

Annual Report 2012

ANNUAL REPORT 2012

Tokyo Medical and Dental University

東京医科歯科大学難治疾患研究所
大学院 疾患生命科学研究部
生命情報科学教育部

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, School of Biomedical Science, Biomedical Science PhD Program,
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
大学院 疾患生命科学研究部
生命情報科学教育部



東京医科歯科大学
難治疾患研究所
大学院 疾患生命科学研究部
生命情報科学教育部
年報

2012

Annual Report
Medical Research Institute
School of Biomedical Science
Biomedical Science PhD Program
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および大学院生命情報科学教育部・疾患生命科学研究部の2011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年度より本学大学院が改組され、生命情報科学教育部は医歯学総合研究科に組み込まれたことから、大学院生命情報科学教育部・疾患生命科学研究部の年報は最後となります。組織図はこれまでのものと2012年度ものを掲載し、改組による組織の改変をご理解いただければ幸いです。

難治疾患研究所 広報委員会

Contents

1. 所在地	3
2. 組織	4 ~ 5
3. 職員及び学生数	6
4. ハイライト	7 ~ 10
5. 難治疾患共同研究拠点	11 ~ 14
6. 学位取得者	15
7. 難研セミナー	16 ~ 17

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 20 ~ 23
- 分子薬理学分野 24 ~ 27
- 分子細胞生物学分野
28 ~ 31
- 分子神経科学分野 32 ~ 34
- 生体防御学分野 36 ~ 38
- 生体情報薬理学分野
40 ~ 43
- 幹細胞制御分野 44 ~ 47
- フロンティア研究室
低酸素生物学 48 ~ 49

・プロジェクト研究室 106 ~ 108

難治病態研究部門

- 神経病理学分野 52 ~ 54
- 病態細胞生物学分野
56 ~ 59
- 発生再生生物学分野
60 ~ 63
- 幹細胞医学分野 64 ~ 67
- 免疫疾患分野 68 ~ 71
- 分子病態分野 72 ~ 75
- フロンティア研究室
ウィルス治療学 76 ~ 77

・ケミカルバイオロジー
スクリーニングセンター

118 ~ 119

ゲノム応用医学研究部門

- 分子細胞遺伝学分野 80 ~ 83
- 分子遺伝学分野 84 ~ 87
- 分子疫学分野 88 ~ 91
- 遺伝生化学分野 92 ~ 95
- エピジェネティクス分野
96 ~ 98
- 生命情報学分野 100 ~ 103
- フロンティア研究室
レドックス応答細胞生物学
104 ~ 105

連携研究部門・その他

- 病態発現機構研究部門
110 ~ 111
- 臓器代謝ネットワーク
研究部門 112 ~ 113
- 大学院教育研究支援
実験施設 114 ~ 116

大学院疾患生命科学研究部

- | | | | |
|------------------------------|----------------------------|---------------------------|------------------------------------|
| 1. ゲノム多様性研究室
72 ~ 75 | 4. 構造情報研究室
122 ~ 125 | 7. 免疫学研究室
68 ~ 71 | 10. 生命システム
モデリング分野
138 ~ 141 |
| 2. ゲノム構造制御研究室
92 ~ 95 | 5. 形質発現制御学研究室
126 ~ 128 | 8. 薬化学分野
130 ~ 133 | |
| 3. システム情報生物学研究室
100 ~ 103 | 6. 分子神経科学研究室
32 ~ 34 | 9. 生命有機化学研究室
134 ~ 137 | |

職員学生名簿	142 ~ 147
諮問委員名簿	148
案内図	149

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

分子代謝医学分野、分子薬理学分野、分子細胞生物学分野、分子神経科学分野、生体情報薬理学分野、幹細胞制御分野、分子構造情報学分野、神経病理学分野、発生再生生物学分野、免疫疾患分野、分子病態分野、分子細胞遺伝学分野、分子遺伝学分野、遺伝生化学分野、エピジェネティクス分野、生命情報学分野、病態細胞生物学分野、幹細胞医学分野、生体防御学分野、フロンティア研究室、プロジェクト研究室、事務部



駿河台地区

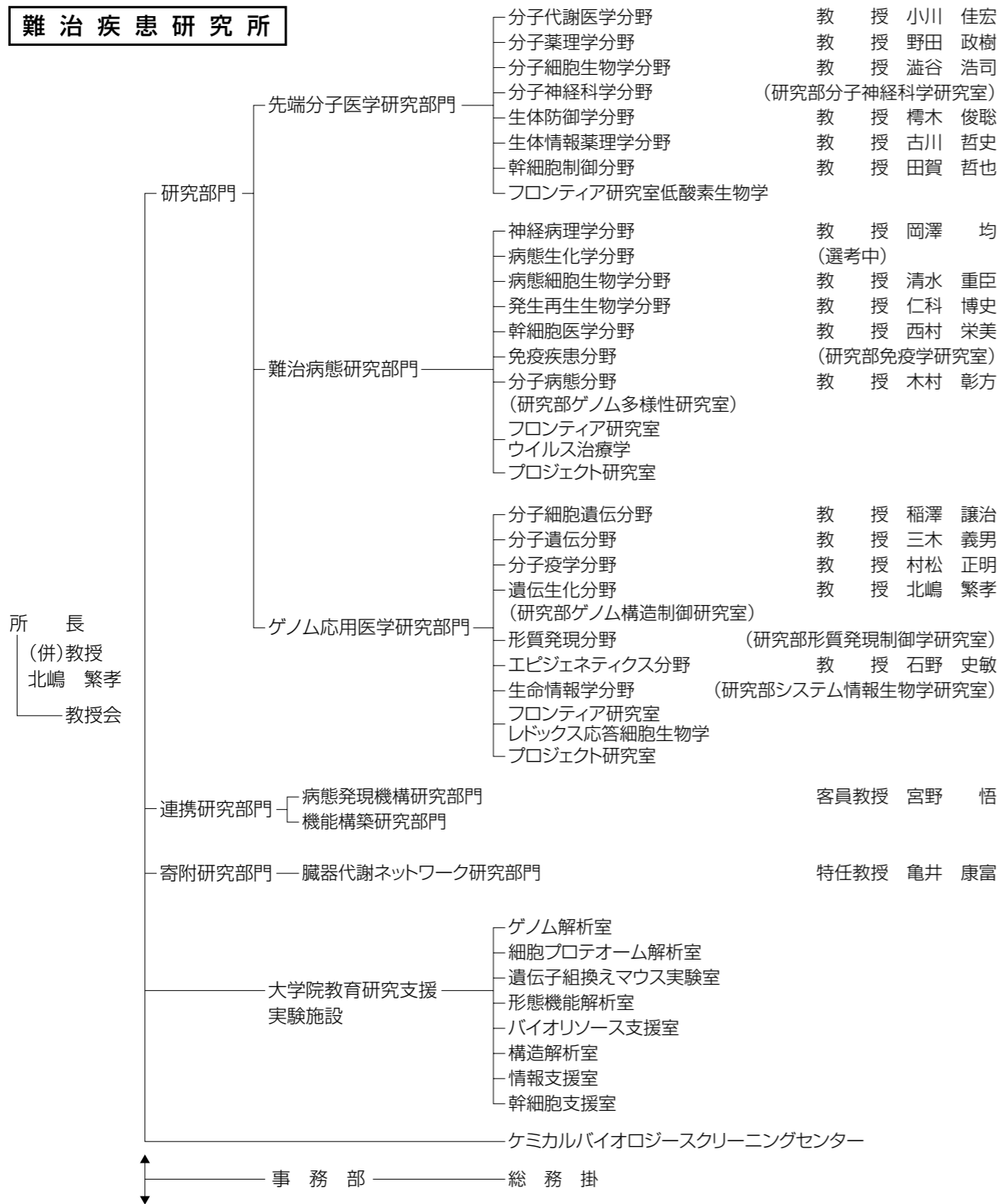
〒101-0062
東京都千代田区神田駿河台2-3-10

難治疾患研究所 分子疫学分野

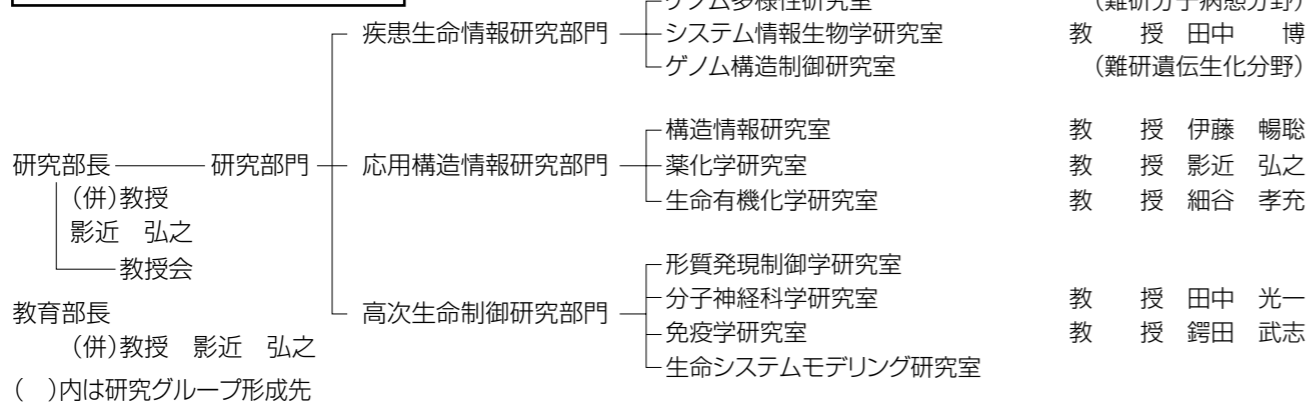
大学院疾患生命科学研究部
薬化学研究室、生命有機化学研究室(現、生体材料工学研究所)

難治疾患研究所

平成24年3月31日まで

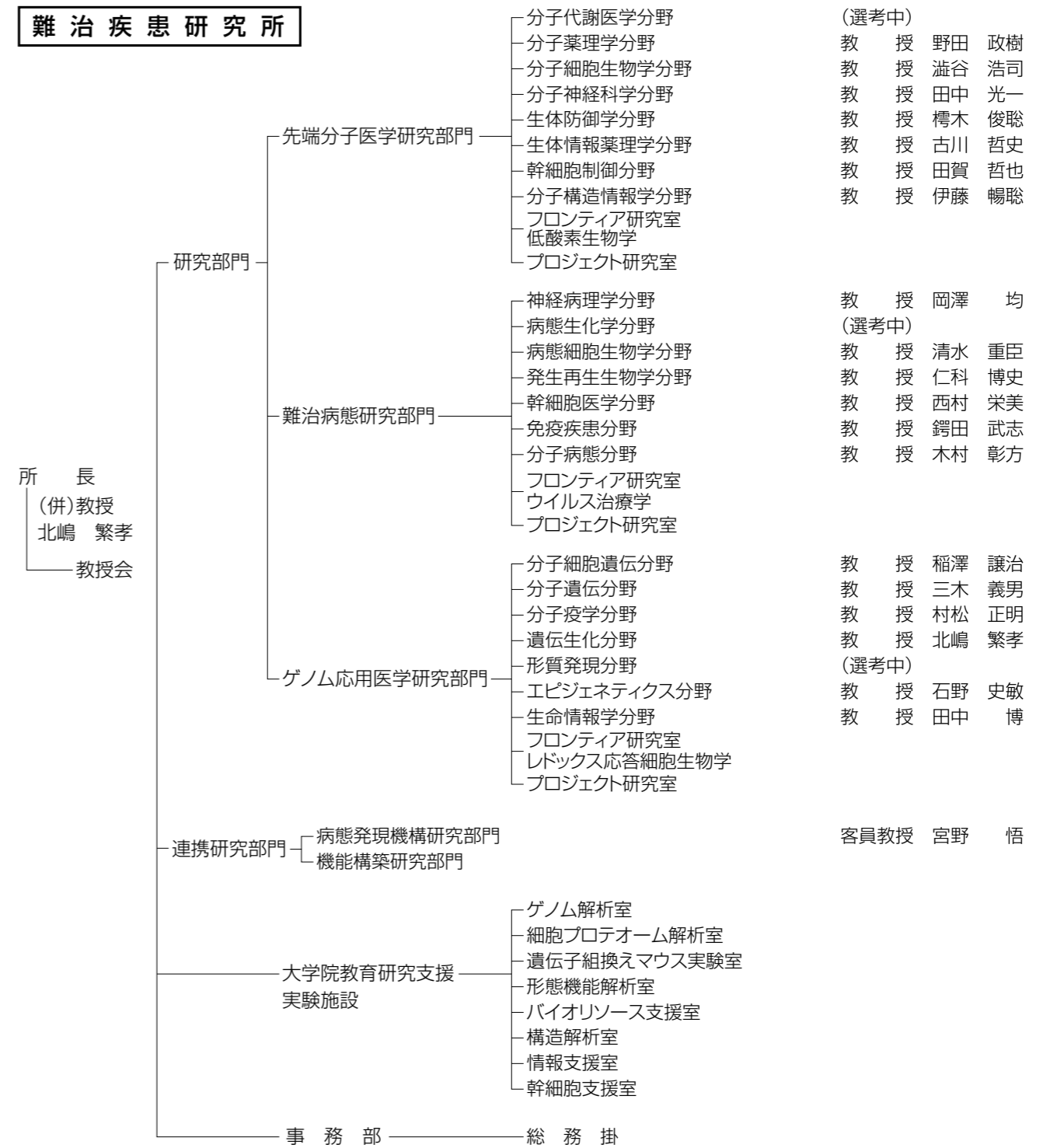


大学院疾患生命科学部



難治疾患研究所

平成24年4月1日現在



職員及び学生数

●学生数

平成 24 年 3 月 1 日現在

部局名	研究部門名等	分野名等	大学院生		専攻生
			医歯学	教育部	
難治疾患研究所・大学院疾患生命科学部	先端分子医学研究部門	分子代謝医学分野	8		
		分子薬理学分野	1		
		分子細胞生物学分野	1	3	
		分子神経科学分野 (高次神経科学分野：分子神経科学研究室)	1	11	
		生体防御学分野			
		生体情報薬理学分野	5	1	
	難治病態研究部門	幹細胞制御分野	5	3	
		神経病理学分野	5	1	
		病態細胞生物学分野		4	
		発生再生生物学分野	3	7	
		幹細胞医学分野	2		
		免疫疾患分野 (免疫学分野：免疫学研究室)			18
	ゲノム応用医学研究部門	分子病態分野 (疾患ゲノム分野：ゲノム多様性研究室)	2	7	
		プロジェクト研究室			1
		分子細胞遺伝学分野	3	2	2
		分子遺伝学分野	4	10	
		分子疫学分野	9	4	1
		遺伝生化学分野 (疾患ゲノム分野：ゲノム構造制御研究室)	4	3	
形質発現分野 (遺伝子発現制御学分野：形質発現制御学研究室)			2		
エピジェネティクス分野		1	8		
大学院疾患生命科学部	応用構造情報研究部門	生命情報学分野 (システム情報生物学分野：システム情報生物学研究室)	26	11	2
		分子構造情報学分野：構造情報研究室		9	
		薬化学分野：薬化学研究室		22	
大学院疾患生命科学部	高次生命制御研究部門	ケミカルバイオロジー分野：生命有機化学研究室		3	
		生命システムモデリング分野		2	
		計	80	147	6

※ () 内は大学院疾患生命科学部
 ※ 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

1. 難治疾患研究所

平成 24 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	17	23	0	25	65	4	2	3	9	74
現員	15	21	2	19	57	3	2	6	11	68

2. 大学院疾患生命科学部

平成 23 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	8	5	0	1	14	0	0	0	0	14
現員	6	5	0	1	12	0	0	0	0	12

ハイライト

腸粘膜を守る抗体の新たな産生の仕組みを解明

ーワクチン開発や自己免疫疾患治療に新たな視点ー

Tezuka, H. et al., Prominent role for plasmacytoid dendritic cells in mucosal T cell-independent IgA induction. *Immunity* 34, 247-257 (2011).

ウイルスや細菌などの病原体は、呼吸器や消化管などの粘膜を介して感染することが知られています。粘膜面では、病原体の感染に対して IgA 抗体が主体となって、病原体である抗原と特異的に結合し、防御応答が誘導されます。IgA は、病原体が粘膜上皮細胞に付着・定着することを阻止したり、病原体から生産される毒素や酵素を中和することによって、感染からの防御に貢献しています。実用化が期待されている粘膜ワクチンは、病原体に対する IgA をいかに効率よく粘膜面で産生できるかが実用化の鍵となっています。

一方、粘膜面では特に感染のない状態でも、恒常的に大量の IgA が産生されています。この IgA の役割は、無数に存在する常在菌から粘膜を守りながらそれら常在菌と共生する、さらには病原体に特異的な IgA が誘導されるまでの数日間を補完する上で重要であると考えられています。最近の研究により、恒常的な IgA の産生では、免疫反応の司令塔である樹状細胞が重要な役割を担っていると考えられていますが、その詳細な仕組みはよく分かっていませんでした。

今回、この恒常的な IgA 産生の仕組みの一端を明らかにしました。樹状細胞は、従来型樹状細胞 (cDC) と形質細胞様樹状細胞 (pDC) に分類されますが、cDC に比べて pDC が強く IgA の産生を誘導することを突き止めました。具体的には、腸内常在菌からの刺激が起点となり、I 型インターフェロン (IFN) が局所 (腸粘膜関連リンパ組織) のストローマ細胞から産生されて、その刺激を受けた pDC が「粘膜型」に変化します。「粘膜型」の pDC では、IgA の産生を促す APRIL や BAFF というたんぱく質が多く発現しており、IgA の産生を効率よく誘導することを明らかにしました (図 1)。

一方、I 型 IFN や APRIL および BAFF の過剰生産は、全身性エリテマトーデス (SLE) やシェーグレン症候群をはじめとする自己免疫疾患や、ある種のがんの病態形

成の一因になることも、ヒトやマウスで報告されています。本成果は、腸管免疫系における、APRIL や BAFF およびその産生細胞である pDC を標的とした、新しいワクチン開発や自己免疫疾患の治療戦略に役立つものと期待されます。

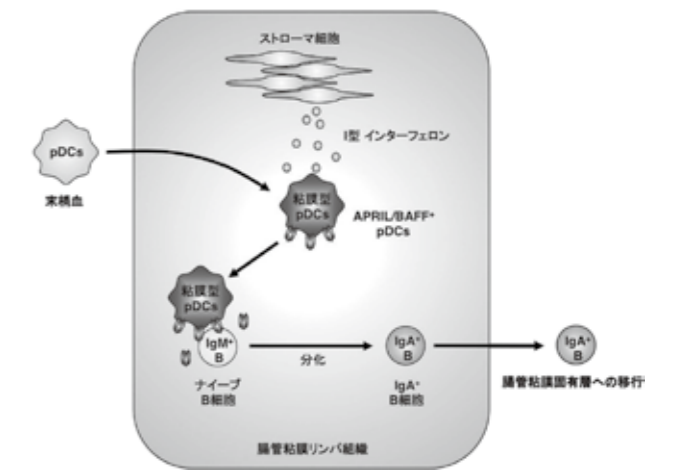


図 1 I 型 IFN による pDC への IgA 産生誘導能力の付与の機構
 腸内粘膜では腸内常在菌による刺激を受け、腸管粘膜のストローマ細胞から I 型 IFN が産生される。末梢から腸管粘膜リンパ組織に移行した「通常」の pDC は、I 型 IFN の刺激によって APRIL や BAFF が発現した「粘膜型」の pDC になる。この「粘膜型」pDC は、APRIL や BAFF を介して、B 細胞を IgM + B 細胞から IgA + B 細胞に分化させる。この IgA + B 細胞は、さらに腸管粘膜固有層に移行して IgA を産生する形質細胞 (IgA + PC) に分化する。

(生体防御学分野 橋木俊聡)

第 6 回研究所ネットワーク国際シンポジウムが開催される (共催：第 10 回駿河台シンポジウム、第 2 回難治疾患共同研究拠点シンポジウム)

研究所ネットワーク国際シンポジウムは、国立大学の 9 つの生命系附置研究所が、最先端の生命科学研究を内外に広く発信することを目的として毎年 1 回開催している国際シンポジウムです。平成 23 年は、難治疾患研究所が担当し、“Research breakthroughs in intractable diseases” をテーマとして企画しました。また、本国際シンポジウムは、難治疾患研究所及び大学院疾患生命科学部・生命情報科学教育部が毎年開催している第 10 回駿河台シンポジウム、難治疾患共同研究拠点シンポジウムと共同で開催致しました。

東日本大震災から余り時間が経っていない時期の開催

ではありましたが、9つの生命系附置研究所からの発表に加えて、4名の海外研究者からの講演を得て、熱のこもった活発な議論が交わされました。

シンポジウム概要は以下の通りです。

第6回 研究所ネットワーク国際シンポジウム

日程 : 平成23年6月9日(木)、10日(金)

場所 : 東京医科歯科大学 MDタワー 鈴木章夫記念講堂

主な講演者

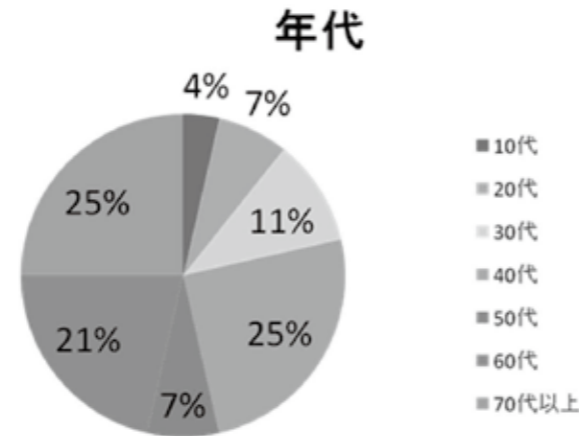
- 田中耕三 (東北大学加齢医学研究所)
- 津本浩平 (東京大学医科学研究所)
- 高橋智聡 (金沢大学がん研究所)
- 杉田昌彦 (京都大学ウイルス研究所)
- 高橋 淳 (京都大学再生医科学研究所)
- 堀口安彦 (大阪大学微生物病研究所)
- 篠原 彰 (大阪大学蛋白質研究所)
- 佐々木裕之 (九州大学生体防御医学研究所)
- 樗木俊聡 (東京医科歯科大学難治疾患研究所)
- Mayumi Ito (NewYork University, USA)
- Richard J. Youle (NIH, USA)
- Kirsten C. Sadler Edepli (Mount Sinai School of Medicine, USA)
- Shingo Kajimura (University of California, USA)
- 他、若手口演発表者9名、ポスター発表者24名 (病態細胞生物学分野 清水重臣)

難治疾患研究所市民公開講座を開催

(共催・学際生命科学東京コンソーシアム)

難治疾患研究所主催の市民公開講座はこれまでも毎年開かれて来ましたが、平成11年2月からは文京区のシビックセンター会議室をお借りして、「文の京・最先端生命科学紹介シリーズ」として年に2回(本学のオープンキャンパスを含めると3回)定期的に開催するようになりました。難治疾患研究所で行われている広範な研究の中で、生活習慣病、ゲノム医学、蛋白質工学、発生・再生医療、免疫・感染症など、社会的にも極めて関心の高い最先端の生命科学分野から2つのトピックを選び、准教授を中心とする若手研究者が約2時間の講演を行っています。文京区報と難治疾患研究所および学際生命科学東京コンソーシアムのホームページなどを通じて広報していますが、医学研究についてこのようなまとまった形の公開講座が少ないこともあり、毎回40～50人の様々な年代の方に参加して頂いています。一部専門的な内容を除くと80～90%の参加者が良かったという

感想をお持ちになっており、生活にかかわる馴染みやすいテーマだった、最先端の生命科学の一端を顧みることができた、基礎研究が治療につながっていくことを期待したい、次回も参加したいなど、極めて好評です。参加者の中には生命科学への興味のほか、ご自身やご家族の病気をきっかけに関心を持たれる方もいらっしゃるようで、市民の方々の視点を踏まえながら基礎研究の意義をお伝えしていくことが大切ではないかと感じています。



第1回 平成23年2月25日	幸田尚准教授 清水則夫准教授	再生医療と最先端の生物学 インフルエンザってそんなに怖い? - 香港風邪・スペイン風邪・新型コロナウイルス・鳥...
第2回 平成23年10月28日	後藤利保准教授 新村芳人准教授	生物の形作り:カエルの形態学と疾患研究の関わり 匂いの遺伝学
第3回 平成24年2月24日	安達貴弘准教授 伊倉貞吉准教授	感染症とアレルギー 蛋白質の機能も、まずカタチから

(パブリックアフェア委員会)

各種受賞

臓器代謝ネットワーク研究部門

伊藤美智子 第16回アディポサイエンス研究会シンポジウム若手優秀ポスター賞「NASHの発症・進展と脂肪組織炎症—新しいNASHモデル・MC4R欠損マウスを用いて—」

伊藤美智子 2011年度日本肥満学会若手研究奨励賞「NASHの発症・進展と脂肪組織炎症—新しいNASHモデル・MC4R欠損マウスを用いて—」

分子代謝医学分野

小川佳宏 第4回日本糖尿病・肥満動物学会研究賞「糖尿病・肥満における慢性炎症の分子機構に関する研究」

菅波孝祥 2011年度日本肥満学会学術奨励賞

「肥満の脂肪組織における慢性炎症の分子機構の解明と医学応用」

蜂屋瑠見 第16回アディポサイエンス研究会シンポジウム若手優秀ポスター賞

「飽和脂肪酸により誘導されるストレス応答性転写因子の機能的意義の解明」

生体情報薬理学分野

小泉明子 2011年キロロカンファレンス優秀ポスター賞

古川哲史 Circulation Journal Best Reviewers of the Year 2011

神経病理学分野

岡澤均 2011年度日本神経学会楳林賞

生体防御学分野

手塚裕之 第6回日本免疫学会研究奨励賞「腸管樹状細胞によるIgA生産誘導機構の解明」

幹細胞医学分野

西村栄美 小川清寺記念賞 リディアオリリー協会

西村栄美 第8回(平成23年度)日本学術振興会賞

日本学術振興会

西村栄美 第8回(平成23年度)日本学士院学術奨励賞 日本学士院

発生再生生物学分野

横井匡 日本小児眼科学会賞受賞

生命情報学分野

Soichi Ogishima Best Poster Award in Asia Pacific Bioinformatics Conference 2011「Inference of the master regulators in the gene regulatory network of Alzheimer's disease progression.」

Ren F, Tsubota A, Hirokawa T, Kumada H, Yang Z, Tanaka H Top 10 Articles Published in the Same Domain since Your Publication 「A unique amino acid substitution, T126I, in human genotype C of hepatitis

B virus S gene and its possible influence on antigenic structural change.」

分子細胞遺伝学分野

春木茂男 第12回田中道子がん研究奨励賞「Frequent silencing of protocadherin 17, a candidate tumour suppressor for esophageal squamous-cell carcinoma.」

村松智輝 平成23年度東京医科歯科大学大学院学生研究奨励賞

ケミカルバイオロジー分野

吉田優 有機合成化学協会・ADEKA研究企画賞

菅野貴美幸 第46回有機反応若手の会ポスター賞

菅野貴美幸 日本ケミカルバイオロジー学会第6回年会ポスター賞

分子神経科学分野

相澤秀紀 平成23年度解剖学会奨励賞受賞

分子薬理学分野

長尾雅史 Plenary Poster Award. The 33rd Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR), San Diego, USA. 「Sympathetic Control of Bone Mass Regulated By Osteopontin」

2011年難治疾患研究所優秀論文賞

最優秀論文賞

手塚裕之(生体防御学分野)「Prominent role for plasmacytoid dendritic cells in mucosal T cell-independent IgA induction」 Immunity

優秀論文賞

上杉篤史(分子細胞遺伝学分野)「The tumor suppressive microRNA miR-218 targets the mTOR component Rictor and inhibits AKT」 Cancer Research

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 phosphorylation in oral cancer」 Cancer Research

山崎世和(発生再生生物学分野)「Stress-activated protein kinase MKK7 regulates axon elongation in the developing cerebral cortex」 Journal of Neuroscience

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 日開催)

大学院生受賞者

1 位 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

2 位 原園陽介 (分子細胞遺伝分野) Exploration of MET-inducing microRNA using function-based screening with expression analysis of E-cadherin in Panc1

3 位 古田薫子 (分子細胞遺伝分野) Functional スクリーニングを用いた肝細胞癌抑制性 microRNA の同定

ベストプレゼンテーション賞 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

ベストディスカッション賞 山本信祐 (分子細胞遺伝分野) Identification of microRNAs negatively regulating NRF2 pathway

難治疾患研究賞 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

萌芽賞 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

若手研究者受賞者

1 位 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

2 位 楠康一 (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

3 位 岸祐介 (免疫疾患分野) Apoptotic marginal zone deletion of anti-Sm/RNP B cells

特許申請

分子細胞遺伝分野

国内出願

特許第 4740621 号「食道癌の検出方法、および、抗食道癌物質のスクリーニング法

稲澤譲治、井本逸勢平成 23 年 5 月 13 日

海外出願

Canadian patent No. 2,411,249

European patent No. 1291424

プロジェクト研究室

山口登喜夫

「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。

ケミカルバイオロジー分野

Granted 1 件

US8067631

国際公開 3 件

WO 2011/002096, WO 2011/118394, US 2011/0244481

国内出願 2 件

特願 2011-050487, 特願 2012-026373

遺伝生化学分野

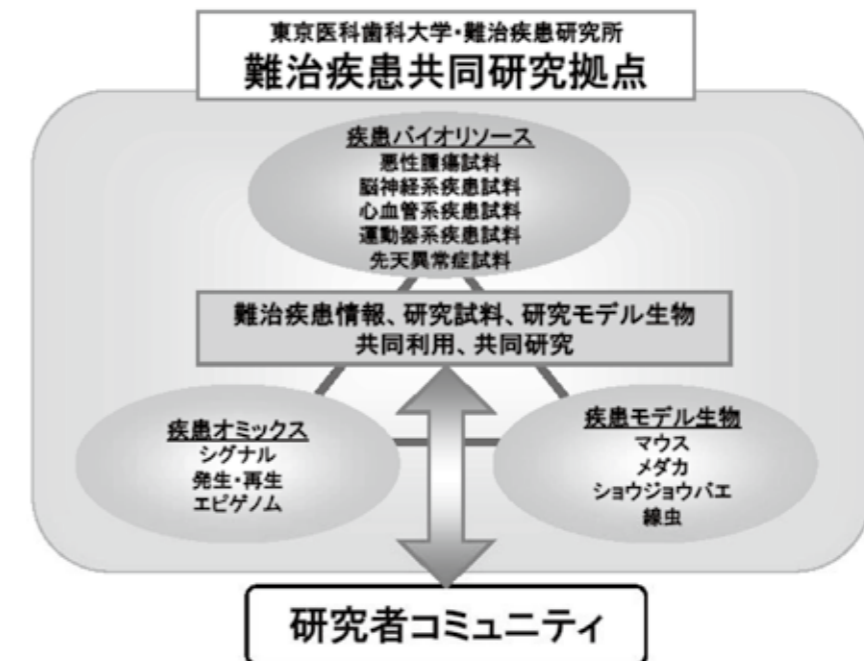
取得日 2011.11.2、特許番号 第 4809061 号「心筋細胞の増殖方法」、発明者 安達三美、中山敬一、北嶋繁孝、高木弘光 特許権者 第一三共株式会社

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。



主な平成 23 年度難治疾患共同研究拠点研究成果

代表者	研究課題名	研究成果
東京大学大学院医学系研究科 岩坪威 教授（担当教員：岡澤均 教授）	核酸結合蛋白質を標的とした神経変性疾患研究： ショウジョウバエモデルを用いた解析	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
山口大学大学院医学系研究科 寺井崇二 准教授（担当教員：小川佳宏 教授）	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	MC4R 欠損マウスを用いた新しい非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）モデルの確立
慶應義塾大学医学部 平沢晃 助教（担当教員：稲澤讓治 教授）	ゲノム・エピゲノム解析による新規婦人科癌関連遺伝子の網羅的探求とその分子機構の解明	子宮体がんのがん抑制遺伝子型マイクロRNA miR-152 を同定
大阪府立母子保健総合医療センター 岡本伸彦 遺伝診療科長 （担当教員：稲澤讓治 教授）	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	小頭症・小脳脳幹部低形成を伴う発達遅滞症の原因遺伝子 CASK の発現異常に多彩なゲノム構造異常が関与することを証明
理化学研究所バイオリソースセンター 小倉淳郎 室長（担当教員：石野史敏 教授）	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	不妊治療に用いられる顕微授精技術の影響

平成 23 年度採択課題

1) 戦略的課題 4 件

代表者	職名	代表者所属機関	研究題目
寺井 崇二	准教授	山口大学大学院医学系研究科	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	外表奇形を伴う発達遅滞 (MCA/MR) の潜在的ゲノム構造異常解析と病態解明
岩坪 威	教授	東京大学大学院医学系研究科	核酸結合蛋白質を標的とした神経変性疾患研究：ショウジョウバエモデルを用いた解析
牧野 伸司	准教授	慶應義塾大学医学部	心臓拡張機能不全モデル動物の分子病態解明を基盤とした創薬スクリーニング系の開発

2) 挑戦的課題 4 件

代表者	職名	代表者所属機関	研究題目
中田 和人	准教授	筑波大学大学院生命環境科学研究科	ミトコンドリア糖尿病に関する新規モデルマウスの作製とその解析
原田 高幸	副参事研究員	東京都神経科学総合研究所	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開発
三浦 直行	教授	浜松医科大学医学部	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
小堤 保則	教授	京大学生命科学研究科	CD22/Siglec2 糖鎖リガンドによる B リンパ球機能と自己免疫の制御についての研究

3) 一般的課題 37 件

代表者	職名	代表者所属機関	研究題目
北村 忠弘	教授	群馬大学生体調節研究所	膵 α 細胞における転写因子 ATF3 の役割
後藤 雄一	疾病研究第二部長	国立精神・神経センター神経研究所	分子生物学的手法による X 連鎖性精神発達遅滞（XLMR）の病因・病態解明
竹林 浩秀	准教授	熊本大学生命科学研究部	転写因子 Olig2 による正常神経幹細胞とグリオーマ幹細胞の分化制御の比較
麻生 佛二郎	教授	高知大学教育研究部医療学系	転写伸長因子異常症の病態の解明
平沢 晃	助教	慶應義塾大学医学部	ゲノム・エピゲノム解析による新規婦人科癌関連遺伝子の網羅的探求とその分子機構の解明
池田 康博	助教	九州大病院	正常眼圧緑内障におけるゲノム酸化障害と網膜神経節細胞死への関与
石谷 太	特任准教授	九州大学生体防御医学研究所	シグナル伝達強度を微調整する蛋白質リン酸化酵素 NLK の制御機構の解明
伊東 進	教授	昭和薬科大学	TGF-β シグナルによる血管成熟制御機構の解明
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
田中 正人	チムリーター	理化学研究所免疫アレルギー科学総合研究センター	食細胞による多様な死細胞の貪食機構とそれに伴う生体応答の解析
新沢 康英	助教	大阪大学大学院医学系研究科	モデルマウスを用いた家族性パーキンソン病の病態メカニズム解析
片桐 豊雅	教授	徳島大学疾患ゲノム研究センター	乳がん易罹患性関連遺伝子の同定とその機能解析
築地 信	准教授	星薬科大学	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
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
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	DNA 損傷チェックポイント及び修復異常に起因する先天性難治疾患遺伝病群の病因・病態解明
久場 敬司	准教授	秋田大学大学院医学系研究科	ヒト CCR4-NOT 複合体の難治性不整脈の重症化における病態生理機能の解明研究
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の病因・病態に関する基礎研究

代表者	職名	代表者所属機関	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
沢辺 元司	病理診療科部長	東京都健康長寿医療センター	ゲノムワイド関連解析で粥状硬化症関連遺伝子として同定した遺伝子の機能解析
宮木 幸一	ゲノム疫学研究室長	国立国際医療センター研究所医療情報解析研究部	メタボリック症候群の遺伝子と環境因子の交互作用の研究
関 直彦	准教授	千葉大学大学院医学研究院	癌遺伝子・癌抑制遺伝子として機能する microRNA とその標的遺伝子に存在するゲノム変異を指標とした発癌リスクのゲノム疫学研究
友田 明美	准教授	熊本大学大学院生命科学研究部	被虐待による神経発達障害に基づく被虐待児のうつ病発症脆弱性に対する分子遺伝学的研究
岡本 伸彦	遺伝診療科長	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
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
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
井本 逸勢	教授	徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部	統合的ゲノム・エピゲノム解析による新規乳癌関連遺伝子の網羅的探索
市川 大輔	学内講師	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
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
金井 克晃	准教授	東京大学大学院農学生命科学研究科	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
栗原 裕基	代謝生化学教室・教授	東京大学大学院医学系研究科	冠動脈の構造・機能の性差の研究
大海 忍	准教授	東京大学医科学研究所	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
中江 進	特任准教授	東京大学医科学研究所	エピジェネティックアプローチによる関節炎炎症機構の解析
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
佐谷 秀行	教授	慶應義塾大学医学部	TNF-α・TGF-β 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
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
山田 仁	助教	福島県立医科大学整形外科	Diaphyseal medullary stenosis(DMS) の家系例における疾患原因遺伝子探索

4) 被災研究者支援 3 件

代表者	職名	代表者所属機関	研究題目
青木 淳賢	教授	東北大学大学院薬学研究科	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
布施 昇男	准教授	東北大学	正常眼圧緑内障のモデルマウスを用いた新規治療薬の検索
西森 克彦	教授	東北大学大学院農学研究科	Lgr4 遺伝子の機能解析

5) 研究集会 3 件

代表者	職名	代表者所属機関	研究題目
明星 宏文	教授	京都大学霊長類研究所	霊長類動物モデルを用いた難治疾患研究
糸 昭苑	教授	熊本大学発生病学研究所	「器官発生の分子機構解明と疾患克服への基盤的理解」シンポジウム
高橋 良輔	教授	京都大学大学院医学系研究科	パーキンソン病とミトファジー

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

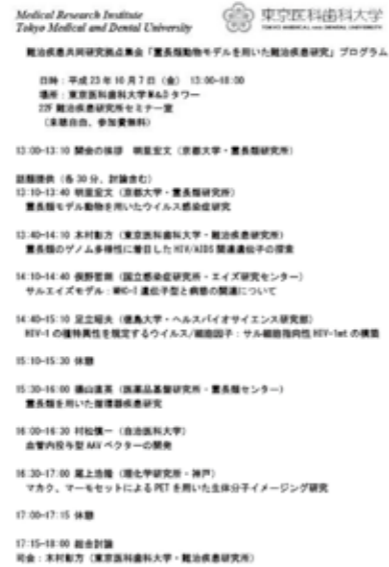
開催日	講師	演題
第 1 回 / 平成 23 年 2 月 25 日	幸田 尚 准教授	再生医療と最先端の生物学
	清水 則夫 准教授	インフルエンザってそんなに怖いのか？ - 香港風邪・スペイン風邪・新型・鳥・・・
第 2 回 / 平成 23 年 10 月 28 日	後藤 利保 准教授	生物の形作り：カエルの形態学と疾患研究の関わり
	新村 芳人 准教授	匂いの遺伝学
第 3 回 / 平成 24 年 2 月 24 日	安達 貴弘 准教授	感染症とアレルギー
	伊倉 貞吉 准教授	タンパク質の機能も、まずカタチから

学位取得者

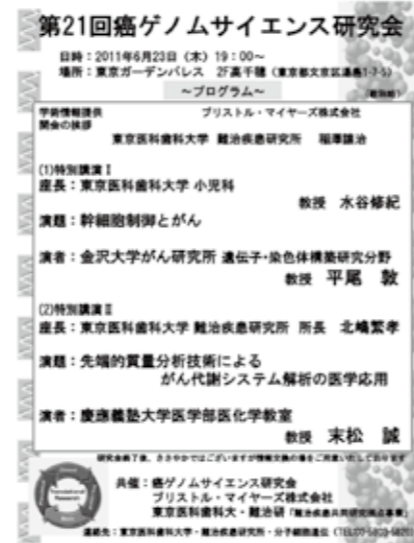
第10回駿河台シンポジウム / 第2回難治疾患共同研究拠点シンポジウム (H23.6.9 ~ 10 開催)



難治疾患共同研究拠点集会 (H23.10.7 開催) [霊長類動物モデルを用いた難治疾患研究]



第21回ゲノムサイエンス研究会 (H23.6.23 開催)



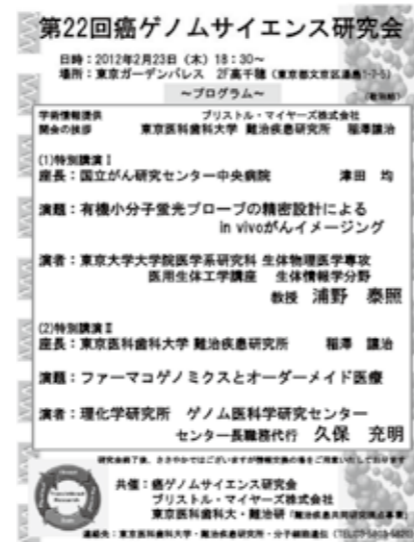
難治疾患共同研究拠点集会 (H23.6.11 開催) [パーキンソン病とミトファジー]



難治疾患共同研究拠点集会 (H23.10.21 開催) [器管発生の分子機構解明と疾患克服への基盤的理解]



第22回ゲノムサイエンス研究会 (H24.2.23 開催)



分子代謝医学分野

杉田 聡 [Metabolic analysis of transgenic mice over-expressing RXR γ in skeletal muscle: increased glucose tolerance and suppression of obesity-induced fatty liver.]

神経病理学分野

中村 蓉子 [Ataxin-7 associates with microtubules and stabilizes the cytoskeletal network.]

分子病態分野

大谷 仁志 [Molecular evolution of immunoglobulin superfamily genes in primates.]

免疫疾患分野

T.D.C. P.Gunasekara [Role of Reactive Oxygen Species(ROS) in Endosomal B cell Antigen Receptor(BCR) Signaling.]

Dong Weng [Identification of the role of novel ER stress sensor-CREB3L2 in B cell development and differentiation.]

レドックス応答細胞生物学

福西 菜穂子 [Induction of Δ Np63 by the Newly Identified Keratinocyte-Specific Transforming Growth Factor β Signaling Pathway with Smad2 and I κ B Kinase α in Squamous Cell Carcinoma]

発生再生生物学分野

横井 匡 [Establishment of Functioning Human Corneal Endothelial Cell Line with High Growth Potential.]

生命情報学分野

Todd A Johnson [hzAnalyzer: detection, quantification, and visualization of contiguous homozygosity in high-density genotyping datasets]

武藤 太和 [Proteomic study of malignant pleural mesothelioma by laser microdissection and two-dimensional difference gel electrophoresis identified cathepsin D as a novel candidate for a differential diagnosis biomarker]

高田 英明 [The current shortage and future surplus of doctors: a projection of the future growth of the Japanese medical workforce]

田中有希 [Effect of music upon awakening from nap

(short term sleep)]

幡野 晶子 [CELLPEDIA: a repository for human cell information for cell studies and differentiation analysis]

金恵 鈴 [Detecting common cytotoxic mechanisms of anticancer drugs in breast cancer cells using kernel canonical correlation analysis]

高橋 定子 [Estimation of new NRTI resistant mutations using entire RT region of HIV-1 by comprehensive covariation analysis]

吉田 いづみ [Comparative evolutionary analysis of Vpu and Nef genes of HIV and SIVs in relation to host factors]

飯島 久美子 [Expression of *MAGE D1* and *D4* genes as predictive markers for recurrence and prognosis of HCC.]

分子遺伝分野

Sadiya Malik [Analysis of the centrosome-targeting activity of a centrosome localization signal in BRCA2]

形質発現分野

川村 豪伸 [The C-terminal region of ICP27 contributes to its viral and host RNA binding activity]

大野 源太 [ASD-2 and SUP-12 regulate muscle-specific alternative splicing of the ADF/cofilin gene in *C. elegans*]

遺伝生化学分野

正木 久晴 [DPPA4 modulates chromatin structure via association with DNA and core histone H3 in mouse embryonic stem cells.]

分子神経科学分野

鈴木 啓子 [BDNF facilitates visual imprinting in chicks.]

分子薬理学分野

Paksinee Kamolratanakul [Nanogel-based scaffold delivery of prostaglandin E(2) receptor-specific agonist in combination with a low dose of growth factor heals critical-size bone defects in mice.]

佐久間 朋美 [CIZ/NMP4 is expressed in B16 melanoma and forms a positive feedback loop with RANKL to promote migration of the melanoma cells.]

難研セミナー

平成 22 年度大学院生研究発表会・若手研究者研究発表会

平成 23 年 3 月 9 日

小野宏晃 (分子細胞遺伝分野)

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

白 樺 (分子細胞遺伝分野)

Inactivation of LC3A variant-1 gene in human cancers

杉田聡 (分子代謝医学分野)

Metabolic analysis of transgenic mice overexpressing RXRg in skeletal muscle: increased glucose tolerance and suppression of obesity-induced fatty liver.

村松智輝 (分子細胞遺伝分野)

食道扁平上皮がんにおける YAP のがん遺伝子としての働き

本田尚三 (分子細胞遺伝分野)

日本人 XLMR の 2 家系に見出された同一の複雑な X 染色体短腕ゲノム再構成は中央アジアを創始とする

上杉篤史 (分子細胞遺伝分野)

機能的スクリーニングによる口腔癌関連新規癌抑制遺伝子型 microRNA の検索

古田繭子 (分子細胞遺伝分野)

新たな RNA 創薬に寄与する肝細胞癌抑制性 microRNA の同定と機能解析

大石咲子 (生体情報薬理学分野)

心房伸展における細胞外 ATP を介した心房の炎症メカニズム

大谷仁志 (分子病態分野)

霊長類における、免疫グロブリンスーパーファミリー遺伝子群の分子進化

柏木太一 (幹細胞制御分野)

神経幹細胞のニューロン / グリア分化プレファレンスを調節する分子 Sprouty4

片岡直行 (MTT プログラム)

低分子化合物によるエクソンスキッピングの筋ジストロフィー治療への応用

石原孝也 (分子細胞遺伝分野)

がん細胞におけるユビキチンリガーゼ ITCH 過剰発現の意義

江花有亮 (生体情報薬理学分野)

心房細胞関連遺伝子座 4q25 における臨床像との関連と機能解析

平成 21 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 23 年 3 月 9 日

岩井佳子 (MTT プログラム)

転写因子 BATF を標的とした免疫抑制剤、抗アレルギー剤の開発

佐藤卓 (生体防御学分野)

白血病幹細胞を標的とした I 型インターフェロン

と分子標的薬の併用による新規慢性骨髄性白血病

根治療法の確立

青戸隆博 (幹細胞医学分野)

白髪をモデルにしたゲノム損傷ストレスによる組織老化の分子基盤の解明

相田知海 (分子神経科学分野)

緑内障の病態解明と予防的遺伝子診断法の開発

2010 年難治疾患研究所優秀論文賞受賞者講演会

平成 23 年 3 月 9 日

有村卓朗 (分子病態分野)

Improvement of Left Ventricular Dysfunction and of Survival Prognosis of Dilated Cardiomyopathy by Administration of Calcium Sensitizer SCH00013 in a Mouse Model

根岸崇大 (発生再生生物学分野) 【代理講演：浅岡洋一】

Retinoic acid signaling positively regulates liver specification by inducing wnt2bb gene expression in medaka.

塩飽裕紀 (神経病理学分野)

Suppression of the novel ER protein Maxer by mutant ataxin-1 in Bergman glia contributes to non-cell-autonomous toxicity.

第 27 回難治疾患共同研究拠点セミナー

井村裕夫 (京都大学 名誉教授、財団法人先端医療振興財団 理事長)

超高齢社会における医療の未来 –とくに先制医療を中心に–

平成 23 年 5 月 12 日

難研セミナー (難治疾患共同研究拠点セミナー)

第 455 回 (第 28 回)

松岡雅人 (東京女子医科大学 医学部 衛生学公衆衛生学 教授)

カドミウム刺激からみた細胞応答反応

平成 23 年 4 月 21 日

第 456 回 (第 29 回)

宮野悟 (東京大学 医科学研究所 ヒトゲノム解析センター 教授)

次世代生命医学研究の鍵—スーパーコンピュータ

井元清哉 (東京大学 医科学研究所 ヒトゲノム解析センター 准教授)

ベイジアンネットワークによる大規模データ統計解析が迫る生命システムの多様性

谷本幸介 (東京医科歯科大学 難治疾患研究所 ゲノム解析室 助教)

ChIP-Seq による低酸素誘導因子 HIF-1_α 結合部位の解析

平成 23 年 5 月 9 日

第 457 回 (第 30 回)

林秀樹 (熊本大学 大学院 先端機構代謝病態学分野 特任助教)

アポリポ蛋白 E 含有リポ蛋白の中樞神経障害に対する役割

平成 23 年 9 月 9 日

第 458 回 (第 31 回)

中田慎一郎 (慶應義塾大学 医学部 総合医科学研究センター 特任講師)

DNA二本鎖損傷応答におけるクロマチンユビキチン化制御

平成 23 年 9 月 29 日

第 459 回 (第 32 回)

下田美智子 (Assistant Professor, Immunotherapy Center, Department of Pathology Georgia Health Sciences University)

B細胞による IL-10 産生を伴う炎症性 CD8 細胞活性化

平成 23 年 10 月 20 日

第 460 回 (第 33 回)

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

Transcription factor control of transitions in pluripotent cell states

平成 23 年 10 月 31 日

第 461 回 (第 34 回)

小布施力史 (北海道大学 大学院 先端生命科学研究院 教授)

不活性 X 染色体における構成的ヘテロクロマチンと条件的ヘテロクロマチンとのクロストーク

平成 23 年 10 月 31 日

第 462 回 (第 35 回)

佐渡島純一 (ニュージャージー医科大学 教授)

心臓における Hippo pathway の役割

平成 23 年 12 月 16 日

第 463 回 (第 36 回)

Alysson Renato Muotri (Assistant Professor University of California San Diego)

Shared molecular pathways in human neurons derived from autistic patients

平成 23 年 12 月 14 日

第 464 回 (第 37 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)

高次元のゲノミクス解析

平成 23 年 11 月 24 日

第 465 回 (第 38 回)

加藤護 (コールドスプリングハーバー研究所 ポストドクトラルフェロー)

Computational analysis of CNVs in germline cells and CNAs in cancer cells

平成 24 年 1 月 12 日

第 466 回 (第 39 回)

Luonan Chen (Professor Key Laboratory of Systems Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences)

Inferring gene regulatory networks from gene expression data by PC-algorithm

平成 23 年 12 月 28 日

第 467 回 (第 40 回)

Siegfried LABELIT (Professor, Chair, Dept. for Integrative Pathophysiology, University Hospital Mannheim, Germany)

Regulation of Muscle Trophicity by MuRF-Family E3 Ubiquitin Ligases

平成 24 年 2 月 3 日

第 468 回 (第 41 回)

Yong Cai (Professor, Dept. of Epigenetics, College of Life Science, Jilin University, Changchun City, Jilin Province, China)

Functional Analyses of human Chromatin Remodeling and Modifying Enzymes

平成 24 年 2 月 20 日

第 469 回 (第 42 回)

伊東進 (昭和薬科大学 生化学研究室 教授)

TGF- β シグナルからの逸脱と疾患

平成 24 年 2 月 29 日

第 470 回 (第 43 回)

中川英刀 (理化学研究所 ゲノム医科学研究センター バイオマーカー探索・開発チーム チームリーダー)

がんゲノムシークエンスと世界の動向

平成 24 年 3 月 28 日

第 471 回 (第 44 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 - 特に細胞間相互作用のシーケンシング解析を例に -

平成 24 年 3 月 29 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。

分子代謝医学

- 飢餓により誘導される骨髄B細胞分化障害における中枢レプチンシグナルの重要性を明らかにした。
- メラノコルチン4型受容体欠損マウスが非アルコール性肝炎の新しいモデル動物になることを明らかにした。
- 骨格筋特異的にRXR γ を発現するトランスジェニックマウスでは骨格筋における糖取込みと全身糖代謝の亢進が認められることを明らかにした。

分子薬理学

- オステオポンチンが、アドレナリン受容体 $\beta 2$ の活性を制御する事により、交感神経刺激による骨量減少に必要とされることを示した。
- Dok-1/Dok-2 遺伝子欠損は、破骨細胞活性化を介して、骨減少を誘導することを示した。
- MURF1 遺伝子欠損は、非荷重によって誘導される骨芽細胞と破骨細胞への効果を抑制することを明らかにした。

分子細胞生物学

- WNK シグナル伝達経路が神経分化に関与することを示した。
- IQGAP1 が β カテニンの核移行に関与することを示した。

分子神経科学

- グリア細胞におけるBDNFシグナルは、神経保護と新生に重要な役割を果たすことを明らかにした。
- グルタミン酸トランスポーターの欠損は、アルツハイマー病モデルの認知障害を悪化させることを明らかにした。

生体防御学

- 形質細胞様樹状細胞への優れた分化能をもつ新しい樹状細胞前駆細胞の同定に成功した。
- 樹状細胞が血球貪食により過剰な免疫・炎症反応を抑制するという、新たな免疫寛容誘導の仕組みを見出した。

生体情報薬理

- 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

- 胎生期神経幹細胞が低酸素環境下でVEGFの産生を介してニューロスフィア形成を増強させることを見出し低酸素ニッチを明らかにした。
- 胎生期に最初に成体型造血が観察されるAGM領域の造血幹細胞の発生と未分化性の長期間の維持にSox17が寄与することを明らかにした。
- 癌幹細胞が、薬剤蓄積性と抵抗性をもつ血管内皮細胞に分化する能力を持つことを示し、癌の治療標的に新たな示唆を与えることができた。

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

教授：小川佳宏 准教授：菅波孝祥

研究内容

過栄養や運動不足等のライフスタイルの欧米化に伴ってメタボリックシンドロームや生活習慣病の罹患率は増加の一途を辿り、これらの克服は国民医療の観点からも極めて重要な課題である。分子代謝医学分野は、内臓脂肪型肥満を背景として糖脂質代謝異常、高血圧を発症するメタボリックシンドロームと動脈硬化性疾患の分子機構の解明と新しい治療戦略の確立を目指している。以上の基礎研究より得られた成果の医学応用を念頭に置いたトランスレーショナルリサーチを実践することにより、これまでに例のない高齢化社会を迎えつつある我が国において国民の健康、医療、福祉の向上に貢献したい。

研究紹介

1. メタボリックシンドロームと慢性炎症

A. 肥満の脂肪組織炎症に関する研究：

肥満あるいは内臓脂肪型肥満を基盤として発症するメタボリックシンドロームは動脈硬化性疾患の前段階として位置付けされており、そ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。一方、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して注目されている。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 /TLR4/NF- κ B 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ことを明らかにした。骨髄マクロファージを用いた M1・M2 マクロファージの *in vitro* 分化系において、Mincle は炎症促進性 M1 マクロファージ選択的に発現していた。ヒト皮下脂肪組織において、Mincle 遺伝子発現は BMI と有意な正相関が認められた ($r^2 = 0.3589$)。Mincle は結核菌や真菌に対する病原体センサーとして生体の感染防御に働くことが報告されているが、本研究により、Mincle が肥満の脂肪組織炎症の発症・進展に関与する可能性が示唆された (Diabetes 60: 819-826, 2011)。

B. 新しい NASH モデル動物の確立と新規治療戦略の開発に関する研究：

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD: non-alcoholic fatty liver disease) はメタボリックシンドロームの肝臓における表現型と考えられており、特に、非アルコール性脂肪肝炎 (NASH: non-alcoholic steatohepatitis) はしばしば肝硬変症や肝癌に進行する疾患として注目されている。NASH の発症機構としては、脂質の蓄積 (1st hit) に引き続き、炎症性サイトカインや酸化ストレスなどの炎症機転 (2nd hit) により組織線維化が誘導されるという「Two hit 仮説」が提唱されているが、詳細な分子機構は不明である。更に、NASH の病態の経時変化を反映する優れたバイオマーカーがないため確定診断や重症度判定には肝生検が必須であること、一旦発症した NASH は多くの場合は進行性であり有効な治療法がないことが臨床的に大きな問題となっている。最近、我々は、中枢性エネルギー代謝調節に関与するメラノコルチン 4 型受容体 (MC4R: melanocortin 4 receptor) を欠損するマウス (MC4R-KO マウス) に高脂肪食を負荷することにより、新しい NASH モデルマウスの確立に成功した (Am. J. Pathol. 179: 2454-2463, 2011)。本モデル動物では、脂肪組織の慢性炎症により遊離脂肪酸が過剰に放出され、肝臓の異所性脂肪蓄積 (脂肪肝) からヒトの NASH に特徴的な肝組織像 (小葉内炎症細胞浸潤、肝細胞風船様変性、肝細胞周囲性線維化) を経て、多発性の肝細胞癌を発症する (図 1)。本モデル動物は、NASH に対する新しい治療戦略の開発に有用であると期待される。

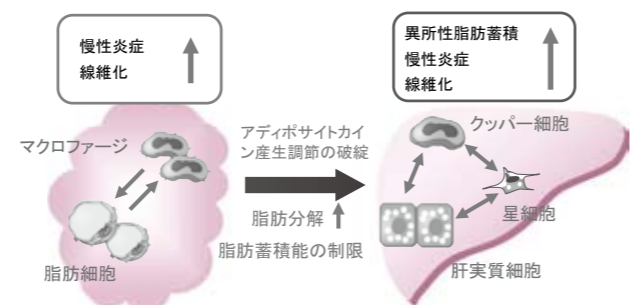


図 1 NASH の病態形成における脂肪組織の慢性炎症

2. 生体の栄養センサー・レプチンによる炎症免疫調節の分子機構

肥満や栄養飢餓において、生体の栄養状態を感知して免疫応答や炎症反応を制御する分子機構は、未だ十分に理解されていない。レプチンは代表的なアディポサイトカインであり、体脂肪量に比例して産生され、視床下部を介して摂食抑制やエネルギー消費の亢進に働く。すなわち、レプチンは、末梢の栄養状態を中枢神経系に伝達し、生体の恒常性維持に働く栄養センサーと捉えることができる。従来、絶食に伴う胸腺の萎縮や末梢血リンパ球の減少にレプチンの関与が報告されているが、その分子機構は不明であった。本研究において我々は、絶食により血中レプチン濃度の低下と骨髄 B リンパ球の分化異常を認めること、レプチンを補充することにより B リンパ球の分化異常が回復することを見出した。一方、遺伝的にレプチンを欠損する *ob/ob* マウスは、過食による肥満や高血糖など絶食マウスとは逆の表現型を呈するにもかかわらず、絶食と同様の骨髄 B リンパ球分化異常が認められた。レプチン受容体は骨髄 B リンパ球にも発現しているが、少量のレプチンを脳室内に補充することにより、絶食マウスや *ob/ob* マウスで認められる骨髄 B リンパ球分化異常はほぼ完全に回復することが明らかになった。以上より、中枢神経系を介するレプチンの炎症免疫調節作用が示唆された (図 2) (J. Neurosci. 31: 8373-8380, 2011)。

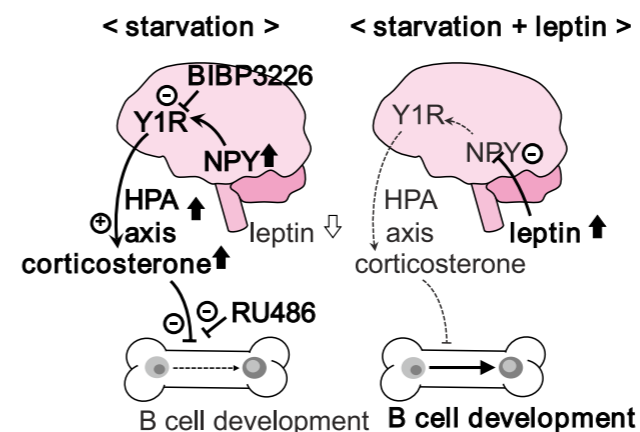


図 2 中枢神経系を介したレプチンの免疫調節作用
絶食下では、中枢レプチンシグナルの欠損により視床下部の NPY-Y1 受容体経路が活性化され、コルチコステロン産生増加を介して骨髄 B リンパ球分化異常が生じるが、中枢へのレプチンの補充によりその分化異常は抑制される (HPA axis, Hypothalamus-pituitary-adrenal axis)。

3. メタボリックシンドロームの標的器官としての骨格筋

骨格筋は人体で最大の組織であり、エネルギー代謝や糖取り込み、運動において重要な役割を果たす。核内受容体 Retinoid X Receptors (RXR) のサブタイプの一つである RXR γ は骨格筋に高発現するが、全身の糖・脂質代謝における骨格筋 RXR γ の意義は不明である。我々

は既に、核内受容体 RXR γ を骨格筋特異的に過剰発現するマウス (RXR γ マウス) を作出し、RXR γ マウスは血糖値が低下することを報告した。本研究では、RXR γ マウスを用いて、肥満により誘導される糖代謝の悪化における骨格筋の RXR γ の機能的意義を検討した。通常食で飼育した RXR γ マウスは骨格筋において、糖輸送担体である Glut1 の発現が増加しており、糖取り込みの増加が認められた。遺伝性肥満 KKA^y マウスとの交配により肥満を誘導すると RXR γ マウスは対照マウスと比較して、肥満による糖代謝の悪化が著しく抑制された。更に、RXR γ マウスでは肥満により誘導される脂肪肝と肝臓におけるインスリン感受性の改善が認められた。以上より、RXR γ マウスでは、骨格筋における糖取り込みの増加が全身の糖代謝を改善すると考えられ、肥満により誘導される糖代謝障害において骨格筋 RXR γ の創薬ターゲットとしての可能性が示唆された (PLoS ONE 6: e20467, 2011)。

4. メタボリックシンドロームのエピジェネティクス制御

多くの疫学調査により胎生期の栄養環境が成人期に発症する肥満や生活習慣病に関連する可能性が指摘されている。一方、胎生期のみならず個体の成長が著しい新生児期も全身臓器の可塑性が高い時期であり、新生児期の栄養環境が成人期の肥満や生活習慣病の疾患感受性に影響を与える可能性がある。本研究では、バイサルファイト法により種々の栄養状態においてマウスの肝臓における脂肪合成遺伝子の DNA メチル化状態を検討し、肝脂肪合成の律速酵素グリセロール 3 リン酸アシル基転移酵素 1 (GPAT1) 遺伝子プロモーターにおける DNA メチル化の程度が遺伝子発現と逆相関することを明らかにした。DNA メチル化の変化は GPAT1 遺伝子プロモーターに特異的であり、脂肪酸合成酵素 (FAS) や stearoyl CoA desaturase 1 (SCD1) など他の脂肪合成遺伝子には認められなかった。又、GPAT1 遺伝子プロモーターには DNA メチル化酵素がリクルートされることが判明した。更に、妊娠期～授乳期の母獣の栄養状態により仔マウス肝臓の GPAT1 遺伝子プロモーターの DNA メチル化が変動しうることが明らかになった。以上より、DNA メチル化により GPAT1 遺伝子はエピジェネティクス制御を受けることが示唆された。

ハイライト

グルコースクランプ法：

インスリン抵抗性の主な責任臓器は肝臓、骨格筋であると考えられている。我々は、臓器別インスリン感受性評価法として、マウスのグルコースクランプ法を導入し、糖尿病マウスモデルの病態の解明を行なっている。グルコースクランプ試験 (hyperinsulinemic-euglycemic clamp) では全身の糖利用率 (glucose infusion rate) および肝臓での糖産生率と骨格筋での糖取り込み率を測定でき、全身のインスリン抵抗性のみならず、各臓器でのインスリン抵抗性の状態について評価可能である。我々は、グルコースクランプ試験により、RXR γ マウスの骨格筋においてインスリン感受性が亢進することを見出した。

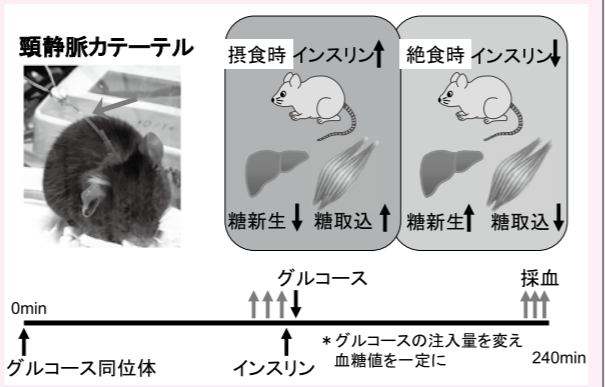


図3 マウスの頸静脈カテーテルにカテーテルを留置する (写真)。グルコースクランプ試験では、一定量のインスリンに対し、一定の血糖値を維持するようにグルコース (グルコース安定同位体を一定量含む) を投与する。投与したグルコースの量および血中の安定同位体の量を測定し、骨格筋に取り込まれたグルコース量と肝臓の糖産生量を計算する。

人事異動

転入：蜂屋瑠見 (日本学術振興会特別研究員)、池田賢司 (大学院生)、小沼邦業 (大学院生)、櫻井俊之 (大学院生)
転出：亀井康富 (准教授)、田中都 (特任助教)、伊藤美智子 (特任助教)、杉田聡 (大学院生)

業績目録

原著論文

- M. Ichioka, T. Suganami, N. Tsuda, I. Shirakawa, Y. Hirata, N. Satoh-Asahara, Y. Shimoda, M. Tanaka, M. Kim-Saijo, Y. Miyamoto, Y. Kamei, M. Sata, Y. Ogawa. Increased expression of macrophage-inducible C-type lectin in adipose tissue of obese mice and humans. *Diabetes* 60: 819-826, 2011.
- N. Satoh-Asahara, T. Sugamami, T. Majima, K. Kotani, Y. Kato, R. Araki, K. Koyama, T. Okajima, M. Tanabe, M. Oishi, A. Himeno, S. Kono, A. Sugawara, M. Hattori, Y. Ogawa, A. Shimatsu; The Japan Obesity Metabolic Syndrome Study (JOMS) Group. Urinary cystatin C as a potential risk marker for cardiovascular disease and chronic kidney disease in patients with obesity and metabolic syndrome. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 6: 265-273, 2011.
- M. Tanaka, T. Suganami, M. Kim-Saijo, C. Toda, M. Tsujii, K. Ochi, Y. Kamei, Y. Minokoshi, Y. Ogawa. Role of central leptin signaling in the starvation-induced alteration of B cell development. *J. Neurosci.* 31: 8373-8380, 2011.
- S. Sugita, Y. Kamei, F. Akaike, T. Suganami, S. Kanai, M. Hattori, Y. Manabe, N. Fujii, T. Takai-Igarashi, J. Oka, H. Aburatani, T. Yamada, H. Katagiri, S. Kakehi, Y. Tamura, S. Takasuga, T. Sasaki, H. Kubo, K. Nishida, S. Miura, O. Ezaki, Y. Ogawa. Metabolic analysis of transgenic mice overexpressing RXR γ in skeletal muscle: increased glucose tolerance and suppression of obesity-induced fatty liver. *PLoS ONE* 6: e20467, 2011.
- M. Itoh, T. Suganami, N. Nakagawa, M. Tanaka, Y. Yamamoto, Y. Kamei, S. Terai, I. Sakaida, Y. Ogawa. Melanocortin-4 receptor-deficient mice as a novel mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. *Am. J. Pathol.* 179: 2454-2463, 2011.

著書・総説

- 西條美佐、菅波孝祥、小川佳宏：「脂肪組織における自然炎症の形成機序」：糖尿病・代謝・内分泌 2011. 98-105, 2011
- 菅波孝祥、小川佳宏：「肥満症と炎症」：日本内科学会雑誌 100(4): 989-995, 2011
- 菅波孝祥、小川佳宏：「肥満症と慢性炎症」：実験医学増刊 慢性炎症—多様な疾患の基盤病態 29(10): 68-74, 2011
- 田中都、菅波孝祥、小川佳宏：「レプチンの炎症・免疫調節作用とCKD」：アディポサイエンス 7(4):327-332, 2011
- 田中都、菅波孝祥、小川佳宏：「脂肪組織炎症とマクロファージ」：最新医学 66:229-236,2011
- 浅原哲子、小川佳宏：「特集動脈硬化の危険因子・メタボリックシンドローム」：総合臨床 60(10): 2039-2046, 2011
- 小川佳宏：「肥満と自然炎症」：日本薬理学雑誌くすりとからだファーマコロジカ 138(5):178-181, 2011
- 江原達弥、亀井康富、高橋真由美、袁勳梅、小川佳宏：「栄養環境と代謝のエビジュネティクス」：実験医学 29(14): 2217-2222, 2011
- 亀井康富、杉田聡、服部真季、小川佳宏：「飢餓における骨格筋代謝調節」：アディポサイエンス 7(3): 220-224, 2011
- 亀井康富、小川佳宏：「脂肪細胞の分子生物学」：臨床検査 55(6): 539-542, 2011
- 亀井康富、小川佳宏：「エビジュネティクスと代謝性疾患」：MedChem News (日本薬学会医薬科学部会) 21(4): 31-33, 2011
- 小川佳宏、浅原哲子：高血圧ナビゲーター第3版 第4章 発症機序・病態 15. 「レプチン」：メディカルレビュー社
- 田中都、菅波孝祥、小川佳宏：Surgical Trauma & Immunological Responses 侵襲と免疫 Vol.20 No.2 特集：侵襲に対する生体反応の個体差 「4. 肥満における生体反応」：メディカルビュー社
- 菅波孝祥：病態から学ぶ新腎臓内科学 「酸化ストレスと炎症」：診断と治療社
- 菅波孝祥：病態から学ぶ新腎臓内科学 「糖・インスリンと脂肪細胞由来因子」：診断と治療社
- M. Itoh, T. Suganami, R. Hachiya, and Y. Ogawa. Adipose tissue remodeling as homeostatic inflammation. *Int. J. Inflamm.* 2011: 720926, 2011.

