなった。In vivo において、頭蓋冠に穴を開け、DiI でラベルした骨芽細胞前駆細胞／骨芽細胞ペレットを移植したところ、

BMP 添加により *Pfn 1* mRNA 発現は低下し、この抑制効果は時間依存的に増強した。また、*Pfn 1* ノックダウンは BMP の *Alp* mRNA 発現誘導を増強させた。さらに、Pfn 1 ノックダウンは、BRE (BMP response element) レポーター活性を増強させた。以上のことから、Pfn 1 は BMP の新規ターゲットであることが示唆された。また、Pfn 1 は BMP 誘導性の骨芽細胞分化を少なくとも一部は転写を介して抑制することが示唆された。(J. Cell. Biochem. 2015)

Nck ノックダウン細胞移植では、ペレットからの細胞遊走が認められなかった。さらに、我々は骨芽細胞における Nck1 と Nck2 のコンディショナル 2 重欠損を作製し、このマウスは骨減少症を示すことを明らかにした。このマウスは、骨形成率を含む骨形成パラメーターレベルを抑制した。興味深いことに骨吸収パラメーターは影響されなかった。さらに、骨髄除去による骨損傷モデルでは、Nck 2 重欠損は骨修復を障害した。以上の結果から、Nck は骨前駆細胞および骨芽細胞の遊走と骨量を制御することが明らかになった。(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2015)

Nck は骨芽細胞前駆細胞／骨芽細胞の遊走を制御することで骨量を制御する

- 骨形成には、骨芽細胞前駆細胞および骨芽細胞が骨形成部位へ遊走する必要がありますが、この細胞遊走と骨形成を繋ぐ分子メカニズムは不明でした。
- 今回、我々は細胞骨格制御因子の一つである Nck が骨形成部位への骨芽細胞遊走に必須な分子であることを見出しました。
- Nck 欠損では、骨芽細胞の遊走が障害され、これにより骨形成が抑制されることを明らかにしました。



人事異動

転出：守屋秀一 (大学院生)、山田 峻之 (大学院生)。

研究業績

原著論文

- Aryal A C S, Miyai K, Izu Y, Hayata T, Notomi T, Noda M, Ezura Y. Nck influences preosteoblastic/osteoblastic migration and bone mass. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2015, 112 (50) : 15432-7.
- Kawasaki M, Ezura Y, Hayata T, Notomi T, Izu Y, Noda. TGF-β suppresses Ift88 expres-

sion in chondrocytic ATDC5 cells. *J. Cell. Biochem.* 2015; 230 (11) : 2788-2795.

- Katsumura S, Ezura Y, Izu Y, Shirakawa J, Miyawaki A, Harada K, Noda M. Beta adrenergic receptor stimulation suppresses cell migration in association with cell cycle transition in osteoblasts-live imaging analyses based on FUCCI system. *J. Cell. Physiol.* 2015; 231 (2), 496-504.
- Lin W, Ezura Y, Izu Y, Smriti A, Kawasaki M, Pawaputanon C, Moriyama K, Noda M. Profilin expression is regulated by bone morphogenetic protein (BMP) in osteoblastic cells. *J. Cell. Physiol.* 2015; 117(3) : 621-628.
- Pawaputanon Na Mahasarakham C, Ezura Y, Kawasaki M, Smriti A, Moriya S, Yamada T, Izu Y, Nishimori K, Izumi Y, Noda M. BMP-2 en-

hances Lgr4 gene expression in osteoblastic cells. *J. Cell. Physiol.* 2015 *In press*

- Nakamoto T, Izu Y, Kawasaki M, Notomi T, Hayata T, Noda M, Ezura Y. Mice Deficient in CIZ/NMP4 Develop an Attenuated Form of K/BxN-Serum Induced Arthritis. *J. Cell. Physiol.* 2015. *In press*
- Moriya S, Izu Y, Araya S, Kawasaki M, Hata K, Pawaputanon Na Mahasarakham C, Izumi Y, Saftig P, Kaneko K, Noda M, Ezura Y. Cathepsin K Deficiency Suppresses Disuse-Induced Bone Loss. *J. Cell. Physiol.* 2015. *In press*
- Izu Y, Ezura Y, Koch M, Birk D, Noda M. Collagens VI and XII form complexes mediating osteoblast interactions during osteogenesis. *Cell Tissue Res.* 2015. *In press*

先端分子医学研究部門 分子細胞生物学分野

教授：澁谷浩司 准教授：後藤利保 助教：佐藤 淳

研究内容

脊椎動物の形態形成、器官形成は、さまざまなシグナル分子が時間的空間的に細胞を誘導することにより成立する。また、これら多くのシグナル分子の破綻が疾患の発症にも結びついている。したがって発生・分化を制御するシグナル分子によるシグナル伝達ネットワークの解明は形態形成、器官形成機構、さらには疾患の発症機構を明らかにする上で重要課題となる。本研究分野では発生過程における形態形成、器官形成を制御する TGF- β 及び Wnt シグナル伝達及び偽性低アルドステロン症 II 型の原因遺伝子 WNK プロテインキナーゼに着目し、解析を進めている。

研究紹介

ツメガエルを用いた canonical Wnt シグナル伝達経路の解析

Wnt シグナル伝達経路は種々の生物において高度に保存されたシグナル伝達経路であり、ガンや胚発生において重要な役割を担っている。Wnt シグナル伝達経路はその作用機序から3つに分類される。(1) β -catenin/TCF を介した転写活性化経路 (canonical)、(2) カルシウム流入を介したシグナル経路 (non-canonical)、(3) Rho, JNK を介し、細胞極性に関わる PCP 経路 (non-canonical)。canonical Wnt シグナル伝達経路は、リガンドである Wnt と膜タンパク質である Frizzled、及び LRP との結合により始まる。Wnt 刺激により DVL は細胞膜で活性化され、 β -catenin を分解する働きを有する APC/Axin/GSK-3 β 複合体を不活化する。分解されなかった細胞質中の β -catenin は核内へ移行し、転写因子 Tcf や c-jun と結合し、Wnt の下流 (標的) 遺伝子の転写を活性化する。Wnt シグナルが伝達されなかった場合は、APC/Axin/GSK-3 β 複合体の存在下で、CK1、GSK-3 β により β -catenin はリン酸化され、その後ユビキチン化され、プロテアソームにおいて分解される。

ツメガエルの胚発生では、canonical Wnt シグナル伝達は初期胚の背腹運命の決定など重要な役割を有しており、原腸胚期の背側における canonical Wnt シグナルの活性化が背側組織を誘導する Wnt 標的遺伝子 (*Xnr3*,

Siamois, *Xtwn* など) の転写を活性化する、また、発生後期の神経胚期では頭部での canonical Wnt シグナル伝達の抑制が頭部形成に必要である。このようにツメガエル胚は canonical Wnt シグナル伝達の解析に適したモデル動物である。

これまでに canonical Wnt シグナル伝達経路における β -catenin の核内移行に関して、足場タンパク質である IQGAP1 が Importin- β 5 と Ran との共作用により、DVL2/IQGAP1/ β -catenin が複合体を形成し、 β -catenin の核内移行を促進することで、IQGAP1 が canonical Wnt シグナル伝達に正に作用することを明らかにした。

今年度は canonical Wnt シグナル伝達経路における β -catenin の分解機構を解明することを目的とし、 β -catenin の分解複合体を形成するタンパク質の一つである Axin1 に結合するタンパク質の単離を試み、質量分析解析 (LC-MS/MS) を行った。その結果、Axin1 と結合するタンパク質として WDR26 を同定した (図 1 A、培養細胞を用いた WDR26 による Axin1 の免疫沈降)。WDR26 はタンパク質間の相互作用に関する LisH、CTLH、WD40 Repeat-ドメインを有し、複数のタンパク質との結合が予測されるタンパク質である。出芽酵母では、9つの glucose-induced degradation-deficient (GID) が単離されており、GID6を除いた GID 複合体を形成し、ポリユビキチン化酵素として機能している。脊椎動物における GID 遺伝子のホモログ遺伝子は以下の通りである。GID1/RanBP9; GID2/Rmnd5; GID3/UBE2H; GID4/C17ors39; GID5/ARMC8; GID7/WDR26; GID8/TWA1; GID9/MAEA。したがって、WDR26 がタンパク質の分解に関与していることが推測されるが、脊椎動物での分解機能に関する知見はまだ報告されていない。

以上のような背景から、我々は WDR26 を介した β -catenin の分解機構の解析を進め、下記のような知見を得ることができた。

1. WDR26 は LisH-ドメインを介して Axin1 と結合し

ていることが明らかとなった。また、Axin1 は GSK-3 β 結合ドメインを含むタンパク質の中央部分で WDR26 と結合することが明らかとなった。

2. ツメガエルにおける WDR26 の発現は初期神経胚期以後に頭部に局在することが分かった (図 1 B、ツメガエルの Whole mount *in situ* hybridization)。

3. ツメガエル胚において、WDR26 のモルフォリノオリゴ (xWDR26-MO) のマイクロインジェクションによる頭部領域でのノックダウンにより、頭部形成不全が確認できた (図 1 C、ツメガエルの xWDR26-MO のインジェクション胚、尾芽胚期)。これは WDR26 のノックダウンにより頭部領域での canonical Wnt シグナル伝達が抑制されていないことを示唆する。

4. ツメガエルの原腸胚期に背側で発現する Wnt 標的遺伝子は *Xwnt-8* の mRNA の腹側への発現によって誘

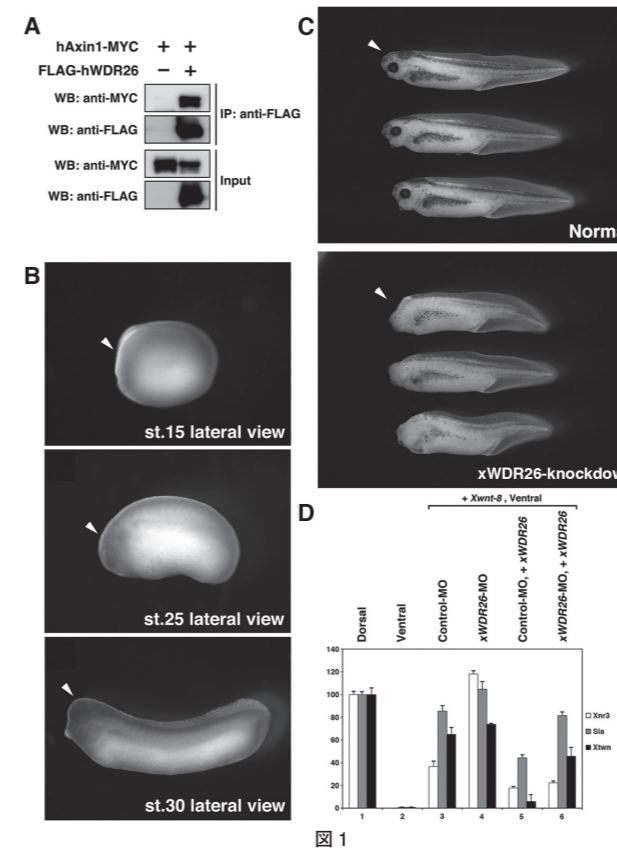


図 1

導される。*Xwnt-8* により腹側に誘導された Wnt 標的遺伝子は WDR26 の発現により減少し、WDR26 のノックダウン (xWDR26-MO) により増加することが分かった (図 1 D、ツメガエルの原腸胚期の RNA を用いた Quantitative RT-PCR)。これは WDR26 が canonical Wnt シグナル伝達を負に制御することを示唆する。

5. 培養細胞において、WDR26 の発現により β -catenin のタンパク質は分解され、siRNA による WDR26 のノックダウンにより β -catenin のタンパク質は安定化することが分かった。

6. WDR26 は β -catenin とは直接結合しないことから、Axin1 を介して β -catenin の分解に関与していることが示唆された。このことは Axin1 との結合ドメインを欠損した WDR26-delta-LisH のコンストラクトではツメガエルの Wnt 標的遺伝子の発現抑制が確認できず、また、培養細胞において、WDR26-delta-LisH では β -catenin の分解が起こらなかったことから示唆された。

7. 培養細胞において、WDR26 は Axin1 との共作用によって β -catenin のユビキチン化を促進していることが明らかになった。

以上の結果より、WDR26 と Axin1 の相互作用により β -catenin が分解されることを明らかとし、canonical Wnt シグナル伝達経路での新たな作用機序が示唆された (図 2)。

Roles of WDR26 in canonical Wnt signaling pathway

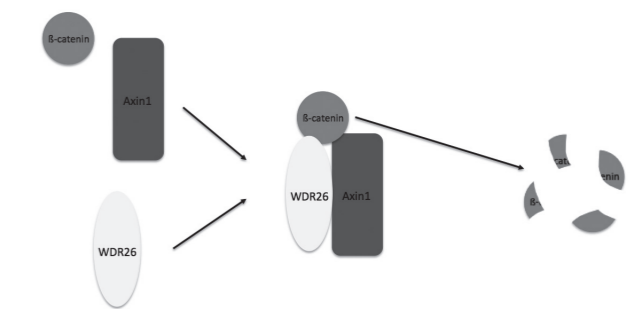


図 2

業績目録

Fukuzono, T., Pastuhov, S. Iv., Fukushima, O., Li,

C., Hattori, A., Iemura, S., Natsume, T., Shibuya, H., Hanafusa, H., Matsumoto, K. and Hisamoto, N. (2016). Chaperone complex BAG2-HSC70

regulates localization of Caenorhabditis elegans leucine-rich repeat kinase LRK-1 to the Golgi. *Genes Cells* in press.

先端分子医学研究部門 分子神経科学分野

教授：田中光一 准教授：相澤秀紀(～2015年5月31日)、相田知海(2015年7月1日～)
助教：相田知海(～2015年6月30日)

研究内容

概略

種々の分子や細胞の機能及びこれらの異常がどのように動物の個体レベルでの行動及び行動異常に関与するかについて遺伝子改変動物を用いて研究する。これらの解析を通して、記憶・学習などの脳高次機能及び機能異常の機構を、分子・細胞および個体レベルで理解する。

研究紹介

1. グルタミン酸トランスポーターの脳機能における役割

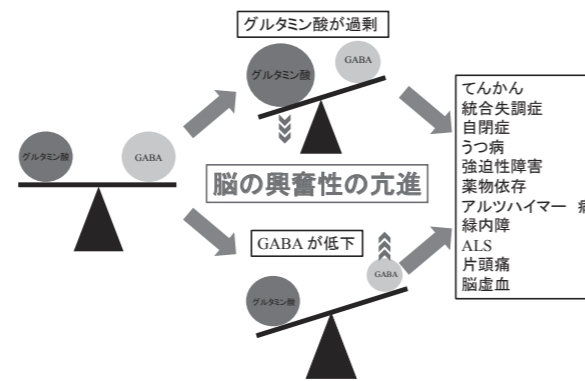
中枢神経系の興奮性シナプス伝達は主にグルタミン酸により担われており、グルタミン酸シグナル伝達の解明は脳機能解明の基礎となる。我々の分野では、神経回路網の形成・脳高次機能におけるグルタミン酸シグナリングの機能的役割を分子、細胞、個体レベルで明らかにすることを旨とする。また、過剰なグルタミン酸は神経毒性を示し、様々な精神神経疾患の原因と考えられている。精神神経疾患におけるグルタミン酸シグナル伝達の病態生理学的役割を解明し、それら疾患の新しい治療法の開発を目指す。グルタミン酸シグナル伝達に中心的な役割を果たすグルタミン酸トランスポーターを中心に研究を行っている。

グルタミン酸トランスポーターは、神経終末から放出されたグルタミン酸を取り込み、神経伝達物質としての作用を終わらせ、細胞外グルタミン酸濃度を低く保つ機能的分子である。現在まで脳のグルタミン酸トランスポーターには、グリア型2種類 (GLT1, GLAST) と神経型2種類 (EAAC1, EAAT4) の計4種類のサブタイプが知られている。

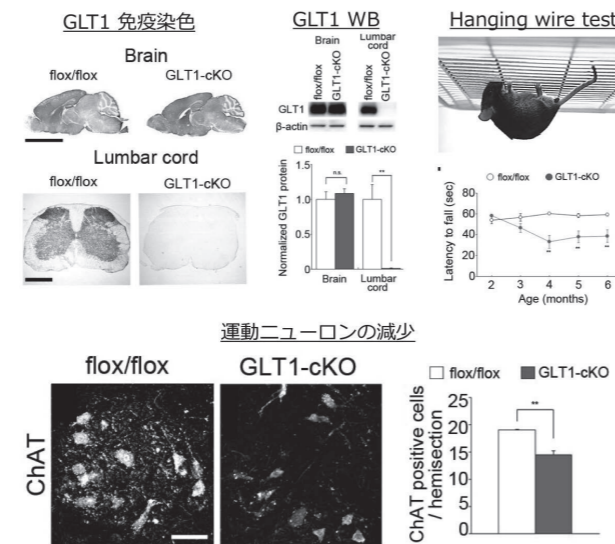
GLASTは、小脳のパーグマンガリアの突起のなかでも平行線維-プルキンエ細胞や登状線維-プルキンエ細胞のシナプス周囲を覆っている突起に密度高く局在し、シナプス間隙からのグルタミン酸の除去を効率よく行っている。しかし、その局在の分子機序は不明であった。我々は、GLASTがCDC42EP4/septinを介してシナプス周囲のグリア細胞の突起に高密度で局在することを明らかにした (Ageta-Ishihara et al, 2015)。また、脊髄特異的 GLT1 欠損マウスを作成し、それが軽度の運動障

害と脊髄前角運動ニューロンの脱落を起こすことを明らかにした。このマウスは慢性的な興奮毒性により運動ニューロンが細胞死を起こす in vivo のモデルであり、筋萎縮性側索硬化症の病態解明・治療法の開発に役立つ期待される。

グルタミン酸トランスポーターの機能異常による興奮と抑制のアンバランスが様々な精神神経疾患を引き起こす



脊髄特異的 GLT1 欠損マウスは軽度の運動障害と脊髄前角運動ニューロンの細胞死を示す。

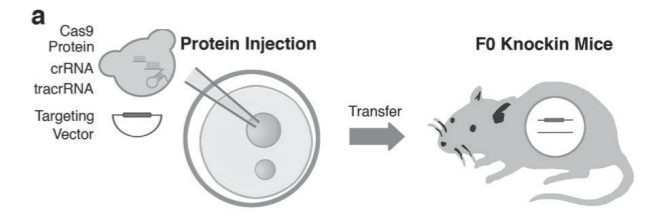


2. ゲノム編集を用いた遺伝子改変技術の開発

遺伝子改変動物、中でも特定の遺伝子を働かなくしたノックアウトマウスや、ヒト疾患の遺伝子変異あるいは蛍光タンパク質等の機能分子を挿入したノックインマウスは、医学生物学発展の原動力となってきた。従来このような遺伝子改変マウスを作製するためには、ES細胞

を用いて、少なくとも1年以上の期間、数百万円以上の費用をかけた複雑な作業が必要であった。この状況は、どのような生物のどのような遺伝子配列も自在に改変可能なゲノム編集技術の登場により一変した。我々は以前からマウス受精卵内で直接遺伝子改変を行う、in vivo ゲノム編集の開発を進めて来た。本年度は、極めて高いゲノム編集効率を持ち、かつ極めて容易に使用可能な、クローニングフリー CRISPR/Cas システムを開発した。化学合成ガイドRNAとCas9タンパク質を用いる事で、従来必要であった大腸菌へのクローニングが不要になった。さらに従来困難であった、蛍光タンパク質等

の長い遺伝子のノックインマウスを、世界最高効率で作製する事に成功した。本成果は遺伝子改変マウス作製の有力な方法として、個体レベルでの遺伝子機能解明に大きく貢献すると期待される。



人事異動

転入：相田知海 (准教授)、杉山香織 (博士課程)、田中萌子、楠瀬未菜 (修士課程)

転出：相澤秀紀 (准教授)、相田知海 (助教)、崔万鵬 (博士課程)、石久保春美 (技術補佐員)

業績目録

発表論文

- Aida, T., Chiyo, K., Usami, T., Ishikubo, H., Imahashi, R., Wada, Y., Tanaka KF., Sakuma, T., Yamamoto, T., Tanaka, K. Cloning-free CRISPR/Cas system facilitates functional cassette knockin in mice. *Genome Biol* 16, 87, 2015.
- Aida, T., Yoshida, J., Nomura, M., Tanimura, A., Iino, Y., Soma, M., Bai, N., Ito, Y., Cui, W., Aizawa, H., Yanagisawa, M., Nagai, T., Takata, N., Tanaka, KF., Takayanagi, R., Kano, M., Gotz, M., Hirase, H., Tanaka, K. Astroglial glutamate transporter deficiency increases synaptic excitability and leads to pathological repetitive behaviors in mice. *Neuropsychopharmacology* 40, 1569-1579, 2015.

- Ishii, K., Kubo, K., Endo, T., Yoshida, K., Benner, S., Ito, Y., Aizawa, H., Aramaki, M., Yamanaka, A., Tanaka, K., Takata, N., Tanaka, K., Mimura, M., Tohyama, C., Kakeyama, M., Nakajima, K. Neuronal heterotopias affect the activities of distant brain areas and lead to behavioral deficits. *J Neurosci* 35, 12432-12445, 2015.
- Ageta-Ishihara, N., Yamazaki, M., Konno, K., Nakayama, H., Abe, M., Hashimoto, K., Nishioka, T., Kaibuchi, K., Hattori, S., Miyakawa, T., Tanaka, K., Huda, F., Hrai, H., Hashimoto, K., Watanabe, M., Sakimura, K., Kinoshita, M. A CDC42EP4/septin-based perisynaptic glial scaffold that facilitates glutamate clearance. *Nature Commun* 6:10090, 2015.

総説

- 相澤秀紀, 崔万鵬, 田中光一 恐怖と不安：脅威に対する動物の適応行動選択とその克服 生体の科学 66(1)29-32 2015年
- 田中光一：グルタミン酸輸送体機能障害と精神疾患、日本臨床、74、163-173, 2016年
- 相田知海, 田中光一 CRISPR/Casでマウスゲノムを自在に操る 生化学 (in press)
- Aida, T. Genome editing in mice using

TALENs. *Targeted Genome Editing Using Site-Specific Nucleases* Chapter 11, 167-182, 2015 (Springer).

研究費

- 相澤秀紀：ストレス対処行動におけるモノアミン制御経路の障害と回復 文部科学省科学研究費補助金、新学術領域研究・計画研究 代表
- 相田知海：ストレス対処行動におけるモノアミン制御経路の障害と回復 文部科学省科学研究費補助金、新学術領域研究・計画研究 分担
- 相田知海：ゲノム編集を駆使してレアバリアントの機能を in vivo で解析する 文部科学省科学研究費補助金・若手研究(B) 代表
- 相田知海：強迫的繰り返し行動の神経回路基盤 武田科学振興財団 代表
- 相田知海：個体で自在に生体情報を計測・操作するための遺伝学ツールノックイン技術の開発 中谷医工計測技術振興財団 代表
- 相田知海：弧発性 ALS の細胞死機序 東京医科歯科大学・「難治疾患の研究」を重点課題とする研究助成 代表
- 田中光一：アストロサイトの多様性の分子基盤解明 文部省科学研究費補助金、基盤研究(B) 代表

先端分子医学研究部門 生体防御学分野

教授：樗木俊聡 講師：小内伸幸 非常勤講師（さきがけ研究員）：佐藤 卓
 難病基盤・応用研究プロジェクト室助教：中西祐輔 特任助教：浅野純平
 プロジェクト助教：梶田美穂子 技術補佐員：黒田聖子、始関紀彰、中村瑠美子
 事務補佐員：上岡寿子

研究内容

概略

当分野では、「生体の防御と恒常性維持の統合的理解」に焦点をあて、それらを担う免疫細胞ないしは組織幹細胞の分化や機能を、正常および疾患病態において理解することを目的としている。主として、単核球系貪食細胞（樹状細胞・マクロファージ）などの免疫細胞や、血液・腸・皮膚などの組織幹細胞を研究対象として、免疫系ならびに組織幹細胞系ホメオスタシスの維持とその破綻による病態構築機序の解明に取り組むことで目的達成を図る。また、それら成果に基づき、難治性疾患の予防治療法の開発へ繋がる応用研究への糸口が得られるよう研究を推進する。

研究紹介

1. 単核球系貪食細胞の研究

1) 単核球系貪食細胞の源となる前駆細胞の発見

1968年、Ralph van Furth, Zanvil A. Cohnにより、単球とマクロファージをまとめて単核球系貪食細胞 (Mononuclear Phagocyte) と呼ぶことが提唱された。1973年、Ralph M. Steinman, Zanvil A. Cohnによって樹状細胞(Dendritic Cell, DC)が同定されたことに伴い、DCも単核球系貪食細胞に分類され現在に至っている。今日、マクロファージの機能は異物排除や感染防御といった古典的免疫学の枠を超え、組織形成・再生などの組織恒常性維持、さらにはがん組織形成やさまざまな炎症性疾患病態構築への積極的関与を含め、広範な生命現象に及ぶことが明らかになりつつある(図1)。一方、DCは、感染など緊急時における免疫応答の発動のみならず、免疫寛容の誘導維持に必要な不可欠な細胞とされている。

DCは、抗原提示能に優れた従来型樹状細胞(cDC)と、ウイルスや自己の核酸に反応して大量のインターフェロンを産生する形質細胞様樹状細胞(pDC)に分類される。私たちの研究グループは、DCだけを大量に産みだす“DC前駆細胞”をマウスで同定し、共通DC前駆細胞(Common DC Progenitor, CDP)として報告した(*Immunity* 2013; *Nat Immunol* 2007)。CDPは、M-CSF受容体(M-CSFR)発現の有無を指標に2種類

に分類される。M-CSFR+CDPは主にcDCを生み出すが、M-CSFR-CDPはpDCへの分化能に優れていた。その後、単球・マクロファージ前駆細胞として共通単球前駆細胞(Common Monocyte Progenitor, cMoP)もマウスにおいて同定されたが、ヒトcMoPは未同定であった。

私たちの研究グループは、数年来、ヒト単核球貪食細胞前駆細胞の同定も試みてきたが、最近、ヒト臍帯血や骨髄を用いてcMoPの同定に成功した(投稿中、特許申請手続き中)。ヒトcMoPは、従来のヒト顆粒球・単球前駆細胞(GMP)分画の中に混在しており、優れた単球・マクロファージへの分化能を示す一方、他の血液細胞へは分化しなかった(図2)。ヒトcMoPは、単球を経て、炎症惹起性マクロファージ、破骨細胞、腫瘍随伴マクロファージ(Tumor Associated Macrophage, TAM)などに分化するため、ヒトcMoPを標的とした新規治療法の開発が期待される。

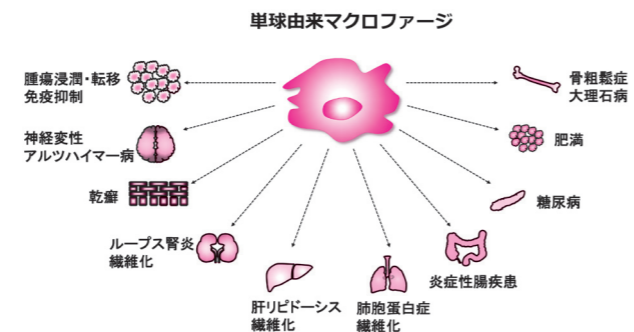


図1 単球由来マクロファージの疾患関与

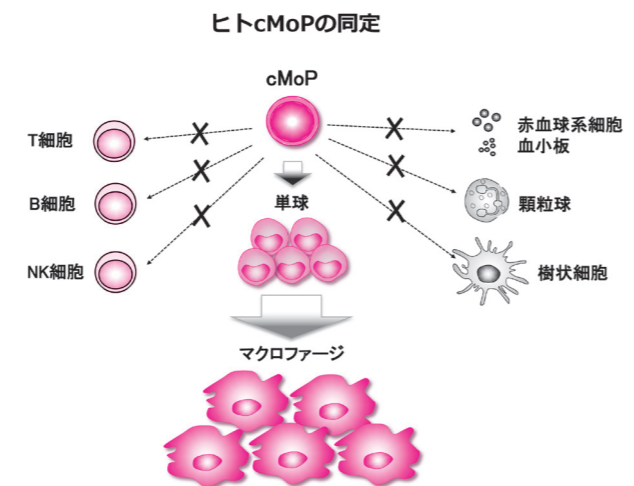


図2 ヒトcMoPは単球・マクロファージだけを産み出し、他の細胞へは分化しない

2) 炎症性腸疾患における単核球系貪食細胞の役割

腸管上皮バリアー機能の破綻は、腸内常在菌の生体内への侵入を介して不適切な免疫応答を惹起し、炎症性腸疾患(Inflammatory Bowel Disease, IBD)の誘因になる。これまで、グラム陰性菌Bacteroides/PrevotellaあるいはEnterobacteriaceaeがIBDのリスクファクターであることが知られていたが、グラム陽性菌の役割に関しては不明であった。

私たちの研究グループは、薬剤誘導性IBDモデルを用いて、腸内常在性グラム陽性菌が、炎症性単球・マクロファージの大腸組織への動員に重要なことを明らかにした(*Mucosal Immunol* 2015)。炎症性サイトカインTNF- α は代表的なIBD増悪因子かつ治療標的の1つであるが、その主たる産生細胞は炎症性単球・マクロファージであった。重要なことに、選択的にグラム陽性菌を除去する抗生物質バンコマイシンを前投与すると、上記IBDモデルにおける炎症性単球・マクロファージの大腸組織への動員が抑制され、IBDの指標である体重減少、腸の短縮程度、炎症性細胞浸潤などが改善した。また、バンコマイシン処置によって減少するグラム陽性菌の主体はLachnospiraceaeであった。クローン病患者やIBDマウス血清中にLachnospiraceaeに反応する抗体が検出されることが報告されており、同菌が、上記メカニズムによって炎症性単球・マクロファージを腸組織に動員、病態構築に寄与していることが示唆される。現在、炎症惹起性単球・マクロファージへの分化メカニズムの詳細を追求中である。

2. 組織幹細胞の研究

1) 免疫系—組織幹細胞系の連関による組織恒常性の維

人事異動

星薬科大学先端生命科学センター特任准教授、手塚裕之

業績目録

原著

1. Liu J, Guo YM, Onai N, Ohyagi H, Hirokawa M, Takahashi N, Tagawa H, Ubukawa K, Kobayashi I, Tezuka H, Minamiya Y, Ohteki T,

and Sawada K. Cytosine-phosphorothionate-guanine oligodeoxynucleotides exacerbates hemophagocytosis by inducing tumor necrosis factor- α production in mice after bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015 [Epub ahead of print]
 2. Kobayashi H, Kobayashi CI, Nakamura-Ishizu A, Karigane D, Haeno H, Yamamoto KN, Sato T, Ohteki T, Hayakawa Y, Barber GN, Kurokawa M, Suda T, and Takubo K. Bacterial c-di-GMP affects hematopoietic stem/progenitors and their niches through STING. *Cell Rep* 11, 71-84, 2015.

3. Nakanishi S, Sato T, and Ohteki T. Commensal Gram-positive bacteria initiates colitis by inducing monocyte/macrophage mobilization. *Mucosal Immunol* 8, 152-60, 2015.

