

Annual Report 2014



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

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

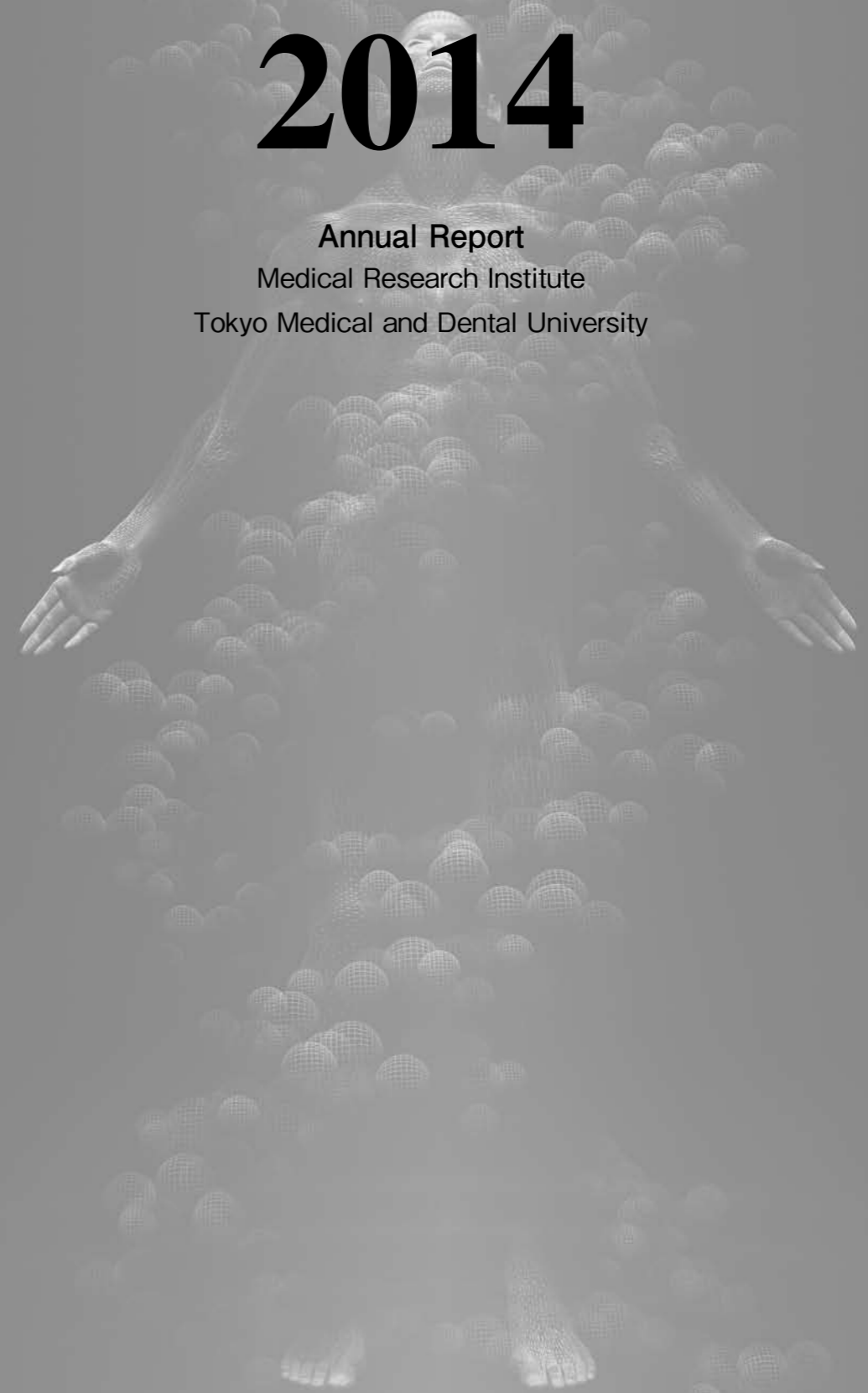
1-5-45 Yushima Bunkyo-ku Tokyo 113-8510 Japan

Tel +81-3-5803-4504

東京医科歯科大学
難治疾患研究所
年報

2014

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2013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、難治疾患を「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病気」とさだめ、最先端の基礎医学・生物学研究の成果を取り入れつつ、時代の要請にあわせた幅広い難治疾患研究を推進しています。この冊子をお読みいただき、成果をご覧いただければと思います。本研究所は平成21年に文部科学大臣に全国共同利用・共同研究拠点「難治疾患共同研究拠点」に認定されており、その活動状況についても記載しています。

平成23年には、本学が日本におけるリサーチユニバーシティの一つに選ばれました。そのことを大変誇らしく思うとともに、研究所としてもさらに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。今年度から分野横断型の難治疾患研究を推進するために「難病基盤・応用研究プロジェクト室」をたちあげました。これまでの研究部門の活動に加え、これらの新しい研究活動により「難治疾患克服」の実現に、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	6～9
5. 難治疾患共同研究拠点	10～13
6. 学位取得者	14
7. 難研セミナー	15～16

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 18～19
2. 分子細胞生物学分野 20～21
3. 分子神経科学分野 22～23
4. 生体防御学分野 24～25
5. 生体情報薬理学分野 26～27
6. 幹細胞制御分野 28～29
7. 分子構造情報学分野 30～31
8. フロンティア研究室 低酸素生物学 32～33
9. テニュアトラック研究室 細胞分子医学分野 34～35

難治病態研究部門

1. 神経病理学分野 38～39
2. 病態細胞生物学分野 40～41
3. 発生再生生物学分野 42～43
4. 幹細胞医学分野 44～45
5. 免疫疾患分野 46～47
6. 分子病態分野 48～49
7. フロンティア研究室 ウイルス治療学 50～51

ゲノム応用医学研究部門

1. 分子細胞遺伝学分野 54～55
2. 分子遺伝学分野 56～57
3. 分子疫学分野 58～59
4. 遺伝生化学分野 60～61
5. ゲノム病理学分野 62～63
6. エピジェネティクス分野 64～65
7. 生命情報学分野 66～67
8. フロンティア研究室 レドックス応答細胞生物学 68～69
9. フロンティア研究室 遺伝子発現制御学 70～71

- ・プロジェクト研究室 74～75
- ・大学院教育研究支援 実験施設 76～78

職員学生名簿	79～83
諮問委員名簿	84
案内図	85

湯島地区

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

難治疾患研究所

分子薬理学分野、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、生体防御学分野、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

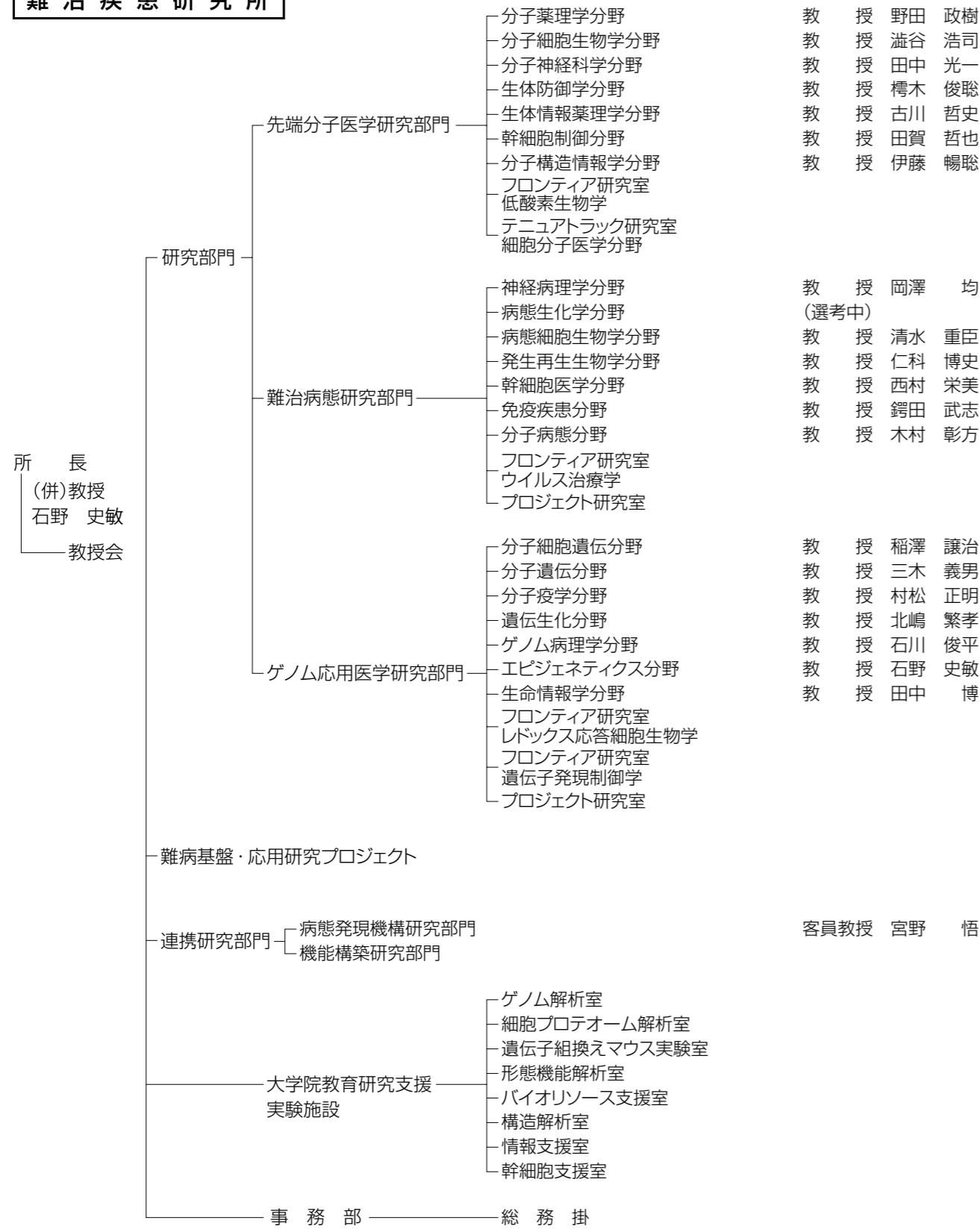
〒101-0062
東京都千代田区神田駿河台2-3-10

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26年4月1日現在



職員及び学生数

●学生数

平成 26 年 3 月 1 日現在

部局名	研究部門名等	分野名等	大学院生		大学院 研究生
			医歯学	教育部	
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
		分子薬理学分野	2	0	0
		分子細胞生物学分野	0	1	0
		分子神経科学分野	4	0	0
		生体防衛学分野	1	0	0
		生体情報薬理学分野	6	1	0
		幹細胞制御分野	13	0	1
		分子構造情報学分野	3	1	0
		フロンティア研究室	0	0	0
		プロジェクト研究室	0	0	0
	難治病態研究部門	神経病理学分野	6	0	1
		病態生化学分野	0	0	0
		病態細胞生物学分野	8	0	0
		発生再生生物学分野	7	1	0
		幹細胞医学分野	0	0	1
		免疫疾患分野	7	0	1
		分子病態分野	1	1	1
		フロンティア研究室	0	0	0
		プロジェクト研究室	0	0	0
		プロジェクト研究室	0	0	0
	ゲノム応用医学研究部門	分子細胞遺伝学分野	11	0	0
		分子遺伝学分野	6	1	0
		分子疫学分野	8	2	2
		遺伝生化学分野	3	0	0
		ゲノム病理学分野	0	0	0
		エピジェネティクス分野	0	3	0
		生命情報学分野	26	2	3
		フロンティア研究室	0	0	0
		プロジェクト研究室	0	0	0
		プロジェクト研究室	0	0	0
		プロジェクト研究室	0	0	0
		プロジェクト研究室	0	0	0
		計			112

※ 大学院生 (医歯学) は大学院医歯学総合研究科
 ※ 大学院生 (教育部) は大学院生命情報科学教育部

●職員数

平成 26 年 3 月 1 日現在

区分	教 員					その他職員				合計
	教 授	准教授	講 師	助 教	計	行(一)	行(二)	旧事務官	計	
定員	22	27	0	25	74	4	1	4	9	83
現員	20	24	2	22	68	3	1	5	9	77

ハイライト

免疫の司令塔、樹状細胞の源となる細胞を発見

— ワクチン開発や自己免疫病治療に新たな視点 —

Onai, N. et al., A clonogenic progenitor with prominent plasmacytoid dendritic cell developmental potential.

Immunity 38, 943-57 (2013).

樹状細胞 (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・医学賞を受賞しました。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ます。血液細胞は造血幹細胞を源とし、DC も例外ではありませんが、DC に分化の方向性が運命決定された、かつ他の血液細胞へは分化しない「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ます。

DC は、抗原提示能に優れた従来型樹状細胞 (cDC) と、ウイルスや自己の核酸に反応して大量のインターフェロンを産生する形質細胞様樹状細胞 (pDC) に大別されます。私たちの研究グループは、過去に上記条件を満たす「DC 前駆細胞」を同定し報告しました。しかしながら、同前駆細胞が生み出す DC の大多数が cDC であったため、pDC への分化能に優れた「pDC 多産性前駆細胞」の存在が予測され、その細胞の同定が待たれていました。

これらの背景に基づき、約 5 年の歳月をかけて、マウス骨髓細胞を用いて以前報告した DC 前駆細胞と近縁の分画を詳しく調べた結果、私たちは pDC への分化能に優れた「pDC 多産性前駆細胞」の同定に世界で初めて成功しました。新たに発見した「pDC 多産性前駆細胞」は、以前報告したものに比べ、pDC を 7-8 倍多く作り出すことができました。また、pDC 分化に必須の転写因子 E2-2 を非常に高く発現し、対照的に、cDC 分化に重要な転写因子 Id2 の発現は比較的低いものでした。これら特徴をふまえ、以前報告した「cDC 多産性前駆細胞」と今回の「pDC 多産性前駆細胞」をまとめて「共通 DC 前駆細胞 (CDP)」と定義しました (図 1)。本研究成果は、DC 分化系譜を書き換え、免疫学・血液学分野に大きなインパクトを与えるものです。現在、感染症やがんに対するワクチンの標的細胞として DC の重要性がクローズ

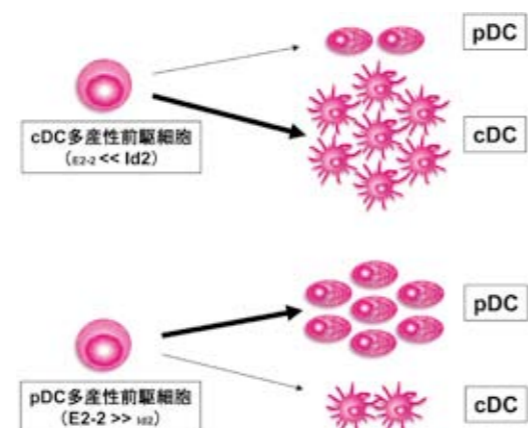


図 1 CDP は cDC 多産性前駆細胞と pDC 多産性前駆細胞に分類される。

アップされています。これとは対照的に、なんら感染のない定常状態では、DC はむしろ免疫寛容の誘導・維持を介して自己免疫病を抑制していることも明らかになってきています。1 個から 500-1,000 個の DC を生み出す、かつ他の血液細胞を生み出さない DC 前駆細胞の発見は、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・治療技術の開発が期待できるものです。

本研究成果は、本学と JST との共同でプレスリリースを行い、関連記事が、日本経済新聞および日刊工業新聞電子版、読売新聞夕刊、科学新聞、本学広報誌 Bloomなどで紹介されました。また、筆頭著者小内伸幸が、2013 年難治疾患研究所最優秀論文賞を受賞しました。

(生体防御学分野 梶木俊聡)

過剰な免疫反応を抑制する新たな樹状細胞のはたらきを発見— 感染症や自己免疫疾患治療に新たな視点 —

Ohyagi, H., Onai, N. et al., Monocyte-derived dendritic cells perform hemophagocytosis to fine-tune excessive immune responses.

Immunity 39, 584-98 (2013).

免疫反応は、病原体を排除することで宿主を防御すると同時に組織を傷害する、いわば「諸刃の剣」です。感染や炎症が起こると DC は、Toll 様受容体 (TLR) をはじめとするセンサーで病原体の構造を認識し、獲得免疫系を活性化して病原体を排除します。しかしながら、サイトカインやウイルス特異的キラー T 細胞 (CTL) などは、病原体の排除に役立つと同時に組織を傷害しま

す。従って、免疫反応には、病原体排除と組織傷害のバランスを調節・維持するための仕組みが必要になります。激しい免疫反応ほど、そのバランスを適度に調節する仕組みの重要性が増すこととなりますが、そのバランス調節機構の実態はよくわかっていませんでした。

激しい炎症時には、貪食細胞による血球の貪食が起こり、さらにいくつかの診断基準を満たす場合を血球貪食症候群 (HPS) と言います。先天的な原因で発症する一次性 HSP と、感染症などに付随して起こる二次性 HPS に分類されます。私たちの研究グループは、この血球貪食現象に着目した。まず、代表的な TLR リガンドである CpG (微生物に多くみられる DNA 配列) あるいは poly I:C (ウイルスの構成成分に類似の合成 RNA) を高濃度で野生型マウスに投与することによって、骨髓、脾臓、末梢血などで血球貪食現象を誘導することに成功しました (図 2 左)。貪食される細胞は主に未熟な有核赤血球でしたが、脱核した成熟赤血球も混在していました。また、貪食細胞が単球由来 DC であることも判りました。ヒトでは、EB ウィルス、サイトメガロウィルス、HIV などの慢性感染症で HPS が観察されます。そこで、マウスに慢性感染するリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV C13) を感染させたところ、やはり血球貪食が効率よく誘導されました (図 2 右)。これらのマウス血球貪食モデルを用いて、血球貪食機構の詳細を調べたところ、高濃度 TLR リガンドあるいは LCMV C13 感染によって赤血球系細胞にアポトーシスが起こり、フォスファチジルセリン (PS) が膜表面に露出して、単球由

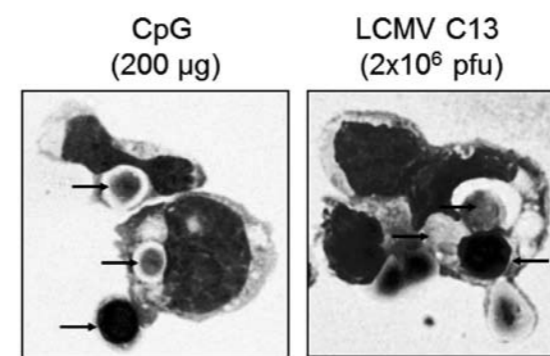


図 2 単球由来 DC による血球貪食

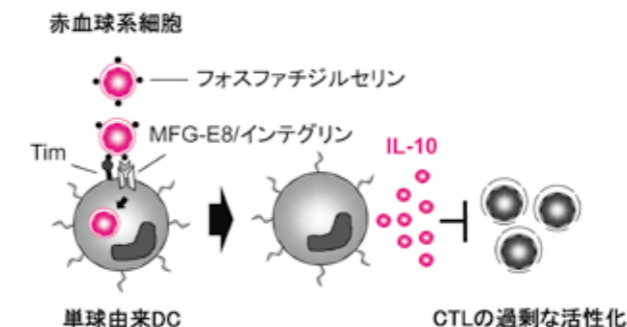


図 3 血球貪食の免疫学的意義

来 DC 上の PS 受容体に結合し、貪食されていました。興味深いことに、単球由来 DC が血球を貪食すると、IL-10 や TGF- β といった免疫抑制性サイトカインを産生して過剰な免疫応答を抑制し個体の死を回避するシステムとして働くことが明らかになりました (図 3)。

血球貪食は激しい炎症状態を抑えることで自らの死を防ぐ代わりに病原体の排除を見送る、宿主~病原体間の共生戦略ととらえることもできます。従って、本研究成果は、慢性感染成立における新たな生物学的意義を提供するものです。また、免疫細胞の暴走など過剰な免疫反応を伴う感染症に対する新たな診断法・治療法の開発が期待できるものです。

本研究成果は、本学と JST との共同でプレスリリースを行い、関連記事が、日経産業新聞および化学工業新聞などで紹介されました。

(生体防御学分野 梶木俊聡)

第 12 回駿河台国際シンポジウム第 4 回難治疾患共同研究拠点シンポジウムを開催

第 12 回駿河台国際シンポジウム「Metabolic syndrome & Cardiovascular diseases」および第 4 回難治疾患共同研究拠点シンポジウムが平成 25 年 10 月 23 日、鈴木章夫大講堂にて開催された。国内外よりシンポジストを招待した講演会では活発な議論が行われた。

シンポジスト講演タイトルを以下に示す。

第 12 回駿河台国際シンポジウム

Dr. Tadahiro Kitamura (Metabolic signal research center, Institute for Molecular and Cellular Regulation, Gunma University)

「The role of ATF3 in the regulation of glucose and energy metabolism」

Dr. Kaoru Saijo (University of California, San Diego, School of Medicine, Department of Cellular and Molecular Medicine)

「Nuclear receptor-mediated repression of Neurodegenerative diseases」

Dr. Michael T. Y. Lam (Department of Cellular and Molecular Medicine, School of Medicine, University of California, San Diego)

「Rev-Erb represses gene regulation by inhibiting enhancer-directed transcript」

Dr. Yumiko Oishi-Tanaka (Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University)

「Coordinated regulation of inflammatory response and lipid homeostasis in macrophage」

Dr. Hiroshi Ashikaga (Department of Medicine, John

Hopkins University)

「MRI-guided catheter ablation of cardiac arrhythmias」

Dr. Seiryu Sugiura

「UT Heart, a multiscale heart simulator to bridge the gap between bench and bedside」

Dr. Tetsushi Furukawa (Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University)

「GWAS of atrial fibrillation in Japan」



第4回難治疾患共同研究拠点シンポジウム

青木淳賢(東北大学大学院薬学研究科)

「ゼブラフィッシュを用いた生理活性脂質リゾホスファチジン酸機能の解明」

麻生悌二郎(高知大学医学部遺伝子機能解析学講座)

「転写伸長/ユビキチンリガーゼ因子 Elongin A の生体内機能の解明」

大澤光次郎(京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA) 臨床応用研究部門疾患再現研究分野)

「ヒト胚性幹細胞からの造血発生における SOX17 の役割」

田中謙二(慶應義塾大学医学部精神神経科学教室、情動の制御と治療学研究寄付講座)

「疾患モデルマウス作成に有効な STOPtetO ノックイン (FAST システム) とその応用例」

田中正人(東京薬科大学生命科学部免疫制御学研究室)

「CD169 陽性マクロファージによる炎症制御」

永森收志(大阪大学大学院医学系研究科生体システム薬理)

「膜輸送複合体におけるトランスポーターの機能共役」

(分子細胞生物学分野 澁谷浩司)

「CD169 陽性マクロファージによる炎症制御」

「膜輸送複合体におけるトランスポーターの機能共役」

(分子細胞生物学分野 澁谷浩司)

「CD169 陽性マクロファージによる炎症制御」

「膜輸送複合体におけるトランスポーターの機能共役」

International Framework in TGF-β Family Signaling”

渡辺千穂 IADR Unilever Hatton Divisional Award. IADR/AADR/CADR General Session& Exhibition

“Functional Analysis of Cnot3 in Regulation of Bone Metabolism.”

「A clonogenic progenitor with prominent plasmacytoid dendritic cell developmental potential」

Immunity

「ヒト胚性幹細胞からの造血発生における SOX17 の役割」

田中謙二(慶應義塾大学医学部精神神経科学教室、情動の制御と治療学研究寄付講座)

「疾患モデルマウス作成に有効な STOPtetO ノックイン (FAST システム) とその応用例」

田中正人(東京薬科大学生命科学部免疫制御学研究室)

「CD169 陽性マクロファージによる炎症制御」

永森收志(大阪大学大学院医学系研究科生体システム薬理)

「膜輸送複合体におけるトランスポーターの機能共役」

(分子細胞生物学分野 澁谷浩司)

「CD169 陽性マクロファージによる炎症制御」

永森收志(大阪大学大学院医学系研究科生体システム薬理)

「膜輸送複合体におけるトランスポーターの機能共役」

(分子細胞生物学分野 澁谷浩司)

「CD169 陽性マクロファージによる炎症制御」

永森收志(大阪大学大学院医学系研究科生体システム薬理)

「膜輸送複合体におけるトランスポーターの機能共役」

(分子細胞生物学分野 澁谷浩司)

「CD169 陽性マクロファージによる炎症制御」

永森收志(大阪大学大学院医学系研究科生体システム薬理)

「膜輸送複合体におけるトランスポーターの機能共役」

(分子細胞生物学分野 澁谷浩司)

「CD169 陽性マクロファージによる炎症制御」

1位 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

2位 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

3位 崔万鵬(分子神経科学分野) Glial dysfunction in the mouse habenula causes depressive behaviors.

ベストプレゼンテーション賞 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

ベストディスカッション賞 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

難治疾患研究賞 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

萌芽賞 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

若手研究者受賞者

1位 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

2位 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

3位 櫻井大祐(分子病態分野) Preferential Binding to Elk-1 by SLE-Associated IL10 risk allele upregulates IL10 expression

「CD169 陽性マクロファージによる炎症制御」

永森收志(大阪大学大学院医学系研究科生体システム薬理)

「膜輸送複合体におけるトランスポーターの機能共役」

(分子細胞生物学分野 澁谷浩司)

「CD169 陽性マクロファージによる炎症制御」

永森收志(大阪大学大学院医学系研究科生体システム薬理)

「膜輸送複合体におけるトランスポーターの機能共役」

(分子細胞生物学分野 澁谷浩司)

「CD169 陽性マクロファージによる炎症制御」

永森收志(大阪大学大学院医学系研究科生体システム薬理)

「膜輸送複合体におけるトランスポーターの機能共役」

(分子細胞生物学分野 澁谷浩司)

「CD169 陽性マクロファージによる炎症制御」

永森收志(大阪大学大学院医学系研究科生体システム薬理)

「膜輸送複合体におけるトランスポーターの機能共役」

出願日:平成25年5月31日

免疫疾患分野

特許番号:5243269号

発明者:鏑田武志 小野寺大志

発明の名称:B細胞におけるCD22機能を抑制することから成る免疫応答の促進方法

特許権者:独立行政法人・科学技術振興機構

登録日:2013.4.12

「CD169 陽性マクロファージによる炎症制御」

永森收志(大阪大学大学院医学系研究科生体システム薬理)

「膜輸送複合体におけるトランスポーターの機能共役」

(分子細胞生物学分野 澁谷浩司)

「CD169 陽性マクロファージによる炎症制御」

永森收志(大阪大学大学院医学系研究科生体システム薬理)

「膜輸送複合体におけるトランスポーターの機能共役」

(分子細胞生物学分野 澁谷浩司)

「CD169 陽性マクロファージによる炎症制御」

永森收志(大阪大学大学院医学系研究科生体システム薬理)

「膜輸送複合体におけるトランスポーターの機能共役」

(分子細胞生物学分野 澁谷浩司)

「CD169 陽性マクロファージによる炎症制御」

永森收志(大阪大学大学院医学系研究科生体システム薬理)

「膜輸送複合体におけるトランスポーターの機能共役」

(分子細胞生物学分野 澁谷浩司)

「CD169 陽性マクロファージによる炎症制御」

永森收志(大阪大学大学院医学系研究科生体システム薬理)

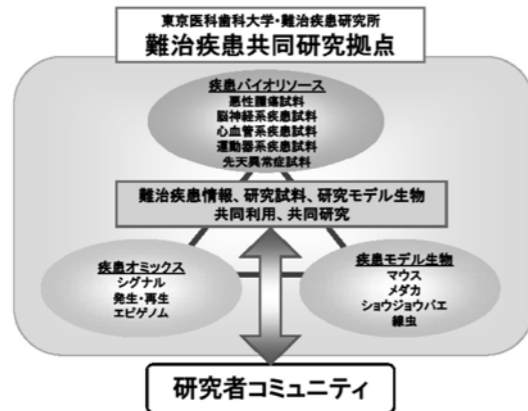
「膜輸送複合体におけるトランスポーターの機能共役」

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 25 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
Thomas Eschenhagen 教授 (エッペンドルフ大学医学部) 有村 卓朗 准教授 (分子病態分野)	肥大型心筋症に見出された ANKRD1 変異が与える心筋収縮パラメーターへの影響	Impact of ANKRD1 mutations associated with hypertrophic cardiomyopathy on contraction parameters of engineered heart tissue. <i>Basic Res Cardiol.</i> 2013;108(3):349.
久場 敬司 准教授 (秋田大学医学部) 木村 彰方 教授 (分子病態分野)	心筋症病態が男性でより重症となるメカニズムを解明	Nuclear accumulation of androgen receptor in gender difference of dilated cardiomyopathy due to lamin A/C mutations. <i>Cardiovasc Res.</i> 2013 Aug 1;99(3):382-94.
寺井 崇二 准教授 (山口大学大学院医学系研究科) 内科 博史 教授 (発生再生生物学分野)	脂肪肝メダカを用いた代謝系疾患病態の解明	The expanding role of fish models in understanding non-alcoholic fatty liver disease. <i>Dis Model Mech.</i> 2013 Jul;6(4):905-14.
安川 孝史 助教 (高知大学医学部) 北嶋 繁孝 教授 (遺伝生化学分野)	ストレス応答遺伝子発現と神経系発生における転写伸長因子エロンガン A の役割を解明	Transcriptional properties of mammalian Elongin A and its role in stress response. <i>J Biol Chem.</i> 2013 Aug 23;288(34):24302-15.
住本 英樹 教授 (九州大学大学院医学研究科) 木村 彰方 教授 (分子病態分野)	FHOD3 変異は拡張型心筋症の原因となる	Dilated cardiomyopathy-associated FHOD3 variant impairs the ability to induce activation of transcription factor SRF. <i>Circ J.</i> 77(12): 2990-2996, 2013.
曾根 雅紀 准教授 (東邦大学理学部) 岡澤 均 教授 (神経病理学分野)	脊髄小脳失調症 1 型の原因が DNA 損傷修復異常であることを解明	Systems biology analysis of Drosophila in vivo screen data elucidates core networks for DNA damage repair in SCA1. <i>Nature Commun.</i> 2013;4:1816
山本 健 准教授 (九州大学生体防御医学研究所) 木村 彰方 教授 (分子病態分野)	ALMS1 多型は若年発症心筋梗塞の遺伝的リスクである	Identification of a glutamic acid repeat polymorphism of ALMS1 as a novel genetic risk marker for early-onset myocardial infarction by genome-wide linkage analysis. <i>Circ Cardiovasc Genet.</i> 2013 Dec;6(6):569-78.
久場 敬司 准教授 (秋田大学医学部) 木村 彰方 教授 (分子病態分野)	アペリンは ACE2 を誘導することにより心不全を改善する	Apelin is a positive regulator of ACE2 in failing hearts. <i>J Clin Invest.</i> 2013 Dec 2;123(12):5203-11.
寺井 崇二 准教授 (山口大学大学院医学系研究科) 菅波 孝祥 准教授 (プロジェクト研究室)	非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) の重症度を反映する病理組織マーカーの同定	Hepatic crown-like structure: a unique histological feature in non-alcoholic steatohepatitis in mice and humans. <i>PLoS One.</i> 2013 Dec 11;8(12):e82163.

