

Annual Report 2015

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

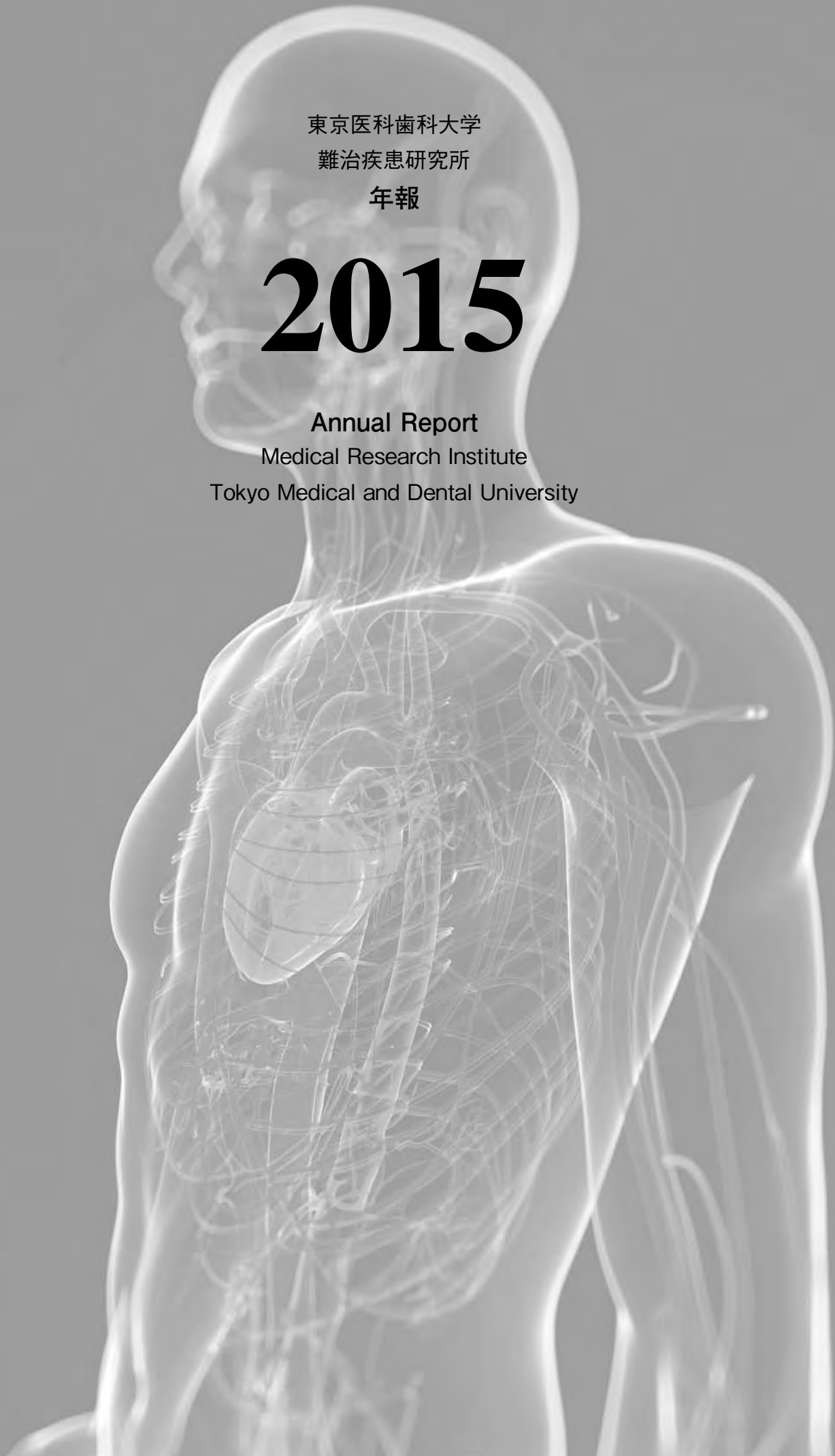
1-5-45 Yushima Bunkyo-ku Tokyo 113-8510 Japan

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

2015

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2014年1月から12月までの研究と教育等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、治療法や予防法が確立されていない難治疾患」の克服のために、最先端の基礎医学・生物学研究の成果を取り入れた研究を推進しています。この冊子をお読みいただければ、私たちが時代の要請にあわせ幅広い難治疾患にとりくんでいることをご理解いただけたと思います。この年報では、平成21年に文部科学大臣に認定された全国共同利用・共同研究拠点「難治疾患共同研究拠点」の活動状況についても記載していますので、合わせてご覧下さい。

平成23年から、本学は日本のリサーチユニバーシティの一つに選ばれており、研究所としてもいっそう研究力の強化を図って行きたいと考えております。そのため、昨年度から分野横断型の難治疾患研究の推進と若手研究者の育成のための「難病基盤・応用研究プロジェクト室」をスタートさせました。これらの活動をあわせることにより「難治疾患克服」の実現に、今後ともいっそう貢献して行きたいと考えております。

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	17～18

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. 生体防衛学分野 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. テニュアトラック研究室 細胞分子医学分野 36～37

難治病態研究部門

1. 神経病理学分野 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
7. フロンティア研究室 ウイルス治療学 52～53

ゲノム応用医学研究部門

1. 分子細胞遺伝学分野 56～57
2. 分子遺伝学分野 58～59
3. 分子疫学分野 60～61
4. 遺伝生化学分野 62～63
5. ゲノム病理学分野 64～65
6. エピジェネティクス分野 66～67
7. 生命情報学分野 68～69
8. フロンティア研究室 レドックス応答細胞生物学 70～71
9. フロンティア研究室 遺伝子発現制御学 72～73

- ・プロジェクト研究室 76～77
- ・大学院教育研究支援 実験施設 78～80

職員学生名簿	81～85
諮問委員名簿	86
案内図	87

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

分子薬理学分野、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、神経病理学分野、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、遺伝生化学分野、エピジェネティクス分野、生命情報学分野、病態細胞生物学分野、幹細胞医学分野、生体防衛学分野、ゲノム病理学分野、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、テニュ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

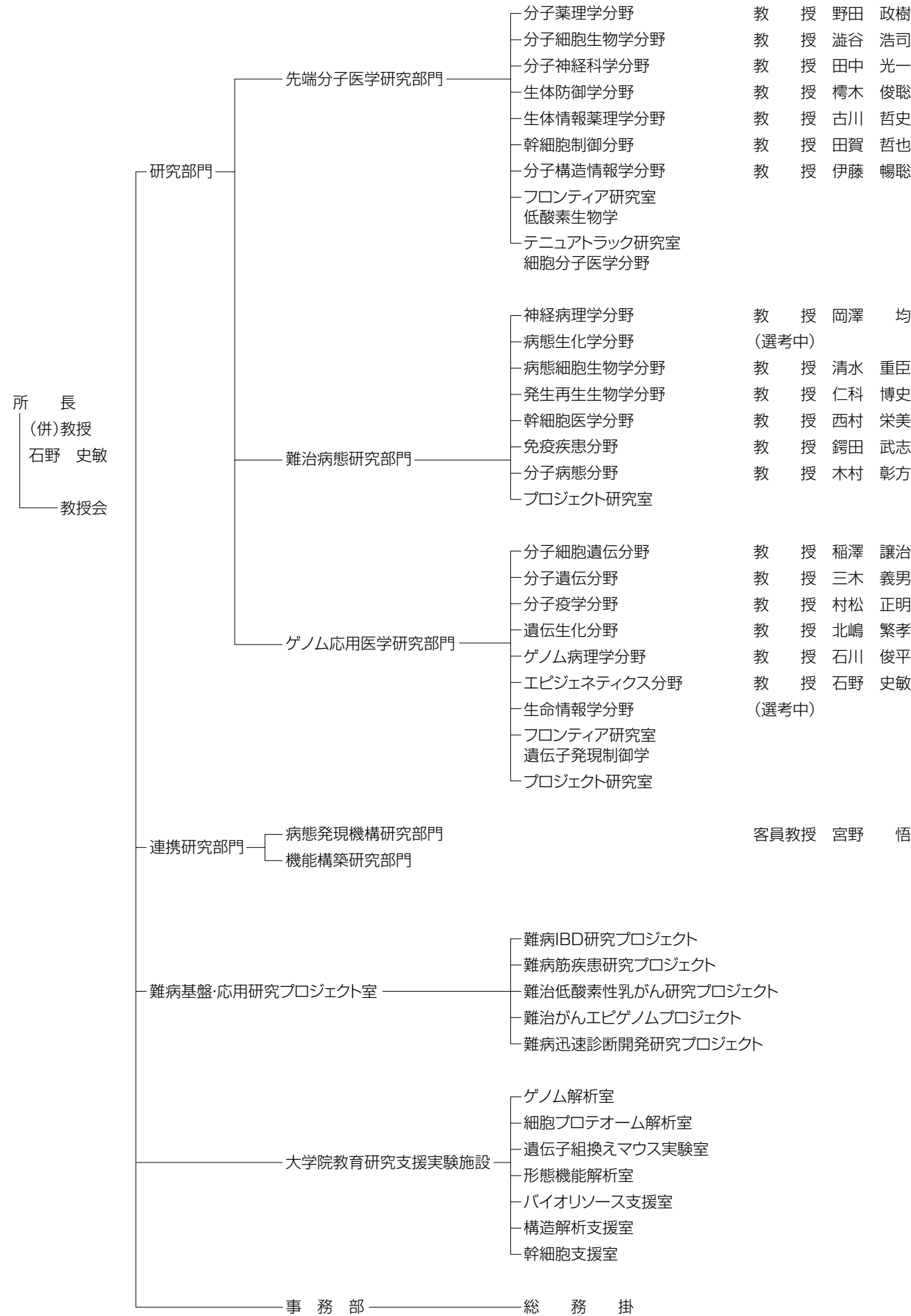
〒101-0062
東京都千代田区神田駿河台2-3-10

難治疾患研究所

分子疫学分野、フロンティア研究室ウイルス治療学、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

平成27年4月1日現在



職員及び学生数

●学生数

平成 27 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	1		
		分子細胞生物学分野	1	0	0	0		
		分子神経科学分野	3	1	2	0		
		生体防御学分野	0	2	0	0		
		生体情報薬理学分野	5	4	0	0		
		幹細胞制御分野	8	4	0	1		
		分子構造情報学分野	1	0	1	0		
		フロンティア研究室	0	0	0	0		
		難治病態研究部門	難治病態研究部門	神経病理学分野	3	2	0	1
				病態生化学分野	0	0	0	0
				病態細胞生物学分野	7	2	0	0
				発生再生生物学分野	2	1	4	0
	幹細胞医学分野			0	1	0	0	
	免疫疾患分野			3	0	6	0	
	分子病態分野			1	0	0	2	
	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	
	ゲノム応用医学研究部門			ゲノム応用医学研究部門	分子細胞遺伝分野	4	3	0
		分子遺伝分野	6		1	2	0	
		分子疫学分野	1		6	3	2	
		遺伝生化分野	4		0	3	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	
		生命情報学分野	1		14	0	2	
		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			53	44	22	9	

●職員数

平成 27 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)	事務系職員	計	
現 員	20	21	2	25	68	3	1	5	9	86

ハイライト

難治疾患研究所 40 周年記念事業

難治疾患研究所は、「難治疾患」研究を標榜するわが国で唯一の国立大学附置研究所ですが、その源流は、昭和 53 (1953) 年から昭和 44 (1969) 年にかけて本学の医学部附属研究施設として設置された 7 つの研究施設 (農村厚生医学研究施設、難聴研究施設、総合法医学研究施設、硬組織整理研究施設、遺伝病研究施設、心臓血管病研究施設、内分泌腫瘍研究施設) にあります。昭和 45 (1970) 年頃から文科省との折衝が行われ、本学ではこれらの研究施設の枠を取り除いて難治疾患研究に取り組む体制を整備することとなり、昭和 48 (1973) 年 9 月に「膠原病その他の難治疾患に関する学理及びその応用の研究」を設置目的として難治疾患研究所が設立され、17 部門 (部門は現在の分野にあたる) 体制による研究がスタートしました。

難治疾患研究所の特色の一つは、特定領域の疾患や研究に限らず、多彩な研究が実施されていることにありますが、和文では「難治疾患研究所」となっているもの、英文では「Medical Research Institute」となっていることから分かるように、発足当初から、疾患研究のみならず広く基礎医学・生命科学研究に取り組んで来た歴史があります。また、もう一つの特色は、研究組織を柔軟に改変しながら、時代の要請に応じた研究領域に取り組んで来たことですが、その走りは昭和 63 (1988 年) から平成 2 (1991) 年にかけて実施された大部門制への移行です。この際の大部門制では、7 部門 (ウイルス・免疫疾患研究部門、遺伝疾患研究部門、成人疾患研究部門、社会医学研究部門、機能・調節疾患研究部門、情報医学研究部門、神経疾患研究部門) に 20 分野とプロジェクト研究室が設置されるとともに、それぞれの部門がプロジェクト研究課題を設定し、新たな難治疾患研究体制のあり方を模索したとも言えます。その後、短期間の 2 大部門制 (11 分野構成の疾患医科学研究系 10 分野構成統合生体信号研究系) を経て、平成 16 (2004) 年には先端分子医学研究部門、難治病態研究部門、ゲノム応用医学研究部門の 3 大部門制となりましたが、この 3 大部門制への移行と併行して、平成 15 (2003) 年には生体材料工学研究所との協同で研究所を母体とする大学院である疾患生命科学部・生命情報科学教育部

を設置しました。研究部・教育部は、平成 25 (2013) 年に改組され、現在は大学院医歯学総合研究科生命理工学系専攻として医歯学系専攻とは独立した大学院教育を担っています。

難治疾患研究所は、平成 21 (2009) 年には文部科学大臣によって全国共同利用・共同研究拠点である「難治疾患共同研究拠点」に認定されており、国内外の難治疾患研究を牽引することが期待されています。一方で、本学は平成 25 (2013) 年には文部科学省の大学力強化促進事業によるリサーチユニバーシティ 22 大学・機関の 1 つに選定され、さらに平成 26 (2014) 年には文部科学省のスーパーグローバル大学 A (トップ型) 13 大学の 1 つに選ばれていることから、難治疾患研究所は、本学の研究力強化と世界で活躍する人材育成に尽力することが必要です。

難治疾患研究所の設置から 40 年を過ぎましたので、今年これを記念した事業を実施しました。その一つは、平成 26 (2014) 年 11 月 28 日に開催された難治疾患研究所 40 周年記念シンポジウムです。このシンポジウムは第 13 回駿河台シンポジウム、第 5 回難治疾患共同研究拠点シンポジウムを兼ねることとして、循環器疾患、精神神経疾患、免疫関連疾患の 3 領域をそれぞれのテーマとしたセッションを組み、各セッションでは難治疾患研究所の教授 2 名、共同研究拠点課題代表者である学外の研究者 1 名、学内他部局 (医学部もしくは生体材料工学研究所) の研究者 1 名、国外から招待した研究者 1 名の合計 5 名の演者によって最新の研究情報が提示され、



多くの意見交換が行われました (図 1)。



図 1 難治疾患研究所 40 周年記念シンポジウムのプログラム

もう一つの記念事業は、難治疾患研究所 40 年史の作成です (図 2)。40 年史は本学の広報誌である Bloom 医科歯科大の特集号として発行されますが、学長、所長、医学部長、歯学部長、生体材料工学研究所長、大学院医歯学総合研究科副研究科長 (生命理工学専攻) の挨拶に加えて、難治疾患研究所の歴史、歴代研究所長の紹介、分野名の変遷と歴代教授名の紹介ページを置き、さらに過去に在籍された教授の先生方から寄稿をいただきました。また、現在の研究体制の下に実施されている各分野における研究のうち、とくに難治疾患に関わる研究の概要紹介を掲載しました。これらに加えて、歴代常勤教員名簿を作成し、「研究所の理念と目標」で締めくくる構成としています。難治疾患研究所が、時代に即して研究体制を改変しながらも、一貫して「難治疾患の学理と応用」に取り組んでいたことを改めて認識し、今後の糧となるものと思われまので、是非ご一読ください。



図 2 難治疾患研究所 40 年史の表紙

(分子病態分野 木村彰方)

2 つのタンパク質が協働して RNA を認識する新しいしくみの解明

— RNA に埋め込まれた暗号を解く手がかりに —
Kuwasaki, K. et al., RBFOX and SUP-12 sandwich a G base to cooperatively regulate tissue-specific splicing. *Nature Structural & Molecular Biology* 21, 778–786 (2014).

タンパク質を作るための遺伝子では、DNA から転写された RNA が加工 (プロセッシング) を受けて成熟したメッセンジャー RNA となり、タンパク質に翻訳されます。多細胞生物では、細胞の種類によって RNA の加工の仕方を変えることで、1 つの遺伝子から多様なタンパク質を産生できます。しかし、RNA の加工を制御するさまざまな RNA 結合タンパク質が認識するのは 4~6 塩基程度の短くてあいまいな配列がほとんどで、このような RNA 結合タンパク質でたくさんの種類の RNA の加工を正確に制御できるしくみはよく解っていませんでした。

本研究では、2 種類の RNA 結合タンパク質 RBFOX と SUP-12 が egl-15 遺伝子の RNA を協働して正確に認識するしくみを核磁気共鳴 (NMR) 法による立体構造の解析により明らかにしました。これら 2 つのタンパク質は、7 番目の塩基グアニン (G) をサンドイッチのように間に挟み込むことで互いの位置がしっかりと固定され、全体として UGCAUGGUGUG という配列を正確に認識していることが明らかとなりました (図)。このサンドイッチ認識のためには 7 番目の塩基が G であり、かつ UGCAUG 配列と GUGUG 配列が隣り合っていないことが、当研究グループが開発した蛍光レポーターの解析などにより確かめられました。

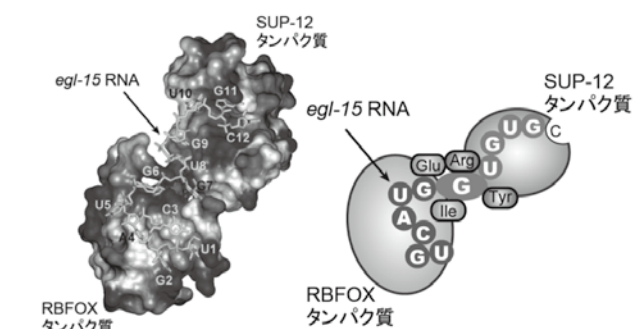


図 2 つのタンパク質 RBFOX と SUP-12 により協働認識された egl-15 遺伝子の RNA の立体構造。

本研究は、2 つの RNA 結合タンパク質が協働することで、個々のタンパク質が単独で認識する様式の場合よりも長い配列をより正確に認識するしくみがあることを初めて明らかにしました。そして、UGCAUGGUGUG という協働認識配列を手がかりに、RBFOX と SUP-12 によって制御される新たな遺伝子の発見に至りました。

たくさんの遺伝子の RNA の加工が組織や細胞の種類

に応じて巧妙に制御されるしくみは未だに完全には解明されておらず、RNA加工の「細胞暗号」と呼ばれています。これまでは、RNA結合タンパク質は個別に研究されてきました。しかし、本研究成果は、RNA結合タンパク質のさまざまな組み合わせによりRNAが協働的に認識されるしくみを解明していくことが「細胞暗号」の完全な解読のためには必須であることを示しています。本研究で行われたように、遺伝学的解析と構造学的解析さらに生物情報学的解析を組み合わせることで、生体におけるRNA加工の「細胞暗号」の体系的な解読につながっていくことが期待されます。

本研究成果は、黒柳秀人准教授と武蔵野大学薬学部の武藤裕教授（当時 理研生命分子システム基盤研究領域チームリーダー）、桑迫香奈子講師（当時 理研生命分子システム基盤研究領域 リサーチアソシエイト）、理化学研究所生命分子システム基盤研究領域の高橋真梨リサーチアソシエイト（現 ライフサイエンス技術基盤研究センター）らの研究グループ、京都大学大学院医学研究科の萩原正敏教授などとの共同研究により、文部科学省および日本学術振興会の科学研究費補助金、科学技術振興機構の戦略的創造研究推進事業ならびに文部科学省のタンパク 3000 プロジェクトの支援のもとでおこなわれたものです。本研究成果は、本学が理化学研究所、武蔵野大学および京都大学と共同でプレスリリースを行い、サイエンスポータルで紹介されたほか、ライフサイエンス新着論文レビューでも内容を紹介します。

（フロンティア研究室 遺伝子発現制御学 黒柳秀人）

**「赤血球からミトコンドリアが除かれるメカニズムを解明」
—新しいタイプのオートファジーが関与—**
Honda S., et al. “Ulk1-mediated Atg5-independent macroautophagy mediates elimination of mitochondria from embryonic reticulocytes” Nature Communications 5, Article number: 4004 2014

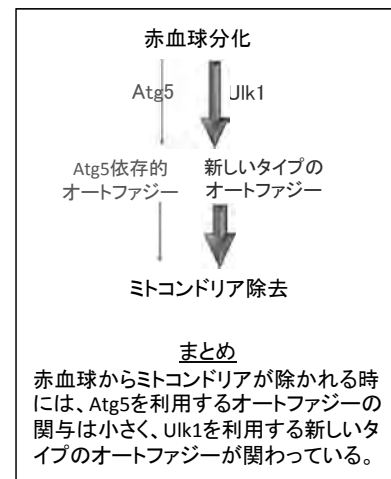
私たちの血液の中を流れる赤血球には、通常の細胞が持っているミトコンドリアは存在しません。これは、赤血球が分化する過程で、ミトコンドリアを排除するためです。このように、「赤血球におけるミトコンドリアの除去」は、現象としては良く分かっていきましたが、その分子メカニズムは充分には明らかにされていませんでした。私たちは、本研究において、この「赤血球におけるミトコンドリアの除去」は、オートファジーと呼ばれる細胞機能によって実行されていることを発見しました。

オートファジーとは、自らの細胞の中の古くなった蛋白質や細胞内小器官を適切に分解する細胞機能です。従来、オートファジーは、Atg5 と呼ばれる分子を使って

行なわれるものと考えられていました。しかしながら、私達のグループは、Atg5分子を使わない新しいタイプのオートファジー（以後、新規オートファジーと記載）を発見しています（Nature 2009）。即ち、私たちの体内では、Atg5 依存的オートファジーと新規オートファジーの少なくとも二つのタイプが存在します。

今回私たちは、① Atg5 依存的オートファジーが起きないマウス（Atg5 欠損マウス）の赤血球では、新規オートファジーが観察されミトコンドリアが適切に排除されること、②新規オートファジーが起きないマウス（Ulk1 欠損マウス）の赤血球では、Atg5 依存的オートファジーは観察されるが新規オートファジーが観察されず、ミトコンドリアが大量に残存すること、を発見しました。即ち、赤血球から正常にミトコンドリアが除かれるためには、新規オートファジーが重要であることが明らかとなりました。また、Ulk1 欠損マウスでは、この異常により、赤血球が脆弱となり、貧血になることも併せて見出しています。

今回の研究成果により、赤血球からミトコンドリアが除かれるメカニズムが明らかとなりました（図参照）。赤血球が成熟化する基本原理を知ることにより、貧血などの血液疾患の病態解析や治療に応用できる可能性があります。

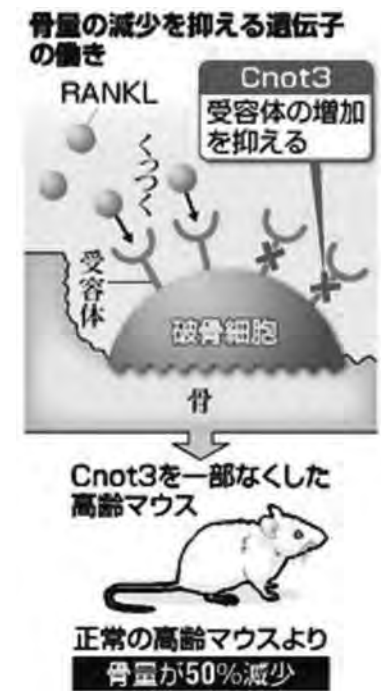


（病態細胞生物学分野 清水重臣）

「骨粗鬆症を抑制する新しい分子機能の発見」
Watanabe C. et al. “Stability of mRNA influences osteoporotic bone mass via CNOT3.” Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America; 111:2692-7, 2014

骨粗鬆症のしくみを明らかにするために、加齢性の骨粗鬆症への Cnot3 の欠失の影響を調査しました。その結果、高齢マウスとし 2 年令の動物を用いて、これと 4 か月の若齢動物とを比較すると骨量は 3 分の 1 に低下し

ましたが、一対が二本の染色体に乗っている Cnot3 遺伝子の片方のみを欠失した動物をここでは KO としますが、この動物では、高齢の野生型に比べさらに骨量が著しく低下しており、重症の骨粗鬆症を示しました。重要なこととして高齢化に伴い骨における内因性の Cnot3 の発現量が 1/3 に減少していることが分かりました。免疫蛍光顕微鏡観察によって、この Cnot3 の分子の細胞内の存在を検討した結果、その蛋白は量の減少に重要な役割を果たす破骨細胞の核には存在せず細胞質に存在していることが分かり、Cnot3 の働きは転写の制御よりも転写後の mRNA の安定性の制御に関わる可能性が示されました。そこで骨量の減少に重要な役割を果たす破骨細胞の形成と機能を促進する遺伝子として RANK のメッセンジャー RNA の分解を検討した結果、Cnot3 の欠失により RANK 遺伝子のメッセンジャー RNA の分解が抑制されることが判明しました。以上のことから、Cnot3 は RANK 遺伝子の発現を抑制することにより加齢による骨量低下を抑えていることが示され、この遺伝子が増加に基づく骨量減少を内因性に抑止する機能を持つことを世界で初めて発見しました。



（分子薬理学分野 野田政樹）

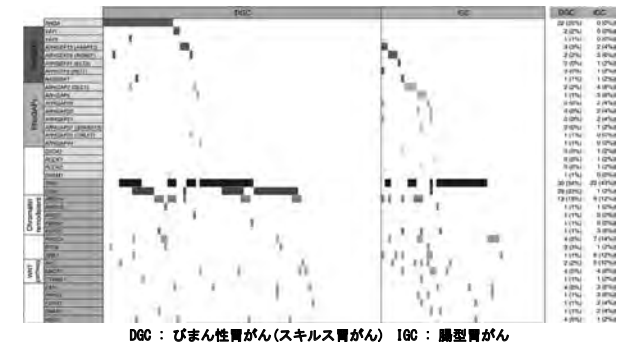
難治性スキルス胃がんの原因遺伝子を同定：RHOA 変異
(Nat Genet. 2014 Jun;46(6):583-7.)

胃がんは日本におけるがん死の主要因の一つで、年間約 5 万人が亡くなっている。胃がんのなかでも特に「びまん性胃がん（スキルス胃癌）」は悪性度の高い難治性がんの一つであり、有効な分子標的治療薬はなく、日本の保健衛生上、大きな問題となっている。その為、スキルス胃がんの原因遺伝子変異を同定し、有効な治療標的

の同定が求められている。

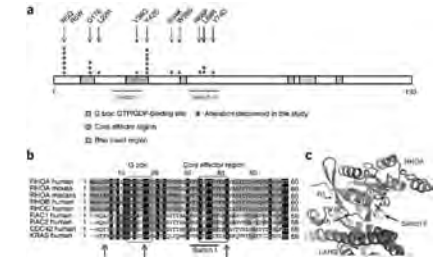
我々は外科手術によって切除されたスキルス胃癌において高深度の全エクソーム解析を行うことではほぼ全ての遺伝子の塩基配列の決定を行った。その結果、スキルス胃癌症例の約 1/4（87 症例中 22 症例：25.3%）に、RHOA 遺伝子の体細胞変異が同定された（図 1）。また、同定した変異中でアミノ酸置換の生じた部位は Arg5、Gly17、Tyr42 に集中していた。特に Tyr42 は RHOA 分子エフェクタータンパクなどと相互称する為に重要なコアエフェクター領域と呼ばれる部位（図 2. a、b）に集中していることが明らかとなった。さらに、変異型 RHOA の機能を明らかにする為に培養細胞を用いた検証実験を行った。変異型 RHOA を有する胃癌細胞株に於いて siRNA による RHOA 遺伝子の発現抑制を行った結果、変異型 RHOA を有する細胞株特異的に増殖抑制効果が見られた。また、siRNA による増殖抑制は、siRNA 非応答性の RHOA 遺伝子の強制発現により増殖抑制効果がキャンセルされた。以上のことから、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。

この研究成果は、これまで有効な治療標的のなかったスキルス胃癌に対して、治療標的候補となる遺伝子変異を同定したという意味で、大変重要なものであると考えられる。



黄色：RHOA関連遺伝子、淡緑：今回の解析で同定または以前の解析で報告のある遺伝子
色付きセルは体細胞変異を示す。例：RHOA（赤）、RhoGEF genes（ピンク）and RhoGAP genes（オレンジ）。変異の層数と頻度を右のカラムに示す。

図 1 スキルス胃がん(87例)及び腸型胃がん(51例)における体細胞変異



(a) RHOAの機能領域の分布と本研究で同定したアミノ酸置換領域。
(b) RHOAとRHOファミリーのアミノ酸配列のアライメント(1-60アミノ酸) G box：緑のボックス、コアエフェクター領域：赤いボックス、赤矢印：高頻度変異アミノ酸部位(Arg5, Gly17 and Tyr42)
(c) RHOAと代表的なエフェクタータンパクLARGの立体構造図。RHOA：緑、LARG：灰色で示す。今回の研究で同定した変異の一つTyr42はRHOAとLARGの結合面に位置する。

図 2 スキルス胃がんにおける RHOA 遺伝子変異の分布
(ゲノム病理学分野 石川俊平)

各種受賞

フロンティア研究室 遺伝子発現制御学

黒柳秀人 「東京医科歯科大学優秀研究賞」(2014年10月10日)

2014年難治疾患研究所優秀論文賞

最優秀論文賞

伊藤日加瑠、塩飽裕紀(神経病理学分野)

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

Molecular Psychiatry

優秀論文賞

崔 万鵬(分子神経科学分野)

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

The Journal of Neuroscience

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」

Nature communications

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日開催)受賞者

大学院生

1位

北澤萌恵(エピ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

2位

毛 瑩(神経病理学分野)

Analysis of molecular pathway of TRIAD

3位

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

難治疾患研究賞

森下真紀(分子細胞遺伝学分野)

Exploring mechanisms for chromothripsis by irradiation.

萌芽賞

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

若手研究者

1位

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

特許申請

フロンティア研究室 ウイルス治療学

【開発の名称】新規な陽性コントロール核酸を利用した、被検試料中の標的核酸の検出・定量法

【発明者】清水則夫、渡邊 健、外丸靖浩

【出願番号】特願 2014-212496

【出願日】2014/10/17

【出願人】国立大学法人 東京医科歯科大学、つくばオリゴサービス株式会社

【開発の名称】マイコプラズマを検出する方法

【発明者】清水則夫、高橋秀行

【出願番号】特願 2014-184379

【出願日】2014/09/10

【出願人】国立大学法人 東京医科歯科大学、株式会社リンフォテック

【開発の名称】滑膜由来間葉幹細胞(MSCs)の軟骨・半月板再生への応用

【発明者】小林 泰、竹内茂雄、山本 修、深澤憲広、関矢一郎、宗田 大、森尾友宏、清水則夫、黒岩保幸

【出願番号】特願 2014-145146

【出願日】2014/07/15

【公開番号】特許公開 2014-196354

【公開日】2014/10/16

【出願人】国立大学法人 東京医科歯科大学、株式会社サイメッド

【開発の名称】滑膜由来間葉幹細胞(MSCs)の軟骨・半月板再生への応用

【発明者】関矢一郎、宗田 大、森尾友宏、清水則夫、黒岩保幸

【出願番号】特願 2009-525260

【出願日】2007/08/22

【公表番号】特表 2010-501547

【公表日】2010/01/21

【特許番号】特許第 5656183 号

【発行日】2014/12/05

【出願人】国立大学法人 東京医科歯科大学、株式会社サイメッド

エピジェネティクス分野

出願番号：特願 2014-73464

発明の名称：1 倍体胚性幹細胞の培養方法

出願日：2014 年 3 月 31 日

分子細胞遺伝学分野

発明の名称：卵巣癌の検出方法、及び抑制方法

出願日：2012/10/24

登録日：2014/6/3

登録番号：特許第 8741641 号

発明の名称：食道癌の検出又は予後の予測のための方法及び食道癌抑制剤

出願日：2010/2/26

登録日：2014/6/13

登録番号：特許第 5557139 号

発明の名称：核酸マイクロアレイのデータ補正方法

出願日：2009/5/27

登録日：2014/7/2

登録番号：200980128809X

発明の名称：卵巣癌の検出方法、及び抑制方法

出願日：2012/9/24

登録日：2014/11/14

登録番号：特許第 5645089 号

分子神経科学分野

特願 2014-232963

「簡便で高効率の遺伝子改変非ヒト哺乳動物の作成方法」

神経病理学分野

発明の名称：脊髄小脳変性症を予防又は治療するための薬剤

出願人：国立大学法人 東京医科歯科大学

発明者：岡澤 均

出願番号：PCT/JP2014/077258(基礎出願：特願 2013-214155)

発明の名称：神経幹細胞の増殖の促進に用いられる製剤、神経幹細胞の減少

に関連する疾患の予防又は治療に用いられる製剤、シナプス後部形成の促進に用いられる製剤、シナプス後部形成の減少に関連する疾患の予防又は治療に用いられる製剤、及びスクリーニング方法

出願人：国立大学法人 東京医科歯科大学

発明者：岡澤 均

特 願：2014-136979

整理番号 :P14-004

提出日：H26 年 7 月 2 日

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 26 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
蒔田 直昌 教授 (長崎大学大学院医薬総合研究科) 木村 彰方 教授 (分子病態分野)	先天性不整脈の新たな原因を究明	Novel calmodulin (CALM2) mutations associated with congenital arrhythmia susceptibility. <i>Circulation Cardiovascular Genetics</i> . 7(4): 466-474, 2014.
石谷 太 准教授 (九州大学・生体防御医学研究所) 澁谷 浩司 教授 (分子細胞生物学分野)	発癌に関与する細胞内情報伝達分子 Dvl の新規調節機構を解明	Hpk2 and Pp1c cooperate to maintain Dvl protein levels required for Wnt signal transduction. <i>Cell Reports</i> . 2014 Sep 11;8(5):1391-404.
蒔田 直昌 教授 (長崎大学大学院医薬総合研究科) 木村 彰方 教授 (分子病態分野)	αミオシン重鎖遺伝子変異は、心筋細胞のサルコメア整合性の障害と電気刺激伝播速度の遅延を来とし、洞不全症候群を引き起こす	A Novel Mutation in the α-Myosin Heavy Chain Gene Is Associated with Sick Sinus Syndrome. <i>Circulation Arrhythmia and Electrophysiology</i> . In Press (doi: 10.1161/CIRCEP.114.002534)
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)	自閉スペクトラム症などの病的な繰り返し行動を脳のグリア細胞の異常が引き起こす仕組みを解明	Astroglial Glutamate Transporter Deficiency Increases Synaptic Excitability and Leads to Pathological Repetitive Behaviors in Mice. <i>Neuropsychopharmacology</i> . 2015 Feb 9. doi: 10.1038/npp.2015.26.

