

Annual Report 2010

ANNUAL REPORT 2010

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/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

2010

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

まえがき

本年報は、国立大学法人東京医科歯科大学難治疾患研究所および大学院生命情報科学教育部・疾患生命科学研究部の2009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 年報編集委員会

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. 学位取得者	14
6. 難研セミナー	15

難治疾患研究所

先端分子医学研究部門

- 分子代謝学分野 18 ~ 21
- 分子薬理学分野 22 ~ 25
- 分子細胞生物学分野
26 ~ 29
- 分子神経科学分野 30 ~ 33
- 生体防御学分野 34 ~ 37
- 生体情報薬理学分野
38 ~ 41
- 幹細胞制御分野 42 ~ 45

・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 48 ~ 51
- 病態生化学分野 52 ~ 55
- 病態細胞生物学分野
56 ~ 58
- 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 ~ 125

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 ~ 103
- 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

- 機能構築客員研究部門
114 ~ 115
- 病態発現機構客員研究部門
116 ~ 117
- 大学院教育研究支援
実験施設 118 ~ 119

・ケミカルバイオロジー
スクリーニングセンター
126 ~ 127

大学院疾患生命科学研究部

- 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 130 ~ 133
- 形質発現制御学研究室
96 ~ 99

- 分子神経科学研究室
30 ~ 33
- 免疫学研究室 68 ~ 71
- 薬化学研究室 134 ~ 137

- 生命有機化学研究室
138 ~ 141
- 生命システム
モデリング研究室
142 ~ 145

職員学生名簿	146 ~ 152
諮問委員名簿	154
案内図	155

湯島地区

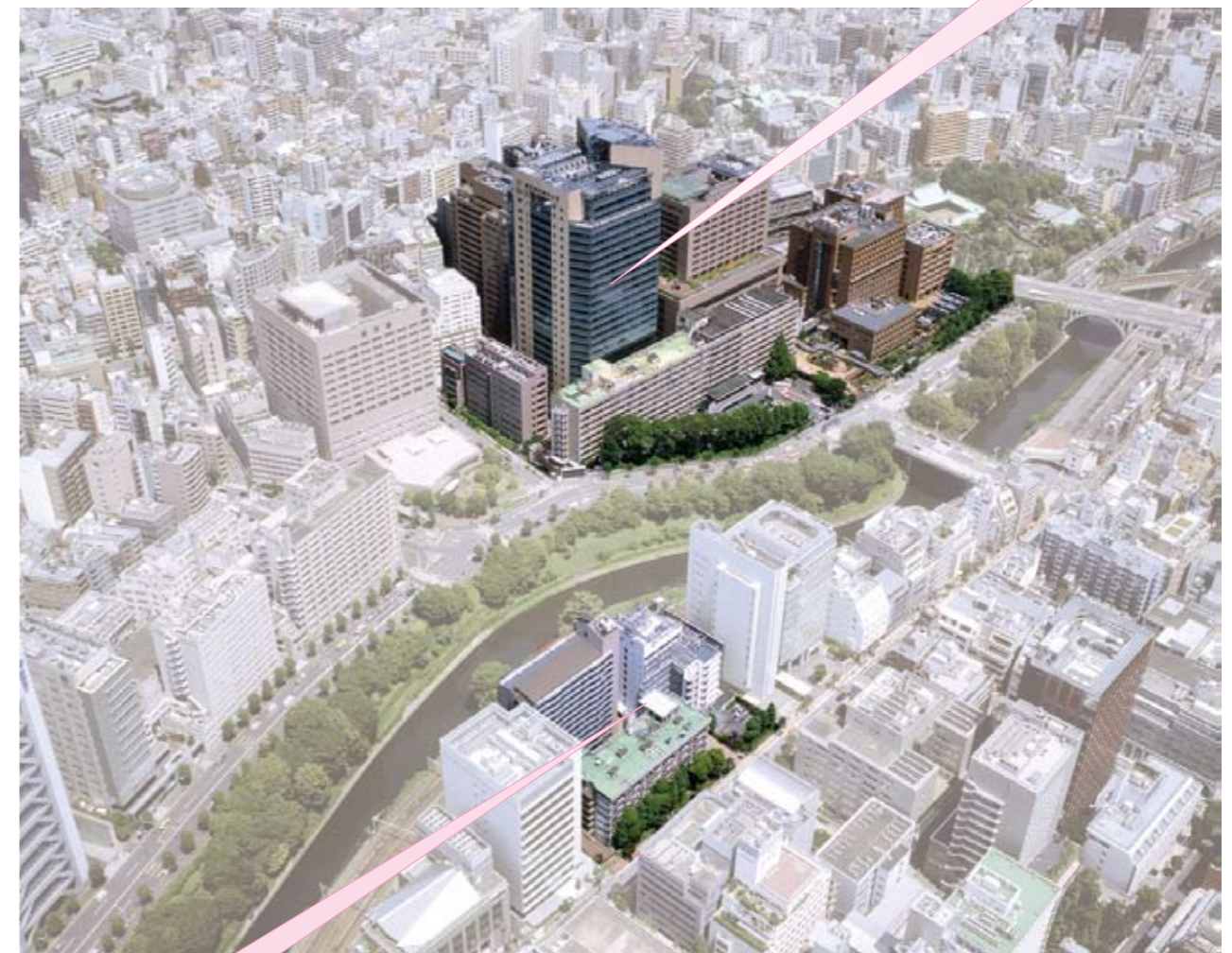
〒113-8510
東京都文京区湯島1-5-45
電話 (03) 3813-6111

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、形質発現分野、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研究部

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、形質発現制御学研究室、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

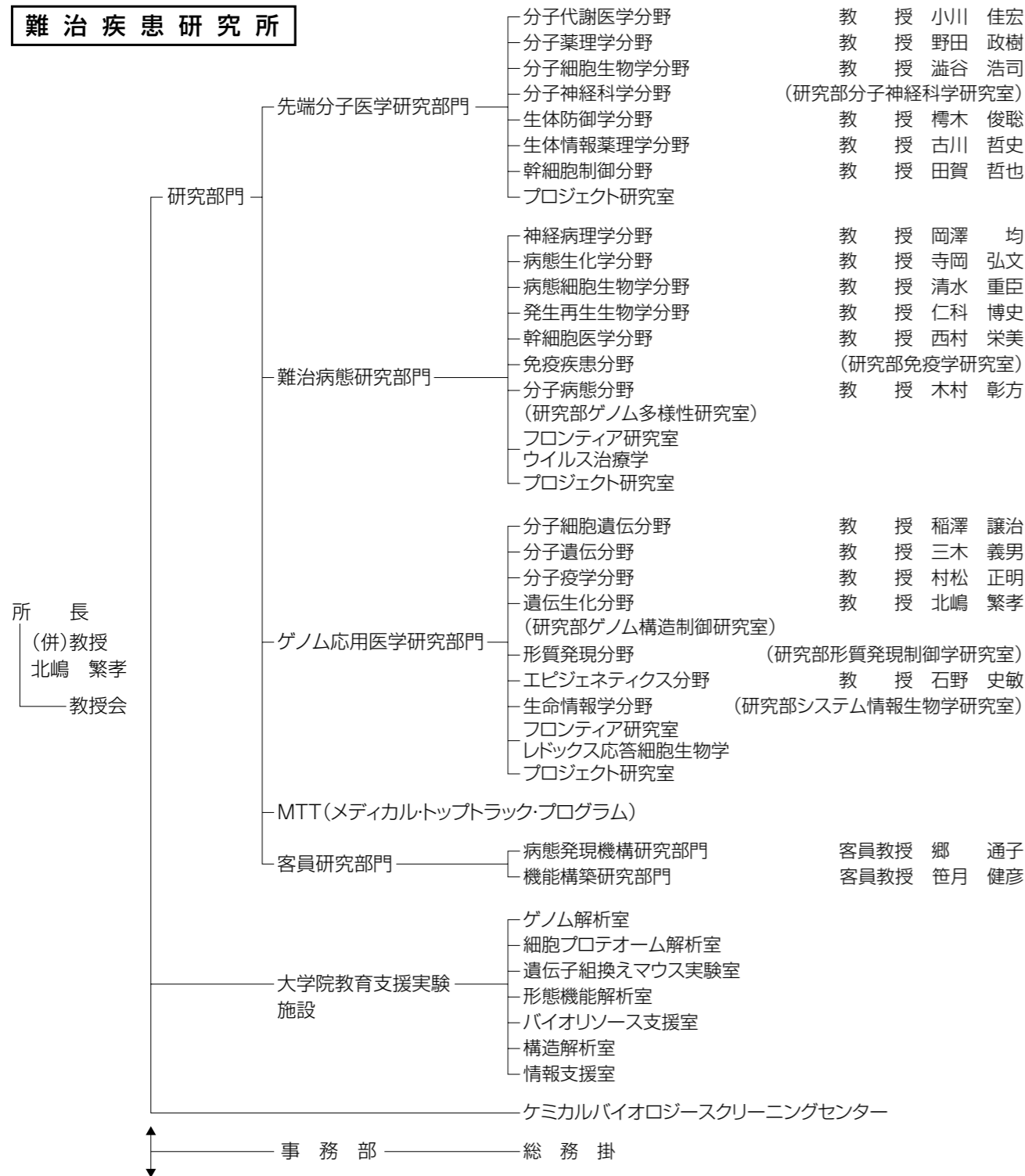
難治疾患研究所

病態生化学分野、分子疫学分野、幹細胞医学分野、生体防御学分野、事務部

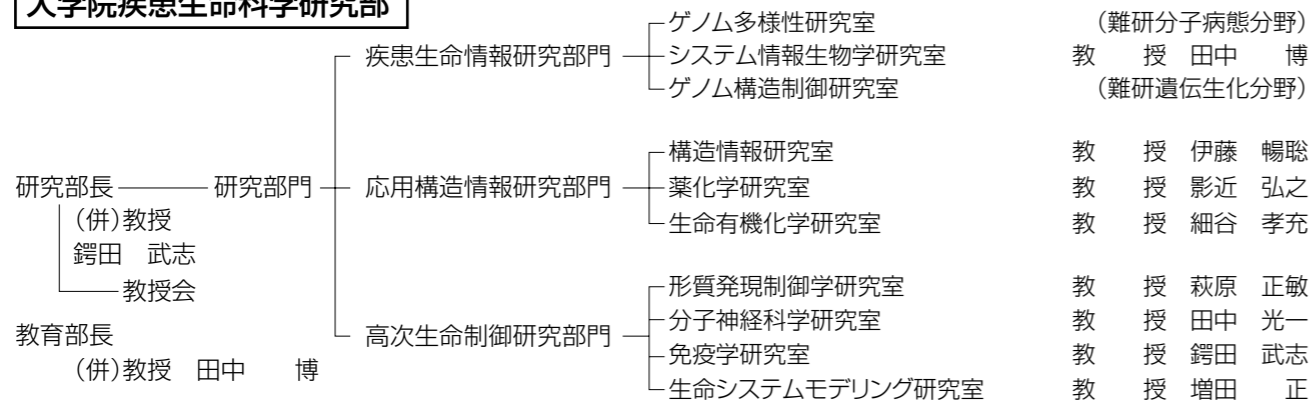
大学院疾患生命科学研究部

薬化学研究室、生命有機化学研究室

難治疾患研究所



大学院疾患生命科学研究所



()内は研究グループ形成先

職員及び学生数

●学生数

平成 22 年 3 月 1 日現在

	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	分子代謝医学	5		
		分子薬理学	3		
		分子細胞生物学		3	
		分子神経科学 (高次神経科学：分子神経科学)		9	
		生体防御学			
		生体情報薬理学	4	1	
		幹細胞制御	1		1
	難治病態研究部門	神経病理学	17		2
		病態生化学	3		
		病態細胞生物学	3	4	
		発生再生生物学	3	7	
		幹細胞医学			
		免疫疾患 (高次生体制御学：免疫学)		9	
		分子病態 (疾患ゲノム：ゲノム多様性)	3	5	
	ゲノム応用医学研究部門	分子細胞遺伝	10	3	1
		分子遺伝	6	8	
		分子疫学	5	1	2
		遺伝生化 (疾患ゲノム：ゲノム構造制御)	5		
		形質発現 (細胞機能制御学：形質発現制御学)		7	1
		エピジェネティクス	1	9	
生命情報学 (システム情報生物学)		34	17	5	
命大学院疾患生命科学研究所	分子構造情報学：構造情報		1		
	ケミカルバイオロジー：薬化学		5		
	ケミカルバイオロジー：生命有機化学				
	生命システムモデリング				
	計	103	89	12	

※ ()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 22 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	17	19	1	23	60	4	2	3	9	69

2. 大学院疾患生命科学研究所

平成 22 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					14
現員	8	5		1	14					14

ハイライト

難治疾患研究所が全国共同利用・共同研究拠点「難治疾患共同研究拠点」に認定される。

平成 21 年 6 月 25 日、東京医科歯科大学難治疾患研究所は、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」に認定されました。本拠点は、1 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し、2「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の推進、3国内外の研究者への上記のリソース群へのアクセスや先端解析支援施設の利用提供、4 難治疾患研究に携わる若手研究者の育成・支援システムの整備、5 シンポジウム等の開催による難治疾患研究の啓発と最先端情報の発信などの業務に努めます。

詳しくは http://www.mext.go.jp/b_menu/houdou/21/06/1279611.htm を御覧ください。

6件の研究成果がプレスリリース！

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

1. Arimura T, Bos MJ, Sato A, Kubo T, Okamoto H, Nishi H, Harada H, Koga Y, Moulik M, Doi YL, Towbin JA, Ackerman MJ, Kimura A. Cardiac ankyrin repeat protein gene (ANKRD1) mutations in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2009; 54(4): 334-342.
2. Moulik M, Vatta M, Witt SH, Alora AM, Murphy RT, McKenna WJ, Boriek A, Oka K, Labeit S, Bowles NE, Arimura T, Kimura A, Towbin JA. ANKRD -the gene encoding cardiac ankyrin repeat protein- is a novel dilated cardiomyopathy gene. *J Am Coll Cardiol.* 2009; 54(4):325-333.

肥大型心筋症は高血圧などの明らかな誘因がなく心室筋の肥大を呈し、突然死、胸痛、心不全の原因となる疾患です。肥大型心筋症の患者さんの多くに家族歴があることから、その病因は遺伝子変異であると考えられていました。これまでの原因遺伝子の探索から、心臓の筋肉

収縮を司る構造タンパク、すなわちサルコメアを構成する要素（ミオシン重鎖など）の遺伝子異常、もしくはZ帯を構成する要素（テレットニンなど）の遺伝子異常が原因となることが判明しています。つまり、肥大型心筋症の原因遺伝子は約 20 種発見されていますが、そのいずれにも異常が生じて肥大型心筋症になります。しかしながら、このような種々の原因遺伝子を調べても異常が発見されるのは約半数に過ぎず、これら以外にも原因遺伝子があると考えられていました。

我々は、国内外の研究者との共同研究によって、これまでに知られている原因遺伝子に変異が見つからない患者さんの集団（日本 144 名、米国 240 名）を対象として心筋細胞での遺伝子発現の制御に関わる CARP 遺伝子の変異を探索しました。その結果、3名の患者さんに3種の変異（P52A、T123M、I280V）を見出しました。CARP はタイチンの N2-A 領域に結合することが知られているため、N2-A 領域についても変異を検索したところ、2名の患者さんに2種の変異を発見しました。これらの変異はいずれも、CARP とタイチン N2-A との結合性を増強するものでした。CARP は胎児期の未熟な心筋細胞や、心不全時などの伸展された心筋細胞で発現が亢進する転写関連因子ですので、心筋細胞の成熟分化や心不全状態の心筋細胞の機能に重要な役割を果たしていると考えられます。そこで、正常または変異 CARP をラットの心筋細胞に遺伝子導入してその分布を検討したところ、成熟心筋細胞では正常 CARP は核から細胞質、ことに Z 帯や I 帯に移動するのに対して、変異 CARP は核膜周辺ないし核内に分布しました（図）。これらのことから、細胞質と核を行き来するタンパク（シャトリングタンパク）である CARP の細胞内局在異常が肥大型心筋症の原因となると結論しました。肥大型心筋症はこれまでサルコメアや Z 帯などの心筋細胞の構造タンパク異常によるとされてきましたが、シャトリングタンパク異常でも同様の病態が生じることを示した発見であり、CARP タンパクの結合性に着目した新たな治療法の開発にも繋がると考えられます。

これとは別に、拡張型心筋症患者さん（日本 48 名、米国 160 名）の解析から、肥大型心筋症患者に見出されたものとはまったく異なる CARP 変異を3種類発見し

ました。拡張型心筋症は原因不明の心拡大と重症心不全を来し、その 20 - 35% は遺伝性であると考えられますが、病因変異が見出される患者さんは家族性拡張型心筋症に限っても約 20% に過ぎませんので、肥大型心筋症よりもさらに原因遺伝子が多彩であると言えます。発見した拡張型心筋症に関連する CARP 変異は、肥大型心筋症の場合とは異なり、いずれもが細胞内での分布異常は示しませんでした。タリンなどの細胞質タンパクとの結合性が減弱していました。また、変異 CARP は心筋細胞を伸展した際の遺伝子発現パターンを変化させました。これらのことから、CARP 変異は、それぞれ異なった機能異常によって、肥大型心筋症と拡張型心筋症という全く異なる2つの原因不明の心筋疾患の病因となることが明らかとなりました。

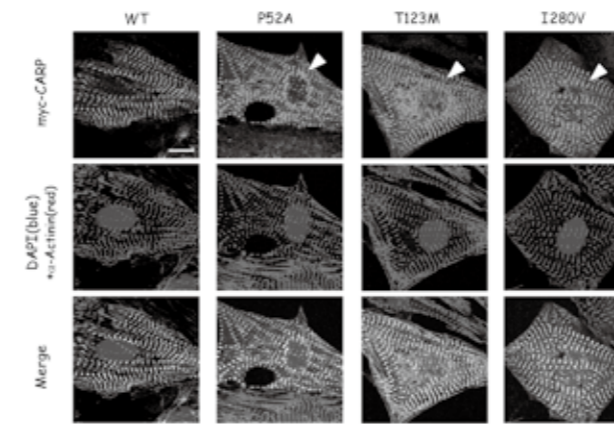


図 肥大型心筋症関連 CARP 変異の局在異常

ラットの成熟心筋細胞に正常もしくは変異 CARP 遺伝子を導入した実験結果。正常 CARP は核内には存在しないが、肥大型心筋症関連変異を導入した CARP は核膜周辺ないし核内に局在している。上段：CARP（緑）の分布、中段：アクチニン（赤）および核（青）の分布、下段：上段と中段を重ねたイメージ像（分子病態分野 木村彰方）

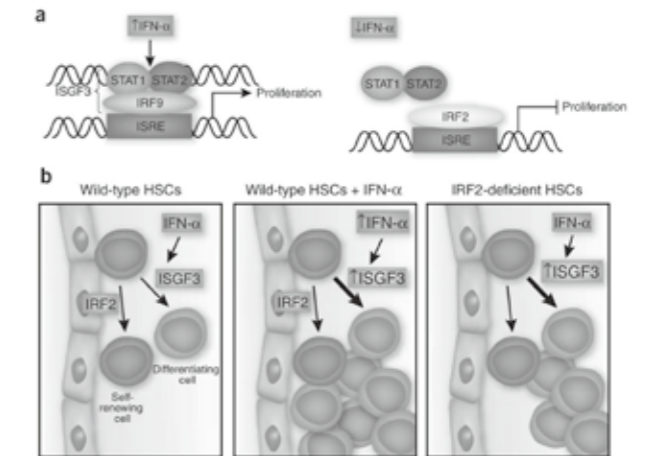
生体防御学分野の研究成果が Nature Medicine 誌に掲載される

Sato T et al. Interferon regulatory factor-2 protects quiescent hematopoietic stem cells from type I interferon-dependent exhaustion. *Nat Med* 15, 696-700 (2009)

造血幹細胞は、赤血球や白血球を含むすべての血液細胞を作り出す源の細胞であり、骨髓ニッチと呼ばれる場所で、ゆるやかに自己増殖を繰り返しながら存在しています。一方、慢性骨髄性白血病では、造血幹細胞と性質のよく似た“がん幹細胞”が白血病細胞を作り出す源の細胞であることが知られています。従って、人為的に造血幹細胞の運命をコントロールすることが可能になれ

ば、慢性骨髄性白血病治療さらには副作用の少ない骨髄移植法の開発に結びつく可能性が高く、非常に重要な研究課題でした。

I 型インターフェロンは、ウイルス感染の際、免疫系を活性化してウイルスを宿主から排除すると同時に宿主細胞に抵抗性を付与重要なサイトカインとして知られています。本研究では、これまで知られていない重要な I 型インターフェロンの機能を明らかにしました。即ち、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分化に伴う減少を誘導することです。I 型インターフェロンスIGNALを抑制する転写因子 IRF2 を欠損するマウスでは、持続的な I 型インターフェロンスIGNALに起因する造血幹細胞の分化に伴う減少が観察されました。現在の抗がん剤治療では、増殖能力の高い白血病細胞のみが標的となります。したがって、本研究成果は、I 型インターフェロンを投与することで、一過性のがん幹細胞の増殖を盛んにし、抗がん剤の効果を高める新治療法の可能性を示すものです。また、このような I 型インターフェロン（と抗がん剤の併用効果）の効果は、放射線照射を軽減・回避可能な骨髄移植法の開発に繋がる可能性を秘めています。



News and Views in Nature Medicine 15, 612-613 (2009)より抜粋
本研究成果は、朝日新聞、毎日新聞、日本経済新聞他、東京新聞、京都新聞、茨城新聞、沖縄タイムス、秋田魁、北日本新聞、河北新報、日経バイオなど、ウェブを含め計40社で紹介された。

（生体防御学分野 橋本俊聡）

「メダカを用いて腸管から肝臓が発生する仕組みを解明」— 器官形成および疾患モデルとして期待されるメダカ —

肝臓は、胆汁の分泌、吸収栄養分の濾過と解毒、糖の貯蔵と血糖の調節など多様な働きをする必須の器官です。またその再生能力の高さから生体肝移植も行われています。しかしながら、その形成（発生や再生）の分子機構は未だ不明な点が多い現状です。私たち研究グループは、母体外で発生が進行するため顕微鏡による観察が

容易であるメダカをモデル生物として、肝臓の形成機構の解明を行っています。英国バース大学、東京大学、大阪大学、山口大学、慶応大学との共同研究で、肝臓の発生が異常なメダカ変異体を単離し解析することで、「体内で産生されるレチノイン酸が肝臓の発生を決定すること」をつきとめました。この発見により、必要な働きをする多機能器官である肝臓の形成の分子機構の一端が解明されました。同時に、器官形成を知るために多用されているマウスでは困難な解析が、メダカでは可能であることを示す成果であると考えられます。また、非アルコール性の脂肪性肝炎を発症するメダカの作製に成功し、「ヒト疾患のモデル生物」としてのメダカの有用性も明らかになりました。

- 1) Takahiro Negishi et al. Retinoic acid signaling positively regulates liver specification by inducing *wnt-2bb* gene expression in medaka. *Hepatology in press*
- 2) Toshihiko Matsumoto et al. Medaka as a Novel and Accurate Model for Human Nonalcoholic Steatohepatitis. *Disease Models & Mechanisms in press*
(発生再生生物学分野 仁科 博史)

病態細胞生物学分野の研究成果が Nature 誌に掲載される

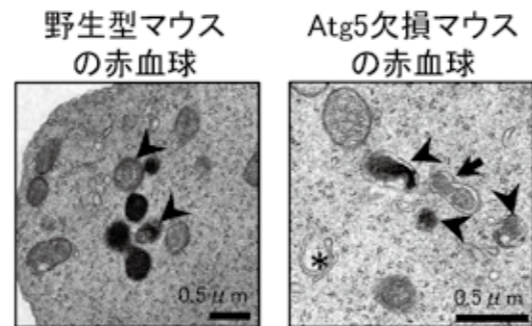
Nishida et al. (2009) Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. *Nature* 461, 654-658

オートファジーは細胞内小器官などの自己構成成分を分解する細胞機能で、傷んだ蛋白質などを消化して、細胞の健全性の維持に貢献しています。従って、その機能破綻は個体発生に大きな影響を与えるだけでなく、神経疾患や発癌など様々な疾患に関与することが知られています。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ました。しかしながら、Atg5 や Atg7 を欠損したマウスの胎仔には顕著な異常が認められず、Atg5 や Atg7 に依存しないオートファジー機構の存在も予想されます。そこで、私たちは、Atg5 欠損マウス由来の細胞を用いて、新たな細胞内浄化機構の存在について検討しました。

まず、マウス由来の細胞に様々なストレスを負荷し、細胞内の微細構造を電子顕微鏡にて観察しました。すると、正常細胞のみならず Atg5 欠損細胞においても、オートファジーの誘導が認められました。この Atg5 非存在

下のオートファジーは、Atg5 依存性オートファジーと同様の形態学的特徴と機能を有しており、我々はこれを「alternative macroautophagy」と命名しました。さらに、この新規オートファジーの実行は、ゴルジ装置やエンドソームを起源として行なわれる事も併せて発見致しました。

さらに、生体内の如何なる状況で、この新規オートファジーが機能しているかを検討したところ、胎仔の心臓、脳、肝臓においてその実行が観察されました。また、赤血球が網状赤血球から分化する際には、脱核とミトコンドリア除去が行なわれますが、このミトコンドリア除去にも関与している事がわかりました。新規オートファジーは細胞ストレスによって強く誘導されることから、発癌、神経疾患、炎症疾患など幅広い疾患に関与していることが考えられ、これらの疾患の新規治療法開発への応用が期待できます。



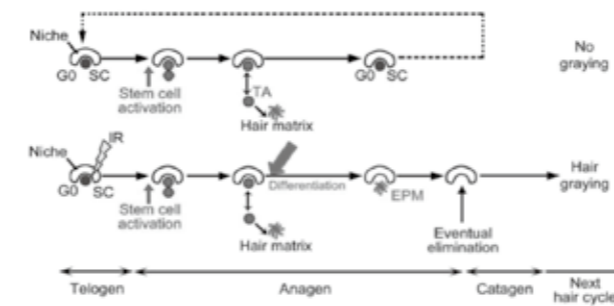
Atg5 欠損マウスの赤血球では新規オートファジーによりミトコンドリアが消化されている。

(病態細胞生物学分野 清水重臣)

色素幹細胞はゲノム損傷ストレスにより分化し自己複製できなくなる

歳をとるとなぜ白髪が増えるのか？ 歳をとると、実は色素幹細胞のプールが減ってくることをこれまでに明らかにしてきたが、なぜ加齢に伴って減ってくるのか、早老症でなぜ若白髪がみられるのかについては謎であった。今回、ゲノムの損傷ストレスと色素幹細胞プールの枯渇、および白髪の発症に深い関連があることが明らかになった。ゲノムは、日々、代謝に伴う活性酸素や紫外線、発癌物質のほか、様々な内因性および外因性のゲノム損傷に晒されている。組織幹細胞のように寿命の長い細胞において損傷の蓄積が問題になると考えられているが、加齢やゲノム損傷に際して組織幹細胞がどのような運命を辿るのか、実際に成体組織内で何が起きているのかその詳細は不明であった。我々は色素幹細胞システムにおける利点を生かして幹細胞運命解析を行った。マウスの毛周期を同調した上で放射線照射などの種々のゲノム損傷ストレスを誘発し、その後の色素幹細胞の運命を追った。その結果、DNA 損傷ストレス後には、従来

考えられて来たようなアポトーシスや細胞老化などといった運命ではなく、むしろ幹細胞が未分化性を失い、ニッチ内でそのまま成熟分化してしまう(異所性分化)ことが判明した。その結果、幹細胞プールが枯渇し、色素細胞を毛母に供給出来なくなって毛が白毛化した(図4, 5, 6)。そのプロセスは、加齢に伴って観察される異所性分化細胞とその消失の過程と酷似していることから(図3)、加齢に伴ってみられる幹細胞の枯渇も、加齢に伴うゲノム損傷ストレスにより誘導される幹細胞の未分化性消失/異所性分化を反映しているものと考えられた(図5)。さらに、ATM 欠損マウスやその他の早老症モデルマウスなど、ゲノム損傷の修復が効率よく起こらないマウスにおいては、幹細胞の未分化性消失が顕著に促進されることも判明した。色素幹細胞プールの量および質を保つ上で ATM を中心とするゲノム損傷応答が重要な役割を果たしていることが明らかになった(Inomata K., Aoto T. et al. *Cell* 2009)。



(幹細胞医学分野 西村栄美)

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構により分子細胞遺伝分野で開発された先天異常診断用ゲノムアレイの実用化がプレスリリースされた

先天異常症候群を解析する装置を世界に先駆け実用化受託解析事業も開始

平成 21 年 9 月 28 日

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構
理事長 村田 成二

NEDO「染色体解析技術開発」プロジェクトの成果を基に開発された、先天異常症の高精度診断を可能にする「先天異常症診断アレイ (GD-700)」が、世界で初めて実用化されました。GD-700 は、東京医科歯科大学・難治疾患研究所、富士フィルム株式会社、株式会社ビー・エム・エル、日本ガイシ株式会社、旭川医科大学が共同開発したもので、染色体ゲノムコピー数の微細な変化(欠失や重複)を短時間、高精度に検出し、31 種類の先天異常症を一度に解析することを可能にします。富士フィルムがアレイを製造・販売し、ビー・エム・エルがアレイを用いた受託解析事業を開始します。

NEDO は、個別化医療を実現するための技術開発を加速し、原因不明の先天異常症、精神発達障害、自閉症、さらには、がん等の診断。疾患解析ツールを創出し、革新的な医療に貢献いたします。

URL: <https://app3.infoc.nedo.go.jp/informations/koubo/press/EK/nedopressplace.2009-01-21.8698110208/nedopress.2009-09-08.3444444824/>

(分子細胞遺伝分野 稲澤譲治)

第 8 回駿河台国際シンポジウム開催される

第 8 回駿河台国際シンポジウムは、ゲノム応用医学部門(稲澤譲治教授)が担当し、ヒトゲノム解析が革新的に進歩している現状を鑑みて、「New Waves in Personal Genomics」というタイムリーな話題をテーマとして取り上げた。本年は、本学主催の国際サマープログラム 2009「Recent Advances in Cancer Research」との合同企画として進められ、平成 21 年 9 月 9 日、歯学部 4 階特別講堂において開催された。第 8 回駿河台国際シンポジウムでは、海外より 3 名の招待講演者を招聘し、所内からは若手研究者を中心に 4 名が講演し、内外から多数の参加者を得て、熱のこもった発表および活発な議論が展開された。

<シンポジウムプログラム: The 8th Surugadai International Symposium "New Waves in Personal Genomics" >

Opening Remarks:

Dr. Ikuo Morita (Trustee, TMDU)

Session 1 (Chairs: Dr. Hiroshi Tanaka, Dr. Fumitoshi Ishino)

1. Dr. David Hawkins (Ludwig Institute for Cancer Research, UCSD, USA)

Global Analysis of the Human Stem Cell Epigenome

2. Dr. Hidehito Kuroyanagi (TMDU)

Regulation of Alternative Splicing in vivo

3. Dr. Yoshihito Niimura (TMDU)

Evolution of Olfactory Receptor Genes in Vertebrates:

From the Viewpoint of Comparative Genetics

Session 2 (Chairs: Dr. Masatoshi Hagiwara, Dr. Yoshio Miki)

4. Dr. Yong Zhang (Beijing Genomics Institute, China)

Application of next-generation sequencing technology on cancer genomics and personal genomics

5. Dr. Masaaki Muramatsu (TMDU)

Genome Epidemiology of Common Diseases

Session 3 (Chairs: Dr. Shigetaka Kitajima, Dr. Johji Inazawa)

6. Dr. Issei Imoto(TMDU)

Integrative Genomics and Epigenomics in Cancer

7. Dr. Jan P. Dumanski(Uppsala University, Sweden)

How Common is Somatic Mosaicism for DNA Copy Number Variations(CNVs)?

Closing Remarks

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

(分子疫学分野 村松正明)

「形質発現制御学研究室の黒柳秀人准教授が平成21年度科学技術分野の文部科学大臣表彰若手科学者賞を受賞」

黒柳秀人准教授は、平成21年度科学技術分野の文部科学大臣表彰において、「生体内可視化技術の開発によるスプライシング暗号の研究」の業績で、高度な研究開発能力を有する若手研究者を対象とする若手科学者賞を受賞した。

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。そして、モデル生物として線虫 (*C. elegans*) を用いることで、生体での組織特異的あるいは発生段階依存的に制御される選択的スプライシングの可視化に成功し、このレポーター線虫を利用した遺伝学的解析により組織特異的な選択的スプライシングの制御因子やシスエレメントを実験的に同定できることを示して、可視化技術が「スプライシング暗号」の解明に利用できることを示した。これらの研究は、結果として、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すこととなった。今後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)

日本版 EHR の提言と政府の医療 IT 政策への反映

生命情報学分野の田中博教授は、政府の IT 戦略本部を担当する内閣官房の「医療評価委員会」の構成員に2006年から就任してから現在まで活動している。とくに地域におけるわが国の医療崩壊の現状を救うのは、(1) 生涯継続的なケア、(2) 病院完結型医療から地域連携に基づく地域完結型医療、さらには最近のワイヤレス情報機器を利用した (3) 日常生活圏で受ける健康・疾病管理の3つの基軸を挙げ、これを可能にする個人の健康・医療情報の生涯データベースとして「日本版 EHR (Electronic Health Record)」をわが国が早急に実現すべき公共インフラであると提唱してきた。2009年7月の政府の IT 戦略である「i-Japan2015」計画において、この考えが取り入れられ、IT 戦略の重要な柱として医療 IT の必要性が考慮され、「日本版 EHR」の実現が明示的に政府の方針として記載され公表された。その後、民主党の政権交代があったが、2009年末の新成長戦略にも引き継がれていた。



(生命情報学分野)

各種受賞

受賞

分子代謝医学分野

田中 都 日本肥満学会若手研究奨励賞 (YIA) 日本肥満学会

菅波孝祥 第24回岡本研究奨励賞 成人血管病研究振興財団

澤田直樹 First-place winner, 2009 Young Investigator's Award in Physiology, Pharmacology and Pathology. The American College of Cardiology.

生体防御学分野

小内伸幸 第4回日本免疫学会研究奨励賞「樹状細胞分化とホメオスタシス」

藤岡優樹 秋田大学大学院医学系研究科 平成21年度学生表彰優秀賞

分子薬理学分野

長尾雅史 Plenary Poster Award. 'Schnurri-2(SHN-2) deficiency counteracts against bone loss induced by ovariectomy.' The 31st Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, Denver, Colorado, U.S.A.

羽生亮 Plenary Poster Award. 'Sympathetic nervous tone modulates constitutively active parathyroid hormone receptor signaling in vivo.' The 31st Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, Denver, Colorado, U.S.A.

納富拓也 Plenary Poster Award. 'Pacemaker channel HCN1 affects osteoclast function in vitro and bone remodeling in vivo.' The 31st Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, Denver, Colorado, U.S.A.

早田匡芳 Plenary Poster Award. 'Dullard, a novel phosphatase, that dephosphorylates and degrades BMP receptors, suppresses signaling in osteoblasts.' The 31st Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, Denver, Colorado, U.S.A.

生命情報学分野

太田沙紀子 第28回医療情報学連合大会研究奨励賞
受賞論文: 「電子タグを用いたベッドサイド業務支援システム-バーコードとの比較」

形質発現分野

黒柳秀人 平成21年度科学技術分野の文部科学大臣表彰若手科学者賞「生体内可視化技術の開発によるスプライシング暗号の研究」

分子代謝医学分野

澤田直樹 First-place winner, 2009 Young Investigator's Award in Physiology, Pharmacology and Pathology. The American College of Cardiology. 「Targeted Deletion of Rac1 in Endothelial Cells Mediates Endothelium-Derived Neurotrophic Activity and Neuroprotection」

菅波孝祥 第24回岡本研究奨励賞 成人血管病研究振興財団 「炎症性メディエータとしての遊離脂肪酸の分子機構の解明と医学応用」

田中 都 日本肥満学会若手研究奨励賞 (YIA) 日本肥満学会 「中枢神経系を介するレプチンの炎症・免疫調節作用」

生体情報薬理学分野

黒川洵子 文部科学大臣賞若手科学者

2009年難治疾患研究所優秀論文賞

最優秀論文賞

西田友哉 (病態細胞生物学)

Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy
Nature

優秀論文賞

伊藤日加瑠 (神経病理学分野)

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

Human Molecular Genetics

有村卓朗 (分子病態分野)

Cardiac Ankyrin Repeat Protein Gene(ANKRD1) Mutations in Hypertrophic Cardiomyopathy
Journal of the American College of Cardiology

志浦寛相 (エピジェネティクス分野)

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

Human Molecular Genetics

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
Circulation Research

2009年難治疾患研究所研究発表会

大学院生受賞者

1位 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

2位 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

3位 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

ベストプレゼンテーション賞 内田好海（発生再生生物学分野）

ストレス応答性キナーゼ JNK による時計蛋白質 PER2 の安定性制御

ベストディスカッション賞 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

難治疾患研究賞 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

若手研究者受賞者

1位 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

2位 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

3位 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

特許申請

分子病態分野

PCT 国際出願：冠状動脈疾患リスクの検査方法（PCT/JP2009/006918）、出願日 2009 年 12 月 16 日

神経病理学分野

（国際特許）Prophylactic/therapeutic agent for neurodegenerative disease. 出願人：東京医科歯科大学 発明者：岡澤 均 特許公開：US-2009/0280488 公開日：2009 年 11 月 12 日

生命有機化学研究室

国際 2 件（PCT/JP2009/052253、PCT/JP2009/061982）
国内 3 件（特願 2009-27904、特願 2009-27921、特願 2009-159129）

免疫疾患分野

発明の名称：B リンパ球の増殖を増強する化合物、出願番号：特願 2009-177776、発明者：鏑田武志、木曾真、石田 秀治 Abdu-Allah, H. H. M.、出願人：独立行政法人科学技術振興機構、国立大学法人岐阜大学

分子細胞遺伝分野

〔特許取得〕

2009.3.27、MASL1 癌 遺 伝 子、特 許 第 4280878 号（1999/1/28 特 許 出 願 平 11-20696、特 許 公 開 2000-217578）

〔特許申請〕

【国内】

2009.5.27、「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・稲澤譲治・井本逸勢、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 2009-128162 (P08-062)

2009.5.26、「核酸マイクロアレイを用いた解析方法」、氏原大・金原秀行・稲澤譲治・井本逸勢、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 2009-126780 (P08-061)

2009.5.26、「核酸アレイ及び核酸アレイの識別方法」、石井靖幸・吉田淳哉・氏原大・三好隼人・岩木義英・稲澤譲治・井本逸勢、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 2009-126894 (P08-060)

2009.5.1、「薬剤耐性マーカーおよびその利用」、井上純・稲澤譲治、稲澤譲治・富士フィルム株式会社、特願 2009-111725

2009.3.25、「食道癌の検出方法及び抑制剤」、井上純・井本逸勢・稲澤譲治、国立大学法人東京医科歯科大学・富士フィルム株式会社、特願 2009-073998 (P08-037)

2009.3.11、「BAC クローンを用いる尿路上皮癌の発生リスク評価方法及び予後予測方法」、金井弥栄・新井恵吏・西山直隆・稲澤譲治、(財)ヒューマンサイエンス財団・国立大学法人東京医科歯科大学、特願 2009-058156 (P08-046)

2009.3.3、「精神遅滞を伴う多発性奇形症候群の判別方法」、稲澤譲治・井本逸勢・林深・会津善紀、国立大学法人東京医科歯科大学・株式会社ビーエムエル・富士フィルム株式会社、特願 2009-049864 (P08-025)

2009.2.2、「医薬組織物、および腫瘍の治療用薬剤」、大木理恵子・川瀬竜也・柴田龍弘・田矢洋一・油谷浩幸・

稲澤譲治・田代文夫、財団法人ヒューマンサイエンス振興財団・国立大学法人東京医科歯科大学・学校法人東京理科大学、特願 2009-022048 (P08-047)

【国外】

[米国]

「神経芽腫の検出方法」、稲澤譲治・井本逸勢・井上純、国立大学法人東京医科歯科大学・富士写真フィルム株式会社、2009.9.28、12/568,569、特願 2008-275176 (P08-031US)「甲状腺癌の検出方法」、稲澤譲治・井本逸勢・石原孝也・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、2009.7.15、12/503,434、特願 2008-184982 (P07-075US)

「癌の検出方法および癌抑制剤」、稲澤譲治・小崎健一・井本逸勢、国立大学法人東京医科歯科大学・富士写真フィルム株式会社、2009.1.22、12/357,894、特願 2008-012256 [EP]

「癌の検出方法および癌抑制剤」、稲澤譲治・小崎健一・井本逸勢、国立大学法人東京医科歯科大学・富士写真フィルム株式会社、2009.1.23、09151217.8、特願 2008-012256

幹細胞医学分野

特願 2009-244447 平成 21 年 10 月 23 日出願、「色素幹細胞の未分化性維持促進剤」

プロジェクト研究室（山口登喜夫）

「バイオピリン検出用イムノクロマトグラフィー測定方法及び装置」（特願 2006-36202）；2009 年 2 月 -2010 年 3 月

学位取得者

分子病態分野

日野原邦彦 「A genome-wide association study using 18,880 microsatellite markers identified MKL1 as a novel disease gene for coronary artery disease.」

病態細胞生物学分野

藤谷健司 「酵母を用いた非アポトーシス細胞死関連分子の探索」

分子薬理学分野

宮井健太郎 「ANA deficiency enhances bone morphogenetic protein-induced ectopic bone formation via transcriptional events.」

分子神経科学分野

孫黎明 「The visualization of experience-dependent plasticity in barrel cortex by Arc mRNA expression.」

我妻明湖 「Genome-wide analysis of specific inhibitory neurons regulating visual cortical plasticity.」

生命情報学分野

Mojgan Haghghi 「Development of clinical ontology for mood disorder with combination of psychomedical information」

大橋渉 「Benefits of pharmacogenomics in drug development - earlier launch of drugs and less adverse events」

病態生化学分野

藤森浩彰 「VEGF promotes proliferation and function of hepatocyte-like cells in embryoid bodies formed from mouse embryonic stem cells」

鹿内弥磨 「Ex utero transplantation of hepatic progenitor cells into the mouse fetal liver」

西田知弘 「Thesis: Transcriptional regulation of ERas gene in mouse embryonic stem cells」

免疫疾患分野

満栄勇 「Augmented B lymphocyte response to antigen in the absence of antigen-induced B lymphocyte signaling in an IgG-transgenic mouse line.」

岸祐介 「Apoptosis of marginal zone B-cells in unimmunized mice.」

分子代謝医学分野

田中都 「Role of central leptin signaling in renal macrophage infiltration under unilateral ureteral obstruction.」

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.」

遺伝生化学分野

山田一彦 「A role of CDK inhibitor p21^{Cip1} in cell cycle of terminally differentiated cardiomyocytes」

構造情報研究室

安部美奈子 「Structural and functional analyses of the BMP10 complex in extracellular region」

エピジェネティクス分野

成瀬美衣 「Retrotransposon-derived *Sirh*-family genes and mammalian viviparity.」

分子細胞遺伝分野

中村恵里奈 「Frequent silencing of a putative tumor suppressor gene melatonin receptor 1A (MTNR1A) in oral squamous-cell carcinoma.」

石原孝也 「*ITCH* is a putative target for a novel 20q11.22 amplification detected in anaplastic thyroid carcinoma cells by array-based comparative genomic hybridization.」

菊池良子 「Frequent inactivation of a putative conditional tumor-suppressor gene, angiopoietin-like protein 2, in ovarian cancer.」

幹細胞医学分野

猪又顕 「Genotoxic stress abrogates renewal of melanocyte stem cells by triggering their differentiation.」

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」

難研セミナー

若手研究者・大学院生研究発表会

平成21年3月6日

山田一彦 (遺伝生化学分野)

CDK inhibitor p21 は細胞周期活性化因子 CDK2 によって安定化され、心筋細胞の再増殖を阻害する

仁平啓史 (分子遺伝学分野)

Pim-1 は RelA/p65 のリン酸化を介して NF- κ B の活性化を制御する

西田友哉 (病態細胞生物学分野)

ATG5/7 非依存性オートファジーの分子機構

本田尚三 (分子細胞遺伝分野)

X-tiling array を用いた X 連鎖性精神発達遅滞 (XLMR) の原因遺伝子検索

佐久間 (藤森) 浩彰 (病態生化学分野)

幹細胞から癌幹細胞への直接的な形質転換の可能性 - マウス ES 細胞をモデルとして

日野原邦彦 (分子病態分野)

ゲノムワイド関連解析により同定された冠動脈疾患感受性遺伝子 MKL1 の解析

小松周平 (分子細胞遺伝分野)

食道癌における新規診断・治療標的遺伝子 OESL1 の同定

細川元靖 (形質発現分野)

Fibroblast growth factor receptor 2 遺伝子の相互排他的スプライシング制御機構

西田知弘 (病態生化学分野)

Transcriptional regulation of ERas gene by Nanog and Klf family proteins in mouse ES cells

鹿内弥磨 (病態生化学分野)

ex utero 法を用いたマウス胎肝臓への細胞移植法の確立と ES 細胞から肝芽細胞への分化誘導

村松智輝 (分子細胞遺伝分野)

食道癌における YAP 増幅の意義

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

古田蒨子 (分子細胞遺伝分野)

肝細胞癌において腫瘍特異的 DNA 過剰メチル化によって制御される癌抑制 microRNA の探索

伊藤綾香 (分子代謝医学分野)

肥満脂肪組織における脂肪細胞肥大化とマクロファージ浸潤による炎症性変化の分子機構

菅波孝祥 (分子代謝医学分野)

飽和脂肪酸と多価不飽和脂肪酸が織りなすメタボリックシンドローム進展の分子機構

亀井康富 (分子代謝医学分野)

骨格筋における糖脂質代謝の分子機構の解明と生活習慣病予防への応用

野島孝之 (形質発現分野)

ウイルス感染が引き起こす PML アイソフォーム

の切り換え

片岡直行 (MTT プログラム)

イントロン内にコードされる microRNA のプロセシング機構の解析

優秀論文賞受賞者講演会

平成21年3月6日

大野源太 (形質発現分野)

STAR family RNA-binding protein ASD-2 regulates developmental switching of mutually exclusive alternative splicing in vivo

黒川洵子 (生体情報薬理学分野)

Acute effects of estrogen on the guinea pig and human Ikr channels and drug-induced prolongation of cardiac repolarization

関田洋一 (エピジェネティクス分野)

1) Role of retrotransposon-derived imprinted gene, Rtl1, in the feto-maternal interface of mouse placenta.

2) Deletions and epimutations affecting the human 14q32.2 imprinted region in individuals with paternal and maternal upd(14)-like phenotypes.

第417回

朝比奈欣治 (南カリフォルニア大学医学部病理学部門)

Developmental origin of hepatic stellate cells and their progenitor cells 平成21年4月10日

第418回

斎藤康太 (東京大学大学院薬学系研究科)

小胞体における新しい積み荷選別機構

平成21年5月28日

第419回

古川功治 (産業技術総合研究所年輪軸生命工学研究センター免疫恒常性チーム)

生体内での抗体親和性成熟の戦略

平成21年4月6日

第420回

川島武士 (沖縄科学技術研究基盤整備機構)

比較ゲノム学が明らかにする動物の発生進化

平成21年4月28日

第421回

権藤洋一 (理化学研究所バイオリソースセンター新規変異マウス研究開発チーム)

ゲノム機能解析ツールとして利用可能な次世代シーケンシングシステム

平成21年5月20日

第422回

仲野徹 (大阪大学生命機能研究科・医学系研究科) 発生・分化におけるエピジェネティック制御

平成21年6月30日

第423回

Ajay Chawla (Stanford University, school of Medicine)

PPAR δ , Apoptotic Cell Clearance and Autoimmunity

平成21年6月24日

第424回

Hans Robert Schöler (Max Planck Institute for Molecular Biomedicine)

Induction of Pluripotency in Adult Somatic and Germline Stem Cells iPS, piPS and gPS

平成21年7月8日

第425回

山本祐二 (財団法人応用生化学研究所理事, カロリンスカ医科大学前助教授)

生体のリズム形成機構 (Central Pattern Generation) - カロリンスカ医科大学での研究生活 -

平成21年6月17日

第426回

Simon Fillatreau (DRFZ)

Activated B cells: the case for a regulatory role

平成21年12月7日

先端分子医学研究部門

Division of Advanced Molecular Medicine

先端分子医学研究部門内の各分野は、種々の異なる視点から、細胞、器官、あるいは個体の恒常性維持と修復の分子基盤について、遺伝子や蛋白質の構造・機能から、多細胞集合体である器官、さらには日々適応を求められる個体に至るまでの様々なレベルで取り組み、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。

- Nod 様受容体リガンド刺激により樹状細胞のクロスプライミング能が亢進することを明らかにした。
- I 型 IFN シグナルが造血幹細胞の自己複製や前駆細胞への分化に重要な役割を担うことを明らかにした。
- 肥満の脂肪組織に浸潤するマクロファージにおいて ATF3 が飽和脂肪酸 /TLR4/NF- κ B 経路の負の制御因子であることを明らかにした。
- 骨格筋委縮における FOXO1 の標的因子としてカテプシン L を同定した。
- 不整脈の性差のメカニズムの一つとして、性ホルモン非ゲノム経路と交感神経ベータ受容体シグナルのクロストークを明らかにした。
- 心臓の部位特異的に発現するイオンチャネル転写制御因子の欠損により難治性家族性不整脈症候群 Brugada 症候群のモデルマウスを作製した。
- p38 MAPK が NLK をリン酸化制御し、頭部形成に関与することを示した。
- WNK \rightarrow 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。
- グルタミン酸トランスポーター GLAST を活性化するインターロイキン 1 が EAAC1 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。
- グルタミン酸トランスポーター GLT1 の発現を増加させると、海馬の苔状線維—CA3 間シナプスの長期抑圧現象を抑制することを示した。
- Tob/BTG ファミリーに属する抗増殖性分子 ANA は、骨形成因子によって誘導される異所性骨形成の抑制因子であることを見出した。
- microRNA をプロセシングする Dicer は、破骨細胞において破骨細胞の分化を促進、及び間接的に骨形成を促進することにより、骨リモデリングを負に制御することを見出した。
- ヒト滑膜由来の間葉系幹細胞の軟骨形成過程において、シグネチャー遺伝子プロモーター上における CpG アイランドのメチル化は、大部分は低く保持されていることを見出した。
- 神経幹細胞において FGF2 と Wnt のシグナルが相互作用して増殖促進性に働く一方で、Notch シグナルを増強させニューロン分化抑制性に働くことを示した。
- 神経幹細胞において FGF2 と Wnt のシグナルが相互作用して増殖促進性に働く一方で、cyclin D1 発現誘導を介してアストロサイト分化抑制性に働くことを示した。
- 胎生期造血幹細胞の解析から、胎盤において CD45 陽性 c-Kit 陽性の side population (SP) 集団中に高い造血活性をもつ細胞が存在することを示した。

難治疾患研究所 先端分子医学研究部門

分子代謝医学分野

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、平成15年4月1日に従来の予防医学分野より名称を変更して新しく発足した分野であり、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と考えている。

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

肥満遺伝子産物レプチンに関する分子医学的研究：

レプチンは脂肪組織に由来する代表的なアディポサイトカインであり、主に視床下部を介して強力に摂食量の減少とエネルギー代謝の亢進をもたらす。肥満と体重増加を制御するとされている。一方、レプチンの受容体は、視床下部のみならず末梢組織において広範に分布しており、構造的にはサイトカインのシグナル伝達分子であるgp130と類似しているため、多くの組織において炎症性サイトカインとしてのレプチンの病態生理的意義が注目されている。

本研究では、一側尿管結紮 (Unilateral Ureteral Obstruction; UUO) によるマウス腎尿細管間質障害モデルを用いて、炎症・線維化促進因子としてのレプチンの病態生理的意義を検討した。遺伝的にレプチンを欠損する *ob/ob* マウスと野生型マウスを用いて UUO を施行し、経時的に腎組織像と遺伝子発現を検討した。野生型マウスでは著しい腎実質の菲薄化とともにマクロファージ浸潤および腎間質線維化を特徴とする炎症性変化を認め、*ob/ob* マウスでは著しく抑制されていた。レプチン受容体遺伝子に変異を有する *db/db* マウスにおい

ても *ob/ob* マウスと同様に腎障害の明らかな抑制が認められた。浸透圧ミニポンプによるレプチンの皮下投与により *ob/ob* マウスにおいて観察された腎障害抑制が消失した。腎尿細管細胞あるいは培養マクロファージを用いた検討より、レプチンは末梢性にこれらの細胞に直接作用して腎臓における炎症性変化を促進する可能性は少ないと考えられた。一方、*ob/ob* マウスにレプチンを脳室内投与すると、皮下投与の場合と同様に腎へのマクロファージ浸潤が増加し、その効果はメラノコルチン3型および4型受容体のアンタゴニスト (SHU9119) の同時投与によりほぼ完全に遮断された。腎尿細管間質障害モデルにおいて、レプチン欠損は炎症および線維化に対して抑制的に作用することが明らかとなり、視床下部メラノコルチン系の関与が示唆された (Endocr. J. 56: 679-689, 2010)。

肥満の脂肪組織における炎症性変化の分子機構に関する研究：

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られており、その分子基盤として全身の軽度の慢性炎症反応が注目されている。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、脂肪組織における炎症性変化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。

A. 肥満の脂肪組織における ATF3 に関する研究

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 ATF3 を同定し、ATF3 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、ATF3 は飽和脂肪酸/TLR4/NF- κ B 経路の負の制御因子として作用することが明らかになった。実際、マクロファージ特異的に ATF3 を過剰発現するトランスジェニックマウスでは、肥満に伴うマクロファージの活性化が減弱しており、ATF3 が慢性炎症を基盤とするメタボリックシンドロ

ームの新しい創薬ターゲットとなる可能性が示唆された (図1) (Circ. Res. 105: 25-32, 2009)。

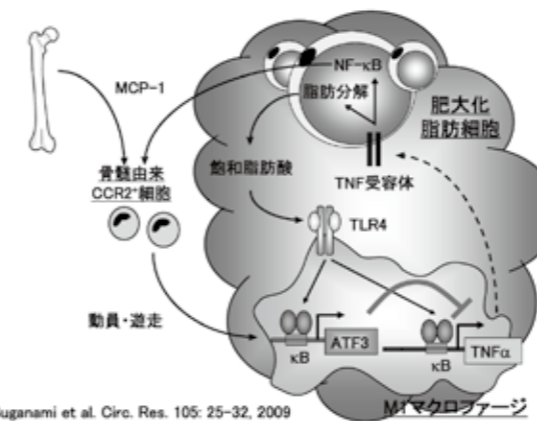


図1 肥満の脂肪組織

B. 肥満患者の末梢血単球の質的变化に関する研究

肥満の脂肪組織においてマクロファージは細胞数の増加のみならず、炎症抑制性 M2 マクロファージから炎症促進性 M1 マクロファージへの極性変化を呈し、マクロファージの質的变化も脂肪組織の慢性炎症や全身の糖脂質代謝に関与することが知られている。一方、脂肪組織に浸潤する前段階、即ち、末梢血単球における質的变化は不明であった。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 の発現は有意に低下し、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著しく低下していた。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 γ 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、肥満症患者において、チアゾリジン誘導体投与により、末梢血単球の質的变化と動脈硬化指標は有意に改善した。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した新しい治療戦略の可能性が示唆された (Diabetes Care 33: e7, 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、糖取込み、運動において重要な役割を果たす。我々は既に、フォークヘッド型転写因子 FOXO1 を生体の栄養状態に応答して変化する骨格筋代謝や骨格筋量の重要な調節分子として位置付けてきた。本研究では、FOXO1 の標的遺伝子の候補として、骨格筋萎縮において FOXO1 と同様の遺伝子発現パターンを示すリソソームタンパク分解酵素カテプシン L 遺伝子に着目した。絶食により誘導されるカテプシン L の遺伝子発現は、骨格筋特異的に優勢阻害型 FOXO1 を発現させたマウスおよび骨格筋特異的 FOXO1 遺伝子欠損マウスにおいて減弱してい

た。マウスおよびヒトカテプシン L 遺伝子プロモーターのいずれにおいても FOXO1 結合領域が存在し、FOXO1 によって活性化されることが明らかになった。カテプシン L はエンドサイトーシスやオートファジーにより、リソソームに運ばれたタンパク質の分解を担う重要な酵素であり、FOXO1/カテプシン L 経路は、絶食により誘導される骨格筋萎縮や代謝変化に関与することが示唆された。以上より、FOXO1/カテプシン L をターゲットとした骨格筋不全、メタボリックシンドロームの予防・治療法の開発につながることを期待された (図2) (Biochem. J. 2010 Jan 20. [Epub ahead of print])。

3. メタボリックシンドロームのエピジェネティクス制御

生活習慣病は遺伝素因と環境因子の相互作用により発症する代表的な多因子疾患であり、この分子基盤として種々の環境因子によりもたらされるエピジェネティックな遺伝子発現制御の機構が関与する可能性がある。本研究では、肥満の脂肪組織では DNA メチル化酵素のうち *de novo* (新規) DNA メチル化酵素 (Dnmt3a) の遺伝子発現が増加することを見出し、肥満の脂肪組織における DNA メチル化のダイナミックな変化が示唆された。脂肪組織特異的に Dnmt3a を過剰発現するトランスジェニックマウスを作出したところ、がん抑制遺伝子 SFRP1 プロモーターの DNA メチル化のわずかな増加と遺伝子発現の抑制が観察された。肥満の脂肪組織において遺伝子発現が減少するものは多いが、この分子機構の一部に Dnmt3a を介する DNA メチル化が関与する可能性がある。一方、Dnmt3a マウスの脂肪組織でインターフェロン α/β シグナリングの下流の転写因子である IRF9 の遺伝子発現の増加が認められた。高脂肪食負荷では標準食の場合と比較して、Dnmt3a マウスの脂肪組織における炎症性遺伝子 TNF α や MCP1 の遺伝子発現の増加が観察された。以上より、肥満の脂肪組織における DNA メチル化の病態生理的意義が示唆された (Obesity 18: 314-321, 2010)。

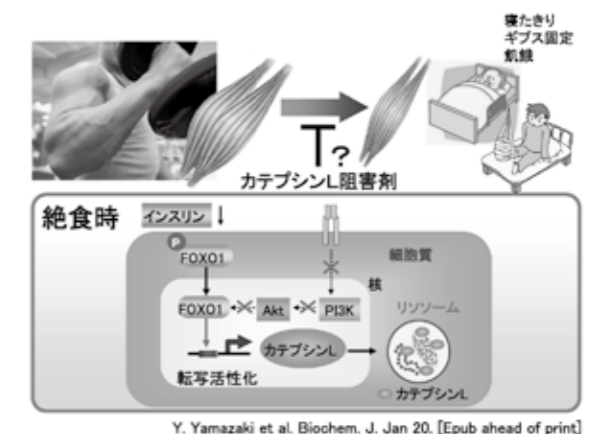


図2 骨格筋萎縮

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。骨芽細胞は、未分化間葉系の細胞より分化する。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、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. microRNA 産生を制御する Dicer 遺伝子の破骨細胞における機能の発見 (溝口史高、早田匡芳、江面陽一、野田政樹)

破骨細胞は、骨を吸収する細胞で、骨リモデリングだけでなく、骨粗鬆症や関節リウマチのような病理学的骨量減少に関与する。microRNA は Dicer によってプロセシングされ、細胞と組織機能における新たな遺伝子発現、翻訳制御システムとして近年注目されているが、破骨細胞における microRNA の役割は未だ明らかにされていない。そこで、本研究では、CathepsinK-Cre マウスと Dicer^{fllox/fllox} マウスを用いて破骨細胞特異的に Dicer を欠損させ、破骨細胞と骨量における効果を検討した。破骨細胞での Dicer 欠損によって、破骨細胞数 (N.Oc/BS) と破骨細胞面 (Oc.S/BS) が減少した。培養系においては、TRAP 陽性多核細胞の発生および NFATc1 と TRAP 遺伝子発現が減少した。一方、骨石灰化速度 (MAR) と骨形成率 (BFR) などの骨芽細胞活性は抑制され、I 型コラーゲン、オステオカルシン、Runx2、Efnb2 などの遺伝子発現が減少した。結果としては、破骨細胞における Dicer 欠損は、骨量増加を引き起こした。Dicer は、破骨細胞において、骨吸収の活性を調節することが明らかにされた (J Cell Biochem, 2009)。

2. ヒト滑膜由来の間葉系幹細胞の軟骨形成過程における CpG アイランドのメチル化状況の解明 (江面陽一、野田政樹)

ヒト滑膜由来間葉系幹細胞 (MSC) は、効率よく成熟軟骨細胞に分化することができる。DNA メチル化はヒト軟骨形成を制御する一つのメカニズムとして示唆されているが、軟骨分化に関連する遺伝子のメチル化状況は知られていない。本研究の目的は、変形性関節症における潜在的な治療応用という観点から、ヒト滑膜由来の MSC の CpG メチル化状況を軟骨分化ベレット培養前後に解析した。その結果、異なってメチル化される CpG に富んだ領域の例外は、分化の際に発現減少する SDF1 の 1-kb 上流の配列にあった。逆説的に、この領域の高メチル化状況は、ベレット培養の 3 週間後に減少した。

軟骨表現型に関連する遺伝子の CpG に富んだプロモーターの DNA メチル化レベルは、ヒト滑膜由来 MSC における軟骨形成過程において、大部分は低く保持されていることが明らかになった (Arthritis Rheum, 2009)。

3. 骨におけるアンドロゲン受容体欠損と後肢非荷重の組み合わせ効果の発見 (斎田良知、早田匡芳、江面陽一、野田政樹)

男性ホルモンは、骨代謝制御において重要な役割を果たす。アンドロゲン受容体 (AR) 遺伝子を欠損するマウスは、骨減少と高回転型骨リモデリングを示すことが報告されている。しかしながら、廃用性骨萎縮におけるアンドロゲン受容体の役割は知られていない。そこで、本研究では、非荷重による骨減少における AR の欠損効果を調べた。野生型 (WT) あるいは AR ノックアウトマウス (ARKO) を後肢の非荷重状態 (HU) または定常状態 (Cont) で飼育し、骨形態計測学的解析を行った。その結果、ARKO-HU は、ARKO-Cont に比べて約 70% 程度海綿骨量が減少した。この減少率は、WT のそれよりも 2 倍以上だった (WT-HU は、WT-Cont に比べて 30% 減少)。4 つのグループのうち、ARKO と HU の組み合わせは、皮質骨量と骨密度が最低となった。また、ARKO-HU グループは、全身性の骨吸収マーカーのデオキシピリジノリンの最高値を示した。ARKO-HU 由来の骨髄細胞の培養における破骨細胞形成レベルは、4 つのグループで最高だった。これらのデータから、アンドロゲン受容体欠損と後肢の非荷重の組み合わせは、骨吸収亢進のために廃用性骨萎縮の悪化を引き起こすことが示唆された (Horm Metab Res, 2009)。

4. 骨欠損部への移植による、骨成長因子を含むナノゲル-架橋ハイドロゲルの骨再生能力に関する研究 (林央子、早田匡芳、江面陽一、野田政樹)

骨欠損を修復するために、吸収性の合成担体を用いた成長因子による骨の細胞の活性化は、有用かつ安全な選択肢である。我々は、骨芽細胞を刺激し骨形成を誘導する BMP の新規合成担体としてのナノゲル-架橋ハイドロゲルの効率を検討した。コレステロールを有するプルランのナノゲル-架橋ハイドロゲル (CHPA/Hydrogel) を、BMP をデリバリーするのに用いた。マウスの頭蓋骨に自発的には治癒しない骨欠損部を作製し、そこに CHPA ハイドロゲルベレットを移植した。低容量の BMP を含む CHPA/Hydrogel を移植すると骨芽細胞の活性化と新生骨の形成が起こった。さらに、円盤状の形態のナノゲルは、骨芽細胞の動員を樹立して活発に骨を形成し、頭蓋骨欠損部を治癒させた。結論として、CHPA/hydrogel は、BMP デリバリーを介して、

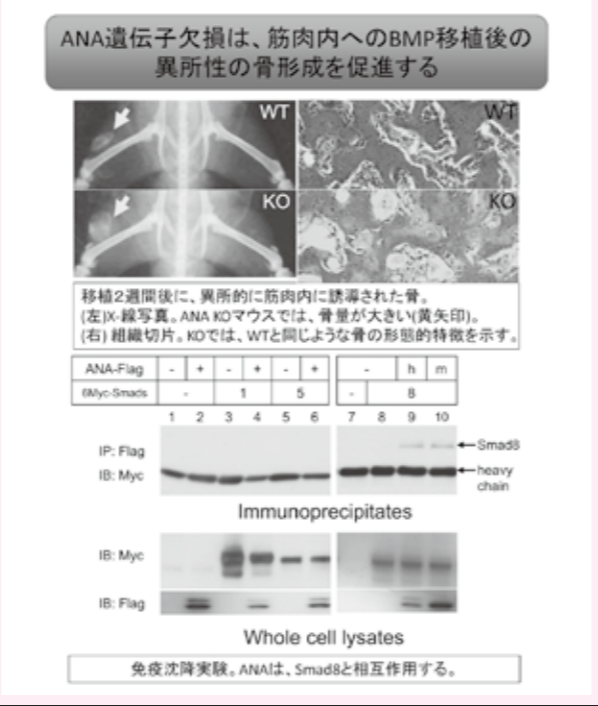
骨を形成し、骨欠損部を修復する骨芽細胞の活性化に対して効率的かつ多用途の担体として役立つことが示された (J Cell Physiol, 2009)。

ハイライト

ANA 遺伝子の異所性骨形成における役割の解明（宮井健太郎、早田匡芳、江面陽一、野田政樹）

ヒトにおける関節置換あるいは脳損傷後の異所性骨形成は、関節の不動と激痛を引き起こす重篤な合併症である。しかしながら、そのような異所性骨形成の背後にあるメカニズムは、完全には理解されていない。骨形成因子（BMP）は、異所性骨形成の誘導因子として規定されており、数種類の阻害因子によって制御されている。ANAはTob/BTGファミリーに属する抗増殖性分子であるが、骨代謝における機能については知られていない。そこで、BMPによる異所性骨形成の活性におけるANAの役割を検討した。ANA欠損と野生型マウスにおいて、異所性骨形成を誘導するために、BMP2を筋肉内に移植した。ANA欠損マウスでは、野生型マウスに比べて、新生骨の骨量が増加した。ANA mRNAは*in vitro*で骨芽細胞においてと同様に、*in vivo*でも骨において発現していた。MC3T3-E1において、ANA mRNAレベルは、BMP2処理によって増加した。ANAの過剰発現は、BMPによる、BMP応答レポーター遺伝子の活性化を抑制した。逆に、siRNAによるANA mRNAのノックダウンは、BMP依存的なBMP応答レポーター遺伝子の発現を促進した。それはまた、筋肉由来のC2C12

細胞においても、BMPによる骨芽細胞分化を促進した。免疫沈降アッセイによって、ANAはSmad8と相互作用することが明らかとなった。以上のことから、ANAはBMPによって誘導される異所性骨形成の抑制因子であり、このANAの阻害活性は、BMP機能の負のフィードバック機構の一部であることが示唆された（J Biol Chem, 2009）。



拠点事業関係

- グローバルCOEプログラム・歯と骨の分子疾患科学の国際研究教育拠点・拠点リーダー
- 学術振興会・先端研究拠点事業
- 特別教育研究経費・硬組織疾患ゲノムセンター

人事異動

転入:宮嶋大輔(大学院生)、鈴木充文(大学院生)、渡辺千穂 (大学院生)、下垣ベティ真利子（事務補佐員）、長谷川優（GCOE事務補佐員）、押江優子（GCOE事務補佐員）
転出:宮井健太郎（大学院生）、中村杏奈（GCOE事務補佐員）、浦田圭乃（事務補佐員）、浅野優紀（GCOE事務補佐員）、長谷川優（GCOE事務補佐員）、下垣ベティ真利子（事務補佐員）

業績目録

原著論文

- Miyai K, Yoneda M, Hasegawa U, Toita S, Izu Y, Hemmi H, Hayata T, Ezura Y, Mizutani S, Miyazono K, Akiyoshi K, Yamamoto T, Noda M. ANA deficiency enhances bone morphogenetic protein-induced ectopic bone formation via transcriptional events. J Biol Chem. 284:10593-600, 2009.
- Izu Y, Mizoguchi F, Kawamata A, Hayata T, Nakamoto T, Nakashima K, Inagami T, Ezura Y,

Noda M. Angiotensin II type 2 receptor blockade increases bone mass. J Biol Chem. 284:4857-64, 2009.

