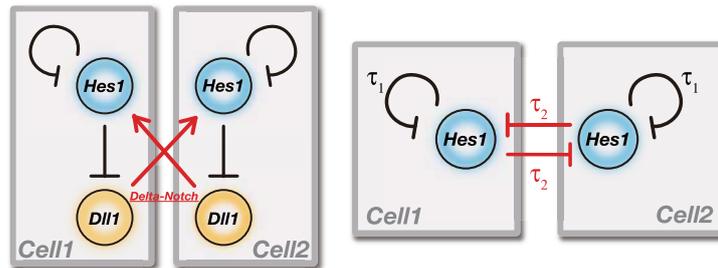


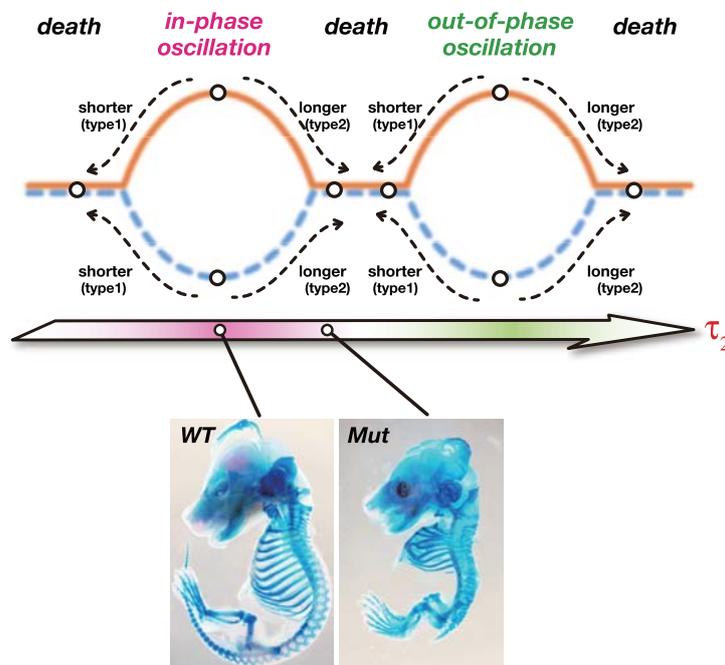
Annual Report

of the Institute for
Frontier Life and Medical Sciences
Kyoto University Vol. 2 2017



$$\frac{d}{dt} X_1(t) = v \frac{K_1^m}{K_1^m + X_1(t - \tau_1)^m} \frac{K_2^n}{K_2^n + X_2(t - \tau_2)^n} - rX_1(t)$$

$$\frac{d}{dt} X_2(t) = v \frac{K_1^m}{K_1^m + X_2(t - \tau_1)^m} \frac{K_2^n}{K_2^n + X_1(t - \tau_2)^n} - rX_2(t)$$



**Annual Report
of the Institute for Frontier Life and Medical Sciences**

Vol.2 2017

**Institute for Frontier Life and Medical Sciences
Kyoto University**

表紙：

時計遺伝子 *Hes1* の発現振動には、自身のネガティブフィードバックにかかる時間遅れ (τ_1) だけではなく、隣接細胞間の相互作用にかかる遅れ (τ_2) も重要である。数理モデルにより τ_2 を変えると、*Hes1* の発現振動が様々なパターン（同相振動、逆相振動、振動なし）を示すことが示唆された。隣接細胞間の相互作用を担う *Dll1* の発現動態を改変したマウスでは、*Hes1* の発現振動が減弱し、体節形成が障害され椎骨の癒合が見られた。

Cover:

Regulation of coupling delay for cell-cell interactions is important for oscillatory networks and precise progress of development. Mathematical modeling suggests that *Hes1* expression exhibits various patterns (in-phase oscillation, out-of-phase oscillation, oscillation death), depending on the value of time delay for cell-cell coupling (τ_2). Alteration of time delay for cell-cell interactions caused by *Dll1* mutations led to dampened oscillations and defects in somitogenesis and vertebral formation.

CONTENTS

Research Activities

ウイルス感染研究部門 Department of Virus Research

| | |
|----------------------------------------------------|----|
| 分子遺伝学分野 Laboratory of Molecular Genetics | 1 |
| ウイルス制御分野 Laboratory of Virus Control | 5 |
| RNA ウィルス分野 Laboratory of RNA Viruses | 13 |
| 微細構造ウイルス学分野 Laboratory of Ultrastructural Virology | 21 |
| がんウイルス分野 Laboratory of Tumor Viruses | 26 |
| 細胞制御分野 Laboratory of Cell Regulation | 30 |
| 免疫制御分野 Laboratory of Immune Regulation | 34 |
| 感染防御分野 Laboratory of Infection and Prevention | 37 |

再生組織構築研究部門 Department of Regeneration Science and Engineering

| | |
|-----------------------------------------------------------|-----|
| 細胞機能調節学分野 Laboratory of Molecular and Cellular Biology | 42 |
| 生体材料学分野 Laboratory of Biomaterials | 48 |
| 再生増殖制御学分野 Laboratory of Tissue Stem Cell Biology | 64 |
| 再生免疫学分野 Laboratory of Immunology | 70 |
| 組織再生応用分野 Laboratory of Tissue Regeneration | 75 |
| 臓器・器官形成応用分野 Laboratory of Organ and Tissue Reconstruction | 84 |
| 発生エピゲノム分野 Laboratory of Developmental Epigenome | 93 |
| 胚性幹細胞分野 Laboratory of Embryonic Stem Cell Research | 98 |
| 統合生体プロセス分野 Laboratory of Integrative Biological Science | 101 |
| 生体再建学分野 Laboratory of Experimental Immunology | 106 |

生命システム研究部門 Department of Biosystems Science

| | |
|----------------------------------------------------|-----|
| 生体分子設計学分野 Laboratory of Cellular Differentiation | 113 |
| ナノバイオプロセス分野 Laboratory of Nano Bioprocess | 119 |
| バイオメカニクス分野 Laboratory of Biomechanics | 123 |
| 発生システム制御分野 Laboratory of Developmental Systems | 134 |
| システムウイルス学分野 Laboratory of Systems Virology | 139 |
| 増殖制御システム分野 Laboratory of Growth Regulation System | 147 |
| RNA システム分野 Laboratory of RNA System | 153 |
| 生体膜システム分野 Laboratory of Biological Membrane System | 157 |
| 組織恒常性システム分野 Laboratory of Tissue Homeostasis | 164 |

附属感染症モデル研究センター Research Center for Infectious Diseases

| | |
|-----------------------------------------------------|-----|
| 霊長類モデル分野 Laboratory of Primate Model | 168 |
| ウイルス感染症モデル分野 Laboratory of Infectious Disease Model | 173 |
| ウイルス共進化分野 Laboratory of Virus-Host Coevolution | 177 |
| 動物実験委員会マウス作製支援チーム Reproductive Engineering Team | 182 |

附属再生実験動物施設 Center for Animal Experiments

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| ウイルス・再生医科学研究所ネットワークシステム Computer Network of Institute for Frontier Life and Medical Sciences | 188 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

| | |
|-----------|-----|
| 共同研究 | 191 |
| 学術集会 | 225 |
| 分野主催のセミナー | 227 |
| 構成員名簿 | 231 |

Research Activities

ウイルス感染研究部門
Department of Virus Research

分子遺伝学分野
Laboratory of Molecular Genetics

| | | | |
|------|-------|---------------|----------------|
| 教授 | 藤田 尚志 | Prof. | Takashi Fujita |
| 准教授 | 加藤 博己 | Assoc. Prof. | Hiroki Kato |
| 特定助教 | 木檜 周 | Assist. Prof. | Amane Kogure |

当研究分野ではウイルス感染に応答して引き起こされる I 型インターフェロンの発現誘導などの、自然免疫反応のメカニズムを研究している。この一連の反応は細胞がウイルスの感染を感知することから開始される。この反応をつかさどるセンサー分子が retinoic acid-inducible gene-I, (RIG-I) であることを発見した。RIG-I に類似した MDA5、LGP2 という分子も存在しており、これらを総称して RIG-I like receptor (RLR) と呼ぶ。進行中の研究プロジェクトを以下に示す。RIG-I の細胞内局在と活性化の解析、RLR 変異による自己免疫疾患の解析、木酢液及び天然化合物の抗ウイルス活性、植物由来の二重鎖 RNA による抗ウイルス応答の研究、抗ウイルス応答における新規因子の研究、抗ウイルス応答の生細胞での可視化、原子間力顕微鏡を用いた RLR と RNA の結合の解析、B 型肝炎の新規治療薬を開発するための研究、SFTSV による自然免疫阻害機構の研究、核内 RIG-I の生理機能の解明、インターフェロン応答を抑制する薬剤の探索。今年度発表した植物由来の二重鎖 RNA による抗ウイルス応答の研究の成果をいかに解説する。

1) 植物由来の二重鎖 RNA は I 型インターフェロン産生とピロプトーシス様の細胞死の誘導によって呼吸器系のウイルス感染防御を誘導する。病原体由来の分子パターン (pathogen-associated molecular patterns) を有する核酸は宿主の免疫応答を惹起する。これまでに合成核酸を用いた免疫活性化の臨床応用の試みは行われてきたが、毒性・安全性などの問題が懸念されていた。我々はこの問題を克服すべく、米ぬかに含まれる天然二重鎖 RNA (rice bran double stranded RNA: rb-dsRNA) を用いた免疫賦活の可能性を検討した。その結果、rb-dsRNA をマウスに経鼻投与すると肺胞マクロファージによる I 型インターフェロン産生が強く誘導され、さらにはインフルエンザ A ウイルスなどの呼吸器系ウイルスのチャレンジに対して強い免疫応答を引き起こすことを観察した。この免疫反応は TRIF 及び MDA5 のノックアウトマウスでは観察されなかったことから、rb-dsRNA がウイルスセンサーである TLR3 及び MDA5 を介して免疫を誘導したものと考えられた。I 型インターフェロン受容体欠損マウスでは免疫応答が誘導されること、そしてその免疫応答はカスパーゼ 1 の阻害剤投与によって消失した。しかしカスパーゼが触媒する IL-1 β の成熟、そのシグナルには依存していなかった。このカスパーゼ 1 の活性化には TRIF が関与すること、その結果 LDH 放出を伴ったピロプトーシス様の細胞死が起き、抗ウイルス応答に関与していることが示された。また、rb-dsRNA の経鼻投与は肺におけるダイナミックな免疫細胞の入れ替わりが起きていることが観察さ

れた。特に肺胞マクロファージは rb-dsRNA 処理による細胞死によって初期に減少するが、数日後には再び増加、回復していた。すなわち、rb-dsRNA の経鼻投与は I 型インターフェロン依存性・非依存性の抗ウイルス応答を系統的に惹起することによって肺での強力な免疫応答を誘導していることが明らかとなった。これらの結果は食物由来の天然 RNA を用いた免疫誘導とその臨床応用の可能性を示すものである。

We have been studying on antiviral innate immunity, particularly on the mechanism of type I interferon (IFN) gene regulation. More than 10 years ago, we identified viral RNA sensors, collectively termed as RIG-I-Like receptor. We have been focusing on the mechanism how RLR discriminates non-self RNA from self RNA. We also investigate how viral replication within the cells is sensed and triggers signals to activate antiviral program, by live cell imaging. We study different viruses including Influenza A, SFTS, hepatitis B viruses in the context of antiviral immune responses of the host. In 2017, we reported that a plant-derived double stranded RNA protected mice from respiratory virus infection. Below is the summary of our report.

1) A Plant-Derived Nucleic Acid Reconciles Type I IFN and a Pyroptotic-like Event in Immunity against Respiratory Viruses.

Nucleic acids carrying pathogen-associated molecular patterns trigger innate immune responses and are used to activate host immunity. Although synthetic nucleic acids have been used for that purpose, they have shown limitations for in vivo and clinical applications. To address this issue, we tested a naturally occurring dsRNA extracted from rice bran (rb-dsRNA) and characterized it as a potent ligand of TLR3 and MDA5. In this study, intranasal administration of rb-dsRNA induced production of type I IFNs by alveolar macrophages and protected mice from morbidity and mortality resulting from respiratory virus infection, such as influenza A virus. This protection was completely absent in mice lacking both TRIF and MDA5, indicating the essential role of TLR3- and MDA5-dependent pathways. Interestingly, IFNAR1-deficient mice retained residual antiviral protection, which was abolished by pharmacological inhibition of caspase 1, but not IL-1b signaling. In fact, rb-dsRNA activated caspase 1 via TRIF, resulting in the release of IL-1b and LDH. In addition to the direct antiviral activity, rb-dsRNA modulated the immune cell population in the lungs by repopulating virus-depleted alveolar macrophages. Our data demonstrate that rb-dsRNA orchestrates IFN-dependent and -independent direct antiviral protection and that it is a potent immune stimulator modulating antiviral immunity in the lungs. These findings open doors to a range of precise immune-modulating studies and therapeutic options.

List of Publications

Kasumba, D.M., Hajake, T., Oh, S-W., Kotenko, S.V., Kato, H., Fujita T.: A Plant-Derived Nucleic Acid Reconciles Type I IFN and a Pyroptotic-like Event in Immunity against Respiratory Viruses. *J Immunol.* 2017 199 (7):2460-2474. doi: 10.4049/jimmunol.1700523. Epub 2017 Aug 28.

Zhanga, Q., Kea, H., Blikslagerb, A., Fujita, T., and Yoo, D. Type III Interferon Restriction by Porcine Epidemic Diarrhea Virus and the Role of Viral Protein nsp1 in IRF1 Signaling. *J. Virol.* 2018 92 (4) doi:10.1128/JVI.01677-17 Accepted Manuscript Posted Online 29 November 2017

List of Presentations

海外招待講演

Fujita, T. Analysis of innate immune responses to SFTSV infection. Universitat Hamburg-Kyoto University Symposium June 6th-8th 2017, Session VI: infection research Hamburg, Germany

海外一般演題

Takeuchi, F., Ikeda, S., Tsukamoto, Y., Otakaki Y., Iwasawa, Y., Yao, W.-L., Narita, R., Ouda, R., Kogure, A., Kato H. and Fujita, T. A new drug screening system for hepatitis B virus cccDNA. 2017 International Meeting "Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, September 3-7 Washington DC, USA

Tsukamoto, Y., Ikeda, S., Yao, W.-L., Narita, R., Hirano, E., Otakaki, Y., Takeuchi, F., Kato, H. and Fujita, T. Identification of novel anti-HBV compounds targeting epsilon-Pol interaction. 2017 International Meeting "Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, September 3-7 Washington DC, USA

国内招待講演

藤田 尚志 抗ウイルス自然免疫機構の恒常活性化に起因する自己免疫疾患モデルの解析（特別講演）第27回日本小児リウマチ学会総会・学術集会 2017年10月6-8日、京都リサーチパーク

Abu Tayeh, A., Emralino, L.F., Ohto, T., Shimizu S., Onizawa, H., Soda, N., Lee, S., Shimada, Y., Funabiki, M., Takami, M., Kato H. and Fujita, T. Gain of function mutation of RIG-I-Like Receptor causes autoimmune symptoms. The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society (ICIS 2017), Kanazawa, Japan October 29-November 2 2017

藤田 尚志 細胞ストレスとしてのウイルス感染と抗ウイルス免疫応答の誘導 Induction of antiviral immunity mediated by stress responses ワークショップ 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 神戸、2017年12月6-8日

国内一般演題

Takeuchi, F., Ikeda, S., Otakaki Y., Iwasawa, Y., Yao, W.-L., Qin, M., Tsukamoto, Y., Narita, R., Kogure, A., Kato H. and Fujita, T. New screening system for hepatitis B virus cccDNA. 5th JAPAN-TAIWAN-KOREA HBV Research Symposium 2017, Tokyo Japan April 8-9 2017

- Hajyake, T., Kasumba, D. M., Oda, H., Matsuno, K., Okamatsu, M., Sakoda, Y., Kato, H. and Fujita, T. Immune-modulating capacity of a plant-derived dsRNA and its potential applications. The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society (ICIS 2017), Kanazawa, Japan Shimizu, S., Shimada, Y., Kato, H. and Fujita, T. Gain of function of MDA5 in CD11c-expressing cells is sufficient to induce lupus-like nephritis. The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society (ICIS 2017), Kanazawa, Japan October 29-November 2 2017
- Onizawa, H., Kato, H., Shimizu, S., Soda, N., Lee, S., Emralino, F. L., Abu Tayeh, A., Ohto, T., Funabiki, M. and Fujita, T. Aicardi-Goutieres syndrome-like inflammation in mutant mice with constitutively activated MDA5. 5th JAPAN-TAIWAN-KOREA HBV Research Symposium 2017, The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society (ICIS 2017), Kanazawa, Japan October 29-November 2 2017
- Yamada, S., Shimojima, M., Kato, H., Saijo, M. and Fujita, T. RIG-I-like receptor pathway is the major source of type I interferon upon severe fever with thrombocytopenia syndrome virus infection in vivo. The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society (ICIS 2017), Kanazawa, Japan October 29-November 2 2017
- Soda, N., Sakai, N., Onizawa, H., Takami, M., Kato, H. and Fujita, T. Investigation of skeletal abnormalities in mice with constitutively activated MDA5. The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society (ICIS 2017), Kanazawa, Japan October 29-November 2 2017
- Abe, H., Takeuchi, K., Kato, H. and Fujita, T. Phosphorylation of Ser386 is important post-transcriptional modification for dimerization of the transcriptionfactor IRF-3 via trans-interaction between Ser386 phosphate and IRF-3 basic pocket. The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society (ICIS 2017), Kanazawa, Japan October 29-November 2 2017

ウイルス感染研究部門
Department of Virus Research

ウイルス制御分野
Laboratory of Virus Control

| | | | |
|------|-------|---------------|----------------------|
| 客員教授 | 松岡 雅雄 | Prof. | Masao Matsuoka |
| 講師 | 安永純一郎 | Sr. Lect. | Jun-ichirou Yasunaga |
| 助教 | 志村 和也 | Assist. Prof. | Kazuya Shimura |

我々の研究室はヒトレトロウイルスであるヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (human T-cell leukemia virus type 1: HTLV-1) 及びヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus: HIV) の研究を行っている。HTLV-1 は成人 T 細胞白血病 (adult T-cell leukemia: ATL) や様々な炎症性疾患の原因となり、HIV は免疫系の破壊により後天性免疫不全状態 (エイズ) を引き起こす。これらのヒトレトロウイルスは巧みに宿主免疫を回避し持続感染を確立するが、結果として重篤な疾患を惹起する。我々は HTLV-1、HIV の研究を通じて“がん”“免疫”“ウイルス”の解析を行うと共に、その機序に立脚した治療法の開発研究を推進している。

1) HTLV-1 の持続感染機構と発がん機序の解析

HTLV-1 は主に CD4 陽性 T リンパ球に感染しており、ATL 及び HTLV-1 関連脊髄症 (HTLV-1-associated myelopathy: HAM) や HTLV-1 ぶどう膜炎といった炎症性疾患の原因となる。HTLV-1 の受容体は様々な細胞に発現するグルコーストランスポーター、GLUT-1 であり、CD4 陽性 T 細胞以外の細胞にも感染しうる。HAM 患者、HTLV-1 キャリアの末梢血より CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、B 細胞、好中球、単球を分離して、次世代シーケンサーを用いて HTLV-1 プロウイルスの組み込み部位の同定を行い、感染細胞のクローナリティを解析した。これらの細胞に共通して存在する組み込み部位が検出され、分化前の造血幹細胞への HTLV-1 感染が示唆された。同一患者の 1 年後の好中球のクローナリティ解析でも、1 年前に見られたものと同クローンを検出し、HTLV-1 の造血幹細胞への持続感染が証明された。HAM 患者より単球を分離して樹状細胞へ分化させると、新規感染を誘導することが証明された。これらの結果より、HTLV-1 は造血幹細胞へ感染し、HTLV-1 感染造血幹細胞が様々な細胞へ分化することで、生体内への新規感染、感染細胞の維持に関与していることが示された。この研究成果は PLoS Pathogens 誌に発表した。

HTLV-1 感染細胞の生体内での生存、増殖には HTLV-1 プロウイルスのプラス鎖とマイナス鎖に各々コードされる Tax と HTLV-1 bZIP factor (HBZ) が重要な役割を果たす。Tax は HTLV-1 の転写を活性化し、ウイルスの複製、個体間伝播に必須である。一方 HBZ は感染細胞のクローナル増殖に重要な役割を果たすと考えられる。Tax は強力ながんタンパク質であるが、ATL 細胞での発現レベルが非常に低いことから、発がんにおける意義は明らかでなかった。ATL 細胞株 MT-1 と KK-1 のごく一部の細胞 (0.05-3%) が Tax を発現していることを見出した。Tax が不安定型 EGFP (d2EGFP)

を誘導するレポーター細胞 MT1GFP を樹立しタイムラプス解析を行ったところ、Tax は多くの場合一過性に発現することが明らかになった (Fig. 1)。Tax のノックダウンは速やかにアポトーシスを誘導したことから、ごく一部の細胞に短時間発現する Tax が MT-1 の維持に必須であると考えられた。Tax は様々なストレス下で誘導されたことから、一過性の Tax 発現はストレスによる細胞死回避にも作用することが示唆された。シングルセル定量 PCR の結果、Tax 発現細胞では有意に NF- κ B 経路関連遺伝子や抗アポトーシス遺伝子が高発現しており、Tax 非発現細胞の中に抗アポトーシス遺伝子の発現が低い細胞群と軽度発現上昇している細胞群が混在していた。これらの所見から、MT-1 は Tax の発現が消失した後も、その効果が持続することにより抗アポトーシス形質を維持し、結果として集団の維持を可能にしていると考えられた。本仮説に関して、数理モデルとコンピューターシミュレーションによる検証を行い、実験で観察された Tax の発現動態と細胞増殖を再現できることが明らかとなった。

Tax は免疫原性が高く宿主免疫の主な標的であり、また恒常的な Tax 発現は、がん遺伝子誘導性の細胞老化を誘導する。HTLV-1 感染細胞は Tax の発現を最小限に抑えることで免疫を回避し感染細胞のアポトーシスを抑制するが、ストレス環境下では Tax を誘導しウイルス複製の活性化による新規感染の拡大を促進するという HTLV-1 の巧妙な生き残り戦略が明らかになった。

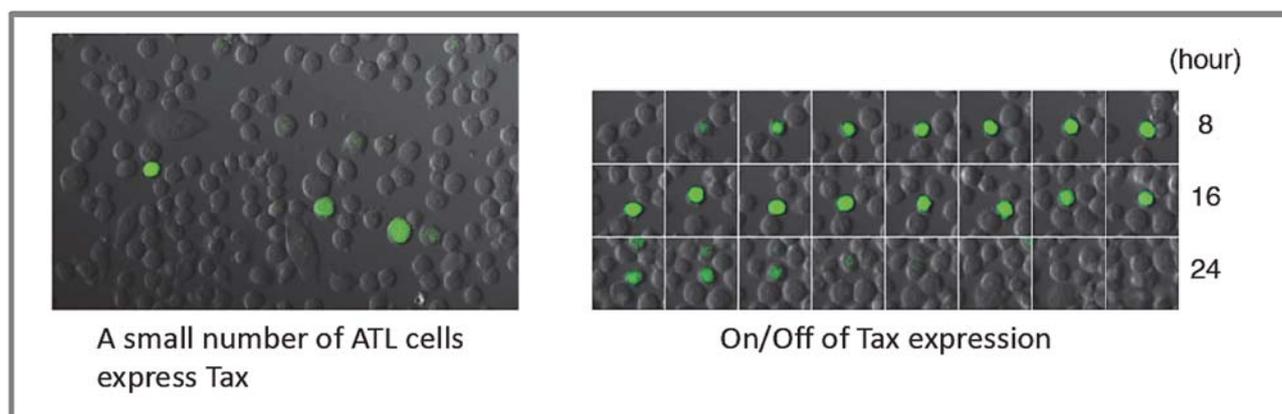


Figure 1. Transient Tax expression in a part of ATL cells

2) HTLV-1 に対する免疫応答の解析と治療法開発

HAM 患者では Tax 及び HBZ に対する免疫応答が亢進しているが、ATL 患者では著明に低下している。抗 CCR4 抗体モガムリズマブによる治療後もしくは造血幹細胞移植後の ATL 患者における免疫応答を解析したところ、完全寛解を維持している一部の症例ではこれらのウイルス抗原に対する T 細胞応答が活性化していることが判明した。以上の結果から、ウイルスに対する免疫応答は病態及び予後に関連していると考えられる。我々の研究室では感染細胞の生体内動態が HTLV-1 感染者と類似しているサル T 細胞白血病ウイルス 1 型 (simian T-cell leukemia virus type 1: STLV-1) 感染ニホンザルを用いて、HTLV-1 ワクチンの開発を行っている。

3) HIV-1 潜伏感染モデル細胞を用いた再活性化誘導機構と抗 HIV 薬に対する感受性の解析

HIV 感染者におけるウイルス複製の持続的コントロールが高活性抗 HIV 薬により可能となったが、潜伏感染細胞が体内に生存し続ける限り、終生にわたる服薬が必要である。この潜伏感染細胞を体内から排除するために、現在様々な手段が検討されているが、未だに効果的な方法は未確立である。そこで潜伏感染細胞の性状をより深く理解するために、再活性化刺激に関与する標的分子の解析を行った。BRD4 阻害剤である JQ-1 は、HIV-1 5'LTR の R 領域からの転写を数十倍選択的に誘導し、効果的な再活性化とそれに伴うウイルス産生が認められた。一方、高活性非核酸系逆転写酵素阻害剤は、JQ-1 で処理した再活性化潜伏感染細胞からの細胞間感染を介した感染拡大において、感染伝達能の低減を引き起こした。これらの結果は、潜伏感染モデル細胞における再活性化機構のより詳細な機序の解明とともに、効率的な再活性化誘導法の確立につながると期待される。現在、BRD4 以外の潜伏感染の再活性化に関連する分子についても検討を進めている。

Both human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and human immunodeficiency virus (HIV) are pathogenic human retroviruses. HTLV-1 promotes clonal proliferation of CD4⁺ T cells, which leads to adult T-cell leukemia (ATL), while HIV destroys CD4⁺ T cells resulting in onset of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Our research objectives are to understand the molecular mechanisms of virus-induced diseases, and to develop novel therapeutic strategies through research of these viruses.

1) Mechanisms for persistent infection with HTLV-1 and malignant transformation of infected cells

HTLV-1 infects mainly CD4⁺ T cells, and induces a fatal malignancy, ATL, and several inflammatory diseases, such as HTLV-1 associated myelopathy (HAM) and uveitis. The receptor of HTLV-1 is a glucose transporter, GLUT-1. Since GLUT-1 ubiquitously expresses on variety of cells, HTLV-1 can infect many types of blood cells. To explore the possibility that HTLV-1 infects hematopoietic stem cells (HSCs), we analyzed integration sites of HTLV-1 provirus in various lineages of hematopoietic cells in patients with HAM and a HTLV-1 carrier using the high-throughput sequencing method. Identical integration sites were detected in neutrophils, monocytes, B cells, CD8⁺ T cells and CD4⁺ T cells, indicating that HTLV-1 infects HSCs *in vivo*. Dendritic cells differentiated from infected monocytes caused *de novo* infection to T cells. These data indicate that infection of HSCs can contribute to the persistence and spread of HTLV-1 *in vivo*.

HTLV-1 provirus encodes two oncogenic factors *tax* and *HTLV-1 bZIP factor* (*HBZ*) in its plus and minus strand, respectively. Tax is a potent activator of viral replication and many signaling pathways involved in cancer development. Tax expression is generally suppressed in infected cells to evade host immune system. Therefore, its precise roles in pathogenesis remained unclear. Live-cell imaging revealed that a small fraction of HTLV-1-induced leukemic cells expresses Tax at a given time, and its expression level is drastically changing in each cell (Fig. 1). Experimental data of single-cell analysis and computer simulation show that a small number of Tax-expressing cells are needed for the maintenance of leukemia. Tax is inducible in response to various stresses. This limited Tax expression is required to maintain the whole cell population

through inhibition of apoptosis. These results suggest that Tax efficiently protects cells from cell death and enhances virus production under stressful conditions. It is an elaborated strategy of HTLV-1 to evade host immunity and enable persistence *in vivo*.

2) Analysis of anti-HTLV-1 immunity and development of novel immunotherapies

Immune response against HTLV-1 antigens such as Tax is generally suppressed in ATL patients. We found enhanced T-cell response against Tax and HBZ in some ATL patients who achieved complete remission by treatment with mogamulizumab, which is a humanized monoclonal antibody against CCR4, or HPSC transplantation. These results suggest recovery of immune reaction is associated with efficacy of the treatments and prognosis. We are now developing new vaccine against Tax and HBZ using Japanese macaques infected with simian T-cell leukemia virus type 1 (STLV-1) as a nonhuman primate model.

3) Reactivation of HIV-1 from latent infected cells

Replication of HIV-1 in infected patients is well controlled by several potent antivirals, but complete eradication cannot be achieved yet due to the presence of latently infected cells, thus requiring life-long therapy. Although several strategies have been proposed to expel the latently infected cells from the patients, none have been successfully established. In order to better understand the latently infected reservoir cells, we are analyzing the target molecules associated with reactivation. Among several molecules, bromodomain protein BRD4 is important for the maintenance of latency. Inhibition of BRD4 by JQ-1, induced transcription from the R region of the 5' LTR, resulting in production of progeny viruses. On the other hand, during the analysis of the inhibitory activity of antivirals against viral expansion from reactivated latently infected cells, we found that potent non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors efficiently abrogated the capacity to transmit the infection to surrounding cells. These results will help to uncover the detailed reactivation process, and consequently, to establish effective reactivation strategies.

List of Publications

- Mohamed, M., Yasunaga, JI., Iwami, S., Nakaoka, S., Koizumi, Y., Shimura, K., and Matsuoka, M. (2018) Sporadic on/off switching of HTLV-1 Tax expression is crucial to maintain the whole population of virus-induced leukemic cells. **Proc Natl Acad Sci USA**, 2018. doi: 10.1073/pnas.1715724115
- Chao, HW., Doi, M., Fustin, JM., Chen, H., Murase, K., Maeda, Y., Hayashi, H., Tanaka, R., Sugawa, M., Mizukuchi, N., Yamaguchi, Y., Yasunaga, JI., Matsuoka, M., Sakai, M., Matsumoto, M., Hamada, S., Okamura, H. (2017) Circadian clock regulates hepatic polyploidy by modulating Mkp1-Erk1/2 signaling pathway. **Nat Commun.** 8, 2238.
- Furuta, R., Yasunaga, JI., Sugata, K., Saito, A., Akari, H., Ueno, T., Takenouchi, N., Fujisawa, JI., Koh, KR., Higuchi, Y., Shimizu, M., Matsuda, F., Melamed, A., Bangham, CR., and Matsuoka, M. (2017) Human

T-cell leukemia virus type 1 infects multiple lineage hematopoietic cells in vivo. **PLoS Pathog.** *13*, e1006722.

Yasunaga, JI., and Matsuoka, M. (2018) Oncogenic spiral by infectious pathogens: The cooperation of multiple factors in cancer development. **Cancer Sci.** *109*, 24-32.

Kataoka, K., Iwanaga, M., Yasunaga, JI., Nagata, Y., Kitanaka, A., Kameda, T., Yoshimitsu, M., Shiraishi, Y., Sato-Otsubo, A., Sanada, M., Chiba, K., Tanaka, H., Ochi, Y., Aoki, K., Suzuki, H., Shiozawa, Y., Yoshizato, T., Sato, Y., Yoshida, K., Nosaka, K., Hishizawa, M., Itonaga, H., Imaizumi, Y., Munakata, W., Shide, K., Kubuki, Y., Hidaka, T., Nakamaki, T., Ishiyama, K., Miyawaki, S., Ishii, R., Nureki, O., Tobinai, K., Miyazaki, Y., Takaori-Kondo, A., Shibata, T., Miyano, S., Ishitsuka, K., Utsunomiya, A., Shimoda, K., Matsuoka, M., Watanabe, T. and Ogawa, S. (2018) Prognostic relevance of integrated genetic profiling in adult T-cell leukemia/lymphoma. **Blood.** *131*, 215-225.

Takiuchi, Y., Kobayashi, M., Tada, K., Iwai, F., Sakurada, M., Hirabayashi, S., Nagata, K., Shirakawa, K., Shindo, K., Yasunaga, JI., Murakawa, Y., Rajapakse, V., Pommier, Y., Matsuoka, M., Takaori-Kondo, A. (2017) HTLV-1 bZIP factor suppresses TDP1 expression through inhibition of NRF-1 in adult T-cell leukemia. **Sci Rep.** *7*, 12849.

Kinosada, H., Yasunaga, JI., Shimura, K., Miyazato, P., Onishi, C., Iyoda, T., Inaba, K., and Matsuoka, M. (2017) HTLV-1 bZIP Factor Enhances T-Cell Proliferation by Impeding the Suppressive Signaling of Co-inhibitory Receptors. **PLoS Pathog.** *13*, e1006120.

Willems, L., Hasegawa, H., Accolla, R., Bangham, C., Bazarbachi, A., Bertazzoni, U., Carneiro-Proietti, AB., Cheng, H., Chieco-Bianchi, L., Ciminale, V., Coelho-Dos-Reis, J., Esparza, J., Gallo, RC., Gessain, A., Gotuzzo, E., Hall, W., Harford, J., Hermine, O., Jacobson, S., Macchi, B., Macpherson, C., Mahieux, R., Matsuoka, M., Murphy, E., Peloponese, JM., Simon, V., Tagaya, Y., Taylor, GP., Watanabe, T., Yamano Y. (2017) Reducing the global burden of HTLV-1 infection: An agenda for research and action. **Antiviral Res.** *137*, 41-48.

List of Presentations

Matsuoka, M. Strategy and Pathogenesis of HTLV-1. 18th Interbational Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses, Tokyo, March 7-10, 2017.

Furuta, R., Yasunaga, JI., Miura, M., Sugata, K., Saito, A., Akari, H., Ueno, T., Takenouchi, N., Fujisawa, J., Koh, KR., Shimizu, M., Matsuda, F., Melamed, A., Bangham, CR., and Matsuoka, M. HTLV-1 Infection in Multiple Lineages of Hematopoietic Cells. 18th Interbational Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses, Tokyo, March 7-10, 2017.

Mahgoub, M., Yasunaga, JI., Shimura, K., Furuta, R., and Matsuoka, M. Transient Tax Expression is Essential for ATL Survival: Insight Based on Single Cell Analysis. 18th Interbational Conference on

Human Retrovirology HTLV and Related Viruses, Tokyo, March 7-10, 2017.

Kinosada, H., Yasunaga, JI., Shimura, K., and Matsuoka, M. HTLV-1 bZIP Factor Promotes T-cell Proliferation by Impairing the Suppressive Function of TIGIT and PD-1. 18th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses, Tokyo, March 7-10, 2017.

Kurita, D., Miyoshi, H., Ichikawa, A., Sasaki, Y., Kawamoto, K., Shimono, J., Matsuoka, M., Kizaki, M., Seto, M., Tamaru, J., Tokuhira, M., and Ohshima, K. Clinicopathological Study of Methotrexate-Associated Lymphoproliferative Disorders in Rheumatoid Arthritis Patients: A Histological Classification and Predictive Factors for Disease Progression. The 59th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, Atlanta, December 9-12, 2017.

安永純一郎、菅田謙治、三浦未知、明里宏文、松岡雅雄 HTLV-1 bZIP factor を抗原としたワクチンの開発と霊長類モデルによる効果の検証 第 27 回抗ウイルス療法学会学術集会・総会、熊本、2017 年 5 月 18-20 日

安永純一郎 HTLV-1 による発がん機構 第 20 回日本レトロウイルス研究会 夏季セミナー、熊本、2017 年 6 月 29-30 日

松岡雅雄 ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型感染細胞の特性・体内動態に基づいた治療戦略 第 4 回日本 HTLV-1 学会学術集会、大阪、2017 年 8 月 18-20 日

安永純一郎 HTLV-1 がコードする 2 つのがん遺伝子 tax と HTLV-1 bZIP factor の相反する機能と役割 第 4 回日本 HTLV-1 学会学術集会、大阪、2017 年 8 月 18-20 日

Ma, G., Yasunaga, JI., Miura, M., Matsumoto, T., Matsuoka, M. HBZ downregulates miR-455, a tumor suppressor microRNA in ATL 第 4 回日本 HTLV-1 学会学術集会、大阪、2017 年 8 月 18-20 日

Mahgoub, M. Yasunaga, JI., Tanabe, J., Matsuoka, M. Characterization of p12, p30 and p13 Accessory Genes Conservation in Simian T-cell Leukemia Virus Type-1 第 4 回日本 HTLV-1 学会学術集会、大阪、2017 年 8 月 18-20 日

樋口悠介、安永純一郎、三田上侑生、大島孝一、松岡雅雄 IL-6 の抑制は HBZ による炎症、発がんを加速する 第 4 回日本 HTLV-1 学会学術集会、大阪、2017 年 8 月 18-20 日

田中梓、安永純一郎、藤本明洋、松岡雅雄 成人 T 細胞白血病細胞のクロマチン構造解析 第 4 回日本 HTLV-1 学会学術集会、大阪、2017 年 8 月 18-20 日

小林正行、櫻田麻希、瀧内曜子、岩井文絵、安永純一郎、松岡雅雄、高折晃史 HBZ はマイクロサテライト不安定性を誘導する 第 4 回日本 HTLV-1 学会学術集会、大阪、2017 年 8 月 18-20 日

平館裕希、水上拓郎、関洋平、村田めぐみ、鷺崎彩夏、手塚健太、鈴木樹理、兼子明久、佐々木永太、野島清子、石上暁代、安永純一郎、蔵田潔、松岡雅雄、明里宏文、浜口功 閉経期雌ニホンザルの生殖器官における HTLV-1 感染動態の解析 第 4 回日本 HTLV-1 学会学術集会、大阪、2017 年 8 月 18-20 日

- 後川潤、有島志保、安永純一郎、久保田龍二、大島孝一、出雲周二、松岡雅雄、齊藤峰輝 遺伝子
改変マウスを用いた HAM 病態モデル動物の作製 第 4 回日本 HTLV-1 学会学術集会、大阪、
2017 年 8 月 18-20 日
- 豊田康祐、安永純一郎、川月章弘、松岡雅雄 HTLV-1 bZIP factor による c-fos 遺伝子発現制御機構
第 4 回日本 HTLV-1 学会学術集会、大阪、2017 年 8 月 18-20 日
- 松岡雅雄 ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型の感染・病原性発現機構 シンポジウム・臓器移植にお
ける HTLV-1 感染の脅威、第 53 回日本移植学会総会 北海道、2017 年 9 月 7-9 日
- Mahgoub, M., Yasunaga, JI., Iwami, S., and Matsuoka, M. Transient expression of HTLV-1 Tax is critical
event for persistence of adult T-cell leukemia cells. 第 76 回日本癌学会学術総会、神奈川、2017 年 9
月 28-30 日
- Toyoda, K., Yasunaga, JI., Kawatsuki, A., and Matsuoka, M. HTLV-1 bZIP factor suppresses *c-fos*
transcription to hijack cellular signaling pathways. 第 76 回日本癌学会学術総会、神奈川、2017 年 9
月 28-30 日
- Yasunaga, JI., and Matsuoka, M. HTLV-1 bZIP factor downregulates miR-455, a tumor suppressor
microRNA in ATL. 第 76 回日本癌学会学術総会、神奈川、2017 年 9 月 28-30 日
- Higuchi, Y., Yasunaga, J., Mitagami, Y., Ohshima, K., and Matsuoka, M. Loss of IL-6 accelerates
inflammation and lymphomagenesis in HTLV-1 bZIP factor transgenic mice lymphomagenesis in
HTLV-1 bZIP factor transgenic mice. 第 79 回日本血液学会学術集会、東京、2017 年 10 月 20-22 日
- Mizukami, T., Kuribayashi, W., Nojima, K., Hiradate, Y., Sasaki, E., Kuramitsu, M., Momose, H., Sugata, K.,
Iwama, A., and Matsuoka, M. Characterization of the ATL stem cell niche and cytokine environment in
an ATL mouse model 第 79 回日本血液学会学術集会、東京、2017 年 10 月 20-22 日
- Sakurada, M., Kobayashi, M., Takiuchi, Y., Iwai, F., Yasunaga, JI., Matsuoka, M., and Kondo, A. HTLV-1
bZIP factor induces microsatellite instability. 第 79 回日本血液学会学術集会、東京、2017 年 10 月
20-22 日
- Shichijo, T., Maruyama, D., Tajima, K., Yuda, S., Maeshima, A., Suzuki, T., Toyoda, K., Yamauchi, N.,
Makita, S., Fukuhara, S., Munakata, W., Kobayashi, Y., Taniguchi, H., Tobinai, K. Assessment index of
clinical transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma. 第 79 回日本血液学会
学術集会、東京、2017 年 10 月 20-22 日
- 豊田康祐、丸山大、黒澤彩子、鈴木智貴、油田さや子、山内寛彦、蒔田真一、福原傑、棟方理、谷
口浩和、前島亜希子、小林幸夫、飛内賢正 CODOX-M/IVAC 療法を受けた悪性リンパ腫患者
の妊孕性・QOL に関する長期フォローアップデータ 第 79 回日本血液学会学術集会、東京、
2017 年 10 月 20-22 日
- 野崎健司、丸山大、田島絹子、前島亜希子、伊丹純、七條敬文、油田さや子、鈴木智貴、豊田康祐、

山内寛彦、蒔田真一、福原傑、棟方理、小林幸夫、谷口浩和、飛内賢正 形質転換 B 細胞性リンパ腫に対する局所放射線照射の役割 第 79 回日本血液学会学術集会、東京、2017 年 10 月 20-22 日

Mahgoub, M., Yasunaga, JI., and Matsuoka, M. Evolutional insight on accessory genes of simian T-cell leukemia virus type 1 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017 年 10 月 24-26 日

Ma, G., Yasunaga, JI., and Matsuoka, M. HTLV-1 bZIP factor (HBZ) downregulates miR-455, a tumor suppressor microRNA in HTLV-1 infected cells 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017 年 10 月 24-26 日

志村和也、松岡雅雄 HIV-1 潜伏感染モデル細胞を用いた再活性化誘導機序の解析 第 31 回日本エイズ学会学術集会、東京、2017 年 11 月 24-26 日

ウイルス感染研究部門
Department of Virus Research

RNA ウイルス分野
Laboratory of RNA viruses

| | | | |
|-------|-------|--------------------------|----------------|
| 教授 | 朝長 啓造 | Prof. | Keizo Tomonaga |
| 特定准教授 | 堀江 真行 | Project Associate. Prof. | Masayuki Horie |
| 特定助教 | 牧野 晶子 | Project Assist. Prof. | Akiko Makino |
| 特定助教 | 小松 弓子 | Project Assist. Prof. | Yumiko Komatsu |

平成 29 年は、1 月に堀江真行が白眉センター特定准教授として加わった。4 月に生命科学研究科修士課程 1 年として角家洋次、向井八尋が入学した。また、12 月には河崎栄治が技術補佐員として加わった。

本年は、以下の項目に関する研究活動を行い、その成果を発表した。(1) 抗ボルナウイルス薬の探索、(2) ボルナ病ウイルスの N 蛋白質の核外輸送シグナルに関する解析、(3) ボルナ病ウイルスのリーダー RNA に関する研究、(4) 非伝播型のボルナウイルスベクターの開発。

(1) では、大学院修士課程に在籍していた徳永が抗ボルナウイルス活性を有する新規薬剤についてスクリーニングを行い、ファビピラビル (T-705) がボルナウイルス複製の強力な阻害剤であることを見出した。T-705 は、ボルナウイルス複製を用量および時間依存的に抑制し、T-705 除去後もボルナウイルス陽性細胞の増加は検出されなかった (Fig. 1)。また、T-705 が哺乳類ならびに鳥類ボルナウイルスの両方の複製を効果的に抑える強力な抗ウイルス活性を有することを示した。(2) では、大学院博士課程 2 年の柳井が、BoDV-1 の N 蛋白質の核外輸送シグナル (NES) 変異体を用いて、その細胞内局在とウイルスポリメラーゼ活性および P 結合能を調べた。その結果、BoDV-1 N 蛋白質の NES は、これまで考えられていた核外輸送を担うだけではなく、ウイルス P 蛋白質との結合を制御し、ウイルスのポリメラーゼ活性にも影響を及ぼすことを明らかにした。

(3) では、共同研究者の本田らが、BoDV-1 感染細胞にて検出されるウイルスゲノムの 3'UTR に由来する機能不明なリーダー RNA (leRNA) の解析を行った。この研究では、BoDV-1 の leRNA の構造を始めて明らかにするとともに、leRNA の発現レベルがウイルスの複製および転写とは相関していないにもかかわらず、3'UTR の変異は leRNA 産生に影響を及ぼしていることを示した。(4) では、共同研究者の藤野ら

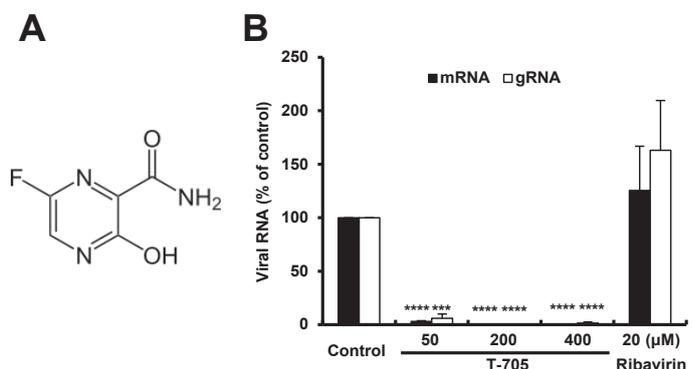


Fig. 1. Favipiravir (T-705) eliminates mammalian bornaviruses from infected cells. (A) Chemical structure of favipiravir (T-705) (B) Quantification of BoDV-1 RNAs in BoDV-1 infected OL cells at 28 days of T-705 treatment

が、M 遺伝子と G 遺伝子の両方を欠損させた非伝達型の BoDV ベクターの開発を報告した。今回開発した非伝播型の BoDV ベクターは、M および G タンパク質の両方を発現する Vero 細胞において効率的に粒子形成がなされる一方、Vero 細胞では細胞間伝播することなく、持続的に外来遺伝子の発現が維持されることが示された。このことより、今回開発した BoDV ベクターは効率的で安全性の高いウイルスベクターであることが示された。

その他の研究活動として、朝長は3月の第12回京都大学附置研究所・センター シンポジウム（金沢）、6月の日本生化学会北陸支部大会（金沢）とウイルス学キャンプ（湯河原）、10月の The National Symposium on Zoonoses Research 2017（Berlin, Germany）、12月の第7回日本微生物学連盟フォーラム（東京）にて招待講演を行った。国際学会へは、2月の Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology（Santa Fe, USA）に大学院博士課程1年と修士課程2年の柳井と小森園が、5月の American Society of Gene and Cell Therapy（ASGCT）Annual Meeting（Washington DC, USA）に小松が、6月の American Society for Virology Annual Meeting（Madison, USA）に大学院修士課程2年の Garcia が、そして12月の 4th ASM Conference on Viral Manipulation of Nuclear Processes（Charleston, USA）に大学院博士課程3年の小嶋がそれぞれ参加し発表を行った。その他、教室員の多くが、10月の日本ウイルス学会（大阪）で研究発表を行った。また、朝長は第60回野口英世記念医学賞を受賞し、授賞式が11月に福島県猪苗代町の野口英世至誠館で開催された（Fig. 2）



Fig. 2. The 60th Hideyo Noguchi Memorial Award for Medical Sciences 2017.

The researches carried out in our group are focused on animal-derived RNA viruses, especially a negative strand RNA viruses replicating in the cell nucleus, bornaviruses. Our projects aim to understand the fundamental mechanisms of the replication and pathogenesis of bornaviruses, including emerging bornaviruses, such as avian bornaviruses and variegated squirrel bornavirus. In addition, we are investigating the evolutionary significance, as well as function, of endogenous bornaviruses in many mammalian genomes, including humans. Furthermore, we are conducting the development of a novel RNA virus vector using bornavirus for regenerative medicine and gene therapies. In 2017, we conducted research on the following subjects.

1) Antiviral activity of Favipiravir (T-705) against mammalian and avian bornaviruses

Previous studies have shown that ribavirin has a potent antiviral effect on infections with a mammalian bornavirus, Borna disease virus (BoDV), as well as avian bornaviruses. However, ribavirin-based treatment does not eliminate bornaviruses from persistently infected cells and viral replication resumes after treatment

cessation. Therefore, to identify agents which can eliminate bornavirus infection from the infected cells, we screened nucleoside/nucleotide mimetics for agents with anti-bornavirus activity. We used Vero cells infected with recombinant BoDV carrying *Gussia luciferase* to monitor BoDV replication and found that favipiravir (T-705) is a potent inhibitor of BoDV replication. T-705 suppressed BoDV replication in a dose- and time-dependent manner during the observation period of 4 weeks. Notably, no increase in luciferase activity or in the number of BoDV-positive cells was detected in the at least 4 weeks following T-705 removal. Our findings provide a novel and effective option for treating persistent bornavirus infection.

2) Dual function of the nuclear export signal of the Borna disease virus nucleoprotein in nuclear export activity and binding to viral phosphoprotein

The nuclear export signal (NES) of BoDV nucleoprotein (N) consisting of leucine at positions 128 and 131 and isoleucine at positions 133 and 136 overlaps with one of two predicted binding sites for the viral phosphoprotein (P). A previous study demonstrated that higher expression of BoDV-P inhibits nuclear export of N. However, the function of N NES in the interaction with P remains unclear. In this study, we examined the subcellular localization, viral polymerase activity, and P-binding ability of BoDV-N NES mutants. We also characterized a recombinant BoDV (rBoDV) harboring an NES mutation of N. BoDV-N with four alanine-substitutions in the leucine and isoleucine residues of the NES impaired its cytoplasmic localization and abolished polymerase activity and P-binding ability. Although an alanine-substitution at position 131 markedly enhanced viral polymerase activity as determined by a minigenome assay, rBoDV harboring this mutation showed expression of viral RNAs and proteins relative to that of wild-type rBoDV. These results demonstrate that BoDV-N NES has a dual function in BoDV replication, including nuclear export of N and an interaction with P, affecting viral polymerase activity in the nucleus.

3) Linkage between the leader sequence and leader RNA production in Borna disease virus-infected cells

The non-segmented, negative-strand (NNS) RNA viruses are known to use the 3'-untranslated region (UTR) of the genomes as a template to synthesize leader RNAs (leRNAs) with unknown functions. BoDV is unique because it establishes a persistent infection and replicates in the nucleus. No report has yet demonstrated the presence of leRNAs during BoDV infection. In this study, we report that BoDV synthesizes leRNAs from the 3'-UTR of the genome. They started at position 5 in the 3'-UTR and ended by the transcription start signal of the nucleoprotein gene. The level of leRNA production is not correlated with the levels of viral replication and transcription. This finding adds a novel viral transcript to the BoDV life cycle.

4) Generation of a non-transmissible Borna disease virus vector lacking both matrix and glycoprotein

Unique among animal RNA viruses, BoDV transcribes and replicates non-cytopathically in the cell nucleus, leading to establishment of long-lasting persistent infection. This striking feature of BoDV indicates its potential as an RNA virus vector system. In this study, a novel nontransmissible rBoDV, rBoDV dMG,

which lacks both matrix (M) and envelope glycoprotein (G) genes in the genome, is reported. rBoDV dMG expressing GFP, rBoDV dMG-GFP, was efficiently generated in Vero/MG cells stably expressing both BoDV M and G proteins. Infection with rBoDV dMG-GFP was persistently maintained in the parent Vero cells without propagation within cell culture. The optimal ratio of M and G for efficient viral particle production by transient transfection of M and G expression plasmids into cells persistently infected with rBoDV dMG-GFP was also demonstrated. These findings indicate that the rBoDV dMG-based BoDV vector may provide an extremely safe virus vector system.

List of Publications

- Postler TS, Clawson AN, Tomonaga K, Kuhn JH et al. (2017). Possibility and challenges of conversion of current virus species names to Linnaean binomials. **Syst Biol** 66, 463-473.
- Honda T, Sofuku K, Matsunaga H, Tachibana M, Mohri I, Taniike M, and Tomonaga K. (2017). Detection of antibodies against Borna disease virus proteins in an autistic child and her mother. **Jpn J Infect Dis.** 70, 225-227.
- Tokunaga T, Yamamoto Y, Sakai M, Tomonaga K and Honda T. (2017). Antiviral activity of Favipiravir (T-705) against mammalian and avian bornaviruses. **Antiviral Res.** 143, 237-245.
- Yanai M, Sakai M, Makino A and Tomonaga K. (2017). Dual function of the nuclear export signal of the Borna disease virus nucleoprotein in nuclear export activity and binding to viral phosphoprotein. **Virology J.** 14, 126.
- Honda T, Sofuku K, Kojima S, Yamamoto Y, Ohtaki N and Tomonaga K. (2017). Linkage between the leader sequence and leader RNA production in Borna disease virus-infected cells. **Virology** 510, 104-110.
- Fujino K, Yamamoto Y, Daito T, Makino A, Honda T and Tomonaga K. (2017). Generation of a non-transmissible Borna disease virus vector lacking both matrix and glycoprotein. **Microbiol Immunol.** 61, 380-386.
- Cui XT, Mino T, Yoshinaga M, Nakatsuka Y, Hia F, Yamasoba D, Tsujimura T, Tomonaga K, Suzuki Y, Uehata T and Takeuchi O. (2017). Regnase-1 and Roquin non-redundantly regulate Th1 differentiation causing cardiac inflammation and fibrosis. **J. Immunol.** 199, 4066-4077.
- 平井悠哉, 朝長啓造. (2017). ボルナウイルスと核内構造. **生体の科学** 68 (3), 261-265.

List of Presentations

- 朝長啓造. ボルナウイルスベクターの開発と遺伝子治療への応用. AMED 難治性疾患実用化研究事業キックオフシンポジウム. 滋賀, 2017年4月21日
- 朝長啓造. ボルナウイルスの核内複製と共存進化における宿主コンピテンシー. ウイルス感染現象

- における宿主細胞コンピテンシーの分子基盤ワークショップ. 大阪, 2017年10月27日
- Masayuki Horie. Paleovirology of bornaviruses. East Asia Joint Symposium 2017. 滋賀, 2017年10月18日
- Masayuki Horie. Paleovirology of bornaviruses. 2nd Kyoto International Symposium on Virus-Host Coevolution. 京都, 2017年11月13日
- 朝長啓造. ウイルス化石が語る生命の進化. 第12回京都大学附置研究所・センターシンポジウム. 京都からの挑戦—地球社会の調和ある共存に向けて. 金沢. 2017年3月11日
- 朝長啓造. ボルナウイルス: RNA ウイルスの核内複製と進化. 「ウイルス感染病態研究の新潮流」 in 日本生化学会北陸支部第35回大会. 石川, 2017年6月3日
- 朝長啓造. ボルナウイルス研究の挑戦と醍醐味. 第14回ウイルス学キャンプ in 湯河原. 静岡, 2017年6月6日
- Keizo Tomonaga. Bornavirus infection: a new model of evolution and coexistence of RNA viruses. The National Symposium on Zoonoses Research 2017. Berlin, Germany 2017年10月12-13日
- 朝長啓造. ボルナウイルスならびに内在性RNAウイルスに関する研究. 第60回野口英世記念医学賞授賞式. 福島, 2017年11月12日
- 朝長啓造. 微生物: 変わり者たちの素顔. 日本微生物学連盟フォーラム. 東京, 2017年12月16日
- 堀江真行. 生物ゲノムに潜む「RNAウイルスの化石」からわかること. KRP アイデア・シェアリング・コミュニティ. 京都, 2017年09月29日
- 小松弓子. Borna disease virus vector for gene delivery: current status and future potential. 第42回インターゲノミクスセミナー. 神戸, 2017年10月27日
- 小嶋将平. 内在性ボルナウイルス様エレメント由来非コードRNAはヒストンmRNAの3'末端プロセッシングを介してボルナウイルス感染を抑制する. Sixth Negative Strand Virus-Japan. 沖縄, 2017年1月16-18日
- Bea Garcia. A double mutation in polymerase L gene enables adaptation of parrot bornavirus-4 to mammalian cell line. Sixth Negative Strand Virus-Japan. 沖縄, 2017年1月16-18日
- 酒井まどか. ボルナウイルスGタンパク質を介したウイルス感染症の評価. Sixth Negative Strand Virus-Japan. 沖縄, 2017年1月16-18日
- 平井悠哉. 核内アクチンによるボルナ病ウイルスのRNPの機能制御機構の解明. Sixth Negative Strand Virus-Japan. 沖縄, 2017年1月16-18日
- Yanai M, Makino A, and Tomonaga K. ADAR2 is involved in the maintenance of the persistent infection of Borna disease virus. Viral Immunity: Mechanisms and Consequences, Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology. Santa Fe. USA. February 19-23, 2017.
- Komorizono R, Makino A, Sassa Y, Horie M and Tomonaga K. Host range of bornaviruses implies an

evolutionary arm race between persistently infected RNA virus and host. *Viral Immunity: Mechanisms and Consequences*, Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology. Santa Fe, USA. February 19-23, 2017.

Shohei Kojima, Tomoyuki Honda, Keizo Tomonaga. A long non-coding RNA derived from an endogenous bornavirus-like element in human genome restricts exogenous bornavirus infection. 15th International Student Seminar. Kyoto, February 23-25, 2017.

Yumiko Komatsu, Dan Takeuchi, Yusuke Yamamoto, Hidetoshi Sakurai, Tomoyuki Honda, Akiko Makino, Yasuhiro Ikeda, and Keizo Tomonaga. Development of Borna disease virus vector for differentiation of human iPSCs into skeletal muscle cells. 20th Annual Meeting of the ASGCT. Washington DC, USA. May 5-11, 2017.

小嶋将平. 内在性ボルナウイルスによるウイルス感染抑制とその分子機序. 第14回ウイルス学キャンプ. 湯河原, 2017年6月5日

Bea Clarise B. Garcia, Yukiko Sassa, Akiko Makino, and Keizo Tomonaga. A double mutation in polymerase L gene enables adaptation of parrot bornavirus-4 to mammalian cell line. 36th Annual Meeting of the American Society for Virology. Madison City, Wisconsin, USA, June 24-28, 2017.

松永秀典, 陸馨仙, 福本素由己, 金井講治, 近江翼, 大村夕美, 本田知之, 朝長啓造. 突然の健忘で発症し精神症状等を合併した抗ボルナウイルス抗体陽性の2症例. 精神神経学会. 名古屋, 2017年6月22-24日

小松弓子. Borna disease virus vector and its potential applications for cancer gene therapy K-CONNEX研究会. 京都, 2017年7月28日

向井八尋, 堀江真行, 小林由紀, 小嶋将平, 前田 健, 朝長 啓造. ユビナガコウモリ属コウモリのゲノムに内在化しているボルナウイルス由来配列の生物学的意義の探索. 日本進化学会第19回大会. 京都, 2017年8月24日

小森園亮, 佐々悠木子, 堀江真行, 牧野晶子, 朝長啓造. ボルナウイルスの宿主域を決定する分子機構とその進化的特徴. 環境微生物系学会合同大会2017. 仙台, 2017年8月29日

堀江真行. 南極コケ坊主におけるウイルス叢の探索. 平成29年度日本学術振興会育志賞研究発表会. 大阪, 2017年9月25日

Tomoyuki Honda, Xiaoshu Liu, Bea Garcia, Nichoras F. Parrish, Keizo Tomonaga. Loading of small RNAs derived from an endogenous bornavirus element on the MIWI protein in GC2 Cells. The 16th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Hyogo, June 4-7, 2017.

Nadine Gillich, Shohei Kojima, Keizo Tomonaga, Martin Schwemmler, Masayuki Horie. Development and characterization of recombinant Borna disease viruses expressing Cre recombinase. The 16th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Hyogo, June 4-7, 2017.

- 酒井まどか, 小森園 亮, 柳井真瑚, 堀江真行, 牧野晶子, 朝長啓造. 新興ボルナウイルスの G 蛋白質を介した感染性の比較. 第 160 回日本獣医学会学術集会. 鹿児島, 2017 年 9 月 13-15 日
- 向井八尋, 堀江真行, 小嶋将平, 長田奈緒, 前田 健, 朝長啓造. ユビナガコウモリゲノムに内在する内在性ボルナウイルス様エレメントの基本的な性状解析と内在化年代の推定. 第 160 回日本獣医学会学術集会. 鹿児島, 2017 年 9 月 13-15 日
- 堀江真行, 向井八尋, 小嶋将平, 朝長啓造. BLAST だけでは見つけられない内在性ボルナウイルス様配列の探索の試み. 第 1 回獣医 RNA ウイルス研究会・第 10 回日本ボルナウイルス研究会合同大会. 鹿児島, 2017 年 9 月 15-16 日
- 柳井真瑚. RNA 編集酵素 ADAR はボルナ病ウイルスに関与する. 第 1 回獣医 RNA ウイルス研究会・第 10 回日本ボルナウイルス研究会合同大会. 鹿児島, 2017 年 9 月 15-16 日
- 小森園 亮, 佐々 悠木子, 堀江 真行, 牧野 晶子, 朝長 啓造. ボルナウイルスの宿主域決定メカニズムの解析. 第 1 回獣医 RNA ウイルス研究会・第 10 回日本ボルナウイルス研究会合同大会. 鹿児島, 2017 年 9 月 15-16 日
- Bea Garcia. The role of L polymerase in the host daptation of bornaviruses. 第 1 回獣医 RNA ウイルス研究会・第 10 回日本ボルナウイルス研究会合同大会. 鹿児島, 2017 年 9 月 15-16 日
- 向井八尋, 堀江真行, 小林由紀, 小嶋将平, 長田奈緒, 前田 健, 朝長啓造. ユビナガコウモリ属コウモリのゲノムに 内在化しているボルナウイルス由来配列の 生物学的意義の探索. 第 1 回獣医 RNA ウイルス研究会・第 10 回日本ボルナウイルス研究会合同大会. 鹿児島, 2017 年 9 月 15-16 日
- 角家洋次, 酒井まどか, 小嶋将平, 牧野晶子, 小松弓子, 朝長啓造. 高純度・高力価ボルナウイルスベクター精製法の開発. 第 1 回獣医 RNA ウイルス研究会・第 10 回日本ボルナウイルス研究会合同大会. 鹿児島, 2017 年 9 月 15-16 日
- Tomoyuki Honda, Xiaoshu Liu, Bea Garcia, Nichoras F. Parrish, Keizo Tomonaga. 内在性ボルナウイルスエレメント由来 piRNA によるボルナウイルス制御. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会. 大阪, 2017 年 10 月 24-26 日
- Akiko Makino and Keizo Tomonaga. Borna disease virus utilizes host mRNA binding proteins, IGF2BPs, for translational regulation. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会. 大阪, 2017 年 10 月 24-26 日
- Yuya Hirai, Akiko Makino, Hideyuki Okamura and Keizo Tomonaga. Analysis of possible influences of nuclear actin in forming the viral factories of Borna disease virus and its crosstalk with Cajal bodies. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会. 大阪, 2017 年 10 月 24-26 日
- Yumiko Komatsu, Yasuhiro Ikeda, Akiko Makino, and Keizo Tomonaga. Characterization of BoDV vector for gene delivery to iPSCs. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会. 大阪, 2017 年 10 月 24-26 日
- 小嶋将平, 平井悠哉, 朝長啓造. Identification of host proteins in intranuclear viral factories assembled by

Borna disease virus. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会. 大阪, 2017 年 10 月 24-26 日

Mako Yanai, Akiko Makino, Keizo Tomonaga. ADAR2 plays a key role in the maintenance of the persistent infection of Borna disease virus. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会. 大阪, 2017 年 10 月 24-26 日

Ryo Komorizono, Akiko Makino, Keizo Tomonaga. Genomic analysis of bornaviruses implies the clade 2 avian bornaviruses possess mammalian-adapted gene composition. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会. 大阪, 2017 年 10 月 24-26 日

Madoka Sakai, Ryo Komorizono, Yumiko Komatsu, Sumio Minamiyama, Makoto Urushitani, Akiko Makino, Keizo Tomonaga. Comparison of transduction efficiency of pseudotyped BoDV vectors with different envelope G proteins from the genus Bornavirus. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会. 大阪, 2017 年 10 月 24-26 日

Yahiro Mukai, Masayuki Horie, Yuki Kobayashi, Shohei Kojima, Nao Nagata, Ken Maeda, Keizo Tomonaga. Molecular biological and evolutionary analysis of an endogenous bornavirus-like nucleoprotein element in miniopterid bat genomes. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会. 大阪, 2017 年 10 月 24-26 日

角家洋次, 酒井まどか, 小嶋将平, 牧野晶子, 小松弓子, 朝長啓造. 高純度・高力価ボルナウイルスベクター精製法の開発. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会. 大阪, 2017 年 10 月 24-26 日

Shohei Kojima, Yuya Hirai, Keizo Tomonaga. Identification of host proteins in intranuclear viral factories assembled by Borna disease virus. 4th ASM Conference on Viral Manipulation of Nuclear Processes. Charleston SC. USA, December 3-6, 2017.

牧野晶子, 小森園 亮. 核内複製をする RNA ウイルスの持続感染戦略. えこえびワークショップ. 岡山, 2017 年 12 月 21-22 日

小森園 亮, 牧野晶子. ボルナウイルスの進化・生存戦略. えこえびワークショップ. 岡山, 2017 年 12 月 21-22 日

ウイルス感染研究部門
Department of Virus Research

微細構造ウイルス学分野

Laboratory of Ultrastructural Virology

教授 野田 岳志 Prof. Takeshi Noda
助教 中野 雅博 Assist. Prof. Masahiro Nakano

本分野では、一般的なウイルス学的手法に加えて電子顕微鏡や原子間力顕微鏡を用いた手法により、微細構造学的観点からインフルエンザウイルスやエボラウイルスの細胞内増殖機構を解明することを目指している。また、ウイルスの細胞内増殖機構を分子レベルで理解することにより、ウイルス増殖を阻害する抗ウイルス薬の開発や、ウイルス感染をブロックする抗体医薬の開発にも取り組んでいる。2017年は、インフルエンザウイルスのゲノム転写・複製におけるリボヌクレオタンパク質複合体(vRNP)の解析を行い、vRNPが合成するRNAとインフルエンザウイルスタンパク質との相互作用を見いだした。さらに、インフルエンザウイルスのゲノムパッケージングにおけるゲノム分節間の相互作用を解析し、過去に報告のない組み合わせのゲノムRNA間相互作用を多数検出した。一方、エボラウイルスに関しては、ヌクレオカプシドの核構造と成るNP-RNA複合体の構造解析を行い、その高分解能構造を得ることに成功した。

1) インフルエンザウイルスのゲノム転写・複製機構の解析

インフルエンザウイルスのゲノムRNA(vRNA)は、核タンパク質NPやポリメラーゼとともにリボヌクレオタンパク質複合体(vRNP)を形成する。vRNPはmRNA合成(転写)およびcRNA合成(複製の第一段階)を担っている。本年はvRNPによって合成されるループ状のRNAがvRNAとcRNAから成る二本鎖RNAであることを明らかにし、さらにインフルエンザウイルスタンパク質NS1がその二本鎖RNA全体を覆うような形で結合できることを原子間力顕微鏡を用いた観察から見いだした。二本鎖RNAは自然免疫を引き起こすファクターとして知られているが、インフルエンザウイルスはNS1タンパク質で二本鎖RNAを覆うことによって宿主の免疫応答から逃れている可能性が示唆された。

2) インフルエンザウイルスのゲノムパッケージング機構の解析

A型インフルエンザウイルスのゲノムRNAは8種類に分節化しており、各ゲノム分節は選択的に集合し子孫粒子に取り込まれる。ゲノム分節間にはパッケージングシグナル配列を介した相互作用が存在すると考えられているが、そのメカニズムについては明らかにされていない。そこで本年は、ゲノムRNA間相互作用ネットワークの全貌を明らかにすることを目的として、Gel Shift Assayにより8種のゲノムRNAが複合体を形成する組み合わせを探索した。その結果、今までに報告のない多くの組み合わせでゲノムRNA間相互作用が検出され、全てのゲノムRNAが複数のゲノム

RNA と相互作用する可能性があることが明らかとなった。

3) エボラウイルスヌクレオカプシドの構造解析

エボラウイルスのゲノム RNA は、複数分子のウイルスタンパク質 NP と結合してらせん構造 (NP helix) を形成する。さらに、VP24、VP30、VP35 およびポリメラーゼ L が NP helix に結合し、成熟ヌクレオカプシド (NC) となってウイルス粒子内に取り込まれる。ウイルスゲノム RNA の転写・複製は NC 上でのみ起こるが、その核構造となる NP helix の分子構造については明らかにされていない。そこで本年は、エボラウイルス NC の構造形成・維持機構を解明することを目的とし、クライオ電子顕微鏡を用いて NP helix の構造解析を行った。その結果、高分解能で NP helix の三次元構造が得られ、NP helix における NP-RNA 結合、隣接する NP-NP 結合、らせん鎖間の NP-NP 結合領域を担うアミノ酸およびその詳細な結合様式が明らかとなった。本研究は、沖縄科学技術大学院大学の Matthias Wolf 准教授との共同研究である。

Virus infections are accompanied by numerous morphological changes in viral and cellular components. Our laboratory aims to elucidate the replication mechanism of influenza and Ebola viruses from the ultrastructural point of view, by using different microscopic analytical methods such as electron microscopy and high-speed atomic force microscopy. In 2017, we found that one of the influenza virus proteins interacts with a double-stranded RNA produced by vRNPs. We also investigated the genome packaging mechanism of influenza virus and discovered many vRNA-vRNA interactions that have not been reported until now. Moreover, we could find the higher-order helical structure of the nucleoprotein-RNA complex of Ebola virus by cryo-electron microscopy.

1) Transcription and replication mechanisms of the influenza virus genome

Influenza virus ribonucleoprotein (vRNP) is composed of the viral RNA genome (vRNA), the viral nucleoprotein (NP), and the viral RNA polymerase complex. The vRNA is transcribed to mRNA (transcription) or cRNA (first step of replication) in the form of vRNP. In this year, we demonstrated that a looped RNA produced by vRNP in vitro was a double-stranded RNA (dsRNA) and that the dsRNA is composed of vRNA and cRNA. Furthermore, we found that influenza virus NS1 protein could bind to the entirety of the dsRNA. This suggests the possibility that influenza virus evades the immune system by masking the dsRNA with NS1.

2) Genome packaging mechanism of influenza virus

Influenza A virus has a genome consisting of eight single-stranded negative-sense RNAs, and each segment is selectively assembled and packaged into a progeny virion. However, the detailed mechanism of the interaction between the segments is unknown. In 2017, we comprehensively searched the pairs of vRNA-vRNA interaction by gel-shift assay and found many interactions which have not been reported until now.

This result suggests the possibility that all influenza A virus vRNA could interact with multiple vRNA segments.

3) Structural analysis of Ebola virus nucleocapsid

The Ebola virus nucleocapsid (NC) has a helical structure and consists of viral genomic RNA (vRNA), nucleoprotein (NP), VP24, VP30, VP35 and polymerase L. The NC is responsible for transcription and replication of vRNA. However, the higher-order structure of the NP helix, which forms the core structure of the NC, is not known. In this year, we examined the higher-order helical structure of the NP-helix by using cryo-electron microscopy to elucidate the morphogenesis of the Ebola virus NC. As a result, we elucidated the structure of NP-RNA binding in NP helix and NP-NP interaction of neighboring NPs. Moreover, we also determined the amino acids responsible for NP-NP binding between NP-RNA helices. This study was a collaboration with Prof. Matthias Wolf, Okinawa Institute of Science and Technology Graduate University.

List of Publications

- Gilmore, J.L., Deguchi, K., and Takeyasu, K. (2017) Nanoimaging of RNA Molecules with Atomic Force Microscopy. **Microscopy and imaging science: practical approaches to applied research and education**, 7, 300-306.
- Majima, R., Shindoh, K., Yamaguchi, T., and Inoue, N. (2017) Characterization of a thienylcarboxamide derivative that inhibits the transactivation functions of cytomegalovirus IE2 and varicella zoster virus IE62. **Antiviral Res.** 140, 142-150.
- Takeuchi, H., Saito, H., Noda, T., Miyamoto, T., Yoshinaga, T., Terahara, K., Ishii, H., Tsunetsugu-Yokota, Y., Yamaoka, S. (2017) Phosphorylation of the HIV-1 capsid by MELK triggers uncoating to promote viral cDNA synthesis. **PLoS Pathog.** 13 (7): e1006441.
- Sugino, H., Usui, T., Shimada, T., Nakano, M., Ogasawara, H., Ishihama, A., and Hirata, A. (2017) A structural sketch of RcdA, a transcription factor controlling the master regulator of biofilm formation. **FEBS Lett.** 591, 2019-2031.
- Saito, H., Takeuchi, H., Masuda, T., Noda, T., and Yamaoka, S. (2017) N-terminally truncated POM121C inhibits HIV-1 replication. **PLoS One** 12 (9): e0182434.
- Chen, M., Aoki-Utsubo, C., Kameoka, M., Deng, L., Terada, Y., Kamitani, W., Sato, K., Koyanagi, Y., Hijikata, M., Shindo, K., Noda, T., Kohara, M., and Hotta, H. (2017) Broad-spectrum antiviral agents: secreted phospholipase A2 targets viral envelope lipid bilayers derived from the endoplasmic reticulum membrane. **Sci. Rep.** 7: 15931
- Iwatsuki-Horimoto, K., Nakajima, N., Ichiko, Y., Sakai-Tagawa, Y., Noda, T., Hasegawa, H., and Kawaoka, Y. (2017) Syrian Hamster as an Animal Model for the Study of Human Influenza Virus Infection. **J.**

Virol. 92, e01693-17.

野田岳志 (2017) インフルエンザウイルスのゲノムパッケージング機構、「化学療法の領域」33, 9

List of presentations

Noda, T. Genome packaging of a seven-segment influenza A virus. 9th Japan-China flu symposium, Beijing, China, March 14, 2017

Noda, T., Murakami, S., Imai, H., Nakatsu, S., Muramoto, Y., Shindo, K., Sagara, H., Kawaoka, Y. seven-segment influenza A virus packages eight ribonucleoprotein complexes. 27th Annual Meeting of the Society for Virology, Marburg, Germany, March 22, 2017

野田岳志、ウイルスゲノム転写装置の動態解析、「ライフサイエンスの革新を目指した構造生命科学と先端的基盤技術研究領域」研究成果報告会、東京、2017年1月20日（招待講演）

宮本翔、インフルエンザウイルスのゲノムパッケージングにおけるゲノム分節間相互作用の解析、6th Negative Strand Virus-Japan Symposium、沖縄、2017年1月16-18日

中野雅博、高速原子間力顕微鏡を用いたインフルエンザウイルスのゲノム転写・複製機構の解明、6th Negative Strand Virus-Japan Symposium、沖縄、2017年1月16-18日

神道慶子、野田岳志、既存薬ライブラリーを用いた新規抗インフルエンザ薬の探索、6th Negative Strand Virus-Japan Symposium、沖縄、2017年1月16-18日

村本裕紀子、川上英良、武長徹、神道慶子、野田岳志、高病原性H5N1鳥インフルエンザウイルス感染の重症化には感染初期の転写因子活性抑制が関与する、6th Negative Strand Virus-Japan Symposium、沖縄、2017年1月16-18日

Gilmore, J.L., Nakano, M., Yoshimura, S., and Noda, T. Analysis of Structural Elements in Influenza Virus mRNA using Atomic Force Microscopy. 6th Negative Strand Virus-Japan Symposium、沖縄、2017年1月16-18日

武長徹、村本裕紀子、井上浄、野田岳志、ラッサウイルス感染を中和するモノクローナル抗体の作出、6th Negative Strand Virus-Japan Symposium、沖縄、2017年1月16-18日

宮本翔、村本裕紀子、神道慶子、中野雅博、野田岳志、インフルエンザウイルスのゲノムパッケージングにおけるゲノム分節間相互作用の解析、第1回獣医微生物学フォーラム、東京、2017年3月2日

宮本翔、村本裕紀子、神道慶子、中野雅博、野田岳志、インフルエンザウイルスのゲノムパッケージングにおけるゲノム分節間相互作用の解析、第14回ウイルス学キャンプ in 湯河原、静岡、2017年6月5-6日

岩附研子、市古有里絵、野田岳志、河岡義裕、ハムスターにおけるインフルエンザウイルスの飛沫

伝播解析、第 160 回日本獣医学会学術集会、鹿児島、2017 年 9 月 13-15 日

宮本翔、村本裕紀子、神道慶子、中野雅博、野田岳志、インフルエンザウイルスの HA 分節の取込みに重要なゲノム RNA 間相互作用、第 160 回日本獣医学会学術集会、鹿児島、2017 年 9 月 13-15 日

坂口翔一、小出りえ、神道慶子、野田岳志、水谷哲也、宮沢孝幸、ネコモルビリウイルス持続感染細胞の性状および免疫応答の解析、第 160 回日本獣医学会学術集会、鹿児島、2017 年 9 月 13-15 日

Miyamoto, S., Muramoto, Y., Shindo, K., Gilmore, J.L., Nakano, M., and Noda, T. A functional vRNA-vRNA interaction important for incorporation of influenza A virus HA segment into virions. The 24th East Asia Joint Symposium on Biomedical Research, Shiga, Japan, October 17-18, 2017

中野雅博、神道慶子、野田岳志、インフルエンザウイルス RNP が合成する RNA の微細構造解析、RNA フロンティアミーティング 2017、滋賀、2017 年 11 月 9 日

畠山大、庄司正樹、山吉誠也、楊理奈、大海菜穂、竹中志織、齋藤彩香、新垣優美絵、増田麻来、小松嗣典、中野雅博、野田岳志、河岡義裕、葛原 隆、インフルエンザウイルスのヒストン様タンパク質・ヌクレオプロテインに対するアセチル化修飾によるウイルス RNA ポリメラーゼ活性変化、第 40 回日本分子生物学会年会（2017 年度 生命科学系学会合同年次大会）、兵庫、2017 年 12 月 6-9 日

ウイルス感染研究部門
Department of Virus Research

がんウイルス分野
Laboratory of Tumor Viruses

| | | | |
|-----|-------|---------------|-------------------|
| 准教授 | 酒井 博幸 | Assoc. Prof. | Hiroyuki Sakai |
| 准教授 | 土方 誠 | Assoc. Prof. | Makoto Hijikata |
| 助 教 | 柳川 伸一 | Assist. Prof. | Shinichi Yanagawa |

本分野では、ウイルス感染による発がん機構の解明とその制御法の開発をめざして、ウイルスと細胞の相互作用の詳細な研究をおこなっている。主な研究対象は、子宮頸がんの原因となるヒトパピローマウイルスと肝臓がんの原因となる B 型肝炎ウイルスと C 型肝炎ウイルスである。

【酒井グループ】

酒井・柳川グループはレトロウイルス研究に始まり、現在は酒井がヒトパピローマウイルス (HPV)、柳川が Wnt 経路の研究を行っている。また理学研究科より、石田薫さんが実験補助として参加している。

1) HPV に関する研究

HPV は、重層上皮組織に感染する病原ウイルスである。特に子宮頸癌発症との関連性は高く、主要な原因因子と考えられている。本年度は HPV の複製モデルを利用して、ウイルス遺伝子の役割を探ると共に、抗ウイルス剤の評価実験を行った。

2) Wnt 経路の解析

Wnt 経路は、発生や発癌に作用している分泌蛋白である。柳川は、Wnt の Co-receptor, LRP6 に結合する蛋白として Keratin associated protein 13 (Krtap13) を見だし、Krtap13 の強制発現が、Wnt 経路を活性化する事を明らかにした。組織特異的に Krtap13 を強制発現するトランスジェニックマウス系を用いて解析し、Lymphoma を誘導する事を明らかにした、現在も解析を進めている。

The research objects are the biology of human papillomavirus (HPV) and the pathway of Wnt signal. Both are involved in organ development and tumorigenesis.

1) Differentiation-specific replication of human papillomavirus (HPV)

The infectious target of HPV is the stratified epithelium, and its infection caused a variety of benign tumors. We are now investigating the biological functions of the viral genes in its replication. We are also

evaluating the antiviral activity of a novel compound with HPV replication platform.

2) Analysis of Krtap13-Induced Activation of Canonical Wnt Signaling Pathway in vivo

Keratin associated protein 13 was found to bind to LRP6, a co-receptor for Wnt. Surprisingly, Krtap13 overexpression markedly stimulates Wnt signaling. Krtap13 induces co-clustering of LRP6 and Dvls, thereby recruiting Axin to the plasma membrane that leads to activation of Wnt signaling. Transgenic mice were generated to analyze effect of overexpression of Flag-tagged Krtap in vivo.

【土方グループ】

土方グループでは、C型肝炎ウイルス（HCV）ならびにB型肝炎ウイルス（HBV）の研究を中心におこなっている。肝炎ウイルスの生活環を分子レベルで解明し、その結果をもとに抗ウイルス薬剤の開発を目指している。また、独自に樹立した正常ヒト肝由来細胞等を用いて、肝分化や肝炎ウイルス感染の研究から肝発癌などの慢性肝疾患の発症機構を明らかにするための研究をおこなっている。

1) HCVに関する研究

日本において主要なC型肝炎ウイルス（HCV）である遺伝子型1bのHCV（HCV1b）は肝発癌との関係が高いことで知られている。しかしながら、野生型HCV1b培養細胞系は未だに構築されていない。そこで野生型HCVの増殖が全遺伝子型について可能になることが報告されたSEC14L2発現細胞を樹立し、野生型HCV1bの組換え体ウイルスの培養系の開発をおこなった。

まずSEC14L2の恒常的産生量が高い細胞クローンが得られ、この細胞に全ゲノム長HCV1b RNAを導入したところ、培養液中に 10^7 copies/mlのHCV RNAが検出され、このHCVの感染性が確認された。今後、HCV感染による肝発癌機構を明らかにするための野生型HCV1bと非がん細胞との相互作用の解析に有力な研究ツールとしての利用が期待された。

2) HBVに関する研究

これまでに我々は、HBV生活環に関与する宿主因子として、脂肪酸生合成経路（FABS）がHBVの粒子産生過程に関与することを見出している。本年度はその詳細な分子機構に関して検討をおこなった。HBV産生細胞を脂肪酸生合成酵素（FAS）の阻害薬（FASi）存在下、炭素鎖数（C）や不飽和数の異なる11種類の脂肪酸（C4:0、C6:0、C8:0、C10:0、C12:0、C14:0、C16:0、C18:1、C18:2、C18:3、C20:4）で処理し、HBV産生に与える効果を評価したところ、FASi処理によって低下する細胞外HBV DNAは、C12:0からC18:1までの脂肪酸の共処理で完全にレスキューされた。またミトコンドリアの脂肪酸beta酸化の阻害剤はこの現象に全く関与しないことがわかった。このことからFABSから産生される脂肪酸がHBV産生に関与することが示唆された。現在、それらの脂肪酸がHBV産生に与える影響について、さらに詳細な検討を進めている。

The major purpose of our research group is clarification of lifecycles of human hepatitis viruses, hepatitis B virus and hepatitis C virus at the molecular level. Development of drugs against these viruses and understanding of chronic liver diseases caused by infection of these viruses are also in the scope of our research. To accomplish those aims, we are now investigating the interaction between those viruses and host cells by using several hepatitis virus culture systems including human hepatocyte derived cells system developed originally in our laboratory.