雑誌企画・監修

小川佳宏 (編集)：アディポサイエンス 特集 2011年3月「やせとアディポサイエンス」 フジメディカル出版

学会発表

- 江原達弥、亀井康富、金井紗綾香、高橋真由美、袁勳梅、菅波孝祥、小川佳宏：「グリセロール3リン酸アシル基転移酵素1 (GPAT1) 遺伝子のDNAメチル化による発現制御」第32回日本肥満学会学術大会, 2011.9.23-24, 淡路
- 田中都、菅波孝祥、西條美佐、築地信、越智梢、亀井康富、小川佳宏：「骨髄Bリンパ球分化に及ぼす中枢レプチンシグナルの作用機序の解明」第32回日本肥満学会学術大会, 2011.9.23-24, 淡路
- 岩崎順博、菅波孝祥、蜂屋瑠見、白川伊吹、西條美佐、袁勳梅、亀井康富、小川佳宏：「飽和脂肪酸による新たな炎症性サイトカイン転写制御機構の検討」第32回日本肥満学会学術大会, 2011.9.23-24, 淡路

シンポジウム・招待講演

- 澤田直樹「血管内皮による神経保護の分子メカニズム-低分子量G蛋白Rac1の役割」第40回日本心臓血管作動物質学会シンポジウム, 2011.2.4-5, 高松
- Yoshihiro Ogawa: Adipose tissue remodeling homeostatic inflammation：2011 Seoul Symposium on Obesity & Diabetes, 2011.4.9, Seoul
- 菅波孝祥、伊藤美智子、小川佳宏：「メタボリックシンドロームの臓器相関における脂肪組織マクロファージの意義」：第84回日本内分泌学会, 2011.4.21-23, 神戸
- 小川佳宏：「エビジュネティクス機構による細胞制御と病態」：ネスレ栄養科学会議, 2011.5.14, 東京
- 伊藤美智子、菅波孝祥、小川佳宏：「EPAとメタボリックシンドローム」：第54回日本糖尿病学会年次学術集会, 2011.5.19-21, 札幌
- 菅波孝祥、小川佳宏：「脂肪組織の慢性炎症」：第54回日本糖尿病学会年次学術集会, 2011.5.19-21, 札幌
- 菅波孝祥、小川佳宏：「脂肪組織の慢性炎症」：第54回日本糖尿病学会年次学術集会, 2011.5.19-21, 札幌
- 小川佳宏：「メタボリックシンドロームと慢性

炎症」：第11回日本抗加齢医学総会, 2011.5.27-29, 京都

9. Yoshihiro Ogawa: Epigenetic Modifications Underlying Insulin Resistance：THE ENDOCRINE SOCIETY’S 93RD ANNUAL MEETING & EXPO (ENDO2011), 2011.6.4-7, Boston

10. Yoshihiro Ogawa: Epigenetic Regulation of Metabolic Diseases：THE ENDOCRINE SOCIETY’S 93RD ANNUAL MEETING & EXPO (ENDO2011), 2011.6.4-7, Boston

11. 小川佳宏：「メタボリックシンドロームと慢性炎症」：熊本大学最先端・次世代研究開発プログラム キックオフシンポジウム 特別講演, 2011.6.30, 熊本

12. Yoshihiro Ogawa: Homeostatic inflammation: A molecular basis underlying metabolic diseases:International Symposium on Inflammation and Disease: 2011.9.8-9, Academia Sinica, 台湾

13. 菅波孝祥、小川佳宏：「病原体センサーと慢性炎症」：第32回日本肥満学会, 2011.9.23-24, 淡路

14. 小川佳宏：「慢性炎症からみたメタボリックシンドローム」：日本薬理学会第39回薬物活性シンポジウム, 2011.11.21-22, 福岡

15. 菅波孝祥、小川佳宏：「Role of saturated fatty acids in adipose tissue inflammation」：第19回日本血管生物医学学会学術集会, 2011.12.8-10, 東京

16. Naoki Sawada, Aihua Jiang, Fumihiko Takizawa, Kevin Croce, Andre Manika, Yevgenia Tesmenitsky, Kyu Tae Kang, Joyce Bischoff, Hermann Kalwa, Thomas Michel, Yasutomi Kamei, Laura E. Benjamin, Masataka Sata, Shuki Mizutani, Yoshihiro Ogawa, Zolt Arany: 「Endothelial PGC-1alpha is highly responsive to metabolic stress and serves as a key determinant of angiogenic response」：第19回日本血管生物医学学会学術集会, 2011.12.8-10, 東京

17. 小川佳宏：「Chronic inflammation, a molecular basis underlying the metabolic syndrome」：第34回日本分子生物学会年会, 2011.12.13-16, 横浜

18. 菅波孝祥、小川佳宏：「Obesity and adipose tissue inflammation」：第34回日本分子生物学会年会, 2011.12.13-16, 横浜

セミナー・研究会

- 小川佳宏：「メタボリックシンドロームと慢性炎症」：Vascular Endocrinology Conference, 2011.2.3, 徳島
- 小川佳宏：「メタボリックシンドロームと自然炎症」：医学と医療の最前線を勉強する会, 2011.2.8, 宮崎
- 澤田直樹：「脳心血管系における低分子量G蛋白Rac1の多様な機能」：第99回福岡心臓血管研究会, 2011.5.16, 福岡
- 小川佳宏：「メタボリックシンドロームと自然炎症」：糧食研究会特別講演, 2011.7.1, 東京
- 小川佳宏：「メタボリックシンドロームと自然炎症」：第214回川崎医学会講演会, 2011.7.26, 岡山
- 小川佳宏：「メタボリックシンドロームと自然炎症」：第24回玄鼻糖尿病カンファレンス特別講演, 2011.9.28, 千葉
- 江原達弥、亀井康富、金井紗綾香、高橋真由美、袁勳梅、菅波孝祥、小川佳宏：「肝脂肪合成遺伝子のエビジュネティクス制御：DNAメチル化に着目して」：第8回FAT-DM研究会, 2011.10.26, 東京
- 小川佳宏：「メタボリックシンドロームと自然炎症」：第6回呼吸リハビリテーションサイエンスフォーラム特別講演, 2011.10.29, 秋田
- 小川佳宏：「メタボリックシンドロームと自然

炎症」：第22回日本レチノイド研究会特別講演, 2011.11.11-12, 東京

10. 小川佳宏：「生活習慣病のエピゲノム制御」：大阪大学蛋白質研究所セミナー 疾患におけるエピゲノム異常の分子機構, 2011.11.17-18, 大阪

11. 小川佳宏：「メタボリックシンドロームと自然炎症」：第27回高知県内分泌代謝研究会特別講演, 2011.11.30, 高知

研究助成金

- 小川佳宏：文部科学省科学研究費補助金、基盤研究 (B)「DNAメチル化に着目したメタボリックメモリーの分子機構の解明と医学応用」
- 小川佳宏：文部科学省科学研究費補助金、挑戦的萌芽研究「骨格筋におけるDNAメチル化標的遺伝子の同定と医学応用」
- 小川佳宏：文部科学省科学研究費補助金、新学術領域研究「メタボリックシンドロームにおける内因性リガンドと病原体センサーの機能的意義の解明」
- 小川佳宏：厚生労働省科学研究費補助金、難治性疾患克服事業「中性性摂食異常症に関する調査研究」
- 小川佳宏：厚生労働省科学研究費補助金、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」
- 小川佳宏：厚生労働省科学研究費補助金、成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業「母子コホート研究による成育疾患の病態解明に関する研究」
- 小川佳宏：科学技術振興機構、橋渡し研究支援推進プログラム「骨髄由来 liver repair cell (LR細胞) の開発」
- 菅波孝祥：文部科学省科学研究費補助金、若手研究 (A)「メタボリックシンドロームにおける遊離脂肪酸ダイナミズムの分子機構の解明」
- 菅波孝祥：文部科学省科学研究費補助金、挑戦的萌芽研究「新規病原体センサー・内因性リガンド系が織りなす急性腎不全の新たな制御機構の解明」
- 菅波孝祥：文部科学省科学研究費補助金、新学術領域研究「新しい非アルコール性脂肪性肝炎モデルを用いた異所性脂肪蓄積の分子機構の解明」
- 澤田直樹：文部科学省科学研究費補助金、基盤研究 (C)「転写因子コアクチベータ PGC-1 α による血管内皮遊走・血管新生制御機構」
- 澤田直樹：文部科学省科学研究費補助金、新学術領域研究「血管内皮による神経再生作用の賦活化におけるRac1 GTPaseの意義の検討」
- 西條美佐：文部科学省科学研究費補助金、基盤研究 (C)「T細胞分極化阻止因子GIFの脂肪組織リモデリング制御における分子機構の解明」
- 蜂屋瑠見：文部科学省科学研究費補助金、特別研究員奨励費「メタボリックシンドロームにおける転写抑制因子ATF3の抗炎症作用の解明と医学応用」
- 菅波孝祥：臨床薬理研究振興財団研究奨励金「新しい疾患モデル動物を用いた非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) の治療戦略の開発に関する研究」
- 澤田直樹：持田記念医学薬学振興財団「血管内皮Rac1 GTPaseを標的とした神経血管ユニット・神経血管ニッチ機能の新規制御法の開発」
- 澤田直樹：鈴木謙三記念医学科学応用研究財団「糖尿病における内皮機能障害の分子メカニズム：代謝ストレス応答性転写コアクチベータPGC-1 α による血管内皮のVEGF応答性制御機構」
- 澤田直樹：先進医薬研究振興財団「血管内皮による神経再生賦活化の制御における内皮Rac1 GTPaseの役割の検討」
- 岩崎順博：田附興風会医学研究所 平成23年度きたの研究奨励金「肥満における慢性炎症の転写制御メカニズムの検討」

他大学への特別講義

小川佳宏：愛媛大学医学部医化学第一講座 非常勤講師
京都大学大学院医学研究科内分泌・代謝内科 非常勤講師
京都大学再生医科学研究所 非常勤講師
千葉大学大学院医学研究院代謝生理学 非常勤講師
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 非常勤講師

難治疾患研究所 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. Dok-1/Dok-2 欠損は、破骨細胞活性化を介して、骨減少を誘導する (川俣綾、早田匡芳、江面陽一、野田政樹)。

骨粗鬆症は、生活の質の減少につながる骨折を引き起こすが、人口の約 10%に発症するという、最も蔓延している疾患の一つである。骨粗鬆症の重要な特徴の一つは、骨減少であるが、その病因は完全には解明されていない。Dok-1 と Dok-2 は、主に血球系の細胞に発現するタンパク質チロシンリン酸化酵素の下流で作用するアダプタータンパク質である。これらのタンパク質は、免疫系を負に制御するが、骨代謝における役割は理解されていない。本研究においては、骨における Dok-1 と Dok-2 の二重欠損の効果を解析した。Dok-1/2 欠損マウスでは、海綿骨と皮質骨の骨量が減少し、長管骨の骨幹部の外周長および内周長が減少した。骨形態計測学的解析により、Dok-1/2 欠損は、骨表面石灰化率、骨石灰化速度、骨形成速度などの骨形成パラメーターのレベルは有意な変化を起こさなかった。一方、Dok-1/2 欠損は、破骨細胞数(骨面)と破骨細胞面(骨面)などの骨吸収パラメーターレベルを促進した。全身性には、Dok-1/2 欠損は尿中デオキシピリジノリンのレベルを増加させた。In vitro で、Dok-1/2 欠損破骨細胞は、骨吸収窩形成を促進し、また、マクロファージ刺激因子 (M-CSF) への感度が亢進していた。これらの結果から、Dok-1 と Dok-2 欠損が破骨細胞の活性化による骨減少を引き起こすということが明らかにされた (J Cell Physiol, 2011)。

2. MURF1 欠損は、非荷重によって誘導される骨芽細胞と破骨細胞への効果を抑制する (近藤久貴、江面陽一、早田匡芳、野田政樹)。

メカニカルストレスの低下あるいは非荷重は、廃用性骨粗鬆症を引き起こす。廃用性骨粗鬆症は、高齢者において、骨折を引き起こし、体の機能を低下させ、死亡率に影響を及ぼす。この骨減少は、骨芽細胞による骨形成の低下と破骨細胞による骨吸収の増加による。MuRF1 は、筋肉の萎縮に関与する筋肉の RING フィンガータンパク質であり、マウスにおいては、後肢の非荷重などの廃用性条件で筋肉における発現が促進される。しかしながら、MuRF1 が非荷重による骨減少に関与するかどうかは知られていない。それゆえ、我々は、非荷重による

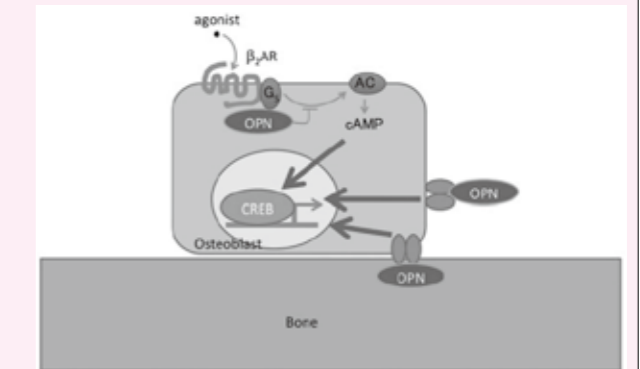
骨減少における MuRF1 欠損の効果を検討した。MuRF1 KO マウスと野生型のコントロールマウスの後肢非荷重実験を行った。野生型マウスにおいて、非荷重は海綿骨量および皮質骨量を減少させた。一方、MuRF1 KO マウスでは、非荷重による骨減少が抑制された。野生型マウスでは、非荷重は骨形成速度を減少させたが、MuRF1 KO マウスでは、この減少が抑制された。非荷重は、破骨細胞数(骨面)を増加させたが、MuRF1 KO マウスでは、この増加が抑制された。これらの結果から、MuRF1 は、骨形成と骨吸収の両方において、廃用による骨減少に関与することが明らかにされた (J Cell Biochem, 2011)。

ハイライト

「骨粗鬆症における交感神経作用は、オステオポンチンによって制御される」(長尾雅史、江面陽一、早田匡芳、中元哲也、納富拓也、野田政樹)

交感神経は骨量を抑制するが、そのメカニズムは完全には解明されていない。本研究においては、細胞とマウスの遺伝学的アプローチによって、この交感神経の活動には、オステオポンチン (OPN) が必要とされることが示された。OPN は、サイトカインで、骨の非コラーゲン性の細胞外基質タンパク質の主要なメンバーである。イソプレテノールによる交感神経刺激が、血液と骨において、OPN の発現レベルを増加させた。OPN 欠損マウスでは、骨芽細胞活性減弱および破骨細胞活性亢進が妨げられる事によって、イソプレテノールによる骨減少が抑制された。さらに、OPN は、交感神経の活性化によって誘導される骨吸収と骨形成に関連する遺伝子発現の変化に必要であった。細胞レベルでは、細胞内 OPN は、B2-アドレナリン受容体の cAMP 産生能力を調整し、cAMP 応答

領域結合タンパク質 (CREB) のリン酸化とそれに関連する転写事象を調整した。これらの結果から、OPN は、骨量の交感神経制御に重要な役割を果たし、この OPN 制御は B2-アドレナリン受容体シグナリングシステムの調整を通じて起こっていることが明らかにされた (Proc Natl Acad Sci USA, 2011)。



B2 アドレナリン受容体シグナリングの OPN による制御モデル図
骨芽細胞において、細胞内 OPN が、Gs と相互作用することにより、B2 アドレナリン受容体を制御し、cAMP 産生と CRE- 依存的な転写活性を減少させ、最終的には骨量減少を引き起こす。細胞外 OPN は、CD44 / インテグリンファミリー受容体の活性化による骨の細胞の制御に関与する。

拠点事業関係
<ol style="list-style-type: none">グローバルCOEプログラム・歯と骨の分子疾患科学の国際研究教育拠点・拠点リーダー 特別教育研究経費・硬組織疾患ゲノムセンター パソシグナリングバイオロジー
人事異動
<div> <div>転入:白川純平(大学院生)、守屋秀一(大学院生)、小川尚子(事務補佐員)</div> <div>転出:佐久間朋美(大学院生)、Paksinee Kamolratanakul(大学院生)、野末陽子(事務補佐員)、楊瑛(ポスドク)</div> </div>
業績目録
原著論文

1. Nagao M, Feinstein TN, Ezura Y, Hayata T, Notomi T, Saita Y, Hanyu R, Hemmi H, Izu Y, Takeda S, Wang K, Rittling S, Nakamoto T, Kaneko K, Kurosawa H, Karsenty G, Denhardt DT, Villardaga JP, Noda M. Sympathetic control of bone mass regulated by osteopontin. ***Proc Natl Acad Sci U S A*** 108:17767-72, 2011.

2. Kamolratanakul P, Hayata T, Ezura Y, Kawamata A, Hayashi C, Yamamoto Y, Hemmi H, Nagao M, Hanyu R, Notomi T, Nakamoto T, Amagasa T, Akiyoshi K, Noda M. Nanogel-based scaffold delivery of prostaglandin E(2) receptor-specific agonist in combination with a low dose of growth factor heals critical-size bone defects in mice. ***Arthritis Rheum*** 63:1021-33, 2011.

3. Hemmi H, Zaidi N, Wang B, Matos I, Fiorese C, Lubkin A, Zbytnuik L, Suda K, Zhang K, Noda M, Kaisho T, Steinman RM, Idoyaga J, Trembl4, an Ig Superfamily Member, Mediates Presentation of Several Antigens to T Cells In Vivo, Including Protective Immunity to HER2 Protein. ***J Immunol*** 188:1147-55, 2012.

4. Sakuma T, Nakamoto T, Hemmi H, Kitazawa S, Kitazawa R, Notomi T, Hayata T, Ezura Y, Amagasa T, Noda M. CIZ/NMP4 is expressed in B16 melanoma and forms a positive feedback loop with RANKL to promote migration of the melanoma cells. ***J Cell Physiol*** (2012 in press).

5. Izu Y, Ezura Y, Mizoguchi F, Kawamata A, Nakamoto T, Nakashima K, Hayata T, Hemmi H, Bonaldo P, Noda M. Type VI collagen deficiency induces osteopenia with distortion of osteoblastic cell morphology. ***Tissue Cell*** 44:1-6, 2012.

6. Kondo H, Ezura Y, Nakamoto T, Hayata T, Notomi T, Sorimachi H, Takeda S, Noda M. MURF1 deficiency suppresses unloading-induced effects on osteoblasts and osteoclasts to lead to bone loss. ***J Cell Biochem*** 112:3525-30, 2011.

7. Ono N, Nakashima K, Schipani E, Hayata T, Ezura Y, Soma K, Kronenberg HM, Noda M. Constitutively active PTH/PTHrP receptor specifically expressed in osteoblasts enhances bone formation induced by bone marrow ablation. ***J Cell Physiol*** 227:408-15, 2012.

8. Seo S, Nakamoto T, Takeshita M, Lu J, Sato T, Suzuki T, Kamikubo Y, Ichikawa M, Noda M, Ogawa S, Honda H, Oda H, Kurokawa M. Crk-associated substrate lymphocyte type regulates myeloid cell motility and suppresses the progression of leukemia induced by p210Bcr/Abl. ***Cancer Sci*** 102:2109-17, 2011.

9. Kawamata A, Inoue A, Miyajima D, Hemmi H, Mashima R, Hayata T, Ezura Y, Amagasa T,

Yamanashi Y, Noda M. Dok-1 and Dok-2 deficiency induces osteopenia via activation of osteoclasts. ***J Cell Physiol*** 226:3087-93, 2011.

10. Morishita M, Ono N, Miyai K, Nakagawa T, Hanyu R, Nagao M, Kamolratanakul P, Notomi T, Rittling SR, Denhardt DT, Kronenberg HM, Ezura Y, Hayata T, Nakamoto T, Noda M. Osteopontin deficiency enhances parathyroid hormone/ parathyroid hormone related peptide receptor (PPR) signaling-induced alteration in tooth formation and odontoblastic morphology. ***Tissue Cell*** 43:196-200, 2011.

11. Hanyu R, Hayata T, Nagao M, Saita Y, Hemmi H, Notomi T, Nakamoto T, Schipani E, Knonenbery H, Kaneko K, Kurosawa H, Ezura Y, Noda M. Per-1 is a specific clock gene regulated by parathyroid hormone (PTH) signaling in osteoblasts and is functional for the transcriptional events induced by PTH. ***J Cell Biochem*** 112:433-8, 2011.

12. Nagao M, Saita Y, Hanyu R, Hemmi H, Notomi T, Hayata T, Nakamoto T, Nakashima K, Kaneko K, Kurosawa H, Ishii S, Ezura Y, Noda M. Schnurri-2 deficiency counteracts against bone loss induced by ovariectomy. ***J Cell Physiol*** 226:573-8, 2011.

受賞

1. 長尾雅史. Plenary Poster Award. The 33rd Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR), San Diego, USA, Sep 16-20, 2011.

国際学会発表

1. Nagao M, Saita Y, Hanyu R, Hayata T, Nakamoto T, Izu Y, Notomi T, Takeda S, Karsenty G, Rittling S, Ezura Y, Villardaga, JP, Noda M. Sympathetic Control of Bone Mass Regulated By Osteopontin. ASBMR 2011 Annual Meeting, San Diego, USA, Sep 16-20, 2011 (Plenary Poster).

2. Kawasaki M, Nakamoto T, Notomi T, Hayata T, Ezura Y, M. Noda M. Expression of Ift88, a Cilia Component Gene, Is Under Temporal Regulation Along with the Differentiation of Chondrocytic Cell Line ATDC5. ASBMR 2011 Annual Meeting, San Diego, USA, Sep 16-20, 2011 (Poster).

3. Suzuki T, Notomi T, Miyajima D, Ezura Y, Nakamoto T, Hayata T, Mizuno A, Suzuki M, Mizoguchi F, Izumi Y, Noda M. TRPV4 Deficiency Suppresses Fluid Flow Induced Activation of Calcium Oscillation in a Manner Dependent on Osteoblastic Differentiation. ASBMR 2011 Annual Meeting, San Diego, USA, Sep 16-20, 2011 (Poster).

4. Sakuma T, Hemmi H, Notomi T, Nakamoto T, Hayata T, Ezura Y, Noda M. Role of CIZ in Melanoma Activity for Metastasis. ASBMR 2011 Annual Meeting, San Diego, USA, Sep 16-20, 2011 (Poster).

5. Nakamoto T, Motoyoshi T, Kawasaki M, Sakuma T, Hayata T, Ezura Y, M. Noda M. Molecular mechanism of CIZ actions to exacerbate inflammation in serum-induced arthritis based on formation of positive feedback loop with IL-1 beta. ASBMR 2011 Annual Meeting, San Diego, USA, Sep 16-20, 2011 (Poster).

6. Ezura Y, Hayata T, Nakamoto T, Notomi T, Sekiya I, Muneta T, Noda M. Identification of the Differentially Methylated Promoter and Intragenic CpG-Cytosines in the Human Synovium and Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells. ASBMR 2011 Annual

Meeting, San Diego, USA, Sep 16-20, 2011 (Poster).

7. Hayata T, Ezura Y, Asashima M, Nishinakamura R, Noda M. Dullard is a novel common negative regulator of BMP signaling in osteoblasts and chondrocytes acting at Smad1 level independently of caveolae-proteasome pathway. ASBMR 2011 Annual Meeting, San Diego, USA, Sep 16-20, 2011 (Poster).

8. Watanabe C, Morita M, Ezura Y, Nakamoto T, Hayata T, Hemmi H, Notomi T, Moriyama K, Yamamoto T, Noda M. Cnot3, a crucial factor of mRNA stability, controls osteoblastic differentiation. The American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) 2011 Annual Meeting, San Diego, USA, Sep 16-20, 2011 (Poster).

9. Notomi T, Kuno M, Ezuta Y, Noda M. Opto-Functional Control of Intracellular RANK1 Transport/Secretion in Osteoblasts To Enhance Coupling With Osteoclasts Based on Photo-Energy Conversion of Molecularly-Engineered Channel-Rhodopsin. ASBMR 2011 Annual Meeting, San Diego, USA, Sep 16-20, 2011 (Poster).

10. Miyajima D, Hayata T, Suzuki T, Ezura Y, Nakamoto T, Notomi T, Amagasa T,Böttcher RT, Fässler R, Nodal M. Conditional Profilin1 Deficiency in Multiple Cell Lineages of Mesenchyme Origin Based on Prxl-Cre System Severely Disrupts Axial and Appendicular Skeletal Development. ASBMR 2011 Annual Meeting, San Diego, USA, Sep 16-20, 2011 (Poster).

11. Aryal S, Miyai K, Ezura Y, Hayata T, Nakamoto T, Pawson T, Noda M. Nck, Actin Cytoskeleton Protein, Supports Osteoblastic Bone Increment and Suppresses Osteoclastic Bone Loss. ASBMR 2011 Annual Meeting, San Diego, USA, Sep 16-20, 2011 (Oral).

12. Hanyu R, Nagao M, Saita Y, Kurosawa H, Kaneko K, Noda M. Anabolic action of PTH signaling on bone activated expression of a clock gene, Per-1. Inaugural International Academy of Sportology, Tokyo, Mar 5, 2011 (Poster).

国内学会発表

1. 川崎真希理、中元哲也、納富拓也、早田匡芳、江面陽一、野田政樹。軟骨細胞 ATDC5において炎症誘導因子 LPS は IL-1βによる CIZ 発現を制御する。第 29 回日本骨代謝学会、大阪、2011 年 7 月 28－30 日。

2. 渡辺千穂、森田斉弘、江面陽一、中元哲也、早田匡芳、辺見弘明、納富拓也、森山啓司、山本雅、野田政樹。 mRNA 制御因子である Cnot3 は骨量制御に関与する。第 29 回日本骨代謝学会、大阪、2011 年 7 月 28－30 日。

3. 鈴木允文、納富拓也、溝口史高、宮嶋大輔、早田匡芳、中元哲也、江面陽一、野田政樹。TRPV4 はメカニカルストレス下での骨芽細胞におけるカルシウムイオン流入を延長する。第 29 回日本骨代謝学会、大阪、2011 年 7 月 28－30 日。

4. 納富拓也、久野みゆき、江面陽一、野田政樹。光エネルギー変換による任意の時間・空間での RANKL 分泌制御法の確立　－膜電位変動による RANKL 分泌機構－。第 29 回日本骨代謝学会、大阪、2011 年 7 月 28－30 日。

5. 早田匡芳、江面陽一、野田政樹。BMP 阻害因子 Dullard は、カベオリン－プロテアソーム経路とは独立に BMP シグナルを抑制する。第 29 回日本骨代謝学会、大阪、2011 年 7 月 28－30 日。

6. 中元哲也、元吉貴之、川崎真希理、佐久間朋美、早田匡芳、江面陽一、野田政樹。CIZ と IL-1βは相互に発現を誘導し、関節炎に関与する。第 29

回日本骨代謝学会、大阪、2011 年 7 月 28－30 日。
7. 江面陽一、納富拓也、早田匡芳、中元哲也、Richard J. Wenstrup, David E. Birk、野田 政樹。エーラスダンロス症候群「古典型」のモデル実験系として知られる 5 型コラーゲンα1 鎖遺伝子ヘテロ欠損マウスの骨形態解析。第 29 回日本骨代謝学会、大阪、2011 年 7 月 28－30 日。

8. 鈴木允文、納富拓也、野田政樹、和泉雄一。Mechanical stress に関するイオンチャネル TRPV4 の歯槽骨における役割の解明。第 54 回秋季日本歯周病学会、山口、2011 年 9 月 24 日。
9. 宮嶋大輔、天笠光雄、野田政樹。四肢-胸郭間葉系細胞における Profilin1 欠失マウスは重度骨格形成不全を示す。第 56 回日本口腔外科学会総会・学術大会、大阪、2011 年 10 月 21－23 日。

プレスリリース

1. 「骨粗鬆症における交感神経作用のメカニズムの解明」2011 年 10 月 11 日。東京医科歯科大学プレスリリース。http://www.tmd.ac.jp/press-release/20111011/index.html

新聞

1. 「骨粗鬆症　仕組み一部解明」朝日新聞 2011 年 10 月 17 日。
2. 「骨粗しょう症　原因物質を解明　東京医科歯科大　マウスで実験」日経産業新聞 2011 年 10 月 19 日。
3. 「運動刺激ないと骨萎縮　関与分子の機能を特定」科学新聞 2011 年 10 月 21 日。
4. 「寝たきり等での骨萎縮　原因タンパクを特定」日本歯科新聞　2011 年 10 月 25 日。

国際招待講演

1. 野田政樹：Control of Osteoblastic Function via Local and Central Mechanisms. The American Society for Cell Biology Annual Meeting, Denver, CO, USA, 2011 年 12 月 3 日。

国内招待講演

1. 野田政樹：第 19 回顎顔面バイオメカニクス学会大会　特別講演　演題：骨のメカニカルストレス応答の細胞生物学。2011 年 11 月 13 日。
2. 野田政樹：第 18 回 BMP 研究会　特別講演　演題：BMP における骨形成と EP4。2011 年 7 月 31 日。
3. 野田政樹：岡山大学　特別講義　演題：骨形成の分子機構。2011 年 1 月 18 日。
4. 野田政樹：岡山大学　大学院セミナー / ECM Society / ITP セミナー。演題：骨関節疾患の基礎研究。2011 年 1 月 18 日
5. 野田政樹：杉並区医師会整形外科医会　講演会　演題：骨粗鬆症の新しい治療。2011 年 5 月 23 日。

主催国際学会

1. 第 5 回グローバル COE 国際シンポジウム「臨床経験からみた軟骨再生研究 - 国際比較と近未来」東京医科歯科大学 M&D タワー大講堂。2011 年 2 月 3 日。

主催セミナー

1. 第 222 回 Bone Biology Seminar. 鹿島田健一「The role of a Forkhead transcription factor, FOXL2, during fetal ovarian development」2011 年 5 月 17 日。
2. 第223回　Bone Biology Seminar. Arthur C. Santora II 「Drug Development for Osteoporosis」2011 年 6 月 20 日。
3. 第224回　Bone Biology Seminar. David E.

Birk 「Regulation of tendon extracellular matrix assembly」2011 年 8 月 11 日。

競争的研究資金

1. 野田政樹「顎骨形成促進への新戦略の分子機構研究」挑戦的萌芽研究
2. 野田政樹「オステオポンチン機能仮説の検証」日本宇宙フォーラム
3. 野田政樹（研究代表者）「歯と骨の分子疾患科学の国際教育研究拠点」グローバル COE プログラム
4. 野田政樹「硬組織疾患プロジェクト」
5. 野田政樹（研究分担者）「滑膜幹細胞による膝半月板再生」文部科学省 再生医療の実現化プロジェクト　再生医療の実現化ハイウェイ
6. 江面陽一「変形性関節症の治療を目指す間葉系幹細胞エビジェネティクスに関する分子生物学的解明」基盤研究(C)
7. 中元哲也「転写因子 CIZ による副甲状腺ホルモンの骨への作用の制御」基盤研究(C)
8. 早田匡芳「Dullard による新規 BMP/TGF-β シグナル抑制機構の発見と軟骨代謝制御」科学研究費補助金　若手研究(B)
9. 納富拓也「神経伝達物質受容体・イオンチャネルによる電位変化を伴う力学的負荷感知機構の解明」科学研究費補助金　若手研究(B)

共同利用・共同研究拠点

1. 野田政樹「CNOT3 遺伝子の骨量制御におよぼす機能について」東京医科歯科大学難治疾患研究所「難治疾患共同研究拠点」共同研究。
2. 早田匡芳「BMP シグナル阻害因子 Dullard による内軟骨性骨化の制御機構の解明」熊本大学発生医学研究所「発生医学の共同研究拠点」共同研究。

難治疾患研究所 先端分子医学研究部門 分子細胞生物学分野

教授：澁谷浩司 准教授：後藤利保 助教：佐藤 淳

研究内容

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

研究紹介

1. セリン/スレオニンキナーゼ WNK (with no lysine(K))

ファミリーは、線虫・ショウジョウバエからほ乳類に至るまで保存されており、ほ乳類には4つの WNK ファミリー分子が存在する。その内、WNK1 及び WNK4 は偽性低アルドステロン症 II 型 (PHAII) と呼ばれる常染色体優性遺伝性の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

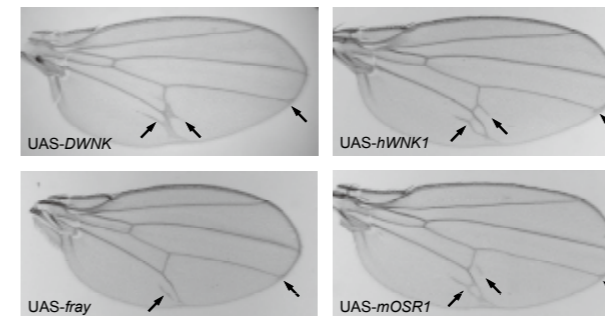
DWNK 変異体のモザイク解析、及び、Dominant Negative として機能するキナーゼ不活性型 DWNK を腹部で異所発現させると、腹部形成不全という表現型が観察された。転写因子 X をコードする遺伝子の突然変異体が同様の表現型を示すことから、転写因子 X と DWNK との遺伝的相互作用が予想された。キナーゼ不活性型 DWNK と転写因子 X を腹部で異所的に共発現させると、キナーゼ不活性型 DWNK による表現型が回復したことから、転写因子 X が DWNK の下流で機能する因子であることが予測された。また、胚期において、DWNK 変異体では、腹部原基での転写因子 X の発現が消失していた。以上の結果から、転写因子 X 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、転写因子 X は、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転写因子 X の関係を調べたところ、高浸透圧刺激により転写因子 X 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、転写因子 X 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、転写因子 X の発現上昇が見られた。以上の結果から、転写因子 X 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、転写因子 X 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。転写因子 X 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、転写因子 X の発現が誘

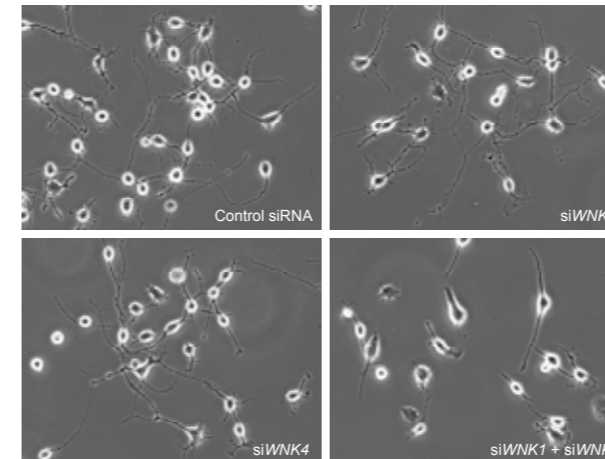
導されず、Neuro2A 細胞においても転写因子 X は WNK シグナル伝達経路の下流因子として機能していた。また、WNK1 及び WNK4 の双方のノックダウンにより、分化に伴う神経突起の伸長が抑えられるという表現型が見られ、さらにはアセチルコリン性神経の分化マーカーの発現も抑制されていた。このことは、WNK シグナル伝達経路が、神経分化にも関与しているという新たな発見であった。また、PHAII の患者において高血圧以外にも見られる精神発達遅延という症状を考慮すると、WNK シグナル伝達経路は、転写因子 X を介して、発症に関与していることが推測された。

このように、WNK シグナル伝達経路は、線虫からショウジョウバエ、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、そ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。

Evolutional conservation of WNK pathway



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) β -catenin/TCF を介した転写活性化経路 (canonical)、(2) カルシウム流入を介したシグナル経路 (non-canonical)、(3) Rho, JNK を介し、細胞極性に関わる PCP 経路 (non-canonical) を制御している。canonical Wnt シグナル伝達経路は、リガンドである Wnt と膜タンパク質である Frizzled、及び LRP との結合により始まる。Wnt 刺激により DVL は細胞膜で活性化され、 β -catenin を分解する働きを有する APC/Axin/GSK-3 複合体を不活化する。分解されなかった細胞質中の β -catenin は核内へ移行し、転写因子 Tcf や c-jun、DVL と結合し、Wnt の下流 (標的) 遺伝子の転写を活性化する。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 β -catenin の核移行を促進することで、背側組織を誘導する Wnt 標的遺伝子 (*Xnr3*, *Siamois*, *Xtwn* など) の転写が活性化される。

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

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) 質量分析解析 (LC-MS/MS) により、IQGAP1 の結合因子として、核内輸送因子である Importin- β 5 を同定した。また、ツメガエルの遺伝子を用いた解析により、核内移行時に複合体を形成する xDVL2、xIQGAP1、 β -catenin の中で xIQGAP1 が特異的に xImportin- β 5 と結合した (図 1A)。
- (2) ツメガエル胚において、アンチセンスモルフォリノオリゴ (MO) を用いた xImportin- β 5 の機能消失に

より、xDVL2、xIQGAP1、 β -catenin の GFP 融合タンパク質が核内に局在する割合が減少した。

(3) ツメガエル胚において、Wnt 刺激によって腹側領域に誘導された Wnt 標的遺伝子の発現量が xImportin- β 5 の機能消失により減少した (図 1B)。

また、IQGAP1 は細胞運動や細胞極性を構築する時に、アクチンフィラメントの重合や配向に関与する Small GTPase (Rac1 や Cdc42) の活性化に寄与している。一方、タンパク質や RNA の細胞質-核間輸送には別の Small GTPase である Ran1 が調節因子として機能しているが、これまでに IQGAP1 との関係は報告されていない。そこで、我々は核内移行に関する Ran1 と IQGAP1 の機能解析を行ない、次の結果を得ることができた。

(4) 培養細胞において、xIQGAP1 と xRan1 の結合が確認された (図 1C)。

(5) ツメガエル胚において、Wnt 刺激によって腹側領域に誘導された Wnt 標的遺伝子の発現量が xRan1 の機能消失により減少し、さらに xRan1 と xImportin- β 5 がともに機能消失することで Wnt 標的遺伝子の発現量が著しく減少した (図 1D)。

今回得られた知見は、核内輸送に必須である Importin- β 5 と Ran1 が IQGAP1 を介し、canonical Wnt シグナル伝達経路における DVL と β -catenin の核内移行に寄与することを強く示唆する (図 2)。

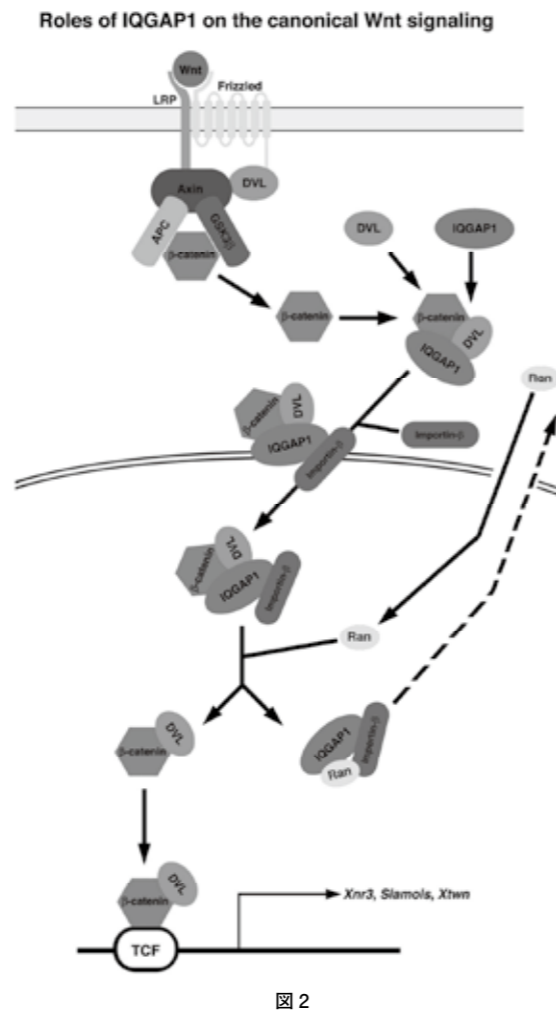


図 2

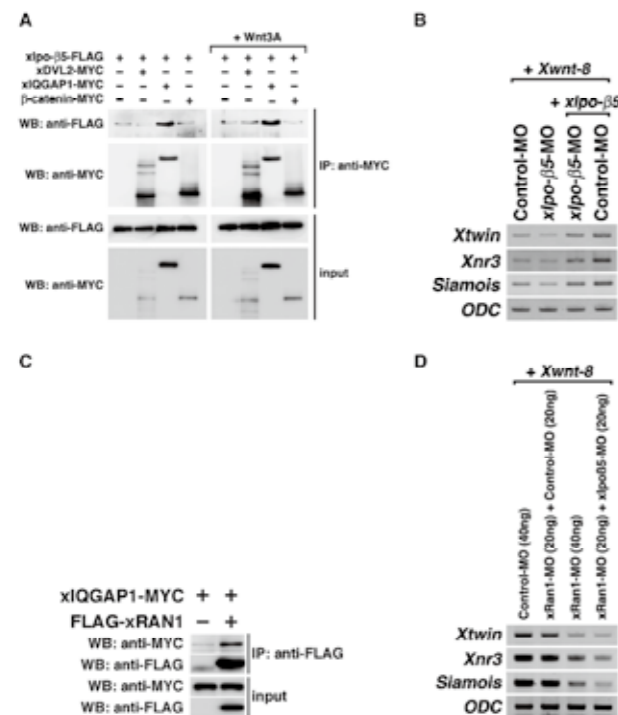


図 1

業績目録

原著論文

- Hanafusa, H., Ishikawa, K., Kedashiro, S., Saigo, T., Iemura, S., Natsume, T., Komada, M., Shibuya, H., Nara, A. and Matsumoto, K. (2011). Leucine-rich repeat kinase LRRK1 regulates endosomal trafficking of the EGF receptor. *Nat. Commun.* 2, 158.
- Goto T., Asashima M. (2011). Chemokine ligand *Xenopus CXCLC (XCXCLC)* regulates cell movements during early morphogenesis. *Dev. Growth Differ.* 53, 971-981.

学会発表

- 佐藤 淳、澁谷 浩司 A new downstream molecule, Awh is involved in the WNK signaling. 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月、横浜、口頭発表及びポスター発表

研究助成金

- 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」
- 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

- 澁谷浩司: 生命情報科学教育部前期課程講義「細胞シグナル制御学特論」
- 澁谷浩司: GCOE 総合プレゼンテーション

難治疾患研究所先端分子医学研究部門分子神経科学分野 大学院疾患生命科学部分子神経科学研究室

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

研究内容

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。

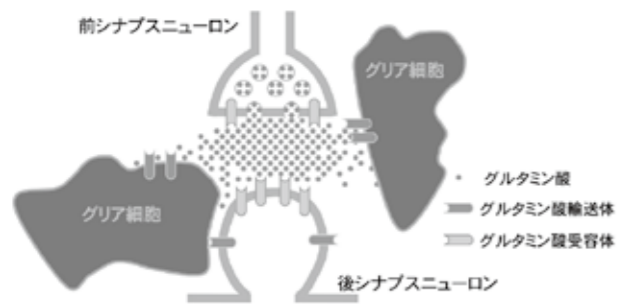
研究紹介

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。

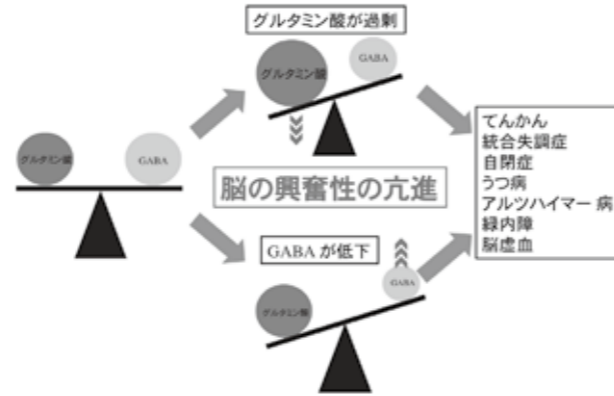
グルタミン酸トランスポーターは、神経終末から放出されたグルタミン酸を取り込み、神経伝達物質としての作用を終わらせ、細胞外グルタミン酸濃度を低く保つ機能的分子である。現在まで脳のグルタミン酸トランスポーターには、グリア型2種類（GLT1, GLAST）と神

グルタミン酸輸送体の役割



グルタミン酸輸送体は、神経細胞から放出されたグルタミン酸を細胞内に回収し、細胞外グルタミン酸濃度を上昇しないようにする遺伝子である。

興奮と抑制のバランスが崩れ、脳の興奮性が亢進すると様々な精神神経疾患を引き起こす



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。

我々は、アルツハイマー病モデルマウスからグリア型グルタミン酸トランスポーター GLT1 を欠損させると、認知機能の障害が促進されることを明らかにした (J Alzheimers Dis 26:447, 2011)。

2. うつ病における手綱核の役割

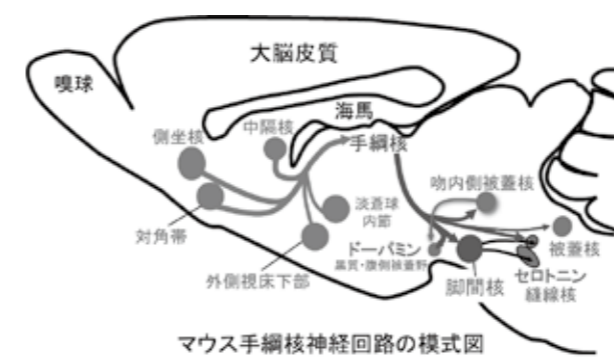
手綱核は脊椎動物の進化を通じて保存されている神経核であり、ドーパミン及びセロトニン神経系の抑制的制御中枢として知られてきた (Aizawa et al., 2011)。近年の研究からうつ病モデルラットではドーパミン神経系の制御中枢である手綱核のシナプス過剰活性化やグルタミン酸濃度調節に関わるアストロサイト型グルタミン酸トランスポータ GLT1 の発現低下がみられることから手綱核のうつ病への関与が示唆されてきた。

我々は、うつ病における手綱核の役割を明らかにするためにげっ歯類手綱核を解剖学的および生理学的に解析し、1) 手綱核が遺伝子発現の異なった多数の亜核により構成される事、2) 外側手綱核神経細胞の一部が脳の状態に依存して活動様式を変化させる事を明らかにしてきた。しかし、このように同定された亜核がそれぞれうつ病病態においてどのような機能を担うかは全く不明である。

今年度は、うつ病病態に深く関与する社会的ストレス感受性に注目し手綱核の役割を検討した。若年マウスを攻撃者マウスに10日間暴露する社会的敗北ストレスは、

ストレスに暴露された野性型マウスが攻撃者を避けるようになる（社会的回避）。これらのマウスは無快楽症様の行動を示し、抗うつ薬の慢性投与で改善されるためうつ病の動物モデル実験系と考えられる。野性型マウスの中でもストレス感受性は多様で、社会的回避試験における攻撃者マウスを回避する“感受性群”と攻撃者をあまり回避しない“非感受性群”に分けられる。このストレス環境に対する動物個体の感受性決定に関与する脳領域を調べるため、社会回避行動における最初期遺伝子 c-Fos の機能的マッピングを行ったところ、ストレス感受性群に比べ非感受性群では外側手綱核の神経細胞活動が増加していることが明らかとなった。この結果は、ドーパミンやセロトニンといったモノアミン神経系の制御を担う手綱核が社会的ストレスに対する感受性決定に関与する事を示唆しており、手綱核機能不全がうつ病へのリスクとなる可能性を示している。

さらに手綱核神経活動の変化が動物行動に及ぼす影響を直接的に調べるため、手綱核の神経細胞及びグリア細胞を遺伝学的に操作する方法を開発した。手綱核原器となる視床上部に発現する Dbx1 遺伝子に注目し、Cre-loxP 系を用いた条件的遺伝子発現マウス系統を作成した。同系統では、薬剤による遺伝子発現の誘導時期に依存して手綱核神経細胞及びアストログリアをそれぞれ蛍光レポータータンパク質により特異的に標識することに成功した。この実験法の確立は、膜電位を人為的に変化させる光遺伝学プローブと組み合わせる事により、社会回避行動における手綱核の役割解明を可能にするものである。



3. 網膜ミューラー細胞に発現する神経栄養因子 (BDNF) の役割

網膜ミューラー細胞における神経栄養因子 BDNF の受容体である TrkB の機能を解明するため、TrkB がミューラーグリア細胞にだけは発現しない遺伝子改変マウスを作製した。マウスの眼球に神経毒性をもつ薬剤を投与すると、緑内障や網膜色素変性症によく似た症状がおきることが知られているが、今回作製したマウスでは、その症状が非常に悪化していました。

また網膜変性の進行中に BDNF を眼球内に投与すると、新たな視細胞や網膜神経節細胞が作られることがわかった。しかし今回作製した遺伝子改変マウスでは、そのような再生現象がみられなかった。これらの結果は、ミューラー細胞に発現する TrkB が、BDNF による神経細胞保護作用の増強や、Müller 細胞の神経前駆細胞としての機能を促進することを示している。グリアは神経細胞よりも多く、比較的ダメージに強いことから、グリアをターゲットにすることにより、緑内障や網膜色素変性症などに対する新たな創薬や、これまでになかった効率的な治療法の開発が期待される。

ハイライト

「網膜のミューラー細胞に発現する神経栄養因子の受容体が、神経細胞の保護や神経細胞の再生に重要である」

網膜ミューラー細胞にだけ神経栄養因子 BDNF の受容体である TrkB を発現しないマウスは、グルタミン酸による網膜神経節細胞死が悪化し、BDNF 投与による視神経細胞の新生が抑制された。この結果は、網膜のグリア細胞であるミューラー細胞に発現する TrkB が、BDNF による神経保護作用の増強及びミューラー細胞の神経幹細胞としての機能促進に重要な役割を果たすことを示している。グリア細胞を標的にした緑内障などに対する新しい治療法の開発に役立つと期待される。

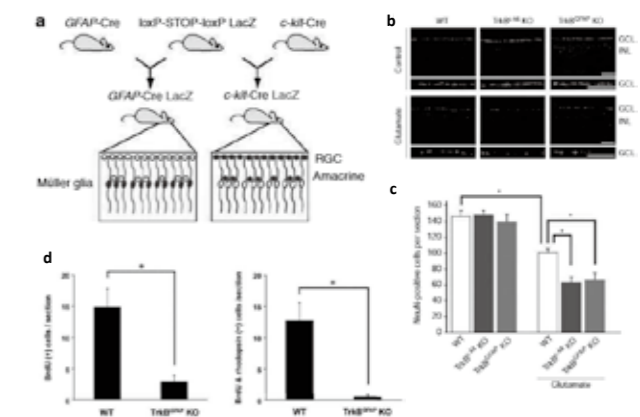


図1 ミューラー細胞特異的 TrkB 欠損マウスにおけるグルタミン酸誘発性神経細胞死および BDNF による神経新生 (a) 網膜ミューラー細胞および神経細胞特異的 TrkB 欠損マウスの作製 (b, c) 網膜ミューラー細胞および神経細胞特異的 TrkB 欠損マウスにおけるグルタミン酸投与による網膜神経節細胞死 (d) 網膜ミューラー細胞および神経細胞特異的 TrkB 欠損マウスにおける BDNF の神経新生効果

人事異動

転入:相澤秀紀（准教授）、伊藤亨子（特任助教）、渡邊清香、山本亜伊梨（技術補佐員）、吉田純一、Zulpiye Habibulla(博士課程)、孫偉楠(修士課程)、橋本真理子（医学部学生）

転出：砂堀愛美

業績目録

発表論文

1. Mookherjee, P., Green, P.S., Watson, G.S., Marques, M.A., Tanaka, K., Meeker, K.D., Meabon, J.S., Li, N., Zhu, P., Olson, V.G., Cook, D.G. GLT-1 loss accelerates cognitive deficits onset in an Alzheimer’s disease animal model. *J Alzheimers Dis* 26. 447-455, 2011.

2. Komine, O., Nagaoka, M., Hiraoka, Y., Hoshino, M., Kawaguchi, Y., Pear, E.S., Tanaka, K. RBP-J promotes the maturation of neuronal progenitors. *Dev Biol* 354. 44-54, 2011.

3. Harada, C., Guo, X., Namekata, K., Kimura, A., Nakamura, K., Tanaka, K., Parada, L.F., Harada, T. Glia- and neuron-specific functions of TrkB signaling during retinal degeneration and regeneration. *Nature Communications* 2:189, 2011.

4. Aizawa, H., Amo, R., Okamoto, H. Phylogeny and ontogeny of the habenular structure. *Front Neurosci.* 5:138, 2011

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* (in press).

6. Tsai, M-C., Tanaka, K., Overstreet-Wadiche, L., Wadiche, JI. Neuronal glutamate transporters regulate glial excitatory transmission. *J Neurosci* 32. 1528-1535, 2012.

研究費

1. 田中光一：ブルキンエ細胞における抑制性シナプスの空間的配置決定の分子基盤 文部省科学研究費補助金, 基盤研究（B）代表

2. 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

3. 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

4. 相田知海：広汎性発達障害モデルを用いた高次脳機能障害の分子機構解明 守谷育英会財団法人研究助成 代表

5. 相田知海：共通病態再現モデル動物を用いた広汎性発達障害の分子病態解明 文部省科学研究費補助金, 若手B 代表

6. 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

難治疾患研究所 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

当分野は、生体の防御と恒常性維持に焦点をあて、それらを担う免疫細胞ならびに組織幹細胞の分化や機能発現機構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. 粘膜免疫の研究

粘膜面では特に感染のない生理的状態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、樹状細胞(dendritic cell, 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もこれまでにユニークなDCサブセットの存在を報告してきた(Nature 448, 929-933(2007); Immunol Rev 234, 247-258(2010))。さらに、本年、恒常的なIgA産生の仕組みに関して新たな知見を得た(Immunity 34, 247-257(2011))。

IgAの産生経路には、T細胞が必要なものと不必要なもの2種類が存在する。後者は、今世紀になって発見された新しい経路で、DCが重要な役割を担っていると考えられている。DCは腸管粘膜関連リンパ組織に局在しており、従来型DC(cDC)と形質細胞様DC(pDC)に分類される。私たちは、cDCに比べてpDCが、強くIgAの産生を誘導すること、このpDCのIgA産生誘導能力が、高いAPRILやBAFF産生によるものであることを見出した。さらに正常なマウスの腸管粘膜関連リンパ組織では、腸内常在菌叢の影響下でストローマ細胞からI型インターフェロンが産生されており、pDCに作用してAPRILやBAFFの産生を促していることを示した。I型インターフェロンやAPRILおよびBAFFの過剰産生は、全身性エリテマトーデス(SLE)やシェーグレン症候群をはじめとする自己免疫疾患、さらにはある

種のがんの病態形成の一因になることもヒトやマウスで報告されていることから、APRILやBAFFおよびその産生細胞であるpDCを標的とした、新しいワクチン開発や自己免疫疾患の治療戦略に役立つことが期待される。

2. 樹状細胞の研究

1) 新しい樹状細胞前駆細胞の同定(図1)

免疫系の司令塔として重要な役割を担うDCは、cDCとpDCの2種類に大別される。特にpDCはウイルス抗原刺激により大量のI型IFNsを生産することを特徴とする。それらDCサブセットは、マクロファージDC前駆細胞(macrophage and DC progenitor, MDP)、共通DC前駆細胞(common DC progenitor, CDP)を経て分化成熟するとされる。しかしながらこの経路を介して分化するDCの大部分はcDCであり、pDCは極めて少数である。この事実は、未知のDC前駆細胞の存在を予感させた。幸い、私たちの研究グループは、新規DC前駆細胞を同定することに成功した。新たに同定したDC前駆細胞は、CDPに比べpDC分化供給能に数倍~10倍程度優れ、pDC分化や機能発現に重要な転写因子E2-2やIRF8の発現レベルが亢進していた。新たなDC前駆細胞から誘導されたpDCの詳細な解析を行った結果、表面抗原やTLRの発現パターン、CpG刺激時の大量のI型IFN生産能などを含め機能的にも正常であった。これらの結果を踏まえ、CDPおよび新規DC前駆細胞を、各々E2-2^{low} CDPおよびE2-2^{high} CDPと呼ぶことを提唱している。E2-2^{low} CDPはcDC供給能に、E2-2^{high} CDPはpDC供給能に優れており、DC供給に関する役割分担が前駆細胞レベルで行われていることを示唆している。この成果はDCの分化系譜を書きかえ、DC前駆細胞

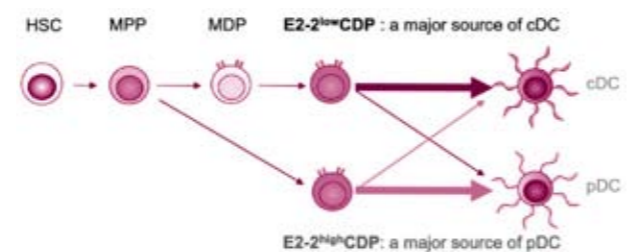


図1 共通樹状細胞前駆細胞(CDP)の同定

胞を用いた免疫関連疾患の治療戦略に道を拓くものであると考えている(投稿中)。

2) 樹状細胞による新しい免疫寛容誘導の仕組み(図2)

免疫反応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必要がある。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、最近、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)が骨髄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。この現象は、“血球貪食”していないDCや他の免疫細胞では観察されなかった。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^{fl/fl})を作製し、同マウスに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おり、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)。

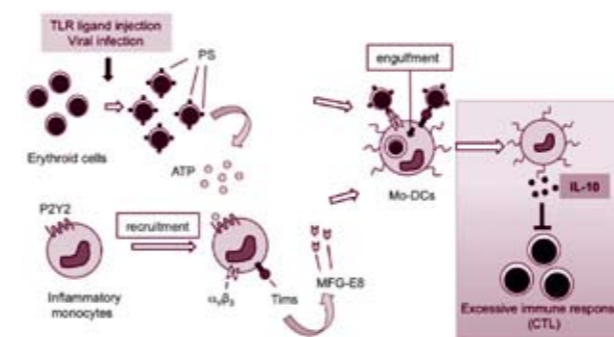


図2 樹状細胞による新規免疫寛容誘導機構

3. 組織幹細胞を基軸とした難治性疾患の理解

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、組織幹細胞プールが十分に保たれ、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I型インターフェロンの作用に基づき、現在、血液、腸、皮膚などにおける難治性免疫疾患の分子基盤を、組織幹細胞の性状変化を基軸として解明すべく、以下の研究を推進している。

1) 血液疾患治療への応用

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、放射線照射を行わない、あるいは軽減した、より安全な移植前処置を確立し、先天性代謝異常疾患の治療を行うことを目的として研究を進めている。

慢性骨髄性白血病(CML)は、造血幹細胞レベルでの異常による骨髄系(顆粒球系)細胞増殖を本態とする造血器腫瘍である。最近、ヒトの白血病細胞の中に、白血病細胞を生み出す源となる細胞が存在することが証明され、白血病幹細胞(LIC)と呼ばれている。正常なHSCと同様、LICは多くが活動休止状態にあり、多くの抗がん剤は増殖中の白血病細胞だけを殺すため、LICは生き残り、白血病が再発してしまう1つの原因であるといわれている。私たちの研究グループは、マウスCMLモデルを使って、I型IFNが休止状態にあるLICのニッチからの離脱活性化を促すことが可能かどうか検証を行っている。

2) 表皮・腸上皮疾患治療への応用

表皮過形成モデルや炎症性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。

業績目録

原著

- Tezuka H, Abe Y, Asano J, Sato T, Liu J, Iwata M, and Ohteki T. Prominent role of plasmacytoid dendritic cells in mucosal T cell-independent IgA induction. *Immunity* 34, 247-257, 2011.
- Mashima H, Sato S, Horie Y, Nakagawa Y, Kojima I, Ohteki T, and Ohnishi H. Interferon Regulatory Factor-2 Regulates Exocytosis Mechanisms Mediated by SNAREs in Pancreatic Acinar Cells. *Gastroenterology* 141(3), 1102-1113, 2011.
- 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* 2011 Dec 20. [Epub ahead of print]

総説・解説

- 梶木俊聡、手塚裕之　T細胞非依存性IgA産生誘導における形質細胞様樹状細胞の質的優位性．細胞工学 30 (No.4), 376-380, 2011.
- 梶木俊聡　腸管粘膜における樹状細胞の役割．日本耳鼻咽喉科学会会報　114, 107-113, 2011.
- 手塚裕之、安部由紀子、梶木俊聡「形質細胞様樹状細胞によるT細胞非依存性IgA産生誘導機構」臨床免疫・アレルギー科　55, 687-692, 2011.
- 梶木　俊聡「pDCによる新たなIgA産生誘導の仕組み」感染　炎症　免疫　Vol.41.No.4. 83-84, 2011.
- 手塚裕之、梶木俊聡　共生の成立・維持における宿主機能　腸内生態系を調整する消化管防御システム．173-182, (財)日本ビフィズス菌センター編「腸内共生系のバイオサイエンス」丸善出版, 2011.
- 手塚裕之、梶木俊聡「腫瘍壊死因子」245, 桂義元、河本宏、小安重夫、山村一彦編「免疫の事典」朝倉書店, 2011.
- 手塚裕之、安部由紀子、梶木俊聡「k. 樹状細胞 (2) 機能」68-69, 日本食品免疫学会編「食品免疫・アレルギーの事典」朝倉書店, 2011.

国際学会招待講演

- Ohteki T. Regulatory role of interferon in HSC homeostasis-an old cytokine with a new function. ESF-JSPS Frontier Science Conference Series for Young Researchers. “Cutting Edge Immunology and its Clinical Application”. Hulshorst, The Netherlands. 2011.32
- Ohteki T, Ohyagi H, Sawada K and Onai N. Dendritic cells hemophagocytose to fine-tune immune responses. The 6th International Symposium of Institute Network. Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan. 2011.6.9
- Ohteki T. Prominent fole for pDCs in mucosal IgA induction. The 6th Chiba University Global COE Symposium Immune System Regulation toward Disease Control. Chiba, Japan. 2011.11.30
- Ohteki T. Role for plasmacytoid dendritic cells in gut IgA induction CFCD3rd International pDC Workshop　Pasteur Institute, Paris, France. 2011.12.8

国内学会・研究会招待講演

- 梶木俊聡　インターフェロンによる造血幹細

- 胞の運命決定制御　第100回日本病理学会ワークショップ13　横浜　2011.4.30
- 梶木俊聡　樹状細胞による新規免疫寛容誘導機構　第9回北東北血液研究会(ファイザー(株)開催)　秋田　2011.5.14
- 梶木俊聡　粘膜免疫と感染症　第11回日本抗加齢医学会総会　京都　2011.5.28
- 梶木俊聡　インターフェロンによる造血幹細胞制御　第22回日本生体防御学会学術総会　那覇　2011.6.30
- 梶木俊聡　腸管粘膜におけるIgA産生機構　東京医科大学大学院セミナー、東京　2011.7.14
- 梶木俊聡　樹状細胞による新しい免疫寛容誘導機構　日本免疫学会第13回免疫サマースクール2011 in ZAO　蔵王　2011.8.2
- 梶木俊聡　樹状細胞による腸管免疫調節機構新　第61回日本アレルギー学会秋季学術大会　東京　2011.11.10
- 手塚裕之　「T細胞非依存性IgA産生誘導における形質細胞様樹状細胞の質的優位性」第32回和漢医薬学総合研究所特別セミナー富山2011.12.9

国内学会発表

- 小内伸幸　大八木秀明　梶木俊聡　樹状細胞による血球貪食は過剰な免疫応答を制御する．第21回 Kyoto T Cell Conference 京都　2011.6.11
- 手塚裕之、梶木俊聡　形質細胞様樹状細胞はT細胞に依存しない優れたIgA産生誘導能を備えている．第21回日本樹状細胞研究会　福岡2011.7.1
- 梶木俊聡　自己と非自己の識別提示と制御．特定領域研究「免疫自己系」平成23年度第1回班会議　京都　2011.7.19
- 小内伸幸　大八木秀明　佐藤卓　四元聡志　澤田賢一　梶木俊聡　炎症性単球由来樹状細胞は血球貪食依存的にIL-10を生産し、過剰な免疫反応を抑制する．第40回日本免疫学会学術集会　千葉2011.11.27
- 手塚裕之　Prominent role for plasmacytoid dendritic cells in mucosal T cell-independent IgA induction.　第40回日本免疫学会学術集会　千葉　2011.11.28
- 佐藤　卓　四元聡志　梶木俊聡　Novel interferon(IFN)-based pretransplantaion conditioning in the treatment of congenital metabolic disorder. 第40回日本免疫学会学術集会千葉　2011.11.28

学外教育活動

梶木俊聡　：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」,秋田大学客員教授、秋田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

- 梶木俊聡（代表）日本学術振興会科学研究費補助金　基盤研究（A）「I型IFNs依存性造血幹細胞統御による新規疾患治療法の創成」
- 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」
- 梶木俊聡（代表）文部科学省科学研究費補助金　特定領域研究「自己と非自己の識別提示と制御」
- 梶木俊聡（分担）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」
- 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治療法の創出」
- 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ーシスの制御」
- 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」
- 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」
- 四元聡志（代表）文部科学省科学研究費補助金　若手研究（B）「樹状細胞による造血幹細胞の制御機構の解析」
- 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」
- 梶木俊聡（代表）内藤記念科学振興財団　医学系研究助成「IFNによる造血幹細胞増殖誘導に基づく新規血液疾患治療法の開発」
- 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」
- 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」
- 手塚裕之（代表）武田科学振興財団　医学系研究奨励（基礎）「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
- 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」
- 手塚裕之（代表）永尾武難病研究基金　医学研究助成「腸管樹状細胞のオートファジーを標的とした炎症性腸疾患の発症機構の解明および治療法の開発」
- 佐藤　卓（代表）鈴木謙三記念医科学応用研究財団　医学系研究助成「白血病幹細胞を標的とした、I型インターフェロンと分子標的薬の併用による新規慢性骨髄性白血病根治法の確立」
- 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法の確立」
- 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」

難治疾患研究所 先端分子医学研究部門 生体情報薬理学分野

教授：古川哲史 准教授：黒川洵子 助教：江花有亮

研究内容

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

研究紹介

1. 心血管系性差医療の基礎的研究

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1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。

次のステップの研究として、XY染色体の違いによる性差の研究を開始した。インクジェット法を用いた小動物冠動脈可視化法を用いて、雌雄の冠循環に出生直後から違いがあることを見出した。この違いがXY染色体の違いによるものかマウスモデルを使って検討を行っている。Y染色体上にありオス性腺の形成を担うSry遺伝子が常染色体に転座したXY-Sryマウスを入手し、XXマウスとXY-Sryを交配することにより、XX♀、XXSry♂、XY-♀、XY-Sry♂の4マウスを作成した。これを用いて、XY染色体の違いによる雌雄の冠循環の違いの検討を行っている。

(東京大学医学部分子代謝生理学分野栗原裕基教授との共同研究)

2. 心房細動の研究

心房細動は最も頻度の高い持続性不整脈であり、日本における患者数は約350万人に上る。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1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・治療法の確立が急がれている。

(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、本年度は国際的メタ解析(CHARGE study)にも参加した。その結果、心房細動の遺伝的リスクとして、合計12のリスクが同定された。6リスクは欧米人でも日本人でも同定され人種を超えた遺伝リスク、4つは欧米人では同定され日本人では同定されず欧米人特異的遺伝リスク、2つは日本人では同定され欧米人では同定されず日本人特異的遺伝リスクと考えられた。

(東京大学医科学研究所中村祐輔教授、理化学研究所田中敏博博士、東京都健康長寿医療センター沢辺元治博士、本学循環器内科との共同研究)

(2) 心房細動関連遺伝子の生物学的機能解析

(1)で同定された心房細動関連遺伝子のうち、有意水準がトップのSNP(ラボネームAF#1)の機能解析を行った。AF#1が存在するハプロブロックには遺伝子が存在せず(gene desert haplo-block)、最も近傍の遺伝子は約150 kb離れた転写因子Pitx2cである。まず同ハプロブロック内のSNP discovery・相関解析から、連鎖不平衡にある21 SNPsが機能的SNPの候補と考えられた。これらの21SNPsを含む各領域でヒストンコード解析を行ったところ、1つのSNPを含む領域がbivalentであり、Pitx2cの転写を抑制すること、保護アレルと危険アレルで抑制の程度に有意差があることが明らかとなった。同SNPが機能的SNPであり、Pitx2cの発現をbivalentに調節するものと考えられた。

(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、心房の伸展刺激によりギャップ結合チャネルを介するATP分泌がマクロファージ動員を誘導す

ることが、心房細動の初期過程に関与することが明らかとなった(図1)。

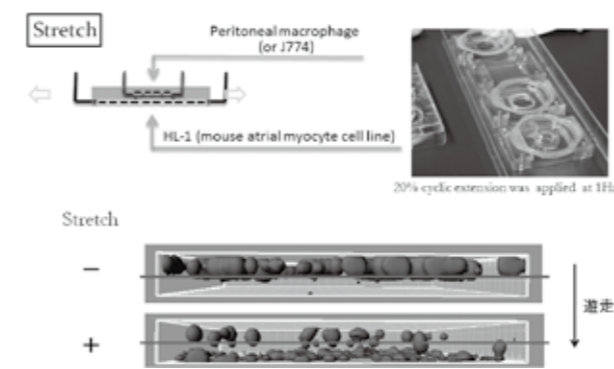


図1. ATP依存性の伸展刺激誘発マクロファージ遊走
A. Boyden chamberの上ウエルのマクロファージ、下ウエルに心房筋細胞を培養し、下ウエルのみに伸展刺激を加えた。
B. 伸展刺激が無いとマクロファージは上ウエルにとどまるが、伸展刺激を加えると下ウエルに遊走する。この遊走は、ATP分解酵素・ATP受容体ブロッカー・ATP放出チャネルブロッカーで抑制された。

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。

(1) NOS1APKOマウスの解析

NOS1APは、欧米で行われたGWAS研究で意外にも心臓突然死に最も強く関連する遺伝子として同定された遺伝子であるが、NOS1APと突然死も関係は不明である。同遺伝子のKOマウスの機能解析を行い、NOS1APでは酸化ストレスが増強していること、これによる心機能低下が突然死と関連することを明らかにした。(国立国際医療センター加藤博規弘士との共同研究)

(2) 心臓ヒス・プルキニエ系特異的転写因子KOマウスの解析

近年、ヒス・プルキニエ系を起源とする不整脈「プルキニエ不整脈」が注目されている。そこで、ヒス・プルキニエ系特異的に発現する転写因子のKOマウスを作成したところ、マウス心電図でJ波様の波形が記録されること、心筋梗塞・電気刺激などにより容易に不整脈が誘発された。同マウスではヒス・プルキニエ系特異的コネクシンCx40の発現が低下していること、Cx40のヘテロKOマウスでも同様の表現型が見られることが明らかとなった(図2)。これらの表現型から、同マウスは臨床で注目されているBrugada症候群(BrS)、早期再分極症候群(ERS)のマウスモデルと考えられる。(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との共同研究)

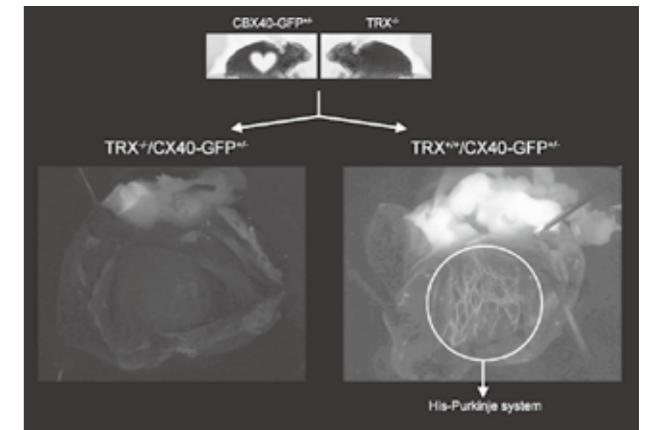


図2. 転写因子TRX(ラボネーム)はHis-Purkinje系におけるCx40の発現を調節
Cx40プロモーター下にGFPを連結したTgマウスとTRX KOマウスを交配すると、His-Purkinje系のGFPが消失し、Cx40の転写が抑制された。

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Ca²⁺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・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う。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。LQT3由来心筋様細胞では、成人心筋細胞における電気生理学的異常が一部維持されているが、これまで注目されていなかった細胞内Ca²⁺動態にも異常があることが示唆された。

(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、①in vitroのhERGアッセイ、②in 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・コストが大きいため、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が期待されている。そこで、本学生体材料工学研究所安田教授、国立医薬品食品衛生研究所諫田博士と共同で、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) 心臓電気現象 3-D シミュレーター構築

計算力が世界 1 となったスーパーコンピュータの医療分野応用の 1 つとして、生命現象の 3-D シミュレーターの構築が期待されている。中でも、心臓電気現象は既に細胞レベルでのコンピューターシミュレーションモデルが構築されていることから、最も実現化に近いと考えられており、また大きな問題となっている薬物誘発性不整脈の予防への応用が強く期待されている。本年度から、内閣府最先端研究開発支援プログラム『未解決のがんと心臓病を撲滅する最低医療開発』（代表永井良三）のサブテーマ「ヒト心臓シミュレーターによる最適医療開発」（代表久田俊明）の枠組みでヒト心臓シミュレーター開発の基礎データ取得とシミュレーターの validation を担当している。単離心筋から得られた各種イオン電流に対する薬物作用を測定し、心臓シミュレーターに導入するパラメーターを取得し東京大学新領域創成科学科久田研究所でコンピューターモデルを構築し、これを in vivo のイヌ 12 誘導心電図に対する影響で評価を行う。

(東京大学新領域創成科学科久田俊明教授、杉浦清了教授、岡田純一博士との共同研究)

トピックス

Motion vector 法を用いた in vitro 心筋収縮能解析システム

従来の心筋収縮能アッセイは、in vivo での心エコー法、カテーテルによる心内圧、心容量測定など行っており、in vitro で心筋収縮性の評価は極めて困難であった。このため、薬物の心毒性は in vivo 試験になるまで評価することが不可能であった。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 (図 3)。本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を行っている。種々の既存の心筋収縮・拡張に作用する薬物を用いて、同法が薬物の心筋収縮能・拡張能に対する作用を正確に評価できるか動作確認実験を行い、同法と電気現象測定 (MEA 法) の同時測定、同法の iPS 由来心筋細胞へ応用、を試みた。

ソニーとの包括連携に関しては日経新聞 4 月 6 日号にプレスリリースされた。

(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)

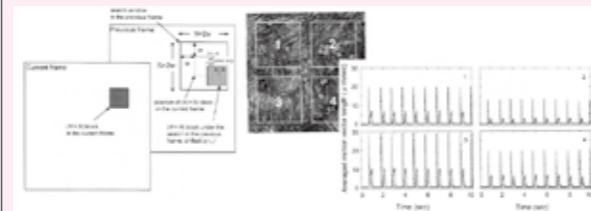


図 3. Motion vector 法による心筋細胞の in vitro 機能評価
ラット初代培養心筋細胞で、1/125 frames/sec の速度で画像を取得し、その移動速度を下段にプロットとした。収縮速度と拡張速度を分けて定量化することができる。

人事異動

転入：高橋健太郎 (大学院医歯学総合研究科)、小島聖美 (本学医学部保健衛生学科検査学専攻卒業研究生)、向和加子 (研究補助員)、武川美帆 (研究補助員)、児玉昌美 (研究補助員)、今泉真理 (研究補助員)、大隅礼子 (研究補助員)
転出：笹野哲郎 (本学循環器内科助教)、小崎恵理 (研究補助員)

業績目録

原著論文

1. Sugiyama H, Nakamura K, Morita H, Akagi S, Tani Y, Katayama Y, Nishii N, Miyoshi T, Nagase S, Kohno K, Kusano FK, Ohe T, Kurokawa J, Furukawa T, Ito H. Circulating KCNH2 current-activating factor in patients with heart failure and ventricular tachyarrhythmia. *PLoS ONE*, 2011;6:e19897.
2. Kurokawa J, Furukawa T. Region- and condition-dependence of the membrane and Ca²⁺ clock in the sinus node. *Circ. J.* 2012;76:192-195.
3. Furukawa T, Oishi S, Sasano T. Atrial fibrillation and inflammation. *Nihon Yakurigaku Zasshi* 2011;138:192-195.
4. Furukawa T, Ebana Y. Current overview of genetic background of atrial fibrillation: possible genetically therapeutic targets for the treatment of atrial fibrillation. *J. Arrhythmia* 2012 (in press).
5. Ellinor DT, Fukukawa T, et al. Meta-analysis in the AFGen Consortium identifies sir novel loci for atrial fibrillation. *Nat. Genet.* 2012 in press.