受賞

平成27年東京医科歯科大学優秀研究賞、小内伸幸
 第44回日本免疫学会学術集会ベストプレゼンテーション賞、川村俊輔(博士課程4年)

持と破綻

私たちの研究グループはこれまで、何ら感染の起きていない生体において、生理レベルのI型インターフェロンシグナルが造血幹細胞(Hematopoietic Stem Cell, HSC)ストレスとして働き、同細胞の幹細胞性低下の原因になることを報告した(*Nat Med* 2009)。また、I型インターフェロンのHSCへの作用を活かして、放射線による移植前処置を行わず、I型インターフェロン誘導剤を用いてHSCを移植することに成功し、これを先天性代謝疾患ムコ多糖症モデルの治療に応用し一定の治療効果を得ることに成功した(*Blood* 2013)。

これらの成果に基づき、I型インターフェロンシグナルを含むサイトカインシグナルの他の組織幹細胞への影響を検討している。現在までに、インターフェロンシグナルが全身性あるいは組織特異的に過剰に入るマウスを用いて、腸上皮再生の源である腸上皮幹細胞(Intestinal Stem Cell, ISC)及び毛や表皮再生の源である毛包幹細胞が減少・枯渇することを見出しており、詳細な分子基盤を追求・解明していく予定である。

3. 他施設共同研究

国立国際医療研究センターならびに慶応大学医学部との共同研究として、細菌由来のbis-(3'-5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate (c-di-GMP)が造血幹前駆細胞(HSPCs)及びニッチにSTINGを介して作用して、HSPCsの細胞増殖と末梢への動員を促すことを明らかにした(*Cell Rep* 2015)。細菌感染時に、速やかに免疫細胞を末梢に供給する仕組みの一端を説明し得る研究成果である。

先端分子医学研究部門 生体情報薬理学分野

教授：古川哲史 准教授：黒川洵子
 助教：江花有亮 (2015年5月まで)、井原健介 (2015年9月から)

研究内容

心血管系の難治疾患・コモン疾患 (特に不整脈・突然死) の病態解明研究を、多角的アプローチ (ゲノム研究、パッチクランプ実験、遺伝子組み換えマウス、計算科学的研究など) により行っている。得られた成果を元に、患者に還元できるトランスレーショナル研究を目指している。

研究紹介

1. 心房細動の研究

心臓細動の全ゲノム相関解析 (GWAS) で、610K SNPs を対象とした解析で15の心房細動関連 SNPs を同定した (Nat. Genet. 2012;44:670-675, Circulation 2014;130:1225-1235)。これらを用いた心房細動予測では、感度 65%、特異度 65% となり、オーダーメイド医療を行うためには予測の精度がまだ不十分と考えられた。そこで、本年度は 1,000K SNPs を対象とした GWAS とレ

ハイライト 1

本年度生体情報薬理学分野が関係したプレスリリースは2件あった:

(1) 心臓 3D-シミュレーターを用いた心毒性予測

東京大学新領域創成科学研究科久田俊明元教授、杉浦清了教授、岡田純一特任講師らが開発した心臓 3D-シミュレーター (UT-Heart) を使って、(株) エーザイ澤田光平博士、吉永貴志博士らとともに、心毒性の予測検討を行い、高精度に心毒性をよそくできることを明らかにした。同成果は、Sci. Advance. (原著論文 2) に発表し、2015年5月1日にプレスリリースを行い、日経新聞、時事通信などに取り上げられた。

(2) 運動時突然死に関係する新たな遺伝子の同定(図1)

His-Purkinje 系は、鳥類・哺乳類になって備わった心室の刺激伝導系で、心室の速く逆行性の伝導を担っている。His-Purkinje 系は致命的な不整脈に関係することが臨床的に指摘されてきたが、その機序は不明で

あった。浜松医科大学生化学三浦直行教授との共同研究で、His-Purkinje 系特異的転写因子 *Irx3* のノックアウトマウスを使ってその機序の検討を行ったところ、運動・交感神経系の緊張により不整脈が誘発されることが明らかとなった。ヒトでも *IRX3* の遺伝的異常が不整脈発生に関係するか、国立循環器病センター清水渉博士らと共に検討を行った。特発性心室細動患者 130 名と健常者 250 名で *IRX3* の遺伝子配列解析を行った結果、特発性心室細動患者 2 名で新たな *IRX3* 変異が同定された。これらの患者で心室細動は運動時に発生した。以上から、*IRX3* 遺伝的異常は運動時の致命的な不整脈発生に関わる新たな遺伝的リスクであることが明らかとなった。同成果は Eur. Heart J. (原著論文 7) に発表し、2015年9月29日プレスリリースを行い、日経新聞、読売新聞を初め多くのメディアに取り上げられた。

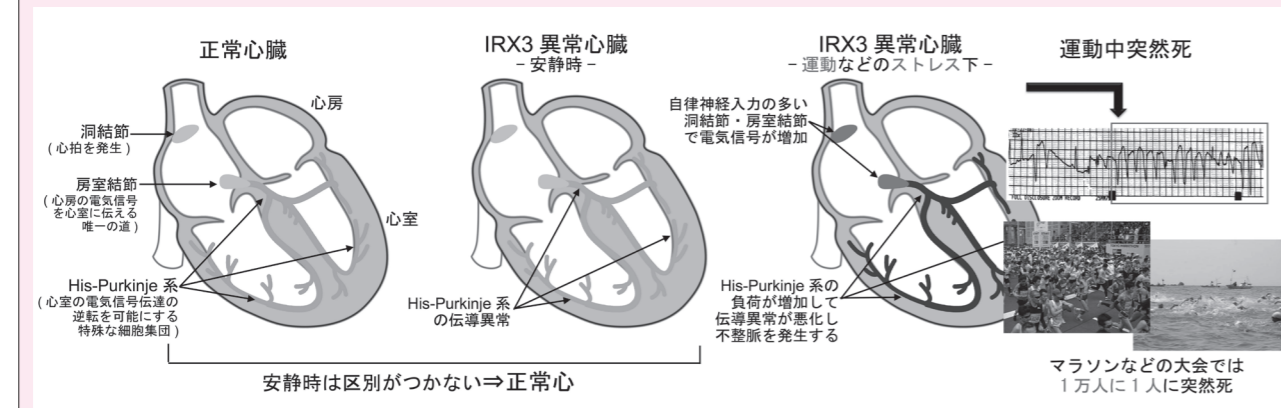


図 1. *IRX3* 遺伝的異常が運動時不整脈をもたらすメカニズム

ア SNP を対象とした全エクソン相関解析 (EWAS) を行った。1,000K SNPs GWAS ではさらに新たな心房細動感受性 SNPs が同定され論文作成中である。EWAS では、オッズ比の高い SNP が1つ見つかった。酸化ストレスへの関連が予想される SNP であり、新たな創薬シーズ同定を目指して機能解析を行っている。

2. 心疾患とマイクロ RNA

最近様々な疾患の発症にマイクロ RNA が関与することが明らかとなってきた。また、循環マイクロ RNA が疾患発症・重症化のバイオマーカーとなることも明らかとなってきた。そこで、様々な疾患モデルマウスの心臓組織、およびヒト患者の末梢血で発現の変化するマイクロ RNA を探索している。本年度は、高脂肪食マウスモデルで miR-27b が発現上昇し、これが Cx40 を標的とする電気的リモデリングにより心臓の伝導障害、催不整脈

作用を示すことを明らかにした。同成果は、*J. Mol. Cell. Cardiol.* 誌 (原著論文 9) に発表した。

3. ヒト iPS 細胞由来心筋細胞と計算科学を用いた心毒性評価系の開発

薬物性不整脈に関する ICH 非臨床ガイドラインの改正予告を受けて、計算科学的方法 (in silico) とヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた in vitro アッセイ法による心毒性評価法の研究を行っている。前者の in silico 法では、国立医薬品食品衛生研究所諫田泰成博士、大阪大学古谷和春博士、永森收志博士、滋賀医科大学芦原貴司博士と共同でヒト iPS 由来心筋モデル構築を目指している。後者については、国立医薬品食品衛生研究所関野祐子博士が率いる AMED 委託研究班および JicSA に属し、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた心毒性評価システムの構築とその検証を行っている。

人事異動

転入：井原健介 (助教)、福田 俊 (修士課程)、孫 溢哈 (修士課程)
 転出：江花有亮 (生命研究倫理センター講師)、藤塚美紀 (修士課程)

業績目録

原著論文

1. Kawabata M, Yokoyama Y, Sasaki T, Tao S, Ihara K, Shirai Y, Sasano T, Goya M, Furukawa T, Isobe M, Hirao K. (2015). Severe iatrogenic bradycardia related to the combined use of beta-blocking agents and sodium channel blockers. *Clin. Pharmacol.* 7, 29-36.
2. Okada J, Yoshinaga T, Kurokawa J, Washio T, Furukawa T, Sawada K, Sugiura S, Hisada T. (2015). Screening system for drug-induced arrhythmogenic risk combining patch clamp and heart simulator. *Sci. Advance* 1, e1400142.
3. Kurokawa J, Sasano T, Kodama M, Li M, Ebana Y, Harada N, Honda S, Nakaya H, Furukawa T. (2015). Aromatase knockout mice reveal an impact of estrogen on drug-induced alteration of murine electrocardiography parameters. *J. Toxicol. Sci.* 40, 339-348.
4. Yamakawa H, Muraoka N, Miyamoto K, Sadahiro T, Isomi M, Haginawa S, Kojima H, Umei T, Akiyama M, Kuishi Y, Kurokawa J, Furukawa T, Fukuda K, Ieda M. (2015). Fibrinblast growth factors and vascular endothelial growth factor promote cardiac reprogramming under defined conditions. *Stem Cell Reports* 5, 1128-1142.

5. Saito Y, Nakamura K, Yoshida M, Sugiyama H, Ohe T, Kurokawa J, Furukawa T, Takano M, Nagase S, Morita H, Kusano K.F, Ito H. (2015). Enhancement of spontaneous activity by HCN4 overexpression in mouse embryonic stem cell-derived cardiomyocytes - A possible biological pacemaker. *PLoS ONE* 10, e0138193.
6. Ihara K, Sasaki T, Shirai Y, Tao S, Maeda S, Kawabata M, Sasano T, Yokoyama Y, Isobe M, Hirao K. (2015). High atrial debibrillation threshold with internal cardioversion indicates arrhythmogenicity of superior vena cava in non-long-standing persistent atrial fibrillation. *Circ. J.* 79, 1479-1485.
7. Koizumi A, Sasano T, Kimura W, Miyamoto Y, Aiba T, Ishikawa T, Nogami A, Fukamizu S, Sakurada H, Takahashi Y, Nakamura H, Ishikura T, Koseki H, Arimura T, Kimura A, Hirao K, Isobe M, Shimizu W, Miura N, Furukawa T. (2015). Genetic defects in a His-Purkinje system transcription factor, *IRX3*, cause lethal cardiac arrhythmias. *Eur. Heart J.* Epub 2015 Oct. 1.
8. Yoshikawa S, Usami T, Kikuta J, Ishii M, Sasano T, Sugiyama K, Furukawa T, Nakasho E, Takayanagi H, Tedder TF, Karasuyama H, Miyawaki A, Adachi T. (2015). Intravital imaging of Ca(2+) signals in lymphocytes of Ca(2+) biosensor transgenic mice: indication of autoimmune diseases before the pathological onset. *Sci. Rep.* Epub 2015 Dec. 9.
9. Takahashi K, Sasano T, Sugiyama K, Kurokawa J, Tamura N, Soejima Y, Sawabe M, Isobe M, Furukawa T. (2015). High-fat diet increases vulnerability to atrial arrhythmia by conduction disturbance via miR-27b. *J. Mol. Cell. Cardiol.* Epub 2015 Dec. 2.

著書

1. 古川哲史. 心臓イオンチャネル A to Z. ライフメディコム, 2015年7月24日.
2. 古川哲史. 目からウロコの心電図 [改訂版] ライフメディコム, 2015年8月10日.
3. 古川哲史. そうだったのか! 臨床に役立つ心臓の発生・再生. メディカルサイエンス・インターナショナル, 2015年9月10日.
4. 古川哲史. 標準薬理学第14章循環系, (編集) 飯野正光, 鈴木秀典, 医学書院, 2015年3月25日.

総説

1. 古川哲史. (2015). コモン不整脈の遺伝的リスク. In: 不整脈 2015. 井上博 (編), メディカルレビュー社, 東京, p16-22.
2. 黒川洵子. (2015). iPS 細胞を用いた抗不整脈薬の心毒性評価. In: 不整脈 2015. 井上博 (編) メディカルレビュー社, 東京 p33-40.
3. 古川哲史. (2015). 法則をつかめばモニタリングはぐんぐんわかる! 心電図と不整脈を読み解くための 20 の黄金ルール. In: HEART nursing Vol. 28, p6-55.
4. 黒川洵子 (2015) 心電図波形の不整脈疾患発生の男女差について, *Japan. J. Electrophysiol. 心電図* 35: 143-147.
5. 芦原貴司, 黒川洵子, 諫田泰成, 原口亮, 稲田慎, 中沢一雄, 堀江稔 (2015) ヒト iPS 細胞由来心筋細胞シートの不整脈研究への応用可能性: in silico 不整脈学の観点から, *生体医工学* 53: 100-105.
6. 黒川洵子 (2015) 薬剤安全性分野における性差薬学の研究, *薬学ニュース* 21:8.

先端分子医学研究部門 幹細胞制御分野

教授：田賀哲也 准教授：鹿川哲史、信久幾夫
助教：楠 康一 技術補佐員：伏見真好、井上和子

研究内容

概要

生体内各組織の形成・維持・再生に重要な役割を果たす幹細胞は、それぞれの組織を構成する多細胞集団を生み出す一方で、そのような多分化能を維持した自己複製も行う。それら組織幹細胞（体性幹細胞）の発生や多分化能維持、あるいは組織内各細胞系譜への分化といった過程においては、増殖分化因子や細胞外マトリクスなどによる細胞外来性のシグナルと、エピジェネティック修飾や転写因子存在プロファイルに基づく細胞内在性のプログラムが深く関わっている。幹細胞制御分野における組織幹細胞に焦点を当てた研究は、主として神経幹細胞や造血幹細胞を研究対象として幹細胞制御の分子基盤を明らかにすることを目的として実施している。また癌幹細胞に焦点を当てた研究では、癌幹細胞の特性解明とともに、癌幹細胞の維持に寄与する微小環境（ニッチ）の分子基盤解明にも取り組んでいる。総合的に得られた知見が、神経幹細胞や造血幹細胞のみならず広く生体内組織の発生・再生に関わる正常幹細胞や、癌の再発に関与する癌幹細胞を制御する機構の普遍的理解ならびに、医療応用への開発的研究の手がかりとなるよう研究を推進している。

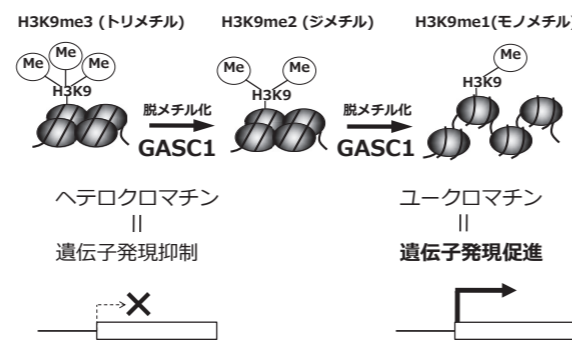
研究紹介

1. ヒストンメチル化修飾によるエピジェネティック制御の脳機能構築における役割に関する研究

エピジェネティック制御が中枢神経系の機能的構築に果たす役割については幾つもの報告があるが、それらは主としてDNAメチル化の関わるものであり、ヒストンメチル化制御の関与については未解明な点が多い。本研究では、扁平上皮がんにおいて遺伝子増幅が見られる遺伝子として難治疾患研究所分子細胞遺伝学分野の稲澤教授らにより見出され、その後遺伝子産物がヒストンH3の9番目のリジンの脱メチル化酵素であることが報告されたGASCIに着目した(図)。稲澤教授から供与されたGasc1遺伝子座にLacZ遺伝子が挿入されたGasc1遺伝子変異マウスを用いて、これまでにGasc1遺伝子が主に大脳皮質や海馬ニューロンに発現することを見出した。さらに、ホームケージ、ロータロッド、バーンズ迷

路などを用いた網羅的行動試験により、Gasc1変異ホモ接合体マウスは多動性および運動学習や空間学習の低下を呈することが明らかになり、神経発達症群のモデルマウスになり得るとした。本年、このGasc1遺伝子変異ホモ接合体マウスの免疫組織化学的解析によって、生後2-3ヶ月齢のGasc1変異マウスの脳内でGFAP陽性アストロサイトの顕著な増加を報告した。このGFAP陽性アストロサイトの増加は、前脳部の特に大脳皮質や線条体等で認められた。一方、海馬では明瞭な違いを認めなかった。近年、アストロサイトがシナプスの形成・機能を制御していることが報告されており、今後、このGasc1変異マウスの呈する行動異常の発症の原因のひとつとしてアストロサイトの機能異常の観点からも更に詳細に解析することは、神経発達症群の発症機構を解明する上で重要な示唆を与えることが期待される。

ヒストン脱メチル化酵素GASCIによる遺伝子発現促進

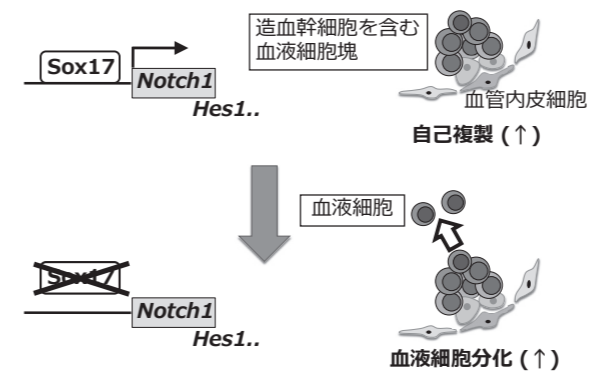


2. 胎生期造血幹細胞の維持に寄与する分子の検討

発生期において造血幹細胞は、大動脈を形成する血管内皮細胞の中で血液細胞と血管内皮細胞両方に分化する細胞(hemogenic endothelial cells)から出芽したように見える未分化な血液細胞の塊(血液細胞塊)の中に最初に見つけられる。この血液細胞塊に含まれる造血幹細胞がどのように維持され、また血液細胞を産み出していくかについて詳細は明らかではなかった。そこで、転写因子であり内胚葉のマーカータンパク質であるSox17を血液細胞塊を構成するCD45^{low}c-Kit^{high}細胞に強制発現すると、支持細胞上で多数の継代を経ても細胞塊を形

成すると共に未分化性が維持されることを明らかとした。続いて、恒常的にSox17を発現させた細胞を、致死量放射線照射を施したマウスに移植すると、長期造血再建能を認め、造血幹細胞が含まれることを明らかとした。さらに、Sox17を導入したことにより得られた血液細胞塊の細胞に対して、Sox17の発現を低下させる操作を行うと、血液細胞分化を誘導することが分かった。以上の結果よりSox17は胎仔期に認める造血幹細胞を含む血液細胞塊の維持に必要であることを示した。続いて、細胞運命決定に重要な役割を果たすことが知られるNotch1タンパク質が、胎生期の血液細胞塊において発現を認め、Sox17がNotch1プロモーターに結合し発現を誘導することを示した。また活性型Notch1細胞内ドメインの強制発現実験およびNotch1のリガンドであるJagged1刺激により、血液細胞塊の未分化性を維持することを明らかとした。さらに、Notch1により発現誘導される下流遺伝子Hes1についても、同様な未分化性の維持を認めた。以上のことから、Sox17-Notch1-Hes1経路が血液細胞塊の未分化性維持に寄与することが示唆された。

【マウス胎生中期の大動脈】

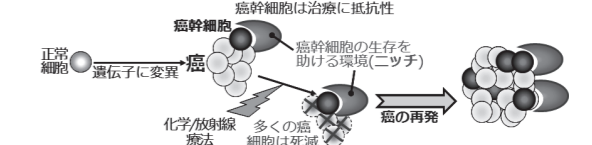


3. 癌幹細胞ニッチの人工構築と性状解明

癌組織中に存在する癌幹細胞(cancer stem cell)は、化学療法や放射線療法などへの抵抗性を有するとともに、自己複製能と多分化能に基づいて、再び不均質な癌組織を形成・維持・拡大する起源細胞として捉えられており、癌の進展と再発に深く関与するとされる(図上段)。また、癌幹細胞の生存と維持に関わる微小環境(ニッチ)の存在も示唆されており、癌の根治に向けて、癌幹

細胞および癌幹細胞ニッチを標的とした治療法の開発が期待される。当分野では、グリオーマ細胞株C6において、Hoechst33342色素排出性細胞集団(side population, SP)が癌幹細胞画分であることを以前に報告した。これを踏まえ、癌幹細胞ニッチの性状解明をめざして、エジンバラ大学との共同研究により、癌幹細胞ニッチを模倣する化学合成ポリマーの探索を行ってきた。以前、一つのニッチ模倣ポリマーとして、SP細胞から免疫不全マウス脳内移植実験で高い腫瘍形成能を示す細胞集団を濃縮するポリマーPU10を同定した。国立がん研究センター研究所との共同研究により、このPU10に結合するニッチ蛋白質候補のひとつとして鉄運搬分子transferrin(Tf)を同定した。その後のSP細胞由来移植腫瘍組織を用いた解析から、CD204陽性の腫瘍随伴マクロファージ(tumor-associated macrophage; TAM)に3価鉄(貯蔵鉄)の存在が確認され、癌の進展における鉄貯蔵TAMの関与が明らかとなった。SP細胞とMP細胞に発現する遺伝子についてcDNAマイクロアレイ解析を行ったところ、単球の動員やマクロファージ(Mφ)前駆細胞の増殖およびMφ分化を担うCCL2やGM-CSFなどの遺伝子発現が、SP細胞において亢進していた。そこで本年度はCCL2受容体に対する阻害剤やGM-CSFの中和抗体を用いた解析を行い、TAMの腫瘍内動員・分化に癌幹細胞が関与していることを明らかにした。癌幹細胞は腫瘍内にニッチを自ら構築し利用する巧みな生存戦略をとるものと考えられた(図下段)。このような癌幹細胞のニッチ構築能力を分子的に説明するとともに、それらを標的として、新たな治療戦略の開発に貢献したい。

癌治療における問題点：治療抵抗性の癌幹細胞とニッチの存在による癌再発



癌幹細胞の利己的生存戦略を標的とした治療法開発への可能性

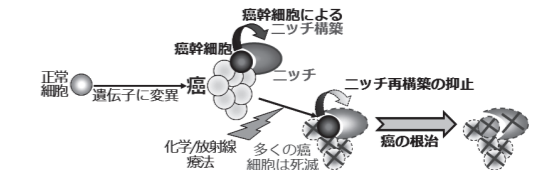


図. 癌幹細胞によるニッチ構築機構と、それを標的とした癌根治の可能性

研究業績

原著論文

1. Sudo G, Kagawa T, Kokubu Y, Inazawa J, and Taga T. Increase of GFAP-positive astrocytes in histone demethylase GASCI/KDM4C/JMJD2C hypomorphic mutant mice. Genes to Cells, in press. 2015

2. Kokubu Y, Tabu K, Wang W, Muramatsu N, Murota Y, Nobuhisa I, Jinushi M, and Taga T. Induction of protumoral CD11c[high] macrophages by glioma cancer stem cells through GM-CSF. Genes to Cells, in press, 2015

3. Tabu K, Muramatsu N, Mangani C, Wu M, Zhang R, Kimura T, Terashima K, Bizen N, Kimura R, Wang W, Murota Y, Kokubu Y, Nobuhisa I, Kagawa T, Kitabayashi I, Bradley M,

and Taga T. A synthetic polymer scaffold reveals the self-maintenance strategies of rat glioma stem cells by organization of the advantageous niche. Stem Cells, in press, 2015

4. Kimura T, Wang L, Tabu K, Tsuda M, Tanino M, Maekawa A, Nishihara H, Hiraga H, Taga T, Oda Y, and Tanaka S. Identification and analysis of CXCR4-positive synovial sarcoma-initiating cells. Oncogene, in press, 2015

先端分子医学研究部門 分子構造情報学分野

教授：伊藤暢聡 准教授：伊倉貞吉 助教：沼本修孝
技術補佐員：服部美智子 博士研究員：品川健朗

研究内容

ゲノム配列の決定やプロテオミクスの進歩により、多くのタンパク質の一次配列やその経時的な機能が解明されてきているが、タンパク質はある特定の立体構造をとることにより初めてその機能を発揮する。いわゆるプリオン病が示すように、タンパク質の化学的組成が同じでも、その立体構造が正しくなければ活性を示さないだけでなく疾病と関連することもある。

本分野では、タンパク質を中心に生体高分子の立体構造やそれに関連した物理化学的な性質を研究することを目的としている。また、合理的薬物設計を目指し、タンパク質と低分子化合物の複合体の構造も数多く決定している。X線結晶解析による立体構造の解析を中心に、分子生物学的手法やコンピュータシミュレーション等も利用してタンパク質の機能発現機構の研究も行っている。一方、数々の生体高分子の立体構造情報（原子座標）が蓄積されつつあり、これと情報科学を結ぶデータベースの構築にも寄与している。こうした研究がこれらのタンパク質を標的とした創薬に結びつくことを目標としている。

研究紹介

1. デングウイルスの血清型による抗体認識特異性の分子機構

デング熱はデングウイルスによる感染症で、蚊を媒介にして感染する。主に熱帯・亜熱帯地域でみられるが、最近日本においても国内発生例が報告され、注意が喚起されている。デングウイルスには4種の血清型（DEN1-DEN4）があり、一度目の感染では比較的軽症で済む場合が多いが、二度目に他の型に感染した場合、交差反応によりデングショック症候群やデング出血熱などを発症し、重症化する場合がある。4種の血清型すべてに効くワクチンはまだなく、その効率的な開発のためにも、抗体がそれぞれの血清型を認識する分子機構の詳細な解明が待たれている。

デングウイルスの抗体結合領域はエンベロープタンパク質の第3ドメイン（ED3）にあり、さらにエピトープ1および2のふたつの領域が結合部位として同定されている。それぞれの血清型におけるエピトープ1および2

の認識特異性、また交差反応性の詳細な知見を得るため、エピトープ部位の変異体解析や立体構造解析を進めている。特にDEN3とDEN4の血清型に対して、それぞれのエピトープ領域を互いに入れ替えた変異体を作成し、これらの免疫応答性を比較した結果、DEN3ではエピトープ2が、DEN4ではエピトープ1が認識特異性に主要な領域である可能性が示唆された。さらに、DEN4-ED3のエピトープ2配列をDEN3-ED3のエピトープ2配列に入れ替えた変異体の結晶構造を決定した(図1)。得られた構造から、エピトープ2領域の置換はED3の全体構造にほとんど影響を与えないものの、その表面電荷分布は大きく異なることがわかった。このことを踏まえ、DEN3-ED3とDEN4-ED3のふたつのエピトープ領域を互いに入れ替えてできる残り5種の変異体について、予想される分子モデルを作製し、結晶構造とあわせて比較検討した。その結果、分子表面の静電ポテンシャルが各変異体により顕著に異なることが明らかとなり、エピトープ領域の認識特異性に大きく関連するものと考えられた。

これらと並行して、ED3分子のコア領域を形成する疎水性アミノ酸に変異を導入した変異体についての解析なども進めており、ED3の熱安定性などの視点からも、4種の血清型と抗体との相互作用機構についての解析が進行中である。



図1 DEN4-ED3のエピトープ2配列をDEN3-ED3のエピトープ2配列に入れ替えた変異体の立体構造。エピトープ2配列の部分はスティックモデルで示している。

本研究は、東京農工大学の黒田裕准教授との共同研究である。

2. アルツハイマー病の発症抑制機構の解析

アルツハイマー病の発症原因のひとつとして考えられているタウタンパク質は、過剰リン酸化を受けることにより、微小管への結合能を失い、凝集化する。この凝集化の抑制に、プロリン異性化酵素（PPIase）のPin1が関わっていると考えられている。Pin1はWWドメインとPPIaseドメインから構成されるタンパク質で、両ドメインともがリン酸化したS/T-P（pS/pT-P）配列を標的としている。一方、タウタンパク質の凝集体では多数のpS/pT-P配列が検出されており、Pin1のいずれかひとつのドメイン、あるいは、両方のドメインとの相互作用が凝集抑制に効いていると考えられてきた。最近、リン酸化タウタンパク質中のpT231-P232がPin1の標的であり、Pin1がその異性化を触媒することによりタウタンパク質の凝集化を抑制するという説が有力視されている。

そこで本研究では、タウペプチドを用いたin vitroの実験系で、Pin1によるpT231-P232の異性化触媒とタウペプチドの凝集抑制能との関係をNMRと蛍光強度変化により解析した。その結果、Pin1は、pT231-P232の異性化を触媒できないにもかかわらず、タウペプチドの凝集化を抑制することが明らかになった。また、WWドメインの方がPPIaseドメインよりも凝集抑制能が高いこともわかった。これらの結果に基づくと、Pin1によるタウタンパク質の凝集抑制機構は両者の結合に伴う単なる平衡の移動であり、Pin1の触媒反応を必要としないことが明らかとなった。

本研究は、広島大学の楯真一教授との共同研究である。

3. Protein Data Bankの改善

X線結晶構造解析や核磁気共鳴（NMR）、さらには電子顕微鏡の発展により、多くの生体高分子の立体構造が蓄積されつつある。さらには「タンパク3000プロジェクト」および「ターゲットタンパク研究プログラム」に

代表される構造ゲノム科学の進展がこの流れを加速している。この膨大な立体構造情報はバイオインフォマティクスなどの分野での貴重な情報源となっている。構造生物学が成立した早い時期からProtein Data Bank (PDB) がこうした成果の主たるアーカイブとして機能してきた。現在は、米国Rutgers大学を中心としたResearch Collaboratory of Structural Bioinformatics (RCSB)、ヨーロッパのEuropean Bioinformatics Institute (EBI)、そして大阪大学蛋白質研究所を中心とした日本のProtein Data Bank Japan (PDBj、http://www.pdbj.org)の三者からなるworld-wide PDB (wwPDB) が連携してPDBの維持・運営にあたっている。本研究室はPDBjの一員としてPDBの活動に参加している。そのひとつに、研究の社会還元の一環としてPDBjが作成している、生体高分子立体構造の教育用データベース、Encyclopedia of Protein Structures (eProtS)がある。これは高校生以上を対象にしたものであるが、教育的な目的だけではなく、健康に関して一般の人々の関心が高まっていることもあり、そうした社会的に関心の高いタンパク質についてその生体構造中心に性質や機能を紹介している。

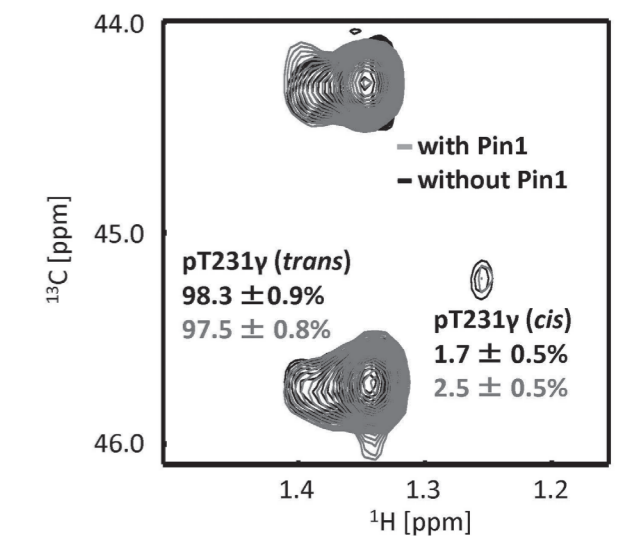


図2 タウペプチドのシスとトランス異性体の割合を、Pin1の存在/非存在下でNMR法によって測定した。その結果、ピーク強度から見積もられた各異性体の割合は、Pin1の有無によって変化しなかった。このことは、Pin1がタウペプチドの異性化を触媒しないことを示している。

人事異動

転入：品川健朗（博士研究員）

研究業績

原著論文

1. Watarai Y, Ishizawa M, Ikura T, Zacconi FC, Uno S, Ito N, Mourino A, Tokiwa H, Makishima M, Yamada S: Synthesis, Biological Activities, and X-ray Crystal Structural Analysis of 25-Hydroxy-25 (or 26)-adamantyl-17 [20 (22),23-diynyl]-21-norvitamin D Compounds. J Med Chem, 58, 9510-9521, 2015.

2. Anami Y, Sakamaki Y, Itoh T, Inaba Y, Nakabayashi M, Ikura T, Ito N, Yamamoto K: Fine tuning of agonistic/antagonistic activity for vitamin D receptor by 22-alkyl chain length of ligands: 22S-Hexyl compound unexpectedly restored agonistic activity. Bioorg Med Chem, 23, 7274-7281, 2015.

3. Kulkarni M.R., Islam M.M., Numoto N., Elahi M., Mahib M.R., Ito N., Kuroda Y.: Structural and biophysical analysis of sero-specific immune responses using epitope grafted Dengue ED3 mutants. Biochim. Biophys. Acta, 1854, 1438-1443, 2015.

4. Masaki S, Kii I, Sumida Y, Kato-Sumida T, Ogawa Y, Ito N, Nakamura M, Sonamoto R,

Kataoka N, Hosoya T, Hagiwara M: Design and synthesis of a potent inhibitor of class 1 DYRK kinases as a suppressor of adipogenesis. Bioorg Med Chem, 23, 4434-4441, 2015.

5. Morooka S, Hoshina M, Kii I, Okabe T, Kojima H, Inoue N, Okuno Y, Denawa M, Yoshida S, Fukuhara J, Ninomiya K, Ikura T, Furuya T, Nagano T, Noda K, Ishida S, Hosoya T, Ito N, Yoshimura N, Hagiwara M.: Identification of a Dual Inhibitor of SRPK1 and CK2 That Attenuates Pathological Angiogenesis of Macular Degeneration in Mice. Mol Pharmacol, 88, 316-325, 2015.

先端分子医学研究部門 フロンティア研究室 低酸素生物学

准教授：中山 恒

研究内容

概要

私たちの研究室では、外界の酸素濃度の変化が、生体内でどのように検知されて、どのように作用しているのかを研究しています。高山や体内の微細環境などは、酸素濃度の低い環境（低酸素環境）にあります。個体や細胞は低酸素環境にさらされると、その変化を素早く感知し、呼吸・代謝をはじめとする様々な生理応答を調節して、その環境に適応します（低酸素応答）。こうして低酸素環境下においても恒常性が維持されます。一方で、がん、虚血性の疾患、免疫疾患などの病気でも低酸素応答が認められ、その病態と密接に関与しています。私たちは、低酸素応答の分子レベルの解析を通して、がん治療や再生医療に貢献することをめざしています。

研究紹介

1. 低酸素コンプレックスの解析による生体内酸素センサー分子同定の試み

Hypoxia-Inducible Factor(HIF)- α は低酸素応答において中心的な役割を担う転写因子です。プロリン水酸化酵素 PHD は HIF- α のプロリン残基を水酸化することで、ユビキチン化を介した分解を促進して、その発現を負に制御します。本研究室では主に PHD に着目して、低酸素応答のシグナル伝達機構の解析を進めています。PHD には 1、2、3 の三種類が存在しており、共通に HIF- α の水酸化に働く一方で、それぞれに独自の働きを持つことが示唆されています。しかしながら、まだこの独自の働きには明らかになっていないことが多く、私たちはこの課題に PHD3 に着目して取り組んでいます。

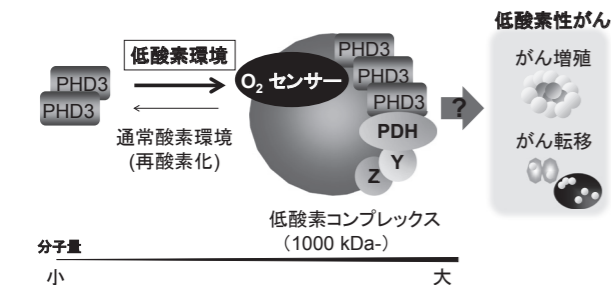


図1 低酸素応答における低酸素コンプレックスの役割

PHD3は低酸素環境に反応して、巨大なタンパク質複合体を形成します（図1）。この複合体中には細胞内の

酸素濃度変化を感知する分子「酸素センサー」が含まれていることが考えられます。そこでプロテオミクス解析を用いて、複合体を構成するタンパク質を網羅的に同定して、酸素センサー分子の同定を試みています。これまでに、この複合体の構成分子としてピルビン酸脱水素酵素 (PDH) を同定しました。PDHはピルビン酸をアセチル CoA へと変換する酵素であり、エネルギー代謝経路において解糖系と TCA 回路を結びつける役割を担います。PHD3は、低酸素下で PDH と結合することにより PDH 複合体の安定性を保持し、PDH 活性を正に制御する分子であることを明らかにしました。低酸素下では、PDH の活性は減少していきませんが、PHD3 との結合は強くなります。このことから、PHD3 は低酸素下での PDH 活性を fine-tuning して、解糖系と TCA 回路のバランスを調節することで、低酸素の程度に応じた効率的なエネルギー産生ができるように働いていると考えられます（図2）。今後、PHD3 を高発現するなどの方法でがん細胞内の PDH 活性を高めて、解糖系への依存状態を解消することを試み、新たながん抑制法に結びつけることをめざしていきたいと思ひます。また、引き続き、複合体構成分子の機能解析を進めて、それらの分子が酸素センサーとして働く機構の解明をめざします（図1）。

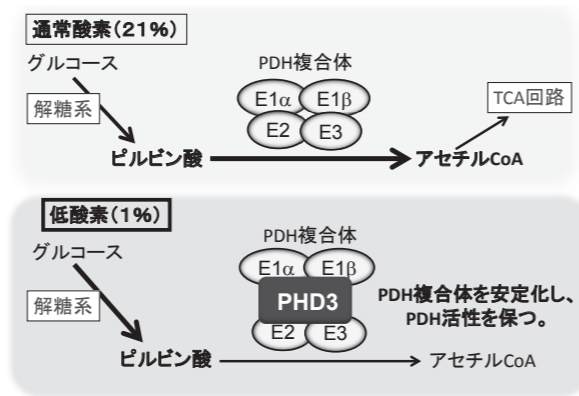


図2 低酸素下での PHD3 による PDH 複合体の安定化

2. 慢性期低酸素応答における CREB、NF- κ B 経路の役割

低酸素応答における中心分子として、これまでに HIF に着目した解析が広く進められてきました。一方で、私たちは低酸素応答の慢性期において、HIF の発現や活

性が低下することを見出しました。そこで、慢性期低酸素応答の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした研究に着手しました。DNA マイクロアレイ解析を行い慢性期低酸素で発現が上昇する遺伝子の同定を行い、マトリックスメタロプロテアーゼ *MMP1* を同定しました。*MMP1* の発現誘導は低酸素培養 24 - 48 時間後の慢性期に認められて、その発現には転写因子 CREB、NF- κ B が働いていることを明らかにしました。これらの転写因子は、慢性期の低酸素環境で強い転写活性を示しました。また、CREB、NF- κ B を siRNA により抑制したがん細胞では、*MMP1* の発現が顕著に減少して、マウス移植モデルにおける肺転移が抑制されることが明らかになりました。このことから、慢性的な低酸素環境

ハイライト

慢性期の低酸素応答における新たなシグナル機構：CREB 経路と ER ストレス応答経路のクロストーク

がんが存在する微小環境は低酸素・低栄養・低グルコースであり、そのような環境に慢性的にさらされているがん細胞は ER ストレスシグナルが活性化されています。私たちは慢性的な低酸素環境で CREB、NF- κ B が活性化されることを見出したことから、これらの経路と ER ストレス応答との関係を新たに解析しました。その結果、CREB は ER ストレスにさらされているがん細胞内で活性化されていることを新たに明らかにしました。さらに、CREB をノックダウンした細胞では、ER ストレス応答経路の中心分子 PERK、IRE1 α の発現が低下して、ER ストレス応答が顕著に抑制されていました。がんにおける ER ストレス応答経路の活性化は、がんの生存維持に働くばかりでなく、上皮間葉転換を引き起こしたり、血管新生を促したりすることで、がん転移を促進することが報告されています。そこで、CREB ノックダウン細胞をマウスに移植したところ、肺への転移が有意に減少することが明らかになりました。この細胞では、低酸素下で CREB に

がもたらすがんの悪性化には、CREB、NF- κ B を介した *MMP1* の発現上昇が関与していると考えられます（図3）。したがって、低酸素性ががんの悪性化を抑制するアプローチとして、HIF を阻害することに加えて、CREB、NF- κ B の活性も同時に抑制することが有効な手法となることが期待されます。さらに、低酸素慢性期における CREB・NF- κ B の標的遺伝子の同定により、慢性的に低酸素環境に存在するがん細胞のマーカー分子が得られることも期待されます。新規がんマーカーの探索は、当研究室が参画している難病基盤・応用研究プロジェクトにおいても、エピジェネティクス制御に着目して進めています（同プロジェクトの難治低酸素性乳がん研究プロジェクトのページを参照下さい）。

よって誘導される細胞外マトリックス構築や血管新生に関わる遺伝子群が低下しており、その結果として、肺転移が減少したと考えられます。CREB は、慢性期低酸素で活性化されてその標的遺伝子の発現を制御することに加えて、ER ストレス経路の増強にも働くことで、がん細胞の転移能を亢進していると考えられます（図3）。今後は、CREB をがんにおける慢性期の低酸素応答・ER ストレス応答経路の両経路を抑制する効果的な標的と位置づけて、その活性を阻害することによるがん抑制効果を検証していきたいと考えています。

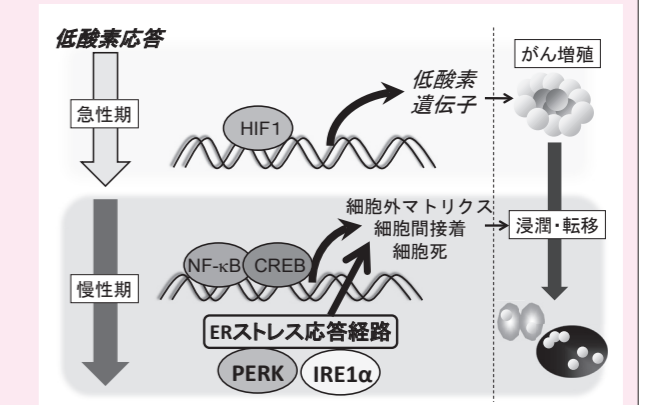


図3 慢性期低酸素応答における ER ストレス応答経路と CREB の協調

業績目録

発表論文

1. Kikuchi D., Tanimoto K., and Nakayama K.* CREB is activated by ER stress and modulates the unfolded protein response by regulating the expression of IRE1 α and PERK. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 469, 243-250. (2016).
2. Katsuta E., Tanaka S., Mogushi K., Shimada S.