平成 25 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	教授	秋田大学大学院医学研究科	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求

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 37 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	乳がん易罹患性関連遺伝子の機能解析
石田 秀治	教授	岐阜大学応用生物科学部	シアル酸誘導体による 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・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	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

代表者	職名	所属機関	研究題目
井上 貴文	教授	早稲田大学理工学術院	自閉症スペクトラム障害モデルマウスにおけるシナプス前部の機能解析
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	助教	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ター発症機序の解明
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エ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
三宅 健介	教授	東京大学医科学研究所	Toll 様受容体と B 細胞抗原受容体との相互作用についての解析
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	長崎大学大学院歯歯薬総合研究科	遺伝性心臓伝導障害の新規病因の解明
大澤 光次郎	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
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
浜崎 浩子	教授	北里大学一般教育部医療系研究科	グルタミン酸トランスポーター遺伝子改変マウスを用いた視床下部・下垂体機能に関する研究

4) 被災研究者支援 2件

代表者	職名	所属機関	研究題目
青木 淳賢	教授	東北大学大学院薬学研究科	ゼブラフィッシュを用いた生理活性リゾリン脂質の発生学的機能の解明
山田 仁	助教	福島県立医科大学	Diaphyseal medullary stenosis (DMS) の家系例における疾患原因遺伝子探索

5) 研究集会 2件

代表者	職名	所属機関	研究題目
築地 信	准教授	星薬科大学	糖鎖免疫研究会
前川 文彦	主任研究員	国立環境研究所	発達障害研究の最先端

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6回 / 平成25年6月21日	笹野 哲郎 准教授	不整脈はなぜ起きるのか？マウスを使った突然死の研究
	佐藤 淳 助教	ハエで何が分かるのか？ハエを使った遺伝性小児難病研究
第7回 / 平成25年10月25日	井上 純 助教	もっと知ろう！ がん遺伝子・染色体のはなし
	安達 貴弘 准教授	見てみよう！ 免疫応答（感染・アレルギー）
第8回 / 平成26年2月21日	田中 裕二郎 准教授	話題の3Dプリント！で理解する ゲノムのはたらきと筋肉の病気
	黒柳 秀人 准教授	遺伝子のプロセッシング暗号を解いて心臓や筋肉の病気を治す！
	岡田 随象 講師	これからのヒトゲノム研究と疾患バイオリソースセンターの取り組み

第12回駿河台シンポジウム / 第4回難治疾患共同研究拠点シンポジウム (H25.10.23 開催)

東京医科歯科大学・国立環境研究所 共催シンポジウム「発達障害研究の最前線」 (H25.11.27 開催)

難治疾患共同研究拠点集会「糖鎖免疫 Glyco-Immunology 2014」 (H26.2.17 ~ 18 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6回 (H25.6.21 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7回 (H25.10.25 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8回 (H26.2.21 開催)

第25回ゲノムサイエンス研究会 (H25.7.4 開催)

第26回ゲノムサイエンス研究会 (H26.2.6 開催)

第8回研究所ネットワーク国際シンポジウム (H25.6.27 ~ 28 開催)

学位取得者

発生再生生物学分野

宮村 憲央
「Establishment and analysis of a novel hepatocellular carcinoma model induced by oncogene YAP」

分子病態分野

安 健博
「IκB is a new clue involved in the regulation of alternative splicing in human and viral genes」

神経病理学分野

Chan Li
「Sox2 transcriptionally regulates PQBP1, an intellectual disability-microcephaly causative gene, in neural stem progenitor cells」

分子細胞生物学分野

清水 幹容
「MAPK6-WNK1/4 Signaling Regulates Anterior Formation in Xenopus Development」

生体情報薬理学分野

大石 咲子
「Extracellular ATP mediates migration of macrophages and arrhythmogenicity in mechanically stretched atrium」
浅山 真秀子
「Effects of ICA-105574 on electrophysiological properties in canine heart」

分子薬理学分野

渡辺 千穂
「The stability of mRNA influences osteoporotic bone mass via Cnot3」
Smriti Aryal A.C.
「Nck1 deficiency accelerates unloading-induced bone loss」

生命情報学分野

高橋 俊哉
「Development of analysis technique of transcription factors and downstream pathways using comprehensive gene expression data」
片山 有紀
「Identification of pathogenesis-related microRNAs in

hepatocellular carcinoma by expression profiling」
菊地 正隆

「Identification of Unstable Network Modules Reveals Disease Modules Associated with the Progression of Alzheimer's Disease」
岸本 太郎
「Accurate mass comparison coupled with two endopeptidases enables identification of protein termini」

分子遺伝分野

高岡 美帆
「BRCA2 Phosphorylated by PLK1 Moves to the Midbody to Regulate Cytokinesis Mediated by Nonmuscle Myosin IIC」
Nadila Wali
「Centrosomal BRCA2 is a target protein of membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP)」
Nurmaa Dashzeveg
「The comprehensive search of p53 target genes that promote apoptosis」

分子疫学分野

キー・チャン・コー
「Association of COMT gene polymorphisms with systemic atherosclerosis in elderly Japanese」

エピジェネティクス分野

山口 祐季
「Analysis of regulatory mechanisms of genomic imprinting」

幹細胞制御分野

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

分子細胞遺伝分野

原園 陽介
「miR-655 is an EMT-suppressive microRNA targeting ZEB1 and TGFBR2」
山本信祐
「The impact of miRNA-based molecular diagnostics and treatment of NRF2-stabilized tumors」

難研セミナー

平成 24 年度大学院生研究発表会・若手研究者研究発表会
平成 25 年 3 月 8 日

内田好海（発生再生生物学分野）
標的既知化合物ライブラリーを用いた中胚葉分化制御機構の解明
高岡美帆（分子遺伝分野）
Plk1-Phosphorylated BRCA2 Localizes to the Midbody and Regulates Cytokinesis by Mediating Activation of Myosin IIC ATPase
村松智輝（分子細胞遺伝分野）
新規がん転移予測マーカー遺伝子および治療標的分子の探索
李滸（神経病理学分野）
Sox2 transcriptionally regulates Pqbp1, an intellectual disability-microcephaly causative gene, in neural stem progenitor cells
伊藤日加瑠（神経病理学分野）
HMGB1 を用いた脊髄小脳変性症 1 型モデルマウスの治療の試み
徐米多（免疫疾患分野）
CD72^{hi} is a modifier gene that regulates Fas^{hi}-induced autoimmune disease
中山恒（フロンティア研究室低酸素生物学）
慢性期低酸素応答における NF-κB/CREB の活性化を介したがん浸潤の分子機構
山崎世和（発生再生生物学分野）
ストレス応答性キナーゼ MKK7 の高次脳機能における役割
本田真也（病態細胞生物学分野）
赤血球成熟段階のミトコンドリア除去における新規オートファジーの役割
田村拓也（神経病理学分野）
小脳脊髄変性症 1 型病態における DNA 損傷修復の関与

平成 23 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 25 年 3 月 8 日

井上純（分子細胞遺伝分野）
神経芽腫の自然退縮メカニズムの解明とそのメカニズムに基づく癌の腫瘍退縮法の確立
小内伸幸（生体防衛学分野）
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
荻島創一（生命情報学分野）
神経難治性疾患の Linked Data による統合データベース開発
江花有亮（生体情報薬理学分野）
心房細動関連遺伝子座である 4q25 に関する機能解析とカテーテル治療後の再発に関する臨床研究
砂山潤（幹細胞医学分野）【代理講演：松村寛之】
色素幹細胞の運命制御における酸化ストレス応答の役割の解明
安健博（分子病態分野）

マクロファージに発現する MKL1 の動脈硬化病態形成機構における役割
荒川聡子（病態細胞生物学分野）
新規オートファジーの変調による血球貪食症候群の病態解明
渡辺幸造（免疫疾患分野）【代理講演：Konuskan UcarAyse】
B 細胞膜型分子 CD72 による自己抗原認識と自己抗体産生抑制機構の解明
信久幾夫（幹細胞制御学分野）
転写因子 Sox17 による造血幹細胞の幹細胞維持および発癌の分子基盤の解明
幸田尚（エピジェネティクス分野）
顕微授精によって影響を受ける遺伝子の同定と解析
小西昭充（病態細胞生物学分野）
テロメア・クロマチン相互作用による染色体末端安定化機構の解明
林深（硬組織疾患ゲノムセンター）
統合的ゲノム解析手法による原因不明の精神遅滞の病態解明
備前典久（幹細胞制御学分野）
人工幹細胞ニッチを用いた神経幹細胞の未分化性維持と分化を制御する分子基盤解明

平成 24 年度難治疾患研究所優秀論文賞受賞者講演会
平成 25 年 3 月 8 日
有村卓朗（分子病態分野）
Molecular basis for clinical heterogeneity in inherited cardiomyopathies due to myopalladin mutations
石川泰輔（分子病態分野）
A novel disease gene for Brugada syndrome: sarcolemmal membrane-associated protein gene mutations impair intracellular trafficking of hNav1.5
倉沢泰治（分子細胞遺伝分野）
Stabilization of phenotypic plasticity through mesenchymal-specific DNA hypermethylation in cancer cells
白樺（分子細胞遺伝分野）【代理講演：井上純】
A transcriptional variant of the LC3A gene is involved in autophagy and frequently inactivated in human cancers

難研セミナー／難治疾患共同研究拠点セミナー
第 496 回／第 69 回
川内 健史（JST さきがけ・慶應義塾大学医学部生理学）
大脳皮質形成のメカニズムの細胞生物学的理解
平成 25 年 4 月 25 日

第 497 回／第 70 回
Pro. Marek Glezerman (Sackler Medical School,

Tel Aviv University)
Gender-Specific Medicine - the struggle for the obvious
平成 25 年 4 月 10 日

第 498 回／第 71 回
野島 孝之（オックスフォード大学サーウエアムダン病理学研究所 Nicholas Proudfoot グループ）
RNA 切断を介した転写終結
平成 25 年 5 月 9 日

第 499 回／第 72 回
和氣 健二郎（本学名誉教授、(株) ミノファーマーゲン製薬 肝臓リサーチ・ユニット）
肝臓の星細胞 - 歴史・形態・機能
平成 25 年 6 月 25 日

第 500 回／第 73 回
Dr. Hunter Fraser (Assistant Prof., Dept. Biology, Stanford University)
Genetic variation in gene expression, DNA methylation, and complex disease
平成 25 年 7 月 26 日

第 501 回／第 74 回
Dr. Joan W. Conaway (Investigator, Stowers Institute for Medical Research, Kansas City, MO, USA)
Transcriptional Regulatory Complexes
転写制御複合体とその機能
平成 25 年 8 月 2 日

第 502 回／第 75 回
Dr. Enkhsaikhan Purevjav (The Heart Institute, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, USA)
GENETIC SCREENING OF CARDIOVASCULAR DISEASES: CINCINNATI CHILDREN'S EXPERIENCE
平成 25 年 8 月 8 日

第 503 回／第 76 回
Josef M. Penninger（オーストリア IMBA 所長、教授）
yeast genetics in mammalian stem cells -new Approaches to functional genetics
平成 25 年 11 月 7 日

第 504 回／第 77 回
伊川 正人（大阪大学・微生物病研究所・付属感染動物実験施設）
CRISPR/Cas9 システムを用いたマウスゲノム編集
平成 25 年 10 月 18 日

第 505 回／第 78 回
本田 尚三 (Postdoctoral Fellow, Department of Biochemistry and Molecular Biology (Kirino Lab), Thomas Jefferson University, MA)
生殖細胞における PIWI-interacting RNA の生合成機構
平成 25 年 11 月 29 日

第 506 回／第 79 回
Juergen Wienands (Cellular and Molecular Immunology Georg August University Goettingen Humboldtallee 34 37073 Goettingen Germany)
Targeting signal effector proteins to the antigen

receptor on native and class-switched memory B cells
平成 25 年 12 月 10 日

第 507 回／第 80 回
松尾勲 (大阪府立母子保健総合医療センター研究所 部長)
マウス胚の前後軸決定機構
平成 26 年 2 月 21 日

第 508 回／第 81 回
岡本伸彦 (大阪府立母子保健総合医療センター遺伝診療科主任部長)
先天異常症候群の診断と包括的ケア

平成 26 年 1 月 10 日

第 509 回／第 82 回
河崎洋司 (金沢大学医学系・脳細胞遺伝子学研究分野 教授)
脳神経系の発達における出生の機能的意義
平成 26 年 3 月 6 日

第 510 回／第 83 回
貝淵弘三 (名古屋大学大学院医学系研究所)
タンパク質リン酸化の網羅的解析法：情動の発現と記憶の制御の理解に向けて
平成 26 年 2 月 20 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

- CNOT3 が mRNA 安定性の制御を介して骨粗鬆症の骨量を制御する重要な因子であることを明らかにした。
- TRPV4 がメカニカルストレスによって誘導される細胞内カルシウム振動に必要とされることを明らかにした。
- Nck1 遺伝子欠損が非荷重によって誘導される骨量減少を加速する事を示した。

分子細胞生物学

- 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

- 興奮毒性による網膜神経節細の変性に、NMDA 受容体の GluRN2B 及び GluRN2D が関与する。
- Dock3 は、GluRN2B 及び GluRN2D の発現を抑制し、緑内障モデルマウスの症状を改善する。
- 外側手綱核の破壊は、REM 睡眠の持続を阻害する。
- ゲノム編集による高速高効率のヒト変異ノックインマウス作製系を構築。

生体防御学

- 免疫の司令塔、樹状細胞の源となる細胞を発見した。
- 過剰な免疫反応を抑制する新たな樹状細胞のはたらきを発見した。

生体情報薬理学

- 心房細動関連遺伝子の全ゲノム解析 (GWAS) により同定した 8 SNPs を用いて心房細動発症予測のアルゴリズムを作成し、心臓細動発症予測の感度が 55%、特異度 72% となることが明らかとなった。
- 心臓伝導系特異的転写因子の遺伝子変異・多型がそれぞれ突然死症候群の原因遺伝子・修飾遺伝子となることを明らかにした。
- iPS 細胞由来心筋細胞を改変し薬物効果・安全性評価系に適した心筋細胞を樹立した。

幹細胞制御

- 胎生中期の AGM 領域において造血幹細胞を含む血液細胞塊の維持に Sox17 が寄与することを明らかにした。
- 神経幹細胞の増殖を促進する FGF2 や Wnt シグナリングがニューロン分化やアストロサイト分化を抑制する分子機構を明らかにし、神経幹細胞の自己複製制御に関する新しいモデルを提唱した。
- C6 グリオーマ細胞株中に存在する癌幹細胞集団の造腫瘍活性を支持する人工ポリマー PolI10 を用いて、癌幹細胞ニッチの候補蛋白質を同定した。

分子構造情報学

- 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。
- ビタミン D 受容体とリトコール酸および合成リガンドとの複合体の構造を明らかにした。

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：早田匡芳
特任講師：納富拓也 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。破骨細胞は、血液の幹細胞由来の前駆細胞から分化するが、その分化過程における細胞間の制

御機構、サイトカインなどの局所における調節因子群による分化制御機構、また、破骨細胞内で機能する転写因子の制御機構を研究対象としている。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. Nck1 欠損は、非荷重によって誘導される骨減少を加速する (Smriti Aryal A.C.、早田匡芳、江面陽一、野田政樹)。

メカニカルストレスは、骨量を規定する重要なシグナルである。Nck1 は、細胞膜の活性化受容体からアクチン細胞骨格リモデリングを制御する細胞質エフェクターへのシグナルを仲介するアダプタータンパク質である。生体において非荷重によって誘導される骨減少における Nck1 の役割を検討した。神経切除による非荷重は、成体の骨における Nck1 遺伝子発現を 2 倍促進した。Nck1 欠損マウス及び野生型マウスを用いて、神経切除による非荷重の骨構造への効果を検討した。神経切除後 4 週間で、非荷重は、野生型のマウスの骨量を 30% 減少させたが、Nck1 欠損マウスでは、50% に悪化させた。これらのデータは、Nck1 遺伝子欠損が、メカニカル非荷重によって誘導される骨減少を加速させることを示し、Nck1 が骨代謝において、メカニカルストレスを介した骨代謝制御において重要な分子である事を示唆する。(J Cell Physiol, 2013)。

2. 骨芽細胞分化は、機械的な力によって誘導されるカルシウム振動に必要とされる TRPV4 遺伝子発現を促進する (鈴木允文、早田匡芳、江面陽一、野田政樹)。

メカニカルストレスは、骨量を変化させることが知られており、力学的刺激の喪失は、骨量減少を引き起こす。力学的刺激が及ぼす骨芽細胞でのカルシウムへの効果における、カルシウムチャネル TRPV4 の役割について着

目した。TRPV4 発現レベルは、培養骨芽細胞の分化過程で促進した。BMP-2 処理は、濃度依存的に TRPV4 遺伝子発現を促進した。TRPV4 発現における BMP-2 の効果は、転写及びタンパク質合成阻害剤によって抑制された。これらの骨芽細胞においては、TRPV4 アゴニストである 4 α -PDD は、カルシウムシグナルを促進し、4 α -PDD の効果は、コントロール細胞に比べて分化した

骨芽細胞で、促進された。機械的刺激としての流体流は、野生型の骨芽細胞で細胞内カルシウム振動を誘導した。一方、TRPV4 欠損は、細胞が流体流にさらされた時でも、カルシウム振動を有意に抑制した。これらのデータは、TRPV4 が、骨芽細胞において、流動によって誘導されるカルシウムシグナルに関与することを示唆する (Bone, 2013)。

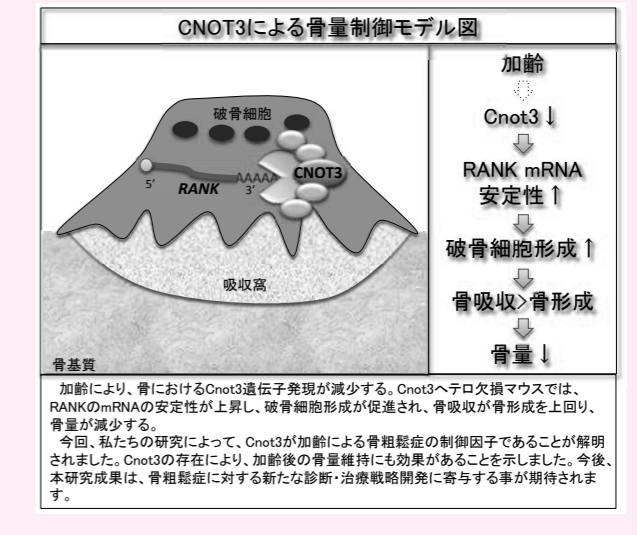
ハイライト

「mRNA 安定性は CNOT3 を介して骨粗鬆症の骨量に影響を及ぼす」

(渡辺千穂、早田匡芳、江面陽一、野田政樹)

破骨細胞形成は、転写後および転写事象の制御下にある。しかしながら、破骨細胞形成の転写後制御は、よく理解されていない。CNOT3 は、mRNA の安定性を制御する CCR4 ファミリーの構成因子であるが、骨における機能は知られていない。本研究において、我々は、一遺伝子座欠失による Cnot3 欠損が骨粗鬆症を誘導する事を示す。Cnot3 欠損は、骨形成上昇を伴う骨吸収を促進し、高回転型の骨減少を引き起こす。細胞レベルでは、Cnot3 欠損は、Receptor activator of NF- κ B (RANKL) の、破骨細胞形成における効果を細胞自律的に促進する。逆に、Cnot3 欠損は、直接骨芽細胞に影響を及ぼさない。Cnot3 欠損は RANKL 発現を変化させないが、生体内で骨における receptor activator of NF- κ B (RANK) mRNA 発現を促進する。Cnot3 欠損は、マウスの骨髄細胞において、RANK mRNA の安定性を約 2 倍促進する。Cnot3 ノックダウンはまた、破骨細胞の前駆細胞株において RANK mRNA 発現を増加させる。CNOT3 抗体は、RANK mRNA を免疫沈降する。Cnot3 欠損は、RANK mRNA の 3' UTR 断片と結合させたルシフェ

ラーゼレポーターの発現を安定化させる。対照的に、Cnot3 過剰発現はそれを不安定化させる。重篤な骨粗鬆症を示した高齢マウスでは、骨における Cnot3 の発現レベルが 3 倍減少する。驚くべき事に、これら的高齢マウスにおいて Cnot3 欠損は、骨粗鬆症をさらに悪化させ、それはまた、破骨細胞活性の促進を介して起きる。我々の結果は、CNOT3 が、加齢による骨粗鬆症においても、少なくとも部分的には RANK mRNA 安定性の転写後低下を介して骨吸収に作用する、骨量の重要な制御因子であることを明らかにした (Proc Natl Acad Sci USA, 2014)。



研究の意義

骨粗鬆症は、本邦ではおよそ 1200 万人 (アメリカ合衆国ではおよそ 2000 万人) に影響を及ぼしている非常に「ありふれた」疾患で、高齢患者の生命を脅かしています。しかしながら、骨吸収の転写後制御に関する根本的な病理生理学は不明です。CNOT3 は、酵母から哺乳類細胞において mRNA 安定性に関与する分子ですが、骨制御における役割は知られていませんでした。私たちは、Cnot3 遺伝子欠損が Receptor activator of NF- κ B (RANK) mRNA 安定性を特異的に促進し、健康な若齢成体動物において骨減少を引き起こすことを発見しました。さらに、Cnot3 遺伝子発現レベルは加齢による骨粗鬆症において減少し、Cnot3 遺伝子欠損はさらにそのような骨粗鬆症を有意に悪化させます。メカニズムとしては、Cnot3 は RANK mRNA に結合し、その 3'-UTR は Cnot3 依存的な不安定性をレポーター遺伝子に与えます。我々の結果により、加齢による骨粗鬆症における Cnot3 制御を明らかにしました。

人事異動

転入：林婉婷 (大学院生)、Pawaputanon na mahasarakham Chantida (大学院生)、藤原令 (事務補佐員)、井上洋子 (事務補佐員)。
転出：渡辺千穂 (大学院生)、富田久美子 (事務補佐員)、押江優子 (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* 111:2692-7, 2014.
2. Komatsu K, Shimada A, Shibata T, Wada S, Ideno H, Nakashima K, Amizuka N, Noda M, Nifuji A. Alendronate promotes bone formation

by inhibiting protein prenylation in osteoblasts in rat tooth replantation model. *J Endocrinol* 219:145-58, 2013.

3. Suzuki T, Notomi T, Miyajima D, Mizoguchi F, Hayata T, Nakamoto T, Hanyu R, Kamolratanakul P, Mizuno A, Suzuki M, Ezura Y, Izumi Y, Noda M. Osteoblastic differentiation enhances expression of TRPV4 that is required for calcium oscillation induced by mechanical force. *Bone* 54:172-8, 2013.

4. Aryal AC, Miyai K, Hayata T, Notomi T, Nakamoto T, Pawson T, Ezura Y, Noda M. Nck1 deficiency accelerates unloading-induced bone loss. *J Cell Physiol* 228:1397-403, 2013.

和文総説

1. 江面陽一、野田政樹. 副甲状腺ホルモンと骨. *CLINICAL CALCIUM* 23: 203-9, 2013.

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

1. IQGAP1 の canonical Wnt シグナル伝達経路での役割

Wnt シグナル伝達経路は種々の生物において高度に保存されたシグナル伝達経路であり、ガンや胚発生において重要な役割を担っている。Wnt シグナル伝達経路の中心的因子である DVL (Dishevelled) は Wnt の下流において (1) β -catenin/TCF を介した転写活性化経路 (canonical)、(2) カルシウム流入を介したシグナル経路 (non-canonical)、(3) Rho, JNK を介し、細胞極性に関わる PCP 経路 (non-canonical) を制御している。canonical Wnt シグナル伝達経路は、リガンドである Wnt と膜タンパク質である Frizzled、及び LRP との結合により始まる。Wnt 刺激により DVL は細胞膜で活性化され、 β -catenin を分解する働きを有する APC/Axin/GSK-3 複合体を不活化する。分解されなかった細胞質中の β -catenin は核内へ移行し、転写因子 Tcf や c-jun、DVL と結合し、Wnt の下流 (標的) 遺伝子の転写を活性化する。

ツメガエルの胚発生において、Wnt シグナルは初期胚での背腹運命の決定など重要な役割を有しており、背側における Wnt シグナルが β -catenin の核移行を促進することで、背側組織を誘導する Wnt 標的遺伝子 (*Xnr3*, *Siamois*, *Xtwn* など) の転写が活性化される。

我々は Wnt シグナル伝達の解明を目的とし、DVL の結合因子の単離を試み、質量分析解析 (LC-MS/MS)

により、新規 DVL1 結合候補として IQGAP1 を同定した。IQGAP1 は Rac1、Cdc42、Clip170、APC などと結合し、細胞運動や極性を制御することが報告されている。また、IQGAP1 が Wnt シグナル伝達における β -catenin を介した転写活性化経路に関与していることも示唆されているが、その詳細なメカニズムは謎であった。我々はこれまでに DVL と IQGAP の関係、さらにそれらの分子の canonical Wnt シグナル伝達での機能を解析し、① xDVL2/xIQGAP1/ β -catenin が複合体を形成し、核内移行すること、② ツメガエル胚における xIQGAP1 の機能消失により、Wnt 標的遺伝子の発現が抑制されたことなど、xIQGAP1 が canonical Wnt シグナル伝達経路において DVL と β -catenin の核移行に寄与する機構こと、③ xIQGAP1 と直接結合する xImportin- β 5 と xRan1 の機能消失実験等から、xImportin- β 5 と xRan1 が IQGAP1 を介し、canonical Wnt シグナル伝達経路における DVL と β -catenin の核内移行に寄与することを明らかにした。

さらに、我々は IQGAP1 を介した核内移行機構の解析を進め、下記のような新たな知見を得ることができた。

- (1) xIQGAP1 は培養細胞において、xRanGEF と同様に活性化型 Ran (GTP-bound Ran) を増加させること。
- (2) xIQGAP1 は活性化型 Ran (GTP-bound Ran) よりも非活性化型 Ran (GDP-bound Ran) に強く結合すること。
- (3) xIQGAP1 は *in vitro* の系で、xRanGAP による活性化型 Ran の GTP の加水分解 (GAP 活性) を抑制すること。
- (4) xIQGAP1 は活性化型 Ran と xRanGAP の結合を阻害することで、xRanGAP による GTP の加水分解を抑制していること。
- (5) *in vitro* の系で、xRanGEF のような Ran に GTP を付加させる (GEF 活性) 機能は有さなかったこと。
- (6) xIQGAP1 により活性化型 Ran と xRanGEF の結合は阻害されなかったこと。

以上の結果より、IQGAP1 と Ran の相互作用 (活性化型 Ran の維持等) が canonical Wnt シグナル伝達経路には必須であることが示された。

2. 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。さらに WNK1 は、ている。当研究室において、WNK \rightarrow SPAK/OSR1 \rightarrow 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。

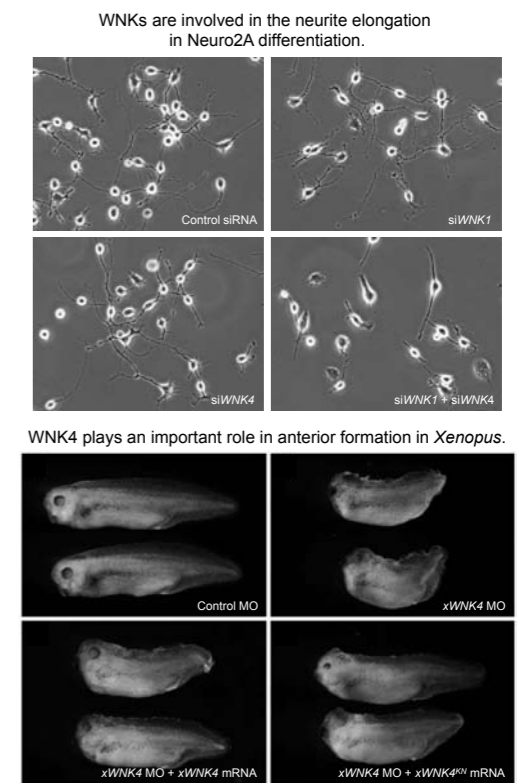
ショウジョウバエの WNK (DWNK) の解析から、WNK シグナル経路の新たな下流因子として Arrowhead (Awh) を単離した。また、そのほ乳類の相同因子 Lhx8 も、WNK シグナル伝達経路により、その発現が制御されており、進化的にも高度に保存されている WNK \rightarrow Lhx8/Awh という新規のシグナル伝達経路を見出した。さらに、Lhx8 は、アセチルコリン性神経の分化に関わっていることから、Neuro2A 細胞を用いて、WNK シグナル伝達経路との関連を解析した。WNK1 及び WNK4 の双方のノックダウンにより、分化に伴う神経突起の伸長が抑えられるという表現型が見られ、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。

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 \rightarrow WNK4 \rightarrow 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。



研究業績

1. Sato, A. and Shibuya, H. (2013). WNK Signaling Is Involved in Neural Development via Lhx8/Awh Expression. *PLoS One* 8, e55301.

2. Shimizu, M., Goto, T., Sato, A. and Shibuya, H. (2013). WNK4 is an essential effector of anterior formation in FGF signaling. *Genes Cells* 8,

442-449.

3. Goto T., Michiue T., Ito Y., Asashima M. (2013). Characterization of CXC-type chemokine molecules in early *Xenopus laevis* development. *Int. J. Dev. Biol.* 57, 41-47.

4. Goto, T., Sato, A., Shimizu, M., Adachi, S., Satoh, K., Iemura, S., Natsume, T and Shibuya, H.

(2013). IQGAP1 Functions as a Modulator of Dishevelled Nuclear Localization in Wnt Signaling. *PLoS One*, 8, e60865.

5. Goto, T., Sato, A., Adachi, S., Iemura, S., Natsume, T. and Shibuya, H. (2013). IQGAP1 regulates nuclear localization of β -Catenin via importin- β 5 in Wnt signaling. *J. Biol. Chem.*, 288, 36351-36360.

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、白 寧、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

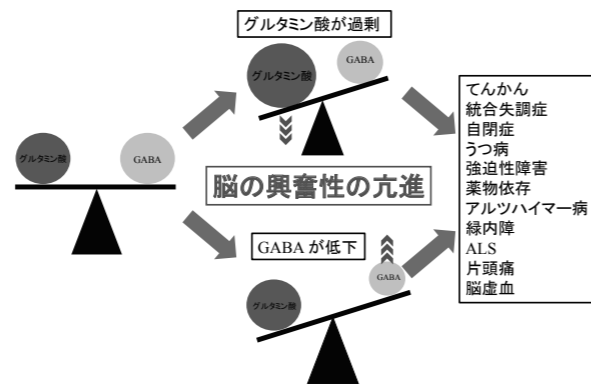
中枢神経系の興奮性シナプス伝達は主にグルタミン酸により担われており、グルタミン酸シグナル伝達の解明は脳機能解明の基礎となる。我々の分野では、神経回路網の形成・脳高次機能におけるグルタミン酸シグナリングの機能的役割を分子、細胞、個体レベルで明らかにすることを旨とする。また、過剰なグルタミン酸は神経毒性を示し、様々な精神神経疾患の原因と考えられている。精神神経疾患におけるグルタミン酸シグナル伝達の病態生理学的役割を解明し、それら疾患の新しい治療法の開発を目指す。グルタミン酸シグナル伝達に中心的な役割を果たすグルタミン酸トランスポーターを中心に研究を行っている。

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

緑内障における網膜神経節細胞 (RGC) の変性にもグルタミン酸の神経毒性が関与している。今年度は、興奮毒性による RGC の変性にグルタミン酸受容体のサブタイプである NR2B および NR2D が関与していることを明らかにした (Bai et al, 2013)。さらに、Dock3 が NR2B および NR2D と複合体を形成し、NR2B および NR2D の細胞膜での発現を減少させ、RGC の保護作用を示すことを明らかにした (Bai, et al, 2013; Namekata et al, 2013)。これらの結果は、NR2B, NR2D および

Dock3 が RGC の保護薬の標的として有望であることを示唆している。

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



2. 外側手綱核の睡眠制御における新たな役割の解明

睡眠は速い眼球運動を伴うレム睡眠とそれ以外のノンレム睡眠に分けられる。うつ病にみられる睡眠障害では、レム睡眠が出現する時間帯が早まり、眼球運動の頻度も高くなることが知られている。しかし、このような特徴的な睡眠変化がどのようにして起こるのかは不明なままであった。セロトニン神経系の活動はその亢進が抗うつ効果を持ち、レム睡眠時に一時的に抑制されることから睡眠障害を高頻度に合併するうつ病の病態に深く関与していると考えられる。

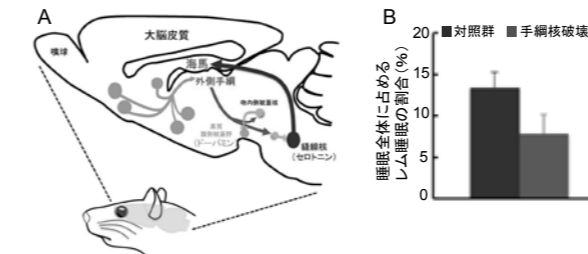
最近の研究により、セロトニンの活動を制御する外側手綱核という脳領域は、動物が不快な状況や予想より悪い状況に陥ると活性化されることが明らかとなっている (図 A)。実際、うつ病患者の外側手綱核では血流量の異常な増加が報告されていることから、「異常に活性化された外側手綱核がセロトニン神経系を抑制し、うつ病症状を引き起こす」という仮説が注目を集めている。

我々は、この外側手綱核が睡眠障害に関係すると考え、ラットを用いた電気生理学的実験により上記仮説を検証した。齧歯類の覚醒-ノンレム睡眠-レム睡眠と変化する脳状態は海馬神経活動の観察により分類可能である。外側手綱核を破壊したラットを用いて電気生理学的に海馬神経活動を測定した結果、レム睡眠の割合が約 41% 減少、1 回のレム睡眠の長さが約 24% 減少することを見いだした (図 B)。さらに、セロトニン神経細胞特異的

神経毒素を用いた実験から、この手綱核機能不全による脳状態への影響はセロトニン作動性神経細胞の活動依存的に行われていることが明らかとなった。また、野生型ラットを測定すると、外側手綱核はレム睡眠時に特徴的に表れる海馬の神経活動と同期して活動していた。

これらの研究成果により外側手綱核はレム睡眠を安定化・維持する機能を持つことが明らかになった。今後、うつ病患者における睡眠障害のメカニズム理解につながるものと期待できる。

外側手綱核の破壊はレム睡眠の持続を阻害する



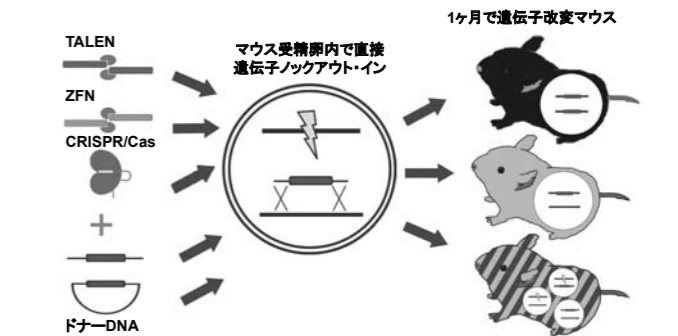
3. in vivo ゲノム編集による高効率・高速ヒト疾患モデルマウスの作出

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。近年では高速遺伝子解読技術の発展に伴い膨大な種類のヒト疾患の稀な変異が同定されつつあるが、それらが実際に疾患の原因であるかは現在ほとんど分かっていない。これらの変異を挿入したヒト化ノックインマウスは、ヒトの変異と疾患の発症の関係を明らかにする為の重要なツールである。一方、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。

近年、どのような生物のどのような遺伝子配列も自在に効率良く改変する事を可能にするゲノム編集技術が開発された。我々はこの技術によりマウス受精卵内で直接遺伝子改変を行う、in vivo ゲノム編集をいち早く開発してきた (図)。これにより、最短1ヶ月、1/50の費用、一度の実験で目的の遺伝子改変マウスを取得可能な極めて高効率のシステムを構築した。実際に、高活性のゲノム編集ツールであるTALENやCRISPR/Casを用いて、緑内障患者さんで発見されたグルタミン酸トランスポーターGLASTの2つの遺伝子変異が各々挿入されたノックインマウス2系統を、世界最高の効率(従来のおよそ25倍)で作製した。さらに様々な精神疾患・神経変性疾患の変異を挿入したヒト化ノックインマウスを多数作製した。また特定の脳部位や細胞だけを可視化・操作する為のノックインマウスの開発中である。

本成果により遺伝子改変マウス作製が極めて容易になり、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：大野里美 (事務補佐員)、樋高政子 (技術補佐員)、柳澤美智子 (特任助教)、今橋理沙、葛山貴弥、杉山香織 (修士課程)

転出：白寧 (特任助教)、松浦春香 (事務補佐員)、杉山勇人、平岡優一、柳澤美智子、Zulpiye Habibulla (博士課程)、孫偉楠 (修士課程)

業績目録

発表論文
1. Schreiner, AE., Durry, S., Aida, T., Stock, MC., Ruther, U., Tanaka, K., Rose, CR., Kafitz, KW. Laminar and subcellular heterogeneity of GLAST and GLT-1 immunoreactivity in the developing postnatal mouse hippocampus. *J Comp Neurol* 522, 204-224, 2014.
2. Bai, N., Aida, T., Yanagisawa, M., Katou, S., Sakimura, K., Mishina, M., Tanaka K. NMDA receptor subunits have differential roles in NMDA-induced neurotoxicity in the retina. *Mol*

Brain 6, 34, 2013.
3. Namekata, K., Kimura, A., Kawamura, K., Guo, X., Harada, C., Tanaka, K., Harada, T. Dock3 attenuates neural cell death due to NMDA neurotoxicity and oxidative stress in a mouse model of normal tension glaucoma. *Cell Death Differ* 20, 1250-1256, 2013.
4. Hiraoka, Y., Komine, O., Nagaoka, M., Bai, N., Hozumi, K., Tanaka, K. Delta like 1 regulates Bergmann glial differentiation during cerebellar development. *Mol Brain* 6, 25, 2013.
5. Bai, N., Hayashi, H., Aida, T., Namekata, K., Harada, T., Mishina, M., Tanaka, K. Dock3 interaction with a glutamate-receptor NR2D subunit preprotects neurons from excitotoxicity. *Mol Brain* 6, 22, 2013.
6. Aizawa H, Yanagihara S, Kobayashi M, Niisato K, Takekawa T, Harukuni R, McHugh TJ, Fukai T, Isomura Y, Okamoto H. The synchronous activity of lateral habenular neurons is essential for regulating hippocampal theta oscillation. *J Neurosci*. 33, 8909-21, 2013.
7. Isomura Y, Takekawa T, Harukuni R, Handa T, Aizawa H, Takada M, Fukai T. Reward-modulated motor information in identified stri-

tum neurons. *J Neurosci*. 33, 10209-20, 2013.
8. Aoki T, Kinoshita M, Aoki R, Agetsuma M, Aizawa H, Yamazaki M, Takahoko M, Amo R, Arata A, Higashijima S-I, Tsuboi T, Okamoto H. Imaging of neural ensemble for the retrieval of a learned behavioral program. *Neuron* 78, 881-894, 2013.