著書

1. 古川哲史. 目からウロコの心電図. ライフメディアコム. 2011 年 12 月 8 日.

総説

1. 古川哲史, ポストゲノム時代の基礎不整脈研究, *Jap. J. Electrocardiol.* 2011;31:1-2
2. 古川哲史, QT 延長毒性はなぜ女性で起こりやすいか? ファルマシア, 2011;47:208-212
3. 細胞 The CELL 特集イオンチャネル up to date 古川哲史編, 2011, Vol 43, No. 11
4. 古川哲史, AMP キナーゼ変異と疾患、内分泌・糖尿病・代謝内科 2011, vol 33, No. 2, pp.111-114
5. 古川哲史, 心電学マイルストーン「The crystal structure of a voltage-gated sodium channel」*Jap. J. Electrocardiol.* 2011;31:5.

学会発表

1. Furukawa T. Electrophysiological characterization of cardiomyocyte-like cells differentiated from human iPS cells. In Symposium 「ヒト iPS 細胞由来心筋樹立による家族性突然死症候群の病態解明と治療法の確立」The 75th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, 2011 August 4, Yokohama
2. Furukawa T. Non-genomic regulation of K+ and Ca2+ channels by sex hormones. Special symposium "Symposium in Honour of Professor Masayasu Hiraoka Ion channels, arrhythmogenesis and channelopathy" 4th Asia Pacific Heart Rhythm Society scientific Session (APHRS

2011), 26th Annual Scientific Session of the Japanese Heart Rhythm Society, 28th Annual Scientific Session of the Japanese Society of Electrophysiology, 18-22 September 2011, Fukuoka, Japan

3. Furukawa T, Genetic risks of atrial fibrillation in Japan. Symposium "Genetics in arrhythmias" 4th Asia Pacific Heart Rhythm Society scientific Session (APHRS 2011), 26th Annual Scientific Session of the Japanese Heart Rhythm Society, 28th Annual Scientific Session of the Japanese Society of Electrophysiology, 18-22 September 2011, Fukuoka, Japan

4. Furukawa T, Oishi S, Sasano T. Stretch-induced ATP release from atrial myocytes as a trigger of inflammation and atrial tachyarrhythmias. Symposium 1 "New Pharmacological Agents for Cardiovascular Diseases" The 28th Annual Meeting of the International Society for Heart Research Japanese Section, December 2-3, 2011, Tokyo, Japan

5. Furukawa T. Electrical diversity of cardiac myocytes and its disruption. Symposium 7 "A comprehensive approach to understand the formation of the cardiovascular network" The 88th Annual Meeting of The Physiological Society of Japan and the 116th Annual Meeting of The Japanese Association of Anatomists, March 29, 2011, Yokohama.

他 30 件

学内外教育活動

古川哲史：東京医科歯科大学医学部細胞生物学講義、生理学、循環器内科学講義
東京医科歯科大学疾患生命科学教育部修士講義 (細胞組織制御学特論)
東京医科歯科大学医学部検査学科講義 (心臓生理学)
日本心電学会医学部生のための心電図読解サマナーセミナー
日本循環器学会コメディカル対象心電図セミナー
日本臨床検査技師会心電図セミナー
黒川洵子：東京医科歯科大学医歯学総合研究科修士課程 (人体機能学) (薬理学)
古川哲史・江花有亮：東京医科歯科大学医学部保健衛生学科検査学専攻卒業研究生指導

競争的研究費

1. 古川哲史 (代表)：文部科学省科学研究費補助金 新学術領域研究公募「心血管特異的“自然炎症”とその破綻機構：非感染性炎症疾患“心房細動”での検討」
 2. 古川哲史 (代表)：文部科学省科学研究費補助金 基盤研究 (B)「難治性コモン不整脈における遺伝子-環境相互作用：GWAS データに基づく検討」
 3. 古川哲史 (代表)：文部科学省科学研究費補助金 挑戦的萌芽研究「新たな研究領域「XY 染色体に基づく循環器系の男女差」の創成」
 4. 黒川洵子 (代表)：文部科学省科学研究費補助金 基盤研究 (C)「発生的アプローチによる心血管領域の性差機構の解析」
 5. 黒川洵子 (代表)：文部科学省科学研究費補助金 新学術領域研究公募「性ホルモン非ゲノム作用における心筋膜ラフト局在化シグナルの定量的解析」
 6. 江花有亮 (代表)：文部科学省科学研究費補助金 若手研究 (B)「心房細動関連遺伝子の機能解析および臨床像との関連研究」
- 他 4 件

難治疾患研究所 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、大西裕子

研究内容

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

研究紹介

1. 神経幹細胞の自己複製における低酸素ニッチに関する研究

神経幹細胞は成体では側脳室の脳室下帯において比較的低酸素環境（ O_2 : 1~8%）下に存在することが知られている。胎生期の脳においても血管系の未熟性などから、神経幹細胞は成体より低酸素状態にあるとされる。本研究では特に未解明の点が多い胎生期神経幹細胞の低酸素微小環境（低酸素ニッチ）の分子基盤解明を目的に実施された。胎生 14.5 日目のマウスから調製した神経幹細胞を用いてニューロスフィアアッセイを行った結果、低酸素条件（ O_2 : 1%）のアッセイでは通常酸素条件（ O_2 : 21%）に比べ、スフィア数が増加した。また低酸素条件で前処理すると通常酸素前処理と比べて、通常酸素下のアッセイにおいてもスフィア数が増加した。さらに、低酸素条件及び通常酸素条件の神経幹細胞培養上清を用いてスフィアアッセイを通常酸素下で行ったとこ

ろ、低酸素培養上清はスフィア数を促進した。これらの結果から、神経幹細胞が低酸素状態に暴露されたときに誘導される分泌因子が神経幹細胞の維持に寄与していると推測した。低酸素状態で神経幹細胞に誘導される遺伝子発現を調べたところ、*VEGF-A mRNA* が顕著に上昇しており、VEGF-A 蛋白をスフィアアッセイに添加すると低酸素条件と同様の効果があった。これらのことから、低酸素環境が神経幹細胞の VEGF-A の発現を誘導することで幹細胞性の維持に寄与し、低酸素ニッチを形成していると考えた。

2. 胎生期のアストロサイト分化におけるエピジェネティック制御機構に関する研究

発生途上の脳でアストロサイト分化が胎生期後半になるまで見られない仕組みとして我々は以前、アストロサイト分化誘導性サイトカインの下流の転写因子 STAT3 が結合するアストロサイト特異的遺伝子プロモーター上のシトシン残基が、胎生中期までの神経幹細胞でメチル化されていて胎生後半に脱メチル化されることを報告した。本年実施した研究から、胎仔期のマウス脳において胎生の進行に伴うその脱メチル化のタイミングと、メチルシトシンを水酸化する酵素 TET3 をコードする遺伝子 *tet3* の発現増加の時期が相関していることを見出した。また、胎生中期のマウス脳由来神経幹細胞培養系に Tet3 遺伝子を強制発現させたところ、本来アストロサイト分化誘導性サイトカインを添加しても応答しないこの胎生中期の神経幹細胞が、アストロサイトに分化して GFAP 蛋白を発現することもわかった。この研究から、アストロサイト分化において重要な脱メチル化制御について TET3 の関与という新たな仕組みの存在を示すことができた。

3. 人工幹細胞ニッチを用いた神経幹細胞の未分化性維持と分化を制御する分子基盤解明に関する研究

ニューロンやグリア細胞を生み出す神経幹細胞は、中枢神経系の高次機能の構築や維持および損傷後の修復において重要な役割を担うことから、治療が困難な中枢神経系の損傷あるいは神経疾患に取り組む上で重要な研究対象であり、神経幹細胞の自己複製制御ならびに分化の

運命付け制御の解明は重要なテーマといえる。これらの制御には神経幹細胞が存在する微小環境『ニッチ』のシグナルが関わっていることが知られているがその全容解明には至っていない。本研究は、従来行われてきた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』を用いるという新しい切り口で、その解明を図る目的で実施した。共同研究者のエジンバラ大学において作成された数百種類の合成ポリマーを用いたマイクロアレイを利用して、マウス神経幹細胞の多分化能を維持した自己複製に寄与するポリマーを同定する実験を行った。ヒットポリマーを特定することができたため、各ポリマーについて、マイクロドット規模から培養ディッシュ規模に拡大した確認実験も実施した。そのようなポリマーについては、マウス神経幹細胞の多分化能を維持した自己複製に寄与することを示すことが出来た。この成果は、神経幹細胞のニッチ受容分子群と下流のシグナルの解明を目指す上で重要であり、患者自身の内在性神経幹細胞を賦活化させる薬剤の開発や、患者由来の iPS 細胞から誘導された神経幹細胞の効率的な増殖技術の開発など、難治性神経疾患や神経損傷等の治療法確立に結び付くものと期待される。

4. 中枢神経系各領域におけるアストロサイトの機能的可塑性に関する研究

アストロサイトは脳の主要な細胞種のひとつであり、神経活動において多様な役割を担っている。ニューロンの生存維持やシナプス伝達の制御、血液脳関門の形成などに加え、シナプス形成誘導活性も報告されている。当分野では、「脳内には各機能に特化した多種類のアストロサイト亜集団細胞系譜（サブクラス）が存在するのではないか」という仮説を立て、高次脳神経機能構築の理解について、これまでにないアストロサイトの多様性という観点から取り組んでいる。ニューロンについては、サイトカインや液性因子などに起因する脳の領域化によって、グルタミン酸作動性ニューロンや、GABA 作動性ニューロンなど異なるタイプのニューロンが産生されることがよく知られているが、アストロサイトではそのような手掛かりはない。脳の領域化はアストロサイトの分化以前に形成されることから、各領域由来のアストロサイトを特異的に追跡し機能解析するための遺伝子ノックインマウスを作成した。昨年作成したモデルマウスを用いて本年は、領域別に存在するアストロサイトをセルソーターで回収して遺伝子発現プロファイリングを実施した。領域別に発現量の異なる遺伝子をいくつか同定することが出来たので、得られたこれらの候補遺伝子についての解析を進めており、アストロサイトの機能的可塑性や多様性に迫る個別候補遺伝子の今後の研究展開

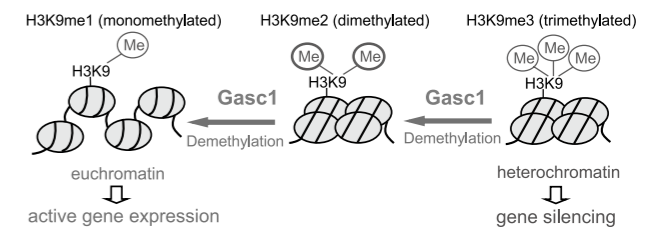


図1 ヒストン脱メチル化酵素 Gasc1 はヒストン H3 の 9 番目のリジン (H3K9) を脱メチル化することでクロマチン構造を弛緩し、遺伝子発現を誘導する。我々は Gasc1 が脳において、胎生期後半から成体に至るまで特にニューロンに高発現していることを見出した。また、*gasc1* 遺伝子変異マウスがヒトの精神運動異常に類する行動異常を呈することを示した。

が期待される段階にある。

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

ヒストン蛋白の修飾と言うエピジェネティック制御が細胞分化に果たす役割についての研究は数多く知られているが、精神神経疾患の原因解明と治療法開発に関連した考察は少なく、この領域で大変重要性の高い研究テーマである。本研究では、扁平上皮がんにおいて遺伝子増幅が見られる遺伝子として本学難治疾患研究所分子細胞遺伝学分野の稲澤教授らにより見出された *gasc1* に着目した。なぜならこの遺伝子産物が、ヒストン H3 の 9 番目のリジンの脱メチル化酵素であることが近年報告された (図1) からである。稲澤教授から供与された、同遺伝子座への *LacZ* 遺伝子挿入変異マウスを用いた昨年までの解析から、*gasc1* 遺伝子が胎生中期以降成体に至るまで、大脳皮質や海馬の分裂後ニューロンに発現することを示した。また、*gasc1* 変異ホモ接合体マウスにおいて *gasc1* 遺伝子発現が 50%以下に減弱していることや、脳の組織学的異常は見られないものの、ロータロッド、バーンズ迷路、ホームケージの各試験により、運動学習や空間学習の低下と多動性を呈することも明らかにした。本年は、このホモ接合体マウス及び正常マウス成体脳を試料として遺伝子発現プロファイリングを行った。正常マウスに比べ発現量が 1.5 分の 1 以下の遺伝子が 630 個、逆に 1.5 倍以上の遺伝子が 549 個見出された。後者の 1 つ *gfap* のコードする GFAP (アストロサイトマーカー) を発現する細胞がホモ接合体マウス大脳で異常に増加していた。今後、回路形成やシナプス機能などについて詳細な解析が必要であるが、本研究はヒストン脱メチル化というエピジェネティック制御の異常を有するマウスがヒトの精神運動異常に類する行動異常を示すという発見を契機に、ヒト精神神経疾患の病因・病態解明と治療法開発の研究において重要な示唆を与えるものである。

6. 胎生期造血組織における造血幹細胞の発生に関する

研究

成体では骨髄に存在する造血幹細胞は、胎生期においてはその存在場所は骨髄以外の組織において胎生の進行に伴う変遷を見せることから、造血幹細胞の発生を明らかにする上で、胎生期造血組織に着目した造血幹細胞研究は重要と考えられる。本年は特に、胎生期造血組織において転写因子 Sox17 が果たす造血幹細胞の発生と未分化性維持における役割に関する研究を実施した。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。Sox17 のコンディショナル遺伝子欠損マウスの研究より、新生仔期において遺伝子欠損を起こすと造血幹細胞数が著しく減少するのに対し、生後 8 週令より遺伝子欠損を起こしても造血幹細胞数に影響がないことから出生前後の造血幹細胞に役割を持つことが示唆された。そこで、胎生期に最初に成体型造血が起きる大動脈-生殖原基-中腎 (AGM) 領域での Sox17 の関与を調べるため、Sox17 の発現を検討すると、大動脈の血管内皮細胞および造血系の細胞が生じる過程の中間体として機能する血管内皮細胞隣接細胞塊に発現を認めた (図 2)。AGM 領域の細胞塊の構成細胞である CD45^{low}c-Kit^{high} 細胞に Sox17 を強制発現すると、ストローマ細胞との共培養で通常は単球へ分化する培養条件においても、浮遊した状態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た。一方、Sox17 の発現により得た細胞塊で Sox17 の発現を停止すると、血液細胞への分化を認めた。このことより Sox17 の発現と未分化性に相関があることが考えられる。また Sox17 強制発現細胞塊を放射線照射したマウスに移植すると、移植の成立が観察された。以上の結果より、Sox17 が AGM 領域由来の血液未分化性を維持することを見出した。

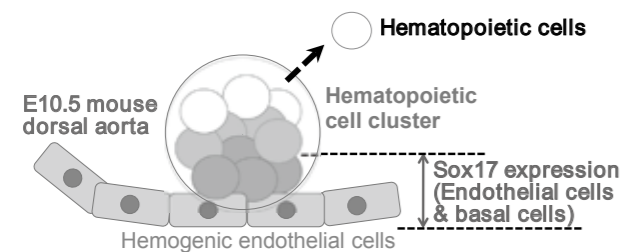


図 2 Sox17 の発現は、aorta-gonad-mesonephros (AGM) 領域の血管内皮および一部の血球細胞クラスターに観察される。

7. 癌幹細胞とその微小環境の特性解明に関する研究

癌幹細胞 (cancer stem cell) のコンセプトは、これまでのがん研究の問題点を指摘すると同時に、癌が根治できる可能性を期待させる。癌塊中に少数存在する癌幹細胞は正常組織幹細胞と同様、自己複製と分化に基づく

不均一な癌組織を形成・維持・拡大する起源細胞として捉えられている。癌幹細胞はニッチと呼ばれる特別な微小環境下において、その自己複製能を維持していることが知られており、当分野では癌幹細胞および癌幹細胞ニッチの性状解明を目指した研究を行っている。グリオーマ細胞株 C6 を DNA 結合色素で染色してフローサイトメーターで観察した際に見られる主細胞集団 main population (MP) とは異なり、低染色性を示す細胞集団 side population (SP) は癌幹細胞の特性を有していることをこれまでに報告した。本年の研究展開により、C6 グリオーマにおいて、SP 細胞集団を形成する癌幹細胞は自ら一部血管内皮細胞へと分化して、ニッチ環境を構築するという生存戦略をとっていることが明らかとなった。血管内皮細胞の近傍には細胞外マトリクスが発現しており、インテグリンを介するシグナルが癌幹細胞の自己複製を制御している可能性が示唆された。加えて、鉄運搬分子トランスフェリンを介するシグナルが、細胞外マトリクスと協調して癌細胞集団の効率的な維持に関与している事を見出している。さらに、腫瘍血管内皮細胞の性状を解析した研究から、癌幹細胞に由来する血管内皮細胞が宿主に由来する血管内皮細胞と比較して、薬剤に蓄積性と抵抗性を示すことが明らかとなった。これらの成果は、微小環境を自作するという重要な癌幹細胞の特性を意味しており、癌幹細胞を標的とした治療指針を考察する上で重要な示唆を与えるものである。

8. 人工癌幹細胞ニッチの構築に関する研究

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ている。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、癌幹細胞分画である 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に対して、接

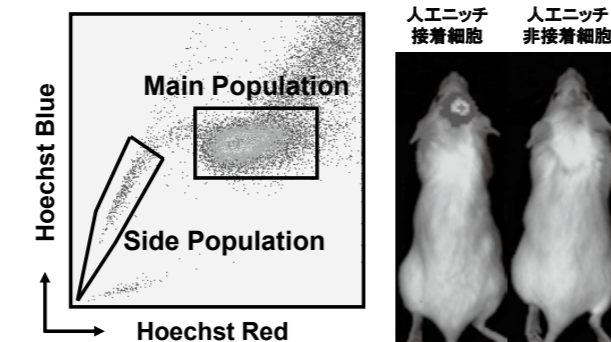


図 3 ヘキスト染色による C6 グリオーマ細胞株に存在する癌幹細胞分画 side population (SP) の検出 (左)。人工癌幹細胞ニッチを用いて、SP 分画の中に造腫瘍能の高い集団があり、実は不均一性を示すことを明らかにした (右)。

着性を示す SP 細胞と非接着性の SP 細胞が確認され、DNA 結合色素での染色とフローサイトメーターを用いた side population 同定法に基づいて分画される癌幹細胞集団は、実は不均一性を示すことを意味していた (図 3)。ウレタンベースのヒット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、このウレタンポリマーが癌幹細胞の不均一性を具現化するひとつの研究ツールとして有用であることが考えられた。

9. アミノレブリン酸 (5-ALA) の癌幹細胞内代謝に関する研究

研究業績

原著論文

1. Yamasaki S, Nobuhisa I, Ramadan A, and Taga T: Identification of a yolk sac cell population with hematopoietic activity in view of CD45/c-Kit expression. *Develop. Growth Differ.* 53:870-877, 2011.
2. Nobuhisa I, Yamasaki S, Ramadan A and Taga T: CD45^{low}c-Kit^{high} cells have hematopoietic properties in the mouse aorta-gonad-mesonephros region. *Exp. Cell Res. In press.*

著書・総説

1. Tabu K, Taga T and Tanaka S. "Glioma Stem Cells" *Molecular Targets of CNS Tumors*, Miklos Garami (Ed) (Intech) 151-176, 2011.
2. Tabu K, Taga T and Tanaka S. "Tumor Stem Cells: CD133 Gene Regulation and Tumor Stemness" *Stem Cells and Cancer Stem Cells*, Volume 2, Part 2 (Springer) 145-153, 2011.
3. 鹿川哲史, 備前典久, 田賀哲也. アストロサイトの発生・分化. *Clinical Neuroscience* 29, 1239-1242, 2011.
4. 田賀哲也, 榎康一, 備前典久. ものづくりから考察する幹細胞の居心地 「ものづくり技術からみる再生医療-細胞研究・創薬・治療-」 Page 18-24, 2011.
5. 備前典久, 田賀哲也. LIF (Leukemia Inhibitory Factor). *臨床免疫・アレルギー科 増刊「サイトカインのすべて」*. 科学評論社. 印刷中.

学術集会発表

1. Tetsuya Taga. Signalling and neural stem cell. *Embryonic Stem Cells as a Model System for Embryonic Development 3rd Latin America Course and Workshop*, Cuernavaca, February 27-March 10, 2011
2. Tetsuya Taga, Yuhei Yamaguchi, Yasuhiro Kokubu, Satoko Hattori, Keizo Takao, Johji Inazawa, Tsuyoshi Miyakawa, Tetsushi Kagawa. Yokohama. Establishment of a new mouse model of neurodevelopmental disorder. *Symposium on New Transgenic Mouse Models for Drug Development*, The 84th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society, March 22-24, 2011. (震災で開催中止、演題・抄録等は公表)
3. 田賀哲也. 幹細胞維持機構の考察による癌の生存戦略解明へのアプローチ 第 316 回情報計算化学生化学会研究講演会 「がん研究とがん治療薬

- の最前線」東京都 2011 年 4 月 18 日
4. Ikuo Nobuhisa, Yuko Kishikawa, Uemura Mami, Maha Anani, Goma Ahmed, Masami Kanai-Azuma, Yoshiaki Kanai, Tetsuya Taga. Role of SoxF family proteins in the maintenance of immature phenotype of hematopoietic progenitors in the aorta-gonad-mesonephros region. 第 9 回幹細胞シンポジウム 東京都 泉ガーデンギャラリー 2011 年 5 月 13-14 日
5. Norihisa Bizen, Toshihiro Inoue, Takeshi Shimizu, Tetsushi Kagawa, Tetsuya Taga. The role of cyclin D1 in inhibition of astrocyte differentiation from neural stem/progenitor cells The 9th Stem Cell Research Symposium, Tokyo, May 13-14, 2011
6. Tetsushi Kagawa, Rieko Nomura, Takeshi Shimizu, Kimi Araki, Naoki Takeda, Naomi Nakagata, Ikuo Nobuhisa, Tetsuya Taga. Analysis of glial cell sub-lineages in the mouse central nervous system マウス中枢神経系におけるグリア亜集団細胞系譜の解析 2011 年 5 月 19 日 第 44 回日本発生生物学会 沖縄県宜野湾市
7. 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, 和泉弘人, 河野公俊, 田賀哲也, 竹田省 子宮体癌幹細胞形質獲得機構における dbpC/contrin の関与 第 10 回日本婦人科がん分子標的研究会学術集会 松江市 2011 年 7 月 2 日
8. 田賀 哲也 第 96 回医工学フォーラム 神経幹細胞の分化制御シグナル 京都市 2011 年 7 月 22 日
9. 鹿川哲史, 山口雄平, 国分康博, 服部聡子, 高雄啓三, 稲澤謙治, 宮川剛, 田賀 哲也 ヒストン脱メチル化酵素遺伝子変異マウスにおけるヒト精神運動異常様行動の解析 2011 年度包括脳ネットワーク夏のワークショップ 2011 年 8 月 23 日 兵庫県神戸市
10. Tetsuya Taga. Stem Cell Regulatory Signals: Basics and Examples from the Central Nervous System. *Tokyo Medical and Dental University International Summer Program 2012*, Tokyo, August 29, 2011.
11. 榎康一, 国分康博, 備前典久, 村松希美, 信久幾夫, 鹿川哲史, 田賀哲也 The cellular and synthetic niches for C6 glioma stem cells 平成 23 年度がん若手研究者ワークショップ 2011 年 9 月 2 日 長野県茅野市
12. Tetsuya Taga. External cues and intrinsic properties regulating neural stem cell fate. *KEY Forum in Developmental Biology and Regenerative Medicine*. Kumamoto, September 8-9, 2011
13. 田賀哲也. 癌幹細胞の自己複製戦略の考察による癌根絶へのアプローチ 東京医科大学大学院

アミノレブリン酸 (5-ALA) はその代謝産物であるプロトポルフィリン IX (PpIX) の腫瘍選択的蓄積性から、脳腫瘍の術中診断および光線力学療法 (PDT) 薬として国内外で広く臨床適用されている。現在、東京工業大学との共同研究により、C6 グリオーマの SP 細胞では、低酸素環境下において PpIX の蓄積が減少することが明らかとなっている。このことは、腫瘍組織内で高頻度に確認される低酸素領域において、癌幹細胞の 5-ALA に基づく可視化が容易ではないという重要な可能性を示唆しており、低酸素による 5-ALA 代謝変動メカニズムの解明が診断効率および PDT 治療効率の向上につながる事が考えられる。

- 特別講義 東京都 2011 年 9 月 12 日
14. Tetsushi Kagawa, Norihisa Bizen, Taichi Kashiwagi, Ikuo Nobuhisa, Takeshi Shimizu, Tetsuya Taga. Specification of Glial Cell Types in the Developing Central Nervous System 中枢神経系グリア細胞の発生分化研究の現状と展望 第 54 回日本神経化学学会 2011 年 9 月 28 日 石川県加賀市
15. Kouichi Tabu and Tetsuya Taga. Control of glioma stem cells by the synthetic polymers 第 70 回日本癌学会学術総会 2011 年 10 月 4 日 名古屋
16. 田賀哲也, 榎康一. 癌幹細胞の自己複製戦略 第 56 回日本人類遺伝学会 シンポジウム 千葉市 2011 年 11 月 11 日
17. Ikuo Nobuhisa, Yuko Kishikawa, Maha Anani, Tetsuya Taga. SoxF family proteins have roles in maintenance of immature phenotype of hematopoietic progenitors in the aorta-gonad-mesonephros region. 第 40 回日本免疫学会学術集会 千葉県 幕張メッセ 2011 年 11 月 27-29 日
18. 田賀哲也. 幹細胞の自己複製と分化の運命付けを制御する仕組み 京都市ササケパーク 平成 23 年度 再生医療分野の産業化を目指した実用セミナー 京都市 2011 年 12 月 1 日
19. Ikuo Nobuhisa, Yuko Kishikawa, Mami Uemura, Maha Anani, Masami Kanai-Azuma, Yoshiaki Kanai, Tetsuya Taga. Maintenance of immature phenotype of the hematopoietic cell clusters in the aorta-gonad-mesonephros region by SoxF family proteins. 第 34 回日本分子生物学会年会 神奈川県横浜市 パシフィコ横浜 2011 年 12 月 13 - 16 日
20. 高沢友輝, 柏木太一, 鹿川哲史, 田賀哲也. 低酸素状態で発生期マウス神経幹細胞に発現する VEGF-A による幹細胞性維持と低酸素ニッチ作用 第 34 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 13 日 神奈川県横浜市
21. Kouichi Tabu, Norihisa Bizen, Yasuhiro Kokubu, Nozomi Muramatsu, Ikuo Nobuhisa, Tetsushi Kagawa and Tetsuya Taga. Maintenance of C6 glioma side population with stemness by the cellular and synthetic niche 第 34 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 14 日 横浜
22. 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

難治疾患研究所 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、癌、虚血性の疾患、免疫性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、癌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- α は低酸素応答において中心的な役割を担う転写因子です。プロリン水酸化酵素 PHD は HIF- α のプロリン残基を水酸化することで、ユビキチンリガーゼ pVHL との結合を促進して、その発現を負に制御します。本研究室では PHD に着目して、低酸素応答のシグナル伝達機構の解析を進めています。PHD には 1, 2, 3 の三種類が存在しており、共通に HIF- α の水酸化に働く一方で、それぞれに独自の働きを持つことも予想されています。まだこの独自の働きには不確かなことが多いため、私たちは PHD3 に着目して、解析を行ってきました。

PHD3 は低酸素環境に反応して、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

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、癌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。

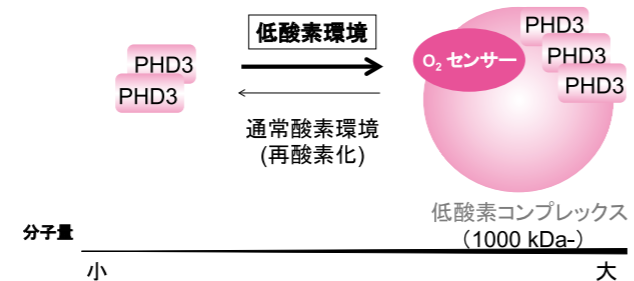


図 1 低酸素下で形成される PHD3 高次複合体

2. 低酸素応答のシグナル伝達機構 –低酸素下での細胞死抑制機構の解析–

PRP19 はスプライシングの制御に関わるタンパク質であることが知られていましたが、低酸素環境における役割はこれまで未知でした。PRP19 の機能を解析するために、強制発現系および siRNA を用いた発現抑制系を用いて細胞を低酸素環境で培養したところ、強制発現系では低酸素下での細胞死が抑制され、siRNA を用いた系では細胞死が亢進することが明らかになりました。したがって、PRP19 は低酸素応答時に細胞死を抑制する働きを担うことが示されました。さらに、この細胞死抑制効果には PHD3 と PRP19 の結合が必須であり、PHD3 と結合できない PRP19 削除変異体は細胞死抑制効果を示しませんでした。PRP19 は PHD3 と結合することにより、PHD3 が引き起こす caspase 経路の活性化を抑制することが、その分子機序であると考えられます（図 2）。

また、PRP19 は HIF の発現制御には関与しないため、HIF とは独立して細胞死を抑制すると考えられます。現在、DNA マイクロアレイ解析を用いて、PRP19 が低酸素下で発現を制御する遺伝子の同定を進めています。

PRP19 は一部の癌細胞で発現が高いことも知られており、その発現を制御する機構の解明と PRP19 の下流に位置する遺伝子の同定は、癌細胞を効率的に細胞死へと導くアプローチの開発につながる事が期待されます。

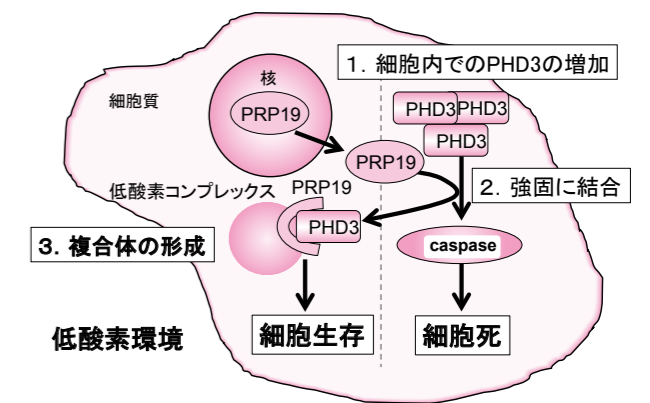


図 2 PHD3-PRP19 の相互作用による低酸素下での細胞死抑制機構

研究業績

和文総説

- 中山 恒 (2011) がんにおける低酸素応答シグナル伝達
実験医学増刊号 がん幹細胞 Vol.29(20)141-147、(羊土社)
- 中山 恒 (2011) 低酸素応答におけるエネルギー代謝調節
The Lung Perspectives Vol.19 63-67、(メディカルレビュー社)

国内学会

- 中山 恒・合田 亘人
低酸素バイオロジーの最前線：生理機能から疾患制御まで（シンポジウム企画）
第 84 回日本生化学会大会 9 月 22 日 京都
- 中山 恒、佐藤益弘、迫田実希
プロリン水酸化酵素 PHD3 と Pre-mRNA processing factor (PRP)19 の相互作用を介した低酸素下での細胞死抑制機構の解析
第 8 回がんとハイポキシア研究会 1 月 30 日 札

観

- 中山 恒
低酸素環境における Pre-mRNA processing factor (PRP)19 による遺伝子発現制御機構
第 84 回日本生化学会大会 9 月 22 日 京都
- 中山 恒
Regulation of matrix metalloproteinase MMP1 gene expression under prolonged hypoxic conditions
第 34 回日本分子生物学会年会 12 月 15 日 横浜

セミナー・シンポジウム講演

- 中山 恒
MTT フェローを経験して – 低酸素応答研究の立ち上げと展開 –
「メディカル・トップトラックの確立」シンポジウム 2 月 22 日 東京
- Koh Nakayama
Regulation of hypoxic cell death by prolyl-hydroxylase PHD3 and PRP19
第 6 回研究所ネットワークシンポジウム 6 月 9 日 東京
- 中山 恒

プロリン水酸化酵素 PHD – Hypoxia-Inducible Factor (HIF) による低酸素応答制御 – その分子機構と疾患における役割 –
腎臓シンポジウム 11 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

- 中山 恒 (代表) 文部科学省科学研究費補助金 若手研究 (B)
「低酸素応答を制御する『酸素センサー』機構の分子メカニズム」
- 中山 恒 (代表) アステラス病態代謝研究会 研究助成金
「低酸素癌の増殖と転移のタイミングを決める分子機構の解析」
- 中山 恒 (代表) 上原記念生命科学財団 研究奨励金
「低酸素シグナルの制御による低酸素癌の制圧」

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

- 脊髄小脳変性症7型遺伝子の新たな機能を明らかにした（神経病理学）
- Ku70 のハンチントン病ハエモデルでの治療効果を確認した（神経病理学）
- 死細胞貪食を制御している分子としてオートファジー関連分子である Beclin1 を同定した（病態細胞生物学）
- 細胞老化に至った細胞においては、サイトカイン産生とオートファジーが同じ場所でおこる（病態細胞生物学）
- ストレスキナーゼ MKK7 がマウス脳形成に必須であることを明らかにした（発生再生生物学）
- 質量顕微鏡を用いてマウス再生肝で変動する脂質の同定を行った（発生再生生物学）
- 17 型コラーゲンが白髪と脱毛を抑制していることを明らかにした（幹細胞医学）
- 毛包幹細胞が色素幹細胞のニッチ細胞として働くことを明らかにした（幹細胞医学）
- 脾臓辺縁帯でおこる新たな B リンパ球の自己トレランスメカニズムを解明した（免疫疾患）
- 他の方法ではタンパク質導入が困難な細胞にタンパク質を効率よく導入して機能を発現させる新規の方法を開発した（免疫疾患）
- BAG3 遺伝子変異は、代謝ストレス時の心筋細胞死を亢進し、拡張型心筋症の原因となることを解明した（分子病態）
- NKG2D レセプターのリガンドである ULBP4/RAET1 は、旧世界ザルでは著明な多型性を示す（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、新規抗 EBV 剤開発に応用している（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し実用化した（ウイルス治療）

難治疾患研究所 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、岡 努、笹辺俊和

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PQB1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1) に成果が得られた。

研究紹介

1. 脊髄小脳変性症7型遺伝子 Ataxin-7 の新たな機能の発見

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。異常タンパクの産生、凝集体形成、神経細胞機能障害、神経細胞死に至る過程は基本的に全ての変性疾患において共有している。

脊髄小脳変性症7型は小脳失調に加えて網膜色素変性を伴う点で特徴的な常染色体優性遺伝の変性疾患である。その原因遺伝子である Ataxin-7 は酵母タンパク Sgf73 のホモログと考えられている。Sgf73 はクロマチンリモデリング複合体である SAGA 複合体の構成要素である。SAGA 複合体には Spt, Ada および Gcn5 acetylase が含まれており、ヒストンタンパク質のアセチル化を行う。この histone acetyltransferase (HAT) 活性によって、転写、DNA 損傷修復、DNA 複製などに多面的に関与している。哺乳類における SAGA 複合体のホモログは TFTC, STAGA, PCAF/GCN5 の3種類が知られており、Ataxin-7 は TFTC 複合体と STAGA 複合体に含まれることが質量解析から明らかになっている。さらに、Ataxin-7 の機能低下が、網膜形成・維持に必要な遺伝子群の発現低下につながることも示されている。

このように、核における Ataxin-7 の機能が明らかになる一方で、Ataxin-7 が細胞質にも存在することが報告されている。それは死後脳あるいは培養細胞における結果であり、後者においては NLS あるいは NES 配列が、細胞質局在と関連していることも報告されている。しかしながら、細胞質に存在する Ataxin-7 が機能的意味を持つかどうかは明らかではなかった。

私たちは今回、Ataxin-7 と DsRed などの蛍光タンパクの融合タンパク質の発現を通じて、Ataxin-7 が微小管と共局在すること、Ataxin-7 が微小管の安定化に寄与していることを示した。

まず、正常な状態で Ataxin-7 を発現することが知られている Hela 細胞を Ataxin-7 抗体で染色すると、細胞周期に関連して、M 期の細胞の細胞質に内在性 Ataxin-7 の線維状の染色像が認められた。次に、Ataxin-7-DsRed 融合タンパク質を培養細胞に発現させて live imaging で観察すると、Ataxin-7-DsRed が核と細胞質の局在をダイナミックに変化させていることを認めた。Ataxin-7-Myc の局在は免疫染色で alpha-tubulin と重なっており (図1)、免疫沈降においても両者が associate していることが示された。alpha-tubulin との結合に正常型 Ataxin-7 と変異 Ataxin-7 の差はなかった。さらに、nocodazole で処理すると、Ataxin-7 が正常型と異常型の差異なく微小管を安定化することが認められ、siRNA の Ataxin-7 ノックダウンで安定性がより

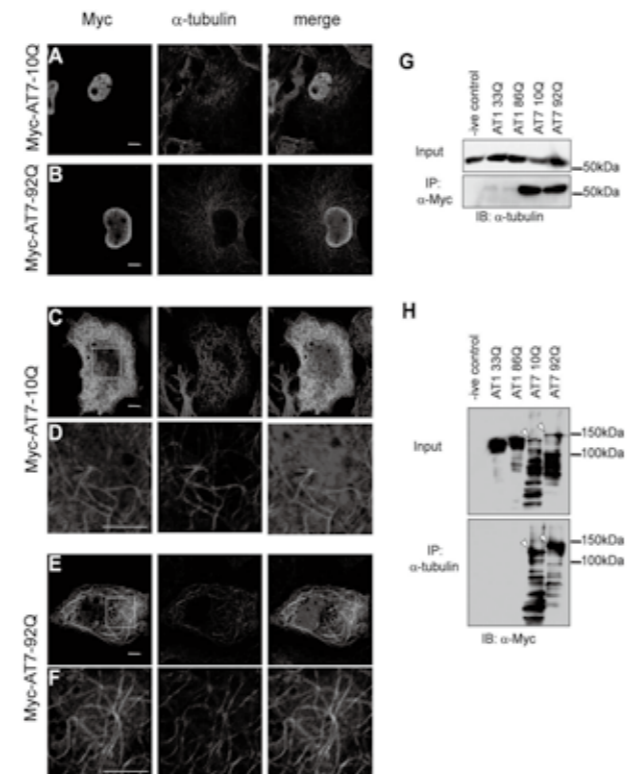


図1 説明：正常型および変異型 Ataxin-7 は alpha-tubulin と結合する

低下することと合致していた。また、異常 Ataxin-7 トランスジェニックマウスを用いて Ataxin-7 を染色すると、正常マウスに認められるプルキンエ細胞樹状突起の Ataxin-7 が消失して、Ataxin-7 凝集体内に取り込まれている像が認められた。これらのことから、封入体への Ataxin-7 の取り込みが、微小管の不安定性につながっている可能性が示唆された (ハイライト)。

2. Ku70 のハンチントン病態にたいする治療効果の確認

私たちは昨年度に DNA 修復タンパク質 Ku70 の機能不全がハンチントン病態として重要な役割を果たすこと、Ku70 の補充がトランスジェニックマウスモデルにおいて顕著な治療効果を示すことを報告した (Enokido et al., JCB 2010)。今後、Ku70 に基盤をおいた分子標的治療を開発する為には、この結果をさらに確認する必要がある。そこで、ショウジョウバエモデルを用いてこの再確認を行った。ショウジョウバエモデルは私たちのオリジナルに開発したものであり、OK6 ドライバーを用いて運動ニューロン特異的に神経変性疾患タンパク質を発現することにより寿命が短縮する表現型を示すものである。これに同じドライバーで Ku70 を共発現させると寿命が顕著に回復した (図2)。これにより Ku70 の病態分子としての位置付けがより確かなものとなった。この結果を得て、さらに Ku70 による分子標的治療開発を進める予定である。

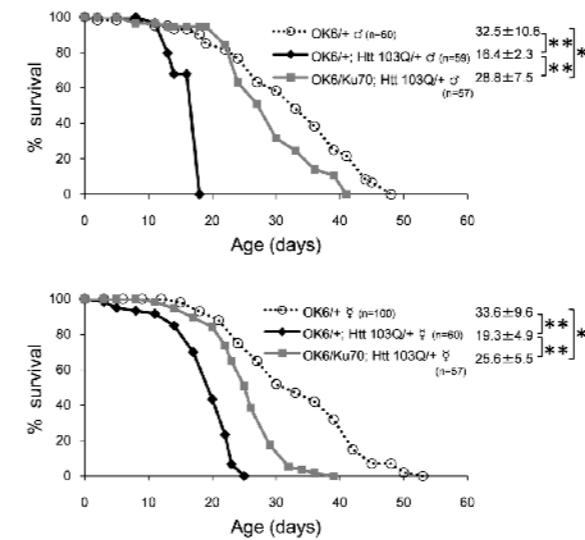
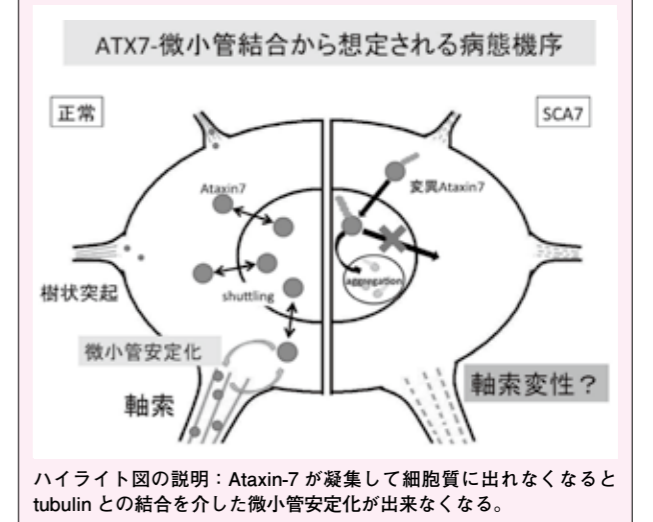


図2の説明：Ku70 はハンチントン病モデルショウジョウバエの寿命を顕著に伸ばす

ハイライト

脊髄小脳変性症7型における Ataxin-7 の微小管安定化を介した病態仮説



業績目録

原著論文

- Oka, T., Tagawa, K., Ito, H. and **Okazawa, H.** (2011). Dynamic Changes of the Phosphoproteome in Postmortem Mouse Brains. *PLoS One*. 6, e21405. doi:10.1371/journal.pone.0021405
- Tamura, T., Sone, M., Iwatsubo, T., Tagawa, K., Wanker, E.E. and **Okazawa, H.** (2011). Ku70 alleviates neurodegeneration in *Drosophila* models of Huntington's disease. *PLoS One*. 6, e27408. doi: 10.1371/journal.pone.0027408
- 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.*** in press

和文総説

- 榎戸 靖、**岡澤 均** (2011). ポリグルタミン病におけるDNA修復異常、Medical Science Digest、Vol.38、No.1、21-24
- 田川一彦、**岡澤 均** (2011). ポリグルタミン病、認知症学(上)—その解明と治療の最新知見—、日本臨牀 増刊号 No.1008、124-128.
- 岡澤 均** (2011). はじめに、精神発達遅滞・自閉症の分子医学、医学のあゆみ、Vo.239、No.6、605-606.
- 塩飽裕紀、**岡澤 均** (2011). PQBP1 遺伝子異常による発達障害の分子医学、医学のあゆみ、Vo.239、No.6、653-659.
- Enokido, Y., Okazawa, H. (2011). DNA Repair in the Nervous System: A New Research for Neurological Disorders. in DNA Repair: New Research edited by Kimura, S. and Shimizu, S. Nova Science. (ISBN: 978-1-62100-756-2)
- 岡澤 均** (2011). DNA 損傷修復からみた神経変性機序、臨床神経学、Vol.51、No.11、979-981
- 岡澤 均** (2011). ポリグルタミン病における凝集毒性概念の変遷と治療、日本認知症学会誌 Dementia Japan Vol.26、No.1、13-20
- 岡澤 均** (2011). ハンチントン病の分子病態解明、臨床神経学、Vol.52、No.2、63-72

国際学会

- Shiwaku, H., **Okazawa, H.** Suppression of the novel ER protein Maxer by mutant ataxin-1 in Bergman glia contributes to non-cell-autonomous toxicity. The 6th International Symposium of Institute Network and the 10th Surugadai International Symposium. Joint Usage/Research Program of Medical Research Institute International Symposium, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo 2011.6.9-10
- Okazawa, H.** Molecular Mechanisms of PQBP1-Linked MR and Microcephaly. 15th International Workshop on Fragile X and Other Early-Onset Cognitive Disorders, Harnack-House, Berlin, Germany, 2011.9.4-7
- Okazawa, H.** PQBP1, a new major causative gene for mental retardation and microcephaly, regulates gene expression through mRNA splicing. Elsevier Conference, RNA Binding Proteins in Neurological Disease, Sheraton National,

Arlington, U.S.A., 2011.11.10-11

- Okazawa, H.**, Tamura, T. Single strand annealing of DNA double strand breaks is involved in the SCA1 pathology. Gordon Conference, CAG Triplet Repeat Disorders, Il Ciocco Hotel and Resort Lucca, Barga, Italy, 2011.6.5-10

国内学会

- 田村拓也、**岡澤 均** 「SCA1 病態におけるDNA 損傷修復異常」 平成 22 年度厚生労働省科学研究費補助金「運動失調症の病態解明と治療開発に関する研究班」 平成 22 年度研究班会議 都市センターホテル 東京 2011.1.13
- 阿部大数、曾根雅紀、田村拓也、白石理紗、**岡澤 均** 「神経変性疾患モデルショウジョウバエを用いた新規 in vivo スクリーニング系の開発」 第 52 回日本神経学会学術大会 名古屋国際会議場 名古屋 2011.5.19
- 曾根雅紀、田村拓也、**岡澤 均** 「SCA1 病態における DNA 損傷修復機構の関与」 第 52 回日本神経学会学術大会 名古屋国際会議場 名古屋 2011.5.19
- 田村拓也、曾根雅紀、**岡澤 均** 「PQBP-1 を介したポリグルタミン病の認知障害の分子メカニズム」 第 52 回日本神経学会学術大会 名古屋国際会議場 名古屋 2011.5.20
- 中村蓉子、田村拓也、**岡澤 均** 「精神発達遅滞原因遺伝子、PQBP1 の発現量は寿命を制御する」 第 34 回日本神経科学大会 パシフィコ横浜 横浜 2011.9.14-17
- 岡 努、田川一彦、伊藤日加瑠、**岡澤 均** 「マウス脳におけるリン酸化タンパク質死後変化の保存状態による差異の網羅的解析」 第 30 回日本認知症学会学術集会 タワーホール 船堀 2011.11.11-13

その他多数

招待講演・セミナー

- 岡澤 均** 「神経変性疾患における DNA 損傷修復」 FANTASY ホテル日航東京 東京 2011.2.5-6
- 岡澤 均** Neurodegeneration and DNA damage. 第 88 回日本生理学会大会・第 116 回日本解剖学会総会全国学術集会 合同大会 パシフィコ横浜 横浜 2011.3.28-30 (シンポジウム) (3.11 の地震の影響で誌上開催に)
- Okazawa, H.** Brain size control by PQBP1 in neural stem cells. iPS 細胞等の初期ステージ橋渡し研究振興に向けた JST-CIRM ワークショップ 神戸ポートピアホテル 神戸 2011.5.16-17
- 岡澤 均** 「DNA 損傷修復からみた神経変性機序」 第 52 回日本神経学会学術大会 名古屋国際会議場 名古屋 2011.5.18-20
- 水澤英洋、西川 徹、**岡澤 均** 「脳神経疾患の理解と治療に向けた戦略について」 第 28 回大学院医歯学総合研究科 大学院セミナー「脳神経疾患の理解と治療に向けた基礎研究の最前線」 東京医科歯科大学 東京 2011.6.27
- 岡澤 均** 「ポリグルタミン病の病態解明から治療開発へ」 京都大学 CREST 特別講演 京都 2011.7.13
- 岡澤 均** 「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」 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」班会議 包括脳ネットワーク夏のワークショップ 神戸国際会議場 神戸 2011.8.21-22
- 岡澤 均** 新学術領域研究「脳内環境」班会議 KKR ホテル熱海 静岡 2012.1.28-29
- 岡澤 均** 「ポリグルタミン病の分子標的治療を目指して」 大阪大学蛋白質研究所セミナー「神経疾患の克服に向けて」 大阪大学蛋白質研究所 大阪 2012.3.1-2

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 - 一般 -014 分担研究者 **岡澤 均**
平成 21 - 23 年度 日本学術振興会科学研究費補助金 基盤研究 B 「複合的動物フェノタイプ解析システムによるポリグルタミン病治療薬開発」 課題番号：21390265 研究代表者 **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」 課題番号：23500438 研究代表者 榎戸 靖

学会等主催

- 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 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 神戸国際会議場 神戸 2011.8.21-22
- 岡澤 均** シナプス病態若手シンポジウム 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 神戸国際会議場 神戸 2011.8.23
- 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 ホテル熱海 静岡 2011.12.17-18
- Okazawa, H.**, Namba, E. International Symposium "Fragile X, Autism and Intellectual Disabilities", Tokyo Medical and Dental University, M&D Tower, Akio Suzuki Memorial Hall, 2012.2.10

難治疾患研究所 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 技術補佐員：吉野育代、辻村恭子 事務補佐員：坂口三美

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 (図2A)、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 (図2B)。

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

新規オートファジー制御低分子化合物の探索を行った。特に、新規オートファジーに関わる分子のノックアウトマウスの作製に成功したことは、大きな収穫であった (論文執筆中)。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。

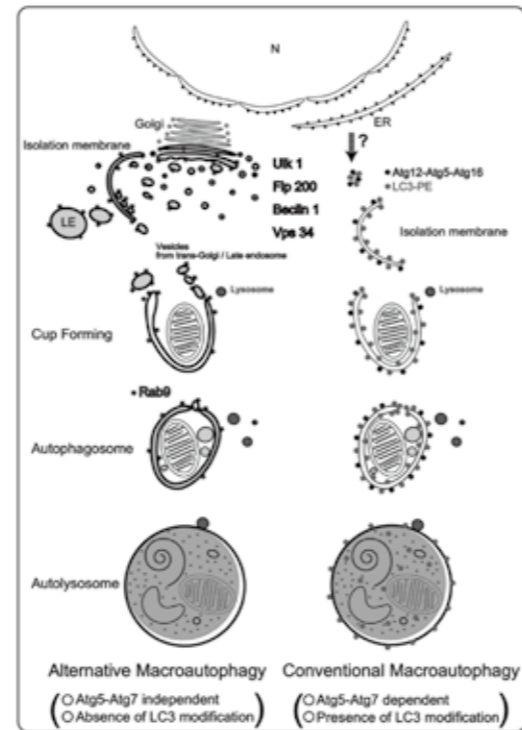


図1 オルタナティブオートファジーの発見
哺乳動物には Atg5 に依存したオートファジーと依存しないオートファジー (オルタナティブオートファジー) が存在しており、両者は刺激や細胞の種類によって使い分けられている。

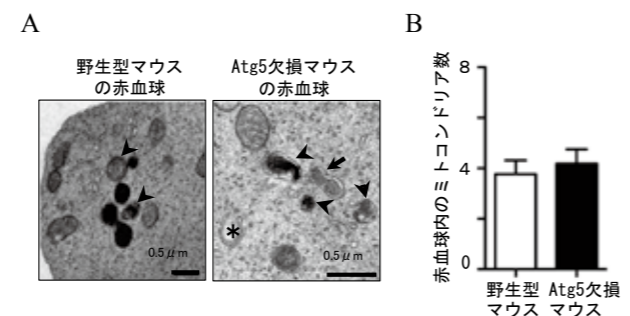


図2 オルタナティブオートファジーによる赤血球ミトコンドリアの除去
A: 野生型マウス (左) と Atg5 欠損マウス (右) の赤血球の電子顕微鏡写真。両方の赤血球で、ミトコンドリアのオートファジー (矢じり) が観察される。*は隔離膜。
B: 成熟赤血球内に残存したミトコンドリアの数。野生型マウスと Atg5 欠損マウスでは、同程度のミトコンドリア除去が誘導されている。

2. オートファジー分子の新たな機能

オートファジー関連分子の一つである Beclin1 の機能解析を行なう過程で、Beclin1 がオートファジーのみならず死細胞の貪食にも関わっていることを発見した。即ち、Beclin1 を欠損した ES 細胞や Beclin1 をノックダウンした J774 マクロファージ細胞株では、アポトーシス細胞の貪食能力が低下していた (図3)。また、その詳細なメカニズムを解析したところ、(1) Beclin1 はアクチンダイナミクスを制御することによってアポトーシス細胞の内部取り込みを調節している事 (図4A)、(2) Beclin1 欠損細胞では、アポトーシス細胞の認識には異常がないものの、その内部取り込みができない事 (図4B)、(3) Beclin1 は small G 蛋白質である Rac1 と協調している機能している事、を見出した。

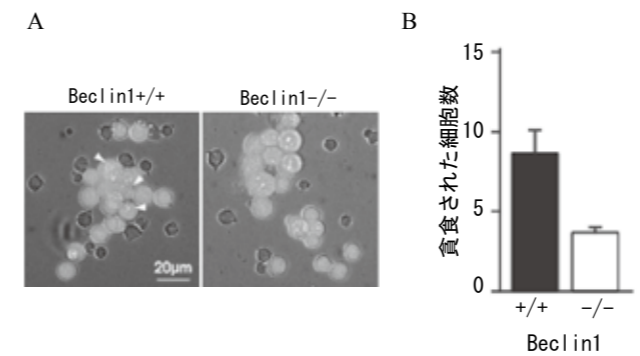


図3 Beclin1 による死細胞貪食の制御
A: 野生型 ES 細胞 (左) と Beclin1 欠損 ES 細胞 (右) にアポトーシス細胞を添加し、貪食能を比較した。野生型細胞では貪食した死細胞が観察される (矢印) が、Beclin1 欠損細胞では観察されない。
B: 貪食された細胞数を定量測定した。

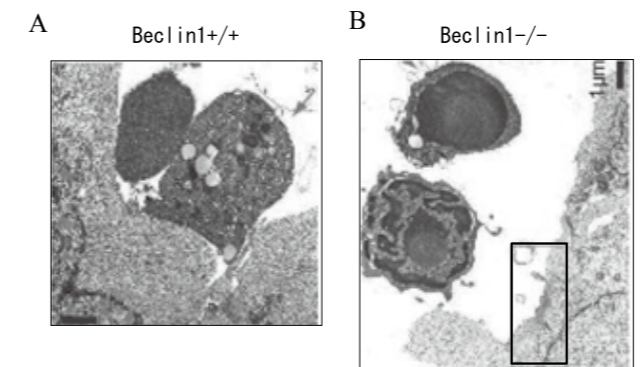


図4 Beclin1 による死細胞貪食過程の形態学的解析
A: 野生型 ES 細胞がアポトーシス細胞 (矢印) を貪食している。ES 細胞の内部では、アクチンが重合し貪食の準備をしている (矢じり)。
B: アポトーシス細胞を認識した Beclin1 欠損 ES 細胞の内部では、アクチンの重合はおきている (四角内部) が、その後の取り込みが実行されない。

3. 細胞老化におけるオートファジーの役割

細胞老化とは細胞が分裂を停止し増殖できなくなった状態で、細胞老化関連 β ガラクトシダーゼ染色が陽性になる事や、サイトカイン産生が亢進する特徴が知られている。実際に、多くの細胞老化ではインターロイキン6などの分泌タンパク質の合成が急速に誘導される。我々はケンブリッジ大学と共同で、この現象が、(1)部分的

にオートファジーに依存している事、(2)ゴルジ体のトランス側に、mTOR とオートファジーが共に集積する細胞内構造物 (mTOR- オートファジー共存コンパートメント: TASCC) が存在 (図5A) し、この領域でサイトカイン合成が実行されている事 (図5B)、を明らかにした。本研究は、蛋白質の異化作用と同化作用が同一の空間で協調して実行されている事を明らかにした点で意義がある。

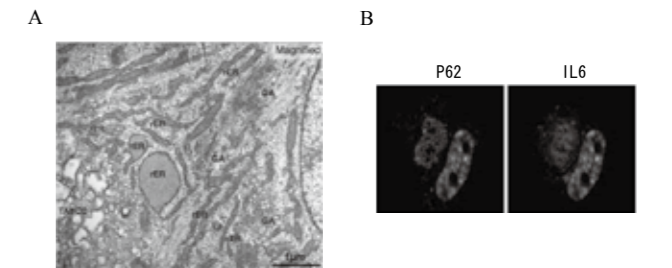


図5 細胞老化の際に観察される TASCC
A: Ras によって誘導された Senescence 細胞の電子顕微鏡像。mTor とオートファジーが共存した細胞内構造物 (TASCC) が存在する。
B: Ras によって誘導された Senescence 細胞の免疫染色像。オートファジー (p62 染色) とサイトカイン産生 (IL6) が TASCC で共存している。

4. 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。

本年は、①超微形態学を用いて、アポトーシス誘導時のミトコンドリア形態変化やアポトーシス関連分子の挙動を観察した。また、② Yeast の系を用いて、Bcl-2 ファミリーによるミトコンドリア膜変化に関わる分子を探索した。

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Ca²⁺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観察すると共に、PTを阻害する低分子化合物の探索を行なった。

5. 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
<p>転入：小西昭充（講師）、吉田達士（特任講師）、本田真也（特任助教）、宮崎大（疾患生命科学研究部修士課程入学）、武田可奈子（疾患生命科学研究部修士課程入学）、</p> <p>転出：西田友哉（米国留学）、李麗淑（米国転出）、菅沼恵（疾患生命科学研究部修士課程より就職）</p>
業績目録
<p>原著論文</p> <ol style="list-style-type: none">Yoshioka Y, Shimizu S, Ito T, Taniguchi M, Nomura M, Nishida T, Sawa Y. p53 Inhibits Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Solid Tumor. <i>J Surg Res.</i> in press 2011 Hikita H, Takehara T, Kodama T, Shimizu S, Shigekawa M, Hosui A, Miyagi T, Tatsumi T, Ishida H, Li W, Kanto T, Hiramatsu N, Shimizu S, Tsujimoto Y, Hayashi N. Delayed-onset caspase-dependent massive hepatocyte apoptosis upon Fas activation in Bak/Bax-deficient mice. <i>Hepatology</i> 54: 240-251, 2011. Narita M, Young ARJ, Arakawa S, Samarajiwa SA, Nakashima T, Yoshida S, Hong SK, Berry LS, Reichelt S, Ferreira M, Tavaré S, Inoki K, Shimizu S, Narita M. Spatial coupling of mTOR and autophagy augments secretory phenotypes. <i>Science</i> 332: 966-970, 2011 Yamasaki T, Kawasaki H, Arakawa S, Shimizu K, Shimizu S, Reiner O, Okano H, Nishina S, Azuma N, Penninger JM, Katada T, Nishina H. Stress-activated protein kinase MKK7 regulates axon elongation in the developing cerebral cortex. <i>Journal of Neuroscience</i> 31: 16872-16883, 2011 Konishi A, Arakawa S, Yue Z, Shimizu S. Involvement of Beclin 1 in the engulfment of apoptotic cells. <i>J. Biol. Chem.</i> in press

<p>総説</p> <ol style="list-style-type: none">ミトコンドリアの変化 清水重臣 「細胞死解析プロトコール」羊土社 108-118　2011 アポトーシスと非アポトーシス細胞死 清水重臣「臨床血液」教育講演号, 2011 オートファジー細胞死の分子機構とその生体での役割 清水重臣「実験医学」羊土社　30：550-555, 2012

<p>学会発表</p>
<p>国際学会</p> <ol style="list-style-type: none">Shimizu S.： “Alternative macroautophagy” International Symposium “Parkinson Disease and Mitophagy” (2011 6/11, Tokyo)
<p>国内学会</p> <ol style="list-style-type: none">清水重臣：「alternative macroautophagyの分子機構と生理機能」第6回オートファジー研究会(2011/1/12-14　掛川) 清水重臣：「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」彩都産学官連携シンポジウム(2011/1/26-27　豊中) 清水重臣：「ストレスによって誘導される種々の細胞死とオートファジー」第30回　岡山免疫懇話会(2011/3/9　岡山) 清水重臣：「細胞死を司るミトコンドリア孔の解析」過渡的複合体シンポジウム(2011/7/21　文京区) 清水重臣：「細胞死とオートファジーのクロス

<p>学内教育活動</p>
<p>清水重臣：福井大学大学院医学系研究科非常勤講師</p>
<p>競争的研究費取得</p>

<p>代表（清水重臣）</p> <ol style="list-style-type: none">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、特定領域研究「新しく発見したオートファジー機構を介した蛋白質品質管理システムの解析」 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閉閉機構の動的解析」 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」 小林がん学術振興会　第5回研究助成金「新たに発見したオートファジー機構を標的とした革新的抗癌剤の開発」 先進医薬研究振興財団　第10回循環医学研究助成「心筋症における新規オートファジーの関与の解明とその治療への応用」 武田科学振興財団　生命科学研究助成「新規オートファジー機構の解析とライソゾーム病への

<p>人事異動</p>
<p>トーク」日本 Cell Death 学会（2011/7/29　文京区）</p> <ol style="list-style-type: none">清水重臣：「オートファジーを標的とした難治疾患克服への戦略」新適塾「難病への挑戦」第7回(2011/9/02　豊中) 清水重臣：「オートファジーと神経変性疾患」 「病態に根ざしたALSの新規治療法開発班」平成23年度ワークショップ(2011/9/22　千代田区) 清水重臣：「様々な疾患を惹起するミトコンドリア細胞死孔の解析」第84回日本生化学会(2011/9/24　京都) 清水重臣：「オートファジーを標的とした難治疾患克服への戦略」金沢大学がん進展制御研究所セミナー（2011/9/27　金沢） 清水重臣：「アポトーシスと非アポトーシス細胞死」第73回日本血液学会（2011/10/14-16　名古屋） 清水重臣：「生体で見られる様々な細胞死とオートファジー」第1回横断的腫瘍フォーラム(2011/12/07　吹田) Shimizu S: “Various Types of Cell Death and Autophagy” 第34回日本分子生物学会年会(2010/12/13-16　横浜) Yoshida S, Yamaguchi H, Shimizu S.: “Molecular mechanism of apoptotic mitochondrial changes in yeast” 第34回日本分子生物学会年会（2010/12/13-16　横浜） Honda S, Arakawa S, Nishida Y, Yoshida T, Shimizu S: “A role of alternative macroautophagy during erythrocyte terminal differentiation” 第34回日本分子生物学会年会（2010/12/13-16　横浜） Yoshida T, Arakawa S, Nishida Y, Shimizu S: “Ulk1 is up-regulated by p53 and involved in alternative autophagy induction” 第34回日本分子生物学会年会（2010/12/13-16　横浜） 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）

