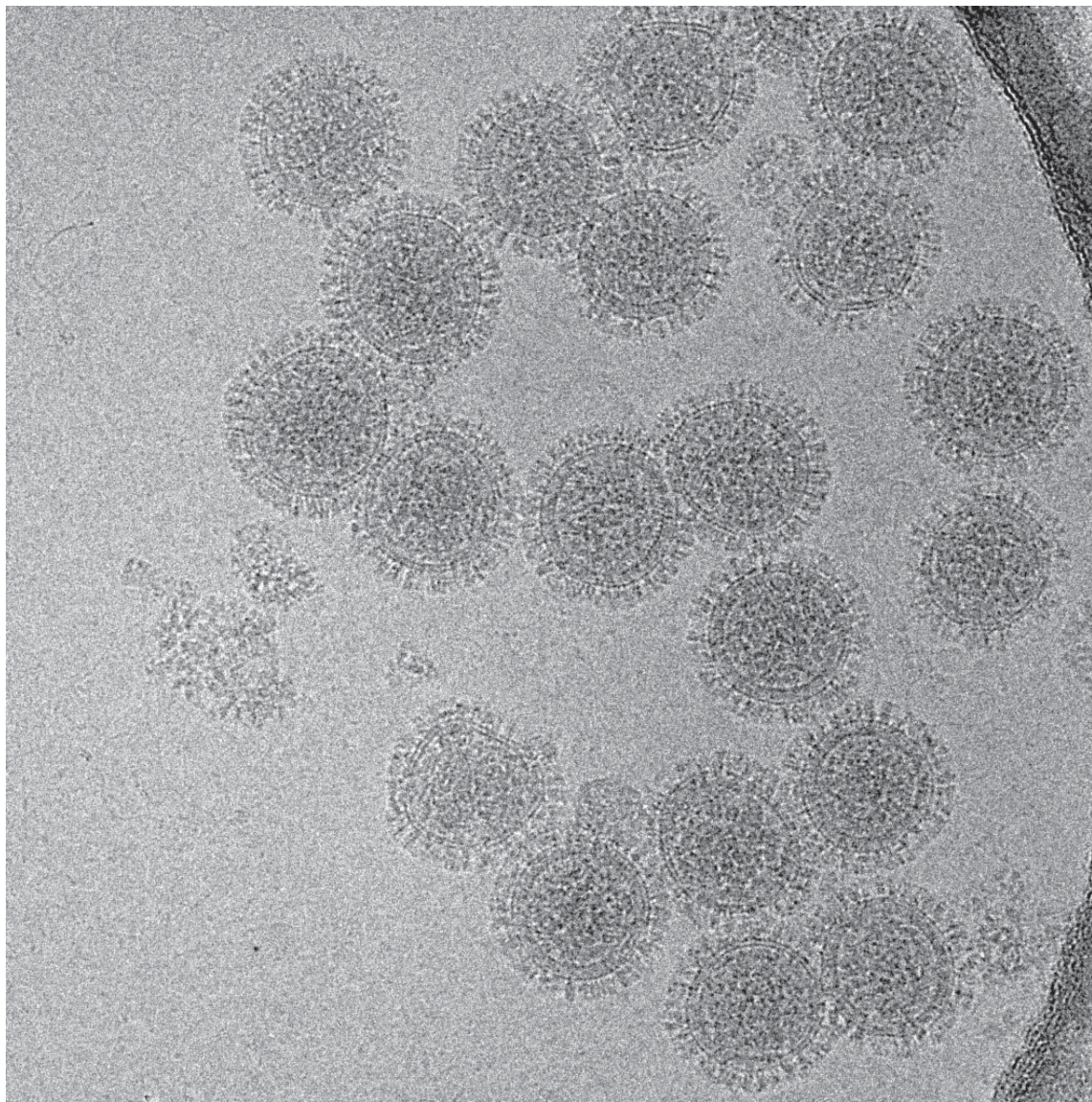


Annual Report

of the Institute for
Frontier Life and Medical Sciences
Kyoto University Vol. 1 2016



京都大学ウイルス・再生医科学研究所年報

Annual Report
of the Institute for Frontier Life and Medical Sciences

Vol.1 2016

Institute for Frontier Life and Medical Sciences
Kyoto University

表紙：

インフルエンザウイルスのクライオ電子顕微鏡像。A型インフルエンザウイルス粒子を精製後、急速凍結し、ネイティブなウイルス粒子構造をクライオ電子顕微鏡で観察した。撮影：神道慶子博士（微細構造ウイルス学分野）

Cover:

An electron micrograph of influenza virus particles. Purified influenza A virions are quickly frozen, and their native structures embedded in vitreous ice are visualized by cryoelectron microscopy. Photo taken by Dr. Keiko Shindo (Lab. of Ultrastructural Virology)

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 ウイルス分野 Laboratory of RNA Viruses	14
微細構造ウイルス学分野 Laboratory of Ultrastructural Virology	22
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	38

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	44
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	69
再生免疫学分野 Laboratory of Immunology	76
組織再生応用分野 Laboratory of Tissue Regeneration	82
臓器・器官形成応用分野 Laboratory of Organ and Tissue Reconstruction	91
発生エピゲノム分野 Laboratory of Developmental Epigenome	99
胚性幹細胞分野 Laboratory of Embryonic Stem Cell Research	104
統合生体プロセス分野 Laboratory of Integrative Biological Science	107
生体再建学分野 Laboratory of Experimental Immunology	110
生体物性学分野 Laboratory of Material Biophysics	118

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	122
ナノバイオプロセス分野 Laboratory of Nano Bioprocess	129
バイオメカニクス分野 Laboratory of Biomechanics	133
システムウイルス学分野 Laboratory of Systems Virology	142
増殖制御システム分野 Laboratory of Growth Regulation System	149
生体情報分野 Laboratory of Integrated Biological Information	155
RNA システム分野 Laboratory of RNA System	159
生体膜システム分野 Laboratory of Biological Membrane System	162
組織恒常性システム分野 Laboratory of Tissue Homeostasis	167
発がん機構分野 Laboratory of Tumor Biogenesis	172

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	175
ウイルス感染症モデル分野 Laboratory of Infectious Disease Model	180
ウイルス共進化学分野 Laboratory of Virus-Host Coevolution	184
動物実験委員会マウス作製支援チーム Reproductive Engineering Team	188

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

ウイルス研究所コンピューターネットワークシステム Computer Network of Institute for Virus Research	193
---	-----

共同研究	195
学術集会	229
分野主催のセミナー	231
構成員名簿	235

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
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。

1) キャップ構造を持たないウイルス由来の転写産物はストレス顆粒を誘導し、そこで RIG-I を活性化する

RIG-I は細胞質においてウイルス由来の RNA (vRNA) を識別して抗ウイルス応答を誘導する。しかし、細胞内での時空間的な vRNA の感知とシグナル伝達は明らかになっていなかった。そこで我々はニューカッスル病ウイルス（非分節、一本鎖マイナス鎖 RNA ウイルス）の感染した細胞内で起きる事象を時間軸に沿って詳細に検討した。始めに RIG-I はウイルスの複製複合体 (vRC) に集合し、そこで活性化され、感染初期のインターフェロン産生を誘導する。その後、感染が進行すると RIG-I はストレス顆粒 (antiviral stress granules, avSG) の形成に伴ってそこへの局在が誘導され、その時期に後期のインターフェロン産生が誘導される。avSG の形成をいくつかの方法で阻害すると、後期のインターフェロン産生が阻害された。このことより avSG は vRNA を効率良く感知する場であることが強く示唆された。avSG にはウイルスのポジティブ鎖 RNA が選択的に集合していることが判明した。また、興味深いことに感染細胞から抽出したポリ A⁺RNA はインターフェロン誘導能を有していることが判明した。非感染細胞からのポリ A⁺RNA はインターフェロン誘導能を持たないことから、ウイルス由来のポリ A⁺RNA が RIG-I を活性化していることが示唆された。詳細な検討の結果、ウイルスのリーダー配列から転写開始し、その後転写を終始せず次ぎの転写単位へ読み進んだ、read through RNA が RIG-I を活性化していることが判明した。この RNA はリーダー

配列から転写開始しているため、キャップ構造を持たない。以上ウイルス感染細胞ではウイルス複製の開始、宿主のストレス応答が起きること、これらの現象に伴って RIG-I がそれらの場に呼び寄せられること、そして抗ウイルス応答が誘導されることが明らかとなった。

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.

1) **Leader-Containing Uncapped Viral Transcript Activates RIG-I in Antiviral Stress Granules.**

RIG-I triggers antiviral responses by recognizing viral RNA (vRNA) in the cytoplasm. However, the spatio-temporal dynamics of vRNA sensing and signal transduction remain elusive. We investigated the time course of events in cells infected with Newcastle disease virus (NDV), a non-segmented negative-strand RNA virus. RIG-I was recruited to viral replication complexes (vRC) and triggered minimal primary type I interferon (IFN) production. RIG-I subsequently localized to antiviral stress granules (avSG) induced after vRC formation. The inhibition of avSG attenuated secondary IFN production, suggesting avSG as a platform for efficient vRNA detection. avSG selectively captured positive-strand vRNA, and poly (A)⁺ RNA induced IFN production. Further investigations suggested that uncapped vRNA derived from read-through transcription was sensed by RIG-I in avSG. These results highlight how viral infections stimulate host stress responses, thereby selectively recruiting uncapped vRNA to avSG, in which RIG-I and other components cooperate in an efficient antiviral program.

List of Publications

- Hsu, A.C., Parsons, K., Moheimani, F., Knight, D.A., Hansbro, P.M., Fujita, T., and Wark, P.A. (2016). Impaired Antiviral Stress Granule and IFN- β Enhanceosome Formation Enhances Susceptibility to Influenza Infection in COPD Epithelium. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.** 55, 117.
- Oh, S.-W., Onomoto, K., Wakimoto, M., Onoguchi, K., Ishidate, F., Fujiwara, T., Yoneyama, M., Kato H., and Fujita, T. (2016). Leader-Containing Uncapped Viral Transcript Activates RIG-I in Antiviral Stress Granules. **PLoS Pathog.** doi: 10.1371/journal.ppat.1005444.

List of Presentations

- Yao, W.-L., Ikeda, S., Tsukamoto, Y., Shido, K., Otakaki, Y., Qin, M., Iwasawa, Y., Takeuchi, F., Kaname, Y.,

- Chou, Y.-C., Chang, C., Watashi, K., Wakita, T., Noda, T., Kato, H., and Fujita, T. Establishment of a human hepatocellular cell line capable of maintaining long-term replication of hepatitis B virus. 4th JAPAN-TAIWAN Research Symposium on Hepatitis B Virus, Taipei, April 9-10, 2016
- Tsukamoto, Y., Ikeda, S., Yao, W-L., Hirano, E., Ootakaki, Y., Kato, H and Fujita, T. Screening for novel inhibitors against Hepatitis B virus replication targeting HBV polymerase-viral pregenomic RNA interaction. The 15th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, September 6-9, 2016
- Akahori, Y., Kato, H., Fujita, T., Moriishi, K., Watashi, K., Wakita, T. and Hijikata M. Development of an HBV culture system using 3D cultured immortalized human hepatocytes transduced with HBV entry receptor. The 15th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, September 6-9, 2016
- Takeuchi, F., Ikeda, S., Tsukamoto, Y., Yao, W-L., Iwasawa, Y., Ootakaki, Y., Qin, M., Narita, R., Kogure, A., Kato, H. and Fujita, T. New screening system for hepatitis B virus cccDNA. The 15th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, September 6-9, 2016
- Yamada, S., Shimojima, M., Narita, R., Kato, H., Saijo, M. and Fujita, T. Analysis of innate immune responses in SFTSV infection. The 15th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, September 6-9, 2016
- Ikeda, S., Yao, W-L., Tsukamoto, Y., Takeuchi, F., Qin, M., Tien, C-F., Iwasawa, Y., Ootakaki, Y., Kaname, Y., Kato, H. and Fujita, T. Gene expression analysis for Hepatitis B Virus (HBV) infected cells via flow cytometry. The 15th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, September 6-9, 2016
- Kogure, A., Yoneyama, M., Kato, H. and Fujita, T. TATA-binding protein (TBP) blocks Influenza virus infection. Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, September 6-9, 2016
- Abe, H., Takeuchi, K., Kato, H. and Fujita, T. Investigation of the key interaction of IRF-3 activation as a therapeutic target site of autoimmunity. Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, September 6-9, 2016
- Oh, S-W., Onomoto, K., Wakimoto, M., Onoguchi, K., Ishidate, F., Fujiwara, F., M., Yoneyama, Kato, H. and Fujita T. Leader-Containing Uncapped Viral Transcript Activates RIG-I in Antiviral Stress Granules. Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, September 6-9, 2016
- Wakimoto, M., Ishidate, F., Fujiwara, T., Kato, H. and Fujita, T. The function of antiviral signal molecule IPS-1 via mitochondria. Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, September 6-9, 2016
- Onizawa, H., Kato, H., Funabiki, M., Ohto, T., Abu Tayeh, A. Lee, S-M., Shimizu, S., Emralino, L., Soda, N. and Fujita, T. Encephalitis in mutant mice with constitutively activated MDA5. Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, September 6-9, 2016
- Soda, N., Miyamoto, A., Kamijyo, R., Sakai, N., Takami, M., Kato, H. and Fujita, T. Activation of MDA5 and

TLR3 affects the differentiation of osteoclasts via IFN- β . Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, September 6-9, 2016

Fujita, T. Sensing viral RNA and activation of antiviral responses. The 2nd International Symposium on Molecular Basis of Virus-Host Interactions, Sapporo, October 22-23, 2016

Akahori, Y., Kato, H., Fujita, T., Moriishi, K., Watashi, K., Wakita, T. and Hijikata M. Development of novel hepatitis B virus culture system using immortalized human hepatocytes. The 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Sapporo, October 23-25, 2016

Fujita, T. Auto immune diseases caused by gain of function mutation of RIG-I-Like Receptors. The 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Okinawa, December 5-7, 2016

Onizawa, H., Kato, H., Soda, N., Funabiki, M. and Fujita, T. Encephalitis in mutant mice with constitutively activated MDA5. The 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Okinawa, December 5-7, 2016

藤田尚志 ウイルスセンサー、RIG-I-Like Receptor の機能異常による自己免疫疾患 第一回北大・部局横断シンポジウム、札幌、2016年3月7日

山田辰太郎、下島昌幸、成田亮、加藤博己、西條政幸、藤田尚志 Analysis of innate immune responses in SFTSV infection 第81回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、長崎、2016年5月13-14日

阿部寛登、竹内恒、加藤博己、藤田尚志 Investigation of the key interaction of interferon regulatory factor-3 activation as a potential therapeutic target site of autoimmunity 第81回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、長崎、2016年5月13-14日

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。これらヒトレトロウイルスの研究を通じて“がん”“免疫”“ウイルス”の解析を行うと共に、その克服を目指した研究を推進している。

1) HTLV-1 感染細胞の特性と病原性発現機構の解析

HTLV-1 は、CD4 陽性 CD25 陽性 T リンパ球の悪性腫瘍である ATL、HTLV-1 関連脊髄症や HTLV-1 ぶどう膜炎といった炎症性疾患の原因となるヒトレトロウイルスである。HTLV-1 プロウイルスは、そのプラス鎖に *tax*、マイナス鎖に *HTLV-1 bZIP factor* (HBZ) をコードし、HTLV-1 の複製及び病原性に重要な役割を果たしている。これまでの解析から、Tax は HTLV-1 の複製や個体間伝播に必須であり、HBZ は感染者体内における感染細胞のクローナル増殖、炎症、発がん重要な役割を果たすと考えている。HTLV-1 感染細胞ではケモカインレセプターである CCR4 が高発現しており、治療標的として重要である。CCR4 発現亢進の機序として HBZ が転写因子 GATA3 の誘導を介して CCR4 の転写を活性化することを見出した。HBZ-Tg マウスの CD4 陽性 T 細胞は CCR4 を強く発現すると同時に、細胞増殖マーカー Ki67 陽性、CD103 陽性であった。実際の ATL 症例における皮膚病変を用いて組織解析を行ったところ、ATL の皮膚浸潤の特徴であるポトリエ微小膿瘍に存在する ATL 細胞が CCR4 及び CD103 を高発現し、同時に Ki67 陽性であることが判明した。CD103 リガンドである E-カドヘリンは皮膚表皮細胞で高発現することが知られており、HBZ は CCR4 発現を誘導することで感染細胞及び ATL 細胞の皮膚浸潤を促進し、さらに CCR4 と CD103 によるシグナルを介して増殖を亢進させる結果、ATL 特有の皮膚病変を形成すると考えられた。本成果は *Cancer Research* 誌に発表した。一方、HBZ が免疫抑制性受容体 T-cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains (TIGIT) を誘導することを見出し、ATL 細胞でも高発現していることを確認した。元来 TIGIT は活性化 T 細胞で発現し、その増殖を抑制すると同時に樹状細胞上の CD155 を認識し IL-10 の産生を促進し免疫応答を抑制する。HAM 症例の解析では Tax 特異的 CTL が TIGIT 抗体処理により活性化することを見出した。これらの所見は感染細胞上の TIGIT が宿主免疫からの回避に寄与し

ていることを示唆した。さらに、HBZ は T 細胞に特異的に発現する thymocyte selection associated (THEMIS) と結合することで、その局在を核から細胞質に移し、TIGIT、PD1 を介した細胞増殖抑制シグナルを阻害することも明らかになった (Fig. 1)。これらの所見から、HBZ は TIGIT の発現を介して、宿主免疫を抑制する一方で、感染細胞自身に対しては負のシグナルを阻害し、増殖と生存を有利にしていると考えられた。この研究成果は PLoS Pathogens 誌に発表した。