1) Development of recombinant HCV gt1b culture system hepatitis C treatment

Genotype 1b (gt1b) is a major genotype of hepatitis C virus (HCV) in Japan and known to be closely related with hepatocellular carcinogenesis. The cell culture system for wild type HCV gt1b, however, has not been developed yet. And we attempted to develop such a system by using a cell line expressing constitutively exogenous SEC14L2 gene that was reported to support the proliferation of all genotypes of HCV. After establishment of cell lines producing SEC14L2 highly, the full length RNA genome of HCV gt1b was introduced into the cells. We observed the production of HCV RNA in the culture medium at high level and confirmed the infectivity of the produced HCV. This recombinant HCV gt1b production system was expected to be an important tool for study of interaction between wild type HCV gt1b and non-cancer cells to reveal the molecular mechanism of hepatocellular carcinogenesis caused by HCV infection.

2) Fatty acids with certain carbon chain length can support hepatitis B virus production

We previously identified that fatty acid biosynthesis (FABS) is related with hepatitis B virus (HBV) lifecycle, especially in the step of viral production. We investigated precise requirement of fatty acids for HBV production by examining the suppressive effects of various saturated and unsaturated fatty acids with various carbon chain lengths on fatty acid synthase inhibitor (FASi) using HBV producing cells. And we found that the reduced level of extracellular HBV DNA by FASi treatment, was rescued by co-treatment with C12:0, C14:0 or C18:1 as C16:0 shown in previous our report, but not with C4:0, C6:0 and C8:0. Moreover, we also observed an inhibitor of mitochondrial fatty acid beta-oxidation was not contributed in this phenomenon. These results suggested that fatty acids newly synthesized by FABS could directly contribute to the HBV production in the cells.

List of Publications

Chen M., Aoki-Utsubo, C., Kameoka M., Deng L., Terada Y., Kamitani W., Sato K., Koyanagi Y., Hijikata M., Shindo K., Noda T., Kohara M., Hotta H.: Broad-spectrum antiviral agents: secreted phospholipase A2 targets viral envelope lipid bilayers derived from the endoplasmic reticulum membrane. *Sci. Rep.*, 2017, 7:15931, DOI:10.1038/s41598-017-16130-w

List of Presentations

Okamura H., Nio Y., Watashi K., Wakita T., Hijikata M.: Fatty acids with certain carbon chain length can support hepatitis B virus production. 2018 International meeting on the molecular biology of hepatitis B viruses, Washington D.C., USA, September. 3-7, 2017

Okamura H., Miyayama Y., Akahori Y., Hijikata M.: Modulation of HBV life cycle by Sulforaphane. 2018 International meeting on the molecular biology of hepatitis B viruses, Washington D.C., USA, September. 3-7, 2017

Okamura H., Nio Y., Watashi K., Wakita T., Hijikata M. : Fatty acids synthesized from cellular fatty acid synthesis pathway play roles in hepatitis B virus production. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会. 大阪 2016 年 10 月 24-26 日

Miyayama Y., Chayama H., Miki D., Imamura M., Chayama K., Hijikata M. : Development of novel recombinant HCV1b culture system. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会. 大阪 2016 年 10 月 24-26 日

ウイルス感染研究部門
Department of Virus Research

細胞制御分野
Laboratory of Cell Regulation

| | | | |
|----|-------|---------------|-------------------|
| 教授 | 杉田 昌彦 | Prof. | Masahiko Sugita |
| 助教 | 森田 大輔 | Assist. Prof. | Daisuke Morita |
| 助教 | 水谷 龍明 | Assist. Prof. | Tatsuaki Mizutani |

本分野では、脂溶性抗原を標的とした新しい免疫システム、すなわち「脂質免疫」を切り口として、感染症やがん、アレルギー病態の解明と制御をめざした研究を推進している。2017年においては、前年度の脂質化ペプチド（リポペプチド）抗原提示分子の同定に引き続き、第2のリポペプチド抗原提示分子を同定してそのX線結晶構造を解明することに成功した。また、結核菌脂質により誘起されるモルモット慢性炎症応答において、好中球由来 S100A9 タンパク質がマクロファージ極性を制御するという前年度の知見を基盤として、これをさらに追究するため S100A9 遺伝子ノックアウトマウスの作出を行い、解析を進めた。

1) 新たなリポペプチド提示分子の同定

ウイルスタンパク質には、そのN末端に脂肪酸（ミリスチン酸）修飾を受けることにより病原因子として機能するものが存在する。本分野では、アカゲザルエイズモデルを活用した研究をもとに、ミリスチン酸付加 Nef タンパク質に由来するリポペプチド断片（C14-GGAI; C14nef5）を特異的に認識する細胞傷害性T細胞の存在すること、さらに古典的MHCクラス1アレルである Mamu-B*098 がリポペプチドを結合し、T細胞に抗原提示するリポペプチド抗原提示分子として機能することを明らかにしてきた。Mamu-B*098:C14nef5 複合体のX線結晶構造解析の結果、Mamu-B*098 分子は従来知られていたMHCクラス1分子と類似した6つのポケット（A～F）からなる抗原結合構造を有していたが、疎水性の大きなBポケットと親水性の小さなFポケットが特徴的であり、それぞれミリスチン酸とセリンアンカー残基を収納する抗原結合様式の存在が明らかとなった（Fig. 1, 左）。ミリスチン酸とセリン残基は、ミリスチン酸修飾を受けるウイルス蛋白質に共通の因子であることから、リポペプチド特異的免疫応答が多くのウイルス感染症において作動する可能性が考えられた。

他方、MHCはpolymorphicであるがゆえに、Mamu-B*098が唯一のリポペプチド提示アレルであるとは考えにくい。実際、C14-GGAI（C14nef4）を特異的に認識するT細胞株を樹立し、その抗原認識の拘束因子として新たなMHCクラス1アレル（LP2）を同定した。LP2:C14nef4 複合体のX線結晶構造解析から、LP2はMamu-B*098と同様疎水性の大きなBポケットを有し、アシル鎖を収納していた。一方、LP2のFポケットのサイズはMamu-B*098より大きく、bulkyなアミノ酸であるイソロイシンがアンカー残基として機能することがわかった（Fig. 1, 右）。以上の結果は、MHCク

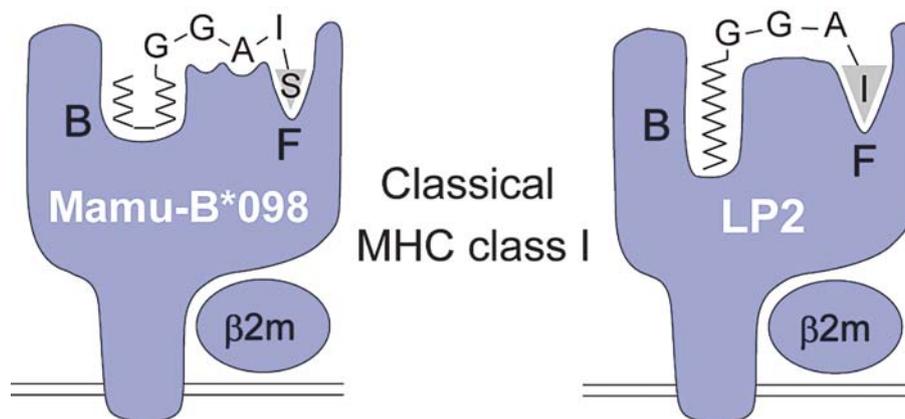


Fig. 1. Identification of two lipopeptide-presenting MHC class I alleles, Mamu-B*098 and LP2, that differentially bind N-myristoylated 5-mer and 4-mer lipopeptides, respectively, and present them to T lymphocytes.

ラス1分子にはペプチド提示サブセットとリポペプチド提示サブセットが存在する可能性を強く示唆する。

2) S100A9 ノックアウトマウスの樹立

結核菌と宿主免疫系の持続的攻防の結果として、結核に特徴的なマクロファージ集塊すなわち肉芽腫が形成される。肉芽腫の形成機序の解明は結核病態の理解と制御に極めて重要であるが、その分子・細胞機序は明確ではなかった。モルモット結核モデルを活用した当分野での最新の研究から、肉芽腫中心部にはS100ファミリー分子A9を高度に発現した好中球が存在すること、またその周辺には菌の長期生存を許容するM2タイプのマクロファージが集積することを見いだした。さらにS100A9特異的阻害剤tasquinimodを投与した動物においては、肉芽腫サイズが縮小するとともに、肉芽腫傍中心部のM2マクロファージ極性化が阻害されることを発見した。以上の結果は、これまで急性炎症において主要な役割を担うと考えられていた好中球が、S100A9を介してM2マクロファージ極性化を誘導し、慢性炎症の質とマグニチュードを規定している可能性を示唆した。そこで、この炎症病態をマウスにおいて再現し、さらにその分子論を明快に論じるため、今年度S100A9ノックアウトマウスの作出を行った。CRISPR/Cas9技術を用いてノックアウト系統を樹立し、骨髄細胞においてS100A9タンパク質発現が失われていること、また脾臓好中球においてS100A9タンパク質の発現が失われていることを確認した (Fig. 2)。

This laboratory aims to establish the molecular and cellular basis underlying what we call “lipid immunity”, a collection of multiple immune pathways directed against lipid antigens. In 2017, we identified the novel lipopeptide-presenting molecule, LP2, that was capable of binding N-myristoylated 4-mer lipopeptides, and determined its X-ray crystallographic structure. We also addressed how lipid immunity may impact on tissue responses and discovered a novel role of neutrophils and their S100A9 protein in

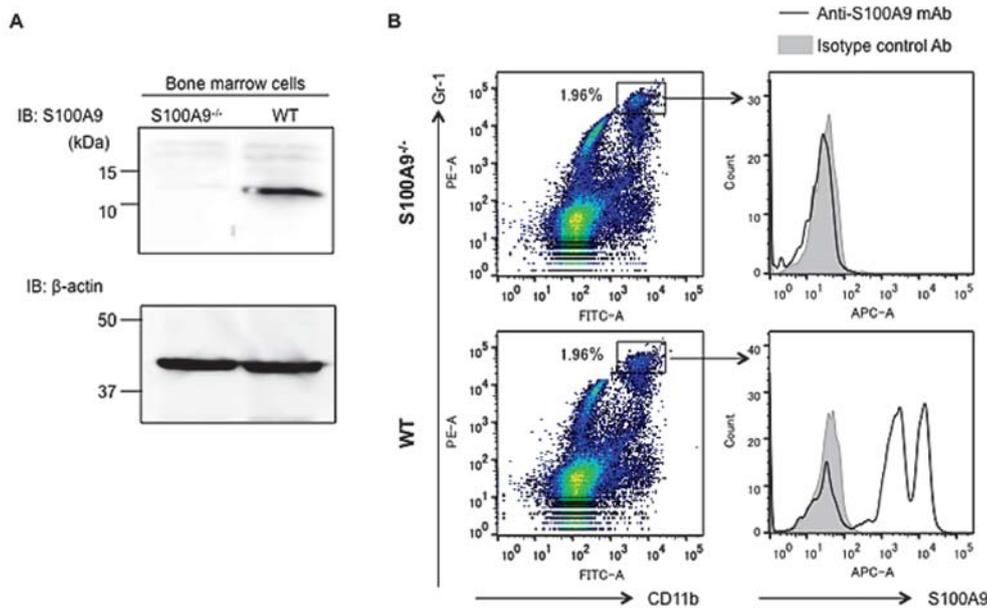


Fig. 2. Loss of S100A9 protein expression in the bone marrow (A) and splenic neutrophils (B) of S100A9 knockout mice.

tuberculosis-associated chronic inflammation. In order to facilitate this study, we have successfully established S100A9 knockout mice by the use of the CRISPR/Cas9 technology.

1) Identification of a novel lipopeptide-presenting molecule

Some viral proteins require N-myristoylation to function. By utilizing the rhesus AIDS model, we have previously demonstrated that T cells existed with the potential to specifically recognize N-myristoylated Nef lipopeptides. Furthermore, we identified the MHC class I allele, Mamu-B*098, as a restriction element controlling the presentation of N-myristoylated 5-mer lipopeptides to T cells (Fig. 1, left). Nevertheless, because of the high level of polymorphism noted for MHC molecules, we predicted that Mamu-B*098 may not be the sole allele capable of mediating lipopeptide presentation. Indeed, we showed this year that another classical MHC class I allele, termed LP2, was able to bind N-myristoylated 4-mer lipopeptides and present them to T cells. An X-ray crystallographic analysis of LP2 revealed the large, hydrophobic B pocket and the unique F pocket, which accommodated the myristate moiety and the C-terminal isoleucine residue, respectively (Fig. 1, right). Taken together, these observations indicate that the acquired immunity has evolved two functionally separate MHC class I subsets, one mediating peptide presentation and the other mediating lipopeptide presentation.

2) A novel function of neutrophils and the S100A9 protein in chronic inflammation

As a result of persistent interactions between mycobacteria and host immunity, globular aggregations of macrophages, termed granulomas, are constructed in tuberculosis. Using the guinea pig model of human tuberculosis, we detected a cluster of S100A9-expressing neutrophils at the core of granulomas, which was

surrounded by M2 type macrophages. The S100A9 inhibitor, tasquinimod, potently suppressed the granuloma formation and the M2 polarization. To extend these observations further, we successfully established S100A9 knockout mice, in which the expression of the S100A9 protein was shown to be abrogated in the bone marrow and in splenic neutrophils (Fig. 2).

List of Publications

藤原永年、杉田昌彦 (2017). 結核菌脂質の特徴と機能 結核 (改訂版) (光山正雄、鈴木克洋編) 98-121.

水谷龍明、杉田昌彦 (2017). 肉芽腫形成を制御する S100A9 陽性好中球 医学のあゆみ 263, 671-672.

List of Presentations

Ano, T., Mizutani, T., Yoshioka, Y., Morita, D., and Sugita, M. A new aspect of neutrophil-macrophage interactions in chronic inflammation. The 15th International Student Seminar. Kyoto, February 23-24, 2017.

Yoshioka, Y., Mizutani, T., Morita, D., and Sugita, M. Neutrophils and the S100A9 protein critically regulate granuloma formation. The 15th International Student Seminar. Kyoto, February 23-24, 2017.

Shima, Y., Morita, D., and Sugita, M. Lipopeptides and phospholipids comprise a novel antigen repertoire presented by classical MHC class I molecules. 12th International Symposium of the Institute Network. Tokyo, November 28-29, 2017.

水谷龍明 結核肉芽腫形成を制御する好中球と S100A9 の役割 北海道大学遺伝子制御学研究所 「感染、免疫、がん、炎症」研究集会、札幌、2017年3月13-14日

水谷龍明、吉岡佑弥、大内結貴、森田大輔、杉田昌彦 結核肉芽腫形成を制御する好中球機能の解明 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (第40回日本分子生物学会、第90回日本生化学会)、神戸、2017年12月6-9日

免疫制御分野
Laboratory of Immune Regulation

| | | | |
|----|-------|---------------|---------------|
| 教授 | 生田 宏一 | Prof. | Koichi Ikuta |
| 助教 | 原 崇裕 | Assist. Prof. | Takahiro Hara |
| 助教 | 崔 広為 | Assist. Prof. | Guangwei Cui |

2017年3月に阿部真也と小川真が医学研究科大学院修士課程を修了し修士の学位を取得し、小川真は就職した。4月に阿部真也が医学研究科大学院博士課程に進学し、岡崎史恵が医学研究科大学院修士課程に入学し、榛葉旭恒は研究員に就任した。したがって、免疫制御分野は現在、教授1名、助教2名、研究員1名、大学院生4名、学部生2名の総勢10名となっている。

本分野では、造血幹細胞からの免疫系細胞の初期分化の分子機構、および免疫応答の制御機構を解明することを通じ、細胞分化の普遍的な原理を明らかにすることを目指している。特に、インターロイキン7レセプター (IL-7R) の免疫系における機能、IL-7によるT細胞抗原受容体遺伝子の制御、IL-7Rの発現制御、IL-7とIL-15産生細胞の可視化と機能解析を中心に研究を進めている。本年の研究成果を以下に記載する。

1) グルココルチコイドによるIL-7Rの発現とT細胞の体内分布の制御

内分泌系はホルモンによって生体の恒常性を制御しているが、免疫系にも影響を与えることが知られている。グルココルチコイド (GC) は副腎皮質から産生される免疫抑制効果をもつステロイドホルモンである。我々は、T細胞においてグルココルチコイド受容体 (GR) がIL-7R α 遺伝子のエンハンサーに結合して転写を活性化することを示してきた。しかし、生体内のGCがIL-7Rの発現を制御しているのかどうか、また、その免疫学的な意義は不明のままである。この問題を明らかにするために、IL-7R α 遺伝子エンハンサーのGR結合モチーフに点突然変異を導入した、IL-7R-GRmマウスを作製し解析した。マウスの血中のGC濃度は夜に高く昼に低い。まず、正常マウスT細胞のIL-7R発現レベルも夜に高く昼に低い日内変動を示したが、IL-7R-GRmマウスではこの変動が消失していた。また、CD4Cre GRcKOマウスでも同様の結果を示した。さらに、正常マウスでは脾臓のT細胞数が夜に増加し昼に減少する一方、末梢血中では逆に昼に増加し夜に減少した。これに対し、上記の二種類の変異マウスではT細胞数の日内変動が見られなかった。また、正常マウスでは脾臓へのホーミングに必要なCXCR4の発現レベルがIL-7Rと同様の日内変動を示したが、二種類の変異マウスではその変動が消失していた。以上の結果から、GCはIL-7RとCXCR4の発現を誘導することで、T細胞の体内動態を制御していることが示された。

1) Glucocorticoids drive diurnal changes in T cell distribution via IL-7R expression

The immune system is affected by steroid hormones. Glucocorticoids are a group of steroid hormones with strong immunosuppressive effects and widely used in clinical practice. However, whether glucocorticoids physiologically control homeostasis and response of the immune system remains unclear. To investigate whether glucocorticoids regulate T cell homeostasis and function by regulating IL-7R expression, we analyzed IL-7R α enhancer GRE mutant and T cell-specific GR-deficient mice. We found that glucocorticoid receptor upregulated IL-7R expression in T cells by binding to the enhancer of the IL-7R locus, and the induction followed circadian rhythm consistent with circadian change of glucocorticoid production. The circadian regulation of IL-7R supported T cell redistribution between spleen and blood by controlling the expression of a chemokine receptor, CXCR4. CXCR4 upregulation induced T cell migration to CXCL12-positive area in spleen. Our results reveal immunoenhancing role of glucocorticoids in controlling the distribution of T cells, and provide insights how the immune function is influenced by circadian rhythm.

List of Publications

Nakamizo, S., Honda, T., Adachi, A., Nagatake, T., Kunisawa, J., Kitoh, A., Otsuka, A., Dainichi, T., Nomura, T., Ginhoux, F., Ikuta, K., Egawa, G., and Kabashima, K. (2017). High fat diet exacerbates murine psoriatic dermatitis by increasing the number of IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells. *Sci. Rep.* 7, 14076.

原崇裕(2016). IL-7 産生細胞の可視化と機能 —多能性造血前駆細胞からリンパ球までの分化を方向づける骨髄 IL-7 ニッチの同定 医学のあゆみ 261, 1060-1064.

谷一靖江(2016). 胸腺と末梢の T 細胞における IL-7 レセプターの機能 医学のあゆみ 261, 1065-1071.

List of Presentations

Shimba, A., and Ikuta, K. Glucocorticoids drive circadian changes in T-cell homing and response via IL-7 receptor. Immunology 2017 (AAI). Washington D.C., May 15, 2017.

Tani-ichi, S., and Ikuta, K. IL-7R α signaling upregulates growth hormone signaling-related gene in naive T cells. Keystone Symposium: Integrating Metabolism and Immunity. Dublin, June 1, 2017.

Ikuta, K. Roles of IL-7 in development and response of the immune system. The 11th International Symposium of the Institute Network. Tokushima, January 27, 2017.

Hara, T., and Ikuta, K. Identification of bone marrow IL-7 niche critical for B lymphopoiesis. KTCC 2017. Kyoto, March 15-17, 2017.

Cui, G., Shimba, A., Tani-ichi, S., Hara, T., and Ikuta, K. Competitive signaling between STAT5 and PI3K of IL-7R modulates T cell development and homeostasis in vivo. KTCC 2017. Kyoto, March 15-17, 2017.

Shimba, A., Cui, G., Tani-ichi, S., Hara, T., and Ikuta, K. Regulation of IL-7 receptor expression by a

proximal enhancer. KTCC 2017. Kyoto, March 16, 2017.

生田宏一 Glucocorticoids drive diurnal homing and response of T cells via IL-7R expression 東京理科大学生命医科学研究所セミナー 野田、2017年8月2日

Terashima, A., Okamoto, K., Nakashima, T., Ikuta, K., and Takayanagi, H. Osteoblasts mediate immunosuppression during sepsis by regulating lymphopoiesis. The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society. Kanazawa, October 29 — November 2, 2017.

岡崎史恵、榛葉旭恒、崔広為、生田宏一 グルココルチコイドは IL-7 受容体の発現を介して T 細胞の体内分布および活性化の日内変動を制御する ConBio2017 (生命科学系学会合同年次大会) 神戸、2017年12月6日

Shimba, A., Cui, G., and Ikuta, K. Glucocorticoids drive diurnal changes in distribution and response of T cells via IL-7 receptor expression 第46回日本免疫学会学術集会、仙台、2017年12月14日

Cui, G., Shimba, A., Zhu, Y., Tani-ichi, S., Hara, T., and Ikuta, K. Competition between STAT5 and PI3K of the IL-7R modulates T cell and type 2 ILC development in vivo、第46回日本免疫学会学術集会、仙台 2017年12月14日

Tani-ichi, S., and Ikuta, K. Exploring the signals upregulating IL-7R α expression via NF κ B activation in T cells 第46回日本免疫学会学術集会、仙台、2017年12月14日

ウイルス感染研究部門
Department of Virus Research

感染防御分野
Laboratory of Infection and Prevention

| | | | |
|----|-------|---------------|----------------|
| 教授 | 竹内 理 | Prof. | Osamu Takeuchi |
| 助教 | 三野 享史 | Assist. Prof. | Takashi Mino |
| 助教 | 植畑 拓也 | Assist. Prof. | Takuya Uehata |

本分野では、自然免疫の観点から炎症の惹起・調節に関わる分子メカニズムの研究を行っている。特に、遺伝子改変マウスの作製および解析と分子生物学的な手法によって研究を進め、炎症を制御しているシグナル伝達や転写後調節の解明を試みている。2017年の成果および研究活動は以下の通りである。

Regnase-1 と Roquin は個別に Th1 分化を制御し、心臓における炎症と線維化を抑制する

獲得免疫細胞である T 細胞の異常な活性化は、自己免疫疾患などの発症につながることから、その活性は、さまざまな機構で厳密に制御されている。中でも、免疫細胞活性化に関わるタンパク質をコードする mRNA の量は、その分解により厳密に制御され、T 細胞の活性化を調節している。免疫細胞の活性化に関わる mRNA 分解を調節する蛋白質として Regnase-1 と Roquin が同定され、これらの分子による免疫制御の分子機構が詳細に研究されてきた。Regnase-1 はインターロイキン 6 を始めとした免疫応答に関連する分子をコードする mRNA を分解する RNA 分解酵素であり、マウスにおいて自己免疫疾患発症の抑制に重要である。これに対し、Roquin は、直接の RNA 分解酵素活性は持たないが、脱アデニル化酵素と結合することで、同様に免疫応答に関わる mRNA を分解し、免疫応答を抑制していることが知られている。マクロファージなどの自然免疫細胞では、Regnase-1 と Roquin は、炎症に関わる共通の mRNA を異なる機構で分解し、炎症を調節する。しかし、T 細胞における Regnase-1 と Roquin の関係性は不明であった。

本研究では、T 細胞において Regnase-1 と Roquin を欠損するマウスを作製、解析することで、Regnase-1 と Roquin による T 細胞の活性化抑制機構を解析した。T 細胞において Regnase-1 と Roquin の両遺伝子を欠損する (DKO) マウスは、Regnase-1 や Roquin のそれぞれを単独に欠損するマウスと比較して、より重篤な全身性の炎症を呈し、特に心臓における強い炎症や線維化を発症した。DKO マウスでは心臓において、コラーゲンなどの線維化に関連する遺伝子や、Th1 マーカーであるインターフェロン γ 遺伝子の発現がコントロール群と比較して上昇していた。DKO マウスでは、脾臓 T 細胞においても、Th2 や Th17 細胞と比較して、Th1 細胞が著明に増加しており、Regnase-1 と Roquin が Th1 分化を抑制することで心臓の炎症を制御していることが示唆された。Transcriptome 解析により、DKO 細胞ではインターフェロン γ 遺伝子を始めとする Th1 遺伝子発現が亢進することを明らかにした。Regnase-1 と Roquin は、Th1 関連遺伝子の中で、*Furin* や *Il12rb1*などをコードす

る mRNA の分解を誘導しており、これにより Th1 分化を抑制することが示唆された。ヒト T 細胞株である Jurkat 細胞で CRISPR/Cas9 システムを用いて Regnase-1 と Roquin の両遺伝子を欠損させた場合にも、*FURIN* や *IL12BR1*, インターフェロン- γ 遺伝子発現の増加を認め、ヒトにおいても Regnase-1 と Roquin は共通の標的 mRNA を個別の機構で抑制していることが示唆された。これまで、Regnase-1 が自身をコードする mRNA を標的として分解し、Regnase-1 自身の蛋白質発現を制御していることが知られている。そこで、Regnase-1 と Roquin 間の相互抑制の可能性について検討した。その結果、Regnase-1 は *Roquin* mRNA を分解し、Regnase-1 欠損下では *Roquin* の発現が上昇すること、しかしその逆は認めないという一方向性の制御関係にあることが明らかとなった。これらの結果は、Regnase-1 と Roquin という RNA 結合蛋白質が同じ mRNA を個別の機構で分解することで、T 細胞活性化を制御し、個体レベルで過剰な免疫応答を抑制していることを示している。

The research projects carried out in this group are aiming to uncover the molecular mechanisms of the regulation of inflammation in innate immunity. Since inflammation is mediated by the production of proinflammatory cytokines, we are studying the cytokine gene expression at the transcriptional and posttranscriptional levels.

Regnase-1 and Roquin non-redundantly regulate Th1 differentiation causing cardiac inflammation and fibrosis

Post-transcriptional regulation is critical for the control of both innate and adaptive immunity. Many immune-related mRNAs have short half-lives because of conserved *cis*-elements, including AU-rich elements and stem-loop structures in their 3' untranslated regions (3' UTRs). Regnase-1 (also known as MCPIP1 and Zc3h12a) and Roquin-1/-2 (known as Rc3h1/2) are RNA binding proteins that are important for degradation of inflammatory mRNAs by recognizing stem-loop structures and maintenance of immune homeostasis.

Although deficiency of either of the proteins leads to enhanced T cell activation, their functional relationship in T cells has yet to be clarified due to lethality upon mutation of both Regnase-1 and Roquin. By using a Regnase-1 conditional allele, we here show that mutations of both Regnase-1 and Roquin in T cells leads to massive lymphocyte activation. In contrast, mutation of either Regnase-1 or Roquin affected T cell activation to a lesser extent than the double mutation, indicating that Regnase-1 and Roquin function non-redundantly in T cells. Interestingly, Regnase-1 and Roquin double mutant mice suffered from severe inflammation and early formation of fibrosis, especially in the heart along with the increased expression of *Ifng*, but not *Il4* or *Il17a*. Consistently, mutation of both Regnase-1 and Roquin leads to a huge increase in the Th1, but not Th2 or Th17 population in spleens compared to T cells with either a single Regnase-1 or Roquin deficiency. Regnase-1 and Roquin are capable of repressing the expression of a group of mRNAs encoding factors involved in Th1 differentiation, such as *Furin* and *Il12rb1* via their 3' UTRs. Moreover, Regnase-1 is capable of repressing *Roquin* mRNA. This cross-regulation may contribute to the synergistic control of T cell activation/polarization. Collectively, our results demonstrate that Regnase-1 and Roquin maintain T cell

immune homeostasis and regulate Th1 polarization synergistically

List of Publications

- Yoshinaga, M., Nakatsuka, Y., Vandenbon, A., Ori, D., Uehata, T., Tsujimura, T., Suzuki, Y., Mino, T., Takeuchi, O. (2017). Regnase-1 maintains iron homeostasis via the degradation of transferrin receptor 1 and prolyl hydroxylase domain-containing protein 3 mRNAs. **Cell Reports** 19, 1614–1630.
- Kozaki, T., Komano, J., Kanbayashi, D., Takahama, M., Misawa, T., Satoh, T., Takeuchi, O., Kawai, T., Shimizu, S., Matsuura, Y., Akira, S., Saitoh, T. (2017). Mitochondrial damage elicits a TCDD-inducible poly (ADP-ribose) polymerase-mediated antiviral response. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 114, 2681–2686.
- Cui, X., Mino, T., Yoshinaga, M., Nakatsuka, Y., Hia, F., Yamasoba, D., Tsujimura, T., Tomonaga, K., Suzuki, Y., Uehata, T., Takeuchi, O. (2017). Regnase-1 and Roquin Nonredundantly Regulate Th1 Differentiation Causing Cardiac Inflammation and Fibrosis. **J. Immunol.** 199, 4066–4077.
- Tartey, S., Takeuchi, O. (2017). Pathogen recognition and Toll-like receptor targeted therapeutics in innate immune cells. **Int. Rev. Immunol.** 36, 57–73.
- Yamashita, A., Takeuchi, O. (2017). Translational control of mRNAs by 3'-untranslated region binding proteins. **BMB Reports** 50, 194–200.
- Uehata, T., Takeuchi, O. (2017). Regnase-1 Is an Endoribonuclease Essential for the Maintenance of Immune Homeostasis. **J. Interferon Cytokine Res.** 37, 220–229.
- Takeuchi, O. (2017). Endonuclease Regnase-1/Monocyte chemoattractant protein-1-induced protein-1 (MCPIP1) in controlling immune responses and beyond. **Wiley Interdiscip Rev. RNA**. DOI: 10.1002/wrna.1449.
- Mino, T., Takeuchi, O. (2017). NSD3 keeps IRF3 active. **J. Exp. Med.** 214, 3475–3476.

List of Presentations

- Takeuchi, O. Short talk: spatiotemporal regulation of inflammatory mRNAs in innate immune responses. Keystone Symposia. Banff, Canada, March 19–23, 2017.
- 竹内理 mRNA 分解の時空間制御による免疫応答調節機構 第 70 回日本細胞生物学会大会, 仙台, 2017 年 6 月 13–15 日 .
- Takeuchi, O. Regulation of inflammatory mRNAs via an endonuclease Regnase-1. 13th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society. Bordeaux, France, September 24–27, 2017.
- Takeuchi, O. Posttranscriptional control of pro-inflammatory cytokine expression by Regnase-1 and Roquin. Cytokines 2017. Kanazawa, Japan, October 29–November 2, 2017.

- Mino, T. Post-transcriptional regulation of inflammation-related mRNAs by Regnase-1. The 12th International Symposium of the Institute Network -Driving Next-Generation Medicine: the Spirit of Pioneering Discovery in Medical Science-. Tokyo, Japan, November 28–29, 2017.
- Chong, Y.K., Tartey, S., Takeuchi, O. Deciphering the role of Cyclin J in regulation of inflammation. 15th International Student Seminar. Kyoto, Japan, February 23–28, 2017.
- 若林敦子, 竹内理 TANK は STING シグナルを介し Pristane による肺胞出血を制御する 第3回日本骨免疫学会, 沖縄県石垣市, 2017年6月27–29日.
- 山嵜大智, 竹内理 新規 RNA 分解酵素による HIV 感染抑制機構の解明 第20回 Summer Retrovirus Conference, 熊本県阿蘇郡, 2017年6月29–30日.
- 吉永正憲, 三野享史, 竹内理 Regnase-1 は鉄代謝関連の mRNA を分解することで鉄恒常性を維持する 第19回日本 RNA 学会年会, 富山県富山市, 2017年7月19–21日.
- Yamasoba, D., Sato, K., Uehata, T., Mino, T., Koyanagi, Y., Takeuchi, O. Identification of an interferon inducible RNA binding protein as a restriction factor of HIV-1. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Osaka, Japan, October 24–26, 2017.
- Nakatsuka, Y., Mino, T., Yoshinaga, M., Uehata, T., Sato, A., Handa, T., Chin, K., Hirai, T., Takeuchi, O. Pulmonary Regnase-1 functions as a posttranscriptional switch in anti-bacterial immunity. The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society. Kanazawa, Japan, October 29–November 2, 2017.
- Yamasoba, D., Sato, K., Uehata, T., Mino, T., Koyanagi, Y., Takeuchi, O. Identification of a novel HIV-1 restriction factor which selectively degrades viral transcripts. 18th Kumamoto AIDS seminar. Kumamoto, Japan, October 30–November 1, 2017.
- 山田信之輔, 織大祐, 宮崎正輝, 植畑拓也, 竹内理 Regnase-1, Zc3h12c はリンパ球分化の最も早い段階で細胞運命を制御している RNA フロンティアミーティング 2017, 滋賀県大津市, 2017年11月8–10日.
- 岩井紀貴, 三野享史, 竹内理 内因性抗原提示における Regnase-1 の役割 RNA フロンティアミーティング 2017, 滋賀県大津市, 2017年11月8–10日.
- Wakabayashi, A., Takeuchi O. TANK prevents Pristane-induced alveolar hemorrhage by suppressing STING signaling. Consortium of Biological Sciences (ConBio) 2017. Kobe, Japan, December 6–9, 2017.
- Yoshinaga, M., Mino, T., Takeuchi, O. Regnase-1 maintains iron homeostasis via the destabilization of iron-regulatory transcripts. Consortium of Biological Sciences (ConBio) 2017. Kobe, Japan, December 6–9, 2017.
- Yamasoba, D., Sato, K., Uehata, T., Mino, T., Koyanagi, Y., Takeuchi, O. Identification of a novel HIV-1 restriction factor which selectively degrades viral transcripts. 2017 Annual Meeting of Japanese Society

for Immunology. Sendai, Japan, December 12–14, 2017.

Cui, X., Mino, T., Yoshinaga, M., Uehata, T., Nakatsuka, Y., Takeuchi, O. Interactions between Regnase-1 and Roquin Regulate Helper T Cell Polarization. 2017 Annual Meeting of Japanese Society for Immunology. Sendai, Japan, December 12–14, 2017.

Iwai, N., Mino, T., Takeuchi, O. Regulation of Regnase-1-mediated mRNA decay by SMG1 inhibitor. 15th International Student Seminar. Kyoto, Japan, February 23–28, 2017.

Yamada, S., Ori, D., Miyazaki, M., Uehata, T., Takeuchi, O. Ribonucleases Regnase-1 and Zc3h12a are critical for B cell differentiation. 15th International Student Seminar. Kyoto, Japan, February 23–28, 2017.

Michisaka, S., Uehata, T., Takeuchi, O. Pertussis toxin triggers degradation of Regnase-1 in the course of autoimmune neuroinflammation. 15th International Student Seminar. Kyoto, Japan, February 23–28, 2017.

Yamasoba, D., Sato, K., Koyanagi, Y., Takeuchi, O. Identification of candidate restriction factors for the HIV infection. Cold Spring Harbor Meeting, RETROVIRUSES. New York, USA, May 22–27, 2017.

Hia, F., Takeuchi, O. Exploring the RNA regulational landscape via codon optimality. The 19th RNA meeting of the RNA Society of Japan. Toyama, Japan, July 19–21, 2017.

Mino, T., Iwai, N., Akaki, K., Yamashita, A., Takeuchi, O. SMG1 regulates inflammatory mRNAs through Regnase-1-mediated mRNA decay. The 19th RNA meeting of the RNA Society of Japan. Toyama, Japan, July 19–21, 2017.

Mino, T., Takeuchi, O. Regnase-1 regulates inflammation-related mRNAs during pioneer rounds of translation. 2017 Annual Meeting of Japanese Society for Immunology. Sendai, Japan, December 12–14, 2017.

細胞機能調節学分野
Laboratory of Molecular and Cellular Biology

| | | | |
|-----|-------|---------------|-----------------|
| 准教授 | 細川 暢子 | Assoc. Prof. | Nobuko Hosokawa |
| 講師 | 平芳 一法 | Sr. Lect. | Ippou Hirayoshi |
| 助教 | 藤本 真慈 | Assist. Prof. | Shinji Fujimoto |

本分野では、3つのグループが独立した研究を行っている。

1) タンパク質の品質管理機構（細川 G）

当研究グループでは、哺乳類細胞におけるタンパク質品質管理機構の研究を行っている。細胞の中で生合成されたタンパク質が機能するためには、細胞内に存在するシャペロンタンパク質などの助けを借りて正しい高次構造を形成する必要がある。小胞体に存在する、SDF2 およびそのホモログである SDF2L1 はいずれも分子量約 25 kDa の比較的小さなタンパク質で、SDF2 は恒常的に発現しており、SDF2L1 は小胞体ストレスによって発現が強く誘導される。機能はよくわかっていなかったが、私たちはこれらのタンパク質が小胞体シャペロンタンパク質 ERdj3 と複合体を形成することを見いだした (Fig. 1)。小胞体には、BiP という代表的なシャペロンタンパク質が存在し、タンパク質品質管理の中心的役割を担っている。ERdj3 は BiP に基質タンパク質を受け渡したり、ATP 水解機能を促進したりすることによって BiP シャペロンサイクルを調節しているが、SDF2 および SDF2L1 は ERdj3 との結合を介して、このシャペロンサイクルでの基質の受け渡しや、ミスフォールドしたタンパク質の凝集体形成を抑制していることを示すことができた (Fig. 1)。

引き続き SDF2 および SDF2L1 の結晶構造解析を行い、構造に基づいた機能解析を進めるとともに、ミスフォールドした糖タンパク質の分解を促進する EDEM タンパク質の機能解析や、小胞体関連分解 (ERAD) を担う膜複合体の解析、小胞体タンパク質の新規機能の検索、タンパク質の細胞内輸送メカニズムを可視化して検討する、といったテーマについても研究を進めている。

2) 本研究グループは、①真核生物における転写制御機構の解析、②コラーゲン分子の機能解析を目的に、標的分子の機能解析ツールとして

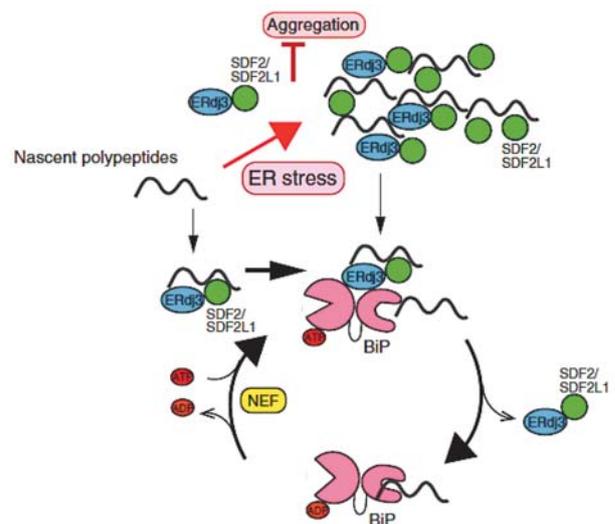


Fig. 1. SDF2 and SDF2L1 prevent aggregation formation in the ER

RNA aptamer (立体構造を介して標的分子に特異的に結合し、その機能を阻害する人工 RNA 分子) を用いた研究を展開している。(平芳 G)

①真核生物における転写制御機構の解析

真核生物の遺伝子が特定の時期や特定の刺激に応じて発現する過程には、様々な分子的事象が関わっている。すなわち、ヌクレオソームリモデリング、様々な転写活性化因子の結合および転写開始複合体の形成、転写開始、そして伸長反応である。これら一連の過程のスムーズな進行には、多くの因子の協調的作用と、それを統合する仕組みの存在が想定される。ショウジョウバエの hsp70 遺伝子をモデルシステムとして、その仕組みの解明に取り組んでいる。

多くの因子の振る舞いを指揮する分子として、我々はショウジョウバエ GAF に注目した。この因子はこれまでに上記の過程のいくつかの段階に関わっていることが報告されている。この分子の機能を、GAF 特異的 RNA aptamer により解析し、GAF が、①プロモーターの GAF 結合配列依存的な転写開始複合体形成段階での調節と② GAF 結合配列非依存的な転写開始後段階での調節に関わっていることを明らかにした。

GAF は転写各段階の転写装置の中で、他のどのような因子と協調しながら適時な転写活性化を司っているのか？ その仕組みはどのようなものか？を解明するため、研究を進行中である。

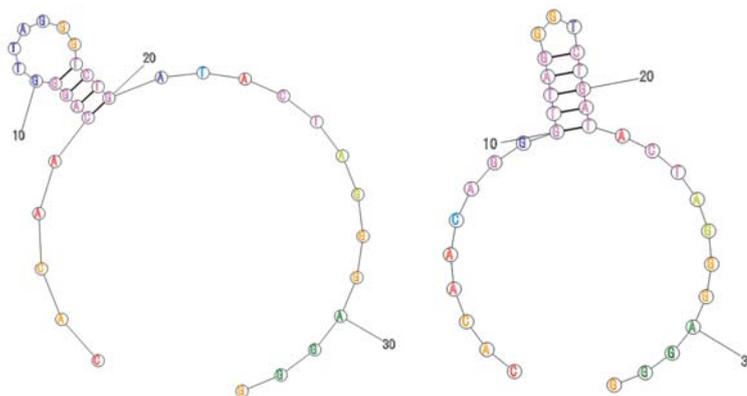


Fig. Predicted secondary structure of GAF specific RNA aptamers

②コラーゲン分子の機能解析

コラーゲン分子は生体の構造維持をはじめ様々な反応の足場として機能する繊維状タンパク質である。その機能解析には抗体のような特異的阻害剤が必要だが、種間の保存度が高いコラーゲンは免疫原性が低く、特異性の高い抗体を作成するのは難しい。

我々はコラーゲンに対する特異的阻害剤の候補として RNA aptamer の選別に取り組んでいる。繊維状タンパク質に対する RNA aptamer の選別はこれまでに報告されていないが、現在、選別を進めているところである。これによりコラーゲン特異的な阻害物質を得ることができれば、生体におけるコラーゲン分子の機能解析ツールとして、極めて有用なものとなるだろう。

3) 正常な T 細胞分化過程で低頻度ながらもおきている T 細胞レセプター β 鎖遺伝子内の非正統的な V(D)J 組換えと発がんとの関連性の解析を行っている。(藤本 G)

非正統的な T 細胞レセプター β 鎖遺伝子 (*Tcrb*) V(D)J 組換え

Tcrb の V(D)J 組換えは、両方の allele で D-J 再構成がおこった後に、どちらか一方の allele で V-DJ

再構成が開始される。すなわち、Jセグメントと組換えられていないDセグメントが単独でVセグメントと再構成することは、可能ではあるけれども実際にはおこらないとされてきた。しかしながら、V14とD1J間の hybrid joint (HJ) を解析する過程で、V14と単独のD1が非正統的に組換えられた構造を正常胸腺から検出した。この構造の生成過程は、以下のように説明可能である (Fig. 3)。

1. D1-J間の再構成に伴い、23RSS(D1) signal end (SE) と J coding end (CE) 間で非正統的な組換え産物である HJ が形成される。
2. RAG complex にとどまった 12RSS(J) が 23RSS(V14) を新たに捕獲する。
3. 正常に 12RSS(J) SE と 23RSS(V14) SE 間で signal joint (SJ) が、D1 CE と V14 CE 間で coding joint (CJ) がそれぞれ生じる。この結果、CJを含む構造は染色体上に残るが、HJとSJは染色体外に切り出されてしまう。興味深いことに、HJがより頻繁に生じる ATM 欠損胸腺においては、この非正統的な構造の検出頻度が下がっていた。

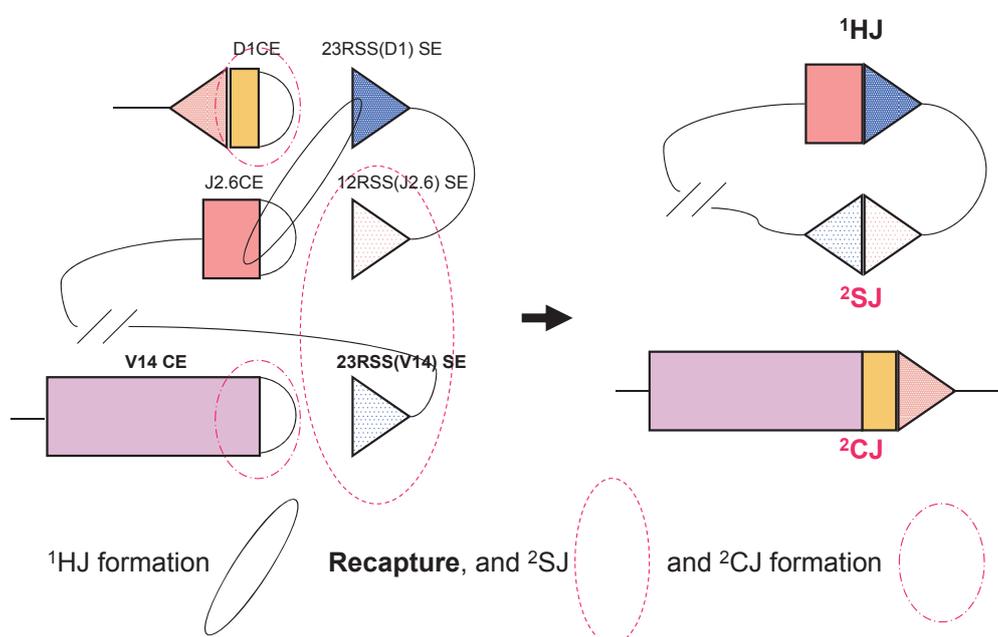


Fig. 3. HJ formation, then recapture, and normal SJ and CJ formation

This laboratory consists of three independent research groups.

1) Protein quality control mechanism (Hosokawa G)

In the living organisms, newly synthesized proteins obtain their native conformations by the assistance of chaperone proteins and folding enzymes. SDF2 and its homologue SDF2L1 are ER resident proteins of about 25 kDa in size. SDF2 is constitutively expressed, whereas the expression of SDF2L1 is greatly up-regulated by the ER stress, however, their functions remain elusive. We have found that both SDF2 and SDF2L1 make a stoichiometric complex with ERdj3 (Fig. 1). BiP is the major chaperone protein in the ER, assisting and regulating the protein quality control. ERdj3 is a co-chaperone of BiP that regulates the BiP chaperone cycle by transferring unfolded proteins and enhancing the ATPase activity of BiP. We have found that SDF2 and

SDF2L1 assist the substrate transfer from ERdj3 to BiP, and prevent the aggregation of misfolded proteins in the ER (Fig. 1). We are analyzing the crystal structures of SDF2 and SDF2L1, and performing other researches on the molecular mechanisms of EDEM proteins that enhance the ERAD of misfolded glycoproteins, HRD1-SEL1L membrane complex that regulates the ER-associated degradation, novel functions of ER proteins, and the intracellular transport mechanism of proteins.

2) Our research aims are ① the investigation of eukaryotic gene expression mechanisms and ② the functional analysis of collagen molecules using RNA aptamers, artificial RNA molecules selected from random RNA pools, as target-specific inhibitors. (**Hirayoshi G**)

① The investigation of eukaryotic gene expression mechanisms

Transcription is a core process of various biological phenomena. Transcription is closely regulated by a variety of factors including general transcription factors and the chromatin-related factors, which cooperate with each other. To clarify how these factors interact with and regulate the function of other factors in the transcription apparatus will lead to a deeper understanding of biological phenomena at a molecular level.

We tried to select RNA aptamers against *Drosophila* GAF and succeeded in obtaining several kinds of domain-specific inhibitor. Using aptamers, we got new insights into transcription regulation mechanisms. GAF, even on naked DNA template, plays important roles in transcription, which consist of two kinds of mechanism; one, at the initiation process, is dependent on the GAGA element of the promoter region and the other, after the initiation, is GAGA element independent manner. As shown above RNA aptamers are powerful tools to probe the function of transcription factors. We will step forward to identify factors that interact with GAF in transcriptional machinery and clarify the mechanisms of eukaryotic gene expression.

② The functional analysis of collagen molecules

Collagen molecules are fiber-protein and have several functions such as the contribution of structural integrity of organisms or scaffolds of various biological reactions. The specific inhibitors such as antibodies are necessary to probe these function, but, because collagens are highly conservative between species so that the immunogenicity is very low, it is difficult to get such kinds of inhibitory molecules.

We now try to sort RNA aptamers which binds specifically to collages. The selection of RNA aptamers for the fiber-protein has not been reported so far. If we are succeed in getting the collagen specific inhibitors, they would be extremely useful as a functional analytical tools of collagen molecules in the living body.

3) Analysis of illegitimate V(D)J recombination, which occurs at a very low frequency within T cell receptor β chain gene, during normal T cell development in relation to tumorigenicity (**Fujimoto G**).

Analysis of non-canonical *Tcrb* V(D)J recombination

Tcrb assembly is distinctively ordered; D to J recombination precedes rearranging V gene segments. Hence

free D segment is not supposed to combine with V, nevertheless structurally possible. Interestingly enough, we found an illegitimate construct in which D1 is directly connected to V14 from normal thymocytes when analyzing hybrid joints (HJs) between V14 and D1J. The construct can be explained as follows: 1. A non-canonical hybrid joint is formed between 23RSS (D1) signal end (SE) and J coding end (CE) in association with D1-J rearrangement. 2. RAG complex still holding 12RSS (J) recaptures 23RSS (V14). 3. Then signal joint (SJ) between 12RSS (J) SE and 23RSS (V14) SE, and coding joint (CJ) between D1 CE and V14 CE are normally formed (Fig. 3). As a result, the CJ stays in the locus but the DNA fragment from 23RSS (D1) to 23RSS (V14), which contains the HJ and the SJ, is excised out from the chromosome. Unexpectedly, the same CJ is detected less in ATM-deficient thymocytes where hybrid joining occurs more frequently.

List of Publications

Fujimori, T., Suno, R., Iemura, S., Natsume, T., Wada, I., Hosokawa, N. (2017). Endoplasmic reticulum proteins SDF2 and SDF2L1 act as components of the BiP chaperone cycle to prevent protein aggregation. *Gnens Cells* 22, 684-698.

List of Presentations

Hosokawa, N. ERp46 triggers mannose trimming activity of EDEM3. International Symposium on ER stress, glycosylation, homeostasis and diseases. Saitama, March 22-23, 2018.

Hosokawa, N., Yu, S., Yagi, H., Ito, S., Kato, K., Wada, I. ERp46 triggers mannose trimming activity of EDEM3. International Symposium on ER stress, glycosylation, homeostasis and diseases. Saitama, March 22-23, 2018.

細川暢子、和田郁夫: SEL1L タンパク質による小胞体関連分解の調節機構. ConBio2017 (2017年度生命科学系学会合同年次大会、第40回日本分子生物学会、第90回日本生化学会大会 神戸) 2017年12月6-9日

平芳一法: RNA アプタマーによるショウジョウバエ転写因子 GAF の機能解析 (2017年度生命科学系学会合同年次大会、2017年12月6日~2017年12月9日、神戸)

藤本真慈、柿沼志津子: 正常胸腺における *Tcrb* D2、J2 間での hybrid joint (HJ)、引き続いて V14 capture 後の coding joint (CJ)、signal joint (SJ) の triple formation. 2017年度生命科学系学会合同年次大会、神戸、2017年12月6-9日

Fujimoto, S. and Kakinuma, S. D1V14 (inverted), an oddly rearranged *Tcrb* in normal thymus. 第46回日本

免疫学会学术集会、仙台、2017年12月12-14日

再生組織構築研究部門
Department of Regeneration Science and Engineering

生体材料学分野
Laboratory of Biomaterials

教授 田畑 泰彦 Prof. Yasuhiko Tabata
助教 城 潤一郎 Assist. Prof. Jun-ichiro Jo

本研究分野の目的は、医療（治療、診断、予防）に応用可能あるいは基礎生物医学研究に役立つ方法、手段、および技術を材料科学の立場に立って研究開発していくことである。生体材料（バイオマテリアル）とは、体内で使用したり、あるいはタンパク質、細胞などの生体成分および細菌、ウイルスと触れて用いられる材料のことであり、本研究分野においては、高分子、金属、セラミックス、およびそれらの複合体からなる生体材料のデザインと創製を行い、得られた生体材料の基礎生物医学および医療への応用を目指している。具体的には、生体組織・臓器の再生治療（一般には、再生医療と呼ばれている）および医療機器、人工臓器のための生体材料、あるいは薬物・遺伝子治療、予防ワクチン、および診断（分子イメージング）効率の向上を目指したドラッグデリバリーシステム（DDS）のための生体材料の研究開発を行っている。加えて、幹細胞の分子生物学、生化学、細胞生物学の研究、および細胞培養のために必要不可欠な生体材料についての研究開発も進めている。以下にその内容をより詳しく述べる。

1) 生体組織の再生治療のための生体材料

再生治療では、体のもつ自然治癒力の基となる細胞の増殖分化能力を高め病気の治療を実現する。本研究分野では、細胞の増殖、分化を高めるための足場としての3次元あるいは多孔質構造をもつ生体吸収性の成形体（人工細胞外マトリックス）をデザイン、創製している。また、細胞の増殖、分化を促すための生体シグナル因子（タンパク質や遺伝子）の体内活性を高めることを目的として、細胞増殖因子あるいはその関連遺伝子のドラッグデリバリーシステム（DDS）研究を行っている。例えば、生体吸収性材料に細胞増殖因子あるいはその関連遺伝子を包含させ、再生部位で徐々に放出（徐放）する。この徐放化技術によって、体内での生体シグナル因子の生物活性が効率よく発揮され、その結果として、種々の生体組織・臓器の再生誘導が促進されることがわかってきている。現在、この細胞増殖因子の徐放化技術を利用した血管、骨、歯周組織などの再生誘導治療の臨床研究が始まっている。加えて、自然治癒力を高めて、難治性慢性疾患の悪化進行を抑制するという抗線維化治療を行っている。

2) 幹細胞工学および再生・創薬研究のための生体材料

本研究分野では、この細胞移植治療に不可欠である幹細胞、前駆細胞、および芽細胞などを効率よく得ることを目的として、それらの細胞の単離、増殖、分化のための培養基材および培養技術に

ついて研究開発を行っている。種々の生体材料からなる培養基材あるいは培養装置（バイオリアクタ）の組み合わせによる細胞培養技術の確立を目指している。これらの一連の研究は、細胞移植再生治療のために利用可能な細胞を得ることを目的としているだけでなく、広く、細胞の増殖・分化、形態形成に関する生物医学の基礎研究（再生研究）にも応用できる生体材料、技術、方法論を提供することも大きな目的である。この技術は細胞を用いた薬の代謝、毒性を評価する創薬研究にも応用できる。加えて、非ウイルス性キャリアを用いて、プラスミド DNA や small interfering RNA (siRNA) などの核酸物質、低分子、ペプチド、タンパク質などを細胞内に効率よく取り込ませ、細胞の生物機能や分化を制御する技術も研究開発している。

体の最小単位は細胞であるが、生体機能の単位は細胞の集合体である。そのため、細胞集合体を利用した研究が始まっているが、細胞集合体サイズの増大にともない、集合体内部の細胞は酸素、栄養の供給が悪く、死滅、細胞機能の維持が困難となる。この問題を解決する技術、方法論を研究している。例えば、生体吸収性ハイドロゲル粒子を細胞集合体内に含ませるという方法により、細胞集合体内での状態が改善、細胞機能の向上が認められた。培養と機能状態のよい細胞集合体が入手できれば、細胞研究の発展と薬の開発、毒性評価（創薬研究）がより進展すると考えられる。

3) ドラッグデリバリーシステム（DDS）のための生体材料

薬物が効くのは、薬物とその作用部位に適切に作用するからである。しかしながら、現実には、薬物は部位選択性がなく、その薬理作用を発現させるために大量投与が行われている。これが薬物の副作用の主な原因となっている。そこで、薬物を必要な部位へ、必要な濃度で、必要な時期にだけ働かせるための試みが行われている。これが DDS である。DDS の目的は、薬物の徐放化、薬物の長寿命化、薬物の吸収促進、および薬物のターゲティングなどである。いずれの目的にも、薬物を修飾するための生体材料が必要である。本研究分野では、対象薬物として、治療薬だけではなく、予防薬、診断薬、化粧品成分、ヘルスケア物質などを取り上げ、生体材料学の観点からの DDS 研究開発を行っている。

4) 外科・内科治療アシストのための生体材料

本研究分野は、高分子、金属、セラミックス、およびそれらの複合材料の医療応用として、外科・内科治療の補助のための生体材料の研究開発を行っている。

The main objective of our department is to investigate and develop methods, procedures, and technologies which are applicable to basic and clinical medicines as well as basic researches of biology and medicine from the viewpoint of material sciences. The materials to use in the body and to contact biological substances, like proteins and cells, are defined as biomedical materials and biomaterials. In our department, various types of biodegradable and non-biodegradable biomaterials of polymers, metals, ceramics, and their composites, are being designed and created aiming at their clinical applications as well as the development of experimental tools necessary for basic researches of medicine and biology which scientifically support clinical medicine.

We are actively proceeding research and development (R & D) of biomaterials to assist reconstructive surgery and apply to drug delivery systems (DDS) for improved therapeutic efficacy. However, it is often difficult for patients to improve their Quality of Life (QOL) only by the therapeutic procedure of reconstructive surgery because the biomaterials applied are of poor biocompatibility and functional substitutability. For organ transplantation, there are several problems to be resolved, such as the lack of donor tissue and organ or the adverse effects of immunosuppressive agents. The two advanced medical therapies currently available are clinically limited in terms of the therapeutic procedure and potential. More detailed explanation about every project is described.

1) Biomaterials for Regeneration Therapy

We are designing and creating 3-dimensional and porous constructs of biodegradability as cell scaffolds of an artificial ECM which supply the local environment of cells proliferation and differentiation. As another technology to promote the proliferation and differentiation of cells, the biodegradable carriers for the controlled release of growth factors and genes are being designed and prepared from gelatin and its derivatives. A new therapy to naturally induce tissue and organ regeneration by the controlled release of various biologically active growth factors has been achieved, and the therapeutic potentials have been scientifically demonstrated through animal experiments. Among the tissue regeneration trials, clinical experiments of angiogenic and bone regeneration therapies have been started by the controlled release technology of basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin-like growth factor (IGF) -1, and platelet-rich plasma (PRP) to demonstrate the good therapeutic efficacy. In addition, the systems of drug targeting and the local release with polymers of an organ affinity are being designed and prepared to achieve the regeneration therapy for chronic disease based on the natural healing potential of patients.

2) Biomaterials for Stem Cells Technology and Regeneration Research of Cell Biology and Drug discovery

The technology and methodology of cell culture with various biomaterials and bioreactors have been explored to efficiently isolate, proliferate, and differentiate stem cells, precursors, and blastic cells. A series of this study not only aims at the preparation of cells suitable for the therapy of regenerative medicine, but also research and development (R&D) of materials, technologies, and methodologies for basic medicine and biology. They are also applicable for the research of drugs discovery to evaluate their metabolism and toxicity. In addition, non-viral vectors for low-molecular weight compounds, peptides, proteins, and nucleic acids (siRNA and decoy DNA) have been investigated to design the DDS system for gene transfection which can biologically analyze the functions of stem cells and genetically engineer cells to activate the biological functions for cell therapy.

The minimum unit of body is cell, but that of biological function is the cell aggregate. The cell culture with cell aggregates has been noted for the basic biological and medical research of cells and drug discovery (the drug development and the toxicity evaluation). However when the size of cell aggregates becomes larger, the

cells in the aggregates tend to die because of the lack of nutrients and oxygen. As one trial to break through the problem, microspheres incorporation enabled cells to improve their function even in the cell aggregate.

3) Biomaterials for DDS

Generally there are few drugs which have a specific selectivity for the site of action. Therefore, the high-dose administration of drugs is necessary to achieve their *in vivo* therapeutic efficacy, while this often causes the adverse effects of drugs. DDS is a biomaterial-technology which allows a drug to act at the right time the right site of action at the necessary concentration. The objective of DDS includes the controlled release of drug, the prolongation of drug life-time, the acceleration of drug permeation and absorption, and the drug targeting. Various biomaterials are inevitably required to achieve every DDS objective. The drugs applicable for DDS include therapeutic drug and gene, diagnostic and preventive drugs, cosmetics, or health care substances etc. The basic idea of DDS is to efficiently enhance the biological functions of such drugs by their combination with biomaterials. Other than the therapeutic drug and gene, the DDS technology and methodology can be applied to enhance the *in vivo* efficacy of vaccination and diagnosis, such as magnetic resonance imaging (MRI), ultrasound diagnosis or molecular imaging. In addition, we are investigating DDS technology and methodology which are applicable to the research and development of cosmetics and health care sciences.

4) Biomaterials for Surgical and Physical Therapies

We molecularly design and creates biomaterials and the related technology mainly from biodegradable polymers aiming at the development of assistant materials and medical devices in surgical and physical therapies.

List of Publications

Li LM, Han M, Jiang X, Yin X, Chen F, Zhang TY, Ren H, Zhang J, Chen Z, Hou T, Ouyang H, Tabata Y, Shen Y, Gao JQ. (2017) Peptide-Tethered Hydrogel Scaffold Promotes Recovery from Spinal Cord Transection via Synergism with Mesenchymal Stem Cells. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017 Feb 1;9 (4):3330-3342. doi: 10.1021/acsami.6b12829. Epub 2017 Jan 18. [Epub ahead of print]

Tian-Yuan Zhang, Jia-He Wu, Qian-Hao Xu, Xia-Rong Wang, Jingxiong Lu, Ying Hu, Jun-ichiro Jo, Masaya Yamamoto, Daishun Ling, Yasuhiko Tabata, Jian-Qing Gao. (2017) Design of magnetic gene complexes as effective and serum resistant gene delivery -systems for mesenchymal stem cells. T.-Y. Zhang et al. / *International Journal of Pharmaceutics* 520 1-13

Kensho Yokota, Tomonori Matsuno, Yasuhiko Tabata and Izumi Mataga. (2017) Evaluation of a Porous Hydroxyapatite Granule and Gelatin Hydrogel Microsphere Composite in Bone Regeneration. *Journal of Hard Tissue Biology* 26[2] 201-212

- Ryo Tamura, Shinji Uemoto, Yasuhiko Tabata. (2017) Augmented liver targeting of exosomes by surface modification with cationized pullulan. *Acta Biomaterialia* PMID:28483695 DOI:10.1016/j.actbio.2017.05.013
- Bing Huang, Xin-Chi Jiang, Tian-Yuan Zhang, Yu-Lan Hu, Yasuhiko Tabata, Zhong Chen, Stefano Pluchino, Jian-Qing Gao. (2017) Peptide Modified Mesenchymal Stem Cells as Targeting Delivery System Transfected with MiR-133b for the Treatment of Cerebral Ischemia, *Int J Pharm*, Aug 18;531 (1):90-100.
- Hideo Jinnou, Masato Sawada, Koya Kawase, Naoko Kaneko, Vicente Herranz-Pérez, Takuya Miyamoto, Takumi Kawaue, Takaki Miyata, Yasuhiko Tabata, Toshihiro Akaike, José Manuel García-Verdugo, Itsuki Ajioka, Shinji Saitoh, and Kazunobu Sawamoto. (2018) Radial Glial Fibers Promote Neuronal Migration and Functional Recovery after Neonatal Brain Injury. *Cell Stem Cell* 22, 128-137
- Toru Takemoto, Yuji Kabasawa, Yusuke Higuchi, Yasuhiko Tabata, Kazuhiro Aoki, Yukihiro Tamura and Hiroyuki Harada. (2017) Combination of the RANKL-binding peptide W9 and bFGF induces bone regeneration in the rat calvarial defect model. *Dent Oral Craniofac Res*, doi:10.15761/DOCR.1000250 Volume 4 (3): 1-7
- Kanako Inoo, Hiroto Bando, Yasuhiko Tabata. (2016) Insulin secretion of mixed insulinoma aggregates-gelatin hydrogel microspheres after subcutaneous transplantation. *Regenerative Therapy* 8 (2018) 38-45 *Terms of Biomaterials Technology. J Bio-Integ* 6:3-7
- Jo, J. and Tabata, Y. (2017). Polysaccharide carriers for induction and evaluation of tissue regeneration and drug delivery. *Polysaccharide in advanced drug delivery*, (edited by Akhilesh Vikram Singh, PharmaMed Press/BSP Books) 1-36.
- Murata, Y., Jo, J., and Tabata, Y. (2017). Preparation of gelatin nanospheres incorporating quantum dots and iron oxide nanoparticles for multimodal cell imaging. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 28, 555-568.
- Janune D, Abd El Kader T, Aoyama E, Nishida T, Tabata Y, Kubota S, Takigawa M (2017). Novel role of CCN3 that maintains the differentiated phenotype of articular cartilage. *J Bone Miner Metab.* 35(6):582-597.
- 鷺尾絢子、諸富孝彦、花田可緒理、吉居慎二、田畑泰彦、北村智昭：第2回バイオガラスを応用したバイオマテリアルの開発：治療法開発につながるトランスレーショナル・リサーチ。日本歯科評論 2 NO.892 vol.77 (2) (2017)
- 田畑泰彦、バイオマテリアル技術からみた再生医療の最前線。 *Frontier of Regenerative Medicine in* 城潤一郎、田畑泰彦、DDS 技術を活用した生物医学研究。 *Drug Delivery System* 32-1, :50-8 (2017)
- 田畑泰彦、バイオマテリアル。 *腎臓内科・泌尿器科*：5 (5)：509-517 (2017)

- 田畑泰彦、創薬研究に応用できる超高分解能タンパク質画像. Record-breaking protein images have applications for drug discovery. パリテイ Vol.32 No.05 (2017)
- 田畑泰彦、化学が支える再生医療最前線. 医療・診断・創薬の化学. 149-156 (2017)
- 田畑泰彦、第5節 細胞培養のための細胞培養基材の開発 - バイオマテリアルを中心に -. (株)技術情報協会 240-247 (2017.11)
- 田畑泰彦、再生医療産業の展望 バイオマテリアル学からみた再生医療の現状と今後の方向性 - 自然治癒力を介した治療技術を支える材料工学 -. 化学経済 24-29 (2017.4)
- 山本 雅哉, 戸田 裕之, 田畑 泰彦: 三次元細胞培養環境としての生体機能性ヒドロゲルを用いたサンドイッチ培養に関する研究. 高分子論文集 (2017), Advance Publication by J-stage 75 巻 (2018) 1 号 p.23-31
- 城潤一郎、田畑泰彦 (2017). DDS 技術を活用した生物医学研究. Drug Delivery System 32 (1), 50-58.

List of Presentations

海外での招待講演

- Tabata, Y. Regenerative Medicine Based on the activation of cells by Biomaterials Technology. AMED 国際ワークショップ New York, USA. March.17-19.2017
- Tabata, Y. Bio-signal delivery of biomaterial technology to activate cell activity for tissue regeneration. 6th Int'l Conference on Tissue Engineering in conjunction with the 3rd Int'l Conference on Regenerative Biomedical, Materials Heraklion, Crete, Greece. June.14-19.2017
- Tabata, Y. Biomaterial-based Regenerative Therapy. Frontier of Regenerative Therapy and Research. Zhejiang Pharmaceutical College 講義, Hangzhou, China. April.11-15. 2017
- Tabata, Y. Drug Delivery Systems for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. Advances in Tissue Engineering 2017, Houston, USA. September-13.2017
- Tabata, Y. Biomaterial design of cell scaffold and drug delivery to realize regenerative therapy. 28th Annual Conference of the European Society for Biomaterials (ESB), Athens, Greece. September.4-8.2017.
- Tabata, Y. Biomaterials Technology Enables Regenerative Therapy for Patients. 2017 TERMIS-AP Conference, Nantong, China. September.21-24.2017
- Tabata, Y. Frontier of Tissue Engineering Technology to Treat Patients. 上海東方医院講演, Shanghai, China. September.28-29.2017
- Tabata, Y. Release Technology of Cell Recruitment Molecules to Induce In Situ Tissue Regeneration Therapy. International Seminar on Biomaterials and Regenerative Medicine (BioReMed2017), Timisoara,

Rumania. October.5-8.2017

Tabata, Y. Biomaterials Technology to Realize Regenerative Medicine. 25th POLYCHAR2017 World Forum On Advanced Materials, Kuala Lumpur, Malaysia. October.9-13.2017

Tabata, Y. Tissue engineering of biomaterials technology to realize regeneration medicine. IMCCB2017 and AusMedtech2017. Melbourne, Australia, May 24-25, 2017

Tabata, Y.: Delivery Technology of Bio-Signals to Realize Tissue Regeneration. 12th International Symposium on Frontiers in Biomedical Polymer (FBPS'17) Seoul, Korea, July 11-14, 2017.

Tabata, Y.: Tissue Regeneration Therapy Based on Biomaterial Technology of Dual Drug Release. 2nd International Conference on Tissue Engineering and Regenerative Medicine (ICTERM) Vanderbijlpark, South Africa, July 26-30, 2017.

Tabata, Y. Delivery Technology of Bio-Signals to Realize Tissue Regeneration. The 6th Asian Biomaterials Congress. Thiruvananthapuram, India, October 25-27, 2017.

Jo, J. Development of Drug Delivery Systems for Genetic Engineering of Stem Cell and Regeneration Imaging. Seminars at Zhejiang Pharmaceutical College and Zhejiang University, Hangzhou, April 11-15, 2017.

Jo, J. and Tabata, Y. Trial on development of imaging technology for regenerative therapy with polymer-based biomaterials. 12th International Symposium on Frontiers in Biomedical Polymers, Seoul, July 11-14, 2017.

海外での一般演題

Jo, J., Yoshimoto, Y., and Tabata, Y. Development of nanoparticle-based delivery system for molecular beacon to visualize the biological function of macrophages. Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society 2017, Nantong, September 22-24, 2017.

Jo, J., Yoshimoto, Y., and Tabata, Y. Trial on development of nanoparticle-based delivery system for molecular beacon to visualize the biological function of macrophages. 12th International Symposium of the Institute Network, Tokyo, November 28-29, 2017.

Jo, J., Yoshimoto, Y., and Tabata, Y. Visualization of the biological function of macrophages by the nanoparticle-based intracellular delivery system of molecular beacon. 14th US-Japan Symposium on Drug Delivery Systems, Maui, December 14-18, 2017

Kanemaru, M., Asai, J., Jo, J-I., Tabata, Y., and Katoh, N. Poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles containing pioglitazone attenuate bleomycin-induced skin fibrosis. the 47th Annual European Society for Dermatological Research Meeting, Salzburg, Austria, September 27-30, 2017.

Imaizumi, M., Nakamura, R., Nakaegawa, Y., Bayu Tirta Dirja, Tada, Y., Tani, A., Sugino, T., Murono, S.,

Omori, K. Novel regenerative approach for the prevention of vocal fold scarring using biodegradable gelatin hydrogel with basic fibroblast growth factor (bFGF). The American Broncho-Esophagological Association (ABEA) 97th Annual Meeting, San Diego, California April 26-28, 2017

Tabei R, Kanazawa H, Fujita J, Tohyama S, Hirano A, Kawaguchi S, Nakajima K, Seki T, Kishino Y, Okada M, Shimizu H, Kobayashi E, Tabata Y, Fukuda K. Development of a Transplant Injection Device for the Optimal Distribution and Retention of iPS Cell-Derived Cardiomyocytes. American Heart Association, Scientific Sessions, Anaheim, CA, November 11-15, 2017.

Nakajima K, Fujita J, Tohyama S, Ohno R, Kanazawa H, Seki T, Kishino Y, Okada M, Kawaguchi S, Tanosaki S, Someya S, H. Shimizu H, Tabata Y, Kobayashi E, Fukuda K. The regenerative therapy of human induced pluripotent stem cells-derived pure cardiac spheroids with gelatin hydrogel restores cardiac function and has weak arrhythmogenic property in heart failure. European Society of Cardiology, Barcelona, August 26-30, 2017.

Kawaguchi S, Fujita J, Hirano A, Kanazawa H, Tohyama S, Handa N, Okuda S, Hishikawa S, Kunita S, Seki T, Nakajima K, Tabata Y, Kobayashi E, Shimizu H, Fukuda K. The regenerative therapy with human iPS cells-derived cardiac spheroids and gelatin hydrogel significantly improves cardiac function and cause no lethal arrhythmia in a pig model of heart failure. European Society of Cardiology, Barcelona, August 26-30, 2017.

Tsumaru S, Masumoto H, Yoshioka M, Yoshizawa K, Kawatou M, Ikuno T, Ikeda T, Tabata Y, Yamashita J.K, Minatoya K. Transplantation of human iPS Cell-derived Endothelial and Mural Cells Incorporated with Gelatin Sponge Scaffold Increased the Blood Perfusion in a Murine Hindlimb Ischemia Model. ESC Congress2017, Barcelona, August 26-30, 2017.

Tsumaru S, Masumoto H, Yoshioka M, Yoshizawa K, Kawatou M, Ikuno T, Ikeda T, Tabata Y, Yamashita J.K, Minatoya K. Therapeutic potential of human iPS Cell-Derived Endothelial and Mural Cells incorporated with Gelatin Sponge Scaffold in a Murine Hindlimb Ischemia Model. European Society for Vascular Surgery 2017, Lyon, September 19-22, 2017.