<p>学内外教育活動</p>
<p>清水重臣：福井大学大学院医学系研究科非常勤講師</p>
<p>競争的研究費取得</p>

<p>代表（清水重臣）</p> <ol style="list-style-type: none">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、特定領域研究「新しく発見したオートファジー機構を介した蛋白質品質管理システムの解析」 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閉閉機構の動的解析」 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」 小林がん学術振興会　第5回研究助成金「新たに発見したオートファジー機構を標的とした革新的抗癌剤の開発」 先進医薬研究振興財団　第10回循環医学研究助成「心筋症における新規オートファジーの関与の解明とその治療への応用」 武田科学振興財団　生命科学研究助成「新規オートファジー機構の解析とライソゾーム病への

<p>代表（小西昭充）</p> <ol style="list-style-type: none">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？」 科学研究費補助金、特定領域研究「DNA損傷チェックポイント回復機構の解析：細胞は如何に細胞周期を再開させるのか？」

<p>代表（荒川聡子）</p> <ol style="list-style-type: none">科学研究費補助金、若手研究（B）「新規オルタナティブ・オートファジーの機能部位の解析」
--

<p>代表（室橋道子）</p> <ol style="list-style-type: none">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」
--

難治疾患研究所 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、肝芽細胞は増殖できず、細胞死 (アポトーシス) が誘導され、肝形成不全となり、マウス個体も致死となります。

現在は、「脊椎動物初期胚の形作りにおける JNK シグナル系の役割」を小型魚類のゼブラフィッシュを用いて、また「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 NK シグナル系の役割」を解明する過程で、Hippo シグナル系を制御する癌抑制遺伝子産物 Ras association domain family (RASSF) に関わることになりました。「JNK シグナル系と Hippo シグナル系とのクロストーク」が興味深い課題として浮かびつつあります。

現在は、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、メダカやマウスをモデル生物に用いて、「脊椎動物の組織や器官形成における Hippo シグナル系の役割」を研究しています。

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

ES 細胞は器官や組織を構成するほぼすべての細胞に分化する能力を有することや試験管内で増殖可能であることから、細胞分化の仕組みの解明を目指す細胞生物学研究や細胞移植医療を目指す再生医学研究に用いられています。我々もマウス ES 細胞を用いたノックアウトマウス作出の経験を活かして、ES 細胞を用いた細胞分化の研究を行っています。これまでに「眼形成マスター遺伝子と呼ばれる PAX6 の神経分化における役割」や「ES 細胞や精巣で特異的発現する CrxOS の役割」について報告してきました。国立成育医療センター眼科との共同

研究です。現在は、細胞分化の運命決定における MAP キナーゼの役割を研究しています。

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。得られた変異体は、その表現型から 5 つのグループ (第 1 群：肝芽形成不全変異体、第 2 群：肝臓低形成変異体、第 3 群：肝臓位置異常変異体、第 4 群：胆嚢色異常変異体、第 5 群：脂質代謝異常変異体) に分類しました。このうち第 2 群に属する「緋扇 (*hiohgi*)」と命名した変異体 (胚の形が扇子に似ている) は、「肝臓が小さく、胸鰭が無い」という興味深い表現型を示します。原因遺伝子の同定から、ビタミン A からオールトランスレチノイン酸 (RA) を合成する酵素 (レチノイン酸合成酵素 タイプ 2, RALDH2) をコードする遺伝子の変異であることが判明しました。詳細な解析から、側板中胚葉 (lateral plate mesoderm) に発現する RALDH2 が RA を産生し、下流に位置する Wnt2bb 遺伝子の発現を誘導し、肝臓の特異化を決定することが示されました。興味深いことに、この RALDH2 による Wnt 遺伝子誘導のシグナル系は、胸鰭の特異化を決定するシグナル系と酷似しています。体内の器官である肝臓が、体外の腕と類似の分子機構で作られるということです。

我々は遺伝的に脂肪肝になりやすいメダカ変異体 *kendama* の単離に成功しました。また、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% もの部分除去した場合 (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。きっちり 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。試行錯誤の段階です。

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 MAP キナーゼの MKK7 は神経伸長を制御する

ストレス応答性キナーゼ MKK7 は JNK を活性化し、標的基質のリン酸化を介して様々な生理応答を引き起こす。JNK シグナル系は特に神経系において、損傷、虚血、神経変性疾患や脳発生などで細胞死誘導シグナルとして機能することが報告されている。しかしながら JNK シグナル系は、胎生期から成体にいたるまで

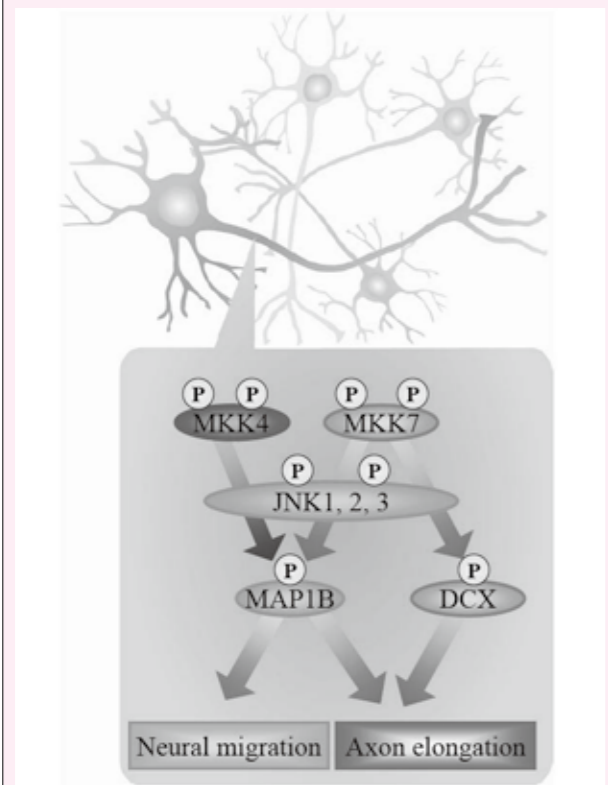


図1 MKK7 シグナルによるマウス神経伸長の制御

恒常的に脳において活性化されており、細胞死誘導機能ではこの現象を説明することはできない。そこで本研究において我々は、神経系特異的 *mkk7* 欠損マウスを作成し、脳発生における JNK シグナル系の生理機能の解明を行った。*mkk7* を神経幹細胞特異的 Nestin-Cre によって欠損させた *Mkk7* CKO マウスを作成し、①自発呼吸ができず生後直後に致死となること、②脳室が拡大し線条体が縮小すること、③軸索路が消失すること、④細胞移動が遅延すること、⑤オートファゴソームやファイバー構造が異常蓄積すること、⑥TAG-1 陽性の脳皮質遠心性神経軸索が消失することを見出した。次に *in utero* electroporation を用いて脳皮質 2/3 層神経細胞特異的に *mkk7* を欠損したところ、⑦ *in vivo* において対側に投射する軸索が消失すること、⑧ *in vitro* において軸索長が著しく減少することを明らかにした。さらに *Mkk7* CKO マウスにおいて⑨微小管の構造制御に寄与する MAPIB、DCX のリン酸化が顕著に低下していること、⑩微小管構造の異常が観察されることを見出した。これらの結果は、JNK シグナル系の恒常的活性化は、脳発生において細胞移動や軸索伸長を制御すること、MKK7 が MAPIB、DCX のリン酸化を介して微小管構造を調整し神経細胞自律的に軸索伸長を制御することを示唆する。

以上のように我々は、細胞死誘導シグナルとして考えられてきた JNK シグナル系が、一方で脳発生の生存シグナルとして機能することを明らかにした。本研究成果は、これまで説明しきれなかった JNK シグナル系の機能を明らかにした点で注目に値する。

人事異動

転入: 岩月麻美子 (特任助教)、畠星治 (特任助教)、西田友哉 (日本学術振興会特別研究員)、藤崎ひとみ (生命情報科学教育部博士前期入学)、齋藤光介 (特別研究学生)
転出:

業績目録

原著論文

1. Tokiwa Yamasaki, Hiroshi Kawasaki, Satoko Arakawa, Kimiko Shimizu, Shigeomi Shimizu, Orly Reiner, Hideyuki Okano, Sachiko Nishina, Noriyuki Azuma, Josef M. Penninger, Toshiaki Katada and Hiroshi Nishina (2011) Stress-activated protein kinase MKK7 regulates axon elongation in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci.* 31, 16872-16883.
2. Norio Miyamura¹, Takashi Nakamura¹, Naoko Goto-Inoue, Nobuhiro Zaima, Takahiro Hayasaka, Tokiwa Yamasaki, Shuji Terai, Isao Sakaida, Mitsutoshi Setou and Hiroshi Nishina (2011) Imaging mass spectrometry reveals characteristic changes in triglyceride and phospholipid species in regenerating mouse liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 408, 120-125. (Contributed equally)
3. Tomomi Osaki, Yoshimi Uchida, Jun Hirayama, and Hiroshi Nishina (2011) Diphenylethylidene dihydrochloride, an inhibitor of NADPH oxidase, suppresses light-dependent induction of clock and DNA repair genes in zebrafish. *Biol. Pharm. Bull.* 34, 1343-1347.
4. Shinya Takahashi, Arisa Ebihara, Hiroaki Kajihara, Kenji Kontani, Hiroshi Nishina, and Toshiaki Katada (2011) RASSF7 negatively regulates pro-apoptotic JNK signaling by inhibiting the activity of phosphorylated-MKK7. *Cell Death Differ.* 18, 645-655.
5. Shinya Takahashi, Kyoko Sakurai, Arisa Ebihara, Hiroaki Kajihara, Kota Saito, Kenji Kontani, Hiroshi Nishina, and Toshiaki Katada (2011) RhoA activation participates in rearrangement of processing bodies and release of nucleated AU-rich mRNAs. *Nucleic Acids Res.* 39, 3446-3457.
6. Hiroshi Yukiura, Kotaro Hama, Keita Nakanaga, Masayuki Tanaka, Yoichi Asaoka, Shinichi Okudaira, Naoki Arima, Asuka Inoue, Takafumi Hashimoto, Hiroyuki Arai, Atsuo Kawahara, Hiroshi Nishina, and Junken Aoki (2011) Autotaxin regulates vascular development via multiple lysophosphatidic acid (LPA) receptors in zebrafish. *J. Biol. Chem.* 286, 43972-43983.
7. Takuro Hisanaga, Shuji Terai, Takuya Iwamoto, Taro Takami, Naoki Yamamoto, Tomoaki Murata, Toshifumi Matsuyama, Hiroshi Nishina, Isao Sakaida (2011) TNFR1 mediated signaling is important to induce the improvement of liver fibrosis by bone marrow cell infusion. *Cell Tissue Res.* 346, 79-88.
8. Shinya Kuwashiro, Shuji Terai, Toshiyuki Oishi, Fujisawa Koichi, Toshihiko Matsumoto, Hiroshi Nishina, Isao Sakaida (2011) Telmisartan improved nonalcoholic steatohepatitis in medaka (*Oryzias latipes*) by reducing macrophage infiltration and fat accumulation. *Cell Tissue Res.* 344, 125-134.
9. Yijun Bao, Kentaro Nakagawa, Zeyu Yang, Mitsunobu Ikeda, Kanchanamala Withanage, Mari Ishigami-Yuasa, Yukiko Okuno, Shoji Hata, Hiroshi Nishina, and Yutaka Hata (2011) A cell-

based assay to screen stimulators of the Hippo pathway reveals the inhibitory effect of dobutamine on the YAP-dependent gene transcription. *J. Biochem.* 150, 199-208.

和文

1. 畠星治, 宮村憲央, 仁科博史: Hippo pathway による肝臓のサイズと発がんの制御; 細胞工学, 細胞工学 30: 943-947 (2011)
2. 仁科博史: Hippo 名前の秘密; 細胞工学 30: 941-942 (2011)
3. 浅岡洋一、仁科博史: メダカとゼブラフィッシュを用いた肝研究; 実験医学 2011 年 8 月号 Vol.29 (No.13), 2090-2095 (2011)
4. 仁科博史: モデル生物-マウスと小型魚類: トランスポートソームの世界-膜輸送研究の源流から未来へ-; 京都廣川書店 (執筆分担), 434-439 (2011)

国際学会発表

1. Hirayama Jun et al.; Light-dependent regulation of zebrafish circadian transcription [Spin Chemistry Meeting 2011, Noordwijk, Netherlands, May 2011]
2. Hiroshi Nishina; RASSF7 functions as an anti-apoptotic regulator of JNK signaling by inhibiting phosphorylated MKK7 activity [2nd RASSF Symposium, Oxford, UK, July 2011]
3. Hirayama Jun et al.; Identification of novel kinase phosphorylating CRYPTOCHROME 1 to regulate its protein stability [5th Asia and Oceania Conference for Photobiology, Nara, Japan, August 2011]
4. Hiroshi Nishina; Imaging mass spectrometry reveals characteristic changes in triglyceride and phospholipid species in regenerating mouse liver [Liver Down Under 2011, Perth, Australia, Nov-Dec 2011]
5. Yoshimi Uchida et al.; Involvement of the Stress Kinase MKK7 in the regulation of the mammalian circadian clock [GCOE International Symposium "Designing the circadian clock", Nagoya, Japan, November 2011]

国内学会発表

1. 宮村憲央他; 肝再生時の脂質代謝の解析 [第 14 回日本肝臓医学研究会; 2011 年 2 月/東京]
2. 宮村憲央他; 質量顕微鏡を用いた再生肝における脂質量変化の解析 [日本薬学会第 131 年会; 2011 年 3 月/静岡]
3. 尾崎友美他; ストレス応答性 JNK シグナル経路による分子時計制御機構の解析 [日本薬学会第 131 年会; 2011 年 3 月/静岡]
4. 平山順; 細胞死抑制因子 DAXX による分子時計制御 [日本分子生物学会第 11 回春季シンポジウム; 2011 年 5 月/金沢]
5. 畠星治他; がん原遺伝子産物 YAP の新規翻訳後修飾アセチル化の同定 [日本分子生物学会第 11 回春季シンポジウム; 2011 年 5 月/金沢]
6. 尾崎友美他; ストレス応答性キナーゼ JNK による分子時計制御因子 BMAL1 のリン酸化 [日本分子生物学会第 11 回春季シンポジウム; 2011 年 5 月/金沢]
7. 畠星治他; がん原遺伝子産物 YAP の新規翻訳後修飾アセチル化の同定 [第 10 回生命科学研究会; 2011 年 6 月/高崎]
8. 宮村憲央他; 質量顕微鏡を用いたマウス再生肝の脂質の解析 [第 18 回肝臓研究会; 2011 年 6 月/東京]
9. 仁科博史; 小型魚類を用いた肝臓研究 [第 1 回医学・創薬に向けた小型魚類モデル利用推進ネットワーク; 2010 年 6 月/名古屋]
10. 仁科博史; 細胞の生死を制御するストレス応

答性 MAP キナーゼシグナル伝達系 [第 20 回日本 Cell Death 学会学術集会; 2011 年 7 月/東京]

11. 山崎世和他; ストレス応答性キナーゼ MKK7 による軸索伸長制御 [第 34 回日本神経科学大会; 2011 年 9 月/横浜]
12. 仁科博史; RASSF family によるストレス応答性 JNK シグナルの制御 [第 84 回日本生化学大会シンポジウム; 2011 年 9 月/京都]
13. 宮村憲央他; 癌遺伝子 YAP による肝臓発生の確立 [第 15 回日本肝臓医学研究会; 2011 年 10 月/秋田]
14. 内田好海他; 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 [第 18 回日本時間生物学会学術大会; 2011 年 11 月/名古屋]
15. 仁科博史/佐々木洋世話人ワークショップ: Recent Advances of Hippo and RASSF Signaling Pathways that Regulates Cell Fate [第 34 回日本分子生物学会年会; 2011 年 12 月/横浜]

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、肝臓研究会・世話人、日本肝臓医学研究会・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評価委員、日本 Cell Death 学会評議員

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, 基礎研究 (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 「癌遺伝子 YAP 依存的肝臓発生の開発と関連マイクロ 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 「時計蛋白質 BMAL1 によるクロマチンダイナミクス制御機構及び生理機能の解明」
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. 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」
10. 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」

難治疾患研究所 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、松村寛行

研究内容

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りおこる病態研究を中心として、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研究領域を創成すると同時に、再生医療や抗老化戦略、がん根治療法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、臓器の中でも最大のものであり、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

たり約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、分に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-H2BEGFPトランスジェニックマウスを作製し、あらたに見つかった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。今後、これら皮膚の幹細胞システムを最大限に生かして、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。



図1

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毛化すること、特に色素幹細胞が休眠状

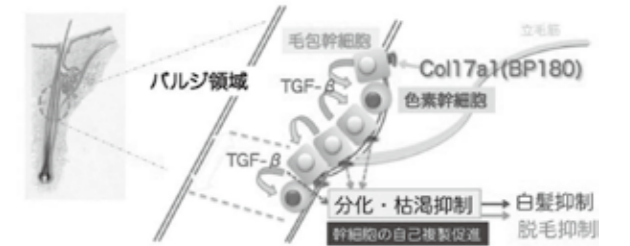
態に入るタイミングで必須であることを明らかにしてきた（Nishimura EK. et al. Science 2005）。また、加齢に伴いニッチにおいて色素幹細胞が“異所性に分化”する現象をはじめて発見し、これはMif遺伝子の変異により有意に促進されることを示した（Nishimura EK. et al. Science 2005）。

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バルジ領域付近に存在しているが、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、色素幹細胞にとっての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）。

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型コラーゲンを高レベルで発現しており、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、毛包幹細胞が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ました。そのメカニズムとしては、毛包幹細胞がTGF-β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-β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-β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若白髪になること、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ました。さらに、TGF-β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判明しました（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-β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（図3）。一方、メラノーマ細胞では、TGF-β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）。

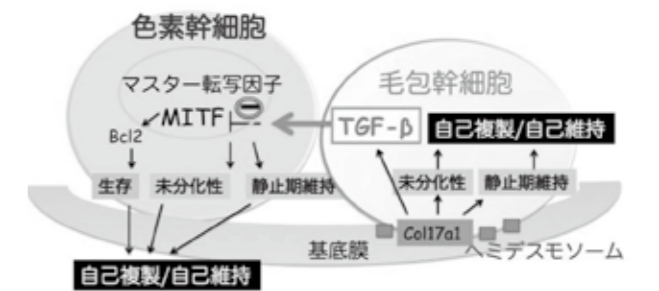
毛包幹細胞は色素幹細胞のニッチ細胞として機能する



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

毛包幹細胞と色素幹細胞の相互関係とその維持機構



毛包幹細胞が色素幹細胞のニッチ細胞として機能する

図3

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の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がある。白髪は、最も典型的な老化現象の一つでもあることに着目し、加齢に伴って色素幹細胞においてどのような変化が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4）、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起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) が明らかになった (図4)。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。

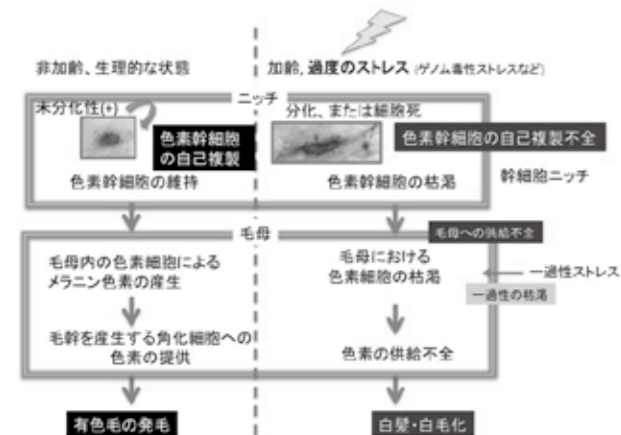


図 4

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、こ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ており、現在、研究を進めている。

人事異動

転入：毛利泰彰 (特任助教)、砂山 潤 (特任助教)、岡田 容子 (技術補佐員)、矢嶋玲子 (技術補佐員)、田口 亮子 (医歯学総合研究科博士過程大学院生)、小林 光 (医歯学総合研究科博士過程大学院生)

業績目録

原著論文

Tanimura S, Tadokoro Y, Inomata K, Binh NT, Nishie W, Yamazaki S, Nakauchi H, Tanaka Y, McMillan JR, Sawamura D, Yancey K, Shimizu H, Nishimura EK. Hair follicle stem cells provide a functional niche for melanocyte stem cells. Cell Stem Cell. 8(2): 177-187, 2011

Sunayama J, Sato A, Matsuda K, Tachibana K, Watanabe E, Seino S, Suzuki K, Narita S, Shibui S, Sakurada K, Kayama T, Tomiyama A, Kitanaka C. FoxO3a functions as a key integrator of cellular signals that control glioblastoma stem-like cell differentiation and tumorigenicity. Stem Cells. 29(9):1327-37, 2011

Mohri Y, Oyama K, Akamatsu A, Kato S, Nishimori K. Lgr4-deficient mice showed premature differentiation of ureteric bud with reduced expression of Wnt effector Lef1 and Gata3. Dev Dyn. 237(8):2235-42, 2011

英文総説

Nishimura EK. Melanocyte stem cells: A melanocyte reservoir in hair follicles for hair and skin pigmentation. Pigment Cell Melanoma Res. 24(3): 401-410, 2011

和文総説

西村栄美：『ステムセルエイジングから見えてくる組織の老化メカニズム』実験医学 Vol.29, No.1, p29-34, 2011 (羊土社)

国内学会招待講演

- 西村栄美：Stem cell regulation and aging in hair follicles：財団法人 放射線影響研究所「International Workshop: Radiation Effects on Mutation in Somatic and Germline Stem Cells」：(広島) 2012年1月18日
- 西村栄美：Stem Cell aging in hair follicles：第34回日本分子生物学会年会：(横浜) 2011年12月13日
- 西村栄美：日本研究皮膚科学会 第36回年次学術大会・総会：(京都) 2011年12月9日
- 西村栄美：In vivoにおける幹細胞制御を探る：第5回 In vivo 実験医学シンポジウム「遺伝子組換え動物の四半世紀と今後の展望」：(東京) 2011年12月8日
- 西村栄美：17型コラーゲンによる毛包幹細胞と色素幹細胞の維持制御：大阪大学蛋白質研究所セミナー「幹細胞を制御する環境因子の分子基盤～細胞-基質間・細胞-細胞間接着による幹細胞の制御機構～」：(大阪) 2011年11月30日
- 西村栄美：幹細胞の維持制御と老化のメカニズム」：京都大学セミナー：(京都) 2011年11月9日
- 西村栄美：毛包の幹細胞制御とエイジング：

- 第16回分生研シンポジウム「組織幹細胞と疾患」：(東京) 2011年10月12日
- 西村栄美：毛包におけるステムセルエイジングと老化：第4回 SYMPHONY：(飯田橋) 2011年9月10日
- 西村栄美：幹細胞維持制御とエイジング：第32回高遠・分子細胞生物学シンポジウム：(高遠) 2011年8月25日
- 西村栄美：白髪と脱毛のメカニズム：幹細胞による幹細胞の制御：第1回細胞再生医療研究会：(神戸) 2011年7月31日
- 西村栄美：幹細胞制御と組織のエイジングに関して：東北大学大学院医学系研究科 医化学セミナー：(仙台) 2011年7月5日
- 西村栄美：Regulation of Stem Cells by Niche Stem Cells：Global COE Program Symposium 2011～Cutting Edge of Stem Cell Medicine～：(慶応義塾大学) 2011年5月16日
- 西村栄美：皮膚再生医学の進歩：皮膚毛包の幹細胞と再生・老化：第97回日本消化器病学会総会：(新宿) 2011年5月14日
- 西村栄美：皮膚毛包の幹細胞と再生・老化：第97回日本消化器病学会総会：(新宿) 2011年5月13日

国際学会招待講演

- Emi Nishimura：Stem Cell Regulation by Stem Cell：21th International Pigment Cell Conference (IPCC)：(Bordeaux, France) September 22nd, 2011
- Emi Nishimura：Hair Follicle Stem Cell Provide a Functional Niche for Melanocyte Stem Cells：ISSCR 9th Annual Meeting：(Tronto, Canada) Jun 16th, 2011

学会発表

- Takahiro Aoto, Natsuko Okamoto, Yoshiki Miyachi, Emi K.Nishimura：Identification of eccrine gland melanocyte stem cells in mouse acral Melanoma：ISSCR 9th Annual Meeting：(Tronto, Canada) Jun 16th, 2011
- Natsuko Okamoto, Takahiro Aoto, Yoshiki Miyachi, Emi K.Nishimura：Identification of eccrine gland melanocyte stem cells in mouse Acral skin as a potential source of acral melanoma：The 9th Stem Cell Research Symposium：(Tokyo) May 13th, 2011

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

- 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) 「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」
- 科学研究費補助金・若手研究B (継続) 青戸隆博 (代表) 「色素幹細胞の異所性分化機構を司る分子経路とその病理学的意義の解明」
- 文部科学研究費補助金・研究活動スタート支援 (継続) 松村寛行 (代表) 「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」

大学院疾患生命科学部免疫学研究室 難治疾患研究所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 技術補佐員：垣内麻優 事務補佐員：高橋博子

研究内容

我々の研究室では、主に以下の4つのテーマについての研究を行っている。これらのテーマはお互いに密接に関連している。

- (1) 記憶免疫応答の際の迅速な記憶 B リンパ球 (B 細胞) の活性化メカニズムと、免疫応答を早期化することによりナイーブ B 細胞の性状を記憶 B 細胞様に変換する感染防御法の開発
- (2) 自己反応性 B 細胞の選択のメカニズムおよび自己免疫疾患における B 細胞機能異常の解明
- (3) B 細胞シグナル伝達の細胞生物学的解析
- (4) 糖鎖シグナルによる抗体応答制御のメカニズムの解明とその制御法の開発

研究紹介

1. 新たな自己反応性 B リンパ球制御機構の発見

個々の B 細胞は特定の抗原に対する抗体のみを産生するが、B 細胞集団としては多様な抗体を産生する。これは、抗体をコードする免疫グロブリン遺伝子の抗原結合部位が、B 細胞発生過程に遺伝子再構成により多様な配列となるためである。しかし、多様な免疫グロブリンが産生されるとその一部は自己抗原に反応し、このような免疫グロブリンを産生する B 細胞は自己反応性 B 細胞となる。自己反応性 B 細胞による自己抗体の産生は種々の自己免疫疾患で見られ、自己免疫疾患の発症や病態に関与する。これまでの、主にマウスを用いた研究により、健全個体では自己反応性 B リンパ球が除去ないしは不活化されることにより自己抗体の産生が防止される自己トレランス機構の存在が明らかとなっている。

B 細胞は骨髄で発生し、成熟するとリンパ節や脾臓などの末梢リンパ組織に移動し、免疫応答をおこす。自己反応性 B 細胞の中には、骨髄で発生すると即座に自己抗原と反応することにより、除去や不活化を受けるものがある。このようなリンパ球が発生する組織で未熟な自己反応性リンパ球が除去ないし不活化を受けることは、中枢性トレランスと呼ばれる。中枢性トレランスについては、すでに解明が進んでいる。しかし、リンパ節や脾臓などの末梢リンパ組織でおこる自己トレランスについてはまだ十分解明が進んでいない。

全身性エリテマトーデス (SLE) では抗 DNA 抗体などの種々の核抗原に対する自己抗体の産生がおこる。とりわけ Sm 抗原などの RNA 関連抗原に対する自己抗体の産生が、疾患発症に重要であるとされている。我々は、抗 Sm 抗体産生 B 細胞が他の抗 DNA 抗体産生 B 細胞などとは異なる新規自己トレランス機構により排除されることを明らかにした。このトレランス機構は脾臓の辺縁帯でおこり、CD40 分子のリガンドである CD40L の過剰発現により阻害される。SLE では CD40L (CD154) 分子の過剰産生がおこり、CD40L の機能を抗 CD40L 抗体によって阻害すると SLE が顕著に改善することから、CD40L が SLE 発症で重要な役割を果たすと考えられている。したがって、CD40L 過剰が抗 Sm 抗体産生 B 細胞の脾臓辺縁帯でのトレランスを阻害することにより、疾患発症に関わる抗 Sm 抗体産生がおこることが示唆される。

本研究では、SLE 発症に関わる抗 Sm 抗体産生 B 細胞の新規トレランス機構と SLE におけるその破壊の機構を明らかにしたものであり、SLE の病因の解明とこの知見を用いた新たな治療法の開発が期待される。

2. タンパク質導入が困難な細胞にタンパク質を効率よく導入して機能を発現させる新規の方法の開発

細胞へのタンパク質導入方法として HIV ウイルスの TAT ペプチド、ポリアルギニンペプチドなどのタンパク質導入ドメイン (PTD) との融合タンパクを用いる方法が広く使用されているが、これらの方法は導入する細胞の細胞表面へパラン硫酸に依存的な方法である。しかしながらへパラン硫酸分解酵素を発現することで悪性化し転移能を獲得したミエローマ等のがん細胞や正常リンパ球はほとんどへパラン硫酸を細胞表面に発現しておらずこれらの細胞にタンパク質を導入する方法についてはあまり明らかになっていなかった。

そこで我々は、本学生体材料工学研究所 (現京都大学) の秋吉教授らのグループと共同で、ナノサイズのヒドロゲルである cationic cholesteryl group-bearing pullulans (cCHP) とタンパク質の複合体を形成することでへパラン硫酸をほとんど発現していない細胞にタンパク質を

導入できるかどうか、さらには細胞機能が制御可能かどうか解析を行った。ミエローマ細胞と正常 CD4 陽性 T 細胞には従来の PTD を用いた方法ではへパラン硫酸の発現が低いほとんどタンパクが導入されなかったが、タンパク質と cCHP の複合体を形成することにより、ミエローマ細胞と CD4 陽性 T 細胞に効率的にタンパクを導入することができた。cCHP によるタンパク質導入は恐らくマクロピノサイトーシスによると考えられる。また cCHP に加えて TAT 融合タンパクを用いた方法とは異なるメカニズムのタンパク質導入試薬で最近開発された Peptide-based carrier や Cationic liposome も用いてマウスプライマリー CD4 陽性 T 細胞にアポトーシスを抑制するタンパク質 Bcl-xL の導入を行った。その結果、Peptide-based carrier や Cationic liposome に比べて cCHP を用いた場合には明らかにより効果的なアポトーシスの阻害が観察された (Watanabe et al. 2011) (図 1)。

cCHP によるタンパク質導入はこれまではタンパク質導入が難しかったへパラン硫酸発現量の少ないがん細胞とプライマリーリンパ球へのタンパク質導入さらには細胞機能の制御を可能とするものであり、今後新規のがん治療法の開発につながることや免疫制御の有用な方法となることが期待できる (図 2)。

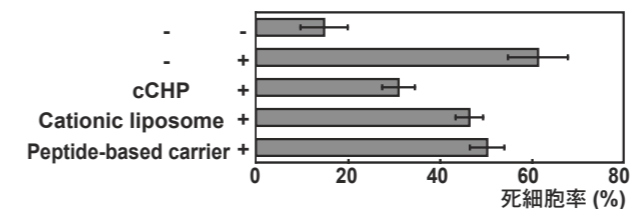
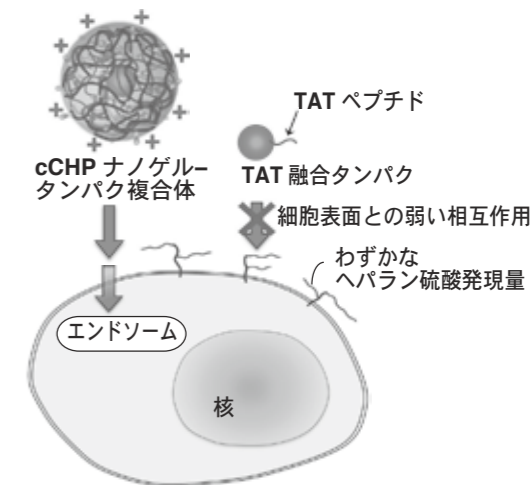


図 1 CD4 陽性 T 細胞への各種キャリアによる Bcl-xL タンパク導入による細胞死の阻害
マウス脾臓由来の CD4 陽性 T 細胞に各種タンパクキャリアで Bcl-xL タンパクを導入後スタウロスポリンで細胞死を誘導した後ハイポディプロイド細胞の割合をフローサイトメーターで測定した



へパラン硫酸をほとんど発現していない細胞

図 2 へパラン硫酸をほとんど発現していない細胞への TAT ペプチドと cCHP によるタンパク質導入の模式図

3. 糖鎖シグナルによる抗体応答制御のメカニズムの解明とその制御法の開発

糖鎖結合分子であるレクチンはとりわけ免疫細胞に多く発現するため、免疫機能は糖鎖による強い制御を受けていると考えられている。自然免疫系などにおける糖鎖の機能についての解析は進んでいるが、リンパ球の活性化制御における糖鎖シグナルの役割については不明な点が多く、今後発展が期待される分野である。我々の研究室では、抗体産生を担う B 細胞に発現し、シグナル機能を持つレクチン分子の機能解明を行なうことにより、これらの分子が抗体応答が重要な機能を果たしていることを明らかにしている。

CD22 (シグレック 2 と呼ばれる) は免疫グロブリンドメインを細胞外に持ち、シアル酸に結合する膜型レクチンで、細胞内領域に抑制性チロシンモチーフ (Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif: ITIM) を持つ。CD22 は、もっぱら B 細胞に発現し、B 細胞抗原受容体 (B cell antigen receptor: BCR, 膜型免疫グロブリンと Ig α /Ig β 分子の複合体) を介するシグナル伝達を負に制御する。我々はこれまでに CD22 が BCR シグナル伝達制御により、抗原と反応した B 細胞が活性化・増殖するか、あるいはアポトーシスをおこすかの運命決定に関わる分子スイッチとしての機能を果たすとともに、抗体応答のタイムコースを制御することを示している。抗体応答のタイムコースは感染防御に重要である。我々は、岐阜大学木曾教授、石田教授と共同で CD22 に高い親和性で結合するシアル酸誘導体の合成を行っており、ヒト CD22 に高親和性で結合する化合物の合成に成功した (Abdu-Allah et al. 2011)。このような化合物は CD22 を標的とする免疫応答制御法を開発するのに有用と考えられる。

ハイライト

全身性エリテマトーデス (SLE) 発症に関わる抗 Sm 抗体産生 B 細胞の新規トランス機構の発見

SLE では抗 DNA 抗体や抗ヒストン抗体などの種々の核抗原に対する自己抗体の産生がおこるが、Sm 抗原などの RNA 関連抗原への自己抗体産生が疾患の発症で重要なことが示されている。自己反応性 B 細胞の制御機構を解明するのに、自己抗体遺伝子を導入したトランスジェニックマウスが用いられる。このようなマウスでは、ほぼすべての B 細胞で特定の自己抗体遺伝子が発現し、特定の自己抗体を産生する B 細胞となるので、解析が容易である。我々は、シカゴ大学の Weigert 教授との共同研究により自己抗体トランスジェニックマウスの解析を行い、抗 Sm 抗体産生 B 細胞が他の自己反応性 B 細胞とは異なる新規メカニズムによりトランスが誘導されることを明らかにした。

抗 DNA 抗体産生 B 細胞は、骨髄で発生すると即座に自己抗原と反応し、除去や不活化、抗原特異性の変更によりトランスが誘導されることが知られている。一方、抗 Sm 抗体産生 B 細胞は骨髄では排除されずに成熟して末梢リンパ組織である脾臓の辺縁帯と呼ばれる領域に移動し、ここで死滅することが明らかとなった。自己抗体トランスジェニックマウスでも脾臓辺縁帯には抗 Sm 抗体産生 B 細胞はごく少数存在するのみであるが、Clodronate liposome をマウスに投与してマクロファージを除去したり、あるいは、マクロファージがアポトーシスを細胞を貪食する際のレセプターを阻害すると、抗 Sm 抗体産生 B 細胞の数が増加し、さらにその一部で実際にアポトーシスを起こしていることが観察された。この結果は、脾臓の辺縁

帯で抗 Sm 抗体産生 B 細胞がアポトーシスをおこし、その後速やかに辺縁帯に多く存在するマクロファージによって除去されることを示している (図 3)。

また、SLE では CD40L (CD154) 分子の過剰産生がおこり、CD40L の機能を抗 CD40L 抗体によって阻害すると SLE が顕著に改善することから、CD40L が SLE 発症で重要な役割を果たすと考えられている。我々は、CD40L 過剰により抗 Sm 抗体産生 B 細胞の脾臓でのアポトーシスが特異的に阻害され、自己抗体産生がおこることを明らかにした。この結果は、SLE において CD40L 過剰が脾臓辺縁帯の自己反応性 B 細胞アポトーシスを阻害し、疾患に関わる自己抗体産生がおこることを示しており、本研究によって我々が明らかにした脾臓辺縁帯での自己反応性 B 細胞の死滅という新規自己トランス機構の破綻が、SLE の発症で重要な役割を果たすことを強く示唆する。

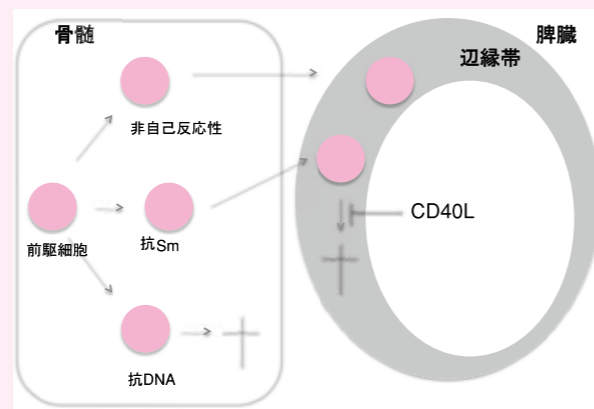


図 3 抗 Sm 抗体産生 B 細胞の新規トランスメカニズム
抗 DNA 抗体産生 B 細胞は骨髄で産生されると死滅したり、あるいは抗原特異性を変更することで自己反応性を失う。一方、抗 Sm 抗体産生 B 細胞は骨髄内ではトランスが誘導されず、脾臓の辺縁帯に移動し、ここで死滅する。辺縁帯での自己反応性 B 細胞のアポトーシスは CD40L によって阻害され、自己抗体の産生がおこる。

人事異動

転入: 高田俊太郎 (博士前期課程)、大森聖也 (博士前期課程)、石倉圭人 (博士前期課程)、Shirly Phoon (博士前期課程)、Ayse Konuskan (10月～博士前期課程)、水原悠介 (卒業研究生)

転出: T.D.C.P.Gunasekara (博士後期課程)、Weng Dong (博士後期課程)、須藤佳之 (博士前期課程)、鷹野勇宜 (博士前期課程)、橋本亜実 (博士前期課程)、杉原潤 (プロジェクト・セメスター)

業績目録

原著論文

1. Abdu-Allah, H. H. M., Watanabe, K., Completo, G. C., Sadagopan, M., Hayashizaki, K., Takaku, C., Tamanaka, T., Takematsu, H., Kozutsumi, Y., Paulson, J.C., Tsubata, T., Ando, H., Ishida, H. and Kiso, M. (2011): CD22-antagonists with nanomolar potency: The synergistic effect of hydrophobic groups at C-2 and C-9 of sialic acid scaffold. *Bioorg. Med. Chem.* 19: 1966-1971.
2. Watanabe, K., Tsuchiya, Y., Kawaguchi, Y., Sawada, S.-i., Ayame, H., Akiyoshi, K. and Tsubata, T. (2011): The use of cationic nanogels to deliver proteins to myeloma cells and primary T lymphocytes that poorly express heparan sulfate. *Biomaterials* 32: 5900-5905.
3. Abdu-Allah, H. H. M., Watanabe, K., Kanie, O., Tsubata, T., Ishida, H. and Kiso, M. (2011). Design and synthesis of multivalent heterobifunctional CD22-ligand as a potential immunomodulator. *Synthesis* 18: 2968-2974.
4. Tsubata, T. (2012) Role of inhibitory BCR co-receptors in immunity. *Infectious Disorders - Drug Targets* (in press).
5. Poe, J. C., Smith, S. H., Haas, K. M., Yanabe, K., Tsubata, T., Matsushita, T. and Tedder, T. F. (2011): Amplified B lymphocyte CD40 signaling drives regulatory B10 cell expansion in mice. *PLoS ONE* 6: 22464.
6. Magesh, S., Ando, H., Tsubata, T., Ishida, H. and Kiso, M. (2011): High-affinity ligands of Siglec receptors and their therapeutic potentials. *Current Medicinal Chemistry* 18: 3537-3550.
7. 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* 42:241-7.

総説

1. 安達貴弘: CD70 と自己免疫疾患 臨床免疫・アレルギー科 56: 213, 2011
2. 安達貴弘: メモリー B 細胞における BCR シグナル伝達 臨床免疫・アレルギー科 56: 452, 2011

その他

1. Tsubata, T. (2011) Я П О Н И Я П О С Л Е З Е М Л Е Т Р Я С Е Н И Я , Ц У Н А М И И К А Т А С Т Р О Ф Ы В Ф У К У С И М Е . Р О С С И Я И Г Е Р М А Н И Я 2:30-31.

国際学会

国内学会

招待講演

1. 鐺田武志「チロシンフォスファターゼ SHP -

1 を活性化する B リンパ球膜分子 CD72 の多型と自己免疫」、第 5 回日本プロティンホスファターゼ研究会学術集会、平成 24 年 1 月 19 日 - 20 日、大阪

その他

1. 渡辺幸造、安達貴弘、鐺田武志「The C-type lectin-like domain containing B lymphocyte membrane molecule CD72 shows Ca²⁺ -independent lectin activity to sulfated glycans」第 40 回日本免疫学会学術集会、平成 23 年 11 月 27 日 - 29 日、幕張
2. 岸祐介、鐺田武志「Apoptotic marginal zone deletion of anti-Sm/RNP B cells is reversed by excess CD40L」第 40 回日本免疫学会学術集会、平成 23 年 11 月 27 日 - 29 日、幕張
3. Tang Miao, 高田俊太郎、鐺田武志「Role of Reactive Oxygen Species in B Cell Antigen Receptor Signaling」第 40 回日本免疫学会学術集会、平成 23 年 11 月 27 日 - 29 日、幕張
4. 安達貴弘「Signaling through the B cell antigen receptor on memory B cells」第 40 回日本免疫学会学術集会、平成 23 年 11 月 27 日 - 29 日、幕張

その他

国際招待セミナー

1. Tsubata, T.: Development of chemical compounds that regulate specific antibody production. 17 March, 2011 中国医学科学院 / 北京協和医科大学、北京、中国
2. Tsubata, T.: Molecular and Cellular aspects of Autoimmune Diseases. 9 January, 2012 中国医科大学、瀋陽、中国
3. Tsubata, T.: Screening of chemical compounds that regulate antibody responses. 14 March, 2012 中国医学科学院 / 北京協和医科大学、北京、中国

その他の講演会

1. 鐺田武志「B リンパ球のトランスと自己免疫疾患」京都大学第二内科同門会講演会、平成 24 年 1 月 21 日

主催セミナー

1. 矢倉英隆 (Universite Paris Diderot, Paris, France) 「科学哲学から生命科学を考える Reflecting on Bioscience from Philosophy of Science」平成 23 年 7 月 27 日
2. 下田美智子 (Georgia Health Sciences University) 「B 細胞による IL-10 産生を伴う炎症性 CD8 細胞活性化 Excessive CD40 signal on B cells trigger inflammatory CD8 T cell activation with IL-10 production」平成 23 年 10 月 20 日
3. Gang Liu (中国医学科学院 / 北京協和医科大学) 「The efforts on the discovery and optimization of new chemical reagents that inhibit non-replicating Mycobacterium tuberculosis」平成 23 年 1 月 27 日
4. 竹松弘 (京都大学) 「Quantitative transcriptomic profiling of biosynthetic pathway of CD77, a marker for human germinal center B cells」平成 23 年 1 月 17 日

競争的研究費取得

1. 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」

難治疾患研究所 難治病態研究部門 分子病態分野 大学院疾患生命科学部 ゲノム多様性研究室

教授：木村彰方 准教授：中島敏晶
助教：有村卓朗 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、バージャー病、などの心血管系疾患と、HIV/AIDS、自己免疫疾患などを含むウイルス・免疫系疾患である。

研究紹介

1. 特発性心筋症の病因究明

拡張型心筋症の病因としての遺伝子変異ないし遺伝的多型の重要性を明らかにしている (Kimura, Circ J, 75:1756,2011) が、本年は新規原因遺伝子として特定した2種のBAG3変異による機能変化を検討した。拡張型心筋症関連変異は、ラット心筋細胞に導入するとサルコメア整合性異常とアポトーシスの亢進を来した。また、H9c2細胞を用いた実験から、拡張型心筋症関連BAG3変異は代謝ストレス誘導性のアポトーシスを亢進することを見出した (Arimura et al., Hum Mut, 32:1481,2011、ハイライト参照)。一方、家族性肥大型心筋症の解析では、わが国の多数の症例を解析し、サルコメア収縮要素をコードする遺伝子群に変異が見出される症例は約半数であることを報告した (Kubo et al., Circ J, 75:2654,2011, Otsuka et al., Circ J, In Press)。これらとは別に、ミオパジン変異が拘束型心筋症の新規原因遺伝子であることを解明した (Purevjav et al., Hum Mol Genet, In

Press)。

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。一方、歯周病が動脈硬化症の危険因子となることが報告されているが、自然免疫に関わるTLR2遺伝子の多型と侵襲性歯周病との有意な関連を明らかにした (Takahashi et al., Open Dent J, 5:190,2011)。これとは別に、TLR2の下流にあるMYD88遺伝子の3'UTR多型がバージャー病と関連することを見出した (Chen et al., J Hum Genet, 56:545,2011)。

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を行っている。昨年に引き続き、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。また、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., Circ Arrhythm Electrophysiol, 4:874,2011)。

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が、それらとHLA以外の遺伝子との機能関連については不明な点も多い。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, In Press)。

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 (Takahara et al., Biochem Biophys Res Commun, 408:615, 2011, Nakamura et al., Microbiol Immunol, 55:768, 2011, Ishii et al., J Virol, In Press)。一方、カニクイザルのMHCクラスI遺伝子を解析し、多数の新規アリルを発見するとともに、同一ハプロタイプ上に複数の主要Mafa-Aアリルが存在するハプロタイプを特定した (Saito et al., Immunogenetics, In Press)。さらに、アカゲザルおよびカニクイザル集団を対象とした解析から、ULBP4/RAET1E遺伝子は旧世界ザルに共通して著明な遺伝的多型性を示すこと、これらの多型部位はNKG2Dとの結合面以外にあることを見出した (Naruse et al., Immunogenetics, 63:501, 2011、ハイライト参照)。

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ったところ、11種の遺伝子が霊長類の進化において強い選択圧を受けたことが明らかになった。このような遺伝子群は感染症との関わりが強く推定される (Ohtani et al. Immunogenetics, 63: 417, 2011)。これとは別に、アカゲザルおよびカニクイザル集団の解析から、TLR2遺伝子の遺伝的多型性の形成には正の選択が関わったことを明らかにした (Takaki, et al. Immunogenetics, In Press)。

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に関わっているが、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Th1/Th2バランスの形成に寄与するTIM1遺伝子の特定のハプロタイプがHIV/AIDS抵抗性に関わることをタイ人集団で明らかにした。本年は、インド人集団でもTIM1多型が

HIV/AIDS抵抗性に関わることを確認した (Kimura et al., Proc Int Conference Emerging Frontiers and Challenges in HIV/AIDS Res, In Press)

ハイライト (顕著な業績)

1) BAG3変異による拡張型心筋症の発症機序 (Arimura et al., Hum Mutat. 32(12): 1481-1491, 2011)

拡張型心筋症 (DCM) は心室腔の拡大、心筋収縮不全を主徴とし、難治性心不全や不整脈を来す。DCM患者の約2割には常染色体性優性遺伝形式に従う家族歴が認められることから、少なくともDCMの一部では遺伝子変異が病因であると考えられる。我々を含むこれまでの研究により、約25種類のDCM原因遺伝子が同定されているが、その全貌は明らかではない。また、原因遺伝子変異がいかなるメカニズムで病態形成をもたらすかについても不明な点が多い。一方、心筋症の原因遺伝子と骨格筋症原因遺伝子にはオーバーラップがあることがよく知られているが、個々の変異がもたらす機能異常の相違についての検討はあまりおこなわれていないのが現状である。

我々は2010年に筋原線維性ミオパチー (myofibrillar myopathy, MFM) の小児患者にBAG3遺伝子変異 (P209L) がde novoで見出されたことと報告されたことから、BAG3遺伝子を候補遺伝子として、家族性心筋症患者集団における変異検索を行った。その結果、家族性DCM患者2名に一般健常者集団にはない2種のミスセンス変異 (R218W, L462P) を見出した。また、これら以外にも4種の変異 (R258W, D300K, P407L, E553D) があるが、いずれも一般健常者集団にも見出される遺伝的多型であった (図1)。

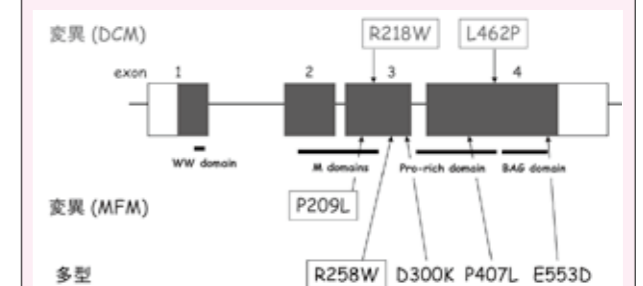


図1 DCMおよびMFMに関連するBAG3遺伝子変異

これらの変異による機能変化を検討するために、正常もしくはDCM変異 (R218W, L462P)、MFM変異 (P209L)、遺伝的多型 (R258W) を導入したBAG3遺伝子にGFPを融合してラット心筋細胞に導入したところ、DCM変異特異的にサルコメア構成異常 (図2) およびアポトーシス亢進 (図3) が観察された。

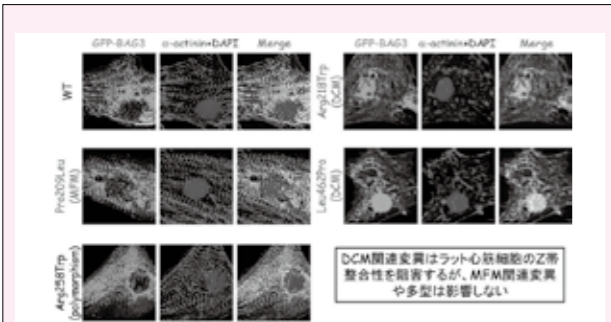


図2 DCM 変異 BAG3 はと心筋細胞サルコメア異常

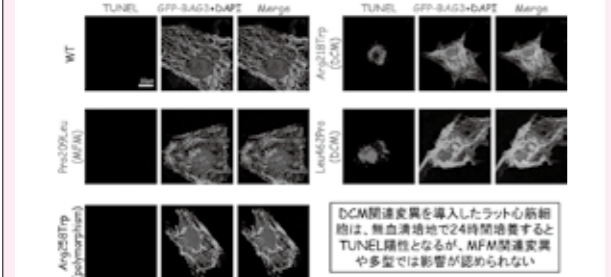


図3 DCM 変異 BAG3 はと心筋細胞アポトーシス

ついで、アポトーシス亢進を定量的に評価するために、心筋由来の培養細胞 H9c2 に正常ないし変異 BAG3 を導入し、ドキシソルビシンによる細胞死を検討したところ、DCM 関連変異特異的にドキシソルビシン誘導性アポトーシスの亢進が観察された (図 4)。

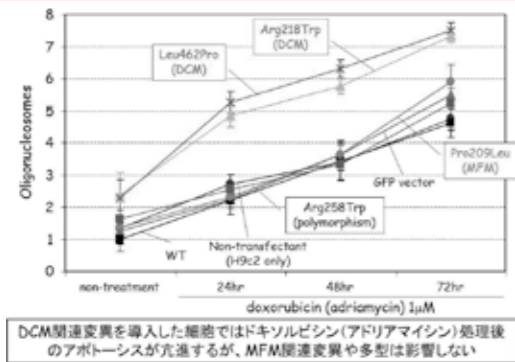


図4 DCM 変異 BAG3 とドキシソルビシン感受性亢進

一方、骨格筋由来培養細胞 C2C12 に正常もしくは変異 BAG3 を導入して、低血清培地化での筋細胞分化 (多核細胞融合) を検討したところ、MFAM 変異特異的に分化遅延が観察された (図 5)。

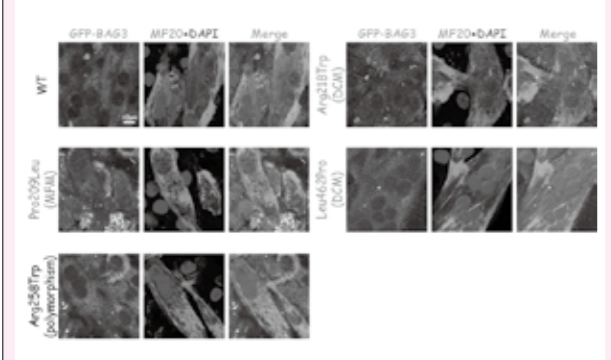


図5 MFAM 変異 BAG3 と骨格筋分化異常

以上のことから、BAG3 は新規の DCM 原因遺伝子

であり、その変異は心筋細胞のサルコメア整合性異常とアポトーシスを来して DCM の発症に関与すること、変異による機能異常は MFAM とはまったく異なることが明らかとなった。

2) 旧世界ザルにおける ULBP4/RAET1E 多型の特徴 (Naruse TK, et al. Immunogenetics 63(8): 501-509, 2011)

アカゲザルやカニクイザルなどの旧世界ザルはエイズウイルスワクチンを初めとするワクチン開発や薬剤の安全性試験における霊長類モデルとして広く利用されている。我々はエイズワクチン開発に関する共同研究として、霊長類モデルの免疫応答性の個体差について解析しているが、これまでに SIV-gag ワクチンを受けたアカゲザル個体における SIV チャレンジ後の抗原特異的 CTL 誘導性が MHC クラス I、ことに特定の Mafa-A アリルによる特定の抗原ペプチド提示能とよく関連することを明らかにしている。一方、糖鎖欠失 SIV ワクチン後の SIV 感染モデルの免疫応答性は、MHC 型に依存しないことも明らかにしており、MHC 以外のローカスの関与が示唆される。そこで、NK 細胞機能に着目した免疫多様性、ことに NK レセプター (NKG2D) のリガンドである ULBP/RAET 遺伝子群の多様性を検討している。

本年は ULBP4/RAET1E 遺伝子について検討したが、アカゲザルおよびカニクイザルはそれぞれ少なくとも 25 種および 14 種のアリルを有しており、ヒトと比較して多型性が大きいことが判明した (表 1)。

Species	MHC Class I		MHC Class II	
	Polymorphisms	% Polymorphisms	Polymorphisms	% Polymorphisms
Human	2	1.00%	3	1.00%
Rhesus average	25	5.00%	22	4.40%
Cynomolgus average	31	6.20%	18	3.60%

表 1 旧世界ザルにおける ULBP4/RAET1E の多様性

ついで、これらの多型をヒト ULBP3 分子の構造から ULBP4 分子の 3D モデルを構築し、モデル上に旧世界ザル集団で検出された多型位置をマップしたところ、図 6 に示すように、いずれの多型とも ULBP 分子表面にはマップされなかった。このことは、旧世界ザルの ULBP4 分子多型は NKG2D との結合性には直接関与しないことを示唆する。

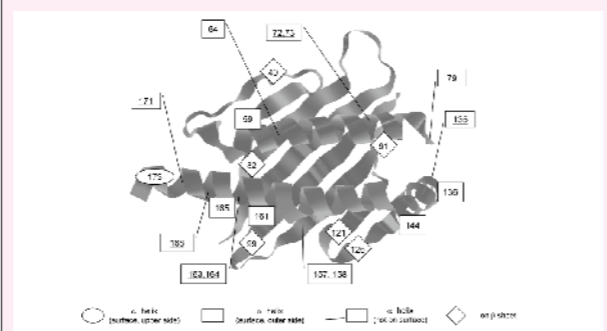


図6 旧世界ザルにおける ULBP4 多型の位置

人事異動

転入：2011年3月に大谷仁志が学位(博士)、大塚春奈、齋藤祐介が学位(修士)を取得の上、大学院を修了した。2011年4月より、飯塚淳次、葛城圭、門田千佳、中本健之が修士課程学生として研究に参加した。

業績目録

原著論文

1. Yanagimachi M, Miyamae T, Naruto T, Hara T, Kikuchi M, Hara R, Imagawa T, Mori M, Kaneko T, Goto H, Morita S, Mizuki N, Kimura A, Yokota S. Association of HLA-A*02:06 and DRB1*09:01 with clinical subtypes of juvenile idiopathic arthritis. *J Hum Genet.* 2011; 56(3): 196-199.
2. Ohtani H, Nakajima T, Akari H, Ishida T, Kimura A. Molecular evolution of immunoglobulin superfamily genes in primates. *Immunogenetics.* 2011; 63(7): 417-428.
3. Chen Z, Nakajima T, Inoue Y, Kudo T, Jibiki M, Iwai T, Kimura A. A single nucleotide polymorphism in the 3'-untranslated region of MyD88 gene is associated with Buerger disease but not with Takayasu arteritis in Japanese. *J Hum Genet.* 2011; 56(7): 545-547.
4. Kimura A. Contribution of genetic factors to the pathogenesis of dilated cardiomyopathy: the cause of dilated cardiomyopathy: genetic or acquired? (genetic-side). *Circ J.* 2011; 75(7): 1756-1765.
5. Takahara Y, Matsuoka S, Kuwano T, Tsukamoto T, Yamamoto H, Ishii H, Nakasone T, Takeda A, Inoue M, Iida A, Hara H, Shu T, Hasegawa M, Sakawaki H, Horiike M, Miura T, Igarashi T, Naruse TK, Kimura A, Matano T. Dominant induction of vaccine antigen-specific cytotoxic T lymphocyte responses after simian immunodeficiency virus challenge. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011; 408(4): 615-619.
6. Naruse TK, Okuda Y, Mori K, Akari H, Matano T, Kimura A. ULBP4/RAET1E is highly polymorphic in the Old World monkey. *Immunogenetics.* 2011; 63(8): 501-509.
7. Kubo T, Kitaoka H, Okawa M, Baba Y, Hirota T, Hayato K, Yamasaki N, Matsumura Y, Otsuka H, Arimura T, Kimura A, Doi YL. Genetic screening and double mutation in Japanese patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circ J.* 2011; 75(11): 2654-2659.
8. Nakamura M, Takahara Y, Ishii H, Sakawaki H, Horiike M, Miura T, Igarashi T, Naruse TK, Kimura A, Matano T. *Matsuoka S. Major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T lymphocyte responses during primary simian immunodeficiency virus infection in Burmese rhesus macaques. *Microbiol Immunol.* 2011; 55(11):768-773.
9. Arimura T, Ishikawa T, Nunoda S, Kawai S, Kimura A. Dilated cardiomyopathy-associated BAG3 mutations impair the Z-disc assembly and enhance the sensitivity to apoptosis in cardiomyocytes. *Hum Mutat.* 2011; 32(12): 1481-1491.
10. Takahashi M, Chen Z, Watanabe K, Kobayashi H, Nakajima T, Kimura A, Izumi Y. Toll-like receptor 2 gene polymorphisms associated with aggressive periodontitis in Japanese. *Open Dent J.* 2011; 5: 190-194.
11. 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. Electrocardiographic characteristics and SCN5A mutations in idiopathic ventricular fibrillation associated with early repolarization. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2011; 4(6): 874-881.
12. 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 immunodominance and cooperation against simian immunodeficiency virus replication in rhesus macaques. *J Virol.* In Press
 13. 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.* In Press
 14. Saito Y, Naruse TK, Akari H, Matano T, Kimura A. Diversity of MHC class I haplotypes in cynomolgus macaques. *Immunogenetics.* In Press
 15. Bertrand AT, Renou L, Papadopoulos A, Beuvin M, Lac?ne E, Massart C, Ottolenghi C, Decostre V, Maron S, Schlossarek S, Cattin ME, Carrier L, Malissen M, Arimura T, Bonne G, DelK32-lamin A/C has abnormal location and induces incomplete tissue maturation and severe metabolic defects leading to premature death. *Hum Mol Genet.* In Press
 16. 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.* In Press
 17. 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.* In Press
 18. Kimura A, Ohtani H, Naruse TK, Nakajima T, Akari H, Mori K, Matano T. Evolutional medicine: an approach to identify the human genome diversity associated with HIV-1/AIDS. In *Proceeding of the International Conference on Emerging Frontiers and Challenges in HIV/AIDS Research.* In Press

総説及び書書

1. Kimura A, Ohtani H, Naruse TK, Nakajima T, Akari H, Mori K, Matano T. Evolutional medicine: an approach to identify the human genome diversity associated with HIV-1/AIDS. In *Proceeding of the International Conference on Emerging Frontiers and Challenges in HIV/AIDS Research.* In Press.

国内学会発表

1. 木村彰方. 心筋症の遺伝子異常と分子病態. 第73回東京心臓の会, 2011年6月11日, 東京. 他11件

国際学会発表

1. Kimura A. Evolutional medicine: An approach to identify genome diversity associated with HIV-1/AIDS. *International Conference on Emerging Frontiers and Challenges in HIV/AIDS Research.* Mumbai, February 6, 2011. 他7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(医療倫理実践論)、本学医学部保健衛生学科(遺伝学)、本学歯学部歯学科(遺伝病学)、本学歯学部総合研究科修士(遺伝疾患)、本学生命情報科学教育部(ゲノム科学特論)、埼玉医科大学医学部(遺伝学)、中島敏晶：本学保健衛生学科(遺伝学)、本学歯学部総合研究科修士(遺伝疾患)、有村卓朗：本学保健衛生学科(遺伝学)

競争的研究経費取得

1. 木村彰方(代表)：東京医科歯科大学フォロアップ経費、日韓共同研究事業継続経費
2. 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
3. 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発現における性差構築の分子機序
4. 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
5. 木村彰方(代表)：日本学術振興会二国間交流事業(日韓共同研究)、拡張型心筋症病態に係るゲノム多様性に関する日韓比較研究
6. 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
7. 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
8. 木村彰方(分担)：厚生労働科学研究費・難治性疾患克服研究事業、自己食空胞性ミオパチーの診断基準確立と治療法開発に関する研究
9. 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
10. 中島敏晶(代表)：科学研究費補助金・基盤(C)、霊長類における自然免疫関連遺伝子の分子進化とエンドトキシン感受性の関わり
11. 中島敏晶(代表)：大阪大学微生物病研究所共同研究、比較ゲノム解析に基づいたHIV感染防御機構に関わる遺伝子の同定
12. 有村卓朗(代表)：AFM (Association Française contre les Myopathies) Research Grant, Molecular pathogenic analysis of the striated muscle laminopathies.

難治疾患研究所 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、鈴木康弘、太田麻利子
事務補佐員：大塚幸子、望月 菊、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
清水則夫、渡邊 健
- B. 軟骨再生に関する研究
清水則夫、片山未来
- C. 網羅的ウイルス検査系の開発と応用
清水則夫、渡邊 健、片山未来
望月菊、鈴木康弘、太田麻利子

研究の概要

A. EBV 感染モデルマウスの開発と応用

ヒト造血幹細胞移植NOG (NOD/SCID/ γ_c^{null}) マウスにEBVを感染し、EBV陽性B細胞リンパの発症や無症候性のEBV持続感染を自在に誘導することが可能になった。また、NOGマウスへ患者末梢血を投与することにより慢性活動性EBV感染症のモデルマウスを世界で初めて作製することに成功した(国立成育医療研究センター研究所母児感染研究部との共同研究)。

B. 再生医療の安全管理法に関する研究

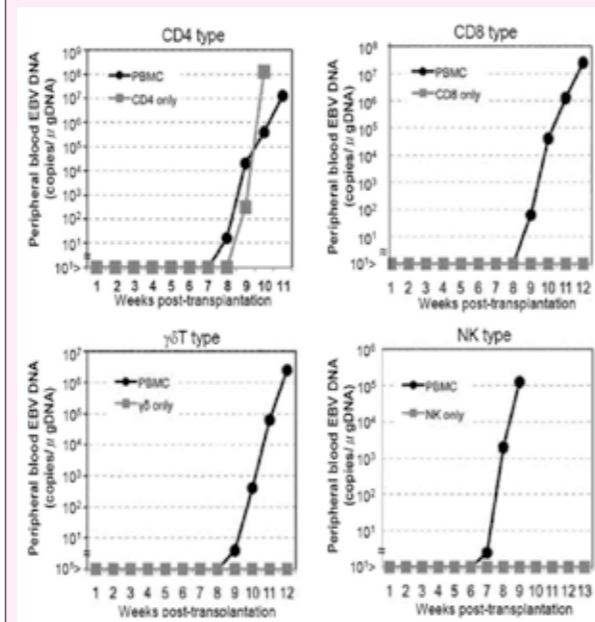
本学医学部運動器外科が行っている滑膜細胞を利用した軟骨再生医療の臨床研究の必要書類作成、滑膜からの軟骨前駆細胞の分離・培養と安全性検査を支援し、安全な臨床研究の遂行に協力している。

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検査系を公開し年間1455検体の微生物検査を実施・臨床科への情報提供を行った。

ハイライト

NOGマウスにCAEBV患者の末梢血を接種すると、マウスにEBV感染細胞が生着し、CAEBVモデルマウスを作製できる事が明らかとなった。今後、このモデルマウスを利用した病気の実態解明と治療薬の開発を進めていく予定である。



CAEBVモデルマウス末梢血中のEBV-DNAの増加。EBV感染細胞がCD4T, CD8T, $\gamma\delta$ T, NK細胞の4種類のCAEBVモデルマウスの作製に成功した。

業績目録

原著論文

- Sugita S et al. Diagnosis of bacterial endophthalmitis by broad-range quantitative PCR. *Br J Ophthalmol*. 2011; 95:345-349.
- Ng SB et al. Activated oncogenic pathways and therapeutic targets in extranodal nasal-type NK/T cell lymphoma revealed by gene expression profiling. *J Pathol*. 2011; 223:496-510.
- Abe T et al. Point-of-Care Testing System Enabling 30-min Detection of Influenza Genes. *LAB CHIP*. 2011; 11:1166-1167.
- Yagasaki H et al. Autoimmune hemolytic anemia and autoimmune neutropenia in a child with erythroblastopenia of childhood (TEC) caused by human herpesvirus-6 (HHV6). *Ann Hematol*. 2011; 90(7):851-852.
- Watanabe A et al. The role of microRNA-150 as a tumor suppressor in malignant lymphoma. *Leukemia*. 2011; 25(8):1324-1334.
- Sugita S et al. Diagnosis of ocular toxoplasmosis by two polymerase chain reaction (PCR) examinations: qualitative multiples and quantitative real-time. *Jpn J Ophthalmol*. 2011; Jul 13. 55(5):495-501.
- Sugita S et al. Detection of Candida & Aspergillus species DNA using broad-range real-time PCR for fungal endophthalmitis. *Graef Arch Clin Exp*. in press.
- Ng SB et al. Dysregulated MicroRNAs Affect Pathways and Targets of Biological Relevance in Nasal-type Natural Killer / T-cell Lymphoma. *Blood*. 118(18):4919-4929. 2011 Nov 3.
- Imadome K et al. Novel Mouse Xenograft Models Reveal a Critical Role of CD4+ T Cells in the Proliferation of EBV-Infected T and NK Cells. *PLoS Pathogens*. 2011;7(10):e1002326. Epub 2011 Oct 20.
- Kuwana Y et al. Epstein-Barr Virus Induces Erosive Arthritis in Humanized Mice. *PLoS ONE* 2011;6(10):e26630. Epub 2011 Oct 19.
- 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;6(11):e27271 2011 Nov 11.

国内学会

- 伊藤仁也 他12名 網羅的ウイルス・真菌PCR法を用いた造血細胞移植後肺障害の迅速診断 第33回日本造血細胞移植学会 2011年10月 松山市
- 谷ヶ崎博 他5名 非血縁骨髄ドナー由来のChromosomal integrate HHV-6 (CIHHV-6)の1女児例 第33回日本造血細胞移植学会 2011年3月10日 松山市
- Yamada C et al. High levels of human cytokines were detected in a novel mouse xenograft model of CAEBV and EBV-HLH. 日本血液学会 2011.10.14-16 名古屋

国際学会

- Imadome K, et al. Novel mouse xenograft models of CAEBV and EBV0HLH reveals a critical role of CD4+ T cells in the proliferation of EBV-infected T and NK cells. XV International Congress of Virology, Sept 2011, Sapporo, JAPAN.