- Ezura Y, Sekiya I, Koga H, Muneta T, Noda M. Methylation status of CpG islands in the promoter regions of signature genes during chondrogenesis of human synovium-derived mesenchymal stem cells. Arthritis Rheum. 60:1416-26, 2009.
- 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 (in press) .
- Hayata T, Blitz IL, Iwata N, Cho KW. Identification of embryonic pancreatic genes using Xenopus DNA microarrays. Dev Dyn. 238:1455-66, 2009.
- Hemmi H, Idoyaga J, Suda K, Suda N, Kennedy K, Noda M, Aderem A, Steinman RM. A new triggering receptor expressed on myeloid cells (Trem) family member, Trem-like 4, binds to dead cells and is a DNAX activation protein 12-linked marker for subsets of mouse macrophages and dendritic cells. J Immunol. 182:1278-86, 2009.
- Hayashi C, Hasegawa U, Saita Y, Hemmi H, Hayata T, Nakashima K, Ezura Y, Amagasa T, Akiyoshi K, Noda M. Osteoblastic bone formation is induced by using nanogel-crosslinking hydrogel as novel scaffold for bone growth factor. J Cell Physiol. 220:1-7, 2009.
- Saita Y, Nakamura T, Mizoguchi F,

Nakashima K, Hemmi H, Hayata T, Ezura Y, Kurosawa H, Kato S, Noda M. Combinatory effects of androgen receptor deficiency and hind limb unloading on bone. Horm Metab Res. 41:822-8, 2009.
9. Segawa Y, Muneta T, Makino H, Nimura A, Mochizuki T, Ju YJ, Ezura Y, Umezawa A, Sekiya I. Mesenchymal stem cells derived from synovium, meniscus, anterior cruciate ligament, and articular chondrocytes share similar gene expression profiles. J Orthop Res. 27:435-41, 2009.
10. Jung JC, Wang PX, Zhang G, Ezura Y, Fini ME, Birk DE Collagen fibril growth during chicken tendon development: matrix metalloproteinase-2 and its activation. Cell Tissue Res. 336:79-89, 2009.

和文総説

1. 野田政樹・長尾雅史・羽生亮・宮井健太郎・江面陽一「分子生物学からみた骨折治療」CLINICAL CALCIUM 19 (5) :634-640, 2009.

受賞

- 長尾雅史 Plenary Poster Award. The 31st Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, Denver, Colorado, U.S.A., September 11-15, 2009.
- 羽生亮 Plenary Poster Award. The 31st Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, Denver, Colorado, U.S.A.,

September 11-15, 2009.

- 納富拓也 Plenary Poster Award. The 31st Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, Denver, Colorado, U.S.A., September 11-15, 2009.
- 早田匡芳 Plenary Poster Award. The 31st Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research, Denver, Colorado, U.S.A., September 11-15, 2009.

国際学会発表

- Nakamoto T, Ono N, Hanyu R, Sakuma T, Hayata T, Ezura Y, Schipani E, Kronenberg H, Noda M. Anabolic Action of PTH/PTHrP Receptor Signaling in Bone is Suppressed by a Nucleocytoplasmic Shuttling Protein CIZ. The 31st annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Denver, Colorado, Sep 11-15, 2009.
- Ampornaramveth R, Pavasant P, Noda M. Cbl-b enhances Runx2 function on osteocalcin promoter activity in osteoblastic cell line. The 31st annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Denver, Colorado, Sep 11-15, 2009.
- Sakuma T, Nakamoto T, Miyai K, Hayata T, Amagasa T, Ezura Y, Noda M. Deficiency of CIZ, Cas Interactive Zinc Finger Protein, Suppresses Tumor Invasion into Bone. The 31st annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Denver, Colorado, Sep 11-15, 2009.
- Hayata T, Ezura Y, Noda M. Dullard, a novel phosphatase, that dephosphorylates and degrades BMP receptors, suppresses signaling in osteoblasts. The 31st annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Denver, Colorado, Sep 11-15, 2009.
- Kamolratanakul P, Kawamata A, Yamamoto Y, Hayata T, Ezura Y, Akiyoshi K, Amagasa T, Noda M. Nanogel Scaffold Delivery of Prostaglandin E2 Receptor (EP4) Specific Agonist in Combination with BMP Repairs Microstructure of Bone Produced in the Defect via Potentiation of Transcription Activity of Smad Response Element. The 31st annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Denver, Colorado, Sep 11-15, 2009.
- Notomi T, Tanaka S, Amano H, Nakamura T, Noda M, Skerry T, Kuno M. Pacemaker channel HCN1 affects osteoclast function in vitro and bone remodeling in vivo. The 31st annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Denver, Colorado, Sep 11-15, 2009.
- Morishita M, Ono N, Hanyu R, Hayata T, Kamolratanakul P, Hemmi H, Nagao M, Ezura Y, Noda M. PTH Signaling and Osteopontin Deficiency Coordinately Enhance Progenitor Niche for the Cells to Support Tooth Development. The 31st annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Denver, Colorado, Sep 11-15, 2009.
- Nagao M, Saita Y, Nakamoto T, Notomi T, Hanyu R, Ezura Y, Hayata T, Masaki Noda. Schnurri-2 (SHN-2) deficiency counteracts against bone loss induced by ovariectomy. The 31st annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Denver, Colorado, Sep 11-15, 2009.
- Ryo Hanyu, , Notomi T, Takeda S, Nagao M, Hemmi H, Hayata T, Ezura Y, Noda M. Sympathetic nervous tone modulates constitutively active parathyroid hormone receptor sig-

naling in vivo. The 31st annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Denver, Colorado, Sep 11-15, 2009.
10. Ezura Y, Sekiya I, Muneta T, Noda M. The hypermethylated high-density CpG-region (-112/-888) of the stromal cell-derived factor 1 (SDF1) is demethylated in the synovium derived mesenchymal stem cells during chondrogenesis. The 31st annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Denver, Colorado, Sep 11-15, 2009.
11. Hemmi H, Idoyaga J, Suda K, Noda M, Steinman RM. The Identification and Characterization of A New Trem-like Molecule. The 31st annual meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Denver, Colorado, Sep 11-15, 2009.

国内学会発表

- 納富拓也、田中伸哉、天野均、中村利孝、野田政樹、久野みゆき。「ベースメーカーチャンネル(HCN1)の欠損は高代謝回転による骨量減少を引き起こす」第29回日本骨形態計測学会。大阪。平成21年5月28-30日。
- 早田匡芳、中元哲也、江面陽一、野田政樹。「骨形成抑制転写因子Cizとその新規結合タンパク質I型コラーゲンC-プロペプチドは核内に共局在する」第120回日本薬理学会関東部会。東京。平成21年7月11日。
- 江面陽一、関矢一郎、宗田大、野田政樹。「ヒト滑膜由来間葉系幹細胞におけるSDF1遺伝子上流の高密度CpG部位(-1115/-888)の高メチル化状態は軟骨細胞分化過程において脱メチル化される」第27回日本骨代謝学会。大阪。平成21年7月23-25日。
- 早田匡芳、江面陽一、野田政樹。「BMP受容体を脱リン酸化し分解する新規脱リン酸化酵素Dullardは、骨芽細胞においてBMPシグナルを抑制する」第27回日本骨代謝学会。大阪。平成21年7月23-25日。
- 納富拓也、田中伸哉、天野均、中村利孝、野田政樹、久野みゆき。「ベースメーカーチャンネル(HCN1)の破骨細胞機能と骨代謝機構への関与」第27回日本骨代謝学会。大阪。平成21年7月23-25日。
- 羽生亮、齋田良知、長尾雅史、伊豆弥生、竹田秀、江面陽一、黒澤尚、野田政樹。「若令マウスにおけるアドレナリンβ2受容体遺伝子欠損はPTHの高回転型骨量増加作用を抑制する」第31回日本整形外科学会基礎学術集会。横浜。平成21年11月5-6日。
- 長尾雅史、齋田良知、羽生亮、辺見弘明、納富拓也、早田匡芳、江面陽一、黒澤尚、野田政樹。「Schnurri-2欠損マウスでは卵巣摘出後も野生型の骨量を維持する」第31回日本整形外科学会基礎学術集会。横浜。平成21年11月5-6日。
- 辺見弘明、Juliana Idoyaga、高井俊行、斉藤隆、野田政樹、Ralph M. Steinmman。「マウス脾臓樹状細胞/マクロファージに発現しているTremファミリー分子Trem-like 4の同定とその解析」第39回日本免疫学会学術集会・総会。大阪。平成21年12月2日。

国際招待講演

- Noda M. ÖGECM Autumn Symposium 2009, November 21st, 2009.
- Noda M. Vincent Hospital in Wien, November 21st, 2009.
- Noda M. American Society for Cell Biology, December, 2009.

国内招待講演

- 野田政樹：「骨の形成とその調節機構」第29

回日本骨形態計測学会 平成21年5月29日
2. 野田政樹：「骨形成の制御機構」第20回栃木県骨・カルシウム代謝研究会 平成21年6月19日
3. 野田政樹：「歯と骨のCOEプログラムの成果」第63回日本口腔科学会 平成21年4月17日
4. 野田政樹：「骨芽細胞制御の分子機構」第61回関西カルシウム懇話会 平成21年3月28日
5. 野田政樹：「メカニカルストレスと骨代謝」第12回超音波骨折治療研究会 平成21年1月17日
6. 野田政樹：宇宙医学生物学ワークショップ「微小重力と骨代謝」(財団法人日本宇宙フォーラム)平成21年1月16日

主催国際シンポジウム

1. 第3回 グローバルCOE国際シンポジウム 「骨研究の最新線」平成21年6月10日、11日

主催セミナー

1. 第212回 Bone Biology Seminar 福本誠二「FGF23とリン代謝異常症」平成21年6月12日
2. 第213回 Bone Biology Seminar 上出利光「インテグリンとそのリガンドは関節炎進展の重要な微小環境を形成する」平成21年7月16日
3. 第214回 Bone Biology Seminar Mark Atlas「Enhancing the biological relevance of functional cell assays through the use of automated shear flow analysis」平成21年8月3日
4. 第215回 Bone Biology Seminar 三品裕司「BMP（骨形成因子）の骨組織発生とリモデリング、顔面形成における機能解析」平成21年11月26日
5. 第216回 Bone Biology Seminar 石井優「破骨前駆細胞の遊走と位置決めへの制御～生体2光子励起顕微鏡を用いた骨組織のライブイメージングより」平成21年12月1日
6. 第217回 Bone Biology Seminar 中村能久「肥満とメタボリックストレス-病原体感知分子による脂肪酸応答とインスリンシグナル調節-」平成21年12月3日

競争的研究資金

1. 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）
2. 野田政樹「悪性黒色腫の骨の転移のメカニズムの解明」科学研究費補助金 特定領域研究
3. 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
4. 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
5. 野田政樹（取組責任者）「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
6. 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）
7. 邊見弘明「新規Trem分子の機能解析」科学研究費補助金 若手研究（B）
8. 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- β 及び Wnt シグナル伝達及び偽性低アルドステロン症 II 型の原因遺伝子 WNK プロテインキナーゼに着目し、解析を進めている。

研究紹介

1. 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

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、全ての発現系で観察できたことから、WNK \rightarrow

OSR1 というシグナル伝達経路は、ショウジョウバエ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、両方が同じ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ことから、その下流もまた保存されていると推測された (図1)。

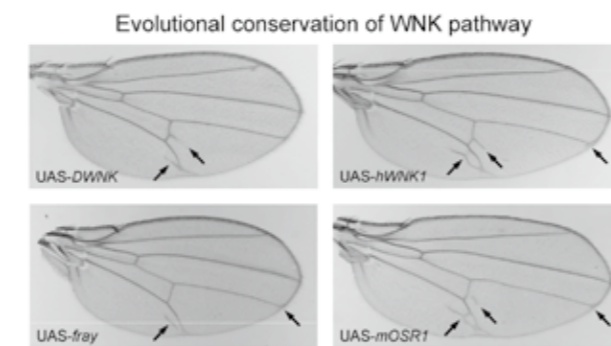


図1

2) 下流転写因子

DWNK 突然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の表現型と同じであり、このことは転写因子 X と WNK とが遺伝的相互作用することを予想させた。そこで、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 と同時に共発現させると、キナーゼ不活性型 DWNK による表現型が回復した。このことから、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 (図2)。

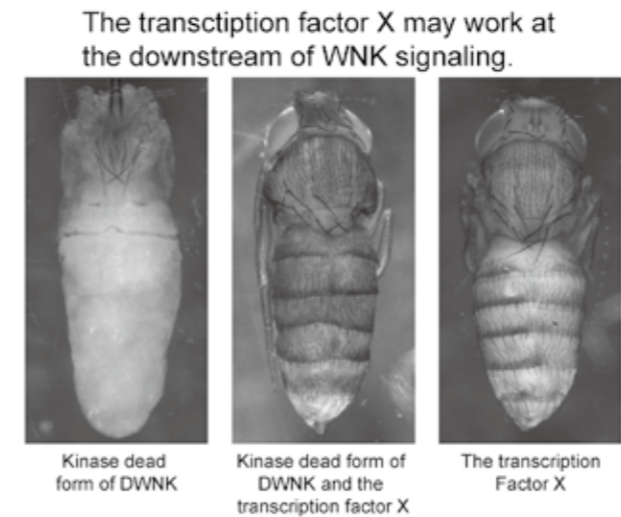


図2

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。PHAII 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、NIH-3T3 cell 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 RT-PCR により解析したところ、高浸透圧刺激により転写因子 X の発現が上昇することが分かった。この条件下で、siRNA を用いて、PHAII 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 の発現が活性化されないため、確かに WNK シグナルにより転写因子 X が活性化されることが確認できた。ショウジョウバエ及び培養細胞系で共に転写因子 X が下流で機能する因子であると示した、これらの結果は、WNK の関与する新たなシグナル経路の存在を推定させており、今後解析を続けていく。

2. p38-NLK 経路による Xenopus 前頭部形成の制御機構

Nemo-like kinase (NLK) は、Drosophila の複眼の細胞極性、翅の形態形成、表皮のパターニングを担う Nemo の相同遺伝子として単離された MAP キナーゼ様セリン・スレオニンキナーゼである。しかし、NLK の活性化機序や基質分子については、一般的な MAP キナーゼファミリー (Erk, p38, JNK) と異なることが予想されており、未だ不明な点が多い。

当研究室はこれまでに NLK の機能解析を行う過程で、NLK が MAPKKK のひとつである TGF- β -

activating kinase 1 (TAK1) の下流で活性化されること、活性化された NLK は転写因子 TCF/LEF を直接リン酸化することで TCF/LEF と β -カテニンの複合体形成を阻害し、Wnt シグナルのカノニカル経路を抑制することを見いだしている (Nature, 399: 798-802, 1999)。NLK の会合分子 NARF (NLK-associated RING finger protein) は NLK のキナーゼ活性に依存して TCF/LEF のユビキチン化修飾とプロテアソームによる TCF/LEF の分解を促進し、Wnt シグナル経路を制御する (J Biol Chem 281: 20749-20760, 2006)。また、アフリカツメガエル (Xenopus laevis) 初期胚を用いた NLK の機能解析により、NLK は転写因子 STAT3 のセリン残基のリン酸化を介して中胚葉誘導を調節すること (Genes & Dev 18: 381-386, 2004)、そして NLK は BMP4 の阻害因子 Chordin により発現誘導される転写因子 Sox11 や MEF2A と会合し、協調的に神経発生を制御している知見を得ている (Genes Cells 7: 487-496, 2002; Mol. Cell. Biol. 27, 7623-7630, 2007)。

さらに、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 NLK の機能消失により、頭部前方領域の形成不全と前方神経マーカー遺伝子群の発現低下が観察された。これらの表現型は NLK mRNA を MO と同時にツメガエル胚に注入することにより回復することから、NLK がツメガエルの頭部前方領域の形成に関与していることが示唆された。そこで前頭部の形成における NLK の機能を検討するために、NLK と相互作用する分子群を網羅的に検索したところ、MAP キナーゼファミリーの一つである p38 が単離された。培養細胞系において NLK と p38 が会合し、p38 による NLK のリン酸化修飾が確認された。ツメガエル胚において p38 β と NLK の神経胚期での発現領域は頭部前方領域で重なっており、特異的な MO を用いて p38 β の機能を消失させると、NLK の機能消失の時と同様に、頭部前方領域の形成不全と各種前方神経マーカーの発現低下が観察された。p38 β の機能消失による表現型は、野生型 NLK の強制発現では回復されたが、p38 β によるリン酸化部位 (Ser42) をアラニンに置換した変異型 NLK では回復されなかった。以上のような知見に加え、ツメガエル胚において、NLK に関してはこれまでに知られていた NLK (以後 xNLK1 とする) 以外に xNLK2 (ほ乳類の NLK により相同性が高い) が存在すること (図3)、p38 に関しては p38 α 、p38 β が頭部形成に関する機能の相違が確認されたことを含めて、下記のような新たな知見を得ることができた。

Schematic of NLK genes

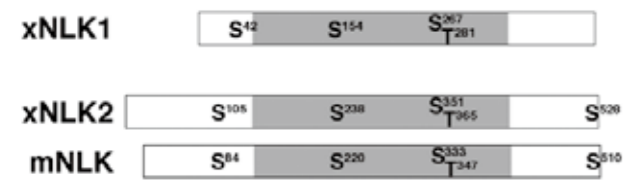


図 3

- 1) 培養細胞系において p38 α 、p38 β はともに NLK と会合し、NLK の C 末端付近のセリン残基 (Ser510) をリン酸化した。
- 2) ツメガエル胚において、神経形成期での xNLK1、xNLK2、p38 α 、p38 β の 4 つの遺伝子の発現は全て頭部前方領域において重なっており、MO を用いてそれぞれの遺伝子の機能を消失させると、xNLK1、xNLK2、p38 β の 3 つの遺伝子に関して頭部前方領域の形成不全が確認された。p38 α の機能消失は頭部形成に影響を与えなかった (図 4)。

p38 functions in anterior neural development

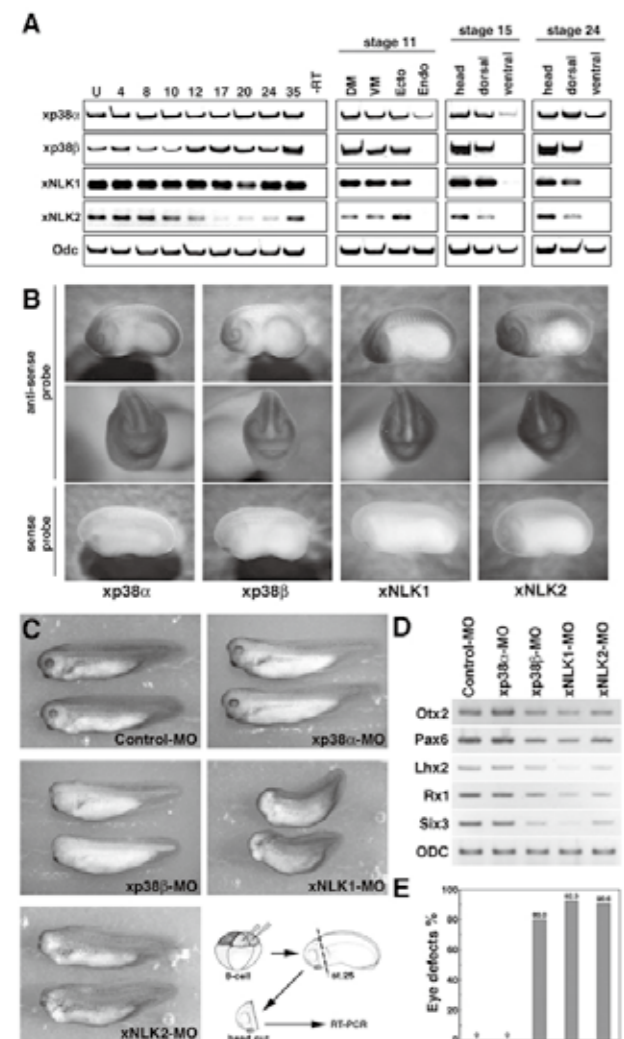


図 4

- 3) p38 β は xNLK1 の N 末端付近のセリン残基 (Ser42) をリン酸化していたが、xNLK2 ではほ乳類の NLK と同様に C 末端付近のセリン残基 (Ser528) を特異的にリン酸化した。p38 β の機能消失による表現型は、野生型 xNLK1 と同様に、xNLK2 の強制発現では回復されたが、p38 β によるリン酸化部位をアラニンに置換した変異型 xNLK2 では回復されなかった。
- 4) xNLK1 の機能消失による表現型は、野生型 xNLK2 の強制発現で、xNLK2 の機能消失による表現型は、野生型 xNLK1 の強制発現で回復された。xNLK1 と xNLK2 の機能の重複が確認された。

今回得られた新たな知見は、ツメガエルに存在する xNLK1 及び xNLK2 の両遺伝子の p38 β によるリン酸化修飾を介した機能制御が頭部前方領域の形成過程に重要であることを示唆した。さらに頭部前方領域の形成過程での p38 α と p38 β の機能の違いを含めて、p38-NLK 経路の神経形成期でのシグナル伝達の多様性を明らかにした結果である。

業績目録

原著

1. Kim, M., Kondo, T., Takada, I., Youn, M.-Y., Yamamoto, Y., Takahashi, S., Matsumoto, T., Fujiyama, S., Shiode, Y., Yamaoka, I., Kitagawa, H., Takeyama, K., Shibuya, H., Ohtake, F. and Kato, S. (2009) . DNA demethylation in hormone-induced transcriptional derepression. *Nature* 461, 1007-1012.
2. 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- β -inducible protein, sequesters Smad proteins from active participation in TGF- β signaling. *Mol. Cell* 37, 123-134.
3. Ohnishi, E., Goto, T., Sato, A., Kim, M., Iemura, S., Ishitani, T., Natsume, T., Ohnishi, J. and Shibuya, H. (2010) . NLK, an essential effector for of anterior formation, functions downstream of p38 MAP kinase. *Mol. Cell. Biol.* 30, 675-683.
4. Nifuji, A., Ideno, H., Ohyama, 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.*

学会

1. Atsushi Sato, Andrew Tomlinson, Hiroshi Shibuya. Characterization and functional analysis of the Drosophila Corin Protein. The 9th Japanese Drosophila Research Conference 2009 年 7 月 掛川。
2. 後藤利保、大西英理子、佐藤淳、金美善、家村俊一郎、石谷太、夏目徹、大西淳之、澁谷浩司 NLK, an essential effector of anterior formation, functions downstream of p38 MAP kinase. 第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 11 日、横浜。

研究助成金

1. 澁谷浩司 (代表) : 文部科学省科学研究費特定領域研究 発生分化を制御する DECODE 回路の解明

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: GCOE 総合プレゼンテーション

3. 後藤利保: GCOE 総合プレゼンテーション

学外活動

1. 澁谷浩司: 筑波大学先端学際領域研究センター 客員研究員

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、EAAC1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。EAAC1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、グリア型グルタミン酸トランスポーター GLAST の活性化がEAAC1欠損マウスの表現型を改善することを明らかにした（Neurosci Lettes 465:160-164, 2009）。

また、グリア型グルタミン酸トランスポーター GLT1

の発現を ceftriaxone で増加させると、海馬の苔状線維—CA3 間シナプスの可塑的变化である長期抑圧年現象を抑制することを明らかにした（J Physiol 587:4575-4588, 2009）。これは、GLT1 によるシナプス可塑性制御の新しいメカニズムを示している。

2. 小脳の発生における Notch-RBP-J シグナルの役割

Notch シグナルは細胞の運命決定に重要なシグナルであり、しかも発現する細胞・時期により異なった機能を果たすことが示唆されている。神経幹細胞において Notch シグナルは、神経幹細胞の未分化性を維持し神経細胞への分化を抑制していることが知られている。しかし、神経細胞へ運命決定された神経前駆細胞における Notch シグナルの機能に関しては、不明である。

我々は、小脳においてアストログリア細胞と分子層に存在する抑制性介在神経細胞である籠細胞、星状細胞の前駆細胞に Cre 酵素が発現する遺伝子改変マウスを用いてアストログリア細胞、籠細胞、星状細胞から Notch シグナル（RBP-J）を欠損したマウスを作製した。その結果、グリア細胞においては、Notch-RBP-J シグナルがバグマングリアの層形成に重要な役割をもつことを明らかにした（Developmental Biology. 2007）。さらにこの変異マウスが、籠細胞、星状細胞が激減するという表現型を示すことを発見した。

小脳において、分子層に存在する籠細胞、星状細胞は、小型の Pax2 陽性神経前駆細胞から産生されることが知られている。また、最近、生後間もない小脳において小型 Pax2 陽性神経前駆細胞になる前に、Pax2 陰性の神経前駆細胞が存在していることが予想されている（Eur J Neurosci. 2007）が、その実体は不明である。この変異マウスの詳細な解析により、変異マウスにおいて小型 Pax2 陽性神経前駆細胞が産生されないことがわかった。さらに解析を進めたところ、神経幹細胞や神経前駆細胞のマーカーである Sox2 陽性で Pax2 陰性の神経前駆細胞が顕著に増加しており、小型 Pax2 陽性神経前駆細胞への分化が止まっていることを突き止めた。このことから、小脳抑制性介在神経細胞の神経前駆細胞において、Notch シグナルが神経前駆細胞から神経細胞への分化を促進することが示唆された。次に、Notch 受容体の

関与を確かめるため、Notch 受容体依存的なシグナルの活性化に必要な MAML 分子のドミナントネガティブ体を Cre の発現と同時期にアストログリア細胞、籠細胞、星状細胞に強制発現させるマウスを作製した。その結果、RBP-J 欠損マウスと同様に、バグマングリアの層形成異常が顕著にみられたが、籠細胞、星状細胞は全く正常に産生されていた。このことから、バグマングリアの層形成には Notch 受容体依存的に RBP-J が機能しているが、籠細胞、星状細胞の産生には、Notch 受容体非依存的に RBP-J が関与している可能性が示唆された。また、近年、RBP-J と転写因子 Ptf1a が Notch 非依存的に抑制性神経細胞への運命決定に関与することが報告されているため、Ptf1a との関連についても解析を行った。その結果、Sox2 陽性 Pax2 陰性神経前駆細胞に Ptf1a の発現が認められず、また、変異マウスにおいて、Ptf1a 欠損マウスで見られるような興奮性の神経細胞への運命転換は全く見られなかった。以上から、小脳抑制性介在神経細胞の神経前駆細胞において、RBP-J は、Notch 受容体及び Ptf1a 非依存的に神経前駆細胞から神経細胞への分化を促進する役割をもつことが示唆された。現在、Genechip を用いて RBP-J により発現制御される遺伝子について解析を行っており、数種類の遺伝子候補が見つかり、それらの関与について解析を行っている。

3. グルタミン酸トランスポーターの骨格筋形成における役割

アミノ酸の一つであるグルタミン酸は、タンパク質合成、エネルギー産生、抗酸化物質の合成、中枢神経系における神経伝達など多様な細胞代謝の中核を担っている。細胞内へのグルタミン酸を供給する主要な経路の一つが、グルタミン酸トランスポーターを介した細胞外から細胞内へのグルタミン酸取り込みである。グルタミン酸トランスポーターの神経伝達制御における機能は良く研究されているが、それ以外のグルタミン酸トランスポーターを介したグルタミン酸代謝の機能的意義はほとんど分かっていない。

我々は神経系の分子として知られるグルタミン酸トランスポーターが、胎児期において末梢組織の原基である体節に、時期特異的に発現していることを発見した。興味深いことに、体節内のグルタミン酸トランスポーターの発現は、時期および部位でダイナミックな変動を示し、体節の分化に伴い消失した。体節内のグルタミン酸トランスポーター発現細胞を様々な時期でラベルし、その細胞系譜を解析したところ、発現時期により骨格筋を始め、骨・軟骨・線維芽細胞など、多くの組織へ分化することを発見した。

さらにグルタミン酸トランスポーターの欠損マウスを

作製したところ、欠損マウスは胎齢 16.5 日目で胎生致死となり、深部背筋を中心とした骨格筋の激しい消失を示した。骨格筋の消失過程を詳細に解析したところ、分化（筋芽細胞同士の融合）、成熟（筋芽細胞と筋管、筋管同士の融合）過程に障害があり、最終的にアポトーシスにより骨格筋が消失することを明らかにした。以上のことから、グルタミン酸トランスポーターを介したグルタミン酸代謝は、骨格筋分化・形成に必須であることが示唆された。本研究は末梢組織において初めてグルタミン酸トランスポーター・グルタミン酸代謝の機能を解明したものである。これまで組織形成の研究は、主に転写因子を中心とした内在性の遺伝プログラムの観点から行われてきたが、本研究は細胞外環境との相互作用の初めて重要性を明らかにしたものである。

癌をはじめ多くの急性・慢性難治疾患には悪液質として知られる骨格筋の激しい消失がしばしば伴い、疾患そのものよりも致命的となることがある。悪液質患者の骨格筋ではグルタミン酸代謝系の異常が知られているが、その原因、またこれ骨格筋消失の機序は不明である。グルタミン酸トランスポーター欠損マウスの骨格筋消失機序の解明は、悪液質の病態の解明に寄与する。また成体における骨格筋再生は骨格筋形成と同様の過程を辿ることから、グルタミン酸トランスポーターの活性化は、骨格筋消失を伴う難治疾患や老化に対する新規治療標的となり得る。

ハイライト

「グルタミン酸トランスポーターの活性化は EAAC1 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 EAAC1 欠損マウスは正常眼圧緑内障と同じ症状を示す。サイトカイである IL-1 (interleukin-1) は、Na⁺-K⁺ ATPase の膜移動を促進し、結果的に Müller 細胞に発現する GLAST によるグルタミン酸の取り込み量を増大させ得る (Mol Cell Biol 283273-3280, 2008)。本研究では、EAAC1 欠損マウスにおいて、IL-1 が緑内障の進行を遅延させることを見いだした。

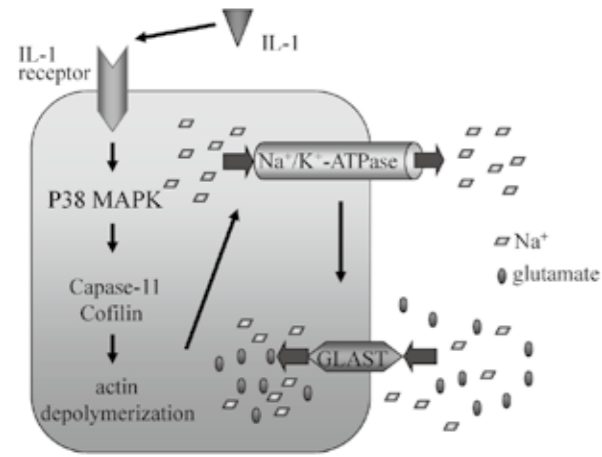


図1 Interleukin-1 (IL-1) がミューラー細胞のグルタミン酸トランスポーター GLAST のグルタミン酸取り込み活性を促進させるメカニズム
IL-1/p38 MAPK (p38 mitogen-activated protein kinase) シグナルはカスベース 11 を活性化し、コフィリンの活性化を通じ F-アクトチンの重合を阻害する。F-アクトチンの脱重合は、Na ポンプ (Na/K-ATPase) の膜への移行を促進し、ミューラー細胞内の Na イオン濃度を減少させ、GLAST のグルタミン酸取り込み活性を増強させる。

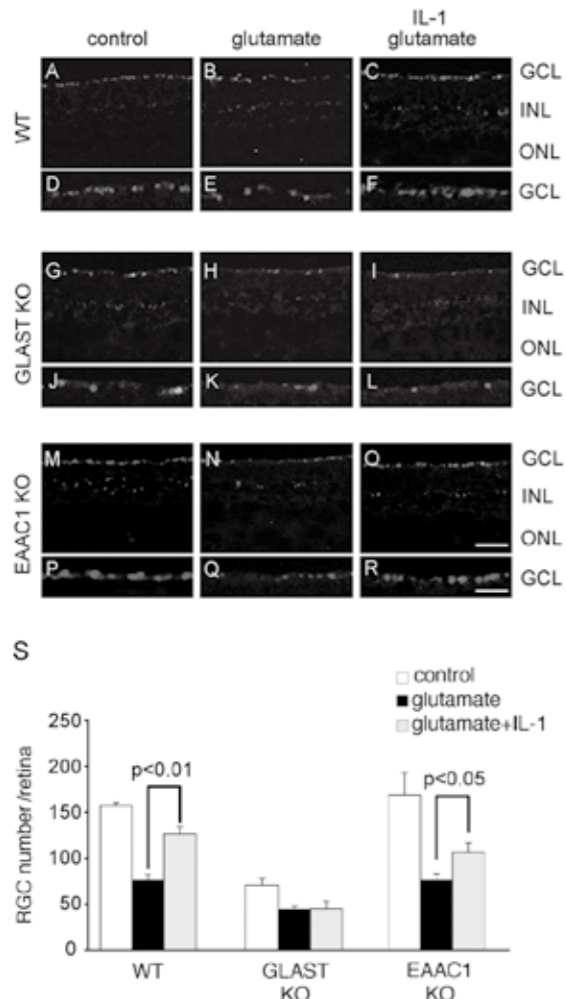


図2 Interleukin-1 は、野生型および EAAC1 欠損マウスにおけるグルタミン酸興奮毒性を抑制するが、GLAST 欠損マウスにおけるグルタミン酸興奮毒性は抑制しない。
WT: 野生型マウス、GLASTKO: GLAST 欠損マウス、EAAC1KO: EAAC1 欠損マウス、GCL: ganglion cell layer, INL: inner nuclear layer, ONL: outer nuclear layer, RGC: retinal ganglion cell

人事異動

転入：相田知海 (助教)、相馬美歩 (リサーチアシスタント)、柳澤美智子、白寧 (博士課程)、加藤さや佳、吉田純一 (修士課程)、北村隆宏 (技術補佐員)、砂堀愛美 (秘書)

転出：浜崎浩子 (北里大学の教授として転出)、塩原靖幸 (アステラス製薬に就職)、櫻井美弥乃 (北里大学へ転出)、和藤大鑑 (東京理科大学へ転出)、楠木亜希子 (産休)

業績目録

発表論文

- Karlsson, R.M., Tanaka, K., Saksida, L.M., Bussey, T.J., Heilig, M., Holmes, A. Assessment of glutamate transporter GLAST (EAAT1) deficient mice for phenotypes relevant to the negative and executive/cognitive symptoms of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 34. 1578-1589, 2009.
- Soma, M., Aizawa, H., Ito, Y., Maekawa, M., Osumi, N., Nakahira, E., Okamoto, H., Tanaka, K., Yuasa, S. Development of the mouse amygdala as revealed by enhanced green fluorescent protein gene transfer by means of in utero electroporation. *J Comp Neurol* 513. 113-128, 2009.
- Omrani, A., Melone, M., Bellesi, M., Safiulina, V., Aida, T., Tanaka, K., Cherubini, E., Conti, F. Up-regulation of GLT-1 severely impairs LTD at mossy fibers-CA3 synapses. *J Physiol* 587. 4575-4588, 2009.
- Namekata, K., Harada, C., Guo, X., Kikushima, K., Kimura, A., Fuse, N., Mitamura, Y., Kohyama, K., Matsumoto, Y., Tanaka, K., Harada, T. Interleukin-1 attenuates normal tension glaucoma-like retinal degeneration in EAAC1 deficient mice. *Neurosci Letters* 465. 160-164, 2009.
- 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* (in press)

総説・著書

- 田中光一：グルタミン酸輸送体機能障害による単一精神病仮説、日本神経精神薬理学雑誌、29:161-164, 2009
- 相田知海、武田拓也、田中光一：グルタミン酸代謝異常疾患としての正常眼圧緑内障、実験医学、27: 1291-1295, 2009

研究費

- 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
- 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
- 田中光一：プ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
- 田中光一：グルタミン酸トランスポーター機能障害によるてんかん発症機序の解明。てんかん治療研究振興財団研究助成。代表

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. 小峯起：神経前駆細胞の多様性獲得メカニズムの解明。金原一郎記念振興財団研究助成。代表

7. 浜崎浩子：鳥類脳キメラを用いた性分化の解析。文部省科学研究費補助金、特定領域研究。代表

教育研究上の特記すべき事項

- (1) 学外における講義などの教育活動
田中光一：佐賀大学医学部。特別講義
浜崎浩子：早稲田大学教育学部。講義

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. 粘膜免疫系の研究

粘膜は多くの病原体が宿主へ侵入する場である。とりわけ腸管粘膜は表面積が250m²（成人）にもおよび、病原体侵入の場であると同時に栄養吸収の場であり常在菌の住処でもある。腸管粘膜免疫系では、食物や常在菌由来の抗原に対して容易に免疫反応を起こさない（免疫寛容）環境が構築されている。事実、腸管粘膜関連リンパ組織（GALT）に存在する多様なDCサブセットは、獲得免疫系細胞群（Treg、Th17、IgA生産など）の分化・機能発現を介して寛容誘導・維持に重要な役割を担っていることが明らかになりつつあり（Immunol Rev 234, 247-258 (2010)）、同機構の詳細を探索することを目的として研究を推進した。その結果、IgA生産に関して興味深い知見を得た。腸管粘膜関連リンパ組織（GALT）ではIgAが効率よく生産されるが、cDCに比べpDCはT細胞非依存性IgA誘導能に優れていることが明らかになった。T細胞非依存性IgA誘導にはDCの生産するAPRILおよびBAFFが重要であるが、GALTのpDCは同じ組織由来のcDCや非粘膜リンパ組織のpDCに比較して、APRILおよびBAFFの発現レベルが数倍～10倍程度亢進していることが判明した。さらに定常状態においてGALTストローマ細胞から生産されるI型インターフェロン（IFNs）がpDCに作用してAPRIL・BAFFを誘導していることを見出した。これらの知見は、IgA生産に関して、pDCが合目的的にGALTでコンディショニングされていることを示唆している。現在、さらに詳細な解析を進めている。

2. 樹状細胞分化の研究

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（classical DC、cDC）と形質細胞様樹状細胞（plasmacytoid DC、pDC）の2種類に大別される。ともに微生物抗原の刺激依存性に活性化し所属リンパ節に移動してT細胞に抗原を提示するが、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。長い間、このcDCとpDCは同一の前駆細胞由来なのか、あるいは異なる前駆細胞に由来するのかが不明であった。当分野では、海外の研究グループとの共同研究によりマウス骨髄中からFlt3⁺M-CSFR⁺細胞を同定し、ex vivo および in vivo において同細胞がcDCとpDCのみへと分化することを明らかにし、共通樹状細胞前駆細胞（common dendritic progenitor、CDP）と命名した。現在、定常状態における末梢二次リンパ組織のDCサブセットはCDPなどから分化すると考えられているが、我々は新たに強力なpDC分化能を持つ新規DC前駆細胞の同定に成功している。CDPとの比較において、新規DC前駆細胞はpDC分化能に数倍優れ、pDC分化や機能発現に重要な転写因子E2-2やIRF8の発現レベルが亢進していた。現在、他のDC前駆細胞との比較において新規DC前駆細胞の解析を進めている。

3. 免疫系による造血幹細胞恒常性制御の研究

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。大部分のHSCは休止状態にあるが、一部のHSCは緩やかに増殖しながら自己複製しつつ前駆細胞を生み出すという、非対称な分裂が行われていると考えられている（図1）。そして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つくられ造血が維持される。個体の造血が生涯保たれるためには、HSCが枯渇してしまわないように、その数を生涯保ち続ける必要があるが、これを可能にしているのがHSCに特有の自己複製という性質である。また、その大半が休止状態にあることもHSCの枯渇を防ぐ上で重要な要因である。一方、興味深いことにHSCにはI型IFN受容体やIFNシグナルを負に制御する転写因子IRF-2が発現しているが、I

型IFNシグナルのHSC自己複製・分化・機能発現などに及ぼす影響は不明であった。そして我々の研究により、I型IFNがHSCの運命決定制御に重要な役割を担うことが明らかになった（Nat Med 15, 696-700 (2009)）。

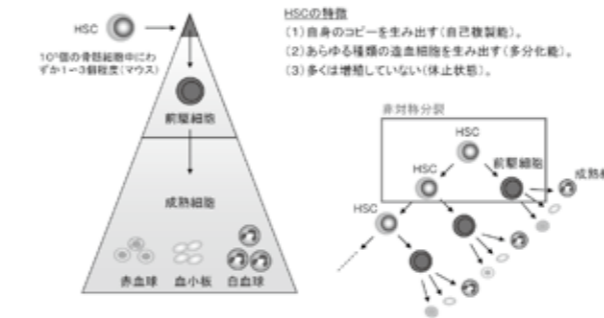


図1 HSCは一生涯にわたり造血を維持する。大部分のHSCは休止状態にあるが、一部のHSCは緩やかに増殖しながら自己複製しながら同時に前駆細胞を生み出す“非対称な分裂”が行われている。

1) HSCにIFNが作用するメカニズム

感染防御を担うサイトカインとしてよく知られているI型IFNが、HSCの運命決定に重大な影響を与えることが明らかになった。代表的なI型IFN誘導剤であるpoly I:CあるいはIFN α を野生型マウスに一回投与すると、HSCの増殖が誘導される。この場合、HSC数の大幅な増減はみられず、対照的に前駆細胞が増加した。すなわち、I型IFNがHSCに一過性に作用する場合には、休止状態にあるHSCが覚醒・増殖して、1つのHSCと1つの前駆細胞を生み出す非対称な分裂が促進されることが推測された。一方、野生型マウス骨髄細胞とI型IFN受容体欠損マウス骨髄細胞を1:1の割合で移入して作製した骨髄キメラマウスにpoly I:CあるいはIFN α を持続的に複数回投与すると、野生型マウス骨髄細胞由来HSCの有意な減少と同前駆細胞の増加が観察された。すなわち、I型IFNがHSCに慢性的に作用する場合には、非対称な分裂ではなく、専らHSCから前駆細胞への分化が促進されているものと考えられる（図2）。

さらに、細胞の増殖を抑制するサイクリン依存性キナーゼインヒビターであるp27^{Kip1}およびp57^{Kip2}の発現を検討した。その結果、IFN α で刺激されたHSCでは、未刺激HSCに比べ、それらの発現が有意に低下していた。すなわち、I型IFNの刺激は、サイクリン依存性キナーゼインヒビターの発現を抑制することによってHSCの増殖を誘導すると考えられた。HSCが自己複製能を維持するためにはトロンボポエチンがその受容体c-Mplを介してHSCに作用することが重要であると考えられている。そこで、c-Mplの発現を検討したところ、IFN α で刺激されたHSCでは、やはりc-Mplの発現が低下していた。持続性のIFN刺激は長時間におよぶc-Mpl発現低下に起因するHSCの自己複製能を誘導す

るのかもしれない。

通常、I型IFNは細胞表面の受容体に結合し、ISGF3複合体を介して様々な遺伝子の発現を誘導する。一方、IRF2は、ISGF3複合体の機能を競合的に阻害することで、IFNによる過剰な遺伝子発現を抑制している。IRF2欠損マウスでは、予想通り、HSC数の大幅な減少が観察され、それとは逆に前駆細胞数が増加していた。すなわち、過剰なI型IFNシグナルを持続的に受けているIRF2欠損マウスのHSC自己複製は著しく低下しており、前駆細胞への分化が促進されHSCが枯渇することが示唆された。

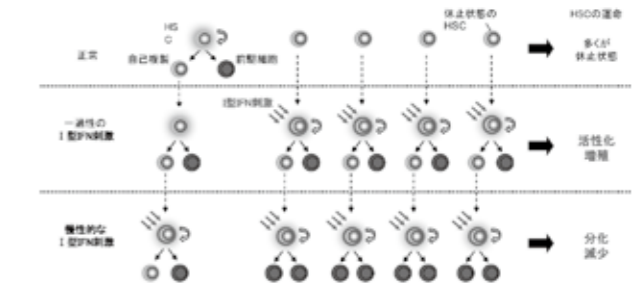


図2 造血幹細胞へのI型IFNの作用。I型IFNの一過性の刺激はHSCの増殖を、慢性的な刺激はHSC数の減少をもたらす。

2) 今後期待される疾患治療への応用

我々の研究成果から、新たにどのような研究の発展性、疾患の予防あるいは治療への応用が期待できるのだろうか。いくつかの具体例を挙げて可能性を述べてみたい。

ウイルス感染とHSC

冒頭でも述べたように、最も良く知られているI型IFNの機能は抗ウイルス作用である。ウイルス感染の際、免疫細胞由来のI型IFNは量的にも群を抜いており、免疫系由来のI型IFNがHSCに作用して、同細胞の増殖を促進する可能性がある。この現象は、造血系ホメオスターシスを維持するためのフィードバック機構として機能している可能性がある。さらにウイルス感染が慢性化しI型IFNの生産が持続すれば、そのような刺激に曝されたHSCは自己複製能を失い減少・枯渇してしまうかもしれない。I型IFN治療を長期に受けているC型肝炎患者で血小板や白血球減少が観察されるのも、同じ現象を観ているのかもしれない。

慢性骨髄性白血病（図3）

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、9番と22番染色体の相互転座によりフィラデルフィア染色体が生じ、分子レベルではBCR-ABL

融合遺伝子が形成される。HSCでこの異常が起ると、BCR-ABL融合蛋白質がチロシンキナーゼ活性を発揮することにより細胞増殖を促進、さらにアポトーシスを抑制することで白血球の増加を引き起こす。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、これらが正常なHSCによく似た性質をもつことから白血病幹細胞(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ですが、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。I型IFNが休止状態にあるLICの増殖を促すことが可能であれば、抗がん剤あるいは分子標的薬の併用治療がLICそのものを殺し再発率を下げる治療法として有効かもしれない。

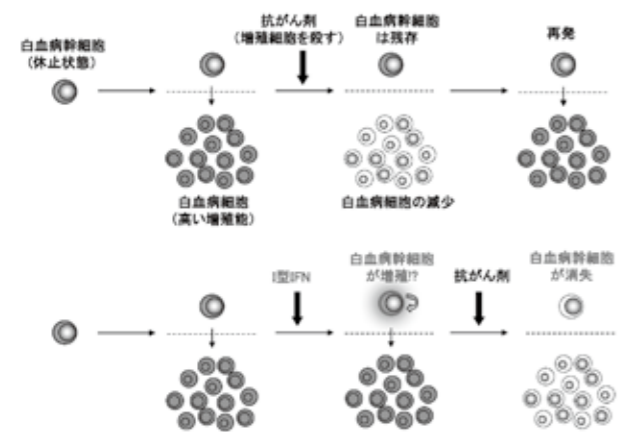


図3 白血病幹細胞を標的とした根治療法 (CML) I型IFNが休止状態にある白血病幹細胞の増殖を促すことが可能であれば、抗がん剤が白血病幹細胞を殺し再発率を下げる治療法として有効かもしれない。

骨髄移植

先天性免疫不全症などの遺伝病、白血病などの疾患はHSC移植(骨髄移植)により治療が可能である。HSC移植時には、レシピエントのHSCを排除しドナーのHSCを効率よく生着させるために、放射線照射、抗癌剤投与等の前処置を行うが、これら前処置は生殖機能不全、多臓器障害、2次的な発ガン、白内障など重篤な副作用を伴う場合がある。また、治療に伴うこれら副作用を考慮し、移植治療には年齢制限がもうけられているのが現状である。I型IFNが正常なHSCの細胞分裂をもたらすこと応用し、抗がん剤の効き目を向上させ、レシピエントのHSCを減少させることができれば、結果的に抗がん剤の減量にも繋がる可能性があり、より副作用の少ない安全な移植前治療の実現に結びつく可能性がある。

業績目録

原著

- 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 cells. *Blood in press*
- Asano J, Tada H, Onai N, Sato T, Horie Y, Fujimoto Y, Fukase K, Suzuki A, Mak TW, and Ohteki T. Nod-like receptor signaling enhances dendritic cell-mediated cross-priming *in vivo*. *J Immunol* 184,736-745 (2010)
- Yamada J, Hamuro J, Fukushima A, Ohteki T, Terai K, Iwakura Y, Yagita H, and Kinoshita S. MHC-matched corneal allograft rejection in an IFN- γ /IL-17-independent manner in C57BL/6 mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50, 2139-2146 (2009)
- Sato T, Onai N, Suda T, and Ohteki T. Interferon regulatory factor-2 protects haematopoietic stem cells from type-I interferon-dependent replicative exhaustion. *Nat Med* 15, 696-700 (2009)
- Tomita T, Kanai T, Totsuka T, Nemoto Y, Okamoto R, Tsuchiya K, Sakamoto N, Ohteki T, Hibi T, and Watanabe M. IL-7 is essential for lymphopenia-driven turnover of colitogenic CD4+ memory T cells in Chronic colitis. *Eur J Immunol* 39, 2737-2747 (2009)

総説・解説

- Tezuka H, and Ohteki T. A gas governing mucosal immunity. *Vaccine*, in press.
- Tezuka H, and Ohteki T. Regulation of intestinal homeostasis by dendritic cells. *Immunol Rev* 234, 247-258 (2010)
- 手塚裕之, 安倍由紀子, 梶木俊聡 消化管粘膜におけるIgA生産機構. *炎症と免疫* 17, 86-92 (2009)
- 手塚裕之, 安倍由紀子, 梶木俊聡 粘膜関連リンパ組織におけるT細胞非依存性IgAクラススイッチ誘導機構. *臨床免疫・アレルギー科* 52, 422-430 (2009)
- 梶木俊聡, 佐藤卓 眠れる造血幹細胞を目覚めさせるインターフェロン. *DENTAL DIAMOND* 34, 80-85 (2009)

国際学会招待講演

- Ohteki T. Regulation of mucosal IgA production by dendritic cells. The 2nd International Symposium of WPI-IFReC "Dynamics of Immune Responses", Osaka, February 13, 2009

国際学会発表

- Ohayagi H, Onai N, Guo Y-M, Takahashi N, Hirokawa M, Sawada K, Ohteki T. Prevention of hemophagocytosis by TNF- α and IL-6 blockade in TLR9- and Nod1-ligand induced hemophagocytic syndrome. 51th American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting. New Orleans, LA. 2009.12.5
- Onai N, Obata-Onai A, Schmid MA, Ohteki T, and Manz MG. Identification of clonogenic common plasmacytoid and dendritic cell progenitors (CDP) in mouse bone marrow. The 9th World Congress on Inflammation. Tokyo 2009.7.8

国内学会・研究会招待講演

- 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生産調節機構. 第28回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 福井 2010.2.18
- Sato T, Onai N, Yoshihara H, Arai F, Suda T, and Ohteki T. IRF-2 protects quiescent HSCs from type-I interferon-dependent exhaustion. 第32回日本分子生物学会年会 横浜 2009.12.10
- 梶木俊聡 インターフェロンによる造血幹細胞の運命決定制御. 第39回日本免疫学会テクニカルセミナー 大阪 2009.12.4
- 梶木俊聡 腸管粘膜免疫系に関する最近の知見. 第39回日本免疫学会 大阪 2009.12.4
- 梶木俊聡 粘膜関連リンパ組織におけるIgA生産誘導機構. 第59回日本アレルギー学会秋季学術大会 秋田 2009.10.29
- 梶木俊聡 IgA産生と粘膜免疫応答. 第13回日本ワクチン学会学術集会 札幌 2009.9.26
- 梶木俊聡 インターフェロンによる粘膜免疫系・造血系制御. 秋田消化管機能と免疫研究. 秋田 2009.9.18
- 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. 第15回箱根山ワークショップ 東京 2009.9.15
- 梶木俊聡 インターフェロンによる造血幹細胞制御. 第16回八幡平造血セミナー 盛岡 2009.9.5
- 梶木俊聡 樹状細胞によるIgA生産誘導のメカニズム. 第46回日本消化器免疫学会総会 松山 2009.7.23
- 梶木俊聡 インターフェロンによる粘膜免疫系・造血系制御. 日本ウイルス学会第6回ウイルス学キャンプ 湯河原 2009.6.29
- 梶木俊聡 樹状細胞によるIgA生産調節機構. 第74回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 京都 2009.6.26
- 梶木俊聡 Decision of HSC fate by type I interferon. ノバルティス秋田免疫セミナー 秋田 2009.6.25

国内学会発表

- Asano J, Tada H, Onai N, Sato T, and Ohteki T. Nod-like receptor signaling enhances dendritic cell-mediated cross-priming *in vivo*. 第39回日本免疫学会学術集会 大阪 2009.12.4
- Onai N, Oyagi H, Sawada K, and Ohteki T. Establishment of a model for murine hematopoietic syndrome by administration of CpG and Nod1 ligand. 第39回日本免疫学会学術集会 大阪 2009.12.4
- Yotsumoto S, Sato T, and Ohteki T. The role of IRF-3 in self-recognition by NK cells. 第39回日本免疫学会学術集会 大阪 2009.12.3
- Tezuka H, Abe Y, and Ohteki T. Critical role for type I IFNs in pDC-induced T cell-independent IgA production. 第39回日本免疫学会学術集会 大阪 2009.12.3
- Sato T, Onai N, and Ohteki T. Decision of HSC fate by type-I IFN signaling. 第39回日本免疫学会学術集会 大阪 2009.12.2
- 大八木 秀明, 小内 伸幸, 郭 永梅, 高橋直人, 廣川 誠, 澤田 賢一, 梶木 俊聡 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. 第3回グローバルCOE若手研究者シンポジウム 群馬 2009.11.10

- 大八木 秀明, 小内 伸幸, 郭 永梅, 高橋直人, 廣川 誠, 澤田 賢一, 梶木 俊聡 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. 日本血液学会東北地方会 福島 2009.9.12

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
小内伸幸, 手塚裕之: 秋田大学大学院医学系研究科非常勤講師

競争的研究費等の取得状況

- 梶木俊聡 (代表) 日本学術振興会科学研究費補助金 基盤研究 (A) 「I型IFNs依存性造血幹細胞統御による新規疾患治療法の創成」
- 梶木俊聡 (代表) 独立行政法人科学技術振興機構戦略的創造研究推進事業CREST「樹状細胞制御に基づく粘膜免疫疾患の克服」
- 梶木俊聡 (代表) 文部科学省科学研究費補助金 特定領域研究「自己と非自己の識別提示と制御」
- 梶木俊聡 (分担) グローバルCOEプログラム「生体調節シグナルの統合的研究」
- 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生産誘導機構の解明とIgA腎症治療への応用」
- 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」
- 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」

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. 不整脈性差医療の基礎研究

疾患罹患率・薬物に対する反応には男女間で差異があり、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。不整脈にも興味深い性差が存在し、QT延長関連不整脈は有意に高い頻度で女性に発症するが、そのメカニズムは不明である。性ホルモンには、古典的な“ゲノム作用 genomic action”に加えて、膜局在シグナル伝達系による“非ゲノム作用 non-genomic action”が存在する。本研究室では性ホルモン非ゲノム作用が心筋イオンチャネルの新たな制御機構であること、不整脈性差の一因となることを報告してきた。本年度の成果は下記である。

(1) 非ゲノム経路特異的性ホルモン受容体 (古川)

非ゲノム経路を担当する性ホルモン受容体の分子実態は未解明であり、議論の的となっている。本研究室では、N末端短縮型エストロゲン・アンドロゲン・プロゲステロン受容体が、細胞膜脂質ラフト/カベオラで性ホルモン非ゲノム経路のシグナル伝達分子と共局在することを報告している。また、血管内皮細胞ではN末端短縮型エストロゲン受容体ER46が非ゲノム経路を担当することが報告されている。そこで、全長型 (fAR)・N末端短縮型 (AR45) アンドロゲン受容体の特性を検討した。

ヒト心臓には、fAR はほとんど発現せず AR45 が優位に発現する。AR45 は fAR が使っているエクソン1の代わりに短いエクソン1b から開始し、ヒト・牛・犬・豚などの大動物で認められるスプライシング重型である。ラット・マウスなどではエクソン1b 中に停止コドンが存在するため AR45 は存在しない。すなわち、AR45 は進化的に発現が変化し、心臓で優位に発現する

スプライシング重型である。fAR と AR45 を発現させた細胞で、ARE (androgen responsive element) にルシフェラーゼを接続し Luc assay を行うと、テストステロンによる転写活性化は fAR 発現細胞で見られ、AR45 では見られない。一方、非ゲノム経路の下流シグナル ERK のリン酸化は fAR 発現細胞では見られず、AR45 発現細胞で見られる。すなわち、再構成系実験において、fAR はゲノム作用を示し、AR45 は非ゲノム作用を示すことが確認された。

fAR と AR45 の細胞膜における局在をスクロース密度勾配遠心後 Western blot 解析を行い検討した。私たちの実験では、細胞膜分画を 5% スクロース (分画1) から 35% スクロース (分画11) に分画したところ、脂質ラフト/カベオラのマーカーである caveolin, flotillin-1 は主に分画5に局在した。fAR・AR45 とも細胞質だけでなく細胞膜にも局在したが、fAR は脂質ラフト/カベオラより高密度分画に局在し、一方 AR45 は主に脂質ラフト/カベオラ分画に局在した。抗 AR45 抗体は2本の陽性バンドを示す。パルミトイル化阻害薬 2-bromopalmitate で処理すると高分子量バンドは消失し低分子量バンドのみとなり、それとともに脂質ラフト/カベオラ分画への局在が消失し、fAR 同様高密度分画に位置するようになった。また AR45 の N 末端にある10個の Cys を順次 Ser に置換すると、置換した数に依存して脂質ラフト/カベオラ分画への局在が減少した。以上から、パルミトイル化が AR45 の脂質ラフト/カベオラ分画への局在、ひいては非ゲノム経路シグナル分子との共局在をもたらしていることが明らかとなった。

(2) 性ホルモン非ゲノム経路と交感神経刺激のクロストーク (黒川、浅山、黒羽、古川)

性ホルモン非ゲノム作用では、L型Caチャネルは交感神経ベータ受容体刺激とのクロストークにより制御される。cAMPにより活性化された場合においてのみ、L型CaチャネルはNOによりsGC・cGMP依存的に抑制される。この性ホルモンによるL型Caチャネル抑制作用は、非選択的 phosphodiesterase (PDE) 阻害剤により消失するが、PKG阻害剤によっては影響を受けない。PDEの中ではPDE2選択的阻害剤により抑制され、PDE3選択的阻害剤では抑制されないことから、薬理学

的にはNO/sGC/cGMP依存的に活性化されたPDE2がcAMPを加水分解し、交感神経ベータ受容体刺激に拮抗したと示唆される。

これらの分子の細胞内局在を、スクロース密度勾配遠心法およびPLA (proximity ligation assay) 法 (トピックス) を用いて検討した。スクロース密度勾配遠心法では、PDE2は主に脂質ラフト/カベオラ分画 (分画5) に局在したのに対して、PDE3は細胞質および少量がより高密度の細胞膜分画に局在した。PLA法により、PDE2がL型Caチャネル α サブユニットCaV1.2と50nm以内の距離で相互作用することが示された。以上から、PDE2と脂質ラフト/カベオラで複合体を形成するL型Caチャネルが、性ホルモン非ゲノム経路に関与するものと考えられた。

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、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9SNPsとボーダーラインの10SNPs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9SNPsとボーダーラインの82SNPs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。そこでこのハプロブロックのシークエンスを24サンプル、48アリルで行ったところ、100以上のSNPsが存在した。このうち上記のタグSNPsと連鎖不平衡にあるSNPsを再度コントロール・ケースでタイピングを行い、最も有意水準の高い機能的SNPを決定した。

(東京大学医科学研究所中村祐輔博士、理化学研究所

田中敏博博士との共同研究)

(2) 心房細動初期過程に関わる炎症・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。そこで本年度は、複数の環境因子が炎症性細胞のマクロファージを動員するメカニズムを主にin vitro実験系で検討した。

心房細動で、心エコー所見で最も高頻度に同定されるのが心房の伸展である。そこで、心房筋に20%の伸展を加えると、Boyden chamberを用いて調べたマクロファージ遊走が亢進していた (図1)。そこで心房から分泌される液性因子に関して検討すると、心房筋伸展によりATPが分泌されること、ATP分解酵素apyrase、ATP分泌阻害薬、P2Y受容体阻害薬で前処置すると伸展刺激によるマクロファージ遊走が消失した。以上から、ATPによるパラクライン作用が心房へのマクロファージ遊走に関与することが明らかとなった。

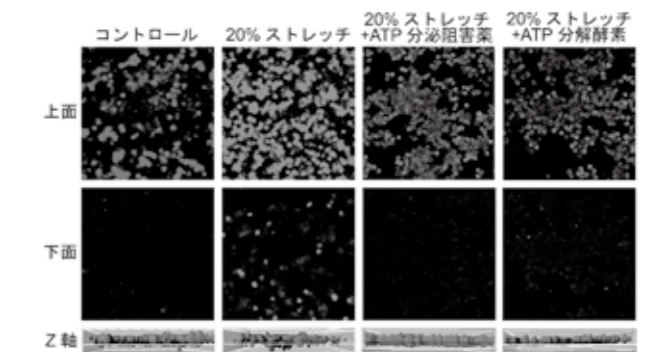


図1 心房筋ストレッチによるマクロファージ遊走
Boyden chamberの上面にマクロファージ、下面に心房筋を培養すると、心房筋の20%伸展によりマクロファージの下面への遊走が惹起された。この遊走は、ATP分泌阻害薬やATP分解酵素で抑制された。

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。本研究室では下記のテーマで心室頻拍・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、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。笹野は留学中に、in vitro実験系でNOS1APとQT間隔の関係を検討した。NOS1APをモルモット心室筋に過剰

発現すると、L型Caチャンネルを抑制しQT間隔が延長すること、この作用がNOS1由来のNOに依存することを報告している。そこで本年度は、NOS1AP KOマウスを用いてin vivoにおける解析を行った。

NOS1AP KOマウスでは、野生型マウスに比べてQT間隔が延長し、Langendorff還流下にoptical mapping法で記録した活動電位幅(APD)は延長しており、これらの作用はNOS1AP阻害薬投与により元に戻った。不整脈誘発刺激として、交感神経刺激、Kチャンネルブロッカーなどでは不整脈誘発率にKOマウスと野生型マウスで差を認めなかったが、電気刺激によりKOマウスでは伝導ブロックと心室頻拍の誘発率が有意に高いことが明らかとなった(図2)。同マウスは、心臓突然死の予防・治療戦略の確立に貢献することが期待される。

(国立国際医療センター加藤規弘博士との共同研究)

(2) ブルガダ症候群様マウスモデル (笹野、古川)

ブルガダ症候群は、東アジアで多く見られる家族性突然死症候群であり、壮年期男性で夜間突然死をきたし、日本では従来“ボックリ病”と呼ばれてきた。一部(15-20%)の症例で心筋Naチャンネル遺伝子(SCN5A)に変異が同定されているが、残りの多くの症例では原因が充分解明されていない。また、ブルガダ症候群の表現型に類似した動物モデルが存在しないため、その病態発現機構の解析は極めて不十分である。今回、心臓で局所的に発現するNaチャンネルの転写因子のKOマウスを作成したところ、ブルガダ症候群様表現型を示すマウスが得られた。

ブルガダ症候群では、脚ブロックと右側胸部誘導で特

徴的ST上昇(coved type・saddle-back type)を呈することを特徴とする。Naチャンネル転写因子のKOマウスでは、体表面心電図で脚ブロック様心電図とST上昇が記録された。また、Langendorff還流下に行った電気刺激により、野生型マウスでは観察されなかった刺激により心室性・心房性不整脈の誘発を認めた。同マウスは、初めてのブルガダ症候群表現型を極めて良く再現するマウスモデルであると考えられ、難治性不整脈疾患ブルガダ症候群の病態解明、予防・治療戦略の確立に貢献することが期待される。

(浜松医大三浦直行博士との共同研究)

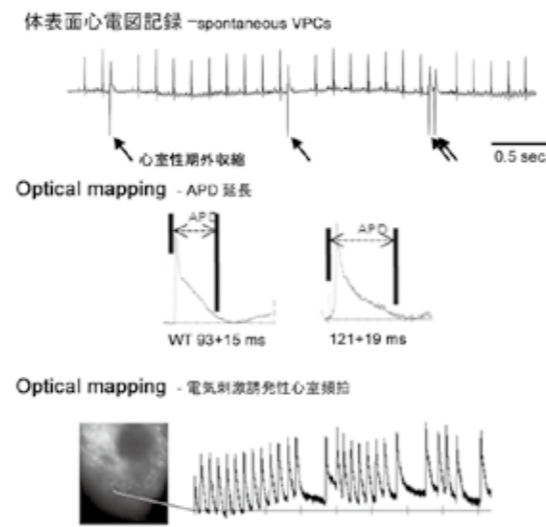


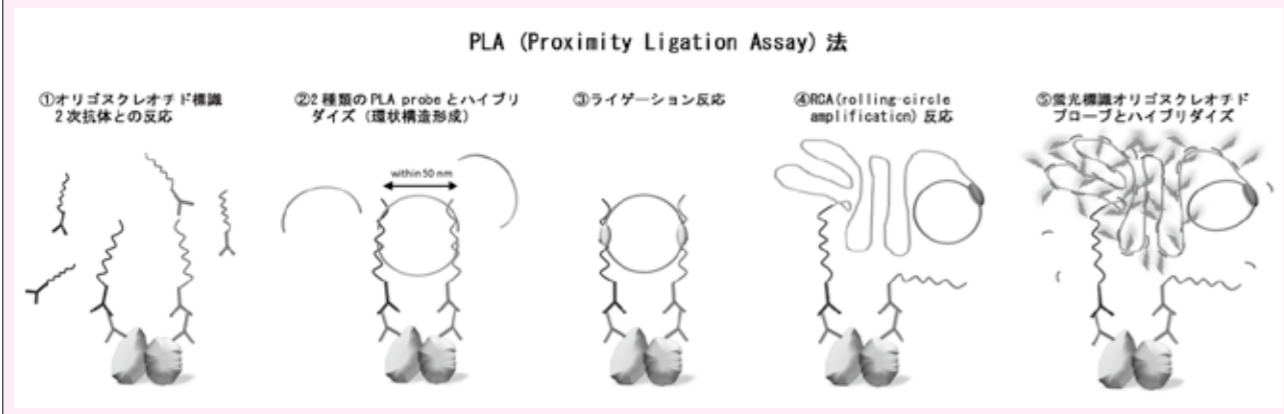
図2 NOS1AP KOマウスの機能解析
 上段：体表面心電図で、頻回に記録されたspontaneous VPCs。
 中段：Optical mapping法で記録したAPDの延長。
 下段：電気刺激で誘発された心室頻拍。

ハイライト

トピックス：PLA (Proximity Ligation Assay) 法

PLA法はOlink Bioscience社が開発したタンパク質間の近接性を検出する免疫細胞・組織染色システムです。オリゴヌクレオチド修飾を施した2次抗体を用い(パネル①)、これにPLA probeがハイブリダイズすることにより直径約50nmの環状構造が形成される

(パネル②)。ライゲーション後(パネル③)、増幅反応RCA(rolling-circle amplification)反応でシグナルを増幅し(パネル④)、蛍光標識オリゴヌクレオチドプローブとハイブリダイズすることにより50nm以内に近接するタンパク質間の相互作用を感度良く検出できるシステムです(パネル⑤)。



人事異動

転入：松原清二(本学循環制御内科学大学院)、平野景子(順天堂大学医学部大学院)、李敏(大学院)、梁美艶(技能補佐員)
 異動：江花有亮(特任助教から助教)
 転出：貝原麻美(助教)、上嶋徳久(大学院)、前田貴志(大学院)、中島崇行(大学院)、角坂祥子(共立薬科大学大学院)、金成光夏(技能補佐員)

業績目録

原著論文

発表論文

- 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, in press.
- Kaihara A, Sunami A, Kurokawa J, Furukawa T. (2009) A genetically encoded bioluminescent indicator for the sodium channel activity in living cells. *J Am Chem Soc*, 131, 41388-4189.
- Kakusaka S, Asayama M, Kaihara A, Sasano T, Suzuki T, Kurokawa J, Furukawa T. (2009) A receptor-independent effect of estrone sulfate on the hERG channel. *J Pharmacol Sci*, 109, 152-156.
- Asada K, Kurokawa J, Furukawa T. (2009) Redox- and calmodulin-dependent S-nitrosylation of the KCNQ1 channel. *J Biol Chem*, 284, 6014-6020.
- Kurokawa J, Bankston JR, Kaihara A, Chen L, Furukawa T & Kass RS. (2009) KCNE variants reveal a critical role of the beta subunit carboxyl terminus in PKA-dependent regulation of the IKs potassium channel. *Channels*, 3, 16-24.
- Sasano T, Kelemen K, Greener ID, Donahue JK. (2009) Ventricular tachycardia from the healed myocardial infarction scar: validation of an animal model and utility of gene therapy. *Heart Rhythm* 6, S91-7.
- Lautamaki R, Schuleri KH, Sasano T, Javadi MS, Youssef A, Merrill J, Nekolla SG, Abraham MR, Lardo AC, Bengel FM. (2009) Integration of Infarct Size, Tissue Perfusion and Metabolism by Hybrid Cardiac PET-CT? Evaluation in a Porcine Model of Myocardial Infarction. *Circulation Cardiovascular Imaging* 2, 299-305.
- Johnston PV, Sasano T (contributed equally), Mills K, Evers R, Lee ST, Smith RR, Lardo AC, Steenbergen C, Gerstenblith G, Lange R, Marb?n E. (2009) Engraftment, differentiation and functional benefits of autologous cardiomyocytes in porcine ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 120, 1075-83.

