

# Annual Report 2013

ANNUAL REPORT 2013

Tokyo Medical and Dental University

東京医科歯科大学難治疾患研究所

東京都文京区湯島1-5-45

電話 03-5803-4504

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

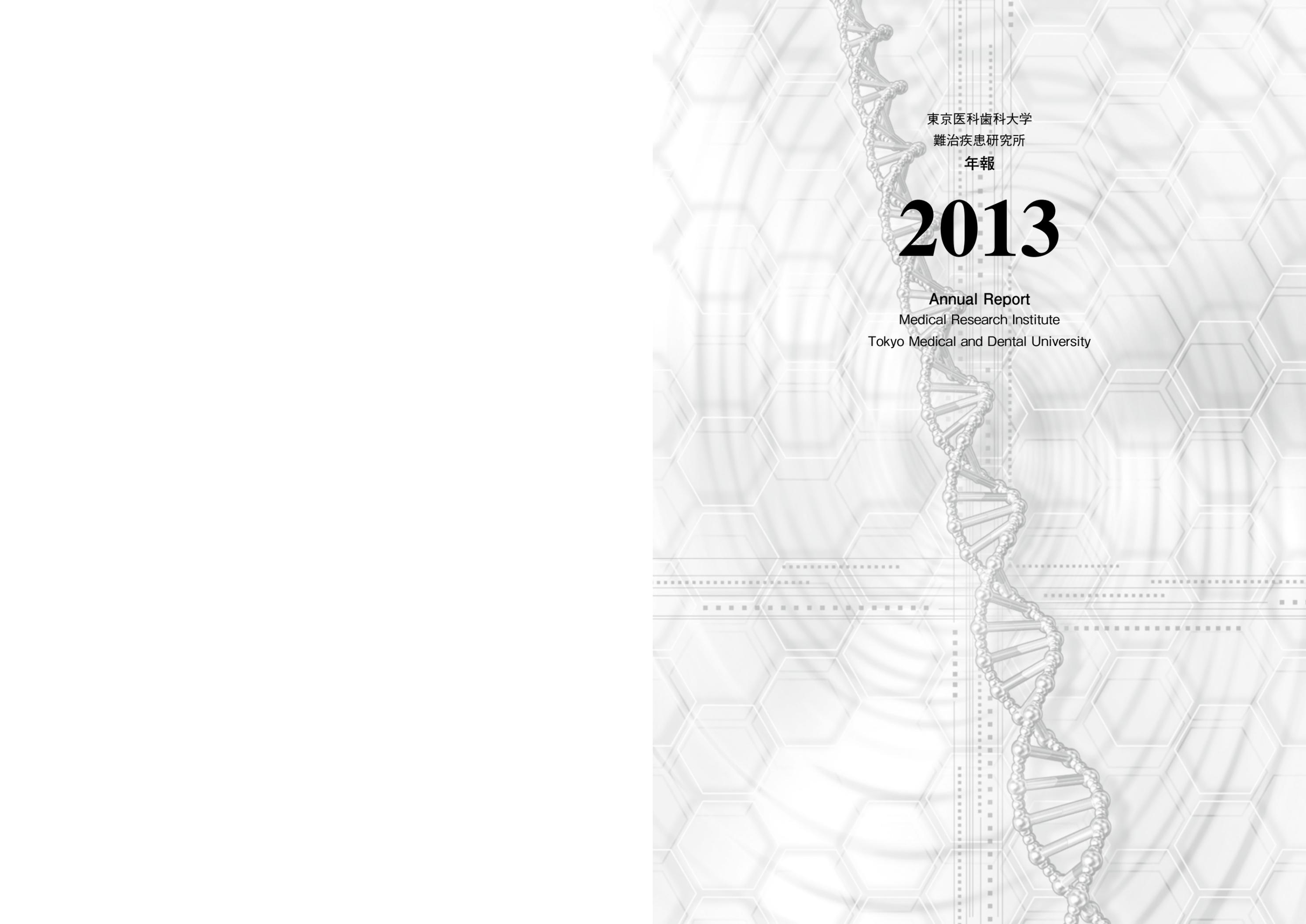
Medical Research Institute Tokyo Medical and Dental University

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

Tel +81-3-5803-4504

年報

東京医科歯科大学難治疾患研究所



東京医科歯科大学  
難治疾患研究所  
年報

**2013**

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の2012年1月より12月までの期間における研究と教育等に関わる活動報告です。2012年度は、大学院改組が行われ、これまで研究所の両輪の1つである生命情報教育部、疾患生命科学研究所は医歯学総合研究科へ統合されましたが、それぞれ修士課程医歯理工学専攻、博士課程生命理工学専攻の中に位置づけられ、研究所が大学院教育に積極的に関わっていくシステムが再構築されました。さらに、平成21年、文部科学大臣より認定された全国共同利用・共同研究拠点「難治疾患共同研究拠点」活動も記載しております。本年報によって、難治疾患研究所の研究のみならず、教育、共同研究拠点に及ぶ広い活動と、私どものミッションである「難治疾患に挑む。」をご理解いただけると幸いです。

難治疾患研究所長 北嶋繁孝

## 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 18～21
2. 分子細胞生物学分野 22～25
3. 分子神経科学分野 26～28
4. 生体防御学分野 30～32
5. 生体情報薬理学分野 34～37
6. 幹細胞制御分野 38～41
7. 分子構造情報学分野 42～44
8. フロンティア研究室 低酸素生物学 46～47

### 難治病態研究部門

1. 神経病理解分野 50～53
2. 病態細胞生物学分野 54～57
3. 発生再生生物学分野 58～61
4. 幹細胞医学分野 62～65
5. 免疫疾患分野 66～69
6. 分子病態分野 70～73
7. フロンティア研究室 ウィルス治療学 74～75

### ゲノム応用医学研究部門

1. 分子細胞遺伝学分野 78～81
2. 分子遺伝学分野 82～85
3. 分子疫学分野 86～89
4. 遺伝生化学分野 90～93
5. ゲノム病理学分野 94
6. エピジェネティクス分野 96～98
7. 生命情報学分野 100～103
8. フロンティア研究室 レドックス応答細胞生物学 104～105

- ・プロジェクト研究室 108～111
- ・大学院教育研究支援実験施設 112～114

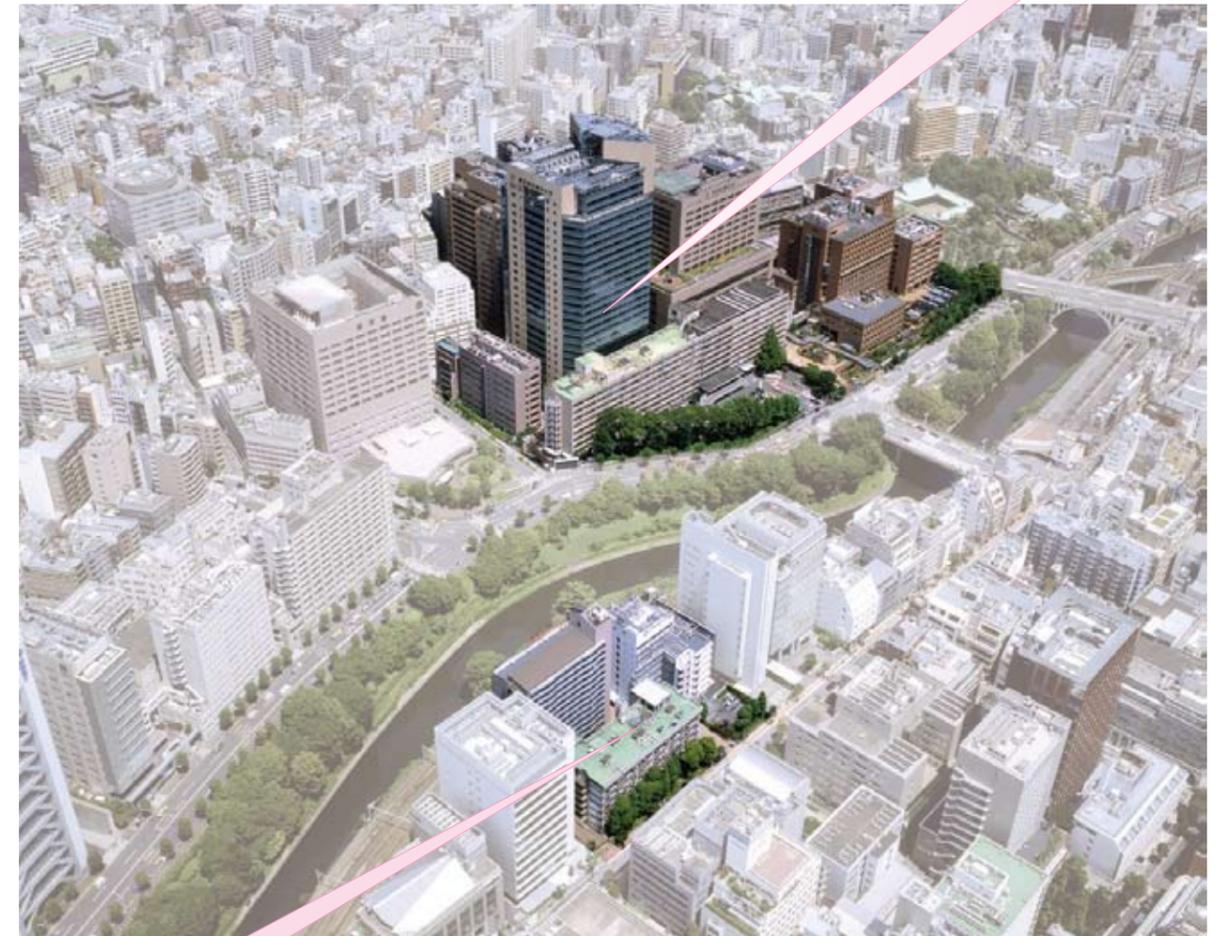
職員学生名簿	115～119
諮問委員名簿	120
案内図	121

## 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、神経病理解分野、発生再生生物学分野、免疫疾患分野、分子病態分野、分子細胞遺伝学分野、分子遺伝学分野、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、プロジェクト研究室、事務部



## 駿河台地区

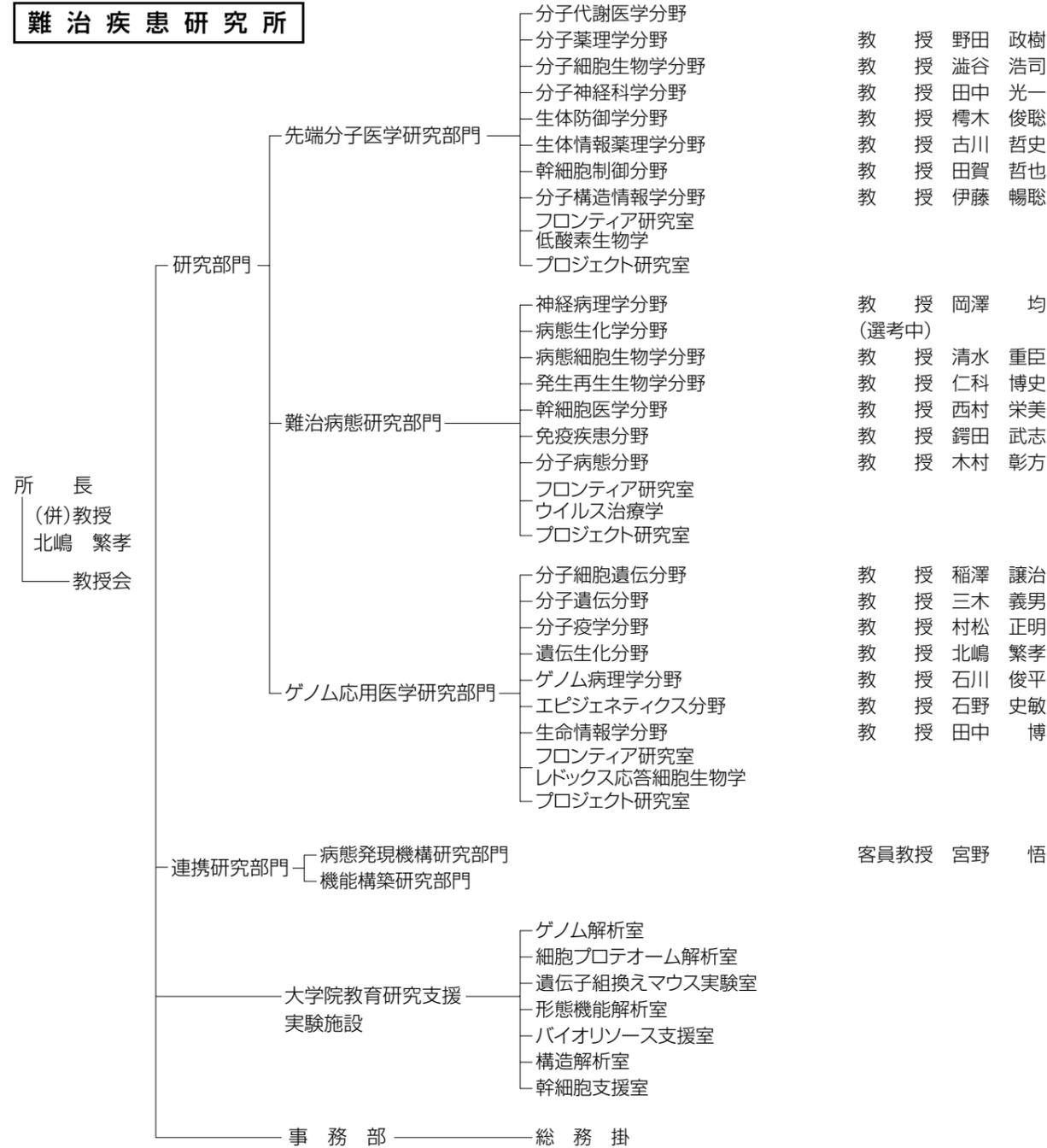
〒101-0062  
東京都千代田区神田駿河台2-3-10

### 難治疾患研究所

分子疫学分野、フロンティア研究室ウィルス治療学、プロジェクト研究室

難治疾患研究所

平成25年4月1日現在



職員及び学生数

●学生数

平成 25 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				
		分子薬理学分野	2			
		分子細胞生物学分野		2		
		分子神経科学分野	7	4		
		生体防御学分野	1			
		生体情報薬理学分野	6	1	2	
		幹細胞制御分野	8	1	2	
		分子構造情報学分野	2	1		
		フロンティア研究室				
		プロジェクト研究室				
	難治病態研究部門	神経病理学分野		4		
		病態生化学分野				
		病態細胞生物学分野	2	2		
		発生再生生物学分野	6	3		
		幹細胞医学分野	2			
		免疫疾患分野	4	5	1	
		分子病態分野	2	3		
		プロジェクト研究室				
	ゲノム応用医学研究部門	分子細胞遺伝学分野		9		
		分子遺伝学分野		5	5	
		分子疫学分野		8	2	2
		遺伝生化学分野		2		
		ゲノム病理学分野				
		エピジェネティクス分野		3	4	
		生命情報学分野		25	5	4
		フロンティア研究室				
		プロジェクト研究室				
		計		98	38	11

※ 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 25 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	2	3	9	83
現 員	20	24	2	19	65	4	1	5	10	75

# ハイライト

## 第11回駿河台国際シンポジウムが開催される

第11回駿河台国際シンポジウム「オミックス研究の新しい潮流」は平成24年7月31日、鈴木章夫大講堂にて開催された。国外、国内、所内から各二名のシンポジストを招待しての講演会であり活発な議論行われた。シンポジストおよび講演タイトルは以下である。

Dr. Keiichi Kodama (Stanford Univ. School of Medicine, Dept of Pediatrics, Div.of Systems Medicine)

Title : Expression-based genome-wide association study links the receptor CD44 in adipose tissue with type 2 diabetes.

Dr. Yusaku Nakabeppu (Medical Institute of Bioregulation, Kyushu Univ)

Title : Altered expression of diabetes-related genes in Alzheimer's disease brains.

Dr. Satoru Miyano (Institute of Medical Science University of Tokyo, Human

Genome Center)

Title: Whole genome sequencing and supercomputer for personalized genomic medicine: The IMSUT plan

Dr. Hiroshi Tanaka (MRI TMDU)

Title: Systems-pathological approach to cancer-metastasis and drug discovery

Dr. Rui Chen (Stanford Univ. School of Medicine, Dept. of Genetics)

Title : Integrated personal omics profile (iPOP) reveals dynamic molecular and medical phenotypes



Dr. Fumitoshi Ishino (MRI TMDU)

Title : Contribution of LTR retrotransposons to evolution of mammals: a novel view from

また同日午後から共催である難治疾患共同研究拠点シンポジウムがおこなわれ、5題の研究演題が発表された。

(分子疫学分野 村松正明)

## プロジェクト研究室の菅波孝祥准教授が「東京医科歯科大学優秀研究賞」を受賞しました

本学では今年度より優れた研究成果をあげた教員に対して、その功績を表彰することにより、本学の若手教員の意欲向上と本学の研究の活性化を図ることを目的として「東京医科歯科大学優秀研究賞」を設けました。

プロジェクト研究室の菅波孝祥准教授は栄えある第一号として、第3回東京医科歯科大学ホームカミングデイ(H24.10.14開催)において大学学長より表彰されました。



### 受賞理由

菅波孝祥准教授は、平成15年度より難治疾患研究所にて研究活動を開始し、生活習慣病の病態生理の解明と新しい治療戦略の開発に関する分子医学的研究に従事してきた。

特に、生活習慣病の上流に位置する肥満の脂肪組織において、脂肪細胞とマクロファージの相互作用により形成される慢性炎症の分子機構を明らかにした論文は、2005年のArterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 誌の表紙として採用され(平成24年7月現在の被引用回数274回)、この研究成果に対して2006 Werner Risau New Investigator Award in Vascular Biology (アメリカ心

臓協会)を受賞した。

菅波准教授は、飽和脂肪酸が単なる栄養素でなく、炎症性アディポサイトカインとして脂肪組織局所や全身臓器の慢性炎症を惹起すること、一方、魚油に多く含まれるn-3多価不飽和脂肪酸は飽和脂肪酸に拮抗的に作用し、炎症抑制性に働くことを見出し、基礎研究と臨床研究の両面で証明した。このような臓器代謝ネットワークの破綻の分子機構の解明や慢性炎症を標的とする新しい生活習慣病の治療戦略の開発に取り組み、その研究成果は国際誌に掲載されるとともに、成人血管病研究振興財団 岡本研究奨励賞(平成21年)、日本肥満学会 学術奨励賞(平成23年)、日本内分泌学会 研究奨励賞(平成24年)など多くの受賞により評価されている。

このように、菅波准教授は、内分泌代謝学の観点よりトランスレーショナルリサーチに取り組み、国内外の研究者との共同研究にも積極的に参画して、関連研究を発展させつつある。菅波准教授が中心となって開発した「脂肪細胞とマクロファージの共培養系」(特許第4862160号)は、メタボリックシンドロームにおける慢性炎症の分子機構の解明や新しい治療標的の探索に有用であり、製薬企業等との共同研究に活用されている。さらに、平成24年度より独立准教授として、生活習慣病の克服を目指す研究活動に主体的に取り組んでいる。

以上の理由により、菅波准教授を東京医科歯科大学優秀研究賞に値すると判断された。

(プロジェクト研究室 菅波孝祥)

### 各種受賞

発生再生生物学分野

浅岡洋一 第21回吉田奨励賞(第34回日本比較生理生化学会大会 2012年7月)

免疫疾患分野

安達貴弘 日本食品免疫学会平成24年度ポスター賞「腸管免疫細胞の活性化モニターリングマウスの樹立」日本食品免疫学会第8回学術大会、平成24年10月16日-17日、東京

生命情報学分野

Miyamoto T, Ogishima S, Nakaya J, Tanaka H; Oxford Journals - Japanese Society for Bioinformatics Prize (2012) "Expression trajectories" of reprogramming and differentiation on expression potential field

分子薬理学分野

早田匡芳 ANZBMS Travel Grant. 第30回日本骨代謝学会、東京、2012年7月19-21日。「四肢及び胸骨特異

的 Dullard 遺伝子欠損マウスは骨化遅延を示す。」

渡辺千穂 ANZBMS Travel Grant. 第30回日本骨代謝学会、東京、2012年7月19-21日。「骨量制御の新転写後性分子機構:mRNA deadenylaseであるCcr4-not complex 構成因子Cnot3の欠失による高回転型の骨量減少の解析。」

平林恭子 第22回日本歯科医学会総会ポスターセッション優秀賞、2012年11月11日。

分子細胞遺伝分野

古田繭子 「Excellent Presentation-Special Award」東京医科歯科大学グローバルCOE(GCOE)プログラム研究発表

鶴田智彦 平成23年度日本産科婦人科学会「優秀論文賞婦人科腫瘍学部門」受賞

松村聡 東京医科歯科大学医科同窓会第14回田中道子賞 受賞

プロジェクト研究室

菅波孝祥 第32回日本内分泌学会研究奨励賞(2012年4月)

「脂肪組織炎症による新しいアディポサイトカイン産生調節の分子機構の解明」

菅波孝祥 2012年東京医科歯科大学優秀研究賞(2012年10月)

### 2012年難治疾患研究所優秀論文賞

優秀論文賞

有村卓朗(分子病態分野)

「Molecular basis for clinical heterogeneity in inherited cardiomyopathies due to myopalladin mutations」  
Human Molecular Genetics

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」  
Circulation Arrhythmia and Electrophysiology

倉沢泰浩(分子細胞遺伝分野)

「Stabilization of phenotypic plasticity through mesenchymal-specific DNA hypermethylation in cancer cells」  
**Oncogene**

白 樺(分子細胞遺伝分野)

「A transcriptional variant of the LC3A gene is involved in autophagy and frequently inactivated in

human cancers」 **Oncogene**

## 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 日開催)

大学院生受賞者

1 位 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

2 位 高岡美帆 (分子遺伝分野) Plk1-Phospholyated BRCA2 Localizes to the Midbody and Regulates Cytokinesis by Mediating Activation of Myosin IIC ATPase

3 位 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

ベストプレゼンテーション賞 高岡美帆 (分子遺伝分野) Plk1-Phospholyated BRCA2 Localizes to the Midbody and Regulates Cytokinesis by Mediating Activation of Myosin IIC ATPase

ベストディスクッション賞 内田好海 (発生再生生物学) 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

難治疾患研究賞 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

萌芽賞 李 潺 (神経病理学分野) “Sox2 transcriptionally regulates Pqbp1, anintellectual disability-microcephary causitive gene, in neural stem progenitor cells”

若手研究者受賞者

1 位 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

1 位 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

3 位 徐 米多 (免疫疾患分野) CD72c is a modifier gene that regulates Faslpr-induced autoimmune disease

## 特許申請

分神経病理学分野

特許査定 2012 年 3 月 27 日

発明の名称：ポリグルタミン病の予防・治療剤

登録番号：特許第 4982739 号

登録日：2012 年 5 月 11 日

出願番号：特願 2006-154059

出願日：2006 年 6 月 1 日

特許権者：国立大学法人東京医科歯科大学

発明者：岡澤 均

発明の名称：精神発達遅滞の非ヒトモデル動物及び精神

発達遅滞の症状を改善する活性を有する物質をスクリーニングする方法

登録番号：特許第 5066710 号

登録日：2012 年 8 月 24 日

出願番号：特願 2007-014795

出願日：2007 年 1 月 25 日

特許権者：国立大学法人東京医科歯科大学

発明者：岡澤 均

発明の名称：新規タンパク質及びそれを利用したポリグルタミン病等の神経変性疾患の予防・治療薬

出願番号：特願 2006-545101

出願日：2005/11/16

登録番号：特許第 5103615 号

登録日：2012/10/12

出願人：国立大学法人東京医科歯科大学

発明者：岡澤 均

病態細胞生物学分野

清水重臣、細谷孝充、室橋道子、吉田優：「ベンゾチオフェン化合物、該化合物を有効成分とするオルタナティブオートファジー誘導剤及び抗癌剤、並びに抗癌活性を有する化合物をスクリーニングするための方法」特願 2012-026373

清水重臣、室橋道子：「抗癌活性を有する化合物をスクリーニングするための方法」特願 2012-026377

分子細胞遺伝分野

< 国内 >

2012 年 10 月 26 日、特許第 5116026 号、「癌の検出方法および癌抑制剤」、稲澤譲治・小崎健一・井本逸勢、東京医科歯科大学・富士フィルム株式会社、特願 2008-012256

2012 年 7 月 27 日、特許第 5044837 号、「食道癌の検出方法」、稲澤譲治、井本逸勢、田中浩司、津田 均、東京医科歯科大学・株式会社ビー・エム・エル、特願 2006-303331

2012 年 6 月 1 日、特許第 5002749 号、「癌抑制剤」、稲澤譲治・井本逸勢・和泉宏幸・横井左奈、東京医科歯科大学・富士フィルム株式会社、特願 2006-078786

< 特許取得 - 海外 (米国) >

2012 年 11 月 27 日、登録番号 8218431、「卵巣癌の検出方法、及び抑制方法」、稲澤譲治・井本逸勢・菊池良子、

国立大学法人東京医科歯科大学・富士写真フィルム株式会社、特願 2007-143111

2012 年 7 月 10 日、登録番号 8216785、「神経芽腫の検出方法」、稲澤譲治・井本逸勢・井上 純、国立大学法人東京医科歯科大学・富士写真フィルム株式会社、特願 2008-275176

2012 年 5 月 22 日、登録番号 8183223、「癌の検出方法および癌抑制剤」、稲澤譲治・小崎健一・井本逸勢、国立大学法人東京医科歯科大学・富士写真フィルム株式会社、特願 2008-275176

2012 年 8 月 15 日、登録番号 1997910、「卵巣癌の検出方法、及び抑制方法」、稲澤譲治・井本逸勢・菊池良子、国立大学法人東京医科歯科大学・富士写真フィルム株式

会社、特願 2007-143111

プロジェクト研究室

山口登喜夫

特許 5100903 号 早期審査請求による特許査定 「リチウム試薬組成物、それを用いたリチウムイオン測定方法及び測定装置」

特願 2012-245766 審査請求中 「リチウム測定方法」 Patent Pending : PCT/JP2012/081742. 他、分割出願 1 件。

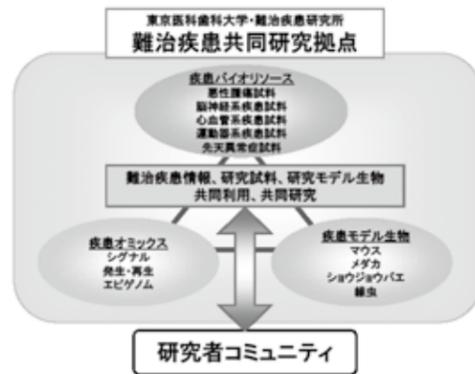
「バイオピリン検出用イムノクロマトグラフィー測定方法及び装置」特許出願 (特願 2006-36202) ; 2009 年 2 月 特許取得 ; 平成 23 年 7 月 8 日 (特許登録日) 特許第 4778804 号。

# 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24年度の主な成果

### iCOD (統合的臨床オミックスデータベース)

患者個人の臨床病理情報や画像診断データと、病変部位におけるゲノム/オミックス情報を統合した我が国で初めてのiCOD (統合的臨床オミックスデータベース) を作製しホームページにアップしました。本学附属病院に入院した患者様約 400 名の病歴、診断、検査、外科的治療、内科的治療、予後の情報、及び看護師が聞き取った生活習慣情報、病理標本の網羅的遺伝子発現情報などが統合されています。日英2カ国語で登録ユーザに対して利用を公開しており、国内外の難治疾患研究者を対象としています。

### テニュアトラック制度について

平成 18 年度から平成 22 年度までの文部科学省科学技術振興調整費「若手研究者の自立的研究環境整備促進」事業により、難治疾患の克服を目指した優れた若手研究者を発掘・育成するため、「メディカル・トップトラック (MTT) 制度」を実施しました。平成 22 年度からは自主財源によりテニュアトラック助教 2 名を育成していますが、平成 25 年 3 月、文科省テニュアトラック定着・普及事業にもとづきテニュアトラック教員 (独立准教授) を採用しました。

## 平成 24 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
岩坪 威	教授	東京大学医学系研究科	遺伝子発現調節分子を標的とした神経変性疾患モデル ショウジョウバエの研究
寺井 崇二	准教授	山口大学大学院医学系研究科	脂肪肝メダカおよびマウスを用いた代謝系難治疾患病態解明に関する研究
蒔田 芳男	教授	旭川医科大学教育センター	多角的ゲノム解析技術による外表面形を伴う発達遅滞 (MCA/MR) の病態解明
牧野 伸司	准教授	慶應義塾大学医学部	房室ブロックを合併する家族性心筋症の病因・病態解明

### 2) 挑戦的課題 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	マウス血球貪食症候群の病態発症機構の解明と新規治療方法の開発
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 で作成した胚における遺伝子発現解析
荻 朋男	助教	長崎大学医学部附属 原爆後障害医療研究施設	転写共役修復欠損性遺伝生疾患の新規責任遺伝子の同定と機能解析
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動的構造解明に向けた分子間相互作用解析

### 3) 一般的課題 35 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	視床下部における転写因子 ATF3 の役割
三浦 直行	教授	浜松医科大学	家族性心臓突然死症候群「ブルガダ症候群」モデルマウスの機能解析
麻生 倂二郎	教授	高知大学教育研究部医療学系	転写伸長因子欠損による神経系異常の本態の解明
石田 秀治	教授	岐阜大学応用生物科学部	CD22/Siglec2 糖鎖リガンドによる B リンパ球機能と難治性疾患の制御についての研究
片桐 豊雅	教授	徳島大学疾患ゲノム 研究センター	乳がん易罹性関連遺伝子候補の機能解析
築地 信	准教授	星薬科大学薬学部	肺炎球菌荚膜糖鎖ワクチンを用いた免疫記憶成立のメカニズム解析
山本 健	准教授	九州大学生体防御医学研究所	自己免疫性甲状腺炎における ULBP/RAET 遺伝子群領域のゲノム・エピゲノム解析
田中 正人	教授	東京薬科大学生命科学部	がん死細胞貪食に伴うがん免疫調節機構の解明
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	CASK 異常を原因とする小脳脳幹部低形成の病態発現機構の解明と治療法 の開発
久場 敬司	准教授	秋田大学大学院医学研究科	RNA 代謝制御因子の難治性不整脈の重症化における役割、意義の解明研究
新沢 康英	助教	大阪大学大学院医学系研究科	家族性パーキンソン病モデルマウスのミトコンドリア動態解析
金児・石野 知子	教授	東海大学健康科学部	胎児期栄養条件のゲノムのエピジェネティック制御に及ぼす影響の研究
中内 啓光	教授	東京大学医学研究所	ニッチによる組織幹細胞の維持機構の解明
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幹細胞・前駆細胞の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	血管・リンパ管新生における TGF-β /Smad シグナル系の役割
平沢 晃	助教	慶應義塾大学医学部	婦人科癌関連癌抑制型 microRNA replacement therapy の有用性の検討
市川 大輔	講師	京都府立医科大学	胃・食道癌のゲノム・エピゲノム解析に基づく分子標的治療シース探索
合田 亘人	教授	早稲田大学理工学術院	プロテオミクス解析を用いた低酸素性腫瘍の新規マーカーの探索
大海 忍	准教授	東京大学医学研究所	特殊抗体を活用した悪性腫瘍マーカー検出システムに関する研究

金井 克晃	准教授	東京大学大学院農学生命科学研究所	神経幹細胞を用いた転写因子 Sox17 のオリゴデンドロサイトへの分化誘導
佐谷 秀行	教授	慶應義塾大学医学部	TNF- $\alpha$ ・TGF- $\beta$ により誘導された上皮間葉転換の時系列遺伝子発現解析
大橋 十也	教授	慈恵医科大学 DNA 医学研究所	IFN の作用を利用した新規骨髄移植前治療法の確立と、先天性代謝異常治療への応用
山本 雅	教授	東京大学医科学研究所	CNOT3 遺伝子の骨量制御におよぼす機能について
鈴木 洋史	教授	東京大学医学部附属病院・薬剤部	特異体質性薬物毒性の発現機構研究
山崎 晶	教授	九州大学生体防御医学研究所	急性腎不全における危機感知センサー Mincle・内因性リガンド系の病態生理的意義に関する研究
田中 謙二	特任准教授	慶應義塾大学医学部	強迫神経症モデルマウスを用いた回復軸の解明
楠 進	教授	近畿大学医学部	免疫性神経疾患における B リンパ球抑制性分子の役割についての実験的研究
安達 三美	講師	帝京大学医学部	終末分化心筋細胞における p21 <sup>cip1</sup> と 27 <sup>kip1</sup> の相互機能の解析
竹内 純	研究主任 准教授	東京大学分子細胞生物学研究所	エピゲノム因子修飾マウスモデル・心筋細胞の機能解析
永森 収志	助教	大阪大学大学院医学系研究科	網羅的定量プロテオミクスを用いた膜マイクロドメインを介する心筋チャネルパター発症機序の解明
阿部 義人	准教授	九州大学薬学研究院	痛みを受容体 [P2X4] への抗体・薬物の結合親和性評価法の開発
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
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の電気生理学的解析
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動脈硬化症関連因子の同定
松永 達雄	室長	東京医療センター 臨床研究センター	耳鳴りとその治療効果に関する遺伝疫学研究

#### 4) 被災研究者支援 3 件

代表者	職名	所属機関	研究題目
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
青木 淳賢	教授	東北大学大学院薬学研究所	ゼブラフィッシュを用いた生理活性リゾリン脂質の発生の機能的解明
西森 克彦	教授	東北大学大学院農学研究所	Lgr4 遺伝子の機能解析

#### 5) 研究会 1 件

代表者	職名	所属機関	研究題目
渡部 和彦	プロジェクトリーダー	東京都医学総合研究所	共同利用・共同研究拠点・日韓神経培養研究セミナー

#### 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4回 / 平成24年11月16日	田中 裕二郎 准教授	ゲノム科学の進歩と筋ジストロフィー
	浅岡 洋一 助教	メダカを用いた肝臓疾患研究
第5回 / 平成25年2月22日	林 深 特任講師	知っておきたい遺伝子・ゲノム・染色体と病気のはなし
	小内 伸幸 講師	私たちの体を守る免疫システムその良い面と悪い面

#### 第11回駿河台シンポジウム / 第3回難治疾患共同研究拠点シンポジウム (H24.7.31 ~ 8.1 開催)



#### 難治疾患共同研究拠点集会 (H24.6.16 開催) 「共同利用・共同研究拠点・日韓神経培養研究セミナー」



#### 第11回知の拠点セミナー (H24.8.24 開催) 読売新聞掲載記事 (平成24年9月2日朝刊)



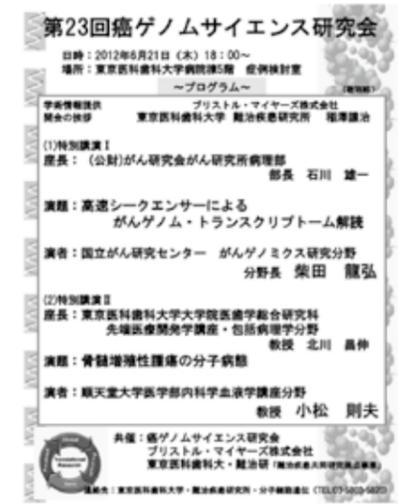
#### 難治疾患研究所市民公開講座 - 最先端生命科学講座シリーズ第4回 (H24.11.16 開催)



#### 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5回 (H25.2.22 開催)



#### 第23回ゲノムサイエンス研究会 (H24.6.21 開催)



#### 第24回ゲノムサイエンス研究会 (H25.2.7 開催)



#### 第7回国際ネットワークシンポジウム (H24.6.14 ~ 15 開催)



# 学位取得者

## 幹細胞医学分野

Nguyen Thanh Binh

「Efficient assay for total antioxidant capacity in human plasma using a 96-well microplate.」

## 神経病理学分野

中村 蓉子

「Ataxin-7 associates with microtubules and stabilizes the cytoskeletal network.」

## 免疫疾患分野

徐 米多

「The study on the role of B cell inhibitory coreceptor-CD72 molecule in the immune homeostasis.」

## 生命情報学分野

宮口 健

「Loss of NKX3-1 as a potential marker for an increased risk of occult lymph node metastasis and poor prognosis in oral squamous cell carcinoma」

鈴木 聡

「Systems analysis of inflammatory bowel disease based on comprehensive gene information」

野上 (松前) ひろみ

「A methodical microarray design enables surveying of expression of a broader range of genes in *Ciona intestinalis*」

Afsaneh Eslami

「Gene expression analysis of tongue squamous cell carcinoma revealed over-expression of PARVB in endophytic type」

## 分子神経科学分野

白 寧

「Identification and functional characterization of Dock3 as a glutamate receptor NR2D subunit binding protein.」

柳澤美智子

「EAAT1 mutations in patients with glaucoma and neuroprotective effects of EAAT1 activator arundic acid in a mouse model of glaucoma.」

平岡優一

「The role of Delta like 1 in the development and maintenance of the phenotype of Bergmann glia.」

杉山 勇人

「Roles of  $\beta$ -adrenergic receptors in the acquisition and consolidation processes of visual imprinting memory.」

## 病態細胞生物学分野

山口啓史

「Discovery of Atg5-independent macroautophagy in *Saccharomyces cerevisiae* and its genetic analysis」

## 遺伝生化学分野

武谷 憲二

「Key role of ATF3 in p53-dependent DR5 induction upon DNA damage of human colon cancer cells.」

## 分子疫学分野

松倉 寛

「Genistein promotes DNA demethylation of the steroidogenic factor 1 (SF-1) promoter in endometrial stromal cells」

## エピジェネティクス分野

岩崎 佐和

「Analysis of mammalian-specific retrotransposon-derived PNMA-family genes」

## 分子薬理学分野

宮嶋 大輔

「Profilin1 regulates sternum development and endochondral bone formation.」

鈴木 允文

「Osteoblastic differentiation enhances expression of TRPV4 that is required for calcium oscillation induced by mechanical force.」

## 分子病態分野

石川 泰輔

「A novel disease gene for Brugada syndrome: sarcolemmal membrane-associated protein gene mutations impair intracellular trafficking of hNav1.5.」

## 分子細胞遺伝学分野

古田 繭子

「The tumor-suppressive miR-497-195 cluster targets multiple cell-cycle regulators in hepatocellular carcinoma.」

小野 宏晃

「SIX1 promotes epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer through ZEB1 activation.」

宮脇 豊

「Esophageal Squamous Cell Carcinoma Developed 11 Years After Allogeneic Bone Marrow Transplantation for Acute Lymphatic Leukemia.」

## プロジェクト研究室

NGUYEN BAO NGOC

「A novel anti-Hepatitis C virus compound, Tp80, promotes expression of Gastrointestinal glutathione peroxidase (GI-GPx)」

# 難研セミナー

平成23年度大学院生研究発表会・若手研究者研究発表会

平成24年3月8日

宮村 憲央 (発生再生生物学分野)

質量顕微鏡を用いたマウス再生肝の脂質の解析

山本 信祐 (分子細胞遺伝学分野)

Identification of microRNAs negatively regulating NRF2 pathway

石井 雅之 (エピジェネティクス分野)

“レトロトランスポゾン由来哺乳類特異的遺伝子群, Sirh4, Sirh5, Sirh6 の進化的解析”

上野 真紀子 (幹細胞医学分野)

色素幹細胞の活性化状態と維持機構

内田 好海 (発生再生生物学分野)

ストレス応答性キナーゼ MKK7 による分子時計制御機構の解明

原園 陽介 (分子細胞遺伝学分野)

Exploration of MET-inducing microRNA using function-based screening with expression analysis of E-cadherin in Panc1

岩崎 佐和 (エピジェネティクス分野)

哺乳類特異的に保存されたレトロトランスポゾン由来の遺伝子群 PNMA ファミリーの解析

江原 達弥 (分子代謝医学分野)

グリセロール3リン酸アシル基転移酵素 (GPAT1) 遺伝子の DNA メチル化による発現制御

山口 啓史 (病態細胞生物学分野)

出芽酵母における Atg5 非依存的マクロオートファジー機構の発見と遺伝学的解析

古田 繭子 (分子細胞遺伝学分野)

Functional スクリーニングを用いた肝細胞癌抑制性 microRNA の同定

榎 康一 (幹細胞制御分野)

腫瘍不均一性が意味する腫瘍幹細胞の生存戦略

林 深 (硬組織疾患ゲノムセンター)

複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

岸 祐介 (免疫疾患分野)

Apoptotic marginal zone deletion of anti-Sm/RNP B cells

平成22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24年3月8日

石川 泰輔 (分子病態分野)

SLMAP 遺伝子異変により引き起こされるブルガダ症候群発症機序の解明

村松 智輝 (分子細胞遺伝学分野)

睪臓がんにおける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

吉田 純一 (分子神経科学分野) 【代理講演: 相田 知海】

強迫性障害の病態解明と効果的治療法の開発

川内 潤也 (遺伝生化学分野)

臨床応用を目指した ATF3 による発がんスバイラル制御機構の解明

松村 寛行 (幹細胞医学分野)

17 型コラーゲンによる毛胞幹細胞運命決定分子基盤の解明

竹中 克也 (分子遺伝学分野)

乳癌原因遺伝子 BRCA2 新規結合分子の探索と相互作用が発癌に果たす分子機構の解明

2011 年難治疾患研究所優秀論文賞受賞者講演会

平成24年3月8日

手塚 裕之 (生体防御学分野)

Prominent role for plasmacytoid dendritic cells in mucosal T cell-independent IgA induction

鶴田 智彦 (分子細胞遺伝学分野)

Identification of miR-152 as a tumor-suppressive microRNA silenced through tumor-specific DNA hypermethylation in endometrial cancer by function-based screening

上杉 篤史 (分子細胞遺伝学分野) 【代理講演: 鶴田 智彦】

The tumor suppressive microRNA miR-218 targets the mTOR component Rictor and inhibits AKT

山崎 世和 (発生再生生物学分野) 【代理講演: 岩月 麻美子】

Stress-activated protein kinase MKK7 regulates axon elongation in the developing cerebral cortex

難研セミナー (難治疾患共同研究拠点セミナー)

第472回 (第45回)

Ian Chambers (Pluripotent Stem Cell Biology, University of Edinburgh Professor)

Transcription factor interactions in ES cells

平成24年6月11日

第473回 (第46回)

Wilfred TV Germeeraad (Division of Haematology, Department of Internal Medicine, Maastricht, University Medical Center Associate Professor)

Human dendritic cells for translational research and immunotherapy

平成24年5月28日

第474回 (第47回)

金田 篤志 (東京大学先端科学技術研究センターゲノムサイエンス分野 特任准教授)

癌のエピゲノム特性とそれを応用した治療戦略

平成24年6月21日

第475回 (第48回)

石川 俊平 (東京大学大学院医学系研究科人体病理学・病理診断学分野 准教授)

がん医療のためのゲノミクス

平成24年6月21日

第476回 (第49回)

後藤 雄一 (国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病研究第二部 部長)

脳発達障害を起す疾患

平成24年6月22日

第477回 (第50回)

神谷 篤 (Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, Johns Hopkins University, School of Medicine Assistant Professor)

How can we address the molecular complexities and pathological roles of genetic risk factors for major mental disorders?

平成24年8月23日

第478回 (第51回)

田中 由美子 (University of California, San Diego School of Medicine, Department of Cellular and Molecular Medicine Project scientist)

グローバルな転写ダイナミズムの理解に基づく生活習慣病発症のメカニズムの解明

平成24年8月15日

第479回 (第52回)

渡部 聡朗 (Yale University リサーチフェローシップ)

マウス生殖細胞形成における small RNA とレトロトランスポゾンのはたらき

平成24年8月15日

第480回 (第53回)

大日向 康秀 (科学技術振興機構 さきがけ研究者)

哺乳類における基底多能性幹細胞の樹立と試験管内全能性誘導

平成24年8月15日

第481回 (第54回)

東田 裕一 (九州大学生体防御医学研究所 准教授)

細胞の記憶を消すしくみ - クロマチンのメチル化修飾制御機構 -

平成24年8月15日

第482回 (第55回)

佐藤 俊朗 (慶應義塾大学医学部消化器内科 特任講師)

腸管上皮幹細胞培養の確立とその応用

平成24年8月24日

第 483 回（第 56 回）

仲野 徹（大阪大学大学院医学系研究科病理学教授）  
細胞の分化と癌化における DNA メチル化制御  
平成 24 年 10 月 23 日

第 484 回（第 57 回）

鈴木 洋（東京大学大学院医学系研究科分子病理学 特任助教）  
Exploring small RNA topography  
平成 24 年 10 月 3 日

第 485 回（第 58 回）

Mark Shackleton（Peter MacCallum Cancer Centre, Medical Oncologist and Group Leader Melanoma Research Laboratory）  
Insights into human melanoma biology through in vivo modeling  
平成 24 年 11 月 6 日

第 486 回（第 59 回）

Peter ten Dijke（Leids Universitair Medisch Centrum Professor）  
TGF-*β* signaling in cancer  
平成 24 年 10 月 31 日

第 487 回（第 60 回）

佐々木 雅人（The Campbell Family Institute

for Breast Cancer Research, Ontario Cancer Institute, Princess Margaret Hospital, University Health Network 博士研究員）  
D-2-ヒドロキシグルタル酸（D2HG）の生理的影響と癌代謝への関与について：イソクエン酸デヒドロゲナーゼ 1（Idh1）変異マウスの解析  
平成 24 年 10 月 22 日

第 488 回（第 61 回）

田中 謙二（慶應義塾大学医学部精神神経科学教室 特任准教授）  
テトラサイクリン遺伝子発現誘導システムの改良と光操作、光計測への応用  
平成 24 年 10 月 31 日

第 489 回（第 62 回）

関矢 一郎（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科軟骨再生学講座 教授）  
滑膜由来間葉系幹細胞による軟骨・半月板再生：基礎研究から臨床応用まで  
平成 24 年 12 月 27 日

第 490 回（第 63 回）

原 英二（公益財団法人がん研究会がん研究所がん生物部 部長）  
細胞老化の分子機構とその発癌制御における役割  
平成 24 年 12 月 27 日

第 492 回（第 65 回）

増富 健吉（独立行政法人国立がん研究センターがん幹細胞研究分野長）  
テロメラーゼ新規機能とがん幹細胞  
平成 24 年 12 月 27 日

第 493 回（第 66 回）

Martin M. Matzuk（Dept. of Pathology & Immunology, Molecular & Cellular Biology, and Molecular & Human Genetics, and Pharmacology, Baylor College of Medicine Professor）  
Translational aspects of reproductive medicine  
平成 24 年 12 月 7 日

第 494 回（第 67 回）

稲葉 カヨ（京都大学大学院生命科学研究所高次生命科学専攻生体応答学分野 教授）  
ノーベル賞へと繋がった樹状細胞研究の道  
平成 25 年 1 月 11 日

第 495 回（第 68 回）

Paolo Bernardi（Department of Biomedical Sciences, University of Padova, Italy）  
The mitochondrial permeability transition pore：A mystery solved？  
平成 25 年 3 月 21 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

- PTH 受容体が、アドレナリン受容体 *β* 2 の存在により、骨量増加することを示した。
- Profilin1 遺伝子欠損は、細胞移動の低下を介して、骨形態形成の阻害をもたらすことを示した。

分子細胞生物学

- WNK シグナル伝達経路が Lhx8 遺伝子発現を介して神経分化に関与することを示した。
- IQGAP1 が Dvl の核移行に関与することを示した。

分子神経科学

- NMDA 受容体の過剰な活性化は、脳形成を障害することを明らかにした。
- マウス外側手綱核の過剰活性化は、急性ストレス下の絶望行動を増悪させることを明らかにした
- 遺伝的に雌の脳であることが正常な性周期の維持に必要なであることを明らかにした。

生体防御学

- 新たな樹状細胞前駆細胞を同定し血液細胞分化系譜に樹状細胞分化系譜を加えた。
- IFN による移植前治療法を確立し、同法を用いて放射線照射なしで造血幹細胞移植および先天性代謝疾患の治療に成功した。

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 2 つの日本人特有の関連遺伝子を含む 12 の心房関連遺伝子を同定した。
- 心臓伝導系特異的転写因子の遺伝子変異・多型がヒト先天性不整脈・コモン不整脈の原因となることを見いだした。
- ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いて、薬物効果・安全性評価系と疾患モデル iPS 細胞を確立した。

幹細胞制御

- 神経幹細胞増殖シグナルの下流因子 cyclin D1 がアストログリア特異的遺伝子発現に必要な STAT3/p300 の活性を抑制することを見出し、自己複製機構の理解に寄与した。
- 胎生期 AGM 領域のうち CD45<sup>low</sup>/c-Kit<sup>high</sup> 細胞に造血活性が高いことを発見した。
- C6 グリオーマ細胞株中に存在する造腫瘍活性の高い癌幹細胞集団を分離し得る人工ポリマーを同定し、人工癌幹細胞ニッチの構築に先鞭をつけた。

分子構造情報学

- 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 受容体と複数の合成リガンドとの複合体の結晶解析に成功した。
- Protein Data Bank Japan（PDBj）への継続的な貢献を続けた。

# 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  
GCOE 国際コーディネーター：中元哲也 GCOE 特任講師：納富拓也

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. Profilin1 は、胸骨発生と内軟骨性骨化を制御する(宮嶋大輔、早田匡芳、江面陽一、野田政樹)。

骨発生は、アクチン細胞骨格の制御下において、細胞の移動性と形態学的adaptationを必要とするダイナミックな過程である。このアクチン細胞骨格系は、アクチン結合タンパク質などの重要な調整因子によって制御される。その中でも、Profilin1 (Pfn1) は、アクチン繊維構造を制御する重要な因子であり、細胞遊走のような数多くの細胞活動に関与している。体の発生の初期において、骨格系の幹細胞と骨芽細胞の前駆細胞は、将来の骨格となる初期原基を形成するために移動する。この移動の間、これらの細胞は、微小環境内で適切な場所に自分自身を位置づけるのに、アクチン細胞骨格の再編成に基づいたプロセスを経る。しかしながら、骨格発生過程における間葉系前駆細胞 (MPC) の制御において、Pfn1 の役割は不明である。そこで本研究において、Prx1-Cre システムによって Pfn1 を MPC で遺伝的に欠損させる事により、骨格発生における Pfn1 の役割を調べた。Pfn1 欠損マウスは、四肢の長管骨の骨髄領域において、海綿骨の欠損を示した。Pfn1 欠損は、皮質骨の骨芽細胞には影響を及ぼさなかったため、位置特異的だった。Pfn1 欠損は、長管骨の縦軸方向の成長を抑制した。In vitro では、Pfn1 欠損は、骨芽細胞の遊走性の遅滞を誘導した。これらの観察は、Pfn1 が骨格発生の重要な分子であり、これは、少なくとも部分的には、細胞遊走性の遅滞と関連していることを明らかにした (J Biol Chem, 2012)。