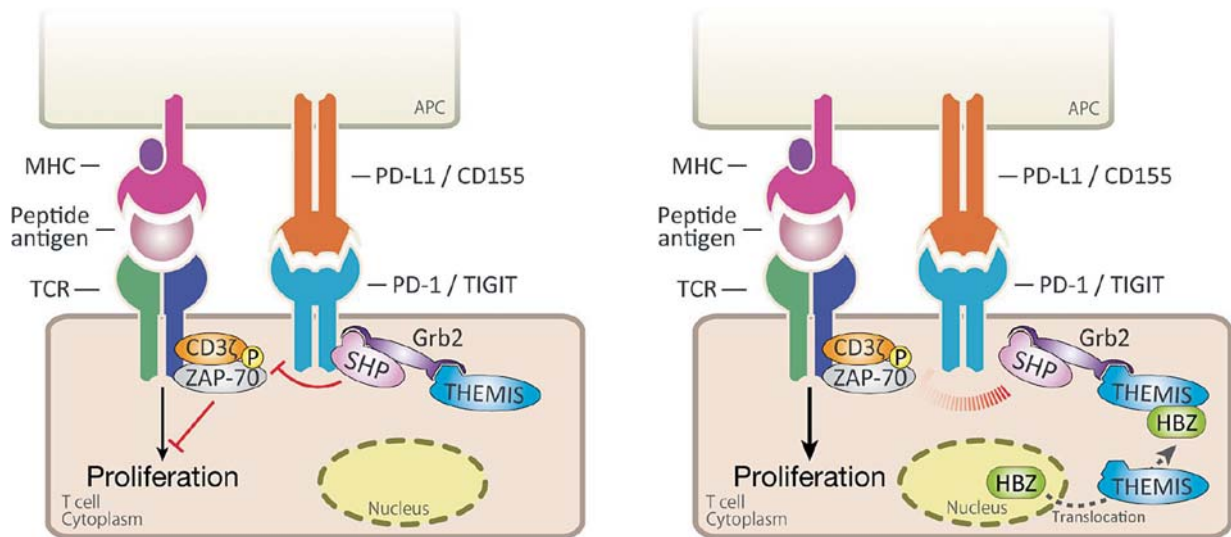


Fig. 1. Schema of HBZ mediated inhibition of inhibitory signaling from co-inhibitory receptors

2) HTLV-1 に対する免疫応答の解析と治療法開発

HBZ は全ての感染細胞に発現するため、格好の治療標的であるが免疫原性が低い。これとは対照的に、Tax は非常に高い抗原性を有している。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、宿主免疫応答の解析及び HBZ (STLV-1 の場合 SBZ)、Tax (STLV-1 の場合 sTax) ワクチンの開発を行っている。以前、抗 CCR4 抗体モガムリズマブを STLV-1 感染ニホンザルに投与すると血中の STLV-1 感染細胞数が減少することを報告したが、その後 1 年以上にわたり感染細胞数が抑制されていることを見出した。その原因としてモガリズマブ投与 STLV-1 感染ニホンザルでは STLV-1 抗原 (sTax と SBZ) に対する CD8 陽性 T 細胞が活性化していることが明らかとなった。さらに、モガリズマブ治療後の ATL 患者検体を調べたところ、完全寛解を維持している一部の症例では HTLV-1 抗原 (Tax と HBZ) 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。この研究成果は Scientific Reports 誌に報告した。

3) HIV-1 潜伏感染モデル細胞を用いた活性化誘導と抗 HIV 薬に対する感受性解析

HIV 感染患者におけるウイルス複製の持続的な抑制が可能となった現在においても、潜伏感染細胞の存在によって、ウイルスを体内から完全に排除することは難しい。そこで、潜伏感染細胞の性

状を詳しく解析するために、青色蛍光タンパク（BFP）を発現する HIV-1 感染性分子クローンをヒト T 細胞株 Jurkat 細胞に導入し、限外希釈法により HIV-1 潜伏感染細胞を樹立した。これらの中から、定常状態では低 BFP 発現でありながら、TNF- α 刺激によりその発現が強く誘導され、かつ感染性ウイルス粒子の産生を引き起こすクローンを選び、潜伏感染細胞からの感染拡大様式を解析した。その結果、BRD4 阻害剤である JQ-1 により T 細胞活性化を伴わない効果的な BFP 発現誘導とウイルス産生が認められた。さらに、JQ-1 で処理した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、抗 HIV 薬に対する感受性が低下していた。活性化により潜伏感染細胞から多数のウイルスが細胞間感染で伝達されたと考えられ、潜伏感染細胞からの感染拡大における感染伝達様式の重要性が明らかとなった。

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 human retroviruses.

1) Molecular mechanisms of HTLV-1-induced pathogenesis

HTLV-1 is the etiological retrovirus of ATL, and several inflammatory diseases, such as HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis and uveitis. HTLV-1 provirus encodes two oncogenes *tax* and *HTLV-1 bZIP factor* (*HBZ*) in its plus and minus strand, respectively. It has been known that a chemokine receptor, CCR4, is highly expressed on HTLV-1-infected cells. We found that HBZ induces CCR4 expression through upregulation of *GATA3* mRNA. In HBZ-transgenic mice, Ki67 expression was correlated with that of CCR4, suggesting that CCR4 is involved in proliferation of HBZ-expressing cells. We analyzed CCR4 and Ki67 expression in skin lesions of ATL patients, and found that CCR4⁺CD103⁺ ATL cells localized in the Pautrier's microabscesses, which are observed in ATL patients. Furthermore, those ATL cells also expressed Ki67, indicating accelerated proliferation. CD103 has been known to interact with E-cadherin, which is expressed in epidermal cells. In this study, we showed that HBZ-induced CCR4 expression is associated with infiltration and proliferation of ATL cells. In addition, we found that a co-inhibitory molecule, T cell immunoglobulin and ITIM domain (*TIGIT*) was induced by HBZ. Through upregulation of *TIGIT*, HBZ induced an immunosuppressive cytokine, IL-10, from not only T cells but also dendritic cells. It is suggested that *TIGIT* impairs anti-HTLV-1 immune responses through production of IL-10. These findings show that HTLV-1 utilizes a co-inhibitory molecule on infected cells to evade the host immune responses. On the other hand, HBZ suppresses an inhibitory signal through co-inhibitory receptors, and promotes proliferation of T cells. As a mechanism for this, we found that HBZ interacts with THEMIS, which forms a complex with Grb2 and SHP-2, and inhibits recruitment of SHP-2 to the inhibitory molecules (Fig. 1). These findings indicated that HBZ has pleiotropic functions in both proliferation and survival of HTLV-1-infected cells.

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

Recently, a humanized monoclonal antibody against CCR4 (mogamulizumab) has been approved for ATL treatment. CCR4 is also expressed in a subset of regulatory T cells (Treg), suggesting that mogamulizumab affects the immune status of the ATL patients. To investigate immune response to the virus after mogamulizumab-treatment, we used Japanese macaques (JMs) infected with simian T-cell leukemia virus type 1 (STLV-1) as a nonhuman primate model. We have reported that mogamulizumab dramatically reduced the number of infected cells in STLV-1-infected JMs. We also found that STLV-1 infected cells were suppressed over 1 year after the treatment. Mogamulizumab-treated JMs showed activation of CD8⁺ T-cell response against STLV-1 antigens (sTax and SBZ). Moreover, we found that some ATL patients who achieved complete remission by mogamulizumab treatment showed enhanced HTLV-1 specific T-cell response. These results suggest that mogamulizumab suppresses CCR4 expressing STLV-1/HTLV-1-infected cells and Treg cells and enhances T cell response against STLV-1/HTLV-1 in vivo.

3) Reactivation of HIV-1 from latent infected cells

Although HIV-1 replication is efficiently suppressed in the infected patients by antiviral drugs, complete eradication has not yet been achieved due to the presence of latently infected cells. In order to gain deeper insight into their importance, we established latent HIV-1-infected cells, which can produce replication-competent fluorescent viruses upon reactivation. Among several reported latency-reversing agents, we tested JQ-1, a BRD4 inhibitor, which efficiently reactivated and induced HIV-1 production from the cells without inducing global T-cell activation. Moreover, we observed that HIV-1 transmission from reactivated cells to uninfected target cells was less susceptible to antiviral drugs such as the ones targeting reverse transcription. These observations indicate that the infection pathway is one of the important factors controlling the expansion of infection from latent infected cells.

List of Publications

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.

Horlad, H., Ma, C., Yano, H., Pan, C., Ohnishi, K., Fujiwara, Y., Endo, S., Kikukawa, Y., Okuno, Y.,

- Matsuoka, M., Takeya, M., and Komohara, Y. (2016) An IL-27/Stat3 axis induces expression of programmed cell death 1 ligands (PD-L1/2) on infiltrating macrophages in lymphoma. **Cancer Sci.** *107*, 1696-1704.
- Alam, M., Kuwata, T., Shimura, K., Yokoyama, M., Ramirez Valdez, KP., Tanaka, K., Maruta, Y., Oishi, S., Fujii, N., Sato, H., Matsuoka, M., and Matsushita, S. (2016) Enhanced antibody-mediated neutralization of HIV-1 variants that are resistant to fusion inhibitors. **Retrovirology** *13*, 70.
- Sugata, K., Yasunaga, JI., Kinoshita, H., Mitobe, Y., Furuta, R., Mahgoub, M., Onishi, C., Nakashima, K., Ohshima, K., and Matsuoka, M. (2016). HTLV-1 Viral Factor HBZ Induces CCR4 to Promote T-cell Migration and Proliferation. **Cancer Res.** *76*, 5068-5079.
- Kawatsuki, A., Yasunaga, JI., Mitobe, Y., Green, PL., and Matsuoka M. (2016) HTLV-1 bZIP factor protein targets the Rb/E2F-1 pathway to promote proliferation and apoptosis of primary CD4(+) T cells. **Oncogene.** *35*, 4509-4517.
- Kuribayashi, W., Takizawa, K., Sugata, K., Kuramitsu, M., Momose, H., Sasaki, E., Hiradate, Y., Furuhashi, K., Asada, Y., Iwama, A., Matsuoka, M., Mizukami, T., and Hamaguchi, I. (2016) Impact of the SCF signaling pathway on leukemia stem cell-mediated ATL initiation and progression in an HBZ transgenic mouse model. **Oncotarget** *7*, 51027-51043.
- Yasuma, K., Matsuzaki, T., Yamano, Y., Takashima, H., Matsuoka, M., and Saito, M. (2016) HTLV-1 subgroups associated with the risk of HAM/TSP are related to viral and host gene expression in peripheral blood mononuclear cells, independent of the transactivation functions of the viral factors. **J. Neurovirol.** *22*, 416-430.
- Horlad, H., Ohnishi, K., Ma, C., Fujiwara, Y., Niino, D., Ohshima, K., Jinushi, M., Matsuoka, M., Takeya, M., and Komohara, Y. (2016). TIM-3 expression in lymphoma cells predicts chemoresistance in patients with adult T-cell leukemia/lymphoma. **Oncol. Lett.** *12*, 1519-1524.
- Sugata, K., Yasunaga, JI., Miura, M., Akari, H., Utsunomiya, A., Nosaka, K., Watanabe, Y., Suzushima, H., Koh, KR., Nakagawa, M., Kohara, M., and Matsuoka, M. (2016). Enhancement of anti-STLV-1/HTLV-1 immune responses through multimodal effects of anti-CCR4 antibody. **Sci. Rep.** *6*, 27150.
- Ma, G., Yasunaga, JI., and Matsuoka, M. (2016). Multifaceted functions and roles of HBZ in HTLV-1 pathogenesis. **Retrovirology** *13*, 16
- Doi, M., Murai, I., Kunisue, S., Setsu, G., Uchio, N., Tanaka, R., Kobayashi, S., Shimatani, H., Hayashi, H., Chao, HW., Nakagawa, Y., Takahashi, Y., Hotta, Y., Yasunaga, JI., Matsuoka, M., Hastings, MH., Kiyonari, H., and Okamura, H. (2016). Gpr176 is a Gz-linked orphan G-protein-coupled receptor that sets the pace of circadian behaviour. **Nat. Commun.** *7*, 10583.
- Yasuma, K., Yasunaga, JI., Takemoto, K., Sugata, K., Mitobe Y., Takenouchi, N., Nakagawa, M., Suzuki, Y., and Matsuoka, M. (2016). HTLV-1 bZIP Factor Impairs Anti-viral Immunity by Inducing Co-inhibitory

Molecule, T Cell Immunoglobulin and ITIM Domain (TIGIT). *PLoS Pathog.* 12, e1005372.

List of Presentations

招待講演 (海外)

Matsuoka, M. Update of HTLV-1 biology, 8th Annual T-Cell Lymphoma Forum. San Francisco, January 28-30, 2016.

一般演題 (海外)

Mahgoub, M. Yasunaga, JI., Matsuoka, M. Transient expression of human T-cell leukemia virus type 1 Tax is essential for proliferation of leukemic cells, The 23rd East Asia Joint Symposium. Taiwan. October 18-20, 2016.

Yasunaga, JI. Furuta, R., Miura, M., Sugata, K., Saito, A., Akari, H., Shimizu, M., Matsuda, F., Ueno, T., Takenouchi, N., Fujisawa, J., Melamede, A., Bangham, CR., Matsuoka, M. Hematopoietic Stem Cell Infected with HTLV-1 Functions As a Viral Reservoir In Vivo, 58th ASH Annual Meeting and Exposition, San Diego, December 3-6, 2016.

Kinosada, H. Yasunaga, JI., Shimura, K., Matsuoka, M., Functional Impairment of Co-Inhibitory Receptors Promotes T-Cell Proliferation in HTLV-1 Associated Adult T-Cell Leukemia Cells, 58th ASH Annual Meeting and Exposition, San Diego, December 3-6, 2016.

招待講演 (国内)

松岡雅雄 ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型の生き残り戦略と病原性 京都血液疾患フォーラム、京都、2016 年 8 月 5 日

松岡雅雄 ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型の病原性発現機構 第 56 回日本リンパ網内系学会総会、熊本、2016 年 9 月 1-3 日

松岡雅雄 ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型の生き残り戦略と病原性 移植との関連 第 4 回北海道感染免疫アカデミー、札幌、2016 年 9 月 16 日

松岡雅雄 白血病・リンパ腫とウイルス 第 57 回日本内科学会九州支部生涯教育講演会、熊本、2016 年 11 月 20 日

一般演題 (国内)

安永純一朗、松岡雅雄 HTLV-1 bZIP factor に対する細胞障害性 T リンパ球の誘導と治療効果 第 12 回血液学若手研究者勉強会 (麒麟塾)、東京都、2016 年 7 月 2 日

越智陽太郎、片岡圭亮、永田安伸、北中明、安永純一朗、岩永正子、野坂生郷、糸永英弘、今泉芳

孝、幣光太郎、宮崎泰司、高折晃史、下田和哉、松岡雅雄、渡邊俊樹、小川誠司 ATL における網羅的遺伝子プロファイルが予後に与える影響の解析 第3回日本 HTLV-1 学会学術集会、鹿児島、2016年8月26-29日

綿谷陽作、佐藤康晴、西田賢司、三好寛明、永田安伸、北中明、白石友一、高折晃史、宮野悟 松岡雅雄、渡邊俊樹、下田和哉、大島孝一、吉野正、小川誠司、片岡圭亮 ATL および T 細胞リンパ腫における遺伝子変異プロファイルの解析 第3回日本 HTLV-1 学会学術集会、鹿児島、2016年8月26-29日

安永純一朗、Mohamed Mohamed、松岡雅雄 ATL 細胞における Tax の一過性発現とその意義 第3回日本 HTLV-1 学会学術集会、鹿児島、2016年8月26-29日

古田梨愛、安永純一朗、三浦未知、菅田謙治、齊藤暁、明里宏文、上野孝治、竹之内徳博、藤澤順一、清水正和、松田文彦、Melamed Anat、Charles Bangham、松岡雅雄 血液系細胞における HTLV-1 感染とその意義 第3回日本 HTLV-1 学会学術集会、鹿児島、2016年8月26-29日

栗林和華子、水上拓郎、滝澤和也、倉光球、浅田善久、岩間厚志、松岡雅雄、濱口功 HBZ-Tg マウスモデルにおける ATL 癌幹細胞の発生機序解明を目指した分子基盤の解明とその機能解析 第3回日本 HTLV-1 学会学術集会、鹿児島、2016年8月26-29日

紀ノ定明香、安永純一朗、松岡雅雄 HTLV-1 bZIP factor は共抑制分子の機能を阻害し T 細胞の増殖を促進する 第3回日本 HTLV-1 学会学術集会、鹿児島、2016年8月26-29日

Kinosada, H., Yasunaga, JI., Shimura, K., and Matsuoka, M. HTLV-1 bZIP factor promotes T-cell proliferation by impairing the suppressive function of co-inhibitory receptors 第15回あわじしま感染症・免疫フォーラム、兵庫県、2016年9月6-9日

Mahgoub, M., Yasunaga, JI., Furuta, R., and Matsuoka, M. Transient expression of HTLV-1 transactivator Tax is essential for survival of adult T-cell leukemic cells 第15回あわじしま感染症・免疫フォーラム、兵庫県、2016年9月6-9日

Fujiwara, Y., Horlad, H., Niino, D., Okuno, Y., Kikukawa, Y., Matsuoka, M., Takeya, M., and Komohara, Y. Inhibitory Effect on Lymphoma Cells Proliferation by Regulating Lipid Metabolism Pathway 第75回日本癌学会学術総会、横浜市、2016年10月6-8日