総説

1. Aida, T., Imahashi, R., Tanaka, K. Translating human genetics into mouse: The impact of ultrarapid in vivo genome editing. *Develop Growth Differ* 56, 34-45, 2014.
2. Aizawa, H., Cui, W., Tanaka, K., Okamoto, H. Hyperactivation of the habenula as a link between depression and sleep disturbance. *Front Hum Neurosci* 7, 826, 2013.
3. Aizawa H. Habenula and the asymmetric development of the vertebrate brain. *Anat Sci Int*. 88, 1-9, 2013.
4. Okamoto H and Aizawa H. Fear and anxiety regulation by conserved affective circuits. *Neuron* 78, 411-413, 2013.

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 特任講師：中西祐輔
特任助教：四元聡志、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、樹状細胞などの免疫細胞や、血液・腸・皮膚などの組織幹細胞を研究対象として、免疫系ならびに組織幹細胞系ホメオスタシスの維持とその破綻に因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。さらに、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. 樹状細胞の研究

1) 免疫の司令塔、樹状細胞の源となる細胞を発見

樹状細胞 (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反応して大量のインターフェロンを産生する形質細胞様樹状細胞 (pDC) に大別される。私たちの研究グループは、過去に上記条件を満たす“DC 前駆細胞”を同定し報告した (*Nat Immunol* 8, 1207-1216 (2007))。しかしながら、同前駆細胞が生み出す DC の大多数が cDC であったため、pDC の源としての DC 前駆細胞の存在が予測され、同定が待望されていた。

これらの背景に基づき、約 5 年の歳月をかけて、マウス骨髓細胞を用いて以前報告した DC 前駆細胞と近縁の分画を詳しく解析した結果、私たちは pDC への分化能に優れた DC 前駆細胞の同定に世界で初めて成功した (*Immunity* 38, 943-57 (2013))。新たに発見した DC 前

駆細胞は、pDC 分化に必須の転写因子 E2-2 を非常に高く発現していた。そこで、以前報告した DC 前駆細胞と今回の DC 前駆細胞をまとめて「共通 DC 前駆細胞 (CDP)」と定義した (図 1)。本研究結果は、DC 分化系譜を書き換え、免疫学・血液学分野に大きなインパクトを与えるものと考えている。現在、感染症やがんに対するワクチンの標的細胞として DC の重要性がクローズアップされている。これとは対照的に、定常状態においては、DC が免疫寛容の誘導・維持を介して自己免疫病を抑制していることも明らかになってきている。1 個から 500-1,000 個の DC を生み出す、かつ他の血液細胞を生み出さない DC 前駆細胞の発見により、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・治療技術の開発が進展することが期待される。

本研究結果は、本学と JST との共同でプレスリリースを行い、関連記事が、日本経済新聞および日刊工業新聞電子版、読売新聞夕刊、科学新聞、本学広報誌 Bloom などで紹介された。また、筆頭著者小内伸幸が、2013 年難治疾患研究所最優秀論文賞を受賞した。

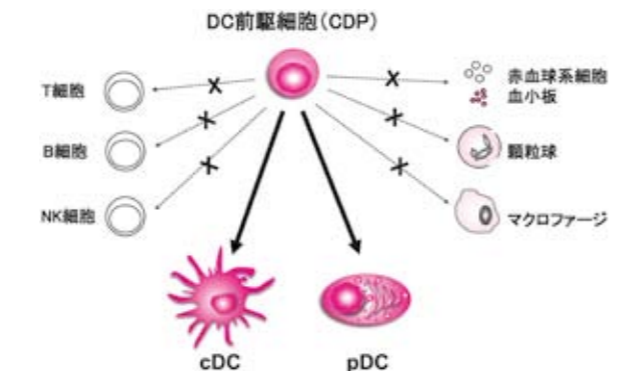


図 1 CDP は DC だけを生み出し、他の血液細胞へは分化しない。

2) 過剰な免疫反応を抑制する新たな DC のはたらきを発見

免疫反応は、病原体を排除することで宿主を防御すると同時に組織を傷害する、いわば“諸刃の剣”である。感染や炎症が起こると DC は、Toll 様受容体 (TLR) をはじめとするセンサーで病原体の特徴を認識し、獲得免疫系を活性化して病原体を排除する。しかしながら、サイトカインやウイルス特異的キラー T 細胞 (CTL) などは、病原体の排除に役立つと同時に組織を傷害する。従って、免疫反応には、病原体排除と組織傷害の balan

スを調節・維持するための仕組みが必要になる。激しい免疫反応ほど、そのバランスを適度に調節する仕組みの重要性が増すことになるが、その実態は不明であった。

私たちの研究グループは、炎症時の血球細胞の貪食 (血球貪食) に着目した。の仕組みを明らかにするために、代表的な TLR が認識するリガンドである CpG (微生物に多くみられる DNA 配列) あるいは poly I:C (ウイルスの構成成分に類似の合成 RNA) を高濃度で野生型マウスに投与して、骨髓、脾臓、末梢血などで血球貪食現象を誘導することに成功した。貪食される細胞は主に未熟な有核赤血球でしたが、脱核した成熟赤血球も混在していた。また、貪食細胞が単球由来 DC であった。ヒトでは慢性感染症で HPS が観察されるため、マウスに慢性感染するリンパ球性脈絡膜膜炎ウイルス (LCMV C13) を感染させたところ、血球貪食が効率よく誘導された。これらのマウス血球貪食モデルを用いて、血球貪食機構の詳細を調べたところ、高濃度 TLR リガンドあるいは LCMV C13 によって赤血球系細胞にアポトーシスが起り、フォスファチジルセリン (PS) が膜表面に露出して、単球由来 DC 上の PS 受容体に結合し、貪食されていた。興味深いことに、単球由来 DC が血球を貪食すると、血清中に IL-10 や TGF- β といった免疫抑制性サイトカインを産生して過剰な免疫応答を抑制していること、特に重篤な感染症において個体の死を回避する免疫抑制システムとして重要なことが明らかとなった (*Immunity* 39, 584-98 (2013)) (図 2)。血球貪食は激し

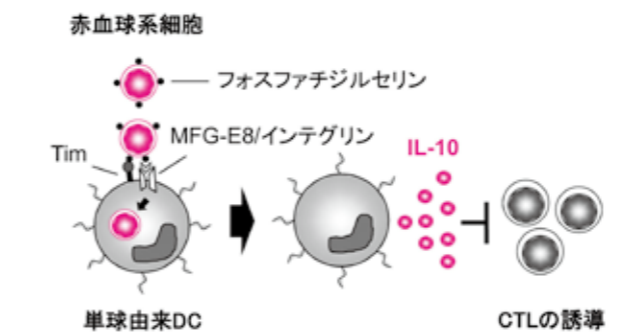


図 2 血球貪食の免疫学的意義

業績目録

原著

1. 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* in press.
2. Ohyagi H, Onai N, Sato T, Yotsumoto S, Liu J, Akiba H, Yagita H, Atarashi K, Honda K, Roers A, Muller W, Kurabayashi K, Hosoi-Amaike M, Takahashi N, Hirokawa M, Matsushima K, Sawada K, and Ohteki T. Monocyte-derived dendritic cells perform hemophagocytosis to fine-tune excessive immune responses. *Immunity* 39, 584-98, 2013.

3. Sato T, Kitawaki T, Fujita H, Iwata M, Iyoda T, Inaba K, Ohteki T, Hasegawa S, Kawada K, Sakai Y, Ikeuchi H, Nakase H, Niwa A, Takaori-Kondo A, Kadowaki N. Human CD1c⁺ myeloid dendritic cells acquire a high level of retinoic acid-producing capacity in response to vitamin D3. *J Immunol* 191, 3152-60, 2013.
4. Hayashi A, Sato T, Kamada N, Mikami Y, Matsuoka K, Hisamatsu T, Hibi T, Roers S, Yagita H, Ohteki T, Oshimura A, Kanai T. A Single strain of *Clostridium butyricum* induces intestinal IL-10-producing macrophages that suppress acute colitis. *Cell Host Microbe* 13, 711-22, 2013.
5. Sato T, Ikeda M, Yotsumoto S, Shimada Y, Higuchi T, Kobayashi H, Fukuda T, Ohashi T, Suda T, and Ohteki T. Novel interferon-based pre-transplantation conditioning in the treat-

ment of a congenital metabolic disorder. *Blood* 121, 3267-73, 2013.

6. Onai N, Kurabayashi K, Hosoi-Amaike M, Toyama-Sorimachi N, Matsushima K, Inaba, K, and Ohteki T. A clonogenic progenitor with prominent plasmacytoid dendritic cell developmental potential. *Immunity* 38, 943-57, 2013.
7. Ichikawa A, Kuba K, Morita M, Chiba S, Tezuka H, Hara H, Sasaki T, Ohteki T, Ranieri V.M, dos Santos C C, Kawaoka Y, Akira S, Luster A D, Lu B, Penninger J M, Uhlig S, Slutsky A S, and Imai Y. CXCL10-CXCR3 enhances the development of neutrophil-mediated fulminant lung injury of viral and non-viral origin. *Am J Respir Crit Care Med* 187, 65-77, 2013.

い炎症状態を抑えることで自らの死を防ぐ代わりに病原体の排除を見送る、宿主～病原体間の共生戦略ととらえることもできる。本研究結果は、本学と JST との共同でプレスリリースを行い、関連記事が、日経産業新聞および化学工業新聞などで紹介された。

2. 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* 15, 696-700 (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* 121, 3267-73 (2013))。

3. その他の共同研究成果 (抜粋)

1) ヒト レチノイン酸産生性 DC の同定

京都大学血液内科との共同研究 (*J Immunol* 191, 3152-60 (2013))。

2) プロバイオティクスによる腸炎抑制機構の解明

慶應義塾大学消化器内科との共同研究 (*Cell Host Microbe* 13, 711-22 (2013))。

3) ビタミン A 欠乏による腸免疫寛容の破綻

徳島文理大学との共同研究 (*Mucosal Immunol*, in press)。

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. 心血管系性差医療を目指した基礎的研究

ハイライト 1 参照

2. 心房細動の研究

ハイライト 2 参照

3. 心室頻拍・突然死の研究

突然死の主因である心室細動の発現機構は不明であり、不整脈研究の最も重要な解決課題の1つとなっている。本研究室では、遺伝子改変マウスやヒト遺伝子解析を介して、突然死の病態解明を目指している。

心室細動の発症には心室の刺激伝導系「ヒス・プルキンエ系」が関与することが知られている。ヒス・プルキンエ系特異的に発現する転写因子 *Irx3* の遺伝子異常が、ヒト特発性心室細動発症と関連することを明らかにした。

4. iPS 細胞を用いた不整脈研究

(1) ヒト iPS 由来心筋の電気生理学的性質の解析

ヒト iPS 由来心筋の創薬応用に注目が集まっている。その可能性と課題を正確に把握するために、パッチクランプ法によりヒト iPS 由来心筋細胞とヒト ES 由来心筋細胞の活動電位を計測し各種パラメーターを比較したところ、非常に似た性質を持つことが確認された。

(2) 遺伝子過剰発現によるヒト iPS 由来心筋の成熟化

ヒト iPS 由来心筋を利用することにより前臨床の心毒性試験の予測性が向上すると期待されているが、それに必要な成熟化心筋を安定的に得ることが課題である。遺伝子の過剰発現により成熟心筋様性質の iPS 心筋を得ることに成功し、薬物誘発性不整脈の指標である QT 延長

を評価することが可能となった。

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おり、本年度は抗癌薬による心毒性の評価への展開を検討した。

（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 3-D 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。

（東京大学新領域創成科学科久田俊明教授らとの共同研究）

ハイライト 1

性ホルモン受容体を介した心筋イオンチャネルの制御機構

我々はこれまでにプロゲステロン受容体(PR)非ゲノム経路で産生された一酸化窒素(NO)がcAMP刺激によって活性化された心筋L型カルシウムチャネル(I_{CaL})を抑制すること、これにはcGMP活性型ホスホジエステラーゼ(PDE2)が関与することをパッチクランプ実験から見出した。この抑制作用様式からPR/NOシグナルとcAMP/PKAシグナルがクロストークすることが示唆された。そこで、本年度は脂質ラフト・非ラフトの局在を認識するレポータータグのついた2種類のFRET分子プローブを用いて生細胞におけるPKA活性を可視化し、PR/NO・cAMP/PKAシグナルのクロストークを解析した。マウス新生児心室筋初代培養細胞に対し、アドレナリン β 受容体(β -AR)アゴニストを添加すると、両プローブのFRETシグナルが上昇した。 β -ARアゴニスト存在下で、 P_4 を添加すると、FRETシグナルはラフト特異的に抑制された(図1A)。この反応は、PRもしくはPDE2依存性であることを薬理的に示した(図1B)。以上よ

り、PR非ゲノム経路と β -ARシグナル経路のクロストークによる I_{CaL} の制御には、細胞内cAMP応答のコンパートメント化が関与することが示唆された。

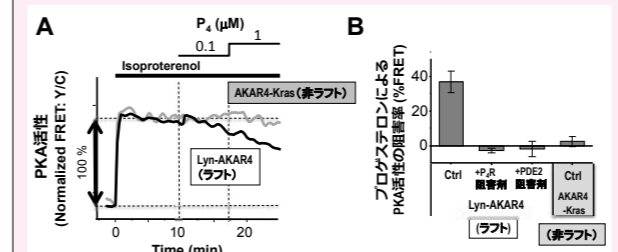


図1. プロゲステロン(P_4)受容体非ゲノムシグナルが新生児マウス心筋細胞内PKA活性に与える影響。A. β アドレナリン性受容体刺激(isoproterenol)によるPKA活性上昇に対する P_4 の作用(FRETシグナルの経時変化)。図の上段に投与薬剤を記している。ラフト特異的なプローブ(Lyn-AKAR4)によるPKA活性測定のみで P_4 阻害が見られた。B. P_4 阻害作用のまとめ。ラフト特異的であり、非ゲノムシグナル阻害剤で P_4 の作用が消失した。

ハイライト 2

心房細動は最も頻度の高い持続性不整脈であり、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。得られたデータは国際

的メタ解析(CHARGE study)に提供され、心房細動の遺伝的リスクとして合計10のリスクが同定された。(理化学研究所ゲノム医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)

(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。GWASで抽出された心房細動関連遺伝子の機能解析から、心房細動のトリガーと考えられる肺静脈心筋の異常興奮に関与する新たなパスウェイを見出した。

(3) 心房細動関連SNPsを用いたリスク層別化

GWASのもう1つの強みは、得られた遺伝情報をもとに疾患発症のリスク層別化が行え、将来的には個別化医療、先制医療の展開が期待される点である。日本人のGWASで得られた遺伝情報から、オッズ比5.5のリスク層別化が可能となった(図2左)。これを元に個別化医療を行うと感度・特異度ともに60%前後となり(図2右)、個別化医療への応用にはさらなる展開「ポストGWAS研究」が必要と考えられる。

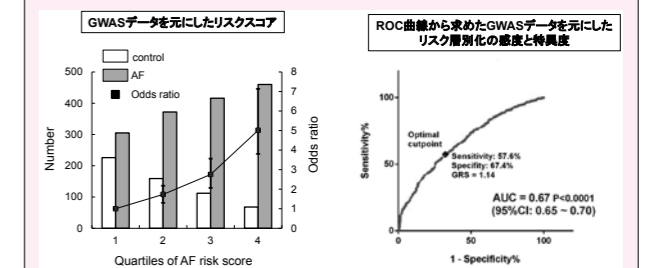


図2. 左: AF関連SNPの数とそのオッズ比からリスクスコアを計算し、4つの25パーセンタイルグループに分類。最も低リスクグループを1として、個々のグループのオッズ比を計算。右: ROC曲線からこのリスク層別化の感度と特異度を計算。

人事異動

転入：張鵬（博士課程）、劉鏈（博士課程）、藤塚美紀（修士課程）
転出：大方信一郎（博士課程）、海野愛子（研究補助員）

業績目録

原著論文

- Asayama M, Kurokawa J, Shirakawa K, Okuyama H, Kagawa T, Okada J, Sugiura S, Hisada T, Furukawa T. Effects of an hERG activator, ICA-105574, on electrophysiological properties of canine hearts. *J. Pharmacol. Sci.* 2013;121:1-8.
- Kurokawa J, Furukawa T. Non-genomic action of sex steroid hormones and cardiac repolarization. *Biol. Pharm. Bull.* 2013;36:8-12.
- Furukawa T, Ebana Y. Current overview of genetic background of atrial fibrillation: possible

- genetically therapeutic targets for the treatment of atrial fibrillation. *J. Arrhythm.* (in press)
- Okata S, Yuasa S, Yamane T, Furukawa T, Fukuda K. The generation of induced pluripotent stem cells from a patient with *KCNH2* G603D, without LQT2 disease associated symptom. *J. Med. Dent. Sci.* 2013;60:17-22.
 - Terao C, Yoshifuji H, Kimura A, Matsumura T, Ohmura K, Takahashi M, Shimizu M, Kawaguchi T, Chen Z, Naruse TK, Sato-Otsubo A, Ebana Y, Maejima Y, Kinoshita H, Murakami K, Kawabata D, Wada Y, Narita I, Tazaki J, Kawaguchi Y, Yamanaka H, Yurugi K, Miura Y, Maekawa T, Ogawa S, Komuro I, Nagai R, Yamada R, Tabara Y, Isobe M, Mimori T, Matsuda F. Two susceptibility loci to Takayasu arteritis reveal a synergistic role of the IL12B and HLA-B regions in a Japanese population. *Am. J. Hum. Genet.* 2013;93:289-97.

著書

- Tetsushi Furukawa. Ion Channel Expression

and Function of iPSC-derived Cardiomyocytes. In: Cardiac Regeneration using Stem Cells. (eds.) Keiichi Fukuda, Shinsuke Yuasa. CRC Press, 2013.

- 古川哲史. そうだったのか! 臨床に役立つ循環薬理学. メディカル・サイエンス・インターナショナル. 2013年2月26日.

総説

- Kurokawa J, Furukawa T. Non-genomic action of sex steroid hormones and cardiac repolarization. *Biol. Pharmacol. Bull.* 2013;36:8-12.
- 古川哲史, 大石咲子, 笹野哲郎. Best Basic Paper on AF2012に選ばれた「心房伸展と炎症のリンクの基礎研究」. *Jap. J. Electrocardiol.* 2013; 32:476-477.
- 古川哲史. 炎症と不整脈: オーバービュー. *Jap. J. Electrocardiol.* 2013;33:159-162.
- 古川哲史. ヒトiPS細胞由来分化誘導心筋細胞を用いた薬物評価. *Jap. J. Electrocardiol.* 2013;SUPPL 3:S-3-23-S-3-29.

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：楠 康一 技術補佐員：伏見真好、井上和子

研究内容

概要

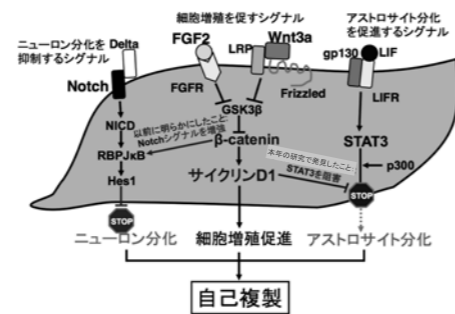
生体内各組織の形成・維持・再生に重要な役割を果たす幹細胞は、それぞれの組織を構成する多細胞集団を生み出す一方で、そのような多分化能を維持した自己複製も行う。それら組織幹細胞（体性幹細胞）の発生・多分化能維持および組織内各細胞系譜への分化の各過程では、増殖分化因子や細胞外マトリクスなどによる細胞外来性のシグナルと、エピジェネティック修飾や転写因子存在プロファイルに基づく細胞内在性のプログラムが深く関わっている。幹細胞制御分野における組織幹細胞に焦点を当てた研究は、主として神経幹細胞や造血幹細胞を研究対象として幹細胞制御の分子基盤を明らかにすることを目的として実施している。また癌幹細胞に焦点を当てた研究では、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. 神経幹細胞の自己複製と分化の運命付けを制御する分子機構の解明

神経幹細胞はニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトなど多種類の細胞に分化する多分化能を持ち、細胞分裂を経てもその多種類の細胞に分化する能力を持ち続ける自己複製能を持つ細胞である。神経幹細胞がどの細胞運命を辿るかは、増殖分化因子や細胞外マトリクスなどの細胞外来性シグナルと、エピジェネティック修飾や転写因子に基づく細胞内在性のプログラムにより制御されている。これまでに当分野では、図の中央および左部分に示すように、神経幹細胞が自己複製しつつ増殖する過程では細胞増殖促進因子 fibroblast growth factor 2 (FGF2) と Wnt による共通シグナル経路の活性化に伴う β -catenin の安定化と核内蓄積が Notch シグナルの増強を引き起こし、ニューロンへの分化運命付けを抑制することを報告した。本年は、神経幹細胞の増殖

シグナルの活性化によりアストロサイトへの分化が抑制され自己複製が保たれる機構の解明に取り組んだ。FGF2 と Wnt により活性化される共通経路は細胞周期促進因子である cyclin D1 の発現を誘導する（図中央）。本年の研究により、この cyclin D1 が細胞周期促進作用とは別に、STAT3 と p300 の双方に結合することでアストログリア特異的遺伝子 *gfap* のプロモーター活性化に必要な STAT-p300 複合体形成を部分阻害し、同遺伝子の発現を抑制することを明らかにした（図右）。以上の成果は、神経幹細胞の自己複製を司る機構について分子的な説明を可能にしたという点で、意義深い。

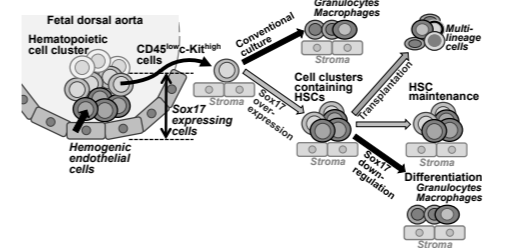


神経幹細胞の自己複製の制御においては、神経幹細胞が存在する微小環境（ニッチ）からのシグナルが関わっているがその全容は明らかになっていない。神経幹細胞ニッチの分子基盤解明のため、当分野では、従来の遺伝子発現プロファイリングなどのアプローチでは達成し得ない、人工合成ポリマーのアレイスライドを用いるという新しい切り口で研究を進めている。エジンバラ大学との共同研究により、これまでに約 400 種類の人工ポリマーについて FGF2 非依存的な神経幹細胞維持を指標に探索し、ヒットポリマーの特定に成功した。本年はその解析を進め、ヒットポリマーに特異的に結合する複数のタンパク質を検出した。

2. 胎生期造血幹細胞の維持に寄与する分子の検討

マウス胎生期において最初に成体型造血が起きる AGM (aorta-gonad-mesonephoros; 大動脈-生殖原基-中腎) 領域では、大動脈の血管内皮細胞から内腔側に出芽したように見える未分化血液細胞の細胞塊より造血幹・前駆細胞が生じることが知られている。内胚葉のマーカー蛋白質で転写因子である Sox17 について、コンディ

ショナル遺伝子欠損マウスの解析より、新生仔期において遺伝子欠損を起こすと造血幹細胞数が著しく減少するのに対し、生後 8 週齢より遺伝子欠損を起こしても造血幹細胞数に影響がないことから、胎生期から出生時期にかけての造血幹細胞に Sox17 が必要であることが示唆された。そこで、AGM 領域での Sox17 の役割を調べるため、Sox17 の発現を解析したところ、大動脈の血管内皮細胞および造血系の細胞が生じる過程の中間体として機能する大動脈内腔血液細胞塊に発現を認めた。さらに、AGM 領域の細胞塊の構成細胞である CD45^{low}c-Kit^{high} 細胞に Sox17 を強制発現すると、通常は単球へ分化するストローマ細胞との共培養条件においても、多数の継代を重ねても浮遊状態で細胞塊を形成しつつ未分化性が保持された。続いてこの様に継代した Sox17 強制発現細胞を放射線照射したマウスに移植すると、末梢血、骨髄、脾臓では単球と赤血球、胸腺では T 細胞に比較的高いキメリズムでコントリビューションが認められた。B 細胞については末梢血、骨髄、脾臓においてキメリズムは低かった。以上の結果より、Sox17 強制発現細胞において長期造血再建能が維持されることを示した（下図）。

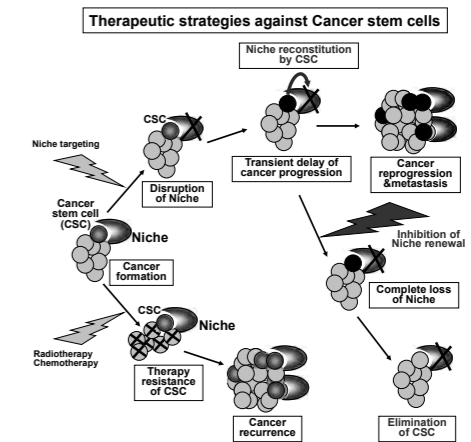


3. 癌幹細胞ニッチの人工構築と性状解明

癌組織中に存在する癌幹細胞 (cancer stem cell) は、放射線化学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（右図下段）。また、癌幹細胞の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た。以前、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。この Pol10 に結合する蛋白質を国立がん研究センター研究所との共同研究により質量分析したところ、鉄運搬分子として知られる transferrin (Tf) がニッチ候補分子として同定された。SP 細胞由来移植腫瘍組織を鉄染色したところ、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 (M ϕ) 前駆細胞の増殖および M ϕ 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おり、癌幹細胞自身が TAM の発生を制御する作用を持つと考察された。National Cancer Institute より公開されているグリオーマ患者 376 例の癌部遺伝子発現データベースの解析からも、Tf 受容体や CD204 の発現と予後を含む腫瘍の悪性度との間に正相関が確認されており、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（上図上段）。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

1. Kusunoki S, Kato K, Tabu K, Inagaki T, Okabe H, Kaneda H, Suga S, Terao Y, Taga T and Takeda S: The inhibitory effect of salinomycin on the proliferation, migration and invasion of human endometrial cancer stem-like cells. *Gynecol. Oncol.*, 129: 598-605, 2013.
2. Uemura M, Ozawa A, Nagata T, Kurasawa K, Tsunekawa N, Nobuhisa I, Taga T, Hara K,

Kudo A, Kawakami H, Saijoh Y, Kurohmaru M, Kanai-Azuma M, and Kanai Y. Sox17 haploinsufficiency results in perinatal biliary atresia and hepatitis in C57BL/6 background mice. *Development*, 140:639-648, 2013.

3. 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*, doi: 10.1002/stem.1613. 2013 [Epub ahead of print]

著書・総説

1. Tabu K, Bizen N, Taga T, and Tanaka S. Gene regulation of Prominin-1 (CD133) in normal and cancerous Tissues. In Prominin-1 (CD133): New Insights on Stem & Cancer Stem Cell Biology. D. Corbeil Ed. (Springer) Adv. Exp. Med. Biol. Volume 777, 73-85, 2013.
2. 楠康一、田賀哲也. 共同研究施設研究内容紹介 (癌幹細胞の同定と治療への応用、コラム欄). 産婦人科の実際 Vol. 63 No.2. 金原出版. 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、大野麻理奈

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ことがわかっている。CD72のリガンドとして、CD100（セマフォリン）などのタンパク質分子が提唱されているほか、ある種の糖鎖が結合することも示唆されている。しかしながら未だ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-CTLD）の立体構造を決定し、

得られた構造情報より、リガンド分子と標的タンパク質間の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-CTLDは単独で大量に発現させると強く凝集してしまい、結晶化に必要な純度と収量を実現することが困難であった。われわれはCD72-CTLDの発現系を見直し、様々な発現コンストラクト、または点変異導入体を検討し、非常に純度が高く、かつ可溶性の試料としてCD72-CTLDを精製することに成功した。また、CD72-CTLDと高可溶性のタグタンパク質との融合タンパク質として発現させることにより、凝集することなく可溶性画分として回収できることがわかり、その後タグタンパク質部分をプロテアーゼにより切断することで、同様の試料を得られることも見出した。これらの試料を用いて結晶化実験を行い、数百種の条件の中からいくつかの条件でCD72-CTLDの結晶を得ることに成功した（図1）。放射光施設を用いたX線回折実験の結果、解析可能と考えられる分解能での反射データが得られ、構造解析が進行中である。

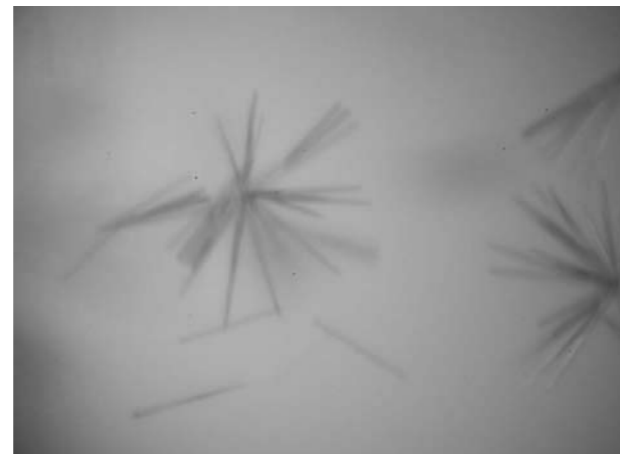


図1 CD72-CTLDの結晶

2. 巨大ヘモグロビンの酸素結合中間状態での結晶構造解析

実用的な血液代替物の開発は現在においても成功しておらず、赤血球の代わりとしてヘモグロビン（Hb）を多量体化させる方法などが検討されている。また、現在の輸血用血液は、保存中に徐々に自動酸化が生じ、Hb

の酸素運搬能力が失われることが問題となっている。

一方で、環形動物などの無脊椎動物の血液中においては、ヒトのHbの数倍から数十倍におよぶ巨大分子量のHbの存在が知られており、その分子構造に興味もたれていた（図2）。また、これらの巨大Hbのなかには、ヒトのHbと比べて著しく自動酸化がされにくいという特徴を有するものも存在している。すなわち、巨大Hbの立体構造と酸素運搬の作用機構、また抗自動酸化の分子機構が詳細に解明されれば、血液代替物の開発に有用な情報となることが期待される。

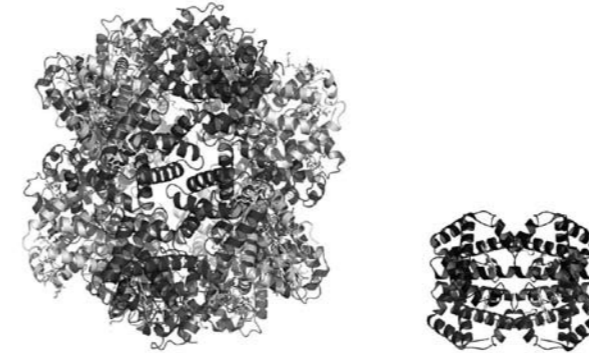


図2 巨大ヘモグロビン(左)とヒトヘモグロビン(右)の立体構造

われわれはこれまでに、巨大Hbの酸素結合型(oxy型)と酸素非結合型(deoxy型)の双方について結晶構造を決定した（図3）。さらにその過程で、巨大Hbのoxy型結晶から、結晶の状態を保ったままdeoxy型へと連続的に変化させることが可能であることを見出した。この条件をより詳細に検討し、すべてのサブユニットに酸素が結合した完全なoxy型から、すべてのサブユニットの酸素が解離した完全なdeoxy型に至るまでの種々の中間状態を再現させた結晶の作製を試みている。このようなoxy-deoxy間の中間状態での結晶構造解析は、ヒトを含むいかなるHb分子においても現在まで全く実現されていない。中間状態の結晶構造解明は、巨大Hbのみならず他のHbにおいても、複数のサブユニットが協同的に酸素を結合し運搬する際の構造変化の過程を詳細に明らかにするうえで、非常に大きな進展をもたらすことが期待される。現在までに得られた数種類の中間体結晶のX線回折データから、構造変化が特に起こりや

すい部位が判明しつつある。

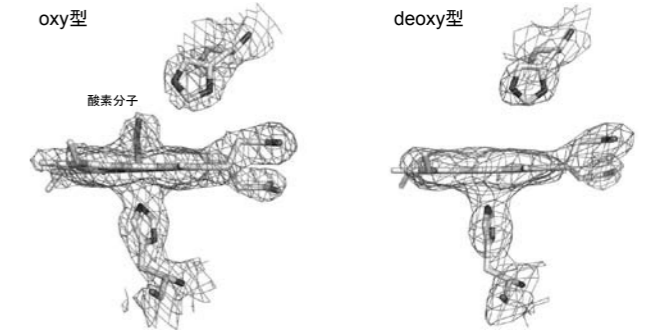


図3 巨大ヘモグロビン酸素結合部位のモデルと電子密度

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

転入：大野 麻理奈（技術補佐員）

業績目録

原著論文

1. Masuno[†] H, Ikura[†] T, Morizono D, Orita I, Yamada S, Shimizu M, Ito N: Crystal structures of complexes of vitamin D receptor ligand-binding domain with lithocholic acid derivatives. *J Lipid Res* 54: 2206-2213, 2013. ([†] These authors contributed equally to this work.)