著書

清水則夫 (分担執筆): 「第4章 1) 細胞治療のウイルス安全性確保に関する取り組み」, 「第7章

5) 病原微生物の網羅的検出法の開発と応用」, 「医薬品の品質管理とウイルス安全性」, 日本医薬品等ウイルス安全性研究会編 (編集委員), 文光堂, 2011

競争的資金

- 厚生労働科学研究費補助金 政策創薬総合研究事業 創薬総合研究 (主任研究者 藤原成悦) 「臍帯血DLIの実用化と細胞治療製剤の医薬品化へ向けてのトランスレションリサーチ」
- 厚生労働科学研究費補助金 障害者対策総合 (感覚器障害分野) 研究事業 (主任研究者 望月學) 「難治性眼炎疾患に対する網羅的迅速診断システムの開発」
- 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」
- 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」
- 成育医療研究開発費 (主任研究者 齋藤昭彦) 「抗菌薬の適正使用と院内感染予防のプログラムの開発」
- 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」
- 文部科学省 国家基幹研究開発事業 再生医療実現化プロジェクト 再生医療の実現化ハイウェイ (主任研究者 関矢一郎) 「滑膜幹細胞による半月板再生」

教育実績

- 5月 大学院医歯学総合研究科医歯科学修士課程 ウイルス・免疫疾患総論講義
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、罹患リスクなど、これまで体質と呼ばれてきたものを科学的に解明する。これにより、難治性の疾患の分子診断法の開発と個別化医療実践への応用、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癌抑制性マイクロ RNA をはじめとする疾患関連遺伝子を同定し病態形成の機構を明らかにした。
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. 実用化レベルの染色体異常診断システムを構築し自動診断装置開発プロジェクトを推進した。

【遺伝生化学】

1. ヒト大腸がん細胞及び遺伝子改変マウスを用いて転写因子 ATF3 の DNA damage 応答ストレスコードのシステムズ解析を行い、がん治療に関わる ATF3 の新規標的遺伝子を同定した。
2. 転写伸長因子 Elongin A、リクルート因子 FCP1 の機能解析を行った。
3. ヒストンメチル化酵素 ASH1L の機能解析を行った。

【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. PKC-delta の新たな DNA 損傷誘導性標的分子として Evi-1 を同定し、PKC-delta による Evi-1 制御は PLZF の転写を促進し、DNA 損傷によるアポトーシス誘導を促進することを明らかにした。

【分子疫学】

1. フコシル転移酵素である Fucosyltransferase 8 (FUT8) の非同義多型 Thr267Lys が肺気腫と関連していることを剖検および臨床サンプルを用いて明らかにした。
2. 大豆由来植物性エストロゲンであるゲニスタインが試験管内で ES 細胞の DNA メチル化パターンに与える影響を、ゲノムワイド DNA メチル化解析法を行い解析した。
3. ゲニスタインを卵巣摘出マウスに経口投与すると、子宮内膜細胞の steroid factor-1 (sf1) 遺伝子のプロモーターを脱メチル化して転写を促進し、子宮内膜が増殖することを明らかにした。

【エピジェネティクス】

1. 胎盤形成に必須な PEG10、PEG11/RTL1 はスシイチレトロトランスポゾン由来遺伝子である。真獣類には同じレトロトランスポゾンに由来する獲得遺伝子が他に 9 個存在している。これら SIRH3-SIRH11 はヒトやマウスなど真獣類特異的に存在している。今回、オーストラリアに生息するワラビーと南アメリカに生息するオポッサムという 2 つの有袋類に属する動物のゲノム解析から、有袋類特異的に存在する SIRH12 遺伝子を発見した。これらの遺伝子は真獣類と有袋類の分岐進化に重要な機能をもつと考えられる。
2. X 染色体不活性化に関係する Xist 遺伝子のノックダウンにより高率に体細胞クローンマウスを作製する方法を開発した(理研バイオリソースセンターとの共同研究)。
3. マウスをモデルに生殖補助医療技術が個体発生のエピジェネティクスに与える影響を解析している。今回、顕微受精 (intracytoplasmic sperm injection:ICSI) で作製したマウスでは、新生児期において遺伝子発現のシフトが起きていることを報告した。

【生命情報】

1. 肝胆膵・総合外科と共同研究により、早期肝細胞癌における再発予測因子 CYP1A2 を同定した。
2. 5 種の霊長類の嗅覚受容体遺伝子を比較し、「3 色型色覚の獲得と引き換えに嗅覚が失われた」という仮説が支持されないことを示した。
3. 米国 National Center for Biomedical Computing の研究拠点で開発された i2b2 データベースシステムを日本語環境へ移植し、医科歯科大学附属病院で収集した患者情報を i2b2 へ格納した。さらに日本語の臨床所見から英語の疾患名を機械抽出し、i2b2 へ取り込むパイプラインを構築した。
4. 日本人感染者から採取した 1980 年代と 2000 年代の HIV-1 サンプルについて比較解析を行い、ウイルスが宿主に感染し易くなった可能性があることを示した。
5. 複雑かつ巨大なタンパク質間相互作用ネットワークを複数の単純な小さいサブネットワークに分割する方法を開発した。この手法を人のタンパク質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。
6. 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。

難治疾患研究所 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
MTT 特任講師：松井 毅 助教：井上 純

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ランドマーク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実な成果を上げている。癌においては、新規の癌抑制性マイクロRNAの同定やオートファジー・リソゾーム機能の変調と発癌などにおいて成果を上げた。遺伝性疾患では、小脳脳幹部低形成を伴う小頭症において CASK 遺伝子異常を見出しこれを報告した。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。

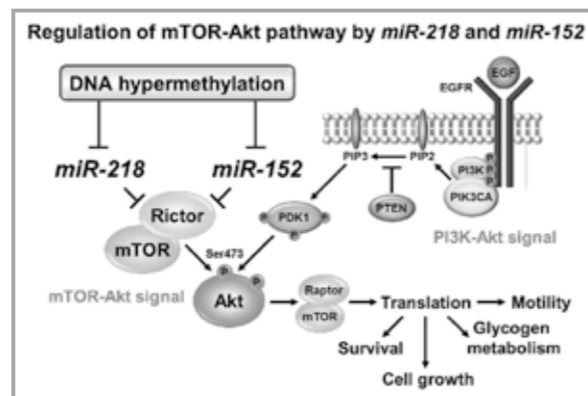
1. 癌 CGH データベース構築とその公開

25 種類の癌種の細胞株を含む総計 2000 例以上において CGH 解析を実施し、CGH データベースを公開した。<http://www.cgtdmd.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) I : 新規癌抑制遺伝子型 miRNA (TS-miRNA) の同定を目的に、OSCC 細胞株での細胞増殖抑制効果を指標とする機能的スクリーニ

ングを行い、327 種類の miRNA 配列から、host 遺伝子である *SLIT2* 遺伝子 (4p15.31) ならびに *SLIT3* 遺伝子 (5q34-q35.1) 近傍の CpG アイランドにおける腫瘍特異的 DNA 過剰メチル化によって発現抑制される *miR-218* と *miR-585* を同定した。さらに、*miR-218* は *Rictor* を標的分子とし、PI3K-Akt シグナル伝達経路とは独立した TOR-AKT シグナル伝達経路を介する Akt Ser473 リン酸化を抑制的に制御していることなどを明らかにした。(Uesugi et al., *Cancer Res*, 71:5765-78, 2011) (図参照)



口腔扁平上皮がん (OSCC) II : 正常の組織発生や癌の悪性形質獲得過程などで重要とされる上皮-間葉転換 (EMT) に注目し、18 株の OSCC 細胞株パネルでの EMT 関連遺伝子群の発現プロファイルを基に上皮系と間葉系細胞株に分類するとともに、同パネルにおける Wnt シグナル関連遺伝子群の発現解析と DNA メチル化解析から、間葉系 OSCC 細胞株で DNA 過剰メチル化により発現抑制される *WNT7A* と *WNT10A* を見出し、既報の間葉-上皮転換 (MET) シグナルである *miR-200-ZEB1-E* カドヘリン (CDH1) 経路とは独立した *miR-200-ZEB1-WNT7A-CDH1* 経路が存在することを明らかにした。(Kurasawa et al., *Oncogene*, 2011 [Epub ahead of print])

子宮体がん (EC) : 腫瘍特異的 DNA 過剰メチル化により発現抑制される TS-miRNA の同定を目的に、327 種類の miRNA 配列から EC 細胞株を用いた機能的スクリーニングと DNA メチル化解析ならびに発現解析を組み合わせた絞り込みを行い、新規 TS-miRNA として

COPZ2 遺伝子 (17q21.32) の intron 1 に座位する *miR-152* を同定した。さらにその標的分子として *E2F3*、*MET*、*Rictor* を明らかにした。EC 症例を用いた解析から DNA 過剰メチル化により *miR-152* が高頻度に発現抑制されていることを明らかにした。EC 細胞株移植 SCID マウスへの *miR-152* 投与実験から合成二本鎖 TS-miRNA を用いた miRNA replacement therapy の新規がん治療法としての有効性を示した。(Tsuruta et al., *Cancer Res*, 71:6450-62, 2011) (図参照)

大腸がん (CRC) : CRC 細胞株を用いた網羅的発現解析と遺伝子オントロジー解析から、EMT 関連遺伝子として *SIX1* に注目した。CRC 細胞株 SW480 を用いた *SIX1* 安定発現株では *CDH1* 発現抑制を伴う EMT が誘導されること、この *SIX1* 過剰発現による EMT 誘導には *ZEB1* の活性化と *miR-200* ファミリーの発現抑制が関与していること、*SIX1* 発現異常が進行 CRC 症例の予後不良群と相関性を示すことなどを明らかにした。(Ono et al., *Oncogene*, 2011 [Epub ahead of print])

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、LPTM5 (Lysosomal-associated protein multispinning membrane 5) 遺伝子産物はリソゾーム関連細胞内小胞に局在し、LPTM5 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、LPTM5 のタンパク質量は、E3 ユビキチンリガーゼの 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明らかにした。そして、NB 細胞での ITCH 発現抑制は、LPTM5 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)。このことから、ITCH は、LPTM5 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、リソゾーム分解経路であるオートファジーの障害は、癌の発生に寄与すると考えられている。我々は、オートファジー関連遺伝子であるヒト *LC3* (microtubule-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* は様々な癌種の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* 2011 [Epub ahead of print])。]

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関連解析 (GWAS) により、2098 人の肺がん患者と 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)。

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 ChIP-Seq 法により、EMT 誘導転写因子 *SIX1* の標的遺伝子候補の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が候補として浮上している。

4. 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” ④ X 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 ⑦ Cancer Array-1500 ⑧ Whole 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」プロジェクトを推進し①アレイデータ解析の専用ソフトの開発、②各種癌の基本ゲノム構造異常データベースの構築、③全自動解析装置等を開発した。

これらのアレイを用いた先天異常解析のプロジェクト

として、2005年より遺伝専門医による遺伝診療科を備える国内23医療施設と連携して「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例を収集して解析を行ってきたGDAによる1次スクリーニングでは69例(10.7%)に疾患関連のゲノムコピー数変化(pathogenic CNV)を検出した。GDA陰性の515例は、WGAを用いた2次スクリーニングで90例(17.5%)にCNVを検出し、病態との関連を両親解析や既存のデータベースとの照応などを通じて評価して61例(11.8%)がpathogenic CNVであると判定した(Hayashi et al. J Hum Genet 2011)。また、本プロジェクトでは小脳脳幹部低形成を伴う小頭症(MICPCH)の原因遺伝子CASKが見出されていたが、新規MICPCH10症例の収集・解析を行い、全例にCASK変異を検出した(Hayashi et al. Hum Genet 2012)。

このようなpCNVの確定診断には日本人健常者のCNV情報が不可欠である。そのため、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、CNVデータベースを構築してWebで公開した。(図2)。

厚生労働省精神・神経疾患研究委託費(18指-5)「精



図2 CGH database、CNV database のバナー [http://www.cghtmd.jp/CNVDatabase]

人事異動
<div> <div>転入:谷本幸介 (ゲノム解析室)、永田啓明、岩館恰子 (大学院特別研究生)、長縄光代 (医歯学総合研究科 修士課程)、Nuylian Michelle Loyola、Daniela Tiaki Uehara (難治疾患研究所専攻生)、李慧 (医歯学総合研究科 博士課程)、奥子田一輝 (共同研究生)</div> <div> <div>転出:松井毅 (MTT 特任講師)、石原孝也 (リサーチレジデント)、本田尚三、倉沢泰浩、上杉篤史、白樺 (医歯学総合研究科、博士課程終了) 鶴田智彦、小西博貴 (大学院特別研究生)、前田誠 (生命情報科学教育部 修士課程)、川原正人、小林</div> </div> </div>

神遅滞リサーチ・リソースの拡充と病因・病態解明をめざした遺伝学的研究」班（主任研究者：後藤雄一先生）の分担研究として、X連鎖性精神発達遅滞 (X-linked Mental Retardation, XLMR) の原因とな CNV 探索を推進した。現在までに神発達遅滞 (MR) を呈する男児が1名以上存在する173家系でX-tiling arrayによるaCGH解析し、13家系(7.5%)にMRとの関連が疑われるCNVを検出した (Honda et al. J Hum Genet 2010)。

受賞等

井上 純：川野小児医学奨学財団若手研究者助成金「神経芽腫の腫瘍自然退縮の動物モデルの構築」

上杉篤史：平成 23 年度難治研優秀論文賞受賞

鶴田智彦：平成 23 年度難治研優秀論文賞受賞

村松智輝：平成 23 年度東京医科歯科大学大学院学生研究奨励賞受賞

古田 繭子：文部科学省科学研究費新学術領域研究がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動・平成 23 年度日仏がんワークショップ公募採択

古田 繭子：東京医科歯科大学グローバル COE (GCOE) スーパースチューデント (SS) 研究発表優秀賞「Excellent Award」受賞

井上 純：平成 23 年度「難治疾患の研究」を重点課題とする研究助成

林 深：平成 23 年度「難治疾患の研究」を重点課題とする研究助成

原園陽介：財団法人 金原一郎記念医学医療振興財団 第 26 回研究交流助成金受領

林 深：論文が掲載誌 Journal of Human Genetics の表紙で紹介

2011年4月6日付で日本人健常者集団を対象としたヒトゲノム多様性データベース「MCG CNV Database」公開

2012年12月ヒトゲノム多様性データベース「MCG CNV Database」に SNP アレイによる解析データを追加公開。

- in autophagy and frequently inactivated in human cancers. Oncogene. 2012 [Epub ahead of print]
- 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. 57:73-7.2012
- Ishihara T, Inoue J, Kozaki K, Imoto I, Inazawa J: The HECT-type ubiquitin ligase ITCH targets lysosomal-associated protein multispinning transmembrane 5 (LAPTM5) and prevents LAPTM5-mediated cell death. J Biol Chem. 286:44086-94. 2011
- 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-specific DNA hypermethylation in cancer cells. Oncogene. 2011 [Epub ahead of print]
- Tsuruta T, Kozaki K, Uesugi A, Furuta M, Hirasawa A, Imoto I, Susumu N, Aoki D, Inazawa J: miR-152 is a tumor suppressor microRNA that is silenced by DNA hypermethylation in endometrial cancer. Cancer Res. 71:6450-62. 2011
- Uesugi A, Kozaki K, Tsuruta T, Furuta M, Morita K, Imoto I, Omura K, Inazawa J: The tumor suppressive microRNA miR-218 targets the mTOR component Rictor and inhibits AKT phosphorylation in oral cancer. Cancer Res. 71:5765-78. 2011
- 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 8 件

英文総説

- Kozaki K and Inazawa J: Tumor-suppressive microRNAs silenced by tumor-specific DNA hypermethylation in cancer cells. Cancer Sci. 2012 [in press]

著書・総説

- 稲澤譲治：中国・日本科学最前線 - 研究の現場から -2011 年版。独立行政法人科学技術振興機構 中国 総合研究センター(東京). 2011, 3, 15 (603P)
- 林深, 稲澤譲治, 蒔田芳男：アレイ CGH を用いた先天異常疾患の網羅的ゲノム異常解析と疾患原因遺伝子の探索. 金原出版株式会社, 小児科. 52: 1583-1590, 2011.
- 他 2 件

国際シンポジウム・招待講演等

- I Inazawa J: Copy-number variation (CNV) in Japanese patients with multiple congenital anomalies and mental retardation (MCA/MR) by array-based comparative genomic hybridization analysis. Taiwan Association of Obstetrics and Gynecology. The 50th Annual Meeting of the Taiwan Association of Obstetrics and Gynecology. The Grand Hi Lai Hotel, Taipei, Taiwan. 13/March/2011
- Inazawa J: Function-based screening of tumor-suppressor microRNAs silenced by DNA hypermethylation in cancer. The 8th Nikko International Symposium 2011. Jichi Medical University. Tochigi, Japan. 21/ October/2011
- 他 2 件

国際学会

- Hayashi S, Imoto I, Makita Y, Hata A, Inazawa J: Pathogenic CNVs and causative genes detected by two-stage screening in 647 patients with mental retardation and multiple congenital anomalies of unknown etiology. The 12th International Congress of Human Genetics/ The American Society of Human Genetics 61th annual meeting. Montreal, Canada. 11-15/ October /2011
- 他 1 件

国内シンポジウム・招待講演等

- 林深, 稲澤譲治：先天異常疾患の原因となるゲノム異常の網羅的探索. 国立大学法人東京医科歯科大学第四回硬組織疾患ゲノムセンター・シンポジウム. 東京医科歯科大学講堂. 東京. 2011 年 1 月 31 日
- 小崎健一, 稲澤譲治：がん細胞において DNA 過剰メチル化により発現抑制される癌抑制遺伝子型 microRNA の機能的スクリーニング. 第 70 回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場. 愛知. 2011 年 10 月 4 日
- 稲澤譲治：がんの統合的ゲノム・エピゲノム解析. 日本人類遺伝学会第 56 回大会 / 第 11 回東アジア人類遺伝学会. 幕張メッセ. 千葉. 2011 年 11 月 11 日
- 他 4 件

国内学会

- 古田 繭子, 小崎健一, 田中真二, 有井滋樹、井本逸勢, 稲澤譲治：Functional スクリーニングを用いた肝細胞癌抑制性 microRNA の同定. 第 70 回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場. 愛知. 2011 年 10 月 5 日
- 村松智輝, 小崎健一, 稲澤譲治：膵臓がん細胞株 Panc1 を用いた自発的転移モデルの構築と検証. 第 70 回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場. 愛知. 2011 年 10 月 3 日
- 他 18 件

主催セミナー

- 第 20, 21 回癌ゲノムサイエンス研究会. 東京医科歯科大学 2011 年 2 月 3 日、6 月 23 日

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:文部科学省科研費 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：新エネルギー・産業技術総合開発機構 委託研究費「個別化医療の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」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：ロシユ・ダイアグノスティックス

株式会社 受託研究費「CGH 解析用オリゴヌクレオチドマイクロアレイの臨床的有用性の検討に関する研究」代表

7. 稲澤譲治：国立精神・神経センター 研究委託費「精神・神経疾患バイオリソース・レポジトリーの構築及び病因病態の解明に関する研究」分担

8. 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

9. 稲澤譲治：文部科学省科研費 新学術領域研究「領域の研究方針の策定」分担

10. 小崎健一:文部科学省科研費 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

11. 井上純：文部科学省科研費 基盤研究 B「神経芽腫における腫瘍自然退縮の分子メカニズムの解明」代表

12. 林 深：文部科学省科研費 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

13. 古田繭子：文部科学省科研費 特別研究員奨励費「新たな RNA 創薬に寄与する幹細胞癌抑制性 microRNA の同定と機能解析」代表

特許申請

国内出願

特許第 4740621 号「食道癌の検出方法、および、抗食道癌物質のスクリーニング法」稲澤譲治、井本逸勢平成 23 年 5 月 13 日

海外出願

Canadian patent No. 2,411,249

European patent No. 1291424

教育

稲澤譲治：医学部医学科「生命と遺伝子」、歯学部「遺伝病学」、保健衛生学科「細胞遺伝学」、大学院医歯学総合研究科修士課程「遺伝疾患総論」「生化学」、大学院生命情報科学教育部「ゲノム科学特論」、京都府立医科大学大学院「血液病態制御学」、神戸大学医学部大学院講義
小崎健一：大学院医歯学総合研究科修士課程「遺伝疾患総論」

難治疾患研究所 ゲノム応用医学研究部門 分子遺伝分野

教授：三木義男 准教授：吉田清嗣
特任准教授：中西 啓 助教：竹中克也

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、この両分子のみならず、このシグナル伝達を担ういくつかのキナーゼに焦点を当て機能解析を進めている。

研究紹介

1. BRCA2 遺伝子の機能解析

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、BRCA2 は母・娘細胞間に形成されるミッドボディに局在する。我々はこれまで、BRCA2 は、midbody においてヒト非筋肉型ミオシン IIC (NMHC IIC) と共局在し、BRCA2 は NMHC IIC のモータードメインの N 末端領域と結合することを報告してきた。しかしながら BRCA2 が NMHC IIC の機能にどのように関与しているのか全くわかっていない。本年度は、NMHC IIC の ATPase 活性に対する BRCA2 の効果を検討したので報告する。また、BRCA2 は中心体局在化シグナル (CLS) を介して中心体に移行することを報告してきたが、その詳細なメカニズムは明らかにされていない。今回我々は、CLS に結合するタンパク質として細胞質ダイニンを同定したのでその結果を報告する。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。

1) BRCA2 によるヒト非筋肉型ミオシン IIC (NMHC IIC) の ATPase 活性の増強

NMHC II の ATPase 活性阻害剤である blebbistatin

を A549 細胞に添加させると、midbody を取巻く IIC リングが崩壊し、cytokinesis での細胞分裂が不完全で多くの細胞がつながった状態が観察された。この結果から、IIC リングの形成には、NMHC IIC の ATPase 活性が必要であることが示唆された。そこで、BRCA2 が NMHC IIC の ATPase 活性に関与するのか検証した。BRCA2 と NMHC IIC は、COS7 細胞で BRCA2-FLAG、または HA-NMHC IIC を発現後、抗 FLAG 抗体、および抗 HA 抗体による免疫沈降産物から調製した。0.63 μg と 2.83 μg の HA-NMHC IIC で、 Mg^{2+} ATPase 活性を測定した結果、0.63 μg では活性がなかったが、2.83 μg では活性 (14.7 $\times 10^3/\text{min}$) が認められた (図 1A)。ところが、0.63 μg の HA-NMHC IIC に 0.50 μg の BRCA2-FLAG を加えると、ATPase 活性 (1.5 $\times 10^3/\text{min}$) が検出された。BRCA2-FLAG を 0.75 μg 反応させた場合、その活性 (4.6 $\times 10^3/\text{min}$) も強くなった (図 1B)。これらの結果から IIC リングは、NMHC IIC の ATPase 作用を介して形成され、その ATPase 活性は、BRCA2 によって制御されている可能性が示唆された。そこで我々は、細胞内で IIC リングがどのように形成されるのか調べるため、A549 細胞に NMHC IIC-GFP を発現させてタイムラプスで IIC リングの形成過程を蛍光顕微鏡 (蛍光と微分干渉) で継時的に観察した。その結果、IIC リングは、cytokinesis での flemming body とそれ以外の細胞内にも数個観察された。細胞内で観察されたリングが IIC リングであることを確かめるため、NMHC IIC-GFP を発現させた COS7 細胞の cell lysate (ATP + Mg^{2+}) をスライドガラスに滴下し、タンパク質を固定後、蛍光顕微鏡で観察した。その結果、IIC リングが観察された。IIC リングの内径は 1.5 ~ 2.0 μm で cytokinesis での flemming body の IIC リングの内径 (1.4 ~ 2.0 μm) とほぼ同等の値を示した。これに対して、blebbistatin を加えた場合、IIC リングが観察されなかった。さらに COS7 細胞で NMHC IIC-GFP と BRCA2-FLAG を共発現させて、上記と同様にタンパク質を固定して抗 GFP 抗体と抗 BRCA2 抗体で免疫染色を行った結果、IIC リングの一部に BRCA2-FLAG が共局在した。

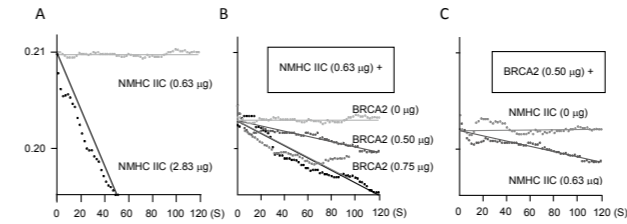


図 1. BRCA2 の NMHC IIC-ATPase 活性への関与 (A) HA-NMHC IIC 0.63 μg では、 Mg^{2+} ATPase 活性は認められなかったが、2.83 μg では活性 (14.7 $\times 10^3/\text{min}$) が認められた。(B) HA-NMHC IIC 0.63 μg に BRCA2-FLAG 0.50 μg を加えると、ATPase 活性 (1.5 $\times 10^3/\text{min}$) が検出された。BRCA2-FLAG を 0.75 μg 反応させた場合、その活性が増強した (4.6 $\times 10^3/\text{min}$)。 (C) 相反実験結果

2) BRCA2 由来中心体局在化シグナル (CLS) の中心体移行システムの解析

遺伝性乳癌の原因遺伝子産物である BRCA2 や、CDK2 のリン酸化酵素活性を誘導するサイクリン E は、中心体局在化シグナル (centrosomal localization signal: CLS) を介して中心体に局在する。両タンパク質の CLS を含むポリペプチドは中心体に局在し、その変異型は局在しない。このように CLS は、中心体への移行に重要な役割を果たすことが示唆されているが、これまでそのメカニズムについては明らかにされていない。そこで我々は、CLS と相互作用するタンパク質を同定して CLS の中心体移行メカニズムの解明を試みた。HA-CLS-DsRed、および HA-DsRed を COS7、MCF7 で発現後、細胞溶解液に対して免疫沈降を行い、その免疫沈降物は直接トリプシン消化して質量分析 (QTRAP 5500 LC/MS/MS システム) で解析した。免疫沈降に用いた抗体は、あらかじめ架橋剤 (BS3) によって proteinG と架橋させて、抗体 (IgG) 由来の重鎖と軽鎖の混入を防いだ。タンパク質の解析から、CLS は細胞質ダイニン 1 の構成タンパク質である重鎖 1 と中間軽鎖 2 が同定された。この重鎖 1 を siRNA でノックダウンさせると内在性の BRCA2 は中心体に局在しないことから、BRCA2 は、その CLS が細胞質ダイニンに結合して中心体に輸送されることが示唆された。

2. DNA 損傷における細胞内シグナル伝達機構と細胞死

DNA は遺伝情報の担い手であり、その正確な複製と子孫への伝達は生物の本質的特性である。一方 DNA は放射線、紫外線などの外的要因だけでなく、細胞の代謝過程で生ずる活性酸素などの内的要因によっても絶えず損傷を受けている。かような DNA 損傷に対し、生物は多様なシグナル伝達機構により細胞周期を停止して損傷を修復し (チェックポイント機構)、修復不能場合には細胞死 (アポトーシス) を誘導し、損傷によって生ずる突然変異の蓄積を回避する。このような DNA 損傷に

関わる機構の破綻は、癌をはじめとする広範な疾患の原因となる。近年、DNA 損傷に関わる多数の遺伝子の機能が解明されたが、いかなる細胞内情報伝達により細胞死 (アポトーシス) を誘導するかという制御機構は、その多くが未だ明らかにされていない。我々はこのシグナル伝達を担ういくつかのキナーゼに焦点を当て、機能解析を進めている。

1) Protein kinase C delta (PKC-delta) による新しい細胞死誘導機構

PKC-delta は DNA 損傷などのストレス刺激に応じてカスパーゼ 3 により分解され、キナーゼ活性が高まりアポトーシスを強く惹起することが知られている (Yoshida K. Cell. Signal. 2007)。その分子メカニズムの一端は解明されてきたが、詳細が明らかになったとは言えない。我々はこれまでに PKC-delta の核内でのアポトーシス標的分子の解析を進めた結果、p53 を新たな基質として同定した (Yoshida K, et al. J. Biol. Chem. 2006)。さらに研究を進めた結果、PKC-delta はリン酸化のみならず、転写レベルで p53 の発現誘導を制御しているという予想外の知見を得た (Liu H, et al. Mol. Cell. Biol. 2007)。興味深いことに、PKC-delta は p53 の制御分子である mdm2 の制御にも関与していることを見出した。PKC-delta の活性を抑えると、p53 とは無関係に mdm2 の発現が減弱した。この制御は翻訳後修飾によるものであり、ユビキチン化の関与が示唆された。そこで mdm2 のユビキチンリガーゼである p300/CBP-associated factor (PCAF) との関連について調べたところ、PKC-delta 抑制による mdm2 の発現低下は PCAF をかいていることが判明した。さらに PKC-delta による DNA 損傷誘導性アポトーシスは mdm2 の過剰発現により高まった。以上より、DNA 損傷による PKC-delta 依存性アポトーシスの新たなエフェクター分子として mdm2 の可能性が示された (Hew HC, et al. Mol. Carcinog. 2011)。我々は、さらなる PKC-delta 依存性細胞死制御の全貌を明らかにすべく、PKC-delta による転写制御分子の網羅的探索を試みた。ChIP-sequencing と microarray それぞれから、PKC-delta によって制御を受けている転写因子を予測し、両アッセイを組み合わせて、最も可能性の高い分子を決定した。その結果、PKC-delta の新たな DNA 損傷誘導性標的分子として Evi-1 を同定した。PKC-delta による Evi-1 制御は PLZF の転写を促進し、DNA 損傷によるアポトーシスを促進することが示された (Hew HC, et al. Biochim. Biophys. Acta 2011)。

2) Protein kinase DYRK2 による細胞周期制御と腫瘍

抑制機構

c-Jun や c-Myc は細胞周期制御に必須な転写因子である。c-Jun や c-Myc はプライミングリン酸化を受けると、引き続いて GSK3beta によるリン酸化が誘導され、さらにユビキチンリガーゼ FBXW7 がリクルートされて c-Jun や c-Myc の分解を促すことが知られている。このリン酸化を起点とした分解は G1 期から S 期への遷移に重要であり、分解異常が発癌や癌の進展と密接に関与していることが報告されている。我々は DYRK2 と呼ばれるリン酸化酵素が、c-Jun や c-Myc のプライミングリン酸化を担っていることを見出した。興味深いことに、DYRK2 をノックダウンすると c-Jun や c-Myc のプライミングリン酸化が顕著に減弱し、それに伴い c-Jun や c-Myc の分解異常による蓄積が観察され、G1 期の顕著な短縮に伴う細胞増殖が亢進した。さらに DYRK2 を恒常的にノックダウンした乳癌細胞をマウスに移植し造腫瘍効果を調べたところ、コントロール細胞と比較して、明らかな造腫瘍能の増強が観察された。次に、ヒト乳癌組織における DYRK2 の発現を検証したところ、乳管内乳癌と比べて浸潤性乳癌では DYRK2 の顕著な発現低下が認められ、一方で c-Jun や c-Myc は発現上昇しているという逆相関現象が観察された。以上より、DYRK2 は DNA 損傷に応答して細胞死を誘導する一方で、G1/S 期の遷移を制御することで細胞周期調節にも寄与しており、発癌抑制に貢献している可能性が示唆された (Taira N, et al. J Clin. Invest. in press) (図2)。

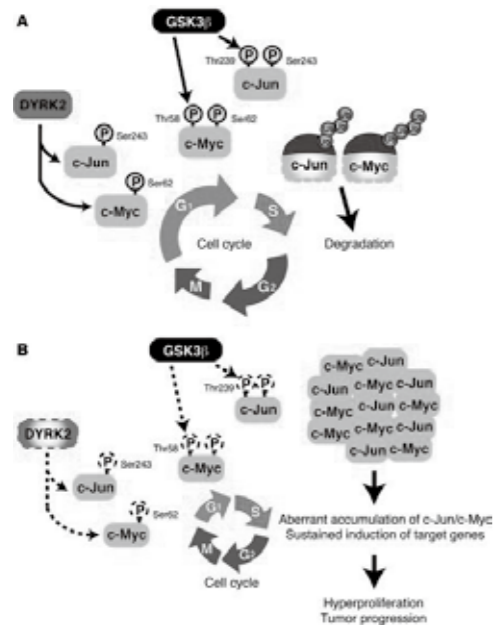


図2. DYRK2 による細胞周期制御のモデル。
(A) G1 後期で、c-Myc と c-Jun は DYRK2 によってリン酸化され、それを GSK3β が認識し、さらに c-Jun と c-Myc をリン酸化する。GSK3β によりリン酸化された c-Jun と c-Myc は、ユビキチン・リガーゼと結合し分解される。(B) DYRK2 がいない場合、GSK3β は c-Jun と c-Myc をリン酸化することができず、その結果、c-Jun と c-Myc は分解されない。c-Jun と c-Myc の蓄積は、目標分子 (例えば cyclin E) を誘導し、過剰な増殖な発がんにつながる。

3) p53 による新規標的遺伝子の探索

マイクロアレイにより p53 による新規標的因子を同定した。現在その機能解析を引き続き進めている。

3. ゲノム上点変異導入による損傷乗り越え DNA 合成酵素の分子間相互作用部位の解析

損傷乗り越え DNA 合成は特殊な DNA 合成酵素群によって行なわれる DNA 損傷修復の一つである。我々は高頻度に標的組換えが行なえるニワトリ B リンパ球由来 DT40 細胞株を用いた実験手法を応用し、ゲノム上に点変異を導入する手法を開発した。外来の変異体 cDNA を発現する従来の手法とは異なり、天然の発現量で遺伝子変異の解析を行なうことが可能になった。Rev3 は Polζ のサブユニットであり 3,130 アミノ酸と非常に巨大であることから本手法で初めて in vivo での分子内機能解析が可能となる。Polζ の別のサブユニットである Rev7 との結合アミノ酸が *in vitro* の実験で明らかになったので、この部位へのゲノム上点変異導入を行なった。紫外線およびシスプラチンに対して、Rev3 の Rev7 結合アミノ酸に変異を入れた P1880F 株は感受性を示した。Rev3 の Mad2 結合アミノ酸に変異を入れた I1877A 株は全く感受性を示さなかった。ただし P1880F 株の示した感受性はいずれも *REV3* 破壊株に比べると弱かった。そのため *in vivo* においては、Pro1880 以外に Rev3 と Rev7 の結合に関与するアミノ酸部位があるか、P1880F であっても Rev7 と弱く結合し得る可能性が考えられた。それぞれの可能性について検討中である。

人事異動

転入：中澤和也 (生命情報科学教育部博士前期課程)、山本武徳 (生命情報科学教育部博士前期課程)、和田匠太 (生命情報科学教育部博士前期課程)、石場俊之 (医歯学総合研究科博士課程)
転出：Hew Hoi Chin (医歯学総合研究科博士課程終了)、伊東明泉 (医歯学総合研究科修士課程終了)、細川佳那 (生命情報科学教育部博士前期課程終了)、工藤卓也 (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

- Kimura J, Kudoh T, Miki Y, Yoshida K. Identification of dihydropyrimidinase-related protein 4 as a novel target of the p53 tumor suppressor in the apoptotic response to DNA damage. *Int. J. Cancer* 128:1524-1531 (2011)
 - Hew HC, Liu H, Miki Y, Yoshida K. PKCdelta regulates Mdm2 independently of p53 in the apoptotic response to DNA damage. *Mol. Carcinog.* 50:719-731 (2011)
 - Hew HC, Liu H, Lu-Z-G, Kimura J, Miki Y, Yoshida K. Identification of Evi-1 as a novel effector of PKCdelta in the apoptotic response to DNA damage. *Biochim. Biophys. Acta* 1803:285-294 (2011)
 - Taira N, Mimoto R, Kurata M, Yamaguchi T, Kitagawa M, Miki Y, Yoshida K. DYRK2 priming phosphorylation of c-Jun and c-Myc modulates cell cycle progression in human cancer cells. *J Clin. Invest.* in press.
 - Iyevleva AG, Kuligina ESh, Mitiushkina NV, Togo AV, Miki Y, Imyanitov EN. High level of miR-21, miR-10b, and miR-31 expression in bilateral vs. unilateral breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat.* 131:1049-1059, 2012.
 - Sakamoto K, Aragaki T, Morita K, Kawachi H, Kayamori K, Nakanishi S, Omura K, Miki Y, Okada N, Katsube K, Takizawa T, Yamaguchi A. Down-regulation of keratin 4 and keratin 13 expression in oral squamous cell carcinoma and epithelial dysplasia: a clue for histopathogenesis. *Histopathology.* 58:531-542, 2011.
 - Wang HF, Takenaka K, Nakanishi A, Miki Y. BRCA2 and nucleophosmin coregulate centrosome amplification and form a complex with the Rho effector kinase ROCK2. *Cancer Res.* 71:68-77, 2011.
- 他 4 篇

総説および著書

- 斉藤 広子, 三木 義男; 乳癌におけるコピー数変異. 生体の科学 62 巻 6 号, 556-559. (2011)
- 三木 義男; 染色体 BRCA2 とスクレオホスミン. 生体の科学 62 巻 5 号, 474-475. (2011)
- 三木 義男; 遺伝性乳癌・卵巣癌の遺伝子診断および研究の現状. 産科と婦人科 78 巻 9 号, 1050-1055. (2011)
- 斉藤 広子, 三木 義男; PARP 阻害剤と癌治療. 癌と化学療法 38 巻 1 号, 12-18. (2011)

招待講演・国内シンポジウム・特別講演

- 三木義男; 遺伝性乳がん卵巣がんの臨床 BRCA1/2 遺伝子検査と薬物療法 BRCA1/2 研究の現状と展望 基礎から臨床. 第 17 回日本家族性腫瘍学会学術集会、シンポジウム、京都市、2011 年 6 月 16-19 日
- 三木義男; 遺伝性乳がん・卵巣がん症候群の

分子遺伝. 第 47 回九州乳癌カンファレンス、特別講演、北九州市、2011 年 11 月 11 日
3. 三木義男; 乳がんはなぜおこるの? - 遺伝子の異常と乳がん - . 乳がん講演会、徳島市、2011 年 11 月 19 日
4. 三木義男; BRCA1/2 遺伝子の分子生物学 - 遺伝子の発見から今、そして今後の展望 - . 日本家族性腫瘍学会・第 14 回家族性腫瘍セミナー、東大阪市、2011 年 8 月 26-28 日
5. 吉田清嗣 アポトーシス誘導の制御機構 第 26 回生体・生理工学シンポジウム / 「バイオシグナルの統合と治療応用に関する研究会」第 21 回研究会、草津、滋賀; 2011 年 9 月 21 日
6. Miki Y, Takenaka K, Nakanishi A. New insights into the cellular function of BRCA2. 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, (oral presentation) Nagoya, Japan, October 3-5, 2011

国内学会発表

- 三木義男; 遺伝性乳がん卵巣がんの臨床 BRCA1/2 遺伝子検査と薬物療法 BRCA1/2 研究の現状と展望 基礎から臨床. 第 17 回日本家族性腫瘍学会学術集会、京都市、2011 年 6 月 16-19 日
 - 三木義男; 新しい頭頸部癌治療の展望 網羅的遺伝子発現情報のがん個別化治療への展開. 第 35 回日本頭頸部癌学会、名古屋市、2011 年 6 月 9-10 日
 - 三木義男; 遺伝性乳がん卵巣がんの臨床 BRCA1/2 遺伝子検査と薬物療法 BRCA1/2 研究の現状と展望 基礎から臨床. 第 35 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会、京都市、2011 年 6 月 16-19 日
 - 三本麗、平直江、鷹橋浩之、内田賢、三木義男、吉田清嗣; DYRK2 は snail/E-cadherin 系を介して癌の浸潤を制御する. 第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋市、2011 年 10 月 3-5 日
 - 平直江、三本麗、倉田盛人、北川昌伸、三木義男、吉田清嗣; DYRK2 による c-Jun/c-Myc のリン酸化は細胞周期 G1/S 期の進行を制御する. 第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋市、2011 年 10 月 3-5 日
 - ダシゼウエケ スルマ、平直江、木村純子、三木義男、吉田清嗣; 癌抑制遺伝子産物 p53 によるアポトーシス関連遺伝子の探索. 第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋市、2011 年 10 月 3-5 日
 - 高岡美帆、斉藤広子、中西啓、三木義男; 細胞質分裂におけるミッドボディでの BRCA2 と II 型ミオシン II C の役割. 第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋市、2011 年 10 月 3-5 日
 - 三木義男、竹中克也、中西啓; がん抑制タンパク BRCA2 の新規細胞機能の解析. 第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋市、2011 年 10 月 3-5 日
 - 木村仁美、中西啓、三木義男; 中心体の大きさと微小管形成はプロテオームによって制御されている. 第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋市、2011 年 10 月 3-5 日
 - 三木義男; BRCA1/2 遺伝子検査の先進医療への取り組み. 第 19 回日本乳癌学会学術総会、仙台市、2011 年 9 月 2-4 日
 - 三木義男、斉藤広子、中西啓; 遺伝性乳癌・卵巣癌症候群 - 基礎から臨床 - . 日本人類遺伝学会第 56 回大会・第 11 回東アジア人類遺伝学会、千葉市、2011 年 11 月 9-12 日
- 他 9 題

競争的研究費取得

・三木 義男 (代表) 平成 23 年度科学研究費補助金 新学術領域研究
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 23 年度科学研究費補助金 挑戦的萌芽研究
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 23 年度科学研究費補助金 基盤 (C)
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 23 年度文部科学省科学技術試験研究・委託業務
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
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法開発
・吉田 清嗣 (代表): 平成 23 年度科学研究費補助金 基盤研究 (B)
腫瘍悪性化分子機構の解明と癌転圧に向けた診断・治療への展開
・吉田 清嗣 (代表): 平成 23 年度科学研究費補助金 新学術領域研究
プライミングリン酸化反応の制御機構とその破綻による病態解明
・吉田 清嗣 (代表): 平成 23 年度科学研究費補助金 挑戦的萌芽研究) ショットガンプロテオミクスを用いた癌の診断・治療標的候補分子の網羅的探索
・吉田 清嗣 (代表): 小林がん学術振興会平成 23 年度 (第 5 回) 研究助成金 乳癌悪性化の分子機構における DYRK2 キナーゼの役割と治療への展開

難治疾患研究所 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、疾患の易罹性や薬剤反応性に関する遺伝子多型の解析を行っている。さらには得られた遺伝子の機能解析研究も行っており、日常的疾患におけるエピゲノム変化の重要性も明らかにしたいと考えている。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)、子宮内膜症などである。大学院生および専攻生には、ゲノム学、遺伝統計学、疫学、そして分子生物学の知識や技術を教育し、学際的に広がりを持つ分野を理解し、ポスト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。

多く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。このための解析手法の開発をバイオインフォマティクスの観点からも進めている。これらの取り組みにより遺伝子多型の疾患に対する相加的、相乗的なリスクを測ることで、将来的にはオーダーメイド医療時代の新しい診断・治療指針の提唱を目指している。

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受け入れられるようになってきた。母親の胎内に宿っている期間に、個体のエピゲノム状態が確立されるが、それが子宮内環境により変化するという考え方である。マウス個体や ES 細胞を用いて、子宮内環境変化が胎児の DNA メチル化状態におよぼす影響についても研究を進めている。

研究紹介

1. Fucosyltransferase 8 (FUT8) 遺伝子 Thr267Lys 多型と肺気腫に関する検討

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) は有病率、死亡率ともに増加傾向にある疾患であり、発症には複数の遺伝子および環境因子が関連している多因子疾患である。喫煙や大

気汚染曝露が発症リスクとして良く知られているが、発症リスク遺伝子に関してはまだ十分に明らかにはなっていない。近年、フコシル転移酵素である Fucosyltransferase 8 遺伝子を欠損させた fut8 欠損マウスが作成され、これらにおいて、生理学および病理学的に肺気腫様変化を認めることが報告された。その機序として fut8 欠損マウスでは TGF- β レセプターシグナル系が障害されており、マトリックスメタロプロテアーゼの亢進が認められた。

そこで、本研究ではヒト FUT8 遺伝子を肺気腫候補遺伝子と仮定して、その遺伝子多型のヒトへの影響を検討した。

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で登録されている日本人高齢者連続剖検例 1503 検体および日本医科大学呼吸ケアクリニックの COPD 外来患者 182 例を対象とした。FUT8 の非同義一塩基多型 Thr267Lys (rs35949016) について TaqMan 法を用いてジェノタイピングを行い、肺気腫との関連を検討した。外来患者は全例において高分解能 CT を行い、% LAA を肺気腫変化の指標として関連を検討した。解析は SPSS を用いてロジスティック回帰分析を行った。

剖検例において肺気腫を有する症例は 163 例 (14.2%) であった。ジェノタイプ頻度は Hardy-Weinberg 平衡を逸脱していなかった。FUT8 遺伝子多型の risk allele はドミナントモデルにおいて肺気腫に対して統計学的に有意差を認めた (AA+AC vs. CC; OR= 1.74, 95% CI = 1.19-2.56, p = 0.005)。一方、COPD 外来患者例でも、同じモデルで risk allele と % LAA に有意差を認めた (AA+AC vs. CC = 37.5 \pm 14.7 vs. 32.7 \pm 13.9, p = 0.04)。

FUT8 遺伝子多型 Thr267Lys はヒトにおいて肺気腫との関連を認めた。糖鎖のコアフコース化はヒトの肺気腫変化の病理過程においても影響している可能性が考えられた。

2. フォルミドペプチドリセプター (FPR 1) 遺伝子多型と胃がんの関連研究

フォルミルペプチドリセプター (FPR1) は 7 回膜貫通型の G タンパク質共役型レセプターであり、炎症性

細胞に発現してフォルミルペプチドに対する遊走性を仲介する遺伝子である。FPR1 は感染症や癌と関連することが示唆されているが、詳細は明らかではない。先行研究では FPR1 遺伝子多型のうち codon 192、アスパラギン→リジン (N192K) の非同義 SNP (rs1042229) が歯周病と関連することが報告されているのがほとんど唯一の報告例である。一般に SNP は 2 アレル性 (biallelic) であるが、ごく少数のもの (<0.1%) は 3 アレル性 (tri-allelic) であることが知られている。この rs1042229 も C/T/G の 3 アレル性であり、これまでシーケンシングによって決定されてきた。そのため多くのサンプルを解析するのは困難であった。そこでこの SNP を検出するためのジェノタイピング法を、融解曲線分析を応用して開発した (BBRC 405:356-361, 2011)。

その結果、rs1042229 を含む DNA 断片から、図 1 に示されるような融解曲線パターンを得ることが出来た。これらは総じて 56°C、62°C、66°C の三つのピークに纏められた。さらに一つ一つの融解曲線を詳細に見て行くと 6 つのパターンが認められた (図 2)。これらのサンプルをダイレクトシーケンシングによって得られた波形をそれぞれの右に示す。56°C、62°C、66°C の単一ピークを示したサンプルのジェノタイプはそれぞれ CC、TT、GG だった。また 56°C /62°C、62°C /66°C、56°C /66°C の二つのピークを持つものはそれぞれ C/T、T/G、C/G だった。この領域には rs1042229 から 8 塩基はなれた所に rs5030880 があり、このふたつの SNP から三つのハプロタイプ T-C、A-T、A-A が推定され、図 2-A、B、C は T-C、A-T、A-G のホモ接合、図 2-D、E、F は

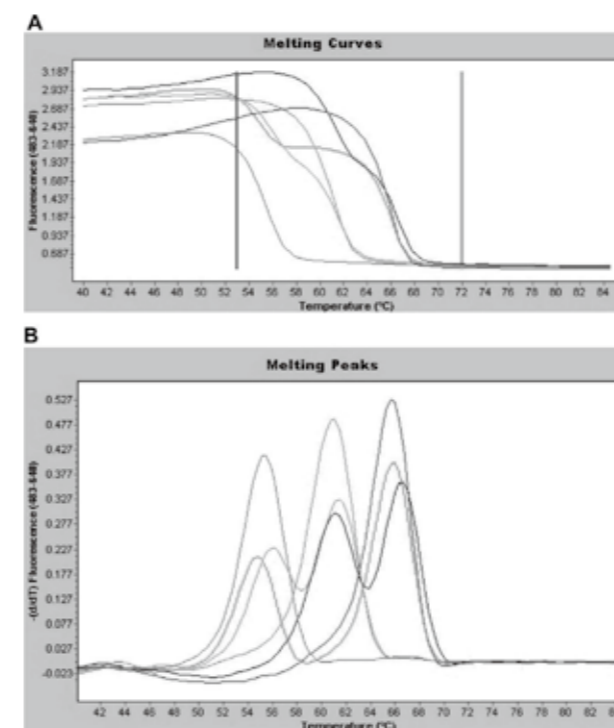


図 1 rs1042229 を含む DNA 断片の融解曲線分析

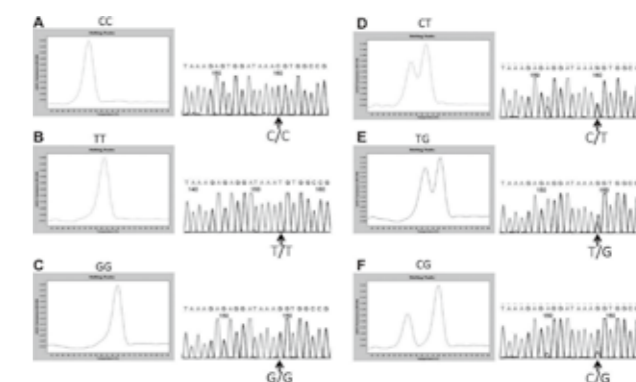


図 2 融解曲線パターンとダイレクトシーケンスの比較

T-C/A-T、A-T/A-G、A-G/T-C のヘテロ接合であることが判明した。このようにハプロタイプ構造を用いて 3 アレル性の SNP を判定することができた。

この方法を用いて東京都長寿健康医療センターの連続剖検例 1503 例において FPR1、rs1042229 の SNP 解析を行い、フェノームスキャンを行った所、K アレルが胃がんに関連していることが明らかとなった (KK vs KN+NN, OR=1.73, 95% CI=1.15-2.55, p=0.0075)。また K アレルがリスクであることは歯周病とも方向が同一であった。

歯周病は胃がんのリスクファクターのひとつであることが疫学的に知られている。この理由として歯周病の歯周ポケットに胃がんの誘発因子であるピロリ菌が常在することが示唆されている。これらのことは FPR1 遺伝子多型が歯周病と胃がんを結ぶ病因関連因子のひとつである可能性を示唆している。

3. ゲニステインは子宮内膜ストローマ細胞において Steroidogenic factor 1 遺伝子プロモーターの脱メチル化を促進する

ゲニステイン (GEN) は大豆製品に多く含まれる植物性エストロゲンであり、近年、エピジェネティックモジュレーターとして認められつつある。卵巣摘出 (OVX) マウスに GEN を 1 週間経口投与したところ、子宮内膜組織の肥厚増殖が見られ、steroidogenic factor 1 (SF-1) 遺伝子の発現が誘導された。同時に GEN は SF-1 遺伝子のプロモーター領域内 CpG の脱メチル化を誘導した。正常子宮内膜組織では、通常それらの CpG は高度にメチル化されており、SF-1 遺伝子発現の抑制が維持されている。GEN 投与後の脱メチル化の割合は、子宮内膜組織の中でも筋層側より管腔側で高かったことから、SF-1 のエピゲノム変化は主に再生増殖した細胞で見られたと考えられた。そこで増殖能を有する細胞として、子宮内膜ストローマからコロニー形成細胞クローンを初代培養し、それらのクローンを in vitro で GEN 処理し、SF-1 遺伝子のメチル化状態変化を高解像度融解

曲線解析法 (high-resolution melting assay=HRM) を用いてスクリーニングした。20 個のクローンのうち 1 つのクローンで、SF-1 遺伝子プロモーターの GEN による脱メチル化誘導が観察された。このクローンは高い増殖能を示した。本研究により、子宮内膜組織におけるごく一部の細胞は GEN に感受性を示しエピジェネティックな変化を示すことが明らかになった。

近年、健康維持や疾患発症に食物や栄養の摂取が重要な役割を果たすこと、さらにその影響は遺伝子のエピゲノム変化を介して現れることが明らかになってきた。しかしその組織特異性や変化の可塑性については未解明のことが多い。GEN は大豆を多く含む伝統的なアジア食に多く含有される。疫学的研究では GEN 摂取と乳がん・前立腺がんのリスク軽減に関連が示唆される。しかし in vitro では逆に乳がん細胞の増殖を促進しうることが知られており、その効果や作用機序の詳細は判っていない。

GEN はエストロゲン受容体 (ER) リガンドであり、特に ERβ に対して強い親和性を示すことから植物性 selective estrogen receptor modulator (SERM) として知られる。GEN の多面的な生理作用が報告されるが、それらは内因性エストロゲンとの相互作用によっても変化する。GEN は各種細胞の DNA メチル化状態を変化させうることが報告されている。しかし、これらは主にがん細胞株を用いた報告であり、正常な細胞を用いた研究や in vivo での研究は少ない。

子宮内膜組織はエストロゲン感受性を持ち、また高い再生増殖能を有する組織であるため、卵巣摘出 (OVX) したげっ歯動物にエストロゲン様物質を投与した効果は子宮肥大試験でアッセイされる。合成エストロゲンをはじめ、GEN やビスフェノール A などのエストロゲン様物質によっても子宮肥大が誘導されるが、その時に内膜細胞に誘導される遺伝子発現変化パターンは必ずしも同一でない。またエピジェネティック変化については明らかにされていない。

SF-1 はオーファン核内受容体であり、StAr、Cyp11a1 (p450scc)、Cyp17a1 (p450c17)、Cyp19a1 (aromatase) 等のエストロゲン生合成系遺伝子群の転写を活性化することが知られる。SF-1 は正常な子宮内膜組織では発現していない。しかしヒトの異所性子宮内膜症組織において、メカニズムは不明であるがプロモーター領域の異常な脱メチル化によって異常に発現することが報告されている。SF-1 活性化の結果生じる局所的エストロゲン合成が子宮内膜症の疾患発症に関与することが示唆されている。

本研究では OVX マウスにおける GEN 誘導子宮肥大の実験モデルを用いて、まず in vivo で GEN により子

宮内膜細胞の SF-1 遺伝子プロモーターに脱メチル化が誘導されることを示した。さらに in vitro でも初代培養子宮内膜ストローマ細胞において SF-1 遺伝子プロモーターが GEN によって脱メチル化されることを示した。

8 週齢の OVX マウス (C57BL/6JJms) に 1 週間 GEN (低用量：60 mg/kg/d、高用量：200 mg/kg/d) を経口投与したのち安楽死させ、子宮を摘出し重量を測定した。双角子宮の片方から RNA を回収し、エストロゲン生合成系遺伝子群の mRNA レベルを GeneChip で解析した。mRNA 発現は Percellome 法によって 1 細胞あたりの copy number として評価した。双角子宮のもう片方からは DNA を回収し、bisulfite sequencing 法により SF-1 遺伝子プロモーター領域のメチル化状態を検討した。

8 週齢の正常マウス (C57BL/6JJms) 子宮内膜細胞の初代培養を行い、コロニー形成細胞クローンを得た。それらクローンを in vitro で 1 週間、生理的濃度の上限值である 10μM の GEN で処理したのち、SF-1 プロモーターの DNA メチル化状態を HRM でスクリーニングし、bi-sulfite sequencing 法で確認した。

OVX マウスへの GEN 投与の結果、高用量で子宮重量増加と共に子宮組織における SF-1 および SF-1 下流遺伝子群の mRNA 発現上昇が認められた。同時に SF-1 遺伝子プロモーター領域の脱メチル化が認められた。解析した領域には -272 位から +199 位にかけて 15 個の CpG が存在する。それら CpG の総計メチル化状態はそれぞれ control で 78.3%、低用量群で 73.9%、高用量群で 54.4%であり、GEN 用量依存性の脱メチル化誘導が示された。高用量群では 15 個の CpG のうちほぼ全ての CpG に脱メチル化が誘導されたが、特に +45 ~ +89 位 の 5 つの CpG を中心に強い脱メチル化が認められた。

次に子宮内膜組織を管腔側と筋層側とに物理的に分け、GEN 投与後の部位別総計メチル化状態を検討した。低用量群では管腔側で 84.8%、筋層側で 65.0%であったのに対し、高用量群では管腔側で 42.1%、筋層側で 66.7%であり、管腔側に顕著な脱メチル化が起きていることがわかった。

GEN はマウス子宮内膜細胞において SF-1 遺伝子プロモーターの脱メチル化を誘導した。植物性イソフラボンによる成体子宮でのエピゲノム変化誘導は本研究が初めての報告であり、この知見は栄養学、公衆衛生の観点から示唆に富む結果である。

人事異動

入室:関自民（大学院生）、増田冨衣（大学院生）

業績目録

原著論文

- Sato N, Yamakawa N, Masuda M, Sudo K, Hatada I, Muramatsu M. Genome-wide DNA methylation analysis reveals phytoestrogen modification of promoter methylation patterns during embryonic stem cell differentiation. PLoS One. 6(4):e19278. 2011
- Matsukura H, Aisaki K, Igarashi K, Matsushima Y, Kanno J, Muramatsu M, Sudo K, Sato N. Genistein promotes DNA demethylation of the steroidogenic factor 1 (SF-1) promoter in endometrial stromal cells. Biochem Biophys Res Commun. 412:366-372. 2011
- Htun NC, Miyaki K, Song Y, Ikeda S, Shimbo T, Muramatsu M. Association of the catechol-O-methyl transferase gene Val158Met polymorphism with blood pressure and prevalence of hypertension: interaction with dietary energy intake. Am J Hypertens. 24:1022-1026. 2011
- Miyaki K, Htun NC, Song Y, Ikeda S, Muramatsu M, Shimbo T. The combined impact of 12 common variants on hypertension in Japanese men, considering GWAS results. J Hum Hypertens. 2011 Jun 2. [Epub ahead of print].
- Honma N, Arai T, Takubo K, Younes M, Tanaka N, Mieno MN, Tamura K, Ikeda S, Sawabe M, Muramatsu M. Oestrogen receptor-β CA repeat polymorphism is associated with incidence of colorectal cancer among females. Histopathology 59:216-224. 2011
- Otani T, Ikeda S, Lwin H, Arai T, Muramatsu M, Sawabe M. Polymorphisms of the formylpeptide receptor gene (FPR1) and susceptibility to stomach cancer in 1531 consecutive autopsy cases. Biochem Biophys Res Commun. 405:356-361. 2011
- Yamada M, Ishii T, Ikeda S, Naka-Mieno M, Tanaka N, Arai T, Kumasaka T, Gemma A, Kida K, Muramatsu M, Sawabe M. Association of fucosyltransferase 8 (FUT8) polymorphism Thr267Lys with pulmonary emphysema.J Hum Genet. 56:857-860. 2011
- Ishii T, Hagiwara K, Kamio K, Ikeda S, Arai T, Mieno MN, Kumasaka T, Muramatsu M, Sawabe M, Gemma A, Kida K. Involvement of surfactant protein D in emphysema revealed by genetic association study. Eur J Hum Genet. [Epub ahead of print] 2011
- Isagawa T, Nagae G, Shiraki N, Fujita T, Sato N, Ishikawa S, Kume S, Aburatani H. DNA methylation profiling of embryonic stem cell differentiation into the three germ layers. PLoS ONE. 6(10):e26052. 2011.
- Zhang L, Dai Y, Bian L, Wang W, Wang W, Muramatsu M, Hua Q. Association of the cell death-inducing DNA fragmentation factor alpha-like effector A (CIDEA) gene V115F (G/T) polymorphism with phenotypes of metabolic syndrome in a Chinese population. Diabetes Res Clin Pract. 91:233-238. 2011
- Daimon M, Oizumi T, Karasawa S, Kaino W, Takasse K, Tada K, Jimbu Y, Wada K, Kameda W, Susa S, Muramatsu M, Kubota I, Kawata S, Kato T: Association of the clusterin gene polymorphisms with type 2 diabetes mellitus. Metabolism Clinical and Exp. 60:815-822. 2011.
- Tohkin M, Kaniwa N, Saito Y, Sugiyama E,

Kurose K, Nishikawa J, Hasegawa R, Aihara M, Matsunaga K, Abe M, Furuya H, Takahashi Y, Ikeda H, Muramatsu M, Ueta M, Sotozono C, Kinoshita S, Ikezawa Z. A whole-genome association study of major determinants for alopecia-related Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in Japanese patients. Pharmacogenomics J. 59(2):216-224. 2011

著書・総説

1. 村松正明 「遺伝子予防医療に対する期待」 ウェルエイジングのための女性医療 太田博明編 pp 269-274 メディカルレビュー社

国内学会発表

1. 池田仁子他 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. 日本人類遺伝学会 第 56 回大会. 2011.10-12. 幕張.
2. 山田美紀他 FUT8 遺伝子 Thr267Lys 多型と肺気腫に関する研究. 日本人類遺伝学会 第 56 回大会. 2011.10-12. 幕張
3. Associations between HLA alleles and Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in Japanese patients related to allopurinol and carbamazepine. Sugiyama Emiko 他 日本薬物動態学会 第 26 回年会. 2011. 11.16-18. 広島
4. 古谷博和他 Carbamazepine 誘発性 Stevens-Johnson 症候群 (SJS) と中毒性表皮壊死症 (TEN) の日本人の遺伝的危険因子. 神経学会総会 2011.5.18-20. 名古屋
5. 鹿庭なほ子他 ゾニサミドおよびフェノバルビタール誘因性スティーブンス・ジョンソン症候群／中毒性表皮壊死症の危険因子. 日本薬学会 第 132 年会. 2012.3.28-31. 札幌.
6. 杉山永見子他 日本人におけるラモトリギン誘因性重症薬疹発症と HLA タイプとの相関解析. 日本薬学会 第 132 年会. 2012.3.28-31. 札幌.

国際学会発表

1. Muramatsu M. Genetic Tests for Common Diseases and Its Implications. BIT Life Sciences’ 2nd World DNA and Genome Day. Dalian, China.24-29 April. 2011.
2. Muramatsu M. 14th CVGAS. Seoul, Korea. 27-29 October. 2011.
3. Muramatsu M. Genetic tests for common diseases.1st Translational Science Seminar. Penang, Malaysia. 10-15 December. 2011.
4. Sato N and Sudo K: Alteration of Ucp1 Promoter Methylation by Phytoestrogen in Mouse Embryoid Body Differentiation Culture, CDB Symposium 2011, Kobe, March, 2011
5. Sato N, Yamakawa N, Masuda M, Sudo H, Hatada I and Muramatsu M: Genome-wide DNA methylation analysis reveals Phytoestrogen Modification of Promoter Methylation Patterns During Embryonic Stem Cell Differentiation, Epigenetics and Developmental Programming Conference, Newcastle upon Tyne, UK, March 2001.
6. Sato N and Sudo K: Effects of Maternal Low Protein Diet on Methylation Variation in Leptin Promoter. WT-Scientific conference “Epignomics of common disease”, Hinxton, UK, September 2011
7. Yamada M. & Ikeda S. Fucosyltransferase 8 (FUT8) polymorphism, Thr267Lys, is associated with pulmonary emphysema. CHEST Meeting 2011. Honolulu, Hawaii. 22-26 October 2011.

学内外教育活動

村松正明：山形大学医学部非常勤講師

研究費取得

1. 平成 22 年度受託研究費ヒュービットジェノミクス (株)「遺伝子の多型とその機能に係わる委託研究」研究代表者 村松正明.
2. 文部科学省科学研究費 (基盤研究 C)「ゲノムワイド関連解析を起点とするメタボリック症候群と動脈硬化の分子疫学研究」：課題番号 22590547 研究代表者 村松正明.
3. 文部科学省科学研究費 (基盤研究 C)「喫煙関連呼吸器疾患へのニコチン受容体遺伝子多型の関与の検討」：課題番号 22590845 分担研究者 村松正明.
4. 文部科学省科学研究費 (挑戦的萌芽研究)「ES 細胞を用いた着床期特有の胎児エピゲノム環境感受性の解析」：課題番号 22659070 研究代表者 佐藤恵子.
5. 文部科学省科学研究費 (若手研究 B)「日本人におけるヒト核内受容体遺伝子多型と疾患の関連研究」：課題番号 21790549 研究代表者 池田仁子.