Ochi, Y., Kataoka, K., Nagata, Y., Kitanaka, A., Yasunaga, JI., Iwanaga, M., Shiraishi, Y., Chiba, K., Sato-Otsubo, A., Sanada, M., Tanaka, H., Suzuki, H., Sato, Y., Shiozawa, Y., Yoshizato, T., Yoshida, K., Nosaka, K., Hishizawa, M., Imaizumi, Y., Hidaka, T., Nakamaki, T., Miyawaki, S., Tobinai, K., Miyazaki, Y., Takaori-Kondo, A., Shibata, T., Miyano, S., Shimoda, K., Matsuoka, M., Watanabe, T., and Ogawa, S. Prognostic Relevance of Integrated Molecular Profiling in Adult T-cell Leukemia / lymphoma 第75回日本癌学会学術総会、横浜市、2016年10月6-8日

Matsuoka, M., and Yasunaga, JI. Leukemogenesis by human T-cell Leukemia virus type 1 (HTLV-1) 第75回日本癌学会学術総会、横浜市、2016年10月6-8日

- Kinosada, H., Yasunaga, JI., and Matsuoka, M. HBZ promotes proliferation of CD4+ T cells by interfering the suppressive function of co-inhibitory molecules 第 75 回日本癌学会学術総会、横浜市、2016 年 10 月 6-8 日
- Mahgoub, M., Yasunaga, JI., and Matsuoka, M. Transient expression episodes of HTLV-1 Tax are essential for survival of adult T-cell leukemic cells 第 75 回日本癌学会学術総会、横浜市、2016 年 10 月 6-8 日
- Kataoka, K., Nagata, Y., Kitanaka, A., Shiraishi, Y., Shimamura, T., Yasunaga, JI., Totoki, Y., Watanabe, T., Shibata, T., Matsuoka, M., Miyano, S., Shimoda, K., and Ogawa, S. Integrated genetic analysis of adult T-cell leukemia / lymphoma 第 75 回日本癌学会学術総会、横浜市、2016 年 10 月 6-8 日
- Ochi, Y., Kataoka, K., Nagata, Y., Kitanaka, A., Yasunaga, JI., Iwanaga, M., Shiraishi, Y., Sanada, M., Yoshizato, T., Yoshida, K., Nosaka, K., Hishizawa, M., Itonaga, H., Imaizumi, Y., Munakata, W., Shide, K., Kubuki, Y., Hidaka, T., Kameda, T., Nakamaki, T., Ishiyama, K., Miyawaki, S., Tobinai, K., Miyazaki, Y., Takaori-Kondo, A., Shibata, T., Miyano, S., Matsuoka, M., Shimoda, K., Watanabe, T., and Ogawa, S. Prognostic relevance of integrated molecular profiling in adult T-cell leukemia / lymphoma 第 78 回日本血液学会学術集会、横浜市、2016 年 10 月 13-15 日
- Watatani, Y., Sato, Y., Nishida, K., Miyoshi, H., Nagata, Y., Kitanaka, A., Shide, K., Shiraishi, Y., Chiba, K., Tanaka H., Yoshizato, T., Yoshida, K., Sanada, M., Miyazaki, Y., Takaori-Kondo, A., Shibata, T., Miyano, S., Matsuoka, M., Watanabe, T., Shimoda, K., Ohshima, K., Yoshino, T., Ogawa, S., and Kataoka, K. Comparative mutational profiling of ATL and other PTCLs 第 78 回日本血液学会学術集会、横浜市、2016 年 10 月 13-15 日
- Furuta, R., Yasunaga, JI., Miura, M., Saito, A., Akari, H., Ueno, T., Takenouti, N., Fujisawa, J., Shimizu, M., Matsuda, F., Melamed, A., Bangham, C., and Matsuoka, M. HTLV-1 infects multi-lineage hematopoietic cells in vivo 第 78 回日本血液学会学術集会、横浜市、2016 年 10 月 13-15 日
- Yasunaga, JI., Mahgoub, M., Shimura, K., and Matsuoka, M. Transient expression of HTLV-1 Tax is important in latency and survival of HTLV-1-infected cells 第 64 回 日本ウイルス学会学術集会、札幌市、2016 年 10 月 23-25 日
- Kinosada, H., Yasunaga, JI. and Matsuoka, M HBZ promotes proliferation of CD4+T cells by impairing the suppressive signal from co-inhibitory molecules 第 64 回 日本ウイルス学会学術集会、札幌市、2016 年 10 月 23-25 日
- 志村和也、松岡雅雄 蛍光 HIV 潜伏感染モデル細胞を用いた活性化誘導と抗 HIV 薬活性の評価 第 30 回日本エイズ学会学術集会・総会、鹿児島、2016 年 11 月 24-26 日

総説

安永純一郎、松岡雅雄 (2016) HTLV-1 プロウイルスマイナス鎖にコードされる HBZ による病原性

発現機構 . 血液フロンティア . 26, 513-520.

古田梨愛、松岡雅雄 (2016) ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型の感染特異性 . 医学のあゆみ . 257, 317-318.

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
特定助教 牧野 晶子 Project Assist. Prof. Akiko Makino

平成 28 年は、生命科学研究所大学院生修士課程 1 年として酒井まどか、具志堅正興、武智美和が入学した。また、3 月にカナダのニューファンドランドメモリアル大学より小松弓子が特定研究員として加わった。4 月には助教の本田知之が大阪大学大学院医学系研究科の准教授として異動した。

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) 新興鳥ボルナウイルスの同定と進化系統の解析、(2) ボルナ病ウイルスの核内複製場の解析、(3) コウモリゲノムにおける内在性ボルナウイルスの機能解明、(4) ボルナウイルスベクターの開発と応用。

(1) では、修士過程 2 年の小森園が新興鳥ボルナウイルス（オウムボルナウイルス 5 型）のゲノム配列の決定と系統樹解析を行い、ボルナウイルス属がその感染宿主域により 3 つのクレードに分けられることを示した。(2) では、共同研究者の平井らが、哺乳類に感染するボルナ病ウイルスが形成する核内の複製場（vSPOTs）の微細構造を超解像顕微鏡を用いて観察した。その結果、vSPOTs は表面に細孔を持ち、外殻がウイルスのヌクレオカプシドで構成されている構造体であることが示された (Fig. 1)。また、ウイルス RNP が細胞分裂時に宿主染色体に分配される様子について、超解像顕微鏡を用いた観察に成功した。(3) では、現白眉センター特定准教授の堀江らが、Eptesicus 属コウモリのゲノムにボルナウイルスの RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ遺伝子とほぼ同長のオープンリーディングフレームを保持している内在化配列 EBLL が存在することを明らかにした。また、Eptesicus 属コウモリ由来組織における EBLL の転写発現を示すことで、EBLL が Eptesicus 属コウモリにおいて機能を付与された可能性を示した。(4) では、米国の MAYO clinic の池田らとの共同研究により、iPS 細胞へのボルナウイルスベクターの導入について成果を発表した。また、現大阪大学大学院医学系研究科の本田が、miRNA を持続的に発現する新規のボルナウイルスベクターの開発について報告した。

その他の研究活動として、朝長は 10 月の山口大学における最先端微生物研究セミナー（山口）、11 月の熊本大学医学・生命科学セミナー（熊本）と International Conference of the Genetics Society of Korea 2016（済州島）、12 月の日本分子生物学

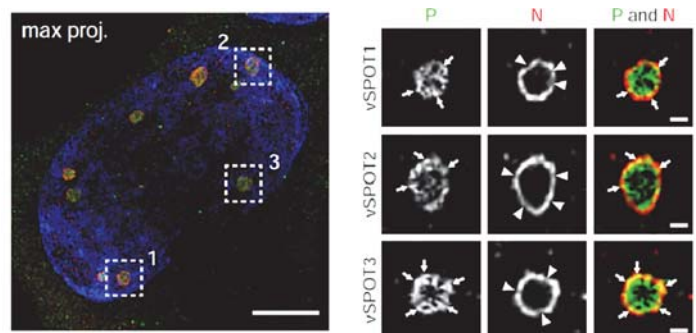


FIG. 1. Observation of BDV proteins in vSPOTs by structured illumination microscopy.

会（横浜）にて招待講演を行った。また、6月の日韓トランスポゾン研究会（釜山）では朝長が、8月の Within host RNA virus persistence: mechanisms and consequences (St. Andrews) と Cold Spring Harbor laboratory meeting (New York) ではそれぞれ朝長と牧野そして大学院博士課程2年の小嶋が発表を行った。10月には European Society of Gene and Cellular Therapy meeting (Florence) で牧野が、そして The 23th East Asia Joint Symposium (台湾) で小嶋が発表した。その他、教室員の多くが、10月の日本ウイルス学会（札幌）で研究発表を行った。小嶋は、The 23th East Asia Joint Symposium ならびに日本ウイルス学会においてそれぞれ Outstanding Young Scientist 1st Place TOMY Award (Fig. 2) と優秀ポスター賞を受賞した。



FIG. 2. Outstanding Young Scientist 1st Place TOMY Award ceremony in the 23th East Asia Joint Symposium

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 2016, we conducted research on the following subjects.

1) Sequence Determination of a New Parrot Bornavirus-5 Strain in Japan

In 2008, metagenomic analyses identified new bornaviruses in parrots with proventricular dilatation disease. Since this discovery, diverse avian bornaviruses have been found in many different orders of pet and wild birds, including Psittaciformes, Anseriformes, Galiformes, Passeriformes, Accipitriformes and Charadriiformes. A new classification of the family Bornaviridae defines the genus Bornavirus as five species. In this study, the genome sequence of a new parrot bornavirus-5 (PaBV-5) detected in *Eclectus roratus* was determined. Phylogenetic analysis showed that the genus Bornavirus is divided into three major clades and that PaBV-5 belongs to clade 2, which contains avian viruses that exhibit infectivity to mammalian cells. Sequence comparisons of the regions known to interact with host factors indicated that the clade 2 avian viruses possess sequences intermediate between the clade 1 mammalian viruses and the clade 3 avian viruses, suggesting that the identified regions might contribute to the differences in virological properties between the

three clades.

2) Borna Disease Virus Assembles Porous Cage-like Viral Factories in the Nucleus

All viruses seek locations within their host cells in which to safely replicate and assemble. The viral factories that are assembled after viral infection serve as such sites. The virus-specific intracellular compartments contain viral replication complexes and play essential roles in the viral life cycle in host cells. Animal-derived RNA viruses frequently form viral factories called viral inclusion bodies. However, the details of how RNA viruses build such intracellular structures are poorly understood. In this study, we examined the structure and formation of the viral factories, called viral speckle of transcripts (vSPOTs), that are produced in the nuclei of host cells by Borna disease virus (BDV). Super-resolution microscopic analysis showed that BDV assembled vSPOTs as intranuclear cage-like structures with pores. The viral nucleoprotein formed the exoskeletons of vSPOTs, whereas the other viral proteins appeared to be mainly localized within these structures. Furthermore, another reconstruction microscopy revealed that filamentous structures resembling viral RNPs appeared to protrude from the outer surfaces of the vSPOTs. These observations demonstrated that BDV generates viral replication factories whose shape and formation are regulated, suggesting the mechanism of the integrity of RNA virus persistent infection in the nucleus.

3) An RNA-dependent RNA polymerase gene in bat genomes derived from an ancient negative strand RNA virus

Endogenous viral elements (EVEs) are virus-derived sequences in the genomes of eukaryotes generated by the germline integration of entire viral genomes or genome fragments. The best known examples of EVEs are endogenous retroviruses (ERVs). Retrovirus genomes integrate into the host genomic DNA as part of their replication cycle, and retroviruses become endogenous when the viruses infect host germline cells. ERVs are molecular fossils of past retrovirus infection events and provide interesting insights into co-evolution between retroviruses and their hosts. Interestingly, some genes that originated from ERVs have allowed the implementation of new biological host features, demonstrating that viral sequences can be sources of genetic novelty in eukaryotes. Endogenous bornavirus-like L (EBLL) elements are inheritable sequences derived from ancient bornavirus L genes that encode a viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) in many eukaryotic genomes. We demonstrated that bats of the genus *Eptesicus* have preserved for more than 11.8 million years an EBLL element, named eEBLL-1, which has an intact open reading frame of 1,718 codons. The eEBLL-1 coding sequence revealed that functional motifs essential for mononegaviral RdRp activity are well conserved in the EBLL-1 genes. Genetic analyses showed that natural selection operated on eEBLL-1 during the evolution of *Eptesicus*. Notably, we detected efficient transcription of eEBLL-1 in tissues from *Eptesicus* bats.

4) A novel intranuclear RNA vector system for long-term stem cell modification

Genetically modified stem and progenitor cells have emerged as a promising regenerative platform in the

treatment of genetic and degenerative disorders, highlighted by their successful therapeutic use in inherent immunodeficiencies. However, biosafety concerns over insertional mutagenesis resulting from integrating recombinant viral vectors have overshadowed the widespread clinical applications of genetically modified stem cells. Here, we report an RNA-based episomal vector system, amenable for long term transgene expression in stem cells. Specifically, we used a unique intranuclear RNA virus, borna disease virus (BDV), as the gene transfer vehicle, capable of persistent infections in various cell types. BDV-based vectors allowed for long-term transgene expression in mesenchymal stem cells (MSCs) without affecting cellular morphology, cell surface CD105 expression or the adipogenicity of MSCs. Similarly, replication-defective BDV vectors achieved long-term transduction of human induced pluripotent stem cells, while maintaining the ability to differentiate into three embryonic germ layers. Thus, the BDV-based vectors offer a genomic modification-free, episomal RNA delivery system for sustained stem cell transduction.

List of Publications

- Ikeda Y, Makino A, Holditch SJ, Lu B, Dietz AB and Tomonaga K. (2016). A novel intranuclear RNA vector system for long-term stem cell modification. **Gene Ther.** 23, 256-262.
- Horie M, Sassa Y, Iki H, Ebisawa K, Fukushi H, Yanai T and Tomonaga K. (2016). Isolation of avian bornaviruses from psittacine birds using QT6 quail cells in Japan. **J. Vet. Med. Sci.** 78, 305-308.
- Horie M, Kobayashi Y, Honda T, Fujino K, Akasaka T, Kohl C, Wibbelt G, Mühldorfer K, Kurth A, Müller MA, Corman VM, Gillich N, Suzuki Y, Schwemmler M and Tomonaga K. (2016). An RNA-dependent RNA polymerase gene in bat genomes derived from an ancient RNA virus. **Sci. Rep.** 6, 25873.
- Honda T, Yamamoto Y, Daito T, Matsumoto Y, Makino A and Tomonaga K. (2016). Long-term expression of miRNA for RNA interference using a novel vector system based on a negative-strand RNA virus. **Sci. Rep.** 6, 26154.
- Komorizono R, Makino A, Horie M, Honda T and Tomonaga K. (2016). Sequence determination of a new parrot bornavirus-5 strain in Japan; implication of clade specific sequence diversity in the regions interacting with host factors. **Microbiol. Immunol.** 60, 437-441.
- Hirai Y, Hirano Y, Matsuda A, Hiraoka Y, Honda T and Tomonaga K. (2016). Borna disease virus assembles porous cage-like viral factories in the nucleus. **J. Biol. Chem.** 291, 25789-25798.
- Parrish NF and Tomonaga K. (2016). Endogenized viral sequences in mammals. **Curr. Opin. Microbiol.** 31, 176-183.
- Honda T and Tomonaga K. (2016). Endogenous non-retroviral RNA virus elements evidence a novel type of antiviral immunity. **Mobile Genetic Elements** 6, e1165785.
- Afonso CL, Amarasinghe GK, Bányai K, et al. (2016). Taxonomy of the order Mononegavirales: update

2016. *Arch. Virol.* 161, 2351-2360.

牧野晶子, 朝長啓造. (2016). ボルナウイルスとバイオセーフティ. 日本バイオセーフティ学会
ニュースレター 6 (1)

本田 知之, 朝長啓造. (2016). 内在性 RNA ウイルスエレメントによる多彩な細胞内 RNA 制御. ウ
イルス . 66, 39-46.

朝長啓造. (2016). ヒトゲノム内の RNA ウイルス由来配列の制御機構と機能. 医学のあゆみ 259,
193-194.