2. Ikura T, Ito N: The peptidyl-prolyl isomerase activity of FK506 binding protein 12 prevents tau peptide from aggregating. *Protein Eng Des Sel*, 26: 539-546, 2013.

3. Nakabayashi M, Tsukahara Y, Iwasaki-Miyamoto Y, Mihori-Shimazaki M, Yamada S, Inaba S, Oda M, Shimizu M, Makishima M, Tokiwa H, Ikura T, Ito N: Crystal structures of hereditary vitamin D-resistant rickets-associated vitamin D receptor mutants R270L and W282R bound to 1,25-dihydroxyvitamin D3 and synthetic ligands. *J Med Chem*, 56: 6745-6760, 2013.

4. Higo K, Ikura T, Oda M, Morii H, Takahashi J,

Abe R, Ito N: High resolution crystal structure of the Grb2 SH2 domain with a phosphopeptide derived from CD28. *Plos One*, 8, e74482: 1-6, 2013.

5. Numoto N, Shimizu K, Matsumoto K, Miki K, Kita A: Observation of the orientation of membrane protein crystals grown in high magnetic force fields. *J Cryst Growth*, 367: 53-56, 2013.

6. Nagamatsu Y, Takeda K, Kuranaga T, Numoto N, Miki K: Origin of Asymmetry at the Intersubunit Interfaces of V₁-ATPase from *Thermus thermophilus*. *J Mol Biol*, 425: 2699-2708, 2013.

先端分子医学研究部門 フロンティア研究室 低酸素生物学

准教授：中山 恒

研究内容

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、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、癌、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、がん治療や再生療法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も予想されています。まだこの独自の働きには不確かなことが多いため、私たちは PHD3 に着目して、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」が含まれていることが考えられます。そこでプロテオミクス解析を用いて、複合体を構成するタンパク質を網羅的に同定して、酸素センサー分子の特定を試みています。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。

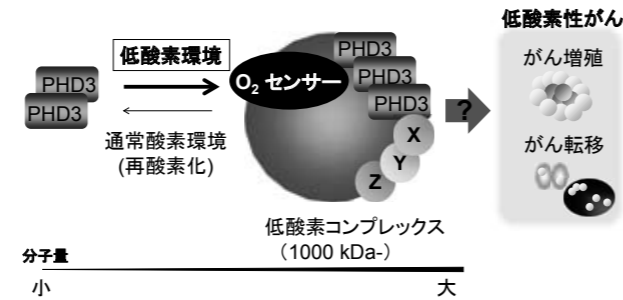


図 1 低酸素環境下での低酸素コンプレックスの形成

2. オミックス解析による慢性期低酸素応答の分子機構の解明

私たちは、MMP1 の解析から慢性期低酸素応答の分子機構の一端を明らかにしてきましたが（ハイライト参照）、まだまだ未知の点が多い領域です。そこで、慢性期低酸素応答に関与する分子を同定するために、マイクロアレイ解析、次世代シーケンサー解析、ならびに、プロテオミクス解析のオミックス的手法を駆使した網羅的なアプローチを実施しています。具体的には、低酸素環境で 48 時間培養した乳がん細胞株を材料として、抽出した RNA を基に遺伝子発現様式を明らかにすることを試みています。また、タンパク質を精製して、二次元電気泳動と質量分析を組み合わせた手法により、慢性期低酸素で発現が上昇する分子の同定を進めています。これらのアプローチから、慢性期低酸素応答を制御するさまざまなシグナル伝達分子や、慢性的な低酸素環境にさらされることにより悪性化するがん細胞のマーカーとして利用できる分子が得られることが期待されます。

ハイライト

慢性期低酸素応答とがんの浸潤・転移

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、私たちは慢性期の低酸素応答において、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、慢性期の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 により抑制することで、*MMP1* の発現が顕著に減少して、細胞の移動能や浸潤能が大きく低下すること、さらに、マウスへの移植モデルにおいて肺転移が有意に抑制されることが明らかになりました（図 2）。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 3）。したがって、低酸素性がんの悪性化を抑制するアプローチとして、HIF を阻害することに加えて、CREB、NF- κ B の活性も同時に抑制することが有効な手法となることが期待されます。

れます。

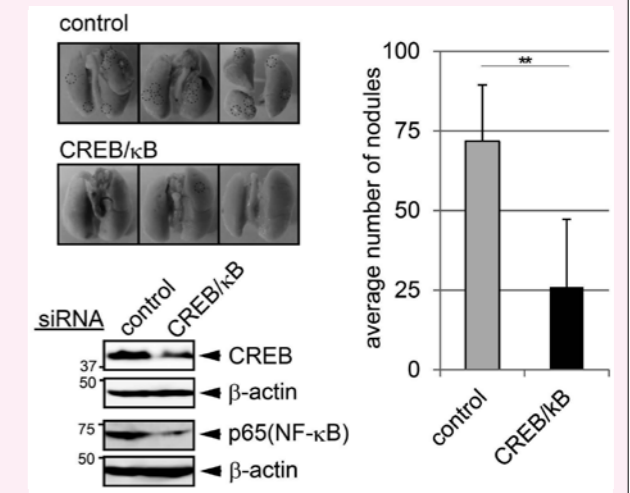


図 2 CREB/NF- κ B-MMP1 経路の抑制による肺転移の減少
CREB/NF- κ B をノックダウンしたがん細胞では *MMP1* の発現低下がみられ、マウス移植モデルにおいて、肺転移が有意に減少した。

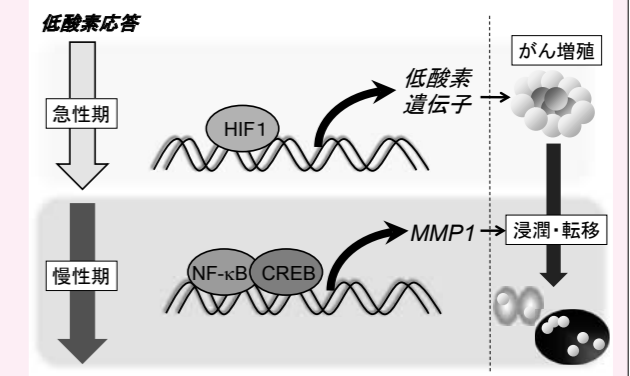


図 3 慢性期低酸素応答における *MMP1* の発現誘導

人事異動

転入：菊池大介（修士課程入学）

業績目録

発表論文

1. Nakayama K.* CREB and NF- κ B are activated during prolonged hypoxia and cooperatively regulate the induction of matrix metalloproteinase *MMP1*. *J. Biol. Chem.* 288, 22584-22595, (2013).
2. Arima N., Uchida Y., Yu R., Nakayama K., Nishina H. Acetylcholine receptors regulate gene expression that is essential for primitive streak formation in murine embryoid bodies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 435, 447-453, (2013).
3. Muramatsu S., Tanaka S., Mogushi K., Adikrisna R., Aihara A., Ban D., Ochiai T., Irie T., Kudo A., Nakamura N., Nakayama K., Tanaka H., Yamaoka S., Arii S. Visualization of stem cell features in human hepatocellular carcinoma enlightened in vivo significance of tumor-host interaction and clinical implication. *Hepatology* 58, 218-228, (2013).
4. Nakayama K., Nangaku M. Hypoxia-inducible factor and signal transducer and activators of transcription 3: two central regulators meet to regulate kidney pathophysiology. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 40, 251-252, (2013).

国際学会

Koh Nakayama
Activation of NF- κ B/CREB pathway during chronic hypoxia induces *Matrix Metalloproteinase (MMP)1* expression and promotes the invasive ability of cancer cells. Gordon Research Conference: Matrix Metalloproteinases
5月23日 Barga, Italy

国内学会

1. 菊池大介, 中山 恒
慢性的な低酸素環境下では NF- κ B/CREB 経路の活性化が *MMP1* の発現を誘導し、癌細胞の浸潤を促進する
第 1 回低酸素研究会 7月6日 東京
2. 中山 恒
長期の低酸素応答による NF- κ B/CREB 経路の活性化はマトリックスメタロプロテアーゼ *MMP1* の発現誘導を介してがん細胞の浸潤能を亢進する
第 86 回日本生化学会大会 9月12日 横浜
3. 中山 恒
NF- κ B/CREB pathway is activated during chronic hypoxia and induces *Matrix Metalloproteinase (MMP)1* expression to promote the invasive ability of cancer cells.
第 36 回日本分子生物学会年会 12月5日 神戸

セミナー・シンポジウム講演

1. 中山 恒
「慢性期低酸素応答における NF- κ B/CREB の活性化を介したがん浸潤の分子機構」
難治疾患研究所 平成 24 年度若手研究者研究発表会 3月8日 東京
2. 中山 恒
「低酸素応答が担う生命現象」
第 82 回日本寄生虫学会大会サテライトミーティング 分子生物学・生理生化学研究会 3月28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）難治疾患研究所「難治疾患の研究」を重点課題とする研究助成
「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」
3. 中山 恒（代表）東京生化学研究会 研究奨励金
「慢性的な低酸素環境がもたらす抗加齢効果の作用機序と癌抑制手法への応用」

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：田中由美子 助教：種市大喜 技術補佐員：四方さゆり

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、その分子メカニズムを明らかにすることに主たる目的としている。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ることから、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のではないかと考えた(図1)。マクロファージは、

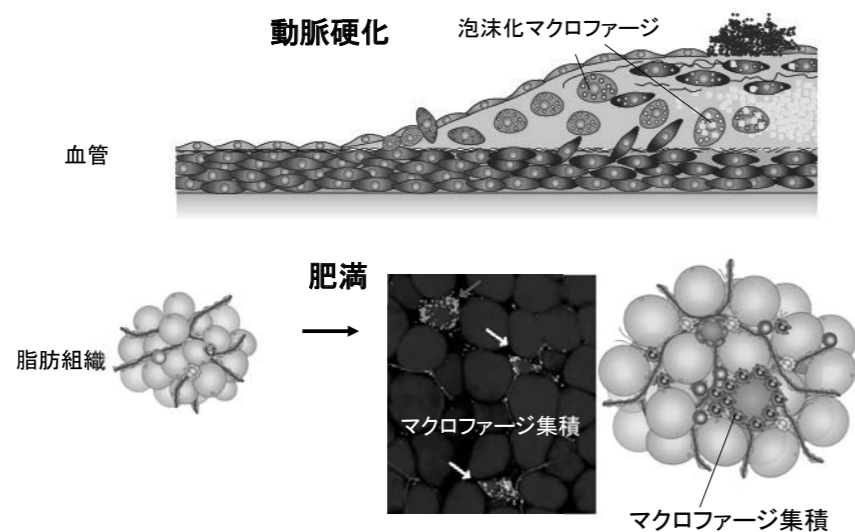


図1 肥満・動脈硬化の全過程にマクロファージが重要

種々の刺激によって活性化されるのみならず、積極的に炎症を収束するという二面性をもつが、単一の細胞での機能修飾のメカニズムは明確にされていない。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響されることを見出した。すなわち、炎症刺激後急性期には解糖系が優位となって炎症促進形質を示すが、炎症後期には ω -3、 ω -9多価不飽和脂肪酸に代表される抗炎症性脂肪酸の合成が増加し、オートクリン・パラクリン経路を

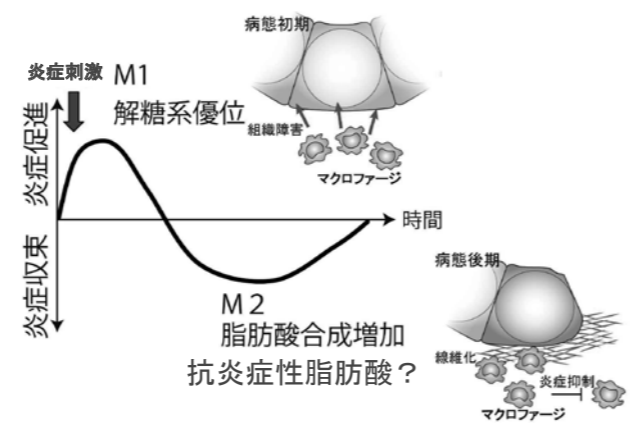


図2 マクロファージにおいて炎症急性期には解糖系優位、後期には脂肪酸合成が増加する

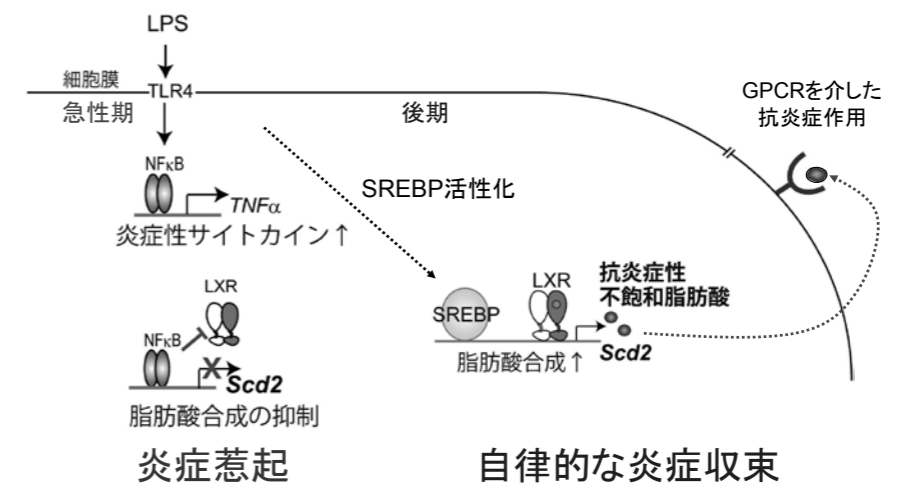


図3 マクロファージは細胞内脂質合成を変動させて自律的に炎症を収束する

介して自律的に炎症を収束した(図2)。つまり、マクロファージの主要な細胞機能としての免疫応答は、細胞内脂質代謝と密接に連携していることを明確にした。さらに、その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ChIP-seq、転写やmRNA合成の増減が定量解析可能なGlobal run-on(GRO)-seq、RNA-seqを組み合わせて全ゲノムスケールでグローバルに解析した。その結果、自律的な炎症制御には、炎症刺激によるNF κ Bの活性化とLiver X receptor(LXR)機能の一過性の抑制、ならびに炎症後期におけるsterol regulatory element binding protein(SREBP)の活性化を含む転写因子ネットワークによる制御と同時に、エピゲノム変化が重要であることを明らかにした(図3、論文投稿中)。

代謝と免疫応答とは個体-組織-細胞の各階層において密接に連携している。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。現在、この仮説を検証すべく研究を進めている。また今後は、細胞内の脂肪酸代謝を是正することによって、細胞内代謝に連動した免疫応答、すなわち免疫-代謝連関を正常化し、マクロファージを安定化させて、肥満・生活習慣病を制御することが可能と期待される。

2. 細胞内脂質代謝を調節する lncRNA の探索

タンパクをコードしていないゲノム領域から産生される非コードRNA(lncRNA)が細胞の分化やシグナルの伝達など、多様な生理活性を持つ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ちに炎症を収束する過程とでそれぞれ転写されるlncRNA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lncRNAを複数同定した。このうち、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lncRNAに標的を絞って、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すすめている。

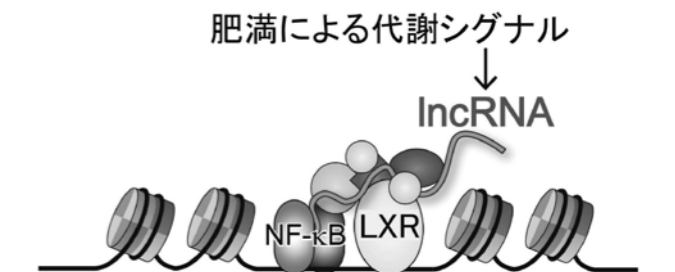


図4 lncRNAは代謝シグナルにตอบสนองし特異的な遺伝子発現を制御する

人事異動

転入：種市大喜(助教)、佐野雅人(技術補佐員)、四方さゆり(技術補佐員)、岡田靖子(事務補佐員)
転出：佐野雅人、岡田靖子

業績目録

原著論文

- Shen H, Eguchi K, Kono N, Fujii K, Shibata M, Oishi-Tanaka Y, Komuro I, Arai H, Nagai R, and Manabe I. The saturated fatty acid palmitate aggravates neointima formation by promot-

- ing smooth muscle phenotypic modulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33, 2596-2607, 2013.
- Lam M, Cho H, Lesch H, Heinz S, Oishi-Tanaka Y, Benner C, Kaikkonen M, Salim A, Rosenfeld M, Ecanas R, and Glass CK. Rev-Erbs negatively regulate macrophage gene expression by repressing enhancer-directed transcription. *Nature* 498, 511-515, 2013.

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

- 網羅解析技術を用いて認知症の病的リン酸化シグナルを解明した（神経病理学）
- ポリグルタミン病の共通病態を担う新規遺伝子を発見した（神経病理学）
- Atg5 に依存しないオートファジー機構が、酵母細胞から哺乳動物まで保存されている事を発見した（病態細胞生物学）
- 生体内において、オートファジー細胞死の同定に成功した（病態細胞生物学）
- 小型魚類を用いた非アルコール性脂肪性肝炎研究をまとめた（発生再生生物学）
- マウス ES 細胞分化誘導におけるアセチルコリン受容体の役割を見出した（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）
- 加齢に伴い脱毛がおこるメカニズムを明らかにした（幹細胞医学）
- 全身性エリテマトーデス（SLE）関連抗 Sm 自己抗体産生 B 細胞が、抗 DNA 抗体産生 B 細胞とは異なる制御を受けることを明らかにした（免疫疾患）
- 抗体応答制御を目的として高親和性 CD22 結合化合物を開発した（免疫疾患）
- HLA 領域内の NFKBIL1 遺伝子が免疫関連遺伝子やウイルス遺伝子のスプライシング制御を介して免疫制御および感染制御に関わることを解明した（分子病態）
- 拡張型心筋症の病態における性差がアンドロゲンレセプターと FHL2 を介する SRF の過剰活性化によることを解明した（分子病態）
- 慢性活動性 EBV 感染症（CAEBV）モデルマウスの作成法を確立し、新規抗 EBV 剤の効果確認を行なっている（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開発・実用化し、多くの医療施設に技術供与している（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：笹邊俊和、吉田千里、藤田慶大、陳 西貴、本間秀典、谷口順子

研究内容

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

研究紹介

1. 前頭側頭葉変性症原因遺伝子VCPはポリグルタミン病の共通病態を制御する

私たちの研究室は、アルツハイマー病、パーキンソン病に次いで頻度の高い神経変性疾患であるポリグルタミン病の病態解明に取り組んでいるが、これらの変性疾患の原因タンパク質は正常タンパク質と結合して機能阻害を起こすと考えられている。私たちは10数年前に、ポリグルタミン配列に結合する新規タンパク質を yeast two-hybrid 法により検索し、PQBPI と共に発見した分子が TERA/VCP である (Imafuku et al., BBRC 1998)。その後、他のグループにより VCP のポリグルタミン病タンパク質の一種 (Ataxin 3) への結合と病態への関与が再検証されていた (Hirabayashi et al., Cell Death & Differ. 2001)。しかしながら、VCP がどのような分子機構でポリグルタミン病態を制御するのか、他のポリグルタミン病タンパク質にも影響を与えるのかなど解明しなければならぬ点が数多く残されていた。VCP は AAA ATPase ファミリーに属するタンパクであるが、「膜輸送」「小胞体関連タンパク質分解」「DNA 損傷修復」などの様々な細胞機能においてその活性が必要である。また、VCP 遺伝子変異自体も前頭側頭葉変性症の原因となることが近年明らかとなっている。

これらの現状を踏まえると、ポリグルタミン病においては VCP を介した共通病態が存在するという仮説が可能になる。また、変異型ポリグルタミン病タンパク質が VCP をトラップすることで神経変性に至るとすれば、多岐にわたる VCP 機能のどれが阻害されることが重要であろうか？本年度の研究において、まずは VCP が実際に様々なポリグルタミン病タンパク質と結合するかを検討した。Ataxin-1 (脊髄小脳失調症 1 型 (SCA1)

の原因遺伝子)、Ataxin-7 (脊髄小脳失調症 7 型の原因遺伝子)、アンドロジェン受容体 (球脊髄性筋萎縮症の原因遺伝子)、ハンチンチン (ハンチントン病 (HD) の原因遺伝子) という、4 種類のポリグルタミン病の疾患遺伝子を用いて検討したところ、正常型、変異型ともにポリグルタミン病タンパク質は VCP に結合し、ポリグルタミン病タンパク質からポリグルタミン配列だけを除いた変異体タンパク質とは結合しなかった。これにより、VCP とポリグルタミン病タンパク質の関係が一般化された。そこで、VCP 神経細胞内のどこで働くか、正常マウスの細胞内局在を検討した。VCP はブルキンエ細胞及び脊髄運動ニューロンでは核に強く局在し、神経細胞において VCP が核での機能を発揮していることが示唆された。私たちはすでに、ポリグルタミン病における核 DNA の二重鎖切断亢進という病態を見出しており (Enokido et al., JCB 2010)、VCP の阻害が DNA ダメージの修復不全を介して病態に関与するのではないかと考え更なる実験を行った (Fujita et al., Nut Commun 2013)。

HD および SCA1 モデルマウスとモデルショウジョウバエにおいて、DNA 二重鎖切断のマーカーであるリン酸化ヒストン (gammaH2AX 及び gammaH2Av) の免疫染色を行ったところ、これらのモデルではいずれも DNA 二重鎖切断の亢進が確認された。さらに、モデルショウジョウバエにおいて VCP を過剰発現させたところ、寿命の短縮といった症状のみならず、gammaH2Av シグナルの低下も顕著であった。VCP は DNA 損傷部位に集積することで DNA 二重鎖切断を促進する機能を持つ。そこで、マイクロレーザー照射法を用いて解析したところ、変異型ハンチンチン及び Ataxin-1 を発現する細胞では VCP のダメージ部位への集積が阻害されていた (Fujita et al., Nut Commun 2013)。

これらの結果は、1) ポリグルタミン病タンパク質はその種類によらず、TERA/VCP/p97 と結合すること、2) 変異ポリグルタミン病タンパク質が VCP と結合した際に VCP の細胞内動態が変化するために、DNA 損傷部位への移動を妨げて DNA 修復能が低下し、最終的に DNA 二重鎖切断が増加すること、を示している (Fujita et al., Nut Commun 2013)。近年、DNA 二重鎖

切断は正常な神経活動によっても誘導されることが明らかになった (Suberbielle et al., Nat Neurosci 2013) が、このように非病態下で通常に生じる DNA 二重鎖切断に対して VCP は修復を行っており、変異ポリグルタミン病タンパク質がこの機能を阻害すると考えられる。現在、ウィルスベクターによるモデルマウスの治療を目指しており、今後の治療応用が期待される。

2. SCA1 病態を制御する DNA 修復分子 RPA1

ポリグルタミン病の共通病態として DNA 損傷修復異常が分かったが、VCP による改善は完全ではない。一方、私たちはハンチントン病に特異的な DNA 修復異常の分子機構をすでに明らかにしている (Enokido et al., JCB 2010)。そこで、ポリグルタミン病の他の疾患にも着目し SCA1 における DNA 損傷修復異常について検討した。

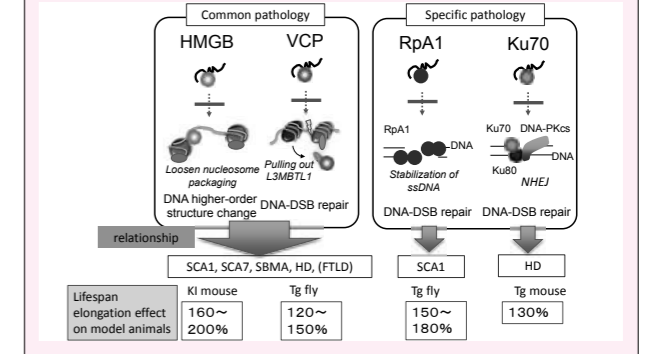
私たちは寿命短縮と羽化率の低下という表現型を示すショウジョウバエモデルを作成し、これを回復できる DNA 損傷修復関連遺伝子を in vivo スクリーニングした。スクリーニングの結果、8 つの寿命回復遺伝子と 12 の短縮遺伝子を見出した。これらの遺伝子を IPA ソフトウェアを用いてネットワーク解析したところ、寿命延長遺伝子ネットワークにおいては RPA1 が短縮遺伝子ネットワークにおいては chk1 がそれぞれ中心的な役割を果たしていることが推定された。これらの遺伝子について複眼変性モデルを用いて病態制御作用を確認した。予想通り RPA1 は過剰発現で病態を改善し、ノックダウンで悪化させた。Chk1 も予想通り過剰発現で病態を悪化させ、ノックダウンで改善した。さらに、RPA1 の過剰発現は寿命のみならず、DNA 二重鎖切断をも回復させた。私たちは免洗実験で、RPA1 が Ataxin 1 と結合することを示した。Ataxin 1 の変異は RPA1 との結合をより強くした。また、マイクロレーザー照射法を用いた解析により変異型 Ataxin 1 が RPA1 の DNA 損傷部位への集積を阻害することを明らかにした (Barclay et al., Hun Mol Genet 2013)。

これらの結果は、変異型 Ataxin 1 が RPA1 をトラップすることでその機能を阻害し、DNA 二重鎖切断がう

まく修復されずに蓄積してしまうことを示している。この DNA 二重鎖切断の蓄積が神経機能を阻害することが主要病態であると想定される。RPA1 は homologous recombination (HR) による二重鎖切断修復に特に重要な機能を持っている。HR は非分裂細胞である神経では働かないと従来考えられていたが、近年では変性が神経細胞の細胞周期を再開させることが明らかとなってきている。RPA1 はこのような細胞で HR を行っているのではないだろうか？実際、SCA1 モデルマウスでは成体のブルキンエ細胞において BrdU を取り込むものがあることを確認している。さらに、chk1 についても阻害剤による SCA1 モデルショウジョウバエの寿命延長を確認しており、今回の結果はモデルマウスでの解析を経て将来、治療につながるものと考えられる (Barclay et al., Hun Mol Genet 2013)。

ハイライト

「ポリグルタミン病における DNA 損傷修復分子の関与」
これまで複数のアンバイアストな網羅的アプローチに基づく病態分子探索により、ポリグルタミン病に DNA 損傷修復が関わっていることを示してきた。本年度では新たに VCP と RPA1 の関与を明らかにした。これらの分子はモデルショウジョウバエの寿命を延長したが、今後ノックインマウス等を用い病態への貢献度を慎重に評価する必要がある。また、すでにマウスモデルでの顕著な延長効果を確認済みの HMGB1、Ku70 と共に複数分子をターゲットとする複合療法も考えられる。これにより、高い治療効果が得られることを期待している。



研究業績

原著

- Fujita, K., Nakamura, Y., Oka, T., Ito, H., Tamura, T., Tagawa, K., Sasabe, T., Katsuta, A., Motoki, K., Shiwaku, H., Sone, M., Yoshida, C., Katsuno, M., Eishi, Y., Murata, M., Taylor, J.P., Wanker, E.E., Kono, K., Tashiro, S., Sobue, G., La, Spada, A.R., and Okazawa, H. (2013) A functional deficiency of TERA/VCP/p97 contributes to impaired DNA damage repair in multiple polyglutamine diseases. *Nature Commun.* 4:1816. doi: 10.1038/ncomms2828
- Li, C., Ito, H., Fujita, K., Shiwaku, H., Yunlong Qi, Y., Tagawa, K., Tamura, T., Okazawa, H.

- (2013) Sox2 transcriptionally regulates Pqbp1, an Intellectual Disability-Microcephaly causative gene, in neural stem progenitor cells. *PLoS ONE* 8. e68627. doi: 10.1371/journal.pone.0068627
- Shiwaku, H., Yagishita S., Eishi Y., Okazawa, H. (2013) Bergmann glia are reduced in spinocerebellar ataxia type 1. *Neuroreport*. 24, 620-625. doi: 10.1097/WNR.0b013e32836347b7.
- Ikeuchi, Y., de la Torre, L., Matsuda, T., Steen, H., Okazawa, H., Bonni, A. (2013) The XLID protein PQBP1 and the GTPase dynamin 2 define a signaling link that orchestrates ciliary morphogenesis in postmitotic neurons. *Cell Reports* 4, 1-11. doi:10.1016/j.celrep.2013.07.042
- Barclay, S.S., Tamura, T., Ito, H., Fujita, K.,

- Tagawa, K., Shimamura, T., Katsuta, A., Shiwaku, H., Sone, M., Imoto, S., Miyano, S. and Okazawa, H. Systems biology analysis of *Drosophila in vivo* screen data elucidates core networks for DNA damage repair in SCA1. *Hum Mol Genet* 2014 Mar 1;23(5):1345-64. doi: 10.1093/hmg/ddt524

総説

- 水口峰之、岡澤均(2013) Polyglutamine tract-binding protein 1 の構造生物学的研究. *YAKUGAKU ZASSHI* 133, 519-526.
- Okazawa, H. (2013) HD Research Around the World: Japan. Past, Present, Future. *HD Insights* vol. 4, 7-8

難治病態研究部門 病態細胞生物学分野

教授：清水重臣 講師：吉田達士 特任講師：辻岡政経 助教：荒川聡子
特任助教：室橋道子、本田真也、山口啓史、橋詰 力、申 珉京

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。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。生体内においては、様々な臓器で観察されるが、特に赤血球の最終分化の際に起るミトコンドリア除去に深く関与していた。即ち、Atg5 欠損マウスの赤血球を観察すると、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った。

本年は、酵母細胞においても新規オートファジー機構が存在することを発見した。即ち、新規オートファジーも酵母細胞から哺乳動物細胞まで保存されたマシナリーである事が判明したのである。さらに、この酵母の系を応用して、新規オートファジーに関わる複数の遺伝子の同定に成功した。

2. 細胞死の解析

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

本年は、オートファジー細胞死を、マウスの個体内において同定する事に成功した。また、アポトーシスが実行される時のミトコンドリアの形態変化を詳細に観察する事に成功した。

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。

ハイライト

1. Atg5 非依存的オートファジー機構は進化的に保存されている。

従来、オートファジーの実行には Atg5 分子が必要であると考えられてきた。このオートファジーは、酵母細胞から哺乳動物細胞まで進化的に保存されている事が知られており、オートファジーの生物学的な重要性を示している。一方我々のグループは、Atg5 に依存しない新しいタイプのオートファジーが存在する事を、哺乳動物細胞において発見した (nature, 2009)。そこで、この Atg5 非依存的オートファジーが進化的に保存されているか否かを検討した。その結果、ある種の化合物を atg5 欠損酵母細胞に添加すると、Atg5 非依存的オートファジーが実行される事が判明した (図1)。即ち、Atg5 非依存的オートファジーも進化的に広く保存された細胞機能である事が判明した。

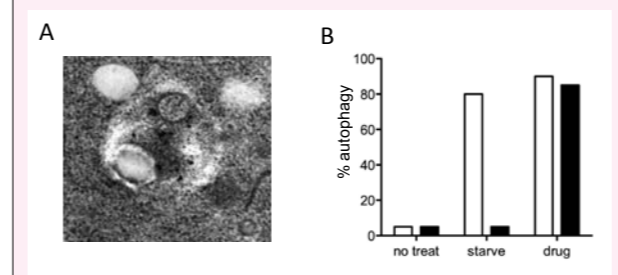


図1 酵母細胞におけるオルタナティブオートファジーの発見 (A) atg5 欠損酵母細胞にストレスを加えるとオートファゴソームが形成された。内部には、リボソームやゴルジ膜が含まれていた。(B) 正常酵母細胞 (白カラム) と atg5 欠損酵母細胞 (黒カラム) を、無刺激 (no treat)、栄養飢餓3時間 (starve)、化合物投与12時間 (drug) 処理し、オートファジーの多寡を位相差顕微鏡にて観察した。その結果、atg5 欠損酵母細胞は、栄養飢餓ではオートファジーを誘導しなかったが、化合物投与ではオートファジーを誘導した。

2. オートファジー細胞死はマウス個体でも観察された。

オートファジーは多くの場合細胞保護的に作用するが、強いストレスが加わった場合には、オートファジーを介した細胞死が実行され、これは「オートファジー細胞死」と呼称されている。オートファジー細胞死の目的の1つは、アポトーシスを代償する事に有る為、Bax/Bak 欠損細胞 (DKO; アポトーシスが起らない細胞) に強いストレスを加えると、オートファジー細胞死が実行される (図2)。一方、Atg5 を欠損させた Atg5/Bax/Bak 欠損細胞 (TKO) においては、強いオートファジーが起らない為、オートファジー細胞死も実行されない (図2)。DKO マウスと TKO マウスを比較すると、指の形成の時の細胞死が、TKO マウスで遅延している事が見出された。

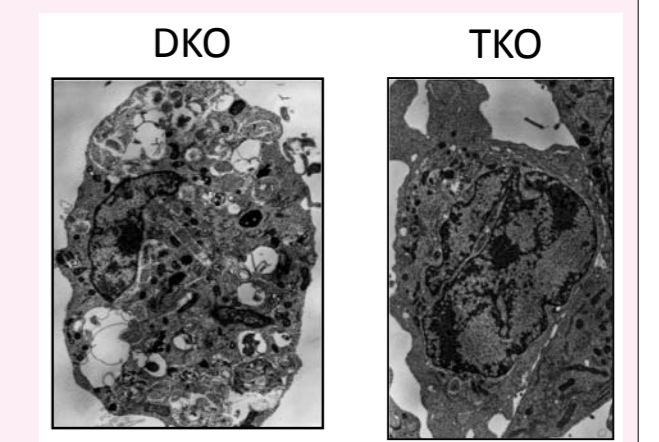


図2 オートファジー細胞死の電子顕微鏡像 Bax/Bak 欠損細胞 (DKO) と Atg5/Bax/Bak 欠損細胞 (TKO) に、DNA 傷害を与え12時間後の電子顕微鏡像を示す。DKO 細胞は、過剰なオートファジーにより細胞死が実行されている。一方、TKO 細胞では、オートファジーは顕著に抑制されており、細胞死を免れている。