その他

佐藤恵子「いのちが引き継ぐエピゲノム模様：環境とエピゲノムと健康について」学際生命科学東京コンソーシアム・市民講演会 2011 年 10 月

難治疾患研究所ゲノム応用医学研究部門遺伝生化分野 大学院疾患生命科学部ゲノム構造制御研究室

教授：北嶋繁孝 准教授：田中裕二郎 助教：川内潤也

研究内容

概略

生命の設計図であるゲノム情報は、最終的な機能実行分子であるタンパク質に翻訳されてはじめてその生物機能が発現される。この遺伝子発現プロセスの中で、転写反応は第一義的な調節段階である。本分野では、転写制御の共通原理の解明と、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、PolII、PolI の遺伝子制御を中核に基本的な制御と病態との関連を研究している。

1-1 転写リサイクリング因子/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アミノ酸リピート配列で酵母からヒトまで保存されリピート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Ser 2, 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。

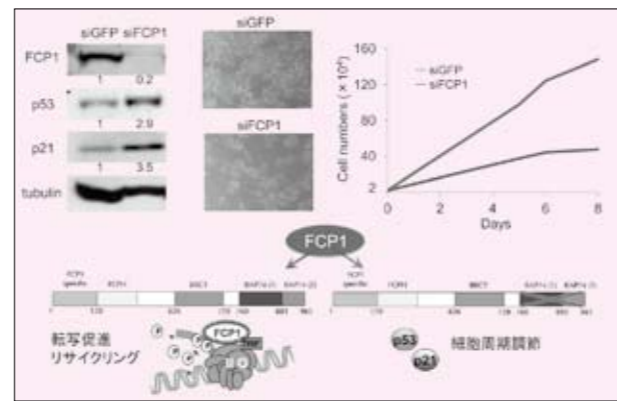


図1 脱リン酸化酵素 FCP1 の生物機能

1-2 転写伸長因子 ElonginA の Dual 機能の解析

開始に引き続く mRNA 合成伸長過程は、転写の重要な制御過程である。エロンガンは、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た。現在、ストレス応答における両活性の生物学的意義を解析している。

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、がんとの関連も数多く示唆されており、ATF3 が、ヒト前立腺がんやホジキン Reed-Sternberg 細胞で高い発現を示しがん細胞の増殖や転移能を正に制御していること、ATF3 の発現がホジキン病診断の Hallmark として有用であることもわかっている。本年度は、ATF3 研究について以下の結果を得た。

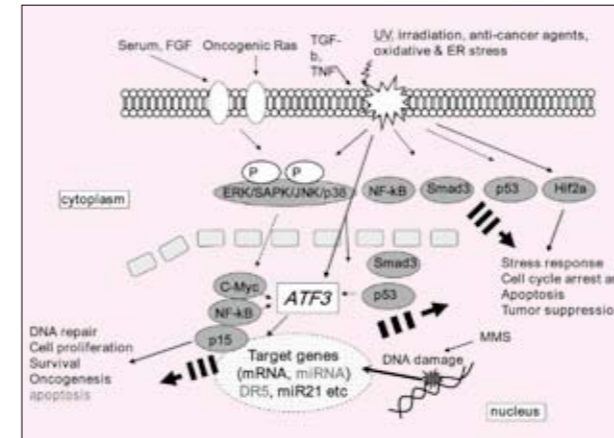


図2 ATF3 誘導のシグナルと伝達

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ご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ご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。

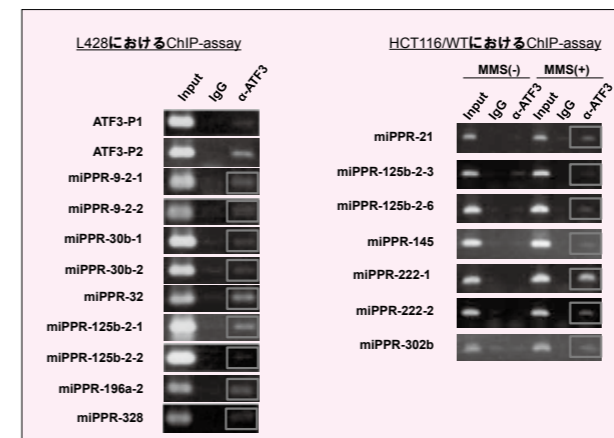


図3 ATF3 の標的 miRNA

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ことを見出している。ATF3 の Opposing role における 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て、細胞レベルおよび個体レベルでの解析をスタートした。また、ヒト大腸がん細胞においてアルキル化剤であるメタンスルホン酸メチル (MMS) によって誘導される ATF3 と、前立腺がん細胞で恒常的に発現されている ATF3 のそれぞれの標的遺伝子を網羅的に探索し、ストレス応答においては ATF3 が p53 target 遺伝子を活性化するが、ATF3 高発現がん細胞では、逆に抑制していることを見出した。ATF3 の“がん抑制機能”と“発がん機能”に p53-ATF3 axis が関与していることが分かった。

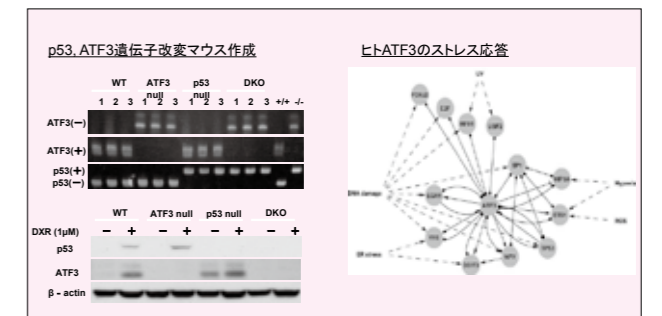


図4 ATF3 システムズバイオロジー

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 誘導薬は、難治がんの新しい治療薬として 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。

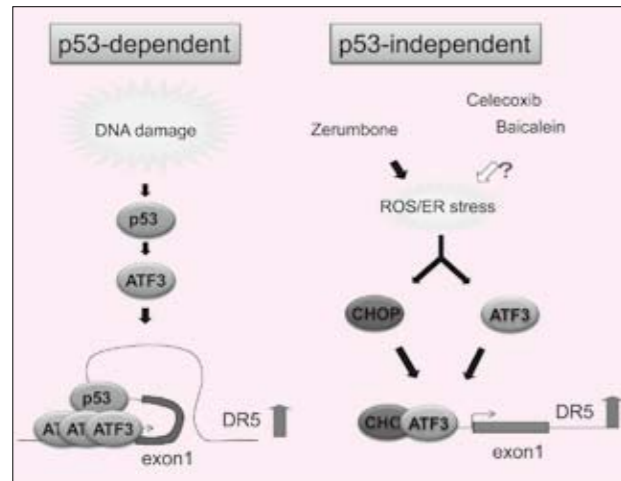


図5 ストレス応答遺伝子 ATF3 による DR5 発現制御

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

様々な酵素によるヒストン修飾の生物学的機能については、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、哺乳類細胞の ChIP-seq 解析では転写が盛んに起こっている遺伝子ほど K36 メチル化を多く受けるという、一見矛盾した結果になっている。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なっている (PLoS One, 2011)。このような二面的な機能の生物学的意義はまだ分からないが、ASH1 が転写開始点近傍に位置する (図6) ことと合わせ、転写開始周辺での正と負の制御に深く関わる事が予想される。

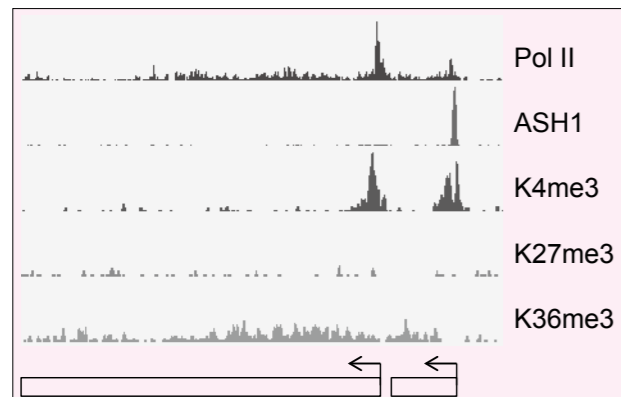


図6 ASH1 のゲノム標的

人事異動

転入：五嶋大統 (卒業研究生、北里大学)
 転出：武谷憲二 (特別研究生、九州大学大学院)、
 正木久晴 (大学院生)、佐々木かおり (大学院生)、
 本下愛子 (医歯学総合修士課程、大学院生)、
 劉 芹 (大学院生)

業績目録

原著論文

1. Tanaka Y, Nakamura A, Morioka M, Inoue S, Tamamori-Adachi M, Yamada M, Taketani K, Kawauchi J, Tanaka-Okamoto M, Miyoshi J, Tanaka H, Kitajima S. Systems analysis of ATF3 in stress response and cancer reveals opposing effects on proapoptotic genes in p53 pathway. *PLoS ONE* 6(10):e26848, 2011
2. Taketani K, Kawauchi J, Tanaka-Okamoto M, Ishizaki H, Tanaka Y, Sakai T, Miyoshi J, Y Maehara Y, Kitajima. Key role of ATF3 in p53 dependent DR5 induction upon DNA damage of human colon cancer cells. *Oncogene in press*
3. Gurzov EN, Barthson J, Marhfour I, Ortis F, Naaman N, Estevel I, Gysemans C, Mathieu C, Kitajima S, Marchetti P, Orntoft T, Bakiri L, Wagner EF, Eiziril DL. Pancreatic b-cells activate a JunB/ATF3-dependent survival pathway during inflammation. *Oncogene in press*
4. Tanaka Y, Kawahashi K, Katagiri Z, Nakayama Y, Mahajan M, Kiuoussis D. Dual Function of Histone H3 Lysine 36 Methyltransferase ASH1 in Regulation of Hox Gene Expression. *PLoS ONE* 6(11):e28171, 2011
5. Yamada K, Tamamori-Adachi M, Goto I, Iizuka M, Yasukawa T, Aso T, Okazaki T, Kitajima S. Degradation of p21Cip1 through anaphase-promoting complex/cyclosome and its activator Cdc20 (APC/CCdc20) ubiquitin ligase complex mediated ubiquitylation is inhibited by cyclin dependent kinase 2 in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 286:44057-44066, 2011
6. Braglia P, Kawauchi J, and Proudfoot NJ. Co-transcriptional RNA cleavage provides a failsafe termination mechanism for yeast RNA polymerase I. *Nucleic Acid Research* 39:1439-1448, 2011

国内学会発表

1. 川内潤也、武谷憲二、田中裕二郎、北嶋繁孝：Regulation of the p53 pathway by ATF3
 平成23年8月 薬科 がん若手研究者ワークショップ
2. 武谷 憲二、平田 学、宮城 知香、川内 潤也、田中 裕二郎、三好 淳、前原 喜彦、北嶋 繁孝：ヒト大腸がん細胞における ATF3 の Death receptor5 (DR5) 誘導機能の解析-DNA damage 誘導 DR5 発現における p53 と ATF3 の相互作用。平成23年12月、横浜 第34回日本分子生物学会
3. 宮城 知香、平田 学、武谷 憲二、五嶋 大統、川内 潤也、田中 裕二郎、北嶋 繁孝：p53 非依存性 Death receptor (DR5) 発現誘導における ATF3 の機能。平成23年12月、横浜 第34回日本分子生物学会

4. 三田村 潤、五嶋 大統、田中 裕二郎、川内 潤也、北嶋 繁孝：ストレス応答遺伝子 ATF3 と p53 による Wnt 阻害因子 DKK1 の発現制御解析。平成23年12月、横浜 第34回日本分子生物学会

5. 小高 愛未、川内 潤也、田中 裕二郎、北嶋 繁孝：PolIICTD 脱リン酸化酵素 FCP1 の細胞増殖に対する影響。平成23年12月、横浜 第34回日本分子生物学会

6. 安川 孝史、川内 潤也、高橋 秀尚、筒井 文、Ronald C Conaway3,4, Joan W Conaway3,4, : 北嶋 繁孝、麻生 悌二郎：転写伸長因子 Elongin A は ES 細胞神経分化時のレチノイン酸誘導遺伝子発現を制御する。平成23年12月、横浜 第34回日本分子生物学会

7. 井上 允、川内 潤也、田中 裕二郎、安川 孝史、麻生 悌二郎、北嶋 繁孝：ストレス反応における mammalian ElonginA の特徴と役割。平成23年12月、横浜 第34回日本分子生物学会

8. 大屋 沙織、宮本 大貴、川内 潤也、田中 裕二郎、北嶋 繁孝：新規抗 ATF3 モノクローナル抗体を用いた組織発現解析と ChIP-seq 解析。平成23年12月、横浜 第34回日本分子生物学会

9. 宮本 大貴、大屋 沙織、川内 潤也、田中 裕二郎、北嶋 繁孝：「遺伝子改変マウスを用いた p53-ATF3 制御系のシステム解析。平成23年12月、横浜 第34回日本分子生物学会

10. 安達 (玉盛) 三美、山田 一彦、飯塚 真由、安川 孝史、麻生 悌二郎、岡崎 具樹、北嶋 繁孝：CDK2 が心筋細胞における APC/CCdc20 ユビキチンリガーゼを介する p21 のユビキチン化を抑制する。平成23年12月、横浜 第34回日本分子生物学会

国際学会および海外セミナー

Kitajima S. Deciphering stress code of ATF3 and its role in cancer and anti-cancer therapy - A systems biology approach- Jilin University, Changchun, August, 2011

学内外教育活動

北嶋繁孝：本学医学部、医歯学総合大学院修士、疾患生命情報大学院修士、九州大学医学部、高知大学医学部

田中裕二郎：本学疾患生命情報教育部、医歯学総合大学院

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」

田中裕二郎 (代表)：文部科学省新学術領域研究「初期胚のヒストン修飾酵素活性をイメージングする」

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 (代表)：難研研究助成金「臨床応用を目指した ATF3 による発がんスパイラル制御機構の解明」

難治疾患研究所 ゲノム応用医学部門 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

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

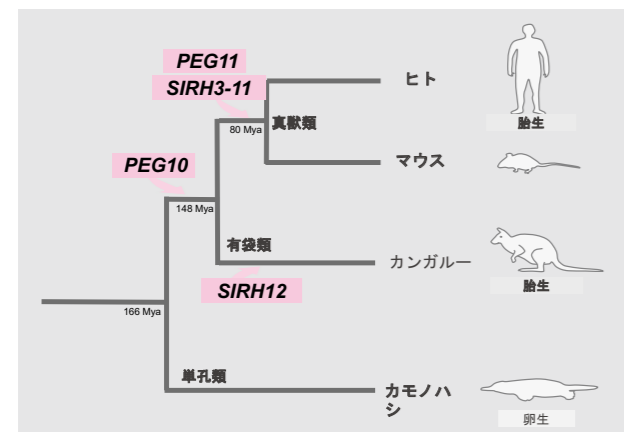


図1 哺乳類における SIRH 遺伝子群の獲得
胎生の哺乳類である真獣類と有袋類に発見された12個の SIRH 遺伝子が、いつ内在遺伝子として獲得されたのか、その時期を示している。MYA は100万年前の意味。166, 148, 80 MYA は、それぞれ1億6600万年前、1億4800万年前、8000万年前を表す。

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てきている。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、哺乳類の進化における役割を解明しようと試みている。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

ハイライト 1

哺乳類における *SIRH* 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ゾンが哺乳類の祖先に感染し、生殖細胞のゲノムに侵入した(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 が伝わるようになり、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。今回、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)。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、イグザプテーション、コオプテーションなどと呼ばれる。*SIRH* 遺伝子群以外に *PNMA* 遺伝子群などが知られており、これらを合わせると30個近くの遺伝子が真獣類、有袋類特異的に獲得されていることがわかって来ている。これら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。

している。今回、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* 遺伝子が発見した。これはオーストラリアの有袋類であるカンガルーの一種タマウワラビーで発見され、南アメリカの有袋類であるオポッサムにも共通する配列が残っていた。しかし、後者では変異によりタンパク質のコーディングが保存されていなかったことから、オポッサムでは遺伝子になり損ねた可能性が考えられる(図1: Ono *et al.* DNA Res 2011、ハイライト参照)。これにより、有袋類と真獣類は異なるセットの *SIRH* 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いと考えている。

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ツジドリーの誕生が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。昨年、理化学研究所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た。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* を片側のXからノックアウトし、X染色体不活性化を正常化させると成功率は約10倍に上昇した。今回は卵に *Xist* siRNA を導入するノックダウン法で同様の効率で体細胞クローンの産出に成功し、体細胞クローン技術の実用化が大きく前進した(Matoba *et al.* PNSA 2011)。

3. 体外受精、顕微授精のエピジェネティックな影響

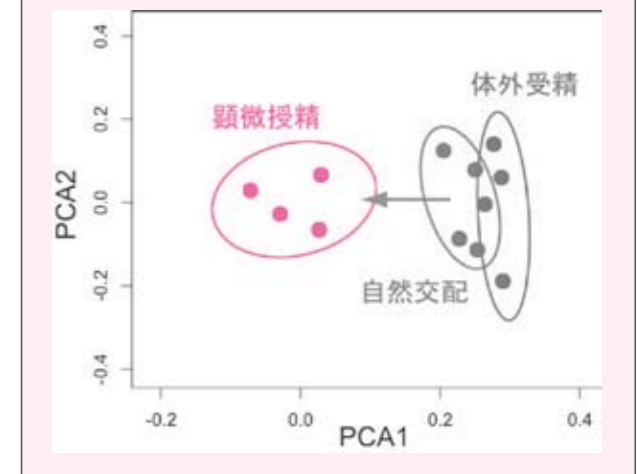
体外受精(IVF)や顕微授精(ICSI)などの生殖補助医療の件数は、近年、急速に増加している。しかし、これらの方法が、個体発生や出生後の子供の遺伝子発現にどのような影響を与えるかはわかっていない。今回、マウスをモデル動物として、精子核を直接卵子に導入する顕微授精法と通常の体外受精の2つの方法で作製したマウス新生仔の各種臓器の遺伝子発現を自然交配で産まれた新生仔と比較解析した。IVFで産まれた産仔では自然交配産仔との変化は見られなかったが、ICSI産仔で

は2%の遺伝子の発現に増減が見られた。これはどの個体にも共通してみられることからICSI技術そのもの由来による変化と考えられる(図2, Kohda *et al.* BBRC 2011)。網羅的な行動解析の結果、生後8週目ではこれらのマウスの活動量にわずかな変化がみられたが、それ以外は正常値を示した。遺伝子発現の変化は生後3ヶ月以降に著しく減少し、自然交配による出産では次世代に伝わらないことを確認した。

ハイライト 2

顕微授精で出生したマウス新生仔における遺伝子発現の変化

精子核を直接卵子に導入する顕微授精法(ICSI)と通常の体外受精(IVF)の2つの方法で作製したマウス新生仔の各種臓器の遺伝子発現を自然交配で産まれた産仔と比較した。IVFで産まれた産仔では自然交配産仔との変化は見られなかったが、ICSI産仔では2%の遺伝子の発現に増減が見られた。これはどの個体にも共通してみられることからICSI技術そのもの由来による変化と考えられる。この図はマウス新生仔脳での遺伝子発現プロフィールを主成分分析によってプロットした結果を示している。それぞれの個体を示す点は自然交配の個体と体外受精の個体では差を示さないが、顕微授精による個体は明確な分離を示した(Kohda *et al.* BBRC 2011)。



人事異動
退職：小林 慎（9月31日、MTT 特任講師） <p>採用：小林 慎（10月1日、非常勤講師）</p>

業績目録

原著論文

- Ono, R., Kuroki, Y., Naruse, M., Ishii, M., Iwasaki, S., Toyoda, A., Fujiyama, A., Shaw, G., Renfree, M. B., Kaneko-Ishino, T. and Ishino, F. Identification of SIRH12, a retrotransposon-derived gene specific to marsupial mammals. *DNA Res* **18**(4), 211-219（2011）.
- Kohda, T., Ogonuki, N., Inoue, K., Furuse, T., Kaneda, H., Suzuki, T., Kaneko-Ishino, T., Wakayama, T., Wakana, S., Ogura, A. and Ishino, F. Intracytoplasmic sperm injection induces transcriptome perturbation without any trans-generational effect. *Biochem Biophys Res Commun* **410**(2), 282-288（2011）.
- Suzuki, S., Shaw, G., Kaneko-Ishino, T., Ishino, F. and Renfree, M. B. Characterisation of marsupial PHLDA2 reveals eutherian specific acquisition of imprinting. *BMC Evol Biol* **11**(1), 244（2011）.
- Matoba, S., Inoue, K., Kohda, T., Sugimoto, M., Mizutani, E., Ogonuki, N., Nakamura, T., Abe, K., Nakano, T., Ishino, F. and Ogura, A. RNAi-mediated knockdown of Xist can rescue the impaired postimplantation development of cloned mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* **108**(51), 20621-20626（2011）.
- Suzuki, S., Shaw, G., Kaneko-Ishino, T., Ishino, F. and Renfree, M. B. The evolution of mammalian genomic imprinting was accompanied by the acquisition of novel CpG islands. *Genome Biol Evol* **3**, 1276-1283（2011）.

国内学会発表

- 石野史敏、金児－石野知子 レトロトランスポゾン由来の哺乳類特異的遺伝子群の生殖機構における機能 発生工学・疾患モデル研究会 2011年3月10日、東京大学医科学研究所。
- 石野史敏 哺乳類の個体発生におけるエピジェネティクスーゲノムインプリンティングと体細胞クローンについてーエピジェネティクスから探る発生から疾患までの制御ー第25回環境ホルモン学会 2011年6月16日、東京大学山上会議所。
- 石野史敏、小野竜一、成瀬美衣、入江将仁、黒木陽子、石井雅之、岩崎佐和、幸田尚、Marilyn Renfree、金児－石野知子 レトロトランスポゾン由来の哺乳類特異的遺伝子群 シンポジウム「転移因子の新たな機能と制御」第84回日本生化学会大会シンポジウム 2011年9月23日、京都国際会議場。
- Fumitoshi Ishino, Ryuichi Ono, Mie Naruse, Masahito Irie, Sawa Iwasaki, Masayuki Ishii and Tomoko Kaneko-Ishino. Role of domesticated genes from retrotransposons in mammalian evolution. Symposium “Mobile elements and its biological functions” The 34th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, December 13-16, PacificoYokohama, Yokohama.
- 成瀬美衣、日野敏昭、赤塚明、幸田尚、中村健司、横山峯介、小野竜一、金児－石野知子、石野史敏 レトロトランスポゾン由来の遺伝子 Sirh7 KO マウスの胎盤の解析 第34回日本分子生物学会年会 2011年12月13日－16日、パシフィコ横浜、横浜。
- 入江将仁、成瀬美衣、幸田尚、小野竜一、石野史敏、金児－石野知子 Sushi-ishi レトロトランスポゾン由来の遺伝子 *Sirh3* の機能解析 第

- 34回日本分子生物学会年会 2011年12月13日－16日、パシフィコ横浜、横浜。
- 及川真実、幸田尚、石野史敏 マイクロアレイ解析のための cDNA 増幅法の改良 第34回日本分子生物学会年会 2011年12月13日－16日 パシフィコ横浜、横浜。
- Sawa Iwasaki, Geoff Shaw, Ryuichi Ono, Shunsuke Suzuki, Marilyn Renfree, Tomoko Kaneko-Ishino, Fumitoshi Ishino, Identification of PNMA-MSI, a retrotransopson-derived gene specific to marsupial mammals. The 34th Annual Meeing of the Molecular Biology Society of Japan, December 13-16 (PacificoYokohama, Yokohama).
- 山口佑季、幸田尚、金児－石野知子、石野史敏 成体体細胞におけるインプリント領域のDNAメチル化解析 第34回日本分子生物学会年会 2011年12月13日－16日 パシフィコ横浜、横浜。
- 小野由美子、渡辺久子、幸田尚、石野史敏、入江将仁、金児－石野知子 胎児への低栄養暴露が与える遺伝子発現への影響 第34回日本分子生物学会年会 2011年12月13日－16日 パシフィコ横浜、横浜。
- Takashi Kohda, Narumi Ogonuki, Kimiko Inoue, Tamio Furuse, Hideki Kaneda, Tomohiro Suzuki, Tomoko Kaneko-Ishino, Teruhiko Wakayama, Shigeharu Wakana, Atsuo Ogura, Fumitoshi Ishino Transcriptome perturbation by intracytospermatic sperm injection in the mouse. The 34th Annual Meeing of the Molecular Biology Society of Japan, December 13-16, PacificoYokohama, Yokohama.
- Ryuichi Ono, Yoko Kuroki, Mie Naruse, Masayuki Ishii, Sawa Iwasaki, Atsushi Toyoda, Asao Fujiyama, Geoff Shaw, Marilyn Renfree, Tomoko Kaneko-Ishino, Fumitoshi Ishino. Identification of SIHR12, a retrotransposon-derived gene specific to marsupial mammals. The 34th Annual Meeing of the Molecular Biology Society of Japan, December 13-16, PacificoYokohama, Yokohama.
- 高橋沙央里、鈴木俊介、小野竜一、幸田尚、金児－石野知子、石野史敏 新規インプリンティング遺伝子スクリーニング方法の開発 第34回日本分子生物学会年会 2011年12月13日－16日 パシフィコ横浜、横浜。
- Masazumi Nishimoto, Miyuki Katano, Toshiyuki Yamagishi, Tomoaki Hishida, Masayoshi Kamon, Yoko Nabeshima, Yo-ichi Nabeshima, Yoko Kuroki, Ryuichi Ono, Fumitoshi Ishino, Hidemasa Kato, Akihiko Okuda. Eutheria-specific UTF1 gene is critical for the placental growth. The 34th Annual Meeing of the Molecular Biology Society of Japan, December 13-16, PacificoYokohama, Yokohama.

国際学会発表

- Sawa Iwasaki, Takashi Kohda, Tomoko Kaneko-Ishino and Fumitoshi Ishino. Genomic impirinting status of retrotransposon-derived *PNMA* family genes, ICC on Genomic Imprinting and Beyond 2011, September 21-23, 2011, Barcelona, Spain.
- Fumitoshi Ishino and Tomoko Kaneko-Ishino. Evolution of genomic imprinting in mammals. Symposium “On the critical issues in EvoDevo”, 44th JSDB Annual Meeting, May 21, 2011, Okinawa Convention Center（Okinawa）.
- Fumitoshi Ishino, Ryuichi Ono, Sunsuke Suzuki, Yoichi Sekita, Mie Naruse, Takashi Kohda and Tomoko Kaneko-Ishino. Role of retrotransposons in mammalian evolution -Domesticated genes for mammalian-specific

functions-, US-Japan Conference: Inflammation, Diabetes and Cancer, August 4, 2011, Beckman Research Institute of City of Hope, California, USA.

- Fumitoshi Ishino and Tomoko Kaneko-Ishino. Evolution of viviparity and genomic imprinting in mammals by retrotransposons, 15th Evolutionary Biology Meeting in Marseilles, September 27-30, 2011, Marseilles, France.
- Fumitoshi Ishino. Retrotransposon-derived genes in mammalian development and evolution. From Early Universe to Evolution of Life, Germany-Japan Round Table, December 1-3, 2011, Heidelberg University, Germany.

学内外教育活動

本学大学院生命情報科学教育部

本学大学院医歯学総合研究科

東京大学大学院医学系研究科

競争的研究費取得

- 石野史敏（代表）日本学術振興会学術創成研究「ゲノム刷込みに関連する哺乳類特異的遺伝子群の個体発生・系統発生における役割」研究代表者 石野史敏。
- 石野史敏（代表）文部科学省科研費基盤研究(S)「哺乳類特異的ゲノム機能の解析」研究代表者 石野史敏。
- 石野史敏（分担）文部科学省科研費基盤研究(S)「マウスを用いたゲノム高度可塑性因子の同定とその応用」研究代表者 小倉淳郎。
- 石野史敏（代表）：日本学術振興会 二国間交流事業共同研究「哺乳類におけるゲノムインプリンティングの進化」。
- 幸田尚（分担）文部科学省特定領域研究「生殖系列の世代サイクルとエピゲノムネットワーク」（計画研究）「核移植技術をもちいた生殖系列の全能性獲得機能の解明」課題番号 20062012 研究代表者 小倉淳郎
- 小野竜一（代表）:文部科学省特定領域研究「生殖系列の世代サイクルとエピゲノムネットワーク」（公募研究）「父性発現インプリント遺伝子 *Peg10* の機能解析と単為発生」課題番号 23013010
- 小野竜一（代表）：文部科学省科研費 若手研究 (B)「レトロトランスポゾン由来の *Peg10* による哺乳類胎生機構獲得の検証」課題番号 22770004
- 石野史敏 上原記念生命科学財団研究助成「医療技術におけるエピジェネティック制御」
- 小野竜一 住友財団研究助成「トランスポゾンを利用した哺乳類の胎生獲得」

大学院疾患生命科学部 システム情報生物学研究室 難治疾患研究所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：荻島創一

研究内容

本研究室では、主として「生命をシステムとして理解する」観点から生命科学、医学の課題解明に取り組んでいる。生命科学分野では、システム進化生物学のテーマを掲げ、生命とは「進化（複雑化）する生命分子ネットワーク」であると捉え、この「システム進化原理」のもとに生命の基本課題の解明を目指している。我々はシステム進化原理が生命科学のグランドセオリーであるとしてその構築を進めている。医学分野では、「システムとして病気を理解する」システム病態学を提唱している。

研究紹介

ハイライト（顕著な業績）

早期肝細胞癌の再発予測因子として酸化ストレスパスウェイに関与する CYP1A2 を発見

Tanaka S, Mogushi K, Yasen M, Ban D, Noguchi N, Irie T, Kudo A, Nakamura N, Tanaka H, Yamamoto M, Kokudo N, Takayama T, Kawasaki S, Sakamoto M, Arii S: Oxidative stress pathways in noncancerous human liver tissue to predict hepatocellular carcinoma recurrence: a prospective, multicenter study. *Hepatology*. 2011;54:1273-81

肝細胞癌は肝臓に発生する腫瘍のうちもっとも典型的なものである。B型・C型肝炎ウイルスやアルコール性肝炎、非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）などの慢性的な肝炎から肝硬変を経て発癌に至ることが多い。肝細胞癌は再発率が高く、肝切除術後のフォローアップは治療戦略上で非常に重要であるため、正確な再発予測マーカーの開発が急務となっている。

そこで我々は、肝胆膵・総合外科と共同研究により、早期肝細胞癌における再発予測因子の同定を試みた。まず、78症例の癌部と周辺組織（非癌部）に対して、マイクロアレイ解析により網羅的な遺伝子発現情報を取得し、再発に関わる遺伝子および臨床病理学的因子評価した。その結果、非癌部における cytochrome P450 1A2 (CYP1A2) の発現低下のみが統計的に有意な因子として選択された。さらに、多施設共同研究により収集された約 200 検体のティッシュマイクロア

レイを用いて、非癌部 CYP1A2 の免疫染色によるバリデーションを行ったところ、CYP1A2 陰性群において再発率が有意に上昇することを認めた。CYP1A2 は主要な肝代謝酵素の一つであるが、非癌部において CYP1A2 と相関する遺伝子セットを Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) により解析したところ、活性酸素種の除去に関わるペルオキシソーム関連遺伝子群が見出された。このため、早期肝細胞癌の再発には、非癌部の酸化ストレスの蓄積による DNA ダメージが関与している可能性が考えられた。将来的には、慢性肝炎や肝硬変の患者に対して CYP1A2 の発現量を調べることで、肝細胞癌のハイリスクグループのスクリーニング検査に応用可能であると考えられる。

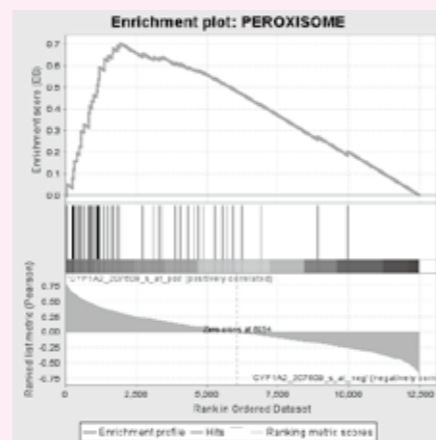


図1 CYP1A2 とペルオキシソーム関連遺伝子群の相関 (p<0.001, FDR=0.042)

1. トランスレショナル情報学をリードする新しい臨床データベース i2b2

米国 National Center for Biomedical Computing の研究拠点で開発された i2b2 データベースシステムは、全国民のパーソナルな臨床履歴を統合検索可能とする仕組みを提供する。i2b2 はデータ定義の柔軟性が高く、コホート研究や臨床試験を含む、あらゆる臨床医学のシーンにおけるデータ格納に実用されている。全米規模で収集された臨床情報のデータマイニングを可能とし、新しい生命医学知識の発見だけでなく、臨床試験の低コスト化と高速化を解決する研究の新興が期待される。i2b2 は Unicode 文字セットをベースとした Java で開発されているので、日本語文字の演算処置は可能だ。i2b2 を日本語環境へ移植し、その言語適合性を評価するとともに、東京医科歯科大学附属病院で収集した患者情報を i2b2 へ格納した。さらに日本語の臨床所見から英語の疾患名を機械抽出し、i2b2 へ取り込むパイプラインを構築した。

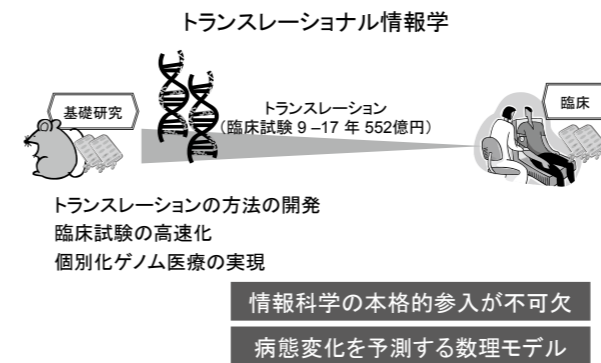


図2

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。

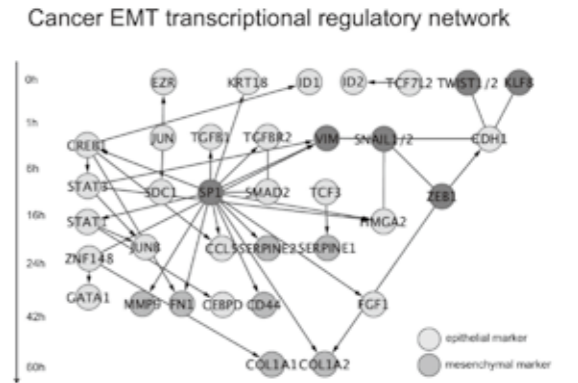


図3

3. タンパク質間相互作用ネットワークを解析する数理的アルゴリズム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して利用されつつある。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、複雑かつ巨大なネットワークを複数の単純な小さいサブネットワークに分割する方法を開発した。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、分子標的抗がん剤のターゲットのうち、約 60% が一つのサブネットワークに含まれる。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を効率よく進めることが出来ると期待される。

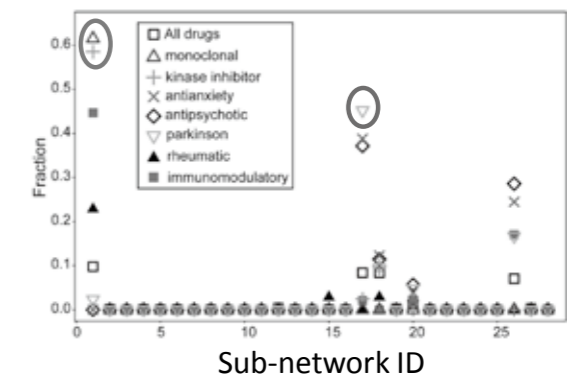


図4 サブネットワークに含まれる薬剤標的分子の割合。横軸はサブネットワークの ID 番号。縦軸は、そのサブネットワークに含まれるそれぞれの薬剤の標的分子の割合。例えば、ID 番号が 1 のサブネットワークには、kinase inhibitor と monoclonal antibody の全薬剤標的分子の内、およそ 60% が含まれている（赤丸）。ID 番号が 17 のサブネットワークには、パーキンソン病治療薬の全標的分子の内、およそ 45% が含まれている（青丸）。

業績目録

原著

- Takata H, Nagata H, Nogawa H, Tanaka H: The current shortage and future surplus of doctors: a projection of the future growth of the Japanese medical workforce, Human Resources for Health, 27:9-14, 2011
- Miyaguchi K, Fukuoka Y, Mizushima H, Yasen M, Nemoto S, Ishikawa T, Uetake H, Tanaka S, Sugihara K, Arii S, Tanaka H: Genome-wide integrative analysis revealed a correlation between lengths of copy number segments and corresponding gene expression profile, Bioinformation, 7:280-4, 2011
- Todd A Johnson, Yoshihito Niimura, Hiroshi Tanaka, Yusuke Nakamura, Tatsuhiko Tsunoda: hzAnalyzer: detection, quantification, and visualization of contiguous homozygosity in high-density genotyping datasets. Genome Biol. 12: R21, 2011
- 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, Doi:10.1002/jor.22029, 2011
- Tanaka Y, Nakamura A, Morioka S M, Inoue S, Tamamori-Adachi M, Yamada K, Taketani K, Kawauchi J, Tanaka-Okamoto M, Miyoshi J, Tanaka H, Kitajima S: Systems analysis of ATF3 in stress response and cancer reveals opposing effects on proapoptotic genes in p53 pathway. PLoS ONE, 6:e26848, 2011
- Hatano A, Chiba H, Moesa HA, Taniguchi T, Nagaie S, Yamanegi K, Takai-Igarashi T, Tanaka H, Fujibuchi W: CELLPEDIA: a repository for human cell information for cell studies and differentiation analyse. Database, Doi:10.1093/database/bar046, 2011
- Okamoto E, Miyamoto M, Hara K, Yoshida J, Muto M, Hirai A, Tatsumi H, Mizuno M, Nagata H, Yamakata D, Tanaka H: Integrated care through disease-oriented clinical care pathways: experience from Japan’s regional health planning initiatives, International Journal of Integrated Care, 11:1-12, 2011
- Tanaka S, Mogushi K, Yasen M, Ban D, Noguchi N, Irie T, Kudo A, Nakamura N, Tanaka H, Yamamoto M, Kokudo N, Takayama T, Kawasaki S, Sakamoto M, Arii S: Oxidative stress pathways in non-cancerous liver tissue to predict hepatocellular carcinoma recurrence: a prospective multicenter study. Hepatology, 54:1273-81, 2011
- 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. Doi:10.1136/gutjnl-2011-300050, 2011
- Muto T, Taniguchi H, Kushima R, Tsuda H, Yonemori H, Chen C, Sugihara Y, Sakamoto K, Kobori Y, Palmer H, Nakamura Y, Tomonaga T, Tanaka H, Mizushima H, Fujita S, Kondo T: Global expression study in colorectal cancer on proteins with alkaline isoele point by two-dimensional difference gel electrophoresis. Journal of Proteomics, 74:858-73, 2011
- Yoshida I, Sugiura W, Shibata J, Ren F, Yang Z, Tanaka H: Change of positive selection pressure on HIV-1 envelope gene inferred by early and recent samples. PLoS ONE, 6:e18630,

2011

- Ohashi K, Kurihara Y, Watanabe K, Ohno-Machado L, Tanaka H: Feasibility Evaluation of Smart Stretcher to Improve Patient Safety during Transfers, Methods Information in Medicine, 49:253-64, 2011
- Shibata J, Sugiura W, Ode H, Iwatani Y, Sato H, Tsang H, Matsuda M, Hasegawa N, Ren F, Tanaka H: Within-host co-evolution of Gag P453L and protease D30N/N88D demonstrates virological advantage in a highly protease inhibitor-exposed HIV-1 case, Antiviral Research, 9: 33-41, 2011
- Naruo Y, Nagashima T, Ushikoshi-Nakayama R, Saeki Y, Nakakuki T, Naka T, Tanaka H, Tsai S.F, Okada-Hatakeyama M: Epidermal growth factor receptor mutation in combination with expression of MIG6 alters gefitinib sensitivity. BMC Systems Biology, 5:29, 2011
- Kishimoto T, Kondo J, Takai-Igarashi T, Tanaka H: Accurate mass comparison coupled with two endopeptidases enables identification of protein termini, Proteomics, 11:485-9, 2011
- Tsukamoto S, Ishikawa T, Iida S, Ishiguro M, Mogushi K, Mizushima H, Uetake H, Tanaka H, Sugihara K: Clinical significance of osteoprotegerin expression in human colorectal cancer, Clinical Cancer Research, 17:2444-50, 2011
- Yoshitake K, Tanaka S, Mogushi K, Aihara A, Murakata A, Matsumura S, Mitsunori Y, Yasen M, Ban D, Noguchi N, Irie T, Kudo A, Nakamura N, Tanaka H, Arii S: Importin- *α* 1 as a novel prognostic target for hepatocellular carcinoma, Annals of Surgical Oncology, 18:2093-103, 2011
- Murakata A, Tanka S, Mogushi K, Noguchi N, Irie T, Kudo A, Nakamura N, Tanaka H, Arii S: Gene expression signature of the gross morphology in hepatocellular carcinoma, Annals of Surgery, 253:94-100, 2011
- Umemura H, Togawa A, Sogawa K, Satoh M, Mogushi K, Nishimura M, Matsushita K, Tanaka H, Takizawa H, Kodera Y, Nomura F: Identification of a high molecular weight kininogen fragment as a marker for early gastric cancer by serum proteome analysis, Journal of Gastroenterology, 46:577-85, 2011
- Kurihara Y, Watanabe K, Nakamura T, Tanaka H: Unconstrained Estimation Method of Delta-Wave Percentage Included in EEG of Sleeping Subjects. IEEE Transactions on Biomedical Engineering, 58:607-15, 2011
- Tun K, Menghini M, D’Andrea L, Dhar P, Tanaka H, Giuliani A: Why so few drug targets: a mathematical explanation. Current Computer-Aided Drug Design, 7:206-13, 2011
- Takai-igarash T, Akasaka R, Maruyama T, Inoue K, Suzuki K, Eguchi M, Yoshida M, Bando M, Takasaki M, Sakota M, Furukawa T, Maejima T, Konagaya A, Matsuura H, Suzumura T, Tanaka H: On experiences of i2b2 (Informatics for Integrating Biology and the Bedside) database with Japanese Clinical Patients’ data. Bioinformation, 6:86-90, 2011
- Hanada K, Hase T, Toyoda T, Shinozaki K, Okamoto M: Origin and evolution of genes related to ABA metabolism and its signaling pathways. Journal of Plant Research, 124: 455-65, 2011
- Sugita S, Kamei Y, Akaike F, Suganami T, Kanai S, Hattori M, Manabe Y, Fujii N, Takai-Igarashi T, Tadaishi M, Oka J, Aburatani H, Yamada T, Katagiri H, Kakehi S, Tamura Y, Kubo H, Nishida K, Miura S, Ezaki O, Ogawa Y: Increased systemic glucose tolerance with in-

creased muscle glucose uptake in transgenic mice overexpressing RXR *γ* in skeletal muscle. PLoS One, 6, e20467, 2011

著書

- (Editors) Tuan D. Pham, Xiaobo Zhou, Tanaka H, …, Xiuping Jia: 2011 International Symposium on Computational Models for Life Sciences (CMLS-11), Toyama City, Japan, 11-13 October 2011, American Institute of Physics
- Tanaka H, Ogishima S: Omics-Based Identification of Pathophysiological Processes Bernd Mayer (ed.), Bioinformatics for Omics Data: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, Springer Science+Business Media, LLC, 719:499-509, 2011
- Yuki Tanaka, Hiroki Nogawa, Hiroshi Tanaka: Music Therapy for Dementia Patients: Tuned for Culture Difference, Early Detection and Rehabilitation Technologies for Dementia, Neuroscience and Biomedical Applications, IGI Global 2011 ISBN:9781609605599

総説

- 田中博：論説「どこでもMY病院」構想について、埼玉国保、12月号、2-5、2011
- 田中博：日本版EHR (Electronic Health Record)の実現に向けて、情報管理, 54(9):521-32、2011
- 田中博:(座談会)特集I　ITコミュニケーションと医療の未来「医療は、どうITを活用すべきか」、保険診療、11月号、40-51、2011
- 田中博：ITによる地域医療連携に診療所が積極的に参加する意義、月刊新医療、9月号、24-28、2011
- 田中博：医療ITの現状と将来　医療再生にはIT化が必須、DRUG STORE NEWS, 8月号、33、2011
- 田中博：東日本大震災の復興後の医療IT体制は如何にあるべきか、デジタヘルス On line、7月28日 up、2011
- 田中博:医療と介護における情報の展開、病院、6月号、424-428、2011
- 田中博：ITは効率化的手段ではなく医療再生に不可欠な基盤である、集中、4月号、54-56、2011
- 田中博：地域医療の全国的な連携に向けて　医療再生へのITの寄与の可能性と「地域医療福祉情報連携協議会」設立、月刊新医療、2月号、62-68、2011
- 田中博：病気を「システムで解く」オミックス医療の可能性、JMS、2月号、30-31、2011
- 田中博：患者情報基盤の確立で生涯継続的な疾患管理を、Medical Tribune, 44:26、2011

国際学会

- Tanaka H: Systems Pathology and its Application to Cancer, 3rd Symposium on Systems and Synthetic Biology (TriSys 2011), Suzhou China, Dec 2011
- Tanaka H: Systems Pathology and its Application to Cancer, China-Japan Symposium on Cancer Research, Shenzhen China, May 2011
- Niimura Y: Diversity of Olfactory Receptor Gene Repertoires among 38 Mammals, Penn State SMBE Symposium on Molecular and Genomic Evolution, March 19-20, 2011, State College, PA, USA
- Niimura Y: Diversity of Olfactory Receptor Gene Repertoires among 38 Mammals, The 20th CDB Meeting Molecular Bases for Evolution of Complex Traits, February 23-24, Kobe, 2011
- Niimura Y and Matsui A: Diversity of

- Olfactory Receptor Gene Repertoires among 38 Mammals, SMBE annual meeting, July 26-30, Kyoto, 2011
- Ogishima S, Tanaka H: Inference of the master regulators in the gene regulatory network of Alzheimer’ s disease progression, Asia Pacific Bioinformatics Conference, Korea, Jan 11-14, 2011
- Ogishima S, Tanaka H: Inference of Disease Attractors and Gene Regulatory Network of Disease Progression. CDB Symposium, Kobe, Mar 14, 2011
- Ogishima S, Kikuchi M, Miyashita T, Kuwano R, Tanaka H: Network-based inference of signature genes of Alzheimer’ s disease progression. International Conference on Systems Biology, Germany, Aug 28-Sep 1, 2011
- Hase T, Tanaka H, Niimura Y: Difference in gene duplicability causes the difference in overall structure of protein-protein interaction networks among eukaryotes. Young Researchers Conference on Evolutionary Genomics, National Center for Sciences Building, Tokyo, Aug 2011
- Kishimoto T, Kondo J, Takai-Igarash T, Tanaka H: Terminal proteomics for biomarker research of plasma proteome, 59th ASMS Conference on Mass Spectrometry conference, Denver, May 2011

国内学会

- 長谷武志：タンパク質間相互作用ネットワークの構造、進化、そして、薬剤標的分子の探索への応用、CMRU研究会「ネットワークから見る生命」、仙台、2011年12月
- 前田萌季：神経膠芽種における intronic microRNA 発現量と近傍遺伝子発現量の相関解析、第34回日本分子生物学会年会、横浜、2011年12月
- Subati S, Mogushi K, Yasen M, Tanaka H: Analysis of aberrant DNA methylation in hepatocellular carcinoma, 第34回日本分子生物学会年会、横浜、2011年12月
- 任鳳蓉、吉田いづみ、田中博：SIV/HIV-1Vpu 遺伝子の進化に関する研究、第25回日本エイズ学会、東京、2011年12月
- 荻島創一、菊地正隆、宮下正哲、桑野良三、田中博：アルツハイマー病のシグネチャ遺伝子の遺伝子調節ネットワークの疾患アトラクターとしての推定、日本分子生物学会、横浜、2011年12月
- 菊地正隆、荻島創一、田中博:アルツハイマー病の進行にともなう遺伝子発現のネットワーク解析、日本分子生物学会、横浜、2011年12月
- 勝田江朗、荻島創一、田中博：TGF *β* により刺激誘導した肺腺癌細胞の上皮間葉転換特異的な遺伝子とその遺伝子調節ネットワーク、日本分子生物学会、横浜、2011年12月
- 宮本直、荻島創一、田中博：ES細胞からの神経分化における転写調節ネットワークとその発現ポテンシャル場の推定、日本分子生物学会、横浜、2011年12月
- 高井貴子.：トランスレーショナル・インフォマティクスの進展、第31回医療情報学連合大会、鹿子島、2011年11月
- Tanaka Y, Takai- Igarash T, Tanaka H, Yura K. Classification of Steroid-Binding Proteins Based on Residue Propensity in Molecular Interactions. CBI/JSBi 2011 合同大会神戸、2011年11月
- 飯島久美子：肝細胞がんにおけるMAGE-D1およびD4の発現とその予後・再発予測マーカーとしての可能性、第70回日本癌学会学術総会、名古屋、2011年10月
- Yasen M：cDNA マイクロアレイによりメチル化感受性遺伝子発現プロファイリングの構

築、第70回日本癌学会学術総会、名古屋、2011年10月

- 宮口健：大腸癌肝転移に関わるゲノム異常および遺伝子発現の統合解析、第70回日本癌学会学術総会、名古屋、2011年10月
- Yuki Tanaka, Hiroki Nogawa, Hiroshi Tanaka：Music therapy with Japanese music for dementia patients; cerebral blood flow analysis by FFT、第12回日本早期認知症学会大会 東京、2011年2月

他8件

招待講演

- 田中博：オミックス医療からシステム分子医学へ、第31回日本医療情報学連合大会　特別セッション、2011年11月
- 田中博：疾患システムバイオロジーの現状と将来、CBI/JSBi2011合同大会、神戸、2011年11月
- 田中博：医療、健康、介護、生活支援サービスが一体的に提供される地域包括ケアの実現と自治体の果たすべき役割、日経BPセミナー　医療・健康・介護の未来と自治体が担うべき役割、東京、2011年10月
- 田中博：災害時および復興後の医療IT体制のグランドデザイン、HCIF 第10回事例研究部会・第7回治験IT化部会、東京、2011年9月
- 田中博：地域医療連携と震災復興後の医療IT体制、「震災復興と医療ICTネットワーク」講演会、宮城、2011年8月
- 田中博：ゲノム・オミックス情報の臨床応用について－「個別化医療」と「先制医療」を目指して－、臨床ゲノム医療学会設立総会特別講座、東京、2011年8月
- 田中博：メタボロミクスによる新規バイオマーカーの発見、第2回オミックス定期講演会　バイオマーカーとオミックスシンポジウム、東京、2011年7月
- 田中有希、田中博、野川裕記：音楽に対する生体反応の解析 - 音楽学・工学・医学を融合させた新たな解析手法の開発、第145回ファジィ科学シンポジウム、東京、2011年7月
- 田中博：オミックス・サイエンスの現状と疾患への応用、第52回日本神経病理学会総会学術研究会、京都、2011年6月
- 田中博：国際動向と日本版EHR、第28回日本医学会総会、東京、2011年4月
- 田中博：地域医療連携とEHR、第10回北海道広域医療連携研究会、札幌、2011年2月
- 田中博：地域医療の連携に向けて、平成22年度島根県自治体病院開設者協議会・全国自治体病院協議会島根県支部合同研修会、島根、2011年2月
- 新村芳人、「匂いの遺伝学」、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2回－、2011年10月
- 荻島創一、田中博：先制医療のためのバイオマーカーのシステム生物学的アプローチによる探索、日本バイオインフォマティクス学会 第3回応用システムバイオロジー研究会、九州、2011年6月27日
- 他16件

研究助成金

- 田中博（代表）：厚生労働科学研究補助金　地域医療基盤開発推進研究事業「日本版EHRを目指した地域連携電子化クリティカルパスにおける共通形式と疾患別項目の標準化に向けた研究」
- 田中博（代表）：文部科学省委託事業　戦略的 大学連携支援プログラム総合的連携型（区分B）「学際生命科学東京コンソーシアムによる全人的大学院人材育成拠点の確立」
- 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

疾患の分子病理理解に基づく診断・治療へ向けた新技術の創出、ブルキンエ細胞変性の分子病態に基づく診断・治療の開発」

- 田中博（分担）：文部科学省科学研究費補助金基盤研究B「超音波医学を駆使した慢性肝炎および非アルコール性脂肪性肝炎の非侵襲的診断法の開発」
- 田中博（代表）：財団法人JKA　自転車等機械工業振興事業に関する補助金「平成23年度音楽を利用した有効な自転車トレーニング効果の実証実験補助事業」
- 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）：科学研究費補助金 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」

学会主催

国内

- 田中博：オミックス医療研究会シンポジウム　創業PG x分科会&データベース分科会 先制医療と個別化医療が拓く未来、理化学研究所（横浜）、2011年12月26日
 - 田中博：オミックス医療研究会　第2回オミックス定期講演会　バイオマーカーとオミックスシンポジウム、歯学部特別講堂、2011年7月7日
 - 田中博：平成22年度厚生労働科学研究事業報告　公開成果報告会　特別講演会「日本版EHRを目指した地域連携電子化クリティカルパスにおける共通形式と疾患別項目の標準化に向けた研究」、1号館9階講堂、2011年6月13日
 - 田中博：日本バイオインフォマティクス学会第2回応用システムバイオロジー研究会、京都大学化学研究所、研究会副査、2011年3月9日
 - 田中博：地域医療の全国的な連携に向けて　地域医療福祉情報連携協議会発足記念シンポジウム、東京医科歯科大学 M & D タワー 2階、会長、2011年1月28日
- 他2件

国際

Yoshihito Niimura: Young Researchers Conference on Evolutionary Genomics. Aug 1-2, 2011, Tokyo

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

特記事項

田中博：テレビ出演　FNNスーパーニュース “被災地民間医院の再建　足りない「ヒト」と「カネ」” 2011.10.16 放送

難治疾患研究所 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 ファミリーの一角である p63 について、ストレス応答性や扁平上皮癌細胞における高レベル発現の病態学的な意義解明をも目指している。

研究紹介

1. 扁平上皮癌細胞の p63 による増殖抑制

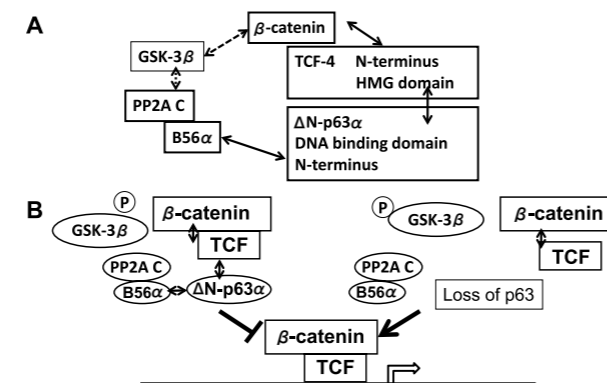
癌抑制遺伝子 p53 ファミリーは p53 (公式名 TP53), p63 (TP63), p73 (TP73) の3つの遺伝子で構成され、それらから産生されるタンパク質は、(1)アミノ酸配列・ドメイン構造、(2)共通の標的ヌクレオチド配列に結合して遺伝子発現を活性化する、など類似した性質を持っている。しかしながら p63 はがん抑制タンパク質として機能するよりは、むしろ胚発生において外胚葉性上皮組織や関連する腺組織の形成に不可欠であることが明らかにされている。がん細胞株やがん組織においては、頭頸部などの扁平上皮がん、基底細胞がん、乳腺上皮がんなどで、非常に高頻度に正常型 p63 が高レベル発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

扁平上皮癌細胞株で siRNA により p63 を消去すると

細胞増殖が抑制される。この機構を遺伝子発現調節とタンパク質リン酸化シグナルの両面から以下のように検討した。

p63 (TP63) は皮膚、口腔などの重層上皮の基底層ケラチノサイト幹細胞に発現し、増殖能と上皮分化能の維持に不可欠である。また、高分化型の扁平上皮癌で高レベル発現し、浸潤癌への進行を抑制している。その機構の一つとして、ケラチノサイト特異的な TGF- β シグナル伝達系との転写レベルでの相互作用があることを最近報告した (Fukunishi N. Neoplasia. 2010 12:969)。p63 による直接的な転写調節機構とは別に、最も多量に存在する Δ Np63 α アイソフォームが脱リン酸化酵素 (PP2A) と結合して、glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) 活性を調節し、 β -catenin を調節するとの報告 (Patturajan, M. Cancer Cell, 2002, 1:365) や、 Δ Np63 α が核内で β -catenin を抑制するとの報告 (Drewelus I. Cell Cycle, 2010, 9:580) がある。実際、扁平上皮癌細胞株で p63 をノックダウンし、発現プロファイル解析を行ったところ、MMP7、MITF、TGFB2 などの β -catenin により誘導されることが知られている遺伝子の発現上昇が見られた。細胞質での GSK-3 α のリン酸化の変化や β -catenin の核移行の促進はなかったが、p63 ノックダウンにより核内 GSK-3 β (Ser9) リン酸化が促進 (GSK-3 β の不活化) した。核内で Δ Np63 α は PP2A と共沈していたが、p63 ノックダウンにより PP2A との共沈は失われ、脱リン酸化酵素活性の低下が見られた。以上のことから、 Δ Np63 α は核内で PP2A と結合して GSK-3 β のリン酸化



Working hypothesis: suppression of β -catenin-induced gene expression by complex formation of β -catenin/TCF/GSK-3 β /PP2A/p63.

を抑制 (活性化) し、 β -catenin/TCF (LEF) による遺伝子発現を抑制する機構があると考えられた。

2. 黒色腫に特有の転写制御因子 MITF-M によるヒト内在性レトロウイルス K LTR の活性化

ヒトと旧世界霊長類ゲノムには内在性レトロウイルス配列が存在し、この配列が進化、再生及び発癌に関係するものと考えられる。人間の内在性レトロウイルス (HERV) K は、5'LTR-gag-pro-pol-env-rec/np9-3'LTR 配列を持ち、100 万～500 万年前ヒトゲノムに統合されたもので、最も新しい内在性レトロウイルスである。黒色腫・乳がんと奇形癌における HERV-K の高表現が報告されているが、LTR と組織特異的な活性化のメカニズムははっきりしない。我々は、黒色腫細胞 (MeWo) における HERV-K 表現を胚腎臓由来 (HEK293) 細胞と比較研究した。クローン化した HERV-K (HML-2. HOM) LTR は、transactivation 活性測定や、変異導入によりその性質を詳細に調べた結果、5' RACE 法によって、LTR で複数の転写開始点 (Inr) が存在することを見出した。さらに HEK293 と MeWo には、異なる転写開始点が存在することが判明した。最も活性の強いと思われる転写開始点は、TATA ボックスと3つの MITF モチーフを持っていた。染色体 HERV-KLTR もクローン化した LTR を細胞に導入したものも、MITF-M (MITF の黒色腫に特有のアイソフォーム) を HEK293 細胞に導入すると、強く活性化した。MITF と HERV-K core 抗原の共発現が、網膜色素性上皮で見られた。しかし悪性黒色腫細胞群 (MeWo, G361 と SK-MEL-28) では通常メラニン細胞と比較して強い HERV-K 発現を示したが、MITF-M mRNA のレベルには差異は見られなかった。このように、MITF-M は HERV-K LTR の色素細胞系譜に特有の機能発現の必要条件である場合があり、悪性黒色腫では高発現していることが分かった。

業績目録

原著論文

Activation of the long terminal repeat of human endogenous retrovirus K by melanoma-specific transcription factor MITF-M
Iyoko Katoh, Anna Mirova, Shun-ichi Kurata, Yasushi Murakami, Kenji Horikawa, Natsuko Nakakuki, Takunobu Sakai, Kunihiko Hashimoto, Ayako Maruyama, Takaaki Yonaga, Nahoko Fukunishi, Kohji Moriishi and Hirohisa Hirai
Neoplasia 2011 13(11):1081 - 1092

学会発表

扁平上皮癌での p63 による核内 GSK-3 β シグナルを介した β -catenin の制御
加藤伊陽子、福西菜穂子、畑隆一郎、井川洋二、倉田俊一
第70回日本癌学会学術総会 名古屋

p63 による核内 GSK-3 β を介した β -catenin 依存性遺伝子発現の制御
倉田俊一、福西菜穂子、畑隆一郎、加藤伊陽子
第84回日本生化学会大会 京都

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 分担
基盤研究 (B) 新規癌抑制性ケモカイン BRAK/CXCL14 の発現制御と腫瘍抑制の分子機構

難治疾患研究所 プロジェクト研究室

難治病態研究部門

助教 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。

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”

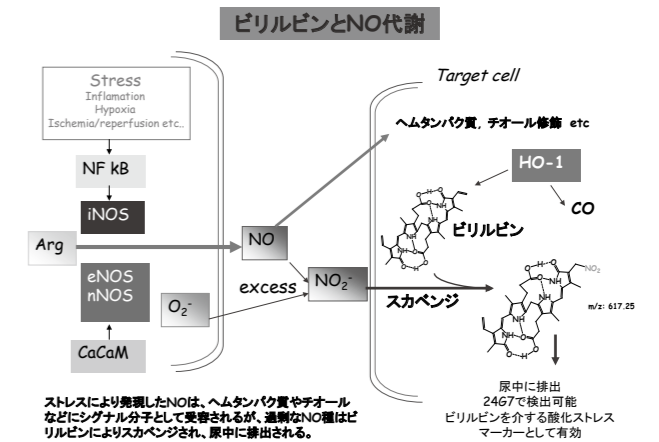
ビリルビンは生体内における第二の抗酸化剤として、低酸素、虚血再灌流、サイトカインや心理的ストレスのような酸化ストレスによって誘導された活性酸素種(ROS)を消去する。ビリルビンの産生はROSにより誘起されるヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)の酵素活性に律速である。既に我々は、ROSがビリルビンのテトラピロール構造を酸化的に分解し、その代謝性中間体である“バイオピリン”が尿に排出されることを明らかにしている。これまでに発見されたバイオピリン類はすべてビリルビンのモノピロール骨格の連結が減少していった分解物のみであり、そのトリガーはOHラジカル、O2ラジカルである。一方、強力なROSであるNO(一酸化窒素)に対してビリルビンが作用した痕跡は見つかっておらず、ROSに対するビリルビンによる抗酸化防御機能の包括的な解明は看過されてきた。ビリルビンは生体内における第二の抗酸化剤として、低酸素、虚血再灌流、サイトカインや心理的ストレスのような酸化ストレスによって誘導された活性酸素種(ROS)を消去する。

このように活性酸素やフリーラジカルによる酸化ストレスは、老化、動脈硬化、癌など多くの疾患に関与している重要な因子である。また、心理・社会的ストレスによっても中枢支配による生体のホメオスタシスを乱され、特に細胞内レドックス制御の破綻により、酸化ストレスを生じ病態発現への引金となっている。そこで、ヘム代謝研究の過程で開発した抗ビリルビン抗体(24G7)を用いて、酸化ストレス時に生じるバイオピリン(bio-

pyrrin)(ビリルビン酸化生成物質)を“酸化ストレスマーカー”の指標として測定する。このバイオピリンの生理学的および臨床的意義をストレスの関連した分野、例えば、外科、循環器内科、精神神経内科、心療内科、産業精神衛生、医薬品開発および市販後医薬品調査(post marketing surveillance: PMS)など様々な領域で検討し、個人の健康管理にも利用可能な尿で測定するストレスチェッカーの開発を行なっている。

今年度の研究方針について；

- (1) ヒト尿中において体内の酸化ストレス(心理的ストレス、虚血性心疾患、脳梗塞、手術侵襲など)を簡単に測れるストレス・チェッカー(ICC: immunochromatography checker; イムノクロマトチェッカー)を民間と共同で開発しており既にプロトタイプを完成させている。
- (2) ヒト尿中に、バイオピリンの分子種の一つとして、NOラジカルおよびパーオキシ・ナイトライト(NO-O2・)と反応して生成した新規化合物であるニトロ化ビリルビン(NO2-bilirubin)を発見した。この事実は、活性化窒素酸化物の代謝や分解解毒にビリルビンが重要な役割を演じている可能性をバイオピリンという分子レベルで証明している。
- (3) ラットを用いて、バイオピリン測定による心臓移植後急性拒絶反応での酸化ストレスの動向と解析を行なう。その結果、バイオピリンは心臓移植後の拒絶反応モニタリングとして極めて有用性が高いと評価された。この成果は、外科領域でトップジャーナルなAmerican Journal of Transplantationに掲載された。
- (4) (株)日立ハイテ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(NO2-bilirubin)であることを確認した。
- (5) ROS生成メディエーターとして作用する微量元素とビリルビン代謝系とのクロストーク解明：高感度微量元素測定キットの開発(AKJ Global Tech)。
- (6) 抗ビリルビンモノクローナル抗体24G7(mAb 24G7)のエピトープの完全解明。



ゲノム応用医学研究部門

助教 左雨秀治

本年は、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、三宅麻穂子と吉田美樹子卒研究生が4月から卒業研究のため研究に参加した。研究課題は「アスコルビン酸大量投与による血液凝固能への影響」でSD系オスラットにヒト大量投与量の2倍量のアスコルビン酸を腹腔内に投与し、60分後に心臓穿刺により血液を採取し、血液凝固能を自動解析装置で解析したが正常群と高濃度ビタミンC投与群で大きな差は認められなかった。この原因としては、ヒトでは、静脈内点滴投与で時間を掛けて投与しているのに対し今回の実験では、腹腔内に一回に大量投与したもの、さらには30分後と短時間採血している点など改善の余地があった。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オスマウスに漢方薬を配合した高脂肪飼料を6週間飼育させ、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で比較すると有意に高脂肪群に比べて漢方薬配合群が低値を示した。現在、血中脂質の変化について解析中である。また、漢方薬に配合されている各生薬の脂質代謝への影響についても動物実験を行っている。他には、フェルラ酸の薬剤多様性についての原著を発表した。

准教授 窪田道典

言語野のように大脳皮質機能に左右差があることはよく知られているが、他の機能についてどのような違いがあるかに関しては、分かっていないことが多い。特に、聴覚野などの皮質感覚野や運動野などの皮質領野において、具体的にどのような左右差があるかということに関しては、未だ不明な点が多い。そこで、今回は音の強度を変えて、聴覚皮質の応答を記録し、大脳皮質聴覚野の左右差を検討した。

種々の大脳皮質領域の活動を調べるために、時間的

連携研究部門・その他

間的な解像度にすぐれている電位感受性色素を用いたオプティカルイメージング法を適用し、左右のモルモット大脳皮質聴覚野から応答を記録した。刺激には、周波数2kHz, 4kHz, 8kHz, 16kHzの純音を使用し、音圧を変化させた (55, 65, 75 dB SPL)。実時間オプティカルイメージング法のために、蛍光性電位感受性色素であるRH795を用いて染色した後、左右の一次聴覚野 (AI 野) から記録を行った。

音圧が 55 dB SPL の時、純音に対する応答は、最初、

等周波数帯の腹側方向に現れ、その後、等周波数帯に沿って広がった。音圧を高くすると、応答が最初に現れる部位は、背側方向に移動し、その後、音圧が低い場合と同様に、等周波数帯に沿って広がった。この最初の応答部位の空間的移動は、右の聴覚皮質よりも左の聴覚皮質の方でより多く生じた。この結果は、左の聴覚皮質は、右の聴覚皮質より広い領野を持つことと関係している可能性がある。

業績目録	
原著論文	
Irie T, Ito K, Ozasa H, Noda Y, Ikeda S, Tanaka S, Arai S, Horikawa S. Splenic artery ligation: A protection against hepatic ischemia/reperfusion injury in partially hepatectomized rats. <i>Hepatology Research</i> in press	
Eto K, Noda Y, Horikawa S, Uchida S, Sasaki S. Phosphorylation of aquaporin-2 regulates its water permeability. <i>J. Biol. Chem.</i> 285:40777-40784, 2010.	
Complex of branched cyclodextrin and lidocaine prolonged the duration of peripheral nerve block. <i>Journal of Anesthesia</i> 2009, 23, 295-297. Suzuki R., Arai YCP., Hamayasu K., Fujita K., Hara K., Yamaguchi T., Sasaguri S.	
Monitoring of urinary biopyrrins after rat cardiac transplantation. <i>Journal of Surgical Research</i> 2009, 151 (2), 266. Maeda H., Yamamoto M., Radhakrishnan G., Nakagawa A., Yamamoto M., Okada H., Yamaguchi T., Sasaguri S.	
Biphasic elevation of bilirubin oxidation during myocardial ischemia reperfusion. <i>Circulation Journal</i> 2008, 72(9), 1520-1527. Yamamoto. M., Maeda H., Hirose N., Yamamoto M., Nakagawa A., Radhakrishnan G., Nakagawa A., Yamamoto M., Okada H., Yamaguchi T., Sasaguri S.	

Bilirubin oxidation provoked by nitric oxide radicals predicts the progression of acute cardiac allograft rejection. *American Journal of Transplantation* 2007, 7 (8), 1897-1906. Yamamoto M., Maeda H., Hirose N., Radhakrishnan G., Katare R.G., Hayashi Y., Rao P Lee G.H., Yamaguchi T., Sasaguri S.

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* 3, 41-45, 2010 (2011 年発行)

Sassa S, Okabe H, Nakayama A, Suzuki S, Kudo H, Sakamoto S. Pharmacological variety of ferulic acid. *Bunkyo J Health Sci Tecno*l 4, 1-6, 2011.

総説

野田裕美, 江渡加代子, 堀川三郎, 佐々木成. アクアポリン複合体制御のダイナミクス. 遺伝子医学 MOOK トランスポートソーム：生体膜輸送機構の全体像に迫る－基礎・臨床・創薬応用研究の最新成果. pp.238-243, 金井好克編集, メディカ

ルドゥ社, 2011.

野田裕美, 江渡加代子, 堀川三郎, 佐々木成. アクアポリン2の細胞内ダイナミクス. バソプレシン受容体拮抗－その基礎と臨床－. pp.61-70, 折田義正監修, 和泉徹, 石川三衛編集, メディカルレビュー社, 2011.

「広範囲血液・尿化学検査、免疫学的検査 (1)」バイオピリン 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)」ビリベルジン 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.

学会発表

江渡加代子, 野田裕美, 堀川三郎, 佐々木成. 水チャネルアクアポリン2はリン酸化で水透過性が制御される. 第21回バソプレシン研究会, 東京, 2011年1月.

江渡加代子, 野田裕美, 堀川三郎, 内田信一, 佐々木成. 水チャネルアクアポリン2はSer 256のリン酸化で水透過性が制御される. 第54回日本腎臓学会学術総会, 横浜, 2011年6月.

入江工, 中村典明, 伴大輔, 野口典男, 工藤篤, 田中真二, 有井滋樹, 堀川三郎, 肝硬変合併肝臓手術に対する脾摘の効果－臨床と動物実験モデルでの検討. 第111回日本外科学会定期学術集会, 東京, 2011年5月26日.

伊東浩次, 平沼進, 堀川三郎, 有井滋樹. 非必須アミノ酸が肝再生に与える影響について. 第111回日本外科学会定期学術集会, 東京, 2011年5月26日.

第84回日本生化学会大会, 国立京都国際会館, 2011, 9, 22. “炎症反応におけるNOとantioxidantとしてのビリルビンの作用：尿中ニトロ化ビリルビンの生成。”岩淵拓也, 平野秀典, 塩地出, 末松 誠, 杉本昭子, 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.

第111回日本外科学会定期学術集会, 紙上開催(東京), 2011. 5, 26-28. “酸化ビリルビンにより評価された冠動脈バイパス術周術期の酸化ストレス動態。”山本正樹, 西森秀明, 福富敬, 割石精一郎, 前田博教, 山口登喜夫, 笹栗志朗.

第73回日本循環器学会年会, 京都, 2010. 3, 5-7. “The time course and distribution of oxidative

stress reflected by bilirubin oxidation after myocardial ischemia reperfusion (2)” Masaki Yamamoto, Hironori Maeda, Nobuyuki Hirose, Morio Yamamoto, Aimi Nakagawa, Geethalaksh Radhakrishnan, Takayuki Sato, Tokio Yamaguchi, Shiro Sasaguri.

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

“Bilirubin Oxidation Reflects the Influence of Nitric Oxide after Myocardial Ischemia Reperfusion.” American College of Surgeons 96th Annual October 3-7, 2010. Masaki Yamamoto, Hideaki Nishimori, Takashi Fukutomi, Seiichiro Wariishi, Takayuki Sato, Tokio Yamaguchi, Shiro Sasaguri.

Hosokawa Y, Kubota M, Sugimoto S, Horikawa J. Sound pressure sensitivities along the frequency band in the primary auditory cortex of guinea pigs observed by optical recording. *J Physiol Sci*, Vol. 61, Suppl. 1, S179 (2011).