List of Presentations

本田知之. 低分子 RNA による新しいウイルス防御機構の解明とその制御方法の探索 第 6 回 産と
学をつなぐ SENRI の会 大阪 2016 年 1 月 13 日

本田知之. Transcript reversion のメカニズム解明の試み. 第 5 回 NSVJ. 沖縄. 2016 年 1 月 25-27 日

中村祥子. ムチン型糖転移酵素 Galnt3 ノックアウトマウスを用いた A 型インフルエンザウイルス
感染動態の解析. 第 5 回 NSVJ. 沖縄. 2016 年 1 月 25-27 日

山本祐介. 「ボルナ病ウイルス M タンパク質の機能部位の探索. 第 5 回 NSVJ. 沖縄. 2016 年 1 月
25-27 日

平井悠哉. ボルナ病ウイルス特異的核内構造体の構造に影響を与える宿主因子の解明. 第 5 回 NSVJ.
沖縄. 2016 年 1 月 25-27 日

本田知之. レトロトランスポゾンと piRNA によるボルナウイルス制御仮説とその検証の試み. 第 9
回ボルナウイルス研究会. 鹿児島. 2016 年 1 月 29 日

牧野晶子. カワリリスボルナウイルスの遺伝子機能解析. 第 9 回ボルナウイルス研究会. 鹿児島.
2016 年 1 月 29 日

小嶋将平. ヒトゲノムに存在する内在性ボルナウイルス様エレメントによる抗ウイルス作用の分子
機序とその進化的意義. 第 9 回ボルナウイルス研究会. 鹿児島. 2016 年 1 月 29 日

小森園 亮. ボルナウイルスにおける宿主特異性のウイルス進化学的解析. 第 9 回ボルナウイルス
研究会. 鹿児島. 2016 年 1 月 29 日

Yanai M, Degushi K, Takeyasu K, Makino A, Honda T and Tomonaga K. Identification of BDV N protein
regions important for viral replication. The 14th International Student Seminar. Kyoto, 2016 年 3 月
10-11 日

Komorizono R, Makino A, Horie M, Garcia BC and Tomonaga K. Probing the Viral Evolution; Phylogenetic
and Infection analyses of Emerging Bornaviruses. The 14th International Student Seminar. Kyoto, 2016
年 3 月 10-11 日

- Garcia BC, Komorizono R, Makino A, Honda T and Tomonaga K. Isolation of mammalian-adapted parrot bornavirus-2 and -4. The 14th International Student Seminar. Kyoto, 2016 年 3 月 10-11 日
- Honda T and Tomonaga K. Analysis of possible crosstalk between Borna disease virus and LINE-1. The 1st Korea-Japan International Symposium for Transposable Elements. Korea, Pusan, 2016 年 6 月 10 日
- Garcia BC, Komorizono R, Sassa Y, Makino A, and Tomonaga K. Adaptation of parrot bornavirus-4 to a mammalian cell line. the 15th International Joint Mini-Symposium on Molecular and Cell Biology between KU-NTU-UT. Taipei City, Taiwan. 2016, Jun 18.
- Kojima S, Honda T and Tomonaga K. A lncRNA derived from an endogenous RNA virus element in human genome functions as a potent inhibitor of exogenous virus infection. RNA2016. Kyoto 2016 年 6 月 28 日 -7 月 2 日
- 山本祐介 . 発現制御可能なボルナ病ウイルスベクターの開発 . 関西ウイルスクラブ . 大阪 2016 年 7 月 30 日
- Tomonaga K. Host factors involved in Borna disease virus persistent infection in the nucleus. Within host RNA virus persistence: mechanisms and consequences. St. Andrews, Scotland, 2016 年 8 月 24-26 日
- Makino A. Regulation of viral particle production in Borna disease virus-infected cells. Within host RNA virus persistence: mechanisms and consequences. St. Andrews, Scotland, 2016 年 8 月 24-26 日
- Kojima S. A novel lncRNA derived from an endogenous RNA virus element in human genome is inhibitor against exogenous virus infection. Regulatory & Non-Coding RNAs, CSHLM, Cold Spring Harbor, New York USA, 2016 年 8 月 23-27 日
- 小森園亮 . ボルナウイルスにおける宿主域規定因子の解析 . 第 13 回ウイルス学キャンプ . 湯河原静岡 , 2016 年 8 月 30-31 日
- Yanai M, Makino A and Tomonaga K. An impaired nuclear export signal of Borna disease virus nucleoprotein enhances viral transcription activity. The 15th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Hyogo, 2016 年 9 月 6-9 日
- Komorizono R, Sakai M, Sassa Y, Horie M, Makino A and Tomonaga K. Host range restriction and zoonotic potential of emerging avian bornaviruses. The 15th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Hyogo, 2016 年 9 月 6-9 日
- Garcia BC, Komorizono R, Sassa Y, Makino A and Tomonaga K. A double mutation in polymerase L gene enables adaptation of parrot bornavirus-4 to mammalian cell line. The 15th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Hyogo, 2016 年 9 月 6-9 日
- Sakai M, Komorizono R, Yanai M, Horie M, Makino A and Tomonaga K. Comparison of the envelope glycoprotein between mammalian and avian bornaviruses. The 15th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Hyogo, 2016 年 9 月 6-9 日

- Makino A, Komorizono R, Sakai M and Tomonaga K. Improvement of the production of Borna disease virus vector. ESGCT2016. Florence Italy, 2016 年 10 月 18-21 日
- Kojima S. A lncRNA derived from an endogenous bornavirus element in human genome suppresses BDV infection. The 23ed East Asia Joint Symposium, the 15th Cross-Strait Symposium on Biomedical Research and the 13th Symposium of the Frontiers of Biomedical Sciences. Taiwan 2016 年 10 月 18-20 日
- 朝長啓造. 内在性 RNA ウイルスの進化的意義. 新学術領域キックオフシンポジウム. 東京, 2016 年 9 月 27 日
- 朝長啓造. ゲノムが語るウイルス共進化. 山口大学最先端微生物研究セミナー. 山口, 2016 年 10 月 7 日
- 松永秀典、本田知之、近江翼、陸馨仙、福本素由己、金井講治、大村夕美、朝長啓造. ドイツで死亡した 3 人の脳炎患者から発見されたカワリリスボルナウイルス (VSBV-1) に対する抗体測定を試み. 日本神経感染症学会. 金沢. 2016 年 10 月 21-22 日
- 牧野晶子, 小森園 亮, Bea Clarise Garcia, 朝長啓造. カワリリスボルナウイルスの特性評価. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌, 2016 年 10 月 23-25 日
- 小松弓子, 竹内 壇, 山本祐介, 桜井英俊, 本田知之, 牧野晶子, 朝長啓造. ボルナウイルスベクターを用いた iPS 細胞から骨格筋への分化誘導法の構築. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌, 2016 年 10 月 23-25 日
- 山本祐介, 藤野 寛, 本田知之, 朝長啓造. ボルナ病ウイルスマトリックスタンパク質の機能解析. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌, 2016 年 10 月 23-25 日
- 小嶋将平, 本田知之, 朝長啓造. ウイルス感染を抑制する内在性ボルナウイルス由来 RNA エレメントの進化. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌, 2016 年 10 月 23-25 日
- 柳井真瑚, 牧野晶子, 朝長啓造. ボルナ病ウイルスの核外輸送シグナルはウイルスの転写活性に関与する. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌, 2016 年 10 月 23-25 日
- 小森園 亮, 牧野晶子, 佐々悠起子, 堀江真行, 朝長啓造. 細胞侵入段階は鳥ボルナウイルスにおける主な宿主域規定要因ではない. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌, 2016 年 10 月 23-25 日
- 徳永智哉, 本田知之, 牧野晶子, 朝長啓造. T-705 によるボルナ病ウイルスの複製阻害. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌, 2016 年 10 月 23-25 日
- Bea Garcia, 小森園 亮. 佐々悠起子, 牧野晶子, 朝長啓造. オウムボルナウイルス 4 の哺乳類細胞への適応. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌, 2016 年 10 月 23-25 日
- 平井悠哉, 牧野晶子, 朝長啓造. ボルナ病ウイルスと核内アクチンの関連の解析. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌, 2016 年 10 月 23-25 日

朝長啓造 . Bornavirus: a new direction of RNA virus research. 熊本大学医学・生命科学セミナー 熊本 ,
2016 年 11 月 9 日

Keizo Tomonaga. Transcription profile and prospective function of non-retroviral RNA virus-derived
elements in mammalian genomes. International Conference of the Genetics Society of Korea 2016. Jeju
Island, Korea 2016 年 11 月 10 日

藤野 寛, 鈴木朋弥, 田原口智士, 朝長啓造 . ジュウサンセンジリス由来内在性ボルナウイルスのボル
ナ病ウイルス感染阻害機構の解明 . 第 39 回分子生物学会 横浜 , 2016 年 11 月 30 日 -12 月 2 日

朝長啓造 . 哺乳動物ゲノムに内在化しているボルナウイルス由来因子の機能解析 . 第 39 回分子生物
学会 横浜 , 2016 年 11 月 30 日 -12 月 2 日

本田知之 , 朝長啓造 . RNA ウイルス持続感染におけるウイルス特異的核内構造体の構造、形成、そ
の生理意義 . 第 39 回分子生物学会 横浜 , 2016 年 11 月 30 日 -12 月 2 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だけでなく電子顕微鏡・原子間力顕微鏡を駆使することで、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。2016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) の微細構造解析を行い、異なるパターンの RNA 合成機構が存在することを見いだした。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、HA 分節と特異的に相互作用するゲノム分節を同定した。一方、エボラウイルスに関しては、ヌクレオカプシドの中核を成す NP ヘリックスの構造解析を行い、NP ヘリックスの三次元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) を担うが、RNA 合成中の vRNP の構造および合成される RNA の形態に関しては全く分かっていない。2016年は、RNA 合成中の vRNP を高速原子間力顕微鏡 (AFM) により解析した。その結果、vRNP による RNA 合成には、いくつかのパターンが存在することが明らかになり、これらが vRNP による転写と複製を表し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 HA 分節に着目して、HA 分節と特異的に相互作用するゲノム分節ならびにその相互作用領域の同定を試みた。HA 分節のパッケージングシグナル配列に変異を導入したウイルスを作製し、感染価の減少が認められたウイルスを得た。この変異ウイルスについて継代を繰り返した結果、感染価は回復し、新たに他の分節にも変異の導入が確認された。以上の実験を通して、HA 分節と相互作用するゲノム分節を同定した。

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。ウイルステノム RNA の転写・複製は NC 上でのみ起こるが、その中核となる NP helix の高次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 2016, we observed influenza virus vRNPs and found that some different morphological forms exist in vRNPs during RNA synthesis. We also investigated the genome packaging mechanism of influenza virus in detail. Moreover, we observed 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. However, from an ultrastructural point of view, it remains unknown whether the vRNP changes its helical structure during transcription and how RNA production proceeds. To reveal the ultrastructure of vRNPs during transcription, we have been examining *in vitro*-transcribed vRNPs using high-speed atomic force microscopy (HS-AFM). We observed some different forms of vRNP-RNA complexes, and the result suggested that the morphological differences in vRNPs represent the different processes of mRNA and cRNA synthesis.

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 2016, we tried to determine which vRNA segments interact with the HA vRNA segment. We introduced mutations into the HA segment and obtained a virus with a decreased titer. By passaging this virus, the virus titer was restored and some mutations were introduced in other vRNA segments, suggesting that the HA vRNA segment interacts with those 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 determined. To elucidate the morphogenesis of the Ebola virus NC, we examined the structure of the NP-helix by using cryoelectron microscopy. As a result, we determined the structure of NP-helix at high resolution. This study was a collaboration with Prof. Matthias Wolf, Okinawa Institute of Science and Technology Graduate University.

List of Publications

- Martyushev, A., Nakaoka, S., Sato, K., Noda, T., and Iwami, S. (2016). Modelling Ebola virus dynamics: implications for therapy. **Antiviral Res.** *135*, 62-73
- Sugita, Y., Kawaoka, Y., Noda, T., and Wolf, M. (2016). Structure of the Ebola virus nucleocapsid core by single particle cryo-electron microscopy. **Microsc. Microanal.** *22*, 66-67
- Nakatsu, S., Sagara, H., Sakai-Tagawa, Y., Sugaya, N., Noda, T., and Kawaoka, Y. (2016). Complete and incomplete genome packaging of influenza A and B viruses. **MBio** *7*; E01248-16
- Takada, H., Shimada, T., Dey, D., Quyyum, M. Z., Nakano, M., Ishiguro, A., Yoshida, H., Yamamoto, K., Sen, R., and Ishihama, A. (2016). Differential Regulation of rRNA and tRNA Transcription from the rRNA-tRNA Composite Operon in Escherichia coli. **PLoS One** *11*: e0163057.
- Arii, J., Shindo, K., Koyanagi, N., Kato, A., and Kawaguchi, Y. (2016). Multiple Roles of the Cytoplasmic Domain of Herpes Simplex Virus 1 Envelope Glycoprotein D in Infected Cells. **J. Virol.** *28*, 10170-10181.
- Gilmore, J. L., and Takeyasu, K. (2016). Commentary: Can AFM Reveal Global Viral RNA Structure?. **J. Pharm. Nanotech.** *4* (1)
- Gilmore, J. L., Yoshida, A., Deguchi, K., Asai, S., Aizaki, K., Kumeta, M., Hyodo, K., Okuno, T., Wakita, T., and Takeyasu, K. (2016). Structural Analysis of Long Single-Stranded RNA Molecules with Atomic Force Microscopy Imaging. **3rd International Multidisciplinary Microscopy and Microanalysis Congress (InterM) in Springer Proceedings in Physics** *186*; 3-9
- Takeyasu, K., Deguchi, K., and Gilmore, J. L. (2016). Structural/Functional Analyses of Protein-Nucleic Acid Interactions by AFM. **3rd International Multidisciplinary Microscopy and Microanalysis Congress (InterM) in Springer Proceedings in Physics** *186*; 229-235

List of presentations

- 野田岳志、インフルエンザウイルスのゲノム転写機構、第30回インフルエンザ研究者交流の会、山形、2016年6月24日（招待講演）
- 野田岳志、インフルエンザウイルスのゲノム転写機構、SRC2016、京都、2016年7月7日（招待講演）
- 野田岳志、インフルエンザウイルスのゲノム転写機構、第31回中国四国ウイルス研究会、鳥取、2016年7月9日（招待講演）
- 野田岳志、インフルエンザウイルスのゲノム転写機構を視る、第15回みちのくウイルス塾、宮城、2016年7月17日（招待講演）
- 野田岳志、インフルエンザウイルスの細胞内増殖機構、平成28年度第一回生物構造学研究会、中性子産業利用促進協議会、東京、2016年9月2日、（招待講演）
- 野田岳志、インフルエンザウイルスの細胞内増殖機構、日本顕微鏡学会関西支部会平成28年度特別講演会プログラム、京都、2016年10月29日（招待講演）
- 中野雅博、転写中インフルエンザウイルス RNP の微細構造解析、5th Negative Strand Virus-Japan Symposium、沖縄、2016年1月25日-27日
- Ryuichi Majima, Keiko Shindoh, Yoshiko Fukui, Toyofumi Yamaguchi and Naoki Inoue, Characterization of the thienylcarboxamide derivative that inhibits the transactivation of CMV and VZV immediate-early proteins、第64回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2016年10月23日-25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。

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。現在、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、解析中である。

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 Krtap13 overexpression 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

これまでに、HCV 感染細胞内において HCV ゲノムの複製に脂肪酸生合成系、特に一価不飽和脂肪酸の合成が関与することを明らかにしてきたが、本年度はこの合成系に対する阻害剤の抗 HCV 薬剤としての可能性について検討した。一価不飽和脂肪酸の合成に直接関わる酵素、ステアシル CoA デサチュラーゼに対する阻害薬の中で、肝細胞に親和性を持つようにデザインされた MK8245 と既存の抗 HCV 薬剤との併用効果について検討したところ、用いた種々の薬剤に対して相加あるいは相乗的な効果が認められ、薬剤として利用可能であることがわかった。

2) HBV に関する研究

本年度は HBV 感染増殖に対する宿主細胞内の脂肪酸生合成系の関与について検討をおこなった。HBV のゲノム複製と粒子産生が行われている培養細胞を用いて、脂肪酸生合成系酵素に対する阻害薬剤の影響を検討した。HBV ゲノム複製はいずれの阻害剤でも変化しなかったが、粒子産生は脂肪酸合成酵素の阻害剤で抑制されることがわかった。作用機序の解析から細胞内における HBV 粒子形成に飽和脂肪酸の合成が関連することが明らかになった。

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) Liver-specific mono-unsaturated fatty acid synthase-1 inhibitor for anti-hepatitis C treatment

Recent studies have shown that stearoyl-CoA desaturase (SCD), an enzyme for long-chain mono-unsaturated fatty acid synthesis, is a key factor that defines HCV replication efficiency.

Therefore, we investigated liver-specific SCD inhibitors would be suitable agents for HCV infected patients. MK8245 one of those agents, was evaluated using recombinant HCV culture systems. We confirmed MK8245's additive or synergistic anti-HCV effects on current anti-viral agent. The results suggest that MK8245 is an option for anti-HCV multi-drug therapy with a low risk of emergence of drug-resistant HCV without significant side effects.

2) Saturated fatty acid plays a role in production of hepatitis B virus particles

We investigated whether fatty acid biosynthesis (FABS) plays a role in HBV proliferation just like as HCV. We examined the effects of inhibitors of the enzymes in the FABS pathway on the HBV lifecycle by using recombinant HBV-producing cultured cells and found that the extracellular HBV DNA level, reflecting HBV particle production, was decreased by treatment with inhibitors suppressed the synthesis of long-chain saturated fatty acids with little cytotoxicity. This suggests that FABS might be a potent target for anti-HBV drug with a mode of action different from current HBV therapy.

List of Publications

Nio Y., Hasegawa H., Okamura H., Miyayama Y., Akahori Y., [Hijikata M.](#) (2016). Liver-specific mono-unsaturated fatty acid synthase-1 inhibitor as one option for anti-hepatitis C treatment. **Antiviral Res.**, 132C, 262-267.

Okamura H., Nio Y., Akahori, Y., Kim S., Watashi K., Wakita T., [Hijikata M.](#) (2016). Fatty acid biosynthesis is involved in the production of hepatitis B virus particles. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 475 (1) 87-92.

Aly H. H., Suzuki J., Watashi K., Chayama K., Hoshino S., [Hijikata M.](#), Kato T., Wakita T. (2016). RNA exosome complex regulates stability of Hepatitis B Virus's X-mRNA transcript in a Non-Stop mediated (NSD) RNA quality control mechanism. **J. Biol. Chem.**, 291, 15958-15974.