平成 26 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
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
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
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
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

3) 一般的課題 51 件

代表者	職名	所属機関	研究題目
寺井 崇二	准教授	山口大学大学院医学系研究科	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
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	乳がん易罹患者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 B リンパ球活性化のメカニズムの解明
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
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	高知大学教育研究部医療学系	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
山本 健	准教授	九州大学生体防御医学研究所	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
萩 朋男	准教授	長崎大学医学部附属 原爆後障害医療研究施設	DNA 修復欠損性遺伝性疾患の新規責任遺伝子の同定と機能解析
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	准教授	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	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
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
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
佐谷 秀行	教授	慶應義塾大学医学部	上皮間葉転換の時系列の転写開始点および遺伝子発現解析
青木 淳賢	教授	東北大学大学院薬学研究所	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の機能的解明
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
安達 三美	准教授	帝京大学医学部	細胞老化と組織老化における新規バイオマーカーの探索
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感受性遺伝子の探索
竹内 純	准教授	東京大学分子細胞生物学研究所	マウス・心筋細胞モデルを用いたエピゲノム修飾因子の機能解析
河崎 洋志	教授	金沢大学医薬保健学域	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
中川 真一	准主任研究員	理化学研究所基幹研究所	統合失調症に関連した選択的スプライシング異常を制御する分子メカニズムの解明
蒔田 直昌	教授	長崎大学大学院医薬総合研究科	遺伝性心臓伝導障害の新規病因の解明
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
木村 太一	助教	北海道大学大学院医学研究科	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

代表者	職名	所属機関	研究題目
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 Deng ウイルス血清型間における交差反応の分子機構の研究
倉橋 浩樹	教授	藤田保健衛生大学総合医学研究所	マイクロアレイを用いた着床前診断法の確立
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	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 カズ子	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
樋口 哲也	准教授	東邦大学医学部	膠原病皮膚病変自然発症モデルマウスの樹立とその解析
廣明 秀一	教授	名古屋大学大学院創薬科学研究科	血液脳関門の制御をめざした蛋白質間相互作用阻害剤のアクセシ法の開発
田中 敏博	教授	疾患バイオリソースセンター	トランスオミックス解析に基づく心房細動バイオマーカーの開発
大木 理恵子	主任研究員	国立がん研究センター研究所	Akt抑制因子であるPHLDA3遺伝子の心臓にける機能解析、心肥大・心不全との関連の解明
片岡 直行	特定准教授	京都大学医学研究科	がん・神経組織の低酸素領域における選択的スライシングの分子機構の解明
辻 典子	主任研究員	独立行政法人産業技術総合研究所	腸管免疫系活性化のバイオイメージングに関する研究
千々和 剛	研究員	公益財団法人実験動物中央研究所	希少腫瘍を標的とした抗癌剤開発を目指したモデル動物の作成と性状解析
亀井 康富	教授	京都府立大学生命環境科学研究所	骨格筋機能に及ぼす転写共役因子の作用機序解明
吉川 宗一郎	助教	大学院医歯学総合研究科 免疫アレルギー学分野	カルシウムインディケータを用いた免疫細胞の生体内イメージング
金井 正美	教授	実験動物センター	Sox17-mCherry融合蛋白質を発現するマウス胎仔におけるSox17の発現解析

4) 国際共同研究 4件

代表者	職名	所属機関	研究題目
FURUTANI-SEIKI, Makoto	Associate Professor	Centre for Regenerative medicine, Department of Biology and Biochemistry, University of Bath	Analysis of medaka mutant, hirage,, with a markedly flattened body caused by mutation of YAP
KAUR Gurvinder	Senior Scientist	All India Institute of Medical Sciences	Comparative Study of HIV/AIDS-associated genome diversities between India and Japan
Charlet-Berguer and Nicolas	Team leader (Associate Professor)	IGBMC	Screening of mutations in genes for BAG3-binding partners in Japanese patients with dilated cardiomyopathy and related diseases
Liu Zhong	Lecturer	Emergency Department, The First Affiliated Hospital of China Medical University	Study on the regulatory mechanisms for production of antibodies to heparin/PF4

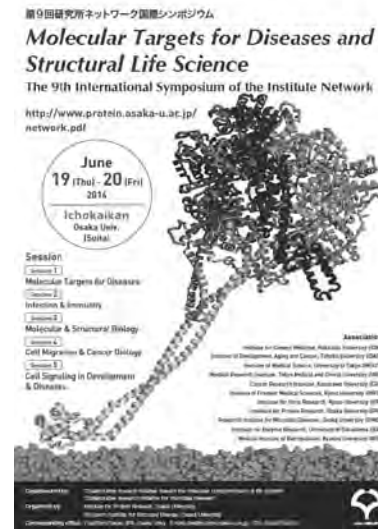
難治疾患研究所市民公開講座 – 最先端生命科学講座シリーズ

開催日	講師	演題
第9回 / 平成26年6月20日	林 丈晴 准教授	心不全/心筋症を理解し、予防・治療に活かしましょう
	古川 哲史 教授	脳梗塞・認知症を併発する怖い不整脈「心房細動」
第10回 / 平成26年10月24日	田中 博 教授	自分の将来の病気を予測する
	村松 正明 教授	メタボの遺伝子と生活習慣病
第11回 / 平成27年2月20日	田中 光一 教授	緑内障研究の最前線
	手塚 裕之 助教	粘膜バリア：病原体と戦う免疫システム

第13回駿河台シンポジウム / 第5回難治疾患共同研究拠点シンポジウム (H26.11.28 開催)



第9回研究所ネットワーク国際シンポジウム (H26.6.19 ~ 20 開催)



難治疾患研究所市民公開講座 – 最先端生命科学講座シリーズ第9回 (H26.6.20 開催)



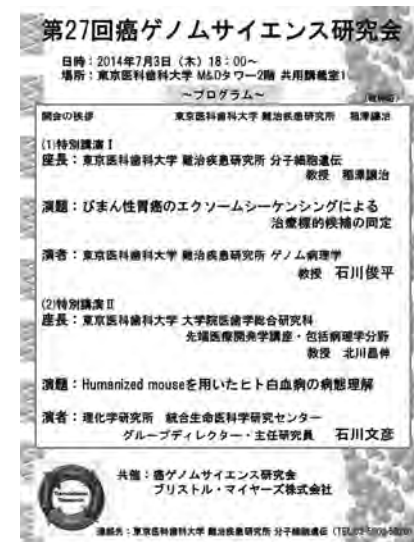
難治疾患研究所市民公開講座 – 最先端生命科学講座シリーズ第10回 (H26.10.24 開催)



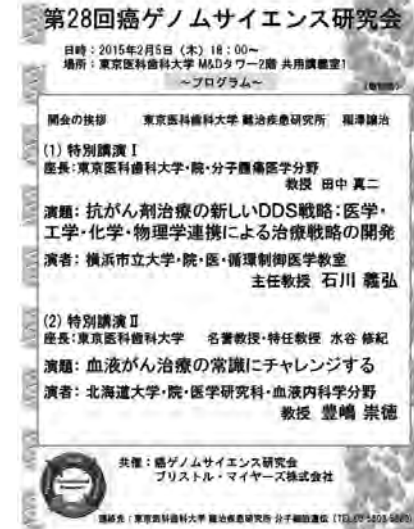
難治疾患研究所市民公開講座 – 最先端生命科学講座シリーズ第11回 (H27.2.20 開催)



第27回ゲノムサイエンス研究会 (H26.7.3 開催)



第28回ゲノムサイエンス研究会 (H27.2.5 開催)



学位取得者

発生再生生物学分野

内田 好海

「Mouse Embryonic Stem Cell-based Drug Screen for Novel Modulators of Mesoderm and Ectoderm Differentiation」

生体情報薬理学分野

李敏 (Min Li)

「Overexpression of cardiac Kir2.1 channel corrects the response of human iPS-derived cardiomyocytes to QT-prolonging drugs」

エピジェネティクス分野

及川 真実

「Nuclear transfer for analysis of X chromosome inactivation cycle in mice.」

高橋 沙央里

「Establishment and analysis of stable haploid embryonic stem cell lines from mice.」

相馬 未来

「Analysis of the long non-coding RNA, *Fat60*, in the mouse development」

分子遺伝分野

加賀美 裕也

「The elucidation of Mps1 functions in mitotic chromosome condensation.」

石場 俊之

「Periostin suppression induces decorin secretion leading to reduced breast cancer cell motility and invasion.」

幹細胞制御分野

Maha Anani

「Sox17 as a candidate regulator of myeloid restricted differentiation potential」

分子細胞遺伝分野

岩館 怜子

「High expression of SQSTM1/p62 protein is associated with poor prognosis in epithelial ovarian cancer」

分子神経科学分野

杉本 潤哉

「Brain region-specific roles of glial glutamate transporter GLT-1」

分子細胞生物学分野

清水 幹容

「MAPK6-WNK1/4 Signaling Regulates Anterior Formation in *Xenopus* Development.」

幹細胞医学分野

岡本 奈都子

「A melanocyte-melanoma precursor niche in sweat glands of volar skin.」

上野 真紀子

「Coupling of the radiosensitivity of melanocyte stem cells to their dormancy during a hair cycle.」

分子疫学分野

ネ・チャー・トン

「Association of the catechol-O-methyl transferase gene Val158Met polymorphism with blood pressure and prevalence of hypertension.」

趙 晨希

「Genetic association study of the RYR3 gene polymorphisms with atherosclerosis in elderly Japanese population」

ジュネイド・パラヤン

「Comprehensive association analysis of selected single nucleotide polymorphisms with cancer prevalence in Japanese population.」

難研セミナー

平成 25 年度大学院生研究発表会・若手研究者研究発表会

平成 26 年 3 月 7 日

崔 万勲 (分子神経科学分野)

Glial dysfunction in the mouse habenula causes depressive behaviors.

藤原 直人 (分子細胞遺伝分野)

NRF2 活性化癌に対する MicroRNA を用いた治療戦略

及川 真実 (エピジェネティクス分野)

核移植技術を用いた哺乳類における X 染色体不活性化機構の解明

高橋 沙央里 (エピジェネティクス分野)

マウス 1 倍体 Epiblast stem cell の解析から得られた新たな X 染色体不活性化機構モデル

有馬 誉恵 (発生再生生物学分野)

マウス初期胚におけるムスカリン性アセチルコリン受容体の機能解析

相馬 未来 (エピジェネティクス分野)

マウス発生過程における長鎖非コード RNA Fat60 の解析

杉本 潤哉 (分子神経科学分野)

グリア型グルタミン酸トランスポーター GLT1 の脳部位特異的機能解析

櫻井 大祐 (分子病態分野)

Preferential Binding to Elk-1 by SLE-Associated IL10 risk allele upregulates IL10 expression.

山口 啓史 (病態細胞生物学分野)

出芽酵母における Atg5 非依存的マクロオートファジー機構の遺伝学的解析

松村寛行 (幹細胞医学分野)

毛包のエイジングと 17 型コラーゲンの役割

村松智輝 (分子細胞遺伝分野)

Exploring target gene(s) within chromosome 19-amplification detected in a subclone from metastatic tumors in mouse transplantable OSCC.

平成 24 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 26 年 3 月 7 日

榎 康一 (分子神経科学分野)

手網核過剰活性化モデルによる難治性うつ病の病態解析

相澤 秀紀 (生体防御学分野)

樹状細胞前駆細胞を用いた新たな自己免疫疾患の制御と新規治療方法の開発

手塚 裕之 (生体防御学分野)

腸管上皮細胞による樹状細胞コンディショニング機能の解明

林 深 (硬組織疾患ゲノムセンター)

小脳・脳幹部低形成を伴う発達遅滞を呈する疾患群の包括的病態解明

中山 恒 (フロンティア研究室低酸素生物学)

慢性期低酸素環境における乳がん悪性化の分子メ

カニズムの解明

平成 25 年度難治疾患研究所優秀論文賞受賞者講演会

平成 26 年 3 月 7 日

小内 伸幸 (生体防御学分野)

A clonogenic progenitor with prominent plasmacytoid dendritic cell developmental potential.

安 健博 (分子病態分野)

A novel link of HLA Locus to the regulation of immunity and infection: NFKBIL1 regulates alternative splicing of human immune-related genes and influenza virus M gene.

田村 拓也 (神経病理学分野)

Systems biology analysis of Drosophila in vivo screen data elucidates core networks for DNA damage repair in SCAL.

備前 典久 (幹細胞制御学分野)

A growth-promoting signaling component cyclin D1 in neural stem cells has anti-astroglial function to execute self-renewal.

藤田 慶大 (神経病理学分野)

A functional deficiency of TERA/VCP/p97 contributes to impaired DNA repair in multiple polyglutamine diseases.

難研セミナー／難治疾患共同研究拠点セミナー

第 516 回／第 89 回

結城 伸泰 (シンガポール国立大学医学部内科・教授)

分子相同性による自己免疫病の発症機序

平成 26 年 4 月 3 日

第 517 回／第 90 回

中村 哲也 (東京医科歯科大学・歯医学総合研究科・准教授)

難治性消化管疾患の病態解明と治療開発をめざして

平成 26 年 6 月 2 日

第 518 回／第 91 回

今井 由美子 (秋田大学大学院医学系研究科・教授)

ウイルスの病原性発現を調節する核内ネットワーク

平成 26 年 6 月 2 日

第 519 回／第 92 回

田中 耕三 (東北大学加齢医学研究所・教授)

細胞分裂機構の解明によるがん化機構・がん治療へのアプローチ

平成 26 年 6 月 3 日

第 521 回／第 94 回

仲 哲治 ((独) 医薬基盤研究所・創薬基盤研究部長)

臨床と基礎をつなぐ「架け橋研究」への取り組みと抱負～「臨床から基礎へ、基礎から臨床へ」の双方向性の研究を目指して～

平成 26 年 6 月 10 日

第 522 回／第 95 回

齊藤 達哉 (大阪大学微生物学研究所・准教授)

炎症の理解と制御法確立を目指して～自然免疫学研究からのアプローチ

平成 26 年 6 月 10 日

第 523 回／第 96 回

原 英二 ((財) がん研究会がん研究所・部長)

細胞老化の分子メカニズムとその発癌制御における役割

平成 26 年 6 月 10 日

第 524 回／第 97 回

米谷 隆 (Professor, University of Pennsylvania)

How does hemoglobin regulate its oxygen-affinity and cooperatively?

平成 26 年 10 月 28 日

第 525 回／第 98 回

清野 宏 (東京大学医科学研究所・所長)

Mucosal Innate Immune Cells for the Regulation of Symbiosis and Inflammation

平成 26 年 11 月 26 日

第 526 回／第 99 回

鈴木 啓一郎 (ソーク研究所・リサーチアソシエイト)

ゲノム編集技術を用いたヒト疾患モデル iPS 細胞の作製

平成 26 年 12 月 4 日

第 527 回／第 100 回

David E. Fisher (Professor &Chairman, Dept of Dermatology Director, Melanoma Program MGH Cancer Center Director, Cutaneous Biology Research Center Massachusetts General Hospital Harvard Medical School)

Skin pigmentation pathways and melanoma risk

平成 26 年 12 月 17 日

第 528 回／第 101 回

難波 大輔 (愛媛大学プロテオサイエンスセンター 細胞増殖・腫瘍制御部門・上級研究員)

培養ヒト表皮角化幹細胞の動態解析とその応用

平成 27 年 1 月 6 日

第 529 回／第 102 回

岡田 随象（東京医科歯科大学 疾患バイオリ
ソースセンター・テニユアトラック講師）
ゲノム・オミックス・疾患疫学の融合に基づく生
命情報科学の新展開
平成 27 年 3 月 3 日

第 530 回／第 103 回

遠藤 俊徳（北海道大学大学院情報科学研究科生
命人間情報科学専攻・教授）
個人ゲノム解析基盤としてのバイオインフォマ
ティクス解析と比較オミックスデータベース構築
平成 27 年 3 月 3 日

第 531 回／第 104 回

角田 達彦（理化学研究所統合生命医科学研究セ
ンター医学数理研究グループ・グループディレ
クター）

全ゲノムビッグデータ解析を活用した個別化医療
の推進
平成 27 年 3 月 3 日

第 533 回／第 106 回

井上 治久（京都大学 iPS 細胞研究所幹細胞学分
野教授）
iPS 細胞を用いた神経変性疾患研究
平成 27 年 3 月 25 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。

分子薬理学分野

- FUSC1 システムを用いて PTH シグナルが物理的シグナルと相互作用することにより細胞の増殖と移動を制御することをリアルタイムで明らかにした。
- 交感神経受容体の発現が PTH により制御され、さらに細胞の BMP への応答性を抑制スル働きを転写レベルにおいて明らかにした。
- RANKL の 3' UTR に対して CNOT3 が結合しその mRNA 安定性を抑制して骨粗鬆症の病態においても内因性の防御的な機能を持つことを明らかにした。

分子細胞生物学分野

- 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。
- IQGAP1 が β -catenin の核移行に関与することを示した。

分子神経科学分野

- 手網核のグリア細胞の機能不全がうつ病に似た行動異常を引き起こす。
- グリア型グルタミン酸トランスポーターの障害が病的な繰り返し行動を引き起こす。
- グリア型グルタミン酸トランスポーター GLAST の発現を増加させる arundic acid は、正常眼圧緑内障モデルの網膜変性を抑制する。
- バルブロン酸は正常眼圧緑内障モデルの網膜変性を抑制する。

生体防御学分野

- 炎症性腸疾患を誘導する腸内細菌を同定した。
- レチノイン酸による腸の恒常性維持機構の一端を明らかにした。

生体情報薬理学分野

- 心房細動関連遺伝子の全ゲノム解析 (GWAS) の閾値下解析によりさらに 6 個の心房細動感受性 SNPs を同定し、合計 16 個の心房細動感受性 SNPs を同定した。
- 薬物の iPS 細胞由来心筋細胞に対する電気的・力学的影響を同時にアッセイする in vitro システムを確立した。
- iPS 細胞由来心筋細胞を改変し、頻度依存性の薬物作用をアッセイできるシステムを確立した。

幹細胞制御分野

- 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 Sox17 が寄与することを明らかにした。
- 精神運動異常様行動を示すヒストン脱メチル化酵素遺伝子変異マウスにシナプスの数と機能の異常を検出した。
- C6 グリオーマ中の癌幹細胞集団の造腫瘍活性を支持するニッチ擬態ポリマーを用いた解析から、癌幹細胞ニッチ構成要素として細胞外基質と鉄の関与を明らかにした。

分子構造情報学分野

- B 細胞抑制性受容体 CD72 の細胞外ドメインの結晶構造を決定した。
- シグナル伝達に関与するタンパク質とリン酸化ペプチドのとの複合体構造を決定し、相互作用の特異性などを明らかにした。
- アルツハイマー病関連タンパク質であるタウタンパク質とプロリン異性化酵素との相互作用を明らかにした。

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.

本分野の研究は、生体のカルシウム調節系に関わる器官および組織における細胞の分子レベルでの制御機構についての解析を行うことにある。特に、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を得ることに重点をおいている。

概 略

本研究分野の主な難治疾患研究の対象は、カルシウム代謝異常疾患、特に骨粗鬆症ならびに後縦靭帯骨化症等の骨量異常疾患である。これらの疾患の分子生物学的、細胞生物学的な病態生理学的基盤の解明を目指しており、研究項目は、以下の点である。(1) 細胞分化の制御に関わる転写因子の解析。(2) 成長因子ならびにサイトカインによる細胞機能制御機構の研究。(3) ホルモンによる遺伝子発現制御機構の研究。(4) 遺伝子ノックアウト動物を用いた疾患動物モデルの作成。(5) 骨芽細胞、軟骨細胞の分化に関わる発生生物学的研究。(6) 破骨細胞の形成ならびに機能調節に関する分子生物学的研究。(7) 物理学的環境因子の骨芽細胞機能への影響の細胞生物学的研究。

研究紹介

骨格系は生体のカルシウム調節系の最大の代謝器官である。骨格系を維持する骨代謝の平衡は、骨組織を形成する骨芽細胞や吸収を行う破骨細胞による骨のリモデリング調節によって保たれている。このリモデリングの平衡が破綻することにより、骨粗鬆症などの骨格系疾患が生じる。骨芽細胞は、未分化間葉系の細胞より分化する過程において局所の調節因子ならびに全身性の調節因子であるホルモンの制御を受ける。これらの因子は、細胞内シグナル伝達機構を介して、核へ情報が伝達され、その下流で活性化される転写因子が細胞分化を決定するが、マトリックスが主体の骨では接着シグナルと転写因子のシグナルが相互作用する。さらに、この過程に関わるサイトカインおよび転写因子の機能と調節、ならびにこれらの細胞機能を調節し、局所的に作用する因子の解析を進めている。さらに骨の形成ならびに吸収とリモデリングの機構の解明により、骨・軟骨組織の再生医工学

の基盤研究を柱としている。上記の問題解明へのアプローチ方法の一つとして、ノックアウトマウスならびにトランスジェニックマウス、ウイルスによる遺伝子導入、網羅的遺伝子発現の解析、ゲノムデータベースの探索を行い、難治疾患の診断法や治療法、さらに再生医学的技術の開発へ向けた基礎研究を行う。

研究内容

1. **Cnot3** は骨粗鬆症において **RANK** の mRNA に対する転写後性制御により骨量決定に関与する(渡辺千穂、早田匡芳、納富拓也、江面陽一、森山啓司、野田政樹)。

骨粗鬆症の病態機構を解析するために、加齢性の骨粗鬆症への Cnot3 の欠失の影響を調査した。その結果、高齢マウスとし 2 年齢の動物を用いて、これと 4 か月の若齢動物とを比較すると骨量は 3 分の 1 に低下したが、Cnot3 遺伝子の片方のみを欠失したヘテロの動物 (以下 KO) では、高齢の野生型 (WT) に比べさらに骨量が著しく低下しており、重症の骨粗鬆症を示した。さらに高齢化に伴い骨における内因性の Cnot3 の発現量が 1 / 3 に減少した。骨量の減少に重要な役割を果たす破骨細胞の形成と機能を促進する遺伝子として RANK のメッセンジャー RNA の分解を検討した結果、Cnot3 の欠失により RANK のメッセンジャー RNA の分解が抑制された。以上のことから、Cnot3 は RANK 遺伝子の発現を抑制することにより加齢による骨量低下を抑え、この遺伝子が加齢に基づく骨量減少を内因性に抑止する機能を持つことを明らかにした。

2. 骨芽細胞における PTH シグナルと $\beta 2$ -adrenergic receptor ($\beta 2AR$) との相互作用機構の解析(守屋秀一、早田匡芳、伊豆弥生、江面陽一、金子和夫、野田政樹)。

骨芽細胞株 MC3T3E-1 に PTH を加えると Adrb2 遺伝子の発現は明瞭に抑制された。この効果は PTH の用量依存的であり、継時的には、添加後一時間で最も抑制された発現が徐々に回復する二相性を示した。このような遺伝子発現抑制が cAMP 経路に依存することは阻害剤を用いた実験系により示されたが、驚くべきことに si-RNA により Adrb2 発現を抑制した MC3T3E-1 では PTH による cAMP 経路の活性化はさらに高められる事

実が見いだされた。これらの結果は、Adrb2 は PTH の一つのターゲットであり、骨芽細胞において PTH の抑制因子として働く事を示唆した (J Cell Biochem, 2014)。

3. 骨芽細胞における $\beta 2$ アドレナリン受容体の活性化は BMP によって誘導されるアルカリフォスファターゼの発現を抑制する(山田峻之、早田匡芳、伊豆弥生、江面陽一、原田清、野田政樹)。

$\beta 2$ アドレナリン受容体 ($\beta 2AR$) の活性化は in vivo における骨形成を阻害することが示されてきたが、骨芽細胞分化に対する作用は明らかにされていない。本研究

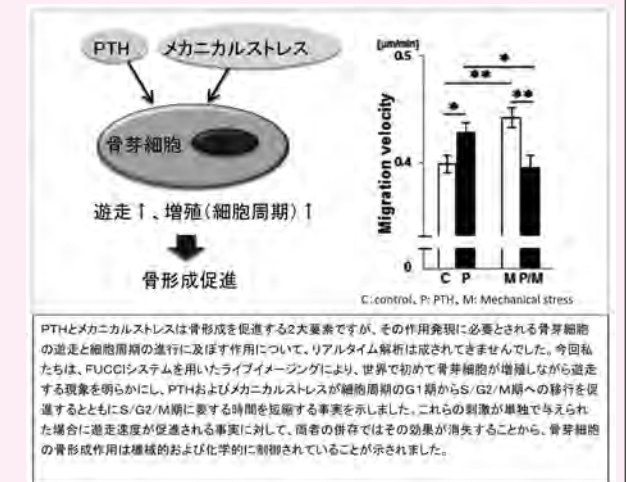
ハイライト

「FUCCI で評価した細胞周期と関連した細胞遊走は PTH とメカニカルストレスによって制御される」(白川純平、早田匡芳、江面陽一、小村健、野田政樹)

骨代謝は破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成の均衡により維持される。骨芽細胞は細胞周期の位相変化に応じた能力として自己複製能と分化能を保有し、これにより細胞の特化と骨形成を可能とする。リモデリングの過程で骨芽細胞は、破骨細胞によって形成された骨吸収窩へと遊走し、新たな骨基質を産生して吸収窩を埋める。このバランス維持は骨恒常性に重要であり、その破綻は骨粗鬆症につながる。骨芽細胞の増殖と遊走のタイミングを制御する機構の解明は、この意味において重要と考えられるが、その動的な関係についての探究は、技術的な困難さから実現されてこなかった。本研究では、マウス頭蓋冠骨芽細胞への FUCCI レポーターシステムを利用することで、この問題を克服し、G1 期においても S/G2/ M 期においても骨芽細胞は遊走することを示した。また、S/G2/ M 期の細胞は G1 期の細胞よりも早く遊走した。興味深いことに骨形成促進作用をもつ副甲状腺ホルモ

は、 $\beta 2AR$ 刺激が骨芽細胞に及ぼす影響として、BMP の誘導するアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性に着目して検討した。骨芽細胞株 MC3T3E-1 細胞の ALP 陽性 foci は BMP によって誘導され、形態学的に特に小さな foci が増加したが、このような小 foci 増加はイソプロテレノール (ISO) 添加により抑制された。生化学的に ISO は BMP 誘導性の ALP 活性を濃度依存的に抑制し、その効果は細胞密度に依存した。これらの結果により、ISO は遺伝子発現レベルで BMP が誘導する骨芽細胞の ALP 活性などの分化形質を抑制することが示された (J Cell Biochem, 2014)。

ン (PTH) は遊走速度を高め、もうひとつの骨形成促進因子であるメカニカルストレス (MS) も同様であった。これに対して両者併用では、骨芽細胞の遊走速度は対照レベルに抑えられ、二つの骨形成促進性刺激の間に交絡のあることが示された。以上の結果は骨芽細胞の遊走は細胞周期と連関して機械的刺激と化学的刺激の両者によって協調的に制御されることで骨量制御に寄与することが示された (J Cell Physiol, 2014)。



人事異動

転入：伊豆弥生 (助教)、勝村早恵 (大学院生)、峯田浩司 (大学院生)、林欣 (大学院生)、並木陽子 (事務補佐員)。
転出：早田匡芳 (助教)、納富拓也 (特任講師)、白川純平 (大学院生)、藤原令 (事務補佐員)、井上洋子 (事務補佐員)、矢澤祐奈 (事務補佐員)、三浦範子 (事務補佐員)。

研究業績

原著論文

1. Watanabe C, Morita M, Hayata T, Nakamoto T, Kikuguchi C, Li X, Kobayashi Y, Takahashi N,

Notomi T, Moriyama K, Yamamoto T, Ezura Y, Noda M. Stability of mRNA influences osteoporotic bone mass via CNOT3. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Feb 18;111(7):2692-7

2. Yamada T, Ezura Y, Hayata T, Moriya S, Shirakawa J, Notomi T, Aryal S, Kawasaki M, Izu Y, Harada K, Noda M. $\beta 2$ Adrenergic receptor activation suppresses BMP-induced alkaline phosphatase expression in osteoblast-like MC3T3E1 cells. J Cell Biochem. 2014 In Press

3. Moriya S, Hayata T, Notomi T, Aryal S, Nakamoto T, Izu Y, Kawasaki M, Yamada T, Shirakawa J, Kaneko K, Ezura Y, Noda M. PTH regulates $\beta 2$ -adrenergic receptor expression in osteoblast-like MC3T3E1 cells. J Cell Biochem. 2015 Jan;116(1):142-8.

4. Hayata T, Yoichi, Ezura, Asashima M,

Nishinakamura R, Noda M. Dullard/Ctdnep1 regulates endochondral ossification via suppression of TGF- β signaling. J Bone Miner Res. 2015 Feb;30(2):318-29.

5. Ezura Y, Nagata J, Nagao M, Hemmi H, Hayata T, Rittling S, Denhardt DT, Noda M. Hindlimb-unloading suppresses B cell population in the bone marrow and peripheral circulation associated with OPN expression in circulating blood cells. J Bone Miner Metab. 2015 Jan;33(1):48-54.

6. Shirakawa J, Ezura Y, Moriya S, Kawasaki M, Yamada T, Notomi T, Nakamoto T, Hayata T, Miyawaki A, Omura K, Noda M. Migration linked to FUCCI-indicated cell cycle is controlled by PTH and mechanical stress. J Cell Physiol. 2014 Oct;229(10):1353-8.

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

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

セリン/スレオニンキナーゼ WNK (with no lysine (K)) ファミリーは、線虫・ショウジョウバエからほ乳類に至るまで保存されており、ほ乳類には 4 つの WNK ファミリー分子が存在する。その内、WNK1 及び WNK4 は偽性低アルドステロン症 II 型 (PHAII) と呼ばれる常染色体優性遺伝性的高血圧症の原因遺伝子として同定されている。当研究室において、WNK → SPAK/OSR1 → Na,K,Cl 共輸送体というシグナル伝達経路が存在することを示し、その制御異常が PHAII で見られる高血圧症の発症原因の一つになっていることを示すことができた。しかしながら、このシグナル経路の制御異常が、PHAII で見られる他の病態、歯や骨の発育不全や精神発達遅延などの原因とは考えにくく、他のシグナル経路の存在が予想された。そこで我々は、新たに WNK に関与する因子の探索を行い、解析を行っている。

1) WNK シグナル経路は、神経分化に関与する。

ショウジョウバエの WNK (DWNK) の解析から、WNK シグナル経路の新たな下流因子として Arrowhead (Awh) を単離した。また、そのほ乳類の相同因子 Lhx8 も、WNK シグナル伝達経路により、その発現が制御されており、進化的にも高度に保存されている

WNK → Lhx8/Awh という新規のシグナル伝達経路を見出した。さらに、Lhx8 は、アセチルコリン性神経の分化に関わっていることから、Neuro2A 細胞を用いて、WNK シグナル伝達経路との関連を解析した。WNK1 及び WNK4 の双方のノックダウンにより、分化に伴う神経突起の伸長が抑えられるという表現型が見られ (図 1)、さらにはアセチルコリン性神経の分化マーカーの発現も抑制されていた。このことは、WNK シグナル伝達経路が、神経分化にも関与しているという新たな発見であった。また、PHAII の患者において高血圧以外にも見られる精神発達遅延という症状を考慮すると、WNK シグナル伝達経路は、Lhx8 を介して、発症に関与する可能性を示唆する初めての結果である (図 2)。

2) WNK4 は、FGF シグナル伝達経路の正の制御因子として機能する。

アフリカツメガエルの WNK4 の発現を、アンチセンス MO により抑制すると、頭部欠損という表現型を示し、頭部や神経のマーカー遺伝子の発現も抑制していた。このことから、WNK4 が頭部形成において、重要な機能を持つことが推測される。頭部形成には、様々なシグナル伝達経路が関与するが、その内の一つである FGF シグナル伝達経路の標的遺伝子、及び FGF シグナル伝達経路による頭部神経マーカーの発現誘導が、WNK4 の発現抑制により、抑制されることを明らかにした。また、FGF シグナル伝達経路により誘導された OSR1 のリン酸化が、WNK4 の発現抑制により、抑制された。以上の結果から、FGF → WNK4 → OSR1 というシグナル伝達経路が示され、頭部形成において、WNK4 が FGF シグナル伝達経路の正の制御因子として、重要な機能を持つことを明らかにした。

このように、WNK シグナル伝達経路は、線虫からショウジョウバエ、アフリカツメガエル、ほ乳類に至るまで広く保存されたシグナル伝達経路であり、発生及び分化の様々な過程において関与が明らかになってきた。しかしながら、WNK シグナル伝達経路の詳細な機構や、PHAII の発症機構などは、まだ未解明であり、今後も解析を続けていく。

WNKs are involved in the neurite elongation in Neuro2A differentiation.

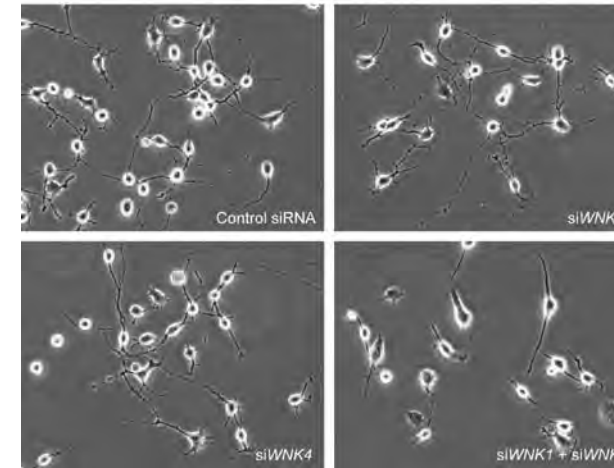


図 1

WNK signaling pathways

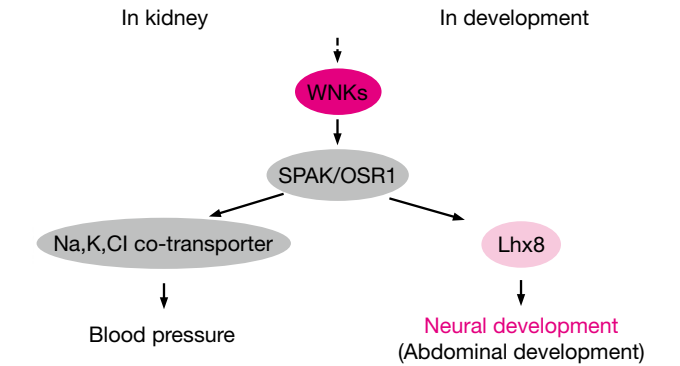


図 2

研究業績

Shimizu, N., Ishitani, S., Sato, A., Shibuya, H. and

Ishitani, T. (2014). Hipk2 and Pp1c Cooperate to Maintain Dvl Protein Levels Required for Wnt Signal Transduction. Cell Rep. 8, 1391-1404.