学会

- Kurobane E, Kurokawa J, Suzuki T & Furukawa T (2009). PDE2 involves in a non-genomic regulation of cardiac L-type calcium currents. 第36回IUPS2009, 京都, *J Physiol Sci*, 59, 126P. (July28, 2009)
- Kurokawa J, Asada K, Furukawa T (2009). Targeted S-nitrosylation of the KCNQ1 channel in the heart. 第36回IUPS2009, 京都, *J Physiol Sci*, 59, 127P. (July28, 2009)
- Kurokawa J, Tamagawa M, Harada N, Honda S, Bai CX, Nakaya H, Furukawa T (2009). Effects of estrogen on the IKr channel and cardiac repolarization. 第53回国生生物物理学会,

ポストン, *BIOPHYS J* 92: 172A

- Sasano T, Chang KC, Youssef A, Abd-Elmoniem KZ, Vonken E, Mills KJ, Osman NF, Stuber M, Halperin H, Calkins H, Abraham MR, Marb?n E. Identification of Substrate of Ventricular Tachycardia by Regional Strain MR Imaging in Infarct Porcine Heart. 2009 Gordon Research Conference, Cardiac arrhythmia Mechanisms, Lucca, Italy
- Furukawa T, Kurokawa J. Nitrosative and oxidative regulation of cardiac potassium currents. 2009 Gordon Research Conference, Cardiac arrhythmia Mechanisms, Lucca, Italy
- Kurobane E, Kurokawa J, Suzuki T & Furukawa T. (2009). Involvement of PDE2 in the inhibitory effect of progesterone on cAMP-stimulated cardiac L-type Ca²⁺ currents. 82回日本薬理学会年会, 横浜, *J Pharmacol Sci*, 109, 138P.
- Kurokawa J, Kaihara A, Furukawa T (2009). The C-terminus region of KCNE1 is essential for PKA-dependent functional regulation of the IKs channel. 82回日本薬理学会年会, 横浜, *J Pharmacol Sci*, 109, 139P.
- 笹野哲郎, 古川哲史, 磯部光章 Optimization of Intracoronary Cell Infusion Protocol to Maximize Early Engraftment of Cells without Thromboembolic Complications. 第73回日本循環器学会 大阪 平成21年3月
- 笹野哲郎, Eduardo Marb?n, 古川哲史 ブタ心筋梗塞モデルに対するCadiosphere-derived cellを用いた細胞治療-経冠動脈の投与の至適条件検討と細胞治療による心機能・不整脈源性の評価-第26回日本心電学会学術集会 京都 平成21年7月
- 笹野哲郎, Shuo-Tsan Lee, Eduardo Marb?n, 古川哲史 ブタ心筋梗塞モデルを用いた、Ischemic postconditioningの不整脈抑制作用の検討-再灌流不整脈と慢性期心室性不整脈に対する抑制効果-第26回日本心電学会学術集会 京都 平成21年7月
- 貝原麻美, 角南明彦, 笹野哲郎, 古川哲史. Na⁺チャンネル可視化プローブと薬物スクリーニング系の作製. 第26回日本心電学会学術集会 京都 平成21年7月

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講義(心臓生理学)
 筑波大学医学部循環器内科講義(不整脈の基礎)
 岡山大学医学部循環器内科講義(不整脈の基礎)
 心電学会医学部生のための心電図読解サマーセミナー
 黒川洵子：慶応義塾大学薬学部講義
 古川哲史・黒川洵子：東京医科歯科大学医学部薬理学選択実習
 古川哲史・黒川洵子：東京医科歯科大学医学部フリースタッフ学生指導

競争的研究費

- 黒川洵子(代表)：文部科学省科学研究費補助金 若手研究A「不整脈トリガー間クレストークの機能的・計算科学的アプローチによる統合的解析」
- 古川哲史(代表)：文部科学省科学研究費補助金 特定領域研究「心血管特異的のトランスポートソーム：分子機構から病態発現まで」
- 貝原麻美(代表)：文部科学省科学研究費補助

- 若手研究B「生物発光を用いたナトリウムチャンネルin vivo可視化検出プローブの開発」
- 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」
- 笹野哲郎(代表)：文部科学省科学研究費補助金 スタートアップ「心房細動における炎症の関与-マクロファージの役割に関する検討と治療標的の検索」
- 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)」
- 古川哲史(代表)：車両財団研究助成事業(分担研究)
- 黒川洵子(代表)：内藤記念科学振興財団「致死性不整脈を誘発するQT延長毒性に対する女性ホルモンの影響」
- 笹野哲郎(代表)：日本心臓血管研究振興会 榊原記念研究助成金「心房細動における新たな炎症メカニズムの解明」
- 笹野哲郎(代表)：日本心臓財団・ノバルティス循環器分子細胞研究助成「ATPのオートクライン/パラクライン作用による心房線維化誘導機序の検討」
- 笹野哲郎(代表)：持田記念医学薬学振興財団「心臓突然死に関与する新しい分子NOS1apの機能解析」

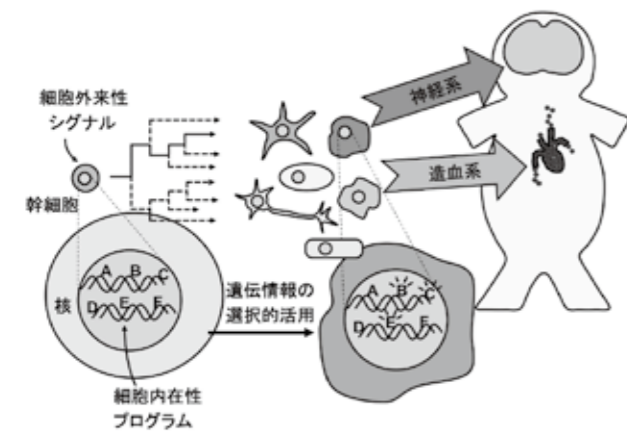
難治疾患研究所 先端分子医学研究部門 幹細胞制御分野

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。ここ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(図1)。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な理解ならびに、医療応用への糸口となるよう研究を推進し

図1 中枢神経系と血液系をモデルにして、遺伝子情報の選択的活用の観点から、幹細胞の分化制御機構を明らかにする。



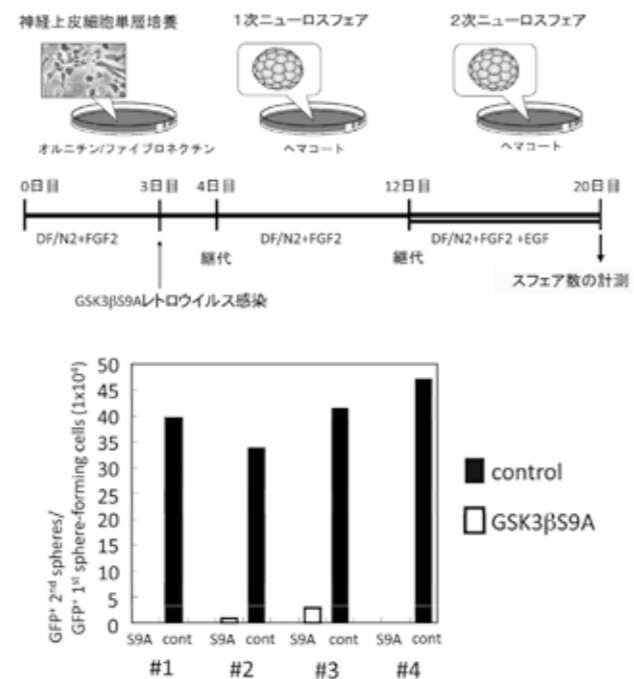
ている。

研究紹介

1. 神経幹細胞運の自己複製の分子基盤解明に関する研究

中枢神経系の構築機構の全容を理解する上で、その構築が盛んに行われる胎生期において神経幹細胞がどのような分子基盤に基づいて運命決定を受けるのかを明らかにすることは、解決すべき重要なポイントのひとつといえる。本研究は特に、神経幹細胞が枯渇することなく、ニューロンおよびグリアを生み出す性質を保持したまま増え続ける「自己複製」の仕組みを明らかにすることを目的に実施された。神経幹細胞が自己複製する際には、増殖が促進される仕組みと分化が抑制される仕組みの双方が連携していることが重要と考えられる。神経幹細胞のin vitroにおける培養時に fibroblast growth factor 2 (FGF2) が広く用いられることを背景に、神経幹細胞において FGF2 の下流のシグナル伝達経路のコンポーネントのいずれかから、ニューロンやグリアの分化を抑

図2 恒常活性化型 GSK3beta 強制発現による神経幹細胞の未分化性維持機構の崩壊



制するシグナルが派生すると想定して取り組むことにした。

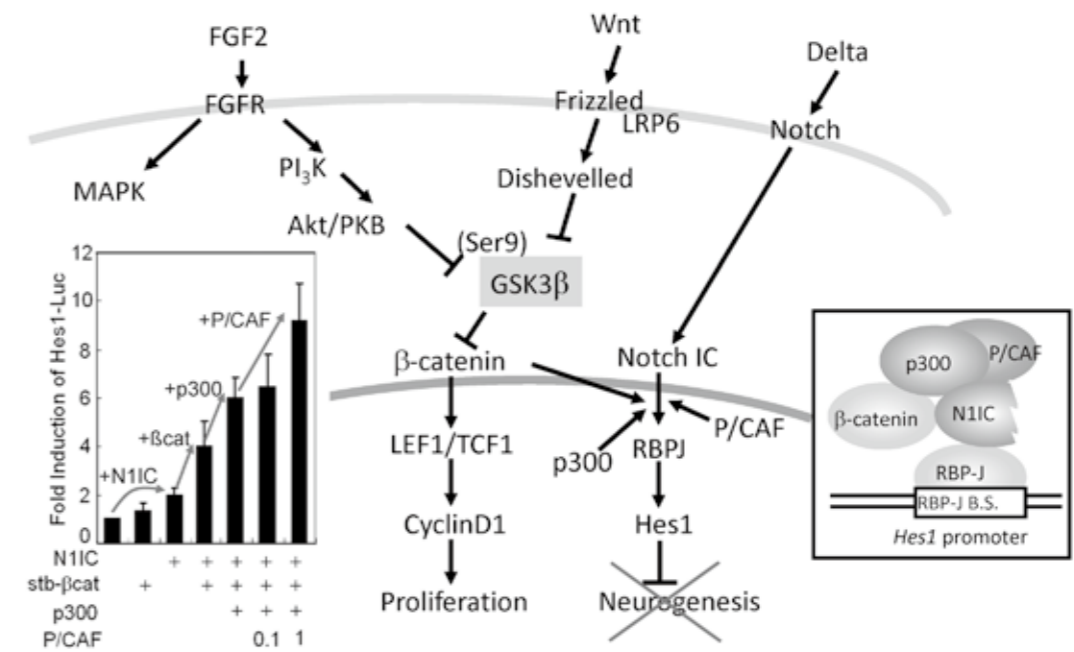
当分野では、神経幹細胞において FGF2、Wnt、Notch のシグナルが相互作用し、前2者のシグナルは、GSK3beta の不活化を経た beta-catenin の核内蓄積量により、cyclin D1 発現誘導を経て増殖促進性に働き(図2)、その一方で、beta-catenin は Notch シグナルの増強によるニューロン分化抑制性に働くことで、自己複製に寄与することを明らかにした(図3)。さらに、FGF2/ Wnt シグナルがアストロサイト分化を抑制する機構について解析を進めた。GSK3beta/beta-catenin 経路のひとつの標的遺伝子産物である cyclin D1 が細胞周期促進作用とは別に GFAP 陽性アストロサイトの分化を抑制することを確認した。その分子機構として、cyclin D1 が STAT3 と p300 の結合を阻害することを見出した。また、cyclin D1 が LIF、BMP2 誘導性のアストロサイト特異的遺伝子 *gfap* のプロモーター活性を抑制することも確認した。これらの結果とこれまでの成果を総合することで、神経幹細胞の自己複製を維持する機構の一端が説明可能となった点で、本研究は意義深い。

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

個体発生における器官形成過程では、組織・器官特異的幹細胞の秩序だった制御が重要である。その制御機構は増殖分化因子群や接着因子群等を介した細胞外来性シグナルと細胞内在性プログラムが深く関わっている。外来のシグナルは細胞表面受容体から核内転写因子に至る経路で伝えられ、転写活性の制御を経て遺伝情報発現プ

ロファイルの変化を導く。また、核内転写調節因子群の存在形態あるいはクロマチン動態に基づいた遺伝情報発現プロファイルの制御は、言わば細胞内在性プログラムと捉えることが出来る。それらの仕組みのいずれもが幹細胞の分化制御を規定する。当研究室のプロジェクトのひとつとして中枢神経系構築機構の解明を進めているが、その際にも、このような仕組みを念頭に置いた神経幹細胞の運命決定機構への取り組みが必要である。この点で、考慮すべき興味深い現象として、胎生の進行に伴ってニューロン分化優位の状況からグリア分化優位の状況に変化する「分化のプリファレンス遷移」がある。それは、ニューロンとアストロサイトは中枢神経系を構成する主要な細胞であり、これらの細胞は神経幹細胞と呼ばれる共通の前駆細胞から誕生するものの、神経幹細胞は発生初期には主にニューロンを生み出し、続いてアストロサイトを生み出すということである。本研究で、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、これら2つの因子は神経幹細胞の分化の指向性において異なる効果が有ることを示した。すなわち、神経幹細胞を EGF で1日間培養したのちにこの因子を除くことにより自発的分化を促すと、アストログリアの出現が顕著に見られるが、FGF2 で1日間培養したのちに FGF2 除去で自発的分化を促しても、そのようにはならなかった。この結果は、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を解明する上で重要な手掛かりを与えるものであり、今後さらに解明を進める予定である。

図3 FGF2・Wnt・Notch シグナリングの相互作用による神経幹細胞自己複製の分子機構



3. 中枢神経系におけるグリア亜集団細胞系譜の発生源解明に関する研究

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。我々は「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ロバストな理解に挑戦している。すなわち、胎生期の神経上皮細胞はBMPやShhなどモルフォゲンにより領域化され、それぞれから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はよく知られている。この領域化はニューロンとグリア細胞系譜の分岐以前に形成されるので、ニューロン同様にアストロサイトも由来領域の違いで機能も異なるのではないかと予想した。我々は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目的でグリア線維性酸性タンパク質 (GFAP) 遺伝子座に Cre-loxP レポーター合成遺伝子 (loxP-nlacZ-loxP-GAP43GFP) を挿入した遺伝子改変マウスを作製した。Emx1/cre ノックインマウス (Iwasato and Itohara により作製) との交配により、大脳皮質領域のEmx1 陽性神経上皮細胞に由来するアストロサイトを極めて高い効率で識別することに成功した。これにより今後の本研究の円滑な展開が期待される。

4. 中枢神経系の機能的構築におけるエピジェネティック制御の関与に関する研究

我々は神経幹細胞の分化制御において、増殖分化因子群や接着因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制御に代表される細胞内在性プログラムが深く関わっていることを示してきた。このことは、中枢神経系の機能的構築におけるエピジェネティック制御の重要性を示唆しているが、個体における中枢神経系の機能的構築への関与については未解明である。本研究では、扁平上皮癌において遺伝子増幅が見られる遺伝子として当研究所の稲澤教授らにより見出された *gascl* の変異マウスの解析に着手した。その理由は、この遺伝子産物が、ヒストン H3 の 9 番目のリジンの脱メチル化酵素であり、本研究による準備研究で脳内での発現が確認されたためである。稲澤教授から供与された変異マウスは同遺伝子への外来遺伝子の挿入変異を有しており、本年実施した研究により、ホモ接合体において *Gascl* 発現の著明な減弱を来たしていることがわかった。外来遺伝子に含まれる *LacZ* 遺伝子発現解析の結果、胎生期神経幹細胞ニューロンの成熟に伴い発現量が増加する知見を

得た。ヒストンメチル化修飾の変化が脳機能構築に与える影響を詳細な解析を、マウス行動解析により実施している。

5. 翻訳後修飾を指標にしたマウス神経幹細胞の分化の運命づけを司る核内分子の探索

神経幹細胞は自己複製能をもつと同時にさまざまな分化制御を受けながらニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトを作り出す能力を有する。神経幹細胞の未分化性維持や分化誘導の分子機構を明らかにすることは、脳の発生の基本的メカニズムの解明に寄与するとともに、神経疾患の新しい治療法開発の手掛かりとなることが期待される。これまで遺伝子発現プロファイリングによるアプローチで神経幹細胞の分化制御を司る仕組みについての知見は出つつも全容解明には至っていない。その理由の一つとして、分化・未分化の制御機構が、これまで深く探索されてこなかった蛋白質翻訳後修飾（リン酸化、分解、核移行など）により行われている可能性が挙げられる。本研究では、神経幹細胞の分化の運命づけに転写因子やクロマチン修飾因子を含む蛋白質の翻訳後修飾が関わっていると仮定し、2D-DIGE 法を含む最新のプロテオミクスの手法を取り入れた核蛋白質の解析を行った。胎生 14 日目のマウス終脳から単離した神経上皮細胞を単層培養する際に、神経幹細胞の自己複製にはたらく線維芽細胞増殖因子 (FGF2) を添加して神経幹細胞を得た神経幹細胞の培養系から FGF2 の除去と再添加を行った後、核蛋白質を分画し、異なる蛍光標識を施して 2D-DIGE を行い、画像プロファイルを比較定量解析した。その結果、pH3-11, 24 x 20cm のゲルで検出された 4095 個の核蛋白質スポットのうち FGF2 刺激により量が変化した 18 個のスポットを認めた。ProQDiamond で染色した結果、18 個中 11 個はリン酸化蛋白質であった。これらの蛋白質スポットは nanoLC-QQTOF MS により同定され、核移行やクロマチン修飾、あるいは転写調節など核内動態に関与する因子を含んでいた。これらの結果は、プロテオミクスの手法は神経幹細胞の運命決定を調節する仕組みを解明する方法として有効であることを示唆しており、同定された分子の機能解析を行っている。

6. 癌幹細胞の特性解明に関する研究

1980 年以降、日本人の死亡原因の第 1 位は悪性新生物（癌）であり、未だ増加の一途をたどっている。しかし、正常幹細胞研究の著しい進展による後押しで再燃した癌幹細胞 (cancer stem cell) のコンセプトは、これまでの癌研究の問題点を指摘すると同時に、癌が根治する可能性を期待させる。癌塊中に微量に存在する癌幹細胞

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階層状の分裂様式を示し、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。加えて、癌幹細胞は化学療法や放射線治療などに抵抗性を示すことから再発への関与が示唆されており、癌病態の解明と根治へ向けた重要な研究対象としてその性状解明が早急に求められている。本研究では癌幹細胞制御の分子基盤確立へ向け、足がかりとなる 2 つのアプローチを実施した。ひとつは、いくつかの癌において、癌幹細胞は膜蛋白質 CD133 の発現を指標に濃縮されるという点に着目したアプローチであり、エピジェネティックな調節を含めた CD133 遺伝子の転写制御機構の解析を行った。もうひとつのアプローチは、幹細胞の自己複製を制御する特別な微小環境（ニッチ）の概念に基づくものであり、癌幹細胞ニッチ療法の可能性に取り組む研究である。細胞内在性プログラムと外来性シグナルを含めた癌細胞社会の包括的な理解が、理想的な分子標的の特定につながるものと期待している。本研究により、癌幹細胞が自ら一部分化して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可能性を示唆するデータを得たことから、その分子基盤の解明により理想的な分子標的の特定を今後目指すことにしている。

7. 胎生期の造血組織における造血幹細胞の特性解明に関する研究

当研究分野におけるプロジェクトの一つの柱である造血幹細胞の特性解明については、胎生期のマウスにおける造血組織に焦点を当てた。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、たとえば、成体型造血幹細胞は、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。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。胎盤における造血幹細胞の存在はいくつかの報告があるが、その表面マーカーなどの詳しい特性は未解決である。本研究では、前年に着手した胎盤における造血幹細胞の性状に関する研究を展開させた。胎生 10.5 日目から 15.5 日まで 1 日ごとのマウス胎盤について、OP9 ストローマ細胞上での敷石状コロニー形成能および半固形培地におけるコロニー形成能を指標に造血活性を解析したところ、調べたいずれの胎生時期においても、CD45 陽性かつ c-Kit 陽性の細胞集団に造血活性が認められた。CD45 陽性 c-Kit 陰性細胞集団、CD45 陰性 c-Kit 陽性細胞集団、CD45 陰性 c-Kit 陰性細胞集団には造血活性は殆ど検出されなかった。また、成体造血幹細胞が濃縮される細胞

集団として知られている Hoechst33342 色素排出性の SP 細胞集団は、CD45 陽性 c-Kit 陽性細胞集団中に最も高い割合で観察された。胎盤は胎児側組織と母体側組織が入り組んでいるが、GFP トランスジェニックマウスの利用により、胎児由来細胞を GFP 標識することを今年度可能にした。これにより幹細胞ニッチの探索に来年度展開させる糸口を得た。

研究業績
原著論文
1. Fukushima M, Setoguchi T, Komiya S, Tanihara H, Taga T. Retinal astrocyte differentiation mediated by leukemia inhibitory factor in co-operation with bone morphogenetic protein 2. <i>Int J Dev Neurosci</i> . 27:685-690, 2009
2. Namihira M, Kohyama J, Semi K, Sanosaka T, Deneen B, Taga T, Nakashima K. Committed neuronal precursors confer astrocytic potential on residual neural precursor cells. <i>Dev Cell</i> 16:245-255, 2009.
著書
1. 田賀哲也, 鹿川哲史, 清水健史, 福田信治 「神経系の分化、形成、再生」 分子生物学イラストレイテッド改訂第 3 版 田村隆明・山本雅編集 羊土社 (東京) Page 269-275, 2009 <総説>
2. 田賀 哲也 中枢神経系の細胞系譜制御をつかさどる分子基盤. 蛋白質核酸酵素 53: 338-342, 2008.

学会発表

- Tetsuya Taga. Signaling in neural stem cells. The Course on Embryonic Stem (ES) Cells as a Model System for Embryonic Development. Sao Paulo, February 6-19, 2009 (lecture)
- Tetsuya Taga. Signaling networks regulating neural stem cell fate. Latin American Stem Cell Symposium. Sao Paulo, February 16-18, 2009 (symposium presentation)
- Tetsuya Taga. Signaling pathways governing maintenance and fate decision of neural stem cells, Symposium "Molecular and cellular basis for neurogenesis and circuit formation", The 42nd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, Niigata, May 31, 2009 (symposium presentation; symposium co-organizer)
- Tetsushi Kagawa, Takeshi Shimizu, and Tetsuya Taga. Studies on FGF2 Signaling in Neural Precursor Cells. Myelin Development, Function and Related Diseases: 9th Biennial Satellite Meeting of International Society for Neurochemistry on Myelin Biology. Gyeongju, Korea, August 19-23, 2009 (oral presentation)
- Tetsuya Taga. Coordinate regulation of stem cell growth and differentiation by transcriptional regulatory networks, 2009 Cancer Stem Cell Symposium "Stem cells and novel hallmarks of carcinogenesis for the management of cancer", Seoul, Korea, November 9-10, 2009 (symposium presentation)
- Ahmed Ramadan, Ikuo Nobuhisa, Shoutarou Yamasaki, and Tetsuya Taga. Characterization of cells that have hematopoietic activity in the placenta of mouse embryo. The 39th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. Osaka, December 2, 2009 (oral presentation)

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 遺伝子変異に伴う精神発達遅滞の新たな治療薬候補を同定した（神経病理学）
- ハンチントン病の新たな病態関連分子として DNA 修復因子 Ku70 を発見した（神経病理学）
- マウス胎仔肝への肝前駆細胞の ex utero 移植法を確立し、ES 細胞由来肝芽細胞の本法による移植・生着と分化・増殖を明らかにした（病態生化学）
- DNA 損傷薬剤カンプトテシンによる DNA 依存性プロテインキナーゼの活性化が、プロテアソーム阻害によって抑制されることを発見した（病態生化学）
- 細胞内構成物の処理機構であるオートファジーの新たなメカニズムを発見した（病態細胞生物学）
- オートファジー細胞死に JNK が関与している事を見出した（病態細胞生物学）
- メダカを用いて腸管から肝臓が発生する仕組みを解明した（発生再生生物学）
- 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成功した（発生再生生物学）
- 白髪の発症メカニズムを明らかにした（幹細胞医学）
- 色素幹細胞の維持に TGF- β シグナルが必須であることを明らかにした（幹細胞医学）
- IgG 陽性記憶 B 細胞での免疫応答亢進のメカニズムを解明した（免疫疾患）
- CD22 に高親和性に結合し B 細胞の機能を制御する合成糖鎖を開発した（岐阜大学木曾研究室との共同研究）（免疫疾患）
- 拡張型心筋症の病因となる ZASP 変異は、糖代謝に関わる PGM1 が代謝ストレスに応じて Z 帯に局在することを障害することを明らかにした（分子病態）
- TRIM5 α の希な多型を複数同定し、それらが HIV-1 感染への感受性あるいは抵抗性を示すことを細胞生物学的、遺伝疫学的に証明した（分子病態）
- ヒト造血幹細胞幹細胞移植 NOG マウスを使用した EBV 感染モデルマウスを利用し、EBV 関連疾患に対する新規薬剤の開発を進めている。（ウイルス治療）
- 数十種類のウイルス、細菌、原虫などを同時定量できる新しい網羅的病原微生物検査系を開発し、実用化を目指している。（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) - 3) にそれぞれ成果が得られた。

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

私たちの研究室が取り組んでいるポリグルタミン病は、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り、異常タンパクの産生、凝集体形成、神経細胞死に至る基本的な病態を他の変性疾患と共有している。ポリグルタミン病はこれまでに 9 種類が知られており、それぞれの原因遺伝子は異なるが、いずれのタンパクもポリグルタミン配列を持っている。ハンチントン病と脊髄小脳変性症 1 型の疾患モデル（モデルマウスおよび細胞モデル）においては、それぞれの原因タンパクであるハンチンチン、アタキシン 1 の核移行が細胞毒性発揮の上で大きな役割を果たしていることが知られている。

私たちは、疾患タンパクの核移行によって如何なる核機能障害が誘導されるかを研究してきた。その結果、核移行したハンチンチン、アタキシン 1 が共通して HMGB タンパクと結合し、その量を減少させ、HMGB の基本的機能である転写ならびに DNA 損傷修復に影響を与えることを発見した (Qi et al., Nature Cell Biology 2007)。HMGB タンパクの病態分子としての同定は、プロテオーム解析によるものであったが、タンパク量変化の起こらない病態分子については見落としの可能性があった。そこで、別な網羅的解析手法であるインタラクトーム（タンパク間結合網羅的情報）を用いて、さらに DNA 損傷修復異常に関与する病態分子の探索を進めた。

その結果、DNA 二重鎖切断修復の non-homologous end joining 際に機能する Ku70 と変異ハンチンチンが結合し、Ku70 の機能障害を通じて、DNA 損傷蓄積につなが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 DNA 二重鎖切断修復は 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、DNA 二重鎖切断部位を 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。変異ハンチンチンタンパク質は 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 (Enokido et al. JCB 2010 in press)。

興味深い事に、約 15 年前に当研究所の寺岡弘文教授により HMGB1/2 タンパク質が DNA-PK のリン酸化を促進することが報告されている (Watanabe F, Shirakawa H, Yoshida M, Tsukada K, Teraoka H. Stimulation of DNA-dependent protein kinase activity by high mobility group proteins 1 and 2. Biochem Biophys Res Commun. 1994 202:736-742.)。この先達の知見を考え合わせると、わたしたちの 2 つの結果は、HMGB-DNA-PK 系のなんらかの機能不全が神経変性に関わりを持つ可能性が高いことを示唆している。今後、その詳細を調べるとともに、治療への応用を考えていきたい。

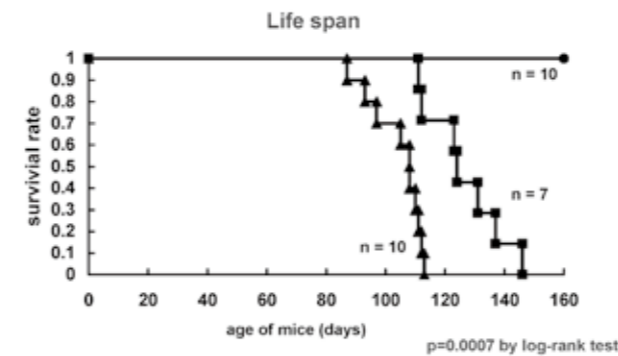


図 1 説明：Ku70 の機能低下を補うために Ku70 を過剰発現させると、ハンチントン病モデルマウス R6/2 の寿命が顕著に延長する。R6/2 は最も重症な疾患モデルであり本研究で見られた 30% の寿命延長は、これまでの最長記録である。

2. PQBP1 遺伝子異常による精神遅滞の研究

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)。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)。すなわち、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考えられる。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。

今回はノックダウンマウスにおいて研究がまとまったので紹介したい。ノックダウンマウス作成には理研の石井俊輔博士らが開発した pDECAP ベクターを用いた。pDECAP ベクターは 500 塩基以上の 2 本鎖 RNA を発現する事が可能で、内在性の RISC によって siRNA となる。PQBP1-pDECAP では 498 塩基対の 2 本鎖 RNA を発現する。従って確実なノックダウンが期待される一方で、off-target effect の可能性も高まる。そこで、出生直後のマウス脳によるウェスタンブロットで、コントロール遺伝子 5 個 (GAPDH, β Actin, α Tubulin, GFAP, MAP2) の発現に変化がない事を確認した上で、PQBP1 発現量を調べたところ、同腹対照群のおよそ 50% であった。

このような PQBP1 ノックダウンマウスを用いて様々

なマウス行動解析を行った結果、ノックダウンマウスには、不安ロケーションに対する認知機能低下と記憶障害が認められた。また、不安関連記憶に関わる、前頭前野、海馬、扁桃体の神経細胞において、ヒストンアセチル化の減少や c-fos 反応性の低下を確認した。近年、ヒストン修飾と記憶の関連が注目されており、実際にヒストンのアセチル化の低下が記憶・学習機能に大きく影響を及ぼすことが報告されている。私たちのモデルマウスにおいても同様の状況が起きている可能性がある。また転写抑制のターゲットとなる遺伝子の一つとして NMDA レセプター 1 (NR1) が低下することを確認しており、遺伝子発現の障害を基にシナプス機能異常が生じている可能性がある。

そこで、種々の HDAC 阻害剤を投与して、症状の変化をみた。このうち PBA 投与により、PQBP1-KD マウスでみられた不安ロケーションに対する認知機能障害は改善し、転写障害に対応するヒストン H3 アセチル化の減少、さらには、神経細胞の活動性を示す c-fos 反応性の低下も PBA 投与により改善した。また、ターゲットの一つと考えられる NR1 発現量低下といった分子変化も改善した (Ito et al. Hum Mol Genet 2009)。

以上の結果から、PQBP1 異常症における精神遅滞の基盤には転写活性の低下が存在し、HDAC 阻害剤による転写活性の亢進は、成熟した大人のマウスになってからでも症状改善につながりうる事が示された。PBA は実際に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。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。

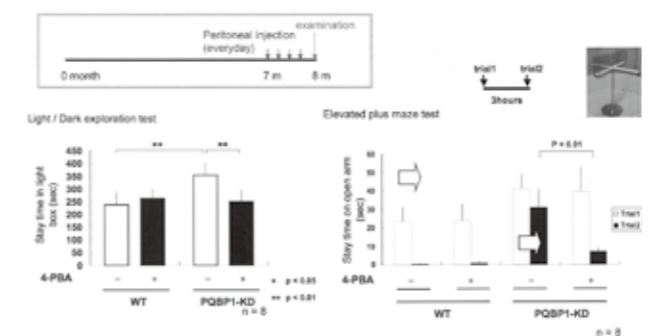
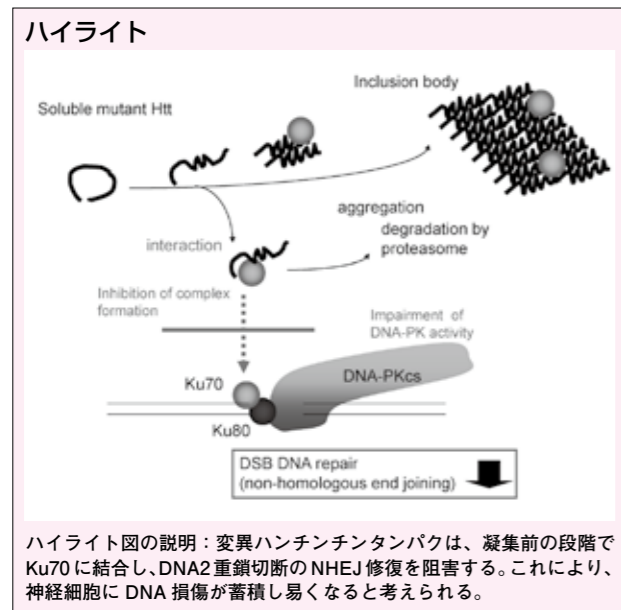


図 2 の説明：明暗箱および高架十字テストで見られた不安関連の認知と記憶の低下は PBA 腹腔投与によって顕著に改善する。

3. Oct-3/4の神経幹細胞における発現

Oct-3/4/Oct-4/Oct-3はES細胞分化のゲートキーパーとして働き、また、iPS細胞作成の必須分子として働く。当分野教授が20年前にOct-3/4を発見したことから、その後も研究を続けている。私たちは先にOct-3/4が神経幹細胞に発現していることを報告した。その後、組織幹細胞におけるOct-3/4の発現の報告が相次ぎ、また、腫瘍幹細胞においてもOct-3/4が発現する事が知られている。ところが、近年Jaenisch教授のグループから、nestin-Creを用いたOct-3/4のconditional KOマウスにおいて異常がでないとの報告があった。この矛盾の原因としては幾つかの可能性がある。第1は、Oct-3/4には多くのpseudogeneが存在することから、私たちの以前の報告はpseudogeneを観察していたというものである。(この場合、私たち以外の報告も同様の可能性が疑われる。)第2は、Oct-3/4は発現しているが、ほとんど機能していないというものである。このどちらの可能性が正しいか、私たちは神経幹細胞からイントロンを挟むプライマー(ゲノムDNAの混入を除外するため)によってPCR増幅したcDNAを直接シーケンスした。その結果、配列はいずれのpseudogeneとも異なり、まさにOct-3/4自身であった(Chin et al. BBRC 2009)。したがって、Oct-3/4は神経幹細胞において発現はするものの機能を果たしにくい状況にあると考えられる。今後、その詳細を解析していく予定である。



業績目録

原著

1. Takahashi K, Yoshina S, Maekawa M, Ito W, Inoue T, Shiwaku H, Arai H, Mitani S, and Okazawa H (2009) Nematode Homologue of PQBP1, a Mental Retardation Causative Gene, Is Involved in Lipid Metabolism. PLoS One 4, e4104.
2. Tamura T, Sone M, Yamashita M, Wanker EE, and Okazawa H (2009) Glial cell lineage expression of mutant ataxin-1 and huntingtin induces developmental and late-onset neuronal pathologies in Drosophila models. PLoS One 4, e4262.
3. Sone M, Uchida A, Komatsu A, Suzuki E, Ibuki I, Asada M, Shiwaku H, Tamura T, Hoshino M, Okazawa H, and Nabeshima Y (2009) Loss of yata, a novel gene regulating the subcellular localization of APPL, induces deterioration of neural tissues and lifespan shortening. PLoS One 4, e4466.
4. Takahashi M, Mizuguchi M, Shinoda H, Aizawa T, Demura M, Okazawa H, Kawano K (2009) Polyglutamine tract binding protein-1 is an intrinsically unstructured protein. Biochimica et Biophysica Acta. 1794(6):936-43.
5. Ito H, Yoshimura N, Kurosawa M, Ishii S, Nukina N, Okazawa H (2009) Knock down of PQBP1 impairs anxiety-related cognition in mouse. Human Molecular Genetics. 18:4539-54
6. Chin JH, Shiwaku H, Goda O, Komuro A, Okazawa H (2009) Neural stem cells express Oct-3/4. Biochemical and Biophysical Research Communications. 388(2):247-51
7. 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 EE, and Okazawa H (2010) Mutant Huntingtin impairs Ku70-mediated DNA repair. Journal of Cell Biology. in press

和文総説

1. 岡澤 均 (2009) TRIAD-第3の細胞死, Brain and Nerve 神経研究の進歩 vol.61(3), page 285-292
2. 伊藤日加瑠, 岡澤 均 (2010) PQBP1異常による発達障害の分子機構, 実験医学 2010年3月増刊号「脳神経系の情報伝達と疾患」, in press
3. 田村拓也, 岡澤 均 (2009) Pol II特異的阻害薬、 α -アミニチンが引き起こす非特異的で緩慢な細胞死 (TRIAD), 日本ケミカルバイオロジー学会機関紙「ケミカルバイオロジー vol 12(3), in press

国際学会

1. Sone M, Okazawa H, Nabeshima Y. Loss of yata, a novel gene regulating the subcellular localization of APPL, results in developmental defects, deterioration of neural tissues and lifespan shortening. 50th Annual Drosophila Research Conference, Chicago, USA, 2009.3.4-8
2. Okazawa H. PQBP1, a causative gene for mental retardation with microcephaly, regulates neural stem cell proliferation through RNA splicing of APC4. Roche-Nature Medicine Translational Neuroscience Symposium, Lucern, Switzerland, 2009.4.16-19
4. Sone M, Okazawa H, Nabeshima Y. Loss of yata/CG1973, a novel gene regulating the trafficking of the Amyloid precursor protein orthologue, induces developmental defects, deteriora-

- tion of neural tissues and lifespan shortening. The 9th Japanese Drosophila Research Conference, Kakegawa, 2009.7.6-8
6. Tamura T, Yamashita M, Sone M, Okazawa H. Glial cell lineage expression of mutant ataxin-1 and huntingtin induces developmental and late onset neuronal pathologies in Drosophila models. The 32nd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Nagoya, 2009.9.16-18
7. Sone M, Okazawa H, Nabeshima Y. Null mutation of Drosophila yata/CG1973, which regulates trafficking of Amyloid precursor protein like, results in progressive eye vacuolization brain volume reduction and lifespan shortening. The 32nd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Nagoya, 2009.9.16-18
8. Sone N, Nabeshima Y, Okazawa H. Molecular genetic analysis of the *Drosophila yata gene*: genetic interaction with the *APP* homologue and involvement in the trafficking regulation of APP-related proteins. 第32回日本分子生物学会年会、横浜、2009.12.9-12
9. Ito H, Yoshimura N, Kurosawa M, Ishii S, Nukina N, Okazawa H. 「Knock down of PQBP1 impairs anxiety-related cognition in mouse」第32回分子生物学会年会、横浜、2009.12.9-12

国内学会

1. 岡澤 均 「ポリグルタミン病におけるDNA損傷修復機能低下」平成20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20年度 研究班会議、東京、2009.1.15-16
2. 岡澤 均 「神経変性の細胞生物学」東京医科大学21世紀COEプログラム「脳の機能統合とその失調」最終年度シンポジウム-分子・細胞からネットワーク・脳機能へ- 市ヶ谷アルカディア 東京 2008.2.
3. 田村拓也 「新規精神遅滞モデルショウジョウバエ、PQBP1変異体の行動遺伝学的解析」CBIR若手シンポジウム、東京、2009.2.1
4. 伊藤日加瑠 「PQBP1遺伝子異常による精神遅滞のマウスモデルの作成と解析」CBIR若手シンポジウム、東京、2009.2.1
5. 塩飽裕紀、岡澤 均「新規微小管/ER関連タンパク質Maxcellの細胞分裂制御」CBIR若手シンポジウム、東京、2009.2.1
6. 塩飽裕紀、田村拓也、曾根雅紀、岡澤 均「神経幹細胞に発現する新規微小管結合分子Maxcellの同定と神経発生制御」第50回日本神経学会総会、仙台、2009.5.20-22
7. 榎戸 靖、吉武綾薫、伊藤日加瑠、岡澤 均「マウス脳におけるHMGB1発現とDNA二重鎖切断の加齢依存的变化」第50回日本神経学会総会、仙台、2009.5.20-22
10. 伊藤日加瑠、岡澤 均「ポリグルタミン病関連タンパクPQBP1の認知記憶機能への関与」平成21年度「統合脳」夏のワークショップ、札幌、2009.8.9-12
11. 曾根雅紀、岡澤 均、鍋島陽一 「ショウジョウバエAPPホモログの細胞内輸送を制御する新規分子yataの同定と遺伝学的解析」第28回日本認知症学会学術集会、仙台 2009.11.20-22
12. Mizuguchi M, Takahashi M, Okazawa H, Kawano K. Fluctuation and function of polyglutamine tract binding protein-1 新学術領域研究「揺らぎと生体機能」第3回公開シンポジウム、名古屋、2009.12.20-21
13. 伊藤日加瑠、岡澤 均 「PQBP1異常による発達障害の分子機構」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」平成21年度研究班会議 東京 2009.11.29 (口演)
14. 伊藤日加瑠、榎戸 靖、田村拓也、岡澤 均「ハンチントン病におけるDNA損傷修復異常に起因

- する神経変性分子機構の解析」第42回精神神経系薬物治療研究報告会、大阪、2009.12.4
15. 岡澤 均 「ポリグルタミン病態における核ストレスの解析と治療応用」平成21年度特定領域研究「統合脳」冬の班会議、東京、2009.12.17-19
16. 伊藤日加瑠、岡澤 均 「ポリグルタミン病態における核ストレスの解析と治療応用」平成21年度 特定領域研究「統合脳」冬の班会議、東京、2009.12.17-19
17. 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

招待講演・セミナー

1. Okazawa H. Analysis of molecular mechanisms of neurodegeneration with Drosophila. The 9th Japanese Drosophila Research Conference, Kakegawa, 2009.7.6-8
2. Okazawa H. Molecular mechanisms of PQBP1-linked developmental disorders. The 32nd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Nagoya, 2009.9.16-18
3. 岡澤 均「網羅的解析から見た神経変性の選択性と共通性」第50回日本神経学会総会・イブニングセミナー6、仙台、2009.5.20
4. 岡澤 均「網羅的解析から見える神経変性の特異性と共通性」東京都神経科学総合研究所・先端研究セミナー、東京、2009.7.23

研究助成金

- 平成20 - 21年度 科学研究費補助金 (特定) 研究代表者 岡澤 均
- 平成20 - 21年度 科学研究費補助金 (特定) 研究代表者 岡澤 均
- 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) 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 分担研究者 岡澤 均
- 平成21 - 23年度 科学研究費補助金 (基盤研究B) 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 (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 財団法人三共生命科学研究振興財団研究助成 岡澤 均
- 平成20 - 21年度 科学研究費補助金 (若手研究B) 研究代表者 田村 拓也

特許出願・取得状況

- (国際特許) Prophylactic/therapeutic agent for neurodegenerative disease. 出願人: 東京医科歯科大学 発明者: 岡澤 均 特許公開: US-2009/0280488 公開日: 2009年11月12日

学会等主催

- 岡澤 均 第33回日本神経科学大会 Neuro 2009 symposium "Frontier of research on autism and related developmental disorders"
- 岡澤 均 第91回関東臨床神経病理懇話会 東京医科歯科大学 2009.1.10
- 岡澤 均 International Symposium "New Approach for Molecular Neuropathology" 東京医科歯科大学 2009.8.13

難治疾患研究所 難治病態研究部門

病態生化学分野

研究内容

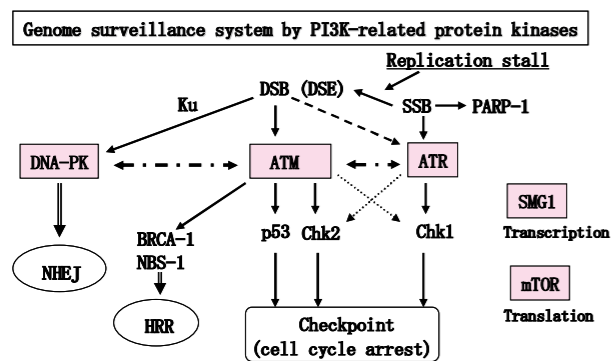
概略

DNA複製・修復・組換えなどのDNA代謝と、細胞増殖・分化・細胞死・形質転換などの細胞の運命との関連を中心にして、DNA代謝応答の不調によって生じる疾患を、分子から細胞・個体レベルにかけて解明すると共に、診断や治療に寄与することを目的としている。その中でも、特に細胞に重篤な影響を与えるDNA2重鎖切断(DSB)の損傷応答シグナル伝達機構と非同源末端連結(Non-homologous end joining = NHEJ)によるDSB修復機構の解明、ならびに、肝移植に替わるあるいはそれを補完する肝細胞移植医療を目標に、多能性幹細胞(ES細胞、iPS細胞)や臍帯血などからの肝細胞系譜への分化誘導・増殖制御、多能性幹細胞のゲノム維持機構を重点に研究を展開している。

研究紹介

1. DNA損傷応答とDSB修復、ゲノム安定化機構

DNA2重鎖切断(DSB)を誘発する電離放射線や化学物質によって染色体に生じたDSBが一カ所でも修復されずに残存すれば、細胞は致命的となる。DSB修復には、相同組換え修復(HRR)と非同源末端連結(NHEJ)があり、DNA依存性プロテインキナーゼ(DNA-PK)およびその活性化タンパク質Ku(Ku70/Ku86ヘテロダイマー)はNHEJに必須である。DNA-PKは、チェックポイントに働くATMやATR、mRNAの品質管理に働くSMG1、翻訳に関わるmTORと共に、PI3K関連プロテインキナーゼファミリーを構成している(下図)。



DNA-PKは酵母など下等な真核生物において優勢な

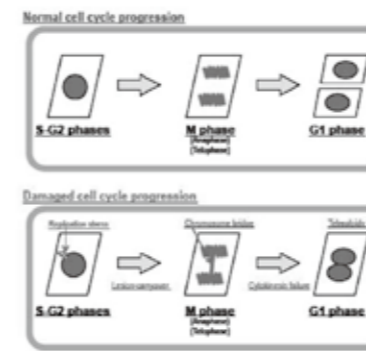
S期に働くHRRとは対照的に、比較的増殖速度が遅く細胞周期のG0/G1期が長いヒトなどの哺乳動物細胞では、NHEJがDSB修復の主役である。NHEJは、抗原受容体遺伝子再構成時のV(D)J組換えの後半部分とも共通している。さて、細胞周期のS期においては短鎖切断が頻繁に生じているが、通常は塩基除去修復系を利用して修復される。未修復のDNA単鎖切断からS期で生じるDNA2重鎖断端(double-strand end; DSE)の情報伝達や修復では、PI3K関連プロテインキナーゼファミリーに属するDNA-PK、ATM、ATRにおいて、ATRはDSEに依存したRPA2のフォーカス形成に関与し、フォーカス形成に依存したRPA2の高リン酸化にはDNA-PKが関わっていることを明らかにしている。さらに、S期に作用点のある抗がん剤カンプトテシンによるDNA-PKの活性化が、プロテアソーム阻害によって抑制されるという興味深い結果も得た。

また、DSBに応答してリン酸化されるヒストンH2AXはH2Aのバリエーションであり、H2AXはH2Aの約一割を占める。これまで、損傷応答時にはATMとDNA-PKが重複してH2AXをリン酸化することが報告されていたが、我々は、H2AXが損傷非依存的・細胞周期(M期)依存的にリン酸化され、フォーカスを形成することを報告した。

こうしたM期の特異性をさらに推し進めた研究結果を基盤として、以下の過程をたどる、細胞がん化の新しい概念を提唱した。

- ① S期の複製ストレス(複製フォークの停止、がん遺伝子の活性化、増殖亢進)によってDSBが生じる
- ② このDSBは、電離放射線照射や類似の効果を発揮するNCSなどの薬剤投与によるDSBとは異なり、S期とG2期のチェックポイントをすり抜ける
- ③ M期に持ち越されたDSBに対しては、機能的なチェックポイントと修復系が作動しない
- ④ その結果、染色体分離と細胞質分裂が完結しない
- ⑤ 細胞分裂ができないため、4倍体として次のG1期に入る
- ⑥ G1期では誤りがちなNHEJによるDSB修復を伴って細胞周期が回転するため、染色体不安定性をもった4倍体さらには異数体細胞となる

- ⑦ さらに、p53/Arfの変異によって、細胞が不死化・がん化する



また、DNA単鎖切断末端を活性発現に要求するポリADP-リボシル化酵素PARP-1のノックアウトマウスにおける、アルキル化剤投与に依存した、あるいは自発的な突然変異の詳細な解析を行った(がんセンター研究所生化学部との共同研究)。

2. 多能性幹細胞のゲノム維持機構

ES細胞やiPS細胞などの多能性幹細胞は、ほぼ無限に、しかも高速に自己複製可能であり、体細胞とは異なったゲノム安定化・維持機構の存在が予測される。ES細胞に高発現している機能未知の多くの遺伝子の中で、DPPA4(Developmental pluripotency associated 4)について検討した結果、DPPA4は転写因子や核マトリックス構成成分ではなく、転写活性の高いクロマチンに特異的に結合して、しかも未分化維持に必須の因子であることをすでに報告した。DPPA4はクロマチン構成因子である可能性が高く、これまでにES細胞の未分化維持に関わるクロマチン結合因子としては、DPPA4以外に報告はない。最近になって、ES細胞のクロマチン構造はルーズな状態にあり、殆どの遺伝子が転写開始直前の段階にあることも示唆されている。ルーズなクロマチン状態はES細胞の速い増殖速度との関連が窺えると共に、ゲノム維持の視点からは非常に不安定な状態を示唆するものであり、何らかの特異なゲノム安定化機構が必須である。DPPA4はその中心プレイヤーであるかもしれない。DPPA4は、クロマチン上でヒストンH1と同程度の流動性を示すこと、DNAとヒストンH3に、N末端側とC末端側でそれぞれ直接結合すること、このことがDPPA4の機能に必須であることを明らかにした。

さらに、ES細胞に特異的に発現しているERas遺伝子発現制御について検討した結果、ES細胞の未分化維持に関わるNanogによって転写制御を受けること、ERas近接プロモーターに存在するNanogコンセンサス配列に結合すること、イントロン1にエンハンサー活性が存在し、このエンハンサー効果は、近接プロモーター

とNanogに依存していること、を明らかにした。

3. 肝臓の再生医療

ドナー不足が深刻である肝移植に替わる肝細胞移植治療を最終目標にして、非肝臓源(ES細胞・iPS細胞、ならびに臨床応用し易い臍帯血細胞)からの肝細胞分化誘導を目指している。マウスES細胞に関しては、当初、内胚葉系への分化誘導は困難視されていたが、ES細胞から懸滴培養によって胚様体を形成させ、その接着培養によって尿素合成能を示す肝細胞様細胞を初めて分化誘導させることができた。その過程において、卵黄嚢では発現しない真に肝細胞特異的のマーカとしてCyp7a1を見出し、ES細胞から肝細胞に分化することを最終証明した。

一般に、ES細胞から肝細胞様細胞への分化効率が低いことから、血管系との相互作用を考慮して検討した結果、VEGFが肝細胞様細胞の分化効率を上げることを証明できた。すでに、国産ヒトES細胞やiPS細胞の使用を視野に入れて、カニクイザルES細胞からの機能的肝細胞分化誘導に先駆的に成功している。その中で、慢性肝障害モデルともいえるuPA/SCIDマウスへの移植では、マウス血中のサルアルブミンの検出とサルアルブミンを発現する肝細胞様細胞を確認したが、ほとんどがマウス肝細胞との融合であった。2003年にはStem Cells誌に、臨床応用しやすい臍帯血有核細胞から肝細胞様細胞への分化誘導分化誘導を報告しているが、uPA/SCIDマウスへの移植では、一過性に肝障害を与えたSCIDマウスへの移植に比べて、機能的な肝細胞様細胞が高効率に生着していることを認めている。また、成体肝臓に特異的に発現するMAT1A(生体メチル化反応のメチル基供与体であるS-adenosylmethionineの合成酵素)の、肝発生・成熟過程における発現制御機構について究明した結果、その発現がエピジェネティックに調節されることが明らかとなった。

従来の肝臓系細胞の移植法では、障害を与えた成体肝を用いていたが、肝芽細胞などの肝前駆細胞の移植モデルとしては必ずしも適切とはいえない。そこで、胎仔肝芽細胞のマウス胎仔肝へのex utero移植法の確立と、マウスES細胞から誘導した肝芽細胞への応用を目指した。その結果、14.5日胎仔肝由来肝芽細胞を14.5日胎仔肝に移植し、19.5日目に帝王切開で得た新生仔の肝において、生着・増殖が認められた。マウスES細胞から無血清単層培養で分化誘導した肝芽細胞の移植にも成功した(ハイライト)。

さらに、マウスiPS細胞からの肝細胞系譜への分化誘導について、ES細胞と比較しながら検討している。

ハイライト

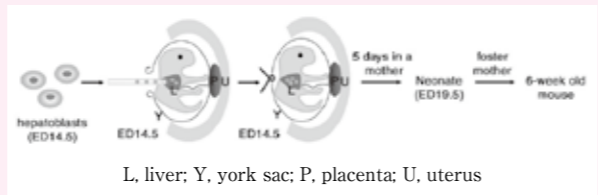
マウス胎仔肝への *ex utero* 肝芽細胞移植法の確立とマウス ES 細胞由来肝芽細胞への応用

ES 細胞などから分化誘導した肝細胞様細胞あるいは肝細胞系譜の細胞の移植系としては、肝部分切除と肝に障害を与える薬剤の投与を併用した方法と、肝傷害を誘発する遺伝子改変マウスや変異マウスが使用されている。いずれのモデルも成体の傷害肝に移植する方法であり、肝傷害がない正常マウスでは、肝臓への生着はほとんど認められない。そのため、これらのモデルは、終末分化した、あるいはそれに近い肝細胞への分化には問題ないが、肝幹細胞や前駆細胞の移植・評価や、肝発生を模倣したプロセスを考える場合、必ずしも適切であるとは言えない。そこで、未成熟なマウス胎仔肝への細胞移植を考案した(下図)。従来、マウス *in utero* 細胞移植は行われていたが、胎仔肝への細胞移植を確実に行うためには、子宮壁と卵黄嚢を切開し、胎仔の肝に直接細胞を移植する *ex utero* 細胞移植法が望ましかった。本法において重要なことは、①移植する細胞懸濁液量を $1\mu\text{l}$ 以下にすること、②移植する同腹胎仔数を 2 – 3 匹にし、残りの胎仔を残らず減胎すること、である。GFP を全身に発現している妊娠 14.5 日マウス胎仔の肝から、 Dlk^+ あるいは PECAM-1^+ 肝芽細胞を分離して、14.5 日マウス胎仔肝に *ex utero* 法にて、胎仔肝あたり 20-30 細胞/ μl を移植した。5 日後(19.5 日目)に帝王切開にて取り出

した新生仔の肝を解析したところ、移植した肝芽細胞は肝に生着・増幅し、その増殖能はレシピエントの肝芽細胞の約 3 倍を示した。新生仔肝に生着した細胞は、グリコーゲンを貯蔵し、レシピエントの肝細胞と同様な分化程度を示したが、胆管上皮細胞への分化は認められなかった。新生仔を乳母マウスに育てさせた 6 週齢のマウス肝には、より成熟した肝細胞が認められた。

さらに、GFP 陽性マウス ES 細胞の無血清単層培養において activin A を 4 日間、FGF2/EGF/HGF を 4 日間加えて培養したところ、分化した細胞の約 2 割を肝芽細胞が占めることを見出した。マウス胎仔肝(14.5 日)へ *ex utero* 移植法によって移植したところ、5 日後(19.5 日目)の新生仔肝に生着し増殖していることが判明した。ただ、14.5 日マウス胎仔由来肝芽細胞と比較すると、生着・増幅効率は低かった。

このマウス胎仔肝への *ex utero* 細胞移植法は、肝幹/前駆細胞(オーバル細胞、小型肝細胞、肝芽細胞など)の分化や肝発生を研究する上で、有効な移植系と考えられる



人事異動

転入: 逆井 良(助教)

転出: 吉岡研一(助教、がんセンター主任研究官)、藤森浩彰(博士課程修了 博士学位受領、退室)、鹿内弥磨(博士課程修了 博士学位受領、引き続き 技術補佐員、後 退室)、西田知弘(生命情報科学教育部博士後期課程修了 博士学位受領、退室)、辰巳健太郎(修士課程修了 修士学位受領、退室)、掛江直子(専攻生退学)

業績目録

原著論文

- Shibata A, Ogino H, Maeda D, Tsutsumi M, Nohmi T, Nakagama H, Sugimura T, Teraoka H, and Masutani M: Role of Parp-1 in suppressing spontaneous deletion mutation in the liver and brain of mice at adolescence and advanced age. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 664: 20-27, 2009
- Shikanai M, Asahina K, Iseki S, Teramoto K, Nishida T, Saito T, Shimizu-Saito K, Ota M, Eto K, and Teraoka H: *Ex utero* transplantation of hepatic progenitor cells into the mouse fetal liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 381:276-282, 2009
- Sakasai R, Teraoka H, and Tibbetts RS: Proteasome inhibition suppresses DNA-dependent protein kinase activation caused by camptothecin. *DNA Repair* (in press)
- Ichijima Y, Yoshioka K, Yoshioka Y, Shinohe K, Fujimori H, Unno J, Takagi M, Goto H, Inagaki M, Mizutani S, and Teraoka H: DNA lesions induced by replication stress trigger mitotic aberration and tetraploidy development. *PLoS ONE* (in press)
- Masaki H, Nishida T, Sakasai R, and Teraoka H: DPPA4 modulates chromatin structure via association with core histone H3 and DNA in mouse embryonic stem cells. *Genes Cells* (in press)
- Sakasai R, Teraoka H, Takagi M, and Tibbetts RS: Transcription-dependent activation of ataxia telangiectasia-mutated prevents DNA-dependent protein kinase-mediated cell death in response to topoisomerase I poison. *J. Biol. Chem.* (in press)

国際学会発表

- Masaki H, Nishida T, Teraoka H: DPPA4 modulates chromatin structure via association with histone H3 and linker DNA in mouse embryonic stem cells. 7th Annual Meeting for the International Society for Stem Cell Research, Barcelona, Spain, July 8-11, 2009
- Nishida T, Masaki H, Yoshioka K, Teraoka H: Transcriptional regulation of ERas by Nanog and Klf family proteins in mouse embryonic stem cells. 7th Annual Meeting for the International Society for Stem Cell Research, Barcelona, Spain, July 8-11, 2009

国内学会・研究会発表

- 鹿内弥磨、井関祥子、太田正人、齊藤佳子、寺岡弘文: *ex utero* マウス胎仔肝臓への *ex utero* 細胞移植法を用いた肝臓前駆細胞の分化能解析、口演「肝の発生・再生」、第 8 回再生医療学会総会、東京、2009 年 3 月 5 日
- Sakasai R, Teraoka H: Activation of ATM and DNA-PK in response to the topoisomerase I poison camptothecin, 第 68 回癌学会総会、横浜、

2009 年 10 月 1–3 日

- Hamada K, Ogino H, Teraoka H, Sugimura T, Masutani M: Enhancement of 5-aza-dC cytotoxicity with PARP inhibitor in human carcinoma cell lines. 第 68 回癌学会総会、横浜、2009 年 10 月 1–3 日
- Unno J, Takagi M, Maeda D, Masutani M, Kiyono T, Teraoka H, Mizutani S: Artemis-dependent DNA double-strand break formation at stalled replication forks. 第 68 回癌学会総会、横浜、2009 年 10 月 1–3 日
- 正木久晴、西田知弘、寺岡弘文: DPPA4 はリンカー DNA とヒストン H3 を介して、マウス ES 細胞のクロマチン構造調節に関与している、第 82 回生化学会大会、神戸、2009 年 10 月 21–24 日
- 逆井 良、寺岡弘文、Tibbetts R: カンプトテシンによる転写を介した ATM と DNA-PK の活性化、第 82 回生化学会大会、神戸、2009 年 10 月 21–24 日
- 西田知弘、正木久晴、逆井 良、寺岡弘文: Transcriptional regulation of ERas gene in mouse embryonic stem cells, 第 32 回分子生物学学会年会、横浜、2009 年 12 月 9–12 日
- Unno J, Takagi M, Masutani M, Kiyono T, Teraoka H, Mizutani S: Artemis-dependent conversion of stalled replication forks to DNA double-strand breaks – A novel role of Artemis as a molecular switch 「ワークショップ 1W4 – ゲノム不安定疾患の分子病態」第 32 回分子生物学学会年会、横浜、2009 年 12 月 9 日
- Sakasai R, Masaki H, Teraoka H, Tibbetts R: Modulation of CPT-induced DNA damage signaling by the ubiquitin pool 「ワークショップ 4W13 – ゲノム異常抑制における翻訳後修飾の機能」第 32 回分子生物学学会年会、横浜、2009 年 12 月 12 日

その他の講演

- 逆井 良、寺岡弘文、Tibbetts RS: カンプトテシンに対する DNA 損傷応答、第 106 回小児血液腫瘍懇話会、東京医科大学、2009 年 5 月 22 日
- 寺岡弘文: 多能性幹細胞から肝細胞系譜への分化誘導とセンダイウイルスベクターを用いた iPS 化の試み、平成 21 年度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「日本人の細胞に由来する iPS 細胞からの誘導ヒト肝細胞を用いたキメラマウス肝炎モデル開発とその前臨床応用」第一回班会議、名古屋市立大学医学部、2009 年 8 月 27 日

学内外教育活動

寺岡弘文: 本学医学部(生命と遺伝子) 大学院医歯学総合研究科修士課程(生化学) 大学院生命情報科学教育部(再生医療・細胞治療実験演習) 大学院がんプロプロジェクト(がんの細胞生物学概論) 大学院ボーダレス教育コース 発生・再構築学コース(10. 再生医療と万能幹細胞) 鶴見大学歯学部・非常勤講師 東邦大学大学院理学研究科・非常勤講師

競争的研究費取得

- 日本学術振興会科学研究費補助金 挑戦的萌芽研究「ES 細胞由来奇形腫のゲノム不安定化の解析」: 課題番号 20659047 研究代表者 寺岡弘文
- 厚生労働科学研究費補助金(代表: 名古屋市大・池田一雄) 「日本人の細胞に由来する iPS 細

胞からの誘導ヒト肝細胞を用いたキメラマウス肝炎モデル開発とその前臨床応用」 分担課題: 「ヒト肝細胞分化誘導」: 研究代表者 寺岡弘文

- 日本学術振興会科学研究費補助金 特別研究員奨励費 「マウス胚性幹(ES) 細胞における未分化維持関連因子 DPPA4 の機能解析」: 課題番号 21・2104 正木久晴(DC2)

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理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が存在することを発見した(図1)。この新規オートファジーは、①ストレスによって誘導され、②形態学的には、従来から知られているオートファジーと鑑別が付かず、③蛋白質分解も認められる。一方で、④オートファジーに不可欠と考えられてきた Atg5, Atg7, LC3 は全く必要としない。

さらに、この新たなオートファジー機構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(図2)。生体内では、様々な胎児臓器で観察される他、赤血球が成熟する際に起るミトコンドリア除去にも関与している。新たなオートファジーは細胞ストレスによって強く誘導されることから、発癌、神経

疾患、炎症疾患など幅広い疾患に関与していることが考えられる。

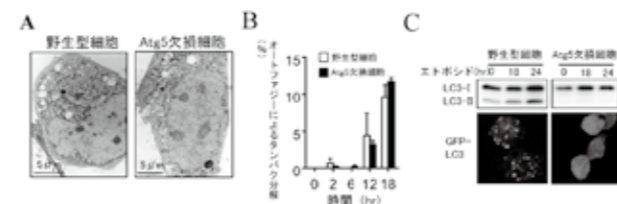


図1 Atg5非存在下で誘導されるオートファジー
A:野生型およびAtg5欠損MEFをエトポシドで刺激したところ、同程度のオートファジーが誘導された。
B:エトポシド投与後に、オートファジーによるタンパク質分解活性を測定したところ、野生型MEFとAtg5欠損MEFでは同程度であった。
C:Alternative macroautophagyには、LC3の脂質化やGFP-LC3のドット形成は伴わなかった。
(Nishida et al., 2009, Nature, 461, 654-658 より改変引用)

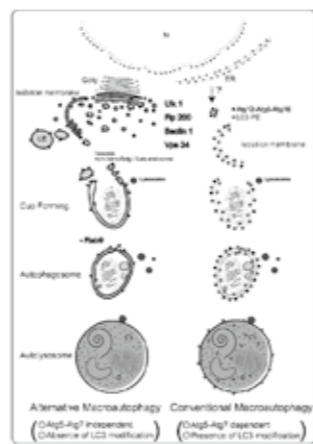


図2 哺乳動物にはAtg5に依存したオートファジーと依存しないオートファジーが存在しており、両者は刺激依存的に使い分けられているものと考えられる。

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、生体内で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、①個々の細胞死機構の詳細を明らかにし(分子レベルの解析)、②各細胞死機構を生体から排除したときの個体表現系を解析し(個体レベルの解析)、生体における細胞死システムの役

割を明確にしたいと考えている。

A. アポトーシス分子機構の解析

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。

最近我々は、Bcl-2ファミリー蛋白質に依存しない膜透過性亢進機構が存在していることを見出し、その詳細なメカニズムと生理的役割の同定を目指している。

B. オートファジー細胞死分子機構の解析

当研究室では、アポトーシスを起こしにくい細胞株(Bax/Bak欠損細胞)に抗癌剤などのアポトーシス刺激を加えると、オートファジー(自食反応)に依存した細胞死機構が活性化し、その結果細胞は死に至ることを、発見している(Nature Cell Biol. 2004)。我々は、このオートファジー細胞死の制御機構の詳細を解析し、ストレスキナーゼであるJNKが重要な役割を果たしている事を見出した(図3)。具体的には、①オートファジー細胞死に伴ってJNKが活性化される事、②JNKの発現抑制や活性抑制により、オートファジー細胞死が緩和される事、③JNKの活性化のみではオートファジー細胞死は誘導されず、他のシグナルの存在も必要である事、④JNKはオートファジー誘導には関与せず、その後の細胞死誘導に寄与している事、等を発見した。

C. ミトコンドリア膜透過性亢進機構を介したネクローシスの解析

単離ミトコンドリアに活性酸素やCa²⁺を添加すると、permeability transition (PT)と呼ばれるミトコンドリア膜の透過性亢進現象が誘導される。我々はPTの制御分子であるCyclophilin D (CyPD)のノックアウトマウスの解析より、①PT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、②PTが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。これらの知見を組み合わせる事により、PTの生理的、病理的意義を明らかにしていく。

D. 細胞死の疾患への応用

アポトーシス、オートファジー細胞死やネクローシスの分子機構や生理的役割を解析し、これらの関与する疾

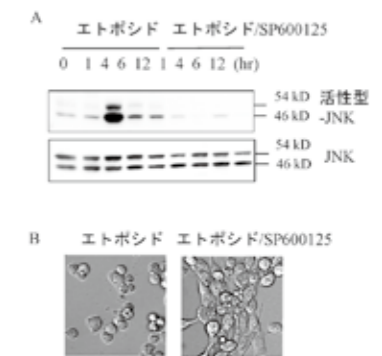


図3 オートファジー細胞死におけるJNKの役割
A: Bax/Bak欠損MEFをエトポシド処理してオートファジー細胞死を誘導すると、JNKの活性化が観察された。
B: オートファジー細胞死はJNK阻害剤(SP600125)の添加によって抑制された。
(Shimizu et al., Oncogene, in press より改変引用)

患を明らかにすると共に、制御薬剤を開発し疾患治療への応用を模索している。

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ATP合成やTCAサイクルなど、代謝反応の中心として細胞の生存に寄与している。一方、上述のごとく、ミトコンドリアは細胞死においても決定的な役割を果たしている。いずれの場合においても、ミトコンドリアと細胞質との間の物質交換、情報交換は、これらの細胞機能に極めて重要である。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。また、ミトコンドリアの機能異常に基づく疾患に対し、ミトコンドリアの機能を正常化させる事による治療法を開発したいと考えている。

ハイライト

オートファジー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。オートファジーの実行メカニズムは、酵母から哺乳動物まで保存されている複数の分子群 Atg5, Atg7, LC3 などによって完全に支配されていると考えられてきた。しかしながら我々は、これらの分子に依存しない新たなオートファジー機構が存在することを発見した。即ち、哺乳動物におけるオートファジーには、①飢餓によって誘導され Atg5 や LC3 が関与するオートファジーと、②ストレスによって誘導され Atg5 非依存的なオートファジーの2種類が存在する事を見出した。Atg5 非依存的なオートファジーは、赤血球の最終分化に際してミトコンドリアの除去などに貢献している(図1)。

人事異動
業績目録

原著論文

1. Young, A.R.J., Narita, M., Ferreira, M., Kirschner, K., Sadaie, M., Darot, J.F.J., Tavaré, S., Arakawa, S., Shimizu, S., Watt, F.M. and M. Narita. Autophagy mediates the mitotic-senescence transition. Genes & Dev. 23, 798-803, 2009

2. Kato, M., Akao, M., Matsumoto-Ida, M., Makiyama, T., Iguchi, M., Takeda, T., Shimizu, S. and T. Kita. The targeting of cyclophilin D by RNAi as a novel cardioprotective therapy: evidence from two-photon imaging. Cardiovascular Research 83, 335-344, 2009

3. Yamagata, H., Shimizu, S., Watanabe, Y., Craigen, W.J. and Y. Tsujimoto. Requirement of voltage-dependent anion channel 2 for pro-apoptotic activity of Bax. Oncogene 28, 3563-3572, 2009