招待講演

山口登喜夫

1. 日本酸化ストレス学会関東支部会 招待講演 2011年12月10日 東京
 2. 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”

学内外教育研究活動

山口登喜夫

1. 高知大学医学部 非常勤講師 医学部講義 2011年度
2. 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
3. 文京学院大学保健医療技術学部 非常勤講師
4. 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, 2011年11月18日

難治疾患研究所 連携研究部門 病態発現機構研究部門

教授：宮野 悟 准教授：井元清哉

研究の内容

難治疾患の病態は複数の遺伝子の制御異常が複雑に相互に影響し合った状態で、システムとしての統合的制御から逸脱した状態であることが明白になってきた。一方、先端的ゲノムシーケンスや網羅的リン酸化プロテオーム解析技術などの開発により大量のオミクスデータが蓄積されてきている。これら超多次元・超ヘテロな生命科学情報をスーパーコンピュータを用いた最先端計算科学戦略や情報処理技術を駆使して、大量シーケンス情報の処理・解析、情報の抽出、構造化、そしてシミュレーションを行い、生体・生命システムの破綻の仕組みを明らかにする。これにより、従来のアプローチでは見えてこなかった難治疾患の分子パスウェイやネットワークが描出され、疾患形成の鍵分子を明らかにすることが可能になると予想される。

当該部門では、難治研の様々な分野と連携して、生命をシステムとして読み解くことで得られた情報をもとに、難治疾患の病態を解明し、それら成果を創薬や治療法開発へと発展させる。

2011年はEMTで変化する大規模遺伝子ネットワークを1024コアで3週間かけて計算し(図1)、ネットワーク解析により(図2) KLF5などEMTを引き起こす新たな遺伝子を発見した。

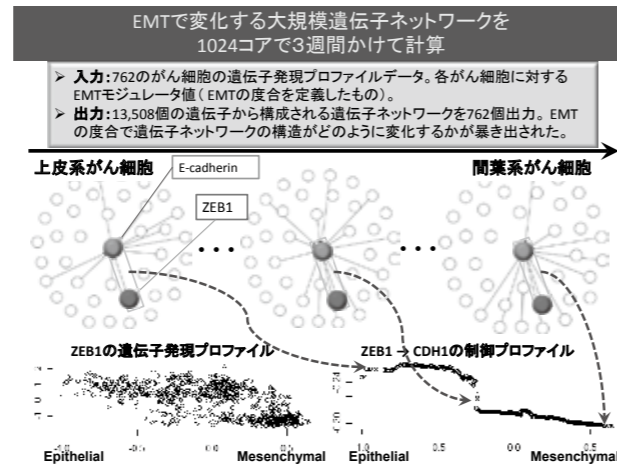


図 1

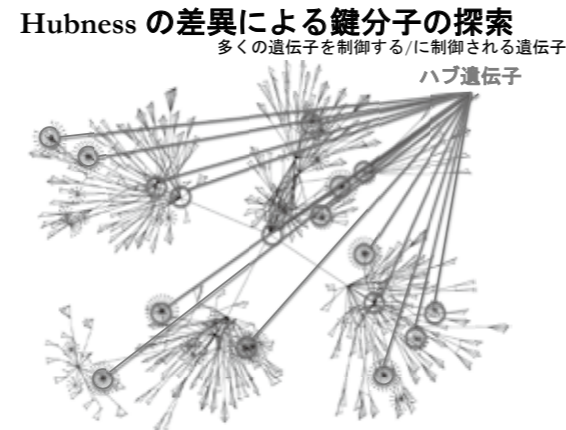


図 2

業績目録

1. Furu M, Kajita Y, Nagayama S, Ishibe T, Shima Y, Nishijo K, Uejima D, Takahashi R, Aoyama T, Nakayama T, Nakamura T, Nakashima Y, Ikegawa M, Imoto S, Katagiri T, Nakamura Y, Toguchida J, Toguchida. Identification of AFAP1L1 as a prognostic marker for spindle cell sarcomas. *Oncogene*. 30 (38): 4015-4025, 2011.
2. Hurley D, Araki H, Tamada Y, Dunmore B, Sanders D, Humphreys S, Affara M, Imoto S, Yasuda K, Tomiyasu Y, Tashiro K, Savoie C, Cho V, Smith S, Kuhara S, Miyano S, Charnock-Jones DS, Crampin EJ, Print CG. Gene network inference and visualization tools for biologists: application to new human transcriptome datasets. *Nucleic Acids Res*. 2011 Dec 6. [Epub ahead of print]
3. Kogo R, Shimamura T, Mimori K, Kawahara K, Imoto S, Sudo T, Tanaka F, Shibata K, Suzuki A, Komune S, Miyano S, Mori M. Long non-coding RNA HOTAIR regulates Polycomb-dependent chromatin modification and is associated with poor prognosis in colorectal cancers. *Cancer Res*. 2011 Aug 23. [Epub ahead of print]
4. Sharma A, Imoto S, Miyano S. A top-r feature selection algorithm for microarray gene expression data. *IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics*. 2011 Nov 11. [Epub ahead of print]
5. Sharma A, Koh CH, Imoto S, Miyano S. Strategy of finding optimal number of features on gene expression data. *Electronic Letters*. 47 (8): 480-482, 2011.
6. Shimamura T, Imoto S, Shimada Y, Hosono Y, Niida A, Nagasaki M, Yamaguchi R, Takahashi T, Miyano S. A novel network profiling analysis reveals system changes in epithelial-mesenchymal transition. *PLoS ONE*. 6(6): e20804, 2011.
7. Tamada Y, Imoto S, Miyano S. Parallel algorithm for learning optimal Bayesian network structure. *J Machine Learning Research*. 12: 2437-2459, 2011.
8. Tamada Y, Imoto S, Araki H, Nagasaki M, Print C, Charnock-Jones DS, Miyano S. Estimating genome-wide gene networks using nonparametric Bayesian network models on massively parallel computers. *IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics*. 8(3): 683 - 697, 2011.
9. Tamada Y, Shimamura T, Yamaguchi R, Imoto S, Nagasaki M, Miyano S. SiGN: large-scale gene network estimation environment for high performance computing. *Genome Informatics*. 25: 40-52, 2011.
10. Tamada Y, Yamaguchi R, Imoto S, Hirose O, Yoshida R, Nagasaki M, Miyano S. SiGN-SSM: open source parallel software for estimating gene networks with state space models. *Bioinformatics*. 27: 1172-1173, 2011.
11. Yamauchi M, Yoshino I, Yamaguchi R, Shimamura T, Nagasaki M, Imoto S, Niida A, Koizumi F, Kohno T, Yokota J, Miyano S, Gotoh N. N-cadherin expression is a potential survival mechanism of gefitinib-resistant lung cancer cells. *Am J Cancer Res*. 1(7): 823-833, 2011.
12. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, Sato Y, Sato-Otsubo A, Kon A, Nagasaki M, Chalkidis G, Suzuki Y, Shiosaka M, Kawahata R, Yamaguchi T, Otsu M, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Ishiyama K, Mori H, Nolte F, Hofmann WK, Miyawaki S, Sugano S, Haferlach C, Koefler HP, Shih LY, Haferlach T, Chiba S, Nakauchi H, Miyano S, Ogawa S. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*. 478 (7367): 64-69, 2011.

難治疾患研究所 寄附研究部門 臓器代謝ネットワーク研究部門

特任教授：亀井康富 特任教員：伊藤美智子、田中 都

研究内容

近年、生体の代謝シグナルの恒常性維持における液性因子や神経ネットワークを介する臓器間相互作用（臓器ネットワーク）の重要性が注目され、この破綻が肥満やメタボリックシンドロームの発症・進展に関与することが明らかになりつつある。本研究部門では、メタボリックシンドロームの成因の解明とその知見を踏まえた新しい予防、診断、治療戦略の確立を目指しており、基礎研究の成果の医学応用を念頭においたトランスレーショナルリサーチの教育を基本方針とするものである。即ち、脂肪組織、骨格筋、肝臓、腎臓、脳などの組織間を行き交う臓器連関・クロストークによるエネルギー代謝制御・炎症制御の実態を解明することにより、メタボリックシンドロームあるいは生活習慣病に対する新しい予防法、診断法、治療法の開発を目指すものである。

研究紹介

1. 飢餓応答における骨格筋の役割に関する研究

飢餓や激しい運動、代謝疾患による栄養環境の変化に対して、生体は各臓器でエネルギー代謝を変化させて適応している。長期の飢餓において骨格筋は構成タンパク質を分解し、生成したアミノ酸は肝臓や腎臓において糖新生の基質として利用される。骨格筋は人体で最大の組織であり、タンパク質の形で主要なエネルギー貯蔵を行っている。骨格筋のみならず他の臓器でもアミノ酸代謝を制御する調節因子の詳細は不明である。

我々はインスリンシグナルに拮抗する転写因子である Forkhead protein-O1 (FOXO1) に着目している。これまでに骨格筋において FOXO1 遺伝子改変マウスを用いて、骨格筋萎縮における FOXO1 の役割を明らかにしている (J. Biol. Chem. 279:41114-41123, 2004; Biochem. J. 427:171-178, 2010)。本研究では、これらの遺伝子操作マウスを用いて、飢餓、栄養障害や廃用性により誘導される骨格筋の萎縮や代謝変化における FOXO1 の新しい標的遺伝子を網羅的に解析し、骨格筋萎縮における病態生理的意義と新しい創薬ターゲットとしての可能性を検証するものである。

2. レプチンの炎症免疫調節機構に関する研究

栄養飢餓時に、免疫機能が低下することは広く知られているが、その分子機構は未だ十分に解明されていない。レプチンは代表的なアディポサイトカインであり、体脂肪量に比例して産生され、視床下部を介して摂食抑制やエネルギー消費の亢進に働く。飢餓時には血中レプチン濃度が低下するため、レプチンは、栄養飢餓時の免疫機能低下に関与する可能性が考えられる。実際、絶食に伴う胸腺の萎縮や末梢血リンパ球の減少にレプチンの関与が報告されているが、その分子機構は不明であった。本研究において我々は、絶食により血中レプチン濃度の低下と骨髄 B リンパ球の分化異常を認めること、レプチンを補充することにより B リンパ球の分化異常が回復することを見出した。一方、遺伝的にレプチンを欠損する ob/ob マウスは、過食による肥満や高血糖など絶食マウスとは逆の表現型を呈するにも関わらず、絶食と同様の骨髄 B リンパ球分化異常が認められた。レプチン受容体は骨髄 B リンパ球にも発現しているが、少量のレプチンを脳室内に補充することにより、絶食マウスや ob/ob マウスで認められる骨髄 B リンパ球分化異常はほぼ完全に回復した。すなわち、レプチンは中枢神経系を介して骨髄 B リンパ球分化を調節することが示唆された。(J. Neurosci. 31:8373-8380, 2011)。

3. 非アルコール性脂肪性肝炎の病態形成における臓器間相互作用の検討：

近年、脂肪組織は多彩な生理活性物質を分泌する内分泌臓器として注目されているが、本来の脂肪組織の機能は過剰なエネルギーの蓄積である。全身の脂肪分布は脂肪組織の脂肪蓄積能力を超えると、非脂肪組織において異所性脂肪蓄積を生じる。異所性脂肪はメタボリックシンドロームや多くの生活習慣病の基盤病態となっており、代表的なものとして非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH: non-alcoholic steatohepatitis) が挙げられる。NASH は肝臓における異所性脂肪蓄積から慢性炎症・線維化を経て肝硬変や肝細胞癌に至る病態である。従来、肥満に合併する糖脂質代謝障害と肝線維化を併せ持つ動物モデルが存在しなかったことから、NASH における脂肪組織の病態生理的意義には不明な点が多い。最近、我々は、

中枢性エネルギー代謝調節に関与するメラノコルチン 4 型受容体 (MC4R: melanocortin 4 receptor) を欠損するマウス (MC4R-KO マウス) に高脂肪食を負荷することにより、新しい NASH モデルマウスの確立に成功した (Am. J. Pathol. 179: 2454-2463, 2011)。本モデル動物では、脂肪組織の慢性炎症により遊離脂肪酸が過剰に放出され、肝臓の異所性脂肪蓄積 (脂肪肝) からヒトの

NASH に特徴的な肝組織像 (小葉内炎症細胞浸潤、肝細胞風船様変性、肝細胞周囲性線維化) を経て、最終的には、多発性の肝細胞癌を発症する。本モデル動物は、NASH の病態形成を臓器間相互作用の観点から捉え、組織機能の破綻から発癌に至る過程の理解に有用と期待される。

人事異動

転入：亀井康富 (特任教授)、伊藤美智子 (特任教員)、田中都 (特任教員)
転出：無し

業績目録

原著論文

1. M. Tanaka, T. Suganami, M. Kim-Saijo, C. Toda, M. Tsuiji, K. Ochi, Y. Kamei, Y. Minokoshi, Y. Ogawa. Role of central leptin signaling in the starvation-induced alteration of B cell development. *J. Neurosci.* 31: 8373-8380, 2011.
2. S. Sugita, Y. Kamei, F. Akaike, T. Suganami, S. Kanai, M. Hattori, Y. Manabe, N. Fujii, T. Takai-Igarashi, J. Oka, H. Aburatani, T. Yamada, H. Katagiri, S. Kakehi, Y. Tamura, S. Takasuga, T. Sasaki, H. Kubo, K. Nishida, S. Miura, O. Ezaki, Y. Ogawa. Metabolic analysis of transgenic mice overexpressing RXR γ in skeletal muscle: increased glucose tolerance and suppression of obesity-induced fatty liver. *PLoS ONE* 6: e20467, 2011.
3. M. Itoh, T. Suganami, N. Nakagawa, M. Tanaka, Y. Yamamoto, Y. Kamei, S. Terai, I. Sakaida, Y. Ogawa. Melanocortin-4 receptor-deficient mice as a novel mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. *Am. J. Pathol.* 179: 2454-2463, 2011.

著書・総説

1. 田中都、菅波孝祥、小川佳宏：「レプチンの炎症・免疫調節作用とCKD」：アディポサイエンス 7(4):327-332, 2011
2. 田中都、菅波孝祥、小川佳宏：「脂肪組織炎症とマクロファージ」：最新医学 66:229-236,2011
3. 亀井康富、杉田聡、服部真季、小川佳宏：「飢餓における骨格筋代謝調節」：アディポサイエンス 7(3):220-224, 2011
4. 亀井康富、小川佳宏：「脂肪細胞の分子生物学」：臨床検査 55(6):539-542, 2011
5. 亀井康富、小川佳宏：「エビジェネティクスと

代謝性疾患」：MedChem News (日本薬学会医薬科学部会) 21(4):31-33
6. 田中都、菅波孝祥、小川佳宏：Surgical Trauma & Immunological Responses 侵襲と免疫 Vol.20 No.2 特集：侵襲に対する生体反応の個体差「4. 肥満における生体反応」：メディカルビュー社
7. M. Itoh, T. Suganami, R. Hachiya, and Y. Ogawa. Adipose tissue remodeling as homeostatic inflammation. *Int. J. Inflamm.* 2011: 720926, 2011.

シンポジウム・招待講演

1. 亀井康富、小川佳宏「生活習慣病とエビジェネティクス」日本農芸化学会シンポジウム 2011.3.28 京都
2. 亀井康富、小川佳宏：「生活習慣病と DNA メチル化」：第 65 回 日本栄養・食糧学会 サテライトシンポジウム ネスレ栄養科学会議, 2011.5.14, 東京
3. 亀井康富、小川佳宏：「骨格筋における遺伝子発現制御と肥満・生活習慣病」：第 65 回 日本栄養・食糧学会シンポジウム, 2011.5.14, 東京
4. 亀井康富、江原達弥、高橋真由美、袁焯梅、小川佳宏：「生活習慣病と DNA メチル化：新生仔期の肝臓における de novo 脂肪合成のエビジェネティクス制御」：第 5 回 日本エビジェネティクス研究会 2011.5.19 熊本
5. 亀井康富、杉田聡、小川佳宏：「骨格筋における遺伝子発現制御と肥満・生活習慣病：遺伝子改変動物を用いた研究」：第 3 回分子骨格筋代謝研究会 2011.6.11 京都
6. 亀井康富、江原達弥、高橋真由美、袁焯梅、小川佳宏：「生活習慣病と脂質代謝の遺伝子発現調節」：第 24 回 日本動物細胞工学会大会シンポジウム, 2011.7.23 東京
7. 田中 都、菅波孝祥、亀井康富、小川佳宏：「中枢性レプチンシグナルの炎症・免疫調節作用」：第 16 回アディポサイエンス研究会, 2011.8.20, 大阪

研究助成金

1. 亀井康富：文部科学省科学研究費補助金、新学術領域研究「肝臓の脂肪蓄積のエビジェネティ

- クス制御の解析」
2. 伊藤美智子：文部科学省科学研究費補助金、研究活動スタート支援「NASH におけるマクロファージの病態生理的意義に関する検討－新規モデルを用いて」
3. 亀井康富：平成 23 年度群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究「骨格筋における転写調節因子 FOXO1 の標的遺伝子の同定と医学応用」
4. 亀井康富：日本栄養・食糧学会学術基金助成「DNA メチル化を介する次世代の生活習慣病感受性決定の分子機序解明」
5. 亀井康富：ひと・健康・未来研究財団研究助成金「運動時の骨格筋におけるアミノ酸代謝遺伝子発現調節機構解明」
6. 亀井康富：ノボノルディスク成長・発達研究賞「マウス肝臓の成長・発達における核内受容体リガンド代謝関連遺伝子の DNA メチル化制御」
7. 亀井康富：ノボノルディスクファーマインスリン研究助成「DNA メチル化制御を受ける骨格筋のインスリン抵抗性・糖代謝関連遺伝子の探索」
8. 亀井康富：森永奉仕会研究奨励金「新生児期の肝臓の脂肪合成におよぼすエビジェネティクス制御に関する研究」
9. 亀井康富：第 24 回小野医学研究助成金「肝臓脂肪蓄積における DNA メチル化制御」
10. 亀井康富：中富健康科学振興財団研究助成金「加齢時の骨格筋萎縮 (サルコペニア) の分子基盤解明」
11. 伊藤美智子：日本応用酵素協会研究助成金「NASH の発症・進展と脂肪組織炎症」
12. 伊藤美智子：小野医学研究財団 第 20 回研究奨励助成金「非アルコール性脂肪性肝炎の病態形成における臓器間相互作用の解明」

特別講義

亀井康富：「生活習慣病とエビゲノム」オープンキャンパス模擬講義, 2011.7.28

他大学への特別講義

亀井康富：東京農業大学応用生物科学部栄養生化学研究室 非常勤講師
京都大学農学研究科食品生物化学専攻 非常勤講師

難治疾患研究所 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方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、2011年の実績である。

1. DNA 受託シーケンスサービス

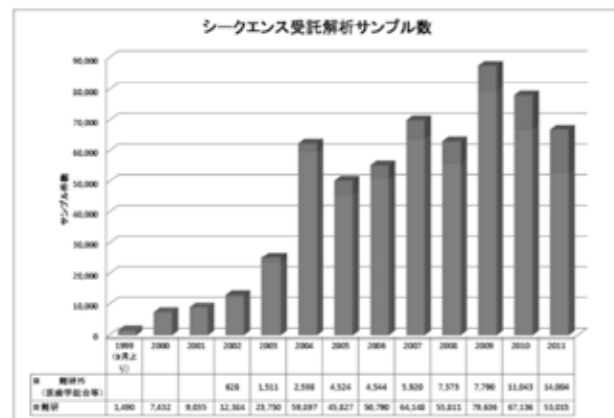
サンプル数 (67,019 件) 及び延べ利用人数 (3,633 名) は、ほぼ例年並みであるが、難研外からの依頼数が着実に増加し、全体の二割を超え、依頼件数 1,450、依頼サンプル数 14,004 と過去最高となった。

2. 設置機器

DNA シーケンサー 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、製氷器、ユニバーサル遠心機を設置し、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



下の説明会を行った。

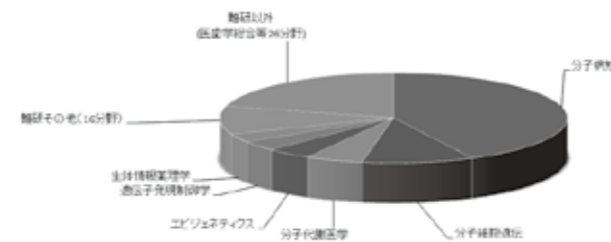
フローサイトメーター取扱い説明会 (7/8, 7/11, および 7/12: 日本ベクトン・ディッキンソン)

第一回次世代シーケンスセミナー (7/20, 医歯学研究支援センターと共催)

第二回次世代シーケンスセミナー (9/21, 医歯学研究支援センターと共催)

第三回次世代シーケンスセミナー (11/16, 医歯学研究支援センターと共催)

2011年 DNAシーケンス利用分野内訳



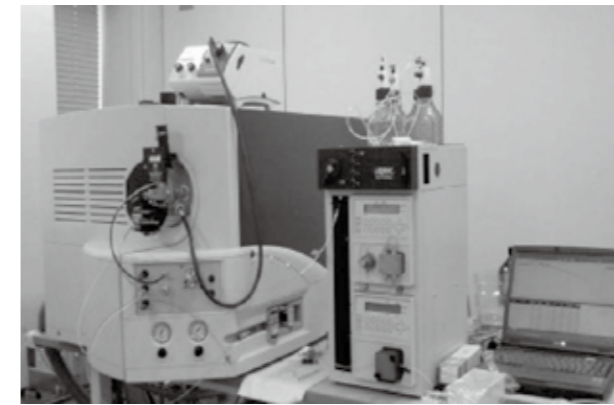
II. 細胞プロテオーム解析室

技術専門職員 名和 眞希子

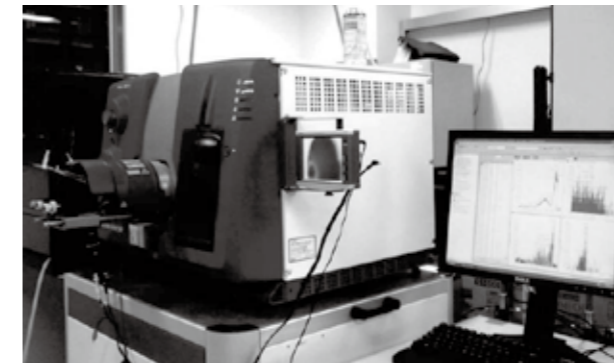
ホームページ <http://www.tmd.ac.jp/mri/lcpr/Top.html>

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

* 学生教育

23 年度生命情報科学研究部のプロテオーム解析演習を行った。

* 支援成果

Proteome Analysis Of Bronchoalveolar Lavage Fluid in Chronic

Hypersensitivity Pneumonitis.

Tsukasa Okamoto, Yasunari Miyazaki, Ryutaro Shirahama, Meiyu Tamaoka and

Naohiko Inase. Allergology International. 2011 Oct 25;0(0).

III. 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為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レーザー顕微鏡、蛍光イメージングワークステーション、凍結マイクロトーム、ロータリーマイクロトーム、スピントリッシュ

ロセッサー、ティッシュエンベディングセンター、定量的 PCR 装置を常備している。今年度は新たにレーザーマイクロダイセクションを導入し、細胞や組織の局所における RNA や蛋白質の解析を可能にした。

<<Common equipment>>

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

IV. 幹細胞支援室

技術専門職員 齋藤 佳子
技術補佐員 永井 恵魅

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 1 名 (技術専門職員) の他、2011 年 6 月 1 日付で技術補佐員 (研究支援推進員) 1 名が着任し、高速セルソーターのオペレーター業務を担当するために講習とトレーニングを受けた後、操作補助や受託の試行を進めた。12 月に 2 年間の任期が満了となる運営委員会の 8 名の委員 (教授 5 名、准教授 3 名) は全員再任し、引き続き幹細胞支援室を担当している。

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、それぞれ下記のような主要機器を研究者の利用に供している。

【駿河台地区 1 階】

高速セルソーター MoFlo Legacy (バックマンコーンター)

パラフィン自動包埋装置一式 (サクラファインテック) ミクロトーム (Thermo)

FACS Calibur (BD)

ハイブリオープン (TAITEC)

超音波破砕器 (BRANSON)

【M&D タワー 21 階】

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（オリンパス）

なお、幹細胞支援室は2012年の3月までにM&Dタワー24階に集約して移設することが難治疾患研究所教授会で決定され、移設すべき機器の選定や移設先のレイアウトの検討などの準備作業を2011年の後半から開始した。

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。2011年会計年度内の運営委員会開催は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、技術補佐員の選考や、M&Dタワー24階への移転に係る会議も適宜開催した。次項に述べる利用者への便宜供与ならびに設置機器の技術習得による供用化準備は、もっぱら技術専門職員1名が対応することで進めており、研究支援推進員1名は高速セルソーターの技術習得に努めて供用化促進を期した。

3. 2011年の供用実績

当支援室は2010年に整備が開始されたところであり、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。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2回、共焦点レーザー顕微鏡については希望者多数のため5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。

V. バイオリソース支援室

技術専門職員 小島 智子

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

細胞株の寄託業務として、汎用性の高い有用な細胞株を、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（2001年制定）に従い収集している。

細胞株の安全、適切な保管維持のため、培養細胞のマイクプラズマ汚染検査をPCR法で実施している。本検

査は研究所内外の研究機関から依頼を受け解析している。

リンパ球の樹立業務では、末梢血からEBVトランスフォームによるBリンパ芽球の株化を受託している。また免疫抑制剤の添加培養系を導入し、高効率の株化細胞の樹立を可能にしている。

大学院生や研究の初心者を対象に細胞培養講習会を実施して基礎的研究技術の支援活動を実施している。

血清共同購入の窓口業務を行っている。

ケミカルバイオロジースクリーニングセンター

センター長：影近弘之 センター専属教員：湯浅磨里

東京医科歯科大学ケミカルバイオロジースクリーニングセンターは2006年に疾患生命科学研究所、難治疾患研究所、生体材料工学研究所により共同で設立されました。ケミカルバイオロジー推進基盤創出事業の一環としてスタートした当センターも今年で5年目を迎え、その間、本学のみならず国際的なケミカルバイオロジー研究の拠点となるべく整備を進めてまいりました。これまでの活動をご報告いたします。

ケミカルバイオロジー研究とは、生命現象を化学（特に化合物）の観点から解明しようという学問であり、化学、生物学、医学、薬理学などの異分野が融合して新たな研究領域を構築しております。近年我が国でもケミカルバイオロジー研究の重要性が認識され、大規模な化合物ライブラリーとハイスループットスクリーニング技術などを組み合わせた新たな機能分子の探索、応用研究の体制作りが望まれています。

ケミカルバイオロジー研究における本センターの役割は、化合物を利用して研究をしたいが、化合物に不慣れた生物・医学系の研究者と、手元の貴重な化合物を生物学的研究に提供したい要望はあるが、的確な共同研究者を探す手段がない等の課題を抱える化学系の研究者の架け橋となり、両者が相補的にお互いの研究に参入することで新たな発見をサポートすることです。

1) 化合物ライブラリーの整備・管理と利用者への配布
本センターでは、2011年12月現在約20,000個の化合物を所有し、全て提供可能です（図1）。化合物は構造多様性を重視した市販の機能未知低分子化合物を中心に収集し、機能既知の低分子化合物も揃えました。一方で、学内の化学系研究者から提供していただいた、市場に出ていない大学保有のオリジナル化合物も揃えております。構造がユニーク、あるいは複雑な化合物ライブラリーを保有しているのは、創薬のみの研究に特化していない本センターのライブラリーの特長ともいえます。オリジナル化合物からヒット化合物が見つければ化学系の研究者と生物・医学系の研究者が連携し、リード化合物創製、構造展開の可能性を秘めています。

化合物はDMSOに溶解後チューブに入れて冷凍保存

し（図2-a, b）、96ウェルプレート単位（10 μ l/well）で希望者に配付しています（図2-c）。化合物ライブラリーの利用者が年々増えており、化合物ライブラリーを利用したスクリーニングへの関心が高いことが伺えます。

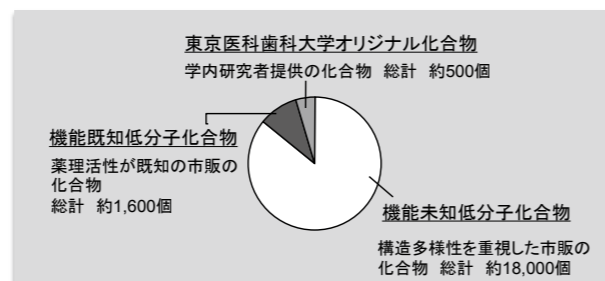


図1 スクリーニングセンター保有化合物の内訳

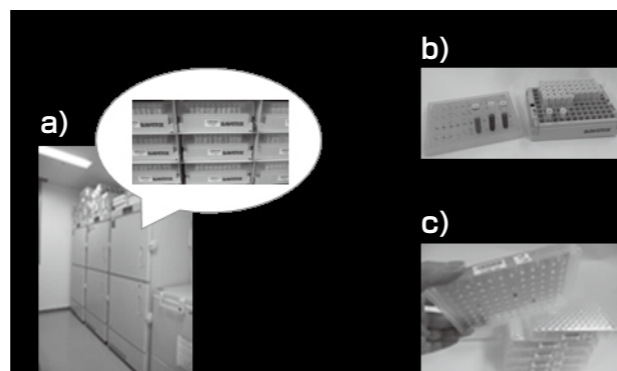




図2 化合物の保管と利用形態
a, b) 化合物はDMSOに溶解後チューブに入れて冷凍保存
c) 96ウェルプレート単位（10 μ l/well）で希望者に配付

2) スクリーニング環境の整備
ハイスループットスクリーニング技術の発展により、スクリーニング機器は高度かつ高額になっており、こうした機器を一研究室で保有・活用するのは困難なため、効率的なスクリーニングを一貫してサポートする環境を整備しました（表1）。これらの機器利用に関して、本センターの利用説明会を開催しており、初年度32名であった利用者が、本年度は60名と増加してきています。

3) 化合物情報交流の推進
本センターではセンター保有化合物閲覧システムTMDU Chemical Biology Database (CBDB, <http://bsmdb.tmd.ac.jp/>) を運用しています（図3）。このデー

表1 スクリーニングセンター設置機器一覧

設備名称	特徴
プレートリーダー ・ ARVO X5 : Perkin Elmer ・ Wallac 1420 ARVO MX : Perkin Elmer 	発光・蛍光・吸光度測定、時間分解蛍光、蛍光偏光測定が可能。 インジェクションユニットが付属されており、基質添加直後からのKinetics Assayなども可能。 （測定実施例） ・ ルミネッセンス発光を用いたキナーゼ/ヘリカーゼ活性評価 ・ MTTアッセイ(吸光度)による間接的生細胞数評価 etc...
ハイコンテント細胞イメージ解析装置 Cellomics ArrayScan VTI : ThermoFisher Scientific 	蛍光ラベル細胞を顕微鏡で撮影してイメージを全自動に取り込み、蛍光情報、形態情報から統計学的な解析が可能。 （測定実施例） ・ 免疫染色によるウイルス感染細胞数測定 ・ GFP/RFP融合タンパク質の発現量比測定 ・ 蛍光基質取り込みによる細胞内タンパク代謝測定 etc..
培養室 ・ クリーンベンチ 2台 : SANYO ・ CO ₂ インキュベータ : SANYO	BSL-2の培養設備を備え、in cell環境でのスクリーニングが一貫して行える。
自動分注装置 ・ EDR-384SII : バイオテック ・ Multi-CHOT : ニチリョー	96 well plate - 384well plate間のサンプルトランスファーが可能。0.5~1000 μ l範囲での分注、希釈が可能。
オートセラウォッシャー ・ AMM-96SII : バイオテック	96 well plateを最大20枚まで洗浄することが可能。

タベースにアクセスすれば、センター化合物の化合物情報およびそれらを用いた生物活性情報が検索できます。また、化合物利用者によって得られた情報もここに蓄積され、当センターの化合物を利用している他の研究者も閲覧可能です。

その他に化合物情報管理ソフト ChemOffice (Windows) / Chem Draw (Macintosh) の全学ライセンス管理を行っており、全学の研究者に対し、CBDBからダウンロードできる化合物構造ファイルなど、化合物情報の手元での閲覧と管理を可能としています。

ケミカルバイオロジースクリーニングセンターでは、より一層のケミカルバイオロジー研究の支援を行い、異分野研究者間の交流の場となるべく、2012年度の生体材料工学研究所改組に伴い、センターの充実化を図って

おります。化合物ライブラリーや機器、情報の提供だけでなく、化合物を用いた共同研究推進の窓口として、是非、本センターを有効利用して頂きたいと考えております。



図3 TMDU Chemical Biology Database
<http://bsmdb.tmd.ac.jp/>

活動実績

講習会

スクリーニングセンター利用者説明会 3回/年
Array Scan VTI 講習会 2回/年
学生実習 (年1回)

講義

大学院生を対象としたケミカルバイオロジー演習

学会発表

・ 湯浅磨里、奥野友紀子、影近弘之:ケミカルスクリーニング推進に向けた基盤構築 東京医科歯科大学での試み 第6回年会 東京、日本ケミカルバイオロジー学会、2011年5月23日-25日
・ 他3件

論文発表

Yijun Bao, Kentaro Nakagawa, Zeyu Yang, Mitsunobu Ikeda, Kanchanamala Withanage, Mari Ishigami-Yuasa, Yukiko Okuno, Shoji Hata,

Hiroshi Nishina, and Yutaka Hata A cell-based assay to screen stimulators of the Hippo pathway reveals the inhibitory effect of dobutamine on the YAP-dependent gene transcription. J Biochem. 2011, 150, 199-208.

特許: 1件

所在地: M & D タワー 22階南西角

大学院疾患生命科学研究所 構造情報研究室

教授：伊藤暢聡 准教授：伊倉貞吉
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。

本研究室では、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。研究部が推進するケミカルバイオロジーにも寄与するため、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. ケミカルバイオロジーとの融合：タンパク質・低分子複合体の解析

大学院疾患生命科学研究所では、ケミカルバイオロジーを強力に推進しているが、本研究室でもその一環として、タンパク質とその低分子リガンドとの複合体の解析を、学内・学外の共同研究を通じて精力的に行っている。これまでに、ウイルスの増殖に必須と考えられるリン酸化酵素 SRPK1 と抗ウイルス活性のある阻害剤、ダウン症の発症原因であるリン酸化酵素 DYRK1A の過剰発現を抑える阻害剤、及び、ビタミンD受容体（VDR）が関与する疾病関連のリガンドなどの研究開発に取り組んできた。その中から、VDRの変異に伴う疾病に関する研究について詳述する。

核内受容体はステロイドホルモンや脂溶性ビタミンA、Dなどの生理作用を担う受容体であり、リガンド依存的な転写因子として特異的な遺伝子の発現を制御して

いる。ビタミンD受容体（VDR）は1 α ,25-ジヒドロキシビタミンD₃（活性型D₃）を内因性アゴニストとする核内受容体で、これはカルシウム代謝の他に細胞の分化誘導や増殖抑制、免疫調節など多彩な生理作用に関わっている。核内受容体とその特異的リガンドの機能は、様々な疾患やそれらの治療と密接に関わっていることから、これらを制御する化合物の創製とそれを用いたケミカルバイオロジー研究は創薬への応用が期待され、活発に行われている。

ビタミンD受容体のリガンド結合ドメイン（VDR-LBD）にある268番目のイソロイシン残基は、リガンド結合ポケット内で活性型D₃の22位の炭素原子付近に位置している。この残基がトレオニン残基へ置き換わったミスセンス変異I268Tは先天性くる病II型の原因として知られ、この変異はVDRと天然リガンドとの相互作用のみならず、他の核内受容体RXRとの相互作用にも影響する。

我々はラットVDR-LBD(del) I264T変異体と天然リガンド、コアクチベーターDRIP205由来の配列をもつペプチドとの三元錯体の結晶化と、構造の解析に成功した。ラットVDRのI264TはヒトVDRのI268Tに相当する変異である。I264T変異体は従来と同様に活性型構造をとらせた形で結晶化されたが、変異部位付近の主鎖および側鎖の位置に違いが見られた。Thr264の側鎖の水酸基はAsn390（この残基はヘリックス10に属する）の側鎖付近に位置し、その結果としてヘリックス4/5、ループ8-9の広範囲の残基が少しずつ位置を変えていた（図1）。

一方、VDRとRXRとの相互作用にはヘリックス10のArg387が関わっていることが知られているが、本構造からはI264T変異がArg387の構造に及ぼす影響はほとんど検出できなかった。しかし、このことは必ずしもArg387が影響を受けないことを意味するものではない。我々が扱うラットVDR-LBDの欠損変異体はヒトVDR-LBDと比べて結晶化が容易であるが、その反面、得られる構造のヘリックス10や12が結晶中のタンパク質間のパッキングに関わっているために、これらの部位は、細胞内での構造を十分に反映していない可能性がある。VDRとRXRとの相互作用を解明するためには、

今後、さらに構造及びダイナミクスに関するデータの集積が必要であろう。

なお、VDRのリガンド研究は、薬化学研究室の影近弘之教授、生体材料工学研究所の増野弘幸博士、山田幸子名誉教授、さらに、昭和薬科大学の山本恵子教授と協力して進めている。

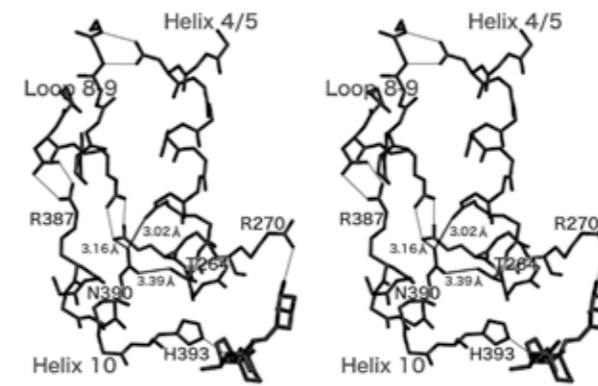


図1a

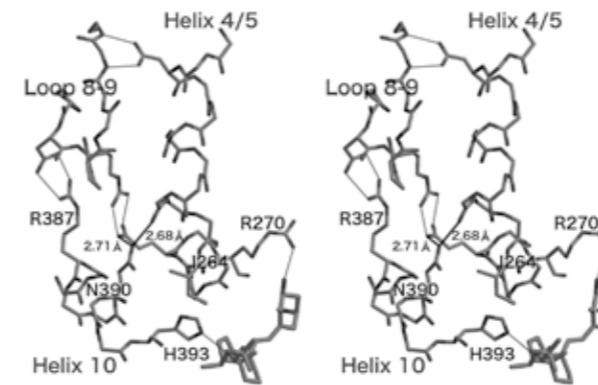


図1b

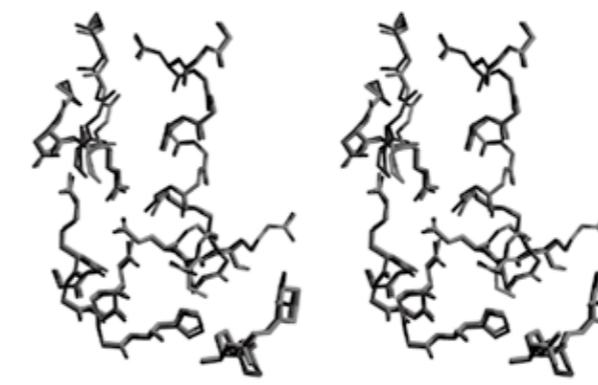


図1c

図1：Asn390はヘリックス4/5およびループ8-9を介して間接的にArg387と相互作用する。（ステレオ図）

Asn390はヘリックス4/5（Ser261およびGlu265）の近くに位置する。また、Arg387は他の核内受容体RXRとの相互作用に関わっている残基である。点変異の無いrVDR-LBD（1b 淡い灰色）では、Asn390の側鎖のアミド基はSer261の主鎖およびGlu265の側鎖の近くにある。それに対してI264T変異体（1a 濃い灰色）ではAsn390の近くにThr264の側鎖の水酸基が存在するため、Asn390の側鎖の向きが若干変化し、結果として側鎖のアミド基はSer261およびGlu265から離れている。両者の座標を重ねてみる（1c）と、Asn390付近の構造に若干の違いが見られる。

2. タンパク質のフォールディング異常に関わる疾病の研究：タウタンパク質とPin1との相互作用

一般に、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が、もし何らかの原因によりタンパク質がその特定の立体構造を取れない場合にはどうなるであろうか。通常そのようなタンパク質はプロテアソームなどによって分解されるが、中には蓄積してAlzheimer病などの疾患の原因となるものもある。

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、天然条件下で特定の立体構造をもたないタンパク質、すなわち、天然変性タンパク質のひとつである。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、単独では特定の立体構造を全く形成しない完全天然変性タンパク質である。ところが、タウタンパク質は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化し蓄積する。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のPin1がタウタンパク質の神経原線維化を阻害するという事例が多数報告されている。タウタンパク質のリン酸化部位は、いずれもSer-ProまたはThr-Proという配列からなり、リン酸化後のpSer/pThr-Pro配列は、確かにPin1の標的である。おそらくこの配列領域でのPin1との相互作用がタウタンパク質の神経原線維化の抑制につながるものと想像されるが、推測の域を出ない。

また、過剰リン酸化を受けた異常タウタンパク質に、プリオンタンパク質と同様の感染性があるという実験データも報告されており、タウタンパク質の物性研究は混沌とした様相を呈している。

このようなタウタンパク質の過剰リン酸化と構造変化の問題に対して、本研究では、タウタンパク質とPin1との相互作用を手がかりに、一連の現象の本質と原因の解明を目指している。我々は前年までにタウタンパク質のリン酸化可能な部位のうちPin1の標的となりうる17箇所について、表面プラズモン共鳴法により解析したところPin1と強く結合する部位は見つからなかった。そこで、本年は、解析領域をタウタンパク質全体に拡張し、リン酸化部位以外での相互作用も視野に入れつつ、網羅的な解析をおこなった。この結果、タウタンパク質中には当初の17箇所のリン酸化部位で観測された相互作用を超える相互作用を示す箇所は存在しないことが明らかになった。したがって、Pin1によるタウタンパク質の神経原線維化の阻害は、タウタンパク質の単なる隔離化あるいは平衡移動によるものではないことが明らかになった。

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生体構造中心に性質や機能を紹介している。

業績目録

原著論文

1. Nomura W, Ohashi N, Okuda Y, Narumi T, Ikura T, Ito N, Tamamura H (2011). Fluorescence-quenching screening of protein kinase C ligands with an environmentally sensitive fluorophore. *Bioconjug. Chem.* **22**, 923-930.
2. Fujii S, Masuno H, Taoda Y, Kano A, Wongmayura A, Nakabayashi M, Ito N, Shimizu M, Kawachi E, Hirano T, Endo Y, Tanatani A, Kagechika H; Boron cluster-based development of potent nonsecosteroidal vitamin D receptor ligands: direct observation of hydrophobic interaction between protein surface and carborane. *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 20933-20941 (2011).
3. Tamashiro T, Tanabe Y, Ikura T, Ito N and 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).

国際学会／招待講演

1. 伊倉貞吉. ペプチジルプロリルイソメラーゼの機能のアミノ酸配列依存性. 公開シンポジウム「蛋白質の機能を解き明かす多彩なアプローチ」, 横浜, 2011年10月.
2. Ito N; OIST/CCP4 School 2011: Protein Data Bank Japan (PDBj), 沖縄, 2011年12月.

国内学会／一般講演

1. 大橋南美, 野村渉, 鳴海哲夫, 奥田善章, 伊倉貞吉, 伊藤暢聡, Nancy E. Lewin, 糸谷恭子, Peter M. Blumberg, 玉村啓和. 環境応答性蛍光基を活用した PKC リガンドの orthogonal screening methods. 第6回日本ケミカルバイオロジー学会年会 (東京, 2011年5月)
2. 肥後邦武, 砂橋朗進, 森井尚之, 池上貴久, 伊倉貞吉, 伊藤暢聡, 安部良, 織田昌幸. CD28 細胞内領域とアダプター分子 Gads SH2 及び Grb2 SH2 との分子間相互作用解析. 第11回日本蛋白質科学会年会 (大阪, 2011年6月)
3. 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 との相互作用解析. 第11回日本蛋白質科学会年会 (大阪, 2011年6月)
4. Ikura, T., Ito, N. Dissection analysis of interactions between tau protein and Pin1. 第49回日本生物物理学会年会 (大阪, 2011年9月)

教育活動

伊藤暢聡: 大学院生命情報教育部, お茶の水女子大学 (非常勤講師)
伊倉貞吉: 大学院生命情報教育部

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」、分担
伊倉貞吉: プロリン異性化酵素 Pin1 との相互作用に伴うタウタンパク質の構造転移の研究、文部科学省 科学研究費補助金 (新学術領域研究「天然変性タンパク質の分子構造と機能発現」)、公募研究・代表

大学院疾患生命科学部 遺伝子発現制御学分野 形質発現制御学研究室

准教授：黒柳秀人 特任助教：井手上社子、木村まり子

研究紹介

0. 背景

ヒトの蛋白質をコードする遺伝子数が約2万3千個程度と、当初予想された数よりはるかに少なく、蛋白質の多様性には、選択的スプライシングが大きく寄与すると推測される。しかし、生体内で選択的スプライシングの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(splicing code)”の解明は進んでいない。そこで、我々はさまざまなアプローチでスプライシング暗号の解明に挑戦している。

人間を含む生物個体は、遺伝情報としてDNAに書き込まれた様々な“形質”を、必要に応じて“発現”させることにより、生命活動を営んでいる。本研究分野では形質発現制御のメカニズム、言い換えれば、核内の遺伝情報が転写装置により読み出され、産生されたmRNA前駆体がプロセシングされ、核外のリボソームへと輸送される仕組みとその制御機構の解明を試みており、その破綻による疾患の病態を解明することを目指している。

ゲノム・プロジェクトやトランスクリプトーム解析の進展により、ヒトを含む高等真核生物でも、予想以上に少ない遺伝子から多様な蛋白質を生み出していることが判明してきている。真核生物では1つの遺伝子が複数のエクソンから構成され、多細胞生物では多くの遺伝子が選択的スプライシングによって複数の最終遺伝子産物を生成する(ヒトではエクソンを複数持つ遺伝子の90%以上)。したがって、選択的スプライシングの制御は多細胞生物に特有の遺伝子発現制御機構として、これまでによく研究されている転写調節に勝るとも劣らない生物的意義を有するものと考えられる。そこで、我々が解明しようとしているのは、転写産物から成熟mRNAへのプロセシング段階での制御機構が存在するか、存在するとすればどのようなシグナル伝達機構下で制御されているかという問題である。

1. 生体内選択的スプライシングレポーターによる組織特異的・発生段階依存的選択的スプライシング制御機構の解明

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、我々はモデル生物である線虫を用いて、選択

的スプライシングをモニターするレポーター系を開発した(Nature Methods, 2006; Nature Protocols, 2010)。このレポーター系では、エクソンの選択的使用に応じてGFP, RFPなどの異なる蛍光タンパク質が発現するようデザインされたミニ遺伝子を作製して線虫に導入しており、生体内における細胞ごとの選択的スプライシングパターンを解析できる(図1)。

我々はこのレポーター系を用いて、線虫のFGF受容体遺伝子 *egl-15* の組織特異的なエクソン選択性を可視化し、組織特異性に異常を示す突然変異体を単離・解析して、スプライシング制御因子として新規のFox-1ファミリーRNA結合タンパク質 ASD-1 (Alternative Splicing-Defective-1) と、別のファミリーのRNA結合タンパク質 SUP-12 が協同して *egl-15* の組織特異性を制御することを見出した(Mol Cell Biol, 2007; Cell Mol Life Sci, 2009)。

我々はまた、線虫のコラーゲン遺伝子 *let-2* の発生段階依存的なエクソン選択性を可視化し、発生段階依存的な変異体を単離・解析して、スプライシング制御因子として新規のSTARファミリーRNA結合タンパク質 ASD-2 を同定した。さらに、一部のイントロンのみが除去されたプロセシング中間体を変異体から検出することにより、選択的スプライシングによるmRNA前駆体の運命決定に重要なイントロン除去の順序を明らかにした(Genes Dev, 2008)(図2)。

これらの成果は、選択的スプライシングレポーターを用いることで、これまで解析されていなかった生体内における選択性制御機構を明らかにできることを示している。さらに、我々が線虫で同定したスプライシング制御因子が哺乳類にまで保存されていることから、選択的スプライシングによる遺伝子発現制御そのものが進化的に保存されていることが明らかとなりつつある。

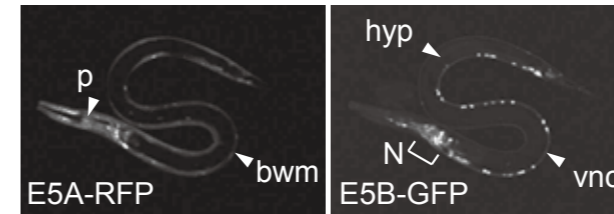


図1. 組織特異的選択的スプライシングレポーター線虫。エクソン5Aの発現を示すRFPとエクソン5Bの発現を示すGFPが組織により異なった発現パターンを示している。

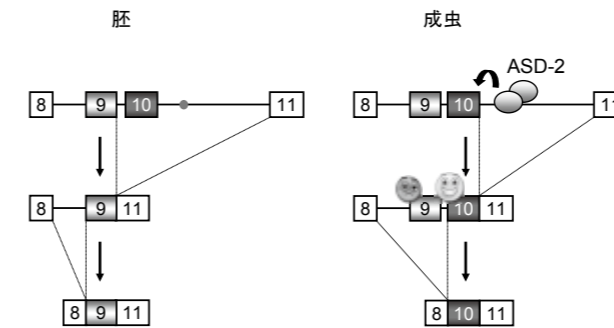


図2. *let-2* mRNA 前駆体のプロセシング経路の解明。胚の時期にはエクソン9下流のエクソン10を含むイントロン領域がまず除かれ、続いて残った上流のイントロンが除かれることによりエクソン9を含むmRNAが生じる(左図)。成虫においては、ASD-2によってエクソン10下流のイントロンの除去が促進され、その後、スプライスアクセプター部位の相対的な強さの違いによりエクソン10選択が一義的に決まる(右図)。

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

我々は上述の線虫を用いた遺伝学的解析により、モデル遺伝子の選択的スプライシングの制御因子を同定し、さまざまな変異体入手している。そこで、これら制御因子変異体と野生型のmRNAを大規模シーケンス解析して比較することにより、選択的スプライシングパターンに差がある遺伝子の同定を行っている。さらに、得られた標的遺伝子の生体内スプライシングレポーター線虫を作製し、これらの標的遺伝子のスプライシング制御パターンの解析を行っている。

同一の制御因子によって制御を受ける標的遺伝子を多数同定したことで、制御に必要なシスエレメントを生物情報学的な解析によって同定したり、シスエレメントの位置とスプライシング制御因子の効果についての関連性を解析したりすることが可能となった。これをさまざまな制御因子の変異体で並行して行うことで、スプライシング暗号の一般化に向けた取り組みを進めている。

3. 脊椎動物 Ttn 遺伝子の心筋特異的・発生段階依存的選択的スプライシング制御機構の解析

哺乳類の心筋、骨格筋のサルコメアに存在する titin タンパク質は、筋繊維の静止張力を生む主成分である。Titin タンパク質の分子量は胎生期の心筋、成体の心筋と骨格筋で異なり、これは選択的スプライシングにより

制御されている。*Ttn* 遺伝子や他のサルコメアタンパク質の遺伝子の変異により拡張型心筋症になるが、拡張型心筋症の心筋では、Titin タンパク質の分子量が大きく、サルコメアが長くなり、心筋の静止張力が低下することが知られている。

そこで我々は、脊椎動物をモデルとして生体内での心筋の選択的スプライシングパターンをモニターするレポーター動物の作製を目指している。そして、発生過程でのスプライシングパターンの変化や、病態モデルでのスプライシングパターンの変化を生体で観察し、スプライシングパターンの変化に関与する因子やエレメントを同定したり、スプライシングパターンを制御できる薬物をスクリーニングしたりすることを通じて、*Ttn* 遺伝子の選択的スプライシングの制御が拡張型心筋症の発症の制御や症状の低減につながる可能性について解析していきたいと考えている。

人事異動

2011年2月、藤森浩中が医歯学総合研究科博士課程の研究に参加（～8月）
2月、生嶋倫子が文部科学省大臣官房へ転出
3月、大野源太が生命情報科学教育部博士後期課程修了、博士号取得
3月、川村豪伸が博士号取得
3月、都甲麻理奈と薄井知美が生命情報科学教育部博士前期課程修了、修士号取得
3月、武井理美が医学部保健衛生学科の卒業研究に参加
3月、片岡直行特任講師（難治疾患研究所MTT）が京都大学へ転出
3月、吉田真由美（京都大学大学院生命科学研究科）が研究指導委託終了
3月、井手上社子特任助教とSaaimatul HUQ 技術補佐員が退職
4月、山本誠とNguyen Bao NGOC が京都大学大学院医学研究科へ研究指導委託
4月、渡辺要平技術補佐員が京都大学から帰任
12月、木村まり子特任助教が着任

研究室移転
2011年2月、M&Dタワー22階から難治疾患研究所駿河台棟5階へ移転

業績目録

原著論文

Atsushi Nishida, Naoyuki Kataoka, Yasuhiro Takeshima, Mariko Yagi, Hiroyuki Awano, Mitsunori Ota, Kyoko Itoh, Masatoshi Hagiwara & Masafumi Matsuo. “Chemical treatment enhances skipping of a mutated exon in the dystrophin gene.” Nature Communications (2011) 2: 308.

海外招待講演

Hidehito Kuroyanagi. “Deciphering splicing codes by visualizing alternative splicing patterns in vivo.” National Taiwan University、台湾、11月.

Hidehito Kuroyanagi. “Regulation of Tissue-Specific Alternative Splicing in *C. elegans*.” Academia Sinica、台湾、11月.

国際学会等発表

Genta Ohno, Kanako Ono, Yohei Watanabe, Marina Togo, Shoichiro Ono, Masatoshi Hagiwara, Hidehito Kuroyanagi. “ASD-2 and SUP-12 cooperatively regulate muscle-specific alternative splicing of the ADF/cofilin gene in *C. elegans*.” NTU-JST Joint Meeting on RNA & Biofunctions - Asia Studies、台北、台湾、11月.

Hidehito Kuroyanagi, Masatoshi Hagiwara, “FOX-1 family and UNC-75 regulate neuron-specific alternative splicing of the *unc-32* gene.” 18th International *C. elegans* Meeting, Los Angeles, CA, USA、6月.

国内招待講演

黒柳秀人「生体における選択的スプライシングの可視化と制御機構の解析」第26回理化学研究所ケミカルバイオロジー研究領域勉強会　理化学研究所和光本所　鈴木梅太郎記念ホール、埼玉県和光市、1月

学内外教育活動

黒柳秀人：大学院生命情報科学教育部、医学部保健衛生学科

競争的研究費

黒柳秀人（個人研究者）　科学技術振興機構　さきがけ「RNA と生体機能」
「mRNA 選択的プロセシングを制御する細胞暗号の解明」
黒柳秀人(代表)　新学術領域研究「RNA 制御学」
計画研究　「生体における組織特異的選択的スプライシング制御機構の解明」

黒柳秀人（共同代表）　日本学術振興会　二国間交流事業　日仏交流促進事業（SAKURA）
「Genome-wide screening for alternative splicing regulators by utilizing a bi-chromatic expression profiler」
大野源太（代表）　日本学術振興会　特別研究員奨励費　「発生段階依存的な選択的スプライシング制御機構の解明」

大学院疾患生命科学部 薬化学分野

教授：影近弘之 助教：藤井晋也 特任助教：森 修一

研究内容

薬化学分野では、有機化学を基盤とした生理活性物質や機能性分子の創製を主な研究目的としている。医薬化学研究では、単に活性物質の構造修飾や計算化学的な活性構造の考察にとどまらず、実際に医薬品としての臨床応用を志向した創薬研究に取り組んでいる。近年の創薬研究においては、分析、分離、計算化学などの著しい進歩によって新たな手法の開発が盛んに行われており、これらの最新の技術を、これまでの有機化学、医薬化学研究での経験と知識に組み込み、独自の医薬化学研究を展開している。現在の主な生体内分子標的は種々の核内受容体群である。一方、細胞内情報伝達系を構築する基本的な情報を網羅的に解析するための方法論の開発も目指している。また、芳香族アミド類の立体化学に関して興味深い現象を見いだしており、ユニークな立体挙動を示す有機化合物を題材にして、基礎化学、医薬化学ばかりでなく材料化学、物性科学への展開を志向して研究を進めている。

研究紹介

1. 核内受容体を分子標的とした医薬化学研究

核内受容体は、固有の脂溶性低分子化合物により活性化されてはじめて特異的応答遺伝子の発現を制御するリガンド依存的転写因子である（図1にレチノイドの場合を例示）。従って、ハウスキーピング的転写装置である基本転写因子群とは異なり、核内受容体は転写の質及び量を特異的に調節する転写制御因子と考えられ、その結果、細胞や個体の分化、増殖、発生、代謝、恒常性などを厳密に調節している。更に、近年、種々の核内受容体が、癌、心血管系疾患、自己免疫疾患、炎症性疾患、生活習慣病など、様々な難治性疾患の発症と治療に関与していることが明らかにされ、重要な創薬分子標的として注目されている。

筆者らは、レチノイドの核内受容体 RAR (Retinoic Acid Receptor)、RXR (Retinoid X Receptor) の特異的リガンドを種々創製してきた。特に、RAR 選択的アゴニストである Am80 (一般名：タミバロテン、図1) は難治性及び再発の前骨髄球性白血病 (APL) の治療薬として我が国で認可された (平成 17 年)。更に、

Am80 を APL 治療以外の難治性疾患へ応用する目的で、血管病変 (動脈硬化症、再狭窄)、自己免疫疾患 (クローン病、リウマチ) などのモデル動物に対する有効性を明らかにした。現在、Am80 の適応拡大に向けた基礎、応用研究を推進するとともに、様々な疾患の治療薬開発を目的に、特徴的な構造、生物活性を有する各種核内受容体リガンドの創製を行っている。

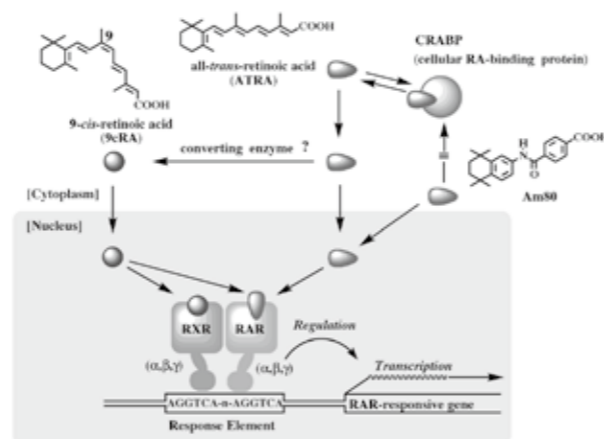


図1 レチノイド核内受容体の作用機序と合成レチノイド Am80 の作用

本年度は、核内受容体の多彩な生理作用を詳細に解析する分子プローブの開発を行った。既に当研究室で構築した蛍光化合物 (クマリン誘導体) ライブラリーをもとに、プロゲステロン受容体 (PR) のリガンドとして機能し、受容体との結合の前後に蛍光特性の異なる化合物を探索した。その結果、ライブラリー中の化合物1が PR アンタゴニスト活性を有することをみだし、構造最適化することによって、強力な PR アンタゴニスト活性もつ化合物2および3を創製した (図2)。このうち、化合物2は、高い PR 結合親和性をもち、PR との結合によって、蛍光強度が著しく増大することがわかった。

2. 細胞内情報伝達機構解析に有用な機能性蛍光物質の開発

特定の機能を持った蛍光物質は、多くの分野の科学研究において非常に有用である。例えば、特定の化学種 (イオン、小分子、酵素) と結合または反応することによってその蛍光特性 (励起波長、蛍光波長、蛍光強度) が変化する機能をもった蛍光分子は、分子種の濃度や活性を蛍光の変化から見積もることができる。このような機能

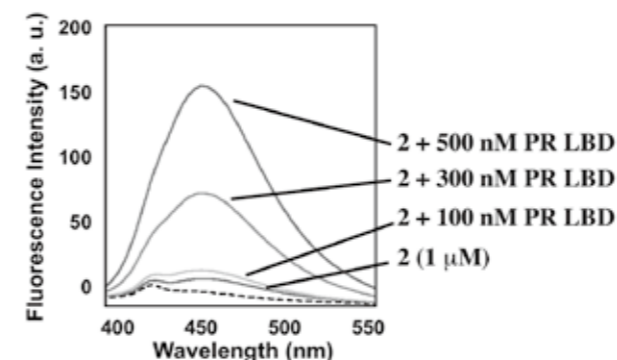
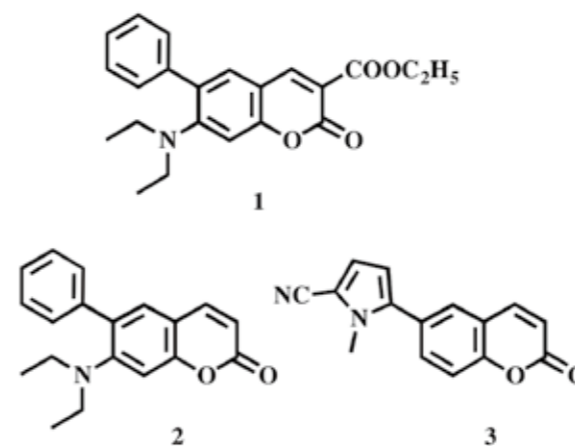


図2 蛍光性 PR アンタゴニストの構造と蛍光特性

性蛍光物質の開発は、これまで経験則、論理的な分子デザインによって行われてきた。一方、筆者らは、単一の出発物質から多数の化合物を効率良く合成していくコンビナトリアル合成によって構築される化合物ライブラリーが有用であると考え、蛍光物質ライブラリーの構築を行ってきた。更に、今年度は、蛍光化合物であるクマリンの構造を基盤として、同じ認識部位に対して、異なる蛍光特性変化を引き起こす化合物群の創製を行った。すなわち、化合物4と5はともにクマリンの6位に Na⁺ イオンに対する認識部位であるクラウンエーテルを有しているが、7位の置換基が異なっている。この隣接する7位の置換基が Na⁺ イオンを認識した際の蛍光変化に影響を与えると考えた。実際、化合物4は Na⁺ イオンと結合することにより、蛍光強度が変化する特性を持っていた。一方、化合物5は Na⁺ イオンと結合することにより、蛍光波長が変化することがわかった。このように、クマリンという単一の骨格に対して、認識部位と蛍光変化制御部位を組み込むことで、様々なタイプの蛍光センサーの開発が可能であると考えられる。

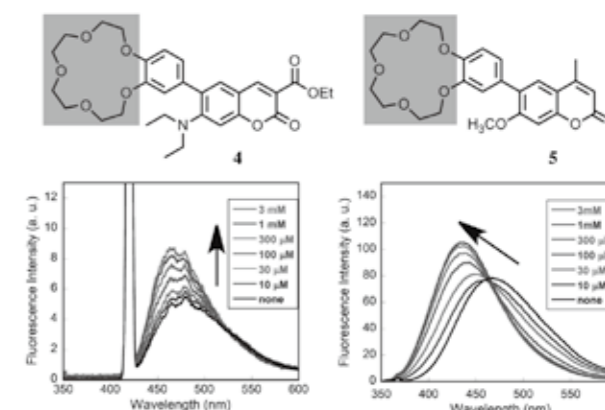


図3 Na⁺ イオンに対して異なる応答を示す蛍光センサーの開発

3. 芳香族アミドの立体特性と機能性分子創製

アミド結合は、蛋白質の構成単位として、その立体構造を規定しているばかりでなく、様々な生理活性物質や機能性分子の鍵構造として見いだすことができる。一般に、アミド結合やその類縁官能基であるウレア、スルホンアミド、グアニジノ結合等は、水素結合部位に富んだグループとして、分子内もしくは分子間の電子的相互作用を意図して分子構築に用いられる。しかし、これらの官能基の立体挙動が分子の三次元構造や物性に関わることも多い。筆者らは、芳香族二級アミドならびに関連する官能基が N-メチル化されるとシス型構造を優先することを見いだしている。この性質は一般性を持ったアミド基の立体特性であり、また、この性質を用いてユニークな立体構造や動的挙動を有する芳香族分子を創製することができる。本年度は、このアミドの立体特性を応用すると、ユニークな構造をもつ環状トリアミドを創製することを示した。化合物6は、再結晶によって、一方のエナンチオマーからなるカプセル型二量体構造をもつキラルな結晶を与えた。大環状有機化合物はシクロデキストリンやカリックスアレーンのように分子認識等の機能を有している。骨格自身にキラリティーを持つ環状トリアミドは、不斉認識能等独特の性質を発揮すると考えている。

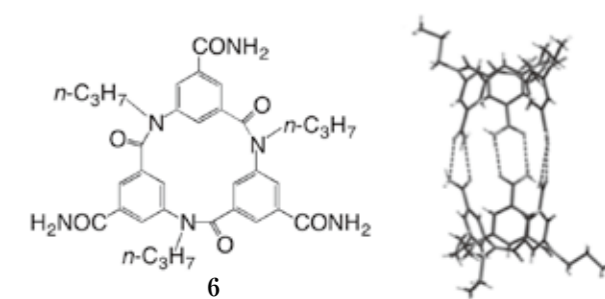


図4 環状トリアミドのキラルなカプセル構造

ハイライト
蛍光物質ライブラリーを基にした蛍光センサー開発
測定対象の化学種と結合または反応することにより蛍光特性が変化する蛍光センサーは、細胞生物学、分析化学等の分野において有用な機能性分子である。近年、測定することが求められる対象は、イオン、活性酸素種のような“小さな”分子に留まらず、特定の蛋白質、細胞種にまで及んでいる。このような“大きな”測定対象に対する蛍光センサー開発において有用な手法は、多種類の蛍光物質からなる蛍光物質ライブラリーを基にした開発法である。蛍光物質ライブラリーは多様な構造を持った蛍光物質群である。従来の化合物ライブラリーを用いた手法と同様に、受容体蛋白質であればリガンド分子、酵素であれば阻害剤が“ヒット”してくるが、ヒットしてきた分子が蛍光を持つという特徴がある。そのため、ヒットした分子は受容体蛋白質、酵素等の局在を蛍光の集積により可視化する蛍光センサーとなりえる。更に、内因性の生体内分子と同様の代謝反応を受けたり、刺激に応じた局在の変化を示す、いわば、蛍光性擬似生体内分子として機能する蛍光センサーも報告されている。最近では、癌細胞、iPS細胞等の特定の細胞種に集積する機能を持つ

人事異動

転入：飯濱翔太郎（大学院生、博士前期課程）、清水章貴（大学院生、博士前期課程）、高口明日香（大学院生、博士前期課程）、竹内由起（大学院生、博士前期課程）、中亮人（大学院生、博士前期課程）、能城静香（大学院生、博士前期課程）、藤原典子（大学院生、博士前期課程）、樋口智章（大学院生、博士前期課程）、武者祥昭（大学院生、博士前期課程）、渡邊優子（大学院生、博士前期課程）

転出：白石拓也（大学院生、博士前期課程）、中津亜紀（大学院生、博士前期課程）、高垣亮平（大学院生、博士前期課程）、小林周作（大学院生、博士前期課程）

業績目録

原著論文

1. Katagiri, K., Furuyama, T., Masu, H., Kato, T., Matsumura, M., Uchiyama, M., Tanatani, A., Tominaga, M., Kagechika, H., Yamaguchi, K., Azumaya, I. Calix[3]amide-based anion receptors: High affinity for fluoride ion and a twisted binding model. Supramol. Chem. 23: 125-130, 2011.
2. Cui, H., Okuhira, K., Ohoka, N., Naito, M., Kagechika, H., Hirose, A., Nishimaki-Mogami, T. Tributyltin chloride induces ABCA1 expression and apolipoprotein A-I-mediated cellular cholesterol efflux by activating LXRA/alpha/RXR. Biochem. Pharmacol. 81: 819-824, 2011.
3. Huang, J. K., Jarjour, A. A., Nait-Oumesmar, B., Kerninon, C., Williams, A. Krezel, W., Kagechika, H., Bauer, J., Zhao, C., Baron-Van Evercooren, A., Chambon, P., Ffrench-Constant, C., Franklin, R. J. M. Retinoid X receptor gamma signaling accelerates CNS remyelination. Nature Neurosci. 14: 45-53, 2011.
4. Ohta, K., Kawachi, E., Fukasawa H., Shudo, K., Kagechika, H. Diphenylamine-based Retinoid Antagonists: Regulation of RAR and RXR Function Depending on the N-Substituent. Bioorg. Med. Chem. 19: 2501-2507, 2011.
5. Masu, H., Sagara, Y., Imabeppu, F., Takayanagi, H., Katagiri, K., Kawahata, M., Tominaga, M., Kagechika, H., Yamaguchi, K., Azumaya, I. Crystal structure of spherical aromatic amide: pseudopolymorphs and formation of infinite water cluster in the channel structure. CrystEngComm 13: 406-409, 2011.
6. Gongal, P. A., March L. D., Holly V. L., Pillay L. M., Berry-Wynne K. M., Kagechika, H., Waskiewicz, A. J. Hmx4 regulates Sonic hedgehog signaling through control of retinoic acid synthesis during forebrain patterning. Div. Biol. 355: 55-64, 2011.
7. Hoshikawa, Y., Kanki, K., Ashla, A.A., Arakaki, Y., Azumi, J., Yasui, T., Tezuka, Y., Matsumi, Y., Tsuchiya, H., Kurimasa, A., Hisatome, I, Hirano, T., Fujimoto, J., Kagechika, H., Shomori, K., Ito, H., Shiota, G. c-Jun N-terminal kinase activation by oxidative stress suppresses retinoid signaling through proteasomal degradation of retinoic acid receptor alpha protein in hepatic cells. Cancer Sci. 102: 934-941, 2011.
8. Ohta, K., Goto, T., Fujii, S., Kawahata, M., Oda, A., Ohta, S., Yamaguchi, K., Hirono, S., Endo, Y. Crystal structure, docking study and structure-activity relationship of carborane-containing androgen receptor antagonist 3-(12-hydroxymethyl-1,12-dicarba-closo-dodecarboran-1-yl)benzonitrile. Bioorg. Med. Chem. 19: 3540-3548, 2011.
9. Villablanca, E. J., Wang, S., de Calisto, J., Gomes, D. C. O., Kane, M. A., Napoli, J. L., Blaner, W. S., Kagechika, H., Blomhoff, R., Roseblatt, M., Bono, M. R., von Andrian, U. H., Mora, J. R. MyD88 and Retinoic Acid Signaling Pathways Interact to Modulate Gastrointestinal Activities of Dendritic Cells. Gastroenterology 141: 176-185, 2011.
10. Uruno, A., Noguchi, N., Matsuda, K., Nata, K., Yoshikawa, T., Chikamatsu, Y., Kagechika, H., Harigae, H., Ito, S., Okamoto, H., Sugawara, A. All-trans retinoic acid and a novel synthetic retinoid tamibarotene (Am80) differentially regulate CD38 expression in human leukemia HL-60 cells: possible involvement of protein kinase C-delta. J. Leukocyte Biol. 90: 235-247, 2011.
11. Iwashita, M., Fujii, S., Ito, S., Hirano, T., Kagechika, H. Efficient and diversity-oriented total synthesis of Riccardin C and application to develop novel macrolactam derivatives. Tetrahedron 67: 6073-6082, 2011.
12. Fujii, S., Yamada, A., Tomita, K., Nagano, M., Goto, T., Ohta, K., Harayama, T., Endo, Y., Kagechika, H. p-Carborane-based androgen antagonists active in LNCaP cells with a mutated androgen receptor. Med. Chem. Commun. 2: 877-890, 2011.
13. Sakai,H., Hirano, T., Mori,S., Fujii, S., Masuno, H., Kinoshita, M., Kagechika, H., Tanatani, A. 6-Arylcoumarins as novel nonsteroidal type progesterone antagonists: An example with receptor-binding-dependent fluorescence. J. Med. Chem. 54: 7055-7065, 2011.
14. Kudo, M., Azumaya, I., Kagechika, H., Tanatani, A. Synthesis of soluble aromatic multi-layered tetra(m-phenylurea) and analysis of its helical conformation in various solvents.