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 助教：相田知海
特任助教：相馬美歩、伊藤亨子、柳澤美智子

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

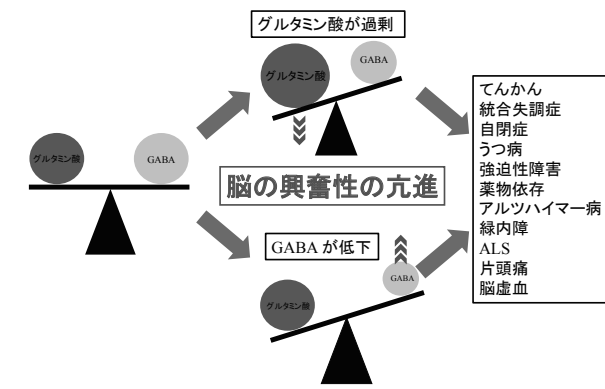
中枢神経系の興奮性シナプス伝達は主にグルタミン酸により担われており、グルタミン酸シグナル伝達の解明は脳機能解明の基礎となる。我々の分野では、神経回路網の形成・脳高次機能におけるグルタミン酸シグナリングの機能的役割を分子、細胞、個体レベルで明らかにすることを目的とする。また、過剰なグルタミン酸は神経毒性を示し、様々な精神神経疾患の原因と考えられている。精神神経疾患におけるグルタミン酸シグナル伝達の病態生理学的役割を解明し、それら疾患の新しい治療法の開発を目指す。グルタミン酸シグナル伝達に中心的な役割を果たすグルタミン酸トランスポーターを中心に研究を行っている。

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。

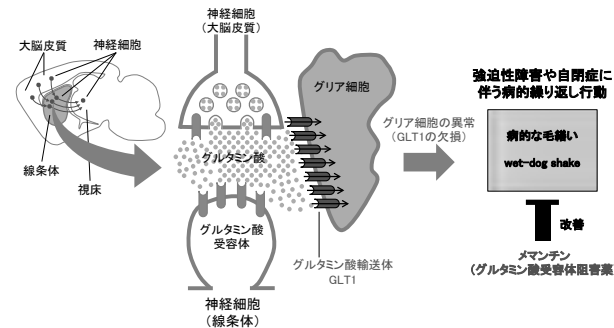
繰り返し行動は、強迫性障害や自閉症スペクトラム障害などで見られる主要な症状であるが、その病態は不明である。我々はマウスを用い、グルタミン酸輸送体 GLT1 欠損による脳内の過剰なグルタミン酸が、皮質—線条体間のシナプス伝達を亢進し、繰り返し行動を引き起こすことを明らかにした (Aida et al, in press)。また、グリア型グルタミン酸輸送体の転写を活性化することによりグルタミン酸の取り込みを亢進させる化合物 arundic acid を見つけ、それが興奮毒性による網膜神経節細胞

の変性を改善することを明らかにした。さらに、arundic acid はヒトの細胞株に発現するグルタミン酸輸送体の発現も亢進させることを明らかにした (Yanagisawa et al, in press)。Arundic acid は、緑内障だけでなく、筋萎縮性側索硬化症・統合失調症・うつ病などの様々な精神神経疾患の治療薬としても期待できる。

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



グリア細胞の異常が病的な繰り返し行動を引き起こす

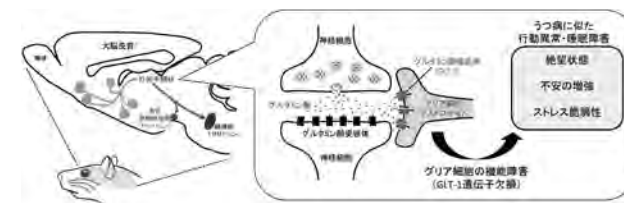


2. 外側手綱核におけるグリア細胞機能不全がうつ病様の行動異常及び睡眠障害を引き起こす

近年、外側手綱核はうつ病患者で病的な血流上昇を示すことからうつ病の原因病巣の候補として注目を集めている。しかし、手綱核の神経活動がどのようにして病的な興奮を示し、うつ病様症状に至るかは未だ不明である。我々はシナプスにおける興奮性伝達物質グルタミン酸の代謝がグリア細胞の一種であるアストロサイトにより制御される事に注目し、「アストロサイトの機能不全が手綱核の過剰な活性化を引き起こし、うつ病様の行動障害を引き起こす」という仮説に至った。アストロサイトの

グルタミン酸輸送体 GLT-1 を抑制したところ手綱核神経細胞の発火率上昇を観察された。このように手綱核が病的に活性化した動物は尾懸垂試験や Novelty-suppressed feeding 試験においてうつ病様の行動異常を示しており、社会敗北ストレス負荷に対する感受性も増加していた。また、これらのマウスはうつ病患者で頻繁に報告されるレム睡眠異常も示していた。

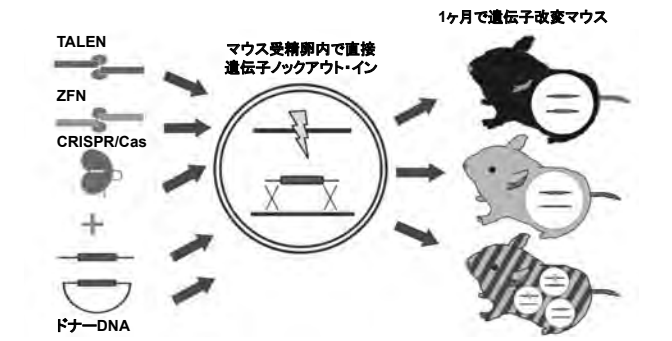
これらの結果は、手綱核におけるアストロサイトにおけるグルタミン酸代謝異常が神経細胞の興奮性を高めうつ病様行動異常及び睡眠障害を引き起こす可能性を示唆している。



3. 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 (図)。本年度は特に CRISPR/Cas システムの応用開発を進めてきた。いくつかの独自技術の開発により、ノックアウトマウスはもとより、ヒトの遺伝子変異ノックインマウス、蛍光タンパク質ノックインマウスなどあらゆるタイプの遺伝子改変マウス作製を、極めて高効率に実現する事に成功した。この結果、作製に要する期間は最短1ヶ月、従来の1/100の費用、一度の実験で目的の遺伝子改変マウスを取得する事が可能になった。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：佐藤宏美 (技術補佐員)、坊卓超 (博士課程)

転出：柳澤美智子、相馬美歩、伊藤亨子 (特任助教)、樋高政子、佐藤宏美 (技術補佐員)、杉本潤哉 (博士課程)、今橋理沙、葛山貴弥、杉山香織 (修士課程)

業績目録

発表論文

1. Yanagisawa, M., Aida, T., Takeda, Namekata, K., Harada, T., Shinagawa, R., Tanaka, K. Arundic acid attenuates retinal ganglion cell death by increasing glutamate/aspartate transporter (GLAST) expression in a model of normal tension glaucoma. *Cell Death Dis* (in press).
2. 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, K.F., 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* (in press)
3. Kimura, A., Guo, X., Noro, T., Harada, C., Tanaka, K., Namekata, K., Harada, T Valproic acid prevents retinal degeneration in a murine model of normal tension glaucoma. *Neurosci Lett*

- 588, 108-113, 2015.
4. Nakamori, T., Sato, K., Kinoshita, M., Kanamatsu, T., Sakagami, H., Tanaka, K., Ohki-Hamazaki, H. Positive feedback of NR2B-containing NMDA receptor activity is the initial step toward visual imprinting: a model for juvenile learning. *J Neurochem* 132, 110-123, 2015.
5. Cui, W., Mizukami, H., Yanagisawa, M., Aida, T., Nomura, M., Isomura, Y., Takayanagi, R., Ozawa, K., Tanaka, K., Aizawa, H. Glial dysfunction in the mouse habenula causes depressive-like behaviors and sleep disturbance. *J Neurosci* 34,

総説

1. 相澤秀紀, 崔万鹏, 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
2. Aida, T. Genome editing in mice using TALENs. *Targeted Genome Editing Using Site-Specific Nucleases* Chapter 11, 167-182, 2015 (Springer).

研究費

1. 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
2. 相澤秀紀: うつ病の行動異常及び睡眠障害に共通した神経回路病態の解明 文部科学省科学研究費補助金、基盤研究(C) 代表
3. 相澤秀紀: 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 東京医科歯科大学難治疾患研究所研究助成「難治疾患の研究」を重点課題とする研究助成 代表
4. 相澤秀紀: うつ病に特徴的なレム睡眠障害におけるグルタミン酸輸送体の役割 稲盛財団研究助成 代表
5. 相澤秀紀: 手綱核過剰活性化のうつ病における役割 プレインサイエンス振興財団研究助成 代表
6. 相澤秀紀: ストレス感受性を制御する神経機構の研究 三井生命厚生事業団医学研究特別助成 代表
7. 相田知海: 非コードゲノムの個体レベルでの機能解釈 東京医科歯科大学・学長裁量優秀若手研究費 代表
8. 相田知海: ゲノム編集を駆使してレアバリエントの機能を 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
9. 相田知海: 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成 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
10. 田中光一: 生涯に亘って心身を支える脳の分子基盤、環境要因、その失調の解明 脳科学研究推進プログラム課題 E 分担
11. 田中光一: 統合失調症のシナプスグリア系病態の評価・修復法創出 戦略的創造研究事業 (CREST) 分担
12. 田中光一: 緑内障統合的分子診断法の確立と実証 厚生労働科学研究費補助金 分担
13. 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 助教：手塚裕之
非常勤講師（さがけ研究員）：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
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シ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、難治性疾患の予防法・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) 免疫の司令塔、樹状細胞の源となる細胞の発見

樹状細胞（Dendritic Cell, DC）は、1973年にラルフ・スタインマン博士により発見され、2011年、博士がその功績によりノーベル生理学・医学賞を受賞した。現在では、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、定常状態における免疫寛容の誘導維持に必要な不可欠な細胞として理解されている。DCのみに分化の方向性が運命決定された“DC前駆細胞”を発見することは、DC分化系譜への新たな発見という観点と臨床応用という観点から重要な研究といえる。

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応答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、上記条件をみたす“DC前駆細胞”がマウス骨髄内に存在することを見出し、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分化に必須の転写因子E2-2を非常に高く発現しており、pDCへの分化能に優れていた。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）、CDPおよびcMoP上流の前駆細胞としてマクロファージ・DC前駆細胞（Monocyte/macrophage and DC Progenitor, MDP）なども各々他グループから報告されており、現在では、私たちのPreviewで紹介したような単核球系貪食細胞の分化系譜が考えられている（*Immunity* 2014）（図1）。

マウスでの成果を踏まえ、現在、ヒトDC前駆細胞あるいは単球・マクロファージ前駆細胞の同定を試みている。1個から500-1,000個のDCあるいは単球・マクロファージを生み出す、かつ他の血液細胞を生み出さないヒト前駆細胞の同定は、今後、感染症・がん・自己免疫病に対する、同細胞を用いた新たな予防・治療技術の開発・進展にとっての重要な試金石と考えている。

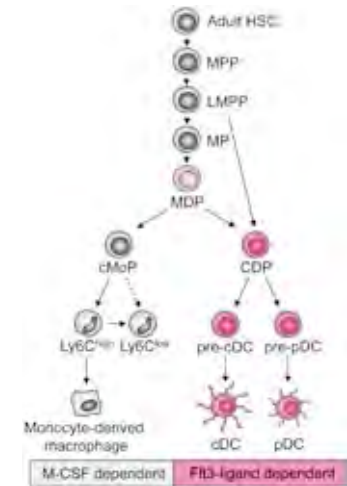


図1 単核球系貪食細胞（DC・マクロファージ）の分化系譜

2) 炎症性腸疾患で単球・マクロファージを動員する腸内常在菌のはたらきを発見

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。大腸は、小腸と比較して、常在菌数が多く種類も豊富である。ヒトならびにマウス大腸ともに、主としてグラム陽性菌 Firmicutes とグラム陰性菌 Bacteroides から構成されている。これまで、同所におけるグラム陰性菌 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、デキストラン硫酸誘導性 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る。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、グラム陽性菌が腸上皮細胞に作用して、炎症性単球・マクロファージの動員に必要なケモカイン CCL2 を発現誘導することも判明した（図2）。さらに、16S rRNA 解析を行い、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。

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菌の重要性を示すものである。炎症性単球・マクロファージを動員する過程が新たな治療標的として有望であることを示した意義も大きい。本論文は、Society for Mucosal Immunology により、す

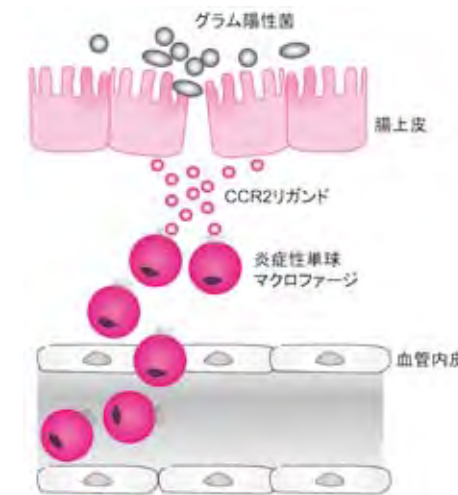


図2 炎症性腸疾患における炎症性単球・マクロファージの浸潤機構

業績目録

原著

- Nakanishi, Sato T, and Ohteki T. Commensal Gram-positive bacteria initiates colitis by inducing monocyte/macrophage mobilization. *Mucosal Immunol* 8, 152-60, 2015.
- Yokota-Nakatsuma A, Takeuchi H, Ohoka Y,

Kato C, Song SY, Hoshino T, Yagita H, Ohteki T, and Iwata M. Retinoic acid prevents mesenteric lymph node dendritic cells from inducing IL-13-producing inflammatory Th2 cells. *Mucosal Immunol* 7, 786-801, 2014.

受賞

平成25年度難治疾患研究所最優秀論文賞、小内

伸幸
著者：Onai N, Kurabayashi K, Hosoi-Amaike M, Toyama-Sorimachi N, Matsushima K, Inaba, K, and Ohteki T.
論文名：A clonogenic progenitor with prominent plasmacytoid dendritic cell developmental potential. *Immunity* 38, 943-57, 2013.

べての雑誌に掲載された粘膜炎論文の中から a Featured Paper of the Month (February, 2015) に選出された。

3) その他（共同研究成果を含む）

ビタミンAの代謝産物であるレチノイン酸（Retinoic Acid, RA）はDCなどから産生され、腸粘膜組織における免疫寛容の誘導に貢献している。徳島文理大学との共同研究として、ビタミンA欠乏マウスでは腸間膜リンパ節DCからのRA産生が誘導されず、代わりに炎症性サイトカイン産生が亢進した。その結果、Th17や炎症性Th2などのエフェクター細胞が誘導された。さらに、食物抗原に対する特異抗体も誘導され、経口免疫寛容が破綻していた（*Mucosal Immunol* 2014）。

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）。この知見に基づき、以下の研究成果を得た。先天性代謝異常疾患の治療において、HSC移植は、酵素補充療法のような定期的かつ頻回治療を回避できるという点では優れているが、放射線や抗がん剤などの移植前処置による重篤な副作用を伴う欠点がある。私たちは、既述の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、その代わりに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）。

2) 腸上皮幹細胞の恒常性維持機構

腸上皮幹細胞（Intestinal Stem Cell, ISC）は腸上皮再生の源である。私たちは、1)の成果に基づき、ISCに焦点をあてた研究も進めている。現在までに、ISCの維持に重要な新規遺伝子を2つ見出し、詳細なメカニズムを検討している。

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

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

ハイライト1 参照

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。糖尿病マウス、高脂肪食マウスの2モデルの心臓組織で発現増加するマイクロRNAが同定され、ターゲットとなる遺伝子および不整脈発現につながるパスウェイが特定された。

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改正が予告されていることを受けて、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、大阪大学倉智嘉久教授が率いる新学術領域研究班に属し、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JiCSAに属し、国立医薬品食品衛生研究所諫田泰成博士と共同で、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。

4. KCNQ1チャンネルを中心とした膜輸送体超複合体形成の解析

心筋活動電位の再分極に寄与するI_{Ks}チャンネルのαサブユニットであるKCNQ1分子の突然変異を原因とした多くの遺伝性チャネロパチーが報告されており、交感神経系による調節や男女差と関連も示されているが、その発症機序については多くの不明な点を残す。一方、近年、イオンチャンネルなどの膜輸送体が細胞膜上で形成する超複合体による機能的共役機構の存在が分泌細胞等で示され、疾患との関連が示唆されている。そこで、本研究では、大阪大学医学部永森収志博士と共同で、KCNQ1チャンネルを中心とした膜輸送体超複合体を構成する分子同定及び機能解析を通して、心筋チャネロパチー発症機序の解明を目指している。

5. 先端テクノロジーを用いた心血管系研究

(1) 動きベクトル解析を用いたin vitro心筋収縮能解析系の研究

ソニー株式会社が開発した動きベクトル解析システムは、心筋収縮能をin vitroで非侵襲的にアッセイすることを可能とした。本研究室では、同システムの薬物心毒性システムへの応用を検討している。本年度は、iPS細胞由来心筋細胞にMEA法と動きベクトル解析を同時に適応し、iPS細胞由来心筋細胞の電気生理学的性質と力学的性質を同時にモニターするシステムを確立した（J. Mol. Cell. Cardiol. 2014;77:178-191）。また、動きベクトル解析で不整脈自体をモニターする系を立ち上げ、spiral reentryの検出に成功した。

（ソニー株式会社メディカル事業ユニット松居恵理子博士らとの共同研究）

(2) 心臓電気現象3Dシミュレーター構築

東京大学新領域創成科学科久田俊明教授、杉浦清了教授らのグループが開発したヒト心臓シミュレーター（UT-heart）を、薬物心毒性評価へ展開することを行っている。本年度は、10の既存薬の5つの心臓イオン電流に対する作用をパッチクランプ法で測定し、同データをUT-heartに導入し既存薬の不整脈リスクをUT-heartが高精度に予測できることが立証した。UT-heartは3Dシミュレーターであり、心筋層に心内膜側-心筋層内-

心外膜側の3層構造を設定しているが、この3層構造をなくすと不整脈リスクの予測が著しく低下することから、薬物の心毒性評価での3Dシミュレーションの重要性が示された。

ハイライト1

心房細動は最も頻度の高い不整脈であり、日本における患者数は約100万人に上る。心原性塞栓による脳梗塞（本邦で年間約25万人）を高頻度に合併し、寝たきり老人の主要な原因の1つである。心房細動は高齢者で罹患頻度が飛躍的に上昇し、また心房細動患者は非患者に比べて認知症の頻度が約2倍高い。したがって、超高齢化社会を迎えたわが国では心房細動の予防・治療法の確立が急がれている。

(1) 心房細動関連遺伝子多型の研究

理化学研究所主導で行われているオーダーメイド医療実現化プロジェクト（第1期2006年～2007年、第2期2008年～2012年、第3期2013年～）に参加し、全ゲノムアプローチ法（genome-wide association study [GWAS]）により心房細動発症に関わる遺伝リスクを網羅的に解析している。前年度までは第2期GWASで合計10（日本人に限ると6）のリスクを同定した。本年度は第2期GWASで遺伝統計学的有意差に僅かに届かなかったSNPsに限りサンプル数を増やし解析を続けた。その結果、新たに心房細動発症と関連する6個のSNPsを同定した（図1）（Circulation 2014;130:1225-1235）。

（理化学研究所ゲノム医科学研究所尾崎浩一博士、久保光明博士、本学疾患バイオリソースセンター田中敏博教授らとの共同研究）

（東京大学新領域創成科学科久田俊明教授・杉浦清了教授・岡田純一博士、エーザイ株式会社澤田光平博士・吉永貴志博士らとの共同研究）

(2) 心房細動関連遺伝子の生物学的機能解析

GWASの強みの1つは、網羅的解析であることから新規の疾患パスウェイが見つかり、新たな治療標的が同定されることである。心房細動では、GWASで抽出された心房細動関連遺伝子の機能解析から、昨年度はあるSNPが心房細動の起源となる肺静脈心筋細胞の発生に関わることを明らかにした。本年度は別のSNPの解析を行い、アクチンの脱重合を促進することにより心房細動で見られるmyolysisの発生に関わることを明らかにした。

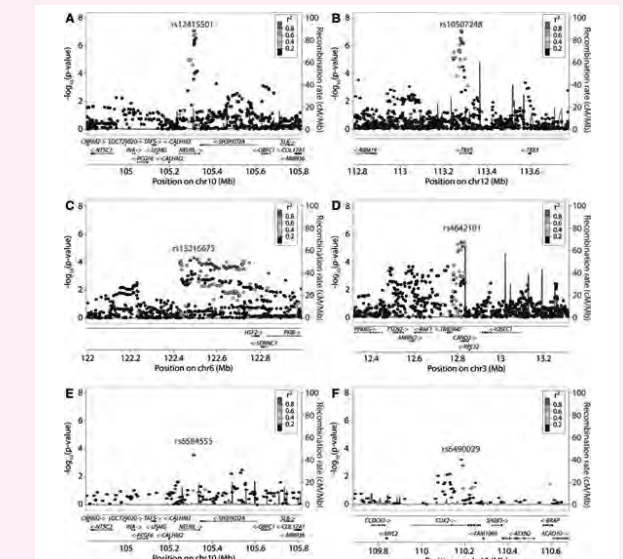


図1. Sub-threshold解析で新たに同定された6個の心房細動感受性SNPs

人事異動

転入: 伊藤沙希(修士課程)、佐藤央望(修士課程)、林英里奈(修士課程)、楊 笹茜(修士課程)、坂田歩美(研究補助員)、木村麗子(研究補助員)
転出: 李 敏(博士課程)、大西裕子(研究補助員)

業績目録

原著論文

- Sinner MF, Tucker N, Lunetta K, Ozaki K, Smith G, Trompet S, Bis J, Lin H, Chung M, Nielsen JB, Lubitz S, Krijthe B, Magnani J, Ye J, Gollob M, Tsunoda T, Müller-Nurasyid M, Lichtner P, Peters A, Dolmatova E, Kubo M, Smith J, Psaty B, Smith N, Jukema JW, Chasman D, Ebana Y, Furukawa T, Macfarlane P, Harris T, Darbar D, Dorr M, Holst A, Hastrup J, Svendsen H, Hofman A, Uitterlinden A, Gudnason V, Isobe M, Malik R, Dichgans M, Rosand J, Wagoner DV, Benjamin E, Milan D, Melander O, Heckbert SR, Ford I, Liu Y, Barnard J, Olesen M, Stricker B, Tanaka T, Kääb S, Ellinor P.

- (2014). Integrating genetic, transcriptional, and functional analyses to identify five novel genes for atrial fibrillation. *Circulation* 130, 1225-1235.
- Hayakawa T, Kunihiro T, Ando T, Kobayashi S, Matsui E, Yada H, Kanda Y, Kurokawa J, Furukawa T. (2014). Image-based evaluation of contraction-relaxation kinetics of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: Correlation and complementary with extracellular electrophysiology. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 77, 178-191.
- Tanaka A, Yuasa S, Mearini G, Egashira T, Seki T, Kodaira M, Kusumoto D, Kuroda Y, Okata S, Suzuki T, Inohara T, Arimura T, Makino S, Kimura K, Kimura A, Furukawa T, Carrier L, Node K, Fukuda K. (2014). ET-1 induces myofibrillar disarray and contractile vector variability in hypertrophic cardiomyopathy-iPS cell-derived cardiomyocytes. *J. Amer. Heart Assoc.* 13, e001263.

著書

- 古川哲史. そうだったのか! 臨床に役立つ心血管ゲノム医学. メディカル・サイエンス・イン

ターナショナル. 2014年3月14日.

総説

- 古川哲史(2014). iPS細胞由来心筋細胞を用いた薬効評価・副作用スクリーニング. 不整脈+PLUS p.9
- 黒川洵子(2014). In silico不整脈予測におけるCiPAの考え方、および日本の取り組み、CBI学会誌 4号2巻, 7.
- 黒川洵子, 古谷和春, 中谷晴昭, 芦原貴司, 久田俊明, 杉浦清了, 岡田純一, 田保充康, 吉永貴志 (2014). 医薬品安全性評価におけるインシリコアプローチの可能性について考える. *Japan. J. Electrophysiol. 心電図* 34:326-329.
- 笹野哲郎, 小泉章子, 古川哲史(2014). His-Purkinje 特異的な転写因子の機能異常とJ波症候群の関連 - J波症候群の新たな原因・修飾遺伝子の可能性 - 循環器専門医 22, 223-230.
- 笹野哲郎, 古川哲史(2014). 刺激伝導系の発生細胞工学 33, 1126-1129.

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
特任助教：梶 康一（～2014年8月）
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。

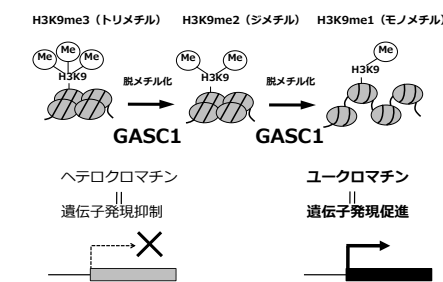
研究紹介

1. 精神神経疾患におけるヒストン修飾によるエピジェネティック制御の関与に関する研究

エピジェネティック制御が細胞分化に果たす役割については数多くの研究者が取り組んでおり、その成果が上がりつつある。一方で、エピジェネティック制御との深い関わりが推察される精神神経疾患の原因解明と治療法開発に関連した報告は未だ少なく、重要性の高い研究課題となっている。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本学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 GASC1 に着目した。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、昨年までに 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してきた。本年は、Gasc1 遺伝子変異ホモ接合体マウス及び正常マウス成体海馬をゴルジ染色してニューロンの形態を観察したところ、シナプス後部の指標となるスパインの異常増加が検出された。また、海馬急性スライスを用いた電気生理学的解析によりシナプス機能を調べたところ、シナプス前部と後部の両方の異常が検出された。本研究はヒストン脱メチル化というエピジェネティック制御の異常を有するマウスがヒトの精神運動異常に類する行動異常を示すという発見を契機に、ヒト精神神経疾患の病因・病態解明と治療法開発の研究において重要な示唆を与えるものである。

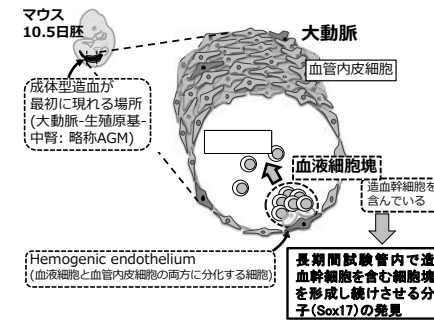
ヒストン脱メチル化酵素GASC1による遺伝子発現促進



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、発生中期の大動脈の内腔側に存在する血液細胞塊の構成細胞をストローマ細胞との共培養を行うと、Sox17 の発現が低下し、顆粒球やマクロファージなどの血液細胞に分化することが知られていた。そこで、血液細胞塊の構成細胞に転写因子 Sox17 を強制発現すると、ストローマ細胞上で浮遊した血液細胞塊を形成した。また Sox17 の発現を維持した細胞について、長期間の培養を行っても

多分化能が保持されることを見出した。また、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、顆粒球およびマクロファージなどの分化した血液細胞が産生した。このことは、造血幹細胞を含む血液細胞塊の構成細胞において、Sox17 の発現量が高い時には多分化能が維持され、発現量が低下すると血液細胞へ分化することを示す。さらに、Sox17 を導入した細胞を放射線照射で造血能を失わせたマウスに移植すると、長期間に渡って移植した細胞がマウスの中で様々な血液細胞を産み出すことが出来た。以上のことから、Sox17 導入細胞において造血幹細胞の維持が起きていることを明らかにした。また、Sox17 を導入した細胞を移植したマウスを解析すると Common myeloid progenitor (CMP) が多量に認められた。Sox17 導入細胞をストローマ細胞と共培養したときには、CMP と共に Myeloid erythroid progenitor (MEP) も観察され、複数回の継代を経ても CMP および MEP が維持された。このことより、Sox17 は造血前駆細胞、とりわけ骨髄球系前駆細胞の維持や分化を制御することが示唆される。

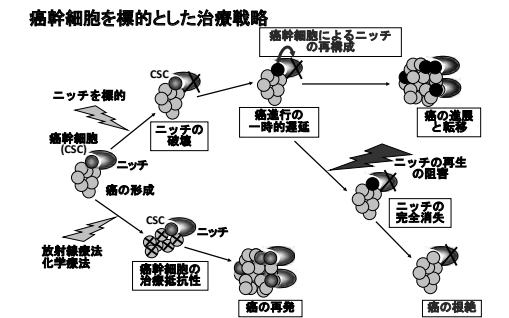


3. 癌幹細胞ニッチの人工構築と性状解明

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 (図下段)。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 Polymer #10 (Pol10) 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 Pol10 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) において 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 の関与が示唆された。

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、CXCL12、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 SP 細胞の培養上清を用いてマウス骨髄由来単球を培養したところ、単球から CD204 陽性 TAM への分化が誘導された。さらに免疫不全マウス脳内への共移植実験において、これら SP 細胞によって誘導される TAM が SP 細胞の腫瘍形成能を促進することが確認され、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推察できる (図上段)。これらを踏まえて、癌幹細胞の利己的な生存戦略の存在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。



研究業績

原著論文

- Nobuhisa I, Osawa M, Uemura M, Kishikawa Y, Anani M, Harada K, Takagi H, Saito K, Kanai-Azuma M, Kanai Y, Iwama A, and Taga T. Sox17-mediated maintenance of fetal intra-aortic hematopoietic cell clusters. Mol. Cell. Biol. 34:1975-1990, 2014

- Bizen N, Inoue T, Shimizu T, Tabu K, Kagawa T, and Taga T. A growth-promoting signaling component cyclin D1 in neural stem cells has anti-astroglial function to execute self-renewal. Stem Cells, 32:1602-1615, 2014
- Anani M, Nobuhisa I, Osawa M, Iwama A, Harada K, Saito K, and Taga T. Sox17 as a candidate regulator of myeloid restricted differentiation potential. Dev. Growth Differ., 56, 469-479, 2014

著書・総説

- 鹿川哲史, 備前典久, 清水健史, 田賀哲也: GSK3βシグナル経路による神経前駆細胞の自己複製制御, 生化学 86: 1, 68-71, 2014.
- 備前典久, 鹿川哲史, 田賀哲也: 神経幹細胞の分化制御機構—細胞外来性シグナルと細胞内在性プログラムによる分化制御, 井村裕夫, 高橋淳監修, 川崎洋志編集「脳神経系の再生医学—発生・再生の融合的新展開—」, 診断と治療社 印刷中 第2章1項, pp28-33, 2014.

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 大学院生：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. B細胞抑制性受容体 CD72 の結晶構造解析

B細胞は免疫系にあって抗体を産生する重要な役割をもつ。CD72はB細胞抗原受容体(BCR)を負に制御し、B細胞の過剰な応答を防ぐなどの役割を担う受容体と考えられている。すなわち、CD72が正常に機能することで、自己免疫やアレルギーは抑制されつつ、病原微生物への抗体産生が起こるものと考えられる。CD72はII型膜貫通タンパク質であり、B細胞や樹状細胞を含む抗原提示細胞上にホモ二量体として発現している。その細胞外領域には、C型レクチン様ドメインがあり、ここにリガンド結合領域が存在すると考えられている。CD72のリガンドとして、ある種の糖鎖が結合することが示唆されているものの、これまでCD72の立体構造は報告されておらず、リガンド認識の分子機構は明らかにされていない。われわれはCD72のC型レクチン様ドメイン(CD72-CTL D)の立体構造を決定し、得られた構造情報よりCD72とリガンド分子との間の分子認識機構を詳細

に解明し、これに基づき新規機能を有するリガンド分子を設計する基盤を与えることを目指している。

CD72-CTL Dは非常に凝集しやすく、大腸菌を用いた発現系では不溶性の封入体を形成してしまう。われわれは封入体を一度変性させて可溶化したうえで、再度活性を有する正常なタンパク質へ再生させるリフォールディング法を用い、さらに最適な発現コンストラクトや点変異の導入などの条件を検討することにより、非常に純度が高く、かつ結晶化に十分な収量でCD72-CTL Dを精製することができる条件を見出した。この試料を用いて結晶化実験を行い、結晶が得られた数種の条件をさらに最適化することで、ロッド状の比較的大型の結晶を再現良く得ることができた。放射光施設を用いたX線回折実験の結果、最大1.2 Å分解能という非常に高い精度で構造決定を行うことに成功した。得られた構造(図1)から、CD72-CTL Dは既報のレクチン様ドメインの構造と大きく異なる特徴を有し、これまでに報告されているレクチン様ドメインのリガンド結合様式とは異なる機構でリガンドを結合することが予想された。これらの結果をふまえ、CD72-CTL Dのリガンド探索と、CD72-CTL Dとリガンド分子との複合体の結晶構造解析を進めている。本研究は、本研究所免疫疾患分野の鏗田武志教授との共同研究である。

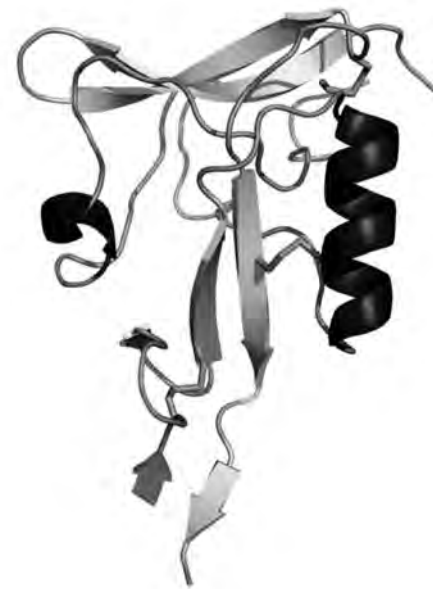


図1 CD72-CTL Dの立体構造

2. T細胞活性化因子とシグナル伝達分子の分子認識機構

ヒトの免疫系で重要な役割を担うT細胞の活性化には、主要組織適合抗原複合体(MHC)との結合によるT細胞レセプター(TCR)を介したシグナルの他に、CD28ファミリー分子を介したシグナルが必要である。CD28の細胞内領域は約40残基からなり、自身では酵素活性を有さない。シグナルの伝達にはまず、Tyrキナーゼがリクルートされ、これによりCD28の細胞内領域がリン酸化を受ける。次にこのリン酸化チロシン(pY)を含むpYMN M配列部位に対し、Grb2、Grb2-related adaptor downstream of Shc(Gads)、PI3-kinaseなどのシグナル伝達分子にあるSH2ドメインが結合することで下流へとシグナルが伝えられていく。CD28とこれら各シグナル分子との間の認識機構の詳細を明らかにすることで、自己免疫疾患や臓器移植後の拒絶反応を抑制する新規医薬品の開発につながることを期待される。

われわれはCD28のリン酸化部位である、pYMN Mを含む8残基からなるペプチドと、GadsのSH2ドメインとの複合体の結晶を調製し、最大1.1 Å分解能の回折データの取得に成功した。さらにCD28の同ペプチドと、PI3-kinaseの2種のSH2ドメイン(nSH2、cSH2)との

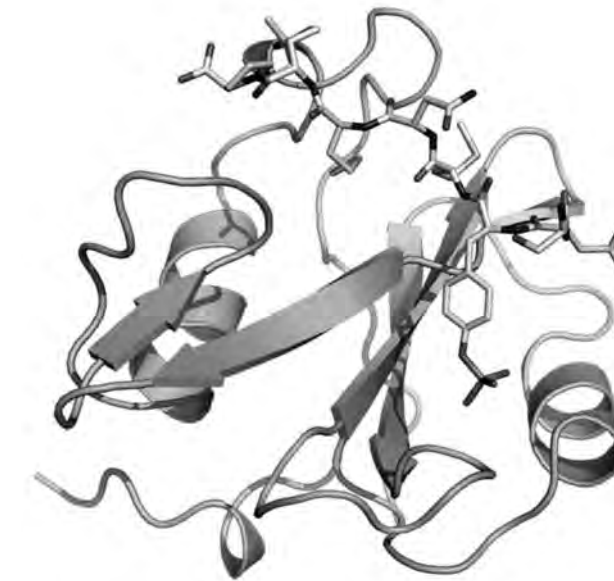


図2 リン酸化CD28ペプチドとPI3K SH2ドメインの複合体構造

複合体についても、それぞれ0.9 Å、1.0 Å分解能の回折データを得た。これら3種の複合体構造について、われわれが先に報告したCD28の同ペプチドとGrb2のSH2ドメインとの複合体と比較したところ、SH2ドメインに結合しているペプチドのコンフォメーションが異なることが明らかになった(図2)。また今回得られた3種の複合体構造を比較した結果、リン酸化Tyr部位の認識機構がそれぞれで若干異なることも明らかとなった。CD28ペプチドと各SH2ドメインとの分子間相互作用についてはITCなどによる解析も進めており、結晶構造情報と統合した総合的な分子間認識機構の理解に向けて研究が進展中である。本研究は、京都府立大学の織田昌幸准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。

人事異動

転出：大野麻理奈(技術補佐員)

業績目録

原著論文

1. Yamamoto M, Onogi H, Kii I, Yoshida S, Iida K, Sakai H, Abe M, Tsubota T, Ito N, Hosoya T,

Hagiwara M: CDK9 inhibitor FIT-039 prevents replication of multiple DNA viruses. J Clin Invest, 124: 3479-3488, 2014.

2. Kudo T, Ishizawa M, Maekawa K, Nakabayashi M, Watarai Y, Uchida H, Tokiwa H, Ikura T, Ito N, Makishima M, Yamada S: Combination of triple bond and adamantane ring on the vitamin D side chain produced partial agonists for vitamin D receptor. J Med Chem,

57: 4073-4087, 2014.

3. Numoto N, Nakagawa T, Ohara R, Hasegawa T, Kita A, Yoshida T, Maruyama T, Imai K, Fukumori Y, Miki K.: The structure of a deoxygenated 400 kDa haemoglobin reveals ternary- and quaternary-structural changes of giant haemoglobins. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 70: 1823-1831, 2014.