### 2. 破骨細胞形成の新規制御因子としての Two-pore channel 2 の同定 (納富拓也、江面陽一、野田政樹)。

破骨細胞分化は、骨粗鬆症における骨量レベルを制御する重要なステップの一つであるが、破骨細胞形成に関与する分子は、完全には理解されていない。本研究においては、two-pore channel 2 (TPC2) が破骨前駆細胞に発現し、そのノックダウン (TPC2-KD) により、RANKL によって誘導される、多核化、酒石酸耐性脱リン酸化酵素 (TRAP) 活性、TRAP mRNA 発現レベル

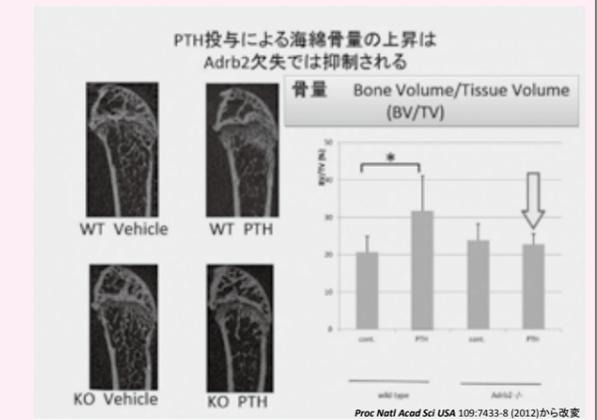
などの重要な事象が抑制された事を示す。細胞内シグナリングに関しては、TPC2-KD は、RAW 細胞において、RANKL によって誘導されるダイナミックなカルシウムイオンのウェービングのレベルを減少させた。TPC2 の標的を探索すると、NFATc1 の核内局在が TPC2-KD 細胞では遅延していた。最後に、TPC2-KD は、培養において、破骨細胞によるピット形成を抑制した。TPC2 が破骨細胞形成の重要な新規分子であると結論づける。(J Biol Chem, 2012)。

## ハイライト

「副甲状腺ホルモンによる骨同化作用は、 $\beta_2$  アドレナリン受容体によって制御される」(羽生亮、早田匡芳、守屋秀一、江面陽一、野田政樹)

カルシウムを制御する主要なホルモンである副甲状腺ホルモン (PTH) と、交感神経の主要な神経伝達物質であるノルエピネフリンは、それぞれ細胞表面の G タンパク質共役受容体である、副甲状腺ホルモン 1 型受容体 (PTHr)、 $\beta_2$  アドレナリン受容体 ( $\beta_2$ AR) を活性化することにより骨リモデリングを制御する。これらの受容体は、刺激性ヘテロ 3 量体 G タンパク質によって仲介される共通の cAMP/PKA シグナル伝達経路を活性化する。交感神経系を介した  $\beta_2$ AR の活性化は、骨形成を減少させ、骨吸収を増加させる。逆に、間欠的 PTH 投与 (iPTH) として知られている PTH (1-34) の日々の注射は、海綿骨と皮質骨形成の刺激を介して骨量を増加させて、骨粗鬆症の重篤なケースにおける骨折率を減少させる。本研究においては、iPTH は  $\beta_2$ AR (Adrb2) 遺伝子欠損マウスにおいて、骨同化作用を示さない事を報告する。 $\beta_2$ AR 欠損は、iPTH によって誘導される骨形成と骨吸収の増加をともに抑制した。 $\beta_2$ AR 欠損は、cAMP/PKA 経路によって制御される骨形成と骨吸収

に関与する、iPTH 標的遺伝子の発現をブロックした。これらのデータは、骨形成と PTH 同化作用を制御する、2 つの異なる G タンパク質受容体である PTHR と  $\beta_2$ AR の予想外の機能的相互作用を示唆する (Proc Natl Acad Sci USA, 2012)。



副甲状腺ホルモン (PTH) を毎日投与した野生型 (WT) マウスの大腿骨では、骨量が増加するが、アドレナリン  $\beta_2$  受容体 (Adrb2) 遺伝子を欠損した (KO) マウスに、同じように毎日 PTH を投与しても、骨量の増加が認められません。PTH は重度の骨粗鬆症の治療薬として使用されていますが、その作用機序は未だ不明な点が多い上、使用制限があり、新規薬剤の開発も期待されています。今回、私たちの研究において、PTH が骨量を増加させるメカニズムの一つとして、PTH の骨増加作用にはアドレナリン  $\beta_2$  受容体の存在が必須である事が明らかになり、今後、PTH 受容体とアドレナリン  $\beta_2$  受容体を標的とした新たな治療戦略が期待されます。



# 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- $\beta$  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. 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は哺乳類に至るまで保存されており、ほ乳類には4つの WNK ファミリー分子が存在する。その内、WNK1 及び WNK4 は偽性低アルドステロン症 II 型 (PHAII) と呼ばれる常染色体優性遺伝性的高血圧症の原因遺伝子として同定されている。当研究室において、WNK  $\rightarrow$  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、新たにショウジョウバエを用いて、WNK と相互作用する因子の探索を行うことにし、解析を行っている。

#### (1) WNK シグナル伝達経路の進化的保存

ショウジョウバエの WNK (DWNK) 及びその下流因子の相同因子である Fray が、ほ乳類の WNK 及び OSR1 と同様の相互作用を持つかを調べたところ、DWNK 及び Fray も培養細胞中で相互作用し、DWNK は Fray をリン酸化していた。また、DWNK 及び Fray、ほ乳類の WNK1 及び OSR1 の異所発現系を用いて、

翅後部に異所的に発現させたところ、全ての発現系において wing vein と呼ばれる翅の支持組織の異所的形成という表現型が観察された。以上のことから、WNK  $\rightarrow$  OSR1 というシグナル伝達経路は、ショウジョウバエでも保存されている経路であることが予測された。当研究室による、マウスや線虫における結果と合わせて考えると、WNK シグナル伝達経路は進化的に広く保存されていると考えられる。

#### (2) 下流転写因子

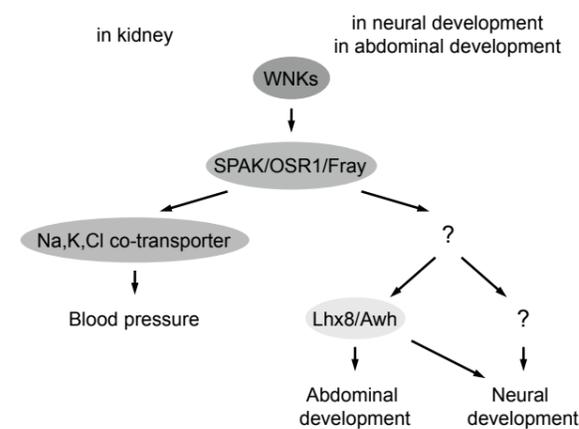
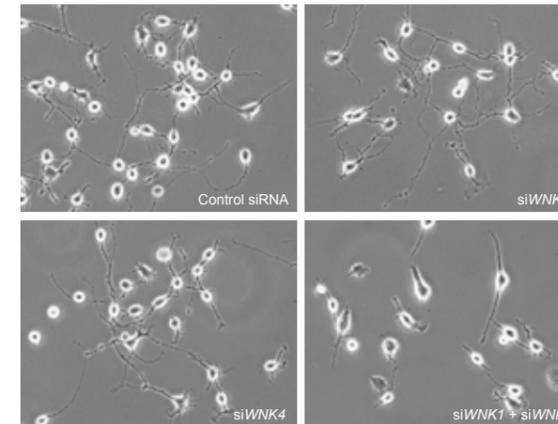
DWNK 変異体のモザイク解析、及び、Dominant Negative として機能するキナーゼ不活性型 DWNK を腹部で異所発現させると、腹部形成不全という表現型が観察された。Arrowhead (Awh) 変異体が同様の表現型を示すことから、Awh と DWNK との遺伝的相互作用が予想された。キナーゼ不活性型 DWNK と Awh を腹部で異所的に共発現させると、キナーゼ不活性型 DWNK による表現型が回復したこと、さらに DWNK 変異体の表現型が Awh の異所発現により回復したことから、Awh が DWNK の下流で機能する因子であることが予測された。また、胚期において、DWNK 変異体では、腹部原基での Awh の発現が消失していた。以上の結果から、Awh は DWNK の下流で機能している遺伝子であると考えられた。

また、Awh は Lhx8 として脊椎動物においても高度に保存されている。NIH3T3 細胞を用い、WNK シグナル伝達経路と Lhx8 の関係を調べたところ、高浸透圧刺激により Lhx8 の発現が経時的に上昇していた。この条件下で、siRNA を用いて、WNK1 及び WNK4 の双方をノックダウンすると、Lhx8 の発現上昇が見られなかった。また、WNK1、WNK4、さらには下流因子である OSR1 の強制発現において、Lhx8 の発現上昇が見られた。以上の結果から、Lhx8 は、ほ乳類において WNK シグナル伝達経路の標的因子であることが分かった。また、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。Lhx8 の発現が、Neuro2A 細胞の分化に伴い、誘導されていたが、WNK1 及び WNK4 の双方をノックダウンすると、Lhx8 の発現が誘導されず、Neuro2A 細胞においても Lhx8

は WNK シグナル伝達経路の下流因子として機能していた。また、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。

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、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 の活性化機構、シグナル伝達経路の詳細な機構などはまだ未解明であり、今後も解析を続けていく。

WNKs are involved in the neurite elongation in Neuro2A differentiation.



### 2. 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)  $\beta$ -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、 $\beta$ -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  $\beta$ -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。このように DVL は細胞内での局在の違いに伴い、Wnt シグナル伝達経路において複数の役割を担っている。

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  $\beta$ -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  $\beta$ -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/ $\beta$ -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  $\beta$ -catenin の核移行に寄与する機構こと、③ xIQGAP1 と直接結合する xImportin- $\beta$ 5 と xRan1 の機能消失実験等から、xImportin- $\beta$ 5 と xRan1 が IQGAP1 を介し、canonical Wnt シグナル伝達経路における DVL と  $\beta$ -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) を増加させた。
- (2) xIQGAP1 は *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

- い。
- (3) 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。
- (4) 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) を抑制した。

- (5) Ran 結合ドメイン (RGD ドメイン) を欠損した IQGAP1 は xIQGAP1 の機能消失による Wnt 表的遺伝子の発現抑制をレスキューできない。

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唆された。

## 業績目録

### 原著論文

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 in press*.
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.* in press.
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.

### 学会発表

1. 佐藤 淳、澁谷 浩司 A new downstream molecule, Awh is involved in the WNK signaling. 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月、福岡、口頭発表及びポスター発表

### 研究助成金

1. 澁谷浩司：文部科学省科学研究費補助金、基盤研究 (B) 「WNK シグナルによる発生制御機構

の解明」

2. 後藤利保：文部科学省科学研究費補助金、基盤研究 (C) 「Wnt シグナル伝達における IQGAP1 を介した  $\beta$  カテニンの核内移行機構の解析」
3. 佐藤淳：文部科学省科学研究費補助金、若手研究 (B) 「PHA2 型の原因遺伝子である WNK 及びそのシグナル伝達経路の包括的解析」

### 教育活動

#### 学内講義

1. 澁谷浩司：修士課程講義「細胞生物学特論」
2. 澁谷浩司、後藤利保、佐藤淳：博士課程講義「生命科学特論 II」
3. 澁谷浩司：GCOE 総合プレゼンテーション

# 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

## 研究内容

### 概 略

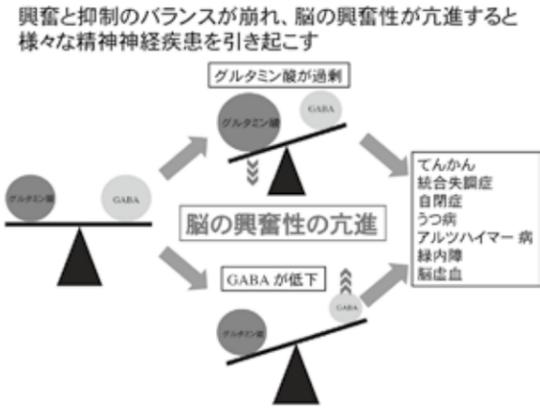
種々の分子や細胞の機能及びこれらの異常がどのように動物の個体レベルでの行動及び行動異常に関与するかについて遺伝子改変動物を用いて研究する。これらの解析を通して、記憶・学習などの脳高次機能及び機能異常の機構を、分子・細胞および個体レベルで理解する。

## 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。

周産期障害では胎児脳は虚血状態となり、脳内に過剰なグルタミン酸が放出される。また周産期障害は自閉症や統合失調症のリスクを高め、これらの精神疾患では脳の微細構造異常が報告されている。GLAST と GLT1 の二重欠損マウスは過剰なグルタミン酸により、胎児期において大脳新皮質・海馬・扁桃体などの脳部位の形成障害を示す。今年度、我々は NMDA 型グルタミン酸受容体の過剰活性化がこれらの障害の原因であることを新たに明らかにした (Aida et al., 2012)。本研究成果から、脳形成障害の新規治療薬の標的として NMDA 型グルタミン酸受容体が有用であることが示された。

### 2. うつ病における手綱核の役割

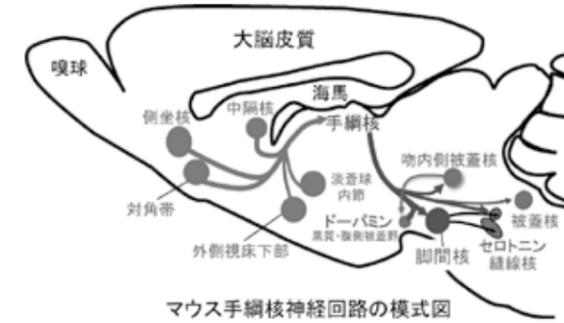
手綱核は脊椎動物の進化を通じて保存されている神経核であり、ドーパミン及びセロトニン神経系の抑制的制御中枢として知られてきた (Aizawa et al., 2012)。近年の研究からうつ病モデル動物ではドーパミン神経系の制御中枢である手綱核のシナプス過剰活性化やグルタミン酸濃度調節に関わるアストロサイト型グルタミン酸トランスポータ GLT1 の発現低下がみられることから手綱核のうつ病への関与が示唆されてきた。

これまでに我々は急性及び慢性ストレス下のマウスにおいて最初期遺伝子 c-Fos が外側手綱核及びその入出力神経核において活性化している事を見出している。しか

し、手綱核の過剰活性化とうつ病様行動の関係は未だ不明なままであった。

今年度は、手綱核の実験的過剰活性化が行動に与える影響を調べるため、シナプスグルタミン酸濃度を上昇させる GLT1 阻害剤 Dihydrokainic acid (DHK) を手綱核特異的に投与した。覚醒マウスの特定の脳部位にのみ DHK を投与するために、新たに頭部固定装置を開発し、イオン泳動法を組み合わせる事により手綱核特異的薬剤投与に成功した。DHK を外側手綱核に投与されたマウスは、外側手綱核及びその出力神経核につい c-Fos 蛋白の上昇をみとめた。このようにして引き起こされた手綱核過剰活性化がストレス下における行動に与える影響を尾懸垂試験で検討したところ、DHK 投与群の動物は、Phosphate buffered saline を投与されたコントロール群と比較して、有意に長い無動時間を示した。

これらの結果は、手綱核過剰活性化が急性ストレス化における無動に代表される絶望行動を増悪させることを示しており、手綱核過剰活性化がうつ病様行動を引き起こす初めての実験的証拠と考えられる。



### 3. 遺伝子により決定される脳の性差

ヒトを含む脊椎動物では、雄と雌では体のつくりや生理機能において多くの違いがある。雌では卵巣、雄では精巣の分化・発達が起こり、それぞれの器官から分泌される性ホルモンの働きによって、これらの性差のほとんどが生じることが通説となっている。一方、性分化に別のメカニズムが関与することも近年示唆されるようになってきたが、不明な点が多い。また、ヒトでも様々な脳の疾病で、男性と女性で罹患率や病態が異なることが報告されているが、その原因は必ずしも明らかにはなっ

ていない。

今回、脳の性によって決まる雄と雌の性質を調べるために、脳とそれ以外の身体の性が異なるキメラニワトリを作って解析した。鳥類は卵の中で胚が育つため、外科的操作によって発育初期の胚で脳を交換することができる。脳の交換は精巣や卵巣ができる前に行った。脳が雌で体が雄であるニワトリの行動は、性行動も含めて、雄鶏と区別がつかなかった。脳が雄で体が雌であるニワトリの行動は雌鶏と同じだったが、産卵開始の遅延、さらに産卵周期の乱れによる産卵数の減少がみられた。血中の性ホルモンの濃度が脳の性によって変化することはなかったが、体が雄型か雌型に関わらず、脳に含まれる女性ホルモンの一種であるエストロジオールの量は雄の脳では雌の脳よりも高いという結果も得られた。

今回の研究成果は、雌を特徴づける性質のうち、性成熟のタイミングと性周期は遺伝的に雌である脳による制御が必要であり、遺伝的に雄である脳ではその機能を完全には担うことができないことを示している。雄と雌の脳には、精巣や卵巣からの性ホルモンに依存せずに、発達様式がもともと異なる神経回路があり、その回路の異常が雌または雄のもつ特異的な機能に障害をもたらす可能性が考えられる。今後このような神経回路を詳細に調べることができれば、脳の性差、性特異的な機能障害の原因、さらに脳疾患の男女差の解明に近づくことができると期待される。



### 脳と身体の性が異なる鶏を用いて行動や生理機能を解析



## ハイライト

「胎児期のグルタミン酸受容体の過剰な活性化は、脳の形成異常を引き起こす」

GLAST と GLT1 の二重欠損マウスは過剰なグルタミン酸により、胎児期において大脳新皮質・海馬・扁桃体などの脳部位の形成障害を示す。胎児脳にはほぼ全てのタイプのグルタミン酸受容体が発現しているが、このうちどのタイプが脳形成障害に関与するかは不明であった。今回、GLAST と GLT1 の二重欠損マウスからさらに、NMDA 型グルタミン酸受容体の必須サブユニットである NR1 を欠損した三重欠損マウスを作製することで、NMDA 型グルタミン酸受容体の過剰活性化がこれらの障害の原因であることを新たに明らかにした(Aida et al, 2012)。本研究結果から、

周産期虚血による脳形成障害の新規治療薬の標的として NMDA 型グルタミン酸受容体が有用であることが示された。

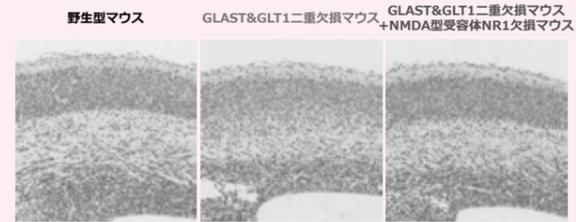


図 NMDA 型グルタミン酸受容体の欠損により GLAST と GLT1 の二重欠損マウスの大脳皮質の層形成異常は正常に戻る  
(左)胎齢16日目の野生型マウスの大脳皮質。明瞭な層の境界が見られる。  
(中)GLAST と GLT1 の二重欠損マウスでは層の境界が不明瞭になり、層形成の異常が認められる。  
(右)GLAST, GLT1 および NMDA 型受容体 NR1 の三重欠損マウスでは、明瞭な層の境界が認められる。

## 人事異動

転入: 松浦春香 (事務補佐員)、石久保春美 (技術補佐員)、杉本調哉、崔万鵬 (博士課程)、白寧 (特任助教)

転出: 楠木亜希子 (事務補佐員)、山本亜伊梨 (技術補佐員)、吉田純一 (博士課程)

## 業績目録

### 発表論文

1. Aizawa H, Kobayashi M, Tanaka S, Fukai T, Okamoto H. Molecular characterization of the subnuclei in rat habenula. *J Comp Neurol*. 2012; 520:4051-4066.
2. Suzuki, K., Maekawa, F., Suzuki, S., Nakamoi, T., Sugiyama, H., Kanamatsu, T., Tanaka, K., Ohki-Hamazaki, H. Elevated expression of brain-derived neurotrophic factor facilitates visual imprinting in chicks. *J Neurochem* 123. 800-810, 2012.
3. Hayashi, H., Eguchi, Y., Fukuchi-Nakanishi, Y., Takeya, M., Nakagata, N., Tanaka, K., Vance, JE., Tanihara, H. A potential therapeutic function of apolipoprotein E-containing lipoproteins for normal tension glaucoma. *J Biol Chem* 287. 25395-25406, 2012.

4. Aida, T., Ito, Y., Takahashi, YK., Tanaka, K. Overstimulation of NMDA Receptors Impairs Early Brain Development in vivo. *PlosOne* 7:eE36853, 2012.
5. Karlsson, R-M., Adwmark, L., Molander, A., Perreau-Lenz, S., Singley, E., Solomon, M., Holmes, A., Tanaka, K., Lovinger, DM., Spanagel, R., Heiling, M. Reduced alcohol intake and reward associated with impaired endocannabinoid signaling in mice with a deletion of the glutamate transporter GLAST. *Neuropsychopharmacology* 63. 181-189, 2012.
6. Tsai, M-C., Tanaka, K., Overstreet-Wadiche, L., Wadiche, JI. Neuronal glutamate transporters regulate glial excitatory transmission. *J Neurosci* 32. 1528-1535, 2012.
7. Maekawa, F., Sakurai, M., Yamashita, Y., Tanaka, K., Haraguchi, S., Yamamoto, K., Tsutsui, K., Yoshioka, H., Mutakami, S., Maeda, T., Tadano, R., Goto, T., Tomonari, K., Oka, T., Ohara, K., Shiraishi, J., Bungo, T., Tsudzuki, M., Ohki-Hamazki, H. A genetically female brain is required for a regular reproductive cycle in chicken brain chimeras. *Nature Commun* 4. 1372, 2013.

### 研究費

1. 相澤秀紀: 脳内モノアミン制御を担う手綱核神経回路の遺伝学的同定 文部省科学研究費補助

- 金、若手研究 (B) 代表
2. 相澤秀紀: 社会的ストレス感受性の神経制御機構 成茂神経科学研究助成基金 代表
3. 相澤秀紀: ストレス感受性を制御する神経機構の研究 三井生命厚生事業団、医学研究助成 代表
4. 相澤秀紀: 手綱核による社会的ストレス感受性制御の神経機構 武田科学振興財団、医学系研究奨励 代表
5. 相澤秀紀: 手綱核によるストレス感受性の制御機構 内藤記念科学振興財団 奨励金・研究助成 代表
6. 相澤秀紀: グルタミン酸神経伝達による社会ストレス感受性の制御機構 ひと・健康・未来研究財団 研究助成 代表
7. 相澤秀紀: 脳の局所興奮性によるストレス感受性の制御機構 上原記念生命科学財団、研究奨励金 代表
8. 相田知海: モデルマウスを用いた正常眼圧緑内障の病態解明と新規治療薬の探索 公益財団法人鈴木謙三記念医科学応用 研究財団調査研究助成 代表
9. 田中光一: 生涯に亘って心身を支える脳の分子基盤、環境要因、その失調の解明 脳科学研究推進プログラム課題 E 分担
10. 田中光一: 統合失調症のシナプスグリア系病態の評価・修復法創出 戦略的創造研究事業 (CREST) 分担
11. 田中光一: 緑内障統合的分子診断法の確立と実証 厚生労働科学研究費補助金 分担

# 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

## 研究内容

### 概略

当分野は、「生体の防御と恒常性維持システム」に焦点をあて、それらを担う免疫細胞あるい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明らかに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・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、樹状細胞の源を発見 (図1)

樹状細胞 (dendritic cell, DC) は、1973年にラルフ・スタインマン博士により発見され、2011年、博士がその功績によりノーベル生理学・医学賞を受賞した。現在では、DCは、感染など緊急時における免疫応答の発動

のみならず、定常状態における免疫寛容の誘導維持に必要な不可欠な細胞として理解されている。DCは、従来型樹状細胞 (conventional DC, cDC) と形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid DC, pDC) に大別され、後者はウイルス感染や自己免疫病 (全身性エリテマトーデス、乾癬) で大量のI型インターフェロンを産生することを特徴とする。血液細胞は造血幹細胞を源とし、DCも例外ではないが、DCのみに分化することが運命付けられた前駆細胞の同定は、同細胞分化系譜の観点とトランスレショナル興味を同時に包含する重要な研究といえる。私たちの研究グループは、これまでにスイスの研究グループとの共同研究として、上記条件を満たすDC前駆細胞を同定し報告したが (Nat Immunol 8, 1207-1216 (2007))、同前駆細胞から分化するDCの大多数がcDCであったため、pDCへの分化能に優れた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、マウス骨髓細胞を詳細に解析した結果、pDCへの分化能に優れたDC前駆細胞の同定に成功した (Immunity, in press)。新たに発見したDC前駆細胞は、以前報告されたものに比べ、pDCを7-8倍多く生み出し、pDC分化に必須の転写因子E2-2を高く発現していた。また、この2つのDC前駆細胞をまとめて「共通樹状細胞前駆細胞 (common DC progenitor, CDP)」と定義した。さらに、CDPが多能前駆細胞から直接分化する経路の存在も明らかになった。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ある。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。

#### 2) 樹状細胞による過剰免疫応答抑制メカニズムを解明

免疫応答は感染病原体を排除すると同時に宿主個体を

損傷するという二面性を持つ。しかしながら、感染をはじめとする免疫反応発動時における免疫寛容 (免疫抑制) の重要性は軽視されがちである。重篤な感染症に罹患した時ほど、激しい免疫反応を抑制し、組織の損傷を最低限に抑え、宿主個体の生存を保障するシステムが必要である。私たちの研究グループは、このような観点から研究を進め、DCによる新しい免疫寛容誘導機構を同定した。高濃度のToll様受容体リガンドあるいは感染後爆発的に増殖するウイルスを野生型マウスに投与すると、赤血球系列の未熟な細胞 (erythroid cell) が骨髓から末梢に動員され、同細胞にアポトーシスが誘導されてDCに貪食される現象が観察された。いわゆる“血球貪食”であるが、興味深いことに、“血球貪食”したDCから“血球貪食”依存性にIL-10が産生された。この現象の生理的意義を追求するため、DCのみがIL-10を産生できないマウス (*Cd11c-Cre/Il10<sup>fl/fl</sup>*) を作製し、重篤なウイルス感染症を誘導したところ、CTL活性の亢進に因る肝障害が誘導され、マウスが死亡した。これらの結果は、重篤な感染症や炎症に際し誘導される“血球貪食”は、IL-10の産生を介して、過剰な免疫反応による組織傷害を抑制し個体の生存を保障するための仕組みであることを示している。今後、重篤な感染症や炎症などの治療法への応用が期待される (投稿中)。

### 2. 粘膜免疫の研究

粘膜面では特に感染のない生理的状态でも恒常的に大量のIgAが産生されており、無数に存在する常在菌から粘膜を守り、常在菌叢のバランスを保つことに役立っている。この恒常的なIgAの産生では、DCが重要な役割を担うと考えられており、私たちの研究グループは、ユニークなDCサブセットの存在とその役割を報告してきた (Nature 448, 929-933 (2007) ; Immunol Rev 234,

247-258 (2010) ; Immunity 34, 247-257 (2011))。また、潰瘍性大腸炎モデルを用いて、炎症の誘導と緩解における常在菌やオートファジーの関わりを研究している。

### 3. 組織幹細胞を基軸とした難治性疾患の克服

組織幹細胞は組織を構成する細胞の供給源となる細胞であり、多系統の細胞に分化する“多分化能”と幹細胞自身を再生する“自己複製能”を持つ細胞と定義される。血液、腸上皮、皮膚 (表皮) のように活発なターンオーバーを繰り返す組織で生涯にわたり組織の機能が維持されるためには、組織幹細胞が十分に保たれ、同幹細胞から適切な数と種類の組織細胞が供給される必要があり、その破綻はさまざまな疾患誘導に繋がる。私たちの研究グループは、I型インターフェロンシグナルが造血幹細胞の性状変化や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、以下の研究を推進している。

#### 1) 先天性代謝疾患ムコ多糖症の治療

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。私たちの研究グループは、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に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の治療に応用し一定の治療効果を得ている (Blood, in press)。

#### 2) 表皮・腸上皮疾患病態の解明

表皮過形成モデルや腸疾患モデルを用いて、皮膚や腸の組織幹細胞の機能や分化異常という視点から病態構築機序を解明すべく研究を行っている。

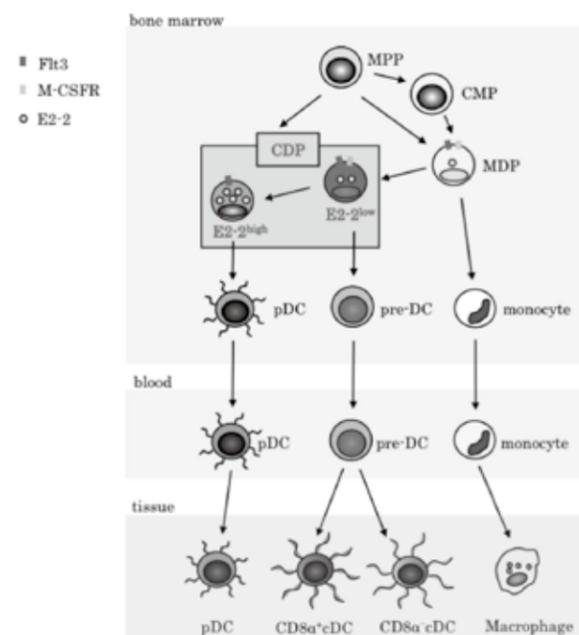


図1 新たなDC前駆細胞の発見と樹状細胞分化系譜における位置付け

## 業績目録

### 原著

1. Liu J, Guo YM, Hirokawa M, Iwamoto K, Ubukawa K, Michishita Y, Fujishima N, Tagawa H, Takahashi N, Xiao W, Yamashita J, Ohteki T, and Sawada K. A synthetic double-stranded RNA, poly I:C, induces a rapid apoptosis of human CD34+ cells. *Exp Hematol*. Apr 40(4), 330-341, 2012.
2. 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*. November 9, 2012. (Epub ahead of print)
3. Onai N, Kurabayashi K, Hosoi-Amaike M, Toyama-Sorimachi N, Matsushima K, Inaba, K, and Ohteki T.pA clonogenic progenitor with prominent plasmacytoid dendritic cell developmental potential. *Immunity*, in press
4. 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 treatment of a congenital metabolic disorder. *Blood*, in press

### 総説・解説

1. 梶木俊聡、手塚裕之 「pDCによる新たなIgA産生誘導メカニズム」医学のあゆみ 240, 182-183 (2012)
2. 梶木俊聡、手塚裕之 「腸管粘膜防御機構を担うIgA抗体の新たな産生機構（形質細胞様樹状細胞のユニークな役割）」炎症と免疫 20, 178-182 (2012)

### 国際学会招待講演

1. Ohteki T. Role for plasmacytoid dendritic cells in gut IgA induction. The 4th Symposium for the Mext Priority Research on Immunological Self. Kyoto 2012.1.28
2. Onai N. Monocyate derived dendritic cells perform hemophagocytosis to fine-tune excessive immune responses. The 20th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages 2012 (MMCB2012). Tokyo 2012.6.15
3. Ohteki T. Monocyte-derived dendritic cells perform hemophagocytosis to fine-tune excessive immune responses. The 11h Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji 2012.9.14
4. Ohteki T. Role for monocyte-derived cells in fine-tuning excessive immune responses. The 12th International Symposium on Dendritic

Cells. Daegu, Korea 2012.10.9

### 国際学会発表

1. Sato T, Ikeda M, Yotsumoto S and Ohteki T. Combination effects of type-I IFNs and imatinib against Leukemia-initiating cells I mouse CML model. 10th Stem Cell Research Symposium. Awaji 2012.5.31
2. Tezuka H, Abe Y, and Ohteki T. Prominent role for plasmacytoid dendritic cells in mucosal T cell-independent IgA induction. The 20th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages 2012 (MMCB2012). Tokyo 2012.6.15
3. Onai N, Oyagi H, Sato T, Yotsumoto S, Kurabayashi, Hosoi-Amaike M, Sawada K, and Ohteki T. Monocyte-derived dendritic cells perform hemophagocytosis to control excessive immune response. The 12th International Symposium on Dendritic Cells. Daegu, Korea 2012.10.9
4. Tezuka H, and Ohteki T. Prominent role for plasmacytoid dendritic cells in mucosal T cell-independent IGA Induction. The 12th International Symposium on Dendritic Cells. Daegu, Korea 2012.10.11
5. Sato T, Yotsumoto S, and Ohteki T. Conmibation effects of type-I IFNs and imatinib against Leukemia-initiating cells in mouse CML model. 2012 Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. Kobe 2012.12.6
6. Onai N, Ohyagi H, Sato T, Yotsumoto S, Kurabayashi K, Sawada K, and Ohteki T. Monocyte derived dendritic cells perform hemophagocytosis to fine-tune excessive immune responses during chronic virus infection. 2012 Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. Kobe 2012.12.7

### 国内学会・研究会招待講演

1. 梶木俊聡 「樹状細胞による免疫調節ダイナミズムの解明」グローバルCOEプログラム生体調節シグナルの統合的研究 最終シンポジウム 群馬 2012.2.9
2. 梶木俊聡 「卓越したpDC分化能をもつ新規DC前駆細胞の同定」第36回皮膚科免疫セミナー 東京 2012.3.3
3. 梶木俊聡 Toward new aspect of integrated surface immunology 第4期SAVRIS 3rd Meeting 大阪 2012.3.23
4. 梶木俊聡「Plasmacytoid DC分化能に優れた新規DC前駆細胞の同定」第4回免疫適塾 つくば 2012.8.18
5. 梶木俊聡 「卓越したpDC分化能をもつ新規DC前駆細胞の同定」BD学術セミナー 2012免疫学の最前線 東京 2012.8.31
6. 梶木俊聡 「からだを守るしくみ“免疫”から学ぶ 旭世衛」 四大学連合文化講演会 東京 2012.10.12

### 国内学会発表

1. 梶木俊聡 第22回日本樹状細胞研究会（第52回日本リンパ網内系学会総会）福島 2012.6.15

### 学外教育活動

梶木俊聡：群馬大学大学院医学系研究科非常勤講師

### 競争的研究費等の取得状況

1. 梶木俊聡（代表）独立行政法人科学技術振興機構戦略的創造研究推進事業CREST「樹状細胞制御に基づく粘膜免疫疾患の克服」
2. 梶木俊聡（代表）梶木俊聡（代表）文部科学省科学研究費補助金 挑戦的萌芽研究「樹状細胞による新たな過剰免疫応答抑制機構」
3. 佐藤 卓（代表）文部科学省科学研究費補助金 新学術領域研究 [I型IFNの作用を利用した白血病幹細胞を標的とする白血病根治療法の創出]
4. 手塚裕之（代表）文部科学省科学研究費補助金 若手研究 (B)「樹状細胞オートファジーによる腸管粘膜免疫系ホメオスタシスの制御」
5. 佐藤 卓（代表）文部科学省科学研究費補助金 若手研究 (B)「幹細胞性の維持におけるインターフェロンシグナル制御システムの意義」
6. 中西祐輔（代表）文部科学省科学研究費補助金 若手研究 (B)「腸管好酸球の恒常性維持と破綻における役割」
7. 浅野純平（代表）文部科学省科学研究費補助金 若手研究 (B)「腸管恒常性維持におけるオートファジー誘導センサーとしてのNod様受容体の役割」
8. 小内伸幸（代表）文部科学省科学研究費補助金 基盤 (C)「マウス及びヒト新規樹状細胞前駆細胞の同定と機能解析」
9. 梶木俊聡（代表）平成23年度上原財団研究助成金「組織幹細胞を基軸とした疾患理解と治療応用」
10. 手塚裕之（代表）住友財団 基礎科学研究助成「炎症性腸疾患の治療過程における樹状細胞TGF-βシグナルの重要性」
11. 手塚裕之（代表）武田科学振興財団 生命科学研究助成「樹状細胞オートファジーによる粘膜免疫系構築機構の解明研究」
12. 手塚裕之（代表）内藤記念科学振興財団 医学系研究助成「腸管恒常性維持における樹状細胞オートファジーの役割の解明」
13. 佐藤 卓（代表）日本白血病研究基金 [I型インターフェロンと分子標的薬（イマチニブ）の併用による、白血病幹細胞を標的とした新規慢性骨髄性白血病根治療法の確立]
14. 中西祐輔（代表）武田科学振興財団 医学系研究奨励（基礎）「腸管免疫システムの腸内細菌に対する恒常性維持と破綻機構の解明」
15. 佐藤 卓（代表）武田科学振興財団 医学系研究奨励（基礎）「インターフェロンシグナル制御不全が表皮幹細胞機能に及ぼす影響とその慢性皮膚疾患形成への関わり」

# 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

### 概略

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. 心血管系性差医療の基礎的研究

疾患罹患率・薬物に対する反応には男女間で差異がある。これを考慮した医療「性差医療 gender-specific medicine (GSM)」が注目されている。性差をもたらすメカニズムの一つとして性ホルモン作用がある。性ホルモン作用には、古典的な「ゲノム作用 genomic action」に加えて、膜局在シグナル伝達系による「非ゲノム作用 non-genomic action」が存在する。本研究室では、一連の研究により性ホルモン非ゲノム作用が不整脈の性差の原因となることを明らかにした。本年度は、性ホルモン非ゲノム経路のシグナロゾームを FRET などの分子イメージング技術を使って検討を行った。

### 2. 心房細動の研究

心房細動は最も頻度の高い不整脈であり、日本における患者数は約 350 万人に上るとされている。また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一つとなる。高齢者で罹患頻度が飛躍的に高く、高齢化社会を迎えたわが国では、心房細動の予防・治療法の確立が喫緊の課題となっている。

#### (1) 心房細動関連遺伝子多型の研究

本研究室は、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）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。また、昨年度は国際的メタ解析 (CHARGE study) に参加し、心房細動の遺伝的リスク

として、合計 10 のリスクの同定に成功した (図 1)。(東京大学医学研究所中村祐輔教授、理化学研究所田中敏博博士、本学保健衛生学科検査学専攻沢辺元治博士、本学循環器内科・不整脈センターとの共同研究)

Locus	Closest gene	European population				Japanese population			
		SNP <sup>#1</sup>	MAF <sup>#2</sup> (%)	Relative risk (95% confidence interval)	P-value <sup>#2</sup>	SNP <sup>#1</sup>	MAF <sup>#2</sup> (%)	Relative risk (95% confidence interval)	P-value <sup>#2</sup>
1q21	KCNJ3	rs6666258	29.9	1.18 (1.13-1.23)	2.0x10 <sup>-14</sup>	rs7514452	18.6	0.72(0.62-0.84)	4.9x10 <sup>-6</sup>
1q24	PRRX1	rs3903239	44.7	1.14 (1.10-1.18)	9.1x10 <sup>-11</sup>	rs593479	50.3	1.21(1.07-1.37)	2.4x10 <sup>-2</sup>
4q25	PITX2	rs6817105	13.1	1.04 (1.05-1.03)	1.8x10 <sup>-16</sup>	rs2634073	31.9	1.84(1.59-2.13)	3.7x10 <sup>-9</sup>
5q31	WNT7A	rs2040862	17.8	1.15 (1.09-1.21)	3.2x10 <sup>-8</sup>	rs6878439	12.7	1.20(1.00-1.44)	0.53
7q31	CAV1	rs3807989	40.4	0.88 (0.84-0.91)	9.6x10 <sup>-11</sup>	rs3807989	34.5	0.78(0.67-0.87)	7.0x10 <sup>-2</sup>
9q22	Cbr3	rs10821415	42.4	1.13 (1.08-1.18)	7.9x10 <sup>-8</sup>	rs6479562	14.7	0.72(0.59-0.87)	4.2x10 <sup>-4</sup>
10q22	SYNPO2L	rs10824026	15.8	0.85 (0.81-0.90)	1.7x10 <sup>-8</sup>	rs3180427	7.9	1.16(1.01-1.33)	0.34
14q23	SYNE2	rs1152591	47.6	1.13 (1.09-1.18)	6.2x10 <sup>-10</sup>	rs7161192	48.4	0.88(0.78-0.99)	0.041
15q24	HCN4	rs7164883	16.0	1.16 (1.10-1.22)	1.3x10 <sup>-8</sup>	rs9920504	2.8	0.68(0.50-0.94)	0.022
16q22	ZFH3	rs2106261	17.6	1.24 (1.17-1.30)	3.2x10 <sup>-10</sup>	rs12932445	37.0	0.80(0.71-0.91)	6.8x10 <sup>-4</sup>

図 1 心房細動 GWAS の国際メタ解析結果  
欧米人と日本人の心房細動関連 SNPs の比較

#### (2) 心房細動関連遺伝子の生物学的機能解析

(1) で同定された心房細動関連遺伝子の機能解析を行っている。有意水準がトップ 2 の SNPs と (A) の 10 リスク以外の日本人のみで心房細動との関連が同定された 2SNPs の解析を行っている。

有意水準の最も高かった SNP が位置する 4q25 領域には遺伝子が存在せず (gene desert)、最も近傍の遺伝子は約 150 kb 離れた転写因子 Pitx2 であることから、4q25 が long-range cis regulation の調節領域であることが示唆される。心筋梗塞で最も関連の高かった 9p21、肥満と最も関連の高かった 16q12.2 も gene desert であり、コモン疾患が gene desert の多型で規定されることは一般的であり、その機序解明はホットな研究領域となっている。我々は、4q25 の epigenome 解析・3C アッセイなどを行い、同部位が bivalent regulator として機能すること、これが発生段階 (間葉系細胞から心筋細胞への分化段階) で作用すること、等を明らかにした。

#### (3) 心房細動初期過程に関わる炎症・免疫機転

心房細動は多因子疾患であり、多くの危険因子と心房細動発症を繋ぐ因子として慢性炎症が背景にあることが示唆されている。そこで、危険因子の中でも頻度の高い心房拡大と慢性炎症の関連を検討した。In vitro, in vivo 実験から、心筋の伸展刺激によりギャップ結合チャ

ネルの 1 つ pannexin-2 を介する ATP 分泌がマクロファージ動員を誘導することを明らかにした。当該発表論文は、Boston Symposium 2013 で Best Basic Paper on AF 2012 に選ばれた。

### 3. 心室頻拍・突然死の研究

突然死 sudden death のほとんどが致死性不整脈である心室頻拍・心室細動によるものであり、その発現機構の解明と予防法・治療法の確立はいまだに不整脈研究の最重要課題となっている。本研究室では遺伝子改変マウスを用いたアプローチにより、心室頻拍・心室細動の病態解明を目指している。

#### ●心臓ヒス・プルキニエ系特異的転写因子 Irx3 の遺伝的異常と運動時突然死

運動中の突然死の頻度は 0.01% 程度と言われており、これは競技スポーツとリクリエーションスポーツの両者で見られる。我々は、ヒス・プルキニエ系特異的に発現する転写因子 Irx3 の遺伝的異常によりが運動中の致死性不整脈が発現することをマウスとヒトで見出した。すなわち、運動に関連した心臓突然死の遺伝的リスクの一つを同定することに成功したものと考える。

(浜松医科大学医学部生化学講座三浦直行教授、国立循環器病センター清水渉博士、横浜労災病院野上昭彦博士、本研究所分子病態分野木村彰方教授との共同研究)

### 4. iPS 細胞を用いた不整脈研究

従来の不整脈研究は、ヒト以外の生物種 (ラット、モルモットなど) の心筋細胞を用いた方法、あるいはヒト遺伝子を培養細胞 (HEK 細胞など) に異所性に発現させてシステムを用いて行われてきたが、実際に不整脈の発生の環境場、特に興奮-収縮連関・細胞内 Ca<sup>2+</sup> ハンドリングが欠如した環境場での検討である点が深刻な問題点となっている。ヒト iPS 細胞から分化誘導した心筋細胞を用いることにより、この問題点のない不整脈研究が可能となることが期待される。

#### (1) 家族性突然死疾患モデルの iPS 細胞樹立と解析

家族性突然死症候群の LQT・Brugada syndrome (BrS) 患者の皮膚生検標本から iPS 細胞を樹立し、これから分化誘導した心筋細胞の機能解析を行っている。現時点で、LQT1, LQT2, LQT3, BrS 患者から iPS 由来心筋様細胞の樹立に成功している。本年度は LQT3/BrS 複合変異の iPS 由来心筋細胞を用いて、比較的若年発症する LQT3 の表現型は iPS 由来心筋細胞で観察されるが、比較的壮年発症の BrS の表現型は観察されないこと、これには iPS 由来心筋細胞と成熟心筋細胞における電位依存性 Na<sup>+</sup> チャネルの  $\beta$  サブユニットの違いが関与することを明らかにした。

(慶應義塾大学医学部循環器内科学教室・再生医学教室福田恵一教授との共同研究)

#### (2) ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた QT 延長薬評価系の確立

市販薬の最も頻度の高いリコールの原因として QT 延長に伴う不整脈があり、新薬開発において厳密な QT 延長に伴う安全性評価が求められている。これらの QT 延長のほとんどが hERG チャネル抑制に基づくことから、新薬開発においては、国際規格の ICHS7B で① in vitro の hERG アッセイ、② in vivo の QT 延長アッセイ、③ ヒトでの thorough QT test (TQT) が求められている。②、③でかかる労力・コストが大きなことから、in vitro でのアッセイの制度の向上が期待されている。特に、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いることによる精度向上に大きな期待が寄せられている。そこで、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた QT 延長薬評価システムの構築とその validation を行っている。本年度は、評価系確立の基盤となるヒト ES 由来心筋細胞と iPS 由来心筋細胞の電気生理学的特性の違いを明らかにした。

(本学生体材料工学研究所情報分野安田賢二教授、国立医薬品食品衛生研究所棟田泰成博士との共同研究)

### 5. 先端テクノロジーを用いた心血管系研究

#### (1) Motion vector 法を用いた心筋収縮機能解析

従来の心筋収縮能アッセイは、in vitro でマグヌスを用いた実験、in vivo での心エコー法、カテーテルによる心内圧・心容量測定などにより行っており、high/intermediate throughput で心筋収縮性の評価は極めて困難であった。ソニー株式会社が開発した motion vector 法は、in vitro で画像処理を行うだけで心筋収縮速度、心筋拡張速度を測定することが可能である。2011 年度からソニー株式会社と共同研究契約を結び、本システムの臨床応用へ向けた検討、特にヒト iPS 由来心筋細胞への応用を行っている。本年度は、

- ・ motion vector が心筋細胞の発生張力と相関することを確認した。
- ・ motion vector が心筋細胞を培養するゲルの硬度の影響を受けることを見出した。
- ・ MVP 法を用いて、疾患 iPS 由来心筋細胞 (心筋症など) の収縮能評価を行った。
- ・ 小型魚類 (ゼブラフィッシュ) の心収縮能評価への応用を行った。

(ソニー株式会社先端マテリアル研究所ライフサイエンス研究部安田章夫博士、松居恵理子博士、早川智弘博士、鳥野初萌博士、同技術開発本部國広威博士との共同研究)

#### (2) 心臓電気現象 3-D シミュレーター構築

京コンピュータの医療分野応用の 1 つとして、生命



# 先端分子医学研究部門 幹細胞制御分野

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

## 研究内容

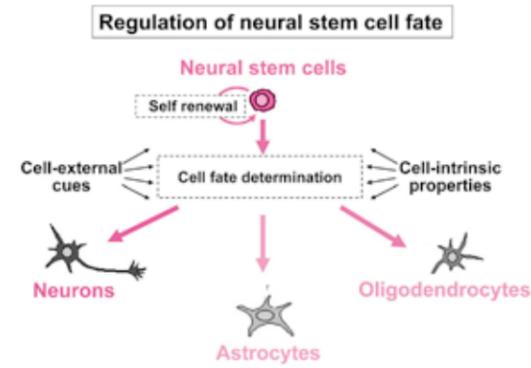
### 概要

生体内各組織の形成・維持・再生に重要な役割を果たす幹細胞は、それぞれの組織を構成する多細胞集団を生み出す一方で、そのような多分化能を維持した自己複製も行う。それら組織幹細胞（体性幹細胞）の発生や多分化能維持、あるいは組織内各細胞系譜への分化といった過程においては、増殖分化因子や細胞外マトリクスなどによる細胞外由来性のシグナルと、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。

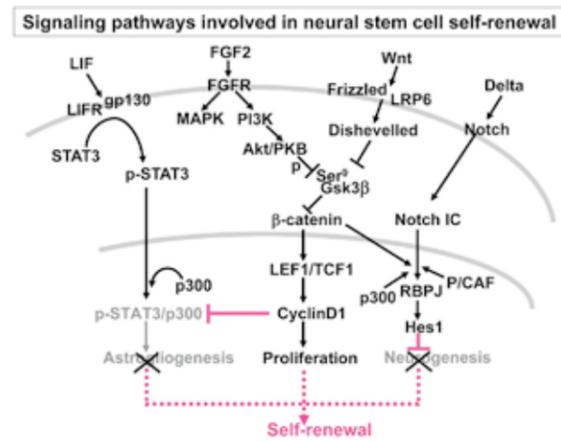
## 研究紹介

### 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

神経幹細胞は自己複製能を有する一方で、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトを生み出す多分化能を持つ。神経幹細胞の自己複製過程および分化の運命決定過程では、増殖分化因子や細胞外マトリクスなどによる細胞外由来性のシグナルと、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（右上図）。2012年には、胎生期マウス神経幹細胞の自己複製に関する分子基盤について、以下の様に新たな示唆を与える結果を得た。神経幹細胞の増殖因子として fibroblast growth factor 2 (FGF2) と Wnt が知られている。当分野では以前に、神経幹細胞において FGF2、Wnt、Notch のシグナルが相互作用して、前2者のシグナルは、GSK3βの不活化



を経たβ-cateninの核内蓄積量により、cyclin D1発現誘導を経て増殖促進性に働き（下図中央）、その一方で、β-cateninはNotchシグナルの増強によるニューロン分化抑制性に働くことで（下図右）、自己複製に寄与することを明らかにした。本年はさらに、FGF2/Wntシグナルがアストログリア分化を抑制する機構として、GSK3β/β-catenin経路のひとつの標的遺伝子産物であるcyclin D1が細胞周期促進作用とは別にGFAP陽性アストロサイトの分化を抑制することを見出した。その分子機構として、cyclin D1がSTAT3とp300の結合を部分阻害することに加え、cyclin D1がアストログリア特異的遺伝子*gfap*のプロモーター活性を抑制することを明らかにした（下図左）。これらの成果を総合することで、



