

# Annual Report 2011

ANNUAL REPORT 2011

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

東京都千代田区駿河台2丁目3番10号

電話 03-5280-8050

[http://www.tmd.ac.jp/mri/mri\\_top.html](http://www.tmd.ac.jp/mri/mri_top.html)

[http://www.tmd.ac.jp/mri/SBS/index\\_j.html](http://www.tmd.ac.jp/mri/SBS/index_j.html)

Medical Research Institute, School of Biomedical Science, Biomedical Science PhD Program,  
Tokyo Medical and Dental University

2-3-10, Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062 Japan

Tel +81-3-5280-8050

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

# 2011

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・疾患生命科学部研究部の2010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。当該年の活動の詳細を研究室単位で具体的に記録されていますが、特記すべき活動内容は巻頭にハイライトとしてまとめてあります。また、研究室構成員は後半部に名簿としてまとめて記載しました。本年報により難治疾患研究所、大学院教育部・研究部がどのような活動をしているか理解して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
3. 職員及び学生数	5
4. ハイライト	6 ~ 13
5. 難治疾患共同研究拠点	14 ~ 17
6. 学位取得者	18
7. 難研セミナー	19 ~ 20

## 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 22 ~ 25
- 分子薬理学分野 26 ~ 29
- 分子細胞生物学分野  
30 ~ 33
- 分子神経科学分野 34 ~ 36
- 生体防御学分野 38 ~ 41
- 生体情報薬理学分野  
42 ~ 45
- 幹細胞制御分野 46 ~ 49

・プロジェクト研究室 110 ~ 112

### 難治病態研究部門

- 神経病理学分野 52 ~ 55
- 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

・メディカル・トップトラック(MTT)  
プログラム 120 ~ 123

### 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
- 形質発現分野 96 ~ 99
- エピジェネティクス分野  
100 ~ 102
- 生命情報学分野 104 ~ 107
- フロンティア研究室  
レドックス応答細胞生物学  
108 ~ 109

### 連携研究系

- 病態発現機構客員研究部門  
114 ~ 115
- 大学院教育研究支援  
実験施設 116 ~ 118

・ケミカルバイオロジー  
スクリーニングセンター  
124 ~ 125

## 大学院疾患生命科学部

- ゲノム多様性研究室  
72 ~ 75
- ゲノム構造制御研究室  
92 ~ 95
- システム情報生物学研究室  
104 ~ 107

- 構造情報研究室 128 ~ 131
- 形質発現制御学研究室  
96 ~ 99
- 分子神経科学研究室  
34 ~ 36
- 免疫学研究室 68 ~ 71

- 薬化学分野 132 ~ 135
- 生命有機化学研究室  
136 ~ 139
- 生命システム  
モデリング研究室  
140 ~ 143

- オミックス  
医療情報学講座  
144 ~ 145

職員学生名簿	146 ~ 152
諮問委員名簿	154
案内図	155

## 湯島地区

〒113-8510  
東京都文京区湯島1-5-45  
電話(03)3813-6111

### 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、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、フロンティア研究室、プロジェクト研究室

### 大学院疾患生命科学部

ゲノム構造制御研究室、システム情報生物学研究室、構造情報研究室、分子神経科学研究室、免疫学研究室、ゲノム多様性研究室、生命システムモデリング研究室



## 駿河台地区

〒101-0062  
東京都千代田区神田駿河台2-3-10  
電話(03)5280-8050

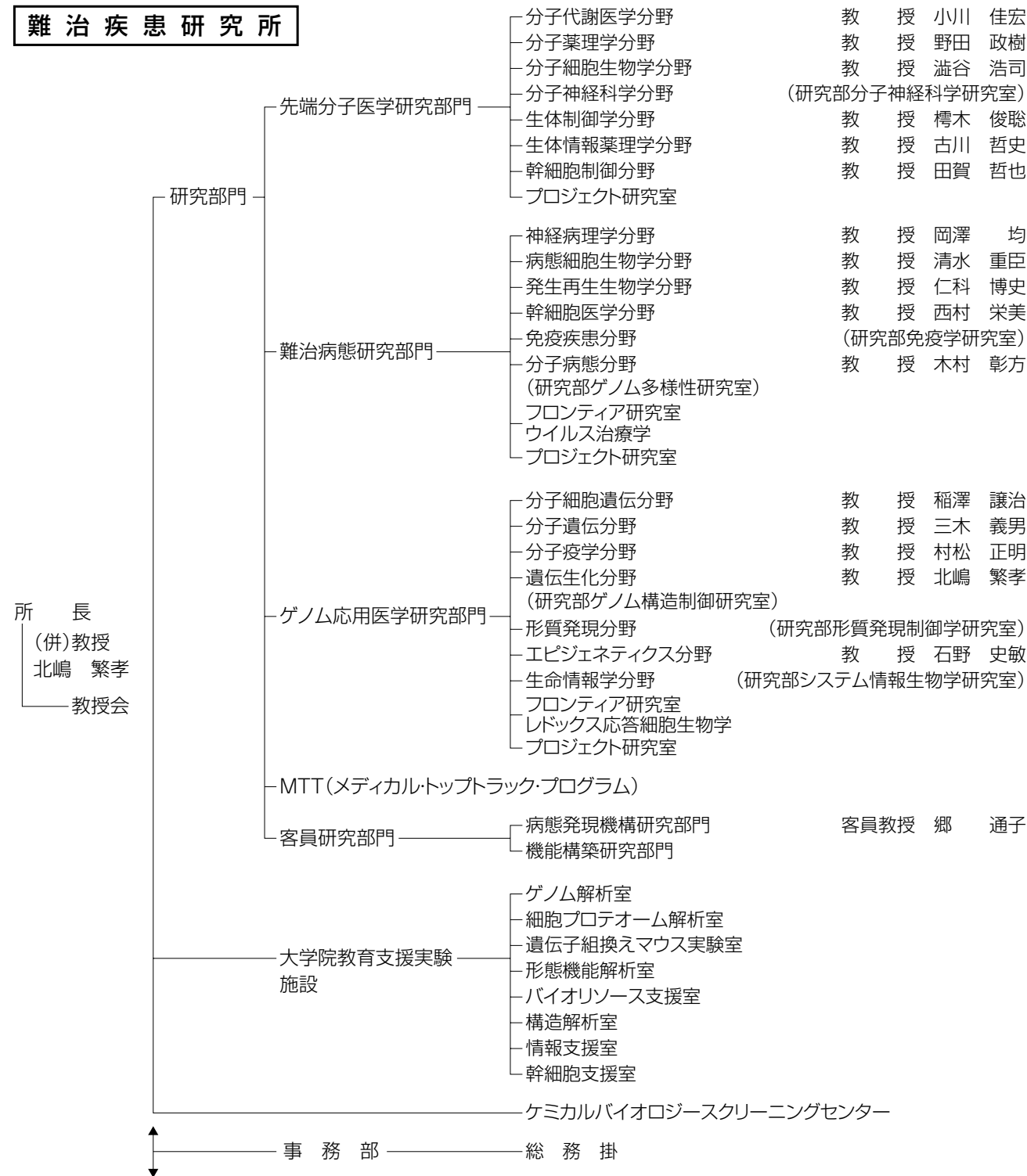
### 難治疾患研究所

分子疫学分野、幹細胞医学分野、生体防御学分野、事務局

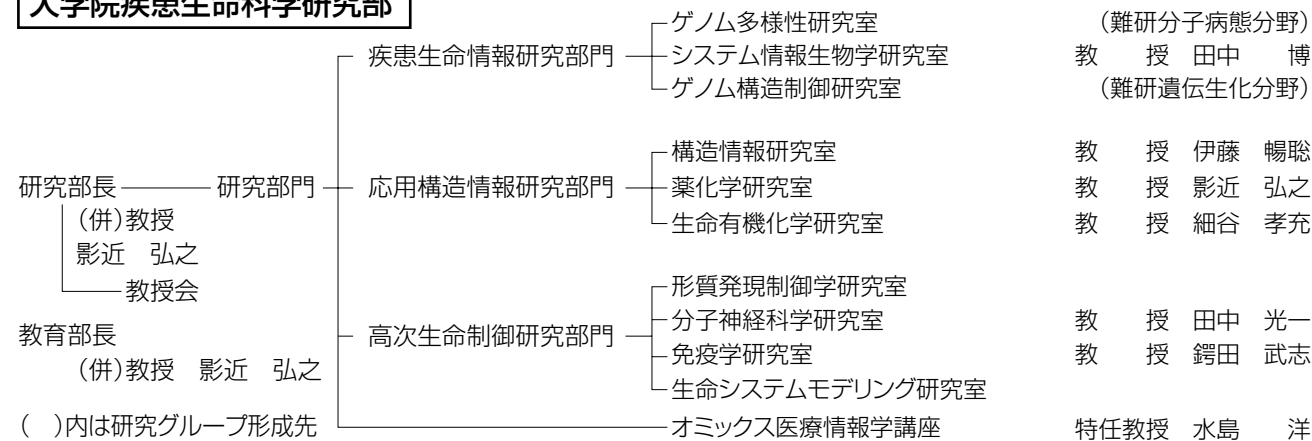
### 大学院疾患生命科学部

薬化学研究室、生命有機化学研究室

**難治疾患研究所**



**大学院疾患生命科学研究所**



**職員及び学生数**

●学生数

平成 23 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研究所	先端分子医学研究部門	分子代謝学分野	7			
		分子薬理学分野	4			
		分子細胞生物学分野	1	5		
		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)			10	
		生体防衛学分野	1			
		生体情報薬理学分野	6	1		
		幹細胞制御分野	5	1	1	
		難治病態研究部門	神経病理解分野	14	1	2
		病態細胞生物学分野	2	4		
		発生再生生物学分野	4	10		
	幹細胞医学分野					
	免疫疾患分野 (免疫学分野：免疫学研究室)			14		
	分子病態分野 (疾患ゲノム分野：ゲノム多様性研究室)	2	8			
	プロジェクト研究室				1	
	ゲノム応用医学研究部門	分子細胞遺伝分野	9	4		
		分子遺伝分野	5	8		
		分子疫学分野	7	5	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)	8	3	1	
		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)			5	
		エピジェネティクス分野			6	
		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)	33	14	2	
	大学院疾患生命科学研究所	応用構造情報研究部門	分子構造情報学分野：構造情報研究室			12
			薬化学分野：薬化学研究室			23
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			10	
		生命システムモデリング分野			5	
計			108	149	8	

※ ( ) 内は大学院疾患生命科学研究所  
 ※ 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 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	17	23	0	25	65	4	2	3	9	74
現員	16	19	1	21	57	4	2	3	9	66

2. 大学院疾患生命科学研究所

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		1	14	0	0	0	0	14
現員	6	5		1	12	0	0	0	0	12



# ハイライト

## ハンチントン病における神経変性の主要病態が DNA 損傷修復障害であることを解明

Enokido, Y. et al., Mutant huntingtin impairs Ku70-mediated DNA repair. *J Cell Biol.* 189, 425-443 (2010).

ハンチントン病は代表的神経変性疾患の一つです。白人での発生率は5・10/100,000で欧米ではアルツハイマー病とらんで注目される疾患です。認知症、不随意運動、鬱等の精神神経症状を示し、寝たきりになった後に早期に死亡します。ハンチントン病は原因解明に分子遺伝学が初めて用いられた神経変性疾患でもあります。この結果、1993年にハーバード大学のJames Gusella教授を中心とするコンソーシアムが原因遺伝子ハンチンチンを発見しました。しかし、ハンチンチンタンパク質の機能、あるいは変異による神経細胞障害の詳細など、分子病態は未解明な部分が多く、またハンチントン病の患者さんの寿命を延ばすことができる有効な治療法も確立されていません。

今回の研究は、ハンチントン病の病態にDNA修復タンパクKu70が関与し、Ku70の機能回復をはかることでハンチントン病モデルマウスの寿命を従来の報告を上回る最大限に延長することができた、というものです。具体的には、1) 変異ハンチントン病タンパクはKu70に結合する、2) 結合を介してKu70のDNA修復機能を阻害する、3) DNA損傷とそのシグナルがトランスジェニックマウス、ノックインマウスおよびヒト患者神経細胞で増加している。3) ダブルトランスジェニックマウスを作成してKu70をハンチントン病マウスモデルR6/2に過剰発現させると、DNA損傷が軽減し寿命が顕著に延長するという結果が得られました。

DNA損傷修復異常は、ポリグルタミン病において2007年に私たちが発表した新たな病態ですが、他の遺伝性神経変性疾患でDNA修復因子自体の遺伝子異常が原因である場合があること、あるいは放射線被曝によって神経変性に類似した症状が起こること、が知られており、神経変性の多様なパソシグナルの中でも本質的な病態と考えられます。

今回の研究は、DNA損傷修復障害が主要な分子病態であり、それを仲介するターゲット分子としてKu70を

同定したものです。さらに、Ku70の機能的代償がハンチントン病モデルマウスの生存期間を過去の報告と比較しても最大限に延長させることが明らかになりました。以上の成果は、ハンチントン病をはじめヒト神経変性疾患に真に有効な治療開発につながる新たな成果と考えられます。

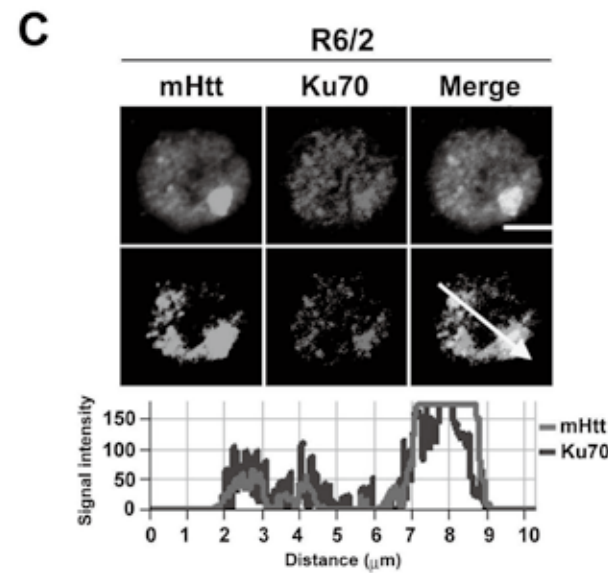


図1 線条体神経細胞の核内でハンチントン病タンパク(Htt)とKu70は結合し共局在する。これによってKu70のDNA修復機能が抑制される。(神経病理学分野 岡澤均)

## 脊髄小脳変性症のグリア細胞由来の神経細胞変性を担う新規分子マクセルを発見

Shiwaku, H. et al. Suppression of the novel ER protein Maxer by mutant ataxin-1 in Bergman glia contributes to non-cell-autonomous toxicity. *EMBO J.* 29, 2446-2460 (2010).

脊髄小脳失調症は、アルツハイマー病、パーキンソン病に次いで患者数の多い神経変性疾患ですが、有効な治療法は確立されておらず、その病態解明と治療開発は喫緊の社会的問題です。

その病態としてグリア細胞を介する神経細胞障害が近年注目されています。脊髄小脳失調症7型(SCA7)においてバーグマングリア細胞が神経変性に関与するとい

う成果も報告されました。一方、別の変性疾患グループである筋萎縮性側索硬化症(ALS)の病態においては近年、グリア細胞の関与が疑われており、グリア細胞の一種であるアストログリアが何らかの毒性物質を放出して神経細胞を障害することが想定されています。しかしながら、グリア細胞を介する神経変性病態である非自律的病態が神経変性疾患の全てに共通するものかどうかは、大きな問題となっています。

今回の研究は、脊髄小脳失調症1型(SCA1)の小脳細胞で発現変化を示す分子の網羅的検索から、小脳細胞においてのみ遺伝子発現が低下し、ハンチントン病などの別の変性疾患では発現が変化しない新規分子MAXERを発見しました。解析の結果、MAXERは進化的に保存されている小胞体膜分子であること、またMAXERが減少すると細胞周期がG1期に停滞すること、さらにMAXERが細胞質・核の間を行き来するサイクリンD1の抑制因子であるCDK5RAP3の局在制御を行い、これによって細胞周期を制御することが明らかになりました。同時に、SCA1におけるMAXERの減少がバーグマングリアの減少を招き、結果として神経細胞に対してグルタミン酸毒性が増加して神経細胞変性に関わることを示しました。

この成果は今後、バーグマングリアの増殖促進や再活性化を介した神経変性疾患の治療開発につながるものと期待されます。

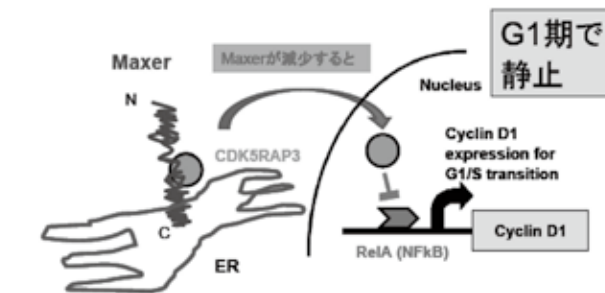


図2 脊髄小脳変性症遺伝子Ataxin-1によるMaxer減少を介したバーグマングリア細胞での病態機序。(神経病理学分野 岡澤均)

## ポリグルタミン病ならびに発達障害におけるPQBP1を介した認知障害の分子メカニズムを解明

Tamura, T. et al., Drosophila PQBP1 regulates learning acquisition at projection neurons in aversive olfactory conditioning. *J Neurosci.* 30, 14091-14101 (2010).

私たちは1999年に、ヒトのポリグルタミン病病態関連分子としてPQBP1を発見しました[JST1]。その後、PQBP1がハンチントン病やSCA1の原因たんぱく質と

結合すること、そしてPQBP1が基本転写因子やRNAスプライシング因子と結合することを明らかにしてきました。この間に、ヨーロッパの大規模な共同研究から、PQBP1は遺伝性精神発達遅滞の原因遺伝子であることが明らかになっています。PQBP1はヒトから線虫や植物に至るまで非常に良く保存された分子で生物にとって重要な機能を持つことが推測されます。

ポリグルタミン病の原因たんぱく質はPQBP1と結合して転写機能を障害し、一方、精神発達遅滞患者[JST2]においては遺伝子変異のためにPQBP1の量が低下していることが知られています。ポリグルタミン病も精神発達遅滞も、学習や記憶に問題を生じることから、PQBP1機能低下が2つの病態に共通する役割を果たしていることが想定されていましたが、その分子メカニズムについては未解決でした。

今回、トランスポゾン挿入変異によってPQBP1の発現量が減少[JST3]したショウジョウバエを作成して、学習と記憶を詳細に解析するとともに、PQBP1変異ショウジョウバエの記憶に関わる神経回路の形態変化と機能変化を詳細に検討し、以下のことが明らかになりました。

- 1) PQBP1発現減少(すなわち機能低下)は学習獲得の障害につながるが、さまざまな記憶の成分(短期記憶、麻酔耐性記憶、長期記憶)には大きな影響を与えないこと。
- 2) PQBP1減少は、ニューロンの数の減少や細胞死には結びつかないこと。
- 3) PQBP1減少は、NMDA受容体の構成成分であるNR1の減少につながり、このためにシナプスレベルでの学習効果が低下することが起こらないこと[JST4]。
- 4) 投射ニューロンのみでPQBP1の発現抑制を行うと、認知障害が出ること。

さらに、これまではショウジョウバエにおいてキノコ体という脳構造が学習・記憶を担っていると考えられてきましたが、今回の研究から投射ニューロンのPQBP1に依存した可塑性が、おのの学習・記憶にとって重要であることが示されました。つまり、PQBP1は投射ニューロンによる学習を担うことが証明された初めての分子と言えます。

また、PQBP1変異体における学習能力の低下は、変異体の発生段階の異常によるものではなく、ショウジョウバエが成虫(大人)になってから生じる機能変化が原因であること、さらに、転写量を上昇させるHDAC阻害剤によって症状が可逆的に改善することも明らかになりました。

なお、本研究の一部(ショウジョウバエの発達障害や



シナプス分子の機能異常の解析)は、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ノロジーの創成』の支援を受けて行われました。(神経病理学分野 岡澤均)

**分子病態分野の研究成果が Journal of the American College of Cardiology 誌に掲載される**

Arimura T, Sato R, Machida N, Bando H, Zhang DY, Morimoto S, Tanaka R, Yamane Y, Bonne G, Kimura A. Improvement of left ventricular dysfunction and of survival prognosis of dilated cardiomyopathy by administration of calcium sensitizer SCH00013 in a mouse model. *J Am Coll Cardiol* 2010 ; 55(14): 1503-1505.

拡張型心筋症は、明らかな誘因がなく心室拡大、心筋細胞脱落、心筋線維化を来し、突然死や難治性心不全の原因となる難病(厚生労働省特定疾患)である。拡張型心筋症の20-35%は家族性に発症することから、それらの病因は遺伝子変異であると考えられる。このため世界的に原因遺伝子の探索が行われ、これまでに心臓の筋肉を構成するタンパク、とくに細胞膜(例えば、ディストロフィンなど)、Z帯(例えば、テレトニンなど)、収縮タンパク(例えば、アクチンやトロポニンTなど)、I帯タンパク(例えば、FHL2やCARPなど)、さらには核膜タンパク(例えば、ラミンA/Cなど)の遺伝子異常が原因となることが判明している。すなわち、拡張型心筋症の原因遺伝子はこれまでに約30種発見されているが、そのいずれに異常が生じても拡張型心筋症の病態を呈する。これらの遺伝子異常が拡張型心筋症を引き起こすメカニズムについては不明な点が多いが、一部の遺伝子異常は心筋収縮のカルシウム感受性を低下させることが報告されている。また、心不全状態でも心筋収縮のカルシウム感受性が低下しているとの報告があるが、カルシウム感受性低下と心不全との直接の因果関係は明らかではない。

一方、拡張型心筋症の治療法としてはβブロッカーやACE阻害剤などが用いられており、薬剤治療が効を奏しない場合には心臓移植が行われる。また、心不全治療法としてフォスフォジエステラーゼ(PDE)阻害剤が使用されることがあるが、短期的には心筋収縮力を増強するものの、長期的な生存予後の改善は認められていない。さらに、最近ではカルシウム増感剤による心不全治療も試みられているが、既存の薬剤にはPDE阻害作用があり、短期的には心不全症状を軽快させるものの長期的な改善効果は得られていないのが現状である。遺伝子変異による拡張型心筋症の多くは成人期以降に発症する

が、発症を予防する方法は確立していない。このため、ことに遺伝性拡張型心筋症では、発症予防法の開発が待たれている。

拡張型心筋症の病態研究や治療研究には動物モデルが用いられるが、ラミンA/C遺伝子を改変したマウス(ラミン変異ノックインマウス)は生後5-6カ月程度から心不全を発症し、心筋細胞の脱落や心筋の線維化を来すとともに、12-13カ月までに死亡するため、重症拡張型心筋症の動物モデルとして研究に使われている。

我々は、東京農工大学獣医学部、九州大学医学部、フランス筋疾患研究所などとの国際共同研究によって、拡張型心筋症モデル動物であるラミンA/C遺伝子改変マウスを用いて、PDE阻害作用のないカルシウム増感剤(SCH00013、全業工業)による拡張型心筋症の発症予防効果を検討した。その結果、発症前(2カ月齢)からカルシウム増感剤を投与することで、心不全の発症遅延と生存予後の改善が認められた。また、カルシウム増感剤を投与したラミンA/C改変マウスでは、心筋の病理変化(心筋細胞の脱落と線維化)の抑制(図)ならびに心筋リモデリング関連遺伝子の発現異常が是正された。一方、ラミンA/C改変マウスでは発症前にはカルシウム感受性が低下していなかった。すなわち、カルシウム感受性が低下していない時期からカルシウム増感剤を投与することで、拡張型心筋症・心不全の発症を抑制できた。このことは、カルシウム増感作用に着目した心不全の発症予防法の開発が可能になることを示す。

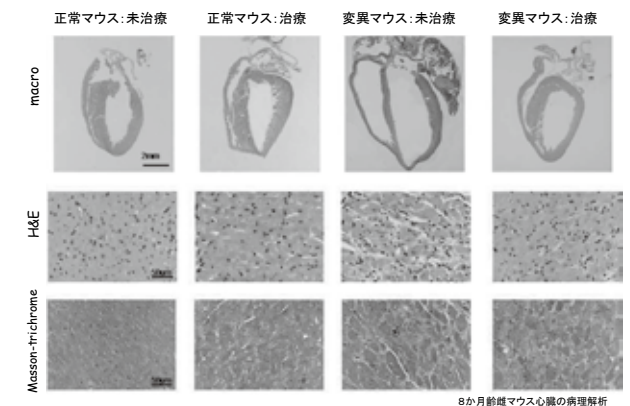


図2 カルシウム増感剤(SCH00013)投与による心筋症モデルマウスの心臓病理変化抑制  
正常マウスあるいは遺伝性拡張型心筋症モデルマウス(LMNA変異ノックインマウス)にSCH00013を投与すると心臓の拡大、心筋線維化が抑制された。上段:8か月マクロ病理像、中段:心筋のヘマトキシリンエオジン染色像、下段:心筋のマッソントリクローム染色像

(分子病態分野 木村彰方)

**形質発現制御学研究室の研究成果が Nature Protocols 誌に掲載される**

“Visualization and genetic analysis of alternative splicing regulation *in vivo* using fluorescence reporters in transgenic *Caenorhabditis elegans*.” *Nature Protocols*, 5

(9): 1495-1517, 2010.

形質発現制御学研究室の黒柳秀人准教授と萩原正敏教授(現京都大学教授)らの研究グループは、mRNA前駆体の選択的スプライシングのパターンを蛍光タンパク質を用いて線虫(*C. elegans*)をモデル生物として生体内で可視化する方法を開発・改良し、Nature Protocols 誌に発表した。

ヒトのタンパク質をコードする遺伝子数は約2万数千個程度で当初予想された数よりはるかに少なく、一方で、90%以上の遺伝子に複数の型の成熟mRNAが存在していることから、多細胞真核生物のタンパク質の多様性には、mRNA前駆体の選択的スプライシングが大きく寄与していると考えられる。しかし、個体レベルで選択的スプライシングを組織特異的、発生段階依存的に制御する分子機構、すなわち「スプライシング暗号」の解明はあまり進んでいなかった。

黒柳秀人准教授らは、生体における選択的スプライシング制御機構を明らかにするために、複数の蛍光タンパク質をレポーターとして、細胞ごとの選択的スプライシングパターンを色として可視化するトランスジェニック動物の作製法を開発してきた。本論文は、形質発現制御学研究室で開発・改良した、生体で選択的スプライシングパターンを可視化するためのミニ遺伝子の作製法、トランスジェニックレポーター線虫の作製法、スプライシング制御因子変異体のスクリーニング法、原因遺伝子のマッピング・同定法、シスエレメントの同定法を詳述・解説したものである。

形質発現制御学研究室では、これまでに線虫やマウスで選択的スプライシングパターンを生体内で可視化することに成功しており、選択的スプライシングの制御機構(制御因子とシスエレメント)が線虫から脊椎動物まで、進化の過程で広く保存されていることを示している。今後もさまざまな遺伝子をモデルとして「スプライシング暗号」の解明が進むことにより、多細胞生物の発生や細胞の分化によって伴って制御される選択的スプライシングの制御機構が明らかになるとともに、ヒトの個人間で見られる遺伝的多型が遺伝子発現に与える影響の解明などに寄与すると期待される。

(形質発現分野 黒柳秀人)

**毛包幹細胞がTGF-βシグナルを介して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:**

Tanimura S et al. Hair follicle stem cells provide a functional niche for melanocyte stem cells. *Cell Stem Cell*, 8, 177-187, 2011. Nishimura EK et al. Key Roles

for Transforming Growth Factor β in Melanocyte Stem Cell Maintenance. *Cell Stem Cell*, 6(2):130-140, 2010

毛包で機能する組織幹細胞である毛包幹細胞および色素幹細胞は、毛包のなかでも立毛筋が付着する部位であるバルジ領域付近に局在することは知られていましたが、毛包幹細胞と色素幹細胞の相互関係や相互作用、その分子メカニズムと白髪・脱毛との関連については明らかではありませんでした。今回、毛包幹細胞と色素幹細胞の維持に膜貫通性のコラーゲンである17型コラーゲン(Col17a1)が必須であり、Col17a1が欠損すると幹細胞間での相互作用による幹細胞維持機構が破綻するため、白髪や脱毛を発症することをはじめて明らかにしました。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ますが、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ます。17型コラーゲンは、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きました。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ますが、その仕組みについては明らかにされていませんでした。今回、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が判明しました。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。(幹細胞医学分野 西村栄美)





## 第9回駿河台シンポジウムが開催される

駿河台シンポジウムは、国際的に第一線で活躍する研究者を招聘して発表を行うとともに、難治疾患研究所および大学院疾患生命科学研究部において推進される最先端の研究成果を広く内外に発信しディスカッションすることにより、新たな研究展開を図る目的で毎年1回開催されている。第9回目となった今回は、先端分子医学研究部門が担当し、「Infection and Immunity」をテーマとして企画された。今年開設されたばかりのM&Dタワー2階共用講義室1において、国際サマープログラム2010シンポジウムならびに、難治疾患共同研究拠点シンポジウムとの共催により、9月8日に開催された。海外から4名の講演者を招聘し、国内の他大学招聘演者1名と、学内演者3名によるプログラム構成となった。学内外から、多くの若手研究者を含む173名の聴講があり、M&Dタワー講堂への同時サテライト放映も行われた。

<シンポジウムプログラム>

Opening Remarks

Dr. Kikuo Ohno (Dean/ Director of Faculty of Medicine, TMDU)

Morning Session

Chair: Toshiaki Ohteki (TMDU)

1. Dr. Masanori Hatakeyama

University of Tokyo, Graduate School of ZMedicine, Department of Microbiology  
Helicobacter pylori CagA as a bacterial oncoprotein

2. Dr. Nawarat Wara-aswapati Charoen

Khon Kaen University, Thailand  
Modulation of Wnt5a in peridontal diseases

3. Dr. Ruslan Medzhitov (来日前日入院のため不参加)

Yale University, School of Medicine/ HHMI, USA

Host defense: Immunity and Immunopathology

Afternoon Session

Chairs: Takeshi Tsubata (TMDU) & Tetsuya Taga (TMDU)

4. Dr. Toshiaki Ohteki (TMDU)

Interferons wake up sleeping hematopoietic stem cells

5. Dr. Paola Ricciardi-Castagnoli

Singapore Immunology Network, SiGN, A\*STAR, Singapore

Immune regulatory role of dendritic cells during

sterile and non-sterile inflammation

6. Dr. Takeshi Tsubata (TMDU)

Membrane-bound lectins and humoral immunity

7. Dr. James W. Kazura

Case Western Reserve University, USA

Progress and challenges toward malaria vaccine development

8. Dr. Hirokazu Tamamura (TMDU)

Anti-HIV inhibitors and AIDS vaccines

Closing Remarks

Dr. Shigetaka Kitajima (Director, Medical Research Institute, TMDU)

(幹細胞制御分野 田賀哲也)

## 生命情報分野のチームが国際タンパク質構造予測コンテスト (CASP9) で上位の成績を収めた

昨年12月に、CASP (Critical Assessment of Techniques for Protein Structure Prediction) の第9回目がアメリカで行われ、日本を含め世界各国から合計174チームが参加した。生命情報研究室 (田中博研) から特任助教の趙泰鎬 (Taeho Jo) 博士が、全参加チームの中で第22位、日本からの参加チームの (6 teams) 中では第2位の好成績を収めた。

CASPは、2年毎に開催される世界的規模のタンパク質立体構造予測コンテストである。組織者から参加チームに実験系に決定された新しいタンパク質構造のアミノ酸配列を与え、Blind Test方式を取る。そして、各チームが独自に開発した計算法を用いて、その配列からタンパク質構造及び機能について予測を行う。予測結果は国際的な審査員により厳格に審査される。今回のCASP9では、129個のアミノ酸配列が174チームに渡された。

CASP9に参加した本分野の趙特任助教がアミノ酸配列からタンパク質の立体構造を予測する計算アルゴリズムを開発した。この手法の特徴は、協調的な水素結合ポテンシャルによる $\beta$ -シートアセンブリの向上のための最適化にある。この手法の有効性がCASP9に高く評価された。

下左図は本分野の手法で予測したTarget T0523の構造

下右図は実験による決定された同タンパク質の構造



(生命情報学分野 田中博)

## 各種受賞

神経病理学分野

田村拓也 2010年度 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 若手優秀発表賞 ホテル札幌芸文館 札幌 2010.7.27-30 「PQBPI 関連精神遅滞モデルショウジョウバエにおける学習障害」

伊藤日加瑠 2010年度 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 若手優秀発表賞 ホテル札幌芸文館 札幌 2010.7.27-30 「HDAC 阻害剤によるPQBPI 精神遅滞モデルマウスの治療」

塩飽裕紀 2010年度 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 若手優秀発表賞 ホテル札幌芸文館 札幌 2010.7.27-30 「脊髄小脳失調症1型原因遺伝子Ataxin-1のnon-cell autonomous毒性はMAXERを介する」

塩飽裕紀 第2回CBIR若手インスパイアシンポジウム Best Poster Award、「脊髄小脳失調症1型原因遺伝子Ataxin-1のnon-cell autonomous毒性はMAXERを介する」、2010.2

分子薬理学分野

Paksinee Kamolratanakul Plenary Poster Award. The 32<sup>nd</sup> Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR), Toronto, CANADA, Oct 15-19, 2010. 'PTH Anabolic Action is Influenced by the Deficiency of TRPV4 in Bone'

宮嶋大輔 Plenary Poster award. The 32<sup>nd</sup> Annual Meeting of ASBMR, Toronto, CANADA, Oct 15-19, 2010. 'Deficiency of Dok-1 and Dok-2, Ras-Erk Pathway Inhibitors, Enhances Bone Loss in Postmenopausal Osteoporosis Model of Mice'

生命情報学分野

Takeshi Hase, Yoshihito Niimura, Hiroshi Tanaka : Top 1 BMC Evolutionary Biology: Most viewed articles in past 30 days : Difference in gene duplicability may explain the difference in overall structure of protein-protein interaction networks among eukaryotes BMC Evol. Biol. 10: 358, 2010

趙泰鎬 (Taeho Jo) : 国際タンパク質構造予測コンテスト (CASP9) 第22位 (全174位中) : 協調的な水素結合ポテンシャルによる $\beta$ -シートアセンブリの向上のための最適化

病態発現機構客員研究部門

棚谷 綾、平成22年度文部科学大臣表彰顕彰若手科学者賞「機能性芳香族アミドフォルダマーの構築と動的立体制御の研究」

生命有機化学研究室

白石 旭 第60回有機合成化学協会関東支部シンポジウム 若手講演賞

## 2010年度難治疾患研究所優秀論文賞

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

Journal of the American College of Cardiology

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.

The EMBO journal

根岸崇大 (発生再生生物学分野)

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

Hepatology

## 平成22年度大学院生研究発表会・若手研究者研究発表会 大学院生受賞者

1位 ベストプレゼンテーション賞 小野宏晃 (分子細胞遺伝学分野)

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

2位 杉田聡 (分子代謝医学分野)

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

2位 本田尚三 (分子細胞遺伝学分野)

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

難治疾患研究賞 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

萌芽賞 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

若手研究者受賞者  
1 位 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

#### 特許申請

神経病理学分野  
特許許可 (US Patent and Trade Office) Prophylactic/Therapeutic Agent for Neurodegenerative Disease. Inventor : Hitoshi Okazawa, Application: National Corporation Tokyo Medical and Dental University, Date : September 17, 2010, Application Number : 12/313,837, Issue Date: November 16, 2010, Patent Number: 7833975

特許許可 (European Patent Office) Prophylactic/Therapeutic Agent for Neurodegenerative Disease. Inventor : Hitoshi Okazawa, Application: National Corporation Tokyo Medical and Dental University, Date: November 22, 2010, Application Number: 07742308.5

特許許可 (US Patent and Trade Office) Gene Encoding a Protein and Preventive/Remedy for Neurodegenerative Diseases such as Polyglutamine Diseases by Utilizing the Same, Inventor : Hitoshi Okazawa, Application: National Corporation Tokyo Medical and Dental University, Date: January 4, 2011, Application Number: 11/791,053

分子細胞遺伝分野

[特許取得]  
2010.3.12、特許第 4473870 号、「新規キメラ蛋白質およびこれをコードする遺伝子、並びに、これらの遺伝子と蛋白質を用いた白血病の判別手段」稲澤譲治・井本逸勢・柚木泰広・今泉益栄、稲澤譲治・株式会社ビーエムエル・井本逸勢・柚木泰広・今泉益栄

[特許申請]

【国内】  
2010.3.3、「癌の検出方法および抑制方法」、稲澤譲治・小崎健一・井本逸勢・古田繭子有井滋樹、富士フィルム株式会社・国立大学法人東京医科歯科大学、特願 2010-046564

2010.2.26「食道癌の検出又は予後の予測のための方法及び食道癌抑制剤」、稲澤譲治・井本逸勢・春木茂男、富士フィルム株式会社・国立大学法人東京医科歯科大学、特願 2010-041825

【国外】

[米国]

「核酸マイクロアレイの異常スポットを検出する方法」、金原秀行・吉田淳哉・氏原大・稲澤譲治・井本逸勢、国立大学法人東京医科歯科大学・富士写真フィルム株式会社、2010.5.26、12/787,953 特願 2009-128162

「食道癌の検出方法及び抑制剤」、稲澤譲治・井本逸勢・小松周平・小崎健一・津田均、国立大学法人東京医科歯科大学・富士写真フィルム株式会社、2010.3.24、12/730,919、特願 2009-073998

[EP]

「核酸マイクロアレイの異常スポットを検出する方法」、金原秀行・吉田淳哉・氏原大・稲澤譲治・井本逸勢、国立大学法人東京医科歯科大学・富士写真フィルム株式会社、2010.5.27、10164051.4 特願 2009-128162

[CN]

「核酸マイクロアレイの異常スポットを検出する方法」、金原秀行・吉田淳哉・氏原大・稲澤譲治・井本逸勢、国立大学法人東京医科歯科大学・富士写真フィルム株式会社、2010.5.27、201010193364.8 特願 2009-128162

エピジェネティクス分野

件名：クローン動物の作出方法、出願番号：特願 2010-197583 (出願日：2010 年 9 月 3 日)、出願人：独立行政法人理化学研究所、国立大学法人岩手大学、国立大学法人東京医科歯科大学 (石野史敏、幸田尚)

病態発現機構客員研究部門

棚谷 綾、「プロゲステロン受容体拮抗剤」(特願 2010-43034)

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測定方法及び装置」(特願 2006-36202)；2009 年 2 月 -2010 年 3 月、特許出願審査中。

MTT フェロー

発明の名称：「遺伝性疾患の予防・改善剤」、発明者：萩原正敏、片岡直行、松尾雅文、西田篤史、出願人 国立大学法人東京医科歯科大学、国立大学法人神戸大学、出願日：平成 22 年 6 月 28 日、特願 2010-14669

生命有機化学研究室

国際公開 2 件

WO 2010/090318：セレンテラミド類縁体

WO 2010/090319：セレンテラジン類縁体及びその製造方法

国際出願 1 件

PCT/JP2010/061371

国内出願 2 件

特願 2010-073429、特願 2010-088175

薬化学研究室

「プロゲステロン受容体拮抗剤」(特願 2010-43034)



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)

本研究所は、原因や成立の仕組みが明らかになっていない病気(難治疾患)を対象にして、原因究明はもとより画期的な診断法や治療法、さらには予防法の開発を目指した研究を行っています。昭和48年に難治疾患の克服を目的とした我が国唯一の国立大学の研究所として設置され、以降、時代の要請に応じた難治疾患研究を推進しています。

本拠点では、難治疾患研究を効果的に推進するために、①原因が分かかっていない病気の患者さんの血液や細胞などの生体試料である「疾患バイオリソース」、②難治疾患を発症するマウスやメダカなどの「疾患モデル生物」、さらに、③遺伝子やタンパク質などの大規模解析とその統合的解析情報の「疾患※オミックス」の3つを難治疾患研究手段の大きな柱として、国内外の研究者にこれらのリソースへのアクセスや先端解析支援施設の利用の機会を提供しており、難治疾患の克服を目指した分野横断的な研究を加速しています。

最近の注目すべき成果

「遺伝性拡張型心筋症における心不全の

予防法開発

遺伝病の一つである遺伝性拡張型心筋症は重症の心不全や突然死を起こすことが知られている難病です。これまでに30種類を超える原因遺伝子が発見されていますが、予防法は確立しておらず、その開発が強く望まれています。本研究所では、新しく開発した※カルシウム増感剤(SCH00013)の投与を、拡張型心筋症モデルマウスに心不全の発症前から開始することで、心不全の発症を遅延させ、また、治療後の回復を促すことに成功しました。この結果から、カルシウム増感作用に着目した遺伝性拡張型心筋症における心不全の予防法の開発と臨床応用に大きな期待が寄せられています。

「先天性異常症の治療法、療育法開発」

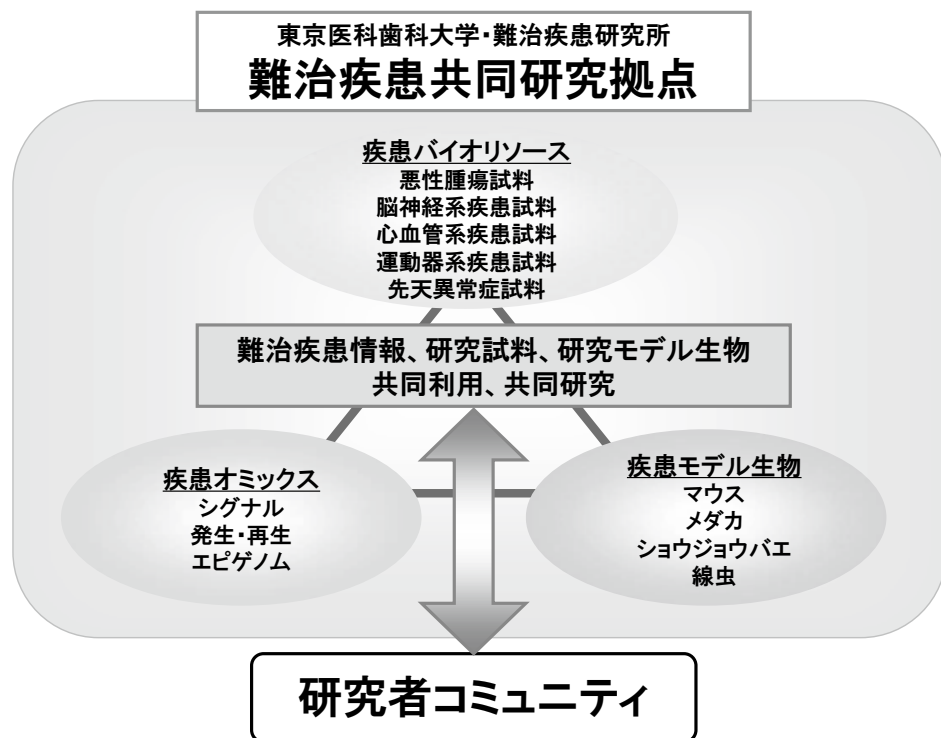
先天性異常症は生まれながらにして持つ病気です。その原因は生殖細胞に含まれる染色体や遺伝子(ゲノム)の異常によるものです。本研究所では、ゲノム異常を検出する装置「ゲノム異常診断アレイ」を開発し、医療にも応用されています。先天性異常症は全人口の数%に見られ、その頻度は決して少なくありませんが、これまでの染色体検査で異常が検出されたのは10%程度であり、残りの90%の原因がつかめずいました。そこで、微小なゲノム異常も検出可能なゲノムアレイを、国内の旭川医大や国立成育医療研究センターをはじめ20の医療機関と連携して約5年間をかけ開発し、現在、約24%のゲノム異常を検出することに成功して

# 難治疾患共同研究拠点

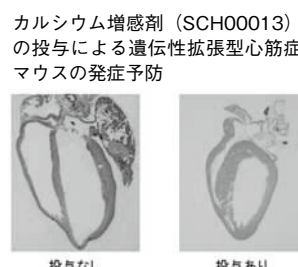
東京医科歯科大学難治疾患研究所は、平成21年6月25日に、文部科学大臣により、全国共同利用・共同研究拠点「難治疾患共同研究拠点」に認定され、平成22年4月1日より難治疾患に関する研究を行っておられる研究者コミュニティの方々と共に本拠点のミッションにより、共同利用・共同研究を推進しております。

拠点のミッション

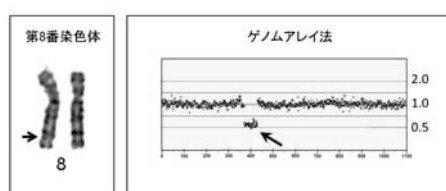
- ・ 難治疾患の病因・病態形成機構解明と診断・予防・治療法開発の基盤形成に資する共同利用・共同研究拠点構築を目的とする。
- ・ 「疾患バイオリソース」、「疾患モデル動物」、「疾患オミックス」の3つの難治疾患研究リソースを活用した公募型の戦略的難治疾患克服共同プロジェクトを推進する。
- ・ 国内外の研究者に、上記のリソース群へのアクセスや現有する先端解析支援施設の利用機会の提供を行ない、本邦の難治疾患研究の広範な発展に貢献する。
- ・ 難治疾患研究に携わる若手研究者の育成・支援システムを整備する。
- ・ シンポジウム等の開催により、難治疾患研究の啓発と最先端情報の発信に努める。



います。このゲノムアレイは、先天性異常症の診断ツールとして医療の現場で利用され、さらに、検出されたゲノム異常を糸口の原因遺伝子の特定や病態の解明が進むことにより、この難治性の遺伝疾患においても医学的根拠にもとづいた治療法や、最適な療育法の開発の道が開かれました。



カルシウム増感剤 (SCH00013) の投与による遺伝性拡張型心筋症マウスの発症予防



遺伝疾患の一つであるランガー・ギディオン症候群(Langer-Gideon Syndrome; LGS)は第8番染色体長腕(8q24.1)(左図矢印の部位)の微細欠失が原因となる。しかし、通常の染色体検査でこの微細欠失を見つけることは極めて難しい。難治研で開発されたゲノムアレイでは染色体微細欠失の部位とサイズを正確に検出することができる。日常の臨床検査として導入が図られている。

今後の展望  
「難治疾患研究とヒトゲノムの多様性」

平成22年10月、日本人男性のゲノム配

列が解読され、一層、個人のゲノム情報にもとづく医療の展開に期待が高まっています。また、ヒトゲノムには遺伝子のコピー数の多様性があることも分かってきました。例えばデンブンを分解してくられる酵素であるアミラーゼの遺伝子のコピー数は、狩猟民族を祖先とするシベリアのヤクート人では数コピー程度であるのに対し、農耕民族を祖先とする日本人では10コピー程度まで増えていることが明らかにされています。さらに、最新のデータでは少なくとも1000種類近くの遺伝子が、アフリカ、ヨーロッパ、そして日本を含むアジアの民族間、さらには、同一民族内における個人間でも、そのコピー数に違いがあることが分かってきました。私たちのゲノムの多様性は従来の予想を遙かに超えており、難治疾患研究においても注目すべき重要な領域です。今後、遺伝子のコピー数の多様性と、個人の体質や病気の発症への関わりやすさ、及び自閉症や統合失調症など脳の機能と密接に関わる病態との関係などが明らかにされてくるものと思われれます。難治疾患研究所では、引き続き、国内および世界の研究者と共有できる知的、物的成果を創出し、その結果、疾患の克服、健康の維持に貢献できるように一人一人が研鑽を積んでいきます。

※オミックスさまざまな方法により分子情報を網羅的に解析し、当該分子の全体性を把握することで、病態解明や新薬の開発などに役立てるもの。  
※カルシウム増感剤カルシウム濃度に依存して生じる筋肉の収縮を増強する薬剤。



平成 22 年度採択課題

1) 戦略的課題 4 件

代表者	代表者所属機関	研究題目
寺井 崇二	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
岩坪 威	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
蒔田 芳男	旭川医科大学教育センター	外形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
牧野 伸司	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	代表者所属機関	研究題目
三浦 直行	浜松医科大学	家族性心臓突然死症候群“ブルガダ症候群”モデルマウスの機能解析
小堤 保則	京大生命科学研究科	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
原田 高幸	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
中田 和人	筑波大学大学院生命環境科学研究所	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

3) 一般的課題 27 件

代表者	代表者所属機関	研究題目
石谷 太	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
戸村 秀明	群馬大学生体調節研究所	小型魚類を用いた心・血管系難治疾患解明に関する研究
竹林 浩秀	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
伊東 進	筑波大学大学院人間総合科学研究科	TGF-β シグナルによる血管成熟制御機構の解明
平沢 晃	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
北村 忠弘	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
麻生倮二郎	高知大学教育研究部医学系	転写伸長因子異常症の病態の解明
新沢 康英	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
後藤 雄一	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
中村 一文	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科	自己免疫性 QT 延長症候群
田中 正人	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
久場 敬司	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
澤田 賢一	秋田大学大学院医学系研究科	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
岡本 伸彦	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
山本 健	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
池田 康博	九州大学病院	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
中内 啓光	東京大学医科学研究科	ニッチによる組織幹細胞の維持機構の解明
築地 信	星薬科大学	肺炎球菌莢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
沢辺 元司	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	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
横井 雅幸	学習院大学理学部	色素性乾皮症バリエーション群細胞と DT40 細胞を用いた損傷乗り越え複製機構の解析
金児・石野 知子	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	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
片桐 豊雅	徳島大学疾患ゲノム研究センター	乳がん易罹患者関連遺伝子の同定とその機能解析
関 直彦	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	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
萩 朋男	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

第 9 回駿河台シンポジウム / 第 1 回難治疾患共同研究拠点シンポジウム (H23.9.8 開催)

研究集会 (第 20 回ゲノムサイエンス研究会)

H23.2.3 開催

第20回癌ゲノムサイエンス研究会

日時：2011年2月3日(木) 19:00～  
場所：東京ガーデンパレス 2F 高千穂 (東京都文京区湯島1-7-5)  
～プログラム～ (敬称略)

学術情報提供 プリストル・マイヤーズ株式会社  
開会の挨拶 東京医科歯科大学 難治疾患研究所 稲澤謙治

(1)特別講演Ⅰ  
座長：慶應義塾大学医学部先端医学研究所 教授 佐谷 秀行  
演題：EML4-ALKががん遺伝子の発見と分子標的治療への展開  
演者：自治医科大学ゲノム機能研究部教授 東京大学大学院医学系研究科ゲノム医学講座 特任教授 間野 博行

(2)特別講演Ⅱ  
座長：東京医科歯科大学難治疾患研究所 所長 北嶋 繁孝  
演題：細胞の守護者・オートファジー ～分子機構と疾患との関わり～  
演者：大阪大学大学院医学系研究科遺伝学・生命機能研究科細胞内膜動態研究室 教授 吉森 保

研究会終了後、ささやかではありますが情報交換の場をご用意いたしております

共催：ゲノムサイエンス研究会  
プリストル・マイヤーズ株式会社  
東京医科歯科大・難治研「難治疾患共同研究拠点事業」  
連絡先：東京医科歯科大・難治疾患研究所・分子細胞遺伝(TEL: 5803-5820)

平成 22 年度「アレイ CGH 診断法実用化コンソーシアム研究集会」

日時：平成 23 年 1 月 15 日 午後 1:30～5:00  
場所：東京医科歯科大学・M&D タワー 23 階共用セミナー室 2  
出席者：  
蒔田芳男 (旭川医科大学教育センター)  
羽田 明 (千葉大学大学院医学研究院公衆衛生学)  
黒澤健司 (神奈川県立こども医療センター遺伝科)  
古谷憲孝 (神奈川県立こども医療センター遺伝科)  
稲澤謙治 (東京医科歯科大学難治疾患研究所・分子細胞遺伝)  
\*岡本伸彦 (大阪府立母子保健総合医療センター・企画調査部)  
\*水野誠司 (愛知県心身障害者コロニー中央病院臨床第一部)  
八木麻理子 (神戸大学大学院医学研究科内科系講座小児科学)  
鮫島希代子 (群馬県立小児医療センター)  
荒木 聡 (東京医科歯科大学小児科)  
林 深 (東京医科歯科大学難治疾患研究所・分子細胞遺伝)  
稲澤 謙治 (東京医科歯科大学難治疾患研究所・分子細胞遺伝)  
【\* 難治疾患共同研究拠点事業より旅費支援】

研究集会内容  
全国 23 の医療機関と形成したコンソーシアムにおいて、臨床的に診断がつかず染色体核型正常である多発奇形を伴う発達遅滞 (MCA/MR) 症例を対象として症例を収集して独自に開発した BAC アレイを用いて解析を行うことで、本領域でのアレイ診断法として実用化するための feasibility study を行った。1 次スクリーニングでは既知染色体異常症の原因領域と全染色体のサブテロメア・傍セントロメア領域に特異的な BAC を収載した診断型アレイである MCG Genome Disorder Array (GDA) を、2 次スクリーニングでは全ゲノム型 BAC アレイである MCG Whole Genome Array-4500 (WGA) を使用した。これまでに 536 症例を解析し、1 次スクリーニングでは 536 例中 54 例 (10.1%) に疾患に関連する CNV (pathogenic CNV; pCNV) を検出した。2 次スクリーニングでは現在までに 349 例の 1 次スクリーニング陰性症例を解析し、48 例 (13.8%) が pCNV を有すると判断した [Hayashi *et al.* J Hum Genet. in press.]。また、GDA は(株)2009 年より BML・富士フィルムに技術移転し、一般受託を開始している。平成 23 年 1 月 15 日に「平成 22 年度アレイ CGH 診断法実用化コンソーシアム研究集会」を開催 (於・M&D タワー 23 階共用セミナー室 2) し、コンソーシアムでの成果を報告するとともに、診断困難な MCA/MR に関して、Clinical research conference (CRC) 形式で討論をした。さらに、本コンソーシアムでの病態解明研究の今後の取り組みに関し話し合った。

難治疾患共同研究拠点説明会

日時：平成 22 年 9 月 8 日 午後 5:45～6:30  
場所：東京医科歯科大学・M&D タワー 21 階大学院講義室 1  
出席者：  
寺井 崇二 (山口大学大学院医学系研究科)  
石谷 太 (九州大学生体防御医学研究所)  
戸村 秀明 (群馬大学生体調節研究所)  
竹林 浩秀 (熊本大学生命科学研究部)  
伊東 進 (昭和薬科大学薬学部)  
平沢 晃 (慶應義塾大学医学部)  
鶴田 智彦 (慶應義塾大学医学部)  
北村 忠弘 (群馬大学生体調節研究所)  
後藤 雄一 (国立精神・神経センター神経研究所)  
久場 敬司 (秋田大学大学院医学系研究科)  
大八木秀明 (秋田大学大学院医学系研究科)  
築地 信 (星薬科大学)  
横井 雅幸 (学習院大学理学部)  
入江 将仁 (東海大学健康科学部)  
小倉 淳郎 (理化学研究所バイオリソースセンター)  
松尾 泰佑 (徳島大学疾患ゲノム研究センター)  
牧野 伸司 (慶應義塾大学医学部)

1. 難治疾患共同研究拠点について (説明者：北嶋所長)
2. 難治疾患共同研究拠点で利用できる施設・機器類について (説明者：石野教授)
3. プロテオーム解析室の見学 (担当者：仁科教授)
4. 受け入れ教員との共同研究打ち合わせ (担当者：各分野教授)



# 学位取得者

## 分子代謝医学分野

山本貴信「Insulin-induced ectodomain shedding of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in adipocytes *in vitro*: role of a disintegrin and metalloproteinase 17.」

山崎芳浩「The cathepsin L gene is a direct target of FOXO1 in the skeletal muscle.」

山城健二「Role of transient receptor potential vanilloid 2 in LPS-induced cytokine production in macrophages.」

## 生体情報薬理学分野

上嶋徳久「A new echocardiographic method for identifying vortex flow in the left ventricle: Numerical validation.」

## 神経病理学分野

伊藤日加瑠「Knock-down of PQBP1 impairs anxiety-related cognition in mouse.」

塩飽裕紀「Neural stem cells express Oct-3/4.」

## 発生再生生物学分野

佐藤益弘「Human PRP19 interacts with prolyl-hydroxylase PHD3 and inhibits cell death in hypoxia.」

畠星治「Identification of a novel post-translational modification, acetylation, of YAP oncoprotein.」

## 分子病態分野

志知大輔「Heart-specific small subunit of myosin light chain phosphatase activates Rho-associated kinase and regulates phosphorylation of myosin phosphatase target subunit 1.」

## 分子遺伝分野

呂正光「Protein kinase Cdelta activates RelA/p65 and nuclear factor-kappaB signaling in response to tumor necrosis factor-alpha.」

云霞「Immunohistochemical study of  $\beta$ -catenin and functionally related molecular markers in tongue squamous cell carcinoma and its correlation with cellular proliferation.」

木村純子「A functional genome-wide RNAi screen identifies TAF1 as a regulator for apoptosis in response to genotoxic stress.」

工藤卓也「D4S234E, a novel p53-responsive gene, induces apoptosis in response to DNA damage.」

## 分子薬理学分野

長尾雅史「Schnurri-2 deficiency counteracts against bone loss induced by ovariectomy.」

羽生亮「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.」

## 病態細胞生物学分野

西田友哉「Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy」

## 生命情報学分野

成尾佳美「Cell-specific Control of epidermal growth factor receptor signalling activity associated with lung cancer」

柴田潤子「Within-host coevolution of Gag P453L and protease D30N/N88D demonstrates virological advantage in a highly protease inhibitor-exposed HIV-1 case」

中原泉「Up-regulation of *PSFI* Promotes the Growth of Breast Cancer Cells」

## エピジェネティクス分野

岩船浩孝「Analysis of mammalian-specific genome features that were newly obtained in evolutionary process.」

入江将仁「identification of responceable region for upd(14)pat-like disease」

## 分子神経科学分野

阿部友美「Analysis of efferent neural pathways of orexin neurons in eliciting food-anticipatory activity.」

伊東義真「The deficiency of glutamate transporters GLAST and GLT1 disrupts the development of amygdala.」

## 分子細胞遺伝分野

春木茂男「Frequent silencing of protocadherin 17, a candidate tumour suppressor for esophageal squamous-cell carcinoma.」

Begum Asma「Identification of PAK4 as a putative target gene for amplification within 19q13.12-q13.2 in oral squamous-cell carcinoma.」

# 難研セミナー

## 平成 21 年度大学院生研究発表会・若手研究者研究発表会

平成 22 年 2 月 23 日

志知大輔 (分子病態分野)

多型マイクロサテライト C1\_2\_5 は、HLA-B/-Cw

ハプロタイプ識別の有用なマーカーとなる

鶴田智彦 (分子細胞遺伝分野)

DNA メチル化異常により発現抑制される子宮体癌関連癌抑制遺伝子型 microRNA の機能的スクリーニング

松村聡 (分子細胞遺伝分野)

肝細胞癌において DNA 過剰メチル化で制御されているがん抑制遺伝子の統合的アレキ解析

伊東義真 (分子神経科学分野)

過剰なグルタミン酸シグナルは扁桃体の発達を障害する

正木久晴 (病態生化学分野)

マウス ES 細胞において、DPPA4 は DNA とヒストン H3 を介してクロマチン構造調節に関与している

岩船浩孝 (エピジェネティクス分野)

ゲノムインプリンティングの分子機構の解析

阿部友美 (分子神経科学分野)

食餌予知行動発現におけるオレキシンの作用部位の解明

大野源太 (形質発現分野)

RNA 結合タンパク質 ASD-2 はアクチン細胞骨格形成に関わる線虫 ADF/コフィリンの筋肉特異的な選択的スプライシングを制御する

内田好海 (発生再生生物学分野)

ストレス応答性キナーゼ JNK による時計蛋白質 PER2 の安定性制御

宮村憲央 (発生再生生物学分野)

概日リズムと DNA 損傷応答を共通に制御するシグナル伝達経路の解明

武内章英 (形質発現分野)

レポーターマウスを用いた、哺乳類スプライシング暗号解読への挑戦

井上純 (分子細胞遺伝分野)

LAPTM5 蓄積による細胞死誘導と神経芽腫の自然退縮機構

林 深 (分子細胞遺伝分野)

小頭症と小脳脳幹部低形成を伴う精神発達遅滞の原因遺伝子 CASK の解析

満栄勇 (免疫疾患分野)

Augmented B Lymphocyte Response to Antigen in the Absence of Antigen-Induced B Lymphocyte Signaling in an IgG-Transgenic Mouse Line.

小林慎 (MTT プログラム)

着床前の雌雄の分化とエピジェネティックな遺伝子制御

亀井康富 (分子代謝医学分野)

生活習慣病発症の易感受性における DNA メチル

化の役割

## 平成 20 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 22 年 2 月 23 日

成瀬美衣 (エピジェネティクス分野)

レトロトランスポゾン由来の遺伝子を利用した哺乳類の胎生機構獲得の検証

古田満子 (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 の機能的探索

## 2009 年度難治疾患研究所優秀論文賞受賞者講演会

平成 22 年 2 月 23 日

西田友哉 (病態細胞生物学分野)

Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy

菅波孝祥 (分子代謝医学分野)

Activating transcription factor 3 constitutes a negative feedback mechanism that attenuates saturated fatty acid/toll-like receptor 4 signaling and macrophage activation in obese adipose tissue

伊藤日加瑠 (神経病理学分野)

Knock-down of PQBP1 impairs anxiety-related cognition in mouse

有村卓朗 (分子病態)

Cardiac Ankyrin Repeat Protein Gene(ANKRD1) Mutations in Hypertrophic Cardiomyopathy

志浦寛相 (エピジェネティクス分野)

Paternal deletion of Meg1/Grb 10 DMR causes maternalization of the Meg1/Grb10 cluster in mouse proximal Chromosome 11 leading to severe pre- and postnatal growth

## 難研セミナー (難治疾患共同研究拠点セミナー)

### 第 427 回

Takeshi Sakurai (Departments of Psychiatry and Pharmacology Seaver Autism Center Mount Sinai School of Medicine)

Autism genetics and synapse biology: application of mouse models

平成 22 年 3 月 10 日

### 第 428 回

Gurvinder Kaur (Molecular Immunology Laboratory, Department of Transplant Immunology and Immunogenetics All India Institute of Medical Sciences, New Delhi)

Immunogenetics of mycobacterial and HIV-1 infections: An Indian experience

平成 22 年 3 月 4 日

### 第 429 回 (第 1 回)

Robert G. Roeder (The Rockefeller University)

がん抑制因子 p53 による転写活性化における co-factor の機能について

平成 22 年 4 月 1 日

### 第 430 回 (第 2 回)

萩原正敏 (形質発現分野)

特別講演 スプライシング暗号解明から RNA 病治療への挑戦

平成 22 年 6 月 22 日

### 第 431 回 (第 3 回)

清水信義 (慶應義塾大学先端研究・GSP センター)

メダカから学ぶヒトゲノムの謎

平成 22 年 7 月 22 日

### 第 432 回 (第 4 回)

斧正一郎 (エモリー大学医学部病理学科)

線虫 *C.elegans* の排卵を調整する細胞骨格タンパク質

平成 22 年 6 月 18 日

### 第 433 回 (第 5 回)

Sabyasachi Das (Dept. Pathology and Laboratory Medicine, Emory University School of Medicine)

Evolution of alpha-defensin multigene family: Insights from primate genome analysis

平成 22 年 8 月 20 日

### 第 434 回 (第 6 回)

小安重夫 (慶應義塾大学医学部)

自然免疫反応で Th2 サイトカインを発現する新しいリンパ球

平成 22 年 7 月 28 日

### 第 435 回 (第 7 回)

Michael Reth (Faculty of Biology, University Freiburg & MPI of Immunobiology)

Autoinhibition: a universal mechanism to regulate signalling from the B cell antigen receptor.

平成 22 年 8 月 20 日

### 第 436 回 (第 8 回)

Rainer Breitling (グラスゴー大学)

メタボロミクスに基づくシステム生物学について

平成 22 年 7 月 22 日

### 第 437 回 (第 9 回)

河崎徳人 (スクリプス研究所)

CD22 as a negative regulator of TLRs in B cells

平成 22 年 8 月 5 日

<b>第 438 回（第 10 回）</b>	<b>第 448 回（第 20 回）</b>
仲一仁（金沢大学がん研究所がん幹細胞研究プログラム遺伝子染色体構築研究分野） がん幹細胞における治療抵抗性メカニズム 平成 22 年 9 月 15 日	下郡智美(理化学研究所脳科学総合研究センター) Neural Development 平成 22 年 12 月 10 日
<b>第 439 回（第 11 回）</b>	<b>第 449 回（第 21 回）</b>
Tilo Kunath（エジンバラ大学幹細胞研究所） FGF-Erk signalling in pluripotency and lineage commitment 平成 22 年 11 月 4 日	竹松弘（京大大学生命科学研究科） Quantitative transcriptomic profiling of biosynthetic pathway of CD77, a marker for human germinal center B cells 平成 23 年 1 月 17 日
<b>第 440 回（第 12 回）</b>	<b>第 450 回（第 22 回）</b>
Gis_le Bonne（フランス国立保健医学研究所（Inserm）） Laminopathies of the striated muscle: from gene defects to possible pathomechanisms? 平成 22 年 10 月 18 日	石谷太（九州大学生体防衛医学研究所　ポストゲノムサイエンスセンター細胞統御システム分野） ゼブラフィッシュを用いたシグナル伝達研究-Nemo-like kinase (NLK) による Wnt/Notch シグナル制御 - 平成 23 年 1 月 24 日
<b>第 441 回（第 13 回）</b>	<b>第 451 回（第 23 回）</b>
中山敬一（九州大学生体防御医学研究所細胞機能制御学部門分子医科学分野） 次世代プロテオミクスが拓く生命科学 research の新地平：もうウェスタンブロッティングは要らない？！ 平成 22 年 10 月 4 日	中内啓光（東京大学医科学研究所・幹細胞治療研究センター・幹細胞治療分野　科学技術振興機構・ERATO 中内幹細胞制御プロジェクト） 幹細胞研究から新しい医療へ 平成 23 年 2 月 4 日
<b>第 442 回（第 14 回）</b>	<b>第 452 回（第 24 回）</b>
西川伸一（理化学研究所発生・再生科学総合研究センター） 解明される血液幹細胞の発生 平成 22 年 10 月 29 日	劉　剛（Institute of Materia Medica, CAMS & PUMC.） 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
<b>第 443 回（第 15 回）</b>	<b>第 453 回（第 25 回）</b>
Keshava Prasad（Institute of Bioinformatics International technology Park） High resolution Proteomic technologies and highly curated protein databases for biomedical investigations 平成 22 年 10 月 14 日	Luonan Chen（Key Laboratory of Systems Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences） Identifying functional pathways and modules from biomolecular networks 平成 23 年 2 月 1 日
<b>第 444 回（第 16 回）</b>	<b>第 454 回（第 26 回）</b>
稲垣暢也（京都大学大学院医学研究科　糖尿病・栄養内科学） β細胞の機能と量－DPP-4 阻害薬と SU 薬の併用による低血糖から学んだこと－ 平成 22 年 12 月 3 日	Yang Zhong（Tibet University in Lhasa & Fundan University in Shanghai） From Bioinformatics to Systems Biology: Case Studies 平成 23 年 2 月 16 日
<b>第 445 回（第 17 回）</b>	
平田務（愛媛大学・上級研究員センター） 扁桃体の発生を制御する分子メカニズムの解明にむけて 平成 22 年 12 月 17 日	
<b>第 446 回（第 18 回）</b>	
清水厚志(慶應義塾大学医学部・分子生物学教室) 次世代シーケンサーの原理と医学への応用 平成 23 年 1 月 20 日	
<b>第 447 回（第 19 回）</b>	
平瀬肇（理化学研究所脳科学総合研究センター） Glial in mature brain 平成 22 年 12 月 7 日	

## 20

# 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。本年度の成果は以下の通りである。

### 分子代謝医学

- 脂肪組織に浸潤するマクロファージにおける飽和脂肪酸の標的分子として macrophage-inducible C-type lectin（Mincl）を同定した。
- 骨格筋において RXR $\gamma$  の活性化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ことが明らかになり、肥満に合併する糖尿病における創薬ターゲットとしての有用性が示唆された。

### 分子薬理学

- コレステロールプルランを担体としたプロスタグランジン E2 受容体アゴニスト（EP4）と BMP2 投与はマウス頭蓋冠の骨欠損モデルを有効に修復できることを示した。
- 骨芽細胞における副甲状腺ホルモン受容体シグナルは時計遺伝子 Per-1 の転写を促進することを明らかにした。
- Schnurri-2 遺伝子欠損による海綿骨の骨量増加はマウス卵巣摘出モデルによる骨量低下を妨げることを見出した。

### 分子細胞生物学

- IQGAP1 が canonical Wnt シグナル伝達経路に関与することを示した。
- WNK → OSR1 というシグナル伝達経路がショウジョウバエからヒトまで広く保存されていることを明らかにした。

### 分子神経科学

- 酸化ストレスに反応して細胞死を誘導するカインース ASK1 が GLAST 欠損マウスの網膜神経節細胞の変性を抑制することを明らかにした。
- 不溶性のグルタミン酸トランスポーター EAAT2 がアルツハイマー病で蓄積することを同定した。

### 生体防御学

- 形質細胞様樹状細胞が、T 細胞に依存しない優れた IgA 生産誘導能力を備えていることを突き止めた。
- 感染あるいは炎症誘導時にける新しい免疫寛容誘導メカニズムを同定した。

### 生体情報薬理

- 日本人を対象として心房細動関連遺伝子の全ゲノム解析（GWAS）を行い、日本人特有の関連遺伝子を含め複数の心房関連遺伝子を同定した。
- 心房細動病態発現における炎症機転の関与の検討を行い、心房筋伸展刺激により産生される危険信号 danger signal が炎症初期段階に関与する可能性を見出した。
- 家族性不整脈疾患 LQT 患者から iPS 細胞を樹立し、分化誘導した心筋細胞を使って病態心筋細胞のモデル系を確立した。

### 幹細胞制御分野

- 神経幹細胞の自己複製において、FGF2・Wnt・Notch シグナルの細胞内伝達経路群の相互作用が増殖促進とニューロン・グリアの未分化性維持の両立に働くことを示した。
- 神経幹細胞の分化の指向性が、胎生の進行に伴いニューロン分化からアストロサイト分化へと変遷する仕組みを調節する分子として Sprouty ファミリーを同定した。
- 転写因子 Sox17 が、胎生中期の造血組織である AGM 領域において、血液前駆細胞の未分化性を維持することを示した。

## 21



# 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

### 研究内容

#### 概略

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の標的器官としての脂肪組織

##### 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 (J. Leukoc. Biol. 88: 33-39, 2010) (図1)。

我々は既に、脂肪細胞に由来する飽和脂肪酸が4型Toll様受容体 (TLR4) の内在性リガンドとしてマクロファージを活性化することを証明し、メタボリックシンドロームの病態形成に関与することを見出した。本研究では、マクロファージにおける飽和脂肪酸の標的分子として macrophage-inducible C-type lectin (Mincle) を同定し、Mincle が肥満の脂肪組織に浸潤するマクロファージに高発現することを証明した。培養マクロファージを用いた検討により、Mincle は飽和脂肪酸/TLR4/NF- $\kappa$ B 経路により発現が誘導されることが明らかになった。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 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)。

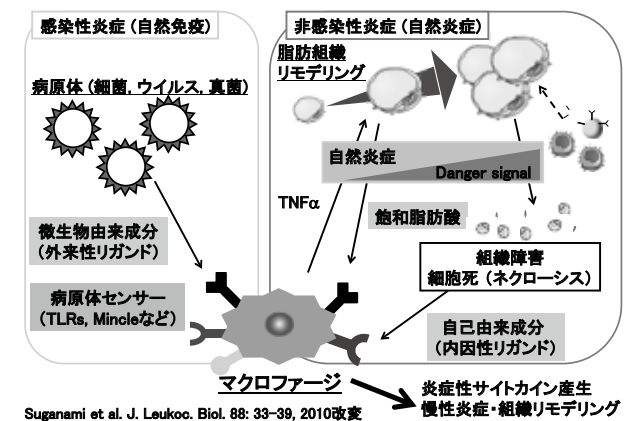


図1 脂肪組織リモデリングと自然炎症

##### B. 肥満・2型糖尿病の末梢血単球機能に関する研究：

肥満の脂肪組織に浸潤するマクロファージの病態生理的意義が注目されているが、脂肪組織に浸潤する前段階、即ち、末梢血単球の変化やその意義は不明である。本研究では、肥満患者の末梢血単球において、M2 マーカー陽性細胞と炎症抑制性サイトカイン IL-10 の発現が有意に低下し、動脈硬化指標 (PWV) と負の相関を示すことが明らかになった。興味深いことに、肥満に2型糖尿病を合併する患者ではこれらのパラメーターが更に低下していた。インスリン抵抗性改善薬であるチアゾリジン誘導体は、PPAR $\gamma$  の活性化を介してマクロファージの M2 分化を促進することが知られているが、肥満症患者ではチアゾリジン誘導体投与により、末梢血単球の質的変化と動脈硬化指標が有意に改善した。以上より、肥満・2型糖尿病における単球機能の改善を標的とする新しい治療戦略の可能性が示唆された (Diabetes Care 33: e7, 2010)。一方、種々の単球・マクロファージマーカーには種差が存在するため、ヒトと実験動物では必ずしも一致した見解が得られていない。我々は、肥満患者の末梢

血単球において、TNF $\alpha$  や IL-6 などの炎症性サイトカインとともに Mincle 遺伝子発現の著しい上昇を見出した。以上より、Mincle がヒト末梢血単球において活性化の指標となる可能性が示唆された (Diabetes 60 : 819-826, 2011)。

#### C. アディポサイトカイン HB-EGF の産生調節機構に関する研究：

ヘパリン結合上皮成長因子様増殖因子 (HB-EGF) は膜蛋白質として生合成され、切断酵素により切断されて放出されるユニークなアディポサイトカインである。肥満マウスでは、脂肪組織においてのみ HB-EGF 遺伝子発現が増加する。本研究では、脂肪細胞における HB-EGF 放出の分子機構を解明するためにアルカリフォスファターゼ融合 HB-EGF を安定発現する 3T3-L1 脂肪細胞を作製し、HB-EGF 放出の検出系を確立した。インスリンは脂肪細胞において HB-EGF 遺伝子発現と放出を誘導したが、未分化脂肪細胞では効果を示さなかった。メタロプロテアーゼ阻害薬を用いた検討により、インスリン誘導性 HB-EGF 放出の少なくとも一部は ADAM17 (a disintegrin and metalloproteinase 17) によることが示唆された。又、リコンビナント HB-EGF 添加により脂肪細胞における HB-EGF 放出が誘導された。以上より、脂肪細胞においてインスリンによる HB-EGF 放出のポジティブフィードバック機構が示唆された。HB-EGF 放出の分子機構の解明は、内分泌細胞としての脂肪細胞の理解に新しい洞察をもたらすと考えられる (Obesity 18: 1888-1894, 2010)。

#### 2. 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 $\gamma$  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 $\gamma$  の意義は不明である。我々は既に、核内受容体 RXR $\gamma$  を骨格筋特異的に過剰発現するマウス (RXR $\gamma$  マウス) を作出し、RXR $\gamma$  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 $\gamma$  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 $\gamma$  の機能的意義を検討した。通常食で飼育した RXR $\gamma$  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 $\gamma$  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 $\gamma$  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 $\gamma$  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 $\gamma$  の創薬ターゲットとしての可能性が示唆された (図2)。

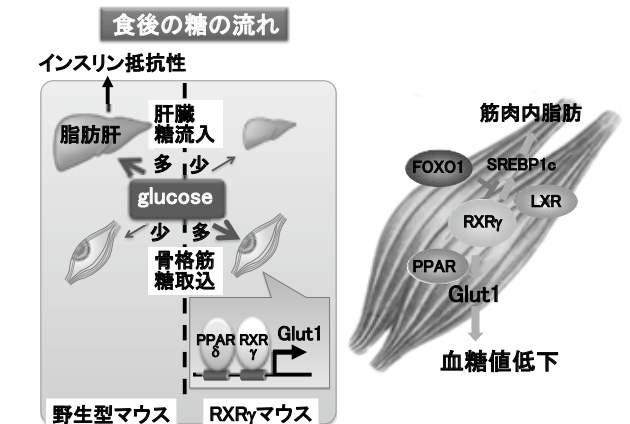


図2 RXR $\gamma$  マウスにおける全身の糖脂質代謝

#### 3. マクロファージにおける炎症性サイトカイン産生の分子機構に関する研究

TLR4 のセカンドメッセンジャーとして細胞内カルシウムの役割を示唆する知見が集積しつつある。しかしながら、TLR4 がいかんして細胞内カルシウムを制御するのか、細胞内カルシウムがどのようにして LPS によるサイトカイン産生に関与するのかについては未解明の点が多い。我々は、非興奮性細胞における主要なカルシウム流入経路である transient receptor potential (TRP) がマクロファージにおける LPS による炎症性サイトカイン産生に関与することを明らかにした。薬理的検討により、LPS による TNF $\alpha$  と IL-6 の遺伝子発現の誘導には TRPC あるいは TRPM ファミリーではなく TRPV ファミリーが関与することが明らかになった。マクロファージでは TRPV ファミリー分子のうち TRPV2 のみが発現しており、shRNA により TRPV2 をノックダウンしたところ、LPS により誘導される TNF $\alpha$  および IL-6 の遺伝子発現と I $\kappa$ B $\alpha$  の分解が抑制された。LPS による細胞内カルシウムレベルの上昇には細胞内外のカルシウム動員が関与していること、特に、細胞内から動員されたカルシウムは NF- $\kappa$ B 依存性の TNF $\alpha$  と IL-6 の遺伝子発現の誘導に関連し、細胞外から動員されたカルシウムは NF- $\kappa$ B 非依存的な IL-6 の遺伝子発現の誘導に関連することが示唆された (Biochem. Biophys. Res. Commun. 398: 284-289, 2010)。

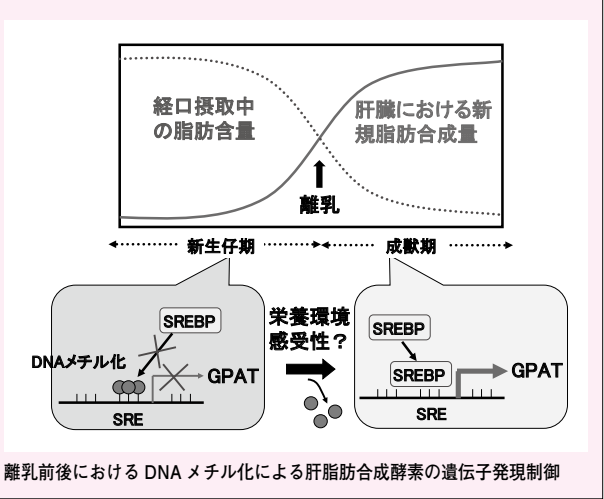


## ハイライト

### 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（GPAT）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GPAT遺伝子プロモーターに特異的であり、他の脂肪合成遺伝子では認められなかった。培養細胞を用い

た検討により、DNAメチル化によりGPAT遺伝子プロモーター転写活性が抑制されることが明らかになった。以上より、GPAT遺伝子はDNAメチル化によるエピジェネティクス制御を受けることが示唆された。



離乳前後におけるDNAメチル化による肝脂肪合成酵素の遺伝子発現制御

### 人事異動

転入：西條美佐（特任助教）、伊藤美智子（特任助教）、蜂屋瑠見（特任助教）、高橋真由美（特任助教）、滝沢文彦（GCOE拠点形成特別研究員）、岩崎順博（大学院生）、青山千賀子（大学院生）
転出：山本幸男（MTT特任講師）、樋口恵子（特任助教）、山本貴信（大学院生）、佐野慶和（技術補佐員）

### 業績目録

#### 原著論文

- N. Satoh, A. Shimatsu, A. Himeno, Y. Sasaki, H. Yamakage, K. Yamada, T. Suganami, and Y. Ogawa. Unbalanced M1/M2 phenotype of peripheral blood monocytes in obese diabetic patients: effect of pioglitazone. *Diabetes Care* 33: e7, 2010.
- M. Tanaka, T. Suganami, S. Sugita, Y. Shimoda, M. Kasahara, S. Aoe, M. Takeya, S. Takeda, Y. Kamei, and Y. Ogawa. Role of central leptin signaling in renal macrophage infiltration under unilateral ureteral obstruction. *Endocr. J.* 57: 61-72, 2010.
- Y. Kamei, T. Suganami, T. Ehara, S. Kanai, K. Hayashi, Y. Yamamoto, S. Miura, O. Ezaki, M. Okano, and Y. Ogawa. Increased expression of DNA methyltransferase 3a in obese adipose tissue: studies with transgenic mice. *Obesity* 18: 314-321, 2010.
- Y. Yamazaki, Y. Kamei, S. Sugita, F. Akaike, S. Kanai, S. Miura, Y. Hirata, B.R. Troen, T. Kitamura, I. Nishino, T. Suganami, O. Ezaki, and Y. Ogawa. The cathepsin L gene is a direct target of FOXO1 in the skeletal muscle. *Biochem. J.* 427: 171-178, 2010.
- T. Yamamoto, T. Suganami, M. Kiso-Narita, P. A. Scherle, Y. Kamei, M. Isobe, S. Higashiyama, and Y. Ogawa. Insulin-induced ectodomain shedding of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in adipocytes *in vitro*: role of a disintegrin and metalloproteinase 17. *Obesity* 18: 1888-1894, 2010.
- T. Suganami and Y. Ogawa. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remod-

eling. *J. Leukoc. Biol.* 88: 33-39, 2010.