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 助教：梶 康一

研究内容

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では、酸素濃度の低い環境（低酸素環境）がみられます。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）。低酸素応答は、低酸素環境下における恒常性維持に働く機構です。一方で、がん、虚血性の疾患、免疫疾患などの病気でも認められ、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

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、ユビキチンリガーゼ pVHL との結合を促進して、その発現を負に制御します。本研究室では 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いため、私たちは PHD3 に着目した解析を行ってきました。

PHD3 は低酸素環境に応答して、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」が含まれていると考えられます。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。この複合体の構成分子として、これまでに、代謝制御に働く酵素、細胞骨格の制御に関わる分子、転写・翻訳に働く分子など、様々な分子を同定してきました。このことから、この複合体は低酸素下での多様な生理応答に関わることが考えられます。また、構成分子の一つ PRP19 は、

PHD3 と低酸素環境下で強固に結合して、細胞死を抑制することを明らかにしました。

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。さらに今後、低酸素性のがんの進行過程において低酸素コンプレックスがどのような役割を担っているのか、そのメカニズムにも迫りたいと考えています（図 1）。

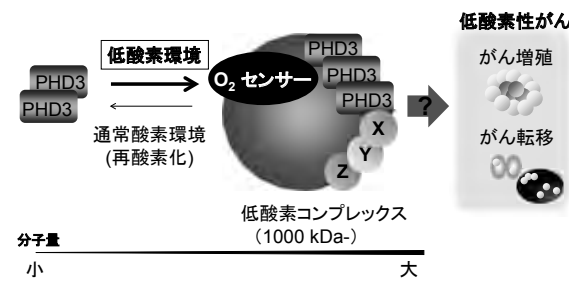


図 1 低酸素応答における低酸素コンプレックスの役割

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新たに見出しました。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て、新たな研究を開始しました。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

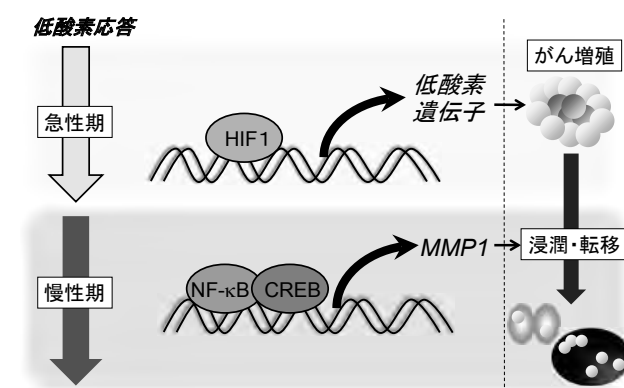


図 2 慢性期低酸素応答における NF- κ B・CREB の活性化

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 2）。したがって、低酸素性のがんの悪性化を抑止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。

ハイライト

低酸素応答における新たな代謝制御機構：PHD3 によるピルビン酸脱水素酵素の制御

がん細胞は解糖系に依存した代謝様式を示すことが知られています。その分子機構の理解はがんの病態解明に重要であると考えられ、近年、世界的に研究が進められています。私たちは低酸素コンプレックスの解析（図 1）を進める中で、新たにピルビン酸脱水素酵素（PDH）が低酸素コンプレックスに含まれることを明らかにしました。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。すなわち、PDH 活性が高いとミトコンドリア内での TCA 回路・電子伝達系を利用して効率的にエネルギーが産生され、その活性が低いと解糖系に依存した代謝様式を示すようになります。PDH は E1 α 、E1 β 、E2、E3 の 4 つのサブユニットから構成される複合体として存在し、ミトコンドリア内で働きます。細胞分画実験から PHD3 もミトコンドリアに存在していることが明らかになり、さらに PHD3 は、四種すべてのサブユニットと結合することが判明しました。そこで、PHD3 の発現を siRNA を用いて抑制したところ、PDH 複合体が不安定化して、PDH の酵素活性が有意に減少することが明らかになりました。こ

れらの結果から、PHD3 は低酸素下のミトコンドリア内で、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が明らかになりました。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 3）。今後、PHD3 を高発現する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っています。

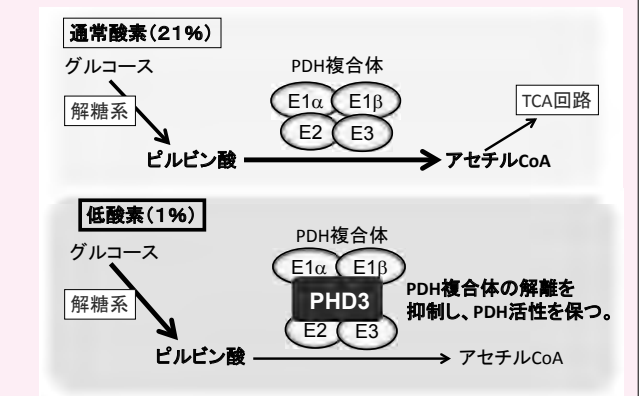


図 3 低酸素下での PHD3 による PDH 複合体の安定化

業績目録

発表論文

1. Kikuchi D, Minamishima YA, and Nakayama K. * Prolyl-hydroxylase PHD3 interacts with pyruvate dehydrogenase (PDH)-E1beta and regulates the cellular PDH activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 451, 288-294, (2014).

国際学会

Koh Nakayama

Activation of NF- κ B/CREB pathway during prolonged hypoxia induces *Matrix Metalloproteinase (MMP)1* expression and promotes the invasive ability of cancer cells. Keystone Symposia: Sensing and Signaling of Hypoxia 1月9日 Breckenridge, USA

国内学会

1. 中山 恒

HIF プロリン水酸化酵素 PHD3 とピルビン酸脱水素酵素 PDH の相互作用を介したエネルギー代謝制御機構 第 87 回日本生化学会大会 10月17日 京都

2. 中山 恒
HIF プロリン水酸化酵素 PHD3 とピルビン酸脱水素酵素 PDH の結合を介したエネルギー代謝制御機構 第 12 回がんハイボキシア研究会 11月22日 佐賀

3. 中山 恒、南嶋 洋司
HIF プロリン水酸化酵素 PHD3 はピルビン酸脱水素酵素 PDH-E1beta と結合して、細胞内のエネルギー代謝を制御する 第 37 回日本分子生物学会年会 ワークショップ 口演 11月27日 横浜

セミナー・シンポジウム講演

1. 中山 恒
慢性期低酸素下の転写制御ーがん転移に働く分子機構 第 2 回低酸素研究会 7月26日 東京

学外教育活動

中山 恒 早稲田大学 先進理工学部 非常勤講師

競争的研究費取得

1. 中山 恒 (代表) 文部科学省科学研究費補助金 基盤研究 (C) 「慢性期の低酸素応答を規定する転写因子の作用機序の解明」
2. 中山 恒 (代表) 武田科学振興財団 医学系研究奨励 「低酸素性がんの ATP 効率利用戦略ー選択的転写機構の解明」
3. 中山 恒 (代表) 加藤記念バイオサイエンス財団 研究助成金 「慢性的な低酸素環境が誘発するがん悪性化の分子機構の解明」
4. 中山 恒 (代表) ノバルティス科学振興財団 研究奨励金 「慢性的な低酸素環境が引き起こすがん悪性化の分子機構の解明」

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

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。生活習慣病の進展にマクロファージなどの免疫細胞が重要な役割を担うことが最近注目されている。当分野では免疫細胞の機能は細胞内代謝と密接に関連していることに着目し、その分子機構を解明することを主たる研究の目的としている。さらに、免疫細胞の機能を改善することにより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制御機構の解明

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、全過程に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特に重要な役割を果たすことが最近、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、種々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。癌細胞を用いた研究で広く明らかにされてきたように、細胞内代謝は細胞機能と密接に関連している。私たちは、マクロファージの多彩な機能は、細胞内代謝に大きく影

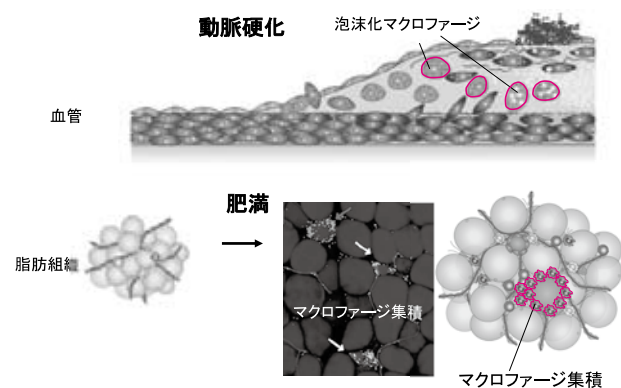


図1 肥満・動脈硬化の全過程にマクロファージが重要である

響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）。細胞内脂質の定量解析（リポミクス）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不飽和脂肪酸（ ω -3, ω -9）に代表される抗炎症性脂肪酸の合成を増加させ、オートクリン・パラクリン経路を介して自律的に炎症収束形質へと変化することを見いだした。さらに、その分子メカニズムについて転写因子のゲノムへの結合やエピゲノム変動を同定することのできるクロマチン免疫沈降-高速シーケンス法（ChIP-seq）、転写量やmRNAの発現を定量的に解析可能な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）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明らかにした。

代謝系と免疫系とは個体-組織-細胞の各階層において密接に連携している。例えば肥満にともない脂肪組織に生じた炎症は、全身のインスリン抵抗性を形成し動脈硬化を促進する。組織レベルでも、臍島に浸潤したマクロファージが β 細胞の機能異常を生じ、糖尿病の発症原因となることが知られている。今回私たちは、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

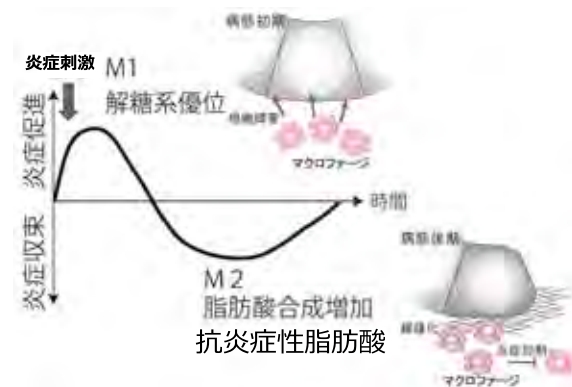


図2 マクロファージでは炎症応答の初期には解糖系が優位となるが、後期には脂肪酸合成が増加する

脂質代謝と密接に連携していることを明らかとした。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しやすい素地を形成しているのではないかと想定される。今後は、細胞内脂質代謝を是正することによって、細胞内代謝と密接に関連して制御される細胞機能を正常化し、マクロファージを安定化させ、肥満・生活習慣病を制御する治療・予防法へと発展させることを目指して、研究を続けている（図3）。

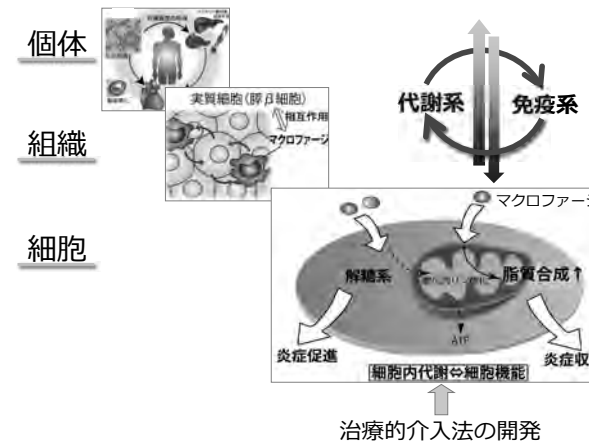


図3 免疫系と代謝系は個体、組織、細胞の各階層において密接に連携している
また、糖尿病をはじめとした生活習慣病発症の背景には、骨格筋量や質の低下が存在する。骨格筋の正常な修復や再生には、筋損傷後の筋再生を担う骨格筋幹細胞とマクロファージとの相互作用が重要である（図4）。そこで、この相互作用のメカニズムについても研究をすすめている。

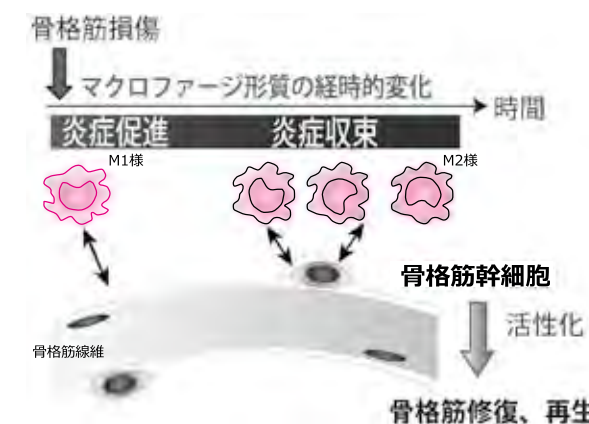


図4 骨格筋の正常な修復と再生にはマクロファージと骨格筋幹細胞との相互作用が重要である

人事異動

転入：林晋一郎（助教）、早川清雄（特任助教）、三木弥名子（技術補佐員）
転出：四方さゆり（技術補佐員）

業績目録

原著論文

Zalc A¹, Hayashi S¹, Auradé F, Bröhl D, Chang T, Mademtzoglou D, Mourikis P, Yao Z, Cao Y, Birchmeier C, Relaix F. Antagonistic regulation of p57kip2 by Hes/Hey downstream of Notch signaling and muscle regulatory factors regulates skeletal muscle growth arrest.

Development. 2014 Jul;141(14):2780-90. ¹: These authors contributed equally to this work

総説

1. 田中(大石)由美子 「細胞代謝とマクロファージ機能」血管医学-Vascular Biology & Medicine 第66号 特集 単球 polarity と病態 メディカルレビュー社 2014
2. 田中(大石)由美子 「メタボリック症候群における慢性炎症」月刊循環器 vol.4 No.4, 2014

2. 細胞内脂質代謝を調節する非コードRNA（non-coding RNA）の探索

タンパクをコードしていないゲノム領域から転写される非コードRNA(non-coding RNA)が多様な機能を持ち、細胞分化や細胞機能を制御することが注目されている。私たちは、核内に転写されるすべての新生RNA(nascent RNA)を全ゲノムスケールで同定することのできるGRO-seq法を用い、マクロファージが炎症刺激を受けて活性化される過程、ならびに活性化されたのに炎症を収束する過程とでそれぞれ転写される非コードRNAを検索した。その結果、炎症収束過程で脂肪酸代謝の増加に関連した遺伝子群の遺伝子領域に特異的に転写される非コードRNAを複数同定した。このうち、ゲノムのエンハンサー領域に特異的に転写され、当該遺伝子の発現調節にかかわるエンハンサーRNAと推測される非コードRNAに標的を絞り、エンハンサーRNAを介した遺伝子発現調節機構やエンハンサーRNAの転写調節にかかわるシグナル伝達ならびに転写制御機構の解析を行っている（図5）。

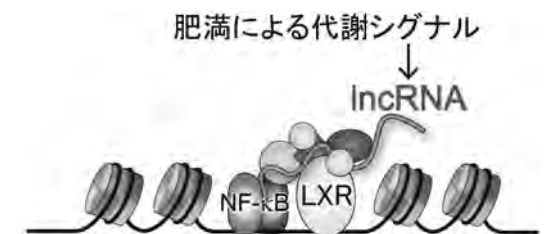


図5 IncRNAは代謝シグナルにตอบสนองし特異的な遺伝子発現を制御する

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

- アルツハイマー病の超早期病態を発見した（神経病理学）
- 脊髄小脳失調症と小頭症の遺伝子治療を基礎研究レベルで開発した（神経病理学）
- 赤血球成熟時に見られるミトコンドリア除去が、新規オートファジーによって実行されていることを見出した（病態細胞生物学）
- オートファジー細胞死は、アポトーシスの代替機構として、個体の発生に関わっていることを見出した（病態細胞生物学）
- 器官サイズ制御シグナル Hippo 系は、網膜前駆細胞の増殖と分化を制御することを見出した（発生再生生物学）
- がん原遺伝子産物 YAP の PDZ 結合部位は、細胞がん化能に必須であることを明らかにした（発生再生生物学）
- マウスの汗腺内に色素幹細胞を発見した（幹細胞医学）
- 色素幹細胞は休眠状態において高い放射線感受性を示すことを明らかにした（幹細胞医学）
- B 細胞に発現する抑制性レセプター CD22 に高親和性に結合する化合物を開発し、免疫増強作用を持つことを明らかにした（免疫疾患）
- B 細胞の活性化に活性酸素種が重要であることを明らかにした（免疫疾患）
- CALM2 の新生変異がカルシウム結合性の低下を介して先天性 QT 延長症候群を引き起こすことを究明した（分子病態）
- NK 細胞レセプター NKG2D のリガンドである ULBP 分子ファミリーの霊長類における進化的特徴を明らかにした（分子病態）
- 作製に成功した慢性活動性 EBV 感染症（CAEBV）モデルマウスを利用し、抗 EBV 剤の開発を進めている（成育医療研究センターとの共同研究）（ウイルス治療）
- 数十種類の病原体を同時・迅速・安価に定量できる新しい網羅的病原微生物検査系を企業に技術供与し、実用化した（ウイルス治療）

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：尾串雄次、陳西貴、藤田慶大、本間秀典、本木和美
非常勤講師：貴名信行、内原俊記、井上治久、曾根雅紀

研究内容

当分野は、神経変性疾患と知的障害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を行っている。

研究紹介

1. 小頭症モデル動物の人為的脳サイズ回復に成功

脳サイズは様々な脳活動の違いを生み出す根本的な要素であり、その調節分子メカニズムを解明する糸口として期待されてきたのが小頭症である。この中で、小頭症原因遺伝子の一つとして近年 PQBP1 が注目されている。PQBP1 は我々が15年前に発見したポリグルタミン病態に関与する分子であるが (Waragai et al., Hum Mol Genet 1999, Okazawa et al., Neuron 2002)、その後、小頭症を伴う知的障害の主要な原因遺伝子であることが示された (Kalscheuer et al., Nature Genetics 2003 等)。PQBP1 の細胞レベルの機能として、我々あるいはハーバード大学の Silver 教授のグループは、RNA のスプライシングを報告してきたが (BBRC 2000; Neuron 2002; Cell 2010; Genes Develop 2013; Nat Commun 2014)、疾患に至る具体的な病態メカニズム、また治療戦略については重要な問題が残っていた。

小頭症原因については従来、神経幹細胞の分化効率の上昇、神経幹細胞の細胞死亢進、分化ニューロンの細胞移動障害の3つのメカニズムが提唱されていた。我々は今回 PQBP1 欠損モデルマウスを作成し小頭症は再現した。ところが、小頭症メカニズムを検討したところ、上記の何れのメカニズムにも当てはまらず、唯一胎児の脳形成期における細胞周期時間の異常延長が起きていた。そこで、この延長こそが神経幹細胞の分裂回数を減らし結果としてニューロン産生を減らしているものと考えた。さらに、PQBP1 欠損マウスでは数百個に上る細胞周期調節タンパク質のスプライシング異常が起きていることを明らかにした。特に、APC4 (細胞周期を制御するユビキチンリガー複合体のサブユニット) の減少を介して細胞周期延長に貢献していることも判明した。また、PQBP1 欠損による神経幹細胞の細胞増殖抑制は、APC4 補充により回復し、胎生期の PQBP1 欠損マウスに APC4 を補うことにより、大脳皮質形成が回復した。

最後に小頭症の胎児期遺伝子治療を主眼として、PQBP1 欠損マウスを妊娠中の母マウスを対象に AAV ベクターを腹腔注射して PQBP1 を補充したところ、生後の脳サイズと学習能力など知的障害関連の症状が改善した。本研究成果は、人為的に脳サイズを調節することが可能であることを証明し、遺伝的な脳サイズ・知能の障害を改善しうる治療法への道筋を示したものである。

2. アルツハイマー病の発症前・超早期病態を部分的に解明

アルツハイマー病 (AD) の治療開発においては、発症前の早期病態を解明が急務である。AD 患者への臨床試験の一つは、アミロイドベータに対する抗体を体内に投与して、脳内での老人斑を形成することを抑制するものであった。欧米の複数の巨大製薬会社がヒト臨床試験を行ったが、抗体により老人斑は消失するにも関わらず、症状は改善しないという結果に終わっている (Holmes et al., Lancet 2008)。また第2の臨床試験として、アミロイドベータを産生する酵素であるガンマセクレターゼの阻害剤のヒト臨床試験も巨大製薬会社によって行われたが、副作用によって開発中止に至っている (Doody et al., N Engl J Med. 2013)。これらの経緯を踏まえ、2014年時点での AD 研究の最重要課題は、発症前・凝集前の超早期病態を明らかにし、これを介した治療戦略を示すことにある。今回、我々は AD モデルマウスと AD 患者の死後脳を対象に、リン酸化タンパク質の網羅的質量解析 (信頼度95%以上で、タンパク質同定数1,000、ペプチド同定数6万以上) を行い、東京大学ゲノム解析センターの宮野悟教授との共同研究により、得られた膨大なリン酸化プロテオームデータをスーパーコンピュータにより解析した。このビッグデータ解析から最終的に得られたコア分子を標的として、モデルマウスを用いた治療実験を行い最終的に機能を確認した。

3. 脊髄小脳失調症モデルマウスの遺伝子治療に成功～神経変性疾患の治療開発につながることを期待～

今回の研究の対象である SCA1 は、原因遺伝子の一部 (ataxin-1 遺伝子エキソン) の CAG リピート配列の異常伸長によって生じる、ポリグルタミン病と呼ばれる、共通の病態を持つ疾患群の一つと考えられている。これ

らの疾患では、疾患タンパク質のミスフォールディングのため生じた立体構造異常により、通常では関連のない分子と結合し、その機能阻害を介して細胞機能異常を生じさせることが知られている。我々の先行研究から、変異型 ataxin-1 が HMGB1 と結合し、核 DNA の損傷修復機能を果たす HMGB1 が不足するため、細胞機能異常が生じる可能性が示されていた (Qi et al. Nature Cell Biology 2007)。

この研究成果を臨床応用に近づけるため、最も信頼性の高い SCA1-KI マウス (ヒト患者の ataxin-1 遺伝子エキソン7の CAG 部分のノックインマウス) に対する HMGB1 の補充の治療効果を検討した。SCA1-KI マウスに HMGB1 をトランスジェニックすると、ロータロッドテストでの運動機能低下が7-21週齢まで改善し、平均寿命も30%延長した。また、SCA1-KI マウスで見られる小脳プルキンエ細胞の核 DNA 損傷増加も改善していた。次に、SCA1-KI マウスにアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いて外来性 HMGB1 を発現させる遺伝子治療実験を行ったところ、運動機能の改善が9-13週齢において認められ、平均寿命は68%延長した。

さらに今回、HMGB1 が核のみならずミトコンドリアの DNA 損傷修復に関与することを新たに明らかにした。ミトコンドリアタンパク質の生化学的解析と免疫電子顕微鏡解析の結果から、HMGB1 がミトコンドリア膜の内部に存在することを新たに発見した。また、次世代シーケンサーによるミトコンドリアゲノム解析から、SCA1-KI マウスではミトコンドリア DNA 変異が増加し、HMGB1 補充はこれを正常化することが明らかとなった。以上から、HMGB1 は核 DNA に対する損傷修復機能のみならず、ミトコンドリア DNA の品質管理機能をも介して、神経変性を抑制する作用があることが示

研究業績

原著

1. Sam S Barclay, Takuya Tamura, Hikaru Ito, Kyota Fujita, Kazuhiko Tagawa, Teppei Shimamura, Asuka Katsuta, Hiroki Shiwaku, Masaki Sone, Seiya Imoto, Satoru Miyano, Hitoshi Okazawa. Systems biology analysis of Drosophila in vivo screen data elucidates core networks for DNA damage repair in SCA1. Hum. Mol. Genet. 2014.03; 23(5): 1345-1364
2. Mineyuki Mizuguchi, Takayuki Obita, Tomohito Serita, Rieko Kojima, Yuko Nabeshima, Hitoshi Okazawa. Mutations in the PQBP1 gene prevent its interaction with the spliceosomal protein U5-15 kD. Nat Commun. 2014.04; 5: 3822
3. Ito H, Shiwaku H, Yoshida C, Homma H, Luo H, Chen X, Fujita K, Musante L, Fischer U, Frints S G M, Romano C, Ikeuchi Y, Shimamura T, Imoto S, Miyano S, Muramatsu S-I, Kawachi T, Hoshino M, Sudol M, Arumughan A, Wanker E E, Rich T, Schwartz C, Matsuzaki F, Bonni A, Kalscheuer V M, Okazawa H. In utero gene therapy rescues microcephaly caused by Pqbp1-hypofunction in neural stem progenitor cells. Mol Psychiatry. 2014.07; [Epub ahead of print] doi: 10.1038/mp.2014.69
4. Tagawa Kazuhiko, Homma Hidenori, Saito Ayumu, Fujita Kyota, Chen Xigui, Imoto Seiya, Oka Tsutomu, Ito Hikaru, Motoki Kazumi, Yoshida Chisato, Hatsuta Hiroyuki, Murayama Shigeo, Iwatsubo Takeshi, Miyano Satoru, Okazawa Hitoshi. Comprehensive phosphoproteome analysis unravels the core signaling network that initiates the earliest synapse pathology in preclinical Alzheimer's disease brain. Hum Mol Genet. 2015. 24(2): 540-558.
5. Hikaru Ito, Kyota Fujita, Kazuhiko Tagawa, Xigui Chen, Hidenori Homma, Toshikazu Sasabe, Jun Shimizu, Shigeomi Shimizu, Takuya Tamura, Shin-Ichi Muramatsu, Hitoshi Okazawa. HMGB1 facilitates repair of mitochondrial DNA damage and extends the lifespan of mutant ataxin-1 knock-in mice. EMBO Mol Med. 2014.12; 15:7(1):78-101.
6. Risa Shiraiishi, Takuya Tamura, Masaki Sone,

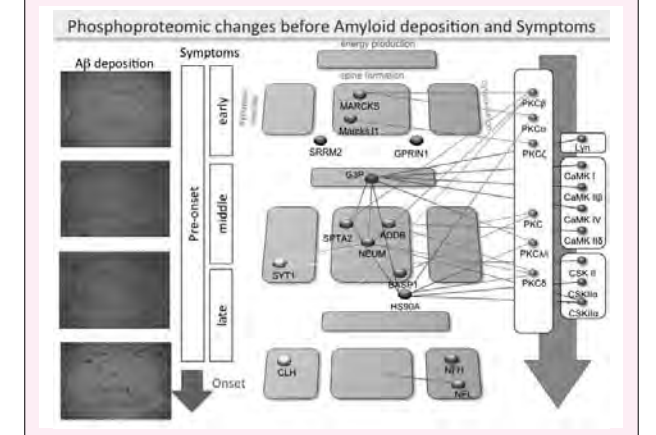
めされた。

今回の研究は HMGB1 による世界最高水準の治療効果を示し、同時に HMGB1 を介した新たな病態メカニズムを示したものである。

ハイライト

「リン酸化プロテオーム解析が示唆するアルツハイマー病の超早期シナプス病態」

ハイエンド質量解析装置を用い、4種類の AD モデルマウス脳とヒト AD 患者死後脳を対象としてリン酸化タンパク質及びリン酸化ペプチドを網羅的に解析した。さらに、スーパーコンピュータを用いたシステムバイオロジー解析により、異常リン酸化シグナルネットワークを時期、モデル特異的に作成した。これにより同定した、17個の AD 病態上重要な役割を果たすと思われるコアタンパク質の大部分は直接的に結合しており、これらを結ぶことでコア病態ネットワークを同定することが出来た。MARCKS は凝集前よりリン酸化が起きており、AD の新たな治療法開発につながる可能性がある。



Hitoshi Okazawa. Systematic analysis of fly models with multiple drivers reveals different effects of ataxin-1 and huntingtin in neuron subtype-specific expression. PLoS ONE. 2014.12; 9(12): e116567

7. Yuko Nabeshima, Mineyuki Mizuguchi, Asagi Kajiyama, Hitoshi Okazawa. Segmental isotope-labeling of the intrinsically disordered protein PQBP1. FEBS Lett. 2014.12; 588(24): 4583-4589

総説

1. 田村拓也、岡澤均 医学のあゆみ 251 巻 5 号 pp449-454 「神経変性疾患の細胞死と Hippo pathway — 神経変性は Hippo pathway で制御されるか? 」2014.11.1
2. 藤田慶大、岡澤均 Annual Review 神経 2015 「中外医学社」 pp65-72 「神経変性疾患の共通病態としての DNA 損傷修復異常」2015.1
3. Hiroki Shiwaku, Hitoshi Okazawa. Impaired DNA Damage Repair as a Common Feature of Neurodegenerative Diseases and Psychiatric Disorders. Curr Mol Med. 2015. [Epub ahead of print]

難治病態研究部門 病態細胞生物学分野

教授：清水重臣 特任講師：辻岡政経、鳥居 暁 助教：荒川聡子、本田真也
特任助教：室橋道子、山口啓史、申 珉京、杉村康行

研究内容

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、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則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生理学的解析を行ない、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、赤血球の最終分化の際に起るミトコンドリア除去を担っていること、② Atg5 欠損マウスの赤血球では野生型マウスと同程度のオートファジーが観察され、その結果赤血球内に残存しているミトコンドリア数は両方のマウスではほぼ同程度であること、③一方、新規オートファジーが誘導されない Ulk1 欠損マウスの赤血

球では、赤血球内での新規オートファジーが起らず、大量のミトコンドリアが残存すること、である。これらの事実より、赤血球における生理的ミトコンドリア除去は、新規オートファジーによって行われていることが明らかになった。この知見は、新規オートファジーの生物学的重要性を示すのみならず、血液学的にも重要な知見である。

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、オートファジー細胞死の発生学的役割を明らかにした。即ち、オートファジー細胞死が起らないマウスを作製したところ、アポトーシスを代償することができず、個体の発生異常が生じた。即ち、オートファジー細胞死の一つの役割が、アポトーシスのバックアップ機構である事が明らかとなった。

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。

Mnd2 マウスは、ミトコンドリアの膜間スペースに局在するプロテアーゼ Omi/HtrA2 の機能異常によってパーキンソン病を発症するマウスである。本年度は、このマウスの発症メカニズムの解析や発症を遅延させる治療法の開発を行ない、一定の成果を得た。また、ミトコンドリア機能を調節できる化合物を発見し、肥満マウスなどへの応用を検討している。

ハイライト

赤血球におけるミトコンドリア除去は、Atg5 非依存的オートファジー機構によって実行されている。

赤血球は、造血幹細胞を起源として、赤芽球系前駆細胞、赤芽球、網状赤血球などを経過して、成熟赤血球へと分化していく。赤芽球までは、核やミトコンドリアなどのオルガネラが存在しているが、分化の進行に伴い、まず細胞核が脱落し、次にミトコンドリアなどのオルガネラが除去されて成熟赤血球となる (図1)。赤血球の核は、細胞外に排出され、それを周囲のマクロファージが消化することで除去されることが知られているが、ミトコンドリア除去に関しては、十分な知見がなかった。

オートファジーとは、細胞を健全に保つために、古くなった細胞内小器官や蛋白質などを適切に分解する細胞機能であるが、我々は Atg5 非依存的オートファジーという新しいタイプのオートファジーを世界に先駆けて発見していた (Nature 2009) (図2)。今回我々は、この新規オートファジーが、赤血球からミトコン

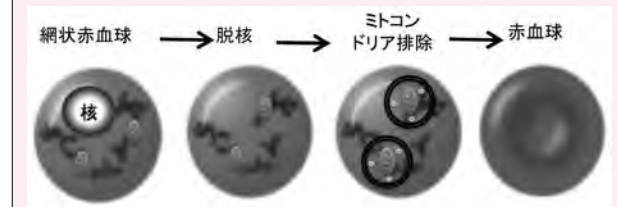


図1 赤血球の最終分化
赤血球の最終分化は、網状赤血球から脱核、ミトコンドリア排除が起って、最終的な成熟赤血球となる。



図2 哺乳動物で見られる2つのオートファジー機構
哺乳動物では、広く知られている Atg5 を利用するオートファジーと、新しいタイプのオートファジーが存在する。

ドリアを除くために必要であることを発見した。具体的には、従来型オートファジーがおきないマウス (Atg5 欠損マウス) では、赤血球からのミトコンドリア除去は正常であったが、新規オートファジーがおきないマウス (Ulk1 欠損マウス) では、赤血球からのミトコンドリア除去が行われず、大量のミトコンドリアを含む赤血球が観察された (図3)。即ち、赤血球から正常にミトコンドリアが除かれるためには、新しいタイプのオートファジーが重要であることが明らかとなった (図4)。また、赤血球からのミトコンドリア除去が行なわれないと、赤血球が脆弱となり、貧血になることも併せて見出した。

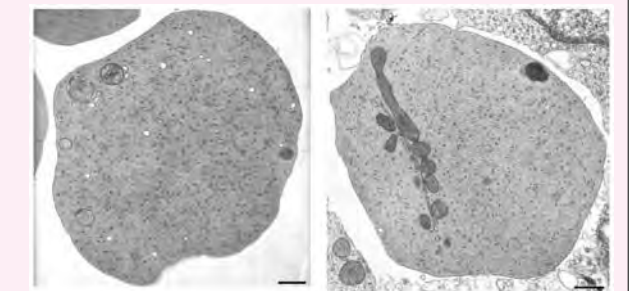


図3 Atg5 欠損赤血球 (左) と Ulk1 欠損赤血球 (右) の超微形態
Atg5 依存的オートファジーが起さない赤血球 (左) ではミトコンドリアが正常に無くなっている。一方、新規オートファジーが起さない赤血球 (右) ではミトコンドリアが除かれていない。



図4 まとめ
赤血球からミトコンドリアが除かれる時には、Atg5 を利用するオートファジーの関与は小さく、Ulk1 を利用する新しいタイプのオートファジーが関わっている。

人事異動

転入：鳥居暁 (特任講師)、杉村康行 (特任助教)、
桜井一 (技術補佐員)、砂田麻理子 (技術補佐員)、
関豊和 (大学院医歯学総合研究科博士課程入学)
遠藤葉月 (大学院医歯学総合研究科修士課程入学)、
川田真大 (東京理科大学からの卒業研究生)
転出：吉田達士 (京都府立医大へ転出)、橋詰力 (東
京大学農学部へ転出)、永田める葉 (大学院医歯
学総合研究科修士課程卒業)、小原睦美 (特別研
究員：東京理科大学修士課程卒業)

業績目録

原著論文

1. Honda S, Arakawa S, Nishida Y, Yamaguchi H, Ishii E, Shimizu S.: Ulk1-mediated Atg5-independent macroautophagy mediates elimination of mitochondria from embryonic reticulocytes. *Nature Commun* 5 Article number:4004 (2014)
2. Shimizu S, Yoshida T, Tsujioka M, Arakawa S.: Autophagic Cell Death and Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 15(2):3145-53 (2014)
3. Shimizu S, Honda S, Arakawa S, Yamaguchi H.: Alternative Macroautophagy and Mitophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 50:64-6 (2014)

総説

1. 清水重臣： オートファジーの新たな展開 [Thrombosis Medicine] 4: 5-10, 2014
2. 清水重臣： ネットプロテオーム「医学のあゆみ」252: 255-256, 2014
3. 清水重臣： 赤血球におけるミトコンドリア除去の機序「血液内科」印刷中 2015
4. 清水重臣： 老化と細胞死「第3版 アンチエイジング医学の基礎と臨床」印刷中 2015
5. 清水重臣： アポトーシス、ネクローシスとオートファジー細胞死「THE LUNG perspectives」印刷中 2015
6. Shimizu S.: Autophagic Cell Death and Cancer Chemotherapeutics. "Innovative Medicine : Basic Research and Development" Springer in press

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：浅岡洋一
特任助教：宮村憲央、内田好海
技術補佐員：生江美佐子 事務補佐員：尾高慶子

研究内容

概略

当分野では、肝臓を中心とする器官の発生と再生の分子機構を、発生工学、遺伝学、細胞生物学、分子生物学、生化学などの幅広い手法を用いて解明し、肝不全や肝癌などの難治性疾患に対する再生医療の開発を目指した基盤研究を展開することを理念としている。また、広範な細胞機能の発現に介在する細胞内シグナル伝達の観点から研究を行なうことにより、高次生命現象である器官の発生や再生の一般性と特殊性を明らかにするとともに、創薬の可能性を追求している。これら目的の理解を目指した教育を行っている。

研究紹介

1. 組織や器官形成のサイズを制御する Hippo シグナル伝達系に関する研究

Hippo シグナル伝達系は、ショウジョウバエの「組織や器官のサイズを規定するシグナル伝達系」として2003年に発見されました。本シグナル伝達系は、細胞の増殖と細胞死を同時に制御することで、組織や器官を構成する細胞数を制御します。近年になって、哺乳類動物のマウスやヒトにおいても本シグナル伝達系が保存されていること、興味深いことにヒトでは「癌抑制シグナル伝達系」として機能していることが示されました。肝臓で本シグナル系に異常が生じると、肝臓のサイズは大きくなり、この状態が継続すると肝癌になることがマウスを用いた実験で示されました。

我々は、細胞核内に存在する「DNA 損傷センサー」および「アポトーシスにおける NK シグナル系の役割」を解明する過程で、Hippo シグナル系を制御する癌抑制遺伝子産物 Ras association domain family (RASSF) に関わることになりました。「JNK シグナル系と Hippo シグナル系とのクロストーク」が興味深い課題として浮かびつつあります。

現在は、メダカやマウスを用いて、Hippo シグナル系の標的分子で転写共役因子である YAP 蛋白質の視点から、「脊椎動物の組織・器官形成および発がん」の研究をしています。

2. マウス胚性幹 (ES) 細胞を用いた細胞分化シグナル伝達系に関する研究

ES 細胞は器官や組織を構成するほぼすべての細胞に分化する能力を有することや試験管内で増殖可能であることから、細胞分化の仕組みの解明を目指す細胞生物学研究や細胞移植医療を目指す再生医学研究に用いられています。我々はマウス ES 細胞を用いた細胞分化の研究を行っています。これまでに「眼形成マスター遺伝子と呼ばれる PAX6 の神経分化における役割」や「ES 細胞や精巣で特異的発現する CrxOS の役割」について報告してきました。国立成育医療センター眼科との共同研究です。現在は、細胞分化の運命決定に関わる因子の同定を化合物ライブラリーを用いて探索しています。