List of Presentations

土方 誠：招待講演、肝炎ウイルス培養系の開発とその応用、“Meet the expert” 広島大学附属病院、広島、2016年9月1日

Akahori Y., Kato H., Fujita T., Moriishi K., Watashi K., Wakita T., [Hijikata M.](#): A cell line derived from immortalized human hepatocytes was highly susceptible to blood-borne hepatitis B virus in the three-dimensional culture condition. 2016 International meeting on the molecular biology of hepatitis B viruses, Seoul, Korea, Sept. 21-24, 2016

Hasegawa H., Nio Y., Okamura H., Miyayama Y., Akahori Y., Hijikata M.: Liver-specific mono-unsaturated fatty acid synthase-1 inhibitor as one option for anti-hepatitis C treatment. 23th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Kyoto, Japan, Oct. 11-15, 2016

Okamura H., Akahori Y., Nio Y., Watashi K., Wakita T., Hijikata M. : Fatty acid biosynthesis specifically regulates hepatitis B virus particle production. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌 2016 年 11 月 23-25 日

Akahori Y., Kato H., Fujita T., Moriishi K., Watashi K., Wakita T., Hijikata M. : Development of novel hepatitis B virus culture system using immortalized human hepatocytes. 第 64 回日本ウイルス学会学術集会. 札幌 2016 年 11 月 23-25 日

赤堀祐一、加藤博己、藤田尚志、森石恆司、渡士幸一、脇田隆字、土方 誠：立体培養した HBV 受容体 hNTCP 発現不死化ヒト肝細胞による新たな HBV 培養系を用いた抗 HBV 薬評価系の構築、第 26 回抗ウイルス療法学会総会、2016 年 5 月 13 日～ 15 日、名古屋

岡村 瞳、赤堀祐一、金ソルイ、渡士幸一、脇田隆字、土方 誠：脂肪酸生合成経路の阻害による HBV 粒子産生抑制機構の解析、第 26 回抗ウイルス療法学会総会、2016 年 5 月 13 日～ 15 日、名古屋

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。2016年においては、脂質化ペプチド（リポペプチド）を提示する新しい抗原提示分子を同定し、そのX線結晶構造を解明した。また、結核菌脂質により誘起される慢性炎症応答において、好中球の新たな役割を見だし、その分子機序を解明した。

1) リポペプチド提示分子の発見と構造決定

ウイルスタンパク質には、そのN末端が脂肪酸（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。アカゲザルエイズモデルを活用した本分野でのこれまでの研究から、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-GGAIS; C14nef5）を特異的に認識する細胞傷害性 T 細胞の存在と機能が明らかになっていたが、リポペプチド抗原認識の分子基盤は明らかではなかった。そこでまず、リポペプチド特異的 T 細胞応答を阻害するモノクローナル抗体を樹立し、その生化学的解析から、リポペプチド抗原提示分子が MHC クラス I 遺伝子産物であることを見いだした。さらに、アカゲザルの遺伝学的解析からその遺伝子候補を絞り込み、T 細胞応答を指標としたリポペプチド抗原提示の再構築実験により、リポペプチド抗原提示分子として Mamu-B*098 を同定した。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 I 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新しい抗原結合様式の存在が明

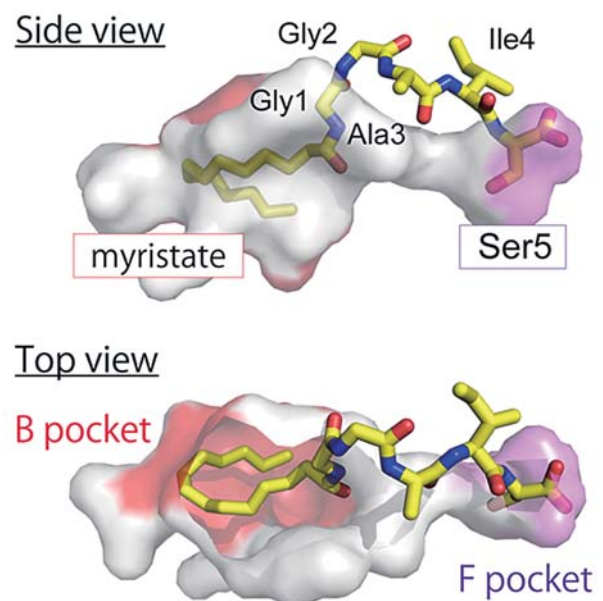


Fig. 1. Viral lipopeptides captured in Mamu-B*098 Ag-binding groove

らかとなった (Fig. 1)。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。

2) 結核慢性炎症を制御する S100A9 陽性好中球の発見

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。肉芽腫を免疫原として作出した肉芽腫特異的モノクローナル抗体クローン群の網羅的解析の結果、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を見いだした。抗がん剤として治験が進められている S100A9 特異的阻害剤 tasquinimod を投与した動物に置いては肉芽腫形成が顕著に抑制されることから、マクロファージを主体とした肉芽腫形成において好中球が産生する S100A9 分子が中心的な役割を担うことが明らかになった。結核とがんの慢性炎症応答の類似性から、がんにおいても同様の分子・細胞機序が存在する可能性が示唆された (Fig. 2)。

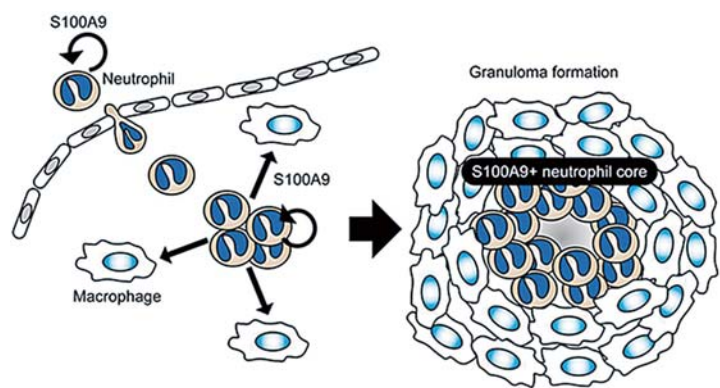


Fig. 2. Neutrophil S100A9-dependent pathways for granuloma formation

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 (Ags). In 2016, we determined the molecular identity of a lipopeptide Ag-presenting molecule and resolved its X-ray crystallographic structure. We also addressed how lipid immunity may impact on tissue responses and discovered a novel role of neutrophils in tuberculosis-associated chronic inflammation.

1) Identification of a molecular and structural basis of lipopeptide Ag presentation

Some viral proteins require N-myristoylation to function. By utilizing the rhesus AIDS model, we have previously demonstrated that T cells exist with a potential to specifically recognize N-myristoylated Nef lipopeptides. In order to address how this lipopeptide Ag presentation may occur, we established monoclonal antibodies (mAbs) that were capable of blocking the lipopeptide-specific T cell response, and revealed that MHC class I-encoded molecules may mediate lipopeptide Ag presentation. By taking genetic as well as T-cell immunological approaches, we identified Mamu-B*098 as a novel lipopeptide Ag presenting molecule. A high-resolution X-ray crystallographic analysis revealed that Mamu-B*098 possessed 6 pockets (A through F) in its Ag binding structure that were comparable to those for other known MHC class I alleles; however,

the large, hydrophobic B pocket and the small, hydrophilic F pocket uniquely accommodated the myristate moiety and the C-terminal serine residue, respectively (Fig. 1). As these anchor components are commonly found in N-myristoylated viral proteins, lipopeptide-specific T cell responses may be mounted in various viral infections.

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. In order to gain insight into how this tissue response may be regulated, we established an array of granuloma-specific mAbs and extensively analyzed their reactivity to granuloma cells, resulting in identification of a cluster of S100A9-expressing neutrophils at the core of granulomas. The S100A9 inhibiting anti-cancer drug candidate, tasquinimod, potently suppressed the granuloma formation, underscoring a critical role of neutrophils and the S100A9 protein in granuloma formation. Given that local recruitment of macrophages and neutrophils is also noted in cancer histopathology, the neutrophil S100A9 protein may also regulate cancer-associated chronic inflammation.

List of Publications

- Morita, D., Yamamoto, Y., Mizutani, T., Ishikawa, T., Suzuki, J., Igarashi, T., Mori, N., Shiina, T., Inoko, H., Fujita, H., Iwai, K., Tanaka, Y., Mikami, B., and Sugita M. (2016). Crystal structure of the N-myristoylated lipopeptide-bound MHC class I complex. **Nat. Commun.** 7, 10356.
- Kim, J.H., Hu, Y., Yongqing, T., Kim, J., Hughes, V.A., Le Nours, J., Marquez, E.A., Purcell, A.W., Wan, Q., Sugita, M., Rossjohn, J., and Winau, F. (2016). CD1a on Langerhans cells controls inflammatory skin disease. **Nat. Immunol.** 7, 1159-1166.
- Yoshioka, Y., Mizutani, T., Mizuta, S., Miyamoto, A., Murata, S., Ano, T., Ichise, H., Yamada, H., Hoshino, Y., Tsuruyama, T., and Sugita, M. (2016). Neutrophils and the S100A9 protein critically regulate granuloma formation. **Blood Advances** 1, 184-192.
- Morita, D., and Sugita, M. (2016). Lipopeptides: a novel antigen repertoire presented by major histocompatibility complex class I molecules. **Immunology** 149, 139-145.
- 水谷龍明、杉田昌彦 (2016). 脂質免疫の新視点からみた非結核性抗酸菌感染症 化学療法の領域 32, 49-55.

List of Presentations

- Shima, Y., Morita, D., Yoshioka, Y., Takama, Y., and Sugita, M. Novel MHC class I pathways for N-myristoylated lipopeptide antigen presentation. The 14th International Student Seminar, Kyoto, March 10-11, 2016.

Morita, D. Discovery of N-myristoylated lipopeptide Ag-presenting MHC class I molecules. The 23rd East Asia Joint Symposium. Taipei City, October 18-20, 2016.

Yoshioka, Y. A key role for neutrophils and the S100A9 protein in the development of tuberculosis granulomas. The 23rd East Asia Joint Symposium. Taipei City, October 18-20, 2016.

森田大輔、杉田昌彦「リポペプチド免疫応答」の発見とその分子機構の解明 第27回日本生体防御学会学術集会、福岡、2016年7月7-9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

2016年4月に向平妃沙と朱媛博が医学研究科大学院博士課程に入学し、谷一靖江が医学研究科人間健康科学専攻の助教に異動した。7月には、崔広為が助教に就任した。したがって、免疫制御分野は現在、教授1名、助教2名、大学院生5名の総勢8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。本年に論文として発表した研究成果を以下に記載する。

1) 多能性造血前駆細胞からリンパ球までの分化を方向付ける骨髄ニッチの同定

骨髄の造血幹細胞 (HSC) は、ケモカイン CXCL12 を発現する間葉系前駆細胞 (CAR 細胞) や内皮細胞が形成する HSC ニッチで自己複製する。一方で、造血幹細胞は多能性造血前駆細胞 (MPP)、リンパ系共通前駆細胞 (CLP) を経て B 細胞を含む種々のリンパ球に分化する。しかし、この造血系細胞分化が骨髄内のどこで、どのように起きているのか明らかではなかった。本研究では、様々な遺伝子改変マウスの骨髄を解析することで、MPP からリンパ球までの分化を支持する特異的なニッチが存在するのか調べた。CXCL12 の受容体である CXCR4 を MPP から欠損させたマウスでは、CLP への分化が抑制され、リンパ球造血能が低下した。また、B 細胞分化に必須なサイトカイン IL-7 を産生するストローマ細胞に対して、CLP は CXCR4 依存的に近接していた。さらに IL-7 産生性ストローマ細胞は、間葉系前駆細胞の約 60% と少数の内皮細胞から成ることを見出した。間葉系前駆細胞から IL-7 を欠損させたマウスでは、B 細胞の初期前駆細胞が減少し、内皮細

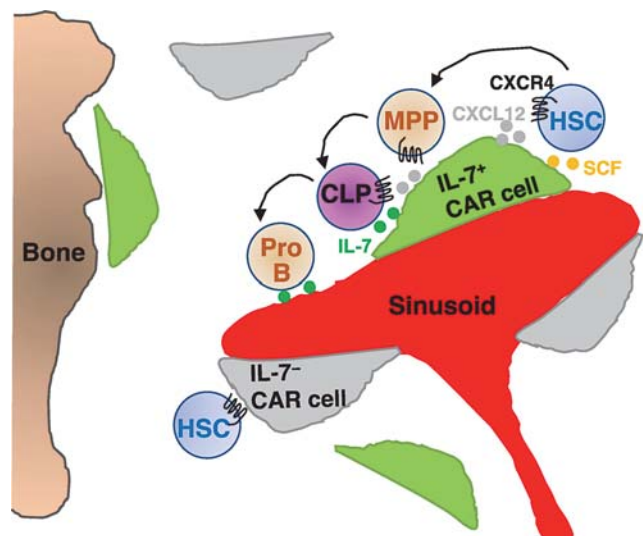


Fig. 1. Specialized HSC niche cells control lymphopoiesis

胞から IL-7 を欠損させたマウスでは、プロ B 細胞およびプレ B 細胞が減少した。また、IL-7 産生性ストローマ細胞から CXCL12 やサイトカイン SCF を欠損させたマウスでは、造血幹細胞と MPP の細胞数が減少した。以上の実験結果から、造血幹細胞ニッチを構成するストローマ細胞の中には、分化方向を決定するサイトカインを産生する亜集団が存在しており、これが MPP 以降の分化を支持する特異的なニッチを形成していることが明らかとなった (Fig. 1)。今後、IL-7 産生性および IL-7 非産生性の骨髄ストローマ細胞の性質の違いを解析することで、骨髄ニッチによる造血制御メカニズムの詳細が明らかにされることが期待される。

1) Hematopoietic stem cell niches produce lineage-instructive signals to control multipotent progenitor differentiation

Hematopoietic stem cells (HSCs) self-renew in bone marrow niches formed by mesenchymal progenitors and endothelial cells expressing the chemokine CXCL12, but whether a separate niche instructs multipotent progenitor (MPP) differentiation remains unclear. We show that MPPs encounter lineage-instructive differentiation signals in HSC niches. Conditional deletion of the chemokine receptor CXCR4 in MPPs reduced differentiation into common lymphoid progenitors (CLPs), which decreased lymphopoiesis. CXCR4 was required for CLP positioning near IL-7⁺ cells. IL-7⁺ cells expressed CXCL12 and the cytokine SCF, were mesenchymal progenitors capable of differentiation into osteoblasts and adipocytes, and comprised a minor subset of sinusoidal endothelial cells. Conditional IL-7 deletion in mesenchymal progenitors reduced B-lineage committed CLPs, whereas IL-7 deletion in endothelial cells specifically reduced proB and preB cells. Moreover, conditional CXCL12 or SCF deletion in IL-7⁺ cells reduced HSC and MPP numbers. Thus, HSC maintenance and multilineage differentiation are distinct cell lineage decisions that are both controlled by HSC niches.

List of Publications

- Huang, Y., Getahun, A., Heiser, R. A., Detanico, T. O., Kirchenbaum, G. A., Casper, T. L., Huang, C., Aydintug, M. K., Carding, S. R., Ikuta, K., Huang, H., Wsocki, L. J., Cambier, J. C., O'Brien, R. L., and Born, W. K. (2016). $\gamma\delta$ T cells shape pre-immune peripheral B cell populations. **J. Immunol.** *196*, 217-231.
- Terashima, A., Okamoto, K., Nakashima, T., Akira, S., Ikuta, K. and Takayanagi, H. (2016). Sepsis-induced osteoblast ablation causes immunodeficiency. **Immunity** *44*, 1434-1443.
- Shinoda, K., Hirahara, K., Iinuma, T., Ichikawa, T., Suzuki, A. S., Sugaya, K., Tumes, D. J., Yamamoto, H., Hara, T., Tani-ichi, S., Ikuta, K., Okamoto, Y., and Nakayama, T. (2016). Thy-1⁺IL-7⁺ lymphatic endothelial cells in iBALT provide a survival niche for memory T-helper cells in allergic airway inflammation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** *113* (20), E2842-2851.

Gil-Cruz, C., Perez-Shibayama, C., Onder, L., Chai, Q., Cupovic, J., Cheng, H., Novkovic, M., Lang, P. A., Geuking, M. B., McCoy, K. D., Abe, S., Cui, G., Ikuta, K., Scandella, E., and Ludewig, B. (2016). Fibroblastic reticular cells regulate intestinal inflammation through IL-15-mediated control of group 1 ILCs. **Nat. Immunol.** 17, 1388-1396.

Gomes, A. C.*[†], Hara, T.*[†], Lim, V. Y.*[†], Herndler-Brandstetter, D., Nevius, E., Sugiyama, T., Tani-ichi, S., Schlenner, S., Richie, E., Rodewald, H., Flavell, R. A., Nagasawa, T., Ikuta, K., and Pereira, J. P.[†] (2016). Hematopoietic stem cell niches produce lineage-instructive signals to control multipotent progenitor differentiation. **Immunity** 45, 1219-1231. *equal contribution, [†] correspondence.

生田宏一、阿部昌史、谷一靖江 . (2016). エンハンサーによる IL-7 レセプターの発現の制御 医学のあゆみ 257, 1170-1172.