4. Nishida, Y, Arakawa, S., Fujitani, K., Yamaguchi, H., Mizuta, T., Kanaseki, T., Komatsu, M., Otsu, K., Tsujimoto, Y. and S. Shimizu. Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. Nature 461, 654-658, 2009

5. Shimada, H., Hirai, K., Simamura, E., Hatta, T., Iwakiri, H., Mizuki, K., Hatta, T., Sawasaki, T., Matsunaga, S., Endo, Y., and S. Shimizu. Paraquat toxicity induced by voltage-dependent anion channel 1 acting as an NADH-dependent oxidoreductase. J. Biol. Chem. 284, 28642-28649, 2009

6. Mouri, A., Noda, Y., Shimizu, S., Tsujimoto, Y. and T. Nabeshima. The role of cyclophilin D in learning and memory. Hippocampus *in press*

7. Shimizu, S., Konishi, A., Nishida, Y., Mizuta, T., Nishina, H., Yamamoto, A. and Y. Tsujimoto. Involvement of JNK in the regulation of autophagic cell death. Oncogene *in press*

雑誌企画

清水重臣：オートファジー：メカニズムと生理機能
細胞 vol41, No7　ニューサイエンス社

総説

1. Shimizu, S, Arakawa, S. and Y. Nishida. Autophagy takes an alternative pathway. Autophagy 6, in press

2. 清水重臣：オートファジー概説　細胞 41: 268-269, 2009

3. 金関恵,荒川聡子:オートファジー(自食作用)の形態学　細胞 41: 274-278, 2009

4. 清水重臣：細胞死制御機構としてのミトコンドリアの働き　医学の歩み 232: 707-711, 2009

5. 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

6. 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

7. 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

著書

清水重臣：細胞死の分子機構「からだと酸素の事典」朝倉書店

学会発表

- 清水重臣：「種々の細胞死実行機構とその破綻に起因する疾患」　“The 26th meeting of molecular cardiology seminar”　(2009/7/14 千葉)
- 清水重臣:「様々な細胞死と疾患」　第1回「死細胞のバイオロジー研究会」(2008/7/29 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1回 “Neuroprotective meeting for young reserchers” (2009/9/26 東京)
- Konishi A., Lange,T.D. and S. Shimizu “TRF2 interact with nucleosome histones to stabilize chromosome ends”　第32回日本分子生物学会年会 (2009/12/11　横浜)
- Arakawa, S., Kanaseki, T., Nishida, Y, Fujitani, K., Yamaguchi, H., Mizuta, T., Tsujimoto, Y. and S. Shimizu. “Morphological analyses of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy.”　第32回日本分子生物学会年会 (2009/12/11　横浜)
- Nishida, Y, Arakawa, S., Mizuta, T., Fujitani, K., Yamaguchi, H., Tsujimoto, Y. and S. Shimizu. “Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy and its molecular analysis”　第32回日本分子生物学会年会（2009/12/11　横浜)
- Yamaguchi, H., Fujitani, K., Nishida, Y, Arakawa, S., Mizuta, T., Kanaseki, T. and S. Shimizu. “Involvement of trans-Golgi/endosomes in Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy”　第32回日本分子生物学会年会（2009/12/11　横浜)
- 清水重臣： “Physiological role of mitochondrial permeability transition”　第9回日本ミトコンドリア学会（2009/12/18 東京)
- 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)

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

- 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」
- 清水重臣（代表）：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」

58

難治疾患研究所 難治病態研究部門 発生再生生物学分野

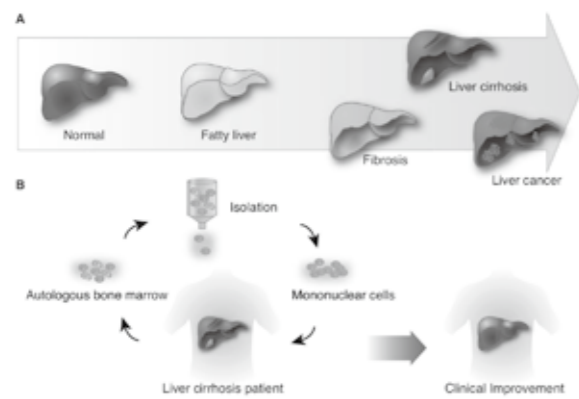
研究内容

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する。

研究紹介

(1) 外界の様々なストレスにตอบสนองするシグナル伝達系の解明と、(2) 脊椎動物の組織や器官形成に関わるシグナル伝達系の解明の2本柱を目的にして研究を行っている。これらの課題を遂行するために、哺乳類動物のマウスと小型魚類のメダカを用いている。肝再生など成体個体における現象の解析にはマウスを、また肝発生など初期胚の現象の解析にはメダカを用いており、モデル生物の利点を活かした研究方法を取っている。また、臨床グループとの共同研究によって、これら基盤研究の成果に基づいた「自己骨髄細胞を用いた肝臓再生療法」の開発に成功している(図1)。



Hata S., Namae M., and Nishina H. *Develop. Growth Differ.* 49, 163 (2007)

図1 ヒト肝疾患と自己骨髄を用いた細胞移植療法

1. ストレス応答性シグナル伝達系の研究

外部環境の変動にตอบสนอง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た。紫外線によるDNA損傷に対処する修復機構、ウイルスや細菌感染から個体を防御する免疫系、心理的あるいは生理的的刺激に対するホルモンによる個体の恒常性を維持する内分泌系などがあげられる。これらストレス応答機構がどのような細胞内シグナル伝達を介して機能するかは不明の点が多い。我々は様々なストレスにตอบสนองし活性化されるJNK(別称SAPK)シグナル伝達系がこの機能発現の一端を担うと考え、その活性化機構や生理的役割に関する研究を行なっている。

1) 2種類の活性化因子MKK4(別称SEK1)とMKK7のノックアウトマウスを作成し、両因子が協調的に働き、JNKを相乗的に活性化し、胎仔肝形成に必須の役割を果たしていることを明らかにしてきた(図2)。MKK4, MKK7 → JNKのシグナル系が、転写因子c-Junを標的にしてCDC2などの細胞周期制御因子の遺伝子発現を調節し、マウス肝臓の幹細胞である肝芽細胞の増殖を制御していること、さらに「肝幹細胞の生死の制御は、増殖シグナルであるJNK系と生存シグナルであるNFκB系、細胞死誘導シグナルであるカスパーゼ系の3者のバランスによって制御される」というモデルを提唱している(図3)。

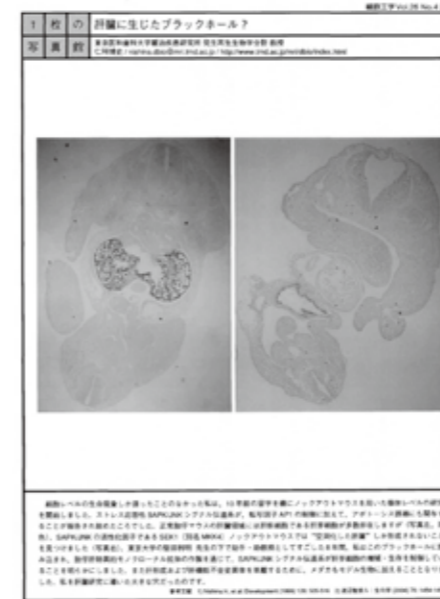


図2 肝形成不全を示すノックアウトマウス

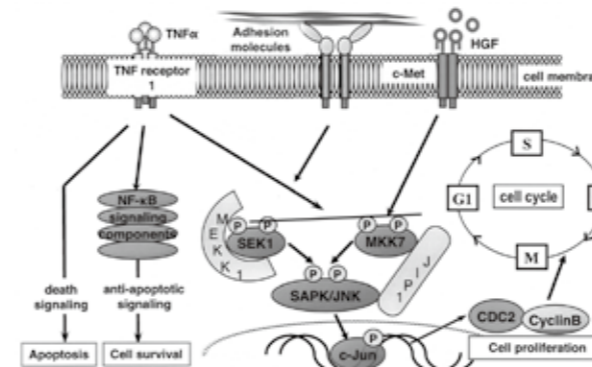


図3 マウス肝芽細胞の生死および増殖を制御するシグナル伝達経路

2) *mkk4* や *mkk7* を欠損したマウス胎仔由来線維芽細胞(MEF)の解析を行い、その結果、MKK4, MKK7が肝芽細胞のみならず、MEFの増殖にも必須の役割を果たすことを見出した。一般にMEFは繰り返しの継代培養中に「生存しているが増殖を止める細胞老化の特徴を示す。興味深いことに、*mkk4* や *mkk7* を欠損したMEFにおいては継代培養中に早期細胞老化を示した。また、MEFに紫外線や酸化ストレスを与えたところ、MKK7欠損細胞は野生型に比べ顕著な早期細胞老化の表現型を示した。元々MKK4, MKK7 → JNKのシグナル系はストレスにตอบสนองして活性化されるキナーゼとして発見された。それ故、我々は「ストレスキナーゼが様々なストレスにตอบสนองして、老化を抑制する役割を担う」というモデルを提唱している。老化の分子メカニズムを解明する手掛かりとなることを期待している。

3) DNA損傷の蓄積により細胞の恒常性が崩れ、異常な分裂・増殖を行うことが細胞の癌化機構の一つと考えられている。JNKシグナル系は、紫外線(UV)照射やDNAアルキル化剤などのDNA損傷を誘導する薬剤に

より持続的に活性化され、細胞周期やアポトーシス誘導の制御に深く関与することが知られている。しかしながら、DNA損傷という核内で生じた事象が、どのようなシグナル伝達機構を介して、細胞質中に存在するJNKの活性化という情報に変換されるかは不明の点が多い。我々は、核内に複数存在する粒子で、DNA損傷のセンサーとして機能し、DNA損傷修復・細胞周期停止・アポトーシス誘導に関与する“Promyelocytic Leukaemia(PML)ボディ”がDNA損傷時に起点となり、核内から細胞質への情報伝達を媒介し、JNKの持続的活性化を誘導するシグナル経路を報告した。本研究成果は、DNA損傷後の細胞の運命決定機構の理解に貢献すると考えられる。

現在は成体マウスにおけるJNK系の生理的役割をMKK4(*A/A*)およびMKK7(*A/A*)マウスの作出による条件付きノックアウトマウスの解析によって明らかにしようとしている。

2. 肝再生および肝発生の研究

1) マウスの肝臓は、全体の70%を切除しても(部分肝切除)、残った30%が約1週間で元の100%の大きさまで再生する。肝再生に関与する複数のシグナル系が報告されているが、「切除後の最初のシグナル分子は何か?」など不明な点も多い。また、部分肝切除1日後に観察される脂肪肝は、再生するために必須の「善玉脂肪肝」であることが知られているが、病態肝に観察される「悪玉脂肪肝」との違いは明瞭ではない。そこで我々は肝臓切除後に変化する分子を質量分析法によって明らかにすることで、これら問題を解決しようとしている(図4)。

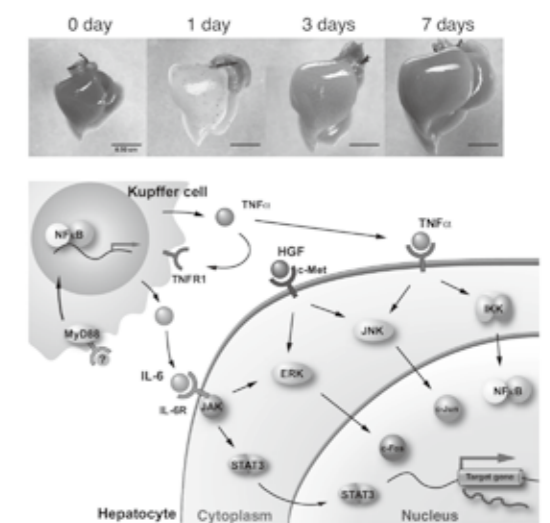


図4 マウス部分肝切除と肝再生

2) 肝臓はその再生能の高さから、生体肝移植に代表される先端医療の標的器官としての実績があり、有効性に加えて安全性や倫理的な問題点を抱える再生医療の面か

らも優れた標的器官であると考えられている。しかしながら、発生研究の面では造血系や神経系に比べてはるかに遅れをとっている。メダカは肝形成過程の観察が行いやすいという発生学的な利点と系統的な変異体のスクリーニングが行えるという遺伝学的な利点を併せ持つ脊椎動物であり、ヒト疾患モデル生物として注目されている(図5)。当研究室では肝形成や肝機能に関わる遺伝子の解明を目指してERATO近藤分化誘導プロジェクト(近藤 寿人教授/清水 誠チームリーダー)に参画し、メダカを用いた大規模スクリーニングを進めてきた。その結果、1) 肝芽細胞の発生に異常のある変異体、2) 肝芽細胞の増殖に異常のある変異体、3) 肝臓の位置異常の変異体、4) ヘモグロビン-ビリルビン代謝変異体、5) 脂質代謝変異体の5群に分類されるメダカ変異体の単離に成功している(図6)。興味深いことに、肝臓の位置異常変異体の1つはヒトにおける無脾症と酷似した表現形、ならびに脂肪肝の表現型を示し、疾患モデルとして、また薬剤のスクリーニングの対象としての活用が期待されている。現在、これら変異メダカの解析を進めている。

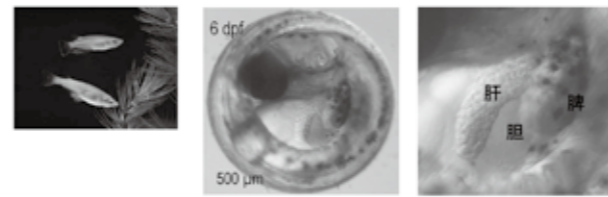


図5 ヒト疾患モデル生物として期待されるメダカ

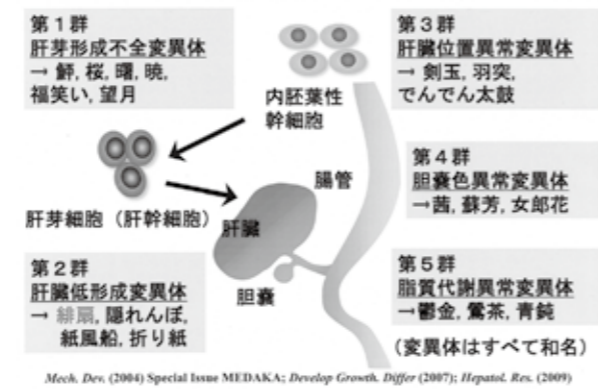


図6 肝形成および肝機能不全メダカ変異体の単離

ハイライト

肝臓は発生期の腸管の一部が出芽することで形成されます(肝芽形成)、その仕組みも明らかではありませんでした。我々は、今回、英国バス大学、東京大学、山口大学、慶応大学、大阪大学などとの共同研究によって、「胚の体内で産生されるレチノイン酸が肝芽形成を決定すること、またこの仕組みはヒレ(ヒトの腕に相当)形成を決定する仕組みと類似していること」を見出しました。母体外で発生が進行するため顕微鏡による観察が容易なメダカをモデル生物に選びました。ゲノムDNAに点変異を導入可能なアルキル化剤ENUで処理することで、様々な肝形成および肝機能不全メダカ変異体を単離することに成功しました。

I) 肝芽ができない変異体、II) 肝臓が小さい変異体、III) 肝臓の左右が逆位である変異体、IV) 胆嚢の色が異常である変異体、V) 脂質代謝が異常である変異体などが得られました。このうちII)群に属する“緋扇”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、ヒレが無い”という興味深い表現型を示しました。原因遺伝子の同定から、ビタミンAからレチノイン酸を合成する酵素(レチノイン酸合成酵素タイプ2)をコードする遺伝子の変異であることが判明しました(図7)。器官形成を解明するために多用されているマウスでは明らかにできなかった肝形成の仕組みが、メダカを用いて初めて明らかされた

と言えます。

また我々は、山口大学との共同研究によって、メダカが「疾患モデル動物」としても有用であることを示しました。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成功しました。ヒトと類似の病理所見や遺伝子発現の変化が観察されました。興味深いことに、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。マウスに比較して小型なメダカは、ハイスループットの薬剤スクリーニングに応用可能であり、「創薬にも貢献するモデル動物」であることが明らかとなりました。これら研究成果は、朝日新聞、日本経済新聞の各誌に加えて、NHKニュースにも取り上げられました。

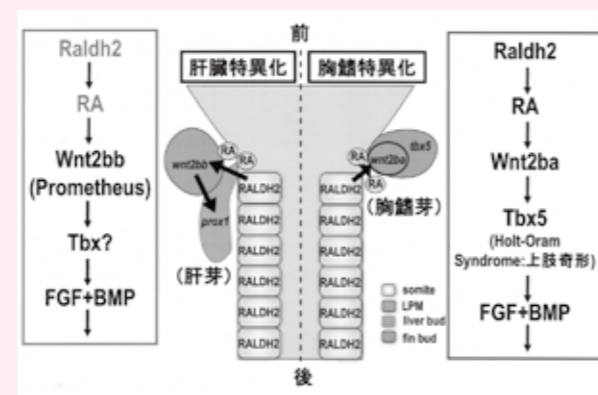


図7 肝臓特異化の分子機構

人事異動

転入：内田好海(生命情報科学教育部博士前期入学)、大野真見(生命情報科学教育部博士前期入学)、野田英一郎(医歯学総合研究科博士課程入学)、呉金展(特任助教)
 転出：阿部美穂子(生命情報科学教育部博士前期修了)、大橋央(医歯学総合研究科修士課程修了)、根岸崇大(特任助教)

業績目録

原著論文

- Yoshifumi Matsumoto, Hiroki Oota, Yoichi Asaoka, Hiroshi Nishina, Koji Watanabe, Janusz M Bujnicki, Shoji Oda, Shoji Kawamura and Hiroshi Mitani (2009) Medaka: a promising model animal for comparative population genomics. *BMC Research Notes* 2, 88.
- Norio Miyamura, Jun Hirayama, Kenji Sawanobori, Teruya Tamaru, Yoichi Asaoka, Reiko Honda, Takuro Yamamoto, Hatsume Uno, Ken Takamatsu, Hiroshi Nishina (2009) CLOCK:BMAL-independent circadian oscillation of zebrafish Cryptochromela gene. *Biol. Pharm. Bull.* 32, 1183-1187.
- Jun Hirayama, Norio Miyamura, Yoshimi Uchida, Yoichi Asaoka, Raiko Honda, Kenji Sawanobori, Takeshi Todo, Takuro Yamamoto, Paolo Sassone-Corsi, and Hiroshi Nishina (2009) Common light signaling pathways controlling DNA repair and circadian clock entrainment. *Cell Cycle* 8, 2794-2780L.
- Shinya Ohata, Makiko Nawa, Takeshi Kasama, Tokiwa Yamasaki, Kenji Sawanobori, Shoji Hata, Takashi Nakamura, Yoichi Asaoka, Toshio Watanabe, Hitoshi Okamoto, Takahiko Hara, Shuji Terai, Isao Sakaida, Toshiaki Katada, and Hiroshi Nishina (2009) Hematopoiesis-dependent expression of CD44 in murine hepatic progenitor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379, 817-823.
- Ryota Saito, Tokiwa Yamasaki, Yoko Nagai, Jinzhan Wu, Hiroaki Kajih, Tadashi Yokoi, Eiichiro Noda, Sachiko Nishina, Hitoshi Niwa, Noriyuki Azuma, Toshiaki Katada, and Hiroshi Nishina (2009) CrxOS Maintains Self-Renewal Capacity of Murine Embryonic Stem Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 390, 1129-1135.
- Nao Shimizu, Hajime Watanabe, Junko Kubota, Jinzhan Wu, Ryota Saito, Tadashi Yokoi, Takumi Era, Takeshi Iwatsubo, Takashi Watanabe, Sachiko Nishina, Noriyuki Azuma*, Toshiaki Katada, and Hiroshi Nishina (2009) Pax6-5a Promotes Neuronal Differentiation of Murine Embryonic Stem Cells. *Biol. Pharm. Bull.* 32, 999-1003. Cover of the issue.
- Shuhei Tanemura, Haruka Momose, Nao Shimizu, Daiju Kitagawa, Jungwon Seo, Tokiwa Yamasaki, Kentaro Nakagawa, Hiroaki Kajih, Josef M. Penninger, Toshiaki Katada, and Hiroshi Nishina (2009) Blockage by SP600125 of Fce Receptor-induced degranulation and cytokine gene expression in mast cells is mediated through inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway. *J. Biochem.* 145, 345-354. Cover of the issue.

英文総説

- Takashi Nakamura and Hiroshi Nishina* (2009) Liver development: lessons from knock-out mice and mutant fish. *Hepatology Research*

32, 633-644.

国際学会招待講演

- Hiroshi Nishina; Physiological roles of Hippo signaling pathway using Medaka, *Oryzias Latipes*. [RASSF First International Symposium, Banff, Canada, February, 2009]

国内学会発表

- 仁科博史：JNK阻害剤SP600125の特異性について[第9回日本肝臓医生物学研究会：2009年1月/山口]
- 仁科博史：モデル生物を用いた「細胞の生と死」を制御するシグナル伝達系の解析[埼玉大学セミナー：2009年2月/浦和]
- 仁科博史：小型魚類を用いたSAPK/JNKシグナル系の解析[生理学研究所セミナー：2009年2月/岡崎]
- 宮村憲史他：MAPキナーゼ系を介したDNA損傷修復と概日リズムの制御[日本薬学会第129年会：2009年3月/京都]
- 長井陽子他：肝臓の左右逆位を示すメダカ変異体kendamaの解析[日本薬学会第129年会：2009年3月/京都]
- 中村貴、仁科博史：顕微質量分析装置を用いた再生肝の解析[第10回日本肝臓医生物学研究会：2009年4月/金沢]
- 中村貴、仁科博史：顕微質量分析装置を用いた再生肝の解析[第16回肝細胞研究会：2009年6月/山形]
- 高橋真也 堅田利明 仁科博史：NMD制御因子Upflはユビキチンリガーゼとして機能する[RNA学会：2009年7月/新潟]
- 濱弘太郎、中永景太、田中将之、浅岡洋一、仁科博史、青木淳賢：リゾホスファチジン酸産生酵素オートタキシンの血管形成過程における役割[第15回小型魚類研究会：2009年9月/名古屋]
- 田中正彦、前濱朝彦、仁科博史「共培養系を用いた高効率な異常型プリオンタンパク質伝播実験系の確立」平成21年度 文部科学省科学研究費補助金特定領域「G蛋白質シグナル」研究班会議、2009年9月、千葉
- 田中正彦、原英之、萩原健一、花田賢太郎、仁科博史、前濱朝彦「共培養系を用いた高効率なPrP^{Sc}伝播実験系の確立」第82回日本生化学会大会、2009年10月、神戸
- 仁科博史：胎仔肝増殖シグナルを担うSAPK/JNK活性化機構の解析[第11回日本肝臓医生物学研究会：2009年10月/東京]
- 仁科博史：メダカ扁平胚hirame変異体の単離と解析[理化学研究所CDB：2009年10月/神戸]
- 仁科博史/畑裕世話人シンポジウム：細胞死・細胞増殖制御を司る新しいシグナル伝達系Hippo pathway 仁科博史、古谷—清水誠：扁平胚の表現型を示すYAPメダカ変異体の単離と解析[第82回日本生化学会大会：2009年10月/神戸]
- 櫻井京子、高橋真也他：P-body形成の生理的意義とその分子機構の解析[第82回日本生化学会大会：2009年10月/神戸]
- 蛭原有紗、高橋真也他：紫外線照射時のJNK活性化制御機構におけるRASSF7の関与[第82回日本生化学会大会：2009年10月/神戸]
- 田中正彦他：共培養系を用いた高効率なPrP^{Sc}伝播実験系の確立[第82回日本生化学会大会：2009年10月/神戸]
- 大野真見他：初期胚形成不全メダカsakuraの解析[第8回ファーマバイオフォーラム：2009年11月/名古屋]
- 内田好海他：細胞死関連因子DAXXによる概日リズム制御機構の解明[第8回ファーマバイオフォーラム：2009年11月/名古屋]
- 仁科博史：小型魚類を用いた器官形成シグナ

ルの解析[東京大学薬学セミナー：2009年11月/東京]

国際学術交流

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

学外教育活動

- 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、山口大学医学部・消化器病態内科学教育研究プログラム・世話人、肝細胞研究会・世話人、日本肝臓医生物学研究会・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

- 仁科博史(代表)：文部科学省科学研究費、特定領域研究(計画研究)「G蛋白質・MAPキナーゼ系によるトランスポートソームの局在と活性化制御」
- 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」
- 中村貴(代表)：文部科学省科学研究費、若手研究(B)「JNKシグナル系による骨代謝制御機構の解析」
- 高橋真也(代表)：日本学術振興会研究費「ナンセンス変異の認識を介したmRNA分解の分子基盤と生理的役割の解明」

難治疾患研究所 難治病態研究部門

幹細胞医学分野

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、再生医療や加齢に伴い発症する癌やその他の難治性疾患の克服へと応用することを目指している。

研究紹介

1. 皮膚における組織幹細胞の同定

皮膚は、最大の臓器であり、他の多くの組織や臓器と同様、新陳代謝を行いながらその恒常性を維持している。その要となっているのが幹細胞であり、周囲の微小環境（ニッチ）による制御のもと自己複製を行い、分化細胞の供給源として機能している。特に、毛包ではその再生と退縮を周期的に繰り返しながら構成細胞の新陳代謝が行われており、毛包内で毛に色素を供給している色



図1 マウス毛包における色素幹細胞の局在

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大変優れている。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）。さらに、毛包のない皮膚領域における幹細胞の同定にも取り組んでいる。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

これまでの研究から、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を明らかにしてきた（Nishimura EK. et al. Science 2005）。*Bcl2* と *Mitif* のそれぞれが色素幹細胞維持のどのステップにおいて重要であるのか調べたところ、*Bcl2* 欠損マウスにて詳細に解析したところ、発生をへてニッチに局在したメラノプラストが、色素幹細胞として休眠状態に入るタイミングで *Bcl2* が生存に必須となることが判明した。さらに、加齢に伴いニッチに

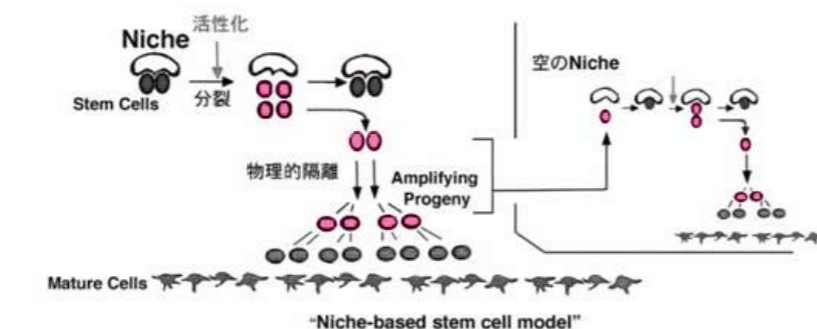


図2 ニッチは色素幹細胞の運命決定において優勢に働く

において色素幹細胞が“異所性に分化”する現象をはじめて発見し、これは *Mitif* 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していることを明らかにしてきたが（Nishimura EK. et al., Nature, 2002.）（図2）そのメカニズムについては明らかではなかった。そこで、ニッチ由来のシグナル伝達経路を同定し、色素幹細胞の運命を細胞外から制御する仕組みについて研究を進めた。その結果、色素幹細胞の居場所であるバルジ領域において TGF- β 2 の発現を有意に認め、色素細胞系譜で特異的に欠損するマウスを作製すると、色素幹細胞がニッチ内において異所性に分化し未分化性を維持できなくなり、幹細胞が枯渇するため白髪になることが明らかになった。このことから、ニッチ由来の TGF- β シグナルが色素幹細胞の維持に必須であることが判明した（Nishimura EK et al., Cell Stem Cell, 2010）。さらに、そのメカニズムとして、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行うと同時に、静止期の導入を促進していることが判明した。色素幹細胞が休眠状態に入る際に、*Bcl2* が生存に必須となるのは、ニッチ由来の TGF- β シグナルに抗して色素幹細胞が生存する必要があるためであることも同時に判明した。一方、メラノーマ細胞では、TGF- β シグナルに抵抗して生存増殖することも明らかになった。（Nishimura EK et al., Cell Stem Cell, 2010）

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引き起こされている可能性が考えられる。白髪は、最も典型的な老化現象の一つでもあることに着目し、加齢に伴って色素幹細胞においてどのような変化が引き起こされるのか研究を進めてきた。

加齢マウスと若齢マウスとの比較から、加齢マウスの髭毛包内において、色素幹細胞が異所性にニッチにおいて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、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（図3）。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た（Nishimura EK. et al. Science 2005）。

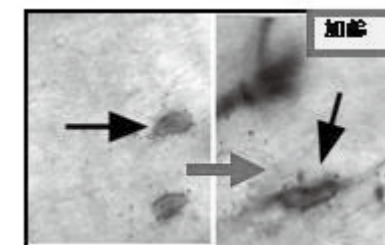


図3 加齢に伴って見られる色素幹細胞の異所性分化

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（図4、5）。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も明らかになった（Inomata K., Aoto T. et al. Cell 2009）。

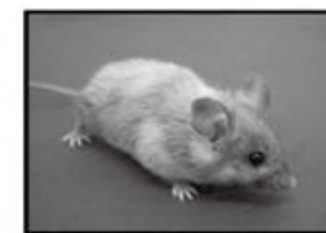


図4 5Gyの放射線照射後に毛の生え変わったマウスの外観

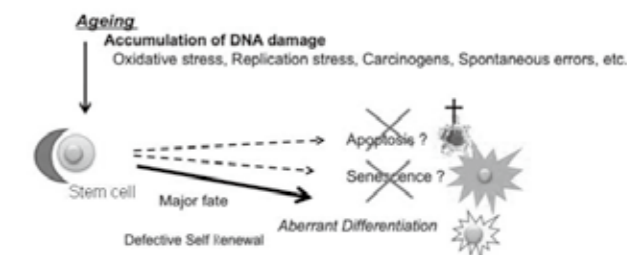


図5 加齢やDNA損傷ストレスに伴う幹細胞の未分化性消失（分化）

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安全に（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、現在作製中のヒトのメラノーマに酷似するモデルマウスを用いて明らかにすべく研究を進めている。

ハイライト

色素幹細胞はゲノム損傷ストレスにより分化し自己複製できなくなる

歳をとるとなぜ白髪が増えるのか？ 実は歳とともに色素幹細胞のプールが減ってくることをこれまでに明らかにしてきたが、なぜ加齢に伴って減ってくるのか、早老症でなぜ若白髪がみられるのかについては謎であった。今回、ゲノムの損傷ストレスと色素幹細胞プールの枯渇、および白髪の発症に深い関連があることが明らかになった。ゲノムは、日々、代謝に伴う活性酸素や紫外線、発癌物質のほか、様々な内因性および外因性のゲノム損傷に晒されている。組織幹細胞のように寿命の長い細胞において損傷の蓄積が問題になると考えられているが、加齢やゲノム損傷に際して組織幹細胞がどのような運命を辿るのか、実際に成体組織内で何が起きているのかその詳細は不明であった。我々は色素幹細胞システムにおける利点を生かして幹細胞運命解析を行った。マウスの毛周期を同調した上で放射線照射などの種々のゲノム損傷ストレスを誘発し、その後の色素幹細胞の運命を追った。その結果、DNA損傷ストレス後には、従来考えられて来たようなアポトーシスや細胞老化などといった運命ではなく、むしろ幹細胞が未分化性を失い、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）ことが判明した。その結果、幹細胞プールが枯渇し、色素細胞を毛母に供給出来なくなって毛が白毛化した(図4、5、6)。そのプロセスは、加齢に伴って観察される異所性分化細胞とその消失の過程と酷似していることから(図3)、加齢に伴ってみられる幹細胞の枯渇も、加齢に伴うゲノム損傷ストレスにより誘導される幹細胞の未分化性消失/異所性分化を反映しているものと考えられた(図5)。さらに、ATM欠損マウスやその他の早老症モデルマウスなど、ゲノム損傷の修復が効率よく起こらないマウスにおいては、幹細胞の未分化性消失が顕著に促進されることも判明した。色素幹細胞プールの量および質を保つ上でATMを中心とするゲノム損傷応答が重要な役割を果たしていることが明らかになった(Inomata K., Aoto T. et al. Cell 2009)。

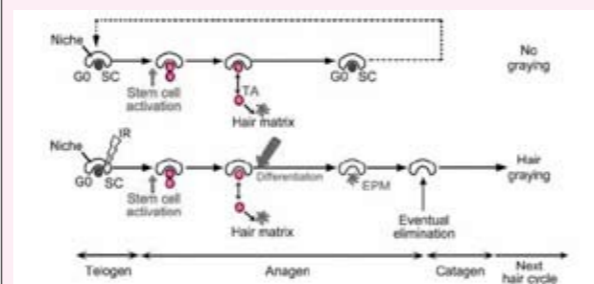


図6 DNA損傷ストレスによる色素幹細胞の異所性分化と枯渇、白髪

人事異動

2009年4月 青戸隆博 助教着任

業績目録

原著論文

1. Nishimura EK., Suzuki M, Igras V, Du J, Lonning S, Miyachi Y, Roes J, Beerman F, Fisher DE. Key roles for Transforming growth factor β in melanocyte stem cell maintenance. Cell Stem Cell, 5:6(2):130-40, 2010
2. Miura M, Ueda A, Takao Y, Nishimura EK, Koide H, Yokota T. A stem cell-derived gene (Sddr) negatively regulates differentiation of embryonic stem cells. Int J Dev Biol. 54(1):33-9, 2010
3. Inomata K, Aoto T, Binh NT, Okamoto N, Tanimura S, Wakayama T, Iseki S, Hara E, Masunaga T, Shimizu H, Nishimura EK. Genotoxic stress abrogates renewal of melanocyte stem cells by triggering their differentiation. Cell. 137(6):1088-99, 2009

著書及び総説

1. 田所優子、西村栄美：「毛包における幹細胞とそのニッチ」最新医学, 64(通号 806)2009(増刊) 1391 ~ 1403

国内学会発表、招待講演

1. 西村栄美：色素幹細胞におけるステムセルエイジング：再生医療学会 シンポジウム「ステムセルエイジング」(東京)平成21年3月5日
2. Shintaro Tanimura, Yuko Tadokoro, Ken Inomata, Wataru Nishie, James R. McMillan, Daisuke Sawamura, Hiroshi Shimizu, Emi K. Nishimura：Hair follicle stem cells provide a COL17A1-dependent niche for melanocyte stem cells, The 7th Stem Cell Research Symposium, May 15th, 2009
3. 西村栄美：幹細胞が老化する？-ステムセルエイジング：湯島皮膚科談話会：(東京)平成21年6月27日
4. 西村栄美：色素幹細胞のステムセルエイジング：慶応義塾大学眼科公開セミナー：(東京)平成21年11月5日
6. 西村栄美：ステムセルエイジングと組織の老化：金沢大学「がん幹細胞医学の創出事業」成果報告シンポジウム「幹細胞とがん」：(金沢)平成21年11月27日
7. 西村栄美：色素幹細胞におけるゲノム損傷応答と発癌：順天堂大学「御茶ノ水アカデミア」(東京)平成21年11月30日
8. 西村栄美：ステムセルエイジングと白髪について：第22回日本色素細胞学会総会 特別講演：(福岡)平成21年12月5日
9. 西村栄美：色素幹細胞の維持機構とエイジング：第22回幹細胞治療フォーラム(東京大学医学研究所)：平成22年1月21日
10. 西村栄美：組織幹細胞の自己複製制御と発癌：平成21年度5領域合同シンポジウム：(東京)平成22年1月14日
11. 西村栄美：Stem Cell Ageing と白髪：PIフォーラム 第84回研究開発委員会：(東京)平成22年1月18日
12. 西村栄美：ステムセルエイジングと白髪：第9回 Kumamoto Dermatological Academy 平成22年3月4日
13. Ken Inomata, Takahiro Aoto, Nguyen Thanh Binh, Natsuko Okamoto, Shintaro Tanimura, Tomohiko Wakayama, Shoichi Iseki, Eiji Hara, Takuji Masunaga, Hiroshi Shimizu, Emi K. Nishimura: Genotoxic stress abrogates renewal of melanocyte stem cells by triggering their differentiation：第7回幹細胞シンポジウム(東京)平成21年5月16日
14. 猪又 顕, 青戸 隆博, グエン・タン ビン, 岡本 奈都子, 谷村 心太郎, 若山 友彦, 井関 尚一, 原 英二, 増永 卓司, 清水 宏, 西村 栄美: ゲノム損傷ストレスによる色素幹細胞の自己複製阻害機構についての解析：第32回日本分子生物学会年会(横浜)平成21年12月9日

2009年度国際学会発表および招待講演一覧

1. Emi 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. 19th 2010

学内外教育活動

1. 西村栄美：東京医科歯科大学医歯学総合研究科修士入学試験担当
2. 西村栄美：平成21年度教育文化週間 市民公開講座「なぜ白髪になるのか？ 幹細胞とエイジングについて」平成21年11月2日(東京医科歯科大学 歯学部特別講堂)

競争的研究経費取得

1. 西村栄美(代表)：平成21年度科学研究費補助金 特定領域研究「がん幹細胞の発生機序の解明とがん幹細胞ニッチの同定」
2. 西村栄美(代表)：平成21年度科学研究費補助金 特定領域研究「色素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19-23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21年度 厚生労働省科学研究費「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. 青戸隆博(代表)：平成21年度 科学研究費補助金 若手スタートアップ「色素幹細胞のゲノム損傷応答から明らかにするメラノーマ発生機序の解明」

特許出願

1. 特願 2009 - 244447 平成21年10月23日出願 「色素幹細胞の未分化性維持促進剤」

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リンパ球の性状を記憶Bリンパ球様に変換する感染防御法の開発
- (2) 自己反応性Bリンパ球の選択のメカニズムの解明とその制御法の開発
- (3) Bリンパ球のストレス応答の解明
- (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. 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するからである。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リンパ球(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。我々は、IgG-BCRがIgM-BCRやIgD-BCRに比べてシグナル伝達能が亢進していることを明らかにしてきた(Wakabayashi et al. 2002, Sato et al. 2007)。また、Goodnowらのグループはナイーブ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作成し、抗体産生が顕著に増強していることを明らかにした。しかしその後、このIgGトランスジェニックマウスでは抗原刺激の際のBCRシグナル伝達がむしろ低下していることが示され、B細胞株を用いた結果とは異なることが示された。

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。このようなBCRシグナル伝達と抗体産生の乖離、また、細胞株と正常B細胞の違いについて検討し、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に重要性を示唆する知見を得た。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細胞活性化を誘導するが、このように常にBCRを介する高レベルのシグナルが誘導されているために、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を示唆する知見を得た。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(Man et al. PLoS One 2010) (図1)。

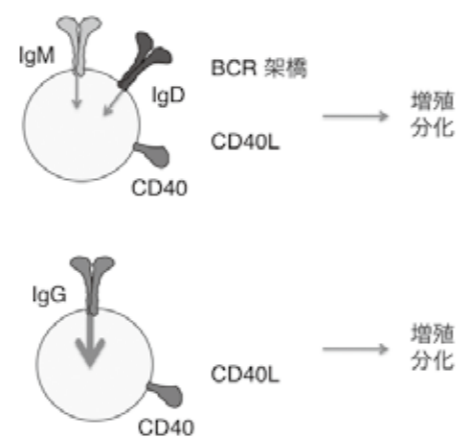


図1 IgG産生B細胞活性化増強のアイドリングモデル
IgMおよびIgDを産生するナイーブB細胞では、抗原との反応による抗原受容体(BCR)架橋とT細胞上のCD40L分子との反応によるCD40を介するシグナル伝達により活性化がおこる。IgG産生B細胞では、抗原非存在下でのIgG-BCRを介する緊張性シグナル伝達のレベルが高く「アイドリング」状態になっており、CD40を介するシグナル伝達のみで迅速に活性化する。

2. 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

動物細胞は種々のレクチン分子を発現し、糖鎖に反応する。レクチン分子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、抗体が病原微生物には産生されるが自己成分には産生されない仕組みや、ワクチンにより抗体応答が増強する仕組みの解明を行なっている。

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リンパ球(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 α /Ig β 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た。その結果、本来のリガンドである α 2.6シアル酸に比べて数千倍強くCD22に結合する化合物を合成することができた(Abdu-Allah et al. 2009)。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。

3. Bリンパ球のアポトーシス制御と自己免疫について

B細胞は抗原刺激によりアポトーシスをおこし、このアポトーシスはCD40を介するシグナルにより阻害され

る。抗原刺激とCD40を介する刺激が共存するとB細胞は活性化・増殖する。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。したがって、CD40もCD22/CD22およびCD72とともに、抗原と反応したB細胞がアポトーシスをおこすか、活性化・増殖するのかを決定する分子スイッチである。また、CD40のリガンドはCD40L分子で、この分子は、活性化T細胞などに発現する。抗原によるB細胞アポトーシスにより、自己抗原に反応した自己反応性B細胞がアポトーシスをおこすと考えられ、実際に、B細胞アポトーシスの異常が自己免疫疾患の発症に関与するという状況証拠は多く蓄積されている。しかしながら、抗原刺激によりどのようなメカニズムでアポトーシスがおこるのか、また、その異常がどのように自己免疫疾患の発症に関わるのかは不明である。我々は、BCR架橋によりアポトーシスをおこすB細胞株などを用いて抗原によるB細胞アポトーシスのメカニズムの解明を行うとともに、CD40Lを過剰発現することにより全身性エリテマトーデス様の自己免疫疾患を発症するCD40Lトランスジェニックマウスを樹立し、このマウスを用いて、B細胞アポトーシスの異常がどのようにして自己免疫疾患の発症を誘導するのかについての研究を進めている。

ハイライト

記憶B細胞の迅速な活性化を説明する「アイドリング」仮説

ナイーブB細胞は膜型IgMと膜型IgDを抗原受容体(B cell antigen receptor, BCR)として細胞表面に発現するが、記憶B細胞はもっぱら膜型IgGを抗原受容体として発現する。我々は、B細胞株を用いてIgG-BCRがIgM-BCRやIgD-BCRに比べてシグナル伝達が亢進していることを示した(Wakabayashi et al. Science 2002, Sato et al. J. Immunol. 2007)。また、GoodnowらのグループはナイーブB細胞にIgGを発現するようなIgGトランスジェニックマウスを作成すると、抗体産生が顕著に増強することを示し(Martin et al. Nat Immunol. 2002)、IgGの発現により正常B細胞でも活性化が亢進することを明らかにした。この知見はIgG産生が記憶B細胞での迅速な抗体産生に関与することを示す。しかしながら、IgG発現によるB細胞の活性化増強がどのようなメカニズムによるのかは不明であった。

我々は、ほぼすべてのナイーブ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独自に作成した。IgGトランスジェニックB細胞はマウス体内では抗原刺激により、記憶B細胞様の迅速で大量の抗体産生を行う。しかし、抗原刺激の際に、カルシウムイオン濃度の変化や種々の細胞内タンパクのチロシン酸化はおこらず、シグナル伝達がおこらないという予想外の性質を示した(図2)。そこで、抗原によるシグナル伝達がおこらないにも関わらず抗体産生が増強するのかについて、我々は、IgGトランスジェニックマウスB細胞の解析を行い、その結果に基づき、「アイドリング」仮説を提唱した(図1)(Man et al. 2010)。

B細胞の活性化には、抗原によって誘導されるBCRを介するシグナル伝達と、活性化Tリンパ球上のCD40L(CD154)との反応によって誘導される

CD40を介するシグナル伝達の両方が必要である。また、BCRは抗原と反応しなくても「緊張性」シグナルと呼ばれる一定レベルの弱いシグナル伝達がおこっており、この緊張性シグナルがB細胞の生存に必要である。「アイドリング」仮説では、IgG-BCRのシグナル伝達能が増強しているために緊張性シグナルが増強して「アイドリング」状態にあり、抗原によるBCRシグナル伝達がなくともCD40を介するシグナル伝達と緊張性BCRシグナル伝達でB細胞の活性化・増殖がおこるといものである。実際に、IgGトランスジェニックB細胞はアゴニスト抗CD40抗体単独刺激で顕著な活性化と増殖をおこす。さらに、「アイドリング」仮説では、このようなアイドリング状態のために迅速なB細胞の活性化がおこることを提唱している。

IgG産生B細胞でのBCRシグナル伝達の低下はGoodnowらのグループも観察している。「アイドリング」仮説はIgG産生B細胞がBCRシグナル伝達低下にも関わらず、抗体産生が顕著に増強していることを説明する唯一のモデルであり、記憶応答の際の迅速で大量の抗体産生のメカニズム解明の手がかりになると期待される。

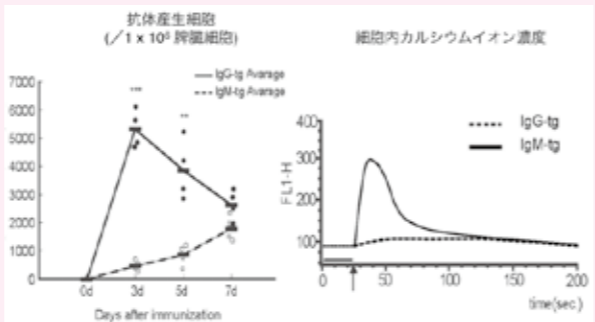


図2 IgGトランスジェニックB細胞の活性化増強と抗原受容体架橋の際のシグナル欠損
IgGトランスジェニックB細胞はマウス体内で抗原刺激を受けると迅速に抗体産生をおこす(左)。しかし、抗原刺激をしてもカルシウムシグナルなどシグナル伝達はおこらない(右)。

人事異動

転入：橋本亜実(博士前期課程)、須藤佳之(博士前期課程)、鷹野勇宜(博士前期課程)、高路(6月～博士後期課程)、Savannah Gore(10月～博士前期課程)、松原直子(特任助教)、本井祐二(技術補佐員)、垣内麻優(技術補佐員)、中谷真子(7月～技術補佐員)

転出：侯蓉(博士後期課程)、石井優輝(博士前期課程)、佐藤綾(博士前期課程)、小西真紀子(博士前期課程)、玉中大智(博士前期課程)

業績目録

原著論文

1. Watanabe, K. and Tsubata, T. (2009) : Autophagy connects antigen receptor signaling to costimulatory signaling in B lymphocytes. *Autophagy* 5: 108-110.
2. Toda, M., Hisano, R., Yurugi, H., Akita, K., Maruyama, K., Inoue, M., Adachi, T., Tsubata, T. and Nakada, H. (2009) : Ligation of tumor-produced mucins to CD22 dramatically impairs splenic marginal zone B cells. *Biochem J.* 417:673-683.
3. Hou, R., Ohtsujii, M., Ohtsujii, N., Zhang, L., Adachi, T., Hirose, S. and Tsubata, T. (2009) : The centromeric interval of chromosome 4 derived from C57BL/6 mice accelerates type 1 diabetes in NOD.CD72^o congenic mice. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 380: 193-197.
4. Yanaba, K., Bouaziz, J.-D., Matsushita, T., Tsubata, T., and Tedder, T. F. (2009) : The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 requires antigen receptor diversity and TLR signals. *J. Immunol.* 182: 7459-7472.
5. Abdu-Allah, H. H. M., Watanabe, K., Hayashizaki, K., Iwayama, Y., Takematsu, H., Kozutsumi, Y., Tsubata, T., Ishida, H. and Kiso, M. (2009) : Synthesis of biotinylated sialoside to probe CD22-ligand interactions. *Tetrahedron Lett.* 50: 4488-4491.
6. Engels, N., König, L. M., Heemann, C., Lutz, J., Tsubata, T., Griep, S., Scharader, V. and Wienands, J. (2009) : Recruitment of the cytoplasmic adaptor Grb2 to surface IgG and IgE provides antigen receptor-intrinsic costimulation to class-switched B cells. *Nature Immunol.* 10: 1018-25.
7. Abdu-Allah, H. H. M., Watanabe, K., Hayashizaki, K., Takaku, C., Tamanaka, T., Takematsu, H., Kozutsumi, Y., Tsubata, T., Ishida, H. and Kiso, M. (2009) : Potent small molecule mouse CD22 inhibitors: exploring the interaction of the residue at C-2 of sialic acid scaffold. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19:5573-75.
8. Kishi, Y., Tsubata, T. (2010) : Apoptosis of marginal zone B-cells in unimmunized mice. *J Med Dent Sci.* 56: 49-54.
9. Man, RY., Ondera, T., Komatsu, E., 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.
10. Ishiura, N., Nakashima, H., Watanabe, R., Kuwano, Y., Adachi, T., Takahashi, Y., Tsubata, T., Okochi, H., Tamaki, K., Tedder, TF., Fujimoto M. (2010) : Differential phosphorylation of functional tyrosines in CD19 modulates B lymphocyte activation. *Eur J Immunol.* (in press)

総説

1. 鐔田武志 Medical Tribune 2009年6月25日号 vol.42 No.26「ことばのカルテ 211・CD72」
2. 鐔田武志: B細胞活性化とIgE産生の分子機構: アレルギー疾患の免疫機構 実験医学増刊 20: 50 - 55, 2009

国際学会

招待講演

1. Tsubata, T.: Membrane-bound lectins and humoral immunity: CREST International Symposium "Acquired Immunity and Glycobiology", 23-24 March, 2009, Kazusa, Japan
2. Tsubata, T.: How unresponsive, slow response and rapid response of humoral immunity is determined? : ZIBI International Summer School on Pathogen-Host-Interplay, 19-26 July, 2009, Berlin, Germany
3. Tsubata, T.: B cell response augmentation by expression of IgG and deficiency in CD22: Annual Symposium of the Korean Association of Immunologists, 9-10 November, 2009, Seoul, Korea

その他

1. Tsubata, T.: Membrane-bound lectins and humoral immunity: 2nd European Congress of Immunology, 13-16 September, 2009, Berlin, Germany
2. N. Engels, L. M. Koenig, C. Heemann, J. Lutz, Tsubata, T., S.Griep, V. Schrader, J. Wienands: The immunoglobulin tail tyrosine of surface IgG and IgE provides antigen receptor-intrinsic costimulation to class-switched B cells: 2nd European Congress of Immunology, 13-16 September, 2009, Berlin, Germany

ポスター

1. Wtanabe, K., Tsuchiya, Y., Kawaguchi, Y., Ayame, H., sawada, S., Akiyoshi, K., Tsubata, T. "Self-assembled cationic nanogel-mediated efficient protein delivery in mouse primary T cells", The 5th international Workshop of Kyoto Tcell conference, Kyoto, Japan, 1-4 June, 2009

国内学会

招待講演

1. 鐔田武志: 「膜形レクチンCD72とBリンパ球アポトーシス」2009年3月17日-18日、生理学研究所研究会「細胞死研究の多面的、包括的理解に向けて」
2. 鐔田武志: 「膜型レクチン分子と獲得免疫」2009年9月9日-11日、第29回糖質学会年会、高山
3. 鐔田武志: 「チロシンフォスファターゼSHP-1を活性化するBリンパ球膜分子CD22とCD72と免疫制御」2009年10月21日-24日、第82回日本生化学会、神戸
4. 鐔田武志: 「IgGおよびIgE産生B細胞に特異的な活性化制御メカニズム」2009年10月29日-31日、第59回日本アレルギー学会秋季学術大会、秋田
5. 鐔田武志: 「チロシンフォスファターゼSHP-1を活性化するBリンパ球膜分子CD22とCD72と免疫制御」2009年11月13日-14日、第四回日本プロテインフォスファターゼ研究会学術集会、熊本
6. 鐔田武志: 「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」2010年1月20日、独立行政法人科学技術振興機構CREST「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」最終公開シンポジウム、東京

7. 鐔田武志: 「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」2010年1月18-19日、細胞死研究会、京都

その他

1. 「CHP-NH2ナノゲルを用いたタンパク導入によるがん細胞とT細胞の細胞死制御」渡辺幸造、土屋祐美子、河口佳典、菖蒲弘人、澤田晋一、秋吉一成、鐔田武志、日本ケミカルバイオロジー学会第四回年会、2009年5月18日-19日、神戸
2. 合成ビオチン化CD22リガンドを用いた競合阻害ELISAによる新規合成CD22リガンドの活性評価、渡辺幸造、竹松弘、鐔田武志、第39回日本免疫学会、2009年12月2日-4日、大阪
3. Ligand-independent high tonic signaling through IgG-BCR induces B-cell receptor signaling defect and enhances B cell response, Man Rong-Yong, Taishi Onodera, Takeshi Tsubata, 第39回日本免疫学会、2009年12月2日-4日、大阪
4. Role of CD72 polymorphism for autoimmune disease, Aya Sato, Rong Hou, Qingshun Lin, Mareki Ohtsujii, Takahiro Adachi, Sachiko Hirose, Takeshi Tsubata, 第39回日本免疫学会、2009年12月2日-4日、大阪 他2件

その他

国際招待セミナー

1. Tsubata, T.: Inhibitory B lymphocyte co-receptor CD72 and autoimmunity, C. M. U. (ジュネーブ大学医療センター), 18 September, 2009, Geneva, Switzerland

一般向けセミナー

1. 鐔田武志: 「免疫とワクチン」、免疫ふしぎ未来～研究者と話そう！身近な免疫学～、2009年5月2日～3日、東京
- 鐔田武志: 「新たなコンセプトによる感染防御薬の開発」新技術説明会ライフサイエンス(独立行政法人科学技術振興機構)、2010年1月29日、東京

主催シンポジウム

CREST International Symposium "Acquired Immunity and Glycobiology" , 23-24 March 2009, Kazusa, Japan

主催セミナー

1. 古川功治(産業技術総合研究所年齢軸生命工学研究センター・免疫恒常性チーム)「生体内での抗体親和性成熟の戦略」平成21年4月6日
2. Shimon Fillatreau (German Arthritis Research Center, Berlin) : Activated B cells: the case for a regulatory role, 7 December, 2009

特許出願

発明の名称: Bリンパ球の増殖を増強する化合物
出願番号: 特願2009 - 177776
発明者: 鐔田武志、木曾真、石田治治 Abdu-Allah, H. H. M.
出願人: 独立行政法人科学技術振興機構、国立大学法人岐阜大学

競争的研究費取得

1. 鐔田武志: 科学技術振興機構、戦略的創造研究推進事業CREST「糖鎖シグナルによる獲得免疫応答制御の解明と疾患制御への応用」(代表)
2. 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構の解明」(代表)
3. 渡辺幸造: 文部科学省科学研究費若手B「B細胞共受容体CD72による自己免疫制御機構の解明」(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. 発心筋症の病因究明

特発性心筋症は原因不明の心筋疾患と定義されていたが、最近の研究でその病因が遺伝子変異にあることが明らかになって来ているが、その全貌解明には至っていない (Kimura et al. J Hum Genet, in press)。本年は、CARP 変異が肥大型心筋症 (Arimura et al. J Am Coll Cardiol, 54:334, 2009) および拡張型心筋症 (Moulik et al. J Am Coll Cardiol, 54:325, 2009) の病因となることを解明した。また、拡張型心筋症の原因である ZASP 遺伝子変異は糖代謝関連酵素である PGM1 との結合性減弱を来すこと、PGM1 は心筋の代謝ストレスに反応して Z 帯に局在することを発見した (Arimura et al. Cardiovasc Res, 83:80, 2009)。さらに、新たな拡張型心筋症原因遺伝子としてフクチン変異 (Arimura et al. Circ J, 73:158, 2009) を同定した。

2. 心筋梗塞関連遺伝子群の検索

多因子病の代表として心筋梗塞を取り上げ、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。全ゲノムにわたるマイクロサテライト (MS) マーカーを用いた解析から少なくとも 6 箇所の心筋梗塞感受性遺伝子座を同定し、うち 1 遺伝子座の責任遺伝子として MKL1 遺伝子プロモーター多型を特定し、これが遺伝子発現を亢進することを解明した (Hinohara et al. Hum Genet, 126:539, 2009)。一方、網羅的 SNP 解析から心筋梗塞と関連するとして報告された 10 種の遺伝子多型について、日本人および韓国人集団での症例 (1,330 名) ー対照 (2,554 名) 研究を実施し、PMSA6 (Hinohara et al. J Hum Genet, 54:248, 2009)、AGTL1 (Hinohara et al. J Hum Genet, 54:554, 2009) を初めとする大多数の遺伝子多型は関連を示さなかったが、唯一 BRAP 多型は有意な関連を示した。また、BRAP と 9p21 は協調して冠状動脈硬化症の遺伝的危険因子になると考えられた (Hinohara et al. J Hum Genet, 54:642, 2009)。

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、その病因となるチャネル異常を検索している。また、候補遺伝子アプローチによる新規不整脈原因遺伝子の探索を実施している。本年の特記事項は、QT 延長症候群の複合ヘテロ接合患者家系に見出された 2 種類の KCNQ1 遺伝子異常が、一方はサブユニット形成障害、他方は小胞体内貯留による細胞内移送障害を来すことを証明したことである (Sato et al. J Biol Chem, 284:35122, 2009)。

4. HLA 領域の解析

HLA 領域には免疫応答性や自己免疫疾患発症を規定する遺伝子群が存在するが、実際に HLA 領域内のどの遺伝子が疾患に関連しているのかについては不明な点も多い。我々は HLA 領域内のマイクロサテライト多型を用いた疾患感受性領域の特定を行っているが、日本人集

団における HLA-B ~ HLA-C 領域の解析から、この領域の構成は複雑な進化をたどったものと考えられた (Shichi et al. J Hum Genet, 54:224, 2009)。一方、CTEPH には深部静脈血栓 (DVT) を伴う症例と伴わない症例があるが、DVT 陽性症例は HLA との関連はまったく示さず、DVT 陰性症例のみが HLA-DPB1*0202 および IKBLp*03 との関連を示した。 (Kominami et al. J Hum Genet, 54:108, 2009)。

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。

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。そこで免疫関連遺伝子群について比較ゲノム解析を実施し、免疫グロブリン (Ig) ドメインを有する遺伝子群には正の選択圧が働いているが、それは Ig ドメインではなく、むしろ Ig ドメイン以外であることを明らかにした。しかしながら、Ig ドメインに特に強い選択圧が働いた可能性のある遺伝子群が存在した。

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おり、これまでも HIV への免疫応答を規定する HLA-B 多型、CCR5 多型や、CCL3L1 コピー数多型が関わるということが明らかになっている。本年はアカゲザルにおける SIV 感染抵抗性を担う宿主因子である TRIM5alpha 遺伝子についてヒト集団における多型を日本人ならびにインド人集団を対象に検討した。その結果、His43Tyr 多型は HIV 感染抵抗性と関連することを見出した。また、稀な多型である Gly110Arg および G176del がそれぞれ HIV 感染に対する感受性および抵抗性と関連することを集団解析ならびに機能解析によって解明した (Nakajima et al. AIDS 23: 2091, 2009)。

8. その他

原因不明の習慣性流産では流産児に大きな性差がある

ことを報告した (Kano et al. Am J Reprod Immunol, 62:125, 2009)。

ハイライト (顕著な業績)

1) 拡張型心筋症関連 ZASP 変異の機能解析 (Arimura et al. Cardiovasc Res. 2009;83(1):80-88.)

ZASP/Cypher/Oracle の変異が拡張型心筋症 (DCM) の原因となることが判明しているが、その分子機序は不明であった。我々は、酵母 2 ハイブリッド系を用いたスクリーニングによって、糖代謝関連酵素である PGM1 が ZASP に結合することを発見した。さらに、DCM 変異は ZASP と PGM1 との結合性を低下することを明らかにした (図 1)。

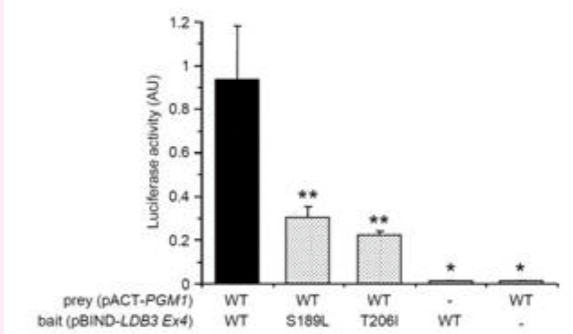


図 1 ZASP 変異は PGM1 結合性を減弱する

さらに、ラット心筋細胞の PGM1 は通常細胞質内に存在しているが、心筋細胞の培養系を用いた実験で、培養液中の FBS やグルコースの濃度を低下させると PGM1 は細胞質から Z 帯に局在を変えることを明らかにした (図 1)。このことは、心筋細胞の代謝ストレスへの対応としての PGM1 の Z 帯局在が ZASP 変異によって障害されることを示唆する。

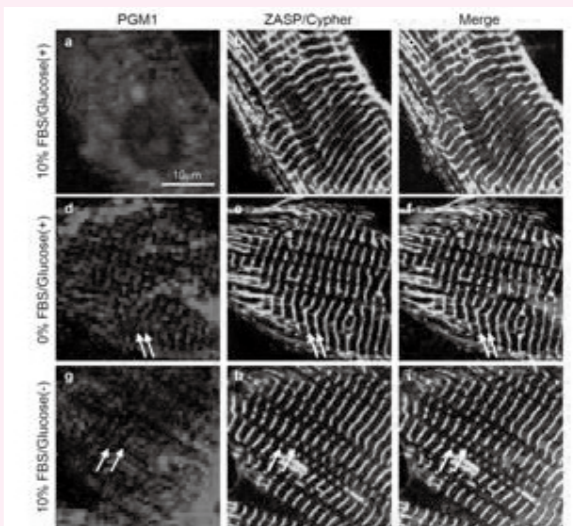


図 2 心筋細胞ストレスによる PGM1 局在変化

2) QT 延長症候群に見出された KCNQ1 変異による KvLQT1 チャネル細胞内移送障害 (Sato A, et al. J Biol Chem. 2009;284(50):35122-35133.)

QT 延長症候群は不整脈や突然死をもたらすが、通常は優性遺伝形式をとる。我々は劣性遺伝形式を示す家族性 QT 延長症候群の家系において、2 種類の異なる KCNQ1 変異 (delV595, P631fs/19) を見出した (図 3)。

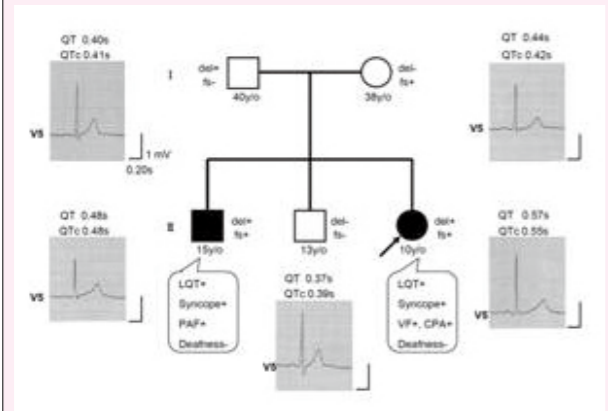


図3 家族性 LQT 家系に見出された KCNQ1 変異

この家系内では 2 種類の変異を同時に有する場合 (複合ヘテロ接合) にのみ QT 延長症候群を発症するが、いずれの変異とも kvLQT1 チャネルの細胞内移送障害をもたらすものであった (図 4)。delV595 変異は細胞内でのチャネル複合体形成異常、P631fs/19 はチャネルの ER 内貯留を来すものであり、いずれも QT 延長症候群を来す KCNQ1 変異としてこれまでに報告のない分子機構である。

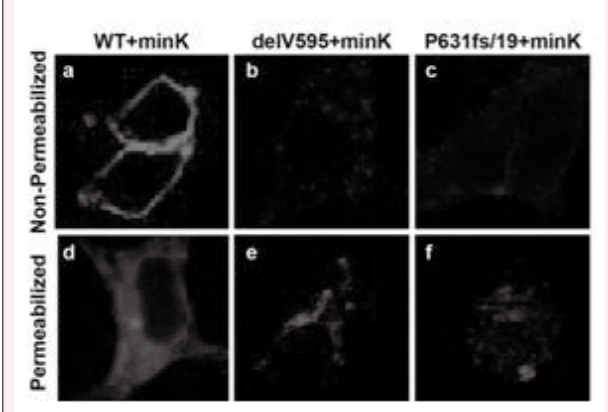


図4 変異による KvLQT1 チャネル細胞内移送障害

3) TRIM5alpha 多型と HIV/AIDS 感受性 (Nakajima T, et al. AIDS. 2009;23(16):2091-2100)

旧世界ザルにおいて SIV 感染抵抗性をもたらす宿主因子として発見された TRIM5alpha は、ヒトにおいても弱いながら HIV 感染抵抗性をもたらす。そこで日本人およびインド人について HIV 感染者集団と対照集団を対象として TRIM5alpha 遺伝子のゲノム多様性を検討したところ、His43Tyr 多型は患者集団中の頻度が有意に低く感染抵抗性に関連すると考えられた。一方、日本人集団において稀な多型 (Gly110Arg および G176del) を見出し、これらはそれぞれ感染感受性および感染抵抗性に関連すると考えられたが、細胞レベルでの機能解析によってそれぞれの機能変化を証明した (図 5)。

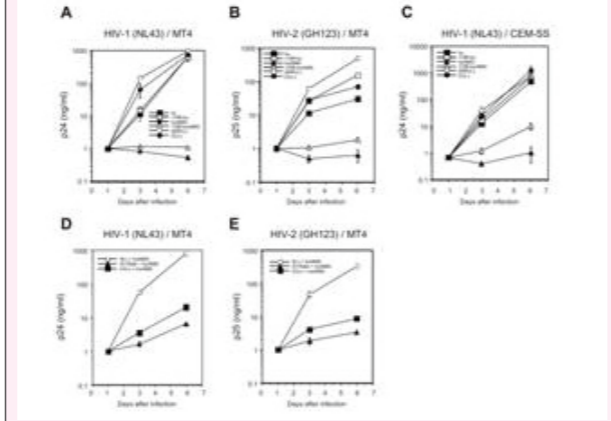


図5 TRIM5 多型は HIV 感染感受性・抵抗性をもたらす

人事異動

転入：2009 年 3 月に安部美奈子、日野原邦彦、陳智勇が学位 (博士) を、柳田梨紗が学位 (修士) を取得の上、大学院を修了した。2009 年 4 月から石川泰輔、小西真紀子が博士課程学生、大塚春奈、奥田裕紀子、齋藤祐介が修士課程学生として研究に参加している。

業績目録

原著論文

- Arimura T, Hayashi YK, Murakami T, Oya Y, Funabe S, Hirasawa EA, Hattori N, Nishino I, Kimura A. Mutational analysis of fukutin gene in dilated cardiomyopathy and hypertrophic cardiomyopathy. *Circ J*. 2009; 73(1): 158-161.
- Kominami S, Tanabe N, Ota M, Naruse T, Katsuyama Y, Nakanishi N, Tomoike H, Sakuma M, Shirato K, Takahashi M, Shibata H, Yasunami M, Chen Z, Kasahara Y, Tatsumi K, Kuriyama T, Kimura A. HLA-DPB1 and NFKBIL1 may confer the susceptibility to chronic thromboembolic pulmonary hypertension in the absence of deep vein thrombosis. *J Hum Genet*. 2009; 54(2): 108-114.
- Ueda K, Hirano Y, Higashiesato Y, Aizawa Y, Hayashi T, Inagaki N, Tana T, Ohya Y, Takishita S, Muratani H, Hiraoka M, Kimura A. Role of HCN4 channel in preventing ventricular arrhythmia. *J Hum Genet*. 2009; 54(2): 115-121.
- Shichi D, Ota M, Katsuyama Y, Inoko H, Naruse T, Kimura A. Complex divergence at a microsatellite marker C1_2,5 in lineage of HLA-Cw/-B haplotype. *J Hum Genet*. 2009; 54(4): 224-229.
- Hinohara K, Nakajima T, Sasaoka T, Sawabe M, Lee BS, Ban J, Park JE, Izumi T, Kimura A. Replication studies for the association of PSMA6 polymorphism with coronary artery disease in East Asian populations. *J Hum Genet*. 2009; 54(4): 248-251.
- Kikkawa EF, Tsuda TT, Sumiyama D, Naruse TK, Fukuda M, Kurita M, Wilson RP, LeMaho Y, Miller GD, Tsuda M, Murata K, Kulski JK, Inoko H. Trans-species polymorphism of the Mhc class II DRB-like gene in banded penguins (genus Spheniscus). *Immunogenetics*. 2009; 61(5): 341-352.
- Tomoyasu Y, Yamaguchi T, Tajima A, Nakajima T, Inoue I, Maki K. Further evidence for an association between mandibular height and the growth hormone receptor gene in a Japanese population. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2009; 136(4): 536-541.
- Kang EH, Yamaguchi T, Tajima A, Nakajima T, Tomoyasu Y, Watanabe M, Yamaguchi M, Park SB, Maki K, Inoue I. Association of the growth hormone receptor gene polymorphisms with mandibular height in a Korean population. *Arch Oral Biol*. 2009; 54(6): 556-562.
- Romphruk AV, Romphruk A, Naruse TK, Raroengjai S, Puapairoj C, Inoko H, Leelayuwat C. Polymorphisms of NKG2D ligands: diverse RAET1/ULBP genes in Northeastern Thais. *Immunogenetics*. 2009; 61(9): 611-617.
- Park YE, Hayashi YK, Bonne G, Arimura T, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I. Autophagic degradation of nuclear components in mammalian cells. *Autophagy*. 2009; 5(6): 795-804.
- Arimura T, Inagaki N, Hayashi T, Shichi D, Sato A, Hinohara K, Vatta M, Towbin JA, Chikamori T, Yamashina A, Kimura A. Impaired binding of ZASP/Cypher with phosphoglucomu-

tase 1 is associated with dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res*. 2009; 83(1): 80-88.