3. 個体の恒常性を制御する生物時計に関する研究

概日リズムは、睡眠/覚醒、血圧、体温、ホルモン分泌、代謝等の生理現象の周期を主に光といった外界からの刺激を利用して外環境に適応させ、生体の恒常性を維持しています。従って、この機構の異常は躁鬱病やメタボリック症候群等の代謝異常を含む多くの病態に関与します。概日リズムは、分子時計と呼ばれる約 24 時間の周期性をもつ転写/翻訳に依存したフィードバックループにより制御されています。この分子時計は、CLOCK, BMAL1, 及び CRY の 3 つの因子 (時計蛋白質) により構成され、我々の全身の組織の個々の細胞に存在しています。疫学的な解析や概日リズムの異常を示す変異マウスの生理学・解剖学的解析により概日リズムと発癌等の疾患の関連は現象として多く報告されています。近年、BMAL1 や CLOCK 等の分子時計制御因子の変異マウスが早老症や代謝異常を発症することが報告され、一部その病態メカニズムに分子時計が関与していることが強く示唆されています。実際に、分子時計は *Wee1* や *c-Myc* 等の細胞周期制御因子や癌遺伝子の転写を制御します。また、時計蛋白質 CLOCK はヒストンアセチルトランスフェラーゼ (HAT) 活性を有し、その酵素活性により多様な細胞機能制御を担うグルココルチコイドレセプター (GR) 等の非ヒストン蛋白質をアセチル化修飾し、ターゲット蛋白質の機能を調節します。さらに、分子時計は CLOCK の HAT 活性により遺伝子の発現調節領域

のクロマチンリモデリングを行います。これは分子時計が細胞のエピジェネティック応答を担う可能性を示唆しています。我々は、分子時計制御に関わる新規の細胞内シグナル経路及び時計蛋白質の翻訳後修飾を見出してきました。重要なこととして、これらのシグナル経路や蛋白質の修飾は細胞の DNA 損傷応答制御においても重要な役割を担っています。実際に、我々は分子時計の光同調と DNA 損傷応答が共通に MAP キナーゼシグナル経路を介して制御されていることを見出しています。現

在我々は、分子時計制御因子として機能する DNA 損傷応答因子 (DNA damage Response Factor: DRF) を同定しています。これらの知見に基づいて、我々は古典的な DNA 損傷修復又は細胞死の選択という応答とは異なる「分子時計を介した新たな DNA 損傷応答機構」という仮説を提唱しそれを証明することにより、概日リズムの異常と発癌の関連の分子機構の一端を解明したいと考えています。

ハイライト

Hippo-Yap シグナル伝達系は網膜前駆細胞の増殖と視細胞分化を制御する

近年、器官サイズ制御シグナル Hippo 伝達系は下流の転写共役因子 Yap を介して、網膜前駆細胞の増殖と分化を司ることが報告されたが、詳細な分子機構については不明な点が多い。そこで我々は初期発生の解析に適したゼブラフィッシュを用いて、網膜形成過程における Hippo シグナルの機能解析を行なった。ゼブラフィッシュ胚に Mst2 (ショウジョウバエ Hippo のオルソログ) に対するモルフォリノを導入した結果、Mst2 機能阻害胚は網膜の形態異常ならびに色素形成異常を呈した。さらに生化学的解析の結果、Yap は転写因子 TEAD との相互作用に重要な TEAD 結合ドメインを介して網膜前駆細胞の増殖に寄与する一方、WW ドメインを介して転写因子 Rx1 と結合し視細胞分化を抑制することが示唆された。このことから、Yap は自身の異なる 2 種類の機能ドメインを介して増殖促進能と分化抑制能の二面性を発揮し、網膜

前駆細胞の増殖と視細胞への分化の切り換えを行なっていると考えられる (図 1)。

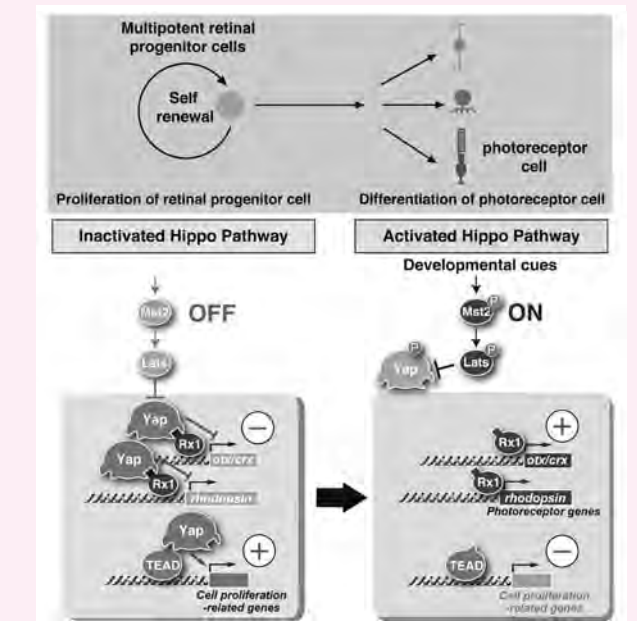


図 1 Hippo シグナルによる網膜視細胞の分化制御モデル

人事異動

転入：宮村憲央 (特任助教採用)、内田好海 (特任助教採用)、有馬啓恵 (博士課程進学)、石原えりか (博士課程入学)、田村律人 (博士課程入学)、濱部凜 (修士課程入学)、細淵彩 (修士課程入学)、鹿野優佳 (修士課程入学)
転出：牧野麻亜子 (修士修了)、山本誠 (博士修了)、内田好海 (特任助教辞職、6/30)、谷真里子 (修士退学、9/30)、細淵彩 (修士、分野変更、10/1)

業績目録

原著論文

- Yoichi Asaoka, Shoji Hata, Misako Namae, Makoto Furutani-Seiki, and Hiroshi Nishina (2014) Hippo pathway controls a switch between retinal proliferation and photoreceptor cell differentiation in zebrafish. *PLoS ONE* 9, e97365.
- Tadanori Shimomura, Norio Miyamura, Shoji Hata, Ryota Miura, Jun Hirayama* and Hiroshi Nishina (2014) The PDZ-binding domain of Yes-associated protein is required for its co-activation of TEAD-mediated *CTGF*

transcription and oncogenic cell transforming activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 443, 917-923.

- Zeyu Yang, Kentaro Nakagawa, Aradhan Sarkar, Junichi Maruyama, Hiroaki Iwasa, Yijun Bao, Mari Ishigami-Yuasa, Shigeru Ito, Hiroyuki Kagechika, Shoji Hata, Hiroshi Nishina, Shinya Abe, Masanobu Kitagawa, Yutaka Hata (2014) Screening with a novel cell-based assay for TAZ activators identifies a compound that enhances myogenesis in C2C12 cells and facilitates muscle repair in the muscle injury model. *Mol. Cell. Biol.* 34, 1607-1621.

- Keita Nakanaga, kotaro Hama, Kuniyuki Kano, Takanoa Sato, Hiroshi Yukiura, Asuka Inoue, Daisuke Saigusa, Hidetoshi Tokuyama, Yoshihisa Tomioka, Hiroshi Nishina, Atsuo Kawahara and Junken Aoki (2014) Overexpression of autotaxin, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, enhances cardia bifida induced by hypo-sphingosine-1-phosphate signaling in zebrafish embryo. *J. Biochem.* 155, 235-241.

- Shuji Terai, Taro Takami, Naoki Yamamoto, Koichi Fujisawa, Tsuyoshi Ishikawa, Yohei Urata, Haruko Tanimoto, Takuya Iwamoto,

Yuko Mizunaga, Takashi Matsuda, Takashi Oono, Miho Marumoto, Guzel Burganova, Luiz Fernando Quintanilha, Isao Hidaka, Yoshio Marumoto, Issei Saeki, Koichi Uchida, Takahiro Yamasaki, Kenji Tani, Yasuho Taura, Yasuhiko Fujii, Hiroshi Nishina, Kiwamu Okita, and Isao Sakaida (2014) [review] Status and prospects of liver cirrhosis treatment by using bone marrow-derived cells and mesenchymal cells. *Tissue Engineering Part B* 20, 1-5.

和文

- 畠星治, 堅田利明, 仁科博史：器官サイズを調節する転写共役因子 YAP の活性制御：生化学 86：464-468 (2014)
- 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：医学のあゆみ、印刷中 (2014)

受賞

- 有馬啓恵：日本薬学会第 13 年会で優秀発表賞受賞 (2014 年 4 月)
- 宮村憲央：第 21 回肝細胞研究会にて優秀ポスター賞を受賞 (2014 年 6 月)

難治病態研究部門 幹細胞医学分野

教授：西村栄美 助教：松村寛行
日本学術振興会特別研究員 (PD)：毛利泰彰、森永浩伸
プロジェクト助教：吉田 剛

研究内容

概要

生体を構築する多くの組織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解明とその破綻によりおこる病態研究から、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。ほ乳類の皮膚の表皮、そしてその付属器である毛包や汗腺の幹細胞システムをモデルとして、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と疾患発症や病態との関連の研究に取り組んでいる。幹細胞医学という新しい領域を創成し、再生医療や抗老化戦略、がん治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

幹細胞とは、細胞の将来の能力のことをいう。成体の組織や臓器において、個々の細胞の運命を解析するシステムが開発され、幹細胞の同定に応用されるようになった。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、簡単にアクセスできる点で実験系としても優れている。特に毛包においては幹細胞およびニッチの可視化を行いやすいなどの利点がある。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報告した。現在、さらなる性状解析を進めている (Okamoto N et al., PCMR, 2014)。

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。我々はそのに着目し、加齢に伴って皮膚の組織幹細胞において見られる変化を解析し統合的な理解を図っている。加齢マウスと若齢マウスでの比較をもとに、加齢マウスの髭毛包内において色素幹細胞がニッチ内で異所性に分化すること、これに次いで幹細胞の枯渇と白髪が起こることを見出した。さらに、ヒトの加齢に伴う生理的な白髪においても、同様の細胞が加齢に伴いニッチ内に現れ、未分化な色素細胞が枯渇してしまうこと、これについて白毛化が起こることを明らかにした。他の幹細胞システムにおいても同様の現象を認めており、組織幹細胞が加齢に伴って自己複製せずに分化するようになり、幹細胞プールが維持できなくなることで白髪などの老化形質が発現することを明らかにしている (Nishimura EK. et al. Science 2005) (Okamoto N et al., PCMR, 2014)

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のメカニズム

早老症候群においては、ゲノムの不安定性に加えて早発性の白毛症 (若白髪) や脱毛が高頻度に見られる。そこで、我々は、加齢に伴う色素幹細胞の異所性分化や白髪が、加齢に伴うゲノム損傷と何らかの関連を持つのではないかと仮説をたてて検証した。その結果、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できた。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、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た (Inomata K. et al. Cell 2009)。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。

ハイライト 1

休眠状態の幹細胞は高い放射線感受性を示す

一般的に、未熟な細胞で増殖頻度の高い細胞が放射線感受性が高いことが知られているが、我々の最近の研究から、毛包が休止期に入り、色素幹細胞が増殖を停止して静止期 (Go) に入ると放射線感受性となること、いったん細胞周期が回りはじめて幹細胞が Non-Go 期にあるときには、むしろ放射線耐性になることを見出した (図 1)。成長期毛包においても、静止期の色素幹細胞においては同様に放射線感受性が高かったことから、休眠状態で維持されている色素幹細胞は放射線感受性が高いこと、ニッチ内に休眠状態と非休眠状態の幹細胞が存在することによって、様々なタイプのゲノム毒性ストレスに対して耐性を示しうることが判明した。他の組織幹細胞システムにおいても普遍性を示すのか、興味深い。Ueno M et al.

Coupling of the radiosensitivity of melanocyte stem cells to their dormancy during a hair cycle. Pigment Cell & Melanoma Research. 2014

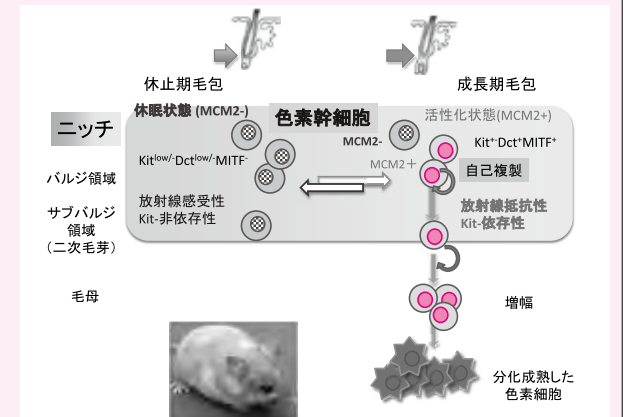


図 1 毛周期における色素幹細胞の活性化状態と放射線抵抗性。色素幹細胞は、毛周期と同調する形で、休眠状態と活性化状態を反復している。その活性化状態と放射線感受性や Kit 依存性は密接な関連を示す。

ハイライト 2

色素幹細胞をあらたに汗腺内に同定

ヒトのがんのなかでも悪性黒色腫 (メラノーマ) は、治療に最も苦渋する難治がんの代表である。しかし、掌蹠など毛包の存在しない皮膚においては、色素幹細胞の存在すら知られておらず、発生機序は明らかではない。我々は、マウスの汗腺の分泌部に自己複製可能な色素幹細胞を発見し、同様の細胞集団をヒトの掌蹠の汗腺分泌部内に見出した (図 2)。さらに、ヒト掌蹠のメラノーマ 初期病変における細胞分布や性状解析から、メラノーマ 初期病変の発生源となりうる可

能性が示唆された。(Okamoto N et al. A melanocyte-melanoma precursor niche in sweat glands of volar skin. Pigment Cell & Melanoma Research. 2014)

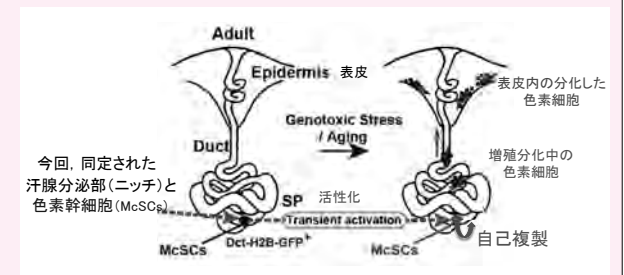


図 2 同定されたマウス汗腺内の色素幹細胞とそのニッチ

業績目録

原著論文

- Okamoto N, Aoto T, Uhara H, Yamazaki S, Akutsu H, Umezawa A, Nakouchi H, Miyachi Y, Saida T, Nishimura EK. A melanocyte-melanoma precursor niche in sweat glands of volar skin. Pigment Cell & Melanoma Research. 27(6):1039-1050, 2014
- Ueno M, Aoto T, Mohri Y, Yokozeki H, Nishimura EK. Coupling of the radiosensitivity of melanocyte stem cells to their dormancy during a hair cycle. Pigment Cell & Melanoma Research. 27(4):540-551, 2014

日本語総説

- 西村栄美:「メラノーマの発生・進展と幹細胞」痛と化学療法 Vol.41(4): p433-436, 2014 (痛と化学療法社)

国内学会招待講演

- 西村栄美: 皮膚の幹細胞システムと老化のメカニズム: 第 19 階分生研シンポジウム: (東京大学) 2014 年 12 月 19 日
- Emi K. Nishimura: Identification of Melanocyte Stem Cells and Melanocyte-melanoma Precursor Niche Glands:

International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa: (Kanazawa, Japan) November 4, 2014

- 西村栄美: 毛の再生と老化: 第 23 回日本形成外科学会基礎学術集会: (松本) 2014 年 10 月 10 日
- 西村栄美: 皮膚幹細胞と毛髪再生: 黒髪を再生できるか?: 第 35 回日本炎症・再生医学会: (万国津梁館・沖縄) 2014 年 7 月 2 日

国際学会招待講演

- Emi K. Nishimura: Coupling of the stress sensitivity of melanocyte stem cells to their dormancy during a hair cycle: IPCC 2014: September 7, 2014, Singapore
- Emi K. Nishimura: Hair follicle aging and stem cell regulation: 8th World Congress for Hair Research: May 14-17, 2014, Jeju Island, Korea
- Emi K. Nishimura: Stress sensitivity of melanocyte stem cells during a hair cycle: 8th World Congress for Hair Research: May 14-17, 2014, Jeju Island, Korea

学会発表

- Hiroyuki Matsumura, Mohri Yasuaki, Nguyen Thanh Binh, Morinaga Hironobu, Emi K. Nishimura: Defective maintenance of COL17A1 in hair follicle stem cells orchestrates hair follicle aging: The 12th Stem Cell Research

Symposium: 2014 年 5 月 30 日 (九州)

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』
金沢大学がん研究所 非常勤講師

外部資金獲得状況

- 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』
- 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』
- 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マソーム構成因子の役割とその仕組みの解明』
- 科学研究費補助金・特別研究員奨励費 (継続) 毛利泰彰 (代表) (最終年度) 『加齢に伴う毛包幹細胞の変化とそのメカニズムの解明』
- 科学研究費補助金・特別研究員奨励費 (新規) 森永浩伸 (代表) 240 万円 (H26 年度) 『DNA 損傷応答を介した色素幹細胞の自己複製制御の仕組み』

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
特任助教：松原直子、徐米多、赤津ちづる 特任講師：王継揚
外国人研究者：Soha Gomaa Ramadan Abdel Salam、劉志紅
技術補佐員：久留主幸江、中野成子、三宅春香 事務補佐員：高橋博子

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. 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。これまでの自己抗体の解析から、SLEで産生される自己抗体は、もともと自己抗原に弱く反応する交差反応性の抗体が体細胞突然変異によって自己抗原に強く反応するようになったものと考えられている。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)とCD40Lを過剰発現するCD40Lトランス

ジェニックマウスを交配することにより、自己抗原に弱く反応する交差反応性のBリンパ球(B細胞)が末梢リンパ組織に出現し、CD40Lの存在下で抗体産生細胞にまで成熟することを明らかにした(Kishi et al. PNAS 2012, Aslam et al. 2014)。この結果は、自己に弱く反応する交差反応性のB細胞が自己トレランスから逃れることを実際に示したものである。我々が樹立したマウスの実験系は、自己に弱く反応する交差反応性のB細胞が、どのようなメカニズムでトレランスを回避し、また、どのように病原性を持つ自己抗体産生をおこすようになるかを解析する優れた実験系になると考えられる。

2. 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

ROSは細胞の活性化や細胞死などで種々の役割を果たす。B細胞においても、B細胞抗原受容体(BCR)の架橋によりROSが産生することが知られている。このROS産生がBCRを介するシグナル伝達やB細胞の活性化に関与するとする知見と関与しないとする知見があり、また、その作用については不明な点が多い。ROSの産生には主なメカニズムとしてNADPH oxidaseによる産生とミトコンドリアでの産生の2つがあることが知られている。我々の研究室では、BCR架橋の際のROS産生のメカニズムとその役割の解析を行なっている。NADPH oxidaseの阻害剤およびミトコンドリア呼吸鎖の阻害剤を用いた解析により、BCR架橋によるROS産生には主にNADPH oxidaseが関与することが明らかとなった。さらに、抗酸化剤の存在下ではBCR架橋によるB細胞の活性化が顕著に抑制されることから、ROSはB細胞活性化で重要な役割を果たすことが明らかになってきた。NADPH oxidaseには7つのアイソフォームがあることが知られているが、そのうちNOX2がB細胞では多量に発現することが知られている。NOX2欠損マウスのB細胞では、BCR架橋の際に初期のROS産生が阻害されるが、後期のROS産生は正常におこり、また、B細胞の活性化も正常であった。この結果から、B細胞の活性化ではBCR架橋後後期のROS産生が重要であることが明らかとなった。

3. シアル酸誘導体による免疫応答制御

これまでに、種々の免疫制御化合物が開発されているが、B細胞を標的とした化合物や糖鎖に由来する化合物はあまり例がない。我々は、B細胞を標的とした糖鎖シグナル分子の修飾化合物を合成することにより、免疫制御化合物の開発をおこなっている。

CD22はSiglecファミリーのメンバーでSiglec-2とも呼ばれ、主にB細胞に発現する。Siglecのメンバーは種々の免疫細胞に発現し、いずれもシアル酸をリガンドとして認識し、その多くは抑制性の機能を持つ。シアル酸は動物細胞に多量に発現するが、微生物でシアル酸を発現するものはまれである。このことから、Siglecはシアル酸を認識して自己への免疫応答を抑制する機能を有すると考えられている。いくつかのSiglecがシアル酸に反応して免疫細胞の活性化を阻害することが示されている。一方、我々の研究室では、CD22が抗原にシアル酸

を含有するかどうかに関わらず、抗原へのB細胞の応答性を抑制することを明らかにした。この結果は、CD22がシアル酸を持つ抗原だけでなく、抗原一般へのB細胞応答を負に制御していることを示す。さらに、CD22欠損マウスを用いた解析により、CD22欠損B細胞では抗体産生応答が顕著に増強していることを示した。これらの結果から、CD22を阻害することによるB細胞の応答を増強できることが示唆され、CD22はB細胞を標的とした免疫応答制御に最適な標的分子であると考えられる。我々の研究室では、岐阜大学応用生命科学部の本曾教授、石田教授らとの共同研究により、CD22に高親和性で結合し、B細胞の活性化を制御する化合物の合成に成功した(ハイライト)。現在、この化合物の生物活性を種々のアッセイ系を用いて明らかにするとともに、製薬企業との共同研究により医薬品としての開発を行なっている。

ハイライト

CD22に高親和性に結合し、Bリンパ球の活性化を制御する化合物の合成

CD22はBリンパ球(B細胞)に発現する抑制性のレセプターで、*a*2,6シアル酸を特異的に認識する。我々の研究室でのこれまでの研究成果からCD22がB細胞を標的として免疫応答を制御する際の優れた標的分子となることが示唆されていた。しかし、CD22のシアル酸への親和性はIC50がmMオーダーで、低いものであるため、より高い親和性でCD22に結合する化合物の開発を行なった。Kelmらがシアル酸の9位にビフェニール基を導入することで、CD22への親和

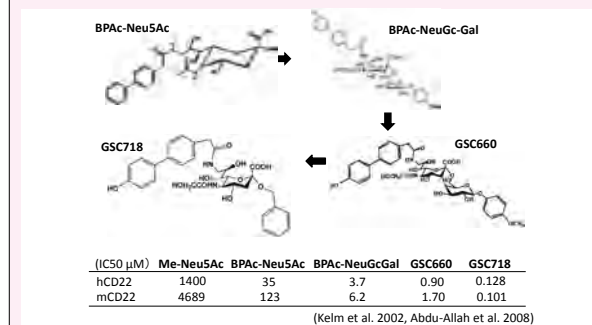


図1 高親和性CD22結合化合物GSC-718の開発

性が100倍程度上昇することを明らかにしていたので、この化合物をもとに合成展開し、2位にガラクトースを付加することで数倍親和性の向上した化合物を作成した。さらに、2位のガラクトースをベンジル基に置換することで、CD22への親和性がさらに数十倍上昇することを発見した(図1)。最終的に得られた化合物はナチュラルリガンドであるシアル酸に比べて1万倍以上高い親和性でCD22に結合し、IC50は約100nMとなった。この化合物をB細胞に作用させると、細胞の増殖を顕著に増強し(図2)B細胞の活性化を制御することが明らかとなった。

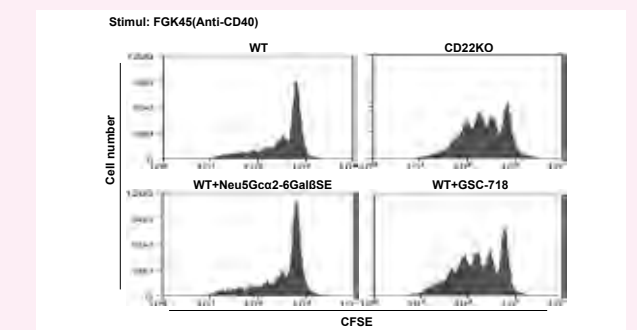


図2 高親和性CD22結合化合物GSC-718によるB細胞の活性化増強CFSEアッセイによりB細胞の増殖を測定した。増殖によりCFSEが希釈されるとピークが左にシフトする。

人事異動

転入：劉志紅(外国人研究員)
転出：別府愛(技術補佐員)、Soha Gomaa Ramadan Abdel Salam(外国人研究員)

業績目録

原著論文

1. Aslam, M., Kishi, Y. and Tsubata, T. (2014): Excess CD40L does not rescue anti-DNA B cells from clonal anergy. *F1000Research* 2: 218.
2. Naito-Matsui, Y., Takada, S., Kano, Y., Iyoda, T., Sugai, M., Shimizu, A., Inaba, K., Nitschke, L., Tsubata, T., Oka, S., Kozutsumi, Y. and Takematsu, H. (2014): Functional evaluation of activation-dependent alterations in the sialoglycan composition of T cells. *J. Biol. Chem.* 289: 1564-1579.
3. Kawai, Y., Ouchida, R., Yamasaki, S., Dragone, L., Tsubata, T. and Wang, J.-Y. (2014): LAPTM5 promotes lysosomal degradation of intracellular but not the cell surface CD3ζ. *Immunol. Cell Biol.* 92:527-534.
4. Tsubata, T. (2014): Siglecs and B cell regulation. In: Taniguchi N., Endo T., Hart G.,

Seeburger P., Wong C. (Ed.) *Glycoscience: Biology and Medicine*: SpringerReference (www.springerreference.com). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2014-04-01 06:48:34 UTC
5. Ouchida, R., Lu, Q., Liu, J., Li, Y., Chu, Y., Tsubata, T. and Wang, J.-Y.: FcmR interacts and cooperates with the B cell receptor to promote B cell survival. *J. Immunol.* 194: 3096-3101.
6. Muro, R., Nitta, T., Okada, T., Ideta, H., Tsubata, T. and Suzuki, H.: The Ras GTPase-activating protein Rasal3 supports survival of naive T cells. *PLoS ONE*. 10: e0119898.

難治病態研究部門 分子病態分野

教授：木村彰方 准教授：林 丈晴
助教：櫻井大祐 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、全国の臨床医学研究者との共同で、ことに小児発症心筋症例について既知の原因遺伝子における変異検索を実施しているが、小児心筋症では de novo 変異例が多いことを見出しており、典型例を報告した (Okada, et al. J Genet 93: 557, 2014)。また、iPS 細胞から誘導した心筋細胞を用いて、ET-1 による心筋細胞肥大と錯走配列形成が病因変異の有無を問わず肥大型心筋症に特徴的であることを報告した (Tanaka, et al. J Am Heart Assoc 3: e001263, 2014 年)。

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、動脈硬化病態を検討している。また、冠動脈硬化のリスクである 9p21 多型が長寿の遺伝マーカーであることを明らかにした

(Pinos, et al, Age 36: 993, 2014)。

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先天性 QT 延長症候群の原因として CALM2 の de novo 変異を多数同定し、それらが Ca 結合性を低下することを見出した (Makita, et al. Circ Cardiovasc Genet 7: 466, 2014)。また、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 (Ishikawa, et al. Circ Arrhythm Electrophysiol In Press)。

4. ヒトおよびサル MHC 領域の解析

HLA 領域には自己免疫疾患発症感受性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 NFKBIL1 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 アリルと CTL 誘導効率との関連を明確に示した (Iwamoto, et al. J Virol 88: 425, 2014. Nomura, et al. Biochem Biophys Res Commun 450: 942, 2014)。また、霊長類における ULBP 遺伝子群の多様性形成の特徴を進化学的に解明した (Naruse, et al. Immunogenet 66 : 161, 2014)。

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 多型が日本人における 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明らかにした (Sakurai, et al. Immunogenet. In Press)。

ハイライト (顕著な業績)

ULBP2 遺伝子群の多様性形成における進化学的意義 (Naruse TK, et al. Immunogenetics 2014; 66: 161-170)

NK 細胞受容体である NKG2D は、NK 細胞のみならず CD8 陽性 T 細胞にも発現し、免疫制御に関わる。NKG2D は MHC クラス I 様分子である ULBP をリガンドとするが、ヒトでは ULBP1 ~ ULBP6 の 6 種類が発現しており、その遺伝子群はクラスターを成している。一方、アカゲザルやカニクイザル等の旧世界ザルが実験モデルとして利用されているが、旧世界ザルにおける ULBP 遺伝子群の構造やゲノム多様性については不明な点が多い。我々は HIV ワクチン開発モデルとして用いられている旧世界ザルにおける免疫応答の個体差制御を解明することを目的として、MHC クラス I 遺伝子群のみならず、ULBP 遺伝子群についてもゲノム多様性を検討している。以前に旧世界ザルでは ULBP 遺伝子群がセットとして重複していることを報告しているが、ULBP2 遺伝子群の解析から、アカゲザル、カニクイザルともに ULBP2.1 と ULBP2.2 がセットとして重複しており、それぞれが著明な遺伝的多型性を示すことを明らかにした。さらに、アカゲザル、カニクイザルに加えて、ヒヒ、ヒト、チンパンジー、ゴリラを含めた霊長類における ULBP 遺伝子群の進化系統樹を作成したところ、ULBP2.1

および ULBP2.2 のゲノム多様性はアカゲザルとカニクイザルが分岐する以前から存在していたこと、ULBP 遺伝子群の祖先型は ULBP2 と ULBP5 であること、ULBP6 遺伝子はヒト特異的に存在し、ヒトとチンパンジーが分岐した後に、ULBP2 が重複して形成されたことなどが推定された。このことは、免疫制御における NKG2D 機能の多様性形成において ULBP 遺伝子群の進化学的選択が寄与したとの新たな視点をもたらす。

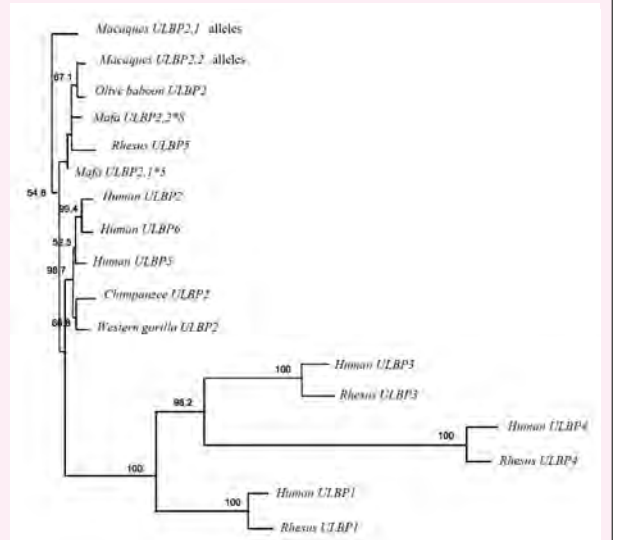


図 霊長類 ULBP 遺伝子群の進化系統樹
ULBP 遺伝子群は ULBP2 と ULBP5 の祖先型から重複・分岐しており、ヒト特異的に存在する ULBP6 はヒトとチンパンジーが分岐した後に ULBP2 遺伝子の重複で形成されたと推定される。

人事異動

転入：9月に山田佳代子 (大学院研究生) が研究に参加。

業績目録

- Iwamoto N, Takahashi N, Seki S, Nomura T, Yamamoto H, Inoue M, Shu T, Naruse TK, Kimura A, Matano T. Control of SIV replication by vaccine-induced Gag- and Vif-specific CD8+ T cells. J Virol. 2014; 88(1): 425-433.
- Nishio A, Noguchi Y, Sato T, Naruse TK, Kimura A, Takagi A, Kitamura K. A DFNA5 mutation identified in Japanese families with autosomal dominant hereditary hearing loss. Ann Hum Genet. 2014; 78(2): 83-91.
- Kimura A. Departure from the Hardy-Weinberg equilibrium. Gene 2014; 537(2): 357.
- Katsuomi G, #Shimizu W, Watanabe H, Noda T, Nogami A, Ohkubo K, Makiyama T, Takehara N, Kawamura Y, Hosaka Y, Sato M, Fukae S, Chinushi M, Oda H, Okabe M, Kimura A, Maemura K, Watanabe I, Kamakura S, Horie M, Aizawa Y, Makita N, Minamino T. Efficacy of bepridil to prevent ventricular fibrillation in severe form of early repolarization syndrome. Int J Cardiol. 2014; 172(2): 519-522.