- K. Yamashiro, T. Sasano, K. Tojo, I. Namekata, J. Kurokawa, N. Sawada, T. Suganami, Y. Kamei, H. Tanaka, N. Tajima, K. Utsunomiya, Y. Ogawa, and T. Furukawa. Role of transient receptor potential vanilloid 2 in LPS-induced cytokine production in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 398: 284-289, 2010.
- Y. Okazaki, N. Ohshima, I. Yoshizawa, Y. Kamei, S. Mariggìo, K. Okamoto, M. Maeda, Y. Nogusa, Y. Fujioka, T. Izumi, Y. Ogawa, Y. Shiro, M. Wada, N. Kato, D. Corda, and N. Yanaka. A novel glycerophosphodiester phosphodiesterase GDE5 controls skeletal muscle development via a non-enzymatic mechanism. *J. Biol. Chem.* 285: 27652-27663, 2010.
- A. Sato, H. Kawano, T. Notsu, M. Ohta, M. Nakakuki, K. Mizuguchi, M. Itoh, T. Suganami, and Y. Ogawa. Anti-obesity effect of ecosapentaenoic acid in high-fat/high-sucrose diet-induced obesity: importance of hepatic lipogenesis. *Diabetes* 59: 2495-2504, 2010.

#### 総説及び著書

- 蜂屋瑠見、菅波孝祥、小川佳宏：「炎症とメタボリックシンドローム」：小児科診療 第73巻、第2号、309-314, 2010
- 蜂屋瑠見、菅波孝祥、小川佳宏：「メタボリックシンドロームとToll-like Receptors」：ファルマシア 2月号、124-128, 2010
- 津田直人、菅波孝祥、伊藤綾香、小川佳宏：「脂肪組織リモデリング」：International Review of Diabetes Vol.2, No.1, 26-31, 2010
- 小川佳宏、佐藤哲子：「肥満の発症機構」：肥満と消化器疾患、2-14, 2010
- 伊藤綾香、菅波孝祥、小川佳宏：「Toll-like receptor」：Vascular Medicine, 62-65, 2010
- 山本貴信、菅波孝祥、小川佳宏：「肥満脂肪組織と合併症形成機構」：治療学、18-23, 2010
- 姫野亜紀裕、佐藤哲子、小川佳宏：「ニコチンの体重に及ぼす影響について」：内分泌・糖尿病・代謝内科、282-286, 2010
- 小川佳宏：「肥満と病原体センサー」：炎症と免疫、36-41, 2010
- 津田直人、菅波孝祥、小川佳宏：「内分泌器官

- としての脂肪組織とメタボリックシンドローム」：臨床検査 Vol.54, No.6、665-669, 2010
- 小川佳宏：「栄養のサイエンス：栄養シグナルとしての脂肪酸」：成人病と生活習慣病 5、534-537, 2010
  - 山本貴信、菅波孝祥、小川佳宏：「感染症、炎症と2型糖尿病（総論）」：Diabetes Frontier No.3, Vol.21, 320-325, 2010
  - 田中 都、菅波孝祥、小川佳宏：「脂肪組織における炎症の意義」：総合臨床 9 Vol.54, No.9, 1895-1899, 2010
  - 田中 都、菅波孝祥、小川佳宏：「レプチン」：Cardio Diabetic Frontier～心血管病と糖尿病を総合的に理解する新たな視点を求めて～、101-106, 2010
  - 小川佳宏：「メタボリックシンドロームと慢性炎症」：糖尿病学の進歩 2010、120-124, 2010
  - 田中 都、菅波孝祥、小川佳宏：「アディポサイトカインを介した臓器間代謝情報ネットワークと高血圧」：血圧 第17巻、第10号、19-22, 2010
  - 山本貴信、菅波孝祥、小川佳宏：「メタボリックシンドロームと酸化ストレス・炎症」：Cardiovascular Frontier Vol.1, No.3、39-45, 2010

#### 雑誌企画・監修

小川佳宏：実験医学 特集 7月号「慢性炎症の分子プロセス」羊土社

小川佳宏：「異所性脂肪：メタボリックシンドロームの新概念」日本医事新報社

#### 国際学会

- Y. Ogawa: Regulation of adipose tissue inflammation. 14<sup>th</sup> International of Endocrinology (ICE2010), 2010.3.30-31, KYOTO
- Y. Ogawa: Adipose Tissue Remodeling as Homeostatic Inflammation. 2010 IDF WPR Congress, 2010.10.17-20, BUSAN, KOREA

#### 国内学会

シンポジウム、招待講演

- 小川佳宏：「栄養のサイエンス：栄養シグナルとしての脂肪酸」：第44回日本成人病（生活習慣

- 病）学会、2010.1.9、東京
- 小川佳宏：メタボリックシンドロームと慢性炎症：第44回糖尿病学の進歩、2010.3.5、大阪
- 小川佳宏：「メタボリックシンドロームと慢性炎症」：第93回日本消化器病学会中国支部例会、2010.6.12、山口
- 小川佳宏：「肥満と慢性炎症」：第31回日本肥満学会、2010.10.1-2、群馬
- 小川佳宏：「Adipose tissue inflammation and the metabolic syndrome」：第53回日本糖尿病学会年次学術集会、2010.5.27-29、岡山
- 小川佳宏：「メタボリックシンドロームと自然炎症」：日本食品免疫学会2010年度大会、2010.6.1-2、東京
- 田中都、菅波孝祥、小川佳宏：「レプチン」：第31回日本肥満学会、2010.10.1-2、群馬
- 小川佳宏：「ω3多価不飽和脂肪酸の抗炎症作用」：第25回日本糖尿病合併症学会、2010.10.22-23、滋賀
- Y. Ogawa：「The metabolic syndrome and chronic inflammation」：第18回日本血管生物医学学会学術集会、2010.12.1-3、大阪
- Y. Ogawa：「Adipose tissue remodeling and homeostatic inflammation」：第33回日本分子生物学会年会、第83回日本生化学会大会合同大会、2010.12.7-10、兵庫

#### 年次集会

- 佐藤哲子、姫野亜紀裕、椋谷真由、佐々木洋介、村中和哉、山田和範、菅波孝祥、小川佳宏、島津 章：「肥満・2型糖尿病の心血管病リスクとしての末梢血単球 M1/M2 phenotype の病態意義の検討－ビオグリタゾンの効果－」：第53回日本糖尿病学会年次学術集会、2010.5.27-29、岡山
- 佐々木洋介、佐藤哲子、姫野亜紀裕、椋谷真由、村中和哉、山田和範、菅波孝祥、小川佳宏、島津 章：「肥満メタボリック症候群の末梢血単球 M1/M2 タイプに対するエイコサペンタエン酸の効果」：第53回日本糖尿病学会年次学術集会、2010.5.27-29、岡山
- 田中 都、菅波孝祥、西條美佐、築地 信、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作用」：第31回日本肥満学会、2010.10.1-2、群馬
- 市岡誠之、菅波孝祥、津田直人、田中 都、白川伊吹、平田陽一郎、宮本恵宏、佐田政隆、亀井康富、小川佳宏：「肥満の脂肪組織における新たな炎症関連遺伝子の探索」：第31回日本肥満学会、2010.10.1-2、群馬
- 江原達弥、亀井康富、金井沙綾香、高橋真由美、菅波孝祥、小川佳宏：「脂肪合成遺伝子のエピジェネティクス制御：DNAメチル化に着目して」：第31回日本肥満学会、2010.10.1-2、群馬
- 亀井康富、江原達弥、菅波孝祥、金井沙綾香、高橋真由美、畑田出穂、岡野正樹、小川佳宏：「肥満とDNAメチル化：DNAメチル化酵素遺伝子改変マウスによる検討」：第31回日本肥満学会、2010.10.1-2、群馬
- 杉田 聡、亀井康富、赤池史子、菅波孝祥、金井沙綾香、真鍋康子、藤井宣晴、三浦進司、江崎 治、小川佳宏：「骨格筋受容体における核内受容体RXRγの糖代謝促進作用」：第31回日本肥満学会、2010.10.1-2、群馬
- 佐藤歩美、伊藤美智子、中久木正則、河野浩之、水口 清、菅波孝祥、小川佳宏：「エイコサペンタエン酸の抗肥満作用と抗肝脂肪酸合成作用の関連」：第31回日本肥満学会、2010.10.1-2、群馬

#### 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：第13回 Cardiovascular-Diabetes Meeting in Hiroshima、2010.1.15、広島
- 小川佳宏：メタボリックシンドロームと慢性炎症：第82回福岡心臓血管研究会、2010.1.18、福岡

福岡

- 小川佳宏：メタボリックシンドロームと慢性炎症：第9回メタボリックシンドローム研究会、2010.3.11、東京
- 小川佳宏：メタボリックシンドロームと自然炎症：生体調節研究所シンポジウム、代謝疾患研究の最前線、2010.3.17、群馬
- 小川佳宏：炎症からみたメタボリックシンドローム：エクア錠発売記念講演会～糖尿病治療の新展開～、2010.4.24、宮城
- 小川佳宏：メタボリックシンドローム、慢性炎症、異所性脂肪：第2回 Ehime Diabetic-Cardiology Forum、2010.8.19、愛媛
- 小川佳宏：慢性炎症：生活習慣病・痛に共通する基盤病態：第34回日本産科婦人科栄養・代謝研究会、2010.9.3-4、三重
- 小川佳宏：慢性炎症における実質細胞-間質細胞相互作用：第91回医工学フォーラム、2010.9.24、京都
- 小川佳宏：メタボリックシンドロームと自然炎症：第3回小児糖尿病代謝フォーラム、2010.11.7、東京
- 小川佳宏：慢性炎症の分子基盤と関連病態：環境エピゲノミクス研究会 第4回定例会、2010.11.15、栃木
- 小川佳宏：メタボリックシンドロームと自然炎症：第2回泌尿器抗加齢医学研究会、2010.11.28、東京

### 学内外教育活動

小川佳宏：医歯学総合研究科修士課程遺伝疾患総論講義、バイオ医療オミックス情報学人材養成プログラム講義、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、千葉大学大学院医学研究院代謝生理学講義、和歌山県立医科大学解剖学第二教室大学院特別講義

#### 競争的研究費取得

- 小川佳宏：文部科学省科学研究費補助金、基盤研究（B）「脂肪組織リモデリングと脂肪毒性の分子機構の解明」
- 小川佳宏：文部科学省科学研究費補助金、挑戦的萌芽研究「肥満に関連するDNAメチル化標的遺伝子の同定と機能解析」
- 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」
- 小川佳宏：科学技術振興機構、企業研究者活用型基礎研究推進事業「食品成分による生活習慣病発症の新しい予防の確立に向けた基盤研究～胎児期・新生児期に着目して」
- 亀井康富：文部科学省科学研究費補助金、基盤研究（C）「骨格筋機能保全のための遺伝子発現制御機構解明」
- 亀井康富：厚生労働省がん研究助成金「肥満・高脂血症・糖尿病モデル動物の発がん感受性と発がん機構に関する研究：肥満・糖尿病モデルマウスにおける発がん関連因子の発現調節機構の研究」

究」

- 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「中枢神経系を介した臓器間クロストークによる腎障害の進展の分子機構の解明」
- 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」
- 杉田 聡：文部科学省科学研究費補助金、特別研究員奨励費「FOXO1による骨格筋量の調節機構の解明」
- 小川佳宏：日本糖尿病財団研究助成金「骨格筋においてDNAメチル化により制御される糖代謝関連遺伝子の同定」
- 亀井康富：ネスレ栄養科学会議研究助成金「乳児期・胎児期の食事成分によるDNAメチル化変化を介した生活習慣病予防を目指した基礎研究」
- 菅波孝祥：日本応用酵素研究会研究助成「慢性炎症を基盤とするメタボリックシンドロームの病因・病態の解明」
- 菅波孝祥：小野医学研究奨励助成金「遊離脂肪酸により誘導される“慢性炎症”の分子機構とメタボリックシンドロームにおける病態生理的意義の解明」
- 菅波孝祥：山口内分泌疾患研究振興財団「遊離脂肪酸を起点とする慢性炎症」



# 難治疾患研究所 先端分子医学研究部門

## 分子薬理学分野

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. Schnurri-2 欠損は、卵巣摘出による骨量減少に拮抗的に作用する (長尾雅史、江面陽一、野田政樹)。

Schnurri-2 (Shn2) は、骨形成と骨吸収の転写調節因子で、その欠損は、低ターンオーバー状態の海綿骨量増加を引き起こす。本研究において、そのような低代謝回転型の骨リモデリングが、高代謝回転状態を誘導するエストロゲンの枯渇下で、調節されるかどうかを検討した。卵巣摘出は、野生型マウスの骨量を減少させた。一方、Shn2 の欠損マウスでも、骨量減少したが、骨量の基礎値が高いため、野生型のコントロールマウスの骨量と同程度だった。エストロゲン欠乏により、Shn2 欠損マウスの破骨細胞の基礎レベルは低かったが、野生型と同程度に骨吸収が上昇した。一方、Shn2 欠損マウスの骨髄培養細胞の石灰化の基礎レベルは低かったが、エストロゲン欠乏により、Shn2 欠損骨髄培養細胞の石灰化レベルは、野生型のコントロールマウスと同程度に上昇した。Shn2 欠損マウスは、卵巣摘出による骨量減少後でも、野生型のコントロールマウスと同程度の骨量を維持し、このことは、卵巣摘出後の、骨髄細胞の高い石灰化活性と相関していることを示す (J Cell Physiol, 2011)。

#### 2. Per-1 は、骨芽細胞において、副甲状腺ホルモン (PTH) シグナルによって制御される特異的な Clock 遺伝子であり、PTH によって誘導される転写現象に機能的に作用する。(羽生亮、早田匡芳、野田政樹)

Per-1 は、clock 遺伝子群の一つで、骨量決定などの様々

な生物学的減少を制御する事が知られている。副甲状腺ホルモンは、骨同化作用を持つが、その作用機序は完全には理解されていない。本研究においては、骨芽細胞特異的 PTH シグナル下において、Per-1 遺伝子発現における PTH の役割について検討した。骨芽細胞特異的に、恒常活性型 PTH 受容体 (caPPR) を発現させたトランスジェニックマウスの骨では、Per-1 遺伝子発現が活性化された。他の clock 遺伝子である Bmal-1 の発現は caPPR によって影響されなかったため、この減少は特

### ハイライト

低用量 BMP とプロスタグランジン E2 受容体特異的アゴニストを含むナノゲルを用いた薬剤送達システムは、重篤な骨欠損を治癒させる (Paksinee Kamolratanakul, 早田匡芳、野田政樹)。

骨再生は現代世界において重要な問題である。骨減少や骨粗鬆症を伴う高齢者における、歯科インプラント、股関節全置換術や膝置換術の必要性が近年増加しつつあり、今まで以上の困難に直面しているからである。

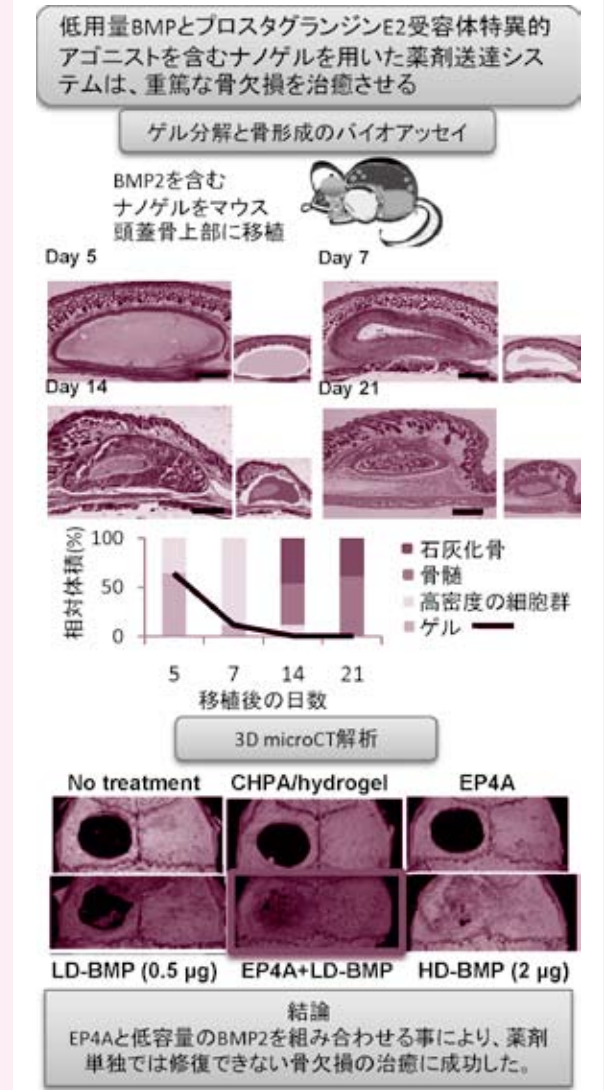
骨形成因子 (BMP) は、動物を用いたアッセイにおいて異所性骨形成能力を持つが、霊長類においては、げっ歯類に比べて、非常に高濃度の BMP が骨形成に必要である。ヒトにおける骨修復に関わる問題の一つは、組換えタンパク質は高価で、高用量の BMP-2 治療は副作用を伴うことである。したがって、非ペプチド性の化合物と組み合わせる事によって、低用量の BMP-2 の能力を増強させることは、経済的に有利であると考えられる。

プロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) は、骨同化作用のある非ペプチド性の試薬で、プロスタグランジン受容体 EP4 のアゴニスト EP4A は、BMP の活性を増強する事が知られている。しかしながら、PGE<sub>2</sub> には、全身性の重い副作用が有り、1日の3回の注射を数週間続けることが、PGE<sub>2</sub> の骨形成を刺激するのに必要とされる。しかしながら、複数回の毎日注射あるいは継続的な点滴を余儀なくさせることが問題点である。それゆえ、1回の投与で済む薬剤送達システムが必要とされている。

これまでに、本研究室において、CHPA/ハイドロゲルが BMP-2 を送達して、骨修復できる事を示して来たが、それでも高用量の BMP-2 が必要とされた。そこで、本研究においては、低用量の BMP-2 と BMP シグナル促進能をもつ EP4A を組み合わせた CHPA/ハイドロゲルを、自然治癒しない規模の骨欠損部に移植し、その骨欠損治癒における効果を検討した。

異的である。興味深い事に、Per-1 発現は、PTH シグナルによって誘導される CRE 依存的な転写に必要とされる。すなわち、骨において、Per-1 と PTH シグナルの同化作用の間で、ポジティブフィードバックループが形成されている。これらのデータは、骨芽細胞における PTH シグナルが、一部転写現象を介して、骨同化作用とともに、Per-1 遺伝子発現を in vivo で活性化させることを示す (J Cell Biochem, 2011)。

EP4A と低用量の BMP-2 の組み合わせは、効率的に、骨芽細胞を活性化し、頭蓋骨の外板、内板、骨髄を形成する事により、頭蓋骨を再生した。そして、それは、通常の頭蓋骨と同様の構造であった。EP4A は、骨芽細胞に対して、低用量 BMP-2 によって誘導された細胞分化と転写現象を促進した。これらのデータは、ナノゲルベースのハイドロゲルを介した、EP4A と低用量 BMP-2 を組み合わせた送達で、骨修復の新しいシステムを提供する事を示す。





拠点事業関係
人事異動

転入：川崎真希理（大学院生）、野末陽子（事務補佐員）、鈴木沙織（GCOE事務補佐員）、冨田久美子（GCOE事務補佐員）、楊瑛（ポスドク）
転出:羽生亮（大学院生）、長尾雅史（大学院生）、邊見弘明（MTT 特任講師）、鈴木沙織（GCOE事務補佐員）

業績目録
------

原著論文

- 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 (EP4) specific agonist in combination with low dosage of growth factor heals critical size bone defect. Arthritis Rheum (2011 in press) .
- Hanyu R, Hayata T, Nagao M, Saita Y, Hemmi H, Notomi T, Nakamoto T, Schipani E, Kronenberg 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.
- 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.
- Shimizu S, Okuda N, Kato N, Rittling SR, Okawa A, Shinomiya K, Muneta T, Denhardt DT, Noda M, Tsuji K, Asou Y. Osteopontin deficiency impairs wear debris-induced osteolysis via regulation of cytokine secretion from murine macrophages. Arthritis Rheum 62:1329-37, 2010.
- Nifuji A, Ideno H, Ohyama Y, Takanabe R, Araki R, Abe M, Noda M, Shibuya H. Nemo-like kinase (NLK) expression in osteoblastic cells and suppression of osteoblastic differentiation. Exp Cell Res 316:1127-36, 2010.
- Mizoguchi F, Izu Y, Hayata T, Hemmi H, Nakashima K, Nakamura T, Kato S, Miyasaka N, Ezura Y, Noda M. Osteoclast-specific Dicer gene deficiency suppresses osteoclastic bone resorption. J Cell Biochem 109:866-75, 2010.

和文総説

- 野田政樹、長尾雅史、羽生亮、溝口史高、納富拓也、早田匡芳、中元哲也、江面陽一「神経と骨」Clinical Calcium 20:1801-1805, 2010.

英文著書

- Noda M, Hayata T, Nakamoto T, Notomi T, and Ezura Y. 6. Mechanical Stress and Bone, Part II Tissue and Gravity. ***Mechanosensing Biology***. Editor: Masaki Noda (Springer). ISBN: 978-4-431-89756-9, 2011.

受賞

- Paksinee Kamolratanakul Plenary Poster Award. The 32<sup>nd</sup> Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR), Toronto, CANADA, Oct 15-19, 2010.
- 宮嶋大輔 Plenary Poster Award. The 32<sup>nd</sup> Annual Meeting of ASBMR, Toronto, CANADA, Oct 15-19, 2010.
- 長尾雅史 ASBMR TRAVEL GRANT 2010.
- 渡辺千穂 東京医科歯科大学「歯科医学における基礎・臨床融合型 ポーゲレス教育研究拠点の形成」国際学会参加支援。

国際学会発表

- Nagao M, Ezura Y, Saita Y, Miyai K, Hanyu R, Nakamoto T, Hemm H, Hayata T, Notomi T, Ishii S,Kato S, Fukumoto S, Kurosawa H, Kaneko K, Noda M. Schnurri2-Deficiency Increases all of 1,25 (OH) 2D3, Renal 25-hydroxyvitamin D 1-*α* Hdroxylase, PTH, FGF23, Serum Calcium and Phosphate in Association with Hypercalcificationin in Joints. The 32<sup>nd</sup> Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR), Toronto , Ontario, Canada, October 15-19, 2010. 口頭。
- Nagao M, Ezura Y, Saita Y, Nakamoto T, Hayata T, Izu Y, Hanyu R, Hemmi H, Notomi T, Rittling S, Kurosawa H, Kaneko K, Denhardt D, Noda M. Osteopontin Plays a Pivotal Role Sympathetic Control of Bone Mass. The 32<sup>nd</sup> Annual Meeting of ASBMR, Toronto, Ontario, Canada, October 15-19, 2010. 口頭。
- Ezura Y, Nagata J, Hemmi H, Nagao M, Notomi T, Hayata T, Nakamoto T, Noda M. Unloading-induced Suppression of B-lymphogenesis and Expansion of Peripheral Monocyte/macrophage Lineage Cells is Preserved in the Mice Deficient for Osteopontin. The 32<sup>nd</sup> Annual Meeting of ASBMR, Toronto , Ontario, Canada, October 15-19, 2010. 示説。
- Hanyu R, Karsenty G, Hayata T, Nakamoto T, Notomi T, Kronenberg H, Saita Y, Hemmi H, Nagao M, Ezura Y, Takeda S, Noda M. Adregergic Receptor Regulates Anabolic Action of Constitutively Active Form of PTH/PTHrP Receptor Signaling,. The 32<sup>nd</sup> ASBMR, Toronto , Ontario, Canada, October 15-19, 2010. 示説。
- Watanabe C, Morita M, Ezura Y, Nakamoto T, Hayata T, Hemmi H, Notomi T, Moriyama K, Yamamoto T, Noda M. Cnot3, a Novel Critical Regulator of a mRNA Stability, is Involved in the Maintenance of the Bone Mass and the Bone Structure in Senile Osteoprosis Model. The 32<sup>nd</sup> Annual Meeting of ASBMR, Toronto , Ontario, Canada, October 15-19, 2010. 示説。
- Kamolratanakul P, Ezura Y, Mizoguchi F, Hayata T, Hemmi H, Notomi T, Amagasa T, Noda M. PTH Anabolic Action is Influenced by the Deficiency of TRPV4 in Bone. The 32<sup>nd</sup> Annual Meeting of ASBMR, Toronto , Ontario, Canada, October 15-19, 2010. 示説。
- Sakuma T, Miyai K, Hayata T, Ezura Y, Noda M. Identification of Novel Molecule for Melanoma Malignancy- Role of CIZ. The 32<sup>nd</sup> Annual Meeting of ASBMR, Toronto , Ontario, Canada, October 15-19, 2010. 示説。
- Hayata T, Ezura Y, Asashima M, Nishinakamura R, Noda M. Dullard, a Novel BMP Inhibitor, Targets Smad1 to Suppress BMP-dependent Transcription in Mammalian Osteoblastic Cells. The 32<sup>nd</sup> Annual Meeting of ASBMR, Toronto , Ontario, Canada, October 15-19, 2010. 示説。
- Miyajima D, Kawamata A, Inoue A, Ezura Y,

- Nakamoto T, Hayata T, Notomi T, Amagasa T, Yamanashi Y, Noda M. Deficiency of Dok-1 and Dok-2, Ras-Erk Pathway Inhibitors, Enhances Bone Loss in Postmenopausal Osteoprosis Model of Mice. The 32<sup>nd</sup> Annual Meeting of ASBMR, Toronto , Ontario, Canada, October 15-19, 2010. 示説。
- Aryal A.C S, Hanyu R, Nakamoto T, Miyai K, Nagao M, Ezura Y, Hayata T, Notomi T, Hemmi H, Pawson T, Noda M. Nck1, a Molecular Adaptor Prerequisite for Cell Motility, is Stimulated by Bone Morphogenetic Protein and Contributes to Maintain Bone Mass. The 32<sup>nd</sup> Annual Meeting of ASBMR, Toronto , Ontario, Canada, October 15-19, 2010. 示説。
- Suzuki T, Notomi T, Ezura Y, Nakamoto T, Hayata T, Hemmi H, Mizuno A, Suzuki M, Mizoguchi F, Izumi Y, Noda M. TRPV4 (Transient Receptor Potential Vanilloid 4) , a Mechanosensor for Bone Is Required for the Maintenance of Bone Mineral Density of Mandible Exposed to Occlusal Force. The 32<sup>nd</sup> Annual Meeting of ASBMR, Toronto , Ontario, Canada, October 15-19, 2010. 示説。
- Nakamoto T, Motoyoshi T, Hada T, Sakuma T, Hayata T, Ezura Y, Kitazawa R, Kitazawa S, Noda M. CIZ Expression is Enhanced by Inflammatory Stimulation and Transcriptionally Regulates the RANKL Promoter. The 32<sup>nd</sup> Annual Meeting of ASBMR, Toronto, Ontario, Canada, October 15-19, 2010. 示説。
- Notomi T, Kuno M, Ezura Y, Noda M. Genetic Conversiion of Osteoclast Precursor to be Responsive to Light-controlled Cation Channel Activation Enhances Differentiation Upon Modulation of their Membrane Potential. The 32<sup>nd</sup> Annual Meeting of ASBMR, Toronto, Ontario, Canada, October 15-19, 2010. 示説。
- Kawamata A, Yokoyama H, Izu Y, Hayata T, Erwin F, Wanger, Nakashima K, Ezura Y, Noda M, Amagasa T Ovariectomy induced bone loss was prevented by the deficiency of jun*d* which determines osteoblastic activity and basal levels of bone mass The 9<sup>th</sup> Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgery, Kuala Lumpur, Malaysia, November 25-28, 2010. 示説。

国内学会発表

- 長尾雅史、齋田良知、羽生亮、辺見弘明、納富拓也、早田匡芳、中元哲也、金子和夫、黒澤尚、江面陽一、野田政樹。マウス Schcurri2欠失は腎25-hydroxyvitamin D 1- alpha hydroxylase の発現高値と高カルシウム・リン積を呈して関接周囲の異所性石灰化をもたらす 第25回日本整形外科学会 京都 10月14-15日，2010.
- 羽生亮、齋田良知、長尾雅史、辺見弘明、納富拓也、早田匡芳、中元哲也、江面陽一、竹田秀、金子和夫、黒澤尚、野田政樹。副甲状腺ホルモンによる全身性骨量増加作用は交換神経系シグナルを必要とする 第25回日本整形外科学会 京都10月14-15日，2010.
- 元吉貴之、中元哲也、江面陽一、早田匡芳、納富拓也、長尾雅史、羽生亮、佐久間朋美、野田政樹。IL-1*β*はマウス軟骨細胞においてCIZの発現を促進する。第28回日本骨代謝学会 東京 7月21日-23日，2010。
- 羽田佑、中元哲也、佐久間朋美、長尾雅史、早田匡芳、江面陽一、北澤理子、北澤莊平、野田政樹。CizによるRANKLのプロモーター制御機構の解析。第28回日本骨代謝学会 東京 7月21日-23日，2010。
- 中元哲也、羽田佑、元吉貴之、佐久間朋美、早田匡芳、江面陽一、野田政樹。転写因子CIZの欠損は、関節炎進展を抑制する。第28回日本骨代謝学会 東京 7月21日-23日，2010。

- 早田匡芳、江面陽一、野田政樹。新規BMP阻害因子Dullardは、骨芽細胞においてSmad1を標的としてBMP応答性の転写を抑制する。第28回日本骨代謝学会、東京 7月21日-23日，2010。
- 納富拓也、久野みゆき、江面陽一、野田政樹。遺伝子導入に基づく破骨細胞機能の光学的新規制御システムは陽イオンチャネル依存性膜電位変動により破骨細胞分化を促進する。第28回日本骨代謝学会、東京 7月21日-23日，2010。
- 佐久間朋美、中元 哲也、宮井 健太郎、辺見弘明、天笠 光雄、早田 匡芳、江面 陽一、野田政樹。CIZは悪性黒色腫細胞の転移に促進的に働く。第33回日本分子生物学会 神戸 12月7日-10日，2010。
- 早田匡芳、江面 陽一、西中村隆一、浅島誠、野田 政樹。新規BMP阻害因子Dullardは、骨芽細胞においてBMP受容体及びSmad1の下流でBMP応答性の転写を抑制する。第33回日本分子生物学会 神戸 12月7日-10日，2010。

国際招待講演

- Noda M: ‘Bone Formation and Extracellular Signaling’. The American Society for Cell Biology 50th Annual Meeting, Philadelphia, PA, USA, December 11, 2010.
- Noda M: ‘Molecular mechanism under lying regulation of bone metabolism’. The 70<sup>th</sup> Anniversary Celebration, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, August 11, 2010.

国内招待講演

- 野田政樹：「非荷重と骨量制御のメカニズム」社団法人 日本酪農乳業協会 第25回国際学術フォーラム 2010年12月4日。
- 野田政樹：「骨粗鬆症治療薬・最新の進化」第23回日本臨床整形外科学会学術集会。神奈川県。2010年7月18日。
- 野田政樹：「骨粗鬆症の基礎」第83回日本整形外科学会学術総会。東京。2010年5月29日。
- 野田政樹：「骨形成の分子機構」第9回日本再生医療学会総会。広島。2010年3月18日。
- 野田政樹：「骨量制御の分子機構」第13回多摩骨代謝研究会。広島。2010年2月13日

主催セミナー

- 第218回 Bone Biology Seminar 二宮義文「医学のなかで、自分の居場所を探す」平成21年12月24日。
- 第219回 Bone Biology Seminar Yukiko Maeda平成22年2月24日。
- 第220回 Bone Biology Seminar 水島昇「Physiological role of autophagy and its regulation mechanism」平成22年6月8日。
- 第221回 Bone Biology Seminar Alexander Valentinitsch 「TEXTURE ANALYSIS IN QUANTITATIVE OSTEOPOROSIS ASSESSMENT」平成22年12月2日。

競争的研究資金

- 野田政樹「骨形成メカニズムとしてのニッチの分子的解明と治療への応用基盤の先端ナノサイエンス」科学研究費補助金 基盤研究 (S)
- 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
- 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
- 野田政樹「硬組織疾患プロジェクト」特別教育研究経費によるプログラム
- 江面陽一「変形性関節症の治療を目指す開業

- 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)
- 江面陽一「関節リウマチの破壊性関節炎を生じる滑膜間質細胞の起源に関するエビジェネティクスの解析」財団法人日本リウマチ財団、調査・研究助成。
  - 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)
  - 早田匡芳「BMPシグナル阻害因子Dullardの骨形成における役割の解明」科学研究費補助金若手研究 (B)
  - 納富拓也「神経伝達物質受容体・イオンチャネルを介した力学的負荷伝達機構の解明」科学研究費補助金 若手研究（スタートアップ）



# 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

### 研究内容

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

### 研究紹介

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

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

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

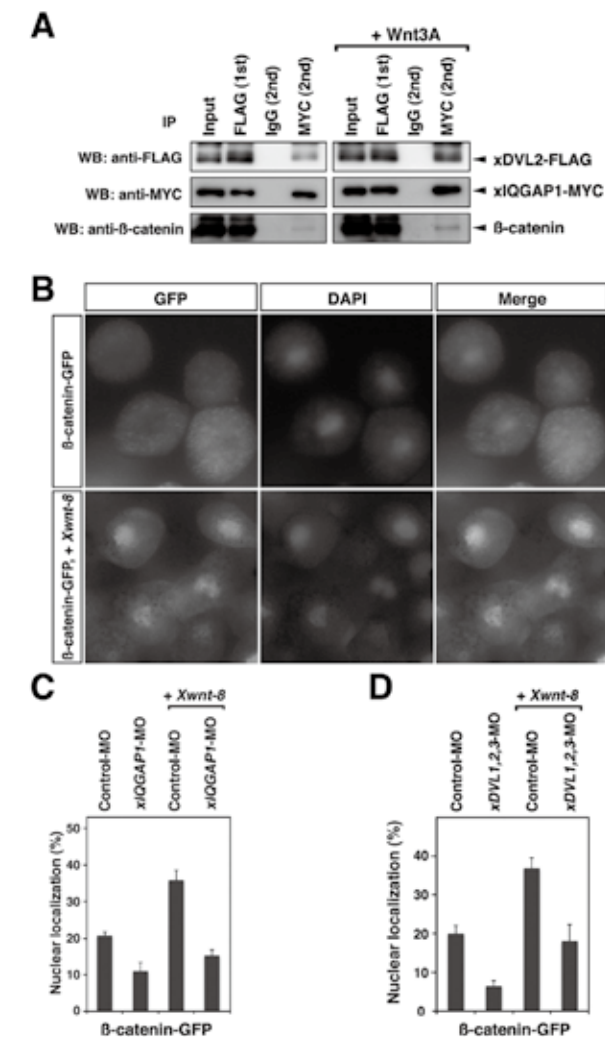
我々は Wnt シグナル伝達の解明を目的とし、DVL の結合因子の単離を試みた。HEK293 細胞に強制発現させた human DVL1 を免疫沈降し、共沈タンパク質群をマスマスペクトロメーターにより解析を行った。その結果、CK1, CK2, Strabismus, Par1, Axin, PP2C など既知の DVL 結合因子とともに、新規 DVL1 結合候補として IQGAP1 が同定された。IQGAP1 はこれまでに RAC, cdc42, Clip170, APC などと結合し、細胞運動や極性を制御すること等が報告されているが、Wnt シグナル伝達における  $\beta$ -catenin を介した転写活性化経路に関与していることも示唆されている。そこで、我々は 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た。その結果、下記のような新たな知見を得ることができた。

- 1) DVL, IQGAP には、それぞれ 3 つの異性体 (DVL1, DVL2, DVL3, IQGAP1, IQGAP2, IQGAP3) が存在し、IQGAP1 は DVL の全ての異性体、また、DVL1 は IQGAP の全ての異性体と結合した。
- 2) ドメイン解析により、DVL1 と IQGAP1 は DVL の C 末端領域 (IBD: IQGAP Binding Domain) と IQGAP1 の IQ repeat motif と Ras GAP-like domain の間の領域 (DBD: DVL Binding Domain) を介して結合することが確認された。
- 3) 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 IQGAP1、及び xDVL2 の機能消失した時に、それぞれの GFP 融合タンパク質の細胞内の局在を解析した。その結果、xIQGAP1 は Wnt 刺激による xDVL2 の膜局在には関与せず、xDVL2 の核移行に必要であった。また、xDVL2 も xIQGAP1 の核移行に必要であった。
- 4) xIQGAP1、xDVL2 のそれぞれの結合領域 (DBD, IBD) を欠失した GFP 融合タンパク質の核移行が減少したことから、xIQGAP1、xDVL2 の核移行にはそれぞれの結合領域 (DBD, IBD) が重要であることが示唆された。
- 5) xIQGAP1、xDVL2 は  $\beta$ -catenin と複合体を形成し、 $\beta$ -catenin の核移行に寄与していた。
- 6) ツメガエル胚において、canonical Wnt シグナル因

子である xDVL2、 $\beta$ -catenin、Xwnt-8 などの mRNA の腹側への過剰発現は二次軸 (背側組織)、及び Wnt 標的遺伝子 (Xnr3, Siamois, Xtwn) の発現を誘導するが、IQGAP1 の機能消失により、それらの誘導は抑制された。

- 7) ツメガエル胚における、xIQGAP1 の他の異性体 (xIQGAP2, xIQGAP3) の機能消失では Wnt 標的遺伝子の発現は抑制されなかった。一方、xDVL2 の他の異性体 (xDVL1, xDVL3) の機能消失は xDVL2 と重複効果を示し、DVL の全ての異性体の機能消失により xIQGAP1 及び  $\beta$ -catenin の核移行、及び Wnt 標的遺伝子の発現誘導は著しく減少した。
- 8) クロマチン免疫沈降法 (ChIP assay) により、xIQGAP1 は Xnr3, Siamois のプロモーター領域に結合しないことが明らかとなった。また、xIQGAP1 は細胞質中の  $\beta$ -catenin の分解には関与していなかった。

IQGAP1 and DVL2 are required for nuclear localization of  $\beta$ -catenin



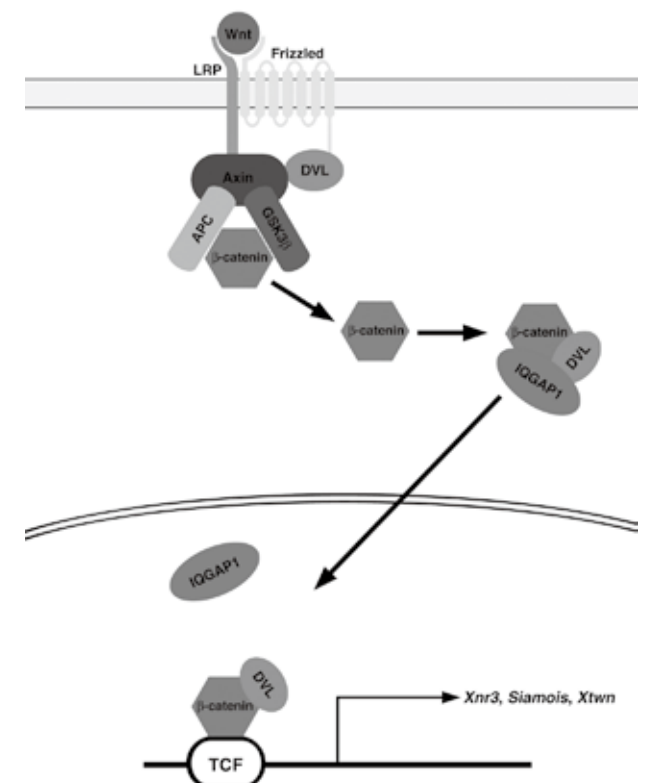
今回得られた知見は、xIQGAP1 が canonical Wnt シグナル伝達経路における DVL と  $\beta$ -catenin の核移行に寄与する新たな分子機構の存在を明らかにした。

#### 2. 偽性低アルドステロン症 II 型の原因遺伝子、WNK プロテインキナーゼ

セリン/スレオニンキナーゼ WNK (with no lysine (K)) ファミリーは、線虫・ショウジョウバエからほ乳類に至るまで保存されており、ほ乳類には 4 つの WNK ファミリー分子が存在する。その内、WNK1 及び WNK4 は偽性低アルドステロン症 II 型 (PHAII) と呼ばれる常染色体優性遺伝性的高血圧症の原因遺伝子として同定されている。現在までに当研究室において、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、身体の奇形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

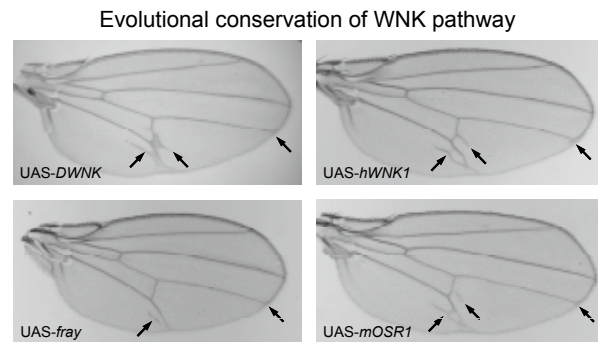
Roles of IQGAP1 on the canonical Wnt signaling



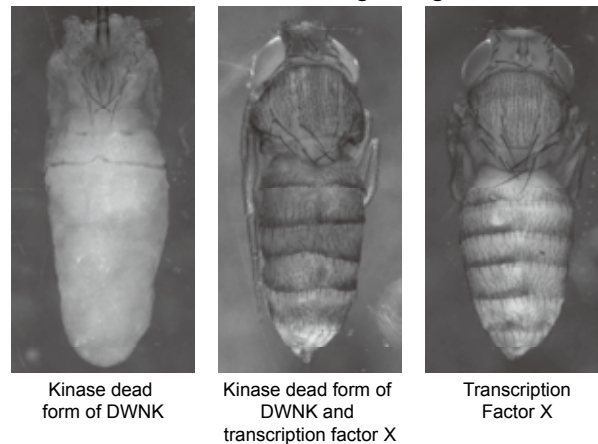
DWNKの異所発現系と共に、ヒトのWNK、及びその下流遺伝子であるマウスOSR1、さらにはOSR1のショウジョウバエ相同遺伝子Frayの異所発現系を構築した。*hh-Gal4*により翅後部に発現させたところ、wing veinと呼ばれる翅の支持組織の異所的形成という表現型が、全ての異所発現で観察されたことから、WNK → OSR1というシグナル伝達経路は、ショウジョウバエからヒトまで広く保存されている経路であることが予測された。また、OSR1/Frayはキナーゼをコードする遺伝子であり、双方が同様の表現型を示したことは、キナーゼの基質も保存されていると考えられる。当研究室による、マウスや線虫に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により、成虫の腹部形成不全という表現型が得られた。さらには、Dominant Negativeとして機能していると考えられる、キナーゼ不活性型DWNKを腹部で強制発現させると、同様に腹部形成不全という表現型を得た。この腹部形成不全という表現型は、ある転写因子Xをコードする遺伝子の突然変異体と同様の表現型であることから、転写因子XとWNKが遺伝的相互作用することが予想された。そこ



Transcription factor X may work at the downstream of WNK signaling.



で、この転写因子Xの異所発現系を構築し、キナーゼ不活性型DWNKと同時に腹部で共強制発現させると、キナーゼ不活性型DWNKによる表現型が回復した。また、*DWNK* 変異体において、転写因子Xの発現が減少していた。これらの結果から、転写因子XはWNKシグナル伝達経路の下流で機能している遺伝子であると考えられる。

また、転写因子Xは、ヒト及びマウスにおいても保存されている。マウスにおいて、転写因子Xは口腔部の形成やアセチルコリン作動性神経の発生において重要な機能を果たしていることが知られている。PHAIの患者において歯や骨の発育不全や精神発達遅延などの症状が現れることを考えると、非常に重要な因子である可能性が高い。そこで、NIH3T3細胞を用い、ほ乳類における、WNKシグナル伝達経路と転写因子Xの関係を調べた。WNKは高浸透圧刺激により活性化されることが知られている。そこで、高浸透圧刺激下での転写因子Xの発現を解析したところ、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くことが分かった。この条件下で、siRNAを用いて、PHAIの原因遺伝子である*WNK1*及び*WNK4*の双方をノックダウンすると、転写因子Xの発現の上昇が見られなかった。また、NIH3T3細胞において*WNK1*の強制発現させたところ、転写因子Xの発現は上昇していた。さらに、WNKの下流因子であるOSR1の強制発現においても、転写因子Xの発現上昇が見られた。以上のことから、転写因子XはWNKシグナル伝達経路の標的因子であることが推測される。

このように、WNKシグナル伝達経路は、線虫からショウジョウバエ、ほ乳類に至るまで広く保存されたシグナル伝達経路であることが明らかになってきた。しかしながら、その詳細な機構および発生過程における機能などはまだ未解明であり、今後も解析を続けていく。

## 業績目録

### 原著

1. Watanabe, Y., Itoh, S., Goto, T., Ohnishi, E., Inamitsu, M., Itoh, F., Satoh, K., Wiercinska, E., Yang, W., Shi, L., Tanaka, A., Nakano, N., Mommaas, A. M., Shibuya, H., ten Dijke, P. and Kato, M. (2010). TMEPAI, a transmembrane TGF- $\beta$ -inducible protein, sequesters Smad proteins from active participation in TGF- $\beta$  signaling. *Mol. Cell* 37, 123-134.
2. Ohnishi, E., Goto, T., Sato, A., Kim, M., Iemura, S., Ishitani, T., Natsume, T., Ohnishi, J. and Shibuya, H. (2010). NLK, an essential effector of anterior formation, functions downstream of p38 MAP kinase. *Mol. Cell. Biol.* 30, 675-683.
3. Nifuji, A., Ideno, H., Ohya, Y., Takanabe, R., Araki, R., Abe, M., Noda, M. and Shibuya, H. (2010). Nemo-like kinase (NLK) expression in osteoblastic cells and suppression of osteoblastic differentiation. *Exp. Cell Res.* 316, 1127-1136.
4. Maruyama, T., Kadowaki, H., Okamoto, N., Nagai, A., Naguro, I., Matsuzawa, A., Shibuya, H., Tanaka, K., Murata, S., Takeda, K., Nishitoh, H. and Ichijo, H. (2010). CHIP-dependent termination of MEKK2 regulates temporal ERK activation2 required for proper hyperosmotic response. *EMBO J.* 29, 2501-2514.
5. Ogawa, Y., Nonaka, Y., Goto, T., Ohnishi, E., Hiramatsu, T., Kii, I., Yoshida, M., Ikura, T., Onogi, H., Shibuya, H., Hosoya, T., Ito, N. and Hagiwara, M. (2010). Development of a novel selective inhibitor of the Down syndrome-related kinase Dyrk1A. *Nat. Commun.* 1, 1090.
6. Goto, T., Fukui, A., Shibuya, H., Keller, R. and Asashima, M. (2010). Xenopus furry contributes to release of microRNA gene silencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 19344-19349.
7. 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.

### 学会

1. 後藤利保、清水幹容、足立俊吾、佐藤清敏、家村俊一郎、夏目徹、澁谷浩司 IQGAP1 functions as a modulator for the nuclear localization of Dishevelled and  $\beta$ -catenin in Wnt signaling. 第33回日本分子生物学会年会第83回日本生化学会大会合同大会2010年12月7日、神戸。

### その他

#### <教育活動>

#### 学内講義

1. 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」
2. 澁谷浩司(後藤利保):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 疾患生命科学部分子神経科学研究室

## 研究内容

### 概略

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

## 研究紹介

### 1. グルタミン酸トランスポーターの脳機能における役割

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

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

我々は、GLAST欠損マウスが正常眼圧緑内障に似た症状 (正常眼圧、網膜神経節細胞の変性、乳頭陥凹の増大、視神経の萎縮) を示すことを報告した。GLAST欠損マウスにおける網膜神経節細胞の変性には酸化ストレスが関与している。今年度は、酸化ストレスに反応して細胞死を誘導する mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase kinase の1つである apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) の機能に注目し、同遺伝子の抑制による GLAST 欠損マウスにおける緑内障症状

の緩和が可能か検討した。GLAST+/-ASK1-/- および GLAST-/-ASK1-/- マウスにおいては、それぞれ GLAST+/- および GLAST-/- マウスと比較して、網膜神経節細胞と視神経の変性過程が遅延し、視神経の機能を示す多局所網膜電位の二次核も6か月間に渡って保たれていることがわかった。ただし GLAST+/-ASK1-/- および GLAST-/-ASK1-/- マウスは正常眼圧を示し、GLAST+/- および GLAST-/- マウスと比較しても malondialdehyde 濃度の減少やグルタチオン産生量の増加を認めなかった。しかし ASK1-/- 由来の培養 Müller グリア細胞を TNF 刺激すると野生型由来と比べて p38 MAPK の活性が抑制され、iNOS の産生量が大幅に減少することがわかった。また ASK1-/- 由来の培養網膜神経節細胞に対する TNF 毒性実験では、野生型由来と比べて有意な細胞死の減少を認めた。以上から神経およびグリアの両細胞における ASK1 活性の制御が、緑内障をはじめとする神経変性疾患の進行抑制に有用な可能性が示された (Cell Death Differ 17:1751-1759, 2010)

また、グリア型グルタミン酸トランスポーター GLT1 の不溶性成分がアルツハイマー病の認知障害の程度に応じて、増加することを見つけ、グルタミン酸の興奮毒性がアルツハイマー病の発症に関与することを明らかにした (J Neuropath Exp Neur 69: 667-676, 2010)。

### 2. 髄芽腫における MYCN の役割

髄芽腫は、小児悪性脳腫瘍の中では最も頻度の高い腫瘍である。一部の髄芽腫では、ソニックヘジホック (SHH) が関与していることが知られているが、大部分の髄芽腫の発症に関与するシグナルは不明である。我々は、髄芽腫に共通するシグナルを検索するため、髄芽腫の網羅的な遺伝子発現解析を行った。その結果、多くの髄芽腫で MYC 遺伝子の発現亢進が観察された。髄芽腫の病態における MYC の役割を解析するため、アストロサイト特異的に MYC を過剰発現させたマウスを作製した。MYC 過剰発現マウスには、SHH の発現が亢進していない髄芽腫が観察された。MYC の過剰発現は、髄芽腫の発生を促進するだけでなく、その転移にも関与することがわかった。さらに、MYC の発現をドキシサイクリンにより抑制すると、髄芽腫が縮小し、生存率が向上

した、これらの結果は、MYC 遺伝子が髄芽腫の発生・転移・維持に重要な役割を果たすことを示している (Genes Dev 24:1059-1072, 2010)。

### 3. 発達早期における記憶・学習行動の神経基盤の解析

幼少期は、刺激に対して神経が可塑的に変化して神経回路の再構築がおこりやすいという特徴を持っており、特に臨界期とよばれる時期には記憶・学習が容易である。この時の神経回路再構築の様式やメカニズムを明らかにすることは、学習障害児の学習支援や認知症でみられる記憶障害の改善などに役立つと考えられる。幼少期の神経可塑性については、視覚あるいは体性感覚を一部遮断した動物モデルを用いて調べられている。しかし幼少期の記憶・学習を支える可塑性が、このように人為的に誘導された感覚系における可塑性と同様のメカニズムでおきているかは不明である。そこでわれわれは、幼少期におこる記憶・学習行動の優れた動物モデルである Chick のインプリンティング (刷り込み) 学習を用いて神経系における可塑性についての研究を進めている。視覚刺激による刷り込み学習では、哺乳類の visual cortex と機能的な類似性をもつ visual Wulst (VW) での視覚情報処理が必要であり、学習に伴ってこの VW と、さらに大脳皮質連合野と類似性のある Intermediate medial mesopallium (IMM) において神経応答の可塑的变化が認められることが明らかになっている。そこで、刷り込み学習成立のためには VW と IMM 間の神経連絡が必要であり、その回路に可塑的な変化が起きているのではないかと予想した。神経細胞にとりこまれて神経細胞体や突起を可視化できるトレーサーを微量注入して調べた結果、VW と IMM はいくつかのシナプスを介して連絡していることが明らかとなった。さらに脳スライスを用いて神経活動を光学的に検出したところ、刷り込み学習の成立個体では VW から IMM への神経伝達強化されており、これには NMDA 受容体が関与していたので、刷り込み学習の成立にはこの回路の強化が重要であることが示唆された。

### ハイライト

「ASK1 の欠損は GLAST 欠損マウスの正常眼圧緑内障様症状を改善する」

グルタミン酸トランスポーター GLAST 欠損マウスは正常眼圧緑内障と同じ症状を示す。酸化ストレスに反応して細胞死を誘導する mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase kinase の1つである apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) の抑制により、GLAST 欠損マウスにおける緑内障症状の進行を遅延させることを見いだした。

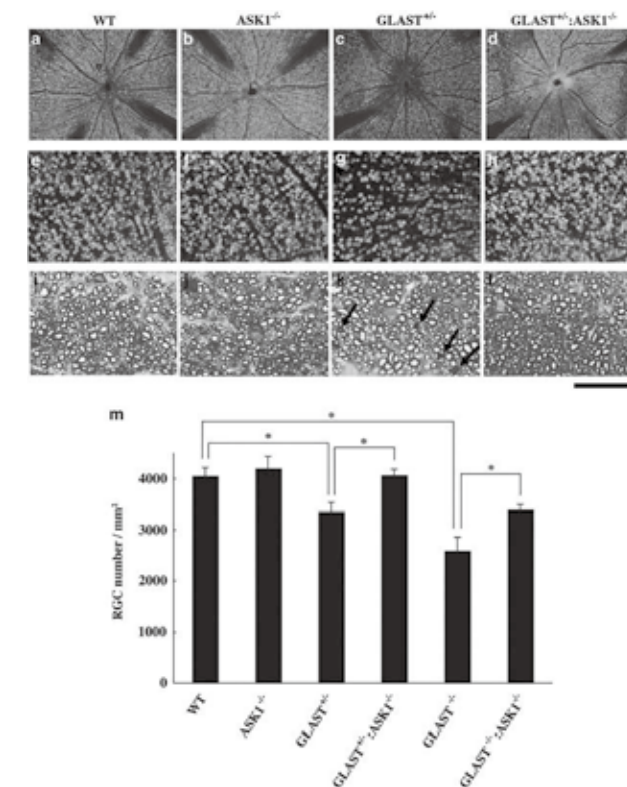


図1 GLAST欠損マウスにおける網膜神経節細胞および視神経の変性における ASK1 欠損の影響 (a-h) GLAST 欠損マウスの網膜神経節細胞死における ASK1 欠損の影響 (i-l) GLAST 欠損マウスの視神経変性における ASK1 欠損の影響 (m) GLAST and/or ASK1 欠損マウスにおける網膜神経節細胞の定量

## 人事異動

転入：相馬美歩（特任助教）、平岡優一、杉山勇人（博士課程）、柳沢佐保子、崔万鵬（修士課程）、川辺光雄（技術補佐員）、楠木亜希子（秘書、産休から復帰）

転出：小峯起（商社へ転出）

## 業績目録

### 発表論文

1. Harada, C., Namekata, K., Guo, X., Yoshida, H., Mitamura, Y., Matsumoto, Y., Tanaka, K., Ichijo, H., Harada, T. ASK1 deficiency attenuates neural cell death in a GLAST deficient mice, a model of normal tension glaucoma. *Cell Death Differ* 17. 1751-1759, 2010

2. Paukert, M., Huang, Y.H., Tanaka, K., Rothstein, J.D., Bergles, D.E. Zones of enhanced glutamate release from climbing fibers in the mammalian cerebellum. *J Neurosci* 30. 7290-7299, 2010.

3. Woltjer, RL., Duerson K., Fullmer, JM., Mookherjee, P., Ryan, AM., Montine, TJ., Kaye, JA., Quinn, JF., Silbert, L., Erten-Lyons, D., Leverenz, JB., Bird, TD., Pow, DV., Tanaka, K., Watson, S., Cook, DG. Aberrant detergent-insoluble EAAT2 accumulates in Alzheimer’ s disease. *J Neuropath Exp Neur* 69. 667-676, 2010.

4. Swartling, F.J., Grimmer, M., Hackett, C.S., Northcott, P.A., Fan, Q-W., Goldenberg, D.D., Lau, J., Masic, S., Nguyen, K., Yakovenko, S., Zhe, X-N., Glimer, H.C.F., Collins, R., Nagaoka, M., Phillips, J.J., Jenkins, R.B., Tihan, T., Vandenberg, S.R., James, C.D., Tanaka, K., Taylor, M.D., Weiss, W.A., Chesler, L. Pleiotropic Role for MYCN in medulloblastoma. *Genes Dev* 24. 1059-1072, 2010.

5. Nakamori, T., Sato, K., Atoji, Y., Kanamatsu, T., Tanaka, K., Ohki-Hamazaki, H. Demonstration of a neural circuit critical for the imprinting behavior in chicks. *J Neurosci* 30. 4467-4480, 2010.