人事異動

転入：吉田達士 (講師)、辻岡政経 (特任講師)、橋詰力 (特任助教)、申珉京 (特任助教)、中井美由紀 (大学院医歯学総合研究科修士課程入学)、中島あゆみ (大学院医歯学総合研究科修士課程入学)、小田奈津季 (大学院医歯学総合研究科修士課程入学)
転出：小西昭充 (群馬大学医学部へ転出)、宮崎大 (疾患生命科学研究所博士課程より退学)、武田可奈子 (大学院医歯学総合研究科修士課程より退学)

業績目録

原著論文

- Mizushima T, Arakawa S, Sanada Y, Yoshino I, Miyazaki D, Urushima H, Tsujimoto Y, Ito T, Shimizu S: Inhibition of epithelial cell death by Bcl-2 improved chronic colitis in IL10 KO mice. *Am J Pathol.* 183, 1936-44 (2013)
- Shimizu S, Yoshida T, Tsujioka M, Arakawa S: Autophagic Cell Death and Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* in press
- Shimizu S, Honda S, Arakawa S, Yamaguchi H: Alternative Macroautophagy and Mitophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* in press

総説

- Shimizu S, Arakawa S, Nishida Y, Yamaguchi H, Yoshida T: Mammalian autophagy can occur through an Atg5/Atg7-independent pathway. *AUTOPHAGY: Cancer, Other Pathologies,*

- Inflammation, Immunity, and Infection.* Vol. 2 (Edit MA Hayat) Academic Press, 49-59 (2013)
- 荒川聡子, 清水重臣: オートファジー細胞死-恒常的オートファジーとオートファジー細胞死の比較 [医学のあゆみ] 246: 364-368, 2013
- 清水重臣: オートファジー細胞死と癌 [医学のあゆみ] 246: 406-410, 2013
- 清水重臣: オートファジー細胞死の分子機構とその生体での役割 [遺伝子医学 MOOK 別冊: 細胞死研究の今] 32-37, 2013
- 清水重臣: ミトコンドリアのストレス応答 [Surgical Frontier] 20: 35-40, 2013

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
学振 PD：宮村憲央 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. 細胞の生死を制御する SAPK/JNK シグナル伝達系に関する研究

外部環境の変動に応答する仕組みを、生物は進化の過程を通じて生存に必須の機構として獲得してきました。紫外線による DNA 損傷に対処する修復系、ウイルスや細菌感染から個体を防御する免疫系など個体の恒常性を維持する仕組みです。我々は様々なストレスに応答し活性化する“MAP キナーゼファミリーの一つである JNK (別名 stress-activated protein kinase (SAPK))”に着目し、その活性化機構や生理的役割について研究しています。

2. 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「組織や器官のサイズを規定するシグナル伝達系」として発見されました。本シグナル伝達系の制御機構と生理的役割について研究しています。

3. 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。

4. 小型魚類メダカを用いた肝臓研究

母胎内の子宮で発生するマウス胚を用いた肝臓発生研究には様々な困難が伴います。それ故、母胎外で発生し、上記の問題を克服できる新たなモデル生物が求められています。我々は、器官形成やヒト疾患のモデル生物として最近注目されている小型魚類メダカを用いて肝形成および肝疾患に関する研究を展開しています。

5. 個体の恒常性を制御する生物時計に関する研究

ヒトを含む多くの生物は、光情報を利用して、睡眠/覚醒やホルモン分泌といった生理機能の日周期を外環境周期に同調させることで恒常性を維持しています。この生理機能の日周期的な変動は概日リズムと呼ばれ生物に内在する約 24 時間の周期性を有する分子時計により形成されます。我々は、ゼブラフィッシュをモデル生物として用いて、概日リズムの光応答機構の研究を行っています。ゼブラフィッシュの分子時計は光に直接応答し、またその構成因子は哺乳動物と共通です。最近、TALEN や CRISPR といった新規のゲノム編集技術が開発され、ゼブラフィッシュを含む多様なモデル生物で遺伝子改変個体の作出が可能になりました。我々は、これらのゲノム編集技術を用いて分子時計の光応答制御に関わる候補因子のノックアウトゼブラフィッシュを作出し解析することで概日リズムの光応答の分子機構の理解を目指しています。

ハイライト

脂肪肝メダカを用いた代謝系疾患病態の解明

平成 22 年度からの山口大学との共同研究の成果、1) ヒト非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) を模倣した新規脂肪肝メダカの作出、および 2) ヒト治療剤 EPA (多価不飽和脂肪酸) やテルミサルタン (核内受容体活性化剤)、エゼチミブ (コレステロール吸収阻害剤) が本脂肪肝メダカにも有効であることを、最新の NASH 研究の観点から紹介致しました (*Disease Models & Mechanisms* 2013)。

正常の肝臓は脂肪肝の前段階を経て、線維化、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH)、肝硬変、肝癌へと病態を悪化させる場合が多いことが知られています (図 1)。それ故、重篤な肝疾患を予防するためには、脂肪肝を軽減させることが有効です。しかしながら、脂肪肝発症機構は不明な点が多いこと、また創薬研究

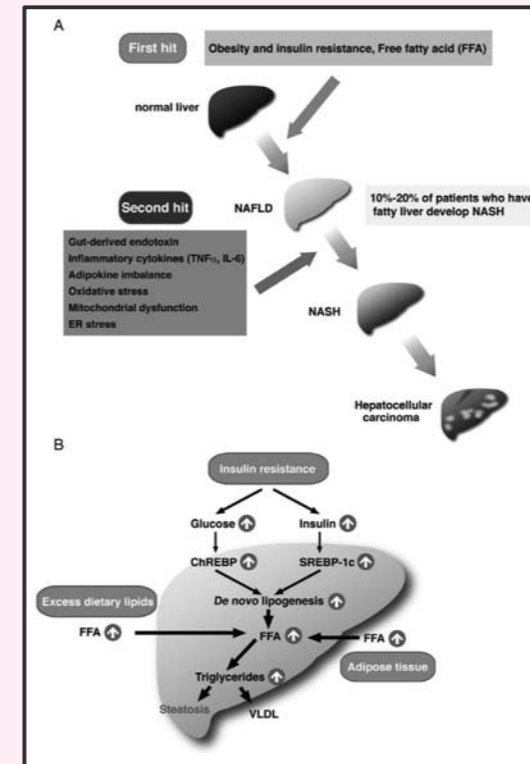


図 1 NASH 形成機構：2 ヒットモデル

を見据えた適切な病態モデル生物が不在であるという未解決な問題が残されています。高脂肪食をメダカに摂取させることによって、NASH をメダカに発症させることに成功しました。ヒトと類似の病理所見や遺伝子発現の変化が観察されました。興味深いことに、米国消化器および肝臓病学会が推奨する治療剤である EPA やテルミサルタン、エゼチミブの投与によって NASH の発症は抑制されました。欧米では既にゼブラフィッシュを用いた各種疾患に対するハイスループット薬剤スクリーニングが行われています (図 2)。マウスに比較して、スクリーニングできる薬剤の数は倍以上、繁殖や飼育にかかる実験費用も数十分の 1 以下という利点があるからです。それ故、ヒト疾患を模倣する小型魚類病態モデルを用いた病態発症機構の解明と創薬研究が注目されています。

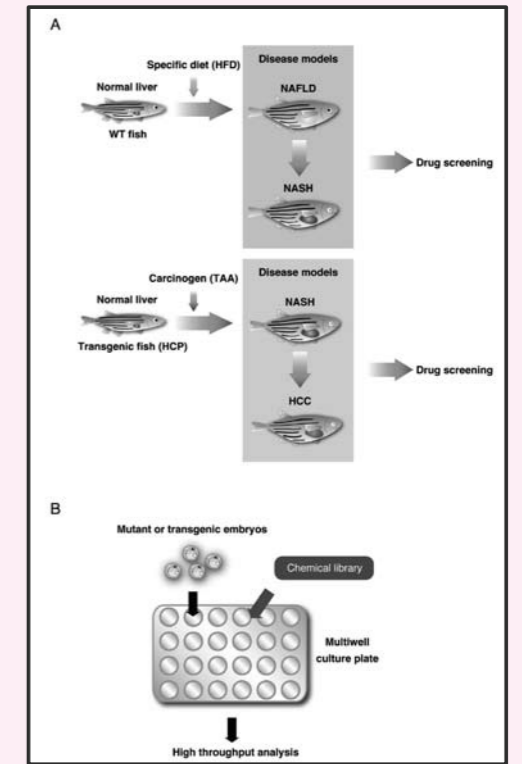


図 2 魚病態モデルを用いた薬剤スクリーニング

人事異動

転入：谷真理子 (修士課程入学)、濱部凜 (特別研究学生)、金子麻倫理 (特別研究学生)、原崇 (特別研究学生)
転出：藤橋ひとみ (修士修了)、山崎世和 (特任助教辞職)、畠星治 (特任助教辞職)、西田友哉 (日本学術振興会特別研究員 PD 辞職、海外留学継続)

業績目録

原著論文

1. Norie Arima¹, Yoshimi Uchida¹, Ruoxing Yu, Koh Nakayama and Hiroshi Nishina (2013)

Acetylcholine Receptors Regulate Gene Expression that Is Essential for Primitive Streak Formation in Murine Embryoid Bodies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 435, 447-453 (Contributed equally)
2. Menno J. Oudhoff, Spencer A. Freeman, Amber L. Couzens, Frann Antignano, Ekaterina Kuznetsova, Paul H. Min, Jeffrey P. Northrop, Bernhard Lehnertz, Dalia Barsyte-Lovejoy, Masoud Vedadi, Cheryl H. Arrowsmith, Hiroshi Nishina, Michael R. Gold, Fabio M.V. Rossi, Anne-Claude Gingras, and Colby Zaph (2013) Control of the Hippo pathway by Set7-dependent methylation of Yap. *Dev. Cell* 26, 188-194.

3. Yoichi Asaoka, Shuji Terai, Isao Sakaida and Hiroshi Nishina (2013) [review] The expanding role of fish models in understanding non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Disease Models & Mechanisms* 6, 905-914.

和文

1. 浅岡洋一：初期発生期における JNK シグナル伝達経路の多様な生理的役割：比較生理生化学 30: 59-67 (2013)
2. 山崎世和、仁科博史：脳における SAPK/JNK シグナルの役割：CLINICAL NEUROSCIENCE：中外医学社 31: 654-656 (2013)

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 特任助教：森永浩伸
日本学術振興会特別研究員（PD）：毛利泰彰

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、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。ほ乳類の皮膚や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、幹細胞システムが加齢やストレスに抗して幹細胞を維持制御し組織の恒常性を維持する仕組みの解明に取り組んでいる。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. 皮膚における組織幹細胞の同定

皮膚は、体重の約16%を占める最大の臓器として知られ、外界から個体を隔てて生命を護る上で不可欠である。皮膚は、表皮、真皮、皮下脂肪織の三層から成り、毛包や汗腺などの付属器を持つ。典型的な幹細胞システムを形成しており、その頂点に位置する幹細胞が周囲の微小環境（ニッチ）による制御のもと自己複製を行い、分化細胞を供給している。毛包はその再生と退縮を周期的に繰り返しながら構成細胞の新陳代謝が行われており、毛包内で毛に色素を供給している色素細胞も毛周期ごとに大部分の細胞が新しく入れ替わる。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おり、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に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、さらに毛のない皮膚領域においても、同じく皮膚付属器である汗腺内に自己複製可能な色素幹細胞を見出している（未発表）。

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。白髪は、最も典型的な老化現象の一つでもあることに着目し、加齢に伴って色素幹細胞においてどのような変化が引き起こされるのか研究を進めてきた。加齢マウスと若齢マウスとの比較から、加齢マウスの髭毛包内において、色素幹細胞が異所性にニッチにおいて分化すること、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。つまり、種をこえて色素幹細胞の維持不全により白髪がおこることが明らかになっており（Nishimura EK, et al. Science 2005）、同様に加齢に伴う脱毛のメカニズムについても、その仕組みについて研究をすすめている。

3. ゲノム損傷下における組織幹細胞の運命制御と組織の老化のメカニズム

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が明らかになった。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が明らかになった（Inomata K., Aoto T. et al. Cell 2009）。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（「ベルゴニー・トリボンドーの法則」）。しかし、我々の研究から、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）入ると放射線感受性となり、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)。幹細胞が休眠状態(G0)において放射線照射を受けるとゲノム損傷応答が遷延化し、次ぎの毛周期で自己複製刺激を受けた際に、ニッチ内で自己複製せずに分化していた。毛周期においてニッチ環境そのものが変動しており、幹細胞の活性状態が異なってくるため、細胞周期あるいはニッチシグナルがその差異を生み出し、自己複製のチェックポイントそのものが修飾される可能性、閾値が変動する可能性が示唆された (Ueno M et al. Pigment Cell Melanoma Res. in press)。

業績目録

原著論文

1. Ueno M, Aoto T, Mohri Y, Yokozeki H and Nishimura EK. Coupling of the radioresistance of melanocyte stem cells to their dormancy during the hair cycle. Pigment Cell Melanoma Res. in press
2. Morinaga H, Takenaka T, Hashiya F, Kizaki S, Hashiya K, Toshikazu B and Sugiyama H. Sequence-specific electron injection into DNA from an intermolecular electron donor. Nucleic Acids Res. 41(8):4724-4728. 2013

日本語総説

1. 西村栄美:「毛髪再生のメディカルサイエンス:毛は生やせるか?」監修:基礎の基礎細胞工学 Vol.32, No.10: p1022-1025, 2013(秀潤社)
2. 松村寛行, 毛利泰彰, 西村栄美:「色素幹細胞とそのニッチ:毛包幹細胞の新しい役割」細胞工学 Vol.32, No.10: p1038-1041, 2013(秀潤社)

国内学会招待講演

1. 西村栄美:色素幹細胞の生物学とその臨床応用の可能性:第13回日本再生医療学会総会:2014年3月6日(京都)
2. 西村栄美:皮膚のステムセルエイジングと幹細胞制御:第9回京大病院 iPS細胞・再生医学研究会:2014年1月22日(京都)
3. 西村栄美:毛包の老化と幹細胞制御:第18回日本臨床毛髪学会:2013年11月23日(一ツ橋)
4. 西村栄美:組織の老化と幹細胞制御:黒髪が生える仕組みとその破綻について:第22回東京

- 臨床血液研究会:2013年10月31日(東京)
5. 西村栄美:組織の老化と幹細胞制御:第86回日本生化学会大会:2013年9月13日(パシフィコ横浜)
6. 西村栄美:色素幹細胞の制御とメラノーマの発生:第29回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会:2013年8月8日(甲府)
7. 西村栄美:上皮の老化と幹細胞制御:第13回抗加齢医学会総会:2013年6月28日(パシフィコ横浜)
8. 西村栄美:毛包における幹細胞の再生と老化:第112回日本皮膚科学会総会:2013年6月14日(パシフィコ横浜)
9. 西村栄美:なぜ老いるのか?:白髪と脱毛のメカニズム:第13回学習院大学生命科学シンポジウム:2013年5月25日(東京)

国際学会招待講演

1. Emi K.Nishimura: Hair Follicle aging and stem cell regulation: The 23rd Hot Spring Harbor International Symposium jointly with The 3rd "Grants for Excellent Graduate Schools" International Symposium: November 5, 2013, Kyushu University
2. Emi K.Nishimura: DNA damage and melanocyte stem cells: Montagna Symposium on the Biology of Skin: October 10, 2013, Washington, USA
3. Emi K.Nishimura: Melanocyte Stem Cells Maintenance, Survival and Differentiation: International Pigment Cell Development Workshop: May 7th, 2013, Edinburgh, UK
4. Emi K.Nishimura: Mechanisms of Hair Follicle Aging and Stem Cell Regulation: 7th World Congress for Hair Research: May 5th,

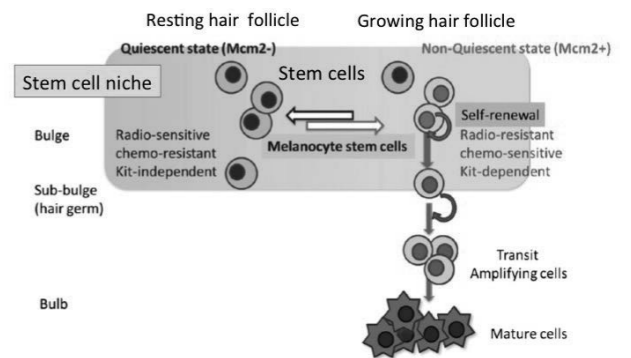


図 色素幹細胞の活性化状態と放射線感受性
静止期（Go期）の色素幹細胞は放射線感受性が高い。一方、活性化された色素幹細胞は放射線に抵抗性である。

2013, Edinburgh, UK

学会発表

1. 西村栄美, 松村寛行: The mechanisms of hair follicle aging and stem cell regulation: 第8回研究所ネットワーク国際シンポジウム: 2013年6月28日(京都)
2. Yasuaki Mohri, Nguyen Thanh Binh, Hiroyuki Matsumura, Yuko Tadokoro, Mayumi Ito, Jan Hoeijmakers and Emi K. Nishimura: The fate switch of hair follicle stem cells to the epidermis underlies baldness due to hair follicle aging: The 11th Stem Cell Research Symposium: 2013年5月17日(東京)

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

1. 先端研究助成基金助成金・最先端次世代開発支援プログラム(最終年度) 西村栄美(代表)(H22-25年度)『組織幹細胞に着目した毛包の組織老化メカニズムの解明』
2. 文部科学研究費補助金・研究活動スタート支援(継続) 松村寛行(代表)(H24年度)『ヒト型マウス皮膚をもつ新規メラノーマモデルマウスの確立とメラノーマ発生機序の解明』

難治病態研究部門 免疫疾患分野

教授：鏑田武志 准教授：安達貴弘 助教：鈴木光浩
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
技術補佐員：久留主幸江、中野成子、三宅春香、別府 愛 事務補佐員：高橋博子

研究内容

免疫系が抗原に反応する際に、抗原がタンパク質であるのか、あるいは、それ以外の分子であるのかによって反応の性状は異なる。これは、もっぱら T リンパ球がタンパク質のみを認識するためである。正常な免疫系は、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とされる。タンパク抗原への免疫応答の際の、病原微生物、微生物以外の異物、自己成分の識別のメカニズムはほぼ解明されているが、非タンパク抗原への免疫応答については未解明の領域が多い。また、非タンパク抗原への免疫応答は、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。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) 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、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。自己抗体を産生する自己反応性 B リンパ球 (B 細胞) は、生体内で除去や不活化などの制御を受けることにより、健康人では自己抗体の産生がおこらない。このような自己反応性リンパ球の制御機構は自己トレランスと呼ばれる。我々は抗 Sm 抗体産生 B 細胞も抗 DNA 抗体産生 B 細胞の一部も脾臓などの末梢リンパ組織で細

胞死をおこすが、両者で CD40L への反応性が異なることを示し、抗 Sm 抗体産生 B 細胞と抗 DNA 抗体産生 B 細胞は異なるトレランス機構により制御されていることを明らかにした (Kishi et al. PNAS 2012, Aslam et al. 2013) (ハイライト参照)。

2. SLE および免疫性神経疾患における自己抗体産生の遺伝的要因についての研究

自己免疫疾患の発症には、遺伝的要因と環境要因が関与する。ギラン・バレー症候群は免疫性神経疾患の代表的な疾患であり、カンピロバクターやインフルエンザ桿菌感染が引き金として重要であることが示されているが、遺伝的要因の関与はこれまで明らかにされてこなかった。ギラン・バレー症候群では、ガングリオシドと呼ばれるシアル酸を含む糖脂質に対する自己抗体の産生がおこる。近年、種々の免疫細胞に発現するシグレックファミリー分子が、シアル酸を認識して免疫反応を抑制する機能があることが明らかとなってきた。そこで、近畿大学楠教授との共同研究で、ギラン・バレー症候群患者のシグレック遺伝子の解析を行なっている。

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はあまり例がなく、糖鎖に由来する化合物はない。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 は主に B 細胞に発現する抑制性の受容体で、 $\alpha 2,6$ シアル酸をリガンドとして認識する。B 細胞が抗原に反応した際に、抗原がシアル酸を含有するかどうかに関わらず、CD22 は B 細胞の活性化を抑制する。我々は、岐阜大学応用生命科学部の木曾教授、石田教授らとの共同研究により、CD22 に高親和性に結合する化合物の合成を行ない、自然界のリガンドである $\alpha 2,6$ シアル酸よりも 1 万倍以上高い親和性で CD22 に結合する化合物 GSC718 の合成に成功した。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しているとともに、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

全身性エリテマトーデス (SLE) 関連自己抗体産生 B 細胞は抗原特異性により異なるメカニズムで自己トレランス (不応答) が維持される。

全身性エリテマトーデス (SLE) では抗 DNA 抗体や抗 Sm 抗体など種々の核成分への自己抗体産生が見られる。Sm 抗原は RNA タンパク質複合体で、抗 Sm 抗体は SLE で特異的に産生され、SLE の発症に関与することが示されている。自己反応性 B 細胞の自己トレランスの解析には、自己抗体トランスジェニックマウスが用いられる。このようなマウスでは、トランスジーンとして導入された自己抗体遺伝子がすべての B 細胞で発現し、自己反応性 B 細胞となる。我々は、シカゴ大学の M. Weigert 博士と共同研究で、彼らの樹立した抗 DNA 抗体 H 鎖トランスジェニックマウス 3H9 および 56R と、我々が樹立した CD40L トランスジェニックマウスを用いた。CD40L は TNF レセプターファミリーのメンバーで細胞の生存や活性化に関わる CD40 のリガンドで、SLE 患者やそのマウスモデルで過剰産生が見られ、CD40L を過剰発現する CD40L トランスジェニックマウスでは SLE 様の自己免疫疾患を自然発症する。

3H9 H 鎖と λ L 鎖の組み合わせからなる抗体は DNA に反応し、この抗 DNA 抗体産生 B 細胞では機能的不活化 (アナジー) が誘導されることが知られている。アナジーが誘導された自己反応性 B 細胞は、通常の B 細胞とは異なり、T 細胞領域に分布して速やかに死滅する。3H9 マウスを CD40L トランスジェニックマウスと交配し、 λ 陽性 B 細胞を調べたところ、その数や局在は 3H9 マウスを差はなかった (Aslam et al. 2013)。また、自己抗体産生もおこらなかった。この結果は、CD40L 過剰によっても抗 DNA 抗体産生 B 細胞のトレランスの破綻がおこらないことを示して

いる。一方我々は、56R H 鎖と V κ 38C の組み合わせにより抗 Sm 抗体が形成され、この抗 Sm 抗体産生 B 細胞は末梢リンパ組織の辺縁帯でアポトーシスをおこして死滅するという新規トレランス機構により制御されていることを明らかにした (Kishi et al. 2012)。さらに、CD40L トランスジェニックマウスと 56R マウスを交配することで、抗 Sm 抗体産生 B 細胞の辺縁帯でのアポトーシスが阻害され、自己抗体産生がおこった。この結果から、抗 Sm 抗体産生 B 細胞は CD40L 過剰によりトレランスの破綻がおこることが明らかである。抗 Sm 抗体産生 B 細胞と抗 DNA 抗体 B 細胞はともに末梢リンパ組織で速やかに死滅するが、局在だけでなく、トレランス破綻の要件も異なることから、両者は異なったメカニズムで担われていることが強く示唆される。したがって、SLE に特徴的な核成分への自己抗体産生も、抗体の特異性により異なるトレランス機構により制御されていることが明らかとなった。

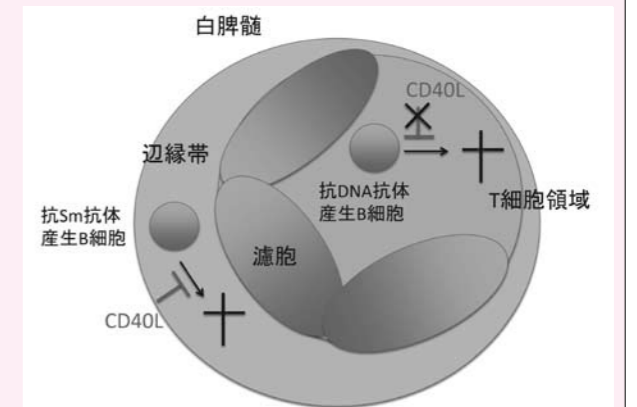


図 自己反応性 B 細胞のトレランスとその破綻
抗 DNA 抗体産生 B 細胞の一部と抗 Sm 抗体産生 B 細胞は末梢リンパ組織で死滅することが示されているが、リンパ組織内の局在が異なるだけでなく、CD40L 過剰により抗 Sm 抗体産生 B 細胞の細胞死が阻害され自己トレランスが破綻するが、抗 DNA 抗体産生 B 細胞ではトレランスの破綻はおこらない。これらの知見から、抗 Sm 抗体産生 B 細胞のトレランスのメカニズムは抗 DNA 抗体産生 B 細胞のトレランスとは異なることが強く示唆される。

人事異動

転入：中野成子 (技術補佐員)、三宅春香 (技術補佐員)、別府愛 (技術補佐員)、Nazim Medzhidov (大学院研究生)、王継揚 (特任講師)、鈴木光浩 (助教)、赤津ちづる (特任助教)、Soha Gomaa Ramadan Abdel Salam (外国人研究者)、吉岡真代 (卒業研究生)

転出：Shirly Phoon (大学院修士課程)、大森聖也 (大学院修士課程)

業績目録

原著論文

1. Shimoda, M., Bolduc, A., Takezaki, M., Amtani, Y., Huang, L., Nutt S. L., Kamanaka, M., Flavell, R. A., Mellor A. L., Tsubata, T. and Koni, P. (2013): Constitutively CD40-activated B cells regulate CD8 T cell inflammatory response by IL-10 induction. *J. Immunol.* 190: 3189-3196.
2. Xu, M., Hou, R., Sato-Hayashizaki, A., Man, R., Zhu, C., Wakabayashi, C., Hirose, S., Adachi, T. and Tsubata, T. (2013): *CD72*^{hi} is a modifier gene that regulates *Fas*^{hi}-induced autoimmune disease. *J. Immunol.* 190: 5436-5445.

3. Aslam, M., Kishi, Y. and Tsubata, T. (2013): Excess CD40L does not rescue anti-DNA B cells from clonal anergy. *PLoS ONE* 8: e7218.
4. 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.
5. Kawai, Y., Ouchida, R., Yamasaki, S., Dragone, L., Tsubata, T. and J.-Y. Wang (2014): LAPTM5 promotes lysosomal degradation of intracellular but not the cell surface CD3 ξ . *Immunol. Cell Biol.* (in press).

難治病態研究部門 分子病態分野

教授：木村彰方 准教授：林 文晴
助教：櫻井大祐 特任助教：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。分子病態分野では、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。

研究紹介

1. 特発性心筋症の病因究明

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。本年は、FHOD3 変異が拡張型心筋症の病因となることを明らかにした (Arimura, et al. Circ J. 77: 2990, 2013)。また、ラミン A/C 遺伝子変異による拡張型心筋症の病態に性差がある分子機序を解明した (Arimura, et al. Cardiovasc Res. 99: 382, 2013)。一方、肥大型心筋症の病因として報告した3種の ANKRD1 変異が、心筋収縮パラメーターに異なる影響を与えることを心筋組織再構築系で証明した (Crocini, et al. Bas Res Cardiol. 108, 349, 2013)。これとは別に、Apelin が ACE2 の制御因子として心不全の抑制に関わることを解明した (Sato, et al. J Clin Invest. 123: 5203, 2013)。

2. 冠状動脈硬化症関連遺伝子群の検索

これまでに MKL1 遺伝子多型が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、機能変化を検討している。また、国際共同研究によって、ALMS1 多型が早発性心筋梗塞のリスク因子となること (Ichihara, et al. Circ Cardiovasc Genet. 6: 569, 2013)、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となること (Pinos, et al. Age. In Press) を明らか

にした。

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研究を実施している。本年の成果として特筆すべきは、SCN3B 変異が Nav1.5 チャンネルの細胞内輸送を障害することで Brugada 症候群の原因となることを見出したことにある (Ishikawa, et al. Circ J. 77: 959, 2013)。

4. ヒトおよびサル MHC 領域の解析

HLA 領域内の自己免疫関連遺伝子である NFKBIL1 の機能を検討し、これが C1k1 および ASF/SF2 との相互作用を介して、免疫関連遺伝子およびインフルエンザ遺伝子のスプライシングを制御することを解明した (ハイライト参照。An, et al. J Autoimmun. 47: 25, 2013)。一方、エイズ (HIV) ワクチン開発において、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 (Takahashi, et al. PLoS ONE 8, e54300, 2013; Nakane, et al. PLoS ONE 8: e73453, 2013; Iwamoto, et al. J Virol. In Press)。また、霊長類における ULBP2 遺伝子の分岐と多様性形成を進化学的に解明した (Naruse, et al. Immunogenet. In Press)。

5. エイズ感受性・抵抗性関連遺伝子の探索

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。本年には、TIM1 多型 (Sharma et al. Hum Immunol. 74:163, 2013) および TRIM5a 多型 (Nakayama et al. AIDS Res Hum Retrovir. 29:919, 2013) が感受性制御に寄与することを明らかにした。

ハイライト (顕著な業績)

NFKBIL1 遺伝子は免疫関連遺伝子群およびインフルエンザウイルス遺伝子の選択的スプライシングを制御する (An J, et al. J Autoimmun. 2013; 47: 25-33.)