Akiyama Y., Aihara A., Matsumura S., Mitsunori Y., Ban D., Ochiai T., Kudo A., Fukamachi H., Tanaka H., Nakayama K., Arai S., Tanabe M. CD73 as a therapeutic target for pancreatic neuroendocrine tumor stem cells. *Int. J. Oncol.* 48, 657-669. (2016).

国際学会

Koh Nakayama
Prolyl-hydroxylase PHD3 interacts with pyruvate dehydrogenase (PDH)-E1 β and regulates

the cellular energy metabolism. *Keystone Symposia: Hypoxia* 5月14日 Dublin, Ireland

国内学会

中山 恒

がんの悪性化における低酸素応答シグナルと小胞体ストレス応答シグナルの新規クロストーク機構の解析 BMB2015 (生化学会・分子生物学会合同大会) 口頭発表 12月3日 神戸

先端分子医学研究部門 テニュアトラック研究室 細胞分子医学分野

准教授：大石由美子 助教 種市大喜、林晋一郎 特任助教 早川清雄
技術補佐員：星野由紀子、鈴木裕美

研究内容

概要

肥満を基盤とした糖尿病、高脂血症などの生活習慣病は、動脈硬化症を進める主要な要因となる。生活習慣病の発症や進展には、マクロファージなどの免疫細胞が重要な役割を担う。また、加齢に伴う骨格筋の質的・量的減少と定義される「サルコペニア」が、生活習慣病の背景として重要であることが最近注目されている。当分野では、①マクロファージを中心とした慢性炎症の分子機構 ②サルコペニアに関連した骨格筋の修復・再生のメカニズムを明らかにすることを主たる研究の目的としている。これらの研究を通じて、生活習慣病の発症や進展を防ぐ予防・治療法の開発を目指す。

研究内容紹介

1. 慢性炎症におけるマクロファージの機能とその制御機構

肥満や糖尿病、動脈硬化症や発癌の基盤となる病態として、慢性炎症が重要である。慢性炎症は、内外の刺激によって惹起された炎症反応が適切に収束せず、軽度の炎症が遷延した状態である。肥満した個体の脂肪組織や、動脈硬化の病巣では共通してマクロファージの浸潤を伴う慢性炎症の所見が観察され、慢性炎症の病態形成にマクロファージが重要な役割を果たすことが近年、明らかとなっている(図1)。マクロファージは多彩な機能を持ち、外的/内因性の刺激によって活性化されて炎症を促進するのみならず、積極的に炎症を収束する。私たち

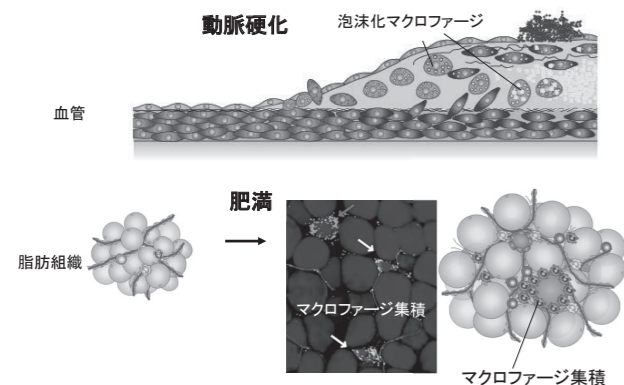


図1 肥満・動脈硬化の病態形成にマクロファージが重要である

は、このようなマクロファージの多彩な機能が、細胞代謝と密接に関連して制御されることを見出した。すなわち、マクロファージが炎症刺激を受けると、炎症応答の初期には解糖系が優位となって炎症を進めるが、炎症応答の後期には脂質代謝を亢進させて炎症収束形質を示す(図2)。

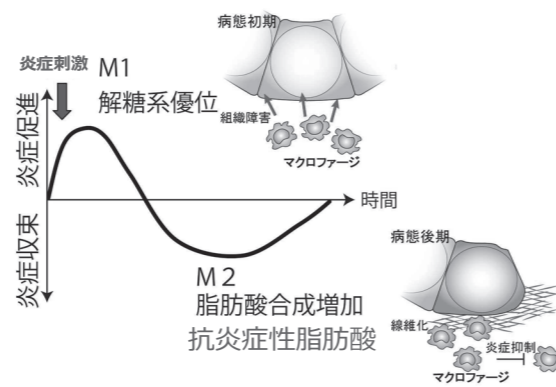


図2 マクロファージは炎症応答の初期には解糖系を亢進し炎症促進形質(M1様)を示すが、後期には脂肪酸合成を増加させて炎症収束形質(M2様)を示す

細胞内脂質の定量解析(リピドミクス)ならびに遺伝子発現解析の結果、マクロファージは炎症応答の後期に抗炎症性不飽和脂肪酸(ω -3, ω -9)の合成を増加させ、自律的に炎症収束形質へと変化した。さらに、その分子メカニズムをクロマチン免疫沈降-高速シーケンス法(ChIP-seq)、Global run-on(GRO)-seqならびにRNA-seqを組み合わせてグローバルに解析した。その結果、マクロファージの自律的な形質の転換には、炎症刺激によるNF κ Bの活性化とLiver X receptor(LXR)機能の一過性の抑制、ならびに炎症後期におけるsterol regulatory element binding protein(SREBP)の活性化を含む転写因子ネットワークによる制御と同時に、エピゲノム変化が重要であることを見いだした。

このように、マクロファージの主要な細胞機能としての免疫応答は、細胞内脂質代謝と密接に連携している。肥満や生活習慣病の病態においては、個体レベルでの代謝変動に起因した免疫系の変動により、免疫系を構成するマクロファージの細胞内代謝が変動し、刺激に対する応答性が変化して炎症が慢性化するのではないかと想定される。

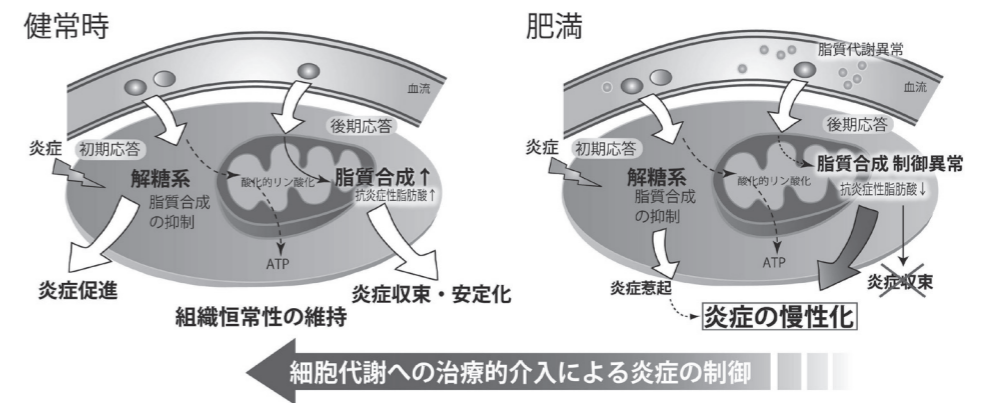


図3 マクロファージの細胞代謝への介入による炎症の制御

現在は、細胞代謝を是正し、マクロファージ機能を正常化する抗生活習慣病治療・予防法の開発を目指して、研究を行っている(図3)。

2. 骨格筋の修復・再生のメカニズムに関する研究

サルコペニアは、加齢に伴う骨格筋の量的・質的低下と定義される。糖尿病をはじめとした生活習慣病が発症する背景には、サルコペニアが重要である。骨格筋は修復・再生能の高い臓器である。骨格筋の修復や再生を司るのは、骨格筋幹細胞である筋衛星細胞である。通常、静止状態にある筋衛星細胞は筋損傷後に活性化されて筋線維への分化をすすめる一方、一部の筋衛星細胞は多分化能を維持したまま静止状態に戻る。私たちは筋修復・再生に重要な新しい因子として、Klf5を同定した。Klf5は内外のストレスにより誘導され、ES細胞の未分化能の維持にも重要なZnフィンガー型の転写因子である。筋修復の過程において、Klf5は分化途上の幼弱な筋線維に一過性に高発現していた(図4)。また、筋衛星細胞特異的にKlf5をノックアウトしたマウス(Pax3-Cre:Klf5^{flax/flax})では筋損傷後の修復が著明に遅延した(図5)。分子生物学的検討の結果、Klf5は骨格筋分化のマスター制御因子であるMyoDと直接相互作用し、Myogeninに代表される成熟した骨格筋のマーカー遺伝子の多くの発現を誘導することを見いだした。すなわち、Klf5は筋衛星細胞の機能維持と筋線維への正常な分化

に必須である。さらに、興味深いことに筋損傷後の修復には筋衛星細胞とマクロファージの相互作用が必須である。今後は、筋衛星細胞とマクロファージとの相互作用の観点から、サルコペニアの病態解明と治療・予防法の開発へと研究を展開してゆきたい。

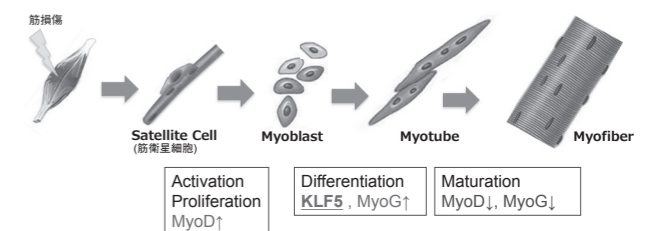


図4 骨格筋再生・修復を担う転写因子ネットワーク

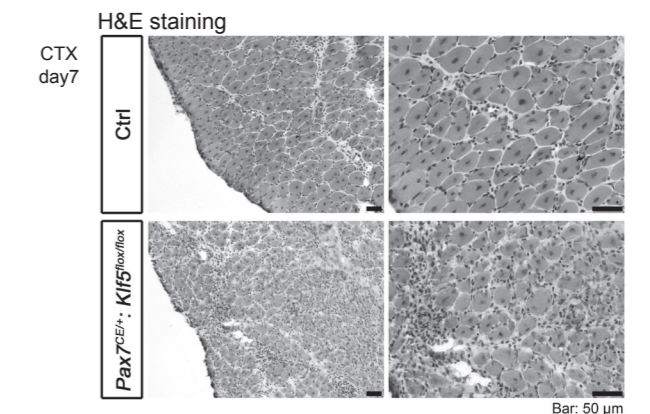


図5 筋衛星細胞特異的Klf5ノックアウトでは筋損傷後の修復が遅延する

人事異動

転入：今野太貴(修士課程)、星野由紀子、鈴木裕美(技術補佐員)
転出：三木弥名子(技術補佐員)

業績目録

原著論文

1. Oishi Y and Manabe I. Immunometabolic control of homeostasis and inflammation.

Inflammation and Regeneration 35(4):185-192, 2015

2. Differentiation of pluripotent stem cells to muscle fiber to model Duchenne muscular dystrophy. Chal J, Oginuma M, Al Tanoury Z, Gobert B, Sumara O, Hick A, Bousson F, Zidouni Y, Mursch C, Moncuquet P, Tassy O, Vincent S, Miyanari A, Bera A, Garnier JM, Guevara G, Hestin M, Kennedy L, Hayashi S, Drayton B, Cherrier T, Gayraud-Morel B, Gussoni E, Relaix F, Tajbakhsh S, Pourquie O. *Nat Biotechnol.* 33(9):962-9, 2015

総説

大石由美子「慢性炎症とエイジング(老化)」第3版アンチエイジング医学の基礎と臨床 メジカルビュー社 2015
大石由美子「マクロファージの細胞代謝と炎症反応」内分泌・糖尿病・代謝内科、科学評論社、第41巻3号 2015
大石由美子「疾患モデルの作成と利用-脂質代謝異常と関連疾患」第1章第10節 pp.111-115 転写因子 KLF5, 株式会社エルアイシー、2015

難治病態研究部門

Division of Pathophysiology

難治病態研究部門では、難治病態形成機構の研究を通じて生命現象の基本的なメカニズムを解明し、新たな診断・治療法の開発に資することを理念とする。この理念に沿って、種々の疾患における難治病態に焦点を当て、病態形成機序の解明研究とそれに基づいた診断法および治療法の開発を念頭においた病態研究を時代の要請に応じて展開し、難治疾患を克服することを目的とする。難治病態研究部門における本年の主な研究成果は以下のとおりである。

難治病態研究部門における主な研究成果

- 生きた脳の内部のオートファジーを観察する技術を開発した（神経病理学）
- アルツハイマー病におけるオートファジー不全を直接的に証明した（神経病理学）
- アポトーシスとネクローシスを同時に抑制できる画期的な化合物を同定した（病態細胞生物学）
- Atg5 依存的オートファジーが、細胞運動を制御していることを発見した（病態細胞生物学）
- 扁平メダカの発見によって 100 年来の謎である重力耐性機構の一端が判明した（発生再生生物学）
- 薬剤が初期胚に及ぼす催奇性を評価可能なマウス ES 細胞試験法を開発した（発生再生生物学）
- 加齢に伴う脱毛の仕組みを解明した（幹細胞医学）
- ヒト皮膚の表皮や真皮の幹細胞の新しい同定法を開発した（幹細胞医学）
- 全身性エリテマトーデス (SLE) での自己免疫応答を細胞レベルで解析できるモデルマウスを作成した（免疫疾患）
- B リンパ球機能制御に関わるレクチン分子 CD22/Siglec2 のシス糖鎖リガンドの役割を明らかにした（免疫疾患）
- α ミオシン重鎖遺伝子のミスセンス変異がサルコメア整合性異常を来とし、洞不全症候群を引き起こすことを究明した（分子病態）
- APOBEC3H 遺伝子ハプロタイプが HIV-1 感染症および AIDS 発症の遺伝的要因であることを日本人およびインド人集団で証明した（分子病態）

難治病態研究部門 神経病理学分野

教授：岡澤 均 准教授：田川一彦 助教：田村拓也
特任助教：陳西貴、藤田慶大、本間秀典、本木和美
非常勤講師：貫名信行、内原俊記、井上治久、曾根雅紀

研究内容

当分野は、1) 神経変性疾患の分子機構の包括的理解とこれに基づいた治療開発を目指した研究、2) 神経変性疾患研究の過程で発見したPQBPIの分子機能解析を通じた精神遅滞の研究、3) Oct-3/4の機能解析を通じた幹細胞分化機構の研究、を行っている。この中で本年度に成果のあった1)について報告する。

研究紹介

飢餓により誘導されるオートファジーに伴う“細胞内”アミロイドの増加を発見

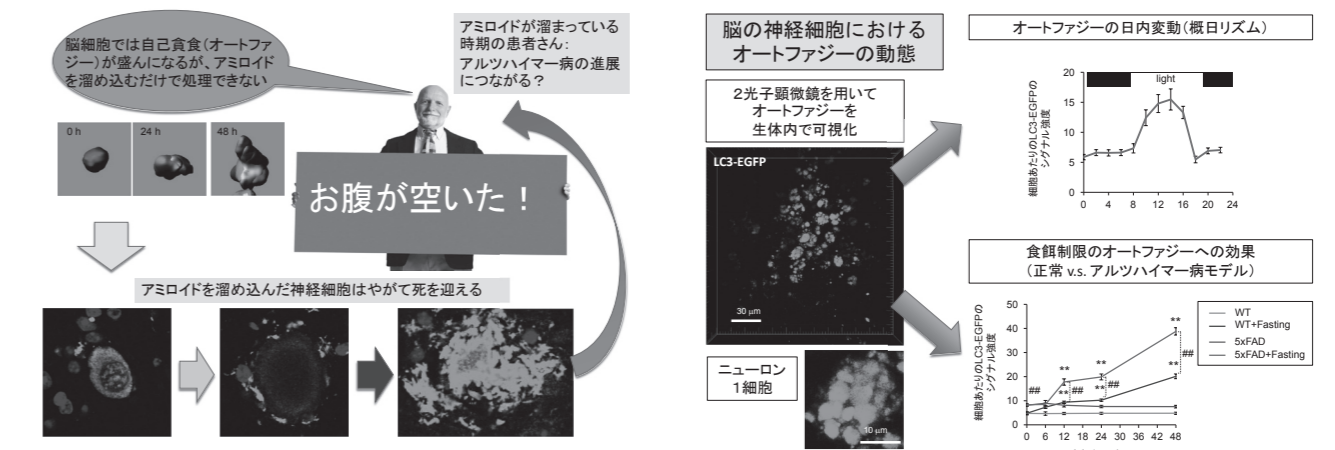
アルツハイマー病を初めとする神経変性疾患は、細胞の内外に異常タンパク質が蓄積することが病理学的な特徴である。アルツハイマー病では、細胞外にベータアミロイドと呼ばれる異常タンパク質が沈着する老人斑と、細胞内にタウタンパク質が凝集する神経原線維変化の2つが起こる。一方、異常タンパク質を除去する細胞機構として、ユビキチン・プロテアソーム系とオートファジー系の2つの分解系が知られ、さらに、オートファジーには、常に一定レベルで働いている基礎的オートファジー (basal autophagy) とカロリー制限などで活性化する誘導性オートファジー (induced autophagy) があることが知られている。これまで、誘導性オートファジーが脳以外の組織においては大きな役割を果たすことは知られていたが、脳組織での誘導性オートファジーの存在が認められないという報告 (Mizushima et al, Mol Biol Cell 2004; など) がある一方で、カロリー制限等による誘導性オートファジーが神経変性疾患における異常タンパク質の凝集を除き、症状を改善するとの結果が多数報告されており (Ravikumar et al, Nat Genet 2004; など)、神経細胞における誘導性オートファジーの有無は決着していなかった。また、高等動物における誘導性オートファジーには、インスリン受容体から mTOR (mammalian target of rapamycin) を介するシグナル経路が重要と考えられているため、糖尿病や高カロリーがリスクファクターと言われるアルツハイマー病の病態理解の上でも、この決着は重要であった。そこで本研究では『神経細胞における誘導性オートファジーの有無』を明らかにすることを第一の目的とした。マクロオートファジーを特徴

付けるオートファゴゾームのマーカー分子である LC3 から作製した融合蛍光タンパク質 (LC3-EGFP) を脳内に発現させて、生きたマウスの脳内部でダイナミックに変化するオートファゴゾームを2光子顕微鏡で観察する方法を開発し、脳における飢餓誘導性オートファジーが、神経細胞において実際に存在することを証明した。さらに、マウス脳と同じ場所を継続的に観察することにより、脳内のオートファゴゾーム形成に概日リズム (circadian rhythm) があることを発見した。

次に、アルツハイマー病では、オートファジーが病態を抑制するのかそれとも進行させるのか、という特異的な問題点があった。オートファジーは細胞内の異常タンパク質を除去するシステムであることから、病態を抑制すると思われる。実際、変性疾患の一つであるポリグルタミン病のモデルマウスでは誘導性オートファジーが症状を改善するとの報告がある (Ravikumar et al, Nat Genet 2004; など)。一方で、アルツハイマー病においては、オートファジー系の膜はベータアミロイド産生の場であり、オートファジーを活性化すると細胞外アミロイドが増加すること (Yu et al, J Cell Biol 2005; Nixon et al, J Neuropathol Exp Neurol, 2005)、アルツハイマー病モデルマウスにおいてオートファジーに必須の遺伝子 Atg7 を欠損させると細胞外ベータアミロイドが減少するという結果 (Nillson et al, Cell Rep 2013) が報告されていた。これらの研究結果は、オートファジーがアルツハイマー病態を進行させることを示唆している。そこで本研究では『アルツハイマー病におけるオートファジーの功罪』を明確にすることを第二の目的とした。結果として、アルツハイマー病態では飢餓による誘導性オートファジーが亢進しているものの、エンドサイトーシス亢進によって細胞外から取り込んだベータアミロイドを十分に分解処理出来ず、細胞内にベータアミロイドを溜め込むこと、さらにはこの細胞内アミロイドの増加はアルツハイマー病で侵されやすい脳内の重要部位で起こることが明らかになった。また、細胞内にベータアミロイドが増加した神経細胞を詳細に観察すると、一部は細胞が膨張して破裂し、ベータアミロイドを周辺にまき散らす像も得られた。これらの結果は、アルツハイマー病態に飢餓状態が重なることによって引き起こされ

る細胞内のベータアミロイドの増加が細胞死につながり、病態の悪化を加速する可能性を示している。

本研究により、脳神経細胞においても飢餓誘導性オートファジーが存在し、さらにマクロオートファジーの活動性には日内変動があることを示した。さらに本研究成果は、アルツハイマー病態におけるオートファジーの活性化が細胞外から細胞内へのベータアミロイドの取り込み促進に働くものの、細胞内部でのベータアミロイドの分解処理には不十分であり、むしろ細胞内にベータアミロイドが蓄積して細胞膨張を伴う細胞死につながる可能性を強く示唆している。今日では、過度なカロリー摂取などの生活習慣がアルツハイマー病進行を早める要素であることが広く認められている。しかし、脳内で細胞外のベータアミロイド濃度がある程度高まった後では、むしろ、カロリー制限によってオートファジーを過度に活性化することがアルツハイマー病態を悪化させるリスクとなることが、本研究成果から想定される。これは、食習慣を通じた認知症予防・治療を今後進める際に重要なポイントと考えられる。また、アルツハイマー病のゲノムワイド関連遺伝子解析 (GWAS) においてオートファ



研究業績

1. Chen, X., Kondo, k., Motoki, k., Homma, H., Okazawa, H. (2015) Fasting activates macroautophagy in neurons of Alzheimer's disease mouse model but is insufficient to degrade amyloid-beta. *Scientific Reports*, 5, Article number: 12115. doi:10.1038/srep12115
2. Kamagata, K., Kerever, A., Yokosawa, S., Otake, Y., Ochi, H., Hori, M., Kamiya, K., Tsuruta, K., Tagawa, K., Okazawa, H., Aoki, S., Arikawa-Hirasawa, E. (2016) Quantitative Histological Validation of Diffusion Tensor MRI by Two-Photon Microscopy of Cleared Mouse Brain. *Magnetic Resonance in Medical Sciences*. In press.
3. Shiwaku, H., Okazawa, H. (2015) Impaired DNA Damage Repair as a Common Feature of Neurodegenerative Diseases and Psychiatric Disorders. *Current Molecular Medicine*, 2015; Vol.15 (2) pp119-128. doi: 10.2174/1566524015666150303002556

ジー関連遺伝子が優位な相関を示していることから (Lipinski et al, Proc Natl Acad Sci USA, 2010)、アルツハイマー病においてオートファジーが機能不全に陥っている可能性も疑われる。この点も、カロリー制限による過度なオートファジー促進がアルツハイマー病の増悪因子となりうることを示唆している。

ハイライト

「過度な食事制限はアルツハイマー病を加速する可能性を示唆」

アルツハイマー病におけるオートファジーの活性化は、細胞内部でのベータアミロイドの分解処理には不十分であり、むしろ細胞内にベータアミロイドが蓄積して細胞膨張をとまなう細胞死につながる可能性が示唆された。したがって、脳内で細胞外のベータアミロイド濃度がある程度高まった後に、カロリー制限によってオートファジーを過度に活性化させることは、アルツハイマー病を悪化させるリスクが高いことが、同研究により認められた。

難治病態研究部門 病態細胞生物学分野

教授：清水重臣 講師：荒川聡子 特任講師：辻岡政経、鳥居 暁
助教：本田真也 プロジェクト助教：山口啓史
特任助教：室橋道子、申珉京、藤掛伸宏 学振特別研究員：吉田 剛

研究内容

概略

当研究室では、①オートファジー機構の解析とその生理的、病理的意義の解明、②細胞死機構の解析とその破綻に由来する疾患の治療薬開発、③ミトコンドリア機能異常に由来する疾患の克服、を3つの柱として研究を行っている。オートファジーに関しては、当研究室で発見した新しいメカニズムによるオートファジーの分子機構やその生理的、病理的意義を解析している。また、オートファジー関連分子の新たな機能の探索も行なっている。細胞死に関しては、哺乳動物個体の中で細胞死システムが如何に機能しているかを探索している。特に、オートファジー細胞死に代表される非アポトーシス細胞死を解析している。また最近、新たな細胞死経路を発見し、その生理的役割を解析している。ミトコンドリアに関しては、ミトコンドリアと細胞質との間の情報交換の基本原理の解明を目指している。最終的には、これらの知見を基盤に生命の動作原理の本質を解明することを目指している。

研究紹介

1. 新しいオートファジー機構の発見とその分子機構解析

オートファジーとは、細胞内小器官などの自己構成成分を分解するシステムで、細胞の健全性の維持に貢献している。また、その機能異常は神経疾患や発癌など様々な疾患に関与することが報告されている。従来オートファジーの実行メカニズムは、酵母から哺乳動物まで保存されている複数の分子群 (Atg5, Atg7, LC3 等) によって完全に支配されていると考えられてきた。しかしながら、当教室では、Atg5, Atg7, LC3 などの分子に依存しない新たなオートファジー機構を発見した。この新規オートファジーは、ゴルジ装置やエンドソームを起源としており、Rab9 等の分子によって調節される。

本年は、この新規オートファジーの解析を行ない、以下の知見を明らかにした。即ち、①新規オートファジーは、酵母から哺乳動物細胞まで保存されていること、②新たな新規オートファジー関連分子を4種類発見した。

また、Atg5 に依存したオートファジーに関しても、

細胞運動やオルガネラ制御に重要な役割を果たしていることを見出した。

2. 細胞死の解析

多くの細胞は自殺装置を内包しており、必要に応じ積極的にそのスイッチを入れ死に至る。この機構は細胞分裂や細胞増殖と協調して機能し、個体発生や組織の恒常性維持に寄与している。従来、生理的な細胞死はアポトーシスのみであると考えられてきたが、我々は世界に先駆けて、非アポトーシス細胞死 (オートファジー細胞死、ネクローシス) の存在を発見した。

本年は、アポトーシスとネクローシスを同時に抑制することができる化合物の発見に成功した。酸化ストレスや虚血による細胞死の多くは、アポトーシスとネクローシスが同時並行的に誘導されるため、両方の細胞死を抑制できる本化合物は、このような刺激による細胞死を強力に抑制しうる。実際に、本化合物は、細胞や心臓における酸化ストレス傷害の抑制に極めて有効であった。

3. ミトコンドリア機能異常に基づく疾患の解析

ミトコンドリアは、代謝反応の中心として細胞の生存に寄与すると同時に、細胞死においても決定的な役割を果たしている。我々は、ミトコンドリアと細胞質との間の物質交換の場となるミトコンドリア膜に着目し、膜蛋白質の機能や構造、膜透過性システムを網羅的に解析したいと考えている。

本年は、弱いアンカッパー作用を有する化合物の発見に成功した。この化合物をミトコンドリアに投与すると、アンカッパー作用により酸素消費速度の上昇、膜電位の低下が誘導される。この化合物は、細胞レベルでは細胞分裂速度を抑制するほか、肥満マウスの痩せ薬様の活性を示しうる。

ハイライト

ネクローシスとアポトーシスを同時に抑制できる細胞死抑制化合物を発見

生体における細胞死には、アポトーシスの他に、オートファジー細胞死やネクロプトーシス、ミトコンドリアを介するネクローシスなどが存在する。細胞に酸化ストレスが加わった際には、アポトーシスシグナルとネクローシスシグナルが並行して活性化される。この為、酸化ストレスの程度によって様々な割合で、アポトーシスとネクローシスが発現することとなる。実際に、臓器の虚血再灌流時には、軽症であればアポトーシス中心に、重症であればネクローシス中心に両方の細胞死が発現する。

アポトーシスはミトコンドリア外膜の膜透過性亢進

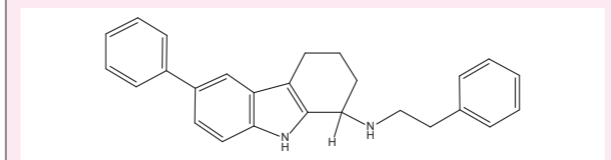


図1 TMD7538 化合物
東京医科歯科大学ケミカルバイオロジーセンター保有の化合物ライブラリーから、ミトコンドリア膜に作用する化合物を同定した。

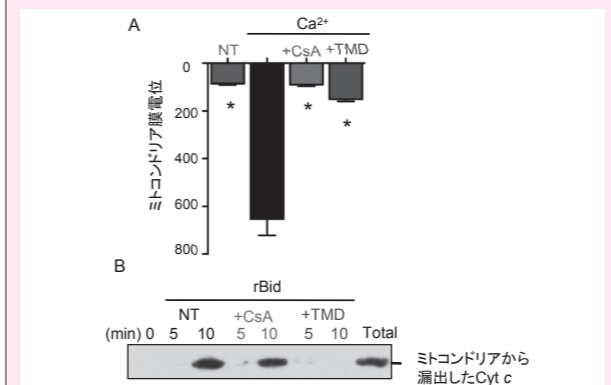


図2 TMD7538 は、ネクローシス時の膜電位低下とアポトーシス時のシトクロム c 漏出を抑制する
A. ネクローシス時の膜電位低下を TMD7538 は抑制する。
B. アポトーシス時のシトクロム c 漏出を TMD7538 は抑制する。

人事異動

承認：荒川聡子 (助教から講師)、山口啓史 (特任助教からプロジェクト助教)
転入：藤掛伸宏 (特任助教)、吉田剛 (学振特別研究員)、野口沙央理 (大学院医歯学総合研究科博士課程入学)、望月啓 (大学院医歯学総合研究科修士課程入学)、奥野暲 (東京理科大学からの卒業研究生)、深堀仁美 (秘書)
転出：杉本康行 (退職)、山下恵実 (大学院医歯学総合研究科修士課程卒業)、中島あゆみ (大学院医歯学総合研究科修士課程卒業)、山本寛典 (大学院医歯学総合研究科修士課程卒業)、小田奈津季 (大学院医歯学総合研究科修士課程卒業)、坂口三美 (退職)

研究業績

原著論文

1. A mild and facile synthesis of aryl and

alkenyl sulfides via copper-catalyzed deborylthiolation of organoborons with thiosulfonates. S. Yoshida, Y. Sugimura, Y. Hazama, Y. Nishiyama, T. Yano, S. Shimizu, T. Hosoya. Chemical Commun. 51:16613-16616, 2015
2. Identification of a novel compound that inhibits both mitochondria-mediated necrosis and apoptosis. S. Arakawa, I. Nakanomyo, Y. Kudo-Sakamoto, H. Akazawa, I. Komuro, S. Shimizu. Biochem. Biophys. Res. Commun. 467, 1006-1011, 2015
3. Direct Thioamination of Arynes via Reaction with Sulfilimines and Migratory N-Arylation. S. Yoshida, T. Yano, Y. Misawa, Y. Sugimura, K. Igawa, S. Shimizu, K. Tomooka, T. Hosoya, J. Am. Chem. Soc. 137:14071-14074, 2015

総説

1. 赤血球におけるミトコンドリア除去の機序
清水重臣「血液内科」70: 368-372, 2015
2. 老化と細胞死

によって誘導され、ネクローシスはミトコンドリア内膜の膜透過性亢進によって誘導されるため、両方の細胞死シグナルは独立しているものと考えられてきた。しかしながら、最近私たちは、このアポトーシスとネクローシスを同時に抑制できる化合物を発見することに成功した (図1)。この化合物は、カルシウムイオンによって誘導されるミトコンドリアの膜電位 (内膜の膜透過性亢進を意味する) と Bid 蛋白質によるシトクロム c 漏出 (外膜の膜透過性亢進を意味する) を同時に抑制することができた (図2)。また、線維芽細胞や初代心筋細胞に活性酸素を投与した時に生じるネクローシスやアポトーシスを抑制することを確認した (図3)。このように、本化合物は臓器虚血傷害の緩和に有用であると思われる。また、この化合物は、本来独立して機能していると思われてきたネクローシスシグナルとアポトーシスシグナルを共に抑制したことより、両方の細胞死シグナルに共通な分子が存在することが示唆された。この知見は、細胞死研究においては、極めて重要な知見である。

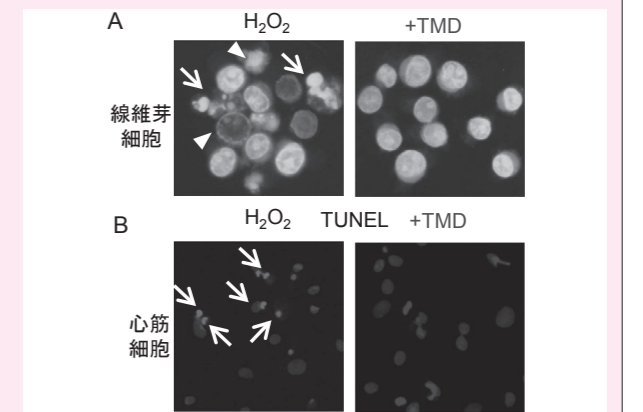


図3 TMD7538 は、酸化ストレスによる細胞死を抑制する。
A.TMD7538 は、過酸化水素によるネクローシス (矢頭) とアポトーシス (矢印) を共に抑制する。
B.TMD7538 は、過酸化水素による心筋細胞の細胞死 (矢印) を抑制する。