- Kimura A. Does a gene polymorphism predisposing to the intermediate phenotype predict the risk of disease? *Circ J*. 2009; 73(6): 1016-1017.
- Moulik M, Vatta M, Witt SH, Alora AM, Murphy RT, McKenna WJ, Boriek A, Oka K, Labeit S, Bowles NE, Arimura T, Kimura A, Towbin JA. ANKRD -the gene encoding cardiac ankyrin repeat protein- is a novel dilated cardiomyopathy gene. *J Am Coll Cardiol*. 2009; 54(4):325-333.
- Arimura T, Bos MJ, Sato A, Kubo T, Okamoto H, Nishi H, Harada H, Koga Y, Moulik M, Doi YL, Towbin JA, Ackerman MJ, Kimura A. Cardiac ankyrin repeat protein gene (ANKRD1) mutations in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2009; 54(4):334-342.
- Kano T, Mori T, Kimura A. Gender ratio distortion in abortuses and live births from patients with recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol*. 2009; 62(3): 125-127.
- Hinohara K, Nakajima T, Yasunami M, Houda S, Sasaoka T, Yamamoto K, Lee BS, Shibata H, Takahashi TY, Arimura T, Sato A, Naruse T, Ban J, Inoko H, Yamada Y, Sawabe M, Park JE, Izumi T, Kimura A. Megakaryoblastic leukemia factor-1 gene in the susceptibility to coronary artery disease. *Hum Genet*. 2009; 126(4): 539-547.
- Hinohara K, Nakajima T, Sasaoka T, Sawabe M, Lee BS, Ban J, Park JE, Izumi T, Kimura A. Validation of the association between AGTRL1 polymorphism and coronary artery disease in Japanese and Korean populations. *J Hum Genet*. 2009; 54(9): 554-556.
- Nakajima T, Nakayama EE, Kaur G, Terunuma H, Mimaya J, Ohtani H, Mehra N, Shioda Y, Kimura A. Impact of novel TRIM5-alpha variants, Gly110Arg and G176del, on the anti-HIV-1 activity and the susceptibility to HIV-1 infection. *AIDS*. 2009; 23(16): 2091-2100.
- Hinohara K, Ohtani H, Nakajima T, Sasaoka T, Sawabe M, Lee BS, Ban J, Park JE, Izumi T, Kimura A. Validation of eight genetic risk factors in East Asian populations replicated the association of BRAP with coronary artery disease. *J Hum Genet*. 2009; 54(11): 642-646.
- Sato A, Arimura T, Makita N, Ishikawa T, Aizawa Y, Ushinohama H, Aizawa Y, Kimura A. Novel mechanisms of trafficking defect caused by KCNQ1 mutations found in long QT syndrome. *J Biol Chem*. 2009; 284(50): 35122-35133.
- 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.

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 Medical Publishers Ltd., New Delhi, 2010
- 他 8 件

国内学会発表

- Arimura T, Bos JM, Sato A, Kubo T, Okamoto H, Nishi H, Harada H, Koga Y, Doi YL, Ackerman MJ, Kimura A: Identification of a

novel gene for hypertrophic cardiomyopathy. 第 73 回日本循環器学会学術集会、大阪、2008 年 3 月
他 9 件

国際学会発表

- Kimura A, Ueda K, Aizawa Y, Sato A, Arimura T, Makita N, Ishikawa T, Aizawa Y: Molecular analysis of arrhythmia associated with HCN4 mutations. 12th Cardiovascular Genomics and Atherosclerosis Symposium. Seoul, October 16-17, 2009.
他 9 件

学内外教育活動

木村彰方：本学医学部 (生体防御学)、本学保健衛生学科 (遺伝学)、本学医歯学総合研究科修士 (遺伝疾患)、本学生命情報科学教育部 (ゲノム科学)、埼玉医科大学医学部 (遺伝学)、神奈川歯科大学歯学部 (生化学)、中島敏晶：本学保健衛生学科 (遺伝学)、本学医歯学総合研究科修士 (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)：科学研究費補助金・基盤研究 (B)、新たな分子病因の解明に基づく心筋症と心不全病態の治療戦略に関する研究
- 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・創業基盤推進研究事業、宿主ゲノム多様性を考慮した C T L 誘導エイズワクチン開発戦略
- 木村彰方 (分担)：厚生労働科学研究費・創業基盤推進研究事業、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疾患概念確立と診断基準作成のための研究
- 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
- 中島敏晶 (分担)：厚生労働科学研究費補助金・政策創業総合研究事業、網羅的ゲノム情報解析による新規抗 HIV 因子の探索
- 中島敏晶 (代表)：平和中島財団・アジア地域重点学術研究助成 霊長類のゲノム配列・多様性比較を基盤とした HIV-1/AIDS 感受性・抵抗性遺伝子の解明
- 有村卓朗 (代表)：科学研究費補助金・若手研究 (B)、ゲノム医学的アプローチによる特発性心筋症病態形成メカニズムの解明
- 成瀬妙子 (代表)：科学研究費補助金・基盤研究 (C)、NK 細胞機能に関連する遺伝子群のゲノム多様性とその医学・生物学的意義
他 4 件

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および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、矢島美彩子
市川 紗弓
- B. EBV の複製機構を解明に関する研究
白形正樹
- C. 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
- D. 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
井上 静、平澤 都

研究の概要

A. EBV 感染モデルマウスの開発と応用

免疫不全マウス NOG (NOD/SCID/ γ_c^{null}) にヒト造血幹細胞を移植したマウス (ヒト化マウス) に接種ウイルス量を変えてEBV感染することにより、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。一方、EBV潜伏感染細胞にEBVがコードするチミジンキナーゼ (EBV-TK) が発現していることを見出し、EBV-TKにより特異的にリン酸化され細胞毒性を発揮する薬剤を同定した。新規抗EBV剤の開発を目指し、EBV感染モデルマウスを使用した前臨床試験を行っている。

B. EBV の複製機構解明に関する研究

EBVの複製機構を解明するため、ウイルス複製因子EBNA1のシグナル伝達による機能制御とin vitro再構成系を用いた複製過程の解析を行い、シグナル伝達によりリン酸化修飾を受けるアミノ酸をEBNA1に同定する

とともに、EBNA1が細胞複製因子ORCをウイルスDNAに結合させることを明らかにした。

C. 軟骨再生の臨床研究に関する研究

本学医学部運動器外科が中心となって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。

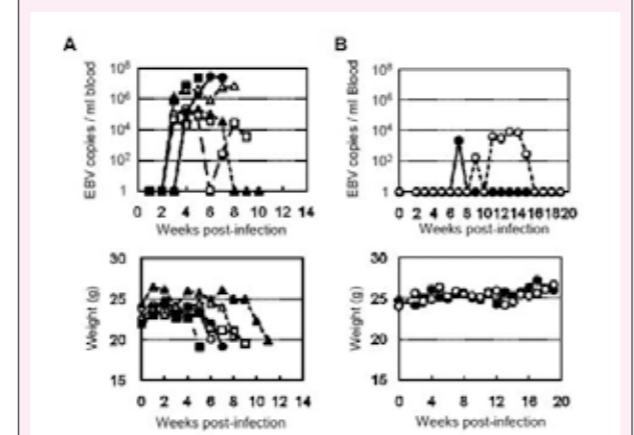
D. 網羅的微生物検査系の開発と応用

検査法実用化の取り組み

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キャピラリーPCR機によるマルチプレックス-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。造血幹細胞移植患者、眼科患者のウイルス検査法としての有用性が示されており (1年間の検査実績: 約1300検体)、先進医療としての認可取得を目指している。

ハイライト

動物モデルによるEBVの潜伏感染状態の再現



A. 10⁷TCID₅₀ のEBVを接種するとリンパ腫が生じマウスの体重が減少死に至る
B. 10¹ TCID₅₀以下の少量のEBVを接種すると安定的な持続感染状態が誘導される (脾・肝臓にはEBV陽性細胞が少数検出され続ける)

業績目録

原著論文

1. Nagasawa M, et al. Serum granulysin as a possible biomarker of NK cell neoplasm *Br J Haematol.* 2009 Nov 13. [Epub ahead of print]
2. Yajima M, et al. T Cell-Mediated Control of Epstein-Barr Virus Infection in Humanized Mice. *J Infect Dis.* 2009 Oct 15. [Epub ahead of print]
3. Iwata S, et al. Quantitative Analysis of Epstein-Barr Virus (EBV) -Related Gene Expression in Patients with Chronic Active EBV Infection. *J Gen Virol.* 2009 Sep 30. [Epub ahead of print]
4. 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: 3265-3275, 2009
5. Moriai S, et al. Production of Interferon- γ -Inducible Protein-10 and Its Role as an Autocrine Invasion Factor in Nasal Natural Killer/T-Cell Lymphoma Cells. *Clin Cancer Res.* 15(22):6771-6779, 2009
6. 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* 128:405-419, 2009.
7. Imadome K, et al. CD40 signaling activated by Epstein-Barr virus promotes cell survival and proliferation in gastric carcinoma-derived human epithelial cells. *Microbes Infect.* 11 (3):429-433, 2009.
8. Ono Y, et al. Follicular dendritic cell sarcoma with microtubuloreticular structure and virus-like particle production *in vitro*. *Pathol.Int.* 59: 332-344, 2009
9. Miyanaga M, et al. A significant association of viral loads with corneal endothelial cell damage in cytomegalovirus anterior uveitis. *Br. J. Ophthalmol.* 2009, in press.
10. 山本 紗也香 他 眼帯帯状疱疹の涙液中の水痘・帯状疱疹ウイルスDNA量 臨床眼科 2009; 63: 707-710.

国内学会発表

1. 杉田直 他 感染性眼内炎の眼内液を用いた細菌Broad-range定量PCRシステムの有用性の検討 第113回日本眼科学会総会4月 東京
2. 清水一史 他 重度免疫不全NOGマウスにおけるインフルエンザウイルス感染: 強毒変異ウイルスの出現 第57回 日本ウイルス学会 学術集会10月27日 東京
3. 今留謙一 他 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57回 日本ウイルス学会 学術集会10月 東京
4. 矢島美彩子 他 EBV感染ヒト化NOGマウスモデルにおけるT細胞応答 第57回 日本ウイルス学会 学術集会10月 東京
5. 塩田節子 他 ヒトヘルペスウイルス6 (HHV-6) ゲノムが検出されたヒト臍帯静脈内皮細胞由来の細胞株HUV-EC-CでのHHV-6の存在様式 第57回 日本ウイルス学会 学術集会10月 東京
6. 和賀 祥、喜安規子、篠原輝里子、白形正樹 EBウイルス複製開始点oriPにおける複製開始複合体形成へのRNAの関与 第82回日本生化学会大会 11月 神戸
7. Noriko Kiyasu, Mito Uehara, Masaki Shirakata, Yasushi Saitoh, Ken-ichi Tsutsumi, and Shou Waga Possible direct involvement of RNA in recruiting the origin recognition com-

plex to the viral and cellular replication origins. 第32回日本分子生物学会年会 12月 横浜

国際学会発表

Sugita S, et al. Use of broad-range quantitative polymerase chain reaction in the diagnosis of bacterial endophthalmitis. 10th International Ocular Inflammation Society Congress, Prague, 5/30-6/2, 2009.

研究助成金

代表 (白形正樹)

日本学術振興会 科学研究費補助金 基盤研究 (C)「シグナル伝達によるEBウイルスEBNA1の機能制御」

分担 (清水則夫)

1. 厚生労働科学研究費補助金 政策創業総合研究事業 創業総合研究 (主任研究者 藤原成悦)「臍帯血DLIの実用化と細胞治療製剤の医薬品化へ向けてのトランスレーショナリサーチ」
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 創業基盤推進研究事業・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. 新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO)「基礎研究から臨床研究への橋渡し促進技術開発/橋渡し促進技術開発」(主任研究者:川上浩司)「橋渡し促進技術開発 (再生医療材料の安全性の確立と規格化及び臨床研究への応用)」
5. 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」
6. 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プログラムの開発」
7. 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」
8. 厚生労働科学研究補助金 感覚器障害研究事業 (主任研究者 望月學)「難治性眼炎症疾患に対する網羅的迅速診断システムの開発」

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
- 6月 大学院生命情報科学教育部 再生医療・細胞治療実験演習
担当教官: 清水則夫

特許

APPLICATION OF SYNOVIUM-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS (MSCs) FOR CARTILAGE OR MENISCUS REGENERATION (米国国際特許出願中 YCT-1301) 出願人: 関矢一郎、発明者: 宗田大、森尾友宏、清水則夫、黒岩保幸

ゲノム応用医学研究部門

Division of Medical Genomics

【研究の理念と概要】

ゲノム応用医学部門では、その本態が明らかでないために適切な治療法が確立されていない難治性の疾患や生活習慣病等の克服に資する研究の実施を理念とする。この理念のもとに、ゲノム構造、ゲノム機能、タンパク情報等を併せた学横断的な研究を実施し、得られた包括的生命科学情報を基盤に難治疾患の病態を明らかにするとともに、罹患リスクなど、これまで体質と呼ばれてきたものを科学的に解明する。これにより、難治性の疾患の分子診断法の開発と個別化医療実践への応用、発症前診断、疾患の予防法の開発を目指し、その成果を以って未来医療に貢献する。

【分子細胞遺伝】

1. 癌のゲノム・エピゲノム解析により疾患関連遺伝子を同定し病態形成の機構を明らかにした。
2. 先天異常症、発達障害、精神発達遅滞の潜在的ゲノム構造解析を進め、疾患特異的な微細ゲノムコピー数異常を同定し、原因遺伝子を特定した。
3. 実用化レベルの染色体異常診断システムを構築し自動診断装置開発プロジェクトを推進している。

【遺伝生化学】

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

【分子遺伝】

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

【分子疫学】

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

【エピジェネチクス】

1. レトロトランスポゾン由来の *Sirh7* 遺伝子が胎盤形成に必須な役割をはたしていることを明らかにした。同じレトロトランスポゾンに由来する *Peg10*、*Peg11/Rtl1* とは機能分化がみられ、一群の新規遺伝子が胎盤という新しい臓器形成に関わったことがあきらかになった。
2. ヒト染色体7番短腕のトリソミーにより出生前後の成長不良を引き起こす Silver-Russell 症候群が引き起こされる。ゲノムインプリンティングの発現調節機構を改変したマウスをもちいた実験により、成長障害にはたらく原因遺伝子が *Grb10* であることを示した。
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示し、相互作用数が大きいハブタンパク質は薬剤標的分子にならないことを明らかにした。
2. バイオインフォマティクスを機軸として、学内外の臨床系研究者と以下のような共同研究を行った：
 - (1) 肝細胞癌の浸潤や転移に関係し、予後予測に重要な遺伝子群とそれらのネットワークの同定。
 - (2) 肝細胞癌における AURKB スプライシングバリエントの予後予測因子としての機能。
 - (3) ラットでの酸化ストレスによる肝発癌に関わる遺伝子 (*IQGAP1*) の同定。
 - (4) 大腸癌の予後予測マーカーとなる遺伝子 (*MUC12*) の同定およびパスウェイ解析。
3. HIV 時系列データの時間情報を取り入れた計算アルゴリズムを開発し、抗 HIV 治療を受けているエイズ患者体内におけるダイナミックな HIV 進化過程を推定することを可能にした。
4. *In silico* の解析で *Hes1* が味覚受容細胞発生においてその幹細胞を未分化状態に維持することを明らかにした。

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

ゲノム情報を基盤として疾患の新しい診断、治療、予防法を開発し、これらの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、予防法を開発を目指している。

研究紹介

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日に富士フィルム株式会社より販売、ビ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、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、アレイデータ解析の専用ソフトの開発、各種癌の基本ゲノム構造異常データベースの構築、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種類の癌種の総計1700例以上において標準CGH解析を実施し、データベースを構築し公開した (CGH Data Base: <http://www.cghtmd.jp/cghdatabase/index.html>)。本データベースは米国NCBI統合データベースにおいて“CGH database Japan”として紹介され、国内外の癌ゲノム研究者に利用されている。ほぼ毎年その内容を更新し、アクセス件数は32945件 (2010/03/17現在) を数えている。

2) 癌のゲノム・エピゲノム解析

食道扁平上皮がん (ESCC) I : 高密度オリゴアレイを用いたゲノムコピー数解析によってESCC細胞株に検出した13q21.2ホモ欠失領域に座位するPCDH17が、プロモーター領域におけるDNAメチル化により高頻度に発現低下することを見出した (Haruki et al., Carcinogenesis 2010)。PCDH17の臨床検体における発現低下が潜在的リンパ節転移に関連している可能性ならびに、強制発現によりESCC細胞株の増殖能、浸潤能を抑制することから、PCDH17が新規のESCC抑制遺伝子であることが明らかになった。

食道扁平上皮がん (ESCC) II : ESCC細胞株に検出した1q32-q41増幅領域の新規増幅標的遺伝子候補として、H3K36やp53K370をメチル化し転写活性調節やp53の不活性化作用を持つことが報告されるSMYD2を同定した (Komatsu et al., Carcinogenesis 2010)。SMYD2はESCCの細胞株や臨床検体で高頻度に発現亢進し、発現亢進する症例では有意に予後不良であること、特にp53が正常の例で予後の増悪に関与することが明らかになるとともに、SMYD2発現亢進による癌細胞増殖促進活性を強制発現ならびにsiRNAを用いたノックダウンの系で証明した。これらの結果から、SMYD2が新規の

ESCCにおける癌遺伝子として、診断・治療の標的になり得ることが示された。

肝細胞がん (HCC) : 近年、ゲノム情報発現系の新たな調節・制御分子として注目されているmicroRNA (miRNA) に着目し、HCCにおける新規診断・治療体系の構築に寄与するがん抑制遺伝子型miRNA遺伝子を同定すべく、CpG island近傍に座位する39種類のmiRNA (43 CpG island) について、CpG islandにおけるDNA過剰メチル化を指標とした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の結果、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miR-124とmiR-203を選出し、がん抑制遺伝子としての抗腫瘍活性を機能的に明らかにするとともに、CDK6やIQGAP1などの直接的な標的分子を複数種類同定した (Furuta et al., Carcinogenesis, 2009)。

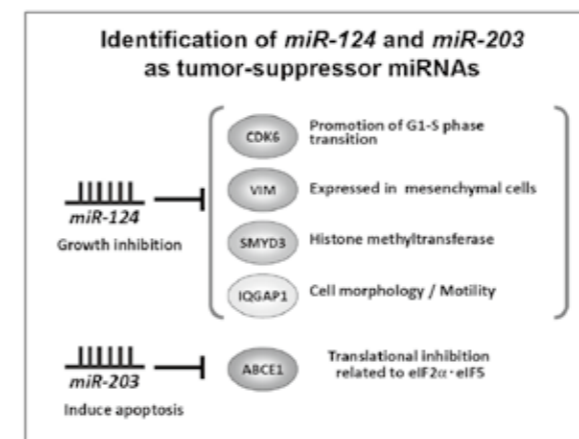


図1

神経芽腫 (NB) : (Inoue et al., PLOS One 2009)

癌の中には、無治療でも腫瘍が自然に消退するものがある。この「腫瘍の自然退縮現象」が高頻度に起こる癌としてNBが知られているが、その分子メカニズムは全く不明である。我々は、BACアレイを用いたDNAメチル化探索法 (BAMCA法) によりLAPTM5 (Lysosomal-associated protein multispansing membrane 5) 遺伝子がNB細胞においてメチル化により発現低下することを同定した。さらに、LAPTM5は予後良好NB腫瘍内に存在する退縮部位の変性NB細胞では高発現していること、およびNB細胞株へのLAPTM5の強制発現により細胞死が誘導されることが明らかになった。興味深いことに、この細胞死において、神経変性疾患で見られるようなユビキチン化陽性封入体の形成を伴っていた。以上のことから、LAPTM5誘導性細胞死が、NBの自然退縮に深く関与することが示唆された。

口腔がん (OSCC) : BACアレイによるゲノムコピー数解析でOSCC細胞株に検出した19q13.12-q13.2増幅領

域内に座位する遺伝子の網羅的な発現解析からOSCCで高頻度に発現亢進する遺伝子を選択し、さらにsiRNAを用いたノックダウンで発現量に依存した増殖抑制 (Oncogene addiction) を認める遺伝子PAK4を同定した (Begum Asma et al., Cancer Sci 2009)。PAK4はOSCCを含む頭頸部における蛋白発現が独立した予後予測因子となることが示され、また他のグループによる癌細胞におけるキナーゼの網羅的変異解析で点突然変異が報告されていることから、新規の治療標的になる可能性がある。

がん関連の主な共同研究 :

①国立がんセンター研究所の柴田龍弘博士のグループが、胃癌のゲノムコピー数解析とチロシンキナーゼのリシーケンスによりHCKとERBB2の2種類のキナーゼの異常が病態に関与すること (Kubo et al., Carcinogenesis 2009)、未分化型胃癌のゲノム解析で検出した13q22増幅の標的遺伝子候補KLF12が新規の胃癌促進遺伝子であること (Nakamura et al., Int J Cancer 2009) を明らかにしたが、ゲノム解析に協力した。②国立がんセンター研究所の金井弥栄病理部部長のグループが、肝細胞癌 (Arai et al., Int J Cancer 2009)、尿路系腫瘍 (Nishiyama et al., Cancer Sci 2009) の癌部ならびに前癌病変におけるDNAメチル化の進行とその病態との関連を明らかにしたが、ゲノムワイドなエピゲノム解析に協力した。③東京医科歯科大学、肝胆膵・総合外科の有井滋樹教授らとの共同研究で、肝細胞癌の遺伝子発現パターンが潜在的血管浸潤の有無を検出し予後予測因子として有用であることを明らかにした (Tanaka et al., Surgery 2010)。④東京医科歯科大学、顎口腔外科の小村健教授のグループと共同で、口腔癌の11q13.3増幅の標的遺伝子候補FADDが癌部特異的に増幅・発現亢進し、さらに発現亢進例では有意にリンパ節転移を起こしやすいことを明らかにした (Prapinjumrun et al., J Oral Pathol Med 2009)。

3. ゲノムアレイの応用技術開発

自作BACアレイをプラットフォームにしたエピゲノム解析応用技術を開発した。

BAMCA法 : DNAメチル化領域のゲノムワイドスクリーニング法として、BACアレイ上でMCA (methylated CpG island amplification) 法を展開するBAC array-based MCA method (BAMCA法) を確立した (Inazawa et al., Cancer Sci, 2004, Review)。本法を用いて、既に神経芽腫がん抑制遺伝子候補NR1H2, PGER2, PGDRおよびOSCCがん抑制遺伝子候補CRABP1を同定した。また、国立がんセンター研究所金井弥栄博士らとの共同でBAMCA法により、肝細胞癌、明細部腎がんにおけ

るメチル化状態のゲノムワイドスクリーニングによって予後や病態との関連が明らかにされている。(Arai E et al, Carcinogenesis 2009, Clinical Cancer Res 2008)

ChIP on BAC-array：当研究室においてBACアレイとクロマチン免疫沈降法（ChIP）を組み合わせた“ChIP on BAC-array”法を確立し、癌や発生に関与する転写因子結合領域の染色体ワイド解析を進めている。既にE2F1の新規標的遺伝子を同定している。

4. 遺伝性疾患のゲノム解析

当教室では 2005 年より国内遺伝診療施設を備える 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)による解析を行い、現在までに 536 例を解析して 56 例 (10.4%) 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。現在までに 353 例を解析し、66 例に CNV を検出した。これらの CNV と病態との関連を、両親解析や既存のデータベースとの照応などを通じて評価し、48 例 (13.6%) 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：後藤雄一先生）の分担研究として、X 連鎖性精神発達遅滞 (X-linked Mental Retardation, XLMR) の原因とな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 173 家系を X-tiling array を用いて解析し、13 家系 (7.51%)

<p>人事異動</p>
<p>転入：小西博貴、遠藤寛則、宮脇豊（医歯学総合研究科、博士課程）、前田誠(生命情報科学教育部、修士課程)、大森逸美、川原正人、小林淳也（医歯学総合研究科、修士課程）、田山さやか（MTT 研究補助員）</p> <p>転出：横井左奈(助教)、小松周平(特別研究学生)、Begum Asma、春木茂男（医歯学総合研究科、博士課程終了）、満友陽子、大森逸美(技術補佐員) 原著論文</p>
<p>業績目録</p>
<p>原著論文</p> <p>1. Arai E, et al.: Genome-wide DNA methylati-</p>

に MR との関連が疑われる CNV を検出した。

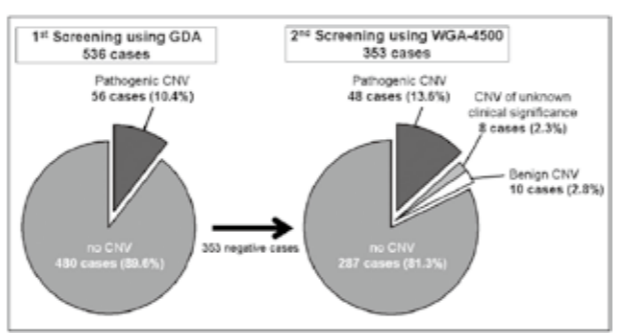


図2

<p>トピックス</p> <p>1) 横井 (石原) 佐奈助教が平成 20 年 6 月 1 日付で、千葉県がんセンター研究局・がんゲノムセンター部長に就任した。</p> <p>2) 鶴田智彦が平成 21 年度難研大学院生・若手研究者研究発表会で難治疾患研究賞を受賞した。</p> <p>3) 井上純が平成 21 年度難研大学院生・若手研究者研究発表会で 3 位を受賞した。</p> <p>4) 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 日に発足した硬組織疾患ゲノムセンターは、当教室から稲澤謙治(兼任)、井本逸勢（兼任）、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のもと着実な研究成果を挙げつつ、事業最終年度に当たる今年度まで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。来年度から、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」として新たなスタートを切る。</p>

<p>Journal. 28:843-53, 2009</p> <p>6. Tanaka S, et al.: Surgical contribution to recurrence-free survival in patients with macrovascular-invasion-negative hepatocellular carcinoma. J Am Coll Surg. 208:368-74, 2009</p> <p>7. Fujita K, et al.: Molecular cloning of t(2;7) (p24.3;p14.2), a novel chromosomal translocation in myelodysplastic syndrome-derived acute myeloid leukemia. J Hum Genet. 54:355-9, 2009</p> <p>8. Komatsu S, et al.: Overexpression of SMYD2 relates to tumor cell proliferation and malignant outcome of esophageal squamous-cell carcinoma. Carcinogenesis. 30:1139-46, 2009</p> <p>9. Arai E, et al.: Genome-wide DNA methylation profiles in liver tissue at the precancerous stage and in hepatocellular carcinoma. Int J Cancer. 125:2854-62, 2009</p> <p>10. Nakamura Y, et al.: Krüppel-like factor 12</p>

<p>plays a significant role in poorly differentiated gastric cancer progression. Int J Cancer. 125:1859-67, 2009</p> <p>11. Begum A, et al.: Identification of PAK4 as a putative target gene for amplification within 19q13.12-q13.2 in oral squamous-cell carcinoma. Cancer Sci. 100:1908-16, 2009</p> <p>12. Kubo T, et al.: Resequencing and Copy Number Analysis of the Human Tyrosine Kinase Gene Family in Poorly Differentiated Gastric Cancer. Carcinogenesis. 30:1857-64, 2009</p> <p>13. Nishiyama N, et al.: Genome-wide DNA methylation profiles in urothelial carcinomas and urothelia at the precancerous stage. Cancer Sci. 101:231-40, 2009</p> <p>14. Inoue J, et al.: Lysosomal-associated protein multispanning transmembrane 5 gene (LAPTM5) is associated with spontaneous regression of neuroblastomas. PLoS One. 4:e7099, 2009</p> <p>15. Furuta M, et al.: miR-124 and miR-203 are epigenetically silenced tumor-suppressive mi-croRNAs in hepatocellular carcinoma. Carcinogenesis.2009 [Epub ahead of print]</p> <p>16. Tanaka S, et al.: Gene-expression phenotypes for vascular invasiveness of hepatocellular carcinomas. Surgery. 147:405-414, 2009</p> <p>17. Prapinjumrunce C, et al.: DNA amplification and expression of FADD in oral squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med. 2009 Dec 22. [Epub ahead of print]</p>

<p>著書・総説</p>

<p>1. 稲澤謙治：講義録 腫瘍学。株式会社メジカルビュー社(東京) pp43-46, 2009.2,10 (4P) (240P)</p> <p>2. 阿部達生、稲澤謙治、井本逸勢、井上純：造血器腫瘍アトラス -形態、免疫、染色体と遺伝子 -改訂第 4 版。日本医事新報社（東京）2009.4.20 (574P)</p> <p>3. 稲澤謙治：入門腫瘍内科学。篠原出版社（東京）2009.10.1 (301P)</p> <p>4. 井本逸勢、稲澤謙治：がん化学療法・分子標的治療update。中外医学社（東京）pp329-333, 2009.10.30 (733P)</p> <p>5. (分担) 稲澤謙治：新臨床腫瘍学（改訂第 2 版）-がん薬物療法専門医のために-, 株式会社南江堂（東京）。2009.11.5 (921P)</p>

<p>国際シンポジウム・招待講演等</p>

<p>1. Inazawa J: Genomic and epigenomic analyses in cancer and genomic disorders. Bulgarian-Japanese Symposium "Genomics and Proteomics in Personalized Medicine". Tokuda Hospital, Sofia, Bulgaria. 19-20/March/2009</p> <p>2. Inazawa J: Integrative genomic and epigenomic analyses in cancer and genomic disorders. Medical Genetics Symposium Commemorating the 10th anniversary of inauguration of Medical Genetics Clinic & Laboratory. Asan Medical Center, Seoul, Korea. 13/November/2009</p> <p>3. Imoto I: Integrative genomics and epigenomics in cancer. The 9th East Asian Union of Human genetics Society. Yonsei 大学 医療院 , Seoul, Korea. 19/November/2009</p>
--

<p>国際学会</p>

<p>1. Honda S, Hayashi S, Imoto I, Toyama J, Okamoto N, Kurosawa K, Nakagawa E, Goto Y, Inazawa J: Exploration of genes related to X-linked mental retardation (XLMR) by BAC-based X-tiling array. 59th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics 2009 (Honolulu, Hawaii USA) 21/October/2009</p> <p>2. Hayashi S, Honda S, Mizuno S, Okamoto N, Makita Y, Hata A, Imoto I, Inazawa J: Analyses</p>
--

of 499 cases of multiple congenital anomalies with mental retardation using array-CGH for investigation and diagnosis. 59th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics 2009 (Honolulu, Hawaii USA) 21/October/2009

<p>国内シンポジウム・招待講演等</p>

<p>1. 稲澤謙治：「高精度ゲノムアレイの開発と疾患遺伝子の探索」, 「テラーメイド医療を目指したゲノム情報活用基盤技術」第 5 回公開シンポジウム。東京。2009 年 8 月 3 日</p> <p>2. 井本逸勢、稲澤謙治：がんの統合的ゲノム・エピゲノム解析。 第 68 回日本癌学会学術総会。パシフィコ横浜。神奈川。2009 年 10 月 1 日</p> <p>3. 小崎健一、稲澤謙治：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 68 回日本癌学会学術総会。パシフィコ横浜。神奈川。2009 年 10 月 2 日</p> <p>4. 稲澤謙治、井上純：LAPTM5 の蓄積により誘導されるオートファジー障害を伴う細胞死；その神経芽腫の自然退縮への関与。第 68 回日本癌学会学術総会。パシフィコ横浜。神奈川。2009 年 10 月 3 日</p> <p>他 5 件</p>
--

<p>国内学会</p>

<p>1. 本田尚三、林深、井本逸勢、當山潤、岡本伸彦、黒澤健司、中川栄二、後藤雄一、稲澤謙治：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 54 回大会。グランドプリンスホテル高輪。東京。2009 年 9 月 24 日</p> <p>2. 林深、岡本奈那、本田尚三、蒔田芳男、羽田明、井本逸勢、稲澤謙治：アレイ C G H を用いた多発奇形を伴う精神遅滞症例解析の 4 年間の実績。日本人類遺伝学会第 54 回大会。グランドプリンスホテル高輪。東京。2009 年 9 月 24 日</p> <p>3. 林深、岡本伸彦、水野誠司、小野正恵、小崎里華、奥山虎之、知念安紹、蒔田芳男、羽田明、井本逸勢、稲澤謙治：小頭症と小脳脳幹部低形成を伴う発達遅滞 12 例における C A S K 遺伝子の解析。日本人類遺伝学会第 54 回大会。グランドプリンスホテル高輪。東京。2009 年 9 月 24 日</p> <p>4. 会津善紀、井本逸勢、林深、小澤伸晃、左合治彦、山口敏和、永田欽也、宮本力、蒔田芳男、羽田明、稲澤謙治：G D A 700 による染色体微細異常解析受託システムの構築。日本人類遺伝学会第 54 回大会。グランドプリンスホテル高輪。東京。2009 年 9 月 24 日</p> <p>5. 井本逸勢、松村聡、小崎健一、有井滋樹、稲澤謙治：ゲノムワイドな統合的 DNA メチル化異常解析による肝癌抑制遺伝子候補探索。日本人類遺伝学会第 54 回大会。グランドプリンスホテル高輪。東京。2009 年 9 月 26 日</p> <p>6. 古田藩子、小崎健一、田中真二、有井滋樹、井本逸勢、稲澤謙治：肝細胞癌において腫瘍特異的 DNA 過剰メチル化により発現抑制される癌抑制 microRNA。第 68 回日本癌学会学術総会。パシフィコ横浜。神奈川。2009 年 10 月 2 日</p> <p>7. 小松周平、井本逸勢、津田均、小崎健一、嶋田裕、市川大輔、大辻英吾、稲澤謙治：食道扁平上皮癌における新規診断・治療標的遺伝子 SMYD2 の同定。第 68 回日本癌学会学術総会。パシフィコ横浜。神奈川。2009 年 10 月 2 日</p> <p>8. 横井左奈、津田均、稲澤謙治：乳癌における 1p13 増幅領域の標的遺伝子 tripartite motif 33 (TRIM33) の解析。第 68 回日本癌学会学術総会。パシフィコ横浜。神奈川。2009 年 10 月 2 日</p> <p>9. 鶴田智彦、小崎健一、平沢晃、阪本浩司、進伸幸、井本逸勢、青木大輔、稲澤謙治：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 の探索。 第 68 回日本癌学会学術総会。パシフィコ横浜。神奈川。2009 年 10 月 2 日</p> <p>10. 松村聡、井本逸勢、小崎健一、有井滋樹、稲澤謙治：肝細胞癌においてエピゲノムで制御されるがん抑制遺伝子の統合的アレイ解析。 第 68 回</p>
--

日本癌学会学術総会。パシフィコ横浜。神奈川。2009 年 10 月 2 日

11. 村松智輝、井本逸勢、松井毅、小崎健一、津田均、嶋田裕、稲澤謙治：食道扁平上皮癌における YAP1 とその isoform の癌遺伝子としての機能。第 68 回日本癌学会学術総会。パシフィコ横浜。神奈川。2009 年 10 月 3 日

12. ベガム アスマ、井本逸勢、小崎健一、津田均、鈴木江美奈、天笠光雄、稲澤謙治：口腔扁平上皮癌における 19q13.12-q13.2 増幅の新規標的遺伝子 PAK4。第 68 回日本癌学会学術総会。パシフィコ横浜。神奈川。2009 年 10 月 3 日

他 13 件

<p>主催セミナー</p>

第 16, 17 回 癌ゲノムサイエンス研究会 . 東京医歯大学. 2009 年 2 月 27 日, 7 月 16 日

<p>国際学術交流</p>

稲澤謙治、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

<p>研究助成金</p>

稲澤謙治：平成 21 年度科研費（特定）「がんの統合的ゲノム解析と個性診断法の開発」代表

稲澤謙治：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

稲澤謙治：JST「個人の遺伝情報に応じた医療の実現プロジェクト（第二期）」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。代表 井本逸勢：平成 21 年度科研費（特定）「ヒトゲノム構造解析ツールとしての高密度ゲノム DNA マイクロアレイの開発と応用」代表

井本逸勢：平成 21 年度科研費（基盤 C）「ゲノム情報と癌遺伝子・癌抑制遺伝子中毒を指標にした食道癌治療標的遺伝子の探索」代表

小崎健一：平成 21 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

稲澤謙治：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発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

<p>特許申請</p>

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

<p>教育</p>

稲澤謙治：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「血液病態制御学」、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

井本逸勢：大学院医歯学総合研究科修士課程「遺伝疾患総論」

難治疾患研究所 ゲノム応用医学研究部門 分子遺伝分野

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。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。また、乳癌は二本鎖 DNA 切断修復機構に関与する BRCA1、BRCA2 遺伝子の異状により発生し、この両分子によって担われる情報伝達の流れの解明は、乳がんの発生機構を解明する上で不可欠である。また、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 遺伝子機能解析

遺伝性乳癌の原因遺伝子産物である BRCA2 タンパク質は、細胞周期の S 期に核内で Rad51 と結合して DNA 修復に関与する。最近、この結合解離が M 期エンタリーへの引き金として働くことが報告されて、BRCA2 は DNA 修復と細胞周期の M 期進行を調整する機能をもつことが示唆された (図 1. A)。また、BRCA2 は細胞周期の G1/S 移行期から 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。中心体は、M 期中期では紡錘体極に位置し、この時期になると BRCA2 は中心体で観察されなくなる。細胞周期がさらに進行して細胞質分裂に入ると、BRCA2 は母・娘細胞の間に形成されるミッドボディに局在する。ところが、中心体、ミッドボディにおける BRCA2 の生理的役割については十分明らかにされていない。そこで我々は、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 が乳癌の発症にどのように寄与しているのか解明したいと考えている。

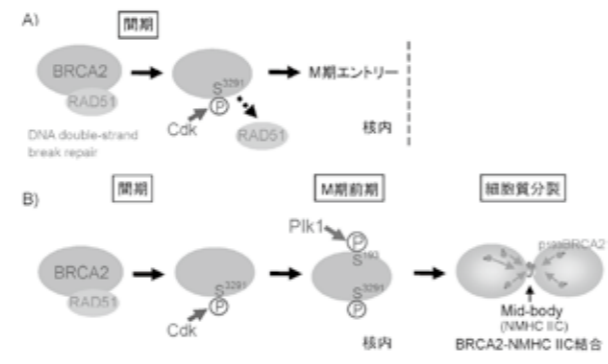


図 1 細胞質分裂における Mid-body での BRCA2-NMHC IIC 複合体の局在

1) BRCA2 は Plectin とともに中心体の局在を制御する

今回我々は、BRCA2 の新規機能を調べるため、グリセロール密度勾配遠心法を用いて BRCA2 と相互作用する新規タンパク質の探索を試みた。その結果、Plectin が同定され、BRCA2-plectin 複合体が中心体の局在制御に関与している可能性が示唆された。Plectin は細胞骨格系タンパク質を架橋する他、核膜構成タンパク質とも相互作用する。Plectin をリン酸化させて、架橋構造を喪失させると、中心体は核から解離した。また、BRCA2-plectin の相互作用阻害や siRNA による両タンパク質の発現抑制によっても同様の中心体局在変化が観察され、さらに核の形態異常も観察された。これらの結果より、BRCA2-plectin 複合体は中心体の局在制御において重要な役割を果たしていることが示唆された (Niwa T, et al. Cancer Sci. 2009)。

2) BRCA2 の細胞質分裂での機能解析

我々は、polo like kinase1 (Plk1) によってリン酸化された BRCA2 (S193) を認識する抗体を作製して、免疫染色にてその局在を観察した結果、BRCA2 が細胞質分裂の mid-body に局在することを明らかにした。siRNA によって BRCA2 の発現を抑制させると、mid-body の伸長化を生じて細胞質分裂時間の延長や分裂阻害が観察された。このように BRCA2 は、細胞質分裂への関与が報告されているが、その詳細は明らかにされていない。また、MCF7 細胞の cell lysate をグリセロール密度勾配遠心法によって分画して、BRCA2 と同じフラクションに存在するタンパク質を質量分析法によって解

析した結果、ヒト非筋肉 II 型ミオシン (NMHC IIC) を同定した。NMHC IIC は、mid-body に局在して細胞質分裂に関与していることが報告されていることから、BRCA2 と NMHC IIC は、共存して細胞質分裂に関与していることが示唆された (図 1. B)。そこで、両タンパク質の結合を明らかにして、さらに A549 細胞で siRNA によって BRCA2 および NMHC IIC の発現を抑制させた結果、mid-body の伸長化や形態異常、二核細胞の増加を検出した。以上ことから両タンパク質の細胞質分裂への関与は、癌細胞での多核化細胞の増加にも関与している可能性が示唆され、さらなる検討を行っている。

3) 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

抗 BRCA2 抗体による共免疫沈降物の質量分析を行い、BRCA2 と相互作用する分子群を同定した。そこで、相同組換え効率を定量化できる DR-GFP 実験系を導入し、相互作用候補分子を siRNA を用いてノックダウンし相同組換え効率を測定した。これにより BRCA2 と同様に相同組換えに関与する相互作用分子を特定した。今後はこの分子の BRCA2 と協調した分子機能について詳細に検討を行なう。また、放射線により二重鎖切断を引き起こした細胞の核画分からの抗 BRCA2 抗体共免疫沈降物の質量分析を開始し、これらの遺伝子についても相同組換え効率の定量化を行なう計画である。

2. DNA 損傷における細胞内シグナル伝達機構と細胞死

DNA は遺伝情報の担い手であり、その正確な複製と子孫への伝達は生物の本質的特性である。一方 DNA は放射線、紫外線などの外的要因だけでなく、細胞の代謝過程で生ずる活性酸素などの内的要因によっても絶えず損傷を受けている。かような DNA 損傷に対し、生物は多様なシグナル伝達機構により細胞周期を停止して損傷を修復し (チェックポイント機構)、修復不能場合には細胞死 (アポトーシス) を誘導し、損傷によって生ずる突然変異の蓄積を回避する。このような DNA 損傷に関わる機構の破綻は、癌をはじめとする広範な疾患の原因となる。近年、DNA 損傷に関わる多数の遺伝子の機能が解明されたが、いかなる細胞内情報伝達により細胞死 (アポトーシス) を誘導するかという制御機構は、その多くが未だ明らかにされていない。我々はこのシグナル伝達を担ういくつかのキナーゼに焦点を当て、機能解析を進めている。

1) Protein kinase C delta (PKC-delta) による NF-kappaB シグナルの制御

PKC-delta は DNA 損傷などのストレス刺激に応じてカスパーゼ 3 により分解され、キナーゼ活性が高まりアポトーシスを強く惹起することが知られている (Yoshida K. Cell. Signal. 2007)。一方様々なサイトカイン刺激での活性も知られているが、そのアポトーシスへの関与は諸説あり、はっきりしていない。我々は PKC-delta の活性を特異的な阻害剤や RNA 干渉により抑えると、TNF-alpha による NF-kappaB の転写活性が有意に低下することを見いだした。この機構は PKC-delta による NF-kappaB のリン酸化調節ではなく、核移行制御にあることが明らかとなった。その主なターゲットとして NF-kappaB のサブユニットの一つである RelA/p65 を同定した。さらに研究を進めた結果、PKC-delta による NF-kappaB 制御は、TNF-alpha によるアポトーシス誘導において負に調節しているという予想外の知見を得た (Lu Z-G, et al. Cancer Res. 2009)。

2) RREB-1 による p53 の転写制御

癌抑制遺伝子 p53 は細胞周期の制御や、アポトーシス誘導に重要な役割を果たしていることが明らかになってきたが、その生理機能と調節機構の詳細ははっきりしない。特に、p53 転写活性の調節についての情報は極めて少ないのが実状である。我々は、PKC-delta が翻訳後修飾だけでなく、転写レベルでも p53 の発現を制御していることを見いだした (Liu H, et al. Mol. Cell. Biol. 2007)。レポーターアッセイの結果から、PKC-delta が p53 のプロモーター領域のうち CPE と呼ばれる配列を介して、p53 の転写活性を促進することを明らかにした。さらに、我々は CPE に結合している転写因子はアポトーシス促進因子 Btf であることを見いだした。DNA 損傷により PKC-delta は Btf と複合体を形成しており、活性化された Btf は CPE と結合し、p53 のプロモーター活性を誘導するが、PKC-delta の阻害剤により Btf と CPE の結合が顕著に抑制された。その結果、p53 の mRNA と蛋白質レベルの発現も明らかに減少した。また、PKC-delta の阻害剤や Btf の siRNA を用いることで、DNA 損傷による p53 依存性アポトーシス誘導が著しく低下した。さらに CPE を介した転写調節因子として RREB-1 と呼ばれる分子を同定した。RREB-1 は PKC-delta とは独立に DNA 損傷に反応して p53 の発現を転写レベルで上昇することが明らかとなった。逆に RREB-1 のノックダウンにより、p53 のみならず p53 によって誘導される遺伝子群の発現も顕著に抑制された。さらに p53 による細胞周期停止や細胞死誘導が有意に阻害され、この影響は p53 に依存していた (Liu H, et al. Biochem. J. 2009)。これらの結果から、Btf や RREB-1 による p53 転写制御を介して、DNA 損傷によ

るアポトーシスを誘導することが明らかになった。

3) 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. DNA 損傷修復機構の解析

1) ヒト細胞のヌクレオチド除去修復に関与する DNA 合成酵素の損傷部位へのリクルート機構の解明

ヌクレオチド除去修復（NER）の後期の過程である、DNA 修復合成と結合については十分な解析が行なわれて来なかった。我々は初めて in vivo の系で NER における合成酵素間の使い分けについて検討を行なった。その結果まず、これまでは S 期の DNA 複製時にのみ起こると考えられてきた PCNA のユビキチン化が、G0 期に静止した状態の細胞でも紫外線照射によって起こり得ること、また、ユビキチン化 PCNA が XRCC1 と協調して Polκ を損傷部位にリクルートし修復合成を行なわせていることを明らかにした。一方、Polδ も Polκ と共に損傷部位にリクルートされ得るが、この過程は古典的な RFC1-RFC2-5 複合体が非修飾型 PCNA などと協調して行っていた。以上の Polκ と Polδ によって損傷部位の半分が修復されており、残りの半分は Polε が CHTF18-RFC2-5 によりリクルートされることによって修復されていることを明らかにした。一連の研究により、NER における DNA 合成酵素の使い分けとそれぞれのリクルート機構が初めて解明された。

2) ゲノム上点変異導入による損傷乗り越え DNA 合成酵素の分子内機能部位の解析

我々は、ニワトリ B リンパ球由来 DT40 細胞株を用いた実験手法を応用し、ゲノム上に点変異を導入する手法を開発した。これまでに、Polκ のモノアルキル化損傷修復機能には DNA 合成活性が必要であること、別の損傷乗り越え合成酵素 Rev1 とは異なる機構で修復に関

与していることを明らかにした。また、DNA 合成不能型 Polκ の存在は修復に阻害的に働かず、機能する他の合成酵素に速やかに置換され得ることが示唆された。次いで上記手法を用い、Rev3 の解析に着手し、ゲノム上点変異導入によって DNA 合成活性は持つが Rev7 と結合していない Rev3 を作出し、予備的な結果では、この細胞株では Polζ が修復する代表的な損傷であるクロスリンクへの感受性が高まる結果を得ている。

3) 相同組換え修復に関与する PTIP 遺伝子破壊株の解析

PTIP (Pax2 transactivation domain-interacting protein) は 6 つの BRCT (BRCA1 C-terminal) ドメインを持つ巨大な核タンパク質である。PTIP は BRCT ドメインを通じて DNA 損傷部位にリクルートされることから DNA 損傷修復に関与すると考えられていた。我々は、ニワトリ B リンパ球由来 DT40 細胞株を活用し、PTIP 遺伝子破壊株を作製した。PTIP 破壊株は、自然 DNA 損傷の増加や高い放射線感受性、高いトポイソメラーゼ I 阻害剤（カンプトテシン）感受性など、相同組換え能の低下を示す表現形を示した。また、相同組換え効率の定量化を行なうと、相同組換え効率の低下が見られた。PTIP 破壊株においても相同組換えに関与する遺伝子の転写量には明確な変化が見られなかったことから、PTIP は転写機能の調節を通じてではなく二重鎖切断の相同組換え修復に直接関与していることが示唆された。

人事異動
業績目録

原著論文

- Takenaka, K. and Miki, Y. Introduction and characterization of a polymerase-dead point mutation into the POLK gene in vertebrates. FEBS Lett, 583, 661-4, 2009
- Liu, H., Hew, H.C., Lu, Z.G., Yamaguchi, T., Miki, Y.* and Yoshida, K. DNA damage signaling recruits RREB-1 to the p53 tumour suppressor promoter. *Biochem J*, 422, 543-51, 2009 *Corresponding author
- Lu, Z.G, Liu, H, Yamaguchi, T., Miki, Y.* and Yoshida, K. Protein kinase Cdelta activates RelA/p65 and nuclear factor-kappaB signaling in response to tumor necrosis factor-alpha. *Cancer Res*, 69, 5927-35, 2009 *Corresponding author
- Nihira, K., Ando, Y., Yamaguchi, T., Kagami, Y., Miki, Y. and Yoshida, K. (2009) Pim-1 controls NF-kappaB signalling by stabilizing RelA/p65. *Cell Death Differ*. 2009 [Epub ahead of print]
- Niwa, T., Saito, H., Imajoh-ohmi, S., Kaminishi, M., Seto, Y., Miki, Y.* and Nakanishi, A. (2009) BRCA2 interacts with the cytoskeletal linker protein plectin to form a complex controlling centrosome localization. *Cancer Sci*, 100, 2115-25. *Corresponding author
- Taira, N., Yamamoto, H., Yamaguchi, T., Miki, Y.* and Yoshida, K. (2009) ATM augments nuclear stabilization of DYRK2 by inhibiting MDM2 in the apoptotic response to DNA damage. *J Biol Chem*. 2009 [Epub ahead of print] *Corresponding author
- Takenaka, K.; Miki, Y. Introduction and characterization of a polymerase-dead point mutation into the POLK gene in vertebrates. FEBS Lett 583:661-664; 2009.

他 3 篇

総説および著書

- 三木 義男：【個別化医療 実現に向けた基盤整備】基礎的観点から ゲノム、トランスクリプトーム情報とがん治療, 治療学 43 巻 3 号 268-271, 2009.
- 三木義男.【個別化医療 実現に向けた基盤整備】基礎的観点から ゲノム、トランスクリプトーム情報とがん治療. 治療学 43(3):268-271; 2009.
- Miki, Y. (2009) Gene expression-based diagnosis of efficacy of chemotherapy for breast cancer. *Breast Cancer*. 他 5 篇

招待講演

国際シンポジウム

- Miki Y. Molecular prediction of therapeutic response and adverse effect of chemotherapy in breast cancer. Institute for Genetic Medicine, Hokkaido University, Research Center for Infection-associated Cancer (RCIAC) , International Symposium New Frontiers in Cancer Research, Hokkaido Japan, March 18,

- 2009
- Yoshida K, Role for DYRK2 on induction of apoptosis in response to DNA damage. The Joint Symposium of the 4th International Symposium of Institutes Network and Osaka University Global COE (Frontier Biomedical Science Underlying Organelle Network Biology) Symposium, Osaka; 1/31 ~ 2/1/09

国内シンポジウム・特別講演

- 三木義男; 牛嶋大; 松浦正明; 長崎光一. 乳癌における治療効果予測因子の現状と今後の展望 化学療法の効果予測因子 基礎の立場から (シンポジウム). 第 17 回日本乳癌学会学術総会、東京、2009 年 7 月
- 三木義男; 長崎光一; 牛嶋大; 宮田敏; 松浦正明; 野田哲生. 分子情報を用いた個別化医療の TR 乳がんの抗がん剤治療効果予測法の開発 (Translational research for personalized medicine based on genome information of cancer patients Genomic study for response prediction of breast cancer chemotherapy) (シンポジウム). 第 68 回日本癌学会学術総会、横浜、2009 年 10 月
- 吉田清嗣 DNA 傷害性アポトーシス誘導における p53 のリン酸化とその意義 第 32 回日本分子生物学会年会 (ワークショップ：p53 研究のニューパラダイム)、横浜；2009 年 12 月

国内学会発表

- 仁平啓史; 三木義男; 吉田清嗣. Pim-1 は RelA/p65 の Ser276 をリン酸化することで NF-κB の活性化を制御する (Pim-1 kinase controls the transcription activity of NF-kappaB through phosphorylation of the RelA/p65 subunit at Ser276). 第 68 回日本癌学会学術総会、横浜、2009 年 10 月
- 中西啓; 斉藤広子; 大海忍; 福田宏之; 高村千鶴子; 三木義男. BRCA2- Myosin IIC complex is localized to the midbody of cytokinesis and required the completion of cytokinesis (和訳中). 第 68 回日本癌学会学術総会、横浜、2009 年 10 月
- 平直江; 三木義男; 吉田清嗣. ATM による DYRK2 のリン酸化は MDM2 を介したユビキチン化の阻害に必要である (ATM phosphorylation of DYRK2 confers resistance to ubiquitination-mediated degradation by MDM2). 第 68 回日本癌学会学術総会、横浜、2009 年 10 月
- 木村純子; 平直江; 三木義男; 吉田清嗣. ライブラリー型 RNA 干渉を用いたアポトーシス誘導関連遺伝子の網羅的探索 (The functional genome-wide RNAi screen identifies TAF1 as a regulator for apoptosis in human cancer cells). 第 68 回日本癌学会学術総会、横浜、2009 年 10 月
- Katsuya Takenaka, and Yoshio Miki. Introduction and characterization of a polymerase-dead point mutation into the POLK gene in vertebrates. 第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 9 日－ 12 日 (横浜). 他 16 篇

国際学会発表

Lu Z-G, Liu H, Yamaguchi T, Miki Y and Yoshida K. PKCdelta activates RelA/p65 and NF-kappaB signalling to prevent TNFalpha-induced apoptosis. 17th ECDO Euroconference on Apoptosis, Paris, France 9/23-9/26/09

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 (代表):科学研究費特定領域 (C) (2) 乳腺発がんにおける BRCA1、BRCA2 の役割
・吉田清嗣 (代表):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):科学研究費 (特定領域研究) がん抑制遺伝子 p53 による細胞死誘導機構の解明とがん治療への応用
・吉田清嗣 (代表)：財団法人武田科学振興財団 2009 年度医学系研究奨励金 (代表) ストレス応答における細胞質－核クロストーク機構とアポトーシス誘導機構の解明
・吉田清嗣 (代表)：財団法人興和生命科学振興財団 平成 21 年度研究助成金 (代表) がん抑制遺伝子 p53 によって誘導されるアポトーシス制御分子の網羅的探索

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。対照疾患は、糖尿病、高血圧、肥満、メタボリック症候群、動脈硬化、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。このための手法開発をバイオインフォマティクスの観点からも進めている。これらの取り組みにより遺伝子多型の疾患に対する相加的、相乗的なリスクを測ることで、将来的にはオーダーメイド医療時代の新しい診断・治療指針の提唱を目指している。

研究紹介

1. TNF- α レアバリエント -856G \rightarrow A の機能解析

Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) は、主にマクロファージや T 細胞から産生される炎症性サイトカインであり、抗腫瘍作用や感染防御に働く一方、炎症性疾患の発症にも関与している。近年、動脈硬化症の本態として血管内における炎症反応の影響が示唆されており、この中で TNF- α も重要な役割を果たしていると考えられている。

当教室ではこれまでに、炎症性サイトカイン遺伝子の遺伝子多型が病理学的粥状硬化に与える影響を検討してきた。その過程で、TNF- α のプロモーター領域に新規のレアバリエント -856G/A (アレル頻度 0.27%、8 症例/

1503 例)、見出した。この変異を持つ 8 症例は動脈硬化度が高い傾向にあり、うち 6 症例では心筋梗塞や脳梗塞の動脈硬化性疾患の病理所見が認められた。動脈硬化症は TNF- α との関連が示唆されていることから、本研究ではこの TNF- α プロモーターの -856 に見出されたレアバリエントが TNF- α の発現に与える影響を in vitro で解析することを目的として行った。

転写因子の結合サイト予測によって -856A (rare variant: RV) に出現が予測された転写因子 C/EBP α 、C/EBP β をそれぞれトランスフェクトした HEK293 細胞の核抽出液を用いて、ゲルシフトアッセイを試みた。その結果、C/EBP α と C/EBP β と DNA の複合体が RV のみに形成されることが示唆され、これは抗体によるスーパーシフトでも確認された (図 1)。また、C/EBP α 、C/EBP β を用いたコトランスフェクションアッセイにより C/EBP が -856G (wild type: WT) に比べて、RV で TNF- α の発現を上昇させ、そのレベルは C/EBP α の方が顕著であった。次に -856A と -856G を持つシフターゼコンストラクトをそれぞれ単球/マクロファージ系 U937 細胞にトランスフェクションし、basal と LPS 及び PMA 処理時でのプロモーター活性を測定した。その結果、RV のプロモーター活性は、LPS/PMA 処理群で WT よりも有意に高いレベルにあることが分かった。次に U937 細胞の核抽出液を用いてゲルシフトアッセイを行ったところ、RV プローブに LPS/PMA 刺激によるバンドの誘導が見られ、これが C/EBP β である事が確認された。

以上、TNF- α プロモーター -856 領域に見出されたレアバリエントが TNF- α 遺伝子の発現に与える影響を検討した結果、このレアバリエントには転写因子 C/EBP が結合し、TNF- α の発現を上昇させる可能性が示された。また、TNF- α の主要な産生源である単球/マクロファージにおいては、C/EBP β がレアバリエントの TNF- α の刺激に対する反応性の亢進に重要な役割を果たしていることを明らかにした。このことは、レアバリエント -856A が、TNF- α の発現に影響を与え、それが動脈硬化症に結びつく可能性を示唆するものである。

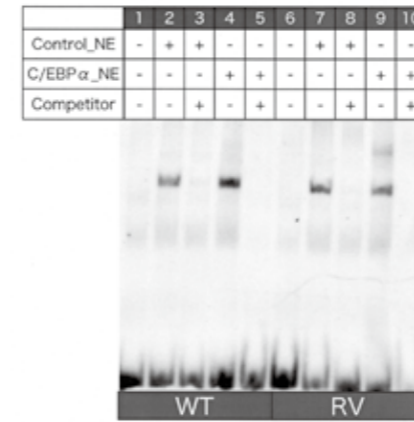


図 1 C/EBP は -856WT には結合しないが -856RV に結合する。

2. TNF α プロモーター領域のメチル化解析手法

TNF- α は、炎症性サイトカインの 1 つであり、様々な疾患との関与が示唆されている。TNF- α の発現は、転写因子の結合、mRNA の安定性、のみならず、DNA メチル化やクロマチン構造の変化などによっても制御されていると考えられる。そこで本研究では、TNF- α のプロモーター領域の簡便な DNA メチル化の解析方法を確立を目指した。

DNA メチル化割合を調べるために、メチル化感受性制限酵素 AciI を用いてゲノムの DNA メチル化状態を判別し、定量的に PCR 増幅産物を解析した。TNF- α のプロモーター領域には -169,-163,-161 の CpG サイトに AciI の認識サイトがあり、この部分の DNA メチル化状態は TNF- α の発現と相関があることが報告されているからである。

U937 細胞を LPS/PMA にて刺激すると、TNF- α の発現上昇とともにプロモーターの著しい脱メチル化が起ることを確認した。そこで、LPS/PMA 処理・未処理細胞から抽出したゲノム DNA を検量線用サンプルとして使い、予め bisulfite シークエンスにて DNA メチル化割合を調べ、更に検量線用サンプルを何種類かの異なる割合で混合させて検量線を作製した。これを用いてヒト DNA サンプルの DNA メチル化割合を算出した。メチル化感受性制限酵素 AciI 消化後に PCR を行う際は、AciI 部位を含むターゲットプライマーと含まないコントロールプライマーを用い、AciI の切断の有無による増幅割合の差から DNA メチル化割合を算出した。その結果、メチル化感受性制限酵素を用いて算出した DNA メチル化割合は、bisulfite シークエンスの結果と近い値 (制限酵素: $22.0 \pm 2.3\%$, bisulfite: 33.3%) となり、今回の方法で、DNA メチル化割合の概算値を求められることがわかった (図 2)。

この方法を用いてまずレアバリエント -856G/A を有する 5 症例の腎臓からの DNA 検体を用いて DNA メチ

ル化を調べたところ、2 検体で AciI 部位の CpG サイトの脱メチル化が見られた。この 2 症例においては脱メチル化は腎臓に特異的で、同症例の脳、肝臓では脱メチル化されていなかった。従ってレアバリエントではなく、臓器毎に TNF α プロモーターのメチル化の要因が異なっている可能性が考えられた。各症例の病理診断と合わせると、炎症のある臓器の検体で、-169,-163,-161 の脱メチル化傾向が認められるようであった。組織ごとの -169,-163,-161 の脱メチル化と炎症の有無に関しては今後サンプルを増やした解析が必要である。一方、レアバリエント部位周辺のメチル化状態について bisulfite シークエンスで直接調べたところ、-782 の CpG サイトは、-856 が A アレルのものの方が低メチル化状態であった。今後より多くのサンプルを用いて解析し、転写因子の結合等と DNA メチル化との関連も調べていくことが必要である。今回、メチル化感受性制限酵素 AciI を用いた方法によって、比較的簡単に DNA メチル化割合を概算することができた。今後、この方法を用い、大規模な DNA メチル化解析を行っていくことが期待出来る。

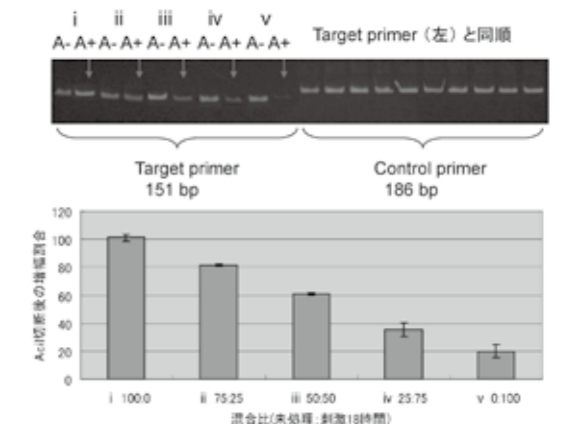


図 2 TNF- α プロモーター DNA メチル化の制限酵素 AciI による定量化

3. 核内受容体 CAR 遺伝子多型と疾患の関連研究

Constitutive Androstane Receptor (CAR) は核内レセプターファミリーのひとつであり、RXR とヘテロダイマーを形成し、転写因子として働くことが知られている。CAR は薬剤フェノバルビタールや農薬残留物質 TCPOBOP などの生体異物に反応して、CYP2B などの異物代謝酵素の遺伝子発現を促進させる。現在、未だに CAR の機能は十分解明されておらず、CAR と疾患との関連研究は行われていない。そこで私達は CAR 遺伝子が人のフェノタイプに及ぼす影響を観察する目的で、Japanese SNP database for Geriatric Research (JG-SNP) に登録された約 1500 例の連続剖検症例において CAR の遺伝子多型を測定し、老年性疾患の発症との関連を検討した。解析の過程で偶然に CAR に新たなノンセンス変異 (R250stop) を 1500 例中 3 例に見出した (図

3)。これらの症例はいずれも担癌患者であったが、原発臓器は異なっており（肝胆道、前立腺、造血器）、現病との関連は明らかではない。一方、アレル頻度の高い塩基多型に関しては5カ所のSNP (MPJ6_1I3003、MPJ6_1I3009 : rs11265571、MPJ6_1I3014、MPJ6_1I3021 : rs6686001、MPJ6_1I3025 : rs2307424) を測定し、主に癌との関連を検討した。その結果、MPJ6_1I3003、MPJ6_1I3009 (OR=1.61, 95% CI=1.00-2.58)、MPJ6_1I3021 (OR=1.65, 95% CI=1.03-2.65) の3カ所のSNPにおいて造血器腫瘍と関連していることが明らかになった。またMPJ6_1I3025 : rs2307424においては造血器腫瘍 (OR=0.56, 95% CI=0.35-0.88)、および白血病 (OR=0.46, 95% CI=0.23-0.93) と関連している事が明らかとなった(図3)。肺癌、胃癌、大腸癌等の他の腫瘍との関連は認められなかった。造血器腫瘍の発症に関してはベンゼン等の暴露がリスクとなることが知られている。また白血病とCYP450遺伝子多型との関連研究も報告されている。今回、私達の結果はCYP450遺伝子群の転写調節因子の遺伝子多型が腫瘍発症リスクに関与する可能性を始めて示唆したものである。

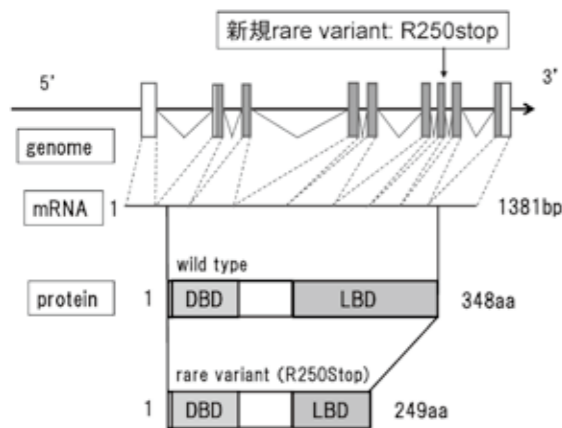


図3 ヒトCAR遺伝子の新規ノンセンス変異

4. 環境因子(ゲニステイン)による子宮内膜細胞のSF-1遺伝子エピゲノム状態の変化についての研究

本来子宮内膜細胞ではSF-1 (Steroidogenic factor-1) 遺伝子の発現は抑制されており、その発現調節領域は高度にCpGメチル化されている。しかし子宮内膜症においては、病変部細胞のSF-1遺伝子調節領域が異常にCpG脱メチル化されており、SF-1遺伝子発現が誘導されていることが近年報告された。SF-1はステロイド合成に関わる酵素群の転写因子として作用するためSF-1が発現することによりエストロゲン合成が促進される。また、エストロゲンは膜型エストロゲン受容体であるGPR30を介してSF-1転写因子の転写活性化能を促進すると考えられている。従って、一旦子宮内膜症細胞

でSF-1が発現すると、エストロゲン合成促進とSF-1の転写活性化能亢進のpositive-feedback loopが形成されてしまい、それが子宮内膜症の悪化、難治性を惹起しているのではないかと考えられる。

我々は、卵巣摘出後マウスに植物性エストロゲンであるゲニステインを投与した場合、子宮内膜細胞のSF-1遺伝子調節領域が顕著にCpG脱メチル化されていることを見いだした。このときにSF-1の転写も誘導されていた。次に我々は、in vitroでマウス子宮内膜細胞のSF-1のCpGメチル化状態に与えるゲニステインの影響を調べた。子宮内膜ストローマ細胞の初代継代培養においてはゲニステインを添加してもSF-1領域は高度にCpGメチル化されたままであった。しかし、その中から樹立したコロニー形成能のあるクローンのうち、非常に増殖能の高いクローンでは、ゲニステインを添加した場合にCpG脱メチル化がみられた。このことから我々は、「子宮内膜細胞のうち高い増殖能を有する組織幹細胞様の細胞は、ゲニステインなどの環境因子に対する感受性-エピゲノム状態の変容性が特異である。すなわち分化した細胞では抑制されるべきSF-1遺伝子のような領域が組織幹細胞様の細胞では環境因子によって再活性化されやすくなるのではないか。このような特異なエピゲノム状態を持った組織幹細胞様の細胞が子宮外に生着し子宮内膜症組織を構成すると難治性の子宮内膜症をひきおこすのではないかと考え、現在その仮説を検証している。

人事異動

退室：アンナ・カロリン・モンテン (専攻生)
入室：平石敦子、増田 萌、山田美紀、陳 曦 (大学院生)、ネ・チー・トン、毕 波、ゾリビア・エビブラ (専攻生)

業績目録

原著論文

1. Sawabe M, Arai T, Araki A, Hosoi T, Kuchiba A, Tanaka N, Naito T, Oda K, Ikeda S, and Muramatsu M. Smoking confers a MTHFR 677C>T genotype-dependent risk for systemic atherosclerosis: Results from a large number of elderly autopsy cases died in a community-based general geriatric hospital. *Atherosclerosis and Thrombosis* 16:91-104, 2009.
2. Matsunaga T, Yonemori C, Tomita E, Muramatsu M. Clique-based data mining for related genes in a biomedical database. *BMC Bioinformatics*. 2009 1:10:205.
3. Zhang L, Miyaki K, Wang W, Muramatsu M. CYP3A5 polymorphism and sensitivity of Blood Pressure to dietary salt. *J Hum Hypertens* 2009 [Epub ahead of print]
4. 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*. 2009 [Epub ahead of print]
5. Daimon M, Oizumi T, Toriyama S, Karasawa S, Jimbu Y, Wada K, Kameda W, Susa S, Muramatsu M, Kubota I, Kawata S, Kato T. Association of the Ser326Cys polymorphism in the OGG1 gene with type 2 DM. *BBRC* 386:26-29, 2009.
6. Miyaki K, Lwin H, Masaki K, Song Y, Takahashi Y, Muramatsu M, Nakayama T. Association between a Polymorphism of Aminolevulinic Dehydrogenase (ALAD) Gene and Blood Lead Levels in Japanese Subjects. *Int J Environ Res Public Health* 6:999-1009, 2009.
7. 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*. [Epub ahead of print]
8. Aoki K, Sato N, Yamaguchi A, Kaminuma O, Hosozawa T, Miyatake S: Regulation of DNA demethylation during maturation of CD4+ naive T cells by the conserved noncoding sequence. *J. Immunol.* 182: 7698-707, 2009.