### 研究費

1. 田中光一：正常眼圧緑内障の病態解明と治療薬の開発．厚生労働科学研究補助金， 代表

2. 田中光一：抑制性神経前駆細胞の実体解明と神経分化における Notch シグナルの役割 文部省科学研究費補助金, 特定領域研究 代表

3. 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

4. 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

5. 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

6. 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

7. 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

8. 相田知海：緑内障の病態解明と予防的遺伝子診断法の開発 難治疾患研究所「難治疾患の研究」を重点課題とする研究助成 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

## 研究内容

### 概 略

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、樹状細胞や粘膜免疫系組織を研究対象として、免疫寛容の誘導とその破綻の分子基盤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、免疫疾患の予防・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

ウイルスや細菌などの病原体は、呼吸器や消化器などの粘膜を介して感染する。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る。また、粘膜面では特に感染のない生理的状态でも、恒常的に大量のIgAが産生されている。このIgAは、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。最近の研究により、恒常的なIgAの産生では、樹状細胞が重要な役割を担うと考えられているが、その詳細な仕組みは不明であった(Immunol Rev 234, 247-258 (2010))。私たちの研究グループは、本年度、この恒常的な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、樹状細胞が重要な役割を担っていると考えられている。腸管粘膜においては、B細胞がパイエル板や腸間膜リンパ節などといった腸管粘膜リンパ組織で分化した後、最終的に腸管粘膜固有層に移行してIgAを産生する形質細胞に分化する。また、樹状細胞は腸管粘膜リンパ組織に局在しており、従来型樹状細胞(cDC)と形質細胞様樹状細胞(pDC)に分類される(図1A)。私たちは、cDCとpDCが恒常的なIgAの産生にどのような役割をしているのかを調べる目的で、マウス腸管粘膜リンパ組織からcDCやpDCを採取してB細胞と培養した。その結果、cDCに比べてpDCが、強

くIgAの産生を誘導することが判明した(図1B)。また、このIgA産生に必要なAPRILやBAFFがpDCで多く発現していることが明らかになった(図1C)。さらに、pDCのIgA産生誘導能力は、このAPRILやBAFFによるものであることも証明した。

それでは、全身で見られる通常のpDCは、APRILやBAFFが多く発現している「粘膜型」のpDCに、どのようにして変化するのだろうか？私たちは、APRILやBAFFの発現を誘導することが報告されているI型インターフェロンに着目した。そこでI型インターフェロンの受容体を欠損するマウスの腸管粘膜リンパ組織からpDCを採取して、正常マウスの腸管粘膜リンパ組織から採取したpDCと比較した。その結果、I型インターフェロン受容体欠損マウスの腸管粘膜リンパ組織から採取したpDCでは、APRILやBAFFの発現が著しく減少していること、また、IgAの産生を誘導する能力が著しく低下しており、さらにこの培養系にAPRILあるいはBAFFを補充することにより、IgAの産生が回復することも判明した。これらの結果は、正常なマウスの腸管粘膜リンパ組織においてI型インターフェロンが産生され、I型インターフェロンはpDCにAPRILやBAFFの産生を促して、pDCを「粘膜型」に変化させていることを示していた。

さらに、正常なマウスの腸管粘膜リンパ組織において、実際にI型インターフェロンを生産している細胞の同定を試みた結果、リンパ組織を取り囲む支持組織のストローマ細胞において、I型インターフェロンが恒常的に発現していることが明らかとなった。さらに興味深いことに、腸内常在菌の存在しない無菌マウスの腸管粘膜リンパ組織から採取したストローマ細胞では、I型インターフェロンの発現が認められなかった。これらの結果から、腸管粘膜リンパ組織において、ストローマ細胞からのI型インターフェロンの産生には腸内常在菌からの恒常的な刺激が必要不可欠であることが示された。さらに、ストローマ細胞から産生されるI型インターフェロンがpDCを刺激して、同細胞にAPRILやBAFFの発現が誘導され、その刺激でB細胞が分化した結果、IgAが恒常的に産生されていることが考えられた(図2)。

今回、腸粘膜でIgAが恒常的に産生されるメカニズ

ムが明らかになり、pDCがIgAの産生を促すAPRILやBAFFの産生細胞として、重要な役割を担うことが示された。一方、I型インターフェロンや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、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。本成果は、腸免疫系における、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ことが期待される。

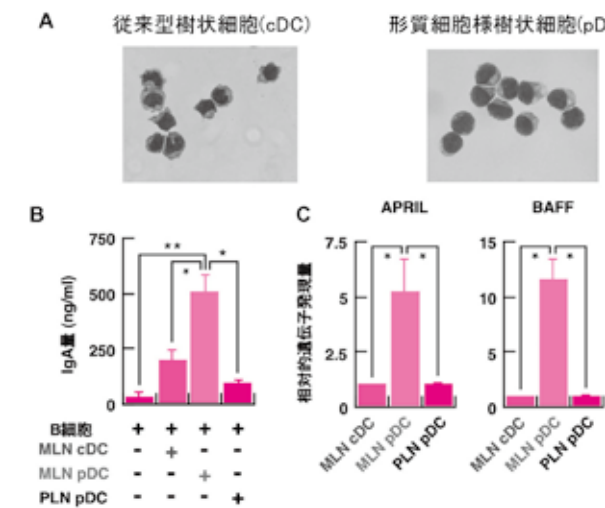


図1 IgA産生誘導におけるpDCの優れた能力 (MLN: 腸間膜リンパ節 PLN: 末梢リンパ節)  
A 樹状細胞 (DC) の形態 (顕微鏡写真)  
B 各種DCとB細胞を培養した後のIgA産生量: 腸間膜リンパ節のpDC (MLN pDC) はIgAの産生誘導量が大いことが分かる。  
C 各種DCにおけるAPRILやBAFFのmRNA発現量: MLN pDCではAPRILやBAFFが多く発現していることが分かる。

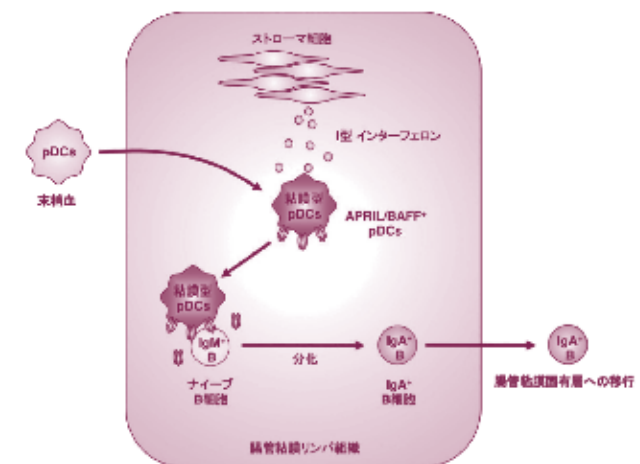


図2 I型インターフェロンによる「粘膜型」pDCの誘導機構  
腸管粘膜では腸内常在菌による刺激を受け、腸管粘膜のストローマ細胞からI型インターフェロンが産生される。末梢から腸管粘膜リンパ組織に移行した通常のpDCは、I型インターフェロンの刺激によってAPRILやBAFFが発現した「粘膜型」のpDCになる。この「粘膜型」pDCは、APRILやBAFFを介して、B細胞をIgM<sup>+</sup>B細胞からIgA<sup>+</sup>B細胞に分化させる。このIgA<sup>+</sup>B細胞は、さらに腸管粘膜固有層に移行してIgAを産生する形質細胞 (IgA<sup>+</sup>PC) に分化する。

## 2. 樹状細胞の研究

### 1) 新しい樹状細胞前駆細胞の同定

免疫系の司令塔として重要な役割を担う樹状細胞は、古典的樹状細胞(cDC)と形質細胞様樹状細胞(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。私たちの研究グループは、強力なpDC分化能を持つ新しいDC前駆細胞の同定に成功し、現在解析を進めている。

### 2) 樹状細胞による新規免疫寛容誘導機構

非感染個体において免疫寛容を保つために、胸腺における自己反応性T細胞の除去、末梢における調節性T細胞による免疫抑制、さらには貪食細胞によるアポトーシス細胞の捕食などが重要であることが知られている。一方、感染をはじめとする免疫反応起動時における免疫寛容の重要性は軽視されがちである。私たちの研究グループは、免疫反応誘導時こそ過剰な免疫反応を抑制し個体の生存を保障する必要があるという観点から研究を進め、樹状細胞による新しい免疫寛容誘導機構を同定し、現在解析を進めている。

## 3. 造血幹細胞の研究

造血幹細胞(HSC)はおもに骨髄中に分布しており、マウスでは骨髄細胞10万個あたりわずか1~3個程度しか存在しない稀少な細胞である。この前駆細胞が白血球、赤血球、血小板に分化することで、あらゆる種類の造血細胞が生まれ造血が維持される。私たちの研究グループは、一過性のI型インターフェロンの刺激が造血幹細胞の増殖を、持続的なI型インターフェロンの刺激が造血幹細胞の減少を誘導することを報告した(Nat Med 15, 696-700 (2009))。この興味深いI型インターフェロンの作用に基づき、現在以下の研究を推進している。

### 1) 新規骨髄移植前治療法の確立と疾患治療への応用

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、I型インターフェロンの作用を活かして、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、ムコ多糖症をはじめとする先天性代謝異常疾患の治療を行う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の増殖を促すことが可能かどうか検証を行っている。

## 2) ウィルス感染によるHSC活性化機構の解明

最も良く知られているI型インターフェロンの機能は抗ウィルス作用である。現在、ウィルス感染の際、I型インターフェロンがHSCに作用して、同細胞の増殖・活性化を誘導することを見出している。また、I型インターフェロンだけでなく、II型I型インターフェロンもこの現象に関わることを示唆する知見を得ている。現在、インターフェロンが如何にHSCを活性化するか、その意義は何かに関して詳細に検討している。

## 業績目録

## 原著

- Tezuka H, Abe Y, Asano J, Sato T, Liu J, Iwata M, and Ohteki T. Prominent role for plasmacytoid dendritic cells in mucosal T cell-independent IgA induction. *Immunity* 34, 247-257 (2011)
- Kanazawa Y, Saito Y, Supriatna Y, Tezuka H, Kotani T, Murata Y, Okazawa H, Ohnishi H, Kinouchi Y, Nojima, Y, Ohteki T, Shimosegawa T, and Matozaki T. Role of SIRPa in regulation of mucosal immunity in the intestine. *Genes Cells* 15 : 1189-1200 (2010)
- Guo Y-M, Ishii K, Hirokawa M, Tagawa H, Ohyagi H, Michishita Y, Ubukawa K, Yamashita J, Ohteki T, Onai N, Kawakami K, Xiao W, and Sawada K. CpG-ODN 2006 and human parvovirus B19 genome consensus sequences selectively inhibit growth and development of erythroid progenitor 15<sup>th</sup> Congress of EHA Barcelona, Spain 2010. 6.11

樹状細胞の樹状細胞

樹状細胞の樹状細胞

## 総説・解説

- Tezuka H,and Ohteki T. A gas governing mucosal immunity. *Vaccine* 28, 8039-8040(2010)
- Tezuka H,and Ohteki T. Regulation of intestinal homeostasis by dendritic cells. *Immunol Rev* 234, 247-258 (2010)
- 小内伸幸 樹状細胞の分化系列とその分化制御機構. 炎症と免疫 9月号, Vol.18, No.5, 3-9, (2010)
- 手塚裕之、阿部由紀子、梶木俊聡 粘膜系樹状細胞（誘導組織）(株) シナジー 臨床 粘膜免疫学 266-274 (2010)
- 梶木俊聡、手塚裕之 「TNF/iNOS産生DCとIgA分泌」 医学のあゆみ 234 (5), 453-457 (2010)
- 梶木俊聡、佐藤 卓 「インターフェロンによる造血幹細胞の運命決定制御」 実験医学 28 (12), 152-156 (2010)

樹状細胞の樹状細胞

## 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. 2011.3.1-6
- Ohteki T, and Sato T. Regulatory role of interferon in HSC homeostasis. 69<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Osaka, Japan. 2010.9.23

樹状細胞の樹状細胞

## 国際学会発表

- Onai N, Ohyagi H, Kurabayashi K, Hosoi M, Hirokawa M, Sawada K, and Ohteki T Inflammatory monocyte-derived dendritic cells engulf phosphatidylserine<sup>+</sup> erythrocytes in a CpG-induced murine hemophagocytic syndrome model. 11<sup>th</sup> International Symposium on Dendritic Cells in Fundamental and Clinical Immunology, DC2010: Forum on Vaccine Science Lugano, Switzerland, 2010.9.28
- Ohyagi H, Onai N, Guo Y-M, Takahashi N, Hirokawa M, Sawada K, and Ohteki T. Establishment of a murine hemophagocytic syn-

drome model by administration of CpG and Nod1 ligand. ISEH (society for hematology and stem cells) Melbourne Convention & Exhibition Centre, Australia, 2010.9.16

- Ohteki T. Reguratory Role of Interferons in HSC Homeostasis 第1回日本血液学会（JSH）国際シンポジウム（The 1<sup>st</sup> JSH International Symposium 2010 秋田大学（秋田市）2010.7.16
- Guo Y-M, Ishii K, Hirokawa M, Tagawa H, Ohyagi H, Michishita Y, Ubukawa K, Ohteki T, Onai N, Kawakami K, Xiao W, and Sawada K. CpG-ODN 2006 and human parvovirus B19 genome consensus sequences selectively inhibit growth and development of erythroid progenitor 15<sup>th</sup> Congress of EHA Barcelona, Spain 2010. 6.11

樹状細胞の樹状細胞

## 国内学会・研究会招待講演

- 手塚 裕之 腸内細菌と粘膜免疫系の相互作用に関する新知見 第51回千葉造血幹細胞移植研究会バーディーホテル千葉 2010.4.17
- 梶木俊聡 眠れる造血幹細胞を目覚めさせるインターフェロン. LO皮膚科学研究会 神奈川2010.2.27
- 佐藤 卓 I型インターフェロンシグナルによる造血幹細胞の機能制御. 第19回東京免疫フォーラム 2010.2.24
- 梶木俊聡 腸内細菌と粘膜免疫系. 第23回東京医科歯科大学大学院歯学総合研究科大学院セミナー 東京 2010.2.22
- 梶木俊聡 樹状細胞によるIgA産生調節機構. 第28回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 福井 2010.2.18

## 国内学会発表

- Oyagi H, Onai N, Guo Y-M, Takahashi N, Hirokawa M, Sawada K, and Ohteki T. CpGとNod1リガンド投与によるマウス血球貪食症候群モデルの樹立（Establishment of a murine hemophagocytic syndrome model by administration of CpG and Nod1 ligand）第72回日本血液学会学術集会パシフィコ横浜（横浜市）2010.9.24
- Onai N, Ohyagi H, Hirokawa M, Sawada K, Ohteki T Combined Challenge of TLR9- and Nod1-ligands induces hemophagocytic syndrome in the mice. 14<sup>th</sup> International Congress Of Immunology, August 24<sup>th</sup> Kobe, 2010.8.24
- Guo Y-M, Ishii K, Hirokawa M, Tagawa H, Ohyagi H, Michishita Y, Ubukawa K, Ohteki T, Onai N, Kawakami K, Xiao W, and Sawada K. CpG-ODN 2006 and human parvovirus B19 genome consensus sequences selectively inhibit growth and development of erythroid progenitor The 1<sup>st</sup> JSH International Symposium 2010, 秋田大学（秋田市）2010.7.17
- 浅野純平、小内伸幸、佐藤卓、梶木俊聡 Nucleotide oligomerization binding domain-like receptor signaling enhances dendritic cell-mediated cross-priming *in vivo* 第20回日本樹状細胞研究会朱鷺メッセ（新潟市）2010.6.18

樹状細胞の樹状細胞

## 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」、国立感染症研究所協力研究員、群馬大学大学院医学系研究科非常勤講師、秋田大学大学院医学系研究科非常勤講師、広島大学医歯薬学総合研究科非常勤講師、筑波大学大学院人間総合科学研究科非常勤講師

## 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」
- 手塚裕之（代表）文部科学省科学研究費補助金 若手研究（B）「形質細胞様樹状細胞によるIgA産生誘導機構の解明とIgA腎症治療への応用」
- 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」
- 梶木俊聡（代表）武田科学振興財団 生命科学研究助成「粘膜におけるTGF-β環境構築メカニズム」
- 梶木俊聡（代表）内藤記念科学振興財団 医学系研究助成「INF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」
- 小内伸幸（代表）武田科学振興財団 医学系研究奨励「マウス及びヒト樹状細胞サブセットの分化機構の解明」
- 小内伸幸（代表）住友財団 基礎科学研究助成「マウス及びヒト樹状細胞サブセットの分化・ホメオスタシス維持機構の解明」
- 小内伸幸（代表）上原記念生命科学財団 医学系研究助成「樹状細胞分化・細胞運命制御機構の解明」
- 小内伸幸（代表）ノバルティス科学振興財団 医学系研究奨励（基礎）「ヒト樹状細胞サブセットの分化・ホメオスタシス機構の解明」
- 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）花王芸術・科学財団 医学系研究助成「表皮幹細胞の機能維持におけるインターフェロンシグナル制御機構の解析」
- 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療法の確立」
- 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療法の確立」
- 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

### 研究内容

#### 概 略

循環器系イオンチャネル・トランスポーター機能を、電気生理学的・細胞生物学的・光学的・遺伝学的・計算科学的解析を用いた学際的アプローチにより研究している。得られた情報をもとに、循環器系難治疾患・コモン疾患（特に不整脈・突然死）の病態解明と新たな治療戦略の確立を目指している。

### 研究紹介

#### 1. 循環器病性差医療の基礎研究（黒川、萩原 [プロジェクトセメスター学生]）

疾患罹患率・薬物に対する反応には男女間で差異があり、これを考慮した医療“性差医療 gender-specific medicine (GSM)”の重要性が指摘されている。循環器病は特に性差が顕著な疾患である。性差のメカニズムとして性ホルモンの寄与が示唆されており、当研究室では、一連の研究から性ホルモン非ゲノム作用が不整脈の性差の一因となることを明らかにしてきた。性ホルモン以外に性差をもたらす機序としてXY染色体の違いがある。当研究室では本年度から循環器病性差研究の次ステップとして、XY染色体の違いを基盤とする循環器病性差の研究に着手した。性染色体の影響が出ない新生児マウスの冠動脈をink-jet法を用いて可視化し、♂・♀間の違いを検討し、第1分枝以降の冠動脈で構造・機能に性差が存在することが示唆された（図1）。

（東京大学大学院医学系研究科栗原裕基博士、西山功一博士との共同研究）

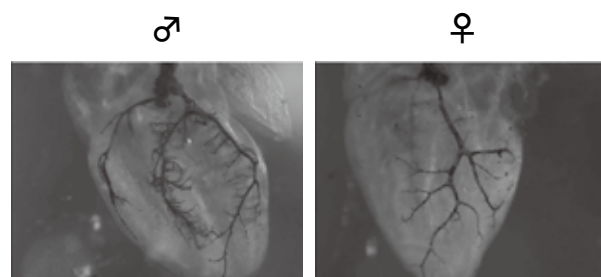


図1 雌雄胎児マウスの冠動脈可視化  
性ホルモンの影響が出る前の胎児期マウスの冠動脈可視化で、明らかな雌雄差が観察された。

#### 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、患者QOLの低下の原因となる。高齢者で罹患頻度が飛躍的に高く、団塊の世代が10年後には心房細動リスク年齢に達することから、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。本研究室では、下記のテーマから心房細動の予防・治療法の確立を目指している。

(1) 心房細動関連遺伝子多型の研究（江花、田島、平野、岸原 [プロジェクトセメスター学生]、古川）

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～）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。第1期プロジェクトでは23万タグSNPsのタイピングを行い、心房細動とBonferroni補正後遺伝統計学的に有意に関連する9 SNPsとボーダーラインの10 SNPsを同定している。本年度は、第2期プロジェクトとして、61万タグSNPsのタイピングを行い、有意に関連する9 SNPsとボーダーラインの82 SNPsが抽出された。

第1期・第2期で遺伝統計学的に有意であったSNPsはいずれも同じ染色体座のハプロブロックに存在するものであった（ラボネームAF#1）。第1期・第2期でボーダーラインのSNPsに関して、東京医科歯科大学大学院ならびに関連病院、東京都健康長寿医療センターの協力でサンプル数を増やしタイピングを行ったところ、1 SNPに関してはBonferroni補正後遺伝統計学的に有意水準に達し（ラボネームAF#2）、他に3つのSNPsに関してはサンプルを加えることにより有意水準が上昇したことから候補SNPsである可能性が示唆された（ラボネームAF#3, #4, #5）。AF#1とAF#2は既に欧米の研究で心房細動との関連が示唆されており、人種を超えて心房細動発症に関わる遺伝的リスクと考えられた。AF#3-#5は欧米での報告はなく、比較的日本人に特異的な遺伝的リスクである可能性が示唆された。

AF#1とAF#2を使ってオッズ比を計算すると、リ

スクアリルが0のケースと4つのケースでは5倍以上の違いがあった。心房細動の治療としてカテーテルによる肺静脈隔離術（PVI）が広く普及している。その成功率は施設により違いがあるが、70～80%と言われている。AF#1を使ってPVI後の心房細動再発を検討すると、保護アリルとリスクアリルを比べると再発率に約20%の違いがあった。以上から、人種を超えて心房細動発症に関係する遺伝的リスクAF#1とAF#2を使うことにより、心房細動発症のリスク層別化と治療効果の予測がある程度可能であることが判明した。

（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、本学循環器内科磯部光章教授との共同研究）

(2) 心房細動病態発現に関わる炎症・免疫機転（笹野、大石、古川）

心房細動の病態発現には、複数の環境因子（高血圧、喫煙、肥満、心不全etc.）と遺伝因子が相互作用し、誘導される軽度の慢性炎症状態が関与し、心房細動患者の心房筋には、Tリンパ球・マクロファージ・肥満細胞などの炎症性細胞が浸潤することが知られている。本研究室では、前年度までに主にin vitro実験系で心房筋の伸展によるギャップ結合チャネルを介して放出されたATPのオートクライン/パラクライン機序を介してマクロファージ動員が誘導されることを明らかにしている。本年度は、同シグナルのin vivoでの関与を検討した。

In vivoで心房進展による心房細動誘発モデルとして、横行大動脈縮窄（trans-aortic constriction [TAC]）モデルが頻用されている。そこで、マウスにTACを行うと心房へのマクロファージの遊走、線維化、心房リモデリング、電気刺激による心房細動誘発が起こることが確認された。そこで、ギャップ結合チャネル阻害薬を前投与したマウスでTACを行うと、マクロファージの遊走、

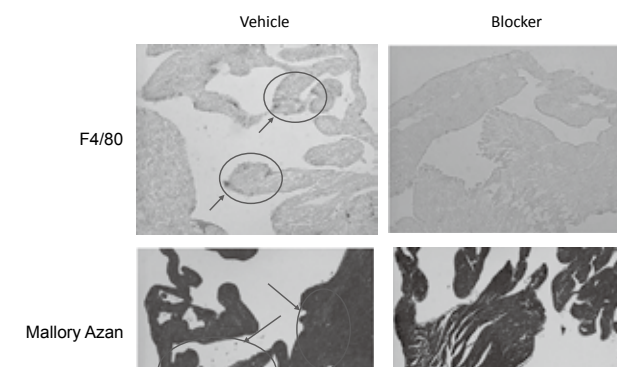


図2 ギャップ結合チャネルブロッカーによるTAC誘発性マクロファージ遊走と線維化の抑制

線維化、心房リモデリング、電気的心房細動誘発がいずれも有意に抑制された（図2）。以上から、心房筋伸展によるATPが関与するオートクライン/パラクライン機序がマクロファージ遊走とこれに続く炎症惹起に関与し、心房細動発現基質の形成に関与することが示唆された。

#### 3. 心室細動・突然死の病態発現の研究

突然死 sudden deathのほとんどが心室頻拍・心室細動によるものであるが、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3つの遺伝子組み換えマウスを用いて心室頻拍・心室細動の予防・治療法の確立を目指している。

(1) NOS1AP (NOS1 adaptor protein) KOマウスの解析（笹野、松原、土屋 [プロジェクトセメスター学生]、古川）

NOS1APは、欧米で行われたGWAS研究で意外にも種々の心筋イオンチャネルを抑えてQT間隔・心臓突然死ともっとも関連の深い遺伝子として同定された。昨年はNOS1AP KOマウスを用いて基礎的な電気生理特性の検討を行い、野生型マウスに比べてNOS1AP KOマウスでQT間隔が長いことを確認した。本年度は、種々のストレス負荷による不整脈・突然死誘発の有無を検討した。

Kチャンネルブロッカー投与、イソプロテレノールによる交感神経刺激、虚血-再還流、心筋梗塞では不整脈誘発率・死亡率にKOマウスと野生型マウスで差を認めなかった。一方、横行大動脈縮窄（trans-aortic constriction [TAC]）での圧負荷およびCa<sup>2+</sup>チャンネルブロッカー投与により、死亡率と不整脈発現がKOマウスで有意に増加した。TACによりKOマウス・野生型間での心機能の違いが著名になるが、死亡は心不全死ではなく突然死であることから、心機能低下による催不整脈性が上昇するものと考えられた。

（国立国際医療センター加藤規弘博士との共同研究）

(2) 刺激伝導系特異的転写因子KOマウスの解析（笹野、小泉、古川）

プルキニエ線維は心室細動の発生に密接に関係することが知られているが、これを検討するための動物モデルが存在しない。今回、末梢刺激伝導系に特異的に発現する転写因子のKOマウスを作製したところ、夜間活動時・運動負荷（水泳）・薬理的交感神経刺激により致死的不整脈が発現した（図3）。同マウスは刺激伝導系の伝導異常の心室細動発生への関与を検討する動物モデルと考えられ、プルキニエ線維の異常は運動・交感神経刺激



による不整脈発生に関与することが示唆された。  
(浜松医科大学医学部生化学講座三浦直行教授との共同研究)

### Telemetry ECG

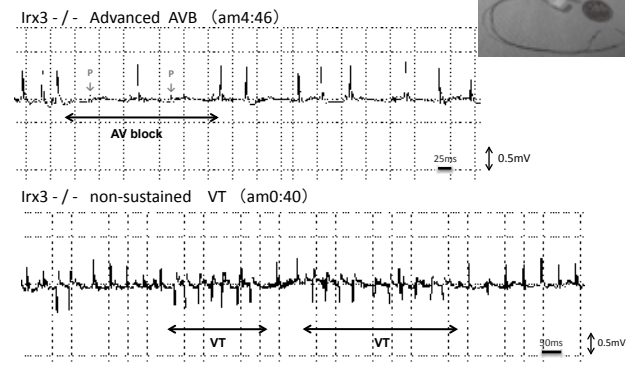


図3 心臓伝導系特異的転写因子 KO マウスの不整脈  
心臓伝導系特異的転写因子 KO マウスのテレメトリー心電図で、高度房室ブロック (上段) と非持続性 VT (下段) が記録された

### (3) 脳型 Na<sup>+</sup> チャネル KO マウスの解析 (笹野、古川)

Drave 症候群は家族性てんかん症候群であり、SUDEP (sudden unexpected death with epilepsy) を来すことが問題とされている。その原因遺伝子である脳型 Na<sup>+</sup> チャネルの KO マウスを作成すると、特に高温時致死性不整脈を発生し突然死を起こすことが観察された。自律神経の異常によるのか、心臓固有の異常によるのかを明らかにするため、自律神経の影響を排除したランゲンドルフ還流下に還流液温度を上昇させると致死性不整脈が発生することが観察された。脳型 Na<sup>+</sup> チャネルは心臓の末梢刺激伝導液にも発現しており、不整脈発生に関わることが示唆された。  
(筑波大学医学部神経内科講座堀米ゆみ博士との共同研究)

### 4. iPS 細胞を用いた不整脈研究 (図4) (黒川、大方、李、古川)

従来の不整脈研究は、ヒト以外の生物種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に異所性に発現させてシステム、のいずれか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-収縮連関細胞内カルシウム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 limitation 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 limitation のない不整脈研究が可能となることが期待される。本研究室では下記の2つのアプローチを行っている：

#### (1) iPS 由来病態心筋細胞の樹立

LQT 患者の皮膚生検標本から iPS 細胞を樹立し、これを心筋への分化誘導し機能解析を行った。現時点で、

LQT タイプ1から1ライン, LQT タイプ2, 3からそれぞれ2ラインの樹立に成功している。LQT3 患者から iPS 由来心筋様細胞では、ヒトに見られる LQT3 の表現型が iPS 由来心筋様細胞でも維持されていることが確認された。

(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)

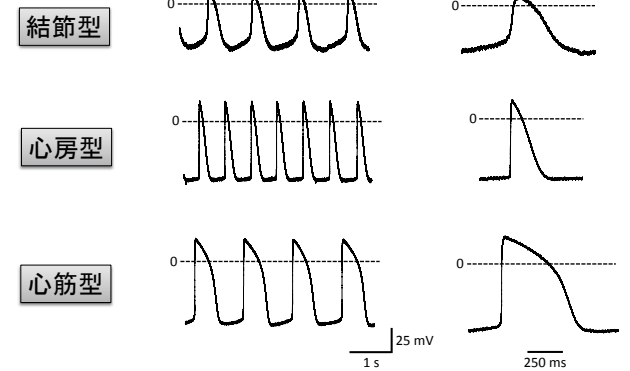


図4 iPS 由来心筋細胞の活動電位記録  
iPS 由来心筋細胞で、結節型 (上段)、心房型 (中段)、心室型 (下段) の活動電位が記録された

#### (2) ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた薬物スクリーニング系

新薬の開発には長年の精力的研究が必要であり、①リード化合物の発見と構造展開→②前臨床試験で(i)薬物動態試験→(ii)薬効・薬理試験→(iii)安全性試験(毒性試験)→③臨床試験で有効性・安全性の確認、のステップが必要である。しかし、長期間の前臨床試験をパスして臨床試験に到達した化合物の約2割が心毒性の判明のために開発中止を余儀なくされる。これは、前臨床試験の段階で、ヒト細胞を用いたアッセイ系がないことが深く関与する。ヒト iPS 細胞由来心筋様細胞を用いて、心毒性のスクリーニング系の確立を行っている。

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

### 人事異動

転入：大方信一郎 (大学院医歯学総合研究科)、小泉章子 (大学院医歯学総合研究科)  
転出：黒羽美加 (慶應義塾大学薬学部大学院)、林万紀子 (技術補佐員)

### 業績目録

#### 原著論文

#### 発表論文

1. Yamashiro K, Sasano T, Tojo K, Namekata I, Kurokawa J, Sawada N, Suganami T, Kamei Y, Tanaka H, Tajima N, Utsunomiya K, Ogawa Y, Furukawa T. (2010). Role of transient receptor potential vanilloid 2 in LPS-induced cytokine production in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 398, 284-289.
2. Yang PC, Kurokawa J, Furukawa T, Clancy CE. (2010). Acute effects of sex steroid hormones on susceptibility to cardiac arrhythmias: a simulation study. *PLoS Comput. Biol.* 6, e1000658.
3. Uejima T, Koike A, Sawada H, Aizawa T, Ohtsuki S, Tanaka M, Furukawa T, Frase AG. (2010). A new echocardiographic method for identifying vortex flow in the left ventricle: Numerical validation. *Ultrasound Med. Biol.*
4. Furukawa T. (2010). Transmural dispersion of repolarization and drug-induced Torsade de Pointes - A 3-D simulation study. *Circ. J.* 75, 49-50.

#### 学会

1. Sugiyama H, Nakamura K, Kurokawa J, Furukawa T, Morita H, Kusano KF, Ohe T, Ito H (2010) KCNH2 current activating factor in serum of patients with heart failure. 第14回心不全学会学術集会, 東京, *Journal of Cardiac Failure*, 16, S160-1.
2. Kurokawa J, Asada K, Kurobane E, Furukawa T (2010). Regulation of cardiac IKs channels by a non-genomic pathway of sex hormones. 第87回日本生理学会大会, 盛岡, *Journal of Physiological Sciences*, 60, S6.
3. Kurobane E, Kurokawa J, Suzuki T & Furukawa T, (2010). A role of PDE2 in a localized regulation of cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> currents by progesterone. 83回日本薬理学会年会, 大阪, *J Pharmacol Sci*, 112, 75P.
4. Kurokawa J, Asada K, Furukawa T (2010). Regulation of the I<sub>Ks</sub> channel by S-nitrosylation at carboxyl-terminus of KCNQ1. 54<sup>th</sup> Biophysical Society Annual Meeting, San Francisco, *Biophys J*, 98, 357B. (Feb 20-24, 2010)
5. 黒川洵子, 遠山周吾, 村田光繁, 古川哲史, 福田恵一 (2010.11.4-5) ヒト iPS 由来心筋の電気生理学的性質. 口頭発表, 平成22年度生理学研究学会, 岡崎
6. 遠山周吾, 村田光繁, 黒川洵子, Lopez-Redondo Fernando, 服部文幸, 水澤美香, 山川裕之, 橋本寿之, 江頭徹, 関朋久, 扇野泰行, 八戸宏二郎, 湯浅慎介, 福田恵一 (2010.10.8-9). ヒト iPS 由来心筋細胞の電気生理学的特性について. 27回日本心電学会, 大分.
7. 黒川洵子 (2010.3.20) 心筋イオンチャネルの制御機構とその破綻による病態の解析. 口頭発表, 平成22年度特定領域研究班若手の会, 大阪.
8. 黒川洵子 (2010.3.30) 心筋 I<sub>Ks</sub> チャネル分子複合体を介した心臓再分極のβアドレナリン性制御. 第130回日本薬学会, シンポジウム発表, 岡山.
9. 黒川洵子, 中村浩章, Colleen E Clancy, 古川

- 哲史 (2010.6.5) 性ホルモンのQT延長に及ぼす作用機構と不整脈シミュレーション. 第112回日本薬理学会関東部会, 静岡.
10. 笹野哲郎, 大石咲子, 田村典子, 磯部光章, 古川哲史 Autocrine/Paracrine Mechanisms for Macrophage Migration Evoked by Mechanical Stretch of Atrial Myocytes. 第74回日本循環器学会 京都 平成22年3月
  11. 松原清二, 笹野哲郎, 江花有亮, 古川哲史, 磯部光章 NOS1AP Regulates Ventricular Repolarization and Arrhythmogenicity via NO Production. 第74回日本循環器学会 京都 平成22年3月
  12. 松原清二, 笹野哲郎, 江花有亮, 古川哲史, 磯部光章 NOS1AP ノックアウトマウスにおけるQT間隔及び不整脈性の検討. 第25回日本不整脈学会学術集会 名古屋 平成22年6月
  13. 笹野哲郎, 大石咲子, 古川哲史 Autocrine/Paracrine Mechanisms for Macrophage Migration Evoked by Mechanical Stretch of Atrial Myocytes. 13th Tokyo-Taipei-Seoul Arrhythmia Conference, 福岡 平成22年10月
  14. 笹野哲郎, 大石咲子, 田村典子, 磯部光章, 古川哲史 心筋伸展における細胞外ATPのオートクライン作用を介した炎症メカニズム 第27回日本心電学会学術集会 大分 平成22年10月
  15. 松原清二, 笹野哲郎, 江花有亮, 古川哲史, 磯部光章 Risk and mechanism for sudden cardiac death in NOS1AP knockout mice. 第14回日本心不全学会 東京 平成22年10月
  16. Furukawa T, Nakamura H, Kurokawa J, Sasano T, Isobe M. Non-genomic regulation of cardiac ion current by sex hormones. XX World Congress JSHR 京都 平成22年5月16日
  17. 古川哲史. イオンチャネル・不整脈と心臓発生・分化. 第9回心臓血管発生研究会特別シンポジウム, 千葉 平成22年7月10日
  18. 古川哲史. イオンチャネル・受容体の細胞なく上での局在と機能. 第25回犬山不整脈カンファレンス, 名古屋 平成22年8月21日
  19. 古川哲史. ラウンドテーブルディスカッション「心電現象と性差-不整脈診療に性差の視点を活かす-」心電現象の性差: 分子レベルでどこまで分かっているのか? 第27回日本心電学会学術集会, 大分, 平成22年10月8日.
  20. 古川哲史. 臨床医のための心臓生理・心臓薬理学. 第27回日本心電学会学術集会, 大分, 平成22年10月9日.
  21. 古川哲史. iPS細胞由来心筋細胞の薬物安全性評価への応用. 心電学フロンティア2010 (第45回理論心電図研究会), 大分, 平成22年10月8日.

#### 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、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)  
東京大学医学部 (不整脈の基礎)  
心電学会医学部生ための心電図読解サマーセミナー  
黒川洵子：慶應義塾大学薬学部講義  
古川哲史・黒川洵子・江花有亮・笹野哲郎：東京医科歯科大学医学部フリーセメスター 学生指導

#### 競争的研究費

1. 笹野哲郎 (代表)：文部科学省科学研究費補助金 基盤研究 (C)「心房細動リスク因子 (メタボリック症候群・心房拡大) における心房炎症機構の解明」
2. 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」
3. 江花有亮 (代表)：文部科学省科学研究費補助金 若手研究 (B)「全ゲノム解析による心房細動感受性遺伝子の同定と機能解析」
  4. 古川哲史 (代表)：文部科学省リーディングプロジェクト「個人の遺伝情報に応じた医療の実現プロジェクト (第2期)：メタボリック症候群関連疾患 (心房細動)」
  5. 古川哲史 (代表)：車両財団研究助成事業
  6. 古川哲史 (分担)：日本循環器学会トランスレショナルリサーチ振興事業「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」
  7. 黒川洵子 (代表)：ソルト・サイエンス研究財団「心臓の酸化ストレスにおけるカリウムイオンの役割」
  8. 黒川洵子 (代表)：第30回薬学研究奨励財団研究助成金、「性差医療に基づいた *in silico* 心臓毒性評価系の確立」
  9. 黒川洵子 (代表)：持田記念研究助成金、「薬物誘発性不整脈に対する男女別毒性評価系の確立について」



# 難治疾患研究所 先端分子医学研究部門 幹細胞制御分野

## 研究内容

### 概要

個体発生において、各組織・器官を構成する多細胞集団を生み出すもとなるそれぞれの組織・器官特異的な幹細胞が重要な役割を担っている。それら幹細胞の発生、多分化能の維持、おのおのの細胞系譜への分化、の各過程には、細胞増殖分化因子群や細胞表面分子群等を介した細胞外来性シグナルと、エピジェネティック修飾や転写因子存在プロファイルなどに基づく細胞内在性プログラムが深く関わっている。幹細胞制御分野ではこのように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に焦点をあてて、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た研究を実施している。また、癌幹細胞の特性解明にも取り組んでおり、総合的に得られた知見が、神経幹細胞・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、医療応用への糸口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の分子基盤解明に関する研究

神経幹細胞が未分化性を維持したまま増殖を繰り返す自己複製の仕組みを明らかにすることは、中枢神経系の構築・維持機構の解明と、その機構の異常に起因する疾患を理解する上で重要である。当分野ではこれまでに、FGF2、Wnt、Notch のシグナルが相互作用し、前2者のシグナルは、GSK3beta の不活化を経た beta-catenin の核内蓄積量により、cyclin D1 発現誘導を経て、神経幹細胞・前駆細胞に対して増殖促進性に働き、その一方で、beta-catenin は後者の Notch シグナルの増強によるニューロン分化抑制性に働くことで、自己複製に寄与することを明らかにしてきた。この、cyclin D1 に関する展開研究を実施し、cyclin D1 強制発現神経幹細胞・前駆細胞に *in vitro* でアストロサイト誘導性サイトカインである LIF と BMP2 を添加しても GFAP 陽性アストロサイトの出現率が約半分に減少することを見出した。つまり、神経幹細胞・前駆細胞の増殖シグナル経路を構成するコンポーネントがアストログリアの分化抑制に働く

ことで自己複製に寄与することを示唆した。

### 2. 神経幹細胞からのニューロンとアストログリアの分化の優位性の変遷の分子機構に関する研究

発生途上の中枢神経系における重要な現象として、胎生中期まではニューロン分化優位の状況であり、その後グリア分化優位の状況に変化するという、分化系譜の優位性の変遷が観察されている (図1)。ニューロンもグリアも共通の前駆細胞である神経幹細胞から分化することから、本研究では、神経幹細胞制御シグナルの解析からこの現象の解明を試みた。これまでの当分野における研究で、FGF2 と EGF は神経幹細胞に対し、同様の神経幹細胞増殖効果を示すのに対し、神経幹細胞を EGF で培養したのちに EGF を除いて促される自発的分化においてはアストログリアの出現が顕著に見られる一方で、FGF2 で培養したのちに FGF2 除去で自発的分化を促してもアストログリアの出現は顕著でない、という重要な差異を見出していた。その後の研究により、この差異は、FGF2 シグナルの下流で作用する細胞内抑制性蛋白質 Sprouty ファミリーが関与していることを明らかにし、神経幹細胞の分化系譜の優位性変遷の分子機構の一端を提示した。

### 3. 中枢神経系各領域におけるアストログリア細胞の機能的可塑性に関する研究

中枢神経系の主要なグリア細胞であるアストロサイトは神経活動を支える多様な役割を担っている。ニューロ

ンへの栄養補給、シナプス伝達の制御、血液脳関門の形成などに加え、最近ではシナプス形成誘導活性も報告された。当分野では「個々のアストロサイトが多機能なのではなく、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」と作業仮説を立て、高次な脳神経機能構築の理解に挑戦している。ニューロンについては、BMP や Shh などに起因する領域化により、グルタミン酸作動性、GABA 作動性など異なるニューロンが産生されることがよく知られている。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。今年度実施した交配実験と脳切片の組織化学的解析により、大脳皮質領域に由来するアストロサイトを高効率で識別することが可能になったことを確認した。

### 4. 精神運動発達障害におけるエピジェネティック制御の関与に関する研究

神経幹細胞分化におけるエピジェネティック修飾の重要性は当分野をはじめ報告があるが、神経運動発達障害の原因解明と治療法開発に関連した考察は少なく、必要性の高い重要研究事項の一つである。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。この遺伝子産物は、ヒストン H3 の9番目のリジンの脱メチル化酵素である。稲

Developmental stage-dependent differentiation of astrocytes

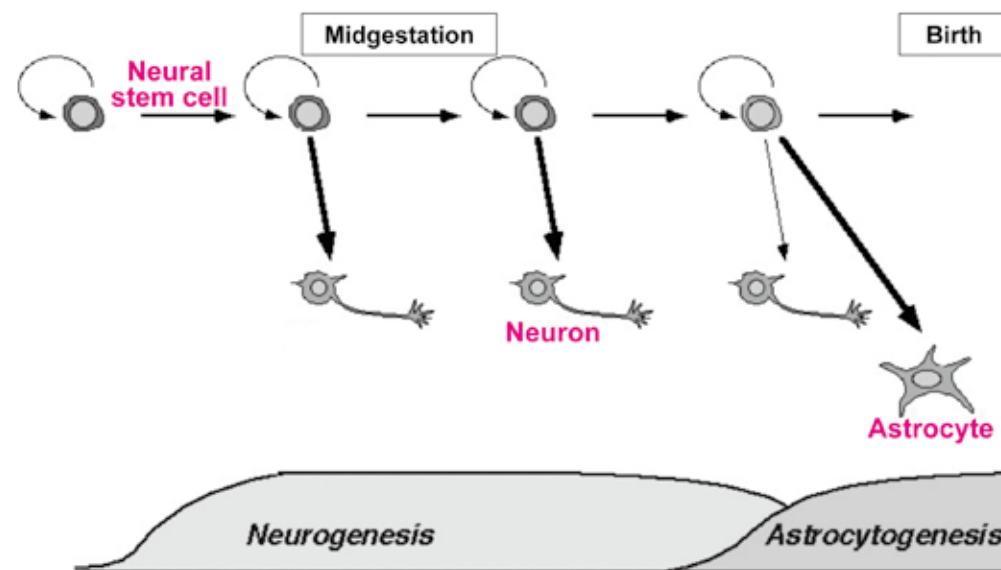


図1

Transition of the site of hematopoiesis during development

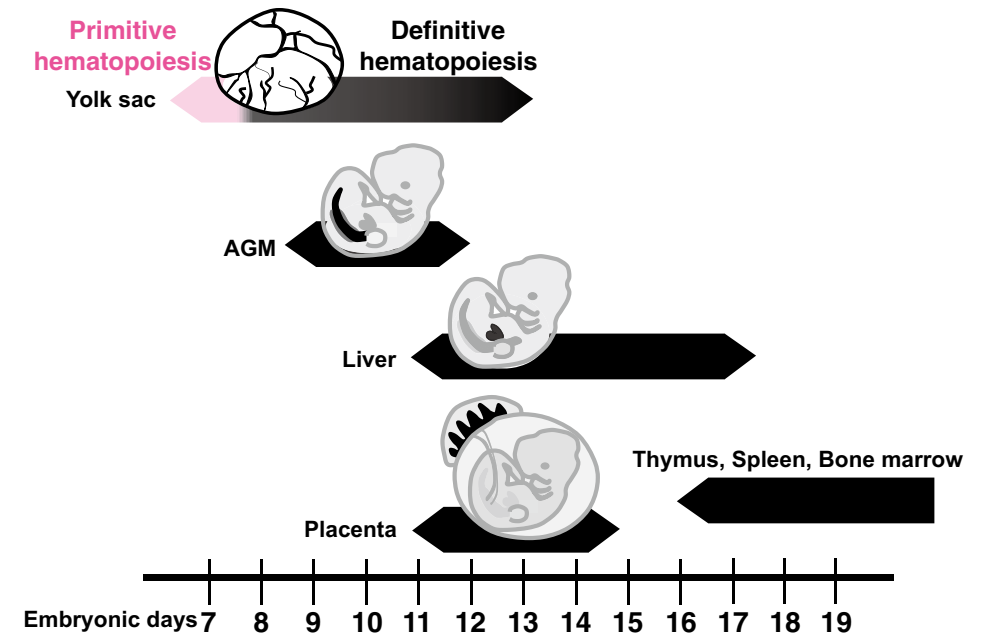


図2

澤教授から供与された同遺伝子への外来遺伝子挿入変異マウスを解析したところ、ホモ接合体において gascl 遺伝子発現の減弱を来していることがわかった。外来遺伝子に含まれる beta-geo 遺伝子発現解析の結果、この遺伝子は、胎生 14 日齢の胎仔脳の解析で分裂後ニューロンにおける発現を認めた。生後 20 日齢では、大脳皮質や線条体などニューロンが多く存在する部位で発現が高かった。gascl 遺伝子低発現変異マウスは、脳の構造上の目立った異常を呈さなかったものの、多動傾向を示した。今後詳細な行動異常解析や組織学的解析、あるいは gascl 遺伝子変異に伴って生じる遺伝子・細胞レベルの解析が必要であるが、これらの成果は、精神運動発達障害の原因解明と治療法開発にあたって、重要な示唆を与えるものである。

### 5. 胎生期造血組織における造血幹細胞の産生機構に関する研究

造血の場は、個体発生の進行に伴い変化することが知られており、卵黄嚢、大動脈-生殖原基-中腎 (AGM) 領域、肝臓、胎盤と、その存在が変遷する (図 2)。この現象は、時期ならびに場所に特異的な、幹細胞特性の変化と幹細胞ニッチの変化を反映しているものと考察されることから、胎生期造血組織は、幹細胞特性と幹細胞ニッチの双方に取り組むにあたり適した材料といえる。当分野ではこれまでに、マウス AGM 領域を材料として

CD45 および c-Kit の発現強度に基づいて分画・解析した研究から、CD45 low/ c-Kit positive 細胞集団に各種血液細胞に分化する能力があることを明らかにした。その後、卵黄嚢を対象とした展開研究により、CD45 low/ c-Kit high の細胞集団が、他の細胞集団に比べて、in vitro の造血活性が最も高いことを見出した。

### 6. 癌幹細胞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がん幹細胞は正常組織幹細胞と同様、自己複製能と多分化能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 (図 3)。当分野の研究グループでは、グリオーマ細胞株 C6 において、主細胞集団 (MP) とは異なり DNA 結合色素に低染色性を示す細胞集団 (SP) が癌幹細胞分画であることを報告した。癌幹細胞の自己複製を制御する特別な微小環境 (ニッチ) の概念に焦点を当てた最近の研究展開により、C6 グリオーマにおいては、SP 細胞集団を形成する癌幹細胞が自ら一部分化して非 SP 細胞 (MP 構成細胞) となり、これが癌幹細胞を支持する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を示唆するデータを得た。これは、癌幹細胞ニッチを標的とした治療法の開発的研究への手掛かりになるものと考えられる。

### Tumor formation and cancer stem cells

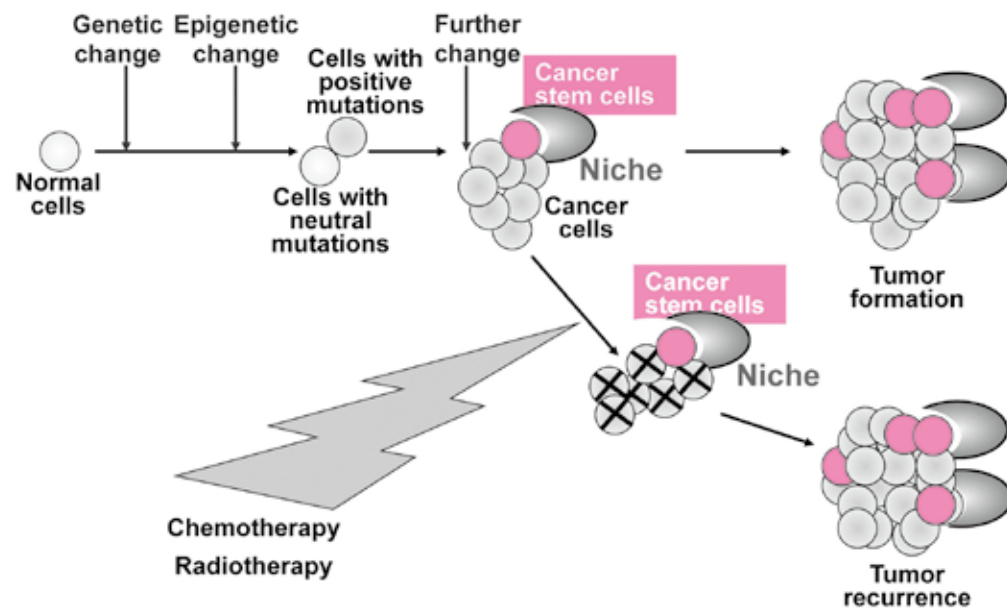


図 3

### 研究業績

#### 原著論文

- Inoue T, Kagawa T, Inoue-Mochita M, Isono K, Ohtsu N, Nobuhisa I, Fukushima M, Tanihara H, and Taga T: Involvement of the HIPK family in regulation of eyeball size, lens formation and retinal morphogenesis. FEBS Lett. 584:3233-3238, 2010.
- Yoshinaga Y, Kagawa T, Shimizu T, Inoue T, Takada S, Kuratsu J, and Taga T: Wnt3a promotes hippocampal neurogenesis by shortening cell cycle duration of neural progenitor cells. Cell. Mol. Neurobiol. 30:1049-1058, 2010.
- Ramadan A, Nobuhisa I, Yamasaki S, Nakagata N, and Taga T: Cells with hematopoietic activity in the mouse placenta reside in side population. Genes Cells 15:983-994, 2010.
- Tabu K, Kimura T, Sasai K, Wang L, Bizen N, Nishihara H, Taga T, and Tanaka S: Analysis of an alternative human CD133 promoter reveals the implication of Ras/ERK pathway in tumor stem-like hallmarks. Mol. Cancer 9:39, pp1-15, 2010.

#### 著書

- 田賀哲也、赤司浩一. 癌幹細胞の発生と stemness 維持 (編集企画). 実験医学 28, 505-555, 2010.
- 田賀哲也、赤司浩一. 癌幹細胞を俯瞰する. 実験医学 28, 506-510, 2010.
- 榎康一、鹿川哲史、田賀哲也. 癌幹細胞の自己複製へのアプローチ. 実験医学 28, 517-524, 2010.
- 鹿川哲史、田賀哲也. Wnt・FGF・Notch シグナル相互作用による神経幹細胞自己複製の制御機構. 医学のあゆみ 233-10,1031-1036,2010.

#### 学術集会発表

- 田賀哲也 長崎大学大学院医歯学総合研究科セミナー 神経幹細胞と神経再生～幹細胞の運命決定機構から見た医療応用の考察～ 長崎大学医学部講義 長崎市 2010 年 1 月 29 日
- 田賀哲也 長崎大学神経解剖学セミナー ニューロンとグリアの分化制御 長崎大学セミナー 長崎市 2010 年 1 月 29 日
- 田賀哲也 神経幹細胞の自己複製機構の考察による癌細胞制御へのアプローチ 発生工学・疾患モデル研究会 第 80 回定例会「神経幹細胞研究と癌幹細胞制御に向けたアプローチ」東京都 2010 年 3 月 9 日
- 備前典久、井上利洋、鹿川哲史、田賀哲也 神経幹細胞前駆細胞における細胞周期調節因子 Cyclin D1 のアストロサイト分化抑制機構 第 5 回神経発生討論会 愛知県岡崎市 2010 年 3 月 19-20 日
- Tetsuya Taga. On the organ development and regeneration. Fayoum University, Fayoum, Egypt. March 22, 2011.
- 鹿川哲史、田賀哲也 中枢神経系グリア重集団細胞系譜の発生起源解析、第 115 回日本解剖学会総会・全国学術集会 シンポジウム「神経回路形成研究の cutting edge」岩手県盛岡市 2010 年 3 月 29 日
- Tetsuya Taga. Academia Sinica-Kumamoto University Joint Symposium. Taipei, Taiwan, April 7-10, 2010
- Kouichi Tabu, Yasuhiro Kokubu, Norihisa Bizen, Ikuo Nobuhisa, Tetsushi Kagawa, Tetsuya Taga. C6 glioma main population maintains side population. 第 8 回幹細胞シンポジウム 兵庫県淡路市 2010 年 5 月 13-15 日 (ポスター発表)

- Ahmed Ramadan, Ikuo Nobuhisa, Shoutarou, Yamasaki, Tetsuya Taga. Cells that have hematopoietic activity in the placenta of mouse embryo reside in the side population. 第 8 回幹細胞シンポジウム 兵庫県淡路市 2010 年 5 月 13-15 日 (ポスター発表)
- Norihisa Bizen, Toshihiro Inoue, Takeshi Shimizu, Tetsushi Kagawa, Tetsuya Taga. Molecular mechanism underlying cyclin D1 mediated inhibition of astrocyte differentiation from neural stem/progenitor cells. 第 8 回幹細胞シンポジウム 兵庫県淡路市 2010 年 5 月 13-15 日 (ポスター発表)
- 榎康一、備前典久、清水健史、鹿川哲史、田賀哲也○ 幹細胞の自己複製戦略の考察による癌細胞制御へのアプローチ「幹細胞研究の癌治療戦略への応用」シンポジウム 第 19 回癌病態治療研究会 東京都 2010 年 6 月 30 日
- 田賀哲也 幹細胞の運命づけ: 鴨長明の考察、角倉了以の展開「幹細胞研究の魅力」シンポジウム 吹田市 2010 年 7 月 31 日
- Ahmed Ramadan, Ikuo Nobuhisa, Shoutarou Yamasaki, Naoki Nakagata, and Tetsuya Taga. Cells with hematopoietic activity in the mouse placenta reside in side population. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology 2010. Kobe, August 22-27, 2010
- Ikuo Nobuhisa, Yoko Kishikawa, Shoutarou Yamasaki, Gomaa Ahmed, and Tetsuya Taga. Role of Sox-17 in hamatopoietic progenitors from the aorta-gonad-mesonephros region maintains immature phenotype. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology 2010. Kobe, August 22-27, 2010
- 榎康一 C6 グリオーマの腫瘍形成における非癌幹細胞集団の関与 平成 22 年度「がん」若手ワークショップ 長野県茅野市 2010 年 9 月 14 日
- Tetsushi Kagawa, Takeshi Shimizu, Kimi Araki, Naoki Takeda, Naomi Nakagata, Ikuo Nobuhisa, Tetsuya Taga. Analysis of glial cell sub-lineages in the developing central nervous system using GFAP/Cre-reporter mouse system. 中枢神経系グリア重集団細胞系譜の GFAP/Cre レポーターマウスを用いた解析 Neuro2010・第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経化学学会大会・第 20 回日本神経回路学会大会合同大会 神戸市 2010 年 9 月 14 日
- 備前典久、井上俊洋、清水健史、鹿川哲史、田賀哲也 Molecular mechanism underlying cyclin D1 mediated inhibition of astrocyte differentiation from neural stem/progenitor cells. 神経幹細胞/前駆細胞における細胞周期調節因子 cyclin D1 のアストロサイト分化制御機構 Neuro2010・第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経化学学会大会・第 20 回日本神経回路学会大会合同大会 神戸市 2010 年 9 月 14 日
- 田賀哲也 神経幹細胞の自己複製と分化制御の分子基盤 神戸大学大学院医学研究科大学院特別講義 神戸市 2010 年 9 月 16 日
- Kouichi Tabu and Tetsuya Taga. Main population helps side population in C6 glioma cell line. C6 グリオーマ細胞株において MP は SP の維持に関与する 第 69 回日本癌学会学術総会 大阪市 2010 年 9 月 21-24 日
- 田賀哲也 神経幹細胞の分化制御から見た中枢神経系の発生と再構築の分子基盤 東京医科歯科大学医歯学総合研究科ポダレス教育「発生・再構築学コース」 2010 年 9 月 30 日
- Tetsuya Taga. Signaling Mechanisms Regulating Cell-Fate. Fayoum University Lecture Series on Stem Cells, Organogenesis and Regeneration. Fayoum, Egypt. October 27-29, 2010.
- Tetsuya Taga. Epigenetic Regulation of Cell-Fate. Fayoum University Lecture Series on Stem Cells, Organogenesis and Regeneration.

- Fayoum, Egypt. October 27-29, 2010.
- Tetsuya Taga. Neural Stem Cell Fate Determination. International Symposium on Stem Cells, Organogenesis, and Regeneration in Fayoum. Fayoum, Egypt. October 27-29, 2010.
- Tetsuya Taga. Molecular Basis of Neural Stem Cell Self-Renewal. International Symposium on Stem Cells, Organogenesis, and Regeneration in Fayoum. Fayoum, Egypt. October 27-29, 2010.
- 田賀哲也 癌幹細胞の生存戦略解明への挑戦 未来創薬研究所講演会 横浜市 2010 年 11 月 5 日
- Norihisa Bizen, Takeshi Shimizu, Toshihiro Inoue, Tetsushi Kagawa, and Tetsuya Taga ○. Cross-talk between growth and differentiation pathways in cell fate determination in the developing brain. The 16th International Conference of the International Society of Differentiation. Nara. November 15-18, 2011.
- Tetsuya Taga. Cross-interactions among cell-external cues and cell-intrinsic programs controlling brain development. Symposium on Epigenetic regulation in development and differentiation. The 33rd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Kobe, December 7, 2010
- Ikuo Nobuhisa, Yoko Kishikawa, Uemura Mami, Maha Anani, Gomaa Ahmed, Masami Kanai-Azuma, Yoshiaki Kanai, and Tetsuya Tag. Role of Sox-17 in hamatopoietic progenitors from the aorta-gonad-mesonephros region maintains immature phenotype. The 33rd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Kobe, December 9, 2010 (poster)
- Norihisa Bizen, Toshihiro Inoue, Takeshi Shimizu, Tetsushi Kagawa, Tetsuya Taga. Cyclin D1 inhibits astrocyte differentiation from neural stem/progenitor cells in a manner independent cell cycle progression. The 33rd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Kobe, December 9, 2010 (poster)
- Yasuhiro Kokubu, Yuhei Yamaguchi, Satoko Hattori, Keizo Takao, Joji Inazawa, Tsuyoshi Miyakawa, Tetsushi Kagawa, Tetsuya Taga. Gene expression and functional analyses of histone demethylase Gascl in brain. The 33rd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Kobe, December 10, 2010 (poster)



# 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

- PQBP1 遺伝子変異による学習障害の分子機序を明らかにした（神経病理学）
- 神経変性の非自律的機構を担う新規分子 Maxer を発見した（神経病理学）
- 新規オートファジー機構の活性化を応用した抗癌剤候補化合物を発見した（病態細胞生物学）
- Omi/HtrA2 の異常によって発症するパーキンソン病の病理機構を解析した（病態細胞生物学）
- p38 の心筋細胞と神経細胞分化の運命決定機構を明らかにした（発生再生生物学）
- 初期胚形成における JNK シグナルの役割を明らかにした（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）
- CD40 シグナルが胚中心 B 細胞の分化を誘導することを明らかにした（免疫疾患）
- IgG 抗原受容体による B 細胞活性化亢進メカニズムについて新たなモデルを提唱した（免疫疾患）
- カルシウム増感剤による遺伝性拡張型心筋症の発症遅延が可能であることをラミン変異ノックインマウスで証明した（分子病態）
- 発現量が低い TIM1 遺伝子 D3-A ハプロタイプが HIV-1 感染後の AIDS 発症遅延と関連することを遺伝疫学的に証明した（分子病態）
- 超免疫不全マウス NOG を使用した慢性活動性 EBV 感染症（CAEBV）モデルの作製に初めて成功した（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

### 研究内容

#### 概略

当分野は、1) 神経変性疾患の分子機構の包括的理解とこれに基づいた治療開発を目指した研究、2) 神経変性疾患研究の過程で発見した PQBP1 の分子機能解析を通じた精神遅滞の研究、3) Oct-3/4 の機能解析を通じた幹細胞分化機構の研究、を行っている。本年度は 1) と 2) に成果が得られた。

### 研究紹介

#### 1. 神経変性疾患ハンチントン病における DNA 損傷修復機能低下

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。

私たちは、疾患タンパクの核移行後の細胞機能障害について 10 年ほど前からオミックス的手法を用いて研究をしてきた。はじめに、可溶性核タンパクのプロテオーム解析の結果、HMGB タンパクがハンチントン病と脊髄小脳変性症 1 型の二つの病態において減少していること、HMGB の基本的機能である転写ならびに DNA 損傷修復に機能低下が起きていることを発見した (Qi et al., Nature Cell Biology 2007)。

次に、インタラクトーム(タンパク間結合網羅的情報)解析を用いて、さらに細胞機能異常に結びつく病態分子の探索を進めた。その結果、DNA2 重鎖切断修復の non-homologous end joining において重要な働きを示す Ku70 と変異ハンチンチンが結合し、Ku70 の DNA 損傷修復機能阻害の結果、DNA 損傷蓄積が増加することを明らかにした。非分裂細胞である神経細胞においては、一般に DNA2 重鎖切断修復は homologous end-joining (HEJ) ではなく、non-homologous end-joining (NHEJ) によって行われる。NHEJ 過程では、DNA2 重鎖切断部位を Ku70 および Ku80 が認識し、局所に DNA-PKcs および XRCC4 (DNA ligase IV) を含む DNA 修復複合体を形成すると考えられている。変異ハンチンチン

ンパク質は Ku70 と結合し、Ku70-Ku80 のヘテロダイマー形成の低下、Ku70, Ku80 の DNA への結合の低下、および DNA-PK 活性の低下を招く。さらに、マウス個体レベルでの Ku70 の補給 (ハンチントン病モデルマウスと Ku70 トランスジェニックマウスの掛け合わせ) は、in vivo の線条体神経細胞における DNA 損傷シグナルの改善とマウス寿命延長につながる。

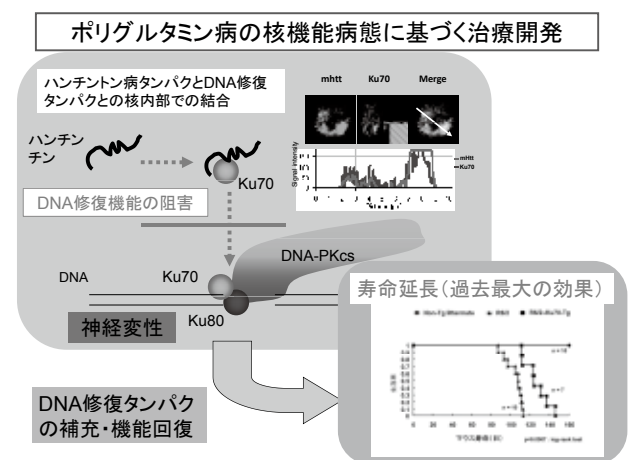


図 1 説明: 異常ハンチントン病タンパク (異常ハンチンチン) は Ku70 と結合して、核内の 2 重鎖切断修復機能を低下させる。この結果、DNA 損傷が蓄積すること (神経細胞は直ちには細胞死を起こさないが) が変性につながる。外部から Ku70 を補充する (内在性発現量の約 2 倍まで上昇させる) とモデルマウスの寿命が顕著に延長する。この寿命延長効果はこれまでの報告の中で最長である。

#### 2. PQBP1 遺伝子異常による学習障害の分子機構の解明

PQBP1 (polyglutamine tract binding protein 1) は、私たちが polyQ タンパク質との結合からポリグルタミン病態関連分子として発見したものである (Waragai et al., Hum Mol Genet 1999)。その後、精神遅滞原因遺伝子としてヨーロッパ精神遅滞研究コンソーシアムが報告した (Kalscheuer et al., Nature Genet 2003)。今日までに 150 例近くが報告され、きわめて頻度の高い精神遅滞であることが明らかになってきた。精神症状としては、精神遅滞の他、hyperactivity などの症状も報告されている。PQBP1 遺伝子変異はフレームシフトを起こすものが大半であり、non-sense RNA decay によって mRNA レベルでの減少が報告されている (Kalscheuer et al., Nature Genet 2003)。したがって、PQBP1 遺伝子変

異は蛋白発現減少を引き起こし、PQBP1 機能低下が生じて、最終的な表現型につながると想像される。このような病態の解析のために、私たちは、病態モデルとして、既にノックアウトマウス、ノックダウンマウス、ショウジョウバエモデルを開発している。

これら動物モデルの中で、本年度は PQBP1 遺伝子変異ショウジョウバエを用いた学習障害の分子機構解明について報告を行った。このショウジョウバエにおいては、piggyBac というトランスポゾンがハエ PQBP1 遺伝子 (dPQBP1) のエキソン 1 に挿入されている。このことによって、dPQBP1 の発現はほぼ消失した状態にある。このハエを用いて、臭い条件付けによる学習・記憶の解析ならびに形態解析を行った。まず、特徴的な所見として、PQBP1 遺伝子変異ショウジョウバエでは、0 時間係数 (performance index) が低下していたが、記憶減衰のパターンは正常コントロールと同様であった。このことは、PQBP1 遺伝子変異ショウジョウバエでは、学習の獲得に障害が起きているものの、短期記憶、麻酔耐性記憶、長期記憶には大きな問題がないものと考えられた。

次に、臭い条件付けの記憶形成に関与する神経経路の形態的観察を行った。この場合最も重要と考えられるのはキノコ体であるが、形態異常は認めなかった。次に投射ニューロンの形態を観察したところ、神経細胞の数には変化がなかったものの、マーカー遺伝子の発現低下に気づいた。投射ニューロンから中枢への投射パターンには異常はなかった。このことから、投射ニューロンに遺伝子発現の機能的異常が起きている可能性が示唆された。

そこで、さらにどのような遺伝子の発現が PQBP1 遺伝子変異ショウジョウバエの学習獲得障害につながっているのかを検索した。昨年報告したマウスの結果も相まって、NMDA 受容体サブユニット NR1 は主要な候補と考えられた。実際、免疫染色やウェスタンブロットの結果は NR1 タンパクの発現低下を指示していた。一方、同じ NMDA 受容体サブユニットの NR2 には低下は認められなかった。さらに投射ニューロン NR1 過剰発現ハエと交配すると、学習獲得障害がレスキューされた。また、投射ニューロンに特異的に PQBP1 の RNAi を発現すると学習獲得障害が同様に観察されたが、キノコ体に同様な RNAi を発現しても学習獲得障害は認められなかった。さらに、HDAC 阻害剤をハエに食べさせると学習障害に部分的な改善を認めた。

以上の結果を総合して、PQBP1 遺伝子変異ショウジョウバエの学習障害は投射ニューロンにおける PQBP1 遺伝子発現低下に基づく NR1 の投射ニューロンでの発現低下によるものと考えられた。この結果は、以下の 3 点

で重要である。1 つは、ショウジョウバエの学習獲得は従来キノコ体が主要な役割をはたすと考えられてきたが、本報告は特定の遺伝子機能低下にもとづく投射ニューロンの機能低下が学習障害にむすびつくことを示した初めての事例である。2 つ目には、PQBP1 遺伝子異常に基づく、精神発達遅滞の分子機構に対して示唆を与える結果である。3 番目には、PBQP1 遺伝子機能低下を起こすポリグルタミン病には認知障害を示すものがあり、これらの変性疾患の認知症状の分子的基盤を示唆する点で重要である。

本研究で用いた PBA は既に実際の臨床現場において、高アンモニウム血症、てんかん、あるいは消化不良などの患者に対する治療として用いられ、また、抗がん剤としても使用されている。一方、これまでに精神遅滞の原因遺伝子として転写活性に関わるものが多数知られており、これら精神遅滞においても転写障害の関与が考えられる。昨年報告したように、マウスモデル (PQBP1 ノックダウンマウス) においても同様に PBA によって不安関連記憶障害が改善された。したがって、今回私たちが同定した PBA がリードとなって今後より有効な治療薬を開発しようと考えている。

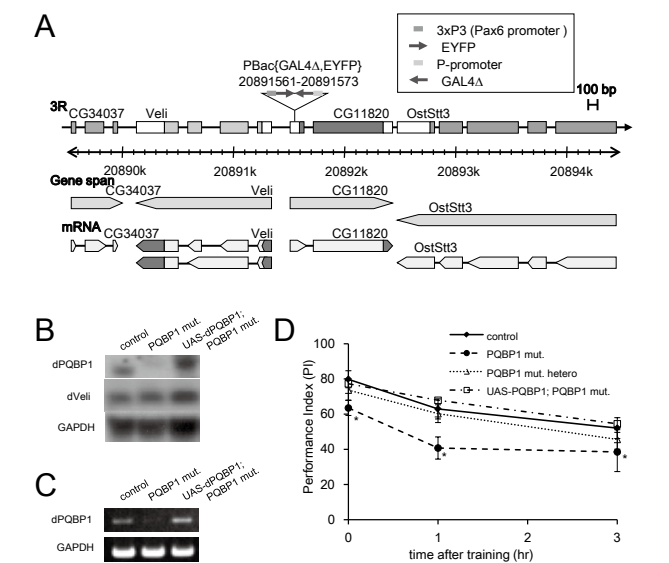
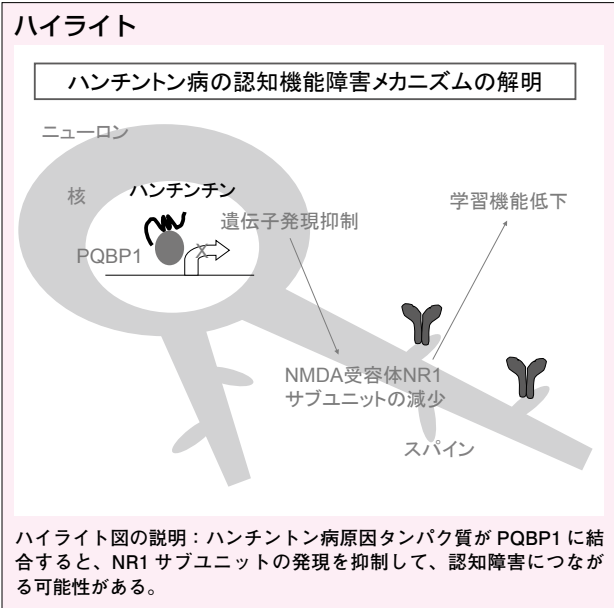


図 2 の説明: A) PQBP1 遺伝子変異ショウジョウバエの遺伝子構造。B) ノーザンブロットによるハエ PQBP1 遺伝子発現レベルの解析。PQBP1 遺伝子変異ショウジョウバエでは dPQBP1 の発現が顕著に落ちているが、隣の遺伝子である dVeli の発現は変化していない。C) 半定量的 RT-PCR においても同様に dPQBP1 の発現低下が確認できる。D) 学習記憶曲線。変異ショウジョウバエでは 0 時間の performance index が低下しているが、その後の減衰はコントロールとほぼ平行である。dPQBP1 を再発現させると学習は正常レベルに回復する。





## 業績目録

### 原著

- Enokido, Y., Tamura, T., Ito, H., Arumughan, A., Komuro, A., Shiwaku, H., Sone, M., Foulle, R., Sawada, H., Ishiguro, H., Ono, T., Murata, M., Kanazawa, I., Tomilin, N., Tagawa, K., Wanker, E.E., and Okazawa, H. (2010). Mutant huntingtin impairs Ku70-mediated DNA repair. *J Cell Biol.* 189, 425-443.
- Takahashi, M., Mizuguchi, M., Shinoda, H., Aizawa, T., Demura, M., Okazawa, H., and Kawano, K. (2010). Polyglutamine tract-binding protein-1 binds to U5-15kD via a continuous 23-residue segment of the C-terminal domain. *Biochim Biophys Acta.* 1804, 1500-1507.
- Shiwaku, H., Yoshimura, N., Tamura, T., Sone, M., Ogishima, S., Watase, K., Tagawa, K., and Okazawa, H. (2010). Suppression of the novel ER protein Maxer by mutant ataxin-1 in Bergman glia contributes to non-cell-autonomous toxicity. *EMBO J.* 29, 2446-2460.
- Honda, S., Hayashi, S., Imoto, I., Toyama, J., Okazawa, H., Nakagawa, E., Goto, Y., and Inazawa, J. (2010). Copy-number variations on the X chromosome in Japanese patients with mental retardation detected by array-based comparative genomic hybridization analysis. *J Hum Genet.* 55, 590-599.
- Konno, M., Hamazaki, T. S., Fukuda, S., Tokuhara, M., Uchiyama, H., Okazawa, H., Okochi, H., and Asashima, M. (2010). Efficiently differentiating vascular endothelial cells from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in serum-free culture. *Biochem Biophys Res Commun.* 400, 461-465.
- Tamura, T., Horiuchi, D., Chen, Y. C., Sone, M., Miyashita, T., Saitoe, M., Yoshimura, N., Chiang, A. S., and Okazawa, H. (2010). Drosophila P/QBP1 regulates learning acquisition at projection neurons in aversive olfactory conditioning. *J Neurosci.* 30, 14091-14101.
- Aoki, Y., Nakamura, A., Yokota, T., Saito, T., Okazawa, H., Nagata, T., and Takeda, S. (2010). In-frame Dystrophin Following Exon 51-Skipping Improves Muscle Pathology and Function in the Exon 52-Deficient mdx Mouse. *Mol Ther.* 18, 1995-2005.

*Mol Ther.* 18, 1995-2005.

### 和文総説

- 岡澤 均 (2010). DNA修復タンパク HMGBを用いたアンチエイジング治療開発、東京生化学研究会 助成研究報告集 平成21年度版(第24集) 38-42.
- 水口峰之、岡澤 均 (2010). 天然変性タンパク質P/QBP-1の揺らぎと生体機能、メディカルバイオ 10月別冊「揺らぎと生体機能」44-48.