清水重臣「第3版 アンチエイジング医学の基礎と臨床」76-77, 2015
3. アポトーシス、ネクローシスとオートファジー細胞死
清水重臣「THE LUNG perspectives」23: 56-59, 2015
4. 細胞死・オートファジーと分子標的治療
清水重臣「日本臨床」8: 1302-1307, 2015
5. 赤血球成熟とオルタナティブオートファジー
清水重臣「臨床免疫・アレルギー科」63: 456-460, 2015
6. オートファジーと細胞死
清水重臣「実験医学増刊号「細胞死研究の基礎と臨床 (仮)」印刷中
7. S. Shimizu, "Innovative Medicine : Basic Research and Development" Autophagic Cell Death and Cancer Chemotherapeutics. Springer Press, 219-226, 2015

難治病態研究部門 発生再生生物学分野

教授：仁科博史 准教授：平山 順 助教：宮村憲央
技術補佐員：生江美佐子 事務補佐員：田中和子

研究内容

概略

当研究室では、情報のやり取り（シグナル伝達）の観点から、発生工学・遺伝学・細胞生物学・生化学・分子生物学などの幅広い実験手法を駆使して、「高次の細胞社会である組織や器官がどのような仕組みで形成され、そして機能発現体として維持されるのか？」という課題を解明することを目的としています。哺乳動物のマウスおよび小型魚類のメダカとゼブラフィッシュをモデル生物に用いて、それぞれの長所を活かして、上記の課題に取り組んでいます。難治性疾患に対する再生療法の開発や創薬のためには、精緻な分子細胞生物学の構築が必須です。

研究紹介

1. 肝臓や脳の形成（発生と再生）を担うシグナル伝達経路に関する研究

細胞の生死を制御するリン酸化カスケードである JNK シグナル伝達経路や Hippo シグナル伝達経路は、個体発生に必須の役割を果たしています。我々は、ノックアウトマウスを作出し、JNK 経路が肝臓や脳の形成に必須であること、また、小型魚類のメダカやゼブラフィッシュを用いて、Hippo 経路が初期胚発生に必須であることを明らかにしてきました。現在は、これらシグナル伝達経路の成体における役割について研究しています。

2. 恒常性維持破綻によって生じるがん発症に関する研究

Hippo 経路は、細胞の数を規定し、「器官のサイズ」や「発がん抑制」を制御します。本シグナル経路の破綻は、ヒトの多様ながんの発症や悪性化に関与することが知られています。我々は、Hippo 経路の標的分子である転写共役因子 YAP がリン酸化以外にアセチル化やメチル化の翻訳後修飾を受けること、また、細胞増殖や細胞分化の制御に加えて細胞張力の制御も行うことを見出

してきました。現在は、本シグナル経路が肝臓の細胞社会を如何に監視し、発がん抑制を如何に制御しているかを研究しています。

3. 脊椎動物の初期胚発生と薬剤の発生毒性に関する研究

胚性幹（ES）細胞は、器官や組織を構成するすべての細胞に分化する能力を有しています(図3)。それ故、発生生物学を基盤にしている再生医学の研究にも用いられています。我々は、ES 細胞とケミカルバイオロジーの手法を用いて、脊椎動物の初期胚発生および催奇性薬剤の発生毒性の解明を行ってきました。現在は、脊椎動物の初期胚における物質代謝について研究しています。

4. 個体発生に伴う概日リズム形成に関する研究

概日リズムは、睡眠や代謝等の生命現象に観察される約 24 時間の周期変動であり、生体の恒常性維持機構として機能します。この生体リズムは、生物に内在する分子時計により形成されます。分子時計は、生物の初期胚には存在せず、個体発生に伴い組織・器官を構成する個々の細胞内に形成されていきます。分子時計が、組織・器官内で互いに同調すると、睡眠や代謝等の生命現象に概日リズムが観察されるようになります。我々は、哺乳動物と共通の概日リズム制御機構を有するゼブラフィッシュを用いて、発生期の概日リズムの形成に関する研究を行っています。ゼブラフィッシュ胚は母体外で発生が進行し、その透明度は高いため、生きた状態で発生に伴う分子時計の動態を観察することが可能です。またゼブラフィッシュでは、孵化後すぐに開始される稚魚の遊泳行動を指標とした行動リズムの解析が行えます。さらに、近年報告されたゲノム編集技術を用いて遺伝子改変個体の作出を簡便に行うことができます。我々は、これらゼブラフィッシュの特性を利用し、個体発生に伴う分子時計および概日リズムの形成機構の解明を目指しています。

ハイライト

扁平メダカの解析から判明した脊椎動物の新しい 3D 器官形成機構 (Nature. 2015; 521(7551):217-221)

脊椎動物の体は複雑な 3 次元的形態をしており、組織や器官が正しく形作られ整然と配置されることにより初めて正常な機能を発揮できる。こうした 3 次元的な形態形成には組織張力の制御が不可欠であるが、その詳細な分子メカニズムは不明な点が多い。今回、我々は *hirame* (*hir*) と命名したメダカ変異体の解析を行った。*hir* 変異体はその名の通りユニークな扁平の形態を示すが、これは器官サイズ制御シグナル Hippo 伝達系の核内標的分子 YAP の変異が原因であった。詳細な解析の結果、*hir* 変異体はアクチオシンを介した組織張力が低下したことにより、重力に耐えきれずに組織の扁平をきたすことが判明した。また、YAP はアクチオシンの活性制御を通じてフィブロネクチンの重合化を引き起こし、眼のレンズと網膜の

正常な組織配置に関与していた。さらにヒト培養細胞を用いた解析から、YAP のエフェクター分子の一つとして ARHGAP18 を同定した。YAP は ARHGAP18 を介して組織張力とフィブロネクチンの重合化を制御すると考えられる。本研究を通じて、YAP が重力に抗って 3 次元的な器官構築を実現する分子機構を初めて明らかにした。(図 1)。

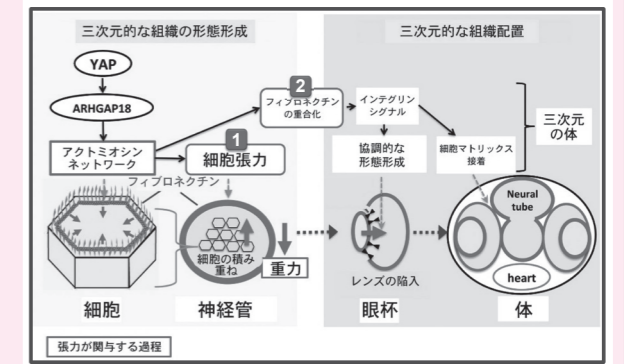


図 1 転写共役因子 YAP による三次元器官の構築機構

人事異動

転入：則信安里、清宮遼太郎（修士課程入学）、宮村憲央（助教採用、6/1）、田中和子（事務補佐員、6/1）
転出：下村忠範（博士修了）、尾高慶子（事務補佐員）、浅岡洋一（特任助教、山口大学医学部講師に昇任）

業績目録

- Ruoxing Yu, Norio Miyamura, Yoshimi Okamoto-Uchida, Norie Arima, Mari Ishigami-Yuasa, Hiroyuki Kagechika and Hiroshi Nishina (2015) A Modified Murine Embryonic Stem Cell Test for Evaluating the Teratogenic Effects of Drugs on Early Embryogenesis. *PLoS ONE* 10 e0145286
- Sean Porazinski¹, Huijia Wang¹, Yoichi Asaoka¹, Martin Behrndt¹, Tatsuo Miyamoto¹, Hitoshi Morita, Shoji Hata, Takashi Sasaki, S.F. Gabby Krens, Yumi Osada, Satoshi Asaka, Akihiro Momoi, Sarah Linton, Joel B. Miesfeld, Brian A. Link, Takeshi Senga, Atahualpa Castillo-Morales, Araxi O. Urrutia, Nobuyoshi Shimizu, Hideaki Nagase, Shinya Matsuura, Stefan Bagby, Hisato Kondoh, Hiroshi Nishina*, Carl-Philipp Heisenberg* and Makoto Furutani-Seiki* (2015) YAP is essential for tissue tension to ensure vertebrate 3D body shape. *Nature* 521, 217-221 (¹Contributed equally; *Corresponding authors)
- Koichi Fujisawa, Shuji Terai, Toshihiko Matsumoto, Taro Takami, Naoki Yamamoto, Hiroshi Nishina, Makoto Furutani-Seiki and Isao

- Sakaida (2015) Evidence for a Role of the Transcriptional Regulator Maid in Tumorigenesis and Aging. *PLoS ONE* 10 e0129950
- Shoudai Kawano, Junichi Maruyama, Shunta Nagashima, Kazutoshi Inami, Wenzhe Qiu, Hiroaki Iwasa, Kentaro Nakagawa, Mari Ishigami-Yuasa, Hiroyuki Kagechika, Hiroshi Nishina, Yutaka Hata (2015) A cell-based screening for TAZ activators identifies ethacridine, a widely used antiseptic and abortifacient, as a compound that promotes dephosphorylation of TAZ and inhibits adipogenesis in C3H10T1/2 cells. *J. Biochem.* 158, 413-423.
- Yuta Motimaru, Morio Azuma, Natsuki Oshima, Yuta Ichijo, Kazuhiro Satou, Kouhei Matsuda, Yoichi Asaoka, Hiroshi Nishina, Takashi Nakakura, Chihiro Mogi, Koichi Sato, Fumikazu Okajima and Hideaki Tomura (2015) Extracellular acidification activates ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1 and GPR4 homologs of zebrafish. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 457, 493-499.

- 仁科 博史 / 企画：発生・器官形成、がん悪性化に関わる Hippo シグナル-創薬標的として高まる YAP/TAZ への期待 実験医学 2015 年 11 月号 Vol.33 No.17 ; 仁科 博史：概論—多細胞社会を制御する Hippo シグナルと標的分子 YAP/TAZ : 2908-2912; 古谷—清木 誠, 浅岡 洋一, 仁科 博史：細胞張力と 3D 臓器形成 : 2913-2919
- 仁科 博史：Hippo-YAP/TAZ シグナル伝達経路：再生医療 Vol. 14, No. 4, 60-62 (2015)
- 千葉 恭敬、仁科 博史：肝臓形成および肝が

- んにおける Hippo-YAP シグナル経路の役割：別冊 医学のあゆみ 61-65 (2015)
- 細胞工学別冊「最新バイオ論文解説総集編 1 今、この論文が熱い」(2015)：仁科 博史：Hippo-YAP/TAZ シグナル研究の展開と新機能の解明：18-21；浅岡 洋一、古谷-清木 誠、Carl-Philipp Heisenberg、仁科 博史：扁平メダカの解析から判明した脊椎動物の新しい 3D 器官形成機構：44-45
- 仁科 博史：扁平メダカを単離して 3D 器官形成の仕組みを探る！：BioResource Now! Vol.11, No.8, 2015
- 浅岡 洋一、古谷-清木 誠、Carl-Philipp Heisenberg、仁科 博史：扁平メダカの解析から判明した脊椎動物の新しい 3D 器官形成機構：細胞工学 8 月号 GRAPHIC HOT PRESS 34: 796-797 (2015)
- 仁科 博史：細胞が重力でつぶれない仕組みを発見：nature ダイジェスト Japanese Author (インタビュー) 12, 18-20 (2015)
- 古谷-清木 誠、Carl-Philipp Heisenberg、仁科 博史：脊椎動物の体の 3D 構造の形成に必須な重力耐性遺伝子の同定：実験医学 7 月号 CURRENT TOPICS 33, 1769-1772 (2015)
- 石原 えりか、仁科 博史：器官の形成と恒常性維持を制御する Hippo シグナル伝達経路：実験医学増刊 知る・見る・活かす！シグナリング研究 2015 33 : 50-55 (2015)
- 浅岡 洋一、古谷-清木 誠、Carl-Philipp Heisenberg、仁科 博史：YAP は脊椎動物の三次元形態を生み出す組織張力の制御に必要不可欠である：ライフサイエンス統合データベース FIRST AUTHOR'S
- 宮村 憲央、仁科 博史：肝発生：肝胆腔 70 : 335-341 (2015)

難治病態研究部門 幹細胞医学分野

教授：西村栄美 准教授：難波大輔 助教：松村寛行
特任助教：毛利泰彰 日本学術振興会特別研究員（SPD）：森永浩伸
プロジェクト助教：福田 誠

研究内容

概要

生体を構築する多くの組織や臓器の恒常性維持においては、幹細胞システムが大きな役割を果たしている。本研究分野では、幹細胞システムの動作原理の研究を通じて、生体組織の再生、老化、がん化の仕組みを理解し、臨床に応用すべく研究を行っている。とくに組織幹細胞の同定、幹細胞周囲の微小環境（ニッチ）が幹細胞運命を制御する仕組みとその分子基盤の解明を通じて疾患発症や病態との関連の研究幹細胞医学という新しい領域を創成し、創薬、先制医療、再生医療へと応用することを目指している。

研究紹介

1. 組織幹細胞の同定

皮膚は、体重の約16%を占める最大の臓器であり、外界から個体を隔て生命を護っている。表皮、真皮、皮下脂肪織から成り、毛包や汗腺などの付属器を持つ。表皮では、恒常的に角化細胞が新陳代謝を行なうのに対して、毛包は周期的に再生を行なう器官であり、多くの細胞が毛周期ごとに新しく入れ替わる。皮膚は、その外観から変化が容易に検出できる上、アクセスが容易で幹細胞の運命追跡も可能であり実験系としても多くの利点を持っている。色素細胞系譜の幹細胞（色素幹細胞）については、我々が2002年にマウス成体の毛包内を世界に先駆けて同定し報告した（Nishimura EK. et al., Nature, 2002.）。最近では、毛包のない掌蹠において豊富に存在する汗腺の中に自己複製可能な色素幹細胞を発見し、その同定、性状解析を進めている（Okamoto N et al.PCMR, 2014.）。そのほか、表皮や真皮の組織幹細胞についてもその同定と応用についての研究を進めている（4.を参照）。

2. 白髪や脱毛などの老化形質の発現メカニズムの解明

加齢に伴い、多くの組織臓器で機能低下および器質的変化が見られるようになる。白髪や脱毛は、最も典型的な老化現象の一つでもある。我々はこれまでに加齢マウスの髭毛包内において、色素幹細胞がニッチ内において異所性に分化すること、これによって幹細胞が枯渇し色

素細胞を供給できなくなるため、白毛化が起こることを見出ししている（Nishimura EK et al. Science 2005）。さらに、ヒトの加齢に伴う生理的な白髪においても、同様のプロセスを経て白毛化が起こる。最近、加齢によって毛包幹細胞が自己複製せずに表皮へと運命をかえて分化すること、これによって幹細胞プールが維持できなくなり毛包がミニチュア化して薄毛と脱毛が進行することを明らかにしており（Matsumura H et al. Science 2016）（ハイライト参照）、組織幹細胞システムにおいて普遍的なメカニズムが存在していると考えられる。

3. ゲノム損傷下における組織幹細胞の運命制御と組織の老化・癌化のメカニズム

早老症候群など、ゲノムの不安定性によって早発性の白毛症（若白髪）や脱毛が高頻度に見られる。我々は、色素幹細胞は、白髪を誘発する程度のDNA損傷ストレスを受けると、ニッチの中で異所性に分化すること、その結果として幹細胞プールが枯渇し白髪となることを明らかにしてきた。さらに、色素幹細胞プールの量に加えて質を保つ上でゲノム損傷応答が重要な役割を果たしていること、さらに“自己複製のチェックポイント”が存在することを明らかにしている（Inomata K. et al. Cell 2009）。そこで、その分子基盤と発癌との関連についての研究を現在行なっている。また、毛包幹細胞においても同様のチェックポイントが存在することを見出ししており（Matsumura H et al. Science 2016）、その実体を解明すべく研究をすすめている。

4. ヒト皮膚幹細胞を用いた皮膚再生技術の開発

ヒト表皮角化幹細胞を皮膚より単離・培養して作製される培養表皮シートは、重度熱傷の治療などの臨床現場で用いられており、ヒト幹細胞を用いた再生医療の実例として、世界的に認知されている。しかしながら、培養表皮シートの作製には多大なコストを必要とし、また、シート作製時の品質管理も不十分である。また、機能的にも審美的にも未解決の課題も多く、普及するレベルには至っていない。そこで我々は、まず培養表皮シートの作製効率と品質を共に向上させることを目的に研究を進めた結果、位相差顕微鏡を用いたタイムラプス観察とそ

の画像解析から、培養ヒト表皮角化幹細胞を非侵襲的かつ簡便に認識する方法を開発することに成功した（Nanba et al., J. Cell Biol., 2015; Tate et al., J. Dermatol. Sci. 2015）。本研究成果は、非侵襲的にヒト表皮角化幹細胞を認識する手法の基礎となるものであり、移植医療や再生医療用の細胞生産での応用が期待される。続いて、真皮組織の線維化抑制や再生を目指すため、ヒト真皮線

維芽細胞のクローンレベルでの性状解析を起こった結果、これら線維芽細胞は、増殖能力の高いクローンと非増殖性ながら組織再編成能力の高いクローンの2種類に分類されることが明らかになった。また、これら2種の線維芽細胞クローンの比率が加齢に伴って変化することも見出した（Hiraoka et al., J. Dermatol. Sci. 2015）。

ハイライト 1

毛包が老化する仕組み

加齢に伴って我々の体を構築する組織や臓器の多くが特有の加齢変化を示しながら小型化し、その機能が低下する。組織や臓器が老化する仕組みについて諸説あるものの、実際に加齢で起こってくる臓器変化の実体とその本質、特に組織や臓器のどの細胞集団がどのような細胞運命を辿るのかについては殆ど知られていない。我々は毛の再生に重要な細胞を供給している毛包幹細胞の運命追跡を行なうことにより、組織幹細胞を中心として進行する老化プログラムの存在を明らかにした。加齢に伴って毛包は再生を繰り返すが、その折に幹細胞分裂を余儀なくされる。若い個体では幹細胞が自己複製したり毛包になる細胞を供給したりするのに対して、加齢に伴って毛包幹細胞にDNA損傷が蓄積し、表皮の角化細胞へと分化しては皮膚表面から剥がれ落ちて失われていくこと、これによって毛包幹細胞とそのニッチが次第に縮小し、毛包自体がミニチュア化するため薄毛となることが明らかになった。加齢に伴うDNA損傷応答によって毛包幹細胞の維持

に必須のXVII型コラーゲン（COL17A1）が失われ、毛包幹細胞が幹細胞性を失って表皮へと運命づけられることをマウスで見出し、ヒトにおいてもその傍証を得た。さらに、マウスの毛包幹細胞においてXVII型コラーゲンの枯渇を抑えると、一連の加齢変化を抑制できた。以上のことから、組織に幹細胞を中心とした老化プログラムが存在すること、またその制御によって加齢関連性疾患の予防や治療へと役立つことが示唆された（Matsumura H et al. Science 2016）。

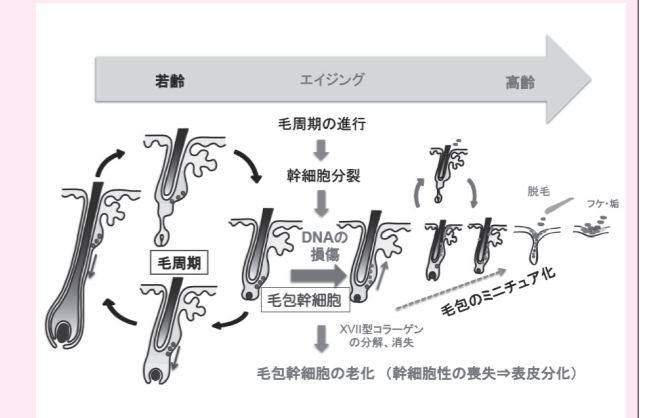


図1 毛包の再生プログラムと老化プログラム

業績目録

原著論文

1. Hiroyuki Matsumura, Yasuaki Mohri, Nguyen Thanh Binh, Hironobu Morinaga, Makoto Fukuda, Mayumi Ito, Sotaro Kurata, Jan Hoeijmakers, Emi K. Nishimura. Hair follicle aging is driven by transepidermal elimination of stem cells via COL17A1 proteolysis. Science 351 (6273):575-589, 2016
2. Nanba D, Toki F, Tate S, Imai M, Matsushita N, Shiraishi K, Sayama K, Toki H, Higashiyama S and Barrandon Y. Cell motion predicts human epidermal stemness. J. Cell Biol. 209(2):305-315, 2015.
3. Tate S, Imai M, Matsushita N, Nishimura EK, Higashiyama S and Nanba, D. Rotation is the primary motion of paired human epidermal keratinocytes. J. Dermatol. Sci. 79(3):194-202, 2015.
4. Fukuda S, Nishida-Fukuda H, Nanba D, Nakashiro KI, Nakayama H, Kubota H and Higashiyama S. Reversible interconversion and maintenance of mammary epithelial cell characteristics by the ligand-regulated EGFR system. Scientific Reports 6:20209, 2015.
5. Hiraoka C, Toki F, Shiraishi K, Sayama K, Nishimura EK, Miura H, Higashiyama S and Nanba D. Two clonal types of human skin fibroblasts with different potentials for proliferation

and tissue remodeling ability. J. Dermatol. Sci. in press.

国内学会招待講演

- 西村栄美：色素幹細胞と色素再生：第79回日本皮膚科学会 東京・東部支部合同学術大会：（東京）2016年2月20-21日
- 西村栄美：皮膚の幹細胞 最新の話題：北海道皮膚科学フォーラム：（北海道）2016年2月6日
- 西村栄美：メラノーマの発生と色素幹細胞の運命制御：第74回日本癌学会学術総会：（名古屋）2015年10月8-10日
- 西村栄美：組織幹細胞の活性化とエイジング：第36回日本炎症・再生医学会：（虎ノ門ヒルズフォーラム）2015年7月21-22日
- 西村栄美：メラノーマの発生と色素幹細胞の運命制御（The role of melanocyte stem cells and their fate regulation in melanoma development）：第74回日本癌学会：（名古屋国際会議場・愛知）2015年8-10日

国際学会招待講演

- Emi K. Nishimura:Stem cells in skin appendages and their fate change by aging:23rd World Congress of Dermatology:(Vancouver, Canada) June 8-13, 2015
- Emi K. Nishimura:Hair follicle aging program in hair follicle stem cells orchestrates dynamic tissue aging and associated hair loss:Gordon

Research Conferences-Epithelial Differentiation & keratinization:(Boston, USA)July 12-17, 2015

学内外教育活動

- 西村栄美：本学医学部医学科 先端医学 講義「幹細胞と分化」
- 西村栄美：本学大学院医歯学総合研究科修士課程 講義「毛包の組織幹細胞」

外部資金獲得状況

1. 文部科学省研究費補助金・基盤研究(S) 西村栄美（代表）(H26-30年度)「幹細胞制御に着目した毛包の再生・老化ダイナミクスの解明から応用まで」
2. 文部科学省研究費補助金・新学術領域研究 西村栄美（代表）(H26-H30年度)「色素幹細胞における老化ストレスと幹細胞の運命制御」
3. 創薬支援推進事業・創薬総合支援事業（新規） 西村栄美（代表）(H27年度)「組織再生に向けた表皮幹細胞制御分子発現調節剤の探索—HTSアッセイ系の確立」
4. 科学研究費補助金・基盤研究C（継続）難波大輔（代表）(H26-28年度)「ヒト表皮多層化に伴う細胞動態とアクチン繊維動態の全系譜解析」
5. 科学研究費補助金・若手研究B（新規）松村寛行（代表）(H26-28年度)「毛包幹細胞の分裂制御におけるヘミデスモソーム構成因子の役割とその仕組みの解明」

難治病態研究部門 免疫疾患分野

教授：鏑田武志 准教授：安達貴弘 助教：鈴木光浩、松原直子
特任助教：徐米多、赤津ちづる 特任講師：王継揚
外国人研究員：劉志紅 特任研究員：唐森
技術補佐員：久留主幸江、中野成子 事務補佐員：高橋博子、内藤宏美

研究内容

正常な免疫系では、病原微生物やがん細胞を排除するが微生物以外の異物や正常な自己成分には反応しない。微生物以外の異物や自己成分への反応は、それぞれ、アレルギーおよび自己免疫疾患の原因となる。非タンパク抗原への免疫応答も、結核菌や髄膜炎菌などの病原微生物への免疫応答や、種々の自己免疫疾患の発症に重要である。非タンパク抗原への免疫応答のメカニズムはタンパク抗原への応答と根本的に異なるが、非タンパク抗原への応答や、非タンパク抗原での病原微生物とそれ以外の異物や自己抗原との識別のメカニズムについては未解明の領域が多い。したがって、非タンパク抗原への免疫応答の解明は、免疫学の残されたフロンティアのなかでもとりわけ重要なものの1つである。本研究室では、以下の研究をおこなっている。

- 1) 糖鎖、糖脂質および核酸関連抗原への抗体産生のメカニズムの解明
- 2) 糖鎖シグナルによる抗体産生制御メカニズムの解明と免疫応答制御のための糖鎖修飾化合物の開発
- 3) 全身性エリテマトーデス (SLE) や免疫性神経疾患における非タンパク性自己抗原への自己抗体産生メカニズムの解明。
- 4) Bリンパ球の活性化における活性酸素など細胞ストレスの役割
- 5) 新規医薬品の開発

研究紹介

1. 合成シアル酸誘導体を用いた糖鎖シスリガンドによるBリンパ球活性化の調節の解明とBリンパ球の活性化制御

免疫細胞の表面には、SiglecファミリーやC型レクチンファミリーの分子など種々のレクチン分子が発現し、その一部はシグナル機能を有する。これらのレクチン分子の中には、同じ細胞が発現する糖鎖リガンド(シスリガンド)と構成的に会合しているものがあり、レクチン分子にシグナル機能があると、細胞表面上の糖鎖がレクチンを介して細胞のシグナル伝達を制御しうるが、シスリガンドによるシグナル制御の詳細については不明な点が多い。

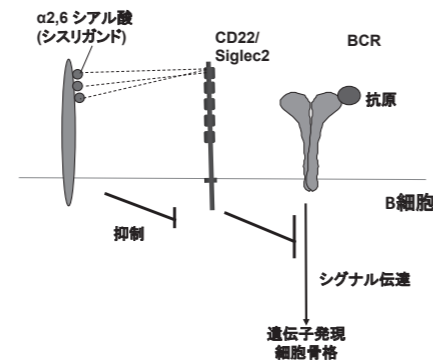


図1 糖鎖シスリガンドα2,6シアル酸によるCD22/Siglec2の制御

CD22/Siglec2はもっぱらB細胞に発現するSiglecファミリーの抑制性レセプターである。CD22はα2,6シアル酸を特異的に認識し、同じB細胞が発現するα2,6シアル酸(シスリガンド)と構成的に結合している。これまで、α2,6シアル酸やシアル酸修飾酵素を欠損するマウス、さらにリガンド結合能を欠損するCD22を発現するB細胞株やマウスなど種々の系でシスリガンドの役割が解析されたが、系によって異なる結果が得られていた。我々の研究室では、岐阜大学の石田教授らと共同でCD22に高親和性で結合するシアル酸誘導体の開発を行い、ナチュラルリガンドに比べて約1万倍高い親和性でCD22に結合するシアル酸誘導体の合成に成功した。このシアル酸誘導体でCD22とシスリガンドの反応を阻害し、B細胞の反応を調べることで、シスリガンドがCD22の機能を抑制していることを明らかにした(図1)。現在、シスリガンドがどのようなメカニズムでCD22の機能を抑制しているのかの解析を行っている。また、CD22結合シアル酸誘導体がBリンパ球の活性化を制御することが明らかとなったことから、この化合物をもとに免疫制御医薬品の開発を行っている。

2. 全身性エリテマトーデス (SLE) における自己抗体産生制御とその破綻機構の解明

SLEは全身性自己免疫疾患の代表的な疾患で、DNAなどの核成分への自己抗体産生が特徴である。これら自己抗体の中でも、Sm抗原などのRNA関連自己抗原への自己抗体の重要性が明らかになってきているが、抗Sm抗体産生B細胞が正常個体ではどのような自己トランス機構によって制御され、SLEでは、どのように

して自己トランス機構を回避して、抗Sm抗体産生がおこるのかは不明である。そこで、我々の研究室では、抗Sm抗体産生B細胞の制御機構やその異常について研究をおこなっている(ハイライト)。

3. Bリンパ球の活性化における活性酸素種(Reactive oxygen species; ROS)の役割についての研究

ハイライト

自己反応性B細胞の可視化による自己抗体産生メカニズムの解明

マウスなどの動物を抗原で刺激し、抗原特異的なリンパ球を可視化し、その動態を解析することで免疫応答がどのようにしておこるのかが明らかになってきました。抗DNA抗体産生B細胞などの自己反応性B細胞の解析でも、同様の手法が用いられ、自己反応性B細胞が骨髄内で発生した未熟なB細胞段階で除去されたり、自己反応性を失うことなどが示された。しかしながら、SLEなどの自己免疫疾患で、どのようにして自己反応性B細胞が自己免疫応答をおこし、自己抗体産生に至るのかは不明であった。これは、疾患での自己抗体産生に関わる自己反応性B細胞を可視化し、実際に自己免疫応答をおこしている個体の中でどの動態を解析する必要があり、これまでにこのような試みは成功していない。

SLEは全身性自己免疫疾患の代表的な疾患で、DNAなどの核成分への自己抗体産生が特徴であるが、これら自己抗体の中でも、Sm抗原などのRNA関連自己抗原への自己抗体や抗DNA抗体が疾患発症に重要であることが示されている。

我々の研究室では、抗DNA抗体のH鎖のみを発現するトランスジェニックマウス56R(シカゴ大学Weigert博士より供与)を用いて、このマウスの中で抗Sm抗体産生B細胞を同定する手法を開発し、このような病態に関わるBリンパ球の動態を解析してきた。

ヒトSLE患者およびマウスSLEモデルでBリンパ球の共刺激分子CD40L(CD154)の過剰発現がみられ、

ROSは細胞の活性化や細胞死などで種々の役割を果たす。我々の研究室では、B細胞抗原受容体(BCR)の架橋により長時間持続するROS産生がおこり、このROS産生がB細胞の活性化で重要であることを明らかにした。NADPH oxidaseの1つであるNOX2はBCR架橋によるROS産生に関わるが、ほかの分子/メカニズムも関与しており、現在、その解明を行っている。

また、Bリンパ球に発現する抑制性レセプターCD72の多型がSLE発症に関連することが知られている。また、CD72欠損マウスではSLE様の自己免疫疾患を発症する。我々の研究室では、56Rマウスでの抗Sm抗体産生B細胞制御へのこれらの分子の役割を解析をおこなってきたが、抗Sm抗体産生細胞は、末梢リンパ組織に出現してから除去され、しかもCD40Lは成熟B細胞のうち辺縁帯B細胞での除去を解除されることが明らかとなった。一方CD72欠損では、成熟B細胞のもう1つの亜集団である濾胞B細胞のみで抗Sm抗体産生B細胞の除去が解除されることが明らかとなってきた(図2)。これらの知見は、これまでに解析されてきた抗DNA抗体産生B細胞やそのほかの人工的な自己反応性B細胞の解析結果とは異なることから、自己免疫疾患発症の際には、これまでに明らかになってきた骨髄の未熟B細胞段階での自己反応性B細胞の制御に障害がおこるのではなく、これまでにわかっていなかった末梢リンパ組織での自己反応性Bリンパ球の制御の異常により疾患惹起性の自己反応性B細胞の応答がおこることが明らかとなってきた。

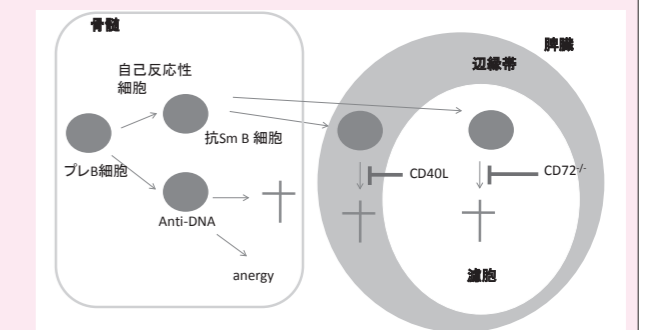


図2 抗Sm抗体産生B細胞の自己トランス

人事異動

転入：Amin Albrzian-Deh-Sheikh(大学院修士課程)、Sundararaman Rengarajan(大学院修士課程)、内藤宏美(事務補佐員)
転出：鈴木光浩(助教)、劉志紅(外国人研究員)、徐米多(特任助教)、高橋博子(事務補佐員)、唐森(特任研究員)、Xuyang Jiao(大学院博士課程)、吉岡真代(大学院修士課程)

業績目録

原著論文

1. Ouchida, R., Lu, Q., Liu, J., Li, Y., Chu, Y., Tsubata, T. and Wang, J.-Y. (2015): FcμR interacts and cooperates with the B cell receptor to promote B cell survival. *J. Immunol.* 194: 3096-3101
2. Muro, R., Nitta, T., Okada, T., Ideta, H., Tsubata, T. and Suzuki, H. (2015): The Ras GTPase-activating protein RalGAP3 supports survival of naive T cells. *PLoS ONE*. 10: e0119898.