国内学会発表

1. 村松正明：フェノームスキャンによる遺伝子機能解析。ゲノム創薬フォーラム第12回シンポジウム 疾患オミックスとゲノム創薬 - Diseaseomeを基盤とした次世代創薬戦略 -。2009.11.9. 東京。
2. 頭金正博、鹿庭なほ子、黒瀬光一、斎藤嘉朗、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。ステイブンス・ジョンソン症候群/中毒性表皮壊死症の発症と関連するバイオマーカーの探索研究。日本臨床薬理学会第30回年会。2009.12.3. 横浜。
3. 末永高志、松永務、関根純、村松正明。テキストマイニングのためのドメイン別単語辞書の構築方法。情報処理学会研究報告(数理モデル化と問題解決)。2009.12.17 電気通信大学。

4. 松倉寛、村松正明、佐藤憲子：Epigenetic regulation of SF-1 gene in endometrial colony-forming cells by genistein 第32回日本分子生物学会年会 2009年12月
5. 砂河孝行、白木伸明、永江玄太、堤修一、佐藤憲子、桑昭苑、油谷浩幸：ES細胞分化におけるDNAメチル化プロファイリング 第32回日本分子生物学会年会 2009年12月

国際学会発表

1. Zhang L, Miyaki K, Wang W, Muramatsu M. CYP3A5 Genotype Is Associated with Blood Pressure and Have An Interaction with Calculated 24h Urinary Sodium Excretion Level in Japanese Male. 12th World Congress on Public Health, Istanbul, Turkey. April 27-May, 2009.
2. Miyaki K, Lwin H, Fujii S, Sakurazawa H, Ando H, Song, Y, Muramatsu M, Takahashi Y, Hoshino H, Suzuki N. Salt reduction intervention in workplace based on behavioral theories - Rationale and design of a randomized controlled trial - The 1st Asia-Pacific Conference on Health Promotion and Education (APHPE). July 18-20, 2009. Chiba.
3. Muramatsu M. Genetic risk factors identified by pathological coronary atherosclerosis as an outcome. 12th Cardiovascular Genomics and Atherosclerosis Symposium. Oct 16-17, 2009. Seoul, Republic of Korea.
4. Muramatsu M. Gene-environment Interaction of Metabolic Syndrome and Atherosclerosis. 12th Cardiovascular Genomics and Atherosclerosis Symposium. Oct 16-17, 2009. Seoul, Republic of Korea.
5. Tohkin M, Kaniwa N, Kurose K, Saito Y, Aihara M, Matsunaga K, Takahashi Y, Furuya H, Muramatsu M, Kinoshita S, Ikezawa Z, Hasegawa R. Exploratory Study of Genetic Biomarkers Associated with Drug-Induced Stevens-Johnson Syndrome and Toxic Epidermal Necrolysis in Japanese Patients. International Society for the Study of Xenobiotics, 16th North American Regional Meeting. October 18-22, 2009. Baltimore, USA.
6. Muramatsu M. Gene environment interactions in metabolic diseases and atherosclerosis. FY2009 International Symposium From Yamagata to the World: Opening the Gate to Advanced Medicine. Nov 6-7, 2009. Yamagata.
7. Susa S, Daimon M, Sakabe J, Sato H, Oizumi T, Karasawa S, Wada K, Jimbu K, Kameda W, Emi M, Muramatsu M, Kato T. A functional polymorphism of the THF- α gene that is associated with type 2DM. FY2009 International Symposium From Yamagata to the World: Opening the Gate to Advanced Medicine. Nov 6-7, 2009. Yamagata.

学内外教育活動

村松正明：山形大学医学部非常勤講師

研究費取得

1. 平成21年度受託研究費ヒュービットジェノミクス(株)「遺伝子の多型とその機能に係わる委託研究」研究代表者 村松正明。
2. 文部科学省科学研究費(基盤研究B)「遺伝子多型情報を用いた減塩介入の血圧値と行動に対する影響の評価」：課題番号19390173 分担研究者 村松正明。
3. 文部科学省科学研究費(基盤研究C)「幹細胞分化を制御するGCNFのDNAメチル化誘導機構」：課題番号19570146 研究代表者 佐藤憲子。

4. 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：遺伝子検査最先端 癌から薄毛までリスクがわかる。Asahi Shimbun Weekly AERA pp.29-31. 2009.12.7.

難治疾患研究所ゲノム応用医学研究部門遺伝生化分野 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、Oxford で ribosomal RNA の Pol II 転写の研究を行った川内助教が参加したことを契機にこれまでの Pol II の遺伝子制御から、核~核小体の遺伝子発現制御のクロストークに視点を広げた研究を開始した。

1-1 転写伸長因子エロンガンの Rpb1 ユビキチン E3 リガーゼ機能と転写制御

RNAポリメラーゼ II (Pol II) 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、我々は、高知大学麻生研と共同で、Elongin ABC が DNA damage に応答する RNAポリメラーゼ II (Rpb1) 分解 E3 リガーゼであることを報告し

た (EMBO J 2008)。さらに、この分解は、Rsp5 によるモノユビキチン化に続いて Elongin/Cullin 複合体によるポリユビキチン化によって起こることも知られている。本年度において、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た。これまでの我々の知見と合わせ、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 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。

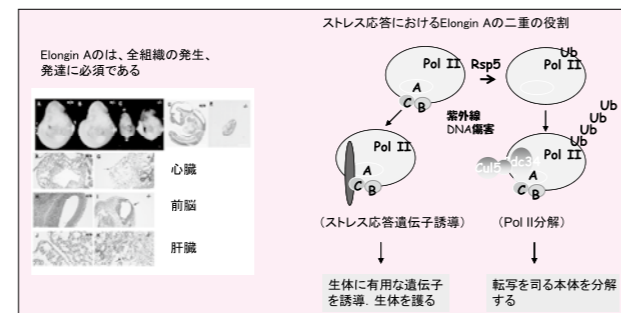


図1 Elongin A の生物機能

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。

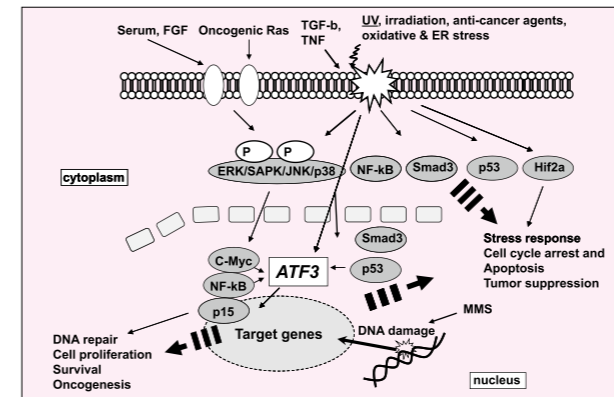


図2 ATF3 誘導のシグナルと伝達

2-1 新規 alternate promoter P1 の解析

既知の ATF3 promoter のおよそ 40 kb 上流に新規な alternate promoter P1 がヒト、マウス間で保存されている。我々は、P1 が既知の P2 とともに各種ストレス刺激や Ras 変異体、TGF- β に応答すること、さらに、ATF3 高発現が、増殖や転移と関連することが報告されているヒト前立腺がん、ホジキン Reed-Sternberg 細胞では、この上位プロモーターが選択的に活性化されていることを発表した (Nucleic Acids Res. 2009)。

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という正反対の作用を示し、一方 c-Myc 下流で細胞増殖を促進したり一部のがん細胞で恒常的に発現されるなど、複雑な機能を有している。しかし、ATF3 がどのような標的遺伝子を制御するかは余り分かっておらず、従って ATF3 の生理学的機能を制御する分子基盤も不明な点が多く残されている。そこで我々は、ヒト大腸がん細胞においてアルキル化剤であるメタンスルホン酸メチル (MMS) によって誘導される ATF3 と、前立腺がん細胞で恒常的に発現されている ATF3 のそれぞれの標的遺伝子を網羅的に探索するため、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った。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が明らかになった。これは、ATF3 が他の多くのストレスセンサーと転写因子ネットワークを形成し、ストレス応答を転写レベルで制御していることを示唆する。我々は更に、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た。

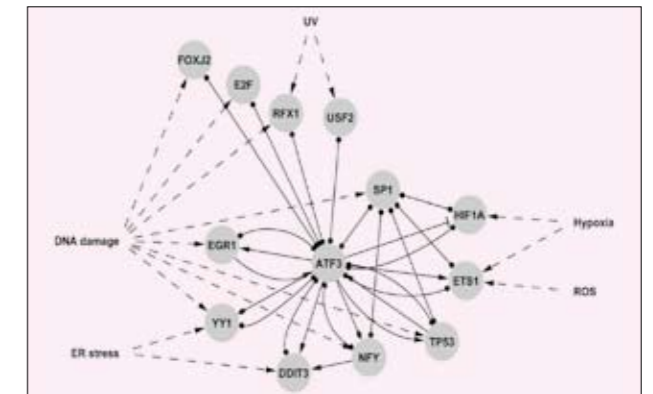


図3 種々のストレス刺激に対する応答と ATF3 経路

2-3 ATF3 複合体の解析からの細胞増殖機能解明

ヒト前立腺がん、乳がん、ホジキン病などでは ATF3 の持続的発現が認められ、がんの悪性度や転移能と正の相関が指摘されている。ATF3 の Oncogene 機能を知る目的で、ATF3 発現が高く診断の Hallmark ともされるホジキンリンパ腫細胞の ATF3 複合体の精製に着手した。ヒストン脱アセチル化酵素のいくつかは ATF3 と結合することを見出し報告した (日本分子生物学会 2009)。さらに、質量分析による ATF3 複合体の解析を進めている。

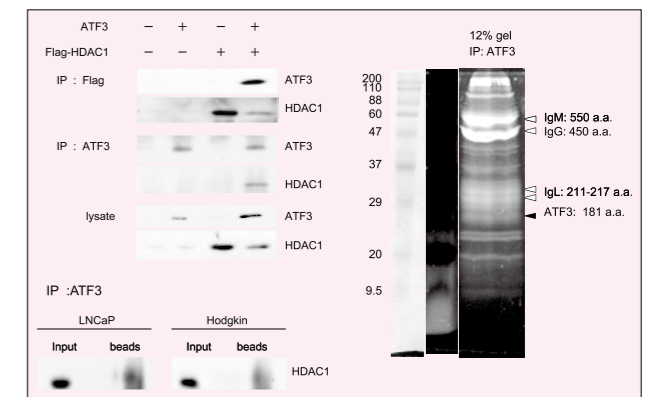


図4 ATF3 複合体解析

3. 心血管系の傷害、庇護、再生

我々は、核移行シグナルを付加したサイクリン D1 (D1NLS) を核内に強制発現させることで心筋の細胞分裂を再誘導できることを見出し、さらに Skp2 共発現による p27 分解を組み合わせたことでより安定な細胞増殖が得られることを見出した (Cardiovascular Res. 2008)。これにより、D1NLS/CDK2/Skp2 の遺伝子治療の有効性が示された。しかしながら、心筋におけるサイクリン D 1 核内移行の障害については不明なままであ

る。本年度は、以下の成果を得た。

4. サイクリンD1複合体の精製と解析

NLSを持たない野生型サイクリンD1をラット胎児心筋細胞に過剰発現させても、D1発現は細胞質に局限され、細胞周期進行を促すことはできない。そこで本年度は核移行阻害の原因を解明するために細胞質からサイクリンD1複合体を精製、質量分析による解析を行った。複数のユビキチンリガーゼが同定され、核内発現抑制の原因の一つと考えられた(日本分子生物学会2009)。これらの結果をもとに、臨床応用を視野に入れてペプチドデコイを用いたサイクリンD1ユビキチン化抑制のin vivo心筋での解析とそれによる細胞周期促進作用を検討中であり、アスピオファーマとの共同研究で新規心筋再生法の開発に向けた研究を進めている。

人事異動

転入:川内潤也(助教、オックスフォード大学)、佐々木かおり(大学院生)、本下愛子(大学院生)、武谷憲二(特別研究学生)、小澤高嶺(卒業研究生)、小高愛未(卒業研究生)、巽一郎(受入研究学生)

転出:山田一彦(大学院生)、保坂百合子(卒業研究生)

業績目録

原著論文

1. Rondon, GA, H. Mischo, J. Kawachi and N.J.Proudfoot. Fail-safe transcriptional termination for protein-coding genes in *S. cerevisiae*. *Mol Cell* 36, 88-98, 2009

2. Suganami T, Yuan X, Shimoda Y, Uchio-Yamada K, Nakagawa N, Shirakawa I, Usami T, Tsukahara T, Nakayama K, Miyamoto Y, Yasuda K, Matsuda J, Kamei Y, Kitajima S, Ogawa Y. ATF3 constitutes a negative feedback mechanism that attenuates saturated fatty acid/Toll-like receptor 4 signaling and macrophage activation in obese adipose tissue. *Circ Res*.105, 25-32, 2009

3. Miyazaki K, Inoue S, Yamada K, Watanabe M, Liu Q, Watanabe T, Adachi-T M, Tanaka Y, and Kitajima S. Differential usage of alternate promoters of the human stress response gene ATF3 in stress response and cancer cells. *Nucleic Acids Res* 37, 1438-1451, 2009

4. Turchi L, Fareh M, Aberdam E, Kitajima S, Simpson F, Wicking C, Aberdam D, and Virrole T. ATF3 and p15PAF are novel gatekeepers of genomic integrity upon UV. *Cell Death and Differentiation* 16, 728-737, 2009

5. Okada M, Sakai T, Nakamura T, Adachi TM, Kitajima S, Matsuki Y, Watanabe E, Hiramatsu R, Sakaue H, Kasuga M. Skp2 promotes adipocyte differentiation via a p27kip1-independent mechanism in primary mouse embryonic fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 379, 249-254, 2009

国内学会発表

1. 刘芹、川内潤也、小澤高嶺、山田一彦、宮崎敬介、田中裕二郎、北嶋繁孝:ATF3(activating transcription factor3)による転写抑制のメカニズム.平成21年12月、横浜 第32回日本分子生物学会

2. 中村絢、田中裕二郎、森岡勝樹、武谷憲二、川内潤也、安達(玉盛)三美、田中博、北嶋繁孝:システムズ・バイオテクノロジーによるATF3標的遺伝子の網羅的探索.平成21年12月、横浜 第32回日本分子生物学会

3. 浅野慎一郎、安達三美、山田一彦、北嶋繁孝:ラット新生心筋細胞のサイクリンD1核内移行制御機構.平成21年12月、横浜 第32回日本分子生物学会

4. 川内潤也、Nick Proudfoot: Parallel mechanism of Pol I and Pol II transcriptional terminations: Co-transcriptional cleavage, Rat1 exonuclease "torpedo" and Sen1 helicase.平成21年12月、横浜 第32回日本分子生物学会

国際学会および海外セミナー

1. Kitajima S, Tamamori-Adachi M, Takagi H, Hashimoto K, Goto K, Hidaka T, Koshimizu U, Yamada K, Goto I, Inomata N. Cardiomyocyte proliferation and protection against post-myocardial infarction heart failure by nuclear gene transfer of cyclin D1 and Skp2 ubiquitin ligase. The 8th International Congress on Coronary Artery Disease from Prevention to Invention. 10-15 Oct. Prague, Czech

2. 川内潤也:「Nuclear Dynamics and RNA (II)」Parallel mechanisms of transcriptional termination between RNA polymerase I and II in *S. cerevisiae*.平成21年6月、札幌 第24回内藤コンファレンス

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

川内潤也:高知大学医学部 大学院セミナー

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プローブによるヒストン就職の時間空間的分析」

川内潤也(代表):第38回かなえ医薬振興財団研究助成金「リボソームRNA転写制御と新規がん治療戦略の開発」

疾患生命科学部 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（ヒトでは全遺伝子の約7割と推定されている）。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

mRNA 前駆体の選択的スプライシングはヒトの全遺伝子の90%以上に見られる普遍的な機構で、高等生物の限られた数の遺伝子から多様な mRNA、タンパク質を産生するのに大きく寄与しており、組織特異的あるいは発生段階依存的な制御が数多く知られている。しかし、選択的スプライシング制御機構は主に培養細胞系を用いて解析されてきたために、生体内における組織特異的・発生段階依存的な制御機構の全貌は未だ明らかではない。

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

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

我々はまた、線虫のコラーゲン遺伝子 *let-2* の発生段階依存的なエクソン選択性を可視化し、発生段階依存的な変異体を単離・解析して、スプライシング制御因子として新規の STAR ファミリー RNA 結合タンパク質 ASD-2 を同定した。さらに、一部のイントロンのみが

除去されたプロセシング中間体を変異体から検出することにより、選択的スプライシングによる mRNA 前駆体の運命決定に重要なイントロン除去の順序を明らかにした (Genes Dev, 2008)。

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。

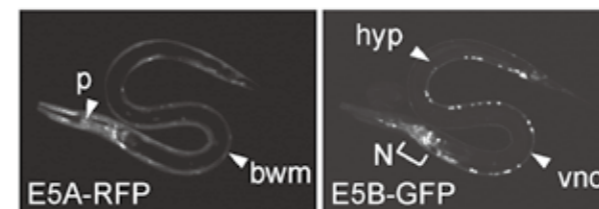


図1. 組織特異的選択的スプライシングレポーター線虫。エクソン5Aの発現を示すRFPとエクソン5Bの発現を示すGFPが組織により異なった発現パターンを示している。



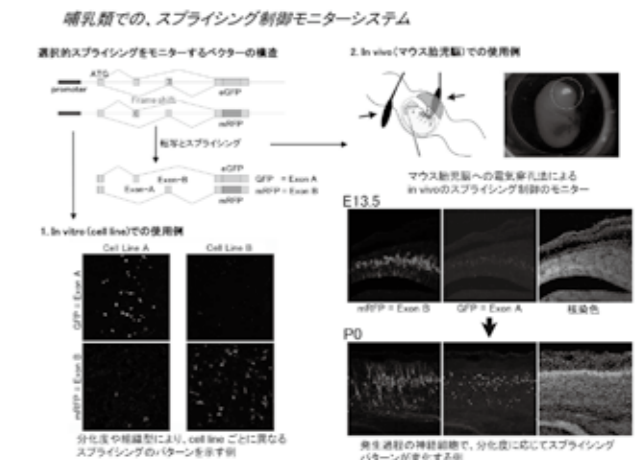
図2. *let-2* mRNA前駆体のプロセシング経路の解明。胚の時期にはエクソン9下流のエクソン10を含むイントロン領域がまず除かれ、続いて残った上流のイントロンが除かれることによりエクソン9を含むmRNAが生じる(左図)。成虫においては、ASD-2によってエクソン10下流のイントロンの除去が促進され、その後、スプライス・アクセプター部位の相対的な強さの違いによりエクソン10選択が一義的に決まる(右図)。

2. マウスの中枢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来ている。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す。



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 SRPKs, CLKs 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 SRPKs 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、SRPKs 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 SRPKs、Clks 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。SRPKs と Clks 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。

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、感染、低酸素状態、高熱被曝、ラジカル産生などの環境の変化や様々なストレスに常に曝されうる状況にある。細胞には、これらの環境変化、ストレスに対して、関連する遺伝子の発現量や機能を調節することで、細胞機能や生存状態を維持する機構が備わっている。こういった発現量制御、機能変化が選択的スプライシングによって行われている例も、これまでに幾つか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、これまで培ってきたスプライシング・レポーター系の技術や分子生物学・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機構の実体の解明を試みている。

業績目録

原著論文

- Nojima T, Oshiro-Ideue T, Nakanoya H, Kawamura H, Morimoto M, Kawaguchi Y, Kataoka N and Hagiwara M (2009) Herpesvirus protein ICP27 switches PML isoform by altering mRNA splicing Nucleic. Acids Res. 37 (19) :6515-27
- Jiang K, Patel NA, Watson JE, Apostolatos H, Kleiman E, Hanson O, Hagiwara M, Cooper DR. (2009) Akt2 regulation of Cdc2-like kinases (Clk/Sty), serine/arginine-rich (SR) protein phosphorylation, and insulin-induced alternative splicing of PKC α mRNA. Endocrinology 150 (5) :2087-97

総説

- Hidehito Kuroyanagi. (2009) Fox-I family of RNA-binding proteins. Cellular and Molecular Life Sciences 66:3895-3907.
- 萩原正敏、野島孝之 (2009) ウイルスによるスプライシング暗号の利用と乱乱 実験医学 増刊 Vol.27 No.10
- 萩原正敏 (2009) リン酸化依存的スプライシング制御機構 蛋白質核酸酵素 Vol.54 No.16
- 黒柳秀人、「選択的スプライシングの可視化と制御機構解明への応用」蛋白質核酸酵素 2009 年 12月号増刊「mRNA プログラム」

学会、シンポジウム主催

萩原正敏 知財人材養成プログラムサマリーセッション 東京、2月
萩原正敏 日本薬理学会第81回関東部会 東京、7月
黒柳 秀人 RNA フロンティアミーティング 2009、湘南、9月

国際学会講演

萩原正敏 研究所ネットワーク国際シンポジウム 大阪、1月
萩原正敏 国際生化学分子生物学会 上海、8月
黒柳秀人 “Regulation of Alternative Splicing *in vivo*” 8th Surugadai International Symposium, 東京、9月.
Hidehito Kuroyanagi, Masatoshi Hagiwara. “Fox-I family and CELF family RNA-binding proteins regulate neuron-specific alternative splicing in *C. elegans*.” Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on EUKARYOTIC mRMA PROCESSING, Cold Spring Harbor, NY, USA, 8月.

国外招待講演

萩原正敏 中国医科大学大学院特別セミナー 瀋陽、10月
Hidehito KUROYANAGI. “Tissue-specific alternative splicing regulation by Fox-1 family in *C. elegans*.” HHMI/UCLA, Department of Microbiology, Immunology, and Molecular Genetics, ロサンゼルス、米国、6月.
Hidehito KUROYANAGI. “Tissue-specific alternative splocing regulation in *C. elegans*.” Centre for Genomic Regulation, バルセロナ、スペイン、12月.

国内招待講演

萩原正敏 医歯学総合研究科大学院セミナー 東京、1月
萩原正敏 文部科学省補助金 平成 20 年度研究

拠点形成費補助金（若手研究者用成否） 大学教育支援プログラム（大学院 GP）「創薬に向けた医薬科学を先導する人材の要請」東京、3月
萩原正敏 日本化学会ノーベル化学賞受賞記念シンポジウム 船橋、3月
萩原正敏 京都大学医学部・大学院セミナー 京都、9月
萩原正敏 TMDU-CMU 国際シンポジウム 東京、10月
萩原正敏 北海道大学医学部眼科学講座セミナー 札幌、10月
萩原正敏 第82回日本生化学大会シンポジウム「ストレス応答の新機軸」 神戸、10月
萩原正敏 第2回グローバル COE 国際シンポジウム 名古屋、11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82回日本生化学会 シンポジウム「多様性と非対称性を獲得する RNA プログラム」神戸、10月

学内外教育活動

萩原正敏：三重大学医学部 医学系研究科 非常勤講師
萩原正敏：京都大学大学院 医学研究科 客員教授

競争的研究費取得

萩原正敏（代表） 独立行政法人 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） 独立行政法人 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） 厚労科研究費補助金 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） 日本学術振興会 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） 独立行政法人 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 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 平成 21 年度「GCOE プログラム」(研究拠点形成費補助金 (研究拠点形成費)
黒柳秀人(代表) 日本学術振興会 基盤研究(C) (一般)「生体内選択的スプライシング可視化技術によるスプライシング制御機構の解析」
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） 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 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）日本学術振興会科学研究費補助金 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 日本学術振興会科学研究費補助金 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

受賞

黒柳秀人．平成 21 年度科学技術分野の文部科学大臣表彰若手科学者賞「生体内可視化技術の開発によるスプライシング暗号の研究」

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. 発生工学的手法は遺伝子発現制御にどのような影響を与えるか？

哺乳類で、はじめて体細胞クローン動物となるクローンヒツジドリーの誕生が1997年に報告されて以来、翌年にマウス、ウシ、そして現在では多くの種において体細胞クローン作製が成功している。この技術は有用家畜類の生産や絶滅危惧種の保存に役に立つだけでなく、ヒトの体細胞クローン胚から作製するES細胞(ntES細胞)の再生医療利用に大きな可能性を与えている。これは分化した体細胞も初期化により発生全能性を再獲得できることを意味し、近年、話題になっているのiPS細胞(誘導多能性幹細胞)の樹立成功へ繋がった。これらの初期化の過程では、ゲノムに書き込まれているDNAメチル化やヒストン修飾などのエピジェネティック情報が、万能細胞または多機能性幹細胞の能力をもつように書き換えられているが、その実態はまだ不明である。しかも、この書き換えが正常の個体発生で起きた状態と必ずしも同じ状態になっていないことも明らかになっている。私たちは2005年のBiological Reproduction誌に体細胞クローンマウスにおける詳細かつ網羅的な遺伝子発現解析

を行った報告を行った。見た目は正常であり将来生殖能力のある個体に成長する体細胞クローンマウスであるが、そこでは全く予想外のことに、これら「遺伝的に全く同一のはずの体細胞クローンマウス間で、多く(全体の20-40%)の遺伝子発現パターンが異なっている」ことが明らかとなった。すなわち「体細胞クローン動物はジェネティックには均一だがエピジェネティックにはきわめて不均一な動物である」ことを意味している。エピジェネティックな不均一性をいかにして克服し、期待通りの個体を産出できるかが、この技術の普及と再生医療への応用に大きな問題であることが明確となり、現在、その方面での改良が進められている。

体細胞クローンマウスの場合には、成長にしたがって肥満や寿命の短縮化が起きており、これらが遺伝子発現の乱れによる可能性が高いと考えられている。一方で、このクローンマウスの解析から、一見正常に見える個体においても隠された遺伝子発現の異常が起きている可能性が明らかになった。現在、ヒトの生殖補助医療には体外受精(IVF)や顕微授精(ICSI)といった方法が用いられている。それぞれ、名前の通り、精子と卵子を体外(シャーレの中)で受精する、または精子の核の部分を卵子に直接挿入するという方法で受精させた後、子宮内に戻して着床させる技術である。マウスの発生工学でも同様に、これらの方法は広く使われており、そこから生まれる個体は、見た目では正常個体と全く変わらないため、実験における正常コントロールとしてよく使われる。そこで、マウスをもちいて、全く正常に見えるIVF個体、ICSI個体の遺伝子発現を調べてみた。その結果、IVF個体では全く正常な遺伝子発現パターンが観察されたが、ICSI個体には新生児期に特徴的な変化が観察された。これらの変化は少なくともB6という系統のマウスでは成体の行動に影響を与えてはいなかった。マウスでの実験結果をヒトに外挿することは簡単ではない。このマウスでの結果は、ヒトにおけるICSIの影響を正確に調べることの必要性を訴えている。

2. 哺乳類特異的遺伝子における胎盤形成機能の解析

ヒトを含む哺乳類のゲノムの中には、哺乳類にしか存在しない遺伝子が幾つかある。これらの遺伝子が、哺

乳類の個体発生にどのような意味をもっているのか体系的な解析を続けている。2001年のGenomics誌に、ヒトのゲノムのなかにレトロトランスポゾンと呼ばれる細胞内を動き回るDNAに由来する遺伝子、*PEG10*の存在を報告した。この遺伝子はマウスやウマ、ウシ、イヌなど私たちが見慣れた動物(真獣類)とカンガルーやコアラなど(有袋類)には共通に保存されているが、トリや魚などの他の高等脊椎動物には存在しない。私たちがこの遺伝子を欠失させたマウス(*Peg10*ノックアウトマウス)を作製したところ、これは受精卵が子宮に着床した直後に胎盤形成不全のために致死となった。これを2006年のNature Genetics誌に報告したが、哺乳類特異的遺伝子が哺乳類で特異的に見られる臓器である胎盤形成に必須な役割を果たしていることの初めての報告となった。ひきつづき、2008年には、同じく哺乳類特異的(この場合には真獣類特異的)な遺伝子である*Peg11/Rtl1*が、真獣類の胎盤の特徴であり、母子間相互作用の中心となる胎児毛細血管の維持に必須な機能をはたし、これを失うと胎児が妊娠後期から新生児期にかけて致死になることをNature Genetics誌に報告した。

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(ハイライト参照、図1、2)。このように、哺乳類特異的遺伝子は哺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ることを意味している。また、*PEG10*と*PEG11/RTL1*がヒト疾患において重要な役割を果たしていたことから、ヒト*SIHR7*の疾患への関与も重要な解析課題となっている。真獣類において、この遺伝子の仲間は合計で11個知られており、他の遺伝子の機能についても研究が進められている。

ハイライト

哺乳類特異的遺伝子群が生物進化に果たした役割

母親が子供を産む胎生という生殖機構は哺乳類に特徴的な性質であると一般には思われている。しかし、カモノハシとハリモグラからなる単孔類は卵生であることから、胎生は哺乳類全体の特徴ではなく、哺乳類の中で有袋類と真獣類が分岐した後に獲得された形質であることがわかる。*PEG10*はこの2つのグループに共通して存在する胎盤形成に必須な遺伝子であり、これらのグループの胎盤進化に重要であったと考えられる。*PEG11/RTL1*は真獣類にのみに存在し、有袋類には存在していない。この*PEG11/RTL1*の有無は何を意味しているのであろうか？

私たちは、これが真獣類と有袋類の生殖戦略に大きな影響を与えたと考えている。真獣類と有袋類は、実は、異なる起源をもつ胎盤を使っている。尿奨膜（絨毛膜）胎盤と卵黄囊胎盤の違いである。後者はニワトリの卵の黄身を包み込む膜のことで、有袋類、真獣類にも構造は保存されているが、中身の卵黄は存在しな



図1 哺乳類（真獣類）の胎盤形成に重要な機能をはたす哺乳類特異的遺伝子群

ノックアウトマウスをもちいた解析から、同じレトロトランスポゾン(sushi-ichiレトロトランスポゾン)に由来する3つの遺伝子、*Peg10* (*Sirh1*)、*Peg11/Rtl1* (*Sirh2*)、*Sirh7*、が胎盤形成に必須の機能を果たすことを明らかにした。面白いことに、これらは胎盤形成にあたってそれぞれ独自の機能を持っており、同じレトロトランスポゾンから異なる機能を持つ遺伝子に変化したことがわかる。生物進化の上で哺乳類が誕生する際、胎生という新しい生殖様式に必須の役割をはたす臓器である胎盤の形成に、このようなレトロトランスポゾンからの新規獲得遺伝子が機能していたことは、哺乳類の進化が極めてまれな偶然のチャンスを活かして起きたことを意味している（図2参照）。

い。そのかわり有袋類では、これが子宮に密着して、母子間の栄養交換、ガス交換という胎盤の機能を果たしている。しかし、子宮に浸潤し胎児毛細血管ネットワークをもちいて栄養交換、ガス交換を行う尿奨膜胎盤よりも機能は落ちるために、有袋類は真獣類と比べると未熟で非常に小さい子供を産む。そのかわり母親のお腹の袋で、授乳により大きく育つ。真獣類ではヒトとマウスは例外的だが、ほぼ成熟した新生児を産み、出産後すぐに子供は動き回ることができる。小さく生んで安全なお腹の袋で長期間育てるという有袋類の戦略は、真獣類とは異なるが、どちらも進化上有利な生殖戦略であると考えられる。

有袋類の一部には尿奨膜胎盤を発達されたものがある。しかし、これは出産直前の非常に短期間しか使われない。「有袋類が*PEG11/RTL1* 遺伝子をもたないため、長期間、尿奨膜胎盤を使えない」と考えると、この遺伝子を獲得したかどうか、真獣類と有袋類の生殖戦略に大きな影響を与えたと考えることができる（図1、2）。

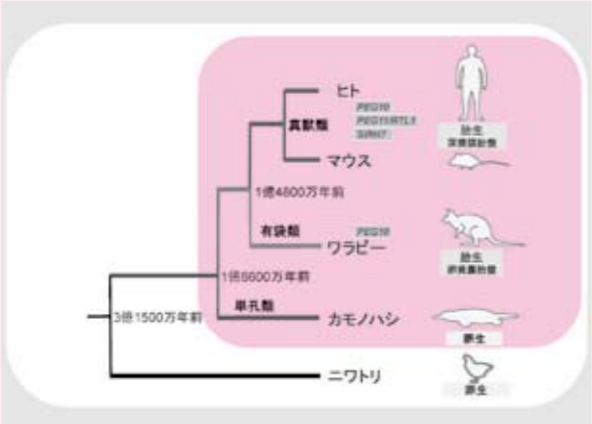


図2 哺乳類の進化と哺乳類特異的遺伝子群

哺乳類に属する3つのグループである真獣類、有袋類、単孔類とその他、鳥類、魚類などの高等脊椎動物における全ゲノム比較をすると、図1でみたsushi-ichiレトロトランスポゾン由来の遺伝子群は、哺乳類の限られたグループ内にのみ存在する遺伝子であることがわかる。*Peg10*は胎生の真獣類と有袋類の両者に存在し、*Peg11/Rtl1*、*Sirh7*の2つは真獣類にのみ存在する。すなわち哺乳類の進化で卵生の単孔類と胎生の真獣類と有袋類が分岐した後に、これらの遺伝子がゲノム中に獲得されて行ったと考えられる。*Peg10*は胎盤形成の初期に、そして*Peg11/Rtl1*、*Sirh7*の2つの遺伝子は真獣類の尿奨膜胎盤という複雑な構造をつくるために重要な働きをしている（図1参照）。特に*Peg11/Rtl1*は母子相互作用の要にあたる胎児毛細血管の維持に必須の機能を果たしていることから、真獣類の長期間の妊娠に耐えられる胎盤形成に重要であったことが推察される。これらの遺伝子の機能と、由来とその時期を考え合わせると、これらの遺伝子の有無が、哺乳類の進化に大きな役割を果たし、特に、*Peg11/Rtl1*の有無はその後の真獣類と有袋類という2つのグループの運命に大きな影響を与えたと考えられる。

人事異動

採用：成瀬 美衣（4月1日、特任助手）
転出：鈴木 俊介（7月15日、海外留学）

業績目録

原著論文

1. Miki, H., Hirose, M., Ogonuki, N., Inoue, K., Kezuka, F., Honda, A., Mekada, K., Hanaki, K. I., Iwafune, H., Yoshiki, A., Ishino, F. and Ogura, A. Efficient production of androgenetic embryos by round spermatid injection. *Genesis* 47(3), 155-160 (2009).
2. Shiura, H., Nakamura, K., Hikichi, T., Hino, T., Oda, K., Suzuki-Migishima, R., Kohda, T., Kaneko-Ishino, T., Ishino, F. Paternal deletion of *Meg1/Grb10* DMR causes maternalization of the *Meg1/Grb10* cluster in mouse proximal Chromosome 11 leading to severe pre- and post-natal growth retardation. *Hum. Mol. Genet.* 18 (8), 1424-1438 (2009).
3. Sato, N., Amino, T., Kobayashi, K., Asakawa, S., Ishiguro, T., Tsunemi, T., Takahashi, M., Matsuura, T., Flanigan, K. M., Iwasaki, I., Ishino, F., Saito, Y., Murayama, S., Yoshida, M., Hashizume, Y., Takahashi, Y., Tsuji, S., Shimizu, N., Toda, T., Ishikawa, K. and Mizusawa, H. Spinocerebellar Ataxia Type 31 Is Associated with "Inserted" Penta-Nucleotide Repeats Containing (TGGAA)n. *Am. J. Hum. Genet.* 85(5), 544-557 (2009).

総説及び著書

1. 金児-石野知子、石野史敏 哺乳類の原点？カモノハシー哺乳類のゲノム機能の進化を探るー蛋白質・核酸・酵素 54(1), 58-64 (2009).
2. 石野史敏、金児-石野知子 ゲノム機能解析からみえてきた哺乳類の進化 *Biophilia* 5(3)44-48 (2009).
3. 石野史敏「ゲノム機能」からみた生物進化のダイナミクス 特集 genetics/epigenetics から見えてきたゲノム機能の進化 *実験医学* 27(19) 3062-3068 (2009).
4. 金児-石野知子、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 特集 genetics/epigenetics から見えてきたゲノム機能の進化 *実験医学* 27(19)3080-3086 (2009).
5. 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).

国内学会発表

1) 石野史敏、小野竜一、関田洋一、鈴木俊介、金児-石野知子 哺乳類に特異的に存在するレトロトランスポゾン由来の遺伝子と胎盤形成 第147回 日本獣医学会学術集会 ワークショップレトロエレメントのダイナミズム 平成21年4月2日（栃木県総合文化センター、宇都宮）。
2) 金児-石野知子 Epigenetics 研究の topicsー哺乳類特異的ゲノム機構とレトロトランスポゾンー第50回 日本哺乳動物卵子学会 シンポジウム 生殖に関わる epigenetics の基礎と臨床 平成21年5月9日（都市センターホテル、東京）。
3) 石野史敏、金児-石野知子 レトロトランスポゾンはどのように哺乳類の進化に関わったか？ーその Genetic な役割と Epigenetic な役割についてー第56回日本実験動物学会総会 シンポジウム 哺乳動物の発生と進化におけるエビジェネティクスの役割 平成21年5月14日(大宮ソニックシティ、大宮)。
4) 石野史敏 哺乳類の胎生獲得におけるレトロトランスポゾンの寄与 京都大学ウィルス研究所

学術講演会 平成21年7月10日（芝蘭会館、京都大学）

5) 石野史敏、金児ー石野知子 ゲノムインプリンティングの起源ーそのとき哺乳類ゲノムに何が起きたのか？- 第82回日本生化学会年会 シンポジウム トランスポゾンとの共生が織りなすゲノムシステムのダイナミクス 平成21年10月14日（神戸国際会議場、神戸）。
6) 石野史敏 哺乳類の胎生とゲノムインプリンティングの進化におけるレトロトランスポゾンの役割について 北海道大学医学部セミナー 平成21年11月5日（北海道大学医学部、札幌）。
7) Fumitoshi Ishino, Ryuichi Ono, Yoichi Sekita, Shunsuke Suzuki, Mie Naruse, Takashi Kohda Atsuo Ogura, Kenji Nakamura, Minesuke Yokoyama, Marylin Renfree and Tomoko Kaneko-Ishino. Mammalian-specific genes derived from retrotransposons functioning placenta formation. The 32nd Annual Meeting of the Moleluclar Biology Society of Japan. Workshop: Integrative approaches towards evolutionary studies. December 9-12, 2009 (Pacifico Yokohama, Yokohama).
8) Hisako Watanabe, Masahito Irie, Takashi Kohda, Fumitoshi Ishino and Tomoko Kaneko-Ishino. The effects of maternal undernutrition on fetal growth. The 32nd Annual Meeting of the Moleluclar Biology Society of Japan. December 9-12, 2009 (Pacifico Yokohama, Yokohama).
9) Hirotake Iwafune, Yuki Yamaguchi, Tomohiro Suzuki, Hiroyasu Furumi, Masakazu Hashimoto, Takashi Kohda, Hideaki Kaneda, Shigeharu Wakana, Toshihiko Shiroishi, Hiroyuki Sasaki, Fumitoshi Ishino. Analysis on mutant mice exhibiting abnormal methylation in DMR. The 32nd Annual Meeting of the Moleluclar Biology Society of Japan. December 9-12, 2009 (Pacifico Yokohama, Yokohama).
10) Daisuke Endo, Yoichi Sekita, Tomoko Kaneko-Ishino, Masayo Kagami, Ryuichi Ono, Takashi Kohda, Tsutomu Ogata, Fumitoshi Ishino. AntiPeg11/Rtl1, essential antisense RNA of retrotransposon derived gene plays two different roles in mouse development. The 32nd Annual Meeting of the Moleluclar Biology Society of Japan. December 9-12, 2009 (Pacifico Yokohama, Yokohama).

11) Masayuki, Ishii, Ryuichi Ono, Mie Naruse, Daisuke Endo, Masahito Irie, Hirotake Iwafune, Takashi Kohda, Tomoko Kaneko-Ishino and Fumitoshi Ishino. Analysis of retrotransposon-derived genes, *Sirh4*, *Sirh5* and *Sirh6*. The 32nd Annual Meeting of the Moleluclar Biology Society of Japan. December 9-12, 2009 (Pacifico Yokohama, Yokohama).

12) Sawa Iwasaki, Takashi Kohda, Tomoko Kaneko-Ishino and Fumitoshi Ishino. Verification of the imprinting status of retrotransposon-derived Pnma-family genes. The 32nd Annual Meeting of the Moleluclar Biology Society of Japan. December 9-12, 2009 (Pacifico Yokohama, Yokohama).

13) Takashi Kohda, Kimiko Inoue, Narumi Ogonuki, Sawa Iwasaki, Xijia Xia, Teruhiko Wakayama, Atsuo Ogura, Tomoko Kaneko-Ishino and Fumitoshi Ishino. The epigenetic shift and random drift of the genome induced by embryo manipulations. The 32nd Annual Meeting of the Moleluclar Biology Society of Japan. December 9-12, 2009 (Pacifico Yokohama, Yokohama).

14) Ryuichi Ono, Mie Naruse, Kenji Nakamura, Toshiaki Hino, Daisuke Endo, Masahito Irie, Hirotake Iwafune, Masayuki Ishii, Takako Usami, Takashi Kohda, Atsuo Ogura, Minesuke

Yokoyama, Tomoko Kaneko-Ishino and Fumitoshi Ishino. The function of retrotransposon-derived gene. The 32nd Annual Meeting of the Moleluclar Biology Society of Japan. December 9-12, 2009 (Pacifico Yokohama, Yokohama).

15) Mie Naruse, Ryuichi Ono, Yoichi Sekita, Daisuke Endo, Masahito Irie, Hirotake Iwafune, Masayuki Ishii, Kenji Nakamura, Toshiaki Hino, Takashi Kohda, Minesuke Yokoyama, Tomoko Kaneko-Ishino and Fumitoshi Ishino. Retrotransposon-derived *Sirh*-family genes and mammalian viviparity. The 32nd Annual Meeting of the Moleluclar Biology Society of Japan. December 9-12, 2009 (Pacifico Yokohama, Yokohama).

国際学会発表

1) Fumitoshi Ishino, Ryuichi Ono, Shunsuke Suzuki, Yoichi Sekita, Mie Naruse, Takashi Kohda and Tomoko Kaneko-Ishino. Retrotramnsposons and Evolution of Genomic Imprinting and Placentation in Mammals. Symposium: Epigenetic impacts for differentiation and patterning. The 42nd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists. May 28-31, 2009（Toki Messe, Niigata).

2) Fumitoshi Ishino, Ryuichi Ono, Shunsuke Suzuki, Yoichi Sekita, Mie Naruse, Takashi Kohda and Tomoko Kaneko-Ishino. Contribution of Retrotransposons to the Evolution of Genomic Imprinting and Placentation in Mammals The 24th NAITO Conference on Nuclear Dynamics and RNA (II) June 23-26, 2009（Chateraise Gateaux Kingdom, Sapporo, Hokkaido).

3) Fumitoshi Ishino. Retorotransposons and trophoblast biology. Trophoblast Day Meeting, July 14-15, 2009（University of Cambridge, UK).

4) Fumitoshi Ishino. Retrotransposon-derived imprinted genes, *Peg10* and *Peg11/Rtl1* and their relation to the origin of viviparity in mammals. From Imprinting to the Epigenome in 25 years. September 4-6, 2009（University of Cambridge, UK).

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

北海道大学大学院医学系研究科

競争的研究費取得

1. 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」
2. 石野史敏（代表）：日本学術振興会 二国間交流事業共同研究「哺乳類に置けるエビジェネティック制御機構の進化」
3. 小野竜一（代表）:文部科学省特定領域研究（公募研究）「生殖細胞でエビ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」
4. 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」
5. 鈴木俊介（代表）文部科学省科研費 若手研究（B）「有袋類特異的ゲノムインプリンティング領域の解析」
6. 遠藤大輔(代表)文部科学省科研費 若手スタートアップ「生存に必須なアンチセンスRNA、*antiPeg11*：生体における機能の二面性」

疾患生命科学研究部 システム情報生物学研究室 難治疾患研究所ゲノム応用医学研究部門生命情報学分野

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

研究紹介

ハイライト

タンパク質間相互作用ネットワークの数理的解析に基づいた薬剤標的分子候補の予測について

近年、人を含めたモデル生物における、網羅的なタンパク質間の相互作用データが利用可能となっている。タンパク質間相互作用ネットワーク (PIN; protein-protein interaction network) は疾患の理解、そして新たな薬剤標的分子を見つけるための鍵である。我々は、酵母および人の PIN の構造を解析することにより、PIN では、相互作用数が中程度のタンパク質がお互いに密に結合し合いバックボーンを構成しているが、一方、相互作用数の非常に多いタンパク質は相互作用数の少ないタンパク質をまとめて機能モジュールを構成していることを発見した (図1)。このような構造を持つネットワークは Highly optimized tolerance (HOT) network と呼ばれ、エラーに対して頑強であり、効率の良い情報伝達を可能にすることが知られている。例えば、Abline2 Internet router-level network も HOT network であることが知られている。さらに、薬剤標的分子を人の PIN にマップしたところ、多数の薬剤標的分子が PIN のバックボーン上に存在すること、相互作用数の少ないタンパク質も薬剤標的分子になりうることを、そして、相互作用数が大きすぎるタンパク質は薬剤標的分子にならないこと

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、IC タグを利用したユキピタス医療や内視鏡などの詳細医療画像の遠隔医療の研究を推進している。

2009 年における代表的な研究内容を以下に紹介する。

が判った。また、抗がん剤の薬剤標的分子の相互作用数は抗がん剤以外の薬剤ターゲットよりも有意に多いことを発見した。これらの結果は、薬剤の標的分子の相互作用数はその薬剤の副作用に影響を与えることを示唆する。最後に、我々は人の PIN のバックボーン上に存在するタンパク質のリストを作成した。このリストは製薬企業がより効率良く、新たな薬剤標的分子を探索するための一助となる。この研究の成果は PLoS Computational Biology に掲載され、雑誌の表紙 (cover story) を飾った。

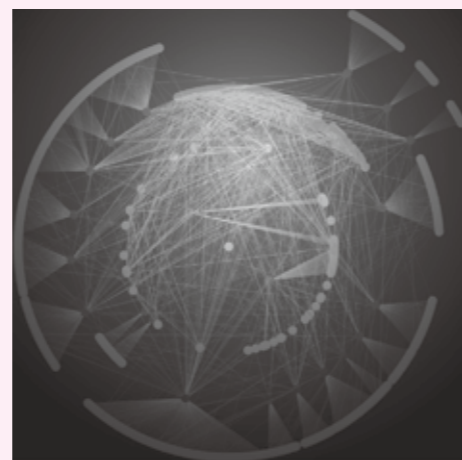


図1. タンパク質間相互作用ネットワークの構造 (酵母)
灰、赤、青色のノードはそれぞれ、相互作用数が少ない、中程度の、非常に多いタンパク質を表す。中程度の相互作用数を持つタンパク質はお互いに密に結合してバックボーンを構築している。

1. オミックス解析による疾患メカニズムの解明と臨床応用

近年の生命科学研究における解析技術の発展にともない、ゲノム・トランスクリプトーム・プロテオームなどの網羅的な分子生物学的データ、すなわちオミックスデータが比較的簡便に得られるようになった。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) 肝細胞癌のフェノタイプや予後に関わる遺伝子群とそれらのネットワーク同定、(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同定、(3) C 型肝炎ウイルス感染時における宿主細胞の発現変動遺伝子およびそれらのパスウェイ解析、(4) 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、(5) 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など、バイオインフォマティクスを機軸として多岐に渡る研究を進めている。

2. 嗅覚受容体遺伝子ファミリーの進化

嗅覚は、動物の生存にとって必須の感覚である。環境中の多様な匂い分子は、嗅覚受容体 (OR) によって検出される。全ゲノム配列を用いた網羅的な解析の結果、OR 遺伝子の数は、ラットで約 1200、ヒトで約 400、ゼブラフィッシュで約 150、フグで 15 と生物種によって大きく異なることが明らかになった。分子進化解析の結果、OR 遺伝子は、多数の遺伝子重複と消失を繰り返しながら、それぞれの種の生存環境に応じてダイナミックに変化してきたことが明らかになった。例えば、視覚が発達した高等霊長類では多くの OR 遺伝子が偽遺伝子化している。また、四足動物の系統では、陸上生活への適応の際に、揮発性の匂い分子を認識する 2 つのグループの OR 遺伝子が急激に数を増やした。OR 遺伝子の起源は脊索動物の共通祖先にまで遡ることができるが、昆虫や線虫は異なる遺伝子を化学受容体として用いており、化学受容体は何度も独立に進化したと考えられる。

3. 生命システムのダイナミクス・進化解析

網羅的分子生物データに基づき、システム進化生物学という新しいテーゼを掲げ、生命の (1) 進化と (2) ダイナミクスのシステム的理解に取り組んでいる。

(1) 生命システムの進化の研究は、個々の遺伝子の進化のみならず、遺伝子群の分子ネットワークのシステムの拘束の下での入れ子の階層進化として捉えるもので、

発生の時間発展的な転写調節ネットワークと網羅的なタンパク質相互作用ネットワークの進化解析を進めている。前者では、その転写調節ネットワークの推定のための新しいプロモータ解析を開発し、Hox の転写調節ネットワークの進化解析を行い、後者では機能モジュールとしての進化を示しつつある。

(2) 生命システムのダイナミクスの研究としては、遺伝子発現制御の機序の解明のため、時系列のマイクロアレイデータのトレンド解析の新しい方法と、セントラルドグマに基づく階層ネットワークモデルの可視化アプリケーションを開発した。

4. SAGE による Transdisease Omics 解析

近年、分子生物学的実験手法の急速な発展により遺伝子やタンパク質等のさまざまな生体分子に対する網羅的な情報 (オミックス情報) を得ることが可能になってきている。このため、ヒトの多様な疾患に対して蓄積された遺伝子発現データを横断的に活用し、疾患間の類似性を遺伝子発現プロファイルの側面から再評価することにより、臨床的に有用な情報を引き出すことが可能になりつつある。ここでは、様々なサンプルの網羅的遺伝子発現情報を提供しているデータバンク GEO (Gene Expression Omnibus) から SAGE (serial analysis of gene expression) によって得られたヒト疾患の網羅的遺伝子発現情報を収集し、疾患間で比較解析を行った。その結果、Breast cancer と Prostate cancer の遺伝子発現パターンの類似度が Ovarian cancer などより高いことがわかった。これらについて調査したところ、この結果はそれぞれの疾患関連遺伝子によるネットワーク解析 (Butte 2008) 結果と一致し、これら 2 疾患には同様の治療法が存在するなどの類似性を支持する情報が得られた。今後、このような異なる疾患間での疾患横断的な研究、解析が進み、異なる疾患間の新たな類似性が発見されれば、薬の適用拡大や、共通のリスクファクターの発見などにつながり、新たな治療アプローチが示唆されることが期待される。

業績目録

原著

- Hase T, Tanaka H, Suzuki Y, Nakagawa S, Kitano H: Structures of protein interaction network and their implications on drug design, PLoS Compt Biol. 5 (10) e1000550, 2009
- Hasegawa N, Sugiura W, Shibata J, Matsuda M, Ren F, Tanaka H: Inferring within-patient HIV-1 evolutionary dynamics under anti-HIV therapy using serial virus samples with vSPA, BMC Bioinformatics, 10:360, 2009
- Niimura Y: On the origin and evolution of vertebrate olfactory receptor genes: Comparative genome analysis among 23 chordate species, Genome Biol. Evol. 1: 34-44, 2009.
- Nagashima T, Ushikoshi-Nakayam R, Suenaga A, Ide K, Yumoto N, Naruo Y, Takahashi K, Saeki Y, Taiji M, Tanaka H, Tsai SF, Hatakeyama M: Mutation of epidermal growth factor receptor is associated with MIG6 expression, FEBS Journal, 276:5239-5251, 2009
- Iwami S, Takeuchi Y, Iwamoto K, Naruo Y, Yasukawa M: A mathematical design of vector vaccine against autoimmune disease, J Theor Biol, 256:382-92, 2009.
- Ishiwata RR, Morioka MS, Ogishima S, Tanaka H: BioCichlid: central dogma-based 3D visualization system of time-course microarray data on a hierarchical biological network. Bioinformatics, 15 February, 25:543-544, 2009
- Yasen M, Mizushima H, Mogushi K, Obulhasim G, Miyaguchi K, Inoue K, Makahara I, Ohta T, Aihara A, Tanaka S, Arii S, Tanaka H: Expression of Aurora B and their Alternative Variant Forms in Hepatocellular Carcinoma and the Adjacent Tissue, Cancer Science, 100:472-480, 2009
- Ota MS, Kaneko Y, Kondo K, Ogishima S, Tanaka H, Eto K, Kondo T: In silico and in vitro analyses reveal role of Hes1 in taste cell differentiation, PLoS Genetics, 5: e1000443, 2009
- Tanaka S, Mogushi K, Yasen M, Noguchi N, Kubo A, Kurokawa T, Nakamura N, Inazawa J, Tanaka H, Arii S: Surgical contribution to recurrence-free survival in patients with macrovascular invasionnegative hepatocellular carcinoma, Journal of the American College of Surgeons, 208:368-374, 2009
- Ren F, Tanaka H, Yang Z: A likelihood look at the supermatrix-supertree controversy, Gene, 441:119-125, 2009
- Iwatani Y, Chan D S, Liu L, Yoshii H, Shibata J, Yamamoto N, Levin J G, Gronenborn A M, Sugiura W: HIV-1 Vif-mediated ubiquitination/degradation of APOBEC3G involves four critical lysine residues in its C-terminal domain, Proc Natl Acad Sci U S A, 106(46): 19539-44, Nov 17, 2009
- Okamoto E, Fujii H, Tanaka H, Yamakata D, Nobutomo K, Nagata H: Development of an IT infrastructure under Japan’s Health Care Reform 2008: a potential for regional health information networks, Jpn J Med Inf, 28:93-98, 2009
- Tun K, Rao RK, Samavedham L , Tanaka H, Dhar PK: Rich can get poor: conversion of hub to non-hub proteins, Systems and Synthetic Biology, DOI 10.1007/s 11693-009-9024-9, 2009
- Ohashi W, Tanaka H: Benefits of pharmacogenomics in drug development - earlier launch of drugs and less adverse events, Journal of Medical Systems, DOI 10.1007/s10916-009-9284-7, 2009
- Suzuki A, Takai-igarashi T, Numabe Y,

Tanak H: Development of a database and ontology for pathogenic pathways in periodontitis, In Silico Biol. 9:1-11, 2009

- Watanabe K, Kurihara Y, Tanaka H: Ubiquitous Health Monitoring at Home-Sensing of Human Biosignals on Flooring, on Tatami Mat, in the Bathtub, and in the Lavatory, IEEE SENSORS JOURNAL, 9:1847-1855, 2009
- Fujibuchi W, Kim H, Okada Y, Taniguchi T, Sone H: High-performance gene expression module analysis tool and its application to chemical toxicity data, Methods Mol Biol, 577:55-65, 2009

著書

- 田中 博：第3章 創業に向けた生命情報の統合、遺伝子医学 MOOK14 次世代創業テクノロジー 実践：インシリコ創業の最前線、180-185、2009
- 田中 博：8.5 日本版 EHR の構築にむけて、新版医療情報 医療情報システム編、387-397、2009
- 高井貴子：ゲノムオントロジー概論、実践ゲノムの最前線、監修：井村裕夫、六然社、61-64、2009

総説

- 田中 博：生命系の構築原理と進化－進化する分子ネットワークとしての生命、物性研究、91:506-539、2009
- 田中 博：地域連携はどこまで進んだか－EHRの実現で日本の医療を救う－ 日本版 EHR の実現を求めて、IT VISION、19:17-19、2009
- 田中 博：電子カルテ導入による中小規模病院のIT 化がもたらす政府施策の影響、月刊新医療、7:32-35、2009
- 田中 博：米国の医療 IT の動向とオバマのCHANGE、HOPE Vision、10:2-3、2009
- 田中 博：疾患別地域クリニカルパスを基盤とした日本版 EHR の構築を、医療タイムス、1915:3-5、2009
- 田中 博：第28回医療情報学連合大会（第9回日本医療情報学会学術大会）日本版 EHR の構築に向けて－ユビキタス健康医療社会の創生、JMS、1:29-34、2009
- 田中 博：長期的医療 IT 政策の枠組みから見た「遠隔医療」、月刊新医療、2:86-93、2009
- 田中 博：“日本版 EHR の構築に向けて”をテーマに「第28回医療情報学連合大会」が開催、INNERVISION (24-1)、1、2009
- 西堀 眞弘、田中 博：広範囲 血液・尿化学検査 免疫学的検査－その数値をどう読むか－ [第7版] (1) I 総論 オミックス医療と臨床検査、日本臨牀、67:47-51、2009
- Niimura Y：Evolutionary dynamics of olfactory receptor genes in chordates: Interaction between environments and genomic contents, Human Genomics 4: 107-118, 2009
- 新村芳人：嗅覚受容体遺伝子ファミリーの進化ダイナミクス－ゲノムと環境の相互作用一、実験医学 (12月号)、27: 3093-3102、2009

国際学会

- Tanaka H: Systems Pathology - A new concept for understanding disease -, CBI-KSBSB Joint Conference, Busan Korea, Nov 2009
- Tanaka H: A possible strategic framework for realizing Japan-version EHR, CJKMI 2009, Daejeon Korean, Oct 2009
- Tanaka H: Systems Pathology, Personalized medicine 2009, Hangzhou China, May 2009
- Tanaka H: Present Situation and Future Trends of Omics-based medicine and systems pathology, Conf. on Biomedical Electronics and

Biomedical Informatics, Moscow Russia, Aug 2009

- Tanaka H: Systems pathology- A new concept for understanding disease -, Chinese Association of Biophysics, China, Jul 2009
- Tanaka H: Present status and future direction of clinical omics research in TMDU, International Symposium of Translational Informatics, Tokyo, Mar 2009
- Ogishima S, Tanaka H: Systems evolutionary analysis on the putative Hox transcriptional networks, European Society for Evolutionary Biology, Trin, Aug 2009
- Ogishima S, Tanaka H: Preliminary analysis on systems evolution of the putative Hox transcriptional networks, OIST Evolution of Complex Systems, Okinawa, Dec 2009
- Niimura Y: Evolution of vertebrate olfactory receptor gene families: From the viewpoint of comparative genomics, The Joint Symposium of the 4th International Symposium of Institutes Network and Osaka University Global COE Symposium, Jan 2009
- Niimura Y: On the origin and evolution of vertebrate olfactory receptor genes: Comparative genome analysis among 23 chordate species, Annual Meeting of the Society for Molecular Biology and Evolution, Jun 2009
- Niimura Y: On the origin and evolution of vertebrate olfactory receptor genes, Comparative genome analysis among 23 chordate species, 12th Congress European Society for Evolutionary Biology, Aug 2009
- Johnson TA, Niimura Y, Tsunoda T: hzAnalyzer: Analysis of contiguous homozygosity in eleven human sample populations using R and Java, American Society of Human Genetics, Oct 2009
- Shibata J, Ren F, Iwatani Y, Tsang H, Matsuda M, Hasegawa N, Tanaka H, Sugiura W: Within-host coevolution of gag p453l and protease d30n/n88d demonstrates virological advantage in a highly protease inhibitor-exposed hiv-1 case, 10th Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance, Virginia USA, Nov 2009
- 他8件

国内学会

- 長谷武志、新村芳人、田中博：真核生物の蛋白質間相互作用ネットワークの構造は遺伝子重複の頻度のリンク数への依存性により決定される、日本進化学会 2009 年年会、札幌、2009 年9月
- 柴田 潤子、杉浦 互、岩谷 靖雅、Hsinyi Tsang、松田昌和、長谷川直紀、任鳳蓉、田中博：宿主内 HIV-1 の共進化変異の解析、Protease 阻害剤耐性変異 D30N/N88D と p1/p6 切断領域の P453L 変異の相互干渉の意義、日本エイズ学会、名古屋、2009 年11月
- 金恵鈴、藤瀨航、茂樺薫、田中博：化合物の毒性反応における活性化メカニズムの解析、CBRC2009、東京、2009 年12月
- 大家彬秀、茂樺薫、田中博：肝細胞癌における転写因子及びその下流パスウェイの網羅的解析、第32回分子生物学学会年会、横浜、2009年12月
- 荻島創一、田中博：生命システムの進化解析と動態解析：生命システムのグラッドデザインの解明を目指して、バイオインフォマティクス学会北海道地域部会 第11回バイオインフォマティクスセミナー、北海道、2009年2月
- 石波龍輔、森岡勝樹、荻島創一、田中博：マイクロアレイデータの転写調節ネットワーク上での3D階層的可視化環境 BioCichlid、第10回オーブンバイオ研究会、石川県、2009年3月
- Morioka MS, Ishiwata RR, Ogishima S, Sone

- T, Oshiro S and Tanaka H: Temporal gene expression analysis of hypoxia using novel pathway analysis、第82回日本生化学会、神戸、2009年10月
- Takahashi Y, Matsuda M, Ogishima S, Ren F, Tanaka H, Sugiura W: Comprehensive analysis of correlated RTI-treated specific mutations between the RT and the RH domain of HIV-1 reverse transcriptase in RTI-treated patients、第32回日本分子生物学学会年会、横浜、2009年12月
- 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、第32回日本分子生物学会、横浜、2009年12月
- Iijima L, Ogishima S, Kikuchi M, Miyashita T, Kuwano R, Tanaka H: Construction of the Alzheimer-disease (AD) pathway database (AlzPathway) and identification of AD candidate risk genes、第32回日本分子生物学学会、横浜、2009年12月
- 菊地正隆、荻島創一、新村芳人、田中博：酵母タンパク質間相互作用ネットワークにおける機能モジュールの進化的拘束、第11回日本進化学会、札幌、2009年9月
- 星昭彦、高井貴子、小川温子、相川京子、田中博：Glyco Signaling and Disease Database の開発、GlycoTokyo 2009 シンポジウム、東京、2009年11月
- 山肩大祐、野川裕記、上田昌史、田中博：医療情報および健康情報の取り扱いにおけるデータ利用の現状と問題点、第29回医療情報学連合大会、広島市、2009年11月
- 柴田匡邦、新村芳人、永田宏、田中博：医師偏在の研究、ジニ係数を用いた診療科別の比較、第59回日本病院学会、2009年7月
- 他5件

研究助成金

- 田中 博（分担）：文部科学省、科学技術振興機構（クレスト）、戦略的創造研究推進事業「精神・神経疾患の分子病理理解に基づく診断・治療へ向けた新技術の創出、プルキンエ細胞変性の分子病態に基づく診断・治療の開発」
- 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国際連携」
- 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（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（教育実践型）「異分野融合型疾患生命科学教育の海外研修」
- 田中 博（代表）：文部科学省委託事業、大学教育改革支援プログラム「国際産業リンケージプログラム」
- 田中博（代表）：文部科学省科学技術試験研究委託事業、ライフサイエンス分野の統合データベース整備事業「統合医科学データベース構築方式の開発」
- 田中博（代表）：厚生労働科学研究補助金、医療安全・医療技術評価総合研究事業「日本版 EHR（生涯健康医療電子記録）の実現に向けた研究」
- 田中博（代表）：科学技術振興調整費新興分野人材養成「バイオ医療オミックス情報学人材養成プログラム」
- 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構築のための情報基盤整備に関する研究」
- 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」

- 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)「初期胚発生の Hox を中心とした転写調節ネットワークのシステム進化解析」
- 荻島創一（代表）：民間企業研究助成金「微生物のシステムバイオロジーに関する研究」味の素株式会社アミノ酸カンパニー 発酵技術研究所

その他

受賞

太田沙紀子：「電子タグを用いたベッドサイド業務支援システム－バーコードとの比較」、第28回医療情報学連合大会研究奨励賞、平成21年6月13日

招待講演

- 田中 博：「病気を「システムで解く」オミックス医療の可能性」、かわさきサイエンス&テクノロジーフォーラム 2009、川崎、2009年11月17日
- 田中 博：「Structure of protein interaction networks and their implication on drug design」、Harvard Medical School セミナー、2009年11月16日
- 田中 博：「デジタル・オミックスとシステム創業」、第12回シンポジウムゲノム創業フォーラム、東京、2009年11月9日
- 田中 博：「疾病解明と治療・創業のためのシステムバイオロジー」、神奈川科学技術アカデミー講演、東京、2009年10月27日
- 田中 博：「次世代疾患オミックスシステムバソロジー」、第37回日本磁気共鳴医学会大会、横浜、2009年10月2日
- 田中 博：「オミックス医療とシステム創業－パーソナルゲノム時代の医療－」、ゲノム創業フォーラム講演、2009年7月21日
- 田中 博：「米国オバマ大統領の医療 IT 政策と日本版 EHR 現状と今後の方向性」、日本医療情報学会、東京、2009年6月4日
- 田中 博：「Ontological Models and Approaches in the Integrated BioMedical Database Project」、IHIC 2009、京都、2009年5月9日
- 田中 博：「Present status and future direction of clinical omics research in TMDU」、オミックスシンポジウム、東京、2009年3月24、25日
- 田中 博：「ユビキタス医療 ICT の展望－医療安全から生涯健康管理まで」、総務省「第3回ユビキタス健康医療シンポジウム」－ユビキタス医療 ICT の展望－、品川、2009年3月11日
- 田中 博：「遠隔医療から EHR/PHR へ 日本の医療 IT の展望」、JTTA Spring Conference、日本遠隔医療学会、東京、2009年2月28日
- 田中 博：「日本版 EHR（生涯健康医療電子記録）の実現に向けた戦略的枠組みについて」、日本版 EHR シンポジウム、名古屋、2009年2月21日
- 他28件

学会主催

- オミックス医療情報学寄附講座開設記念講演会、歯学部附属病院特別講堂、組織委員長、2009年11月19日
- 東京医科歯科大学・中国医科大学 シンポジウム、歯学部附属病院特別講堂、組織委員長、2009年10月14日
- オバマの医療 IT 政策と日本版 EHR、野口英世記念会館、組織委員長、2009年6月4日
- 「病気に挑む生命科学」学際生命科学が先端医学の未来を切り拓く！、歯学部特別講堂、大会主催者、2009年6月2日

- オミックス医療シンポジウム、品川プリンス、大会長、2009年3月24-25日
- オミックス医療研究会、創業ファーマコゲノミクス分科会、東京工業大学、大会主催者、2009年3月17-18日
- ユビキタス医療シンポジウム 15、品川コクヨホール、大会主催者、2009年3月11日
- オミックス医療研究会、パンパシフィック横浜ベイホテル東急、大会長、2009年1月24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。

GSK3 β 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 GSK3 β が調節を受け、p21^{waf1} や cyclinD1 の安定化に影響すると考えられた。

扁平上皮癌の悪性転化と p63 の発現調節

p63 は上皮性異形成・上皮内癌では高く維持されるが、浸潤癌への悪性転化とともに発現が低下する。p63 は TA 型と Δ N 型の 2 つの転写物として発現するが、90% 以上をしめる Δ N 型の転写制御を解析することにより、癌の進行と p63 の関連を検討した。その結果、 Δ N-p63 のプロモーターは新しく発見された Smad2/3-IKK α による TGF β シグナル伝達系によって活性化されることが明らかになった。p63 と IKK α の間での相互増幅機構が、高分化型での両者の高発現、および悪性転化の過程での発現低下と深く関連すると考えられる。

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 (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に比較して、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。

遊離環流肺標本で肺を静止状態に保つと傷害が起こることは、肺組織が機械的刺激を受けないことに起因していることを強く示唆している。肺組織の過伸展による ROS、炎症性サイトカインの産生は解明されてきたが、

周期的な伸展刺激を受けないことによる肺傷害はその検出が困難なこともあり証明されておらず、その病態生理は不明である。人工心肺使用時、移植肺の保存では呼吸運動を受けない静止状態に肺を保つことを余儀なくされるためこの点は臨床的にも重要な課題であり、ラット遊離環流肺標本で static lung で肺血管床の透過性亢進、血管抵抗の上昇が起こることを示した。

業績目録

原著論文

[Lung-lunginteraction in isolated perfused unilateral hyperventilated rat lungs](#)
Asan B, Kurata, S., Mitaka, C., and Imai, T. *Translational Research* 154:298-314, 2009

Salvage of non-ischemic control lung from injury by unilateral ischemic lung with apocynin, an NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) oxidase inhibitor, in isolated perfused rat lung. Chenting, Z., Kurata, S., Mitaka, C., and Imai, T. *Translational Research* 152:273-282, 2009

国際学会

P63 is induced by a newly identified keratinocyte-specific TGF- β signal. Katoh, ., Fukunishi, N., Kurata, S. & Ikawa, Y. *American Association of Cancer Research 2009 100th Annual Meeting Proceedings*

国内学会

p63 promotes proliferation of squamous cell carcinomas through a novel pathway of PP2A and GSK-3 β

[Nahoko Fukunishi](#), Iyoko Katoh, Ryu-Ichiro Hata, Yoji Ikawa & Shun-ichi Kurata
第 68 回日本癌学会 - (インターナショナルセッション) - 横浜

The newly identified keratinocyte-specific TGF- β signal by Smad2/IKK α induces the major isoform of p63.
Nahoko Fukunishi, Iyoko Katoh, Yoshiya Tomimori, Atsuhito Nakao, Keiichi Tsukinoki, Masahiko Ito, Yoji Ikawa, Shun-ichi Kurata
第 68 回日本癌学会 横浜

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

以下のプロジェクトに参加

私立大学学術研究高度化推進事業†・神奈川歯科大学大学院歯学研究科
ハイテクリサーチ・センター整備事業 総括責任者 畑隆一郎 プロ
ジェクト名：口腔癌の進展・転移を規定する因子の同定、作用機構の解
析と診断法およびオーダーメイド医療への展開 プロジェクト期間：5
年間
個別プロジェクト名：p 6 3 による接着因子発現誘導に依存する口腔由
来扁平上皮がん細胞の接着と転移 プロジェクトリーダー：倉田俊一

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、さらに種々の薬剤を投与してその効果を検討することで急性肺障害の発症メカニズムを解明して、予防や治療方法を見出すことを目的に研究を行っている。

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”

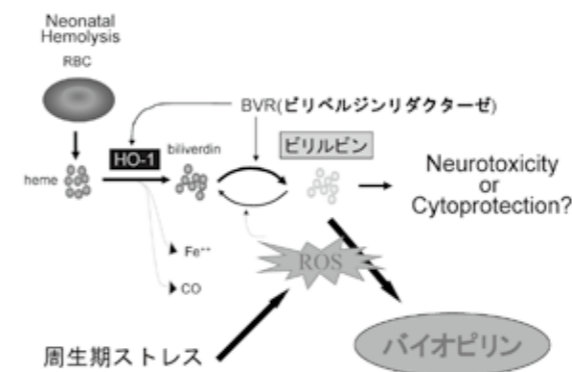
活性酸素やフリーラジカルによる酸化ストレスは、老化、動脈硬化、癌など多くの疾患に関与している重要な因子である。また、心理・社会的ストレスによっても中枢支配による生体のホメオスタシスを乱され、特に細胞内レドックス制御の破綻により、酸化ストレスを生じ病態発現への引金となっている。そこで、ヘム代謝研究の過程で開発した抗ビリルビン抗体(24G7)を用いて、酸化ストレス時に生じるバイオピリン(biopyrrin)(ビリルビン酸化生成物質)を“酸化ストレスマーカー”の指標として測定する。このバイオピリンの生理学的および臨床的意義をストレスの関連した分野、例えば、外科、循環器内科、精神神経内科、心療内科、産業精神衛生、医薬品開発および市販後医薬品調査(post marketing surveyrance: 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)を間便に測れるストレス・チェッカー(ICC: immuno-chromatochecker; イムノクロマトチェッカー)を民間と共同で開発しており既にプロトタイプを完成させている。
(2) ヒト尿中に、バイオピリンの分子種の一つとして、NOラジカルおよびパーオキシ・ナイトライト(NO-O₂・)と反応して生成した新規化合物であるニトロ化ビリルビン(NO₂-bilirubin)を発見した。この事実は、活性化窒素酸化物の代謝や分解解毒にビリルビンが重要な役割を

演じている可能性をバイオピリンという分子レベルで証明している。

(3) ラットを用いて、バイオピリン測定による心臓移植後急性拒絶反応での酸化ストレスの動向と解析を行なう。その結果、バイオピリンは心臓移植後の拒絶反応モニタリングとして極めて有用性が高いと評価された。この成果は、外科領域でトップジャーナルな American Journal of Transplantation に掲載された。

(4) (株)日立ハイテックとの共同実験で、LC/MS/MSを用いた心臓移植後の急性拒絶反応での予知的バイオピリンの上昇物質の分子構造の同定により、ニトロ化ビリルビン(NO₂-bilirubin)であることを確認した。

【ビリルビン酸化・還元サイクルとバイオピリンの産生】



ゲノム応用医学研究部門

坂本 忍、左雨秀治

今年度は、過剰投与の鉄がラットの肝臓、腎臓に沈着すると、腎障害を起こし、特に遠位尿細管を障害するために、カルシウムの再吸収が阻害され、骨量減少症を誘発すること、さらに雌よりも雄の方が障害され易いという性差を見いだした。また、閉経期後婦人では毎日1時間以上の歩行運動と魚介類摂取が、高脂血症の予防につながることを基礎と臨床の面で明らかにした。思春期・妊娠期の疾患と栄養食事療法について分担執筆し(建帛社)、医学・生物学について生物学大事典に分担執筆した(東京化学同人)。

窪田道典

動物(ヒトを含む)にとって、この世界で生じる音の方向を感知することは、捕食者から逃れたり、獲物を捕らえるなど生きて行くために必須である。また、音の統一的認識のためには、その音が同一の物や動物から発せられているものなのかを決める手掛かりが必要となるが、その情報を与える点でも、音の方向知覚は重要である。しかし、この音の発生方向の感知に大脳皮質がどのように関与しているのかは、まだ不明な点が多い。そこで、この音の発生方向の感知に大脳皮質聴覚野がどのよ

うに関与しているかを調べるのが、今回の研究の目的である。

広範囲の大脳皮質の時空間的な活動を調べるために、左右のモル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、純音(2, 4, 8, 16kHz)と雑音を用い、中央と左45度と右45度の位置からそれぞれ純音と雑音を聞かせた。麻酔下で蛍光性電位感受性色素であるRH795を用いて染色した後、一次聴覚野とそれを囲む高次聴覚野から記録を行った。オプティカルイメージング装置として、12×12チャンネル数を持つフォトダイオードアレイを用い、1フレームあたり0.6msの時間分解能で蛍光イメージを取り込んだ。

左右の聴覚野では、応答潜時や抑制の大きさが異なっていたが、左右どちらの一次聴覚野でも、中央からの音に対する応答は、対側45度からの音に対する応答よりもやや弱かった。しかし、高次聴覚野では、特に、左右のPとVP野で、中央あるいは同側45度からの音に対する応答は、対側45度からの音に対する応答よりも明らかに弱かった。また、この傾向は雑音刺激より純音刺激を用いた場合の方が顕著であった。

これらの結果は、音の水平方向の位置を感知するのに、高次聴覚皮質の後側部位が特に関与していることを示唆している。

業績目録

原著論文

Li YH, Eto K, [Horikawa S](#), Uchida S, Sasaki S, Li XJ, Noda Y. Aquaporin-2 regulates cell volume recovery via tropomyosin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41: 2466-2476, 2009.