蛍光センサー開発にも応用されている等、応用性は幅広く、今後の蛍光センサー開発のスタンダードとなりえる手法である。

当分野においても、研究概要 1、2 で述べたように、蛍光物質クマリンを母核としたライブラリーを構築している。クマリンは、これまで様々な受容体蛋白質に対するリガンド分子の基本骨格となることが報告されている、いわば、“Ligand Like”、“Drug Like”な蛍光団である。構築したライブラリーを、これまで当分野が研究対象としてきた、核内受容体群に対するリガンド探索に適用したところ、図2に示す、プロゲステロン受容体に対するリガンド分子を見いだすことに成功した。さらに見いだされたりガンド分子は、受容体との結合前後で蛍光強度が変化する機能も有しており、スクリーニング系の構築、受容体の高感度なイメージングへと適用可能な分子である。一方で、本ライブラリー構築に用いた合成法は、研究概要 2 で述べたような様々な機能を持つ蛍光センサー開発に応用可能であった。今後は、さらに多様な測定対象に対する蛍光センサー開発へと適用すべくライブラリーの拡張および、スクリーニングを行っていく予定である。

Chirality 1E: E84-E90, 2011.
15. Fujii, S., Masuno, H., Taoda, H., Kano, A., Wongmayura, A., Nakabayashi, M., Ito, N., Shimizu, M., Kawachi, E., Hirano, T., Endo, Y., Tanatani, A., Kagechika, H. Boron Cluster-based Development of Potent Non-Secosteroidal Vitamin D Receptor Ligands: Direct Observation of Hydrophobic Interaction between Protein Surface and Carborane. J. Am. Chem. Soc. 133: 20933-20941, 2011.

著書及び総説

1. 影近弘之, 棚谷綾：核内受容体を標的とするケミカルバイオロジー、生体の化学 62: 480-481, 2011.

国際学会発表

一般講演

1. Fujii, S., Masuno, H., Nakabayashi, M., Hirano, T., Kawachi, E., Ito, N., Kagechika, H. Development and structural basis of novel non-secosteroidal VDR ligands based on hydrophobic carborane cage. IME Boron XIV, Niagara Falls, Canada, Sep. 2011.
2. Yamada, A., Fujii, S., Tomita, K., Nagano, M., Harayama, T., Ohta, K., Endo, Y., Kagechika, H. Development of novel carborane-based androgen receptor antagonists effective for mutated receptor. IME Boron XIV, Niagara Falls, Canada, Sep. 2011.
3. Wongmayura, A., Fujii, S., Sekine, R., Kano, A., Kawachi, E., Masuno, H., Hirano, T.,, Kagechika, H., Tanatani, A. Novel non-secosteroidal vitamin D receptor ligands bearing a spherical hydrophobic core-Difference between carborane and bicyclohydrocarbon-. IME Boron XIV, Niagara Falls, Canada, Sep. 2011.
4. Hirano, T., Shiraishi, T., Kubo, H., Hiromoto, K., Kagechika, H. Facile Method for the Development of Various Fluorescent Sensors Based on the Construction of Coumarin Compound Library. AIMECS11, Tokyo, Dec. 2011.
5. Fujii, S., Iwashita, M., Ito, S., Hirano, T., Kagechika H.Efficient and Diversity-Oriented Total Synthesis of Riccardin C. AIMECS11, Tokyo, Dec. 2011.
6. Mori, S., Iwase, K., Iwanami, N., Tanaka, Y., Kagechika, H., Hirano, T. Development of Novel Bisubstrate-Type Inhibitor of Histone Methyltransferase SET7/9. AIMECS11, Tokyo, Dec. 2011.
7. Masuno, H., Fujii, S., Miyajima, Y., Kawachi, E., Kagechika, H. Development of Silicon- and Germanium-containing Ligands for Nuclear Receptors. AIMECS11, Tokyo, Dec. 2011.
8. Yamada, A., Fujii, F., Tomita, K., Nagano, M., Harayama, T., Ohta, K., Endo, Y., Kagechika, H. Development of Novel AR Antagonists Active in LNCaP Cells with Mutated Androgen Receptor. AIMECS11, Tokyo, Dec. 2011.
9. Nakano, E., Yanagida, N., Mori, S., Fujii, S., Kagechika, H. Development of Novel Progesterone Receptor Antagonists Based on Boron Cluster as a Hydrophobic Core Structure. AIMECS11, Tokyo, Dec. 2011.

国内招待講演

1. 影近弘之. 核内受容体リガンドの創製と医薬への応用. 帝人ファーマセミナー, 東京, 2011年3月.

国内学会

1. 平野智也, 秋山淳, 藤原敬士, 影近弘之. Tricarbocyanine 類の分子内会合現象制御を利用した蛍光センサー開発. 日本化学会第 91 春期年会, 横浜, 2011年3月.
2. 白石拓也, 久保晴子, 廣本健一, 平野智也, 影近弘之. クマリンを基本骨格とする蛍光センサーの開発研究. 日本薬学会第 131 年会, 静岡, 2011年3月.
3. 藤原敬士, 平野智也, 影近弘之. BODIPY 類の会合現象制御を 利用した蛍光センサーの開発研究. 日本薬学会第 131 年会,静岡,2011年3月.
4. 関根良太, 藤井晋也, 増野弘幸, 加納敦, 中林誠, 伊藤暢聡, 河内 恵美子, 棚谷綾,平野智也, 影近弘之. カルボランを基盤とした新 規非セコステロイド型ビタミン D 受容体リガンドの創製. 日本薬学会第 131 年会, 静岡, 2011年3月.
5. 中野英一, 藤井晋也, 森修一, 柳田尚毅, 影近弘之. カルボランを 基盤とした新規非ステロイド型 PR リガンドの創製. 日本薬学会第 131 年会, 静岡, 2011年3月.
6. 宮島友, 藤井晋也, 増野弘幸, 影近弘之. ケイ素およびゲルマニウ ム含有フェノール誘導体の性質と生物活性. 日本薬学会第 131 年会,静岡, 2011年3月.
7. 伊藤茂, 武知進士, 山口忠敏, 平野智也, 杉本昭子, 影近弘之. メチル置換ジヒドロピラジン類の潜在的エナミン性の確認. 日本薬学会第 131 年会, 静岡, 2011年3月.
8. 谷口香織, 小沢正晃, 滝沢進也, 村田滋, 平野智也, 影近弘之, 岸田晶夫, 大崎愛弓. *Quassia amara* 由来の新規蛍光分子の構造と生細胞への適用. 日本薬学会第 131 年会, 静岡, 2011年3月.
9. 藤本慎子, 松村実生, 榊飛雄真, 片桐幸輔, 東屋功, 影近弘之, 棚谷綾. 芳香族環状トリアミドのキラリティーと自然分晶. モレキュラー・キラリティー 2011, 東京, 2011年5月.
10. 白石拓也, 久保晴子, 廣元健一, 平野智也, 影近弘之. クマリンを基本骨格とする蛍光センサーの開発研究. ケミカルバイオロジー学会第 6 回年会, 東京, 2011年5月.
11. 増野弘幸, 藤井晋也, 前田満将, 前田貴志, 平野智也, 河内恵美子, 影近弘之. ケイ素およびゲルマニウムを持つレチノイド X 受容体 (RXR) リガンドの開発. ビタミン学会第63回大会, 広島, 2011年6月.
12. 影近弘之. レチノイド X 受容体の新規リガンドの創製. 第 331 回脂溶性ビタミン総合研究委員会, 名古屋, 2011年7月.

13. 藤原敬士, 秋山淳, 平野智也, 影近弘之. 蛍光物質の会合現象の解析と、リガンド分子の蛍光ラベル化への応用. 日本化学会関東支部会, 東京, 2011年8月.
14. 平野智也, 岩瀬健太, 森修一, 岩浪直子, 田中裕二郎, 影近弘之. 補酵素構造を基にした、ヒストンメチル化酵素 SET7/9 に対する bisubstrate 型阻害剤の開発. 第 5 回バイオ関連化学シンポジウム, つくば, 2011年9月.
15. 藤原敬士, 秋山淳, 影近弘之, 平野智也. 会合現象制御を利用した蛍光センサーの開発. 日本分析化学会第 60 年会, 名古屋, 2011年9月.
16. 白石拓也, 久保晴子, 廣元健一, 影近弘之, 平野智也. クマリンを基本骨格とする多機能性蛍光センサーの効率的な開発法の構築. 日本分析化学会第 60 年会, 名古屋, 2011年9月.
17. 大崎愛弓, 谷口香織, 滝沢進也, 平野智也, 村田滋, 影近弘之, 岸田晶夫. 熱帯産薬用植物 *Quassia amara* 由来の新規蛍光物質の構造と生細胞への適用. 第 53 回天然有機化合物討論会, 大阪, 2011年9月.
18. 神田翠, 藤井晋也, 片桐幸輔, 榊飛雄真, 東屋功, 影近弘之, 棚谷綾. *N,N*-ジアリアルスクアルアミドの立体特性、第 36 回反応と合成の進歩シンポジウム, 徳島, 2011年11月.

19. 高垣亮平, 森修一, 影近弘之. ホウ素クラスター含有二級アルコールのリパーゼによる光学分割. 第 15 回生体触媒化学シンポジウム, 東京, 2011年12月.

研究助成金

影近弘之：文部科学省科学研究費・新学術領域研究「核内受容体を介した生体システム状態変動の細胞階層における解析」(代表)

影近弘之：文部科学省科学研究費・萌芽研究「ビタミンKの新しい機能解明を志向した医薬化学研究」(代表)

藤井晋也：文部科学省科研費・若手研究B「高周期 14 族元素の生理活性分子疎水性フラグメントとしての展開」(代表)

森修一：文部科学省科研費・若手研究B「新規蛍光プローブを利用した、ヒストンメチル化酵素阻害剤スクリーニング系の開発」(代表)

森修一：笹川科学研究助成「酵素ポケットの不斉空間を利用した、新規不斉反応の開発研究」(代表)

大学院疾患生命科学研究所 ケミカルバイオロジー分野 生命有機化学研究室

教授：細谷孝充 助教：吉田 優、隅田有人

研究内容

生命有機化学研究室では、有機合成化学を基盤として生命科学現象の解明に有用な新しい方法論の開発を目指して、研究を行っている。とくに、高い反応性を潜在する化合物を利用し、目的の生体分子を選択的に化学修飾する技術を開発している。加えて、ヒトへの応用を指向した生体分子イメージング法に適用できるプローブの開発に向けて、新たな基盤技術の創出に向けた基礎研究を行っている。さらに、これらの研究過程で直面する課題を、有機化学的新手法を案出することで解決しながら、オリジナリティーの高い、疾患の治療薬および早期診断薬の開発に貢献することを目指している。

研究紹介

1. クリック反応を用いる新しい分子連結法の開発

特異な反応性を持つ化合物を創出し、生体分子修飾に有用な分子連結法の開発を行っている。

生体分子機能を調べるためには、目的の分子だけを観測あるいは捕捉できることが望ましい。これを可能にする手法として、近年、アジドとアルキンとの環化付加反

応に代表されるクリック反応が汎用されている。アジドとアルキンはいずれも生体内には存在しない bioorthogonal な官能基であるため、この反応によって標的の分子だけを狙って標識することができる。とくに、最近、このクリック反応が無触媒で進行するような環状アルキンが相次いで開発されている。

これに対して我々は、より簡便な生体分子の化学修飾法を開発する目的で、ジイン1を用いてアジド分子同士を連結する「ダブルクリック法」の開発に成功した(図1a)。本手法は、ジイン1を共通して利用し、入手容易なアジド化合物によってアジド基を有する生体分子を標識できる実用的な手法である。今回我々は、ダブルクリック法のさらなる効率向上を目指し、ジアジド2を用いる段階的なダブルクリック反応を考案した。すなわち、立体障害によってかさ高いアジド基の反応性が大きく低下することを期待し、立体的な環境の大きく異なる2つのアジド基を配置したジアジド2を設計した(図1b)。実際に、ジアジド2に対してアルキン3aを作用させたところ、期待通り、モノ環化付加体を高選択的に得ることができた。しかし、得られた主生成物は、予期に反し、

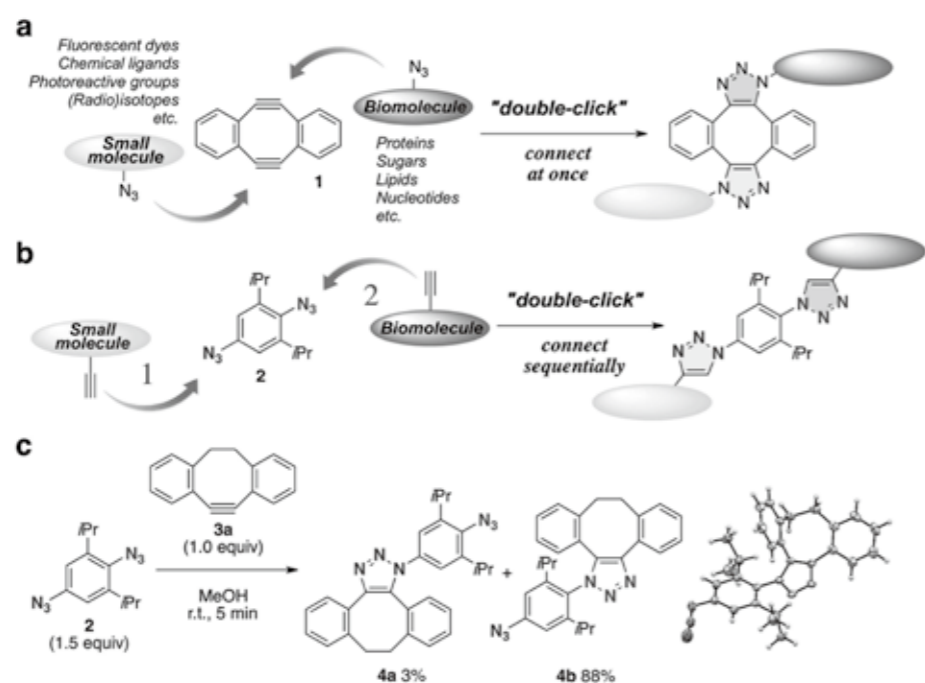


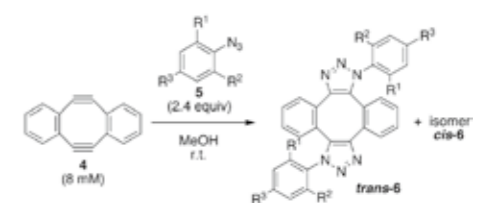
図1 逐次ダブルクリック反応の開発

かさ高いアジド基で反応した化合物4bであった(図1c)。当初の想定とは異なる結果となったものの、4bにはさらにクリック反応が可能な未反応のアジド基が残存しているため、ジアジド2は逐次連結に有効な分子であるといえる。一方で、ジアジド2の示した、一見すると異常な反応性が大変興味深かったことから、我々はその要因の解明に取り組むことにした。

まず、かさ高い置換基を有するアジド化合物のクリック反応性に関して精査した。具体的には、重メタノール中で各種アジド5とジイン1との反応を行い、¹H NMRを用いて追跡した。その結果、ベンジルアジド(5a, 87%/30分)、かさ高い脂肪族アジドであるアダマンチルアジド(5b, 18%/4時間)と比べて、かさ高い芳香族アジドである2,6-ジイソプロピルフェニルアジド(5c, quant./<5分)が著しく高い反応性を示すことが分かった。

次に、各種芳香族アジドとジインとの反応を行い、ベンゼン環上の置換基がアジド基の反応性に与える影響を精査した(図2)。その結果、置換基の及ぼす電子的な影響はそれほど大きくない一方、アジド基の両オルト位に置換基を有するときには、アジド基の反応性が大きく向上することが明らかになった。とくに、その置換基が大きくなるにつれて、ジインとの反応速度が向上し、イソプロピル基を有するときには76倍もの反応性を示した。

両オルト位のかさ高い置換基によって、アジド化合物のクリック反応性が著しく向上することが明らかになっ



Entry	R ¹	R ²	R ³	5	6	Yield/% ^a (trans/cis) ^b	k/M ⁻¹ s ⁻¹	k _{rel}
1	H	H	H	5d	6d	94 (43/57) ^c	8.8 × 10 ⁻³	1
2	H	H	OMe	5e	6e	89 (36/64)	3.3 × 10 ⁻²	3.8
3	H	H	CF ₃	5f	6f	97 (50/50)	7.9 × 10 ⁻³	0.9
4	Me	H	H	5g	6g	98 (52/48)	1.2 × 10 ⁻²	1.4
5	iPr	H	H	5h	6h	95 (60/40)	8.9 × 10 ⁻³	1.0
6	Me	Me	H	5i	6i	92 (64/36)	3.2 × 10 ⁻¹	36
7	Et	Et	H	5j	6j	93 (73/27)	3.8 × 10 ⁻¹	43
8	iPr	iPr	H	5c	6c	95 (96/4)	6.7 × 10 ⁻¹	76

^aIsolated yields. ^bBased on ¹H NMR analysis except 6d. Stereochemistry was determined by X-ray analysis except 6f.

図2 ジイン1と芳香族アジド5とのダブルクリック反応

た。この結果は、大きな立体障害を凌駕するほど、両オルト位の置換基がアジド基の反応性を向上させていることを示している。そこで、各種分析および理論計算を用いて、この活性化の要因について詳しく調べた。その結果、UVスペクトルにおいて、両オルト位置置換基によるアジド基活性化原理を解明する糸口となる顕著な差を見いだした(図3a)。すなわち、5dでは250 nm付近に強い吸収を持つものに対して、5cでは対応する吸収がほとんど見られないことが明らかになった。この結果は、5dにおけるアジド基とベンゼン環との共鳴に由来する吸収が5cではほとんど観測されていないことを示して

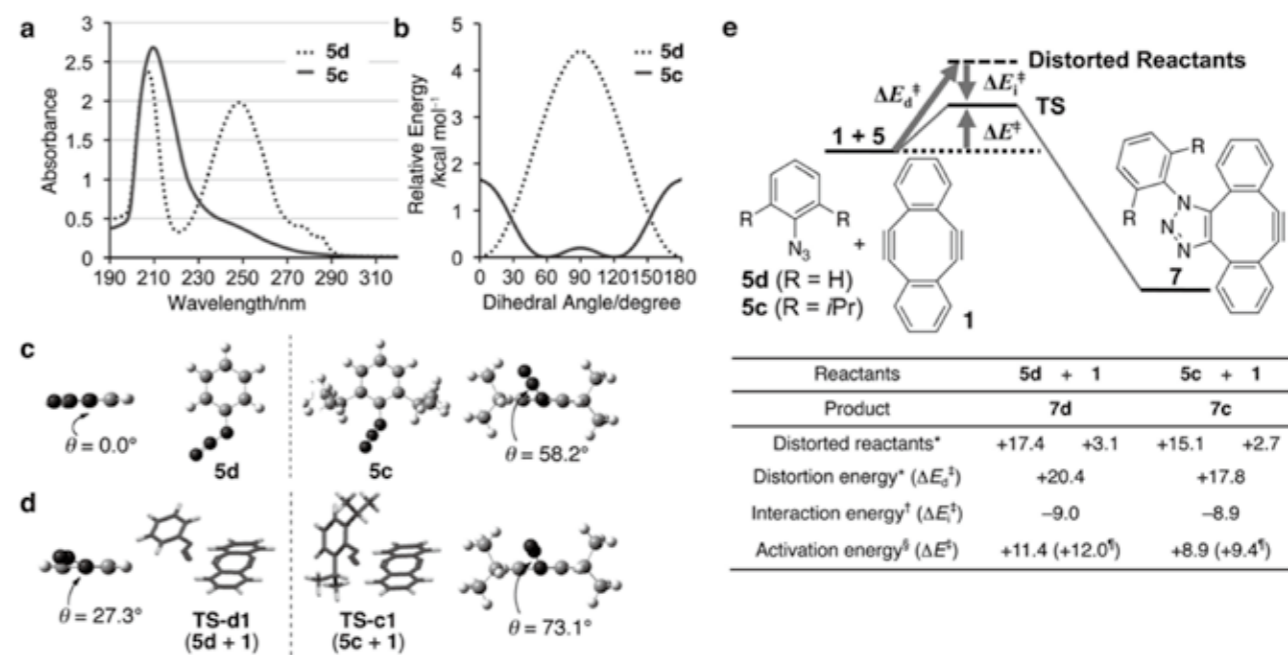


図3 両オルト位のかさ高い置換基が芳香族アジド基に及ぼす効果

(a) Absorption spectra of phenyl azide (5d) and 2,6-diisopropylphenyl azide (5c) in MeOH (100 μM). (b) Calculated rotation energy for azido group of 5d and 5c. (c) Side and overhead views of the global minima on the potential energy surface obtained for 5d and 5c. (d) Calculated transition state (TS) structures for the first cycloaddition of diyne 1 with 5d and 5c and the side views of the azides at the TS. q indicates the rotational angle of the azido group from the aromatic plane. (e) Distortion, interaction and activation energies (in kcal mol⁻¹) for the first cycloaddition. All calculations were performed by a density functional theory (DFT) method (B3LYP/6-31G(d)) with a GAMESS suite of program codes on a Tsubame 2.0 system at Tokyo Institute of Technology.

いる。さらに、理論計算（B3LYP/6-31G(d)）を行い、これらアジドの最安定構造を調べたところ、アジド基とベンゼン環との共鳴の状態が異なることを支持する結果を得ることができた。5dにおいては、直線構造であるアジド基が、ベンゼン環と最も強く共鳴する同一平面に位置するのが安定であることが分かった。一方、2,6-ジイソプロピルフェニルアジドにおいては、両オルト位置換基との反発を避け、アジド基とベンゼン環とが大きくねじれた構造が最安定であった（図3c）。さらに、アジド基を回転させるためのエネルギーを比べると、5cは5dよりもアジド基の回転障壁が小さいことも分かった（図3b）。

次に、理論計算（B3LYP/6-31G(d)）によって、5dおよび5cとジイン1との反応の経路を解析した（図3e）。その結果、それぞれの環化付加反応の遷移状態(TS)構造を得ることができ（図3d）、その活性化エネルギーは、5dの場合は11.4 kcal/mol、5cの場合は8.9 kcal/molと、実験結果をよく再現する結果を得ることができた。さらに、活性化エネルギーに差が生じた要因を精査するため、Houkらにより最近提唱されたDistortion/Interactionモデルを用いて遷移状態構造の解析を行った。その結果、活性化エネルギーの差のほとんどは、5cと5dとのDistortionエネルギーの差であることが分かった。すなわち、5cにおいては、遷移状態構造に至るまでに失う共鳴による安定化がほとんどないため、5dよりも小さなエネルギーで遷移状態構造にまで歪むことができると言える。加えて、ベンジルアジドにおいても、メチレン水素との超共役によるアジド基の安定化への寄与のため、2,6-ジイソプロピルフェニルアジドと比べて反応性が低下していると理解できる。

以上のように、我々は、生体分子の効率の高い化学修飾法を開発する中で、かさ高い芳香族アジド基の新奇な反応性を見いだした。今後、今回開発した逐次ダブルクリック反応や、特徴的な反応性を有するかさ高い芳香族アジドを利用し、有用な生体分子修飾法を開発したいと考えている。さらに、共鳴禁止による官能基の活性化原

人事異動
異動：隅田有人（助教、2012年1月）
業績目録
原著論文
1. Yoshida S, Shiraishi A, Kanno K, Matsushita T, Johmoto K, Uekusa H, Hosoya T. Enhanced clickability of doubly sterically-hindered aryl azides. Sci Rep 1:82 doi: 10.1038/srep00082, 2011. <p>2. Takahashi K, Yamagishi G, Hiramatsu T, Hosoya A, Onoe K, Doi H, Nagata H, Wada Y,</p> <p>Onoe H, Watanabe Y, Hosoya T. Practical synthesis of precursor of [<i>N</i>-<i>methyl</i>-¹³C]vorozole, an efficient PET tracer targeting aromatase in the brain. Bioorg Med Chem, 19(4): 1464-1470, 2011.</p> <p>3. Takahashi K, Onoe K, Doi H, Nagata H, Yamagishi G, Hosoya T, Tamura Y, Wada Y, Yamanaka H, Yokoyama C, Mizuma H, Takashima T, Bergström M, Onoe H, Långström B, Watanabe Y. Increase in hypothalamic aromatase in macaque monkeys treated with anabolic-androgenic steroids: PET study with [¹³C] vorozole. NeuroReport, 22(7): 326-330, 2011.</p> <p>4. Anwar A, Hosoya T, Leong KM, Onogi H, Okuno Y, Hiramatsu T, Koyama H, Suzuki M,</p>

理を拡張し、新しい官能基の活性化法という基礎的かつ重要な手法の開発に繋げていきたいと考えている。

2. 薬剤などの生物活性物質の標的タンパク質の解明研究

薬剤や天然有機化合物などの生物活性物質がどのようなメカニズムでその活性を示すのかはよく分かっていないことが多い。当研究室では、光反応を利用した標的タンパク質の捕獲・同定法（光親和性標識法）に着目して研究を進めている。とくに、放射性同位元素（RI）を用いない方法の開発、新しい光反応性官能基の合成、光ラベル化タンパク質の効率の検出系の開発、実際の光反応性プローブの合成とその標的タンパク質同定研究を一貫して行っている。さらに、薬剤の副作用発現分子機構の解明も目指している。

3. 生体分子イメージングのための新しい生物発光・蛍光システムの開発

オワンクラゲは、発光タンパク質イクオリンを利用して発光する生物である。我々は、その発光基質であるセレンテラジンに着目し、生体分子イメージングに有用なアナログ体の開発を行っている。また、イクオリン発光後に生成する青色蛍光タンパク質（BFP）中の発光クロモフォアであるセレンテラミドのアナログを合成し、新しい性質を有する蛍光タンパク質の開発も目指している。さらに、セレンテラミドの構造を基盤とした生体分子イメージングに有用な蛍光試薬の開発も行っている。

4. 生体内分子イメージングのためのPETトレーサー候補化合物の創製

非侵襲的な生体内分子イメージング法である陽電子放出断層撮影（PET）用トレーサー候補化合物の創製を行っている。薬剤そのものの体内動態とその薬剤が相互作用する標的タンパク質をイメージングすることで、各種疾患の早期発見と治療薬開発の効率化に貢献できると考えている。

Hagiwara M, Garcia-Blanco MA. The Kinase Inhibitor SFV785 Dislocates Dengue Virus Envelope Protein from the Replication Complex and Blocks Virus Assembly. PLoS ONE, 6(8): e23246, 2011.	Hagiwara M, Garcia-Blanco MA. The Kinase Inhibitor SFV785 Dislocates Dengue Virus Envelope Protein from the Replication Complex and Blocks Virus Assembly. PLoS ONE, 6(8): e23246, 2011.
5. Ozawa M, Takahashi K, Akazawa K-h, Takashima T, Nagata H, Doi H, Hosoya T, Wada Y, Cui Y, Kataoka Y, Watanabe Y. Positron Emission Tomography Imaging of Aromatase in Gastric Parietal Cells using [¹³ C]Vorozole. J Nucl Med, 52(12): 1964-1969, 2011.	5. Ozawa M, Takahashi K, Akazawa K-h, Takashima T, Nagata H, Doi H, Hosoya T, Wada Y, Cui Y, Kataoka Y, Watanabe Y. Positron Emission Tomography Imaging of Aromatase in Gastric Parietal Cells using [¹³ C]Vorozole. J Nucl Med, 52(12): 1964-1969, 2011.
6. Sakai D, Kii I, Nakagawa K, Matsumoto HN, Takahashi M, Yoshida S, Hosoya T, Takakuda K, Kudo A. Remodeling of Actin Cytoskeleton in Mouse Periosteal Cells under Mechanical	

Loading Induces Periosteal Cell Proliferation during Bone Formation. PLoS ONE, 6: e24847, 2011.	
7. Islam MdS, Nagasaka R, Ohara K, Hosoya T, Ozaki H, Ushio H, Hori M. Biological Abilities of Rice Bran-derived Antioxidant Phytochemicals for Medical Therapy. Curr Top Med Chem, 11(14): 1847-1853, 2011.	

国際学会	
1. Hosoya T, Kii I, Shiraishi A, Yoshida S, Hiramatsu T, Matsushita T, Uekusa H, Yoshida S, Yamamoto M, Kudo A, Hagiwara M. Strain-promoted double-click reaction for chemical modification of azido-biomolecules. 10th International Symposium on Organic Reactions (ISOR10), Yokohama, Japan, Nov. 2011.	
2. Kanno K, Yoshida S, Shiraishi A, Matsushita T, Johmoto K, Uekusa H, Hosoya T. Enhanced clickability of doubly sterically-hindered aryl azides. 10th International Symposium on Organic Reactions (ISOR10), Yokohama, Japan, Nov. 2011.	
3. Yoshida S, Sumida Y, Iimori R, Sahara-Miura Y, Satoh Ji, Inouye S, Hosoya T. Concise synthesis of v-coelenterazine toward near-infrared bioluminescence imaging. 10th International Symposium on Organic Reactions (ISOR10), Yokohama, Japan, Nov. 2011.	
4. Sumida Y, Yoshida S, Hosoya T. Highly regio- and stereoselective synthesis of (<i>E</i>)- <i>α</i> -silyl- <i>α</i> , <i>β</i> -unsaturated alkenes via palladium-catalyzed hydrosilylation. 10th International Symposium on Organic Reactions (ISOR10), Yokohama, Japan, Nov. 2011.	
国内学会	
1. 細谷孝充, 喜井 勲, 白石 旭, 平松俊行, 松下武司, 植草秀裕, 吉田 優, 山本 誠, 工藤 明, 萩原正敏. ダブルクリック反応：生体分子の新しい化学修飾法. 日本化学会第91 春季年会, 横浜, 2011年3月.	
2. 菅野貴美幸, 吉田 優, 白石 旭, 松下武司, 植草秀裕, 細谷孝充. かさ高い芳香族アジドによるクリック反応の高速化. 日本化学会第91 春季年会, 横浜, 2011年3月.	
3. 吉田 優, 白石 旭, 菅野貴美幸, 松下武司, 植草秀裕, 細谷孝充. かさ高さが加速するクリック反応に関する理論的考察. 日本化学会第91 春季年会, 横浜, 2011年3月.	
4. 岡田健佑, 吉田 優, 松下武司, 植草秀裕, 細谷孝充. 芳香族ニトリルオキシドおよびニトロンの1,3-双極子付加環化反応におけるかさ高い置換基の効果. 日本化学会第91 春季年会, 横浜, 2011年3月.	
5. 飯森理絵, 隅田有人, 吉田 優, 佐原由依子, 佐藤淳一, 井上 敏, 細谷孝充. 近赤外生物発光イメージングを目指した <i>ν</i> -セレンテラジンの高効率合成法の開発. 日本化学会第91 春季年会, 横浜, 2011年3月.	
6. 飯森理絵, 隅田有人, 吉田 優, 佐原由依子, 佐藤淳一, 井上 敏, 細谷孝充. 近赤外生物発光イメージングを目指した <i>ν</i> -セレンテラジンの高効率合成法の開発. 日本化学会第91 春季年会, 横浜, 2011年3月.	
7. 菅野貴美幸, 吉田 優, 白石 旭, 松下武司, 上本紘平, 植草秀裕, 細谷孝充. かさ高い芳香族アジドによるクリック反応の高速化. 日本ケミカルバイオロジー学会第6 回年会, 東京, 2011年5月.	
8. Azlinda Anwar, 細 谷 孝 充, Kok Mun Leong, 小野木博, 奥野友紀子, 平松俊行, 古山浩子, 鈴木正昭, 萩原正敏, Mariano A. Garcia-Blanco. The kinase inhibitor SFV785 dislocates	

dengue virus envelope protein from the replication complex and blocks virus assembly. 日本ケミカルバイオロジー学会第6 回年会, 東京, 2011年5月.	
9. 細谷孝充. 飯森理絵, 隅田有人, 吉田 優, 佐原由依子, 佐藤淳一, 井上 敏. 近赤外生物発光イメージングを目指した <i>ν</i> -セレンテラジンの高効率合成法の開発. 第6 回日本分子イメージング学会総会・学術集会, 神戸, 2011年5月.	
10. 横山ちひろ, 川崎章弘, 高橋佳代, 細谷孝充, 渡辺恭良, 尾上浩隆. 脳内アロマテース活性とコモンマーモセットの社会行動特性との関連： ¹¹ C-cetrozoleを用いたPET 研究. 第6 回日本分子イメージング学会総会・学術集会, 神戸, 2011年5月.	
11. 宮島真理, 楠原洋之, 高橋佳代, 細谷孝充, 高島忠之, 渡辺恭良, 藤田卓也, J. D. Shuetz, 杉山雄一. アロマターゼ阻害剤の血液脳関門を介した輸送機構の解析. 日本薬理学会第26 年会, 東京, 2011年5月.	
12. 吉田 優, 白石 旭, 菅野貴美幸, 松下武司, 上本紘平, 植草秀裕, 細谷孝充. かさ高い芳香族アジドによるクリック反応の高速化. 第99 回有機合成シンポジウム, 東京, 2011年6月.	
13. 菅野貴美幸, 吉田 優, 白石 旭, 松下武司, 上本紘平, 植草秀裕, 細谷孝充. かさ高い芳香族アジドによるクリック反応の高速化. 第46 回有機反応若手の会, 水上, 2011年7月.	
14. 菅野貴美幸, 吉田 優, 白石 旭, 松下武司, 上本紘平, 植草秀裕, 細谷孝充. かさ高い芳香族アジドによる高速クリック反応. 第28 回有機合成化学セミナー, 天童, 2011年8月.	
15. 吉田 優, 喜井 勲, 白石 旭, 平松俊行, 松下武司, 植草秀裕, 山本 誠, 工藤 明, 萩原正敏, 細谷孝充. ダブルクリック反応の開発と生体分子の化学修飾法への応用. 第28 回有機合成化学セミナー, 天童, 2011年8月.	
16. 隅田有人, 吉田 優, 細谷孝充. パラジウム触媒のヒドロシリル化を用いたシリルアルケンおよび <i>α</i> -シリルエステルの合成. 第58 回有機金属化学討論会, 名古屋, 2011年9月.	
17. 吉田 優, 白石 旭, 菅野貴美幸, 松下武司, 上本紘平, 植草秀裕, 細谷孝充. かさ高い芳香族アジド基が有する高いクリック反応性の発見. 第22 回基礎有機化学討論会, 筑波, 2011年9月.	
18. 菅野貴美幸, 吉田 優, 細谷孝充. 逐次クリック反応を指向したアジド−アルキン環化付加反応における選択性の検討. 第22 回基礎有機化学討論会, 筑波, 2011年9月.	
19. 山本 誠, 小野木博, 細谷孝充, 萩原正敏. 宿主機構を標的とした広範囲な抗DNA ウィルス薬の開発. 第84 回日本生化学会大会, 京都, 2011年9月.	
20. 隅田有人, 飯森理絵, 吉田 優, 三浦由依子, 佐藤淳一, 井上 敏, 細谷孝充. 近赤外生物発光イメージングを目指した <i>ν</i> -セレンテラジンの高効率合成法の開発. 第53 回天然有機化合物討論会, 大阪, 2011年9月.	
21. 細谷孝充. 標的タンパク質同定のための有機化学. 新学術領域研究「天然物ケミカルバイオロジー：分子標的と活性制御」キックオフシンポジウム, 横浜, 2011年10月.	
22. 吉田 優, 白石 旭, 菅野貴美幸, 松下武司, 上本紘平, 植草秀裕, 細谷孝充. かさ高い芳香族アジド基の特異な反応性を利用した高速クリック反応. 第37 回反応と合成の進歩シンポジウム, 徳島, 2011年11月.	
23. 隅田有人, 吉田 優, 細谷孝充. パラジウム触媒によるヒドロシリル化を利用したシリルアルケンの高位置および立体選択的合成. 第100 回有機合成シンポジウム, 東京, 2011年11月.	
24. 吉田 優, 隅田有人, 飯森理絵, 三浦由依子, 佐藤淳一, 井上 敏, 細谷孝充. 新しい近赤外生物発光基質の創製を目指した <i>ν</i> -Coelenterazine 合成法の開発. 第100 回有機合成シンポジウム, 東京, 2011年11月.	

25. 宮島真理, 楠原洋之, 高橋佳代, 細谷孝充, 高島忠之, 渡辺恭良, 藤田卓也, J. D. Shuetz, 杉山雄一. Characterizing determining factors for brain exposure of aromatase inhibitors. 日本薬物動態学会第26 回年会, 広島, 2011年11月.	
26. 戸田 取, 細谷悟史, 遠藤 毅, 根岸瑠美, 福島慶子, 伊藤由馬, 十川久美子, Thanai Paxton, 喜井 勲, 朴 明宣, 大野 敏, 竹内真粧美, 横川隆志, 西川一八, 山下克子, 徳永万喜洋, 細谷孝充, 林 宣宏. 神経細胞における生体膜ラフトの動作メカニズムの解明. 第34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011年12月.	
27. 細谷悟史, 戸田 取, 遠藤 毅, 根岸瑠美, 福島慶子, 伊藤由馬, 十川久美子, Thanai Paxton, 喜井 勲, 朴 明宣, 大野 敏, 竹内真粧美, 横川隆志, 西川一八, 山下克子, 徳永万喜洋, 細谷孝充, 林 宣宏. ミリストイル基を介した HIV Nef の免疫細胞のシグナル伝達系への介入. 第34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011年12月.	

特許
Granted 1件 <p>US8067631</p> 国際公開 3件 <p>WO 2011/002096, WO 2011/118394, US 2011/0244481</p> 国内出願 2件 <p>特願 2011-050487, 特願 2012-026373</p>

学外教育活動
該当なし

研究助成金
細谷孝充（分担）：科学技術振興機構（JST）・科学技術振興調整費「国際共同研究の推進」プログラム（平成21～23年度）「鳥インフルエンザ治療薬の国際共同開発研究」 <p>細谷孝充（分担）：文部科学省・革新的細胞解析研究プログラム（セルイノベーション）（平成22～25年度）「網羅的スプライシング暗号解析に基づくRNA 病の解明と治療技術の探索」</p> 細谷孝充（分担）：文部科学省・分子イメージング研究戦略推進プログラム（平成22～26年度）「分子イメージングによるタウ凝集阻害剤開発」 <p>細谷孝充（分担）：科学技術振興機構（JST）・CREST（平成23～27年度）「エビゲノム創薬による広汎性発達障害の克服」</p> 吉田 優（代表）：日本学術振興会（JSPS）・若手研究B（平成23～24年度）「精密有機合成による近赤外生物発光基質の開発」 <p>吉田 優（代表）：公益財団法人野口研究所・野口遵研究助成金（平成23～24年度）「近赤外生物発光イメージングを指向した新規セレンテラジン類縁体の開発」</p> 吉田 優(代表):財団法人内藤記念科学振興財団・内藤記念科学奨励金（平成23～24年度）「機能性ジインの創製に基づく生体分子化学修飾法の開発」
受賞
吉田 優 有機合成化学協会・ADEKA 研究企画賞 <p>菅野 貴美幸（M1）第46 回有機反応若手の会ポスター賞</p> 菅野 貴美幸（M1）日本ケミカルバイオロジー学会第6 回年会 ポスター賞

疾患生命科学研究部 生命システムモデリング分野

准教授：福岡 豊

研究内容

生物は冗長性に富み、かつ多重フィードバック系として構成されているため、その機能を正しく理解するためには、個々の構成要素の特性を知るだけでは不十分であり、それらの要素が相互作用した際の振る舞いを、システムとして解析することが必要である。生命システムモデリング分野では、分子から細胞、組織、臓器、個体など、ミクロからマクロのさまざまな生命現象を対象として、数理工学的モデリングによるシステム工学的アプローチ、および、大規模な生命情報のデータマイニングによる情報論的アプローチによって、生命現象を解明・理解することを目指している。また、システム工学アプローチを用いた治療法に関する研究も行っている。

研究紹介

1. バイオインフォマティクス

1) 染色体上の遺伝子位置を考慮したマルチオミックス解析

DNA マイクロアレイによる遺伝子の発現データに加え、microRNA (miRNA) やメチル化など、ゲノムワイドなデータが蓄積されている。我々の研究グループでは、さまざまな観点から、このようなデータを解析し、生命システムに関する研究を行っている。

miRNA は 22 塩基程度のノンコーディング RNA で、発生、分化、細胞増殖、アポトーシスなどに関与していることが示唆されている。我々は、線虫の遺伝子発現データを用いて、miRNA からの距離と遺伝子発現の関係を解析し、生殖細胞では miRNA 近傍の遺伝子の発現量が低くなっていること、および、それらの発現量の低い遺伝子の多くは miRNA のシードと相補な配列を含んでいることを示した。一方、マウスやヒトなどの哺乳類では、線虫とは異なる傾向があることを見出した。

近年、がんにおける miRNA の役割が注目を集め、がんで異常な発現を示す miRNA が多く、半数以上の miRNA ががんに関連する部位近傍にあること等が報告されている。我々は、これまでに、原発性の肝細胞がんと周囲の非がん部において miRNA 近傍の遺伝子の発現量を調べた。データは悪性度の異なる 20 人分であり、がん部周囲の非がん部は肝硬変または慢性肝炎の状態

であった。がん部と非がん部で miRNA 近傍の遺伝子の発現状態が顕著に異なることが示された。がん部では miRNA 近傍の遺伝子の発現レベルがゲノム全体と異なったが、非がん部では miRNA 近傍の遺伝子の発現レベルとゲノム全体の発現レベルに大きな差はなかった。さらに、miRNA の存在する部位によって両者の差が異なることが示された。また、今年度は、さらにデータ数を増やし、HBV や HCV の感染といった疾患背景が異なる患者で発現が変化する miRNA を同定した。

また、大腸癌と肝細胞癌において、DNA コピー数と遺伝子発現の関係を統合的に解析した。DNA コピー数と遺伝子発現の間には、コピー数が増えると発現も増え、コピー数が減ると発現も減るなどの単純な関係は存在しなかった。そこで、コピー数が増えている領域の長さを考慮した解析を行った。その結果、コピー数が増えるケースでは、領域が長くなるほど、そこに含まれる遺伝子の発現が上昇する傾向が見られた。これは、DNA の修飾や高次構造など、遺伝子発現に関係するさまざまな要因が、領域が長くなるほど、元の染色体と同様に働きやすくなることを示唆している。一方、コピー数が減る場合は、大腸癌と肝細胞癌で一致した傾向は見られなかった。コピー数の減少に関しては、さらなる解析が必要である。

2) 適応閾値による遺伝子発現データの解析

DNA マイクロアレイによる実験においては、条件の違いにより意味のある発現量の変化を見出すことが重要である。実験条件が少なく、それぞれの条件で多数回のマイクロアレイ測定が行える場合、統計的な手法を用いることによって有意な変化を検出することができる。一方、実験条件が多い場合や測定回数が少ない場合などには、一定の閾値 (2 倍以上あるいは 1/2 以下など) を越える変化を示す遺伝子に有意な発現変化があったとして処理されることが多い。しかし、発現量は遺伝子によって大きく異なり、高い発現を示す遺伝子に適した閾値が、低発現の遺伝子の閾値として適切であるかは必ずしも明らかでない。また、マイクロアレイによる実験結果の解釈を難しくするのは多数の false positive (偽陽性) の存在である。我々は、広範囲な発現量において false positive を抑制し、有意な変化を検出するために、発現

量に応じて閾値を定める適応閾値法を提案した。

適応閾値法では、同一条件で測られた 2 枚以上のマイクロアレイデータを用いて、その条件における各遺伝子の発現のバラツキを評価し、遺伝子の発現量に応じてバラツキの範囲を統計的に処理することによって閾値を計算する。適応閾値法をヒトの正常細胞から得られた発現データに適用したところ、妥当性の高い少数の遺伝子のみが有意な変化を示したとして検出された。例えば、心筋細胞と皮膚の比較では、cell communication と cell adhesion molecules という pathway に含まれる遺伝子が特異的に変化していた。これは細胞接着の様式の違いによると考えられる。

3) 炎症性腸疾患の網羅的疾患関連遺伝子解析

ヒトゲノム解析に関連する研究が進み、疾患に特異的な分子ネットワークの歪みを同定しようとする学問が発達した。我々はこうした網羅的疾患関連遺伝子の解析方法を炎症性腸疾患 (IBD) に適応し、未だ不明確な部分多い IBD の病態進展に関与する遺伝子ネットワークの探索を試みた。まず、用いられる薬剤に応じて、IBD の重症度を軽度と重度に分けた。同一の薬剤が処方される疾患を sibling disease と定義する。その結果、軽度では関節リウマチ、重度では乾癬、強直性脊椎炎、ベーチェット病が sibling disease であった。これらの疾患群に関連する遺伝子を 4 つの公的データベースから網羅的に集め、各遺伝子が報告されている頻度も考慮して、sibling disease の関連遺伝子を定めた。次に、STRING8 を用いて、これらの関連遺伝子の相互作用ネットワークを同定した。その際、使用される薬剤の標的タンパク質の機能に類似したもののみをネットワークに含むようにした。このような解析によって、軽度の IBD では炎症に関連する遺伝子の関与が多く、重症化するにつれて腫瘍形成やアポトーシスに関連する遺伝子が関与するという結果が得られた (図 1-a, b)。これは IBD の進行にともない、関与する分子の機能が変化していることを示しており、今後の IBD の病態解明の一助となると考えられる。この方法は他の疾患にも適用可能であることから、種々の疾患においても重篤度に応じたシステム病態学的解析に応用できる。

2. 生体信号処理

1) アブレーションのためのカテーテル誘導法

カテーテルアブレーションによる不整脈治療のための新しいカテーテル誘導法について研究している。この方法では、心臓の電気活動を等価ダイポールで近似し、体表面電極の位置と心電図から逆問題を解いて、等価ダイポールの位置を推定する。得られた等価ダイポールの位置から、治療 (焼灼) 部位を決定し、その位置にカテー

テルを誘導する。その際、カテーテル先端に別のダイポールを取り付けることによって、カテーテル先端の位置と焼灼部位を同一の方法で推定する。したがって、逆問題を解くときに胸部をかなり単純化しても、誘導時の系統的な誤差の影響を低減できる。これまでに、解剖学的に妥当な形状の胸部導体モデルを用いて、5 mm 程度の誤差で焼灼部位にカテーテル先端を誘導できることを示した。また、体表面の電極位置が正確に測れない状況を想定したシミュレーションでも、位置ずれの標準偏差が 10 mm 程度なら、位置ずれがない場合とほぼ同等の誘導精度が得られることを確認した。

2) 容量性結合電極を用いた生体信号計測

心電図、筋電図などの生体信号を計測する場合、従来は電極とペーストを用いていた。しかし、長時間の計測や乳幼児を対象とした計測では、ペーストを用いない方法や皮膚に電極を接触させることなく計測する方法が求められていた。そこで開発されたのが、容量性結合電極を用いる方法で、綿のシャツを着たまま心電図を測ることができる。我々はこの電極をシャツの下に設置して終夜心電図を計測し、睡眠時無呼吸症候群の診断を行う方法を研究している。呼吸と心臓の活動には深い関連があり、さまざまなパラメータを用いて無呼吸状態を心電図

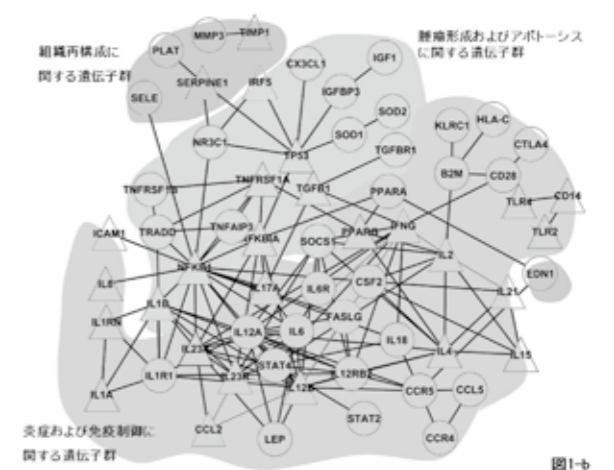
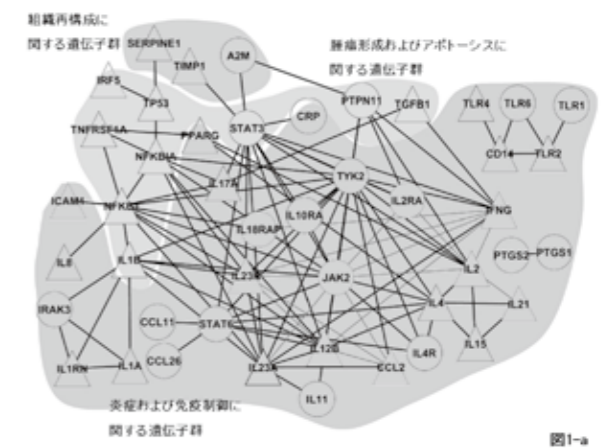


図 1 同定された IBD 関連遺伝子のネットワーク
a 軽度、b 重度

から検出する方法が提案されている。容量性結合電極を用いた心電図では、従来の接触型に比べて、PQRSTの各波の識別が難しくなるケースがある。そのような事情を勘案して、RR間隔から無呼吸状態を推定することを試みている。

業績目録

原著論文

1. Yutaka Fukuoka, Hidenori Inaoka, Makoto Noshiro: Adaptive thresholds to detect differentially expressed genes in microarray data, *Bioinformation*, 7, 33-37, Aug. 2011.
2. Ken Miyaguchi, Yutaka Fukuoka, Hiroshi Mizushima, Mahmut Yasen, Shota Nemoto, Toshiaki Ishikawa, Hiroyuki Uetake, Shinji Tanaka, Kenichi Sugihara, Shigeki Arie, Hiroshi Tanaka: Genome-wide integrative analysis revealed a correlation between lengths of copy number segments and corresponding gene expression profile, *Bioinformation*, 7, 280-284, Nov. 2011.
3. Takeshi Tsutsumi, Takuo Ikeda, Yutaka Fukuoka, Kensuke Watanabe, Shigeru Kikuchi: Time course of the recovery of three-dimensional eye position in patients with acute cerebellitis, *Auris Nasus Larynx*, Epub ahead of print 2011.
4. Ken Miyaguchi, Narikazu Uzawa, Kaoru Mogushi, Ken-Ichiro Takahashi, Chieko Michikawa, Yoshimi Nakata, Jun Sumino, Norihiko Okada, Hiroshi Mizushima, Yutaka Fukuoka, Hiroshi Tanaka: 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, *International Journal of Oncology*, Epub ahead of print 2012.

国際会議

1. Yutaka Fukuoka: Introduction to integrative biophysical engineering and informatics, SICE Annual Conference 2011, Sep. 2011.
2. Akihiko Hoshi, Takako Takai-Igarashi, Ryo Akasaka, Yutaka Fukuoka, Hiroshi Tanaka: The i2b2 with Japanese clinical patients' data and miRNA expression profiles, 2012 Joint Summits on Translational Science, American Medical Informatics Association, Mar. 2012.

学会発表

1. 小林こず恵, 田中真澄, 稲岡秀検, 根武谷吾, 福岡豊, 小林弘祐, 野城真理: 機械的伸展時間が肺動脈血管内皮細胞の炎症性物質産生に与える影響, 第26回生体生理工学シンポジウム, 2011年9月.
2. 稲岡秀検, 福岡豊, 野城真理: がんにおけるDNAメチル化状態の網羅的解析, 第26回生体生理工学シンポジウム, 2011年9月.
3. 前田萌季, 宮口健, 福岡豊, 田中博: 神経膠芽腫におけるintronic microRNA発現量と近傍遺伝子発現量の相関解析, 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月.

学内外教育活動

1. 福岡豊: 生命情報科学教育部(生命システムモデリング特論, 生体工学特別演習, 疾患生命科学概論)
2. 福岡豊: 医学部保健衛生学科(医学情報処理I)

職員学生名簿

難治疾患研究所分子代謝医学分野

教授 小川佳宏
准教授 菅波孝祥
特任講師(GCOE) 澤田直樹
特任助教 西條美佐
袁勲梅
白川伊吹
高橋真由美
日本学術振興会特別研究員 蜂屋瑠見
GCOE拠点形成特別研究員 滝沢文彦
技術補佐員 濱口美穂
金井紗綾香
越智梢
大学院生 市岡誠之
津田直人
江原達弥
南部宏英
岩崎順博
青山千賀子
池田賢司
小沼邦葉
櫻井俊之
服部真季
卒業研究生 笠原知美
田村江梨奈

難治疾患研究所分子薬理学分野

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 宮嶋大輔
鈴木允文
Aryal Smriti
渡辺千穂
白川純平
守屋秀一
川崎真希理

事務補佐員 野末陽子
小川尚子
GCOE事務補佐員 押江優子
富田久美子

難治疾患研究所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
田雅文
松澤純平
大熊祐一
研究支援員 伏見真好
満友陽子

難治疾患研究所分子神経科学分野

疾患生命科学部分子神経科学研究室

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
大学院生 鈴木啓子
廣田有里
柳澤美智子
白寧
杉山勇人
平岡優一
Zulpiye Habibulla
吉田純一
崔万鵬
孫偉楠
技術補佐員 渡邊清香
山本亜伊梨
秘書 楠木亜希子

難治疾患研究所生体情報薬理学分野

教授 古川哲史

准教授 黒川洵子
大学院生 江花有亮
浅山真秀子
大石咲子
軽部裕也
大方信一郎
小泉章子
平野景子
高橋健太郎
李敏

難治疾患研究所幹細胞制御分野

教授 田賀哲也
准教授 鹿川哲史
准教授 信久幾夫
特任助教 柏木太一
学振特別研究員 榊康一
技術補佐員/秘書 伏見真好
技術補佐員 田口理恵
大西裕子
鈴木寛子
大学院生 備前典久
マハ アナニ
国分康博
野村莉絵子
木下傑
高沢友輝
村松希美
卒業研究生 原田果歩
天野麻友美

難治疾患研究所生体防御学分野

教授 樗木俊聡
講師 小内伸幸
助教 手塚裕之
特任講師 中西祐輔
特任助教 佐藤卓
四元聡志
浅野純平
技術補佐員 雨池まゆ香
黒田聖子
山村竜典
事務補佐員 上岡寿子

難治疾患研究所神経病理学分野

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
助任助教 田村拓也
伊藤日加瑠
岡努
笹邊俊和
技術補佐員 吉田千里
田島たよ子
飯沼千恵
溝井千春
秘書 菊地令子
大学院生 中村蓉子
Min Xu
Chan Li
今村朋美
黒巢佳祐
専攻生 Hong Zhang
Ei Mou

難治疾患研究所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
秘書 坂口三美
技術補佐員 吉野育代
辻村恭子
大学院生 渡辺雄一郎
山口啓史
吉田志穂
宮崎大
武田可奈子
特別研究生 小原睦弥
永田める菜

難治疾患研究所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
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 横井匡
山本誠
野田英一郎
宮村憲央
内田好海
市原祐樹
大谷智実
尾崎友美
迫田実希
下村忠範
藤橋ひとみ
特別研究生 斎藤光介

疾患生命科学研究部免疫学研究室

難治疾患研究所免疫疾患分野

教授 鐔田武志
准教授 安達貴弘
助教 渡辺幸造
特任助教 岸祐介
松原直子
大学院生 徐米多
高嶋航
砂永翠
唐森
高田俊太郎
大森聖也
石倉圭人
Shirly Phoon
Ayse Konuskan
技術補佐員 垣内麻優
事務補佐員 高橋博子
卒研究生 水原悠介

難治疾患研究所分子病態分野

疾患生命科学研究部ゲノム多様性研究室

教授 木村彰方
准教授 中島敏晶
助教 有村卓朗
助教(特任) 成瀬妙子
事務補佐員 佐々木悦子
技術補佐員 植田由希子
才田清美
非常勤講師 大川真一郎
猪子英俊
大学院生 石川泰輔
小西真紀子

安健博
金澤知徳
田中優
葛城圭
門田千佳
中本貴之
飯塚淳次
高橋茉莉香
小泉伸也
共同研究者 久場敬司
山本健
牧野伸司

難治疾患研究所幹細胞医学分野

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

難治疾患研究所分子細胞遺伝分野

教授 稲澤譲治
准教授 小崎健一
MTT特任講師 松井毅
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
財団法人がん研究振興財団
リサーチ・レジデント 石原孝也
大学院生 坂本宙子
本田尚三
白樺
村松智輝
古田繭子
鶴田智彦
倉沢泰浩
上杉篤史
小野宏晃

岡本奈那
小西博貴
遠藤寛則
宮脇豊
川原正人
小林淳也
大森逸美
前田誠
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
技術補佐員 高橋綾子
森留美
MTT技術補佐員 田山さやか
事務補佐員 福川順子
篠崎優子

難治疾患研究所分子遺伝分野

教授 三木義男
准教授 吉田清嗣
特任准教授 中西啓
助教 竹中克也
特任助教 平直江
技能補佐員 山口智子
大学院生 高岡美帆
Nadila Wali
真利久サディア
ダウゼウエゲヌルマ
石場俊之
奥郁美
郭甜甜
加賀美裕也
鈴木一穂
木村仁美
滝沢良子
中澤和也
山本武徳
和田匠太

難治疾患研究所分子疫学分野

教授 村松正明

准教授 佐藤憲子
大学院生 池田仁子
藤本耕一
松倉寛
キイ・チャン・コー
山田美紀
ネ・チー・トン
ジュネイド パラヤン
平石敦子
趙晨希
陳曦
張曉亮
関自民
増田冴衣
専攻生 サリヤ デカメサフン

難治疾患研究所遺伝生化学分野

疾患生命科学研究部ゲノム構造制御研究室

教授 北嶋繁孝
准教授 中裕二郎
助教 川内潤也
事務補佐員 高柳久仁子
大学院生 井上允
大屋沙織
小高愛未
平田学
三田村潤
宮城知香
宮本大貴
卒業研究生 五嶋大統

難治疾患研究所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
MTT特任講師 小林慎
特任助教 成瀬美衣
大学院生 松本和也
石井雅之
岩崎佐和
山口祐季
及川真実
高橋沙央里
相馬未来
北澤萌恵
押本彩夏

難治疾患研究所生命情報学分野

疾患生命科学研究部システム情報生物学研究室

教授 田中 博
 准教授 新村 芳人
 助教 荻島 創一
 寄附講座助教 馬合木 特亜森
 特任准教授 任鳳 蓉
 高井 貴子
 中谷 純
 特任講師 小田 夏奈江
 特任助教 広井 嘉栄
 長谷 武志
 茂 楠 薫
 長谷川 直紀
 飯島 久美子
 技術補佐員 宮口 健
 大学院生 岡田 伊佐男
 大西 貴幸
 片山 有紀
 高橋 俊哉
 山口 浩信
 金子 佳之
 石渡 龍輔
 高田 英明
 遠藤 有人
 松前 ひろみ
 宮口 健
 Kyaw Tun
 鈴木 聡
 上野 英一
 浦島 直
 Syed Ali Zaidi
 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
 Afsaneh Eslami
 糖谷 祥子
 長谷川 浩章
 Aw Wanning
 小泉 典秋
 星 昭彦
 勝田 江朗
 山口 玲子

前田 萌季
 小田 康太郎
 Sophia Subat
 田中 教生
 宮本 直
 川本 紗穂
 辻 輝章
 Asiya Hapaer

難治疾患研究所フロンティア研究室低酸素生物学

准教授 中山 恒

難治疾患研究所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
 鈴木 康弘
 太田 麻利子
 事務補佐員 大塚 幸子

難治疾患研究所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

難治疾患研究所プロジェクト研究室

難治病態研究部門

准教授 山口 登喜夫
 堀川 三郎

ゲノム応用医学研究部門

准教授 窪田 道典
 助教 左雨 秀治

難治疾患研究所連携研究部門病態発現機構研究部門

教授 宮野 悟
 准教授 井元 清哉

難治疾患研究所寄付研究部門臓器代謝ネットワーク研究部門

特任教授 亀井 康富
 特任教員 伊藤 美智子
 特任教員 田中 都

疾患生命科学研究部構造情報研究室

教授 伊藤 暢聡
 准教授 伊倉 貞吉
 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 品川 健朗

疾患生命科学研究部薬化学研究室

教授 影近 弘之
 助教 藤井 晋也
 特任助教 森 修一
 技術補佐員 河内 恵美子
 技術職員 増野 弘幸
 非常勤講師 岩浪 直子
 大学院生 山田 歩
 藤原 敬士
 白石 拓也
 中津 亜紀
 高垣 亮平
 小林 周作
 飯濱 翔太郎
 清水 章貴
 高口 明日香
 竹内 由起
 中 亮人
 能城 静香
 藤原 典子
 樋口 智章
 武者 祥昭
 渡邊 優子

疾患生命科学研究部生命有機化学研究室

教授 細谷 孝充
 助教 吉田 優
 隅田 有人
 学外協力者 菅野 貴美幸

疾患生命科学研究部形質発現制御学研究室

准教授 黒柳 秀人
 特任助教 木村 まり子
 技術補佐員 都甲 麻理奈
 渡辺 要平
 大学院生 グエン パオ ゴック
 学部生 武井 理美

疾患生命科学研究部生命システムモデリング研究室

准教授 福岡 豊

難治疾患研究所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 永井 恵魅

バイオリソース支援室

技術専門職員 小島 智子

ケミカルバイオロジースクリーニングセンター

特任助教 湯浅 磨里

難治疾患研究所事務部

事務長 川柳 成巳
 専門職員 中川 久子
 総務掛長 鈴木 誠
 総務主任 小林 俊彦
 総務掛員 牛山 史子
 林 健策

事務補佐員 庄司 純子
 西山 裕子
 高橋 将貴

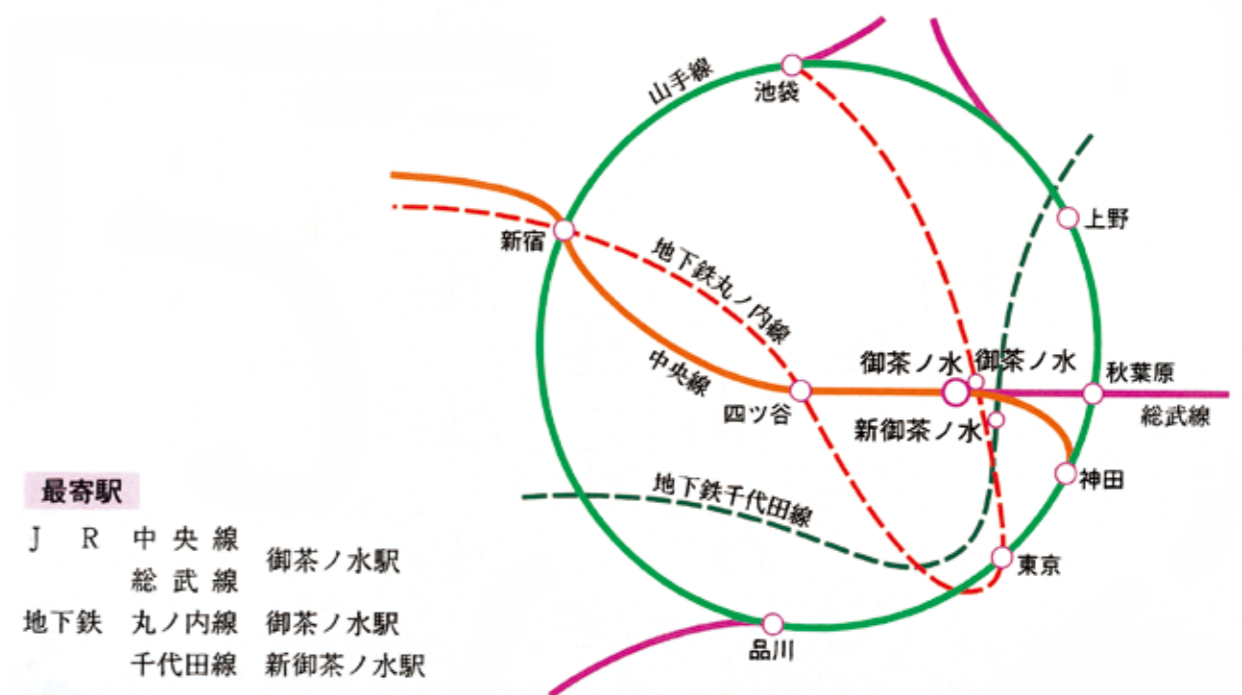
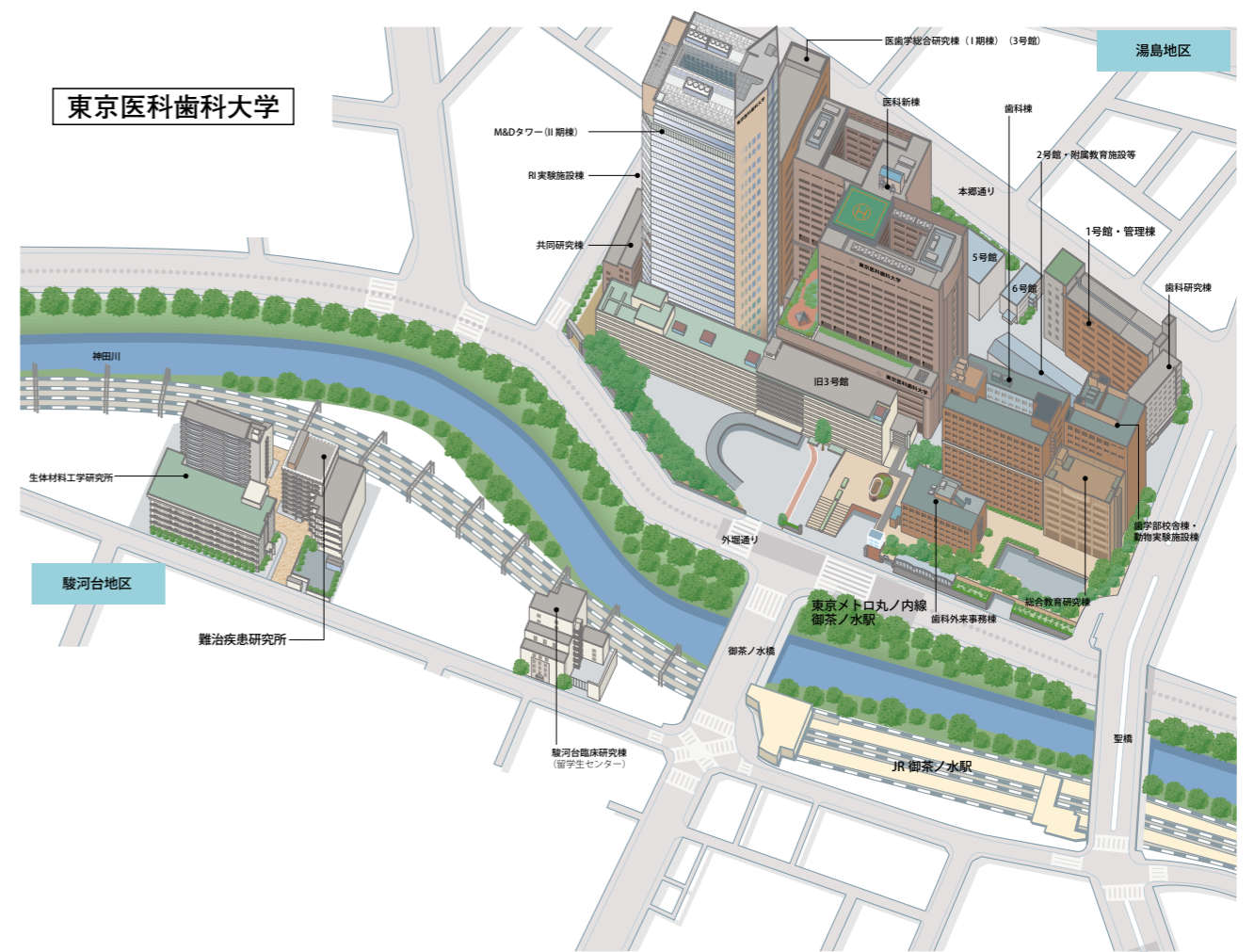
技術職員 望月 静雄
 技術専門職員 馬場 裕子

**難治疾患研究所・
大学院疾患生命科学部・
大学院生命情報科学教育部
運営諮問委員会委員**

- 金澤 一郎 宮内庁宮内庁長官官房皇室医務主管
- 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 星薬科大学大学長
- 中村 祐輔 東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター長
- 長野 哲雄 東京大学大学院薬学系研究科長
- 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 2012

東京医科歯科大学難治疾患研究所

大学院 疾患生命科学研究部

生命情報科学教育部

〒 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