3. Li, Y., Takahashi, Y., Fujii, S., Suzuki, A., Tsubata, T., Hase, K. and Wang, J.-Y.: EAF2 mediates germinal center B cell apoptosis to suppress excessive immune responses and prevent autoimmunity. *Nature Communications*. 7:10836 (2016)

総説・著書

1. Tsubata, T. (2016): CD22 and CD72 are inhibitory receptors dominantly expressed in B lymphocytes and regulate systemic autoimmune diseases. *Z. Rheumatol.* 75: 86-89.
2. 入村達郎、鏑田武志 糖鎖免疫 細胞工学 35:209-213 (2016)

難治病態研究部門 分子病態分野

教授：木村彰方 准教授：林 文晴
助教：櫻井大祐、安 健博 プロジェクト助教：成瀬妙子

研究内容

概略

ヒト疾患の病因および病態形成には多かれ少なかれ遺伝学的な要因すなわちヒトゲノムの変異ないし多型に象徴されるゲノム機能の多様性が関与する。疾患の発症がほぼ遺伝的要因のみで規定されるものが単因子病であり、環境要因と遺伝的要因の両者が関与すること疾患を多因子病と呼ぶ。分子病態分野では、単因子病、多因子病を問わず、病因が不明ないし病因は判明しても病態形成機構が解明されていないために有効な診断、治療、予防法が確立されていない難病に焦点をあて、それぞれの病因や病態形成に関わるゲノム多様性の同定とその機能的意義の解明を目指している。現在の主な対象疾患は、特発性心筋症、心筋梗塞、不整脈、バージャー病、などの心血管系疾患と、HIV/AIDS、自己免疫疾患などを含むウイルス・免疫系疾患である。

研究紹介

1. 特発性心筋症の病因究明

我々を含む国内外の研究者らにより心筋症の原因遺伝子とその変異による機能異常が解明されているが、さらなる未知の心筋症原因遺伝子を同定するために、候補遺伝子アプローチや連鎖解析を行っている。また、強度のスポーツを続けると心臓肥大・心電図異常を呈することがある(スポーツ心肥大)ことが知られているが、肥大型心筋症との鑑別診断が難しいことがある。そこで、心電図異常を示すスポーツ者を対象として肥大型心筋症原因遺伝子の変異を検索したところ、約5%に肥大型心筋症の原因とされている変異が見出されたが、詳細な検討の結果その大半が稀な多型であると考えられ、真の病因変異を有する例は約1%であった(Kadota, et. al. J Hum Genet 60: 641, 2015)。これとは別に、脊髄小脳変性症と肥大型心筋症を合併した家系の解析を行い、心筋症の病因として心筋トロポニンT変異を同定した(Kawai, et. al. Int Heart J. In Press)。さらに、心筋症の病因変異と機能異常に関する最新知見をとりまとめた(Kimura, J Hum Genet. In Press)。

2. 冠状動脈硬化症関連遺伝子群の検索

患者集団と一般集団における網羅的ゲノム解析から

MKL1 遺伝子多型が感受性と関連することを明らかにしたため、MKL1 高発現マウスを作製し、引き続き動脈硬化病態を検討している。

3. 難治性不整脈の病因究明

難治性不整脈の病因と病態解明に関連する共同研究として、QT 延長症候群、Brugada 症候群、洞不全症候群などについて、候補遺伝子アプローチによる新規不整脈原因遺伝子の探索を実施している。本年度の成果として特筆すべきは、国際共同研究によって、MYH6 変異が心筋サルコメア整合性異常と細胞間刺激伝道速度を低下し、洞不全症候群の原因となることを見出したことにある(Ishikawa, et al. Circ Arrhythm Electrophysiol. 8: 400, 2015)。また、IRX3 変異が新規の不整脈原因遺伝子であることを解明した(Koizumi, et. al. Eur Heart J, In Press)。

4. ヒトおよび動物 MHC 領域の解析

HLA 領域には自己免疫疾患発症を規定する遺伝子群が存在する。昨年までに引き続き、HLA 領域内の自己免疫関連遺伝子である NFKB1I による選択的スプライシング制御を検討している。一方、エイズ(HIV)ワクチン開発で用いられるアカゲザルについて、そのワクチン免疫応答の個体差を制御するゲノム多様性を検討している。本年は、アカゲザルワクチン個体の解析から特定の MHC アリルによる CTL 誘導効率が、SIV 抵抗性となる指標となること示した(Nomura et. al. PLoS Pathogen. 11: e1005247, 2015)。また、ペンギン属における MHC クラス I 遺伝子の多様性形成を明らかにした(Kikkawa et. al. MHC. 22: 156, 2015)。

5. エイズ感受性・抵抗性関連遺伝子の探索

HIV に暴露しても感染するかどうかには個人差があることが知られている。また、HIV 感染後の経過や AIDS 発症までの期間にも大きな個人差が存在する。このような HIV/AIDS への感受性・抵抗性に関わるヒトゲノム多様性について、進化学的観点からも検討しており、霊長類の進化において強い選択圧が存在したと推定される遺伝子群をターゲットにした関連解析を進めている。本年は、

APOBEC3H 多型が HIV-1 感染ならびに AIDS 発症の感受性制御に寄与することを日本人集団およびインド人集団

について明らかにした(Sakurai, et al. Immunogenet. 67: 253, 2015, Naruse et. al. J Hum Genet. In Press)。

ハイライト (顕著な業績)

α ミオシン重鎖遺伝子 (MYH6) 変異は家族性洞性不整脈症候群 (familial sick sinus syndrome) の原因となる (Ishikawa T, et al. Circulation Arrhythm Electrophysiol. 2015; 8(2): 400-408)

洞不全症候群 (sick sinus syndrome, SSS) は、洞房結節の機能異常によって徐脈を来す比較的頻度の高い不整脈であるが、一部に家族歴が認められ、これまでの解析で心筋 Na チャネル遺伝子、アンキリン B 遺伝子、過分極活性化型カチオンチャネル遺伝子の変異が原因となることが報告されている。我々は、それらの遺伝子に変異が認められない日本人 SSS 症例を対象として、ダイレクトシーケンスによって MYH6 変異を検索し、1 例に第 22 エクソン中のコドン 933 番の 3 塩基欠損 (delE933) を検出した。ついで、ミオシン重鎖の 3 D モデルを構築すると、delE933 変異は α ヘリクス構造に変化をもたらすと推定されたため、ミオシン結合タンパク C の C1 ~ C2 ドメインとの結合性を検討すると、変異があるとこれらの結合性が強化することが判明した。そこで、ラット心筋細胞に正常 MYH6、delE933 変異 MYH6、SSS に関連すると報告されている R721W バリエント MYH6 をそれぞれ導入して検討したところ、delE933、R721W はいずれも心筋細胞内で核膜近傍へ集積し、サルコメア構造の崩壊が観察された (図)。また、心房筋由来細胞株 HL-1 に正常および del933E 変異 MYH6 をそれぞれ導入し、64-well 電極上で細胞間電気刺激伝播速度を検

討した結果、delE933 は電氣的興奮の伝播遅延を来した。さらに、モルフォリーノを用いてゼブラフィッシュの MYH6 発現を低下させると、心房の拡大と徐脈が生じること、正常および del933E 変異 MYH6 をそれぞれ導入したところ、正常 MYH6 では徐脈から回復するが、del933E 変異 MYH6 による徐脈回復は十分でなかった。以上より、MYH6 変異 (delE933 変異) は SSS の原因となると考えられ、そのメカニズムとして心房筋の分化異常の関与が推定された。

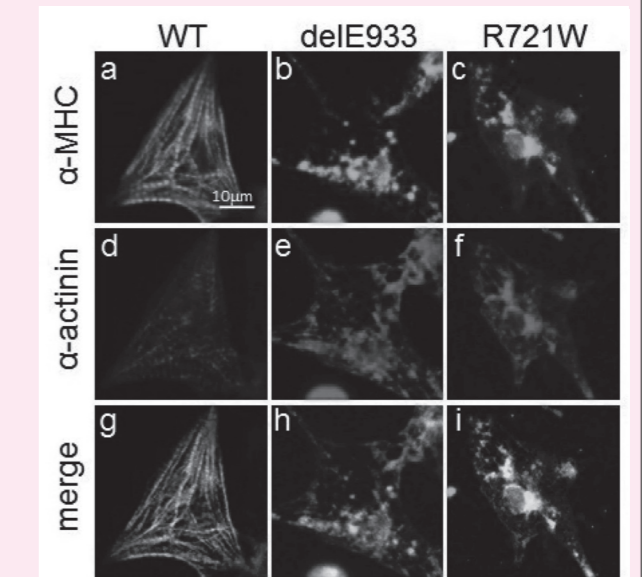


図 MYH6 変異導入によるサルコメア整合性障害 SSS に関連する MYH6 変異 (delE933 および R721W) はいずれもラット心筋初代培養細胞に導入するとサルコメア整合性疾患を来す。

人事異動

転入：9月に櫻井大輔が助教任期満了にて退職。
転出：12月に安健博が助教に就任。

業績目録

1. Ishikawa T, Jou CJ, Nogami A, Kowase S, Arrington CB, Barnett SM, Harrell DT, Arimura T, Tsuji Y, Kimura A, Makita N. A novel mutation in α -myosin heavy chain gene is associated with sick sinus syndrome. Circ Arrhythm Electrophysiol. 2015; 8(2): 400-408.
2. Sakurai D, Iwatani Y, Ohtani H, Naruse TK, Terunuma H, Sugiura W, Kimura A. APOBEC3H polymorphisms associated with susceptibility to HIV-1 infection and AIDS progression in Japanese. Immunogenetics. 2015; 67(4): 253-257.
3. Kadota C, Arimura T, Hayashi T, Naruse

- TK, Kawai S, Kimura A. Screening of sarcomere gene mutations in young athletes with abnormal findings in electrocardiogram: identification of a MYH7 mutation and MYBPC3 mutations. J Hum Genet. 2015; 60(10): 641-645.
4. Nomura T, Yamamoto H, Ishii H, Akari H, Naruse TK, Kimura A, Matano T. Broadening of virus-specific CD8+ T-cell responses is indicative of residual viral replication in aviremic SIV controllers. PLoS Pathog. 2015; 11(11): e1005247.
5. Kikkawa E, Tsuda TT, Hosomichi K, Tsuda M, Inoko H, Kimura A, Naruse TK, Murata K. Molecular evolutionary analysis of seven species of penguins (order: Sphenisciformes) in MHC class I gene. MHC 22(3): 156-163, 2015.
6. Tanaka T, Kimura A. Cardiovascular Genetics. J Hum Genet. In Press (doi:10.1038/jhg.2015.147)
7. Kimura A. Molecular genetics and pathogenesis of cardiomyopathy. J Hum Genet. In Press (doi:10.1038/jhg.2015.83)

8. Koizumi A, Sasano T, Kimura W, Miyamoto Y, Aiba T, Ishikawa T, Nogami A, Fukamizu S, Sakurada H, Takahashi Y, Nakamura H, Ishikura T, Koseki H, Arimura T, Kimura A, Hirao K, Isobe M, Shimizu W, Miura N, Furukawa T. Genetic defects in a His-Purkinje system transcription factor, IRX3, cause lethal cardiac arrhythmias. Eur Heart J. In Press (doi: org/10.1093/eurheartj/ehv449)
9. Naruse TK, Sakurai D, Ohtani H, Sharma G, Sharma SK, Vajpayee M, Narinder KM, Kaur G, Kimura A. APOBEC3H polymorphisms and susceptibility to HIV-1 infection in an Indian population. J Hum Genet. In Press (doi: 10.1038/jhg.2015.136)
10. Kawai H, Morimoto S, Takakuwa Y, Ueda A, Inada K, Sarai M, Arimura T, Mutoh T, Kimura A, Ozaki Y. Hypertrophic cardiomyopathy accompanied by spinocerebellar atrophy with a novel mutation in troponin I gene. Int Heart J, In Press

ゲノム応用医学研究部門

Division of Medical Genomics

【研究の理念と概要】

ゲノム応用医学部門では、その本態が明らかでないために適切な治療法が確立されていない難治性の疾患や生活習慣病等の克服に資する研究の実施を理念とする。この理念のもとに、ゲノム構造、ゲノム機能、タンパク情報等を併せた学横断的な研究を実施し、得られた包括的生命科学情報を基盤に難治疾患の病態を明らかにするとともに、罹患リスクなど、これまで体質と呼ばれてきたものを科学的に解明する。これにより、難治性の疾患の分子診断法の開発と個別化医療への応用、発症前診断、疾患の治療法・予防法の開発を目指し、その成果を以って未来医療に貢献する。

【分子細胞遺伝】

1. 癌のゲノム・エピゲノム解析によりマイクロRNAを含む癌関連遺伝子を同定し病態形成機構を明らかにするとともに、候補治療標的分子を同定した。
2. 先天異常症、発達障害、精神発達遅滞症の645例のゲノム解析を行い155例（24.0%）において疾患原因となるゲノムコピー数異常（CNV）を見出した。

【遺伝生化学】

1. ストレス応答転写レプレッサー ATF3のalternate promoterによる制御と、システムバイオロジーを用いたp53-ATF3経路の遺伝制御の網羅的解析を行った。
2. 転写伸長因子Elongin AのRpb1 E3リガーゼ活性とストレス応答遺伝子誘導機能のDual機能を解析した。

【分子遺伝】

1. 乳がん発生機構の解明を目指して、乳がん原因遺伝子BRCA2の新規結合分子の探索によるDNA損傷修復機構の解明を進めるとともに、BRCA2の中心体、細胞質分裂に於ける新規機能を同定した。
2. BRCA変異腫瘍に対する合成致死性効果を示す新規低分子化合物の探索を進めている。
3. 中心体複製制御機構の解明に向け、画像認識による中心体自動計数システムを構築した。

【分子疫学】

1. DNA修復酵素CHD4の非同義置換pD140Eが発癌リスクと関連していることを明らかにした。
2. 多因子疾患の遺伝子検査結果を医師の説明を介して回付した場合、被験者の健康観・疾病観に与える影響についての研究を進めている。

【エピジェネティクス】

1. LTRレトロトランスポゾン由来の*SIRH*遺伝子群が、哺乳類でもヒトおよびマウスを含む真獣類のグループに多数存在することを報告し、そのうち*Peg10*、*Peg11/Rtl1*、*Sirh7*の3つの遺伝子が胎盤形成に関わる様々な機能、*Sirh11*が脳の認知機能に必須な役割をはたしていることを明らかにした。
2. 哺乳類におけるLTRレトロトランスポゾン由来の遺伝子の分布を調べると、上記の*SIRH*遺伝子群およびもう一つの*PNMA*遺伝子群は、胎生の哺乳類のグループ（真獣類と有袋類）にのみ存在し、真獣類に多く存在していることが明らかになった。これら*SIRH*および*PNMA*遺伝子群は、真獣類と有袋類の分岐やそれぞれの進化に重要な機能を果たしていると考えられる。
3. 体外受精や顕微授精といった生殖補助医療技術が、個体発生に与える影響を、マウスモデルとともにヒト受精卵をもちいて解析している。

【ゲノム病理学】

1. 臨床腫瘍組織を直接免疫マウスに移植したPatient-Derived-Xenograft（PDX）モデルを用いて並列型シーケンサーによる包括的遺伝子発現解析により癌-間質相互作用のプロファイルを行っている。
2. がん免疫治療のバイオマーカーの探索を目的として免疫ゲノミクス解析を行っている。
3. びまん性（スキルス）胃癌のゲノムシーケンシングを行い、RHOA遺伝子のドライバー変異を同定した。

【医科学数理分野】

1. 医学・医療オミックスビッグデータ解析の顕著な成果として、300例の肝がんの全ゲノムを解析し、ゲノム変化をもとに6つの亜病態分類ができ、かつそれぞれ全く異なる予後であることを示しました。
2. QT延長症候群の20%の症例は原因が不明ですが、全エクソーム解析とタンパク質間相互作用ネットワーク解析により、新たな原因を発見し、かつ、その半数がカルモジュリン分子と相互作用することを見出しました。
3. 4つの最新のエクソーム実験キットを比較し、またハロプレックス法と統合することでカバー率を上げ、先天性神経疾患や難聴の新たな原因遺伝子を発見しました。

ゲノム応用医学研究部門 分子細胞遺伝分野

教授：稲澤譲治 講師：井上 純 助教：村松智輝

研究内容

ゲノム情報を基盤に疾患の新しい診断、治療、予防法の開発、ならびに基礎研究で得られた成果を臨床医学に展開する「トランスレーションリサーチ」に多大な期待が寄せられている。私たちは、ゲノム構造変化、エピゲノム遺伝子制御機構、体系的遺伝子発現解析など統合的ゲノム解析研究を推進し、癌や遺伝疾患の原因遺伝子探索と病態の解明、さらにこれら難治疾患における画期的な診断、治療、予防法の開発を目指している。

研究紹介

1. がんオミクスに基づく個別化医療推進基盤の確立

① がん転移分子機構に基づいた転移抑制法の開発

がんの悪性化の要因の一つであるがん転移は、複雑かつ多段階のステップによって成立する事象である。これまでも様々な分子機構が報告されてきたが、未だ不明な点が多い。口腔扁平上皮がん細胞株を用いた *in vivo* selection による高転移性亜株の樹立を行い、ゲノム一次構造や遺伝子発現変化などを網羅的に解析し、タンパク質翻訳に関与するハイブシン経路が転移に関わることを同定した (Muramatsu T et al. Oncogene 2016 in press)。また、上皮間葉転換 (Epithelial Mesenchymal Transition: EMT) の変化を *in vitro* で可視化するための機能的スクリーニング系を構築した。EMT 促進性 miRNA の探索において、Vimentin これを用いて、328 種類の miRNA を搭載した miRNA ライブラリーをスクリーニングして、新規 EMT 促進性 miRNA の *miR-544a* を同定した (Yanaka Y et al. Carcinogenesis 2015)。

② オートファジー活性を指標としたがんの個別化医療の確立

オートファジーは、がん細胞の生存・薬剤耐性に寄与する。しかし、各がんにおいて、オートファジー活性が異なる為、その活性に基づいたがんの治療戦略が重要になる。そのような中、2015 年度、子宮体がんにおいて、オートファジーによるタンパク質分解の基質 p62/SQSTM1 分子が高発現は、悪性形質の獲得および予後不良に関連することを明らかにした (Iwadate R et al. Am J Pathol. 2015)。このことは、p62 分子の発現は、がんの悪性化に寄与しており、かつ各がんのオートファ

ジー活性のマーカーとなる可能性を示唆している。

③ NRF2 活性化癌に対するマイクロ RNA 創薬の開発

抗がん剤を用いた治療抵抗性の克服は、がん治療における大きな課題である。転写因子 NRF2 の活性化は、治療抵抗性の獲得に寄与しており、一部の癌では、NRF2 が恒常的に活性化している。そのような中、*mir-634* は、NRF2 を含む治療抵抗性に寄与する複数の遺伝子群を同時に抑制することにより、効率的にアポトーシスを誘導することを明らかにした。さらに、*mir-634* の投与は、抗がん剤の治療効果を最大限に引き出すための新たな治療戦略となることが示した (ハイライト 1) (Fujiwara N et al. Cancer Res. 2015)。

2. 個別化がん医療実現のための開発研究

「AMED・オーダーメイド医療実現プログラム」において、肺、胃、結腸・直腸 (大腸)、前立腺、乳腺、食道扁平上皮など 6 がん種を対象に、11 名の研究者からなるプロジェクトチームを組織し、理化学研究所ならびに東大医科研・バイオバンクジャパン (BBJ) と資源、知識、情報、技術等において緊密な連携のもと、オールジャパン体制でオーダーメイドがん医療実現のための開発研究を推進している。この取り組みにより、個人のゲノム情報に基づいた最適な医療の実現化を目指している。

3. 食道扁平上皮がんの新規治療標的分子と診断バイオマーカーの同定

「AMED・次世代がん研究シーズ戦略的育成推進プログラム」において、食道扁平上皮がん (ESCC) を対象として、エキソームを含む統合的オミックス解析を実施することにより、新規治療薬・診断マーカーの開発研究を実施している。

4. 遺伝性疾患のゲノム解析

2005 年より国内 23 医療施設の遺伝専門医と「アレイ CGH 診断法実用化コンソーシアム」を組織し、多発奇形をともなう発達遅滞症例を対象にマイクロアレイを用いた微細ゲノム構造異常のスクリーニングを実施してきた。その成果として、原因不明とされていた日本人先天異常症 645 例のうち、155 例 (24.0%) において疾患原因となるゲノムコピー数異常 (CNV) を検出した (ハイライト 2) (Uehara DT et al. J Hum Genet. 2016)。

5. AMED 戦略的国際科学技術協力推進事業「日本・フィンランド研究交流」

平成 26-28 年度「ゲノミクス・バイオインフォマティクスを活用した難治性卵巣がん細胞システムの理解と治療候補薬の探索」(研究代表者:日本側 稲澤 譲治、フィンランド側 ヘルシンキ大学分子医学研究所 オリ・カリオニーニ教授)の研究交流事業を推進している。本研

究は、卵巣がんをモデルとしてバイオインフォマティクス・パイプラインを構築し、難治性卵巣がん治療効果の向上とがん個別化治療の確立を目指す事業である。2015 年度は、2015 年 6 月 26 日 (札幌)、12 月 14 日 (ヘルシンキ) の 2 回、両国事業推進研究者による研究進捗報告会を開催した。

ハイライト 1

癌抑制性マイクロ RNA の同定

mir-634 は、ミトコンドリア機能維持および抗アポ

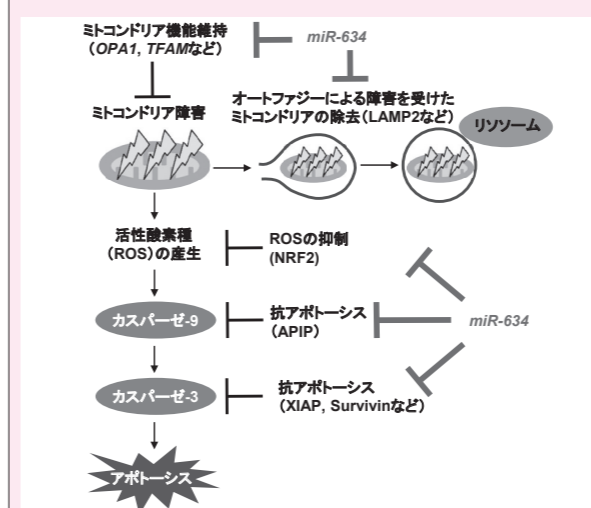


図 1 miR-634 によるミトコンドリア性アポトーシスの誘導に分子機構

トーシスやオートファジーといった細胞生存・治療抵抗性に寄与する遺伝子群を同時に抑制することにより、効率的にアポトーシスを誘導する (図 1)。担がんモデルマウスにおける *mir-634* の投与は、シスプラチンによる抗腫瘍効果を顕著に増強することが分かった (図 2)。これらの発見は、核酸医薬としての *mir-634* の投与は、抗がん剤の治療効果を最大限に引き出すための新たな治療戦略となることが期待される (Fujiwara N et al. Cancer Res. 2015)。

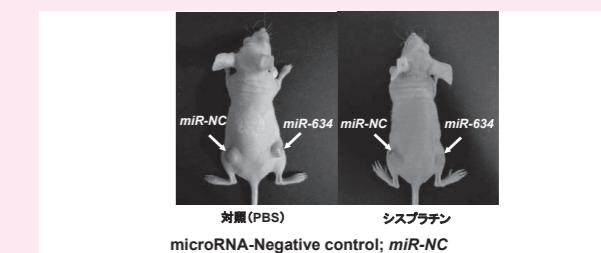


図 2 担がんマウスにおける miR-634 の投与による抗腫瘍効果

ハイライト 2

原因不明の日本人先天異常症における疾患原因となるゲノムコピー数異常の検出

原因不明の日本人先天異常症の患児 645 症例を対象にマイクロアレイ解析を行い、155 例 (24.0%) に疾患原因となる CNV を見出した (図)。本研究は、日本人における原因不明先天異常症の大規模なマイクロアレイ解析の結果を初めて示したものである。

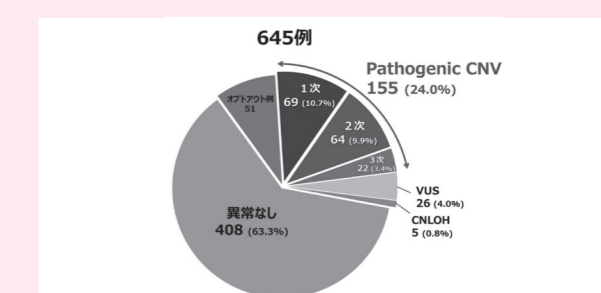


図 マイクロアレイによる Pathogenic CNV の検出

業績目録

原著論文

- Muramatsu T, Kozaki K, Imoto S, Yamaguchi R, Tsuda H, Kawano T, Fujiwara N, Morishita M, Miyano S, Inazawa J. The hypusine cascade promotes cancer progression and metastasis through the regulation of RhoA in squamous cell carcinoma. Oncogene. 2016 (in press)
- Morishita M, Muramatsu T, Suto Y, Hirai M, Konishi T, Hayashi S, Shigemizu D, Tsunoda T, Moriyama K, Inazawa J. Chromothripsis-like chromosomal rearrangements induced by ionizing radiation using proton microbeam irradiation system. Oncotarget. 2016 (in press).
- Sudo G, Kagawa T, Kokubu Y, Inazawa J, Taga T. Increase in GFAP-positive astrocytes in histone demethylase GAS1/KDM4C/JMJD2C hypomorphic mutant mice. Genes Cells. Jan 25 2016.
- Uehara DT, Hayashi S, Okamoto N, Mizuno S, Chinen Y, Kosaki R, Kosho T, Kurosawa K, Matsumoto H, Mitsubuchi H, Numabe H, Saitoh S, Makita Y, Hata A, Imoto I, Inazawa J. SNP array screening of cryptic genomic imbalances in 450 Japanese subjects with intellectual disability and multiple congenital anomalies previously negative for large rearrangements. J Hum Genet. Jan 7 2016.
- Morita K, Naruto T, Tanimoto K, Yasukawa C, Oikawa Y, Masuda K, Imoto I, Inazawa J, Omura K, Harada H. Simultaneous Detection of Both Single Nucleotide Variations and Copy Number Alterations by Next-Generation Sequencing in Gorlin Syndrome. PLoS One. 10 2015.
- Yanaka Y, Muramatsu T, Uetake H, Kozaki K, Inazawa J. miR-544a induces epithelial-mesenchymal transition through the activation of WNT signaling pathway in gastric cancer. Carcinogenesis. 36 1363-1371 2015.
- Ozaki Y, Fujiwara K, Ikeda M, Ozaki T, Terui T, Soma M, Inazawa J, Nagase H. The oncogenic role of GAS1 in chemically induced mouse skin cancer. Mamm Genome. 26 591-597 2015.
- Fujiwara N, Inoue J, Kawano T, Tanimoto K, Kozaki K, Inazawa J. miR-634 Activates the Mitochondrial Apoptosis Pathway and Enhances Chemotherapy-Induced Cytotoxicity. Cancer Res. 75 3890-3901 2015.
- Iwadate R, Inoue J, Tsuda H, Takano M, Furuya K, Hirasawa A, Aoki D, Inazawa J. High Expression of p62 Protein Is Associated with Poor Prognosis and Aggressive Phenotypes in Endometrial Cancer. Am J Pathol. 185 2523-2533 2015.
- Dobashi Y, Tsubochi H, Matsubara H, Inoue J, Inazawa J, Endo S, Ooi A. Diverse involvement of isoforms and gene aberrations of Akt in human lung carcinomas. Cancer Sci. 106 772-781 2015.

ゲノム応用医学研究部門 分子遺伝分野

教授：三木義男 准教授：中西 啓 助教：高岡美帆 特任助教：宮口 健

研究内容

遺伝性乳がん原因遺伝子 BRCA1・BRCA2 によって担われる情報伝達の流れは、乳がんの発生機構を解明する上で不可欠である。この両分子の DNA 二本鎖切断修復機能は、遺伝子変異による発がんを予防する守護者である一方で、がん組織内では抗がん剤による DNA 障害を修復し、細胞死誘導を低下させ治療抵抗性をもたらす。そこで、乳腺発がんにおける DNA 損傷修復機能、細胞死誘導機能などの役割を解明するとともにこれを利用した乳がんの新規治療法開発に取り組む。

研究紹介

1. BRCA2 欠失細胞における微小管阻害剤による新規合成致死誘導機構の解明

遺伝性乳がんの原因遺伝子産物である BRCA タンパク質は、DNA 二本鎖切断の相同組換え修復に必須なタンパク質である。近年、BRCA 変異腫瘍に対して、ポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ1 (PARP1) 阻害剤が有効であると報告された。一方、我々は、BRCA2 が DNA 修復に加えて中心体制御、細胞質分裂にも機能することや、PARP1 阻害剤と異なる機構で BRCA2 欠失細胞に合成致死を誘導する低分子化合物を見出し報告してきた。本学医療機能分子開発室所有の低分子既知化合物 1,579 個を用いて、BRCA2 欠失細胞の増殖抑制を解析、中心体動態に関する微小管脱重合阻害剤を合成致死性の候補として検出した。BRCA1 変異がん細胞では、パクリタキセルは微小管への結合能が低下し抗腫瘍効果が低いことがすでに報告されている。しかし、BRCA2 変異がん細胞の微小管阻害剤に対する感受性について報告はない。我々は、BRCA2 欠失とパクリタキセルが合成致死を誘導することを見出し、さらにこの合成致死誘導機構を明らかにするため、パクリタキセルを処理した BRCA2 ノックダウン細胞における微小管の重合度を解析した。その結果、パクリタキセル処理の BRCA2 ノックダウン細胞は、BRCA2 正常細胞と比較して、重合した微小管量が増加することを確認した。さらに、BRCA2 結合タンパクとして、Microtubule-Associated Proteins (MAPs) ファミリーの一つである MAP4 を同定した。MAP4 は、パクリタキセルと相補的に微小管

構造を安定化させることが報告されている。この場合、BRCA2 のノックダウンは、MAP4 を遊離し、パクリタキセルとの併用によって微小管重合の安定性を促進させると推測される。BRCA2 と微小管脱重合阻害剤による合成致死性は、BRCA2 遺伝子変異をもつ乳がん患者に対して、新たな治療薬の選択範囲を広げることにつながる。

2. がん細胞の遊走、浸潤における FKBP51 タンパク質の機能について

FKBP51 タンパク質は、免疫抑制剤 FK506 に結合する標的分子として同定された。近年、悪性黒色腫などで FKBP51 の発現増加が、がんの遊走・浸潤を亢進させると報告されたが、詳細なメカニズムは明らかにされていない。我々はヒト骨肉腫由来 U2OS 細胞のアクチン骨格の観察から、FKBP51 がアクチン骨格再編成に関与することを明らかにした(図1)。FKBP51 をノックダウンさせた U2OS 細胞は、細胞先端に生じる仮足の構築が阻害され、同時にアクチンストレスファイバーの崩壊が生じた。一方、FKBP51 の過剰発現により仮足やアクチンストレスファイバーの強い発現が観察された。また FKBP51 の新たなパートナータンパク質として STARD13 を同定した。STARD13 は Rho-GAP ドメインを有するタンパク質で、Rho-GTP を加水分解して Rho-GDP に変換することでがん細胞の遊走や浸潤を抑制することが報告されている。現在、siRNA-FKBP51 処理による Rho-GTP の発現量の変化を詳細に検証している。FKBP51 は、STARD13 と結合して STARD13 の Rho-GAP 活性を抑制して、アクチン骨格再編成の誘導

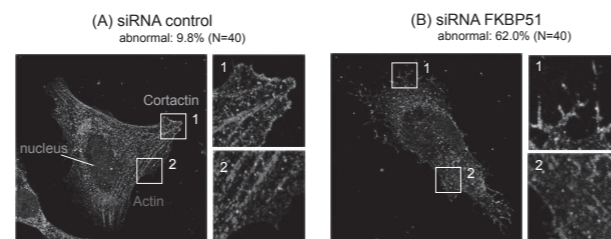


図1 FKBP51 ノックダウンは、アクチン骨格構成や葉状仮足形態を阻害する
siRNA コントロール(A)、FKBP51(B)を導入した U2OS 細胞を葉状仮足(緑)と F アクチン(赤)の指標として cortactin 抗体、phalloidin で免疫染色を行った。ボックスは拡大図を示し、FKBP51-siRNA を導入した細胞は、コントロールに比べて葉状仮足と F アクチンに異常が認められた。

を促し、がん細胞の遊走・浸潤に関与する新しい機能を有することが示唆される。

3. エストロゲン依存型 BRCA2 タンパク質の機能解析

BRCA2 遺伝子の欠損・変異による乳がんや卵巣がんの発症は、エストロゲンホルモンが作用する組織でその発症リスクを高めることから、BRCA2 タンパク質の機能とエストロゲンとの関連性は強く示唆されている。しかしながら両者を結び付けるがん発症機構は、明らかにされていない。近年、エストロゲンが結合したエストロゲン受容体 α (ER α) は、転写因子として BRCA2 タンパク質を発現することが報告されている。今回我々は、エストロゲン—ER α 依存的に発現する BRCA2 タンパク質が、細胞周期依存的に発現する BRCA2 タンパク質と異なる細胞内動態を示すことを明らかにしたので報告する。MCF-7 細胞にエストロゲンを添加して 24 時間後、抗 BRCA2 抗体で免疫染色を行い共焦点レーザーキャノン顕微鏡にて Z スタック画像を取得した。核と細胞質内の BRCA2 の発現量を MetaMorph で画像解析した結果、エストロゲンを処理した細胞内の BRCA2 は、エストロゲン未処理の細胞に比べて細胞質から有意に検出された。また、エストロゲン処理した MCF-7 細胞を細胞質と核に分画して、抗 BRCA2 抗体を用いたイムノブロット解析からも同様の結果が得られた。次に、エストロゲン—ER α 依存的に発現する BRCA2 が、核内に移行するのかを検証するため、siRNA で内在性 BRCA2 の発現を抑制させた MCF-7 細胞に対してエストロゲンを添加した。その結果、BRCA2 の発現量は細胞質より核内の比率が増加した。このことから核内の BRCA2 の発現量は、一定の範囲内に維持されて細胞質から核内への移行が制御されている可能性が示唆された(図2)。現在、エストロゲン—ER α 依存的に発現する BRCA2 が、DNA 損傷・修復機能を有するのかを検証している。エストロゲンは、DNA 損傷を引き起こして発がんのイニシエーションの可能性が報告されていることから、エストロゲン—ER α 依存的 BRCA2 の発現は、DNA 損傷・修復の 2 次的防御機構としてその重要性が示唆される。

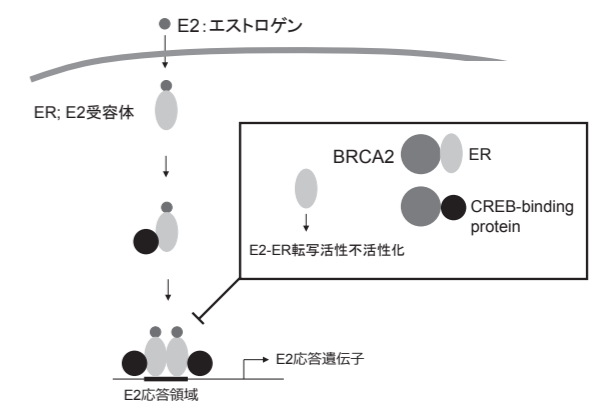


図2 E2-ERalpha シグナル伝達における BRCA2 役割のモデル
BRCA2 は CBP および ER α に結合して E2-ER α の活性を阻害し、E2 応答遺伝子の発現を抑制する可能性が示唆された。

4. リサイクリングエンドソームにおける BRCA2 の新規機能の可能性

我々は、BRCA2 が細胞質分裂に機能することを明らかにした。細胞内輸送器官であるエンドソームには細胞質分裂と共通して働く分子が多数知られ、その中には、BRCA2 との相互作用が報告されている分子も存在する。そこで、BRCA2 もエンドソームに存在し機能している可能性を考えた。HeLa S3 細胞からエンドソームライゼートを精製し、BRCA2 のエンドソーム局在を確認した。次に、エンドソームにおける BRCA2 のパートナー探索を行い、BRCA2 と相互作用する分子候補として、リサイクリングエンドソームに関わる分子を多数検出した。このことから、BRCA2 はエンドソームの中でも特にリサイクリングエンドソームに関わる可能性が示唆された。BRCA2 とダイニンの結合を当研究室においてすでに確認していることから、結合分子の中でも、特にリサイクリングエンドソームを輸送する際にモータータンパク質ダイニンとの仲介を行う Rab11-FIP3 (Rab11 family-interacting protein 3) に着目した。Rab11-FIP3 は、リサイクリングエンドソーム輸送にかかわることや中心体に局在して M 期のスピンドル形成に必要とされること、また細胞質分裂に関与することがすでに報告されている。BRCA2 及び Rab11-FIP3 の細胞内器官における相互の影響を検討している。

人事異動

転入：大塚菜央(修士課程)
転出：倉科太一(修士課程)、紺野真衣(修士課程)、清水優香(修士課程)

業績目録

原著論文

1. Pal SK, Nguyen CT, Morita KI, Miki Y, Kayamori K, Yamaguchi A, Sakamoto K. THBS1 is induced by TGF β 1 in the cancer stroma and promotes invasion of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2016.

2. Wang J, Ding Q, Fujimori H, Motegi A, Miki Y, Masutani M. Loss of CtIP disturbs homologous recombination repair and sensitizes breast cancer cells to PARP inhibitors. *Oncotarget.* 2015.

3. Nakamura S, Takahashi M, Tozaki M, Nakayama T, Nomizu T, Miki Y, Murakami Y, Aoki D, Iwase T, Nishimura S, Yamauchi H, Ohsumi S, Baba S, Shimizu T. Prevalence and differentiation of hereditary breast and ovarian cancers in Japan. *Breast Cancer.* 2015;22(5):462-468.