組織適合性抗原複合体遺伝子座 (HLA) は、自己あるいは外来抗原に対する免疫応答を遺伝的に制御するが、その詳細には不明な点が残されていた。我々は、関節リウマチや高安病などの自己免疫疾患や慢性炎症性疾患への感受性・抵抗性が NFKBIL1 遺伝子 (IkBL 分子) によって制御されることを報告したが、IkBL の機能は不明であった。そこで、IkBL に結合する分子を探索したところ、C1k1 が得られた。ついで、IkBL と C1k1 との結合を免疫沈降法で確認し、IkBL と C1k1 が核スペクトルに共局在することを確認した。C1k1 は選択的スプライシングに関わることから、CD45, CTLA4, CD72 等の免疫関連遺伝子群のミニジーンを作製して検討したところ、IkBL はスプライシングを抑制すること、C1k1 と拮抗すること、スプライシングには hnRNP および ASF/SF2 が必要であ

ること、C1k1 のキナーゼ活性は必要ないこと、IkBL と C1k1 は ASF/SF2 の RRM ドメインに結合することを明らかにした。さらに、IkBL はインフルエンザウイルス M 遺伝子のスプライシングを抑制した。これらの知見は、IkBL がスプライシング制御を介して、免疫制御とウイルス感染制御の両者に関わることを示す。

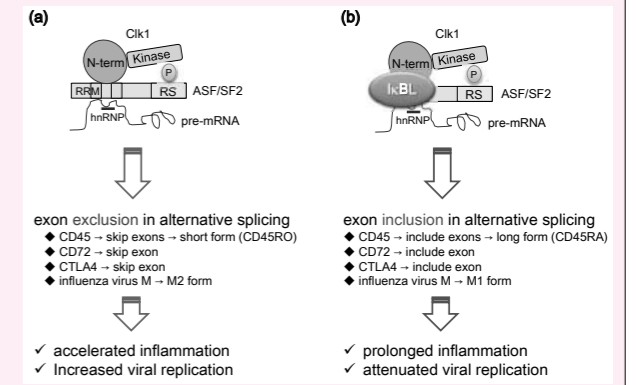


図1 IkBLによる選択的スプライシング制御モデル (a) C1k1 と ASF/SF2 は hnRNP 存在下に免疫関連遺伝子の選択的スプライシングを亢進する。(b) IkBL は ASF/SF2 の RRM ドメインへの結合で C1k1 と拮抗的に作用し、スプライシングを抑制する。

人事異動

転出: 3月に有村卓朗が退職。4月に石川泰輔 (医学博士) と門田千佳 (理学修士)、9月に安健博 (理学博士) が課程修了。転入: 5月に林文晴が准教授に着任。9月に藍智彦 (大学院研究生) が研究に参加。

業績目録

- Sharma G, Ohtani H, Kaur G, Naruse TK, Sharma SK, Vajpayee M, Kimura A, Mehra NK. Status of TIM-1 exon 4 haplotypes and CD4+T cell counts in HIV-1 seroprevalent North Indians. Hum Immunol. 2013; 74(2): 163-165.
- Ishikawa T, Takahashi N, Ohno S, Sakurada H, Nakamura K, On YK, Park JE, Makiyama T, Horie M, Arimura T, Makita N, Kimura A. Novel SCN3B mutation associated with Brugada syndrome affects intracellular trafficking and function of Nav1.5. Circ J. 2013; 77(4): 959-967.
- Takahashi N, Nomura T, Takahara Y, Yamamoto H, Shiino T, Takeda A, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Sakawaki H, Miura T, Igarashi T, Koyanagi Y, Naruse TK, Kimura A, Matano T. A novel protective MHC-I haplotype not associated with dominant Gag-specific CD8+ T-cell responses in SIVmac239 infection of Burmese rhesus macaques. PLoS ONE. 2013; 8(1): e54300.
- Nakayama EE, Nakajima T, Kaur G, Miyama J, Terunuma H, Mehra NK, Kimura A, Shioda T. A naturally occurring single amino acid substitution in human TRIM5a linker region affects its anti-HIV-1 activity and susceptibility to HIV-1 infection. AIDS Res Hum Retroviruses. 2013; 29(6): 919-924.
- Crocini C, Arimura T, Reischmann S, Eder A, Braren I, Hansen A, Eschenhagen T, Kimura A, Carrier L. Impact of ANKRD1 mutations associated with hypertrophic cardiomyopathy on con-

- traction parameters of engineered heart tissue. Basic Res Cardiol. 2013; 108(3): 349.
- Arimura T, Onoue K, Takahashi-Tanaka Y, Ishikawa T, Kuwahara M, Setou M, Shigenbu S, Yamaguchi K, Bertrand AT, Machida N, Takayama K, Fukusato M, Tanaka R, Somekawa T, Nakano T, Yamane Y, Kuba K, Imai Y, Saito N, Bonne G, Kimura A. Nuclear accumulation of androgen receptor in gender difference of dilated cardiomyopathy due to lamin A/C mutations. Cardiovasc Res. 2013; 99(3): 382-394.
- Terao C, Yoshifuji H, Kimura A, Matsumura T, Ohmura K, Takahashi M, Shimizu M, Kawaguchi T, Chen Z, Naruse TK, Sato-Otubo A, Ebana Y, Maejima Y, Kinoshita H, Murakami K, Kawabata D, Wada Y, Narita I, Tazaki J, Kawaguchi Y, Yamanaka H, Yurugi K, Miura Y, Maekawa T, Ogawa S, Komuro I, Nagai R, Yamada R, Tabara Y, Isobe M, Mimori T, Matsuda F. Two susceptibility loci to Takayasu arteritis reveal a synergistic role of the IL12B and HLA-B regions in a Japanese population. Am J Hum Genet. 2013; 93(2): 289-297.
- Nakane T, Nomura T, Shi S, Nakamura M, Naruse TK, Kimura A, Matano T, Yamamoto H. Limited impact of passive non-neutralizing antibody immunization in acute SIV infection on viremia control in rhesus macaques. PLoS ONE 2013; 8(9): e73453.
- An J, Nakajima T, Shibata H, Arimura T, Yasunami M, Kimura A. 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. J Autoimmun. 2013; 47: 25-33.
- Arimura T, Takeya R, Ishikawa T, Yamano T, Matsuo A, Tatsumi T, Nomura T, Sumimoto H, Kimura A. Dilated cardiomyopathy-associated FHOD3 variant impairs the ability to induce activation of transcription factor SRF. Circ J. 2013; 77(12): 2990-2996.
- Sato T, Suzuki T, Watanabe H, Kadowaki A,

- Fukamizu A, Liu PP, Kimura A, Ito H, Penninger JM, Imai Y, Kuba K, Apelin is a positive regulator of ACE2 in failing hearts. J Clin Invest. 2013; 123(12): 5203-5211.
- Ichihara S, Yamamoto K, Asano H, Nakatochi M, Sukegawa M, Ichihara G, Izawa H, Hirashiki A, Takatsa MF, Umeda H, Iwase M, Inagaki H, Hirayama H, Sone T, Nishigaki K, Minatoguchi S, Cho MC, Jang Y, Kim HS, Park JE, Tada-Oikawa S, Kitajima H, Matsubara T, Sunagawa K, Shimokawa H, Kimura A, Lee JY, Murohara T, Inoue I, Yokota M. Identification of a glutamic acid repeat polymorphism of ALMS1 as a novel genetic risk marker for early-onset myocardial infarction by genome-wide linkage analysis. Circ Cardiovasc Genet. 2013; 6(6): 569-578.
- 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. In Press
- 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, García-Dorado D, Hinohara K, Andreu AL, Kimura A, Hirose N, Lucia A. The rs133049 polymorphism on locus 9p21.3 and extreme longevity in Spanish and Japanese cohorts. Age. In Press
- 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. In Press
- Naruse TK, Akari H, Matano T, Kimura A. Divergence and diversity of ULBP2 genes in rhesus and cynomolgus macaques. 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

当フロンティア研究室の研究対象

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。

2011年の研究活動

- A. EBV 感染症モデルマウスの開発と応用
清水、片山
- B. 再生医療に関する研究
清水、片山、高橋、大隅
- C. 網羅的ウイルス検査系の開発と応用
清水、望月、太田、外丸

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

免疫不全マウスNOGにヒト造血幹細胞移植したヒト化マウスにEBV感染させた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

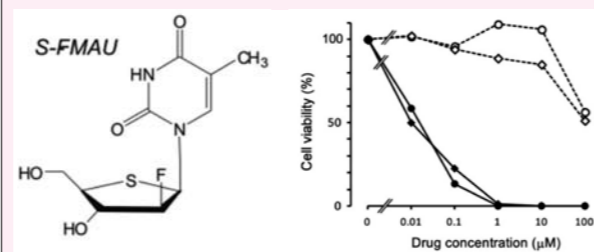
本学医学部運動器外科が行っている滑膜細胞を利用した軟骨再生・半月板再生医療の臨床研究を実施する際に必要な書類作成、幹細胞の分離・培養、ウイルス・マイコプラズマ検査を支援し、安全な臨床研究の実施に協力している。

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臨床科への情報提供を行った。

ハイライト

樹立したEBV陽性T/NK細胞株を利用し、新規抗EBV剤の候補物質を同定した



図の説明：新規抗EBV剤の候補物質 S-FMAU【左】EBV陽性細胞にのみ強い殺細胞効果が認められる【右】(東北大児玉博士との共同研究)

業績目録

原著論文

1. Kobayashi Z, Akaza M, Numasawa Y, Ishihara S, Tomimitsu H, Nakamichi K, Saijo M, Morio T, Shimizu N, Sanjo N, Shintani S, Mizusawa H: Failure of mefloquine therapy in progressive multifocal leukoencephalopathy: Report of two Japanese patients without human immunodeficiency virus infection. *Journal of the Neurological Sciences* 324, 190-194(2013)
2. Yan J, Ng SB, Tay JL, Lin B, Koh TL, Tan J, Selvarajan V, Liu SC, Bi C, Wang S, Choo SN, Shimizu N, Huang G, Yu Q, Chng WJ: EZH2 overexpression in natural killer/T-cell lymphoma confers growth advantage independently of histone methyltransferase activity. *blood* 121: 4512-4520(2013)
3. 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. *Raspiration*. [Epub ahead of print] (2013)
4. Ito K, Shimizu N, Watanabe K, Saito T, Yoshioka Y, Sakane E, Tsunemine H, Akasaka H, Kodaka T, Takahashi T: Analysis of viral in-

fection by multiplex polymerase chain reaction assays in patients with liver dysfunction. *Internal Medicine*. 52(2):201-11(2013)

国内学会

1. 今留謙一 松田剛 川野布由子 千葉佑規乃 新井文子 中澤温子 伊藤守 清水則夫 藤原成悦 難治性EBウイルス関連T/NKリンパ増殖性疾患モデルマウスを用いた新規治療薬3剤の評価研究 日本ウイルス学会 11月神戸
2. 清水則夫 再生医療におけるウイルス・マイコプラズマ安全性検査系の開発 第14回日本医薬品等ウイルス安全性研究会 9月(東京)

競争的資金

1. 厚生労働科学研究費補助金 政策創薬総合研究事業 創薬総合研究(主任研究者 藤原成悦)「臍帯血DLIの実用化と細胞治療製剤の医薬品化へ向けてのトランスレーションリサーチ」
2. 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」
3. 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」
4. 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」

5. 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」
6. 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」
7. 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 再生医療の実現化ハイウェイ(主任研究者 関矢一郎)「滑膜幹細胞による膝半月板再生」
8. 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」
9. 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】

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。

【遺伝生化学】

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

【分子遺伝】

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

【分子疫学】

1. 細胞膜リン脂質代謝に関連する ATPase である ATP10D の遺伝子多型が冠動脈および脳動脈の動脈硬化と関連していることを明らかにした。
2. GWAS で報告された心筋梗塞に関連する 8 種の遺伝子多型の効果を冠動脈硬化で追試し、CDKN2A/B, ADTRP, PDGFD の遺伝子多型が関連することを見出し、これらが相加的に疾患リスクに関与していることを示した。

【エピジェネティクス】

1. LTR レトロトランスポゾン由来の SIRH 遺伝子群が、哺乳類でもヒトおよびマウスを含む真獣類のグループに多数存在することを報告し、そのうち *Peg10*, *Peg11/Rtl1*, *Sirh7* の 3 つの遺伝子が胎盤形成に関わる様々な機能に必須な役割を果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】

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、高頻度な活性化変異（gain-of-function mutation）を同定した。

【生命情報学】

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て、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）の同定およびパスウェイ解析。
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 助教：村松智輝 講師：井上 純
特任講師：林 深

研究内容

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

研究紹介

1. がん関連マイクロRNAの統合的スクリーニングと核酸医薬の技術開発

近年、上皮間葉転換 (epithelial to 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を蛍光値として検出可能な独自の *in vitro* 機能的探索モデル系を確立し、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。miR-655 の強制発現系では、E-カドヘリンの発現上昇や典型的な EMT 誘導遺伝子の発現低下のみならず、間葉系細胞の上皮系細胞への形態変化を伴った運動能と浸潤能の抑制を認めた。加えて、食道扁平上皮癌 (ESCC) においては、miR-655 発現低下と予後に有意に相関を認めた。さらに、TGF- β シグナル経路において重要な遺伝子である ZEB1 と TGFBR2 が miR-655 の直接的な標的遺伝子であることを明らかにした。これらの結果から、miR-655 の発現低下が TGF- β -ZEB1-E-カドヘリン経路を活性化し、がん細胞の悪性形質獲得を促進することが示唆された。(Harazono et al., PLoS One, 2013)

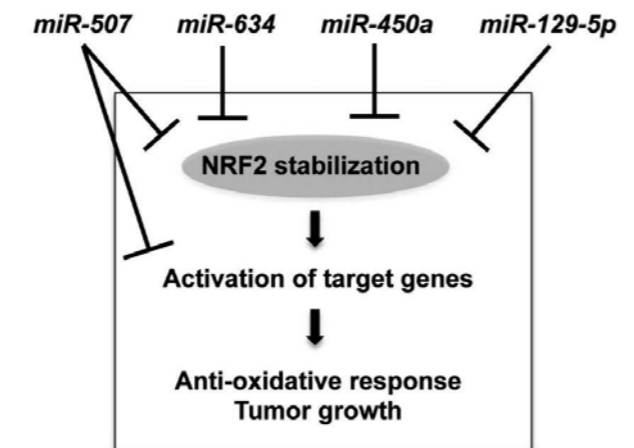
2. 次世代ゲノム解析の応用技術開発

次世代シーケンサーによる ChIP-Seq 法：がん悪性形質獲得に重要な EMT を正に制御する転写因子として報告した SIX1 の標的遺伝子を同定すべく、次世代シーケンサーによる ChIP-Seq 法を用いた網羅的探索を進めている。公共データベースに収載されている大規模デー

タと ChIP-seq 結果の統合解析を行うことで SIX1 標的遺伝子の探索を進めている。

3. 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

様々な癌種由来細胞株におけるオートファジー活性を測定することにより、オートファジー障害を持つ癌細胞およびその原因遺伝子の異常を特定した。また、オートファジー障害を持つ癌では、転写因子 NRF2 が恒常的に活性化することにより、癌の悪性化に寄与していると言われている。NRF2 の転写活性を指標としたレポーターシステムを用いた miRNA ライブラリースクリーニングにより、NRF2 の転写活性を直接的に負に制御する 4 種の miRNAs (miR-507, -634, -450a, -129-5p) を同定した (図)。さらに、マウス担癌モデルにおいて、miRNA 投与による抗腫瘍効果が認められた。これらの結果は、オートファジー活性に基づいた癌の個別化治療のための分子基盤に繋がると考えられる。



4. がん関連の主な共同研究：

平成 25 年度 文部科学省「オーダーメイド医療の実現プログラム (第 3 期)」において、「研究課題・ゲノム網羅的解析情報を基盤とするオーダーメイドがん医療実現のための開発研究(研究代表者・東京医歯大・稲澤譲治)」が採択され、食道扁平上皮がん (東京医歯大・愛知がんセ)、乳がん (がん研・徳島大)、肺がん (名大・滋賀医大)、大腸がん (阪大・がん研)、前立腺がん (京大・岩手医大)、胃がん (国立がん研究セ・徳島大) の 6 種類

を対象に、個別化がん医療の実現に向けて、がん感受性遺伝子や悪性度バイオマーカーの探索研究を推進している。

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 147 例 (22.6%) に疾患原因を検出している。

人事異動

転入：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)、平本秀一 (共同研究生)
転出：原岡陽介、山本信祐 (医歯学総合研究、博士課程終了)、長縄光代 (医歯学総合研究、修士課程終了)、奥子田一輝、(共同研究生) 永田啓明 (大学院特別研究生)

業績目録

英文原著論文

1. Uno M, Saitoh Y, Mochida K, Tsuruyama E, Kiyono T, Imoto I, Inazawa J, Yuasa Y, Kubota T, Yamaoka S: NF- κ B Inducing Kinase, a Central Signaling Component of the Non-Canonical Pathway of NF- κ B, Contributes to Ovarian Cancer Progression. PLoS One. 9:e88347. 2014
2. Nishimura J, Yamamoto M, Hayashi S, Ohyashiki K, Ando K, Brodsky AL, Noji H, Kitamura K, Eto T, Takahashi T, Masuko M,

- Matsumoto T, Wano Y, Shichishima T, Shibayama H, Hase M, Li L, Johnson K, Lazarowski A, Tamburini P, Inazawa J, Kinoshita T, Kanakura Y: Genetic variants in C5 and poor response to eculizumab. N Engl J Med. 370:632-9. 2014
3. Takemura K, Kawachi H, Eishi Y, Kitagaki K, Negi M, Kobayashi M, Uchida K, Inoue J, Inazawa J, Kawano T, Board PG: γ -Glutamylcyclotransferase as a novel immunohistochemical biomarker for the malignancy of esophageal squamous tumors. Hum Pathol. 45:331-41. 2014
4. Dobashi Y, Sato E, Oda Y, Inazawa J, Ooi A: Significance of Akt activation and AKT gene increases in soft tissue tumors. Hum Pathol. 45:127-36. 2014
5. Yamamoto S, Inoue J, Kawano T, Kozaki K, Omura K, Inazawa J: The impact of miRNA-based molecular diagnostics and treatment of NRF2-stabilized tumors. Mol Cancer Res. 12:58-68. 2014
6. Low SK, Takahashi A, Ashikawa K, Inazawa J, Miki Y, Kubo M, Nakamura Y, Katagiri T: Genome-wide association study of breast cancer

- in the Japanese population. PLoS One. 8:e76463. 2013
7. Yamamoto Y, Konishi H, Ichikawa D, Arita T, Shoda K, Komatsu S, Shiozaki A, Ikoma H, Fujiwara H, Okamoto K, Ochiai T, Inoue J, Inazawa J, Otsuji E: Significance of GSTP1 for predicting the prognosis and chemotherapeutic efficacy in esophageal squamous cell carcinoma. Oncol Rep. 30:1687-94. 2013
8. Harazono Y, Muramatsu T, Endo H, Uzawa N, Kawano T, Harada K, Inazawa J, Kozaki K: miR-655 is an EMT-suppressive microRNA targeting ZEB1 and TGFBR2. PLoS One. 8:e627572013. 2013
9. Furuta M, Kozaki K, Tanimoto K, Tanaka S, Ariei S, Shimamura T, Niida A, Miyano S, Inazawa J: The tumor-suppressive miR-497-195 cluster targets multiple cell-cycle regulators in hepatocellular carcinoma. PLoS One. 8:e60155. 2013
10. Endo H, Muramatsu T, Furuta M, Uzawa N, Pimkhaokham A, Amagasa T, Inazawa J, Kozaki K: Potential of tumor-suppressive miR-596 targeting LGALS3BP as a therapeutic agent in oral cancer. Carcinogenesis. 34:560-9. 2013

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 特任講師：長崎光一
助教：竹中克也 特任助教：宮口 健

研究内容

二本鎖 DNA 切断修復機構において機能する BRCA1・BRCA2 は、遺伝性乳がんの原因蛋白であり、この両分子によって担われる情報伝達の流れの解明は、乳がんの発生機構を解明する上で不可欠である。また、DNA 損傷修復機能の破綻は複製や転写制御機構を阻害し、細胞死を抑制し結果的にはがんをはじめとする広範な疾患の原因となる。そこで、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合成致死療法の開発に取り組む。

研究紹介

1. BRCA2 遺伝子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

近年、BRCA1/2 遺伝子変異腫瘍に対して、ポリ (ADP-リボース) ポリメラーゼ 1 (PARP1) の阻害剤は、高い殺傷作用を発揮することが報告された。これは、BRCA 遺伝子変異に対して PARP1 酵素を阻害することで、破綻した DNA 相同組換え修復機構とそのバックアップのために働く酵素 (PARP1) が失活するために生じると考えられている。この時、失活した BRCA 遺伝子産物に対して PARP1 阻害剤は、「合成致死性」の関係にあり、両方の機能が共に阻害されたとき、がん細胞は消滅する。

当研究室では、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いる。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 1230 個の増殖抑制効果を測定した結果、40 化合物 (3.2%) がヒットした。そのうち抗菌・抗がん薬が 70%、微小化形成阻害作用を示す化合物が 13% 含まれていた。本研究はスタートしたばかりであるが、この既知化合物のスクリーニング結果から、今後機能未知化合物のスクリーニングから検出されるヒット化合物は、抗菌・抗がん作用を有する可能性が示唆された。

2. BRCA2 タンパク質の機能解析

我々はこれまでに、膜型マトリックスメタロプロテアーゼ 1 (MT1-MMP) によって、BRCA2 タンパク質が切断 (2135 番目のアスパラギンと 2136 番目のロイシンの間) されることを明らかにし、各切断部位を特異的に認識する抗体の作成を報告してきた。切断型 BRCA2 は、N 末端側を N-BRCA2、C 末端側を C-BRCA2 と命名した。

今回我々は、野生型 BRCA2 と切断型 C-BRCA2 の細胞内のタンパク質量に注目した。野生型 BRCA2 タンパク質の発現パターンは、細胞周期で制御されて、S 期初期に最も多く発現して S 期後期から G2/M 期にかけて減少する。これに対して、C-BRCA2 タンパク質は、S 期後期から G2/M 期にかけて最も多く検出された。MT1-MMP の発現量は、細胞周期を通して大きな変動はなかった。同様に、中心体での BRCA2 の動態についても、細胞周期を通して正確に制御されている。BRCA2 は、M 期の進行に伴い中心体から消失する。このメカニズムは、これまで明らかにされていない。我々は、切断型 C-BRCA2 が S 期後期から G2/M 期にかけて多く産生されることに注目して、中心体での BRCA2 の消失は MT1-MMP の切断が関与しているのではないかと考えた。siRNA によって MT1-MMP の発現を抑制させた HeLaS3 細胞は、野生型 BRCA2 の発現量は増加し、逆に切断型 C-BRCA2 のタンパク質量は減少した。さらに、本来消失する M 期中期 (metaphase) での中心体を取巻く BRCA2 は、MT1-MMP の発現抑制によってその消失が抑制された。これらの結果から M 期の進行に伴い中心体から消失する BRCA2 は、MT1-MMP によるタンパク質分解が関与することが示唆された。

我々はこれまで、BRCA2 は、ミッドボディにおいてヒト非筋肉型ミオシン IIC と共局在し、ミオシン IIC の ATPase 活性に対する BRCA2 の効果を検討してきた。

3. 中心体複製制御に係わる BRCA2 分子内領域の決定に向けた、画像認識による中心体自動計数システムの構築

我々は近年、BRCA2 が正確な中心体複製制御に関与

することを見出した。BRCA2 は超巨大分子であり、また DNA 修復などへの関与も知られる多機能分子であることから、分子内の領域毎に機能が分担されている可能性が考えられた。BRCA2 を小断片に分割し、各断片が中心体複製に与える影響を各細胞の中心体数を計数することにより定量化する手法を着想した。従来中心体の計数は中心体蛍光染色検体を無作為に撮影し、顕微鏡写真を実験者が目で見て数える手法が採られてきた。ところが本計画のように比較対照数が数十にもなる場合、統計的に有効な結論を得るために計数せねばならない細胞数は膨大なものになる。そのため従来法に因ってでは肉体的・時間的に現実的でないだけでなく、同一の判定基準の

ハイライト

「BRCA2 によるヒト非筋肉型ミオシン IIC の ATPase 活性の増強」

ヒトミオシン II の ATPase 活性阻害剤である blebbistatin を A549 細胞に添加させると、ミッドボディを取巻く IIC リングが崩壊し、細胞質分裂時の細胞分裂が不完全に終わる。この結果からも、IIC リングの形成には、ミオシン IIC の ATPase 活性が必要である。そこで、BRCA2 がミオシン IIC の ATPase 活性にどのように関与するのかを検討した。BRCA2 とミオシン IIC の重鎖 (NMHC) は、COS7 細胞で BRCA2-FLAG、または HA-NMHC IIC を発現後、抗 FLAG 抗体、および抗 HA 抗体による免疫沈降産物から調製した。この時、HA-NMHC IIC に内在性ミオシン軽鎖の 12A と 12B isoform の結合が確認された。免疫沈降産物の HA-NMHC IIC に対して Mg^{2+} ATPase 活性を測定したところ、ATPase 活性は認められなかったが、BRCA2-FLAG を加えるとその活性が検出された。ATPase 活性は、BRCA2-FLAG の濃度依存的に強くなった。さらに、BRCA2 に結合するミオシン IIC 領域 (A1-HA) の添加は、ATPase 活性を阻害した。また、NMHC の推定 ATP

維持が非常に困難であることから、正確な測定の実現は難しかった。そこで我々はコンピューターソフトを用いた画像解析により各細胞の中心体を自動計数するシステムの構築に取り掛かった。細胞毎に異なる染色ムラやバックグラウンドを認識・除去して真に中心体と考えられる染色像のみを抽出し、不偏的基準で複製前後の中心体数を正確に計数するマクロプログラミングとパラメータ設定にはほぼ目処が立った。少数のサンプルを用いた計測性能評価の後、さらなる自動化過程を実装し、BRCA2 分子内の中心体制御責任領域を決定できる見込である。

結合部位に変異を導入させた NMHC-IIC (AA)-HA に BRCA2-FLAG を加えても ATPase 活性は検出されなかった。興味深いことに BRCA2-FLAG の添加に伴い、内在性ミオシン IIC 軽鎖のリン酸化が確認された。今回我々は、BRCA2-FLAG の免疫沈降産物からミオシン軽鎖をリン酸化する Rho 結合キナーゼ (ROCK1) を同定した。BRCA2 と ROCK1 複合体は、BRCA2 を介してミオシン IIC の重鎖 (motor domain) に結合して、その後 ROCK1 が軽鎖をリン酸化してミオシン IIC の ATPase 活性を向上させる可能性が考えられた (図 2)。これらの結果から IIC リングは、ミオシン IIC の ATPase 作用を介して形成され、その活性は、BRCA2 によって制御されていることが示唆された。

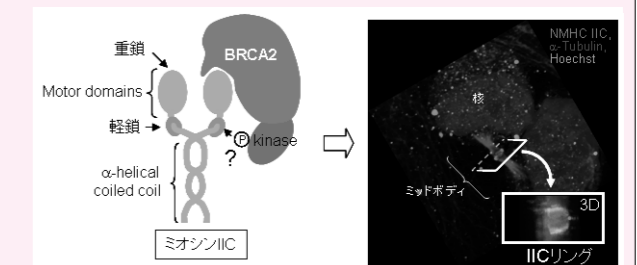


図 2 BRCA2 によるミオシン IIC の ATPase 活性増強メカニズム

業績目録

原著論文

1. 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, 443:1148-1154.
2. 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, 4:3.
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.
4. Nakamura S, Takahashi M, Tozaki M, Nakayama T, Nomizu T, Miki Y, Murakami Y, Aoki D, Iwase T, Nishimura S, et al. Prevalence and differentiation of hereditary breast and ovarian cancers in Japan. *Breast Cancer* 2013.
 5. Mimoto R, Taira N, Takahashi H, Yamaguchi T, Okabe M, Uchida K, Miki Y, Yoshida K. DYRK2 controls the epithelial-mesenchymal transition in breast cancer by degrading Snail. *Cancer Lett* 2013, 339:214-225.
 6. Low SK, Takahashi A, Ashikawa K, Inazawa J, Miki Y, Kubo M, Nakamura Y, Katagiri T,

- Genome-wide association study of breast cancer in the Japanese population. *PLoS One* 2013, 8:e76463.
7. Kawazu M, Ueno T, Kontani K, Ogita Y, Ando M, Fukumura K, Yamato A, Soda M, Takeuchi K, Miki Y, et al. Transforming mutations of RAC guanosine triphosphatases in human cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, 110:3029-3034.

主催会議

第 2 回 日本 HBOC コンソーシアム学術総会、東京都、2014 年 1 月 18 日・19 日

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. 冠動脈硬化と CDKN2A/B, ADTRP, PDGFD 遺伝子多型の関連

ゲノムワイド関連解析 (GWAS) の結果、心筋梗塞に関連する多くの感受性遺伝子/遺伝子多型が報告されるようになった。本研究は心筋梗塞への中間表現形質としての冠動脈硬化に着目し、これらの遺伝子多型との関連を調べた。GWAS で報告されている以下の8個遺伝子多

型 (SNP) を検討した: CDKN2A/B (rs1333049), ADTRP (rs6903956), PDGFD (rs974819), TCF21 (rs12190287), COL4A1-A2 (rs4773144), HHIPL1 (rs2895811), ADAMTS7 (rs4380028) and UBE2Z (rs46522)。サンプルは東京都長寿健康医療センターで行われた連続剖検例 1536 例を用いた。その結果、調べた SNP のうち CDKN2A/B ($p=0.007$ and $OR=1.843$, 95% CI 1.293- 2.629, $p=0.001$, for CC+CG vs. GG) がもっとも強い関連を示した。また ADTRP も関連を見られたが、既報の結果とリスクアレルが逆であった ($p=0.008$ and $OR=1.652$, 95% CI 1.027-2.656, $p=0.038$ for GG vs. AA+AG)。一方 PDGFD は女性において冠動脈硬化と関連がみられたが男性ではみられなかった ($p=0.023$)。

CDKN2A/B, ADTRP, PDGF の三つの遺伝子多型からリスクアレルの数と冠動脈硬化度には有意な正の相関が認められた (図1)

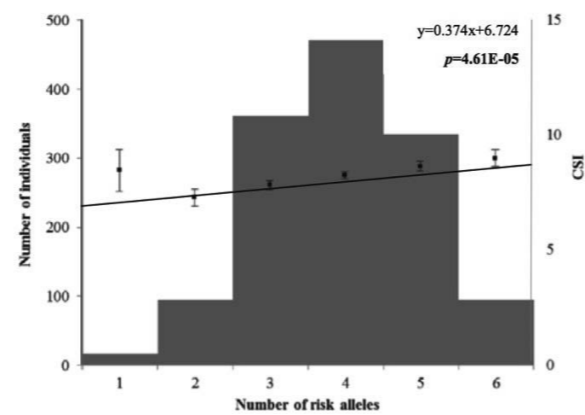


図1

以上の結果は心筋梗塞のリスク因子としての冠動脈硬化には複数の遺伝子多型の相加的効果が関与していることを示唆している。

2. ATP10D 遺伝子多型と動脈硬化の関連

ATP10D は P 型 ATPase ファミリーに属し、細胞脂質二重膜の外側から内側にリン脂質を移動させる酵素である。コーカシアン対象に行われた GWAS 研究において、ATP10D 遺伝子の遺伝子多型 (rs2351791, G/T) は血清脂質プロファイルおよび心筋梗塞と関連していることが報告された。本研究は日本人においてもこの関連が見られるかどうかを検証するために行われた。サン

ルは東京都長寿健康医療センターで行われた連続剖検例 1536 例を用いて解析した。動脈硬化度は冠動脈狭窄度 (CSI)、脳動脈硬化指数 (ICAI)、および病理的動脈硬化指数 (PAI) (八本の動脈硬化度の総和) を用いて検討した。冠動脈硬化と脳動脈硬化は rs2351791 関連していた (GG vs. GT+TT 各 $p=0.001$ 、年齢、性、高血圧、

糖尿病、HDL、飲酒喫煙で調整)。一方全身的な動脈硬化との関連は認められなかった。また血清 HDL コレステロール値は GG 型の方が GT+TT 型より低かった。

以上の結果 ATP10D 遺伝子多型は血清 HDL コレステロール値および冠動脈、脳動脈の動脈硬化と関連していることが示唆された。

人事異動

入室:前田裕子(大学院生)、藤谷啓雄(大学院生)
キン・テ・テ・ゾー(大学院生)
退室:キー・チャン・コー(大学院生)

業績目録

原著論文

1. Kengia JT, Ko KC, Ikeda S, Hiraishi A, Mieno-Naka M, Arai T, Sato N, Muramatsu M, Sawabe M. A gene variant in the Atp10d gene associates with atherosclerotic indices in Japanese elderly population. *Atherosclerosis*. 231:158-62. 2013

2. Daimon M, Sato H, Kaino W, Tada K, Takase K, Karasawa S, Wada K, Kameda W, Susa S, Oizumi T, Kayama T, Muramatsu M, Kato T. Association of the G-protein $\beta 3$ subunit gene polymorphism with the incidence of cardiovascular disease independent of hypertension: the Funagata study. *J Hum Hypertens*. 27:612-6. 2013

3. Honma N, Mori S, Zhou H, Ikeda S, Mieno MN, Tanaka N, Takubo K, Arai T, Sawabe M, Muramatsu M, Ito H. Association between estrogen receptor- β dinucleotide repeat polymorphism and incidence of femoral fracture. *J Bone Miner Metab*. 31:96-101.2013

4. Honma N, Yamamoto K, Ohnaka K, Morita M, Toyomura K, Kono S, Muramatsu M, Arai T, Ueki T, Tanaka M, Kakeji Y, Maehara Y, Okamura T, Ikejiri K, Futami K, Maekawa T, Yasunami Y, Takenaka K, Ichimiya H, Terasaka R. Estrogen receptor- β gene polymorphism and colorectal cancer risk: effect modified by body mass index and isoflavone intake. *Int J Cancer*. 132:951-8. 2013

5. Yatsuga C, Toyohisa D, Fujisawa TX, Nishitani S, Shinohara K, Matsuura N, Ikeda S, Muramatsu M, Hamada A, Tomoda A. No association between COMT genotype and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in Japanese children. *Brain Dev*. S0387-7604(13)00258-1 2013

6. Kaniwa N, Sugiyama E, Saito Y, Kurose K, Maekawa K, Hasegawa R, Furuya H, Ikeda H, Takahashi Y, Muramatsu M, Tohkin M, Ozeki T, Mushihiro T, Kubo M, Kamatani N, Abe M, Yagami A, Ueta M, Sotozono C, Kinoshita S, Ikezawa Z, Matsunaga K, Aihara M; Japan Pharmacogenomics Data Science Consortium. Specific HLA types are associated with anti-epileptic drug-induced Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in Japanese subjects. *Pharmacogenomics*. 14:1821-31. 2013

7. 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*, in press

国際学会発表

1. Htun NC, Miyaki K, Zhao C, Muramatsu M, Sato N Effects of COMT and MTHFR on normal variation of mental health in a Japanese population. *Human Genome Meeting 2013* 4.13-18, Singapore

2. Zhao C, Ikeda S, Arai T, Mieno NM, Sato N, Muramatsu M, Sawabe M. Association of the RYR3 gene polymorphisms with atherosclerosis in elderly Japanese population. *Human Genome Meeting 2013* 4.13-18, Singapore

3. Sato N "Genetic risk assessment of type 2 diabetes appropriate for individualized health care in Japan", 2nd International Conference on Translational & Personalized Medicine, 2013. 08.05-07, Chicago, USA

4. Muramatsu, M, Daimon M, Sato N. "A genomic nomogram of type 2 diabetes risk assessment for Japanese" *Human Genome The 14th International Meeting on Human Genome Variation and Complex Genome*. 2013. 9.30-10.2 Seoul, Korea

国内学会発表

1. 佐藤憲子「日本人糖尿病の複合遺伝子リスク」オミックス医療研究会「パーソナルオミックス医療の現状と未来」、2013.04.19. 東京

2. Sato N "Effects of intrauterine environment on fetal epigenome", *AsiaCORD 2013*, 2013.04.19-20. 神戸

3. 佐藤憲子「胎生初期の栄養変化による影響がマウス胎仔エピゲノムに現れるタイミング」第2回日本 DOHaD 研究会, 2013.06.07-08, 東京

4. Dechamethakun S, Ikeda S, Arai T, Sato N, Sawabe M, Muramatsu M. Association of CDKN2A/B, ADTRP, and PDGFD polymorphisms with coronary atherosclerosis in Japan". *生命医薬情報学連合大会*, 2013.10.28-31, 東京

5. Zhao C, Htun NC, Sato N, Muramatsu M. "Phasing haplotypes of HLA genes from Next Generation Sequencing data at individual level" *生命医薬情報学連合大会*, 2013.10.28-31, 東京

6. Kyaw TZ, Sato N, Muramatsu M. Exploring Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) hypothesis employing publicly available data. *生命医薬情報学連合大会*, 2013.10.28-31, 東京

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、お茶の水女子大学非常勤講師

研究費取得

1. 文部科学省科学研究費 (基盤研究 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」: 課題番号 24590399 研究代表者 佐藤憲子

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. 転写制御機構の解明

真核生物においては、3種類のRNAポリメラーゼ (I, II, III) がそれぞれリボソーム (r)RNA、メッセンジャー (m)RNA、トランスファー (t)RNAの転写を担う。これらの転写制御メカニズムには共通した部分と相互作用する部分があり、遺伝子発現と生物機能制御の理解にはより広い視野にたった研究が必須である。本分野では、PolII、PolIの遺伝子制御を中核に基本的な制御と病態との関連を研究している。

1-1 転写リサイクリング因子/Pol II CTD 脱リン酸化酵素 FCP1 の機能解析

Pol II 転写サイクルにおいて Rpb1 CTD (C-terminal domain) はリン酸化・脱リン酸化される。CTD の 7 アミノ酸のリピート配列は、転写開始とともに Ser 2,5,7, Thr4 がリン酸化されるが、転写終了後には脱リン酸化される。この可逆的 CTD 脱リン酸化の主要な因子は FCP1 であり、その部分欠損は遺伝病の原因である。我々は HeLa 細胞の FCP1 ノックダウンによって、p53-p21 が活性化され可逆性の細胞増殖の抑制が起こることを見出した。CCFDN の治療戦略を念頭に FCP1 による新しい生物機能の解明を目指している。

1-2 転写伸長因子 Elongin A の Dual 機能の解析

mRNA 合成伸長過程は、転写の最も重要な制御過程である。転写伸長因子 Elongin A は DNA damage に応答する RNA ポリメラーゼ II (Rpb1) 分解 E3 リガーゼ活性と転写伸長機能との2つの活性を持つ。これまでに Elongin A が脳神経の発生、分化に重要な機能を果たしていることを報告してきたが、本年度は DNA 傷害応答において、Elongin A が Rpb1 のユビキチン化を誘導し、かつ複数のストレス応答遺伝子の迅速な誘導に関与していることを見出した。さらに一見そう反する機能である転写伸長と Rpb1 ユビキチン化とを担うドメインが1分子内の異なった領域で担われていることを明らかにした (ハイライト1)。