Hirao S, Masumoto H, Nishio H, Kawatou M, Li Z, Kanemitsu H, Ueyama K, Yamazaki K, Ikeda T, Tabata Y, Yamashita J.K, Minatoya K. Poster The therapeutic potential of human iPS cell-derived cardiac tissue onto a porcine myocardial infarction model. American Heart Association 2017, Anaheim, November 11-15, 2017

Tsumaru S, Masumoto H, Yoshioka M, Yoshizawa K, Kawatou M, Ikuno T, Ikeda T, Tabata Y, Yamashita J.K, Minatoya K. Therapeutic Angiogenesis of human iPS Cell-Derived Endothelial and Mural Cells incorporated with Gelatin Sponge Scaffold in a Murine Hindlimb Ischemia Model. American Heart Association 2017, Anaheim, November 11-15, 2017

Nakajima N, Hashimoto S, Sato H, Takahashi K, Akashi Y, Tanaka R, Tabata Y, Terai S. Anti-fibrotic efficacy

of gelatin sheet containing triamcinolone acetonide. The 14th US-Japan Symposium on Drug Delivery Systems. Maui, Hawaii, December 14-18, 2017

国内でのシンポジウム招待講演

田畑泰彦 見えてきた再生医療実用化のキーポイント -そろそろ本音の話をしよう-. 動物再生医療推進協議会 (CARM) 勉強会、東京、2017年1月18日

田畑泰彦 細胞成長因子を利用した組織再生誘導の現状と今後. 第16回日本再生医療学会総会、仙台、2017年3月7-9日

Tabata, Y. Regeneration Therapy Based on Drug Delivery Technology. International Symposium on Drug Delivery and Pharmaceutical Sciences: Beyond the History、京都、2017年3月9-10日

田畑泰彦 細胞成長因子を利用した組織再生誘導の現状と今後 第16回日本再生医療学会総会、仙台、2017年3月7-9日

黒田 隆、浅田隆太、猪原登志子、向井久美、宗 和隆、後藤公志、田畑泰彦、秋山治彦、松田秀一 特発性大腿骨頭壊死症に対する rhFGF-2 を用いた低侵襲再生医療 第16回日本再生医療学会総会、仙台、2017年3月7-9日

武元 徹、樺沢勇司、樋口佑輔、田畑泰彦、田村幸彦、青木和広、原田浩之 ラット頭蓋骨欠損部に局部適用した RANKL 結合ペプチド W9 と bFGF による骨形成促進作用の評価 第16回日本再生医療学会総会、仙台、2017年3月7-9日

田畑泰彦: 高分子技術からみた再生医療の最前線. Frontier of Regenerative Medicine from the Viewpoint of Polymer Technology. 第66回高分子学会年次大会、幕張、2017年5月29-31日

城潤一郎、田畑泰彦 ドラッグデリバリーシステムを用いた再生医療イメージングの重要性 量子科学技術研究開発機構量子イメージング創薬アライアンス「次世代MRI・造影剤」キックオフシンポジウム、東京、2017年5月23日

湯川 博、石川 哲也、田畑 泰彦、馬場 嘉信 量子ドットによる移植幹細胞 in vivo 蛍光イメージング 第33回日本DDS学会学術集会、京都、2017年7月6-7日

山本 雅哉、田畑 泰彦 再生医療のための Drug とその DDS 技術の開発 第33回日本DDS学会学術集会、京都、2017年7月6-7日

城潤一郎、田畑泰彦 再生医療のための核酸導入技術 第38回日本炎症・再生医学会 シンポジウム5 組織工学を活用した再生医療 (日本再生医療学会合同)、大阪、2017年7月18-19日

田畑泰彦 マテリアルからみた再生医療の最前線 -細胞能力を高める医療の実現-. 第70回日本酸化ストレス学会学術集会、つくば、2017年6月28-29日

田畑泰彦 バイオマテリアル技術が支える先端医療と研究. 東京大学医科学研究所 学友会セミ

ナー、東京、2017年8月23日

田畑泰彦 DDS技術を用いた抗線維化治療. バクスター株式会社講演、東京2017年8月31日

田畑泰彦 再生医療の現状をわかりやすく解説する. ライオンズクラブ講演会、神戸、2017年9月13日

田畑泰彦 再生医療分野を支えるバイオマテリアル技術とは?. JST-CRDS レクチャー、東京、2017年9月15日

田畑泰彦 バイオマテリアルからみたゼラチンの有用性. 2017ライフサイエンスバイオマテリアル研究会、京都、2017年10月13日

田畑泰彦 これならわかる「化学の目から再生医療の本質に迫る」. 日本化学会秋季事業 第7回CSJ化学フェスタ2017、東京、2017年10月17-19日

田畑泰彦 再生医療とは自然治癒力を活用する医療である—再生治療と再生研究—(手外科領域への応用を含む). 第26回日本形成外科学会基礎学術集会、大阪、2017年10月19-20日

田畑泰彦 DDS技術がカバーする領域は広い—治療、診断、予防とライフサイエンスへの展開—. 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科「分子イメージング講義シリーズ」、岡山、2017年11月25日

国内での一般演題

田畑泰彦 再生医療における生体材料の役割. 基調講演: 生体材料を活用した再生医療・ライフサイエンスの現状と展望. 第1回メドジェル ハイドロゲルセミナー、東京2017年1月27日

田畑泰彦 炎症細胞をあやつるバイオマテリアル技術. 医工学フォーラム-2016年度特別学術講演会- 京都、2017年2月8日

田畑泰彦 生体機能性高分子—からだを治すポリマー(生物医学研究から先端医療を支える高分子技術). KIPS 高分子講座、京都、2017年2月15日

田畑泰彦 自然治癒力を高めて病気を治す②~再生医療はここまできている~. 芦屋カレッジ修了記念講演、芦屋、2017年3月15日

田畑泰彦 バイオマテリアルからみた再生医療の最近の進歩と今後. 京都コモンズ第18回セミナー、京都、2017年3月29日

田畑泰彦 3D知財組織化技術の創薬研究の展開. 旭硝子共同研究報告会、横浜2017年4月10日

田畑泰彦 モノづくり技術からみた再生治療と再生研究. 横河電機企業講演、東京、2017年4月17日

田畑泰彦 細胞能力を高めるためのモノづくり技術-再生医療サポートビジネスに向けて-. 平成29年度 再生医療サポートビジネス懇話会、京都、2017年4月24日

- 田畑泰彦 再生医療ビジネスの現状と将来展望について. 持田製薬企業講演、東京 2017年4月27日
- 田畑泰彦 バイオマテリアルから見た再生医療の世界 -細胞能力を高める先端医療-. 京大東京工
化会、東京。2017年4月28日
- 田畑泰彦 バイオマテリアルからみた先端医療の最前線と今後. 岡山大学特別講演、岡山、2017年
5月10日
- 田畑泰彦 歯の治療学. 九州歯科大学歯学部 口腔機能学講座、九州 2017年5月19日
- 田畑泰彦 バイオマテリアルからみた再生治療と再生研究. 東レリサーチセンター講演 滋賀、
2017年5月29日
- 田畑泰彦 バイオマテリアルを用いた再生医療. 大阪大学歯学部 歯科理工学特別講義、大阪、2017
年6月23日
- 田畑泰彦 再生医療の最前線と今後の展望. 同志社大学生命医科学講義、京都 2017年6月30日
- 田畑泰彦 材料科学技術からみた再生医療分野とは. ナード研究所 企業講演、大阪 2017年7月
3日
- 田畑泰彦 体を治す高分子. 高分子化学序論、京都、2017年7月5日
- 田畑泰彦 DDSの対象となる Drug について考えてみよう -日本 DDS 学術集会に際して-. 第33回
日本 DDS 学会学術集会、京都、2017年7月6-7日
- 田畑泰彦 自然治癒力を高めて病気を治す①～再生医療の実際～. 芦屋カレッジ、芦屋、2017年9
月20日
- 田畑泰彦 細胞を元気にするための細胞環境づくり材料・技術=再生医療関連サポートビジネス.
「再生医療ビジネスシンポジウム in KRP PartX」、京都、2017年9月26日
- 田畑泰彦 再生医療に必要な不可欠なモノづくり技術. ANJ 新経営者クラブ 11月例会、東京、2017
年11月6日
- 田畑泰彦 再生医療とは細胞能力を高める医療-細胞環境を作り与えるモノづくり技術-. 「平成29
年度 再生医療の全体像を見わたせる分かりやすい解説講座」、京都、2017年11月9日
- 田畑泰彦 バイオマテリアルを利用した再生治療の現状と課題. 「電子線照射 技術セミナー -再
生医療・滅菌に関する話題提供-」、福井、2017年11月22日
- 田畑泰彦 生体組織工学をベースとした再生医療. 京都府立医科大学眼科講義、京都、2017年11
月29日
- 山本雅哉、田畑泰彦 軟骨組織のタイプ判別法としてのラマン分光法に関する研究 第16回日本
再生医療学会総会、仙台、2017年3月7-9日
- 戸部 賢、鈴木敏之、小杉謙介、田畑泰彦、齋藤 繁 リドカイン徐放シートの臨床応用と安全性
の確認、第16回日本再生医療学会総会、仙台、2017年3月7-9日

- 高橋 克、喜早ほのか、斉藤和幸、東郷由弥子、塚本容子、三島清香、杉並重希子、原田英光、田畑泰彦、別所和久 分子標的治療による欠損歯の再生 第16回日本再生医療学会総会、仙台、2017年3月7-9日
- 村谷誠司、山本雅哉、狩野光伸、田畑泰彦 糖応答性ハイドロゲルを用いた分岐型血管様構造の作製、第16回日本再生医療学会総会、仙台、2017年3月7-9日
- 田村 周久、黒田泰輔、福田健太郎、富田篤志、田畑泰彦、笠嶋快周 ゼラチンマイクロスフィアとウマ間葉系幹細胞を用いて作製した細胞凝集体に関する検討 第16回日本再生医療学会総会、仙台、2017年3月7-9日
- 明石祐典、城潤一郎、田畑泰彦 PLGA ナノ粒子を用いた血小板への薬剤導入と薬剤放出 第16回日本再生医療学会総会、仙台、2017年3月7-9日
- 鈴木涼介、河合勝也、鈴木茂彦、田畑泰彦 新規創傷治癒促進材料シルクエラスチンの菌増殖抑制効果における作用機序解析、第16回日本再生医療学会総会、仙台、2017年3月7-9日
- 武元 徹、樺沢 勇司、樋口 佑輔、田畑 泰彦、青木 和弘、田村 幸彦、原田 浩之 ラット頭蓋骨欠損部に局所適用したRANKL 結合ペプチド W9 と bFGF による骨形成促進作用の評価 第33回日本 DDS 学会学術集会、京都、2017年7月6-7日
- 田中 絢香、中村 仁美、田畑 泰彦、藤森 由香、熊澤 恵一、木村 正 ヒト凍結融解卵巣組織移植片における生体分解性ゼラチンハイドロゲルを用いた basic fibroblast growth factor (bFGF) 徐放の効果 第33回日本 DDS 学会学術集会、京都、2017年7月6-7日
- 升本 英利、南方 謙二、西尾 博臣、山本 雅哉、大村 友博、横出 正之、清水 章、松原和夫、田畑 泰彦、湊谷 謙司 塩基性線維芽細胞増殖因子含有ゼラチンハイドロゲルシートによる心筋再生治療の2 治験例 第33回日本 DDS 学会学術集会、京都、2017年7月6-7日
- 山田 啓之、羽藤 直人、田畑 泰彦 徐放化栄養因子を用いた鼓膜再生治療の検討 第33回日本 DDS 学会学術集会、京都、2017年7月6-7日
- 中島 尚、橋本 哲、佐藤 裕樹、上村 顕也、佐藤 祐一、若槻 華子、宮田 昌幸、明石 祐典、田畑 泰彦、寺井 崇二 トリアムシノロンアセトニド内包化ゼラチンシートの効果の検証 第33回日本 DDS 学会学術集会、京都、2017年7月6-7日
- 田中 聡一、松下 雄彦、宮地 伸晃、茨木 一行、西田 京平、荒木 大輔、神崎 至幸、田畑泰彦、黒田 良祐 マウス変形性関節症モデルに対するシンバスタチン含有ゼラチンハイドロゲル関節内投与による関節症進行抑制効果 第33回日本 DDS 学会学術集会、京都、2017年7月6-7日
- 金丸 麻衣、城 潤一郎、浅井 純、加藤 則人、田畑 泰彦 PPAR- γ 刺激薬徐放性ナノ粒子による強皮症の局所治療：ブレオマイシン誘発強皮症モデルマウスを用いた試み 第33回日本 DDS 学会学術集会、京都、2017年7月6-7日

- 吉増 達也、木下 貴裕、田畑 泰彦、山本 雅哉、川後 光正、平井 慶充、大橋 拓矢、矢田 由美、尾浦 正二、西村 好晴 徐放化 basic-FGF 製剤の胸腔内投与による肺気腫の再生医療 第 33 回日本 DDS 学会学術集会、京都、2017 年 7 月 6-7 日
- 義村 耕平、吉崎 舟洋、田畑 泰彦 マクロファージ動員因子としての retinoic acid 導入 lysophosphatidyl choline の機能評価 第 33 回日本 DDS 学会学術集会、京都、2017 年 7 月 6-7 日
- 小林 香央里、湯川 博、村田 勇樹、城 潤一郎、小野島 大介、山本 雅哉、石川 哲也、田畑 泰彦、馬場 嘉信 量子・磁気ナノハイブリッド粒子による幹細胞イメージングおよびハイパーサーミア効果 第 33 回日本 DDS 学会学術集会、京都、2017 年 7 月 6-7 日
- 城潤一郎、明石祐典、田畑泰彦、乳酸グリコール酸共重合体ナノ粒子を用いた血小板ハイブリッドドラッグデリバリーシステムの構築 第 66 回高分子学会年次大会、千葉、2017 年 5 月 29-31 日
- 城潤一郎、明石祐典、田畑泰彦 高分子ナノ粒子による血小板をキャリアとするドラッグデリバリーシステムの構築 第 33 回日本 DDS 学会学術集会、京都、2017 年 7 月 6-7 日
- 城潤一郎、田畑泰彦 マクロファージの生物機能イメージングのための高分子系バイオマテリアル技術の開発 第 46 回医用高分子シンポジウム、東京、2017 年 7 月 24-25 日
- 田畑泰彦、明石祐典、城潤一郎 高分子ミセルと血小板を利用した抗癌剤の癌組織ターゲティング 公益財団法人日本化学繊維研究所 第 75 回講演会、京都、2017 年 11 月 15 日
- 城潤一郎、田畑泰彦 高分子造影剤を用いた血管新生の磁気共鳴イメージング 第 7 回 DDS 再生医療研究会、東京、2017 年 12 月 23 日
- 村上隆英、山下幸大、吉澤恵子、村田勇樹、坂井義治、田畑泰彦 ICG 含有ナノ粒子を用いた癌転移リンパ節のイメージング 第 33 回 DDS 学会学術集会、京都、2017 年 7 月 6-7 日
- 村上隆英、山下幸大、土黒一郎、坂井義治、田畑泰彦 生体付着性ナノ微粒子による液状・スプレー型癒着防止材 第 33 回 DDS 学会学術集会、京都、2017 年 7 月 6-7 日
- 村田 勇樹、城 潤一郎、田畑 泰彦 量子ドット含有ゼラチンハイドロゲルナノ粒子による酵素反応のイメージング 第 16 回日本再生医療学会総会、仙台、2017 年 3 月 7-9 日
- 小林 香央里、湯川 博、村田 勇樹、城 潤一郎、小野島 大介、山本 雅哉、石川 哲也、田畑 泰彦、馬場 嘉信 量子・磁気ナノハイブリッド材料を用いた幹細胞イメージングおよびハイパーサーミア効果 第 16 回日本再生医療学会総会、仙台、2017 年 3 月 7-9 日
- 小林 香央里、湯川 博、村田 勇樹、城 潤一郎、小野島 大介、山本 雅哉、石川 哲也、田畑 泰彦、馬場 嘉信 量子・磁気ナノハイブリッド粒子を用いた幹細胞イメージング・ハイパーサーミア効果 日本化学会第 97 春季年会、横浜、2017 年 3 月 16-19 日
- 村田 勇樹、城 潤一郎、田畑 泰彦 量子ドットを用いた細胞内酵素反応イメージングプローブの作製 日本分子イメージング学会第 12 回学会総会・学術総会、横浜、2017 年 5 月 25-26 日

- 村田 勇樹、城 潤一郎、田畑 泰彦 量子ドット蛍光スイッチングを利用した細胞内酵素反応イメージングプローブの作製 第33回日本DDS学会学術集会、京都、2017年7月6-7日
- 小林 香央里、湯川 博、村田 勇樹、城 潤一郎、小野島 大介、山本 雅哉、石川 哲也、田畑 泰彦、馬場 嘉信 量子・磁気ハイブリッド粒子による幹細胞イメージングおよびハイパーサーミア効果 第33回日本DDS学会学術集会、京都、2017年7月6-7日
- 村上 隆英、山下 幸大、村田 勇樹、坂井 義治、田畑 泰彦 ICG含有ナノ粒子を用いた癌転移リンパ節のイメージング 第33回日本DDS学会学術集会、京都、2017年7月6-7日
- 村田 勇樹、城 潤一郎、田畑 泰彦 細胞死可視化のための量子ドットを用いた酵素反応イメージング試薬のデザイン 第38回日本炎症・再生医学会、大阪、2017年7月18-19日
- 村田 勇樹、城 潤一郎、田畑 泰彦 細胞の生物機能可視化のためのモレキュラービーコンによる細胞内 mRNA のイメージング 日本バイオマテリアル学会第12回関西若手研究発表会、奈良、2017年8月31日
- 村田 勇樹、城 潤一郎、田畑 泰彦 細胞の生物機能可視化のためのモレキュラービーコン内包ゼラチンナノ粒子の作製 第39回日本バイオマテリアル学会大会、東京、2017年11月20-21日
- 成田 萌、城 潤一郎、山本 雅哉、田畑 泰彦 ホストゲスト相互作用を利用したポリエチレングリコールハイドロゲルの作製 第66回高分子学会年次大会、幕張、2017年5月29-31日
- 成田 萌、田畑 泰彦 ナノパターン基材上での間葉系幹細胞の増殖と抗炎症サイトカイン分泌 第39回日本バイオマテリアル学会大会、東京、2017年11月20-21日
- 田中隆介、Kim Yanghee、田畑泰彦 単球動員作用をもつ難水溶性薬剤を徐放可能なフィブリンゲルの作製 第33回日本DDS学会学術集会、京都、2017年7月6-7日
- 田中隆介、Kim Yanghee、田畑泰彦 組織再生のための単球遊走薬物徐放システムを組み込んだフィブリンゲルの調製と抗炎症性マクロファージ分化作用 第38回日本炎症・再生医学会、大阪、2017年7月18-19日
- 田中隆介、田畑泰彦 疎水性薬剤徐放化フィブリンハイドロゲルによる抗炎症性マクロファージ動員システムの作製 日本バイオマテリアル学会関西ブロック 第12回若手研究発表会、奈良、2017年8月31日
- 田中隆介、田畑泰彦 抗炎症性マクロファージ動員のための疎水性薬剤徐放化フィブリンハイドロゲルの作製 第39回日本バイオマテリアル学会大会、東京、2017年11月20-21日
- 鷺尾 絢子、手嶋 浩貴、横田 兼欣、北村 知昭、田畑 泰彦 根尖歯周組織の再生誘導に用いるバイオガラスゼラチンスポンジの作製と評価 第39回日本バイオマテリアル学会大会、東京、2017年11月20-21日
- Hsu, C.J., Jo, J.Ichiro., Sakuma, M., Tabata, Y. Preparation of macrophages genetically engineered with mRNA of interleukin-10. 33th Annual Meeting of the Japan Society of Drug Delivery System, Kyoto,

July 6-7, 2017

Hsu, C.J., Jo, J. Ichiro., Sakuma, M., Tabata, Y. Anti-inflammatory cytokine secretion of engineered macrophages with messenger RNA delivery. The 38th Annual Meeting of the Japan Society of Inflammation and Regeneration, Osaka, July 18-19, 2017

Hsu, C.J., Jo, J. Ichiro., Sakuma, M., Tabata, Y. Prolonged secretion of IL-10 by transfected macrophages with cationized gelatin nanospheres incorporating IL-10 mRNA. Symposium 2017 of The Japanese Society for Biomaterials, Tokyo, November 20-21, 2017

吉崎舟洋、義村耕平、田畑泰彦 retinoic acid 導入 lysophosphatidyl choline の創傷治癒マクロファージ誘導機能の評価 第 38 回日本炎症・再生医学会、大阪、2017 年 7 月 18-19 日

許 峻睿、田畑泰彦、城潤一郎、佐久間恵 メッセンジャー RNA を用いて改変したマクロファージの抗炎症性サイトカインの分泌 第 38 回日本炎症・再生医学会、大阪、2017 年 7 月 18-19 日

城潤一郎、明石祐典、田畑泰彦 高分子ナノ粒子を用いた血小板をキャリアとするドラッグデリバリーシステムの構築 第 38 回日本炎症・再生医学会、大阪、2017 年 7 月 18-19 日

湯川 博、石川哲也、田畑泰彦、馬場嘉信 最先端量子技術に基づく肝不全モデルマウス内移植幹細胞 in vivo 蛍光リアルタイムイメージング診断 第 38 回日本炎症・再生医学会、大阪、2017 年 7 月 18-19 日

百鳥直樹、田中隆介、田畑泰彦 pioglitazone 徐放化粒子の作製とマクロファージへの作用 日本バイオマテリアル学会関西ブロック 第 12 回若手研究発表会、奈良、2017 年 8 月 31 日

百鳥直樹、田中隆介、田畑泰彦 マクロファージに作用する 2 種類の疎水性薬物の徐放化材料の作製 第 39 回日本バイオマテリアル学会大会、東京、2017 年 11 月 20-21 日

升本 英利、南方 謙二、西尾 博臣、山本 雅哉、大村 友博、横出 正之、清水 章、松原 和夫、田畑 泰彦、坂田 隆造、湊谷 謙司. 塩基性線維芽細胞増殖因子含有ゼラチンハイドロゲルシートによる心筋再生治療の 2 治験例 第 33 回日本 DDS 学会学術集会、京都、2017 年 7 月 6-7 日

西尾 博臣、升本 英利、南方 謙二、熊谷 基之、山本 雅哉、大村 友博、横出 正之、清水 章、松原 和夫、田畑 泰彦、湊谷 謙司. 虚血性心疾患患者に対する bFGF 含有ゼラチンハイドロゲルシート移植の安全性と有効性 第 7 回 DDS 再生医療研究会、東京、2017 年 12 月 23 日

中島尚、橋本哲、上村顕也、佐藤祐一、若槻華子、宮田昌幸、明石祐典、田畑泰彦、寺井崇二 トリアムシノロンアセトニド徐放化ゼラチンハイドロゲルシートの効果の検証 第 16 回再生医療学会総会、仙台、2017 年 3 月 7-9 日

中島尚、橋本哲、佐藤 裕樹、上村顕也、佐藤祐一、若槻華子、宮田昌幸、明石祐典、田畑泰彦、寺井崇二 トリアムシノロンアセトニド内包化ゼラチンシートの効果の検証 第 33 回日本 DDS 学会学術総会、京都、2017 年 7 月 6-7 日

吉増達也、木下貴裕、田畑泰彦、山本雅哉、川後光正、平井慶充、大橋拓矢、矢田由美、尾浦正二、
西村好晴 徐放化 basic-FGF 製剤の胸腔内投与による肺気腫の再生医療 第 33 回日本 DDS 学
会学術集会、京都、2017 年 7 月 6-7 日

再生組織構築研究部門
Department of Regeneration Science and Engineering

再生増殖制御学分野
Laboratory of Tissue Stem Cell Biology

| | | | |
|----|-------|---------------|-------------------------|
| 教授 | 瀬原 淳子 | Prof. | Atsuko Sehara -Fujisawa |
| 助教 | 飯田 敦夫 | Assist. Prof. | Atsuo Iida |
| 助教 | 佐藤 文規 | Assist. Prof. | Fuminori Sato |

私たちのグループでは、骨格筋を中心に、その発生・再生機構を研究してきた。しかし、近年はそれに加えて、骨格筋萎縮の問題にも取り組んでいるので、本年度はそれに関して報告したい。

地球上の全ての生物が共有する主たる環境因子に“時間”と“重力”がある。“時間”に関しては進化・発生・老化との関連から研究も盛んであり、多くの科学的知見の蓄積がある。iPS細胞のように、ある意味時間を人為的に巻き戻すことすら可能となっている。一方、重力に関しては私たち人間のみならず全ての生物が事実上終生その影響下にあるにも関わらず科学的知見の蓄積に乏しい。その理由は、重力の影響を長期的に除去することは地球上では不可能であり、現時点では地球を離れ、宇宙空間へ飛び出すしか方法がないからだ。現在、地球の重力圏を離れ長期的に微重力環境に滞在することが可能なのは唯一、国際宇宙ステーション ISS だけである。ISS には日本実験棟「きぼう」があり、そこでは宇宙環境を対象とした様々な研究が実施されている (http://www.jaxa.jp/projects/iss_human/kibo/index_j.html)。今は半ば常識になっているが、重力負荷もまた骨格筋維持の重要な要因であることは、1970年ソユーズ9号で18日間宇宙に滞在した宇宙飛行士に著しい筋力低下と筋萎縮が見られたことなどから、初めて示唆されたものである。一方、骨格筋活動量低下によって引き起こされる筋萎縮は廃用性筋萎縮と呼ばれ、骨折によるギブス固定などによって生じる筋萎縮などがその典型であり、筋肉を使えるようになれば回復する。宇宙滞在に起因する筋萎縮は、この廃用性筋萎縮に類似すると考えられている。これは、ISS内での運動負荷による筋萎縮の顕著な軽減や、廃用性筋萎縮のマーカー遺伝子とされるユビキチン・プロテアソーム系遺伝子の発現上昇、さらには地球帰還後のリハビリテーションにより回復する可塑的な筋萎縮であること、などによる。

しかしそもそも、重力負荷を受けないことによる筋萎縮は、どこまで運動負荷を受けないことによる廃用性筋萎縮と共通性があり、また異なるのだろうか？ 私たちのひとつの疑問はそこにある。現在、筋萎縮予防策として宇宙飛行士はISSにおいて毎日2時間程度の運動を行っているが、運動していても、長期宇宙滞在は15%前後の筋量減少とそれに伴う筋力低下や代謝の変化をもたらす。そして、ミオシン重鎖で区別される筋繊維のタイプが、I型のみオシン重鎖を持つ遅筋タイプから、I/IIa型、IIa型を持つ速筋タイプへと変化することがヒトでも確認され、これは長期寝たきりによる変化に類似するものであるという。これは、重力負荷と運動負荷のかかる筋繊維の違いだけでなく、これらの負荷が関わる骨格筋維持の仕組みの違いを反映していると考えられる。さらに、

宇宙滞在の、血液循環や神経系への影響も明らかになってきた今、神経支配を受け、血管に囲まれた骨格筋の変化は、それらの機能変化と密接に関わっている可能性がある。加齢・癌などの疾病に伴う不可逆に見える筋萎縮についての知見が乏しいのと同様、宇宙での筋萎縮メカニズムは未知なところが多いのである。

そのような背景のもと、私たちの研究グループは宇宙滞在による骨格筋萎縮メカニズムの解明を目的として、小型魚類であるゼブラフィッシュを用いた2度のISS宇宙滞在实际（*Zebrafish Muscle*, *Zebrafish Muscle2*）を実施した。その経過を報告したい。宇宙滞在による骨格筋萎縮研究の対象動物として水棲生物であるゼブラフィッシュを選択したのは、主に以下のような理由からである。

A. 水棲生物に関して微重力環境下における安定的長期飼育の実績がある

B. 小型動物ゆえに軌道上で固定操作などが可能で、ある程度のサンプル数を確保できる

C. 骨格筋の基本構造がヒトやマウスと同じで、脊椎モデル生物として確立されている

Aに関して、意外にも水棲生物を用いた宇宙滞在实际の歴史は古く、特に日本が独自に開発した水棲生物実験装置（AQH）は、世界的にも高い評価を得ている。宇宙メダカが飼育されていたのもこの装置で、より安定的な飼育を目的とした開発が続けられてきた。Bは、最も重要な要素と言える。これまでの個体を扱った研究の多くは、地上に帰還後に固定・サンプリングしたものを“宇宙滞在”として解析してきた。しかし、軌道上で何が起きているのかを知るためには、軌道上での筋萎縮の確認と遺伝子・タンパク質発現の評価が必要である。サンプル数確保の重要性は言うまでもない。Cに関して、ゼブラフィッシュは遺伝子データベースが充実しており、変異体/トランスジェニックライブラリーも豊富である。ゲノム編集技術の発展により、逆遺伝学的実験手法を用いた研究も容易になり、創薬分野では化合物スクリーニングなどにも用いられ、ニーズの高いモデル生物となっている。ここまで水棲生物であるゼブラフィッシュを用いることの利点ばかりを述べてきたが、実は宇宙実験の実施にあたっては大きな疑問があった。それは地上においても浮力を利用し水中に浮かんでいる（宇宙遊泳に似ている？）ゼブラフィッシュの骨格筋も、ヒトと同様に宇宙滞在によって本当に萎縮するのだろうかという根本的な疑問である。さらには、そもそも宇宙滞在による筋萎縮と類似するとされる廃用性筋萎縮はゼブラフィッシュにも起こり得るのかという疑問である。前者は宇宙滞在实际の結果が得られるまでは知りようがないが、後者に関しては運動量を減らすことによって確認できることから、予備実験としてゼブラフィッシュの運動抑制実験を実施した。その結果、ゼブラフィッシュにおいても廃用性筋萎縮と類似の遺伝子発現変化がみられることが確認され、いよいよ宇宙実験を実施できる運びとなった。

宇宙滞在实际は、次世代シーケンサー用いたトランスクリプトーム解析を中心とし、実施にあたり地上帰還後も含めた経時的なサンプリングを計画した。これは長期滞在による反応だけではなく、初期反応、微重力環境への適応、地上帰還後の反応を知りたかったからである。多くの宇宙滞在实际が、ある一点でのサンプリングや帰還後のサンプリングを実施していたことからこの点を重視した。実際にはカザフスタンのバイコヌール宇宙基地から6週齢のゼブラフィッシュ18匹を打ち上げ、全個体を無事にISSへ送り届けることに成功した。サンプリングに関しては、微重力環境2日目（6匹）、5週目（6匹）、さらにはおよそ6週間の宇宙滞在实际後の地上帰還後2日目（3匹）、5週目（3匹）が計画された。

宇宙滞在による筋萎縮の廃用性筋萎縮との類似性や差異を検討する上で、運動量を評価する必要がある。陸生動物モデルを宇宙実験で使う場合、歩くことが困難なため、その運動量減少に起因する廃用性萎縮を考慮せねばならない。宇宙滞在に伴うゼブラフィッシュの運動量の変化とともに、その経時経過を調べることにより、彼らが微重力環境にどのように適応していくのかを調べた。多くの魚には光に背を向けて泳ぐ背光性がある。宇宙滞在実験ではこの性質を利用し、安定した飼育を可能としている。平衡感覚は基本的に前庭器官がその役割を担うが、微重力環境下では前庭器官は機能しなくなるため、魚類は視覚情報を頼りに上下を認識するようになる。そのため、ISS内では水槽上方にLED照明を設置し、さらに水槽下方から給餌を行うことによって暫定的な上下を設定している。ISS・地上コントロール飼育とも定期的に動画を撮影し、これを用いて運動距離・速度を測定し、運動の量と質を評価した。その結果、ゼブラフィッシュは高い適応能力を示し、ISS滞在数日後には地上コントロールと区別がつかなくなるほど上手に泳ぐ様子が確認された。驚いたことに、地上コントロールに比較して、遊泳距離、速度ともに有意な差は認められず、運動量には変化がないことが明らかとなった。しかし、詳細は省略するが動画の解析から地上での姿勢制御が宇宙では観察されなくなり、遊泳姿勢に質的な変化が生ずることを見出した。

そして、宇宙滞在5週目のゼブラフィッシュ切片サンプルを測定し、筋萎縮の有無を調べた。その結果、水棲生物ゼブラフィッシュにおいても筋萎縮が確認され、特に背側の骨格筋の萎縮が顕著である傾向を認めた。この結果から、水中に棲むゼブラフィッシュも陸生のヒトなどと同様の重力依存的な骨格筋維持機構を備えていることがわかった。では、そのメカニズムはどのようなものだろうか。宇宙滞在に伴って変動する遺伝子が多数確認され、その多くは極めて興味深い機能を持つものであった。前述した廃用性筋萎縮を模擬した運動抑制ゼブラフィッシュ骨格筋のトランスクリプトームとは必ずしも一致せず、逆の変動を示す遺伝子も多数見出されたことから、単純に廃用性筋萎縮に類似した筋萎縮ではないと推察される。また、これまで宇宙滞在によって発現量が変化することが報告されている遺伝子の中には地上帰還後2日目に同様の発現変動が見られるものもあり、現在、宇宙滞在時・地上帰還後の遺伝子発現プロファイルを詳細に比較・検討しているところである。

ここまでの実験方法は、実は一つの大きな問題点を含んでいる。それは、宇宙滞在における微重力環境と宇宙放射線の影響を区別して考慮できていないという点である。つまり、2014年に実施したゼブラフィッシュ長期宇宙滞在実験から得られた結果は、「宇宙滞在=微重力環境」ではなく、少なくとも「宇宙滞在=微重力環境+宇宙放射線」の影響ということになる。近年、宇宙滞在による宇宙放射線被ばくを対象とした多くの研究がされており、生体に及ぼす様々な影響が報告されている。骨格筋を対象とした宇宙実験は、宇宙滞在による筋萎縮が運動によって顕著に抑制されることもあり、どうしても微重力環境の影響を中心に議論されがちである。しかし、火星探査など人類がこれまでに経験したことのない長期宇宙滞在に関しては、宇宙放射線の影響も注目すべきなのである。そこで、宇宙滞在実験“Zebrafish Muscle”を模擬した低線量 γ 線照射実験を実施した。その結果、期間を通して有意に発現変動する遺伝子が数多く見られ、宇宙滞在による発現変動遺伝子と同様の発現変動を示す遺伝子が多数確認された。より詳細な解析を進めるためには、宇宙放射線の影響がない微重力環境が必要となるが、宇宙放射線の影響を除外した環境下で長期の微重力環境を設

定することは現時点では不可能となっている。しかし逆に、宇宙放射線に等しく暴露されている状況下で人工的 1G 環境を作り出すことにより、詳細に微重力環境依存的な影響を調べることは可能となっている。我々のグループは、ISS 内で人工的 1G 環境を使用した実験“Zebrafish Muscle 2”を行う機会を得た（2017 年 12 月）。“Zebrafish Muscle”、“Zebrafish Muscle 2”の結果を合わせて検討することによって初めて、微重力環境依存的な影響が明らかにできるだろう。

宇宙滞在による骨格筋萎縮は一般に広く知られ、今や古典的な研究テーマと思われているが、実はそのメカニズムは未解明である。幸運なことに私たちのグループはゼブラフィッシュを用いた宇宙滞在実験を実施するきわめて貴重な機会を得た。この宇宙滞在実験に関して多大なご協力をいただいた皆様に、この場をお借りして感謝の意を表したい。本研究は主に科研費の助成（15H05938（瀬原）、(C) 15K11917（佐藤））を受けておこなったものである。

When we have to immobilize a broken bone in a cast or need to be on extended bed rest, we experience a rapid decrease in the mass and strength of skeletal muscle. This type of muscle wasting, called as disuse muscle atrophy, is reversed in daily life, and promoted by exercise. In contrast, gradual and generalized loss of skeletal muscle mass and function in sarcopenia, an age-related syndrome, and in disease-related cachexia seriously affects quality of life because it is irreversible to date. The severe muscle atrophy is also caused by neurogenic diseases and injuries such as amyotrophic lateral sclerosis and spinal cord injury because the command center or the neural circuit of exercise is affected in these cases. We carried out a project named “Zebrafish Muscle”. A key question of this project is whether skeletal muscle atrophy also occurs in adult zebrafish, tropical fresh water fish, under microgravity. Young adult zebrafish were launched successfully to the International Space Station for 5 weeks. As a result, we found skeletal muscle atrophy of fish during staying in space. We will elucidate mechanisms for muscle atrophy in space for the first time by comparing transcriptome data of skeletal muscle during stay in space and after return to the earth with those on the earth.

List of Publications

Naitoh, H., Suganuma, Y., Ueda, Y., Sato, T., Hiramuki, Y., Fujisawa-Sehara, A., Taketani, S. and Araki, M. (2017). Upregulation of matrix metalloproteinase triggers transdifferentiation of retinal pigmented epithelial cells in *Xenopus laevis*: A link between inflammatory response and regeneration. **Developmental Neurobiology**. 77 (9), 1086-1100

Tsumagari, K., Shirakabe, K., Ogura, M., Sato, F., Ishihama, Y. and Sehara-Fujisawa, A. (2017). Secretome analysis to elucidate metalloprotease-dependent ectodomain shedding of glycoproteins during neuronal differentiation. **Genes to Cells**. 22, 237-244.

List of Presentations

招待講演（海外）

Atsuko Sehara-Fujisawa, Lessons from Space: Studies on Skeletal Muscle Regeneration and Atrophy, Lecture in Philipps-University Marburg, Marburg, Germany, March 14, 2017.

一般演題（海外）

Kamezaki, A., Sato, F., Aoki, K., Asakawa, K., Kawakami, K. and Sehara-Fujisawa, A. Live cell imaging and proteomic approaches shed light on novel aspects of ectodomain shedding in developing neurons. Joint Meeting of German and Japanese Society of Developmental Biologists 2017, Kiel, Germany, March 16, 2017.

招待講演（国内）

瀬原淳子、宇宙科学から探る筋萎縮機構、第9回分子骨格筋代謝研究会、京都、2017年7月17日

Atsuko Sehara-Fujisawa, Visualization of the Ectodomain Shedding of Neuregulin/Glial Growth Factor, 第40回日本神経科学大会、千葉、2017年7月22日

瀬原淳子、筋維持・萎縮機構の研究：宇宙から学ぶこと、宇宙科学談話会、相模原、2017年9月6日

飯田敦夫、モデル生物を使う助教がユニーク生物の研究を提案し、自分好みの研究会まで立ち上げた経緯と現状、第42回日本比較内分泌学会大会、奈良、2017年11月17日

Atsuko Sehara-Fujisawa, Studies on skeletal muscle regeneration and atrophy? What zebrafish experienced in a space tour、第12回研究所ネットワーク国際シンポジウム、東京、2017年11月28日

瀬原淳子、筋維持・萎縮機構の研究：宇宙から学ぶこと、第6回実験動物科学シンポジウム - 宇宙における動物実験 -, つくば、2017年12月1日

一般演題（国内）

Sato, F., Minyong, C., Wang, Z., Iwase, M., Uchida, S., Sakimura, T., Kono, Y., Shirakawa, M., Tanigaki, F., Chatani, M., Kudo, A., Takahashi, A., Kobayashi, J., Imamura, K., Horiuchi, T., Suzuki, Y., Sugano, S., Koichi, K. and Sehara-Fujisawa, A. What Zebrafish Experienced on a Space Tour、International Symposium on Living in Space 2017、東京、2017年3月9日

Arai, H., Sato, F., Yamamoto, T., Kiyonari, H. and Sehara-Fujisawa, A. Involvement of Adam 19 in the fate decision of cardiac neural crest cells. Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists、東京、2017年5月10-11日。

Kuriki, M., Sehara-Fujisawa, A. and Sato, F.. Roles of a transcription factor 19A in the ossification of

sternum. Auunal Meeting of the Japanese Society of Development Biologists、東京、2017年5月10-11日。

Tabuchi, M., Kamezaki, A., Sato, F., Aoki, K., Asakawa, K., Kawakami, K. and Sehara-Fujisaw, A. Visualization of Neuregulin 1 ectodomain shedding in motor neurons in zebrafish. Auunal Meeting of the Japanese Society of Development Biologists、東京、2017年5月10-11日。

飯田敦夫、グーデア科胎生魚 *Xenotoca eiseni* の臀鰭の左右非対称構造、日本動物学会近畿支部研究発表会、神戸、2017年5月13日

曾我部舞奈、多光子顕微鏡を用いたライブイメージング技術の限界突破、第69回日本細胞生物学会大会、仙台、2017年6月15日

飯田敦夫、小型魚類ゼブラフィッシュを使った発生機構の研究、次世代生命科学の研究会、福岡、2017年7月13日

Choi Minyong、水棲生物を使った研究、「宇宙に生きる」若手夏合宿、松本、2017年8月22日

Maina Sogabe, Break the Limit of Live Imaging Technology using sparse modeling, International Meeting on “High-Dimensional Data-Driven Science” (HD³-2017)、京都、2017年9月12日

佐藤文規、Choi Minyong、王梓、岩瀬海里、今村聖実、堀内映美、内田智子、小林純也、高橋昭久、菅野純夫、鈴木穰、川上浩一、瀬原淳子、宇宙滞在が骨格筋に及ぼす影響—重力負荷減少だけではなさそう？、日本宇宙生物科学学会第31回大会、前橋、2017年9月21日

再生組織構築研究部門
Department of Regeneration Science and Engineering

再生免疫学分野
Laboratory of Immunology

| | | | |
|-----|-------|---------------|------------------|
| 教授 | 河本 宏 | Prof. | Hiroshi Kawamoto |
| 准教授 | 宮崎 正輝 | Assoc. Prof. | Masaki Miyazaki |
| 助教 | 増田 喬子 | Assist. Prof. | Kyoko Masuda |

造血においては多能造血幹細胞から順次分化能が限定されていき、いろいろの系列の単能前駆細胞が生成する。我々の研究室は、この分化能限定過程において、前駆細胞の運命を振り分ける分子機構を解析することを目指している。造血過程の全体を研究対象としているが、中でも T 細胞に至る過程に比重を置いて研究を進めている。また、胸腺上皮細胞の分化過程の研究も行っている。一方、再生した T 細胞を用いた免疫細胞療法の開発も進めている。

再生免疫細胞療法は、他家移植の系での臨床応用を考えている。そのためには、再生した細胞が免疫学的に拒絶をされないことが重要になる。2017 年度はこの問題に関する成果が得られたので、以下に紹介する。

1) iPS 細胞から再生した細胞に対して NK 細胞が引き起こす免疫反応の解明とその制御法の開発

再生医療分野では、現在、質の良い iPS 細胞をつくってそれを多くの患者に使うという戦略（iPS 細胞ストック事業）が iPS 細胞研究センターを中心にして進められている。白血球の血液型である HLA 遺伝子を、父方由来と母方由来の 2 セットについて同一（HLA- ホモ）である人から iPS 細胞を作製すると、片方だけ同じセットを持つ人（HLA- ヘテロ）に再生した組織を移植した場合に、拒絶反応が起こりにくいと期待される。従って iPS ストック事業では、HLA- ホモの iPS 細胞株のラインアップの備蓄が進められている。現在 HLA ハプロタイプの頻度の多い順に HLA- ホモ株が 2 種類配布されており、この 2 種類で日本人の 24% がカバーできる。ただし、このようにホモ - ヘテロ移植の場合でも、免疫系による拒絶反応を完全に回避するのは難しいと考えられる。免疫学的問題点がいくつかある中で、今回は、NK（ナチュラルキラー）細胞が起こしうる免疫反応について調べた。NK 細胞は、HLA 中の HLA-C という分子を出していない細胞を殺傷するという特性を持っており、HLA-C は、HLA-C1 型と、HLA-C2 型の 2 型に分けられる。

今回の研究では、仮想の移植細胞として、HLA- ホモで HLA-C が C1/C1 型の iPS 細胞から T 細胞あるいは血管内皮細胞を再生した。仮想の患者として、HLA- ヘテロかつ C1 型と C2 型の両方の HLA-C を有する健常人から NK 細胞を採取し、再生細胞を殺傷するかどうかを調べた。結果として、NK 細胞が再生細胞を殺傷することが明らかになった（図 1）。つまり、この組み合わせで移植を行うと、拒絶反応が起こる可能性を示している。NK 細胞は、再生細胞が C2 型の HLA-C を出していないことを感知して攻撃していた。そこで、再生細胞が C2 型の HLA-C を出すように iPS 細胞

に遺伝子改変を加えた。すると、NK 細胞による殺傷が起こらなくなった。

NK 細胞による攻撃が起こりうる組み合わせは、iPS 細胞株によって異なるが、iPS ストック事業で総じてみると 30% の頻度で起こると予測でき、それらのケースでは、移植後により注意深い経過観察が必要と考えられる。また、HLA 分子を導入する方法は、iPS 細胞を用いた再生医療の中で起こりうる移植片の拒絶反応を軽減させるのに役立つと期待できる。

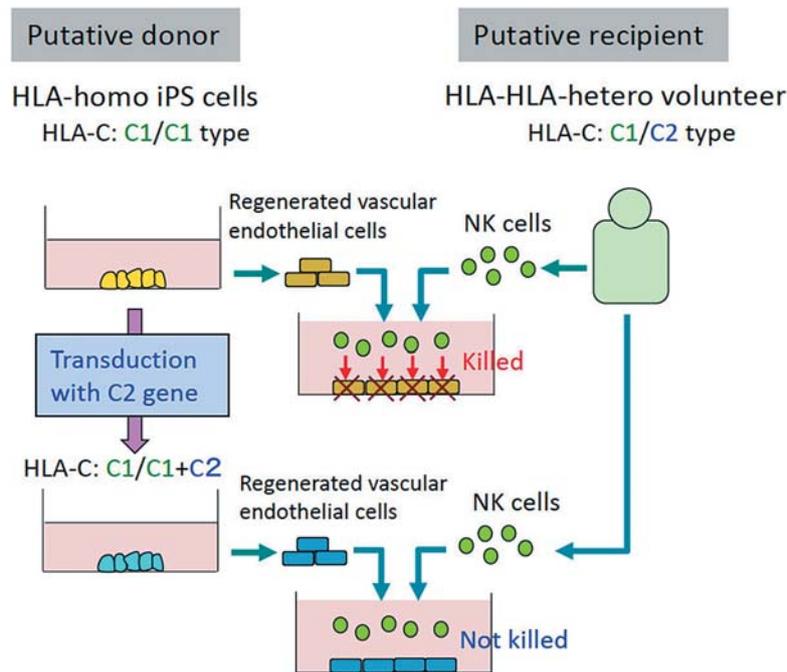


Fig. 1 NK cells from a KIR-ligand mismatched HLA-hetero person exerted cytotoxicity against regenerated tissue derived from HLA haplotype-homozygous iPS cells based on missing-self recognition, but such cytotoxicity was cancelled when missing HLA-C2 gene was over-expressed in the regenerated cells.

The major aim of our laboratory is to elucidate the molecular mechanisms that regulate cell fate decisions in the process of lineage restriction from multipotent hematopoietic stem cells to unipotent progenitors. Among various events occurring during hematopoiesis, we are mainly focusing on the process towards the production of T cells. We are also studying developmental process of thymic epithelial cells. In parallel with these basic subjects, we are also committed to the research to apply culture method for clinical settings, where we focus on the regeneration of immune cells that are potentially useful in immune cell therapy against cancer.

In 2017, we published one paper that concerns an issue whether regenerated cells are successfully grafted or not in allogeneic transplantation setting, focusing on NK cell-mediated immune reaction.

1) Clinical consideration in transplantation of regenerated tissue derived from HLA haplotype-homozygous iPS cells: NK cell alloreactivity against KIR ligand-mismatched HLA-haploidentical tissue

HLA haplotype-homozygous (HLA-homo) iPSCs are being prepared, to be used for allogeneic transplantation of regenerated tissue into recipients carrying an identical haplotype in one of the alleles (HLA-hetero). However, it remains unaddressed whether NK cells respond to these regenerated cells. HLA-C allotypes, known to serve as major ligands for inhibitory receptors of NK cells, can be classified into group 1 (C1) and group 2 (C2), based on their binding specificities. We found that the T cells and vascular endothelial cells regenerated from HLA-homo-C1/C1 iPSCs were killed by specific NK cell subsets from a putative HLA-hetero-C1/C2 recipient. Such cytotoxicity was cancelled when target cells were regenerated from iPSCs transduced with the C2 gene identical to the recipient. These results clarify that NK cells can kill regenerated cells by sensing the lack of HLA-C expression, and further provide basis for a novel approach to prevent such NK cell-mediated rejection responses.

List of Publications

- Ichise H, Nagano S, Maeda T, Miyazaki M, Miyazaki Y, Kojima H, Yawata N, Yawata M, Tanaka H, Saji H, Masuda K, and Kawamoto H. NK cell alloreactivity against KIR ligand-mismatched HLA-haploidentical tissue derived from HLA haplotype-homozygous iPS cells. **Stem Cell Reports**. 12;9 (3):853-867.2017.
- Seki M, Kimura S, Isobe T, Yoshida K, Ueno H, Nakajima-Takagi Y, Wang C, Lin L, Kon A, Suzuki H, Shiozawa Y, Kataoka K, Fujii Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Shimamura T, Masuda K, Kawamoto H, Ohki K, Kato M, Arakawa Y, Koh K, Hanada R, Moritake H, Akiyama M, Kobayashi R, Deguchi T, Hashii Y, Imamura T, Sato A, Kiyokawa N, Oka A, Hayashi Y, Takagi M, Manabe A, Ohara A, Horibe K, Sanada M, Iwama A, Mano H, Miyano S, Ogawa S, Takita J. **Nat Genet**. 49:1274-1281.2017.
- Noguchi S, (Kawamoto H; 78th of 178 authors) FANTOM5 CAGE profiles of human and mouse samples. **Sci Data**. 4:170112.2017.
- Miyazaki M, Miyazaki K, Chen K, Jin Y, Turner J, Moore AJ, Saito R, Yoshida K, Ogawa S, Rodewald HR, Lin YC, Kawamoto H, Murre C. The E-Id Protein Axis Specifies Adaptive Lymphoid Cell Identity and Suppresses Thymic Innate Lymphoid Cell Development. **Immunity**. 46:818-834.2017.
- 河本宏 (2017). 歴史から紐解く免疫学 及び表紙イラスト, 免疫ペディア 317, 14-27
- 前田卓也、増田喬子、河本宏 (2017). iPS 細胞技術を用いたがん抗原特異的 T 細胞療法の開発, がん免疫療法 -What's now and what's next?- (遺伝子医学 MOOK31 号) 292, 209-215
- 増田喬子 (2017). Q46, Q66, Q68, 実験医学別冊 ラボ必携 フローサイトメトリー Q&A 正しいデータを出すための 100 箇条 313, 155-156, 211-213, 216-217

河本宏 (2017). iPS 細胞技術を駆使したがん, 感染症のあらたな制御 序文 / 再生したキラー T 細胞を用いたがんの免疫細胞療法—他家移植用の即納 T 細胞製剤の開発, 週刊医学のあゆみ 263 巻 11, 12 号 263, 893-901

増田喬子 (2017). 胸腺の再生—現状と課題, 週刊医学のあゆみ 263 巻 11, 12 号 263, 933-940

List of Presentations

海外でのシンポジウム招待講演

河本宏 「Generation and Regeneration of T cells」 The Molecular Developmental Biology of Lymphocytes, Symposium in honor of Ellen Rothenberg, USA, April.2017.4.20

国内でのシンポジウム招待講演

河本宏 「Regeneration of CD8 $\alpha\beta$ type T cells with potent tumor antigen-specific cytotoxic activity from T cell-derived iPSCs」 日本がん免疫学会総会シンポジウム 1”Immune Cell Engineering”, 千葉, 2017 年 6 月 29 日

河本宏 「iPS 細胞技術を用いたがん抗原特異的キラー T 細胞の再生—他家移植の系で使える T 細胞製剤の開発—」 日本肝癌研究会, 京王プラザホテル, 2017 年 7 月 6 日

河本宏 「T 細胞の発生と再生—iPS 細胞技術を用いたがん抗原特異的キラー T 細胞の再生—」 Sapporo Stem Cell Conference2017, 札幌, 2017 年 8 月 10 日

河本宏 「再生医療の現状と問題点—再生 T 細胞を用いたがんの免疫細胞療法の開発—」 愛知学院大学歯学会第 91 回学術大会, 愛知, 2017 年 1 月 3 日

河本宏 「iPS 細胞技術を用いたがん抗原特異的キラー T 細胞の再生—ネオアンチゲンを標的とした個別化医療への応用—」 第 23 回国際個別化医療学会学術集会, 東京品川, 2017 年 10 月 28 日

河本宏 「転写とエピゲノム制御による免疫細胞の分化制御と疾患」 ConBio2017 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 神戸, 2017 年 12 月 7 日

永野誠治 「iPS 細胞技術を用いた再生 T 細胞療法」 ConBio2017 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 神戸, 2017 年 12 月 7 日

国内での一般演題

前田卓也 「iPS 細胞技術を用いたがん抗原特異的キラー T 細胞の再生」 Kyoto Basic Science Forum 2017, 京都市, 2017 年 4 月 7 日

長畑洋佑 「T 前駆細胞の系列決定状態のエピジェネティックな維持機構」 細胞生物学のための発明の会, 神奈川県三浦市, 2017 年 8 月 8 日

小林由佳「The construction and application of human-type artificial lymphoid tissues」第46回日本免疫学会学術集会, 仙台, 2017年12月13日

永野誠治「iPSCs transduced with TCR gene give rise to potent CTLs with antigen specific cytotoxic activity comparable to those from T-iPSCs」第46回日本免疫学会学術集会, 仙台, 2017年12月13日

嘉島相輝「WT1-specific CTLs regenerated from T cell derived iPS cells exert therapeutic effect in xenograft model of renal cell carcinoma (ポスター)」第46回日本免疫学会学術集会, 仙台, 2017年12月13日

組織再生応用分野
Laboratory of Tissue Regeneration

教授 戸口田淳也 Prof. Junya Toguchida
准教授 吉富 啓之 Assoc. Prof. Hiroyuki Yoshitomi

本研究分野の目標は間葉系組織の増殖分化機構を理解することで、間葉系組織の臨床病態を分子レベルで明らかにし、それに基づいて新規の治療法を開発することである。以下のテーマについて現在研究を遂行している。

1. 間葉系幹細胞に関する研究

骨髄間質細胞中には、間葉系組織の様々な細胞に分化可能な組織幹細胞である間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cell, MSC) が存在しているとされている。しかし MSC の本態に関しては未解明な点が多く、MSC を用いた間葉系組織の再生医療を科学的根拠に基づいた医療とするためには、その理解が必須である。我々は京都大学医学部整形外科学教室との共同研究として、MSC の初代培養を行い、増殖及び分化能に関する解析を行っている

2. 多能性幹細胞を用いた間葉系組織の研究

平成 19 年 11 月に山中伸弥教授らによって樹立されたヒト iPS 細胞は、無限の増殖能を有する多能性幹細胞であり様々な医学・医療応用が探索されている。我々は iPS 細胞から誘導した間葉系細胞に関する下記の研究を行っている。

1) 肉腫起源細胞の探索

肉腫とは間葉系組織に発生する悪性腫瘍であり、臨床及び病理学的に極めて多様な腫瘍の集団である。近年の遺伝子解析技術の進歩により、それぞれの腫瘍において腫瘍発生に深く関連する遺伝子異常 (ドライバー変異) が明らかにされてきているが、起源細胞に関しては、その多くにおいて不明である。我々はドライバー変異を、新たに開発した薬剤誘導型発現ベクターを用いて多能性幹細胞に導入し、異なる分化段階で発現させることで、分化段階特異的なドライバー変異の影響を解析し、腫瘍の多様性の成因を明らかにするとともに、個別化治療の開発に寄与する情報を得ることを目指

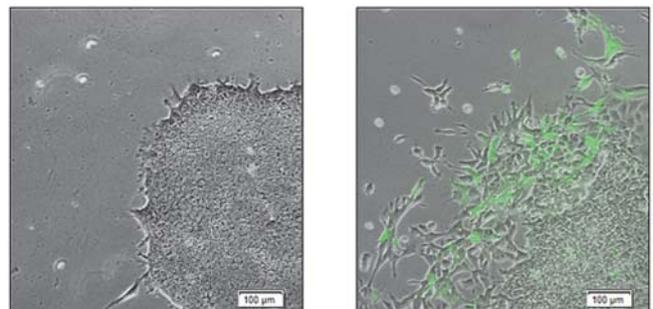


Fig. 1. iPSCs without (left) or with (right) expression of SS18-SSX fusion and fluorescent protein. Note the cell morphology change by SS18-SSX expression.

している現在、滑膜肉腫における SS18-SSX 融合遺伝子と (図 1)、軟骨肉腫における変異 IDH1 遺伝子という二つのドライバー変異に関する研究を展開している。

2) 疾患特異的 iPS 細胞を用いた病態解明と創薬

遺伝性の骨軟骨系疾患の多くは、病態が不明で有効な治療法が確立されていない。特定の個人から樹立できるという iPS 細胞の特質を利用して、近年、疾患罹患者由来の iPS 細胞を樹立して病態解明から創薬に向けた研究が展開されている。我々は難治性骨軟骨疾患の 1 つである進行性骨化性線維異形成症 (FOP) に対して病態解明と治療薬の探索を行った。我々は I 型 BMP 受容体の 1 つである ALK2 の FOP 型変異が、正常細胞では TGF- β シグナルを伝達するアクチビン A により BMP シグナルを伝達するという分子病態を明らかにし、創薬への手がかりを見出すことに成功した。さらにこれらのシグナルを阻害する薬剤を探索し、悪性腫瘍などに使用されている mTOR シグナル阻害剤、シロリムスが有効であることを見出し、平成 29 年 9 月より FOP に対するシロリムスの多施設共同二重盲検医師主導型治験を京都大学を皮切りに実施している。

平成 29 年 9 月からは再生医療実現拠点ネットワークプログラム「難治性骨軟骨疾患に対する革新的 iPS 創薬技術の開発と応用」において新たに難治性骨軟骨疾患に対する研究を開始し、我々が新たに開発した 10 日という短期間で安定して iPS 細胞から骨芽細胞・骨細胞を誘導する培養系を用いて、骨形成不全症などの骨軟骨系難病の病態解明ならびに創薬研究を行っている。さらに、ウイルス・再生医科学研究所 安達研究室との共同研究にて、骨芽細胞・骨細胞の分化過程ならびに骨様結節の形成過程を共焦点蛍光顕微鏡を用いて三次元的に可視化することに成功している (図 2)。このことにより、骨軟骨系難病の病態解明のみならず骨芽・骨細胞の分化成熟機構の詳細な解明が期待される。

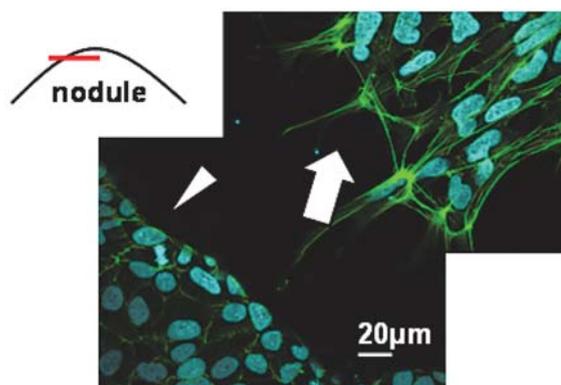


Fig. 2. Immunostaining with phalloidin and DAPI of bone-like nodules with osteoblast-like (arrowhead) and osteocyte-like (arrow) cells differentiated from iPSCs.

The objectives of our laboratory are to disclose the pathology of disorders in mesenchymal tissues at the molecular level and to develop new therapeutic modalities by understanding physiological growth and differentiation of mesenchymal cells. Following projects are currently undertaken.

1. Researches on mesenchymal stem cells

Mesenchymal stem cells (MSC), which exist in bone marrow stromal tissues, have a potential to differentiate to cells of various types in mesenchymal tissues. Many fundamental features of MSCs, however, are still unknown, which are crucial for the development of regeneration therapy using MSC as the evidence

based medicine. In collaboration with the Department of Orthopaedic Surgery in Kyoto University Hospital, we have analyzed the growth and differentiation potential of primary human MSCs.

2. Researches on mesenchymal tissues using pluripotent stem cells

Human iPS cells, which were established by Prof. Shinya Yamanaka on November 2007, are pluripotent stem cells with unlimited growth potential, and promising materials to apply for a variety of medical fields. We have been engaging following projects on mesenchymal tissues using iPS cells.

1) Investigation for the cell-of-origin in sarcomas using pluripotent stem cells

Sarcomas are malignant tumors developed in mesenchymal tissues and consisted of tumors with a variety of clinical and pathological features. By recent advances in the genome analyses, driver mutations, which are strongly involved in the development of each type of tumors, have in has been discovered in a number of tumors. Cell-of-origins of each tumor, however, are still missing in most of cases. Using PSCs with drug-inducible driver mutations, we analyze the effect of mutations in different stages of differentiation. This approach may help to explain the heterogeneity of tumors and also provide information for personalized medicine. We are now analyzing two driver mutations, IDH1/2 genes in chondrosarcomas and SS18-SSX fusion gene (Fig. 1) in synovial sarcoma.

2) Approaches for intractable musculoskeletal diseases using disease-specific iPS cells

In most of cases, the pathophysiology in hereditary musculoskeletal diseases is still to be investigated and no effective treatments are available. Using the advantage that iPS cells can be established from particular individuals, a number of disease-specific iPS cells have been established and used to understand the disease and discover the drugs. We have discovered novel molecular mechanisms and obtained the key for drug discovery in one of such diseases, fibrodysplasia ossificans progressive. We have discovered that Acitivin-A, which is an inducer of TGF- β signal in normal cells, transmits erroneously the BMP signal via FOP-type mutant ACVR1/ALK2. Furthermore, high through put screening identified an mTOR inhibitor, rapamycin, as a candidate treatment for FOP. Multicenter double-blinded investigator-initiated clinical trial of rapamycin for FOP has started from September 2017.

We started new AMED project “Development and Application of Innovative Drug-screening Technology Using Patient Derived iPS Cells for Intractable Bone and Cartilage Diseases” from this year. Using a newly developed stable and rapid protocol for engineering oseteo-lineage cells from iPSCs, we are now investigating the pathogenesis of intractable bone and cartilage diseases, including Osteogenesis Imperfecta, aiming drug discovery. Furthermore, we have succeeded three-dimensional visualization of the bone-like nodule formation by the collaboration with Prof. Adachi of Infront (Fig. 2), which will help us to understand how osteogenic lineage cells such as osteoblasts and osteocytes develop and also to investigate the pathology of bone-forming diseases.

List of Publications

- Ikeguchi, R., Aoyama, T., Kakinoki, R., Ueda, M., Kasai, Y., Maekawa, T., Tada, H., Yamamoto, M., Matsuda, S., Nakamura, T., Toguchida, J. (2017). A clinical trial for Kienböck disease by cultured autologous multipotent mesenchymal stromal cells augmented with vascularized bone grafts: A report of five cases. **J Orthop Sci.** 17, 30032-30035.
- Hino, K., Horigome, K., Nishio, M., Komura, S., Nagata, S., Zhao, C., Jin, Y., Kawakami, K., Yamada, Y., Ohta, A., Toguchida, J., Ikeya, M. (2017). Activin-A enhances mTOR signaling to promote aberrant chondrogenesis in fibrodysplasia ossificans progressiva. **J Clin Invest.** 127, 3339-3352.
- Konishi, E., Nakashima, Y., Mano, M., Tomita, Y., Kubo, T., Araki, N., Morii, E., Yoshikawa, H., Haga, H., Toguchida, J., Ueda, T., Osawa, M., Hoshi, M., Inoue, T., Aono, M., Yanagisawa, A.. (2017). Chondroblastoma of extra-craniofacial bones: Clinicopathological analyses of 103 cases. **Pathol Int.** 67, 495-502.
- Nakahara, Y., Kitoh, H., Nakashima, Y., Toguchida, J., Haga, N.. (2017). Longitudinal study of the activities of daily living and quality of life in Japanese patients with fibrodysplasia ossificans progressiva. **Disabil Rehabil.** 16, 1-6.
- Kitani-Morii, F., Imamura, K., Kondo, T., Ohara, R., Enami, T., Shibukawa, R., Yamamoto, T., Sekiguchi, K., Toguchida, J., Mizuno, T., Nakagawa, M., Inoue, H. (2017). Analysis of neural crest cells from Charcot-Marie-Tooth disease patients demonstrates disease-relevant molecular signature. **Neuroreport.** 28, 814-821.
- Ikeguchi, R., Kakinoki, R., Ohta, S., Oda, H., Yurie, H., Kaizawa, Y., Mitsui, H., Aoyama, T., Toguchida, J., Matsuda, S. (2017). Recipient bone marrow-derived stromal cells prolong graft survival in a rat hind limb allotransplantation model. **Microsurgery.** 37, 632-640.
- Iwata, T., Ito, H., Furu, M., Ishikawa, M., Azukizawa, M., Yoshitomi, H., Fujii, T., Akiyama, H., Matsuda, S. (2017). Subsidence of total ankle component associated with deterioration of an ankle scale in non-inflammatory arthritis but not in rheumatoid arthritis. **Mod Rheumatol.** 27, 417-424.
- Mori, M., Hashimoto, M., Matsuo, T., Fujii, T., Furu, M., Ito, H., Yoshitomi, H., Hirose, J., Ito, Y., Akizuki, S., Nakashima, R., Imura, Y., Yukawa, N., Yoshifuji, H., Ohmura, K., Mimori, T.. (2017). Cell-contact-dependent activation of CD4+ T cells by adhesion molecules on synovial fibroblasts. **Mod Rheumatol.** 27, 448-456.
- Fujii, T., Nishi, E., Ito, H., Yoshitomi, H., Furu, M., Okabe, N., Ohno, M., Nishi, K., Morita, Y., Morita, Y., Azukizawa, M., Okahata, A., Tomizawa, T., Kimura, T., Matsuda, S. (2017). Nardilysin is involved in autoimmune arthritis via the regulation of tumour necrosis factor alpha secretion. **RMD Open.** 3, e000436.
- Emori, T., Hirose, J., Ise, K., Yomoda, JI., Kasahara, M., Shinkuma, T., Yoshitomi, H., Ito, H., Hashimoto,

M., Sugahara, S., Fujita, H., Yamamoto, N., Morita, Y., Narumiya, S., Aramori, I. (2017). Constitutive Activation of Integrin $\alpha 9$ Augments Self-Directed Hyperplastic and Proinflammatory Properties of Fibroblast-like Synoviocytes of Rheumatoid Arthritis. **J Immunol.** 199, 3427-3436.

Masamoto, K., Otsuki, B., Fujibayashi, S., Shima, K., Ito, H., Furu, M., Hashimoto, M., Tanaka, M., Lyman, S., Yoshitomi, H., Tanida, S., Mimori, T., Matsuda, S. (2017) Factors influencing spinal sagittal balance, bone mineral density, and Oswestry Disability Index outcome measures in patients with rheumatoid arthritis. **Eur Spine J.** 27, 406-415.

Morita, Y., Ito, H., Ishikawa, M., Fujii, T., Furu, M., Azukizawa, M., Okahata, A., Tomizawa, T., Kuriyama, S., Nakamura, S., Nishitani, K., Yoshitomi, H., Matsuda, S. (2017). Subchondral bone fragility with meniscal tear accelerates and parathyroid hormone decelerates articular cartilage degeneration in rat osteoarthritis model. **J Orthop Res.** doi: 10.1002/jor.23840. [Epub ahead of print]

戸口田淳也 (2017). 骨軟部腫瘍の診断と治療【(Part1) 基礎 幹細胞を用いた肉腫の基礎研究 **Bone Joint Nerve** 3, 393-399.

池谷真、日野恭介、松本佳久、福田誠、戸口田淳也【再生医療と疾患解明の鍵となる組織幹細胞 生体内の維持・分化制御からオルガノイド形成、がん・幹細胞疾患まで】(第4章) 病態からみた幹細胞の制御機構 間葉系幹細胞疾患としての進行性骨化性線維異形成症 **実験医学** 17, 2913-2919.

日野恭介、堀込一彦、池田篤史、海老瀬速雄、池谷真、戸口田淳也 (2017) 患者由来 iPS 細胞を用いた進行性骨化性線維異形成症 (FOP) の病態解明 **住友化学** 2017, 45-48.

吉富啓之、戸口田淳也 (2017)【骨免疫学の進歩が変える骨関節疾患アプローチ】骨免疫学と新たな治療への展望 iPS 細胞を用いた骨格系難病研究 **THE BONE** 31, 217-221

戸口田淳也 (2017) iPS 細胞の医療応用 現状と展望 **日本赤十字リハビリテーション協会誌** 31, 6-9

日野恭介、池谷真、戸口田淳也 (2017) 話題の疾患と治療 患者由来 iPS 細胞を用いた進行性骨化性線維異形成症 (FOP) の病態解明 **感染・炎症・免疫** 46, 55-58

請田雄大、岡本健、中山富貴、坪山直生、戸口田淳也 (2017) 当院における類上皮肉腫の治療成績 **中部日本整形外科災害外科学会雑誌** 59, 779-780

戸口田淳也 (2017) 新しい医療技術 進行性骨化性線維異形成症 (FOP) に対する新規治療法の開発 **整形・災害外科** 59, 1525-1531

List of Presentations

戸口田淳也 iPS 細胞を活用した希少難病研究 - 進行性骨化性線維異形成症に対する新規治療法の開発 - 第3回希少がん対策専門部会、東京、2017年2月17日

池口良輔、青山朋樹、柿木良介、上田路子、笠井泰成、前川平、多田春江、山本倫生、松田秀一、

中村孝志、戸口田淳也 キーンベック病に対する骨髄間葉系幹細胞を用いた細胞治療について
第 16 回日本再生医療学会、仙台、2017 年 3 月 7-9 日

薦田洋、田中麻衣、永池碧、永田早苗、戸口田淳也、中山功一 バイオ 3D プリンタによる iPS 細胞由来硝子軟骨の作製 第 16 回日本再生医療学会、仙台、2017 年 3 月 7-9 日

戸口田淳也 有痛性運動器疾患への iPS 細胞技術の応用とそれに伴う医療倫理 ～薬物治療の次を見据えて～ 第 1 回まがたまセミナー、松江、2017 年 3 月 9 日

戸口田淳也 iPS 細胞を使った靭帯骨化症に関する研究の現状 平成 28 年度大阪靭帯骨化症友の会、大阪、2017 年 3 月 26 日

戸口田淳也、日野恭介、池谷真、川井俊介、吹上謙一、吉富啓之 疾患特異的 iPS 細胞を用いた骨軟骨系統疾患治療研究 第 120 回日本小児科学会学術集会、東京、2017 年 4 月 14 日

戸口田淳也 iPS 細胞による病気の再現と治療薬開発 iPS 細胞研究基金支援の会講演会、高岡、2017 年 7 月 10 日

戸口田淳也 骨・軟部腫瘍の診断・治療における新しい分子生物学的アプローチ 第 50 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会、東京、2017 年 7 月 13 日

戸口田淳也、日野恭介、川井俊介、吹上謙一、池谷真、吉富啓之 疾患 iPS 細胞を活用した難治性骨軟骨疾患に対する創薬 第 38 回日本炎症・再生医学会、大阪、2017 年 7 月 18 日

戸口田淳也 骨軟骨領域における iPS 細胞研究の現況と展望 第 35 回日本骨代謝学会、福岡、2017 年 7 月 28 日

Toguchida J. Application of disease-specific iPS cells for systemic skeletal diseases. 2nd Catholic iPSC International Symposium. Seou, November 9, 2017

戸口田淳也 iPS 細胞医療応用の現況と展望 - ヒト iPS 細胞 10 年 - 第 11 回 iPS 細胞産学合同研究会、京都、2017 年 9 月 22 日

戸口田淳也、玉置さくら、金永輝、鎌倉武史、吉富啓之 多能性幹細胞の肉腫研究への応用 第 76 回日本癌学会学術総会、横浜、2017 年 9 月 28 日～ 30 日

杉野隆一、大平美紀、山下聡、竹信尚典、戸口田淳也、牛島俊和、上條岳彦 主成分分析を用いた DNA メチル化パターンによる細胞のタイプの特徴付け 第 76 回日本癌学会学術総会、横浜、2017 年 9 月 28 日～ 30 日

戸口田淳也 iPS 細胞を活用した病態解明から創薬 神戸ポートアイランド創薬フォーラム、神戸、2017 年 10 月 2 日

Toguchida J. Investigator initiated clinical trial of mTOR inhibitor for FOP. FOP DRUG DEVELOPMENT FORUM. Sardinia. October 13-14, 2017

戸口田淳也 iPS 細胞を活用した難治性骨格系疾患の病態解析 第 32 回日本整形外科学会基礎学術

集会、那覇、2017年10月26日

戸口田淳也 健康長寿社会をめざす iPS 細胞研究の展開 第 62 回予防医学事業推進全国大会、千葉、2017年10月27日

Toguchida J. Application of disease-specific iPS cells for intractable skeletal diseases. CiRA 2017 - International Symposium. Kyoto. November 6-8, 2017.

戸口田淳也 iPS 細胞による病気の再現と治療薬開発 科学技術・イノベーション戦略調査会「医療分野の研究に関する小委員会」、東京、2017年11月24日

戸口田淳也 iPS 細胞を活用した後縦靭帯骨化症の病態解析 平成 29 年度第 2 回後縦靭帯骨化症の病態解明・治療法開発に関する研究班ミーティング、東京、2017年11月25日

戸口田淳也 iPS 細胞を活用した後縦靭帯骨化症の病態解析 平成 29 年度第 2 回厚生労働省・AMED 難治性疾患実用化研究事業【脊柱靭帯骨化症に関する調査研究】【脊柱靭帯骨化症の治療指針策定および手術治療の質を高めるための大規模多施設研究】【後縦靭帯骨化症に対する骨化制御機構の解明と治療法開発に関する研究】合同班会議、東京、2017年11月25日

戸口田淳也 後縦靭帯骨化症の研究 再生医療実現拠点ネットワークプログラム「難治性骨軟骨疾患に対する革新的 iPS 創薬技術の開発と応用」平成 29 年度拠点運営会議プログラム、京都、2017年11月28日

川井俊介 骨分化誘導法の研究と応用 再生医療実現拠点ネットワークプログラム「難治性骨軟骨疾患に対する革新的 iPS 創薬技術の開発と応用」平成 29 年度拠点運営会議プログラム、京都、2017年11月28日

戸口田淳也 iPS 細胞を応用した希少難病の病態解明と創薬 第 35 回再生医療を推進する議員の会、東京、2017年12月13日

戸口田淳也 iPS 細胞の医療応用:現況と展望 第 26 回 iPS 細胞ビジネス協議会情報交換会、京都、2017年12月15日

吉富啓之 関節リウマチの病態に迫る - 臨床検体から学んだこと - 医工学フォーラム - 2016 年度特別学術講演会 -、京都、2017年2月8日

吉富啓之 関節リウマチ滑膜炎の炎症病態 - 臨床サンプルの解析から - 第 16 回関西膠原病フォーラム、京都、2017年3月25日

Yoshitomi, H., Kawai, S., Maekawa, H., Deguchi, N., Sekiguchi, K., Takarada, T., Toguchida, J. Efficient gene editing of human iPSCs using drug selection cassette-free homology arm. ISSCR 2017 Annual Meeting, Boston, June 14-17, 2017

吉富啓之 iPS 細胞を用いた難病研究と FOP JPTSA 中国支部大会、広島、2017年9月16日

吉富啓之、小林志緒、土井浩平、岡島章憲、伊藤宣、松田秀一、戸口田淳也 炎症環境下ヒト CD4

陽性 T 細胞の転写制御解析 JCR ベーシックリサーチカンファレンス、東京、2017 年 10 月 13-14 日

吉富啓之、土井浩平、伊藤宣、松田秀一、戸口田淳也 Transcriptional regulation of PD-1+CD4+ T cells under inflammatory conditions 第 46 回日本免疫学会学術集会、仙台、2017 年 12 月 12-14 日

Matsuda M., Uemura M., Yamanaka Y., Saito M., Osawa M., Ikeya M., Yamamoto T., Yoshitomi H., Toguchida J., Woltjen K., Ebisuya M., Alev C. Modeling the segmentation clock with pluripotent stem cells. Joint Meeting of the German and Japanese Societies of Developmental Biologists, Zoological Institute, Kiel, Germany, March 15-18, 2017

Matsuda M., Uemura M., Yamanaka Y., Saito M., Osawa M., Ikeya M., Yamamoto T., Yoshitomi H., Toguchida J., Woltjen K., Ebisuya M., Alev C. Establishment of a pluripotent stem cell based model of the segmentation clock. RIKEN Center for Developmental (CDB) Symposium 2017 "Towards Understanding Human Development, Heredity, and Evolution", Kobe, Japan, March 27-29, 2017

Matsuda M., Uemura M., Yamanaka Y., Saito M., Osawa M., Ikeya M., Yamamoto T., Yoshitomi H., Toguchida J., Woltjen K., Ebisuya M., Alev C. Modeling the segmentation clock with pluripotent stem cells. Annual 50th Annual Meeting of the Japanese and Society for Developmental Biology (JSDB), Tokyo, Japan, May 10-13, 2017

Matsuda M., Uemura M., Yamanaka Y., Saito M., Osawa M., Ikeya M., Yamamoto T., Yoshitomi H., Toguchida J., Woltjen K., Ebisuya M., Alev C. Modeling the human segmentation clock with pluripotent stem cells. 15th Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research (ISSCR), Boston, MA, USA, June 14-17, 2017

Hino K., Horigome K., Nishio M., Komura, S., Nagata S., Zhao, C., Jin, Y., Kawakami K., Yamada, Y., Ohta, A., Toguchida, J., Ikeya, M. CiRA 2017 International Symposium, Kyoto, November 6-8, 2017

Kamakura, T., Jin, Y., Tamaki, S., Okamoto, T., Yoshitomi, H., Toguchida, J., Functional significance of mutant IDH in cartilage-forming tumors, 15th International Student Seminar, Kyoto, February 23-24, 2017

川井俊介、岡本健、吉富啓之、戸口田淳也：iPS 細胞を用いた骨疾患研究 第 41 回近畿肉腫研究会 大阪 2017 年 2 月 18 日

Kawai, S., Yoshitomi, H., Alev, C., Matsuda, S., Toguchida, J. Disease-modeling and drug-screening of congenital bone disease using patient-derived iPSCs by rapid and robust induction method. 15th International Student Seminar, Kyoto, February 23-24, 2017

Kawai, S., Yoshitomi, H., Alev, C., Hada, M., Koyama, Y., Nagata, S., Nishio, M., Sekiguchi, K., Fukiage, K., Matsuda, S., Toguchida, J. Recapitulation of disease-phenotype using patient-specific iPSCs of osteogenesis imperfecta International Society for Stem Cell Research 2017, Boston, June 14-17, 2016

Kawai, S., Yoshitomi, H., Alev, C., Hada, M., Nagata, S., Nishio, M., Koyama, Y., Uemura, M., Sekiguchi, K., Maekawa, H., Ikeya, M., Jin, Y., Tamaki, S., Fukiage, K., Matsuda, S., Toguchida, J. Rapid one-step osteogenesis from human iPS cells to osteocyte and its application for congenital bone diseases. CiRA 2017 International Symposium, Kyoto, November 6-8, 2017

Kawai, S., Yoshitomi, H., Alev, C., Hada, M., Nagata, S., Nishio, M., Koyama, Y., Uemura, M., Maekawa, H., Jin, Y., Tamaki, S., Ikeya, M., Fukiage, K., Matsuda, S., Toguchida, J. Rapid one-step osteogenesis from human iPS cells to osteocyte utilizing for in vitro disease modelling. CiRA Retreat 2017, Ohtsu, November 9-10, 2017

鎌倉武史、金永輝、玉置さくら、岡本健、吉富啓之、戸口田淳也：軟骨形成性腫瘍における変異型 IDH の機能的意義について 第 30 回日本軟骨代謝学会、京都、2017 年 3 月 3 日 -4 日

Maekawa, H., Kawai, S., Yoshitomi, H., Alev, C., Hada, M., Nagata, S., Nishio, M., Koyama, Y., Uemura, M., Jin, Y., Tamaki, S., Matsuda, S., Toguchida, J. Application of patient-specific iPS cells for the research of bone forming diseases 2017 CiRA retreat, Otsu, November 9-10, 2017

再生組織構築研究部門
Department of Regeneration Science and Engineering

臓器・器官形成応用分野
Laboratory of Organ and Tissue Reconstruction

准教授 中村 達雄 Assoc. Prof. Tatsuo Nakamura
准教授 角 昭一郎 Assoc. Prof. Shoichiro Sumi

【中村グループ】

臓器・器官形成応用分野では、生体内再生“*in situ* Tissue Engineering”の概念に基づいて再生医学を推進し、人類の幸福に貢献することを研究の第一目標にしています。これによって、未だ治療法がない症例や、或いは移植ドナー不足のため治療が受けられない患者さんが救われることを目指しています。さらに、再生医療が普及すると高騰を続けている医療費が抑制されることが期待されると考えています。

人間の体には、本来、再生能が備わっており、我々はそれらを引き出す手法を開発しています。それが生体内再生 *in situ* Tissue Engineering です。すなわち、自己の細胞が増殖、分化できる適切な足場を体内に与えることによって、損傷を受けた自己の臓器が本来の構造と機能を再生出来るようにしています。研究の方法としては、再生医学の3つの柱である (1) 足場、(2) 細胞、(3) 増殖・成長因子を生体内で働かせる生体内再生“*in situ* Tissue Engineering”という手法を独自に開発し、それを進めています。具体的には、同種・異種の臓器や組織から酵素処理で免疫原性を完全に無くしたコラーゲンを抽出し、それをを用いて作製した細胞外マトリックスや、或いは組織から細胞を完全に除去することにより作製した細胞外基質、さらには生体内で分解吸収される合成高分子を用い、それらに増殖因子などを除放させる DDS (薬物送達システム) を組み合わせることによって、欠落した組織や臓器が再生する枠組みを生体内に作ります。この枠組みを『足場』とし、生体内の幹細胞が増殖、分化することにより、自己の組織や臓器が再生復元されます。

当分野の研究の根幹概念は、細胞が増殖、再分化して、元の臓器を復元させる“場”(環境)を人工的に体の中に作れば、哺乳動物の臓器や組織も両生類のイモリのように再生復元させることが出来るというメカニズムを医学に応用するものです。このような生体内再生“*in situ* Tissue Engineering”は世界に先駆けて我々が提唱してきた方法であり、人工気管や人工神経などはすでに臨床応用され、これによって救われる患者さんの数も着々と増えてきています。この新しい技術は21世紀の医療の中心的柱になるものと考えています。

【Nakamura Group】

In situ Tissue Engineering: We have devised a new approach to the development of artificial organs. The main procedure using tissue engineering for tissues and internal organs involves the removal of the cell

component from auto- or allo-organs to obtain only the extracellular matrix, so-called refined extracellular matrix (ECM) and reconstitutes the solid structure from the extracted collagen. This ECM or reconstituted structure is then employed as scaffolding, which after implantation into the patients is used for the regeneration or re-differentiation of tissue. Organs made of self-cells thus regenerate. Organs that regenerate in this manner not only possess highly differentiated tissue structures, but also show functional recovery, because all the cells are derived from the patients themselves. Whether or not our new method is practicable will depend mainly on the intrinsic regeneration capacity of each tissue. Up to now, in higher mammals including man, it has been believed that highly differentiated organs lose their ability to regenerate. We consider that mammals do not, in fact, lose this potential, and that the potential is hidden by excessively rapid wound healing around the failing tissues. In this sense, if we can provide good conditions using refined ECM, we can induce this hidden potential even in higher mammals. We have already carried out successful trials at regenerating peripheral nerves, the esophagus, the trachea, and blood vessels with this method. A similar method is also applicable to other soft tissue organs such as the liver, heart, and lung, as well as the spinal cord. These results will be welcomed by patients who are dependent on palliative life-support systems, or transplantation candidates who are waiting for suitable donors. An additional benefit is that patients will be freed from the side effects of immunosuppressive drugs. The judgment of the brain death can then be discussed separately from the issue of transplantation, and will become a personal problem. Furthermore, this new approach helps to reduce ever-expanding medical costs, which are in danger of destroying our health insurance system in the near future.

ECM Method

To obtain the purified extracellular matrix, cell components are completely removed from homo or allo-organs. The solid structure is reconstituted from the ECM and extracted collagen. Growth factors are then applied to facilitate cell proliferation. Then this ECM-collagen-growth factor composite is implanted into the living body as temporary scaffolding for new organ regeneration. Besides this, bioabsorbable materials will also be applied instead of purified ECM as a bulk structure for organ regeneration. Both extracted collagen and growth factors should facilitate cell proliferation and cell dedifferentiation, leading to regeneration of organs completely composed of cells derived from patients.

***in situ* Tissue Engineering and Field theory**

Cells (or living tissues) of patients are complexed (mixed) with purified ECM or bioabsorbable material. Using this complex, reconstruction of the failing tissues or organs will be attempted. Mesenchymal stem cell (MSC) obtained from the bone marrow is now applied to this method.

List of Publications

Nakamura, T., Inada, Y., Shigeno, K. (2018) Artificial sensory organs: latest progress. Japanese **J Artif**

Organs. 21, 17-22.

- Kobayashi, T., Mizuta, M., Hiwatashi, N., Kishimoto, Y., Nakamura, T., Kanemaru, S., Hirano, S. (2017). Drug delivery system of basic fibroblast growth factor using gelatin hydrogel for restoration of acute vocal fold scar. **Auris. Nasus. Larynx.** 44, 86-92.
- Hiwatashi, N., Hirano, S., Mizuta, M., Kobayashi, T., Kawai, Y., Kanemaru, S., Nakamura, T., Ito, J., Kawai, K., Suzuki, S. (2017) The efficacy of a novel collagen-gelatin scaffold with basic fibroblast growth factor for the treatment of vocal fold scar. **J Tissue Eng Regen Med.** 11, 1598-1609.
- Nakaegawa, Y., Nakamura, R., Tada, Y., Suzuki, R., Takezawa, T, Nakamura, T., Omori, K. (2017) Effects of artificial tracheal fixation on tracheal epithelial regeneration and prevention of tracheal stenosis. **Acta Otolaryngol.** 13, 627-634.
- Yutaka, Y., Sato, T., Zhang, J., Matsushita, K., Aiba, H., Muranishi, Y., Sakaguchi, Y., Komatsu, T., Kojima, F., Nakamura, T., Date, H. (2017) Localizing small lung lesions in video-assisted thoracoscopic surgery via radiofrequency identification marking. **Surg. Endosc.** 31, 3353-3362.
- Kawai, T., Hayashi, H., Nishizawa, Y., Nishikawa, A., Nakamura, R., Kawahira, H., Ito, M., Nakamura, T. (2017) Compact forceps manipulator with a spherical-coordinate linear and circular telescopic rail mechanism for endoscopic surgery. **Int J CARS.** 12, 1345-1353.
- Yutaka, Y., Hamaji, M., Sato, T., Nakamura, T. (2017) Does a good beginning make a good end? The importance of biocompatibility. **J Thorac Cardiovasc Surg.** 15, 940-941.
- Nakamura, R., Tani, A., Yoshie, S., Ikeda, M. Wada, I., Hazama, A., Nomoto, Y., Tada, Y., Nakamura, T., Omori, K. (2017) Heparin cross-linked collagen sponge scaffolds improve functional regeneration of rat tracheal epithelium. **J Tissue Eng Regen Med.** 11, 3027-3037.
- Hatayama, T., Nakada, A., Nakamura, H., Wakatsuki, M., Tsujimoto, G., Nakamura, T. (2017) Regeneration of gingival tissue using in situ tissue engineering with collagen scaffold. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.** 124, 348-354.
- Muranishi, Y., Sato, T., Yutaka, Y., Sakaguchi, Y., Komatsu, T., Yoshizawa, A., Hirata, M., Nakamura, T., Date, H. (2017) Development of a novel lung-stabilizing device for VATS procedures. **Surg Endosc.** 31, 4260-4267.
- Shionoya, Y., Sunada, K., Shigeno, K., Nakada, A., Honda, M., Nakamura, T. (2017) Can nerve regeneration on an artificial nerve conduit be enhanced by ethanol-induced cervical sympathetic ganglion block? **Plos One.** 12, e0189297.
- Inada, Y., Moroi, K., Morimoto, S., Fujikawa, T., Tateuchi, H., Nakamura, T. (2017) Regeneration of the completely transected sciatic nerve using a bioabsorbable nerve conduit filled with collagen: A Case Report with 14-Year follow-up. **JBJS Case Connector.** 7, e7.

Kaneko, M. Tsuji, T., Kishimoto, Y., Sugiyama, Y., Nakamura, T., Hirano, S. (in press) Regenerative effects of basic fibroblast growth factor on restoration of thyroarytenoid muscle atrophy caused by recurrent laryngeal nerve transection. **J Voice**.

Muranishi, Y., Sonobe, Y., Hamaji, M., Kawaguchi, A., Hijiya, K., Motoyama, H., Menju, T., Aoyama, A., Chen-Yoshikawa, TF., Sato, T., Date, H. (in press) Surgery for metachronous second primary lung cancer versus surgery for primary lung cancer: a propensity score-matched comparison of postoperative complications and survival outcomes. **Interact Cardiovasc Thorac Surg**.

Muranishi, Y., Sato, T., Ueda, Y., Yutaka, Y., Sakaguchi, Y., Nakamura, T., Date, H. (in press) A novel suction-based lung-stabilizing device for video-assisted thoracoscopic surgical procedures. **J Thorac Dis**.

List of Presentations

Yutaka, Y. A new wireless surgical marker using radiofrequency identification technology for localizing small lung lesions in minimally invasive thoracoscopic surgery. 25th Annual Meeting of Asian Society for Cardiovascular and Thoracic Surgery. Korea, March 25, 2017.

Yutaka, T. Three dimensional navigation surgery via radiofrequency identification technology in video-assisted thoracoscopic subsegmentectomy in a canine model. 25th International Congress of the EAES. Frankfurt, June 15, 2017.

Nakai, R., Yamaguchi, S., Toda, M., Azuma, T., Hashimoto, H., Takadama, H. Evaluation of the susceptibility artifacts by various materials using MRI. The 45th annual meeting of the Japanese Society for Magnetic Resonance. Tochigi, September 14-16, 2017.

Muranishi, Y., Sato, T., Tanooka, M., Doi, H., Yutaka, Y., Sakaguchi, S., Komatsu, T., Hasegawa, S., Kamikonya, N., Nakamura, T., Date, H. Development of a novel spacer to reduce mediastinal organ toxicity from stereotactic body radiotherapy, in canine models. IASLC 18th World Conference Centre on Lung Cancer. Yokohama, October 15-18, 2017.

Azuma, T., Nakai, R. Optimization in biomedical measurement and analysis study of the MR spectroscopy. The 11th ICME International Conference on Complex Medical Engineering. Shenzhen, China, November 22-26, 2017.

Nakai, R., Azuma, T. Development of a measurement method for the mandibular movement using MRI. The 11th ICME International Conference on Complex Medical Engineering. Shenzhen, China, November 22-26, 2017.