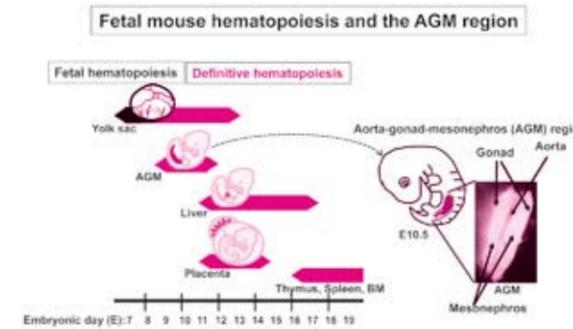
神経幹細胞の自己複製を維持する機構が説明可能となった点で、本研究は意義深い。

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

ていることが知られている。神経幹細胞ニッチの分子基盤解明のため、当分野では、一般的な従来方法つまり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で約400種類のポリマーを、神経幹細胞を維持し得るかどうかを指標に探索し、昨年ヒットポリマーを特定した。そのヒットポリマーについて、本年は引き続き中規模合成標品および対照ポリマー標品の供給を得て生物学的効果を解析し、マウス神経幹細胞をFGF2やWntシグナルの非存在下で自己複製させることを確認した。

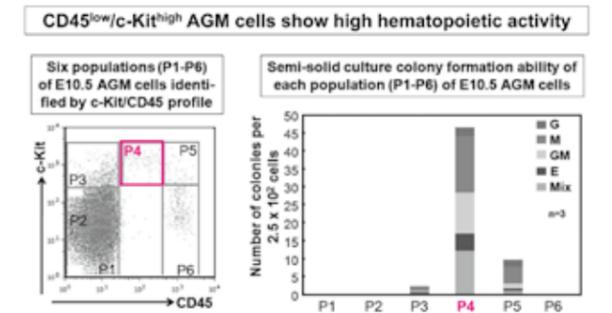
神経幹細胞の分化制御の観点から議論される興味深い現象として、アストログリアの分化が胎生期後半になるまで見られないことが挙げられる。当分野では以前、胎生の進行に伴うアストログリア特異的遺伝子中のメチルシトシンの脱メチル化が神経幹細胞にアストログリア分化能を賦与することを示した。最近ではメチルシトシンを水酸化する酵素TET3に着目してその分子機構解明を目指している。昨年のTET3強制発現系に引き続き、本年はTET3のノックダウンベクターを作成することで、神経幹細胞のアストログリア分化能賦与の理解に努めた。

### 2. 胎生期造血幹細胞の特性解明



個体発生の進行に伴って造血の場が変遷することが知られており、卵黄嚢、大動脈-生殖原基-中腎（AGM）領域、肝臓、胎盤と、その存在が変遷する（上図左）。この現象は、時期ならびに場所に特異的な、幹細胞特性の変化と幹細胞ニッチの変化を反映しているものと考察されることから、胎生期造血組織は、幹細胞および幹細胞ニッチの双方に取り組むにあたり適している。胎生期AGM領域における造血幹細胞の存在はいくつかの報告があるが、その表面マーカーなどの詳しい特性は未解決であったため、マウスAGM領域（上図右）を材料として研究を実施した。CD45およびc-Kitの発現強度を抗体染色とFACS解析に基づいてプロファイリングすると、幾つかの画分にわけることができた（右上の図左）。

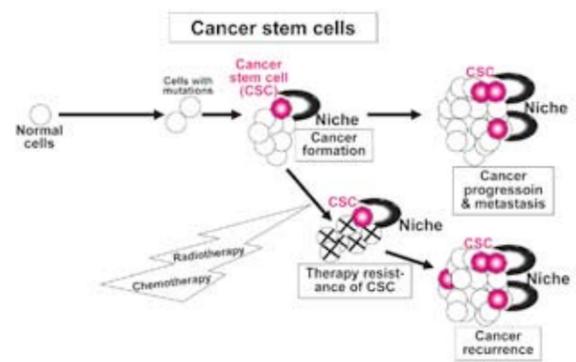
このうち、CD45 low/ c-Kit high 細胞集団（同図のP4画分）に各種血液系細胞に分化する能力があることを明らかにした。これは、OP9ストローマ細胞上での数石状コロニー形成能および半固形培地におけるコロニー形成能（下図右）を指標に造血活性を解析した結果、明らかとなったものである。なお当分野では、卵黄嚢を対象とした展開研究によっても、CD45 low/ c-Kit highの細胞集団が、他の細胞集団に比べて造血活性が最も高いことを見出している。さらに、胎生期造血組織として知られる胎盤における造血幹細胞の特性は未解決であったが、マウス胎生10.5日目から15.5日目までいずれの胎生時期においても、胎盤内細胞の同様の細胞画分に造血活性を認めるとともに、成体造血幹細胞が濃縮される細胞集団として知られているHoechst33342色素排出性の“side population (SP)”細胞がこの細胞画分に存在することも見出している。これらを総合して、本年の研究は胎生期の造血幹細胞の特性について重要な示唆を与えたといえる。



また、このようなAGM領域のCD45 low/ c-Kit high細胞集団の出現とその造血活性の維持に寄与する転写因子として前年その関与を示唆したSox17の機能に関する研究を、本年も引き続き実施した。Sox17は、high mobility group (HMG)-boxと呼ばれるDNA結合ドメインを有する転写因子であり、元々は内胚葉のマーカー蛋白質として知られている。前年には、胎生10.5日AGM領域のCD45 low/ c-Kit high細胞にSox17を強制発現すると、ストローマ細胞との共培養で細胞塊を形成しつつ多数の継代を重ねても未分化性が保持されるという現象を認めていたが、本年はそのような細胞を放射線照射したマウスに移植する実験により、生体内でもリンパ球を含む各血液細胞への多分化能を有していることを見出した。Sox17に関する研究は、造血幹細胞の発生と幹細胞性維持の解明の糸口となる成果を導くものと考えられる。

### 3. 癌幹細胞ニッチの人工構築と性状解明

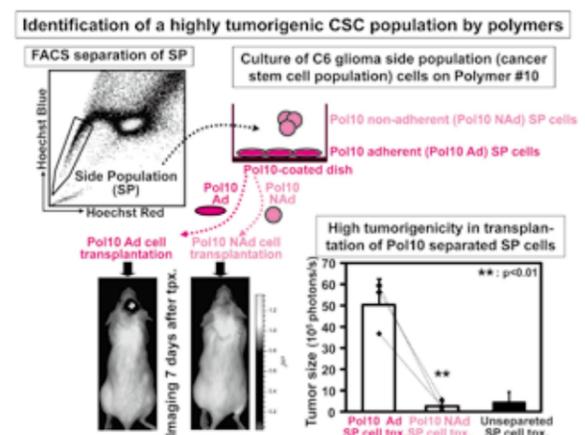
癌幹細胞 (cancer stem cell) のコンセプトが近年、癌研究分野において注目されている。このコンセプトにおいて腫瘍は、遺伝子に変異を生じて無限の増殖能を獲



得したクローナルな均質細胞の集団ではなく、腫瘍中に少数存在する癌幹細胞が、化学療法や放射線療法などへの治療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（上図）。また、癌幹細胞の生存と維持に関わるニッチの存在も示唆されている。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報告した（右下の図左上）。これを踏まえ、癌幹細胞のより効率的な分離培養、および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、人工ニッチの探索を行った。約 400 種類の化学合成ポリマーをスライド上にドットしたアレイを用いた研究から、癌幹細胞画分である C6 グリオーマの SP 細胞を効率的に増殖させる 6 種類のポリマー分子（ヒットポリマー）を同定した。ヒットポリマーのうち、ウレタンをベースとしたひとつのポリマー Polymer #10 (Pol10) に対して、SP 細胞の中にも、Pol10 接着性を示す SP 細胞と Pol10 非接着性の SP 細胞が存在することが確認され、Hoechst33342 色素での低染色性に基づいて認識されてきた癌幹細胞集団は、実は不均質性を示すことを明らかにした（同図右上）。Pol10 ポリマーへの接着性を示した SP 細胞は免疫不全マウスの脳内への移植実験において高い腫瘍形成能を示したことから（同図左下と右下）、このポリマーが造腫瘍性の高い癌幹細胞のニッチをミミックする分子であることが示唆された。これまで

の癌幹細胞のマーカーに関する研究成果や、このポリマーによる成果は、癌幹細胞や癌幹細胞ニッチを標的とした治療法の開発的研究に結びつく足掛かりとなる。

癌幹細胞は腫瘍内に巧みにニッチを構築し利用する生存戦略をとるものと推察する。腫瘍内の間質細胞の一つとして、腫瘍随伴マクロファージ（tumor-associated macrophage; TAM）の存在が古くから知られているが、当分野では、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、TAM マーカー CD68 および CD204 の発現と腫瘍の悪性度との正相関を確認した。しかし癌幹細胞と TAM の相互作用の詳細は未だ明らかでない。最近の実験で、NOD/SCID マウスの脳内に癌幹細胞画分である SP 細胞集団を移植する際に、SP 細胞で教育したマクロファージ (Mφ) を共移植すると、対照 Mφ との共移植よりも、強い腫瘍形成をもたらした。SP 細胞と MP 細胞に発現する遺伝子について cDNA マイクロアレイ解析を行ったところ、単球の動員や Mφ 前駆細胞の増殖および Mφ 分化を担う CCL2、CXCL12、GM-CSF などの遺伝子発現が、SP 細胞において亢進していた。以上の結果から、癌幹細胞は効率的に単球から Mφ への増殖・分化を促し、誘導されたマクロファージは TAM 様の働きで腫瘍の進展を促す作用を持つと考察した。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、前年に明らかにした癌幹細胞由来血管ニッチとの関わりや TAM の関与などの観点から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. Nobuhisa I, Yamasaki S, Ramadan A and Taga T: CD45low c-Kit high cells have hematopoietic properties in the mouse aorta-gonad-mesonephros region. *Exp. Cell Res.*, 318:705-715, 2012.
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, in press.

### 著書・総説

1. 備前典久, 田賀哲也. LIF (Leukemia Inhibitory Factor). 臨床免疫・アレルギー科 (特集: サイトカインのすべて) 57, 545-552, 2012.
2. Tabu K, Taga T, and Tanaka S. Tumor stem cells: CD133 gene regulation and tumor stemness. In *Stem Cells and Cancer Stem Cells*, Volume 2, Part 2, (Springer.) 145-153, 2012.
3. 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., in press.
4. 鹿川哲史, 田賀哲也. ニューロンとグリアの分化. 脳神経科学イラストレイテッド 改訂第3版 (真鍋俊也, 森寿, 渡辺雅彦, 岡野栄之, 宮川剛編集). 羊土社. 印刷中

### 学術集会発表

1. 備前典久, 鹿川哲史, 中村肇伸, 仲野徹, 田賀哲也. メチル化シトシンヒドロキシラーゼ Tet3 は DNA 脱メチル化を介して胎生期神経幹細胞/前駆細胞のアストロサイト分化能獲得に寄与する第 10 回神経発生討論会 2012 年 3 月 15-16 日 福井県福井市
2. Tetsuya Taga, Kouichi Tabu, Norihisa Bizen, and Nozomi Muramatsu. Multi-disciplinary approaches towards understanding cancer stem cell (CSC) self-renewal strategies: CSC niches as therapeutic targets. Seoul National University CRI Cancer Symposium 2012: Innovative Approaches to Explore Novel Druggable Targets. Seoul, May 16-18, 2012.
3. Kouichi Tabu, Norihisa Bizen, Yasuhiro Kokubu, Nozomi Muramatsu, Ikuo Nobuhisa, Tetsushi Kagawa and Tetsuya Taga. Cellular and synthetic niche for C6 glioma stem cells. The 10th Stem Cell Research Symposium. Awaji, May 31-June 1, 2012.
4. Norihisa Bizen, Tetsushi Kagawa, Toshinobu Nakamura, Toru Nakano, and Tetsuya Taga. 5-methylcytosine hydroxylase TET3-mediated acquisition of astrocytic competence of mid-

- gestational neural stem cells. The 10<sup>th</sup> Stem Cell Research Symposium. Awaji, May 31-June 1, 2012.
5. Tetsuya Taga, Tetsushi Kagawa, Norihisa Bizen, Yuhei Yamaguchi, Yasuhiro Kokubu, Satoko Hattori, Keizo Takao, Tsuyoshi Miyakawa, Johji Inazawa, Toshinobu Nakamura, Toru Nakano. Epigenetic regulation of mouse neural stem cell differentiation and functional development. The 10<sup>th</sup> Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research. Yokohama, June 13-16, 2012.
6. Kouichi Tabu, Norihisa Bizen, Yasuhiro Kokubu, Nozomi Muramatsu, Ikuo Nobuhisa, Tetsushi Kagawa and Tetsuya Taga. Cellular heterogeneity contributes to tumor stem cell maintenance in C6 glioma. The 10<sup>th</sup> Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research. Yokohama, June 13-16, 2012.
7. Nozomi Muramatsu, Kouichi Tabu, Ikuo Nobuhisa, Tetsushi Kagawa and Tetsuya Taga. Characterization of bone marrow derived-macrophages stimulated by C6 glioma stem cells. The 10<sup>th</sup> Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research. Yokohama, June 13-16, 2012.
8. Ikuo Nobuhisa, Mitsujiro Osawa, Mami Uemura, Yoko Kishikawa, Maha Anani, Kaho Harada, Haruna Takagi, Akihiko Kudo, Masami Kanai-Azuma, Yoshiakira Kanai, Atsushi Iwama, Tetsuya Taga. Sox-F family proteins have roles in the maintenance of immature phenotype of the hematopoietic cell clusters in the aorta-gonad-mesonephros region of mouse embryos. The 10<sup>th</sup> Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research. Yokohama, June 13-16, 2012.
9. Norihisa Bizen, Kouichi Tabu, Mei Wu, Toshihiro Inoue, Takeshi Shimizu, Tetsushi Kagawa, Mark Bradley, Tetsuya Taga. Synthetic polymer-based neural stem cell niche identification. The 10<sup>th</sup> Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research. Yokohama, June 13-16, 2012.
10. 稲垣徹訓, 加藤聖子, 楠木総司, 中林一彦, 榎康一, スルスマン グリ ユスブ, 岡部瞳, 和泉弘人, 河野公俊, 田賀哲也, 秦健一郎, 竹田省, 網羅的メチレーション解析による癌幹細胞形質獲得関連遺伝子の同定 第 11 回日本婦人科がん分子標的研究会学術集会 日光市, 2012 年 6 月 22-23 日
11. 楠木総司, 加藤聖子, 榎康一, スルスマン グリ ユスブ, 稲垣徹訓, 岡部瞳, 和泉弘人, 河野公俊, 田賀哲也, 竹田省. 子宮体癌の癌幹細胞形質獲得機構における精巣特異的発現遺伝子 dbpC/contrin の関与と癌幹細胞マーカーの同定 第 11 回日本婦人科がん分子標的研究会学術集会 日光市, 2012 年 6 月 22-23 日
12. 田賀哲也, 鹿川哲史, 備前典久, 山口 雄平, 国分 康博, 服部 聡子, 高雄 啓三, 宮川 剛, 稲澤 謙治, 中村肇伸, 仲野徹. DNA / ヒストンのメチル化制御による中枢神経系の発生制御: 分子機構からヒト精神運動異常様行動を示す遺伝子変

- 異モデルマウスまで. 第 33 回日本炎症・再生医学学会 シンポジウム「幹細胞の転写制御, エピジェネティック制御」 福岡市, 2012 年 7 月 5-6 日
13. Tetsuya Taga, Tetsushi Kagawa, Norihisa Bizen, Yuhei Yamaguchi, Yasuhiro Kokubu, Satoko Hattori, Keizo Takao, Tsuyoshi Miyakawa, Johji Inazawa, Toshinobu Nakamura, Toru Nakano. Regulation of mouse brain development by DNA and histone methylation: From molecular basis to cognitive, behavioral, and motor abnormalities in gene-manipulated model mice. The 35<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society Symposium on Epigenetics and neuropsychiatric disorders. Nagoya, September 18-21, 2012.
14. Kouichi Tabu and Tetsuya Taga. Functional heterogeneity within a tumor stem cell population identified by the synthetic polymer niche. 71<sup>st</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Sapporo, September 19-21, 2012.
15. Nozomi Muramatsu, Kouichi Tabu and Tetsuya Taga. C6 glioma side population cells induce differentiation of bone marrow-derived monocyte lineage. 71<sup>st</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Sapporo, September 19-21, 2012.
16. Tetsushi Kagawa, Suguru Kinoshita, Georgina Phillips, Shunro Tomiyoshi, Norihisa Bizen, Takeshi Shimizu, Tetsuya Taga. Role of glycogen synthase kinase 3 beta in neuronal migration during corticogenesis. 11<sup>th</sup> biennial meeting of Asian Pacific Society for Neurochemistry/ 55<sup>th</sup> Meeting of Japanese Society for Neurochemistry. September 30-October 2, 2012.
17. Ikuo Nobuhisa, Mitsujiro Osawa, Kaho Harada, Haruna Takagi, Atsushi Iwama, Tetsuya Taga. Hematopoietic cell clusters from the aorta-gonad-mesonephros region exhibited long-term repopulating ability by overexpression of Sox17. 2012 Annual Meeting of the Japan Society for Immunology. Kobe, December 5-7, 2012.
18. Ikuo Nobuhisa, Mitsujiro Osawa, Mami Uemura, Yoko Kishikawa, Maha Anani, Kaho Harada, Haruna Takagi, Masami Kanai-Azuma, Yoshiakira Kanai, Atsushi Iwama, Tetsuya Taga. Hematopoietic cell clusters present in the aorta-gonad-mesonephros region exhibited long-term repopulating ability by Sox17-expression. The 35<sup>th</sup> Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. Fukuoka, December 11-14, 2012.
19. Tetsushi Kagawa, Suguru Kinoshita, Georgina Phillips, Shunro Tomiyoshi, Norihisa Bizen, Takeshi Shimizu, Tetsuya Taga. Role of glycogen synthase kinase 3 beta in neuronal migration during corticogenesis. The 35<sup>th</sup> Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. Fukuoka, December 11-14, 2012.

# 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  
特任助教：中林 誠、安部美奈子 技術補佐員：服部美智子

## 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. 心筋特異的因子 BMP-10 の細胞外複合体の解析

Bone Morphogenetic Protein (BMP) ファミリーは、成長因子のひとつである TGF- $\beta$  ファミリーに属しており、様々な臓器および組織形成で細胞の増殖・分化に関わるサイトカインである。なかでも BMP-10 は心筋特異的因子として心筋細胞の増殖・分化に関与していることが知られており、BMP-10 の遺伝子変異は、高血圧性心筋症との関連が示唆されている。われわれは BMP-10 の活性化、機能様式および病態に関わる詳細な分子機構を、立体構造情報に基づいて解明し、将来的な治療薬開発などの応用に結び付けることを目指している。これまでの研究から、BMP-10 の成熟化機構は非常に特徴的であることが知られている。すなわち、まずプレプロ型 BMP-10 として翻訳された後、プロ型二量体を形成し、その後フューリン等のプロテアーゼにより切断を受けプロペプチド部位と BMP-10 部位に分かれる。しかしながら、プロペプチド部位と BMP-10 部位は解離することなく複

合体を形成しており、この状態で成熟型 BMP-10 となることが明らかにされている。成熟型 BMP-10 は細胞膜上の受容体と相互作用をすることにより、BMP-10 とプロペプチドとの相互作用を変化させ、活性型 BMP-10 となって機能するものと考えられている。

われわれはこれまでに、プロペプチドと BMP-10 とが細胞外では 2:2 の複合体として安定に存在していることを明らかにし、また、プロペプチドと成熟型 BMP10 の複合体が、数種類の細胞外マトリックスタンパク質と超分子複合体を形成していることを示す結果も得ている。さらにプロペプチドと BMP-10 複合体の結晶化に成功し、放射光施設を利用して X 線回折データを取得した。得られたデータの自己回転関数から、プロペプチドと BMP-10 複合体は、結晶内で 24 量体と思われる大きな会合体となっていることが示された。現在、分子内の各アミノ酸残基を帰属できる分解能を得るべく、結晶の高品質化をはかっている、この過程で、磁気力場中での結晶化も試みている。非常に強い磁気力場中では、非磁性の水やタンパク質分子に対しても磁気力が働く。これを利用することで、通常では結晶化中の溶液内で不可避的に生ずる対流を抑制することができ、タンパク質の結晶をより穏やかな環境で成長させることにより、結晶の高品質化が期待できる。このような環境を積極的に利用し、結晶の高品質化に最適な条件を検討中である。

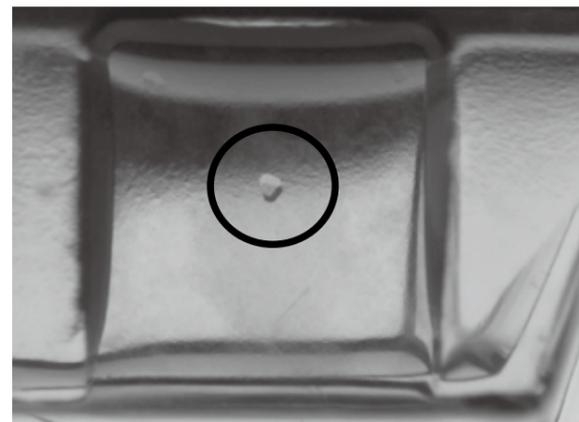


図1 磁気力場中で結晶化したBMP-10複合体(円で囲まれた中にある塊)。

### 2. タウタンパク質とプロリン異性化酵素との相互作用

Alzheimer 病の原因タンパク質のひとつとして考えら

れているタウタンパク質は、正常時には細胞内の微小管に結合し、微小管の重合の促進や安定化に寄与するが、過剰リン酸化を受けることにより構造転移をおこし、微小管への結合能を失って神経原線維変化を形成し蓄積する。この過程で、タウタンパク質は Alzheimer 病の発症に関わると考えられている。

最近、プロリン異性化酵素とタウタンパク質の間の相互作用に関して様々なことがわかってきている。まず、正常時において、FKBP51 と FKBP52 というプロリン異性化酵素の働きでタウタンパク質の微小管からの解離や再結合が促され、微小管の伸長反応が制御されている。次に、過剰リン酸化状態において、Pin1 というプロリン異性化酵素の作用によりタウタンパク質の神経原線維変化の形成が阻害される。また、プロリン異性化酵素の FKBP12 も神経原線維変化に集積する。このように正常時、過剰リン酸化状態を問わずプロリン異性化酵素はタウタンパク質と様々な相互作用を行なっているものの、これまでの研究はほとんどが in vivo のもののため分子間の相互作用機構に関する知見に乏しかった。

そこで、本研究では、プロリン異性化酵素とタウタンパク質との相互作用を in vitro で解析することにした。タ

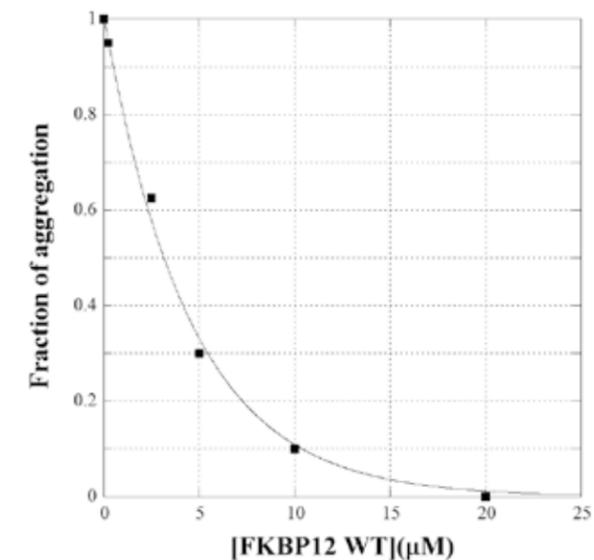


図2 FKBP12 によるタウタンパク質の凝集阻害。

ウタンパク質の微小管結合部位は、特に凝集性が高く神経原線維変化の形成の要因となっていることから、この部位に焦点を絞り、タウタンパク質の凝集に対するプロリン異性化酵素の影響について系統的に調べた。その結果、Pin1 だけでなく、FKBP12 もまた、タウタンパク質の凝集を阻害する能力が高いことがわかった。また、この阻害には FKBP12 のプロリン異性化活性が関与することもわかった。さらに、FKBP12 は凝集したタウタンパク質に作用し、その凝集をほぐす能力もあることも明らかにできた。

### 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立体構造中心に性質や機能を紹介している。

## 人事異動

転入：宮下ミチ香（大学院医歯学総合研究科医歯理工学系専攻（修士課程））、沼本修孝（助教）  
転出：中林誠（特任助教）、安部美奈子（特任助教）

## 業績目録

### 原著論文

1. Tamashiro T, Tanabe Y, Ikura T, Ito N, Oda M: Critical roles of Asp270 and Trp273 in the *α*-repeat of the carbohydrate-binding module of endo-1,3-*β*-glucanase for laminarin-binding avidity. Glycoconj J 29: 77-85, 2012.

2. Iwaya N, Akiyama K, Goda N, Tenno T, Fujiwara Y, Hamada D, Ikura T, Shirakawa M, Hiroaki H: Effect of Ca(2+) on the microtubule-severing enzyme p60-katanin: Insight into the substrate-dependent activation mechanism. FEBS J 279: 1339-1352, 2012.

3. Nomura W, Masuda, A, Ohba, K, Urabe A, Ito N, Ryo A, Yamamoto N, Tamamura H: Effects of DNA Binding of Zinc Finger and Linkers for Domain Fusion on Catalytic Activity of Sequence-Specific Chimeric Recombinases Determined by a Facile Fluorescent System.

Biochemistry 51: 1510-1517, 2012.

4. Yoshimoto N, Sakamaki Y, Haeta M, Kato A, Inaba Y, Itoh T, Nakabayashi M, Ito N, Yamamoto K: Butyl Pocket Formation in the Vitamin D Receptor Strongly Affects the Agonistic or Antagonistic Behavior of Ligands. J. Med. Chem. 55: 4373-4381, 2012.

### 国内学会／招待講演

1. 伊藤暢聡．蛋白質リン酸化酵素の阻害剤複合体の構造からみるユニークな阻害メカニズム．第12回日本蛋白質科学会年会、名古屋、2012年6月20-22日

2. 伊藤暢聡．Protein Data Bank & Structure Deposition at PDBj. 2012年 CCP4 講習会 – in 福岡 –、福岡、2012年11月2日

### 国内学会／一般講演

1. 伊倉貞吉、伊藤暢聡．表面プラズモン共鳴法によるタウタンパク質と Pin1 との相互作用の解剖分析．新学術領域研究「天然変性タンパク質の分子認識機構と機能発現」第2回公開シンポジウム、大阪、2012年1月24、25日

2. 伊倉貞吉、伊藤暢聡．Pin1のタウタンパク質凝集阻害能の解析．第12回日本蛋白質科学会年会、名古屋、2012年6月20-22日

3. 岩谷奈央子、合田奈都子、天野剛志、藤原芳江、浜田大三、伊倉貞吉、白川昌宏、廣明秀一．微小管切断酵素 p60-katanin に対する Ca<sup>2+</sup> の効果．第12回日本蛋白質科学会年会、名古屋、2012年6月20-22日

4. 伊倉貞吉、伊藤暢聡．タウタンパク質の凝集の初期段階の解析．第50回日本生物物理学会年会、名古屋、2012年9月22-24日

5. Tamashiro, T., Tanabe, Y., Kanaori, K., Ikura, T., Ito, N., Oda, M. Contribution of Trp273 in the *α*-repeat of the carbohydrate-binding module of endo-1,3-*β*-glucanase to laminarin binding. 第50回日本生物物理学会年会、名古屋、2012年9月22-24日

### 教育活動

伊藤暢聡：大学院医歯学総合研究科生命理工学系専攻、お茶の水女子大学大学院人間文化創成科学研究科（非常勤講師）

伊倉貞吉：大学院医歯学総合研究科医歯学系専攻

### 研究費

伊藤暢聡：厚生労働省、厚生労働科学研究費（エイズ対策研究事業）、「APOBEC3分子のタンパク質レベルの機能性多型を基礎とした HIV-1 複製抑制機構の分子基盤の解明」、分担

# 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

本研究室では、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、体内の微細環境において、酸素濃度の低い環境（低酸素環境）がみられます。個体は低酸素環境にさらされると、呼吸・代謝の調節をはじめとする様々な生理応答を引き起こして、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の維持に働く機構です。一方で、低酸素応答は、がん、虚血性の疾患、免疫疾患などの病気でも認められ、その病態と密接に関与しています。私たちは、低酸素応答の分子レベルでの解析を通して、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同定の試み

HIF- $\alpha$ 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- $\alpha$  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- $\alpha$  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 は低酸素環境に反応して、巨大なタンパク質複合体を形成します（図 1）。この複合体中には細胞内の酸素濃度変化を感知する分子「酸素センサー」が含まれていることが考えられます。そこでプロテオミクス解析を用いて、複合体を構成するタンパク質を網羅的に同定して、酸素センサー分子の同定を試みています。こ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、多様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様々な生理応答に関わることが考えられます。構成分子の一つ PRP19 は、PHD3 と低酸素環境下で強固に結合することを明らかにしまし

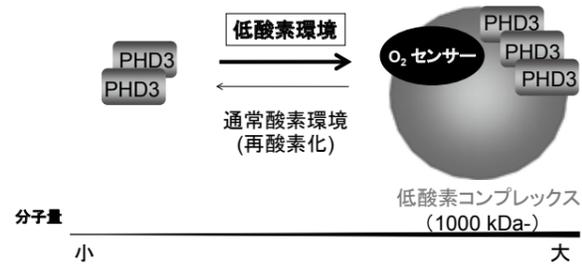


図 1 低酸素下で形成される PHD3 高次複合体

た。PRP19 は通常酸素環境では直線状の分子構造を取りますが、低酸素環境では環状様の構造を取るようになり、PRP19 分子内の N 末端側と C 末端側の二か所で PHD3 と結合して、結合が強固になることが示唆されました。このように PRP19 は酸素濃度の変化に応じて構造を変えることで、酸素センサーとして働く分子であると考えられます。この分子の特性を利用して、がん組織内の低酸素環境のモニタリングや、低酸素シグナル伝達の抑制を実現するツールの開発をめざしています。

### 2. 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により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- $\kappa$ 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化能を示しました。また、CREB、NF- $\kappa$ 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、コラーゲンゲル上での細胞の移動能や浸潤能が大きく低下することが明らかになりました。このことから、慢性的な低酸素環境がもたらすがんの悪性化には、CREB、NF- $\kappa$ B を介した *MMP1* の発現上昇が

関与していると考えられます（図 2）。したがって、低酸素性がんの悪性化を抑止するアプローチとして、HIF を阻害することに加えて、CREB、NF- $\kappa$ 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。

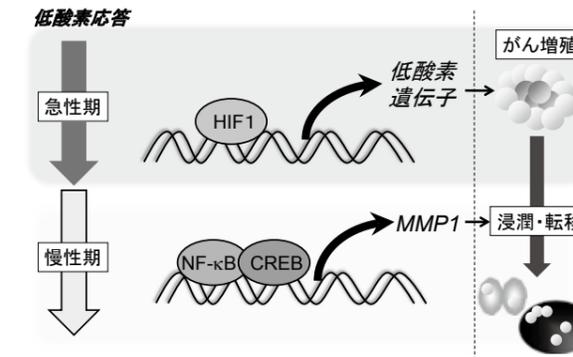


図 2 慢性期低酸素応答における *MMP1* の発現誘導

### 3. プロテオミクス解析による慢性期低酸素応答因子の同定

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、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、プロテオミクス解析を実施しています。低酸素環境で 48 時間培養した乳がん細胞株より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タンパク質の同定を進めています（図 3）。このアプローチから、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。

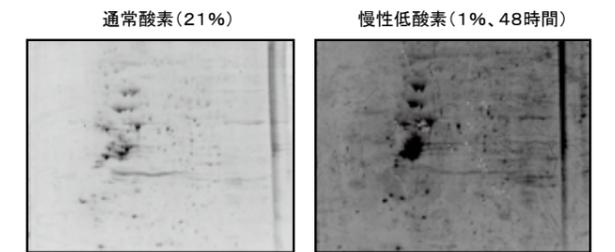


図 3 慢性期低酸素応答タンパク質の網羅的同定

## 研究業績

### 和文総説

1. 中山 恒・合田 亘人 (2012) 実験医学 5 月号 (羊土社) 低酸素応答システム - HIF・PHD の新機能と疾患 - 特集企画
2. 中山 恒・合田 亘人 (2012) 多彩な生命現象に働く低酸素応答システム 実験医学 5 月号 Vol.30(8)1246-1251、(羊土社)
3. 中山 恒 (2012) PHD によって制御される低酸素応答シグナル HIF 経路と HIF 非依存的経路の役割 実験医学 5 月号 Vol.30(8)1283-1288、(羊土社)

### 国際学会

- Koh Nakayama  
Regulation of matrix metalloproteinase *MMP1* expression by NF- $\kappa$ B pathway during prolonged hypoxic conditions.  
Keystone Symposia: Advances in Hypoxic Signaling  
2月14日 Banff, Canada

### 国内学会

1. 中山 恒・南嶋 洋司 低酸素応答が制御する多彩な生命現象 - 生理機能の解明から疾患に迫る - (シンポジウム企画) 第 85 回日本生化学会大会 12 月 14 日 福岡
2. 中山 恒 NF- $\kappa$ B signaling pathway regulates the expression of matrix metalloproteinase *MMP1* during prolonged hypoxic conditions. 第 33 回内藤カンファレンス 6 月 28 日 札幌
3. 中山 恒 長期低酸素応答における NF- $\kappa$ 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* の発現を誘導してがん細胞の浸潤能を亢進する 第 35 回日本分子生物学会年会 12 月 12 日 福岡
4. 中山 恒 急性期と慢性期の低酸素応答において活性化される転写因子の機能解析 第 85 回日本生化学会大会 12 月 14 日 福岡

### セミナー・シンポジウム講演

1. 中山 恒

「東京医科歯科大学版テニュアトラックプログラム」- 研究室の立ち上げからテニュア獲得まで - 群馬大学 ASRLD ユニット・ミニシンポジウム  
1月20日 前橋  
2. 中山 恒 生物と酸素のサイエンス 東京医科歯科大学オープンキャンパス 模擬授業 7月26日 東京

### 学外教育活動

中山 恒 早稲田大学 先進理工学部 非常勤講師

### 競争的研究費取得

1. 中山 恒 (代表) 文部科学省科学研究費補助金 基盤研究 (C) 「慢性期の低酸素応答を規定する転写因子の作用機序の解明」
2. 中山 恒 (代表) 医用薬物研究奨励富岳基金 「慢性期の低酸素応答を規定する転写因子の同定と低酸素性癌の病態解明へのアプローチ」

# 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

- 病的リン酸化シグナル網羅解析の技術基盤を確立した（神経病理学）
- PQBP1 発現レベルと寿命との関連を発見した（神経病理学）
- 癌抑制遺伝子 p53 は、血管内皮細胞増殖因子 VEGF の転写調節を介して、腫瘍血管の増生を抑制している事を見出した（病態細胞生物学）
- クローン病モデルマウスにおける腸炎重症化には、腸管上皮細胞の細胞死による腸内細菌の粘膜内侵入が重要である事を見出した（病態細胞生物学）
- ストレス応答性キナーゼ MKK7 は、時計分子 Per2 のリン酸化を介して生物時計の周期を制御することを見出した（発生再生生物学）
- がん抑制シグナル Hippo 系の標的転写共役因子 YAP は、核内でアセチル化／脱アセチル化の翻訳後修飾を受けることを見出した（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）
- 加齢に伴いマウスの背部に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) で病原性を持つとされる RNA 関連自己抗原への抗体産生の新たな制御メカニズムを解明した（免疫疾患）
- 自己免疫リンパ増殖症候群 (ALPS) のマウスモデルで修飾遺伝子を同定した（免疫疾患）
- ミオパラジン変異はサルコメア整合性を障害し、肥大型心筋症、拡張型心筋症、拘束型心筋症の原因となることを解明した（分子病態）
- 心筋 T 管や筋小胞体に存在する機能不明の SLMAP の変異が Nav1.5 チャネルの細胞内輸送を障害し、Brugada 症候群の原因となることを解明した（分子病態）
- 慢性活動性 EBV 感染症 (CAEBV) モデルマウスの作製に初めて成功し、CAEBV 成立の要因解析を行っている（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：伊藤日加瑠、笹邊俊和、吉田千里、藤田慶大、本木和美、陳 西貴

## 研究内容

### 概 略

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 PQBP1 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。本年度は主に 2) に成果が得られた。

## 研究紹介

### 1. 精神遅滞原因遺伝子 PQBP1 は遺伝学的に寿命に影響する

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。私たちはポリグルタミン配列に結合する新規タンパク質として PQBP1 を 10 数年前に発見した (Waragai et al., Hum Mol Genet 1999)。PQBP1 は、核優位に存在する (しかし細胞質との間を行き来する) タンパク質であり、転写とスプライシングのカップリングに関わりスプライゾームに含まれること、細胞のストレス下でストレス顆粒に含まれることが知られ、転写ならびに転写後の遺伝子発現調節に関わることが、私たちや他の研究グループによって明らかにされてきた。また、PQBP1 遺伝子変異自体は、ヨーロッパから西アジア、アフリカにかけての地域 (およびアメリカ大陸) で、頻度の非常に高い精神遅滞の原因遺伝子であることが、明らかになってきた。

今日的な視点からすると、PQBP1 は遺伝子発現スペクトラムに広汎な影響を与える遺伝子であり、その変化が精神遅滞 (知的障害) あるいは神経変性に関わるものという仮説が可能である。現在、私たちはモデルマウスを確立して遺伝子発現変化と症状発現の関連について詳細を解析しているが、一方で、PQBP1 の発現量変化が個体レベルで寿命とどのような関係にあるかを検討した。私たちは、PQBP1 の機能低下が知的障害の症状につながることを、ショウジョウバエレベル、マウスレベルで確認済みであり (Ito et al. Hum Mol Genet 2009;

Tamura et al., J Neurosci 2010)、その補正を目指した治療を考慮している。その際には PQBP1 補正の作用と副作用を個体レベルで概観する必要性があり、本年度の研究はそれに対応するものである。

PQBP1 変異を持つショウジョウバエが学習機能低下を示すことは既に報告している (Tamura et al., J Neurosci 2010)。本年度の研究は PQBP1 変異ショウジョウバエの寿命が明らかに短縮している所見から始まった。特異的なドライバーを用いて PQBP1 の発現を全身レベルで上昇させる、あるいは、神経細胞のみで上昇させることによって、学習障害および寿命短縮に対してどのような効果があるかを観察した。その結果、PQBP1 遺伝子発現量と寿命においては、正常ハエ発現量以下ではおよそ正の相関が見られるが、正常ハエ発現量を上回ると逆に寿命が短縮することが分かった (図 1)。また、PQBP1 遺伝子発現量と学習能力においては、正常ハエ発現量以下においては、やはり正の相関が認められるが、正常ハエ発現量を上回っても学習能力の悪化は認められなかった (図 2)。次に、PQBP1 のノックダウンを、全身発現と神経細胞発現のドライバーを用いて組織特異的に行ったところ、全身発現では極端な寿命短縮を認めたが、神経細胞に於けるノックダウンは軽度な寿命短縮に止まった。また、神経細胞のみの過剰発現では寿命の短縮は見られなかった (図 3)。

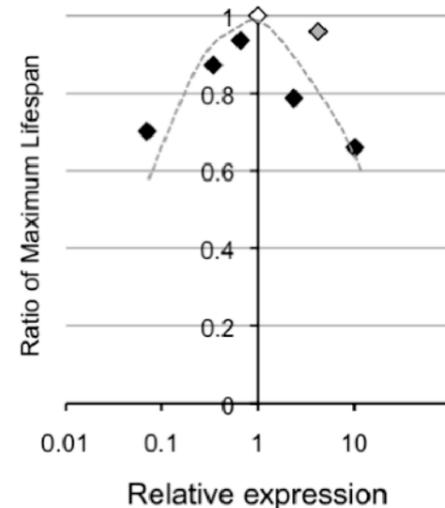


図 1 説明：PQBP1 発現量とショウジョウバエ寿命 (最長寿命) の関係

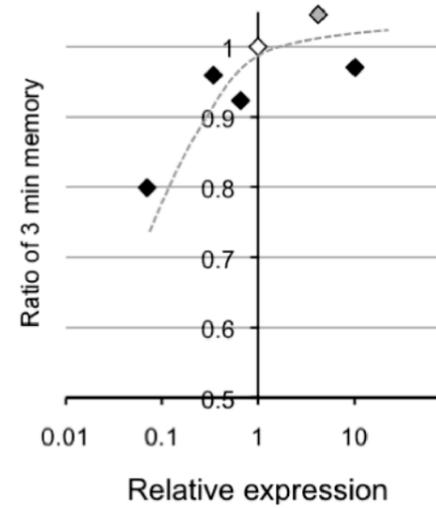


図 2 の説明：PQBP1 発現量と学習能力の関係

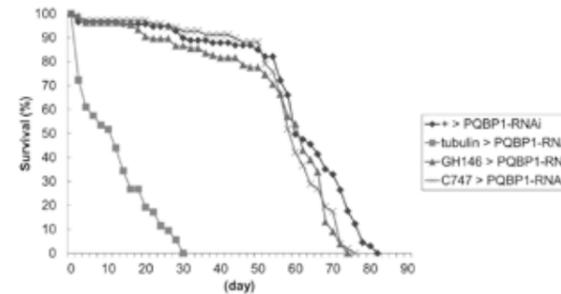


図 3 の説明：PQBP1 の組織特異的ノックダウンによる生存曲線の変化 tubulin ドライバーは全身組織でのノックダウン、GH146 と C747 は神経細胞におけるノックダウンの目的で用いられた。

これらの結果は、全身組織における PQBP1 の過剰あるいは過少発現は寿命に大きな影響を与えるが、脳においては過少発現が学習能力低下と若干の寿命短縮につながるものの、脳の過剰発現は学習能力を改善するに止まり、寿命の短縮も延長も起こさないことを意味している。これは、将来に向けて治療戦略を考える上で有用な知識である。また、本研究では PQBP1 遺伝子変異によるショウジョウバエ遺伝子の網羅的発現解析も併せて

行っており、現在進行中のマウスでの発現プロファイル解析と併せて、知的障害の発症メカニズムに有用な知識が得られつつある。

## 2. PQBP1 の構造解析

私たちは King's College of London のグループと PQBP1 の構造解析について共同研究を行っている。PQBP1 の N 末側から約 3 分の 1 に位置する WW ドメインの構造解析については既に Nature 姉妹誌などに報告があるが、中央から C 末端の C-terminal ドメインについては構造が十分には分かっていなかった。彼らの構造解析は、C-terminal ドメインは天然変性タンパク質としての性質を有することが明らかになった。

**ハイライト**  
 PQBP1 C-terminal ドメインの構造モデル

90°

13nm

ハイライト図の説明：PQBP1 は天然変性タンパク質としての性質を有する。

## 業績目録

### 原著論文

- Nakamura, Y., Tagawa, K., Oka, T., Sasabe, T., Ito, H., Shiwaku, H., La Spada, A.R. and Okazawa, H. (2012). Ataxin-7 associates with microtubules and stabilizes the cytoskeletal network. ***Hum Mol Genet.*** 21(5): 1099-1110. doi: 10.1093/hmg/ddr539
- Ress, M., Gorba, C., Gorba, C., de Chiara, C., Bui, T.T.T., Garcia-Maya, M., Drake, A.F., Okazawa, H., Pastre, A., Svergun, D. and Chen, Y.W. (2012). The solution model of the intrinsically disordered polyglutamine tract binding protein-1 (PQBP-1). ***Biophys J.*** 102:1608-1616. doi: 10.1016/j.bpj.2012.02.047
- Tamura T., Sone M., Nakamura Y., Shimamura T., Imoto S, Miyano S. and Okazawa H. (2012). A restricted level of PQBP1 is needed for the best longevity of Drosophila. ***Neurobiology of Aging.*** 2013 Jan;34(1):356.e11-20. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2012.07.015

### 和文総説

- 伊藤日加瑠、岡澤均、「ポリグルタミン蛋白質と神経変性疾患」, 生体の科学 , 2012, 64, 339-344
- 岡澤均、「脳疾患のバイオマーカーとオプトジェネティクス」企画 , 実験医学 , 2012, vol.30, No.16
- 岡澤均、「概論：技術革新による神経科学の新潮流」, 実験医学 , 2012, vol.30, No.16, 2548-2553.
- 田川一彦、岡澤均、「ハンチントン病のバイオマーカー研究」, 実験医学 , 2012, vol.30, No.16, 2572-2576.
- 水口峰之、岡澤均「Polyglutamine tract-binding protein 1 の構造生物学的研究」, YAKUGAKU ZASSI, in press

### 国際学会

- Okazawa, H., Pathomechanisms of PQBP1 in neurons and neural stem cells causing learning defect and microcephaly The 2<sup>nd</sup> Japan-Korea Neural Tissue culture seminar, Tokyo Medical and Dental University, M&D Tower, Akio Suzuki Memorial Hall, 2012.6.16
- Ito, H., Kurosu K., Okazawa, H., HMGB1 as a therapeutic molecule candidate for spinocerebellar ataxia type1. The 2<sup>nd</sup> Japan-Korea Neural Tissue culture seminar, Tokyo Medical and Dental University, M&D Tower, Akio Suzuki Memorial Hall, 2012.6.16
- Okazawa, H., Pathomechanisms of Intellectual Disabilities linked to a new RNA splicing protein, PQBP1, Tokyo Medical and Dental University International Summer Program 2012, Tokyo Medical and Dental University, M&D Tower, Akio Suzuki Memorial Hall, 2012.8.27-29
- Okazawa, H., Pathomechanisms of Intellectual Disability (ID) linked to a new RNA splicing protein, PQBP1” Cell Symposia Functional RNAs, Hotel Melia, Sitges, Spain

### 国内学会

- 田村 拓也、曾根 雅紀、岩坪 威、田川 一彦、Erich Wanker、岡澤 均「DNA 修復タンパク質・Ku70 はハンチントン病の神経変性を抑制する」第 53 回日本神経学会学術大会 東京国際フォーラム 東京 2012.5.25
- 田村 拓也、「SCA1 病態における DNA 損傷修復異常」第五回分子高次機能研究会 KKR ホテルびわこ 滋賀 2012.8.27-29
- Sam S. Barclay、田村 拓也、伊藤 日加瑠、鳥

- 徹平、勝田 明寿香、曾根 雅紀、塩飽 裕紀、田川 一彦、井元 清哉、宮野 悟、岡澤 均「脊髄小脳変性症 1 型における DNA 損傷修復遺伝子の効果：in vivo スクリーニング」第 35 回日本神経科学大会 名古屋国際会議場 名古屋 2012.9.18-21
- 田村拓也、中村蓉子、塩飽裕紀、岡澤均、「PQBP1 遺伝子発現量と症状の相関関係」第 31 回日本認知症学会学術集会 つくば国際会議場 筑波 2012.10.26-28
- 伊藤 日加瑠、黒巢佳祐、岡澤 均、「脊髄小脳変性症 1 型(SCA1)の治療候補分子 HMGB1」第 35 会日本分子生物学会年会 福岡国際会議場 マリンメッセ福岡 福岡 2012.12.11-14
- 田村 拓也、曾根 雅紀、中村 蓉子、鳥村 徹平、井元 清哉、宮野 悟、岡澤 均、「発現量依存的に寿命をコントロールする遺伝子、PQBP1」第 35 回分子生物学会年会 福岡国際会議場マリンメッセ福岡 福岡 2012.12.11-14
- 田村 拓也、曾根 雅紀、中村 蓉子、鳥村 徹平、井元 清哉、宮野 悟、岡澤 均「発現量依存的に寿命をコントロールする遺伝子、PQBP1」第 85 回日本生化学会大会 福岡国際会議場マリンメッセ福岡 福岡 2012.12.14-16
- 伊藤 日加瑠、岡澤 均、「HMGB1 を用いた脊髄小脳変性症 1 型モデルマウスの治療」運動失調症の病態解明と治療開発に関する研究班 平成 24 年度班会議 都市センターホテル 東京 2013.1.9-10
- 伊藤 日加瑠、田川 一彦、岡澤 均、「HMGB1 を用いた脊髄小脳変性症 1 型モデルマウス治療の試み」第 5 回 東京医科歯科大学 CBIR 若手インスパイアシンポジウム 東京医科歯科大学 東京 2013.2.23
- Chan Li, Hikaru Ito, Kyota Fujita, Hiroki Shiwaku, Yunglong Qi, Kazuhiko Tagawa, Takuya Tamura, Hitoshi Okazawa “Sox2 transcriptionally regulates Pqbp1, an intellectual disability-microcephaly causative gene, in neural stem progenitor cells” 第 5 回 東京医科歯科大学 CBIR 若手インスパイアシンポジウム 東京医科歯科大学 東京 2013.2.23
- 田村 拓也、Sam Barclay、藤田 慶大、伊藤 日加瑠、本木 和美、鳥村 徹平、勝田 明寿香、塩飽 裕紀、曾根 雅紀、田川 一彦、井元 清哉、宮野 悟、岡澤 均、「脊髄小脳変性症 1 型における DNA 損傷修復遺伝子の効果：in vivo screening による解析」第 5 回 東京医科歯科大学 CBIR 若手インスパイアシンポジウム 東京医科歯科大学 東京 2013.2.23

### その他

- Okazawa, H., Synapse Pathology, International Synapse Research Workshop 2012, Okazaki Conference Center, Okazaki, 2012.11.8-9 (座長)

### 研究助成金

〔研究助成金〕

平成 23 – 25 年度 厚生労働省科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 「運動失調症の病態解明と治療法開発に関する研究」 課題番号：H23-難治ー一般ー014 分担研究者 岡澤 均
平成 21 – 25 年度 科学技術振興機構戦略的創造研究推進事業 研究領域：精神・神経疾患の分子病態理解に基づく診断・治療へ向けた新技術の創出 「ポリグルタミン病の包括的治療法の開発」共同研究者 岡澤 均
平成 22 – 26 年度 文部科学省科学研究費補助金 新学術領域研究 「シナプス・ニューロサーキットパソロジーの創成」 課題番号：22110001 研究代表者 岡澤 均
平成 22 – 26 年度 文部科学省科学研究費補助金 新学術領域研究 「発達障害・変性疾患のシナ

プスダイナミックパソロジーの解明」 課題番号：22110002 研究代表者 岡澤 均

平成 22 – 26 年度 文部科学省「脳科学研究戦略推進プログラム」『心身の健康を維持する脳の分子基盤と環境因子（生涯健康脳）』（課題 E）研究課題名：「脳の正常老化と異常老化を分岐する環境由来の脳リン酸化シグナルの解明」 研究代表者 岡澤 均

平成 23 – 25 年度 日本学術振興会科学研究費補助金 若手研究 B 「新規病態関連分子をターゲットとしたポリグルタミン病の治療効果」 課題番号：23700373 研究代表者 伊藤日加瑠
平成 23 – 25 年度 日本学術振興会科学研究費補助金 基盤 C 「アストロサイト系譜細胞の代謝異常によって生じる神経病態メカニズムの解析」 課題版号：23500438 研究代表者 榎戸 靖