総説

1. 宮口 健, 三木 義男; I. 癌と遺伝 A. がんの発症メカニズムと癌関連遺伝子. 癌の遺伝医療: 遺伝子診断に基づく新しい予防戦略と生涯にわたるケアの実践 南江堂. 2-8, (2015)

2. 中西 啓, 三木 義男; 【家族性腫瘍学・家族性腫瘍の最新研究動向】原因遺伝子 ゲノム安定性維持に関わる BRCA1 と BRCA2 の新しい役割. 日本臨床 73 巻増刊 6 家族性腫瘍学. 317-321, (2015)

3. 三木 義男; 遺伝性乳癌卵巣癌のマネージメント】BRCA 遺伝子の発見から新たな臨床遺伝学へ. 産科と婦人科 82 巻 6 号, 599-604, (2015)

ゲノム応用医学研究部門 分子疫学分野

教授：村松正明 准教授：佐藤憲子 助教：池田仁子

研究内容

概略

本分野では、難治性病態に繋がる日常的慢性疾患 (Common Chronic Diseases) の発症・進展と遺伝子および環境因子の関連を明らかにする目的で、ゲノム情報を駆使し、疫学的手法を用いて解析をする。基本的には疫学フィールドや臨床サンプルを持つ研究グループとの共同研究のもとで、疾患の発症に及ぼす遺伝子および環境因子およびそれらの交互作用の発見と検証、疾患の易罹患性や薬剤反応性に関与する遺伝子多型の解析を行う。対象疾患はメタボリック症候群 (糖尿病、高血圧、高脂血症、肥満)、動脈硬化、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) などである。これらの日常的疾患は多因子疾患であり、遺伝子-環境因子、遺伝子-遺伝子の交互作用の影響を包括的に捉えるためバイオインフォマティクス研究も進めている。また日常的慢性疾患の素因の一部は胎児期に形成されるという Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) 仮説を検証すべく、子宮内環境により胎児期のエピゲノム状態が変化して疾患の易罹患生に影響を及ぼすかどうかの検討を行っている。

これらの取り組みによりゲノムと環境による疾患に対する相加的、相乗的なリスクを知ることで、先制医療や新しい予防医学に有意義な指針を提唱することを目指している。またパーソナルゲノム時代の到来に備えて、ゲノム解析結果を個人に返却した場合の心理的影響や行動変容に関する社会医学的な取り組みも行っている。大学院生および専攻生には、ゲノム医学、遺伝統計学、疫学、そして分子生物学などの知識や実験手技を教育し、学際的に広がりを持つ分野を理解してパーソナルゲノム時代に適応した研究を推進できる人材の育成を行う。

研究紹介

1. *CHD4* 遺伝子 pD140E 多型と癌の関連研究：喫煙との相互作用

発癌の過程において DNA 損傷・修復は大きく関与している。種々の環境因子の曝露によりおこる DNA 損傷を修復する過程が破綻により癌化すると考えられる。従って DNA 損傷修復経路にある遺伝子多型が癌の易罹患性に関与することが考えられる。Chromodomain he-

licase DNA-binding protein 4 (CHD4) 遺伝子は、クロマチンリモデリングに中心的な役割を担い、細胞周期を調整し、DNA 損傷反応に関わる酵素の一つである。マイクロサテライト不安定性の胃癌と大腸癌での研究で、CHD4 の発現が減少することが報告されている。また CHD4 は細胞周期を調整しその破綻により癌細胞が増殖することや、CHD4 の体細胞変異が漿液性粘膜炎のエキソームシークエンスで同定されている。本研究では、CHD4 遺伝子の胚細胞変異が癌と関連すると仮定し、CHD4 非同義一塩基多型を検索し、病理学的に診断された癌との関連を連続剖検例 2343 検体で検討した。

東京都健康長寿医療センター研究所バイオリソースセンターに登録されている日本人高齢者連続剖検例 2343 検体を対象とした。CHD4 の非同義一塩基変異について Illumina 社の Infinium Human Exome Chip を用いて Genotyping を行い、担癌及び各種癌との関連を検討した。解析は SPSS を用いてロジスティック回帰分析を行った。

その結果、潜在癌も含めた担癌例は 1446 例 (61.7%) であった。CHD4 の 9 つの非同義一塩基変異のうち 7 つは monomorphic で、残る 2 つの一塩基変異 p.E139D と p.D140E について解析を行った。p.D140E のマイナーアレル頻度は 2.2% でホモ接合は認めず、全例ヘテロだった。p.E139D と p.D140E は 3 塩基しか離れておらず DNA チップタイピングにおいて干渉が認められたため、p.D140E の全例に対してはダイレクトシーケンス法を用いて確認した。p.D140E は Dominant model において担癌例に対して統計学的に有意差を認めた (OR = 2.17, 95% CI = 1.37-3.44, p = 0.001)。また男性のみを対象としても有意差を認めた (OR = 3.77, 95% CI = 1.59-8.92, p = 0.003) が、女性では認めなかった。さらに喫煙歴との関連を検討すると、喫煙例と関連を認めた (OR = 4.66, 95% CI = 1.82-11.9, p = 0.001) が、非喫煙例とは認めなかった。一方、p.E139D では担癌例に対して有意差を認めなかった。各種癌に対しては、p.D140E と肺癌 (OR = 3.99, 95% CI = 2.07-7.67, p < 0.001)、直腸癌 (OR = 6.23, 95% CI = 2.31-16.8, p < 0.001)、悪性リンパ腫 (OR = 3.24, 95% CI = 1.43-7.33, p = 0.005) との関連を認めた。

CHD4 遺伝子変異 p.D140E は、病理学的に癌が確認された連続剖検例で担癌と関連付けられていることを発見した。さらに喫煙習慣はリスクを高める可能性が示唆された。CHD4 は 2045 アミノ酸から成り、2 つの plant homeodomain (PHD) zinc finger ドメイン、2 つのクロモドメインと 1 つのヘリカーゼドメインからなる。p.D140E の変異は酸性アミノ酸ストレッチ中にあり、134 番から 144 番までのアミノ酸配列は、133-EEEE(D/E)DDDD-145 で括弧内が p.D140E であり、ポリグルタミン酸とポリアスパラギン酸の境目に位置する。p.D140E のアミノ酸変化によりポリグルタミン酸が 6 つから 7 つに伸長されることが癌のリスクを増加させることと関連している可能性が推測される。

一般に細胞周期を調整する遺伝子や DNA 修復過程にある遺伝子の調節解除機能異常が癌の発生に寄与すると考えられる。CHD4 は DNA 損傷反応を調整するクロマチンリモデリング因子としての機能に加え、TP53 の脱アセチル化による G1/S 細胞周期を調整する役割も担う。細胞周期を調整する遺伝子の変異や発現異常は癌の発生を意味する。しかしながら、これらの多型の部位は、CHD4 の癌を抑制する DNA 修復活性を標的とする ATPase/helicase ドメインや、未修飾 H3K4 やメチル化 H3K9 のヒストン H3 結合部位である PHD フィンガーのどちらでもない。従って、CHD4 p.D140E は、癌関連遺伝子の変異を含む多段階過程を通じて癌の発生を加速させている可能性が考えられた。このポリグルタミン酸-ポリアスパラギン酸の伸長は CHD4 の 3 つの核内ターゲット配列に隣接したクロマチン結合部位であるという報告がある。同様のポリグルタミン酸-ポリアスパラギ

between the orexin (hypocretin) receptor 2 gene polymorphism Val308Ile and nicotine dependence in genome-wide and subsequent association studies. *Mol Brain* 8:50 (2015)

3. Zhou H, Mori S, Tanaka M, Sawabe M, Arai T, Muramatsu M, Mieno MN, Shinkai S, Yamada Y, Miyachi M, Murakami H, Sanada K, Ito H. A missense single nucleotide polymorphism, V114I of the Werner syndrome gene, is associated with risk of osteoporosis and femoral fracture in the Japanese population. *J Bone Miner Metab.* 33:694-700 (2015)

4. Zhou H, Mori S, Ishizaki T, Tanaka M, Tanisawa K, Mieno MN, Sawabe M, Arai T, Muramatsu M, Yamada Y, Ito H. Genetic risk score based on the lifetime prevalence of femoral fracture in 924 consecutive autopsies of Japanese males. *J Bone Miner Metab.* [Epub ahead of print] (2015)

5. Maekawa K, Nakamura R, Kaniwa N, Mizusawa S, Kitamoto A, Kitamoto T, Ukaji M, Matsuzawa Y, Sugiyama E, Uchida Y, Kurose K, Ueta M, Sotozono C, Ikeda H, Yagami A, Matsukura S, Kinoshita S, Muramatsu M, Ikezawa Z, Sekine A, Furuya H, Takahashi Y, Matsunaga K, Aihara M, Saito Y; Japan

ン酸の伸長は他のいくつかの遺伝子でも認められている。しかし、このアミノ酸伸長の機能や相互作用するタンパク質やドメインに関しては明らかではなく、さらなる検討が必要である。ポリグルタミン酸-ポリアスパラギン酸の伸長におけるアミノ酸置換が CHD4 の機能的ドメインに間接的な影響を与え、結果として、DNA 修復メカニズムの欠落を導くことが予想された。

複数の遺伝子変異の集積によって癌が発生することはよく知られている。DNA 損傷や癌化に影響する可能性のある要因のうち、最も重要な発癌物質は喫煙である。タバコは 60 種類以上の DNA 変異を惹起する化学物質を含む。DNA の未修復または不完全な修復は細胞周期調節の異常や、アポトーシスや転移調節破綻を導く。DNA 修復酵素である CHD4 多型において、喫煙習慣が癌のリスクを増加させた今回の結果により、癌の発生における遺伝子環境相互作用の可能性を示唆する。例えば、The Cancer Genome Atlas における CHD4 の体細胞変異の頻度を CHD4 と関連していた肺癌で見ると、肺腺癌で 2.6%、肺扁平上皮癌では 6.2% であった。肺癌、悪性リンパ腫、直腸癌と CHD4 の関連が認められたが、他の環境要因は依然として明らかでない。

表 pD140E と癌の関連解析

Types of cancer	P value	OR (95% CI)	Adjusted P value	OR (95% CI)
Lung cancer	<0.001	3.20 (1.78-5.73)	<0.001 ^a	3.43 (1.89-6.25) 3.99 (2.07-7.67)
Gastric cancer	0.82	1.10 (0.49-2.47)		
Colon cancer	0.02	2.37 (1.14-4.91)		
Malignant lymphoma	0.004	3.03 (1.42-6.47)	0.004 ^b 0.005 ^b	3.08 (1.43-6.64) 3.24 (1.43-7.33)
Breast cancer	0.03	2.75 (1.10-6.92)		
Hepatocellular carcinoma	0.06	2.57 (0.95-6.91)		
Pancreatic cancer	0.55	0.54 (0.07-4.02)		
Biliary tract cancer	0.39	1.72 (0.50-5.84)		
Rectum cancer	<0.001	5.09 (2.10-12.4)	<0.001 ^a <0.001 ^b	6.19 (2.46-15.5) 6.23 (2.31-16.8)
Esophageal cancer	NR			
Prostate cancer ^c	0.16	1.72 (0.81-3.63)		
Uterine cancer ^d	NR			

a: 年齢・性で調整、b: 年齢・性・喫煙歴で調整、c: 男性のみ、d: 女性のみ

人事異動

退室：池田仁子 (国立国際医療センターへ転出)

業績目録

原著論文

1. Yamada M, Sato N, Ikeda S, Arai T, Sawabe M, Mori S, Yamada Y, Muramatsu M, Tanaka M. Association of the chromodomain helicase DNA-binding protein 4 (CHD4) missense variation p.D140E with cancer: potential interaction with smoking. *Genes Chromosomes Cancer* 54:122-128 (2015)
2. Nishizawa D, Kasai S, Hasegawa J, Sato N, Yamada H, Tanioka F, Nagashima M, Katoh R, Satoh Y, Tagami M, Ujike H, Ozaki N, Inada T, Iwata N, Sora I, Iyo M, Yamada M, Kondo N, Won MJ, Naruse N, Uehara-Aoyama K, Itokawa M, Ohi K, Hashimoto R, Tanisawa K, Arai T, Mori S, Sawabe M, Naka-Mieno M, Yamada Y, Yamada M, Sato N, Muramatsu M, Tanaka M, Irukayama-Tomobe Y, Saito YC, Sakurai T, Hayashida M, Sugimura H, Ikeda K. Associations

ゲノム応用医学研究部門 遺伝生化分野

教授：北嶋繁孝 准教授：田中裕二郎

研究内容

概略

生命の設計図であるゲノム情報は、最終的な機能実行分子であるタンパク質に翻訳されてはじめてその生物機能が発現される。この遺伝子発現プロセスの中で、転写反応は第一義的な調節段階である。本分野では、転写制御の共通原理の解明と、ストレス応答や病態発現に関わる遺伝子制御を明らかにすることを主要な研究テーマとしている。近年、基本的な転写に関わる因子が転写症候群と呼ばれる難治疾患に深く関わることや、がんの細胞運命に関わることも明らかにされている。遺伝子発現機構とそれに関わる制御分子の研究によって、様々な疾患の病態を分子レベルで理解し、その結果に基づいた新しい治療法や予防法の開発を目指している。

研究紹介

1. ヒト大腸がんの Wnt-ATF3 経路とがん浸潤能の研究

ヒト大腸がんでは Wnt 経路の高頻度の変異が認められる。我々は、ATF3 が正常細胞を含むヒト大腸がんにおいて Wnt 経路の直接の標的遺伝子であり、 β -catenin の変異を有するがんでは、ATF3 が恒常的に高い発現を示すことを明らかにした。さらに、ATF3 は、がん細胞増殖には有意な影響を及ぼさなかったが、がん細胞の遊走、浸潤能を抑制していることを見出した。加えて、網羅的解析により、ATF3 が、多数の Wnt 標的遺伝子を活性化する一方、転移関連遺伝子、上皮間葉移行関連遺伝子を抑制している negative regulator であることを見出した (図 1)。また、我々は、大腸がん細胞における ATF3 が MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein-1) をはじめとする複数の炎症関連因子の発現を抑制することを報告しており、転移の *in vivo* 系評価も合わせて更なる解析を進行している。

2. システムバイオロジーによる ATF3 標的遺伝子の探索

ストレス応答転写因子 ATF3 は、DNA 損傷・薬剤・酸化ストレス・サイトカインなどのさまざまな刺激により迅速に発現が誘導され、標的遺伝子を介して細胞運命

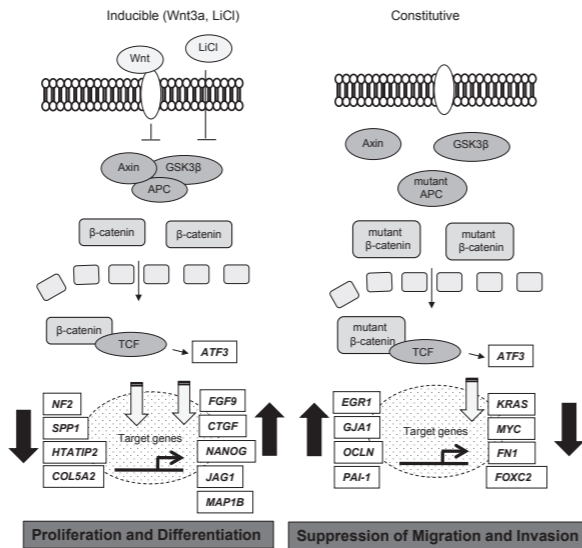


図 1 誘導型と恒常型の Wnt-ATF3 経路

の決定に関わる生体応答の“ハブ機能”を果たす転写因子である。我々は、ATF3 が p53 の標的遺伝子であると同時に、p53 転写を抑制することで、発がん、がん抑制の両様の機能を持つことを報告してきた。本年は、p53-ATF3 axis の意義を解析する目的で、ATF3・p53 のダブルノックアウトマウスを作製し、DNA 傷害応答の網羅的遺伝子発現と ChIP-seq 解析により詳細な解析を進めた。本研究は、新学術領域研究「システムがん」の支援により東大医科研宮野研究室との共同研究で進めている。

3. ASH1 による筋ジストロフィー原因遺伝子の発現制御

ASH1 はヒストン H3 のリジン 36 特異的メチル化酵素で、Hox 遺伝子の活性化因子だが、最近、4 番染色体上の反復配列の短縮を原因とする筋ジストロフィー (FSHD) において、ASH1 が転写される non-coding RNA に結合し、DUX4 プロモーターを活性化することが明らかになった。本研究では、ASH1 を含めクロマチン構造制御因子のノックアウトモデルを作成し、ASH1 による DUX4 プロモーター活性化機構を解析している。また、ASH1 および non-coding RNA を標的とする新たな治療薬の開発にも取り組んでいる。

ハイライト 1

FCP1 は p53 を介して細胞周期を制御する

Wnt 標的遺伝子 ATF3 はがん抑制遺伝子である大腸がん細胞株 HCT116 を含む β -catenin 変異大腸がん細胞の ATF3 発現レベルは、Wnt の活性化と関連していた (図 2)。事実、ATF3 ルシフェラーゼ解析、DNA affinity precipitation、 β -catenin ChIP-PCR によって、ATF3 遺伝子プロモーターの -30 ~ -40 塩基領域に TCF4/ β -catenin binding site が存在し、当該部位に β -catenin がリクルートされることを見出した。このことから、HCT116 においてストレス応答遺伝子 ATF3 が、Wnt の直接の標的遺伝子であることを明らかにした。

また、*in vitro* 系遊走能・浸潤能解析を行ったところ、ATF3 ノックダウン株は、がん細胞の遊走・浸潤を促進することを見出した。さらに、Wnt 標的遺伝子、tumor metastasis 関連遺伝子、EMT 関連遺伝子の RT2 Profiler PCR Array 解析により、Wnt-ATF3 pathway によって制御される遺伝子として、KRAS や FN など 21 種類の候補遺伝子を同定した。以上より、ストレス応答遺伝子 ATF3 が、Wnt の直接の標的遺伝子でありながら、遺伝子発現制御を介して遊走・浸潤を負に制御するがん抑制遺伝子として機能することを示した。

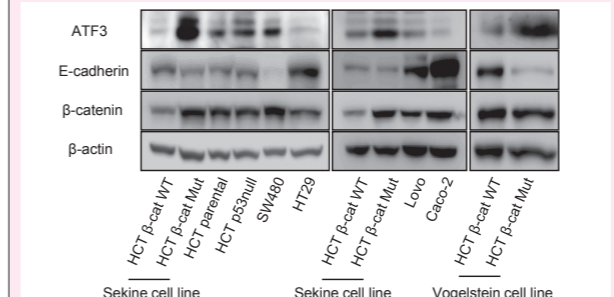


図 2 異常 Wnt シグナルによる ATF3 発現誘導

ハイライト 2

ATF3 は p53 pathway を含む種々の pathway に関わる

ATF3 KO・p53 KO・DKO マウスの MEF を作成し、実験を行った。Doxorubicin で刺激を行い、経時的に RNA を回収し、網羅的な遺伝子発現解析を行った。ストレス応答に関わるパスウェイの遺伝子発現をまと

めるために、DNA damage response、Unfolded protein response などの既知パスウェイ情報を利用して、発現をヒートマップで表した。この結果、ATF3 を KO することによって、WT よりも有意に発現が変動する遺伝子が見出された (図 3)。これら遺伝子は ATF3 KO で抑制されるものが多く、ATF3 は通常、系としてこれら遺伝子を活性化していることが考えられる。さらに別の解析では、ATF3 の機能が p53 の有無に依存する可能性を示唆する結果が得られた (図 4)。ATF3 が p53 非存在下では、細胞遊走、血管新生、細胞運動関連遺伝子を上昇させ、p53 の存在下では、細胞周期に関わる遺伝子群が ATF3 によって抑制されていた。これらのことから、p53 標的遺伝子 ATF3 は、p53 存在下ではがん抑制作用を示すが、非存在下ではむしろ発がんに関連する遺伝子の制御を行っていることが示された。

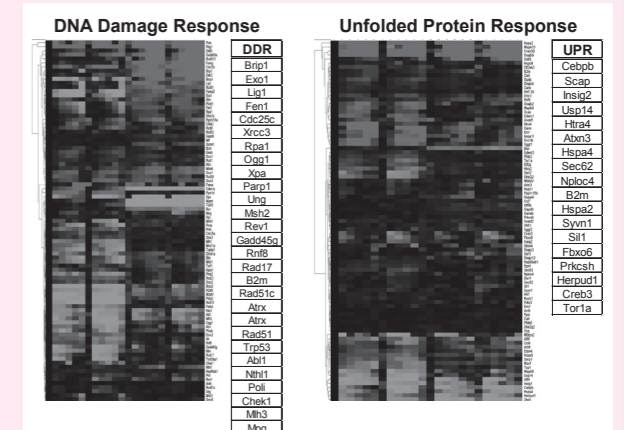


図 3 Stress response の heatmap

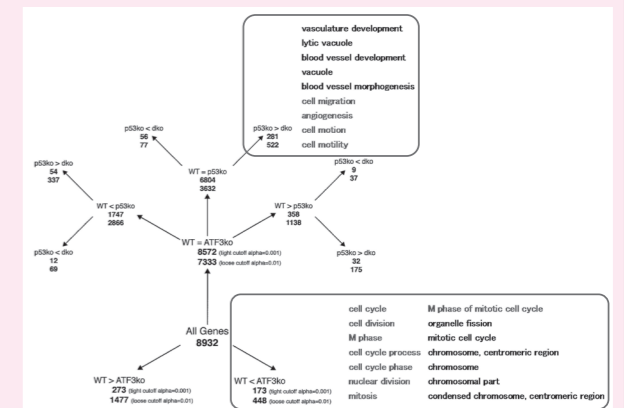


図 4 p53 の有無による ATF3 の機能の差異

人事異動

転入：斉藤翔太 (受入研究生 北里大学)、井上允 (技術補佐員)
 転出：川内潤也 (難治疾患研究所 遺伝生化 助教)、大塚菜央 (卒業研究生、北里大学)、井上允 (大学院医歯学総合研究科 博士課程)、福本悟史 (大学院医歯学総合研究科 修士課程)、高屋俊輔 (大学院医歯学総合研究科 修士課程)、鈴木卓也 (受入研究生 東京バイオテクノロジー専門学校)、大塚菜央 (受入研究生 北里大学)

研究業績

原著論文

- Inoue M et al. ATF3 is a direct target of the Wnt classical pathway and its anti-invasive role in human colon cancer cells. manuscript in preparation 2016;
- Uchida Y et al. Systems analysis of DNA damage response of p53-ATF3 pathway in a mouse model. manuscript in preparation 2015;
- Fukasawa K et al. ATF3 deficiency protects

- against RANKL-induced osteoporosis by suppressing proliferation of osteoclast precursors. revised 2015;
- Iezaki, Ozaki et al. ATF3 deficiency in chondrocytes alleviates osteoarthritis development. revised 2015;
 - Sood V et al. ATF3 hyper-induced during Japanese encephalitis virus infection negatively regulates the antiviral signalling in the absence of type 1 interferons. submitted

ゲノム応用医学研究部門 ゲノム病理学分野

教授：石川俊平 助教：砂河孝行、加藤洋人

研究内容

腫瘍性疾患や炎症・免疫疾患などは、多種の細胞によって構成される複雑な系であり、病態の原因となる細胞だけでなく、それら多種の細胞が相互作用することにより疾患の病態や悪性を引き起こしている。したがって、これら相互作用するシグナルを同定し、介入することは疾患発症機構の理解およびその治療戦略を考えるうえで重要な課題となる。本研究分野では、ゲノムレベルで多量のデータ計測を行うことによりその動態を明らかにし解析のなかから介入可能な治療ターゲットやバイオマーカーになりうる特異的現象の探索と疾患における意義について解析を行っている。

また難治性疾患の発症メカニズムをゲノミクスの側面から解明することも行っている。並列型シーケンサーを用いた臨床疾患検体の包括的ゲノミクス解析を行うことにより、その分子メカニズムの理解を試みている。

研究紹介

1. がん-間質相互作用のゲノミクス

腫瘍組織は、癌細胞のほか、免疫細胞、血管やリンパ管を構成する細胞、線維芽細胞など多様な細胞により構成されている。これら腫瘍細胞を除く細胞は間質細胞と言われ腫瘍微小環境を構築している。これまで腫瘍悪性化における微小環境の役割は良くわかっていなかったが近年、リンパ球、マクロファージをはじめとする炎症・免疫細胞や線維芽細胞が癌の浸潤や転移に寄与していることが示されてきた。また、腫瘍間質の形成は、癌細胞への抗癌剤のデリバリーや効果に影響することも知られている。このような知見から腫瘍間質は、新たな治療標的としても注目されている。

ゲノム病理学分野では、これまで包括的および定量的に評価することの難しかった複数細胞により構成される腫瘍組織内の細胞間相互作用全体を解析する手法を開発している（がん-間質インタラクトーム）。担癌動物モデルより摘出した腫瘍組織のトランスクリプトームデータを取得後、ヒト由来、マウス由来の配列に振り分けることで腫瘍細胞と間質細胞の遺伝子発現プロファイルを構築し、タンパク相互作用データベースを取り込むこと

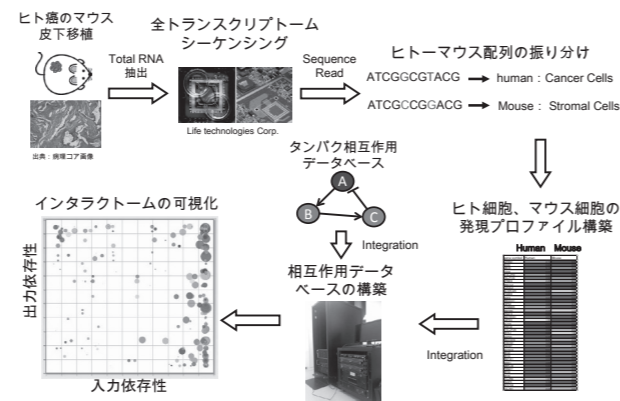


図1 がん-間質インタラクトームの網羅的解析

によりがん-間質細胞間の全体像（インタラクトーム）を捕え、さらに強い相互作用を起こすシグナル経路を同定することを試みている。

またより臨床の病態に近い相互作用を解析する為に、実験動物中央研究所と共同で臨床腫瘍組織の直接移植モデル（PDX：Patient Derived Xenograft）を用いて多様な腫瘍でインタラクトームの解析を行っている。

2. 臨床疾患組織のゲノミクス解析

ゲノム病理学分野では、様々な難治性疾患の臨床検体のゲノミクス解析を進めている。並列型シーケンサーを用いたトランスクリプトームシーケンスや全エクソームシーケンス等の包括的なデータ取得を行い、発症メカニズムをゲノミクスの側面から解明することを試みている。我々は外科手術によって切除されたびまん性胃がん（スキルス胃癌）において高深度の全エクソーム解析により、スキルス胃癌症例の約1/4（87症例中22症例：25.3%）に、RHOA 遺伝子の体細胞変異を同定した。培養細胞を用いた検証実験の結果、このような RHOA 遺伝子変異は、がんの原因として働く「ドライバー変異」だということが示唆された。ゲノム病理学分野では、スキルス胃癌における RHOA 遺伝子変異の分子メカニズムの研究を進め、分子標的薬への応用を含めた研究を継続している。この他にも、多種のがん検体をはじめとするさまざまな難治性疾患に対するゲノミクスのアプローチを進めている。

3. 腫瘍浸潤リンパ球の抗原受容体レパトア解析

腫瘍組織の周囲に浸潤しているリンパ球（Tumor Infiltrating Lymphocytes）は、腫瘍免疫において重要な役割を果たしていると考えられており、実際種々の癌で予後と関連することが知られている。しかし、その詳細な性質は未だ明らかではない。

ゲノム病理学分野では、並列型次世代シーケンス技術を用いて腫瘍浸潤リンパ球の抗原受容体配列を解析することで、その性質を解明しようと試みている。現在、我々はスキルス胃癌を主なターゲットとして解析を行っている（図2）。スキルス胃癌は、極めて予後が不良であるうえに、分子標的薬のターゲットになりうるドライバー変異の頻度がきわめて低く、また変異の数が少ないことから免疫チェックポイント阻害薬などの免疫療法の効果も乏しいと考えられ、本研究により新たな治療法の

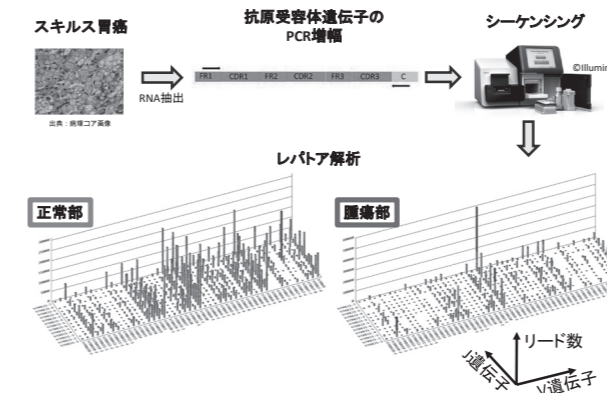


図2 腫瘍浸潤リンパ球の抗原受容体レパトア解析

研究業績

原著論文

- Maeda D, Akiyama Y, Morikawa T, Kunita A, Ota Y, **Katoh H**, Niimi A, Nomiya A, **Ishikawa S**, Goto A, Igawa Y, Fukayama M, Homma Y. Hunner-Type (Classic) Interstitial Cystitis: A Distinct Inflammatory Disorder Characterized by Pancystitis, with Frequent Expansion of Clonal B-Cells and Epithelial Denudation. PLoS One 2015 Nov 20;10(11):e0143316. doi: 10.1371/journal.pone.0143316. PMID: 26587589
- Saito S, Morishima K, Ui T, Hoshino H, Matsubara D, **Ishikawa S**, Aburatani H, Fukayama M, Hosoya Y, Sata N, Lefor AK, Yasuda Y, Niki T. The role of HGF/MET and FGF/FGFR in fibro-

blast-derived growth stimulation and lapatinib-resistance of esophageal squamous cell carcinoma. BMC Cancer. 2015 Feb 25;15(82). doi: 10.1186/s12885-015-1065-8. PMID: 25884729

- Ushiku T, **Ishikawa S**, Kakiuchi M, Tanaka A, **Katoh H**, Aburatani H, Lauwers GY, Fukayama M. RHOA mutation in diffuse-type gastric cancer: a comparative clinicopathology analysis of 87 cases. Gastric Cancer. 2015 Apr 1. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25823974.

国際会議発表

- Komura D, Isagawa T, Sato R, Kishi K, Suzuki R, Ishikawa S. Comprehensive analysis of tumor - stromal interactome

blast-derived growth stimulation and lapatinib-resistance of esophageal squamous cell carcinoma. BMC Cancer. 2015 Feb 25;15(82). doi: 10.1186/s12885-015-1065-8. PMID: 25884729

- Kato H, Komura D, Konishi H, Yamamoto A, Fukayama M, Ishikawa S. Immunogenomic Characterization of Tumor Infiltrating TCR Repertoire in the Gastric Carcinoma Environments using Archived Histopathological Specimens 3rd Annual immunogenomics 2015 Shaping the Future of Human Health, HUNTSVILLE, ALABAMA, USA, Sep.28-Sep.30, 2015
- Kato H, Komura D, Konishi H, Yamamoto A, Fukayama M, Ishikawa S. Immunogenetic profiling of tumor infiltrating T cells among human gastric cancer IMMUNE PROFILING IN HEALTH AND DISEASE, Seattle, USA, Sep.9 - Sep.11, 2015

開発につながることを期待される。

4. Functional Genomic Screening

ゲノム病理学分野では、核酸バーコードを付加された網羅的 shRNA ライブラリと並列型次世代シーケンス技術を融合させることにより、機能ゲノミクス・スクリーニングを行っている。その一例として、網羅的 shRNA レンチウイルス・ライブラリを感染させた各種のがん細胞株をマウスに移植し、移植前後における shRNA 感染細胞のクローン組成を比較することによって、新しいがん治療標的分子の探索を行ってきた（図3）。現在までに多数のヒトがん細胞株を用いた実験を進めており、複数のがん治療標的遺伝子候補を同定することができた。今後も、網羅的 shRNA ライブラリを用いた機能ゲノミクス・スクリーニングを行っていくことで、新規性のあるがん治療標的分子の同定を試みる。

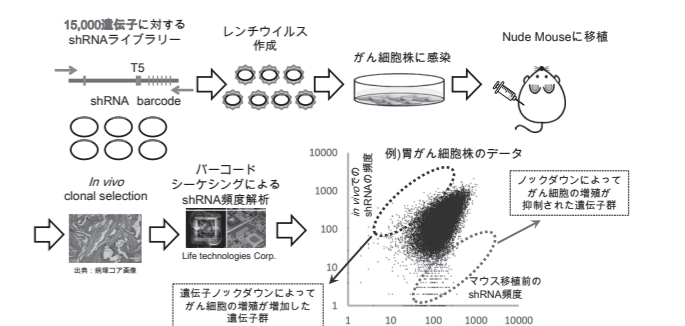


図3 Functional Genomic Screening を用いた新しいがん治療標的遺伝子の探索

ゲノム応用医学研究部門 エピジェネティクス分野

教授：石野史敏 准教授：幸田 尚 助教：志浦寛相 助教：川崎佑季
特任講師：李知英 特任助教：入江将仁 非常勤講師：小林 慎
事務補佐員：前田伊久子

研究内容

概略

エピジェネティクス分野では、遺伝・個体発生・進化等のさまざまな生命現象を、ゲノム機能という立場から総合的に理解することを目指しています。現在の研究の主要テーマは、1) 哺乳類特異的なゲノム機能であるゲノムインプリンティングの分子機構・生物学的意義の解明、2) ゲノム機能進化と哺乳類の進化の関係の解明、3) 体細胞クローン動物や生殖補助医療を含む発生工学的手法による個体発生におけるエピジェネティック過程の解明です。ヒトを含む哺乳類を対象に据え、遺伝学とエピジェネティクスを統合した研究により哺乳類に共通する特徴的なゲノム機能解明をめざしています。これにより、ヒトの生物学(哺乳類の生物学)の再構築と、それに基づくエピジェネティック医療実現のための基盤づくりに貢献したいと考えています。

研究紹介

1. 哺乳類のゲノムインプリンティングの解析

哺乳類の父親・母親由来のゲノムは片親性発現を示すインプリント遺伝子群 (*Peg* と *Meg*) の存在により、個体発生、成長において異なる機能を果たしています。ゲノムインプリンティングと哺乳類の胎生との関係を解明するため、胎盤形成に必須な *Peg10*、*Peg11* の機能解析をすすめ、さらにゲノムインプリンティング型ヒト疾患治療法の開発を進めています。

2. LTR-レトロトランスポゾン由来の遺伝子群の哺乳類進化への寄与

哺乳類に存在する LTR レトロトランスポゾンに由来

する遺伝子群は哺乳類の進化に大きな寄与したと考えています。上記の *Peg10*、*Peg11* は sushi-ichi レトロトランスポゾン由来の *SIRH* 遺伝子群の代表例ですが、これに属する総ての遺伝子の機能解析を東海大学の金児-石野教授と進めています。

3. 受精直後の胚における父親・母親由来のゲノム機能の差異

受精直後から着床までの間の父親・母親由来のゲノム機能の差異はこれまで解析されてきませんでした。次世代シーケンス技術により初期胚における雌雄ゲノムからの遺伝子発現の詳細を解析しています。さらに体細胞クローン技術やヒトの生殖医療技術である顕微授精の遺伝子発現に与える影響も調べています。

4. 哺乳類における半数体細胞株の樹立と特性解析

哺乳類半数体細胞株は変異体分離による遺伝学的解析を飛躍的に進めると期待されています。これらの細胞を安定培養する技術開発や、哺乳類に特異的な X 染色体不活性化機構やゲノムの倍数性と細胞分化の関係など生物学的な重要な問題の解明に向けた研究を進めています。

5. ゲノムのメチル化状態を解析する新技術開発

遺伝子発現調節に重要な役割を果たす DNA メチル化ですが、ヒドロキシメチル化状態に変換されるとその機能が変ると考えられています。ゲノム中のメチル化関係の修飾を配列レベルで解析できる EnIGMA 法を開発し、個体発生やガンにおけるエピジェネティック解析を進めています。

ハイライト

レトロトランスポゾン由来の遺伝子 *Sirh11/Zcchc16* は 脳の認知機能に関係している (Irie *et al.* PLoS Genet 2015)

哺乳類には LTR レトロトランスポゾンに由来して遺伝子となったものが 30 個以上存在している。それらは sushi-ichi に近縁のレトロトランスポゾンに由来する *SIRH* (sush-ichi-related retrotransposon homologues) 遺伝子群と gypsy_12DR に近縁のレトロトランスポゾンに由来する *PNMA* (paraneoplastic Ma antigen) 遺伝子群である。当分野では、これまで *SIRH* 遺伝子に属する *Peg10/Sirh1* および *Peg11/Rtl1/Sirh2* が哺乳類特異的臓器である胎盤形成や機能維持に必須の機能をもつこと (Nat Genet 2006, 2008)、*Sirh7/Ldoc1* が胎盤細胞の成熟/分化に関係すること (Development 2014) を実証し、哺乳類の胎生進化に LTR レトロトランスポゾンが極めて重要な役割を果たしたことを世界で初めて明らかにしている (Proc Jpn Acad Ser B 2015)。

残りの総ての *SIRH* 遺伝子に関しても、ノックアウトマウスの解析を通じて機能解析を行っており、今回は、*Sirh11/LZcchc16* がノルアドレナリン (NA) の量の制御を通じて脳の認知機能に関わることを種々の行動試験 (図 1) および脳内の神経伝達物質の定量

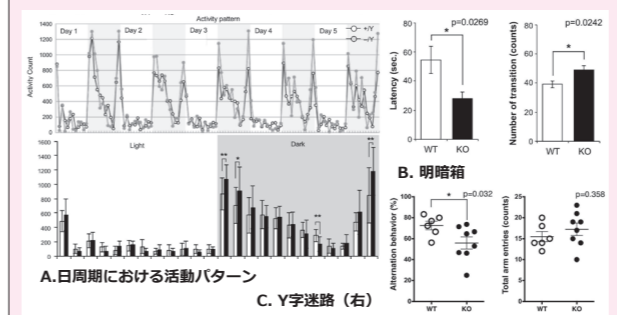


図 1 *Sirh11/Zcchc16* ノックアウト (KO) マウスの行動異常
Sirh11/Zcchc16 遺伝子は成体の脳、腎臓、生殖巣 (精巣、卵巣) で発現している。KO マウスの生育、妊性、生殖率は正常であり、腎臓機能にも問題は見られなかった。しかし、飼育環境下において行動の異常が観察されたことから、網羅的な行動解析を行った。オープンフィールドテストでは異常はなかったものの、ホームケージアクティビティテスト (A) では暗期直後と明期直前の行動量が常に高く、明暗箱 (B) では明所に出るまでの時間の減少と往復回数の増加、Y 迷路 (C) では正解率の低下が見られた。これらは新規環境への対応に障害があると考えられ、認知機能の問題と考えられた。

業績目録

原著論文

- Kagami M, Kurosawa K, Miyazaki O, Ishino F, Matsuoka K, Ogata T. Comprehensive clinical studies in 34 patients with molecularly defined UPD(14)pat and related conditions (Kagami-Ogata syndrome). Eur J Hum Genet 23(11), 1488-1498 (2015).
- Ito M, Sferruzzi-Perri AN, Edwards CA, Adalsteinsson BT, Allen SE, Loo T-H, Kitazawa M, Kaneko-Ishino T, Ishino F, Stewart CL and

- Ferguson-Smith AC. A trans-homologue interaction between reciprocally imprinted miR-127 and *Rtl1* regulates placenta development. Development 142(14), 2425-2430 (2015).
- Ono R, Ishii M, Fujihara Y, Kitazawa M, Usami T, Kaneko-Ishino T, Kanno J, Ikawa M and Ishino F. Double strand break repair by capture of retrotransposon sequences and reverse-transcribed spliced mRNA sequences in mouse zygotes. Sci Rep. 5:12281 (2015).
- Irie M, Yoshikawa M, Ono R, Iwafune H, Furuse T, Yamada I, Wakana S, Yamashita Y, Abe T, Ishino F* and Kaneko-Ishino T*.