2. ストレス応答転写因子 ATF3 の解析

細胞運命の決定は生体の恒常性維持とその破綻である種々の疾患病態に深く関係している。ATF/CREB ファミリーに属する b-Zip 型転写因子 ATF3 は、Immediate Early Response 遺伝子であり標的遺伝子を介して細胞運命の決定に関わっている。ATF3 は、生体応答の「ハブ機能」を果たす転写因子でありがんにおいては、「がん抑制機能」と「発がん機能」の両機能を有する。

2-1 システムバイオロジーによる ATF3 標的遺伝子の網羅的探索

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「Product inhibition」の機能を有することを報告している。我々は、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遺伝子改変マウスを作製し、DNA 傷害応答の mRNA, microRNA 網羅的遺伝子発現解析を、文科省新学術領域研究「システムがん」のもとで東大医科研宮野研究室との共同研究で進めている。

2-2 ATF3 は p53 非依存性に ER ストレス下で DR5 発現を正に制御する

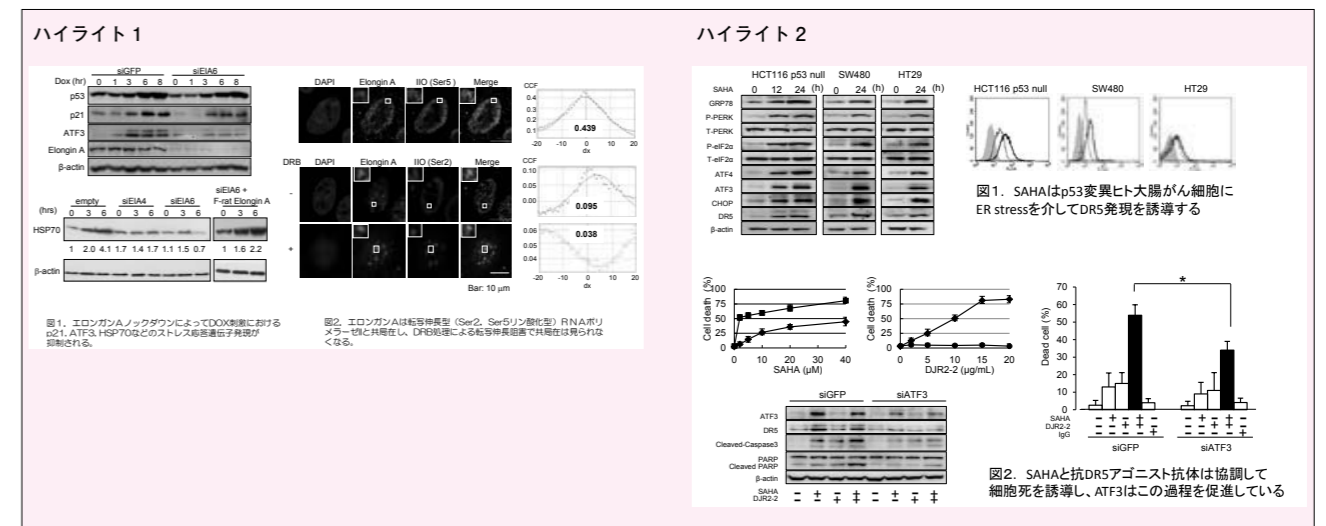
Death Receptor (DR5) は、がん細胞表面に高発現されている TNF ファミリー膜受容体であり、リガンドである TRAIL や DR5 agonist 抗体による Extrinsic な細胞

死シグナルを伝達する。この細胞死はがん細胞選択的であり TRAIL-based の細胞死は抗がん治療の新しい戦略として期待される。我々は、ヒト大腸がん細胞において、DR5 遺伝子が ATF3 結合性の標的遺伝子であること (PLoS ONE 2011)、ヒト大腸がん治療薬 Camptothecin が、p53 と ATF3 を誘導し協調的な DR5 発現をもたらすことを報告した (Oncogene 2012)。今年度は、さらに、Zerubone, Celecoxib の Natural products や、慢性皮膚リンパ腫治療薬 SAHA を含む6種のHDAC阻害剤が、DR5 遺伝子の転写を誘導し DR5 アゴニスト抗体との併用による強力に効果的ながん細胞死を誘導することを見出した (BBRC in press)。これらの作用は p53 非依存性であり、ATF3 ノックダウンや Atf3 遺伝子欠損 MEF では抑制され、小胞体ストレス (ER ストレス) 応答経路を介していた。以上、ATF3 は p53 野生型がんと変異がんの両方において、それぞれ p53 と ER ストレス下流の Pro-apoptotic 因子 CHOP と協調して DR5 発現誘導と細胞死に関わることを明らかにした。TRAIL と DR5 誘導薬との併用療法は、難治がんの新しい治療戦

略として Phase II の段階にあるが、がんの TRAIL 抵抗性はクリアすべき課題である。ATF3 の発現レベルの modulation は、TRAIL 抵抗性をクリアしさらに有効な治療薬の開発につながる可能性があるとともに、TRAIL 抵抗性を説明ないし克服するバイオマーカーとしての ATF3 の役割を明らかにする意義は高い (ハイライト2)。

3. ヒストンメチル基転移酵素 ASH1 の機能解析

ASH1 は、Hox 遺伝子の発現維持に必要とされる trithorax グループの一員で、ヒストン H3 リジン 36 を選択的にメチル化するクロマチン制御因子である。ヒト第4番染色体のレトロ反復配列 (D4Z4) の短縮に伴って発症する顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーでは、ASH1 が D4Z4 領域の転写活性化に関わることが明らかになっており、現在その分子作用機序を明らかにするために研究を進めている。ASH1 による D4Z4 の転写活性化機序が明らかになれば、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーの新しい分子治療標的となる可能性がある。



人事異動

転入：福本悟史 (本学医歯学総合研究科、北里大学)、高屋俊輔 (本学医歯学総合研究科、麻布大学)、内田洋平 (技術補佐員)、稗田麻記子 (技術補佐員)、鈴木卓也 (受入研究生、東京バイオテクノロジー専門学校)、藤沢晃久 (卒業研究生、北里大学)、新井菜月 (卒業研究生、北里大学)
転出：なし

研究業績

原著論文

- Liu J, Edagawa M, Goshima H, Inoue M, Yagita H, Liu Z, Kitajima S. 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. *BBRC* 2014 Feb 12. pii: S0006-291X(14)00228-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.01.184. [Epub ahead of print]
- Kawauchi J, Inoue M, Fukuda M, Uchida Y, Yasukawa T, Conaway RC, Conaway JW, Aso T,

Kitajima S. Transcriptional properties of Mammalian elongin A and its role in stress response. *J Biol Chem*. 2013 Aug 23;288(34):24302-15. doi: 10.1074/jbc.M113.496703. Epub 2013 Jul 3.

- Lee YS, Sasaki T, Kobayashi M, Kikuchi O, Kim HJ, Yokota-Hashimoto H, Shimpuku M, Susanti VY, Ido-Kitamura Y, Kimura K, Inoue H, Tanaka-Okamoto M, Ishizaki H, Miyoshi J, Ohya S, Tanaka Y, Kitajima S, Kitamura T. Hypothalamic ATF3 is involved in regulating glucose and energy metabolism in mice. *Diabetologia*. 2013 Jun;56(6):1383-93. doi: 10.1007/s00125-013-2879-z. Epub 2013 Mar 6.

ゲノム応用医学研究部門 ゲノム病理学分野

教授：石川俊平 助教：砂河孝行、加藤洋人

研究内容

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

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

研究紹介

がん - 間質間相互作用

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

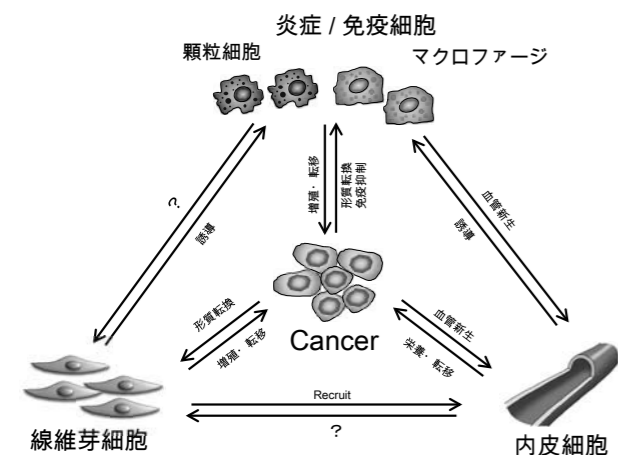


図1 がん - 間質間相互作用

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。

1. がん - 間質間相互作用のゲノミクス

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、膀胱癌移植モデルにおいてこの手法を用いて検討したところ間質から癌細胞への経路として複数の重要な相互作用シグナルを同定することができ、臨床検体や化合物を用いた動物実験においても確認することができた。このように、がん-間質インタラクトームの全体像を把握し、細胞間相互作用を狙ったバイオ医薬品などの新しい治療標的の探索を行っている。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

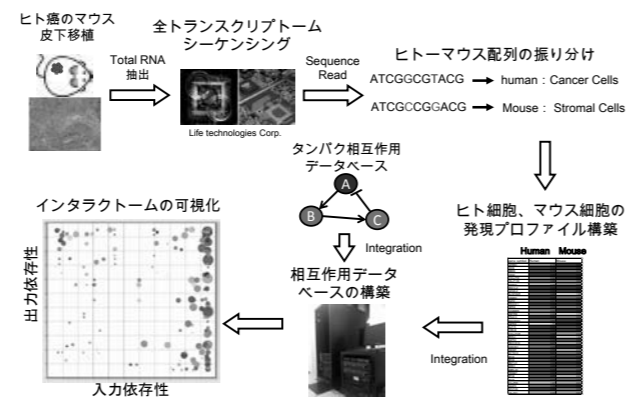


図2 がん - 間質インタラクトームの網羅的解析

の解析を行っている。

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 shRNA ライブラリーと並列型シーケンス技術を融合させることにより、腫瘍間質中におけ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いる。図3で示すようにがん細胞と線維芽細胞の共移植することで得られた腫瘍組織を解析することにより、生体内における線維芽細胞の増殖を亢進もしくは抑制する遺伝子が探索可能である。このように、がん細胞をマウスに移植することで得られる様々な「腫瘍組織」中において、

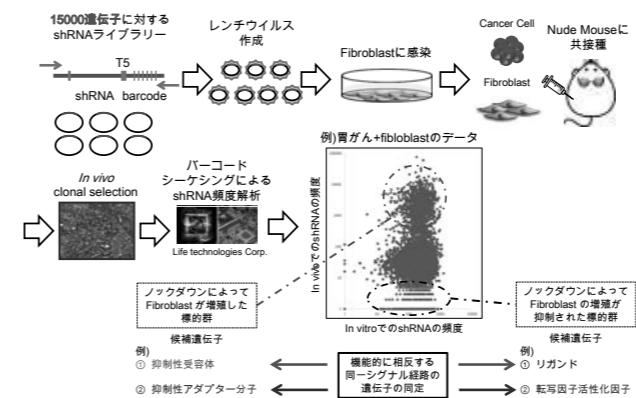


図3 Functional Genomic Screening を用いた癌間質間相互作用解析

研究業績

- Li W, **Katoh H**, Wang L, Yu X, Du Z, Yan X, Zheng P, Liu Y. FOXP3 regulates sensitivity of cancer cells to irradiation by transcriptional repression of BRCA1. *Cancer Res.* 2013 Apr 1;73(7):2170-80.
- Sato T, Kaneda A, Tsuji S, **Isagawa T**, Yamamoto S, Fujita T, Yamanaka R, Tanaka Y, Nukiwa T, Marquez VE, Ishikawa Y, Ichinose M, Aburatani H. PRC2 overexpression and PRC2-target gene repression relating to poorer prognosis in small cell lung cancer. *Sci Rep.* 2013;3:1911.
- 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.* 2013 Jun 10. [Epub ahead of print]
- Nakaya T, Kikuchi Y, Kunita A, **Ishikawa S**, Matsusaka K, Hino R, Aburatani H, Fukayama M. Enrichment of stem-like cell population comprises transformation ability of Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A for non-transformed cells. *Virus Res.* 2013 Jun;174(1-2):108-15.
- Yamamoto S, Tateishi K, Kudo Y, Yamamoto K, **Isagawa T**, Nagae G, Nakatsuka T, Asaoka Y,

- Ijichi H, Hirata Y, Otsuka M, Ikenoue T, Aburatani H, Omata M, Koike K. Histone demethylase KDM4C regulates sphere formation by mediating the cross talk between Wnt and Notch pathways in colonic cancer cells. *Carcinogenesis.* 2013 Oct;34(10):2380-8.
- Saito T, Takeda N, Amiya E, Nakao T, Abe H, Semba H, Soma K, Koyama K, Hosoya Y, Imai Y, **Isagawa T**, Watanabe M, Manabe I, Komuro I, Nagai R, Maemura K. VEGF-A induces its negative regulator, soluble form of VEGFR-1, by modulating its alternative splicing. *FEBS Lett.* 2013 Jul 11;587(14):2179-85.
 - Kon A, Shih LY, Minamino M, Sanada M, Shiraishi Y, Nagata Y, Yoshida K, Okuno Y, Bando M, Nakato R, **Ishikawa S**, Sato-Otsubo A, Nagae G, Nishimoto A, Haferlach C, Nowak D, Sato Y, Alpermann T, Nagasaki M, Shimamura T, Tanaka H, Chiba K, Yamamoto R, Yamaguchi T, Otsu M, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Nakamaki T, Ishiyama K, Nolte F, Hofmann WK, Miyawaki S, Chiba S, Mori H, Nakouchi H, Koeffler HP, Aburatani H, Haferlach T, Shirahige K, Miyano S, Ogawa S. Recurrent mutations in multiple components of the cohesin complex in myeloid neoplasms. *Nat Genet.* 2013 Oct;45(10):1232-7.
 - Fustin JM, Doi M, Yamaguchi Y, Hayashi H, Nishimura S, Yoshida M, **Isagawa T**, Suimye-Morioka M, Kakeya H, Manabe I, Okamura H. RNA-methylation-dependent RNA processing controls the speed of the circadian clock. *Cell.* 2013 Nov 7;155(4):793-806.
 - Goda S, **Isagawa T**, Chikaoka Y, Kawamura T, Aburatani H. Control of Histone H3 Lysine 9 (H3K9) Methylation State via Cooperative Two-step Demethylation by Jumonji Domain Containing 1A (JMJD1A) Homodimer. *J Biol Chem.* 2013 Dec 27;288(52):36948-56
 - 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 Jan 21. [Epub ahead of print]
 - Ichimura T, Morikawa T, Kawai T, Nakagawa T, Matsushita H, Kakimi K, Kume H, **Ishikawa S**, Homma Y, Fukayama M. Prognostic Significance of CD204-Positive Macrophages in Upper Urinary Tract Cancer. *Ann Surg Oncol.* 2014 Feb 4. [Epub ahead of print]
 - Ui T, Morishima K, Saito S, Sakuma Y, Fujii H, Hosoya Y, **Ishikawa S**, Aburatani H, Fukayama M, Niki T, Yasuda Y. The HSP90 inhibitor 17-N-allylamino-17-demethoxy geldanamycin (17-AAG) synergizes with cisplatin and induces apoptosis in cisplatin-resistant esophageal squamous cell carcinoma cell lines via the Akt/XIAP pathway. *Oncol Rep.* 2014 Feb;31(2):619-24.

どの遺伝子をノックダウンされた線維芽細胞がどのような活性を示すかを包括的に明らかにしている (Loss-of-function screening)。癌関連線維芽細胞がどのように増生しているのかについての分子メカニズムが解明され、がん間質の破綻を利用した新規がん治療標的の探索を行っている。

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。びまん性胃癌 (スキルス胃癌) においては高深度の全エクソーム解析によって、20%以上の高い頻度で somatic mutation を呈する新規遺伝子を同定した。この遺伝子は、細胞内の細胞骨格制御や細胞運動能制御、及びさまざまな分子シグナル経路に関り、びまん性胃癌の重要なドライバー遺伝子と考えられる。ゲノム病理学分野では、びまん性胃癌におけるこの新規遺伝子変異の機能解析、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く。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。

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 非常勤講師：小林 慎

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わ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

ゲノムインプリントの消去には能動的脱メチル化が必要である

哺乳類では個体発生において父親・母親由来のゲノムは異なる機能を果たしている。精子、卵子に刷込まれたこの親由来の情報 (ゲノムインプリント) は、受精卵が発生過程や生まれた子供の体細胞の中では一生維持される。しかし、次の世代に伝える際には、始原生殖細胞 (PGC) の中で一度完全に消去され、再度、生殖細胞系列で再刷込みをうける (図 1)。ゲノムインプリントはインプリント遺伝子の作る遺伝子クラスター全体の遺伝子発現調節領域 (Differentially methylated region) 配列における雌雄ゲノムの DNA メチル化の違いとして記憶されている。哺乳類の発生過程ではこのようなゲノムワイドな DNA メチル化の消去

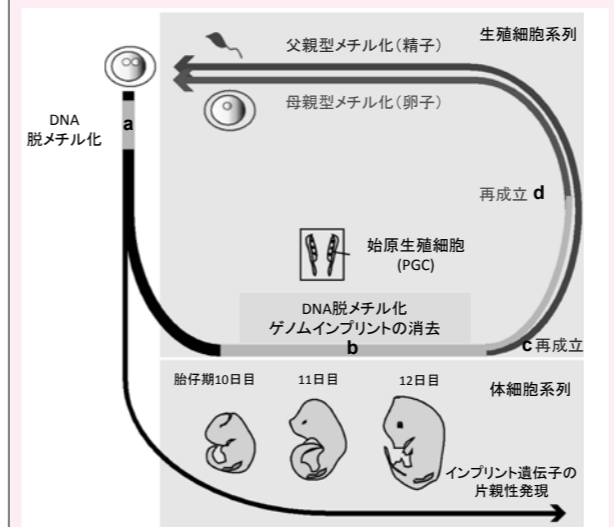


図 1 哺乳類の生活環におけるゲノムインプリントのリプログラミングゲノムワイドの脱メチル化は、受精直後の受精卵 (a) と生殖細胞系列の PGC の中で起きる (b)。精子、卵子に刷込まれたゲノムインプリント (c, d) (赤と青の細線) は合わさって体細胞系列で一生維持され (黒線)、a では耐性を示すため残る。PGC は体細胞と同じゲノムインプリントを持ち (太い黒線)、将来の生殖巣 (卵巣や精巣) である生殖隆起に定住する前後でのみ消去される (b)。

が、受精直後から着床までの初期発生過程においてもみられる (図 1)。この DNA 脱メチル化の機構には細胞分裂 (DNA 複製) に伴って希釈されるタイプの受動的脱メチル化と細胞分裂に依存しない能動的脱メチル化が存在する。受精直後の卵子由来の雌性前核は受動的脱メチル化を受ける。雄性前核と PGC の脱メチル化機構は 2010 年位までは能動的脱メチル化の代表例と考えられていたが、前者は急激なヒドロキシメチル化を受けたのち受動的脱メチル化を受けることが明らかになっている。PGC については受動的機構を示唆する状況証拠が報告されていたが、私たちのグループはマウス個体を用いた実験で、細胞複製を阻害剤で止めた状況でも胎仔中の PGC の脱メチル化が進むことから、これが塩基除去修復を介する経路で行なわれることを初めて明らかにした (Sci Rep in press)。卵子ではゲノムインプリントの消去から減数分裂までの期間が短いため、能動的脱メチル化機構は完全なリプログラミング (消去・再成立) のために必須であると考えられる (図 2)。

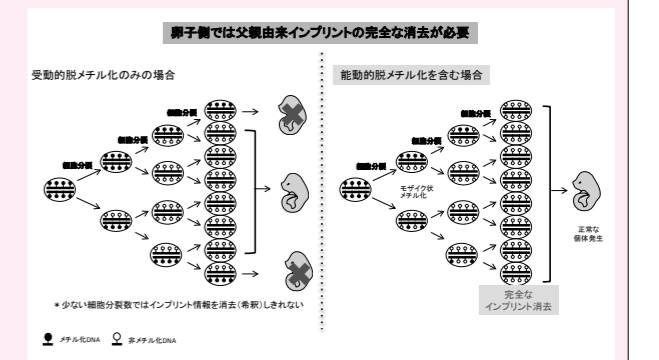


図 2 卵子における完全なゲノムインプリント消去の重要性メスの PGC ではゲノムインプリントの消去開始から減数分裂の開始までの細胞分裂の回数は限られる。受動的脱メチル化だけでは幾つかの卵細胞にメチル化 DNA が残り (細胞分裂 3 回ならば 2/8、4 回ならば 2/16)、特に、父親型インプリントが残る場合は発生異常の原因となると考える。その意味で能動的脱メチル化はゲノムインプリントの完全な消去に必須の機構です。

業績目録

原著論文

- Kohda T and Ishino F. Embryo manipulation via assisted reproductive technology and epigenetic asymmetry in mammalian early development. (Review) *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 368(1609):20120353 (2013).
- Wakayama S, Kohda T, Obokata H, Tokoro M, Li C, Terashita Y, Mizutani E, Nguyen VT, Kishigami S, Ishino F and Wakayama T. Successful serial recloning in the mouse over multiple generations. *Cell Stem Cell* 12(3), 293-297 (2013).

- Oikawa M, Matoba S, Inoue K, Kamimura S, Hirose M, Ogonuki N, Shiura H, Sugimoto M, Abe K, Ishino F and Ogura A. RNAi-mediated Knockdown of Xist Does Not Rescue the Impaired Development of Female Cloned Mouse Embryos. *J Reprod Dev* 59(3), 231-237 (2013).
- Iwasaki S, Suzuki S, Clark H, Ono R, Shaw G, Renfree MB, Kaneko-Ishino T and Ishino F. Identification of novel *PNMA-MSI* in marsupials suggests LTR retrotransposon-derived *PNMA* genes differently expanded in marsupials and eutherians. *DNA Res* 20(5), 425-436 (2013).
- Nishimoto M, Katano M, Yamagishi T, Hishida T, Kamon M, Nabeshima Y, Nabeshima Y, Katsura Y, Satta Y, Deakin JE, Graves JAM,

- Kuroki Y, Ono R, Ishino, F, Okazaki Y, Kato H and Okuda A. *In vivo* function and evolution of the eutherian-specific pluripotency marker *UTF1*. *PLoS One* 8(7):e68119 (2013).
- Kobayashi S, Totoki Y, Soma M, Matsumoto K, Fujihara Y, Toyoda A, Sakaki Y, Okabe M and Ishino F. Identification of an imprinted gene cluster in the X-inactivation center. *PLoS One* 8(8):e71222 (2013).
- 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* (in press).

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：茂櫛 薫、森岡勝樹

研究内容

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マを掲げ、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。

研究紹介

ハイライト

「アルツハイマー病におけるタンパク質間相互作用ネットワーク解析」

近年開発されているアルツハイマー病（AD）根本治療薬の多くは効果が見られていない。その理由の一つとして既知のタンパクに加え様々な生体分子が複雑に絡み合っていることが示唆され、それら生体分子の関係は疾患の進行とともにダイナミックに変化すると考えられる。本研究では AD のステージとして用いられる Braak stage の進行とともに、細胞内のタンパク質間相互作用ネットワークがどのように変動するか

を解明するために、各 Braak stage ごとの AD 患者死後脳から採取した 3 つの脳部位（嗅内皮質、海馬、上前頭回）のマイクロアレイデータとヒトタンパク質間相互作用データを組み合わせ、解析を行った。その結果、AD 初期に影響を受ける嗅内皮質では正常な老化に比べ AD の進行とともにネットワークが顕著に崩壊していくことが分かった（図 1）。さらに、ネットワークの崩壊に寄与する責任分子の一つとして脱ユビキチン化酵素 UCHL5 を同定した。

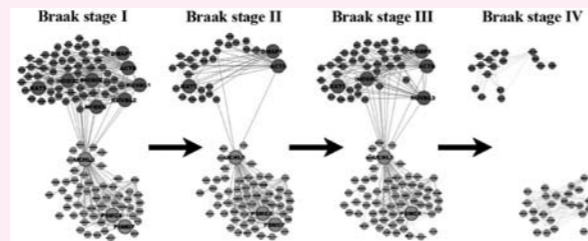


図 1 嗅内皮質における Braak stage の進行に伴ったネットワーク崩壊。ダークグレーのノードはヒストンアセチルトランスフェラーゼ関連モジュールに属するタンパク質を、ライトグレーのノードはプロテアソーム関連モジュールに属するタンパク質を示す。Braak stage の進行とともにモジュールを構成するタンパク質が消えていき、Braak stage IV では UCHL5 の消失に伴い、2 つのモジュールの間の連携が失われることが観察された。

1. オミックス解析による疾患メカニズムの解明と臨床応用

近年の生命科学研究における解析技術の発展にともない、ゲノム・トランスクリプトーム・プロテオームなどの網羅的な分子生物学的データ、すなわちオミックスデータが比較的簡便に得られるようになった。これらの膨大な情報から有用な知見を引き出すためには、生物学的・医学的知識はもちろんのこと、データマイニングや統計学的手法、機械学習などといった情報科学的アプローチ（バイオインフォマティクス）が必須である。我々は、学内外の診療各科や研究施設との共同研究を行っており、主に (1) 肝細胞癌の予後予測マーカー探索、(2) 大腸癌における遠隔転移再発の予測マーカー探索、(3) 慢性閉塞性肺疾患の新薬開発に向けたドラッグリポジショニング研究など、オミックスデータとバイオインフォマティクスを機軸として多岐に渡る研究を進めている。

2. 蛋白質間相互作用ネットワークのモジュール構造に着目した薬剤ターゲット分子の探索

網羅的なタンパク質間相互作用ネットワークの情報は、薬剤の作用機序の調査などにおいて、システムの視点からの理解を助ける重要なリソースとなっている。蛋白質間相互作用ネットワークはモジュール構造を持ち、モジュール内のタンパク質は関連性が強くお互いに似た機能を有することが知られている。今回、我々は、人の蛋白質間相互作用ネットワークにおいて複数のモジュールを同定し、それぞれのモジュールがどのような薬剤の

implication. *Hepatology*, 58(1):218-28.

人事異動

転入：森岡勝樹（助教）
転出：新村芳人（准教授）

研究業績

原著論文

1. Kikuchi, M., Ogishima, S., Miyamoto, T., Miyashita, A., Kuwano, R., Nakaya, R., Tanaka, H. (2013). Identification of Unstable Network Modules Reveals Disease Modules Associated with the Progression of Alzheimer's Disease. *PLoS ONE*, DOI: 10.1371/journal.pone.0076162.
2. Tanaka, Y., Nogata, H., Tanaka, H. (2013). Effect of Music upon Awakening from Nap. *Biomedical Soft Computing and Human Sciences*, 18(2):29-37.
3. Tanaka, K., Ishihara, T., Sugizaki, T., Kobayashi, D., Yamashita, Y., Tahara, K., Yamakawa, N., Iijima, K., Mogushi, K., Tanaka, H., Sato, K., Suzuki, H., Mizushima, T. (2013). Mepenzolate bromide displays beneficial effects in a mouse model of chronic obstructive pulmonary disease. *Nature Communications*, 4:2686.
4. Mogushi, K., Tanaka, H. (2013). PathAct: a novel method for pathway analysis using gene expression profiles. *Bioinformatics*, 9(8):394-400.
5. Ogishima, S., Mizuno, S., Kikuchi, M., Miyashita, A., Kuwano, R., Tanaka, H., Nakaya, J. (2013). A Map of Alzheimer's Disease-Signaling Pathways: A Hope for Drug Target Discovery. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 93(5):399-401.
6. Muramatsu, S., Tanaka, S., Mogushi, K., Adikrisna, R., Aihara, A., Ban, D., Ochiai, T., Irie, T., Kudo, A., Nakamura, N., Nakayama, K., Tanaka, H., Yamaoka, S., Arai, S. (2013). Visualization of stem cell features in human hepatocellular carcinoma enlightened in vivo significance of tumor-host interaction and clinical
7. Takahashi, M., Obayashi, M., Ishiguro, T., Sato, N., Niimi, Y., Ozaki, K., Mogushi, K., Mahmut, Y., Tanaka, H., Tsuruta, F., Dolmetsch, R., Yamada, M., Takahashi, H., Kato, T., Mori, O., Eishi, Y., Mizusawa, H., Ishikawa, K. (2013). Cytoplasmic Location of alpha1A Voltage-Gated Calcium Channel C-Terminal Fragment (Cav2.1-CTF) Aggregate Is Sufficient to Cause Cell Death. *PLoS ONE*, 8(3):e50121.
8. Rotkrue, P., Shimada, S., Mogushi, K., Akiyama, Y., Tanaka, H., Yuasa, Y. (2013). Circulating microRNAs as biomarkers for early detection of diffuse-type gastric cancer using a mouse model. *British Journal of Cancer*, 108(4):932-40.
9. Sato, K., Tanaka, S., Mitsunori, Y., Mogushi, K., Yasen, M., Aihara, A., Ban, D., Ochiai, T., Irie, T., Kudo, A., Nakamura, N., Tanaka, H., Arai, S. (2013). Contrast-enhanced intraoperative ultrasonography for vascular imaging of hepatocellular carcinoma: clinical and biological significance. *Hepatology*, 57(4):1436-47.
10. Mayinuer, A., Yasen, M., Mogushi, K., Obulhasim, G., Xieraili, M., Aihara, A., Tanaka, S., Mizushima, H., Tanaka, H., Arai, S. (2013). Upregulation of Protein Tyrosine Phosphatase type IVA member 3 (PTP4A3/PRL-3) Associated with tumor differentiation and a poor prognosis in human hepatocellular carcinoma. *Annals of Surgical Oncology*, 20:305-17.
11. Sumino, J., Uzawa, N., Okada, N., Miyaguchi, K., Mogushi, K., Takahashi, K.I., Sato, H., Michikawa, C., Nakata, Y., Tanaka, H., Amagasa, T. (2013). Gene expression changes in initiation and progression of oral squamous cell carcinomas revealed by laser microdissection and oligonucleotide microarray analysis. *International Journal of Cancer*, 132(3):540-8.
12. Kikuchi, A., Ishikawa, T., Mogushi, K., Ishiguro, M., Iida, S., Mizushima, H., Uetake, H., Tanaka, H., Sugihara, K. (2013). Identification of NUCKS1 as a colorectal cancer prognostic mark-

ターゲット分子を含むのかについて、詳細な調査を行った。その結果、異なる薬剤は、異なるモジュールをターゲットにしていることを発見した。例えば、抗不安薬や、パーキンソン病に対する薬剤などは、抗がん剤とは異なるモジュールをターゲットとしている。このような、モジュールに含まれる分子や相互作用を詳細に調査することにより、それぞれの病気に対する新しい薬剤標的分子の探索や、mechanisms of action に関する研究を効率よく進めることが出来る可能性がある。

er through integrated expression and copy number analysis. *International Journal of Cancer*, 132(10):2295-302.

13. Obulhasim, G., Yasen, M., Kajino, K., Mogushi, K., Tanaka, S., Mizushima, H., Tanaka, H., Arai, S., Hino, O. (2013). Up-regulation of dbpA mRNA in hepatocellular carcinoma associated with metabolic syndrome. *Hepatology International*, 7:215-25.
14. Kudo, A., Mogushi, K., Takayama, T., Matsumura, S., Ban, D., Irie, T., Ochiai, T., Nakamura, N., Tanaka, H., Anzai, N., Sakamoto, M., Tanaka, S., Arai, S. (2013). Mitochondrial metabolism in the noncancerous liver determine the occurrence of hepatocellular carcinoma: a prospective study. *Journal of Gastroenterology*, Doi: 10.1007/s00535-013-0791-4.
15. Wang, Z., Pascual-Anaya, J., Zadissa, A., Li, W., Niimura, Y., ..., Zhang, G., Irie, N. (2013). The draft genomes of soft-shell turtle and green sea turtle yield insights into the development and evolution of the turtle-specific body plan. *Nat Genet*, 45: 701-706.
16. Matsumae H, Hamada M, Fujie M, Niimura Y, Tanaka H, Kawashima T. (2013). A methodical microarray design enables surveying of expression of a broader range of genes in *Ciona intestinalis*. *Gene* 519: 82-90.

総説

1. 田中博：がんの転移と創薬のシステム分子医学、*シュミレーション*、Vol.32、No.2、106-111、2013
2. 田中博：病院完結型から地域包括ケアを前提とした新しい医療 IT 連携へ、*Doctor's Career Monthly*、リクルート、8-9、2013
3. Niimura Y. (2013). Identification of chemosensory receptor genes from vertebrate genomes. *Methods Mol Biol*. 1068: 95-105.
4. Niimura Y. (2013). Identification of olfactory receptor genes from Mammalian genome sequences. *Methods Mol Biol*. 1003: 39-49.