- Naruse TK, Akari H, Matano T, Kimura A. Divergence and diversity of ULBP2 genes in rhesus and cynomolgus macaques. Immunogenetics. 2014; 66(3):161-170.
- Pinós T, Fuku N, Cámara Y, Arai Y, Abe Y, Rodríguez-Romo G, Garatachea N, Santos-Lozano A, Miro-Casas E, Ruiz-Meana M, Otaegui I, Murakami H, Miyachi M, Garcia-Dorado D, Hinohara K, Andreu AL, Kimura A, Hirose N, Lucia A. The rs1333049 polymorphism on locus 9p21.3 and extreme longevity in Spanish and Japanese cohorts. Age. 2014; 36(2): 933-943.
- Okada S, Suzuki Y, Arimura T, Kimura A, Narumi H, Hasegawa S. A novel de novo mutation of beta-cardiac myosin heavy chain gene found in a 12-year-old boy with hypertrophic cardiomyopathy. J Genet. 2014; 93(2): 557-560.
- Makita N, Yagihara N, Crotti L, Johnson CN, Beckmann BM, Roh MS, Shigemizu D, Lichtner P, Ishikawa T, Aiba T, Homfray T, Behr ER, Klug D, Denjoy I, Mastantuono E, Theisen D, Tsunoda T, Satake W, Toda T, Nakagawa H, Tsuji Y, Tsuchiya T, Yamamoto H, Miyamoto Y, Endo N, Kimura A, Ozaki K, Motomura H, Suda K, Tanaka T, Schwartz PJ, Meitinger T, Kääh S, Guichney P, Bhuiyan ZA, Shimizu W, Watanabe H, Chazin WJ, George AL. Novel calmodulin (CALM2) mutations associated with congenital

- arrhythmia susceptibility. Circ Cardiovasc Genet. 2014; 7(4): 466-474.
- Nomura T, Yamamoto H, Takahashi N, Naruse TK, Kimura A, Matano T. Identification of SIV Nef CD8 T cell epitopes restricted by a MHC class I haplotype associated with lower viral loads in a macaque AIDS model. Biochem Biophys Res Commun. 2014; 450(2): 942-947.
- Tanaka A, Yuasa S, Mearini G, Egashira T, Seki T, Kodaira M, Kusumoto D, Kuroda Y, Okata S, Suzuki T, Arimura T, Makino S, Kimura K, Kimura A, Furukawa T, Carrier L, Nobe K, Fukuda K. ET-1 induces myofibrillar disarray and contractile vector in hypertrophic cardiomyopathy-iPS cell-derived cardiomyocytes. J Am Heart Assoc. 2014; 3(6): e001263.
- 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 alpha-myosin heavy chain gene is associated with sick sinus syndrome. Circ Arrhythm Electrophysiol. In Press
- 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. In Press

難治病態研究部門 フロンティア研究室 ウイルス治療学

准教授：清水則夫

技術補佐員：望月 菊、伊賀上未来、小島尚美、島田ひかり、湯之前雄太

研究内容

ヒトに持続感染するウイルス性難治疾患の原因究明と治療法・検査法の開発を目指し研究を進めている。現在は主に、免疫不全マウスを利用したEBウイルス(EBV)感染症のモデル実験系の確立と治療薬・治療法開発への応用、再生医療の品質管理法としての網羅的ウイルス検査システムの開発と臨床検査への応用を目指した研究を行っている。

2014年の研究活動

A. 新規抗EBV剤の開発

清水、望月

B. 軟骨再生に関する研究

清水、小島、湯之前

C. 網羅的ウイルス検査系の開発と応用

清水、島田、伊賀上

研究の概要

A. EBV感染モデルマウスの開発と新規抗EBV剤の開発への応用

NOGマウスにヒト造血幹細胞移植したヒト化マウスにEBV感染させて作成したEBV感染症モデルマウスを利用し、新規に同定した抗EBV剤の候補物質の前臨床試験を実施中である(東北大学医学部、国立成育医療

研究センターとの共同研究)。

B. 再生医療の安全管理法に関する研究

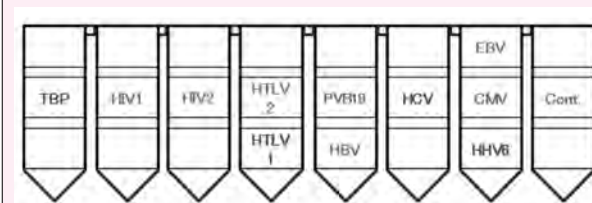
本学医学部運動器外科が行っている滑膜細胞を利用した軟骨再生・半月板再生医療の臨床研究を実施する際に必要な書類作成、幹細胞の分離・培養、ウイルス・マイコプラズマ検査を支援し、安全な臨床研究の実施に協力している。

C. 網羅的微生物検査系の開発と応用

多種類の微生物を網羅的・高感度・安価・簡便に検査することが可能な、マルチプレックスPCR法と試薬の固相化法を開発した。本学医学部付属病院に本検査系を公開し、年間1846検体の微生物検査を実施した。

ハイライト

マルチプレックスPCRによる細胞製剤のウイルス検査試薬を開発・実用化した。



図の説明: 8 well ストリップに表記のウイルス検査試薬を固相化し、簡便・迅速な検査を可能にした(同様な試薬はタカラバイオから販売中)

業績目録

原著論文

1. Fujiwara S, Kimura H, Imadome K, Arai A, Kodama E, Morio T, Shimizu N, Wakiguchi H: I Current research on chronic active Epstein-Barr virus infection in Japan. *Pediatr Int.* 56(2):159-166.(2014)
2. Tachikawa R, Tomii K, Seo R, Nagata K, Otsuka K, Nakagawa A, Otsuka K, Hashimoto H, Watanabe K, Shimizu N.: Detection of herpes viruses by multiplex and real-time polymerase chain reaction in bronchoalveolar lavage fluid of patients with acute lung injury or acute respiratory distress syndrome. *Respiration* 87(4):279-286.(2014)
3. Yoshimori M, Imadome K, Komatsu H, Wang L, Saitoh Y, Yamaoka S, Fukuda T, Kurata M, Koyama T, Shimizu N, Fujiwara S, Miura O, Arai A.: CD137 Expression Is Induced by Epstein-Barr Virus Infection through LMP1 in T or NK Cells and Mediates Survival Promoting Signals. *PLoS One* 9(11):e112564.(2014)
4. Ng SB, Ohshima K, Selvarajan V, Huang G, Choo SN, Miyoshi H, Shimizu N, Reghunathan R, Chua HC, Yeoh AE, Quah TC, Koh LP, Tan PL,

Chng WJ.: EBV-associated T/NK-cell lymphoproliferative disorder in children and young adults has similar molecular signature to extranodal nasal NK/T-cell lymphoma but shows distinctive stem cell-like phenotype. *Luek Lymphoma* 10:1-27 [Epub ahead of print] (2014)

総説・著書

1. 清水則夫、渡邊 健、高橋秀行、外丸靖浩、森尾友宏 再生医療等細胞製剤の品質評価法: ウイルス・マイコプラズマ試験 再生医療の細胞培養技術と産業展開 p51-62. 紀ノ岡正博監修 シーエムシー出版

競争的資金

1. 厚生労働科学研究費補助金 医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業(主任研究者 川崎ナナ)「細胞組織加工医薬品のウイルス感染リスク評価に関する研究」
2. 厚生労働科学研究費補助金 創薬基盤推進研究事業(主任研究者 小原有弘)「疾患研究のための細胞コレクションの資源化ならびに品質評価法・特性解析法開発に関する研究」
3. 厚生労働科学研究費補助金 難治疾患克服事業(主任研究者 藤原成悦)「慢性活動性EBウ

イルス感染症の診断法及び治療法確立に関する研究」

4. 成育医療研究開発費(主任研究者 今留謙一)「成育医療における病原体迅速診断システムによる適正な感染症診療の実現と周産期感染症予防に関する研究」
5. 厚生労働科学研究費補助金 再生医療実用化研究事業(主任研究者 関矢一郎)「幹細胞による次世代の低侵襲軟骨再生医療の開発と臨床応用」
6. 文部科学省 国家基幹研究開発事業 再生医療実用化プロジェクト 再生医療の実用化ハイウェイ(主任研究者 関矢一郎)「滑膜幹細胞による膝半月板再生」
7. 独立行政法人 科学技術振興機構 再生医療実現拠点ネットワークプログラム 技術開発個別課題(主任研究者 森尾友宏)「iPS細胞・体性幹細胞由来再生医療製剤の新規品質浄化技術法の開発」
8. 厚生労働科学研究費補助金 再生医療実用化研究事業(主任研究者 関矢一郎)「滑膜幹細胞による半月板・関節軟骨の治癒促進・再生」

教育実績

- 11月 大学院医歯学総合研究科医歯科学修士課程免疫学講義
担当教官: 清水則夫

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、罹りリスクなど、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実践への応用、発症前診断、疾患の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。

【分子細胞遺伝分野】

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、精神発達遅滞の潜在的ゲノム構造解析を進め、疾患特異的な微細ゲノムコピー数異常を同定し、原因遺伝子を特定した。
3. 日本人ゲノム多様性データベースを構築し公開した。

【遺伝生化分野】

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。

【分子遺伝分野】

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。

【分子疫学分野】

1. 日本人における 2 型糖尿病のリスク計算方法を作成・評価した。
2. リアノジン受容体 (RYR3A) の遺伝子多型が動脈硬化症と関連していることを見いだした。

【エピジェネティクス分野】

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。これらの遺伝子は、*Peg10*, *Peg11/Rtl1*, *Sirh7* 遺伝子の機能から考えて、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、マウスをモデルに解析している。

【ゲノム病理学分野】

1. 癌の Xenograft 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-間質間相互作用のプロファイルを行っている。臨床腫瘍組織を直接免疫マウスに移植した Patient-Derived-Xenograft (PDX) についても解析を開始した。
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 のドライバー遺伝子変異を同定した。

【生命情報学分野】

1. タンパク質間相互作用ネットワーク (PIN) の数理的解析に基づいた、相互作用数の中程度のタンパク質が生命ネットワークのバックボーンをなし、また薬剤標的分子にもなりうること、そして、相互作用数が大きいハブタンパク質は薬剤標的分子にならないことを明らかにした。
2. バイオインフォマティクスを機軸として、学内外の臨床系研究者と以下のような共同研究を行った：
 - (1) 肝細胞癌の浸潤や転移に関係し、予後予測に重要な遺伝子群とそれらのネットワークの同定。
 - (2) 肝細胞癌における AURKB スプライシングバリエーションの予後予測因子としての機能。
 - (3) ラットでの酸化ストレスによる肝発癌に関わる遺伝子 (IQGAP1) の同定。
 - (4) 大腸癌の予後予測マーカーとなる遺伝子 (MUC12) の同定およびバスウェイ解析。
3. HIV 時系列データの時間情報を取り入れた計算アルゴリズムを開発し、抗 HIV 治療を受けているエイズ患者体内におけるダイナミックな HIV 進化過程を推定することを可能にした。
4. *In silico* の解析で Hes1 が味覚受容細胞発生においてその幹細胞を未分化状態に維持することを明らかにした。

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. 上皮間葉転換を基軸としたがん転移分子機構の解明

近年、上皮間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT) は、正常の発生過程に加え、がん等の疾患への関与が注目されている。EMT 抑制性 miRNA を探索すべく、E-カドヘリンのプロモーター活性依存的に蛍光タンパク質を発現する独自の *in vitro* 機能的探索モデル系を確立した。同モデル系を用いた 470 種類の合成二本鎖 miRNA の機能的探索において新規 EMT 抑制性 miRNA である miR-655 を同定した。さらなる候補 miRNA を同定しており、現在、治療応用の可能性を検証している。

2. オートファジー活性を指標とした癌の個別化医療の確立

オートファジーは、癌細胞の生存・薬剤耐性に寄与することで、癌の進展に関与すると考えられてきた。しかしながら、当教室では、一部のヒト癌において、遺伝子異常に起因してオートファジーが不活性化していることを見出してきた。このことは、各癌に対して、オートファジー活性に基づいた癌の治療戦略が重要になることを示唆している。そのような中、本年度、実際の癌組織検体において、オートファジー活性の状態を調べることを目的として、オートファジーによるタンパク質分解の基質 p62/SQSTM1 分子の発現解析を行ってきた。様々な癌種由来 1258 症例中 358 症例において、p62 分子が高発現しており、これらの症例では、オートファジー活性が低いことが推測された。さらに、卵巣癌において、p62 分子が高発現する症例は、予後が悪いことが明らかに

なった (Iwadate R et al. *Acta Histochemica et Cytochemica*. 2015 in press) (図)。また、現在、オートファジー活性の有無に依存して感受性が異なる低分子化合物、マイクロ RNA などの探索を進めており、オートファジー活性を指標とした癌の個別化医療の確立を目指して研究を進めている。

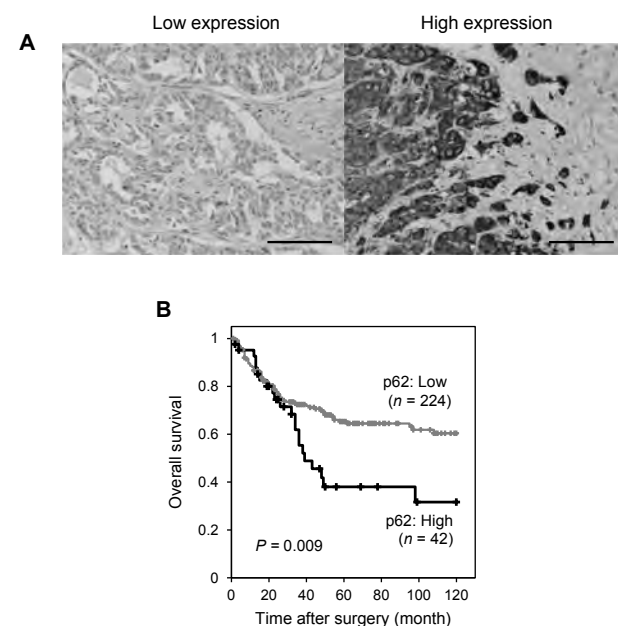


図 卵巣癌検体における p62/SQSTM1 タンパク質の発現解析
A: 卵巣癌組織における染色像
B: 266 例の卵巣癌検体における全生存率

3. 個別化がん医療実現のための開発研究

わが国において高い発症頻度の肺、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、国内で優れた成果を上げている 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。

4. 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

文部科学省・次世代がん研究シーズ戦略的育成推進プ

ログラム「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 (研究代表者・東京医歯大・稲澤譲治) において、食道扁平上皮がん (ESCC) を対象として、エク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、がん遺伝子中毒を引き起こすドライバー変異を見出し、新規治療薬の開発研究を実施している。非がん遺伝子中毒としてがん特異的に変調をきたす遺伝子ネットワークを包括的に理解し、ハブのみならず摂動因子を明らかにすることで ESCC における「合成致死性」の概念に基づく新規治療薬開発の道を開く。さらに、ESCC のみならず口腔扁平上皮がん (OSCC) 等の上部消化管領域におけるフィールド・キャンセライゼーション (広域発がん) の分子メカニズムの解明、及び ESCC の新たな診断法の確立に向けた研究を推進する。

人事異動

転入：古澤啓子、奥田将史 (医歯学総合研究、博士課程)
転出：今岡直毅、三藤里愛、宮田楓、森澤翔 (医歯学総合研究科 修士課程)、藤原直人、李 慧 (医歯学総合研究、博士課程終了)、岩館怜子 (大学院特別研究生)

業績目録

英文原著論文

- Iwadate R, Inoue J, Tsuda H, Takano M, Furuya K, Hirasawa A, Aoki D, Inazawa J. High expression of SQSTM1/p62 protein is associated with poor prognosis in epithelial ovarian cancer. *Acta Histochemica et Cytochemica*. 2015 in press.
- Hayashi S, Yagi M, Morisaki I, Inazawa J. Identical deletion at 14q13.3 including PAX9 and NKX2-1 in siblings from mosaicism of unaffected parent. *J Hum Genet*. 2015 in press.
- Komatsu S, Ichikawa D, Hirajima S, Nagata H, Nishimura Y, Kawaguchi T, Miyamae M, Okajima W, Ohashi T, Konishi H, Shiozaki A, Fujiwara H, Okamoto K, Tsuda H, Imoto I, Inazawa J, Otsuji E. Overexpression of SMYD2 contributes to malignant outcome in gastric cancer. *Br J Cancer*. 2015 112 357-364.
- Matsumoto H, Zaha K, Nakamura Y, Hayashi S, Inazawa J, Nonoyama S. Chromosome 9q33q34 microdeletion with early infantile epileptic encephalopathy, severe dystonia, abnormal eye movements, and nephroureteral malformations. *Pediatr Neurol*. 2014 51 170-175.
- Hosoda F, Arai Y, Okada N, Shimizu H, Miyamoto M, Kitagawa N, Katai H, Taniguchi H, Yanagihara K, Imoto I, Inazawa J, Ohki M, Shibata T. Integrated genomic and functional analyses reveal glyoxalase I as a novel metabolic oncogene in human gastric cancer. *Oncogene*. 2014 Mar 24.

国際学会発表

<招待講演>

- Inazawa J. Exploring cancer-related miRNAs by function-based screening. international conference on the 19th Annual Meeting of Korean Society of cancer Prevention. 12/December/2014
- Inazawa J. Exploring Tumor Suppressor microRNAs Silenced by Tumor-specific DNA Hyper-Methylation in Cancer 2014 17th Annual Conference A-IMBN .st.Luke's Medical Center-Global City Taguig, Philippines. 1/December/2014

<口頭発表>

- Hayashi S, Okamoto N, Takanashi J, Inazawa J. Comprehensive investigation of CASK and other relevant genes in 41 patients with intellectual disability, microcephaly and disproportionate pontine and cerebellar hypoplasia (MICPCH) using next-generation sequencing. ASHG 2014 Annual Meeting San Diego, CA. 21/October/2014

<ポスター発表>

- Uehara DT, Hayashi S, Mizuno S, Inazawa J. De novo heterozygous deletion involving NFIX in a Japanese subject with severe intellectual disability, postnatal growth delay and relative macrocephaly. ASHG 2014 San Diego, CA. 19/October/2014
- Fujiwara N, Inoue J, Kawano T, Kozaki K, Inazawa J. Mir-634-mediated modulation of cancer chemotherapy. AACR 2014 San Diego CA USA.
- Muramatsu T, Kozaki K, Imoto S, Yamaguchi R, Tsuda H, Kawano T, Miyano S, Inazawa J. Exploring target gene(s) within chromosome 19-amplification detected in a subclone from metastatic tumors in mouse transplantable OSCC.

国内学会発表

<シンポジウム>

- 稲澤譲治、野間博行: 進展するがんゲノミクス・

5. 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による「アレイ CGH 診断法実用化コンソーシアム」を組織し、臨床診断のつかない多発奇形を伴う発達遅滞を対象として複数のゲノムアレイを用いたスクリーニングを行い、646 例中 160 例 (24.8%) に疾患原因を検出している。また、本研究により見出されてきた CASK 遺伝子のハプロ不全による小脳脳幹部低形成を伴う小頭症の収集解析を行い、42 例中 32 症例 (76.2%) に疾患原因となる多彩なゲノム異常を検出し、病態を包括的に明らかにしてきた (Hayashi S et al. *J Hum Genet*. 2015 in press)。また、先天異常症の潜在的染色体異常診断ツールとして Genome Disorder Array (GD アレイ) の開発と実用化、日本人健常者の親子のトリオ 100 組のアレイ解析による日本人健常者の CNV データベースの構築と Web 公開を行った。

エピゲノミクス研究・がん関連マイクロ RNA の探索と診断・治療への応用。日本人類遺伝学会第 59 回大会シンポジウム。東京。2014 年 11 月 22 日

- 稲澤譲治: がん抑制性 RNA の探索と同定。第 73 回日本癌学会学術総会。パシフィコ横浜。神奈川。2014 年 9 月 27 日

<その他>

口頭発表: 6 演題
ポスター発表: 2 演題

【特許出願】

- 発明の名称: 卵巣癌の検出方法、及び抑制方法 分割出願番号: 13 / 659, 834 (出願日: 2012/10/24)、公開番号: US20130045479 (出願日: 2013/02/21)、登録番号: 特許第 8741641 号 (登録日: 2014/6/3)、発明者: 稲澤譲治、井本逸勢、菊池良子 (敬称略)、出願人: 富士フイルム株式会社、国立大学法人東京医科歯科大学、本学整理番号: P06-082US-V
- 発明の名称: 食道癌の検出又は予後の予測のための方法及び食道癌抑制剤: 出願番号: 特願 2010-041825 (出願日: 2010/02/26)、公開番号: 特開 2011-177034 (公開日: 2011/09/15)、登録番号: 特許第 5557139 号 (登録日: 2014/06/13)、発明者: 稲澤譲治、井本逸勢、春木茂男 (敬称略)、出願人: 富士フイルム株式会社、国立大学法人東京医科歯科大学、本学整理番号: P09-053
- 発明の名称: 核酸マイクロアレイのデータ補正方法: 出願番号: 200980128809.X (出願日: 2009/05/27)、公開番号: CN102105597 (公開日: 2011/06/22)、登録番号: 200980128809.X (登録日: 2014/07/02)、発明者: 氏原大、金原秀行、稲澤譲治、井本逸勢 (敬称略)、出願人: 富士フイルム株式会社、国立大学法人東京医科歯科大学、本学整理番号: P07-057D-P-CN
- 発明の名称: 卵巣癌の検出方法、及び抑制方法: 分割出願番号: 特願 2012-209426 (出願日: 2012/09/24)、基礎出願番号: 特願 2007-143111 (出願日: 2007/05/30)、登録番号: 特許第 5645089 号 (登録日: 2014/11/14)、発明者: 稲澤譲治、井本逸勢、菊池良子 (敬称略)、出願人: 富士フイルム株式会社、国立大学法人東京医科歯科大学、本学整理番号: P06-082V

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：竹中克也
特任助教：宮口 健 特任助教：高岡美帆

研究内容

遺伝性乳がん原因遺伝子 *BRCA1*・*BRCA2* は、二本鎖 DNA 切断修復機構で機能し、この両分子によって担われる情報伝達の流れの探究は、乳がんの発生機構を解明する上で不可欠である。*BRCA1*・*BRCA2* の変異による DNA 損傷修復機能の破綻は、複製や転写制御機構を阻害し、これが乳がん発生の原因となる。一方、この原因を逆手に取り、合成致死治療に応用する研究が進んでいる。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 の欠損はパクリタキセル導入による微小管の重合を安定化させる

当研究室では、家族性乳癌の原因遺伝子産物である BRCA2 が DNA 修復に加えて中心体の複製やポジショニング、細胞質分裂に機能することを報告してきた。我々は、BRCA2 の中心体、および細胞質分裂に対する機能に注目して、PARP1 阻害剤とは異なる機構で合成致死効果を示す低分子化合物を見出すため、東京医科歯科大学医療機能分子開発室所有の化合物ライブラリーを用いて、そのスクリーニングを行ってきた。これまでに BRCA2 欠失細胞 (Capan-1 細胞) に対して低分子既知化合物 1579 個の増殖抑制効果を測定した結果、53 化合物がヒットした。そのうち抗癌薬が 33%、抗生物質は 9 個、Na⁺・K⁺ ATPase 阻害剤は 3 個、その他関連性のないものは 23 個であった。抗がん剤の中には、パクリタキセルを含む微小管脱重合阻害剤が含まれていた。

次に、BRCA2 ノックダウン細胞の 3 次元 (3D) 培養に対して、パクリタキセルが合成致死を誘導するのかを検討した。3D 培養は、がん細胞が *in vivo* の腫瘍形態に近いスフェロイド形態を示すことから、単層培養より生体に近いモデルとして注目されている。そこでスフェロイドを形成しやすい乳がん T-47D 細胞に対して、siRNA で BRCA2 をノックダウンさせた後、パクリタキセルを添加した結果、パクリタキセル単剤に対して 3D スフェロイド形成は阻害された。そこで、BRCA2 の欠失がパクリタキセルとの併用で微小管の安定性に影

響を及ぼすのかを調べるため、微小管重合アッセイを行った。その結果、BRCA2 ノックダウン細胞にパクリタキセルを添加すると、重合微小管の割合は 34.5% から 57.5% に増加した。これに対して、パクリタキセル単剤ではその割合が 33.2% から 41.9% に増加したに過ぎなかった (図 1)。この結果は、BRCA2 の欠失とパクリタキセルとの併用は、微小管の重合・脱重合の動的不安定性をより重合安定性の方向に向かわせていることを示唆するものである。

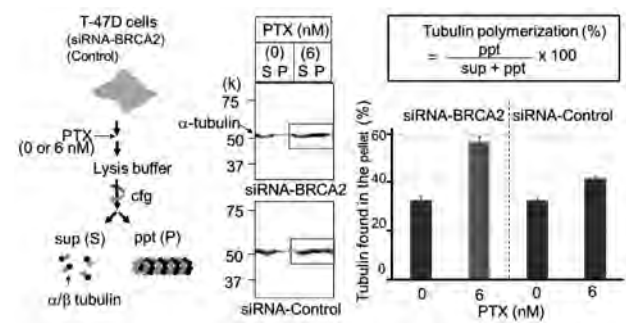


図 1 BRCA2 ノックダウン細胞の微小管重合アッセイ。細胞は、DMSO または 6nM パクリタキセル (PTX) を添加 24 時間後、微小管重合アッセイを行った。左図：細胞可溶化後、遠心して重合微小管を含む沈殿物 (ppt; P) とチューブリン 2 量体を含む可溶性画分 (sup; S) を分画した。中央：各サンプル同量を SDS-PAGE に展開して抗-チューブリン抗体でイムノプロットを行った。右図：各 SDS-PAGE のバンドを定量後、重合チューブリン量の比率を算出した。沈殿画分のチューブリン量に対する総チューブリン量 (沈殿画分と可溶性画分のチューブリン量を合わせた) の割合を重合チューブリン量の比率とした。実験は 3 回繰り返して行った。

2. M 期中心体は、細胞内ユビキチン修飾タンパク質凝集の足場として機能する

中心体は、細胞周期を通して 1 サイクル 1 回複製し、M 期前期に中心体は成熟し、M 期中期では成熟化が完了して染色体の分離に関与する。この成熟化は、染色体分裂時に中心体の構造維持のため重要と考えられているが、詳しい成熟化機構およびその機能は明らかでない。S 期と M 期の中心体構成タンパク質の相対的定量比較を行うため、SILAC 法でラベル化して質量分析計で解析した。その結果、991 個のタンパク質を同定し、310 個のタンパク質が S 期に、325 個のタンパク質が M 期に発現量が増加していることを示し、M 期中心体には、リジン (K)-48 鎖と K-63 鎖ユビキチン修飾タンパク質が多く集まって、ユビキチン修飾タンパク質の凝集が M 期の中心体の成熟を促進して、さらに中心体は、細胞内

ユビキチン修飾タンパク質を一時的に集める足場として機能することを明らかにした。

さらに、ユビキチン化の阻害は、中心体の成熟化を阻害し、異常な紡錘糸の形成や染色体分配による異数体を誘導したことから、SILAC - LC/MS/MS を用いて 37 個のユビキチン修飾タンパク質を同定して、その中で Hsp90 (Hsp90 α or Hsp90 β) が中心体に局在することを確認した。Hsp90 α の siRNA によるノックダウンでは M 期に紡錘糸形成が観察されず、Hsp90 α のクライアントタンパク質が PIK1 で、Hsp90 α の発現抑制が PIK1 活性を阻害することが推測された。さらに、Hsp90 α は、M 期の成熟した中心体において K-48 鎖、および K-63 鎖ユビキチン修飾されることを明らかにした。

3. ペリオスチン抑制によるデコリンの分泌は乳がん細胞の遊走・浸潤を減少させる

がん細胞の転移は、細胞表面分子とその微小環境に影響を受けるが、がん細胞の周囲を取り巻く環境 (間質) は、十分明らかになっていない。この間質に存在するタンパク質を同定するため、我々は葉状腫瘍 (腺組織を囲む間質細胞が腫瘍化したもの) に注目した。iTRAQ-質量分析計を用いて葉状腫瘍と正常組織のタンパク質を同定して、その発現量を相対比較した結果、葉状腫瘍組織でデコリンの発現量が低く、ペリオスチンが増加していた。この現象は、35 人の葉状腫瘍患者から採取した葉状腫瘍組織の組織免疫染色によっても確認できた。さらに、抗デコリンおよび抗ペリオスチン抗体の免疫沈降産物の質量分析による解析から、葉状腫瘍組織と乳がん細胞

株 BT-20 細胞で、両タンパク質の複合体を確認した。また、T-47D 細胞に対する siRNA によるペリオスチンのノックダウン後、MRM-質量分析計を用いて細胞培養液中のデコリンを検出した結果、デコリンを同定した。デコリンを発現しない MDA-MB-231 細胞にデコリンを過剰発現させた細胞培養液中からも分泌デコリンを検出した。この分泌されたデコリンが、がん細胞の遊走・浸潤性に影響を及ぼすのかを検討するため、siRNA-ペリオスチン処理した BT-20 細胞とデコリンを過剰発現させた MDA-MB-231 細胞を用いて検証した結果、両細胞ともに細胞遊走能と浸潤能が低下していた。本研究は、葉状腫瘍および乳がん細胞において、ペリオスチンとデコリンの複合体形成を明らかにして、この複合体形成阻害は抗癌剤の新しい分子標的になる可能性を示唆するものである。

我々は、ペリオスチンががん細胞の細胞質に遊離するデコリンを捕捉して、細胞外にデコリンの分泌を抑制するペリオスチンの新しい機能を提唱する。乳がん細胞に対するペリオスチンの発現抑制は、線維芽細胞や筋繊維芽細胞から分泌させるデコリンと同じ効果を引き起こす可能性を示唆するものである。そこで、デコリンの分泌が細胞内のデコリンとペリオスチンのタンパク質量のバランスが崩れたことに起因するモデルを提唱する。細胞外マトリックスの構成因子として、デコリンはがん細胞の遊走・浸潤を阻害することが他のグループからも報告されている。従って、デコリンとペリオスチン両方を発現するがん細胞では、両者の結合阻害剤は、がん細胞自らデコリンを分泌して、がんの浸潤転移を抑制する新しい抗がん剤の分子標的となる可能性が示唆された。

人事異動

転入：高岡美帆 (特任助教)、伊藤 駿 (修士課程)、梅垣麻里子 (修士課程)、佐藤 玄 (修士課程)
転出：長崎光一 (特任講師)、Nadila Wali (博士課程)、Nurmaa Dashzeveg (博士課程)、手代木翔太 (修士課程)

業績目録

原著論文

- Ishiba T, Nagahara M, Nakagawa T, Sato T, Ishikawa T, Uetake H, Sugihara K, Miki Y, Nakanishi A. Periostin suppression induces decorin secretion leading to reduced breast

- cancer cell motility and invasion. Sci Rep. 2014 Nov 17; 4: 7069.
- Tan TZ, Miow QH, Miki Y, Noda T, Mori S, Huang RY, Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transition spectrum quantification and its efficacy in deciphering survival and drug responses of cancer patients. EMBO Mol Med. 2014 Sep 11; 6(10): 1279-93.
- Kimura H, Miki Y, Nakanishi A. Centrosomes at M phase act as a scaffold for the accumulation of intracellular ubiquitinated proteins. Cell Cycle. 2014; 13(12):1928-37.
- Wada Y, Matsuura M, Sugawara M, Ushijima M, Miyata S, Nagasaki K, Noda T, Miki Y. Development of detection method for novel fusion gene using GeneChip exon array. J Clin Bioinforma. 2014 Feb 18; 4(1): 3.

- Takaoka M, Saito H, Takenaka K, Miki Y, Nakanishi A. BRCA2 phosphorylated by PLK1 moves to the midbody to regulate cytokinesis mediated by nonmuscle myosin IIC. Cancer Res. 2014 Mar 1; 74(5): 1518-28.
- Wali N, Hosokawa K, Malik S, Saito H, Miyaguchi K, Imajoh-Ohmi S, Miki Y, Nakanishi A. Centrosomal BRCA2 is a target protein of membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP). Biochem Biophys Res Commun. 2014 Jan 24; 443(4): 1148-54.

総説

宮口 健、三木 義男：癌の発症メカニズムと癌関連遺伝子、癌の遺伝医療 南江堂、2-8, (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性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開始する。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. 日本人における 2 型糖尿病のリスク計算と評価

GWAS による 2 型糖尿病関連遺伝子の抽出

日本人における 2 型糖尿病のリスク計算方法の作成を行った。世界で行われている 2 型糖尿病およびその関連フェノタイプによる症例対照研究は全体では約 3,000 論文・129 SNPs が報告されているが、その中から日本人を対象とした研究として 286 論文・69 SNPs まで絞り込

む事ができた。そこで、解析結果の P 値の分布、サンプルサイズ、何回独立した研究室で再現されているか等で信頼度順に SNP を並び替え、それぞれの論文報告をもとに尤度比 (Likelihood Ratio: LR) を計算した結果を図 1 に示す。

左側の表は日本人用の 2 型糖尿病関連 SNP リストで、右側の表は欧米人用として報告されているものである (Cell,148:1298, 2012 より抜粋・改変)。最も信頼度が高いものは日本人・欧米人共に、最初に GWAS で発見された Transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) 遺伝子である。また、Top10 を見ると、順位の違いはあるが頻出する SNP は同じである。一方、10 位以降 30 位までを見ると、欧米特異的・アジア特異的な SNP が共通の SNP の中に含まれてきて人種差が歴然としてくる。以上の点を踏まえて、Top10 のみで計算するのであれば欧米人用を適用しても良いが、欧米人用ではオッズ比等が異なることもあり、なるべく日本人用を使用した方が良い事が判かる。

日本人用の2型糖尿病関連SNPリスト				欧米人用の2型糖尿病関連SNPリスト			
順位	SNP	染色体	遺伝子	順位	SNP	染色体	遺伝子
1	rs7794843	10q26	TCF7L2	1	rs7794843	10q26	TCF7L2
2	rs1111878	10q26	near_APOE	2	rs10811881	near_CDKN2A/B	
3	rs13289834	10q26	SLC6A6	3	rs2277882	near_KCND1	
4	rs4911841	10q26	near_CDKN2A/B	4	rs4801136	PTO	
5	rs4922890	10q26	JZFP2	5	rs7794843	CDKN2A/B	
6	rs7794843	10q26	CDKN2A/B	6	rs1820848	SLC6A6	
7	rs2277882	10q26	KCND1	7	rs4420863	JZFP2	
8	rs2277882	10q26	KCND1	8	rs2277882	KCND1	
9	rs1111878	10q26	near_APOE	9	rs1111878	near_APOE	
10	rs1111878	10q26	JAZF1	10	rs1111878	near_PRR12	
11	rs13289834	10q26	GCCR	11	rs7579328	near_R51	
12	rs13289834	10q26	near_SPRY2	12	rs4477053	near_ZBED3	
13	rs342674	10q26	PROX1	13	rs2371362	KCND1	
14	rs13289834	10q26	KCND1	14	rs1820848	SLC6A6	
15	rs13289834	10q26	near_DUSP9	15	rs864740	JAZF1	
16	rs1436655	10q26	CDC12-CAMK1D	16	rs1522731	RBM27	
17	rs1436655	10q26	PEPD	17	rs1002029	RPLP2-AS1	
18	rs1436655	10q26	CDC12-CAMK1D	18	rs1002029	WPI1	
19	rs1512463	10q26	UBE2E2	19	rs1512463	EPO	
20	rs1719872	10q26	HMG20A	20	rs898854	TP53NP1	
21	rs1719872	10q26	near_DUSP9	21	rs898854	near_DUSP9	
22	rs1820848	10q26	PRR12	22	rs1277976	CDC12-CAMK1D	
23	rs1820848	10q26	ARAF1	23	rs1103188	near_DCD	
24	rs1820848	10q26	VPS36A	24	rs7579328	THADA	
25	rs1820848	10q26	TP53NP1	25	rs4801136	near_ADAMTS1	
26	rs1820848	10q26	SYNG1	26	rs1103188	SYNG1	
27	rs1820848	10q26	near_GCC1	27	rs1820848	MTNR1B	
28	rs1820848	10q26	GLIS3	28	rs2327798	HNF1B	
29	rs1820848	10q26	near_PSMC6	29	rs2327798		
30	rs1820848	10q26	KCNK16	30	rs2327798		

図 1 2 型糖尿病関連 SNP の日本人と欧米人の比較

高島コホート研究のデータを用いた検証

上述の日本人用 SNP リストを作った上で、論文から取ってきた数値から算定式を作り、高島コホート研究のデータを用いて検証した。高島コホートとは文部科学省「21 世紀 COE プログラム」の一環として平成 16 年度より山形大学医学部が山形県高島町と共同で実施したゲノムコホート研究である。

使用したのは高島コホートの 1,615 人 (男性 724 人、

女性 891 人) のデータである。年齢は 61.3 ± 10.2、BMI は 23.4 ± 3.1、高血圧 (Hyper Tension; HT) は 52.3% で、2 型糖尿病の罹患率は 9.5% であった。その中で、SNP データ・BMI・HT のフェノタイプデータの欠損値のないデータセットを使用し、事後確率値がどのくらい正確に 2 型糖尿病を判別できるのか Receiver Operating Characteristic (ROC) 分析により検証を行った (図 2)。

BMI あるいは HT のみでは pre-test probability と比較してほぼ変わらない。これに 20SNPs を入れると多少上がり、ROC 曲線の下面積 (area under the curve; AUC) は 0.707 となる。このように SNP データを入れると、事後確率値が上昇することが分かる。

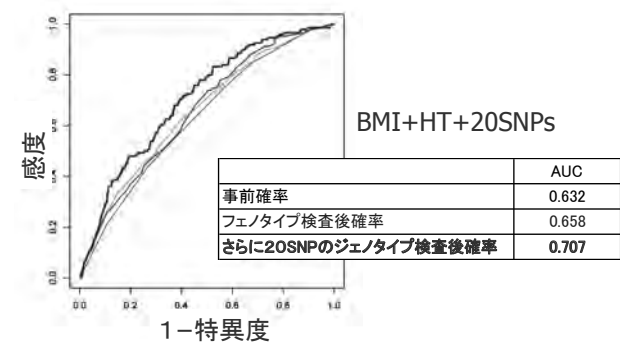


図 2 高島コホート研究のデータセットを用いた ROC 分析

リスクノモグラム

今回検索した中で 61 歳男性のノモグラムの例を示す (図 3)。ここでは、BMI で見ると痩せており、HT も無く糖尿病リスクは減るが、SNP の Genotype ではリスクのある方のジェノタイプがホモとなっている。1 つ 1 つの事前確率・事後確率を見るとリスクが積み上がっており、検査前確率 (pre-test probability) では 19% であるが、事後テスト確率 (post-test probability of risk) は 32% と、約 1.5 倍 risk が上昇している (図 5)。そして実際に、この人は痩せていて血圧が低いにもかかわらず糖尿病であった。このように遺伝子検査は個人の疾患リスクを判定するのに有効利用することが可能になると考えられる。

2 型糖尿病リスク評価 (ノモグラム)

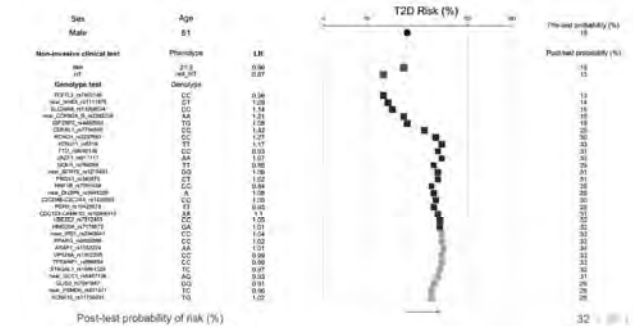


図 3 高島コホート研究のデータセットを用いた 2 型糖尿病のリスク評価の一例

人事異動

入室：田村理弥 (大学院生)、メディナ・アブドサタル (専攻生)
退室：ネ・チャー・トン (大学院生)、趙 晨希 (大学院生)、ジュネイド・バラヤン (大学院生)、平石敦子 (大学院生)、沢辺美亜 (大学院生)

業績目録

原著論文

- Dechamethakun S, Ikeda S, Arai T, Sato T, Sawabe M and Muramatsu M. Associations between the CDKN2A/B, ADTRP and PDGFD Polymorphisms and the Development of Coronary Atherosclerosis in Japanese Patients. J Atheroscler Thromb. 21:680-90 2014
- Zhao C, Ikeda S, Arai T, Naka-Mieno M, Sato N, Muramatsu M, Sawabe M. Association of the RYR3 gene polymorphisms with atherosclerosis in elderly Japanese population. BMC Cardiovasc Disord. 14:6 2014
- Parlayan C, Ikeda S, Sato N, Sawabe M, Muramatsu M, Arai T. Association analysis of single nucleotide polymorphisms in miR-146a and miR-196a2 on the prevalence of cancer in elderly Japanese: a case-control study. Asian Pac J Cancer Prev. 15:2101-7 2014
- Sato N, Htun NC, Daimon M, Tamiya G, Kato T, Kubota I, Ueno Y, Yamashita H, Fukao A, Kayama T, Muramatsu M. Likelihood ratio-based integrated personal risk assessment of type 2 diabetes. Endocr J. 61:967-88. 2014
- Htun NC, Miyaki K, Zhao C, Muramatsu M, Sato N. Epistasis effects of COMT and MTHFR on inter-individual differences in mental health: under the inverted U-shaped prefrontal dopamine model. Biochem Biophys Res Commun. 451:574-9. 2014
- Ueta M, Kaniwa N, Sotozono C, Tokunaga K, Saito Y, Sawai H, Miyadera H, Sugiyama E, Maekawa K, Nakamura R, Nagato M, Aihara M, Matsunaga K, Takahashi Y, Furuya H, Muramatsu M, Ikezawa Z, Kinoshita S. Independent strong association of HLA-A*02:06 and HLA-B*44:03 with cold medicine-related Stevens-Johnson syndrome with severe mucosal involvement. Sci Rep. 4:4862. 2014
- Honma N, Arai T, Muramatsu M. Association between colorectal cancer and estrogens. Nihon Rinsho. 72:49-55 2014 Japanese.