Cognitive function related to the *Sirh11/Zcchc16* gene acquired from an LTR retrotransposon in eutherians. PLoS Genet 11(9):e1005521 (2015).

総説

- Kaneko-Ishino T and Ishino F. Mammalian-specific genomic functions: Newly acquired traits generated by genomic imprinting and LTR retrotransposon-derived genes in mammals. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 2015;91(10):511-538.

解析 (図 2) から明らかにした。大変興味深いことに、この遺伝子は他の多くの *Sirh* 遺伝子同様に真獣類に広く保存されているが、南米に生息する異節類 (アルマジロやナマケモノ) では、多くの変異が入ることで偽遺伝子化している。これは遺伝子として真獣類の共通祖先に獲得された後、系統特異的に機能した遺伝子ということになり、真獣類の多様化に関与した遺伝子の一つとも考えられる (図 3)。

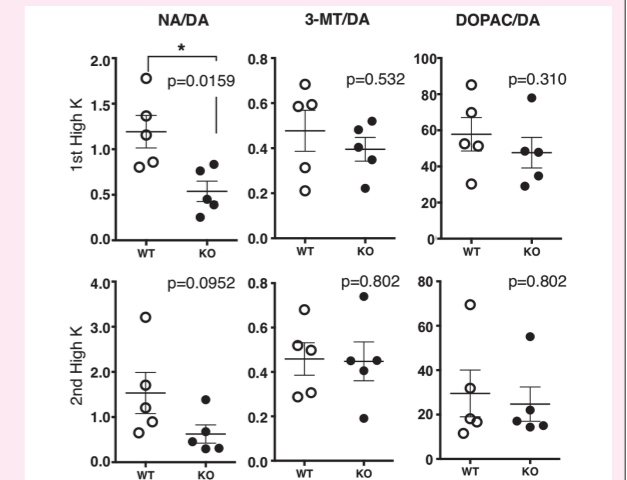


図 2 *Sirh11/Zcchc16* は脳内ノルアドレナリン量の調整にかかわる大脳皮質における各種神経伝達物質量を、脳内にプローブを挿入して定量したところ、ダイアリシス法ドーパミン (DA) の代謝産物の一つであるノルアドレナリン (NA) 量が優位に低いことが明らかになった。図では DA との量比で示してある。ノルアドレナリンは、新規物の認識や注意力上昇に機能するホルモンとして知られており、KO マウスの示す行動異常をうまく説明する。3-MT: 3-methoxytyramine, DOPAC: 3, 4-dihydroxyphenylacetic acid. NA, 3-MT, DOPAC は DA の代謝産物。

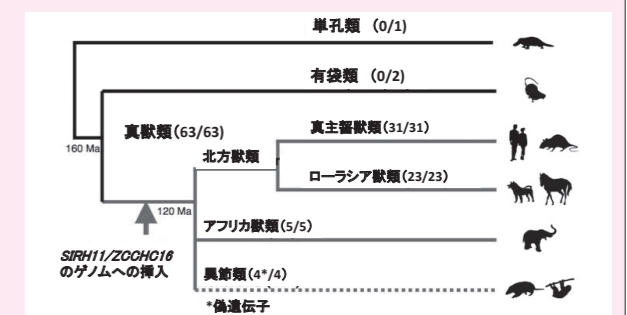


図 3 *Sirh11/Zcchc16* の真獣類 4 大グループにおける分布
Sirh11/Zcchc16 に相同性を示す DNA 配列は真獣類を構成する 4 つの主要グループ (真主嚙獣類、ローラシア獣類、アフリカ獣類、異節類) の全てに確認される。しかし、南米に生息する異節類では *Sirh11/Zcchc16* のコードするタンパク質はストップ変異やフレームシフト変異により完全に機能を失っていると考えられる。すなわち、真獣類の共通祖先で獲得された *Sirh11/Zcchc16* は異節類を除く 3 つの主要グループにおける脳機能の進化に貢献したと考えられる。

ゲノム応用医学研究部門 医科学数理分野

教授：角田達彦 講師：重水大智 助教：宮 冬樹

研究内容

革命的に進展中のゲノム・オミックス観測技術を医学応用すること、特にそれらを用いて個別化医療を推進することが、期待されています。従来の治療法では個々の患者を十分には見ることができませんでした。しかし、患者の個人間の多様性を診断し、各患者に合わせた適切な種類と量の治療を施すことや、健康な状態からの発症の予防を実現することが必要です。本研究分野では、そのような医科学の課題を、数学や計算科学を使って克服します。現在、病院等の医療機関から、ゲノム・オミックスデータ、臨床情報など、医療・医学のビッグデータが蓄積されつつありますが、それらからデータマイニングを行うことで、がんや生活習慣病、神経変性疾患をはじめとする難病の原因を発見します。次に、分子プロフィールに基づくクラスタリングにより病気を分類し、また疾患メカニズムを全体のシステムとして理解します。このような形で、ゲノム・オミックスデータや臨床情報に基づく、発症や進行の知見が蓄積されます。そして、機械学習等の方法論を用いて、新しい患者の来院時に、患者ごとに、適切な治療法や予防法の予測を行うことが、各医療機関で実現できるようになります。

研究紹介

1. 医学・医療における臨床・全ゲノム・オミックスのビッグデータの解析に基づく疾患の原因探索・亜病態分類とリスク予測の研究 (科学技術振興機構 CREST)

オーダーメイド医療の確立をめざし、オミックス・臨床データと分子DBを統合してビッグデータを構成し、最先端の統計学・情報学を駆使した統合解析、そして医療ビッグデータの解析基盤を支える解析技術の開発研究を行っています。その計画は、①ビッグデータの標準化と統合、管理、②疾患の複合因子の探索、③疾患の亜病態分類、④個人毎の病態・治療応答性の予測、からなります。データのリソースは、①全ゲノムデータと臨床情報を持つバイオバンク、②がん患者の多層オミックスと臨床情報、③肝がん全ゲノム配列と臨床情報、④薬剤投与例の豊富な肝炎ゲノム前向き観察コホート、⑤薬剤投与経過の詳細なりウマチ前向き観察ゲノム時系列コホート、などです。背景として、個々の患者での医薬品の適

正使用、医療費削減、薬害防止に必要な、日本人のためのオーダーメイド医療と先制医療の実現と、新規治療標的開発という社会的・経済的課題があります。また、遺伝的多様性や環境因子を持つ、オミックス・臨床データの、非構造的で雑然としたデータからのマイニングや、単層解析や複合因子の検出力の限界の打破が必要です。本学では、これらの新たな解析手法を提案しています (Lyons J. et al. *J. Theor. Biol.* 2016; Sharma R. et al. *IEEE Trans Nanobioscience* 2015)。それらの手法をもとに、平成27年は、実データ解析を主に理化学研究所にて行い、肝内胆管がんの解析 (Fujimoto A. et al. *Nature communications* 2015) や、肝がん300例のオミックスプロファイルによるクラスタリング結果と予後などの臨床情報との強い相関が見いだされるなど、成果が見いだされています。

2. QT延長症候群の新規原因遺伝子候補の発見

QT延長症候群は、突然死を引き起こす可能性がある難治性の遺伝性不整脈疾患で、約2,000人に1人の頻度で発症することが知られています。これまでに少なくとも15種類の原因遺伝子が報告されていますが、約2割の患者は既知の原因遺伝子に変異が認められません。そこで私たちは、既知の原因遺伝子に変異が認められなかった発端者とその血縁者120例と、その血縁に属さない発症者138例の計258例に対して、次世代シーケンサーとスーパーコンピュータを用いて全エクソームシーケンズ解析を行い、新たな原因遺伝子の同定を試みました。その結果、11種の新たな原因遺伝子の候補を同定できました。中でも、カルモジュリン結合遺伝子がQT延長症候群の発症に関与している可能性を明らかにしました (Shigemizu, D. et al. *PLoS ONE* 2015)。

3. 最新エクソーム濃縮キットの性能比較

現在、疾患原因遺伝子の探索などに全エクソームシーケンズ解析が活用され、ロシユ社の「SeqCap EZ (v3.0)」、イルミナ社の「Nextera Rapid Capture Exome (v1.2)」、アジレント社の「SureSelect XT (v5)」(アジレント社XT)、「SureSelect QXT (v5)」(アジレント社QXT)の4種類のエクソーム濃縮キットがよく利用

されています。しかしながら、この最新のエクソーム濃縮キットに対する性能比較解析は行われておらず、どの解析にどのキットを用いるのか、判断が困難です。そこで私たちは、最新の4種類のキットに対して、①ターゲット領域、②ターゲット領域の濃縮率、③シーケンズの読みの深さの均一性、④遺伝子コード領域の変異同定数、⑤既知疾患関連変異のシーケンズカバー率に着目し、性能比較をしました (Shigemizu, D. et al. *Scientific Reports* 2015)。この解析結果は、今後のエクソーム解析を実施する研究者の一助になることが期待されます。

4. 先天性疾患の原因遺伝子の探索と同定

近年私たちは先天性の神経疾患 (小頭症、皮質形成異常症、水頭症、脳梁欠損症、小脳形成不全、巨脳症、等) および難聴の疾患原因変異の探索および同定と臨床診断への応用を目指し、日本各地の主に小児科の病院と研究

機関との間でコンソーシアムを立ち上げました。実験解析手法としては疾患関連の原因あるいは候補として知られる遺伝子をターゲットとした targeted resequencing、または全遺伝子の exon 領域をターゲットとした whole-exome sequencing (WES) の手法を用いて次世代シーケンサー (NGS) で読解を実施し、バイオインフォマティクス手法を駆使した解析パイプラインも開発しました。NGSのcall精度として偽陰性率0.021%、疑陽性率0.064%にて高精度に検出できることを確認しました。これまで約500検体 (約170家系) について解析を実施し、多数の新規を含む疾患原因変異の同定に至り、新規変異に関しては in vitro 細胞培養系等での機能解析により変異タンパク質の機能の変調についても複数実証しました。2015年度だけで本研究テーマからの論文を7報 (Okamoto N., Miya F., et al. *Clin. Genet.* 88, 288-292 (2015) 等) 報告しました。

ハイライト

通常の次世代シーケンズ解析では同定が困難な検体の疾患原因変異の探索法の開発

WESは疾患の原因変異探索に非常に有用な手法ですが、実際の同定率は世界的に25%程度と言われ、実際に我々の研究でも同定率は約35%程度で、候補すら残らない検体が20%ほど存在しました。市販品のWESキットではタンパク質コード領域 (CDS) の10%程度が実はシーケンズできておらず、既知の疾患原因変異の9割程度がCDS領域に存在することを鑑みると、CDSの読み逃しが原因の一つとして考えられました。そこで我々は、既存のWESに加え、selective circularization-based target enrichment法と呼ばれる手法を組み合わせる方法を確立させ (CCCS法)、CDS領域のカバー率を上げるプローブを構築し、最終的に97%以上のCDS領域のシーケンズが可能となりました (Miya F. et al. *Sci. Rep.* 5, 9331 (2015))。既存のWESでは何も候補が残らなかった7家系に対してCCCS法で、1家系以上について疾患原因変異を新たに同定することに成功しました (図参照)。さらに我々は新規の解析手法を開発中で、最終的に

WESデータでの疾患原因変異同定率を50%程度まで引き上げることを目指しています。

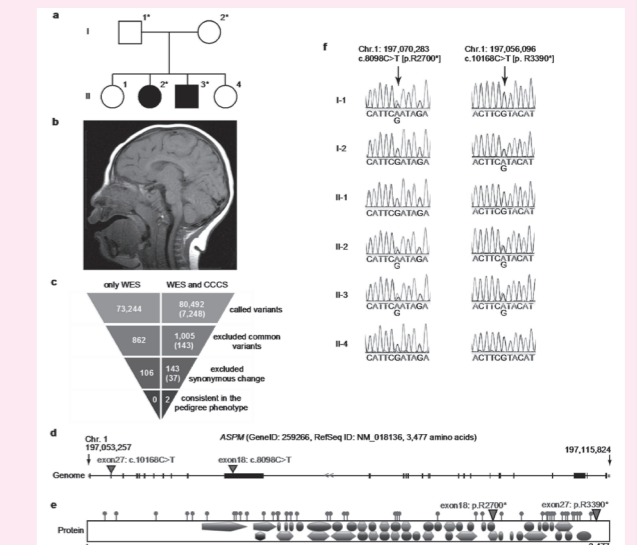


図 CCCS法により疾患原因変異が同定できた小頭症家系。(a)小頭症家系の家系図。(b)小頭症患者のMRI。(c)WESとCCCS法の統合解析による候補変異の絞り込み結果数。(d)WESとCCCSの統合解析により同定されたASPM遺伝子上の2つの変異 (compound heterozygote) の遺伝子上の位置。(e)同、タンパク質上の位置とドメイン (色付きの図形がデータベースに登録されているドメインを示す)。赤丸ピンは既知の疾患原因変異の場所で、赤三角が今回見つかった変異箇所。(f)サンガーシーケンズによる確認実験結果。

研究目録

- James Lyons, Kuldip K Paliwal, Abdollah Dehzangi, Rhys Heffernan, Tatsuhiko Tsunoda, Alok Sharma. Protein fold recognition using HMM-HMM alignment and dynamic programming. *J. Theor. Biol.* 2016.03; 393 67-74.
- Maki Morishita, Tomoki Muramatsu, Yumiko Suto, Momoki Hirai, Teruaki Konishi, Shin Hayashi, Daichi Shigemizu, Tatsuhiko Tsunoda, Keiji Moriyama, Johji Inazawa. Chromothripsis-like chromosomal rearrangements induced by ionizing radiation using proton microbeam irradiation system. *Oncotarget*. 2016.02;
- Atsuko Konta, Kouichi Ozaki, Yasuhiko Sakata, Atsushi Takahashi, Takashi Morizono, Shinichiro Suna, Yoshihiro Onouchi, Tatsuhiko Tsunoda, Michiaki Kubo, Issei Komuro, Yoshinobu Eishi, Toshihiro Tanaka. A functional SNP in FLT1 increases risk of coronary artery disease in a Japanese population. *J. Hum. Genet.* 2016.01;
- Ronesh Sharma, Abdollah Dehzangi, James Lyons, Kuldip Paliwal, Tatsuhiko Tsunoda, Alok Sharma. Predict Gram-Positive and Gram-Negative Subcellular Localization via Incorporating Evolutionary Information and Physicochemical Features Into Chou's General PseAAC. *IEEE Trans Nanobioscience*. 2015.12; 14 (8): 915-926.
- 角田 達彦. 医科学におけるビッグデータ解析と数理研究 臨床免疫・アレルギー科. 2015.12; 64 (6): 565-571.
- Akihiro Ito, Tadahiro Shimazu, Satoko Maeda, Asad Ali Shah, Tatsuhiko Tsunoda, Shun-Ichiro Iemura, Toru Natsume, Takafumi Suzuki, Hozumi Motohashi, Masayuki Yamamoto, Minoru Yoshida. The subcellular localization and activity of cortactin is regulated by acetylation and interaction with Keap1. *Sci Signal*. 2015; 8 (404): ra120.

ゲノム応用医学研究部門 フロンティア研究室 遺伝子発現制御学

准教授：黒柳秀人 プロジェクト助教：山崎裕美子
特任助教：ハサン・シャーミン

研究紹介

ヒトを含む真核生物では、転写された RNA がプロセシングを経て成熟 mRNA となることから、転写後プロセシングの選択的な制御により、ひとつの遺伝子からでも必要に応じて多様なタンパク質が産生されている。ヒトではタンパク質遺伝子の実に 9 割が複数の成熟 mRNA を産生することが明らかになっている。また、ヒトの疾患の原因として報告される変異のうちタンパク質の機能に影響しないものには、mRNA の転写後プロセシングに大きく影響するものが多いことが報告されている。したがって、転写後プロセシング制御機構の解明は、これまでによく研究されてきた転写調節に勝るとも劣らない重要な遺伝子発現制御機構であり、個人ゲノムの解読が進む今後の疾患研究において重要性がますます高まっていくと予想される。当研究室では、DNA から転写された mRNA 前駆体が組織特異的・発生段階依存的にプロセシングされて多様な成熟 mRNA となるための「細胞暗号」の解明を目指して研究を展開している。

1. 蛍光選択的プロセシングレポーターによる組織特異的・発生段階依存的選択的プロセシング制御機構の解明

mRNA プロセシングの制御機構を生体内で解析するために、当研究室では、複数の蛍光タンパク質を用いてミニ遺伝子を構築し選択的プロセシングパターンを 1 細胞レベルで可視化するレポーター系を開発した (Nat Meth, 2006; Nat Protoc, 2010)。

このレポーター系を利用して、(1) 線虫の FGF 受容体遺伝子 *egl-15* の筋特異的なエクソン選択性を可視化し、RBFOX ファミリー RNA 結合タンパク質 ASD-1 および FOX-1 と筋特異的 RNA 結合タンパク質 SUP-12 が協働して筋芽細胞のスプライシングを制御することで FGF 受容体のリガンド特異性の制御に関わることを見出した (Nat Meth 2006; Mol Cell Biol, 2007)。(2) 線虫のコラーゲン遺伝子 *let-2* の発生段階依存的なエクソン選択性を可視化し、発生段階依存性の制御因子として STAR ファミリー RNA 結合タンパク質 ASD-2 を同定した。さらに、選択的スプライシングによる mRNA 前駆体の運命決定に重要なイントロン除去の順序を明らか

にした (Genes Dev, 2008; Nat Protoc, 2010)。(3) 線虫の 2 種類のコフィリンをコードする *unc-60* 遺伝子の筋特異的な mRNA プロセシングパターンの切り替えを SUP-12 と ASD-2 が協働して制御することを見出した (PLoS Genet, 2012)。(4) 線虫の V-ATPase の α サブユニットをコードする *unc-32* 遺伝子の 2 組の相互排他的エクソンが組織特異的に選択されることを示し、両組の神経系特異的エクソンの選択に必須な制御因子として神経系特異的 CELF ファミリー RNA 結合タンパク質 UNC-75 を同定した (PLoS Genet, 2013)。また、線虫の相互排他的選択的エクソンについて、選択性や構造の網羅的な解析を行い、特徴を明らかにした (Worm, 2014)。

これらの研究で同定した線虫のスプライシング制御因子は哺乳類に相同遺伝子が存在することから、選択的スプライシングによる遺伝子発現制御機構が進化的に保存されていることが明らかとなりつつある。

2. トランスクリプトーム解析による選択的スプライシング制御因子の標的遺伝子の網羅的探索

上述の研究で得られた選択的スプライシング制御因子の変異体線虫と野生型線虫の mRNA を大規模シーケンス解析して生物情報学的手法で比較することにより、選択的スプライシングパターンに差がある遺伝子を網羅的に探索し、制御因子の標的遺伝子の同定を行っている。これまでに、UNC-75 の制御の標的となる合計 24 個の選択的スプライシング事象を同定した。さらに、スプライシングレポーター線虫の作製により、これらの標的エクソンがさまざまな組織特異的制御を受けること、UNC-75 はシスエレメント (G/U)UGUUGUG 配列を介して神経系特異的な制御に関わること、シスエレメントの位置により影響が異なる「位置効果」(図参照)を示すことを見出した (Nucleic Acids Res, 2013)。



図 UNC-75 による選択的スプライシング制御の位置効果。標的エクソンの上流に結合するとスプライシングを抑制し、下流に結合すると促進する。NAR, 2013 より改変。

3. 2つの RNA 結合タンパク質による標的 RNA の協働的認識機構の構造生物学的解析

mRNA プロセシングを組織特異的に正確に行うためには、mRNA 前駆体の塩基配列を特異的に認識して結合しプロセシングを制御する RNA 結合タンパク質のはたらきが不可欠である。しかし、個々の RNA 結合タンパク質の RNA 結合ドメインが認識する配列は短く特異性も低いため、RNA 結合タンパク質がなぜ標的遺伝子を組織特異的に正確に制御できるのか、不明な点も多い。

当研究室では、RNA 結合ドメインを 1 つずつもつ線

ハイライト

難病基盤・応用研究プロジェクト室「難病筋疾患」 タイチン遺伝子のスプライシング異常と拡張型心筋症

拡張型心筋症は、心筋壁が薄く伸展することによって心室の内腔が拡大しポンプ機能が障害されて機能不全に陥るものであり、根本的な治療法が確立されていない。近年、拡張型心筋症患者の遺伝子解析により、心筋サルコメアを構成し筋収縮に関連するさまざまなタンパク質の遺伝子変異が相次いで報告されている。タイチンもその 1 つであり、サルコメアが伸展した際に受動張力を発揮して過伸展を防ぐ。心臓では、タイチンをコードする *TTN* 遺伝子の選択的スプライシングにより短い N2B 型とやや長い N2BA 型のタイチンが発現するが、拡張型心筋症心筋では、張力が大きい N2B 型の比率が減少し張力が小さい N2BA 型の比率が増加する。拡張型心筋症患者の約 25% で *TTN* 遺伝子の短縮変異やミスセンス変異が見つかるが、これらの変異の機能的意義は必ずしも明らかではない。一方、RNA 結合タンパク RBM20 の欠損ラットが心筋で *Ttn* 遺伝子のスプライシング異常を示して心筋症を自然発症することが近年報告された。

当プロジェクトでは、*TTN* 遺伝子の二色蛍光スプライシングレポーターミニ遺伝子を作製し、RBM20

虫の 2 つの RNA 結合タンパク質 ASD-1 と SUP-12 が線維芽細胞成長因子受容体遺伝子 *egl-15* の配列を協働的に認識する分子機構を、武蔵野大学の武蔵裕教授らのグループなどとともに明らかにした (Nat Struct Mol Biol, 2014)。この成果は、分子間で特定の塩基をサンドイッチすることにより全体として安定な複合体を形成して特定の塩基配列を認識する分子機構を初めて明らかにしたもので、今後のさまざまな RNA 結合タンパク質の組み合わせによる協働性の解析につながると期待される。

による *TTN* 遺伝子の心筋型スプライシング制御を解析する実験系を構築した。そして、拡張型心筋症患者で変異が集中して報告されている RBM20 の RSRSP 配列中の Ser635 残基と Ser637 残基がともにリン酸化されること、それが RBM20 の核移行に必須であることを見出した。

当プロジェクトのメンバーである分子病態分野の木村彰方教授らは、遺伝性心疾患関連 67 遺伝子の変異をスクリーニングするシステムを構築し、家族歴を有する拡張型心筋症患者に新たに RBM20 の R634W 変異を見出している。また、欧米人患者では、D888N、G1031X、P1081R、E1206K などのミスセンス変異やナンセンス変異が報告されている。そこで、上述のレポーターミニ遺伝子を利用して、これらの変異が RBM20 のスプライシング制御能に与える影響を順次解析中である。また、タイチンの N2B 型と N2BA 型の発現比率の変化と心筋症の因果関係の実験的に検証するための遺伝子改変マウスや、*Rbm20* 遺伝子に患者型のアミノ酸置換変異を導入するモデルマウスの作製を並行して進めている。当プロジェクトにより拡張型心筋症と *TTN* 遺伝子のスプライシング制御機構の関連が明らかになり、拡張型心筋症の病態解明や治療標的の開発につながることが期待される。

人事異動

- 4 月、渡部栄地が大学院医歯学総合研究科修士課程医歯理工学専攻に入学
- 7 月、齋藤ますみ (医学部保健衛生学検査技術学専攻) が参加 (～9 月)
- 8 月、山崎裕美子プロジェクト助教が退職
- 11 月、ハサン・シャーミン特任助教が着任

業績目録

原著論文

- 1. Takei, S, Togo-Ohno, M, Suzuki, Y, KUROYANAGI, H. Evolutionarily conserved autoregulation of alternative pre-mRNA splicing by ribosomal protein L10a. Nucleic Acids Res (2016). DOI: 10.1093/nar/gkw152.
- 3. 黒柳秀人, 渡辺要平, 鈴木稔, 萩原正敏. 線虫 CELF ファミリー RNA 結合タンパク質 UNC-75 は神経系特異的かつ位置依存的に選択的スプライシングを制御する. BMB2015 (第 38 回日本分

総説等

- 1. 黒柳秀人. 第 25 章「デコイ RNA」. 非コード RNA (廣瀬哲郎・泊幸秀編、化学同人、印刷中)

学会等講演

- 1. 黒柳秀人. mRNA 前駆体の転写とスプライシングを自己制御する因子の解析. 東京地区線虫勉強会. 東京大学浅野キャンパス, 2015 年 11 月
- 2. 山崎裕美子, 村山里枝, 大野麻理奈, 黒柳秀人. *TTN* 遺伝子の選択的スプライシングモニタリングと拡張型心筋症の創薬スクリーニング. BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会) ワークショップ. 神戸市, 2015 年 12 月
- 3. 黒柳秀人, 渡辺要平, 鈴木稔, 萩原正敏. 線虫 CELF ファミリー RNA 結合タンパク質 UNC-75 は神経系特異的かつ位置依存的に選択的スプライシングを制御する. BMB2015 (第 38 回日本分

子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会) ワークショップ. 神戸市, 2015 年 12 月

国際学会発表

- 1. Satomi Takei, Yutaka Suzuki and Hidehito Kuroyanagi. Evolutionarily conserved autoregulation of alternative pre-mRNA splicing by ribosomal protein L10a. Cold Spring Harbor Meeting on Eukaryotic mRNA Processing. Cold Spring Harbor, NY, USA, 2015 年 8 月

教育活動

黒柳秀人：大学院医歯学総合研究科、医学部保健衛生学科、東京大学非常勤講師

市民講座等

黒柳秀人：SSH 分子生物学講座「Deciphering Cellular Codes for Pre-mRNA Processing」(東京都立日比谷高校、2015 年 7 月)

プロジェクト研究室

ゲノム応用医学研究部門

准教授：窪田道典

解熱鎮痛作用のあることで有名なアスピリンの元となるサリチル酸が脳皮質聴覚野の応答にどのような効果があるのかを、純音とFM音とを用いて調べた。

記録方法として、時間的空間的な解像度にすぐれている電位感受性色素を用いたオプティカルイメージング法を適用し、左右のモルモット脳皮質から純音およびFM音の応答を記録した。刺激には、純音（0.5 kHzおよび16.5 kHz）と0.5 kHz–16.5 kHzのFM音を用い、持続時間を16–160 msの間で変化させた。実時間オプティカルイメージング法のために、蛍光性電位感受性色素であるRH795を用いて染色した後、左右の一次聴覚野（AI野）から記録を行った。サリチル酸投与前と投与後（200 mg/kg）8時間経過した動物を用い、各等周波数帯における応答の強さを計測した。

0.5 kHzの周波数の純音を与えた時には、応答ピークの強さは、40 msと160 msの持続時間で強かった。また、0.5 kHzの等周波数帯における応答強度は、刺激の持続時間に関係なく、他の等周波数帯の応答強度よりも強かった。FM音を与えた時には、16 kHzの等周波数帯において、16 msの持続時間の時に最も強い応答を示した。この時、16 kHzの等周波数帯と他の等周波数帯とのピーク強度の差は、上昇FM音を与えた時の方が下降FM音を与えた時より大きかった。この結果は、サリチル酸投与前と投与後とで同様であった。

しかし、FM音を与えた時には、持続時間16 msの時に最も強い応答を示した後、ピーク強度は持続時間の増大に伴い減少した。この減少は、サリチル酸投与前では、持続時間40 msまで減少したが、サリチル酸投与後では、減少は持続時間64 msまで続いた。

業績目録

Hosokawa Y, Kubota M, Sugimoto S, Horikawa J.

Salicylate-induced neural changes of the FM function in the primary auditory cortex of guinea pigs observed by optical recording. J Physiol Sci. Vol. 65, Suppl. 1, S262(2015).

難病基盤・応用研究プロジェクト室 大学院教育研究支援実験施設

難病基盤・応用研究プロジェクト室

プロジェクト室長：木村彰方

難病基盤・応用研究プロジェクト室は以下の5研究プロジェクト室で構成した。

研究課題名	研究チーム 氏名(所属部門・分野・職) ○研究代表者、*専任助教
【難病 IBD 研究プロジェクト】 炎症性腸疾患(クローン病・潰瘍性大腸炎)を対象とする創薬開発研究	○清水重臣(難治病態・病態細胞生物・教授) 樗木俊聡(先端分子・生体防御学・教授) 木村彰方(難治病態・分子病態・教授) 櫻井大祐(難治病態・分子病態・助教) 荒川聡子(難治病態・病態細胞生物・助教) 浅野純平(先端分子・生体防御学・特任助教) *中西祐輔(プロジェクト専任助教)
【難病筋疾患研究プロジェクト】 RNA制御に着目した拡張型心筋症と顔面肩甲上腕型進行性筋ジストロフィーの病態解明	○木村彰方(難治病態・分子病態・教授) 黒柳秀人(ゲノム応用・遺伝子発現制御学・准教授) 田中裕二郎(ゲノム応用・遺伝生化学・准教授) 林 文晴(難治病態・分子病態・准教授) 森岡勝樹(ゲノム応用・生命情報学・助教)
【難病低酸素性乳がん研究プロジェクト】 乳がんの悪性化に働く低酸素エピジェネティクスの分子機構の解析	○中山 恒(先端分子・低酸素生物学・准教授) 三木義男(ゲノム応用・分子遺伝・教授) 石野史敏(ゲノム応用・エピジェネティクス・教授) 澁谷浩司(先端分子・分子細胞生物学・教授) 山口登喜夫(難治病態・プロジェクト研究室・准教授) *楠 康一(プロジェクト専任助教)
【難病がんエピゲノム研究プロジェクト】 エピゲノム解析のための新技術開発	○幸田 尚(ゲノム応用・エピジェネティクス・准教授) 石野史敏(ゲノム応用・エピジェネティクス・教授) 井上 純(ゲノム応用・分子細胞遺伝学・准教授) *川崎佑季(プロジェクト専任助教)
【難病迅速診断開発研究プロジェクト】 簡便・迅速な網羅的遺伝子検査系の確立	○清水則夫(難治病態・フロンティア准教授→再生医療センター・准教授) 森尾友宏(本学医学部・小児科・教授) 新井文子(本学医学部・血液内科・助教) 谷本幸介(ゲノム解析室・助教)

各研究プロジェクト室の概要は以下の通りである。なお、難病筋疾患研究プロジェクトおよび難病低酸素乳がん研究プロジェクトの主要な研究概要は、ゲノム応用医学研究部門フロンティア研究室(遺伝子発現制御学)および先端分子医学研究部門フロンティア研究室(低酸素生物学)にそれぞれ記載している。

難病 IBD 研究プロジェクト (炎症性腸疾患(クローン病・潰瘍性大腸炎)を対象とする創薬開発研究)

研究内容

炎症性腸疾患(IBD)は腸管に炎症を引き起こし長期に下痢・血便が続く慢性疾患の総称で、潰瘍性大腸炎とクローン病の2疾患からなり、厚生労働省により、特定疾患(難病)に指定されている。本研究プロジェクトは、IBDの病態形成メカニズムの解析と本疾患を対象とした創薬開発を目的としている。

研究紹介

腸管上皮のバリアー機能の破綻は、腸内常在細菌の生体への侵入を介して過剰な免疫応答を惹起する。この腸内常在細菌に対する過剰な免疫応答がIBDの病態形成において重要な役割を果たしていることが示唆されている。即ち、遺伝的な背景により自発的に腸炎を発症するマウスにおいても、そのマウスを無菌化あるいは抗生物質を投与することにより、その発症を抑制することが可能であることが知られている。

我々の研究グループでは、デキストラン硫酸塩誘導性

IBDモデルを用い、腸内常在細菌に対する過剰な免疫応答が惹起されるメカニズムについて解析を行なっている。炎症性サイトカインTNF- α は代表的なIBD増悪因子であり治療標的の1つでもあるが、我々は、TNF- α を産生する主な免疫細胞は炎症性単球・マクロファージであることを明らかにした(*Mucosal Immunol* 2015)。重要なことに、選択的にグラム陽性細菌を除去する抗生物質バンコマイシンを前投与すると、上記IBDモデルにおける炎症性単球・マクロファージの大腸組織への浸潤が抑制され、IBDの指標である体重減少、腸組織像などが改善した。更に、16S rRNA解析より、バンコマイシン処置によって減少するグラム陽性細菌の主体はLachnospiraceaeであることが明らかとなり、同菌が大腸上皮細胞に作用することによって、炎症性の単球・マクロファージを大腸炎症局所へ浸潤させるケモカインの産生が誘導されことを示唆した。

これらの知見は、IBD発症に関して従来のGWAS等から示唆されている遺伝的要因に加え、環境因子としての腸内常在性グラム陽性細菌の重要性を示すものである。また、これらの研究から、単球およびマクロファージの浸潤と炎症サイトカインの産生がIBDの病態形成において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。現在、これらの細胞を制御することによる、新たなIBDの治療戦略を検討している。

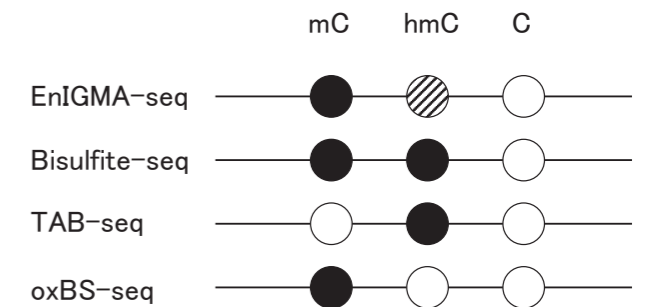
業績

Nakanishi Y, Sato T, and Ohteki T. Commensal Gram-positive bacteria initiates colitis by inducing monocyte/macrophage mobilization. *Mucosal Immunology* 2015.152-60.