### 国際学会

- Ito, H., Enokido, Y., Tamura, T., Okazawa, H. Mutant huntingtin impairs Ku70-mediated DNA repair. The First International Conference of Neural Cell Culture, Seoul, South Korea, 2010.6.25
- 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 First International Conference of Neural Cell Culture, Seoul, South Korea, 2010.6.25
- Enokido, Y., Tamura, T., Ito, H., Komuro, A., Shiwaku, H., Wanker, E.E., Okazawa, H. Mutant Huntingtin impairs Ku70-mediated DNA repair. Neuro 2010, Kobe, Japan, 2010.9.24
- Tamura, T., Horiuchi, D., Chen, Y.C., Sone, M., Miyashita, T., Saito, M., Yoshimura, N., Chiang, A.S., Okazawa, H. dP/QBP1 is involved in a memory trace at projection neurons. Neuro 2010, Kobe, Japan, 2010.9.24

### 国内学会

- 岡澤 均「変異 ataxin-1 および huntingtin の non-cell autonomous 毒性」平成21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法開発に関する研究」平成21年度研究班会議 東京 2010.1.14-15
- 田村拓也、曾根雅紀、山下真弓、Wanker Erich E、岡澤 均「Ataxin-1/Huntingtin のグリア細胞由来毒性の解析」第51回日本神経学会 東京国際フォーラム 東京 2010.5.20-22
- 伊藤日加瑠、黒澤 大、貫名信行、岡澤 均「HDAC阻害剤によるP/QBP1精神遅滞モデルマウスの治療」第51回日本神経学会 東京国際フォーラム 東京 2010.5.20-22

ウスの治療」第51回日本神経学会総会 東京国際フォーラム 東京 2010.5.20-22

- 曾根雅紀、鍋島陽一、岡澤 均「ショウジョウバエ APP の細胞内輸送を制御する新しい分子 yata の同定と分析」第51回日本神経学会総会 東京国際フォーラム 東京 2010.5.22
- 伊藤日加瑠、岡澤 均「ハンチントン病における DNA 損傷修復障害」平成22年度日本生化学会関東支部例会・第51回新潟生化学懇話会合同研究集会 長岡技術科学大学 新潟 2010.5.28-29
- 田村拓也、岡澤 均「精神遅滞を伴う自閉症関連遺伝子の解析と治療法開発」「発達障害の神経科学的基盤の解明と治療法開発に関する研究」平成22年度第1回班会議 小平市 東京 2010.6.26-27
- 榎戸 靖、田村拓也、伊藤日加瑠、小室見彦、塩飽裕紀、岡澤 均「変異ハンチンチン蛋白質による DNA 損傷修復酵素 Ku70 の機能阻害」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 ホテル札幌芸文館 札幌 2010.7.27-30
- 伊藤日加瑠、黒澤 大、貫名信行、岡澤 均「HDAC阻害剤によるP/QBP1精神遅滞モデルマウスの治療」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 ホテル札幌芸文館 札幌 (病態脳ポスター) 2010.7.27-30
- 田村拓也、堀内大輔、曾根雅紀、齋藤 実、宮下知之、岡澤 均「P/QBP1 関連精神遅滞モデルショウジョウバエにおける学習障害」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 ホテル札幌芸文館 札幌 2010.7.27-30
- 曾根雅紀、岡澤 均「細胞内小胞輸送と神経変性：ショウジョウバエモデルを用いた解析」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 ホテル札幌芸文館 札幌 2010.7.30
- 塩飽裕紀、田村拓也、曾根雅紀、渡瀬 啓、岡澤 均「脊髄小脳失調症1型原因遺伝子 Ataxin-1 の non-cell autonomous 毒性は MAXER を介する」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 ホテル札幌芸文館 札幌 2010.7.27-30
- 榎戸 靖、田村拓也、伊藤日加瑠、小室見彦、塩飽裕紀、Wanker Erich E、岡澤 均「変異ハンチンチン蛋白質による DNA 修復酵素 Ku70 の阻害」Neuro 2010 神戸コンベンションセンター

神戸 2010.9.24

- 田村拓也、堀内大輔、Yi-Chung Chen、曾根雅紀、宮下知之、齋藤 実、吉村奈津恵、Ann-Shyn Chiang、岡澤 均「感覚二次ニューロン依存的な記憶に関わる新規分子、dP/QBP1」Neuro 2010 神戸コンベンションセンター 神戸 2010.9.24
- 田村拓也、岡澤 均「dP/QBP1 と projection neuron と学習障害」第3回分子高次機能研究会 冠着荘長野 2010.11.23
- 水口峰之、土谷 芳、岡澤 均、河野敬一 Fluctuation and function of polyglutamine tract binding protein-1.「揺らぎと生体機能」第4回公開シンポジウム 滋賀県立県民交流センター 滋賀 2010.11.30-12.1

### 招待講演・セミナー

- 岡澤 均「神経変性疾患における DNA 修復異常と脳老化」第5回 Bone Forum in Hanno 埼玉 2010.3.3
- 岡澤 均「細胞機能から見たポリグルタミン病の神経変性」東京大学大学院医学研究科講義 東京大学 東京 2010.5.11
- 岡澤 均「変性疾患細胞死モデルとしての転写障害性神経細胞死 TRIAD」第36回東京女子医科大学・神経懇話会 東京女子医科大学 東京 2010.6.29
- 岡澤 均「神経変性における神経細胞死」第19回日本 Cell Death 学会学術集会 -細胞死研究の新たなステージ- 愛知県産業労働センター 名古屋 2010.7.31
- Okazawa, H. Molecular Mechanisms of P/QBP1-linked Developmental Disorders. Seminar, Henry Hood Research Program, Weis Center for Research, Geisinger Clinic, Danville, USA, 2010.9.30
- 岡澤 均「神経変性概念のパラダイムシフトと治療戦略」第5回四大学連合文化講演会 -橋記念講堂 東京 2010.10.8
- Okazawa, H. Dynamic change of synapse molecule in developmental disorder. Kick off symposium of Scientific Research on Innovative Area "Foundation of Synapse and Neurocircuit Pathology", Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, 2010.10.27
- 岡澤 均「ハンチントン病と DNA 修復障害」日本人類遺伝学会第55回大会 大宮ソニックシティ 大宮 2010.10.27-30
- 岡澤 均「ポリグルタミン病における凝集毒性概念の変遷と治療」第29回日本認知症学会学術集会 ウィンクあいち 名古屋 2010.11.5-7

### 研究助成金

- 平成20-22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：H20-難治-一般-014 分担研究者 岡澤 均
- 平成16-22年度 厚生労働省精神神経疾患研究委託費「神経学的基盤に基づく発達障害の診断・治療ガイドライン策定に関する総合的研究」課題番号：19指-8 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21年度研究助成 財団法人三共生命科学研究所 岡澤 均
- 平成22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

### 特許出願・取得状況

- 特許許可 (US Patent and Trade Office) Prophylactic/Therapeutic Agent for Neurodegenerative Disease. Inventor : Hitoshi Okazawa Application: National Corporation Tokyo Medical and Dental University Date : September 17, 2010 Application Number : 12/313,837 Issue Date: November 16, 2010 Patent Number: 7833975
- 特許許可 (European Patent Office) Prophylactic/Therapeutic Agent for Neurodegenerative Disease. Inventor : Hitoshi Okazawa Application: National Corporation Tokyo Medical and Dental University Date: November 22, 2010 Application Number: 07742308.5
- 特許許可 (US Patent and Trade Office) Gene Encoding a Protein and Preventive/Remedy for Neurodegenerative Diseases such as Polyglutamine Diseases by Utilizing the Same Inventor : Hitoshi Okazawa Application: National Corporation Tokyo Medical and Dental University Date: January 4, 2011 Application Number: 11/791,053

### 学会等主催

- 岡澤 均 病態脳科学関連ワークショップ「脳疾患研究の新しい潮流」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 ホテル札幌芸文館 札幌 2010.7.28
- 岡澤 均 若手参加分野別将来構想討議会(病態) 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 ホテル札幌芸文館 札幌 2010.7.30
- Okazawa, H. Kick off symposium of Scientific Research on Innovative Area "Foundation of Synapse and Neurocircuit Pathology" Tokyo Medical and Dental University, M&D Tower, Large Hall, 2010.10.27



# 難治疾患研究所 難治病態研究部門

## 病態細胞生物学分野

### 研究内容

#### 概略

当研究室では、①オートファジー機構の解析とその生理的、病理的意義の解明、②細胞死機構の解析とその破綻に由来する疾患の治療薬開発、③ミトコンドリア機能異常に由来する疾患の克服、を3つの柱として研究を行っている。オートファジーに関しては、当研究室で発見した新しいメカニズムによるオートファジーに関して、その分子機構や生理的、病理的意義を解析している。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、酵母菌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: Nature 2009)。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、特に赤血球が成熟する際に起るミトコンドリア除去に深く関与している。

本年は、①新規オートファジーの制御分子の探索、②新規オートファジーアッセイ系の確立、③新規オートファジー欠損マウスの解析、④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複数の分子を同定し、これらの分子の機能解析に成功したことは、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。

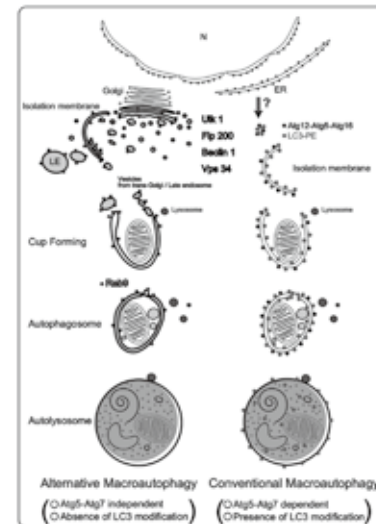


図1 オルタナティブオートファジーの発見  
哺乳動物には Atg5 に依存したオートファジーと依存しないオートファジー(オルタナティブオートファジー)が存在しており、両者は刺激や細胞の種類によって使い分けられている。

#### 2. 細胞死の解析

多くの細胞は自殺装置を内包しており、必要に応じ積極的にそのスイッチを入れ死に至る。この機構は細胞分裂や細胞増殖と協調して機能し、個体発生や組織の恒常性維持に寄与している。従来、生理的な細胞死はアポトーシスのみであると考えられてきたが、我々を初めとする複数のグループにより非アポトーシス細胞死の存在が明らかにされ、生体内においては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。我々は、個々の細胞死の分子機構や生理学的意義を解明したいと考えている。

##### 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、ミトコンドリア膜の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、その時のアポトーシス関連分子の挙動を観察した。また、② Bcl-2 ファミリー蛋白質に依存しないアポトーシス機構の分子メカニズムの解明を行った。

##### B. オートファジー細胞死

当研究室では、オートファジーを利用した細胞死機構の存在を世界に先駆けて発見し(Nature Cell Biol. 2004)、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(Oncogene 2009)。

(1)オートファジー細胞死はアポトーシスとは異なる機構によって実行されること(図2)、(2)抗癌剤の多くはアポトーシス誘導による殺癌細胞効果によってその作用を発揮していること、の2点を勘案すると、オートファジー細胞死誘導化合物は革新的な抗癌剤となりうる可能性を有している。この為、我々は、オートファジー細胞死機構を活性化する低分子化合物をスクリーニングにより同定した(図3A)。さらに、この化合物の抗癌剤としての有用性を検討したところ、ex vivo の担癌マウスモデルにおいて、強い抗癌活性を示すことを見出した(図3B)。

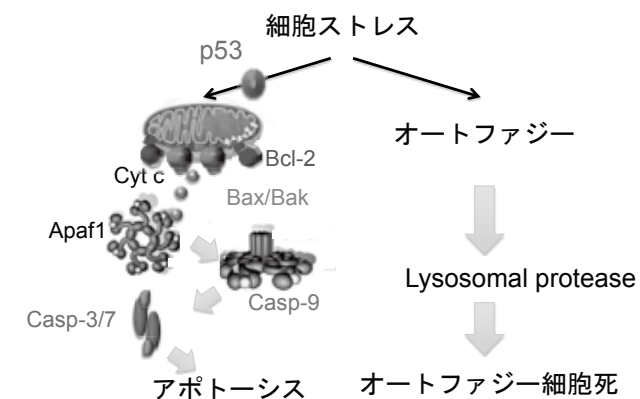


図2 アポトーシスとオートファジー細胞死  
アポトーシスとオートファジー細胞死は、強い細胞ストレスで誘導されるが、その分子メカニズムは大きく異なっている。通常は、アポトーシスが優先して実行される。

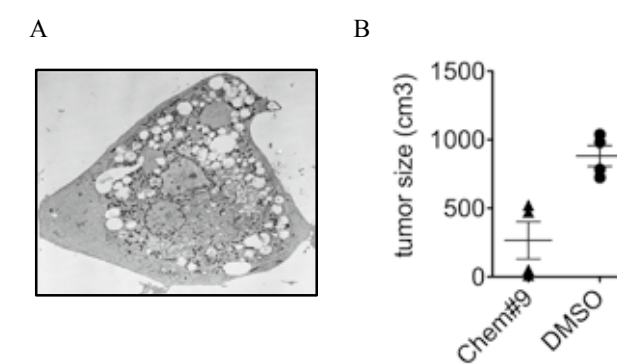


図3 オートファジー細胞死誘導化合物による抗癌効果  
オートファジー細胞死を特異的に誘導できる低分子化合物をスクリーニングにより同定し、さらに担癌モデルマウスを用いて個体レベルでの抗癌効果を確認した。A: 化合物 #9 を細胞に投与した時に誘導されるオートファジー細胞死の電子顕微鏡像。B: 化合物 #9 を担癌マウスに投与した後の腫瘍径 (DMSO が対照)。

#### C. ミトコンドリア膜透過性亢進機構を介したネクローシスの解析

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

#### 3. ミトコンドリア機能異常に基づく疾患の解析

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

Mnd2 マウスは、ミトコンドリアの膜間スペースに局在するプロテアーゼ Omi/HtrA2 の機能異常によってパーキンソン病を発症するマウスである。本年度は、このマウスを解析し、mnd2 マウスの線条体、黒質においてパーキン蛋白質(パーキンソン病の原因蛋白質)が、発症以前に顕著に減少していることを見出した(図4A)。さらに、mnd2 マウスの病態がパーキンの減少によるものか否かを検討する為に、脳特異的パーキン過剰発現マウスを作製して、mnd2 マウスと交配した。しかしながら、パーキン過剰発現によって mnd2 マウスの病状を改善させることは出来なかった(図4B)。現在、パーキン以外の蛋白質に注目して、mnd2 マウスの病態の解析を行っている。

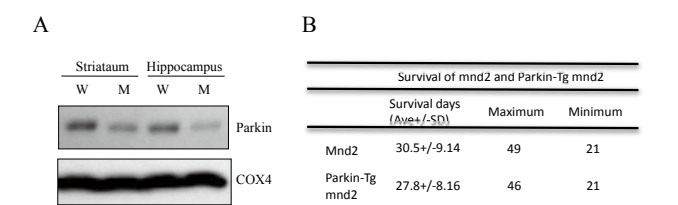


図4 mnd2 マウスのパーキンソン病発症におけるパーキン蛋白質の関与  
A: mnd2 マウスの脳においては、発症以前にパーキン蛋白質の発現量が低下していた。W: 野生型マウス、M: mnd2 マウス  
B: mnd2 マウスにおけるパーキンソン病は、脳組織特異的パーキン過剰発現マウスと交配しても改善しなかった。



## ハイライト

オートファジー細胞死は、アポトーシスとは異なる細胞死の様式であり、その異常は神経疾患や発癌など様々な疾患に関与する。多くの抗癌剤は、癌細胞にアポトーシスを誘導することで、その薬効を発揮している。我々は、p53欠損癌細胞など、アポトーシスに抵抗性を示す癌に対する治療を念頭に、オートファジー

細胞死を特異的に誘導できる低分子化合物のスクリーニングを行った。その結果、約2万種類の化合物から23種類のオートファジー細胞死誘導化合物を同定した。さらに、ex vivoの担癌マウスモデルを作製して、これらの化合物の生体での抗癌効果を確認し、抗癌剤の候補となる化合物を同定した(図3)。

## 人事異動

転入：西田友哉（特任助教）、吉田志穂（疾患生命科学研究所修士課程入学）、  
転出：佐藤徹（疾患生命科学研究所修士課程より就職）、鈴木佐和子（疾患生命科学研究所修士課程より就職）

## 業績目録

### 原著論文

- Mouri A, Noda Y, Shimizu S, Tsujimoto Y, Nabeshima T. The role of cyclophilin D in learning and memory. *Hippocampus* 20, 293-304, 2010
- Shimizu S, Konishi A, Nishida Y, Mizuta T, Nishina H, Yamamoto A, Tsujimoto Y. Involvement of JNK in the regulation of autophagic cell death. *Oncogene* 29, 2070-2082, 2010
- Nabeyama A, Kurita A, Asano K, Miyake Y, Yasuda T, Miura I, Nishitai G, Arakawa S, Shimizu S, Wakana S, Yoshida H, Tanaka M. xCT deficiency accelerates chemically induced tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 6436-6441, 2010
- Ideguchi K, Shimizu S, Okumura M, Tsujimoto Y. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition is not involved in neurodegeneration in mnd2 mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 393, 264-267, 2010.
- Kamiya K, Tsumoto K, Arakawa S, Shimizu S, Morita I, Yoshimura T, Akiyoshi K. Preparation of connexin43-integrated giant Liposomes by a baculovirus expression-liposome fusion method. *Biotechnol. Bioeng.* 107, 836-843, 2010
- Yoshida T, Mizuta T, Shimizu S. Neurodegeneration in mnd2 mutant mice is not prevented by parkin transgene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 402, 676-679, 2010.
- Yoshioka Y, Shimizu S, Ito T, Taniguchi M, Nomura M, Nishida T, Sawa Y. p53 Inhibits Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Solid Tumor. *J Surg Res. in press* 2011

### 総説

- Shimizu S, Arakawa S. and Nishida Y. Autophagy takes an alternative pathway. *Autophagy* 6.2, 290-291, 2010
- 西田友哉, 荒川聡子, 清水重臣：Atg5やAtg7を必要としないオートファジー機構の発見 *細胞工学* 29:186-187, 2010
- 荒川聡子, 西田友哉, 清水重臣：Atg5やAtg7を必要としない新規オートファジー機構の発見 *実験医学* 28:448-451, 2010
- 清水重臣, 荒川聡子, 西田友哉：新しいオートファジー機構の発見 *DENTAL DIAMOND* 35:72-76, 2010
- 清水重臣, 荒川聡子, 西田友哉：Atg5非依存性オートファジーの形態学と分子生物学「顕微鏡」45: 94-96, 2010
- 清水重臣：オートファジーの新たな展開と炎症制御 「細胞工学」秀潤社 29: 799-803,2010
- 清水重臣：ミトコンドリアの変化 「細胞死解析プロトコール」羊土社 印刷中

### 学会発表

### 国際学会

- Shimizu S. A critical role for the autophagy gene Ulk1 in Atg5-independent alternative macroautophagy. Gordon Conference (2010 4/25-30, Italy)
- Shimizu S. Discovery of Atg5/Atg7-

independent alternative macroautophagy. 6<sup>th</sup> Institute network symposium (2010 6/24-25, Kanazawa)

### 国内学会

- 清水重臣：「新規オートファジーの制御機構」第9回細胞死研究会 (2010/1/19 京都)
- 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16回Nagoyaアポトーシス研究会 (2010/2/25 名古屋)
- 清水重臣：” Multiple mechanisms of cell death and their regulation by mitochondria” 第74回日本循環器学会 (2010/3/5 京都)
- 清水重臣：「オートファジーと細胞死のクロストーク」第19回日本Cell Death学会 (2010/7/30-8/1 名古屋)
- 小西昭充, 荒川聡子, 清水重臣：「オートファジー因子Beclin1によるアポトーシス細胞除去の制御」第19回日本Cell Death学会(2010/7/30-8/1 名古屋)
- 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」北大外科セミナー (2010/8/30 札幌)
- 清水重臣：「生体における様々な細胞死の役割」Molecular Cardiovascular Conference II (2010/9/3-5 小樽)
- 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53回日本放射線影響学会 (2010/10/20 京都)
- 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33回日本分子生物学会年会 (2010/12/7-10 神戸)
- 荒川聡子, 中名生幾子, 清水重臣：「アポトーシス誘導時におけるミトコンドリア膜の微細構造解析」第33回日本分子生物学会年会(2010/12/7-10 神戸)
- 亀井優理, 小西昭充, 西田友哉, 山口啓史, 深井文雄, 清水重臣：「アポトーシス細胞の貪食におけるABCA1トランスポーターの役割」第33回日本分子生物学会年会(2010/12/7-10 神戸)
- 室橋 道子, 辻村 恭子, 吉野 育代, 小西昭充, 清水 重臣：「オルタナティブオートファジーのケミカルバイオロジー」第33回日本分子生物学会年会 (2010/12/7-10 神戸)
- 室橋 道子, 荒川聡子, 清水 重臣：「オルタナティブオートファジーのケミカルバイオロジー」第33回日本分子生物学会年会(2010/12/7-10 神戸)
- 西田友哉, 荒川聡子, 清水 重臣：「Bcl-2ファミリータンパク質によるオートファジー制御の検討」第33回日本分子生物学会年会 (2010/12/7-10 神戸)
- Konishi A, Shimizu S, deLange T. “TRF2 BASIC DOMAIN INTERACTS WITH NUCLEOSOMAL HISTONES TO STABILIZE CHROMOSOME ENDS” 第33回日本分子生物学会年会 (2010/12/7-10 神戸)
- 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)

### 学内外教育活動

清水重臣：岐阜大学大学院医学系研究科非常勤講師

### 競争的研究費取得

#### 代表(清水重臣)

- 科学研究費補助金、基盤研究(S)「新しく発見したオートファジー機構の包括的理解とその「オートファジー病」への応用」

- 科学研究費補助金、新学術領域研究「ミトコンドリア膜上に一過性に形成される過渡期細胞死孔の捕捉」
- 科学研究費補助金、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「アポトーシスを可視化するマウスの開発とその応用」
- 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」
- ヤクルトバイオサイエンス研究助成「腸内フローラにより誘起される炎症性腸疾患の病態解明とその制御法の開発」
- 住友財団「新しく発見したオートファジー機構の生理機能解析とその疾患への応用」

#### 代表(小西昭充)

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

#### 代表(荒川聡子)

- 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」

# 難治疾患研究所 難治病態研究部門

## 発生再生生物学分野

### 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。

#### 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。

#### 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 細胞や精巢で特異的発現する CrxOS の役割」について報告してきました。

#### 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 *ken-dama* 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。

#### 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。きちんと 100% に戻ることから、「肝臓は自分のサイズを知っている」こととなります。多くの生物学者が興味を持ってきた課題です。また、部分肝切除後 1 日目には脂肪肝が観察されますが、この脂肪肝は病態の前段階である「悪玉脂肪肝」ではなく、肝再生のエネルギーを供給するのに必須な「善玉脂肪肝」です。悪玉脂肪肝と善玉脂肪肝の違いも興味ある研究課題です。

#### 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。



## ハイライト

ストレス応答性 MAP キナーゼの JNK はボディープラン形成を、p38 は心筋細胞と神経細胞分化を制御する

ストレス応答性の MAP キナーゼの一つである JNK の初期胚形成期における役割を解明する目的で、上流の活性化因子 MKK4 と MKK7 のノックダウン実験を、ゼブラフィッシュ胚を用いて行った。その結果、MKK4b-JNK シグナル伝達系は Wnt11 の発現抑制を通じて、ボディープラン形成の重要な過程である収束伸長 (convergent extension) を制御していることを見出した (図1)。これまでは Wnt11 は JNK の上流に存在すると考えられていたが、JNK による負のフィードバック制御機構も存在することが初めて明らかになった。また、MKK7-JNK は体節の形成を制御していることも見出し、MKK4a による背腹の形成制御に加えて、MKK4a, MKK4b, MKK7 による複数の

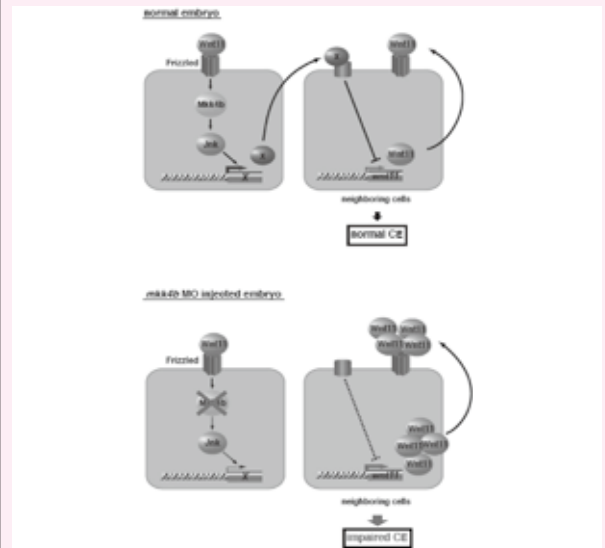


図1 MKK4b-JNK-Wnt11 シグナルによるゼブラフィッシュ胚収束伸長の制御

JNK シグナルが多様な生命現象制御を担っていることを明らかにした (図2)。また、マウス ES 細胞を用いた細胞分化誘導実験において、もう一つのストレス応答性 MAP キナーゼ p38 が、p38-MEF2C-BMP2 シグナルを介して、心筋細胞分化誘導を促進し、神経細胞分化と神経細胞分化の運命決定機構の一部を解明して研究成果である (図3)。

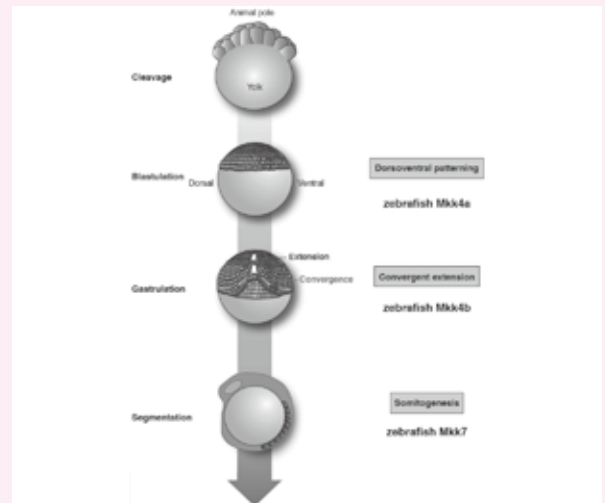


図2 ボディープラン形成におけるゼブラフィッシュ MKK4 および MKK7 の多様な役割

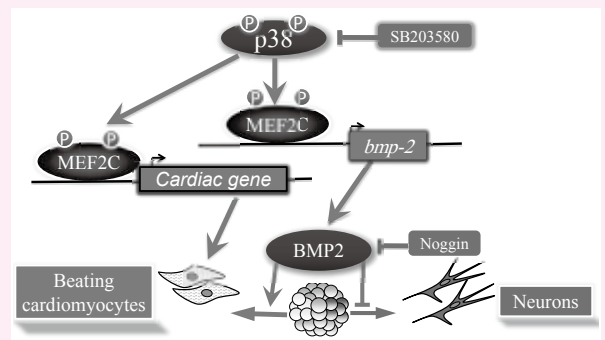


図3 マウス ES 細胞の心筋細胞および神経細胞分化誘導を制御する p38 MAP キナーゼ

## 人事異動

転入：山崎世和 (特任助教)、下村忠範 (医歯学総合研究科修士課程入学)、市原祐樹 (生命情報科学教育部博士前期入学)、大谷智実 (生命情報科学教育部博士前期入学)、尾崎友美 (生命情報科学教育部博士前期入学)、迫田実希尾崎友美 (生命情報科学教育部博士前期入学)  
転出：中村貴 (助教)、高橋真也 (日本学術振興会特別研究員)、呉金展 (特任助教)

## 業績目録

### 原著論文

1. Takahiro Negishi, Yoko Nagai, Yoichi Asaoka, Mami Ohno, Misako Namee, Hiroshi Mitani, Takashi Sasaki, Nobuyoshi Shimizu, Shuji Terai, Isao Sakaida, Hisato Kondoh, Toshiaki Katada, Makoto Furutani-Seiki\*, and Hiroshi Nishina\* (2010) Retinoic acid signaling

positively regulates liver specification by inducing wnt2bb gene expression in medaka. *Hepatology* 51, 1037-1045. (\*Corresponding authors) Press release  
2. Kentaro Nakagawa<sup>1</sup>, Misato Sugahara<sup>1</sup>, Tokiwa Yamasaki<sup>1</sup>, Hiroaki Kajihō, Shinya Takahashi, Jun Hirayama, Yasuhiro Minami, Yasutaka Ohta, Toshio Watanabe, Yutaka Hata, Toshiaki Katada and Hiroshi Nishina (2010) Filamin Associates with Stress Signaling Kinases MKK7 and MKK4 and Regulates JNK Activation. *Biochem. J.* 427, 237-245. (\*Contributed equally)  
3. Jinzhan Wu<sup>1</sup>, Junko Kubota<sup>1</sup>, Jun Hirayama<sup>1</sup>, Yoko Nagai, Sachiko Nishina, Tadashi Yokoi, Yoichi Asaoka, Jungwon Seo, Nao Shimizu, Hiroaki Kajihō, Takashi Watanabe, Noriyuki Azuma, Toshiaki Katada, and Hiroshi Nishina (2010) p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Controls a Switch between Cardiomyocyte and Neuronal Commitment of Murine Embryonic Stem Cells by Activating Myocyte Enhancer

Factor 2C-Dependent Bone Morphogenetic Protein 2 Transcription. *Stem Cells and Development* 19, 1723-1734.  
4. Jungwon Seo<sup>1</sup>, Yoichi Asaoka<sup>1</sup>, Yoko Nagai, Jun Hirayama, Tokiwa Yamasaki, Misako Namee, Shinya Ohata, Nao Shimizu, Takahiro Negishi, Daiju Kitagawa, Hisato Kondoh, Makoto Furutani-Seiki, Josef M. Penninger, Toshiaki Katada, and Hiroshi Nishina\* (2010) Negative regulation of wnt11 by JNK signaling is required for convergent extension during vertebrate gastrulation. *J. Cell. Biochem.* 110, 1022-1037.  
5. Yoko Nagai<sup>1</sup>, Yoichi Asaoka<sup>1</sup>, Misako Namee, Kota Saito, Haruka Momose, Hiroshi Mitani, Makoto Furutani-Seiki, Toshiaki Katada and Hiroshi Nishina (2010) The LIM protein Ajuba is required for ciliogenesis and left-right axis determination in medaka. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 396, 887-893.  
6. G. Gregory Neely, Keiji Kuba, Anthony Cammarato, Kazuya Isobe, Sabine Amann,

Liyong Zhang, Mitsushige Murata, Lisa Elmen, Vijayanti Gupta, Suchir Arora, Rinku Sarangi, Debasis Dan, Susumu Fujisawa, Takako Usami, Cui-ping Xia, Alex C. Keene, Nakissa N. Alayari, Hiroyuki Yamakawa, Ulrich Elling, Christian Berger, Maria Novatchkova, Rubina Koggruber, Keichi Fukuda, Hiroshi Nishina, Mitsuki Isobe, J. Andrew Pospisilik, Yumiko Imai, Arne Pfeufer, Andrew A. Hicks, Peter P. Pramstaller, Sai Subramaniam, Akinori Kimura, Karen Ocorr, Rolf Bodmer, Josef M. Penninger (2010) A Global In Vivo Drosophila RNAi Screen Identifies NOT3 as a Conserved Regulator of Heart Function. *Cell* 141, 142-153. Cover of the issue  
7. Shigeomi Shimizu, Akimitsu Konishi, Yuya Nishida, Takeshi Mizuta, Hiroshi Nishina, Akitsugu Yamamoto, and Yoshihide Tsujimoto (2010) Involvement of JNK in the regulation of autophagic cell death. *Oncogene* 29, 2070-2082.  
8. Ryuichi Mashima, Kazuho Honda, Yi Yang, Yohei Morita, Akane Inoue, Sumimasa Arimura, Hiroshi Nishina, Hideo Ema, Hiromitsu Nakauchi, Brian Seed, Hideaki Oda, and Yuji Yamanashi (2010) Mice lacking Dok-1, Dok-2, and Dok-3 succumb to aggressive histiocytic sarcoma. *Laboratory Investigation* 90, 1357-1364.  
9. Toshihiko Matsumoto, Shuji Terai, Toshiyuki Oishi, Shinya Kuwashiro, Koichi Fujisawa, Naoki Yamamoto, Yusuke Fujita, Yoshihiko Hamamoto, Makoto Furutani-Seiki, Hiroshi Nishina and Isao Sakaida (2010) Medaka as a Novel and Accurate Model for Human Nonalcoholic Steatohepatitis. *Disease Models & Mechanisms* 3, 431-440. Press release, Cover of the issue, Faculty of 1000 Medicine Masahiko  
10. Tanaka, Hideyuki Hara, Hiroshi Nishina, Kentaro Hanada, Kenichi Hagiwara, Tomohiko Maehama (2010) An improved method for cell-to-cell transmission of infectious prion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 397, 505-508.

### 英文総説

1. Yoichi Asaoka and Hiroshi Nishina (2010) [review] Diverse Physiological Functions of MKK4 and MKK7 during Early Embryogenesis. *J. Biochem.* 148: 393-401.  
2. Yoshimi Uchida, Jun Hirayama, Hiroshi Nishina (2010) [review] A common origin: signaling similarities in the regulation of the circadian clock and DNA damage responses. *Biol. Pharm. Bull.* 33, 535-544. Cover of the issue  
3. Shuhei Tanemura, Tokiwa Yamasaki, Toshiaki Katada and Hiroshi Nishina (2010) [review] Utility and limitations of SP600125, an inhibitor of stress-responsive c-Jun N-terminal kinase. *Curr. Enzym. Inhib.* 6, 26-33.

### 和文

1. 仁科博史：分子細胞生物学 第6版 (Lodish et al.) (翻訳分担) 東京化学同人 (2010)  
2. 仁科博史：生物学事典、東京化学同人 (執筆分担) (2010)  
3. 仁科博史：小型魚類メダカを用いた肝形成および肝疾患研究：肝細胞研究会ホームページ：研究交流 (<http://hepato.umin.jp/kouryu/kouryu12.html>) (2010)  
4. 平山順、内田好海、宮村憲央、沢登健治、仁科博史：概日リズムによる生理機能の制御機構：自律神経 47, 297-300 (2010)  
5. 中村貴、早坂孝宏、井上菜穂子、仁科博史、瀬藤光利：「メタボロームの分布可視化法について」メタボロミクス：その解析技術と臨床・創薬応用研究の最新線、メディカルドゥ、遺伝子医学 MOOK 16, 131-135 (2010)

### 国際学会発表

1. Yoichi Asaoka and Hiroshi Nishina; Negative Regulation of Wnt11 Expression by Jnk Signaling during Convergent Extension [9th International meeting on ZEBRAFISH DEVELOPMENT AND GENETICS, Wisconsin, USA, June, 2010]  
2. Yoichi Asaoka and Hiroshi Nishina; Liver biology and disease: lessons from mutant fish [The Joint Symposium of the 5th International Symposium of Institute Network and the International Symposium Commemorating Inauguration of Kanazawa University Cancer Research Institute, Kanazawa, June, 2010]  
3. Hiroshi Nishina; The LIM protein Ajuba is required for ciliogenesis and left-right axis determination in medaka [FASEB Summer Research Conferences 2010, Aspen, USA, August, 2010]  
4. Hiroshi Nishina; Regulation of ES cell differentiation [Lectures on Organogenesis and Regeneration in Fayoum University, Fayoum, Egypt, October, 2010]  
5. Hiroshi Nishina; Generation and Regeneration of liver [Fayoum University International Symposium on Stem Cells, Fayoum, Egypt, October, 2010]  
Yoko Nagai et al.; The LIM protein Ajuba is required for ciliogenesis and left-right axis determination in medaka [The 16th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience, Tokyo, Japan, December, 2010]  
6. Yoshimi Uchida et al.; The death domain-associated protein DAXX interacts with the core clock component BMAL1 and modulates circadian transcription [The 16th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience, Tokyo, Japan, December, 2010]

### 国内学会発表

1. 仁科博史：細胞死調節因子 Daxx による分子時計制御 [細胞死研究会; 2010年1月/京都]  
2. 仁科博史：私のキャリアパス [東大医科研 GCOE キャリアパス支援セミナー; 2010年2月/東京]  
3. 仁科博史：小型魚類を用いたトランスポートソーム下流シグナル伝達系の解析 [輿論送公開シンポジウム; 2010年3月/大阪]  
4. 宮村憲央他：細胞死調節因子 Daxx による概日リズムの分子機構 [日本薬学会第130年会; 2010年3月/岡山]  
5. 長井陽子他：LIMファミリータンパク質 Ajuba は初期発生過程の繊毛形成に関与する [日本薬学会第130年会; 2010年3月/岡山]  
6. 内田好海他：ストレス応答キナーゼ JNK による時計蛋白質 PER2 の安定性制御 [日本薬学会第130年会; 2010年3月/岡山]  
7. 仁科博史：肝細胞の増殖を制御するシグナル伝達の解析 [第12回日本肝臓医生物学研究会; 2010年4月/静岡]  
8. 仁科博史：マウスやメダカを用いた MAP キナーゼシグナル伝達系の生理機能の解析 [東京女子医大セミナー; 2010年5月/東京]  
9. 仁科博史：小型魚類メダカを用いた肝臓研究 [第7回日本胎盤臨床研究会; 2010年5月/東京]  
10. 仁科博史：小型魚類メダカを用いた肝臓研究：肝形成と肝疾患 [大学院生命情報教育部公開シンポジウム; 2010年6月/東京]  
11. 内田好海他：JNK シグナル伝達系による分子時計制御機構の解明 [日本分子生物学会第10回春期シンポジウム; 2010年6月/東京]  
12. 仁科博史：小型魚類メダカを用いた肝臓左右性決定機構の解明 [第17回肝細胞研究会; 2010年6月/秋田]

13. 山崎世和、仁科博史：ストレス応答性キナーゼ MKK7 欠損マウスにおける脳形成異常 [第9回生命科学研究会; 2010年6月/筑波]  
14. 平山順、仁科博史：細胞死制御因子 DAXX による分子時計制御 [第9回生命科学研究会; 2010年6月/筑波]  
15. 浅岡洋一、仁科博史：ストレス応答性 JNK シグナル伝達系のゼブラフィッシュ初期胚における役割 [第16回小型魚類研究会; 2010年9月/埼玉]  
16. 長井陽子他：LIMファミリータンパク質 Ajuba は初期発生過程の繊毛形成に関与する [第16回小型魚類研究会; 2010年9月/埼玉]  
17. 宮村憲央、仁科博史：プロトオンコジーン YAP による肝細胞増殖誘導法の開発 [第13回日本肝臓医生物学研究会; 2010年10月/札幌]  
18. 大谷智実他：ゼブラフィッシュ培養細胞を用いた概日リズムの光同調機構の解析 [第9回ファーマバイオフォーラム; 2010年10月/京都]  
19. 尾崎友美他：DNA 損傷応答における概日リズムの役割 [第9回ファーマバイオフォーラム; 2010年10月/京都]  
20. 下村忠範他：ストレス応答性 JNK シグナル経路による概日リズム制御因子 PER2 の機能制御 [第9回ファーマバイオフォーラム; 2010年10月/京都]  
21. 仁科博史：マウスやメダカを用いた肝形成機構の解明 [北里大学セミナー; 2010年10月/東京]  
22. 仁科博史：小型魚類メダカを用いた肝形研究 [第22回分子糖尿病研究会; 2010年12月/東京]  
23. 仁科博史/高橋良輔世話人ワークショップ：小型魚類メダカやゼブラフィッシュを用いた疾患研究 [BMB2010; 2010年12月/神戸]  
24. 山崎世和他：ストレス応答性キナーゼ MKK7 欠損マウスにおける脳形成異常 [BMB2010; 2010年12月/神戸]  
25. 仁科博史：小型魚類ゼブラフィッシュおよびメダカを用いた器官形成機構の解明 [徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部セミナー; 2010年12月/徳島]

### 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、京都大学薬学部・非常勤講師、東京工業大学生命理工学部・非常勤講師、早稲田大学先進理工学部・非常勤講師、秋田大学医学部・非常勤講師、埼玉大学理学部・非常勤講師、徳島大学・非常勤講師、山口大学医学部・消化器病態内科学教育プログラム・世話人、肝細胞研究会・世話人、日本肝臓医生物学研究会・世話人、肝疾患と肝再生研究会・世話人

### 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) 「肝機能および肝再生不全モデル生物の作出と解析」  
2. 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」  
3. 平山順 (代表)：科学研究費補助金 若手研究 (B) 「基本生理機能調節における概日リズム制御蛋白質の酵素活性及び翻訳後修飾の役割」



# 難治疾患研究所 難治病態研究部門

## 幹細胞医学分野

### 研究内容

#### 概要

生体を構築する多くの組織の恒常性維持において、幹細胞システムが大きな役割を果たしている。本研究分野では、幹細胞システムの動作原理の解明とその破綻によりおこる病態研究を中心として、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



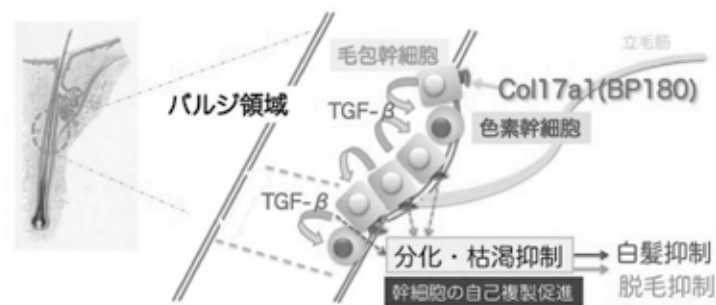
図1

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）。これまでに掌蹠など毛包が存在しない皮膚において色素幹細胞が存在するかどうか不明であったが、今年度、マウス足底の汗腺内に未知の色素細胞集団を見出しており、色素幹細胞としての条件を満たすかどうか検証中である。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。

#### 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、色素細胞発生分化のマスター制御因子として知られる MITF 転写因子および、その標的遺伝子である *Bcl2* が必須であり、その欠損により毛が白髪化すること、特に色素幹細胞が休眠状態に入るタイミングで必須であることを明らかにしてきた（Nishimura EK. et al. Science 2005）。また、加齢に伴いニッチにおいて色素幹細胞が“異

#### 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

所性に分化”する現象をはじめて発見し、これは *Mitf* 遺伝子の変異により有意に促進されることを示した（Nishimura EK. et al. Science 2005）。

一方、ニッチによる細胞外からの幹細胞制御については、色素幹細胞の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。我々は、今年度、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（図2）（Tanimura S et al. Cell Stem Cell 2011）（ハイライト参照）、毛包幹細胞の分泌する TGF- $\beta$  が色素幹細胞に作用し、その未分化性維持と休止期の維持を促進することが判明した（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- $\beta$  シグナルに抗して色素幹細胞が生存する必要があるためであることも同時に判明した（図3）。一方、メラノーマ細胞では、TGF- $\beta$  シグナルに抵抗して生存増殖することも明らかになった。（Nishimura EK et al., Cell Stem Cell, 2010）

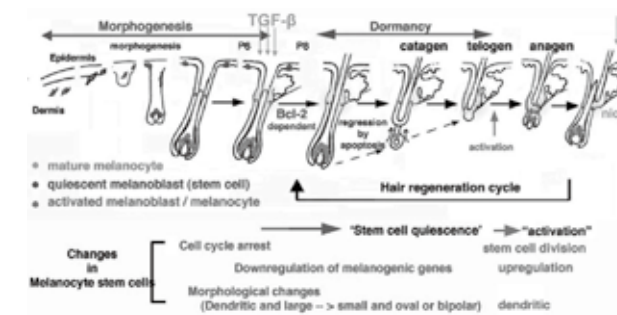


図3

#### 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的な変化が見られるようになる。加齢に伴って見られるこれら老化形質は、寿命の長い組織幹細胞やニッチにおける加齢変化によって主にひきおこされている可能性ある。白髪は、最も典型的な老化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おこることがわかっている。さらに、加齢に伴って幹細胞が枯渇することによって老化形質を発現する例が実在することをはじめて明らかにしている（Nishimura EK. et al. Science 2005）。

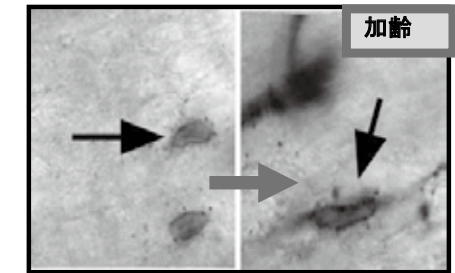


図4

#### 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）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ことが明らかになった。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）。

#### 5. 組織幹細胞を制御する技術の開発

21世紀の新しい治療として再生医療が着目と期待を集めており、iPS細胞から目的の機能を持つ細胞を分化誘導して、これを再生医療に用いるなどの試みが盛んになされるようになった。しかし、生体内に移植された細胞を長期にわたって維持する必要があるため、組織幹細胞レベルで維持制御する必要がある。組織幹細胞を長期にわたって癌化させることなく維持制御する技術を開発するためにも、上記1-4の取り組みから明らかになる基本を応用する。



## 6. 幹細胞システムにおける癌の発生機序の解明

癌は、加齢に伴ってその発生頻度が著しく増加する。幹細胞システムを形成する組織から、いかにして癌が発生するのか、その細胞の起源を知ることは、癌の発生機序を理解し応用する上でも重要である。組織幹細胞が癌の起始細胞としても重要視されているが、ヒトのがんのなかでも悪性黒色腫（メラノーマ）は、治療に最も苦渋

する代表であり、放射線療法にも化学療法にも殆ど反応しない予後最悪の癌である。本来、色素幹細胞は、放射線に高感受性であるが、メラノーマになると放射線や化学療法に耐性である。発がんのどの段階から、どういった契機で色素幹細胞ががん幹細胞のもつ性質である放射線抵抗性を獲得しているのか、ヒトのメラノーマに酷似するモデルマウスを作製し研究を進めている。

### ハイライト

毛包幹細胞が TGF- $\beta$  シグナルを介して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：

Tanimura S et al. Hair follicle stem cells provide a functional niche for melanocyte stem cells.

Cell Stem Cell, 8, 177-187, 2011

Nishimura EK et al. Key Roles for Transforming Growth Factor  $\beta$  in Melanocyte Stem Cell Maintenance. Cell Stem Cell, 6 (2) :130-140, 2010

毛包で機能する組織幹細胞である毛包幹細胞および色素幹細胞は、毛包のなかでも立毛筋が付着する部位であるバルジ領域付近に局在することが知られていますが、毛包幹細胞と色素幹細胞の相互関係や相互作用、その分子メカニズムと白髪・脱毛との関連については明らかではありませんでした。今回、毛包幹細胞と色素幹細胞の維持に膜貫通性のコラーゲンである 17 型コラーゲン (Coll17a1) が必須であり、Coll17a1 が欠損すると幹細胞間での相互作用による幹細胞維持機構が破綻するため、白髪や脱毛を発症することをはじめに明らかにしました。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ますが、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ます。17 型コラーゲンは、ヘミデスマ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きました。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ますが、その仕組みについては明らかにされていませんでした。今回、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が判明しました。そのメカニズムとしては、毛包幹細胞が TGF- $\beta$  シグナルを介して色素幹細胞の未分化性や休眠状態を促進制御していることによるもので、17 型コラーゲンを欠損するマウスでは、毛包幹細胞における TGF- $\beta$  の発現が早期から失われ、隣接して存在する色素幹細胞における TGF- $\beta$  シグナルが入らなくなるために色素幹細胞を維持できなくなり若白髪になること、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- $\beta$  シグナルを介した色素幹細胞維持のメカニズムとしては、色素細胞の発生分化のマスター転写因子 MITF の発現抑制を介して色素幹細胞の未分化性維持を促進すると同時に、静止期の導入を促進していることが判明しました。

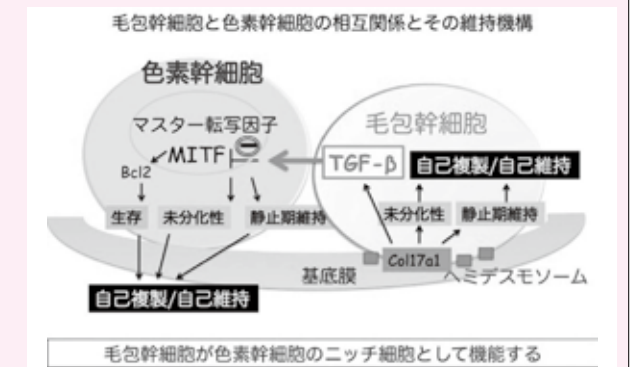
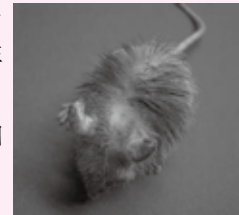


図 6



### 人事異動

2010 年 1 月 松村寛行 助教 (TT) 着任

### 業績目録

#### 原著論文

1. 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 : 177-187, 2011
2. Nishimura EK, Suzuki M, Igras V, Du J, Lonning S, Miyachi Y, Roes J, Beerman F, Fisher DE. Key Roles for Transforming Growth Factor  $\beta$  in Melanocyte Stem Cell Maintenance Cell Stem Cell, 6 (2), 130-140, 2010

#### 英文総説

1. Nishimura, EK, Melanocyte Stem Cells: A melanocyte reservoir for hair and skin pigmentation. Pigment Cell Melanoma Res. 2011, in press

#### 和文総説

1. 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
2. 青戸隆博, 西村栄美：「幹細胞から考える組織の老化メカニズム なぜ歳をとると白髪になるのか？」再生医療 9(2) : pp239-249, 2010.
3. 青戸隆博, 西村栄美：「ステムセルエイジングと白髪」医学のあゆみ 234(8) : pp799-800, 2010
4. 青戸隆博, 西村栄美：「白髪が生じるメカニズム」ファルマシア 46(12) : pp1115-1120, 2010.

#### 国内学会招待講演

1. Emi K. Nishimura : Stem cells in the hair follicle bulge sustain pigmented hair growth through their niche function: 3<sup>rd</sup> Symposium of the IMSUT & RCAST Global COE, (Auditorium of The Institute of Medical Science, The University of Tokyo Tokyo) March 4<sup>th</sup>, 2011
2. 西村栄美: 毛包幹細胞による色素幹細胞の制御: 第 10 回日本再生医療学会総会: (東京) 2011 年 3 月 2 日
3. 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: 第 93 回回工学会フォーラム (京都) 2011 年 1 月 14 日
4. 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: Advans 研究会 2010 : (木更津) 2010 年 12 月 22 日
5. 西村栄美: 毛包における幹細胞と老化、ストレス: 第 31 回日本炎症・再生医学会シンポジウム: (東京) 2010 年 8 月 6 日
6. 西村栄美: ステムセルエイジングと老化: iPS・ES・体性幹細胞 Forum 2010 ~基礎研究から臨床応用・創薬研究へ~: (東京) 2010 年 6 月 29 日
7. 西村栄美: 色素幹細胞の品質管理とエイジング: 日本分子生物学会第 10 回春季シンポジウム: (宮城) 2010 年 6 月 8 日
8. 西村栄美: ステムセルエイジングと白髪のサイエンス: 第 3 回アンチエイジングアカデミー: (東京) 2010 年 6 月 5 日
9. 西村栄美: 毛包における幹細胞の生業と白髪脱毛: 第 62 回日本細胞生物学会大会 シンポジウム: (大阪) 2010 年 5 月 19 日
10. 西村栄美: 白髪発生のメカニズムに関する研

究: 毛髪化学技術者協会 第 127 回学術大会: (東京) 2010 年 4 月 22 日  
11. 西村栄美: ステムセルエイジングと白髪のメカニズム: 第 109 回日本皮膚科学会総会 教育講演: (大阪) 2010 年 4 月 18 日

#### 2010 年度 国際学会招待講演

1. Emi K. Nishimura : Genotoxic Stress Abrogates Renewal of Melanocyte Stem Cells by Triggering Their Differentiation in Mice : ISSCR 8<sup>th</sup> Annual Meeting : (San Francisco, CA USA) June 19<sup>th</sup>, 2010
2. Emi K. Nishimura : Melanocyte Stem Cell Maintenance and aging : Cold Spring Harbor AsiaConferences : (Suzhou Dhsu Lake, China) Sept. 24<sup>th</sup>, 2010
3. Emi K. Nishimura : "Why does our hair turn gray?" : JSPS/JHU/NIA-sponsored symposium : (Baltimore, U.S.A) Ageing vs .Regenerative Medicine: How Much Can Stem Cell Do? (NIA, Baltimore, USA) Feb. 19<sup>th</sup> 2010

#### 学内外教育活動

1. 西村栄美: 本学医学部医学科 講義 (MIC : Medical Introduction) 「細胞分化」, 「臨床から研究へ」, 金沢大学がん研究所 非常勤講師, 日本皮膚科学会認定皮膚科専門医研修講習会 選択コース講師

#### 競争的研究経費取得

1. 西村栄美 (代表) : 平成 22-25 年度 最先端・次世代研究開発支援プログラム「組織幹細胞に着目した毛包の組織老化メカニズムの解明」
2. 西村栄美 (代表) : 平成 22 年度 武田科学振興財団 生命科学助成「毛包内の幹細胞運命決定における細胞外環境の役割とその分子基盤の解明」
3. 西村栄美 (代表) : 平成 19-22 年度 科学研究費補助金 若手研究 (S) 「色素幹細胞の質的变化に着目した白髪発症機序の解明と老化解明へのアプローチ」
4. 西村栄美 (分担) : 平成 22 年度 厚生労働省科学研究費 がん研究開発費「固形がんにおけるがん性幹細胞の役割の究明とがん性幹細胞を標的とした治療法開発に関する研究」
5. 西村栄美 (分担) : 平成 22 年度 厚生労働省科学研究費補助金 政策創薬総合研究事業「多能性幹細胞の新規培養空間創出による幹細胞医薬研究の底上げ」
6. 西村栄美 (分担) : 平成 22 年度 科学研究費補助金 基盤研究 (A) 「ヒト化アクティブモデルマウスによる水疱性類天疱瘡の発生機序解明と新規治療法開発」
7. 青戸隆博 (代表) : 平成 21-22 年度 科学研究費補助金 若手 (B) 「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」
8. 松村寛行 (代表) : 平成 22-23 年度 科学研究費補助金 研究活動スタート支援「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」



# 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

## 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細胞シグナル伝達におけるストレス応答の役割の解明
- (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. CD40シグナル過剰による免疫異常についての研究

全身性エリテマトーデス(SLE)などの自己免疫疾患患者やそのモデル動物では、CD40分子のリガンドであるCD40L(CD154)分子の過剰発現が示されており、また、CD40Lへの中和抗体によりSLE患者とそのモデルでの疾患活動性が顕著に低下することが知られている。したがって、CD40L過剰は自己免疫疾患の発症で重要な役割を果たすことが知られているが、CD40L過剰がどのような免疫異常を引き起こすのかについての詳細は不明である。この点を解明するために、我々はCD40LをB細胞で発現するCD40Lトランスジェニックマウスを樹立し、このマウスでSLE様の自己免疫疾患が自然発症することを示し(Higuchi et al. 2002)、CD40L過剰が自己免疫疾患発症に十分であることを明らかにした。さらに、このマウスを用いてCD40L過剰がどのような免疫異常を引き起こすのかの解明を行なっている。

CD40分子はTNF受容体ファミリーに属する分子で、B細胞の他に樹状細胞などの抗原提示細胞に発現する。一方、CD40L分子はTNFファミリーの分子で、活性化T細胞などに発現し、B細胞の生存を誘導することが知られている。CD40Lは、とりわけ、リンパ濾胞に局在して胚中心応答に関与する濾胞ヘルパーT細胞(TFH

細胞)が高レベルで発現する。

胚中心は、免疫応答の際に濾胞内で活発に増殖するB細胞が形成する構造である。胚中心では、免疫グロブリンの体細胞突然変異と高親和性抗体産生B細胞の選択的な生存がおり、その結果、高親和性抗体の産生がおこる。高親和性抗体を産生するようになったB細胞は、長寿命プラズマ細胞に分化して抗体産生をおこなったり、記憶B細胞に分化して免疫記憶を担うようになる。CD40およびCD40L分子は胚中心形成に必須である。これは、当初はTFH細胞が発現するCD40Lが胚中心B細胞の生存を誘導するものと想定された。しかし、我々が、CD40Lトランスジェニックマウスにおける胚中心反応を解析したところ、胚中心が早期に退縮するという予想外の結果が得られた(Kishi et al. J. Immunol. 2010)。さらに、記憶応答等の解析から、CD40L過剰により胚中心B細胞の分化が亢進して、プラズマ細胞や記憶B細胞が早期に産生され、胚中心反応が早期に終息することが強く示唆された。今回の我々の結果は、胚中心反応においてCD40LがB細胞の分化を誘導し、胚中心反応の終息を誘導することを示したものである(図1)。SLEなどの自己免疫疾患では、CD40Lの過剰発現が見られるが、これらの自己免疫疾患での抗体産生の過剰には、胚中心でのB細胞の分化亢進が関与する可能性が示唆される。

これまでに、我々をはじめ多くのグループがCD40を介するシグナルがB細胞の生存を誘導することをin vi

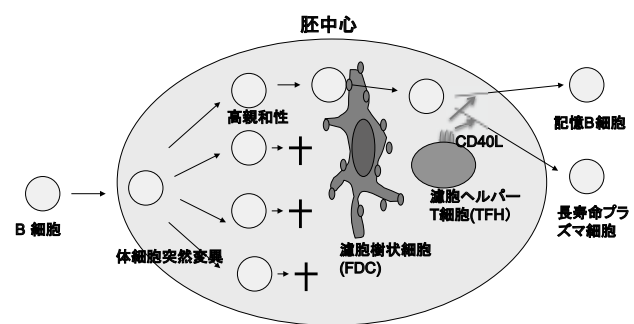


図1 胚中心反応とCD40L  
胚中心ではB細胞が増殖するとともに、抗体遺伝子の体細胞突然変異と、高親和性抗体産生B細胞の選択的な生存により、高親和性抗体を産生するB細胞が出現する。高親和性抗体産生B細胞は長寿命プラズマ細胞や記憶B細胞に分化し、胚中心から移動する。胚中心にはCD40Lを高レベルに発現する濾胞ヘルパーT細胞が存在するが、このCD40Lは胚中心B細胞の生存ではなく、分化を誘導する。

troの系で示している。胚中心B細胞ではCD40を介するシグナルは主に分化誘導に働くものの、SLEなどの自己免疫疾患ではCD40L過剰により自己反応性B細胞の除去が阻害され、自己抗体産生に関与することが想定される。この点を明らかにするために、我々は、すべてのB細胞が自己抗体を産生するような自己抗体がトランスジェニックマウスとCD40Lトランスジェニックマウスを交配し、CD40L過剰が自己反応性B細胞除去による自己トレランスを破綻させるかの解析を行なっている。

### 2. 記憶応答の際の迅速な抗体産生メカニズムの解明

記憶応答の際には免疫応答が早期におこり、病原微生物を速やかに排除する。これは、初回応答の際に抗原に反応して活性化したリンパ球の一部が記憶リンパ球となって体内で長期間生存し、再度同じ抗原に反応した際に迅速に活性化されるからである。したがって、記憶リンパ球の迅速な活性化はワクチンによる感染症防御で中心的な役割を果たす。しかしながら、記憶リンパ球がどのようなメカニズムで迅速に活性化するかについては不明である。

抗原と反応したことのナイーブB細胞は、膜型IgMとIgDを抗原受容体(BCR, B cell antigen receptor)として発現するが、一方、記憶B細胞は細胞表面に膜型IgGを抗原受容体として発現する。ナイーブB細胞でIgGを産生するようなIgGトランスジェニックマウスでは、抗体産生が顕著に増強していることが明らかとなっている。我々は独自にすべてのナイーブB細胞がIgGを産生するようなIgGトランスジェニックマウスを作成し、このマウスでは抗原刺激をしても全くBCRシグナル伝達がおこらないが、マウスに抗原で免疫すると多量の抗体を産生することを明らかにした(Man et al. PLoS one 2010)。このようなBCRシグナル伝達と抗体産生の乖離について検討し、抗原無刺激下でのBCRを介する低レベルシグナル伝達である緊張性シグナルが鍵を握ることを明らかにした。通常、緊張性シグナルはB細胞の生存を誘導するだけであるが、IgG-BCRはもともとシグナル伝達能が高いために緊張性シグナルだけでもB細胞活性化を誘導しているために、抗原刺激の際にさらにシグナル伝達を誘導することができない状態になっていることが示唆された。この知見から、我々はIgG-BCRが常に活性化シグナルを伝達した状態になっているために、IgG産生B細胞はT細胞ヘルプにより速やかに抗体産生をおこすという「アイドリング」モデルを提唱した。

### 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おこるか否かの決定や抗体産生の“早さ”の制御に関わることを明らかにしている。

CD22(シグレック2とも呼ばれる)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、CD72はC型レクチンファミリーに属する膜型レクチンであり、これらの分子はともに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とCD72は、もっぱらB細胞に発現する。これらのレクチン分子はともに、細胞表面でB細胞抗原受容体(B cell antigen receptor: BCR, 膜型免疫グロブリンとIg $\alpha$ /Ig $\beta$ 分子の複合体)と会合し、細胞内のITIM部分でチロシンフォスファターゼSHP-1を活性化することにより、BCR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B細胞を試験管内で培養して種々の刺激を加える実験から、CD22とCD72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ことを示し、抗体産生を制御する重要な分子であることを明らかにしてきた。

また、CD22は抗体応答のタイムコースを制御する(Onodera et al. 2008)。抗体応答のタイムコースは感染防御に重要である。そこで、我々は、岐阜大学木曾研究室と共同で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. 投稿中)。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

CD40 を介するシグナルが胚中心 B 細胞の分化を誘導する。

B 細胞は抗原に反応して抗体産生を行なうが、この際に活性化、増殖した B 細胞が胚中心と呼ばれる構造を形成する。胚中心 B 細胞では、免疫グロブリンの体細胞突然変異と高親和性抗体産生 B 細胞の選択的な生存がおこり、その結果、高親和性抗体の産生がおこる。さらに、高親和性抗体を産生するようになった B 細胞は長寿命プラズマ細胞または記憶 B 細胞となって、胚中心から移動する。CD40 および CD40L は胚中心形成に必須であり、また、胚中心には CD40L を高レベルに発現する濾胞ヘルパー T 細胞 (follicular T helper cell; TFH) が存在する。このように、CD40 を介するシグナルは胚中心反応で重要な役割を果たすと考えられるが、CD40 シグナルがどのように胚中心 B 細胞を制御するのかについての詳細は明らかではない。

そこで、我々は、CD40L を B 細胞で発現することにより、構成的に B 細胞で CD40 シグナルが活性化されている CD40L トランスジェニックマウスを作成し、このマウスにおける胚中心反応の解析を行なった。これまで、CD40 シグナルは B 細胞の生存を誘導することから、CD40 シグナルは胚中心での B 細胞の生存に関わるのではないかと考えられていた。しかし、CD40L トランスジェニックマウスでは、このような予想に反し、胚中心の形成が不良であることが明らかとなった。CD40L トランスジェニックマウスを免疫すると免疫後 5 日目までは野生型マウスと同様の小さな胚中心を形成した。野生型マウスではその後、胚中

心が顕著に増大するが、CD40L トランスジェニックマウスでは、5 日目をピークとして胚中心が退縮した。一方、胚中心反応では、高親和性の抗体産生や、記憶 B 細胞および長寿命プラズマ細胞の産生がおこるが、これらの反応は CD40L トランスジェニックマウスでもほぼ正常におこっており、とりわけプラズマ細胞への分化が効率よくおこっていた。したがって、CD40L の過剰により、胚中心 B 細胞の分化、とりわけプラズマ細胞への分化が亢進し、胚中心 B 細胞が分化して胚中心外へと移動するために早期に胚中心が退縮することが強く示唆された。これらの結果は、胚中心における CD40L が胚中心 B 細胞の生存シグナルではなく分化シグナルとして機能することを示している。

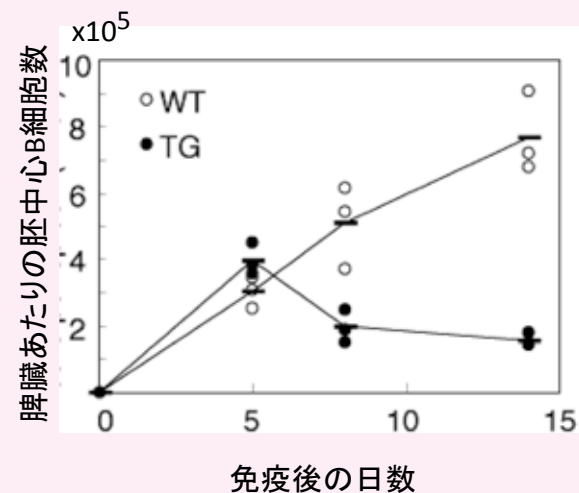


図2 CD40L トランスジェニックマウスにおける胚中心の早期退縮  
野生型マウス (WT) および CD40L トランスジェニックマウス (TG) を免疫後、フローサイトメトリーで胚中心 B 細胞数を測定した。

## 人事異動

転入：高嶋航 (博士前期課程)、砂永翠 (博士前期課程)、唐森 (10 月～博士前期課程)、杉原潤 (10 月～プロジェクト・セメスター)、石倉圭人 (10 月～卒業研究生)

転出：築地信 (MT T 特任講師)、高路 (博士後期課程)、Savannah Gore (博士前期課程)、坂巻靖郎 (博士前期課程)、高久千秋 (博士前期課程)、田中麻衣 (博士前期課程)、本井祐二 (技術補佐員)、林崎浩史 (技術補佐員)、中谷真子 (技術補佐員)、新家純子 (事務補佐員)

## 業績目録

### 原著論文

- Man, R.-Y., Onodera, T., Komatsu, E. and Tsubata, T. (2010) : Augmented B Lymphocyte Response to Antigen in the Absence of Antigen-induced B Lymphocyte Signaling in an IgG-transgenic Mouse Line. *PLoS One* 5: 8815.
- Ishiura, N., Nakashima, H., Watanabe, R., Kuwano, Y., Adachi, T., Takahashi, Y., Tsubata, T., Okochi, H., Tamaki, K., Tedder, T. F. and Fujimoto M. (2010) : Differential phosphorylation of functional tyrosines in CD19 modulates B lymphocyte activation. *Eur. J. Immunol.* 40: 1192-1204.
- Kishi, Y., Aiba, Y., Higuchi, T., Furukawa, K., Tokuhisa, T., Takemori, T. and Tsubata, T. (2010) : Augmented antibody response with premature germinal center regression in CD40L-transgenic mice. *J. Immunol.* 185: 211-219.
- Bolduc, A., Long, E., Stapler, D., Cascalho, M., Tsubata, T., Koni, P. A. and Shimoda, M. (2010) : Constitutive CD40L expression on B cells prematurely terminates germinal center response and leads to augmented plasma cell production in T cell areas. *J. Immunol.* 185: 220-230.

### 総説

- 鏗田武志 : IgG-BCR による B 細胞アイトリンゲ 臨床免疫・アレルギー科 2010 年 7 月号 科学評論社 54 : 9 - 13, 2010

### 国際学会

#### 招待講演

- Tsubata, T.: Control of infectious diseases by functional modulation of B lymphocytes. The 8th German-Japanese Immunology Symposium "Regulation of Immune Response and Disease", 26-29 September, 2010, Cuxhaven, Germany.
- Tsubata, T.: Apoptotic deletion of self-reactive B cells in the splenic marginal zone. The Gwen Knapp Symposium "the Antigen Targets of Autoimmune Disease", The University of Chicago, 8-9 October, 2010, Chicago, USA.
- Tsubata, T.: Control of Infectious Diseases by Functional Modulation of B Lymphocyte Lectins. The 28th Naito Conference on "Glycan Expression and Regulation [I]: Functions and Disease Mechanisms", 27-30 July, 2010, Kanagawa.

#### ワークショップ

- Kishi, Y., Higuchi, T., Sakamaki, Y., Tsubata, T.: Overexpression of CD40L (CD154) breaks down self-tolerance in spleen in autoantibody-transgenic mice. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology, 22-27 August, 2010, Kobe.

### その他

- Abdu-Allah, H. H. M., Ishida, H., Tsubata, T., Kelm, S., Paulson, J. C., Ando, H., Kiso, M.: Design and Synthesis of Novel Sialosides as potent and selective CD22-Inhibitors. Sialoglyco Meeting 2010, 21-26 August, 2010, Potsdam, Germany.
- Man, R.-Y., Onodera, T., Komatsu, E., Tsubata, T.: Augmented B Lymphocyte Response to Antigen in the Absence of Antigen-Induced B lymphocyte Signaling in an IgG-Transgenic Mouse Line. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology, 22-27 August, 2010, Kobe.
- Tanaka, M., Imai, N., Tsubata, T., Tsuiji, M.: The immune responses during the primary phase against capsular polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae*. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology, 22-27 August, 2010, Kobe.
- Hou, R., Sato, A., Lin, Q., Ohtsui, M., Adachi, T., Hirose, S., Tsubata, T.: Effect of CD72c allele on SLE susceptibility. 14<sup>th</sup> International Congress of Immunology, 22-27 August, 2010, Kobe.
- Tsuiji, M., Tanaka, M., Imai, N., Hayashizaki, K., Tsubata, T.: The Immune Response against Capsular Polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae*. The 28th Naito Conference on "Glycan Expression and Regulation [I]: Functions and Disease Mechanisms", 27-30 July, 2010, Kanagawa.

### 国内学会

#### 招待講演

- 鏗田武志「免疫グロブリンクラス特異的 B 細胞抗原受容体シグナル」、第 9 回細胞死研究会、平成 22 年 1 月 18 日 - 19 日、京都
- 鏗田武志「膜型レクチン分子とその糖鎖リガンドによる獲得免疫応答の制御」、CREST「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」公開シンポジウム、独立行政法人科学技術振興機構、平成 22 年 1 月 20 日、東京

### その他

#### 国際招待セミナー

- Tsubata, T.: Excess CD40L and autoimmunity. Immunotherapy Center, Medical College of Georgia, 6 October 2010, Augusta, USA.
- Tsubata, T.: Apoptotic deletion of marginal zone B cells: a novel tolerance mechanism of pathogenic self-reactive B cells. Deutsches Rheuma-Forschungszentrum Berlin (DRFZ), 4 October 2010, Berlin, Germany.

#### その他の講演会

- Tsubata, T.: Membrane-bound lectins and humoral immunity. International Summer Program 2010 "Infection and Immunity", Tokyo Medical and Dental University, 5-8 September, 2010, Tokyo.
- 鏗田武志「なぜヒトは免疫疾患に悩むのか？」学際生命科学東京コンソーシアム・市民講演会、平成 22 年 4 月 10 日、東京
- 鏗田武志「新たなコンセプトによる感染防御薬の開発」独立行政法人科学技術振興機構 (JST) 新技術説明会・ライフサイエンス、平成 22 年 1 月 29 日、東京

#### 主催セミナー

- 河崎徳人 (スクリプス研究所)「CD22 as a negative regulator of TLRs in B cells」平成 22 年 8 月 5 日
- Michael Reth (Molecular Immunology, the

Centre for biological signalling studies, Faculty of Biology, University Freiburg & MPI for Immunobiology) : Autoinhibition: a universal mechanism to regulate signalling from the B cell antigen receptor, 20 August, 2010.

- 竹松弘 (京都大学生命科学研究科)「Quantitative transcriptomic profiling of biosynthetic pathway of CD77, a marker for human germinal center B cells」平成 23 年 1 月 17 日
- Gang Liu (Institute of Materia Medica, CAMS & PUMC) : The efforts on the discovery and optimization of new chemical reagents that inhibit non-replicating *Mycobacterium tuberculosis*. 27 January, 2011.

### 競争的研究費取得

- 鏗田武志 : 独) 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」(代表)
- 鏗田武志 : 財) 武田科学振興財団 2010 年度生命科学助成「特異抗体産生早期化技術を用いた新規感染防御法の開発」(代表)
- 鏗田武志 : 財) 先進医薬振興研究財団 血液医学研究助成金「制御性 B 細胞亜集団 B10 細胞を標的とした自己免疫疾患治療法の開発」(代表)
- 安達貴弘 : 科学研究費補助金 (基盤研究 (C))「記憶 B 細胞の迅速で強い抗体生機機構の解明」(代表)



# 難治疾患研究所 分子病態分野 疾患生命科学研究所 ゲノム多様性研究室

## 研究内容

### 概 略

ヒト疾患の病因および病態形成には多かれ少なかれ遺伝学的な要因、すなわちヒトゲノムの変異ないし多型に象徴されるゲノム機能の多様性が関与する。疾患の発症がほぼ遺伝的要因のみで規定されるものが単因子病（いわゆる遺伝病）であるが、より一般的な疾患においても環境要因と遺伝的要因の両者が関与することから、このような疾患を多因子病と呼ぶ。分子病態分野では、単因子病、多因子病を問わず、病因が不明ないし病因は判明しても病態形成機構が解明されていないために、有効な診断、治療、予防法が確立されていない疾患、すなわち難病に焦点をあて、それぞれの病因や病態形成に関わるゲノム多様性の同定とその機能的意義の解明を目指している。さらに、このような知見に立脚して、難病の新たな診断法や治療法の開発にも取り組んでいる。現時点での主な対象疾患は、特発性心筋症、心筋梗塞、不整脈、パージャラー病、慢性血栓塞栓性肺高血圧症などの心血管系疾患と、HIV/AIDS、自己免疫疾患などを含むウイルス・免疫系疾患である。

## 研究紹介

### 1. 特発心筋症の病因究明

原因不明の心筋疾患と定義されていた特発性心筋症は、最近の研究でその病因が遺伝子変異にあることが解明され (Kimura, J Hum Genet, 55:81,2010)、変異を有する患者集団の長期フォローアップ経過から遺伝子解析の有用性を示した (Choi et al., Clin Cardiol, 33:430,2010, Hitomi et al., J Cardiol, 56:189,2010)。また、Nebulette 変異が拡張型心筋症 (Purejav et al., J Am Coll Cardiol, 56:1493,2010) の病因となることを解明した。一方、ラミン変異マウスにカルシウム増感剤を投与することで、遺伝性拡張型心筋症の発症遅延が可能であることを示した (Arimura et al., J Am Coll Cardiol, 55:1503,2010)。これとは別に、ミオシンフォスファターゼの小サブユニット M21 が ROCK の活性化を通じて M110 のリン酸化を制御することを解明した (Shichi et al., J Biol Chem, 285:33680,2010)。

### 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種々の候補遺伝子多型の解析を行っている。昨年までに実施した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ている。一方、動脈硬化の初期段階には活性化マクロファージにおける炎症性サイトカインの発現亢進が関与するが、動脈硬化の治療薬として用いられる AT1R 阻害剤 Losartan による炎症性サイトカインの発現亢進抑制には PPAR $\gamma$  の活性化が関わることを示した (An et al., Hypertension Res, 33:831,2010)。これとは別に、慢性血栓塞栓性肺高血圧症の危険因子としてフィブリノーゲン $\alpha$  多型を同定し、これがマイクロ RNA (miR-759) による発現制御のターゲットであることを証明した (Chen et al., Hum Genet, 128:443,2010)。

### 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、拡張型心筋症の原因である ZASP 遺伝子変異は、心筋 Na チャネルの機能変化を介して不整脈の発症にも関わることを示した (Li et al., Circulation Arrhythm Electrophysiol, 3:646,2010)。一方、NOT3 が心筋の形態、収縮機能および電気生理学的機能に重要であることを解明した (Neely et al., Cell, 141:142,2010)。

### 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。本年の解析により、グレープス病の感受性には、HLA-A および HLA-DP 領域の遺伝子と CTLA4 遺伝子の協調作用が関与することを明らかにした (Takahashi et al., J Hum Genet, 55:323,2010)。また、若年関節リウマチに合併する脈絡膜炎の感受性が HLA-A\*02 と DRB1\*0901 によって制御される

ことを見出した (Yanagimachi et al., J Hum Genet, 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、ミャンマー由来のアカゲザル集団を対象とした Mamu-A および Mamu-B 遺伝子の解析を行い、多数の新規アレルの発見を含め、ミャンマーにおけるアカゲザルの MHC 多様性を明らかにした (Naruse et al., Immunogenetics, 62:601,2010)。一方、糖鎖付加変異 SIV 生ワクチンを用いることで、MHC に依存しない有効な SIV 感染抵抗性が得られることを明らかにした (Sugimoto et al., PLoS ONE, 5:e11678,2010)。

### 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。昨年度までの比較ゲノム解析によって、免疫関連遺伝子群のうち、免疫グロブリン (Ig) ドメインを有する遺伝子群 (Ig スーパーファミリー、IgSF) には正の選択圧が働いていることを明らかにした。そこで本年は、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。その結果、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, 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が関わっているが、そのような宿主因子については不明な点が残されている。我々は進化医科学的手法によって HIV 感受性遺伝子を特定する試みを行っているが、昨年度までの解析で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 遺伝子を対象とした検討を行った。タイの HIV-1 感染コホートについての解析で、TIM1 遺伝子の D3-A ハプロタイプが HIV-1 感染後の生存予後が有意に良好であることを見

出した。また、D3-A ハプロタイプは TIM1 遺伝子発現が有意に低いことを明らかにした (Wichukchinda, Nakajima et al., AIDS, 24:1625,2010)。一方、APOBEC3B 多型は日本人集団、インド人集団とも HIV/AIDS との関連を認めなかった (Itaya et al., J Infect Dis, 202:815,2010)。

### ハイライト (顕著な業績)

1) カルシウム増感剤による拡張型心筋症の発症予防 (Arimura et al., J Am Coll Cardiol 55(14) : 1503-1505, 2010.)

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、それらの原因遺伝子のいずれに変異があっても DCM となることから、病因ないし病態形成において共通する機能異常が存在すると考えられる。我々は従来の研究から、心筋収縮のカルシウム (Ca) 感受性低下が DCM の病因・病態形成に関与するとの仮説を提唱しているが、その仮説を検証する目的で、ラミン A/C 遺伝子変異によって DCM を来すモデルマウス (ラミン変異マウス) を用いて、これに DCM 発症前から Ca 増感剤を投与することで発症予防が可能かどうかを検討した。その結果、2 カ月齢からの継続的な Ca 増感剤 (SCH00013) の投与によってラミン変異マウスの生存曲線は雄マウス、雌マウスとも有意に延長した (図 1)。

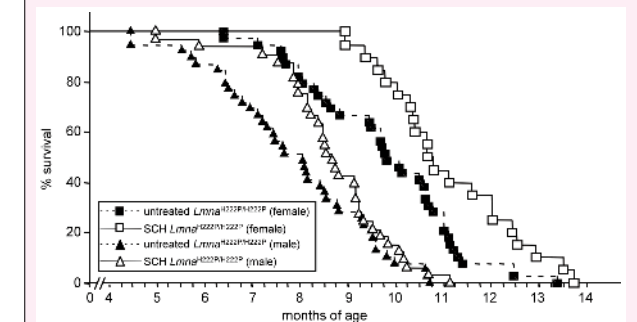


図 1 Ca 増感剤投与による DCM マウスの生存延長

また、8 カ月齢における心筋組織の病理像を検討したところ、Ca 増感剤投与群では心筋細胞脱落抑制、線維化抑制が認められ、病理学的にも DCM 発症予防が証明された (研究所ハイライト参照)。さらに、心筋リモデリング関連遺伝子の発現性を検討したところ、Ca 増感剤投与群ではリモデリング遺伝子の発現異常が是正されていた (図 2)。以上より、Ca 増感剤投与による遺伝性 DCM の発症予防が可能であること



が明らかになった。

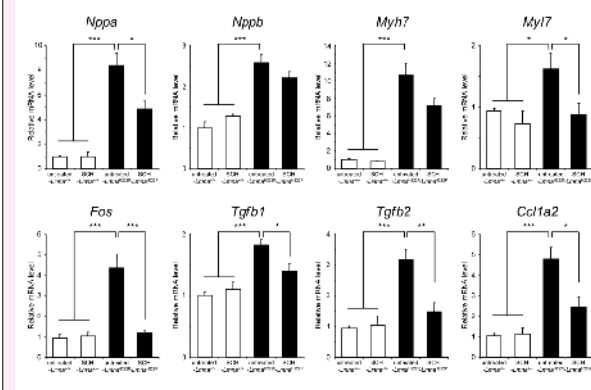


図2 Ca増感剤投与による心筋リモデリング抑制

2) TIM1 多型と HIV/AIDS 感受性 (Wichukchinda, Nakajima et al., AIDS 24(11) : 1625-1631, 2010.)