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ので酸素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。

研究紹介

1. ミトコンドリア膜間部 (intermembrane space) への procaspase-9 インポートの試み

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 (pro-casp-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 pro-casp-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。

2. 扁平上皮癌細胞の p63 による制御

癌抑制遺伝子 *p53* ファミリーは *p53* (公式名 *TP53*)、*p63* (*TP63*)、*p73* (*TP73*) の 3 つの遺伝子で構成され、それらから産生されるタンパク質は、(1) アミノ酸配列・ドメイン構造、(2) 共通の標的ヌクレオチド配列に結合して遺伝子発現を活性化する、など類似した性質を持っている。しかしながら p63 はがん抑制タンパク質として機能するよりは、むしろ胚発生において外胚葉性上皮組織や関連する腺組織の形成に不可欠であることが明らかにされている。がん細胞株やがん組織においては、頭頸部などの扁平上皮がん、基底細胞がん、乳腺上皮がんなどで、非常に高頻度に正常型 p63 が高レベル発現しているが、発現促進の分子機構や、がん細胞の核内に多量に存在している p63 タンパク質の機能についての確かな知見はない。そこで、p63 が扁平上皮癌の発症と経過にどのような機能を果たしているかを明らかにすることを目的として研究を行っている。

p63 による Wnt シグナル標的遺伝子発現の活性化

p63 (TP63) は p53 ファミリーの遺伝子で、ケラチノサイト幹細胞で発現し、細胞増殖能の維持や分化の制御に重要である。また、口腔、皮膚、乳腺に由来するがんを高発現し、細胞の腫瘍化にも深く関係している。扁平上皮がん細胞 FaDu で p63 をノックダウンし、遺伝子発現プロファイルを解析したところ、CCND2 (cyclin D2)、SNAI2/SLUG、DKK3 を含む Wnt シグナル標的遺伝子の発現低下が見られ、RT-PCR などで確認された。Wnt response element (WRE) 配列によるルシフェラーゼ遺伝子レポーター・アッセイで、扁平上皮がん

最も優勢に発現している Δ Np63a アイソフォームが TCF4 と β カテニン存在下で強く発現誘導した。 Δ Np63a は GSK-3 β の脱リン酸化酵素である protein phosphatase 2A (PP2A) の制御因子 B56a (PPP2R5A) と結合することが報告されており (Patturajan M, Cancer Cell. 2002;1(4):369-79)、実際 PP2A で免疫沈降すると B56a と Δ Np63a が共沈した。しかし、細胞質と核内での PP2A の活性は p63 ノックダウンにより影響を受けず、GSK-3 β のリン酸化も、 β カテニンの核移行も、変化しなかった。すでに報告されているように (Drewelus I, Cell Cycle. 2010;9(3):580-87) 核抽出液から免疫沈降すると Δ Np63a は TCF4 と結合していたが、 β カテニンと Δ Np63a の結合は検出されなかった。さらに ChIP 解析によっても LEF/TCF- β catenin 複合体と p63 が直接関係する結果を得ることは出来なかった。以上より p63

は TCF/LEF 抑制因子 (Groucho 等) をブロックして活性化する可能性が高いものと考えられた。

3. 肺障害における遠隔臓器障害機能の解明

ARDS (Acute respiratory distress syndrome) は肺炎・敗血症などにより引き起こされる重篤な症状である。この際腎などの遠隔臓器に肺と同様の重篤な障害をもたらす場合のあることが知られている。本研究では、LPS などによりラットに起こした ARDS の腎への影響が PARP (poly polymerase) により抑制され、肺一腎間の悪性化のクロストークを抑制することを突き止めた。この成果は肺炎・敗血症における ARDS 治療の進展に寄与するものと考えられる。

業績

原著

1. Khin M, Hnin S, Mitaka C. (途中5名省略) Kurata S, Tomita Inhibition of poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase attenuates lung-kidneycrosstalk induced by intratracheal lipopolysaccharide instillation in rats Respiratory research. 2013 14 126-134

2. Miniwan T, Mitaka C (途中5名省略) Kurata S, Tomita M. Atrial natriuretic peptide attenuates kidney-lung crosstalk in kidney injury. Journal of surgical research 2013 186 217-225

3. Katoh I and Kurata S. Association of endogenous retroviruses and long terminal repeats with human disorders. Frontiers in oncology 11 (3)234-237 (依頼原稿・総説)

学会

1. Detection of the import of procaspase-9 into the mitochondrial intermembrane space Iyoko Katoh, Nahoko Fukunishi, Shun-ichi Kurata 第86回日本生化学会 横浜 9月

2. A novel mechanism of Wnt/beta-catenin signal activation by p63 Iyoko Katoh, Nahoko Fukunishi, Ryu-ichiro Hata

Shun-ichi Kurata
第72回日本痛学会学術総会 横浜 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：木村まり子

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を生成することが明らかになっている。したがって、転写後プロセシングの制御は、特に多細胞生物にとって、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。

研究紹介

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

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

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

駆体の運命決定に重要なイントロン除去の順序を明らかにした(Genes Dev, 2008; Nat Protoc, 2010)。(3) 線虫の2種類のコフィリンをコードする *unc-60* 遺伝子の筋特異的な mRNA プロセシングパターンの切り替えを SUP-12 と ASD-2 が協働して制御することを見出した(PLoS Genet, 2012)。(4) 線虫の V-ATPase の α サブユニットをコードする *unc-32* 遺伝子の2組の相互排他的エクソンが組織特異的に選択されることを示し(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)。

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ミニ遺伝子

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できることを確認している。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見出している。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。

人事異動・研究室改称

2013年2月、飯塚舞(医学部保健衛生学科検査技術学専攻)が卒業研究生として研究に参加(～9月)
3月、木村まり子特任助教が退職
8月、永森千寿子と濱みなみ(医学部保健衛生学科検査技術学専攻)が研究に参加(～9月)
9月、Nguyen Bao NGOC が博士(生命情報科学)の学位を授与された
10月、プロジェクト研究室(遺伝子発現制御研究室)からフロンティア研究室(遺伝子発現制御学)に改称

業績目録

原著論文

- Kuroyanagi H, Watanabe Y, Hagiwara M. CELF family RNA-binding protein UNC-75 regulates two sets of mutually exclusive exons of the *unc-32* gene in neuron-specific manners in *Caenorhabditis elegans*. PLoS Genetics. 9: e1003337, 2013.
- Kuroyanagi H, Watanabe Y, Suzuki Y, Hagiwara M. Position-dependent and neuron-specific splicing regulation by the CELF family RNA-binding protein UNC-75 in *Caenorhabditis elegans*. Nucleic Acids Research. 41: 4015-4025, 2013.
- Iwasa H, Maimaiti S, Kuroyanagi H, Kawano S, Inami T, Ikeda M, Nakagawa K, Hata Y. Yes-associated protein homolog, YAP-1, is involved in the thermotolerance and aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Experimental

- Cell Research. 319: 931-945, 2013.
- Iwasa H, Kuroyanagi H, Maimaiti S, Ikeda M, Nakagawa K, Hata Y. Characterization of RSF-1, the *Caenorhabditis elegans* homolog of the Ras-association domain family protein 1. Experimental Cell Research. 319: 1-11, 2013.

総説等

- 木村まり子, 黒柳秀人. New Technology 選択的スプライシング可視化システム. Medical Science Digest 39: 502-503, 2013.
- Hidehito Kuroyanagi. Switch-like regulation of tissue-specific alternative pre-mRNA processing patterns revealed by customized fluorescence reporters. Worm 2: e23834, 2013.

招待講演

- 黒柳秀人. mRNA前駆体の選択的プロセシングパターンを可視化して解析する. 日本農芸化学会中部支部第169回例会若手シンポジウム. 岐阜大学サテライトキャンパス, 岐阜市. 2013年11月.
- 黒柳秀人. 蛍光タンパク質レポーターを用いた mRNA 前駆体の転写後プロセシング制御機構の遺伝学的解析. 日本遺伝学会第85回大会. 慶應義塾大学日吉キャンパス, 横浜市. 2013年9月.
- Hidehito Kuroyanagi. Regulation of tissue-specific alternative splicing by the RBFOX family. Harvard FAS Center for Systems Biology, Cambridge, MA, USA, 2013年8月.
- Hidehito Kuroyanagi. Genetic analyses of alternative splicing regulation in *C. elegans*. University of California, Los Angeles, CA, USA, 2013年6月.

国際学会発表

- Hidehito Kuroyanagi, Marina Togo, Yohei Watanabe, Motoki Hoshina, Yutaka Suzuki and Masatoshi Hagiwara. Multi-domain protein LST-3 regulates pre-mRNA transcription and alternative splicing in *C. elegans*. CSHL Meeting on Eukaryotic mRNA Processing. Cold Spring Harbor, NY, USA, 2013年8月.
- Satomi Takei, Hidehito Kuroyanagi. Ribosomal Protein L1 regulates alternative splicing of its own pre-mRNA. 19th International *C. elegans* Meeting. UCLA, Los Angeles, CA, USA, 2013年6月.

教育活動

黒柳秀人: 大学院医歯学総合研究科, 医学部保健衛生学科

競争的研究費

黒柳秀人(代表). 新学術領域研究「RNA制御学」計画研究「生体における組織特異的選択的スプライシング制御機構の解明」.
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). 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」.



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。

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：堀川三郎

虚血再灌流障害の発症機序とそれに対する生体防御機構の解明

臓器移植や腫瘍摘出などの臓器切除に伴う血流の遮断（虚血）、そして再開（再灌流）は組織に障害を引き起こすことが知られている。これが虚血再灌流障害であり、虚血時の障害をさらに悪化させる。この原因については、急激な血流の再開に伴う酸化ストレスや種々のサイトカインの関与が示唆されている。我々は、虚血再灌流に起因する組織障害とそれに対する生体防御機構を解明し、関連する疾患の治療成績の向上ならびに予防に貢献することを目標としている。

1. 肝臓の虚血再灌流障害の防御

成人間生体肝移植において、移植後の肝機能不全の主な原因に虚血再灌流障害がある。これはドナーからの摘出肝がレシピエントに移植されるまでの間、虚血の状態に保存され、移植後に血流を再開するために起こる不可避の障害である。移植を受けた患者の予後のため、肝虚血再灌流障害の防御・軽減は臨床的に重要な課題である。脾臓は肝臓に近接した臓器で、脾臓からの血液は門脈を介して肝臓に流入する。さらに、脾臓で産生される様々な因子が肝臓の機能に関与していることが示唆されている。我々は脾臓を摘出しておくことで、肝臓の虚血再灌流障害が軽減することを明らかにした。しかし、脾臓摘出の長期に亘る影響は未解決な点が多い。そこで、我々は脾動脈を部分的に結紮し、肝虚血再灌流障害への影響を検討した。虚血再灌流障害は肝臓の左葉と中葉に入る肝動脈、門脈、胆管をクリップで遮断し、その後再開灌流することで誘導した。前もって脾動脈を部分結紮しておくことで、肝障害が顕著に抑制されることを生化学的および組織学的に解析し、明らかにした。現在、虚血再灌流障害を被った肝部分切除後の残余肝における肝再生機構について、脾動脈結紮や脾臓摘出、および種々の薬物を用いてメカニズムを詳細に検討している。また、脂肪肝における虚血・再灌流障害についても併せて検討している。

2. 小腸虚血再灌流に起因する急性肺障害の防御

小腸の移植手術や部分切除時における小腸虚血、その

後の再灌流の結果、小腸自身の虚血再灌流障害に加え、遠隔臓器である肺に急性の障害が生じることがある。小腸の虚血再灌流に起因する急性の肺障害は高い致死率を引き起こすことが知られている。この急性肺障害の主な原因のひとつに、小腸での再灌流に伴って発生するフリーラジカルや炎症性サイトカインの関与が示唆されているが、その詳細は明らかではない。我々はラットを用い、小腸に長時間の虚血をおこない、再灌流後の小腸および肺の組織を生化学的および組織学的に解析し、さらに種々の薬剤を投与してその効果を検討することで急性肺障害の発症メカニズムを解明して、予防や治療方法を見出すことを目的に研究を行っている。

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により、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 EugeneBraunwald, 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元素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: immuno-chromato-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。

業績目録

英文原著

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-moculated sounds

- (5) ROS 生成メディエーターとして作用する微量元素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

言語機能のようにヒトの脳皮質に左右差があることはよく知られているが、他の機能や他の動物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野において、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、その周波数変化速度を変えた時に一次聴覚皮質の応答を記録することにより、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脳皮質から FM 音の応答を記録した。刺激には、0.5kHz - 16.5kHz の FM 音を用い、持続時間を 16-400ms の間で変化させた。実時間オプティカルイメージング法のために、蛍光性電位感受性色素である RH795 を用いて染色した後、左右の一次聴覚野 (AI 野) から記録を行った。

周波数変化の遅い (0.04-0.25kHz/ms) 変化速度を持つ上昇 FM 音を与えると、FM 音の初めの周波数に対応する等周波数帯の背側領域から応答が現れ、FM 音に応じた周波数帯を横切る形で応答が続いた。周波数変化の速い (0.5-1kHz/ms) FM 音の場合は、遅い場合と同様に初期応答は背側領域に現れたが、より周波数の高い等周波数帯に移動した。このような応答は、左の聴覚皮質でよく観察された。右の聴覚皮質では、初期応答に続く応答の現れる部位は、FM 音の周波数には依存しなかった。

in the left and right primary auditory cortex of guinea pigs observed by optical recording. J Physiol Sci, Vol. 63, Suppl. 1, S164 (2013).

大学院教育研究支援実験施設

I. ゲノム解析室

助教：谷本 幸介

技術補佐員：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（研究支援研究員）：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7～8万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ラボの管理も行っている。

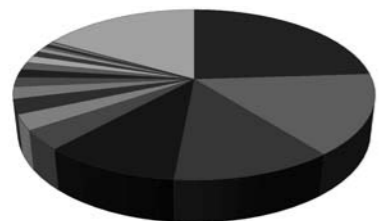
以下は、2013年の実績である。

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

DNA 受託シーケンスサービスのサンプル依頼数(68,470件)及び延べ利用人数(3,371名)は、ほぼ例年並みである。難研外からの依頼数も多く、依頼件数1,126、依頼サンプル数11,493となり、全体の2割を占めている。

昨年より次世代シーケンサ (Ion Torrent PGM) が共通機器として導入されており、ゲノム解析室はオペ

分野別DNAシーケンス依頼内訳



- 分子病態学
- 分子細胞遺伝学
- エピジェネティクス
- 生体情報薬理学
- 分子内分泌代謝学
- 分子神経科学
- 病態細胞生物学
- 発生再生生物学
- 免疫疾患学

レーション支援を行い、本年の稼働実績は84ランだった。また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、17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解析をし、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

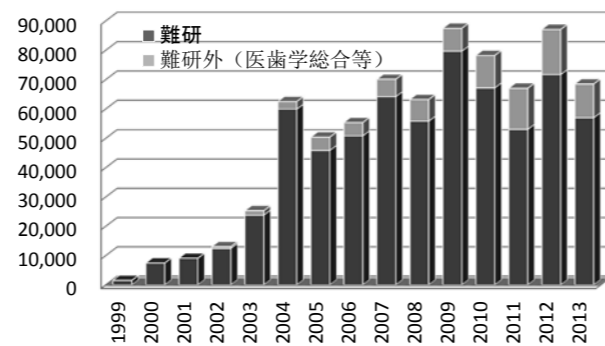
DNA シーケンサー 3130xl 2台、次世代シーケンサー Ion torrent PGM、PCR 5台、フローサイトメーター、発光プレートリーダー、製氷器、ユニバーサルテーブルトップ遠心機、Ion OneTouch システム、Covaris shearing equipment、バイオアナライザーを設置し、利用者の便に供している。

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。

- 5/21 発光プレートリーダー講習会 (ベルトールド・ジャパン)
- 6/6 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)
- 7/10 フラグメント解析講習会 (ライフテクノロジー・ジャパン)
- 7/25 Ion torrent PGM 受託解析説明会 (ゲノム解析室)
- 12/20 Ion torrent PGM 講習会 (ライフテクノロジー・ジャパン)

年別DNAシーケンスサンプル依頼数

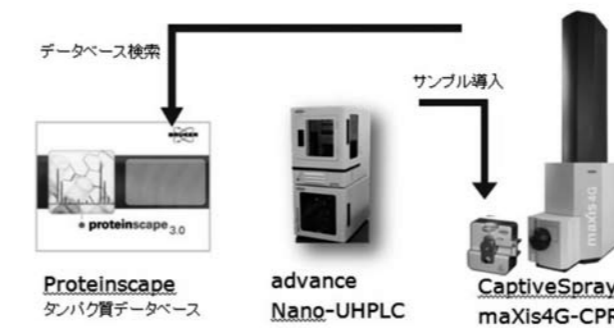


II. 細胞・プロテオーム解析室

技術専門職員：名和眞希子

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：木崎 未央

技能補佐員（研究支援推進員）：遠藤 由加

技能補佐員：中村麻衣子

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7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）：孫 黎明

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、スピント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を常備している。今年度は、新たにX線照射装置を一台導入した。また、免疫蛍光染色などの定量測定を可能にする為に、画像解析ソフトIMARISを導入した。

<<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るべく活動している。その運営は、幹細胞支援室運営委員会により審議を重ねつつ、難研教授会の協力を得ながら行っている。管理スタッフは技術専門職員1名が管理業務全般を、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（ベックマンコーンター）

高速セルソーター MoFlo XDP（ベックマンコーンター）

共焦点レーザー顕微鏡タイムラプス撮影システム FV10i-w（オリンパス）

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

受託サービスの料金やルールについて、利用実績を元に運営委員会にて協議を重ね、難研教授会の承認を得て決定し、2013年8月1日より高速セルソーター MoFlo

による受託サービスを開始した。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. 2013年の供用実績

前年に引き続き7月までは主として所内研究者に向けて利用案内と機器およびサービスの供用を行った。8月1日以降は、学内他部局および機器によっては学外の研究者も利用可能となった。機器の利用、受託サービスの利用、講習会の開催などの案内は、主にホームページにて行った。講習会は、セルソーターについては、オペレーターによる受託がスタートしたので、研究者自身でのソーティングのための新たな講習会を受けるより受託サービスを利用することを勧めているので、開催していない。共焦点レーザー顕微鏡については4回の講習会を開催し、うち2回は希望者多数のため2から3分割して繰り返し開催にて実施した。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る。

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、適正な倫理的配慮のもとで収集された培養細胞株、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設置され、以下のような活動を行っている。

細胞株寄託業務は、汎用性の高い有用な細胞株を、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（2001年制定）に従い収集、保存している。保存細胞株の分譲も実施している。また、細胞株の安全、適切な保管維持を目指し、マイコプラズマ汚染検査をPCR法で実施している。本検査は外部機関からも受託している。B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講習会を開催している。また血清共同購入の窓口業務を実施している。

本年度は細胞株分譲業務を拡大し、本学内及び外部研究者が利用できる分譲体制を産学連携推進本部と連携して整備した。これにより外国機関への細胞株譲渡の実績を有する。

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 早 田 匡 芳
 特 任 講 師 納 富 拓 也
 特 任 助 教 Smriti Aryal A.C.
 大 学 院 生 白 川 純 平
 守 屋 秀 一
 川 崎 真 希 理
 山 田 峻 之
 林 婉 婷
 Pawaputanon na mahasarakham Chantida
 八 田 愛 理 奈
 事 務 補 佐 員 藤 原 令
 井 上 洋 子
 矢 澤 祐 奈

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 清 水 幹 容
 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
 白 寧
 柳 澤 美 智 子
 大 学 院 生 杉 本 潤 哉
 崔 万 鵬
 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
 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
 大 学 院 生 軽 部 裕 也
 李 敏
 小 泉 章 子
 張 鵬
 劉 鏈
 大 類 悠 斗
 小 島 聖 美
 五 領 田 小 百 合
 藤 塚 美 紀
 高 橋 健 太 郎
 杉 山 浩 二
 卒 研 生 伊 藤 沙 希
 林 英 里 奈
 技 術 補 佐 員 児 玉 昌 美
 安 東 朋 子
 大 西 裕 子
 大 貫 し づ 江

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 榑 康 一
 備 前 典 久
 技 術 補 佐 員 伏 見 真 好
 井 上 和 子
 大 学 院 生 Anani Maha
 須 藤 元 輝
 國 分 康 博
 Wang Wenqian
 天 野 麻 友 美
 金 子 祥 子

原 田 果 歩
 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 寺 嶋 一 夫
 卒 業 研 究 生 江 石 遥 夏

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
 特 任 講 師 中 西 祐 輔
 特 任 助 教 四 元 聡 志
 大 学 院 生 浅 野 純 平
 技 術 補 佐 員 川 村 俊 輔
 黒 田 聖 子
 始 関 紀 彰
 中 村 瑠 美 子
 事 務 補 佐 員 上 岡 寿 子

分子構造情報学分野

教 授 伊 藤 暢 聡
 准 教 授 伊 倉 貞 吉
 助 教 沼 本 修 孝
 技 術 補 佐 員 服 部 美 智 子
 大 野 麻 理 奈
 大 学 院 生 品 川 健 朗
 宮 下 ミチ香

神経病理学分野

教 授 岡 澤 均
 准 教 授 田 川 一 彦
 非 常 勤 講 師 貫 名 信 行
 内 原 俊 記
 曾 根 雅 紀
 助 教 田 村 拓 也
 特 任 助 教 笹 邊 俊 和
 吉 田 千 里
 藤 田 慶 大
 陳 西 貴
 本 間 秀 典
 谷 口 順 子
 技 術 補 佐 員 田 島 たよ子
 溝 井 千 春

宇 山 祐 子
 伊波川 貴美子
 秘 書 大 橋 麻 美
 大 学 院 生 M a o Y i n g
 近 藤 和
 内 田 成 則
 専 攻 生 Juliana Bosso 谷口

病態細胞生物学分野

教 授 清 水 重 臣
 講 師 吉 田 達 士
 特 任 講 師 辻 岡 政 経
 助 教 荒 川 聡 子
 特 任 助 教 室 橋 道 子
 本 田 真 也
 山 口 啓 史
 橋 詰 力
 申 珉 京
 秘 書 坂 口 三 美
 技 術 補 佐 員 吉 野 育 代
 辻 村 恭 子
 大 学 院 生 杉 本 夕 奈
 永 田 める菜
 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
 小 原 睦 弥
 特 別 研 究 学 生

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
 学 振 P D 宮 村 憲 央
 技 術 補 佐 員 生 江 美 佐 子
 事 務 補 佐 員 尾 高 慶 子
 大 学 院 生 山 本 誠
 野 田 英 一 郎
 内 田 好 海
 下 村 忠 範
 有 馬 誉 恵
 牧 野 麻 亞 子
 谷 真 理 子
 Y u R u o x i n g
 特 別 研 究 生 齋 藤 光 介

三 浦 良 太
 金 子 麻 倫
 濱 部 凜

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 ず る
 Soba Gomaa Ramadan Abdel Salam
 特 任 講 師 王 継 揚
 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
 大 学 院 生 唐 森
 高 田 俊 太 朗
 Ayse Ucar Konuskan
 江 崎 澄 代
 焦 旭 阳
 Aslam Mohammad
 大 学 院 研 究 生 Nazim Medzhidov
 卒 業 研 究 生 吉 岡 真 代

分子病態分野

教 授 木 村 彰 方
 准 教 授 林 丈 晴
 助 教 櫻 井 大 祐
 特 任 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
 葛 城 圭
 大 学 院 研 究 生 藍 智 彦
 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
 特 任 助 教 森 永 浩 伸
 日 本 学 術 振 興 会 特 別 研 究 員 毛 利 泰 彰
 技 術 補 佐 員 大 西 宏 規
 矢 嶋 玲 子
 竹 之 内 一 政
 事 務 補 佐 員 渡 邊 郁
 大 学 院 生 上 野 真 紀 子
 高 田 亜 紀
 大 学 院 研 究 生 劉 楠
 Sally Eshiba
 大 学 生 岡 本 桜

分子細胞遺伝学分野

教 授 稲 澤 讓 治
 准 教 授 小 崎 健 一
 助 教 井 上 純
 ゲノム解析支援室助教 谷 本 幸 介
 特 任 講 師 林 深
 学 振 博 士 研 究 員 村 松 智 輝
 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
 坂 本 宙 子
 特 別 研 究 生 永 田 啓 明
 高 橋 寛 吉
 岩 館 怜 子
 平 本 秀 一
 井 上 綾 乃
 歯 学 部 研 究 体 験 実 習 生

分子遺伝学分野

教 授 三 木 義 男
 特 任 准 教 授 中 西 啓
 特 任 講 師 長 崎 光 一
 助 教 竹 中 克 也
 特 任 助 教 宮 口 健
 大 学 院 生 Nadila Wali

Nurmaa Dashzeveg
石場俊之
加賀美裕也
手代木翔太
倉科太一
紺野真衣
清水優香

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
非常勤講師 須藤カツ子
大学院学生 佐田文宏
大学院学生 ネ・チー・トン
大学院学生 ジュネイド・バラヤン
大学院学生 平石敦子
大学院学生 趙晨希
大学院学生 サリヤ・デカメサフン
大学院学生 沢辺美亜
大学院学生 カウン・シー・トゥ
大学院学生 キン・テテ・ゾー
大学院学生 前田裕子
大学院学生 藤谷啓雄
大学院学生 平岡弓枝
大学院学生 テイ・ザ・チョウ

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
事務補佐員 高柳久仁子
技術補佐員 内田洋平
大学院学生 井上允
大学院学生 五嶋大統
大学院学生 福本悟史
大学院学生 高屋俊輔
特別研究学生 枝川真
卒業研究生 新井菜月
卒業研究生 藤沢晃久
卒業研究生 高橋拓也
卒業研究生 鈴木卓也
外国人研究者 劉嘉

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
非常勤講師 小林慎
事務補佐員 前田伊久子
大学院学生 及川真実
大学院学生 高橋沙央里
大学院学生 相馬未来
大学院学生 高木清考
大学院学生 北澤萌恵
大学院学生 松沢歩

生命情報学分野

教授 田中博
助教授 茂櫛薫
教授 森岡勝樹
特任准教授 任鳳蓉
特任助教授 長谷武志
大学院学生 飯島久美子
大学院学生 金子佳之
大学院学生 遠藤有人
大学院学生 上野英一
大学院学生 田中泰羽
大学院学生 澤井一
大学院学生 太田沙紀子
大学院学生 清水千佳子
大学院学生 鈴木麻美
大学院学生 糠谷祥子
大学院学生 長谷川浩章
大学院学生 小泉典秋
大学院学生 星昭彦
大学院学生 Aw Wanping
大学院学生 井上紀彦
大学院学生 丸山智久
大学院学生 渡邊考
大学院学生 佐竹紀彦
大学院学生 西部弘純
大学院学生 杉本京子
大学院学生 Sophia Subat
大学院学生 大久保三代
大学院学生 Asiya Hapaer
大学院学生 小出康太
大学院学生 高橋敏宏
大学院学生 萩原純也
大学院学生 大坪香澄美
大学院学生 張徳政

ゲノム病理学分野

教授 石川俊平
助教授 砂河孝行
研究補佐員 加藤洋人
研究補佐員 佐藤玲子
研究補佐員 貴志一貴
研究補佐員 鈴木良平
研究補佐員 相原聡子
事務補佐員 田向美春
共同研究員 西田浩之

フロンティア研究室低酸素生物学

准教授 中山恒
大学院学生 菊池大介

フロンティア研究室ウイルス治療学

准教授 清水則夫
技術補助員 片山未来
技術補助員 望月菊
共同研究員 太田麻利子
共同研究員 高橋秀行
共同研究員 大隅一興
共同研究員 外丸靖浩
事務補佐員 大塚幸子
事務補佐員 齋藤園子

フロンティア研究室遺伝子発現制御学

准教授 黒柳秀人
大学院学生 武井理美
大学院学生 保科元氣
大学院学生 村山里枝

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 田中由美子
助教授 種市大喜
技術補佐員 四方さゆり
技術補佐員 佐野雅人

プロジェクト研究室

准教授 山口登喜夫
准教授 堀川三郎
准教授 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

大学院教育研究支援実験施設

ゲノム解析室

助教授 谷本幸介
技術補佐員 牧谷麗子
技術補佐員 伊藤暁子
技術補佐員 蘭部知奈美

細胞プロテオーム解析室

技術専門職員 名和眞希子

遺伝子組み換えマウス実験室

技術職員 宇佐美貴子
技能補佐員 中村麻衣子
技能補佐員 木崎未央
技能補佐員 遠藤由加

形態機能解析室

技術補佐員 孫黎明

幹細胞支援室

技術専門職員 齋藤佳子
技術補佐員 山崎彰子

構造解析室

技術専門職員 馬場裕子

バイオリソース支援室

技術専門職員 小島智子

事務部

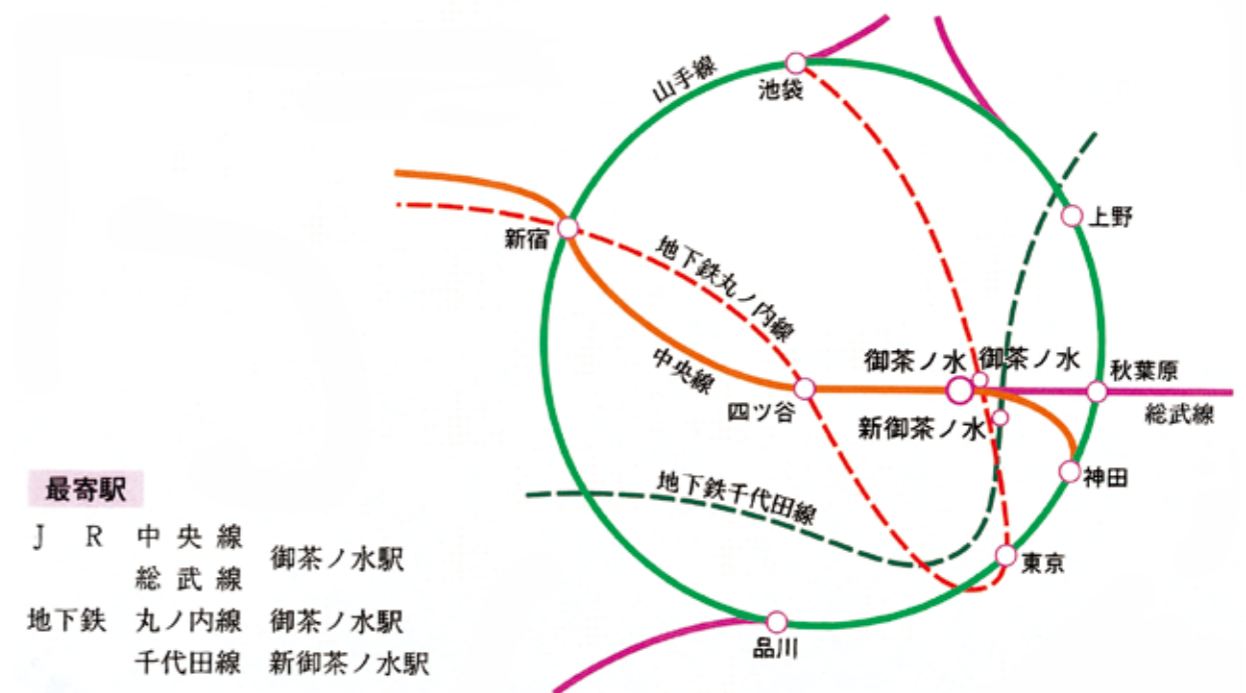
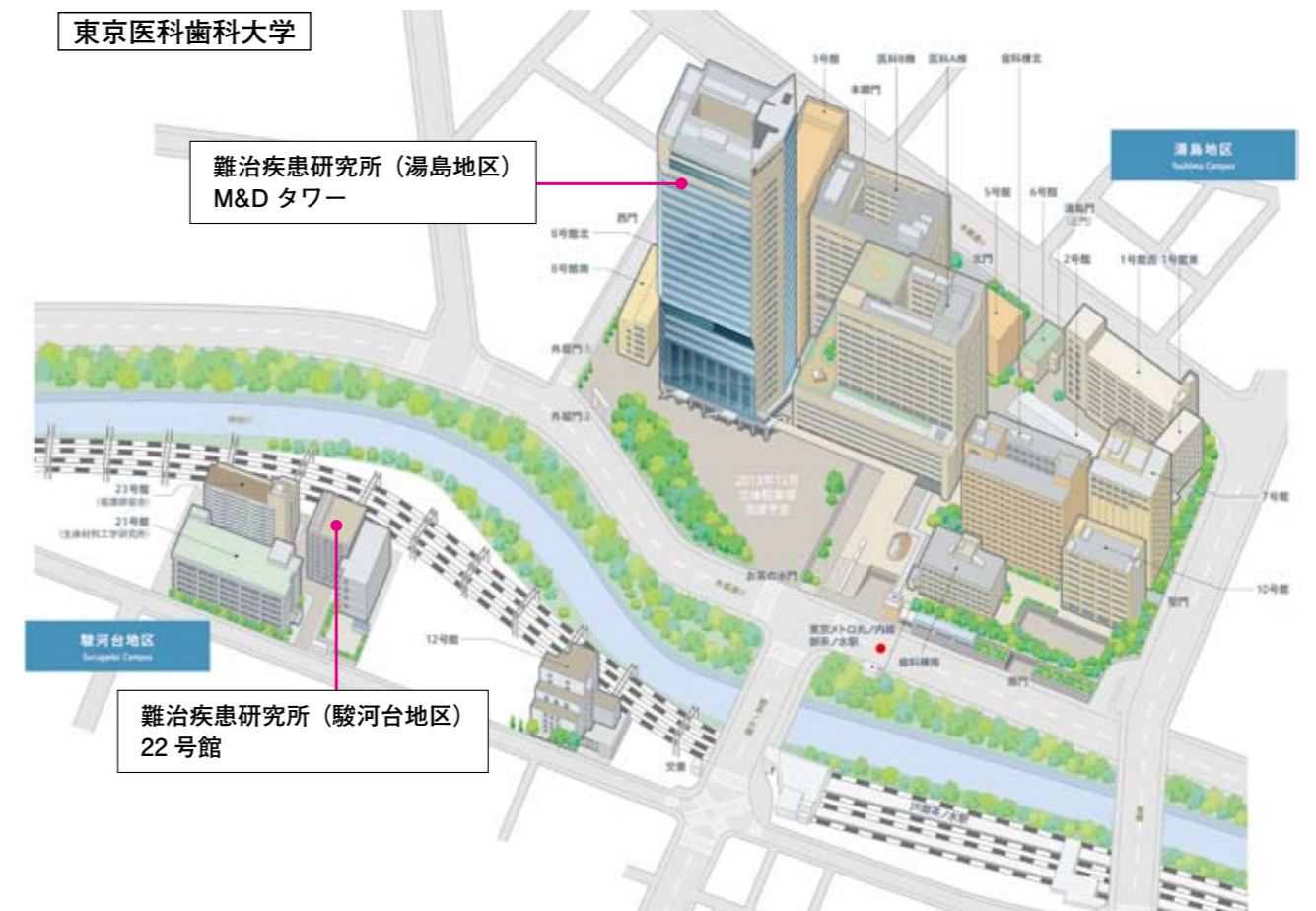
事務長 坂入幸雄
総務掛長 能澤一彦
総務主任 小林俊彦
総務掛員 林健策
総務掛員 大島昌子
総務掛員 木下清隆
事務補佐員 庄司純子
事務補佐員 尾崎久視子
事務補佐員 高橋将貴

難治疾患研究所運営諮問委員会委員

- 郷 通子 情報・システム研究機構 理事
- 笹月 健彦 九州大学高等研究院 特別主幹教授
- 田中 隆治 星薬科大学大学長
- 谷口 克 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 自治医科大学長
- 中釜 斉 国立がん研究センター研究所長
- 長野 哲雄 東京大学創薬オープンイノベーションセンター 特任教授
- 西川 伸一 J T生命誌研究館 顧問

(50音順)

案内図



年報 2014

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