難病がんエピゲノム研究プロジェクト (難治性のがんをはじめとした細胞のエピゲノム解析のための新技術開発)

難治性のがんの研究をはじめとして医学、生物学の幅広い分野においても、遺伝子発現調節の要であるエピゲノムの正確な情報を得ることは常に必要とされており、DNAのシトシンメチル化修飾の解析はその大きな柱の一つである。近年メチルシトシン(mC)がTet酵素によってヒドロキシメチルシトシン(hmC)に酸化されること、これが脱メチル化過程の重要な中間体であることが明らかにされ、さらにhmC自身も転写調節に重要な役割を担っていることを示唆する報告が増えている。従ってこれからのシトシン修飾解析は、hmCを含めた実験系に移行する必要がある。そこで、本プロジェクトではmC、hmC、及び非修飾のシトシン(C)を同時に1塩基単位で同定する新しい原理に基づく実験法を開発するとともに、この手法をがん細胞のエピゲノム解析に適用することで、酸化修飾シトシン塩基の意義を明らかにすることを目指して研究を行ってきた。

我々が考案した新手法(Enzyme-assisted Identification of Genome Modification Assay: EnIGMA)はmC、hmC、Cそれぞれを95%という高い精度で解析できるだけでなく、図に示すように3つのシトシン修飾状態を同一分子上で1塩基解像度で解析できる画期的な手法である(1, 投稿中)。EnIGMA法については次世代シーケンサーを用いたゲノムワイドの解析への適用、さらなる同定精度の向上、微量サンプルからの解析のための高感度化を行っている。



既存のmC解析法で最もよく使われているbisulfite法ではmCとhmCを区別することができない。一方、TAB-seqやoxBS-seqではhmCのみ、あるいはmCのみを同定することはできるが、両者を同時に解析することはできない。我々が開発したEnIGMA法では複数の解析法の結果を比較することなく、同時にこれら3つのシトシン修飾状態を同定することが可能である。

また、がんのエピゲノム解析の対象として口腔扁平上皮癌におけるMIR106A-363クラスター遺伝子領域についてEnIGMA法の解析を行った。このCpG islandにおいては正常細胞株とがん細胞株の間でhmCの明らかな違いは認められなかったが、一つのCpG部位において正常細胞株及びがん細胞株のどちらにおいても37~46%と顕著に高いhmCが検出された。これは、hmC修飾がCpGアイランドの領域単位の制御ではなく、単一CpG部位の単位で行われていることを示唆している。

(1) A Novel method "EnIGMA" for the simultaneous identification of methylcytosine and hydroxymethylcytosine at a single base resolution. Yuki Kawasaki, Yukiko Kuroda, Isao Suetake, Shoji Tajima, Fumitoshi Ishino & Takashi Kohda. Submitted for publication.

難病迅速診断開発研究プロジェクト (簡便・迅速な網羅的遺伝子検査系の確立)

【目的と概要】本プロジェクトでは、マルチプレックスPCR法を応用し、ウイルス・細菌・真菌などを原因とする難治性疾患の病原因子を簡便(単純なピペティング操作のみ)・短時間(1時間以内)に同定(あるいは定量)することを可能にする新しい検査法を開発し、順次検査対象を様々な難病関連遺伝子に拡大することを目指します。完成すれば、外来受診当日に病名を確定し、適切な治療を迅速に開始することが可能になると期待されます。

【これまでの成果】

1. 先進医療 A として 3 件承認：眼感染症（ウイルス、細菌・真菌）、日和見ウイルス感染症
2. 特許出願 2 件：新規マイコプラズマ検査系、新規陽性コントロールを使用した定量系
3. 技術移転 20 件：東京大学、CiRA、大阪大学、東北大学、九州大学、山口大学など
4. キット販売 2 件：ウイルス検査キット、マイコプラ

- ズマ検査キット（平成 28 年 3 月予定）
5. 多施設共同研究：開発した眼感染症の病原体 24 種類を網羅的に検出する検査試薬を使用した全国多施設共同研究を平成 28 年度より開始予定で準備中
6. ウイルス性肝炎（9 種類）、呼吸器（20 種類）、真菌（16 種類）の網羅的検査系が作成し性能試験を実施中

大学院教育研究支援実験施設

I. ゲノム解析室

助教：谷本 幸介
技術補佐員（研究支援推進員）：伊藤 暁子
技術補佐員（研究支援推進員）：菌部知奈美
技術補佐員：福井 都代

本解析室は、難治疾患研究所の教職員・学生および難治疾患共同研究拠点の参加研究者が実施するゲノム解析研究の支援を目的としている。最新機器の原理や使用法の講習会を通じた研究者への技術紹介、知識啓蒙を行っている。さらに、日常業務として、研究所内外からのゲノム情報の受託解析を行い研究の推進を図っており年間約 4 万件の解析実績を持っている。また、所内研究者、学生が共通して利用できる研究機器を配置するとともに、各分野にある共通性の高い機器を登録したヴァーチャルラボの管理も行っている。

以下は、2015 年の実績である。

1. キャピラリーシーケンス受託シーケンスサービス、及び次世代シーケンス受託解析サービス

本年のキャピラリーシーケンス受託シーケンスサービスのサンプル依頼数は 39,489、延べ利用人数は 2,938 名であった。難研外からの依頼サンプル数は 14,267 となり、全体の 3 割を占めている。

次世代シーケンス（Ion torrent PGM）による受託解析サービスについては、本年は 27 ラン（内難研外 2 ラン）行った。2015 年 7 月よりライブラリ作製からも受託できるオプションを追加し、利用の拡大と利便性

向上をはかっている。解析についてはデータ解析を含めたサポートを行うことで、利用者の個別のニーズに対応した支援を行っている。

2. 設置機器

キャピラリーシーケンス 3130xl 2 台、次世代シーケンス Ion Torrent PGM、フローサイトメーター、発光プレートリーダー、Agilent バイオアナライザ、DNA 断片化装置 Covaris、蛍光マイクロビーズ検出システム Luminex、サーマルサイクラー 5 台、遠心機、遠心濃縮機

3. 説明会等

解析機器技術の紹介及び共通機器利用促進のため、以下の講習会を行った。

- 7 月 14 日 フローサイトメーター講習会（日本ベクトン・ディッキンソン株式会社）
- 7 月 23 日 次世代シーケンス受託解析説明会（ゲノム解析室）
- 8 月 19 日 ルミノメーター講習会（ベルトールド・ジャパン株式会社）

4. 人事異動

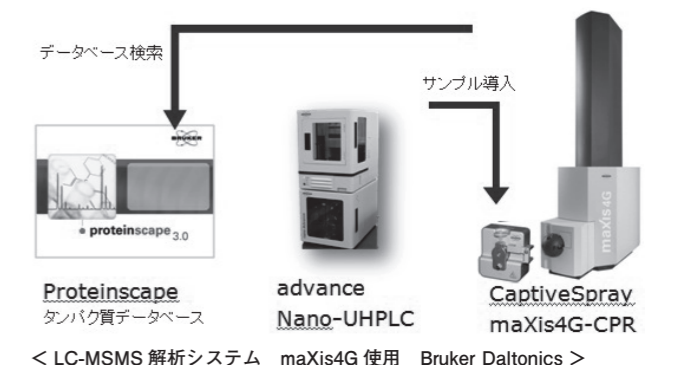
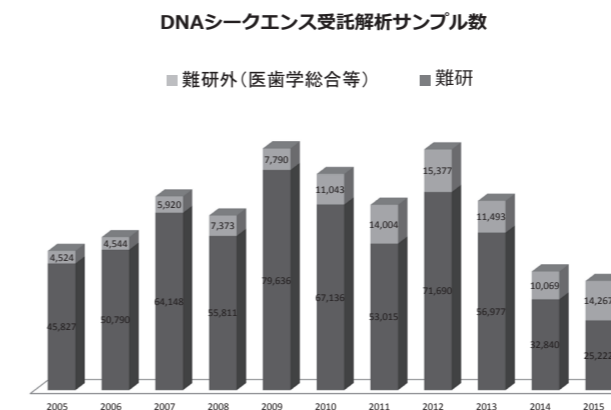
- 転出 牧谷 麗子（技術補佐員）
- 転入 福井 都代（技術補佐員）

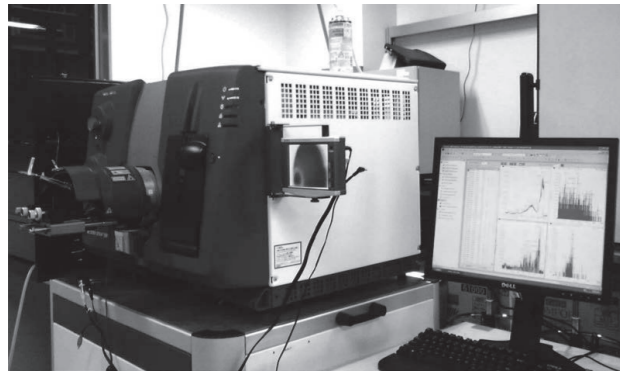
II. 細胞・プロテオーム解析室

技術専門職員：名和真希子

ホームページ <http://www.tmd.ac.jp/mri/lcpr/Top.html>

本解析室ではプロテオーム解析について、二次元電気泳動システム、質量分析計、表面プラズモン共鳴測定装置、HPLC を常備しており、様々な視点から蛋白質に対





< LC-MSMS 解析 Qtrap5500 使用 ABCIEX >

する解析を行える状況になっている。質量分析計による蛋白質の同定についての受託解析も行っている。特に本年は、新しいLC-MSMS解析システムも始動しているため、同定率の向上が期待される。また、既に学内に異なるタイプの質量分析機器が複数台稼動しており、目的蛋白質の同定・翻訳後修飾等の同定には使い分けが必要である。実際にこうした複数台の機器について、円滑に解析、利用、運営できるよう互いに連携を図っている。

Ⅲ. 遺伝子組換えマウス実験室

技術職員：宇佐美貴子

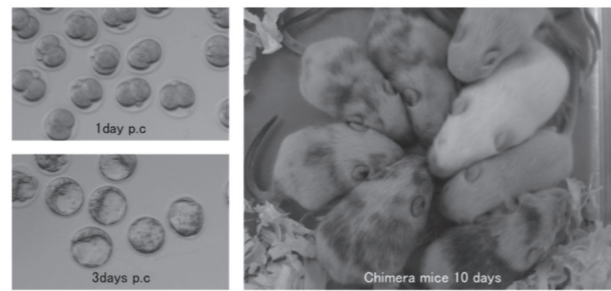
技術補佐員：石久保春美

技能補佐員：中村麻衣子

技能補佐員：木崎 未央

技能補佐員（研究支援推進員）：遠藤 由加

遺伝子組換えマウスは、遺伝子操作により外来遺伝子の導入、内在性の遺伝子を改変したマウスで、現在、医学・生命科学分野における大学院教育・研究には欠かせない材料となっている。難治疾患研究の分野においても、疾患モデルとして利用できるなど、病因や病態、新たな診断法・治療法の開発に必須である。本実験室では、技術職員および飼育専任スタッフのサポートにより、組換えマウス作成・特定微生物排除・飼育維持・胚凍結による系統保存を行うことにより、マウス個体を用いた生命



科学・難治疾患研究の教育基盤となっている。今年度からは、学内向けに、ゲノム編集技術を用いた遺伝子組換えマウス作製支援サービスも開始した。

本実験室は、難治疾患研究所の大学院教育支援施設として、教授若干名からなる運営委員会が管理・運営にあたり、新規利用者への教育、新たな組換えマウスの樹立や搬入の審査などの適正な利用をはかっている。

Ⅳ. 形態機能解析室

技術補佐員（研究支援推進員）：野村 隆之

本解析室は、所内研究者が形態学的解析を行うための共同利用施設として設置された。疾患に伴う遺伝子や蛋白質の動的変化を細胞や組織レベルにおいて経時的に解析することは、難治疾患の病態解明・診断・治療にとって不可欠な手段であり、本解析室では、遺伝子構造解析が終了したポストゲノム時代に欠かすことのない強力なツールを提供し、研究の便宜をはかっている。

具体的には、機能分子の変化をDNA、RNA、蛋白質レベルで解析することのできる共焦点顕微鏡、蛍光イメージングワークステーション、凍結マイクローム、ロータリーマイクローム、スピントッシュプロセッサ、ティッシュエンベディングセンター、定量的PCR装置、レーザーマイクロダイセクション、X線照射装置を常備している。

<<Common equipment>>

- ・ Confocal laser microscope
- ・ Fluorescence microscope
- ・ Cryostat
- ・ Rotary microtome
- ・ Spin-tissue-processor
- ・ Tissue-embedding-station
- ・ Real-time PCR
- ・ Laser microdissection
- ・ X-ray System

Ⅴ. 幹細胞支援室

技術専門職員：齊藤 佳子

技術補佐員（研究支援推進員）：豊田 麻美

ホームページ：<http://www.tmd.ac.jp/mri/scl/index.html>

難治疾患研究所の大学院教育研究支援施設のひとつ幹細胞支援室は、2009年12月に設置され、2010年に入り実質的な整備が開始された。当支援室は、組織幹細胞、胚性幹細胞（ES細胞）、iPS細胞など、組織・臓器の成り立ちの解明、疾患の理解、再生医療の開発などにおいて重要な役割を果たす幹細胞研究あるいは幹細胞由来の分化した細胞群の研究を支援するため、関連研究者が利用できる機器の整備と供用化に対応するべく活動している。その運営は、幹細胞支援室運営委員会により審議を重ねつつ、難研教授会の協力を得ながら行っている。管理スタッフは技術専門職員1名が管理業務全般を、2015年3月で退職した技術補佐員（研究支援推進員）に代わって2015年4月に着任した技術補佐員（研究支援推進員）1名が高速セルソーターのオペレーター業務を担当している。

1. 設置機器

幹細胞支援室はM&Dタワー24階において、下記の主要機器を研究者の利用に供している。本年は共焦点レーザー顕微鏡撮影システムFV10i-DOC（オリンパス）が新たに利用可能となった。

- 高速セルソーター MoFlo Legacy（ベックマンコールター）
- 高速セルソーター MoFlo XDP（ベックマンコールター）
- 共焦点レーザー顕微鏡タイムラプス撮影システムFV10i-w（オリンパス）
- 共焦点レーザー顕微鏡撮影システムFV10i-DOC（オリンパス）
- 倒立型電動リサーチ顕微鏡IX81（オリンパス）
- ハイブリオープン（TAITEC）
- 超音波破砕器（BRANSON）

2. 受託サービス

高速セルソーターMoFloによるソーティング受託サービスを2013年8月1日より行っている。利用対象者は、所内のみならず、学内他部局、および学外の研究者でも利用可能である。サービス開始以降、学内他部局の研究者の利用も増え、学外からも問い合わせを受けている。

3. 2015年の供用実績

前年に引き続き設置機器の利用提供とソーティング受託サービスを行った。共焦点レーザー顕微鏡の講習会は4、8、12月に申込者数にあわせて合計9回行った。11月にはイメージングセミナーを開催し、共焦点レーザー顕微鏡のタイムラプス利用例や実験ノウハウの紹介を行った。支援室の利用案内や講習会の開催案内、機器予約の管理は、主にホームページで行った。2015年の当支援室の利用者数はのべ471人であった。今後も利用者のニーズに合った支援室となるよう、既存の機器のバージョンアップやサービス向上等に努めていく。

Ⅵ. バイオリソース支援室

技術専門職員：小島 智子

バイオリソース支援室は、生命医科学分野における研究・教育の発展に貢献するためのバイオリソースバンクと位置付け、培養細胞株、ゲノム資源等の研究材料を提供するとともに、大学院教育・研究を支援する施設として活動を行っている。

細胞株の寄託・分譲業務は汎用性の高い有意な樹立細胞株の寄託から分譲まで一連の体制を構築し、コンプライアンス遵守した有効活用に取り組んでいる。また細胞株の安全、適切な保管維持を目指し、マイコプラズマ検査（PCR法）を実施している。リンパ球樹立業務は、免疫抑制剤の導入により安定した樹立効率を維持している。基礎的研究技術支援として、大学院生、研究初学者を対象とした細胞培養初心者講習会を開催し、血清の共同購入窓口業務も実施している。

本年は学外からのリンパ球樹立依頼に応じて、外部機関からのリンパ球樹立受託システムを産学連携研究センターと連携しながら整備して実施した。また学内からのリンパ球樹立受託も増加している。マイコプラズマ汚染検査は学内、所内から多数受託した。

Ⅶ. 構造解析支援室

構造解析支援室には、高輝度X線発生装置とイメージングプレートX線回折装置が設置されており、タンパク質や核酸などの生体高分子やそれらと低分子化合物の複合体の立体構造解析の支援を目的としている。また、タンパク質などの粒子径（ひいては会合・凝集状態）の計測が行える動的光散乱装置も導入されている。大学院の学生を対象として、装置の取り扱いやタンパク質の結晶化についての演習を行ったほか、研究所の共同研究拠点事業に参画し、学外からの利用者も受け入れている。

職員学生名簿

分子薬理学分野

教授 野田 政 樹
 准教授 江面 陽 一
 助教 伊豆 弥 生
 大学院生 川崎 真 希
 勝村 早 恵
Chantida Pawaputanon Na Mahasarakham
 林 婉 婷
 峯田 浩 司
 林 欣

分子細胞生物学分野

教授 澁谷 浩 司
 准教授 後藤 利 保
 助教 佐藤 淳
 大学院生 中里 茜
 中川 竜 弥
 研究支援員 満友 陽 子

分子神経科学分野

教授 田中 光 一
 准教授 相澤 秀 紀
 相田 知 海
 助教 石田 紗 恵
 子 大町 優 史
 大学院生 崔 万 鵬
 赵 卓 扬
 杉山 香 織
 田中 萌 子
 楠瀬 未 菜
 技術補佐員 石久保 春 美
 事務補佐員 大野 里 美

生体情報薬理学分野

教授 古川 哲 史
 准教授 黒川 洵 子
 助教 井原 健 介
 ポスドク (RPD) 児玉 昌 美
 大学院生 小泉 章 子

軽部 裕 也
 張 鵬
 劉 鏈
 伊藤 沙 季
 林英 里 奈
 杨 筱 茜
 福田 俊
 孙 溢 晗
 高橋 健 太 郎
 杉山 浩 二 子
 安東 朋 子
 木村 麗 子
 坂田 步 美
 山口 邦 子

技術補佐員

事務補佐員

幹細胞制御分野

教授 田賀 哲 也
 准教授 信久 幾 夫
 助教 榑 康 一
 連携研究員 鹿川 哲 史
 久 備前 典 久
 非常勤講師 影山 龍 一 郎
 柏木 太 一
 技術補佐員 井上 和 子
 大学院生 國分 康 博
 須藤 元 輝
 王 文 茜
 室田 吉 貴
 齋藤 清 香
 野本 駿 希
 横居 優 貴
 江石 遥 夏
 高橋 聡 美

生体防御学分野

教授 樗木 俊 聡
 講師 小内 伸 幸
 非常勤講師(さきがけ専任研究員) 佐藤 卓
 難病基盤・応用研究プロジェクト室助教 中西 祐 輔

特任助教 浅野純平
プロジェクト助教 梶田美穂子
大学院生 川村俊輔

稲澤美奈子
南出夏奈
今村周平

技術補佐員 黒田聖子
事務補佐員 始関紀彰
上岡寿子

分子構造情報学分野

教授 伊藤暢聡
准教授 伊倉貞吉
助教 沼本修孝
技術補佐員 服部美智子
大学院生 Asiya Hapaer

神経病理学分野

教授 岡澤均
准教授 田川一彦
助教 田村拓也
特任助教 藤田慶大
陳西貴
本木和美
本間秀典
補佐員 関綾子
張雪梅
佐藤しげみ
藤井幹世
大学院生 毛瑩
Juliana Bosso Taniguchi
田中ひかり
星野絵莉子

病態細胞生物学分野

教授 清水重臣
講師 荒川聡子
特任講師 辻岡政経
鳥居暁
助教 本田真也
プロジェクト助教 山口啓史
特任助教 室橋道子
申珉京
藤掛伸宏
学振特別研究員 吉田剛
秘書 深堀仁美
技術補佐員 吉野育代

大学院生 辻村恭子
桜井一
砂田麻理子

杉本夕奈
関豊和
野口沙央理
後藤佑太
中井美由紀
遠藤葉月
望月啓
特別研究学生 川田真大
卒業研究生 奥野瞭

発生再生生物学分野

教授 仁科博史
准教授 平山順一
助教 浅岡洋一
宮村憲央
技術補佐員 生江美佐子
事務補佐員 尾高慶子
田中和子
大学院生 千葉恭敬
野田英一郎
有馬誉恵
石原えりか
田村律人
YU Ruoxing
濱部凜
鹿野優佳
則信安里
清宮遼太郎
特別研究生 原崇
三浦良太

免疫疾患分野

教授 鏑田武志
准教授 安達貴弘
助教 松原直子
技術補佐員 久留主幸江
中野成子
王継揚
特任講師 赤津ちづる
特任助教 内藤宏美
事務補佐員 野本真菜
研究従事者 テインティンソー
大学院生 Medzhidov, Nazim
Feng, Yang-yang

Alborzian-Deh-Sheikh, Amin
Rengarajan, Sundararaman
高田俊太郎
Mohammad, Aslam
唐森
吉岡真代
町田惇
焦旭阳
連携研究員 長谷川美佳
助教 鈴木光浩
事務補佐員 高橋博子
特任助教 徐米多

分子病態分野

教授 木村彰方
准教授 林丈晴
助教 安健博
プロジェクト助教 成瀬妙子
事務補佐員 佐々木悦子
技術補佐員 植田由希子
大久保奈菜
非常勤講師 布田伸一
大学院生 丸山智久
大学院研究生 藍智彦
山田佳代子
吉川枝里
共同研究者 住本英樹
蒔田直昌
久場敬司
山本健
牧野伸司

幹細胞医学分野

教授 西村栄美
准教授 難波大輔
助教 松村寛行
特任助教 毛利泰彰
日本学術振興会特別研究員(SPD) 森永浩伸
プロジェクト助教 福田誠
大学院生 高田亜希
劉楠
Sally Eshiba
連携研究員 佐藤宗範
村口太一
技術補佐員 矢嶋玲子
西貝燕
難波富士緒

寺井梢
西森由里子
事務補佐員 渡邊郁

分子細胞遺伝学分野

教授 稲澤譲治
講師 井上純
助教 村松智輝
大学院生 Daniela Tiaki Uehara
Nuylan Michelle Loyola
Sujata Sakha
森下真紀
高橋寛吉
平本秀一
古澤啓子
奥田将史
外内えり奈
平林恭子
AKDEMIR BURAK

分子遺伝学分野

教授 三木義男
准教授 中西啓
助教 高岡美帆
特任助教 宮口健
大学院生 ウカル コスカン アイシュ
倉科太一
紺野真衣
清水優香
伊藤駿
梅垣麻里子
佐藤玄

分子疫学分野

教授 村松正明
准教授 佐藤憲子
助教 池田仁子
大学院生 サリア・デチャメタダグン
カウンシー・トゥー
キン・テテ・ゾー
テイ・ザ・チョウ
前田裕子
藤谷啓雄
勝田江朗
萩原純也
田村理弥
坂本大和

研 究 生 鈴木 健 司
メディナ・アブドサタル
エイ・ココ・ミン
シルバ・バベッティナット
縦 媛
坪 田 惟 里

遺伝生化分野

教 授 北 嶋 繁 孝
准 教 授 田 中 裕 二 郎
大 学 院 生 新 井 菜 月
藤 沢 晃 久
卒 業 研 究 生 酒 井 菜 摘
齊 藤 翔 太
技 術 補 佐 員 井 上 允
内 田 洋 平

エピジェネティクス分野

教 授 石 野 史 敏
准 教 授 幸 田 尚
助 教 志 浦 寛 相
特 任 講 師 李 知 英
特 任 助 教 入 江 将 仁
非 常 勤 講 師 小 林 慎
大 学 院 生 高 木 清 考
北 澤 萌 恵
松 沢 歩
黒 田 友 紀 子
細 井 勇 輔

ゲノム病理学分野

教 授 石 川 俊 平
助 教 砂 河 孝 行
加 藤 洋 人
特 任 助 教 河 村 大 輔
技 術 補 佐 員 佐 藤 玲 子
山 本 麻 未
鈴木 良 平
富 永 健
小 西 寛 城
非 常 勤 講 師 永 井 純 正
事 務 補 佐 員 田 向 美 春
大 学 院 生 藤 橋 未 希

医科学数理分野

教 授 角 田 達 彦
講 師 重 水 大 智

助 教 宮 冬 樹

フロンティア研究室低酸素生物学

准 教 授 中 山 恒
技 術 補 佐 員 江 口 加 代 子

フロンティア研究室遺伝子発現制御学

准 教 授 黒 柳 秀 人
特 任 助 教 ハサン シャーミン
技 術 補 佐 員 大 野 麻 理 奈
大 学 院 生 渡 部 栄 地

テニュアトラック研究室細胞分子医学分野

准 教 授 大 石 由 美 子
助 教 種 市 大 喜
林 晋 一 郎
特 任 助 教 早 川 清 雄
技 術 補 佐 員 星 野 由 紀 子
鈴木 裕 美
大 学 院 生 今 野 太 貴

プロジェクト研究室

准 教 授 窪 田 道 典

連携研究部門病態発現機構

客 員 教 授 宮 野 悟
井 元 清 哉

難病基盤・応用研究プロジェクト室

難病 IBD 研究プロジェクト

助 教 中 西 祐 輔

難治がんエピゲノム研究プロジェクト

助 教 川 崎 佑 季

大学院教育研究支援実験施設

ゲノム解析室

助 教 谷 本 幸 介
技 術 補 佐 員 (研 究 支 援 推 進 員) 伊 藤 暁 子
蘭 部 知 奈 美

技 術 補 佐 員 福 井 都 代

細胞プロテオーム解析室

技 術 専 門 職 員 名 和 眞 希 子

遺伝子組み換えマウス実験室

技 術 職 員 宇 佐 美 貴 子
技 術 補 佐 員 石 久 保 春 美
技 能 補 佐 員 中 村 麻 衣 子

木 崎 未 央

技能補佐員(研究支援推進員) 遠 藤 由 加

形態機能解析室

技 術 補 佐 員 (研 究 支 援 推 進 員) 野 村 隆 之

幹細胞支援室

技 術 専 門 職 員 齊 藤 佳 子

技 術 補 佐 員 (研 究 支 援 推 進 員) 豊 田 麻 美

支援室

技 術 専 門 職 員 馬 場 裕 子

バイオリソース支援室

技 術 専 門 職 員 小 島 智 子

事務部

事 務 長 坂 入 幸 雄

総 務 係 長 能 澤 一 彦

総 務 主 任 小 林 俊 彦

総 務 係 員 林 健 策

青 木 明 日 加

木 下 清 隆

事 務 補 佐 員 平 野 好 美

中 村 展 子

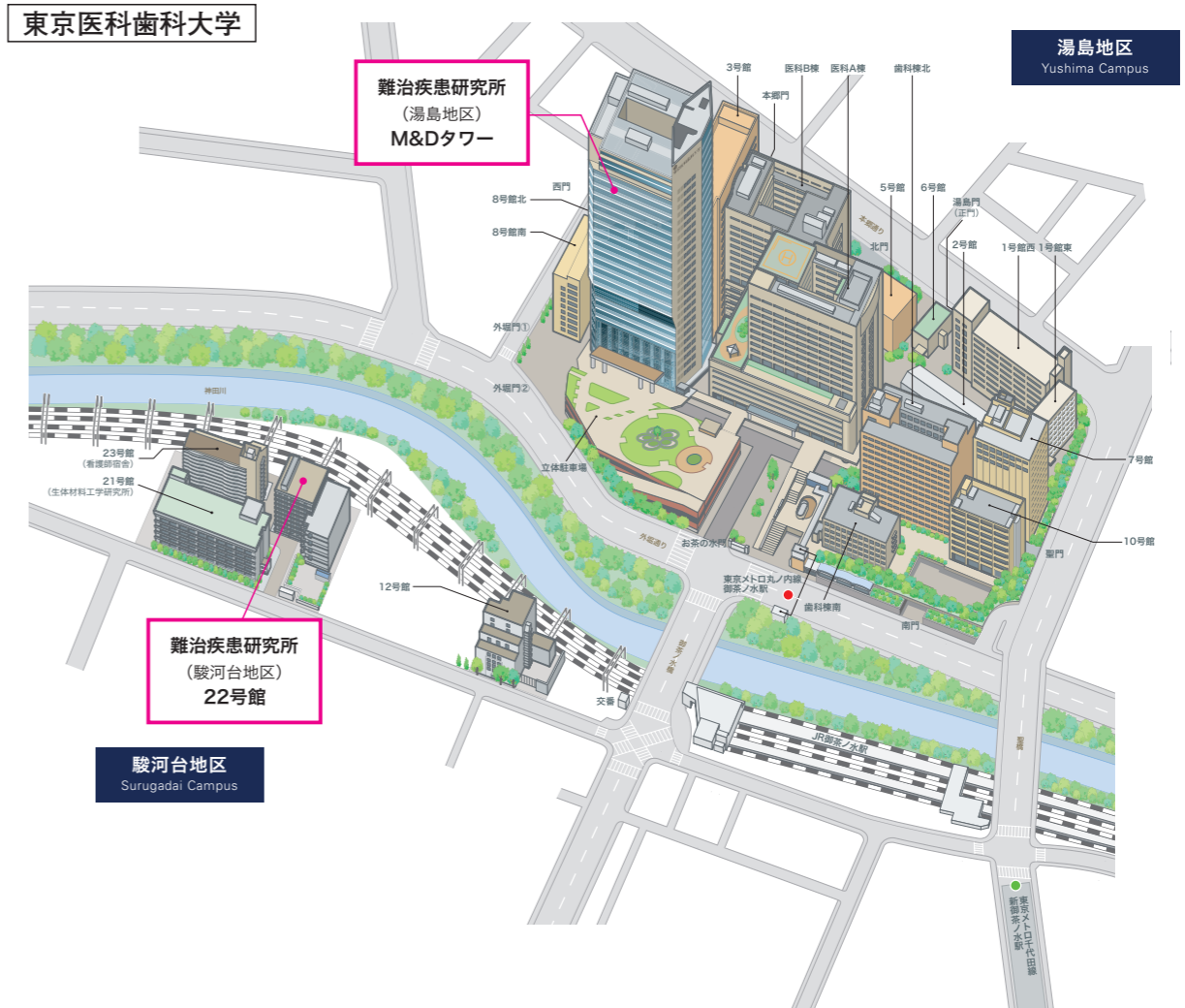
高 橋 将 貴

難治疾患研究所運営諮問委員会委員

- 郷 通子 先生 名古屋大学 理事
- 笹月 健彦 先生 九州大学高等研究院 特別主幹教授
- 田中 隆治 先生 星薬科大学長
- 谷口 克 先生 理化学研究所統合生命医科学研究センター
免疫制御戦略研究グループ グループディレクター
- 永井 良三 先生 自治医科大学長
- 中釜 斉 先生 国立がん研究センター研究所長
- 長野 哲雄 先生 東京大学創薬機構 客員教授
- 西川 伸一 先生 J T生命誌研究館 顧問

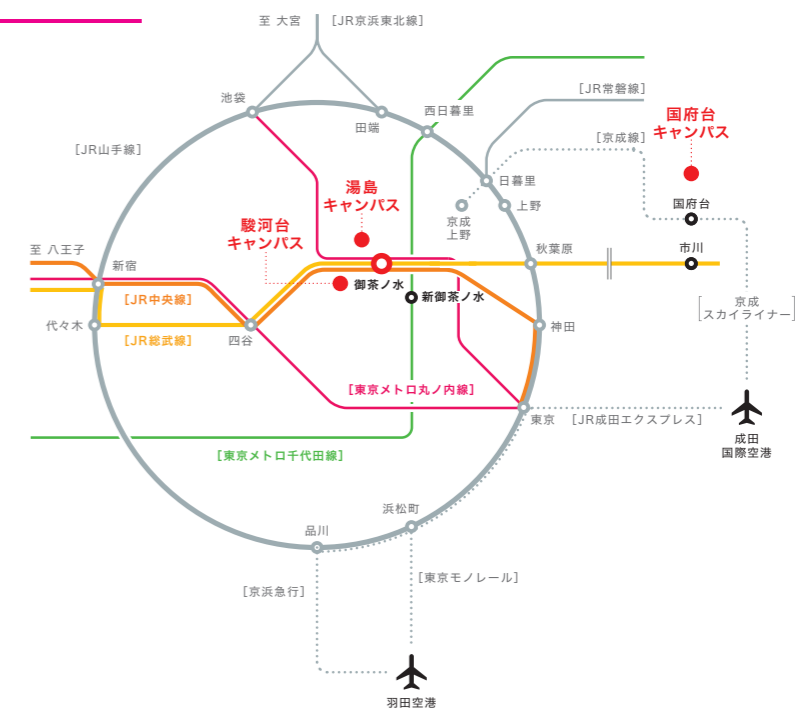
(50音順)

案内図



最寄駅

- ・JR 御茶ノ水駅
- ・東京メトロ丸ノ内線 御茶ノ水駅
- ・東京メトロ千代田線 新御茶ノ水駅



年報 2016

東京医科歯科大学難治疾患研究所

〒 113-8510

東京医科歯科大学難治疾患研究所

東京都文京区湯島 1 - 5 - 45

03(5803)4504 (代表)

印刷所 株式会社廣濟堂