稲田有史. 骨関節障害をともなう前腕の不全切断再接着後の拘縮手（ピンチ不能、握力 0kg）を如何に機能再建するか』. 第 36 回奈良手の外科懇話会. 奈良、2017 年 2 月 25 日.

稲田有史. 一般演題 座長 【稀な疾患の治療】 第 60 回日本手外科学会学術集会. 愛知、2017 年

4月27日.

稲田有史、中村達雄、諸井慶七郎、嶋裕子. 『献血に続発する神経障害性疼痛の病態仮説（末梢総和仮説）の検証とその対策－関西圏日本赤十字による前向き多施設大規模検討－』. 第60回日本手外科学会学術集会. 愛知、2017年4月28日.

豊洋次郎. RFID技術を応用した手術用ワイヤレスマーカによる三次元ナビゲーション手術. 第34回日本呼吸器外科学会総会. 福岡、2017年5月19日.

豊洋次郎. 京都大学における新しい手術用ワイヤレスマーカの開発～気管支鏡を用いた次世代の術前マーキング. 第40回日本呼吸器内視鏡学会総会. 長崎、2017年6月10日.

稲田有史、中村達雄、諸井慶七郎、嶋裕子. 『静脈穿刺後神経障害性疼痛の謎を説く！－アメリカ赤十字献血後神経障害性疼痛と日本赤十字との対比とその大規模多施設前向き介入結果－』. 第15回整形外科痛みを語る会. 兵庫、2017年7月2日.

稲田有史、中村達雄、諸井慶七郎、森本 茂. 『静脈穿刺後神経障害性疼痛の発生機序について－末梢総和仮説提唱と日本赤十字社関西圏での介入試験結果』 第28回日本末梢神経学会学術集会. 愛知、2017年8月26日.

東高志、滝沢修、中井隆介. プロトン7T-MRSにおける磁気共鳴周波数のドリフトと生体温度計測. 生体医工学シンポジウム. 長野、2017年9月15-16日.

村西佑介、佐藤寿彦、上田雄一郎、豊洋次郎、坂口泰人、中村達雄、伊達 洋至. 胸腔鏡手術に用いる肺スタビライザー. 第30回日本内視鏡外科学会総会. 京都、2017年12月7-9.

豊洋次郎. ワイヤレスマーカを用いた肺領域における三次元ナビゲーションシステム. 第30回日本内視鏡外科学会総会. 京都、2017年12月9日.

【角グループ】

私どものグループでは、内分泌・代謝疾患に対する再生医療の研究を使命としており、糖尿病の再生医療を中心的な研究テーマとして、全世界で増加している糖尿病に対して、希望すればいつでも受けられる安全で根治的な治療法の開発を目指して研究を行っている。具体的な研究内容としては、長年研究を続けているバイオ人工膵島の実用化に向けた研究、各種の幹細胞等を用いた新しい糖尿病治療用細胞資源の探索、および、これらの作成に不可欠な周辺技術の研究開発である。さらに、近年は、細胞の三次元培養法の研究開発から、糖尿病治療に不可欠の膵島細胞研究に加えて、肝細胞を用いた再生医療や創薬に繋がる研究にも力を入れている。

マクロカプセル化の研究

膵島を免疫隔離機能のあるゲルなどに包んで移植すると、免疫抑制を行うことなく体内で膵島を機能させることが可能となる。従来は微細なマイクロカプセルを中心に研究されてきたが、一度移

植すると完全に除去するのは困難で、異物反応による線維性被膜形成などによって機能が低下する。私どものグループでは、株式会社クラレから異物反応が非常に軽微なエバールの多孔質膜の提供を受けて、この膜でバッグを作成し、これに、温度感応性にゲル化するキトサン溶液に懸濁した膵島を充填するマクロカプセル化法を考案し、皮下血管新生前処置と組み合わせて、これを皮下に移植する治療法の妥当性を検証している。これが実現すれば、細胞を漏らすことなく回収・交換することも可能となり、異種膵島移植にも応用が可能となるばかりか、腫瘍形成などが危惧される未分化細胞から分化誘導した膵島やその他の代謝・内分泌組織にも応用可能となるなど、幅広い応用範囲があると、各方面から期待を集めている。

その他の研究

これまでの研究成果として、高品質の細胞集塊を簡便かつ効率的に作製する培養面を開発し、株式会社クラレから Elplasia MP500 などの商品名で上市されている。効率的な細胞集塊作製技術は今後の再生医療の発展にとって必用不可欠な基礎技術であり、現在は、この培養面を自動培養装置に組み込んで、より大量の細胞集塊を効率的に作製する培養装置の研究を行っている。

[Sumi Group]

The final goal of our research group is to establish regenerative medicine for endocrine metabolic diseases including diabetes mellitus. The goal should be a safe and effective therapy available whenever and wherever required for a growing number of diabetes patients world-wide. Major fields of our research are studies on bioartificial pancreas toward clinical application, search for novel cell sources applicable to diabetes therapy utilizing wide range of cells including various stem cells, and developmental research upon technologies to accomplish these studies. Recently, we utilize innovative 3-D culture methods not only for islet cell studies but also for hepatocyte studies toward regenerative medicine and drug discovery research.

Studies on macro-encapsulation

Encapsulating islets in immune-isolating gel enables islet transplantation without immune suppression. Micro-encapsulation used to be studied mainly. However, micro-capsules are not retrievable and fibrous membrane formation due to foreign body reaction hampers their long-term function. Our group made bags with EVOH membrane (provided by Kuraray) that was proved to cause minimal foreign body reaction and islets suspended in chitosan solution that gels in temperature-sensitive manner are packed in a EVOH bag. This macro-capsule will be transplanted into subcutaneous site prepared with neovascularization induction. This method under validation will enable allo- and xeno-transplantation without immune suppression or cell leakage. So, the similar methods can be applied not only for islets but widely for other endocrine-metabolic tissues derived from undifferentiated cells with risks of tumor-formation and others.

Other studies

We have developed culture surface that enables easy and efficient formation of high quality cell spheres and the device is commercially available with a trade name of Elplasia MP500 etc (Kuraray). Methods of efficient cell sphere formation is one of the essential factor to promote future regenerative medicine. So, our group is studying application of this culture surface to a new device that can make huge amount of cell spheres more efficiently in automated cell culture system.

List of Publications

Sakata N, Yamaguchi Y, Chen Y, Shimoda M, Yoshimatsu G, Unno M, Sumi S, Ohki R. Pleckstrin homology-like domain family A, member 3 (PHLDA3) deficiency improves islets engraftment through the suppression of hypoxic damage. PLoS One. 12: e0187927, 2017.

Liu HC, Wu WT, Wu CC, Yang KC, Yeh KT, Sumi S, Wang CC. An assessment of femoral rotational alignment of mini-incision total knee arthroplasty: A comparison based on the transepicondylar line from the kneeling view and the intraoperative posterior condylar line. J Orthop Sci. 22: 506-511, 2017.

Sumi S, Kawagoe M, Abe R, Yanai G, Yang KC, Shirouzu Y. A multiple-funnels cell culture insert for the scale-up production of uniform cell spheroids. Regenerative Therapy 7: 52-60, 2017.

Wu CC, Hsu LH, Sumi S, Yang KC, Yang SH. Injectable and biodegradable composite bone filler composed of poly (propylene fumarate) and calcium phosphate ceramic for vertebral augmentation procedure: An in vivo porcine study. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 105: 2232-2243, 2017.

Huang TL, Yang CH, Yanai G, Liao JY, Sumi S, Yang KC. Synergistic effect of L-ascorbic acid and hyaluronic acid on the modulation of matrix metalloproteinase-3 and -9 in human chondrocytes. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 106:1809-1817, 2018 [Epub ahead of print: Sep 15, 2017]

List of Presentations

角 昭一郎. 代謝・内分泌疾患に対する再生医療実現に向けた私どもの取り組みについて. 医工学フォーラム 2016, 京都、2017年2月8日

角 昭一郎, 白水 泰昌, 柳井 伍一, 金宗 潤, 楊 凱強, Canning PN. 異種組織皮下移植に向けた私どもの取り組み. 第19回異種移植研究会, 京都、2017年2月25日.

金宗 潤, 児玉 亮, 塩田 良, 角 昭一郎. ハイコンテンツ毒性試験用3次元培養細胞モデル. 第16回日本再生医療学会総会, 仙台、2017年3月9日.

坂田 直昭, 大木 理恵子, 佐藤 英昭, 吉松 軍平, 青木 豪, 石田 晶玄, 元井 冬彦, 内藤 剛, 海野 倫明, 角 昭一郎. 膝島移植における新規ドナーの開発に向けて:がん抑制遺伝子 PHLDA3 をターゲットとした治療戦略. 第16回日本再生医療学会総会, 仙台、2017年3月8日.

- 坂田直昭, 大木理恵子, 佐藤英昭, 吉松軍平, 青木豪, 石田晶玄, 元井冬彦, 内藤剛, 海野倫明, 角昭一郎. がん抑制遺伝子 PHLDA3 を標的とする膵島移植法確立のための基盤研究. 第44回日本膵・膵島移植研究会, 京都, 2017年3月11日.
- 角昭一郎, 白水泰昌, 柳井伍一, 金宗潤, 楊凱強, Canning PN. マクロカプセル化膵島 (Macro-encapsulated islets, MEI) 移植実現に向けた取り組み. 第44回日本膵・膵島移植研究会, 京都, 2017年3月11日.
- 角昭一郎. 糖尿病再生医療の現在と未来. シンポジウム: 糖尿病克服に向けた未来の移植・再生医療. 第44回日本膵・膵島移植研究会, 京都, 2017年3月11日.
- 後藤昌史, 稲垣明子, 山形洋平, 村山和隆, 渡邊君子, 前田浩, 猪村武弘, 五十嵐康宏, 植松智海, 宮崎勇希, 水井崇浩, 戸子台和哲, 宮城重人, 角昭一郎, 藤盛啓成, 大内憲明, 里見進. 東北大学における次世代膵島移植確立へ向けた技術革新. ワークショップ: 膵島移植の現在と未来. 第44回日本膵・膵島移植研究会, 京都, 2017年3月11日.
- Sumi S, Canning PN, Yang KC. A new macro-encapsulation device for subcutaneous islet transplantation. IPITA (International pancreas & islet transplant association) 16th International Congress. Oxford, UK, June, 20-23, 2017.
- Yamane K, et al. Mitomycin-C treatment ameliorates the survival transplanted islet graft in intraportal islet transplantation. IPITA (International pancreas & islet transplant association) 16th International Congress., Oxford, UK, June, 20-23, 2017
- Seiichiro T, et al. The optimal environment of islet transplantation into the prevascularised subcutaneous site. IPITA (International pancreas & islet transplant association) 16th International Congress. Oxford, UK, June, 20-23, 2017.
- Sumi S, Canning PN, Yang SY, Yang KC. Novel macro-encapsulation device for subcutaneous cell/tissue transplantation. ISOMRM (International Symposium of Materials on Regenerative Medicine) Tao-Yuan, Taiwan, Aug. 25, 2017.
- 山根佳, 穴澤貴之, 多田誠一郎, 井ノ口健太, 増井俊彦, 海道利実, 岡島英明, 角昭一郎, 上本伸二. 経門脈膵島移植における膵島 Preconditioning の有効性. 第53回 日本移植学会総会 旭川, 2017年9月8日.
- 多田誠一郎, 穴澤貴之, 山根佳, 井ノ口健太, 増井俊彦, 海道利実, 岡島英明, 角昭一郎, 上本伸二. 血管床の誘導が皮下膵島移植の成績に与える影響. 第53回 日本移植学会総会 旭川, 2017年9月8日.
- 角昭一郎. ブタ膵島移植に向けた我々の取り組み. 第5回日本先進医工学ブタ研究会, 三島, 2017年10月13日.
- 山根佳, 他. 経門脈膵島移植における免疫寛容の誘導～移植前膵島 Preconditioning の有効性～. 第

44 回日本臓器保存生物医学学会学術集会, 大阪、2017 年 11 月 11 日.

角 昭一郎. 異種豚島移植を目指すマクロカプセル化デバイス開発の現状. シンポジウム 7: 異種移植. 第 44 回日本臓器保存生物医学学会学術集会, 大阪、2017 年 11 月 11 日.

再生組織構築研究部門
Department of Regeneration Science and Engineering

発生エピゲノム分野
Laboratory of Developmental Epigenome

准教授 多田 高 Assoc. Prof. Takashi Tada
准教授 中馬新一郎 Assoc. Prof. Shinichiro Chuma

【多田グループ】

本グループでは、ヒト体細胞が多能性幹細胞に再プログラム化される分子機構の解明を行っています。2016年には、体細胞と多能性幹細胞の中間段階である iRS (intermediately Reprogrammed Stem) 細胞株の樹立に成功し、再現性良く、高効率に、繰り返し iRS 細胞から iPS (人工多能性幹: induced Pluripotent Stem) 細胞に再プログラム化する姿を観察できるようになりました。iRS 細胞は、遺伝子改変技術が容易に応用できます。この特性を利用して、未分化性鍵因子として知られる *OCT4* 遺伝子の活性を GFP 蛍光蛋白質として可視化しました。

無限増殖能をもつ多能性幹細胞研究の関連から、老化・若返りに関わる因子も研究しています。ADIPONECTIN 蛋白質は、若返り血中サイトカインとして知られています。ADIPONECTIN と幹細胞は、共に老化防止に機能します。両者の働きの関わり合いの解明を目指しています。

1) iRS 細胞を用いた再プログラム化機構の解明

iRS 細胞は低密度培養により安定に長期間の増殖維持ができる一方、培養条件の変更のみで iPS 細胞への再プログラム化を再開できる新たな再プログラム化中間細胞株である。培養条件を低密度から高密度培養に変更すると、約 1 週間で iPS 細胞コロニーが高効率で出現する。加えて、単一 iRS 細胞からの増殖が可能であることが、遺伝子改変処理後の陽性クローンの選別を容易にしている。ゲノム編集により内在性 *OCT4* 遺伝子の下流に蛍光マーカー遺伝子 *GFP* をノックインし、可視化した (Fig. 1)。その結果、1) 外来性再プログラム化因子の不活性化と同時に内在性 *OCT4* 遺伝子が活性化、2) 内在性 *OCT4* 遺伝子活性の後に MET (Mesenchymal-Epithelial Transition) が起こる、3) MET 直後の *OCT4* の活性は不安定で、その後安定化することが明らかになった。iRS 細胞でのゲノム編集は、再プログラム化の分子機構解明に新たな展開をもたらすと期待される。

2) ヒト ADIPONECTIN と幹細胞

ADIPONECTIN (ADIPO) は、若返りサイトカイ

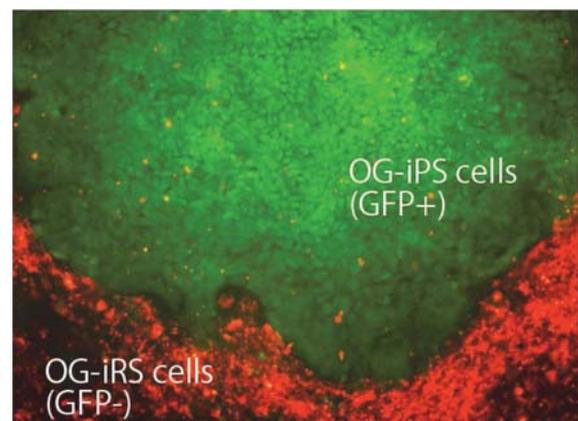


Fig. 1. A GFP-positive iPS cell colony converted from OG-iRS cell

ンとして知られ、血管や筋肉の炎症予防に働く。幹細胞は古い組織を新しい組織に置き換えることで若さの維持に機能する。多能性幹細胞の一種である iPS 細胞への ADIPO の働きを調べて見ると、ADIPO は iPS 細胞のアポトーシス（細胞死）を抑制する効果があることが明らかになった。ADIPO が細胞死抑制に働く分子機構が注目される。

[Tada Group]

Aims of researches in our laboratory are understand of molecular mechanism of somatic reprogramming into induced pluripotent stem (iPS) cell, and effect of ADIPONECTIN (ADIPO) on survival of iPS cells. In 2016, we succeeded to establish intermediately reprogrammed stem (iRS) cells as stable cell lines, pausing at the middle of the reprogramming process. iRS cells possessed unique property that reprogramming was reproducibly and efficiently resumed toward iPS cell generation. Furthermore, genome-editing technology that was feasibly applied to iRS cells, realized GFP-mediated visualization of the endogenous *OCT4* gene activity in living reprogramming cells. Another research subject, ADIPO is an anti-aging cytokine. Stem cell functions in maintaining homeostasis by chronologic replacement of old tissues with new tissues. We are exploring relationship between the two anti-aging players.

1) Molecular mechanisms in iRS cell reprogramming to iPS cell

iRS cells were stably maintained for passages under a culture condition at low cell density, while resumed reprogramming into iPS cells by high cell density culture. iRS cells converted to iPS cells on similar molecular processes among colonies within a week. Furthermore, feasibility of single cell cloning of iRS cell contributed to efficient generation of genetic modification-applied iPS cells with the modern genome-editing technology. OG-iRS cell, in which fluorescence marker *GFP* gene was knocked-in downstream of the endogenous *OCT4* gene, realized visualization of the activity of *OCT4* in living cells on the reprogramming. Conversion of OG-iRS cells into OG-iPS cells revealed that 1) up-regulation of endogenous *OCT4* occurred reciprocally with the silencing of exogenous reprogramming factors, 2) activation of endogenous *OCT4* preceded to entry to MET (Mesenchymal-Epithelial Transition), and 3) *OCT4* expression was unstable in pre-matured iPS cell colonies soon after entry to MET.

2) Human ADIPONECTIN and stem cell

ADIPO functioning in anti-inflammation of the blood vessel and muscle is known as an anti-aging cytokine, which is mainly secreted from adipocytes, and circulated on blood flow. Stem cell is also an important anti-aging player for keeping body young by replacement of aging tissues with newly generated tissues. We found that extracellular stimuli by exposure to ADIPO inhibited apoptotic cell death of iPS cells, demonstrating functional relationship between two anti-aging players.

List of Publications

Teshigawara, R., Cho, J., Kameda, M. and Tada, T. (2017). Mechanism of Human Somatic Reprogramming to iPS Cell. **Lab Invest.** 97:1152-1157.

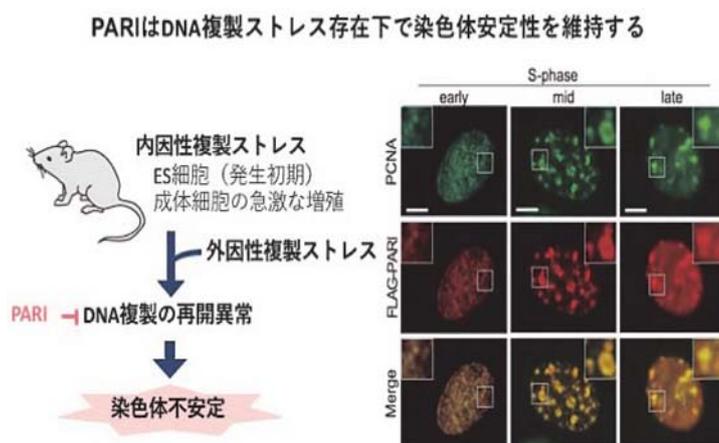
List of Presentations

Teshigawara, R., Cho, J., Kameda, M. and Tada, T. (2017) Novel function of Adiponectin -Induction of cell death by overexpression of nucleus-localized Adiponectin- 第40回日本分子生物学会年会、神戸、2017年12月6日-12月9日（口頭発表）

勅使河原利香、曹 準権、亀田雅博、多田 高（2017）アディポネクチンの新たな機能 -核局在アディポネクチン過剰発現による細胞死 - 第40回日本分子生物学会年会、神戸、2017年12月6日-12月9日（ポスター）

【中馬グループ】

当研究グループでは、幹細胞 - 生殖細胞の発生サイクルにおける遺伝情報の継承と再編の制御メカニズムの解明、またその理解に基づく細胞および個体の遺伝情報の恒常性制御を目指して研究を進めている。(1) 胚性多能性幹 (ES) 細胞はゲノム損傷による G1 チェックポイント等が観察されないが、ES 細胞の DNA 変異率は分化細胞と比べて低く、染色体不安定性のスペクトルも ES 細胞と分化細胞では異なる。これら ES 細胞と分化細胞の相違はゲノム損傷応答の高次制御の違いによるものと考えられるが、その分子機序は体系的に理解されていない。我々は ES 細胞や生殖幹 (GS) 細胞の増殖分化過程におけるゲノム維持機構、特に DNA 損傷に対する細胞周期制御、DNA 複製および染色体動態に焦点を置いて研究に取り組んでいる。(2) 幹細胞 - 生殖細胞サイクルにおいて遺伝情報の安定な継承は個体、種の成立に重要である一方、配偶子形成過程では減数分裂による相同組換えと1倍体化によって遺伝情報の多様性が生まれる。我々は幹細胞 - 生殖細胞サイクルの遺伝的安定性と減数分裂の制御転換の研究を進めている。



【Chuma Group】

The genome integrity of pluripotent stem cells, which give rise to all the cell lineages including the germline, is of fundamental importance to both basic biology as well as biomedical application. However, it

remains largely unclear whether and how the genetic stability of pluripotent stem cells and germline stem cells is properly coordinated with their cellular proliferation and differentiation programs. To better understand these issues, we are carrying out systematic and detailed characterization of DNA damage responses in mouse embryonic stem cells, germline stem cells and their differentiated progenies. Our research aims to understand the developmental stage and/or cellular context dependent control (s) of genome stability and diversification in the germline stem cell cycle.

List of Publications

Yoshimura T, Watanabe T, Kuramochi-Miyagawa S, Takemoto N, Shiromoto Y, Kudo A, Kanai-Azuma M, Tashiro F, Miyazaki S, Katanaya A, Chuma S, Miyazaki JI. (2018). Mouse GTSF1 is an essential factor for secondary piRNA biogenesis. *EMBO Rep.* doi: 10.15252/embr.201642054.

Mochizuki AL, Katanaya A, Hayashi E, Hosokawa M, Moribe E, Motegi A, Ishiai M, Takata M, Kondoh G, Watanabe H, Nakatsuji N, Chuma S. (2017). PARI Regulates Stalled Replication Fork Processing to Maintain Genome Stability upon Replication Stress in Mice. *Mol Cell Biol.* doi:10.1128/MCB.00117-17.

Kabayama Y, Toh H, Katanaya A, Sakurai T, Chuma S, Kuramochi-Miyagawa S, Saga Y, Nakano T, Sasaki H. (2017). Roles of MIWI, MILI and PLD6 in small RNA regulation in mouse growing oocytes. *Nucleic Acids Res.* 45:5387-5398.

List of Presentations

Ami Katanaya, Mihoko Hosokawa, Eri Hayashi, Ayako Mochizuki, Emiko Moribe, Shinichiro Chuma. A proteomic approach to developmental control of genome stability in pluripotent stem cells and differentiated cells in mice. *Frontier of Biomolecular Mass Spectrometry.* Kyoto. February.7. 2017

細川 美穂子、刀谷 在美、林 瑛理、望月 綾子、沼田 興治、阿部 訓也、末盛 博文、中辻 憲夫、中馬 新一郎。生殖系列細胞の発生サイクルにおける減数分裂プログラムの獲得メカニズム。日本遺伝学会第 89 回大会。岡山。2017 年 9 月 13 日

望月 綾子、刀谷 在美、林 瑛理、細川 美穂子、森部 江美子、茂木 章、石合 正道、高田 穰、近藤 玄、渡辺 仁美、中辻 憲夫、中馬 新一郎。PARI regulates stalled replication fork processing to maintain genome stability upon replication stress in mice. 日本遺伝学会第 89 回大会。岡山。2017 年 9 月 14 日

Ami Katanaya, Mihoko Hosokawa, Ayako Mochizuki, Eri Hayashi, Emiko Moribe, Norio Nakatsuji, Shinichiro Chuma. Developmental control of genome stability and diversification in the germline cell cycle in mice. 新学術領域「生殖細胞のエピゲノムダイナミクスとその制御」公開シンポジウム。筑波。2017 年 11 月 22 日

Mihoko Hosokawa, Ami Katanaya, Eri Hayashi, Ayako Mochizuki, Koji Numata, Kuniya Abe, Hirofumi Suemori, Norio Nakatsuji and Shinichiro Chuma. Meiosis priming in the germline stem cell cycle in mice. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017). 神戸, 2017 年 12 月 7 日

再生組織構築研究部門
Department of Regeneration Science and Engineering

胚性幹細胞分野
Laboratory of Embryonic Stem Cell Research

准教授 末盛 博文 Assoc. Professor Hirofumi Suemori
特定講師 川瀬栄八郎 Program-Specific Sr. Lect. Eihachiro Kawase

胚性幹細胞分野ではヒト ES 細胞の医療応用を目指した基盤研究を行っている。これまでに樹立したヒト ES 細胞株は国内の研究機関に分配され多くの研究成果が上げられている。また ES 細胞の未分化性維持や細胞分化の分子機構の解析の他、安全性の高い培養法の開発などの将来の医療応用において不可欠の技術開発研究をおこなっている。ヒト ES 細胞の臨床利用のための細胞プロセシング施設を有し、ヒト ES 細胞株の樹立、培養、操作、品質保証、安全性確保等にわたる技術開発及び取扱基準規格の構築を行っている。将来的には、臨床応用に使用可能な品質レベルのヒト ES 細胞リソースの構築と臨床研究施設への提供を目的としている。

1) ヒト ES 細胞株の樹立と臨床応用を目指した基盤研究

ヒト ES 細胞株、ヒト iPS 細胞株などのヒト多能性幹細胞株は、創薬や細胞治療に有用な細胞リソースとして期待されている。我々はヒト ES 細胞の医療応用を目指した基盤研究を行っている。これまでに 5 株のヒト ES 細胞株を樹立し、50 件以上の研究計画に対して細胞株を分配し多くの研究成果が上げられている。

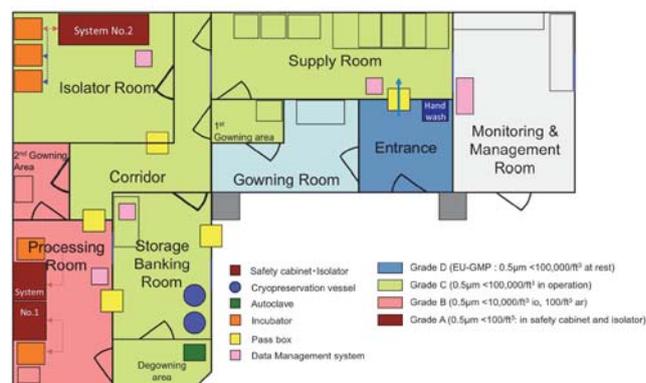
これらの成果を実際の臨床利用に展開する上で、多能性幹細胞の効率的な拡大培養法の確立が必要不可欠である。これを実現するための培養技術開発をこれまでに進めてきているが、これらの技術は、ヒト ES/iPS 細胞の利用において国内で広く活用されている。効率のよい細胞凍結法やヒト組換えラミニン断片を用いたフィーダーフリー培養法などはその例で、製品化を通じて研究の発展に貢献している。これをさらに発展させ、細胞の継代に要する時間やコストを大幅に削減する技術の開発にも成功している。

2) 細胞プロセシング施設による臨床用ヒト ES 細胞バンクの構築

ヒト ES 細胞樹立指針や再生医療関連の法律の整備により、ヒト ES 細胞の臨床利用に向けての制度が整えられてきている。これらに対応して、新たに医薬品 GMP レベルでのヒト ES 細胞株の樹立を行うべく準備を進めている。ヒト ES 細胞を臨床使用するためのヒト ES 細胞株の樹立、培養、操作、品質保証、安全性確保等にわたる取扱基準規格の検証を進め、将来の臨床用ヒト ES 細胞のシードストックの作製を目指している。そのため、既存の ES 細胞のクリーンアップによる臨床用細胞ストックの作製に関する実証研究を行い、臨床利用に耐えうる細胞ストックの作製が可能であることを示している。

また、臨床用 ES 細胞バンクの品質管理を国際的な水準で実施するため、ISCBI (International Stem Cell Banking Initiative) による、臨床レベルでのヒト ES 細胞のバンクングのための品質基準の策定に参画している。これらをもとに、臨床利用可能なヒト ES 細胞の樹立のための手続きを進めた。臨床研究に使用する細胞は再生医療等の安全性の確保等に関する法律に基づき、特定細胞加工物製造許可を得る必要がある。本施設について当該許可申請を行い、臨床用ヒト ES 細胞の樹立とストックのための許可を得た。国内で初めて許可を得たヒト ES 細胞の樹立施設である。

Cell Processing Facility for clinical-grade human ES cells



臨床用ヒト ES 細胞の樹立研究について文部科学大臣および厚生労働大臣の確認を得、インフォームドコンセントに基づき余剰胚の提供を受け、臨床用 ES 細胞の樹立を開始した。

Human ES cell lines are considered to have great potential of ES cells in medical research and application such as cell transplantation therapy and drug discovery. We established human ES cell lines at a high efficiency and analyzed their characters in detail. The hESC lines have been distributed to over 50 research projects in Japan. We are also performing researches on molecular mechanisms of self-renewal and differentiation of human ES cells, and developing techniques for genetic manipulation of hES cells. In addition, we possess a Cell Processing Facility (CPF) to develop core technologies to generate and supply clinical grade human embryonic stem (hES) cell lines. We have set up standard operation procedures (SOPs) to produce clinical grade hES cell lines to establish a clinical grade hES cell bank in the near future, aiming to supply them to researchers in the fields of regenerative medicine

1) Establishment and analysis of human ES cell lines aiming clinical application

Embryonic stem (ES) cell lines are pluripotent stem cell lines which can be propagated indefinitely in culture retaining their differentiation potency into every cell types of tissues in the body. Since establishment of human ES cell lines were reported, clinical use of functional tissues and cells from human ES cells are expected. In Japan, there have been many demands for use of human ES cells on basic and pre-clinical researches. We started to establish human ES cell lines using donated frozen embryos in January 2003 and successfully established 5 human ES cell lines. We have distributed these cell lines to over 50 researches.

2) Cell processing facility for banking of clinical grade human ES cell lines.

For clinical application of hES cells, several issues remain to be solved such as development of complete-

defined culture medium and feeder-cell free substrates. To verify these factors we should establish a standard that reaches international levels. To achieve that purpose we have been working as a member of working groups of the International Stem Cell Forum (ISCF) and banking group of ISCBI (International Stem Cell Banking Initiative). Recently the ISCBI established “Consensus Guidance for Banking and Supply of Human Embryonic Stem Cell Lines for Research Purposes” as a first fruit, and we are working to establish guidelines for clinical use of human ES cells.

List of Publications

Miyazaki T, Isobe T, Nakatsuji N, Suemori H. Efficient Adhesion Culture of Human Pluripotent Stem Cells Using Laminin Fragments in an Uncoated Manner. *Sci Rep*. 2017 Jan 30;7:41165. doi: 10.1038/srep41165.

Tanase JI, Yokoo T, Matsumura Y, Kinoshita M, Kikuchi Y, Suemori H, Ohyama T. Magnesium chloride and polyamine can differentiate mouse embryonic stem cells into trophoblast or endoderm. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Jan 22;482 (4):764-770. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.11.108.

Yamauchi K, Li J, Morikawa K, Liu L, Shirayoshi Y, Nakatsuji N, Elliott DA, Hisatome I, Suemori H. Isolation and characterization of ventricular-like cells derived from NKX2-5eGFP/w and MLC2vmCherry/w double knock-in human pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Jan 1;495 (1):1278-1284. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.11.133. Epub 2017 Nov 22.

簡便かつ低コスト化を実現したヒト多能性幹細胞の培養法

宮崎隆道、末盛博文, *実験医学* 35, 3273-3278

List of Presentations

末盛博文 「ヒト ES 細胞の培養技術開発と臨床利用の最近の動向について」信州大学医学部 ヒト ES 細胞研究に関する研修会、松本、2017 年 2 月 16 日

寺村岳士、松田浩一、竹原俊幸、小野寺勇太、福田寛二、鈴木孝一、末盛博文「ヒト iPS 細胞の自動評価および近赤外線レーザー照射による分化細胞の除去と未分化維持における有効性の検討」仙台、2017 年 3 月 7-9 日

菅三佳、平井雅子、上田直子、劉有容、中野貴子、福田隆之、末盛博文、古江 - 楠田美保「ヒト多能性幹細胞の培養における増殖因子の生理活性測定法の開発」岡山、2017 年 6 月 30 日

再生組織構築研究部門
Department of Regeneration Science and Engineering

統合生体プロセス分野
Laboratory of Integrative Biological Science

| | | | |
|--------|-------|---------------|-----------------|
| 教授 | 近藤 玄 | Prof. | Gen Kondoh |
| 准教授 | 廣田 圭司 | Assoc. Prof. | Keiji Hirota |
| 助教(兼務) | 渡邊 仁美 | Assist. Prof. | Hitomi Watanabe |

当分野では、不妊症、免疫関連疾患の新規治療法開発を目指し、受精と自己免疫寛容維持の新規メカニズムの解明に焦点をあてた研究を展開している。本年度は、マウス精子が受精能を獲得する過程において、ラフトの局在変化が重要なステップのひとつであることを見出した。また、Th17細胞のエフェクター機能を制御するサイトカイン IL-23 を標的とした可溶性 IL-23 受容体分子 (sIL-23R) を構築し、アデノウイルスベクターを用いた sIL-23R 遺伝子導入が自己免疫病に対する遺伝子療法になりうる可能性を示した。さらに、自己免疫寛容維持に中心的な役割を果たす制御性 T 細胞の胸腺分化において、Satb1 を介したエピゲノム形成機構を明らかにした。

1) マウス精子受精能とラフト局在変化の相関性

マウス精子は、段階的な成熟過程を経ることで受精能を獲得することが知られている。我々は、先行研究において受精能獲得過程にある精子の膜表面では GPI アンカー型タンパク質 (GPI-AP) 遊離とラフト局在変化が連動して起こり、これらが受精に重要な反応であることを示唆した。今回、BALB/c および C57BL/6 バックグラウンドの GPI アンカー型 EGFP (EGFP-GPI) トランスジェニックマウス (以下 Tg マウス) の精子についてこれらの現象の比較を行い、また複数系統を追加しての相関解析から、精子受精能とラフト局在変化との間に正の相関性を見出した。

2) 免疫寛容維持機構と T ヘルパー細胞の制御機構

生体の恒常性を維持するため、免疫システムの鍵となる免疫寛容維持機構が常時作動し、自己反応性 T ヘルパー細胞の活性化を積極的に制御している。免疫寛容維持機構の破綻により、免疫細胞による自己組織・臓器の傷害・損傷が起こることでアレルギー反応、炎症性疾患、自己免疫疾患が惹起される。

本年度、自己免疫病を惹起する Th17 細胞に対する新規制御法を開発した。サイトカイン IL-23 は、Th17 細胞のエフェクター機能・維持に必須のサイトカインとして知られており、自己免疫疾患患者を対象とした臨床治験においても抗 IL-23 抗体の有用性が示されている。私たちは、IL-23 を標的とした遺伝子治療の可能性を検討するため、アデノウイルスベクターを用いた sIL-23R 遺伝子導入法を開発した。多発性硬化症の動物モデルを用い、sIL-23R をコードするアデノウイルスベクター 8 を静注投与することにより、STAT3 活性阻害と実験的自己免疫性脳脊髄炎を有意に抑制できる

ことを示した。これらの結果は、IL-23 を標的とした遺伝子治療が、Th17 細胞の関与が示唆されている様々な自己免疫病に対する新規治療戦略になりうることを明らかにした。

制御性 T 細胞の胸腺分化におけるスーパーエンハンサー及びエピゲノム形成に関与する新規分子機構を明らかにした。制御性 T 細胞は、自己免疫寛容維持の鍵となる細胞集団であり、様々な免疫応答を負に制御している。私たちは、ゲノムオーガナイザー Satb1 が、制御性 T 細胞特異的なスーパーエンハンサー活性と制御性 T 細胞関連遺伝子発現を制御し、制御性 T 細胞の胸腺分化と生体内における自己免疫寛容維持に重要な働きを果たすことを明らかにした。これらの結果から、Satb1 の機能不全が、ヒト自己免疫疾患の原因因子の一つである可能性が示唆され、今後、Satb1 と自己免疫疾患のゲノムワイド関連解析が期待できる。

This laboratory aims to understand the mammalian fertilization process and the molecular and cellular mechanisms underlying how immune tolerance is maintained and self-reactive T cells attack our body. In 2017, we found that the relationship between GM1 movement and *in vitro* fertilization ability was confirmed in multiple mouse strains, suggesting that lipid raft movement is one of the important steps for completing the sperm maturation process. Moreover, we found that administration of adeno-associated vector 8 encoding sIL-23R was an effective immunotherapy for an animal model of multiple sclerosis. We also identified a molecular mechanism underlying Satb1-dependent epigenetic modifications of regulatory T precursor cells during differentiation in the thymus.

1) Lipid raft movement linked to sperm competency for fertilization in mice

Mammalian sperm acquires fertilization ability after several maturation processes, particularly within the female reproductive tract. Here, we show that lipid raft movement is fundamental for sperm to be competent for fertilization by comparing the sperm maturation process of two mouse inbred strains, C57BL/6 and BALB/c. We found that ganglioside GM1 movement was exclusively reduced in BALB/c compared with C57BL/6 among other examined sperm maturation parameters, such as glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored protein (GPI-AP) release, sperm migration to the oviduct, cholesterol efflux, protein tyrosine phosphorylation and acrosome reaction, and was strongly linked to sperm fertility phenotype. The relationship between GM1 movement and *in vitro* fertilization ability was confirmed in other mouse strains, suggesting that lipid raft movement is one of the important steps for completing the sperm maturation process.

2) Molecular and cellular basis of immune tolerance and T helper functions

Immunological self-tolerance is a key immune system and regulates the activation of self-reactive T helper cells. Breakdown of self-tolerance leads to allergic, inflammatory, and autoimmune diseases mediated by aberrant activation of effector immune cells.

We developed a gene therapy targeting the cytokine IL-23 which is a key factor to drive the effector

function of autoimmune Th17 cells and is implicated in the pathogenesis of autoimmune diseases in humans. Clinical trials using anti-IL-23 antibody showed a promising efficacy in treating patients with psoriasis. We found that a single injection of adeno-associated virus 8 encoding sIL-23R ameliorated the clinical scores of experimental autoimmune encephalomyelitis with significant inhibition of STAT3 phosphorylation. These results indicate that clinical interventions, which specifically interfere an interaction between IL-23 and IL-23R, may be a potential therapeutic strategy for the treatment of autoimmune diseases.

We elucidated a novel molecular mechanism underlying Satb1-dependent epigenetic modifications of regulatory T precursor cells during differentiation in the thymus. Regulatory T cells play a key role in maintaining immune homeostasis and inhibiting multiple immunological responses. We identified that the genome organizer Satb1 was important for regulatory T cell-specific super-enhancer activation and signature gene expression in the thymus, which in turn led to the development of functional regulatory T cells. These results suggest that the impairment of Satb1 function may cause autoimmune diseases in humans due to the loss of regulatory T cells.

List of Publications

- Miralles M, Eixarch H, Tejero M, Costa C, **Hirota K**, Castaño AR, Puig M, Stockinger G, Montalban X, Bosch A, Espejo C, Chillón M. (2017). Clinical and Histopathological Amelioration of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by AAV Vectors Expressing a Soluble Interleukin-23 Receptor. *Neurotherapeutics*. 4, 1095-1106.
- Kitagawa Y, Ohkura N, Kidani Y, Vandenbon A, **Hirota K**, Kawakami R, Yasuda K, Motooka D, Nakamura S, Kondo M, Taniuchi I, Kohwi-Shigematsu T, Sakaguchi S. (2017). Guidance of regulatory T cell development by Satb1-dependent super-enhancer establishment. *Nat Immunol*. 18, 173-183.
- Yoshimoto, Y., A. Takimoto, **H. Watanabe**, Y. Hiraki, **G. Kondoh**, C. Shukunami. *Scleraxis* is required for maturation of tissue domains for proper integration of the musculoskeletal system. *Scientific Reports* 7:45010. doi: 10.1038/srep45010 (2017).
- Das, N-R., H. Miyata, H. Hara, K. Uchiyama, J. Chida, M. Yano, **H. Watanabe**, **G. Kondoh**, S. Sakaguchi. Effects of prion protein devoid of the N-terminal residues 25-50 on prion pathogenesis in mice. *Arc. Virol*. doi: 10.1007/s00705-017-3295-3 (2017).
- Fujihira, H., Y. Masahara-Negishi, M. Tamura, C. Huang, Y. Harada, S. Wakana, D. Takakura, N. Kawasaki, N. Taniguchi, **G. Kondoh**, T. Yamashita, Y. Funakoshi, T. Suzuki. Lethality of mice bearing a knockout of the *Ngly1*-gene is partially rescued by the additional deletion of the *Engase* gene. *PLoS Genet*. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006696> (2017).
- Watanabe, H.**, **R. Takeda**, **K. Hirota**, **G. Kondoh**. Lipid raft dynamics linked to sperm competency for fertilization in mice. *Genes to Cells* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28425215> (2017).

- Mochizuki, A-L., A. Katanaya, E. Hayashi, M. Hosokawa, E. Moribe, A. Motegi, M. Ishiai, M. Takata, **G. Kondoh, H. Watanabe**, N. Nakatsuji, S. Chuma. PARI regulates stalled replication fork processing to maintain genome stability upon replication stress in mice. *Mol Cell Biol.*, 37-23, pii: e00117-17, (2017).
- Hara, H., H. Miyata, N-R. Das, J. Cida, T. Yoshimochi, K. Uchiyama, **H. Watanabe, G. Kondoh**, T. Yokoyama, S. Sakaguchi. Prion protein devoid of the octapeptide repeat region abrogates BSE pathogenesis in mice. *J. Virol.*, 92-1, pii: e01368-17, (2017).
- Ohashi, M., Y. Umemura, N. Koike, Y. Tsuchiya, Y. Inada, **H. Watanabe**, T. Tanaka, Y. Minami, O. Ukimura, T. Miki, T. Tajiri, **G. Kondoh**, Y. Yamada, K. Yagita. Disruption of circadian clockwork in in vivo reprogramming-induced mouse kidney tumors. *Genes to Cells*, in press.
- Tsubaki, T., T. Kadonosono, S. Sakurai, T. Shiozawa, T. Goto, S. Sakai, T. Kuchimaru, T. Sakamoto, H. Watanabe, G. Kondoh, S. Kizaka-Kondoh. Novel Adherent CD11b+ Gr-1+ Tumor-infiltrating Cells Initiate an Immunosuppressive Tumor Microenvironment. *Oncotarget*, in press.
- Shukunami, C., A. Takimoto, Y. Y. Nishizaki, Y. Yoshimoto, S. Tanaka, S. Miura, **H. Watanabe**, T. Sakuma, T. Yamamoto, **G. Kondoh**, Y. Hiraki. Scleraxis is a transcriptional activator that regulates the expression of Tenomodulin, a marker of mature tenocytes and ligamentocytes. *Scientific Reports*, in press.
- Morita, M., T. Sato, M. Nomura, Y. Sakamoto, Y. Inoue, R. Tanaka, S. Ito, K. Kurosawa, K. Yamaguchi, Y. Sugiura, H. Takizaki, Y. Yamashita, R. Katakura, I. Sato, M. Kawai, Y. Okada, **H. Watanabe, G. Kondoh**, S. Matsumoto, A. Kishimoto, M. Obata, M. Matsumoto, T. Fukuhara, H. Motohashi, M. Suematsu, M. Komatsu, K-I. Nakayama, T. Watanabe, T. Soga, H. Shima, M. Maemondo, N. Tanuma. PKM1 confers metabolic advantages and promotes cell-autonomous tumor cell growth. *Cancer Cell*, in press.

List of Presentations

- Keiji Hirota**: An inflammatory cellular network of autoimmune Th17 cells, GM-CSF-producing ILCs and synoviocytes in the development of autoimmune arthritis, Keystone symposia, Immune Regulation in Autoimmunity and Cancer, Whistler, March 26 - 30, 2017, Canada
- Keiko Yasuda, Yohko Kitagawa, Shimon Sakaguchi, **Keiji Hirota**: Satb1 controls the differentiation and terminal effector function of Th17 cells, 第46回 日本免疫学会学術集会、仙台、2017年12月12-14日
- Ryoki Kobayashi, Yohei Watanabe, Noriko M Tsuji, **Keiji Hirota**, Tomoko Kurita-Ochiai: Characterization of Innate lymphoid cells in inflamed gingiva of mice infected with Porphyromonas gingivalis, 第46回 日本免疫学会学術集会、仙台、2017年12月12-14日
- Gen Kondoh, Hitomi Watanabe, Rie Takeda, Keiji Hirota** Lipid raft dynamics linked to sperm

competency for fertilization in mice. 第4回国際生殖生物学会、那覇、2017年9月27-29日

生命システム研究部門
Department of Biosystems Science

生体再建学分野
Laboratory of Experimental Immunology

客員教授 坂口 志文 Visiting Prof. Shimon Sakaguchi

当研究室では、(1) 免疫自己寛容の導入・維持機構の細胞、分子レベルでの理解、特に制御性 T 細胞 (Regulatory T cells、以下 Treg と略) の役割、(2) Treg を標的とする腫瘍免疫応答の惹起法、強化法の開発、自己免疫病の治療法、移植臓器に対する免疫寛容導入法の開発、また (3) 自己免疫病、特に自己免疫性関節炎、の原因・発症機構の理解、をめざしている。

2017 年度、液性免疫の抑制的制御を主として担う濾胞性制御性 T 細胞 (Follicular regulatory T cells, Tfr) の分化を解析した。その結果、胚中心に存在し、CD25 を発現しないが、Bcl6 の発現など濾胞性ヘルパー T 細胞 (Follicular helper T cell, T_{fh}) と共通な遺伝子発現パターンを特徴とする Tfr のサブセットを同定した。IL-2 を投与すると、Tfr の形成が阻害されるが、IL-2 は Bcl-6 に拮抗作用のある転写因子 Blimp1 を誘導するため、IL-2 阻害により Bcl-6 依存的な Tfr が分化すると考えられる。この Tfr サブセットは液性免疫を制御する場合の標的として重要である (Wing et al., PNAS, 2017)。

また、当研究室で確立し、自己免疫性関節炎を自然発症する SKG マウスを用いて、Th17 細胞が、他の関節組織細胞にどのように働き慢性炎症を惹起・維持するのか解析した。その結果、Th17 細胞由来 IL-17 は、線維芽細胞様滑膜細胞 (Fibroblast-like synoviocyte, FLS) および自然リンパ球 (Innate lymphoid cell, ILC) に働き、GM-CSF の産生を促す。関節内 T 細胞および組織細胞由来の IL-2, IL-33, CpG DNA は ILC からの GM-CSF 産生を惹起する。さらに、FLS あるいは ILC の GM-CSF 産生を阻害すると関節炎の発症は阻止される。この結果は、サイトカイン (IL-17, GM-CSF) によって媒介される T 細胞、ILC、組織細胞 (例えば FLS) 間の細胞ネットワークが慢性炎症の惹起・進行に果たす役割、炎症制御の標的としての重要性を示したものである (Hirota et al., Immunity, In press)。

This laboratory studies: (i) the cellular and molecular basis of immunologic self-tolerance, in particular, the roles of regulatory T (Treg) cells; (ii) the strategy for eliciting effective immune responses to autologous tumor cells, or inducing immunologic tolerance to organ transplants, by manipulating the mechanism of immunologic self-tolerance; and (iii) the cause and pathogenetic mechanism of autoimmune diseases, in particular, rheumatoid arthritis.

In 2017, we studied how humoral immune responses are controlled by Treg cells. It has been well established that T-follicular helper (T_{fh}) cells have a critical role in the formation and maintenance of germinal center (GC) reactions responsible for the production of high quality antibodies. T-follicular regulatory (Tfr) cells, a subset of Foxp3 expressing Treg cells, have a critical role in the control of antibody

responses. While Tregs express CD25 and are dependent on IL-2, Tfr also express the transcription factor BCL6 that in Tfh cells is inhibited by IL-2. We found that mature Tfr cells in the germinal centers or circulating in human blood down-regulated CD25 and gained a transcriptional signature mixed between Tfh and Tregs while retaining their regulatory function. These cells represented an IL-2 independent branch of effector Tregs losing CD25 expression but gaining increased expression of Tfh related markers such as BCL6 and CXCR5 in both mice and humans. The results are instrumental in targeting Tfr cells to control physiological and pathological humoral immune responses (Wing et al., PNAS, 2017).

By utilizing an animal model of autoimmune arthritis (SKG mice) established in our laboratory, we are also studying how chronic autoimmune disease is initiated and maintained. In 2017, we particularly addressed how Th17 cells controlled other inflammatory cells in autoimmune tissue damage. With SKG mice that spontaneously develop Th17 cell-mediated autoimmune arthritis, we showed that arthritogenic Th17 cells stimulated fibroblast-like synoviocytes (FLS) via IL-17 to secrete GM-CSF and also expanded synovial resident innate lymphoid cells (ILCs) in inflamed joints. Activated synovial ILCs, which expressed CD25, IL-33Ra, and TLR9, produced abundant GM-CSF upon stimulation by IL-2, IL-33, or CpG DNA. Loss of GM-CSF production by either ILCs or radio-resistant stromal cells such as FLS prevented Th17 cell-mediated arthritis. GM-CSF production by Th17 cells augmented chronic inflammation, but was not mandatory for the initiation of arthritis. Together with the presence of GM-CSF-producing ILCs in inflamed joints of rheumatoid arthritis patients, these results indicate that a cellular cascade of autoimmune Th17, ILCs and non-lymphoid stromal cells, via IL-17 and GM-CSF, mediates chronic joint inflammation and can be a target for therapeutic intervention (Hirota et al., Immunity, In press).

List of Publications

1) 原著論文

Kitagawa Y, Sakaguchi S. Molecular control of regulatory T cell development and function. *Curr Opin Immunol.* 49:64-70, 2017.

Ikeda K, Kinoshita M, Kayama H, Nagamori S, Kongpracha P, Umemoto E, Okumura R, Kurakawa T, Murakami M, Mikami N, Shintani Y, Ueno S, Andou A, Ito M, Tsumura H, Yasutomo K, Ozono K, Takashima S, Sakaguchi S, Kanai Y, Takeda K. Slc3a2 Mediates Branched-Chain Amino-Acid-Dependent Maintenance of Regulatory T Cells. *Cell Rep.* 21:1824-1838, 2017.

Cossarizza A, —Sakaguchi S, —Zimmermann J. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies. *Eur J Immunol.* 47:1584-1797, 2017.

Kitagawa Y, Ohkura N, Kidani Y, Vandenbon A, Hirota K, Kawakami R, Yasuda K, Motooka D, Nakamura S, Kondo M, Taniuchi I, Kohwi-Shigematsu T, Sakaguchi S. Guidance of regulatory T cell development by Satb1-dependent super-enhancer establishment. *Nat. Immunol.* 18:173-183, 2017.

Wing JB, Kitagawa Y, Locci M, Hume H, Tay C, Morita T, Kidani Y, Matsuda K, Inoue T, Kurosaki T, Crotty

- S, Coban C, Ohkura N, Sakaguchi S. A distinct subpopulation of CD25⁺ T-follicular regulatory cells localizes in the germinal centers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 114:E6400-E6409, 2017.
- Hosokawa T, Kimura T, Nada S, Okuno T, Ito D, Kang S, Nojima S, Yamashita K, Nakatani T, Hayama Y, Kato Y, Kinehara Y, Nishide M, Mikami N, Koyama S, Takamatsu H, Okuzaki D, Ohkura N, Sakaguchi S, Okada M, Kumanogoh A. Lamtor1 Is Critically Required for CD4₊ T Cell Proliferation and Regulatory T Cell Suppressive Function. *J Immunol*. 199:2008-2019, 2017.
- Noguchi S, —Sakaguchi S, —Hayashizaki Y. FANTOM5 CAGE profiles of human and mouse samples. *Sci Data*. 4:170112, 2017.
- Suzuki T, Murakami S, Biswal SS, Sakaguchi S, Harigae H, Yamamoto M, Motohashi H. Systemic Activation of NRF2 Alleviates Lethal Autoimmune Inflammation in Scurfy Mice. *Mol Cell Biol*. 37 (15). pii: e00063-17, 2017.
- Kakugawa K, Kojo S, Tanaka H, Seo W, Endo TA, Kitagawa Y, Muroi S, Tenno M, Yasmin N, Kohwi Y, Sakaguchi S, Kohwi-Shigematsu T, Taniuchi I. Essential Roles of SATB1 in Specifying T Lymphocyte Subsets. *Cell Rep*. 19:1176-1188, 2017.
- Garg G, Nikolouli E, Hardtke-Wolenski M, Toker A, Ohkura N, Beckstette M, Miyao T, Geffers R, Floess S, Gerdes N, Lutgens E, Osterloh A, Hori S, Sakaguchi S, Jaeckel E, Huehn J. Unique properties of thymic antigen-presenting cells promote epigenetic imprinting of alloantigen-specific regulatory T cells. *Oncotarget*. 8 (22):35542-35557, 2017.
- Carrascosa CL, Klein M, Kitagawa Y, Lückel C, Marini F, König A, Guralnik A, Raifer H, Hagner S, Raedler D, Böck A, Kang C, Lohoff M, Garn H, Schaub B, Berberich-Siebelt F, Sakaguchi S, Bopp T, Huber M. Reciprocal regulation of the *Il9* locus by counteracting activities of transcription factors IRF1 and IRF4. *Nat. Commun*. 8:15366, 2017.
- Kato K, Kawase A, Azukizawa H, Hanafusa T, Nakagawa Y, Murota H, Sakaguchi S, Asada H, Katayama I. Novel interferon- γ enzyme-linked immunoSpot assay using activated cells for identifying hypersensitivity-inducing drug culprits. *J Dermatol Sci*. 86:222-229, 2017.
- Glatman Zaretsky A, Konradt C, Dépis F, Wing JB, Goenka R, Atria DG, Silver JS, Cho S, Wolf AI, Quinn WJ, Engiles JB, Brown DC, Beiting D, Erikson J, Allman D, Cancro MP, Sakaguchi S, Lu LF, Benoist CO, Hunter CA. T regulatory cells support plasma cell populations in the bone marrow. *Cell Rep*. 18:1906-1916, 2017.
- Tanaka A, Sakaguchi S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Cell Res*. 27:109-118, 2017.
- Nagase H, Takeoka T, Urakawa S, Morimoto-Okazawa A, Kawashima A, Iwahori K, Takiguchi S, Nishikawa H, Sato E, Sakaguchi S, Mori M, Doki Y, Wada H. ICOS₊ Foxp3₊ TILs in gastric cancer are prognostic markers and effector regulatory T cells associated with *Helicobacter pylori*. *Int J Cancer*. 140: 686-695, 2017.

Sasaki N, Yamashita T, Kasahara K, Fukunaga A, Yamaguchi T, Emoto T, Yodoi K, Matsumoto T, Nakajima K, Kita T, Takeda M, Mizoguchi T, Hayashi T, Sasaki Y, Hatakeyama M, Taguchi K, Washio K, Sakaguchi S, Malissen B, Nishigori C, Hirata KI. UVB Exposure Prevents Atherosclerosis by Regulating Immunoinflammatory Responses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 37:66-74, 2017.

2) 総説

西塔拓郎・坂口志文：大腸がん組織の FOXP3⁺CD4⁺T 細胞サブポピュレーションは炎症の有無により予後を相反する方向に制御する、がん分子標的治療 Vol.15 No.3 86-89, 2017

木谷友次朗・坂口志文：腫瘍浸潤制御性 T 細胞の特異的転写制御、臨床免疫・アレルギー科 Vol.68 No.6 595-600, 2017

坂口志文：ノーベル賞と医学の進歩・発展 獲得的免疫寛容の発見—バーネット、メダワー—最新医学 Vol.72 No.12 114-117, 2017

List of Presentations

1) 学会・研究会発表

Motono Osaki : Soluble form of CTLA-4 facilitates M2 macrophage differentiation, preferentially inhibiting Th1 but not Th2 in auto-inflammatory condition. The 6th NIF Winter School on Advanced Immunology. Singapore, January 22-26, 2017.

Atsushi Tanaka: Treg-specific control of TCR signaling molecules 第 46 回日本免疫学会総会・学術総会、仙台、2017 年 12 月 12-14 日

Ryoji Kawakami, Norihisa Mikami, Atsushi Sugimoto, Naganari Ohkura, Shimon Sakaguchi : Epigenomic signatures of extrathymic-derived regulatory T-cells. 第 46 回日本免疫学会総会・学術総会、仙台、2017 年 12 月 12-14 日

Yoshiaki Yasumizu, Naganari Ohkura, Yohko Kitagawa, Shimon Sakaguchi : Significance of the regulatory T cell-specific epigenetics in autoimmune disease susceptibility. 第 46 回日本免疫学会総会・学術総会、仙台、2017 年 12 月 12-14 日

Keiko Yasuda, Yohko Kitagawa, Shimon Sakaguchi : Satb1 controls the differentiation and terminal effector function of Th17 cells. 第 46 回日本免疫学会総会・学術総会、仙台、2017 年 12 月 12-14 日

2) 講演・シンポジウム

坂口志文：Targeting regulatory T cell in cancer immunotherapy. Immuno-Oncology Vertex 2017、京都、2017 年 1 月 21 日

Shimon Sakaguchi : Control of immune responses by regulatory T cells. The 6th NIF Winter School on

Advanced Immunology, Singapore, January, 22-26, 2017.

坂口志文：制御性 T 細胞と自己免疫 新学術領域研究 ネオ・セルフの生成・機能・構造、東京、2017 年 1 月 31 日

坂口志文：免疫自己寛容と自己免疫疾患 第 80 回日本皮膚科学会東京支部学術大会 横浜、2017 年 2 月 11-12 日

坂口志文：免疫制御とがん治療 金沢大学がん進展制御研究所共同利用・共同研究拠点シンポジウム 金沢、2017 年 2 月 14-15 日

坂口志文：免疫反応をコントロールする制御性 T 細胞—免疫疾患の克服に向けて— 膳所高校スーパーサイエンスハイスクール事業 滋賀、2017 年 2 月 16 日

坂口志文：免疫学の常識を覆す制御性 T 細胞研究 日本食品工業倶楽部月例会大阪、2017 年 2 月 17 日

坂口志文：免疫反応をコントロールする制御性 T 細胞—免疫疾患の克服に向けて— 読売テクノ・フォーラム研究交流会 東京、2017 年 2 月 20 日

坂口志文：「制御性 T 細胞による免疫疾患の治療をめざして」第 56 回静岡県病院学会 静岡、2017 年 2 月 25 日

坂口志文：制御性 T 細胞 (Treg) 誘導薬の創製「次世代免疫制御を目指す創薬医学融合拠点」ラップアップミーティング 京都、2017 年 3 月 1 日

坂口志文：制御性 T 細胞の発生・分化の分子基盤 第 4 回 Medical Frontier Consortium beyond the Organcentric Dogma 東京、2017 年 3 月 25-26 日

Shimon Sakaguchi : Control of immune responses by regulatory T cells. The 18th International Vasculitis & ANCA Workshop in Tokyo. Tokyo, March 25-28. 2017.

坂口志文：制御性 T 細胞とがん免疫 千葉癌免疫治療研究会 千葉、2017 年 4 月 14 日

坂口志文：制御性 T 細胞と自己免疫病 第 61 回日本リウマチ学会総会・学術集会 福岡、2017 年 4 月 20-22 日

Shimon Sakaguchi : Treg: from discovery to therapeutic application. Potential Therapies Based on Understanding Treg Development and Function. Celgene. Cambridge. MA USA, April, 26 2017.

Shimon Sakaguchi : Tregs-development and function. TRANZ (the Transplantation Society of Australia and New Zealand) 2017. Brisbane Australia, May 7-9 2017.

Shimon Sakaguchi : Targeting Regulatory T Cells for Cancer Immunotherapy. Immunotherapy@Brisbane 2017. Brisbane Australia. May 10-12, 2017.

Shimon Sakaguchi : Control of immune responses by regulatory T cells. The Crafoord Prize Lectures in Polyarthritis. The control of inflammation; regulatory T cells in health and disease. Lund, Sweden, 2017.

May 16, 2017.

Shimon Sakaguchi : Targeting transcriptional and epigenetic control of Treg cell development. The Crafoord Symposium in Polyarthritis. The control of inflammation; regulatory T cells in health and disease. Stockholm Sweden, May 17, 2017.

坂口志文：制御性 T 細胞と自己免疫、がん免疫 第 116 回日本皮膚科学会総会仙台、2017 年 6 月 2 - 4 日

坂口志文：免疫制御と自己免疫病 第 5 回免疫フロンティア B to B セミナー 大阪、2017 年 6 月 13 日

Shimon Sakaguchi : Treg cells: development and function. RIKEN IMS Summer Program 2017. Yokohama, June 16-21 2017.

Shimon Sakaguchi : Control of immune responses by regulatory T cells. RIKEN IMS-JSI International Symposium on immunology 2017. Tokyo, June, 22-23, 2017.

Shimon Sakaguchi : Suppression, anergy and deletion in peripheral tolerance. The Huenig Symposium Regulation of the T-cell response. Wuerzburg, Germany, June 30, 2017.

坂口志文：制御性 T 細胞と自己免疫・腫瘍免疫 第 3 回免疫治療 Expert Seminar 東京、2017 年 7 月 3 日

坂口志文：制御性 T 細胞の発見と臨床応用 第 227 回生命科学フォーラム E 東京、2017 年 7 月 11 日

坂口志文：制御性 T 細胞による免疫応答制御 平成 29 年度名医に学ぶセミナー熊本、2017 年 7 月 12 日

坂口志文：制御性 T 細胞と炎症制御 第 38 回日本炎症再生医学会 大阪、2017 年 7 月 18-19 日

坂口志文：制御性 T 細胞とがん治療 第 59 回日本婦人科腫瘍学会 熊本、2017 年 7 月 27-29 日

坂口志文：制御性 T 細胞とがん治療 第 15 回日本臨床腫瘍学会 神戸、2017 年 7 月 27 - 29 日

坂口志文：制御性 T 細胞の発生と機能 日本免疫学会第 19 回免疫サマースクール 2017 湘南、2017 年 7 月 31 日 - 8 月 3 日

坂口志文：Treg を標的としたがん免疫療法の可能性について 第 4 回 ATL 疾患検討会 2017. 8. 5. 東京、2017 年 8 月 5 日

坂口志文：日本人がみつけた免疫細胞『制御性 T 細胞』免疫反応を抑えるとは 免疫ふしぎ未来 2017 東京、2017 年 8 月 6 日

坂口志文：制御性 T 細胞による炎症制御 第 20 回間質性肺炎細胞分子病態研究会 東京、2017 年 8 月 19 日

坂口志文：制御性 T 細胞による免疫応答制御 第 5 回ブリストル血液学アカデミー 東京、2017 年

9月2日

Shimon Sakaguchi : TCR signaling, Treg, and Autoimmunity. 47th Annual Meeting of the German Society for Immunology. Erlangen, Germany, September 12-15, 2017.

Shimon Sakaguchi : TCR signaling, Treg, and Autoimmunity. 8th International Conference on Autoimmunity: Mechanisms and Novel Treatments. Rhodes, Greece, September 17-22, 2017.

坂口志文：制御性 T 細胞による免疫応答制御 第 9 回血液疾患免疫療法学会学術集会 東京、2017 年 9 月 30 日

坂口志文：制御性 T 細胞：その歴史と現在 第 68 回日本皮膚科学会中部支部学術大会 京都、2017 年 7 月 7-8 日

坂口志文：制御性 T 細胞を標的とするがん免疫療法 Bio Japan 2017 横浜、2017 年 10 月 11-13 日

Shimon Sakaguchi : TCR signaling, Treg, and Autoimmunity. Commemorative Symposium for “Institute for Frontier Life and Medical Sciences, Kyoto University. Ohtsu, October 19, 2017.

Shimon Sakaguchi : TCR signaling, Treg, and Autoimmunity. Baruj Benacerraf Lecture in Immunology. Boston U.S.A. October 25, 2017.

Shimon Sakaguchi : TCR signaling, Treg, and Autoimmunity. International Symposium of the Center for Animal Disease Models 2017. Tokyo, October 28, 2017.

Shimon Sakaguchi : TCR signaling, Treg, and Autoimmunity. Cytokines 2017 The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society. Kanazawa, October 29- November 2, 2017.

Shimon Sakaguchi : Cancer immunotherapy targeting Treg Cells. AACR New Horizons in Cancer Research 2017. Shanghai China, November 6-9, 2017.

Shimon Sakaguchi : TCR signaling, Treg, and Autoimmunity/Tumor Immunity. KAI International Meeting 2017. Seoul Korea, November 8-10, 2017.

坂口志文：制御性 T 細胞による免疫応答制御 2017 年度 生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 神戸、2017 年 12 月 6-9 日

坂口志文：制御性 T 細胞と自己免疫病 第 42 回大阪リウマチカンフェランス 大阪、2017 年 12 月 16 日

(賞)

Crafoord Prize

文化功労者顕彰

2017 年度第 22 回安藤百福賞「大賞」

生体分子設計学分野
Laboratory of Cellular Differentiation

| | | | |
|----|-------|---------------|-----------------|
| 教授 | 開 祐司 | Prof. | Yuji Hiraki |
| 助教 | 三浦 重徳 | Assist. Prof. | Shigenori Miura |
| 助教 | 有馬 祐介 | Assist. Prof. | Yusuke Arima |

本研究分野では、軟骨および腱・靭帯にそれぞれ特異的に発現する血管新生抑制因子 Chondromodulin-I および Tenomodulin を切り口として、軟骨・腱・靭帯の形成と再生修復および組織血管化の分子機構の解明を主たるテーマとして研究を行っている。また、材料工学的なアプローチによる細胞機能制御にも取り組んでいる。

1. 腱・靭帯の分化・成熟マーカー Tenomodulin の組織特異的発現制御機構の解析

II 型膜貫通型糖タンパク質である Tenomodulin (Tnmd) は、主に腱・靭帯で発現し、basic helix-loop-helix 型転写因子である Scleraxis (Scx) が転写活性化因子として働くことを明らかにした。Scx 欠失マウスにおいて、発生過程の腱・靭帯における Tnmd の発現はほぼ消失し (Fig. 1), 腱細胞において siRNA を用いて Scx をノックダウンすると Tnmd の発現が有意に低下した。そこで、Tnmd の転写開始点上流約 1 kb にわたり Scx によって制御される転写制御配列を探索したところ、TATA box を含む 174 bp にプロモーター活性を認め、その上流 -1030 ~ -295 において腱細胞特異的なエンハンサー活性を見出した。さらに、Scx 及び Twist1 がそれぞれ E12 または E47 とヘテロダイマーを形成してこの領域に存在する 2 つの E-box 配列に直接結合することで Tnmd の転写活性を制御していることがわかった。本研究により、腱・靭帯の分化・成熟を制御する新たな分子メカニズムの一端を明らかにした。

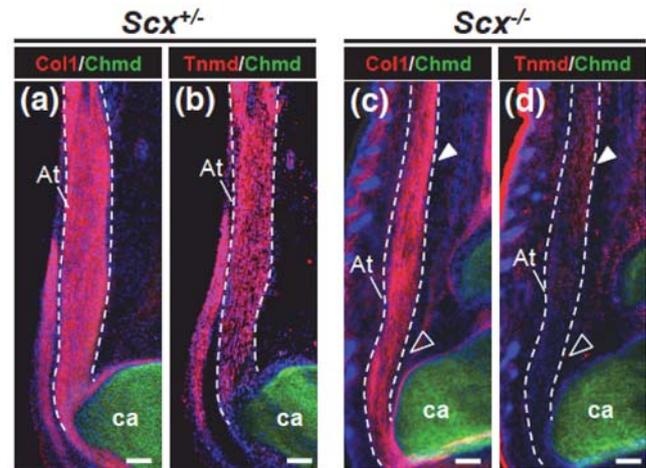


Fig. 1. Decreased expression of Tnmd in Scx-deficient mice. Double immunostaining of Chmd (green; cartilage) and Col1 (red; tendons and ligaments) (a, c) or Tnmd (red; tendons and ligaments) (b, d) was performed on frozen sections prepared from Scx^{+/+} (a, b) and Scx^{-/-} (c, d) at P1.

2. 軟骨と腱 / 靭帯連結部の形成過程における Scx⁺/Sox9⁺ 前駆細胞の役割

脊椎動物が体を動かすためには、骨格・筋・腱の緊密で機能的かつ物理的な連結が不可欠である。

腱は筋と骨格を連結することで、メカニカルトランスミッターとして機能し、一方、靭帯は骨と骨を連結することで関節の安定化を担う。軟骨・筋・腱・靭帯などの各コンポーネントは、筋骨格系の発生初期にまず独立した原基として形成される。その後、組織形成の進行に伴って各コンポーネントは連結されるが、そのメカニズムは明らかにされていない。

SRY-box containing gene 9 (Sox9) と Scleraxis (Scx) はそれぞれ軟骨形成と腱形成に不可欠な転写因子であるが、一部の腱・靭帯前駆細胞 (teno-/ligamento-progenitors) や軟骨前駆細胞 (chondroprogenitors) においては、筋骨格系形成初期に Sox9 と Scx が共に発現している。そこで、ScxCre マウスとレポーターマウスを交配して Scx 陽性細胞の系譜を解析すると、Scx 陽性である軟骨前駆細胞が軟骨と腱 / 靭帯の連結部付近の軟骨細胞に分化することが明らかとなった。一方、Scx の発現領域において Sox9 陽性細胞の系譜を解析した結果、Scx 陽性細胞は Sox9 の発現履歴により、Scx⁺/Sox9⁺ 前駆細胞と Scx⁺/Sox9⁻ 前駆細胞の二つの集団に分かれることが明らかとなった。腱細胞は Scx⁺/Sox9⁺ 及び Scx⁺/Sox9⁻ 前駆細胞に由来しており、軟骨原基に近づくほど多くの腱細胞が Scx⁺/Sox9⁺ に由来していた。靭帯細胞と椎間板の線維輪の細胞は Scx⁺/Sox9⁺ 細胞に由来していた。さらに、Scx⁺/Sox9⁺ 細胞において特異的に Sox9 を欠失させると、軟骨と腱 / 靭帯の連結部や椎間板の線維輪において低形成や欠損が認められた。これらの結果から、Scx⁺/Sox9⁺ 細胞群は腱細胞・靭帯細胞・軟骨細胞となる多能性を有し、軟骨と腱 / 靭帯の連結部の構築に寄与することが明らかとなった。

3. 材料工学的アプローチによる細胞機能制御

1) 細胞表面の混在環境が細胞間相互作用へ及ぼす影響の理解

細胞の表面は膜タンパクや糖鎖など様々な分子で混在した環境である。しかし、細胞表面の混在環境を定量的に評価する手法がなく、混在環境が細胞間相互作用へ及ぼす影響を系統的に理解するのは困難である。そこで我々の有する生細胞の表面修飾技術を活用して細胞表面の混在環境を模倣したモデル細胞膜を構築し、混在環境下での細胞間相互作用の理解に取り組んだ。細胞表面に均一に分布していた細胞間接着分子は、細胞間接着後速やかにその接着面に集積することがわかった。さらに、細胞表面にかさ高い分子が混在する場合、細胞間の特異的な相互作用が増強されることが示された。

2) 均質な iPS 細胞由来膵島様細胞の調製

アガロースゲルからなるマイクロウェル内でヒト iPS 細胞を培養し、凝集体の状態膵内分泌細胞へと分化誘導させた。均一サイズの凝集体を分化誘導することで C-peptide 陽性細胞を高効率で誘導でき、得られた膵島様凝集体はグルコース濃度に応じた C-peptide 放出を示した。マイクロウェル培養では、均質な膵島様細胞を簡便に得られることが分かった。

3) 免疫抑制剤を用いない皮下膵島移植

移植および摘出が容易な皮下への膵島移植法の確立を目指した。血管誘導能を持った薬物を担持したハイドロゲルをマウスまたはラット皮下に移植し、移植部位周辺に血管網を形成させた。その後、ハイドロゲルを取り出した部位へ膵島を移植することで、免疫抑制剤の投与なしで血糖値を長期間正常化することができた。

The proper growth and differentiation signaling from the surrounding extracellular environment regulates tissue formation and its functions. We are aiming at the elucidation of molecular interactions and signaling networks underlying vascularization of mesenchymal tissues and formation of skeletal tissues such as cartilage, bone and tendon/ligaments. Our current research efforts are focused on the following studies.

1. Transcriptional regulatory mechanism of Tenomodulin, a marker of mature tenocytes and ligamentocytes

Tenomodulin (Tnmd) is a type II transmembrane glycoprotein predominantly expressed in tendons and ligaments. We found that scleraxis (Scx), a member of the Twist-family of basic helix-loop-helix transcription factors, is a transcriptional activator of Tnmd expression in tenocytes. During embryonic development, Scx expression precedes that of Tnmd. Tnmd expression is nearly absent in tendons and ligaments of Scx-deficient mice generated by transcription activator-like effector nucleases-mediated gene disruption. Scx silencing by small interfering RNA significantly suppressed endogenous Tnmd mRNA levels in tenocytes. Mouse Tnmd contains five E-box sites in the ~1-kb 5'-flanking region. A 174-base pair genomic fragment containing a TATA box drives transcription in tenocytes. Enhancer activity was detected in the upstream region (-1030 to -295) of Tnmd in tenocytes, but not in NIH3T3 and C3H10T1/2 cells. Preferential binding of both Scx and Twist1 as a heterodimer with E12 or E47 to CAGATG or CATCTG and transactivation of the 5'-flanking region were confirmed by electrophoresis mobility shift and dual luciferase assays, respectively. Scx directly transactivates Tnmd via these E-boxes to positively regulate tenocyte differentiation and maturation.

2. Analysis of *Scx*⁺/*Sox9*⁺ progenitors during establishment of the junction between cartilage and tendon/ligament

SRY-box containing gene 9 (*Sox9*) and scleraxis (*Scx*) regulate cartilage and tendon formation, respectively. At the early stages of musculoskeletal development, both *Sox9* and *Scx* are detected in the subpopulation of tendon/ligament progenitors and chondroprogenitors. Lineage analysis crossing *ScxCre* transgenic mice with reporter mice revealed that *Scx*⁺ chondroprogenitors differentiate into chondrocytes near the chondro-tendinous/ligamentous junction during development.

Sox9 lineage tracing in the *Scx*⁺ domain revealed that *Scx*⁺ progenitors can be subdivided into two distinct populations with regard to their *Sox9* expression history: *Scx*⁺/*Sox9*⁺ and *Scx*⁺/*Sox9*⁻ progenitors. Tenocytes are derived from *Scx*⁺/*Sox9*⁺ and *Scx*⁺/*Sox9*⁻ progenitors. The closer the tendon is to the cartilaginous primordium, the more tenocytes arise from *Scx*⁺/*Sox9*⁺ progenitors. Ligamentocytes as well as the annulus fibrosus cells of the intervertebral discs are descendants of *Scx*⁺/*Sox9*⁺ progenitors. Conditional inactivation of *Sox9* in *Scx*⁺/*Sox9*⁺ cells causes defective formation in the attachment sites of tendons/ligaments into the cartilage, and in the annulus fibrosus of the intervertebral discs. Thus, the *Scx*⁺/*Sox9*⁺ progenitor pool is a unique multipotent cell population that gives rise to tenocytes, ligamentocytes and chondrocytes during the establishment of the chondro-tendinous/ligamentous junction.

3. Materials engineering approaches to control cellular function

1) Understanding of cell-cell interactions under molecular crowding condition of cell surface

The surface of cells is known to be crowded with a wide variety of membrane molecules. However, the role of crowding molecules on cellular interactions is still unclear because it is difficult to quantify or control the crowding conditions of cell surface. In order to study the effect of crowding condition on cell-cell interactions, we prepared a model cell surface crowded with cell surface molecules taking advantages of our cell surface modification technologies. We found that ligand and its receptor were recruited at cell-cell interface and that the recruitment was enhanced by co-existence of bulky membrane molecules.

2) Uniform production of islet-like cell aggregates from iPS cells

For cell therapy using iPS-derived cells, it is critical to prepare large amount of cells with required cell functions. In order to prepare large amount of insulin-producing cells, aggregates of human iPS cells were formed using agarose microwell plates and differentiated into pancreatic endocrine cells. Culture of iPS cells in the microwell allowed us to prepare aggregates with uniform size. Differentiated aggregates exhibited an ability to release C-peptide in a glucose dependent manner.

3) Subcutaneous islet transplantation without administration of immunosuppressive drugs

We aimed at establishment of less-invasive and efficient islet transplantation together with the avoidance of immunosuppressive drugs for the treatment of type 1 diabetes. Drug-loaded hydrogels were implanted into subcutaneous site in order to induce a vascular network. After removal of hydrogels, islets were transplanted into the prevascularized site. This method demonstrated long-term survival and function of transplanted islets without administering immunosuppressive drugs.

List of Publications

Sono, T., Akiyama, H., Miura, S., Min Deng, J., Shukunami, C., Hiraki, Y., Tsushima, Y., Azuma, Y., Behringer, RR and Matsuda S. (2017). THRAP3 interacts with and inhibits the transcriptional activity of SOX9 during chondrogenesis. **J Bone Miner Metab.** doi: 10.1007/s00774-017-0855-2

Arimura, H., Shukunami, C., Tokunaga, T., Karasugi, T., Okamoto, N., Taniwaki, T., Sakamoto, H., Mizuta, H., Hiraki, Y. (2017). TGF- β 1 Improves Biomechanical Strength by Extracellular Matrix Accumulation Without Increasing the Number of Tenogenic Lineage Cells in a Rat Rotator Cuff Repair Model. **Am J Sports Med.** 45, 2394-2404.

Yoshimoto, Y., Takimoto, A., Watanabe, H., Hiraki, Y., Kondoh, G., Shukunami, C. (2017). Scleraxis is required for maturation of tissue domains for proper integration of the musculoskeletal system. **Sci Rep.** 7, 45010.

Kodama T, Nakai R, Goto K, Shima K, Iwata H (2017). Preparation of an Au-Pt alloy free from artifacts in magnetic resonance imaging. **Magn Reson Imaging.** 44, 38-45.

Hirano K, Konagaya S, Turner A, Noda Y, Kitamura S, Kotera H, Iwata H (2017). Closed-channel culture

system for efficient and reproducible differentiation of human pluripotent stem cells into islet cells. **Biochem Biophys Res Commun.**, 487, 344-350.

Kuwabara, R., Hamaguchi, M., Fukuda, T., Sakai, H., Inui, M., Sakaguchi, S., and Iwata, H. (2017). Long-term Functioning of Allogeneic Islets in Subcutaneous Tissue Pretreated with a Novel Cyclic Peptide without Immunosuppressive Medication. **Transplantation**. *in press*.

有馬祐介, 岩田博夫 (2017) バイオインターフェースの医療応用, **CSJ カレントレビュー 24 医療・診断・創薬の化学－医療分野に挑む革新的な化学技術**, p84-90

List of Presentations

三浦重徳, 佐藤幸治, 根岸みどり, 手島哲彦, 竹内昌治 流体せん断力によるヒト胎盤バリア極性構造の形成 第16回日本再生医療学会、仙台、2017年3月7-9日

吉本由紀, 滝本品, 渡邊仁美, 近藤玄, 佐久間哲史, 山本卓, 開祐司, 宿南知佐 ゲノム編集技術を用いた鎖骨頭蓋異形成症モデルマウスの作成、日本ゲノム編集学会第2回大会、大阪、2017年6月29日

吉本由紀, 滝本品, 開祐司, 宿南知佐 basic helix-loop-helix 型転写因子 Scleraxis は腱・靭帯接合部の成熟を制御する 第35回日本骨代謝学会学術集会、福岡、2017年7月27日

滝本品 Pax1/9 による椎間板 ECM の発現制御と恒常性維持 第18回運動器科学研究会、呉、2017年9月1-2日

三浦重徳 Pax1 硬節エンハンサーの進化的変遷と脊椎形成 第18回運動器科学研究会、呉、2017年9月1-2日

吉本由紀, 滝本品, 開祐司, 宿南知佐 Scx/Sox9 陽性前駆細胞は腱・靭帯付着部の形成に寄与する 第59回歯科基礎医学会学術大会、長野、2017年9月17日

吉本由紀, 滝本品, 渡邊仁美, 近藤玄, 佐久間哲史, 山本卓, 開祐司, 宿南知佐 転写因子 Scleraxis は筋骨格系を連結する組織の成熟を制御する 2017年度生命科学系学会合同年次大会、兵庫、2017年12月8日

Arima, Y., Iwata, H. Recruitment and exclusion of DNA tethered to model cell membrane upon DNA-mediated cell attachment. The 8th Taiwan-Japan Symposium on Nanomedicine. Taipei, March 16-17, 2017 (**invited talk**).

Arima, Y., Hirai, Y., Iwata, H. Cell surface engineering for manipulating cell functions. . The 5th China-Japan Symposium on Nanomedicine. Suzhou, September 16-18, 2017 (**invited talk**).

Kodama T., Toda M., Arima Y., Ozasa H, Ogawa A, Murayama Y. Development of Stain eluting coils to enhance neck endothelialization and thrombus organization in the aneurysm cavity. 14th Congress of the World Federation of Interventional and Therapeutic Neuroradiology. Budapest, October 16-19, 2017.

Toda M., Ozasa H, Ogawa A, Arima Y., Kodama T., Iwata H. Development and evaluation of a statin-carrying embolization coils. 14th Congress of the World Federation of Interventional and Therapeutic Neuroradiology. Budapest, October 16-19, 2017.

有馬 祐介 細胞－人工材料間および細胞－細胞間の接着に影響する種々の因子 粉体工学会 2017年第1回ソフト粒子・界面研究会, 京都, 2017年2月17日 (招待講演)

Arima, Y., Hirai, Y., Iwata, H. Control of multicellular aggregate structure using cell surface modification with recombinant proteins. 11th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2017). Sendai, December 13-15, 2017 (**invited talk**).