学会発表

- 佐藤憲子、須藤カツ子、村松正明、胎生初期栄養変化が引き起こすマウス成体臓器遺伝子発現パ

- ターンの早期変動、第 3 回日本 DOHaD 研究会、東京、2014.07.25
- Sariya Dechamethakun, Shinobu Ikeda, Tomio Arai, Noriko Sato, Motoji Sawabe and Masaaki Muramatsu. Association of CDKN2A/B, ADTRP, and PDGFD polymorphisms with coronary atherosclerosis in Japan 生命医薬情報学連合大会 2014 10.2
- Muramatsu M, Hayashi M, Yamashita N, The effect of genetic test for common diseases on the perception of health and illness. 生命医薬情報学連合大会 2014 10.2
- 佐藤憲子、尤度比を用いた 2 型糖尿病の統合的リスク評価、日本人類遺伝学会第 59 回大会、東京 2014. 11.20

学内外教育活動

村松正明：山形大学医学部非常勤講師、北里大学薬学部非常勤講師、お茶の水大学非常勤講師

研究費取得

- 村松正明 (代表) 基盤 C 「パーソナルゲノムの生活習慣病予防への応用に関する研究」
- 佐藤憲子 (代表) 基盤 C 「生活習慣病に繋がるエピゲノム変化が胎生期低栄養により形成される機序の解明」

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 助教：川内潤也

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. Pol II CTD 脱リン酸化酵素 FCP1 の機能解析

真核生物は、3つのRNAポリメラーゼを有している。その中でも、coding RNA や一部の non-coding RNA など、多用な遺伝子の転写は Pol II が主体となっている。Pol II には、7アミノ酸のリピード配列からなる CTD が存在し、リン酸化、脱リン酸化による制御を受けることによって、転写サイクルが進行する。転写サイクルでは、転写開始時の CTD は非リン酸化状態であるが、進行にともなって CTD の Ser2、Ser5、Ser7、Thr4 がリン酸化され、転写終結後、新たなサイクルの転写を開始するために CTD は脱リン酸化される。この可逆的な CTD 脱リン酸化の主要な因子が FCP1 であると考えられている (図1)。また、FCP1 をコードする遺伝子 CTDPI の異常は、顔面異形症を含む全身の成長障害を呈する常染色体劣性遺伝病 CCFDN の原因である。当研究室では、新学術領域「転写サイクル」の支援により、転写終結・リサイクリングの機構と CCFDN の病態解明の研究を進めている。

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. 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、がん細胞の遊走、浸潤能を抑制していることを見出した。

4. 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。

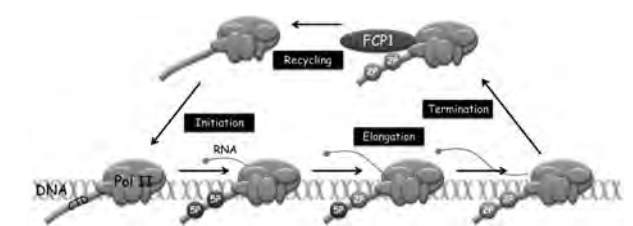


図1 転写サイクルにおける FCP1 のリサイクリングへの寄与

ハイライト (顕著な業績)

1. FCP1 は p53 を介して細胞周期を制御する

MCF7 細胞において FCP1 をノックダウンすると、FCP1 の発現減少に伴って、p53 の蓄積と p53 標的遺伝子である p21 の発現が誘導されることで、細胞増殖が顕著に抑制されることを見出した。p53 null 細胞を用いた実験では、FCP1 をノックダウンすると p53 WT 細胞と同様に細胞増殖が抑制された。しかしながら、コントロールの細胞では、p53 WT および null 細胞の細胞増殖に差は見られなかったが、p53 WT 細胞と比較して p53 null 細胞の FCP1 ノックダウンによる細胞増殖の抑制は緩やかであり、p21 の発現誘導は非常に弱かった (図2)。また、p53 WT 細胞において FCP1 をノックダウンすると、G1 期の割合が増加したが、p53 null 細胞では、FCP1 をノックダウンしても大きな変化は認められなかった。このことから、FCP1 ノックダウンは、p53 を介して G1 期で細胞周期を停止させることが明らかになった。

また、細胞周期に関わる遺伝子群の網羅的定量解析を行ったところ、p53 存在下では、FCP1 ノックダウンにより G2/M Transition や M 期に関連する遺伝子の多くの発現が減少することが明らかになった。FCP1 は、有糸分裂に関わるタンパク質を脱リン酸化することで M 期を制御しているという報告があったが、p53 を介して M 期関連遺伝子の発現を転写レベルで制御している可能性が示唆された (図3)。

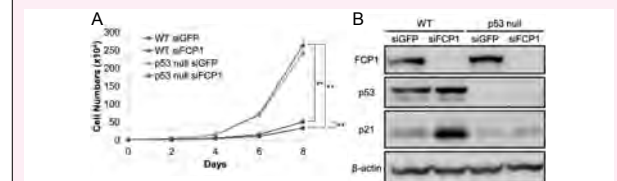


図2 FCP1 ノックダウンによる p53 を介した細胞増殖抑制

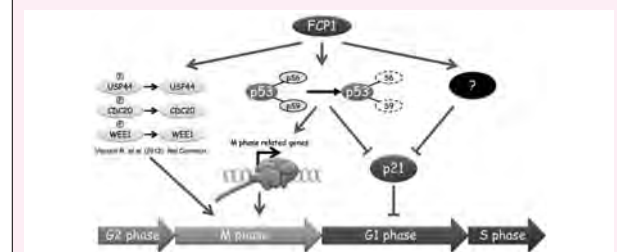


図3 FCP1 の G1 期と M 期の制御機構

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、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4)。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5)。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。

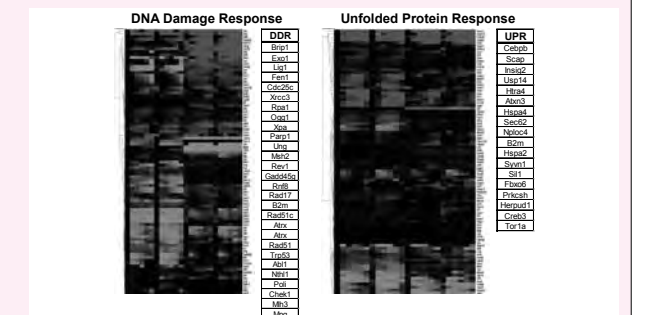


図4 Stress response の heatmap



図5 p53 の有無による ATF3 の機能の差異

人事異動

転入：新井菜月 (大学院医歯学総合研究科 修士課程)、藤沢晃久 (大学院医歯学総合研究科 修士課程)、大塚菜央 (卒業研究生、北里大学)、酒井菜摘 (受入研究生、東京バイオテクノロジー専門学校)
 転出：五嶋大統 (大学院医歯学総合研究科 修士課程)、枝川真 (特別研究生、九州大学)、劉嘉 (外国人研究者、中国・吉林大学)、稗田麻記子 (技術補佐員)

研究業績

原著論文

- Liu J, Edagawa M, Goshima H, Inoue M, Yagita H, Liu Z, et al. Role of ATF3 in synergistic cancer cell killing by a combination of HDAC inhibitors and agonistic anti-DR5 antibody through ER stress in human colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;445(2):320-6.
- Edagawa M, Kawauchi J, Hirata M, Goshima

H. Inoue M, Okamoto T, et al. Role of activating transcription factor 3 (ATF3) in endoplasmic reticulum (ER) stress-induced sensitization of p53-deficient human colon cancer cells to tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis through up-regulation of death receptor 5 (DR5) by zerubone and celecoxib. *J Biol Chem* 2014;289(31):21544-61.

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化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-間質間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(図1)。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。

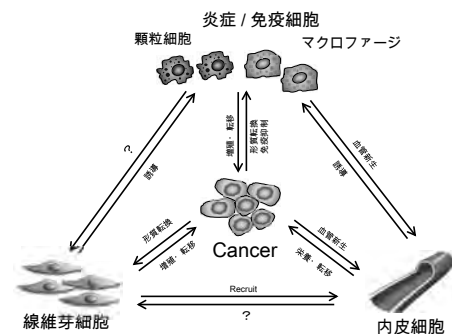


図1 がん-間質間相互作用

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、図2)。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。我々は、膵臓癌移植モデルにおいてインタラクトーム法を用いて検討したところ癌細胞から間質への経路としてWNT7B及びWNT10A-FZD1経路を同定した(図3)。間質におけるWNTシグナルの意義を検討する為に線維芽細胞株の活性化及びマウス腹腔マクロファージの炎症応答への作用について検討を行った。その結果、WNTシグナルの活性化は、TGFβ処理による線維芽細胞の活性化を促進すること、さらにLPSによるマウス腹腔マクロファージの炎症応答を抑制することが明らかとなった。以上の知見から癌細胞による間質細胞のWNTシグナル活性化は、線維芽細胞の筋線維芽細胞への活性化及び腫瘍免疫の抑制を介して腫瘍間質形成に寄与している可能性が示唆された。現在、*in vivo*における機能の検証を行っている。

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。

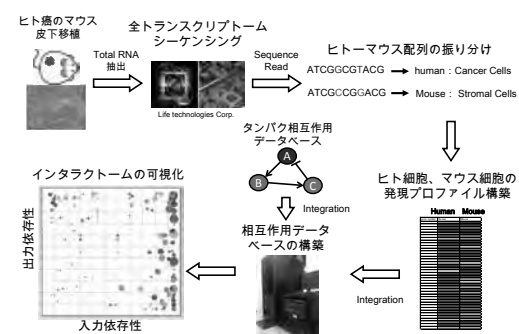


図2 がん-間質インタラクトームの網羅的解析

2. 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 ライブラリーと並列型次世代シーケンス技術を融合させることによってさまざまな機能的スクリーニングを行っており、多彩な側面から、新しいがん治療標的の発見を目指している。その一例として、各種のがん細胞と網羅的 shRNA レンチウイルス・ライブラリーを感染させた線維芽細胞をマウスに共移植することによって、がん組織中に存在する個々の線維芽細胞を網羅的にキャラクタライズする手法を開発してきた(図4)。この実験系では、がん細胞と線維芽細胞の共移植システムによって得られたがん組織を解析することによって、生体内がん組織における線維芽細胞の増殖を亢進あるいは抑制させる候補遺伝子を探索することが可能である。2014年までに、胃がん、膵がん、大腸がん、肝細胞がんをはじめとする多数のヒトがん細胞株を用いた実験を行っており、複数のがん治療標的遺伝子の候補を同定することができた。今後も、shRNA ライブラリーを用いたさまざまな機能的スクリーニングを精力的に行っていくことで、新規性あるがん治療標的分子の同定を試みてい

膵臓癌細胞株Xenograftモデルを用いたInteractomeデータ

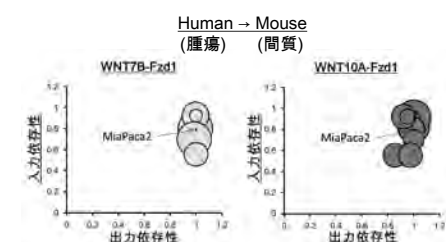


図3 がん-間質間相互作用としてのWNTシグナルの同定

研究業績

- Totoki Y, Tatsuno K, Covington KR, Ueda H, Creighton CJ, Kato M, Tsuji S, Donehower LA, Slagle BL, Nakamura H, Yamamoto S, Shinbrot E, Hama N, Lehmkuhl M, Hosoda F, Arai Y, Walker K, Dahdouli M, Gotoh K, Nagae G, Gingras MC, Muzny DM, Ojima H, Shimada K, Midorikawa Y, Goss JA, Cotton R, Hayashi A, Shibahara J, [Ishikawa S](#), Guiteau J, Tanaka M, Urushidate T, Ohashi S, Okada N, Doddapaneni H, Wang M, Zhu Y, Dinh H, Okusaka T, Kokudo N, Kosuge T, Takayama T, Fukayama M, Gibbs RA, Wheeler DA, Aburatani H, Shibata T. Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes. Nat Genet. 2014 Dec;46(12):1267-73. doi: 10.1038/ng.3126. Epub 2014 Nov 2.
- Katsuda T, Kurata H, Tamai R, Banas A, Ishii T, [Ishikawa S](#), Ochiya T. The *in vivo* evaluation of the therapeutic potential of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for acute liver disease. Methods Mol Biol. 2014;1213:57-67. doi: 10.1007/978-1-4939-1453-1_6. PMID: 25173374.
- Kobayashi S, Hara A, [Isagawa T](#), Manabe I, Takeda K, MaruYama T. The Nuclear IκB Family Protein IκBNS Influences the Susceptibility to Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in a Murine

Model. PLoS One. 2014 Oct 27;9(10):e110838. doi: 10.1371/journal.pone.0110838. eCollection 2014. PMID: 25347393.

- Hanihara-Tatsuzawa F, Miura H, Kobayashi S, [Isagawa T](#), Okuma A, Manabe I, MaruYama T. Control of Toll-like Receptor-Mediated T Cell-Independent Type 1 Antibody Responses by the Inducible Nuclear Protein IκB-ζ. J Biol Chem. 2014 Aug 14. pii: jbc.M114.553230. [Epub ahead of print] PMID: 25124037.
- Ibrahim R, Matsubara D, Osman W, Morikawa T, Goto A, Morita S, [Ishikawa S](#), Aburatani H, Takai D, Nakajima J, Fukayama M, Niki T, Murakami Y. Expression of PRMT5 in lung adenocarcinoma and its significance in epithelial-mesenchymal transition. Hum Pathol. 2014 Jul;45(7):1397-405. doi:10.1016/j.humpath.2014.02.013. Epub 2014 Feb 28. PubMed PMID: 24775604.
- Kakiuchi M, Nishizawa T, Ueda H, Gotoh K, Tanaka A, Hayashi A, Yamamoto S, Tatsuno K, [Katoh H](#), Watanabe Y, Ichimura T, Ushiku T, Funahashi S, Tateishi K, Wada I, Shimizu N, Nomura S, Koike K, Seto Y, Fukayama M, Aburatani H, [Ishikawa S](#). Recurrent gain-of-function mutations of RHOA in diffuse-type gastric carcinoma. Nat Genet. 2014 Jun;46(6):583-7. doi: 10.1038/

く。

3. 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、スキルス胃がん症例の約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(ハイライト参照)。ゲノム病理学分野では、スキルス胃がんにおける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。

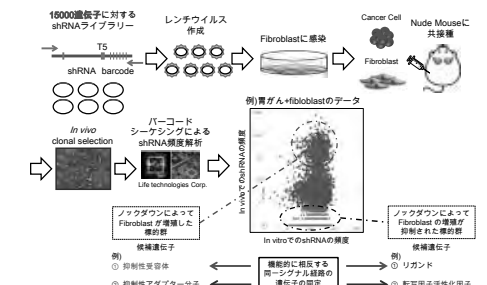


図4 Functional Genomic Screeningを用いた癌間質間相互作用解析

ng.2984. Epub 2014 May 11. PubMed PMID: 24816255.

- Hamana W, Motoi N, [Ishikawa S](#), Ushijima M, Inamura K, Hatano S, Uehara H, Okumura S, Nakagawa K, Nishio M, Horai T, Aburatani H, Matsuura M, Iwasaki A, Ishikawa Y. A subset of small cell lung cancer with low neuroendocrine expression and good prognosis: a comparison study of surgical and inoperable cases with biopsy. Hum Pathol. 2014 May;45(5):1045-56. doi: 10.1016/j.humpath.2014.01.001. Epub 2014 Jan 23. PubMed PMID: 24746210.
- Tanaka M, Suzuki HI, Shibahara J, Kunita A, [Isagawa T](#), Yoshimi A, Kurokawa M, Miyazono K, Aburatani H, [Ishikawa S](#), Fukayama M. EVI1 oncogene promotes KRAS pathway through suppression of microRNA-96 in pancreatic carcinogenesis. Oncogene. 2014 May 8;33(19):2454-63. doi: 10.1038/onc.2013.204. Epub 2013 Jun 10. PubMed PMID: 23752186.
- Hayashi A, Morikawa T, Kawai T, Kume H, [Ishikawa S](#), Homma Y, Fukayama M. Clinicopathological and prognostic significance of EZH2 expression in upper urinary tract carcinoma. Virchows Arch. 2014 Apr;464(4):463-71. doi: 10.1007/s00428-014-1541-6. Epub 2014 Jan 21. PubMed PMID: 24446035.

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：小野竜一 特任講師：李 知英
特任助教：成瀬美衣、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およびゲノム機能進化と哺乳類の進化の関係についての研究、2) 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 *Sirh7/Ldoc1* は妊娠状態のコントロールに必須の機能を果たしている (Naruse *et al.* Development 2014)

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 M 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を実証し、哺乳類の

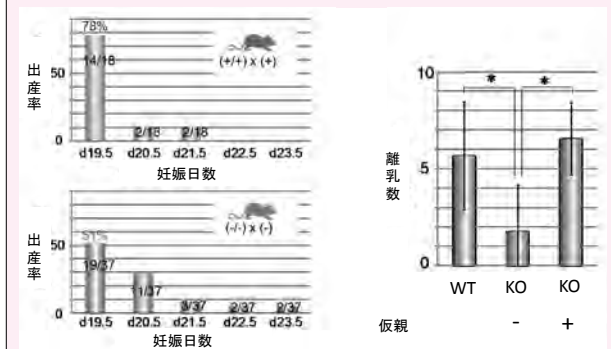


図1 *Sirh7/Ldoc1* ノックアウトマウスによる出産遅延と産乳率の低下 LTR レトロトランスポゾン由来の真獣類特異的遺伝子 *Sirh7/Ldoc1* の機能を明らかにした。この遺伝子は胎盤の各種細胞の分化/成熟に関係することによって、胎盤の産生するホルモン分泌に関係し、妊娠維持や分娩のタイミングの調節に重要な働きをしていた。*Peg10*、*Peg11/Rtl1* について、胎盤における機能を証明した3番目の例であり、これらの遺伝子群の哺乳類の胎生進化における重要性をさらに裏付けるものである。マウスの胎盤には巨大栄養芽細胞 (Giant trophoblast cells)、スポンジ様栄養芽細胞 (Spongiotrophoblast cells) などが存在する。前者はプロゲステロン (P4)、プラゼンタルラクトゲン I と 2、後者は様々なプロラクチン様タンパク質という妊娠維持や分娩のタイミング制御に重要なホルモンを産生する。*Sirh7/Ldoc1* のノックアウトマウスの胎盤では、これらの細胞の割合や分化速度に異常を生じ、形態的にもきれいな層構造を作れなくなる。また、分泌されるホルモン量や時期がずれるため、分娩遅延が起き、新生児の産乳率も低下する。すなわち *Sirh7/Ldoc1* が哺乳類の生殖機構に必須な役割りを果たしていることが証明された。仮親につけた場合には新生児は正常な率で産乳することがわかる。

業績目録

原著論文

1. Kawasaki, Y., Lee, J., Matsuzawa, A., Kohda, T., Kaneko-Ishino, T. and Ishino F. Active DNA demethylation is required for complete imprint erasure in primordial germ cells. *Sci Rep* 4:3658 (2014).
2. Oikawa, M., Inoue, K., Shiura, H., Matoba, S., Kamimura, S., Hirose, M., Mekada, K., Yoshiki, A., Tanaka, S., Abe, K., Ishino, F. and Ogura, A. Understanding the X chromosome inactivation

cycle in mice: A comprehensive view provided by nuclear transfer. *Epigenetics* 9(2): 1-8(2014).

3. Soma, M., Fujihara, Y., Okabe, M., Ishino, F. and Kobayashi, S. Ftx is dispensable for imprinted X-chromosome inactivation in preimplantation mouse embryos. *Sci Rep*. 4:5181 (2014).
4. Kamimura, S., Hatanaka, Y., Hirasawa, R., Matsumoto, K., Oikawa, M., Lee, J., Matoba, S., Mizutani, E., Ogonuki, N., Inoue, K., Kohda, T., Ishino, F. and Ogura, A. Establishment of paternal genomic imprinting in mouse prospermatogonia analyzed by nuclear transfer.

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 (Nat Genet 2006, 2008)。

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、胎盤特異的に発現する *Sirh7/Ldoc1* が胎盤の各種細胞の分化/成熟に必須の機能を果たしていることを明らかにした。胎盤の細胞は妊娠維持や分娩のタイミングの調整に必須の各種ホルモンを分泌しているため、*Sirh7/Ldoc1* ノックアウトマウスは分娩の遅延を生じ、出生した子供の産乳率が低下する (図1)。また、この解析を通してマウスの胎盤で妊娠維持に必須のプロゲステロン (P4) の合成が起きていることを実証し、1970年代から続いている議論に終止符を打った (図2)。この P4 合成は卵巣の P4 合成が偽妊娠から妊娠状態へ切り替わる極めて特異的な時期にのみ見られるが、おそらくげっ歯類の妊娠には必須の機能を果たしていると考えられる。私たちが開発した P4 測定法を応用することにより、他の真獣類においても胎盤での P4 合成があることが、今後、実証されることが期待される。

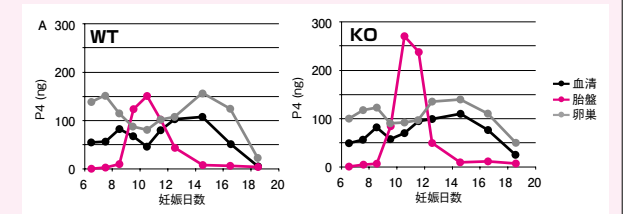


図2 マウス胎盤でのプロゲステロン合成の実証 プロゲステロン (P4) は、哺乳類において妊娠維持に必要なホルモンです。ヒトでは妊娠初期には卵巣が P4 産生をしますが、妊娠後期では胎盤が産生しています。一方、マウス等のげっ歯類は、妊娠の総ての期間において卵巣が唯一の P4 産生器官であると考えられてきました。今回、*Sirh7/Ldoc1* ノックアウトマウスの解析で、出産遅延がみられてことから P4 産生の詳細を調べてみました。妊娠初期の着床時期の前で、卵巣からの P4 産生が一時的に低下することが知られていました。妊娠が成立する場合、また卵巣での P4 産生が上昇するのですが、この切り替えの時期に一時的に、胎盤が P4 産生していることを発見しました。これが局所的に機能して妊娠を維持しているものと考えられます。私たちの開発した方法で、他の真獣類でも胎盤での P4 産生が今後明らかになることが期待されます。胎盤 (赤)、卵巣 (灰色) での P4 発現量と血清中の P4 量 (黒) を示した。

Biol Reprod 91(5):120(2014).

5. Takahashi S, Lee J, Kohda T, Matsuzawa A, Kawasumi M, Kanai-Azuma M, Kaneko-Ishino T and Ishino F. Induction of the G2/M transition stabilizes haploid embryonic stem cells. *Development* 141(20): 3842-3847(2014).
6. Naruse M, Ono R, Irie M, Nakamura K, Furuse T, Hino T, Oda K, Kashimura M, Yamada I, Wakana S, Yokoyama M, Ishino F, Kaneko-Ishino T. Sirh7/Ldoc1 knockout mice exhibit placental P4 overproduction and delayed parturition. *Development* 141(24): 4763-4771 (2014).

ゲノム応用医学研究部門 生命情報学分野

教授：田中 博 助教：森岡勝樹

研究内容

概略

本研究室では、主として「生命をシステムとして理解する」観点から生命科学、医学の課題解明に取り組んでいる。生命科学分野では、システム進化生物学のテーゼを掲げ、生命とは「進化（複雑化）する生命分子ネットワーク」であると捉え、この「システム進化原理」のもとに生命の基本課題の解明を目指している。我々はシステム進化原理が生命科学のグランドセオリーであるとしてその構築を進めている。医学分野では、オミックス医療及び「システムとして病気を理解する」システム分子医学を推進している。大半の疾患は単因子疾患ではなく、分子的な変異・異常と臓器組織レベルでの異常、個体レ

ハイライト

定量的 Waddington エピゲネティック地形と iPS 細胞およびがんの転移への応用

ヒトの細胞は受精卵から分化して神経細胞や筋肉細胞など約 210 種類ある細胞型になる。それぞれの細胞型においてその細胞に必要な機能を遂行するために、ゲノムのどの遺伝子を発現させるかを決めているのは、エピゲノム機構 (epigenome, epigenetics) である。この細胞の発分化の運命を譬えとして表したものに Waddington のエピゲネティック地形がある。これは多能性細胞から細胞分化の過程を、細胞を表す球が丘の頂上から稜線に挟まれた谷間を転げ落ちていく形で表した。各成熟した細胞の細胞型は、このエピゲノム地形のなかで、一定の窪み (basin) として安定な場を形成する。

「細胞分子ネットワーク」はエピゲノム機構により、発現している遺伝子の分子ネットワークとして各細胞型の機能を担う。ここでその状態空間 (state space) を考えると、各細胞型はこの状態空間において窪み basin によって囲まれた安定点として示される。すなわち、各細胞型は、状態空間におけるアトラクター状態にある。それゆえ、分化過程は、「アトラクター遷移」として捉えられる。様々な細胞においてどの遺伝子が発現しているかは、各細胞の遺伝子発現プロファイル

レベルでの臨床症状が相互に関連して、「システムとしての病気」が構成される。その網羅的分子表現型が疾患オミックス・プロファイル情報である。これまでの疾病観にかわる、オミックス医療・システム分子医学こそが分子時代の医学を切り拓くものだと考えている。その他の研究分野としては、医療への情報技術 (IT) の応用を行う医療情報学の研究も進めており、「地域医療福祉情報連携協議会」を創立して地域医療連携を推進するだけでなく、厚労省・総務省からの要請を受けて、みやぎ医療福祉情報ネットワーク協議会アドバイザーとして、東日本大震災の被災地の復興後医療 IT 体制構築のグランドデザインの策定に取り組んでいる。

によって表され、公的データベースを用いると、細胞分子ネットワークの状態空間において、各細胞状態の確率分布が得られる。定量的 Waddington エピゲノム地形とは、この細胞状態の確率分布をもとにして形成される。細胞状態の発現確率分布を $f(r)$ とすると、Waddington エピゲノム地形に相当する細胞状態の安定度を扱う確率準ポテンシャル場 U は $-\ln f(r)$ として与えられる。このように定量化された細胞状態の純ポテンシャル場としての定量的 Waddington エピゲノム地形 $U(r)$ (qWEL) において、細胞分化を理論的に把握できる。

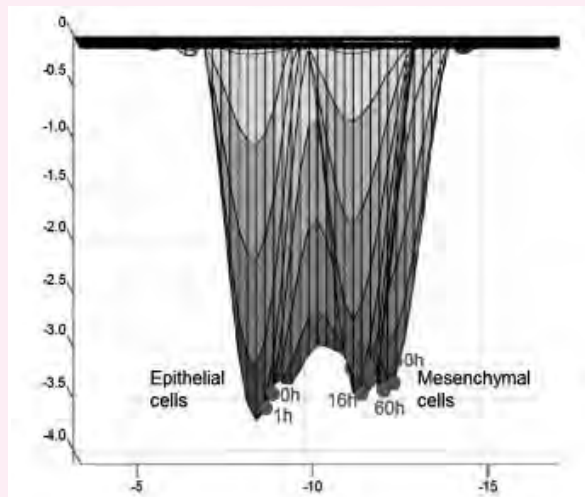


図 がん上皮間葉転移のqWELポテンシャル上の軌跡

再生医療における繊維芽細胞から iPS 細胞からの移行も、繊維芽細胞のポテンシャル場における窪み basin から多能細胞の basin への移行のアトラクター遷移の確率を高めることにある。また我々は qWEL 理論による「がんの転移過程」の機序解明について解明した。がんの転移は、単なる細胞増殖の異常だけではなく、上皮組織から間葉組織への細胞型の転移 Epithelial-Mesenchymal Transistion (EMT) が基本過程として働いている。これは上皮細胞の細胞分子ネットワークから間葉細胞の分子ネットワークへの構造変換であり、その構造変換がマスター転写因子に

よって、構造変換されると考えられる。我々は Takahasi らの epithelial-mesenchymal transition の実験データ (Takahashi et al., J Biol Chem. 285, 2010) を用いて、GEO の EMT 遺伝子発現プロファイルデータで qWEL ポテンシャル場を構成したあと、TNF α 、TGF β を加えた時の網膜上皮色素細胞の EMT を qWEL 場上で軌跡を描いた。結果は、EMT 過程は、3つの basin を経過するポテンシャル移行過程であり、マスター転写因子として ZEB1 と SMAD2 が EMT を駆動していることがわかった。

研究業績

原著論文

1. Eslami A, Miyaguchi K, Mogushi K, Watanabe H, Okada N, Shibuya H, Mizushima H, Miura M, Tanaka H: PARVB overexpression increases cell migration capability and defines high risk for endophytic growth and metastasis in tongue squamous cell carcinoma. British Journal of Cancer, Doi:10.1038/bjc.2014.590, 2014
2. Hase T, Kikuchi K, Ghosh S, Kitano H, Tanaka H: Identification of drug-target modules in the human protein-protein interaction network. Artificial Life and Robotics, 19(4):406-413, 2014
3. Katsuta E, Tanaka S, Mogushi K, Matsumura S, Ban D, Ochiai T, Irie T, Kudo A, Nakamura N, Tanaka H, Tanabe M, Arii S: Age-related clinicopathologic and molecular features of patients receiving curative hepatectomy for hepatocellular carcinoma. The American Journal of Surgery, 208(3):450-456, 2014
4. Watanabe K, Kurihara Y, Watanabe K, Azami T, Nukaya S, Tanaka H: Bio-Signals Sensing by Novel Use of Bi-directional Microphones in a Mobile Phone for Ubiquitous Healthcare Monitoring. IEEE Transactions on Human-Machine Systems, 44(4):545-550, 2014
5. Tsubota A, Mogushi K, Aizaki H, Miyaguchi K, Nagatsuma K, Matsudaira H, Kushida T, Furihata T, Tanaka H, Matsuura T: Involvement of MAP3K8 and miR-17-5p in Poor Virologic Response to Interferon-Based Combination Therapy for Chronic Hepatitis C. PLoS One, 9(5):e97078, 2014
6. Kudo A, Mogushi k, Takayama T, Matsumura S, Ban D, Irie T, Ochiai T, Nakamura N, Tanaka H, Anzai N, Sakamoto M, Tanaka S, Arii S: Mitochondrial metabolism in the noncancerous liver determine the occurrence of hepatocellular carcinoma: a prospective study. J Gastroenterol, 49(3):502-10, 2014
7. Andersson R et al. FANTOM Consortium (Tanaka H. incl.): An atlas of active enhancers across human cell type and tissues. Nature, 507(7493):455-461, 2014
8. Alistair R. et al. FANTOM Consortium (Tanaka H. incl.): A promoter-level mammalian expression atlas. Nature, 507(7493):462-470, 2014
9. Kobayashi T, Takeuchi JS, Ren F, Matsuda K, Sato K, Kimura Y, Misawa N, Yoshikawa R, Nakano Y, Yamada E, Tanaka H, Hirsch VM, Koyanagi Y: Characterization of red-capped mangabey tetherin: implication for the co-evolu-

- tion of primates and their lentiviruses. Scientific Reports 4, 5529, 2014
10. Yoshikawa R, Takeuchi JS, Yamada E, Nakano Y, Ren F, Tanaka H, Münk C, Harris RS, Miyazawa T, Koyanagi Y, Sato K: Vif determines the requirement for CBF- β in APOBEC3 degradation. Journal of General Virology, doi: 10.1099/jgv.0.000027, 2014
 11. Nukaya S, Sugie M, Kurihara Y, Hiroyasu T, Watanabe K, Tanaka H: A noninvasive heart-beat, respiration, and body movement monitoring system for neonates. Artificial Life and Robotics, 19(4):414-419, 2014

総説

1. 田中 博:地域医療情報連携による医療の再生、最新臨床脳卒中⑦-最新の診断と治療-, 日本臨牀, 697-705, 2014
2. 田中 博:オミックス医療とシステム分子医学、(植田充美編)「生命のビックデータ利用の最前線」、シーエムシ出版、202-210, 2014
3. 田中 博:薬剤開発とオミックス-先制医療、個別化医療、システム分子医学での薬剤開発一、(井村裕夫編)「臨床研究のススメ」最新医学社、131-139, 2014
4. 田中 博:「バイオデータベースの近年の動向 - バイオバンクの国際的普及と生命・医療情報の融合」、計測と制御, Vol.53, No.5, 395-400, 2014
5. 田中 博: ICT を活用した地域連携型医療・包括型ケアが医療再生の鍵、Hospital TODAY、TERUMO, 1-2, 2014
6. 田中 博:新しい医療は ICT なしではうまれない、FUJITSU 5、Vol.573、9、2014
7. 田中 博: 医学部医学科研究室訪問 10 生命情報学分野(遠隔医療研究)、Y-SAPIX Journal、Vol.10、44-45、2014
8. 「どこでもマイ病院」実現のために、毎日新聞、P23、2014年7月14日
9. 診療情報の電子利用、朝日新聞、2014年6月28日

招待講演

1. 田中 博:「ビックデータのゲノム・オミックス医療への応用」、第8回スーパーコンピュータ「京」と創薬・医療の産学連携セミナー -HPCI 計算生命科学推進プログラム、ステーションコンファレンス、東京、2014年12月5日
2. 田中 博:「生涯にわたる健康医療電子記録 PHR 等」、メディカル・データ・ビジョン主催: 患者が喜び集まる診療電子記録セミナー、東京、2014年11月21日
3. 田中 博:「疾患ネットワークとドラッグリポ

- ジショニング(DR)」、第42回日本潰瘍学会シンポジウム、慶応義塾大学、2014年10月31日
4. 田中 博:「ゲノム電子カルテの国内外の動向と展望」、情報計算化学生化学会2014年大会フォーカストセッション ゲノム電子カルテ、東京、2014年10月28日
 5. 田中 博:「Co mputional Drug Repositioning 一疾患ネットワークを中心にして一」、生化学会フォーラム、2014年10月17日
 6. 田中 博:「地域包括ケアにおける予防の重要性」、奈良県庁主催:奈良県介護予防に関する研修会、奈良、2014年10月14日
 7. 田中 博:「ゲノム・オミックス医療の臨床的実現に向けて」、亀田総合病院、2014年9月30日、鴨川
 8. 田中 博:「ゲノム医療時代の臨床研究に関わる人材養成と雇用の機会」、CBI学会主催:第4回、ICT活用のフロンティアと求められる人材、東京、2014年9月25日
 9. 田中 博:「生体内ネットワークの統合による創薬ツールの開発 バイオ(メディカル)ビックデータ」、(独)科学技術振興機構 研究開発戦略センター主催:「次世代基盤技術区分」俯瞰に関するワークショップ、東京、2014年9月24日
 10. 田中 博:「生涯にわたる健康医療電子記録 PHR 等」、メディカル・データ・ビジョン主催: 患者が喜び集まる診療電子記録セミナー、福岡、2014年9月5日
 11. 田中 博:「Attractor transition analysis of iPS cell and cancer metastasis in quantified Waddington epigenetic landscape (qWEL)」、AROB 19th 2014、大分、2014年1月22日
 12. 田中 博: パネルディスカッション、理化学研究所 予防医療プログラム 開所記念シンポジウム「疾患リスク管理と予防ヘルスケア」、理化学研究所(横浜)、2014年1月14日

主催学会

1. 田中 博: 地域医療福祉情報連携協議会 第7回シンポジウム「医療・介護・福祉から地域を結ぶ」、東京医科歯科大学 M & D タワー2階、会長、2014年6月26日
2. 田中 博: 日本オミックス医療学会「ゲノム医療の最先端 ~メイヨークリニックの試み Dr. Weinsilboum 氏を囲んで~」、東京医科歯科大学 M & D タワー2階、会長、2014年6月25日
3. 田中 博: 地域医療福祉情報連携協議会「地域医療福祉連携ネットワーク交流会「私にできる地域包括ケア ~超高齢時代における地域医療福祉の課題と連携~」」、日本橋三井ホール、会長、2014年2月26日