List of Presentations

谷一靖江、生田宏一：Role of TCR γ enhancer 'E γ 4' for the development and function of $\gamma\delta$ T cells, International Congress of Immunology 2016、メルボルン、2016年8月22日

崔広為、榛葉旭恒、谷一靖江、原崇裕、生田宏一：Competitive signaling between STAT5 and PI3K of the IL-7R modulates T cell development and homeostasis in vivo、International Congress of Immunology 2016、メルボルン、2016年8月23日

榛葉旭恒、崔広為、阿部真也、朱媛博、向平妃沙、谷一靖江、原崇裕、生田宏一：Role of glucocorticoids in T cell homeostasis and T cell response、The 23rd East Asia Joint Symposium、台北、2016年10月19日

原崇裕、生田宏一：骨髄におけるリンパ球分化を制御する IL-7 産生ストローマ細胞の同定、第26回 Kyoto T Cell Conference、大津、2016年5月20日

崔広為、榛葉旭恒、朱媛博、小川真、谷一靖江、原崇裕、生田宏一：Competitive balance between STAT5 and PI3K signaling pathways of IL-7R modulates T cell development and homeostasis in vivo、第26回 Kyoto T Cell Conference、大津、2016年5月21日

生田宏一：Roles of IL-7 in development and response of the immune system、千葉大学医学研究科リーディング大学院セミナー、千葉、2016年5月27日

生田宏一：Roles of IL-7 in development and response of the immune system、サバンチ大学セミナー、イスタンブール、2016年6月13日

生田宏一：Visualizing the immune microenvironment by reporter mice、富山大学医学研究科大学院セミナー、富山、2016年10月3日

崔広為、榛葉旭恒、阿部真也、朱媛博、向平妃沙、谷一靖江、原崇裕、生田宏一：Local function of the IL-15 niche in thymus、第45回日本免疫学会学術集会、宜野湾、2016年12月7日

阿部真也、原崇裕、崔広為、生田宏一：Identification of IL-15 niche for NK cells in bone marrow、第 45 回日本免疫学会学術集会、宜野湾、2016 年 12 月 7 日

寺島明日香、岡本一男、審良静男、生田宏一、高柳広：Immunodeficiency caused by sepsis-induced osteoblast ablation、第 45 回日本免疫学会学術集会、宜野湾、2016 年 12 月 7 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
特定助教	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。2016年の成果および研究活動は以下の通りである。

1) N4bp1 を介した新規炎症応答制御機構の同定

病原体等に対して一旦惹起された炎症応答は、適切に収束し恒常性が維持されている。免疫細胞における炎症性サイトカインを始めとしたエフェクター分子の発現収束には、転写に加えて転写後の mRNA レベルでの調節も重要である。これまでの研究により、炎症性サイトカイン mRNA が細胞質内において TTP や Roquin, Regnase-1 といった転写後調節因子によって分解をうけることが、炎症応答の制御に重要であることが明らかとなっている。しかしながら核内においても炎症性サイトカイン mRNA の転写後調節が機能しているかに関しては不明であった。今回、我々は、核内に局在する新規の RNase として N4bp1 (NEDD4 binding protein 1) を同定した。N4bp1 は N 末端に KH ドメインを、C 末端に Regnase-1 と相同な RNase ドメインを有するタンパク質である。我々が作製した N4bp1 欠損マウスは、加齢に伴って炎症細胞の臓器への浸潤や自己抗体の産生が認められ、自発的に自己免疫疾患様症状を呈した。また N4bp1 欠損マクロファージに Toll-like receptor 刺激を行うと、炎症性サイトカイン mRNA の発現がスプライシングを受けた成熟型に加え、新生 pre-mRNA レベルでも亢進していた。しかしながら、NF- κ B や AP-1 といった転写因子の活性化は認められなかったことから、N4bp1 は転写後サイトカイン pre-mRNA の発現を制御していることが示唆された。さらに、HEK293 細胞における N4bp1 およびイントロン配列を含んだレポーター遺伝子の発現系による解析から、N4bp1 が *Il6* や *Il12b* といった炎症性サイトカイン pre-mRNA を特異的に分解することが示唆された。従って本研究により炎症性サイトカイン mRNA の転写後発現調節は核と細胞質の両方で多段階的に制御されているという事が明らかとなった。

2) Regnase-1 の鉄恒常性維持における役割

遺伝子発現は様々な制御機構により厳密に調節されている。そのような制御機構の一つとして転写後調節が挙げられる。我々の研究室では、炎症を負に調節する RNA 分解酵素 Regnase-1 (Mcpip1,

Zc3h12a) を以前同定した。我々は Regnase-1 が *Il6*, *Il12b*, *Icos*, *c-Rel* をはじめとする炎症関連遺伝子の mRNA を分解することで、自然免疫系と獲得免疫系の双方を制御していることを明らかにした。

Regnase-1 の発現は免疫細胞のみに局限しているわけではないことから、Regnase-1 が非免疫細胞でも機能を有する可能性が示唆された。興味深いことに、Regnase-1 を欠損したマウスでは自己免疫疾患に加え、重度の貧血を発症する。しかしながら、Regnase-1 の欠損により貧血を発症する機構は不明である。そこで、我々は貧血の病態形成における Regnase-1 の作用機構を検討した。Regnase-1 を全身、もしくは腸管上皮細胞特異的に欠損したマウスを作製したところ、ともに鉄欠乏性貧血を発症することから、腸管上皮での鉄代謝の異常が示唆された。また、鉄の腹腔内投与により鉄欠乏性貧血は改善することから、腸管における鉄吸収の低下が原因であることが明らかとなった。そこで、食餌中の鉄が主に吸収される部位である十二指腸での Regnase-1 の機能解析を進めた。十二指腸でのトランスクリプトーム解析を行ったところ、鉄吸収の制御に関わる Regnase-1 の標的遺伝子として *Egln3* を見出した。実際、*Egln3* により制御される鉄輸送体遺伝子の発現は Regnase-1 の欠損により損なわれていた。次に Regnase-1 欠損マウスにおいて *Egln3* の活性を喪失させると、貧血と鉄欠乏が改善することが明らかとなった。このことは Regnase-1 を介した *Egln3* mRNA の分解が鉄吸収の制御にとって重要であることを示唆している。以上のことから、Regnase-1 は炎症の制御だけでなく、鉄恒常性の維持においても役割を果たしていることが示された。

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.

1) Identification of N4bp1 as a novel nuclear endoribonuclease critical for immune regulation

The immune responses against pathogens need to cease to maintain immune homeostasis. Immune cells control production of inflammatory cytokines and effector molecules by the transcriptional and post-transcriptional regulations. Recent studies revealed the importance of cytoplasmic post-transcriptional regulation in cytokine production via analysis of proteins such as TTP, Roquin and Regnase-1. However, it was not clear if post-transcriptional regulation functions in the nucleus. Here, we identified Nedd4 binding protein 1 (N4bp1) as a novel RNase localized in the nucleus. N4bp1 harbors N-terminal KH domains and a C-terminal RNase domain. Interestingly, *N4bp1*^{-/-} mice spontaneously developed glomerulonephritis, infiltration of lymphocytes in several tissues, and produced auto-antibodies. Toll-like receptor-mediated expression of cytokine mRNAs such as *Il6* was enhanced in *N4bp1*^{-/-} macrophages compared with wild-type controls. Further, the expression of nascent pre-mRNAs encoding proinflammatory cytokines, in addition to mature mRNAs, was increased in *N4bp1*^{-/-} macrophages. Nevertheless, activation of transcription factors, NF- κ B and AP-1, was unaffected by N4bp1 deficiency, suggesting that N4bp1 controls target mRNAs at the

posttranscriptional levels. Reporter analysis of *Il6* and *Il12b* mRNAs harboring introns in HEK293 cells revealed that N4bp1 specifically degrades cytokine pre-mRNAs. Thus, our study demonstrates that proinflammatory cytokine mRNAs undergo regulations not only in the cytoplasm, but also in the nucleus.

2) Role of Regnase-1 in the maintenance of iron homeostasis

Gene expression is tightly controlled through multiple regulatory layers, including post-transcriptional regulation. We have previously identified a ribonuclease Regnase-1 (otherwise known as Mcpip1 or Zc3h12a) as an essential negative regulator of inflammation. We have shown that Regnase-1 destabilizes a set of inflammation-related mRNAs such as *Il6*, *Il12b*, *Icos* and *c-Rel*, thereby controlling both innate and acquired arms of the immune system.

The expression of Regnase-1 is not restricted to immune cells, giving rise to the question whether Regnase-1 has a role in non-immune cells. Interestingly, *Regnase-1*^{-/-} mice suffer from severe anemia as well as autoimmune disease. However, the mechanisms by which mice with Regnase-1 deficiency develops anemia have remained obscure. In this study, we investigated the role of Regnase-1 in the development of anemia. We found that genetic ablation of Regnase-1 in the whole body or in the intestinal epithelial cells leads to iron deficiency anemia, suggesting that Regnase-1 participates in the regulation of iron metabolism in the intestinal epithelium. Moreover, intraperitoneal iron administration to *Regnase-1*^{-/-} mice reversed the iron deficiency anemia, suggesting a defect in intestinal iron uptake. These findings motivated us to investigate the role of Regnase-1 in the duodenum, where dietary iron uptake mainly takes place. Transcriptome analysis of the duodenum revealed a novel target of Regnase-1 associated with the regulation of dietary iron uptake - *Egln3* mRNA. Indeed, the expression of EglN3-regulated iron transporter genes were impaired in *Regnase-1*^{-/-} duodenum. Abrogation of EglN3 activity in *Regnase-1*^{-/-} mice ameliorates the anemia and iron deficiency, suggesting that Regnase-1-mediated *Egln3* mRNA decay is essential for the regulation of dietary iron uptake. Taken together, these findings uncover a novel role of Regnase-1 in the maintenance of iron homeostasis, as well as in the regulation of inflammation.

List of Publications

- Yokogawa, M., Tsushima, T., Noda, N.N., Kumeta, H., Enokizono, Y., Yamashita, K., Standley, D.M., Takeuchi, O., Akira, S., and Inagaki, F. (2016). Structural basis for the regulation of enzymatic activity of Regnase-1 by domain-domain interactions. **Scientific Reports** 6, 22324.
- Martino, M.M., Maruyama, K., Kuhn, G.A., Satoh, T., Takeuchi, O., Müller, R., and Akira, S. (2016). Inhibition of IL-1R1/MyD88 signalling promotes mesenchymal stem cell-driven tissue regeneration. **Nat. Commun.** 7, 11051.
- Masuda, K., Ripley, B., Nyati, K.K., Dubey, P.K., Zaman, M.M., Hanieh, H., Higa, M., Yamashita, K., Standley, D.M., Mashima, T., Katahira, M., Okamoto, T., Matsuura, Y., Takeuchi, O., and Kishimoto, T.

(2016). Arid5a regulates naive CD4+ T cell fate through selective stabilization of Stat3 mRNA. **J. Exp. Med.** 213, 605-619.

Ishikita, A., Matoba, T., Ikeda, G., Koga, J., Mao, Y., Nakano, K., Takeuchi, O., Sadoshima, J., and Egashira, K. (2016). Nanoparticle-Mediated Delivery of Mitochondrial Division Inhibitor 1 to the Myocardium Protects the Heart From Ischemia-Reperfusion Injury Through Inhibition of Mitochondria Outer Membrane Permeabilization: A New Therapeutic Modality for Acute Myocardial Infarction. **J. Am. Heart Assoc.** 5, e003872.

植畑拓也, 竹内理 (2016). 免疫系の表現型解析 実験医学別冊 208-215.

三野享史 (2016). Regnase-1 と Roquin による炎症性 mRNA の制御 臨床免疫・アレルギー科 65, 180-184.

三野享史, 竹内理 (2016). 免疫研究における RNA-Seq システム免疫学へのアプローチ 実験医学別冊 NGS アプリケーション RNA-Seq 実験ハンドブック 197-203.

三野享史, 竹内理 (2016). Regnase-1 と Roquin による炎症性 mRNA の制御 医学のあゆみ 257, 180-182.

三野享史, 竹内理 (2016). Regnase-1 と Roquin による炎症性 mRNA の制御 日薬理誌 特集 147 351-356.

吉永正憲, 竹内理 (2016). 慢性炎症における炎症性サイトカインの新たな制御機構 最新医学 71 (11), 23-27.

吉永正憲, 竹内理 (2016). 炎症性サイトカイン IL-6 とその転写後調節 医学のあゆみ 259 (5), 371-376.

List of Presentations

Mino, T. Regnase-1 and Roquin regulate a common element in inflammatory mRNAs by spatiotemporally distinct mechanisms. The 23rd East Asia Joint Symposium. Taipei City, Taiwan, October 18-20, 2016.

Yoshinaga, M., Mino, T., and Takeuchi, O. The ribonuclease Regnase-1 plays a role in iron homeostasis and anemia. International Congress of Immunology 2016. Melbourne, Australia, August 21-26, 2016.

Mino, T. Post-transcriptional regulation of inflammation-related mRNAs by Regnase-1 and Roquin. The 15th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji, Japan, September 6-9, 2016.

Akaki, K., Mino, T., and Takeuchi, O. Dynamic post-transcriptional regulation by Regnase-1. The 14th International Student Seminar. Kyoto, Japan, March 10-11, 2016.

Yamasoba, D., Imamura, T., Sato, K., Koyanagi, Y., and Takeuchi, O. A novel ribonuclease involved in the suppression of HIV infection. The 14th International Student Seminar. Kyoto, Japan, March 10-11,

2016.

吉永正憲, 竹内理 A novel role of Regnase-1 in iron homeostasis and anemia AMED-CREST 「炎症の慢性化機構の解明と制御に向けた基盤技術の創出」研究開発領域 若手研究者報告会, 大阪府大阪市, 2016年6月15-16日.

Sadahiro, A., Fukao, A., Takizawa, N., Takeuchi, O., and Fujiwara, T. Analyses of cell type specific translation from IRES mRNA derived from two different poliovirus strains. RNA 2016. Kyoto, Japan, June 28-July 2, 2016.

山嵜大智, 佐藤佳, 中野雄介, 三沢尚子, 神道慶子, 野田岳志, 小柳義夫, 竹内理 HIV感染を制御する新規RNA分解酵素の同定 第19回 Summer Retrovirus Conference, 京都府京都市, 2016年7月7-8日.

岩井紀貴, 三野享史, 竹内理 SMG1阻害剤によるRegnase-1依存性mRNA分解の制御 RNAフロンティアミーティング2016, 北海道虻田郡ニセコ町, 2016年8月31日-9月2日.

貞廣暁利, 足達俊吾, 深尾亜喜良, 夏目徹, 竹内理, 藤原俊伸 ポリオウイルスの細胞種特異的なIRES依存的翻訳の解析 RNAフロンティアミーティング2016, 北海道虻田郡ニセコ町, 2016年8月31日-9月2日.

Cui, X., and Takeuchi, O. Stabilization of Regnase-1 protein by antisense morpholino oligos. The 15th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji, Japan, September 6-9, 2016.

Yamasoba, D., Sato, K., Sindo, K., Noda, T., Koyanagi, Y., and Takeuchi, O. Identification of a novel RNase as a restriction factor for HIV budding. The 15th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji, Japan, September 6-9, 2016.

貞廣暁利, 足達俊吾, 深尾亜喜良, 船上仁範, 夏目徹, 竹内理, 藤原俊伸 ポリオウイルスの細胞種特異的なIRES依存的翻訳の解析 第39回日本分子生物学会年会, 神奈川県横浜市, 2016年11月30日-12月2日.

Sadahiro, A. Analyses of cell type specific translation from IRES mRNA derived from two different poliovirus strains. Tokyo RNA Club the 22nd meeting. Tokyo, Japan, December 3, 2016.

Mino, T., and Takeuchi, O. Post-transcriptional regulation of inflammation-related mRNAs by Regnase-1. 2016 Annual Meeting of Japanese Society for Immunology. Ginowan City, Japan, December 5-7, 2016.

Nakatsuka, Y., Mino, T., and Takeuchi, O. A pivotal role of Regnase-1 at the airway epithelium for the protection against pathogens through the enhancement of IgA secretion. 2016 Annual Meeting of Japanese Society for Immunology. Ginowan City, Japan, December 5-7, 2016.

Tartey, S., and Takeuchi, O. Novel Cyclin controls neoplastic alterations and bacterial infection by regulating neutrophil homeostasis. 2016 Annual Meeting of Japanese Society for Immunology. Ginowan City, Japan, December 5-7, 2016.

Yoshinaga, M., Mino, T., and Takeuchi, O. The ribonuclease Regnase-1 plays a critical role in iron homeostasis and anemia. 2016 Annual Meeting of Japanese Society for Immunology. Ginowan City, Japan, December 5-7, 2016.