Suzuki R., Arai YCP., Hamayasu K., Fujita K., Hara K., [Yamaguchi T.](#), Sasaguri S. Complex of branched cyclodextrin and lidocaine prolonged the duration of peripheral nerve block. *Journal of Anesthesia* 2009. 23, 295-297.

Maeda H., Yamamoto M., Radhakrishnan G., Nakagawa A., Yamamoto M., Okada H., [Yamaguchi T.](#), Sasaguri S. Monitoring of urinary biopyrrins after rat cardiac transplantation. *Journal of Surgical Research* 2009. 151(2), 266.

Yamamoto. M., Maeda H., Hirose N., Yamamoto M., Nakagawa A., 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., Radhakrishnan G., Katare R.G., Hayashi Y., Rao P Lee G.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.

R. Watanabe, E. Tominaga, R. Jinbo, S. Suzuki, H. Kudo, [S. Sakamoto](#): A new method for the treatment of human papilloma virus (HPV) infection in vulva and uterine cervix (vilvar condylomata acuminata and cervical pre-cancer) using a 5-fluorouracil (5-FU) ointment. *Med. Postgraduates* 47(2): 77-81, 2009.

N. Nemoto, S. Suzuki, H. Kudo, H. Okabe, H. Kikuchi, [S. Sakamoto](#): Gender differences in waist circumference, body mass index, and plasma levels of biochemical markers in middle- to old-aged healthy Japanese. *Med. Postgraduates* 47(3): 39-44, 2009.

Y. Nunokawa, A. Hosoya, T. Murase, R. Suzuki, R. Jinbo, [S. Sakamoto](#): Effects of a low-zinc feeding on the oral, intraperitoneal and intravenous glucose tolerance tests in growing rats. *Med. Postgraduates* 47(4): 45-49, 2009.

N. Nemoto, S. Suzuki, H. Kikuchi, H. Okabe, [S. Sassa](#), [S. Sakamoto](#): Ethyl-eicosapentaenoic acid reduces liver lipids and lowers plasma levels of lipids in mice fed a high-fat diet. *in vivo* 23: 685-690, 2009.

[S. Sassa](#), H. Okabe, N. Nemoto, H. Kikuchi, H. Kudo, [S. Sakamoto](#): Incadronate may prevent colorectal carcinogenesis in mice with ulcerative colitis. *Anticancer Res* 29(11): 4615-4619, 2009.

[S. Sassa](#), N. Nemoto, S. Suzuki, H. Kudo, [S. Sakamoto](#): Effects of Chinese herbal medicines on bone loss in castrated female rats. *Source & Mechanisms-III, Ethnomedicine, Recent Progress in Medicinal Plants* Vol. 29: 31-40, 2009.

著書・総説

野田裕美, 江渡加代子, 堀川三郎, 佐々木成. 尿管管での水輸送. *腎と透析* 67: 333-338, 2009.

「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 2009年度版 (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 2009年度版 (第7版) 日本臨床社 pp 769-771.

坂本 忍: 思春期・妊娠期の疾患と栄養食事療法 栄養食事療法シリーズ (全10巻) 第7巻 建帛社 2009.

左雨秀治、根本尚子、柁津一樹、坂本 忍、鈴木敏恵、村尾 蘭、加藤亜衣、工藤秀機、鈴木麗子: 更年期高脂血症・脂肪肝に対する茵陳蒿湯の基礎的検討: 産婦人科 漢方研究のあゆみ 26: 107-112, 2009.

国際学会発表

Eto K, Noda Y, Li YH, Kobayashi K, [Horikawa S](#), [Sasaki S](#). PKA phosphorylation of recombinant aquaporin-2 at serine 256 increases its water permeability. The 42nd Annual Meeting of American Society of Nephrology, San Diego, USA, October, 2009.

Maeda H., Yamamoto M., Radhakrishnan G., Nakagawa A., [Yamamoto M.](#), Okada H., Yamaguchi T., Sasaguri S. "Monitoring of urinary biopyrrins after rat cardiac transplantation : non-invasive and earlier prediction of acute rejection by a sensitive oxidative marker. 4th Annual Academic Surgical Congress February 5 2009. Florida USA.

Hosokawa Y, [Kubota M](#), Horikawa J. Optical imaging of azimuthal activities in multi-fields of the left and right guinea-pig auditory cortices. *J Physiol Sci*, Vol. 59, Suppl. 1, 193. The XXXVI International Congress of Physiological Sciences, 2009.

国内学会発表

江渡加代子, 野田裕美, 堀川三郎, 佐々木成. 水チャネルアキアポリン2はリン酸化で水透過性を高める. 第52回日本腎臓学会学術総会, 2009年6月 横浜

第82回日本生化学会大会、神戸国際展示場、2009, 10, 21-24. "Human urinary nitro-biopyrrins are the degradative metabolites of a reaction of bilirubin as antioxidant with stress-inducible NO : In silico study of 24G7-epitope in bilirubin and nitro-biopyrrins." Takuya Iwabuchi, Yoshinori Hirano, Izuru Shioji, Makoto Suematsu, Akiko Sugimoto, [Tokio Yamaguchi](#).

第73回日本循環器学会年会、大阪、2009. 3. 20-22. "The time course and distribution of oxidative stress reflected by bilirubin oxidation after myocardial ischemia reperfusion" 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

第41回酸化反応討論会、仙台、2009、11、14-15. “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

学内外教育研究活動

山口登喜夫

1. 高知大学医学部 非常勤講師 医学部講義 2009年
2. 慶応義塾大学医学部 客員助教授:ヘム代謝の病態生化学に関する研究指導
3. 文京学院大学保健医療技術学部 非常勤講師
4. 秋田大学医学部 大学院講義 2009年5月15日

連携研究系

難治疾患研究所連携研究系 機能構築客員研究部門

研究内容

本研究部門は、生体機能を解明するために、生体システムを構成する分子や細胞といった素因子を総体とした機能として解析を進めていき、細胞や組織に対してどのように作用するかの機能メカニズムの解明を行う。

1. 細胞機能構築についての研究 (図 1)

3次元細胞培養システムは、遺伝子機能解析において2次元細胞培養とアニマルモデルのそれぞれの解析方法の欠点を補う有効な解析システムであるが、大腸癌細胞においては、まだ有効な解析システムが確立されていない。本年度、我々は、大腸癌 HCT116 細胞の変異 KRAS 遺伝子を欠損させて HKe3 細胞は、正常な大腸クリプトと同様な増殖・分化様式を呈するシステムの樹立に成功し、活性化 KRAS が DNA 修復関連遺伝子の発現とアポトーシスを3次元特異的に抑制することを見出した。これらの結果より、活性化 KRAS は遺伝子変異の蓄積に重要な役割を果たすこと、および、この3次元培養システムは大腸癌の in vivo における発癌機構の解明に重要な解析システムになり得ることが示唆された。

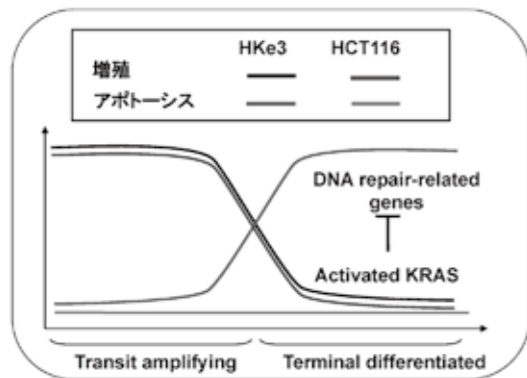


図1 変異 KRAS は生体内微小環境においてアポトーシス、DNA 修復を抑制する

2. SARS コロナウイルスに対するヒト型中和抗体の開発 (図 2)

ヒト抗体を産生するトランスジェニック動物を利用して SARS-CoV に対するヒト抗体 (IgG) の開発を行った。SARS-CoV 中和活性を有する hIgG を利用した SARS-CoV 感染患者の治療は、SARS に対する安全な免疫療法となると考えられる。また、すでにトランスクロモソ-

ム技術を利用したヒト IgG 産生マウスおよびウシが開発されており、これらの動物を利用することで大量の抗 SARS-CoV ヒト IgG を調製可能である。これらの動物を免疫するための新たな手法の開発を行い、完全ヒト単クローン抗体であり、in vitro で SARS-CoV 中和活性を示す 5H10 を得た。5H10 の認識エピトープは SARS 回復期患者血清中抗体により優勢に認識されるエピトープと同一であり、また SARS-CoV の Spike 蛋白質の開裂部分に対応していた。5H10 のウイルス中和機構は SARS-CoV の細胞への融合阻害と考えられた。同抗体の効果を SARS-CoV 感染サルモデルで検討したところ、5H10 はウイルス増殖を抑制し、ウイルス感染により病理的变化も著名に抑制した。本研究は SARS-CoV 対策のみならず新興感染症に対する安全で迅速な完全ヒト抗体療法開発の基盤となるものである。

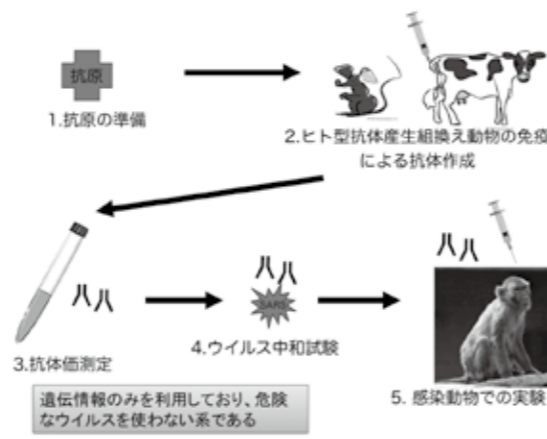


図2 中和抗体作成の戦略

3. MHC クラス I レセプター Ly49Q による新規炎症制御機構についての研究

好中球は、炎症の際に速やかに細胞極性を形成し、炎症部位へと遊走浸潤する。このような迅速な細胞移動を可能にするために、好中球には特有の極性形成機構と遊走制御機構が存在する。しかしながらその分子基盤は明らかでない部分が多い。Ly49Q は抑制性モチーフ (ITIM) を有する NK レセプターファミリーに属する分子で、古典的 MHC クラス I を認識する。しかしながらこの分子は、NK 細胞には発現が認められず、プラズマ樹状細胞、好中球、マクロファージといった炎症細胞に

原曲して発現する。私たちは、Ly49Q ノックアウトマウスを用いた解析から、この MHC クラス I レセプターが好中球の細胞極性の形成と組織浸潤に重要な役割を果たすことを明らかにした。炎症刺激存在下で Ly49Q は、ITIM 依存的に好中球の速やかな極性形成と組織浸潤を媒介した。しかしながら、炎症刺激が存在しない定常状態では、Ly49Q は接着斑の形成を抑制することによって好中球の接着を抑制し、これは Ly49Q による Src および PI3 キナーゼの抑制によるものと考えられた。定常状態で Ly49Q は抑制性フォスファターゼである SHP-1 と会合しているが、炎症刺激存在下では、活性化フォスファターゼとして知られ、接着や細胞遊走に重要な SHP-2 を会合することを見出した。従って、定常状態における抑制機能と炎症刺激存在下における活性化機能という相反する Ly49Q の機能は、エフェクターフォスファターゼとしての SHP-2 のリクルートによって切り替わると考えられた。私たちはまた、Ly49Q がある種のラフト構築の責任分子であり、Src を正しいタイミングで適切なラフト空間へと動員するために重要な役割を果たしていることも見出した。これらの結果に基づいて、私たちは、Ly49Q が好中球を定常状態から極性形成、細胞遊走へと速やかに切り替えるスイッチデバイスであり、このスイッチ機能は Ly49Q によるラフトとラフトに会合するシグナル分子の時空間的制御を介するというモデルを提唱した。このような Ly49Q のスイッチ機能によって、炎症刺激に応答した速やかな好中球の応答が媒介されると同時に定常状態における好中球の恒常性維持が保証されているものと考えられる。

4. 抗体の多様性制御に関わる因子の研究 (図 4)

我々はこれまでに、多様性の低い IgG1+ B 細胞で DapK3 が多く発現し、逆に多様性の高い IgG2b+ B 細胞で発現が減少していることを見出している。この分子は細胞の生死を制御する分子、p21^{WAF1} の機能をリン酸化により制御すると言われている。そこで本分子の B 細胞での働きを解明するため、WEHI-231 細胞を用いた解析を行なった。WEHI-231 細胞は B 細胞抗原受容体のクロスリンクによりアポトーシスを引き起こす。DapK3 はアポトーシスを促進する活性を有しており、一般的な過剰発現系を用いた実験では評価が難しい。我々は flip-flop 型 Cre-loxP 組換え反応を用いた遺伝子発現誘導系をレンチウイルスベクターに組み込み、これを用いて WEHI-231 の安定形質転換株を樹立した。Cre を用いて野生型 DapK3 発現を誘導すると、B 細胞抗原受容体刺激によるアポトーシス誘導活性が約 2 倍になった。一方、リン酸化反応の活性中心に変異を導入した DapK3 を誘導するとアポトーシス誘導能が約 1/2 になった (domi-

nant negative 効果)。これらのことより、DapK3 の発現量は B 細胞抗原受容体刺激によるアポトーシス誘導にリンクしていることが示唆された。つまり B 細胞の多様性決定に重要なクローン選択過程のしきい値に影響を及ぼすことが予想された (図 3)。

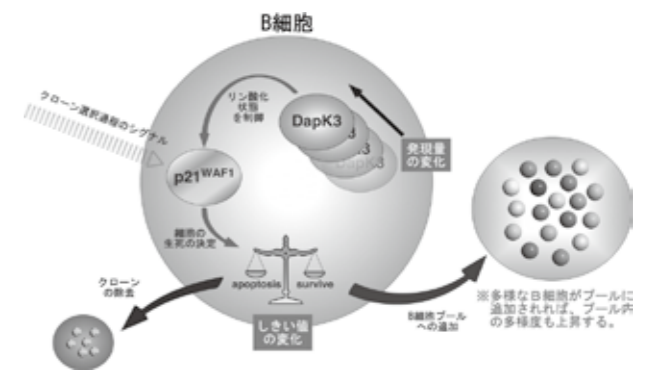


図3

業績目録

原著論文

- Sasawatari S, Yoshizaki M, Taya C, Tazawa A, Furuyama-Tanaka K, Yonekawa H, Dohi T, Makrigiannis AP, Sasazuki T, Inaba K, Toyama-Sorimachi N. The Ly49Q Receptor Plays a Crucial Role in Neutrophil Polarization and Migration by Regulating Raft Trafficking. *Immunity*, in press, 2010
- Haga S, Nagata N, Okamura T, Yamamoto N, Sata T, Yamamoto N, Sasazuki T, Ishizaka TACE antagonists blocking ACE2 shedding caused by the spike protein of SARS-CoV are candidate antiviral compounds. *Antiviral Res.* in press, 2009
- Patrick MS, Oda H, Hayakawa K, Sato Y, Eshima K, Kirikae T, Iemura S, Shirai M, Abe T, Natsume T, Sasazuki T, Suzuki H. Gasp, a Grb2-associated protein, is critical for positive selection of thymocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106(38):16345-50, 2009
- Yoo BH, Woo X, Li Y, Haniff M, Sasazuki T, Shirasawa S, Eskelinen EL, Rosen KV. Oncogenic ras-induced downregulation of autophagy mediator Beclin-1 is required for malignant transformation of intestinal epithelial cells. *J Biol Chem.* 285(8):5438-49, 2009
- Nakabayashi K, Komaki G, Tajima A, Ando T, Ishikawa M, Nomoto J, Hata K, Oka A, Inoko H, Sasazuki T: Japanese Genetic Research Group for Eating Disorders (JGRED), Shirasawa S. Identification of novel candidate loci for anorexia nervosa at 1q41 and 11q22 in Japanese by a genome-wide association analysis with microsatellite markers. *J Hum Genet.* 54(9):531-537, 2009
- Palmioli A, Sacco E, Airoidi C, Di Nicolantonio F, D'Urzo A, Shirasawa S, Sasazuki T, Di Domizio A, De Gioia L, Martegani E, Bardelli A, Peri F, Vanoni M. Selective cytotoxicity of a bicyclic Ras inhibitor in cancer cells expressing K-Ras(G13D). *Biochem Biophys Res Commun.* 386(4):593-597, 2009
- Trobridge P, Knoblaugh S, Washington MK, Munoz NM, Tsuchiya KD, Rojas A, Song X, Ulrich CM, Sasazuki T, Shirasawa S, Grady WM. TGF-beta Receptor Inactivation and Mutant Kras Induce Intestinal Neoplasms in Mice via a beta-Catenin-Independent Pathway. *Gastroenterology.* 136(5):1680-1688, 2009
- Fujimoto T, Doi K, Koyanagi M, Tsunoda T, Takashima Y, Yoshida Y, Sasazuki T, Shirasawa S. ZFAT is an antiapoptotic molecule and critical for cell survival in MOLT-4 cells. *FEBS Lett.* 583(3):568-572, 2009
- Fujimoto T, Miyasaka K, Koyanagi M, Tsunoda T, Baba I, Doi K, Ohta M, Kato N, Sasazuki T, Shirasawa S. Altered energy homeostasis and resistance to diet-induced obesity in KRAP-deficient mice. *PLoS ONE.* 4(1):e4240, 2009
- Tsunoda T, Takashima Y, Fujimoto T, Koyanagi M, Yoshida Y, Doi K, Tanaka Y, Kuroki M, Sasazuki T, Shirasawa S. 3D-specific inhibition of DNA repair-related genes by activated KRAS in colon crypt model. *Neoplasia*, in press
- Kuba, H., Furukawa K. : An optimized procedure for efficient phage display of antibody fragments with a low folding efficiency. *Protein Expr. Purif.* (2009) 65, 148-153.

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

ヒトゲノムの80%以上の遺伝子からスプライシングバリエーションの発現が観察されている。蛋白質相互作用の多様化を通じた蛋白質ネットワークへの寄与という観点から、選択的スプライシングによる翻訳プロダクトが安定なタンパク質立体構造を形成するかどうかの予測、さらに病態発現機構などとの関わりを推定する。また、多細胞個体が形成されていく過程での、さまざまなRNA情報発現制御システムの研究を通して、動物の発生分化調節機構を明らかにする。

業績目録

論文

1. Masafumi Shionyu, Akihiro Yamaguchi, Kazuki Shinoda, Ken-ichi Takahashi, and Mitiko Go, AS-ALPS: a database for analyzing the effects of alternative splicing on protein structure, interaction and network in human and mouse. Nucl. Acids Res. 37: D305-D309 (2009). http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/37/suppl_1/D305
2. Kei Yura, Sintawee Sulaiman, Yosuke Hatta, Masafumi Shionyu and Mitiko Go, RESPOS Data Base for Analyzing the Correspondence of RNA Sites to Protein Three-Dimensional Structures. Plant and Cell Physiology 50(11): 1865-1873 (2009).
3. Fukumura, K., Taniguchi, I., Sakamoto, H., Ohno, M., & Inoue, K. U1-independent pre-mRNA splicing contributes to the regulation of alternative splicing. Nucl. Acids Res. 37, 1907-1914 (2009)
4. Suzuki, H., Tsukahara, T., & Inoue, K. Localization of c-mos mRNA around the animal pole in the zebrafish oocyte with Zor-1/Zorba. BioScience Trends 3, 96-104 (2009)
5. Fukumura, K., & Inoue, K. Role and mechanism of U1-independent pre-mRNA splicing in the regulation of alternative splicing. RNA Biol. 6, 395-398 (2009)
6. Fukao, A., Sasano, Y., Imataka, H., Inoue, K., Sakamoto, H., Sonenberg, N., Thoma, C & Fujiwara, T. The ELAV protein HuD stimulates cap-dependent translation in a poly(A)- and eIF4A-dependent manner. Mol. Cell 36,1007-1017 (2009)
7. Takeda, Y., Mishima, Y., Fujiwara, T., Sakamoto, H., & Inoue, K. DAZL relieves miRNA-mediated repression of germline mRNAs by controlling poly(A) tail length in zebrafish. PLoS ONE 4, e7513 (2009)
8. Tani, S., Kusakabe, R., Naruse, K., Sakamoto, H., & Inoue, K. Genomic organization and embryonic expression of miR-430 in medaka (*Oryzias latipes*): insights into the post-transcriptional gene regulation in early development. Gene 449, 41-49. (2010)

解説

1. 由良 敬、郷 通子「陸上植物オルガネラのRNA編集の役割」生物物理 49(5), 244-255 (2009)
2. 福村和宏、井上邦夫 (2009) エキソン認識と選択的mRNAスプライシング制御の分子メカニズム。蛋白質核酸酵素・増刊号 (共立出版) 54, 2032-2037

国際シンポジウム招待講演

1. Mitiko Go, "Events during Information Flow from Genomic Sequence to Protein Structure/Function in Biological System", The 4th Global COE International Symposium 2009 Joint with the 19th Hot Spring Harbor Symposium "Molecular Evolution and Bioinformatics", 2009.11.1
2. Mitiko Go, "Information Flow from Genes to Proteins", "International Symposium: Fifty Years of Biophysics Research at Nagoya University" March 12-14, 2010.

研究会講演

1. 郷 通子「遺伝情報の流れの複雑性からみる

生物進化」国際高等研究所 平成21年度第3回研究会「生物進化の持続性と転移」2010.3.2

教育活動 (啓蒙講演)

1. 郷 通子 「たくさんの師との巡り会いと海外で学んだ経験」第9回日本蛋白質科学会年会 ヒストリー・レビュー講演 熊本 2009.5.22
2. 郷 通子 「生命科学の今とこれから」京都産業大学生命科学フォーラム ライフサイエンスが未来を創る! 大阪NHKホール 2009.8.22

研究費取得

1. 郷 通子 科学研究費 基盤研究 (B) 「選択的スプライシングを受けたタンパク質の立体構造モデリングによる機能解析」
2. 井上邦夫 科学研究費 基盤研究 (C) 「U1に依存しない新規スプライシング機構の解明」
3. 井上邦夫 科学研究費 新学術領域研究 (研究領域提案型) 「多様性と非対称性を獲得するRNAプログラム」計画研究「mRNA制御システムによる生殖細胞形成機構」

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。また、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による研究支援を行っている。さらに、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、2009年の実績である

1. 学生教育

2009年度生命情報科学教育部のゲノム及び遺伝子発現解析演習を行った。

DNA 受託シーケンスサービス

- 1) 延べ利用人数はほぼ昨年並みであったが、サンプル件数は、難研内からの依頼が多く過去最高の87,426件であった。
- 2) 消耗品の値上がりのため、4月1日より泳動のみの料金を値上げする一方、学内への更なる貢献を目的として、難研外のシーケンス反応を含む解析料金は900円/サンプルから600円/サンプルに値下げした。

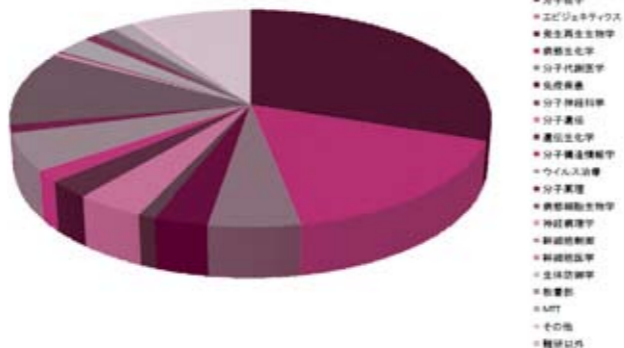
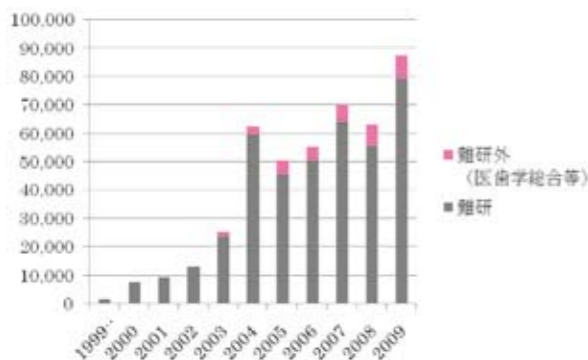
2. 設置機器

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

転出：石川 蘭子（技術補佐員）

転入：伊藤 暁子（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。

現在設置されているセルソーターは、従来の機種と比較してはるかに高速、高純度で細胞を精製することが可能であるため、生体内にごく少数しか存在しない細胞でも多数精製することが可能である。



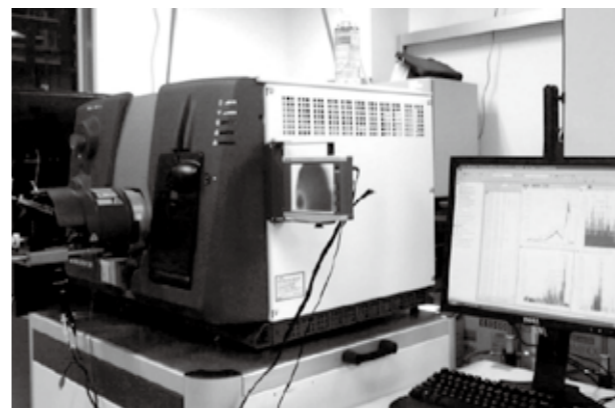
MOFLO セルソーター

また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台稼動しており、目的蛋白質の同定・翻訳後修飾等の同定には使い分けが必要である。実際にこうした複数台の機器について、円滑に解析、利用、運営できるよう互いに連携を図っている。



LC-MSMS 解析 Q-tof micro



LC-MSMS 解析 ABCSCIEX QTRAP5500

21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。

本年度M&DタワーII期棟21階に移転した。

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・準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、また、本実験室は生命情報科学教育部の「発生工学演習」をサポートしている。



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、凍結マイクローム、ロータリーマイクローム、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、難治疾患の病態解明・診断・治療にとって不可欠な手段であり、本解析室では遺伝子構造解析が終了したポストゲノム時代に欠かすことの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。難治疾患研究所・疾患生命科学研究部・生体材料研究所の研究者を対象として、装置の取り扱いやタンパク質の結晶化についての講習会を開催した。また、生命情報科学教育部の学生に対しても、同様の演習を行った。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。

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 CD8 T 細胞形成のメカニズム

記憶 CD8 T 細胞は長期間体内に存在して、naïve 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します。ウイルスや癌などに対する記憶 T 細胞は、再感染や癌再発で生体防御に貢献する一方で、自己反応性記憶 T 細胞は自己免疫疾患を引き起こします。感染症や癌に対するワクチン開発や自己免疫疾患の予防・治療には、記憶 T 細胞形成のメカニズムの解明が不可欠です。私たちの研究グループでは、もっとも強力な抗原提示細胞である樹状細胞に生体内で直接抗原を運んで抗原特異的記憶 CD8 T 細胞を誘導する手法 (in vivo antigen delivery system) を用いて記憶 T 細胞形成のメカニズムの解明に取り組んでいます。

Naïve な T 細胞は樹状細胞から抗原提示を受けて活性化すると、effector T 細胞に分化してそのほとんどが細胞死に至りますが、一部は生き残って記憶 T 細胞へと分化します。この記憶 T 細胞分化の鍵を握るのが IL-7 シグナルで、effector T 細胞のうち IL-7 受容体 (IL-7R) の発現が低い細胞は死にますが、IL-7R 発現の高い細胞が生き残って記憶 T 細胞となることが知られています。けれども記憶 T 細胞形成期における IL-7R の発現制御機構についてはよくわかっていません。

当研究室では短命の effector T 細胞と長命の記憶 T 細胞で発現の異なる新規 AP-1 ファミリー転写因子に注目して、GFP/knock-in マウスを作製し、この転写因子が、IL-7R の転写制御を介して記憶 T 細胞の分化に重要な役割を果たすことを明らかにしました (投稿中)。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免疫調節薬は副作用も小さく、安全性の面から見ても優れた自己免疫・アレルギー疾患の治療法として期待されます。そこで当研究室ではこの転写因子を標的とした低分子化合物のスクリーニングを行い新規免疫抑制剤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、私たちが日常的に呼吸で消費している酸素が、体内でどのように働いているのかを研究してい

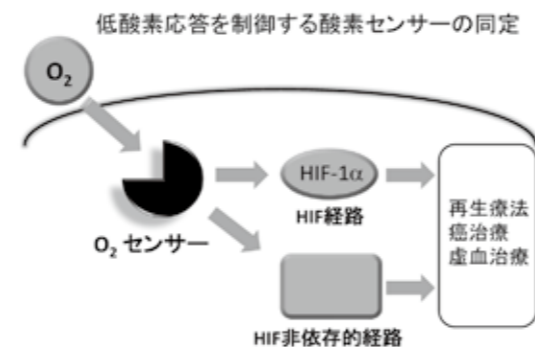
ます。個体は、酸素濃度の低い環境で低酸素応答を引き起こして適応します。低酸素応答は、個体の発生や癌などの疾患にも関与していることが解ってきました。低酸素応答の分子・細胞レベルでの解析を通して、癌治療や器官の再生療法に貢献することをめざしています。

1. 低酸素応答のシグナル伝達機構の解析

HIF-1 α は低酸素応答において中心的な役割を担う転写因子である。HIF-1 α は、細胞が低酸素環境におかれると速やかに安定化され、その発現が上昇する。低酸素応答シグナル経路で HIF-1 α の上流に位置し、HIF-1 α の安定化に関与しているのがプロリン水酸化酵素 PHD である。本研究室では PHD に着目して、低酸素応答で活性化される HIF 経路と HIF 非依存的経路のシグナル伝達機構の解析を進めている。

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

PHD は低酸素応答性の巨大なタンパク質複合体を形成する。PHD 複合体中には細胞内の酸素濃度変化を感知する酸素センサーが含まれていることが考えられる。そこでプロテオミクス解析を用いた複合体構成タンパク質の探索を進め、酸素センサーとして働く分子を同定することを試みている。酸素センサーを利用して、癌組織内の低酸素環境の検出と再酸素化を可能にするツールの開発に結びつけたい。



曾根雅紀 (MTT 特任講師)

ショウジョウバエ遺伝学を用いた神経発生・神経変性の分子機構の解析

近年、ショウジョウバエ遺伝学を用いたヒト疾患モデル研究が盛んに行われている。私と共同研究者はこれまでに、神経変性に関連するショウジョウバエの新しい分子である *yata* を同定・解析してきた。*yata* 変異体は発生異常・早期死亡および進行性の複眼空胞形成・脳萎縮を呈する。これまでに、*yata* は、APPL (アルツハイマー病原因分子である APP のホモログ) およびその他の分子の細胞内輸送調節を介して神経恒常性維持に必要とされていることが明らかになっている。そこで、*yata* と相互作用する分子を同定し、*yata* の分子機能をさらに解析した結果、*yata* の標的分子を輸送するための輸送小胞形成機構が、発生ステージによってコンディショナルな On/Off 制御を受けていることが示唆された。

邊見 弘明

樹状細胞・マクロファージ・破骨細胞等における新規 Trem 分子の機能解析

マクロファージ・樹状細胞は、主として自然免疫を担っており、マクロファージは特に細菌や異物やアポトーシスに陥った細胞の貪食を行い、また、樹状細胞は主として抗原提示細胞として働き、抗原特異的な T 細胞の活性化を誘導し、その後続く獲得免疫の反応をコントロールしていることが知られている。近年、これら細胞を強く活性化してサイトカイン産生等を促す分子 (例えば、細菌やウイルス構成成分を認識する Toll-like receptor (TLR) リガンドなど) の他に、これら細胞の活性化状態を調節していることが示唆されている分子群についての報告も多くなされてきている。これらのうち、ある分子は TLR リガンド等と協調的に作用して強くサイトカイン産生などを強く誘導するものがあり、逆にその活性化を負に調節する分子も知られている。これら分子の中に Trem ファミリー分子が知られており、これまでに我々は、Trem-like 4 が樹状細胞・マクロファージのサブセットで発現し、また、その soluble form が、死細胞に親和性を示すことを見いだした。現在では、そのノックアウトマウスを用いてその生理的な機能の解析を行っており、上記マクロファージや樹状細胞の他に、同じ細胞系譜に属し骨吸収や骨リモデリングに関与している破骨細胞についても、解析を進めている。新たに見いだしたこのような分子の生理的な役割を検討することを中心にして、死細胞による自然免疫・獲得免疫に与える影響とその機構を明らかにしたいと考えている。

佐藤 淳

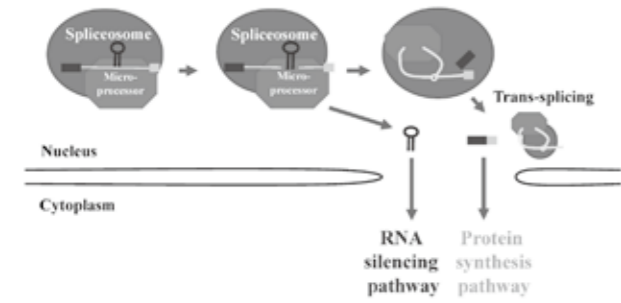
CRD タンパク質 Corin のショウジョウバエ相同遺伝子の機能解析

Wnt シグナル伝達経路において、Wnt 受容体 Frizzled に存在する Cystein Rich Domain (CRD) は、Wnt 結合部位として機能するが、Wnt シグナルと関連が知られていないタンパク質からも見つかった。ヒト Corin もその一つであり、CRD だけでなく、LRP ドメイン及び膜型セリンプロテアーゼ部位も保持し、血圧を制御する ANP の変換酵素として、高血圧症に関与する。しかし、Corin の生体内での機能制御や各ドメインの機能、シグナル伝達系は、ほとんど明らかにされていない。遺伝学的機能解析に優れたショウジョウバエを用いて、ショウジョウバエ相同遺伝子の機能を明らかにしていくことで、高血圧症などの疾患発症メカニズムの解明を目指している。ショウジョウバエには 2 種の Corin (DCorin, DCorin2) が存在する。DCorin 突然変異体は何の表現型も示さないが、DCorin の欠損変異型の異所発現により得られた表現型から、EGF シグナルに関与することが予測された。EGF 受容体をコードする遺伝子 *EGFR* の活性化型変異体と *DCorin* 変異体の二重変異体では、*EGFR* 活性化型変異体による表現型を回復した。これらの結果は、DCorin は、EGF シグナル伝達経路の新たな因子として機能している可能性を示唆するものである。DCorin2 突然変異体も何の表現型も示さないが、野生型の強制発現により、翅の支持組織である翅脈の異所的形成や翅の周辺部の欠損という表現型が得られた。これらの表現型は、Notch シグナルに関与する可能性を示唆している。DCorin 及び DCorin2 のように CRD を持つタンパク質が Wnt シグナル伝達経路ではなく、他のシグナル伝達経路に関わっていることは、非常に興味深く、今後も解析を続けていく。

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。しかし、イントロンは単なるがらくたではなく、snoRNA や miRNA など機能性 RNA を含む場合がある。miRNA は標的 mRNA の分解や翻訳抑制を引き起こす低分子 RNA である。ゲノム解析の結果、ヒト miRNA の約 80% が他の遺伝子のイントロン内にコードされていることが明らかになったが、その生合成経路は不明であった。そこでイントロン内に miRNA を持つ mRNA 前駆体を用いた in vitro 反応系を開発し、解析を行った。その結果、イントロン内 miRNA の産生にはスプライシングは必須ではないこと、そして miRNA 前駆体の産生はスプライシングによって促進されるが、miRNA がイントロン内に存在す

るとスプライシングは逆に阻害されることを示した。また、miRNA 生合成複合体 Microprocessor とスプライソソームとが会合していることを明らかにした。以上の結果より、イントロン内に存在する miRNA の場合、1) Microprocessor がスプライソソームとともに miRNA を含むイントロン上で miRNA 前駆体の切り出しを行う 2) 切断後の mRNA 前駆体の断片は複合体内に保持され、スプライシングが起こる 3) その結果一分子の mRNA 前駆体から、miRNA と mRNA の 2 つの機能性分子が産生されるという経路をたどることが強く示唆された。



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。これらの結果は、BDNF が脳神経細胞のコレステロールホメオスタシス自体を調整している可能性を示唆しています。脳のコレステロールホメオスタシスの異常は、アルツハイマー病などの神経変性疾患において報告されていることから、現在は脳神経細胞におけるコレステロールホメオスタシス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、中でも心房細動及び心臓突然死の病態解明と新しい治療標的の発見を目標に研究を進めています。

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。心房細動の進展には心房の炎症が重要な役割を果たすことが報告されています。我々は、心房筋に対して機械的伸展刺激を加えることにより、心房筋細胞が gap junction channel を介してスクレオチドを放出することを発見しました。放出されたスクレオチドは autocrine 作用により心房筋でのケモカインの発現を増強し、マクロファージの浸潤及び活性化を誘導していました。この機序は、心房拡大における炎症機転の最上流に位置するものと考えられ、この炎症メカニズムの解明は心房細動に対する新たなアップストリーム治療につながると期待されます。

また、QT 延長及び心臓突然死に関与すると近年報告されている新たな分子 NOS1AP (CAPON) について、ノックアウトマウスを用いて種々の病態モデルにおける催不整脈性を検討しております。NOS1ap は多くの研究において共通して QT 間隔との相関が強く示されている分子であり、この分子の心房における作用を明らかにすることは心臓突然死の病態解明に役立つと思われま

山本 幸男

エストロゲンによる肝脂質蓄積抑制の分子機構

脂質代謝に性差が存在することは広く知られているが、その制御機構における分子基盤には不明な点が多い。閉経に伴うエストロゲンの欠如は、脂質代謝異常の病態として高脂血症および脂肪肝のリスクを高めるが、閉経後治療としてのホルモン補償療法によってこれらのリスクは軽減される。すなわち、エストロゲンは脂質合成に抑制的に働いていると考えられる。その機構として、エストロゲンの主要な作用点である核内受容体 ER α (Estrogen Receptor α) が、脂質代謝のマスターレギュレーターである核内受容体 LXR (Liver X Receptor) に直接もしくは間接的に働き、遺伝子発現を制御することにより脂質代謝を抑制することを見いだした。現在、全く独立に働くと考えられていたこれらの核内受容体のクロストークにより脂質代謝が制御される詳細な分子機構を検討している。さらに、ER α -KO マウスを用いて個体レベルの検証を進めている。本研究の成果は、性差に基づく脂質代謝制御の分子基盤を明らかにするだけではなく、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) や肝硬変あるいは肝癌の前駆段階である肝脂質蓄積 (脂肪肝) に対する全く新しい治療法を開発するための基礎的な知見となることが期待できる。

松井 毅

重層上皮形成・維持機構の解析

人体を構成する各器官はその表層を上皮組織と呼ばれ

る細胞シートにより区画化する事によりそれぞれの生理機能の遂行を可能にしている。上皮組織には、一層からなり消化器系 (胃や腸等)・泌尿器系 (腎臓)・呼吸器系 (気管や肺等) を覆う単層上皮組織と、皮膚や食道、子宮を覆う多層からなる重層上皮組織が存在している。このように生物学的に重要な働きを担っている上皮組織であるが、その形成・維持機構の分子メカニズムは明らかになっていない部分が多い。そこで、本研究では重層上皮組織の形成・維持機構を分子レベルで理解する事によって、様々な皮膚疾患の理解、更には上皮全般の形成・維持機構を明らかにする事を試みている。

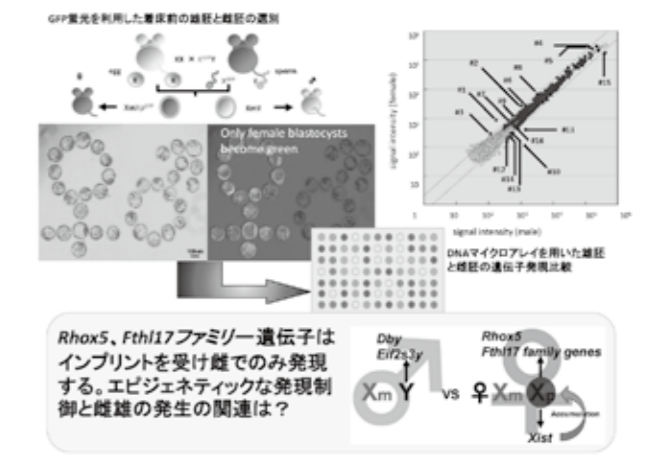
我々は以前、高速 *in situ* hybridization 法により重層上皮特異的蛋白質分解酵素 SASPase のマウスホモログを同定し、その欠損マウスは体側に小皺が形成される事を明らかにしていた。本年度は、皮膚表皮表面の生理学的・生化学的解析を可能にするために、無毛マウス (Hos: HR-1) との戻し交配を行った。その結果、SASPase 欠損無毛マウスは乾燥肌様表皮を示す事が明らかとなった。現在その皮膚表皮の詳細な形態学的・生化学的解析及び皮膚疾患との関連解析を行っている。

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

雄と雌は様々な面で違っている - 例えば体の大きさ、骨格、生殖器官、脳の構造などが挙げられる -。このような雄と雌の違いは、一般的に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比べることにした。しかし、精巣、卵巣が分化する以前の胚は見た目だけでは雌雄を区別することはできない。そこで、トランスジェニックマウスを利用した着床前の性判別方法を用いる工夫を行い、胚盤胞期の雄胚と雌胚を合計 1000 個以上選別した。次に両者の遺伝子発現を 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. Nucleic Acids Res., 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、これまで注目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

御が雌雄の分化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。

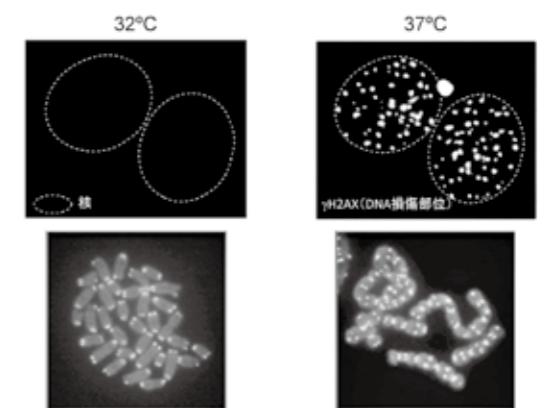


小西昭充

1. 染色体 DNA 傷害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 傷害の検出、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 傷害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ってきました。我々は、テロメアの機能破綻を一般的な DNA 傷害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、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 2008 年)、



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)

現在、この技術を発展させて、一般的な DNA 傷害に対する細胞応答反応の解析を行っています。また、発癌や老化と密接に関連していると考えられ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。

平山 順

概日リズムの DNA 損傷応答機構としての機能

概日リズムはホルモン分泌等の生理機能の周期を外環境に適応させ維持する機構です。この異常は発癌や糖尿病等の代謝異常といった現代社会を脅かす疾患を含む多くの病態に関与しています。概日リズムは全身の個々の細胞に存在する分子時計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 つの時計蛋白質により構成される約 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です (図 1)。分子時計は細胞周期制御因子 *Wee1* や癌遺伝子 *c-Myc* 等の転写制御を介して他の細胞機能に影響を与えることが報告されています。また、時計蛋白質 CLOCK がヒストンアセチルトランスフェラーゼ (HAT) 活性を有し、グルココルチコイドレセプター (GR) といった他の細胞機能制御因子をその HAT 活性によりアセチル化し機能調節することが報告されています。さらに、分子時計は CLOCK の HAT 活性によりターゲット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 (図 1)。我々は、これらの分子時計による細胞機能制御が化学物質等による DNA 損傷により受ける影響及びその分子機構を明らかにし、DNA 損傷応答機構としての分子時計の機能という新規の概念の確立を目指しています。概日リズムの異常は多くの疾患を引き起こすことから、我々の研究には予防医学の基盤研究としての貢献が期待されます。

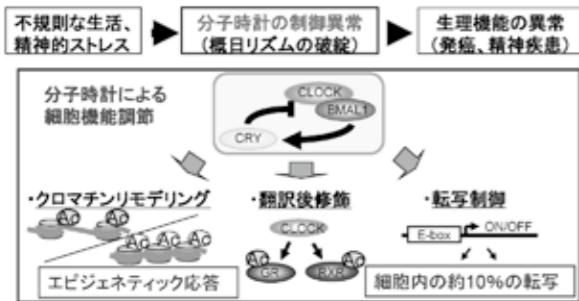


図 1. 分子時計による細胞機能の制御

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. κ B ζ regulates TH17 development by cooperating with ROR nuclear receptors. *Nature* (*in press*)

[Hemmi H.](#), Idoyaga J, Suda K, Suda N, Kennedy K, Noda M, Aderem A, Steinman RM. A new triggering receptor expressed on myeloid cells (Trem) family member, Trem-like 4, binds to dead cells and is a DNAX activation protein 12-linked marker for subsets of mouse macrophages and dendritic cells. *J Immunol.* 182: 1278-86, 2009.

Ohnishi, E., Goto, T., [Sato, A.](#) (these three author contributed equally) , Kim, M-S, Iemura, S., Natsume, T., Ohnishi, J. and Shibuya, H. (2010) . Nemo-Like Kinase, an essential effector of anterior formation, functions downstream of p38 mitogen-activated protein kinase. *Mol. Cell Biol.* 30: 675-683.

Nojima, T., Oshiro-Ideue, T., Nakanoya, H., Kawamura, H., Morimoto, T., [Kawaguchi, Y.](#), Kataoka, N. and Hagiwara, M. (2009) . Herpesvirus protein ICP27 switches PML isoform by altering mRNA splicing. *Nucleic Acids Research* 37: 6515-6527

[Kataoka, N.](#)^{*,*}, Fujita, M.[#] and Ohno, M.^{*} (2009). (*Equal contribution, *Corresponding authors) . Functional association of the Microprocessor complex with spliceosome. *Molecular and Cellular Biology* 29: 3243-3254

Koshimizu H, Kiyosue K, Hara T, Hazama S, [Suzuki S.](#) Uegaki K, Nagappan G, Zaitsev E, Hirokawa T, Tatsu Y, Ogura A, Lu B, Kojima M. Multiple functions of precursor BDNF to CNS neurons: negative regulation of neurite growth, spine formation and cell survival. *Molecular Brain* 2(1):27

[Sasano T.](#), Kelemen K, Greener ID, Donahue JK: Ventricular tachycardia from the healed myocardial infarction scar: validation of an animal model and utility of gene therapy. *Heart Rhythm* 2009; 6: S91-7.

Johnston PV, [Sasano T.](#) (contributed equally), Mills K, Evers R, Lee ST, Smith RR, Lardo AC, Steenbergen C, Gerstenblith G, Lange R, Marbán E. Engraftment, differentiation and functional benefits of autologous cardiomyocyte-derived cells in porcine ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 2009; 120: 1075-83.

Kakusaka S, Asayama M, Kaihara A, [Sasano T.](#), Suzuki T, Kurokawa J, Furukawa T. A receptor-independent effect of estrone sulfate on the hERG channel. *J Pharmacol Sci.* 2009; 109: 152-6.

[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.* 2010 Feb 25. [Epub ahead of print] (*: corresponding author)

Miyamura N*, [Hirayama J](#)^{#.}, Sawanobori K, Tamaru T, Asaoka Y, Honda R, Yamamoto T, Uno H, Takamatsu K, Nishina H. CLOCK: BMAL-independent circadian oscillation of zebrafish Cryptochromela gene. *Biol. Pharm. Bull.* 32:1183-1189, 2009. (*Contributed equally; #Corresponding author)

[Hirayama J](#)[#], Miyamura N, Uchida Y, Asaoka Y, Honda R, Sawanobori K, Todo T, Yamamoto T, Sassone-Corsi[#] P, and Nishina H. Common light signaling pathways controlling DNA repair and circadian clock entrainment in zebrafish. *Cell Cycle* 8:2794-2801, 2009. (#Corresponding author)

Uchida Y, [Hirayama J](#)[#], and Nishina H. A common origin: signaling similarities in the regulation of the circadian clock and DNA damage responses. *Biol. Pharm. Bull.* In Press (#Corresponding author)

英文総説

[Nakayama K.](#) (2009) Cellular signal transduction of the hypoxia response. *J. Biochem.* 146, 757-65

日本語総説

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 「RNA プロセッシング異常:RNA 病を斬る」29: 175-180 (2010)

片岡直行, 芳本玲, 藤田恵, 大野睦人 イントロンの代謝機構 蛋白質核酸酵素・増刊「mRNA プログラム」54: 2060-2065 (2009)

片岡直行 snRNA の機能および機能異常による疾患 BIO Clinica「小さな RNA と疾患」24: 706-711 (2009)

学会発表

Molecular mechanism of ubiquitin ligase PRP19 activation by prolyl-hydroxylase PHD3 during hypoxia response 中山 恒, 佐藤益弘, 迫田実希 第 32 回 日本分子生物学会 12 月 11 日 横浜

[Hemmi H.](#), Idoyaga J., Suda K., Noda M., Steinman R.M. The Identification and Characterization of A New Trem-like Molecule. American Society for Bone and Mineral Research 31st Annual meeting, Denver, Co, USA, September, 2009.

邊見弘明, マウス脾臓樹状細胞 / マクロファージに発現している Trem ファミリー分子 Trem-like 4 の同定とその解析. 邊見弘明, Juliana Idoyaga, 高井俊行, 斉藤隆, 野田政樹, Ralph M. Steinman. 第 39 回日本免疫学会学術集会. 大阪. 2009 年 12 月.

[Atsushi Sato](#), Andrew Tomlinson, Hiroshi Shibuya. Characterization and functional analysis of the Drosophila Corin Protein. The 9th Japanese Drosophila Research Conference 2009 年 7 月 掛川。

[Shin Kobayashi](#), Yoshitaka Fujihara, Nathan Mise, Kazuhiro Kaseda, Kuniya Abe, Fumitoshi Ishino, Masaru Okabe, Epigenetic regulation in male and female at preimplantation stages. THE 24th NAITO CONFERENCE, June 24th, 2009

片岡直行, 二宮賢介, 吉田真由美, 萩原正敏 選択的スプライシング調節因子 SRp75 の標的遺伝子の同定と解析 第 11 回日本 RNA 学会年会 新潟朱鷺メッセ

[Kataoka N.](#), Fujita, M. and Ohno M. (2009) . Functional association of the Microprocessor complex with spliceosome. *Eukaryotic mRNA processing.* Cold Spring Harbor, New York, USA.

小林 慎, 藤原祥高, 三瀬み丹, かせ田一宏, 阿部訓也, 石野史敏, 岡部 勝 「インプリントが原因で 2 細胞期から雌胚で過剰に発現する X 染色体上の *Fat45* ファミリー遺伝子」, 第 3 回日本エピジェネティクス研究会年会, 2009 年 5 月 22 日

招待講演

小林 慎 第 54 回日本生殖医学会 (金沢・2009/11/22-2009/11/23) : タイトル 「雌で発現する X 染色体上のインプリント遺伝子の発見」

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) 「細胞の酸素センシング機構の解析」

邊見弘明 (代表) 科学研究費補助金若手研究 (B)、新規 Trem 分子の機能解析

佐藤 淳 (代表) :平成 21 年度科学研究費若手研究 (B), 「PHA2 型原因遺伝子 WNK のショウジョウバエ相同遺伝子の解析」

山本幸男 (代表) :文部科学省科学研究費補助金、基盤研究 (C) 「核内受容体 ER α と CAR の活性化バランスによる肝脂質代謝制御の分子機構」

山本幸男:小野医学研究財団・研究奨励助成金 「エストロゲンレセプター *a* による脂肪蓄積抑制の分子機構の解明」

小西昭充 2009 年度 度武田科学振興財団医学系研究奨励金 「テロメア機能不全を利用した DNA 損傷に対する細胞応答の分子機序の解析」

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。本センターでは 2009 年度までに、以下の整備を行いました。

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 18,000 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、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 μ M in 10% DMSO）、基本的には 96 ウェルプレート単位（10 μ l/well）で希望者に配付しています。その他の濃度や容量での配付を希望される場合、またスクリーニング後のヒット化合物個別配付をご希望の場合はセンターまでご相談いただくことになっています。

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）。本センターでは現在保有しているマルチラベルプレートリーダーを追加し、時間分解蛍光、蛍光偏光に対応したプレートリーダーを導入し、*in vitro* でのより緻密な解析に対応できるようにしました。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、ハイコンテックス細胞解析装置を導入しました。また医歯学総合研究棟への移転に伴う細胞培養設備の充実、384 ウェル対応分注機の導入など、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。



図 1 化合物スクリーニングの方向性とセンター設備

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（現福島大学教授）、江口博之准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/>、図 2) 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 ChemOffice (Windows) / Chem Draw (Macintosh) の全学ライセンス管理を行っており、全学の研究者に対し、CBDB からダウンロードできる化合物構造ファイルなど、化合物情報の手元での閲覧と管理を可能としています。

その他利用詳細につき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。

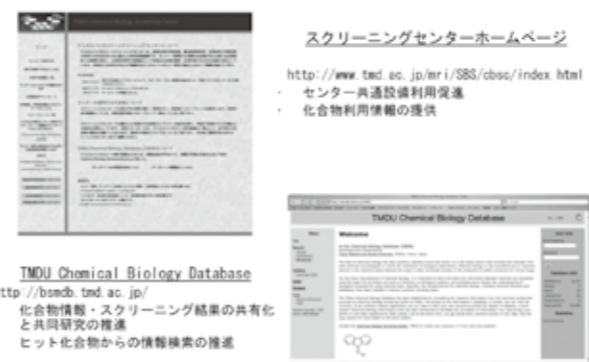


図 2 スクリーニングセンター HP と TMDU Chemical Biology Database トップページ



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しうることもある。

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。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や、ダウン症への関与が指摘されているリン酸化酵素 DYRK1A を抑える阻害剤、抗体と低分子抗原など、様々な複合体の構造を解析している。その中から、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。

活性型ビタミン D は主にカルシウム代謝を調節するホルモンであり、抗がん剤、乾癬などの免疫疾患治療薬などの標的と考えられている。近年、様々な疾病が VDR の活性化と結びついていることが明らかになるにつれ、その調節をねらった化合物の開発に期待が集まっ

ている。

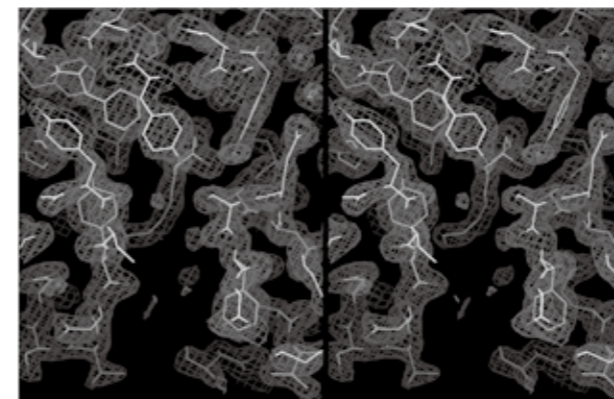
一方で、先天性くる病 II 型 (HVDRR; hereditary vitamin D-resistant rickets) のような、VDR の変異を原因とする疾患も見つかっている。くる病はビタミン D の代謝異常に伴うカルシウムの吸収低下によって発症する疾病であるが、HVDRR ではビタミン D 受容体のリガンド結合ドメイン (VDR-LBD) 内のミスセンス変異がカルシウムの吸収低下に大きく関与している可能性がある。現在までに同定されている HVDRR 関連のミスセンス変異のうち、特に、286 番目の Trp の Arg への変異 (W286R) は VDR の機能との相関が明確なため注目されている。W286 は、リガンド結合ポケット内で天然リガンド $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ の CD 環付近に位置しており、VDR の転写活性型コンフォメーション形成に必須のアミノ酸残基である。しかし、W286R VDR は、天然リガンドに全く応答しないために標的遺伝子の転写活性化に重大な欠陥が生じる。今のところ、HVDRR の最も効果的な治療法はカルシウムの静脈内投与であるが、長期にわたる治療を必要とし、患者に多大な負担をかけるばかりでなくクオリティーオブライフ (QOL) を低下させることにもなる。

それに代わる方法として、変異 VDR の機能を改善させる選択的アゴニストの創製を目指した研究が行われてきたが、W286R 変異受容体の機能の活性化を目的としたこれまでリガンドの探索では、ドッキングシミュレーションの結果に基づいて設計された C 環 9 位に置換基をもつビタミン D3 誘導体の多くが、W286R VDR を介する転写をほとんど誘導しないことが判明している。そこで、本研究では、まず、変異 W286R VDR-LBD が天然リガンドを認識する上での欠陥を原子レベルで解明し、変異受容体の機能を活性化させるようリガンド設計の示唆を得ることを目的として、モデル系であるラット W282R VDR-LBD (W282R rVDR-LBD) の結晶構造の解明を試みた。その結果、W282R rVDR-LBD、天然リガンド、コアクチベーター DRIP205 由来の配列をもつペプチドとの三元錯体の結晶化と、1.65 Å の分解能での構造解析に成功した。得られた W282R rVDR-LBD の構造は典型的なアゴニスト結合型のコンフォメーションで、点変異の無い rVDR-LBD と類似したものであった

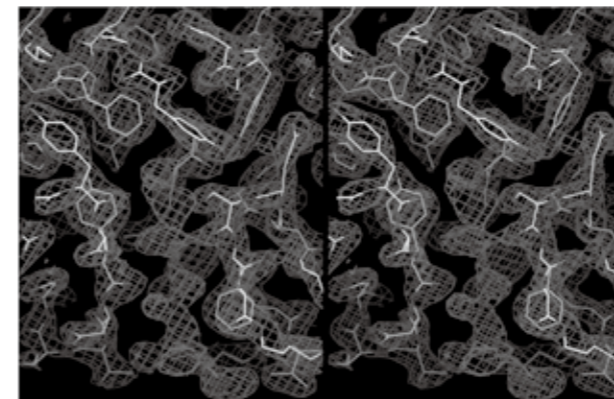
が、変異 VDR では R282 付近の電子密度が不明瞭になっていた (図 1A)。

既報のすべての VDR-LBD の結晶構造には、3 本の β -ストランドが逆平行に並んだ β -シート構造が存在する (図 1B)。ラット VDR の W282 (ヒト VDR では W286) は、3 つのうち中央の β -ストランド上に位置する残基である。ところが、W282R rVDR-LBD ではこの中央 β -ストランドの電子密度が、主鎖、側鎖ともに見えない。この結果は、W282R 変異体ではアルギニン側鎖のグアニジウム基がリガンド結合ポケットの疎水性環境へ入ることができず、そのために側鎖のみならず、R282 付近の主鎖の構造までもが乱されることを示唆している。今後、この知見を基に、変異 VDR の機能を活性化させる選択的リガンドを考案したい。

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



A



B

図 1. くる病型変異 W282R rVDR-LBD (A) と点変異の無い rVDR-LBD (B) のリガンド結合部位における構造の違い。両構造を比較するために電子密度マップ ($2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ マップ (1.5 σ), ステレオ図) を描いた。どちらのマップも、Asp278-Gln287 のアミノ酸残基を欠いた座標を用いて描かれている。

W282R rVDR-LBD では、3 つ並んだ β -ストランドのうち、本来あるはずの中央の β -ストランドの電子密度が確認できない (A の中央付近)。一方、点変異の無い rVDR-LBD では、天然リガンド $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ の手前に明瞭な電子密度が存在しており (B の中央付近)、中央の β -ストランドに対応している。くる病型変異 W282R は、この中央の β -ストランド内にあるので、両者の違いの原因は変異の有無であると考えられる。

2. T 細胞の活性化におけるシグナル伝達機構の解析

T 細胞は、造血幹細胞に由来し、獲得免疫の中心的司令塔として重要な役割を担っている。成熟した T 細胞は、リンパ節へと移入した後、特異的な抗原刺激によって活性化を受け、増殖するとともにエフェクター細胞やメモリー細胞へと分化する。T 細胞の活性化には、抗原提示細胞により提示された非自己ペプチド-MHC 複合体と T 細胞受容体との相互作用に加えて、抗原提示細胞の CD86 (B7) と補助受容体 CD28 との相互作用を介したシグナル伝達も必要である。さらに、このシグナル伝達には、CD28 の細胞内ドメインの SH2 および SH3 結合モチーフが重要であることが知られている。SH2 結合モチーフは pYMNM 配列からなり、PI3K、Grb2、Gads らの SH2 ドメインとの相互作用が報告されている。一方、SH3 結合モチーフは PXXP 配列からなり、これら 3 種類のタンパク質の SH3 ドメインを標的としていると考えられている。しかし、これらのタンパク質の SH2 及び SH3 ドメインと CD28 との相互作用に関しては、作用機序はもとより相互作用における差異など、未だに解明されていない点が多々残っている。

そこで、私たちは、T 細胞の活性化における補助受容体 CD28 を介するシグナル伝達機構の解明をめざし、CD28 の pYMNM モチーフと PI3K、Grb2、Gads らの SH2 ドメインとの相互作用に加えて、PXXP モチーフと Grb2 と Gads の SH3 ドメインとの相互作用の解析もおこなっている。表面プラズモン共鳴法により、CD28 の pYMNM モチーフと PI3K、Grb2、Gads 由来の SH2 ドメインとの相互作用を解析したところ、CD28 は PI3K との親和性が最も高く、Grb2 と Gads とは同程度の親和性を示した。また、PI3K の 2 つの SH2 ドメイン間でも CD28 に対する親和性に差異があり、C 末端 SH2 の方が高いことが明らかになった。一方、PXXP モチーフと SH3 ドメインとの相互作用に関しては、Grb2 及び Gads 全長を用いた研究により、それが CD28 と Grb2 及び Gads との相互作用を強めることが示唆された。しかし、PXXP モチーフに変異を加えても相互作用が変化しなかったことから、CD28 と SH3 との相互作用についてはさらに解析が必要であろう。

私たちは、さらに詳細な相互作用解析を行うため、CD28 の pYMNM モチーフと SH2 ドメインとの複合体の結晶を作製し、X線結晶構造解析法による研究を進めている。

なお、本研究は東京理科大学の東隆親教授および安部良教授、京都府立大学の織田昌幸准教授らと協力して進めている。

3. Protein Data Bank の改善

X線結晶構造解析や核磁気共鳴 (NMR)、さらには電子顕微鏡の発展により、多くの生体高分子の立体構造が蓄積されつつある。さらには「タンパク 3000 プロジェクト」に代表される構造ゲノム科学の進展がこの流れを加速している。この膨大な立体構造情報はバイオインフォマティクスなどの分野での貴重な情報源となっている。構造生物学が成立した早い時期から Protein Data Bank (PDB) がこうした成果の主たるアーカイブとして機能してきた。現在は、米国 Rutgers 大学を中心とした Research Collaboratory of Structural Bioinformatics (RCSB)、ヨーロッパの European Bioinformatics Institute (EBI)、そして大阪大学蛋白質研究所を中心とした日本の Protein Data Bank Japan (PDBj、<http://www.pdbj.org>) の3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, Yoshimoto N, Sakamaki Y, Nakabayashi M, Ikura T, Tamamura H, Ito N, Shimizu M, Yamamoto K: A new class of vitamin D analogues that induce structural rearrangement of the ligand-binding pocket of the receptor. *J. Med. Chem.*, 52, 1438-1449 (2009).