ウイルスの塩基配列比較によって、HIV の祖先は旧世界ザルの SIVmac がチンパンジーに感染して変異した SIVcpz であると推定されている。一方、旧世界ザルは一般に SIVmac 感染に抵抗性であり、チンパンジーは SIVcpz に感染するが一般に AIDS 発症には抵抗性であることが知られている。これらに着目し、霊長類比較ゲノム解析から、進化速度が速く、かつチンパンジーではヒトに比較してゲノム多様性が乏しいことが知られている TIM1 遺伝子の多型と HIV/AIDS との関連を検討した。タイでの HIV 感染コホートを対象とした研究により、TIM1 お D3-A ハプロタイプを有する感染者は AIDS 発症が有意に遅く、また生存予後も有意に良いことが判明した (図3)。

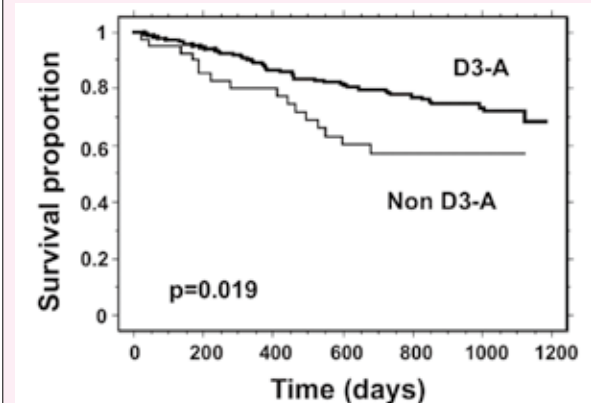


図3 TIM1 遺伝子 D3-A 型は生存予後が良好である

一方、B リンパ芽球様細胞株を用いて、TIM1 遺伝子のゲノム多様性と遺伝子発現性との関連を検討したところ、発現性と関連すると報告されているプロモーター多型 (rs7702919 および rs41297577) はいずれも発現性とは関連しなかった。一方、D3-A 型を有する細胞では D3-A 型の細胞に比べて TIM1 発現性が有意に低かった (図4)。TIM1 は Th1/Th2 バランスを Th2 型優位に誘導することが知られているため、Th1/Th2 バランスが Th1 型優位になることが AIDS

発症抵抗性に関わると推定された。

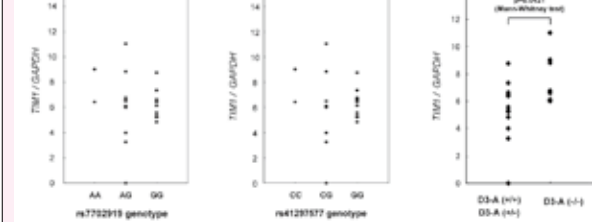


図4 TIM1 遺伝子 D3-A 型は発現性が低い

3) M21 による PP1M のリン酸化制御 (Shichi et al., J Biol Chem 285(44) : 33680-33690, 2010.)

心筋に特異的に発現する M21 はミオシン軽鎖フォスファターゼ (PP1M) のスモールサブユニットであり、M21A および M21B の2種類のアイソフォームがあるが、ラージサブユニットである M110/M130 のリン酸化を制御することで、PP1M の活性を抑制し、その結果として心筋の Ca 感受性を亢進することが知られている。そこで、M21 による M110/M130 のリン酸化制御を検討したところ、M21A は M110 に強く、M21B は M130 に弱く結合した。また、M21A は M110 の 696Thr のリン酸化を亢進するが、852 位に結合することで 853Thr のリン酸化を抑制した (図5)。

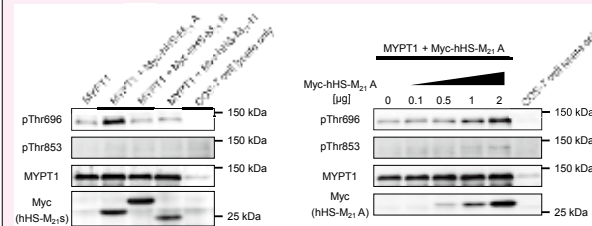


図5 M21 は M110 の 696Thr のリン酸化を亢進する

また、696Thr のリン酸化は ROCK 阻害剤で抑制されることから検討したところ、M21 は ROCK と結合することが判明した (図6)。

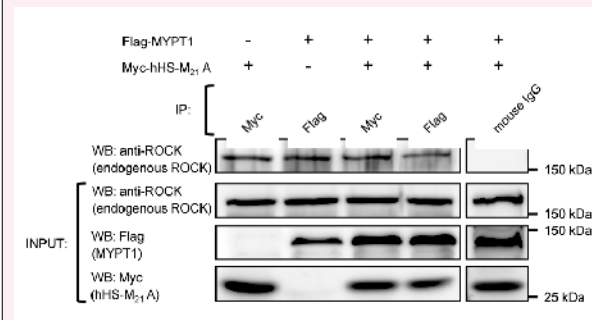


図6 M21 は内因性 ROCK と共沈する

さらに、M21 は ROCK を活性化し、細胞内で ERM のリン酸化をも亢進した。以上のことから、M21 は ROCK の活性化を介して、PP1M の M110 サブユニットのみならず、他の基質のリン酸化も亢進すると考えられた。

## 人事異動

転入：2010年3月に志知大輔が学位(博士)を取得の上、大学院を修了した。2010年4月より、金澤知徳、田中優が修士課程学生として研究に参加した。また、医歯学総合研究科の他講座所属学生である高橋茉莉香(歯系・歯周病科)、小泉伸也(医系・血管外科)が研究に参加している。

## 業績目録

### 原著論文

- Matuda S, Arimura T, Kimura A, Takekura H, Ohta S, Nakano K. A novel protein found in the I bands of myofibrils is produced by alternative splicing of the DLST gene. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1800(1): 31-39.
- Kimura A. Molecular basis of hereditary cardiomyopathy: abnormalities in calcium sensitivity, stretch response, stress response and beyond. *J Hum Genet*. 2010; 55(2): 81-90.
- Arimura T, Sato R, Machida N, Bando H, Zhang DY, Morimoto S, Tanaka R, Yamane Y, Bonne G, Kimura A. Improvement of left ventricular dysfunction and of survival prognosis of dilated cardiomyopathy by administration of calcium sensitizer SCH00013 in a mouse model. *J Am Coll Cardiol*. 2010; 55(14): 1503-1505.
- #Neely1 GG, #Kuba K, #Cammarato A, Isobe K, Amann S, Zhang L, Murata M, Elmen L, Gupta V, Arora S, Sarangi R, Dan D, Fujisawa S, Usami T, Xia CP, Keene AC, Alayari NA, Yamakawa H, Elling U, Berger C, Novatchkova M, Kogelgruber R, Fukuda K, Nishina H, Isobe M, Pospisilik JA, Imai Y, Pfeufer A, Hicks A, Pramstaller PP, Subramaniam S, Kimura A, Ocorr K, Bodmer R, Penninger JM. A global in vivo Drosophila RNAi screen identifies NOT3 as a conserved regulator of heart function. *Cell*. 2010; 141(1): 142-153. (#, equal contribution)
- Takahashi M, Kimura A. HLA and CTLA4 polymorphisms may confer a synergistic risk in the susceptibility to Graves' disease. *J Hum Genet*. 2010; 55(5): 323-326.
- #Wichukchinda N, #Nakajima T, Saipradit N, Nakayama EE, Ohtani H, Rojanawiwat A, Pathipvanich P, Ariyoshi K, Sawanpanyalert P, Shioda T, Kimura A. TIM1 haplotype may control the disease progression to AIDS in a HIV-1-infected female cohort in Thailand. *AIDS*. 2010; 24(11): 1625-1631. (#, equal contribution)
- Itaya S, Nakajima T, Kaur G, Terunuma H, Ohtani H, Mehra N, Kimura A. No evidence of an association between the APOBEC3B deletion polymorphism and susceptibility to HIV infection and AIDS in Japanese and Indian populations. *J Infect Dis*. 2010; 202(5): 815-816.
- An J, Nakajima T, Kuba K, Kimura A. Losartan inhibits LPS-induced inflammatory signaling by PPAR-gamma-dependent mechanism in human THP-1 macrophage. *Hypertension Res*. 2010; 33(8): 831-835.
- #Choi JO, #You CW, Nah JC, Park JR, Lee BS, Choi BY, Cho BY, Lee SC, Park SW, Kimura A, Park JE. Long-term outcome of four Korean families with hypertrophic cardiomyopathy caused by four different mutations. *Clin Cardiol*. 2010; 33(7): 430-438. (#, equal contribution)
- Hitomi N, Kubo T, Kitaoka H, Hirota T, Hamada T, Hoshikawa E, Hayato K, Okawa M, Kimura A, Doi YL. A frameshift deletion mutation in the cardiac myosin-binding protein C gene was associated with dilated phase of hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardio-

myopathy. *J Cardiol*. 2010; 56(2): 189-196.

- Naruse TK, Chen Z, Yanagida R, Yamashita T, Saito Y, Mori K, Akari H, Yasutomi Y, Miyazawa M, Matano T, Kimura A. Diversity of MHC class I genes in Burmese-origin rhesus macaque. *Immunogenetics*. 2010; 62(9): 601-611.
- Sugimoto C, Watanabe S, Naruse T, Kajiwara E, Shiino T, Umamo N, Ueda K, Sato H, Ohgimoto S, Hirsh V, Villinger F, Ansari AA, Kimura A, Miyazawa M, Suzuki Y, Yamamoto N, Nagai Y, Mori K. Protection of macaques with diverse MHC genotypes against a heterologous SIV by vaccination with a deglycosylated live-attenuated SIV. *PLoS ONE*. 2010; 5(7): e11678.
- Chen Z, Nakajima T, Tanabe N, Hinohara K, Sakao S, Kasahara Y, Tatsumi K, Inoue Y, Kimura A. Susceptibility to chronic thromboembolic pulmonary hypertension may be conferred by miR-759 via its targeted interaction with polymorphic fibrinogen alpha gene. *Hum Genet*. 2010; 128(4): 443-452.
- Purevjav E, Varela J, Morgado M, Kearney DL, Li H, Taylor MD, Arimura T, Moncman CL, McKenna W, Labeit S, Vatta M, Bowles NE, Kimura A, Boriek AM, Towbin JA. Nebulette mutations are associated with dilated cardiomyopathy and endocardial fibroelastosis. *J Am Coll Cardiol*. 2010; 56(18): 1493-1502.
- Shichi D, Arimura T, Ishikawa T, Kimura A. Heart-specific small subunit of myosin light chain phosphatase activates Rho-associated kinase and regulates phosphorylation of myosin phosphatase target subunit 1. *J Biol Chem*. 2010; 285(44): 33680-33690.
- Li Z, Ai T, Samani K, Xi Y, Tzeng HP, Xie M, Taylor MD, Wu S, Ge S, Dong JW, Cheng J, Ackerman MJ, Kimura A, Sinagra G, Brunelli L, Faulkner G, Vatta M. A ZASP missense mutation, S196L, leads to cytoskeletal and electrical abnormalities in a mouse model of cardiomyopathy. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2010; 3(6): 646-656.
- 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*. In Press (doi:10.1038/jhg.2010.159)
- Ohtani H, Nakajima T, Akari H, Ishida T, Kimura A. Molecular evolution of immunoglobulin superfamily genes in primates. *Immunogenetics*. In Press

### 総説及び著書

- Nakajima T, Kimura A. Comparative genomics: insight into human health and disease. In *The HLA Complex in Biology and Medicine: a resource book*. (Mehra N, ed), pp566-588. Jaypee Brothers Med. Publishers, New Delhi, 2010.
- Kimura A. Cardiomyopathy, sarcomeropathy and Z-diskopathy. In *Genes and Cardiovascular Function* (Dhalla NS, Nagano M, Ostadal B, eds.), Springer, New York, In Press

### 国内学会発表

- Kimura A. Plenary session Cardiomyopathy UP to DATE. Molecular basis of cardiomyopathies: recent advances. The 74th annual scientific meeting of the Japanese Circulation Society, March 6, 2010, Kyoto.

### 国際学会発表

- Kimura A. Molecular etiology of idiopathic cardiomyopathy. XXth World Congress of the International Society for Heart Research 2010 Kyoto, Kyoto, Japan, May 14, 2010.

### 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(医療倫理観実践論)、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)、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

- 木村彰方(代表)：東京医科歯科大学フォローアップ経費、日韓共同研究事業継続経費
- 木村彰方(代表)：科学研究費補助金・基盤研究(B)、心筋症の分子病態解明に立脚した心不全治療戦略の開発
- 木村彰方(代表)：科学研究費補助金・挑戦的萌芽研究、タンパク輸送に着目した心筋疾患治療戦略の開発
- 木村彰方(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
- 木村彰方(代表)：日本学術振興会二国間交流事業(日仏共同研究)、特発性心筋症の病態形成機構の解明と治療戦略の開発
- 木村彰方(代表)：日本学術振興会二国間交流事業(日印共同研究)、進化医学的手法を用いた HIV/AIDS 関連遺伝子の同定と治療・予防戦略の開発
- 木村彰方(分担)：厚生労働科学研究費・創薬基盤推進研究事業、宿主ゲノム多様性に対応する抗原発現ベクターを用いた治療エイズワクチン開発
- 木村彰方(分担)：厚生労働科学研究費・創薬基盤推進研究事業、多様なエイズウイルス株の感染を制御する宿主応答の同定
- 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
- 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
- 木村彰方(代表)：生存科学研究費委託事業、特発性心筋症の病因と病態形成機構に関する研究
- 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



# 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

## 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。

## 2008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、市川 紗弓
- B. 軟骨再生の臨床研究に関する研究  
清水則夫、渡邊 健、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  
平澤 都、杉山俊平
- D. ポイントオブケア核酸増幅装置の開発  
清水則夫、渡邊 健

## 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/ $\gamma_c^{null}$ ) 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

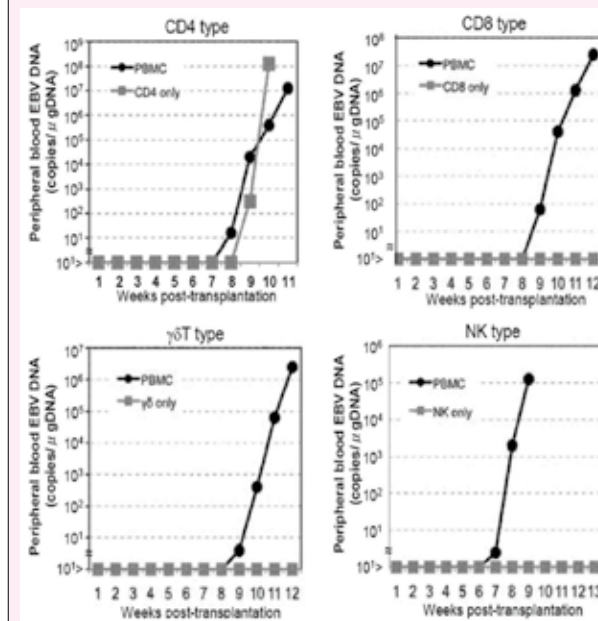
ブによる検証・メルティング解析法を組み合わせた独自のシステムを開発・実用化した。本学医学部付属病院に検査系を公開し年間の1453検体の微生物検査を実施した。

### D. ポイントオブケア核酸増幅装置の開発

ソニー株式会社との共同研究によりポータブル核酸増幅装置を開発し、インフルエンザウイルス検出による性能実証実験を行っている。

## 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

1. Sugita S et al. Diagnosis of bacterial endophthalmitis by broad-range quantitative PCR. *Br J Haematol.* Jul 31, 2010 [Epub ahead of print].
2. Nagasawa M et al. Serum granulysin as a possible biomarker of NK cell neoplasm. *Br J Haematol.* 148(5): 812-814, 2010.
3. Zhang Y et al. Aberrant expression of NK cell receptors in Epstein-Barr virus-positive gammadelta T-cell lymphoproliferative disorders. *Hematology.* 15(1): 43-47, 2010.
4. Kariya Y et al. Dominant-negative derivative of EBNA1 represses EBNA1-mediated transforming gene expression of Epstein-Barr virus infection independent of rapid loss of viral genome. *Cancer Sci.* 101(4): 876-881, 2010.
5. Iwata S et al. Quantitative Analysis of Epstein-Barr Virus (EBV)-Related Gene Expression in Patients with Chronic Active EBV Infection. *J Gen Virol.* 91(Pt1): 42-50, 2010.
6. Yamanaka Y et al. Aberrant overexpression of microRNAs activate AKT signaling via down-regulation of tumor suppressors in natural killer-cell lymphoma/leukemia. *Blood.* 114(15): 3265-3275, 2010.
7. Miyagawa Y et al. Ex vivo expanded cord blood CD4 T lymphocytes exhibit a distinct expression profile of cytokine-related genes from those of peripheral blood origin. *Immunology.* 128(3): 405-419, 2010.
8. Chan KK et al. Interleukin-2 induces NF-kappaB activation through BCL10 and affects its subcellular localization in natural killer lymphoma cells. *J Pathol.* 221(2): 164-74, 2010.

### 国内学会発表

1. 小川 学 他7名 ヘルペスウイルスの関与が疑われるぶどう膜炎に対する眼内液PCR検査の有用性の検討 第114回日本眼科学会 4月15日 名古屋
2. 小川 学 他5名 PCR法を用いたアcant・アメラ角膜炎の補助診断 第21回臨床寄生虫学会 6月19日 東京
3. 今留謙一 他8名 EBウイルス関連血球貪食症候群モデルマウスの作製と解析 第58回日本ウイルス学会学術集会 11月7日 徳島
4. 今留謙一 他8名 EBウイルス関連T/NKリンパ増殖性疾患モデルマウスの作製と解析 第7回EBウイルス研究会 7月9日 札幌
5. 今留謙一 他11名 EBウイルス関連T/NKリンパ増殖性疾患モデルマウスの政策と病態発現解析 第20回EBウイルス感染症研究会、3月6日 東京
6. 満生紀子 他11名 当科で施行した造血幹細胞移植患者における網羅的PCR法による経時的ウイルス検査 第32回日本造血細胞移植学会総会、2月19日 浜松

### 国際学会発表

1. Ogawa M et al. Use of Human Herpes Virus (HHV) PCR Assays to Detect Viral DNA in Ocular Fluids of Patients with Herpetic Eye Diseases. ARVO 2010, Fort Lauderdale, Florida.
2. Imadome K et al. A xenotransplant model of chronic active EB virus infection by use of NOG mice. The 14<sup>th</sup> Biennial Conference of the International Association for Research on Epstein-Barr Virus & Associated Diseases, Sept 2010, Birmingham, UK.

## 研究助成金

### 分担(清水則夫)

1. 厚生労働科学研究費補助金 政策創薬総合研究事業 創薬総合研究(主任研究者 藤原成悦)「臍帯血DLIの実用化と細胞治療製剤の医薬品化へ向けてのトランスレションリサーチ」
2. 厚生労働科学研究費補助金 ヒトゲノム・再生医療等研究事業(主任研究者 中畑龍俊)「サイトカインによる増幅培養臍帯血による臍帯血移植の臨床試験」
3. 厚生労働科学研究費補助金 創薬基盤推進研究事業・生物資源研究(主任研究者 増井徹)「細胞研究資源の資源化ならびに品質評価法・特性解析開発に関する研究」
4. 厚生労働科学研究費補助金 難治疾患克服事業(主任研究者 藤原成悦)「慢性活動性EBウイルス感染症の実態解明と診断法確立に関する研究」
5. 厚生労働省成育医療研究委託費(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」
6. 厚生労働科学研究費補助金 再生医療実用化研究事業(主任研究者 森尾友宏)「再生医療・細胞治療製剤の汎用可能な新規微量高感度品質管理・安全性検証システムの開発と製剤の規格化に関する研究」

### 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】

癌のゲノム・エピゲノム解析により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。

1. 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。
2. 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ている。

### 【遺伝生化学】

1. ストレス応答転写レプレッサー ATF3 のシステムバイオロジーを用いた p53-ATF3 経路の遺伝制御の網羅的解析から、Death receptor 5 が ATF3 の標的遺伝子であることを見出した。TRAIL-base のがん治療への新しい知見を得た。
2. 転写伸長因子 Elongin A の Rpb1 E3 リガーゼ活性とストレス応答遺伝子誘導機能の Dual 機能を解析し、DNA damage 応答において遺伝子選択的制御に関わることを見出した。

### 【分子遺伝】

1. 乳がん原因遺伝子 BRCA2 に結合する新規分子の探索による DNA 損傷修復機構の解明を進めるとともに、BRCA2 の中心体、細胞質分裂に於ける新規機能を同定した。
2. DNA 損傷における細胞内シグナル伝達機構と細胞死誘導メカニズムについて、いくつかのキナーゼに焦点を当て機能解析を進め、p53、NF-kappaB に関わる新規シグナル制御機構を同定した。

### 【分子疫学】

1. CYP3A5 は内因性ステロイドの代謝を司る p450 系の酵素であるが、この遺伝子多型が塩分摂取量と交互作用を持って血圧と関連する事を見出した。
2. 慢性閉塞性肺疾患（COPD）は肺気腫と慢性気管支炎の両者が合併した症候群であるが、SERPINE2 遺伝子多型が肺気腫と関連することを示した。

### 【エピジェネティクス】

1. 哺乳類には Sushi-ichi レトロトランスポゾン由来の獲得遺伝子が 11 個存在している。これらの遺伝子には胎盤形成や哺乳行動など哺乳類特異的な機能があると予測し、ノックアウトマウスによる解析を行なっている。
2. ENU ミュータジェネシスにより精子形成不全マウスを作製し、原因遺伝子の同定とこのマウスの精原細胞におけるゲノムインプリンティングの解析を行った。
3. 体外受精や顕微授精といった生殖補助医療技術が、個体発生に与える影響を、マウスをモデルに解析している。

### 【形質発現】

1. SRPIN340 や TG003 などスプライシングパターンに影響を与える低分子化合物を見出し、これらがウイルス疾患や未熟児網膜症などの新規治療薬になり得ることを示した。
2. 蛍光タンパク質を利用して生細胞内でリン酸化反応を可視化する系を開発し、これまで解析されていなかった生体内における組織特異的・発生時期特異的なスプライシング制御機構を明らかにした。

### 【生命情報】

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

# 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

## 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「トランスレーショナルリサーチ」に多大な期待が寄せられている。私たちは、ゲノム構造変化、エピゲノム遺伝子制御機構、体系的遺伝子発現解析など統合的ゲノム解析研究を推進し、癌や遺伝疾患の原因遺伝子探索と病態の解明、さらにこれら難治疾患における画期的な診断、治療、予防法の開発を目指している。

## 研究紹介

特に疾患特異的ゲノム構造異常を標的にした疾患遺伝子の同定アプローチを体系化し、新規の癌や遺伝疾患の関連遺伝子を発見してきている。これらは癌個性診断のバイオマーカーとして、あるいは創薬の標的分子候補として注目されている。さらに、構想から6年の歳月を経て実用化した高精度・高密度のin-houseゲノムアレイを開発した。国際水準からも高精度のツールとしてMCG (Molecular Cytogeneticsの略) アレイの呼称で認知されている。これらMCGアレイプラットフォームで展開するゲノム、エピゲノム解析は癌と遺伝疾患の病態解明に威力を発揮している。また、先天異常症の潜在的染色体異常診断ツールとして開発したGenome Disorder Array (通称、GDアレイ) は2009年9月28日に富士フイルム株式会社より販売、ピーエムエル社で受託検査化されている。

### 1. 高精度ゲノムアレイの開発

独自にゲノムアレイシステムを開発した。その内訳は、①4523個のBACクローンを配置した全ゲノムをカバーする高密度アレイ、②染色体1p36の20Mbを間断なくカバーしたアレイ、③癌関連遺伝子800種類の解析を可能とする「がん個性診断」用アレイ、④X染色体を1003個のBACで埋め尽くした高密度アレイ、⑤既知遺伝疾患、染色体異常症の診断アレイ (GDアレイ)、⑥ヒト copy number variation (CNV) 検出アレイである。2006年度からは、独立行政法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) プロジェクト「個別化医療実現のための技術融合バイオ診断技術開発/染色体解析技

術開発」プロジェクトに採択され、①アレイデータ解析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全自動解析装置等の開発研究を進めている。本プロジェクトにより2009年度に⑦Cancer Array-800、⑧Whole Genome Array-15000が完成した。

### 2. 癌ゲノム構造異常の網羅的スクリーニング

#### 1) CGH データベースの構築

25種類の癌種のCGH解析データベースを構築し公開した。(CGH Data Base: <http://www.cgthmd.jp/cghdatabase/index.html>) さらに日本人100家系トリオ (父母子) のCGH解析を行いCNVデータベースを構築し“MCG CNV Data base”として公開した。



図1

#### 2) 癌のゲノム・エピゲノム解析

**食道扁平上皮がん (ESCC) I** : ESCC細胞株での11q22増幅に標的分子であるYes-associated protein (YAP) の機能を解析した。YAP高発現の患者群は、低発現患者群に比して有意に予後不良であり、YAP発現がESCCの独立した予後規定因子であることを明らかにした。一方、ESCC細胞株の増殖能がYAP発現依存的に制御されること、さらにはYAPの発現抑制によってG<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>期の細胞が蓄積し、p21の発現上昇とsurvivinの発現低下を生じることなどから、YAPがESCC関連がん遺伝子として機能し、ESCCの新たな治療標的分子となり得ることを示した (Muramatsu et al., Carcinogenesis, 2010)。

**食道扁平上皮がん (ESCC) II** : ESCC細胞株ならびに肺癌細胞株のホモ欠失領域から網羅的探索によって、これまでに新規がん抑制遺伝子protocadherin 17 (PCDH17) ならびに20 (PCDH20) を同定し、PCDHはcadherinのsubfamilyであり、その多くの機能は未だ不明である。現在、ESCCにおいて腫瘍特異的なDNAメチル化異常により発現抑制されるがん抑制遺伝

子としてPCDH17, 20とは別の数種類のPCDHファミリー遺伝子を同定し、詳細な解析を進めつつある。

**肝細胞がん (HCC)** : MeDIP-chip法による網羅的メチル化解析ならびに発現アレイによる網羅的発現解析を施行した。これらを統合し、1種類の既知がん抑制遺伝子と10種類の新規がん抑制遺伝子候補を選出し、さらにDNA過剰メチル化により発現抑制されている1種類のHCCがん抑制遺伝子候補を同定した。同候補遺伝子の臨床検体162例での免疫組織学的解析ではその発現低下が予後不良と関連し、多変量解析で独立した予後規定因子である。また、同候補遺伝子の安定発現株は*in vitro*ならびに*in vivo*共に細胞増殖を抑制することから、HCCの発癌・進展過程に深く関与することが示唆された (投稿中)。

**子宮体がん (EC)** : ECにおける新規治療体系の構築に寄与する新規がん抑制遺伝子型miRNA (TS-miRNA) の同定を目的に、327種類のmiRNA配列を搭載する合成2本鎖RNAライブラリーを用いてEC細胞株での細胞増殖抑制効果を指標とした機能的スクリーニングを行い、103種類の候補miRNAを選出した。さらに、DNAメチル化解析と発現解析を組み合わせた絞り込みによって、ECでDNA過剰メチル化により発現抑制を受ける1種類の新規がん抑制遺伝子型miRNAを同定するとともに、3種類の新規標的分子を明らかにした (投稿中)。

**口腔がん (OSCC) I** : OSCCの新規TS-miRNAの同定を目的に、OSCC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施行し、OSCCでDNA過剰メチル化により発現抑制を受ける2種類の新規TS-miRNAを同定した。さらにその新規標的分子を同定するとともに、詳細な分子機序を明らかにした (投稿中)。

**口腔がん (OSCC) II** : OSCCにおいて、CpG island近傍に座位する51種類のmiRNA (42 CpG island) について、CpG islandのDNAメチル化解析を行った。さらに、発現解析を組み合わせた絞り込みによって、細胞株ならびに臨床検体においてDNA過剰メチル化と発現抑制が高頻度に一致する1種類の新規TS-miRNAを同定し、その標的分子を含めた分子機序の解析を進めている。

**口腔がん (OSCC) III** : 上皮-間葉転換 (EMT) は、正常の組織発生に加え、癌細胞における悪性形質の獲得に重要な生物現象である。既報のEMT関連マーカー19遺伝子の発現プロファイルを基に18株のOSCC細胞株を上皮系細胞株と間葉系細胞株に分類し、これらのOSCC細胞株におけるWntシグナル経路に関連する27遺伝子の発現解析ならびにDNAメチル化解析によって、間葉系細胞株で特異的なDNA過剰メチル化によ

って発現抑制される2種類のWNT遺伝子を見出した。(投稿中)。

**大腸がん (CRC)** : 網羅的発現解析をもとに、間葉系細胞株で有意に発現亢進する遺伝子を抽出した。さらにgene ontologyで絞り込まれた新規14遺伝子から、間葉系の細胞形質を誘導 (MET) する新規候補遺伝子を見出し、そのMET誘導の分子機序として*miR-200-ZEB1-Eカドヘリン経路の上流で機能することを明らかにした*。(投稿中)。

### がん関連の主な共同研究 :

①国立がん研究センター研究所の柴田龍弘博士のグループが肺神経内分泌腫瘍の新規がん遺伝子DEKを同定した (Shibata T et al., Oncogene 2010)。②国立がん研究センター研究所の金井弥栄 病理部部長のグループが、尿路上皮系腫瘍における病態とゲノム・エピゲノム異常との関連を明らかにした (Nishiyama N et al., Carcinogenesis 2010)。

### 3. 癌におけるオートファジー関連遺伝子のエピゲノム異常

オートファジーは、細胞内タンパク質分解機構であり、その不活性化は、癌の発生に寄与する。

なかでも、オートファジー関連遺伝子の1つであるLC3遺伝子に着目して、詳細な解析を行った。ヒトLC3遺伝子ファミリー (LC3A variant-1, 2, LC3B, LC3C) のうち、LC3Bに加えてLC3A variant-1遺伝子もまた、オートファジーに関与することを明らかにした。さらに、LC3A variant-1は、種々の癌細胞株 (111/244株; 45.5%) および食道癌臨床検体において、DNAメチル化により不活性化していることを明らかにした (投稿中)。

### 4. 遺伝性疾患のゲノム解析

2005年より遺伝診療施設を備える国内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、臨床的に診断のつかない多発奇形を伴う発達遅滞 (MCA/MR) を対象に、疾患成立の原因となるゲノム異常の解析を進めてきた。1次スクリーニングとして当研究室で開発した染色体微細欠失症候群診断アレイ “Genomic Disorder Array” (通称GDアレイ) による解析を、2011年2月までに599例を解析して67例 (11.2%) に疾患に関連すると考えられるゲノムコピー数変化 (pathogenic CNV) を検出した (図2)。更に、GDアレイでの陰性症例に対しては2次スクリーニングとして全染色体をターゲットとしたBACアレイである “Whole Genome Array-4500” にて解析した。2011年2月まで



に426例を解析し、80例にCNVを検出した。これらのCNVと病態との連関を、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、55例（12.9％）がpathogenic CNVを有すると判断した（図2）。また、厚生労働省精神・神経疾患研究委託費（18指-5）「精神遅滞リサーチ・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：後藤雄一郎長）の分担研究として、X連鎖性精神発達遅滞（X-linked Mental Retardation, XLMR）の原因となる潜在的ゲノムコピー数異常の探索を推進している。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198家系をX-tiling arrayを用いて解析し、15家系（7.6％）に

<b>トピックス</b>
1）稲澤譲治 教授が平成22年4月1日付けで、硬組織疾患ゲノムセンター センター長（併任）に就任した。
2）井本逸勢 准教授が平成22年5月1日付けで、徳島大学大学院ヘルスパイオサイエンス研究部人類遺伝学分野教授に就任した。
3）小崎健一 硬組織疾患ゲノムセンター特任准教授が平成22年6月1日付けで、准教授に就任した。
4）林深 特任助教が平成22年8月1日付けで、硬組織疾患ゲノムセンター特任講師に就任した。
5）本田尚三が平成22年度難治疾患研究所国際研究者海外派遣プログラムにて米国派遣された。
6）春木茂樹が第12回 田中道子がん研究奨励賞を受賞した。
7）硬組織疾患ゲノムセンター：本学「硬組織疾患研究プロジェクト」により2005年4月1日に発足した

<b>人事異動</b>
<p>転入：原園陽介、山本信祐（医歯学総合研究科、博士課程）</p> <p>転出：井本逸勢（准教授）、松村聡（医歯学総合研究科、博士課程終了）</p>
<b>業績目録</b>
<b>原著論文</b>
<ol style="list-style-type: none"><li>Muramatsu T, Imoto I, Matsui T, Kozaki K, Haruki S, Sudol M, Shimada Y, Tsuda H, Kawano T, Inazawa J: YAP is a candidate oncogene for esophageal squamous-cell carcinoma. Carcinogenesis. 2010 [Epub ahead of print]</li> <li>Hayashi S, Imoto I, Aizu Y, Okamoto No, Mizuno S, Kurosawa K, Okamoto Na, Honda S, Araki S, Mizutani S, Numabe H, Saitoh S, Kosho T, Fukushima Y, Mitsubuchi H, Endo F, Chinen Y, Kosaki R, Okuyama T, Ohki H, Yoshihashi H, Ono M, Takada F, Ono H, Yagi M, Matsumoto H, Makita Y, Hata A, Inazawa J: Clinical application of array-based comparative genomic hybridiza-</li></ol>

MRとの関連が疑われるCNVを検出した。

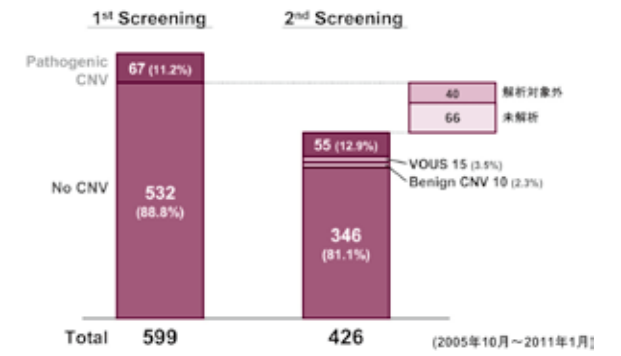


図2

<b>硬組織疾患ゲノムセンター</b> は、開設時より稲澤譲治教授（併任）、井本逸勢 准教授（併任）、小崎健一 特任准教授がゲノム構造解析部門の中心メンバーとして参加し、本学の21世紀COEプログラム「歯と骨の分子破壊と再構築のフロンティア」（平成15年度に採択）や平成20年度採択のグローバルCOEプログラム「歯と骨の分子疾患科学の国際教育研究拠点」との緊密かつ有機的な協力体制を構築しつつ、着実な研究成果を挙げ、国内外においても他に例のない骨軟部、口腔領域疾患のトランスレーショナル・リサーチセンターとしての機能を果たしてきた。今年度からは本学「先端硬組織疾患ゲノム・ナノサイエンス統合プロジェクト」によって稲澤譲治 教授をセンター長（併任）とする新体制となり、林深 特任講師らの若手研究者を中心にゲノム医学とナノサイエンス科学とを統合する新たな先端研究を目指して同事業を推進しつつある。
--

<p>tion by two-stage screening for 536 patients with mental retardation and multiple congenital anomalies. J Hum Genet. 2010 [Epub ahead of print</p> <p>3. Miki D, Kubo M, Takahashi A, Yoon KA, Kim J, Lee GK, Zo JI, Lee JS, Hosono N, Morizono T, Tsunoda T, Kamatani N, Chayama K, Takahashi T, Inazawa J, Nakamura Y, Daigo Y: Variation in TP63 is associated with lung adenocarcinoma susceptibility in Japanese and Korean populations. Nat Genet. 42:893-6. 2010</p> <p>4. Takata R, Akamatsu S, Kubo M, Takahashi A, Hosono N, Kawaguchi T, Tsunoda T, Inazawa J, Kamatani N, Ogawa O, Fujioka T, Nakamura Y, Nakagawa H: Genome-wide association study identifies five new susceptibility loci for prostate cancer in the Japanese population. Nat Genet. 42:751-4. 2010</p> <p>5. Honda S, Hayashi S, Imoto I, Toyama J, Okazawa H, Nakagawa E, Goto YI, Inazawa J: Copy-number variations on the X chromosome in Japanese patients with mental retardation detected by array-based comparative genomic hybridization analysis. J Hum Genet. 55:590-9.2010</p> <p>6. Shibata T, Kokubu A, Miyamoto M, Hosoda F,</p>	<p>Gotoh M, Tsuta K, Asamura H, Matsuno Y, Kondo T, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S: DEK oncoprotein regulates transcriptional modifiers and sustains tumor initiation activity in high-grade neuroendocrine carcinoma of the lung. Oncogene. 29:4671-81. 2010</p> <p>7. Honda S, Orii K, Kobayashi J, Hayashi S, Imamura A, Imoto I, Nakagawa E, Goto Y, Inazawa J: Novel deletion at Xq24 including the UBE2A gene in a patient with X-linked mental retardation. J Hum Genet. 55:244-7. 2010</p> <p>8. Saitoh Y, Martinez Bruyn VJ, Uota S, Hasegawa A, Yamamoto N, Imoto I, Inazawa J, Yamaoka S: Overexpression of NF-kappaB inducing kinase underlies constitutive NF-kappaB activation in lung cancer cells. Lung Cancer. 70:263-70. 2010</p> <p>9. Haruki S, Imoto I, Kozaki K, Matsui T, Kawachi H, Komatsu S, Muramatsu T, Shimada Y, Kawano T, Inazawa J: Frequent silencing of protocadherin 17, a candidate tumour suppressor for esophageal squamous-cell carcinoma. Carcinogenesis. 31:1027-36. 2010</p> <p>10. Furuta M, Kozaki KI, Tanaka S, Arii S, Imoto I, Inazawa J: miR-124 and miR-203 are</p>
--	---

epigenetically silenced tumor-suppressive microRNAs in hepatocellular carcinoma. Carcinogenesis. 31:766-76. 2010

他7編

#### 著書・総説

- 春木茂男、井本逸勢、稲澤譲治：がんのゲノミクス・エピゲノミクス. 医歯薬出版（株）. 別冊医学のあゆみ. がんの分子病理診断の新展開：5-12. 2010（2010/5/20）（8P）
- 稲澤譲治：染色体異常－検査の進歩、結果の解釈. 日本医師会. 日本医師会雑誌. 第139巻第3号：562-566. 2010（2010/6/1）（5P）
- 小崎健一、稲澤譲治：癌細胞におけるDNAメチル化異常とmicroRNA発現制御. ニューサイエンス社 . 細胞 . 42巻6号：232-235. 2010（2010/6/20）（4P）
- 小野宏晃、井本逸勢、稲澤譲治：遺伝子・ゲノム変異と大腸癌発癌～全ゲノムを研究対象としてみえてきたこと～. メディカルレビュー社. 大腸癌 FRONTIER. 26-31.2010（2010/9/20）（6P）

#### 国際シンポジウム・招待講演等

- Inazawa J: Cancer genomics and epigenomics. Chilean-Japanese joint meeting for screening of digestive tumors and International symposium of advances in medical and surgical treatment of colorectal disorders. ClinicaLasCondes,Chile.10/August/2010
  - Inazawa J: Integrative genomics and epigenomics for identification of cancer-related genes. Linking systems-biology to cancer research. Seoul national university dental hospital. Seoul.Korea. 6 /November/2010
- 他1件

#### 国際学会

- Inoue J, Misawa A, Tanaka Y, Ichinose S, Hosoi H, Sugimoto T, Imoto I, Inazawa J: Lysosomal-associated protein multispanning transmembrane 5 gene (LAPTM5) is associated with spontaneous regression of neuroblastomas. 8th Joint Conference of the American Association for Cancer Research and Japanese Cancer Association (Waikoloa, Hawaii, USA) 5-9/ February/ 2010
  - Kozaki K, Imoto I, Mogi S, Omura K, Inazawa J: Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer. 8th Joint Conference of the American Association for Cancer Research and Japanese Cancer Association (Waikoloa, Hawaii, USA) 5-9/ February/ 2010
  - Muramatsu T, Imoto I, Matsui T, Kozaki K, Tsuda H, Shimada Y, Inazawa J: Functional significance of potential oncogene *YAP* and its isoforms in esophageal squamouse cell carcinoma (ESCC) . 101th annual meeting of American Association for CancerResearch 2010 (Washington, DC, USA) 17-21/ April/ 2010
  - Furuta M, Kozaki K, Tanaka S, Arii S, Imoto I, Inazawa J: miR-124 and miR-203 are epigenetically silenced tumor-suppressive microRNAs in hepatocellular carcinoma. 101th annual meeting of American Association for Cancer Research 2010 (Washington, DC, USA) 17-21/ April/ 2010
- 他7件

#### 国内シンポジウム・招待講演等

- 稲澤譲治：「LAPTM5蓄積で誘導されるリソゾーム細胞死と神経芽腫の自然退縮機構」。がん

特定研究5領域合同シンポジウム. 学術総合センター・一橋記念講堂. 東京. 2010年1月14日

- 井上純、稲澤譲治:癌細胞におけるオートファジー経路の障害. 第69回日本癌学会学術総会. 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル. 大阪. 2010年9月23日
- 稲澤譲治：がんの統合的ゲノム・エピゲノム解析とがん関連遺伝子の探索. 第69回日本癌学会学術総会. 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル. 大阪. 2010年9月23日
- 林深、稲澤譲治：アレイCGHの臨床応用とCNVデータベースの構築. 日本人類遺伝学会第55回大会. 大宮ソニックシティ. 埼玉. 2010年10月29日

他5件

#### 国内学会

- 白樺、井上純、井本逸勢、稲澤譲治：ヒト癌におけるLC3A variant-1の発現低下の意義. 第69回日本癌学会学術総会. 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル. 大阪. 2010年9月22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. 第69回日本癌学会学術総会. 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル. 大阪. 2010年9月22日
- 村松智輝、井本逸勢、松井毅、小崎健一、嶋田裕、津田均、稲澤譲治：食道扁平上皮がんにおけるYes-associated protein（YAP）のがん遺伝子としての可能性. 第69回日本癌学会学術総会. 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル. 大阪. 2010年9月23日
- 松村聡、井本逸勢、小崎健一、田中真二、有井滋樹、稲澤譲治：肝細胞癌におけるCpGアイランドの過剰メチル化により発現制御される新規がん抑制遺伝子の同定. 第69回日本癌学会学術総会. 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル. 大阪. 2010年9月23日
- 小野宏晃、井本逸勢、小崎健一、杉原健一、稲澤譲治：発現アレイを用いた大腸癌におけるEMT関連遺伝子の探索. 第69回日本癌学会学術総会.大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル. 大阪. 2010年9月24日
- 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69回日本癌学会学術総会. 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル. 大阪. 2010年9月24日
- 上杉篤史、小崎健一、鶴田智彦、古田繭子、井本逸勢、小村健、稲澤譲治：口腔癌細胞株の機能的スクリーニングを用いたDNAメチル化異常により発現抑制される癌抑制遺伝子型microRNAの探索. 第69回日本癌学会学術総会. 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル. 大阪. 2010年9月24日
- 鶴田智彦、小崎健一、平沢晃、阪壺浩司、進伸幸、井本逸勢、青木大輔、稲澤譲治：子宮体癌細胞株の機能的スクリーニングを用いたエピゲノム異常により発現抑制される癌抑制遺伝子型microRNAの同定. 第69回日本癌学会学術総会. 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル. 大阪. 2010年9月24日
- 倉沢泰浩、小崎健一、小野宏晃、井本逸勢、天笠光雄、稲澤譲治：癌細胞においてDNAメチル化異常により発現抑制されるEMT関連分子の探索. 第69回日本癌学会学術総会. 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル. 大阪. 2010年9月24日
- 林深、岡本奈那、本田尚三、井本逸勢、蒔田

芳男、羽田明、稲澤譲治：複数のゲノムアレイによる先天異常疾患におけるゲノム評価. 日本人類遺伝学会第55回大会. 大宮ソニックシティ. 埼玉. 2010年10月28日

- 小林淳也、本田尚三、林深、井本逸勢、折居恒治、今村淳、中川栄二、後藤雄一、稲澤譲治：UBE2Aを含むXq24のゲノム欠失により特徴的な臨床症状を示した男児例. 日本人類遺伝学会第55回大会. 大宮ソニックシティ. 埼玉. 2010年10月28日
- 本田尚三、林深、小林淳也、井本逸勢、中川栄二、後藤雄一、稲澤譲治：BAC-based X-tiling arrayを用いたX連鎖性精神発達遅滞（XLMR）の原因遺伝子探索. 日本人類遺伝学会第55回大会. 大宮ソニックシティ. 埼玉. 2010年10月29日

他10件

#### 主催セミナー

第18,19回 癌ゲノムサイエンス研究会.東京医歯科大学.2010年2月25日,6月17日

#### 国際学術交流

稲澤譲治、井本逸勢：タイ王国チュラロンコン大学歯学部口腔外科 Atiphan Pimkankam 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：平成22年度科研費（新学術領域）「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：新エネルギー・産業技術総合開発機構受託研究費「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：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標した新規胃がん関連遺伝子の探索と同定）代表

小崎健一：平成22年度科研費（基盤C）「癌特異的エピゲノム異常を指標とした口腔癌抑制microRNAの網羅的探索」代表

稲澤譲治：厚生労働省科研費「網羅的なゲノム異常解析に基づく多段階がん過程並びに臨床病態の分子基盤の解明とその臨床応用に関する研究」分担

他 9件

#### 特許申請

①国内出願

1. 2009.3.3, 「精神遅滞を伴う多発性奇形症候群の判別方法」、特願2009-049864

他7件

特 許 取 得：2009/3/27 特 許 第 4280878 号、MASL1 癌遺伝子

#### ②海外出願

[米国・E・P]

1. 2009.1.22「癌の検出方法および癌抑制剤」、特願2008-012256

他2件

#### 教育

稲澤譲治：医学部医学科「遺伝子と生命」、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」、京都府立医科大学大学院「血液病憲制御学」、東北大学医学部医学科「臨床遺伝学」、福島県立医科大学医学部「分子細胞遺伝学」、北海道医療大学



# 難治疾患研究所 ゲノム応用医学研究部門 分子遺伝分野

## 研究内容

### 概 略

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。具体的には、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。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する。細胞周期がさらに進行して細胞質分裂に入ると、BRCA2 は母・娘細胞間に形成されるミッドボディに局在する。昨年我々は、polo like kinase1 によってリン酸化された BRCA2 (セリン 193) が、ミッドボディに局在することを報告した。さらに、同時期にヒト非筋肉型ミオシン IIC (NMHC IIC) がミッドボディに局在して両タンパク質が共存して細胞質分裂に関与する可能性を示唆した。そこで両タンパク質のミッドボディにおける機能を明らかにする為、本年度我々は、両タンパク質の結合領域を検討した。また我々は、癌細胞株に約 250k に相当する切断型 BRCA2 タンパク質が存在することを見出した。この切断型 BRCA2 タンパク質の産生メカニズムの解明から BRCA2 タンパク質の乳癌発症への関与を明らかに出来ないかと考えて新たな取り組みを試みている。BRCA2 タンパク質の機能解析からその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 はヒト非筋肉型ミオシン IIC のモータードメインに結合する

BRCA2 と NMHC IIC との結合領域を明らかにするた

め、NMHC IIC はモータードメインとコイルド-コイルドメインを含む 2 つの領域 IIC-N (1-1000 a.a.)、および IIC-C (887-2003 a.a.) の HA タグ融合タンパク質と BRCA2-FLAG との結合を検討した (図 1)。COS-7 細胞に IIC-N、または IIC-C と BRCA2-FLAG を発現させて免疫沈降法によって結合を検討した結果、BRCA2-FLAG は IIC-N と結合した。そこで IIC-N をさらに 3 つの領域 (IIC-N/1: 1-341 a.a., IIC-N/2: 331-670 a.a., IIC-N/3: 661-1000 a.a.) に分けて結合部位を検討した結果、BRCA2-FLAG はモータードメインの N 末端側 (IIC-N/1) と結合した。

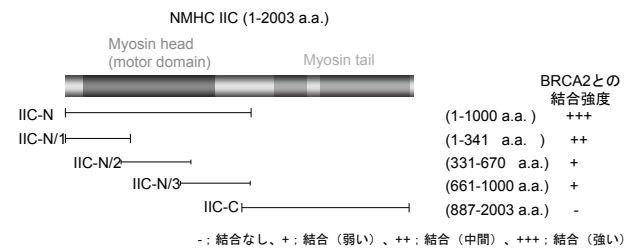


図 1 BRCA2-FLAG と結合する NMHC IIC の結合領域の検討

一方、NMHC IIC が BRCA2 のどの領域と結合するのか明らかにするため、BRCA2 を 8 領域 (R1: 1-157 a.a., R2: 113-685 a.a., R3: 639-1508 a.a., R4: 1475-1620 a.a., R5: 1596-2280 a.a., R6: 2241-2940 a.a., R7: 2611-3318 a.a., R8: 3119-3418 a.a.) に分けて、それぞれ FLAG タグ融合タンパク質として HA-NMHC IIC との結合を免疫沈降法によって検討した (図 2)。その結果、HA-NMHC IIC は R3, R5, R6, R7 と結合した。免疫沈降産物のイムノプロットの結果からバンド強度を比較したところ、R5 と R6 に対しては強く、R7 に対しては弱いバンドが検出された。このことから BRCA2 の領域によって結合の強さに差があることが示唆された。今後、NMHC IIC の N 末端側 (IIC-N/1) を細胞内で過剰発現させて BRCA2 と NMHC IIC との結合阻害によって細胞質分裂にどのように影響を与えるのか検討を進めて、ミッドボディにおける BRCA2 の生理的役割を明らかにしたいと考えている。

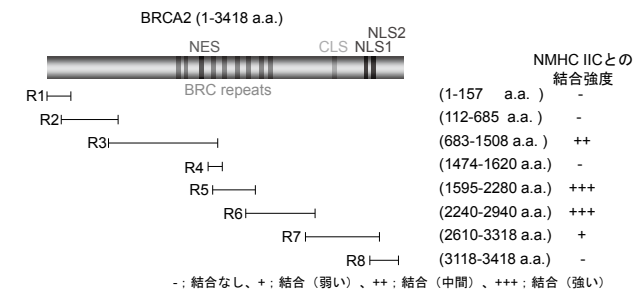


図 2 HA-NMHC と結合する BRCA2 の結合領域の検討

### (2) 癌細胞株における BRCA2 分解産物の同定

乳癌細胞株 MCF7 の BRCA2 タンパク質に対して、エピトープの異なる 2 種類の抗体 (中央部: 1651-1821 a.a., C 末端: 2959-3418 a.a.) を用いてイムノプロットを行った結果、中央部を認識する抗体で、野生型 BRCA2 タンパク質 (分子量 380k) とともに 250k に特異的なバンドを検出した。C 末端を認識する抗体ではこのバンドは検出されなかった。同様の結果は、乳癌細胞株 SK-BR-3、子宮頸癌細胞株 HeLa S3、非小細胞癌株 A549 でも認められた。そこで、この 250k のバンドが本当に BRCA2 由来のバンドであるかどうか明らかにするため、MCF7 細胞の細胞抽出液を S DS-PAGE に展開して、250k 付近のバンドを切り出し、QTRAP5500 の LC/MS/MS システムを用いて MRM 解析を行った。その結果、BRCA2 タンパク質を同定した。また、HeLa S3 細胞に対する抗 BRCA2 抗体免疫沈降物を SDS-PAGE に展開して、Sypro Ruby 染色後に 250k 付近のバンドを質量分析で解析したところ、BRCA2 タンパク質を同定した。これまでに、BRCA2 のスプライシングバリエーションでタンパク質の発現は報告されていないことから、この 250k に相当するバンドは BRCA2 分解産物と考えられた。一方、正常ヒト乳腺上皮細胞 (HMEC) や、ヒト乳腺線維嚢胞症由来の乳腺上皮細胞 (MCF10A) から 250k のバンドは検出されなかった。現在、この分解産物の形成機序を明らかにするとともに、細胞内での機能解析から、BRCA2 分解産物の散発性乳癌への関与を視野に研究を進めている。

(3) 乳癌原因遺伝子 BRCA2 に新規に結合する分子群の発見と、その結合が正確な中心体複製制御に果たす役割の解明

乳癌原因遺伝子 BRCA2 は二重鎖切断 DNA の相同組換え修復に関与するとともに、中心体にも局在する。BRCA2 をノックダウンすると中心体複製が異常になることから、中心体複製制御にも役割を果たしている可能性が示唆されていた。我々は培養細胞の中心体画分から BRCA2 を免疫沈降し、その共免疫沈降物を質量分析した。その結果 BRCA2 に新規に結合する分子として、nucleophosmin(NPM) と Rho-associated coiled-coil con-

taining protein kinase 2(ROCK2)を得ることができた。この両分子はこれまでに正確な中心体複製に役割を果たすことが知られていることから、BRCA2 とこれら両分子との結合が中心体複製に重要な働きを担っている可能性が考えられた。我々は BRCA2 が NPM と結合する分子内領域を、BRCA2 の部分配列と NPM を培養細胞に共発現することによって検定した。これにより BRCA2 の 3,418 アミノ酸のうち、639-1,000 アミノ酸領域が NPM との結合領域であることを解明した。この小領域を培養細胞に強発現すると、内在性の BRCA2 と NPM の結合を阻害することができ、この時中心体数が異常に増加したり多核になったりする細胞が多く見られた。このことから、BRCA2 と NPM の結合は中心体の正確な複製と中心体数の制御に重要な役割を果たしていると考えられた。中心体数の異常による染色体の異常分配や多核の形成は癌化に特徴的に見られることから、乳癌発症に BRCA2 と NPM の結合不能が関与している可能性がある。今後 BRCA2 とこれら分子との結合が癌治療の標的になり得る可能性について検討していきたい。

## 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) Pim-1 による NF-kappaB シグナルの制御

癌の進展と密接に関わっている細胞内シグナル経路の一つとして、NF-kappaB シグナルが知られている。この標的遺伝子の大部分が細胞生存に関与しており、多くの癌でこのシグナルが活性化している。このシグナルを抑制することが出来れば、癌の進展や転移を抑えることが出来る可能性が高まる。NF-kappaB を構成する転写因子の一つである RelA/p65 はリン酸化などの多様な翻訳後修飾を受け転写活性が制御されている。なかでもセ



リン 276 残基のリン酸化は RelA/p65 の DNA 結合活性を亢進すると共に、転写コア口ベーター CBP/p300 との結合を誘導することから、RelA/p65 の転写能を活性化する重要な修飾であることが明らかになってきた。しかしこのリン酸化を担うキナーゼははっきりしない。そこでこのキナーゼを同定するためにラムダファージによる Ser276 リン酸化特異的抗体を用いた発現クローニングを行い、候補となるキナーゼの同定を試みた。その結果 Pim-1 を同定した。Pim-1 は TNFalpha などのサイトカイン刺激により RelA/p65 をリン酸化し、その転写活性能を亢進するとともに、SOCS-1 による RelA/p65 のユビキチン化を抑制し、安定化に寄与していることが明らかとなった。さらに Pim-1 による NF-kappaB の活性化は、TNFalpha 依存的な細胞死（アポトーシス）誘導を抑制していることが示唆された。以上の結果、Pim-1 による Ser276 のリン酸化は、RelA/p65 の活性化のみならず安定化にも寄与することで、NF-kappaB シグナルを正に制御していることが示唆された。多くの癌で Pim-1 の過剰発現や活性化が報告されていることから、Pim-1 が癌の分子標的となることが期待される（Nihira K, et al. Cell Death Differ. 2010）。

#### (2) DNA 損傷における p53 によるアポトーシス誘導制御機構の解析

p53 のセリン 46 のリン酸化はアポトーシス誘導に必須であることから、直接セリン 46 をリン酸化するキナーゼの同定を目的としてリン酸化抗体を用いたキナーゼの発現クローニング法により試みたところ、DYRK2 という新たなキナーゼを発見した。このキナーゼは DNA 二本鎖切断を惹起するような抗がん剤処理により、セリン 46 をリン酸化し、アポトーシス誘導に必須であることを明らかにした (Taira N, et al. Mol. Cell 2007)。次に、DYRK2 がどのように p53 をリン酸化するかについて検討したところ、DNA 損傷後 ATM が DYRK2 をリン酸化し、核内の DYRK2 が安定化し活性化することで始めてセリン 46 のリン酸化が可能になることを見いだした (Taira N, et al. J. Biol. Chem. 2010)。

#### (3) c-Abl による Pitx1 の活性制御

c-Abl チロシンキナーゼは細胞質、核両方に存在するが、核内 c-Abl が DNA 損傷により活性化し、アポトーシスを誘導することが知られている（Yoshida K et al, Mol. Cell. Biol. 2002; Yoshida K et al, Nat. Cell Biol. 2005）。Pitx1 は転写因子であり、近年癌抑制遺伝子として注目されている。活性化すると p53 の発現を高め、アポトーシスを誘導するが、その生理機能と調節機構の詳細ははっきりしない。我々は、DNA 損傷に応答して c-Abl が Pitx1 の発現を制御していることを見いだした (Yamaguchi Y, et al. Apoptosis 2010)。この機構には核

内 c-Abl が関与していることも明らかとなった。また c-Abl は Pitx1 をリン酸化するが、どのチロシン残基であるかは不明である。さらに Pitx1 をノックダウンすると、DNA 損傷によって誘導されるアポトーシスが有意に抑制され、これは c-Abl の活性依存的であった。このことから、Pitx1 は c-Abl による発現制御により、細胞死誘導を正に調節していることが判明した。

#### (4) 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進めている。

#### 人事異動

三木 義男

転入：ダシゼウエゲ　ヌルマ（生命情報科学教育部博士後期課程）、加賀美裕也（生命情報科学教育部博士前期課程）、鈴木一穂（生命情報科学教育部博士前期課程）、郭　甜甜（医歯学総合研究科修士課程）、木村仁美（卒研究生）、滝沢涼子（卒研究生）

転出：呂正光（医歯学総合研究科博士課程終了）、云霞（医歯学総合研究科博士課程終了）、木村純子（生命情報科学教育部博士後期課程終了）、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. and Yoshida, K. (2011) 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**, 1524-31.
- Kudoh, T., Kimura, J., Lu, Z.G., Miki, Y. and Yoshida, K. (2010) D4S234E, a novel p53-responsive gene, induces apoptosis in response to DNA damage. *Exp Cell Res*, **316**, 2849-58.
- Nihira, K., Ando, Y., Yamaguchi, T., Kagami, Y., Miki, Y. and Yoshida, K. (2010) Pim-1 controls NF-kappaB signalling by stabilizing RelA/p65. *Cell Death Differ*, **17**, 689-98.
- Ogi, T., Limsirichaikul, S., Overmeer, R.M., Volker, M., Takenaka, K., Cloney, R., Nakazawa, Y., Niimi, A., Miki, Y., Jaspers, N.G., Mullenders, L.H, Yamashita, S., Fousteri, M.I and Lehmann, A.R. (2010) Three DNA polymerases, recruited by different mechanisms, carry out NER repair synthesis in human cells. *Mol Cell*, **37**, 714-27.
- Taira, N., Yamamoto, H., Yamaguchi, T., Miki, Y. and Yoshida, K. (2010) ATM augments nuclear stabilization of DYRK2 by inhibiting MDM2 in the apoptotic response to DNA damage. *J Biol Chem*, **285**, 4909-19.
- Wang, H.F., Takenaka, K., Nakanishi, A. and Miki, Y. (2011) BRCA2 and nucleophosmin co-regulate centrosome amplification and form a complex with the Rho effector kinase ROCK2. *Cancer Res*, **71**, 68-77.
- Yamaguchi, T., Miki, Y. and Yoshida, K. (2010) The c-Abl tyrosine kinase stabilizes Pitx1 in the apoptotic response to DNA damage. *Apoptosis*, **15**, 927-35.
- Wang, X., Takenaka, K., Takeda, S. (2010) PTIP promotes DNA double-strand break repair through homologous recombination. Genes to Cells, **15**, 243-54.
- Hew HC, Liu H, Miki Y, Yoshida K. PKCdelta regulates Mdm2 independently of p53 in the apoptotic response to DNA damage. *Mol. Carcinog.* in press.
- 他 5 篇

#### 総説および著書

英文：

- Yoshida, K. and Miki, Y. The cell death machinery governed by the p53 tumor suppressor in response to DNA damage. *Cancer Sci*, **101**, 831-5. (2010)
- Miki, Y. Gene expression-based diagnosis of efficacy of chemotherapy for breast cancer. *Breast Cancer*, **17**, 97-102. (2010)

和文：

- 三木 義男【乳癌　基礎と臨床の架け橋】発がん・増殖　BRCA 遺伝子機能とその機能欠損による乳癌発生機序．最新医学 65 巻 6 月増刊

- 1307-1317. (2010)
- 齊藤 広子, 三木 義男【DNA 修復とがん治療の分子標的】Interface on Cancer Therapy DNA 修復とがん治療の分子標的　DNA 損傷修復機構．がん分子標的治療 8 巻 2 号 94-101. (2010)
- 他 2 篇

#### 招待講演

国際シンポジウム

- Miki Y. Large - scale genomic studies in breast cancer patients for personalized chemotherapy. Sixth International Symposium on Hormonal Oncogenesis, Tokyo, Japan, September 12-16, 2010
- Miki Y. Interference with BRCA2, which localized to the centrosome, leads to abnormal nuclear division. The 15th Japan - Korea Cancer Research Workshop - Tumor microenvironment and progress in breast cancer research -, Incheon, Korea, December 21-22, 2010

国内シンポジウム・特別講演

- 三木 義男 . Molecular biology における分子解析法 (Analytical methods in molecular biology (From basic techniques to the advanced technology)). 第 69 回日本癌学会学術総会、教育口演、大阪、2010 年 9 月
- 三木 義男; 牛嶋 大; 松浦 正明; 秋山 太; 岩瀬 拓士; 長崎 光一. 今、乳癌の最先端研究はどこまで進んでいるのか 乳がんにおける gene expression profiling 研究の現状と今後の展望．第 18 回日本乳癌学会総会、シンポジウム、札幌、2010 年 6 月
- 吉田清嗣　p53 リン酸化依存性アポトーシス誘導における転写指向性と分子機構　BMB2010 (ワークショップ：「p53 ワールド」、その多彩な生理作用　～複雑なシグナルネットワークから疾患病態生理まで～)、神戸；2010 年 12 月
- 他 3 題

#### 国際学会発表

- Hui-Feng Wang, Katsuya Takenaka, Akira Nakanishi, and Yoshio Miki. BRCA2 and nucleophosmin coregulate centrosome amplification and form a complex with ROCK2. The Sixth International Symposium on Hormonal Oncogenesis. 12-16 September 2010 (Urayasu)

#### 国内学会発表

- 三本 麗; 木村 純子; 三木 義男; 吉田 清嗣 . 新規 p53 応答遺伝子 D4S234E は DNA 損傷下において小胞輸送を介してアポトーシスを誘導する (D4S234E, a novel p53-responsive gene, induces apoptosis via the ER trafficking in response to DNA damage). 第 69 回日本癌学会学術総会、大阪、2010 年 9 月
- 細川 佳那; 中西 啓; 齊藤 広子; 三木 義男 . がん細胞における欠損型 BRCA2 タンパク質の同定とその形成機序 (Identification of a cleavage product of BRCA2 in cancer cell lines and its formative mechanism). 第 69 回日本癌学会学術総会、大阪、2010 年 9 月
- 高岡 美帆; 中西 啓; 三木 義男 . S 期核内における BRCA2 の新しい局在部位 (The localization of BRCA2 foci in normal S-phase nuclei). 第 69 回日本癌学会学術総会、大阪、2010 年 9 月
- 真利久 サディヤ; 中西 啓; 三木 義男 . BRCA2 由来中心体移行シグナルの解析 (Analysis of centrosome localization signal (CLS) in BRCA2). 第 69 回日本癌学会学術総会、大阪、2010 年 9 月
- Tiantian Guo; 中西 啓; 齊藤 広子; 大海 忍; 三木 義男 . Akt キナーゼによるリン酸化 BRCA2

と 14-3-3 $\gamma$ との結合 (Phosphorylation of BRCA2 Akt kinase promotes its binding to 14-3-3gamma). 第 69 回日本癌学会学術総会、大阪、2010 年 9 月

- 平 直江; 三本 麗; 倉田 盛人; 北川 昌伸; 三木 義男; 吉田 清嗣 . DYRK2 は転写因子 c-Jun/c-Myc へのリン酸化を介して細胞周期 G1/S 期の進行を制御する (DYRK2 regulates the G1/S transition by phosphorylation of c-Jun and c-Myc. 第 69 回日本癌学会学術総会、大阪、2010 年 9 月
- Katsuya Takenaka, Hui-Feng Wang, Akira Nakanishi, and Yoshio Miki. BRCA2 and nucleophosmin coregulate centrosome amplification and form a complex with ROCK2. BMB2010. 7-10 December 2010 (Kobe)
- 他 13 篇

#### 主催学会（学会名、日時、場所）

- The Sixth International Symposium on Hormonal Oncogenesis, September 12-16, 2010, Tokyo, Japan (Co-chairperson)
- The 15th Japan - Korea Cancer Research Workshop - Tumor microenvironment and progress in breast cancer research -, December 21-22, 2010, Incheon, Korea. (Organizer)

#### 学内外教育活動

三木義男:本学大学院医歯学総合研究科修士課程、生命情報科学教育部／疾患生命科学研究部

#### 競争的研究費取得

- 三木義男 (分担)：文部科学省科学研究費補助金（基盤研究 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
- 吉田清嗣（代表）：平成 22 年度科学研究費（基盤研究（B））レドックス代謝制御における核—細胞質クロストークとアポトーシス誘導機構の解明
- 吉田清嗣（代表）：公益信託佐藤記念癌研究助成基金　平成 22 年度研究助成金　腫瘍悪性化の分子機構における DYRK2 の役割と治療への応用
- 吉田清嗣（代表）：金原一郎記念医学医療振興財団　第 25 回基礎医学医療研究助成金　腫瘍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
- 竹中克也（代表）：文部科学省科学研究費補助金若手研究（B）「乳癌原因遺伝子 BRCA に結合する新規分子の探索とゲノム変異導入による細胞機能解明」
- 竹中克也（代表）：京都大学ウイルス研究所共同研究課題「動物細胞における、Rev7 と結合できない Rev3 ゲノム上点変異導入と表現形解析」



# 難治疾患研究所 ゲノム応用医学研究部門 分子疫学分野

## 研究内容

### 概要

本分野では、難治性病態に繋がる日常的多因子疾患の発症・進展に関わる遺伝子、環境因子を明らかにする目的で、ゲノム情報を駆使しつつ、疫学的手法を用いながら解析をしている。基本的には疫学フィールドや臨床サンプルを持つ研究グループとの共同研究のもとで、疾患の発症に及ぼす遺伝子および環境因子およびそれらの交互作用の発見と検証、疾患の易罹患性や薬剤反応性に関与する遺伝子多型の解析を行っている。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、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。ほとんど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、相乗的なりスクを測ることで、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。また生活習慣病はその一部の素因が胎児期に形成されるという考え方が広く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. SERPINE2 遺伝子多型と肺気腫との関連

SERPINA1, SERPINA3, SERPINE2 遺伝子は慢性閉塞性肺疾患 (COPD) との関連が報告されているが、肺気腫との関連は知られていない。我々は、日本人高齢者の1335例の連続剖検症例を用いて、これまでに COPD

との関連の報告がある上記3つの遺伝子の12個の遺伝子多型 (SNPs) と肺気腫との関連を調べた。全剖検例のうち、189症例 (14.1%) に中等度以上の肺気腫が認められ、有意な性差が見られた (男性 20.5%、女性 7.0%;  $p < 0.0001$ )。関連を調べた3遺伝子の12SNPsのうちSERPINE2 遺伝子の遺伝子多型 (rs975278) で肺気腫との関連が見られた (オッズ比 (OR) = 1.54,  $p = 0.037$ )。また、喫煙者に限定した場合、より強い関連が見られた (OR = 2.02,  $p = 0.002$ )。このことからSERPINE2 遺伝子は肺気腫の形成に関与し、特に喫煙者においてその傾向が強いことが示された。

1995年から2003年まで東京都老人医療センター (現健康長寿医療センター) にて病理解剖された1536例の連続剖検例中、肺病理所見のある1335例を対象にした。肺気腫の診断は肺病理専門家により巨視的に行われ、進行度を0-4の5段階に分類し両葉の平均値を肺気腫のスコアとした。喫煙との関連が報告されている小葉中心性肺気腫のスコアが2より大きい場合、もしくは汎小葉性肺気腫のスコアが1以上の場合を肺気腫有りとした。対象となるSNPsは、これまでCOPDと関連が報告されているSERPINA1の7SNPs (rs8004738, rs17751769, rs709932, rs11832, rs1303, rs28929474, and rs17580) , SERPINA3の3SNPs (rs4934, rs17473, and rs1800463) , そしてSERPINE2の2SNPs (rs840088 and rs975278) を選択した。

対象1335例中の小葉中心性肺気腫症例はminimal changeが99例 (7.4%)、mild changeが248例 (18.6%)、moderate changeは156例 (11.7%)、severe changeは28例 (2.1%) に認められた。189例 (14.2%) が前述の診断基準により病理学的に肺気腫と診断した。肺気腫は男性 (20.5%) の方が女性 (7.0%) より有意に多かった ( $p < 0.0001$ )。喫煙歴のある例は喫煙歴の無い例に比べ肺気腫のオッズ比が4.45と高く、男性 (OR = 4.14) よりも女性 (OR = 5.22) の方でやや高い傾向が見られた。

今回候補に挙げた12SNPsのうちa1アンチトリプシン欠損を示すSERPINA1の2つのSNPs (rs28929474 and rs17580)およびSERPINA3の2つのSNPs (rs17473 and rs1800463) については、今回の連続剖検症例では認められなかった。その他のSNPsに関しては、国際

HapMap project のデータベースでの頻度との乖離は見られず、Hardy-Weinberg 平衡からの有意な逸脱は見られなかった。

SERPINE2 遺伝子のrs975278では肺気腫の有無とgenotypeの分布に有意差が認められた (OR = 1.54, 95% CI = 1.02-2.30;  $p = 0.037$ )。喫煙者に限ると、SERPINE2 遺伝子のrs975278のGGホモが肺気腫症例で有意に認められた (OR = 2.02, 95% CI = 1.29-3.15;  $p = 0.002$ )。

SERPINA1およびSERPINA3のSNPsについては、肺気腫の有無によるgenotype頻度の違いは認められなかった。またSERPINA1の5つのSNPsではプロタイプ解析を行ったが、肺気腫との関連は認められなかった。

今回の連続剖検例を用いた検討ではSERPINE2 遺伝子の遺伝子多型 (rs975278) と肺気腫の間に有意な関係が認められた。特に喫煙者に限った場合、マイナーアレルホモで肺気腫のオッズ比が2.02であった。肺気腫とSERPINE2 遺伝子との関連を示した初めての報告である。

SERPINE2は発生時期および成人の肺、気道上皮に発現がみられるセリンプロテアーゼインヒビターであり、凝固線溶系でスロンビン、ウロキナーゼ、プラスミンなどを阻害する働きが有る。プラスミンはメタロプロテアーゼの活性化に関与していることが報告されており、またメタロプロテアーゼの遺伝子多型と肺機能の低下との関与が報告されていることから、SERPINE2が肺の生理機能に関与していることが推測される。

SERPINE2 遺伝子はCOPDの関連遺伝子としてGenome wide linkage analysisで候補遺伝子に上がり、それに引き続いてSERPINE2 遺伝子多型と喫煙者のCOPDの患者対象研究で関連が報告された。3つの異なるグループでreplication研究が行われ、1つは関連が示されたが、他の2つは関連が認められなかった。SERPINE2は重症COPDの低酸素血症やCOPDの気管支拡張薬の反応性などとの関連も示されておりCOPDの関連遺伝子である可能性が示されているが、肺気腫との関連を示したのは本研究が初めてである。

HapMap projectによると今回の連続剖検例での肺気腫との関連の見られたSERPINE2の遺伝子多型 (rs975278) のアレル頻度は人種間で異なっているが、COPDとの関連を示した既報告と同様にGアレルがリスクアレルとなっていた。今回の研究ではSERPINE2 遺伝子多型は特に喫煙者での肺気腫により強い関連が認められた。喫煙により惹起される肺障害の修復過程において、SERPINE2の発現に違いがおこることが予想されるが、現在のところこのメカニズムは不明である。

連続剖検症例を用い、SERPINE2 遺伝子多型と肺気腫との関連が示された。

### 2. HLA-B\*1511はカルバマゼピン関連スティープンス・ジョンソン症候群の日本人における遺伝的危険因子である

医薬品による重篤な副作用であるスティープンス・ジョンソン症候群/中毒性表皮壊死症 (SJS/TEN) は、発症率は低いが致死率が高く予後が悪い。近年、南アジア人において、カルバマゼピン (CBZ) 誘因性SJS/TENとHLA-B\*1502との強い関連が見いだされた。そこで、日本人におけるCBZ誘因性SJS/TEN発症を予測できるバイオマーカーの探索を目的に、CBZ服用後にSJS/TENを発症した症例を対象としてHLAのタイピングを行った。

発症にCBZの関与が否定できないと判断され、文書による同意が得られたSJS/TEN典型例11例及び非典型例3例について、HLAクラスI及びII領域をシーケンシングにより配列を解析しHLAタイプを決定した。対照には日本人健康人における各HLAタイプのアレル頻度の文献値を用いた。

本研究では、HLA-B\*1502保有者はいなかったが、典型症例2名及び非典型症例2名でHLA-B\*1502と同一のセロタイプHLA-B75に属するHLA-B\*1511が検出された。典型症例におけるHLA-B\*1511のアレル頻度9.09%は、健康人におけるアレル頻度1%よりも有意に高く ( $p=0.0263$ )、オッズ比は9.76であった。非典型例を含めた場合には健康人とのオッズ比は16.3 ( $p=0.0004$ ) であった。

これまでに、タイ人及びインド人のCBZ誘因性SJS/TENにおいて、HLA-B75に属するHLA-B\*1508、HLA-B\*1521及びHLA-B\*1511の保有者が報告されている。これらを考慮するとアジア人においては、HLA-B\*1502のみならずHLA-B75のいくつかのサブタイプが、CBZ誘因性SJS/TENの危険因子であることを示唆している。

### 3. 核内受容体遺伝子CARの遺伝子多型を用いたフェノームスキャン研究

核内受容体constitutive androstane receptor (CAR; NR1I3) 遺伝子は、内因性及び外因性の化学物質や薬剤等の生体内異物センサーとして働いており、コレステロールや肝臓の胆汁酸の排泄にも関与していることが知られている。これまでに動物を使った実験系から、マウスCAR遺伝子が生体内の異物を代謝する機能は明らかになってきているが、ヒトCAR遺伝子での役割はまだ明らかになっていない。そこで我々は、マイナーアレル



頻度が1%以上のヒト CAR 遺伝多型と代謝性疾患に焦点を当て、日本人の高齢者連続剖検例 1536 検体において、遺伝子多型と代謝性疾患の種々のフェノタイプとの関連を検討した。6 種類のヒト CAR 遺伝子多型 (rs55802895, rs56835010, rs6686001, rs2502815, rs2307424, rs2307418) は融解曲線法ならびに TaqMan 法によりジェノタイプ判定を行い、多重ロジスティック回帰分析を用いて遺伝的効果と代謝性疾患の関連を検討した。フェノームスキャン解析の結果、rs2307424 と rs2502815 多型は高脂血症のリスクが低いことがわかった。rs2307424 多型を maker として選出した 3 つの Tag SNP (rs3829793, rs3813627, rs3813628) においてもマイナーアレルを 1 つ以上持つヒトで高脂血症のリスクが有意に低かった (表 1)。さらに、5'-UTR 領域に存在する rs5580289, rs56835010, rs6686001 (LD; D' >0.99, r<sup>2</sup>>0.98) の 3 つの多型では、マイナーアレルをホモで持つヒトの低 HDL コレステロール血症 (HDL<40mg/dL) リスクが上昇した (表 1)。これらの結果は交絡因子 (対象者の死亡時年齢、性別、高血圧と高脂血症そして糖尿病の既往歴、喫煙歴、飲酒習慣の有無) で調整した後も、統計学的有意な関連が保持されていた。高血圧症、糖尿病などの代謝性疾患とは関連が認められなかった。また 5'-UTR 領域に存在する 3 つの多

疾患	db_SNP ID rs number	Genotype	Adjusted OR (95% CI)	P value
高脂血症	rs2502815	G/G	1.00 Reference	
		A/G + A/A	0.28 (0.12-0.61)	0.0016
		T/T	1.00 Reference	
rs2307424	T/C + C/C	0.29 (0.13-0.65)	0.0025	
低HDLコレステロール血症 (HDL < 40mg/dL)	rs55802895	G/G + G/A	1.00 Reference	
		A/A	1.52 (1.02-2.26)	0.0377
	rs56835010	A/A + A/G	1.00 Reference	
		G/G	1.54 (1.04-2.28)	0.0331
rs6686001	A/A + C/A	1.00 Reference		
	C/C	1.55 (1.04-2.31)	0.0326	

ORs are adjusted for age at death, gender, status of smoking and alcohol drinking, the presence of hypertension, hyperlipidemia, and diabetes mellitus.