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

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。この過程でフォールディングに失敗したタンパク質や遺伝子の変異などのためにミスフォールドしたタンパク質は細胞内分解を受ける。小胞体内腔でミスフォールドしたタンパク質は、一旦細胞質に逆行輸送された後にプロテアソームによって分解され、この仕組みは小胞体関連分解（Endoplasmic reticulum-associated protein degradation; ERAD）と呼ばれている。2016年度においては、ERADにおいて中心的役割を担う小胞体膜上のユビキチンリガーゼ複合体（HRD1-SEL1L 複合体）について解析し、SEL1L タンパク質の膜貫通領域がタンパク質の安定性に重要であるとともに、ERAD 基質の分解制御にも重要であることを明らかにした（Fig. 1）。引き続きこの複合体の安定性と ERAD の制御機構について研究を進めている。

また、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、小胞体シャペロンタンパク質の構造解析、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、などのテーマについても研究を進めている。

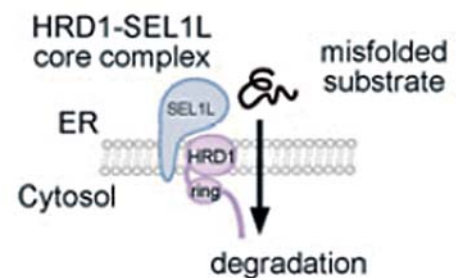


Fig. 1. HRD1-SEL1L ubiquitin ligase complex in the ER membrane

2) RNA アプタマーを用いた真核生物転写制御機構の解析（平芳 G）

真核生物では、クロマチンに包まれた遺伝子が、必要な時に RNA polymerase II を結合できる状態になり、遺伝子の発現が開始される。ショウジョウバエ HSP70 遺伝子では paused polymerase を形成することが知られており、これは伸長反応を制御する機構の存在を示唆するものである。HSP70 遺伝子の発現制御に関わる因子として GAF がある。これはプロモーターの GAGA 配列に結合し、

クロマチンリモデリング因子をプロモーターに呼びこむことが、古くから知られている。GAF に特異的に結合する RNA aptamer を使った解析より、我々は、HSP70 遺伝子や Actin 遺伝子などの GAF 依存性遺伝子において、GAF が GAGA 配列とは無関係に、転写開始後の複合体に取り込まれることを明らかにした。このことは、GAF が転写開始から伸長反応への移行制御に関わっている可能性を示すものである (Fig. 2)。GAF を通した転写制御機構の解明により、クロマチンリモデリング、転写開始複合体の形成、転写開始、そして伸長へと至る一連の反応の全体像を詳細に理解できるものと考えている。

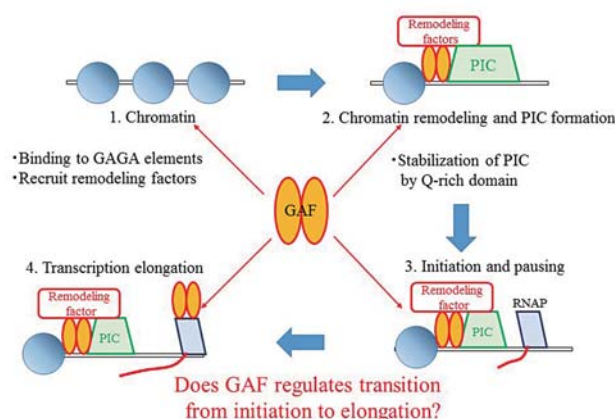


Fig. 2 Orchestration of Transcription by GAF

3) 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 (藤本 G)

当グループでは、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 (*Tcrb*) 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。*Tcr* の V(D)J 組換えは、遺伝子セグメントと組換えシグナル配列 (RSS) の間が切断されることで開始される。切断箇所の遺伝子セグメント側を coding end (CE)、RSS 側を signal end (SE) と呼ぶ。正常な V(D)J 組換えでは、各遺伝子セグメントの CE 同士が結合する (coding joining (CJ))。このとき同時に SE 同士も結合する (signal joining (SJ))。前年度までにわれわれは、正常胸腺においても、CE と SE がつなぎ合わされる非正統的な hybrid joining (HJ) が少なからず観察されることを明らかにした。*Tcrb* D2-J2.1 間の HJ では、本来 D2 と 3' 23RSS の間でおこるべき切断が 5' 12RSS と D2 の間でおこり、D2 末端 (配列の特徴から CE ではなく SE と判定される) が逆向きに J2.1 CE と結合していた。このとき残された 5' 12RSS (D2) CE の少なくとも一部は、予想外なことに、V14 CE に組換えられていることを今年度初めて見出した (Fig. 3)。すなわち、非正統的な V(D)J 組換えが進行した後に正統的な組換えがおこったと考えられ、さらに詳細な解析を続けている。

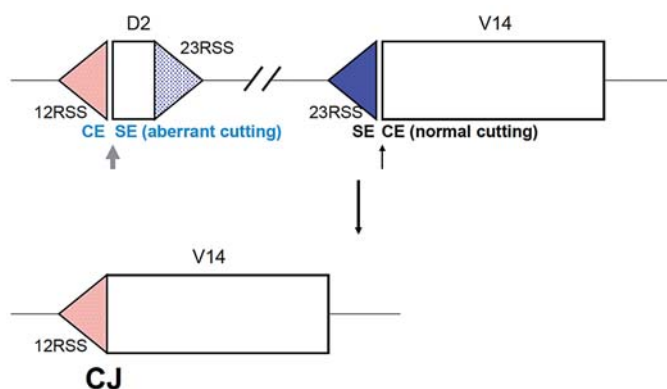


Fig. 3 Newly found CJ

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 to function properly. During this process, misfolded proteins that failed to obtain their native conformations are normally degraded intracellularly. Terminally misfolded proteins in the endoplasmic reticulum (ER) are retrotranslocated to the cytosol and degraded by the cytosolic proteasome, a mechanism known as ER-associated protein degradation (ERAD). HRD1-SEL1L ubiquitin ligase complex in the ER membrane plays a central role in ERAD. We have recently clarified the importance of SEL1L transmembrane region for the stability of SEL1L protein, as well as the regulation of ERAD substrates (Fig. 1). We are now analyzing the mechanism of SEL1L degradation and that of HRD1-SEL1L complex formation.

Most of the proteins that are synthesized in the ER are N-glycosylated, and EDEM proteins enhance the ERAD of misfolded glycoproteins. We are analyzing the molecular mechanisms of EDEM proteins, as well as the structural analysis of chaperone proteins, novel functions of ER proteins, and the intracellular transport mechanism of ER cargo.

2) Functional analyses of *Drosophila* GAF by RNA aptamers (Hirayoshi G)

In eukaryotic cell, genes are packed into chromatin structure. After this structure is disturbed, general transcription factors and RNA polymerase bind to DNA and transcription begins. On *Drosophila* HSP70 gene, RNA polymerase is paused at the promoter proximal region, suggesting that there is a mechanism to regulate transcription elongation process. One of regulatory factors involved in HSP70 gene expression is GAF, which binds to GAGA elements and recruits chromatin remodeling factors. Our analyses with GAF-specific RNA aptamers found that, on GAF-dependent promoter such as HSP70 gene promoter or Actin gene promoter, GAF was incorporated into transcription apparatus after transcription initiation even if GAGA elements were mutated, implying a role of GAF in a transition from initiation to elongation (Fig. 2). These results will lead to clarify the overall picture of eukaryotic transcription mechanism including chromatin remodeling, PIC formation, transcription initiation, and elongation.

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

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. V(D)J recombination of *Tcr* starts with cutting between gene segments and their following recombination signal sequences (RSSs). After the cleavage, the end of the gene segment is named "coding end(CE)", and that of the RSS "signal end(SE)". During normal V(D)J recombination two CEs join together (coding joining (CJ)) and simultaneously two SEs join together (signal joining (SJ)). We had shown that rare hybrid joining (HJ) between a CE and a SE occurs at a very low frequency on the process of D2-J2.1 recombination in normal thymus last year. In

this case, aberrant cutting between 5' 12RSS and D2, instead of canonical cutting between D2 and 3' 23RSS, produced a SE at the D2 side, and then the SE joined to the J2.1 CE. We have examined the fate of the other 5' 12RSS (D2) CE and have found that at least a part of 5' 12RSS (D2) CEs are joined to V14 CE (Fig. 3), indicating that legitimate recombination followed the non-canonical cutting. Further analysis is now in progress.

List of Publications

Hosokawa, N. and Wada, I. (2016). Association of the SEL1L protein transmembrane domain with HRD1 ubiquitin ligase regulates ERAD-L. **FEBS J.**, 283, 157-172

List of Presentations

細川暢子、和田郁夫 SEL1L タンパク質の分解機構 第 68 回日本細胞生物学会大会、京都、2016 年 6 月 15-17 日

法邑賢一、平芳一法 RNA aptamer を用いたショウジョウバエ GAF の機能解析 第 39 回日本分子生物学会年会、横浜、2016 年 11 月 30 日 -12 月 2 日

藤本真慈、柿沼志津子 *Tcrb* 遺伝子 D-J 再構成の際に正常胸腺でも低頻度で生じる hybrid joint 第 39 回日本分子生物学会年会、横浜、2016 年 11 月 30 日 -12 月 2 日

Fujimoto, S., and Kakinuma, S. Hybrid joint formation in normal thymocytes during *Tcrb* rearrangements that occur by deletion. 第 45 回日本免疫学会学術集会、宜野湾、2016 年 12 月 5-7 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
准教授	山本 雅哉	Assoc. Prof.	Masaya Yamamoto
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

Zhang, S., Matsushita, T., Kuroda, R., Nishida, K., Matsuzaki, T., Matsumoto, T., Takayama, K., Nagai, K., Oka, S., Tabata, Y., Nagamune, K., and Kurosaka, M. (2016). Local Administration of Simvastatin Stimulates Healing of an Avascular Meniscus in a Rabbit Model of a Meniscal Defect. **Am J Sports Med** 44, 1735-1743.

Weinand, C., Neville, C.M., Weinberg, E., Tabata, Y., Vacanti, J.P. (2016). Optimizing Biomaterials for Tissue Engineering Human Bone Using Mesenchymal Stem Cells. **Plast Reconstr Surg** 137, 854-863

Watanabe, M., Li, H., Kim, A.G., Weilerstein, A., Radu, A., Davey, M., Loukogeorgakis, S., Sánchez, M.D., Sumita, K., Morimoto, N., Yamamoto, M., Tabata, Y., Flake, A.W. (2016). Complete tissue coverage achieved by scaffold-based tissue engineering in the fetal sheep model of Myelomeningocele. **Biomaterials** 76, 133-143.

- Xinglei Yao, LW., Faiola, F., Liu, B., Zhang, T., Tabata, Y., Mizuguchi, H., Nakagawa, S., Gao, J.Q., Zhao, R.C. (2016). Coating with spermine-pullulan polymer enhances adenoviral transduction of mesenchymal stem cells. **Int J Nanomedicine** *11*, 6763-6769.
- Vo, T.N., Tabata, Y., Mikos, A.G. (2016). Effects of cellular parameters on the in vitro osteogenic potential of dual-gelling mesenchymal stem cell-laden hydrogels. **Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition** *27*, 1277-1290.
- Vo, T.N., Shah, S.R., Lu, S., Tataru, A.M., Lee, E.J., Roh, T.T., Tabata, Y., Mikos, A.G. (2016). Injectable dual-gelling cell-laden composite hydrogels for bone tissue engineering. **Biomaterials** *83*, 1-11.
- Uehara, T., Mise-Omata, S., Matsui, M., Tabata, Y., Murali, R., Miyashin, M., and Aoki, K. (2016). Delivery of RANKL-Binding Peptide OP3-4 Promotes BMP-2-Induced Maxillary Bone Regeneration. **J Dent Res** *95* (6), 665-72.
- Toda, H., Yamamoto, M., Uyama, H., Tabata, Y. (2016). Fabrication of hydrogels with elasticity changed by alkaline phosphatase for stem cell culture. **Acta Biomater.** *29*, 215-227.
- Ugamori, Y., Mise-Omata, S., Maeda, C., Aoki, S., Tabata, Y., Murali, R., Yasuda, H., Udagawa, N., Suzuki, H., Honma, M., and Aoki, K. (2016). Peptide drugs accelerate BMP-2-induced calvarial bone regeneration and stimulate osteoblast differentiation through mTORC1 signaling. **Bioessays** *38*(8), 717-725.
- Sowa, Y., Kishida, T., Imura, T., Numajiri, T., Nishino, K., Tabata, Y., Mazda, O. (2016). Adipose-Derived Stem Cells Promote Peripheral Nerve Regeneration In Vivo without Differentiation into Schwann-Like Lineage. **Plast Reconstr Surg** *137*, 318E-30E.
- Sakai, S., Sato, K., Tabata, Y., Kishi, K. (2016). Local release of pioglitazone (a peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist) accelerates proliferation and remodeling phases of wound healing. **Wound Repair Regen** *24*, 57-64.
- Nagai, H., Nishiyama, K., Seino, Y., Tabata, Y., Okamoto, M. (2016). Evaluation of Autologous Fascia Implantation With Controlled Release of Fibroblast Growth Factor for Recurrent Laryngeal Nerve Paralysis Due to Long-term Denervation. **Annals of Otolaryngology and Laryngology** *125*, 508-515.
- Morimoto, N., Kakudo, N., Ogura, T., Hara, T., Matsui, M., Yamamoto, M., Tabata, Y., Kusumoto, K. (2016). Easy-to-use preservation and application of platelet-rich plasma in combination wound therapy with a gelatin sheet and freeze-dried platelet-rich plasma: a case report. **Eplasty** *16*, e22.
- Matsumine, H., Sasaki, R., Tabata, Y., Matsui, M., Yamato, M., Okano, T., Sakurai, H. (2016). Facial nerve regeneration using basic fibroblast growth factor-impregnated gelatin microspheres in a rat model. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine** *10*, E559-E67.

- Lu, S., Lee, E.J., Lam, J., Tabata, Y., and Mikos, A.G. (2016). Evaluation of Gelatin Microparticles as Adherent-Substrates for Mesenchymal Stem Cells in a Hydrogel Composite. **Ann Biomed Eng** 44, 1894-1907.
- Lam, J., Clark, E.C., Fong, E.L.S., Lee, E.J., Lu, S., Tabata, Y., Mikos, A.G. (2016). Evaluation of cell-laden polyelectrolyte hydrogels incorporating poly (L-Lysine) for applications in cartilage tissue engineering. **Biomaterials** 83, 332-346.
- Lam, J., Clark, E.C., Fong, E.S., Lee, E.J., Lu, S., Tabata, Y., Mikos, A.G. (2016). Data describing the swelling behavior and cytocompatibility of biodegradable polyelectrolyte hydrogels incorporating poly (L-lysine) for applications in cartilage tissue engineering. **Data Brief** 7, 614-9.
- Kuroda, Y., Asada, R., So, K., Yonezawa, A., Nankaku, M., Mukai, K., Ito-Ihara, T., Tada, H., Yamamoto, M., Murayama, M., Morita, S., Tabata, Y., Yokode, M., Shimizu, A., Matsuda, S., Akiyama, H. (2016). A pilot study of regenerative therapy using controlled release of recombinant human fibroblast growth factor for patients with pre-collapse osteonecrosis of the femoral head. **Int Orthop** 40, 1747-1754.
- Kumagai, M., Marui, A., Tabata, Y., Takeda, T., Yamamoto, M., Yonezawa, A., Tanaka, S., Yanagi, S., Ito-Ihara, T., Murayama, T., Teramukai, S., Katsura, T., Matsubara, K., Kawakami, K., Yokode, M., Shimizu, A., Sakata, R.. (2016) Safety and efficacy of sustained release of basic fibroblast growth factor using gelatin hydrogel in patients with critical limb ischemia. **Heart and Vessels** 31, 713-721.
- Komatsu, K., Shibata, T., Shimada, A., Ideno, H., Nakashima, K., Tabata, Y., and Nifuji, A. (2016). Cationized gelatin hydrogels mixed with plasmid DNA induce stronger and more sustained gene expression than atelocollagen at calvarial bone defects in vivo. **J Biomater Sci Polym Ed** 27, 419-430.
- Kim, Y.H., Tabata, Y. (2016). Recruitment of mesenchymal stem cells and macrophages by dual release of stromal cell-derived factor-1 and a macrophage recruitment agent enhances wound closure. **Journal of Biomedical Materials Research Part A** 104, 942-956.
- Janune, D., Abd, El. Kader. T., Aoyama, E., Nishida, T., Tabata, Y., Kubota, S., Takigawa, M. (2016). Novel role of CCN3 that maintains the differentiated phenotype of articular cartilage. **J Bone Miner Metab** DOI 10.1007/s00774-016-0793-4.
- Huang, C., Orbay, H., Tobita, M., Miyamoto, M., Tabata, Y., Hyakusoku, H., Mizuno, H. (2016). Proapoptotic effect of control-released basic fibroblast growth factor on skin wound healing in a diabetic mouse model. **Wound Repair Regen** 24, 65-74.
- Horikoshi-Ishihara, H., Tobita, M., Tajima, S., Tanaka, R., Oshita, T., Tabata, Y., and Mizuno, H. (2016). Coadministration of adipose-derived stem cells and control-released basic fibroblast growth factor facilitates angiogenesis in a murine ischemic hind limb model. **J Vasc Surg** 64, 1825-1834.
- Hirai, K., Tabata, Y., Hasegawa, S., Sakai, Y. (2016). Enhanced intestinal anastomotic healing with gelatin hydrogel incorporating basic fibroblast growth factor. **Journal of Tissue Engineering and**

Regenerative Medicine 10, E433-E42.