ゲノム応用医学研究部門 フロンティア研究室 レドックス応答細胞生物学

准教授：倉田俊一

地球上の殆んど全ての生物は、酸素存在下で生息しているため酸化による強い酸化ストレスに曝されている。一方、細胞内酸化ストレスは主としてミトコンドリアの電子伝達系から発生する ROS (活性酸素種) に起因すると考えられており、酸化還元調節と酸化ストレス応答反応は細胞の生存とホメオスタシスのための不可欠な生理機構である。この破綻によって生じる酸化ストレスは多くの疾病や、老化などの原因または増悪因子として作用する。本研究室では、多くの酸化ストレスに関係する疾患の病態解明を目指す。また、酸化ストレスと深いかわりを持つ癌抑制タンパク質 p53 ファミリーの一員である p63 について、ストレス応答性や扁平上皮癌細胞における高レベル発現の病態学的な意義解明をも目指している。

倉田は、平成 27 年 3 月 31 日で退職となりました。

研究紹介

p63 による Wnt 標的遺伝子の正と負の制御

p63 (TP63) は TA 及び ΔN アイソフォームとして発現しており複雑な転写調節因子としての機能を持つと考えられている。咽頭がん由来癌細胞株に、p63 ノックダウン処理を行うと、Wnt ターゲット遺伝子のうちいくつかのものは (MMP7 等) 発現抑制を受ける、一方 SLUG 遺伝子などは活性化されることが判明した。pGL3-OT 及び pGL3-OF を用いた、レポーター解析を行うと p63 アイソフォームの内 $\Delta Np63\alpha$ のみが、Wnt ターゲット遺伝子の調節に関係していることが判明した。 $\Delta Np63\alpha$ は TCF-4 と結合しているが、 β カテニンとは結合しないことなどが、すでに知られている。そこで p63 と TCF 及び β カテニンとの関係を解析するために、p63、TCF-4、 β カテニンそれぞれの抗体を用いた ChIP 解析を p63 ノックダウン細胞で実施した。MMP7 の

WRE への p63 の結合は研究室出来なかったが β カテニンの WRE への結合は p63 ノックダウンにより亢進された。この結果は、MMP7 の転写が $\Delta Np63\alpha$ と TCF の作用により抑制されることを示している。さらに SLUG の上流には p53・p63 結合配列が存在し活性化促進の可能性が考えられた。

ミトコンドリア IMS へのプロカスペース 9 の取り込み

ミトコンドリアには多数種のタンパク質が存在する。特に内膜と外膜の間 (intermembrane space, IMS) には、ミトコンドリアに局在するタンパク質ばかりでなく、多数のサイトゾル・タンパク質が含まれていることがプロテオミクス解析によって明らかにされてきた。アポトーシス開始酵素である procaspase-9 (procasp-9) はサイトゾルに局在するタンパク質であるが、ミトコンドリア IMS でも検出されており、ミトコンドリアによる procasp-9 のインポート、活性化、放出の機構と意義についてはまだ明らかでない。本研究では HeLa 細胞からミトコンドリアを精製し、大腸菌で発現させた procaspase-9-flag タンパク質、in vitro 転写・翻訳により合成した procaspase-9-flag タンパク質をインポートさせる実験を行った。Proteinase K 処理によりミトコンドリア外膜タンパク質を分解させた後もミトコンドリアに内包されているタンパク質として procaspase-9 が検出されたことから、IMS へ移行したと考えられた。この移行はグルタチオンにより強く促進された。また、CCCP により膜電位を喪失させたミトコンドリアではこの移行は起こらなかった。CHCHD4 (MIA40) などの IMS 移行に作用するタンパク質の関与を siRNA を用いたノックダウン・ミトコンドリアを使って検討している。また、IMS 移行のタンパク質特異性や、移行に必要なアミノ酸配列について解析を行っている。

業績

原著

Katoh I and Kurata S. Association of endogenous retroviruses and long terminal repeats with human disorders. *Frontiers in oncology* 11 (3) 234-237 2015

学会

Positive and negative regulation of Wnt target genes by p63 (TP63)
第 87 回日本生化学会 京都 10 月

学内外教育活動

本学救命救急大学院生指導
文京学園非常勤講師

研究費取得

科学研究費補助金
基盤研究 (C) 口腔癌進行における p63 の発現消失と Wnt シグナルの活性化

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 特任助教：山崎裕美子

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



図 *unc-32*遺伝子エクソン4の組織特異的選択性を可視化した蛍光スプライシングレポーター線虫。PLoS Genet, 2013より改変。

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a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(図)、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。

unc-75 変異体と野生型の比較により、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(G/U)UGUUGUG配列を介して神経系特異的な制御に関わることを見出した(Nucleic Acids Res, 2013)。

3. 脊椎動物 TTN 遺伝子の心筋特異的選択的スプライシング制御機構の解析

哺乳類の心筋と骨格筋のサルコメアに存在する巨大なタンパク質タイチンは、筋繊維の受動的張力を生む重要な成分である。タイチンの分子量は胎生期の心筋、成体の心筋と骨格筋で異なり、これは選択的スプライシングにより制御されている。拡張型心筋症の心筋では受動的張力の小さいタイチンアイソフォームが増加することが報告されているほか、タイチンをコードする *TTN* 遺伝子の心筋特異的スプライシングに必須のスプライシング制御因子RBM20の遺伝子変異が拡張型心筋症の患者の

ハイライト

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

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つずつもつ線虫の2つのRNA結合タンパク質 ASD-1とSUP-12

組織特異的にスプライシング反応を制御するRBFOXファミリーRNA結合タンパク質およびSUP-12によるRNAの協働的な認識の機構。ライフサイエンス 新着論文レビュー 2014年9月12日。

人事異動・研究室改称

2014年3月、渡部栄地(東京理科大学基礎工学部生物工学科)が卒業研究生として参加
3月、武井理美、保科元気、村山里枝が修士(医科学)の学位を授与された
4月、大野麻理奈技術補佐員が配置換えにより転入
6月、山崎(加藤)裕美子特任助教が着任
7月、齋藤ますみ(医学部保健衛生学科検査技術学専攻)が参加(～10月)

業績目録

原著論文

1. Kuwasako K, Takahashi M, Unzai S, Tsuda K, Yoshikawa S, He F, Kobayashi N, Güntert P, Shirouzu M, Ito T, Tanaka A, Yokoyama S, Hagiwara M, Kuroyanagi H, Muto Y. RBFOX and SUP-12 sandwich a G base to cooperatively regulate tissue-specific splicing. Nature Structural & Molecular Biology. 21: 778–786, 2014.
2. Kuroyanagi H, Takei S, Suzuki Y. Comprehensive analysis of mutually exclusive alternative splicing in *C. elegans*. Worm. 3: e28459, 2014.

総説等

1. 桑迫香奈子、高橋真梨、黒柳秀人、武藤 裕。

国際シンポジウム講演

1. Hidehito Kuroyanagi. Cooperative regulation of tissue-specific alternative splicing by multiple splicing factors determines ligand-binding specificity of FGF receptors. The 9th International Symposium of the Institute Network 大阪大学、大阪府吹田市、2014年6月。
2. Hidehito Kuroyanagi. RBFOX and SUP-12 cooperatively regulate muscle-specific alternative splicing to determine ligand-binding specificity of FGF receptors in *C. elegans*. 理研シンポジウム「Noncoding RNA Regulation」理化学研究所 和光キャンパス、埼玉県和光市、2014年10月。

国際学会発表

1. Masahiro Tomioka, Yasuki Naito, Hidehito Kuroyanagi, Yuichi Iino. Combinatorial expression of evolutionally conserved RNA binding proteins determines neuron-type specific alternative splicing of the *daf-2* insulin/IGF receptor in *C. elegans*. *C. elegans* Development, Cell Biology and Gene Expression Meeting in Association with the 6th Asia-Pacific *C. elegans* Meeting, 奈良市、2014年7月。

一部で見られることから、拡張型心筋症と *TTN* 遺伝子のスプライシング制御の関係が注目されている。

当研究室では、*TTN* 遺伝子の心筋特異的なスプライシングパターンを可視化する蛍光レポーターを作製し、RBM20によるスプライシング制御を生細胞で可視化して解析する実験系を構築した。さらに、拡張型心筋症患者に見られる変異によりRBM20のスプライシング制御能が失われることを明らかにしている。現在は、RBM20による *TTN* 遺伝子の選択的スプライシング制御機構の解明を通じて、*TTN* 遺伝子のスプライシング制御異常と拡張型心筋症の関係の解明を目指している。

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、武蔵野大学の武藤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、研究所ハイライトも参照)。RNA結合タンパク質の中には1つのタンパク質に複数のRNA結合ドメインをもつものが多くあり、分子内協働性により標的認識の特異性を高める例はこれまででも報告されていたが、本研究成果は、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ものと期待される。

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

市民公開講座

黒柳秀人：遺伝子のプロセシング暗号を解いて心臓や筋肉の病気を治す！(2014年2月21日)

競争的研究費

黒柳秀人(代表)、挑戦的萌芽研究「リボソームタンパク質による選択的スプライシング制御機構の解明」。
黒柳秀人(代表)、新学術領域研究「転写サイクル」公募研究「転写産物の高精細プロファイリングによる転写と転写後プロセシングの共役機構の解明」。
黒柳秀人(代表)、基盤研究(B)「mRNA前駆体の組織特異的転写後プロセシングの制御機構の解明」。
黒柳秀人(代表)、挑戦的萌芽研究「タイチンアイソフォームの発現比率と拡張型心筋症の関係の解明」。
黒柳秀人(代表)、武田科学振興財団医学系研究奨励「タイチン遺伝子のスプライシング制御異常による拡張型心筋症発症モデルの検証」。

受賞

黒柳秀人：東京医科歯科大学優秀研究賞(2014年10月)

プロジェクト研究室
大学院教育研究支援実験施設

プロジェクト研究室

難治病態研究部門

准教授：山口登喜夫

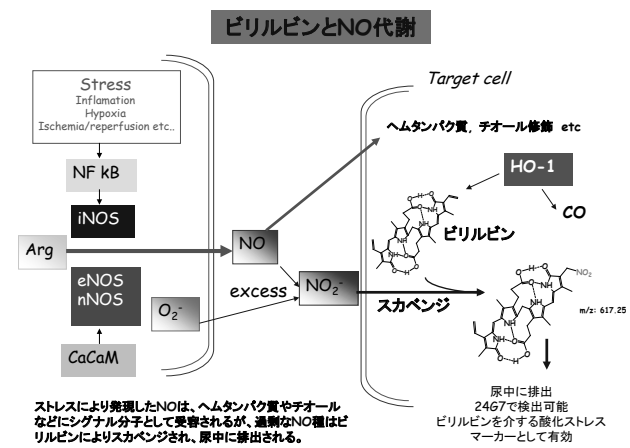
“酸化ストレスマーカーとしてのバイオピリンの研究”

研究テーマである「ヘムおよびビリルビン代謝」の研究を遺伝生化学分野から難治病態プロジェクト研究室に移行後も一貫して続けており、その過程において'97年に *in vitro* での米国の研究者の発表と相前後して、*in vivo* でビリルビンが生体内の強力な抗酸化物質として作用することを解明し、その臨床への応用研究を継続している。今までに得られた多くの成績で、酸化ストレスが関与している疾患は尿中バイオピリンが増加することより、臨床に応用可能な ELISA やチェッカーの開発を行ってきた。22～24 年度の大きな成果として、ラットを用いた心臓移植実験において異系統ラット間で起きる術後約 7 日目の拒絶反応に対して、既に術後 3 日目に尿中バイオピリンの急激な上昇現象が観られることを発見した。このことより、臓器移植後の予後の尿中バイオピリン測定が拒絶反応など合併症発症の特異的な予知因子 (predictor) となり得ることを報告した (Circulation Journal 2008. 72(9), 1520. & Am J Transplant 2007. 7(8), 1897. Yamamoto M et al.)。これらの論文で、この拒絶反応の主要原因物質は一酸化窒素 (NO ラジカル) であることが解り、事実 NO 合成酵素 (NOS) の阻害剤である NMMA を移植後に連続投与していると拒絶反応は抑えられた。実際に、心臓移植後の尿中バイオピリンの増加時はビリルビンと NO との反応生成物であるニトロ化バイオピリン (Bilirubin-NO₂) が主に増加していることを LC/MS/MS で証明している (現在 BBRC 投稿中)。さらに、内科系の国際的雑誌である「New England Journal of Medicine」誌に心疾患の Biomarker として尿中 Biopyrrins の測定を推奨している (N Engl J Med 358:202148-2159.2008 Eugene Braunwald, M.D.)。また本年度は、新たに慶應義塾大学医学部医化学において指導していた大学院生が博士課程終了後、当プロジェクト研究室に社会人専攻生として入学して ROS (活性酸素種) 生成メディエーターとして作用する微量金属とビリルビン代謝系とのクロストークの解明：高感度微量元素測定キットの開発をテーマとして研究をスタートしたが、すでに各種金属元素をマイクロプレートリーダー

で迅速定量可能なキットを開発した。

今年度の研究方針について：

- (1) ヒト尿中において体内の酸化ストレス (心理的ストレス、虚血性心疾患、脳梗塞、手術侵襲など) を簡単に測れるストレス・チェッカー (ICC: immunochromatography-checker; イムノクロマトチェッカー) を民間と共同で開発しており既にプロトタイプを完成させている。
- (2) ヒト尿中に、バイオピリンの分子種の一つとして、NO ラジカルおよびパーオキシ・ナイトライト (NO-O₂·) と反応して生成した新規化合物であるニトロ化ビリルビン (NO₂-bilirubin) を発見した。この事実は、活性化窒素酸化物の代謝や分解解毒にビリルビンが重要な役割を演じている可能性をバイオピリンという分子レベルで証明している。
- (3) ラットを用いて、バイオピリン測定による心臓移植後急性拒絶反応での酸化ストレスの動向と解析を行なう。その結果、バイオピリンは心臓移植後の拒絶反応モニタリングとして極めて有用性が高いと評価された。この成果は、外科領域でトップジャーナルな American Journal of Transplantation に掲載された。
- (4) (株) 日立ハイテクとの共同実験で、LC/MS/MS を用いた心臓移植後の急性拒絶反応での予知的バイオピリンの上昇物質の分子構造の同定により、ニトロ化ビリルビン (NO₂-bilirubin) であることを確



認した。

- (5) ROS 生成メディエーターとして作用する微量金属とビリルビン代謝系とのクロストーク解明：高感度微量元素測定キットの開発 (AKJ Global Tech)。
- (6) 抗ビリルビンモノクローナル抗体 24G7 (mAb 24G7) のエピトープの完全解明。
- (7) 炭酸リチウム剤は、てんかん、双極性障害の急性期治療及び維持療法 (リチウム療法) における第一選択薬である。今回リチウムセンサー配位子として用いた簡便迅速な血清中のリチウム濃度の直接定量法、及びその測定試薬組成物キットを開発した (共同研究：メタロジェニクス (株))。

ゲノム応用医学研究部門

准教授：窪田道典

大脳皮質には言語野のように左右差があることはよく知られているが、他の機能にも同様な左右差があるかどうかは、まだ不明な点が多い。特に、皮質感覚野や運動野などの皮質領域において、どのような左右差があるかということに関しては、よく分かっていない。そこで、今回は周波数変調音 (FM 音) を用いて、その周波数変化速度を変えた時に、応答強度が聴覚皮質の各等周波数帯でどのように変化するかを調べることで、皮質聴

覚野の左右差を検討した。

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、左右のモルモット大脳皮質から FM 音および純音の応答を記録した。刺激には、0.5 k Hz - 16.5 k Hz の FM 音を用い、持続時間を 16 - 400 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) から記録を行い、各等周波数帯の背側領域と腹側領域で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、どの周波数帯においても応答ピークの強さは、刺激の持続時間にはよらずほぼ一定であった。FM 音を与えた場合は、8 kHz と 16 kHz の等周波数帯では、刺激の持続時間が 16 ms の時に最大応答を示し、64 ms 以上の持続時間では応答強度が減少した。このような応答強度と刺激持続時間との関係は、等周波数帯の背側領域で顕著に見られたが、腹側領域でははっきりせず、他の低い周波数帯でもはっきりしなかった。このような応答は、左の聴覚皮質でよく観察された。

業績目録

英文原著

Effects of lifestyle factors on urinary oxidative stress and serum antioxidant markers in pregnant Japanese women : A cohort study. Matsuzaki M, Haruna M, Ota E., Murayama R,

Yamaguchi T, Shioji I, Sasaki S, Yamaguchi T, Murashima S. BioScience Trends. 2014. 8(3), 176-184.

Determination of the epitope of anti-bilirubin monoclonal antibody 24G7 by kinetic analysis. Takuya Iwabuchi, Makoto Suematsu, Akiko Sugimoto, Tokio Yamaguchi. In submission

(Biochem Biophys Res Commun)

Hosokawa Y, Kubota M, Sugimoto S, Horikawa J. Neural activities to frequency-modulated sounds in the frequency bands of the primary auditory cortex of guinea-pigs observed by optical recording. J Physiol Sci, Vol. 64, Suppl. 1, S250 (2014).

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

研究支援者：牧谷 麗子

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

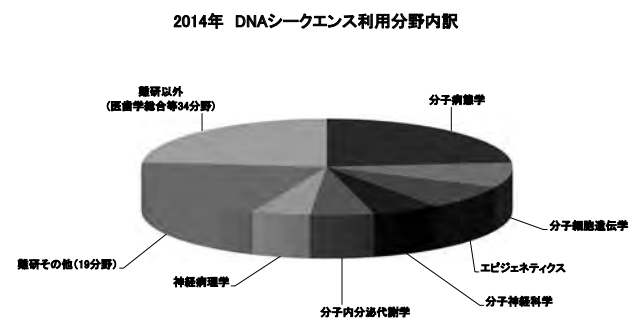
本解析室は、難治疾患研究所の教職員・学生および難治疾患共同研究拠点の参加研究者が実施するゲノム解析研究の支援を目的としている。最新機器の原理や使用法の講習会を通じた研究者への技術紹介、知識啓蒙を行っている。さらに、日常業務として、研究所内外からのゲノム情報の受託解析を行い研究の推進を図っており年間約6万件の解析実績を持っている。また、所内研究者、学生が共通して利用できる研究機器を配置するとともに、各分野にある共通性の高い機器を登録したヴァーチャルラボの管理も行っている。

以下は、2014年の実績である。

1. DNA 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DNA 受託シーケンスサービスのサンプル依頼数は42,909、延べ利用人数は2,985名であった。難研外からは依頼件数1,180件、依頼サンプル数10,069となり、全体の2割以上を占めている。

2012年より次世代シーケンサー（Ion Torrent



PGM) が共通機器として導入され、ゲノム解析室はオペレーション支援を行ってきたが、2013年7月より、所内外の要望に応えるために次世代シーケンサー (Ion torrent PGM) による受託解析サービスを開始した。本年は35ラン (内難研外3ラン) の受託解析を行った。受託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。

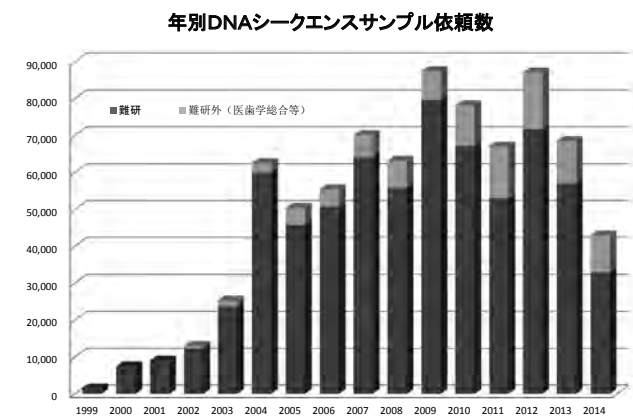
2. 設置機器

DNA シーケンサー 3130xl 2台、次世代シーケンサー Ion torrent PGM、PCR 5台、フローサイトメーター、発光プレートリーダー、製氷機、ユニバーサルテーブルトップ遠心機、Ion OneTouch システム、Covaris、バイオアナライザー

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。

- 5月22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)
- 6月9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)
- 12月17日 次世代シーケンサー受託解析説明会 (ゲノム解析室)



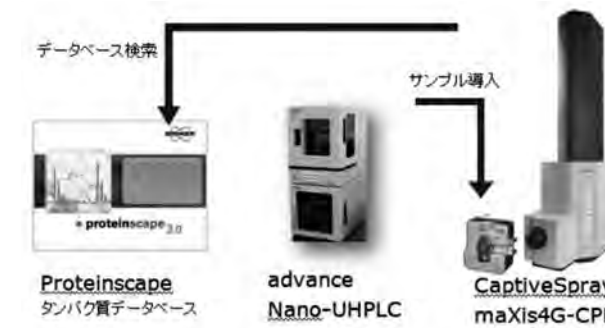
II. 細胞・プロテオーム解析室

技術専門職員：名和眞希子

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

本解析室は、所内の研究者が細胞分離やプロテオーム解析を行うにあたり支援・委託解析を行う共同利用施設として設置された。主に細胞と蛋白質を対象とする解析の研究支援に焦点を置き、最新の機器を設置し解析技術の進歩に対応していく方針である。

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稼働しており、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、運営できるように互いに連携を図っている。



<LC-MSMS 解析システム maXis4G 使用 Bruker Daltonics >



<LC-MSMS 解析 Qtrap5500 使用 ABSCIEX>

III. 遺伝子組換えマウス実験室

技術職員：宇佐美貴子

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。

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・准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、凍結マイクロトーム、ロータリーマイクロトーム、スピンドリッシュプロセッサ、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）：山崎 彰子

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、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。

高速セルソーター MoFlo Legacy（ベックマンコーラー）

高速セルソーター MoFlo XDP（ベックマンコーラー）

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）

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 による受託サービスを2013年8月1日より開始した。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となった。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. 2014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2014年5月と11月に申込者数にあわせてそれぞれ3回ずつ合計6回行った。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。2014年の当支援室の利用者数はのべ516人で、前年の1.88倍であった。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。

学外からの受託依頼に対応するため、受託対象を拡大した体制の整備を産学連携研究センターと連携してすすめる、本年も国外に細胞株の分譲を実施した。また外部大学、民間企業からのマイコプラズマ検査も受託した。学内からはリンパ球樹立受託が増加している。

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
 特 任 助 教 Smriti Aryal A.C.
 大 学 院 生 守 屋 秀 一
 川 崎 真 希 理
 山 田 峻 之
 林 婉 婷
 Pawaputana na mahasarakhan Chanida
 八 田 愛 理 奈
 峯 田 浩 司
 研 究 生 林 欣
 共 同 研 究 生 白 川 純 平
 事 務 補 佐 員 並 木 陽 子

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
 卒 研 生 中 川 竜 弥
 研 究 支 援 員 伏 見 真 好
 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
 助 教 相 田 知 海
 特 任 助 教 相 馬 美 歩
 伊 藤 亨 子
 柳 澤 美 智 子
 大 学 院 生 杉 本 潤 哉
 崔 万 鵬
 赵 卓 扬
 今 橋 理 沙
 葛 山 貴 弥
 杉 山 香 織
 技 術 補 佐 員 石 久 保 春 美

樋 高 政 子
 佐 藤 宏 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 江 花 有 亮
 ポスドク（RPD） 児 玉 昌 美
 大 学 院 生 小 泉 章 子
 軽 部 裕 也
 張 鵬
 劉 鍾
 藤 塚 美 紀
 伊 藤 沙 季
 林 英 里 奈
 佐 藤 央 望
 楊 筱 茜
 高 橋 健 太 郎
 杉 山 浩 二
 技 術 補 佐 員 安 東 朋 子
 木 村 麗 子
 坂 田 歩 美
 事 務 補 佐 員 山 口 邦 子

幹細胞制御分野

教 授 田 賀 哲 也
 准 教 授 鹿 川 哲 史
 信 久 幾 夫
 技 術 補 佐 員 伏 見 真 好
 井 上 和 子
 大 学 院 生 國 分 康 博
 須 藤 元 輝
 Wang Wenqian
 室 田 吉 貴
 池ノ上知世
 木 村 亮 介
 齋 藤 清 香
 箕 輪 あ お い

大学院研究生
共同研究員
連携研究員

野本駿希
横居優貴
寺嶋一夫
江石遥夏
高橋聡美

生体防御学分野

教授 梶木俊聡
講師 小内伸幸
助教 手塚裕之
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
技術補佐員 黒田聖子
始関紀彰
中村瑠美子
上岡寿子

事務補佐員

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 品川健朗

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
本間秀典
尾串雄次
秘書 印南留美
関綾子
技術補佐員 大谷彰子
田島たよ子
事務補佐員 上野美恵子
佐藤しげみ
藤井幹世
大学院生 近藤和
内田成則
Juliana Bosso 谷口
毛榮
星野絵莉子
専攻生 張雪梅

病態細胞生物学分野

教授 清水重臣
特任講師 辻岡政経
鳥居暁
助教 荒川聡子
本田真也
特任助教 室橋道子
山口啓史
申珉京
杉村康行
秘書 坂口三美
技術補佐員 吉野育代
辻村恭子
桜井一
砂田麻理子
大学院生 杉本夕奈
関豊和
山下恵実
後藤佑太
山本寛典
中島あゆみ
中井美由紀
小田奈津季
遠藤葉月
特別研究学生 川田真大

発生再生生物学分野

教授 仁科博史
准教授 平山順
助教 浅岡洋一
特任助教 宮村憲央
内田好海
技術補佐員 生江美佐子
尾高慶子
秘書 山本誠
野田英一郎
下村忠範
有馬誉恵
石原えりか
田村律人
YU Ruoxing
谷真理子
濱部凜
鹿野優佳
細淵彩
原崇
特別研究学生 三浦良太

免疫疾患分野

教授 鐔田武志
准教授 安達貴弘
助教 鈴木光浩
特任助教 松原直子
徐米多
赤津ちづる
外国人研究員 劉志紅
特任講師 王継揚
技術補佐員 久留主幸江
中野成子
事務補佐員 高橋博子
唐森
大学院生 高田俊太郎
焦旭阳
Aslam Mohammad
Nazim Medzhidov
吉岡真代
Feng Yang-Yang
連携研究員 長谷川美佳

分子病態分野

教授 木村彰方
准教授 林丈晴
助教 櫻井大祐
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 飯塚淳次
大学院研究生 藍智彦
山田佳代子
大学院生(血管外科) 小泉伸也
共同研究者 住本英樹
蒔田直昌
久場敬司
山本健
牧野伸司
安健博

幹細胞医学分野

教授 西村栄美
助教 松村寛行
日本学術振興会特別研究員 毛利泰彰
森永浩伸
特任助教 吉田剛

技術補佐員 矢嶋玲子
福田誠
事務補佐員 渡邊郁
大学院生 高田亜季
劉楠
Sally Eshiba
大学院生 岡本桜

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
ゲノム解析支援室助教 谷本幸介
硬組織疾患ゲノムセンター特任講師 林深
大学院生 Nuylan Michelle Loyola
Daniela Tiaki Uehara
李慧
Sujata Sakha
藤原直人
谷中淑光
森下真紀
今岡直毅
三藤里愛
宮田楓
森澤翔
古澤啓子
奥田将史
特別研究学生 永田啓明
高橋寛吉
岩館怜子
平本秀一
歯学部研究体験実習生 佐川夕季

分子遺伝学分野

教授 三木義男
特任准教授 中西啓
助教 竹中克也
特任助教 宮口健
高岡美帆
大学院生 石場俊之
加賀美裕也
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
 助教授 池田仁子
 大学院生 サリア・デチャメタグン
 カウンシー・トゥー
 キン・テテ・ゾー
 前田裕子
 藤谷啓雄
 勝田江朗
 萩原純也
 田村理弥
 研究生 メディナ・アブドサタル
 エイ・ココ・ミン
 坪田惟里

遺伝生化分野

教授 北嶋繁孝
 准教授 田中裕二郎
 助教授 川内潤也
 大学院生 井上允
 福本悟史
 高屋俊輔
 新井菜月
 藤沢晃久
 卒業研究生 大塚菜央
 鈴木卓也
 酒井菜摘
 技術補佐員 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
 助教授 小野竜一
 特任講師 李知英
 特任助教授 成瀬美衣
 入江将仁
 川崎佑季
 小林慎
 高木清考
 北澤萌恵
 松沢歩
 黒田友紀子

難病基盤・応用研究プロジェクト室助
 非常勤講師
 大学院生

生命情報学分野

教授 田中博
 助教授 森岡勝樹
 特任准教授 任鳳蓉
 特任助教授 長谷武志
 大学院生 金子佳之
 遠藤有人
 上野英一
 田中泰羽
 澤井一
 太田沙紀子
 清水千佳子
 鈴木麻美
 糠谷祥子
 長谷川浩章
 小泉典秋
 星昭彦
 Aw Wanping
 井上紀彦
 丸山智久
 渡邊考
 佐竹紀彦
 西部弘純
 杉本京子
 Sophia Suba
 大久保三代
 Asiya Hapaer
 張徳政

ゲノム病理学分野

教授 石川俊平
 助教授 砂河孝行
 加藤洋人
 佐藤康成
 相原聡子
 佐藤玲子
 山本麻未
 貴志一樹
 鈴木良平
 田向美春
 藤橋未希

共同研究員
 技術補佐員
 事務補佐員
 大学院生

フロンティア研究室低酸素生物学

准教授 中山恒
 助教授 榑康一
 大学院生 菊池大介

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 山崎裕美子
 技術補佐員 大野麻理奈
 卒研究生 渡部栄地

フロンティア研究室レドックス応答細胞生物学

准教授 倉田俊一

テニユアトラック研究室細胞分子医学分野

准教授 大石由美子
 助教授 種市大喜
 林晋一郎
 特任助教 早川清雄
 技術補佐員 三木弥名子

プロジェクト研究室

准教授 山口登喜夫
 窪田道典

連携研究部門病態発現機構

教授 宮野悟
 准教授 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

助教授 中西祐輔

難治がんエピゲノム研究プロジェクト

助教授 川崎佑季

難治低酸素性乳がん研究プロジェクト

助教授 榑康一

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
 研究支援者 牧谷麗子
 技術補佐員 伊藤暁子
 蘭部知奈美

細胞プロテオーム解析室

技術専門職員 名和真希子

遺伝子組換えマウス実験室

技術職員 宇佐美貴子
 技能補佐員 中村麻衣子
 木崎未央
 遠藤由加

形態機能解析室

技術補佐員 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 山崎彰子

バイオリソース支援室

技術専門職員 小島智子

支援室

技術専門職員 馬場裕子

事務部

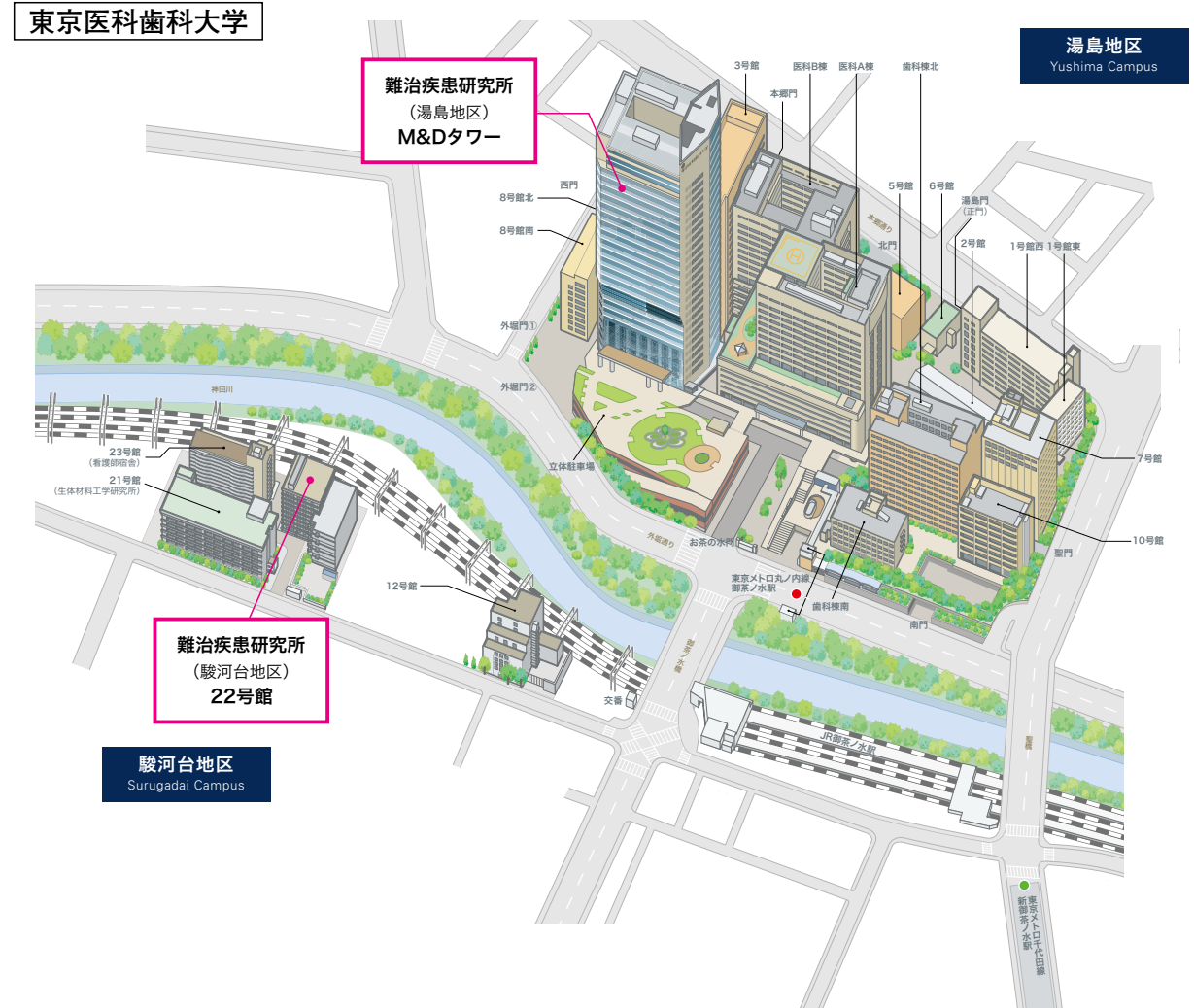
事務長 坂入幸雄
 総務掛長 能澤一彦
 総務主任 小林俊彦
 総務掛員 林健策
 青木明日加
 木下清隆
 事務補佐員 井上奈緒美
 中村展子
 高橋将貴

難治疾患研究所運営諮問委員会委員

- 郷 通子 先生 情報・システム研究機構 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 独立行政法人医薬品医療機器総合機構 理事
- 西川 伸一 先生 J T生命誌研究館 顧問

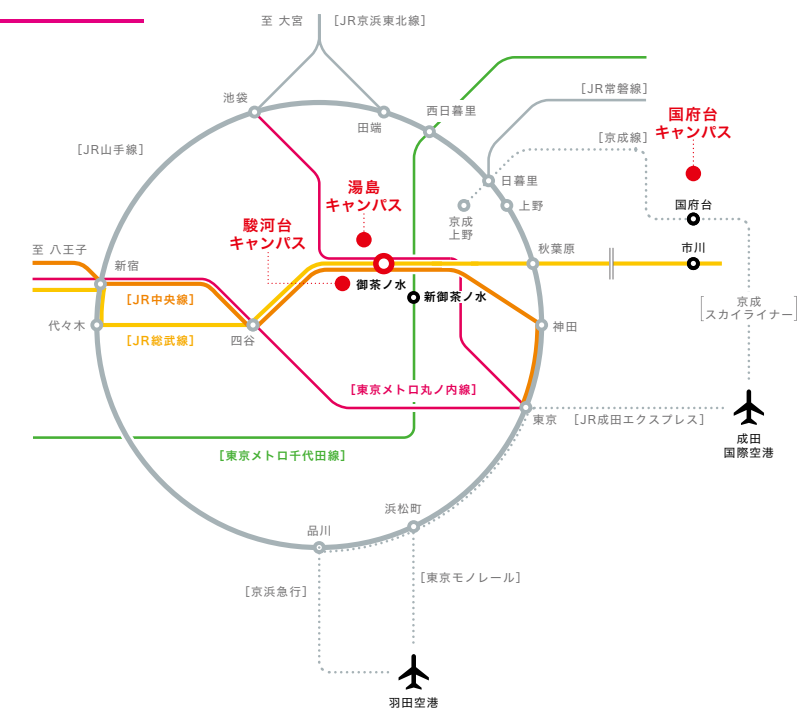
(50 音順)

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 2015

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