平成 24 – 26 年度 日本学術振興会科学研究費補助金 基盤 C 「脊髄小脳失調症 I 型における複合体タンパク質プロテオーム解析による分子病態の解明」 課題版号：24500378 研究代表者 田川一彦

### 特許出願・取得状況

特許査定 2012 年 3 月 27 日
発明の名称：ポリグルタミン病の予防・治療剤
登録番号：特許第 4982739 号
登録日：2012 年 5 月 11 日
出願番号：特願 2006-154059
出願日：2006 年 6 月 1 日
特許権者：国立大学法人東京医科歯科大学
発明者：岡澤 均
本学整理番号：P05-047

発明の名称：精神発達遅滞の非ヒトモデル動物及び精神発達遅滞の症状を改善する活性を有する物質をスクリーニングする方法
登録番号：特許第 5066710 号
登録日：2012 年 8 月 24 日
出願番号：特願 2007-014795
出願日：2007 年 1 月 25 日
特許権者：国立大学法人東京医科歯科大学
発明者：岡澤 均
本学整理番号：P06-069

発明の名称：新規タンパク質及びそれを利用したポリグルタミン病等の神経変性疾患の予防・治療薬
出願番号：特願 2006-545101
出願日：2005/11/16
登録番号：特許第 5103615 号
登録日：2012/10/12
出願人：国立大学法人東京医科歯科大学
発明者：岡澤 均
本学整理番号：P04-009P-JP

### 受賞

- 伊藤日加瑠 第 5 回 CBIR 若手インスパイアシンポジウム 優秀賞、「HMGB1 を用いた脊髄小脳変性症 1 型モデルマウス治療の試み」 2013.2
- 伊藤日加瑠 平成 24 年度難治疾患研究所発表会 優秀賞（第 1 位）、「HMGB1 を用いた脊髄小脳変性症 1 型モデルマウス治療の試み」 2013.3.8
- 田村拓也 平成 24 年度難治疾患研究所発表会 優秀賞（第 1 位）、「小脳脊髄変性症 1 型病態における DNA 損傷修復の関与」 2013.3.8
- Chan Li 平成 24 年度難治疾患研究所発表会 萌芽賞、「Sox2 transcriptionally regulates Pqbp1, an intellectual disability-microcephaly causative gene, in neural stem progenitor cells」 2013.3.8

### 学会主催等

- Okazawa, H., International Symposium “Fragile X, Autism and Intellectual Disabilities”, Tokyo Medical and Dental University, M&D Tower, Akio Suzuki Memorial Hall, 2012.6.16
- 岡澤 均 「高齢期を豊かに生きる脳の老化と認知症の克服」第 53 回日本神経学会学術大会市民公開講座（座長） 東京医科歯科大学 東京 2012.5.26

- Okazawa, H., The 2<sup>nd</sup> Japan-Korea Neural Tissue culture seminar, Tokyo Medical and Dental University, M&D Tower, Akio Suzuki Memorial Hall, 2012.6.16
- 岡澤 均 新学術領域「シナプス・ニューロサーキットパソロジーの創成」 夏の班会議 脳科学研究推進支援ネットワーク 夏のワークショップ 仙台国際センター 仙台 2012.7.24

- 岡澤 均 シナプス病態若手シンポジウム「脳疾患関連 3 領域合同シンポジウム」 包括型脳科学研究推進支援ネットワーク 夏のワークショップ 仙台国際センター 仙台 2012.7.25
- 岡澤 均 新学術研究領域「シナプス・ニューロサーキットパソロジーの創成」 冬の班会議 KKR ホテル鎌倉わかみや 鎌倉 2012.12.15-16

# 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：小西昭充 特任講師：吉田達士 助教：荒川聡子  
特任助教：室橋道子、本田真也、山口啓史

## 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 (図1)。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、①新規オートファジーの制御分子の探索、②複数の新規オートファジー欠損マウスの作製と解析、③酵母における新規オートファジー機構の発見に成功し

た。特に、酵母における新規オートファジー機構を発見したことは、大きな収穫であった (論文投稿中)。また、新規オートファジーを特異的に制御できる化合物を発見し、その生体における投与効果を確認した。

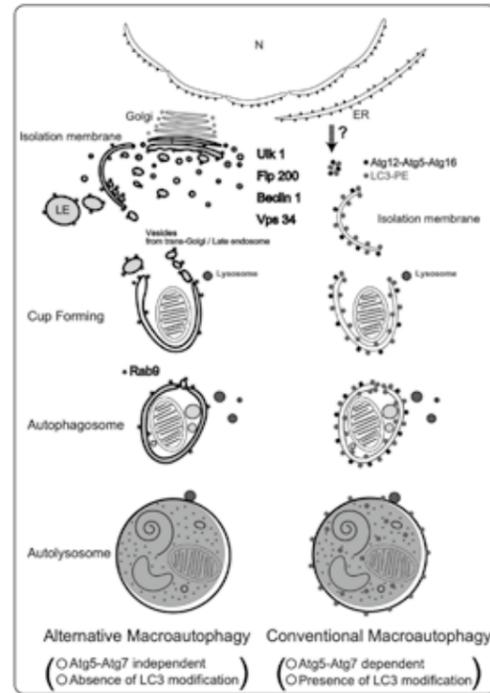


図1 オルタナティブオートファジーの発見  
哺乳動物には Atg5 に依存したオートファジーと依存しないオートファジー (オルタナティブオートファジー) が存在しており、両者は刺激や細胞の種類によって使い分けられている。

### 2. 細胞死の解析

多くの細胞は自殺装置を内包しており、必要に応じ積極的にそのスイッチを入れ死に至る。この機構は細胞分裂や細胞増殖と協調して機能し、個体発生や組織の恒常性維持に寄与している。従来、生理的な細胞死はアポトーシスのみであると考えられてきたが、我々を初めとする複数のグループにより非アポトーシス細胞死の存在が明らかにされ、生体内においてはアポトーシス、オートファジー細胞死、ネクロトーシスなど、複数の細胞死機構が様々な機能しているものと考えられる。

当教室では、個々の細胞死の分子機構や生理学的意義を解明したうえで、お互いの細胞死機構のクロストーク、生体内における細胞死全体の意義の解明を目指してい

る。

### A. アポトーシス

アポトーシス分子機構において、多くのアポトーシスシグナルはミトコンドリアに入り、ミトコンドリアの膜透過性を亢進させる。アポトーシスを主に制御しているのは Bcl-2 ファミリー蛋白質であり、これらはミトコンドリアの膜透過性を調節することによって細胞の生死を決定している。アポトーシスは様々な疾患の発症に関与しており、本年はクローン病、癌との関係について検討した。

クローン病とは炎症性腸疾患の一つであり、緩解憎悪を繰り返す難治性の疾患である。本疾患の発症には腸内細菌の存在が欠かせず、腸管上皮細胞の細胞死によって腸内細菌が粘膜下層に侵入する事が病態メカニズムの一部と考えられている。しかし、腸管上皮細胞の細胞死様式に関しては十分な知見が得られていない。そこで、我々のグループは、クローン病モデルマウス (IL10 欠損マウス) を用いて、腸管上皮細胞の細胞死様式を決定すると共に、抗アポトーシス分子 Bcl-2 を腸管上皮細胞に高発現したトランスジェニックマウスと交配する事により、腸管上皮細胞死の程度や病状が変化するか否かを検討した。その結果、腸管上皮細胞では、アポトーシスとネクロトーシス様細胞死が共に誘導されていた (図2)。興味深い事に、どちらの細胞死も Bcl-2 の高発現によって緩和され、その結果クローン病症状が顕著に抑制された (図3)。これらの結果は、腸管上皮細胞の細胞死を緩和する事によりクローン病を治療できる可能性を示している。

P53 はゲノムの傷害を認識し、細胞周期停止やアポトーシスを誘導する蛋白質であり、その機能異常は発癌の原因の一つである。我々のグループは、p53 によるア

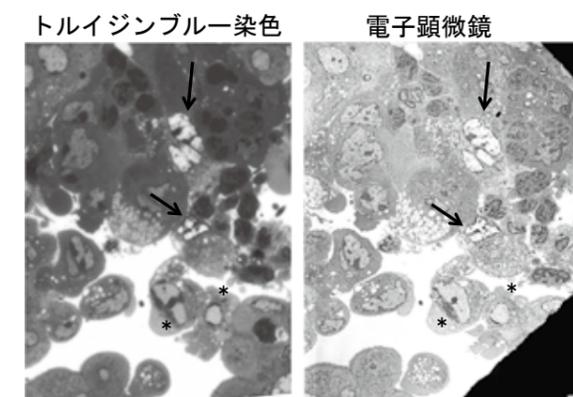


図2 クローン病モデルマウスにおける腸管細胞死の形態  
16 週令の IL10 欠損マウスの大腸をトルイジンブルー染色し (左)、同じ切片を電子顕微鏡 (右) にて観察した。ネクロトーシス (矢印) とアポトーシス (アスタリスク) が共に観察される。

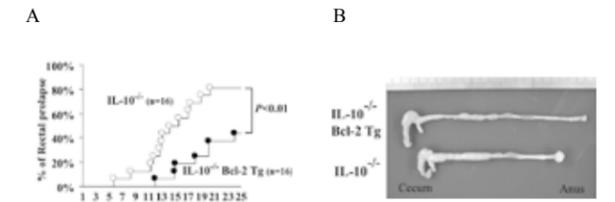


図3 Bcl-2 を腸管上皮細胞に過剰発現することによって、炎症性腸炎が抑制された。  
A: IL10 欠損マウスと IL10 欠損/Bcl-2 発現マウスの脱肛が発症する期間。  
B: 16 週令の IL10 欠損マウスと IL10 欠損/Bcl-2 発現マウスの大腸の比較。IL10 欠損マウスは腸管が肥厚して短縮しているが、この表現型は腸管上皮細胞に発現した Bcl-2 によって緩和される。

ポトーシス制御機構を解析している過程で、p53 が腫瘍血管の産生を抑制している事を見出した (図4)。また、このメカニズムを解析したところ、p53 が低酸素誘導性転写因子 HIF-1 の発現量を直接制御し、その結果 VEGF (血管内皮細胞増殖因子) の発現を抑制している事が判明した。実際に、ヒトの癌組織を用いて、p53 変異の有無と VEGF 発現量の関係を調べると、p53 に変異の見られる癌では VEGF の発現が亢進している (図5) 事が明らかとなった。これらの結果は、p53 による癌制御の新しいメカニズムを提示するものである。

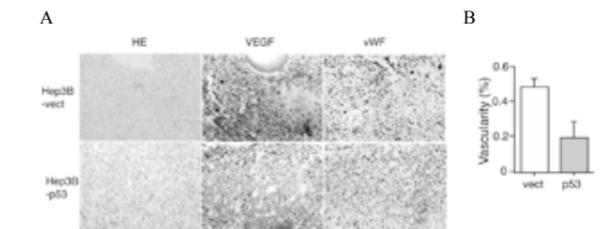


図4 p53 の発現によって腫瘍内血管新生が抑制される。  
A: Hep3B 細胞 (p53 欠損細胞) と p53 を発現させた Hep3B 細胞をマウスに移植して血管新生の程度を観察した。p53 発現細胞では、VEGF 産生が少なく、血管新生 (vWF) も抑制されていた。  
B: 新生血管を免疫染色し、その量を定量評価した。

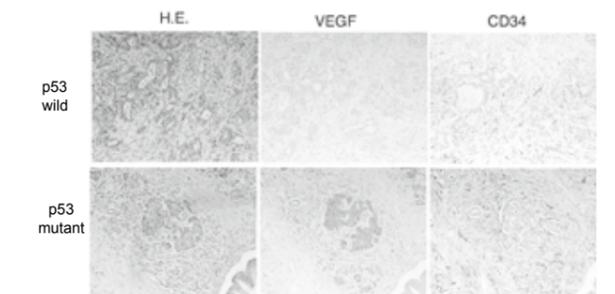


図5 ヒトの腫瘍においても、p53 発現腫瘍は血管新生が抑制される。  
P53 が正常型の腫瘍と変異型 p53 を持った腫瘍を比較すると、正常型 p53 の腫瘍の方が、VEGF 産生が少なく、血管新生 (CD34) も抑制されていた。本図は代表例を示すが、解析した他の 30 例においても同様な結果であった。

### B. オートファジー細胞死

当研究室では、オートファジーを利用した細胞死機構の存在を世界に先駆けて発見し、さらに、この機構は

JNKの活性化を介して実行されることを見出した。本年は、オートファジー欠損マウスを用いて、生体内でオートファジー細胞死が観察される場所を検討した（論文執筆中）。また、オートファジー細胞死を誘導できる低分子化合物を同定し、その標的分子の探索、抗癌剤としての有用性を検討した。

### C. ミトコンドリア膜透過性亢進機構を介したネクローシスの解析

単離ミトコンドリアに活性酸素やCa<sup>2+</sup>を添加すると、permeability transition (PT) と呼ばれるミトコンドリア膜の透過性亢進現象が誘導される。我々はPTの制御分子であるCyclophilin D(CyPD)のノックアウトマウスの解析より、PTが心筋梗塞などの際にネクローシスの原因となっていることや、学習や記憶に影響を与える事を報告してきた。本年は、超微形態学を用いて、PT

誘導時のミトコンドリア形態を電子顕微鏡や超微細共焦点顕微鏡にて観察した。

### 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。

### 人事異動

吉田志穂

武田可奈子（左）と清水重臣（右）

転入：山口啓史（特任助教）、杉本夕奈（大学院医歯学総合研究科 博士課程入学）、永田める菜（疾患生命科学研究所修士課程入学）、小原睦弥（特別研究学生）、山下恵実（特別研究学生）、後藤佑太（特別研究学生）、山本寛典（特別研究学生）
転出：吉田志穂（疾患生命科学研究所修士課程より就職）、武田可奈子（疾患生命科学研究所修士課程より退学）

### 業績目録

#### 原著論文

- Yoshioka Y, Shimizu S, Ito T, Taniguchi M, Nomura M, Nishida T, Sawa Y. p53 Inhibits Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Solid Tumor. *J Surg Res.* 174 : 291-297, 2012
- Konishi A, Arakawa S, Yue Z, Shimizu S. Involvement of Beclin 1 in the engulfment of apoptotic cells. *J. Biol. Chem.* 287: 13919-29, 2012
- Fukamatsu M, Ogawa M, Arakawa S, Ashida H, Suzuki M, Furuse M, Nakayama K, Shimizu S, Kin M, Mimuro H, Sasakawa C. Shigella targets epithelial tricellular junctions to spread between cells via a noncanonical clathrin-dependent endocytic pathway. *Cell Host Microbe.* 11: 325-336, 2012
- Miyaoka Y, Ebato K, Kato H, Arakawa S, Shimizu S, Miyajima A. Hypertrophy and unconventional cell division of hepatocytes underlie liver regeneration. *Curr. Biol.* 22: 1166-75, 2012
- Nakase I, Okumura S, Katayama S, Hirose H, Pujals S, Yamaguchi H, Arakawa S, Shimizu S, Futaki S. Transformation of an antimicrobial peptide into a plasma membrane-permeable, mitochondria-targeted peptide via the substitution of lysine with arginine *Chemical Commun.* 48: 11097-99, 2012

#### 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. in press*
- 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「実験医学」羊土社 30:550-5 (2012)
- 清水重臣：生体におけるマイトファジーの役

割「実験医学」羊土社 30: 1390-95（2012）

#### 著書

- 清水重臣：アポトーシス調節系「分子標的薬」日本臨床 70: 125-30（2012）

#### 学会発表

#### 国際学会

- S. Shimizu : “Molecular Mechanisms and Physiological Roles of Atg5/Atg7-independent Macroautophagy” The 6<sup>th</sup> Symposium on Autophagy (2012/10/30)

#### 国内学会

- 清水重臣：「放射線によって誘導される様々な細胞死とオートファジー」第2回分子状水素医学シンポジウム（2012/2/11 港区）
- 清水重臣：「Atg5に依存しないオートファジーの分子機構とその生理機能」バッシングナリングバイオロジー ワークショップ（2012/4/24 文京区）
- 清水重臣：「なぜ赤血球にはミトコンドリアがないのか？～オートファジーの働き～」第3回ミトコンドリアとDDS（2012/7/7 札幌市）
- 清水重臣：「Alternative Macroautophagy and Cancer」第71回日本癌学会（2012/9/19 札幌市）
- 清水重臣：「様々なストレスに対応する為に機能するオートファジー」第16回日本統合医療学会（2012/12/9 吹田市）
- 清水重臣：「Maintenance of tissue homeostasis by dying cells and autophagy」第35回日本分子生物学会（2012/12/13 福岡市）
- Honda S, Arakawa S, Nishida Y, Yoshida T, Shimizu S: 「A role of alternative macroautophagy during erythrocyte terminal differentiation」第35回日本分子生物学会（2012/12/11～14 福岡市）
- Arakawa S, Yamaguchi H, Kanaseki T, Shimizu S: 「Discovery of Atg5-independent alternative macroautophagy in yeast and its morphological analysis」第35回日本分子生物学会（2012/12/11～14 福岡市）
- Yamaguchi H, Arakawa S, Kanaseki T, Shimizu S: 「Discovery of Atg5-independent alternative macroautophagy in yeast and its genetic analysis」第35回日本分子生物学会（2012/12/11～14 福岡市）
- Konishi A: 「Checkpoint recovery from DNA damage」第35回日本分子生物学会（2012/12/11～14 福岡市）
- 本田真也、荒川聡子、西田友哉、吉田達士、

清水重臣：「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」第12回日本ミトコンドリア学会（2012/12/19 筑波市）

#### 学内外教育活動

清水重臣：福井大学大学院医学系研究科非常勤講師、東京理科大学非常勤講師

#### 競争的研究費取得

代表（清水重臣）

- 科学研究費補助金、基盤研究（S）「新しく発見したオートファジー機構の包括的理解とその「オートファジー病」への応用」
- 科学研究費補助金、新学術領域研究「ミトコンドリア膜上に一過性に形成される過渡期細胞死孔の捕捉」
- 科学研究費補助金、挑戦的萌芽研究「ミトコンドリアにおけるアポトーシス孔開閉機構の動的解析」
- 医薬基盤機構 保健医療分野における基礎研究推進事業「オートファジー細胞死の制御を基盤とした癌分子標的治療薬の開発」
- 上原記念生命科学財団 第8回 特定研究助成「新たに発見したオートファジー機構を標的とした先端的な癌治療法の開発」
- 東京生化学研究会 研究助成「オートファジー細胞死を標的とした抗癌剤の開発」
- 日本対がん協会「リレー・フォー・ライフ・プロジェクト未来」研究助成「オートファジー細胞死を標的とした新規抗癌剤の開発」
- ライフサイエンス振興財団研究助成「オートファジー機構を応用したスマート・エイジング対策法の開発」

代表（小西昭充）

- 科学研究費補助金、基盤研究（C）「DNA損傷回復制御機構の解明：細胞は如何にしてDNA損傷から回復するのか？」

代表（荒川聡子）

- 科学研究費補助金、若手研究（A）「赤血球分化におけるオルタナティブ・オートファジーの生理機能の解明」
- 科学研究費補助金、挑戦的萌芽研究「オルタナティブ・オートファジーモニターマウスの作出」
- 持田記念研究助成「血球貪食症候群の病態生理機構の解明と治療法開発研究」
- かなえ医薬振興財団研究助成「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」

代表（室橋道子）

- 科学研究費補助金、研究活動スタート支援「新規オートファジー誘導剤の臨床薬への応用」

# 難治病態研究部門 発生再生生物学分野

教授：仁科博史 准教授：平山順 助教：浅岡洋一  
特任助教：山崎世和、畠星治、岩月麻美子  
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。JNK 活性化因子である 2 種類のリン酸化酵素 MKK4 (別名 SEK1) と MKK7 の観点から解析を行ってきました。これまでに、両因子が協調的に働き JNK を相乗的に活性化することを見出しました。「MKK4 と MKK7 による JNK の連続リン酸化モデル」を提唱しています。また、本シグナル伝達系は、発生期のマウスの肝臓の幹細胞 (肝芽細胞) の増殖シグナルとして機能することを明らかにしました。本シグナル系に不具合が生じると、マウス個体は肝形成不全を伴う致死となり、小型魚類のゼブラフィッシュでは初期胚形成が異常なることを報告してきました。現在は、「哺乳類動物の脳形成と脳の機能維持における JNK シグナル系の役割」を条件付きノックアウトマウスを用いて解析しています。

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

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

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

### 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。これまでに「眼形成マスター遺伝子と呼ばれる PAX6 の神経分化における役割」や「ES 細胞や精巣で特異的に発現する CrxOS の役割」について報告してきました。国立成育医療センター眼科との共同研究です。現在は、細胞分化の運命決定に関わる因子を化合物ライブラリーを用いて探索しています。

### 4. 小型魚類メダカを用いた肝臓研究

発生期の肝形成は、幹細胞である肝芽細胞が内胚葉由来の前腸から発生することに始まります。肝芽細胞は増殖を繰り返した後、胆管上皮細胞や成熟肝細胞へ分化・成熟します。*in vitro* 組織培養系の進歩や多数のノックアウトマウスの作出によって、肝形成に関与する遺伝子やシグナル伝達系が明らかになりつつあります。しかしながら、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。これまでに「肝形成不全および肝機能不全メダカ変異体」を複数単離することに成功しています。

また、遺伝的に脂肪肝になりやすいメダカ変異体 *kendama* の単離や、山口大学医学部との共同研究によって、高脂肪食をメダカに摂取させることによって、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) をメダカに発症させることにも成功しています。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、多価不飽和脂肪酸である EPA の同時投与によって NASH の発症は抑制されました。欧米では既に小型脊椎動物ゼブラフィッシュを用いた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。マウスに比較して、スクリーニングできる薬剤の数は百倍以上、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変異体の単離が注目されています。正常の肝臓は脂肪肝の前段階を経て、線維化、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。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。*kendama* メダカ変異体や高脂肪食摂取による NASH 様メダカを用いた脂肪肝発症機構の解明と創薬研究が期待されています。現在は、上記変異体の原因遺伝子の同定の観点から、「肝形成機構および脂肪肝発症機構」を研究しています。

### 5. マウスを用いた肝再生研究

人類は紀元前の大昔に既に「肝臓が再生すること」を知っていたようです。プロメテウスという神様の神話がそれを示しています。マウスでは、肝臓全体の 70% もの部分を除去了した場合 (部分肝切除)、残りは 30% の部分が、約 1 週間後で、元の 100% のサイズに戻ります。きちんと 100% に戻ることから、「肝臓は自分のサイズを知っている」こととなります。多くの生物学者が興味を持ってきた課題です。また、部分肝切除後 1 日目には脂肪肝が観察されますが、この脂肪肝は病態の前段階である「悪玉脂肪肝」ではなく、肝再生のエネルギーを供給するの

に必須な「善玉脂肪肝」です。悪玉脂肪肝と善玉脂肪肝の違いも興味ある研究課題です。現在は、これら魅力的な課題を、Hippo シグナル系と脂質代謝の観点から取り組んでいます。

### 6. 個体の恒常性を制御する生物時計に関する研究

概日リズムは、睡眠/覚醒、血圧、体温、ホルモン分泌、代謝等の生理現象の周期を主に光といった外界からの刺激を利用して外環境に適応させ、生体の恒常性を維持しています。従って、この機構の異常は躁鬱病やメタボリック症候群等の代謝異常を含む多くの病態に関与します。概日リズムは、分子時計と呼ばれる約 24 時間の周期性をもつ転写/翻訳に依存したフィードバックループにより制御されています。この分子時計は、CLOCK, BMAL1, 及び CRY の 3 つの因子 (時計蛋白質) により構成され、我々の全身の組織の個々の細胞に存在しています。疫学的な解析や概日リズムの異常を示す変異マウスの生理学・解剖学的解析により概日リズムと発癌等の疾患の関連は現象として多く報告されています。近年、BMAL1 や CLOCK 等の分子時計制御因子の変異マウスが早老症や代謝異常を発症することが報告され、一部その病態メカニズムに分子時計が関与していることが強く示唆されています。実際に、分子時計は *Wee1* や *c-Myc* 等の細胞周期制御因子や癌遺伝子の転写を制御します。また、時計蛋白質 CLOCK はヒストンアセチルトランスフェラーゼ (HAT) 活性を有し、その酵素活性により多様な細胞機能制御を担うグルココルチコイドレセプター (GR) 等の非ヒストン蛋白質をアセチル化修飾し、ターゲット蛋白質の機能を調節します。さらに、分子時計は CLOCK の HAT 活性により遺伝子の発現調節領域のクロマチンリモデリングを行います。これは分子時計が細胞のエピジェネティック応答を担う可能性を示唆しています。我々は、分子時計制御に関わる新規の細胞内シグナル経路及び時計蛋白質の翻訳後修飾を見出してきました。重要なこととして、これらのシグナル経路や蛋白質の修飾は細胞の DNA 損傷応答制御においても重要な役割を担っています。実際に、我々は分子時計の光同調と DNA 損傷応答が共通に MAP キナーゼシグナル経路を介して制御されていることを見出しています。現在我々は、分子時計制御因子として機能する DNA 損傷応答因子 (DNA damage Response Factor: DRF) を同定しています。これらの知見に基づいて、我々は古典的な DNA 損傷修復又は細胞死の選択という応答とは異なる「分子時計を介した新たな DNA 損傷応答機構」という仮説を提唱しそれを証明することにより、概日リズムの異常と発癌の関連の分子機構の一端を解明したいと考えています。

## ハイライト

### ストレス応答性キナーゼ MKK7 は生物時計の周期を制御する

概日リズムは生命活動の周期を外界の日周期に適應させ維持する機構であり、分子時計と呼ばれる転写-翻訳を介したネガティブフィードバックループにより細胞自律的に維持されている。近年の阻害剤網羅的スクリーニングからストレス応答性キナーゼ JNK の阻害剤である SP600125 が分子時計の周期を伸長させることが報告されたが、その分子時計制御機構については明らかとなっていない。我々は、JNK の活性化因子である MKK7 の遺伝的欠損細胞を用いて、分子時計制御機構の解明を試みた。その結果、MKK7-JNK シグナル経路が1)分子時計の周期を制御すること、2) PER2 及び BMAL1 のリン酸化を誘導すること、3) PER2 のユビキチン化を抑制し安定化を誘導すること、さらに4) 既知の PER2 分解誘導キナーゼである CK1 とは別のアミノ酸残基のリン酸化を誘導することを見出した。PER2 の安定性制御は分子時計の周期制御に重要であることが知られている。本研究は MKK7-JNK シグナル経路が PER2 の安定化を介して分子時計の周期を制御することを示唆する (図1)。

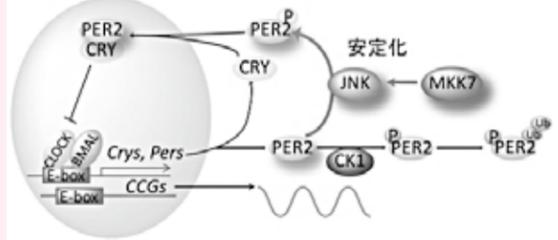


図1 MKK7-JNK シグナル経路による分子時計制御モデル

### YAP は核内でアセチル化／脱アセチル化の翻訳後修飾を受ける

キナーゼカスケードである Hippo シグナルは、転

写共役因子である YAP をリン酸化することで細胞質に局在化させ、YAP 依存的な遺伝子発現誘導を負に制御する。細胞質におけるリン酸化修飾を介した YAP の制御機構は良く理解されている一方で、YAP の核内における制御機構やリン酸化以外の翻訳後修飾による制御については不明な点が多く残されている。そこで我々は核内で生じる新たな YAP の翻訳後修飾の同定を目的として、生化学的なスクリーニング解析を行った。その結果、1) YAP の核内移行を誘導する刺激を同定し、2) 核内に移行した YAP がアセチル化酵素である CBP/p300 によってアセチル化されること、3) YAP の C 末端の2ヶ所のリジンがアセチル化部位であること、4) これらの部位のアセチル化は脱アセチル化酵素である SIRT1 によって脱アセチル化されること、5) アセチル化により YAP の転写活性化能が抑制されること、6) YAP のアセチル化は細胞生存能を制御していることを見出した。核内における新たな YAP の制御機構として、アセチル化サイクルの存在を初めて明らかにした (図2)。

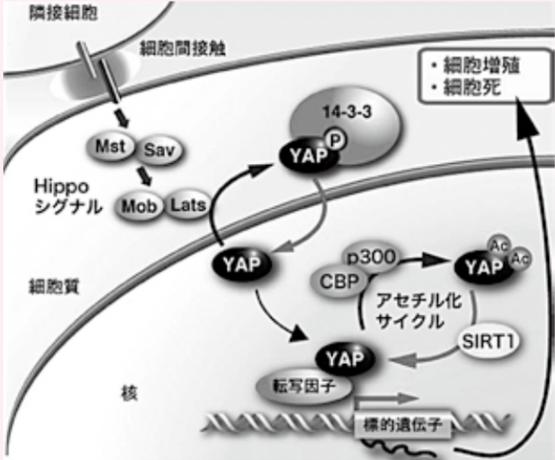


図2 核内における YAP のアセチル化サイクルのモデル

## 人事異動

転入:有馬誉恵 (修士課程入学)、牧野麻亜子 (修士課程入学)、三浦良太 (特別研究学生)  
転出:大谷智実 (修士修了)、尾崎友美 (修士修了)、市原祐樹 (修士修了)、迫田実希 (博士課程中退)、岩月麻美子 (特任助教辞職)

## 業績目録

### 原著論文

1. Shoji Hata, Jun Hirayama, Hiroaki Kajih, Kentaro Nakagawa, Yutaka Hata, Toshiaki Katada, Makoto Furutani-Seiki and Hiroshi Nishina (2012) A novel acetylation cycle of transcription co-activator Yes-associated protein that is downstream of Hippo pathway is triggered in response to SN2 alkylating agents. *J. Biol. Chem.* 287, 22089-22098.

2. Yoshimi Uchida, Tomomi Osaki, Tokiwa Yamasaki, Tadanori Shimomura, Shoji Hata, Kazumasa Horikawa, Shigenobu Shibata, Takeshi Todo, Jun Hirayama and Hiroshi Nishina (2012) Involvement of Stress Kinase Mitogen-activated Protein Kinase Kinase 7 in Regulation of Mammalian Circadian Clock. *J. Biol. Chem.* 287, 8318-8326.  
3. Yoshimi Uchida, Tadanori Shimomura, Jun Hirayama and Hiroshi Nishina (2012) Light, reactive oxygen species, and magnetic fields activating ERK/MAPK signaling pathway in cultured zebrafish cells. *Appl. Magn. Reson.* 42, 69-77.  
4. Miki Nishio, Koichi Hamada, Kohichi Kawahara, Masato Sasaki, Fumihito Noguchi, Shuhei Chiba, Kensaku Mizuno, Satoshi O. Suzuki, Youyi Dong, Masaaki Tokuda, Takumi Morikawa, Hiroki Hikasa, Jonathan Eggenschwiler, Norikazu Yabuta, Hiroshi

Nojima, Kentaro Nakagawa, Yutaka Hata, Hiroshi Nishina, Koshi Mimori, Masaki Mori, Takehiko Sasaki, Tak W. Mak, Toru Nakano, Satoshi Itami, and Akira Suzuki (2012) Cancer Susceptibility and embryonic lethality in Mob1A/1B double mutant mice. *J. Clin. Invest.* 122(12):4505-4518.  
5. Tadashi Yokoi, Yuko Seko, Tae Yokoi, Hatsune Makino, Shin Hatou, Masakazu Yamada, Tohru Kiyono, Akihiro Umezawa, Hiroshi Nishina, Noriyuki Azuma (2012) Establishment of Functioning Human Corneal Endothelial Cell Line with High Growth Potential. *PLoS ONE* 7(1):e29677.  
6. Ken Okada, Akihide Kamiya, Keiichi Ito, Ayaka Yanagida, Hidenori Ito, Hiroki Kondou, Hiroshi Nishina and Hiromitsu Nakauchi (2012) Prospective isolation and characterization of bi-potent progenitor cells in early mouse liver development. *Stem Cells and Development* 21,

1124-1133.

7. Takuya Iwamoto, Shuji Terai, Yuko Mizunaga, Naoki Yamamoto, Kaoru Omori, Koichi Uchida, Takahiro Yamasaki, Yasuhiko Fujii, Hiroshi Nishina, and Isao Sakaida (2012) Splenectomy enhances the anti-fibrotic effect of bone marrow cell infusion and improves liver function in cirrhotic mice and patients *J. Gastroenterol.* 47, 300-312.  
8. Toshiyuki Oishi, Shuji Terai, Shinya Kuwashiro, Koichi Fujisawa, Toshihiko Matsumoto, Hiroshi Nishina and Isao Sakaida (2012) Ezetimibe reduces fatty acid quantity in liver and decreased inflammatory cell infiltration and improved NASH in medaka model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 422, 22-27.  
9. Shoji Hata and Hiroshi Nishina (2012) [Letters to the Editor] Reply to Sun et al.: Targeting YAP acetylation in cancer. *J. Biol. Chem.* 287, 35443.  
10. Tokiwa Yamasaki, Hiroshi Kawasaki and Hiroshi Nishina (2012) [review] Diverse roles of JNK and MKK pathways in the brain. *J. Signal Trans.* 2012: 459265.  
11. Hiroshi Nishina (2012) [commentary] hDlk-1: A cell surface marker common to normal hepatic stem/progenitor cells and carcinomas. *J. Biochem.* 152, 121-123.

### 和文

1. 平山順, 仁科博史: 活性酸素シグナルと概日リズム: 実験医学 2012 年 11 月増刊号 羊土社 36-41 (2012)  
2. 宮村憲央, 仁科博史: モデル生物を用いた肝発生および肝サイズ制御機構の解明: 肝胆臓 65: 21-28 (2012)  
3. 宮村憲央, 瀬藤光利, 仁科博史: 質量顕微鏡法を用いたマウス再生肝の解析: 生化学 84: 680-684 (2012)  
4. 皇星治, 仁科博史: Hippo シグナリング: シグナル伝達キーワード事典: 羊土社 58-60 (2012)  
5. 仁科博史: 薬学用語辞典, 東京化学同人 (分担執筆) (2012)

### 受賞

1. 浅岡洋一: 第 34 回日本比較生理生化学会大会にて第 21 回吉田奨励賞を受賞 (2012 年 7 月)

### 国際学会発表

1. Tokiwa Yamasaki; Analyses of physiological functions of stress kinase MKK7 in developing cortex and adult nervous system [Yale CNRR seminar, New Haven, USA, April 2012]  
2. Hiroshi Nishina; A novel acetylation cycle of the transcription co-activator Yes-associated protein that is downstream of the Hippo pathway is triggered in response to S<sub>2</sub> alkylating agents [2012 FASEB Science Research Conference, Aspen, USA, July 2012]  
3. Tokiwa Yamasaki; Stress-activated protein kinase MKK7 regulates axon elongation in the developing cerebral cortex [Neuroscience 2012, SN's 42nd annual meeting, New Orleans, USA, Oct 2012]  
4. Shoji Hata and Hiroshi Nishina; A novel acetylation cycle of the transcription co-activator Yes-associated protein that is downstream of the Hippo pathway is triggered in response to S<sub>2</sub> alkylating agents [International Symposium on GENETIC AND EPIGENETIC CONTROL OF CELL FATE, Kyoto, Japan, November 2012]  
5. Hiroshi Nishina; Liver Formation and Disease: Lessons from Fish and Mouse [4<sup>th</sup> World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition, Taipei, Taiwan,

November 2012]

### 国内学会発表

1. 仁科博史: Liver development, regeneration and disease: lessons from mice and fish [第 9 回心血管幹細胞研究会: 2012 年 1 月/東京]  
2. 仁科博史: Liver development, regeneration and disease: lessons from mice and fish [東京大学薬学セミナー: 2012 年 1 月/東京]  
3. 仁科博史: モデル生物を用いた器官形成機構の解明 [山口大学医学部セミナー: 2012 年 1 月/宇部]  
4. 岩月麻美子他: 神経組織特異的 Mkk7 欠損マウスの解析 [第 132 回日本薬学会: 2012 年 3 月/札幌]  
5. 皇星治: がん遺伝子産物 YAP の新規翻訳後修飾アセチル化の同定 [第 16 回日本肝臓医学生物学研究会: 2012 年 3 月/熱海]  
6. 宮村憲央: がん遺伝子 YAP による肝細胞がんの発症機構の解明 [第 16 回日本肝臓医学生物学研究会: 2012 年 3 月/熱海]  
7. 仁科博史: 質量顕微鏡法 [第 55 回日本腎臓学会学術総会: 2012 年 6 月/横浜]  
8. 皇星治他: がん遺伝子産物 YAP の新規翻訳後修飾アセチル化の同定 [第 19 回肝細胞研究会: 2012 年 6 月/札幌]  
9. 宮村憲央他: がん遺伝子産物 YAP による細胞競合および肝がん誘導系の確立 [第 19 回肝細胞研究会: 2012 年 6 月/札幌]  
10. 内田好海他: ストレス応答性キナーゼ MKK7 による概日リズム制御機構の解明 [第 11 回生命科学研究会: 2012 年 6 月/秋田]  
11. 浅岡洋一: ストレス応答性 MAP キナーゼシグナル伝達系のゼブラフィッシュ初期胚における役割の解明 [第 34 回日本比較生理生化学会: 2012 年 7 月/葉山] 第 21 回吉田奨励賞受賞講演  
12. 山崎世和他: 細胞の生死を制御するストレス応答性 MKK7 の神経系における生理的役割の解明 [第 21 回日本 Cell Death 学会: 2012 年 7 月/名古屋]  
13. 仁科博史: マウスとメダカから学ぶ肝形成と肝疾患 [秋田大学医学部セミナー: 2012 年 8 月/秋田]  
14. 有馬誉恵他: 神経細胞特異的欠損マウスを用いた概日リズム制御機構におけるストレス応答性キナーゼ MKK7 の機能解析 [第 11 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフィォーラム: 2012 年 9 月/福岡]  
15. 内田好海他: ストレス応答性 MKK7-JNK シグナル経路による分子時計制御 [第 11 回ファーマバイオフィォーラム 2012: 2012 年 9 月/福岡]  
16. 平山順他: ストレス応答性リン酸化酵素による概日リズム制御 [第 19 回日本時間生物学学会学術大会: 2012 年 9 月/札幌]  
17. 山崎世和他: JNK signaling is required for the maintenance of motor performance in old-age animals [第 35 回日本神経科学大会: 2012 年 9 月/名古屋]  
18. 平山順他: Light-dependent UV-tolerance in zebrafish early embryo [第 18 回小型魚類研究会: 2012 年 9 月/京都]  
19. 浅岡洋一他: Analysis of the Hippo signaling pathway regulating neuronal differentiation in the retina. [第 18 回小型魚類研究会: 2012 年 9 月/京都]  
20. 宮村憲央: がん遺伝子 YAP による肝細胞癌発症機構の解明 [第 17 回日本肝臓医学生物学研究会: 2012 年 10 月/旭川]  
21. 千葉恭敬: がん遺伝子 YAP 誘導性肝細胞がんのゲノム解析 [第 17 回日本肝臓医学生物学研究会: 2012 年 10 月/旭川]  
22. 斎藤光介: YAP パラログ TAZ の肝がん誘導能の検討 [第 17 回日本肝臓医学生物学研究会: 2012 年 10 月/旭川]  
23. 浅岡洋一: 器官サイズ制御因子 YAP の網膜

分化における機能解析 [第 5 回 RRM: 2012 年 12 月/東京]

24. 仁科博史: がん遺伝子 yap 依存的異常肝細胞の排除と肝細胞がんの発症 [第 35 回日本分子生物学学会年会: 2012 年 12 月/福岡]  
25. 平山順他: ストレス応答性キナーゼによる概日リズム制御 [第 35 回日本分子生物学学会年会: 2012 年 12 月/福岡]  
26. 皇星治他: がん遺伝子産物 YAP アセチル化サイクルの同定 [第 85 回日本生化学会大会: 2012 年 12 月/福岡]

### 国際学術交流

1. Josef M. Penninger, M.D., Ph. D., Professor and Director of Institute of Molecular Biotechnology of the Austrian Academy of Sciences (IMBA), Vienna, Austria  
2. Makoto Furutani-Seiki, M.D., Ph.D., Associate Professor of Univ. of Bath, UK

### 学外教育活動

1. 仁科博史: 東京大学薬学部・非常勤講師、山口大学医学部・消化器病態内科学教育研究プログラム・世話人、肝細胞研究会・世話人、日本肝臓医学生物学研究会・世話人、肝疾患と肝再生研究会・世話人、自然科学研究機構「メダカ」バイオリソース運営委員会委員、日本 Cell Death 学会評議員  
2. 浅岡洋一: 東京医科歯科大学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 4 回「メダカを用いた肝臓疾患研究」[2012 年 11 月/文京区シビックセンター]

### 競争的研究費等の取得状況

1. 仁科博史 (代表): 日本学術振興会研究費, 基盤研究 (B) 「マウスやメダカを用いた肝発生・再生および肝病態シグナルネットワークの解明」  
2. 仁科博史 (代表): 文部科学省研究費, 新学術領域研究「MAP キナーゼ・Hippo シグナル系による細胞運命決定制御の解明」  
3. 仁科博史 (代表): 日本学術振興会研究費, 挑戦的萌芽研究「器官サイズ制御因子 YAP 依存的肝癌誘発系の開発とマイクロ RNA の網羅的発現解析」  
4. 仁科博史 (分担): 厚生労働科学研究費補助金 (肝炎等克服緊急対策研究事業) 「骨髄および脂肪由来細胞を用いた次世代型肝臓再生・修復 (抗線維化) 療法の開発研究」  
5. 平山順 (代表): 科学研究費補助金 若手研究 (A) 「DNA 損傷シグナルによる概日リズム制御機構の解明」  
6. 平山順 (代表): 文部科学省研究費, 新学術領域研究「活性酸素シグナルによる概日リズム制御機構の解明」  
7. 平山順 (代表): 日本学術振興会研究費, 挑戦的萌芽研究「概日リズム制御因子によるヌクレオソーム形成・維持の分子機構及び生理的意義の解析」  
8. 浅岡洋一 (代表): 科学研究費補助金 若手研究 (B) 「小型魚類を用いた器官サイズ制御を司る Hippo シグナル伝達系の解析」  
9. 浅岡洋一 (代表): 文部科学省研究費, 新学術領域研究「器官サイズ制御シグナルによる神経管・血管系上皮組織の 3 次元構築機構の解明」  
10. 岩月麻美子 (代表): 科学研究費補助金 研究活動スタート支援 「ストレスシグナル欠損マウスを用いた毒性金属・放射線による病態発症機序の解明」  
11. 宮村憲央 (代表): 科学研究費補助金 特別研究員奨励費 「質量顕微鏡を用いた肝臓内低分子代謝産物の網羅的可視化とバイオマーカーの探索」  
12. 内田好海 (代表): 科学研究費補助金 特別研究員奨励費 「ストレスシグナルによる概日リズム制御の分子メカニズムおよび生物学的意義の解明」

# 難治病態研究部門 幹細胞医学分野

教授：西村栄美 助教：青戸隆博 助教：松村寛行  
特任助教：砂山潤、毛利泰彰 技術補佐員：大西宏規、岡田容子、矢嶋玲子  
事務補佐員：渡邊 郁

## 研究内容

### 概要

生体を構築する多くの組織の新陳代謝および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る病態の解明を中心として、生体組織の再生、老化、がん化の仕組みを理解し臨床に応用すべく研究を行っている。特に、マウスやヒトの皮膚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、幹細胞システムが様々なゲノム損傷ストレスや加齢に抗して幹細胞プールを保持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すると同時に、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、最大の臓器として知られ、他の多くの組織や臓器と同様、新陳代謝を行いながらその恒常性を維持している。その要となっているのが組織幹細胞であり、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、分化細胞の供給源として機能している。特に、毛包で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いる。特に、毛包においては幹細胞およびニッチの可視化を行いやすいなどの利点を生かし、我々はマウス成体皮膚において色素幹細胞を世界に先駆けて発見、同定している（Nishimura EK. et al., Nature, 2002.）（図1）。

掌蹠など毛包の存在しない皮膚においても色素幹細胞が存在するのかについては未だ明らかにされていない。近年、メラノーマ（悪性黒色腫）の診断がダーモスコピーと呼ばれる一種の拡大鏡を用いた診断技術により格段の進歩を遂げている。特に、足底や手掌などの掌蹠は、皮丘と皮溝が交互に分布する特徴的な構造を持ち、メラノーマが発生しやすく、他の皮膚領域と比較して面積あ

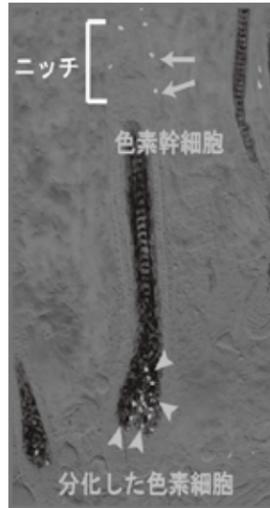


図1

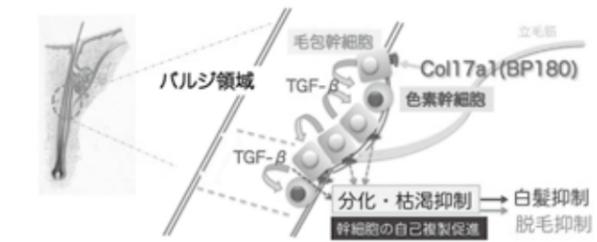
り約16倍発生しやすい。メラノーマでは、症例の86%で皮丘に一致した色素沈着パターン（皮丘平行パターン）が見られ（感度）、逆に皮丘優位のパターンが見られれば、99%がメラノーマであること（特異度）が、近年、斎田らによって明らかにされている。汗管の開口部が皮丘に一致して分布しており、メラノーマ細胞が皮丘に一致して選択的に分布しやすいことから、我々はマウスの掌蹠で汗腺が存在するfootpad皮膚を調べたが、これまでの既知の色素細胞マーカーで調べる限り、色素細胞系譜の細胞は検出されなかった。そこで、我々は不活性化された未分化なメラノプラストが、未知の幹細胞集団として存在することを想定し、Dct-H2BGFPトランスジェニックマウスを作製し（図1）、あらたにfootpad皮膚に見つかったGFP陽性細胞集団が幹細胞として十分な条件を満たすかどうかについて解析を進めている。このトランスジェニックマウスにおいては、体幹などの休止期毛包において深い休眠状態に入った色素幹細胞においてもGFPの発現を安定的に認めることから、毛周期や細胞の活性化状態に関わらず色素幹細胞を安定的にマーキングするシステムとして有効であることを明らかにしている（未発表）これら皮膚付属器内の幹細胞システムをモデルとして、幹細胞システムの動作原理を明らかにすべく研究を進めている。

## 2. 組織幹細胞の維持機構の解明

組織幹細胞の維持には幹細胞自身に加えて幹細胞周囲の微小環境（幹細胞ニッチ）による制御が重要であることが複数の組織において明らかにされている。色素幹細胞側で重要となる分子としては、色素細胞の発生分化のマスター制御因子として知られるMITF転写因子および、その標的遺伝子であるBcl2が必須であり、その欠損により毛が白髪化すること、特に色素幹細胞が休眠状態に入るタイミングで必須であることを明らかにしてきた（Nishimura EK. et al. Science 2005）。また、加齢に伴いニッチにおいて色素幹細胞が“異所性に分化”する現象をはじめて発見し、これは*Mitf*遺伝子の変異により有意に促進されることを示した（Nishimura EK. et al. Science 2005）。

一方、ニッチによる細胞外からの幹細胞制御については、幹細胞ニッチが色素幹細胞の運命を優勢に決定することを現象として捉えてはいたが（Nishimura EK. et al., Nature, 2002.）、そのメカニズムについては明らかではなかった。毛包幹細胞と色素幹細胞は毛包のなかほどに位置するバルジ領域に存在しているが、色素幹細胞は、黒髪のもとになる色素細胞の供給源となり、毛包幹細胞は毛髪のもとになる角化細胞の供給源となることで、毛が生え変わるごとに色素を持つ毛を生やしている。我々は、色素幹細胞と隣接して毛包バルジ領域に存在する毛包幹細胞が、色素幹細胞に対して機能的なニッチ細胞として働くこと、そして、そのためには毛包幹細胞が発現する17型コラーゲンが必須であることを最近見出した（図2）（Tanimura S et al. Cell Stem Cell 2011）。

### 毛包幹細胞は色素幹細胞のニッチ細胞として機能する



17型コラーゲンが白髪と脱毛を抑制するメカニズム

図2

17型コラーゲン（Col17a1/BP180/BPAG2）は、ヘミデスモソームを構成する膜貫通性のコラーゲンで表皮基底細胞を基底膜に強く固定する役割が知られていた。また、ヒトで先天的に17型コラーゲンを欠損すると早発性の脱毛が見られるが、その仕組みについては明らかに

されていなかった。我々は、毛包幹細胞が17型コラーゲンを発現しており、毛包幹細胞の幹細胞性を維持するという役割を持つと同時に、色素幹細胞のニッチ細胞として機能するためにも必須であること、これらの役割により白髪と脱毛を抑えていることを明らかにした。そのメカニズムとしては、毛包幹細胞がTGF- $\beta$ シグナルを介して色素幹細胞の未分化性や休眠状態を促進制御していることによるもので、17型コラーゲンを欠損するマウスでは、毛包幹細胞におけるTGF- $\beta$ の発現が早期から失われ、隣接して存在する色素幹細胞におけるTGF- $\beta$ シグナルが入らなくなるために色素幹細胞を維持できなくなり白毛化すること、毛包幹細胞を含む基底細胞でのみ17型コラーゲンを発現させると一連の異常がすべて回復することが判明した。さらに、TGF- $\beta$ シグナルを介した色素幹細胞維持のメカニズムとしては、色素細胞の発生分化のマスター転写因子MITFの発現抑制を介して色素幹細胞の未分化性維持を促進すると同時に、静止期の導入を促進していることが明らかになった（Nishimura EK et al., Cell Stem Cell, 2010）。また、色素幹細胞が休眠状態に入る際に、*Bcl2*が生存に必須となるのは、ニッチ由来のTGF- $\beta$ シグナルに抗して色素幹細胞が生存する必要があるためであることも同時に判明した。一方、メラノーマ細胞では、TGF- $\beta$ シグナルに抵抗して生存増殖することも明らかになった。（Nishimura EK et al., Cell Stem Cell, 2010）。

## 3. 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な変化が見られるようになる。加齢に伴って見られるこれら老化形質は、寿命の長い組織幹細胞やニッチにおける加齢変化によって主にひきおこされている可能性ある。白髪は、最も典型的な老化形質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ひきお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メラニン色素を持って樹状の形態をとるようになる（形態的には通常の分化に酷似すること（図3）、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わかっている。さらに、加齢に伴って幹細胞が枯渇することによって老化形質を発現する例が実在することをはじめて明らかにしている（Nishimura EK. et al. Science 2005）。加齢に伴ってみられる脱毛において、毛包幹細

胞における何らかの変化が、脱毛に先立って見られるのかどうかについても解析を行っている。

#### 4. ゲノム損傷下における組織幹細胞の運命制御と組織老化のメカニズム

早老症の多くで、早発性の白毛症（若白髪）や脱毛が高頻度に見られる。近年、遺伝性の早老症の原因遺伝子が明らかにされ、そのほとんどがゲノム損傷応答や修復に関わる遺伝子の変異に基づくこと、これらの疾患患者でゲノム不安定性が認められることが明らかにされている。そこで、我々は、加齢に伴ってみられる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、白髪を誘発する程度のDNA損傷ストレスを受けた後には、色素幹細胞は、アポトーシスや細胞老化などといった一般的に重篤なゲノム損傷後の細胞運命として知られているようなものではなく、幹細胞そのものが未分化性を失い、ニッチ内でそのまま成熟分化してしま

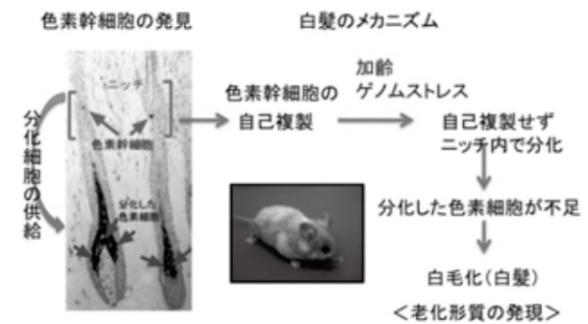


図3

う（異所性分化する）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（図3）。また、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）。毛包幹細胞においても特異的な変化が見られるのかどうか、色素幹細胞の維持不全において毛包幹細胞が果たす役割についても解析を行っている。

#### 5. 幹細胞システムにおける癌の発生機序の解明

癌は、加齢に伴ってその発生頻度が著しく増加する。幹細胞システムを形成する組織から、いかにして癌が発生するのか、その細胞の起源を知ることは、癌の発生機序を理解し応用する上でも重要である。組織幹細胞が癌の起始細胞としても重要視されているが、ヒトのがんのなかでも悪性黒色腫（メラノーマ）は、治療に最も苦渋する代表であり、放射線療法にも化学療法にも殆ど反応しない予後最悪の癌である。本来、色素幹細胞は、放射線に高感受性であるが、メラノーマになると放射線や化学療法に耐性である。発がんのどの段階から、どういった契機で色素幹細胞ががん幹細胞のもつ性質である放射線抵抗性を獲得しているのか、ヒトのメラノーマに酷似するモデルマウスを複数作製し研究を進めている。さらにマウスのfootpadの色素幹細胞は、毛包内の幹細胞と比較して放射線にも抵抗性に自己複製することから、掌蹠にメラノーマが生じやすい可能性について検討している。

#### 業績目録

##### 原著論文

1. Mohammad S, Matsumura H, Okubo-Suzuki R, Ohkawa N, Inokuchi K. Neuronal stimulation induces autophagy in hippocampal neurons that is involved in AMPA Receptor degradation after chemical long-term depression. J Neurosci. 32(30): 10413-10422. 2012
2. Mohri Y, Oyama K, Sone M, Akamatsu A, Nishimori K. LGR4 is required for the cell survival of the peripheral mesenchyme at the embryonic stages of nephrogenesis. Biosci Biotechnol Biochem. 76(5): 888-91. 2012

##### 国内学会招待講演

1. 西村栄美：ゲノム毒性と幹細胞制御：毛の老化の謎に迫る：第29回日本毒性病理学会総会：2013年2月1日（つくば）
2. 西村栄美：Hair Follicle aging and stem cell regulation：リエゾンラボ研究会：2013年1月23日（熊本大学発生医学研究所）
3. 西村栄美：幹細胞の維持制御とエイジング：なぜ白髪になるのか？：日本抗加齢医学会研修用講習会：2012年11月18日（東京）
4. 西村栄美：Hair Follicle Aging and stem cell regulation：The 34<sup>th</sup> Japan Society for Biomedical Gerontology Symposium & Micro-Nano Global COE：2012年10月16日（名古屋）
5. 西村栄美：17型コラーゲンと薄毛、白毛の関

- 係について：毛髪再生研究会：2012年9月21日（東京）
6. 西村栄美：毛の再生と老化：第3回 Molecular Cardiovascular Conference II：2012年9月8日（キロロ：北海道）
  7. 西村栄美：幹細胞制御と毛髪老化：第30回日本美容皮膚科学会総会：2012年8月18日（名古屋）
  8. 西村栄美：毛髪のエイジングと幹細胞制御：第8回加齢皮膚医学研究会：2012年7月8日（高知）
  9. 西村栄美：幹細胞制御と毛髪老化：第12回日本抗加齢医学会総会：2012年6月23日（横浜）
  10. 西村栄美：毛包のステムセルエイジングと老化：第111回日本皮膚科学会総会：2012年6月2日（京都）
  11. 西村栄美：毛包における幹細胞制御とエイジング：第116回日本眼科学会総会「シンポジウム2 幹細胞のサイエンス」：2012年4月5日（東京）

##### 国際学会招待講演

- Nishimura EK：Stem cell regulation by Stem cells in hair follicles：SID Annual Meeting; May 9-12, 2012, North Carolina, USA.