栗原 令、岩田 博夫 環状ペプチド担持デバイスにより皮下に作製した免疫寛容部位とその部位への膝島移植 第16回日本再生医療学会総会 仙台 2017年3月7-9日

Nakai R, Yamaguchi S, Toda M, Azuma T, Hashimoto H, Takadama H. Evaluation of the susceptibility artifacts by various materials using MRI. 第45回日本磁気共鳴医学会大会、宇都宮、2017年9月14-16日

磯部 潤、有馬祐介 単鎖DNA－ポリエチレングリコール－脂質による細胞間接着に及ぼす混在分子の影響 第66回高分子討論会 松山、2017年9月20-22日

磯部 潤、有馬祐介 細胞膜上に混在する分子が細胞間相互作用へ及ぼす影響 第39回日本バイオマテリアル学会大会 東京、2017年11月20-21日

生命システム研究部門
Department of Biosystems Science

ナノバイオプロセス分野
Laboratory of Nano Bioprocess

教授 楠見 明弘 Prof. Akihiro Kusumi
助教 笠井 倫志 Assist. Prof. Rinshi Kasai

1. 生きている細胞中での1分子観察と操作法の開発

世界的には、in vitro での1分子観察と操作ができる研究室は増えてきている。しかし、私達の研究室の特徴は、1分子観察と操作を生細胞中でおこなうことで、それによって、1分子細胞生物学が可能になった。具体的には生きている細胞中の1分子を、マイクロ秒レベルの時間分解能、ナノメートルレベルの空間精度で追跡し、さらに、それらの分子の活性化（反応）までも1分子毎に見る方法を開発してきた（これらは世界でも我々のみ）。これは、ナノサイエンス／ナノテクノロジーとの融合領域として、1分子ナノバイオロジー、1分子細胞生物学という新しい学問分野の創造につながりつつある。

なお、以下の発見は、1分子法を使って初めて可能になったものであり、単なる生細胞中でのイメージングや多数分子の計測では不可能であったものばかりである。

2. 細胞膜の基本的な構造と、働き方について

細胞膜は2次元の液体（連続体）と考えられてきた。しかし、私達は、(1) 細胞膜はコンパートメント化されていること、(2) これは細胞膜に取り込まれた全ての分子に対して働くこと、(3) その機構は、基本的にはアクチン膜骨格によるもので、膜骨格とそこに結合した膜貫通型タンパク質が拡散障壁として働くこと、などを示した。これは、シンガー－ニコルソンモデルに重要な変更を迫るものであり、膜の構造と働き方について、基本的なパラダイムシフトを起こした研究である。

さらに最近、電子線トモグラフィー法を用いて、細胞膜の細胞質側表面に存在するアクチン膜骨格の構造を、3次元再構成法によって、定量的に可視化することに成功した。細胞膜試料として、細胞膜の内側表面を急速凍結ディープエッチ白金レプリカに写し取ったものを用いた。これによって、膜の内側表面の膜骨格の網目の大きさを求めたところ、それが、膜分子の拡散によって得られたコンパートメントの大きさとピッタリと一致した（図1参照）。

受容体はシグナルを受けた後、会合して運動を停止するものが多いが（シグナルが来た位置を数十秒程度記憶する）、これは、会合体が膜骨格によるコンパートメントに閉じ込められるか、膜骨格に結合することによることがわかった。さらに、神経細胞の細胞膜には脂質をも通さない拡散障壁が生じるが、これも、アクチン膜骨格とここに結合する膜貫通型タンパク質が密に集合することによって出来ることを示した。

3. シグナル伝達の基本的な仕組みについて

シグナル伝達は、多くの場合、シグナル分子のランダムな拡散運動と衝突によって担われると考えられてきた。近年の、多くの足場タンパク質の発見は、これとは全く逆に、上流と下流の分子は、足場タンパク質が関与する場合にはずっと結合しているものであり、シグナルが来たら、固体の電気回路のように、シグナルを伝えるものであると考えられるようになった。しかし、私達は、ある分子が活性化されると、それに結合する足場タンパク質、下流分子などが急速に集まって信号複合体を形成すること、それらの多くは安定ではなく1秒以下の寿命で分解（不活化）する、ことを見いだした（Ras-Rafの系、ラフトの関与する系）。すなわち、1回毎のシグナル伝達は量子化されており、多数分子の平均として観察される生化学やイメージングによるシグナル変化は、これらの量子的なパルス状のシグナルの和であり、それを担うのがこれらの短寿命シグナル複合体であることが示された。これは、シグナル系のシステムとしての働き方を理解するためには、極めて重要な知見で、きわめて動的なシグナル分子の組織化によるシステム動作の一端が見えてきたと言える。

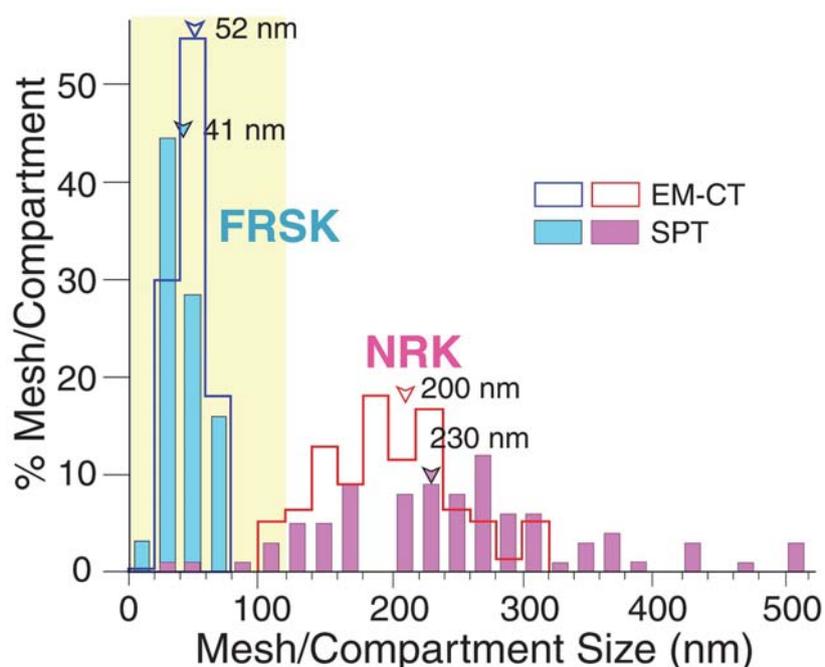


図1. 細胞膜の細胞質側表面に存在するアクチン膜骨格の構造を、3次元再構成法によって、定量的に可視化し、膜の内側表面の膜骨格の網目の大きさを求めた。網目の大きさの分布を、オープンバーで示す。赤がNRK細胞、青が、FRSK細胞。さらに、細胞膜中のリン脂質の拡散運動から求めたコンパートメントの大きさの分布を、クローズドバーで示す。両者は、各々の細胞でよく一致する。このように、網目やコンパートメントの大きさが大きく異なる2種の細胞で、それぞれ一致が見られたことは、膜骨格フェンスとそれに結合した膜貫通型タンパク質のピケットモデルを強く支持する。

Paradigm shift of the concept of the plasma membrane structure

The plasma membrane has been considered to be a two dimensional liquid, with their constituent molecules, membrane proteins and lipids, diffusing freely in the plasma membrane, the Singer-Nicolson model widely accepted for these 30 years. However, we found that the plasma membrane is partitioned into many small compartments, and both membrane lipids and proteins undergo short-term confined diffusion within a compartment, and long-term hop diffusion between the compartments. These membrane compartments are delimited by the membrane skeleton and the transmembrane proteins anchored to the membrane skeleton (Fujiwara et al., 2002; Murase et al., 2004; Kusumi et al., 2005; Morone et al., 2006). This entails a paradigm shift for the concept of the plasma membrane, from the continuous 2-dimensional fluid to the compartmentalized, structured system. This could be found because we have developed high time resolution (25 microseconds) single-molecule tracking techniques (Kusumi et al., 2005). If more than one molecule is observed at the same time, the single hop event would be masked by averaging over all the molecules under observations. Without high-time resolutions, the residency time within a compartment for 1 ms to 1 s could not be detected.

Single-molecule force microscope

An ultra-sensitive, single-molecule optical force scanning probe microscope was developed that uses a single membrane molecule as a probe. This microscope measures the interaction force between the membrane-molecule probe with the membrane skeleton mesh in live cells, and, by mapping the force, images of the membrane skeleton that interact with the membrane molecule were obtained (Ritchie et al., in preparation). A theoretical framework was developed to understand/predict the behavior of single membrane molecules being dragged by the optical trap (Ritchie et al. in preparation).

Detection of transient interactions of two species of molecules in living cells

Two species of molecules were labelled in different colors, and a method to detect their colocalization at the level of single molecules was developed for the first time (Koyama et al., 2005).

Single-molecules FRET imaging of H-Ras activation in living cells

The activation of H-Ras, a GTP-binding protein involved in the signaling pathways for cell proliferation and reorganization of the cytoskeleton, was visualized at the level of individual molecules using a technique called single-molecule fluorescence resonance energy transfer (single-molecule FRET; Murakoshi et al., 2004; Kusumi and Murakoshi, 2005). Activation of H-Ras takes place only temporarily (< 2 s), and is accompanied by transient immobilization, which is likely due to the transient formation of an activated-Ras signaling complex with scaffolding proteins.

List of Publications

- Kinoshita, M., Suzuki, K. G. N., Matsumori, N., Takada, M., Ano, H., Morigaki, K., Abe, M., Makino, A., Kobayashi, T., Hirosawa, K. M., Fujiwara, T. K., Kusumi, A. (Co-Corresponding author), and Murata, M. (2017). Raft-based sphingomyelin interactions revealed by new fluorescent sphingomyelin analogs. **J. Cell Biol.** *216*, 1183-1204.
- Wakayama, S., Kiyonaka, S., Arai, I., Kakegawa, W., Matsuda, S., Ibata, K., Nemoto, Y. L., Kusumi, A., Yuzaki, M., and Hamachi, I. (2017). Chemical labeling for visualizing native AMPA 1 receptors in live neurons. **Nat. Commun.** *8*, 14850.
- Nemoto, Y. L., Morris, R. J., Hijikata, H., Tsunoyama, T. A., Shibata, A. C. E., Kasai, R. S., Kusumi, A. (Co-Corresponding author), and Fujiwara, T. K. (2017). Dynamic meso-scale anchorage of GPI-anchored receptors in the plasma membrane: prion protein vs. Thy1. **Cell Biochem. Biophys.** *75*, 399-412.
- Shirai, Y. M., Tsunoyama, T. A., Hiramoto-Yamaki, N., Hirosawa, K. M., Shibata, A. C. E., Kondo, K., Tsurumune, A., Ishidate, F., Kusumi, A. (Co-Corresponding author), and Fujiwara, T. K. (2017). Cortical actin nodes: Their dynamics and recruitment of podosomal proteins as revealed by super-resolution and single-molecule microscopy. **PLoS ONE** *12*, e0188778

List of Invited Presentations

- R. S. Kasai and A. Kusumi. Transient GPCR dimers and their functions as revealed by single-molecule tracking. Gordon Conference on “GPCRs – From Single Molecules to New Forms of Treatment”. Il Ciocco, Italy, March 12-17, 2017.
- A. Kusumi. Very transient molecular complexes enable signal transduction: findings by single-molecule tracking. IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2017. Haiko, Hainan Province, China. May 7, 2017.
- A. Kusumi. Single-molecule view of the plasma membrane organization for signal transduction. **Closing Plenary Lecture**. FENS Regional Meeting. Pécs, Hungary. September 2017.
- A. Kusumi. Single-molecule tracking detection of very transient signaling molecular complexes. The Second Adriatic Symposium on Biophysical Approaches in Biomedical Studies. The Mediterranean Institute for Life Sciences, Split, Croatia. September 2017.
- A. Kusumi. Signal transduction by transient molecular complexes: findings by single-molecule tracking. 5th European Joint Theoretical/Experimental Meeting on Membranes (EJTEMM2017). Jagiellonian University, Krakow, Poland. 6-8 December 2017.

生命システム研究部門
Department of Biosystems Science

バイオメカニクス分野
Laboratory of Biomechanics

| | | | |
|-----|----------|---------------|----------------------|
| 教授 | 安達 泰治 | Prof. | Taiji Adachi |
| 准教授 | 井上 康博 | Assoc. Prof. | Yasuhiro Inoue |
| 講師 | オケヨ ケネディ | Lecturer | Kennedy Omondi Okeyo |
| 助教 | 亀尾 佳貴 | Assist. Prof. | Yoshitaka Kameo |

本分野では、生物の発生過程における細胞分化、形態形成、成長、さらには生体組織・器官のリモデリングや再生による環境への機能的適応など、多様な生命現象における自律的な制御メカニズムの解明を目指し、力学、生命科学、医学を含む学際的研究を行っている。2017年においては、張力作用下の α カテニンとビンキュリン分子の結合・解離のリアルタイム観察に成功した。また、成長上皮組織の陥入における収縮細胞の空間的パターンの力学的役割を数理的に解明した。

1) AFM-TIRFによる張力作用下の α カテニンに対するビンキュリン誘導のリアルタイム観察

接着結合は、細胞間に作用する張力に対して力学的強度を適応させることが知られる。この作用により、個々の細胞が発生させる張力は組織レベルで統一的に制御され、例えば、発生期における組織変形の駆動力となる。接着結合の構成要素である α カテニンは張力センサの機能を有しており、細胞間張力のもとで、ビンキュリンの誘導を介して接着結合近傍のアクチン細胞骨格の再構築を促進する。これまでの研究により、 α カテニンによる張力感知は動的なプロセスにより達成されることが示唆されている；(1) 張力の作用により α カテニンが自己阻害構造を解放する。

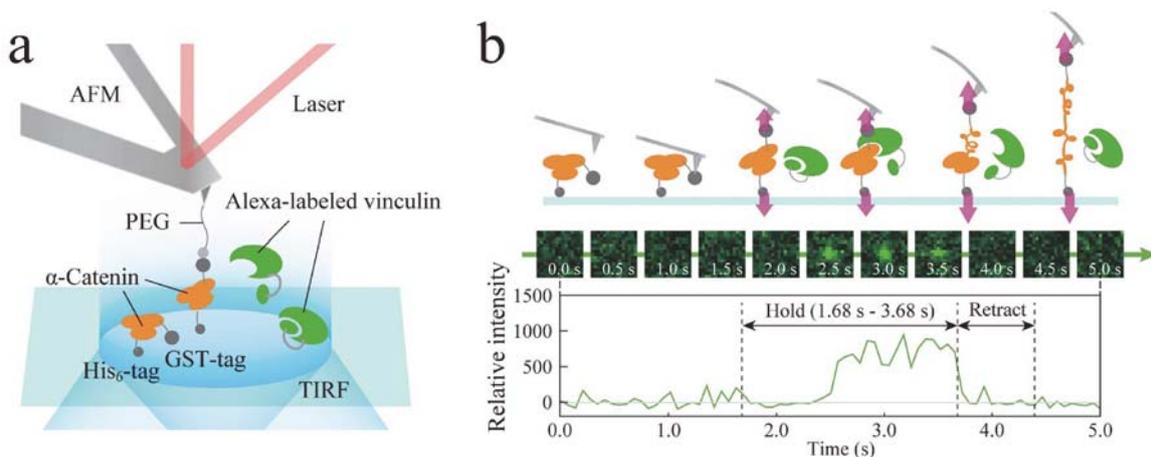


Fig. 1. (a) A novel AFM-TIRF system. (b) Real-time imaging of vinculin recruitment to stretched α -catenin under tension.

(2) 力学適応的な構造変化により α カテニンが安定な中間状態をとる。(3) ビンキュリンが結合することにより中間状態がさらに安定化する。一方で、張力作用下における分子の結合解離を追跡する実験手法は、これまでに提案されていない。よって、本研究では、原子間力顕微鏡 (Atomic force microscopy; AFM) と全反射蛍光照明 (Total internal reflection fluorescence; TIRF) を組み合わせた新しい実験系を構築した (図 1)。本実験系により、基板に化学固定した α カテニン分子に対して AFM による張力負荷を行うと同時に、TIRF により、 α カテニン分子と溶媒中のビンキュリン分子の結合・解離をリアルタイムで観察することに成功した。

2) 成長上皮組織の陥入における収縮細胞の空間的パターンの力学的役割

上皮陥入は、形態形成における組織変形の基本モードのひとつであり、平坦な上皮シートから 3 次元的な形状が作られる際に必須となる。陥入は、収縮細胞の空間的なパターンに従い生じるが、その空間的なパターンにより、どのように組織変形が生じるのかは、十分に理解されていない。本研究では、成長組織に見られる陥入において、収縮細胞の配置に関する空間的パターンの力学的役割を多細胞動力学シミュレーションにより検討した。その結果、細胞増殖と頂端収縮は、それぞれ、変形の大きさと位置を規定することが明らかとなり、陥入方向は、収縮細胞の空間的なパターンに依存することがわかった。さらに、頂端収縮作用をもたらす二つの異なる分子機構 (頂端面における表面張力による収縮、および、線張力による収縮) を考慮すると、たとえ同一の空間的なパターンにおける頂端収縮であったとしても、陥入方向は、これら分子機構の違いに応じて、異なる可能性があることがわかった。以上の結果から、細胞増殖による上皮細胞シートの座屈が陥入を引き起こし、その陥入方向と陥入位置は、収縮細胞の空間的なパターンによって定まるくさび形状をした細胞の配置によって決定されることが示唆された。

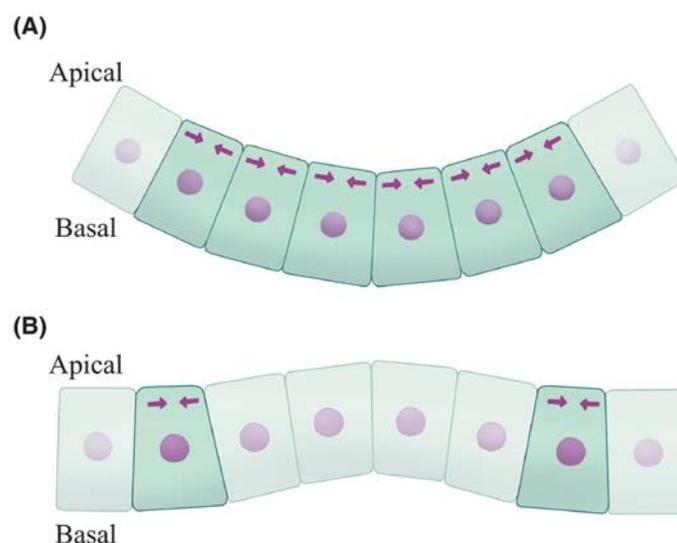


Fig.2. Schematic representation of cell shapes in the apicobasal axis under (A) circular pattern and (B) circumferential pattern, inducing (A) basally and (B) apically convex shapes of the epithelial cell sheet, respectively.

This laboratory aims to clarify the regulatory mechanism of self-organization which underlies a diverse biological phenomena through an interdisciplinary approach, encompassing mechanics, life and medical sciences. In 2017, we developed a novel system for real time observation of the dynamics of α -catenin and vinculin molecules simultaneously under tension. In addition, using multicellular dynamics simulations, we have also clarified a mechanical role for the spatial patterns formed by contractile cells during invagination of a growing epithelial tissue.

1) Real-time TIRF observation of vinculin recruitment to stretched α -catenin by AFM

Intercellular adherens junctions (AJs) adapt their mechanical strength in response to intercellular tension. For instance, during development, tension generated by individual cells is integrated to drive multicellular dynamics of morphogenesis, such as shape change. In particular, α -catenin, a component protein of AJs, is known to function as a tension sensor involved in the recruitment of vinculin to accelerate actin remodeling under tension. Although many studies have suggested that α -catenin-mediated tension-sensing is a dynamic molecular process, which involves a conformational change of α -catenin under tension to expose a cryptic vinculin binding site, there are no suitable experimental methods to directly explore the process. In this study, we developed a novel system by combining atomic force microscopy (AFM) and total internal reflection fluorescence (TIRF). In this system, α -catenin molecules, modified on coverslips, were stretched by AFM and their recruitment of Alexa-labeled full-length vinculin molecules, dissolved in solution, were observed simultaneously, in real time, using TIRF (Fig. 1).

2) Mechanical role of the spatial patterns of contractile cells in invagination of growing epithelial tissue

Epithelial invagination is one of the fundamental deformation modes during morphogenesis, and is essential for deriving the three-dimensional shapes of organs from a flat epithelial sheet. Invagination occurs in an orderly manner according to the spatial pattern of the contractile cells; however, it remains elusive how tissue deformation can be caused by cellular activity in the patterned region. In this study, we investigated the mechanical role of the spatial patterns of the contractile cells in invagination of growing tissue using multicellular dynamics simulations. We found that cell proliferation and apical constriction were responsible for expanding the degree of tissue deformation and determining the location of the deformation, respectively. The direction of invagination depended on the spatial pattern of the contractile cells. Further, comparing the simulation results of surface and line contractions as possible modes of apical constriction, we found that the direction of invagination differed between these two modes even if the spatial pattern was the same. These results indicate that the buckling of the epithelial cell sheet caused by cell proliferation causes the invagination, with the direction and location determined by the configuration of the wedge-shaped cells given by the spatial pattern of the contractile cells.

List of Publications

1. 論文

- Hirashima, T., Hoshuyama, M., Adachi, T. (2017). In vitro Tubulogenesis of Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) Spheroids Occurs Depending on Constituent Cell Number and Scaffold Gel Concentration. **Journal of Theoretical Biology** 435, 110-115.
- Takano-Yamamoto, T., Sasaki, K., Fatemeh, G., Fukunaga, T., Seiryu, M., Daimaruya, T., Takeshita, N., Kamioka, H., Adachi, T., Ida, H., and Mayama, A. (2017). Synergistic Acceleration of Experimental Tooth Movement by Supplementary High-frequency Vibration Applied with a Static Force in Rats. **Scientific Reports** 7-1, #13969
- Kim, Y.-K., Kameo, Y., Tanaka, S., Adachi, T. (2017). Capturing Microscopic Features of Bone Remodeling into a Macroscopic Model Based on Biological Rationales of Bone Adaptation. **Biomechanics and Modeling in Mechanobiology** 16-5, 1697-1708.
- Matsuda, K., Gotoh, H., Tajika, Y., Sushida, T., Aonuma, H., Niimi, T., Akiyama, M., Inoue, Y., and Kondo, S. (2017). Complex Furrows in a 2D Epithelial Sheet Code the 3D Structure of a Beetle Horn. **Scientific Reports** 7, 13939 1-9.
- Inoue, Y., Watanabe, T., Okuda, S., and Adachi, T. (2017). Mechanical Role of the Spatial Patterns of Contractile Cells in Invagination of Growing Epithelial Tissue. **Development Growth and Differentiation** 59, 444-454.
- Han, S.-W., Tamaki, T., Hoon-Kyu Shin, and Adachi, T. (2017). Local Stiffness of Osteocyte Using Atomic Force Microscopy. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology** 17-8, 5755-5758.
- Maki, K., Nakao, N., and Adachi, T. (2017). Nano-mechanical Characterization of Tension-sensitive Helix Bundles in Talin Rod. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 484-2, 372-377.
- Mori, H., Okeyo, K.O., Washizu, M., and Oana, H. (2017). Nucleosomes Exhibit Non-uniform Unwrapping Along Native Chromatin Fibers with Increasing Salt Concentration as Revealed by Direct Imaging in a Microfluidic Channel, **Journal of Biotechnology**, 13, 1700245.

2. 書籍・総説

- Kameo, Y., Tsubota, K., and Adachi, T. (2018). “**Bone Adaptation: In Silico Approach**”, **Frontiers of Biomechanics Volume 2**, Springer Japan, Total 209 pages.
- Adachi, T., and Kameo, Y. (2017). Computational Biomechanics of Bone Adaptation by Remodeling. **Multiscale Mechanobiology of Bone Remodeling and Adaptation**, 231-258, Springer.
- 牧功一郎, 安達泰治 (2017). 細胞結合を解した力の感知－分子引張実験によるアプローチ 高度物理刺激と生体応答 32-35.

- 安達泰治、松下慎二、井上康博 (2017). 細胞骨格アクチンフィラメントの分子メカノバイオロジー解析 細胞のマルチスケールメカノバイオロジー 13-43.
- 安達泰治 (2017). 骨再生用スキャフォールド構造設計の計算医工学支援 別冊・医学のあゆみ 146-152.
- 井上康博 (2017). 上皮形態形成のメカニズム解明に向けた数理モデル 実験医学 (増刊) 35 (5), 203-206.
- 井上康博 (2017). 機械的刺激に伴う化学反応プロセスの制御 生物物理 57 (1), 26-29.

List of Presentations

1. 講演・シンポジウム

- Inoue, Y. (Invited Talk) Multiscale interplay between intracellular and multicellular dynamics in tissue morphogenesis. 2017 Cellular and Molecular Bioengineering Conference, Hawaii, USA, January, 4-7, 2017.
- Adachi, T. (Invited Lecture) Modeling and Simulation of Bone Metabolism and Adaptation by Remodeling. KSME-JSME Joint Symposium at 2017 Spring Conference of Bioengineering Division of KSME (The Korean Society of Mechanical Engineers), Daejeon, Korea, April, 27-28, 2017.
- Adachi, T., and Kameo, Y. (Invited Talk) Modeling Mechano-biochemical Couplings in Trabecular and Osteonal Bone Remodeling. Coupled Problems in the Biomechanics of Bone and Arteries, VII, International Conference on Coupled Problems in Science and Engineering (Coupled Problems 2017), Rhodes Island, Greece, June, 12-14, 2017.
- Adachi, T. (Invited Lecture) In Silico Experiments of Bone Metabolism and Functional Adaptation by Remodeling. The 14th Meeting of Bone Biology Forum, Makuhari, August, 18-19, 2017.
- Adachi, T., Miya, Y., and Kameo, Y. (Invited Talk) In-silico Experiments of Mechano-biochemical Couplings in Bone Adaptation by Remodeling. 5th Switzerland-Japan Workshop on Biomechanics (SJB2017), Zermatt, Switzerland, September, 14-17, 2017
- Okeyo, K.O. (Invited Talk), Integrating Microfluidics and Tissue Engineering for Organ-on-a Chip Applications, Lab-on-a-Chip and Microfluidics World Congress 2017, Coronado Island, California, USA. October, 2-4, 2017.
- Adachi, T. (Special Lecture) In Silico Experiment of Bone Metabolism and Adaptation by Remodeling, Medical Device Innovation Center, National Cheng Kung University, Tainan, Taiwan, October, 13, 2017.
- Okeyo, K.O. (Invited Talk), Induction of stem cell self-assembly by adhesion restriction, Lab-on-a-Chip, Microfluidics & Biosensors Asia 2017, Taipei, Taiwan, November 30- December 1, 2017.

安達泰治、宮 雄貴、亀尾佳貴、井上康博、中島友紀（シンポジスト）骨の形態リモデリングと代謝の *in silico* 実験 第 37 回日本骨形態計測学会、シンポジウム 2「医歯薬工連携による骨研究」、大阪、2017 年 6 月 22-24 日

安達泰治（シンポジスト）局所的な力学環境がもたらす骨基質の異方性形成 第 44 回日本臨床バイオメカニクス学会、シンポジウム「骨のマイクロナノメカニクス」、松山、2017 年 11 月 24-25 日

2. 学会

Maki, K., and Adachi, T. Biomechanical Characterization of α -catenin by Single-molecule Approaches Using AFM and TIRFM. 15th International Student Seminar: Biology in Bloom, Kyoto, February 23-24, 2017.

Okeyo, K.O., Yamada, K., and Washizu, M., Cell “Shoji”- A Novel Method of Cell Culture and Structure Formation, Japan-Taiwan Nanomedicine Symposium, Taipei, Taiwan, March 16-17, 2017.

Marcotti, S., Maki, K., Adachi, T., Gwendolen C. Reilly, Damien Lacroix. Nanofishing of Hyaluronic Acid on Murine Osteoblast Precursor Cells. The ORS 2017 Annual Meeting, San Diego, California, March 19-22, 2017.

Nakao, N., Maki, K., and Adachi, T. Actin Remodeling in Nascent Focal Adhesion Explored by Integrin Nanofishing. CDB Symposium 2017, Towards Understanding Human Development, Heredity, and Evolution, Kobe, March 27-29, 2017.

Takeda, H., Kameo, Y., and Adachi, T. Mechanical Modelings of Optic-cup Morphogenesis Caused by Tissue Growth and Constriction. CDB Symposium 2017, Towards Understanding Human Development, Heredity, and Evolution, Kobe, March 27-29, 2017.

Yamada, K., Okeyo, K.O., Kurosawa, O., Oana, H., and Washizu, M., Direct Observation-based Analysis of Compaction stability of Individual Chromosomes Isolated from Single Mammalian Cells”, Transducers 2017, Kaohsiung, Taiwan, June 18-22, 2017.

Kim, Y.-K., Kameo, Y., Tanaka, S., and Adachi, T. Theoretical Evaluation of Macroscopic Bone Remodeling Models Considering Osteocytic Mechanosensing. The 23rd Congress of the European Society of Biomechanics (ESB2017), Seville, Spain, July, 2-5, 2017.

Maki, K., Nakao, N., and Adachi, T. Mechanical Characterization of Tension-sensitive Helix Bundles in Talin Rod by Nano-tensile Testing. The 23rd Congress of the European Society of Biomechanics (ESB2017), Seville, Spain, July, 2-5, 2017.

Kameo, Y., Takeda, H., and Adachi, T. A Model for Retinal Invagination in Optic-cup Morphogenesis Driven by Growth and Constriction. The 23rd Congress of the European Society of Biomechanics (ESB2017), Seville, Spain, July, 2-5, 2017.

- Takeda, H., Kameo, Y., and Adachi, T. Finite Element Investigation of Mechanical Roles of Tissue Growth and Constriction during Optic-cup Morphogenesis. The 26th Congress of the International Society of Biomechanics (ISB2017) and the 9th Asian-Pacific Conference on Biomechanics (APBiomech2017), Brisbane, Australia. July, 23-27, 2017.
- Adachi, T., Miya, Y., Imai, K., Kameo, Y., and Inoue, Y. In Silico Study on the Effect of RANKL Expression Rate on Trabecular Morphological Change. The 26th Congress of the International Society of Biomechanics (ISB2017) and the 9th Asian-Pacific Conference on Biomechanics (APBiomech2017), Brisbane, Australia. July, 23-27, 2017.
- Okeyo, K.O. Fabrication of in Vitro Tissue/organ Models for Disease Modeling and Drug Development, The 3rd Africa International Biotechnology and Biomedical Conference (AIBBC 2017), Sino Africa Joint Research Center, Jomo Kenyatta University of Agriculture and Technology (JKUAT), Juja, Kenya, September 12-15, 2017.
- Maki, K., and Adachi, T., Monitoring Vinculin Association with α -catenin under Tension by AFM- TIRF System. 5th Switzerland-Japan Workshop on Biomechanics (SJB2017), Zermatt, Switzerland, September, 14-17, 2017.
- Ando, Y., Okeyo, K.O., and Adachi, T., Self-organized Morphological Changes in ES Cells on Adhesion-restricted Substrates. 5th Switzerland-Japan Workshop on Biomechanics (SJB2017), Zermatt, Switzerland, September, 14-17, 2017.
- Kameo, Y., Miwa, M., and Adachi, T., Computational Investigation of the Effect of Molecular Weight on the Flow-mediated Signal Transport in Bone. 5th Switzerland-Japan Workshop on Biomechanics (SJB2017), Zermatt, Switzerland, September, 14-17, 2017.
- Kim, Y.-K., Kameo, Y., Tanaka, S., and Adachi, T., Quantitative Evaluation of Macroscopic Bone Remodeling Models Based on Bone Morphometries Essential for the Equilibrium State. 5th Switzerland-Japan Workshop on Biomechanics (SJB2017), Zermatt, Switzerland. September, 14-17, 2017.
- Nakao, N., Maki, K., and Adachi, T., Analysis of Mechanical Behaviors of Maturing Focal Complex by Nano-tensile Testing. 5th Switzerland-Japan Workshop on Biomechanics (SJB2017), Zermatt, Switzerland. September, 14-17, 2017.
- Takeda, H., Kameo, Y., and Adachi, T., Continuum Mechanics Modeling of Retinal Morphogenesis Caused by Non-uniform Growth. 5th Switzerland-Japan Workshop on Biomechanics (SJB2017), Zermatt, Switzerland. September, 14-17, 2017.
- Tanabe, M., Okeyo, K.O., Okanojo, M., Hanzawa, H., Washizu, M., and Takeda, S., Basic Study of iPS Cell Culture Substrate by Using Metal Micro Mesh Device, Lab-on-a-Chip and Microfluidics World Congress 2017, Coronado Island, California, USA. October, 2-4, 2017.

Kurosawa, S., Okeyo, K.O., Iwata, H., and Washizu, M., Novel Micromesh Culture Method Enables Self-assembly Cell Sheet Formation and Mechanotransduction, International Symposium on Nanomedicine 2017, School of Medicine Centennial Hall, Tohoku University, Sendai, Japan. December 13-15, 2017.

松村保之、須長純子、亀尾佳貴、安達泰治 曲げを受ける培養長管骨中の遺伝子発現解析 日本機械学会バイオエンジニアリング部門第 29 回バイオエンジニアリング講演会講演、名古屋、2017 年 1 月 19-20 日

三輪将也、亀尾佳貴、安達泰治 間質液流れを介した細胞間シグナル輸送が骨の機能的適応に及ぼす影響 日本機械学会バイオエンジニアリング部門第 29 回バイオエンジニアリング講演会講演、名古屋、2017 年 1 月 19-20 日

寶珠山美歩、平島剛志、安達泰治 力学的環境に依存する上皮管腔形成過程のイメージング解析 日本機械学会バイオエンジニアリング部門第 29 回バイオエンジニアリング講演会講演、名古屋、2017 年 1 月 19-20 日

井上康博、立尾 樹、安達泰治 上皮折りたたみの多細胞力学シミュレーション 日本機械学会バイオエンジニアリング部門第 29 回バイオエンジニアリング講演会講演、名古屋、2017 年 1 月 19-20 日

亀尾佳貴、石原正行、大多尾義弘 骨小腔—骨細管系の構造的相違が骨梁リモデリングに及ぼす影響 日本機械学会第 29 回バイオエンジニアリング講演会 名古屋、2017 年 1 月 19-20 日

岡野定雅弘、オケヨ・ケネディ、半澤宏子、武田志津、鷺津正夫、細胞初期化に向けた電界集中型細胞融合による細胞核交換 平成 29 年電気学会全国大会、富山、2017 年 3 月 15-17 日

石川敬一、須長純子、亀尾佳貴、安達泰治 コラーゲンゲル上における骨芽細胞様細胞の能動的配向 第 40 回日本バイオレオロジー学会年会、倉敷、2017 年 5 月 27-28 日

安藤悠太、オケヨ・ケネディ、安達泰治 細胞接着制限環境下における mES 細胞の培養第 40 回日本バイオレオロジー学会年会、倉敷、2017 年 5 月 27-28 日

金 英寛、亀尾佳貴、田中 栄、安達泰治 骨リモデリング駆動力の数理的考察：平衡状態における骨形態 第 37 回日本骨形態計測学会、大阪、2017 年 6 月 22-24 日

井上康博、安達泰治 形態形成における力学—生化学連成の数理モデル 第 64 回理論応用力学講演会、東京、2017 年 8 月 22-24 日

仲尾信彦、牧功一郎、安達泰治 Outside-in シグナルを介して成熟する接着分子複合体のナノ力学挙動解析 日本機械学会 2017 年度年次大会、埼玉、2017 年 9 月 4-7 日

芦谷遼太郎、須長純子、安達泰治 力学刺激に対するマウス単離骨細胞の一酸化窒素産生挙動解析 日本機械学会 2017 年度年次大会、埼玉、2017 年 9 月 4-7 日

安藤悠太、オケヨ・ケネディ、安達泰治 メッシュ構造基板を用いた接着領域制限下における mES 細胞の未分化性評価 日本機械学会 2017 年度年次大会、埼玉、2017 年 9 月 4-7 日

- 宮 雄貴、亀尾佳貴、中島友紀、安達泰治 海綿骨スケールにおける骨代謝・リモデリング シミュレーション 日本機械学会 2017 年度年次大会、埼玉、2017 年 9 月 4-7 日
- 竹田宏典、亀尾佳貴、安達泰治 眼杯の形態形成を引き起こす細胞活動の力学的作用 日本機械学会 2017 年度年次大会、埼玉、2017 年 9 月 4-7 日
- 立尾 樹、井上康博、安達泰治 周囲組織から拘束を受ける成長上皮組織の変形シミュレーション 日本機械学会 2017 年度年次大会、埼玉、2017 年 9 月 4-7 日
- 平島剛志、安達泰治 細胞の異方的なメカノレスポンスが発生過程の精巣上体細管の径を維持する 日本生物物理学会第 55 回年会、熊本、2017 年 9 月 19-21 日
- 木村健治、井上康博 曲面上のブラウン運動シミュレーション手法の検討 日本物理学会 2017 年秋季大会、岩手、2017 年 9 月 21-24 日
- 立尾 樹、井上康博、安達泰治 上皮組織に折り畳み構造が形成されるメカニズムの数値的検討第 27 回日本数理生物学会年会、札幌、2017 年 10 月 6-8 日
- 木村健治、井上康博 曲率依存性を再現する曲面上のブラウン運動シミュレーション法の検討第 27 回日本数理生物学会年会、札幌、2017 年 10 月 6-8 日
- 松田惇志、井上康博、安達泰治 樹状突起スパイン内アクチン混み合い環境下における分子の拡散シミュレーション 日本機械学会第 28 回バイオフィロンティア講演会、徳島、2017 年 10 月 28-29 日
- 小笹正裕、亀尾佳貴、武石直樹、安達泰治 骨細胞周囲のプロテオグリカンが流れによる細胞突起変形に及ぼす影響 日本機械学会第 28 回バイオフィロンティア講演会、徳島、2017 年 10 月 28-29 日
- オケヨ・ケネディ、山田快、小穴英廣、鷺津正夫 マイクロメッシュを基板とする共培養システムを用いた生体内組織挙動の再現 電気学会センサ・マイクロマシン部門第 34 回センサ・マイクロマシンと応用システムシンポジウム、広島、2017 年 10 月 31 日 -11 月 2 日
- 松田惇志、井上康博、安達泰治 樹状突起スパイン内の空間混み合い効果によるシグナル分子のサイズ依存的センシング機構 電気学会センサ・マイクロマシン部門第 34 回センサ・マイクロマシンと応用システムシンポジウム、広島、2017 年 10 月 31 日 -11 月 2 日
- 小笹正裕、亀尾佳貴、武石直樹、安達泰治 骨細管内部構造が流れによる骨細胞メカノセンシングに及ぼす影響 電気学会センサ・マイクロマシン部門第 34 回センサ・マイクロマシンと応用システムシンポジウム、広島、2017 年 10 月 31 日 -11 月 2 日
- 石川敬一、須長純子、亀尾佳貴、安達泰治 張力センシングを介した骨芽細胞様細胞の能動的配向 電気学会センサ・マイクロマシン部門第 34 回センサ・マイクロマシンと応用システムシンポジウム、広島、2017 年 10 月 31 日 -11 月 2 日
- 木村健治、井上康博 ブラウン動力学シミュレーションによる生体膜上の分子拡散動態の検討 第

40 回日本分子生物学会年会、神戸、2017 年 12 月 6-9 日

金 英寛、亀尾佳貴、田中 栄、安達泰治 骨リモデリング数理モデルの生物学的構築と理論的評価 日本機械学会第 30 回バイオエンジニアリング講演会、京都、2017 年 12 月 14-15 日

宮 雄貴、亀尾佳貴、中島友紀、安達泰治 骨代謝・リモデリングにおける *in silico* 実験系の確立 日本機械学会第 30 回バイオエンジニアリング講演会、京都、2017 年 12 月 14-15 日

立尾 樹、井上康博、安達泰治 成虫原基における成長する上皮組織の折り畳み形成シミュレーション 日本機械学会第 30 回バイオエンジニアリング講演会、京都、2017 年 12 月 14-15 日

松田惇志、井上康博、安達泰治 アクチンフィラメントによる分子混み合い環境下における分子の異常拡散の解析 日本機械学会第 30 回バイオエンジニアリング講演会、京都、2017 年 12 月 14-15 日

安藤悠太、オケヨ・ケネディ、安達泰治 細胞接着を制限したメッシュ構造基板による mES 細胞の自己組織化誘導 日本機械学会第 30 回バイオエンジニアリング講演会、京都、2017 年 12 月 14-15 日

河野沙紀、オケヨ・ケネディ、安達泰治 血管内皮細胞と神経幹細胞の共培養システムの開発 日本機械学会第 30 回バイオエンジニアリング講演会、京都、2017 年 12 月 14-15 日

木部善清、オケヨ・ケネディ、安達泰治 メッシュ構造基板上で作製した筋芽細胞シートの細胞配向性 日本機械学会第 30 回バイオエンジニアリング講演会、京都、2017 年 12 月 14-15 日

石川敬一、須長純子、亀尾佳貴、安達泰治 ゲル上骨芽細胞様細胞の能動的配向における細胞内張力の役割 日本機械学会第 30 回バイオエンジニアリング講演会、京都、2017 年 12 月 14-15 日

芦谷遼太郎、須長純子、安達泰治 往復せん断流れ場におけるマウス単離骨細胞の一酸化窒素産生挙動解析 日本機械学会第 30 回バイオエンジニアリング講演会、京都、2017 年 12 月 14-15 日

小笹正裕、亀尾佳貴、武石直樹、安達泰治 多孔質骨梁中の流れによる骨細胞突起変形シミュレーション 日本機械学会第 30 回バイオエンジニアリング講演会、京都、2017 年 12 月 14-15 日

仲尾信彦、牧功一郎、安達泰治 形成初期における細胞接着分子構造体のナノ引張特性 日本機械学会第 30 回バイオエンジニアリング講演会、京都、2017 年 12 月 14-15 日

Guyot Yann, and Adachi, T., A Cell Population Dynamic Model for Neurons Migration during Early Stage Corticogenesis. 日本機械学会第 30 回バイオエンジニアリング講演会、京都、2017 年 12 月 14-15 日

竹田宏典、亀尾佳貴、安達泰治 組織形態形成における細胞移動と組織変形の連成モデリング 日本機械学会第 30 回バイオエンジニアリング講演会、京都、2017 年 12 月 14-15 日

3. 研究会・セミナー

Inoue, Y., Multicellular dynamics simulation on folding of epithelial sheet caused by cell proliferation.

JAPAN-UCI 3D Morphogenesis Meeting, University of California Irvine, USA, July, 10-11, 2017.

安達泰治 時間と場が制御する脳発生の数理モデル化とシミュレーション 文部科学省科学研究費補助金新学術領域「脳構築における発生時計と場の連携」第1回領域班会議、沼津、2017年1月27-28日

安達泰治 骨の代謝・リモデリングの数理バイオメカニクス 第24回西播磨整形外科医会学術講演会、姫路、2017年2月25日

亀尾佳貴 生体組織の成長とリモデリングの数理バイオメカニクス 大阪府立母子保健総合医療センター研究所セミナー、大阪、2017年3月9日

井上康博 多細胞組織に立体形状が作られる力学原理の数理 文部科学省科学研究費補助金新学術領域「生物の3D形態を構築するロジック」2017年度班会議、札幌、2017年6月26-27日

松田惇志、井上康博、安達泰治 アクチンフィラメントによる物理障壁中の分子の拡散挙動解析 CREST「生命動態の理解と制御のための基盤技術の創出」研究領域第8回数値デザイン道場、静岡、2017年6月29-30日

木村健治、井上康博 スパイン表面分子拡散シミュレーション法の検討 CREST「生命動態の理解と制御のための基盤技術の創出」研究領域第8回数値デザイン道場、静岡、2017年6月29-30日

井上康博 上皮組織変形の多細胞力学シミュレーション 第85回バイオメカフォーラム21研究会、大阪、2017年7月5日

安達泰治、亀尾佳貴、Yann Guyot、竹田宏典、武石直樹 脳発生の数理モデリング・シミュレーション基盤の構築 文部科学省科学研究費補助金新学術領域「脳構築における発生時計と場の連携」第2回領域班会議、神戸、2017年7月28-29日

Matsuda, A., Inoue, Y., and Adachi, T., Fluorescence Correlation Spectroscopy in a Confined Environment. 「生命動態の理解と制御のための基盤技術の創出」研究領域第6回領域会議、沖縄、2017年11月27-28日

Kimura, K., and Inoue, Y., Brownian dynamics simulation of molecular diffusion on spine surface. 「生命動態の理解と制御のための基盤技術の創出」研究領域第6回領域会議、沖縄、2017年11月27-28日

安達泰治 骨の機能的適応・代謝のバイオメカニクス AMED再生医療実現拠点ネットワークプログラム「難治性骨軟骨疾患に対する革新的iPS創薬技術の開発と応用」、京都、2017年11月28日

木村健治、井上康博 曲率依存性を再現するブラウン運動シミュレーションによる曲面上の粒子拡散動態 第15回計算数学研究会、栃木、2017年12月1-3日

亀尾佳貴 脳発生制御機構の解明に向けた数理モデリング・シミュレーション基盤構築の試み 次世代脳プロジェクト冬のシンポジウム、東京、2017年12月20-22日

発生システム制御分野
Laboratory of Developmental Systems

教授 永樂 元次 Prof. Mototsugu Eiraku

脳や心臓等の器官形成過程は細胞の増殖、分化、移動等を伴う極めて複雑な現象である。器官形成を実現するための原理を理解し、試験管内で機能的な器官形成を再現するために、本分野では多能性幹細胞（ES/iPS 細胞）を用いて *in vitro* での組織形成技術の開発を行なうと共に、その形成過程を解析する事で多細胞が協調して機能的な器官を作る分子機構を明らかにする事を目的として研究に取り組んでいる。本年度は、ES 細胞から組織形成の最も初期に現れる自発的な対称性の破れ機構を解明した。

アフリカツメガエルを用いた分子生物学的研究から明らかにされてきたように、胚発生の初期過程において、神経外胚葉はオーガナイザーからの BMP シグナル阻害因子によって誘導される（デフォルトモデル）。この考えは ES 細胞から *in vitro* で神経組織へと分化する場合にも当てはまり、増殖因子や血清などを出来るだけ排除した環境で培養することによって、ES 細胞を効率的に神経系の細胞へと分化誘導することができる。我々は、*in vitro* で三次元神経組織を効率よくかつ再現性よく誘導する手法として SFEBq 法（Serum-free culture of embryoid body-like aggregates with quick reaggregation）を開発した（Eiraku et al., 2008）。この手法では ES 細胞を低吸着性のウェルを用いて素早く再凝集させ無血清培地で浮遊培養する。SFEBq 法を用いる利点として、同じサイズの ES 細胞塊を大量に作成できること、また高い再現性を持って効率よく神経上皮組織へと分化させることが挙げられる。SFEBq 法では培地の組成によって大脳や小脳、網膜といった脳の様々な領域を誘導

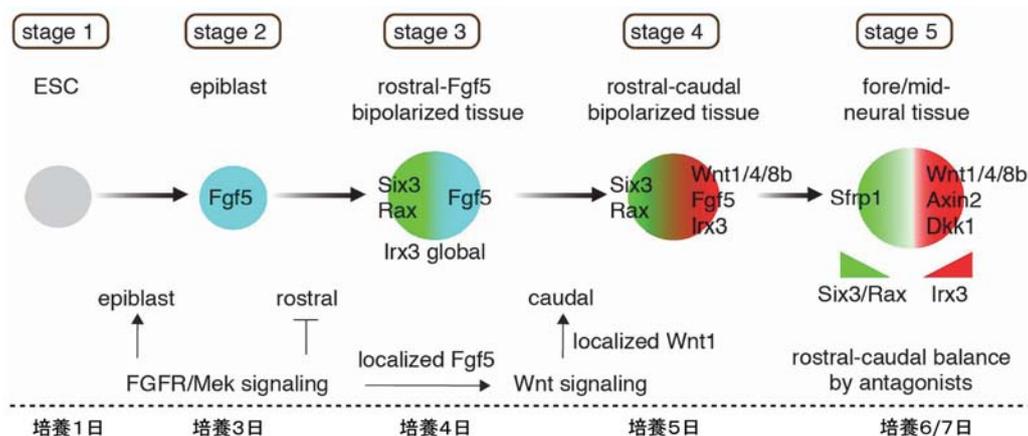


図 1、ES 細胞由来の神経組織における自発的なパターン形成機構
(Takata et al., 2017 より改訂)

する事が出来るが、特定の領域の神経組織を 100% の効率で誘導できる訳ではない。多くは複数の領域の混じった神経オルガノイドとして誘導される。例えば、CDM (Chemically Defined Medium) と呼ばれる培地を用いて神経誘導を行なった場合、ES 細胞は Six3 を発現する前脳領域と Irx3 を発現する中脳領域の 2 つの領域に相互排他的に分割された神経オルガノイドを形成する (Wataya et al., 2008, Takata et al., 2017)。しかしながら、どのような機構で 1 つの ES 細胞塊にこのような領域パターンが誘導されるのかは不明であった。そこで我々は、Six3 と Irx3 の発現をそれぞれ GFP と RFP で同時にモニターできる ES 細胞株を作製し、タイムラプスイメージングを用いて、神経パターンニング過程の詳細な継時観察を行なった (Takata et al., 2017)。その結果、分化 3 日目の ES 細胞塊において Six3 の局所的な発現がまず観察され、それに遅れて Irx3 が Six3 と反対領域で発現する事がわかった。また、網羅的な遺伝子発現解析によって Six3 を発現する領域では Wnt シグナルの抑制因子が、一方 Irx3 を発現する領域では Wnt リガンドを含む Wnt シグナル関連因子が特異的に発現している事がわかった。これは Wnt シグナル活性のイメージング解析を行なうことによっても確認された。Wnt シグナルを阻害すると Irx3 の発現が阻害されることから、神経オルガノイドにおいても発生過程同様、後方化には Wnt シグナルが必須である事が示唆された。しかしながら、Wnt シグナルの局所的な活性化は Six3 の局所的な発現の後におこる事から、神経オルガノイドにおける自発的なパターンニングは Wnt シグナルだけで説明することができない。そこで次に、我々は FGF シグナルに注目して解析を行なった。まず培養 2 日目から bFGF シグナルを培地に加える事によって Six3 の発現を抑制する事、また培地に bFGF を添加し、同時にビーズを用いて局所的に FGF 阻害剤を作用する事で局所的に Six3 を誘導できることを明らかにした。また、FGF5 と Six3 の発現を同時にモニターする事により、Six3 の領域化に先立って、FGF5 の領域化が起きている事も分かった。これらの実験結果は、多能性幹細胞からの神経組織分化において、均一な多細胞体が自発的に FGF シグナル活性のパターンを形成し、そのことが引き金となって Six3 の局所的な発現および Wnt シグナルのパターン形成を誘導することを示唆している。また FGF5 はエピブラストのマーカであり、Oct4 などの多能性因子も初期の分化過程において Six3 と相補的な発現パターンを示す事から神経誘導のタイミングと神経前後パターンニングが相関関係にある事も明らかになった。SFEBq 法では外部環境は均一であり、均一な ES 細胞からなる多細胞体から、細胞間相互作用によってのみ一連の複雑な現象が自己組織化的に起こることは非常に興味深い。しかしながら、FGF シグナルの極性を自己組織的に誘導する分子機構について不明である。また、Oct4 と Six3 の相互排他的な発現は初期のマウス胚においても確認されたことから、個体発生過程でも今回明らかになった組織自律的な前後軸形成機構が働いている可能性が考えられる。

The mammalian central nervous system arises from epiblast-derived neural ectoderm, which then forms a rostral-caudal (R-C) axial pattern that defines the location of the future forebrain, midbrain, hindbrain and spinal cord. At the cellular and tissue levels, it is thought that the processes of R-C neural axis (neuraxis) formation involves a number of differentiation and regionalization steps, including epiblast differentiation, the generation of three germ layers, neuroectoderm (or neural plate, NP) formation, and morphogen gradient-

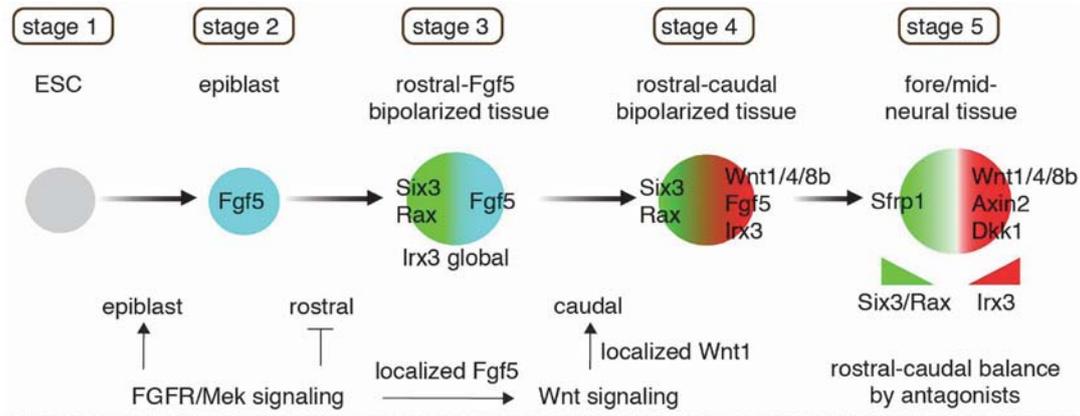


Fig1 Model for self-patterning in ESC culture
(Takata et al., 2017)

dependent specification of the embryonic neuraxis. However, our understanding of the links between these processes is still lacking, especially with regard to the intrinsic properties of neuroectoderm patterning along the R-C axis.

The pluripotent epiblast arises from the inner cell mass (or, when cultured in vitro, called embryonic stem cell [ESC]³) in the mammalian blastocyst. The rostral region of the epiblast becomes ectoderm, one of three germ layers, which is subsequently resolved into non-neural and neural ectoderm (or neuroectoderm, NE). The NE is further destined for neural lineage and eventually regionalized along the embryonic axis to form the R-C patterned NE. Peter Nieuwkoop's "activation-transformation model" is a classical model of vertebrate R-C NE patterning. In this model, the ectoderm first receives an "activation" signal that neuralizes the ectoderm and induces its differentiation into forebrain. Then, in the presumptive caudal region, a second "transforming" signal caudalizes the ectoderm's regional identity. One challenge to studying the early events of mouse NE development is analyzing the formation of the patterned R-C NE at an early embryonic stage. It is difficult to visualize key steps and to isolate specific cell types in quantities large enough for genetic and chemical manipulation at distinct development stages. Moreover, due to the interplay of intrinsic and extrinsic signals, the developing embryo is a complex system. However, we have previously reported efficient methods for generating several parts of the NE in a three-dimensional (3-D) culture of reaggregated mouse ESCs in vitro. One intriguing observation in the 3-D culture is the spontaneous formation of certain patterns within an aggregate of cells. Although this culture begins with homogenous stem cell aggregates floating in a uniform culture environment, the resultant tissues exhibit non-uniform patterns with certain levels of structural order. Furthermore, these tissues can self-form fairly complex structures, such as the optic cup, stratified cerebral cortex, and Rathke's pouch (even non-neural tissue). Thus, we believe this ESC 3-D culture system provides a useful model for investigating the intrinsic properties of early developing NE tissues and for purifying an essential signaling interplay.

The present study is designed to elucidate how intrinsic mechanisms drive the key processes of R-C NE patterning during neural tissue development. Here, using the self-organizing properties of ESCs, we show that

ESC-derived tissue self-generates a Six3⁺ rostral and a Irx3⁺ caudal bipolarized patterning. By live imaging of multiple color knock-in reporter lines and genome-wide analysis, an initial rostral polarization is governed by localized Fgf signaling, which then induces Wnt signaling for a caudal polarization at later stage. Differentially expressed Wnt antagonists, Dkk1 and Sfrp1 perform roles in orchestrating the formation of a balanced rostral-caudal neural pattern. From our observation, we propose a model for self-patterning of the R-C NE that depends on sequential and localized activation of Fgf and Wnt signaling.

List of Publications

- Okuda S, Miura T, Inoue Y, Adachi T, Eiraku M. (2018) Combining Turing and 3D vertex models reproduces autonomous multicellular morphogenesis with undulation, tubulation, and branching. **Sci Rep** 8, 2386.
- Takata N, Abbey D, Fiore L, Acosta S, Feng R, Gil HJ, Lavado A, Geng X, Interiano A, Neale G, Eiraku M, Sasai Y, Oliver G. (2017) An Eye Organoid Approach Identifies Six3 Suppression of R-spondin 2 as a Critical Step in Mouse Neuroretina Differentiation. **Cell Rep.** 21, 1534-1549.
- Takata N, Sakakura E, Eiraku M, Kasukawa T, Sasai Y. (2017) Self-patterning of rostral-caudal neuroectoderm requires dual role of Fgf signaling for localized Wnt antagonism. **Nat Commun.** 8, 1339.
- Ohgushi M, Minaguchi M, Eiraku M, Sasai Y. (2017) A RHO Small GTPase Regulator ABR Secures Mitotic Fidelity in Human Embryonic Stem Cells. **Stem Cell Reports.** 9, 58-66.
- Okuda S, Eiraku M. (2017) Role of molecular turnover in dynamic deformation of a three-dimensional cellular membrane. **Biomech Model Mechanobiol.** 16, 1805-1818.
- Takata N, Eiraku M. (2017) Stem cells and genome editing: approaches to tissue regeneration and regenerative medicine. **J Hum Genet.** 63, 165-178.
- 奥田覚、永樂元次 (2017) 眼杯オルガノイド x Computational Biology **実験医学** 35, 2883-2888
- 永樂元次 (2017) 試験管内での終脳組織分化 **生体の科学** 68, 34-37
- 永樂元次 (2017) 神経オルガノイドにおける組織自律的なパターンニング機構 **医学の歩み** 264, 8

List of Presentations

- Eiraku M. Self-organization of patterned tissues from mouse and human stem cells. Cold Spring Harbor Laboratory Conference “Development and 3-D Modeling of the Human Brain”, Cold Spring Harbor NY, December 6 - 9, 2017
- 永樂元次 神経オルガノイド培養系における種特異的な発生時間スケール 第69回日本細胞生物学会大会、仙台、2017年6月13-15日

永樂元次 細胞の自己組織化能を利用した in vitro での機能的立体組織の構築 第 37 回比較眼科学
会年次大会、つくば、2017 年 7 月 29-30 日

永樂元次 多細胞の自己組織化能を利用した機能的立体組織構築 細胞を創る会 10.0、京都、2017
年 10 月 19-20 日

永樂元次 多細胞の自己組織化能を利用した in vitro での機能的立体組織構築 日本機械学会
BE2017、京都、2017 年 12 月 15 日

生命システム研究部門
Department of Biosystems Science

システムウイルス学分野
Laboratory of Systems Virology

| | | | |
|----|-------|-----------|-----------------|
| 教授 | 小柳 義夫 | Prof. | Yoshio Koyanagi |
| 講師 | 佐藤 佳 | Sr. Lect. | Kei Sato |

本研究室では、ウイルス学からの生命現象の解明を目的として研究を進めている。2017年には、ヒト造血能を有する“ヒト化マウス”モデルを用いて HIV-1 の祖先ウイルスの宿主であるチンパンジーからヒトへのウイルスの適応進化過程の再現・解析実験に取り組んだ。また、HIV-1 がどのように宿主のウイルス制御因子に適応してきたのかを明らかにするために、ヒト化マウスモデルを使ったウイルス解析とゲノム情報技術解析の融合研究を展開し、HIV-1 の進化原理の解明に繋がる知見を得た。森脇美優は平成 29 年 3 月に生命科学研究科修士課程を修了し、大阪大学附属病院に就職した。

1) ヒト化マウスモデルを用いたエイズウイルス適応進化メカニズムの解析

新興病原性ウイルスの出現原理は、“off-the-shelf emergence”と“tailor-made adaptation”のふたつに大別される (Homles, “The evolution and emergence of RNA viruses”, 2009)。前者は「新宿主への適応性を旧宿主内で予め獲得していたウイルスが種間伝播した」こと、後者は「新宿主への適応性を新宿主への侵入後に変異・獲得した」ことにそれぞれ起因する。

分子系統学的解析から、パンデミックを引き起こした HIV-1 は、チンパンジーのウイルス SIVcpz が約 100 年前にヒトに種間伝播・適応進化することにより誕生したと推定されている (Gao *et al*, Nature, 1999; Worobey *et al*, Nature, 2008)。しかしながら、SIVcpz がどのようにしてヒトへの適応進化を遂げ、パンデミック HIV-1 へと変貌したのかは明らかではない。本研究では、SIVcpz のヒトへの適応進化メカニズムを再現・解明することを目的として、ヒト化マウスモデル（ヒト造血幹細胞移植マウス）を用いた実験を行った。培養細胞を用いた *in vitro* 実験の結果、各 SIVcpz の感染性および各ウイルスタンパク質の機能に差異は確認されなかった。一方、ヒト化マウスモデルを用いた *in vivo* 実験の結果、パンデミック HIV-1 に関連のない SIVcpz に比べ、生体内における SIVcpz MB897 株の増殖性、病原性はパンデミック HIV-1 のそれらにきわめて酷似していた。興味深いことに、SIVcpz MB897 感染ヒト化マウスにおいて、感染・侵入に重要なウイルスタンパク質 gp120 に、G413R の非同義変異がすべてのマウス共通に挿入されていることを見出した。さらに、培養細胞およびヒト化マウスを用いた実験により、この gp120 G413R 変異が、*in vitro/in vivo* におけるウイルス複製を亢進する“tailor-made adaptation”であることを実証した。

以上の結果から、SIVcpz は原則的に“off-the-shelf emergence”としてヒトへの適応進化を遂げたこと、すなわち、元来ヒトへの適応性のきわめて高い SIVcpz がヒトに伝播し、パンデミック HIV-1

へと変貌したことが示唆された。さらに、ウイルス複製を亢進する“tailor-made adaptation”を獲得することにより、それを促進したことが示唆された (Sato *et al*, J. Virol. 92, e1905-17, 2018)。

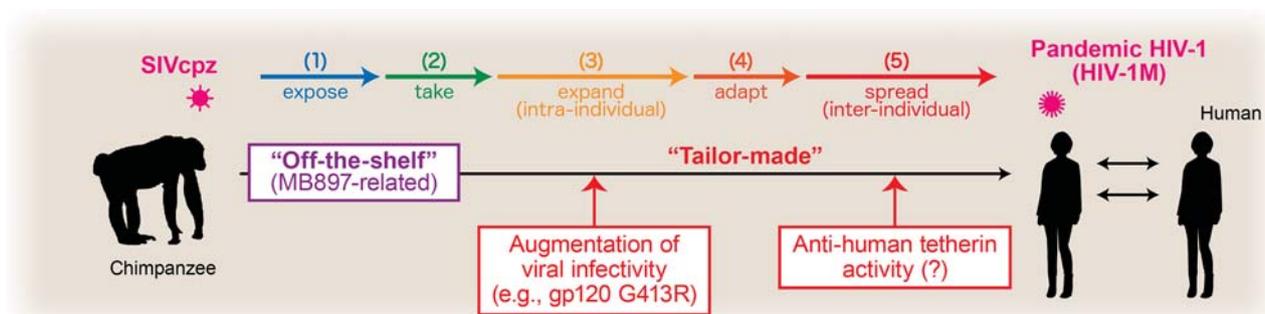


Fig. 1. Possible mechanism of adaptive evolution of SIVcpz to humans.

2) ウイルス制御因子 (APOBEC3H) の意義の解明

ヒト細胞は、ウイルス複製阻害タンパク質（ウイルス制御因子）を発現する。一方ウイルスは、ウイルス制御因子を拮抗阻害するタンパク質をコードすることで、ウイルス自身の複製を維持する。ウイルス制御因子の代表例として、ヒト免疫不全ウイルス1型（HIV-1）の複製を抑制する細胞性シチジン脱アミノ化酵素である APOBEC3 (A3) ファミリータンパク質群がよく知られている。ヒトでは、A3A, A3B, A3C, A3D, A3F, A3G, A3H と名付けられた7種のA3分子をコードしている。一方 HIV-1 は自身のゲノムがコードする viral infectivity factor (Vif) タンパク質により、ユビキチン/プロテアソーム経路依存性の A3 分解が誘導される。これまで当研究室は、ヒトの A3D, A3F, A3G がヒト化マウスモデルを用いた *in vivo* の実験において抗 HIV-1 活性を示すことを報告した (Sato *et al*, PLOS Pathog., 2014)。しかし、A3H が生体内において抗 HIV-1 活性を示すのか、わかっていなかった。

A3H には7つの遺伝子多型があり、そのタンパク質の安定性の違いから、stable, intermediate, unstable ハプロタイプに分類されること、また、stable A3H が HIV-1 の複製を抑制することが知られていた (OhAinle *et al*, Cell Host Microbe, 2008)。一方、HIV-1 株には、stable A3H を拮抗阻害できる Vif (39F と 48H : hyper-Vif) と拮抗阻害できない Vif (39V と 48N : hypo-Vif) の存在が報告されていた (Ooms *et al*, Cell Host Microbe, 2013)。これらの知見をもとに本研究では、stable A3H ハプロタイプドナー由来の造血幹細胞を移植したマウス (stable A3H ヒト化マウス) に hyper-Vif HIV-1 と hypo-Vif HIV-1 を共感染させ、感染6週齢において、どちらのウイルスが優位に複製できるのか検討した。その結果、stable A3H ヒト化マウスでは、hyper-Vif HIV-1 が優位に複製すること、加えて hypo-Vif HIV-1 に由来するウイルスが hyper-Vif 型の特定の2アミノ酸変異 (V39F と N48H) を獲得することを見いだした。以上の結果より、生体内でも A3H は抗 HIV 活性を有し、さらに HIV-1 は Vif の特定のアミノ酸変異の獲得により容易に A3H の抗 HIV-1 活性を解除しうることを示唆された (Fig. 2)。この感染実験の結果に加え、データベースより 3000 株以上の *vif* 配列の解析、及び、世界中の 1000 人以上のヒトゲノム情報から A3H 多型解析を行い、実際のヒト集団の中で HIV-1 が流行拡大する過程において、A3H が HIV-1 に対して抑制的に働いていることを示唆する結果を得た。本

研究は、実験ウイルス学と生物情報学、さらに数理生物学を融合させたシステムウイルス学的アプローチであり、ヒト集団における HIV-1 の適応進化モードを解明しようという試みである (Nakano *et al.*, PLOS Pathog. 13, e1006348, 2017)。

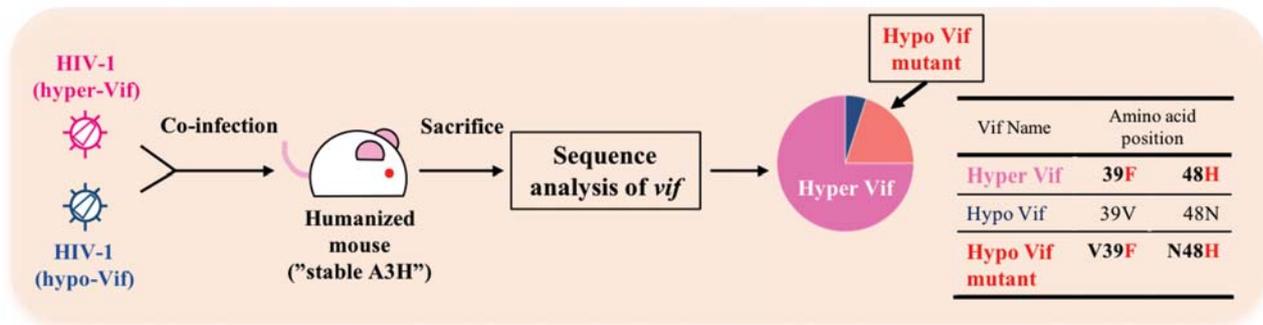


Fig. 2. A schematic of hyper/hypo-Vif HIV-1s co-infection into stable A3H humanized mouse.

1) Experimental adaptive evolution of SIVcpz, the precursor of HIV-1, in humanized mouse model

From the mid-20th century, humans are exposed to the menace of viral infectious diseases such as SARS coronavirus, Ebola virus and Zika virus. These outbreaks of emerging/re-emerging viruses can be triggered by cross-species viral transmission from wild animals to humans or zoonoses.

HIV-1, the causative agent of AIDS, is originated from SIVcpz, the chimpanzee precursor of the human virus, approximately 100 years ago. This indicates that HIV-1 has emerged through the cross-species transmission of SIVcpz from chimpanzees to humans. However, it remains unclear how SIVcpz has evolved into pandemic HIV-1 in humans. To address this question, we inoculated three SIVcpz (MB897, EK505, and MT145), four pandemic HIV-1 (NL4-3, NLCSFV3, JRCSF and AD8) and 2 non-pandemic HIV-1 (YBF30 and DJO0131) strains. Humanized mice infected with SIVcpz strain MB897, a virus phylogenetically similar to pandemic HIV-1, exhibited a comparable peak viral load to that of mice infected with pandemic HIV-1, while peak viral loads of mice infected with SIVcpz strains EK505 or MT145 as well as non-pandemic HIV-1 strains were significantly lower. These results suggest that SIVcpz strain MB897 is pre-adapted to humans when compared to the other SIVcpz strains. Moreover, viral RNA sequencing of MB897-infected humanized mice identified a nonsynonymous mutation in *env*, G413R substitution in gp120. The infectivity of the gp120 G413R mutant of MB897 was significantly higher than that of parental MB897. Furthermore, we demonstrated that the gp120 G413R mutant of MB897 augments the capacity for viral replication in both *in vitro* cell cultures and humanized mice. Taken together, this is the first experimental investigation to use an animal model to demonstrate a gain-of-function evolution of SIVcpz into pandemic HIV-1 (Fig. 1) (Sato *et al.*, J. Virol. 92, e1905-17, 2018).

2) Impact of endogenous APOBEC3H haplotypes on HIV-1 replication in humanized mouse model

APOBEC3 proteins belong to family of cytosine deaminase and are involved in the mechanism of innate

defense against viruses including HIV. Human genome codes seven APOBEC3 genes (*A3A*, *A3B*, *A3C*, *A3D*, *A3F*, *A3G*, and *A3H*). In previous studies, it is indicated that A3D, A3F and A3G can inhibit replication of *vif* deleted HIV-1 (HIV-1 delta *vif*) both *in vivo* and *in vitro*, whereas HIV-1 encoded viral infectivity factor (Vif) protein can degrade these APOBEC3 using a ubiquitin/proteasome pathway. On the other hand, *A3H* is polymorphic and can be categorized into seven haplotype phenotypes: stable (II, V, and VII) intermediate (I), and unstable (III, IV, and VI). Moreover, it is indicated that stable A3H is able to restrict replication of HIV-1 delta *vif*. However, the anti-viral effect of endogenous A3H *in vivo* has yet to be examined. Here, we utilized the humanized mouse model (NOD/SCID *Il2rg*^{-/-} (NOG) mouse transplanted with human CD34⁺ hematopoietic stem cells with stable *A3H* gene.) and demonstrated that stable *A3H* haplotypes specifically affect HIV-1 fitness determined by the two amino acid residues at positions 39 and 48 of HIV-1 Vif. We performed a 6-week viral replication experiment under stable A3H pressure using stable A3H humanized mouse and found that stable A3H-resistant HIV-1 was dominant. Moreover, stable A3H-susceptible HIV-1 frequently gains the ability to counteract stable A3H. Taken together, these results suggested that HIV-1 replication were inhibited by endogenous stable A3H *in vivo*, whereas stable A3H-susceptible HIV-1 can easily acquire ability to counteract stable A3H (Fig. 2). Subsequent molecular phylogenetic analysis using more than 3,000 *vif* sequences including all subtypes obtained from the HIV-1 sequence database and cell culture experiment using several transmitter/founder HIV-1 Vifs suggest that the A3H polymorphism may influence the efficacy of HIV-1 dissemination at individual and population levels. (Nakano *et al*, PLOS Pathog. 13, e1006348, 2017).

List of Publications

- Chen, M., Aoki-Utsubo, C., Kameoka, M., Deng, L., Terada, Y., Kamitani, W., Sato, K., Koyanagi, Y., Hijikata, M., Shindo, K., Noda, T., Kohara, M., and Hotta, H. (2017). Broad-spectrum antiviral agents: secreted phospholipase A2 targets viral envelope lipid bilayers derived from the endoplasmic reticulum membrane. **Sci. Rep.** 7, 15931.
- Nakano, Y., Aso, H., Soper, A., Yamada, E., Moriwaki, M., Juarez-Fernandez, G., Koyanagi, Y., and Sato, K. (2017a). A conflict of interest: the evolutionary arms race between mammalian APOBEC3 and lentiviral Vif. **Retrovirology** 14, 31.
- Nakano, Y., Misawa, N., Juarez-Fernandez, G., Moriwaki, M., Nakaoka, S., Funo, T., Yamada, E., Soper, A., Yoshikawa, R., Ebrahimi, D., Tachiki, Y., Iwami, S., Harris, R. S., Koyanagi, Y., and Sato, K. (2017b). HIV-1 competition experiments in humanized mice show that APOBEC3H imposes selective pressure and promotes virus adaptation. **PLOS Pathog.** 13, e1006348.
- Sato, K., Misawa, N., Takeuchi, J.S., Kobayashi, T., Izumi, T., Aso, H., Nagaoka, S., Yamamoto, K., Kimura, I., Konno, Y., Nakano, Y., and Koyanagi, Y. (2018). Experimental adaptive evolution of simian immunodeficiency virus SIVcpz to pandemic human immunodeficiency virus type 1 by using a

humanized mouse model. **J. Virol.** 92, e1905-17.

Satou, Y., Katsuya, H., Fukuda, A., Misawa, N., Ito, J., Uchiyama, Y., Miyazato, P., Islam, S., Fassati, A., Melamed, A., Bangham, C. R. M., Koyanagi, Y., and Sato, K. (2017). Dynamics and mechanisms of clonal expansion of HIV-1-infected cells in a humanized mouse model. **Sci. Rep.** 7, 6913.

Soper, A., Juarez-Fernandez, G., Aso, H., Moriwaki, M., Yamada, E., Nakano, Y., Koyanagi, Y., and Sato, K. (2017a). Various plus unique: Viral protein U as a plurifunctional protein for HIV-1 replication. **Exp. Biol. Med.** 242, 850-858.

Soper, A., Kimura, I., Nagaoka, S., Konno, Y., Yamamoto, K., Koyanagi, Y., and Sato, K. (2017b). Type I interferon responses by HIV-1 infection: association with disease progression and control. **Front. Immunol.** 8, 1823.

Ueda, M.T., Kurosaki, Y., Izumi, T., Nakano, Y., Oloniniyi, O.K., Yasuda, J., Koyanagi, Y., Sato, K., and Nakagawa, S. (2017). Functional mutations in spike glycoprotein of Zaire ebolavirus associated with an increase in infection efficiency. **Genes Cells** 22, 148-159.

Yoshikawa, R., Takeuchi, J.S., Yamada, E., Nakano, Y., Misawa, N., Kimura, Y., Ren, F., Miyazawa, T., Koyanagi, Y., and Sato, K. (2017). Feline immunodeficiency virus evolutionarily acquires two proteins, Vif and protease, capable of antagonizing feline APOBEC3. **J. Virol.** 91, e00250-17.

佐藤佳, 小柳義夫. (2017a). AIDS ウイルスとヒトの進化的軍拡競争 — ウイルス蛋白質とヒト蛋白質の相互作用からみえてくる進化的せめぎあい. **医学のあゆみ** 260, 17037-17041.

岩見真吾, 佐藤佳. (2017). ウイルス感染の数理科学的理解. **実験医学増刊 生命科学で使えるはじめての数理モデルとシミュレーション** (鈴木貴, 久保田浩行 編) 35, 883-886.

佐藤佳. (2017b). ヒト特異的ウイルス感染症のモデルとしてのヒト化マウス. **臨床免疫・アレルギー科** 68, 255-262.

佐藤佳. (2017c). 公的データベースとバイオインフォマティクスを基盤としたウイルス感染症の理解. **医学のあゆみ** 263, 188-189.

List of Presentations

小柳義夫. HIV と宿主制御因子の相互作用解析に基づくウイルス感染拡大様式の解明, 北海道大学遺伝子病制御研究所「感染、免疫、がん、炎症」研究集会, 札幌, 2017年3月14日.

Sato, K. Experimental-phylogenetic investigation on HIV-1 heterogeneity during adaptive/evolutionary process to human population. 第64回日本生態学会大会, 東京, 2017年3月16日.

小柳義夫. レトロウイルスと宿主の相克, 大阪大学微研アドバンスセミナー, 大阪, 2017年4月14日.

- 小柳義夫、中野雄介、三沢尚子、佐藤佳 . HIV と宿主制御因子 APOBEC3H の相互作用解析に基づくウイルス感染拡大様式の解明 , 第 27 回抗ウイルス療法学会 , 熊本 , 2017 年 5 月 19 日 .
- Nakano, Y., Misawa, N., Juarez-Fernandez, G., Moriwaki, M., Nakaoka, S., Funo, T., Yamada, E., Soper, A., Yoshikawa, R., Ebrahimi, D., Tachiki, Y., Iwami, S., Harris, R. S., Sato, K., and Koyanagi, Y. Impact of endogenous APOBEC3H haplotypes on HIV-1 replication in humanized mouse model. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Retroviruses, New York, USA, May 23, 2017.
- Yamada, E., Misawa, N., Nakaoka, S., Klein, L., Reith, E., Langer, S., Hopfensperger, K., Iwami, S., Schreiber, G., Kirchhoff, F., Koyanagi, Y., Sauter, D., and Sato, K. Basal tetherin expression is sufficient to control HIV-1 replication during the acute phase of infection in vivo. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Retroviruses, New York, USA, May 24, 2017.
- Yamasoba, D., Sato, K., Koyanagi, Y., and Takeuchi, O. Identification of candidate restriction factors for the HIV infection. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Retroviruses, New York, USA, May 25, 2017.
- 中野雄介 , 三沢尚子 , 佐藤佳 , 小柳義夫 . 生体内での APOBEC3H 制御に対する HIV Vif の解除機能獲得 . 第 31 回近畿エイズ研究会学術集会 , 大阪 , 2017 年 6 月 3 日 .
- Nakano, Y., Misawa, N., Kimura, I., Konno, Y., Nagaoka, S., Yamamoto, K., Aso, H., Juarez-Fernandez, G., Soper, A., Sato, K., and Koyanagi, Y. ヒト APOBEC3H とレンチウイルスの攻防 , SRC (日本レトロウイルス研究会夏期セミナー), 阿蘇 , 2017 年 6 月 29 日 .
- Soper, A., Moriwaki, M., Misawa, N., Yamada, E., Nakano, Y., Aso, H., Rokusuke Yoshikawa, Sato, K., and Koyanagi, Y. Evaluation of artificial HIV-1 heterogeneity in vitro and in vivo, SRC (日本レトロウイルス研究会夏期セミナー), 阿蘇 , 2017 年 6 月 29 日 .
- Juarez-Fernandez, G., Misawa, N., Sato, K., and Koyanagi, Y. Elucidation of HIV-1 Gag p40 polyprotein regulatory mechanism for viral replication in vitro and in vivo, SRC (日本レトロウイルス研究会夏期セミナー), 阿蘇 , 2017 年 6 月 29 日 .
- Ueda, M., Kurosaki, Y., Izumi, T., Nakano, Y., Oloniniyi, O., Yasuda, J., Koyanagi, Y., Sato, K., and So Nakagawa. Functional mutations in spike glycoprotein of Zaire ebolavirus associated with an increase in infection efficiency, SMBC (Society for Molecular Biology and Evolution) meeting, Austin, Texas, USA, July 2-6, 2017.
- Yamada, E., Nakaoka, S., Klein, L., Reith, E., Langer, S., Hopfensperger, K., Iwami, S., Schreiber, G., Kirchhoff, F., Koyanagi, Y., Sauter, D., and Sato, K. (2018). Human-specific adaptations in Vpu conferring anti-tetherin activity are critical for efficient early HIV-1 replication *in vivo*. **Cell Host Microbe** 23, 110-120 e117.
- 佐藤佳 . 宿主因子 tetherin による生体内 HIV-1 複製制御機構の解明 , 第 19 回白馬シンポジウム , 仙台 , 2017 年 7 月 14 日 .

- 小柳義夫. エイズウイルスの過去と現在, 第 12 回ウイルス・再生医科学研究所公開講演会, 京都, 2017 年 7 月 15 日.
- 佐藤佳, 木村出海, 今野順介, 長岡峻平, 山本啓輔, 麻生啓文, 中野雄介, 小柳義夫. タンパク質間相互作用から紐解くウイルスと宿主の進化的軍拡競争のダイナミズム, 日本進化学会第 19 回大会, 京都, 2017 年 8 月 24 日.
- Nagaoka, S., Yamamoto, K., Hirohumi Aso, Kimura, I., Konno, Y., Nakano, Y., Sato, K., and Koyanagi, Y. ネコ科動物由来 APOBEC3 とネコ免疫不全ウイルスの進化的軍拡競争の解析, 日本進化学会第 19 回大会, 京都, 2017 年 8 月 26 日.
- Nakano, Y., Misawa, N., Shinji Nakaoka, Sato, K., and Koyanagi, Y. APOBEC3H variants induce HIV-1 adaptation into humans, 第 16 回あわじしま感染症・免疫フォーラム, 淡路島, September 6, 2017.
- 伊藤悠介, 立木佑弥, 佐藤佳, 小柳義夫, 岩見真吾. 宿主タンパク質 APOBEC3F と免疫応答により排斥的に駆動される HIV-1 の多様化と病態進行の数理モデル, 第 27 回日本数理生物学会年会, 札幌, 2017 年 10 月 6-8 日.
- Nakano, Y., Misawa, N., Kimura, I., Konno, Y., Nagaoka, S., Yamamoto, K., Aso, H., Sato, K., and Koyanagi, Y. Influence of human APOBEC3H on primate lentivirus evolution,
- Aso, H., Yamamoto, K., Kimura, I., Konno, Y., Nagaoka, S., Nakano, Y., Sato, K., and Koyanagi, Y. ネコ科における APOBEC3 とレンチウイルスの進化的軍拡競争の実験的検証, 第 65 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2017 年 10 月 24 日.
- Konno, Y., Yamamoto, K., Nagaoka, S., Kimura, I., Nakano, Y., Sato, K., and Koyanagi, Y. APOBEC3 タンパク質によるネコ免疫不全ウイルスの種間伝播制御機構の解析, 第 65 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2017 年 10 月 24 日.
- Yamasoba, D., Sato, K., Uehata, T., Mino, T., Koyanagi, Y., and Takeuchi, O. HIV-1 感染を制御する新規 RNA 結合タンパク質の同定, 第 65 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2017 年 10 月 24 日.
- Koyanagi, Y. and Sato, K., Regional prevalence of HIV-1 adjustment to APOBEC3H variants revealed from wet/dry investigations. 第 18 回熊本エイズセミナー, 熊本, October 30, 2017.
- Soper, A., Misawa, N., Nakano, Y., Sato, K., and Koyanagi, Y. Evaluation of artificial HIV-1 heterogeneity in vitro and in vivo, 第 18 回熊本エイズセミナー, 熊本, October 30, 2017.
- Yamasoba, D., Sato, K., Misawa, N., Uehata, T., Mino, T., Koyanagi, Y., and Takeuchi, O. Identification of a novel HIV-1 restriction factor which selectively degrades viral transcripts, 第 18 回熊本エイズセミナー, 熊本, October 30, 2017.
- Koyanagi, Y. and Sato, K., Origin of HIV-1 and the related retroviruses, 2nd Kyoto International Symposium on Virus-Host Coevolution/Human-Nature Interplacement Life Science, Kyoto, November 13, 2017.
- Nakano, Y., Misawa, N., Konno, Y., Kimura, I., Nagaoka, S., Yamamoto, K., Aso, H., Kumata, R., Juarez-

Fernandez, G., Soper, A., Sato, K., and Koyanagi, Y. Tracing the evolution of primate lentiviruses, 第 40 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2017 年 12 月 7 日 .