国際学会／一般講演

1. Masuno H, Fujii S, Nakabayashi M, Ikura T, Ito N, Shimizu M, Kagechika H: Crystal structures of non-secosteroid ligands bound to vitamin D nuclear receptor. 14th Workshop on Vitamin D, Brugge (Belgium), October 2009.
2. Yamada S, Nakabayashi M, Ikura T, Ito N, Yoshimoto N, Shimizu M, Yamagishi K, Kudo T, Tokiwa H, Ogura M, Chuma M, Makishima M: X-ray crystal structures, biological activity and structure-activity relationships of novel vitamin D partial agonists/antagonists. 14th Workshop on Vitamin D, Brugge (Belgium), October 2009.
3. Inaba Y, Nakabayashi M, Itoh T, Yoshimoto N, Ikura T, Ito N, Shimizu M, Yamamoto K: 22S-Butyl-1 α ,24R-dihydroxyvitamin D3: Recovery of agonistic activity for vitamin D receptor. 14th Workshop on Vitamin D, Brugge (Belgium), October 2009.

国内学会／招待講演

1. Ikura T, Urakubo Y, Ito N: Co-evolutionary analysis of interactions between barnase and barstar. 第47回日本生物物理学会年会、徳島、2009年10月。

国内学会／一般講演

1. 稲葉有香、吉本暢子、中林誠、伊倉貞吉、伊藤暢聡、清水正人、山本恵子：22-ブチル活性型ビタミンD誘導体の生物活性と受容体複合体構造、第129回日本薬学会年会、京都、2009年3月。
2. 大橋南美、野村渉、加藤舞、堤浩、糸谷恭子、伊倉貞吉、伊藤暢聡、吉田清嗣、Lewin NE、Blumberg PM、玉村啓和：PKC C1Bドメインの合成およびその蛍光性誘導体を用いた新規スクリーニング法の開発、第129回日本薬学会年会、京都、2009年3月。
3. 大橋南美、奥田善章、野村渉、堤浩、芹澤雄樹、伊倉貞吉、伊藤暢聡、吉田清嗣、Lewin NE、Blumberg PM、玉村啓和：蛍光性 diacylglycerol-lactone 誘導体の合成と機能評価、第4回日本ケミカルバイオロジー学会年会、神戸、2009年5月。
4. Higo K, Takahashi J, Oda M, Morii H, Ikura T, Ito N, Azuma T, Abe R: Purification of Gads and its interaction with CD28 cytoplasmic domains. 第47回日本生物物理学会年会、徳島、2009年10月。
5. 稲葉有香、伊藤俊将、吉本暢子、中林誠、伊倉貞吉、伊藤暢聡、清水正人、山本恵子：ビタミンD誘導体の側鎖構造と活性に関する研究、日本レチノイド研究会、東京、2009年11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

疾患生命科学部ケミカルバイオロジー分野 薬化学研究室

研究内容

概要

薬化学研究室では、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、固有の低分子化合物により活性化される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プ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。

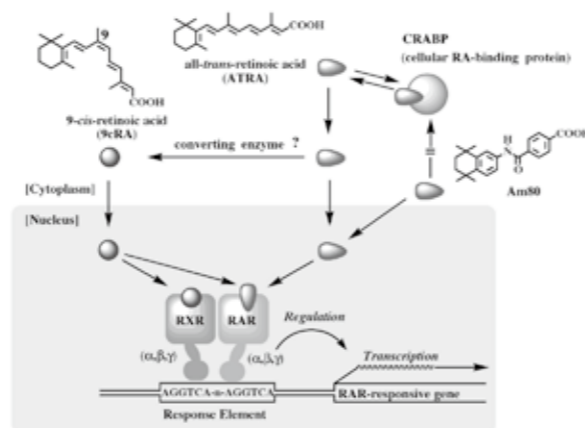


図1 レチノイド核内受容体の作用機序と合成レチノイド Am80 の作用

また、核内受容体の脂溶性ファーマコフォアとしてホウ素クラスターであるカルボランが有効であることを示しており、本年度はカルボランを骨格に持つビタミン D アゴニスト 1 の創製を行った。また、VDR との共結晶の X 線結晶構造解析により、その結合様式を明らかとした。(図2、ハイライト参照)。

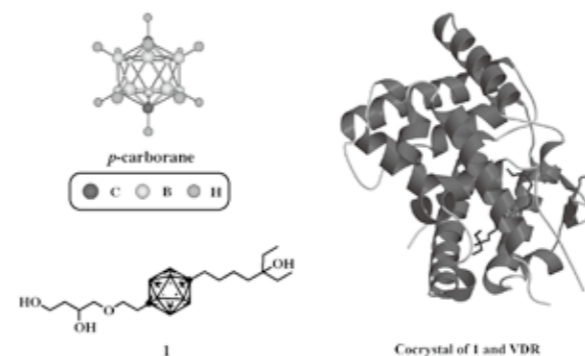


図2 カルボランを持つ新規 VDR アゴニストとその VDR 結合様式

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、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の開発を行い(図3)、溶媒やタンパク質の存在等の環境変化に伴って蛍光特性を変える化合物を見いだした。会合現象は近い領域における距離の変化の検出に最適であることから、FRET 等の従来の制御機構では検出することができなかった測定対象の蛍光センサー開発に新たな方法論を提供すると考えている。



図3 会合を制御した蛍光センサーの開発

4. 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、スルフォ

ニアミド、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、らせんを形成する芳香族多層分子の立体特性を実験的、理論的に解析し、その動的挙動、絶対構造の同定に成功した。この知見は新しい機能性芳香族分子の構築に有用である。

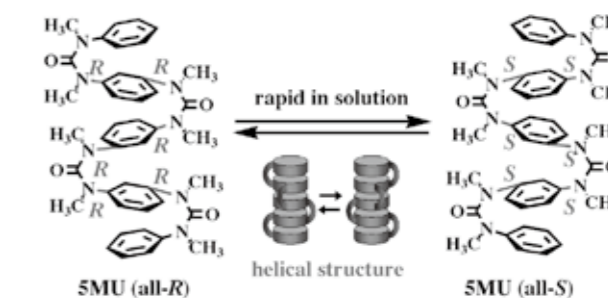


図4 らせんを形成する芳香族多層分子

ハイライト

非 *seco*-ステロイド型ビタミンD誘導体の創製

ビタミンD₃は脂溶性ビタミンの一種であり、ビタミンA（レチノイド）同様、生体内で活性型となり、核内受容体VDRを介してカルシウム代謝調節や細胞の分化誘導・増殖制御、免疫調整など多彩な生理作用を発現する。これまでに、天然のビタミンD₃をリード化合物として多くの誘導体が合成され、幾つかの化合物は医薬品として用いられている。近年、骨疾患やがんに対する有効性以外に、自己免疫疾患、神経変性疾患への応用も指摘され、生物学的特性や構造の異なる新しい誘導体の創製が期待されている。これまでに合成されてきたビタミンD誘導体のほとんどは天然体と同じ*seco*-ステロイド骨格を持ち、構造的な多様性はない。一方、筆者らは、ホウ素クラスターであるカルボランを脂溶性ファーマコフォアとして用いた各種核内受容体リガンドの創製を行ってきた。その知見を元に、天然ビタミンDとは全く構造の異なる非*seco*-ステロイド型誘導体としてカルボラン誘導体**1**（図2）の創製に成功した。化合物**1**は、ヒト白血病細胞HL-60の分化誘導活性において、活性型ビタミンDと同程度の活性を示した。高活性な非*seco*-ステロイド型ビタミンD誘導体はほとんど知られておらず、ビタミンD研究のツール及び創薬リードとして有用な化合物であると考えている。また、この化合物存在下でビタミンD核内受容体VDRの結晶化を行い、X線結晶構造解析に成功した。カルボラン誘導体が受容体に特異的に結合していることを直接的に示した最初の例である。本構造情報を元に、より高活性で、生物活性に特徴（作用選択性等）を持つ、新たなビタミンD誘導体の開発が可能であると考えている。

人事異動

転入：森修一（特任助教）、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）、藤原敬士（大学院生、博士前期課程）、宮島友（大学院生、博士前期課程）

転出：平野智也（助教）、Khin Su Yi（専攻生）

業績目録

原著論文

- Fujii, S., Ohta, K., Goto, T., Kagechika, H., Endo, Y. Acidic heterocycles as novel hydrophilic pharmacophore of androgen receptor ligands with a carborane core structure. Bioorg. Med. Chem. 17: 344-350, 2009.
- Hirano, T., Osaki, T., Fujii, S., Komatsu, D., Azumaya, I., Tanatani, A., Kagachika, H. Fluorescent visualization of the conformational change of aromatic amide or urea induced by *N*-methylation. Tetrahedron Lett. 50: 488-491, 2009.
- Eshima, K., Fukaya S., Sugimoto, A., Mori, T., Yokoi, H., Yamamoto, Y., Sugiura, S., Honda, S., Masuko, N., Murakami, K., Yamasaki, Y., Kagechika, H. Contribution of AP-1 interference induced by TAC-101 to tumor growth suppression in a hepatocellular carcinoma model. Tumor Biol. 30: 1-7, 2009.
- Takahashi, Y., Inoue, J., Kagechika, H., Sato, R. ApoC-III gene expression is sharply increased during adipogenesis and is augmented by retinoid X receptor (RXR) agonists. FEBS Lett. 583: 493-497, 2009.
- Bourhis, E., Maheux, J., Paquet, B., Kagechika, H., Shudo, K., Rompré, P., Rouillard, C., Lévesque, D. The transcription factors *Nur77* and retinoid X receptors participate in amphetamine-induced locomotor activities. Psychopharmacol. 202: 635-648, 2009.
- Ohashi, E., Kogai, T., Kagechika, H., Brent, G. A. Activation of the PI3 Kinase Pathway By Retinoic Acid Mediates Sodium/Iodide Symporter Induction and Iodide Transport in MCF-7 Breast Cancer Cells. Cancer Res. 69: 3443-3450, 2009.
- Kurosu, T., Ohki, M., Wu, N., Kagechika, H., Miura, O. Sorafenib induces apoptosis specifically in cells expressing BCR/ABL by inhibiting its kinase activity to activate the intrinsic mitochondrial pathway. Cancer Res. 69: 3927-3936, 2009.
- Satoh, T., Higuchi, Y., Kawakami, S., Hashida, M., Kagechika, H., Shudo, K., Yokoyama, M. Encapsulation of the synthetic retinoids Am80 and LE540 into polymeric micelles and the retinoids' rerease control. J. Controlled Release 136: 187-195, 2009.
- Suzuki, K., Takahashi, K., Nishinaki-Mogami, T., Kagechika, H., Yamamoto, M., Itabe, H. Docosahexaenoic acid induces adipose differentiation-related protein through activation of retinoid X receptor in human choriocarcinoma BeWo cells. Biol. Pharm. Bull. 32: 1177-1182, 2009.
- Hatanaka, M., Shimba, S., Sakaue, M., Kondo, Y., Kagechika, H., Kokame, K., Miyata, T., Hara, S. Hypoxia-Inducible Factor-3α Functions as an Accelerator of 3T3-L1 Adipose Differentiation. Biol. Pharm. Bull. 32: 1166-1172, 2009.
- Kudo, M., Hanashima, T., Muranaka, A., Sato, H., Uchiyama, M., Azumaya, I., Hirano, T., Kagechika, H., Tanatani, A. Identification of Absolute Helical Structures of Aromatic Multi-layered Oligo(*m*-phenylene)s in Solution. J. Org.

Chem. 74: 8154-8163, 2009.
12. Tsai, N.-P.; Huq, M.; Gupta, P.; Yamamoto, K.; Kagechika, H.; Wei, L.-N. Activation of Testicular Orphan Receptor 4 by Fatty Acids. Biochim. Biophys. Acta- Gene Regul. Mech. 1789: 734-740, 2009.

著書及び総説

- 影近弘之、棚谷綾。フォルダマー、In 超分子サイエンス&テクノロジー－基礎からイノベーションまで（国武豊喜監修）第3章、第1節、pp 467-476, NTS, 2009.
- Hirano T, Kagechika H. Construction of Coumarin Library for Development of Fluorescent Sensors. In Combinatorial Methods for Chemical and Biological Sensors, Edited by Radislav A. Potyrailo and Vladimir M. Mirsky. Chapter 18, Springer, pp 441-451, 2009.
- 岡本巖、影近弘之、棚谷綾。環境応答型芳香族アミド化合物の構造変換と動的制御。有機合成化学協会誌 67(12), 1240-1249, 2009.

国際学会発表

- Kagechika, H., Matsumura, M., Fujimoto, N., Komatsu, D., Masu, H., Katagiri, K., Azumaya, I., Tanatani, A. Cyclic Tri(*m*-*N*-methylbenzamide): Synthesis and Unique syn Conformation Bearing A Chiral Cavity. ISNA13, Luxembourg, July 2009.
- Tanatani, A., Kudo, M., Hanashima, T., Muranaka, A., Sato, H., Uchiyama, M., Azumaya, I., Kagechika, H. Helical Structure of Aromatic Multi-layered Oligo(*m*-phenylene)s. ISNA13, Luxembourg, July 2009.
- Hirano, T., Akiyama, J., Kagechika, H. Development of a novel “functional” fluorescent labeling reagents for various ligand molecules. World Molecular Imaging Congress, Montreal, Canada, Sep. 2009.
- Fujii, S., Kano, A., Sekine, R., Kawachi, E., Masuno, H., Hirano, T., Tanatani, A., Kagechika, H. Development of Novel Non-secosteroidal Vitamin D Receptor Ligands Based on Carborane as A Hydrophobic Core Structure. 14th Vitamin D Workshop, Brugge, Belgium. Oct. 2009.
- Masuno, H., Fujii, S., Nakabayashi, M., Ikura, T., Ito, N., Shimizu, M., Kagechika, H. Crystal Structures of Non-secosteroid Ligands Bound to Vitamin D Nuclear Receptor. 14th Vitamin D Workshop, Brugge, Belgium, Oct. 2009.
- Kagechika, H. Development of Novel Nuclear Receptor Ligands for Cancer Therapy. 2009 TMD-CMU International Symposium, Tokyo, Oct. 2009.

国内招待講演

- 影近弘之。レチノイド:ケミカルバイオロジーから創薬へ、平成20年度北陸大学学術フロンティア年次集会「生命科学・物質科学を拓くケミストリー」。金沢、2009年3月。
- 影近弘之。レチノイド:ケミカルバイオロジー研究から創薬へ、東京医科歯科大学公開シンポジウム、東京、2009年6月。
- 影近弘之。脂溶性ビタミン：最近の医薬化学研究から、第2回有機立体化学研究会 講演会、東京、2009年7月。

国内学会

- 平野智也、大崎隆、藤井晋也、小松大輔、東屋功、棚谷綾、影近弘之。蛍光センサーを志向した芳香族アミド、ウレア立体構造変化の可視化。

- 日本化学会第89春期年会、東京、2009年3月。
- 増野弘幸、前田満将、前田貴志、伊藤茂、河内恵美子、藤井晋也、平野智也、影近弘之。ケイ素原子を含むRXRリガンドの合成、日本薬学会第129年会、東京、2009年3月。
- 岩下真純、平野智也、藤井晋也、伊藤茂、影近弘之。多様な誘導体展開を志向した Riccardin C の全合成、日本薬学会第129年会、東京、2009年3月。
- 秋山淳、平野智也、影近弘之。近赤外光で励起可能な環境応答型蛍光団の開発と蛍光ラベル化リガンドへの応用。日本薬学会第129年会、東京、2009年3月。

- 武田典明、岩下真純、藤井晋也、江島心、最上-重本由香里、最上-西巻知子、平野智也、影近弘之。Riccardin C をリード化合物とした新規LXR アゴニストの創製、日本薬学会第129年会、東京、2009年3月。
- 平野智也、秋山淳、影近弘之。リガンド分子への蛍光ラベル化を志向した、近赤外光励起が可能な蛍光団の開発。ケミカルバイオロジー学会第4回年会、神戸、2009年5月。
- 藤井晋也、加納敦、平野智也、河内恵美子、増野弘幸、棚谷綾、中林誠、伊倉貞吉、伊藤暢聡、清水正人、影近弘之。新規非セコステロイド型VDRリガンドの構造展開と受容体結合様式の解析。ビタミン学会第61回大会、亀岡、2009年5月。
- 藤井晋也、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核内受容体リガンドの創製。第120回日本薬理学会関東部会、東京、2009年7月。
- 平野智也、秋山淳、影近弘之。Tricarbo-cyanine系蛍光物質の会合現象制御による蛍光センサーの開発。第24回生体機能関連化学シンポジウム、福岡、2009年9月。
- 藤井晋也、加納敦、平野智也、河内恵美子、増野弘幸、棚谷綾、中林誠、伊倉貞吉、伊藤暢聡、清水正人、影近弘之。カルボランを疎水性骨格とする新規非ステロイド型VDRリガンドの構造展開。第35回反応と合成の進歩シンポジウム、金沢、2009年11月。
- 藤井晋也、山田歩、富田景子、長野麻央、原山尚、太田公規、遠藤泰之、影近弘之。変異を有するARに対して有効な新規ARアンタゴニストの創製。日本レチノイド研究会第20回学術集会、東京、2009年11月。
- 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に対して有効なカルボラン含有新規ARアンタゴニストの創製。第28回メデイシナルケミストリーシンポジウム、東京、2009年11月。

研究助成金

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)

影近弘之：文部科学省科学技術試験研究「転写因子KLF5を標的とする炎症性疾患の治療法開発：合成レチノイドの臨床応用」(分担)

影近弘之：厚生労働省科学研究費補助金・政策創薬総合研究事業「転写制御因子ネットワークによる次世代の動脈硬化予防治療薬開発に関する基礎的研究」(分担)

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高機能な生物活性低分子プローブを開発することにより、生命現象の分子レベルでの理解と制御を行うことを目指して研究を行っている。とくに、高い反応性を有する官能基や化学種を用いて、標的タンパク質を選択的に化学修飾する技術の開発や、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可能な可視化プローブ開発のための基盤技術の創出に向けた基礎研究などを行っている。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. 生物活性物質の標的タンパク質同定研究

近年「分子標的薬」と称される薬剤開発が盛んである。これは、分子設計の段階から特定の標的分子（多くは疾患に関連するタンパク質）に狙いを定めて開発された薬のことである。古くから類似の方法が試みられてきたが、先に化合物の薬効が見出され、後になって（本当の）標的タンパク質が明らかになったケースも多い。疾患発症の原因に関する生物学的理解の蓄積と創薬研究手法の進歩に伴い、タンパク質をはじめとする疾患関連生体分子の機能を厳密に制御しようとする戦略が、近代創薬研究の主流となりつつある。しかし、実際には薬剤や天然物など、多くの生物活性物質については、毒性などの副作用を含め、その活性発現の分子機構は不明である。それらは生体内においてタンパク質などの生体分子に直接作用することで情報シグナルに影響を及ぼしているはずであるが、その標的分子が分かっていないことが多い。未知の標的タンパク質を同定することは、生物学的に未解明である重要な細胞内シグナル伝達経路の発見に貢献できるばかりでなく、そのシグナル経路に起因する疾患の治療薬開発に向けて新たな分子標的創薬ターゲットを提供することができるため、重要な課題である。

当研究室では、光化学反応を利用した標的タンパク質の捕獲・同定法である光親和性標識法に着目して研究を

行っている。具体的には、1) 光ラベル化タンパク質の検出に放射性同位体 (RI) を用いる必要がなく標的タンパク質を直接解析できる新しい手法の開発、2) コンパクトかつラベル化効率の高い新しい光反応性官能基の合成、3) 薬剤等の生物活性物質の光反応性プローブ化、およびそれを用いた標的タンパク質同定研究、などを一貫して行っている。

我々は、プローブの生物活性の保持に重点をおいた、一般性の高い non-RI 光親和性標識法を開発するために、光反応性官能基の他に、脂肪族アジド基またはエチニル基などの bioorthogonal な（天然の生体分子中には存在しない）官能基を有する生物活性物質を光親和性標識プローブとして用いる新たな手法を考案した (図1)。本手法では、脂肪族アジド基やエチニル基が光に対して比較的安定であることを利用し、標的タンパク質の光ラベル化（第一段階）後にこれらの官能基とのみ特異的に結合を形成可能な click 反応などを行うことで、蛍光試薬や biotin など任意の検出用官能基を導入（第二段階）することができる。本手法の特徴は、RI を用いないために光ラベル化タンパク質を質量分析等により直接解析できることと、プローブ化の際に光反応性官能基以外には小さく低極性なアジドメチル基 (-CH₂N₃) またはエチニル基 (-C≡CH) を導入するだけでよいため、プローブ化に伴う生物活性の低下を最小限に抑えられることである。

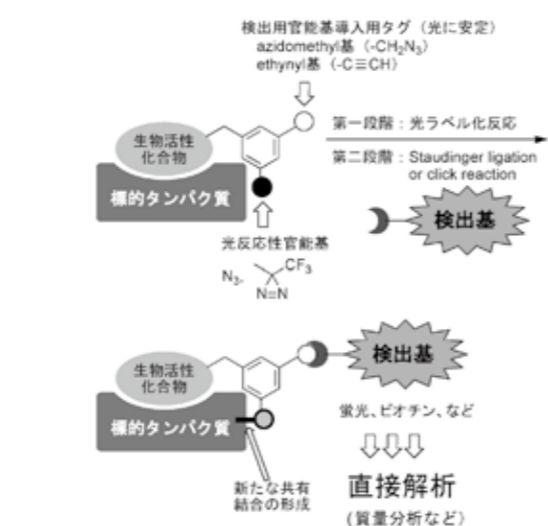


図1 non-RI 光親和性標識法

実際に本手法を用いてこれまでに、1) 抗高脂血症薬である cerivastatin をプローブ化した photovastatin CAA1 を用いた HMG-CoA 還元酵素の特異的ラベル化および結合部位の決定 (図2A)、2) 筋弛緩薬である dantrolene をプローブ化した GIF-0430 の開発とそれを用いた標的タンパク質の同定 (図2B)、3) パーキンソン病発症関連候補物質である 1BnTIQ をプローブ化した 1DAzBnTIQ の開発とそれを用いた標的タンパク質の同定 (図2C)、などに成功している。とくに dantrolene の標的タンパク質に関しては、それが分子量約 23 kDa のマウス sk-NSPII (ヒトでは RTN2-C) であることが分かり、最近ノックアウトマウス等を用いた検討の結果、このタンパク質が運動 (筋収縮) による 4 型グルコーストランスポーター (GLUT4) の細胞膜へのトランスロケーションを制御し、細胞内への糖取り込みを調節していることが明らかとなった。そのためこのタンパク質は、血糖調節、すなわち糖尿病等の治療薬開発の新規ターゲットとして有望視されている。

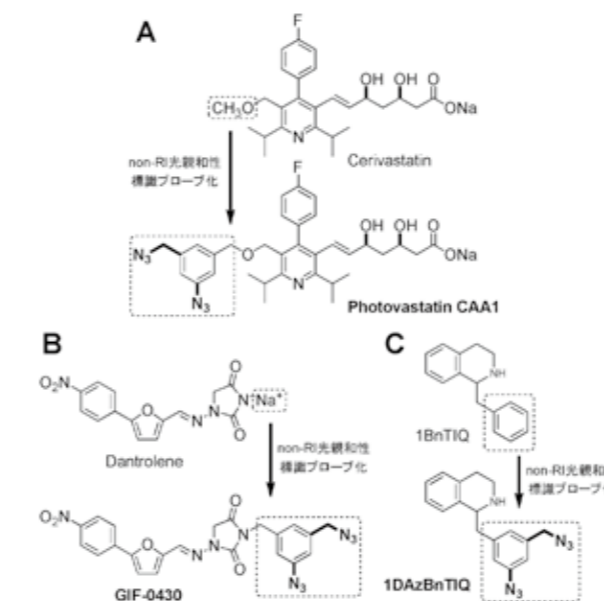


図2 標的タンパク質の光ラベル化に成功したプローブ

関連して最近、薬剤等の生物活性化合物によく見られるビアリール型構造を有する化合物を簡便に non-RI 光親和性標識プローブ化するために、ジアジド官能基を有するフェニルボロン酸ピナコールエステルを共通中間体として用いた鈴木-宮浦反応によるジアジドビアリール化合物の合成法を確立した (図3)。今後、本反応などを利用して効率的に様々なプローブを開発し、それらの標的タンパク質同定研究を行っていく予定である。

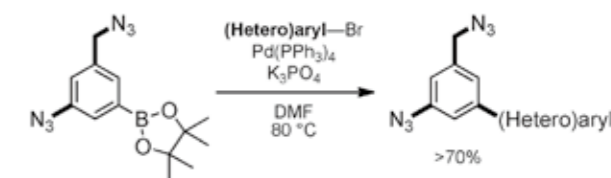


図3 簡便なプローブ開発に向けて

2. 新しい生物発光システム開発のための新規発光基質の設計と合成

イクオリン (AQ) は、緑色蛍光タンパク質 GFP と同様に、海洋性発光生物であるオワンクラゲから発見された発光タンパク質である。AQ は、分子量約 21 kDa のタンパク質であるアポイクオリン (ApoAQ) と、発光基質であるセレンテラジン (CTZ) に酸素が付加したヒドロペルオキシド誘導体とからなる複合体である。AQ に Ca²⁺ が結合するとタンパク質の三次構造が変化し、CTZ のヒドロペルオキシド誘導体が脱炭酸を伴いながら励起状態のセレンテラミド (CTMD) に変換される。これが基底状態に戻る際に、青色発光 (λ_{max} = 472.5 nm) を示すと考えられている。AQ の発光後に生成する Ca²⁺ が結合した ApoAQ と CTMD とからなる複合体は蛍光能 (λ_{max} = 475 nm) を有しており、BFP (Blue Fluorescent Protein) と呼ばれている。EDTA 等のキレート剤で BFP から Ca²⁺ を除いた ApoAQ と CTMD からなる複合体もまた gFP (greenish fluorescent protein) と称される発光タンパク質 (λ_{max} = 485 nm) であり、gFP に CTZ を加えることで AQ を再構成することができる (図4)。

最近我々は、チッソ株式会社横浜研究所と共同で、CTZ の C2 位ベンゼン環上の水酸基を改変した類縁体から作製した半合成 AQ の中に、5 ~ 6 秒と長い発光半減期を示すものがあることを見出した (AQ は約 0.8 秒)。この半合成 AQ 中の CTZ 類縁体は、従来の長時間発光を示す基質よりも安定で取扱い易く、大量合成が可能で

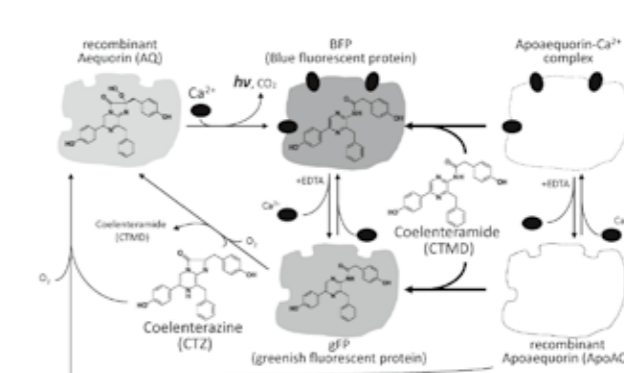


図4 イクオリン発光系

ある。また、長時間発光を示すため定量性に優れており、その半合成 AQ が、アゴニスト刺激による G タンパク質共役受容体 (GPCR) のハイスループットスクリーニング (HTS) アッセイに有効であることが示唆された。さらに最近我々は、Ca²⁺ 存在下または非存在下で ApoAQ に CTMD を加えることで、効率よく BFP および gFP を再構成できることを見出している (図 4)。現在これらの知見をもとに、CTZ および CTMD の構造を改変した類縁体を設計・合成し、ApoAQ と組み合わせることで、とくに発光・蛍光波長の長波長化を目的に、生体分子イメージングに応用可能な新しい生物発光システムの開発を目指している。

3. 生体分子イメージングのための PET プローブ開発

陽電子放出断層画像法 (PET 法) は、ヒトでがんの診断などに臨床使用されている非侵襲的な生体分子イメージング法である。PET 法では、生物活性物質の構造の一部に ¹¹C (半減期約 20 分) や ¹⁸F (同約 110 分) などの短寿命陽電子放出核種を導入することで PET プローブ化し、それを被験者に投与することで、その体内動態をイメージングすることができる (図 5)。PET 画像で観察されるプローブの集積の様子は、プローブが標的とするタンパク質などの生体分子の局在をイメージングしていることにほかならない。また、プローブの体内における代謝の様子などの情報も定量的に解析できることから、薬剤候補化合物の開発早期の段階における実用性の評価に適しており、PET 法を導入することで大幅な創薬コストの削減と開発期間の短縮が期待できる。2008 年に日本でもマイクロドーズ臨床試験実施に関するガイドラインが厚生労働省より発布され、PET 法などでヒトを対象とした臨床試験を速やかに実施できる体制が整った。PET プローブ合成の際、とくに ¹¹C 標識プローブの場合には、短い半減期に対応する高速化学反応を利用する必要があるが、最近では代謝に安定な炭素-¹¹CH₃ 結合形成を数分以内で行える高速メチル化反応が開発されるなど、新しい PET プローブを開発するための基盤技術が整いつつある。

最近我々は、理化学研究所分子イメージング科学研究センターと共同で、脳内アロマテースの分布を定量解析するための新規 PET プローブの開発に成功した。アロマテースは、性ステロイドホルモンである男性ステロイド (アンドロゲン) を女性ステロイド (エストロゲン) に変換するチトクローム P450 酵素の一つ (CYP19) である。この酵素は生体内の多くの部位に発現しているが、脳内では部位により発現量が異なり、とくに視床下部および辺縁領域に局在していることが知られている。また、脳内においてアロマテースにより産出されるエストロゲ

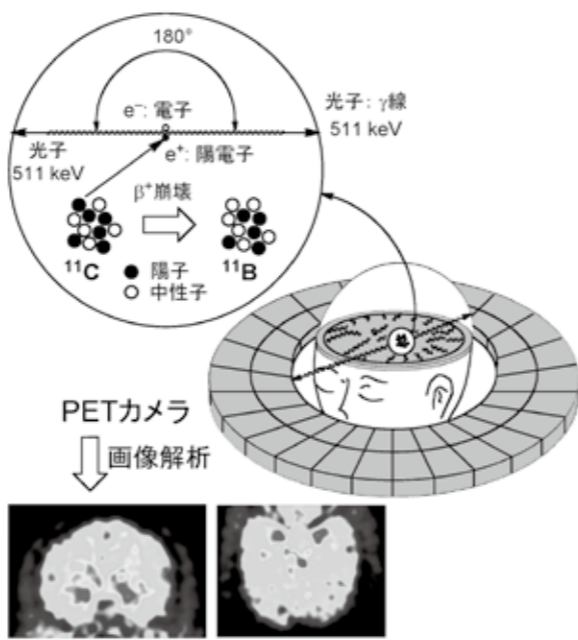


図 5 PET 法の原理

ンは、認知・記憶・知覚等の神経機能に関与するとともに、損傷した部位の astrocyte に発現して神経保護を行うことも報告されている。したがって、アロマテースの脳内解析は、関連疾患の診断やその治療薬開発研究に有効であると考えられる。我々の開発した新規アロマテース阻害型 ¹¹C 標識プローブである [¹¹C]cetrozole を用いた PET イメージングでは、従来用いられてきたプローブである [¹¹C]vorozole と同様に脳内の扁桃体においてその部位特異的集積が観察された。 [¹¹C]Cetrozole は [¹¹C]vorozole と比較して、大脳皮質等への非特異的な結合が抑制されているとともに、 [¹¹C]vorozole では不鮮明であった側坐核への集積が観察された。これは [¹¹C]cetrozole の炭素-¹¹CH₃ 部が代謝に対して安定であるためであると考えられ、より定量性に優れたアロマテース特異的 PET プローブであることが示唆された。今後本プローブを用いた脳内アロマテースの関与する疾患に関する基礎研究の推進、および本プローブのそれら疾患の早期診断への活用が期待されるとともに、中枢系副作用の少ないアロマテース阻害型乳がん治療薬の開発研究に貢献すると期待される。

人事異動

転入：細谷孝充 (教授、2009 年 4 月)

業績目録

原著論文

- Hosoya T, Inoue A, Hiramatsu T, Aoyama H, Ikemoto T, Suzuki M. Facile synthesis of diazido-functionalized biaryl compounds as radioisotope-free photoaffinity probes by Suzuki-Miyaura coupling. *Bioorg. Med. Chem.* 17(6): 2490-2496, 2009.
- Inouye S, Hosoya T. Reconstitution of blue fluorescent protein from recombinant apoaequorin and synthetic coelenteramide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 386(4): 617-622, 2009.
- Kuramori C, Azuma M, Kume K, Kaneko Y, Inoue A, Yamaguchi Y, Kabe Y, Hosoya T, Kizaki M, Suematsu M, Handa H. Capsaicin binds to prohibitin 2 and displaces it from the mitochondria to the nucleus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379(2): 519-525, 2009.
- Doi H, Ban I, Nonoyama A, Sumi K, Kuang C, Hosoya T, Tsukada H, Suzuki M. Palladium(0)-Mediated Rapid Methylation and Fluoromethylation on Carbon Frameworks by Reacting Methyl and Fluoromethyl Iodide with Aryl and Alkenyl Boronic Acid Esters: Useful for the Synthesis of [¹¹C]CH₃-C and [¹⁸F]FCH₂-C-Containing PET Tracers (PET = Positron Emission Tomography). *Chem. Eur. J.* 15(16): 4165-4171, 2009.
- Suzuki M, Sumi K, Koyama H, Siqin, Hosoya T, Takashima-Hirano M, Doi H. Pd⁰-Mediated Rapid Coupling between Methyl Iodide and Heteroarylstannanes: An Efficient and General Method for the Incorporation of a Positron-Emitting ¹¹C Radionuclide into Heteroaromatic Frameworks. *Chem. Eur. J.* 15(45): 12489-12495, 2009.
- Ikemoto T, Hosoya T, Takata K, Aoyama H, Hiramatsu T, Onoe H, Suzuki M, Endo M. Functional role of NSP-like I protein in membrane translocation of glucose transporter 4. *Diabetes* 58 (12): 2802-2812, 2009.
- Islam Md S, Yoshida H, Matsuki N, Ono K, Nagasaka R, Ushio H, Guo Y, Hiramatsu T, Hosoya T, Murata T, Hori M, Ozaki H. Antioxidant, free radical scavenging and NF-κB inhibitory activities of phytosteryl ferulates: Structure-activity studies. *J. Pharmacol. Sci.* 111 (4): 328-337, 2009.

総説・著書

- 細谷孝充. 光親和性標識法, 医療・診断をめざす先端バイオテクノロジー (バイオ研究のフロンティア 3, 関根光雄 編) 工学図書.

国際学会

- Suzuki M, Sumi K, Koyama H, Siqin, Hosoya T, Takashima-Hirano M, Doi H. An efficient method for the incorporation of a positron emitting ¹¹C radionuclide into various heteroaromatic frameworks by Pd(0)-mediated rapid coupling of methyl iodide with hetero-arylstannanes. 18th International Symposium on Radio-pharmaceutical Sciences, Edmonton, Canada, Jul. 2009.
- Hosoya T. Exploring target proteins of bioactive compounds by radioisotope-free photoaffinity labeling based on the use of bioorthogonal

groups. The 25th Naito Conference on Chemical Biology [II], Sapporo, Japan, Sep. 2009.

- Takahashi K, Hosoya T, Onoe K, Doi H, Nagata H, Hiramatsu T, Li Xiao-Le, Wada Y, Takashima T, Katayama Y, Yamanaka H, Suzuki M, Onoe H, Watanabe Y. ¹¹C-Labeled cetrozole: a better PET tracer for aromatase. 2009 World Molecular Imaging Congress(WMIC), Montreal, Canada, Sep. 2009.

国内依頼講演

- 細谷孝充. non-RI 光親和性標識法による低分子生物活性物質の標的タンパク質探索. 平成 21 年度化学系学協会東北大会・有機コロキウム, 郡山, 2009 年 9 月.

国内学会

- 大野 敏, 大平敦史, 朴 明宣, 平山寛之, 横川隆志, 平松俊行, 細谷孝充, 鈴木正昭, 中村政志, 林 宣宏, 西川一八. アジドチロシン導入カルモデュリンとリガンドとの光クロスリンク反応. 第 3 回無細胞生命科学研究会, 青森, 2009 年 3 月.
- 小川 靖, 吉田実代, 大西英理子, 平松俊行, 小野木博, 澁谷浩司, 細谷孝充, 萩原正敏. リン酸化阻害剤によるダウン症治療薬開発アプローチ. 第 82 回日本薬理学会年会, 横浜, 2009 年 3 月.
- 尾上典之, 長谷川傑, 中嶋一恵, 平松俊行, 細谷孝充, 鈴木正昭, 大野 敏, 横川隆志, 西川一八, 尾之内均, 内藤 哲. CGS1 遺伝子の新生ベプチドと S-アデノシルメチオニンによるリボソームの翻訳アレスト機構. 日本植物生理学会創立 50 周年記念年会, 名古屋, 2009 年 3 月.
- 平松俊行, 郭 穎, 細谷孝充. 検出用エチニル基一体型光親和性標識用官能基の開発. 日本化学会第 89 春季年会, 船橋, 2009 年 3 月.
- 飯森理絵, 細谷孝充, 佐原由依子, 井上 敏. 新規セレンテラジン類縁体の各種ルシフェラーゼに対する基質特異性の検討. 日本化学会第 89 春季年会, 船橋, 2009 年 3 月.
- 岡 光平, 細谷孝充, 井上 敏. 新規蛍光性セレンテラミド類縁体の合成. 日本化学会第 89 春季年会, 船橋, 2009 年 3 月.
- 飯森理絵, 細谷孝充, 佐原由依子, 井上 敏. 新規セレンテラジン類縁体の各種生物発光系における基質特異性の検討. 日本ケミカルバイオロジー学会第 4 回年会, 神戸, 2009 年 5 月.
- 細谷孝充, 岡 光平, 井上 敏. 蛍光性セレンテラミド類縁体の開発. 日本ケミカルバイオロジー学会第 4 回年会, 神戸, 2009 年 5 月.
- 鈴木正昭, 鷺見賢吾, 古山浩子, 斯琴, 細谷孝充, 高島好聖, 土居久志. ヨウ化メチルとヘテロ芳香族スタナンとの高速カップリング反応-¹¹C 含有ヘテロ芳香族化合物 PET トレーサーの高効率一般合成法-. 日本ケミカルバイオロジー学会第 4 回年会, 神戸, 2009 年 5 月.
- 小川 靖, 吉田実代, 大西英理子, 平松俊行, 小野木博, 澁谷浩司, 細谷孝充, 萩原正敏. ダウン症治療薬創成に向けた新規リン酸化阻害剤開発. 日本ケミカルバイオロジー学会第 4 回年会, 神戸, 2009 年 5 月.
- 久米華奈子, 倉森見典, 東 基記, 加部泰明, 細谷孝充, 木崎昌弘, 半田 宏. 抗ガン剤カプサイシンによるアポトーシス誘導機構の解析. 日本ケミカルバイオロジー学会第 4 回年会, 神戸, 2009 年 5 月.
- 細谷孝充, 井上 敦, 平松俊行, 喜井 勲, 工藤 明. non-RI 光親和性標識法による新規 Wnt シグナル調節因子の探索. 第 120 回日本薬理学会関東支部会, 東京, 2009 年 7 月.
- 奥野友紀子, 小野木博, 細谷孝充, 鈴木正昭, 伊藤暢聡, 萩原正敏. SRPK1-SRPIN340 複合体の構造解析と新規 SRPK 阻害剤の開発. 第 120 回日本薬理学会関東支部会, 東京, 2009 年 7 月.

- 小川 靖, 吉田実代, 野村奈美子, 平松俊行, 小野木博, 細谷孝充, 萩原正敏. 腫瘍特異的な survival kinase を標的とした腫瘍特異的抗がん剤アジュバントへの試み. 第 120 回日本薬理学会関東支部会, 東京, 2009 年 7 月.
- 横川隆志, 大野 敏, 中谷暁弘, 尾関有紀, 平山寛之, 蔵方 甫, 平松俊行, 細谷孝充, 西川一八. *Methanosarcina acetivorans* PyIRS を利用した部位特異的リシンアナログ導入タンパク質の合成. 第 22 回日本 Archaea 研究会講演会, 札幌, 2009 年 7 月.
- 光岡有美子, 大野 敏, 横川隆志, 平山寛之, 林 宣宏, 細谷孝充, 平松俊行, 鈴木正昭, 西川一八. 部位特異的にアジドチロシンを導入したタンパク質の大腸菌生細胞での発現. 第 82 回日本生化学会大会, 神戸, 2009 年 10 月.
- 鈴木正昭, 鷺見賢吾, 古山浩子, 斯琴, 細谷孝充, 高島好聖, 土居久志. ヨウ化メチルとヘテロ芳香環置換トリブチルスタナンとの高速カップリングによる短寿命 ¹¹C 含有ヘテロ芳香族 PET トレーサーの高効率合成法. 第 40 回中部化学関係学協会支部連合秋季大会, 岐阜, 2009 年 11 月.
- 池本隆昭, 細谷孝充, 高田孔美, 尾上浩隆, 鈴木正昭, 遠藤 實. 骨格筋細胞における NSP11 の機能的役割. 第 116 回日本薬理学会近畿支部会, 大津, 2009 年 11 月.
- 平松俊行, 細谷孝充, 山岸 玄, 李 曉榮, 白石 旭, 高橋佳代, 尾上嘉代, 土居久志, 長田浩子, 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. 脳内アロマテースのイメージング用 PET プローブの開発. 第 28 回メディスナルケミストリーシンポジウム, 東京, 2009 年 11 月.
- 朴 明宣, 大野 敏, 光岡有美子, 平山寛之, 横川隆志, 林 宣宏, 細谷孝充, 平松俊行, 鈴木正昭, 西川一八. 非天然アミノ酸を利用したタンパク質の部位選択的糖鎖修飾. 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009 年 12 月.

出願特許

国際 2 件 (PCT/JP2009/052253, PCT/JP2009/061982)
国内 3 件 (特願 2009-27904, 特願 2009-27921, 特願 2009-159129)

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科学研究所研究奨励金 (SUNBOR GRANT) (平成 20～21 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 (代表)：財団法人内藤記念科学振興財団内藤記念特定研究助成金 (平成 21 年度) 「エチニル基を検出用タグとして有する一体型 non-RI 光親和性標識用官能基の開発」
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」

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

一般に、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、生命現象のミクロからマクロまでを対象として、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。

研究紹介

1. システム・バイオロジー

1) ミオシン・アクチン系におけるドッキング過程の分子動力学シミュレーション

筋収縮を引き起こすタンパク質であるミオシンは、分子モータの1種である。ミオシンは、ATPを加水分解する際に生じる化学エネルギーを力学エネルギーに変換する。この化学エネルギーから力学エネルギーへの変換のメカニズムについては、50年以上の研究にも関わらず、いまだに諸説が提唱され、確実なことが分かっていない。また、これまでに提唱されている説では、実験的に得られた事実を統一的な原理で説明することができなかった。そこで、これまでに得られた実験データを矛盾なく説明するために「解離駆動機構」を提唱した。

ADP状態あるいはヌクレオチド無し状態のミオシン分子は、アクチン繊維との間で分子間引力を発生しており、この力によって位置及び方向特異的な結合を行う。分子間引力に伴うポテンシャルエネルギーは、ATPの加水分解に伴うエネルギー変化と同程度であり、ミオシンのアクチン繊維へのドッキング過程で減少する。「解離駆動機構」では、このエネルギーの減少分がミオシン分子内の歪みエネルギーに変換された後、力学的な仕事であるパワーstrokeのエネルギーに利用されると考える。この一連の過程で、ATPのエネルギーは、ミオシンがアクチン繊維から解離するために用いられ、パワーstrokeには直接には関与しないと考えた。以上

のような過程をシミュレーションで再現する第一歩として、ミオシン分子がアクチン繊維にドッキングする過程を分子動力学で計算した。

初期構造として、電子顕微鏡画像から再現したミオシンとアクチン繊維の複合体構造 (PDB ID: 1M8Q) を用いた。1M8Qの配置は、3次元電子顕微鏡画像に、ミオシンとアクチンの個々のX線構造情報を重ね合わせたもので、細部においては正確な構造を示している訳ではない。

この複合体構造からミオシン1分子とアクチン7分子を取り出した。取り出したアクチン分子の内、両端に位置する2分子ずつ、合計4分子を空間に固定し、中央の3分子を可動にした。初期構造のままではミオシン分子の一部がアクチンと衝突しているため、繊維から3 nm離れた位置に平行移動させた。分子動力学計算に使用したソフトウェアはGROMACSで、力場はGROMOS96-43a1、水モデルはSPCを用いた。時間刻みは2 fsで、12 nsまで計算を行った。

ミオシンは、初期構造では、アクチン繊維のマイナス側に位置するアクチン分子の近傍にあり、プラス側のアクチン分子とは、約1.5 nm離れた位置にあったが、4 ns経過後にはミオシンとアクチンの両者に変形と移動が生じ、プラス側のアクチンとも接触する配置になった。これは、これまでに実験的に推測されていたミオシンの結合様式に一致する。

筋収縮は生物学的な現象であると同時に、ミオシン分子とアクチン分子のタンパク質間相互作用という物理化学的な現象である。また、ミオシンによる化学エネルギーから力学的な仕事への変換過程において、関与する化学反応はATPの加水分解だけである。従って、量子力学を基盤とする物理学の原理に基づいて、ミオシンとアクチンの相互作用及びATPの加水分解過程を精密にシミュレーションできれば、分子モータの原理を理解できるようになると考えられる。今回のミオシン分子のアクチン繊維へのドッキングシミュレーションは、そのような試みへの1つのステップである。

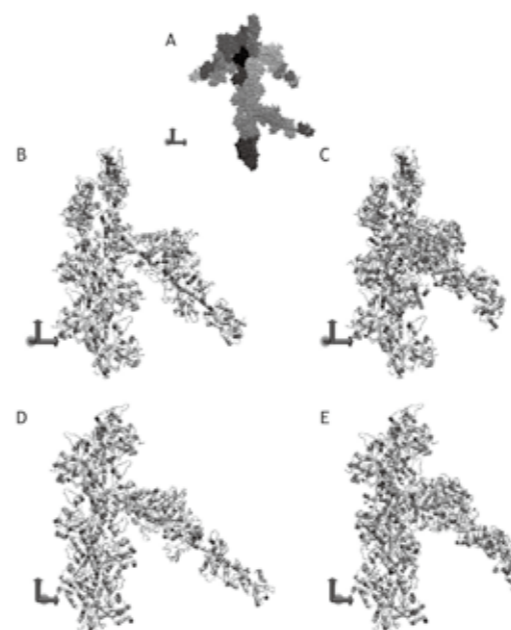


図1 ミオシン分子のアクチン繊維へのドッキング。(A) 分子動力学計算の初期構造として用いたミオシンとアクチンの複合体 (PDB:1M8Q)。この構造から、最下部に位置するミオシン1分子と、それに接近しているアクチン7分子を切り出して、計算に用いた。(B) 初期構造。(C) 12 ns 経過後の構造。(D) 初期構造を別の視点から見たもの。(E) 12 ns 経過後の構造を (D) と同じ視点から見たもの。最初、ミオシンはアクチン繊維のプラス側にある第2のアクチン分子からは遠ざかっていたが、4 ns 経過後には、ミオシンとアクチン両者の配置が変化して、第2のアクチンを含むアクチン2分子とミオシン分子が接近した。この複合体構造は安定で12 ns 経過後もほとんど変化しなかった。

2. 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発現データの解析

DNA マイクロアレイ等の技術の発展により、大規模な遺伝子の発現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、このような発現データを解析し、発現メカニズムに関する研究している。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、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。また、線虫の生殖細胞ではmicroRNA (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。我々のグループでは、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。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、がん部と非がん部でmiRNA近傍の遺伝子の発現状態が顕著に異なることが見出された。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。一方、miRNAとターゲット遺伝子の相関係数は、がん部と非がん部で有意な差がなかった。これらの結果から、がん部においてはmiRNAの発現に異常が生じている可能性が示唆された。

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り、意味のある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意味のある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。我々は、広範囲な発現量において意味のある変化を検出するために、発現量に応じて閾値を定める方法を提案した。

本手法では、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。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意味のある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、これに加法性と乗法性のノイズを加えることによって作成した。その際、それぞれのノイズは正規分布に従い、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。結果の一例を図2に示す。この図は、加法性および乗法性ノイズの分散を変えたときの感度(Sensitivity)の変化を示したものである。感度は全ての条件で80%以上であり、特異度(Specificity)は99%以上であった。これらの結果は本手法の有効性を示している。

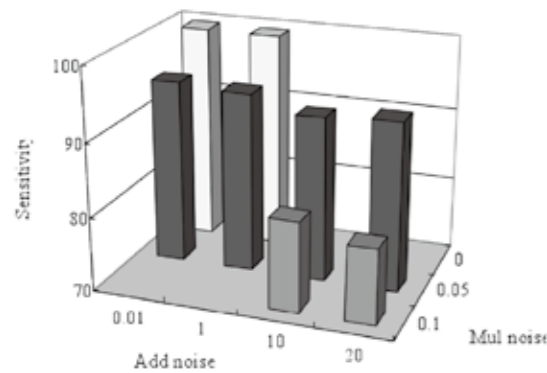


図2 加法性・乗法性ノイズの分散と感度の関係。

業績目録

原著論文

1. Fukuoka Y, Oostendorp TF, Armoundas AA. Method for guiding the ablation catheter to the ablation site: a simulation and experimental study. *Med Biol Eng Comput* 47, 3, 267-278, 2009.
2. 小林こず恵, 岸亜由美, 田中真澄, 稲岡秀検, 根武谷吾, 福岡豊, 小林弘祐, 野城真理. シリコーン膜のひずみと膜接着細胞のひずみとの比較. *生体医工学*, 47巻5号, 464-469, 2009.
3. Masuda T. A deterministic mechanism producing the loose coupling phenomenon observed in an actomyosin system. *BioSystems* 95, 2, 104-113, 2009.
4. Masuda T. A simulation model of the conventional kinesin based on the Driven-by-Detachment mechanism. *Biosystems* 97, 2, 121-126, 2009.
5. 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*, (published on-line), 2010.

国際学会発表

一般

1. Inaoka H, Fukuoka Y, Noshiro M. Co-expression analysis in close physical proximity using tumor data. The 20th International Conference on Genome Informatics, Yokohama, Dec, 2009.
2. Kobayashi K, Tanaka M, Inaoka H, Nebuya S, Fukuoka Y, Kobayashi H, Noshiro M. Cytokine productions and gene expressions caused by mechanical stretching of normal human pulmonary artery endothelial cells. The 20th International Conference on Genome Informatics, Yokohama, Dec, 2009.
3. 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, 2010.

国内学会発表

一般

1. 稲岡秀検, 福岡豊, 野城真理. 大規模がん発現データにおける共発現解析. 第48回生体医工学大会, 東京, 2009年4月.
2. 小林こず恵, 岸亜由美, 田中真澄, 稲岡秀検, 根武谷吾, 福岡豊, 小林弘祐, 野城真理. 肺胞上皮細胞の機械的伸展による形状変化の測定. 第48回生体医工学大会, 東京, 2009年4月.
3. 小林こず恵, 岸亜由美, 田中真澄, 稲岡秀検, 根武谷吾, 福岡豊, 小林弘祐, 野城真理. 肺動脈内皮細胞の機械的伸展による形状変化の測定. 第24回生体生理工学シンポジウム, 仙台, 2009年9月.
4. Masuda T. Molecular dynamics simulation for the docking process of myosin against an actin filament. 第47回日本生物物理学会年会, 徳島, 2009年10月.
5. 岩村泰輔, 福岡豊, 内山孝憲, 稲岡秀検, Yansen Mahmut, 水島洋, 田中真二, 有井滋樹, 野城真理, 田中博, Isaac S. Kohane. 肝細胞がんにおけるmicroRNA発現量と近傍遺伝子発現量の関係. 第32回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009年12月.

学内外教育活動

1. 増田正, 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, 生体システム工学特別演習)

2. 福岡豊: 生命情報科学教育部(疾患生命科学概論)
3. 増田正: 医学部保健衛生学科(保健統計学)
4. 福岡豊: 医学部保健衛生学科(医学情報処理I)
5. 福岡豊: 慶應義塾大学大学院理工学研究科(生体情報工学)

競争的研究費獲得

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.
2. 福岡豊: DNA結合In vitroセクションに基づく結合親和性予測ソフトウェアの開発, 東京医科歯科大学大学院疾患生命科学研究所プロジェクト研究, 分担.

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 伊藤綾香
特任助教 袁勲梅
特任助教 白川伊吹
特任助教 樋口恵子
特任助教 田中都
学振特別研究員 伊藤美智子
学振特別研究員 蜂屋瑠見
技術補佐員 濱口美穂
金井紗綾香
佐野慶和
事務補佐員 東郷和
GCOE 拠点形成特別研究員 山崎芳浩
大学院生 山本貴信
山城健二
杉田聡
市岡誠之
津田直人
江原達弥
南部宏英
中川信貴

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 長尾雅史
羽生亮
Paksinee Kamolratanakul
中川朋美
宮嶋大輔
鈴木充文
Aryal Smriti

渡辺千穂
事務補佐員 浦田圭乃
下垣ベティ真利子
GCOE 事務補佐員 浅野優紀
中村杏奈
長谷川優
押江優子

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 金美善
大学院生 清水幹容
田雅文
研究支援員 高井環
伏見真好

難治疾患研究所分子神経科学分野

疾患生命科学部分子神経科学研究室

教授 田中光一
准教授 浜崎浩子
助教 小峯起
助教 相田知海
リサーチ・レジデント 相馬美歩
大学院生 阿部友美
前田秀一
中森智啓
伊東義真
鈴木啓子
廣田有里
柳澤美智子
白寧
杉山勇人
武田拓也
塚越久実
平岡優一
鮎澤三緒
澤田裕美
安部倫太郎

加藤 さや佳
吉田 純一
技術補佐員 櫻井美弥乃
和藤大鑑
北村隆宏
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
助教 江花有亮
大学院生 山城健二
浅山真秀子
大石咲子
軽部裕也
松原清二
平野景子
田嶋佐和子
李珉
技術補佐員 林万紀子
梁美艶
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
信久幾夫
学振特別研究員 楠康一
秘書 伏見真好
技術補佐員 田口理恵
国分康博
大学院生 備前典久
特別研究学生 アハメドラマダン
山口雄平
専攻生 マハアナニ

難治疾患研究所生体防御学分野

教授 樗木俊聡
講師 小内伸幸
助教 手塚裕之
特任講師 中西佑輔
特任助教 佐藤卓志
四元聡志
浅野純平
特別研究学生 劉嘉嘉
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
助教 田村拓也
特任助教 小室晃彦
受託研究員 丸淵茂樹
大学院生 伊藤日加瑠
塩飽裕紀
Chan Li
Min Xiu
中村蓉子
白石理沙
雪由江
秦知香
専攻生 SAINAWER MAIMAITI

難治疾患研究所病態生化学分野

教授 寺岡弘文
助教 逆井良
技術専門職員 齊藤佳子
非常勤講師 田内広
仲野徹
大学院生 正木久晴
只井祐美
濱田健佑

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
吉田達志
特任助教 中名生幾子
李麗淑
室橋道子
秘書 坂口三美
大学院生 西田友哉
山口啓史
藤谷健司
佐藤徹
鈴木佐和子
菅沼恵
亀井優里

難治疾患研究所発生再生生物学分野

教授 仁科博史
助教 浅岡洋一
中村貴

学振特別研究員 高橋真也
 特任助教 根岸崇大
 呉金展
 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
 宮村憲央
 田中正彦
 大野真見
 内田好海
 特別研究学生 沢登健治
 山崎世和
 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 鏑田武志
 准教授 安達貴弘
 助教 渡辺幸造
 特任助教 岸祐介
 満栄勇
 松原直子
 大学院生 T.D.Chinthika P.Gunasekara
 徐米多
 翁東
 坂卷靖郎
 高久千秋
 田中麻衣
 須藤佳之
 鷹觜勇宜
 橋本亜実
 品川健朗
 技術補佐員 本井祐二
 垣内麻優
 林崎浩史
 Y u R i n
 事務補佐員 新家純子
 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 有村卓朗

特任助教 成瀬妙子
 事務補佐員 佐々木悦子
 植田由希子
 技術補佐員 加藤和江
 非常勤講師 大川真一郎
 猪子英俊
 大学院生 志知大輔
 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
 高橋茉莉香
 共同研究者 陳智勇

難治疾患研究所幹細胞医学分野

教授 西村栄美
 助教 青戸隆博
 特任助教 松村寛行
 西田知弘
 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

難治疾患研究所分子細胞遺伝分野

教授 稲澤讓治
 准教授 井本逸勢
 COE拠点形成特任准教授 小崎健一
 助教 横井左奈
 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 小松周平
 Begum Asma
 菊池良子
 坂本宙子
 本田尚三
 白樺
 村松智輝
 古田繭子
 鶴田智彦
 春木茂男
 松村聡

倉沢泰浩
 上杉篤史
 小野宏晃
 岡本奈那
 小西博貴
 宮脇豊
 川原正人
 小林淳也
 大森逸美
 前田誠
 NEDO 技術補佐員 高橋綾子
 森留美
 事務補佐員 福川順子
 篠崎優子

難治疾患研究所分子遺伝分野

教授 三木義男
 准教授 吉田清嗣
 特任准教授 中西啓
 助教 竹中克也
 技能補佐員 山口智子
 大学院生 呂正光
 王慧峰
 平直江
 木村純子
 Hew Hoi Chin
 高岡美帆
 仁平啓史
 Nadila Wali
 真利久サディア
 工藤卓也
 伊藤明泉
 奥郁美
 細川佳奈
 卒業研究生 加賀美裕也
 郭甜甜

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 池田仁子
 実験助手 馬場裕子
 非常勤講師 菅野純
 大学院生 宮木幸一
 藤本耕一
 松倉寛
 チイ・チャン・コー

平石敦子
 増田萌
 山田美紀
 陳曦
 専攻生 ネ・チャー・トン
 ソリア・エビブラ
 特別研究学生 毕波

難治疾患研究所遺伝生化分野

疾患生命科学研究部ゲノム構造制御研究室

教授 北嶋繁孝
 准教授 田中裕二郎
 助教 安達三美
 川内潤也
 事務補佐員 高柳久仁子
 大学院生 刘芹
 浅野慎一朗
 中村絢
 佐々木かおり
 本下愛子
 特別研究学生 武谷憲二
 卒業研究生 小澤高嶺
 小高愛未
 受入研究学生 巽一郎

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

教授 萩原正敏
 准教授 黒柳秀人
 准教授（客員） 廣瀬哲朗
 助教 武内章英
 特任助教 小川靖
 野島孝之
 二宮賢介
 技術補佐員 井手上社子
 モニマアロム
 渡辺要平
 大学院生 川村豪伸
 山本誠
 大野源太
 グエンバオゴック
 都甲麻理奈
 ジュネイドゥバラヤン
 薄井知美
 チャオチェンシー
 学部生 丸岡浩之

難治疾患研究所エビジェネティクス分野

教授 石野史敏
 准教授 幸田尚
 助教 小野竜一
 鈴木俊介
 遠藤大輔
 成瀬美衣
 大学院生 松本和也
 入江将仁
 王長山
 岩船浩孝
 石井雅之
 岩崎佐和
 山口祐季
 夏希佳
 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 荻島創一
 寄附講座教授 水島洋
 寄附講座助教 馬合木特亜森
 客員教授 野川裕記
 客員助教 山口功
 科振特任准教授 任鳳蓉
 高井貴子
 中谷純
 科振特任講師 下川和郎
 小田夏奈江
 科振特任助教 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
 山肩大祐
 金子佳之
 石渡龍輔
 高田英明
 柴田匡邦
 遠藤有人
 Todd Johnson
 永家聖
 柴田潤子
 成尾佳美
 高橋定子
 幡野晶子
 武藤太和
 保科光揮
 田中有希
 中原泉
 松前ひろみ
 吉田いづみ
 金恵鈴
 宮口健
 飯島久美子
 Kyaw Tun
 鈴木聡
 上野英一
 笠原直子
 浦島直隆
 菊地正隆
 太田沙紀子
 Wanping Aw
 田中泰羽
 澤井一
 鈴木麻美
 飯田一雄
 岸本太郎
 江原忠
 大戸康紀
 鈴木華絵
 飯島里紗
 大家彬秀
 Afsaneh Eslami
 渡部友香理
 山口玲子
 水野聖士
 田中教生

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
 助教 白形正樹
 大学院生 市川紗弓
 平澤都
 技術補助員 渡邊健
 片山未来
 井上静
 事務補佐員 白谷友美
 共同研究員 渡辺哲
 矢島美彩子

難治疾患研究所フロンティア研究室レドックス応答細胞生物学

准教授 倉田俊一

難治疾患研究所プロジェクト研究室

難治病態研究部門

准教授 山口登喜夫
 堀川三郎

ゲノム応用医学研究部門

准教授 坂本忍
 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

教授 郷通子
 准教授 井上邦夫

難治疾患研究所機能構築客員研究部門

教授 笹月健彦
 准教授 古川功治

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
 博士研究員 小川(土屋)裕子
 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
 専攻生 Khin Su Yi
 学外協力者 海老沢和明
 白石拓也

疾患生命科学研究部生命有機化学研究室

教授 細谷孝充

疾患生命科学研究部生命システムモデリング研究室

教授 増田正
 准教授 福岡豊
 大学院生 岩村泰輔

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
 築地信
 曾根雅紀
 邊見弘明
 佐藤淳
 片岡直行
 鈴木辰吾
 笹野哲郎
 山本幸男
 松井毅
 小林慎
 小西昭充
 平山順
 MTT技術補佐員 黒田聖子
 迫田実希
 今井ノリ
 月田島たよ子
 月林田美和
 山中智子
 満友陽子
 吉田真由美
 邱紅麗
 小崎恵理
 越智梢
 田山さやか
 平野亜由美
 辻村恭子
 本田玲子

事務補佐員 小笠原 怜 加
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**

助 教 矢野倉美恵子
技術補佐員 牧 谷 麗 子
伊 藤 暁 子

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 葉 山 謙 二
木 崎 未 央
福 島 幸 子

形態機能解析室

技 術 補 佐 員 孫 黎 明

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
湯 浅 磨 里

難治疾患研究所事務部

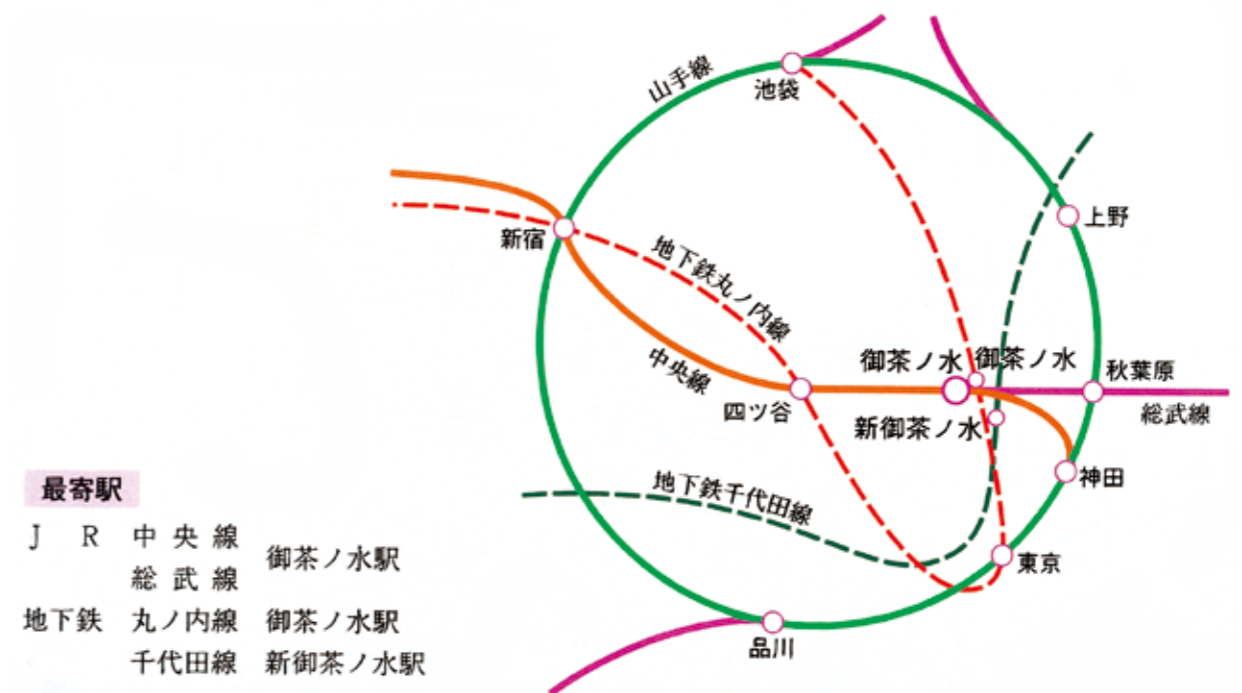
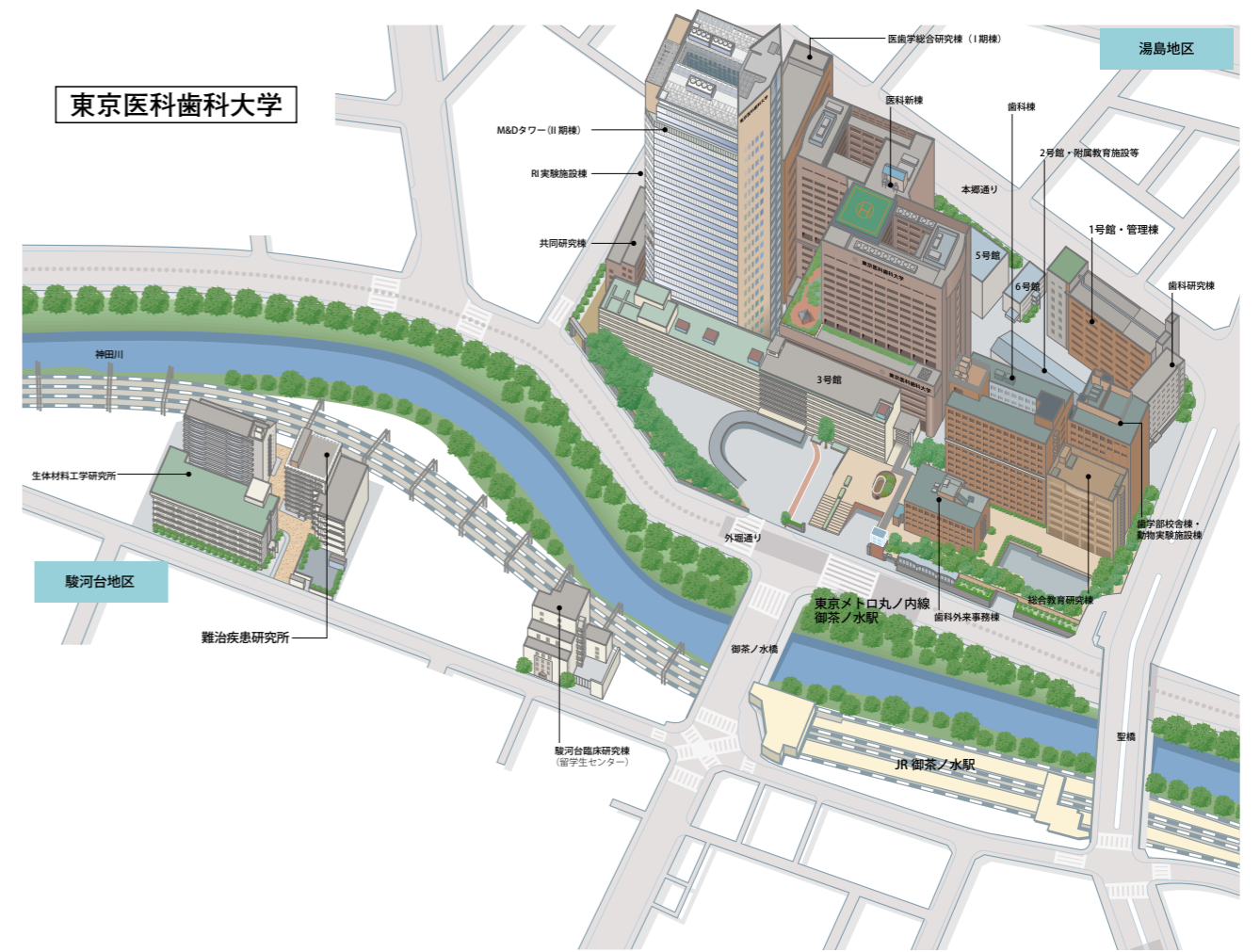
事 務 長 川 柳 成 巳
専 門 職 員 増 田 弘 之
鈴 木 誠
総 務 掛 長 畠 山 光 喜
総 務 掛 員 林 健 策
事 務 補 佐 員 富 山 聡 子
西 山 裕 子
技 士 望 月 静 雄

**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 2010

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