##### 学会発表

1. 西村栄美：毛包が老化するメカニズム：第35回日本分子生物学会年会：（福岡国際会議場・マリンメッセ福岡）2012年12月13日
2. 上野真紀子：色素幹細胞の活性化状態と維持

- 機構：第20回毛髪科学研究会：（久留米）2012年12月1日
3. 西村栄美：Identification of melanocyte stem cells in eccrine glands：第24回日本色素細胞学会学術大会：（長浜）2012年11月24日
  4. Aoto T, Okamoto N, Uhara H, Akutsu H, Umezawa A, Miyachi Y, Saida T, Nishimura EK. Identification of eccrine gland melanocyte stem cells in mouse acral skin as a potential source of acral melanoma：ISSCR 10th Annual Meeting：July 14, 2012, YOKOHAMA

##### 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」

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（継続） 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. 文部科学省研究費補助金・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：渡辺幸造  
特任助教：岸 祐介、松原直子、徐米多  
技術補佐員：久留主幸江 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。

## 研究紹介

### 1. 全身性エリテマトーデス (SLE) における病原性自己抗体産生制御機構の解明

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産生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、健常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をの制御機構は自己トレランスと呼ばれる。我々は、最近抗Sm抗体産生B細胞が、他の自己反応性B細胞とは異なる制御を受けていることを明らかにした。

抗DNA抗体などを産生する自己反応性B細胞は、B細胞が発生分化する骨髄内でおそらく自己抗原と反応することにより、自己トレランスが誘導されること示されてきた。最近我々は、シカゴ大学のWeigert教授らとの共同研究により、抗Sm抗体産生B細胞が骨髄内での自己トレランスを回避し、末梢リンパ組織に出現することを、明らかにした(Kishi et al. PNAS 2012)。もっとも、末梢リンパ組織に出現した抗Sm抗体産生B細胞は、速やかにアポトーシスをおこして死滅するために自己抗体は産生されない。しかし、CD40L(CD154)を過剰に発現させ、B細胞にCD40を介するシグナル伝達がおこると、抗Sm抗体産生B細胞のアポトーシスが阻害され、抗Sm抗体産生がおこる。一方、CD40L過剰は骨髄での自己トレランスの破綻はおこさない。このため抗Sm抗体産生が選択的におこることになる。つまり、末梢リンパ組織での自己トレランスは、骨髄での自己トレランスに比べて破綻をおこしやすく、このために抗Sm抗体の産生がおこるものと考えられる。今後は、抗Sm抗体産生B細胞が骨髄での自己トレランスを回避するメカニズムや、末梢リンパ組織でアポトーシスが制御されるメカニズムなど、SLEで抗Sm抗体産生がおこる詳細なメカニズムの解明を行なっていく予定である。

### 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、遺伝的要因の関与も考えられる。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。

また、SLE発症の遺伝的要因の解析を行い、自然発症

SLEモデルとして広く用いられているMRL/lprマウスにおける修飾遺伝子の同定に成功した(Xu et al. J. Immunology revised)。修飾遺伝子は、単独では疾患の発症を誘導できないが、何らかの疾患誘導遺伝子による疾患の発症効率や重症度、病像を左右する遺伝子で、がんや不整脈などで研究が進んでいるが、免疫疾患での修飾遺伝子の研究はあまり進んでいない。我々が同定した修飾遺伝子は、単独では疾患をおこさないが、MRL/lprマウスでの自己免疫疾患発症で重要な役割を果たす。詳細はハイライトを参照されたい。

### 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、

#### ハイライト

##### CD72<sup>a</sup>はSLE様自己免疫疾患の修飾遺伝子である

修飾遺伝子とは、疾患原因遺伝子以外の疾患に関わる遺伝子で、原因遺伝子による疾患の発症頻度、重症度や症状を左右する。このため、がんや不整脈などでは精力的に研究が行なわれているが、免疫疾患ではこれまであまり研究が進んでいない。

Fas(CD95)分子はTNF受容体ファミリーの分子で、免疫細胞を含む種々の細胞に発現し、リガンドに反応するとアポトーシスを誘導する。この分子の機能欠失型変異により、自己免疫疾患とリンパ節腫脹などを伴う自己免疫リンパ増殖症候群(ALPS)が発症する。この疾患の動物モデルとしてMRL/lprマウスが知られており、このマウスでもFas遺伝子の機能欠失型変異(lpr変異)があり、重度の全身性エリテマトーデス(SLE)様自己免疫疾患とリンパ節や脾臓といったリンパ組織の顕著な腫脹を伴う。しかし、lpr変異をMRL以外の純系マウスに導入してコンジェニックマウスを作成すると、マウスのバックグラウンドによって発症が左右される。すなわち、C57BL/6(B6)マ

表1. Fas<sup>pr</sup>変異による自己免疫疾患発症はマウス系統によって異なる

マウス系統	Fas <sup>+/+</sup>	Fas <sup>lpr/lpr</sup>
C3H	健常	健常
C57BL/6	健常	健常
AKR	健常	中等度自己免疫疾患
MRL	軽度の自己免疫疾患	重症自己免疫疾患

免疫制御化合物の開発をおこなっている。

CD22はシグレックファミリーの膜分子で、主にB細胞に発現し、抗原受容体シグナル伝達を抑制することによりB細胞の活性化を負に制御する。CD22は $\alpha$ 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は最も強くリン酸化される分子の1つである。このことから、CD22はB細胞の活性化の主要な抑制分子であると考えられる。我々は、岐阜大学応用生命科学部の本曾教授、石田教授らとの共同研究により、CD22に高親和性に結合する化合物の合成を行なっている。その結果、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。

ウスやC3Hマウスでは自己免疫疾患は発症しないが、AKRマウスでは中等度の自己免疫疾患を発症する。また、BALB/cマウスではアレルギー性炎症がおこる。これらの知見は、各純系マウスが持つ修飾遺伝子によってlpr変異による自己免疫疾患の発症や重症度、症状が修飾されることを示している。

CD72は主にBリンパ球(B細胞)に発現する抑制性の膜分子である。細胞外領域にはC型レクチン様ドメインが、細胞内には抑制性チロシンモチーフ(ITIM, immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif)がある。B細胞が抗原と反応して抗原受容体を介するシグナル伝達がおこると、CD72のITIMもリン酸化され、チロシンフォスファターゼSHP-1をリクルートすることで、抗原受容体を介するシグナル伝達を負に制御する。能勢らは、遺伝学的な解析によりCD72を含む領域がMRL/lprマウスでの自己免疫疾患の発症に関連することを示した。CD72にはCD72<sup>a</sup>、CD72<sup>b</sup>、CD72<sup>c</sup>のハプロタイプが知られている。CD72<sup>a</sup>は他のハプロタイプに比べて、細胞外領域に多数のアミノ酸置換を伴う変異があり、また、C型レクチン様ドメインには7アミノ酸の欠失がある。興味深いことにlpr変異により自己免疫疾患をきたす、MRLおよびAKRではともにCD72<sup>c</sup>を持つ。

我々は、まずCD72<sup>a</sup>が他のCD72ハプロタイプに比べて機能的に劣ることを明らかにした。B細胞株にCD72<sup>a</sup>またはCD72<sup>b</sup>の発現ベクターを導入して、これらの分子を発現すると、CD72<sup>a</sup>は抗原受容体を介するシグナル伝達を強く抑制したが、CD72<sup>c</sup>はごく弱くしか抑制しなかった。CD72<sup>a</sup>はCD72<sup>b</sup>と高い相同性

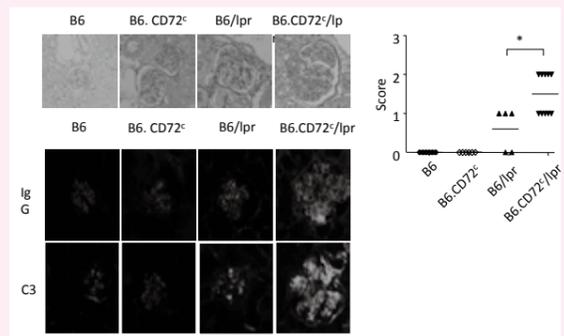
を示すことから、CD72<sup>c</sup>はCD72<sup>a</sup>やCD72<sup>b</sup>に比べて機能的に障害されたハプロタイプであることが示された。

次いで、マウスの交配を繰り返し B6 マウスに MRL マウスの CD72<sup>c</sup> を含む染色体領域を導入した B6.CD72<sup>c</sup> コンジェニックマウスを作成した。B6.CD72<sup>c</sup> マウスはまったく自己免疫症状を示さなかったが、B6.CD72<sup>c</sup>/lpr マウスは中等度の自己免疫疾患を発症した。同じように CD72<sup>b</sup> を発現する MRL コンジェニックマウスを作成したところ、MRL/lpr マウスにくらべ MRL.CD72<sup>b</sup>/lpr マウスでは自己免疫疾患の重症度が減弱していた。これらの知見から、CD72<sup>c</sup> はそれ自身では自己免疫疾患を誘導しないが、lpr 変異による自己免疫疾患の発症を制御する修飾遺伝子であることが明らかとなった。

さらに、B6 マウスバックグラウンドの CD72 欠損マウスを作成したところ、B6.CD72<sup>c</sup> マウスとは異なり、CD72 欠損単独で中等度の自己免疫疾患の発症を誘導した。この結果は、CD72 が自己免疫疾患の発症を阻害する重要な分子であることを示している。さら

に、CD72<sup>c</sup> はその機能のある程度保持するために単独では自己免疫疾患発症を誘導できないが、lpr 変異の存在下で自己免疫疾患の発症を誘導する修飾遺伝子として機能することが明らかとなった。

ALPS でもその症状や発症頻度は家系によって異なることが知られており、修飾遺伝子の寄与が想定される。CD72 はヒトでも多型があることが知られており、ALPS における修飾遺伝子としても機能することが示唆される。



図：lpr 変異と CD72<sup>c</sup> が共同してループス腎炎を誘導する。12 ヶ月令のマウスの腎臓の PAS 染色および免疫蛍光染色を示す。蛍光染色では IgG および補体を染色し、免疫複合体の沈着を検出している。

## 人事異動

転入：久留主幸江（技術補佐員）、江崎澄代（修士課程）、焦旭阳（修士課程）、Aslam Mohammad（大学院研究生）

転出：垣内麻優（技術補佐員）、水原悠介（卒業研究生）、石倉圭人（博士前期課程）、岸祐介（特任助教）、渡辺幸造（助教）、高嶋航（博士前期課程）、砂永翠（博士前期課程）

## 業績目録

### 原著論文

- Klionsky, D.J., Abdalla, F. C. Tsubata, T. et al. (2012): Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 8: 1-100.
- Kishi, Y., Higuchi, T., Phoon, S., Kamiya, K., Riemekasten, G., Akiyoshi, K., Weigert, M. and Tsubata, T. (2012): Apoptotic marginal zone deletion of anti-Sm/ribonucleoprotein B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 7811-7816.
- Tsubata, T. (2012): Role of inhibitory BCR co-receptors in immunity. *Infect Disord Drug Targets* 12:181-190.
- Maeno, E., Tsubata, T. and Okada, Y. (2012) : Apoptotic volume decrease (AVD) is independent of mitochondrial dysfunction and initiator caspase activation. *Cells* 1: 1156-1167.
- Hitomi, Y., Adachi, T., Tsuchiya, N., Honda, Z.-I., Tokunaga, K and Tsubata, T. (2012): Human CD72 splicing isoform responsible for resistance to systemic lupus erythematosus regulates serum immunoglobulin level and is localized in endoplasmic reticulum. *BMC Immunol.* 13: 72.
- Shimoda, M., Bolduc, A., Takezaki, M., Amtani, Y., Huang, L., Nutt S. L., Kamanaka, M., Flavell, R. A., Mellor A. L, Tsubata, T., Koni, P. (2013): Constitutively CD40-activated B cells regulate CD8 T cell inflammatory response by IL-10 induction. *J. Immunol.* (190) : 3189-3196).
- Adachi T, Harumiya S, Takematsu H, Kozutsumi Y, Wabl M, Fujimoto M, Tedder TF. (2012): CD22 serves as a receptor for soluble IgM. *Eur J Immunol.* 2012 42:241-7.
- Xu, M., Hou, R., Sato-Hayashizaki, A., Man, R., Zhu, C., Wakabayashi, C., Hirose, S., Adachi, T. and Tsubata, T. (2013): *CD72<sup>c</sup>* is a modifier gene

that regulates *Fas<sup>br</sup>*-induced autoimmune disease. *J. Immunol.* (in press)

### 国際学会

#### 招待講演

- Tsubata, T.: CD72<sup>c</sup>, a haplotype encoding the SHP-1-binding B lymphocyte molecule, is a modifier gene for murine lupus, the 10<sup>th</sup> International Conference on Protein Phosphatase, Feb 7-9, 2013, Tokyo

#### 一般演題

- Suganuma, Y., Matsubara, N., Iwayama, Y., Ueki, A., Imamura, A., Ando, H., Tsubata, T., Ishida, H. and Kiso, M.: Synthesis and biological evaluation of the mimics of cis ligand for CD22. The 4th Asian Communication for Glycobiology and Glycotechnology (ACGG), Oct 28-31, 2012, Jeju, Korea

### 国内学会

#### 招待講演

- 鐺田武志「シグレックと感染免疫」第5回感染病態研究フロンティア、平成24年8月4日、東京
- 鐺田武志「全身性自己免疫疾患と自己トレランス」第四回全国共同利用・共同研究「酵素学研究拠点」シンポジウム、平成24年10月2日、東京
- 鐺田武志「C型レクチン様分子CD72による硫酸糖鎖への免疫応答の制御」第85回日本生化学会大会 平成24年12月14日-16日、福岡
- 鐺田武志「自己抗体産生とアイソタイプ」第20回自己抗体と自己免疫シンポジウム、平成25年2月2日、東京

#### 一般演題

- Tang, M., Takata, T., Tsubata, T.: Time, place and pathway-specific involvement of reactive oxygen species in B cell antigen receptor signaling. 日本免疫学会学術総会、平成24年12月5日-7日、神戸
- Kishi, Y., Phoon, S., Tsubata, T.: Excess CD40L specifically perturbs self-tolerance of anti-Sm antibody recognizing the same components as patient-derived antibodies. 日本免疫学

会学術総会、平成24年12月5日-7日、神戸

- 安達 貴弘「腸管免疫細胞の活性化モニターリングマウスの樹立」日本食品免疫学会第8回学術大会、平成24年10月16日-17日、東京
- Adachi, T., Yoshikawa, S., Karasuyama, H.: In vivo imaging of B cell activity in a genetically encoded calcium indicator YC3.60 reporter mouse line. 日本免疫学会学術集会、平成24年12月5日-7日、神戸

### 受賞

- 岸祐介 難治疾患研究所研究発表会 若手研究者部門 第3位：Apoptotic marginal zone deletion of anti-Sm/RNP B cells.
- 安達貴弘 日本食品免疫学会平成24年度ポスター賞  
「腸管免疫細胞の活性化モニターリングマウスの樹立」日本食品免疫学会第8回学術大会、平成24年10月16日-17日、東京

### 主催セミナー

- Wilfred TV Germeraad(Maastricht University Medical Center, Maastricht, The Netherlands): Human dendritic cells for translational research and immunotherapy, May 28, 2012.

### 競争的研究費取得

- 鐺田武志：独立行政法人日本学術振興会 日中医学交流事業共同研究「Bリンパ球による免疫抑制機能を標的として自己免疫疾患治療薬の開発」
- 鐺田武志：独立行政法人日本学術振興会 平成24年度科学研究費補助金基盤研究 (B)「Bリンパ球レクチンの糖鎖認識と機能」
- 鐺田武志：文部科学省 平成24年度科学研究費補助金 (新学術領域研究)「Bリンパ球における受容体エンドサイトーシスとエンドソームシグナリングの統合的理解」
- 渡辺幸造：独立行政法人日本学術振興会 平成24年度科学研究費補助金 若手研究 B「B細胞膜型分子 CD72 を介した自己免疫制御機構の解明」
- 安達貴広：独立行政法人日本学術振興会 平成24年度科学研究費補助金 基盤研究 C「記憶 B細胞の迅速で強い抗体産生機構の解明」
- 岸祐介：独立行政法人日本学術振興会 平成24年度科学研究費補助金 若手研究 B「RNA 関連自己抗原への B細胞トレランス機構とその破綻についての研究」

# 難治病態研究部門 分子病態分野

教授：木村彰方 准教授：有村卓朗  
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。疾患の発症がほぼ遺伝的要因のみで規定されるものが単因子病（いわゆる遺伝病）であるが、より一般的な疾患においても環境要因と遺伝的要因の両者が関与することから、このような疾患を多因子病と呼ぶ。分子病態分野では、単因子病、多因子病を問わず、病因が不明ないし病因は判明しても病態形成機構が解明されていないために有効な診断、治療、予防法が確立されていない疾患、すなわち難病に焦点をあて、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。さらに、このような知見に立脚して、難病の新たな診断法や治療法の開発にも取り組んでいる。現時点での主な対象疾患は、特発性心筋症、心筋梗塞、不整脈、パージャ病、などの心血管系疾患と、HIV/AIDS、自己免疫疾患などを含むウイルス・免疫系疾患である。

## 研究紹介

### 1. 特発性心筋症の病因究明

我々を含む国内外の研究者らにより心筋症の原因遺伝子とその変異による機能異常が解明されている。肥大型心筋症では25種、拡張型心筋症では30種を超える原因遺伝子が報告されているが、既知の原因遺伝子に変異が見出される症例は、家族性肥大型心筋症で約60%、家族性拡張型心筋症で約20%である。我々は、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が、ミオパラジン変異が肥大型心筋症、拡張型心筋症、拘束型心筋症の病因となること、CARPとの結合異常を来すことを見出した（ハイライト参照）。また、拘束型心筋症に見出された変異(Q529X)はサルコメア整合性を障害することを明らかにした。さらに、肥大型心筋症および拡張型心筋症に見出された変異(Y20C)を高発現するトランスジェニックマウスを作製したところ、肥大型心筋症病態を呈した(Purevjav, Arimura, et al. Hum Mol Genet, 21:2039,2012)。これとは別に、わが国における肥大型心筋

症患者のサルコメア変異分布を解明した(Ohtsuka, et al, Circ J 76:453,2012)。また、MYBPC3遺伝子重複変異を有する拡張相肥大型心筋症症例の特徴的な臨床経過を報告した(Sato, et al., Intern Med, 51:2559,2012)。

### 2. 冠状動脈硬化症関連遺伝子群の検索

多因子病の代表として冠状動脈硬化症（心筋梗塞等）を取り上げ、患者集団と一般集団における網羅的ゲノム解析からMKL1遺伝子が冠状動脈硬化症への感受性と関連することを明らかにしたため、MKL1高発現マウスを作製し、機能変化を検討している。また、U937細胞をPMA処理することでマクロファージ系に誘導する実験系を用いて、MKL1がM1型マクロファージよりM2型マクロファージへの分化を促すことを見出した。一方、MKL1ノックアウトマウスは血管内皮障害後の内腔狭窄が軽度であること、すなわちMKL1は内皮障害後の血管リモデリング促進因子であることを解明した(Minami T, et al. EMBO J, 31:4428,2012)。一方、多施設国際共同研究によって、9p21多型は冠動脈硬化症の進展に関わるが、心筋梗塞の発症因子ではないことを解明した(Chan et al., J Am Col Cardiol. In Press)。

### 3. 難治性不整脈の病因究明

難治性不整脈の病因と病態解明に関連する共同研究として、QT延長症候群、特発性心室細動、Brugada症候群、カテコラミン誘導性心室頻拍などについて、候補遺伝子アプローチによる新規不整脈原因遺伝子の探索を実施している。本年度の成果として特筆すべきは、SLMAP変異がNav1.5チャ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世界で初めて見出したことにある(Ishikawa, et al. Circ Arrhythm Electrophysiol, 5:1098,2012)（ハイライト参照）。また、心室性不整脈を伴う拡張型心筋症の原因となるZASP変異がNav1.5の機能障害を来すこと(Xi, et al. Circ Arrhythm Electrophysiol, 5:1017,2012)、SCN3B変異がNav1.5の細胞内輸送を傷害してBrugada症候群を来すこと(Ishikawa, et al. Circ J, In press)、特発性心室細動の原因となるSCN5A変異が心筋細胞の早期再分極をもたらすことを明らかにした(Watanabe

et al., Int J Cardiol, 159:238,2012)。

### 4. HLA領域の解析

HLA領域には自己免疫疾患発症を規定する遺伝子群が存在する。昨年までに引き続き、HLA領域内の自己免疫関連遺伝子であるNFKBIL1について、その機能解析を行った。一方、カニクイザル家系試料を用いてMHCクラスI領域の特徴的なハプロタイプ構成を明らかにした(Saito et al., Immunogenetics, 64:131,2012)。

### 5. サルMHCの構造解析

エイズ(HIV)ワクチン開発では、サルエイズウイルス(SIV)を用いたアカゲザルが動物モデルとして用いられ、ワクチン免疫応答に個体差のあることが知られている。この個体差を制御する因子を解明する目的で、ヒトと比較しつつアカゲザルMHC領域、KIR領域、NKG2領域、RAET1/ULBP領域の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(Ishii, et al., J Virol, 86:738,2012; Nomura, et al., J Virol, 86:6481,2012; Takahashi, et al. PLoS ONE, In Press)。

### 6. 疾患関連遺伝子の成立における遺伝的選択圧

ヒトゲノムの多様性には人種差や民族差があり、これはヒトの進化や移住適応とも関連していると推定され

る。ヒトIgSF遺伝子群をリファレンスとし、チンパンジー、オランウータン、アカゲザル、マーモセットのオルソログ遺伝子群との配列比較による進化的検討を行い、TIM1遺伝子が強い選択圧を受けたこと、旧世界ザルでは著しい多型を示すが、この多型がSIVワクチン後の中和抗体産生と関連することを見出した。さらに、TIM1は新世界ザルでは複数の系統で独立して偽遺伝子化していることを解明した(Ohtani, et al., Immunogenetics, 64:669,2012)。これとは別に、旧世界ザルのTLR2遺伝子に選択圧が関わったことを見出した(Takaki, et al. Immunogenetics, 64:15,2012)。

### 7. エイズ感受性・抵抗性関連遺伝子の探索

HIVに暴露しても感染するかどうかには個人差があることが知られている。また、HIV感染後の経過やAIDS発症までの期間にも大きな個人差が存在する。このようなHIV/AIDSへの感受性・抵抗性にはヒトゲノム多様性が関わっているが、そのような宿主因子については不明な点が残されている。我々は進化医学的手法によってHIV感受性遺伝子を特定する試みを行い、霊長類において強い進化選択圧を受けたTIM1遺伝子の特定のハプロタイプがHIV感染後のCD4数と関連すること(Sharma, et al., Hum Immunol, 74:163,2013)、TRIM5a多型がHIV感染制御に関わること(Nakayama, et al. AIDS Res Hum Retroviruses, In Press)を解明した。

## ハイライト（顕著な業績）

1) 特発性心筋症の新規原因遺伝子の発見：MYPN変異(Purevjav E, Arimura T, et al. Hum Mol Genet. 2012; 21(9): 2039-2053.)

特発性心筋症は原因不明の心筋細胞機能異常による心疾患と定義されるが、臨床的には心肥大と拡張障害を来す肥大型心筋症(HCM)や心拡大と収縮障害を来す拡張型心筋症(DCM)が主な臨床型である。いずれの病型的心筋症とも家族内発症が知られており、多発家系の多くで常染色体性優性遺伝形式に従う遺伝性を示すことから、1980年代後半から我々を含めた国内外の研究者らによって連鎖解析や候補遺伝子解析が進められ、すでにHCMで25種類、DCMで30種類以上の原因遺伝子が報告されている。しかしながら、病因となる遺伝子変異が見出されるのは家族性HCMで約60%、家族性DCMで約20%に過ぎず、さらに未知の原因遺伝子が存在するものと考えられる。

我々は、米国 Cincinnati 小児病院 Towbin 教授らとの国際共同研究で既知の原因遺伝子に変異が見出さ

れない特発性心筋症(HCMおよびDCM)患者集団について、ミオパラジン遺伝子(MYPN)変異を検索し、多数の病因変異を同定した(図1)。

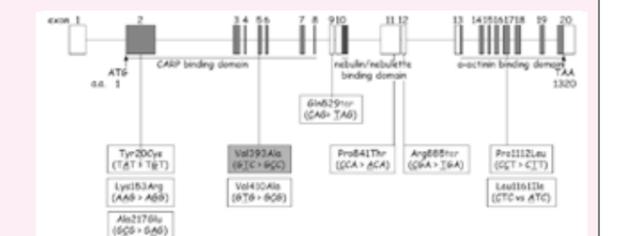


図1 特発性心筋症患者集団に見出されたMYPN変異

特記すべきことは、Y20C変異がHCMおよびDCMに見出され、Q529X変異がHCM様病態とDCM様病態を呈する拘束型心筋症の同胞例に見出されたことである。すなわち、同じ変異が異なる心筋症病態の原因となることを示した。

病因変異の機能解析として、Q529X-MYPNをラット胎児心筋初代培養細胞に導入したところ、サルコメアが形成されなかった(図2)。一方、Y20C-MYPNではこのような変化は認めなかった。このことは、

Q529X 変異がサルコメア整合性異常をもたらすことを示す。

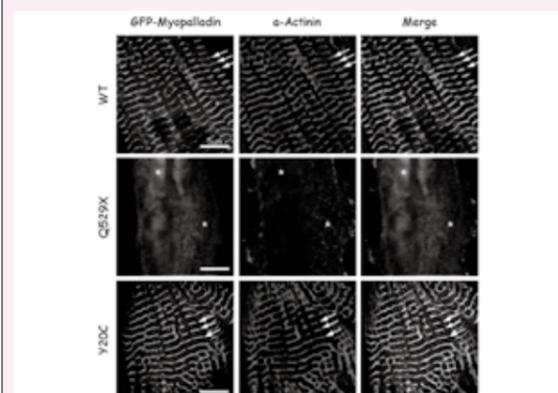


図2 Q529-MYPNによるサルコメア整合性障害

ついで、MYPNとCARPが結合することが知られていることから、Q529X以外の変異について、CARPとの結合性を検討したところ、HCM関連変異はいずれもCARP結合性が増強したが、DCMにも見出されるY20CではCARP結合性が減弱したことから、これらは疾患特異的な機能変化と考えられた(図3)。

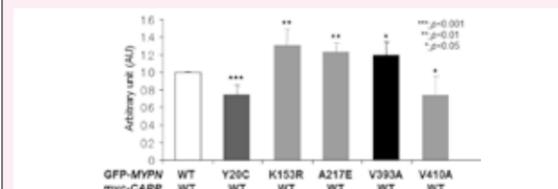


図3 MYPN変異によるCARP結合性変化

さらに、Y20C変異による病態形成をin vivoで検討するためにトランスジェニックマウス(Tg)を作製したところ、WT-MYPN-Tgには心機能異常を認めなかったが、Y20C-MYPN-Tgは心肥大および心筋サルコメアの断裂などのHCM様病態を呈した(図4)。

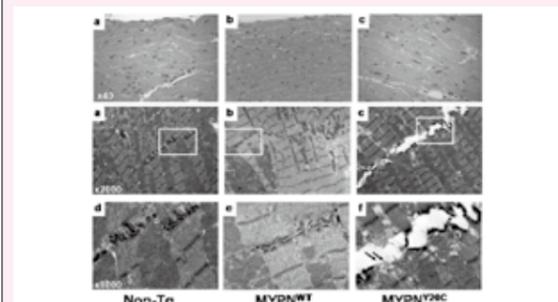


図4 Y20C-MYPN-TgはHCM病態を呈する

以上より、MYPN変異は多様な機能異常をもたらすことで心筋症病態をもたらすと結論した。

2) Brugada症候群の新規原因遺伝子の発見: SLMAP変異 (Ishikawa T, et al. Circ Arrhythm Electrophysiol. 2012; 5(6): 1098-1107)

我々を含む国内外の研究者により Brugada 症候群

の原因遺伝子がこれまでに12種同定されているが、変異が同定できるのは患者の約20%に過ぎないため、未知の原因遺伝子が存在すると考えられている。そこで我々は、米国 Mayo クリニック、伊国パビア大学、韓国サムスン医学センターとの国際共同研究で、既知の原因遺伝子に変異がない Brugada 症候群患者について、T管や小胞体に発現する機能不明な SLMAP 遺伝子の変異を検索した。その結果、疾患関連変異を複数発見した(図5)。

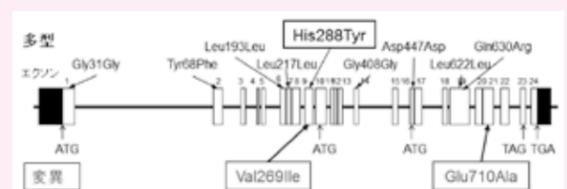


図5 Brugada 症候群患者に見出された SLMAP 変異

ついで、2種類の病因変異(V269I, E710A)および遺伝的多型(H288Y)による機能変化を検討したところ、病因変異特異的に心筋NaチャンネルであるNav1.5の細胞表面の発現性を阻害することが判明した(図6)。この発現性低下は SLMAP 特異的の siRNA で解除されることから、SLMAP 変異特異的に Nav1.5 の細胞内輸送障害をもたらされることを示す。

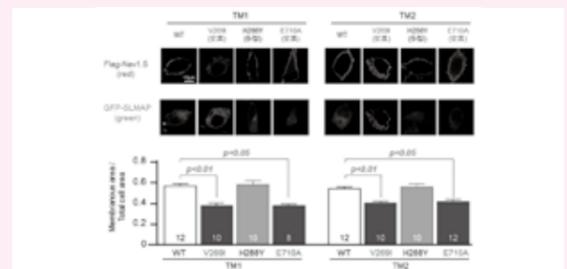


図6 SLMAPはNav1.5の細胞内輸送を障害する

さらに、電気生理学的解析から、SLMAP 変異は Nav1.5 の活性を低下させるが、電気的特性には大きな影響を与えないことが判明した(図7)。

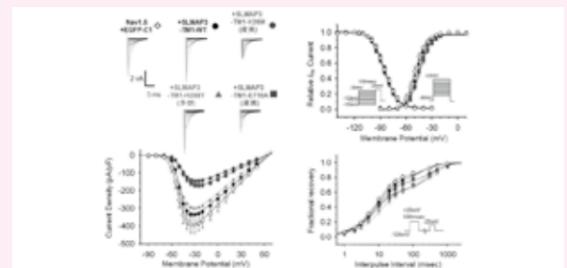


図7 SLMAP 変異は Nav1.5 活性を低下する

以上のことから、SLMAP 変異が Nav1.5 の機能低下を介して Brugada 症候群の原因となることに加えて、SLMAP が細胞表面分子の細胞内輸送に関わることを明らかにした。

## 人事異動

転出: 2012年3月に中島敏晶が退職した。また、中本健之が退学した。転入: 2011年5月に有村卓朗が准教授に昇任した。2012年10月より櫻井大祐が助教に就任した。

## 業績目録

### 原著論文

- Ishii H, Kawada M, Tsukamoto T, Yamamoto H, Matsuoka S, Shiino T, Takeda A, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Naruse TK, Kimura A, Takiguchi M, \*Matano T. Impact of vaccination on cytotoxic T lymphocyte immunodeficiency virus replication in rhesus macaques. J Virol. 2012; 86(2): 738-745.
- Takaki A, Yamazaki A, Maekawa T, Shibata H, Hirayama K, Kimura A, Hirai H, Yasunami M. Positive selection of Toll-like receptor 2 polymorphisms in two closely related old world monkey species, rhesus and Japanese macaques. Immunogenetics. 2012; 64(1): 15-29.
- Saito Y, Naruse TK, Akari H, Matano T, Kimura A. Diversity of MHC class I haplotypes in cynomolgus macaques. Immunogenetics. 2012; 64(2): 131-141.
- Otsuka H, Arimura T, Abe T, Kawai H, Aizawa Y, Kubo T, Kitaoka H, Nakamura H, Nakamura K, Okamoto H, Ichida F, Ayusawa M, Nunoda S, Isobe M, Matsuzaki M, Doi YL, Fukuda K, Sasaoka T, Izumi T, Ashizawa N, Kimura A. Prevalence and distribution of sarcomeric gene mutations in Japanese patients with familial hypertrophic cardiomyopathy. Circ J. 2012; 76(2): 453-461.
- Purevjav E, Arimura T, Augustin S, Huby A-C, Takagi K, Nunoda S, Kearney DL, Taylor MD, Terasaki F, Bos JM, Ommen SR, Shibata H, Takahashi M, Itoh-Satoh M, McKenna W, Murphy RT, Labeit S, Yamanaka Y, Machida N, Park JE, Alexander PMA, Weintraub RG, Kitaura Y, Ackerman MJ, Kimura A, Towbin JA. Molecular basis for clinical heterogeneity in inherited cardiomyopathies due to myopalladin mutations. Hum Mol Genet. 2012; 21(9): 2039-2053.
- Watanabe H, Nogami A, Ohkubo K, Kawata H, Hayashi Y, Ishikawa T, Nagao S, Yagihara N, Takehara N, Kawamura Y, Sato A, Okamura K, Sato M, Hosaka Y, Fukae S, Chinushi M, Oda H, Okabe H, Kimura A, Maemura K, Watanabe I, Kamakura S, Aizawa Y, Shimizu W, Makita N. Similarities and differences in genetic and clinical characteristics between early repolarization syndrome and Brugada syndrome. Circ Arrhythm Electrophysiol. 2012; 5(2): e60-e61.
- Nomura T, Terahara K, Yamamoto H, Shiino T, Takahashi N, Nakane T, Iwamoto N, Ishii H, Tsukamoto T, Kawada M, Matsuoka S, Takeda A, Terahara K, Tsunetsugu-Yokota Y, Iwata-Yoshikawa N, Hasegawa H, Sata T, Naruse TK, Kimura A, Matano T. Association of major histocompatibility complex class I haplotypes with disease progression after simian immunodeficiency virus challenge in Burmese rhesus macaques. J Virol. 2012; 86(12): 6481-6490.
- Ohtani H, Naruse TK, Iwasaki Y, Ishida T, Akari H, Matano T, \*Kimura A. Lineage-specific evolution of T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 gene in the primates. Immunogenetics. 2012; 64(9): 669-678.
- Watanabe H, Nogami A, Ohkubo K, Kawata H, Hayashi Y, Ishikawa T, Makiyama T, Nagao

- Yagihara N, Takehara N, Kawamura Y, Sato A, Okamura K, Hosaka Y, Sato M, Fukae S, Chinushi M, Oda H, Okabe M, Kimura A, Maemura K, Watanabe I, Kamakura S, Horie M, Aizawa Y, Shimizu W, Makita N. Clinical characteristics and risk of arrhythmia recurrences in patients with idiopathic ventricular fibrillation associated with early repolarization. Int J Cardiol. 2012; 159(3): 238-240.
- Xi Y, Ai T, De Lange E, Li Z, Wu G, Brunelli L, Kyle WB, Cheng J, Ackerman MJ, Kimura A, Weiss JN, Qu Z, Kim JJ, Faulkner G, Vatta M. Loss-of-function of hNav1.5 by ZASP1-D117N associated with intraventricular conduction disturbances in left ventricular noncompaction. Circ Arrhythm Electrophysiol. 2012; 5(5): 1017-1026.
- Sato A, Sakamoto N, Ando K, Kaneshiro T, Uekita H, Sugimoto K, Yamaki T, Kunii H, Nakazato K, Suzuki H, Saitoh S, Sato M, Tamagawa K, Arimura T, Kimura A, Takeishi Y. Dilated phase of hypertrophic cardiomyopathy caused by two different sarcomere mutations, treated with surgical left ventricular reconstruction and cardiac resynchronization therapy with a defibrillator. Intern Med. 2012; 51(18): 2559-2564.
- Ishikawa T, Sato A, Marcou CA, Tester DJ, Ackerman MJ, Crotti L, Schwartz PJ, On YK, Park JE, Nakamura K, Hiraoka M, Nakazawa K, Sakurada H, Arimura T, Makita N, Kimura A. A novel disease gene for Brugada syndrome: sarcolemmal membrane-associated protein gene mutations impair intracellular trafficking of hNav1.5. Circ Arrhythm Electrophysiol. 2012; 5(6): 1098-1107.
- Minami T, Kuwahara K, Nakagawa Y, Takaoka M, Kinoshita H, Nakao K, Kuwabara Y, Yamada Y, Yamada C, Shibata J, Usami S, Yasuno S, Nishikimi T, Ueshima K, Sata M, Nakano H, Seno T, Kawahito Y, Sobue K, Kimura A, Nagai R, Nakao K. Reciprocal expression of MRTFA and myocardin is crucial for pathological vascular remodeling in mice. EMBO J. 2012; 31(23):4428-4440.
- 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. In Press.
- 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. In Press.
- 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, In Press 2013; 8(1): e54300.
- Chan K, Patel RS, Newcombe P, Nelsone CP, Qasim A, Epstein SE, Burnett S, Vaccarino V, Zafari AM, Shah SH, Anderson JL, Carlquist JF, Hartiala J, Allayee H, Hinohara K, Lee BS, Erl A, Ellis KL, Goel A, Schaefer AS, Eddine N, Mokhtari NEE, Goldstein BA, Hlatky MA, Go AS, Shen GQ, Gong Y, Pepine C, Laxton RC, Wittaker JC, Tang WHW, Johnson JA, Wang QK, Assimes TL, Nöthlings U, Farrall M, Watkins H, Richards MA, Cameron VA, Muendlein A, Drexel H, Koch W, Park JE, Kimura A, Shen WF, Simpson IA, Hazen SL,

- Horne BD, Hauser ER, Quyyumi AA, Reilly MP, Samani NJ, Ye S. Association between the chromosome 9p21 locus and angiographic coronary artery disease burden - a collaborative meta-analysis. J Am Col Cardiol. In Press.
- 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. In Press.

### 国内学会発表

- 木村彰方, 大谷仁志, 成瀬妙子, Gaurav Sharma, Gurvinder Kaur, Narinder K Mehra, 明里宏文, 石田貴文, 俣野哲朗. 霊長類におけるTIM1遺伝子進化とHIV/AIDS. 第21回日本組織適合性学会. 2012年9月. 東京. 他12件

### 国際学会発表

- Akinori Kimura. Cardiomyopathy as a disease of abnormalities in sensing for stretch and metabolic stress in cardiac sarcomere. 4th Sensing Biology Symposium. Tokyo. Jan. 30, 2012. 他5件

### 学内外教育活動

木村彰方: 本学医学部(生体防御学)、本学医学部保健衛生学科(遺伝学)、本学歯学部歯学科(遺伝病)、本学歯学部総合研究科修士(遺伝疾患)、埼玉医科大学医学部(遺伝学)、有村卓朗: 本学保健衛生学科(遺伝学)

### 競争的研究経費取得

- 木村彰方(代表): 東京医科歯科大学フォローアップ経費, 日韓共同研究事業継続経費
- 木村彰方(代表): 科学研究費補助金・基盤研究(B), 心筋症の分子病態解明に立脚した心不全治療戦略の開発
- 木村彰方(代表): 科学研究費補助金・新学術領域研究, 難治性心疾患の病態解明における性差構築の分子機序
- 木村彰方(代表): 科学研究費補助金・挑戦的萌芽研究, タンパク輸送に着目した心筋疾患治療戦略の開発
- 木村彰方(分担): 厚生労働科学研究費・創薬基盤推進研究事業, 宿主ゲノム多様性に対応する抗原発現ベクターを用いた治療エイズワクチン開発
- 木村彰方(分担): 厚生労働科学研究費・創薬基盤推進研究事業, APOBEC3分子のタンパク質レベルの機能的多型を基礎としたHIV-1複製抑制機構の分子基盤の解明
- 木村彰方(研究協力): 厚生労働科学研究費・難治性疾患克服研究事業, 特発性心筋症に関する調査研究
- 有村卓朗(代表): AFM (Association Française contre les Myopathies) Research Grant, Molecular pathogenic analysis of the striated muscle laminopathies.
- 有村卓朗(代表): 科学研究費補助金・若手研究(B), 体系的遺伝子変異解析に立脚した心不全病態の包括的解明
- 有村卓朗(分担): 科学研究費補助金・若手研究(B), 心臓拡張機能制御の解明および生体内拡張機能可視化の確立
- 成瀬妙子(代表): 科学研究費補助金・基盤研究(C), 自己免疫疾患の発症要因としてのNKレセプターリガンド群の発現抑制機構

# 難治病態研究部門 フロンティア研究室 ウイルス治療学

准教授：清水則夫  
技術補佐員：渡邊 健、片山未来、望月 菊、太田麻利子、高橋秀行  
事務補佐員：大塚幸子、齋藤園子

## 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、渡邊
- B. 再生医療に関する研究  
清水、片山、高橋
- C. 網羅的ウイルス検査系の開発と応用  
清水、渡邊、望月、太田

## 研究の概要

### A. EBV 感染症モデルマウスの開発と応用

ヒト造血幹細胞移植NOG (NOD/SCID/ $\gamma_c^{null}$ ) マウスの効率用作成法を確立した(ヒト化マウス)。ヒト化マウスにEBVを感染すると、関節に慢性関節リウマチ特有の症状が出現することから、EBVが当該疾患の発症に関与していることが示唆された(日本大学医学部、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

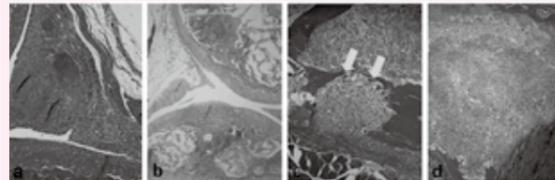
本学医学部運動器外科が行っている滑膜細胞を利用した軟骨再生・半月板再生医療の臨床研究を実施する際に必要な書類作成、幹細胞の分離・培養とウイルス・マイコプラズマ検査を支援し、安全な臨床研究の実施に協力している。

### 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・プローブによる検証・メルティング解析法を組み合わせた独自のシステムを開発・実用化した。本学医学部附属病院に本検査系を公開し、年間1593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

EBV感染ヒト化マウスの膝関節を病理組織学的に解析を行ったところ、慢性関節リウマチに特徴的な病変が生じていることが確認された。



図の説明：EBV感染ヒト化マウス膝関節の病理学的解析。a：EBV(+)滑膜の増殖 b：EBV(-) c：EBV(+) pannus様病変 d：EBV(+)関節周囲骨髄の浮腫

## 業績目録

### 原著論文

1. Ramakrishnan R, et al. Epstein-Barr virus BART9 miRNA modulates LMP1 levels and affects growth rate of nasal NK T cell lymphomas. *PLoS One*. 2011:e27271.
2. Ogawa M, et al. Broad-range real-time PCR assay for detection of bacterial DNA in ocular samples from infectious endophthalmitis. *Jpn J Ophthalmol*. 56(6):529-535, 2012.
3. Sugita S, et al. Virological analysis in patients with human herpes virus 6-associated ocular inflammatory disorders. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 12:53(8):4692-8, 2012.
4. Ogawa M, et al. Novel diagnosis of fungal endophthalmitis by broad-range real-time PCR detection of fungal 28S ribosomal DNA. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 250(12):1877-1883, 2012.
5. Sugita S, et al. Detection of Candida & Aspergillus species DNA using broad-range real-time PCR for fungal endophthalmitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 250:391-398, 2012.