Kumata, R., Misawa, N., Narumi Saito, Yusuke Kakizoe, Shinji Nakaoka, Shingo Iwami, Sato, K., and Koyanagi, Y. Quantification of HIV cell-free and cell-to-cell infectious efficiency change by IFN- α based on experimental-mathematical investigations, 第 40 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2017 年 12 月 8 日 .

Kimura, I., Yamamoto, K., Nagaoka, S., Aso, H., Konno, Y., Nakano, Y., Sato, K., and Koyanagi, Y. Investigation of virus-host evolutionary arms race: APOBEC3 versus Vif, 第 40 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2017 年 12 月 8 日 .

小柳義夫. エイズウイルス研究の始まりと現在, HIV カンファレンス, 国立病院機構名古屋医療センター, 名古屋, 2017 年 12 月 12 日 .

柿添友輔, 熊田隆一, 三沢尚子, 中岡慎治, 小柳義夫, 佐藤佳, 岩見真吾. HIV-1 感染細胞におけるインターフェロン α 干渉作用の定量的解析, 応用数学分科会, 瀬田, 2017 年 12 月 14-16 日 .

生命システム研究部門
Department of Biosystems Science

増殖制御システム分野
Laboratory of Growth Regulation System

| | | | |
|------|-------|---------------|--------------------|
| 教授 | 影山龍一郎 | Prof. | Ryoichiro Kageyama |
| 准教授 | 大塚 俊之 | Assoc. Prof. | Toshiyuki Ohtsuka |
| 助教 | 小林 妙子 | Assist. Prof. | Taeko Kobayashi |
| 特定助教 | 下條 博美 | Assist. Prof. | Hiromi Shimojo |

本分野では、いろいろな生命現象において遺伝子発現が2～3時間周期で振動することを見出し、その意義や制御機構の解明を目指して研究を行っている。特に、神経発生や体節形成における遺伝子発現振動に注目して解析を進めてきた。塩基性領域・ヘリックス・ループ・ヘリックス (bHLH) 因子である Hes1, Hes5 や Hes7 はネガティブフィードバックによって自律的に2～3時間周期で発現が振動し、Hes1 や Hes7 の発現振動によって周期的に抑制されるためにその下流遺伝子の発現も振動する。最近の解析から、発現振動の振幅だけでなく、周期や位相にも多様な情報が組込まれていることが示唆されてきた。今回の解析から、Notch リガンドである Delta-like1 (Dll1) を介して振動情報が細胞間で伝達されること、神経発生のタイミングに Hes5 の発現振動が重要であることが分かった。

1) 光遺伝学による遺伝子発現の細胞間リズム同期の再構成

多細胞生物において遺伝子発現の細胞間相互作用はリガンド及びレセプター（受容体）と呼ばれる送受信機能を担う生体分子によって実現される。しかし、細胞がパルス振動などの動的状態を自分以外の細胞にどのように伝達しているのかは十分に明らかになっていない。例えばマウスの発生期の体節形成過程では Notch シグナルが2～3時間周期で振動して細胞集団レベルで位相が同期している。この同期現象の存在は、細胞が振動情報の送受信機能を備えており、細胞同士がお互いの位相情報を交換して自分の位相を合わせていることを示唆している。この情報伝達機構を明らかにするため、Notch シグナルを介した遺伝子発現リズムの細胞間位相同期現象を光遺伝学技術によって再構成することを試みた。具体的には、Notch シグナルの制御に関わる生体分子の振動ダイナミクスを光遺伝学技術によって人工的に誘導・再構築した。それと同時に、遺伝子活性の生細胞観察を可能にする生物発光レポーターを用いることで、光振動に対する細胞の動的応答を1細胞経時イメージングによって定量計測した。その結果、受信機能に関しては、通常2～3時間周期で振動している Hes1 の遺伝子発現リズムが様々な周期（1.8～5.5時間）の外部刺激に応答・同期できること、特に Hes1 リズムの自然周期（約2.6時間）に近い周期の外部刺激で最も効率的に同期できること、そしてその動的応答は位相情報だけを考慮した確率的位相モデルを使った数値シミュレーションによって再現可能であることが明らかになった。また、リガンド分子の Dll1 の発現を光制御可能

な送信細胞と、隣接細胞の Dll1 からの刺激に伴う応答を発光によって光計測可能な受信細胞の 2 種類の細胞を混在させて培養して周期的光刺激を与えた結果、受信細胞の周期的な応答が観察できた (Fig. 1)。この動的情報伝達の再構成実験の結果は、リガンド分子の Dll1 の発現ダイナミクスが周期・位相の動的情報の細胞間伝達を実現するのに十分であることを示している。以上から、光遺伝学による制御技術と生細胞イメージング技術とを組み合わせることによって、遺伝子発現の動的情報が細胞間で送信・解読されるための情報処理機構を解明できることがわかった。本研究は、様々な生体分子による遺伝子活性の動的制御機構を解明するために基盤技術として有用であると考えられる。

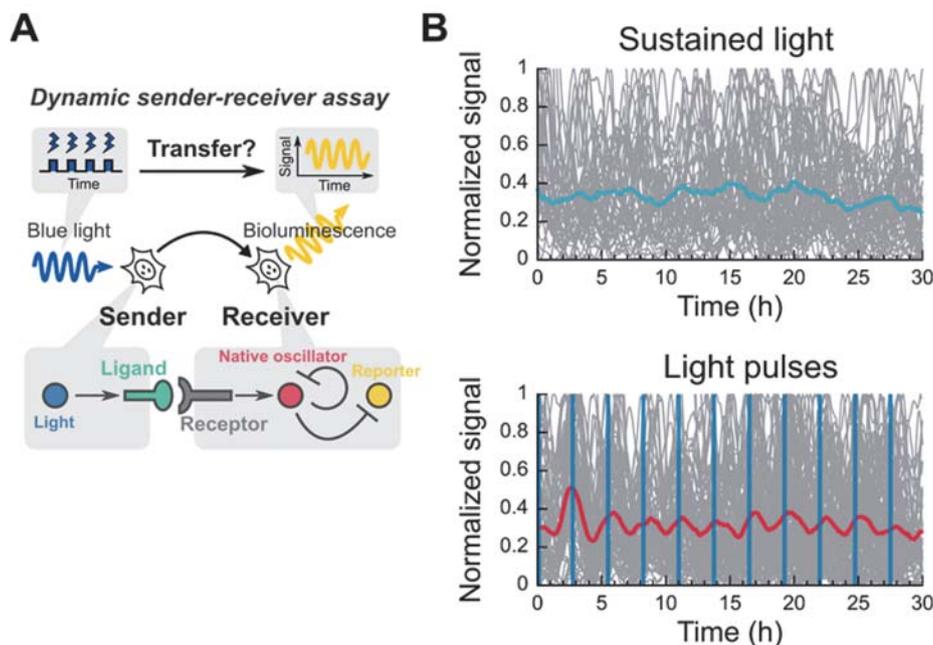


Fig. 1. Optogenetic ligand expression in sender cells and bioluminescent reporter expression in receiver cells.

2) 大脳新皮質発生過程におけるニューロン産生・グリア産生の移行タイミングの制御機構の解明

哺乳動物の大脳新皮質発生過程においては、まず神経幹細胞から深層ニューロン、続いて浅層ニューロンが順に産生され、ニューロン産生終了後にグリア産生に移行する。こうしたニューロン・グリア分化の移行タイミングは、脳のサイズや細胞構成を決定する上で重要である。本研究では、大脳新皮質発生過程の神経幹細胞における遺伝子発現を任意の時期に制御可能な Tet-On システムを用いたトランスジェニックマウスを作製し、Hes5 の強制発現が脳の形態形成およびニューロン・グリア分化に及ぼす影響を解析した。Hes5 強制発現では、深層ニューロン産生から浅層ニューロン産生への移行タイミングが早まり、ニューロン産生からグリア産生への移行もより早期に見られた (Fig. 2)。逆に Hes5 ノックアウト (KO) マウスにおいては、深層ニューロン産生から浅層ニューロン産生への移行、およびニューロン産生からグリア産生への移行タイミングがいずれも遅延していた (Fig. 2)。こうした移行タイミングの制御において *Hmga* 遺伝子が重要な働きをしているため、Hes5 強制発現マウスおよび Hes5 KO マウスにおける発現を調べたところ、Hes5 強制発現では *Hmga*

遺伝子の発現が減少し、*Hes5* KO マウスでは増加していた。これらの結果から、*Hes5* は *Hmga* 遺伝子の発現レベルを調節することにより、ニューロン・グリア分化の移行タイミングを制御することが示唆され、発現振動により *Hes5* が適正レベルに維持される可能性が示された。

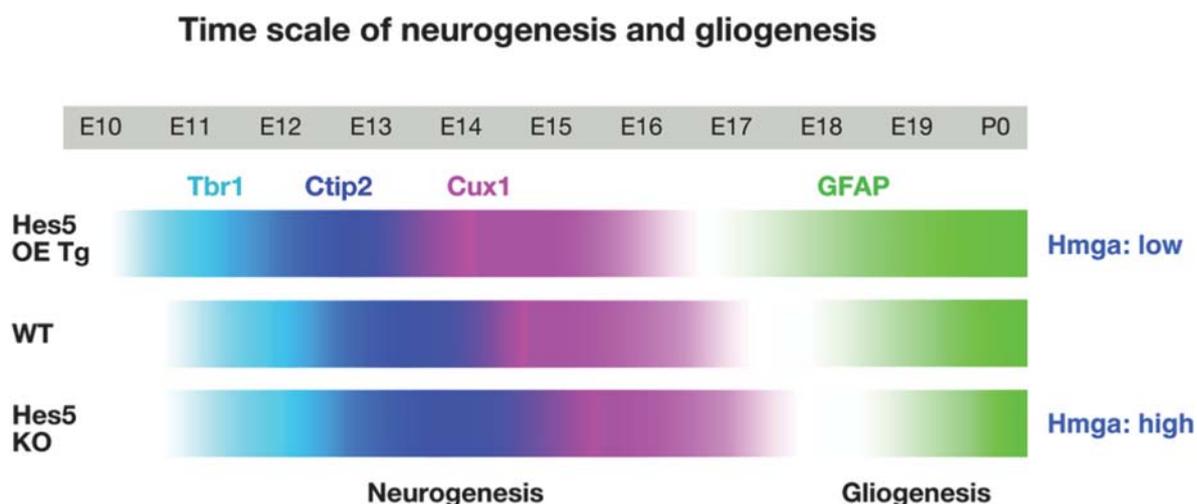


Fig. 2. Abnormal switching of neurogenesis and gliogenesis in *Hes5*-overexpressing and *Hes5* KO mice.

We found that gene expression oscillates with a period of about 2-3 h in many biological events and try to elucidate the significance and mechanism of such oscillatory gene expression. Particularly, we have been focusing on neurogenesis and somitogenesis. The expression of the basic-helix-loop-helix (bHLH) transcription factors *Hes1*, *Hes5* and *Hes7* oscillates autonomously by negative feedback, and these oscillations drive oscillatory expression of the downstream genes. Recent studies suggested that not only the amplitude but also the period and phase of oscillatory expression encode various information. We now found that the oscillatory information is transmitted between cells via the Notch ligand Delta-like1 (*Dll1*), and that *Hes5* oscillations may be important for the timing of neurogenesis and gliogenesis.

1) Optogenetic perturbation and bioluminescence imaging to analyze cell-to-cell transfer of oscillatory information

Cells communicate with each other to coordinate their gene activities at the population level through signaling pathways. It has been shown that many gene activities are oscillatory and that the frequency and phase of oscillatory gene expression encode various types of information. However, whether or how such oscillatory information is transmitted from cell to cell remains unknown. Here, we developed an integrated approach that combines optogenetic perturbations and single-cell bioluminescence imaging to visualize and reconstitute synchronized oscillatory gene expression in signal-sending and signal-receiving processes. We found that intracellular and intercellular periodic inputs of Notch signaling entrain intrinsic oscillations by frequency tuning and phase shifting at the single-cell level. In this way, the oscillation dynamics are

transmitted through Notch signaling, thereby synchronizing the population of oscillators. Thus, this approach enabled us to control and monitor dynamic cell-to-cell transfer of oscillatory information to coordinate gene expression patterns at the population level.

2) **Hes5 regulates the transition timing of neurogenesis and gliogenesis in mammalian neocortical development**

During mammalian neocortical development, neural stem/progenitor cells (NSCs) sequentially give rise to deep layer neurons and superficial layer neurons through mid- to late-embryonic stages, shifting to gliogenic phase at perinatal stages. Previously, we found that the Hes genes inhibit neuronal differentiation and maintain NSCs. Here, we generated transgenic mice that overexpress Hes5 in NSCs of the central nervous system, and found that the transition timing from deep to superficial layer neurogenesis was shifted earlier, while gliogenesis precociously occurred in the developing neocortex of Hes5-overexpressing mice. By contrast, the transition from deep to superficial layer neurogenesis and the onset of gliogenesis were delayed in *Hes5* knockout (KO) mice. We found that the Hmga genes (*Hmga1/2*) were downregulated in the neocortical regions of Hes5-overexpressing brain, whereas they were upregulated in the *Hes5* KO brain. Furthermore, we found that Hes5 expression led to suppression of *Hmga1/2* promoter activity. These results suggest that Hes5 regulates the transition timing between phases for specification of neocortical neurons and between neurogenesis and gliogenesis, accompanied by alteration in the expression levels of Hmga genes, in mammalian neocortical development.

List of Publications

- Isomura, A., Ogushi, F., Kori, H., and Kageyama, R. (2017). Optogenetic perturbation and bioluminescence imaging to analyze cell-to-cell transfer of oscillatory information. **Genes & Dev.** *31*, 524-535.
- Kawaguchi, K., Kageyama, R., and Sano, M. (2017). Topological defects control collective dynamics in neural progenitor cell cultures. **Nature** *545*, 327-331.
- Bansod, S., Kageyama, R., and Ohtsuka, T. (2017). Hes5 regulates the transition timing of neurogenesis and gliogenesis in mammalian neocortical development. **Development** *144*, 3156-3167.
- Isomura, A., Kori, H., and Kageyama, R. (2017). Segmentation genes enter an excited state. **Dev. Cell** *43*, 121-123.
- Isomura, A. and Kageyama, R. (2017). Illuminating information transfer in signaling dynamics by optogenetics. **Curr. Opin. Cell Biol.** *49*, 9-15.
- Shimojo, H. and Kageyama, R. (2017). Ultradian oscillations in Notch signaling during tissue morphogenesis. In **Biological Clocks** (Eds: K. Honma and S. Honma) Hokkaido Univ. Press, pp. 79-92.
- 影山龍一郎 (2017). 神経分化と転写制御. 遺伝子発現制御機構 (田村隆明・浦聖恵) 東京化学同人

pp. 140-144.

影山龍一郎 (2017). 時間・空間パターン形成の制御：分節時計．遺伝子発現制御機構（田村隆明・浦聖恵）東京化学同人 pp. 187-191.

List of Presentations

Kageyama, R. Oscillatory control of neural stem cells. Keystone Symposium: Neurogenesis during Development and in the Adult Brain, Olympic Valley, USA, January 8-12, 2017.

Kageyama R. How to rejuvenate your brain. International Symposium on "Frontiers of Innovative Research towards Sustainable Society in Asia", Bangkok, Thailand, February 4, 2017.

Kageyama R. Dynamic transcriptional control of neural stem cells. EMBO Conference "Gene Regulatory Mechanisms in Neural Fate Decisions" Alicante, Spain, September 7-10, 2017.

Kageyama R. Dynamic transcriptional control of neural stem cells. The Notch Meeting X, Athens, Greece, October 1-6, 2017.

Araki A, Minatohara K, Akiyoshi M, Imayoshi I, Kim R, Kawashima T, Bito H, Kageyama R, Okuno H. Reactivation of a neuronal subpopulation in the dentate gyrus during memory recalls with long intervals. Annual Meeting of the Society for Neuroscience. Washington DC, November 11-15, 2017.

影山龍一郎 . Understanding the mechanisms of biological events by using mathematical modeling. 第9回 NAGOYA グローバルリトリート , 愛知 , 2017年2月10-11日 .

影山龍一郎 . Dynamic transcriptional control of neural stem cells. Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists. 東京 , 2017年5月10-13日 .

Shimojo H, Kori H, Isomura A, Ohtsuka T, Miyachi H, Kageyama R. Ultradian oscillations of Notch signaling in cell-cell interactions regulate dynamic gene expression networks and tissue morphogenesis. Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists. 東京 , 2017年5月10-13日 .

小林久美子、新野祐介、宮脇敦史、影山龍一郎 . 一細胞レベルの蛍光イメージングによる分節時計遺伝子 *Hes7* の発現振動位相調節機構の解析 . 第69回日本細胞生物学会大会 , 仙台 , 2017年6月13-15日 .

影山龍一郎 . 発生過程におけるダイナミックな遺伝子発現動態の解明と制御 , 第39回日本光医学・光生物学会 , 名古屋 , 2017年7月21-22日 .

Ohtsuka T, Bansod S, Kageyama R. *Hes5* regulates the transition timing of neurogenesis and gliogenesis in neocortical development via downregulation of *Hmga* genes. 第40回日本神経科学大会 , 幕張 , 2017年7月20-23日 .

Shimojo H, Kageyama R. Dynamic gene expressions during neural development. 第40回日本神経科学大

会, 幕張, 2017 年 7 月 20-23 日 .

Tateya T, Sakamoto S, Ishidate F, Imayoshi I, Kageyama R. Dynamic Atoh1 expression in prosensory domain of mammalian developing cochlea. 第 40 回日本神経科学大会, 幕張, 2017 年 7 月 20-23 日 .

Araki A, Minatohara K, Akiyoshi M, Imayoshi I, Kim R, Kawashima T, Bito H, Kageyama R, Okuno H. Reactivation of a neuronal subpopulation in hippocampal dentate gyrus during recent and remote memory recall. 第 40 回日本神経科学大会, 幕張, 2017 年 7 月 20-23 日 .

Araki A, Minatohara K, Akiyoshi M, Imayoshi I, Kim R, Kawashima T, Bito H, Kageyama R, Okuno H. Reactivation of a neuronal subpopulation during memory recalls in the dentate gyrus of the hippocampus. 第 9 回光操作研究会, 仙台, 2017 年 10 月 21-22 日 .

小林久美子 . 一細胞レベルの蛍光イメージングによる分節時計遺伝子 Hes7 の発現振動位相調節機構の解析 . 第 40 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2017 年 12 月 6-9 日 .

松宮舞奈 . ES 細胞から未分節中胚葉組織への分化誘導 . 第 40 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2017 年 12 月 6-9 日 .

下條博美、影山龍一郎 . 遺伝子発現動態と神経分化の時間制御機構 . 次世代脳プロジェクト・冬のシンポジウム, 東京, 2017 年 12 月 21-22 日 .

生命システム研究部門
Department of Biosystems Science

RNA システム分野
Laboratory of RNA System

| | | | |
|----|-------|---------------|-------------------|
| 教授 | 大野 睦人 | Prof. | Mutsuhito Ohno |
| 助教 | 北島 真 | Assist. Prof. | Makoto Kitabatake |
| 助教 | 谷口 一郎 | Assist. Prof. | Ichiro Taniguchi |

細胞の中の RNA の大部分は裸ではなくタンパク質との複合体 (RNP) として存在し機能する。当分野は、RNP の形成・構造変換・輸送・解体・品質管理など、RNP をめぐる様々な現象に興味を持って研究している。本年度の主な研究として、輸送 RNP 顆粒の解析、転写産物の分類に関わる hnRNP C のドメインの解析、真核生物リボソームの品質管理に関わる新たな因子の解析、があげられる。

1) 核内キャップ構造結合因子複合体とエキソン境界部複合体が結合した輸送 RNP 粒子

mRNA 輸送および局所翻訳は、ニューロンにおける遺伝子発現を時空間的に制限する上で非常に重要な役割を果たす。様々な mRNP 顆粒は、樹状突起内の mRNA の局在、貯蔵、翻訳、分解の単位として機能し、シスエレメントを持つ mRNA および RNA 結合タンパク質やマイクロ RNA などのトランス因子を含み、刺激や転写産物に特異的な局所翻訳を司る。ここでは、核内キャップ結合タンパク質複合体 (CBC) およびエキソン境界部複合体 (EJC) のコア成分を含む、ヒトの神経プロセスにおける mRNP 顆粒のクラスを報告する。これらの顆粒は、安定化された微小管と物理的に会合し、eIF4E に富む顆粒や P-body から空間的に分離している。神経プロセスの遠位部位に CBC および EJC の両方を保持する mRNP が存在するという事実は、いくつかの局在 mRNA が「最初の翻訳」をまだ受けていないことを示唆している。

2) RNA ポリメラーゼ II 転写産物の分類に関わる hnRNP C のドメイン

真核生物の核内で転写される様々な種類の RNA は、その種類に対応した独自の輸送機構によって細胞質へ輸送される。近年の研究から、核外輸送因子が輸送後の RNA の機能、安定性、および局在に影響を与えることがわかってきた。したがって、核外輸送において RNA 種が適切に分類される機構は重要である。我々の研究室ではこれまでに、RNA ポリメラーゼ II の転写産物のうち、mRNA と U snRNA が RNA の長さによって分類されることを明らかにした。さらに、分類する因子として hnRNP C を同定した。この hnRNP C による分類は、hnRNP C が長い RNA (mRNA) に優先的に結合し、U snRNA 輸送因子である PHAX の RNA 結合を阻害する活性によるものであることがわかっているが、その詳細な分子機構は不明である。本研究では、PHAX の長い RNA への結合を hnRNP C が阻害する分子機構を明らかにするため、阻害活性に必須である hnRNP C のドメインを

特定することを目的とした。hnRNP C は RNA 結合を担う RNA recognition motif (RRM) と BASIC と呼ばれる 2 つのドメインと、多量体形成に必要な ZIPPER や ACIDIC ドメインなどを持つ。本研究で行った hnRNP C の変異体解析により、RNA 分類に必要なドメインを明らかにすることができた。この成果は近々論文報告予定である。

3) 真核生物リボソームの品質管理に関わる新たな因子

真核生物のリボソームは約 80 個のリボソームタンパク質と 4 本の rRNA から構成される巨大な複合体である。ペプチジル基転移反応 (PTC) をはじめ、リボソームの触媒活性には rRNA が重要な役割を果たしており、rRNA の重要塩基のひとつに点変異を導入するだけでリボソームの機能は失われてしまう。真核生物は、このような機能不全リボソームを選択的に認識して分解する品質管理機構をそなえている。われわれは、Mms1 を含む E3 ユビキチン化酵素複合体が機能不全リボソームを認識してユビキチン化を行うということを明らかにしたが、この E3 複合体がリボソーム上の何を目印にして機能不全粒子を見分けているのかという本質的な点については、いまだ明らかにできていない。近年の研究により、われわれが Bet1 と名付けた因子が機能不全リボソームに特異的に結合し E3 複合体を呼び込むというモデルが考えられた。今回、この因子がリボソーム上のどこに結合しているかの位置情報を紫外線架橋法を介した次世代シーケンス解析で解明し、あわせて、この因子が結合した 80S リボソームに結合した mRNA の配列情報を解析し、機能不全リボソームの生化学的な特徴を解明した。この成果の論文報告を準備している。

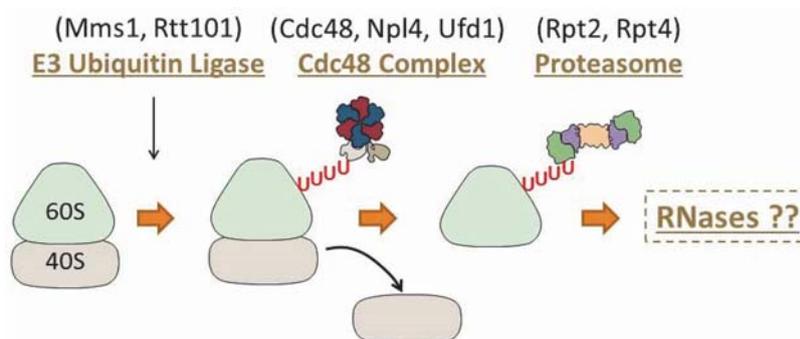


Fig.1 Model of 25S non-functional rRNA decay (NRD)

In eukaryotic cells, many genes are separated by introns into multiple exons that should be joined together. In addition, the cell itself is separated by the nuclear envelope into two major compartments, the nucleus and the cytoplasm. These two types of separations necessitate specific gene expression mechanisms such as RNA splicing and nuclear transport. Prof. Mutsuhito OHNO's laboratory is studying various aspects of eukaryotic gene expression with great emphasis on "RNA" as a key molecule. In addition, we are also working on quality control mechanisms of eukaryotic ribosome particles.

1) Transport Granules Bound with Nuclear Cap Binding Protein and Exon Junction Complex

RNA transport and regulated local translation play critically important roles in spatially restricting gene expression in neurons. Heterogeneous population of RNA granules serve as motile units to translocate, store, translate, and degrade mRNAs in the dendrites contain cis-elements and trans-acting factors such as RNA-binding proteins and microRNAs to convey stimulus-, transcript-specific local translation. Here we report a class of mRNA granules in human neuronal processes that are enriched in the nuclear cap-binding protein complex (CBC) and exon junction complex (EJC) core components, Y14 and eIF4AIII. These granules are physically associated with stabilized microtubules and are spatially segregated from eIF4E-enriched granules and P-bodies. The existence of mRNAs retaining both nuclear cap binding protein and EJC in the distal sites of neuronal processes suggests that some localized mRNAs have not yet undergone the “very first translation,” which contribute to the spatio-temporal regulation of gene expression.

2) Domains of hnRNP C that are essential for the sorting of RNA pol II transcripts

In eukaryotic cells, various species of RNA are synthesized in the nucleus. Newly transcribed RNA species are exported to the cytoplasm by their specific nuclear export factors. Accumulating evidence shows that export factors affect the fate of RNA, such as its functions, stability and/or cytoplasmic localization. Therefore, it is essential that different RNAs are appropriately classified for export. We have previously shown that RNA polymerase II transcripts are classified according to their length, and identified heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) C as the key classification factor. HnRNP C binds preferentially to longer transcripts, thereby sorting RNA polymerase II transcripts into two RNA categories: long mRNA and short U snRNA. HnRNP C has an inhibitory activity on the recruitment of PHAX, an adapter protein for U snRNA export, to the long transcripts so that they are committed to mRNA export pathway. However, the detailed mechanism by which hnRNP C binds longer transcripts and inhibits their binding to PHAX is still unknown. To further understand the molecular mechanism of the classification, we systematically analyzed domains of hnRNP C and determined the essential domains for the classification of RNA polymerase II transcripts. The results will be published in the near future.

3) A bridge that links an E3 ubiquitin ligase complex and nonfunctional 60S ribosomal particles

The eukaryotic ribosomes are composed of 4 rRNAs and 80 ribosomal proteins. We and others previously reported that the defective ribosomal subunits containing mutations in their 25S rRNAs are selectively eliminated from the cytoplasm by ubiquitin-proteasome system (nonfunctional rRNA decay, NRD). However, the molecular mechanism defining the selective ubiquitination of the nonfunctional ribosomes has remained elusive. We lately showed a 60S-associating protein, which we name Bet1 (bridge to E3 complex), essential for the degradation of mutant 25S rRNAs. Importantly, Bet1 is also physically associated with the E3 ubiquitin ligase involved in 25S NRD, indicating that this protein is a bridge between defective 60S and the E3 complex. Biochemical analyses revealed that Bet1 is selectively enriched on the 60S particle containing a nonfunctional mutant 25S rRNA, suggesting a central role of this bridge protein in the functional

inspection of the 60S subunits. This year we revealed Bet1 binding site on nonfunctional 60S particles by using UV crosslink mediated RNA pull down and sequencing. Possible mechanisms for the release of the factor from the normal 60S subunits will be discussed.

List of Publications

Wang, D.O., Ninomiya, K., Mori, C., Koyam, A., Haan, M., Kitabatake, M., Hagiwara, M., Chida, K., Takahashi, S.I., Ohno, M., Kataoka, N. (2017) Transport Granules Bound with Nuclear Cap Binding Protein and Exon Junction Complex Are Associated with Microtubules and Spatially Separated from eIF4E Granules and P Bodies in Human Neuronal Processes. **Front Mol. Biosci.** 2017 Dec 22;4:93. doi: 10.3389/fmolb.2017.00093. eCollection 2017. PMID: 29312956

List of Presentations

芳本 玲、谷口 一郎、大野 睦人、前田 明 環状 RNA (circRNA) の核外輸送機構の解明 第 40 回 日本分子生物学会年会、神戸、2017 年 12 月 6-9 日

竹岩俊彦、大野睦人 mRNA 様 long noncoding RNA の核局在化機構の解析 RNA フロンティアミーティング 2017、大津、2017 年 11 月 8-10 日

Ichiro Taniguchi, Mutsuhito Ohno Identification of RNA helicase used in U snRNA export 第 19 回日本 RNA 学会年会、富山、2017 年 7 月 19-21 日

Sayaka Dantsuji, Ichiro Taniguchi, Mutsuhito Ohno Systematic analysis of hnRNP C domains in sorting RNA polymerase II transcripts 第 19 回日本 RNA 学会年会、富山、2017 年 7 月 19-21 日

Sayaka Dantsuji, Ichiro Taniguchi, Mutsuhito Ohno Systematic analysis of hnRNP C domains in sorting RNA polymerase II transcripts 15th International Student Seminar、京都、2017 年 2 月 23-24 日

“Best Presentation Prize”

生体膜システム分野
Laboratory of Biological Membrane System

| | | | |
|-----|-------|---------------|-------------------|
| 教授 | 秋山 芳展 | Prof. | Yoshinori Akiyama |
| 准教授 | 森 博幸 | Assoc. Prof. | Hiroyuki Mori |
| 助教 | 檜作 洋平 | Assist. Prof. | Yohei Hizukuri |

本研究室では、大腸菌や海洋性ビブリオ菌等の細菌における表層タンパク質の、細胞内での折りたたみ、分泌、膜組み込み、局在化、分解及びストレス応答などの諸過程が機能的ネットワークを形成し的確に起こるために細胞に備えられている仕組みを解析し、細菌細胞表層タンパク質の機能発現と秩序維持機構を明らかにしようと努めている。2017年は、外膜タンパク質のアセンブリーと品質管理に関わるペリプラズムプロテアーゼ BepA の TPR ドメインに注目して、その機能・構造解析を行いました。また、生体内で迅速におこるダイナミックなタンパク質の挙動を高時間・高空間分解能で解析することのできる新たな手法として、PiXie 法を開発しました。

1) 大腸菌のペリプラズムプロテアーゼ BepA は、TPR domain を介したタンパク質間相互作用により外膜機能を維持する

大腸菌などのグラム陰性細菌の外膜外葉は LPS (リポ多糖) から構成され、化学物質等に対する透過障壁として働く。LPS の外膜への挿入は、外膜機能維持と細胞の生育に必須の働きを持つ外膜タンパク質 LptD により媒介される。

大腸菌の BepA は、C 末端側に TPR ドメインを持つ。TPR ドメインは、細菌からヒトまで多くのタンパク質に存在しており、タンパク質間相互作用等に働くモジュールである。我々はこれまでに、BepA が、LptD の成熟化や外膜へのアセンブリーを促進する分子シャペロン様機能と、正常なアセンブリーに失敗した LptD 等の分解除去を行うプロテアーゼとしての機能を併せ持ち、外膜の機能維持に重要な役割を果たすことを示した。また、BepA は、βバレル型外膜タンパク質の外膜への組み込みに関わる BAM 複合体構成タ

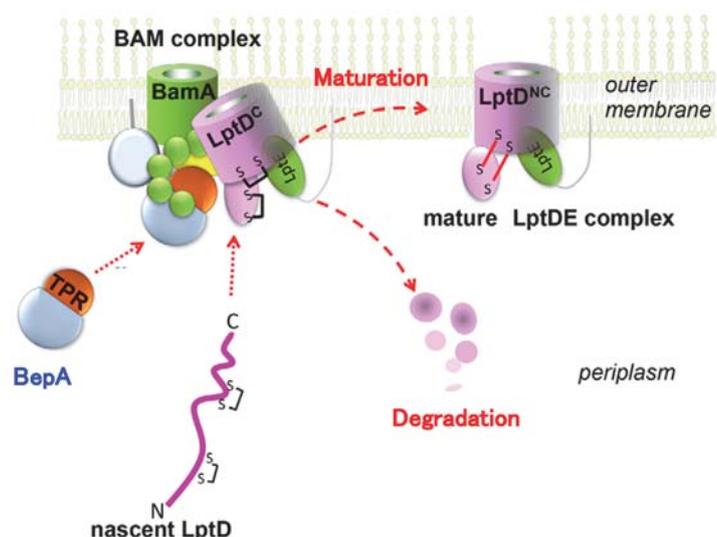


Fig. 1. Roles of BepA in biogenesis of outer membrane proteins

ンパク質とも相互作用することも報告した。しかし、BepA が、如何にして LptD や BAM 因子と相互作用しているのか、TPR ドメインが BepA 機能にどのような役割を果たしているのかはよくわかっていなかった。

我々は、TPR ドメインの機能について検討するために、TPR ドメインの立体構造を X 線結晶構造解析により決定すると共に、このドメインをターゲットとして、網羅的な部位特異的 *in vivo* 光架橋実験を行い、多くの部位で架橋産物を検出した。これらの架橋産物の質量分析やイムノブロットングによる解析から、TPR ドメインが LptD や BAM 複合体の構成タンパク質と特定の位置で直接相互作用する事が示唆された。また、TPR ドメインの変異解析から、TPR ドメインを介した LptD や BAM 複合体との相互作用が、BepA が機能するために重要であることを見出した (図 1)。

2) 生細胞内の新生タンパク質のフォールディング・アセンブリー過程を解析可能な光架橋法の構築

新生タンパク質の成熟化は、リボソームでの合成、細胞内の適切な場所への輸送 (局在化)、機能的構造の形成 (フォールディング・サブユニットアセンブリー) といった過程を経て起こる。これらの過程において、新生タンパク質は分子シャペロン等、様々な細胞因子と一過的に相互作用する。細胞内でのタンパク質成熟過程を理解するためには、迅速に起こるタンパク質間相互作用の変化を高時間・空間分解能で解析する必要があるが、それを可能とする簡便な手法は存在しなかった。我々は、部位特異的 *in vivo* 光架橋法を改良することで、そのような解析が可能な手法の開発に取り組んだ。

部位特異的 *in vivo* 光架橋法は、pBPA のような側鎖に光反応性のクロスリンカーを有する非天然アミノ酸を導入したタンパク質を細胞内で発現させて行う架橋実験法であり、生細胞内でのタンパク質の動態を高い空間分解能で解析できる優れた手法である。しかしながら、従来の方法では、検出可能な架橋複合体の形成に通常数分以上の UV 照射が必要であり、その時間分解能の低さのため、迅速なタンパク質間相互作用の変化を追跡することはできなかった。

我々は、非常に強力な UV 照射器を用いることで、1 秒程度の照射により従来条件での 6 分照射時に匹敵する架橋を形成できることを見出した。これとパルスチェイス法を組み合わせることで、迅速に起こるタンパク質間相互作用を追跡する手法、PiXie (pulse-chase and *in vivo* photo-cross-linking experiment) 法を構築した (図 2)。PiXie 法の有用性を実証するために 3 種のタンパク質複合体をモデルとして解析を行った。まず、PiXie 法でペリプラズムのホモ 2 量体タンパク質 PhoA を用い、新規合成後光架橋による生じる 2 量体の形成速度を解析すると、先行研究と同様の結果が得られ、本手法によって成熟過程におけるタンパク質複合体形成過程を解析できることを示した。また、内膜の SecD/SecE 複合体形成過程の解析によって、SecD のペリプラズムドメインの折り畳みが

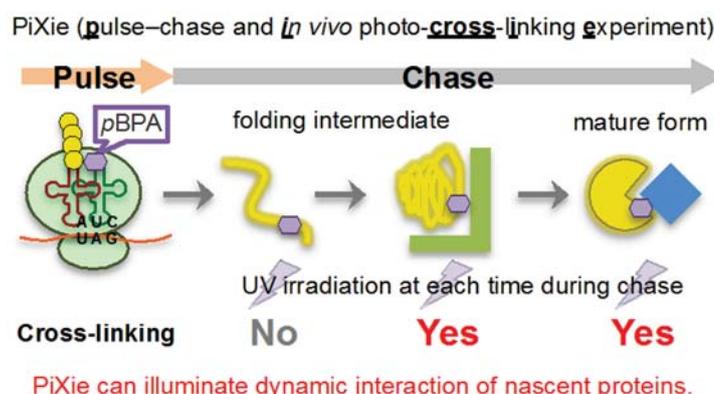


Fig. 2. Schematic representation of the PiXie method

SecD/SecE 膜貫通領域のアセンブリー過程に先だって起こることが示唆された。さらに、外膜の LptD/LptE 複合体の解析から、LptE は「LptD 成熟中間体」と相互作用して複合体形成すること、LptD の成熟中間体は少なくとも二つの異なる状態を取り得ることが示唆された。以上の結果から、我々が構築した PiXie 法によって、これまで解析が困難であった細胞内でのタンパク質の成熟中間体でのフォールディング・相互作用を解析できることが実証された。また、本手法は一般的に成熟過程の解析が困難な膜タンパク質にも適用できることが分かった。PiXie 法は、細胞内タンパク質動態を解析し得る、汎用性・有用性の高いツールとなるものと期待される。

本年は、理学研究科大学院生 (M1) として渡邊哲朗さん、本名彩正さん、宇都滉一さんが新たに研究室に加わりました。一方、何あゆみさん、米重大河さん、明後尚美さん、山形優太郎さんが修士課程を終了し、就職・進学のため研究室を去りました。

The research projects carried out in this laboratory are concerned with dynamic aspects of cell surface proteins in bacteria including *Escherichia coli* and *Vibrio alginolyticus*. Specifically, processes of protein folding, protein translocation across and integration into the membrane, membrane protein proteolysis and extracytoplasmic stress responses are studied by combined molecular genetic, biochemical, biophysical and structural approaches. In 2017, we conducted structural and functional analysis of the TPR domain of BepA, a periplasmic protein involved in assembly and quality control of outer membrane proteins. We also developed a new method, named Pixie, which permits high spatiotemporal resolution *in vivo* analysis of newly-synthesized protein dynamics.

1) The TPR domain of BepA is required for productive interaction with substrate proteins and the β -barrel assembly machinery (BAM) complex

BepA is an *E. coli* periplasmic protein having an N-terminal protease domain and a C-terminal tetratricopeptide repeat (TPR) domain. We have previously shown that BepA is a dual functional protein with chaperone-like and proteolytic activities involved in membrane assembly and proteolytic quality control of LptD, a major component of the outer membrane lipopolysaccharide translocon. Interestingly, BepA can associate with the BAM complex that mediates membrane assembly of β -barrel outer membrane proteins. However, the molecular mechanism of BepA function and its association with the BAM complex remains unknown. We determined the crystal structure of the BepA TPR domain, which revealed the presence of two subdomains formed by four TPR motifs. Systematic site-directed *in vivo* photo-cross-linking was used to map the protein-protein interactions mediated by the BepA TPR domain, indicating that this domain interacts both with a substrate and with the BAM complex. Mutational analysis showed that these interactions are important for the BepA functions. These results suggest that the TPR domain plays critical roles in BepA functions through interactions both with substrates and with the BAM complex and provide insights into the mechanism of biogenesis and quality control of the outer membrane (Fig. 1).

2) A photo-cross-linking approach to monitor folding and assembly of newly-synthesized proteins in a living cell

Many proteins form multimeric complexes that play crucial roles in various cellular processes. Studying how proteins are correctly folded and assembled into such complexes in a living cell is important to understand the physiological roles and the qualitative and quantitative regulation of the complex. However, few methods suitable for analyzing these rapidly occurring processes are available. Site-directed *in vivo* photo-cross-linking is an elegant technique that enables analysis of protein–protein interactions in living cells with high spatial resolution. However, the conventional site-directed *in vivo* photo-cross-linking method is unsuitable for analyzing dynamic processes. We thus developed a new method that can analyze the folding and assembly of a newly-synthesized protein with high spatiotemporal resolution by combining an improved site-directed *in vivo* photo-cross-linking technique with a pulse–chase approach. We demonstrate that this method, named pulse–chase and *in vivo* photo-cross-linking experiment (PiXie; Fig. 2), enables the kinetic analysis of the formation of an *E. coli* periplasmic (soluble) protein complex (PhoA). We also used the PiXie method to analyze assembly/folding processes of two membrane complexes (SecD/SecF in the inner membrane and LptD/LptE in the outer membrane), which provided new insights into their biogenesis. Our new method should permit analysis of the dynamic behavior of various proteins and enables examination of protein–protein interactions at the level of individual amino acid residues. Our new technique will have valuable utility for studies of protein dynamics in many organisms.

List of Publications

- Miyazaki, R., Myougo, N., Mori, H., and Akiyama, Y. (2018) A photo-cross-linking approach to monitor folding and assembly of newly synthesized proteins in a living cell. **J. Biol. Chem.** *293*, 677-686.
- Daimon, Y., Iwama-Masui, C., Tanaka, Y., Shiota, T., Suzuki, T., Miyazaki, R., Sakurada, H., Lithgow, T., Dohmae, N., Mori, H., Tsukazaki, T., Narita, S.-i., and Akiyama, Y. (2017) The tetratricopeptide repeat (TPR) domain of BepA is required for productive interaction with substrate proteins and the β -barrel assembly machinery (BAM) complex. **Mol. Microbiol.** *106*, 760-776.
- Furukawa, A., Yoshikaie, K., Mori, T., Mori, H., Morimoto, Y. V., Sugano, Y., Iwaki, S., Minamino, T., Sugita, Y., Tanaka, Y. and Tsukazaki, T. (2017) Tunnel formation inferred from the I form structures of the proton-driven protein secretion motor SecDF. **Cell Reports** *19*, 895-901.
- Akiyama, K., Hizukuri, Y., and Akiyama, Y. (2017) Involvement of a conserved GFG motif region in substrate binding by RseP, an *Escherichia coli* S2P protease. **Mol. Microbiol.** *104*, 737-751.
- Hizukuri, Y., Akiyama, K., and Akiyama, Y. (2017) Biochemical Characterization of Function and Structure of RseP, an *Escherichia coli* S2P Protease. **Methods Enzymol.** *584*, 1-34
- 大門康志 (2017) 臨床検査のピットフォール, 日常検査で見過ごされやすい Clostridium 属菌に注

意！検査と技術 45, 880-883.

石井英治、森博幸（2017）ビブリオ属細菌における2つのタンパク質膜透過促進因子の生理的意義と使い分け機構．医学のあゆみ 261, 1178-1179.

List of Presentations

Mori, H. Structure and physiological function of SecDF that enhances protein export. International symposium 'Harmonized supermolecular motility machinery and its diversity', 名古屋、2017年9月13-14日

Mori, H., Sakashita, S., Ito, J., Ishii, E. and Akiyama, Y. Identification and characterization of a translation arrest motif in VemP by systematic mutational analysis. 日本生物物理学会第55回年会 シンポジウム「実験と理論計算で明らかになってきた細胞環境での蛋白質間相互作用」、熊本、2017年9月19-21日

Mori, H. Nascent chain-monitored remodeling of the Sec machinery for salinity adaptation of a marine bacterium, *Vibrio alginolyticus*. Commemorative symposium for 33rd international prize for biology 'Marine biology opens a frontier for the future'. 筑波、2017年12月5-6日

何あゆみ、三登一八、秋山芳展、森博幸 タンパク質膜透過促進因子 SecD の P1 ヘッド領域における基質結合部位の探索．2017年生体運動研究合同班会議、神戸、2017年1月6-8日

秋山芳展 ビブリオ菌における新生鎖機能を介したタンパク質膜透過の制御．2016年度「新生鎖の生物学」班会議、横浜、2017年1月6日

古川新、吉海江国仁、森貴治、森博幸、森本雄祐、菅野泰功、岩木薫大、南野徹、杉田有治、田中良樹、塚崎智也 タンパク質膜透過を駆動するモータータンパク質のスナップショット．2017年生体運動研究合同班会議、神戸、2017年1月6-8日

秋山芳展 大腸菌における SRP 経路を介した熱ショック応答転写因子 σ^{32} の機能調節．兵庫県立大学大学院生命科学研究科セミナー、兵庫、2017年1月26日

大門康志、舩井千草、宮崎亮次、田中良樹、櫻田洋人、鈴木健裕、堂前直、森博幸、塚崎智也、成田新一郎、秋山芳展 大腸菌のペリプラズムプロテアーゼ BepA は TPR domain を介したタンパク質間相互作用により外膜機能を維持する．日本農芸化学会2017年度大会、京都、2017年3月17-21日

秋山光市郎 大腸菌膜内切断プロテアーゼ RseP の基質選別機構．2016年度国立遺伝学研究所研究会「単細胞システム細胞装置のダイナミズム」、三島、2017年3月27日-28日

森博幸 ビブリオ菌 SecDF2 の発現を制御する VemP の翻訳伸張停止と解除の分子機構．2016年度国立遺伝学研究所研究会「単細胞システム細胞装置のダイナミズム」、三島、2017年3月27-28日

秋山芳展 大腸菌の S2P ファミリー膜内切断プロテアーゼ RseP による特異的基質認識機構．広島

大学大学院医歯薬保健学研究院分子細胞情報学セミナー、広島、2017年4月18日

宮崎亮次、明後尚美、森博幸、秋山芳展 部位特異的 *in vivo* 光架橋法の改良による生体内タンパク質成熟過程解析法の開発。第14回21世紀大腸菌研究会、熱海、2017年6月8-9日

吉谷亘平、石井英治、江口陽子、谷口勝英、杉本宏、新家粧子、宮崎亮次、秋山芳展、城宜嗣、深溝慶、内海龍太郎 構造に基づいた小型膜タンパク質 SafA によるセンサーキナーゼ PhoQ 活性化メカニズムの解析。第14回21世紀大腸菌研究会、熱海、2017年6月8-9日

三宅拓也、檜作洋平、秋山芳展 大腸菌 S2P ファミリープロテアーゼ RseP の機能未知 PCT 領域の解析。第14回21世紀大腸菌研究会、熱海、2017年6月8-9日

宮崎亮次 *in vivo* 光架橋法の改良による新生タンパク質成熟過程解析法の開発。「新生鎖の生物学」第4回若手ワークショップ、京都、2017年8月29-31日

田中勇真、石井英治、秋山芳展、森博幸 塩環境変化に応答したビブリオ菌 SecDF パラログの交換を介したタンパク質膜透過装置の再編成。「新生鎖の生物学」第4回若手ワークショップ、京都、2017年8月29-31日

三宅拓也、檜作洋平、秋山芳展 細菌の表層ストレス応答活性化を担う膜内切断プロテアーゼ RseP の新規機能調節領域の解析。「新生鎖の生物学」第4回若手ワークショップ、京都、2017年8月29-31日

Hizukuri, Y., Suzuki, T., Terushima, K., Dohmae, N. and Akiyama, Y. Component of the bacterial flagellar type III secretion system receives proteolysis by a rhomboid family protease in the membrane. International symposium 'Harmonized supramolecular motility machinery and its diversity', 名古屋、2017年9月13-14日

Ishii, E., Chiba, S., Hashimoto, N., Sakashita, S., Kojima, S., Homma, M., Ito, K., Akiyama, Y. and Mori, H. Marine *Vibrio* features alternative cation-dependence of SecDF paralogs regulated by a nascent polypeptide, VemP, for environmental adaptation. International symposium 'Harmonized supermolecular motility machinery and its diversity', 名古屋、2017年9月13-14日

檜作洋平、照島功祐、秋山芳展 A component of the flagellar type III secretion system receives proteolytic cleavage by rhomboid protease GlpG inside the membrane. 日本生物物理学会第55回年会、熊本、2017年9月19-21日

Tsukazaki, T., Furukawa, A., Yoshikaie, K., Mori, T., Mori, H., Morimoto, V. Y., Sugano, T., Iwaki, S., Minamino, T., Sugita, Y. and Tanaka, T. Protein translocation motor SecDF. 日本生物物理学会第55回年会 シンポジウム「構造生命科学の新しい潮流」、熊本、2017年9月19-21日

Miyake, T. Functional analysis of a novel regulatory region of RseP, an intramembrane cleaving protease involved in a bacterial extracytoplasmic stress response. 24th East Asia Joint Symposium on biomedical research, Otsu, October. 17-18, 2017

- 石井 英治、坂下 宗平、秋山 芳展、森 博幸 *V. alginolyticus* における翻訳停止依存的な膜透過促進因子の発現制御機構 . 第 51 回ビブリオシンポジウム、沖縄 (石垣島)、2017 年 10 月 20 日
- 宮崎亮次、明後尚美、森博幸、秋山芳展 生細胞内の新生タンパク質動態を解析可能な光架橋法の構築 . 新学術領域研究「新生鎖の生物学」平成 29 年度第 1 回班会議、別府、2017 年 11 月 8-10 日
- 石井 英治 海洋性ビブリオ菌の新生鎖によるタンパク質膜透過能の監視を介した塩環境適応 . 第 70 回日本細菌学会関西支部学術総会 若手プロジェクトチーム 企画シンポジウム、大阪、2017 年 11 月 25 日
- 檜作洋平、照島功祐、秋山芳展 細菌 Rhomboid ファミリープロテアーゼ GlpG はべん毛 III 型分泌装置の構成因子の分解に関与する . ConBio2017、神戸、2017 年 12 月 6-9 日
- 石井 英治、坂下 宗平、秋山 芳展、森 博幸 新生ポリペプチド鎖を介した発現制御における mRNA 二次構造形成の重要性 . 2017 年度生命科学系学会合同年次大会、神戸、2017 年 12 月 6-9 日
- 宮崎亮次、明後尚美、森博幸、秋山芳展 部位特異的 *in vivo* 光架橋法による生細胞内での新生タンパク質のフォールディング・複合体形成の動的過程の解析 . 2017 年度生命科学系学会合同年次大会、神戸、2017 年 12 月 6-9 日
- 三宅拓也、檜作洋平、秋山芳展 細菌の表層ストレス応答に関わる膜内切断プロテアーゼ RseP の新規機能調節領域の解析 . 2017 年度生命科学系学会合同年次大会、神戸、2017 年 12 月 6-9 日
- 秋山芳展 大腸菌の S2P ファミリー膜内切断プロテアーゼ RseP による選択的基質認識機構 . 山口大学学院創成科学研究科セミナー、山口、2017 年 12 月 13 日

生命システム研究部門
Department of Biosystems Science

組織恒常性システム分野
Laboratory of Tissue Homeostasis

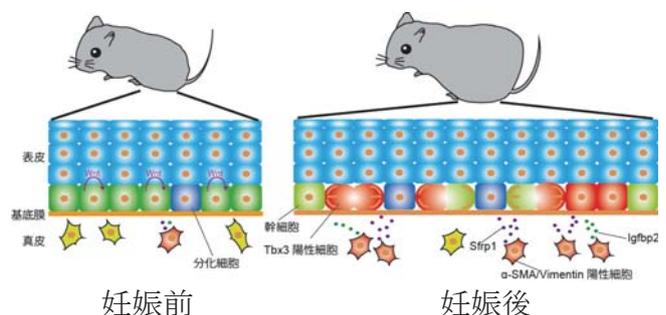
| | | | |
|----|-------|---------------|-------------------|
| 教授 | 豊島 文子 | Prof. | Fumiko Toyoshima |
| 助教 | 小田裕香子 | Assist. Prof. | Yukako Oda |
| 助教 | 松村 繁 | Assist. Prof. | Shigeru Matsumura |

本分野では、対称・非対称分裂を介した幹細胞の増殖・分化制御機構と組織恒常性・再生における役割の解明をめざして研究を推進している。2017年においては、妊娠マウスの腹部皮膚の伸展における表皮幹細胞ダイナミズムを解明した。また、長鎖非翻訳 RNA の転写制御と ES 細胞分化における機能を検証した。

1) 妊娠期の腹部皮膚の伸展を可能とする表皮幹細胞の分裂・分化制御機構の解明

皮膚組織は表皮、真皮、皮下組織より構成され、表皮基底層には、増殖能と未分化性を維持する表皮幹細胞が存在する。近年、皮膚の新陳代謝や創傷治癒における表皮幹細胞の制御機構が明らかとなってきた。一方、皮膚は体型変化に伴って表面積を柔軟に変化させるが、生理的な体形変化に対して表皮幹細胞がどのように応答しているのかについては全く不明である。

本研究では、急速に拡張する妊娠期の腹部皮膚に着目し、そのメカニズムを解析した。その結果、妊娠期には、腹側表皮の基底層に高い増殖能を持つ細胞が出現することを見出した。この細胞集団は転写因子 Tbx3 を発現しており、表皮幹細胞が基底膜に対して水平に非対称分裂あるいは対称分裂分化することにより産生されることが分かった。Tbx3 陽性細胞は、さらに水平分裂を繰り返し、妊娠期の急速な拡張拡張を可能としていた。また、妊娠期には、真皮に存在する α -SMA/Vimentin 陽性細胞が、分泌タンパク質である Sfrp1、Igfbp2 を分泌することで Tbx3 陽性細胞の産生を促進することを明らかにした。Tbx3 陽性細胞は、創傷時においても基底層に出現して創傷治癒を促進すること、Sfrp1、Igfbp2 を注射することで、創傷治癒が促進されることを示した。本研究成果は、再生医療やアンチエイジングへの応用展開につながると期待される。



2) グアニン四重鎖を介した H19 長鎖非翻訳 RNA の転写制御機構の発見

長鎖非翻訳 RNA である H19 遺伝子は、古くから知られたインプリンティング遺伝子である。H19

RNA は発生中の多くの組織で発現し、細胞の増殖や分化の制御するが、*H19* の発現制御機構についてはインプリンティングのほかには、ほとんど不明である。本研究では、*H19* の発現制御機構としてグアニン四重鎖を介した転写制御機構を見出した。グアニン四重鎖とは、グアニンが豊富な核酸が取ることのできる高次構造であり、テロメアやがん関連遺伝子のプロモーター領域に存在することが知られている。我々は、*H19* の転写開始点直後には進化的に保存された、グアニンに富んだ配列が存在しており、*in vitro* の実験からこの配列がグアニン四重鎖を形成していること、またこの配列が転写を制御していることを見出した。さらに、*H19* グアニン四重鎖と結合する因子として二つの転写因子、Sp1 と E2F1 を同定した。これらの因子は細胞周期や胚性幹細胞の分化といった細胞の状態によって、*H19* グアニン四重鎖との結合状態を変化させ、*H19* の発現量を正および負の両方向に制御していることが分かった。*H19* RNA は多くのがん細胞で高発現し、細胞の増殖や浸潤を誘導することから、本研究で明らかになったグアニン四重鎖による *H19* の発現調節機構は、エピジェネティックな機構を介した、がん治療の有効なターゲットとなることが期待される。

1) Epidermal stem cell division drives abdominal skin expansion during pregnancy

During pregnancy, tissue stem cells in several organs are activated in response to a physiological alteration of the maternal body. We identified a highly proliferative interfollicular epidermal (IFE) basal cell population in the rapidly expanding abdominal skin of pregnant mice. These cells expressed Tbx3 that is necessary for their propagation to drive skin expansion and accommodate foetal growth. The Tbx3⁺ IFE basal cells were positive for transit-amplifying cell marker CD71 with reduced expression of IFE stem cell marker Axin2. Using lineage tracing and division pattern analysis, we found that the IFE stem cells gave rise to the Tbx3⁺ basal cells through planar-oriented asymmetric or symmetric cell divisions. This biased division of the Axin2⁺ IFE basal cells was induced by secreted proteins that were expressed in dermal cells. Upon wounding, Tbx3⁺ IFE basal cells played a pivotal role in tissue repair, which was enhanced by topical administration of the dermal secretory proteins. Our findings demonstrate a fine-tuned IFE stem cell/progeny organization during pregnancy and suggests its application in regenerative medicine.

2) A novel mechanism for the regulation of H19 gene transcription by the G-quadruplex structure.

H19 gene is a well-known imprinted gene that encodes a long non-coding RNA. *H19* RNA is widely expressed in embryonic tissues, but its expression is restricted in only a few tissues after birth. However, regulation of *H19* gene expression remains poorly understood outside the context of genomic imprinting. We identified evolutionarily conserved guanine (G)-rich repeated motifs at the 5' end of the *H19* coding region that are consistent with theoretically deduced G-quadruplex sequences. We showed that the G-rich motif, located immediately downstream of the transcription start site (TSS), forms a G-quadruplex structure *in vitro*. We found that the *H19*-G-quadruplex regulates *H19* gene expression through association with transcription factors Sp1 and E2F1, which either suppress or promote the *H19* transcription, respectively. Moreover, *H19* expression during differentiation of mouse embryonic stem cells appears to be regulated by the *H19*

G-quadruplex. These results demonstrate that the G-quadruplex functions as a novel regulatory element for *H19* gene expression.

List of Publications

Ichijo, R., Kobayashi, H., Yoneda, S., Iizuka, Y., Kubo, H., Matsumura, S., Kitano, S., Miyachi, H., Honda, T., and Toyoshima, F. (2017). Tbx3-dependent amplifying stem cell progeny drives interfollicular epidermal expansion during pregnancy and regeneration. **Nat. Commun.** 8, 508.

Ikeda, M. and Toyoshima, F. (2017). Dormant pluripotent cells emerge during neural differentiation of embryonic stem cells in a FoxO3-dependent manner. **Mol. Cell. Biol.** 37, e00417-16.

Fukuhara, M., Ma, Y., Nagasawa, K., and Toyoshima, F. (2017). A G-quadruplex structure at the 5' end of the *H19* coding region regulates *H19* transcription. **Sci. Rep.** 8, 45815.

Ichijo, R., Iizuka, Y., Kubo, H., and Toyoshima, F. (2017). Essential roles of Tbx3 in embryonic skin development during epidermal stratification. **Gene Cells** 22, 284-292.

List of Presentations

豊島文子 Orchestration of stem and progenitor cells drives abdominal skin expansion during pregnancy 第15回幹細胞シンポジウム、東京、2017年5月26-27日

上月智司、豊島文子 Dynamics of liver stem/progenitor cells during pregnancy 第15回幹細胞シンポジウム、東京、2017年5月26-27日

Takuya Okada, Ryo Ichijo, Mitsuko Fukuhara, Fumiko Toyoshima Interfollicular epidermal cell dynamics in the process of abdominal skin contraction after parturition 第15回幹細胞シンポジウム若手の会 東京、2017年5月26-27日

上月智司、豊島文子 妊娠期における肝前駆細胞のダイナミクス 第24回肝細胞研究会、北海道、2017年6月30-7月1日

豊島文子 生理的な体型変化に適応するための表皮幹細胞ダイナミクス 高遠シンポジウム、長野、2017年8月24-25日

石橋 理基、松山 奈央、阿部 浩太、豊島 文子 マウス生体内における *Inscuteable* 遺伝子の発現制御機構の解析 生命科学系学会合同年次大会、神戸、2017年12月6-9日

松山 奈央、石橋 理基、阿部 浩太、豊島 文子 *Inscuteable* promoter-CreERT2 遺伝子改変マウスを用いた *Inscuteable* 遺伝子の発現制御機構の *in vivo* 解析 生命科学系学会合同年次大会、神戸、2017年12月6-9日

久保嘉一、一條遼、山本拓也、豊島文子 妊娠期の皮膚拡張における転写因子 Tbx3 の機能解析 生

命科学系学会合同年次大会、神戸、2017年12月6-9日

一條遼、小林大毅、米田早織、飯塚ゆい、久保嘉一、松村繁、北野さつき、宮地均、本田哲也、豊島文子 妊娠期の腹側皮膚伸展を可能とする表皮幹細胞ダイナミクスの解明 生命科学系学会合同年次大会、神戸、2017年12月6-9日

阿部浩太、石橋理基、豊島文子 Crispr/Cas9 システム及び ssDNA を用いた、受精卵インジェクションによるノックインマウスの作製 生命科学系学会合同年次大会、神戸、2017年12月6-9日

上月智司、豊島文子 妊娠期における、肝細胞・肝幹細胞の時空間依存的細胞分裂による肝細胞再編成機構の解析 生命科学系学会合同年次大会、神戸、2017年12月6-9日

岡田拓也、一條遼、小田裕香子、豊島文子 出産後の皮膚収縮における表皮細胞のダイナミクス解析 生命科学系学会合同年次大会、神戸、2017年12月6-9日

霊長類モデル分野
Laboratory of Primate Model

准教授 三浦 智行 Assoc. Prof. Tomoyuki Miura

2017年3月に川上朗彦が人間・環境学研究科修士課程を修了し、BIKENに就職した。また、高橋唯基がオフィス・アシスタントを終了した。8月に教務補佐員の森ひろみが辞職した。12月に医学部人間健康科学科2回生の鳥居也紗がオフィス・アシスタントとして研究室のメンバーに加わった。

当研究室ではレトロウイルス (HIV, SIV, SHIV) およびフラビウイルス (DENV) の感染を分子・培養細胞・感染個体レベルで総合的に解析することにより、これらウイルスの病原性を解明し、ウイルス疾患の治療と予防法を開発することを目的としている (Fig. 1)。2017年の代表的な研究進展状況を以下に記述する。

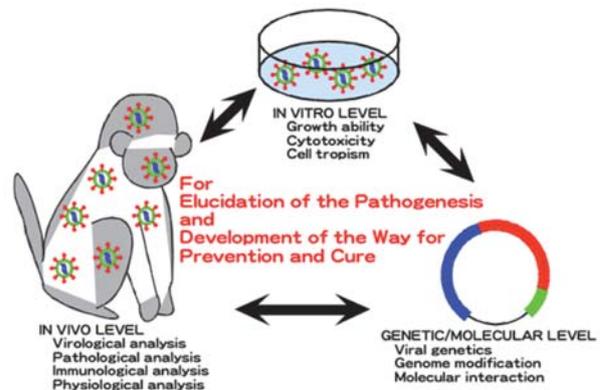


Fig. 1. Research Cycle of Primate Model for Infectious Diseases

1) CCR5 指向性サル/ヒト免疫不全ウイルス感染アカゲザル血漿における中和能の進化

近年、ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) ワクチンによる強力な広域中和能を持つ中和抗体の誘導が期待され、動物モデルでの評価が望まれている。サル免疫不全ウイルスに HIV-1 の外被タンパク (Env) 遺伝子を組み込んだサル/ヒト免疫不全ウイルス (SHIV) は、抗 HIV-1 中和抗体を評価できると期待される。我々はこれまでに、中和抵抗レベルが Tier 1B の CXCR4 指向性 SHIV-KS661 (KS661) の Env 遺伝子に 5 つの変異を加えた CCR5 指向性 SHIV-MK1 (MK1) を作成し、アカゲザルに順化させたところ、ウイルス血症を伴って持続感染する Tier 2 レベルの中和抵抗性 SHIV-MK38 (MK38) を得た (Fig. 2)。この実験の過程で MK1 を接種した 2 頭のうちの 1 頭において

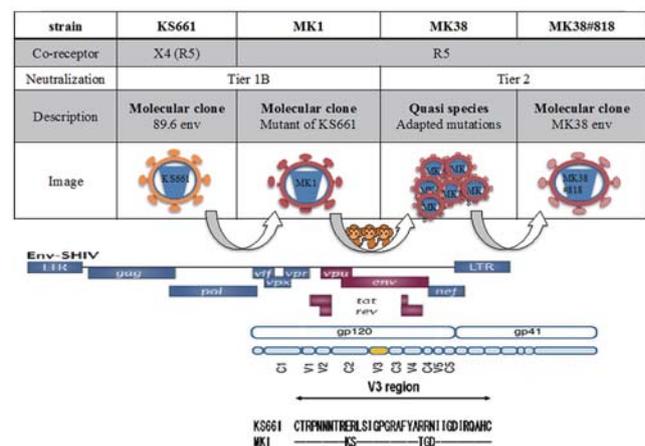


Fig. 2. Summary of SHIV research

10⁴copies/ml 以上のウイルス血症を伴って2年以上にわたって持続感染した。そこで、この MK1 持続感染ザルの血漿中に産生された抗体のウイルス中和能を評価した。中和能は、TZM-bl 細胞への感染系におけるインディケーター（ルシフェラーゼ）遺伝子の発現低下により評価した。持続感染ザルの血漿において、Tier 1B の MK1 に対して感染 6 週以降に中和活性がみられ、Tier 2 の MK38 に対しては、感染 64 週以降に中和活性がみられた。別株の Env に対しては、Tier 1A のウイルスに対して感染 6 週以降の血漿で中和活性がみられ、Tier 2 ウイルスに対して感染 36 週以降に中和活性がみられはじめた。さらに感染 100 週以降には、調べた 9 株の Tier 2 ウイルスの半数以上を中和した。すなわち、感染 6 週（Tier 1B）から感染 36 週（Tier 2）にかけてウイルスに対する中和能が強化し、感染 100 週以降には中和能の広域化による抗体の成熟が示唆された。以上のことから、Tier 1B の MK1 感染アカゲザルモデルは、Tier 2 中和抗体誘導メカニズムを解明するうえで有用であると考えられる。

2) デングウイルス感染霊長類モデル構築に向けた基盤研究

デングウイルス（DENV）感染症は熱帯地域で毎年流行を繰り返しているが、未だに治療薬やワクチンはない。その要因の一つに実験動物モデル、特に臨床症状を示す非ヒト霊長類（NHP）モデルの欠如が挙げられる。インドではサルと蚊の間で感染環が成立しているという報告もあり、インド原産ボンネットモンキーは NHP モデルの候補となりうる。そこで我々はボンネットモンキーにおける DENV の複製能を評価し、新規 DENV 感染 NHP モデル構築への可能性を検討した。ウイルスは臨床分離株である DENV-1 型（10-07 株）、DENV-2 型（09-74 株）、DENV-3 型（00-40 株）、DENV-4 型（09-48 株）および感染性分子クローンである DENV-1 型（02-20 株）を用いた。ボンネットモンキーの末梢血単核細胞（PBMC）に MOI=0.1 でウイルスを接種し、48 時間後の培養上清中のウイルス力価をプラークアッセイによって測定した。ボンネットモンキーに DENV を 10⁶ PFU で攻撃接種後、経時的に採血し IgM、IgG 抗体価を ELISA によって、中和抗体価を 50% プラーク減少中和試験によって、ウイルス RNA 量を定量 PCR 法によってそれぞれ解析した。ボンネットモンキーの PBMC において、DENV-4 の増殖能が有意に高かった。DENV-4 をボンネットモンキーに接種したところ、体温変化や発疹は認められなかったが、一時的な血小板や白血球の減少が認められた。また、血中のウイルス RNA 量は接種後 2 日目をピークに減少していた。さらに IgM 抗体は接種後 3 日目、IgG 抗体は 7 日目、中和抗体は 7 日目からそれぞれ増加していた。顕著な臨床症状は示さなかったが、接種法や接種量を検討することによって、個体内でより増殖し臨床症状を示すようになる可能性が考えられる。また、用いたサルの個体数およびウイルス株数が少ないことから、今後はより多くの組み合わせで増殖能の比較を行いたい。さらに、別の血清型による二次感染時におこる抗体依存性感染増強についての解析も考えられる。本研究は新たな DENV 感染霊長類モデルの可能性を示唆するとともに、抗 DENV 薬、ワクチン開発の一助になることが期待される。

This laboratory aims to elucidate the pathogenicity and develop therapeutic and prophylactic methods for viral infectious diseases and comprehensively analyzes the infection of retroviruses (HIV, SIV, SHIV) and

Flavivirus (DENV) at the molecular level, cultured cell level and infected individual level (Fig. 1). Representative research progress in 2017 will be described below.

1) Evolution of neutralizing ability in CCR5-tropic simian / human immunodeficiency virus-infected rhesus monkey plasma

In recent years, the induction of potent and broad neutralizing antibodies by HIV-1 vaccine is desired, and evaluation in an animal model is expected. Simian / human immunodeficiency virus (SHIV), which incorporated the HIV-1 Env gene into simian immunodeficiency virus, is expected to be able to evaluate anti-HIV-1 neutralizing antibodies. We previously created a CCR5-tropic SHIV-MK1 (MK1) by introducing five amino acid mutations in the Env gene of CXCR4 tropic SHIV-KS661 (KS661) with neutralization resistance level of Tier 1B and acclimatized to rhesus monkeys, obtaining neutralization resistant Tier 2 SHIV-MK38 (MK38) (Fig. 2). In the course of experiments, one of two intravenously inoculated rhesus monkeys with MK1 showed persistently infection at more than 10^4 copies/ml over 2 years. Therefore, the virus neutralizing ability of the antibody in plasma of MK1 persistently infected monkey was evaluated. Neutralizing ability was evaluated by a decrease in expression of an indicator (luciferase) gene in viral infection of TZM-bl cells. In plasma of persistently infected monkeys, neutralizing activity against Tier 1B MK1 was observed after 6 weeks of infection and neutralizing activity against Tier 2 MK38 was observed after 64 weeks of infection. For other strains, neutralizing activity against Tier 1A virus was observed in plasma after 6 weeks of infection and neutralizing activity against Tier 2 virus was observed after 36 weeks of infection. Furthermore, after 100 weeks of infection, more than half number of the 9 Tier 2 viruses examined were neutralized. That is, the ability to neutralize against virus increased from 6 weeks (Tier 1B) to 36 weeks (Tier 2) of infection, and it was suggested that maturation of the antibody was caused by broadening the neutralizing ability after 100 weeks of infection. From the above, it is considered that the Tier 1B MK1-infected rhesus macaque model is useful for elucidating the mechanism of Tier 2 neutralizing antibody induction.

2) Fundamental study for constructing a primate model for dengue virus infection

Dengue virus (DENV) causes a wide range of illnesses in humans, including Dengue fever and Dengue haemorrhagic fever. Some animal models of DENV infection have been established; however, Old World monkeys have not yet been used as DENV infection animal models. Bonnet monkeys (*Macaca radiata*), a type of Old World monkey, have been used for studies of experimental and natural infections by flaviviruses. In this study, several DENV strains were evaluated at the replication level using peripheral blood mononuclear cells. Our findings indicated that DENV-4 09-48 strain, which was isolated from a traveller returning from India in 2009, was a highly replicative virus. Three bonnet monkeys were infected with 09-48 strain, and antibody responses were assessed; DENV nonstructural protein 1 antigen was detected, and high viraemia was observed. Thus, these results indicated that bonnet monkeys and 09-48 strain could be used as a reliable primate model for the study of DENV.

List of Publications

- Beauchemin, C. A., Miura, T., and Iwami, S. (2017). Duration of SHIV production by infected cells is not exponentially distributed: Implications for estimates of infection parameters and antiviral efficacy. **Sci. Rep.** 7, 42765.
- Iwanami, S., Kakizoe, Y., Morita, S., Miura, T., Nakaoka, S., and Iwami, S. (2017). A highly pathogenic simian/human immunodeficiency virus effectively produces infectious virions compared with a less pathogenic virus in cell culture. **Theor. Biol. Med. Model.** 14, 9.
- Seki, S., Nomura, T., Nishizawa, M., Yamamoto, H., Ishii, H., Matsuoka, S., Shiino, T., Sato, H., Mizuta, K., Sakawaki, H., Miura, T., Naruse, T. K., Kimura, A., and Matano, T. (2017). *In vivo* virulence of MHC-adapted AIDS virus serially-passaged through MHC-mismatched hosts. **PLoS Pathog.** 13, e1006638.

List of Presentations

- Nomura, T., Ishii, H., Seki, S., Yamamoto, H., Terahara, K., Miura, T., and Matano, T. Induction of mutant epitope-specific CD8+ T cells is an indicator of the beginning of viral control failure in SIV controllers, 35th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, Madison, WI, August 22-25, 2017.
- 三浦智行 霊長類モデルを用いた HIV 感染症の予防・治療法開発 第 26 回サル疾病ワークショップ、相模原、2017 年 7 月 1 日
- 姫野愛、石田裕樹、森ひろみ、松浦嘉奈子、菊川美奈子、三浦智行 CCR5 指向性サル / ヒト免疫不全ウイルス感染アカゲザル血漿における中和能の進化 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017 年 10 月 24-26 日
- 陣野萌恵、関根将、横山温香、三浦智行、伊吹謙太郎 免疫不全ウイルス感染病態研究におけるサル化マウスの有用性の検討 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017 年 10 月 24-26 日
- Seki, Y., Saito, A., Satou, Y., Harada, S., Yoshimura, K., Ode, H., Iwatani, Y., Ishii, H., Yoshida, T., Washizaki, A., Murata, M., Yasutomi, Y., Matano, T., Miura, T., Akari, H. Characterization of HIV-1mt Long-term Latent infection in *Cynomolgus* Macaques 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017 年 10 月 24-26 日
- Sano, M., Kuwata, T., Matsuoka, S., Akari, H., Miura, T., Matano, T. Neutralizing antibody induction and changes in viral env sequences in the chronic phase of SIVsmH635FC infection 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017 年 10 月 24-26 日
- Nomura, T., Ishii, H., Seki, S., Yamamoto, H., Terahara, K., Miura, T., Matano, T. Induction of mutant epitope-specific CD8+ T cells is an indicator of the beginning of viral control failure in SIV controllers 第 65 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、2017 年 10 月 24-26 日
- Kuwata, T., Shimizu, M., Sano, M., Matsuoka, S., Matano, T., Seki, Y., Akari, H., Miura, T., Matsushita, S.

Analysis of neutralizing antibody induction in SIV-infected macaques 第18回熊本エイズセミナー、熊本、2017年10月30-11月1日

Masuda, A., Harada, S., Takahama, S., Takahashi, K., Konno, K., Kobayakawa, T., Himeno, A., Miura, T., Kuwata, T., Matsushita, S., Yoshimura, K., Tamamura, H. Development of CD4 mimics for enhancement of activity of HIV neutralizing antibodies 第18回熊本エイズセミナー、熊本、2017年10月30-11月1日

関洋平、齊藤暁、佐藤賢文、原田恵嘉、吉村和久、大出裕高、岩谷靖雅、石井洋、Islam Mohammad Saiful、芳田剛、村田めぐみ、鷺崎彩夏、保富康宏、俣野哲朗、三浦智行、俣野哲朗、明里宏文 カニクイザルにおける HIV-1mt 長期潜伏感染の解析 第31回日本エイズ学会学術集会、東京、2017年11月24-26日

桑田岳夫、佐野雅人、松岡佐織、俣野哲朗、関洋平、明里宏文、三浦智行、松下修三 SIV 感染サルをモデルとした中和抗体誘導メカニズムの解析 第31回日本エイズ学会学術集会、東京、2017年11月24-26日

関紗由里、野村拓志、西澤雅子、石井洋、三浦智行、俣野哲朗 伝播により変異を蓄積した SIV の感染免疫動態に関する研究 第31回日本エイズ学会学術集会、東京、2017年11月24-26日

野村拓志、石井洋、関紗由里、山本浩之、寺原和孝、三浦智行、俣野哲朗 SIV 複製制御個体における SIV 野生型 / 変異型エピトープ特異的 CTL 誘導動態の解析 第31回日本エイズ学会学術集会、東京、2017年11月24-26日

附属感染症モデル研究センター
Research Center for Infectious Diseases

ウイルス感染症モデル分野
Laboratory of Infectious Disease Model

教授 明里 宏文 Prof. Hirofumi Akari

当分野では、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）やヒト T 細胞白血病ウイルス（HTLV-1）等の難治性ウイルス感染症に関する研究を行っている。これらのウイルスには、①長い年月に及ぶ持続感染の末に発症に至る、②宿主の免疫機構を巧妙に回避する術を持つ、③非常に狭い（選択的な）宿主特異性を示す、などの共通点がある。この宿主特異性という難題に取り組み、これまでにウイルスの改変や宿主の遺伝的背景による選別などにより、実験用霊長類を用いた新規感染モデルを樹立した。このモデル動物を用いて、ウイルスがヒトの体内で引き起こす様々な現象や病態を明らかにし、さらに新規治療法やワクチンの開発にも貢献していきたいと考えている。

1. 霊長類モデルを用いた HIV 感染症根治のための基盤研究

今日、HIV-1 感染症は適切な抗 HIV 療法（ART）により、AIDS に至ることなく日常生活を送ることが可能な慢性疾患となった。しかし、HIV 感染者は治療の長期化に伴う様々な非感染性合併症（循環器疾患、脂質異常、神経認知障害、癌など）の発症リスクが高いことに加え、精神的・社会的リスクも非常に大きい。現状では、最新の ART でも HIV を体内から除去することは不可能であり、ART 中断により HIV リバウンドが生じるため終生の ART 治療が必要となり、保健医療における経済的負担も非常に大きい。従って、根治を目指した新たな取り組みが求められる。欧米諸国においては、ART を継続しなくても HIV 複製を阻止可能な機能的根治、さらに HIV リザーバーの除去による根治が HIV 感染症研究における最優先課題となっている。現時点で有望視されている根治療法としては、①造血幹細胞移植、②治療ワクチン、③ shock and kill 療法が注目されている。ART 治療中の健常 HIV 感染者を対象として臨床試験を行う際には、薬剤の種類やその用量・投与頻度などの比較検討による最適化やその安全確保が求められる。さらに ART 治療中の HIV 感染者では血漿中ウイルス RNA 量が検出限界以下となるため、臨床試験での有効性評価はリンパ組織内に局在するとされているリザーバーサイズの定量が不可欠と考えられる。しかし被験者は健常 HIV 感染者であることを踏まえると、介入試験におけるリンパ節等の生検を伴うリザーバーサイズの評価は非常に困難である。

私達は、独自に開発した新規 HIV 感染霊長類モデルの活用というユニークな切り口により、HIV 感染症の根治治療法創出に向けた基盤を確立すべく前臨床試験を中心とした基礎・応用研究を推進している。これまでに、サルへの感染性を獲得した改変 HIV-1 を用いて長期潜伏 HIV-1 感染霊長類モデルを確立することに初めて成功した。このモデルでは、カニクイザルへのウイルス接種後ヒトと同レベルの感染初期ウイルスロードを呈した後、細胞性・液性獲得免疫の協調的応答により長期

にわたり血漿中ウイルス RNA が検出限界以下に制御される。この際、生検リンパ節細胞のソーティング解析によりリンパ節胚中心の濾胞性ヘルパー T 細胞 (follicular helper T cells; Tfh) に HIV が局在していること、また人為的免疫抑制によりウイルス再活性化が生じることを見いだしている。すなわち、長期潜伏感染霊長類モデルを用いることで、HIV 感染者を対象とした介入試験では困難なリンパ節の連続生検によるリザーバーサイズの詳細な動態評価が可能となった。現在、HIV 潜伏感染の詳細な機序およびその動態について検討を進めている。

他方、HIV-1 潜伏感染霊長類モデルによる shock and kill 療法の前臨床試験を念頭に、カニクイザル末梢血リンパ球における Latency reversing agent (LRA) の細胞活性化能及び細胞毒性を検討した。10-Methyle-Aplog-1(10MA-1) は入江教授 (本学農学研究科) らが開発した LRA の 1 種であり、BET 阻害薬である JQ1 を併用することにより潜伏感染 HIV の活性化において顕著な相乗効果を示した。10MA-1 単独、JQ1 との併用ともに、顕著な細胞毒性は認められなかった。以上の結果より、10MA-1 と JQ1 の併用により安全性の高い LRA として有用であることが示唆された。今後は HIV-1 潜伏感染ザルの末梢血リンパ球細胞及びリンパ節細胞を用いて、上記 LRA によるリザーバー細胞からの HIV-1 誘導効果、及び炎症応答について検討を行う。最終的には、HIV-1 潜伏感染カニクイザルへの投薬によるリザーバーサイズの縮減効果を評価したい。

2. STLV-1 自然感染ニホンザルに関する Cohort 研究：高感染率の機序

本邦では HTLV-1 キャリアは約 100 万人とされ、その陽性率は約 1% となっている。他方、日本固有の野生霊長類であるニホンザルは、HTLV-1 に非常に近縁なレトロウイルスである STLV-1 に非常に高い割合で感染していることが報告されている。この原因として、一部のサル個体が STLV-1 で個体内でのウイルス量が顕著に高いといった可能性が挙げられるが、詳細は不明である。本研究では霊長類研究所の放飼場で飼育されているニホンザル 300 頭について、STLV-1 特異抗体およびプロウイルス DNA 陽性細胞の定量的解析を行うとともに、経年的な変動や母子感染、水平感染の可能性について検討を行った。その結果、STLV-1 抗体陽性率は約 66% であり、高頻度の STLV-1 感染が確認された。抗体陽性の個体のほとんど (95.7%) が末梢血リンパ球のプロウイルス DNA が陽性であった。その抗体価やプロウイルス DNA 陽性細胞率およびその頻度分布は、HTLV-1 キャリアにおける場合とほぼ同程度を示しており、個体内での STLV-1 ウイルス量が特に高いとは考えられなかった。次に、母子関係と STLV-1 感染を検討したところ、母子感染率は約 30% であり、HTLV-1 母子感染率 (母乳の長期授乳で 15-20%) と比べてやや高い頻度であった。また、水平感染の可能性について検討したところ、4 年間での陽転率は 85.7% であり夫婦間での HTLV-1 感染頻度と比べ高いものであった。以上の結果より、STLV-1 高感染率の原因はウイルスそのものの特性というよりはむしろニホンザルの社会生態に基づく個体間感染機会の多さによるものと推測された。従って STLV-1 自然感染ニホンザルは、HTLV-1 母子感染や水平感染の阻止に向けた有用な動物モデルと考えられる。

This laboratory is newly established in 2013 for active and effective collaboration between Institute for

Virus Research and Primate Research Institute of Kyoto University. We are investigating the mechanisms for the viral persistency and pathogenesis of intractable viruses, including human immunodeficiency virus (HIV) and human T-cell leukemia/lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1), by employing novel non-human primate models for the viral infection. We also seek to contribute to the development of new therapeutics and antiviral vaccines.