表 1

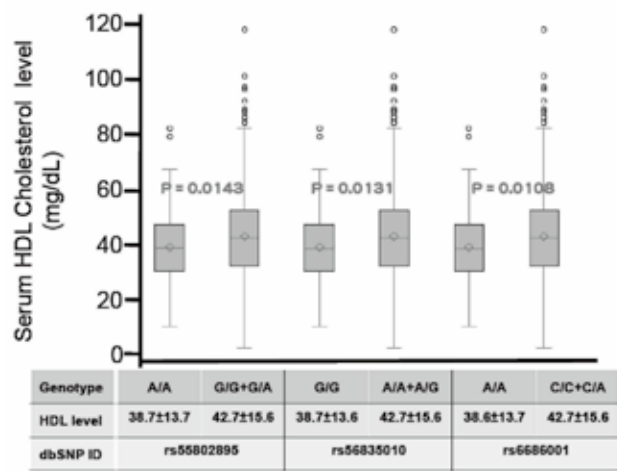


図 1

型のマイナーアレルをホモで持つヒトは、それ以外のヒトに比べて血清 HDL 値が有意に低かった (図 1)。本結果はマウスにおいて CAR が脂質代謝を調節するという報告に一致しており、脂質レベルの調節にヒト CAR 遺伝子が関与することを示唆している。

#### 4. 子宮内環境変化が胎児エピゲノム状態に及ぼす影響の解析

望ましくない子宮内環境で育成した胎児は、生後生活習慣病を発症しやすい。その病態メカニズムは明らかではないが、胎児期に決定されるエピゲノム状態が子宮内環境によって変化することに起因するとされている。胎児期のエピゲノム状態は発生に従って大きく変動する。特に受精後の DNA 脱メチル化及び着床後の新生 DNA メチル化は最も顕著な変動である。そこで着床後の胚発生を模倣できるマウス ES 細胞分化系を用いて、子宮内環境変化が初期発生における DNA メチル化状態の変動にどのような影響を与えるのかを検討した。マウス ES 細胞を胚様体形成により分化させ、心筋細胞の拍動が明確に確認されるまでの 10 日間、培地に植物性エストロゲン、ゲニステインを添加させた場合とさせない場合の DNA メチル化レベルの差を解析した。母胎を介したゲニステインの効果は Avy アレルの DNA メチル化レベルを指標に解析されているが、変化は胚発生過程の三胚葉形成以前だと考えられている。我々は、Avy アレルのようなレトロトランスポゾン由来の遺伝子プロモーターではなく、内在性の遺伝子プロモーター領域に与える影響を調べるために、メチル化感受性制限酵素とプロモーターアレイを用いてゲニステインによる DNA メチル化状態の変化を解析した。その結果、74 カ所のプロモーター領域の DNA メチル化に差があることが判明したが、その差の程度は小さく、差のある領域は短く限定された領域であった。このうち Ucp1 と Syt11 の 2 つの遺伝子プロモーターについて、さらに DNA メチル化レベルが分化段階を追ってどのように変化するかを解析した。未分化状態から分化 4 日目まではゲニステインの有無に関わらず、両者のプロモーターとも新生 DNA メチル化によりメチル化レベルが増加した。Ucp1 と Syt11 のプロモーターは 4 日目から 10 日目にかけてメチル化レベルが低下するが、その過程にゲニステインが影響を与え、Ucp1 については全般的な脱メチル化が促進され、Syt11 については特定の CpG サイトの脱メチル化が促進された。これらのことから、内在性のプロモーターの一部においても、ゲニステインは三胚葉形成段階あるいはその直後に DNA メチル化状態を変化させることがわかった。

#### 人事異動

入室：関自民 (専攻生)、張曉亮、ジェネイド パラヤン、趙晨希 (大学院生)

#### 業績目録

##### 原著論文

- Miyaki K, Oo T, Song Y, Lwin H, Tomita Y, Hoshino H, Suzuki N, Muramatsu M: Association of a cyclin-dependent kinase 5 regulatory subunit-associated protein 1-like 1 (CDKAL1) polymorphism with elevated hemoglobin A1c levels and the prevalence of metabolic syndrome in Japanese men: Interaction with dietary energy intake. *Am J Epidemiol.* 172:985-991, 2010.
- Miyaki K, Oo T, Song Y, Lwin H, Tomita Y, Hoshino H, Suzuki N, Muramatsu M, Miyaki et al. Respond to "Gene x Lifestyle Interactions" *Am J Epidemiol.* 172:998-999, 2010
- Zhang L, Miyaki K, Wang W, Muramatsu M. CYP3A5 polymorphism and sensitivity of Blood Pressure to dietary salt. *J Hum Hypertens* 24:345-350, 2010
- 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.* 2010 [Epub ahead of print]
- Fujimoto K, Ikeda S, Arai T, Tanaka N, Kumasaka T, Ishii T, Kida K, Muramatsu M, Sawabe M. Polymorphism of SERPINE2 gene is associated with pulmonary emphysema in consecutive autopsy cases *BMC Med Genet* 11:159, 2010
- Matsunaga T, Kuwata S, Muramatsu M. Computational gene knockout reveals transdis-ease-transgene association structure. *J Bioinform Comput Biol.* 8:843-66, 2010
- Kaniwa N, Saito Y, Aihara M, Matsunaga K, Tohkin M, Kurose K, Furuya H, Takahashi Y, Muramatsu M, Kinoshita S, Abe M, Ikeda H, Kashiwagi M, Song Y, Ueta M, Sotozono C, Ikezawa Z, Hasegawa R; JSAR research group. HLA-B\*1511 is a risk factor for carbamazepine-induced Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis in Japanese patients. *Epilepsia.* 51:2461-2465, 2010
- Ikeda H, Takahashi Y, Yamazaki E, Fujiwara T, Kaniwa N, Saito Y, Aihara M, Kashiwagi M, Muramatsu M. HLA class I markers in Japanese patients with carbamazepine-induced cutaneous adverse reactions. *Epilepsia* 51:297-300, 2010
- Yokoyama K, Urashima M, Ohkido I, Kono T, Yoshida T, Muramatsu M, Niu T, Hosoya T. L-type voltage-dependent calcium channel alpha subunit 1C is a novel candidate gene associated with secondary hyperparathyroidism: an application of haplotype-based analysis for multiple linked single nucleotide polymorphisms. *Nephron Clin Pract.* 115:237-243, 2010
- Karasawa S, Daimon M, Sasaki S, Toriyama S, Oizumi T, Susa S, Kameda W, Wada K, Muramatsu M, Fukao A, Kubota I, Kawata S, Kayama T, Kato T. Association of the common fat mass and obesity associated (FTO) gene polymorphism with obesity in a Japanese population. *Endocr J.* 57:293-301, 2010
- Daimon M, Oizumi T, Karasawa S, Kaino W, Takase K, Tada K, Jimbu Y, Wada K, Kameda W, Susa S, Muramatsu M, Kubota I, Kawata S, Kato T. Association of the clusterin gene poly-

morphisms with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism.* 2010 [Epub ahead of print]

##### 国内学会発表

- 佐藤憲子, 山川直美: ES 細胞分化過程においてゲニステインが DNA メチル化状態に与える影響の解析. 第 4 回日本エピジェネティクス研究会 2010 年 5 月
- 村松正明: 薬効・毒性関連遺伝子のファーマコジェノミクス. 日本学術会議シンポジウム. 2010 年 6 月 11 日, 東京.
- 村松正明: ゲノムで解くメタボリック症候群. 学際生命科学東京コンソーシアム第 4 回市民講演会. 2010 年 10 月 23 日, 神奈川.
- 鹿庭なほ子, 頭金正博, 黒瀬光一, 長谷川隆一, 高橋幸利, 古谷博和, 松永佳世子, 村松正明, 木下茂, 相原道子, 池澤善郎, 齋藤嘉朗: カルバマゼピン関連スティーブンス・ジョンソン症候群 / 中毒性表皮壊死症の日本人における遺伝的危険因子. 日本臨床薬理学会. 2010 年 12 月 1 日 ~ 3 日, 京都.
- 松倉寛, 張 曉亮, 村松正明, 佐藤憲子: 子宮内膜細胞における SF-1 遺伝子のエピジェネティック変化についての研究 第 33 回日本分子生物学会年会 2010 年 12 月
- Takayuki Isagawa, Genta Nagae, Shirai Nobuaki, Noriko Sato, Shoen Kume, Hiyoyuki Aburatani: "DNA methylation profiling in differentiation of embryonic stem cells into three germ layers." 第 33 回日本分子生物学会年会 2010 年 12 月

##### 国際学会発表

- Sawabe M, Tanaka N, Arai T, Naka Mieno M, Ikeda S, Muramatsu M: Genetic polymorphisms of SLC22A3-LPAL2LPA gene cluster has direct and indirect effects on coronary atherosclerosis and coronary heart disease. *Human Genome Meeting.* 18-21, May, 2010. Montpellier, France.
- Ikeda S, Arai T, Mieno M, Tanaka N, Sawabe M, Muramatsu M. Association of genetic polymorphisms in human NR 113 with hyperlipidemia in elderly Japanese population. *Human Genome Meeting.* 18-21, May, 2010. Montpellier, France.
- Ikeda S, Miyaki K, Song S, Lwin H, Tomita Y, Muramatsu M: The effect of CDKAL1 polymorphism on metabolic phenotype cohort in Japan. *The Joint Scientific Meeting of IEA Western Pacific Region and Japan Epidemiological Association.* Jan 9-10, 2010, Saitama.
- Muramatsu M: Nutrigenomics of Metabolic Syndrome. *Aesthetics Asia* 2010, Sept 17-19, 2010. Singapore
- Muramatsu M: Path-Analysis of SLC22A3-LPAL2-LPA Gene Region Reveals Different Effects on Coronary Heart Disease (CHD) . 13<sup>th</sup> CVGAS. Oct1&2, 2010. Seoul, Korea
- Muramatsu M. Gene-environment interactions in metabolic syndrome and genetic tests. 13<sup>th</sup> A-IMBN Symposium. 11-14 Nov, 2010. Taipei

##### 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

- 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.
- 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.
- 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.
  - 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 佐藤憲子.
  - 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.

##### 特記事項

新聞記事など

村松正明: 先端技術・医療 バイオ医新 追跡調査、新薬に生かす. *日経産業新聞* pp.29-31. 2010.8.23.



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

## 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 転写伸長因子エロンガンの Rpb1 ユビキチン E3 リガーゼと転写制御の Dual 機能は、分離できる生物機能か？

RNAポリメラーゼ II (PolII) 転写の活性化や抑制の本体が、開始に引き続く mRNA 合成伸長によることが広く認識され、その制御の重要性が広く認識されている。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、両活性が Elongin A 分子の異なる機能ドメイン

ンによる Bifunctional 因子である結果を得つつある。さらに、我々がこれまでに作成した Elongin A KD 安定 HeLa 細胞では、DNA damage response において Rpb1 分解が起こらないものの、ストレス応答遺伝子の転写誘導が顕著に障害されていることをしめしていたが、このストレス応答の回復は転写機能により回復されるものの、E3 リガーゼ活性ドメインによっては Rescue されないことを見出した。以上より、Elongin A は、ストレス応答において細胞の生命分子である Rpb1 の分解を行うと同時に細胞運命に関わる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 safety device として働いていると言える。

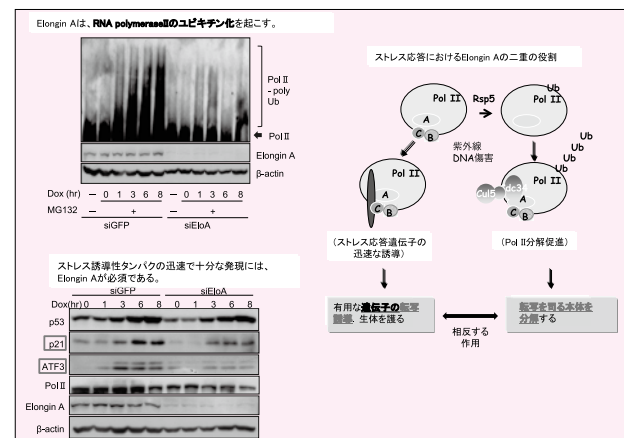


図1 Elongin A の生物機能

### 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。本年度は、ATF3 研究について以下の結果を得た。

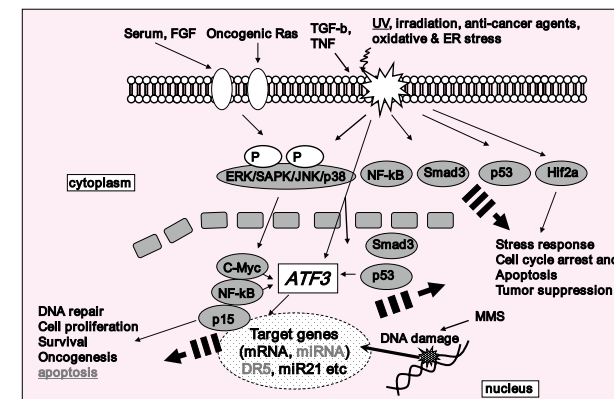


図2 ATF3 誘導のシグナルと伝達

#### 2-1 新規 alternate promoter P1 の解析、ATF3 標的マイクロRNA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。

#### 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、ヒト大腸がん細胞においてアルキル化剤であるメタンルホン酸メチル (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するため、クロマチン免疫沈降法によるプロモーターアレイ解析を行い、ATF3 は大腸がん細胞では約 6,000 個、前立腺がん細胞では約 1,300 個のプロモーターに結合し、しかもその多くに ATF3 以外のストレス制御転写因子の結合モチーフが存在することを明らかにしている。更に、ATF3 ノックダウンとマイクロアレイによる発現プロファイリングによって、ATF3 が直接数百単位の標的遺伝子を活性化または抑制

することを明らかにした。特に、ATF3 は p53 の既知の標的遺伝子の 40% にも及ぶ遺伝子に結合するばかりでなく、MMS によって誘導された ATF3 は細胞死関連遺伝子を選択的に活性化することを示している。

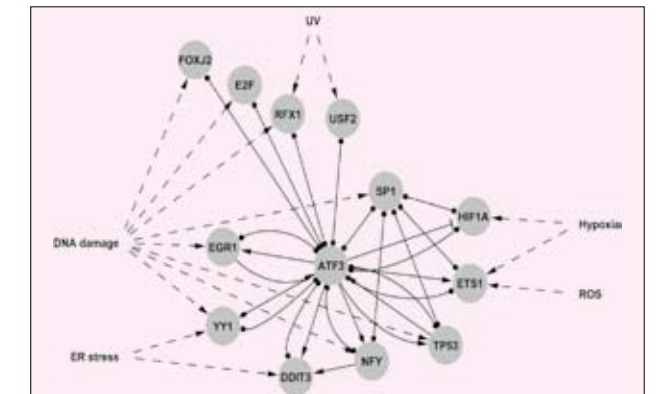


図3 種々のストレス刺激に対する応答と ATF3 経路

#### 2-3 ストレス応答遺伝子 ATF3 は Camptothecin (CPT) による 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 receptor5) が ATF3 結合性標的遺伝子であることが示唆された。本年度においてヒト大腸がん細胞を用いた ATF3 と DR5 発現制御の解析を進めた。その結果、大腸がん治療薬である CPT 刺激による DR5 転写誘導に ATF3 が重要な正の作用を持つことを明らかにした。一方、DR5 は TRAIL あるいはその Agonist によるがん細胞死を誘導し新たな治療として期待されているが、ATF3 は、TRAIL 療法とりわけ TRAIL/CPT の併用療法において ATF3 が重要なバイオマーカーになる可能性がある (武谷ら, 分子生物学会・生化学会発表 2010)。

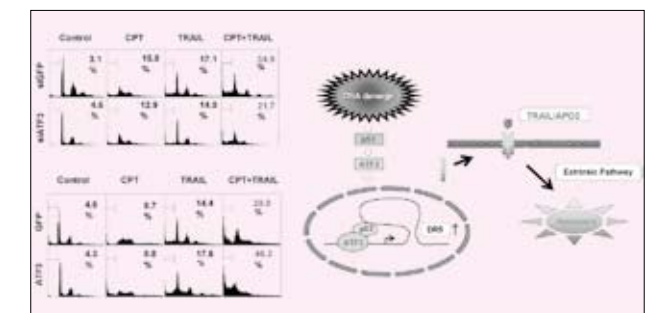


図4 ATF3 は Camptothecin による DR5 発現を高め、アポトーシスを促進する

### 3. 新規 FRET プローブで細胞内のヒストン修飾酵素活性の動態を見る

コア・ヒストンは様々な酵素によって生化学的修飾を受けることが知られており、これらの修飾部位に特異的に結合するアダプター分子や、これと複合体を形成する因子によって遺伝子発現が制御されている。我々は従来、ヒストン H3 リジン 36 (K36) を特異的にメチル化する



酵素 ASH1 をクローニングし、Hox 遺伝子の発現制御に於ける機能を明らかにして来た。このようなクロマチンの高次構造制御は、分化した細胞に於ける安定した遺伝子発現パターンの維持に重要な役割を持っていると考えられて来たが、一方で K36 メチル化を含めヒストン修飾は全て可逆反応であり順反応と逆反応をそれぞれ触媒する酵素が存在することが知られている。即ち、ヒストン修飾は細胞の中で極めてダイナミックに変化している可能性がある。ChIP 解析などこれまでのクロマチン構造解析法では、このように動的なヒストン修飾の変化を捉えることは難しかった。そこで我々は、ヒストン修飾酵素活性を可視化する FRET プローブを新規に開発し、これを用いて細胞一個一個の中でヒストン修飾酵素活性の動きを定量化し、マウス初期発生に於ける非対称性の起源を細胞レベルで同定する試みを行っている（田中、新学術領域「細胞コミュニティ」、定量分子生物学の会発表 2010）。

## 人事異動

転入：正木久晴（大学院生、病態生化）、小高愛未（大学院生、北里大学）、三田村潤（大学院生、明治大学）、大屋沙織（大学院生、東京医科歯科大学）、平田学（大学院生、東邦大学）、宮本大貴（大学院生、東京農業大学）、井上允（大学院生、法政大学）、宮城知香（大学院生、東京農業大学）、青木真志（卒業研究生、北里大学）

転出：安達三美（助教、帝京大学）、浅野慎一郎（大学院生）、中村絢（大学院生）、巽一郎（受入研究学生）

## 業績目録

### 原著論文

1. Braglia P, Kawachi J, and Proudfoot NJ. (2011) Co-transcriptional RNA cleavage provides a failsafe termination mechanism for yeast RNA polymerase I. *Nucleic Acid Res.* 39(4) 1439-1448 (2011)

2. Spohn D, Rossler OG, Phillip SE, Raubuch M, Kitajima S, Griesemer D, Hoth M, Thiel G. (2010) Thapsigargin induces expression of ATF3 in human keratinocytes involving Ca<sup>2+</sup> ions and c-Jun N-terminal protrin kinase. *Mol Pharmacol* 78, 865-876. 2010

### 国内学会発表

1. 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 22 年 12 月、神戸 第 33 回日本分子生物学会

2. 佐々木 かおり、川内 潤也、田中 裕二郎、北嶋 繁孝：転写因子 ATF3 による microRNA の発現制御機構。平成 22 年 12 月、神戸 第 33 回日本分子生物学会

3. 武谷 憲二、本下 愛子、川内 潤也、田中 裕二郎、前原 喜彦、北嶋 繁孝：ストレス応答遺伝子 ATF3 は Camptothecin による DR5 発現を正に制御する。平成 22 年 12 月、神戸 第 33 回日本分子生物学会

4. 正木 久晴、西田 知弘、逆井 良、北嶋 繁孝、寺 岡 弘 文：Biological function of DPPA4 in mouse ES cells and human iPS cells。平成 22 年 12 月、神戸 第 33 回日本分子生物学会

5. 第 429 回難研セミナー：Dr.Robert G Roeder (The Rockefeller University) :Function of diverse transcriptional coactivators in animal cells. 平成 22 年 4 月、東京医科歯科大学

6. 田中裕二郎：「FRET プロープで細胞内ヒストン修飾酵素活性を見る」平成 22 年 6 月、神戸新学術領域「細胞コミュニティ」第 2 回班会議

7. 田中裕二郎：「細胞内ヒストン修飾酵素活性の定量」平成 22 年 11 月、東京 定量生物学の会第 3 回年会

8. 田中裕二郎：「FRET プロープで細胞内ヒストン修飾酵素活性を見る」平成 23 年 1 月、福岡新学術領域「細胞コミュニティ」第 3 回班会議

### 国際学会および海外セミナー

なし

### 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）：文部科学省基盤研究（C）「転写抑制因子 ATF3 の遺伝子制御と生物機能の解析」

北嶋繁孝（代表）：JST 産学イノベーション顕在化シーズ研究 「サイクリン D1 核移行制御ペプチドによる心筋再生法の開発」

田中裕二郎（代表）：文部科学省基盤研究（C）「FRET プロープによるヒストン修飾の時間空間的分析」

田中裕二郎（代表）：文部科学省新学術領域研究・細胞コミュニティ「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）：第 28 回持田記念研究助成金「bZip 型転写因子 ATF3 によるマイクロ RNA 転写制御とがん治療戦略」

# 大学院疾患生命科学研究部 形質発現制御学研究室 難治疾患研究所 形質発現分野

## 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。しかしながら、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、以下に述べる様々なアプローチで、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学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。

mRNAのスプライシングは、複数のRNA蛋白質複合体によって触媒されており、その他多数の蛋白質が関与する。そのうちのひとつSF2/ASFに代表されるSR蛋白質群は、RNA認識モチーフとアルギニン/セリン・リピート(RSドメイン)を持つ。これらRSドメ

インリン酸化・脱リン酸化反応が、mRNAスプライシングに必須の反応であることから、RSドメインのリン酸化酵素が探索され、Clk1/Sty、Clk2、Clk3、Clk4、SRPK1、SRPK2、hPRP4などが、我々を含む数グループによって同定された。我々は現在、これらのリン酸化酵素によるスプライシング因子の制御機構の生理学的意義を中心に、さまざまなアプローチで解析を行っている。

### 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に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、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、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的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。

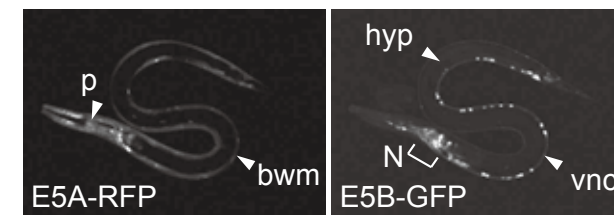


図1 組織特異的選択的スプライシングレポーター線虫。エクソン5Aの発現を示すRFPとエクソン5Bの発現を示すGFPが組織により異なる発現パターンを示している。

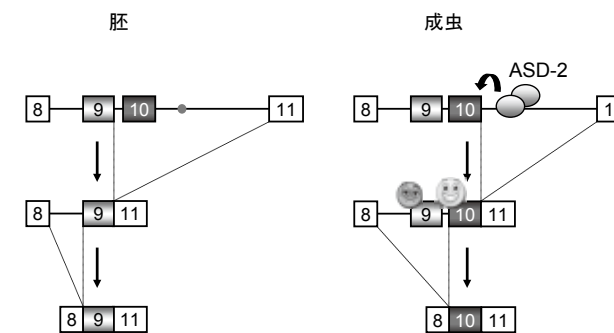


図2 *let-2* mRNA前駆体のプロセシング経路の解明。胚の時期にはエクソン9下流のエクソン10を含むイントロン領域がまず除かれ、続いて残った上流のイントロンが除かれることによりエクソン9を含むmRNAが生じる(左図)。成虫においては、ASD-2によってエクソン10下流のイントロンの除去が促進され、その後、スプライス・アクセプター部位の相対的な強さの違いによりエクソン10選択が一義的に決まる(右図)。

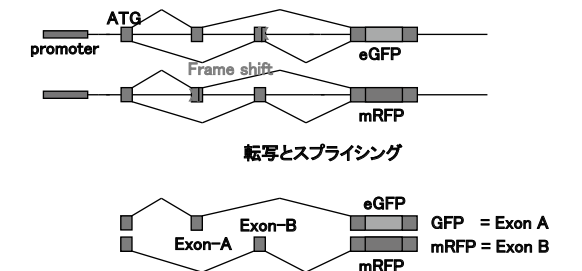
### 2. マウスの中樞神経系におけるプロテオームの多様化創出と部位特異的発現制御メカニズムの解明

哺乳類の臓器の中で、特に高度で複雑な構造と機能を持つ神経系では、脳の機能に必須のさまざまな重要な分子が、その選択的スプライシングにより、発現や機能を調節されていることが知られている。また、これらの選択的スプライシングの異常により、神経変性疾患、精神疾患などが起こることも報告されてきており、実際にヒトの中で、選択的スプライシング制御が非常に重要な役割を担っていることが分かってきている。しかしながら、発生時期や臓器や細胞ごとに、個々の遺伝子がどのような内部の状況や外部刺激に反応して、またどのようなスプライシング制御因子の相互作用からなる調節を受けて、細胞や臓器全体としていかに機能発現を調節されているかについては、実際まだほとんど分かっていないのが現状である。

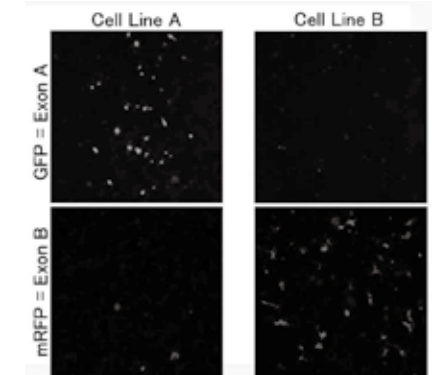
そこで我々は、マウスの生体の中での選択的スプライシングの状態を、発生過程の神経系や成体脳の部位ごと

に、単一細胞のレベルでモニターするスプライシング・モニター系を開発し、In Utero electroporation、mouse genetics と組み合わせることで、選択的スプライシングの制御因子群の機能解析および、それらによる神経発生、神経機能調節、大脳形成の制御機構の解明を目指している(PLoS ONE, 2010)(図3)。

#### 1. 選択的スプライシングをモニターするベクターの構造

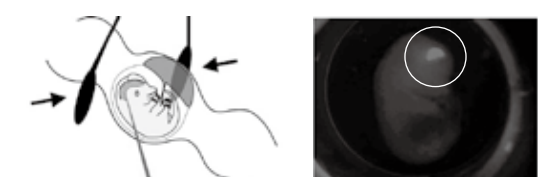


#### 2. In vitro (cell line)での使用例

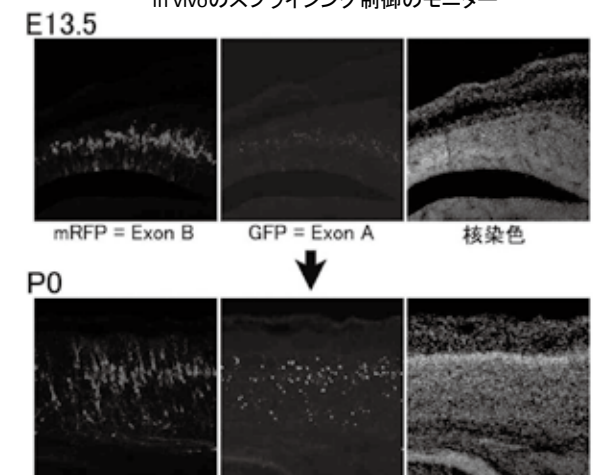


分化度や組織型により、cell line ごとに異なるスプライシングのパターンを示す例

#### 3. In vivo (マウス胎児脳)での使用例



マウス胎児脳への電気穿孔法による in vivo のスプライシング制御のモニター



発生過程の神経細胞で、分化度に応じてスプライシングパターンが変化する例

図3 哺乳類での、スプライシング制御モニターシステム



### 3. ウイルス RNA のスプライシング制御機構の解明とその治療への応用

ウイルスは、その小さなゲノム DNA から多彩な蛋白質を発現する必要があり、mRNA スプライシングや、プロテアーゼによる切断を行い、種々の蛋白質を発現する。特にウイルス RNA のプロセシングでは、感染細胞の RNA 結合蛋白質は不可欠な存在である。RNA 結合蛋白質である SR 蛋白質は発見当初、選択的スプライシングを制御する因子として同定されたが、その機能は多彩であり、mRNA の輸送や蛋白質の翻訳にも関わる因子であることが証明されている。SR 蛋白質ファミリーはSer-Arg反復配列からなるRSドメインを共通に持ち、このRSドメインは細胞内でSRPK, Clk等により、高度にリン酸化されている。

我々は、SR蛋白質の一つであるSRp75とそのリン酸化酵素SRPK2が、HIV-1の産生を亢進することを見出している（*PNAS*, 2006）。このことから、細胞因子であるSR蛋白質とそのリン酸化酵素SRPKは、ウイルスの増殖に必須な因子と考えられる。我々はこれらウイルスの増殖メカニズムに注目し、SRPK特異的阻害剤としてSRPIN340を得ることに成功した。

SRPIN340はヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス、シンドビスウイルス、SARSウイルス等に対しても増殖抑制能を有することから、適応範囲の広い抗ウイルス剤であることが明らかになり、抗ウイルス薬として開発を進めている。現在、SRPIN340の誘導体を合成し、C型肝炎ウイルス、インフルエンザウイルス、デング熱ウイルス等に対しても有望な低分子化合物を得ている。さらに基盤的な研究として、ヘルペスウイルス由来蛋白質ICP27が、宿主のPML (*promyelocytic leukemia protein*) 遺伝子の選択的スプライシングを変化させ、ウイルス増殖に影響を与えていることを明らかにした(*NAR*, 2009)。この報告は、ウイルス増殖と宿主遺伝子選択的スプライシングの関係について詳細な機構を明らかにした初めての例である。

#### 4. “PSYCHIKファミリー”に属する蛋白質リン酸化酵素に対する新規阻害剤の開発とその臨床応用可能性の検討

ヒトゲノムの解読により、518種類に上る蛋白質リン酸化酵素の存在が予想されている。これらのリン酸化酵素は生命現象の多彩な局面で重要な役割を果たし、また、幾つかのリン酸化酵素に対する特異的阻害剤が、既に臨床の場で主要な治療薬として使用されている。しかし、依然として多くのリン酸化酵素においては、その生理的・病的な機能は解明されていない。また、機能が判明している物においても、臨床的に有用な阻害剤や活性促進剤

が得られている物はごくわずかにすぎない。

我々は先にSRPK、Clkの特異的な阻害剤を世界に先駆けて開発し、これらの化合物が生命現象を解明する上で有用なツールになりうる事を示した。この成功を基に、阻害薬開発の対象とするリン酸化酵素を拡大して、さらなる探索を進めている。SRPKとClkはそれぞれ近縁のリン酸化酵素ファミリーであるが、他にもPRP4、DYRK、HIPKファミリーが近縁に位置し、全体としてより大きなリン酸化酵素ファミリーを形成している。これらのリン酸化酵素は、中枢神経系の発生および機能維持、アポトーシスの制御、pre-mRNA スプライシング等に関与している。我々はこれらを総称してPSYCHIKファミリー（PRP4、SRPK、DYRK、Clk、HIPK Family）と呼ぶ事を提唱し、それぞれのファミリーに対する特異的阻害剤を開発している。現在までに、新たに得られた化合物に対して、1) in vitro アッセイ、2) in cell 機能アッセイ、3) X線共結晶構造解析、4) whole embryo development アッセイによる解析を行った。その結果は、これらの化合物が新たな生物学的解析の有用なツールであることを確認するだけでなく、現在治療法を持たない難治性疾患への治療薬開発の可能性を示している（Nature Communications, 2010）。

#### 5. ストレス応答に関わるスプライシング制御機構の解明

細胞は、癌化、ウイルス感染、低酸素状態、熱ショック、ラジカル産生などの環境の変化や様々なストレスに曝される可能性が常にある。これらのストレスへの応答に、選択的スプライシングによる遺伝子発現制御が関わっている例も、これまでに報告されてきている。しかし、実際に、ストレス応答時にどのような機構によってスプライシングが制御されているかについては殆ど知られていない。そこで、細胞に対する各種ストレス、細胞の癌化などの環境の変化に応答して、実際にスプライシング・パターンが変化する遺伝子をモデル遺伝子として、これまでに培ったスプライシング・レポーター系や分子生物学・細胞生物学的手法を駆使し、スプライシング制御機構とそれによるストレス応答の実体の解明を試みている。

また、細胞は、ある種のストレス条件下においては、異常な蛋白質の産生を防ぐために、転写やRNA プロセシング、翻訳などの遺伝子発現機構を停止させるという防御機構を備えている。我々は、通常のスプライシング反応が抑制されるストレス条件下において、むしろ反応が促進されるユニークなスプライシング機構を発見し、その機構によって発現誘導される遺伝子が、細胞のストレスからの迅速な回復に必要であることを見出した。

人事異動
2010年3月、武内章英助教、二宮賢介特任助教が京都大学へ転出 <div> <div>3月、小川靖特任助教が名古屋大学へ転出</div> <div>3月、川村豪伸が大学院生命情報科学教育部博士後期課程修了</div> <div>3月、東京バイオテクノロジー専門学校の山田貴之が卒業研究を修了</div> <div>6月、萩原正敏教授が京都大学へ転出</div> <div>7月、喜井勲特任助教が京都大学へ転出</div> <div>8月、野島孝之特任助教が英国Oxford大学へ転出</div> <div>9月、黒川博史が技術補佐員に着任</div> <div>9月、ジュネイド・バラヤンが生命情報科学教育部博士前期課程修了、修士号取得</div> <div>9月、渡辺要平技術補佐員が京都大学へ転出、モニマ・アロム技術補佐員が退職</div> <div>11月、大学院生の趙晨希が転出</div> <div>12月、サイマトゥル・ホックが技術補佐員に着任</div> </div>

### 業績目録

#### 原著論文

- Nowak DG, Amin EM, Rennel ES, Hoareau-Aveilla C, Gammons M, Damodoran G, Hagiwara M, Harper SJ, Woolard J, Ladomery MR, Bates DO (2010). Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) splicing from pro-angiogenic to anti-angiogenic isoforms: a novel therapeutic strategy for angiogenesis. J Biol Chem 285(8): 5532-5540.
- Akihide Takeuchi, Motoyasu Hosokawa, Takayuki Nojima, Masatoshi Hagiwara (2010). Splicing reporter mice revealed the evolutionally conserved switching mechanism of tissue-specific alternative exon selection. PLoS One 5(6): e10946.
- Hidehito Kuroyanagi, Genta Ohno, Hiroaki Sakane, Hiroyuki Maruoka & Masatoshi Hagiwara (2010). Visualization and genetic analysis of alternative splicing regulation *in vivo* using fluorescence reporters in transgenic *Caenorhabditis elegans*. Nature Protocols 5(9): 1495-1517.
- Yasushi Ogawa, Yosuke Nonaka, Toshiyasu Goto, Eriko Ohnishi, Toshiyuki Hiramatsu, Isao Kii, Miyo Yoshida, Teikichi Ikura, Hiroshi Onogi, Hiroshi Shibuya, Takamitsu Hosoya, Nobutoshi Ito & Masatoshi Hagiwara (2010). Development of a novel selective inhibitor of the Down syndrome-related kinase Dyrk1A. Nature Communications 1(7): 1-9.

#### 総説

- 萩原正敏. 「基礎の基礎」細胞工学 (学研メディカル秀潤社, 2010) 特集「RNAプロセシング異常：RNA病を斬る」 29(2): 126-130.
- 野島孝之, 萩原正敏. 「RNAスプライシングの可視化による創薬スクリーニング」細胞工学 (学研メディカル秀潤社, 2010) 29(2).
- 片岡直行, 萩原正敏. 「RNAスプライシング操作によるRNA病治療戦略」細胞工学 (学研メディカル秀潤社, 2010) 29(2).
- 黒柳秀人. みにれびゅう「選択的スプライシング制御機構解明の新たなアプローチ」生化学 (日本生化学会, 2010) 82(5): 402-411.
- 大野源太, 黒柳秀人. 「選択的スプライシングの分子機構と生命現象」実験医学増刊 拡大・進展を続けるRNA研究の最先端 (羊土社, 2010) 28(10): 1591-1596.

<b>メディア</b>
日経産業新聞 2010年1月29日付 11面

#### 国際学会主催

黒柳秀人 4th East Asia *C. elegans* Meeting (東京都渋谷区)をHead Organizerとして開催 (日本学術振興会 国際研究集会採択)、2010年7月。

#### 国際学会招待講演

黒柳秀人 “Regulation of Tissue-Specific Alternative Splicing in *C. elegans*” The 19th CDB Meeting. 神戸市、5月。

#### 海外招待講演

萩原正敏 “Decipherment of splicing code and its manipulation with small chemicals for new therapeutics.” Signature Seminar Series Committee, シンガポール、2月。

#### 国内招待講演

萩原正敏「RNA病を斬る／RNAプロセシング異常に対する創薬の試み」三重大学大学院医学セミナー、1月。

黒柳秀人「蛍光レポーター線虫の作製と遺伝学的解析」細胞光計測・制御のための新規バイオ技術創成クラスター第2回シンポジウム特別講演、慶應義塾大学理工学部、3月。

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回東北大学脳科学グローバルCOE若手フォーラム、東北大学医学部、6月。

#### 学内外教育活動

萩原正敏：大学院生命情報科学教育部、医学部保健衛生学科、京都大学医学部、東京大学客員教授、三重大学医学部・医学系研究科非常勤講師
黒柳秀人：大学院生命情報科学教育部、医学部医学科、医学部保健衛生学科
武内章英：医学部保健衛生学科
二宮賢介：医学部保健衛生学科
喜井勲：医学部保健衛生学科
野島孝之：医学部保健衛生学科

#### 競争的研究費取得

萩原正敏（代表）科学技術振興機構 国際共同研究 鳥インフルエンザ治療薬の国際共同開発研究
萩原正敏（分担）科学技術振興機構 CREST「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」
萩原正敏（代表）厚労科研費補助金 難治性疾患克服研究事業 研究奨励分野「未熟児網膜症の原因と治療に関する調査研究」
萩原正敏（代表）、武内章英（分担）科学研究費補助金 基盤研究（A）「スプライシング暗号の解読による神経発生過程の解明」
萩原正敏（代表）科学技術振興機構 分子イメージング研究プログラム「難治感染症に対する新規治療薬開発のためのイメージング研究」
萩原正敏（代表）NEDO 健康安心イノベーションプログラム「新規悪性腫瘍分子プローブの基盤技術開発」
萩原正敏（代表）上原記念科学振興財団「遺伝子発現パターンの可視化によるスプライシング暗号の解明」
萩原正敏「GCOEプログラム」研究拠点形成費補助金
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（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」
野島孝之（代表）新学術領域研究（研究課題提案型）「悪性腫瘍特異的なRNA選択的スプライシングを制御する抗がん剤の開発」
野島孝之（代表）科学研究費補助金 若手研究 (B) 「ヘルペスウイルス感染による宿主選択的スプライシング制御と免疫回避機構」
井手上社子（代表）科学研究費補助金 奨励研究 「癌特異的転写後調節を利用した癌診断技術の開発」
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」



# 難治疾患研究所 ゲノム応用医学研究部門 エピジェネティクス分野

## 研究内容

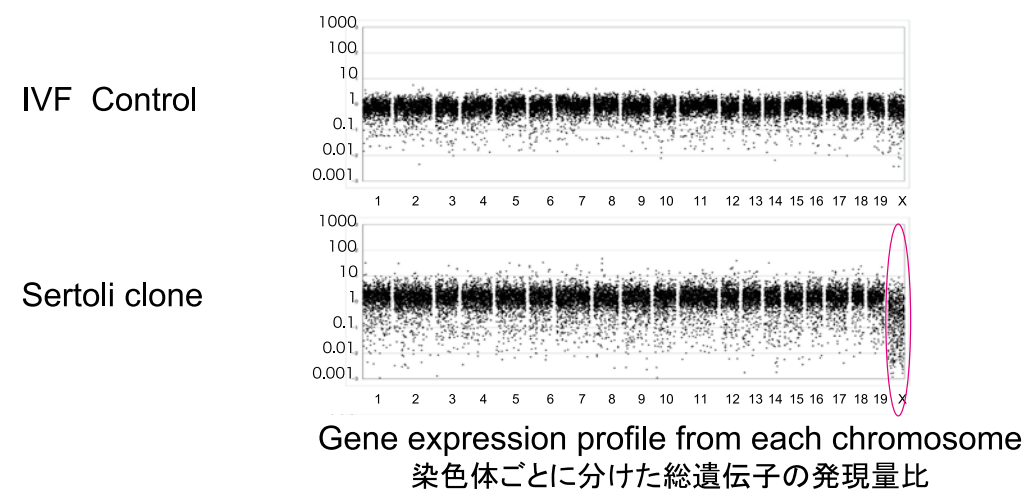
### 概 略

エピジェネティクス分野では、遺伝・個体発生・進化等のさまざまな生命現象を、ゲノム機能という立場から総合的に理解することを目指しています。現在の研究の主要テーマは、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。3番目となる例は *Sirh7* で、これも *Peg10*、*Peg11/Rtl1* と同じ種類のレトロトランスポゾンに由来した遺伝子である。この遺伝子も胎盤で顕著に発現が見られるが、これを欠失した場合、胎盤構造に大きな乱れが生じることを明らかにした（昨年 の年報のハイライト参照）。このように、哺乳類特異的遺伝子は哺



## Aberrant X chromosome inactivation in somatic clones

体細胞クローンマウスにはX染色体不活性化異常が起きている

図1 体細胞クローンマウスの網羅的遺伝子発現解析

体細胞核を未受精卵に移植して作製する体細胞クローン胚を着床前の段階でDNAマイクロアレイをもちいた網羅的遺伝子発現解析を行った。この図では、一つの点が一遺伝子の相対発現量（正常胚と比較して同じであれば1）を表している。また、各遺伝子はマウスの常染色体1番から19番とX染色体に振り分けて表している（図2参照）。このようにすると体細胞クローン胚では、X染色体上の遺伝子が全体的に発現低下をひき起していることがわかる。

乳類で特徴的な臓器の形成に関係しており、生物進化上で哺乳類が誕生する際に、重要な役割を果たした遺伝子であった。これらに加えて、*Sirh3*、*Sirh4*、*Sirh5*、*Sirh6*、*Sirh11*などのノックアウトマウスを作製し、東海大学健康科学部との共同研究でその機能解析を進めている。

## 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iPS細胞（誘導多能性幹細胞）の樹立成功へ繋がった。

### ハイライト

#### 体細胞クローンマウスにおけるX染色体不活性化の異常

哺乳類ではメスがXX、オスがXYという性染色体を持っており、メスの2本のX染色体の片方が、ランダムに選ばれて不活性化することにより、遺伝子発現量の補正を行なっている。これは哺乳類独自の機構であり、私たちの研究室で進めている哺乳類特異的ゲノム機能の一つと言える。X染色体上には生育に必須な遺伝子が幾つも存在しており、このX染色体不活性化機構は哺乳類の発生に必須な役割をはたしている。このX染色体不活性化機構で中心的な役割を果

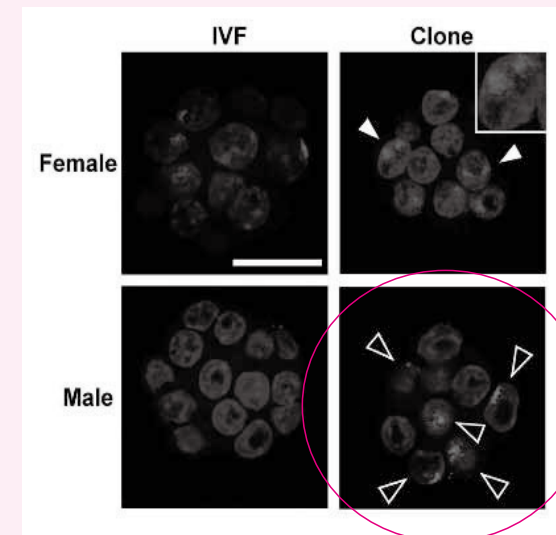
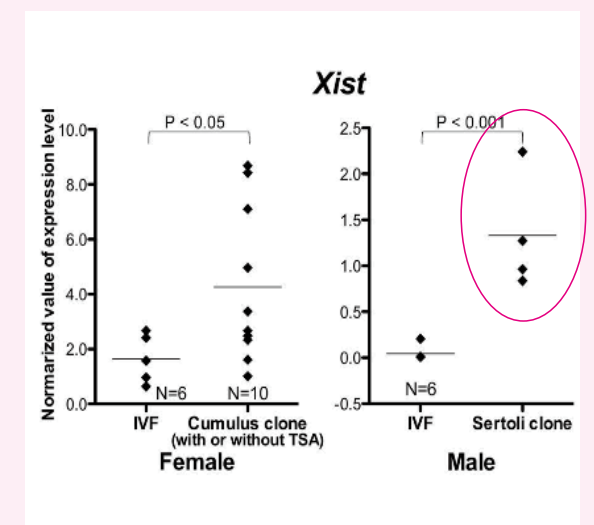


図2 Xist 遺伝子の異常発現

A. 上段はメス（XX）、下段はオス（XY）。IVFのコントロールではメスの体細胞の中で片方のXからだけXist遺伝子が発現し、オスからは発現が見られない。Cloneではメスの2本のX染色体からのXistの発現が見られる細胞が出現しており、オスからも発現が見られる。左：メス、右：オス。通常では発現しないオスの細胞からXistが高発現しているのがわかる。

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。その原因を探るために、私たちは理化学研究所バイオリソースセンターの発生工学技術室の小倉淳郎室長のグループとの共同研究で、着床前の胚盤胞という段階で体細胞クローンと正常受精卵を、DNAマイクロアレイを用いて解析した。その結果、体細胞クローンでは性染色体であるX染色体の異常な不活性化により、X染色体全域に渡って遺伝子発現が低下していることをつきとめた（図1）。そこでXist遺伝子をノックアウトし、1本のX染色体を不活性化できなくしたマウスの体細胞を材料にして体細胞クローンを作製したところ、オス、メスの体細胞をもちいたクローンのどちらも、従来の方法の約10倍高い成功率が達成できた（ハイライト参照）。この成功により、体細胞クローン作製効率の大幅な上昇が達成できたことのみならず、この原理をもとにした新たな改良法の開発が可能になったと考えている。

たすのがXist遺伝子である。この遺伝子是不活性化されるX染色体からのみ発現する。オスには1本のX染色体しかないため、当然、オスではXist遺伝子は発現しない。ところがオスの体細胞から作製したクローンマウスでは、Xist遺伝子の発現が確認され、異常な不活性化がおきていることが明らかになった（図2）。また、メスの体細胞から作製した場合でも、2本のX染色体ともに不活性化している細胞が生じていることが明らかになった。これにより図1のような、X染色体全域にわたる遺伝子発現の低下がひき起されていると考えられる。





人事異動
採用：岩船 浩孝（4月1日、特任助教）

業績目録
------

#### 原著論文

- Kobayashi, S., Fujihara, Y., Mise, N., Kaseda, K., Abe, K., Ishino, F. and Okabe, M. The X-linked imprinted gene family *Fthl17* shows predominantly female expression following the two-cell stage in mouse embryos. Nuc Acids Res **38**(11), 3672-3681 (2010).
- Kaneko-Ishino, T. and Ishino, F. Retrotransposon silencing by DNA methylation contributed to the evolution of placentation and genomic imprinting in mammals. Develop Growth Differ **52**(6), 533-543(2010).
- Inoue, K., Kohda, T., Sugimoto, M., Sado, T., Ogonuki, N., Matoba, S., Shiura, H., Ikeda, R., Mochida, K., Fujii, T., Sawai, K., Otte, A. P., Tian,X. C., Yang, X., Ishino, F. Abe, K. and Ogura, A. Impeding *Xist* expression from the active X chromosome improves mouse somatic cell cloning. Science **330**(6003),496-499(2010).

#### 総説及び著書

- 石野史敏　ゲノムインプリンティング　炎症と免疫 **18**(1)109-111(2010).
- 石野史敏、金児-石野知子　インプリンティングとその分子機構　Frontier in Gynecology **17**(4)11-16(2010).
- 石野史敏　哺乳類の体の大きさ　大きさの生物学 細胞工学　**29**(12)1272-1275(2010).

#### 国内学会発表

- 石野史敏　哺乳類における胎生・ゲノムインプリンティングの獲得とレトロトランスポソンの寄与について　北海道大学グローバルCOE物質科学イノベーション講演会　平成22年5月11日（北海道大学).
- 石野史敏　体細胞クローニング技術や生殖補助医療におけるエピジェネティックな課題　東大医科研大学院セミナー　平成22年6月14日（東京大学医科学研究所)
- 石野史敏　哺乳類における胎生とゲノムインプリンティングの進化とレトロトランスポゾン　首都大学東京セミナー　平成22年6月25日（首都大学東京)
- 石野史敏、金児-石野知子　哺乳類における胎生の進化とレトロトランスポゾン　第19回三木成夫記念シンポジウム　平成22年7月21日（鶴見大学講堂)
- 石野史敏　哺乳類における胎生の進化とレトロトランスポゾン　第18回日本胎盤学会・第28回絨毛性疾患研究会　教育講演　平成22年10月1日（ホテル日航熊本)
- 石野史敏　体細胞クローン動物とエピジェネティクス　Human Science 財団勉強会　平成22年10月13日（Human Science 財団本部)
- 石野史敏　ゲノムインプリンティング制御　大阪大学蛋白研セミナー　平成22年11月19-20日（大阪大学)
- 石野史敏　ゲノムインプリンティング：ほ乳類におけるその生物学的意義　第21回フォーラム・イン・ドージン　エピジェネティクスによる細胞のメタモルフォーゼ　平成22年11月26日（ホテルキャッスル熊本)
- 岩崎佐和、幸田尚、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群 Pnma-family におけるインプリンティングの検証　BMB2010　2010年12月7-10日（神戸ポータア

- イランド)
- 遠藤大輔、関田洋一、金児-石野知子、石野史敏　Peg11/Rtl1 とそのアンチセンス RNA にコードされる microRNA は独立した経路で協調的に働きマウスの発生に必須な役割を果たす　BMB2010　2010年12月7-10日（神戸ポータアイランド)
- 岩船浩孝、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-ichi レトロトランスポゾン由来の遺伝子 *Sirh11* の個体での役割　BMB2010　2010年12月7-10日（神戸ポータアイランド)
- 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-ichi レトロトランスポゾン由来の遺伝子 *Sirh3* の機能解析　BMB2010　2010年12月7-10日（神戸ポータアイランド)
- 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 の胎盤発生における役割　BMB2010　2010年12月7-10日（神戸ポータアイランド)
- 幸田尚、越後貫成美、井上貴美子、古瀬民生、金田秀貴、鈴木智広、金児-石野知子、若山照彦、若菜茂晴、小倉淳郎、石野史敏　顕微授精によって誘導されるマウスの遺伝子発現変化　BMB2010　2010年12月7-10日（神戸ポータアイランド)
- 渡辺久子、小野由美子、幸田尚、石野史敏、入江将仁、金児—石野知子　胎仔期低栄養暴露が与える遺伝子発現への影響　BMB2010　2010年12月7-10日（神戸ポータアイランド)

#### 国際学会発表

- Fumitoshi Ishino, Ryuichi Ono, Shunsuke Suzuki, Yoichi Sekita, Mie Naruse, Takashi Kohda and Tomoko Kaneko-Ishino. Evolution of mammalian viviparity and genomic imprinting by retrotransposons. NAIST Global COE International Symposium 2010 Plasticity in Development and Evolution November 11-12, 2010 (NAIST Millennium Hall).

#### 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
北海道大学大学院理学系研究科
首都大学東京大学院理学系研究科

#### 特許申請

発明の名称：クローン動物の作出方法
出願番号：特願 2010-197583（出願日：2010年9月3日）

#### 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」
- 石野史敏（代表）：日本学術振興会　二国間交流事業共同研究「哺乳類に置けるエピジェネティック制御機構の進化」
- 小野竜一(代表):文部科学省特定領域研究（公募研究）「生殖細胞でエピジェネティックリプログラミングされる胎盤形成に必須な遺伝子群の解析」
- 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獲得による哺乳類の胎生進化の解明」

# 疾患生命科学研究所 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

## 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ゼを掲げ、生命とは「進化（複雑化）する生命分子ネットワーク」として捉え、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。大半の疾患は単因子疾患

ではなく、分子的な変異・異常と臓器組織レベルでの異常、個体レベルでの臨床症状が相互に関連して、「システムとして病気」が構成される。これまでの疾病観にかわる、システム病態学こそが分子時代の医学を切り開くものだと考えている。

その他の研究分野としては、医療への情報技術（IT）の応用として、地域医療における医療情報の連携や国民規模の電子化健康医療情報基盤の政策科学の研究に従事している。

2010年における代表的な研究内容を以下に紹介する。

## 研究紹介

### ハイライト

#### 遺伝子重複による真核生物の蛋白質間相互作用ネットワークの進化

蛋白質間相互作用ネットワーク（protein-protein interaction network; PIN）は、非同類結合性（図1）を有すると考えられている。非同類結合性を有するネットワークでは、相互作用数が多い蛋白質（ハブ蛋白質）は相互作用数が少ない蛋白質をまとめて機能モジュールを構成し、ハブ蛋白質同士の相互作用が抑制されている（図1）。非同類結合性は進化的に自然選択されていると考えられているが、この構造を生成する進化的なメカニズムは不明である。

そこで、我々は、真核生物55種のプロテオームおよび真核生物5種のPINを比較した。その結果、相互作用数の少ない蛋白質が頻繁に遺伝子重複されている生物種（図2）ではPINは非同類結合性を有するが、ハブ蛋白質が頻繁に重複されている生物種（図2）では非同類結合性を示さなかった。相互作用数の少ない蛋白質を優先的に遺伝子重複しながらネットワーク成長モデルに基づいたコンピューターシミュレーションを行ったところ、生成されたネットワークは非同類結合性を示した。一方、ハブ蛋白質を優先的に遺伝子重複した場合、ネットワークは非同類結合性を示さなかった。

以上の結果から、PINの非同類結合性は遺伝子重複により自然に生成されるものであり、自然選択によるものではないことが示唆された。この研究の成果は、BMC Evolutionary Biology 誌に掲載され、多くの読者からの注目を浴び、Highly accessed article として認定された。

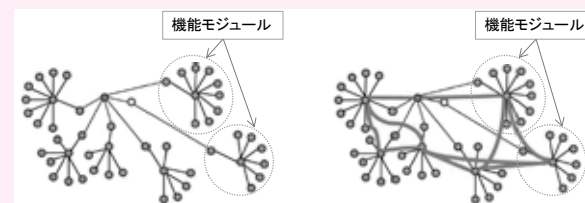


図1. 非同類結合性を示すネットワーク（左図）と非同類結合性を示さないネットワーク（右図）  
非同類結合性のあるネットワークでは異なる機能モジュール間の混線がうまく防がれるが、非同類結合性を示さないネットワークでは異なる機能モジュール間の混線が生じてしまう、と考えられている。そのため、非同類結合性は生物の生存に有利であると考えられてきた。

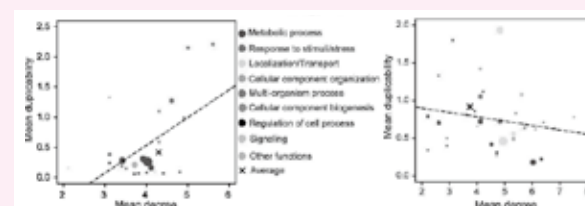


図2. 蛋白質の遺伝子重複のしやすさと相互作用数との関係  
左図はマラリア原虫の、右図が酵母の結果。各点は一つの gene ontology カテゴリーを表す。縦軸は、各 gene ontology カテゴリー内の蛋白質の平均の遺伝子重複のしやすさ、横軸は平均の相互作用数を表している。点線は regression line を表す。

## 1. 疾患オミックスデータのバイオインフォマティクス

Harvard Medical School が開発した患者情報データベースシステム i2b2 を日本に移植し、本学附属病院で収集した患者情報を格納した日本版 i2b2 を開発した。i2b2 は、次世代の高度個別化医療を目指し、大学病院、クリニック、患者団体、といった様々なレベルのデータをシームレスに繋ぐことができるよう、オントロジーに基づくオブジェクト指向型データベース構造を実現している。日本語 i2b2 の構築においては、日本語の所見テキストから疾患名を機械抽出し、英語に機械翻訳する自然言語処理の手法を開発した。

病態の Progress を克明に捉えるには、細胞内のタンパク質の網羅的情報が有用である。MASS で観測したプロテオームデータについて、タンパク質の N 末端と C 末端を簡便に特定する方法がなかった。Lys 残基の N 末端および C 末端のみを特異的に切断する酵素を活用して、任意のタンパク質の N 末端と C 末端を組織的かつ簡便に特定できる方法を開発した。この手法をヒトの血漿に応用したところ、未知の N 末端や C 末端を持つタンパク質が見出され、疾患との関連性が示唆された。

## 2. オミックス解析による疾患メカニズムの解明と臨床応用

近年の生命科学研究における解析技術の発展にともない、ゲノム・トランスクリプトーム・プロテオームなどの網羅的な分子生物学的データ、すなわちオミックスデータが比較的簡便に得られるようになった。これらの膨大な情報から有用な知見を引き出すためには、生物学的・医学的知識はもちろんのこと、データマイニングや統計学的手法、機械学習などといった情報科学的アプローチ（バイオインフォマティクス）が必須である。

我々は、学内外の臨床各科と共同研究を行っており、主に（1）肝細胞癌の早期再発予測マーカー探索、（2）大腸癌における遠隔転移再発の予測マーカー探索、（3）乳癌における上皮間葉転換の分子メカニズムの解析など、オミックスデータとバイオインフォマティクスを機軸として多岐に渡る研究を進めている。

## 3. iCOD：疾患のシステム病理学的視点に基づいた統合臨床オミックスデータベース

近年、疾患における病理学的知見と関連づけられた網羅的な分子情報が大量に蓄積されつつある。これらの間の関係を精査することによって、様々な疾患において遺伝子やパスウェイが持つ役割の発見や、創薬の手がかりなどに結びつくことが期待されている。

このような観点から、我々のグループは統合臨床オ

ミックスデータベース（iCOD）を作成した。このデータベースは、CT や X 線画像、各種検査値から投薬歴、生活歴までの包括的な臨床・診断情報に加えて、網羅的な遺伝子発現情報やゲノムコピー数などの分子情報を併せて持つだけでなく、これらの情報を階層的に分けて Web 上で解析を行うことができるツールも用意されている。またこのデータベースは、臨床医科学データベース倫理案に沿った階層的データ管理が行われている。



## 業績目録

### 原著

- Hase T, Niimura Y, Tanaka H: Difference in gene duplicability may explain the difference in overall structure of protein-protein interaction networks among eukaryotes, BMC evolutionary biology, 10:358, 2010
- Shimokawa K, Mogushi K, Shoji S, Hiraishi A, Mizushima H, Tanaka H: iCOD: an integrated clinical omics database based on the systems-pathology view of disease, BMC Genomics, 11:S19, 2010
- Shimizu S, Iida S, Ishiguro M, Uetake H, Ishikawa T, Takagi Y, Kobayashi H, Higuchi T, Enomoto M, Mogushi K, Mizushima H, Tanaka H, Sugihara K: Methylated BNIP3 gene in colorectal cancer prognosis, Oncology Letters, 1:865-72, 2010
- Takano S, Sogawa K, Yoshitomi H, Shida T, Mogushi K, Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Ishihara T, Tanaka H, Yokosuka O, Nomura F, Miyazaki M: Increased circulating cell signalling phosphoproteins in sera are useful for the detection of pancreatic cancer, British journal of Cancer, 103:223-31, 2010
- Nakahara I, Miyamoto M, Shibata T, Akashi-Tanaka S, Mogushi K, Oda K, Ueno M, Takakura N, Mizushima H, Tanaka H. Ohta T: Up-regulation of PSF1 Promotes the Growth of Breast Cancer Cells, Genes to Cells, 15:1015-24, 2010
- Ohashi K, Ota S, Ohno-Machado L, Tanaka H: Smart medical environment at the point of care: Auto-tracking clinical interventions at the bed side using RFID technology, Computers in Biology and Medicine, 40:545-54, 2010
- Tanaka H: Omics-based Medicine and Systems Pathology, Methods of Information in Medicine, 49:173-85, 2010
- Yoshida T, Kobayashi T, Itoda M, Muto T, Miyaguchi K, Mogushi K, Shoji S, Shimokawa K, Iida S, Uetake H, Ishikawa T, Sugihara K, Mizushima H, Tanaka H: Clinical omics analysis of colorectal cancer incorporating copy number aberration and gene expression data, Cancer Informatics, 9:147-61, 2010
- Matsuyama T, Ishikawa T, Mogushi K, Yoshida T, Iida S, Uetake H, Mizushima H, Tanaka H, Sugihara K: MUC12 mRNA Expression is an independent marker of prognosis in stage II and stage III colorectal cancer, International Journal of Cancer, 127:2292-99, 2010
- Tanaka S, Mogushi K, Yasen M, Noguchi N, Kubo A, Nakamura N, Ito K, Miki Y, Inazawa J, Tanaka H, Arii S: Gene expression phenotypes for vascular invasiveness of hepatocellular carcinomas, Surgery, 147:405-14, 2010
- Nakaya J, Kimura M, Hiroi K, Ido K, Yang W, Tanaka H: Genomic sequence variation markup language (GSVML) , International Journal of Medical Informatics, 79:130-42, 2010
- Watanabe K, Kurihara Y, Nakamura T, Tanaka H: Design of a Low-Frequency Microphone for Mobile Phones and Its Application to Ubiquitous Medical and Healthcare Monitoring, IEEE SENSORS JOURNAL 1, 10:934-41, 2010
- Nakagawa M, Sakamoto N, Ueyama M, Mogushi K, Nagaie S, Itsui Y, Azuma S, Kakinuma S, Tanaka H, Enomoto N, Watanabe M: Mutations in the interferon sensitivity determining region and virological response to combination therapy with Pegylated-interferon alpha

2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C-1b infection, Journal of Gastroenterology, 45:656-65, 2010

14. Nishimura-Sakurai Y, Sakamoto N, Mogushi K, Nagaie S, Nakagawa M, Itsui Y, Sekine-Osajima Y, Tasaka-Fujita M, Onuki-Karakama Y, Suda G., Mishima K, Yamamoto M, Ueyama M, Funaoka Y, Watanabe T, Chen CH, Kakinuma S, Tsuchiya K, Tanaka H, Enomoto N, Watanabe M: Comparison of HCV-associated gene expression and cell signaling pathways in cells without HCV replicon and in replicon-cured cell, Journal of Gastroenterology, 45:523-36, 2010

15. Tsubota A, Mogushi K, Nariai K, Tanaka H, Tada N: IQGAP1 and vimentin may be key regulator genes in naturally occurring hepatotumorigenesis induced by oxidative stress, Carcinogenesis, 31:504-11, 2010

16. Matsui A, Go Y, Niimura Y: Degeneration of olfactory receptor gene repertoires in primates: No direct link to full trichromatic vision, Mol. Biol. Evol. 27:1192-1200, 2010

17. Nakagawa S, Niimura Y, Miura K, Gojobori T: Dynamic evolution of translation initiation mechanisms in prokaryotes, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 107:6382-87, 2010

18. Obulhasim G, Fujii H, Matsumoto T, Yasen M, Abe M, Matsuoka S, Ohtsuji N, Hino O: Mesothelin gene expression and promoter methylation/hypomethylation in gynecological tumors, Eur J Gynaecol Oncol, 31:63-71, 2010

19. Aihara A, Tanaka S, Yasen M, Matsumura S, Mitsunori Y, Murakata A, Noguchi N, Kudo A, Nakamura N, Ito K, Arii S: The selective Aurora B kinase inhibitor AZD1152 as a novel treatment for hepatocellular carcinoma, J Hepatol, 52: 63-71, 2010

### 著書

1. 田中 博（分担執筆）：病院情報システムの技術的現況と展望、月刊新医療別冊・データブック「医療機器システム白書2010-2011」、218-21, 2010

### 総説

- 田中博：日本の医療における ICT 化の現状と日本版 EHR（第 3 回）－我が国の医療の現状と医療 ICT の役割、Monthly IHEP、9 月号、1-3、2010
- 田中博：欧州では EHR は第 2 世代に、PC-Webzine、8 月号、33、2010
- 田中博：医療介護分野で加速する IT エンジニアの活躍フィールド、Tech 総研、8 月 25 日 up、2010
- 田中博：日本の医療における ICT 化の現状と日本版 HER（第 2 回）－我が国の医療の現状と医療 ICT の役割、Monthly IHEP、8 月号、9-11、2010
- 田中博:病院情報システムの技術的現況と展望、医療機器システム白書 2010～2011、第 3 章、218-221、2010
- 田中博：総説、ITMedical、Vol.3、No.2、6-7、2010
- 田中博：日本の医療における ICT 化の現状と日本版 HER（第 1 回）－我が国の医療の現状と医療 ICT の役割、Monthly IHEP、7 月号、1-3、2010
- 田中博：キーパーソンに聞く「日本版 EHR」実現までのロードマップ、Tech Target、6 月 29 日 up、2010
- 田中博：日本版 EHR の現状～進む実証実験と実現への課題、Tech Target、4 月 7 日 up、2010
- 新村芳人、柴田匡邦、大橋渉、田中博：医療に対するインフォマティクスからのアプローチ：

医療の効率化へ向けて、日本バイオインフォマティクス学会ニュースレター、20:2-4、2010

11. 高井貴子、田中博：異分野融合型疾患生命科学教育の国際連携、Zenis、Vol.2、20-21、2010

12. 高井貴子、福岡豊、田中博：臨床データの公的利用とトランスレーショナル研究、計測と制御、42:553-7、2010

### 国際学会

- Tanaka H: Current State and Futures of Systems Pathology, Translational Research Excellence Conference (TRX10) , Brisbane, Australia, Oct 2010
- Tanaka H: Omics-based Medicine and Systems Pathology, Libya, Jan 2010
- 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 T: On experiences of i2b2 (Informatics for Integrating Biology and the Bedside) database with Japanese Clinical Patients' data, International Conference on Bioinformatics 2010, Tokyo, 2010
- Kishimoto T, Kondo J, Takai-Igarashi T, Tanaka H: A Novel Method for Analyzing Protein Terminals, 58th ASMS Conference on Mass Spectrometry conference, Colorado, 2010
- Nagaie S, Terashima K, Mogushi K, Yasen M, Nakamura N, Tanaka S, Kitagawa M, Arii S, Tanaka H: Comprehensive Analyses of Gene Expression Pattern Based on Tumor Differentiation in Hepatocellular Carcinoma. A Relationship with Hepatic Stellate Cells. The American Society for Cell Biology 50th Annual Meeting, Philadelphia, USA, Dec 2010
- Miyashita A, Saitoh Y, Hatsuta H, Tsukie T, Kakita A, Iijima R, Ogishima S, Tanaka H, Takahashi H, Murayama S, Ihara Y, Kuwano R: Gene expression profiling of postmortem brain tissues with Alzheimer’s disease, ICAD 2010, Hawaii, Jul 2010
- 他 3 件

### 国内学会

- 茂柳薫、田中真二、Mahmut Yasen、野口典男、入江工、工藤篤、中村典明、稲澤謙治、田中博、有井滋樹：肝細胞癌の早期再発を予測する非癌部遺伝子発現プロファイル、第 46 回日本肝臓学会総会、山形、2010 年 5 月
- 長谷武志、田中博、新村芳人：遺伝子重複による蛋白質間相互作用ネットワークの進化、第 12 回日本進化学会大会、2010 年 8 月
- Hatano A, Moesa HA, Chiba H, Taniguchi T, Nagaie S, Yamanegi K, Fujibuchi W: CELLPEDIA: Comprehensive human cell database toward cell differentiation analysis, CBRC2010、東京、2010 年 7 月
- Kim H, Kato T, Mogushi K, Tanaka H, Fujibuchi W: Detection of common pathways activated by anticancer drugs using regularized kernel canonical correlation analysis, CBI 学会、東京、2010 年 9 月
- Tanaka Y, Nogawa H, Tanaka H: 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、2010 年 2 月
- Kikuchi M, Ogishima S, Niimura Y, Tanaka H: A global view of functional module in the proteine interaction network, BiWO, Tokyo, Jul 2011
- Mizuno S, Iijima R, Ogishima S, Kikuchi M, Fukuhara T, Miyashita A, Kuwano R, Tanaka H: AlzPathway: a comprehensive map for both discovering risk candidate genes and revealing

mechanism of Alzheimer’s disease, BMB 2010, Kobe, Dec 2010

8. 遠藤有人、五味悠一郎、田中博：Pubmed 日本語版の基礎的検討、日本医療情報学会、浜松、2010 年 11 月

9. Mahmut Y、水島洋、茂柳薫、Gulanbar O、田中真二、有井滋樹、田中博：マイクロアレイ解析により肝癌再発、悪性度診断分子マーカーの構築と同定、第 99 日本病理学会、東京、2010 年 4 月

10. 飯島久美子、Mahmut Y、水島洋、田中博：肝細胞癌における MAGE 遺伝子の発現解析、第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会合同大会、神戸、2010 年 12 月

他 33 件

### 招待講演

- 田中 博：医療情報システム、第 14 回日本医療統合学会講演、徳島、2010 年 12 月 11 日
- 田中 博：医療 IT の最新の動向―生涯電子カルテとユビキタス医療、テレコム・ニューサービス研究会、東京、2010 年 8 月 19 日
- 田中 博：デジタル・オミックス医学と Systems Pathology、第 16 回 Future of Radiology、東京、2010 年 5 月 27 日
- 田中 博：電子カルテと IC 医療－中小病院にとつてのこれからの医療 IT ー、JBCC のセミナー、東京、2010 年 5 月 22 日
- 田中 博：Innovation in Medical Information and Communication Technology 、チェリープロッサムシンポジウム、横浜、2010 年 4 月 16 日
- 田中 博：病気をシステムで解くーオミックス医療の未来、サイエンスフォーラム講演、2010 年 3 月 28 日
- 田中 博：オバマ大統領の医療 IT 政策と日本版 EHR の実現にむけて、NORTH シンポジウム、札幌、2010 年 3 月 19 日
- 田中 博：ICT による医療改革、ユビキタスシンポジウム、北海道、2010 年 2 月 20 日
- 田中 博：異分野融合型疾患生命科学教育の国際連携、CBI 学会新春情報交換会講演、東京、2010 年 1 月 12 日
- Niimura Y: Evolutionary dynamics of olfactory receptor genes in vertebrates, Interaction between environments and genomic contents, Asian Young Researchers Conference on Computational and Omics Biology, Taiwan, Mar 2010
- 新村芳人：脊椎動物嗅覚受容体遺伝子ファミリーの進化－環境に応じて変化するゲノムー、第 12 回日本進化学会大会、東京、2010 年 8 月 4 日
- 新村芳人：脊椎動物嗅覚受容体遺伝子ファミリーの進化－環境に応じて変化するゲノムー、日本遺伝学会第 82 回大会、札幌、2010 年 9 月 22 日
- 荻島創一：比較トランスクリプトーム解析によるタンパク質間相互作用ネットワークの機能モジュールの大域的構造および進化、日本進化学会東京大会、2010 年 8 月
- 長谷武志、田中博、新村義人：遺伝子重複による蛋白質間相互作用ネットワークの進化、生命情報科学若手の会第 2 回研究会、三島、2010 年 10 月
- 他 32 件

### 研究助成金

- 田中 博（代表）：文部科学省 ライフサイエンス分野の統合データベース整備事業「統合医学データベース構築方法の開発」
- 田中 博（代表）：文部科学省委託事業 大学教育の国際化加速プログラム（総合戦略型）「異分野融合型疾患生命科学教育の海外連携」
- 田中 博（代表）:厚生労働科学研究補助金「日

本版 ETR を目指した地域連携電子化クリエイティブ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（分担）：文部科学省 科学技術振興機構（CRESTO）戦略的創造研究推進事業「精神・神経疾患の分子病態理解に基づく診断・治療へ向けた新技術の創出、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）：厚生労働科学研究補助金 肝炎等克服緊急対策研究事業「肝癌早期発見を目的とした分子マーカーおよび画像診断システムの開発」
- 田中 博（分担）：文部科学省科学研究費補助金基盤研究 C「オミックス解析によるマイクロ RNA のがんにおける役割の解明」
- 田中 博（分担）：文部科学省科学研究費補助金基盤研究 B「積極的疾患サーベイランスシステム構築のための情報基盤整備に関する研究」
- 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」
- 新村芳人（代表）：科学研究費補助金若手研究 B「全ゲノム配列を用いた嗅覚および他の化学受容体遺伝子ファミリーの比較進化解析」
- 新村芳人（分担）：科学研究費補助金基盤研究 B「ナメクジウオの内分泌機構の解明と脊椎動物との比較内分泌学的研究」
- 荻島創一(代表):科学研究費補助金(若手 B)「発生・分化システムの時系列遺伝子発現の安定状態（アトラクター）の同定と遷移解析」

### その他

受賞

賞 の 名 称 : Top 1 BMC Evolutionary Biology: Most viewed articles in past 30 days
受 賞 者 名 : Takeshi Hase, Yoshihito Niimura, Hiroshi Tanaka
受賞論文 : Difference in gene duplicability may explain the difference in overall structure of protein-protein interaction networks among eukaryotes  BMC Evol. Biol. 10: 358, 2010

賞の名称 : 国際タンパク質構造予測コンテスト (CASP9) で上位に選ばれた (174 位中第 22 位)
受賞者名 : 趙泰鎬 (Taeho Jo)
受賞論文 : 協調的な水素結合ポテンシャルによる βシートアセンブリの向上のための最適化

学会主催

- JAMINA セミナー、東京医科歯科大学、実行委員長、2010 年 12 月 3 日
- JAMINA セミナー、東京医科歯科大学、実行委員長、2010 年 11 月 26 日
- 生命情報学セミナー、「新世紀医療の担い手 Human Variome Project Biomedical Curator」、東京医科歯科大学、実行委員長、2010 年 11 月 25 日
- 千里ライフサイエンスセミナー（パーソナルゲノム時代の統合医療データベース戦略)、大阪、実行委員長、2010 年 5 月 21 日
- JAMINA セミナー、東京医科歯科大学、実行委員長、2010 年 4 月 23 日
- 東京医科歯科大学バイオ医療オミックス情報学人材養成プログラム成果発表会－国際シンポジウム「次世代疾患オミックスの新展開」、みらいホール（桜木町）、実行委員長、2010 年 2 月 2 日

# 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

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

## 研究紹介

### 1. 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以下の点を中心に研究を行った。

### GSK3βを介した p63 による細胞増殖調節

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検討した。その結果、p63 が消去されると、タンパク質脱リン酸化酵素 PP2A 活性低下を介して GSK3βが調節を受け、p21<sup>waf1</sup> や cyclinD1 の安定化に影響すると考えられた。

### 扁平上皮癌におけるケラチノサイト特異的 TGF-βシグナル経路による p63 の誘導

p53 ファミリーの p63 遺伝子は重層上皮の基底細胞に発現しており、その分化と維持に重要な役割を果たしている。一方、頭頸部、皮膚の扁平上皮癌の初期に p63 が高発現し、浸潤癌で消失することが報告されている。しかしながら、p63 の発現と癌のステージの関係については殆ど分かっていない。

本研究では、ケラチノサイト特異的な TGF-βシグナル伝達分子である Smad2 と IKKαによる ΔNp63 のプロモーター活性化を検出し、その活性化に ΔNp63 プロモーター領域内の Smad binding element (SBE) が必須であることを明らかにした。ChIP 解析と共免疫沈降法により、Smad2 の SBE への結合を確認し、Smad2 と IKKαが核内で相互作用することを明らかにした。一方、非浸潤性扁平上皮癌細胞における p63、IKKαの発現抑制は、浸潤能を亢進させた。さらに、扁平上皮癌組織アレイの免疫組織染色により、p63 の発現増強と IKKαの核移行・蓄積が、高分化型・非浸潤癌のステージで特異的に観察され、浸潤性癌ではどちらも消失する結果を得た。以上のことから、p63 は Smad2 と IKKαを介した新規の TGF-βシグナル経路の標的遺伝子であり、扁平上皮癌悪性化の抑制に寄与していることが示唆された。

### 2. 呼吸運動を受けない静止肺におこる肺傷害とその機序の解明

胸郭の吸気／呼気運動により、肺は周期的に伸展し、機能的残気量 (FRC : functional residual capacity) レベルまで収縮することを繰り返して、肺血流との間でガス交換を行っている。長時間にわたり肺が呼吸運動を受けないことは生理的環境ではありえないが、FRC レベル以上で肺を一定の状態に保ち静止状態におくこと (continuous positive airway pressure: CPAP) が、日常臨床上 (人工心肺使用時、等) では稀でない。我々は遊離環流肺標本 (神経系、血球系、ホルモンの液性因子

の影響を除外できる) を用いて虚血再環流肺傷害、過換気肺傷害に関する研究を行う過程で、静止肺 (5%炭酸ガス加空気 で bubbling 中の環流液で環流されているため肺組織 pH, PCO2, PO2 は正常に維持されている) が正常換気を受けている肺と比較して、肺胞上皮／肺血管内皮の透過性が亢進し、血管抵抗も上昇することを発見した。

## 業績目録

### 原著論文

Fukunish N, Katoh I, Tomimori T, Tsukinoki K, Hata RI, Nakao A, Ikawa Y, [Kurata S](#)  
Induction of ΔNp63 by the newly identified keratinocyte-specific TGF-β signaling pathway with Smad2 and IKKα in squamous cell carcinoma  
*Neoplasia* 2010 12(12):969-979

Bilali A, [Kurata S](#), Ikeda S, Georgieva GS, Zhu C, Tomita M, Katoh I, Mitaka C, Eishi Y, Imai T.  
Lung-lung interaction in isolated perfused unilateral hyperventilated rat lungs.  
*Transl Res.* 2010; 155(5):228-237.