### 国内学会

1. 吉山裕規 他3名 EBV 遺伝子BNLF2aとBNLF2bは溶解感染初期と潜伏期に発現し、腫

- 瘍化に関与する 第60回日本ウイルス学会 2012年11月(大阪)
2. 松田剛 他15名 ヒト化マウスを用いたEBウイルス関連リンパ増殖性疾患に対する免疫細胞治療のモデル実験 第60回日本ウイルス学会 2012年11月(大阪)
  3. 清水則夫 網羅的ウイルス検査法の開発と臨床ウイルス学的検査への応用 第30回日本染色体遺伝子検査学会学術集会 2012年11月(東京)
  4. 清水則夫 移植医療・細胞治療におけるウイルス検査系の開発輸血学会関東甲信越支部会 2012年9月(東京)
  5. 今留謙一 他4名 細胞表面抗原マーカー解析によるEBV特異的CTL誘導の検討 第27回ヘルペスウイルス研究会 2012年6月(名古屋)
  6. 小川学 4名 真菌28S rRNA領域定量PCRの真菌性眼内炎診断における有効性の検討 第116回日本眼科学会総会 2012年4月(東京)
  7. 今留謙一 他10名 EBウイルス関連血球貧血症候群モデルマウスの作成と解析、第21回EBウイルス感染症研究会 2012年3月(東京)
  8. 今留謙一 他8名 EBV関連血球貪食リンパ組織球症モデルマウスの作製と病態発現解析 第21回EBウイルス感染症研究会 2012年3月(東京)

### 競争的資金

1. 厚生労働科学研究費補助金 政策創業総合研究事業 創業総合研究(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」

### 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癌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. 乳がん原因遺伝子 BRCA2 に結合する新規分子の探索による 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. DNA 損傷における細胞内シグナル伝達機構と細胞死誘導メカニズムについて、いくつかのキナーゼに焦点を当て機能解析を進め、p53、NF-kappaB に関わる新規シグナル制御機構を同定した。

### 【分子疫学】

1. 動脈硬化症重症例から、炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  のプロモーターに存在するレアバリエント (rare variant)-856G/A を発見し、機能解析を行った結果、変異アレルにおいて転写因子 C/EBP が結合して転写活性に促進的に働く事を見出した。
2. TNF- $\alpha$  プロモーター領域のメチル化状態を PCR およびメチル化感受性制限酵素 AciI を用いて定量的に検出するシステムを確立し、種々の遺伝子型のヒトの種々の組織で検討を行った。

### 【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はたしていることを明らかにした。
2. 哺乳類における LTR レトロトランスポゾン由来の遺伝子の分布を調べると、上記の *SIRH* 遺伝子群およびもう一つの *PNMA* 遺伝子群は、胎生の哺乳類のグループ (真獣類と有袋類) にもみ存在し、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。
2. 免疫疾患のメカニズムや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の技術基盤づくりを開始した。
3. 臨床検体のゲノム解析を行うための技術的基盤づくりを開始した。
4. 1月に分野がスタートしたばかりのため研究室の環境づくりに取り組んだ。

### 【生命情報】

1. タンパク質間相互作用ネットワーク (PIN) の数理的解析に基づいた、相互作用数の中程度のタンパク質が生命ネットワークのバックボーンをなし、また薬剤標的分子にもなりうること、そして、相互作用数が大きいハブタンパク質は薬剤標的分子にならないことを明らかにした。
2. バイオインフォマティクスを機軸として、学内外の臨床系研究者と以下のような共同研究を行った：
  - (1) 肝細胞癌の浸潤や転移に関係し、予後予測に重要な遺伝子群とそれらのネットワークの同定。
  - (2) 肝細胞癌における AURKB スプライシングバリエント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 准教授：小崎健一 助教：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

特に疾患特異的ゲノム構造異常を標的にした疾患遺伝子の同定アプローチを体系化し、新規の癌や遺伝疾患の関連遺伝子を発見してきている。これらは癌個性診断のバイオマーカーとして、あるいは創薬の標的分子候補として注目されている。次世代シーケンサーとその応用技術を取り入れた統合的ゲノム、エピゲノム解析アプローチにより癌と遺伝疾患の病態解明において確固たる成果を上げている。癌においては、新規の癌抑制性 miRNA (miRNA) の同定やオートファジー・リソゾーム機能の変調と発癌において成果を見出した。また、遺伝性疾患では、小脳脳幹部低形成と CASK 遺伝子異常を報告し、また先天異常症の潜在的染色体異常診断ツールとして Genome Disorder Array (通称、GD アレイ) を実用化した。

### 1. 癌 CGH データベース構築とその公開

25 種類の癌種の細胞株を含む総計 2000 例以上において標準 CGH 解析を実施し、CGH データベースを公開した。(http://www.cghtmd.jp/cghdatabase/index.html) 本データベースは米国 NCBI 統合データベースにおいて“CGH database Japan”として紹介され、さらに、遺伝医学教科書「Color Atlas of Genetics」第3版 (Eberhard Passarge 博士著、Thieme 出版) で紹介されている。

### 2. 癌のゲノム・エピゲノム解析

口腔扁平上皮がん (OSCC) のエピゲノム解析：機能性低分子 RNA である miRNA は、癌の発症や進展過程の分子機序に深く関与することが明らかにされてい

る。本研究では、腫瘍特異的な DNA 過剰メチル化により遺伝子サイレンシングを受ける新規がん抑制遺伝子型 miRNA (TS-miRNA) の単離・同定を目的に、OSCC 細胞株での CpG island 5' 側近傍に座位する miRNA を対象とした網羅的 DNA メチル化スクリーニングを施行し、新規 TS-miRNA として *miR-596* を同定した。また、OSCC 症例における DNA 過剰メチル化と臨床病理学的悪性度との相関性、ならびに *in vivo* 実験系における新規抗癌剤としての有用性等を明らかにした。一方、*miR-596* の細胞増殖抑制効果がアポトーシス誘導によること、さらに、*miR-596* の標的分子として *LGALS3BP* を同定し、*LGALS3BP* の発現・翻訳阻害を介して ERK1/2 のリン酸化を抑制し、細胞増殖を負に制御しうることが明らかにした。(Endo *et al.*, *Carcinogenesis*, in press)

### 3. 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 RNA IP Seq 法：肝細胞がん (HCC) の RNA 創薬に有用な TS-miRNA の同定を目的に、HCC 細胞株における合成二本鎖 miRNA ライブラリーの機能的スクリーニングと miRNA 発現アレイを用いた網羅的発現解析を施行し、細胞増殖抑制活性を認め且つ正常肝臓組織に比して HCC 細胞株において発現低下を示す miRNA を選出した。それらの中でも、HCC 臨床検体において高頻度に癌部特異的発現低下を示す *miR-497-195* クラスターに着目して、詳細な機能的解析を行った。*miR-195* と *miR-497* は、各々の遺伝子導入により細胞周期の停止を誘導し、特に細胞周期に関わる遺伝子群の発現を優位に変動させた。これらの miRNA の作用機序を明らかにすべく、Argonute 2 (Ago2) 免疫沈降法と次世代シーケンサーでの RNA-Seq を組み合わせた RNA IP Seq 法を試み、*miR-195* と *miR-497* の標的遺伝子群の同定を試みた。候補標的遺伝子群には、細胞周期に関わる遺伝子群が優位に含まれており、その中でも、*miR-195* の標的遺伝子として既報である *CDK6*, *CyclinD1*, *E2F3* に加えて、*BTRC*, *CDC25A*, *CDK4*, *Cyclin D3*, *Cyclin E1* を新規に同定した。各標的遺伝子の HCC 臨床検体での発現解析では、本解析で新規に同定した *Cyclin E1*、

*CDC25A*, *CDK4* の癌特異的な発現亢進を高頻度に認め、また miRNA 発現との負の相関も微弱ながらも有意であつたことから、*miR-195* と *miR-497* の発現低下とともに、これらの標的遺伝子群の発現上昇も HCC の発症過程に深く関与することが示唆された。(Furuta *et al.*, *PLoS One*, in press)

(図1参照)

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上皮-間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) を正に制御する転写因子として報告した SIX1 の標的遺伝子群を同定すべく、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。転写因子結合領域の特定には独自の情報科学的手法を用い、いくつかの標的遺伝子候補が得られつつある。

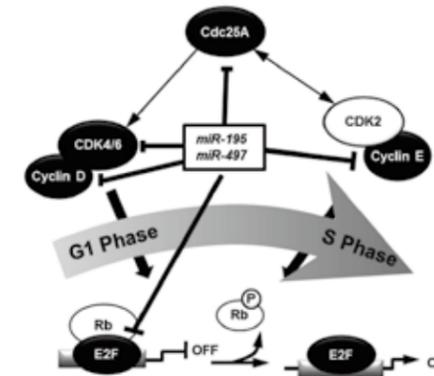


図1 miR-195 と miR-497 による細胞周期制御モデル

### 4. オートファジー・リソゾーム機能の変調と発がん

癌の中には、無治療でも腫瘍が自然に消退するものがある。この「腫瘍の自然退縮現象」が高頻度に起こる癌として、神経芽腫 (Neuroblastoma; NB) が知られている。これまで、我々は、LAPTM5 (Lysosomal-associated protein multispansing membrane 5) 遺伝子産物はリソソーム関連細胞内小胞に局在し、LAPTM5 陽性小胞の蓄積により惹起される細胞死が NB の自然退縮に深く寄与することを示してきた。さらに、最近、LAPTM5 のタンパク質量は、E3 ユビキチンリガーゼである ITCH によるユビキチン化により、負に制御されていることを同定した。そして、NB 細胞での ITCH 発現抑制は、LAPTM5 陽性小胞の蓄積を介した細胞死誘導を促進した (Ishihara *et al.* *J Biol. Chem.* 286 44086-44094, 2011) (図2)。このことから、ITCH は、LAPTM5 の発現量を負に制御することにより、NB の自然退縮を抑制している可能性が示唆された。

一方、リソソーム分解経路であるオートファジーの障害は、癌の発症に寄与すると考えられている。そんな中、我々は、オートファジー関連遺伝子であるヒト LC3 (mi-

crotubule-associated protein 1 light chain 3, MAP1LC3) 遺伝子ファミリーには、5 種類の LC3 遺伝子 (*LC3A-variant-1*; *v1*, *-variant-2*; *v2*, *LC3B*, *LC3B2 and LC3C*) が含まれ、既知の *LC3B* 以外に *LC3Av1* もまたオートファジーに関与することを明らかにした。さらに、*LC3Av1* は様々な癌種由来細胞株および食道癌臨床検体において、DNA メチル化異常により、高頻度に不活性化していることを明らかにした (Bai *et al.* *Oncogene* 2012 Oct 4;31(40):4397-408)。

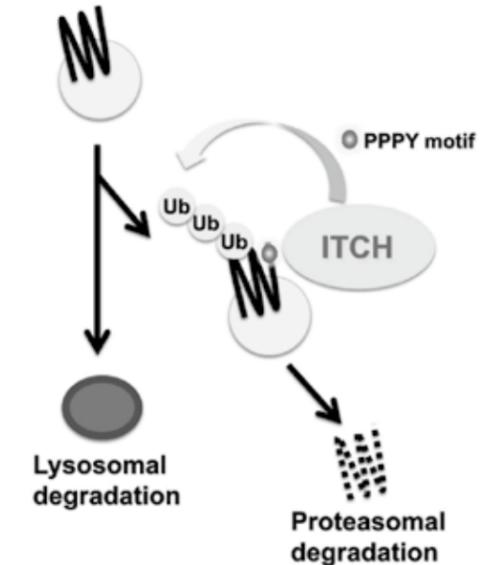


図2 ITCH によるユビキチン化を介した LAPTM5 のタンパク質分解

がん関連の主な共同研究：平成 21 年度より、文部科学省 科学技術試験研究委託事業「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 (研究代表者・東京医歯大・稲澤譲治)」を推進し、肺がん (名大・滋賀医大)、乳がん (がん研・徳島大)、胃がん (国立がん研究セ・徳島大)、直腸・結腸がん (東京医歯大、阪大) 前立腺がん (京大・岩手医大) の 5 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。肺がんゲノムワイド相関解析 (GWAS) により、2098 人の肺腺がん患者と 11048 人の健常者の間で 50 万個の遺伝子多型の比較から東アジア人の肺腺がん罹患リスクを規定する TP62 と TERT2 の 2 遺伝子を同定した (Nature Genet 2010)。前立腺がんの GWAS 解析で新規の日本人前立腺がん感受性 SNP の 5 種類を同定した (Nature Genet 2010)。引き続き日本人・日系人の GWAS により、新たに 4 つの SNP が前立腺がんに関連することを発見した (Nature Genet 2012)。

### 5. 遺伝性疾患のゲノム解析 高精度ゲノムアレイの開発

独自に以下のBACアレイシステムを開発した。①全ゲノムをカバーする高密度“Whole Genome Array (WGA) -4500” ②染色体1p36の20Mbをカバーした“1p36 コンティグアレイ” ③癌関連遺伝子800種類を搭載した「がん個性診断」用“Cancer Array-800” ④X染色体の偽常染色体領域外の“X-tiling Array” ⑤既知染色体微細構造異常症の診断アレイ“Genome Disorder Array (GDA)” ⑥ヒト copy number variation (CNV) 検出アレイ、⑦Cancer Array-1500 ⑧Whole Genome Array-15000、⑨がんゲノム診断実用化Cancer Array-miniを完成させた。

2006-2011年にかけて、独立行政法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) プロジェクト「個別化医療実現のための技術融合バイオ診断技術開発／染色体解析技術開発」プロジェクトに採択され、①アレイデータ解析ソフトウェアの開発 ②各種癌の基本ゲノム構造異常データベースの構築 ③全自動解析装置等の開発研究を進めた。さらに、日本人健常者の親子のトリオ100組でアレイCGH解析を行い、④日本人健常者のCNV情報を集積するCNVデータベースを構築してWebで公開した (図3)。

以上のアレイとデータベースの蓄積を基盤として、先天異常解析のプロジェクトとして2005年より国内23医療施設と連携して遺伝専門医による「アレイCGH診断法実用化コンソーシアム」を組織し、染色体検査ならびに臨床所見から診断のつかない多発奇形を伴う発達遅滞 (MCA/MR) の646例を対象賭した解析を行っている。GDAによる1次スクリーニングで69例 (10.6%) に、WGAを用いた2次スクリーニングでは64例 (9.8%) に疾患関連のゲノムコピー数変化 (pathogenic CNV; pCNV) を検出した (Hayashi et al. J Hum Genet 2011)。現在ではSNPアレイを用いた3次スクリーニングを行って現時点までに約12例にpCNVを検出してお



図3 CGH database、CNV database のバナー [http://www.cghtmd.jp/CNVDatabase]

り、全体として約1/4のMCA/MRに新たに病態を説明するゲノム異常を検出している。

これらの成果を端緒として、小頭症・小脳脳幹部低形成を伴う発達遅滞 (MICPCH) の原因遺伝子CASKの指摘や、10p11.23p12.1欠失に起因する顎顔面領域の異常を伴うMCA/MR症例などを報告し、先天異常疾患におけるgenotype- phenotypeの連関を明らかにすることで病態の解明に寄与する成果を挙げてきた (Hayashi et al. 2012; Okamoto et al. 2012)。

#### 受賞等

- 松村 聡が東京医科歯科大学医科同窓会第14回田中道子賞を受賞した。
- 古田 繭子が東京医科歯科大学グローバルCOE (GCOE) プログラム研究発表で「Excellent Presentation -Special Award-」を受賞した。
- 井上 純が平成23年度「難治疾患の研究」を重点課題とする研究助成に採択された。
- 林 深が平成23年度「難治疾患の研究」を重点課題とする研究助成に採択された。
- 原園陽介が財団法人金原一郎記念医学医療振興財団第26回研究交流助成に採択された。
- 上杉篤史 (大学院医歯学総合研究科博士課程 平成22年度卒業) が平成23年度難治疾患研究所優秀論文賞を受賞した。
- 鶴田智彦 (大学院特別研究学生 平成22年度卒業) が平成23年度難治疾患研究所優秀論文賞を受賞した。
- 林 深が平成23年度大学院生・若手研究者研究発表会で若手研究者部門1位を受賞した。
- 原園陽介が平成23年度大学院生・若手研究者研究発表会で大学院生部門2位を受賞した。
- 古田 繭子が平成23年度大学院生・若手研究者研究発表会で大学院生部門3位を受賞した。
- 山本信祐が平成23年度大学院生・若手研究者研究発表会でベストディスカッション賞を受賞した。
- 鶴田智彦 (現・永寿総合病院産婦人科勤務) が平成23年度日本産科婦人科学会「優秀論文賞婦人科腫瘍学部門」を受賞した。
- 松村 聡の論文が掲載誌 Clinical Cancer Research (2012年7月1日号) の表紙で紹介された。
- 小崎健一が (公財) 大阪癌研究会 平成24年度一般学術研究助成に採択された。

#### 人事異動

転入：Sujata Sakha (難治疾患研究所専攻生)、Nuylan Michelle Loyola、Daniela Tiaki Uehara (難治疾患研究所専攻生→医歯学総合研究科博士課程)、藤原直人、谷中淑光、森下真紀、(医歯学総合研究科博士課程)、高橋寛吉 (大学院特別研究生) 転出：遠藤寛則、宮脇 豊 (医歯学総合研究科博士課程終了)、古田 繭子 (学振ポスドク)

#### 業績目録

##### 英文原著論文

- Furuta M, Kozaki K, Tanimoto K, Tanaka S, Aarii 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, in press.
- 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, in press.
- Miyawaki Y, Imoto I, Tokairin Y, Kawada K, Nakajima Y, Nishikage T, Nagai K, Kajiwara M, Inazawa J, Kawano T: Esophageal Squamous Cell Carcinoma Developed 11 Years After Allogeneic Bone Marrow Transplantation for Acute Lymphatic Leukemia. Jpn J Clin Oncol 43: 69-73, 2013.
- Miyawaki Y, Kawachi H, Ooi A, Eishi Y, Kawano T, Inazawa J, Imoto I: Genomic copy-number alterations of MYC and FHIT genes are associated with survival in esophageal squamous-cell carcinoma. Cancer Sci 103: 1558-1566, 2012.
- Matsumura S, Imoto I, Kozaki K, Matsui T, Muramatsu T, Furuta M, Tanaka S, Sakamoto M, Aarii S, Inazawa J: Integrative array-based approach identifies MZB1 as a frequently methylated putative tumor-suppressor in hepatocellular carcinoma. Clin Cancer Res 18: 3541-3551, 2012.
- Honda S, Hayashi S, Nakane T, Imoto I, Kurosawa K, Mizuno S, Okamoto N, Kato M, Yoshihashi H, Kubota T, Nakagawa E, Goto Y, Inazawa J: The incidence of hypoplasia corpus callosum in patients with dup (X) (q28) involving MECP2 is associated with the location of distal breakpoints. Am J Med Genet A 158A: 1292-1303, 2012.
- Ono H, Imoto I, Kozaki K, Tsuda H, Matsui T, Kurasawa Y, Muramatsu T, Sugihara K, Inazawa J: SIX1 promotes epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer through ZEB1 activation. Oncogene 31: 4923-4934, 2012.
- Okamoto N, Hayashi S, Masui A, Kosaki R, Oguri I, Hasegawa T, Imoto I, Makita Y, Hata A, Moriyama K, Inazawa J: Deletion at chromosome 10p11.23-p12.1 defines characteristic phenotypes with marked midface retrusion. J Hum Genet 57: 191-196, 2012.
- Bai H, Inoue J, Kawano T, Inazawa J: A transcriptional variant of the LC3A gene is involved in autophagy and frequently inactivated in human cancers. Oncogene 31: 4397-4408, 2012.
- Honda S, Satomura S, Hayashi S, Imoto I, Nakagawa E, Goto Y, Inazawa J: Concomitant microduplications of MECP2 and ATRX in male patients with severe mental retardation. J Hum Genet 57: 73-77, 2012.
- Kurasawa Y, Kozaki K, Pimkhaokham A, Muramatsu T, Ono H, Ishihara T, Uzawa N, Imoto I, Amagasa T, Inazawa J: Stabilization of phenotypic plasticity through mesenchymal-spe-

cific DNA hypermethylation in cancer cells. Oncogene 31: 1963-1974, 2012.
12. Hayashi S, Okamoto N, Chinen Y, Takanashi J, Makita Y, Hata A, Imoto I, Inazawa J: Novel intragenic duplications and mutations of CASK in patients with mental retardation and microcephaly with pontine and cerebellar hypoplasia (MICPCH). Hum Genet 131: 99-110, 2012.

他7件

##### 英文総説

- Kozaki K, Inazawa J: Tumor-suppressive microRNAs silenced by tumor-specific DNA hypermethylation in cancer cells. Cancer Sci 103: 837-845, 2012.

##### 著書・総説

- (分担) 稲澤譲治:新臨床腫瘍学 (改訂第3版) -がん薬物療法専門医のために-, 株式会社南江堂 (東京). pp8-13(6P), 2012/12/15 (755P)

##### 国際シンポジウム・招待講演等

- Inazawa J: Identification of tumor-suppressor micro-RNAs silenced by DNA hypermethylation in cancer. 2012 Seoul National University Cancer Research Institute Symposium. Seoul National University Kwanak Campus, Culture Center, Seoul, South Korea. 16-19/ May/2012.
- Inazawa J: Exploring of tumor suppressive micro-RNAs silenced by tumor-specific DNA hypermethylation in cancer. The 22nd HCS/the 4th JARI Joint International Symposium. Hiroshima, Japan. 30/August/2012.

他1件

##### 国際学会

- Inoue J, Ishihara T, Kozaki K, Imoto I, Inazawa J: HECT-type ubiquitin ligase ITCH targets lysosomal-associated protein multispanning transmembrane 5 (LAPTM5) and prevents LAPTM5-mediated cell death. American Association for Cancer Research, 103rd Annual Meeting 2012. Chicago, USA, 2012.
- Hayashi S, Naganawa M, D.T.Uehara, Inazawa J: Investigation of the parental origin and genomic mechanisms involved in de novo pathogenic CNVs in congenital disorders. The American Society of Human Genetics 62nd annual meeting, San Francisco, USA, 2012.

他3件

##### 国内シンポジウム・招待講演等

- 稲澤譲治：がんにおけるリソソーム分解系の障害. 第21回日本Cell Death学会学術集会. 名古屋大学医学部付属病院中央診療棟3階講堂. 愛知. 2012年7月28日 .
- 井上 純、稲澤譲治：ヒト癌におけるオートファジー関連遺伝子の異常. 第71回日本癌学会学術総会. さっぽろ芸文館. 北海道. 2012年9月19日 .
- 小崎健一、遠藤寛則、稲澤譲治：がん DNAメチル異常を指標とした癌抑制遺伝子型 microRNA の探索. 第71回日本癌学会学術総会. 札幌市教育文化会館. 北海道. 2012年9月20日 .

##### 国内学会

- 村松智輝、小崎健一、井元清哉、山口 類、宮野 悟、稲澤譲治：ヒト口腔癌細胞株を用いた癌転移分子メカニズムの解析. 第71回日本癌学会学術総会. ロイトン札幌. 北海道. 2012年9月21日 .
- 林 深、長縄光代、Daniela Tiaki Uehara、稲澤譲治：高解像度アレイを用いた pathogenic CNV を付加的に修飾する微細 CNV の探索. 日本人類遺伝学会第57回大会. 京王プラザホテル.

東京. 2012年10月27日 .

他11件

##### 主催セミナー

- 第22, 23回癌ゲノムサイエンス研究会. 東京医歯大学. 2012年2月23日, 6月21日 .

他1件

##### 国際学術交流

稲澤譲治、小崎健一：タイ王国チュラロンコン大学歯学部口腔外科 Atiphan Pimkamkam 博士と「口腔癌のゲノム・エピゲノム解析」に関する共同研究

##### 研究助成金

- 稲澤譲治：文部科学省科研費 新学術領域研究「がんの統合的ゲノム・エピゲノム解析と治療標的分子シーズの探索」代表
- 稲澤譲治：(独) 日本学術振興会 基盤研究 A「がんのゲノム・エピゲノム解析に基づく個性診断法の開発」代表
- 稲澤譲治：文部科学省 科学技術試験研究委託事業「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 (胃がんの個別化医療を目指した新規胃がん関連遺伝子の探索と同定)」代表
- 稲澤譲治：文部科学省 次世代がん研究戦略推進プロジェクト「食道扁平上皮癌の新規治療標的分子と診断バイオマーカーの同定」代表
- 稲澤譲治：厚生労働省科研費 第3次対がん総合戦略研究事業「網羅的なゲノム異常解析と詳細な臨床情報に基づく、ヒトがんの多様な多段階発がん過程の分子基盤の解明とその臨床応用に関する研究」分担
- 小崎健一：(独) 日本学術振興会 基盤研究 B「癌抑制遺伝子型 microRNA の統合的スクリーニングと核酸医薬への応用」代表
- 井上純：(独) 日本学術振興会 基盤研究 B「神経芽腫における自然退縮の分子メカニズムの解明」代表
- 井上純：厚生労働省科研費 第3次対がん総合戦略「オートファジー活性を指標とした癌個別化医療の分子基盤に関する研究」代表
- 林 深：日本学術振興会 若手研究 B「共通のゲノム異常に基因する新規症候群の定義と病態解析」代表
- 林 深：厚生労働省科研費 障害者対策総合研究事業「原因不明の精神遅滞の病態解明を目指した統合的ゲノム解析」代表

他2件

##### 特許取得

<特許取得-国内>

- 2012年10月26日、特許第5116026号、「癌の検出方法および癌抑制剤」、稲澤譲治・小崎健一・井本逸勢、東京医科歯科大学・富士フィルム株式会社、特願 2008-012256

他2件

<特許取得-海外 (米国)>

- 2012年11月27日、登録番号 8218431、「卵巣癌の検出方法、及び抑制方法」、稲澤譲治・井本逸勢・菊池良子、国立大学法人東京医科歯科大学・富士写真フィルム株式会社、特願 2007-143111

他2件

##### 教育

稲澤譲治：歯学部 歯学科「歯科医療と遺伝疾患」、医学部 保健衛生学科「遺伝学」、医歯学総合研究科 医歯理工学専攻 修士課程「遺伝医学特論」、「生化学」、京都府立医科大学大学院「大学院特別講義」小崎健一：医歯学総合研究科 生命理工学系専攻「生命科学特論Ⅰ」、医歯学総合研究科 修士課程「遺伝医学特論」、「生化学」、医学部 保健衛生学科「遺伝学」井上純：医歯学総合研究科 生命理工学系専攻「生命科学特論Ⅰ」

# ゲノム応用医学研究部門 分子遺伝分野

教授：三木義男 特任准教授：中西 啓  
助教：竹中克也 特任助教：宮口 健

## 研究内容

### 概 略

二本鎖 DNA 切断修復機構において機能する BRCA1・BRCA2 は、遺伝性乳癌の原因蛋白であり、この両分子によって担われる情報伝達の流れの解明は、乳癌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（アポトーシス）を抑制し結果的には癌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. BRCA1/2 遺伝子変異腫瘍に対する合成致死性効果を示すタンパク質の探索

家族性乳癌の原因遺伝子産物である BRCA1/2 タンパク質は、DNA2 本鎖切断での相同組換え修復に必須なタンパク質である。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（PARP）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 修復機構とそのバックアップのために働く安全装置（PARP1）を排除する機構である。変異 BRCA 遺伝子と PARP1 酵素は、「合成致死性（Synthetic lethal）」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。BRCA1/2 は、DNA 修復以外に中心体や細胞質分裂にも関与する多機能タンパク質であることから、DNA 修復阻害剤以外の組み合わせによって合成致死性効果は期待される。本研究は、BRCA1/2 遺伝子変異腫瘍に対して合成致死性効果をもたらす新たな分子標的因子を見出すことを目的とする。

siRNA で BRCA1/2 の発現を抑制させた乳癌細胞（MCF7 細胞）に対して、作用機序の異なる既存の抗癌剤（シスプラチン；プラチナ製剤、5-FU；代謝拮抗剤、アドリアマイシン；抗がん性抗生物質、パクリタキセル；微小管阻害剤）を作用させて WST-1 法により生細胞を測定した（図 1）。テトラゾリウム塩の WST-1 は、細胞

表面で可溶性のフォルマザンに還元される。この還元は、生細胞中の NAD(P)H 産生に依存するため、形成されるフォルマザン色素の量は、培養中の代謝活性を持つ細胞の数に相関する。今回の測定で合成致死性効果が認められたのは、BRCA2 発現抑制とパクリタキセルの組み合わせであった。我々はこれまでの研究から、BRCA2 の発現抑制が中心体の複製やポジショニングに影響を及ぼすことを明らかにしてきた。BRCA2 単独の発現抑制では、細胞死まで至らない。これにパクリタキセル（5 mM）を添加させ場合、パクリタキセル単剤に比べて有意にがん細胞の増殖抑制効果を示した。ところが、BRCA2 発現抑制と他の抗がん剤との組み合わせでは、合成致死性効果はなかった。さらに、BRCA1 発現抑制と 4 つの抗がん剤については、いずれにおいても合成致死性効果は認められなかった。以上の結果から、BRCA2 遺伝子変異腫瘍に対して合成致死性効果が期待できる分子標的因子として、中心体の機能に関わるタンパク質がその候補として示唆された。

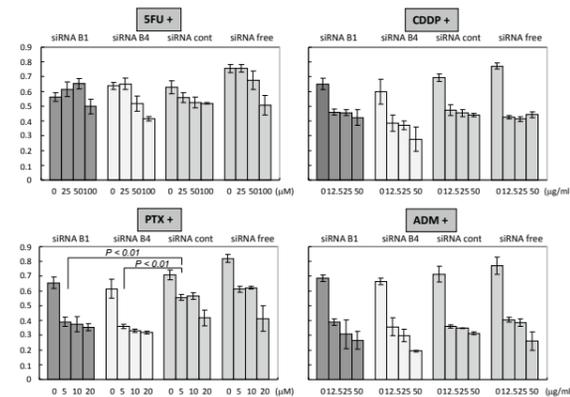


図 1 BRCA2 ノックダウン MCF7 細胞に対する 抗癌剤の合成致死性作用

### 2. BRCA2 分解産物の同定と機能解析

家族性乳癌の原因遺伝子産物である BRCA2 タンパク質は、核内で Rad51 と結合して DNA 修復に関与する。一方、BRCA2 は細胞周期の G1/S 期から M 期前期にかけて中心体の周りを取り巻く様に局在し、細胞質分裂期に入ると、母・娘細胞間に形成されるミッドボディに局在し細胞質分裂に関与することが報告されている。我々はこれまでに乳癌細胞株 MCF7 細胞、SK-BR-3 細胞、

子宮頸癌細胞株 HeLa S3 細胞、非小細胞癌株 A549 細胞の BRCA2 タンパク質に対して、エピトープの異なる 2 種類の抗体（中央部：1651-1821 a.a.、C 末端：2959-3418 a.a.）を用いてイムノブロットを行った結果、野生型 BRCA2 タンパク質（分子量 380k）とともに 250k 付近に特異的なバンドを検出してきた。C 末端を認識する抗体ではこのバンドは検出されなかった。一方、正常ヒト乳腺上皮細胞（HMEC）から 250k のバンドは検出されなかった。

この 250k 付近のバンドが BRCA2 由来のものであるのかを確かめるため、HeLa S3 細胞から調製した抗 BRCA2 抗体免疫沈降物を SDS-PAGE に展開して、250k 付近のバンドを質量分析計（QTRAP5500 の LC/MS/MS システム）で解析した結果、BRCA2 タンパク質を同定した。同じバンドからマトリックスメタプロテアーゼ 1（MT1-MMP）が同定された。そこで、MT1-MMP による BRCA2 の切断とその切断部位を明らかにするため、BRCA2 の切断候補領域を含んだポリペプチドに MT1-MMP を反応させた。フラグメントは、MT1-MMP によって切断され MT1-MMP の阻害剤 GM6001 によってその切断は抑制された。さらに質量分析計で切断部位を解析した結果、2135 番目のアスパラギンと 2136 番目のロイシンで切断されることを明らかにした。切断型 BRCA2 は、N 末端側を N-BRCA2、C 末端側を C-BRCA2 と命名した。そこで、各切断部位を特異的に認識する抗体を作成して、HeLa S3 細胞で 2 つのフラグメントの細胞内での局在を観察した結果、N-BRCA2 は細胞質に局在し、C-BRCA2 は核内に foci を形成した（図 2A）。また、C-BRCA2 の産生をいくつかの細胞株（MDA-MB-231, MDA-MB-157, BT-20, T-47D, MCF7, SK-BR-3, MCF10A, HMEC）でイムノブロットを用いて検出した結果、HMEC だけ切断型のフラグメントが検出されなかった。

次に、X 線照射後、経時的に野生型 BRCA2 と C-BRCA2 の核内 foci の数と核 1 個あたりの foci の蛍光強度平均値を Operetta™ (PerkinElmer) で測定した（図 2B）。両者の foci の数は、照射 10 時間後まで大きな変動はなかった。ところが、野生型 BRCA2-foci の蛍光強度は、照射 30 分まで増加してその後緩やかに減少した。一方、C-BRCA2-foci の蛍光強度は、照射 10 分まで減少してその後ほぼ一定の値を示した。さらに STAR Morphology 解析によって、両 foci の核内分布を解析した結果、照射 5 分までは、両 foci は核の内部に分布した。野生型 BRCA2-foci は、照射 5 分から 30 分にかけて核膜近辺に分布して、その後 foci の分布は徐々に内部に移行した。C-BRCA2-foci の分布は、変化がなかった。核膜近辺は、ヘテロクロマチン領域が集中しており、野

生型 BRCA2-foci の分布がどうしてこのように変化するのは今後の課題である。しかし、X 線照射後野生型 BRCA2- と C-BRCA2-foci の分布に違いが観察されたことは、非常に興味深い結果である。今後、BRCA2 タンパク質の機能解析からその新しい役割を明らかにして、BRCA2 が乳癌発症にどのように寄与しているのか解明したいと考えている。

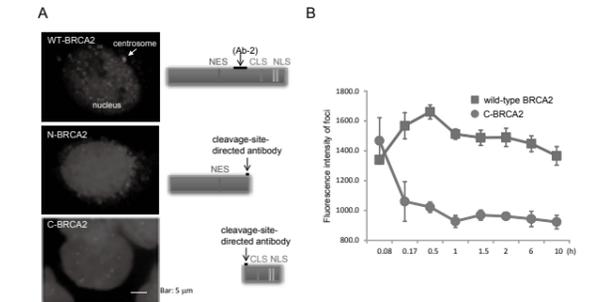


図 2 野生型 BRCA2 と C-BRCA2 の細胞内局在と X 線照射（10 Gy）後の両タンパク質の核内 foci 蛍光強度の変化

### 3. M 期開始における中心体成熟化機構の解析

中心体は、1 対の中心小体とその周りを囲んだ中心体周辺物質（PCM）から構成され、微小管の形成中心として機能する。細胞周期を通して 1 サイクルに 1 回複製し、M 期前期に中心体は成熟し、M 期中期では成熟化が完了して染色体の分離に関与する。現在、中心体の成熟化のイニシエーターとして、polo-like kinase-1（Plk1）が報告されている。Plk1 によってリン酸化された pericentrin が、CEP192、GCP-WD、Aurora A、g-tubulin を中心体へリクルートすることが報告されている。また、この成熟化は、染色体分裂時に中心体の構造維持のため重要と考えられているが、詳しい成熟化機構およびその機能は明らかでない。本研究は、中心体の成熟化機構とその成熟化の生理的意義を明らかにすることを目的とする。

S 期と M 期の中心体構成タンパク質の相対的定量比較を行うため、iTRAQ 法と SILAC 法でラベル化して質量分析計で解析した。その結果、プロテアソームの制御因子である Ecm29 のタンパク質量が、S 期に比べて M 期で約 2 倍増加していた。siRNA による Ecm29 のノックダウンによって中心体のプロテアソーム活性が低下することから Ecm29 はプロテアソーム活性を抑制する機能をもつ事が示唆された。M 期では、Ecm29 に加えてプロテアソーム構成タンパク質の発現量も増加することから、細胞周期を通して Ecm29 がプロテアソーム活性を一定に維持する機能をもつことが推測された。実際、S 期と M 期中心体のプロテアソーム活性を測定したところ、両者の活性はほぼ一定に保たれていた（図 3A）。それでは細胞周期を通じて中心体でプロテアソーム活性

を保つ生理的役割は何なのか？この問いに対して我々は、微小管再構成 assay を試みた。siRNA-Ecm29 導入細胞（プロテアソーム活性の低下）にノコダゾールを添加し微小管を脱重合させた後、新鮮な培地を加えて微小管再構成を観察した。細胞は、20 秒間隔で回収して $\gamma$ -tubulin 抗体で免疫染色を行い、超解像度レーザー顕微鏡 (CW STED) で解析した (図 3B)。その結果、siRNA で ECM29 をノックダウンさせた細胞は、コントロール siRNA を処理した細胞に比べて、中心体からの微小管再形成までの時間が短く、微小管形成に影響を及ぼすことが観察された。さらに、ECM29 の発現抑制によって、S 期 arrest が検出された。以上の結果から、細胞周期で中心体のプロテアソーム活性のバランスが崩れると微小管形成の活性や細胞周期の進行に影響を及ぼすことが確かめられた。ECM29 は、中心体を含む細胞内のプロテアソーム活性を制御するため、今回の siRNA による実験が中心体のプロテアソーム活性にだけ影響を及ぼすことにはならない。しかし、中心体特異的にプロテアソーム活性を制御することが不可能であり、これまでもプロテアソーム阻害剤を用いて中心体の微小管形成能を解析している報告が多数あることから、ECM29 発現抑制によるプロテアソーム活性制御を試みた。現在、中心体への輸送モータータンパク質の細胞質ダイニンが S 期に比べて M 期中心体で約 2 倍増加することを確認した。これによって輸送されるタンパク質が M 期中心体の成熟化に関与しているのではないかと考えて研究を進めている。

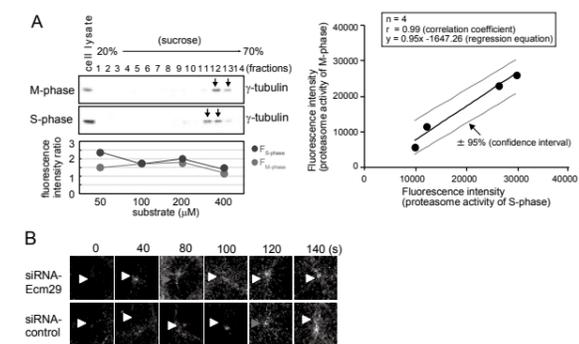


図3 S期とM期中心体のプロテアソーム活性の比較とEcm29発現抑制による微小管再構成に与える影響

#### 4. 乳癌原因遺伝子 BRCA2 と協調し DNA 損傷修復に係わる新規分子群の同定

乳癌原因遺伝子 BRCA2 は二重鎖切断 DNA の相同組換えによる修復に関与している。我々は近年、共免疫沈降物を質量分析し、BRCA2 に結合する候補分子群を得た。この中に、BRCA2 と協調して相同組換え修復に関

与する分子が潜在的に含まれ得ると仮説を立て、候補の一部の遺伝子について相同組換えへの関与を検討した。手法としては広く使われている DR-GFP による蛍光検出手法を当研究室内で再構成した。数種類の遺伝子について siRNA によるノックダウンを行ない相同組換え効率を測定したところ、ほとんどの遺伝子については影響が見られなかったが、VCP については相同組換え効率の低下が見られた。VCP は当時二重鎖切断修復への関与は知られていなかったもののその後関与が報告されたことから、BRCA2 と協調して相同組換えに係わっている可能性がある。また質量分析結果を対象に DR-GFP による検出手法でスクリーニングすることによって新規の相同組換え関与分子を得られることが実証されたことから、今後同様の枠組みで新規の機能的相互作用分子の発見を目指す。

#### 5. 中心体複製制御に係わる BRCA2 分子内領域の検討

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、協調して機能する結合分子として nucleophosmin (NPM) と Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 2 (ROCK2) を得た。このうち NPM については BRCA2 の N 末端寄りの領域が結合し得ることを報告した。最近実験手法の発達により発現効率が向上したため改めて分子内結合領域について検討したところ、新たに C 末端寄りの領域も NPM との結合に関連する可能性を見出した。新規に見出した領域が NPM と直接に結合するのか、あるいは ROCK2 などを通して間接的に結合するのかを検討している。またこの領域も中心体の正しい複製に関与しているのであれば、領域内の癌ゲノム変異が異常な細胞分裂を引き起こし発癌につながっている可能性を追究する。

#### 6. 紫外線高感受性症候群責任遺伝子 UVSSA の同定

稀少な遺伝性病例である紫外線高感受性症候群は、転写共役ヌクレオチド除去修復機構 (TC-NER) に欠損が見られるが、同じく光線過敏症を特徴とする色素性乾皮症やコケイン症候群のような特異的原因遺伝子は長らく明らかとなっていなかった。我々は次世代ゲノムシーケンシングにより患者の全エキソーム塩基配列を決定し、その原因遺伝子が機能未知とされてきた KIAA1530 であることを見出し UVSSA と命名した。これにより各種 TC-NER 欠損性遺伝子疾患における臨床的所見の違いを説明できる可能性が開かれた。この研究は長崎大学との本研究所共同研究拠点事業の一環として実施した。

#### 人事異動

転入：手代木翔太 (大学院医歯学総合研究科修士課程 医歯理工学専攻)  
 転出：吉田 清嗣 (准教授、東京慈恵会医科大学 生化学講座教授に転出)、Sadiya Malik (本学生命情報科学教育部博士後期課程終了)、郭 甜甜 (本学医歯学総合研究科修士課程終了)、鈴木 一穂 (本学生命情報科学教育部博士前期課程終了)

#### 業績目録

##### 原著論文

- Kawazu, M., Ueno, T., Kontani, K., Ogita, Y., Ando, M., Fukumura, K., Yamato, A., Soda, M., Takeuchi, K., Miki, Y., Yamaguchi, H., Yasuda, T., Naoe, T., Yamashita, Y., Katada, T., Choi, Y.L. and Mano, H. (2013) Transforming mutations of RAC guanosine triphosphatases in human cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Taira, N., Mimoto, R., Kurata, M., Yamaguchi, T., Kitagawa, M., Miki, Y. and Yoshida, K. (2012) DYRK2 priming phosphorylation of c-Jun and c-Myc modulates cell cycle progression in human cancer cells. *J Clin Invest*, **122**, 859-72.
- Suzuki, K., Dashzeveg, N., Lu, Z.G., Taira, N., Miki, Y. and Yoshida, K. (2012) Programmed cell death 6, a novel p53-responsive gene, targets to the nucleus in the apoptotic response to DNA damage. *Cancer Sci*, **103**, 1788-94.
- Satoh, Y., Sugai, S., Uehara, H., Mun, M., Sakao, Y., Okumura, S., Nakagawa, K., Ishikawa, Y., Miki, Y. and Miyata, S. (2012) Clinical impact of intraoperative detection of carcinoembryonic antigen mRNA in pleural lavage specimens from nonsmall cell lung cancer patients. *Thorac Cardiovasc Surg*, **60**, 533-40.
- Sakamoto, K., Fujii, T., Kawachi, H., Miki, Y., Omura, K., Morita, K., Kayamori, K., Katsube, K. and Yamaguchi, A. (2012) Reduction of NOTCH1 expression pertains to maturation abnormalities of keratinocytes in squamous neoplasms. *Lab Invest*, **92**, 688-702.
- Iyevleva, A.G., Kuligina, E., Mitushkina, N.V., Togo, A.V., Miki, Y. and Imanyitov, E.N. (2012) High level of miR-21, miR-10b, and miR-31 expression in bilateral vs. unilateral breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat*, **131**, 1049-59.
- Nakazawa Y, Sasaki K, Mitsutake N, Matsuse M, Shimada M, Nardo T, Takahashi Y, Ohyama K, Ito K, Mishima H, Nomura M, Kinoshita A, Ono S, Takenaka K, Masuyama R, Kudo T, Slor H, Utani A, Tateishi S, Yamashita S, Stefanini M, Lehmann AR, Yoshiura K, Ogi T. (2012) Mutations in UVSSA cause UV-sensitive syndrome and impair RNA polymerase IIo processing in transcription-coupled nucleotide-excision repair. *Nature Genetics* **44**, 586-592. 他3篇

##### 総説および著書

- 三木 義男:[がん種別の個別化治療の最前線]

BRCA 遺伝子と個別化治療. *がん分子標的治療* 10 巻 1 号, 13-18, (2012)  
 2. 三木 義男:[遺伝性乳癌卵巣癌診療の新時代] BRCA1 と BRCA2 遺伝子産物の機能 基礎から臨床. *癌と化学療法* 39 巻 4 号, 498-501, (2012)  
 3. 齊藤 広子, 三木 義男:[乳癌 (第 2 版) - 基礎と臨床の最新研究動向-] 乳癌の分子生物学と発癌機序 発癌機序 乳癌の発癌機序 概論 (分子機構、多段階発癌機序を含めて). *日本臨床* 70 巻増刊 7 乳癌, 92-96, (2012) 他5編

##### 招待講演・国内シンポジウム・特別講演

- 三木 義男, 中西 啓: BRCA2 の新規機能と合成致死理論に基づく新規乳癌治療法開発の可能性. 第 20 回日本乳癌学会学術総会、熊本市、2012 年 6 月 28-30 日
- 三木 義男, 中西 啓: Hereditary breast/ovarian cancer -New development of the molecular diagnosis and treatment- 遺伝性乳がん・卵巣がん症候群 - 分子診断・治療の新たな展開 -. 第 71 回日本癌学会学術総会シンポジウム、札幌市、2012 年 9 月 19 日 - 21 日

##### 国内学会発表

- 宮口 健, 郭 甜甜, 三木 義男, 中西 啓: Phosphorylation of BRCA2 by Akt is involved in BRCA2-14-3-3 gamma interaction related to centrosome dynamics 中心体制御に関わる BRCA2 - 14-3-3 $\gamma$  複合体形成には Akt による BRCA2 のリン酸化が関与する. 第 71 回日本癌学会学術総会、札幌市、2012 年 9 月 19 日 - 21 日
- 木村 仁美, 中西 啓, 三木 義男: Proteasome activity affects cancerous centrosome hypertrophy プロテアソームの活性は癌細胞における中心体の肥大化に影響する. 第 71 回日本癌学会学術総会、札幌市、2012 年 9 月 19 日 - 21 日
- 高岡 美帆, 齊藤 広子, 中西 啓, 三木 義男: BRCA2 contributes success of cytokinesis through regulation of non-muscle myosin IIC ATPase activity 乳癌原因遺伝子産物 BRCA2 は II 型ミオシン IIC の ATPase 活性の制御を通して細胞質分裂に働く. 第 71 回日本癌学会学術総会、札幌市、2012 年 9 月 19 日 - 21 日
- 石場 俊之, 中西 啓, 高木 洋子, 笠原 舞, 杉本 齊, 永原 誠, 中川 剛士, 佐藤 隆宣, 杉原 健一, 三木 義男: The correlation of decorin and periostin indicated by the proteomics of phyllodes 葉状腫瘍のプロテオーム解析から導いた decorin と periostin の関連性. 第 71 回日本癌学会学術総会、札幌市、2012 年 9 月 19 日 - 21 日
- 中西 啓, Nadila Wali, 齊藤 広子, 大海 忍, 三木 義男: 切断型 BRCA2 の形成機序および機能解析. 日本人類遺伝学会第 57 回大会、新宿区、10 月 25 日 - 27 日 他 13 篇

##### 国際学会発表

Miyaguchi K, Miki Y, Nakanishi A : Phosphorylation of BRCA2 by Akt is involved in BRCA2-14-3-3 gamma interaction related to centrosome dynamics. 15<sup>th</sup> International Congress

on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer, Kanazawa, 2012/11/15-17

##### 学内外教育活動

- 三木 義男: 本学大学院医歯学総合研究科修士課程 2012 Imperial College Student の受け入れ: Miss Marie Kubo "Exploiting synthetic lethality in chemotherapy for BRCA1/2-deficient breast cancers" 論文作成

##### 競争的研究費取得

- 三木 義男 (代表) 平成 24 年度厚生労働科学研究費補助金 第 3 次対がん総合戦略研究事業 研究題目: 難治性乳癌の克服に向けた画期的治療法の開発基盤推進研究
- 三木 義男 (代表) 平成 24 年度文部科学省科学研究費補助金 基盤研究 (B)
- 研究題目: BRCA の機能解析と合成致死に基づく標的分子探索
- 三木 義男 (代表) 平成 24 年度文部科学省科学研究費補助金 新学術領域研究 研究題目: 乳癌の分子サブタイプ分類と個別化抗癌剤治療の開発
- 三木 義男 (代表) 平成 24 年度文部科学省科学研究費補助金 挑戦的萌芽研究 研究題目: MT1-MMP の中心体制御を介した新規がん形質転換機構の解明
- 三木 義男 (分担) 平成 24 年度文部科学省科学研究費補助金 基盤 (C)
- 研究題目: 細胞アレイによる卵巣癌抗癌剤効果予測システムの構築と分子標的薬の探索
- 三木 義男 (分担) 平成 24 年度文部科学省科学技術試験研究・委託業務 研究題目: 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
- 三木 義男 (代表) 平成 23 年文部科学省科学技術試験研究・委託業務 研究題目: 分子プロファイリングによる新規標的の同定を通じた難治がん治療開発
- 竹中克也 (代表) 平成 24 年度文部科学省科学研究費補助金基盤研究 (C)
- 研究題目: 乳癌原因遺伝子 B R C A 2 新規結合分子が中心体複製及び DNA 修復に果たす役割の解明
- 竹中克也 (代表) 平成 24 年度京都大学ウイルス研究所共同研究課題「Rev7 と結合できない Rev3 ゲノム上点変異導入動物細胞株の表現形解析」
- 竹中克也 (代表) 平成 24 年度京都大学放射線生物研究センター共同利用研究「DNA 損傷乗り越え複製酵素のサブユニット間結合が修復に果たす役割の解明」
- 竹中克也 (代表) 平成 24 年度公益財団法人武田科学振興財団医学系研究奨励 (基礎)「乳癌原因遺伝子 BRCA2 新規結合タンパク質が発癌過程に関与する機構の解明」

# 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

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・進展に関わる遺伝子、環境因子を明らかにする目的で、ゲノム情報を駆使しつつ、疫学的手法を用いながら解析をしている。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っている。対象疾患は糖尿病、高血圧、肥満、メタボリック症候群、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解析する必要がある。従ってバイオインフォマティクスの観点からの研究も進めている。また日常的慢性疾患の一部の素因は胎児期に形成されるという考え方があり、(Developmental Origins of Health and Disease=DOHaD) 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という仮説を検証すべく研究を行っている。

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。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っている。

## 研究紹介

### 1. 日本人高齢者における COMT 遺伝子 Val/Met 多型と全身性動脈硬化度の関連に関する研究

アテローム性動脈硬化症は加齢性病変であり、先進国で主要な死因のひとつである循環器系疾患の原因となる。動脈硬化症の進行には遺伝要因と環境要因が関わっている。家系解析により遺伝要因が 30% 以上を占めることが示唆されており、実際近年のゲノム研究から多くの動脈硬化症関連遺伝子が同定されている。カテコール-O-メチルトランスフェラーゼ (COMT) はドーパミン、

アドレナリン、ノルアドレナリンなどのカテコラミン類を分解する酵素であり、COMT には酵素活性を変化させる Val/Met 多型が知られている。本研究では COMT 多型の動脈硬化度に与える影響を調べた。

### 方法

東京都健康長寿医療センターの 1536 例を連続剖検例サンプルとした。全身性動脈硬化度、冠動脈硬化度および脳動脈硬化度の指標として pathological atherosclerotic index (PAI)、coronary stenotic index (CSI)、および intracranial atherosclerotic index (ICAI) の判定的な指標を用いた。COMT 遺伝子多型 rs4680 (G/A=Val/Met) および rs4633(C/T) を Taqman 法でジェノタイピングし、関連解析を行った。

遺伝子多型 rs4680 GG 多型および rs4633 CC 多型は PAI との間に有意な相関が認められた (p=0.031 および p=0.035、年齢、喫煙、飲酒、高血圧、糖尿病で調整後)。いずれの多型も CSI、ICAI との相関は認められなかった。男女別の解析においては、両多型と PAI の関連は女性でのみ認められ、男性では認められなかった。

COMT の高酵素活性 Val アレルは動脈硬化の進展と関連しており、その効果は女性において顕著であった。COMT はカテコラミン類、エストロゲン、ホモシチンの代謝を司っており、動脈硬化進展とのより詳細な検討が必要である。