1) Basic and applied study toward the cure of HIV-1 infection

Recent advance of antiretroviral therapy may result in infectious diseases caused by HIV-1 infection to be controllable. However, it is not possible to eliminate HIV-1 from the body and thus the infected carriers must take medicine through life with the risks of adverse drug reactions, emergence of drug-resistant virus, and viral reactivation under the immunocompromised status. A number of studies for HIV-1 cure have been conducted to date, however, the clinical application awaits further breakthrough by extensive investigations. Here we present a novel macaque model of HIV-1 latency suitable for the basic and preclinical studies for the cure. Experimental infection of cynomolgus macaques with a modified HIV-1, which can replicate in macaques, developed a substantial level of plasma viremia in the acute phase, however, followed by long-term latency without detectable viremia for more than 3 years. Our recent study demonstrates that transient elimination of CD8⁺ T lymphocytes led to reappearance of HIV-1 in the blood, indicating the presence of reservoir cells that are potentially able to produce infectious HIV-1. Further analyses showed that HIV-positive cells were mainly reserved in follicular helper T lymphocytes in the germinal center of lymph nodes. Taken together, latent HIV-1 infection of macaques will be highly useful for further understanding the molecular and immunological mechanisms by which HIV-1 can be hidden in the germinal center, 'the secure shelter', and also for evaluating the efficacy and safety of new therapeutics for the cure of HIV-1 infection.

2) Cohort study on Japanese macaque naturally infected with STLV-1

A simian T-cell leukemia/lymphotropic Virus Type 1 (STLV-1) belongs to Genus Deltaretrovirus similar to HTLV-1. It was reported previously that the prevalence of STLV-1 infection in Japanese macaques (*Macaca fuscata*) appeared to be remarkably higher than the cases of other nonhuman primates, whereas it has not been clarified what causes the high prevalence. It is possible that antibody titers and/or proviral loads (PVLs) at least in part of the STLV-1-infected macaques could be extremely high or low, which results in efficient transmission and eventual high prevalence. In order to examine the possibility, we evaluated antibody titers against STLV-1 and proviral loads in 300 Japanese macaques. It was found that (i) the rate of seroprevalence for STLV-1 was 66% in average, (ii) the antibody titers and the PVLs among the infected macaques were comparable to the cases of HTLV-1-infected humans, and (iii) no statistical differences were observed in the distributions among the five troops of the macaques examined. These results suggest that the high prevalence may be caused by and social ecology of Japanese macaques but not the individual differences regarding the viral permissiveness in immunological and virological aspects. The natural STLV-1 infection of Japanese macaques is useful as a novel animal model for prevention of maternal and horizontal transmission of

HTLV-1.

List of Publications

- Yokokawa, H., Higashino, A., Suzuki, S., Moriyama, M., Nakamura, N., Suzuki, T., Suzuki, R., Ishii, K., Kobiyama, K., Ishii, K., Wakita, T., Akari, H*, Kato, T*. (2018). Induction of humoral and cellular immunity by immunisation with HCV particle vaccine in a non-human primate model. **Gut** 67, 372-379. (*co-correspondance)
- Nakashima, M., Tsuzuki, S., Awazu, H., Hamano, A., Okada, A., Ode, H., Maejima, M., Hachiya, A., Yokomaku, Y., Watanabe, N., Akari, H., Iwatani, Y. (2017). Mapping Region of Human Restriction Factor APOBEC3H Critical for Interaction with HIV-1 Vif. **Journal of Molecular Biology** 429, 1262-1276.
- Furuta, R., Yasunaga, J., Miura, M., Sugata, K., Saito, A., Akari, H., Ueno, T., Takenouchi, N., Fujisawa, J., Koh, K.R., Higuchi, Y., Mahgoub, M., Shimizu, M., Matsuda, F., Melamed, A., Bangham, C.R., Matsuoka, M. (2017). Human T-cell leukemia virus type 1 infects multiple lineage hematopoietic cells *in vivo*. **PLoS pathogens** 13, e1006722.

ウイルス共進化分野
Laboratory of Virus-Host Coevolution

准教授 宮沢 孝幸 Assoc. Prof. Takayuki Miyazawa

ウイルスは様々な疾病を引き起こす「病原体」として発見され、長年研究されてきた。しかしながら最近のゲノム解析技術の発達により、生体内や環境中にはいまだに未同定のウイルスが数多く存在し、そのほとんどは非病原性であることが分かってきた。また、ウイルスのなかには宿主の生殖細胞のゲノムに入り込んで「内在化」し、内在化したウイルスが新しい機能をもつことも明らかになってきた。本分野は未知のウイルスを探索するとともに、内在性ウイルスによる哺乳類の進化過程を明らかにすることを目的としている。

1) ヒト内在性レトロウイルスを利用したベクター開発に関する研究

内在性レトロウイルス (ERV) は、外来性レトロウイルスが生殖細胞に感染することで、宿主のゲノムに入り込んだものである。ヒトゲノムにおいても ERV は発見されており、ERV 由来の配列はヒトゲノムの約 8% を占めている。すべてのヒト内在性レトロウイルス (HERV) は感染性を失っているが、現在も蛋白質を発現しているものが存在する。一方で、これまでに ERV を利用したベクターとして、ネコ内在性レトロウイルス (RD-114 ウイルス) のエンベロープ蛋白質を用いたベクターが開発されている。RD-114 ウイルスはアミノ酸トランスポーターの一種である ASCT2 を受容体とし、RD-114 のエンベロープ蛋白質を用いたベクターは、造血幹細胞である CD34 陽性細胞に遺伝子を導入することができる。我々は新規 ERV ベクターの開発を目指して、ヒト免疫不全ウイルス 1 型のカプシドを内包する HERV エンベロープ蛋白質を用いたシュードタイプウイルスベクターを作製した。このベクターは、現在遺伝子治療に使用されているものと同等の感染価をもち得ることが示唆された。

2) サルレトロウイルス 5 型 (SRV-5) のニホンザルへの感染実験

近年、京都大学霊長類研究所および生理学研究所のニホンザル繁殖施設において、多数のニホンザルが原因不明の血小板減少症を呈して死亡した。我々は以前、疫学調査とニホンザルへの感染実験を行い、霊長類研究所で発生したニホンザル血小板減少症の病因が、サルレトロウイルス 4 型であることを報告した。一方、生理学研究所で発生した同症は、疫学調査の結果からサルレトロウイルス 5 型 (SRV-5) との関連が疑われていたが、病因の確定には至っていなかった。そこで、本研究では SRV-5 のニホンザルへの感染実験を行い、SRV-5 と同症の関連を調べた。発症個体から分離した SRV-5、また分離ウイルスを元に作製した SRV-5 感染性クローン由来ウイルスをそれぞれ 2 頭のニホンザルに投与した。その結果、分離ウイルスおよび感染性クローン由来ウイルスを接種した

各1頭において約1ヶ月で急激な血小板減少が認められた。一方、残り2頭に対しては免疫抑制剤としてデキサートを投与したが、発症せずに無症候性のキャリアとして生存した。これらの個体の全身組織からDNAを抽出し、SRV-5の感染を定量的PCRで確認したところ、SRV-5はほとんどすべての臓器に感染していることがわかった。さらに、SRV-5が細胞に感染する際の受容体として中性アミノ酸トランスポーター（ASCT2）を使用していることを見出した。以上の結果より、生理学研究所で発生したニホンザル血小板減少症がSRV-5の単独感染によって引き起こされる疫病であることを証明した。

Most viruses have been discovered as pathogens which induce a variety of diseases in the hosts. By virtue of the development of sequencing analyses, we noticed that there are still many unidentified viruses, and most of them are nonpathogenic. Furthermore, retroviruses infected germ-line cells in the past and became endogenous retroviruses (ERVs) which have physiological functions. This laboratory aims to identify novel viruses, and to reveal the mechanism of mammalian evolution by endogenous viruses.

1) Studies for development of a viral vector using human endogenous retrovirus

Endogenous retroviruses (ERVs) are remnants of exogenous retroviruses that have infected the germ-line cells, and fixed in the genome during evolution. Some ERVs have been identified in the human genome, and they compose approximately 8 % of the human genome. Although almost all human ERVs (HERVs) are replication-incompetent due to mutations, some HERVs still express viral proteins. Whereas, the viral vector using a feline endogenous retrovirus (RD-114) envelope protein has already been developed. RD-114 utilizes ASCT2, an amino acid transporter, as a virus receptor, and the viral vector using RD-114 envelope protein is able to infect CD34 positive hematopoietic stem cells and transduce a therapeutic gene. We have generated a pseudotype viral vector using a HERV envelope protein which can rescue human immunodeficiency viral core in order to develop a new ERV vector. The viral titer of the vector we have generated is comparable to those of vectors used in gene therapies recently.

2) Experimental infection of simian retrovirus type 5 in Japanese macaques

Recently, a large number of Japanese macaques (*Macaca fuscata*) died after exhibiting an unknown hemorrhagic syndrome at the Kyoto University Primate Research Institute (KUPRI) and the National Institute for Physiological Sciences (NIPS). We previously reported that the causative agent of hemorrhagic syndrome at KUPRI Japanese macaques was simian retrovirus (SRV) type 4 (SRV-4). Following investigations suggested that the hemorrhagic disease occurred at the NIPS is associated with SRV type 5 (SRV-5); however, the etiology still remained unclear. In this study, we conducted experimental infection of SRV-5 in Japanese macaques and investigated the association between SRV-5 and the hemorrhagic syndrome. We inoculated the SRV-5 isolate and a molecularly cloned SRV-5 into each two Japanese macaques. As a result, each one macaque inoculated with the SRV-5 isolate and the clone-derived virus exhibited acute

thrombocytopenia within one month after inoculation. On the other hand, the remaining two survived as asymptomatic carriers even after administrating the immunosuppressive agent (Dexamethasone). The distribution of SRV-5 proviruses in tissues revealed that SRV-5 infected a variety of tissues in Japanese macaques. We also demonstrated that SRV-5 utilizes a neutral amino acid transporter (ASCT2) as a functional receptor. From these results, we conclude that the hemorrhagic syndrome of Japanese macaques occurred at the NIPS was caused by a single infection of SRV-5.

List of Publications

Yoshikawa, R., Takeuchi, J. S., Yamada, E., Nakano, Y., Misawa, N., Kimura, Y., Ren, F., Miyazawa, T., Koyanagi, Y., Sato, K. (2017) Feline immunodeficiency virus evolutionarily acquires two proteins, Vif and protease, capable of antagonizing feline APOBEC3. **J. Virol.** 91, e00250-17.

Sakurai, T., Nakagawa, S., Bai, H., Bai, R., Kusama, K., Ideta, A., Aoyagi, Y., Kaneko, K., Iga, K., Yasuda, J., Miyazawa, T., Imakawa, K. (2017). Novel endogenous retrovirus-derived transcript expressed in the bovine placenta is regulated by WNT signaling. **Biochem J.** 474, 3499-3512.

宮沢孝幸 (2017). ネコの異同識別におけるミトコンドリア DNA 分析の現状 **DNA 鑑定** 9, 9-21.

List of Presentations

Sakaguchi, S., Koide, R., Shindo, K., Noda, T., Mizutani, T., Miyazawa, T. Persistent feline morbillivirus infection in CRFK cells. 17th International Congress of Virology (International Union of Microbiological Societies 2017), Singapore, July 17-21, 2017.

Shimode, S., Nakagawa, S., Miyazawa, T. Tracing the ancient cat's migration by analyzing retroviral integration sites. 17th International Congress of Virology (International Union of Microbiological Societies 2017), Singapore, July 17-21, 2017.

宮沢孝幸 第二回サイエンスバトル「猫に捧げるサイエンス」 第二回サイエンスカフェ、東京、2017年5月8日 (招待講演)

宮沢孝幸 内在性レトロウイルスと哺乳類の胎盤進化 第58回日本臨床ウイルス学会、長崎、2017年5月27-28日 (招待講演)

Miyazawa, T. Possible induction of mammalian genome complexity by endogenous retroviruses activated by the solar wind. Transdisciplinary Mie-Symposium 2017, Mie, June 17-18, 2017.

Miyazawa, T. Possibility of mammalian evolution by retrotransposons activated by the cosmic rays. The 2nd Japan-Korea International Symposium for Transposable Elements, Tokyo, June 27-28, 2017.

宮沢孝幸 レトロウイルスによる生命の進化と宇宙との関わり 京都大学総合生存学ミニワークショップ「進化・絶滅と宇宙」、京都、2017年6月29日 (招待講演)

- 宮沢孝幸 レトロトランスポゾンと生殖・発生 第35回日本受精着床学会、鳥取、2017年7月20-21日（招待講演）
- 宮沢孝幸 医学に貢献している獣医学のお話 – 私たちはウイルスを遺伝子移動装置として進化に利用してきた！ – 日本臨床獣医学フォーラム年次大会2017、東京、2017年9月15-17日（招待講演）
- 宮沢孝幸 ブタ内在性レトロウイルスの制御に関する研究動向 第44回日本臓器保存生物医学学会学術集会、大阪、2017年11月10-11日（招待講演）
- 宮沢孝幸 胎盤の進化とレトロウイルス 第32回日本生殖免疫学会学術集会、東京、2017年12月2-3日（招待講演）
- 宮沢孝幸 レトロウイルスの起源と内在性レトロウイルスによる哺乳類の進化 基礎物理学研究所・未来創成学国際研究ユニット学術研究会「生体、人体、精神、宇宙–つながりの深層を探る」、京都、2017年5月2-3日
- 下出紗弓、中川草、金村優香、宮沢孝幸 内在性レトロウイルスを指標とした日本国内への欧米ネコ流入の評価 日本進化学会第19回大会、京都、2017年8月24-26日
- Kitao, K., Nakaya, Y., Hoshino, S., Miyazawa, T. A scenario of endogenization process of gammaretroviruses in the koala genome. 日本進化学会第19回大会、京都、2017年8月24-26日
- 橋本暁、吉川禄助、中川草、岡本宗裕、宮沢孝幸 宿主と共種分化する非病原性レトロウイルスから探るニホンザルの移動経路 環境微生物系学会合同大会2017、宮城、2017年8月29-31日
- 金村優香、山浦瑞樹、小出りえ、宮沢孝幸 細胞増殖を抑制する猫白血病ウイルスF8701株の感染性分子クローンの作製 第160回日本獣医学会学術集会、鹿児島、2017年9月13-15日
- 小出りえ、坂口翔一、桑原千恵子、酒井沙知、浅井健一、川上和夫、宮沢孝幸 ベトナムの猫におけるネコモルビリウイルスの遡及血清調査 第160回日本獣医学会学術集会、鹿児島、2017年9月13-15日
- 坂口翔一、小出りえ、神道慶子、野田岳志、水谷哲也、宮沢孝幸 ネコモルビリウイルス持続感染細胞の性状および免疫応答の解析 第160回日本獣医学会学術集会、鹿児島、2017年9月13-15日
- 下出紗弓、中川草、金村優香、宮沢孝幸 内在性レトロウイルスによるイエネコゲノム多様性の評価 第160回日本獣医学会学術集会、鹿児島、2017年9月13-15日
- Hashimoto, A., Yoshikawa, R., Nakagawa, S., Okamoto, M., Miyazawa, T. Dual infection of two simian foamy virus serotypes in Japanese macaques. The 65th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Osaka, October 24-26, 2017.
- 宮沢孝幸、金村優香、坂口翔一、下出紗弓 国内におけるミトコンドリアDNA型（マイトタイプ）の地域偏在性 第10回DNA鑑定学会、東京、2017年11月9-10日

下出紗弓、宮沢孝幸、青井 貴之 ヒト iPS 細胞由来栄養膜細胞の樹立方法の検討 2017 年度生命科学系学会合同年次大会、兵庫、2017 年 12 月 6-9 日

金村優香、山浦瑞樹、小出りえ、宮沢孝幸 ネコ白血病ウイルス F8701 株の受容体解析：新規受容体サブグループの可能性 2017 年度生命科学系学会合同年次大会、兵庫、2017 年 12 月 6-9 日

マウス作製支援チーム
Reproductive Engineering Team

技術専門職員 宮地 均 Technical Specialist Hitoshi Miyachi
技術専門職員 北野さつき Technical Specialist Satsuki Kitano

マウス作製支援チームはウイルス動物実験専門委員会の下でマウス受精卵の凍結保存をはじめトランスジェニックマウス (Tg) やノックアウトマウス (KO) の作製支援を行っている。また、生殖工学技術を用い、体外受精によるマウスコロニーの拡大、ホモマウス作製、胎生期解析用の受精卵準備や ICSI (顕微授精)、卵巣移植なども実施可能である。最近では CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子編集マウスの作製も実施している。詳細についてはホームページをご参照いただきたい。http://www.infront.kyoto-u.ac.jp/ex_ivr/Lab/tgkoivf/index.htm 過去3年間の実績は下記の通りである。

1) 胚の凍結保存

| | | |
|--------|--------|----------|
| 2015 年 | 146 系統 | 40,165 個 |
| 2016 年 | 187 系統 | 34,679 個 |
| 2017 年 | 171 系統 | 37,763 個 |

2) トランスジェニックマウスの作製

| | 依頼数 | 使用胚数 | Tg 産仔数 |
|--------|-----|--------|------------|
| 2015 年 | 35 | 17,122 | 139 (0.8%) |
| 2016 年 | 44 | 18,232 | 113 (0.6%) |
| 2017 年 | 43 | 19,509 | 135 (0.7%) |

3) キメラマウスの作製

| | クローン数 | 使用胚数 | 毛色キメラ数 |
|--------|-------|-------|------------|
| 2015 年 | 22 | 2,249 | 107 (4.8%) |
| 2016 年 | 18 | 1,872 | 71 (3.8%) |
| 2017 年 | 38 | 3,474 | 78 (2.2%) |

4) CRISPR/Cas9 システムによる遺伝子編集マウスの作製

| | 依頼数 | 使用胚数 | 遺伝子編集マウス数 |
|--------|-----|-------|-----------|
| 2015 年 | 15 | 5,906 | 17 (0.3%) |

| | | | |
|--------|----|--------|-----------|
| 2016 年 | 23 | 8,980 | 66 (0.7%) |
| 2017 年 | 30 | 11,809 | 49 (0.4%) |

Reproductive engineering team is a support unit for generating transgenic mouse (Tg) and knockout mouse (KO) under the animal committee of our institute. We also perform cryopreservation of mouse fertilized eggs. Current staffs are Kitano and Miyachi. Results of last three years are as follows.

1) Freezing embryos

| | | | |
|------|--|-------------|----------------|
| 2015 | | 146 strains | 40,165 embryos |
| 2016 | | 187 strains | 34,679 embryos |
| 2017 | | 171 strains | 37,763 embryos |

2) Transgenic mouse production with cloned DNAs

| | No of constructs | No of embryos injected | No of transgenic pups obtained |
|------|------------------|---------------------------|-----------------------------------|
| 2015 | 35 | 17,122 | 139 (0.8%) |
| 2016 | 44 | 18,232 | 113 (0.6%) |
| 2017 | 43 | 19,509 | 135 (0.7%) |

3) Production of chimeric mouse

| | No of ES clones | No of embryos injected | No of coatcolor chimera obtained |
|------|-----------------|---------------------------|-------------------------------------|
| 2015 | 22 | 2,249 | 107 (4.8%) |
| 2016 | 18 | 1,872 | 71 (3.8%) |
| 2017 | 38 | 3,474 | 78 (2.2%) |

4) CRISPR/Cas9

| | No of constructs | No of embryos | No of genome edited mouse |
|------|------------------|---------------|------------------------------|
| 2015 | 15 | 5,906 | 17 (0.3%) |
| 2016 | 23 | 8,980 | 66 (0.7%) |
| 2017 | 30 | 11,809 | 49 (0.4%) |

List of Publications

Ichijo, R., Kobayashi, H., Yoneda, S., Iizuka, Y., Kubo, H., Matsumura, S., Kitano, S., Miyachi, H., Honda,

T., and Toyoshima, F. (2017). Tbx3-dependent amplifying stem cell progeny drives interfollicular epidermal expansion during pregnancy and regeneration. *Nat. Commun.* 8, 508-017-00433-7.

Kuroki, S., Okashita, N., Baba, S., Maeda, R., Miyawaki, S., Yano, M., Yamaguchi, M., Kitano, S., Miyachi, H., Itoh, A., Yoshida, M., and Tachibana, M. (2017). Rescuing the aberrant sex development of H3K9 demethylase *Jmjd1a*-deficient mice by modulating H3K9 methylation balance. *PLoS Genet.* 13, e1007034.

List of Presentations

宮地 均、北野さつき、伊藤克彦、生田宏一 CRISPR/Cas9 を利用した遺伝子編集マウス作製実績
第 136 回関西実験動物研究会、京都、2017 年 12 月 1 日

宮地 均、北野さつき、伊藤克彦、生田宏一 CRISPR/Cas9 システムによるノックインマウス作製
第 35 回動物生殖工学研究会、川崎、2017 年 12 月 2 日

附属再生実験動物施設 Center for Animal Experiments

| | | | |
|------------|-------|---------------|-----------------|
| 教授・施設長（兼務） | 近藤 玄 | Prof. | Gen Kondoh |
| 准教授（兼務） | 廣田 圭司 | Assoc. Prof. | Keiji Hirota |
| 助教 | 渡邊 仁美 | Assist. Prof. | Hitomi Watanabe |

当施設では、平成 27 年度イヌ；178 頭、ウサギ；36 羽、ラット；188 匹、マウス；9,000 匹が実験動物として飼養された。これらの実験動物の日常的な飼育・管理を教授 1 名、准教授 1 名、助教 1 名、技術職員 3 名、非常勤職員 19 名で行っている。

動物実験を行うにあたっては、生命倫理・動物福祉に十分な理解と配慮をして実施する事が大前提である。この原則を周知・徹底させるため、動物実験に従事する者は、動物実験に関する法規制・内規、実験動物の取り扱い方等についての全学講習および所内講習を受講することが義務付けられている。本年も所内講習を 12 回開催した。

また研究支援として遺伝子改変・ゲノム編集マウスの作出を行っている。我々は、“時間と労力のかからない技術の採用や改良”を心掛けてきたが、近年、TALEN や CRISPR-Cas9 ゲノム編集法を用いた簡易な遺伝子破壊・遺伝子挿入マウス作出技術が開発された。当施設でもこれらを積極的に取り入れ、本年は 40 件以上の遺伝子改変・ゲノム編集マウスの作製に携わった。

Experimental animals, such as mouse, rat and others, are housed in our Center under strict regulation of animal experimental committee and institutional guidelines for animal welfare. Moreover, we have been considered for long time: how to make gene-manipulated mice more rapidly and conveniently. Recently, genome engineering methods have been established using TALEN or CRISPR-Cas9 systems. We have searched for many methods and finally developed our own protocol making such mice more easily and reproducibly. We newly developed more than 40 gene-manipulated mouse strains in this year.

List of Publications

Miralles M, Eixarch H, Tejero M, Costa C, **Hirota K**, Castaño AR, Puig M, Stockinger G, Montalban X, Bosch A, Espejo C, Chillón M. (2017). Clinical and Histopathological Amelioration of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by AAV Vectors Expressing a Soluble Interleukin-23 Receptor. *Neurotherapeutics*. 4, 1095-1106.

Kitagawa Y, Ohkura N, Kidani Y, Vandenbon A, **Hirota K**, Kawakami R, Yasuda K, Motooka D, Nakamura S, Kondo M, Taniuchi I, Kohwi-Shigematsu T, Sakaguchi S. (2017). Guidance of regulatory T cell development by Satb1-dependent super-enhancer establishment. *Nat Immunol*. 18, 173-183.

- Yoshimoto, Y., A. Takimoto, **H. Watanabe**, Y. Hiraki, **G. Kondoh**, C. Shukunami. *Scleraxis* is required for maturation of tissue domains for proper integration of the musculoskeletal system. *Scientific Reports* 7:45010. doi: 10.1038/srep45010 (2017).
- Das, N-R., H. Miyata, H. Hara, K. Uchiyama, J. Chida, M. Yano, **H. Watanabe**, **G. Kondoh**, S. Sakaguchi. Effects of prion protein devoid of the N-terminal residues 25-50 on prion pathogenesis in mice. *Arc. Virol.* doi: 10.1007/s00705-017-3295-3 (2017).
- Fujihira, H., Y. Masahara-Negishi, M. Tamura, C. Huang, Y. Harada, S. Wakana, D. Takakura, N. Kawasaki, N. Taniguchi, **G. Kondoh**, T. Yamashita, Y. Funakoshi, T. Suzuki. Lethality of mice bearing a knockout of the *Ngly1*-gene is partially rescued by the additional deletion of the *Engase* gene. *PLoS Genet.* <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006696> (2017).
- Watanabe, H., R. Takeda, K. Hirota, G. Kondoh.** Lipid raft dynamics linked to sperm competency for fertilization in mice. *Genes to Cells* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28425215> (2017).
- Mochizuki, A-L., A. Katanaya, E. Hayashi, M. Hosokawa, E. Moribe, A. Motegi, M. Ishiai, M. Takata, **G. Kondoh, H. Watanabe**, N. Nakatsuji, S. Chuma. PARI regulates stalled replication fork processing to maintain genome stability upon replication stress in mice. *Mol Cell Biol.*, 37-23, pii: e00117-17, (2017).
- Hara, H., H. Miyata, N-R. Das, J. Cida, T. Yoshimochi, K. Uchiyama, **H. Watanabe, G. Kondoh**, T. Yokoyama, S. Sakaguchi. Prion protein devoid of the octapeptide repeat region abrogates BSE pathogenesis in mice. *J. Virol.*, 92-1, pii: e01368-17, (2017).
- Ohashi, M., Y. Umemura, N. Koike, Y. Tsuchiya, Y. Inada, **H. Watanabe**, T. Tanaka, Y. Minami, O. Ukimura, T. Miki, T. Tajiri, **G. Kondoh**, Y. Yamada, K. Yagita. Disruption of circadian clockwork in in vivo reprogramming-induced mouse kidney tumors. *Genes to Cells*, in press.
- Tsubaki, T., T. Kadonosono, S. Sakurai, T. Shiozawa, T. Goto, S. Sakai, T. Kuchimaru, T. Sakamoto, **H. Watanabe, G. Kondoh**, S. Kizaka-Kondoh. Novel Adherent CD11b+ Gr-1+ Tumor-infiltrating Cells Initiate an Immunosuppressive Tumor Microenvironment. *Oncotarget*, in press.
- Shukunami, C., A. Takimoto, Y. Y. Nishizaki, Y. Yoshimoto, S. Tanaka, S. Miura, **H. Watanabe**, T. Sakuma, T. Yamamoto, **G. Kondoh**, Y. Hiraki. *Scleraxis* is a transcriptional activator that regulates the expression of Tenomodulin, a marker of mature tenocytes and ligamentocytes. *Scientific Reports*, in press.
- Morita, M., T. Sato, M. Nomura, Y. Sakamoto, Y. Inoue, R. Tanaka, S. Ito, K. Kurosawa, K. Yamaguchi, Y. Sugiura, H. Takizaki, Y. Yamashita, R. Katakura, I. Sato, M. Kawai, Y. Okada, **H. Watanabe, G. Kondoh**, S. Matsumoto, A. Kishimoto, M. Obata, M. Matsumoto, T. Fukuhara, H. Motohashi, M. Suematsu, M. Komatsu, K-I. Nakayama, T. Watanabe, T. Soga, H. Shima, M. Maemondo, N. Tanuma. PKM1 confers metabolic advantages and promotes cell-autonomous tumor cell growth. *Cancer Cell*, in press.

List of Presentations

Keiji Hirota: An inflammatory cellular network of autoimmune Th17 cells, GM-CSF-producing ILCs and synoviocytes in the development of autoimmune arthritis, Keystone symposia, Immune Regulation in Autoimmunity and Cancer, Whistler, Canada, March 26-30, 2017

Keiko Yasuda, Yohko Kitagawa, Shimon Sakaguchi, **Keiji Hirota**: Satb1 controls the differentiation and terminal effector function of Th17 cells, 第46回 日本免疫学会学術集会、仙台、2017年12月12-14日

Ryoki Kobayashi, Yohei Watanabe, Noriko M Tsuji, **Keiji Hirota**, Tomoko Kurita-Ochiai: Characterization of Innate lymphoid cells in inflamed gingiva of mice infected with Porphyromonas gingivalis, 第46回 日本免疫学会学術集会、仙台、2017年12月12-14日

Gen Kondoh, **Hitomi Watanabe**, **Rie Takeda**, **Keiji Hirota** Lipid raft dynamics linked to sperm competency for fertilization in mice. 第4回国際生殖生物学会、那覇、2017年9月27-29日

ウイルス・再生医科学研究所ネットワークシステム Computer Network of Institute for Frontier Life and Medical Sciences

助 教 竹本経緯子 Assist. Prof. Keiko Takemoto

ウイルス研究所と再生医科学研究所の統合によって発足した新研究所では、情報セキュリティ管理の一環としてコンピュータネットワークの再編を目指している。新研究所のWEBサイトはホスティングサービスを利用し、CMSによるスムーズな記事更新を可能にし、新研究所の研究成果などを発信している。一方で共同利用機器や会議室の予約システムなどまだ統合ができていないシステムに関して、新サーバーによる統合環境構築を進めている。メールホスティングサービスを用いた新研究所用電子メールアドレスは大きな問題もなく稼働しており、今年度末で、旧ウイルス研究所、旧再生医科学研究所のメールサーバが停止することとなる。

セキュリティの観点からは、新研究所の全分野を対象にネットワーク接続機器の一覧を作成し、無線アクセスポイントの管理体制を含め、情報セキュリティ連絡管理体制等を整え、年度初頭にはネットワークセキュリティ講習会を開催した。

研究所ネットワーク管理に加えて、竹本は次世代シーケンサーのデータ解析を行っている。ヒト及びマウスを対象とした内在性レトロウイルスのエピジェネティックな発現制御を研究しており、RNAseq や CHIPseq データから内在性レトロウイルスの脱抑制の制御機構の解明を目指している。

Institute for Frontier Life and Medical Sciences LAN system (Infront-LAN) has administrated by the information security committee consisted of three staffs (Prof. Hiraki, Associate Prof. Inoue and Assist. Prof. Takemoto). Infront-LAN has provided a variety of network services, including E-Mail, WEB-mail, WWW, File-sharing, online reservation of seminar rooms, SSH and all Outgoing TCP services except for P2P. We got a network domain for this new institute and built new WEB site and mail server on the university hosting service systems. The security policy settings was revised because two institutes (ex. virus and ex. frontier) had implemented different security policies before their integration took place. Now we have the list of Wi-Fi routers which are used in each laboratory at the institute and an emergency communication flow for the accidents of network. All network users are supposed to get certifications of training of e-learning course which is provided by Institute for Information Management and Communication of Kyoto University.

In addition to the administration of network, Takemoto have studied the epigenetic regulation of mouse endogenous retroviruses during cell differentiation. Conditional knockdown mice of histone methyltransferase Setdb1, and/or DNA de novo methyltransferase Dnmt1 have been analyzed with RNA-seq and CHIP-seq.

List of Publications

竹本経緯子、加藤雅紀、眞貝洋一 Setdb1 による内在性レトロウイルスの制御機構、第 40 回日本分子生物学会年会、神戸、2017 年 12 月 6 日

共同研究

再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点
2016年度共同研究報告（研究期間：2016年4月～2017年3月）

【コラーゲン分子上の特異な配列を認識するアプタマーの取得と再生医学への応用】

○研究代表者 早稲田大学理工学術院 小出 隆規 教授

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者 細胞機能調節学分野 平芳 一法 講師

○研究経過及び研究成果

本研究では、Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX) を用いて I 型コラーゲンに特異的に結合する RNA アプタマーの取得を目指した。SELEX は標的に結合する核酸 (RNA) を段階的に濃縮する方法である。初めにランダムな配列を持つ RNA プールを出発材料とし、標的に結合した RNA を回収して増幅する。この増幅された RNA を次のプールとし、再び標的に結合させて回収、増幅する。これを繰り返すことで、標的に結合する RNA アプタマーを濃縮する。具体的には、40 塩基のランダム領域を 22 塩基の固定領域 (プライマー領域) 2 つで挟んだ RNA プールを設計し、選択圧を強化させつつ 8 ラウンドの SELEX を行った。

8 ラウンドの SELEX を終えた後、RNA 配列の濃縮の様子を見るため、SELEX 前後のシーケンス解析を行い、ランダム領域の長さや配列を比較した。シーケンス解析の結果、SELEX 前の核酸プールを増幅した段階で、すでにランダム領域が設計した 40 塩基より短い RNA 集団がドミナントになっていたことがわかった。配列の相同性に関しては、SELEX 前ではランダムな配列であったものが、SELEX 後では 6～8 塩基の部分的に同じ配列が 6 グループ見られた。今回標的としているコラーゲンは複数のエピトープを提示できる巨大な分子であるため、いくつかのグループに収束しているのは妥当な結果であると考えられる。しかし、当初設計した RNA よりも短い 20-mer 程度のものがほとんどであるため、高アフィニティー、高選択性をもったアプタマーを取得するためには再度のトライアルが必要と考えられる。

○研究成果の公表

該当なし

【ゲノム編集技術を用いた椎間板機能の恒常性維持機構の解明】

○研究代表者 広島大学大学院医歯薬保健学研究科 宿南 知佐 教授

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者 生体分子設計学分野 開 祐司 教授
滝本 晶 特定助教

○研究経過及び研究成果

椎骨を連結し力学的負荷を緩衝する椎間板の弾力性は、Aggrecan (Acan) のようなプロテオグリカンが水を保持することによって生じる。本共同研究では、Transcription activator-like effector nuclease (TALEN) を用いたゲノム編集により、Paired box gene (*Pax*) 1 と *SRY-Box9* (*Sox9*) によって制御される *Acan* の転写制御領域 (*enAcan*) を改変したマウスを作出し、*enAcan* の機能を *in vivo* で解析

した。

本共同研究では、まず TALEN を用いたゲノム編集により、359 bp の *enAcan* (図 1) に存在する Sox9 と Pax1 の結合部位を標的として、マウスのゲノム DNA に変異・欠失を導入した。その結果、標的領域に変異・欠失が導入された 35 頭のファウンダーマウスが得られた。この中から、Sox9 及び Pax1 の結合部位と欠失塩基数を考慮し、表 1 に示す 5 種類のマウス系統を確立した。

次に、各マウス系統の肋骨及び尾椎の椎間板線維輪における *Acan* の発現レベルを、リアルタイム PCR 法により解析した。各遺伝子型 (*enAcan*^{+/+}、*enAcan*^{+/-}、及び *enAcan*^{-/-}) の 3 週齢の雄性マウス 3 頭又は 4 頭から抽出した total RNA は、逆転写反応後リアルタイム PCR により解析し、One-way analysis of variance 法により有意差検定を行った。その結果、欠失塩基数が 13 bp の系統 A 及び 33bp の系統 B では、肋骨及び椎間板線維輪のいずれにおいても、各遺伝子型の間で *Acan* の発現レベルに有意な差が認められなかった。一方、105bp を欠失した系統 C の *enAcan*^{-/-} では、椎間板線維輪の *Acan* の発現レベルが *enAcan*^{+/+} と比較して約 16% 低下していた ($P < 0.01$)。しかし、系統 C の肋骨では、各遺伝子型の間で *Acan* の発現レベルに差は認められなかった。また、133bp を欠失

```

1  GTCCAGAATGGAAGGGACCAAGGTGCCAGGGATGACCAATCCCTCAAGAA
51  TCCCCCTGGAAACTCCTCCCTGGAGACACCCTTCCCCAGAATAGGCAAGG
101 AGGGCTAGAAACACCCACATAAACAGCGCATCCACAAAACCCCACTGTCC
151 CCAGGCTTTCCTCCCTCAGCCCTTGCTATTTTTATCTGGAGAGCAAGAGG
201 GGGTTGCCAGGCAGGGCCACGCCGCTGTTTATGTCTGAAATTTGAAAAGA
251 TGCACAGTGTACTTGGGAGAAGGCGTTGCAGGGAAAGGAATTTGAGAGAA
301 TTTCAAACCTGGCAGGGTGAAATAGGTGCCTTGTGTTCAGGCTTATGACTC
351 TGGAAAAGCTACTCAACCCATGGCATGAAGAGGGGCCATGGACGGGTGCA
401 AATGCCACGTGTGAGATTTGGGATAGATGGAGACTCAGTTTACCTGGCT
451 GAGGGGATCAACCGATCTCAGACTGGGGTGCTTTGTGAGGAAGTCCTTCT
501 ACCCCCGAATAACACTTCTCTTTATGGCTTCCACATTGACACTTGAGTAT

```

図 1. *enAcan* (下線) を含むマウスのゲノム領域の配列

TALEN 標的配列 (青囲み線) は、Sox9 結合部位 (赤) とその近傍の Pax1 結合部位を取り囲む領域に設計した。

表 1. TALEN によるゲノム編集により得られた *enAcan* の部分欠失マウス系統

| マウス系統 | 欠失領域* | 欠失塩基数 (bp) | 欠失した結合部位 |
|-------|---------|------------|-----------|
| A | 320-332 | 13 | Sox9 |
| B | 320-352 | 33 | Sox9・Pax1 |
| C | 310-414 | 105 | Sox9・Pax1 |
| D | 198-330 | 133 | Sox6・Sox9 |
| E | 325-532 | 208 | Sox9・Pax1 |

* 欠失領域は、図 1 の塩基配列の数で示している。

した系統 D の *enAcan*^{-/-} では、*Acan* の発現レベルは肋軟骨において約 34%、椎間板線維輪において約 28% 低下していた (いずれも $P < 0.001$ vs. *enAcan*^{+/+})。本報告書作成時点で解析が終了していない系統 E についても、試料の収集を進め、今後解析を行う予定である

enAcan には転写因子 Sox5、Sox6、及び Sox9 が結合し、これにより *Acan* の組織特異的発現が強力に誘導されることが明らかになっているが (Mol Cell Biol 28, 4999-5013, 2008)、本共同研究の結果から、Sox9 の結合部位のみを欠失させることによっては、*Acan* の発現レベルは有意に変化しないことが明らかになった。研究代表者は、ゲノム編集技術を用いて 359 bp の *enAcan* 全体を欠失するマウス系統の作出にも着手しており、これによって軟骨及び椎間板線維輪における *enAcan* の役割がより明確になるものと期待される。

○研究成果の公表

(学会発表)

“Regulation of intervertebral disc development by Pax1 and Sox9.” Chisa Shukunami (invited speaker), Cartilage Biology and Pathology (Gordon Research Conference). Renaissance Tuscany Il Ciocco Lucca (Barga), Italy, April 4, 2017.

【再生現象を顕微鏡レベルで可視化する超高解像度磁気共鳴イメージング技術の開発】

○研究代表者 放射線医学総合研究所分子イメージング診断治療研究部

青木 伊知男 チームリーダー

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者 生体材料学分野 田畑 泰彦 教授

○研究経過及び研究成果

組織再生誘導を効率的に行うためには、再生過程を顕微鏡レベルの解像度で三次元的に可視化する技術の開発が必要である。本研究では、高感度高周波コイルを用いた高磁場磁気共鳴画像装置 (MRI) による超高解像度 MRI 技術と再生研のもつ組織工学材料・ナノプローブ作製技術を融合、骨再生過程、とりわけ血管新生を詳細に可視化する技術を開発するものである。

超高解像度磁気共鳴イメージング (マイクロ MRI) は、通常の MRI に次の 3 つの技術を加える事で達成した。高い磁場強度 (1 テスラ装置に比較して約 7 倍の信号雑音比 (SNR))、低温により熱ノイズを抑える冷却高周波コイル (通常のコイルに比較して約 3 倍の SNR)、さらに血管滞留型の高分子造影剤 (撮像時間の短縮、積算回数数の増加により 2 ~ 3 倍程度の SNR 増大、および血管外への漏出が少ないことによる血管内外のコントラスト増大)。

In vivo での実証実験は、次のように実施した。骨形成因子 (BMP) -2 または対照となる生理食塩水を含浸したゼラチンハイドロゲルを Slc:ddY マウス背部皮下へ埋入し、異所性の骨形成を誘導した。骨形成誘導後、マイクロ MRI を用いて経時的に微小血管の撮像を行った。MRI 撮像は、7T 前臨床装置 (Bruker Biospin, Avenice-III) および 2ch フェイズドアレイ冷却コイルを用いて、血管造影剤法 (MR angiograph, 3D FLASH) にて、直後、7、14、21 日後に撮像し、その後、組織を摘出した。

結果: 50 μ m 等方性空間分解能による血管造影マイクロ MRI のシステムが構築され、異所性骨再

生モデルに適用可能となった。また、ゼラチンハイドロゲルによる BMP-2 徐放化モデルと、PBS 対照モデルを比較したところ、BMP-2 では移植後 7 日後に、ゲルに接触する血管が複数観察された。BMP-2 では移植後 14 日後に、非常に細く高密度な血管群（またはゆっくりと流れる貯留水）が、広い領域で観察された。

本手法は、再生過程における血管新生の経時変化を *in vivo* で非侵襲的に観察する手法として有用と考えられた。今後は、初期に誘導される血管密度あるいは血流が骨形成に与える影響について、組織学的評価も含めて検討していく予定である。

○研究成果の公表

(発表論文)

1. Wells JA, Thomas DL, Saga T, Kershaw J, Aoki I. MRI of cerebral micro-vascular flow patterns: A multi-direction diffusion-weighted ASL approach. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2016 Jul 26. pii: 0271678X16660985. PubMed PMID: 27461904. (マイクロ MRI の開発段階における成果)

(学会発表)

1. 青木伊知男、高磁場 MRI による細胞標識とマイクロイメージングを用いた炎症再生評価、第 37 回日本炎症・再生医学会、平成 28 年 6 月 16～17 日、京都
2. 青木伊知男、高磁場 MRI と機能性造影剤による小動物 *in vivo* イメージング、第 63 回日本実験動物学会総会・ミニシンポジウム「実験動物 *in Vivo* イメージング技術の展開」、ミューザ川崎、2016.5.20
3. Ichio Aoki, Functional and Theranostic Contrast Agent, Japanese Society for Magnetic Resonance in Medicine, JSMRM-KSMRM joint symposium、大宮ソニックシティ、2016.9.10
4. Ichio Aoki, Functional and Theranostic Contrast Agents for MRI, The 18th Northeastern Asian Symposium on Molecular Imaging-based Precision Medicine (A3 Molecular Imaging symposium), JSPS-NSFC-NRF, Eastern Cloud Hotel, Hangzhou, China. 2016.11.12
5. Ichio Aoki, Approach to Multiscale Imaging using Micro-MRI and Functional Contrast Agents. International Symposium on Multimodal Medical Engineering (MME), Chiba University, 2017.3.3

(特許出願)

1. 「放射線等を用いた生理活性物質の活性制御方法、及び生理活性物質包含放射線等刺激応答性ゲル」特願 2016-092524、村山周平、青木伊知男、城潤一郎、佐賀恒夫、国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構、日本、特願 2016-092524

(共同研究課題が発展したプロジェクト等)

1. 文科省科学研究費・基盤 A、5 年間。ウイルス・再生医科学研究所・田畑教授と共に「機能性ナノ・マンガン造影剤開発による「マンガン染色 -MRI 病理解析法」の創成」という題名で応募し採択された。

【病態解明のための構造制御されたバイオマテリアルを用いた培養肺高血圧症血管モデルの構築】

- 研究代表者 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 狩野 光伸 教授
- ウイルス・再生医科学研究所共同研究者 生体材料学分野 山本 雅哉 准教授
- 研究経過及び研究成果

本研究では、主として、以下の2つの研究項目について研究を行った。

研究項目①構造制御されたバイオマテリアルを用いた管腔構造の形成

構造制御されたバイオマテリアルとして、刺激応答性バイオマテリアルからなるテンプレートを作製した。まず、刺激応答性バイオマテリアルとして、細胞傷害性の少ないソルビトールに反応して水に対する溶解性が変化する m-アミノフェニルボロン酸 (APBA) 導入ゼラチンを合成した。得られた APBA 導入ゼラチンを水に溶解させ、濃度の異なる APBA 導入ゼラチン水溶液に対する貯蔵弾性率 (G') および損失弾性率 (G'') の温度変化を測定した。各濃度における G' および G'' の交点の値から APBA 導入ゼラチン水溶液のゲル化温度を算出したところ、10, 20, および 35 wt% の APBA 導入ゼラチン水溶液のゲル化温度は、それぞれ 47.5, 59.8, および 64.3 °C であることがわかった。これらの温度で高精度デジタルディスペンサーから APBA 導入ゼラチンを吐出することにより、Y字型に構造制御されたテンプレートを作製することができた。次に、得られたテンプレートに正常血管由来細胞を接着させ、それをコラーゲンゲルに包埋した。所定期間培養後、培地にソルビトールを添加したところ、テンプレートが除去され、正常血管由来細胞がコラーゲンゲル内にテンプレートと類似の形状で転写されていることがわかった。

研究項目②肺高血圧症血管由来平滑筋細胞の培養

研究項目①で作製したテンプレートに肺高血圧症血管由来平滑筋細胞を播種し、正常血管内皮細胞と同様にコラーゲンゲル内に包埋した。培地にソルビトールを添加したところ、正常血管内皮細胞と同様に、肺高血圧症血管由来平滑筋細胞をコラーゲンゲル内に転写することができた。一方、転写効率は必ずしも高くなく、技術的な改善の余地があることもわかった。今後の研究課題として、研究を継続していく予定である。

○研究成果の公表

- ① 村谷誠司、山本雅哉、狩野光伸、田畑泰彦：糖応答性ハイドロゲルを用いた血管様分岐型管腔構造の作製。日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016 (2016年11月21日、福岡)
- ② 村谷誠司、山本雅哉、狩野光伸、田畑泰彦：糖応答性ハイドロゲルを用いた分岐型血管様構造の作製。第16回日本再生医療学会総会 (2017年3月7日、仙台)

【細胞間相互作用の制御にもとづく単個細胞から細胞凝集塊への形成過程のタイムラプス解析】

- 研究代表者 福井大学大学院工学研究科 藤田 聡 准教授
- ウイルス・再生医科学研究所共同研究者 組織修復材料学分野 有馬 祐介 助教
- 研究経過及び研究成果

本研究では、単個細胞が相互作用し、集合体を形成していく動的なプロセスを、細胞の移動性を前後方向に限定した二次元細胞遊走モデルを用いてタイムラプス解析することで解析することを目指した。これにより細胞の凝集過程を定量的に表現し、細胞から組織が構築される動的原理の統合的理解につなげる。そのアプローチとして、エレクトロスピニング法で紡糸したポリスチレンの微細ファイバーを用いた。このファイバー上に細胞接着分子を固定化したのち、細胞を播種し、タイムラプス顕微鏡で遊走のムービーを取得した。ムービーを画像解析することにより、ファイバー上に接着する細胞の伸展および遊走速度を定量化した。

まず、軟骨細胞での細胞遊走挙動の解析を試みた。その結果、細胞間相互作用が細胞と基材の相互作用よりも強固であるため、細胞同士がすぐに強い凝集塊を形成し、基材であるファイバーにほとんど接着しなかった。そこで以降の検討では、ヒト由来線維肉腫細胞株 HT-1080 を用いた。

腫瘍細胞の多くは上皮組織に由来する。ここで上皮間葉転換 (EMT) が誘導されると、細胞極性の喪失や細胞形態、細胞接着分子の変化などの細胞の性質に大きな変化が見られ、浸潤能の獲得などに影響を与える。一般的に EMT の誘導により Cadherin 依存性の細胞同士の接着から Integrin 依存性の細胞 - 細胞外マトリクス (ECM) 間の接着へと変化することが知られている。このプロセスは単個細胞が凝集塊を形成する場合と逆の過程でありこれを理解することは、単個細胞から細胞凝集塊へと移行していくプロセスと本質的に同等の現象だと推察される。そこで、ファイバー上での細胞遊走プロセスについて、細胞間接着を模した Cadherin 依存のもと起こる場合と、細胞 - ECM 間接着を模した Integrin 依存のもと起こる場合でどのように違うかを比較した。

Cadherin の微細ファイバー上への固定化には、IgG の Fc 部と E-cadherin (E-cad) を結合させた E-cad-Fc キメラタンパクを用いた。このキメラタンパクは疎水性に富んだ Fc 部分を有することから、疎水性の高いポリスチレンなどの材料と疎水性相互作用により強く吸着し、材料表面には E-cad が配向方向を揃えて固定化される。Integrin 依存のもとでの細胞培養には、Fibronectin (FN) 固定化ファイバーを用いた。細胞の接着部位を解析するためにアクチン繊維と裏打ちタンパク質の免疫染色を行った。E-cad 依存性接着は β -catenin を染色、Integrin 依存性接着は Paxillin を染色、アクチン繊維は蛍光標識された Phalloidin で染色することで観察した。

その結果、FN 上の細胞は長い仮足を伸展させているのに対し、E-cad-Fc 上の細胞は丸い形状で接着しており、仮足は伸びていなかった。次に、観察開始から 6 時間に渡る細胞の長さや速度を比較検討したところ、FN 上の細胞は移動の際、細胞が伸展と退縮を繰り返している事がわかった。細胞がアクチン繊維の張力を駆動力にして移動する際にファイバー上でこうした移動形態をとると考えられる。一方で E-cad-Fc 上の細胞は細胞の伸展退縮や移動はほとんど見られなかった。

次に FN, E-cad-Fc 上の細胞のアクチン繊維と接着部位を免疫染色により観察した。その結果、FN 上の細胞ではアクチンのストレスファイバーの形成が見られたが、E-cad-Fc 上の細胞はストレスファイバーの形成は見られず、アクチンは皮質部分にしか存在していなかった。また、接着部位に局在するタンパク質染色では、FN 上の細胞には顕著な Paxillin 発現が見られ、基材に対して Integrin 依存で接着している事がわかった。一方で、E-cad-Fc 上の細胞は Paxillin の発現が見られなかったことから、基材に対しての接着に Integrin の寄与は少ない事が考えられる。また、 β -catenin の染色像では、E-cad-Fc 上の細胞のみに β -catenin の強い発現が見られたことから、基材に対する E-cad 依

存接着がおき、それによって β -cateninの増加が起きたと考えられる。さらに、これらの細胞の形態や接着タンパクの発現量は、ファイバーへの接着時間に大きく依存することもわかった。ここまでで、単個細胞における接着タンパク質の違いによる影響を見ることができたため、今後は、複数細胞の遊走挙動をより詳細に解析していく。

また、細胞集団の遊走挙動解析へ向け、細胞間接着の制御による細胞塊形成についても検討した。細胞表面修飾材（単鎖DNA-ポリエチレングリコール-脂質複合体）を用いることで細胞表面を単鎖DNAで修飾することができる。他方の細胞を相補DNAで修飾することで、細胞間の接着を誘導することができた。さらに、細胞間接着を誘導する分子として、単鎖DNAの代わりにE-カドヘリン細胞外ドメインについても検討した。細胞表面をE-カドヘリン修飾することで、同種細胞間の接着を誘導し細胞塊を形成することができた。これにより、上述のファイバー-細胞間でのカドヘリン相互作用に加え、細胞-細胞間でのカドヘリン相互作用も人工的に誘導できることが分かった。細胞集団の遊走挙動解析のためには一定サイズ（細胞数）の細胞塊を形成させることが必要であるため、今後は細胞塊サイズを制御する条件検討を行っていく。

○研究成果の公表

1. Analysis of cell migration on a single fiber immobilized with Fc-cadherin, R. Hayamizu, S. Suye, T. Akaike, S. Fujita, *9th International Conference on Fiber and Polymer Biotechnology*, Osaka (2016)
2. Fc-カドヘリン固定化ファイバー上での細胞遊走挙動の解析, 早水 亮貴, 末 信一郎, 赤池 敏宏, 藤田 聡, 第 65 回高分子学会年次大会, 神戸 (2016)
3. 神経膠芽腫細胞遊走におけるミトコンドリア動態のシングルファイバーを用いた解析, 河合 佑介, 竹内 綾子, 藤田 聡, 松岡 達, 第 63 回中部日本生理学会, 岡崎 (2016)
4. Fc-カドヘリン固定化ファイバー上での細胞遊走挙動の解析, 早水 亮貴, 末 信一郎, 赤池 敏宏, 藤田 聡, 平成 28 年度高分子学会北陸地区若手研究会, 福井 (2016) (優秀ポスター賞)
5. カドヘリンの勾配を表面に有するファイバー上での細胞遊走解析, 早水 亮貴, 赤池 敏宏, 末 信一郎, 藤田 聡, 日本バイオマテリアル学会第 5 回北陸信越若手研究発表会, 長岡 (2016)
6. Control of multicellular aggregate structure using cell surface modification with recombinant proteins. Y. Arima, Y. Hirai, H. Iwata, *10th Anniversary International Symposium on Nanomedicine (ISNM2016)*. Tsukuba (2016)

【遺伝子トラップ・エンハンサートラップ法を用いた神経細胞-支持細胞相互作用の解明】

○研究代表者 国立遺伝学研究所 川上 浩一 教授

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者 再生増殖制御学分野 瀬原 淳子 教授

○研究経過及び研究成果

中枢・末梢神経系の神経細胞は、オリゴデンドロサイトやアストロサイト・シュワン細胞などの支持細胞集団とともに脳を構築・維持する。我々は、世界に先駆けて遺伝子トラップ法・エンハンサートラップ法による神経回路網の可視化、及びその形成に関与する遺伝子の大規模スクリーニン

グと解析を行い、神経回路構築に重要なはたらきをする分子を同定しつつあるが、それと同時に、脳回路形成におけるこれら支持細胞の役割や機能にも着目している。

そこで、神経系周辺の多様な細胞集団を可視化し、新規の神経系支持細胞の同定・支持機構の解明によって脳構築・維持の新たな機構を明らかにしたいと考え、支持細胞をマークできる遺伝子トラップフィッシュをスクリーニングしてきた。それらの遺伝子トラップフィッシュを利用して、また、増殖因子とそのプロテアーゼによる制御の観点から発生・再生における細胞間相互作用を研究している瀬原グループと共同研究をすることによって、グリアその他の支持細胞と神経細胞の相互作用のタンパク質レベルでの解明を試みてきた。このような試みの中で、これまでに、視覚情報の中枢である視蓋の神経幹細胞を可視化できるエンハンサートラップを用いた神経分化の研究 (Sato, T., *et al. PLoS One* 10, e0127360. (2015))、グリア細胞が可視化されるエンハンサートラップを用いた側線神経系構築に関する研究 (Xiao, Y., *et al. Disease Models & Mechanisms* dmm.018184 (2015)) について共同研究を行い、これらに関してはすでに2015年に2つの論文を発表した実績がある。

本研究ではあらたに、主にふたつの観点から研究に取り組んだ。ひとつは、グリア細胞の増殖因子制御、ひとつはエンハンサートラップラインの挿入部位遺伝子として同定された転写因子の役割に焦点を絞った研究である。

グリア細胞の増殖因子制御

まず、運動神経で発現し支持細胞であるシュワン細胞の増殖・分化を制御する増殖因子を可視化し、支持細胞と神経細胞の相互作用の観点から脳構築機構の解明を目指した。この増殖因子は、グリア増殖因子とも呼ばれる ErbB リガンドで、中枢・末梢神経系においては主に神経細胞で産生され、その支持細胞として神経の軸索をミエリン化するグリア細胞に作用し、それらの移動、生存や分化の促進に関わる。しかし、この増殖因子の活性が、ミエリン形成やシナプス形成を時間的空間的に制御できるのは、どのような仕組みによるのかは不明である。そこで、そのような時空間的制御が、①グリア増殖因子の転写の時空間的特性に基づく制御によるのか、それとも②神経細胞内でグリアを軸索上で効率よくミエリン化すべく、グリア増殖因子の局在化が制御を担うのか、それとも、③この増殖因子は、細胞外ドメインが切断される、いわゆるエクストドメインシェディングを受けることから、そのような翻訳後制御が支持細胞の移動や分化を時間的空間的に制御しているのか、これらの疑問を解決すべく、瀬原グループと共同して、グリア増殖因子の可視化プローブを作成した。

このプローブは、グリア増殖因子の細胞外領域を mCherry、細胞内領域を GFP で標識したもので、N-CISSOR と命名された。まず、培養細胞 HEK293T 細胞を用いて、N-CISSOR の細胞表面上での分布、Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) 刺激により誘導される切断動態、および受容体である ErbB3 をリン酸化させる生理活性などを調べ、N-CISSOR がグリア増殖因子の細胞表面への分布や切断を正しく再現することを確認した。次に、個体中での NRG1 の切断を評価するため、N-CISSOR をゼブラフィッシュ胚で神経細胞特異的に発現させた。エンハンサートラップラインとして、CaP 運動神経特異的に Gal4 が発現するトランスジェニックライン Tg (SAIGFF213A) を確立し、それを、その Gal4 に依存して NCISSOR を発現するライン Tg (5 × UAS:N-CISSOR) とかけ

合わせることによって、単一神経細胞内での NCISSOR の分子動態の観察を実現し、その切断を可視化・計測することに成功した。その結果、グリア増殖因子は、運動神経細胞において細胞体よりも軸索で優先的に切断されること、そしてその切断はメタロプロテアーゼあるいはセリンプロテアーゼのひとつ BACE により制御されていることがわかった。この結果は、グリア増殖因子によるグリア細胞の活性化制御機構のひとつとして、増殖因子のエクトドメインシェディングの時間的空間的制御が関与していることを示したものである (Kamezaki A *et al.*, *Sci. Rep.*, 2016)。

神経系・血管系組織構築に関わる新たな分子機構の解明

一方、側線神経のターゲットである有毛細胞をもつ感覚受容器（側線）で発現する 2 系統に関してトランスポゾン挿入部位の遺伝子を同定したところ、転写因子をコードすることがわかった。この遺伝子に関して解析したところ、神経組織の形成のみならず血管系形成にも必須の役割を果たすことがわかってきた。photoconversion 型蛍光タンパク質で細胞集団をラベルするなどの方法で、その細胞系譜を検討するとともに、CRISPR-Cas9 システムを用いてこの転写因子のノックアウトゼブラフィッシュを作成し、神経分化や血管形成・維持に関与する分子機構・細胞間相互作用を解析中である。また、コンディショナルノックアウトマウスの作成にも取り組み、その役割がマウスで保存されているかどうかを現在瀬原グループで検討中である。今後この遺伝子の役割と、神経系・血管系組織構築に関する新たな知見が得られることが期待される（未発表）。

○研究成果の公表

(発表論文)

Visualization of Neuregulin 1 ectodomain shedding reveals its local processing in vitro and in vivo.

Kamezaki A, Sato F, Aoki K, Asakawa K, Kawakami K, Matsuzaki F, Sehara-Fujisawa A. *Scientific Rep.* June ; 6:28873. DOI:10/1035/srep28873 (2016)

(学会発表)

(口頭)

Kamezaki, A., Sato, F., Aoki, K., Aoki, K., Asakawa K., Kawakami, K. and Sehara-Fujisawa A. Live cell imaging and proteomic approaches shed light on novel aspects of ectodomain shedding in developing neurons. Joint Meeting of the German and Japanese Societies of Developmental Biologists, Kiel, Germany, 15-18 March 2017, 2017.

Kamezaki, A. Development of a fluorescent probe to monitor NRG1 ectodomain shedding in vitro and in vivo. JSDB Special Symposium. Tokyo, June 2, 2016.

(特許)

発明者：瀬原淳子、亀崎青沙、佐藤文規、青木一洋、川上浩一

権利者：京都大学（京大番号：5315）

発明名称：NRG1 の切断検出用プローブ、NRG1 の切断検出用プローブをコードするポリヌクレオチド、NRG1 の切断検出用プローブの発現ベクター、NRG1 の切断検出用形質転換体、NRG1 の切断検出方法、および NRG1 切断酵素の阻害剤のスクリーニング方法

出願番号：特願 2016-053156

出願日：2016年（平成28年）3月16日

【遺伝子改変多能性幹細胞を用いた網膜芽細胞腫及び二次がん発生機構の解明】

○研究代表者 国立がん研究センター中央病院 森 泰昌 医員

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者 組織再生応用分野 戸口田 淳也 教授

○研究経過及び研究成果

RB1 遺伝子の経配偶子性変異 (RB1^{+/+}) を原因とする遺伝性両眼性網膜芽細胞腫患者由来 iPS 細胞の作製と解析を目的として、患者由来 iPS 細胞作製とゲノム解析ならびに iPS 細胞バンクへの寄託のための倫理申請を完了した。本研究期間内において2例の両眼性網膜芽細胞腫の患者血液ならびに組織から体細胞における RB1 遺伝子のゲノム変異、ならびに腫瘍細胞のゲノムにおける対側アレルの二次性変異領域を特定した。その結果、これら2例の RB1 遺伝子変異は、いずれも経配偶子性変異及び体細胞性変異が異なるフレームシフト変異であることが判明した。現在 iPS 細胞作製を京都大学にて進めている。

本研究の目的である網膜芽細胞腫及び二次がん発生機構の解明の為、まず網膜芽細胞腫の患者について発症までの期間、再発、転移、治療法と二次がんの部位、腫瘍の分化度等病理学的分類、瘍形成性、二次がん発症の有無、と RB1 遺伝子変異パターンの解析を106例の網膜芽細胞腫を対象として行った。その結果、ゲノム変異は RB1 エクソン上のほぼ全領域で認められた。また蛋白構造やドメインに関連した特異的な集積は見られなかった。遺伝性、非遺伝性あるいは両眼性・片眼性の比較においては、遺伝性にフレームシフトやスプライシング変異が多く、非遺伝性ではミスセンス/インフレーム変異がやや多い傾向が示された。また片眼性・非遺伝性では変異の指摘できない症例もわずかに含まれた。

次に網膜芽細胞腫で発現する分子について病理組織検体を用いた免疫組織化学染色ならびに RNA in situ hybridization を用いて解析を行った。蛋白発現として哺乳類における眼発生に関連する分子 SOX2, Bmi1, CRX, OTX1/2, Rhodopsin 等について検索を行った。その結果、Bmi1, CRX, OTX1/2 は、ほぼ全ての症例に強い陽性像を示した。一方、SOX2 はほぼ全ての症例ではあるものの、陽性細胞はごく少数に留まった。これらは形態学的に比較的均一に見られる腫瘍内の分化勾配が示された。また Rhodopsin は非常に分化度の高い（正常網膜に類似した）腫瘍の一部にのみ発現が見られた。さらに本解析からこれまで報告のない2種の新規蛋白（分子 X, Y）の発現があることを発見した。特に網膜芽細胞腫瘍特異的で背景の正常網膜には発現が見られない分子 X について、RNA 発現も含め多数症例で詳細に解析し、確認を行い再現性が見られた。この結果治療ターゲット候補分子 X を得た。さらに分子 X の直接的なターゲット探索のため、クロマチン免疫沈降法と次世代シーケンサーによる解析により、分子 Z を発見した。Z はメチルトランスフェラーゼであり、プロモーター領域に分子 X のモチーフを有することを明らかとした。

今後、前述した現在作製中の患者由来 iPS を対象に、残った正常アレルをゲノム編集にて壊し

RB1 遺伝子 null⁺細胞を作製する。これらの細胞を既知の方法により神経あるいは骨へ分化した際の同定したターゲット候補分子 X の発現の有無を解析する。さらに網膜ならびに間葉系細胞への分化誘導と in vitro, in vivo 双方で腫瘍化能の有無を解析する。腫瘍化が見られた場合、候補分子 X のカスケードの阻害から腫瘍化抑制の可否について検討を行う。

○研究成果の公表

現在論文投稿準備中

【膵内分泌腫瘍の新規がん抑制遺伝子 PHLDA3 の機能抑制を利用した膵島移植効率向上法の確立】

○研究代表者 国立がん研究センター研究所 大木 理恵子 ユニット長

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者 臓器・器官形成応用分野 角 昭一郎 准教授

○研究経過及び研究成果

研究代表者は PHLDA3 研究の第一人者である (Cell, Vol. 136, pp. 535-550, 2009 など)。また、一方で角昭一郎准教授は膵島研究の第一人者であり、本共同研究を行うことで分野の垣根を越えた融合領域の研究が推進可能となる。また、膵島移植の専門家である坂田直昭助教も研究チームに加え、膵島を用いた膵島移植実験を行う。お互いの得意分野を生かす事で、必ず糖尿病治療に結びつく、実り多い研究成果が得られると考えており、これまでに京都大学再生研共同研究として支援されている研究を PNAS に投稿し受理された (PNAS, 111 (23), E2404-E2413, 2014)。また、本研究課題に関わる特許を出願した (移植材料及びその調製方法、特願 2014-107529、PCT/JP2015/064792)。

膵島移植の際の最大の課題は、未だ低率の移植成績を向上させる事にあるが、現行の膵島分離法では、膵臓の消化による膵島への障害などにより、100% の膵島を確保する事は不可能である。加えて、分離された膵島は膵臓消化の影響で無血管状態となり虚血にされされる事、膵島分離行程により酸化ストレスが惹起され膵島を障害する事などの理由から膵島のアポトーシスが誘導され、分離後よりその数は減少し、インスリン分泌能は著しく低下する。さらに、移植後 (現行の方法では門脈内に直接投与する) には、血液凝固反応などによって惹起される炎症反応物質・細胞の影響や膵島自身が末梢門脈を塞栓する事で移植部位の虚血が助長される事により、移植した膵島の大部分が早期に失われる。われわれは門脈内移植された膵島の約 60% が失われる事を既報にて確認しており (Islets, 1 (1), 26-33, 2009)、このような膵島の脆弱性に PHLDA3 促進的に関与することも解明している (PNAS, 111 (23), E2404-E2413, 2014, Sakata N, et al, submitted)。

我々は、これまで機能未知であった PHLDA3 遺伝子が、p53 によって誘導される遺伝子である事を見だし、PHLDA3 が p53 による Akt 抑制を担う重要な遺伝子である事を世界で初めて明らかにした (Cell, Vol. 136, pp. 535-550, 2009)。PHLDA3 遺伝子は、細胞膜に存在するイノシトールリン脂質 (PIPs) との結合に働く PH ドメインのみから構成されるタンパク質をコードしている。一方、Akt も PH ドメインを持つタンパク質であり、活性化には PH ドメインを介して細胞膜に局在する事が必須である。PHLDA3 は、Akt のいわば内在的に発現する dominant negative 体として機能し、Akt と PIPs との結合を直接阻害する。その結果、Akt の細胞膜局在は阻害され、下流の生存シグナルは伝達されない (Fig. 1)。

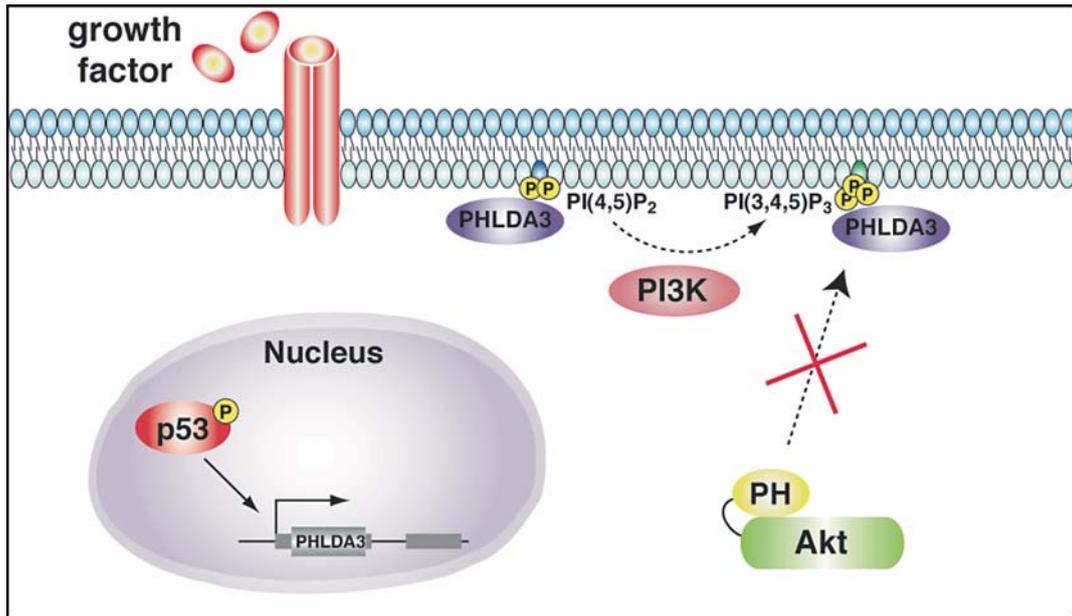


Fig.1 p53によってPHLDA3が誘導されると、PHLDA3は細胞膜上のPIPsと結合し、結果として、Aktは膜移行と活性化が阻害される。

がん抑制において、非常に強いがん化促進能を持つAktの活性を制御する事はとても重要である。実際にPHLDA3の発現を抑制した細胞ではAktの異常な活性化が認められるとともに、細胞ががん化（足場非依存性の増殖能を獲得）している事が示され、PHLDA3はがん抑制能を有する事が示された。さらに、ヒト肺及び膵内分泌腫瘍においてPHLDA3遺伝子の高頻度な欠損が認められた。これらのがん組織では正常組織と比較してPHLDA3の発現低下とAkt活性の上昇が認められ、PHLDA3が内分泌腫瘍のがん抑制遺伝子として機能していると考えられた。

一方で、PHLDA3が膵内分泌腫瘍のがん抑制遺伝子であるという事から、PHLDA3が膵内分泌細胞の増殖を制御するのではないかと考え研究を進めている。これまでに膵島β細胞由来の細胞株RIN細胞、正常膵島細胞を用いて、膵β細胞においてPHLDA3が細胞増殖とAkt活性を抑制している事を明らかにした。

さらにはPHLDA3欠損マウスにおいて膵島の過形成が認められており、PHLDA3は膵島細胞の増殖を抑制する事が示された (Fig. 2)

これまでに角昭一郎准教授との共同研究によって、分離膵島から得た膵島細胞を用い (Fig. 3)、PHLDA3が膵島細胞において細胞増殖の抑制、アポトーシス誘導に機能する事を明らかにした。

また、PHLDA3欠損マウスを用いて実験的に一型糖尿病を引き起こすと、PHLDA3欠損マウスでは野生型マウスに比べ、顕著に血糖値の上昇が抑えられている事が示され (Fig. 4)、マウス生体内

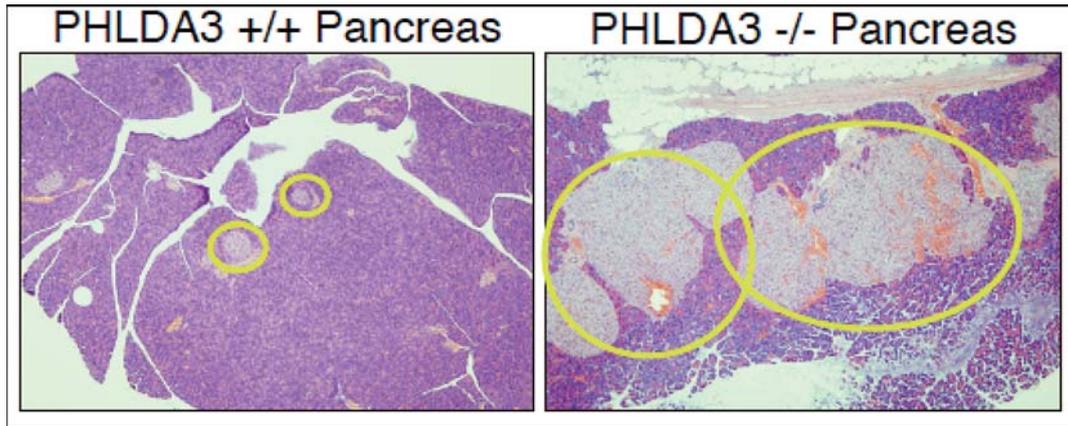


Fig.2 同腹の野生型マウスとの膵臓組織の比較。PHLDA3 欠損マウスでは膵島が異常に大きい。

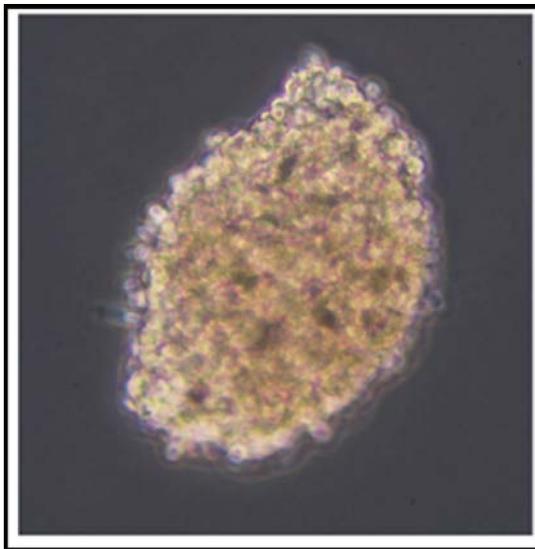


Fig.3 分離した rat 膵島

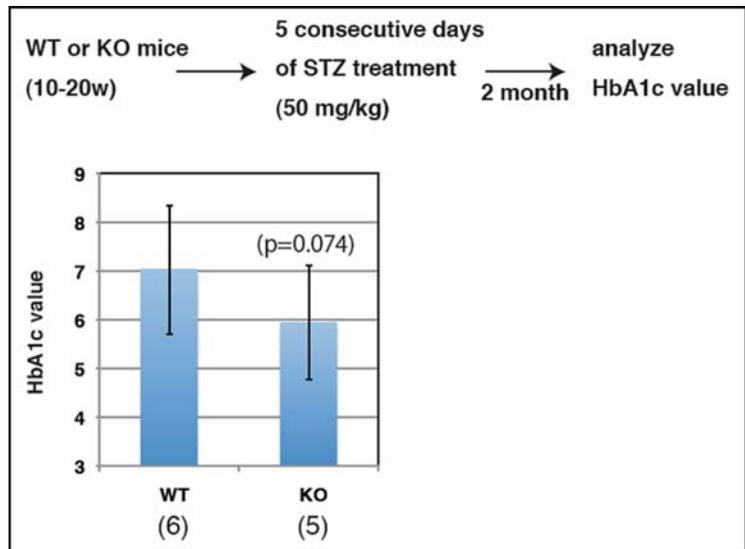


Fig.4 PHLDA3 KO マウスでは、STZ 誘発性の高血糖が抑制される。

においても PHLDA3 が膵島細胞の増殖、アポトーシスを制御する事が示された。

今後さらに膵島機能に PHLDA3 がどのように関わるのか解析を進める事で、糖尿病研究、膵島移植に役立つ成果を得る事が可能である。さらには PHLDA3 機能を抑制した膵島を作り出し、再生医療の分野に役立てたいと考えている。

○研究成果の公表

(発表論文)

1. Sakata N, Yamaguchi Y, Yoshimatsu G, Unno M, Sumi S, Ohki R. PHLDA3 Deficiency Improves Islets Engraftment through the Suppression of Hypoxic Damage. submitted.
2. Ezawa I, Sawai Y, Kawase T, Okabe A, Tsutsumi S, Ichikawa H, Kobayashi Y, Tashiro F, Namiki H,

- Kondo T, Semba K, Aburatani H, Taya Y, Nakagama H, Ohki R. Novel p53 target gene FUCA1 encodes a fucosidase and regulates growth and survival of cancer cells. *Cancer Sci.* 2016;107:734-745. 査読あり
3. Asano Y, Kawase T, Okabe A, Tsutsumi S, Ichikawa H, Tatebe S, Kitabayashi I, Tashiro F, Namiki H, Kondo T, Semba K, Aburatani H, Taya Y, Nakagama H, Ohki R. IER5 generates a novel hypophosphorylated active form of HSF1 and contributes to tumorigenesis. *Sci Rep.* 2016;6:19174. 査読あり
 4. Shirouzu Y, Yanai G, Yang KC, Sumi S. Effects of Activin in Embryoid Bodies Expressing Fibroblast Growth Factor 5. *Cell Reprogram.* 2016;18:171-186. 査読あり
 5. Tsuchiya H, Sakata N, Yoshimatsu G, Fukase M, Aoki T, Ishida M, Katayose Y, Egawa S, Unno M. Extracellular Matrix and Growth Factors Improve the Efficacy of Intramuscular Islet Transplantation. *PLoS One.* 2015;10:e0140910. 査読あり
 6. Hata T, Sakata N, Yoshimatsu G, Tsuchiya H, Fukase M, Ishida M, Aoki T, Katayose Y, Egawa S, Unno M. Cholestatic Liver Injury After Biliary Reconstruction Impairs Transplanted Islet Viability and Function. *Am J Transplant.* 2015;15:2085-2095. 査読あり
 7. Sakata N, Sax N, Yoshimatsu G, Tsuchiya H, Kato S, Aoki T, Ishida M, Katayose Y, Egawa S, Kodama T, Unno M. Enhanced ultrasonography using a nano/microbubble contrast agent for islet transplantation. *Am J Transplant.* 2015;15:1531-1542. 査読あり
 8. Hata T, Sakata N, Yoshimatsu G, Tsuchiya H, Fukase M, Ishida M, Aoki T, Katayose Y, Egawa S, Unno M. Nerve Growth Factor Improves Survival and Function of Transplanted Islets Via TrkA - mediated β Cell Proliferation and Revascularization. *Transplantation.* 2015;99:1132-1143. 査読あり
 9. Wang X, Li G, Koul S, Ohki R, Maurer M, Borczuk A, Halmos B. PHLDA2 is a key oncogene-induced negative feedback inhibitor of EGFR/ErbB2 signaling via interference with AKT signaling. *Oncotarget.* 2015. [Epub ahead of print] 査読あり
 10. Fujita T, Yuno M, Okuzaki D, Ohki R, Fujii H. Identification of non-coding RNAs associated with telomeres using a combination of enChIP and RNA sequencing. *PLoS One.* 2015;10:e0123387. 査読あり
 11. Kanamune J, Kim C-M, Iwanaga Y, Rivas-Carrillo JD, Sumi S, Uemoto S, Yokokawa K. Tissue complex of adult pancreatic duct and vascular endothelial cells promotes in vitro differentiation into insulin-producing cells. *Stem Cells Res. Devel. Ther.* 2015;2:5-14. 査読あり
 12. Aoki T, Motoi F, Sakata N, Naitoh T, Katayose Y, Egawa S, Miyazaki J, Unno M. Somatostatin analog inhibits the growth of insulinoma cells by p27-mediated G1 cell cycle arrest. *Pancreas.* 2014;43:720-729. 査読あり

13. Sakata N, Aoki T, Yoshimatsu G, Tsuchiya H, Hata T, Katayose Y, Egawa S, Unno M. Strategy for clinical setting in intramuscular and subcutaneous islet transplantation. *Diabetes Metab Res Rev.* 2014;30:1-10. 査読あり
14. Ohki R, Saito K, Chen Y, Kawase T, Hiraoka N, Saigawa R, Minegishi M, Aita Y, Yanai G, Shimizu H, Yachida S, Sakata N, Doi R, Kosuge T, Shimada K, Tycko B, Tsukada T, Kanai Y, Sumi S, Namiki H, Taya Y, Shibata T, Nakagama H. PHLDA3 is a novel tumor suppressor of pancreatic neuroendocrine tumors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014;111:E2404-13. 査読あり
15. Noguchi CCY, Furutani E, Sumi S. Mathematical model of glucose-insulin metabolism in type 1 diabetes including digestion and absorption of carbohydrates. *SICE Journal of Control, Measurement, and System Integration.* 2014;7:314-320. 査読あり
16. Sumi S, Yanai G, Qi M, Sakata N, Qi Z, Yang KC, Shirouzu Y, Hiura A, Gu YJ, Inoue K. Review: Macro-encapsulation of islets in polyvinyl alcohol hydrogel. *J Med Biol Eng.* 2014;34:204-210. 査読あり
17. Sakata N, Yoshimatsu G, Tsuchiya H, Aoki T, Mizuma M, Motoi F, Katayose Y, Kodama T, Egawa S, Unno M. Imaging of transplanted islets by positron emission tomography, magnetic resonance imaging, and ultrasonography. *Islets.* 2013;5:179-187. 査読あり
18. Hata T, Sakata N, Aoki T, Yoshimatsu G, Tsuchiya H, Hayashi H, Motoi F, Goto M, Katayose Y, Egawa S, Unno M. Postoperative cholestasis and cholangitis after total pancreatectomy with biliary reconstruction impair the function of autotransplanted islets. *Transplantation.* 2013;96:e40-43.
19. Sakata N, Goto M, Motoi F, Hayashi H, Nakagawa K, Mizuma M, Yamaya H, Hasegawa Y, Yamaguchi S, Sawada S, Ottomo S, Okada T, Fukase K, Yoshida H, Ito T, Hirota M, Ishigaki Y, Sekiguchi S, Rikiyama T, Katayose Y, Fujimori K, Egawa S, Shimosegawa T, Katagiri H, Satomi S, Unno M. Clinical experiences in the treatment of pancreatic arteriovenous malformation by total pancreatectomy with islet autotransplantation. *Transplantation.* 2013;96 (5):e38-40. 査読あり
20. Yoshimatsu G, Sakata N, Tsuchiya H, Ishida M, Motoi F, Egawa S, Sumi S, Goto M, Unno M. Development of polyvinyl alcohol bioartificial pancreas with rat islets and mesenchymal stem cells. *Transplant Proc.* 2013;45:1875-1880. 査読あり
21. Fujita T, Asano Y, Ohtsuka J, Takada Y, Saito K, Ohki R, Fujii H. Identification of telomere-associated molecules by engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation (enChIP). *Sci Rep.* 2013;3:3171. 査読あり
22. Yanai G, Hayashi T, Qi Z, Yang KC, Shirouzu Y, Shimabukuro T, Hiura A, Inoue K, Sumi S. Electrofusion of mesenchymal stem cells and islet cells for diabetes therapy: a rat model. *PLoS One.* 2013;8:e64499. 査読あり
23. Yang KC, Wu CC, Yang SH, Chiu CC, Sumi S, Lee HS. Investigating the suspension culture on aggregation and function of mouse pancreatic β -cells. *J Biomed Mater Res A.* 2013;101: 2273-2282. 査