### 学会

Induction of *p63* by the keratinocyte-specific TGF-beta signaling pathway in squamous cell carcinomas

[Nahoko Fukunishi](#), Iyoko Katoh, Ryu-Ichiro Hata, Yoji Ikawa & Shun-ichi Kurata  
第 69 回 日本癌学会総会 大阪国際会議場

### 学内外教育活動

本学救命救急大学院生指導  
神奈川大学 客員教授  
文京学園非常勤講師

### 研究費取得

科学研究費補助金 基盤研究 (C) P63 が制御する細胞接着因子の発現プロファイルと上皮—間葉転換 代表



# 難治疾患研究所 プロジェクト研究室

## 難治病態研究部門

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、さらに種々の薬物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。

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、O<sub>2</sub>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。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、O<sub>2</sub>ラジカルである。一

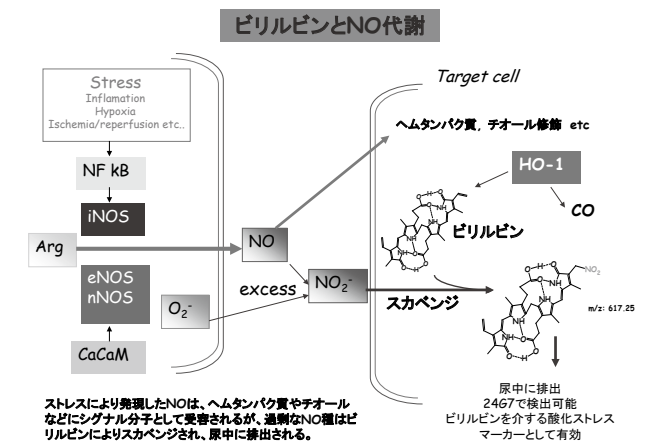
方、強力なROSであるNO（一酸化窒素）に対してビリルビンが作用した痕跡は見つかっておらず、ROSに対するビリルビンによる抗酸化防御機能の包括的な解明は看過されてきた。

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

- (5) ROS生成メディエーターとして作用する微量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

左雨秀治

今年、文京学院大学・保健医療技術学部・臨床検査学科の4年生、山田博絵、田中恵と大神田敬の3名が4月から卒業研究のため研究に参加した。研究内容は、メチオニンの過剰投与による肝臓・腎臓への影響についての研究をラットで用いて行った。結果、肝臓・腎臓の組織への影響は認められなかったが血漿中ALPとLDアイソザイムの増加が認められ肝臓障害の可能性示された。また、UA値、コレステロール値とCRE値が高値を認めたことから、肝臓・腎臓臓器への障害が窺えた。もうひとつは、メスラットの卵摘による赤血球膜脂質構成成分への影響についてのテーマでSD系メスラットを用いて研究を行った。結果、リン脂質の構成割合に対してコレステロール割合の増加が認められ、ホスファジルエタノールアミンの増加も認められたことから、血球の流動性の低下が示唆された。以上の研究成果は、卒業研究発表会で報告し、第47回関東甲信地区医学検査学会で発表された。また、ラット造血器官のDNA合成能に与えるエリスロポエチンの影響などの研究を行い発表した。

窪田道典

大脳半球の機能に左右差があることは、ヒトの言語処理に関する領域などでは知られているが、どの領域でどのような違いがあるかに関しては、不明な点が多い。特に、聴覚野や視覚野などの皮質感覚野において、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、未だよく分かっていない。そこで、今回、大脳皮質聴覚野

の機能的左右差を検討するため、倍音を聞かせて、両側の聴覚皮質からの応答を調べた。

時空間的な大脳皮質活動を調べるために、左右のモット大脳皮質聴覚野に、電位感受性色素を用いたオプティカルイメージング法を適用した。刺激には、周波数2kHz、4kHz、8kHz、16kHzの純音から成る倍音を使用し、倍音の構成成分を変化させた。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（A野とDC野）から記録を行い、周波数2kHz、4kHz、8kHz、16kHzに対応する周波数帯から、それぞれ、波

形を測定した。

倍音を構成する成分の数が増加するにつれ、2kHzに対応する周波数帯の波形振幅のピーク値は増大したのに対し、16kHzに対応する周波数帯の波形振幅のピーク値は減少した。また、低周波数倍音による16kHzに対応する周波数帯の波形振幅の抑制には、左右差が観察された。左の聴覚野では、低周波数倍音による抑制は、時間的に早い時期において観察されたのに対して、右の聴覚野では、低周波数倍音による抑制は、時間的に遅い時期において観察された。

## 業績目録

### 原著論文

Eto K, Noda Y, Horikawa S, Uchida S, Sasaki S. Phosphorylation of aquaporin-2 regulates its water permeability. *J. Biol. Chem.* 285:40777-40784, 2010.

Complex of branched cyclodextrin and lidocaine prolonged the duration of peripheral nerve block. *Journal of Anesthesia* 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. *Journal of Surgical Research* 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. *Circulation Journal* 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.

Sassa S, Nemoto N, Okabe H, Suzuki S, Kudo H, Sakamoto S. Effects of Chinese herbal medicines on bone loss in castrated female rats. *Recent Progress in Medicinal Plants 29:Drug Plants III* ,31-40,2010.

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, 2010(in press).

Hosokawa Y, Kubota M, Horikawa J. Optical imaging of neural activities of the right and left guinea pig auditory cortices evoked by the harmonic sound. *J Physiol Sci, Vol. 60, Suppl. 1, S139* (2010).

### 著書・総説

「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

野田裕美、李宇華、江渡加代子、堀川三郎、内田信一、佐々木成。アクアポリン2による細胞容積調節メカニズム。第20回バゾプレシン研究会、東京、2010年1月。

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Ser256のリン酸化で水透過性が充進する。第53回日本腎臓学会学術総会、神戸、2010年6月。

伊東浩次、堀川三郎、田中真二、有井滋樹。肝臓でのMethionine adenosyltransferaseの発現について。第52回日本消化器病学会大会(JDDW2010)、横浜、2010年10月。

第83回日本生化学会大会、神戸国際展示場、2010.12.8. “Human urinary nitro-biopyrrins are the degradative metabolites of a reaction of bilirubin as antioxidant with stress-inducibile NO: In silico study of 24G7-epitope in bilirubin and nitro-bilirubin.” Takuya Iwabuchi, Yoshinori Hirano, Izuru Shioji, Makoto Suematsu, Akiko Sugimoto, Tokio Yamaguchi. December 8. 2010 Kobe Japan.

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130年会、岡山、2010、3.27. 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

” Bilirubin Oxidation Reflects the Influence of Nitric Oxide after Myocardial Ischemia Reperfusion.” American College of Surgeons 96<sup>th</sup> Annal October 3-7, 2010. Masaki Yamamoto,

Hideaki Nishimori, Takashi Fukutomi, Seiichiro Wariishi, Takayuki Sato, Tokio Yamaguchi, Shiro Sasaguri.

“Monitoring of urinary biopyrrins after rat cardiac transplantation: non-invasive and earlier prediction of acute rejection by a sensitive oxidative marker.” 4<sup>th</sup> Annual Academic Surgical Congress February 5 2009. Florida USA. Maeda H., Yamamoto M., Radhakrishnan G., Nakagawa A., Yamamoto M., Okuda H., Yamaguchi T., Sasaguri S.

山田博絵、田中 恵、工藤秀機、小池盛雄、芝紀代子、金森きよ子、澤田久美子、関 貴行、川上保子、久保田 亮、左雨秀治 ラット腎・肝に与えるアミノ酸（メチオニン）過剰投与の影響～基礎的検討～ 第47回関東甲信地区医学検査学会 大宮、2010年11月27・28日

田中 恵、山田博絵、工藤秀機、小池盛雄、芝紀代子、金森きよ子、澤田久美子、関 貴行、川上保子、久保田亮、左雨秀治 ラット腎・肝に与えるアミノ酸（メチオニン）過剰投与の影響～メチオニン投与による血漿蛋白分画・ALP・LDアイソザイムの変動～ 第47回関東甲信地区医学検査学会 大宮、2010年11月27・28日

大神田 敬、川上保子、工藤秀機、芝 紀代子、左雨秀治 SDラット卵巣摘出後における赤血球膜脂質構成成分の変動～閉経における血漿脂質と赤血球膜脂質への影響～ 第47回関東甲信地区医学検査学会 さいたま市、2010年11月27・28日

### 学内外教育活動

左雨秀治  
文京学院大学保健医療技術学部、特別講義（4年生）：骨粗鬆症の基礎、2010年7月12日

山口登喜夫

1. 高知大学医学部 非常勤講師 医学部講義 2010年度
2. 慶応義塾大学医学部 客員助教授：へ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. 第1回高気圧酸素スポーツ医学研究会の発足に参加。2010年1月15日



# 難治疾患研究所 連携研究系 病態発現機構客員研究部門

## 研究の目的

ヒトのゲノムから選択的スプライシングにより蛋白質のバリエーションが生産されている。選択的スプライシングによる蛋白質多様化と病態発現機構との関わりや蛋白質ネットワークに及ぼす効果を推定するために、ホモロジーモデリングによる蛋白質の立体構造予測が重要な手段となる。そのために、精度の高いアミノ酸配列アライメント法の開発を行う。また、非天然型構造を有する核内受容体リガンドを創製し、核内受容体のリガンド依存的構造転換に基づいた「核内受容体活性制御仮説」を提唱し、本仮説の検証と新たな核内受容体リガンド分子設計を行っている。新しい核内受容体リガンドが臨床的に高い頻度で見られる癌細胞などに対しても増殖抑制作用なども明らかにする。

## 研究の内容

### 1. ホモロジーモデリングの精度の高いアミノ酸配列アライメント法の開発

選択的スプライシングが病態発現機構となる例が数多く知られている。選択的スプライシングにより得られる蛋白質の機能を推定するために、その立体構造の予測が役立つ。立体構造の予測に、最も広く使われているホモロジーモデリングにおいて、標的となる蛋白質（標的）と鋳型蛋白質（鋳型）とのアミノ酸配列アライメントの精度が、標的立体構造モデルの精度を大きく左右する。これまで様々なアライメント精度の向上がなされてきたが、未だに十分な精度をもつアライメント法はない。そこで本研究では、遠縁関係にある蛋白質のアライメントに類する挿入欠失（ギャップ）の位置を正確に見いだす方法を開発した。蛋白質のギャップ部位を調べたところ、その出現頻度と挿入残基の溶媒接触度とは、指数関数の関係にあることが明らかになった。この関係を、標的—鋳型のペアワイズアライメントにおけるギャップペナルティの計算に導入し、新規アライメント法を開発した (ALAdGAP: Alignment with Accessibility dependent Gap Penalty; [http://cib.cf.ocha.ac.jp/target\\_protein/](http://cib.cf.ocha.ac.jp/target_protein/))。この方法により、配列一致度が 20 ~ 40% の配列ペアにおいて、従来法よりも精度よいアライメントが得られることがわかった (図

1)。

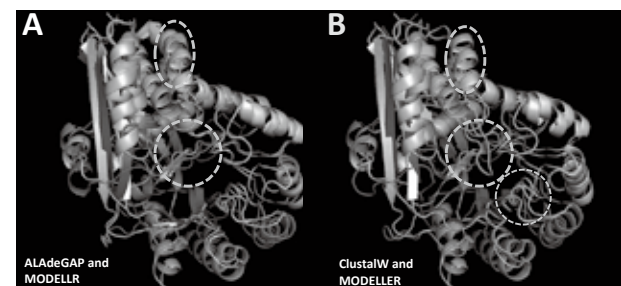


図 1 *Bacillus subtilis yitF* の立体構造モデル。E. *scherrichia coli* 由来の G lucD とのアライメントを元に ALAdGAP を使って作成したモデル (A) と、ClustalW を使って作成したモデル (B)。色つき鎖はモデル構造、白色鎖は X 線結晶解析構造。黄色の破線は両モデル構造が大きく違う箇所を示す。(B) では活性部位がループで覆われているため基質が近づけない。

この方法と既存のモデル構造構築ソフトウェアを用いて、昨年開催された第 9 回蛋白質立体構造予測コンテスト (CASP9) に参加したところ、適切な鋳型を選択できれば、上位チームが提出したモデル構造に劣らないモデルが得られることがわかった。このことにより、ALAdGAP がホモロジーモデリングに適したアライメント法であることが実証できた。コンピュータプログラム ALAdGAP は [http://cib.cf.ocha.ac.jp/target\\_protein/](http://cib.cf.ocha.ac.jp/target_protein/) から公開した。

### 2. 非天然型構造を有する核内受容体リガンドの創製

核内受容体は、ステロイドホルモンや脂溶性ビタミン等の作用を担う受容体であり、リガンド依存的転写因子として、分化、発生、代謝などの生命現象を制御している。本研究室では、核内受容体のリガンド依存的構造転換に基づいた「核内受容体活性制御仮説」を提唱し、本仮説の検証と新たな核内受容体リガンド分子設計を行っている。現在の主な研究課題は以下の 2 項目である。

#### (1) アンドロゲン受容体 (AR) アンタゴニストの創製研究

AR アンタゴニストは前立腺癌のホルモン療法剤として用いられるが、AR の変異等に伴い薬剤耐性および癌増悪化を引き起こす。本研究室では、従来のアンタゴニストとは構造の全く異なる AR アンタゴニストを創製した (図 2a)。これらの化合物は、臨床的に高い頻度で見られる変異 AR を有する前立腺癌細胞に対しても増殖抑制を示すという生物特性をもつ。

#### (2) 非セコステロイド型ビタミン D 誘導体の創製

ビタミン D は種々の皮膚疾患、がん、骨疾患、自己免疫疾患に有効であることから、多くの誘導体が合成されているが、高活性誘導体のすべてが天然体と同じセコステロイド骨格を持っている。本研究室では、新規骨格を有するビタミン D 誘導体の探索を行っており、これまでに、含窒素芳香族化合物 (図 1b) などに強いビタミン D 活性を見いだしている。

### 3. アミドの立体特性を活かした機能性芳香族分子構築

アミド結合は蛋白質の基本骨格でもあり、また多くの生理活性物質の機能発現に重要な役割を持っている。本研究では、アミド結合の立体特性を利用して様々な機能

性芳香族化合物を創製することを目指している。例えば、図 3 に示す化合物は溶媒特性によって立体構造を転換するアミド化合物であり、その立体構造変化を蛍光特性の変化として観測することができる。このような環境応答性分子は対象とする分子、反応、外的刺激等を検知する蛍光センサーへと応用することができる。

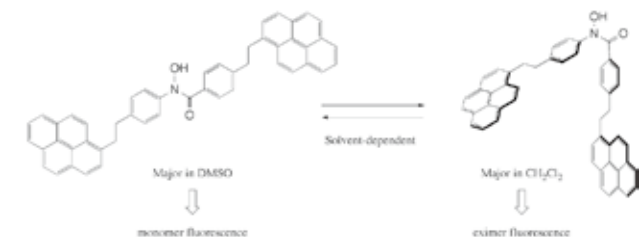


図 3 溶媒特性に応答して蛍光特性を変化する環境応答型アミド化合物

## 業績目録

### 原著論文

- Hijikata, A., Yura, K., Noguti, T. and Go, M., Revisiting gap locations in amino acid sequence alignment and a proposal for a method to improve them by introducing solvent accessibility. PROTEINS: Structure, Function and Bioinformatics 2010 (in press).
- Kakuta, H., et al. Cyclic-tri (N-methyl-metabenzamide)s: Substituent Effect on the Bowl-shaped Conformation in the Crystal and Solution States. Tetrahedron 66: 8254-8260, 2010.

### 和文著書及び総説

- 棚谷綾. 芳香族アミドの立体特性と動的立体制御—機能性芳香族化合物構築の鍵構造として—. 生命化学研究レター. 32: 21-26, 2010.

### 国際コンテスト

- Yura, K., Hijikata A., Noguti, T. and Go, M., Application of Computer Program ALAdGAP for Prediction Contest of Newly Determined Protein Structures, CASP9 (9<sup>th</sup> community wide experiments on the Critical Assessment of Techniques for Protein Structure Prediction) from April 14 to August 7, 2010.

### 国際シンポジウム主催

- Go, M. and Clutter, M., Connections, Bringing Together the Next Generation of Women Leaders in Science, Technology, Engineering and Mathematics, the National Women's Education Center, Saitama, Japan on July 5-7, 2010.

### 国際学会発表 (招待講演)

- Tanatani, A. Control of Molecular Structure and Function. Development of Functional Aromatic Molecules in Materials Science and Medicinal Chemistry. Jpn-USA Symposium: Connections-Bringing Together the Next Generation of Woman Leaders in Science, Technology, Engineering and Mathematics, Tokyo, July, 2010

### 国際学会発表 (一般講演)

- Yura, K., et al. Improvement of the Quality

- of Model Structures by Improving the Template-Target Alignments. CASP9 (9<sup>th</sup> community wide experiments on the Critical Assessment of Techniques for Protein Structure Prediction) Meeting, Asilomar, California, USA, December 5-9, 2010.
- Tanatani, A., et al. Development of Novel Progesterone Antagonists Bearing A 6-Arylcoumarin Skeleton. ICE2010 Official Satellite Symposium - Nuclear Receptor and its Frontier, Kyoto, March, 2010.
- Matsumura, M., et al. Development of Novel Porphyrin Derivatives Based on Steric Properties of Amide Bond. 5<sup>th</sup> ISMSC 2010, Nara, June 2010.
- Kudo, M., et al. Synthesis and Conformational Analysis of Helical Aromatic Multilayered Ureas. ISCD-22, Sapporo, July, 2010.
- Matsumura, M., et al. Development of Novel Porphyrin Derivatives Based on Steric Properties of Amide Bond. 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Honolulu, Dec. 2010.
- Kudo, M., et al. Synthesis and Conformational Analysis of Helical Aromatic Multilayered Ureas. 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Honolulu, Dec. 2010.

### 国内招待講演

- 由良敬、郷 通子、植物オルガネラにおける RNA エディティング: タンパク質立体構造との関係とエディティング部位の予測、日本進化学会 2010 年大会 ワークショップ: ゲノム進化学の新展開、東京工業大学、2010 年 8 月。
- 棚谷綾. 非セコステロイド型 VDR リガンドおよび非ステロイド型 PR リガンドの創製. 帝人ファーマ株式会社・関節研究所第 6 回 VD3 研究会. 東京、2010 年 6 月。
- 棚谷綾. アミド結合の立体特性を活かした芳香族フォルダマーの創製. 名古屋大学工学部セミナー. 名古屋、2010 年 11 月。

### 国内学会等発表

- 由良 敬ら、ALAdGAP チームの CASP9 参加報告. IPAB 公開セミナー 「CASP9 特集 タンパク質立体構造予測の最新動向」 東京工業大学、2011 年 2 月。
- 松村実生ら、芳香族アミドの立体特性を活かした新規ボルフィリン誘導体の創製. 日本化学会第 90 春期年会、大阪、2010 年 3 月。
- 酒井悠ら、6-アリアルルマリン環を母核とした新規プロゲステロンアンタゴニストの創製.

- 日本薬学会第 130 年会、岡山、2010 年 3 月。
- 数井優子ら、ビタミン D 活性を有するリコロール酸誘導体の創製. 日本薬学会第 130 年会、岡山、2010 年 3 月。
- 関根良太ら、カルボランを基盤としたチオエーテル構造を有する新規 VDR リガンドの創製. 日本薬学会第 130 年会、岡山、2010 年 3 月。
- 増野弘幸ら、VDR 活性を持つ LCA 誘導体の合成と VDR 結合構造の解析. 日本ビタミン学会第 62 回大会、盛岡、2010 年 6 月。
- 影近弘之ら、カルボランを疎水性骨格とするビタミン D 誘導体とその核内受容体結合様式. 第 7 回中性子捕獲療法学会、東京、2010 年 8 月。
- 山本紗をりら、五員環の複素環構造を基盤とした芳香族アミドの立体特性. 第 21 回基礎有機化学討論会、名古屋、2010 年 9 月。
- 藤本慎子ら、N,N'-ジアルキル型芳香族アミドの酸化還元による立体構造変換と光学特性. 第 21 回基礎有機化学討論会、名古屋、2010 年 9 月。
- 岡本巖ら、N,N'-ジアルキル型芳香族アミドの酸化還元による立体構造変換と光学特性. 第 21 回基礎有機化学討論会、名古屋、2010 年 9 月。
- 平野智也ら、クマリン骨格を基盤とした蛍光センサーの効率的開発法の構築と、蛍光性プロゲステロンリガンド開発への応用. 第 4 回バイオ関連化学シンポジウム、大阪、2010 年 11 月。
- 金井美紗紗ら、環境応答型アミドの構造特性を利用した蛍光センサー分子の開発. 第 36 回反応と合成の進歩シンポジウム、名古屋、2010 年 11 月。
- 吉田悦子ら、ビビリジリアミドおよびウレアの合成と立体特性. 第 36 回反応と合成の進歩シンポジウム、名古屋、2010 年 11 月。
- 岡本 巖ら、酸化還元による環境応答を利用した N,N'-ジアルキル型芳香族アミドの立体構造変換と機能発現. 第 36 回反応と合成の進歩シンポジウム、名古屋、2010 年 11 月。
- 藤井晋也ら、ホウ素クラスターを疎水性骨格とする新規非セコステロイド型ビタミン D 誘導体. 日本レチノイド研究会第 21 回学術集会、東京、2010 年 11 月。
- 松村実生ら、アミド結合の立体特性を活かしたボルフィリン誘導体の合成と立体構造解析. 第 19 回有機結晶シンポジウム、大阪、2010 年 11 月。

### 競争的研究資金の取得状況

- 棚谷綾: 文部科学省科学研究費・若手研究 A 「核内受容体シグナル制御の医薬化学研究」(代表)
- 棚谷綾: 武田科学振興財団・薬学系研究奨励「核内受容体選択的モデュレーター—の論理的設計と医薬開発基盤の構築」(代表)



# 難治疾患研究所 共同利用施設 大学院教育研究支援実験施設

## I. ゲノム解析室

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、2010年の実績である。

### 1. DNA 受託シーケンスサービス

サンプル数及び延べ利用人数はほぼ昨年並みであったが、なかでも難研外からの依頼が着実に増加し、依頼件数 1,248、依頼サンプル数 11,043 と過去最高となり、全体の一割を超えている。

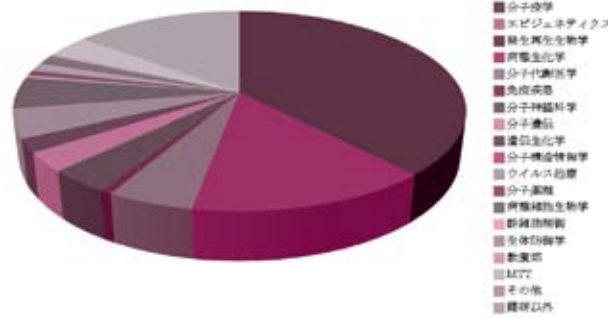
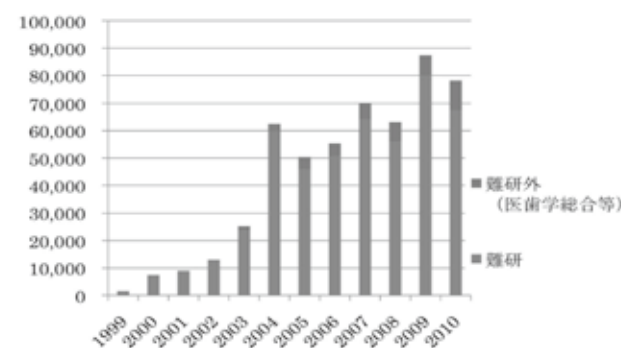
### 2. 設置機器

DNA シーケンサー 3130xl 2台、PCR 5台、ライトキャプチャー、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. 人事異動

退職：矢野倉 美恵子 (助教)

転入：菌部 知奈美 (技術補佐員)



## II. 細胞・プロテオーム解析室

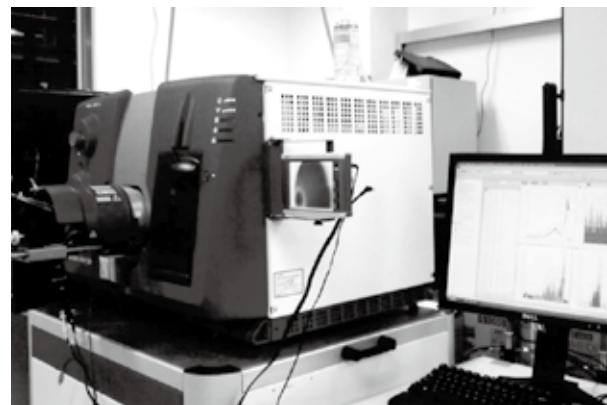
ホームページ <http://www.tmd.ac.jp/mri/lcpr/Top.html>

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-tof-micro



LC-MSMS 解析 ABCIEX QTRAP5500

### \* 学生教育

22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 Lung Fibrosis Associated with Systemic Sclerosis. Ryutarō Shirahama, Yasunari Miyazaki, Tsukasa Okamoto, Naohiko Inase and Yasuyuki Yoshizawa. Allergology International.59(4). 409-15(2010)

HumanPRP19 interacts with prolyl-hydroxylase PHD3 and inhibits cell death in hypoxia Masuhiro Sato, Miki Sakota and Koh Nakayama.

Experimental Cell Research. 316(17). 2871-82(2010)

## III. 遺伝子組換えマウス実験室

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

科学・難治疾患研究の教育基盤となっている。

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



## IV. 形態機能解析室

本解析室は、所内の研究者がいつでも使用できる共同利用施設として設置された。設置された機器は、様々な難治疾患における各種臓器の形態学的変化だけでなく、機能分子の変化を DNA, RNA、蛋白質レベルで解析することのできる共焦点顕微鏡、蛍光イメージングワークステーション、凍結マイクロトーム、ロータリーマイクロトーム、スピントリッシュプロセッサ、ティッシュエンベディングセンター、定量的 PCR 装置を常備している。

疾患に伴う遺伝子の質的・量的変化を細胞・組織レベルで経時的に解析することは、難治疾患の病態説明・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できない強力なツールを提供し、研究の便宜をはかっている。

## V. 構造解析支援室

構造解析支援室には、高輝度 X 線発生装置とイメージングプレート X 線回折装置が設置されており、タンパク質や核酸などの生体高分子やそれらと低分子化合物の複合体の立体構造解析の支援を目的としている。また、本年、動的散乱装置が導入されて、タンパク質などの粒子径や会合・凝集状態の計測も可能になった。生命情報科学教育部 (および、学際生命科学東京コンソーシアム参加校) の学生を対象として、装置の取り扱いやタンパク質の結晶化についての演習を行った。なお、本支援室



は、平成 22 年 2 月に M&D タワー 22 階に移設された。

## VI. 幹細胞支援室

2009 年 12 月 16 日の難治疾患研究所教授会により設置が決定した幹細胞支援室は、2010 年に入り実質的な整備が開始された。2010 年 4 月 1 日付で当支援室の管理スタッフとして技術専門職員 1 名が着任した。当支援室は、組織幹細胞、胚性幹細胞 (ES 細胞)、iPS 細胞など、組織・臓器の成り立ちの解明、疾患の理解、再生医療の開発などにおいて重要な役割を果たす幹細胞研究あるいは幹細胞由来の分化した細胞群の研究を支援するため、関連研究者が利用できる機器の整備と供用化に対応すべく活動している。

### 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 (ベックマンコールター)

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)



High-speed cell sorter MoFlo Legacy (左図) と MoFlo XDP (右図)

### 2. 運営

2010 年に整備が始まったことから、新たに発足した幹細胞支援室運営委員会 (教授 5 名、准教授 3 名) 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。当年の運営委員会開催は 22 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。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推移しており、次年以降の研究支援推進員 1 名の任用による一層の供用化促進を期した。

### 3. 2010 年の供用実績

当支援室は当年に整備が開始されたところであり、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、供用化を軌道に乗せるべく活動した。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 Legacy を 2 回、同 MoFlo XDP を 2 回、パラフィン包埋薄切関連を 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 6 分割しての繰り返し開催にて実施した。高速セルソーターについては、講習受講後に個別トレーニングをメーカーにより行ってもらうとともに、既習得者の操作見学・助言などの協力も得て、研究者がより円滑に機器を操作できるように取り計らった。

## VI. バイオリソース支援室

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を PCR 法で検査している。また各研究室のマイクプラズマ汚染検査も受託している。

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 リンパ球の株化を受託している。また効率的な樹立のため免疫抑制剤を導入している。

初心者培養講習会を実施し、大学院学生の基礎的な研究支援をしている。

血清共同購入の窓口業務は、研究者が個別に血清ロットチェック後選択するシステムで実施し、適正な価格での購入を取りまとめている。

# 難治疾患研究所

## メディカル・トップトラック(MTT)プログラム

岩井 佳子

### 記憶 T 細胞の多様性維持機構

リンパ組織には新しい抗原を認識するナイーブ T 細胞と、過去に出会った抗原を認識する記憶 T 細胞が存在します。記憶 T 細胞は長期間体内に存在して、ナイーブな T 細胞よりも早くて大きな免疫応答を誘導して速やかに抗原を除去することができます(免疫学的記憶)。ウイルスや細菌などさまざまな病原体から身体を守るにはできるだけ多くの種類の記憶 T 細胞が存在すること、すなわち記憶 T 細胞の多様性の維持が重要です。脾臓やリンパ節などのリンパ組織の大きさは限られているので、限られた空間の中でできるだけ多くの種類の記憶 T 細胞が存在するには、ある 1 種類の記憶 T 細胞クローンが増えすぎないようにコントロールする必要がありますがそのメカニズムはわかっていません。

私たちの研究グループでは、記憶 T 細胞で発現の高い新規 AP-1 ファミリー遺伝子に注目して、GFP/knock-in マウスを作製しました。するとこの遺伝子欠損マウスでは、記憶 T 細胞クローンが異常に増殖して、記憶 T 細胞の多様性が失われることを発見しました。これらの結果から、この遺伝子は記憶 T 細胞の増殖をコントロールすることによって記憶 T 細胞の多様性を維持するきわめて重要な遺伝子であることがわかりました(投稿準備中)。この転写因子は活性化したリンパ球に極めて限局的に発現することから、この分子を標的とした新規免疫調節薬の開発を目指しています。

中山 恒

### 低酸素応答の分子機序の解明と酸素センサー分子の同定

本研究室では、酸素が生体内でどのように働いているのかを研究しています。個体は、酸素濃度の低い環境で低酸素応答を引き起こして適応します。低酸素応答は、癌などの疾患にも関与しています。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。

#### 1. 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

HIF-1 $\alpha$ は低酸素応答において中心的な役割を担う転写因子です。プロリン水酸化酵素 PHD は HIF-1 $\alpha$ の発

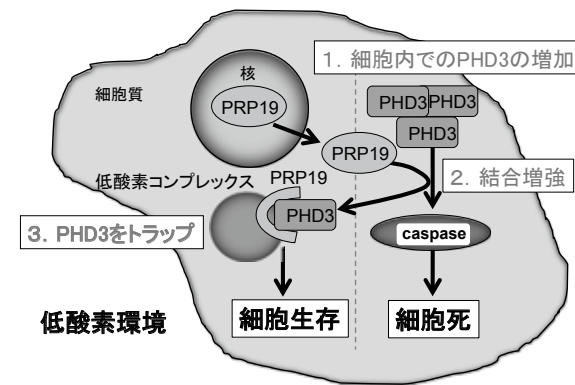
現を負に制御します。本研究室では PHD に着目して、低酸素応答のシグナル伝達機構の解析を進めています。

私たちは、PHD3 がスプライシング制御タンパク質である PRP19 と結合することを明らかにしました。PHD3 と PRP19 の結合は低酸素下で増強されて、PHD3 が引き起こす caspase 経路の活性化を抑制することが判明しました。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、さらなる解析を進めています。

#### 2. 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

PHD3 は低酸素応答性の巨大なタンパク質複合体を形成します。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構成タンパク質を探索し、酸素センサー分子の同定を試みています。酸素センサーを利用して、癌組織内の低酸素環境のモニタリングや再酸素化を実現するツールの開発をめざしています。

PHD3-PRP19の相互作用による低酸素下での細胞死抑制機構



片岡 直行

高等真核生物では、核遺伝子の多くはイントロンによって分断化されている。そこで mRNA 前駆体からイントロンを除く反応であるスプライシングが、遺伝子発現には必須となる。スプライシングは、多種類の RNA やタンパク質が関与する複雑な反応であり、精密な制御を受けている。その制御が破綻した場合、ヒトでは疾患として現れる場合が数多く報告されている。このような

疾患を「RNA 病」と呼んでいるが、ジストロフィンに起因する筋ジストロフィーもその 1 つである。私は、神戸大学医学部の松尾雅文教授の研究室との共同研究により、ジストロフィン遺伝子の 31 番目のエクソン中にナンセンス変異を持っている患者を見出した。この患者では、その変異のため機能を持つ蛋白質ができないと予想されたが、患者組織を用いた免疫染色像より、ジストロフィタンパク質がある程度発現しているのが観察された。そこで RNA を解析したところ、変異を持ったエクソン 31 を含む mRNA の他に、このエクソンを含まない mRNA を発現していることが明らかになった。そこでこのエクソンを含む領域を用いたレポーターを作製し、スプライシング機構の解析を行ったところ、この患者にみられる変異は (GAG  $\rightarrow$  TAG)、Exonic Splicing Enhancer の活性を失わせ、エクソンとして認識されないようにするためとばされることを明らかにした。さらに、このエクソンをとばすスプライシングを促進すれば、野生型に近い活性を持つ変異型ジストロフィタンパク質を増やすことができると考え、これまでにスプライシングに影響を与えることが報告されているいくつかの低分子化合物を細胞に添加し、変異型第 31 エクソンのスプライシングに与える影響を調べた。その結果、TG003 という化合物が、レポーターを導入した細胞と患者由来細胞の両方において濃度依存的に、第 31 エクソンをとばした mRNA の産生と、それに伴うジストロフィタンパク質の発現を促進することを見出した。

鈴木辰吾

脳の発達と活動を分子レベルで解明する研究は、脳の基本原理を知る上で非常に重要です。近年の研究によって脳の働きに関与するさまざまな蛋白質や遺伝子が同定されてきましたが、脳に存在する脂質の機能的役割は十分に解明されていません。そこで私たちは、脳の機能を調整する脳由来神経栄養因子 (BDNF) の作用に注目し、その刺激によって変動する脂質をメタボローム的に解析しています。これまで我々が行った研究から、BDNF は培養神経細胞のコレステロール合成を促進し、シナプス形成に寄与することが明らかになっていました。しかし、本研究によって多数の脂質を解析したところ、BDNF はコレステロールの合成だけでなく、その代謝も促進することが見出されました。そして、BDNF ノックアウトマウスの脳では、コレステロール合成と代謝がそれぞれ低下していることが明らかになりました。特に神経細胞におけるコレステロール代謝を担う酵素 CYP46 の発現が BDNF によって誘導されることから、BDNF が神経細胞のコレステロールホメオスタシスを調整している可能性を示唆している可能性を示唆さ

れました。現在はコレステロール代謝経路を特異的に阻害することなどによって、脳神経細胞におけるコレステロール代謝の生理的な役割を探索しています。

笹野 哲郎

### 難治性不整脈を対象とした研究を進めています。

#### 1. 心房リモデリングの初期メカニズムの解明

心房細動は本邦で最も多い不整脈であり、脳梗塞や心不全の原因となることからその治療法の確立が急務です。我々は、心房筋細胞が伸展刺激に対して一過性に細胞外に ATP を放出すること、この ATP 放出に寄与する分子が pannexin であることを発見しました。放出された ATP は心房筋へのマクロファージ遊走を誘導し、また心房での炎症性サイトカインの産生を促していました。心房細動の進展には心房の炎症と線維化を中心とする心房リモデリングが重要な役割を果たすと考えられています。心房リモデリングによる炎症機転は、この初期メカニズムと考えられます。

今年度は in vivo の実験を中心に行いました。マウスを用いて心房圧負荷モデルを作成するとマクロファージの浸潤と心房の線維化が認められ、電気刺激によって心房頻拍が誘発されました。このことから圧負荷モデルは心房リモデリングを誘導し、心房細動の基質を作ると考えられます。この疾患モデルに対して、pannexin の阻害剤を投与すると、マクロファージ浸潤・線維化・心房頻拍の誘発性はすべて抑制されました。これらの結果より、pannexin を抑制するという新たな心房細動治療の可能性が期待されます。

#### 2. 心臓突然死の病態解明

心臓突然死に関する 2 つの分子について、ノックアウトマウスを用いて検討を進めました。まず、QT 延長及び心臓突然死に関与すると報告されている NOS1AP について、ノックアウトマウスは心臓での酸化ストレスが増大していることを明らかにしました。疾患モデルを作成すると、圧負荷モデルでは不整脈による突然死を、ドキシソルビシンによる急性酸化ストレスモデルでは心不全死を呈しました。NOS1AP は NOS1 の調節タンパクであり、NO を介して Ca ハンドリングを調節すると考えられています。NOS1AP ノックアウトマウスは、酸化ストレスによって Ca 制御機構が破綻すると考えられ、詳細な分子メカニズムを解析中です。

さらに、J wave syndrome に関連すると思われる分子 Irx3 について検討を行いました。Irx3 ノックアウトマウスは、特殊な条件下で心室の刺激伝導系の機能異常によると思われる心室性不整脈が誘発されることを発見し、そのメカニズムの解析を行っています。



## 松井 毅

### 脊椎動物陸上進出に伴う上皮進化機構の解明

地球上の脊椎動物は、約3億6千万年前に、水中から陸上に進出した。その際、厳しい気相の環境に適應する為、新しい遺伝子群を獲得し、体表面の単層上皮組織を何らかの機構で「上皮進化」させ、重層上皮組織である皮膚表皮を形成したと考えられる。

本研究では、陸上気相環境に脊椎動物がどのように体表面を適應させてきたのかを明らかにする為、重層上皮組織皮膚と共に獲得された「皮膚特異的遺伝子」欠損マウスを作成する事で、「太古の皮膚を再現」する事を試みている。高速 in situ hybridization スクリーニングにより同定した皮膚表皮の最上層（顆粒層）で発現する皮膚特異的プロテアーゼ SASPase の欠損ヘアレスマウスを作成し、乾燥肌モデルマウスの作成に成功した。この変異マウスは、アトピー性皮膚炎の最大の疾患素因であるフィラグリン分解異常を伴っていた。また、アトピー性皮膚炎患者ゲノム中に、SASPase 遺伝子の機能抑制変異の存在も確認している。これらの結果は、アトピー性皮膚炎等の皮膚疾患発症機序の新しい概念になる可能性が考えられる。

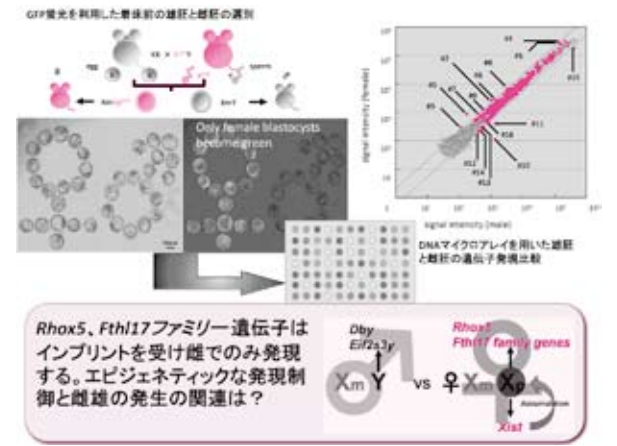
また、皮膚特異的分泌因子 Dermokine の研究からは、「早期消化器癌における単層上皮多層化現象」において、皮膚特異的遺伝子群の一部が発現する事を見だし、実際に Dermokine が有効な血清腫瘍マーカーとなる事を報告した。

## 小林 慎

### 着床前の雌雄の分化とエピジェネティックな遺伝子制御

一般的には雄と雌の違いは、分化した生殖腺により引き起こされると考えられている。では、生殖腺の分化以前に雌雄の発生に違いは無いのであろうか？この疑問に取り組むため、胚盤胞期における雌胚と雄胚の遺伝子発現をDNAアレイにより比べた結果、雌雄で900個近い遺伝子の発現が異なることが分かった。更に雌特異的に発現する Rhox5 遺伝子、Fthl17 family 遺伝子に注目し、これらがインプリントを受け父親由来のX染色体から発現することを証明した (Rhox5:Kobayashi, S et al. Curr Biol,2006、Fthl17 family:Kobayashi, S et al. NAR, 2010)。つまり、これらの遺伝子はインプリントを受けることにより、雌特異的な発現を示すのである。我々の解析で見つかったX染色体上のインプリント遺伝子は、

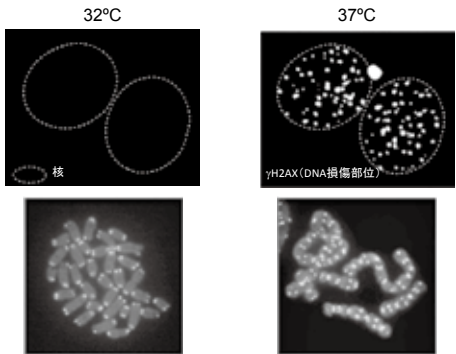
これまで殆ど解析されていなかった着床前の雌雄の発生に、エピジェネティックな遺伝子発現制御が深く関わっている可能性を示している。今後個体レベルでの機能解析を行うことにより、エピジェネティックな制御が雌雄の発生や疾患とどのように関連しているのかを明らかにしていきたい。



## 小西昭充

1. 染色体DNA損傷に対する細胞応答の解析
  2. テロメアにおける染色体末端保護機構の解析
- 遺伝情報の保存、伝達の役割を担っている染色体DNAは常に内在的、外来的な原因により傷害を受ける危険性にさらされているため、DNA損傷の検出、修復反応は生命維持のために必要不可欠な機能です。DNA損傷に対する反応の異常は、発癌・免疫異常・老化・不妊など多くの疾病の原因となると考えられています。一方、真核生物の染色体末端は、テロメアと呼ばれる特殊な構造によって保護されており、この機能が減弱すると染色体末端部は一般的なDNA損傷部位と非常に似た反応が起こり不安定化することが近年の研究で分かりました。我々は、テロメアの機能破綻を一般的なDNA損傷のモデルとして利用し、染色体DNA損傷シグナル経路の全容解明を目指しています。

我々は、すでにテロメア機能を自由にコントロールするシステムの開発に成功しており (図、Genes Dev 誌



テロメア機能不全誘導システム  
温度変化により染色体末端部にDNA損傷反応が誘導される(上段)  
このとき、細胞のDNA損傷修復機構により染色体末端は細胞周期依存的に融合が起こる(下段)

2008年)、現在、この技術を発展させて、一般的なDNA損傷に対する細胞応答反応の解析を行っていま

## 業績目録

### 原著論文

Okamoto, K., Iwai, Y., Oh-hora, M., Yamamoto, M., Morio, T., Aoki, K., Ohya, K., Jetten, A.M., Akira, S., Muta, T., and Takayanagi, H. IκBζ regulates TH17 development by cooperating with ROR nuclear receptors. *Nature*, 2010, 464 (7293):1381-5.

Sato M., Sakota M., and Nakayama K. Human PRP19 interacts with prolyl-hydroxylase PHD3 and inhibits cell death in hypoxia. *Exp. Cell Res.* 318, 2871-2882, (2010)

Qi J., Nakayama K., Cardiff R.D., Borowsky A.D., Kaul K., Willaims R., Krajewski S., Mercola D., Carpenter P.M., Bowtell D., and Ronai A.Z. Siah2-dependent concerted activity of HIF&FoxA2 regulates formation of neuroendocrine phenotype & neuroendocrine prostate tumors. *Cancer Cell* 18, 23-38, (2010).

Numakawa T, Suzuki S, Kumamaru E, Adachi N, Richards M, Kunugi H. BDNF function and intracellular signaling in neurons. *Histol and Histopathol.* 25(2):237-58. (2010)

Yamashiro K, Sasano T, Tojo K, Namekata M, Kurosawa J, Sawada N, Suganami T, Kamei Y, Tanaka H, Tajima N, Utsunomiya K, Ogawa Y, Furukawa T. Role of transient receptor potential vanilloid 2 in LPS-induced cytokine production in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 398: 284-9.

\*Tagi T, \*Matsui T, Kikuchi S, Hoshi S, Ochiai T, Kokuba Y, Kinoshita-Ida Y, Kisumi-Hayashi F, Morimoto K, Imai T, Imoto I, Inazawa J, Otsuji E: Dermokine as a novel biomarker for early-stage colorectal cancer. *J. Gastroenterol* 45:1201-11, 2010. (\*Equal contribution)

Matsui, T., Miyamoto, K., Kawasaki, H., Ebihara, T., Hata, K., Tanahashi, S., Ichinose, S., Imoto, I., Inazawa, J., Kudou, J., Amagi, M. SASPase regulates stratum corneum hydration through profilgrin-to-filaggrin processing. *EMBO Mol. Med.* 2011 in press

Shin Kobayashi\*, Yoshitaka Fujihara, Nathan Mise, Kazuhiro Kaseda, Kuniya Abe, Fumitoshi Ishino, Masaru Okabe (2010) The X-linked Imprinted Gene Family *Fthl17* Shows Predominantly Female Expression Following the 2-cell Stage in Mouse Embryos *Nucleic Acids Res.* 38(11), 3672-81. (\*: corresponding author)

Shimizu, S., Konishi, A., Nishida, Y., Mizuta, T., Nishina, H., Yamamoto, A., and Tsujimoto, Y. Involvement of JNK in the regulation of autophagic cell death. *Oncogene* (2010), 29, 2070-2082.

### 英文総説

Nakayama K. Growth and progression of melanoma and non-melanoma skin cancers regulated

by ubiquitination. *Pigment Cell Melanoma Res.* 23, 338-351, (2010).

### 学会発表

中山 恒、佐藤益弘、迫田実希  
Pre-mRNA processing factor(PRP)19はプロリン水酸化酵素PHD3と結合して低酸素下での細胞死を抑制する  
BMB2010 12月8日 神戸

“Chemical treatment of muscular dystrophy that enhances skipping of the mutated exon in the dystrophin gene”  
Kataoka, N., Nishida, A., Takeshima, Y., Yagi, M., Awano, H., Ota, M., Itoh, K., Hagiwara, M. and Matsuo, M.  
Cold Spring Harbor Asia Conferences “RNA Biology” (2010), Suzhou, China

佐野哲郎、大石咲子、古川哲史: Autocrine/Paracrine Mechanisms for Macrophage Migration Evoked by Mechanical Stretch of Atrial Myocytes. 13th Tokyo-Taipei-Seoul Arrhythmia Conference, 福岡 平成22年10月

笹野哲郎、大石咲子、田村典子、磯部光章、古川哲史: 心房伸展における細胞外ATPのオートクライン作用を介した炎症メカニズム 第27回日本心電学会学術集会 大分 平成22年10月

Akimitsu Konishi, Shigeomi Shimizu, Titia de Lange  
“TRF2 BASIC DOMAIN INTERACTS WITH NUCLEOSOMAL HISTONES TO STABILIZE CHROMOSOME ENDS”  
第33回日本分子生物学会年会、2010年12月、神戸

小西昭充、荒川聡子、清水重臣  
「オートファジー因子Beclin1によるアポトーシス細胞除去の制御」  
第19回日本CellDeath学会学術総会、2010年6月、名古屋

### 招待講演

小林慎: 第82回大会日本遺伝学会 (札幌・2010/9/22)  
タイトル「雌雄の発生におけるエピジェネティックな遺伝子発現制御」(招待講演)ワークショップ: マウス・ラットをモデルとした哺乳遺伝学

### Akimitsu Konishi

“Checkpoint Recovery from DNA damage”  
特定領域研究「細胞周期フロンティア-増殖と分化相関」国際シンポジウム” Cell Cycle and Cell Differentiation - From A to Z”, 2010年11月、名古屋

### 小西昭充

「染色体末端保護のしくみ -テロメア機能制御技術の開発と展開について-」  
第58回システム自然科学研究科セミナー (名古屋市立大学)、2010年5月、名古屋

### 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)

す。また、発癌や老化と密接に関連しているテロメア機能制御のメカニズムの解明にも取り組んでいます。

「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」

笹野哲郎 (代表) 2010年度文部科学省科学研究費補助金 基盤研究 (C)  
「心房細動リスク因子 (メタボリック症候群・心房拡大) における心房炎症機構の解明」

松井毅 第42回 (2010年度) 財団法人内藤記念科学奨励金研究助成「重層上皮特異的遺伝子欠損マウスにおける上皮由来疾患患者発生機構の解析」

小林慎 (代表) 文部省科学研究費 (新学術領域) X染色体の不活化と機能性非コードRNAの解析

小林慎 (代表) 住友財団基礎科学研究助成 X染色体不活性化における機能性small RNA *Far2, Far3* の解析

小西 昭充 2010年度 科学研究費補助金・特定領域研究 (公募研究)  
「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?」

小西 昭充 2010年度 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?」

小西 昭充 (研究分担者)  
2010年度 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」

### 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

# ケミカルバイオロジースクリーニングセンター

ケミカルバイオロジースクリーニングセンター連絡先 (湯島地区 M&D タワー 22 階、センター HP : <http://www.tmd.ac.jp/mri/SBS/cbsc/index.html>) は本事業を推進するための中心的な施設として疾患生命科学研究部、難治疾患研究所、生体材料工学研究所が共同して 2006 年に設立しました。多様な化合物のもつ様々な生理反応への影響を解析するケミカルバイオロジー研究手法の利用と発展には、希望する人がなるべく多様な化合物を利用できるプラットフォームおよび対応した研究環境の整備が不可欠です (図 1)。本センターでは 2010 年度までに以下の 3 点に注目して整備を進め、現在各年度約 50 名の方々が利用しています (図 2)。

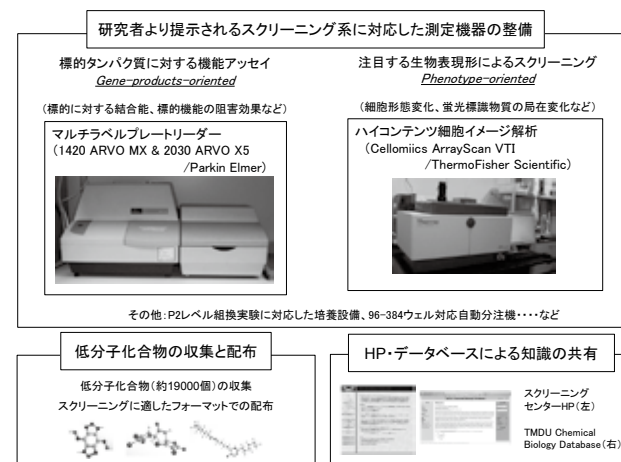


図 1 化合物スクリーニングの方向性とセンター設備

年度	センター 利用登録者数	プレートリーダー 利用件数	アレイスキャン 利用件数
2007	33	336	
2008	56	693	
2009	47	475	
2010	58	343	151

図 2 スクリーニングセンター利用状況

## 1) 低分子化合物の収集・管理と希望者への配付

スクリーニングセンターでは 2010 年 3 月現在までで約 19,000 個の低分子化合物が提供可能です。この内訳は約 17,000 個の構造多様性を重視した低分子化合物、

約 1500 個の機能既知化合物、および学内研究者よりご提供いただいた低分子化合物 (約 500 個) が含まれています。これら化合物は DMSO に溶解後 (10mM in 100% DMSO および 100 $\mu$ M in 10% DMSO)、基本的に 96 ウェルプレート単位 (10 $\mu$ l/well) で希望者に配付しています。事業開始から現在まで本センター化合物を利用したスクリーニングは 30 課題進行しており、いくつかのプロジェクトではヒット化合物からの類縁体検討、作用機序解析がすすんでいます。

## 2) 化合物スクリーニング環境の提供

ケミカルバイオロジー研究における化合物スクリーニングでは、1) 遺伝子産物に対する直接効果を検討する方法、2) 期待する細胞内効果を検討する方法の 2 方向性があり、結果を相互比較することによってより目的に沿った化合物の選択を可能にします (図 1)。現在、本センターではマルチラベルプレートリーダーを 2 台保有し (2030 ARVO X5/Parkin Elmer)、吸光、発光、蛍光測定の外に紫外域吸光、時間分解蛍光、蛍光偏光による *in vitro* でのより緻密な解析に対応できるようになりました。また細胞・生体を利用した高密度アッセイに対応するため、ハイコンテツ細胞解析装置 (Cellomics ArrayScan VTI/ThermoFisher Scientific) を導入しました。ArrayScan VTI については導入後回数利用説明会を行い、スクリーニングを目的とした利用が進んでいます (図 2)。ArrayScan VTI を用いた測定例のいくつかは本センターホームページにて紹介しています。さらに P2 組換え実験に対応した細胞培養設備の整備、384 ウェル対応分注機の導入など、*in vivo*、*in vitro* 双方での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えています。

## 3) 化合物情報共有のためのプラットフォーム：TMDU Chemical Biology Database

化合物スクリーニングにおいて、一研究者での解析には限りがありますが、解析情報を化合物ユーザー間で共有化することにより思いもかけない結論が得られることがあります。センターでは、疾患生命科学研究部の増田正教授、江口博之教授の全面的なご協力を受け、センター

保有化合物情報閲覧システム TMDU Chemical Biology Database (CBDB、<http://bsmdb.tmd.ac.jp/>) を立ち上げ、運用しています。このデー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、化合物情報管理ソフトである ChemBioOffice (Windows)/ChemBioDraw (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。

その他利用詳細に関しましては順次本センターホームページにて紹介していく予定です。



図 3 スクリーニングセンター所在地





# 疾患生命科学研究所 構造情報研究室

## 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など、様々な複合体の構造を解析してきた。その中から、Down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)とそのリガンドとの相互作用について詳述する。

#### 1-1. Down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

DYRKは、中枢神経系の形成異常を呈するショウジョウバエの変異体から同定された *minibrain* の哺乳類にお

ける相同遺伝子で、DYRK1A, DYRK1B, DYRK2, DYRK3, DYRK4の5種類がある。これらの遺伝子からコードされたタンパク質DYRKはTyrとSer/Thrの双方をリン酸化する蛋白リン酸化酵素であるが、現在もなおそのシグナル伝達上の役割はほとんど不明のままである。これらの遺伝子のうち、DYRK1A遺伝子は21番染色体のDown syndrome critical region (DSCR)に位置しているが、Down症候群モデルマウスTs65DnやヒトDown症患者脳でDYRK1A遺伝子が過剰発現していることが確認されており、Down症候群で高頻度に見られるタウタンパク質の過剰リン酸化やβアミロイドの蓄積など、Alzheimer病様の病態との関連が注目されている。そこで、本研究ではタンパク質DYRK1Aの構造を決定するとともに、その構造情報をもとにDown症やAlzheimer病の治療薬となる特異的な阻害剤を創製することを目指した。化合物ライブラリーに対するスクリーニングの結果、新規なDYRK1A阻害物質であるINDY((1Z)-1-(3-ethyl-5-hydroxy-2(3H)-benzothiazoylidene)-2-propanone)が見つかった。INDYはベンゾチアゾール誘導體で、ATPと拮抗してDYRK1Aに対し強い阻害効果(IC<sub>50</sub>値は0.24 μM、K<sub>i</sub>値は0.18 μM)を示した。これまでに知られていたDYRK1A阻害剤のハルミン(harmine)が、モノアミン酸化酵素(MAO)も阻害してしまうのに対して、INDYはMAOを阻害せず、特異性が高い。

我々は、DYRK1A/INDY複合体およびDYRK1A/ハ



図1. DYRK1A/INDY複合体の結晶構造。INDY(濃い灰色の空間充填モデル)はDYRK1A(薄い灰色のリボンモデル)のATP結合ポケットに結合していた。

ルミン複合体の双方のX線結晶構造解析を行った。その結果、INDYもハルミンもDYRK1AのATP結合ポケットに似た様式で結合することがわかった(図1)。さらに、MAO/ハルミン複合体の結晶構造の比較から、INDYの特異性の根拠となる分子モデルを提案した。

なお、本研究は形質発現分野の萩原正敏教授(現・京都大学)およびケミカルバイオロジー分野の細谷孝充教授らと協力して進めている。

#### 1-2. ビタミンD受容体(VDR)とそのリガンドとの相互作用

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1α, 25-ジヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>(活性型D<sub>3</sub>)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なリガンドの機能は、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。

VDRのアнтаゴニストとしては、「ZK168281に代表される側鎖に長鎖エステル構造をもつもの」、「TEI-9647に代表される側鎖にメチレンラクトン構造をもつもの」、「側鎖にラクタム環をもつDLAM」、「側鎖にアダマンタン構造をもつアダマンチルVD」などが知られている。これらに加えて最近、側鎖の22位にブチル基をもつビタミンD<sub>3</sub>誘導體がVDRアンタゴニスト作用を示すことが明らかにされた。我々はその作用機序を理解するために、22S-ブチル型アンタゴニストが結合したVDRのリガンド結合ドメイン(LBD)の結晶構造解析を進めているが、良質の複合体結晶は今まで得られていなかった。

実は、このような問題は我々だけのものではないらしい。VDR-LBDと活性型D<sub>3</sub>および合成アゴニストとの複合体の結晶構造解析には多くの研究グループが成功している。しかしながら、現在知られているアゴニスト結合型(活性型)の構造では、転写共役因子と相互作用する部位や他の核内受容体とのヘテロ二量体化に関わる部位が結晶のバックギン(結晶内で隣り合う分子どうしの接触)に寄与しているため、得られる構造は結晶化と強く関連する。従来の結晶化条件では特定の構造をとるVDR-LBD(=活性型構造)だけが晶出するので、アンタゴニストを結合した不活性型構造の結晶化などは難しい。

しかし一方で我々は、ラットVDR-LBDのK409G変異体を用いることにより、22S-ブチル型アンタゴニスト、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に成功した(図2)。この方法は「VDRのC末端、転写共役因子と相互作用する部位は今まで通りの位置に居ればいい。その代わりに、途中に一箇所‘柔らかい’ところを作って、その箇所よりもN末端側の構造変化は見られるようにしてやる。」という発想に基づいている。このようにして得られた結晶構造のC末端は事前に予想した通り、既報の活性型構造と同じ位置を占めていたが、ループ6-7およびヘリックス11の位置は変化していた(図3)。この結果は、ヘリックス11がヘリックス3やループ6-7から引き離されると、VDRのリガンド結合ポケットが閉じられにくくなることを示唆している。

なお、VDRのリガンド研究は、薬化学研究所の影近弘之教授、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。

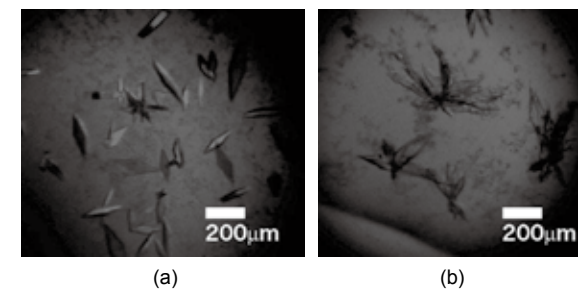


図2. K409G変異によるVDR-LBD、22S-ブチル型アンタゴニスト、ペプチド三元錯体の結晶の改善。ラットVDR-LBDのK409G変異体を用いた場合(a)と、点変異の無いラットVDR-LBDを用いた場合(b)の結晶を比較すると、ほぼ同じ条件下での結晶化にも関わらず、結晶の質には大きな違いがあった。(b)の結晶からは、良質な回折データが得られなかった。

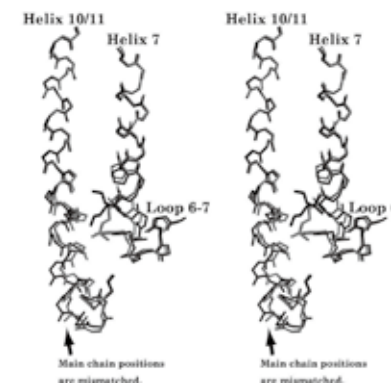


図3. 22S-ブチル型アンタゴニストの結合に伴うVDR-LBDのヘリックス11とループ6-7の構造変化(ステレオ図)。22S-ブチル型アンタゴニストを結合したK409G変異体(濃い灰色)と活性型D<sub>3</sub>を結合したK409G変異体(薄い灰色)の構造を重ね合わせると、ヘリックス11(矢印で示す)とループ6-7の位置の違いが見られる。



## 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、それらを含む 17 種類のペプチドを合成し、それぞれと Pin1 との相互作用を表面プラズモン共鳴法により解析した。その結果、いずれのペプチドも Pin1 との解離定数がミリモラー程度であり、17 箇所のリン酸化部位の中に Pin1 と強く結合する部位は見つからなかった。一方、ミリモラー程度の解離定数は、プロリン異性化酵素と基質とにみられる典型的な値であることから、Pin1 によるタウタンパク質の神経原線維化の阻害は Pin1 の単なる結合によるのではなく、Pin1 の酵素活性と関係していることが示唆された。

## 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ており、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. Inaba Y, Nakabayashi M, Itoh T, Yoshimoto N, Ikura T, Ito N, Shimizu M, Yamamoto K: 22S-Butyl-1 $\alpha$ ,24R-dihydroxyvitamin D(3): Recovery of vitamin D receptor agonistic activity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 121, 146-150 (2010).
2. Ogawa Y, Nonaka Y, Goto T, Ohnishi E, Hiramatsu T, Kii I, Yoshida M, Ikura T, Onogi H, Shibuya H, Hosoya T, Ito N, Hagiwara M: Development of a novel selective inhibitor of the Down syndrome-related kinase Dyrk1A. *Nat. Commun.*, 1, 1-9(2010).

### 国際学会／招待講演

1. Ito N: PDBj (Protein Data Bank Japan), CCP4 Seminar and Workshop, Osaka, November 2010.

### 国内学会／一般講演

1. 野中洋介、小川靖、伊倉貞吉、吉田実代、平松俊行、小野木博、細谷孝充、伊藤暢聡、萩原正敏：ダウン症治療薬創成へ向けた試み・新規 Dyrk1A 阻害剤の特異性の結晶構造からの解析、第 5 回日本ケミカルバイオロジー学会年会、横浜、2010 年 5 月。
2. 中林誠、稲葉有香、酒巻雄太、吉本暢子、伊藤俊将、島崎美佳、増野弘幸、清水正人、山本恵子、伊倉貞吉、伊藤暢聡：結晶構造は、22S-プテリルビタミン D<sub>3</sub> 誘導体の作用機序をどこまで教えてくれるのだろうか？ 第 62 回ビタミン学会大会、盛岡、2010 年 6 月。
3. 増野弘幸、数井優子、伊倉貞吉、中林誠、伊藤暢聡、藤井晋也、河内恵美子、棚谷綾、影近弘之：VDR 活性をもつ LCA 誘導体の合成と VDR 結合構造の解析、第 62 回ビタミン学会大会、盛岡、2010 年 6 月。

### 教育活動

伊藤暢聡：大学院生命情報教育部  
伊倉貞吉：大学院生命情報教育部

### 研究費

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)

伊藤暢聡：鳥インフルエンザ治療薬の国際共同開発研究、科学技術振興調整費「アジア・アフリカ科学技術協力の戦略的推進 国際共同研究の推進」  
伊藤暢聡：ダウン症患者で早期に発症するアルツハイマー病治療薬、科学技術振興機構「研究成果最適展開支援プログラム」

# 疾患生命科学部 薬化学分野

## 研究内容

### 概要

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転写因子である(図1にレチノイドの場合を例示)。従って、遺伝子プロモーターを介した転写に共通した因子であり、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制御する転写制御因子と考えられる。リガンド依存的転写因子として核内受容体は細胞や個体の分化、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、これまでレチノイドの核内受容体 RAR (Retinoic Acid Receptor)、RXR (Retinoid X Receptor) の特異的アゴニスト、アンタゴニストを種々創製してきた。特に、RAR 選択的な 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形白血病 (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。また、レチノイド療法の有用性を拡張すべく、高分子ミセルへの封入による放出制御 (徐放性) についても検討を行っている。

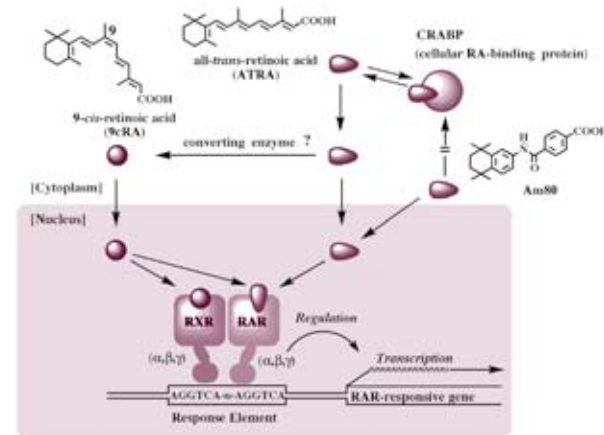
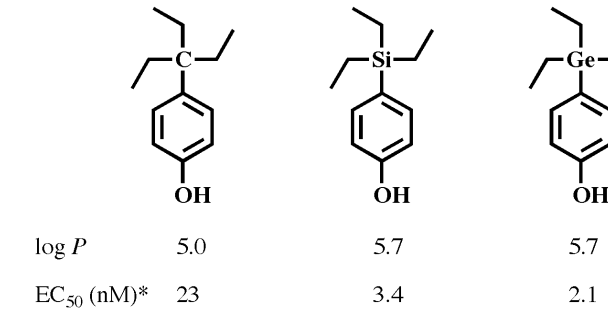


図1 レチノイド核内受容体の作用機序と合成レチノイド Am80 の作用

本年度は、核内受容体リガンドの重要な構造要素である疎水性構造に着目し、シリル原子やゲルマニウム原子をもつ置換基の有用性を検証した。各種アルキル及びアリール置換シリル基、ゲルミル基を持つフェノール誘導体を合成し、これら置換基の疎水性パラメータの測定及びフェノール誘導体のエストロゲン活性を測定した。炭素、シリル、ゲルマニウムを中心元素として持ち、同じアルキル基を持つ置換基を比較すると、シリル、ゲルマニウムを中心元素として持つ置換基は、疎水性パラメータ (log P) が約 0.6 ~ 0.8 高いことがわかった。また、フェノール誘導体のエストロゲン活性は、置換基の疎水性にある程度の相関を示し、シリル、ゲルマニウム含有置換基が核内受容体リガンドの疎水性構造として有用であることを示した。特に、*p*-(2,2-diethylpropyl)phenol と比べて、そのゲルマニウム誘導体 *p*-(triethylgermyl)

phenol は 1桁強い nM オーダーの活性を示した。



\*EC<sub>50</sub> value was determined by the cell proliferation assay of MCF7 cells.