### 2. 日本人高齢者における心筋梗塞関連遺伝子多型の冠動脈狭窄に対する影響

動脈硬化症は心筋梗塞 (MI) や脳血管障害などの重篤なイベントの基礎疾患であり、その発症と進展には環境因子および複数の遺伝子が関わっていることが明らかになって来ている。近年、ゲノムワイド関連解析 (genome-wide association study=GWAS) が行われるようになり、日本人における MI リスク遺伝子/遺伝子多型が多数同定された。本研究では日本人で発見したこれらの遺伝子多型に注目し、病的に観察した動脈硬化症や心血管病変に対する遺伝的リスクを追試検討した。サンプルは長寿健康医療センターバイオリソースセンターに登録されている 1503 例の連続剖検例 (平均死亡年齢 80.3 歳、男女比 1.16:1) を対象とした。これらの症例の

死因は日本の死亡統計の分布にほぼ従っており、一般的な高齢者集団であると考えられた。本研究では LTA (rs1041981)、LGALS2 (rs7291467)、PSMA6 (rs1048990)、および BTN2A1 (rs6929846) の遺伝子多型について Taqman 法にてジェノタイピングを行った。病理所見からえた MI の有無および冠動脈狭窄指数 (CSI) を目的変数として解析を行った。その結果、全ての遺伝子多型において HWE からの逸脱はなく、病的 MI との関連は多変量解析に置いて、いずれの遺伝子多型とも関連は見られなかった。しかしながら、CSI との関連においては、LTA rs1041981 (OR=1.54, 95% CI: 1.17-2.01)、LGALS2 rs7291467 (OR=1.62, 95% CI: 1.11-2.37)、BTN2A1 rs6929846 (OR=1.42, 95% CI 1.01-2.02) が有意な関連を示し (p<0.05)、リスクアレルも先行研究と同じ方向であった。一方、PSMA6 では関連は認められなかった。以上により、LTA、LGALS2、BTN2A1 遺伝子多型は高齢者において、MI の中間形質 (Intermediate phenotype) である冠動脈狭窄の程度と関連している事が明らかとなった。

### 3. 肺気腫の感受性遺伝子の探索：コモンおよびレアバリエント解析における Exome array の有用性の検討

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) は世界での死因で第 4 位の疾病であり、患者数も増えており、その原因を明らかにすることが求められている。発症機序として喫煙あるいは他の環境要因ばかりでなく、遺伝因子も関与しているとされている。これまで common SNP を搭載した DNA チップを用いたゲノムワイド関連解析が行われて COPD と関連する複数の遺伝子が明らかとなってきている。本研究では、肺気腫 (Pulmonary emphysema: PE) に関連する遺伝子を明らかにする目的で、主にコード領域にあるコモンおよびレアバリエントを搭載した Exome チップ (Infinium HumanExome Beadchip、Illumina 社) を用いた。本 Exome チップは、多人種での 24 万以上の単一塩基マーカー (single nucleotide variant: SNV) が選定されており、これが日本人集団においても有用であるかを合わせて評価した。肺気腫との関連は、日本人高齢者連続剖検例 2305 検体のうち、喫煙歴を有する男性検体 716 例で検討した。このうち病理所見により肺気腫有りとし、無しの症例はそれぞれ 253 例および 463 例であった。242,877 バリエントマーカー中、常染色体上の 74,808 SNV (30.8%) を検知した。我々のバリエント検知率は、既報の白人集団での結果とほぼ同程度であった。肺気腫との関連解析では最も低い p 値は  $1.07 \times 10^{-4}$  で、多重検定を考慮すると統計学的に有意な SNV はなかった。そこで低い p 値を示した遺伝子に関して、ゲノムオントロジーを評価した。DAVID か

ら得られた gene-GO を用いた分類では、60% 程度が生物学的過程と代謝に分類された。以上のように、日本人集団においても一塩基のコモンまたはレアバリエントを評価する点において Exome チップの有用性が示唆された。ここで得られた肺気腫候補遺伝子に関して考察も加える。

COPD は典型的な多因子疾患であり、発症機序として喫煙などの環境要因ばかりでなく、遺伝因子も関与していることが明らかとなっている。これまで common SNP を用いたゲノムワイド関連解析で COPD と関連する複数の遺伝子が明らかとなってきている。しかし common SNP だけでは多因子疾患に関連する遺伝因子の一部しか説明できないことが近年の研究より明らかになって来た。最近の次世代シーケンズ技術は、より迅速かつ低価格でゲノムの構造および機能を解明することを可能にし、common SNP ばかりではなく rare variant のカタログ化に大きく寄与している。その結果、エクソンにある common および rare な一塩基変異を検出する Exome チップが開発された。本研究では、先ず、この Exome チップの日本人における有用性も評価した。

比較する表現形質として、COPD の主要な病理学的特徴である肺気腫 (PE) を選択した。PE は肺実質の破壊によって特徴づけられ通常末梢細気管支の不可逆的な拡大を病理学的に同定されることによって定義され、明らかな線維化は認めず、肺胞壁の破壊を伴う。PE の病因として最も重要なものは喫煙であるが、その他にも、慢性炎症や、肺のプロテアーゼ及び抗プロテアーゼ活性との間の不均衡、また酸化ストレスなどが関与していると言われている。近年のゲノムワイド関連解析 (GWAS) により、多くの COPD の疾患感受性遺伝子が報告されているが、疾患発症の詳細なメカニズムは解明されていない。そこで本研究では、肺気腫に関して、Exome チップ (Infinium HumanExome Beadchip、Illumina 社) を用いて得られたコモンおよびレアバリエントから疾患感受性遺伝子候補を検討した。

東京都健康長寿医療センター研究所バイオリソースセンターに登録されている日本人高齢者連続剖検例 2305 検体を対象とし、解剖時肺気腫所見記録のある 2016 例中、喫煙歴を有する男性 716 例について検討した。DNA 抽出は腎髄質より行った。タイピングはイルミナ社の Infinium HumanExome Beadchip を用いた。統計解析は、Student's t-検定、フィッシャーの正確検定およびロジスティック回帰分析を用いた。アミノ酸変化によるタンパク質機能の影響を予測は PolyPhen2 を用いた。遺伝子機能のアノテーション分析には DAVID(6.7) を用いた。

Exome チップに搭載されている 242,877 バリエント



# 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

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、生命の環境応答や疾患の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与することが明らかにされており、さらに、遺伝制御が細胞周期制御、細胞死などの細胞運命や生体の恒常性維持に関与することも明らかである。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、Pol II、Pol I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。

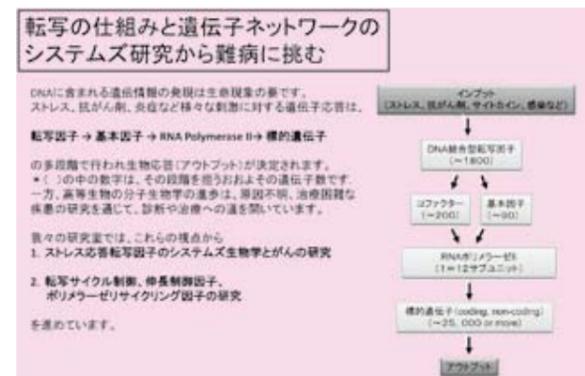


図1 「転写の仕組みと遺伝子ネットワークのシステムズ研究から難病に挑む」

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

RNAポリメラーゼII (PolII) の転写サイクルにおいてそのCTDはリン酸化・脱リン酸化される。CTD (C-terminal domain) は、Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Serの7アミノ酸のリピード配列で酵母からヒトまで保存されリピード数は進化とともに増加し、ヒトでは52回反復されている。転写活性化とともにCTDのSer2, 5はリン酸化されて転写は活性化されるが、転写終結時には脱リン酸化されないと次の転写に向かうことができない。このCTD脱リン酸化の主要な遺伝子はFCP1でありその部分欠損はCCFDNという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、同時にFCP1とp53との結合を見出した。FCP1ノックダウンによる「転写ストレス」と「FCP1によるp53制御」の両面から解析を進めている。

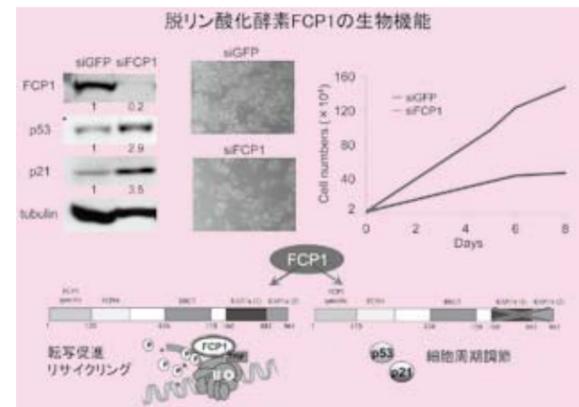


図2 脱リン酸化酵素 FCP1 の生物機能

### 1-2 転写伸長因子ElonginAのDual機能の解析

開始に引き続き mRNA 合成伸長過程は、転写の重要な制御過程である。Elongin は、ABC の3つのサブユニットからなる3量体であるが、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制御機能との2つの活性を持つ。本年度においては、Doxorubicin による DNA 傷害応答において、ElonginA が、Rpb1 サブユニット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

(HSP70 や ATF3、p21 など) の迅速な誘導に関与していることを見出し、転写制御と Rpb1 ユビキチン化とを担うドメインが異なった領域で担われていることを明らかにした。さらに、共同研究拠点の成果として、ElonginA 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見出した。

## 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、種々のストレス刺激によって転写レベルで誘導されるが、多くの場合転写抑制因子として働く。最近、ATF3 がマクロファージや natural killer cell などで免疫にかかわるシグナルを負に制御する negative regulator であることが見出されている。さらに、ATF3 のがんにおける役割も数多く示唆されており、抗がん剤作用に関わる「がん抑制機能」と同時に、ヒト前立腺がんやホジキン Reed-Sternberg 細胞での高発現が、がん細胞の増殖や転移能を正に制御しているなど「発がん機能」も知られている。我々は、がんにおける ATF3 機能の役割を研究しているが、本年度は、ATF3 研究について以下の結果を得た。

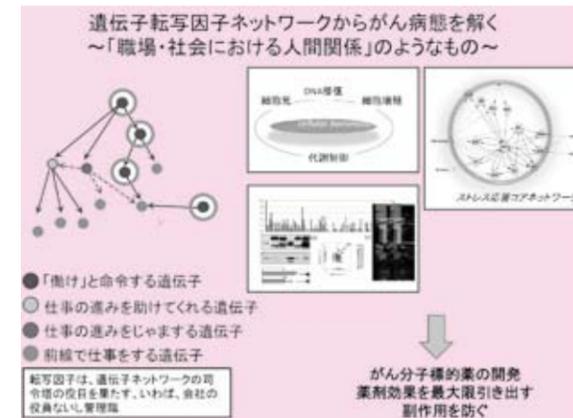


図3 「遺伝子転写因子ネットワークからがん病態を解く」

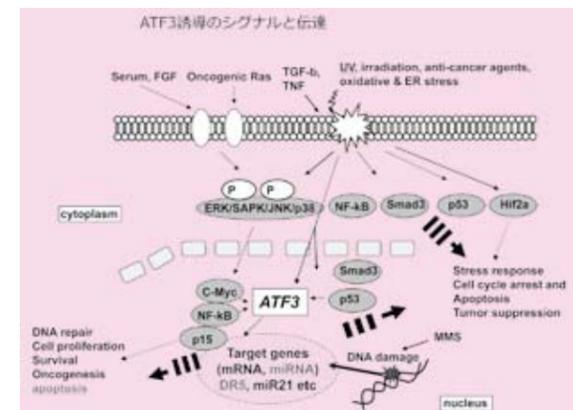


図4 「ATF3誘導のシグナルと伝達」

## 2-1 ATF3によるマイクロRNA制御の探索

近年その生物機能とくにがんとの関わりが注目される microRNA について、ATF3 が転写制御する標的 microRNA の探索を開始した。複数の microRNA promoter に ATF3 が結合することがクロマチン免疫沈降法によって確認され、ATF3 は mRNA だけでなく、non-coding gene の転写制御も介して、生物機能を発揮することが示唆された (佐々木ら、分子生物学会・生化学会発表 2010)。また、近年その生物機能とくにがんとの関わりが注目される microRNA について、ATF3 が転写制御する標的 microRNA の探索を開始した。複数の microRNA promoter に ATF3 が結合することがクロマチン免疫沈降法によって確認され、ATF3 は mRNA だけでなく、non-coding gene の転写制御も介して、生物機能を発揮することが示唆された。

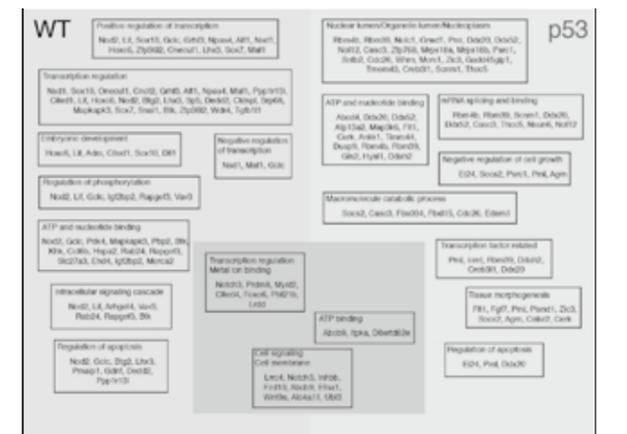


図5 それぞれのマウス株での mRNA と microRNA での正準相関分析 (多変量解析) で mRNA 群と相関があるとされた microRNA 群についての株間での比較

## 2-2 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

ATF3 は、細胞の種類やストレス刺激の条件によって細胞死を誘導または抑制する Opposing role を示す転写因子であるが、これらの異なった Context における ATF3 の標的遺伝子は不明である。我々は、ATF3 が p53 の標的遺伝子であると同時に、p53 転写抑制因子であるネガティブフィードバック制御を見出している。p53-ATF3 axis の意義を解析する目的で、ATF3, p53 の遺伝子改変マウスを作製した。p53/Atf3 の4つの遺伝子背景を有するマウス繊維芽細胞を用いて、DNA 傷害誘導剤 Doxorubicin 応答の mRNA, microRNA 網羅的遺伝子発現解析を行った。現在、解析中であるが、ATF3 と p53 との複雑な競合作用、拮抗作用が明らかになりつつある。

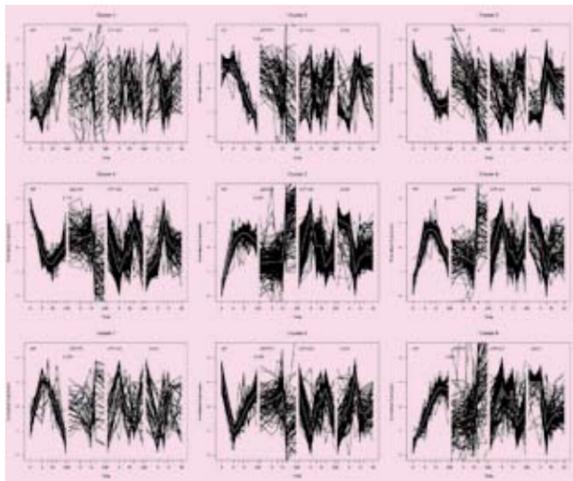


図6 mRNA array 結果のうち、p53 atf3 binding motif 両方を promoter に持つ遺伝子群での clustering

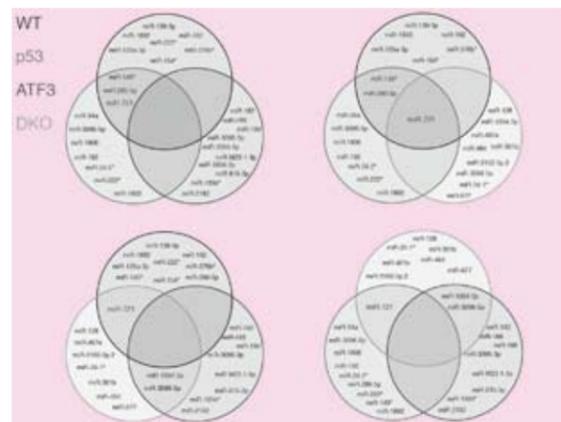


図7 WT p53

## 2-3 ストレス応答遺伝子 ATF3 は p53 依存性および非依存性に DR5 発現を正に制御する

DNA damage 応答の ATF3 網羅的解析から DR5 (Death receptor 5) が ATF3 結合性標的遺伝子であることを見出し、ヒト大腸がん治療薬 Camptothecin が p53 依存性に ATF3 と DR5 の発現を誘導することを見出した。今年度は、さらに、他の DR5 誘導剤が p53 変異大腸がん細胞においても ATF3 を誘導し、DR5 誘導に重要な働きをしていることを見出した。現在、TRAIL と DR5 誘導薬との併用は、難治がんの新しい治療戦略として Phase II の段階にあるが、ATF3 の発現レベルの modulation が DR5 誘導剤の有効な開発につながる可能性がある。

## 3. ヒストンメチル基転移酵素 ASH1 の二面的な転写制御機能

ヒストン修飾が転写のどの過程にどのような影響を与えているのかは、実は必ずしも明らかではない。例えば、ヒストン H3 のリジン 36(K36) のメチル化は酵母で転写伸長を抑制することが知られているが、我々の最近の研究により、K36 特異的メチル基転移酵素の一つ ASH1 は、K4 メチル基転移酵素である MLL と協調して Hox プロモーターを強く活性化するが、ASH1 による K36 メチル化は転写に必須ではなくむしろ抑制することが明らかにされた。さらに、ASH1 の顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーへの関わりが共同研究先の報告で明らかになった。

## 人事異動

転入: 枝川 真(特別研究学生、九州大学大学院)、井上 允(本学医歯学総合研究科博士課程生命理工専攻、本学修士課程)、五嶋大統(本学医歯学総合研究科修士課程、北里大学)、福本悟史(卒業研究生、北里大学)、内田洋平(受入研究生、東京バイオテクノロジー専門学校)、高橋拓也(受入研究生、東京バイオテクノロジー専門学校)、劉 嘉(外国人研究者、中国・吉林大学)

転出: 小高愛未(医歯学総合修士課程、大学院生)、三田村潤(医歯学総合修士課程、大学院生)、大屋沙織(医歯学総合修士課程、大学院生)、平田学(医歯学総合修士課程、大学院生)、宮本大貴(生命情報科学教育部修士課程、大学院生)、宮城知香(生命情報科学教育部修士課程、大学院生)、井上 允(生命情報科学教育部修士課程、大学院生)

## 業績目録

### 原著論文

1. Yasukawa T, Bhatt S, Takeuchi T, Kawauchi J, Takahashi H, Tsutsui A, Muraoka T, Inoue M, Tsuda M, Kitajima S, Conaway RC, Conaway JW, Trainor PA, Aso T. Transcriptional Elongation Factor Elongin A Regulates Retinoic Acid-Induced Gene Expression during Neuronal Differentiation. *Cell Reports* 10.1016/j.celrep.2012.09.031
2. Kawauchi J, Kitajima S. "Mechanism of Transcriptional Termination" in *Encyclopedia of Systems Biology* chapter 1408 (W. Dubitzky, O. Wolkenhauer, K. Cho & H. Yokota (eds), DOI 10.1007/978-1-4419-9863-7. Springer Science+Business Media LLC, 2012
3. Cagianca DS, Casa V, Bodega B, Carvalho C, Ginelli E, Tanaka Y, Carmo-Fonseca M, Gabellini D. A ncRNA regulating a Polycomb/Trithorax

epigenetic switch in muscular dystrophy. *Cell* in press, 2012

4. Taketani K, Kawauchi J, Tanaka-Okamoto M, Ishizaki H, Tanaka Y, Sakai T, Miyoshi J, Maehara Y, Kitajima S. Key role of ATF3 in p53-dependent DR5 induction upon DNA damage of human colon cancer cells. *Oncogene*. 2012 Apr 26;31(17):2210-21.

### 国内学会発表

1. 五嶋 大統, 川内 潤也, 枝川 真, 平田 学, 宮城 知香, 井上 允, 北嶋 繁孝: p 53 非依存性 Death receptor pathway (DR5) 発現誘導における ATF3 の機能. 平成 24 年 12 月、福岡 第 35 回日本分子生物学会
2. 枝川 真, 川内 潤也, 井上 允, 内田 洋平, 田中裕二郎, Paul Sheridan, 山口 類, 井元 清哉, 宮野 悟, 前原 喜彦, 北嶋 繁孝: ストレス応答における P53-ATF3 間の機能的相互作用とその働き. 平成 24 年 12 月、福岡 第 35 回日本分子生物学会

3. 井上 允, 川内 潤也, 安川 孝史, 麻生 梯二郎, 北嶋 繁孝: ストレス反応における mammalian ElonginA の特徴と役割. 平成 24 年 12 月、福岡 第 35 回日本分子生物学会

4. 安川 孝史, Bhatt Shachi, 竹内 保, 川内 潤也, 高橋 秀尚, 筒井 文, 村岡 拓也, 井上 允, 津田 雅之, 北嶋 繁孝, Conaway Ronald C., Conaway Joan W., Trainor Paul A., 麻生 梯二郎: 感覚神経系の発生・分化における転写伸長因子 Elongin A の役割. 平成 24 年 12 月、福岡 第 35 回日本分子生物学会

5. 田中 裕二郎, Daphne Cagianca, Davide Gabellini. ASH1 による顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーの DUX4 遺伝子発現制御機構. 平成 24 年 12 月、福岡 第 35 回日本分子生物学会

6. 川内 潤也, 山口 類, 井元 清哉, 宮野 悟, 北

嶋 繁孝: ストレス誘導性転写因子 ATF3 と p53 の機能的相互作用. 平成 24 年 9 月、札幌 第 71 回日本癌学会学術総会

7. Kawauchi J: Functional interaction between stress response gene ATF3 and p53. 14<sup>th</sup> June 2012, Sendai 第 7 回研究所ネットワーク国際シンポジウム

### 国際学会および海外セミナー

Kitajima S.: Stress Code of P53-Atf3 Axis in Cancer and Anti-cancer Treatment, BIT's 5<sup>th</sup> Annual World Congress of Cancer. Beijing International Convention Center (BICC), Beijing, China. May 18-20, 2012

### 学内外教育活動

北嶋繁孝: 本学医歯学総合大学院、九州大学医学部、高知大学医学部

田中裕二郎: 本学医歯学総合大学院生命理工専攻

### 競争的研究費取得

北嶋繁孝 (代表): 文部科学省新学術領域研究「がん治療抵抗性のシステムの解析」

北嶋繁孝 (代表): 文部科学省基盤研究 (C) 「遺伝子改変マウスを用いた ATF3 の発がんがん抑制研究機能の研究」

田中裕二郎 (代表): 厚生労働省科学研究費「顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーのエピジェネティック病態解明と革新的治療法の開発」

川内潤也 (代表): 若手研究 (B) 「RNA ポリメラーゼ II 転写とリンクする p53 制御機構」

川内潤也 (計画班・分担): 文部科学省新学術領域研究「Pol2 の転写伸長・終結・リサイクル過程におけるチェックポイント制御機構の解明」

## 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  
技術補佐員：佐藤玲子 事務補佐員：田向美春

### 研究内容

ゲノム病理学分野は2013年1月1日付で石川俊平の教授としての赴任に伴い始まった分野である。同日に技術補佐員として佐藤玲子が、1月16日付で事務補佐員として田向美春が採用された。また助教の公募を行い選考委員会の審議を経て砂河孝行が選ばれ2月16日付で採用された。また4月日付で助教を更に1名採用予定である。

研究室の場所はM&Dタワーの24F北側であり2012年度(2013年1月～3月)は研究機材や一般事務用品の設置・搬入、情報インフラの整備を含めた研究室の立ち上げ作業を行った。

ゲノム病理学ではゲノミクス的手法を基盤として、難治性疾患における病理の解明や診断法・治療法に資する研究を行うことを目的としている。主に腫瘍性疾患や炎症・免疫疾患のように多種の細胞による複雑な系のメカ

ニズムについて、包括的に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ていく。実際のヒト疾患組織の解析を通じてゲノミクス解析を臨床現場で応用する為の技術開発・インフラ構築も目的である。

また医科歯科大のプロジェクトとして始まった疾患バイオリソースセンターの会議に加わりインフラ整備や関連書類整備等に参加している。

大学院教育については2013年3月より大学院医歯学総合研究科 先端医療開発学講座に属し「疾患ゲノミクス」分野として受け持つ。疾患のゲノミクスについてその適応や手法・解釈についての一連の流れを学ぶこと及び、ヒト疾患組織に対してゲノム解析を行う為の技術開発・インフラ・ガイドラインについて知り実際のヒト疾患組織解析を通じてゲノム解析の応用的側面を学習することなどを目標としている。

# 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  
GCOE 特任講師：李 知英 非常勤講師：小林 慎 特任助教：成瀬美衣  
技術補佐員：石井雅之

## 研究内容

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、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と、このようなゲノム機能進化と哺乳類の進化の関係についての研究です。もう一つが、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。どちらも、ヒトを含む哺乳類を対象に据えたもので、哺乳類のゲノム機能を遺伝学とエピジェネティクスを統合した研究により解明しようとしています。このような研究から、21世紀におけるヒトの生物学（哺乳類の生物学）の再構築と、その知識に基づいたエピジェネティック医療の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. 哺乳類特異的ゲノム機能の解析

私たちの研究室ではヒトを含む哺乳類のゲノムのなかに、胎生という生殖機構に関係した哺乳類に特異的な機能を与えた遺伝子群の探索を行なっている。特に注目しているのは哺乳類にしか存在しない LTR レトロトランスポゾン由来の遺伝子群である。これまで sushi-ichi レトロトランスポゾンに由来する父親性発現遺伝子 *PEG10* と *PEG11/RTL1* が、ノックアウトマウスを用いた実験から、それぞれ受精卵が子宮に着床した直後に胎盤形成や、胎盤における母子間相互作用の場となる胎児毛細血管の維持に必須な遺伝子として機能していることを明らかにした。これらとおなじ sushi-ichi レトロトランスポゾンに由来する遺伝子群は、真獣類に 11 個保存されており、現在、東海大学健康科学部との共同研究で sushi-ichi レトロトランスポゾンに由来する残りの *SIRH* 遺伝子群 (*Sirh3* ~ *Sirh11*) のノックアウトマウスの機能解析を進めている。これらの遺伝子はほとんどすべてが真獣類に保存されている遺伝子であり、唯一、*PEG10* だけが真獣類と有袋類の 2 つのグループで共通している。昨年、有袋類のゲノムの網羅的解析から、有袋類の系列にのみ獲得された *SIRH12* 遺伝子を発見し

た。本年は哺乳類に存在するもう一つの LTR レトロトランスポゾン由来の遺伝子群である *PNMA* (paraneoplastic Ma antigen) 遺伝子群において同様の解析を行った (図 1: Iwasaki *et al.* DNA Res in press、ハイライト参照)。これらの遺伝子群は新規のものを含めて真獣類には 19 個が確認されたが、これらの相同遺伝子は有袋類には存在しなかった。しかし有袋類にのみ共通する *PNMA-MS1* および南アメリカの有袋類にのみ存在する *PNMA-MS2* 遺伝子を新規に発見した。*SIRH* 遺伝子群の結果とあわせ、LTR レトロトランスポゾンに由来する遺伝子群に関しては、有袋類と真獣類は全く異なるセットの遺伝子群を有することが明らかになった。これらの遺伝子は、哺乳類のこれら 2 つのグループの分岐進化にそれぞれ貢献した可能性が高く、それらの生物学的機能に興味を持たれる。

### 2. 体細胞クローンマウスの成功率の向上

哺乳類で、はじめて体細胞クローン動物となるクローンヒジドリーの誕生が 1997 年に報告されて以来、翌年にマウス、ウシ、そして現在では多くの種において体細胞クローン作製が成功している。この技術は有用家畜類の生産や絶滅危惧種の保存に役に立つだけでなく、ヒトの体細胞クローン胚から作製する ES 細胞 (ntES 細胞) の再生医療利用に大きな可能性を与えている。これは分化した体細胞も初期化により発生全能性を再獲得できることを意味し、近年、話題になっているの iPS 細胞 (誘導多能性幹細胞) の樹立成功へ繋がった。

しかし、体細胞クローン動物の成功率は当初より大きな改善はみられていない。これまで、理化学研究所バイオリソースセンターの小倉淳郎室長との共同研究で、体細胞クローンマウスでは X 染色体の異常な不活性化が起きていることを明らかにし、これを改善するため X 染色体不活性化をひき起す原因遺伝子の *Xist* のノックアウトやノックダウンにより X 染色体不活性化を正常化させ、成功率を約 10 倍に上昇させることに成功した。今回は理化学研究所発生・再生科学総合研究センターの若山照彦チームリーダーとの共同研究で、体細胞クローンマウスの成功率を上昇させるエピジェネティック試薬 (トリコスタチン A) を処理した場合、新生児における

遺伝子発現が著しく改善されていることを報告した。これらの総合的な解析から体細胞クローン技術の実用化が大きく前進される (Kohda *et al.* Cellular Reprogramming 2012)。

## ハイライト

### 哺乳類における *SIRH* 遺伝子群と *PNMA* 遺伝子群の獲得 (図 1)

哺乳類には卵生の単孔類 (カモノハシ、ハリモグラ) と胎生の有袋類 (カンガルー、コアラなど) と真獣類 (ヒト、マウスなど) の 3 つのグループが存在している。真獣類の胎盤の形成には *PEG10*、*PEG11/RTL1* が必須の働きをしているが、これは LTR 型レトロトランスポゾンであるスシイチレトロトランスポ

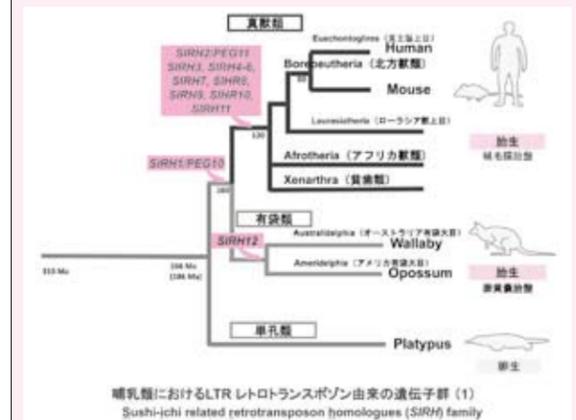
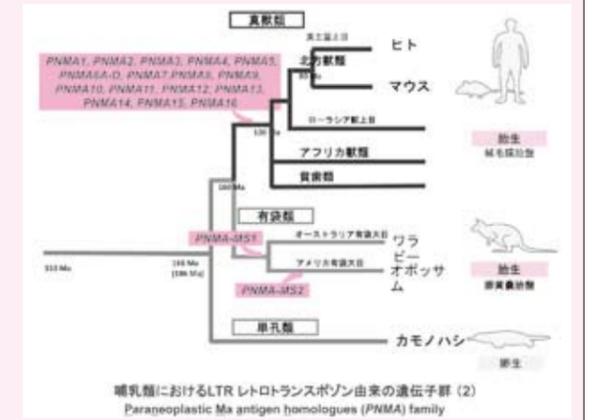


図 1 哺乳類における LTR レトロトランスポゾン由来の遺伝子群  
胎生の哺乳類である真獣類と有袋類には 2 種類の LTR レトロトランスポゾンから内在化した遺伝子が存在している。1 つがスシイチレトロトランスポゾンに由来する *SIRH* 遺伝子で、*PEG10/SIRH1* は真獣類と有袋類の両方に存在するが、*PEG11/SIRH2* および *SIRH3* ~ *SIRH11* は真獣類のみに、*SIRH12* は有袋類にのみ存在している (左図)。もう 1 つは *PNMA* 遺伝子群で基本的に真獣類には 19 個が存在する (*PNMA1* ~ *PNMA19* のうち *PNMA6* は A ~ D の 4 つがタンデムに存在している) が、有袋類は *PNMA-MS1* とオポッサムにのみ存在する *PNMA-MS2* の 2 個だけである。図ではこれらが内在遺伝子として獲得された時期を示している (右図)。Ma は 100 万年前の意味。166, 160, 80 Ma は、それぞれ 1 億 6600 万年前、1 億 6000 万年前、8000 万年前を表す。120 Ma に超大陸パンゲアが分裂し北米、ユーラシア、南米、オーストラリアそして南極に別れ、その後、真獣類や有袋類は大分散と言われる適応進化をはじめが、これら LTR レトロトランスポゾン由来の遺伝子は、それ以前に真獣類の共通祖先、有袋類の共通祖先でそれぞれ獲得されていたことがわかる。

ゾンが哺乳類の祖先ゲノムに侵入した (内在化) 結果、通常の遺伝子と同様に子孫にレトロトランスポゾン由来の DNA が伝わりようになり、長い時間をへて新しい遺伝子へと変化したものである。すなわち、これらレトロトランスポゾン由来の新規遺伝子が哺乳類の進化に大きく関係したことを意味している。このスシイチレトロトランスポゾンに由来する遺伝子群を私たちは *SIRH* 遺伝子と命名し、それぞれの機能の解明を進めている。昨年、有袋類の系列でのみ遺伝子化した *SIRH12* を発見し報告した (One *et al.* DNA Res 2011) が、本年はもう一つの LTR 型レトロトランスポゾン由来の遺伝子群である *PNMA* 遺伝子群の網羅的解析を行った (Iwasaki *et al.* DNA Res in press)。レトロトランスポゾンから内在遺伝子化する機構はドメスティケーション、イグザブテーション、コオプテーションなどと呼ばれる。*SIRH* 遺伝子群と *PNMA* 遺伝子群の分布から、合わせて 30 個近くの遺伝子が真獣類と有袋類の 2 つの系統に別々に獲得されていることが明らかになった。これらの遺伝子が哺乳類進化へどのような寄与をしたのか関心が高まっている。





# ゲノム応用医学研究部門 生命情報学分野

教授：田中 博 准教授：新村芳人 助教：茂樺 薫

## 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、「システムとして病気を理解する」システム分子医学を提唱している。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。これまでの疾病観にかわる、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。医学分野では、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 (顕著な業績)

発現ポテンシャル場に基づいた細胞の状態遷移を誘導する遺伝子の推定 “Expression trajectories” of reprogramming and differentiation on expression potential field. Miyamoto T, Ogishima S, Nakaya J, Tanaka H

本論文は、日本バイオインフォマティクス学会の Oxford Journal 賞を受賞した。

線維芽細胞に山中因子を導入するなど、体細胞に数種類の遺伝子を導入することで、誘導多能性幹 (iPS) 細胞を樹立可能である。この機構を理解するための概念として、Waddington のランドスケープが引用されることが多い。本研究では、遺伝子発現データに基づ

いて、Waddington のランドスケープに代わる細胞の状態安定性を示す細胞状態ランドスケープを構築し、目的細胞への状態遷移を誘導する遺伝子探索を行う。まず、ヒト iPS 細胞やその樹立に用いた線維芽細胞、ヒトの組織から得られた成熟細胞など合計 956 サンプルのマイクロアレイデータを用い、発現変動の大きい 603 遺伝子を抽出した。これらの遺伝子を用いた主成分分析により、多能性をもった ES/iPS 細胞や再プログラム化前の線維芽細胞、分化誘導細胞群、発達中の胚、神経系・非神経系の成熟組織などに分類された。次に、遺伝子発現量に基づいて各細胞状態の出現頻度を求め、細胞状態の頻度分布を作成した。この頻度分布を各細胞状態の実現確率の近似と考え、主成分分析で構成された平面に新たな次元として加え、網羅的な細胞状態の安定性を表した細胞状態ランドスケープ (発現ポテンシャル場) を構築した。これによって、例えば、線維芽細胞から iPS 細胞への再プログラム化は谷から山を越えて別の谷へ移るように解釈できる。さらに、発現ポテンシャル場を用いて、目的細胞への誘導における各遺伝子の寄与度を計算することで、誘導因子探索を行った。線維芽細胞から iPS 細胞への状態遷移の場合、寄与度の大きい遺伝子、つまりその状態遷移を誘導する度合いの大きい転写因子をコードする遺伝子の上位には山中因子の一つである Sox2 や幹細胞でのメチル化と関連する因子が推定された。本研究で、構築された発現ポテンシャル場は網羅的な細胞状態の安定性を評価したもので、目的細胞への誘導における因子探索も行える有用な解析手法である。

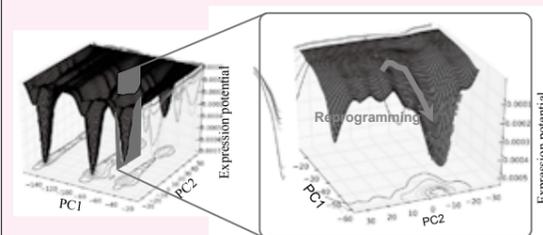


図1 発現ポテンシャル場。リプログラミングは、線維芽細胞の谷から山を越えて iPS 細胞の谷へ移るといように解釈できる

## 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。また最近では、次世代シーケンシング技術によるゲノムや転写産物の配列解析も主流になりつつある。これらの膨大な生物学的ビッグデータから有用な知見を引き出すためには、生物学や医学の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、学内外の臨床各科と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) 次世代シーケンサーを用いた脊髄小脳変性疾患や肝細胞癌の解析、(4) DNA メチル化解析による遺伝子発現制御機構の解明、(5) タンパク修飾の動態解析など、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。疾患の分子生物学的プロセスの解明のみならず、より正確な診断方法や治療標的分子の探索など、オミックス医療の実現に向けた研究を推進している。

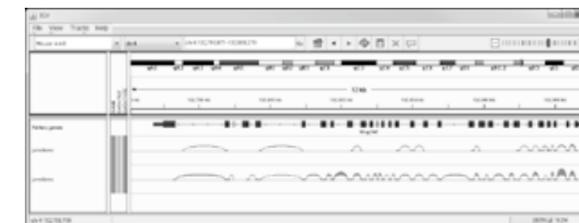


図2 脊髄小脳変性疾患モデルマウスで得られた RNA-seq データをゲノムにマッピングした例

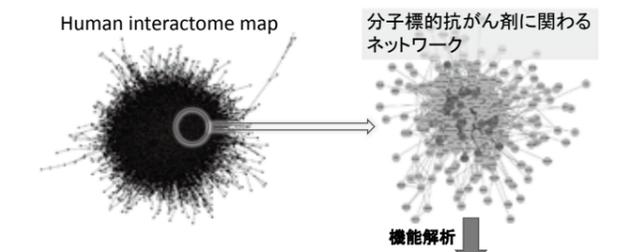
## 2. 癌・転移 (EMT)・アルツハイマー病の疾患進行のシステム病態解析

網羅的分子生物 (オミックス) データによる、癌およびその転移の分子メカニズムに関与する上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition: EMT)、神経変性疾患であるアルツハイマー病のシステム病態研究に取り組んでいる。疾患の発症・進行の転写調節ネットワーク、遺伝子調節ネットワークとタンパク質間相互作用ネットワークを推定し、それらのネットワークにおいてキーとなるマスター因子の探索を行っている。さらに、これらの疾患の発症・進行、細胞転換 (EMT)、細胞分化 (iPS/ES 細胞) のプロセスについて、遺伝子調節ネットワークからそれぞれの細胞状態のアトラクターを規定し、そ

の遷移の解析も行っている。こうしたシステム病態研究におけるオミックスデータ解析のためにはデータ統合が必要となる。そのための情報基盤の整備として、Linked Data による難治性疾患のデータの統合にも取り組んでいる。

## 3. 複雑な分子間相互作用ネットワークを解析する手法の開発とその薬剤標的分子探索への応用

網羅的なタンパク質間相互作用ネットワークの情報は、薬剤標的分子の予測およびその副作用の予測などを行う際に、システムの視点からの理解を助ける重要なツールとなっている。しかしながら、タンパク質間相互作用ネットワークは極めて複雑かつ巨大であり、このネットワークから生物学的に有用な情報を取り出すのは難しい。この問題を解決するために、我々は、複雑な巨大ネットワークから、任意の大きさのシンプルなサブネットワークを抽出する手法を開発した。この手法を人のタンパク質間相互作用ネットワークに適用し調査を行ったところ、薬剤のターゲットはある特定のサブネットワークに集中して存在することを発見した。例えば、ある一つのシンプルなサブネットワークは、分子標的抗がん剤の既存のターゲットの半数以上を含み、このサブネットワークは複数の重要なシグナリングパスウェイ (例えば、血管内皮増殖因子に関わるシグナリングパスウェイや、チロシンキナーゼに関するシグナリングパスウェイ) に関わっていることが判った。このようなサブネットワークに含まれる分子やその間の相互作用を集中して調べることにより、新しい薬剤標的分子の探索や、既存の薬剤の mechanisms of action に関する調査を効率よく進めることが出来ると期待される。



GO biological process	FDR q-value	Enrichment
vascular endothelial growth factor signaling pathway	7.37E-11	39.34
JAK-STAT cascade involved in growth hormone signaling pathway	1.01E-20	31.35
transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	3.69E-39	7.04

図3 分子標的抗がん剤に関わるサブネットワークの抽出と機能解析。左図は人のタンパク質間相互作用ネットワークの全体図。右図は、左図に示したネットワークから抽出された、分子標的抗がん剤に関わるシンプルなサブネットワーク。右図の赤丸は、既に判明している、分子標的抗がん剤の標的分子となっている蛋白質を表している。この赤丸のノードの近傍に位置するノードの中に、新たな薬剤標的分子の候補となりうる蛋白質が含まれていると予測される。下表は、右図のサブネットワークに対して機能解析を行った結果を示している。このサブネットワークは、血管内皮増殖因子に関わるシグナリングパスウェイ、Jak-Stat シグナリングパスウェイ、そして、チロシンキナーゼに関するシグナリングパスウェイに関わっていることが示唆される。

## 業績目録

### 原著

- Boeck M, Ogishima S, Tanaka H, Kramer S, Kaderali L: Hub-centered gene network reconstruction using automatic relevance determination. PLoS ONE, 7(5):e35077, 2012
- Katayama Y, Maeda M, Miyaguchi K, Nemoto S, Yasen M, Tanaka S, Mizushima H, Fukuoka Y, Arii S, Tanaka H: Identification of pathogenesis-related microRNAs in hepatocellular carcinoma by expression profiling. ONCOLOGY LETTERS, 4:817-23, 2012
- Khamas A, Ishikawa T, Mogushi K, Iida S, Ishiguro M, Tanaka H, Uetake H, Sugihara K: Genome-wide screening for methylation-silenced genes in colorectal cancer. International Journal of Oncology, 41:490-6, 2012
- Khamas A, Ishikawa T, Shimokawa K, Mogushi K, Iida S, Ishiguro M, Mizushima H, Tanaka H, Uetake H, Sugihara K: Screening for epigenetically masked genes in colorectal cancer using 5-Aza-2'-deoxycytidine, microarray and gene expression profile. Cancer Genomics & Proteomics, 9:67-75, 2012
- Kikuchi A, Ishikawa T, Mogushi K, Ishiguro M, Iida S, Mizushima H, Uetake H, Tanaka H, Sugihara K: Identification of NUCKS1 as a colorectal cancer prognostic marker through integrated expression and copy number analysis. International Journal of Cancer, Doi:10.1002/ijc.27911, 2012
- Mayinuer A, Yasen M, Mogushi K, Obulhasim G., Xieraili M, Aihara A, Tanaka S, Mizushima H, Tanaka H, Arii S: 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. DOI 10.1245/s10434-012-2395-2, 2012
- Miyaguchi K, Uzawa N, Mogushi K, Takahashi K.I, Michikawa C, Nakata Y, Sumino J, Okada N, Mizushima H, Fukuoka Y, Tanaka H: Loss of NKX3-1 as potential marker for an increased risk of occult lymph node metastasis and poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. International Journal of Oncology, 40:1907-14, 2012
- Mizuno S, Iijima R, Ogishima S, Kikuchi M, Matsuoaka Y, Ghosh S, Miyamoto T, Miyashita A, Kuwano R, Tanaka H: AlzPathway: a comprehensive map of signaling pathways of Alzheimer’s disease. BMC Syst Biol, 6:52, 2012
- Nomura F, Sogawa K, Noda K, Seimiya M, Matsushita K, Miura T, Tomonaga T, Yoshitomi H, Imazeki F, Takizawa H, Mogushi K, Miyazaki M, Yokosuka O: Serum anti-Ku86 is a potential biomarker for early detection of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. Biochem Biophys Res Commun, 421:837-43, 2012
- Nukaya S, Shino T, Kurihara Y, Watanabe K, Tanaka H: Noninvasive Bed Sensing of Human Biosignals via Piezoceramic Devices Sandwiched Between the Floor and Bed, IEEE SENSORS JOURNAL , 12:431-438, 2012
- Obulhasim G, Yasen M, Kajino K, Mogushi K, Tanaka S, Mizushima H, Tanaka H, Arii S, Hino O: Up-regulation of dbpA mRNA in hepatocellular carcinoma associated with metabolic syndrome. Hepatology International, Doi: 10.1007/s12072-012-9357-4, 2012
- Okazaki S, Ishikawa T, Iida S, Ishiguro M, Kobayashi H, Higuchi T, Enomoto M, Mogushi K, Mizushima H, Tanaka H, Uetake H, Sugihara K: Clinical significance of UNC5B expression in

- colorectal cancer. International Journal of Oncology, 40:209-16, 2012
- Shimada S, Mimata A, Sekine M, Mogushi K, Akiyama Y, Fukamachi H, Jonkers J, Tanaka H, Eishi Y, Yuasa Y: Synergistic tumour suppressor activity of E-cadherin and p53 in a conditional mouse model for metastatic diffuse-type gastric cancer. Gut, 61:344-53, 2012
- Sekiya I, Ojima M, Sizuki S, Yamaga M, Horie M, Koga H, Tsuji K, Miyaguchi K, Ogishima S, Tanaka H, Muneta T: Human mesenchymal stem cells in synovial fluid increase in the knee with degenerated cartilage and osteoarthritis. Journal of Orthopaedic Research, 30:943-9, 2012
- Suzuki S, Takai-Igarashi T, Fukuoka Y, Wall DP, Tanaka H, Tonellato P.J: Systems analysis of inflammatory bowel disease based on comprehensive gene information. BMC Medical Genetics, Apr 5; 13:25, 2012
- Xieraili M, Yasen M, Mogushi K, Obulhasim G, Mayinuer A, Aihara A, Tanaka S, Mizushima H, Tanaka H, Arii S: Villin 1 is a predictive factor for the recurrence of high serum alpha-feto-protein-associated hepatocellular carcinoma after hepatectomy. Cancer Science, 103:1493-501, 2012
- Yae T, Tsuchihashi K, Ishimoto T, Motohara T, Yoshikawa M, Yoshida GJ, Wada T, Masuko T, Mogushi K, Tanaka H, Osawa T, Kanki Y, Minami T, Aburatani H, Ohmura M, Kubo A, Suematsu M, Takahashi K, Saya H, Nagano O: Alternative splicing of CD44 mRNA by ESRP1 enhances lung colonization of metastatic cancer cell. Nature Communications, 6:883, 2012
- Yasen M, Obulhasim G., Kajino K, Mogushi K, Mizushima H, Tanaka S, Tanaka H, Hino O, Arii S: DNA binding protein A expression and methylation status in hepatocellular carcinoma and the adjacent tissue. International Journal of Oncology, 40:789-97, 2012

#### 著書

- 田中博　他（共著）：災害医療と IT、第1章 医療と IT- 有事における可能性を探る　東日本大震災と医療 IT、ライフメディコム、18-29、2012
- 田中博　他（編著）：災害医療と IT、第1章 医療と IT- 有事における可能性を探る　ライフメディコム、2012
- 田中博　他（共著）：新しい薬学事典、A 基礎医学「A18 オミックスと創薬」朝倉書店、2012
- 田中博、高井貴子、荻島創一、茂樺薫、長谷武志、著：先端医療と創薬のための疾患システムバイオロジー-オミックス医療からシステム分子医学へー、大学用　図書目録2013、培風館、2012
- 田中 博：生物学「ゲノム医学革命」、今度こそ本当か、大学用　図書目録2013、培風館、43、2012
- 新村芳人：興奮する匂い 食欲をそそる匂い～遺伝子が解き明かす匂いの最新線～、技術評論社、2012
- Niimura Y: Evolution of chemosensory receptor genes in primates and other mammals. Post-Genome Biology of Primates, Primatology Monographs (eds. Hirai H, Imai H, Go Y), Springer, 2012
- Hase T, Niimura Y: Protein-protein interaction networks: Structures, evolution, and application to drug design. Protein Interaction / Book 2 (ed. Weibo Cai), InTech, 2012
- 新村芳人 他（共著）：嗅覚受容体遺伝子ファミリー、『化学受容の科学』（東原和成 編）、化学同人 DOJIN BIOSCIENCE シリーズ、2012
- 新村芳人　他（共著）：ゲノムの大きさ、『進

化学事典』（日本進化学会 編）、共立出版、2012
11. 荻島創一、茂樺薫　他（共著）：秋山徹 監、井元清哉・河府和義・藤湖航 編、「バイオ実験に絶対使える 統計の基本Q&A」羊土社、2012

#### 総説

- 田中 博：病医院連携と ICT ①　超高齢化社会と病医院完結型医療の破綻、医師のための経営情報、10月号、2-3、2012
- 田中 博：総論・進むべき連携の視座を説く 地域医療連携システムの進展と日本版 PHR の動向、月刊新医療、9月号、24-28、2012
- 田中 博：患者情報を電子化・共有　被災3県で導入へ、毎日新聞 2012年7月19日号
- 田中 博：薬剤開発とオミックス-先制医療、個別化医療、システム分子医学での薬剤開発ー、最新医学、67(3):122-127、2012
- 田中 博：「ICT で実現する新たな “日本の医療”」、週刊医学界新聞　医学書院、第 2971 号：1-3、2012
- 田中 博：災害時と震災後の医療 IT 体制、情報管理、54(12):825-835、2012
- Niimura Y: Olfactory receptor multigene family in vertebrates: from the viewpoint of evolutionary genomics. Current Genomics 13, 103-111, 2012

#### 国際学会

- Tanaka H: Disaster-Tolerant Architecture of Regional Healthcare System with Special Reference to Great East Japan Earthquake Disaster, Advances in Environmental Science and Sustainability, Sliema, Malta, Sep 7-9, 2012
- Tanaka H: Systems-Pathology of Cancer - Metastasis and Drug Discovery, The 5th International Symposium for Future Technology Creating Better Human Health and Society,” Signal Transduction in Cancer and Infectious Diseases: Prevention, Diagnosis and Therapy”, Okayama University, Okayama, Japan, March 15-16, 2012
- Niimura Y, Hase T: Difference in gene duplicability may explain the difference in overall structure of protein-protein interaction networks among eukaryotes, Annual meeting of the Society for Molecular Biology and Evolution, Dublin, Ireland, June 2012
- Matsumae H, Hamada M, Fujie M, Tanaka H, Niimura Y, Kawashima T: Expression analysis in neural tissues of the Chordate, Ciona intestinalis by the use of a customized microarray, Society for Molecular Biology and Evolution Annual Meeting, Dublin, Ireland, June, 2012
- Ogishima S, Kikuchi M, Miyashita A, Kuwano R, Tanaka H: Network-based inference of signature genes in Alzheimer’s disease progression as an attractor of a disease state, ISMB 2012, Long Beach, USA, July, 2012
- Kikuchi M, Ogishima S, Miyamoto T, Tanaka H. Network analysis of the progression of Alzheimer’s disease by gene expression data. ISMB 2012, Long Beach, USA, July, 2012