読あり

24. Chen PY, Wu CC, Lu DH, Sumi S, Lin FH, Yang KC. Microenvironment-regulated gene expression, morphology, and in vivo performance of mouse pancreatic β -cells. *Process Biochemistry*. 2013;48: 58-67. 査読あり
25. Sakata N, Yoshimatsu G, Tsuchiya H, Egawa S, Unno M. Animal models of diabetes mellitus for islet transplantation. *Exp Diabetes Res*. 2012;2012:256707. 査読あり
26. Sakata N, Goto M, Gumpei Y, Mizuma M, Motoi F, Satomi S, Unno M. Intraoperative ultrasound examination is useful for monitoring transplanted islets: a case report. *Islets*. 2012;4:339-342. 査読あり
27. Sakata N, Sumi S, Yoshimatsu G, Goto M, Egawa S, Unno M. Encapsulated islets transplantation: Past, present and future. *World J Gastrointest Pathophysiol*. 2012;3:19-26. 査読あり
28. Saito Y, Chan NK, Sakata N, Hathout E. Nerve growth factor is associated with islet graft failure following intraportal transplantation. *Islets*. 2012;4:24-31. 査読あり
29. Qi Z, Yamamoto C, Imori N, Kinukawa A, Yang KC, Yanai G, Ikenoue E, Shen Y, Shirouzu Y, Hiura A, Inoue K, Sumi S. Immunoisolation effect of polyvinyl alcohol (PVA) macro-encapsulated islets in type 1 diabetes therapy. *Cell Transplant*. 2012;21:525-534. 査読あり
30. Sakata N, Chan NK, Chrisler J, Obenaus A, Hathout E. Bone marrow cell cotransplantation with islets improves their vascularization and function. *Transplantation*. 2010;89:686-693. 査読あり
31. Sakata N, Hayes P, Tan A, Chan NK, Mace J, Peverini R, Sowers L, Pearce WJ, Chinnock R, Obenaus A, Hathout E. MRI assessment of ischemic liver after intraportal islet transplantation. *Transplantation*. 2009;87:825-830. 査読あり
32. Ozeki C, Sawai Y, Shibata T, Kohno T, Okamoto K, Yokota J, Tashiro F, Tanuma S, Sakai R, Kawase T, Kitabayashi I, Taya Y, Ohki R. Cancer susceptibility polymorphism of p53 at codon 72 affects phosphorylation and degradation of p53 protein. *J Biol Chem*. 2011;286:18251-18260. 査読あり
33. Kawase T, Ohki R, Shibata T, Tsutsumi S, Kamimura N, Inazawa J, Ohta T, Ichikawa H, Aburatani H, Tashiro F, Taya Y. PH domain-only protein PHLDA3 is a p53-regulated repressor of Akt. *Cell*. 2009;136:535-550. 査読あり
34. Ohki R, Kawase T, Ohta T, Ichikawa H, Taya Y. Dissecting functional roles of p53 N-terminal transactivation domains by microarray expression analysis. *Cancer Sci*. 2007;98:189-200. 査読あり
35. Yang KC, Qi Z, Wu CC, Shirouzu Y, Lin FH, Yanai G, Sumi S. The cytoprotection of chitosan based hydrogels in xenogeneic islet transplantation: An in vivo study in streptozotocin-induced diabetic mouse. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;393: 818-823. 査読あり
36. Qi Z, Shen Y, Yanai G, Yang K, Shirouzu Y, Hiura A, Sumi S. The in vivo performance of polyvinyl alcohol macro-encapsulated islets. *Biomaterials*. 2010;31: 4026-4031. 査読あり

37. Sakata N, Gu Y, Qi M, Yamamoto C, Hiura A, Sumi S, Sunamura M, Matsuno S, Inoue K. Effect of rat-to-mouse bioartificial pancreas xenotransplantation on diabetic renal damage and survival. *Pancreas*. 2006;32:249-57. 査読あり
38. Qi M, Gu Y, Sakata N, Kim D, Shirouzu Y, Yamamoto C, Hiura A, Sumi S, Inoue K. PVA hydrogel sheet macroencapsulation for the bioartificial pancreas. *Biomaterials*. 2004;25:5885-5892. 査読あり

(特許)

1. 明石 満、松崎典弥、海野倫明、坂田直昭、吉松軍平 人工組織及びその製造方法：PCT/JP2015/064792
2. 角昭一郎、大木理恵子、坂田直昭 移植材料およびその調整法：PCT/JP2015/064792
3. 明石 満、松崎典弥、海野倫明、坂田直昭、吉松軍平 人工組織及びその製造方法：特願 2014-248292
4. 角昭一郎、大木理恵子、坂田直昭 移植材料およびその調整法：特願 2014-107529

【ヒト多能性幹細胞からの各種心筋細胞の選択的分取とその解析および心臓の再構成】

○研究代表者 鳥取大学医学系研究科 白吉 安昭 准教授

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者 胚性幹細胞分野 末盛 博文 准教授

○研究経過及び研究成果：

ヒト iPS/ES 細胞を用いた心筋分化誘導系では、各種サブタイプ心筋が混在した状態で分化誘導される。そこで、本研究では、サブタイプ心筋、特に洞結節ペースメーカー細胞（HCN4 陽性）と心室筋細胞（MLC2v 陽性）とを選択的に分取できる実験の系の構築と、純化した各種心筋の特性解析、それらを用いた心臓の再構成を目標とした。

ヒト iPS 細胞 409B2 株を用いて、① HCN4 遺伝子のエクソン I に GFP（緑色蛍光タンパク質）を挿入した BAC（Bacterial Artificial Chromosome）ベクターを用いて、HCN4 発現細胞を GFP で、同時に、② CRISPR/Cas9 によるゲノム編集法によって MLC2v のエクソン I に mCherry をノックインし、MLC2v 発現細胞を mCherry（赤色蛍光タンパク質）で、可視化できる二重改変 iPS 細胞株を樹立した。この細胞株を用いて心筋を分化誘導し、GFP と mCherry の蛍光を指標に心筋を分画すると、GFP 陽性細胞は、洞結節ペースメーカー細胞型の、mCherry 陽性細胞は、心室筋型の電気生理学的特性を示すことが分かった（第 81 回日本循環器学会学術集会、Shiaryoshi et al, 論文準備中）。また、この HCN4 陽性細胞は、HL1 などの心房筋細胞と電気的に結合し、それらの拍動を制御できることも見出している。

HCN4 は、成体のペースメーカー細胞の最良のマーカであるが、同時に、一次心臓領域（FHF）に存在するプロジェニター細胞のマーカでもある。事実、分化誘導初期の HCN4 陽性細胞は、分裂能を持ち、その後、ペースメーカー細胞と心室筋用細胞とに発生できることがわかった（第 39 回日本分子生物学会年会）。

最後に、これらの心筋による心臓の再構成までは到達しなかったが、HCN4 陽性細胞の各種イオ

ンチャンネルブロッカーに対する応答能を市販心筋と比較したところ、ほぼ同等の結果が得られ、創薬安全性試験への応用可能性が示唆された（第43回日本毒性学会学術年会）。

○研究成果の公表

（発表論文）

1. Yasuaki Shirayoshi, Kumi Morikawa, Shinichi Itou, Yu Ikeuchi, Natsumi Shimizu, Akira Fujii, Tadahiro Nomura, Nobuto Ikeda, Yoshinori Yosida, Lee, Ichiro Hisatome. HCN4 is efficient maker for creating biological pacemaker.（投稿準備中）

（学会発表）

1. 白吉安昭、森川久未、山内香織、横井文香、福村健太、野崎大蔵、末盛博文、久留一郎 選別純化したヒト多能性幹細胞由来分化誘導心筋に関する電気生理学的特性と薬剤応答性の評価 第43回 日本毒性学会学術年会（2016年6月29日～7月1日）ウインクあいち、名古屋
2. 福村健太、横井文香、森川久未、野崎大蔵、久留一郎、白吉安昭 ヒトiPS細胞に由来するHCN4陽性心筋前駆細胞の解析 第39回 日本分子生物学会年会（2016年11月30日～12月2日）パシフィコ横浜、横浜
3. 山本堅士郎、丹野翔伍、足立真彩、森川久未、大月優樹、大谷直由、陶山淑子、八木俊路朗、萩野和秀、三明淳一郎、白吉安昭、山本一博、西村元延、久留一郎。虚血性心不全モデルに対する脂肪幹細胞シートと心不全薬の併用効果の検討。第16回 日本再生医療学会総会（2017年3月7日～9日）仙台国際センター、仙台
4. Yasuaki Shirayoshi, Kumi Morikawa, Kenta Fukumura, Ichiro Hisatome. Fluorescent Human iPS/ES Reporter Lines Offer the Opportunity to Track Cardiac Subtype Cells in Cell-based Therapies and Drug Development. 第81回 日本循環器学会学術集会（2017年3月17日～19日）石川県立音楽堂他、金沢
5. Fluorescent reporter lines in human iPS cells offer useful platforms to study cardiac subtype specification, cell-based therapies of cardiac disease and drug development. Yasuaki Shirayoshi, Kenta Fukumura, Kumi Morikawa, Ichiro Hisatome. ISSCR2017, June 14-17 (2017), BOSTON, USA

【ES細胞の多能性制御に関わる新規遺伝子の機能解析】

○研究代表者 奈良県立医科大学医学部 堀江 恭二 教授

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者 再生実験動物施設 近藤 玄 教授

○研究経過及び研究成果

我々の研究室では、Venusをレポーターに用いた遺伝子トラップ法を用いて、ES細胞で発現が変動する新規遺伝子を同定した。Venus陽性細胞と陰性細胞をcell sorterで分離して、細胞の形態、in vitroでの分化能、種々の遺伝子発現の違いを明らかにし、本遺伝子の発現がES細胞の多能性と正の相関を示すことを示唆する結果を得た。また、顕微鏡下での生細胞観察により、本遺伝子の発現変動を1週間に渡り計測した。本遺伝子は約2Mbに渡る遺伝子クラスターを形成する。クラスター

全体を欠失させるために、ゲノム配列を詳細に解析し、クラスターの上流・下流の境界を明らかにした。

前年度の本共同研究で、機能未知の zinc finger protein について遺伝子破壊マウスを作製した。今年度は、ホモ変異体マウスが生後 1 日で高頻度に死亡するとの知見を得た。

○研究成果の公表

未発表

【新規サイクリン関連遺伝子の脊髄神経管分化・成長における役割】

○研究代表者 奈良先端科学技術大学院大学 笹井 紀明 准教授

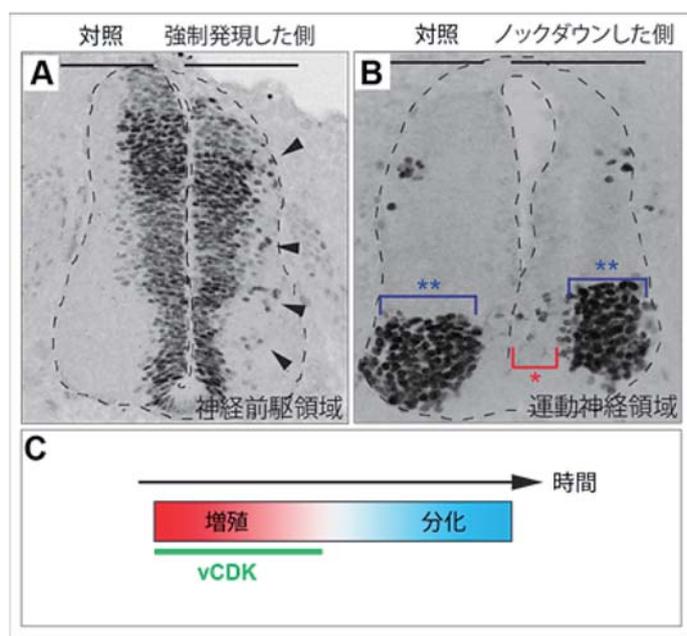
○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者 統合生体プロセス分野 廣田 圭司 准教授

○研究経過及び研究成果

ヘッジホッグ (Hedgehog) と総称される遺伝子群は、胚発生における細胞の増殖や分化を制御する細胞外シグナル因子をコードする。申請者は、このうち特にソニック・ヘッジホッグ (Sonic Hedgehog; Shh) によって制御される細胞増殖を直接制御するエフェクター分子を同定する目的で、Shh の下流遺伝子を mRNA シーケンス法によるトランスクリプトーム解析によって網羅的に解析し、それらの中から候補遺伝子として、新規のサイクリン依存性キナーゼ (以下 vCDK と呼ぶ: v は ventral (腹部) の意味) を同定した (メタデータの一部を Sasai et al., 2014 で発表)。サイクリンやその関連因子は細胞分裂や増殖に関与することが示唆されるが、vCDK の機能は新規であるためにほとんど不明である。

申請者らのニワトリ胚を用いた予備的解析の結果、vCDK は胚性期前駆細胞の増殖に関わっていることが明らかとなった (図 1)。そこで、vCDK の個体レベルにおける機能を、遺伝子機能を完全に破壊したマウス個体を用いて解析することにした。

この経緯のもとに、平成 28 年 4 月より京都大学再生医科学研究所 (当時)・統合生体プロセス分野の廣田圭司准教授とともに遺伝子欠損マウスの作成を開始した。まず CRISPR/Cas9 を用いた遺伝子破壊法により、vCDK の遺伝子座のエキソン 3 にガイド RNA を設計し、4~60 塩基対程度の欠損を生じたキメラまたはヘテロマウスを 60% 程度の高確率で多数得ることに成功し、そのうちの 1 つの系統を継代しながら解析することとした。



(図 1) ニワトリ胚を用いた vCDK の予備的解析。(A) vCDK の強制発現により、前駆細胞の増殖が著しく亢進した (矢頭)。(B) siRNA により分化が尚早 (*) になり、神経細胞数が減少 (**)。 (C) vCDK が前駆細胞の増殖をコントロールしている。

その結果、vCDK 遺伝子破壊マウスは生存可能であるが、体のサイズが野生型に比べて極端に小さく (図 2A, B)、組織レベルでは腎臓の形成不全 (図 2C, D) が見られている。この表現型から、vCDK が神経発生のみならず、広く器官形成やその機能維持、またはそのサイズ決定に対して重要な役割を担うことが強く示唆された。

また、さらなる細胞レベルでの解析には vCDK の器官内における発現を細胞レベルで捕捉する必要がある。この目的で、vCDK の遺伝子座に eYFP 遺伝子を挿入したマウスを同様に CRISPR/Cas9 法により作成することにした。この作成では、vCDK 遺伝子の翻訳スタートコドン (ATG) の直下にガイド RNA をデザインして eYFP 遺伝子を挿入し、本来の遺伝子の機能が破壊される代わりに eYFP が発現するようにした。この目的で、eYFP をコードする領域とその前後各 1kb のゲノム領域 (計 2.9kb) を人工遺伝子合成により作成し、人工遺伝子断片、ガイド RNA、Cas9 タンパク質を受精卵に顕微注入した。この結果、37 個体中 10 個体という高確率で挿入が見られ、eYFP ノックインマウスが産出されていることが示唆された。このマウスを解析することにより、ヘテロマウスの解析からは器官内における発現位置の確認が、ホモマウスの解析からは vCDK 遺伝子欠損の表現型が、それぞれ観察できると期待される。

この解析は、平成 29 年度も継続して行う予定である。

(参考文献) Sasai et al. (2014) PLoS Biol. 12, e1001907

○研究成果の公表

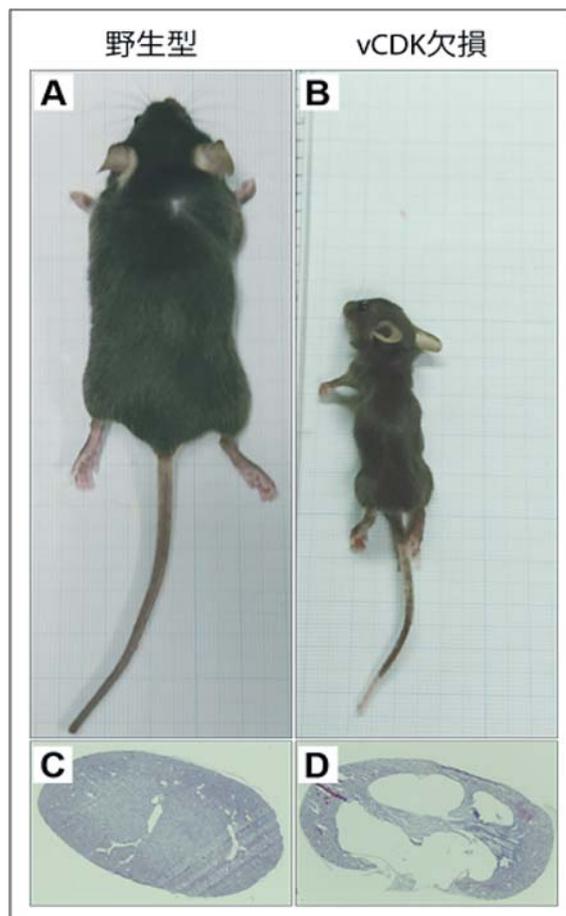
(論文)

1. Akiko Nishi-Hori, Hitomi Watanabe, Minori Kadoya, Tomo Ichikawa, Gen Kondoh, Keiji Hirota, Noriaki Sasai “Essential roles of a novel Cyclin Dependent Kinase in the neurogenesis and organogenesis.” (2017)

論文準備中

(学会発表)

1. 笹井紀明「神経管のパターン形成における多次的制御メカニズム」Tokyo Vertebrate Morphology Meeting (東京慈恵会医科大学：招待講演) 2016 年 8 月



(図 2) (A, B) 野生型と vCDK 欠損マウスの 4 週齢の外観。(C, D) 腎臓の表現型。欠損マウスでは大部分の構造が欠失している。

【生骨組織中の骨細胞の微細構造・形態のライブイメージング手法の構築とメカノセンシング機能における意義】

○研究代表者 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 上岡 寛 教授

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者 バイオメカニクス分野 安達 泰治 教授

○研究経過及び研究成果

多光子励起レーザー走査型顕微鏡 FLUOVIEW FV1200MPE (Olympus) を用いてニワトリ胚頭蓋冠の骨組織の観察を行った。本研究ではカルシウム蛍光指示薬 Fluo-8AM (AAT Bioquest) を用いた三次元タイムラプスイメージングで、頭蓋冠骨の幼弱骨細胞、成熟骨細胞ともに自律性のカルシウムオシレーションを認めた。流体剪断応力を負荷した結果、幼弱骨細胞と比較して成熟骨細胞では、細胞内カルシウムイオンの上昇率が有意に高い値を示した。次に骨細胞の成熟に伴って細胞内カルシウムイオンの上昇率が変化するメカニズムを解明するために、三次元培養した骨細胞様細胞株 MLO-Y4 を経時的に回収し、形態的な変化と骨細胞関連遺伝子の発現変化を評価した。長期間培養した群では短期間培養した群と比較して、MLO-Y4 細胞は細胞突起を伸展させ、周囲の細胞と連結するような成熟骨細胞と類似した特徴を持つようになった。また、real-time PCR によりコネキシン 43、I 型コラーゲン、オステオカルシンの mRNA 発現量が有意に上昇していた。これらの結果から、骨細胞ではその成熟に伴ってカルシウムイオン応答、コネキシン 43 の発現が亢進され、機械的刺激に対する反応が増強することで、石灰化の進行した深部骨組織の骨代謝能が高められている可能性が示唆された。今後は細胞間ネットワークの三次元的解析及び遺伝子発現解析から、情報伝達の方向や時間的変化、機能的変化をさらに明らかにしていきたいと考えている。

○研究成果の公表

(学会発表)

1. 第 34 回日本骨代謝学会学術集会 (2016 年 5 月、大阪)
2. オーストラリア・ニュージーランド骨代謝学会学術大会 (2016 年 8 月、ゴールドコースト、オーストラリア)
3. 第 38 回米国骨代謝学会学術大会 (2016 年 9 月、アトランタ、アメリカ)

ウイルス感染症・生命科学先端融合的共同研究拠点

2016 年度共同研究課題達成状況 (研究期間：2016 年 4 月～2017 年 3 月)

①霊長類 P3 感染実験

霊長類 P3 実験として計 4 件の研究をおこなった (免疫不全ウイルス (SIV 及びサル指向性 HIV-1 (stHIV) を使った) に関する研究 3 件、インフルエンザウイルスに関する研究 1 件)。

【アカゲザルを用いた HIV-1 の個体内複製機構・病原性発現機構の解析】

○研究代表者：徳島大学大学院医歯薬学研究部 教授 足立 昭夫

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：准教授 三浦 智行

○達成状況：

徳島大学大学院医歯薬学研究部足立昭夫教授と遺伝子工学的に構築したアカゲザル指向性 R5 HIV-1 (HIV-1rmt) クローンをアカゲザル個体に単独あるいは混合感染させた（それぞれ 1 個体）。いずれの感染個体でもウイルス複製が確実に観察されたが、低レベルであった。この実験と並行して、プロトタイプウイルス MN5/LSDQgtu (5gtu) を比較対照として、5 種類の新規 R5 HIV-1rmt クローンウイルスをアカゲザルリンパ球細胞株 M1.3S に接種し長期培養を行った。M1.3S 長期感染細胞から増殖効率が標準クローン 5gtu より顕著に向上した分子ウイルスクローンの取得に成功した。(64th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, 2016 年発表)

【インフルエンザウイルスの霊長類感染モデルを用いた研究】

○研究代表者：東京大学医科学研究所 教授 河岡 義裕

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授 小柳 義夫、准教授 三浦 智行、
技術職員 阪脇 廣美、技術職員 水田 量太

○達成状況：

東京大学医科学研究所河岡義裕教授とサルモデルを使ったインフルエンザウイルスのエアロゾル感染系の確立を試みた。市販のネブライザーを用いてエアロゾル化した高病原性 H5N1 鳥インフルエンザウイルスをカニクイザルに噴霧し、肺でのウイルス増殖の様子を調べた。エアロゾル化したウイルスを投与したサルでは、通常の投与方法によってウイルス液を接種したサルに比べて、ウイルスが全ての肺葉に効率よく分布することが分かった。(日本獣医学会、2016 年発表)

【霊長類モデルによる HIV 感染症根治のための基盤研究】

○研究代表者：京都大学霊長類研究所 教授 明里 宏文

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：准教授 三浦 智行

○達成状況：

京都大学霊長類研究所明里宏文教授と長期 stHIV 潜伏感染モデルを用いたリザーバー解析を行った。潜伏感染期は優勢な獲得免疫応答によりウイルス増殖が制御される一方、それに対して逃避変異を誘導することにより潜伏感染が維持されること、さらに濾胞性ヘルパー T (TFH) 細胞が感染の場となっていることを示唆する知見を得た。本霊長類モデルは潜伏感染機構の詳細な解析に大きく寄与すると共に、リンパ節中の TFH 細胞におけるプロウイルス DNA 量を指標とすることで shock and kill 療法など HIV 感染症の根治に向けた新規治療法の有効性や安全性の検証に有用なモデルとなると期待される。(34th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, 2016 年発表)

【粘膜感染サルエイズモデルにおける CTL 誘導に関する研究】

○研究代表者：国立感染症研究所エイズ研究センター 教授 俣野 哲朗

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：准教授 三浦 智行、技術職員 阪脇 廣美、
技術職員 水田 量太

○達成状況：

国立感染症研究所エイズ研究センター俣野哲朗センター長と SIV 感染サルにおける感染免疫学的解析データを蓄積した (Sci. Rep. 6:30153, 2016)。安楽殺解剖時のみでなく直腸生検時に採取したサンプルも用い、経時的な粘膜 T 細胞反応解析系を構築した。SIV の伝播によって、MHC 関連 SIV 変異の蓄積およびウイルスの in vitro 複製能低下が生じることを明らかにした。一方、サル末梢血より分離した CD8 陽性 T 細胞由来の iPS 細胞より樹立した非特異的 CD8 陽性 T 細胞のサルへの導入を試みた。

②マウス P3 感染実験

マウス P3 感染実験として計 1 件の研究をおこなった (ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) に関する研究 1 件)。

【ヒト化マウスを用いた HIV-1 潜伏感染モデルの確立】

○研究代表者：京都大学医学研究科血液・腫瘍内科学 教授 高折 晃史

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授 小柳 義夫

○達成状況：

京都大学医学研究科血液腫瘍内科学の高折晃史教授とヒト化マウスを用いての HIV 潜伏感染動物モデルを開発するための基礎研究を行った。2 種の蛍光タンパク質を発現する DuoFluo HIV と Vpx を用いた静止期 T 細胞への遺伝子導入法を用いて、より効率的に潜伏感染をモデル化できるか検討した。Vpx を用いた方法は潜伏感染効率を増加させなかった。DuoFluo HIV (RGH) ではヒト活性化 CD4 陽性 T 細胞において 3 - 4% のウイルス産生感染、1 - 3% ほどの潜伏感染分画が得られた。二種の蛍光タンパク質の配列相同性から相同組換えが起こっていたため、新たな蛍光タンパク質の組み合わせの DuoFluo HIV (MKO) を入手した。細胞株及び初代培養 T 細胞を用いて条件を検討中で、潜伏感染細胞の RNAseq を予定している。

③遺伝子・細胞レベルのウイルス・生命科学研究

ウイルス・生命科学研究を計 22 件行った (ウイルスに関しては、HTLV-1 研究 2 件、HIV/SIV 研究 2 件、インフルエンザウイルス研究 2 件、ボルナウイルス研究 1 件、エボラウイルス研究 1 件、デングウイルス研究 2 件及び肝炎ウイルス研究 1 件。ウイルス研究の基盤となる生命科学に関しては、自然免疫研究 3 件、RNA 輸送に関する研究 1 件、神経組織の分化調節機構に関する研究 2 件、細胞分裂軸に関する研究 1 件、細胞膜に関する研究 2 件、獲得免疫反応の日内変動する研究 1 件、結核菌脂質免疫の研究 1 件)。

【B 型肝炎ウイルス高効率感染培養系の樹立とこれを利用した新規抗ウイルス剤探索】

○研究代表者：国立感染症研究所ウイルス第二部 主任研究官 渡士 幸一

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：准教授 土方 誠

○達成状況：

国立感染症研究所渡士幸一主任研究官と独自に樹立した不死化ヒト肝細胞 HuS-E/2 細胞に B 型肝炎ウイルス (HBV) 感染受容体である NTCP 分子を発現させた細胞株 E/NtG8 細胞を Cellbed を用いた立体培養することで、HBV の感染増殖を再現する非がん細胞を用いた培養系の構築に成功した。抗 HBV 薬のスクリーニングを同時に進めていたところ、脂肪酸生合成系酵素阻害薬により HBV 粒子産生が抑制されることを明らかにした。さらなる検討から長鎖飽和脂肪酸の産生が HBV 粒子産生に参与することを明らかにした。(Biochem. Biophys. Res. Commun. 475: 87-92, 2016)

【放射線腸障害におけるトリガー因子の同定と新規治療法の開発】

○研究代表者：千葉大学大学院医学研究院粘膜免疫学 教授 植松 智

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授 竹内 理

○達成状況：

千葉大学医学研究院植松智教授と腸管粘膜固有層の解析を行った。通常は絨毛の粘膜固有層に局在する好酸球は、粘膜下層には殆ど認められない。ところが、 γ 線腹部限局照射 12 週の Balb/C のマウスにおいては、線維化している漿膜下の粘膜下層に好酸球の著明な浸潤が認められた。そこで、好酸球を欠失する Δ dblGATA マウスを解析した結果、腸管粘膜固有層の好酸球が完全に消失していることを確認した。放射線による線維化に好酸球が必須の役割を果たすことが分かった。(未発表)

【内在性ボルナウイルス様配列の生物学的意義の解明】

○研究代表者：鹿児島大学共同獣医学部 特任助教 堀江 真行

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授 朝長 啓造

○達成状況：

鹿児島大学共同獣医学部堀江真行特任助教とコウモリゲノムのスクリーニングにより、*Eptesicus fuscus* および *Miniopterus natalensis* のゲノムに、それぞれ大きな ORF を持つ EBL 配列があることを突き止めた。分子進化学的解析により、それらの EBL 配列は何らかの機能を持ちうることを明らかにした。さらに、*Eptesicus* 属および *Miniopterus* 属コウモリの諸臓器を採取し、上記の EBL が mRNA として転写されていることを明らかにした。(Sci. Rep. 6, 25873, 2016)

【免疫応答における IL-7 レセプターの機能解析】

○研究代表者：九州大学生体防御医学研究所 教授 吉開 泰信

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授 生田 宏一

○達成状況：

九州大学生体防御医学研究所吉開泰信教授と内在性のグルコルチコイド (GC) が IL-7R の発現を制御しているのかどうかを明らかにするために、グルコルチコイド受容体 (GR) 結合モチーフ変異マウスと T 細胞特異的な GR 遺伝子破壊マウスを解析した。血中の GC 濃度の変動と呼応して、T 細胞の IL-7R と CXCR の発現レベルが日内変動を示したが、変異マウスではこの変動が消失した。さらに、脾臓の T 細胞数が夜に増加し昼に減少する一方、変異マウスではこのような日内変

動が見られなかった。リステリア菌を感染させると、夜の場合には CD8 T 細胞の応答が高くなるが、変異マウスではこの変動が消失した。以上の結果から、GC は IL-7R と CXCR4 の発現を誘導することで、T 細胞の体内分布と免疫応答を制御していることが示された。

【大規模配列解析によるフィロウィルスの病原性に関するアミノ酸サイトの同定と機能解析】

○研究代表者：東海大学医学部 助教 中川 草

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授 小柳 義夫、助教 佐藤 圭

○達成状況：

東海大学医学部中川草助教とエボラウイルスの Zaire 種の GP 遺伝子 147 配列（重複配列を除いた）をデータベースより取得し、非同義置換（dN）と同義置換（dS）の進化速度の比率（dN/dS）を計算し、正の淘汰を受けた、すなわち生存に有利な突然変異として集団に広がったアミノ酸置換サイトを推定した。その結果、2つのアミノ酸サイトで統計的に有意な正の淘汰（A82V と T544I）を同定した。また、2014-15 年の西アフリカにおけるアウトブレイクで流行した Makona 株の全ゲノム配列を用いた系統解析では、これらの二つの変異体の集団への広まり方が、まったく異なることを発見した。（Genes Cells. 22:148-159, 2016）

【Develop a selectable anti-HIV-1 gene therapy vector using CRISPR/CAS9 system】

○研究代表者：UCLA AIDS institute, UCLA School of Nursing Associate professor An, Dong Sung

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授 小柳 義夫、助教 蝦名 博貴

○達成状況：

UCLA AIDS institute の Dong Sung An 准教授とヒト HPRT と CCR5 に対する CRISPR/Cas9 発現レンチウイルスベクターを作製したが、このベクターの感染価が非常に低いことがわかった。そこで、センダイウイルスベクターの使用に変更した。薬剤による選択なしで、80%を超える効率的な CD34 陽性ヒト血液幹細胞へ遺伝子導入に成功し、CCR5 発現抑制が得られた。（未発表）

【構造決定に向けた細菌型 S2P ホモログの変異体作製】

○研究代表者：横浜市立大学学術院国際総合科学群自然科学系列 准教授 禾 晃和

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授 秋山 芳展、助教 檜作 洋平

○達成状況：

横浜市立大学学術院国際総合科学群禾晃和准教授と細菌型 S2P タンパク質の解析を行った。このタンパク質ホモログの多くは、ペリプラズム側には可溶性のドメインをもつが、細胞質側の可溶性ドメインには短いループで構成されると予測されている。膜タンパク質は一般に可溶性ドメインのサイズが大きい方が結晶化しやすいと考えられることから、細胞質側に変異を導入し、抗体断片を結合させることとした。その結果、変異導入後も分酸状態が良好で、また、抗体とも強固に結合する試料が得られた。（Methods Mol. Biol. 1493: 57-72, 2017, Genes Cells）

【インフルエンザウイルス・転写複製装置のクライオ電子顕微鏡解析】

○研究代表者：沖縄科学技術大学院大学 生体分子電子顕微鏡解析ユニット 博士研究員

杉田 征彦

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授 野田 岳志

○達成状況：

沖縄科学技術大学院大学杉田征彦博士研究員と酵素反応中における野生型インフルエンザウイルス RNP の三次元構造を解析することによって、機能中の RNP の構造変化機構の一端を明らかにした。また、均一な構造を持つ組換え RNP の細胞内再構築法・精製法を確立しつつある。現在は、クライオ電子顕微鏡内での撮影および単粒子解析法の適用に向けて、精製法と氷包埋法の最適化を行っている。(Microscopy and Microanalysis 22: 66-67, 2016)

【SLOT 法を用いたインフルエンザウイルスに対する亜型交差性中和抗体の創出】

○研究代表者：慶應義塾大学先端生命科学研究所 特任准教授 井上 浄

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授 野田 岳志

○達成状況：

慶應義塾大学先端生命科学研究所井上浄特任准教授と SLOT 法に必要な機材のセッティングならびにデータ解析機器のセッティングを行った。またインフルエンザウイルスの HA 抗原を用いてマウスに免疫を行い、そのマウスの 2 次リンパ組織を用いて SLOT を行った。SLOT を行ったマウスにおいて HA 抗原に対する抗体の産生が認められ、今後亜型交差性について検討を進める。(未発表)

【新規神経幹細胞分化法によるサブタイプ特異的ニューロン産生技術の開発】

○研究代表者：Korea Brain Research Institute (KBRI) Principal Investigator 小曾戸 陽一

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：助教 小林 妙子

○達成状況：

Korea Brain Research Institute の小曾戸陽一室長と条件検討のため主にヒト培養細胞を用い、1) 染色体の一部を蛍光標識するための諸技術（蛍光色素取り込み、およびゲノム編集技術）の検討、2) 超解像顕微鏡を活用した染色体ダイナミクスの新規培養基質上でのライブ観察を順次共同研究として遂行し、いずれも期待通りの成果を収めた。本年度の成果は、平成 29 年度に計画している神経分化過程にある幹細胞の染色体ダイナミクスの解析に活用する。(未発表)

【HTLV-1 関連脊髄症モデルマウスを用いた疾患病態解明と新規治療法の開発】

○研究代表者：川崎医科大学微生物学 教授 齊藤 峰輝

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授 松岡 雅雄、講師 安永 純一郎

○達成状況：

川崎医科大学医学部齊藤峰輝教授と神経抗原特異的 TCR と Tax あるいは HBZ のダブル Tg マウス (Tax-2D2-Tg または HBZ-2D2-Tg マウス) の一部は、6 - 8 週齢で HTLV 脊髄症 (HAM) 類似

の下肢対麻痺を自然発症した。病理組織学的解析では、上部胸髄から仙髄にかけて、くも膜下腔から脊髄実質にわたるほぼ左右対称性の細胞浸潤を認めた。浸潤細胞は CD4 主体であり、Iba1 染色により、局所のミクログリアが活性化していることが示唆された。また、発症マウスでは、未発症マウスと比較して血漿中 CXCL10 濃度の有意な上昇を認めた。(18th International Conference on Human Retrovirology 2017)

【天然脂質の免疫機能解析と応用】

○研究代表者：帝塚山大学現代生活学部食物栄養学科 教授・学科長 藤原 永年

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授 杉田 昌彦

○達成状況：

帝塚山大学現代生活学部藤原永年教授と抗酸菌に関する解析を行った。グルコースモノミコール酸は抗酸菌感染に伴い、宿主生体内に存在するグルコースを基質として新生される抗酸菌細胞壁糖脂質であり、感染成立の優れたマーカー分子である。本研究において、グルコースモノミコール酸合成酵素・グルコース基質複合体の X 線結晶構造を決定することに成功した。また、グリセロールモノミコール酸は抗酸菌潜伏感染と連動して合成される細胞壁脂質である。本研究において、グリセロールモノミコール酸が宿主自然免疫受容体 Mincle を介して慢性肉芽腫応答を惹起することを明らかにした。(未発表)

【デングウイルス感染症非ヒト霊長類モデル構築に向けた基盤研究】

○研究代表者：公益財団法人東京都医学総合研究所・感染制御プロジェクト 主任研究員

日紫喜 隆行

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：准教授 三浦 智行

○達成状況：

東京都医学総合研究所日紫喜隆行主任研究員とデングウイルスに関する解析を行った。予めインフルエンザウイルスの NS1 タンパク質を細胞内で発現させておくとデングウイルスのインターフェロン α に対する感受性が低下することが明らかとなった。そして、デングウイルスゲノムにインフルエンザ NS1 遺伝子を挿入した組み換えウイルスを作製し性状解析を行ったところ、作製したウイルスの増殖能がほぼ親株と同程度であったが、インターフェロン α に対する感受性が親株と比較し顕著に低下することが示された。(未発表)

【妊娠期における表皮幹細胞の増殖・分化ダイナミクスの解析】

○研究代表者：京都大学医学部附属病院皮膚科 講師 本田 哲也

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授 豊島 文子、学振特別研究員 一條 遼

○達成状況：

京都大学医学研究科本田哲也講師と細胞周期をライブイメージングできるマウスを用いて、非妊娠・妊娠期マウス腹側皮膚を二光子顕微鏡で解析したその結果、S/G2/M 期の細胞の割合が妊娠期に有意に上昇することが分かった。また、表皮幹細胞をラベルし細胞系譜解析を行ったところ、妊

娠の進行に伴い、幹細胞コロニーが拡大する現象が観察された。また、幹細胞の分裂様式が妊娠期では変化することを見出した。(第 65 回日本細胞生物学会大会、2016 年)

【自然免疫応答における転写後調節の解明】

○研究代表者：近畿大学薬学部生化学教室 教授 藤原 俊伸

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授 竹内 理

○達成状況：

近畿大学薬学部藤原俊伸教授と RNA 結合タンパク質に関する解析を行った。CCCH-type zinc-finger domain を有する RNA 結合タンパク質には Regnase-1 を始め自然免疫細胞においてサイトカイン産生の転写後制御に関わるものがある。本研究では、このタンパク質群が自然免疫細胞においてサイトカイン mRNA 翻訳に与える影響を検討した。マウスマクロファージに Toll-like receptor 刺激を行いその Cell lysate をシヨ糖密度勾配による超遠心を用いた細胞分画し、共同研究で Polysome 分画に存在する mRNA の変化を解析した。その結果、マクロファージ刺激により、Polysome に存在するサイトカイン mRNA の割合が亢進することが明らかとなった。(Cell, 161:1058-1073, 2015)

【RNA 結合タンパク質の標的 RNA 構造解析とその機能的意義】

○研究代表者：国立研究開発法人理化学研究所予防医療・診断技術開発プログラムマネージャー 村川 泰裕

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授 竹内 理

○達成状況：

理化学研究所村川康裕ユニットリーダーと CLIP 法を行った。本手法は RNA 結合タンパク質が認識する RNA 配列や構造の解析に重要な手法である。本研究では、CCCH 型 Zinc finger を持つ RNA 結合タンパク質のいくつかに関し HITS-CLIP 解析を行った。その結果、タンパク質に結合する RNA の精製に成功し、これにアダプターを付加、次世代シーケンサーによるシーケンスを行った。今後、このデータを解析していく予定である。(未発表)

【哺乳類間の脳の大きさの違いを作り出す仕組みの解明】

○研究代表者：熊本大学発生医学研究所 助教 畠山 淳

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授 影山 龍一郎

○達成状況：

熊本大学発生医学研究所畠山淳助教とカニクイザル胚の脈絡叢に特異的に発現する分泌因子を複数同定した。これらの因子が霊長類の神経幹細胞の増殖にどのような作用があるのか検討した。ヒト ES 由来の神経幹細胞を用いて増殖を促す因子を選定し、その内の 1 つについて詳細に解析し、その因子が霊長類の脳の拡大化に一部貢献していることを示唆するデータを得た。このことから、脳脊髄液に含まれる因子の違いが脳の種間差創出に関与することが強く示唆された。(未発表)

【インターフェロン誘導性抗デングウイルス因子 RyDEN の分子機能の解析】

○研究代表者：大阪医科大学予防社会医学講座微生物学教室 講師 鈴木 陽一

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授 小柳 義夫

○達成状況：

大阪医科大学予防社会医学講座鈴木陽一講師とデングウイルス抑制分子であると見出した RyDEN について解析をおこなった。この分子はその中央領域を介して PABPC1 と結合し、その結合は RyDEN の抗デングウイルス活性の発揮に重要であることがわかった。In vitro 実験の結果から、RyDEN は非特異的な RNA 結合性タンパク質であるものの、デングウイルス RNA への結合特異性は PABPC1 の存在によって高まることが明らかとなった。(PLoS Pathogens 12:e1005357, 2016)

【mRNA 前駆体から機能ある環状 RNA ができあがる仕組み】

○研究代表者：藤田保健衛生大学総合医科学研究所遺伝子発現機構学研究部門 教授 前田 明

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授 大野 睦人、助教 谷口 一郎

○達成状況：

藤田保健衛生大学総合医科学研究所前田明教授と転写誘導可能な ciRS-7 を含む circRNA を発現するレポータープラスミドを作製し、ヒト培養細胞を用いて細胞質局在機構を解析した。培養細胞の細胞生物学的実験とアフリカツメガエルの微量注入実験により、circRNA が細胞分裂時での拡散ではなく、能動的に核外輸送されていることを明らかにした。さらに、その核外輸送経路は、mRNA 核外輸送経路に参与する因子 TAP に依存している根拠が得られ、mRNA 核外輸送経路と類似のメカニズムが関与していることがわかった。(未発表)

【SIV に感染するサル免疫細胞を持つマウスの作製】

○研究代表者：京都大学医学研究科人間健康科学科系専攻 准教授 伊吹 謙太郎

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：准教授 三浦 智行

○達成状況：

京都大学医学研究科伊吹謙太郎准教授と3～5歳令のアカゲザルから骨髓液約4ml/頭を採取し、全骨髓細胞（一部はその後CD4+細胞をビーズ法により除去）を分離した。これらをNOGマウス移植後、サル免疫細胞の生着が認められたマウス（CD4除去全骨髓細胞移植マウス2匹、全骨髓細胞移植マウス1匹）に対してSIVmac239株 1.5×10^6 TCID50/匹を腹腔内接種し、SIVの感染動態を解析した。SIV接種後1週目より両群のマウスの末梢血中でSIVRNA及びDNAが検出された。さらにSIV感染後9-10週で剖検したマウスの肺、脾臓、腸間膜リンパ節、胸腺等のリンパ組織及び子宮においてSIV DNAが検出され、全身でSIV感染が成立していることが明らかとなった。（第63回日本ウイルス学会学術集会、2016年）

【成人T細胞白血病リンパ腫の病態解析】

○研究代表者：久留米大学医学部・病理学 教授 大島 孝一

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授 松岡 雅雄、講師 安永 純一郎

○達成状況：

久留米大学医学部大島孝一教授と HTLV がコードしている HBZ により発現誘導される CCR4 の ATL 病態における意義について、国際誌 Cancer Research に発表した (Cancer Res, 76:5068-5079, 2016)。ホジキン病様 ATL 症例のクローナリティに関して解析を行った。

【大腸菌ヒスチジinkinナーゼセンサー PhoQ のリガンド結合ポケットの解析】

○研究代表者：近畿大学生物理工学部 講師 江口 陽子

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授 秋山 芳展、博士研究員 石井 英治、
大学院生 吉谷 亘平

○達成状況：

近畿大学生物理工学部江口陽子講師と大腸菌ヒスチジinkinナーゼセンサー PhoQ のリガンド結合に関する研究をおこなった。二成分情報伝達系 PhoQ/PhoP 系のヒスチジinkinナーゼセンサー PhoQ の活性化は、サルモネラ属菌などの病原菌の病原性発現に関わる。大腸菌では膜タンパク質である SafA が、同じ内膜上に局在する PhoQ に直接結合することで PhoQ を活性化する。PhoQ-SafA 相互作用を解析するに当たり、SafA の検出が困難であることと、レポーターアッセイにおける PhoQ タンパク量の株間での差が問題であった。SafA の検出に関しては SafA にタグを付けることで解決し、PhoQ の発現量の差については phoQ 5' 末端の制限酵素サイトの有無に起因することが明らかになった。この2つの問題が解決され、現在、SafA と変異型 PhoQ の相互作用を解析している。(未発表)

2017 年度共同研究課題一覧

再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点

| 研究代表者 | ウイルス・再生医科学研究所 共同研究者 | 研究課題名 |
|---------------------------------------------|-------------------------|-------------------------------------------|
| 東京大学医科学研究所 小原 洋志 特任講師 | 生体材料学分野 田畑 泰彦 教授 | ヒト iPS 細胞を活用した新規 3 次元胎児モデルの確立 |
| 放射線医学総合研究所分子イメージング診断治療研究部 青木 伊知男 チームリーダー | 生体材料学分野 城 潤一郎 助教 | 「見える再生因子」が拓く戦略的徐放化再生医療の実現 |
| 国立遺伝学研究所 川上 浩一 教授 | 再生増殖制御学分野 瀬原 淳子 教授 | 行動に関わる神経回路の同定とその機構 |
| 滋賀医科大学学生化学分子生物学講座 縣 保年 教授 | 再生免疫学分野 河本 宏 教授 | iPS 細胞技術とゲノム編集を用いた効率のよいがん抗原特異的キラー T 細胞の再生 |
| 理化学研究所統合生命医科学研究センター 池川 志郎 チームリーダー | 組織再生応用分野 戸口田 淳也 教授 | iPS 細胞を用いた脊椎の形成機構と側彎症の分子病態の解明 |
| 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 宝田 剛志 准教授 | 組織再生応用分野 戸口田 淳也 教授 | PRRX1+ 細胞の不均一性理解によるヒト骨格形成過程の分子理解 |
| 大阪大学大学院生命機能研究科 長澤 丘司 教授 | 統合生体プロセス分野 近藤 玄 教授 | 造血幹細胞ニッチの形成と維持に必須の転写因子 Foxcl1 の作用機構の解明 |
| 奈良県立医科大学医学部 堀江 恭二 教授 | 統合生体プロセス分野 近藤 玄 教授 | マウス ES 細胞の多能性を規定する細胞間の不均一性の解析 |
| 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科 笹井 紀明 准教授 | 統合生体プロセス分野 廣田 圭司 准教授 | 器官形成と個体サイズを制御する細胞増殖制御機構の解明 |
| 広島大学大学院医歯薬保健学研究科 宿南 知佐 教授 | 生体分子設計学分野 開 祐司 教授 | 腱・靭帯付着部形成を制御する分子機構の解明 |
| 慶応義塾大学理工学部 須藤 亮 准教授 | バイオメカニクス分野 安達 泰治 教授 | 細胞外基質の力学的特性が多細胞の三次元動的プロセスに与える影響 |
| 熊本大学生命資源研究・支援センター 竹尾 透 講師 | 再生実験動物施設 渡邊 仁美 助教 | 受精能獲得精子選別による In vitro 単精子受精に関する研究 |

ウイルス感染症・生命科学先端融合的共同研究拠点

① 霊長類 P3 感染実験

| 研究代表者 | ウイルス・再生医科学研究所 共同研究者 | 研究課題名 |
|----------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| 国立感染症研究所エイズ研究センター 侯野 哲朗 センター長 | 霊長類モデル 三浦 智行 准教授 ウイルス感染症モデル 明里 宏文 教授 附属感染症モデル研究センター 阪脇 廣美 技術職員 水田 量太 技術職員 | サルエイズモデルにおける CTL の腸管感染防御能に関する研究 |
| 徳島大学大学院医歯薬学研究部 野間口 雅子 教授 | 霊長類モデル 三浦 智行 准教授 | アカゲザルを用いた HIV-1 の個体内複製機構・病原性発現機構の解析 |
| 京都大学霊長類研究所 明里 宏文 教授 | 霊長類モデル 三浦 智行 准教授 | HIV-1 感染症の根治を目指した新規治療戦略の確立に向けた基礎研究 |
| 東京大学医科学研究所 河岡 義裕 教授 | システムウイルス学分野 小柳 義夫 教授 霊長類モデル 三浦 智行 准教授 附属感染症モデル研究センター 阪脇 廣美 技術職員 水田 量太 技術職員 | インフルエンザウイルスの霊長類感染モデルを用いた研究 |

② マウス P3 感染実験

| | | |
|-------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|
| 国立遺伝学研究所人類遺伝研究部門 井ノ上 逸朗 教授 | システムウイルス学分野 小柳 義夫 教授 佐藤 佳 講師 | ヒト化マウスモデルを用いた HIV-1 感染病態のシステムウイルス学的解析 |
| 京都大学医学研究科血液・腫瘍内科学 高折 晃史 教授 | システムウイルス学分野 小柳 義夫 教授 | ヒト化マウスを用いた HIV-1 潜伏感染モデルの確立 |

③ 遺伝子・細胞レベルのウイルス・生命科学研究

| | | |
|----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| 富山大学大学院医学薬学研究部（医学）ウイルス学講座 谷 英樹 准教授 | 微細構造ウイルス学分野 野田 岳志 教授 | 組換え VSV システムを用いた抗ラッサウイルスモノクローナル抗体の作出 |
| 大阪大学大学院医学系研究科感染症・免疫学講座ウイルス学 本田 知之 准教授 | RNA ウイルス分野 朝長 啓造 教授 | RNA ウイルス感染とレトロトランスポゾン活性との関連性の解析 |
| 東京都医学総合研究所・感染制御プロジェクト 日紫喜 隆行 主任研究員 | 霊長類モデル 三浦 智行 准教授 | デングウイルス感染症非ヒト霊長類モデル構築に向けた基盤研究 |
| 横浜市立大学大学院生命医科学研究科 禾 晃和 准教授 | 生体膜システム分野 秋山 芳展 教授 檜作 洋平 助教 | 細菌型 S2P ホモログへの安定化変異の導入 |
| UCLA AIDS institute, UCLA School of Nursing An, Dong Sung Associate professor | システムウイルス学分野 小柳 義夫 教授 | Develop a selectable anti-HIV-1 gene therapy vector using CRISPR/CAS9 system |

| | | |
|---------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| 沖縄科学技術大学院大学生体分子電子顕微鏡解析ユニット 杉田 征彦 博士研究員 | 微細構造ウイルス学分野 野田 岳志 教授 | インフルエンザウイルス・転写複製装置のクライオ電子顕微鏡解析 |
| 東海大学医学部 中川 草 助教 | システムウイルス学分野 小柳 義夫 教授 佐藤 佳 講師 | フィロウイルスの感染効率・病原性に関する実験ウイルス学と分子進化学による学際融合研究 |
| 国立感染症研究所ウイルス第二部 渡士 幸一 主任研究官 | がんウイルス分野 土方 誠 准教授 | 新規 B 型肝炎ウイルス感染培養系の性状解析と複製阻害剤同定 |
| 慶應義塾大学先端生命科学研究所 井上 浄 特任准教授 | 微細構造ウイルス学分野 野田 岳志 教授 | SLOT 法を用いたウイルスに対する高機能抗体の創出 |
| 東京大学生産技術研究所 藤井 輝夫 教授 | 増殖制御システム分野 影山 龍一郎 教授 磯村 彰宏 共同研究者 | オプトジェネティクスとマイクロフルイディクスを用いた遺伝子発現ダイナミクスの制御手法の基盤構築 |
| 京都大学医学研究科人間健康科学系 専攻 伊吹 謙太郎 准教授 | 霊長類モデル 三浦 智行 准教授 | サル免疫細胞を持つマウスにおける SIV 感染病態の解析 |
| Korea Brain Research Institute 小曾戸 陽一 Lab Head | 増殖制御システム 小林 妙子 助教 | ヒト多能性幹細胞からの大脳皮質ニューロン分化に細胞外の物理的環境が果たす役割 |
| 川崎医科大学微生物学 齊藤 峰輝 教授 | ウイルス制御分野 安永 純一郎 講師 情報制御学分野 松岡 雅雄 客員教授 | 遺伝子改変マウスによる HTLV-1 関連脊髄症の発症機序解明と治療法の開発 |
| 富山大学医学部 戸邊 一之 教授 | 免疫制御分野 生田 宏一 | 脂肪組織における IL-7 の機能解析 |
| 国立感染症研究所ウイルス第一部 下島 昌幸 室長 | 分子遺伝学分野 藤田 尚志 教授 加藤 博己 准教授 山田 辰太郎 大学院生 | 重症熱性血小板減少症候群ウイルスの病原性発現機序の解明 |
| 藤田保健衛生大学総合医科学研究所 遺伝子発現機構学研究分門 前田 明 教授 | RNA システム分野 大野 睦人 教授 谷口 一郎 助教 | mRNA 前駆体から機能ある環状 RNA が作られ運ばれる仕組み |
| 筑波大学生命領域学生研究センター 西村 (佐田) 亜衣子 助教 | 組織恒常性システム分野 豊島 文子 教授 一條 遼 博士研究員 | 皮膚の恒常性維持における表皮幹細胞のダイナミクス解析 |

学術集会

Commemorative Symposium for “Institute for Frontier Life and Medical Sciences, Kyoto University”

Date: Oct.19 (Thu) 2017 9:00-12:25

Venue: Biwako Hotel

| | |
|-------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| Opening remark | Director Yuji Hiraki |
| “Why and how human T-cell leukemia virus type 1 causes diseases” | Masao Matsuoka (Kumamoto University) |
| “Role of interferons in Zika virus infection and disease” | Akiko Iwasaki (Yale University) |
| “Control of immune responses by regulatory T cells” | Shimon Sakaguchi (Osaka University) |
| “Molecular regulation of tissue-resident regulatory T cell development” | Axel Kallies (The University of Melbourne) |
| Closing remark | Vice Director Hiroshi Kawamoto |

2nd Kyoto International Symposium on Virus-Host Coevolution / Human-Nature Interlacement Life Science

(Joint Symposium of Institute for Frontier Life and Medical Sciences (infront) and Primate Research Institute)

13th (Mon) November, 2017 10:00-16:40

Yamauchi Hall, Shiran-Kaikan, Kyoto

Program

| | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| “Opening remark” | Yuji Hiraki (Institute for Frontier Life and Medical Sciences, Kyoto University) | Chair : Yoshio Koyanagi |
| “Pathogenesis of primate T-cell leukemia virus type 1” | Masao Matsuoka (Faculty of Life Sciences, Kumamoto University) | |
| “Evolution of HIV-1 and the related retroviruses” | Yoshio Koyanagi (Institute for Frontier Life and Medical Sciences, Kyoto University) | |
| “Changing nature of H5N1 avian influenza virus in Egypt” | Yohei Watanabe (Department of Infectious Diseases, Kyoto Prefectural University of Medicine) | |
| “Selective evolution of an anti-retroviral host factor TRIM5 in macaque monkeys” | Hirofumi Akari (Primate Research Institute, Kyoto University) | Chair : Kei Sato |
| “Evolution-guided enhancement of human antiviral immunity” | Alex Compton (National Cancer Institute, NIH) | Chair : Hiroo Imai |
| “Comparison of whole genome Simian betaretrovirus (SRV) from wild caught Indonesian macaques with published references” | Joko Pamungkas (Primate Research Center, Bogor Agricultural University, Indonesia) | Chair : Hirohisa Hirai |
| “Receptor-ligand interaction in various types of primates” | Hiroo Imai (Primate Research Institute, Kyoto University) | |
| “Bornavirus-derived genes in mammalian genomes” | Masayuki Horie (Hakubi Center for Advanced Researches/ Institute for Frontier Life and Medical Sciences, Kyoto University) | |
| “The outcome of the joint project and closing remarks” | Yoshio Koyanagi and Takakazu Yumoto (Institute for Frontier Life and Medical Sciences, Primate Research Institute, Kyoto University) | |

京都大学ウイルス・再生医科学研究所
「再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点」
平成 28 年度共同研究報告会

開催日：2017 年 3 月 24 日（金）

場 所：京都大学ウイルス・再生医科学研究所

開会挨拶

所長 開 祐司（京都大学ウイルス・再生医科学研究所）

「再生現象を顕微鏡レベルで可視化する超高解像度磁気共鳴イメージング技術の開発」

青木 伊知男 チームリーダー（放射線医学総合研究所分子イメージング研究センター）

「iPS 細胞技術とゲノム編集を用いた効率のよいがん抗原特異的キラー T 細胞の再生」

縣 保年 教授（滋賀医科大学化学分子生物学講座）

「遺伝子改変多能性幹細胞を用いた網膜芽細胞腫及び二次がん発生機構の解明」 森 泰昌 医員（国立がん研究センター中央病院）

「膵内分泌腫瘍の新規がん抑制遺伝子 PHLDA3 の機能抑制を利用した膵島移植効率向上法の確立」

大木 理恵子 研究員（国立がん研究センター研究所）

「ヒト多能性幹細胞からの各種心筋細胞の選択的分取とその解析および心臓の再構成」 白吉 安昭 准教授（鳥取大学医学系研究科）

「ES 細胞の多能性制御に関わる新規遺伝子の機能解析」

堀江 恭二 教授（奈良県立医科大学医学部）

「新規サイクリン関連遺伝子の脊髄神経管分化・成長における役割」

笹井 紀明 准教授（奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科）

ウイルス・再生医科学研究所 第 12 回公開講演会

開催日：2017 年 7 月 15 日（土）

場 所：京都大学百周年時計台記念館 1 階 百周年記念ホール

開会挨拶

「生物のデザインを理解して再現する～発生生物学と幹細胞制御技術～」

永樂 元次（ウイルス・再生医科学研究所 教授）

「エイズウイルスの過去と現在」

小柳 義夫（ウイルス・再生医科学研究所 教授・副所長）

分野主催のセミナー

| 開催日 | 講演者・所属 | 演 題 | 主催分野 |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2017. 1.12 | 中島 友紀 (東京医科歯科大学) | 骨リモデリングの制御機構 | バイオメカニクス |
| 2017. 1.20 | 成瀬 恵治 (岡山大学大学院 医歯薬学総合 研究科 システム生理学) | メカノメディスン：メカノ医工学を駆使した再生医療・生殖医療への展開 | 再生増殖制御学 |
| 2017. 2.10 | 植松 智 (千葉大学大学院医学研究院粘膜 免疫学・東京大学医科学研究所国 際粘膜ワクチン開発研究セン ター) | 急性、慢性放射線腸障害における自然免疫の役割 | 感染防御 |
| 2017. 2.10 | 奥村 敦 (Associate Research Scientist Center of Infection and Immunity, Columbia University Special volunteer at Rocky Mountain Laboratory, NIAID Laboratory of Virology) | 宿主遺伝子の多様性が可能にしたエボラ出血熱の病原性と抵抗性のシステム解析 | 微細構造ウイルス学 |
| 2017. 2.10 | 茶谷 昌宏 (昭和大学歯学部歯科薬理学講座) | 骨関連遺伝子改変メダカを駆使した新たな生命科学 研究 | 再生増殖制御学 |
| 2017. 3. 3 | 前田 直良 (北海道大学 薬学研究院 創薬科学 研究教育センター バイオ医薬学 部門) | 成人T細胞白血病治療標的としてのマトリセルラー 分子の意義 | システムウイルス学 |
| 2017. 3. 9 | 廣井 昇 (アルバート・アインシュタイン医 学校) | 22q11.2 染色体数変異—統合失調症と自閉スペクトラム 症に関連する遺伝子、行動表現型の解体— | 増殖制御システム |
| 2017. 3.27 | 間 陽子 (理化学研究所・分子ウイルス学特 別研究ユニット) | インシリコおよびナノ技術を駆使した牛白血病ペプ チドワクチンの開発 | 霊長類モデル |
| 2017. 3.27 | 張 險峰 (Harbin Veterinary Research Institute, CAAS, Harbin, China) | Mechanism of Vpr Enhancement of Env expression during HIV-1 infection of macrophages and dendritic cells | 霊長類モデル |
| 2017. 4.20 | Emiko Urano (Tsukuba Primate Research Center, National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition (Current) HIV Dynamics and Replication Program, National Cancer Institute) | Resistance Pathways for Potent and Broadly Active HIV-1 Maturation Inhibitors; Insights Into Gag Structure During Assembly and Maturation | システムウイルス学 |
| 2017. 5.17 | Taeyoon Kim (Weldon School of Biomedical Engineering, Purdue University) | Reconstructing the Mechanical Behaviors of Cells in Silico | バイオメカニクス |
| 2017. 6. 7 | 宮崎 徹 (東京大学大学院医学系研究科) | 血中タンパク質 AIM による生体内異物除去機構を基 盤とした新しい疾患治療パラダイム | ウイルス共進化 |
| 2017. 6.14 | 長谷川 秀樹 (国立感染症研究所) | インフルエンザと次世代ワクチン | がんウイルス |
| 2017. 6.23 | Noelia Urbán (Investigator Scientist, The Francis Crick Institute, London, UK) | Ascl1 post-transcriptional regulation in the developing and adult brain | 増殖制御システム |
| 2017. 6.23 | 鐔田 武志 (東京医科歯科大学難治疾患研究 所) | 糖鎖、核酸と B リンパ球応答 | 免疫制御 |
| 2017. 6.28 | 宮下 脩平 (東北大学大学院農学研究科植物 病理学分野) | 植物ウイルスのもつ社会システムを、実験と数理モ デリングで覗き見る | システムウイルス学 |

| 開催日 | 講演者・所属 | 演 題 | 主催分野 |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2017. 7. 5 | 小林 剛 (大阪大学微生物病研究所 ウィルス免疫分野) | 分節2本鎖 RNA ウィルスにおける遺伝子操作系の確立と展開 | RNA ウィルス |
| 2017. 7.12 | 幸谷 愛 (東海大学総合医学研究所医学部) 内科学系血液腫瘍内科造血腫瘍分野 | EBV 関連リンパ腫における EBV 感染腫瘍由来エクソソームの役割 | 感染防御 |
| 2017. 7.14 | 戸邊 一之 (富山大学医学部第一内科学) | 脂肪組織マクロファージによる インスリン感受性の調節 | 免疫制御 |
| 2017. 7.19 | 橋口 隆生 (九州大学医学部) | RNA ウィルスの細胞侵入機構と宿主による液性免疫応答 | 微細構造ウイルス学 |
| 2017. 7.24 | Saumendra N. Sarkar (University of Pittsburgh Cancer Institute Hillman Cancer Research, USA) | Recent progress on OASL study | 分子遺伝学 |
| 2017. 7.26 | 松野 啓太 (北海道大学大学院獣医学研究院微生物学教室) | ダニ媒介性フレボウィルスの多様性と病原性 | 分子遺伝学 |
| 2017. 8. 2 | 戸田 智久 (Laboratory of Genetics, Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, USA) (Fred H. Gage lab) | The role of nuclear structural protein for the maintenance of neural progenitors | 生命科学研究科 |
| 2017. 9.11 | Daniel Sauter (Institute of Molecular Virology, Ulm University Medical Center, Ulm, Germany) | Global transcriptome analyses reveal extensive suppression of antiviral immune responses by the HIV-1 accessory protein Vpu | システムウイルス学 |
| 2017. 9.20 | 山路 剛史 (The Rockefeller University, Thomas Tuschl lab.) | 生殖細胞の発生と腫瘍化抑制に働く新たな mRNA 制御機構 | RNA システム |
| 2017. 9.27 | 宮崎 直幸 (大阪大学 蛋白質研究所) | クライオ電子顕微鏡単粒子構造解析法によるウイルスや蛋白質複合体の近原子分解能構造解析 | 微細構造ウイルス学 |
| 2017. 9.28 | Juana Diez (University Pompeu Fabra, Barcelona) | A novel translational control mechanism hijacked by viruses that involve RNA structures within coding sequences | システムウイルス学 |
| 2017. 9.28 | Andreas Meyerhans (University Pompeu Fabra, Barcelona) | Virus infection fate regulation: transcriptional dynamics reveals a critical role of the Xcl1-Xcr1 communication axis in chronic infections | システムウイルス学 |
| 2017. 9.29 | Luis G. Morelli (Group Leader, IBioBA CONICET- Max Planck Society Partner Institute Buenos Aires, Argentina) | Collective oscillations in the zebrafish segmentation clock | 増殖制御システム |
| 2017.10. 3 | 古寺 哲幸 (金沢大学・バイオ AFM 先端研究センター) | 高速 AFM による生体分子のビデオ観察 | 生体膜システム |
| 2017.10. 4 | 竹田 潔 (大阪大学大学院医学系研究科・免疫学フロンティア研究センター) | 腸管恒常性維持機構の解析 | 感染防御 |
| 2017.10. 6 | 長崎 慶三 (高知大学農林海洋科学部 水圏ウイルス研究室) | ウイルスと宿主は一蓮托生：寛容が支える共存関係 | RNA ウィルス |
| 2017.10.23 | 鈴木 康嗣 (Department of virology, Viruses and RNAi unit, Institut Pasteur, France) | シマカゲノム中の内在性フラビウイルス配列の解析とウイルス媒介能への関与の可能性 | システムウイルス学 |

| 開催日 | 講演者・所属 | 演 題 | 主催分野 |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2017.11. 2 | Gabriel Nuñez (Department of Pathology and Comprehensive Cancer Center, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan, U.S.A.) | Control of Pathogen Colonization by Host Immunity and the Microbiota in the Gut | 感染防御 |
| 2017.11. 6 | 高松 由基 (Institut für Virologie, Philipps- Universität Marburg, Germany) | エボラウイルスの複製機構の解明 1) スクレオカプ シドの輸送機序、2) VP30 リン酸化の分子機序 | 微細構造ウイルス学 |
| 2017.11. 8 | 宮田 卓樹 (名古屋大学大学院医学系研究科) | 脳形成テクトニクスにおける流れと澱み | バイオメカニクス |
| 2017.11.10 | Nicolas Chevrier (Institute for Molecular Engineering, The University of Chicago) | A predictive framework for adjuvant combinatorics reveals potent anti-cancer vaccines | 感染防御 |
| 2017.11.10 | Nathalie Grandvaux (Université de Montréal Research Chair in Signaling of Viral Infections and Oncogenesis, Canada) | Study the innate IFN response to Respiratory Syncytial Virus (RSV) | 分子遺伝学 |
| 2017.11.14 | Alex Compton (National Cancer Institute (NIH/ NCI)・Head) | Evolution-guided enhancement of human antiviral immunity | システムウイルス学 |
| 2017.12. 4 | Raul Vizcardo (アメリカ国立衛生研究所国立がん 研究所) | Developing the next generation of iPSC cell-based therapies | 再生免疫学 |
| 2017.12.19 | Masayuki Shimojima (National Institute of Infectious Diseases, Tokyo) | New findings including unpublished data of SFTSV. | 分子遺伝学 |

構成員名簿

(2018年1月1日現在)

◆京都大学ウイルス・再生医科学研究所教職員等◆

所長(兼): 開 祐 司 副所長(兼): 小 柳 義 夫, 河 本 宏

◆京都大学ウイルス・再生医科学研究所諮問会議◆

井 上 純一郎(東京大学医科学研究所教授)
月 田 早智子(大阪大学大学院生命機能研究科教授)
長 田 重 一(大阪大学免疫学フロンティア研究センター教授)
岩 井 一 宏(京都大学大学院医学研究科教授)
中 部 主 敬(京都大学大学院工学研究科教授)
松 田 道 行(京都大学大学院生命科学研究科教授)
開 祐 司(ウイルス・再生医科学研究所所長)
小 柳 義 夫(ウイルス・再生医科学研究所副所長)
河 本 宏(ウイルス・再生医科学研究所副所長)

◆京都大学ウイルス・再生医科学研究所運営委員会委員◆

<ウイルス感染症・生命科学先端融合的共同研究拠点>

石 野 史 敏(東京医科歯科大学難治疾患研究所所長)
松 浦 善 治(大阪大学微生物病研究所所長)
保 富 康 宏(医薬基盤・健康・栄養研究所 霊長類医科学研究センターセンター長)
井 上 純一郎(東京大学医科学研究所教授)
小 柳 義 夫(ウイルス・再生医科学研究所副所長)
朝 長 啓 造(ウイルス・再生医科学研究所教授)
秋 山 芳 展(ウイルス・再生医科学研究所教授)
野 田 岳 志(ウイルス・再生医科学研究所教授)

<再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点>

大 隅 典 子(東北大学大学院医学系研究科教授)
坂 口 志 文(大阪大学免疫学フロンティア研究センター特任教授)
妙 中 義 之(国立循環器病研究センター研究開発基盤センターセンター長)
田 中 栄(東京大学大学院医学系研究科教授)
月 田 早智子(大阪大学大学院生命機能研究科教授)
長 田 重 一(大阪大学免疫学フロンティア研究センター教授)
西 田 幸 二(大阪大学大学院医学系研究科教授)
岩 井 一 宏(京都大学大学院医学研究科教授)
河 本 宏(ウイルス・再生医科学研究所副所長)
田 畑 泰 彦(ウイルス・再生医科学研究所教授)
瀬 原 淳 子(ウイルス・再生医科学研究所教授)
戸口田 淳 也(ウイルス・再生医科学研究所教授)
近 藤 玄(ウイルス・再生医科学研究所教授)

■ウイルス感染研究部門■

<分子遺伝学分野>

教授：藤田尚志 准教授：加藤博己 特定准教授：岡部泰賢 特定助教：木檜 周
研究員：應田涼太 教務補佐員：呉 成旭 技術補佐員：木村春奈, 吉原智美 事務補佐員：小柴里美
大学院生：山田辰太郎, 覃 勉, 大音泰介, 池田宗太郎, 脇本 舞, 羽者家宝, AbuTayeh Ahmed, 竹内文彦, 李 受玫,
沙 添威, Horton Amanda Claire, Khalil Jumana A.T, 清水翔太, Emralino Francine Lianne, Saikruang Wilaiporn, Duić Ivana,
阿部寛登, 早田信正, 尾田 遥, 古座岩範保, 島田雄貴, 富永哲明, 柳井智行, 白坂勇太郎, Huynh Duc
研究生：鬼澤秀夫 共同研究者：船曳正英

<ウイルス制御分野>

講師：安永純一朗 助教：志村和也 臨床検査技師：大西知帆
研究員：馬 広勇, Mohamed Mohamed Mahgoub Mohamed Ahmed, 栗田大輔 派遣職員：日黒智美
大学院生：樋口悠介, 豊田康祐, 七條敬文 教務補佐員：刑部麻衣子 共同研究者：前田道之, 趙 鉄軍

<RNA ウィルス分野>

教授：朝長啓造 特定准教授：堀江真行 特定助教：牧野晶子, 小松弓子
事務補佐員：若城佳寿美
大学院生：山本祐介, 小嶋将平, 柳井真瑚, 小森園亮, Bea Garcia, 酒井まどか, 具志堅正興, 武知美和, 向井八尋, 角家洋次
共同研究者：本田知之, 平井悠哉

<微細構造ウイルス学分野>

教授：野田岳志 助教：中野雅博 特定研究員：神道慶子 日本学術振興会特別研究員 (RPD)：村本裕紀子
日本学術振興会 外国人特別研究員：Jamie Lynn Gilmore 技術補佐員：森田裕弥
大学院生：武長 徹, 宮本 翔, 山形優太郎, 田村涼馬, Connor Park
学部生：藤田陽子 共同研究者：井上浄, 杉田征彦, 谷 英樹 交換留学生：Jing shih-Wei

<がんウイルス分野>

准教授：酒井博幸, 土方 誠 助教：柳川伸一 技術補佐員：石田 薫
大学院生：赤堀祐一, 李 宗南, 岡村 瞳, 宮山陽平, 菊田駿一, 堀 一樹, 李 海仁

<細胞制御分野>

教授：杉田昌彦 助教：森田大輔, 水谷龍明
大学院生：大内結貴, 翠川陽大, 嶋 耀子, 吉岡佑弥, 国松友香, 世良隼太

<免疫制御分野>

教授：生田宏一 助教：竹本経緯子, 原 崇裕, 崔 広為 研究員：榛葉旭恒
大学院生：向平妃沙, 朱 媛博, 阿部真也, 岡崎史恵, 旭 拓真, 江島亜希, 高見大地
共同研究者：谷一靖江, 高原和彦, 清水 章

<感染防御分野>

教授：竹内 理 助教：三野享史 助教：植畑拓也 研究員：若林敦子
技術補佐員：長谷川純子
大学院生：中塚賀也, 阿部壮岐, Xiaotong Cui, 貞廣暁利, 夜久 愛, 吉永正憲, Fabian Hia, 赤木宏太郎, 山嵜大智, 岩井紀貴,
道坂沙貴, 山田信之輔, Chong Yee Kien, Yang sheng-Fan, 市野瀬拓也,
共同研究者：増谷 弘

<応答調節分野>

客員教授：河岡義裕 客員准教授：佐藤賢文

<ウイルス免疫分野>

客員教授：Charles R. M. Bangham

■再生組織構築研究部門■

<細胞機能調節学分野>

准教授：細川暢子 講師：平芳一法 助教：藤本真慈

大学院生：服部徳哉，松井優人，于 尚誉，花房 賢，氏家 梓，中川幸大，平田幸大

研修員：法邑賢一

<生体材料学分野>

教授：田畑泰彦 助教：城潤一郎 特定研究員：吉澤恵子

技術補佐員：高橋香織，床田千穂子

事務補佐員：吉岡奈美

大学院生：田中隆介，成田 萌，村田勇樹，許 峻睿，穴水美菜，森岡智子，山下幸大，村上隆英，鈴木貴久，

内田雄一郎，金丸麻衣，上本裕介

学部生：大川将志，西菌拓也，今西綾乃

研究員（民間等共同研究員）：井上佳一郎，藤田悠二

研究員（受託研究員）：井田昌孝，吉見智彦，駒田行哉，上村 聡，石丸純子，早乙女俊樹，平山奈津実，朝倉光博，阿内康平，

松野久美子，中村耕一郎，水野克秀

研究員（内地研究員）：西東洋一

共同研究者：佐藤貴彦

<再生増殖制御学分野>

教授：瀬原淳子 助教：飯田敦夫 特定助教：佐藤文規 教務補佐員：荒井宏行

技術補佐員：黒田信子，岩瀬海里 事務補佐員：渡邊祐子

大学院生：栗木麻央，曾我部舞奈，堀 新平，王 梓，Choi Minyong，田淵麻衣

<再生免疫学分野>

教授：河本 宏 准教授：宮崎正輝 助教：増田喬子 特定助教：趙 向東，上堀淳二

特定研究員：永野誠治，小林由佳 非常勤研究員：宮崎和子，渡邊 武

事務補佐員：藤井絵里香 技術補佐員：瀬和敬子 派遣職員：（技術補佐員）白敷いずみ，野口友里亜

（事務補佐員）中宮真梨恵，矢崎理恵

大学院生：長畑洋佑，西村有史，糸原 俊 特別研究学生：嘉島相輝 共同研究者：縣 保年

<組織再生応用分野>

教授：戸口田淳也 准教授：吉富啓之，岡本 健（附属病院） 特定助教：金 永輝（附属病院）

特定拠点助教：Cantas Alev (CiRA) 研究員：玉置さくら 特定職員：永田早苗 (CiRA)

教務補佐員：出口法子（附属病院） 事務補佐員：安田尚代，芳野麻里絵

派遣職員（技術補助）：小山優子，羽田匡孝，植村茉耶，奥村奈央

大学院生：川井俊介，宗圓 充，磯部 悠，山中良裕，鎌倉武史，天ヶ瀬凜，前川裕継，湯川愛友

共同研究者：宝田剛志，渡辺 真，水品善之，田中公輔，日野恭介，山本理絵，西尾 恵

<臓器・器官形成応用分野 中村 G >

准教授：中村達雄

非常勤講師：茂野啓示，稲田有史，村田宮彦，東高志，堀義生，萩原明於

特定研究員：荒木 淳 研修員：町口敏彦，中本裕也 技術補佐員：石田久恵 事務補佐員：矢延聡枝

大学院生：豊洋次郎，坂口泰人，村西佑介，上田雄一郎 研究生：金子真弓，畑山敬秀

<臓器・器官形成応用分野 角 G >

准教授：角昭一郎 非常勤講師：小川知彦，白水泰昌，金宗 潤

民間等共同研究員：柳井伍一，大蘭三千代 事務補佐員：上野小寿恵

大学院生：楊 凱強，楊 心好，Priyadarshini Naskar Canning

<発生エピゲノム分野 多田 G>

准教授：多田 高 研究員：福地恵美

大学院生：勅使河原利香, 曹 準権

<発生エピゲノム分野 中馬 G>

連携教授：中辻憲夫 准教授：中馬新一郎 特定研究員：細川美穂子

教務補佐員：森部江美子, 酒井睦美, 刀谷在美

大学院生：林 瑛理, 中川史之

<胚性幹細胞分野>

准教授：末盛博文 特定講師：川瀬栄八郎 特定教授：浅田 孝 特定職員：高田 圭 特定研究員：山内香織

事務補佐員：廣富ひとみ

<統合生体プロセス分野>

教授：近藤 玄 准教授：廣田圭司 助教（兼）：渡邊仁美

<生体再建学分野>

客員教授：坂口志文 特定助教：三上統久 研究員：大崎一直, 木本富子, 安田圭子

連携研究支援員：松浦真由美 技術補佐員：山本恵津子

<生体物性学分野>

(欠員中)

<再生医工学分野>

客員教授：Mohammad R. K. Mofrad

■生命システム研究部門■

<生体分子設計学分野>

教授：開 祐司 助教：三浦重徳, 有馬祐介 研究員：滝本 晶 特定研究員：戸田満秋

技術補佐員：杉山弘美 事務補佐員：鈴木義子

大学院生：栞原 令, 磯部 潤, 柴沼宏輔

<ナノバイオプロセス分野>

助教：笠井倫志 研究員：坪井久恵 教務補佐員：小島久美子

<バイオメカニクス分野>

教授：安達泰治 准教授：井上康博 講師：OKEYO Kennedy Omondi

助教：亀尾佳貴

特定研究員：木村健治, Yann Guyot 教務補佐員：須長純子 事務補佐員：平良美智代

大学院生：芦谷遼太郎, 安藤悠太, 竹田宏典, 立尾 樹, 仲尾信彦, 宮 雄貴, 石川敬一, 小笹正裕, 松田淳志, 齋梧 等,

玉嶋雄大, 木部善清, 河野沙紀, 佐藤優里佳

学部生：楠瀬彬久, 鳥遼太郎, 清水桜子, 寺澤良亮, 森 泉, 森川健太郎

特別研究学生：金 英寛

<発生システム制御分野>

教授：永樂元次 准教授：大申雅俊 特定研究員：瀬戸裕介 企業等共同研究研究員：黒田貴雄

共同研究者：森 俊介, 奥田 覚 大学院生：秋山拓海, 神林 昌 学部生：河嶋 照, 小林 翼, 吉田 慧

事務補佐員：和穎 文

<システムウイルス学分野>

教授：小柳義夫 講師：佐藤 佳 研究員：中野雄介 教務補佐員：三沢尚子

大学院生：山田英里, Juárez Guillermo, Soper Andrew, 木村出海, 今野順介, 長岡峻平, 山本啓輔

共同研究者：眞弓 慶, 関 貴弘

<増殖制御システム分野>

教授：影山龍一郎 准教授：大塚俊之 助教：小林妙子 特定助教：下條博美 研究員：楯谷智子
学振特別研究員：荒木杏菜, 越智翔平 教務補佐員：小林久美子, 前田勇樹, 岩本由美子, 倉橋むつみ
技能補佐員：谷本貴子 事務補佐員：澤田英里 オフィス・アシスタント：榎 泰祐
大学院生：坂本 進, 貝瀬 峻, 高木あかり, 松宮舞奈, 松崎公信, 山口優輔, 末田梨沙, 朴 文恵,
CHAMBERS Jack, SHQIRAT J.M. Mohammed, 大木圭佑, 木下晃 研究生：MAVUK Özgün
共同研究者：今吉 格, 磯村彰宏, 山田真弓

<生体情報分野>

(欠員中)

<RNA システム分野>

教授：大野陸人 助教：北畠 真, 谷口一郎 研究員：竹岩俊彦, 町谷充洋, 堀川 航, 浜島りな
大学院生：川本崇仁

<生体膜システム分野>

教授：秋山芳展 准教授：森 博幸 助教：檜作洋平 特定研究員：石井英治 研究員：大門康志
技術補佐員：佐野美智代 技能補佐員：伊藤 淳
大学院生：宮崎亮次, 吉谷亘平, 田中勇真, 三宅拓也, 宇部滉一, 本名彩正, 渡邊哲朗

<組織恒常性システム分野>

教授：豊島文子 助教：小田裕香子 特定研究員：石橋理基 技術補佐員：太田陽子
大学院生：一條 遼, 上月智司, 岡田拓也, 松山奈央, 久保嘉一, 阿部浩太, 廣田紗奈, 森 美樹

<発がん機構分野>

教授：米原 伸

<情報制御学分野>

客員教授：松岡雅雄

■附属感染症モデル研究センター■

センター長(兼)：朝長啓造

<霊長類モデル分野>

准教授：三浦智行 研究員：姫野 愛 技術補佐員：松浦嘉奈子
オフィス・アシスタント：鳥居也紗 派遣職員：菊川美奈子
大学院生：YALÇIN PISIL, 山浦瑞樹, 李 佳霖
共同研究者：志田壽利

<ウイルス感染症モデル分野>

教授：明里宏文 特定研究員：関 洋平 鷲崎彩夏 教務補佐員：村田めぐみ
技術補佐員：辻 薫, Tan Wei Keat

<ウイルス共進化分野>

准教授：宮沢孝幸 教務補佐員：金村優香 技術補佐員：正玄裕子
大学院生：宮穂里江, 橋本 暁, 小出りえ, 谷利爵公, 北尾晃一
共同研究者：坂口翔一, 下出紗弓, 平野丈夫, 司 悠真

技術専門職員：宮地 均, 小中(北野) さつき 技術職員：阪脇廣美, 水田量太

■附属再生実験動物施設■

教授・施設長(兼)：近藤 玄 准教授・副施設長(兼)：角昭一郎 准教授(兼)：廣田圭司 助教：渡邊仁美

技術専門職員：出口央士 技術職員：渋谷 翔， 俣野真帆， 教務補佐員：竹田理恵
技能補佐員：竹明フサ， 向 一哲， 竹内 宏， 川北美奈子， 高溝一郎， 吉田保子， 藤堂詩子， 鷺尾朱音， 穴田祐子， 佐治佑沙，
新 謙一， 柴山 厚子
研究支援推進員：古卿智英， 永井智美， 佐々木勉， 吉田美保， 富士原達美
事務補佐員：北澤志津江 派遣職員：西山尚之， 片山龍一

■非常勤講師■

| | | | | | | | |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 松野 啓太 | 長崎 慶三 | 小林 剛 | 橋口 隆生 | 宮崎 直幸 | 長谷川秀樹 | 鏑田 武志 | 竹田 潔 |
| 幸谷 愛 | 金田 安史 | 青木伊知男 | 中村 雅也 | 國枝 武和 | 河野 史倫 | 中村 和弘 | 渡部 良広 |
| 稲田 有史 | 茂野 啓示 | 堀 義生 | 萩原 明於 | 村田 宮彦 | 東 高志 | 小川 知彦 | 白水 泰昌 |
| 金宗 潤 | 仙石慎太郎 | 竹尾 透 | 坂口 教子 | 田中 淳 | 近藤 淳 | 須藤 亮 | 中島 友紀 |
| 芳賀 永 | 宮田 卓樹 | 宮下 修平 | 古寺 哲幸 | 宮崎 徹 | | | |

■事務部■

事務長：小林英治 総務掛長：服部和枝 主任：原 彰子， 瀬尾健太郎
教務補佐員：采女久実子 派遣職員：岩見直美， 竹島愛美 労務補佐員：稲垣きよみ

Annual Report
of the Institute for Frontier Life and Medical Sciences,
Kyoto University
Vol.2 2017

2018年9月25日 発行
京都大学ウイルス・再生医科学研究所



Institute for Frontier Life and Medical Sciences
Kyoto University