図2 Si、Ge 原子を持つエストロゲン活性分子

### 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、特定の分子種 (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、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、蛍光物質同士もしくは蛍光物質と他の分子団との会合を制御した蛍光センサーとして、Bodipy 誘導体の開発を行い (図3)、その特性を活かした蛍光性リガンド、チロシンニトロ化を検出する化合物へ応用しうることを示した。

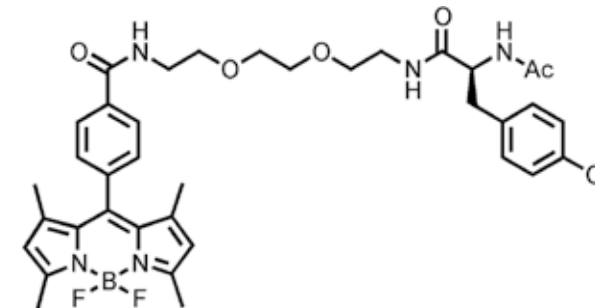


図3 会合を制御した Bodipy 誘導体の例

### 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、ヒドロキサム酸誘導体が溶媒の種類によって立体構造を転換することを見いだした。本化合物にパイレンを組み込むことで、その構造変化を蛍光特性の差として観測できることを見いだした。このような分子は蛍光センサーや分子スイッチとしての応用が期待できる (図4、ハイライト参照)。

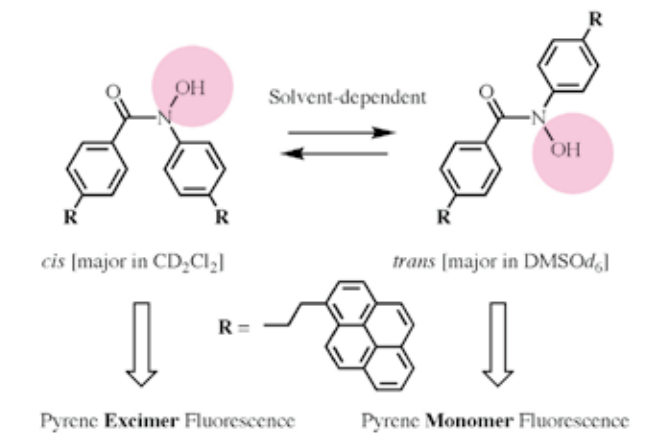


図4 溶媒特性によって立体転換する分子



## ハイライト

### 環境応答型芳香族アミド分子の創製

分子やその集合体の立体構造や動的挙動はこれらの機能発現に重要な要素の一つである。近年、外的環境の変化に伴って構造変化を引き起こす分子が、機能性分子への応用を目的に創製されている。このような分子は分子マシーン、分子スイッチなどと総称されており、ポリマーや分子集合体の分野では、光、熱、酸塩基などの外的要因による構造変化により、物性や形状が大きく変化する例が種々知られている。小分子の場合には、構造変化をスイッチ部として用いる場合が多く、ロタキサン構造を用いた分子シャトルや、1,2-ジアリールエテンの環化反応やアゾベンゼンの異性化反応を利用した系などが開発されている。筆者らは、レチノイド(活性ビタミン A)の医薬化学研究において、強力な活性をもつアミド化合物 Am80 (図1) が*N*-メチル化という化学修飾によってアミド結合の立体構造が trans 型から cis 型へと変わり、活性を失うことを見いだした。さらに、このようなアミド結合の立体転換が、*N*-メチル化という化学修飾で行うのではなく、周囲の環境変化に対応して引き起こすことができることを見いだした。これまでに、pH、酸化還元反応、溶媒特性によって立体構造が変化する化合物を見いだしている。このスイッチ部となるアミド構造に蛍光団を組み込むことによって、外的因子によって引き起こる立体転換を蛍光特性の変化として検出することも可能である。ただし、上述したような小分子による分子スイッチもしくは環境応答型分子は、構造転換に要するエネルギー障壁が十分に高く、外からの刺激を受けることによって初めてその構造を相互に変換するものが一般的である。アミド結合の cis/trans 異性のような比較的エネルギー障壁の低い平衡反応を分子スイッチ機能へと応用できるのかはこれからの課題であろう。筆者らが見いだした芳香族アミドの立体特性は、単純で一般性のある系であり、また、金属の配位のような強い相互作用に基づいていないため、用途に応じて様々な分子設計や化学修飾が可能であり、機能性分子開発を目指して研究を進めている。

#### 人事異動

転入：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）、神田翠（研究委託生、お茶の水女子大学大学院博士前期課程）、宮城夏子（医学部4年生）

転出：関根良太（大学院生、博士前期課程）、中野英一（大学院生、博士前期課程）、宮島友（大学院生、博士前期課程）

### 業績目録

#### 原著論文

- Kurosu, T., Wu, N., Oshikawa, G., Kagechika, H. Miura, O. Enhancement of imatinib-induced apoptosis of BCR/ABL-expressing cells by nutlin-3 through synergistic activation of the mitochondrial apoptoic pathway. Apoptosis 15: 608-620, 2010
- Yasmin, R., Kannan-Thulasiraman, P., Kagechika, H., Dawson, M. I., Noy, N. Inhibition of Mammary Carcinoma Cell Growth by RXR is Mediated by the Receptor’s Oligomeric Switch. J. Mol. Biol. 397: 1121-1131, 2010.
- Ito, S., Hirano, T., Sugimoto, A., Kagechika, H., Takeuchi, S., Yamaguchi, T. Latent Enamine Functionality of 5-Methyl-2,3-dihydropyradines. Chem. Pharm. Bull. 58: 885-1002, 2010.
- Gohbara, A., Katagiri, K., Sato, T., Kubota, Y., Kagechika, H., Araki, Y., Araki, Y., Ogawa, T. In Vitro Murine Spermatogenesis in an Organ Culture System. Biol. Reprod. 83: 261-267, 2010.
- Fujishima, T.: Fujii, S.; Harayama, T. Synthesis and Biological Activity of Fluorinated Vitamin D. Curr. Org. Chem. 14: 962-976, 2010.
- Kogai, T., Liu, Y.-Y., Richter, L. L., Mody, K., Kagechika, H., Bent, G. A. Retinoic Acid Induces Expression of the Thyroid Hormone Transporter, Monocarboxylate Transporter 8 (Mct8). J. Biol. Chem. 285: 27279-27288, 2010.
- Harayama, T.; Asai, M.; Miyagoe, T.; Abe, H.; Takeuchi, Y.; Yamaguchi, A.; Fujii, S. Effect of oxygen substituent in the aniline part of benzanilide on the regioselectivity in direct arylation using palladium-phosphine reagents. Heterocycles 81: 1881-1889, 2010.
- Goto, T., Ohta, K., Fujii, S., Ohta, S., Endo, Y. Design and synthesis of androgen receptor full antagonists bearing a p-carborane cage: Promising ligands for anti-androgen withdrawal syndrome. J. Med. Chem. 53: 4917?4926, 2010.
- Kakuta, H., Azumaya, I., Masu, H., Matsumura, M., Yamaguchi, K., Kagechika, H., Tanatani, A. Cyclic-tri(N-methyl-meta-benzamide)s: substituent effects on the bowl-shaped conformation in the crystal and solution states. Tetrahedron 66: 8254-8260, 2010.
- Takeuchi, H., Yokota, A., Ohoka, Y., Kagechika, H., kato, C., Song, S.-Y., Iwata, M. Efficient Induction of CCR9 on T Cells Requires Coactivation of Retinoic Acid Receptors and Retinoid X Receptors (RXRs): Exaggerated T Cell Homing to the Intestine by RXR Activation with Organotins. J. Immunol. 185: 5289-5299, 2010.
- Mori, S., Iwase, K., Iwanami, N., Tanaka, Y., Kagechika, H., Hirano, T. Development of novel bisubstrate-type inhibitors of histone methyl-transferase SET7/9. Bioorg. Med. Chem. 18: 8158-8168, 2010.
- Ohta, K., Kawachi, E., Shudo, K., Kagechika, H. Design and Synthesis of Novel Retinoid

Synergists having a Dibenzodiazepine Skeleton. Heterocycles, 81: 2465-2470, 2010.

13. Hirano, T., Akiyama, J., Mori, S., Kagechika, H. Modulation of intramolecular heterodimer-induced fluorescence quenching of tricarbocyanine dye for the development of fluorescent sensors. Org. Biomol. Chem. 8: 5568-5575, 2010.

#### 著書及び総説

1. Hirano, T., Kagechika, H. Thyromimetics: a review of recent reports and patents (2004 - 2009). Expert Opinion 20, 213-228, 2010.

#### 国際学会発表

##### 招待講演

1. Kagechika, H. Development of Novel Synthetic Ligands for Nuclear Receptors. The 14<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology (ICE2010), Kyoto, Mar. 2010.
2. Kagechika, H. Development of Novel Non-seco-Stroid-type Vitamin D Derivatives. ICE2010 Official Satellite Symposium - Nuclear Receptor and its Frontier-, Kyoto, Mar. 2010.

##### 一般講演

1. Fujii, S., Ohta, K., Endo, Y., Kagechika, H. Development of Novel Nonsteroidal Androgen Receptor Ligands Based on Hydrophobic Boron Clusters. ICE2010 Official Satellite Symposium - Nuclear Receptor and its Frontier-, Kyoto, Mar. 2010.
2. Tanatani, A., Sakai, H., Mori, S., Fujii, S., Hirano, T., Kagechika, H. Development of Novel Nonsteroidal Androgen Receptor Ligands Based on Hydrophobic Boron Clusters. ICE2010 Official Satellite Symposium - Nuclear Receptor and its Frontier-, Kyoto, Mar. 2010.
3. Matsumura, M., Muranaka, A., Uchiyama, M., Masu, H., Azumaya, I., Kagechika, H. Tanatani, A. Development of Novel Porphyrin Derivatives Based on Steric Properties of Amide Bond. ISCD-22, Nara, June, 2010.
4. Kudo, M., Hanashima, T., Muranaka, A., Sato, H., Uchiyama, M., Kagechika, H., Tanatani, A. Synthesis and Conformational Analysis of Helical Aromatic Multilayered Ureas. ISCD-22, Aug. 2010.
5. Fujii, S., Yamada, A., Ohta, K., Endo, Y., Kagechika, H. Development of Novel Androgen Antagonists Based on Hydrophobic Boron Clusters. EFMC-ISMCM2010 21<sup>st</sup> International Symposium on Medicinal Chemistry, Brussels, Bergium, Sep. 2010.

#### 国内招待講演

1. 影近弘之. 核内受容体を分子標的とした医薬化学研究-レチノイドを中心に. 第5回 Metabolic Syndrome Seminar, 岡山, 2010年2月.

#### 国内学会

1. 山田歩, 富田景子, 長野麻央, 藤井晋也, 原山尚, 太田公規, 遠藤泰之, 影近弘之. 変異受容体にも有効な新規アンドロゲンアンタゴニストの創製. 日本薬学会第130年会, 岡山, 2010年3月.
2. 山田裕樹, 伊藤茂, 影近弘之, 安原義, 杉本昭子. ビロンを基本骨格とした新規 MMP 阻害剤の開発. 日本薬学会第130年会, 岡山, 2010年3月.
3. 関根良太, 藤井晋也, 増野弘幸, 平野智也, 河内恵美子, 棚谷綾, 影近弘之. カルボランを基盤としたチオエーテル構造を有する新規 VDR リガンドの創製. 日本薬学会第130年会, 岡山,

2010年3月.

4. 数井優子, 増野弘幸, 藤井晋也, 平野智也, 河内恵美子, 影近弘之, 棚谷綾. ビタミンD活性を有するリトコール酸誘導体の創製. 日本薬学会第130年会, 岡山, 2010年3月.
5. 酒井悠, 平野智也, 森修一, 藤井晋也, 影近弘之, 棚谷綾. 6-アリアルクマリン環を母核とした新規プロゲステロンアンタゴニストの創製. 日本薬学会第130年会, 岡山, 2010年3月.
6. 松村実生, 村中厚哉, 内山真伸, 榊飛雄真, 東屋功, 影近弘之, 棚谷綾. 芳香族アミドの立体特性を活かした新規ボルフィリン誘導体の創製. 日本化学会第90春期年会, 大阪, 2009年3月
7. 山田歩, 富田景子, 長野麻央, 藤井晋也, 原山尚, 太田公規, 遠藤泰之, 影近弘之. 変異 AR を有する LNCaP 細胞に対して有効な新規 AR アンタゴニストの創製. ケミカルバイオロジー学会第5回年会, 東京, 2010年5月.
8. 増野弘幸, 数井優子, 伊倉貞吉, 中林誠, 伊藤暢聡, 藤井晋也, 河内恵美子, 棚谷綾, 影近弘之. VDR 活性をもつ LCA 誘導体の合成と VDR 結合構造の解析. ビタミン学会第62回大会, 岩手, 2010年5月.
9. 影近弘之, 藤井晋也, 増野弘幸, 平野智也, 伊藤暢聡, 伊倉貞吉, 棚谷綾. カルボランを疎水性骨格とするビタミンD誘導体とその核内受容体結合様式. 第7回中性子捕獲療法学会, 東京, 2010年8月.
10. 藤井晋也, 山田歩, 太田公規, 遠藤泰之, 影近弘之. カルボランを疎水性骨格とする新規アンドロゲン受容体リガンドの創製. 第7回中性子捕獲療法学会, 東京, 2010年8月.
11. 岡本巖, 高橋優介, 澤村美香, 森田延嘉, 田村修, 榊飛雄真, 東屋功, 影近弘之, 松村実生, 棚谷綾. 第21回基礎有機化学討論会, 名古屋, 2010年9月.
12. 山本紗をり, 榊飛雄真, 東屋功, 花鳥貴幸, 影近弘之, 棚谷綾. 五員環の複素環構造を基盤とした芳香族アミドの立体特性. 第21回基礎有機化学討論会, 名古屋, 2010年9月.
13. 藤本慎子, 松村実生, 小松大輔, 榊飛雄真, 片桐幸輔, 東屋功, 影近弘之, 棚谷綾. 環状トリアミドの二量体形成と結晶多形. 第21回基礎有機化学討論会, 名古屋, 2010年9月.
14. 平野智也, 酒井悠, 白石拓也, 森修一, 藤井晋也, 棚谷綾, 影近弘之. クマリン骨格を基盤とした蛍光センサーの効率的開発法の構築と、蛍光性プロゲステロン受容体リガンド開発への応用、第4回バイオ関連化学シンポジウム、大阪、2010年9月.
15. 金井美紗衣, 平野智也, 榊飛雄真, 東屋功, 影近弘之, 棚谷綾. 環境応答型アミドの構造特性を利用した蛍光センサー分子の開発、第36回反応と合成の進歩シンポジウム、名古屋、2010年11月.
16. 藤井晋也, 増野弘幸, 埜田善之, 加納敦, 中林誠, 伊藤暢聡, 河内恵美子, 清水正人, 棚谷綾, 平野智也, 影近弘之. ホウ素クラスターを疎水性骨格とする新規非セコステロイド型ビタミンD誘導体：受容体結合様式と構造展開. 日本レチノイド研究会第21回学術集会, 高槻, 2010年11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・基盤研究 A 一般「遺伝子転写制御のケミカルバイオロジー研究」(代表)

藤井晋也：文部科学省科研費・若手研究 B「新規疎水性骨格の開発を基盤とした非セコステロイド型ビタミンD受容体リガンドの創製」(代表)



# 疾患生命科学部ケミカルバイオロジー分野 生命有機化学研究室

## 研究内容

### 概要

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. ダブルクリック反応：生体分子の新しい修飾法

新しい薬剤の開発が世界中で活発に行われているものの、開発に要する労力に比べて、効率的に新薬が開発できているとは言い難い。これは、生体分子機能への理解が未だに不十分であることが一因で、実際、現行の医薬品でさえ、生体にどのように作用し、その薬効を示しているのか未解明な場合が多い。そのため、新規薬剤の開発には、多数の候補化合物の合成が必要とされている。従って、疾患に関与する生体分子機構の詳細を明らかにできれば、新薬開発が大幅に効率化され、画期的な分子標的薬剤の開発につながると期待される。

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。しかし、膨大な数の分子が混在する生体内において、目的の分子だけを特異的に認識することは容易ではない。これに対して、近年、生体内には存在しない (bioorthogonal な) 官能基を標的の分子に導入し、この官能基に対する特異的な反応を利用することで、目的の生体分子だけに目印となる分子をつなげることができるようになってきた。この際に用いられる反応として、クリック反応と呼ばれる信頼性の高い反応が汎用されるようになってきた。

生体分子の化学修飾法として、銅触媒を用いてアジドとアルキンを連結する [3+2] 環化付加反応が代表的なクリック反応として広く用いられているようになり、生

命科学研究の手法に革新的な進展をもたらしている。本反応に利用される官能基であるアジドとアルキンは、どちらも生体内には存在しない bioorthogonal な官能基であるため、標的の分子だけを狙って標識するのに最も適した反応の一つである。本反応は官能基許容性が広い上、水中・低濃度であっても利用でき、細胞抽出液中などの数多くの分子の共存下でも確実にアジドとアルキンとを選択的に連結できることが特徴である。しかし、本反応は優れた反応ではあるものの、触媒として用いる銅が細胞毒性を有することや反応速度が遅いことなど、生物応用の観点からは改善の余地があった。これに対して近年、歪みの大きな環状アルキンを利用すると、歪みの解消を駆動力とすることで、アジドとの環化付加反応が無触媒で速やかに進行することが見いだされ、生体分子を効率よく化学修飾する新方法論として広く用いられるようになってきた。最近では、高歪みアルキン **1**, **2a-c** が相次いで合成され (図 1)、反応の高速化が達成されるとともに、実際に生体分子のイメージングに用いられている。

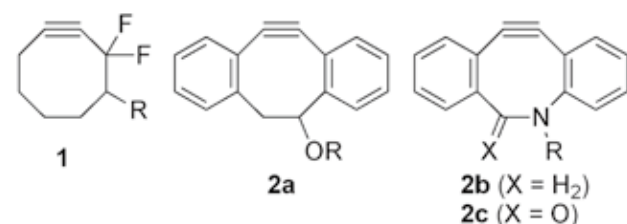


図 1 高歪み環状アルキン

これに対して我々は、2つの高度に歪んだアルキン部位を有する Sondheimer ジイン (**3**) を用い、一方にアジド基を有する生体分子、もう一方に標識用のアジド化合物との2度の環化付加反応 (ダブルクリック反応) を行うことができれば、生体分子を簡単に化学修飾できると考えた (図 2)。従来法である歪んだ環状モノインを用いる手法は反応効率などの面で優れた手法ではあるものの、機能部位を導入したモノインを研究目的に応じてその都度合成するのに労力を要する点が問題であった。一方、ジイン **3** に対するダブルクリック反応を用いれば、ジイン **3** を共通して利用し、入手容易なアジド化合物で標識できるため、より簡便な手法を創出できると期待される。

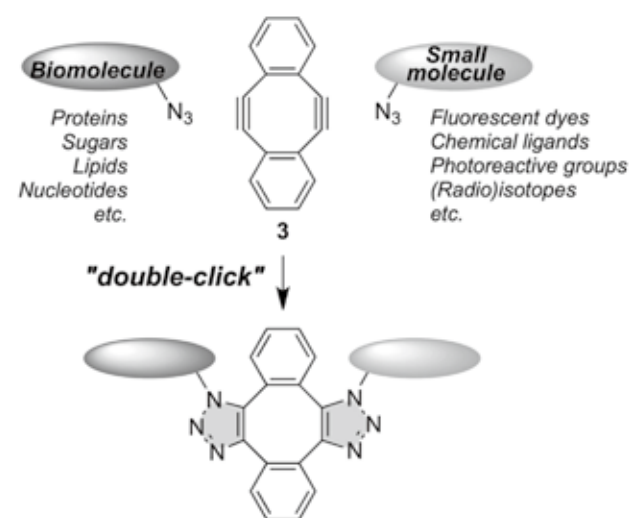


図 2 ダブルクリック反応

そこで、まずジイン **3** とベンジルアジド (**4a**) の反応を検討したところ、反応は速やかに進行し、ほぼ定量的に二重環化付加生成物を得ることに成功した (図 3A)。なお、生成物はトランス体 **6a**、シス体 **7a** の混合物であり、X 線結晶構造解析により、いずれも特徴的な鞍型の構造を有することが分かった (図 3B)。次に、ジイン **3** に対して等量のアジド **4a** を作用させたところ、予期に反して、二重付加体 **6a**, **7a** の生成と未反応のジイン **3** が確認されるのみで、モノイン **5** を得ることはできなかった。密度汎関数理論 (DFT) 計算によってジイン **3** とメチルアジド (**4b**) の反応経路を解析したところ、1段階目の環化付加反応 (12.4 kcal/mol) に比べて、2段階目の環化付加反応 (8.8, 9.5 kcal/mol) の方が活性化エ

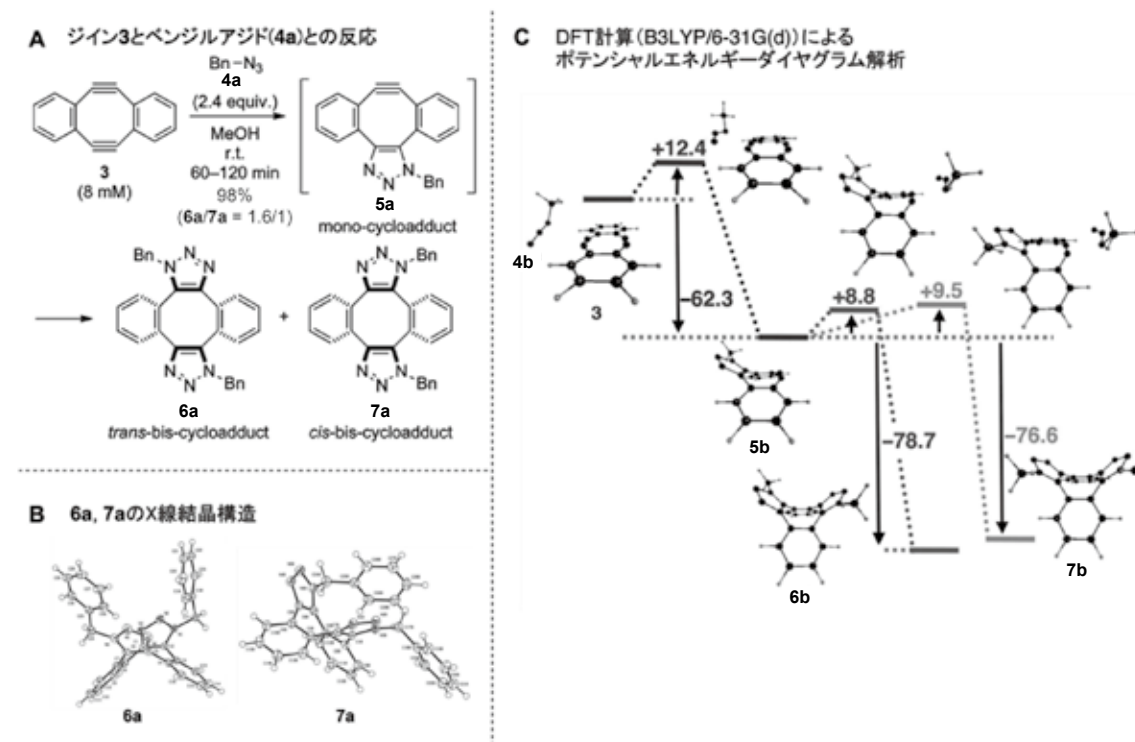


図 3 ダブルクリック反応の検討

ネルギーは低く、モノイン中間体 **5** の方がジイン **3** よりも反応性が高いことが示唆された (図 3C)。そこで、2種のアジド化合物をジインを介してつなぐため、ジイン **3** に対して2種類のアジド化合物の混合物を加えたところ、それぞれのアジド化合物がジインに付加した目的生成物を中程度の収率で得ることができた。本結果から、ダブルクリック反応を用いることで、ジインを介して標的のアジド化合物を異なる種類のアジド化合物と連結できることが示された。

今回開発したダブルクリック反応を利用することで、実際に生体分子の化学修飾を検討した。

まず、HaloTag タンパク質と HaloTag リガンドが特異的に効率良く共有結合を形成することを利用し、アジド基を有する HaloTag リガンドを用いてアジド含有 HaloTag タンパク質を作製した。次に、作製したアジド HaloTag タンパク質と蛍光性アジド化合物の混合物に対してジインを作用させたところ、効率良くタンパク質を蛍光標識することができた (図 4)。さらに、アジドタンパク質に対して先にジインのみを作用させた後、未反応のジインを除去し、続けて蛍光性アジド化合物を加えたときにも、高効率でタンパク質を蛍光標識できることが明らかになった。すなわち、アジドタンパク質との反応においては、2分子のアジドタンパク質がジインと結合した生成物 (ダイマー) はほとんど確認されず、モノイン中間体を利用した段階的な蛍光標識が可能であることが分かった。



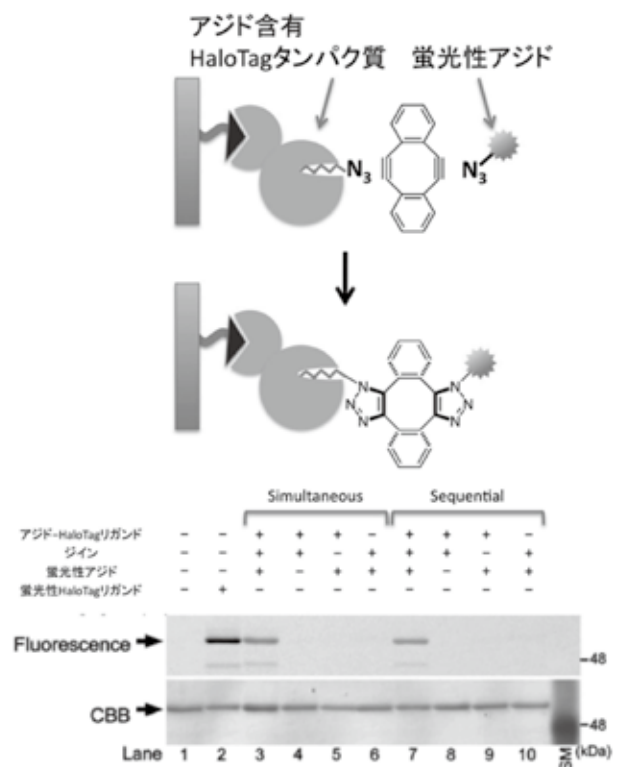


図4 ダブルクリック反応によるアジド含有 HaloTag タンパク質の蛍光標識

次に、ダブルクリック反応を利用し、アジド基を有する生細胞中の分子の局在をイメージングしようと考えた。具体的には、文献既知の手法で生細胞 (HEK293) にアジド糖を代謝的に取り込ませることで、細胞膜表面の複合糖質にアジド基を導入し、このアジド基に対してダブルクリック反応を行い、細胞膜表面の蛍光標識を試みた (図5)。その結果、細胞膜に局在する複合糖質を効率よく蛍光標識でき、今回開発したダブルクリック反応による生体分子の化学修飾法が生細胞においても利用できる簡便な手法であることが明らかになった。

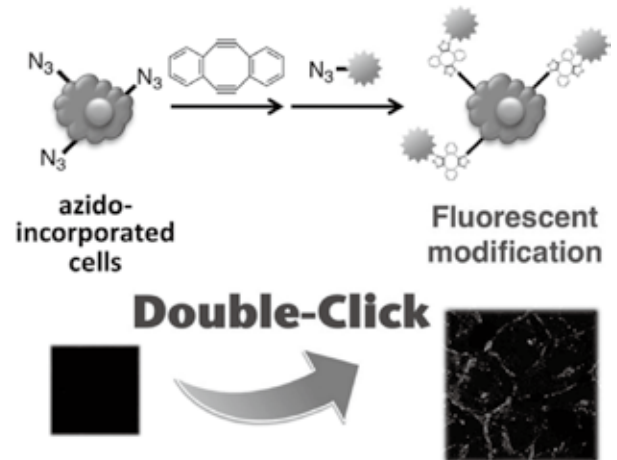


図5 ダブルクリック反応による生細胞の蛍光標識

以上のように、我々は、Sondheimer ジーンと2分子のアジドとの2度の環化付加反応が効率良く進行することを見いだした。また、このダブルクリック反応を活用し、生細胞にも適用できる簡便な生体分子化学修飾法の

開発に成功した。本法は、ジーンを共通して用いることで、入手容易なアジド化合物を生体分子に導入できるため、生命科学分野の多様な研究課題に柔軟に対応できる優れた手法であると考えている。簡便な本手法の活用により、生命科学研究の進展を加速させ、様々な未知の生体分子機能が解明されると期待される。

## 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、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。

## 人事異動

転入：吉田 優 (助教、2010年4月)  
隅田有人 (特任助教、2011年1月)

## 業績目録

### 原著論文

- Kii I, Shiraishi A, Hiramatsu T, Matsushita T, Uekusa H, Yoshida S, Yamamoto M, Kudo A, Hagiwara M, Hosoya T. Strain-promoted double-click reaction for chemical modification of azido-biomolecules. *Org Biomol Chem* 8(18): 4051-4055, 2010.
- Inouye S, Iimori R, Sahara Y, Hisada S, Hosoya T. Application of New Semi-Synthetic Aequorins with Long Half-Decay Time of Luminescence to G-Protein-Coupled Receptor Assay. *Anal Biochem* 407(2): 247-252, 2010.
- Ogawa Y, Nonaka Y, Goto T, Ohnishi E, Hiramatsu T, Kii I, Yoshida M, Ikura T, Onogi H, Shibuya H, Hosoya T, Ito N, Hagiwara M. Development of a novel selective inhibitor of the Down syndrome-related kinase Dyrk1A. *Nat Commun* 1:86 doi: 10.1038/ncomms1090, 2010.
- Kohta R, Kotake Y, Hosoya T, Hiramatsu T, Otsubo Y, Koyama H, Hirokane Y, Yokoyama Y, Ikeshoji H, Oofusa K, Suzuki M, Ohta S. 1-Benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline binds with tubulin  $\beta$ , a substrate of parkin, and reduces its polyubiquitination. *J Neurochem* 114(5): 1291-1301, 2010.
- Abe Y, Okumura E, Hosoya T, Hirota T, Kishimoto T. A single starfish Aurora kinase performs the combined functions of Aurora-A and Aurora-B in human cells. *J Cell Sci* 123(22): 3978-3988, 2010.

### 国際学会

- Takahashi K, Hosoya T, Onoe K, Doi H, Nagata H, Watanabe Y, Wada Y, Takashima T, Katayama Y, Yamanaka H, Suzuki M, Onoe H, Watanabe Y.  $^{13}\text{C}$ -Labeled cetrozole and its analogs: excellent PET probes for aromatase. 2010 World Molecular Imaging Congress (WMIC). Kyoto, Japan, Sep. 2010.
- Yokoyama C, Kawasaki A, Takahashi K, Hosoya T, Watanabe Y, Onoe H. Functional associations of aromatase and serotonin transporters with social behavior: PET studies with  $^{14}\text{C}$  cetrozole and  $^{14}\text{C}$  DASB in common marmosets. 2010 World Molecular Imaging Congress (WMIC). Kyoto, Japan, Sep. 2010.
- Takahashi K, Hosoya T, Onoe K, Doi H, Nagata H, Watanabe Y, Wada Y, Takashima T, Katayama Y, Yamanaka H, Suzuki M, Onoe H, Watanabe Y. Imaging brain aromatase using  $^{14}\text{C}$  cetrozole and its analogs. *Neuroscience* 2010 (40<sup>th</sup> Annual Meeting of Society for Neuroscience (SfN)), San Diego, USA, Nov. 2010.
- 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. The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2010), Hawaii, USA, Dec. 2010.
- Hosoya T, Kurakata H, Iimori R, Yoshida S, Sahara Y, Inouye S. Novel substrates for red-shifted bioluminescence and fluorescence in aequorin system. The 2010 International Chemical

Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2010), Hawaii, USA, Dec. 2010.

### 国内学会

- 辻本 舞, 大原和幸, 長阪玲子, 潮 秀樹, 堀 正敏, 細谷孝充. アディボネクチン分泌促進作用における  $\gamma$ -オリザノールの構造活性相関. 日本農芸化学 2010 年度大会, 東京, 2010年3月.
- 細谷孝充, 藏方 甫, 澤崎恵介, 佐原由依子, 井上 敏. イクオリン系生物発光・蛍光発光の長波長化のための新規基質の開発. 日本ケミカルバイオロジー学会第5回年会, 横浜, 2010年5月.
- 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. 歪み誘起性 Double-Click 反応によるアジド基含有生体分子の化学修飾. 日本ケミカルバイオロジー学会第5回年会, 横浜, 2010年5月.
- 野中洋介, 小川 靖, 伊倉貞吉, 吉田実代, 平松俊行, 小野木博, 細谷孝充, 伊藤暢聡, 萩原正敏. ダウン症治療薬創成へ向けた試み・新規 Dyrk1A 阻害剤の特異性の結晶構造からの解析. 日本ケミカルバイオロジー学会第5回年会, 横浜, 2010年5月.
- 高橋佳代, 細谷孝充, 尾上嘉代, 土居久志, 長田浩子, 渡辺由美子, 平松俊行, 李 曉榮, 和田康弘, 高島忠之, 片山由美子, 山中 創, 鈴木正昭, 尾上浩隆, 渡辺恭良.  $^{13}\text{C}$ -Labeled cetrozole: an excellent PET probe for aromatase in brain in emotional disorders. *Neuro2010*, 神戸, 2010年9月.
- 飯森理絵, 佐原由依子, 佐藤淳一, 久田 素, 吉田 優, 細谷孝充, 井上 敏. 半合成イクオリンを用いる G タンパク質共役型受容体アッセイに有用な新規セレンテラジン類縁体の合成. 生物発光化学発光研究会第27回学術講演会, 東京, 2010年10月.
- 白石 旭, 喜井 勲, 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, 細谷孝充. ダブルクリック反応: 高歪みアジド化合物を用いる生体分子の化学修飾法. 第60回有機合成化学協会関東支部シンポジウム, 新潟, 2010年12月.

### 特許

国際公開2件  
WO 2010/090318: セレンテラミド類縁体  
WO 2010/090319: セレンテラジン類縁体及びその製造方法  
国際出願1件  
PCT/JP2010/061371  
国内出願2件  
特願 2010-073429, 特願 2010-088175

### 学外教育活動

細谷孝充: 東京工業大学生命理工学部非常勤講師

### 研究助成金

細谷孝充 (代表): 財団法人サントリー生物有機化学研究所研究奨励金 (SUNBOR GRANT) (平成20~22年度) 「non-RI 光親和性標識法による新規 Wnt シグナルカスケード制御因子の探索」  
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」  
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」  
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」

吉田 優 (代表): 日本学術振興会 (JSPS)・研究活動スタート支援 (平成22~23年度) 「機能性高歪みアジドの開発と生体分子化学修飾への応用」

### 受賞

白石 旭 (M2) 第60回有機合成化学協会関東支部シンポジウム 若手講演賞



# 疾患生命科学研究部 生命システムモデリング研究室

## 研究内容

### 概略

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、システム工学的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。特に、染色体上の遺伝子位置を考慮した解析を行っている。これまでにヒト、マウス、ラット、ショウジョウバエ、線虫、酵母の6種の真核生物について、遺伝子の共発現と遺伝子間距離の関係を調べ、どの生物種においても染色体上での距離が近い遺伝子ペアの共発現率が高いことを示した。現在、この解析をヒトのがんと非がん組織からの遺伝子発現データに適用し、両者の違いを検討している。

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た。この解析では、それぞれのmiRNAを中心に幅の異なるウィンドウを設定し、ウィンドウに含まれる遺伝子の平均発現レベルを計算した。その後、全てのmiRNAについての結果を平均した。その結果、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、研究がさかんに行われるようになってきている。そのような中で、がんで異常な発現を示すmiRNAが多い、半数以上のmiRNAががんに関連する部位近傍にある、乳がん等において多くのmiRNAがコピー数異常を示すことが報告されている。我々は、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。上記と同様のウィンドウを用いた解析を行ったところ、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を見出された。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。一方、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と遺伝子の発現の相関係数を比較したところ、がん部と非がん部の差はウィンドウ幅が小さくなるほど顕著になり、ウィンドウ幅が小さい場合は、がん部で正の相関を示すものが有意に多くなった。さらに詳しく調べると、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。

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。実験条件が少ない場合、それぞれの条件で多数回のマイクロアレイ測定を行えば、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。まず、データを中央値で正規化し、2枚のマイクロアレイデータの対応するプローブの発現量の比を計算する。正規化した発現量の対数を計算し、この値を横軸に、発現量の比を縦軸にプロットする(図1参照)。次にデータを幅 $d$ のいくつかの区間に分ける。区間ごとに50個のプローブをランダムに選んで、発現比の最大値と最小値を求める。この操作を50回繰り返し、最大値と最小値の99.99%信頼区間を計算する。最大値の信頼区間の上限を $g$ 倍したものを上側の閾値、最小値の信頼区間の下限を $1/g$ 倍したものを下側の閾値とした。

この方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。前者は、心臓では細胞が同期して収縮するために細胞間での情報の伝達が必要なためであると考えられる。後者については、心筋細胞ではコラーゲンが多いのに対し、皮膚ではケラチンが多いなど、細胞接着の様式の違いによるものと考えられる。

さらに、シミュレーションによって本手法の有効性を詳しく検討した。シミュレーションデータは、ヒトの海馬から得られた13アレイの発現データの平均値を真値として、加法性ノイズと乗法性ノイズを加えることによって作成した。加法性、乗法性のノイズはそれぞれ正規分布に従い、平均は0である仮定し、分散をさまざまに変えてシミュレーションを行った。これをコントロール条件のデータとした。これと比較する実験条件のデータは、コントロールデータからランダム選んだ1000プローブの発現値を対数変換後、正規乱数を加えることで作成した。加法性ノイズの分散は0.01~20、乗法性ノイズの分散は0~0.1、実験データの作成に用いた正規乱数は平均4、分散0.8とした。

典型的な発現量と発現比の関係を図1に示す。縦の点線は区間を表し、灰色の太線は、 $g=2$ のときの上下側の適応閾値を表している。図に示されるように、ほとんどの遺伝子が上下の閾値の間にあり、計算された閾値の妥当性が確認される。図2は、ノイズの分散と感度の

関係を表しており、(a)  $g=1.2$ 、(b)  $g=2$ 、(c)  $g=5$ の結果である。 $g=5$ ではノイズが大きい場合に感度が低くなるが、それ以外の条件では感度が90%以上であることがわかる。一方、特異度は $g=5$ ではすべてのノイズ条件で99.9%以上であり、 $g=1.2$ でも99%以上である。また、 $g=2$ の結果はこれらの中間となる。これらの結果は、適応閾値がfalse positiveを抑えるのに効果が高く、妥当性の高い遺伝子を検出することによって、発現データの解釈を容易にすることを示唆している。

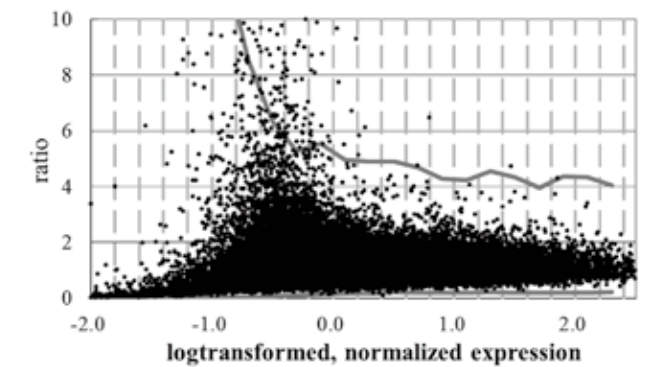


図1 同一条件で得られた発現量の比の分布と計算された適応閾値。ノイズの分散は加法性20、乗法性0.05であり、縦の点線は適応閾値の計算に用いる区間である。実線は $g=2$ のときの適応閾値である。

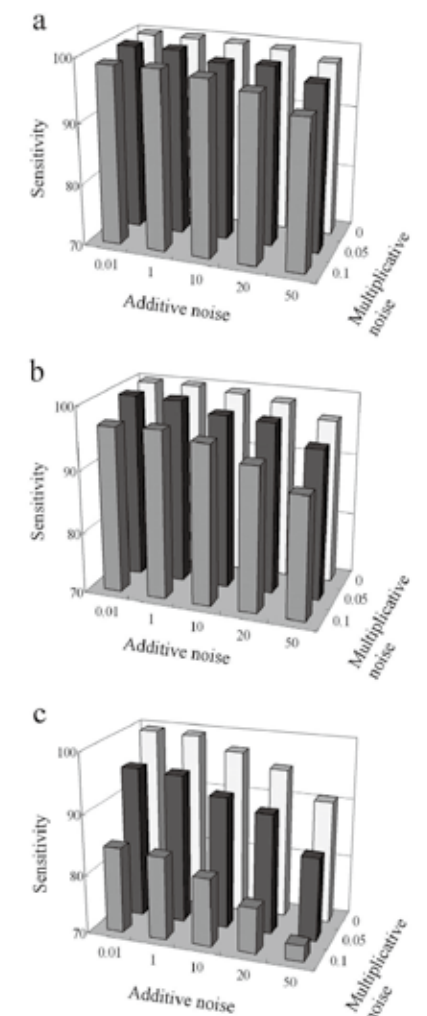


図2 ノイズ分散と感度の関係。(a)  $g=1.2$ 、(b)  $g=2$ 、(c)  $g=5$ の結果。



## 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、提案した逆問題解法アルゴリズムによるダイポール位置の推定精度を検討した。特に、ノイズと心臓内でのダイポール位置の影響について調べ、推定誤差が数～20 mmであることを示した。また、カテーテルの誘導精度についてもシミュレーションによって検討し、5 mm 程度の誤差で焼灼部位に誘導できることを示した。

本年度は、逆問題を解くときに用いる電極位置が正確に得られない状況について検討した。電極は心臓付近に集中的に配置するもの（図3）とし、心臓内のダイポールによる体表面電位を計算する。標準偏差 10 mm の電極位置のずれを導入し、逆問題を解いてダイポール位置を推定した。その結果、ダイポール位置の推定誤差は、位置ずれがない場合とほぼ変わらないことが示された。しかし、位置ずれの標準偏差を 30 mm、50 mm と大きくすると、推定誤差の平均値、標準偏差ともに大きくなった。また、位置ずれの標準偏差が 10 mm の場合に、カテーテルを治療部位に誘導するシミュレーションを行ったところ、位置ずれがない場合と、ほぼ同等の誘導精度が得られた。この結果は、本誘導法では逆問題を解くときに用いるモデルが実際と異なっている、その影響を低減できることを示している。

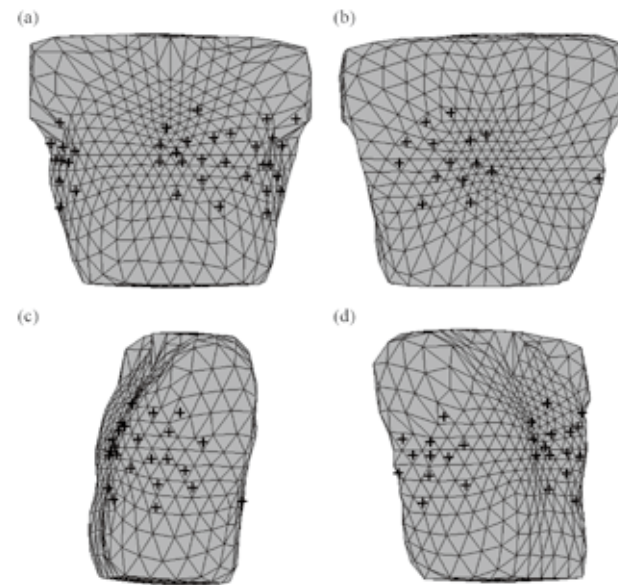


図3 体表面電位の計算に用いた電極の配置  
(a) 正面、(b) 背面、(c) 左側面、(d) 右側面

## 人事異動

転出:増田正 (福島大学)、大橋久美子 (Brigham Women's Hospital)

## 業績目録

### 原著論文

1. Tsutsumi T, Murakami M, Kawaishi J, Chida W, Fukuoka Y, Watanabe K. Postural stability during visual stimulation and the contribution from the vestibular apparatus. *Acta Oto-Laryngologica*, 130:464-471, 2010
2. Ohashi K, Ohno-Machado L, Tanaka H. Smart medical environment at the point of care: auto-tracking clinical interventions at the bed side using RFID technology. *Comput Biol Med*, 40:545-554, 2010
3. Ohashi K, Kurihara Y, Watanabe K, Ohno-Machado L, Tanaka H. Feasibility evaluation of smart stretcher to improve patient safety during transfers. *Methods Inf Med*, 49, 2010

### 総説

1. 田中博, 福岡豊. 次世代オミックス医学への展開、計測と制御, 49:537-542, 2010
2. 高井貴子, 福岡豊, 田中博. 臨床データの公的利用とトランスレーショナル研究. 計測と制御, 49:553-557, 2010

### 国際会議

1. Suzuki S, Takai-Igarashi T, Fukuoka Y, Tanaka H, Fusaro V, Pivovarov R, Tonellato PJ. Clinical gene network analysis on inflammatory bowel disease. *International Omics Symposium*, Yokoyama, Feb. 2010
2. Fukuoka Y, Inaoka H, Noshiro M. Adaptive Threshold for detecting differentially expressed genes in microarray data —a simulation study to investigate its performance. *32nd International IEEE EMBS Conference*, Buenos Aires, Sep. 2010
3. Kobayashi K, Tanaka M, Inaoka H, Kokubo K, Nebuya S, Fukuoka Y, Kobayashi H, Noshiro M. Temporal changes in gene expressions and cytokine productions caused by stretching of normal human pulmonary artery endothelial cells. *European Respiratory Society Annual Congress*, 281, Sep. 2010
4. Inaoka H, Fukuoka Y, Noshiro M. Genome-wide DNA methylation analysis in tumor and normal tissues from lung squamous cell carcinoma and serous cystadenocarcinoma. *IEEE International Conference on Bioinformatics & Biomedicine*, Hong Kong, Dec 2010
5. Kobayashi K, Tanaka M, Inaoka H, Kokubo K, Nebuya S, Fukuoka Y, Kobayashi H, Noshiro M. Effects of cyclic stretch on early response gene expressions in normal human pulmonary artery endothelial cells in vitro. *IEEE International Conference on Bioinformatics & Biomedicine*, Hong Kong, Dec 2010

### 学会発表

#### 招待講演

1. 福岡豊. 生命情報の統合的解析-MEと生命情報の架け橋を目指して-. 第25回生体・生理工学シンポジウム、岡山、2010年9月

#### 一般講演

1. 小林こず恵, 田中真澄, 福岡秀敏, 根武谷吾、

福岡豊, 小林弘祐, 野城真理. Microarray analysis of mRNA expressions related to IL-6 in stretched normal human pulmonary artery endothelial cells. 第49回生体医工学学会大会、2010年6月、大阪  
2. 福岡豊, 岩村泰輔, 根本翔太, 宮口健, 飯村諭, 内山孝憲, 福岡秀敏, Mahmut Y, 水島洋, 田中真二, 有井滋樹, 野城真理, 田中博, Kohane IS. 肝細胞がんにおける microRNA 発現量と近傍遺伝子発現量の相関解析. *BMB2010*, 神戸、2010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)

### 競争的研究費

1. 福岡豊: オミックス解析によるマイクロRNAのがんにおける役割の解明、文部科学省科学研究費・基盤研究(C) (一般)、研究代表者

# 疾患生命科学研究所 オミックス医療情報学講座

## 研究内容

### 1. 概 略

近年、ゲノム・トランスクリプトーム・プロテオーム・メタボローム・エピゲノムなどのオミックス情報の解析が可能になり、これらと臨床医療情報とを統合して解析を行うことで疾患のシステム解析を通して新しい視点での研究、つまりオミックス医療が注目されてきている。次世代シークエンサーをはじめとして、様々なオミックス解析機器がさらに開発されるなかで、これらの情報をいかに統合し、情報学的な視点から解析を行っていくかを検討するシステムバイオロジー的見地からのオミックス医療情報学とよばれる医学研究が重要になってきている。

東京医科歯科大学情報医科学センターで平成17年度から文部科学省科学技術振興調整費によって数十名からなるプロジェクトチームを構築し、医学部附属病院、歯学部附属病院との連携によって「網羅的疾患分子病態データベースの構築」を行ってきた。その3年間の成果として、500症例を越す肝臓癌、大腸癌、口腔癌の検体を収集するとともにオミックス情報と臨床情報を網羅的に集めたデータベース化を行った。また、平成20年度からは統合疾患オミックスデータベース (integrated Clinical Omics Database:iCOD <http://omics.tmd.ac.jp/>) を公開している。

このプロジェクトの成果を活用し、さらにオミックス医療情報を用いた新しい医療を推進するために、平成21年10月1日、疾患生命科学研究所内にオミックス医療情報学講座が寄付講座として設立された。

我々は臨床の研究分野との協力によりデータベースのさらなるデータ収集をおこないつつ、生命情報学分野との協力によりデータの解析から新規疾患関連遺伝子や関連タンパク質の探索を行い、その分子生物学的な解析を行っている。

また、臨床における活用のためには、臨床における遺伝子解析のシステム化、および高感度で簡便な診断機器の開発が必須となってくる。本寄附講座では臨床応用可能な診断機器の開発研究もマイクロブラッドサイエンス社との共同研究で行っている。

一方、IT医療や医療情報学の研究に関しても行って

おり、近年活発になって来ている携帯情報端末を用いた医療支援や地域医療支援などに関する研究も活発に行っている。

### 2. 研究内容

#### 2. 1. 疾患関連遺伝子の探索

肝細胞癌、大腸癌、口腔癌を中心に臨床検体と臨床情報の収集を行っており、すでに約1000症例が集積され、データベース化されている。

肝細胞癌についてはプロジェクト開始当初から各種の臨床情報に関連した発現変化をみせる遺伝子を発見してきている。これまでの Aurora Kinase B やそのスプライシングバリエーションの異常発現に加え、本年度はMAGE 関連遺伝子の発現変化に関する発表も行った。また、これらの発現変化についてはゲノム情報の変化やメチル化などのエピゲノム情報の変化についての解析も加え、疾患における意義や機能に関する考察も行っている。

大腸癌に関してはトランスクリプトーム (発現解析) による解析だけで臨床情報と関連する遺伝子を探すのが困難であったが、複数のオミックス情報を組み合わせることで関連する遺伝子の絞り込みを行うことに成功し、発表している。また大腸癌の肝転移症例に関してはコピー数変異を指標とした追跡および転移に関連した遺伝子変化の探索を行って発表している。

口腔癌についても、発現変化やコピー数変化と臨床病理情報の関連からの解析をおこなっており、いくつかの候補遺伝子に関してその生物学的な意味づけを解析している。

また、臨床現場で入手しやすい末梢血からの疾患解析についても積極的に行う予定である。

#### 2. 2. 小型分子検出機の開発

網羅的な情報解析を行うオミックス解析は費用も時間もかかるもので、臨床現場ですぐ役立つものではなく、多くの症例から関連する遺伝子を網羅的に探索する研究である。この成果を実際の医療に役立てるためには開業医を含めた臨床現場で迅速に解析が可能なシステムを開発することにある。我々は発電酵素を用いた電気的信号

解析による高感度分子検出技術を開発しており、これを用いることで早く、安価に、どこでも分子解析がおこなえるよう、研究を進めている。現在は臨床検査用の開発とともに、感染検査や食品汚染検査などに使えるシステムの開発も行っている。

### 2. 3. 医療を支援する医療 IT に関する研究

情報機器や情報システムの進歩はめざましいものがあるが、医療においてそれを適用するには様々な課題がある。遠隔医療やインターネット医療など、これまでの医療情報学に関するさまざまな取り組みの経験を活かし

業績目録		
<b>原著論文 (2010-2011)</b>		
Tsukamoto S, Ishikawa T, Iida S, Ishiguro M, Mogushi K, <a href="#">Mizushima H</a> , Uetake H, Tanaka H, Sugihara K. Clinical Significance of Osteoprotegerin Expression in Human Colorectal Cancer. Clin Cancer Res. 2011 Jan 26. PMID: 21270110.	築と同定。第99日本病理学会(2010.4.27-29 東京) 日本病理学会会誌第99巻第一 (2010) P2- 1 -76.	年11月20日 Pubmed 日本語版開発の基礎的検討
Muto T, Taniguchi H, Kushima R, Tsuda H, Yonemori H, Chen C, Sugihara Y, Sakamoto K, Kobori-Fujie Y, Perlmer H, Nakamura Y, Tomonaga T, <a href="#">Mizushima H</a> , Fujita S, Kondo T. Global expression study in colorectal cancer on proteins with alkaline isoelectric point by two-dimensional difference gel electrophoresis. J Proteomics. 2011 Mar 5. PubMed PMID: 21385629.	<a href="#">Mahmut Yasen</a> , <a href="#">水島 洋</a> らメタボリックシンドローム背景肝発癌過程における dbpA 遺伝子の発現、メチル化異常の検討。第99日本病理学会(2010.4.27-29 東京) 日本病理学会会誌第99巻第一 (2010) P2- 1 -74.	<a href="#">YasenMahmut</a> , <a href="#">水島洋</a> ら 第33回日本分子生物学会年会、第83回日本生化学会大会合同大会 2010年12月9日 Elucidation of Liver metastasis mechanism of colorectal cancer by genetic alternation. 3P-0970 <a href="#">水島 洋</a> ら NRF2 の恒常的な活性化は肺がん細胞の増殖亢進に働く、第33回日本分子生物学会年会、第83回日本生化学会大会合同大会 (神戸) 2010年12月9日
iCOD : an integrated clinical omics database based on the systems-pathology view of disease. Kazuro Shimokawa, Kaoru Mogushi, Satoshi Shoji, Atsuko Hiraishi, <a href="#">Hiroshi Mizushima (Corresponding Author)</a> and Hiroshi Tanaka. BMC Genomics 2010 Vol.11(Sup4) S19	<a href="#">Mahmut Yasen</a> , <a href="#">水島 洋</a> ら非ウイルス背景肝癌における dbpA 遺伝子のゲノム、エピゲノム異常とその意義。第46回日本肝臓学会総会 (2010.5.27-28 山形) 肝臓 51 巻 suppl.(1) (2010) P-129.	<a href="#">Mahmut Yasen</a> , <a href="#">水島 洋</a> ら肝細胞癌におけるMAGE 遺伝子の発現解析。第33回日本分子生物学会年会、第83回日本生化学会大会合同大会 (神戸) 2010年12月10日 4P-0963.
Up-regulation of PSF1 promotes the growth of breast cancer cells. Nakahara I, Miyamoto M, Shibata T, Akashi-Tanaka S, Kinoshita T, Mogushi K, Oda K, Ueno M, Takakura N, <a href="#">Mizushima H</a> , Tanaka H, Ohta T. Genes Cells. 15(10):1015-24, 2010 Sep 5.	<a href="#">Mahmut Yasen</a> , <a href="#">水島 洋</a> ら遺伝子発現解析に基づいて肝癌脈管浸潤関連遺伝子の探索と同定。第46回日本肝臓学会総会 (2010.5.27-28 山形) 肝臓 51 巻 suppl. (1) (2010) P-131.	<a href="#">Mahmut Yasen</a> , <a href="#">水島 洋</a> ら肝細胞癌における dbpA 遺伝子の発現異常 (Expession of dbpA mRNA of NBNC related hepatocellular carcinoma)。第46回日本肝臓研究会 (2010.7.8-9 大阪) O7-3.
Clinical omics analysis of colorectal cancer incorporating copy number aberrations and gene expression data. Yoshida T, Kobayashi T, Itoda M, Muto T, Miyaguchi K, Mogushi K, Shoji S, Shimokawa K, Iida S, Uetake H, Ishikawa T, Sugihara K, <a href="#">Mizushima H (Corresponding Author)</a> , Tanaka H. Cancer Inform. 2010 Jul 29;9:147-61.	<a href="#">Ken Miyaguchi</a> , <a href="#">Mahmut Yasen</a> , <a href="#">Hiroshi Mizushima</a> et al. 第69回日本癌学会学術総会(大阪) 2010年9月22日 Genomic alteration related with carcinogenesis and liver metastasis of colorectal carcinoma P-0104	<a href="#">Mahmut Yasen</a> , <a href="#">水島 洋</a> ら肝臓において高血清 AFP 値と関連する遺伝子の発現解析。第101回日本外科学会 (2010.4.8-10 名古屋) 日本外科学会雑誌 (0301-4894) 111 巻臨増 2 Page676 (2010.03)
MUC12 mRNA expression is an independent marker of prognosis in stage II and stage III colorectal cancer. Matsuyama T, Ishikawa T, Mogushi K, Yoshida T, Iida S, Uetake H, <a href="#">Mizushima H</a> , Tanaka H, Sugihara K. Int J Cancer. 2010 Nov 15;127(10):2292-9.	<a href="#">Hiroshi Mizushima</a> , et al. 第69回日本癌学会学術総会 2010年9月24日 Identification of novel biomarker in colorectal cancer through integrated copy number and gene expression analysis	<a href="#">Mahmut Yasen</a> , <a href="#">水島 洋</a> ら肝細胞癌の分化度から見た網羅的遺伝子発現パターンと肝星細胞との関連性、第24回肝臓洞壁細胞研究会学術集会 (福島市)
<b>学会発表 (2010年のみ)</b>	<a href="#">Mahmut Yasen</a> , <a href="#">水島 洋</a> ら。マイクロアレイ解析により肝癌再発、悪性度診断分子マーカーの構	<a href="#">K Terashima</a> , et al. Follicular dendritic cells express stemness- and neuroepithelial cell- molecules, 2010, 14th International Conference of Immunology (Kobe, Japan)
	<a href="#">Mahmut Yasen</a> , <a href="#">水島 洋</a> ら。マイクロアレイ解析により肝癌再発、悪性度診断分子マーカーの構	<a href="#">Yasen Mahmut</a> , et al. Comprehensive analyses of gene expression pattern based on tumor differentiation in hepatocellular carcinoma. A relationship with hepatic stellate cells, 2010, 49th Annual Meeting of American Society of Cellular Biology (Philadelphia, USA) その他6件
	<a href="#">Mahmut Yasen</a> , <a href="#">水島 洋</a> ら。マイクロアレイ解析により肝癌再発、悪性度診断分子マーカーの構	<b>学会の主催</b> 平成22年10月23日 モバイルヘルスシンポジウム2010 場所：東京医科歯科大学
	<a href="#">Mahmut Yasen</a> , <a href="#">水島 洋</a> ら 第30回医療情報学連合大会 2010	



# 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 亀井康富  
 特任講師(GCOE) 澤田直樹  
 助教 菅波孝祥  
 特任助教 西條美佐  
 袁勲梅  
 高橋真由美  
 白川伊吹  
 田中都  
 伊藤美智子  
 蜂屋瑠見  
 技術補佐員 濱口美穂  
 金井紗綾香  
 事務補佐員 東郷和  
 大学院生 杉田聡  
 市岡誠之  
 江原達弥  
 滝沢文彦  
 津田直人  
 南部宏英  
 岩崎順博  
 青山千賀子  
 中川信貴  
 服部真季

## 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 Paksinee Kamolratanakul  
 佐久間朋美  
 宮嶋大輔  
 鈴木充文  
 Aryal Smriti  
 渡辺千穂  
 川崎真希理

事務補佐員 野末陽子  
 GCOE事務補佐員 押江優子  
 鈴木沙織  
 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  
 研究支援員 伏見真好

## 難治疾患研究所分子神経科学分野

### 疾患生命科学研究所分子神経科学研究室

教授 田中光一  
 助教 小峯起  
 相田知海  
 相馬美歩  
 前田秀一  
 中森智啓  
 神辺太樹  
 鈴木啓子  
 廣田有里  
 柳澤美智子  
 白寧  
 杉山勇人  
 平岡優一  
 加藤さや佳  
 吉田純一  
 柳澤佐保子  
 崔万鵬  
 技術補佐員 川辺光男  
 秘書 楠木亜希子  
 砂堀愛美

## 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  
 田嶋佐和子  
 李敏  
 松原清二  
 平野景子  
 技術補佐員 小崎恵理  
 林万紀子  
 事務補佐員 山口邦子

## 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 Ahmed RAMADAN  
 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  
 山口雄平  
 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  
 専攻生 Yin W U

## 難治疾患研究所生体防御学分野

教授 梶木俊聡  
 講師 小内伸幸  
 助教 手塚裕之  
 特任講師 中西佑輔  
 特任助教 佐藤卓  
 四元聡志  
 浅野純平  
 大学院生 劉嘉嘉  
 特別研究学生 池田麻穂子  
 倉林和隆  
 技術補佐員 細井まゆ香  
 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 榎戸靖  
 特任講師 田川一彦  
 非常勤講師 曾根雅紀  
 助教 田村拓也  
 特任助教 伊藤日加瑠  
 小室晃彦  
 受託研究員 丸淵茂樹  
 技術補佐員 田島たよ子  
 飯沼千恵  
 溝井千春  
 秘書 菊地令子  
 磯部温子  
 大学院生 中村蓉子  
 Min Xu  
 Chan Li  
 SAINAWER MAIMAITI  
 白石理紗  
 雪由江  
 秦知香  
 今村朋美  
 黒巢佳祐  
 専攻生 Chaomaolige  
 Hong Zhang

## 難治疾患研究所病態細胞生物学分野

教授 清水重臣  
 助教 荒川聡子  
 吉田達士  
 特任助教 李麗淑  
 室橋道子  
 西田友哉  
 秘書 坂口三美  
 技術補佐員 吉野育代  
 中名生幾子  
 大学院生 山口啓史  
 菅沼恵  
 亀井優里  
 吉田志穂

## 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  
 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  
 野田英一郎  
 佐藤益弘  
 畠星治  
 田中正彦  
 宮村憲央  
 内田好海  
 大野真見  
 市原祐樹  
 大谷智実  
 尾崎友美  
 迫田実希  
 下村忠範  
 特別研究学生 長井陽子

**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  
 助教授 渡辺幸造  
 特任助教 岸祐介  
 松原直子  
 大学院生 TDChinthika P.Gunasekara  
 徐米多  
 翁東  
 須藤佳之  
 鷹野勇宜  
 橋本亜実  
 高嶋航  
 砂永翠  
 唐森  
 プロジェクトセメスター 杉原潤  
 卒業研究生 石倉圭人  
 技術補佐員 今井ノリ  
 垣内麻優  
 事務補佐員 高橋博子

**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  
 助教授 有村卓朗  
 特任助教 成瀬妙子  
 事務補佐員 佐々木悦子  
 技術補佐員 植田由希子  
 非常勤講師 大川真一郎

大学院生 猪子英俊  
 大谷仁志  
 石川泰輔  
 小西真紀子  
 安健博  
 大塚春奈  
 奥田裕紀子  
 齋藤祐介  
 金澤知徳  
 田中優  
 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  
 助教授 青戸隆博  
 松村寛行  
 技術補佐員 大西宏規  
 事務補佐員 渡邊郁  
 大学院生 上野真紀子  
 特別研究学生 Nguyen Thanh Binh  
 共同研究員 岡本奈都子  
 田口亮子

**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  
 助教授 井上純  
 特任助教 林深  
 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  
 松村聡  
 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  
 高橋綾子  
 森留美  
 福川順子  
 篠崎優子  
 NEDO技術補佐員  
 事務補佐員

**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  
 助教授 竹中克也  
 特任助教 平直江  
 技能補佐員 山口智子  
 大学院生 Hew Hoi Chin  
 高岡美帆  
 仁平啓史  
 Nadila Wali  
 真利久サディア  
 伊藤明泉  
 奥郁美  
 細川佳奈  
 加賀美裕也  
 郭甜甜  
 鈴木一穂

**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  
 助教授 池田仁子  
 実験助手 馬場裕子  
 非常勤講師 宮木幸一  
 大学院生 藤本耕一  
 松倉寛  
 チイ・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  
 増田萌  
 陳曦  
 張曉亮  
 趙晨希

ゾリビア・エビブラ  
**難治疾患研究所遺伝生化分野**  
 教授 北嶋繁孝  
 准教授 田中裕二郎  
 助教授 川内潤也  
 事務補佐員 高柳久仁子  
 大学院生 刘芹  
 正木久晴  
 佐々木かおり  
 本下愛子  
 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  
 特別研究学生 武谷憲二  
 卒業研究生 青木真志

**疾患生命科学研究部形質発現制御学研究室**

**難治疾患研究所形質発現分野**

准教授 黒柳秀人  
 特任助教 井手上社子  
 技術補佐員 サイマトウル・ホック  
 黒川博史  
 事務補佐員 生嶋倫子  
 大学院生 山本誠  
 大野源太  
 グエン バオ ゴック  
 都甲麻理奈  
 薄井知美  
 学部生 丸岡浩之

**難治疾患研究所エピジェネティクス分野**

教授 石野史敏  
 講師 幸田尚  
 助手 小野竜一  
 特任助手 遠藤大輔  
 成瀬美衣  
 岩船浩孝  
 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

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  
 助教授 荻島 創一  
 特任准教授 任鳳 蓉  
 高井 貴子  
 中谷 純  
 特任講師 下川 和郎  
 小田 夏奈江  
 特任助教 広井 嘉栄  
 井戸 敬介  
 長谷 武志  
 茂 櫛 薫  
 長谷川 直紀  
 庄 司 敏  
 森岡 勝樹  
 技術補佐員 宮口 健  
 井戸田 昌也  
 根本 翔太  
 大学院生 岡田 伊佐男  
 大西 貴幸  
 Emilio Campos  
 片山 有紀  
 田中 義智  
 高橋 俊哉  
 山口 浩信  
 金子 佳之  
 石渡 龍輔  
 高田 英明  
 遠藤 有人  
 永家 聖  
 高橋 定子  
 幡野 晶子  
 武藤 太和  
 田中 有希  
 松前 ひろみ  
 吉田 いづみ  
 金 惠 鈴  
 宮口 健  
 飯島 久美子  
 K y a w T u n  
 鈴木 聡  
 上野 英一  
 笠原 直子

浦島 直  
 菊地 正隆  
 太田 沙紀子  
 田中 泰羽  
 澤井 一  
 鈴木 麻美  
 飯田 一雄  
 岸本 太郎  
 江原 忠士  
 大戸 康紀  
 清水 千佳子  
 Afsaneh Eslami  
 糖屋 祥子  
 長谷川 浩章  
 Aw Wanping  
 水野 聖士  
 渡部 友香里  
 鈴木 華絵  
 田中 教生  
 勝田 江朗  
 山口 玲子  
 前田 萌季  
 小田 康太郎

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  
 大学院生 市川 紗弓  
 平澤 都  
 技術補助員 渡邊 健  
 片山 未来  
 事務補佐員 大塚 幸子  
 共同研究員 杉山 俊平

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

難治疾患研究所病態発現機構客員研究部門

客員教授 郷 通子

客員准教授 棚谷 綾

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  
 技術補佐員 安部 美奈子  
 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  
 関根 良太  
 中野 英一  
 藤原 敬士  
 宮島 友  
 白石 拓也  
 中津 重紀  
 高垣 亮平  
 小林 周作  
 神田 翠  
 宮城 夏子  
 飯濱 翔太郎  
 能城 静香  
 高口 明日香

研究委託生  
 セメスター学生  
 学外協力者

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  
 特任助教 隅田 有人  
 大学院生 飯森 理絵  
 白石 旭  
 学部生 岡田 健佑  
 菅野 貴美幸

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

疾患生命科学研究部オミックス医療情報学講座

時任教員 水島 洋  
 〃 助教 馬合木 特亜森

難治疾患研究所 MTT プログラム

MTTフェロー 岩井 佳子  
 中山 恒  
 片岡 直行  
 鈴木 辰吾  
 笹野 哲郎  
 松井 毅  
 小林 慎  
 小西 昭充  
 MTT技術補佐員 黒田 聖子  
 朴 永男  
 満友 陽子  
 小崎 恵理  
 越 智 梢  
 田山 さやか  
 平野 亜由美  
 辻村 恭子  
 事務補佐員 山田 りえ

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

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

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 奥野 友紀子

難治疾患研究所事務部

事務長 川柳 成巳  
 専門職員 増田 弘之  
 中川 久子  
 総務掛長 鈴木 誠  
 総務掛員 牛山 史子

事務補佐員	林 健 策
事務補佐員	高 橋 郁
技術職員	西 山 裕 子
技術専門職員	望 月 静 雄
	馬 場 裕 子

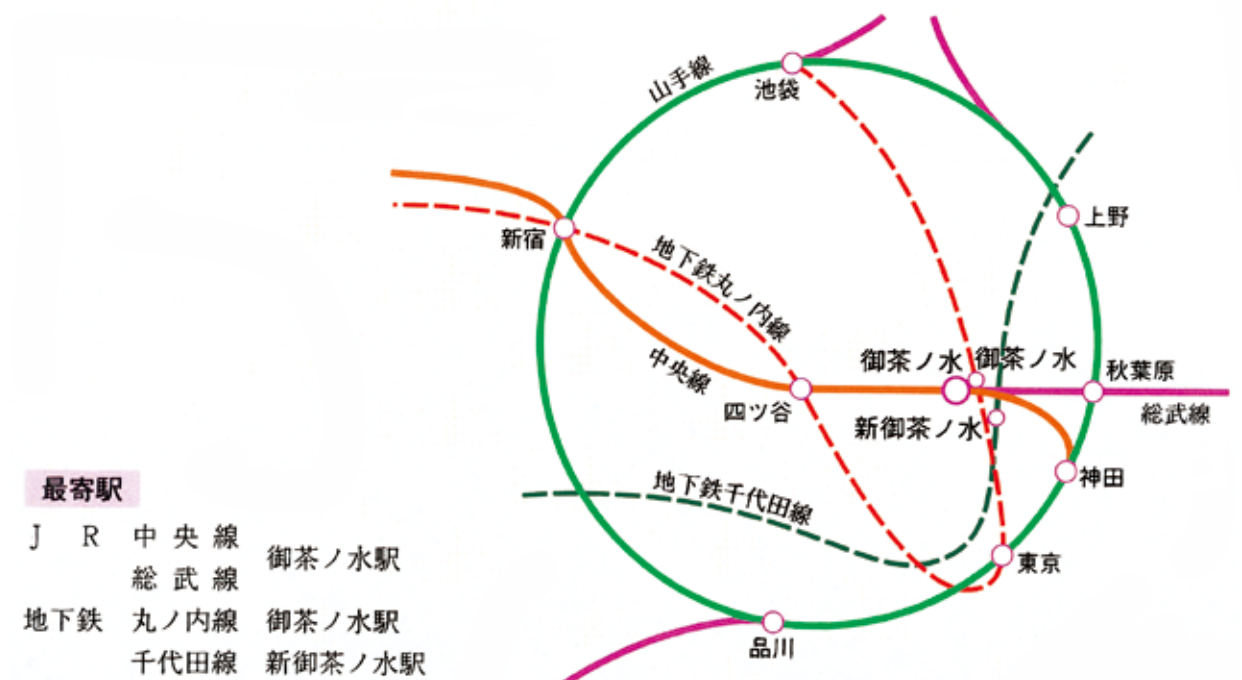
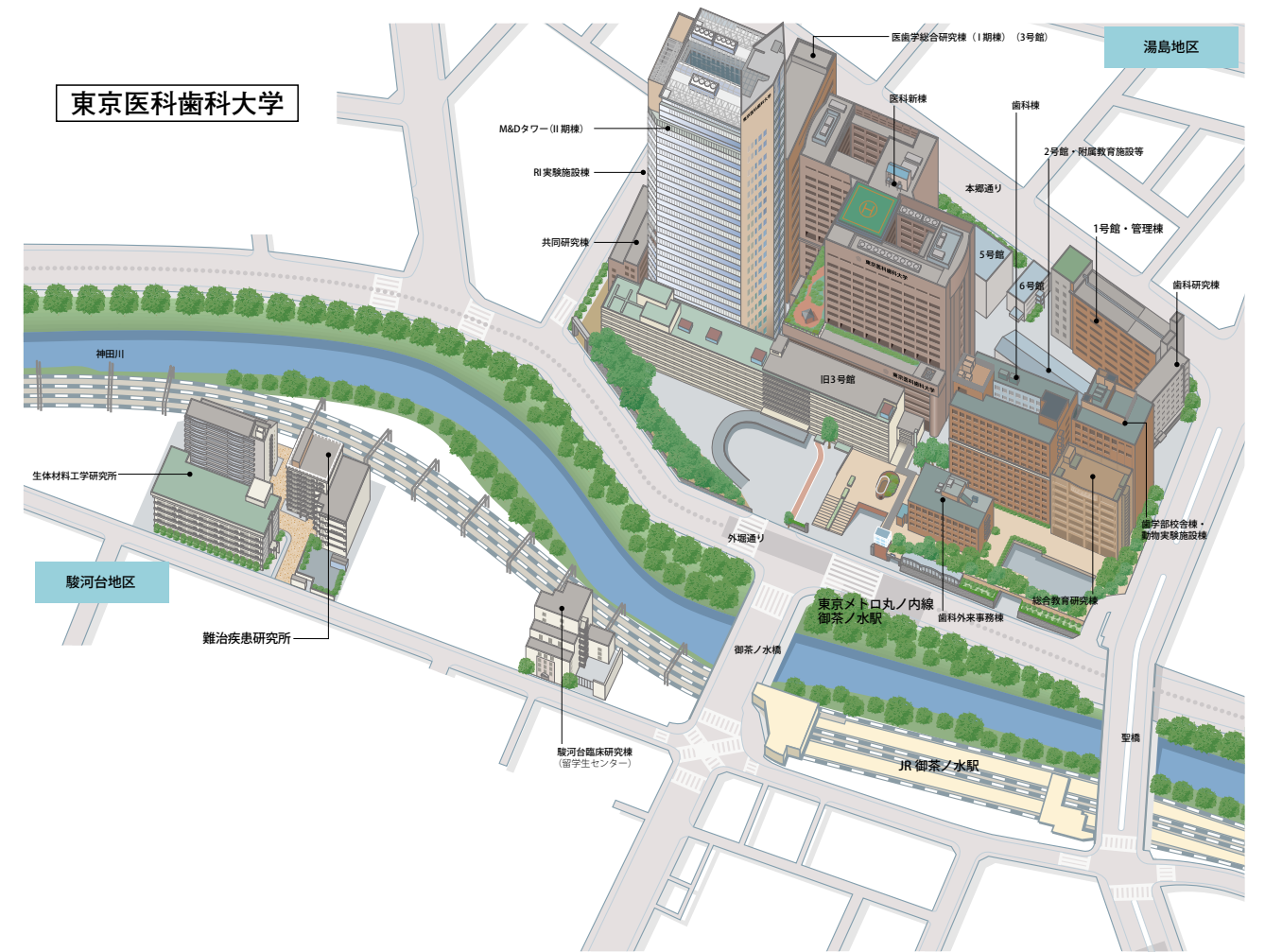


**難治疾患研究所・  
大学院疾患生命科学研究部・  
大学院生命情報科学教育部  
運営諮問委員会委員**

- 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 国立遺伝学研究所生命情報・DDBJ 研究センター教授  
 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教授  
 村松 正實 埼玉医科大学ゲノム医学研究センター名誉所長

(50 音順)

**案内図**



年報 2011

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

〒 101-0062

東京医科歯科大学難治疾患研究所

東京都千代田区神田駿河台 2 丁目 3 番 10 号

03(5280)8050 (代表)

印刷所 株式会社 廣濟堂