#### 国内学会

- Subati S, Mogushi K, Yasen M, Tanaka H: 肝細胞癌の DNA メチル化における遺伝子とバスケイの同定、第 35 回日本分子生物学会年会、福岡、2012年12月
- Kishimoto T, Kondo J, Takai-Igarash T, Tanaka H: A Novel Method for Analyzing Protein Termini, 生命医薬情報学連合大会、東京、2012年10月
- Tanaka Y, Takai-Igarash T, Tanaka H, Yura

- Classification of Steroid-binding Proteins Based on Residue Propensity and Molecular Function, 生命医薬情報学連合大会、東京、2012年10月
- Kaminuma T, Ogishima S, Hase T, Mogushi K, Yukawa M, Komiyama N, Tanaka H: Frame design and partial implementation of the CADU platform, 生命医薬情報学連合大会、東京、2012年10月
- Miyamoto T, Ogishima S, Nakaya J, Tanaka H: “Expression trajectories” of reprogramming and differentiation on expression potential field, 生命医薬情報学連合大会、東京、2012年10月
- 馬合木特　亜森、古来木拜尔　鳥布力哈斯木、マイスル　アブドラフマン、茂樺薫、飯島久美子、水島洋、田中博、有井滋樹、田中真二：肝細胞癌における PTP4A3/PRL-3 の異常発現とその臨床的意義、第 71 回日本癌学会学術総会、札幌、2012年9月
- 飯島久美子、茂樺薫、馬合木特　亜森、田中真二、有井滋樹、田中博：肝細胞がんにおける全 MAGE ファミリー遺伝子の発現変動、第 71 回日本癌学会学術総会、札幌、2012年9月
- 松井淳、新村芳人：哺乳類における霊長類の嗅覚受容体遺伝子レパトリーの進化、第 28 回日本霊長類学会大会、名古屋、2012年7月
- Sawai H, Takai- Igarash T, Nakaya J, Tanaka H: A Pathway Based Prioritization for Risk Genes of Bipolar Disorder, 生命医薬情報学連合大会、東京、2012年10月
- Ueno E, Takai-Igarash T, Tanaka H: Simulation of K+ ion flux in the gap junction network in Cochlea in the Inner Ear, 生命医薬情報学連合大会、東京、2012年10月
- Hirano K, Takai-Igarash T, Nakaya J, Tanaka H: Extraction of Binary Relationships from the Literatures on Aging Studies, 生命医薬情報学連合大会、東京、2012年10月
- 古来木拜尔　鳥布力哈斯木、馬合木特　亜森、茂樺薫、飯島久美子、水島洋、田中真二、田中博、有井滋樹、樋野興夫：メタボリックシンドロームに伴う肝細胞癌の網羅的遺伝子発現プロファイルの構築、第 71 回日本癌学会学術総会、札幌、2012年9月
- 松井淳、郷康広、豊田敦、会津智幸、石崎比奈子、今井啓雄、藤山秋佐夫、平井啓久、新村芳人：Exome データを利用した霊長類の嗅覚受容体遺伝子の比較解析、日本進化学会第 14 回大会、東京、2012年8月

#### 招待講演

- 田中 博：がんのシステムパソロジー-転移と創薬、生命医薬情報学連合大会（CBI学会年次大会）「情報学がつなぐこれからの生命医学」、東京、2012年10月
- 田中 博：がんの転移と創薬に関するシステム分子医学、横浜市立大主催シンポジウム、横浜、2012年10月
- 田中 博：Systems-pathological approach to cancer - metastasis and drug discovery, 11th Surugadai International Symposium “New Waves of Omics Research”「オミックス研究の新しい潮流」、東京、2012年7月
- 田中 博：先制医療・創薬のための疾患システムバイオロジー　オミックス医療からシステム分

- 子医学へ、日本プロテオーム学会、東京、2012年7月
- 田中 博：Systems-pathological approach to cancer -metastasis and drug discovery-、第 2 回日中がん研究シンポジウム、幕張、2012年5月
- 田中 博：Systems-pathology of cancer - metastasis and drug discovery、岡山大学国際シンポジウム、岡山、2012年3月
- 田中 博：災害時および復興後の医療 ICT 体制のグラウンドデザイン、第 1 回横浜工医連携研究開発セミナー、横浜、2012年1月
- 田中 博：シンポジスト「最先端医学と統合医療」第 15 回日本統合医療学会　埼玉大会、大宮、2012年1月
- 長谷武志:網羅的な標的探索と標的データベースの現状、第 330 回 CBI学会研究講演会「GWAS、オミックス　経路網からの標的探索 -期待と現実と対策、東京、2012年8月
- 田中博:地域包括ケアプロジェクトの展望、ヘルスケアサービス BIZ フォーラム 2012、青森、2012年12月
- 田中 博：地域医療福祉情報連携の将来像、地域医療福祉情報連携に関する教育講座　第3回地域医療福祉情報連携の現状と今後、仙台、2012年12月
- 田中 博：日本における地域医療 IT 体制の動向と将来展望、地域医療情報連携推進機構シンポジウム　日米における医療 IT の動向と将来展望、東京、2012年12月
- 田中 博：地域医療連携ネットワークによる地域医療の再生、第 40 次市町村ゼミナール 第 9 講「地域医療連携ネットワークによる地域医療の再生」、名古屋、2012年11月
- 田中 博：電子カルテと IT 医療～中小病院にとつてのこれらの医療 IT ～、医療情報システムフェア 2012、岐阜、2012年11月
- 田中 博：コーディネーターの定義・役割と地域医療福祉連携の基本構造、地域医療福祉情報連携に関する教育講座　第 2 回地域医療福祉情報連携コーディネーター育成講座、仙台、2012年11月
- 田中 博：システム分子医学と次世代統合臨床オミックスデータベース、日経バイオテクノロフェッショナルセミナー「個別化医療におけるゲノムデータベースの活用ーゲノムデータベースは創薬と医療に役立つかー」、東京、2012年11月
- 田中 博：今後の医療におけるどこでも MY 病院の在り方、どこでも MY 病院山梨大会ー地域で支える新しい糖尿病対策を、私たちやまなしから、山梨、2012年9月
- 田中 博：圏域階層的な地域医療情報連携を目指して、JBHC 医療総合セミナー 2012、東京、福岡、大阪、2012年5月
- 田中 博：がんシステム分子生物学の現状と将来、東工大 GP シンポジウム、東京、2012年3月
- 田中 博：パネリスト「災害時を想定した医療のあり方」、市民フォーラム「平時から災害時に耐え得る医療を目指して」、東京、2012年3月
- 田中 博：システム分子医学とがんへの応用、国際シンポジウム：統合医療におけるがんの予防および治療、東京、2012年2月
- 田中 博：システム分子医学の現状と展望、第 1 回岐阜遺伝子情報研究会、岐阜、2012年2月
- 田中 博：地域医療再生と情報連携、地域医

療福祉情報連携協議会　第 3 回シンポジウム　福島における地域医療再生と情報連携～放射線と健康リスクをいかに考えるか？～、東京、2012年2月
24. 田中 博：オミックス医療からシステム分子医学へ　～オミックス医療研究会の目指すもの～、第 1 回オミックス医療研究会交流フォーラムゲノム臨床医学の実現に向けて、東京、2012年1月
他 5 件

#### 研究助成金

- 田中 博（代表）：厚生労働科学研究費補助金　地域医療基盤開発推進研究事業「地域医療連携の全国普及を目指した地理的境界や職種の境界を越えた安全な情報連携に関する研究」
- 田中 博（代表）：厚生労働科学研究費補助金　地域医療基盤開発推進研究事業「被災地における地域医療情報連携体制のあり方に関する研究」
- 田中 博（代表）：文部科学省科学研究費補助金　挑戦的萌芽研究「腫上皮間葉転換における癌アトラクターの解明」
- 田中 博（分担）：文部科学省科学研究費補助金　基盤研究(C)「動脈老化と動脈中膜変性疾患（大動脈解離、脳動脈瘤、脳動脈解離）のプロテオーム解析」
- 田中博（分担）：文部科学省科学技術振興機構（CREST）戦略的創造研究推進事業「精神・神経疾患の分子病態理解に基づく診断・治療へ向けた新技術の創出、プルキンエ細胞変性の分子病態に基づく診断・治療の開発」
- 新村芳人（代表）：文部科学省 科学研究費 若手研究(B)「嗅覚受容体遺伝子ファミリーを用いた遺伝子重複によるゲノム進化の解析」
- 荻島創一（代表）：文部科学省 科学研究費 若手研究(B)「発生・分化システムの時系列遺伝子発現の安定状態（アトラクター）の同定と遷移解析」

#### その他

#### 学会主催

- 田中博:オミックス医療研究会シンポジウム 創薬 PG x 分科会&データベース分科会「統合的オミックス研究が拓く創薬・医療の将来と社会的課題」、理化学研究所（横浜）、会長、2012年12月26日
- 田中博:生命医薬情報学連合大会「情報学がつなぐこれからの生命医学」、東京、会長、2012年10月14日～17日
- 田中博:地域医療福祉情報連携協議会　第 4 回シンポジウム　災害復興の IT 進展と地域医療福祉情報連携の新たな方向性～クラウド、IT 新技術が地域医療福祉介護連携に与える影響～、東京医科歯科大学、会長、2012年6月27日
- 田中博:地域医療福祉情報連携協議会　第 3 回シンポジウム　福島における地域医療再生と情報連携～放射線と健康リスクをいかに考えるか？～、東京医科歯科大学、会長、2012年2月4日

#### 学内外の教育活動

田中博：奈良先端科学技術大学講師　生命情報学 授業

# 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

### 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) 共通の標的ス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、本研究では 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し、口腔癌の診断に関する新しい分子マーカーや治療の標的を検索することを目的として研究を行った。

### p63 は Wnt シグナル標的遺伝子発現を活性化する

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で高発現し、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、扁平上皮がんで最も優勢に発現している  $\Delta Np63\alpha$  アイソフォームが TCF4 と  $\beta$  カテニン存在下で強く発現誘導した。 $\Delta Np63\alpha$  は GSK-3 $\beta$  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  $\Delta Np63\alpha$  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 $\beta$  のリン酸化も、 $\beta$  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  $\Delta Np63\alpha$  は TCF4 と結合していたが、 $\beta$  カテニンと  $\Delta Np63\alpha$  の結合は検出されなかった。多くの組織の腫瘍化過程で APC の変異などによる Wnt シグナル伝達の活性化が起こるが、p63 が発現している扁平上皮がんでは、核内で  $\Delta Np63\alpha$  が TCF/LEF と相互作用して Wnt 標的遺伝子発現を増強すると考えられる。

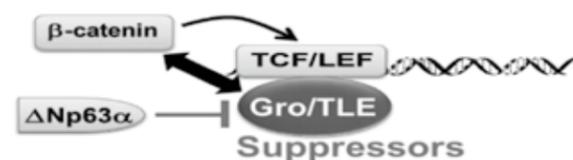


図  $\Delta Np63$  で活性化される Wnt ターゲット遺伝子(仮説)

## 業績目録

### 学会

1. p63 enhances Wnt target gene expression by nuclear complex formation with beta-catenin and TCF.  
Iyoko Katoh, Nahoko Fukunishi, Ryu-Ichiro Hata, Shun-ichi Kurata  
第 71 回日本癌学会学術総会 札幌 九月
2. p63 は Wnt シグナル標的遺伝子発現を活性化する  
倉田俊一 福西菜穂子 畑 隆一郎 加藤 伊陽子  
第 85 回日本生化学会 福岡 12 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

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

## 先端分子医学研究部門

准教授：菅波孝祥

### 1. 肥満の脂肪組織炎症に関する研究：

肥満を基盤として発症するメタボリックシンドロームの分子基盤として、全身の軽度の慢性炎症が注目されている。実際、肥満の脂肪組織ではマクロファージの浸潤が増加すること報告されており、脂肪細胞とマクロファージの相互作用により誘導される慢性炎症がメタボリックシンドロームの基盤病態と考えられる。最近、我々は、脂肪組織炎症の新たな調節分子として macrophage-inducible C-type lectin (Mincle) を同定した。Mincle は、飽和脂肪酸 / Toll-like receptor 4 (TLR4) 経路により発現が誘導され、肥満の脂肪組織マクロファージに高発現する。Mincle 欠損マウスに高脂肪食を負荷すると、野生型マウスと同程度の体重増加を認めるが、肝臓などにおける異所性脂肪の沈着は有意に軽減し、一方、脂肪組織重量は増加した。脂肪組織では、脂肪細胞のサイズが増大し、間質線維化の抑制が認められた。この時、Mincle 欠損マウスは全身の糖代謝も良好に保たれた。本研究により、Mincle が肥満の脂肪組織炎症の新しい制御分子であり、特に、体内脂肪分布の調節に重要な役割を果たすことが示唆された。

### 2. 飽和脂肪酸による炎症制御機構に関する研究：

飽和脂肪酸は、肥満における主要な炎症惹起因子と考えられるが、その炎症性サイトカイン誘導機構の全容は明らかになっていない。本研究では、既に明らかにした病原体センサー TLR4 を介する経路に加え、新しい炎症制御機構を検討した。マクロファージを用いたマイクロアレイ解析により、飽和脂肪酸は、主に TLR4 非依存的にストレス応答性転写因子 activating transcription factor 4 (ATF4) とその下流の経路を強力に活性化することを見出した。ATF4 ヘテロ欠損マウス由来マクロファージでは、飽和脂肪酸や小胞体ストレスにより誘導される炎症性サイトカイン発現が野生型よりも減弱した。一方、TLR4 リガンド刺激による炎症性サイトカイン発現には、全く差を認めなかった。さらに、マクロファージに ATF4 を過剰発現すると、TLR4 リガンド刺激による炎症性サイトカイン発現が相乗的に増強した。本研究により、ATF4 は、飽和脂肪酸により活性化

されるストレス応答経路と炎症性サイトカイン発現とを結ぶ重要な制御因子であることが明らかになった。

## 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、それを通じて臨床で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。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

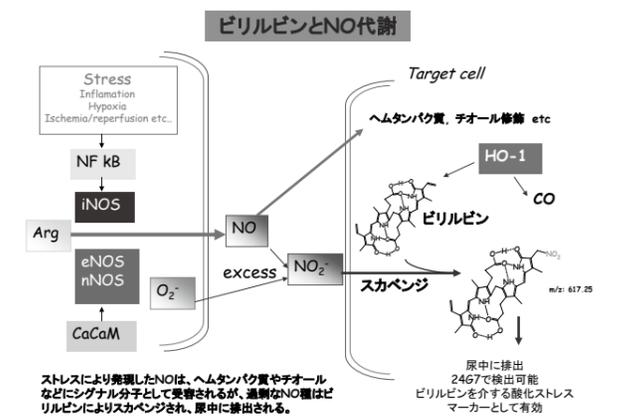
#### “酸化ストレスマーカーとしてのバイオピリンの研究”

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。21～22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-NO<sub>2</sub>) 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)。また本年度は、新たに慶應義塾大学医学部医化学において指導していた大学院生が博士課程終了後、当プロジェクト研究室に社会人専攻生として入学して ROS (活性酸素種) 生成メディエーターとして作用する微量

金属とビリルビン代謝系とのクロストークの解明：高感度微量元素測定キットの開発をテーマとして研究をスタートしたが、すでに各種金属元素をマイクロプレートリーダーで迅速定量可能なキットを開発した。

#### 今年度の研究方針について：

- (1) ヒト尿中において体内の酸化ストレス (心理的ストレス、虚血性心疾患、脳梗塞、手術侵襲など) を簡単に測れるストレス・チェッカー (ICC: 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-O<sub>2</sub>・) 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 (NO<sub>2</sub>-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)日立ハイテックとの共同実験で、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 (NO<sub>2</sub>-bilirubin) であることを確認した。
- (5) ROS 生成メディエーターとして作用する微量金属とビリルビン代謝系とのクロストーク解明：高感度微量元素測定キットの開発 (AKJ Global Tech)。
- (6) 抗ビリルビンモノクローナル抗体 24G7 (mAb 24G7) のエピトープの完全解明。



## ゲノム応用医学研究部門

**助教** : **左雨秀治**

　　今年は、文京学院大学・保健医療技術学部・臨床検査学科の4年生2名、福田有紗と米田優衣卒研生が4月から卒業研究のため研究に参加した。研究課題は「ラット門脈血と循環血における血液成分の比較」で9週齢SD系オスラットを2日間絶食した群と絶食しなかった群の門脈血と循環血において、血糖値や脂質・蛋白、血液像に差が見られるのではないかと推察し、各群で門脈血と循環血の採取を行い、血液像用の塗抹標本と生化学測定用血漿サンプルを測定時まで−30℃で保存した。結果は、両群とも門脈血と循環血では、グルコース・トリグリセライド・ヘモグロビン濃度が循環血群の方が高値を示した。また、絶食した群で血小板数と好酸球数に増加が見られ、グルコース・トリグリセライド・リン脂質・ALTで減少し、2012年卒業研究集録に掲載された。その他の研究としては、漢方薬大柴胡湯の脂質代謝への影響について、ICRオスマウスに大柴胡湯と大柴胡湯から1生薬を抜いた群を配合した高脂肪飼料を6週間食餌させ、体重を毎週測定し体重の増加率を正常群、高脂肪群と漢方薬配合群と比較すると有意に高脂肪群に比べて大柴胡湯群が低値を示した。また、1生薬抜いた群では、大柴胡湯群に比して大黄・枳実・芍薬・生姜・黄芩の各生薬を抜いた群体重の増加が認められた。また、血中脂質については、総コレステロール値が高脂肪群に対して、大柴胡湯群並びに1生薬を抜いた全ての群で有意に減少した。この研究については、日本薬学会133年会で学会発表（2013年3月30日、横浜）。

#### 准教授 : 窪田道典

　　脳は、内外界に生じる出来事に対処するために情報処理を行っている。しかし、脳は忠実に出来事を再現するわけではない。その有名な例は、エッシャーのだまし絵のような錯覚であり、脳の情報処理過程の解明に糸口を与えてくれる貴重な現象である。錯覚は視覚だけでなく他の感覚系でも生じる。聴覚系における錯覚の例として、無音区間のある音（不連続音）を聞かせても、その無音区間と同時に雑音を聞かせると、音が連続して聞こえるという補完現象が知られている。そこで、今回音の補完の脳内処理過程を探るために、聴覚皮質の各部位がどのように補完に関わっているのかを調べた。

　　大脳皮質の広い領域の活動を調べるために、時間的空的

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た。電位感受性色素としてRH795を用い、モルモットの大脳皮質聴覚野から記録を行った。

　　無音区間のある不連続音を聞かせると、最初の音に対する応答に加えて、無音区間後の音に対する応答も生じた。この無音区間と同時に広帯域雑音を聞かせると、無音区間後に生じる応答が顕著に減少、あるいは消滅した。この減少の程度は、各聴覚部位で異なり、一次聴覚野よりも、DC野やベルト領域で大きく減少した。無音区間と同時に与える広帯域雑音は、補完現象を生じさせる条件であることが知られている。さらに、この補完現象を弱めることが知られているノッチ雑音を無音区間と同時に聞かせると、無音区間後に生じる応答が部分的に回復した。この結果は、DC野やベルト領域が音の補完現象に関係していることが示唆されるものである。特に、DC野は応答変化が顕著に現れる最初の領域であるため、この領域が音の補完現象に重要な部位であることが示唆される。

#### 准教授　黒柳秀人、特任助教　木村まり子

　　ヒトのタンパク質をコードする遺伝子の多くでmRNA前駆体の組織特異的、発生段階依存的な選択的プロセシングが起こっており、塩基配列の多型や変異はmRNA前駆体プロセシングの異常を通じて遺伝子発現に影響すると考えられる。しかし、生体内でスプライシングパターンを決定する制御機構、すなわち「スプライシング暗号」の解明はあまり進んでおらず、塩基配列の多型や変異の影響の予測は困難なのが現状である。

　　我々は生体内での選択的スプライシングの制御機構を解析するために、選択的スプライシングパターンを可視化する蛍光タンパク質レポーター系を開発、実用化した。そして、モデル生物である線虫を用いた遺伝学的な解析によりさまざまなスプライシング制御因子や制御配列を同定し、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にしている。さらに、スプライシング制御因子変異体と野生型線虫のmRNAを大規模シーケンス解析して比較することにより、標的遺伝子を網羅的に探索し、スプライシング制御機構を明らかにしている。これらの成果がスプライシング暗号の体系的な解明に寄与すると期待される。

### 業績目録

#### 原著論文

Watanabe Y, Nakamura T, Ishikawa S, Fujisaka S, Usui I, Tsuneyama K, Ichihara Y, Wada T, Hirata Y, Suganami T, Izaki H, Akira S, Miyake K, Kanayama HO, Shimabukuro M, Sata M, Sasaoka T, Ogawa Y, Tobe K, Takatsu K, Nagai Y. The Radioprotective 105/MD-1 complex contributes to diet-induced obesity and adipose tissue inflammation. *Diabetes* 61: 1199-1209, 2012.

Ehara T, Kamei Y, Takahashi M, Yuan X, Kanai S, Tamura E, Tanaka M, Yamazaki T, Miura S, Ezaki O, Suganami T, Okano M, Ogawa Y. Role of DNA methylation in the regulation of lipogenic glycerol-3-phosphate acyltransferase 1 gene expression in the mouse neonatal liver. *Diabetes* 61: 2442-2450, 2012.

Satoh-Asahara N, Shimatsu A, Sasaki Y, Nakaoka H, Himeno A, Tochiya M, Kono S, Takaya T, Ono K, Wada H, Suganami T, Hasegawa K, Ogawa Y. Highly purified eicosapentaenoic acid increases interleukin-10 levels of peripheral blood monocytes in obese patients with dyslipidemia. *Diabetes Care* 35: 2631-2639, 2012.

Takumi Irie, Koji Ito, Hisashi Ozasa, Yumi Noda, Satoru Ikeda, Shinji Tanaka, Shigeki Arii, Saburo Horikawa. Splenic artery ligation: A protection against hepatic ischemia/reperfusion injury in partially hepatectomized rats. *Hepatology Research* 2012; 42(8): 819-827.

Suzuki S, Kudo H, Nakayama A, Sassa S, Kikuchi H, Sakamoto S. Effects of Recombinant Human Erythropoietin on DNA Synthesis in Rat Hematopoietic Organs. *Bunkyo J Health Sci Technol* 4, 41-45, 2011. (2012年発行)

Sassa S, Kikuchi H, Okabe H, Suzuki S, Kudo H, Sakamoto S. Effect of Ipriflavone on Mammary Carcinogenesis, Uterine Adenomyosis and Bone Mineral Density of Tibia Mice. *Bunkyo J Health Sci Technol* 5, 51-56, 2012. (2013年発行)

Kudo H, Suzuki S, Okabe H, Kikuchi H, Sassa S, Sakamoto S. Gender Difference in Bone Loss Induced by Iron Overload in Rats. *Bunkyo J Health Sci Technol* 5, 57-65, 2012. (2013年発行)

*左雨秀治*, 坂本　忍 : 骨と漢方　産婦人科漢方研究のあゆみ　No.30, 2013 (in press)

Kubota M, Miyamoto A, Hosokawa Y, Sugimoto S, Horikawa J. Spatiotemporal dynamics of neural activity related to auditory induction in the core and belt fields of guinea pig auditory cortex. *Neuroreport*. 23(8):474-478 (2012).

Ojima H, Taira M, Kubota M, Horikawa J. Recognition of Non-Harmonic Natural Sounds by Small Mammals Using Competitive Training. *PLoS ONE* 7(12): e51318 (2012).

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)

Kuroyanagi H, Watanabe Y, Hagiwara M.(2013) PLoS Genetics. doi: 10.1371/journal.pgen.1003337.

Kuroyanagi H, Watanabe Y, Suzuki Y, Hagiwara M. (2013) Nucleic Acids Research. doi: 10.1093/nar/gktt097.

Iwasa H, Maimaiti S, Kuroyanagi H, Kawano S, Inami T, Ikeda M, Nakagawa K, Hata Y. (2013) Experimental Cell Research. doi:10.1016/j.yexcr.2013.01.020.

Iwasa H, Kuroyanagi H, Maimaiti S, Ikeda M, Nakagawa K, Hata Y. (2013) Experimental Cell Research. 319: 1-11.

Ohno G, Ono K, Togo M, Watanabe Y, Ono S, Hagiwara M, Kuroyanagi H. (2012) PLoS Genetics. 8: e1002991.

#### 総説等

「**広範囲血液・尿化学検査、免疫学的検査（1）**」
バイオリン　山口登喜夫、杉本昭子　日本臨床67巻増刊号（第7版）日本臨床社　pp 149-154.

「**広範囲血液・尿化学検査、免疫学的検査（1）**」
ピリベルジン　山口登喜夫、杉本昭子　日本臨床67巻増刊号（第7版）日本臨床社　pp 769-771.

Kuroyanagi H. (2013　0　Worm. doi: 10.4161/worm.23834.

Kuroyanagi H, Takeuchi A, Nojima T, Hagiwara M. (2012) Chapter 28 In “Alternative pre-mRNA Splicing: Theory and Protocols” (Wiley-VCH).

#### 学会発表、招待講演等

伊東浩次、堀川三郎、入江　工、有井滋樹．肝切除後の残余肝に対する脾摘と門脈血流について．第112回日本外科学会定期学術集会，千葉，平成24年4月

入江　工、中村典明、松村　聡、伴　大輔、落合高徳、工藤　篤、田中真二、有井滋樹、堀川三郎．脾動脈結紮前処置が肝部分切除後肝再生に与える効果について．　第48回日本肝臓学会総会，金沢，平成24年6月

第85回日本生化学会大会、福岡、2012、12、16. “Photoisomerization 特性を有する多価ハロゲン基導入テトラピロール配位子による新規なTDM-血中リチウム定量法とそのPOCT化の可能性” 岩淵拓也、鈴木裕子、手島楊彦、小田島次勝、山口登喜夫

第98回中国四国合同地方会、徳島、2011. 5. 13-14. “心筋虚血再灌流後の酸化ストレス評価と抗酸化治療の導入” 山本正樹、西森秀明、割石精一郎、福富敬、佐藤隆幸、山口登喜夫、渡橋和政

日本薬学会131年会、静岡、2011、3. 29. “糖尿病性酸化ストレスに伴うビリルビンの応答” 鈴木　綾、山口登喜夫、杉本昭子

“The efficacy of antioxidant therapy for myo-

cardial ischemia reperfusion” Asian Society for Cardiovascular and Thoracic Surgery, March 8-10, 2012. Masak Yamamoto, Hideki Nishimori,Takashi Hukutomi, Seichiro Wariishi, Nobuo Kondo, Kazuki Kihar, Tokio Yamaguchi, Kazumasa Orihashi

山口登喜夫　日本酸化ストレス学会関東支部会招待講演　2012年12月10日　東京

山口登喜夫　高知大学大学院博士課程医学専攻セミナー　2012年1月16日　高知 “酸化ストレスマーカーとしてのビリルビン抗体とその応用”

林　忠紘、中島賢治、和田篤敬、鈴木敏恵、工藤秀機、*左雨秀治*：抗肥満作用に対する大柴胡湯構成生薬の関与度．日本薬学会133年会、演題番号30amD-186、3月30日、2013年、横浜パシフィコ

Hosokawa Y, Kubota M, Sugimoto S, Horikawa J. Optical imaging of neural activities in the right and left auditory cortices of the guinea pig evoked by the frequency-modulated sounds. *J Physiol Sci*. Vol. 62, Suppl. 1, S231 (2012).

#### 学内外教育活動

山口登喜夫

- 高知大学医学部　非常勤講師　医学部講義2012年度
- 慶応義塾大学医学部　客員助教授：ヘム代謝の病態生化学に関する研究指導　2012年度
- 文京学院大学保健医療技術学部　非常勤講師2012年度
- 本学第2回高気圧酸素スポーツ医学研究会に参加。2012年3月10日

左雨秀治
文京学院大学　保健医療技術学部、4年生特別講義：骨粗鬆症の基礎、2012年6月18日

黒柳秀人
大学院生命情報科学教育部、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
さきがけ「RNAと生体機能」（個人研究者）、新学術領域研究「RNA制御学」計画研究（代表）、挑戦的萌芽研究（代表）

#### 受賞

菅波孝祥　第32回日本内分泌学会研究奨励賞(2012年4月)
「脂肪組織炎症による新しいアディポサイトカイン産生調節の分子機構の解明」
菅波孝祥　2012年東京医科歯科大学優秀研究賞(2012年10月)

#### プレス・リリース

山口登喜夫
日本経済新聞　平成24年4月4日朝刊
“躁鬱病薬の成分　簡単測定キット”
その他、千葉日報、読売新聞、朝日新聞、ちばぎん総研刊行

# 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：伊藤 暁子  
 技術補佐員：菌部知奈美

本解析室は、大学院生命情報科学教育部「ゲノム及び遺伝子発現解析演習」の支援と、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ルラボの管理も行っている。以下は、2012年の実績である。

### 1. DNA 受託シーケンスサービス

サンプル数 (67,019 件) 及び延べ利用人数 (3,633 名) は、ほぼ例年並みであるが、難研外からの依頼数が着実に増加し、依頼件数 1,514、依頼サンプル数 15,377 と過去最高となり、全体の 2 割を占めている。

### 2. 設置機器

DNA シークエンサー 3130xl 2 台、PCR 5 台、フローサイトメーター、発光プレートリーダー、製水器、ユニバーサルテーブルトップ遠心機、Ion torrent PGM シークエンサー、Ion OneTouch システムを設置し、利用者の便に供している。

### 3. 説明会等

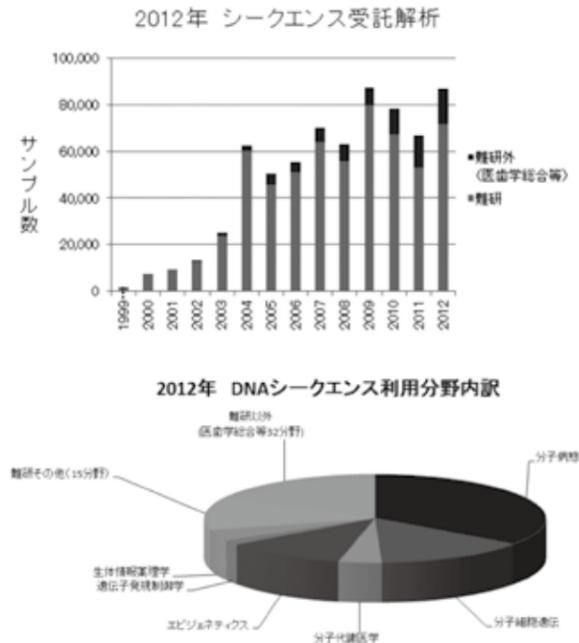
解析機器技術の紹介及び共通機器利用促進のため、以下の講習会を行った。

第 1 回 Ion torrent PGM 講習会 (ライフテクノロジーズ) (4/17-18)

フローサイトメーター取扱い講習会 (日本ベクトン・ディッキンソン) (6/5-6)

第 2 回 Ion torrent PGM 講習会 (ライフテクノロジーズ) (10/18)

第 3 回 Ion torrent PGM 講習会 (ライフテクノロジーズ) (12/20)



## II. 細胞・プロテオーム解析室

技術専門職員：名和真希子

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

本解析室は、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。二次元電気泳動による蛋白質の二次元分離と解析から、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、LC-MSMS 解析も始動しているため、同定率の向上が期待される。また、既に学内に異なるタイプの質量分析機器が複数稼働しており、目的蛋白質の同定・翻訳後修飾等の同定には使い分けが必要である。実際にこうした複数台の機器について、円滑に解析、利用、運営できるように互いに連携を図っている。



LC-MSMS 解析 Q-tofmicro



LC-MSMS 解析 ABSCIEX QTRAP5500

## III. 遺伝子組換えマウス実験室

技術職員：宇佐美貴子

技術補佐員：池上 道博

技術補佐員：木崎 未央

技術補佐員：福島 幸子

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、難治疾患研究所および疾患生命研究部・生命情報科学教育部の大学院教育支援施設の一部として、教授・准教授若干名からなる運営委員会が、管理・運営にあたり、新規利用者への教育、新たな組換えマウスの樹立や搬入の審査などの適正な利用をはかっている。

## IV. 形態機能解析室

技術補佐員：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、スピントイッシュプロセッサ、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、新たにスピントイッシュプロセッサを一台購入した。また、免疫蛍光染色などの定量測定を可能にするために、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

## V. 幹細胞支援室

技術専門職員：齊藤 佳子

技術補佐員：山崎 彰子

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。管理スタッフは技術専門職員1名が管理業務全般を、2012年3月で退職した技術補佐員（研究支援推進員）に代わって、2012年8月1日付で着任した後任の技術補佐員（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

幹細胞支援室は難治疾患研究所駿河台地区1階とM&Dタワー21階の二か所において稼働していたが、2012年3月上旬にM&Dタワー24階に移設・集約作業を行い、同3月15日に供用再開の利用者にアナウンスした。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（ベックマンコールター）

高速セルソーター MoFlo XDP（ベックマンコールター）

共焦点レーザー顕微鏡タイムラプス撮影システム FV10i-w（オリンパス）

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）

超音波破碎器（BRANSON）

2012年3月の移設に伴って、それまで駿河台地区にて管理していたパラフィン自動包埋装置一式（サクラファインテック）とマイクロトーム（Thermo）を、難研大学院教育研究支援施設の形態機能解析室へ管理移管した。また、MTTプログラムの管理であった倒立型電動リサーチ顕微鏡 IX81（オリンパス）を新たに管理することとなった。

### 2. 運営

幹細胞支援室運営委員会による審議を重ねつつ、難研

教授会の協力を得ながら運営を行った。2012年の運営委員会開催は年間10回であり、迅速を旨として主にメール等による会議とした。その他、技術補佐員の選考に係る会議も合議による形態で4回開催した。

### 3. 2012年の供用実績

前年に引き続き主として所内研究者に向けて、現有機器の利用案内、講習会の開催、使用ルール作り、試行運用の開始などにより、供用化を軌道に載せるべく活動した。また、移設したこともあり、ホームページを作成して公開した。講習については、各機器のメーカー担当者により、高速セルソーター MoFlo XDP を1回、共焦点レーザー顕微鏡については希望者多数のため3分割しての繰り返し開催にて実施した。高速セルソーターについては、講習受講後に個別トレーニングをメーカーにより行ってもらうとともに、研究支援推進員による操作補助、試行受託を行い、研究者がより円滑に機器を操作できるように取り計らった。

## VI. 構造解析支援室

技術専門職員：馬場 裕子

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

# 職員学生名簿

### 分子薬理学分野

教授 野田 政 樹  
准教授 江面 陽 一  
助教 早田 匡 芳  
GCOE国際コーディネーター 中元 哲也  
GCOE 特任講師 納富 拓也  
大学院生 Smriti Aryal A.C.  
渡辺 千穂  
白川 純平  
守屋 秀一  
川崎 真希理  
山田 峻之  
八田 愛理奈  
小川 尚子  
GCOE 事務補佐員 押江 優子  
富田 久美子

### 分子細胞生物学分野

教授 澁谷 浩 司  
准教授 後藤 利 保  
助教 佐藤 淳  
大学院生 清水 幹 容  
大熊 祐 一  
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  
大学院生 柳澤 美智子  
杉山 勇 人  
平岡 優 一  
Zulpiye Habibulla  
杉本 潤 哉  
崔 万 鵬

孫 偉 楠  
技術補佐員 石久保 春 美  
秘書 松浦 春 香

### 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 榎部 裕 也  
大方 信 一 郎  
小泉 章 子  
李 敏  
高橋 健 太 郎  
杉山 浩 二  
大類 悠 斗  
五領田 小百合  
小島 聖 美  
大学院研究生 張 鵬  
劉 鏈  
技術補佐員 安東 朋 子  
海野 愛 子  
大隅 礼 子  
大西 裕 子  
木村 麗 子  
事務補佐員 山口 邦 子

### 幹細胞制御分野

教授 田賀 哲 也  
准教授 鹿川 哲 史  
信久 幾 夫  
特任助教 榎 康 一  
非常勤講師 須田 年 生  
影山 龍 一 郎  
柏木 太 一  
技術補佐員 / 秘書 伏見 真 好  
技術補佐員 井上 和 子  
大学院生 備前 典 久  
マハ アナニ

大学院研究生  
須藤元輝  
国分康博  
村松希美  
原田果歩  
天野麻友美  
金子祥子  
室田吉貴  
寺嶋一夫  
王 文茜

**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  
特任講師 中西祐輔  
特任助教 佐藤卓志  
四元聡平  
浅野純平  
技術補佐員 黒田聖子  
事務補佐員 上岡寿子  
大学院生 川村俊輔

**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  
特任助教 中林誠  
安部美奈子  
技術補佐員 服部美智子  
大学院生 宮下ミチ香  
品川健朗

**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  
曾根雅紀  
内原俊記  
助教 田村拓也  
特任助教 伊藤日加瑠  
笹邊俊和  
吉田千里  
藤田慶大  
本木和美  
陳西貴  
技術補佐員 田島たよ子  
溝井千春

秘書 宇山祐子  
大学院生 伊波川貴美子  
岸本麻里  
Min Xu  
Chan Li  
Ying Mao  
専攻生 Hong Zhang

**病態細胞生物学分野**

教授 清水重臣  
講師 小西昭充  
特任講師 吉田達士  
助教 荒川聡子  
特任助教 室橋道子  
本田真也  
山口啓史  
坂口三美  
秘書 吉野育代  
技術補佐員 辻村恭子  
大学院生 渡辺雄一郎  
杉本夕奈  
宮崎大  
永田める菜  
特別研究学生 小原睦弥  
山下恵実  
後藤佑太  
山本寛典

**発生再生生物学分野**

教授 仁科博史  
准教授 平山順  
助教 浅岡洋一  
特任助教 山崎世和  
特任助教 畠星治  
特任助教 岩月麻美子  
学振PD 西田友哉  
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  
宮村憲央  
内田好海  
下村忠範  
迫田実希  
藤橋ひとみ  
有馬誉恵  
牧野麻亜子

特別研究生 Yu Ruoxing  
斎藤光介  
三浦良太

**免疫疾患分野**

教授 罇田武志  
准教授 安達貴弘  
特任助教 松原直子  
徐米多  
技術補佐員 久留主幸江  
事務補佐員 高橋博子  
大学院生 唐 森  
高田俊太郎  
大森聖也  
Shirly Phoon  
Ayse Ucar Konuskan  
江崎澄代  
焦旭阳  
大学院研究生 Aslam Mohammad

**分子病態分野**

教授 木村彰方  
准教授 有村卓朗  
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 大川真一郎  
猪子英俊  
大学院生 石川泰輔  
安健博  
葛城圭  
門田千佳  
飯塚淳次  
小泉伸也  
加藤智子  
卒研究生 住本英樹  
共同研究者 久場敬司  
山本健  
牧野伸司  
訪問研究者 陳智勇

**幹細胞医学分野**

教授 西村栄美  
助教 青戸隆博  
松村寛行

特任助教 砂山潤  
毛利泰彰  
技術補佐員 大西宏規  
岡田容子  
矢嶋玲子  
事務補佐員 渡邊郁  
大学院生 上野真紀子  
Nguyen Thanh Binh  
田口亮子  
小林光  
共同研究員 羽田乃武子  
佐藤康成

**分子細胞遺伝学分野**

教授 稲澤譲治  
准教授 小崎健一  
助教 井上純  
硬組織疾患ゲノムセンター特任講師 林 深  
ゲノム解析室助教 谷本幸介  
ポスドク 古田繭子  
大学院生 坂本宙子  
村松智輝  
小野宏晃  
岡本奈那  
遠藤寛則  
宮脇豊  
原園陽介  
山本信祐  
永田啓明  
岩館怜子  
長縄光代  
Nuylan Michelle Loyola  
Daniela Tiaki Uehara

李 慧  
與子田一輝  
藤原直人  
谷中淑光  
Sujata Sakha  
森下真紀  
高橋寛吉  
卒業研究生 三藤里愛  
疾患バイオリソースセンター助教 高橋綾子  
森留美  
事務補佐員 福川順子  
篠崎優子

### 分子遺伝分野

教授 三木 義男  
 特任准教授 中西 啓  
 助教授 竹中 克也  
 特任助教 宮口 健  
 大学院生 高岡 美帆  
 Nadila Wali  
 ダウゼウエゲ スルマ  
 石場 俊之  
 加賀 美裕也  
 木村 仁美  
 滝沢 良子  
 中澤 和也  
 山本 武徳  
 和田 匠太  
 手代木 翔太

### 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 キイ・チャン・コー  
 山田 美紀  
 ネ・チー・トン  
 ジュネイド・バラヤン  
 平石 敦子  
 趙 晨希  
 サリヤ・デカメサフン  
 増田 冴衣  
 沢 辺 美 亜  
 カウン・シー・トゥ  
 キン・テテ・ゾー  
 専攻生 仙石 梓  
 卒業研究生

### 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  
 大学院生 井上 允  
 五嶋 大統  
 特別研究学生 枝川 真  
 卒業研究生 福本 悟史  
 内田 洋平  
 高橋 拓也  
 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  
 GCOE特任講師 李 知英  
 非常勤講師 小林 慎  
 特任助教 成瀬 美衣  
 技術補佐員 石井 雅之  
 大学院生 山口 祐季  
 及川 真実  
 高橋 沙央里  
 相馬 未来  
 高木 清考  
 北澤 萌恵  
 川尻 成俊

### 生命情報学分野

教授 田中 博  
 准教授 新村 芳人  
 助教授 茂 櫛 薫  
 特任准教授 任 鳳 蓉  
 特任助教 長谷 武志  
 飯島 久美子  
 大学院生 山口 浩信  
 金子 佳之  
 石渡 龍輔  
 遠藤 有人  
 鈴木 聡  
 上野 英一  
 浦島 直  
 菊地 正隆  
 太田 沙紀子  
 田中 泰羽  
 澤井 一  
 鈴木 麻美  
 岸本 太郎  
 清水 千佳子  
 Syed Ali Zaidi  
 糠谷 祥子  
 長谷川 浩章  
 Aw Wanping  
 小泉 典秋  
 星 昭彦  
 井上 紀彦  
 丸山 智久  
 渡邊 考  
 Sophia Subat

Asiya Hapaer

小出 康太  
 宮本 直章  
 辻 輝章  
 萩原 純也  
 高橋 敏宏  
 大坪 香澄美

### ゲノム病理学分野

教授 石川 俊平  
 助教授 砂河 孝行  
 技術補佐員 佐藤 玲子  
 事務補佐員 田向 美春

### フロンティア研究室 低酸素生物学

准教授 中山 恒

### 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 渡邊 健  
 片山 未来  
 望月 菊  
 太田 麻利子  
 高橋 秀行  
 事務補佐員 大塚 幸子  
 齋藤 園子

### 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

### プロジェクト研究室

#### 先端分子医学研究部門

准教授 菅波 孝祥

#### 難治病態研究部門

准教授 山口 登喜夫  
 堀川 三郎

#### ゲノム応用医学研究部門

准教授 窪田 道典  
 助教授 左雨 秀治  
 准教授 黒柳 秀人

特任助教 木村 まり子  
 大学院生 武井 理美  
 保科 元気  
 村山 里枝  
 学部生 飯塚 舞

### 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 谷本 幸介  
 技術補佐員 牧谷 麗子  
 伊藤 暁子  
 蘭部 知奈美

#### 細胞プロテオーム解析室

技術専門職員 名和 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 池上 道博  
 木崎 未央  
 福島 幸子

#### 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

#### 構造解析支援室

技術専門職員 馬場 裕子

#### バイオリソース支援室

技術専門職員 小島 智子

### 事務部

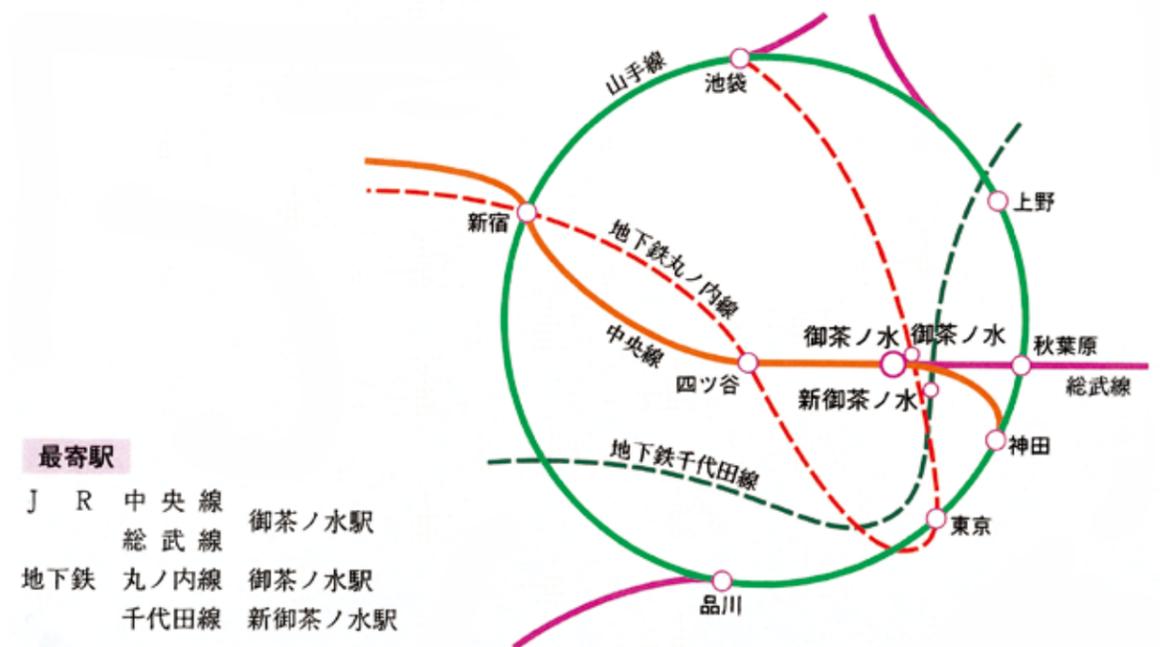
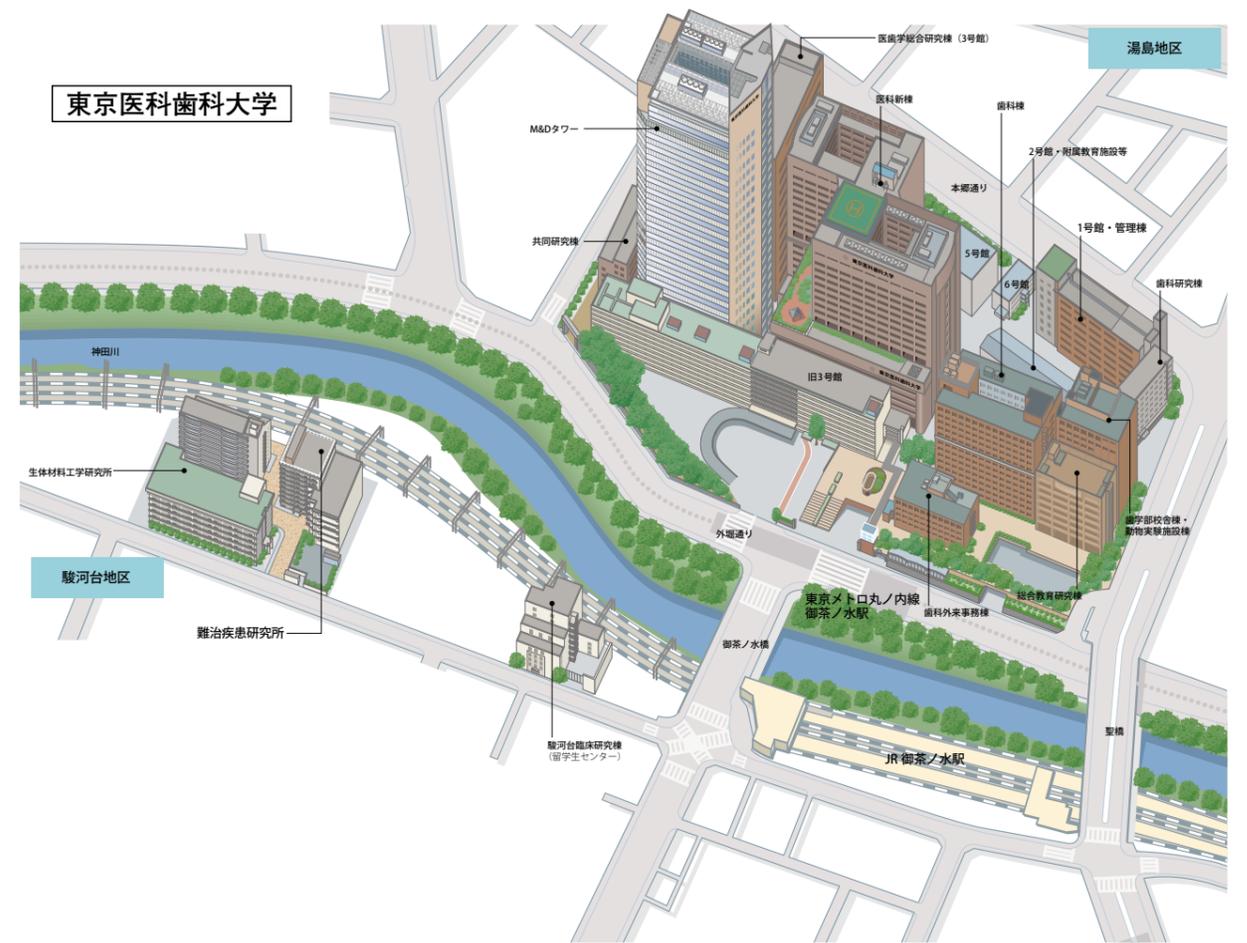
事務 長 川柳 成巳  
 総務掛 長 鈴木 誠  
 総務主任 小林 俊彦  
 総務掛員 林 健策  
 大島 昌子  
 事務補佐員 庄司 純子  
 川野 千恵  
 高橋 将貴

# 難治疾患研究所運営諮問委員会委員

- 金澤 一郎 国際医療福祉大学教授
- 郷 通子 情報・システム研究機構理事
- 五條堀 孝 国立遺伝学研究所副所長
- 笹月 健彦 九州大学高等研究院特別主幹教授
- 谷口 克 理化学研究所横浜研究所免疫・アレルギー科学総合研究センター長
- 中嶋 暉躬 元星薬科大学大学長
- 長野 哲雄 東京大学大学院薬学系研究科教授
- 村松 正實 埼玉医科大学ゲノム医学研究センター名誉所長

(50音順)

## 案内図



年報 2013

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