- Hagiwara, K., Chen, G., Kawazoe, N., Tabata, Y., Komuro, H. (2016). Promotion of muscle regeneration by myoblast transplantation combined with the controlled and sustained release of bFGF_{cpr}. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine** 10, 325-333.
- Arai, Y., Aoki, K., Shimizu, Y., Tabata, Y., Ono, T., Murali, R., Mise-Omata, S., and Wakabayashi, N. (2016). Peptide-induced de novo bone formation after tooth extraction prevents alveolar bone loss in a murine tooth extraction model. **Eur J Pharm** 782 (5), 89-97.
- Akita, H., Fujiwara, T., Santiwarangkool, S., Hossen, N., Kajimoto, K., El-Sayed, A., Tabata, Y., Harashima, H. (2016). Transcytosis-Targeting Peptide: A Conductor of Liposomal Nanoparticles through the Endothelial Cell Barrier. **Small** 12, 1212-1221.
- Tamura, R., Uemoto, S., and Tabata, Y. (2016). Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cell-derived exosomes on a concanavalin A-induced liver injury model. **Inflammation and Regeneration** 36:26 DOL 10.1186/s41232-016-0030-5.
- Tatsutomi, M., Jo, J., and Tabata, Y. (2016). Preparation of a nitric oxide imaging agent from gelatin derivative micelles. **Regenerative Therapy**, 5, 64-71.
- Wan, L., Yao, X., Faiola, F., Liu, B., Zhang, T., Tabata, Y., Mizuguchi, H., Nakagawa, S., Gao, JQ., Zhao, RC. (2016). Coating with spermine-pullulan polymer enhances adenoviral transduction of mesenchymal stem cells. **Int J Nanomedicine**, 13;11, 6763-6769.
- Janune, D., Abd El Kader, T., Aoyama, E., Nishida, T., Tabata, Y., Kubota, S., Takigawa, M. (2016). Novel role of CCN3 that maintains the differentiated phenotype of articular cartilage. **J Bone Miner Metab**, Epub ahead of print.
- Sugimine, Y., Niwa, A., Matsubara, H., Kobayashi, K., Tabata, Y., Heike, T., Nakahata, T., Saito, MK. (2016). A portable platform for stepwise hematopoiesis from human pluripotent stem cells within PET-reinforced collagen sponges. **Int J Hematol**, 104 (6), 647-660.
- Morimoto, N., Kakudo, N., Ogura, T., Hara, T., Matsui, M., Yamamoto, M., Tabata, Y., Kusumoto, K. (2016). Easy-to-Use Preservation and Application of Platelet-Rich Plasma in Combination Wound Therapy With a Gelatin Sheet and Freeze-Dried Platelet-Rich Plasma: A Case Report. **Eplasty**, 5;16:e22.
- Sugamori, Y., Mise-Omata, S., Maeda, C., Aoki, S., Tabata, Y., Murali, R., Yasuda, H., Udagawa, N., Suzuki, H., Honma, M., Aoki, K. (2016). Peptide drugs accelerate BMP-2-induced calvarial bone regeneration and stimulate osteoblast differentiation through mTORC1 signaling. **Bioessays**, 38 (8), 717-25.
- Vo, TN., Tabata, Y., Mikos, AG. (2016). Effects of cellular parameters on the in vitro osteogenic potential of dual-gelling mesenchymal stem cell-laden hydrogels. **J Biomater Sci Polym Ed**, 27 (12), 1277-1290.
- Nagata, J., Matsui, M., Tabata, Y. (2016). Intracellular release of rapamycin from poly (lactic acid)

nanospheres modifies autophagy. **J Biomater Sci Polym Ed**, 27 (13), 1291-1302.

Miyamoto, M., Takagi, G., Kubota, Y., Kirinoki, S., Tezuka, M., Tara, S., Shimizu, W., Fukushima, Y., Kumita, S., Tabata, Y. (2016). [Therapeutic angiogenesis for refractory peripheral arterial disease (PAD)]. **Nihon Rinsho**, 74 Suppl 2, 343-351.

Arai, Y., Aoki, K., Shimizu, Y., Tabata, Y., Ono, T., Murali, R., Mise-Omata, S., Wakabayashi, N. (2016). Peptide-induced de novo bone formation after tooth extraction prevents alveolar bone loss in a murine tooth extraction model. **Eur J Pharmacol**, 5, 782:89-97.

Watanabe, M., Li, H., Kim, AG., Weilerstein, A., Radu, A., Davey, M., Loukogeorgakis, S., Sánchez, MD., Sumita, K., Morimoto, N., Yamamoto, M., Tabata, Y., Flake, AW. (2016). Complete tissue coverage achieved by scaffold-based tissue engineering in the fetal sheep model of Myelomeningocele. **Biomaterials**, 76, 133-43.

Kim, YH., Tabata, Y. (2016). Recruitment of mesenchymal stem cells and macrophages by dual release of stromal cell-derived factor-1 and a macrophage recruitment agent enhances wound closure. **J Biomed Mater Res A**. 104 (4), 942-956.

Kim, YH., Tabata, Y. (2016). Enhancement of wound closure by modifying dual release patterns of stromal-derived cell factor-1 and a macrophage recruitment agent from gelatin hydrogels. **J Tissue Eng Regen Med**, Epub ahead of print doi: 10.1002/term.2202.

田畑泰彦 (2016) 第2章 再生医療等製品 9. バイオマテリアル技術を用いた再生医療 バイオ医薬品と再生医療 (乾 健一監修 中山書店) 256-262.

田畑泰彦 (2016) 第1章 細胞培養のための細胞培養基材—バイオマテリアル技術の重要性— 細胞培養の基礎知識と細胞培養基材の利用・留意点 (情報機構) 3-11.

田畑泰彦 (2016) 先端医療を支えるコントロールドリリース技術 **Drug Delivery System** vol.31 no.3 219-227.

田畑泰彦 (2016) 第2章 再生医療等製品 9 バイオマテリアル技術を用いた再生医療 1. 再生医療におけるバイオマテリアル技術の重要性. Indd2-8.

田畑泰彦 (2016) 再生医療の基礎技術 バイオマテリアル・ハイブリッド材料.

田畑泰彦 (2016) 第1章 バイオマテリアル足場技術の現状と今後—再生治療と再生研究— 再生医療足場の開発と市場 (シーエムシー出版) 3-13.

山本雅哉, 田畑泰彦 (2016). ドラッグデリバリーシステムを利用した再生医療 バイオサイエンスとインダストリー 74, 8-14.

田畑泰彦 (2016) 第3章 マテリアルと生体組織との反応 バイオマテリアル—その基礎と先端研究への展開— (東京化学同人) 94-151.

田畑泰彦 (2016) 第7章 細胞増殖因子とサイトカイン バイオマテリアル—その基礎と先端研究への展開— (東京化学同人) 328-334.

田畑泰彦 (2016) 第7章 血管再生法 バイオマテリアル—その基礎と先端研究への展開— (東京化学同人) 338-341.

List of Presentations

海外での招待講演

Tabata, Y. Biomaterial-Based Regenerative Medical Therapy. JSPS 二国間交流事業共同研究 (インド), India, March 2-3, 2016.

Tabata, Y. Biomaterials Necessary for Cell-Based Regenerative Medicine. EMN kaohsiung Meeting 2016 Taiwan, March 14-18, 2016.

Tabata, Y. Biodegradable polymers for tissue engineering and drug delivery. (basic) Tissue engineering of biomaterial technology necessary for tissue regeneration therapy. (recent topics) Drug delivery and tissue engineering course, Mexico, April 13-15, 2016.

Tabata, Y. Biomaterials Technology Indispensable to Realize Regeneration Therapy and Research, Galway, Ireland, Jun 22-24, 2016.

Tabata, Y. Frontier of Tissue Engineering-Based Regenerative Medicine. The 6th International Conference on the Development of Biomedical Engineering, Ho Chi Min City, Vietnam, Jun 27-29, 2016.

Tabata, Y. Biomaterial-Based Regenerative Medicine for Patients. ET course, Jakarta, Indonesia, August 2-5, 2016.

Tabata, Y. Tissue Engineering: Enable Platforms for Regenerative Medicine. ASEAN Course on Bioceramics and Tissue Engineering (In Conjunction to Travel with Bioceramics Scholars), Jakarta, Indonesia, August 3-5, 2016.

Tabata, Y. Drug Delivery System for Regenerative Medicine. Advances in Tissue Engineering 2016, Short course Houston, USA, August 10-13, 2016.

Tabata, Y. Drug Delivery Technology to Realize Tissue Regeneration. TERMIS-AP2016, Taipei, Taiwan, September 3-6, 2016.

Tabata, Y. Biomaterials Technology Indispensable for Regenerative Medicine. BIOMMED2016, Constanta, Romania, September 15-18, 2016.

Tabata, Y. Biomaterials for Medical Device, Drug Delivery System, and Tissue Engineering. Frontier of Biomaterial-Based Tissue Regeneration. Peking University, Peking, China, October 12-13, 2016.

Tabata, Y. Tissue Engineering to Regeneration Therapy. TERMIS-AP, Taiwan, Kenting, October

31-November 3, 2016.

Tabata, Y. Biomaterials Technology Indispensable for Regenerative Medicine. 6th International Conference on Materials Science and Technologies- ROMAT2016, Bucharest, Romania, November 9-12, 2016.

海外での一般演題

Yamamoto, M. Design for in vitro cellular microenvironments by using bio-functional hydrogels. 2016 Asia University Symposium on Biomedical Engineering. Beijing, July 20-21, 2016.

Yamamoto, M. Design of functional hydrogels to create cellular microenvironments in vitro. Mini Symposium at Taipei Medical University. Taipei City, September 6, 2016.

Yamamoto, M., Toda, H., Tabata, Y. Sandwich culture of mesenchymal stem cells between bio-functional hydrogels as a novel 3-D culture method for regulating their osteoblastic differentiation. 10th World Biomaterials Congress. Montreal, May 17-22, 2016.

Yamamoto, M., Arimoto, K., Muratani, S., Sato, K., Kano, M.R., Tabata, Y. Design of sugar-responsive hydrogels as a sacrificial template to fabricate vascularized collagen gels in vitro. 10th World Biomaterials Congress. Montreal, May 17-22, 2016.

Yamamoto, M., Toda, H., Tabata, Y. Sandwich culture of human mesenchymal stem cells with ephrinB2 oriented-immobilized polyacrylamide hydrogels. Biointerfaces International Zurich 2016. Zurich, August 23-25, 2016.

Yamamoto, M., Muratani, S., Arimoto, K., Tabata, Y. Design of a sugar-responsive gelatin hydrogel as a sacrificial template to create vascularized channel structures in collagen gels. The 2016 Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society- Asia Pacific Meeting. Taipei City, September 3-6, 2016.

Yamamoto, M., Muratani, S., Tabata, Y. Design of sugar-responsive hydrogels to fabricate vascularized collagen gel scaffolds with a branched-vessel structure. Biomaterials International 2016. Kenting, October 31-November 2, 2016.

Jo, J. and Tabata, Y. Development of polysaccharide-based drug delivery systems for genetic engineering of stem cell and regeneration imaging Seminar in Amrita Centre for Nanosciences and Molecular Medicine, Amrita Institute of Medical Sciences, Kerala, January 26-30, 2016.

Jo, J., Tatsutomi, M., and Tabata, Y. Visualization of nitric oxide-producing macrophages with a polymer micelle-based fluorescent probe. 10th World Biomaterial Congress 2016, Montreal, May 17-22, 2016.

Jo, J., Yoshimoto, Y., and Tabata, Y. Design and preparation of antibody-immobilized gelatin nanoparticles incorporating a molecular beacon to visualize the biological function of macrophages. The 2016 Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society- Asia Pacific Meeting (TERMIS-AP

2016), Tamsui, September 3-6, 2016.

Masumoto, H., Yamamizu, K., Ikuno, T., Takakubo, H., Minakata, K., Ikeda, T., Tabata, Y., Yamashita, J.K.. A technology for cardiac regeneration using human iPS cell-derived cardiac tissue including multiple cardiovascular lineages. AHA American Heart Association. New Orleans, November 12-16, 2016.

Zipeng, Li., Masumoto, H., Minakata, K., Kawatou, M., Takimoto, S., Hirao, S., Ikeda, T., Tabata, Y., Yamashita, J.K., Sakata, R. Sequential treatment with sustained-release of basic fibroblast growth factor followed by transplantation of human induced pluripotent stem cell-derived cardiac tissue improved left ventricular function in a rat chronic myocardial infarction model. AHA American Heart Association. New Orleans, November 12-16, 2016.

Takimoto, S., Masumoto, H., Minakata, K., Tabata, Y., Yamashita, J.K. The efficacy of transplantation of human iPS cell derived cardiac tissue for dilated cardiomyopathy hamster model. AHA American Heart Association. New Orleans, November 12-16, 2016.

国内でのシンポジウム招待講演

田畑泰彦 ダブル徐放化技術を用いた体内細胞動員による組織再生 第25回インテリジェント材料・システムシンポジウム、東京、2016年1月8日

田畑泰彦 再生医療についてパナソニック株式会社講演会、2016年1月22日

田畑泰彦 材料表面処理・加工技術からみた再生医療 ASTEC 第11回表面技術会、東京、2016年1月28日

田畑泰彦 バイオマテリアルをテーマとした講演会 .JSR ライフサイエンス株式会社、東京、2016年2月10日

田畑泰彦 自然治癒力を介した再生治療と再生研究の実現を目指して 第2回再生医療産業化展、大阪、2016年2月25日

田畑泰彦 細胞を元気づけて病気を治す - 再生医療の全体像を知る - 第70回京大品川セミナー、東京、2016年3月4日

田畑泰彦 自然治癒力を高めて病気を治す～再生医療はここまできている～ 芦屋カレッジ修了式、芦屋、2016年3月9日

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 バイオインテグレーション学会第6回大会、大阪、2016年3月12日

田畑泰彦 再生医療実用化に必要な不可欠な組織工学技術の現状と展望—再生研究と再生治療— 第15回日本再生医療学会総会、大阪、2016年3月17日

田畑泰彦 再生医療に必要な不可欠なモノづくり技術 中国経済連合会 産業・技術委員会、広島、2016

年3月18日

田畑泰彦 自然治癒力を促進する再生医療、モノづくり技術・周辺産業 ニッケ講演会、大阪、2016年3月30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28年度再生医療サポートビジネス懇話会、京都、2016年4月20日

田畑泰彦 幹細胞移植治療に対するバイオマテリアルの有用性 DS ファーマアニマルヘルス講演会、大阪、2016年4月28日

田畑泰彦 工学技術で実現化する再生医療の現状と今後 -再生治療と再生研究- 第3回ラマンバイオセンシングコンソーシアム、東京、2016年5月10日

田畑泰彦 ライフサイエンス分野における事業化と課題 MORESCO 講演会、神戸、2016年6月14日

田畑泰彦 ものづくり技術からみた先端医療 -再生医療を例として- デンカ講演会、東京、2016年6月20日

田畑泰彦 徐放化DDS技術を用いた患者まで届いている再生治療 第32回日本DDS学会学術集会、静岡、2016年6月30日

田畑泰彦 再生医療「バイオとナノテク・材料分野の融合領域」俯瞰ワークショップの検討状況、東京、2016年7月18日

田畑泰彦 自然治癒力を高めて病気を治す再生医療 -高分子材料の重要性-(公社)高分子学会 高分子同友会、東京、2018年7月26日

田畑泰彦 モノづくりから見た医療と研究 TOWA 講演会、京都、2016年8月30日

田畑泰彦 再生医療分野におけるバイオセンシングの役割 ラマンバイオセンシングコンソーシアム、東京、2016年8月31日

田畑泰彦 バイオマテリアルから見た再生医療の最前線―細胞能力を高める医療の実現― 第159回日本獣医学会学術集会、神奈川、2016年9月8日

田畑泰彦 細胞を元気にするための「モノづくり技術」=再生医療サポートビジネス 再生医療ビジネスシンポジウム in KRP Part IX、京都、2016年9月13日

田畑泰彦 再生医療における診断・評価技術の重要な役割 KRIC 第4回テーマ別研究会『診断・評価』、大阪、2016年9月27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～芦屋川カレッジ、芦屋、2016年9月28日

田畑泰彦 バイオマテリアルとしてのゼラチンの重要性 ライフサイエンスバイオマテリアル研究会2016、京都、2016年9月30日

- 田畑泰彦 バイオマテリアルのバイオ分解への応用展開 イビデン講演会、岐阜 2016 年 10 月 6 日
- 田畑泰彦 「自然治癒力を高めて病気を治す」－再生治療と再生研究の実現にモノづくり技術は必要不可欠である－ 第 36 回「コスモ・バイオ バイオプロダクトセミナー」大阪会場 学術講演、大阪、2016 年 10 月 22 日
- 田畑泰彦 「自然治癒力を高めて病気を治す」－再生治療と再生研究の実現にモノづくり技術は必要不可欠である－ 第 36 回「コスモ・バイオ バイオプロダクトセミナー」東京会場 学術講演、東京、2016 年 10 月 29 日
- 田畑泰彦 DDS と再生医療におけるバイオマテリアルの重要性 武田薬品工業 講演会、大阪、2016 年 11 月 7 日
- 田畑泰彦 自然治癒力を高めて病気を治す－再生医療ビジネスへのモノづくり技術－「平成 28 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、2016 年 11 月 14 日
- 田畑泰彦 バイオマテリアルの再定義とイノベーション応用の可能性 日本バイオマテリアル学会 シンポジウム 2016、福岡、2016 年 11 月 22 日
- 田畑泰彦 Tissue Engineering of Biomaterials Technology to Realize Tissue Regeneration Therapy 第 61 回 公益社団法人 日本口腔外科学会総会・学術大会、幕張、2016 年 11 月 27 日
- 田畑泰彦 再生医療分野へのモノづくり技術の応用 日本ゼオン講演会、東京、2016 年 11 月 29 日
- 田畑泰彦 組織工学技術を活用した再生治療・再生研究の現状と今後 第 29 回阪大医療組織工学フォーラム、大阪、2016 年 11 月 30 日
- 田畑泰彦 バイオマテリアルから見た再生医療ビジネス iPS 細胞ビジネス協議会第 22 回情報交換会、京都、2016 年 12 月 6 日
- 田畑泰彦 Significance of Interdisciplinary Research Collaboration to Achieve Advanced Medicine 筑波大学院ビジネスリーダーズセミナー、茨城、2016 年 12 月 7 日
- 城潤一郎 高分子系バイオマテリアル材料の幹細胞生物機能修飾および再生医療イメージングへの応用 iPS 細胞ビジネス協議会 第 22 回情報交換会、京都、2016 年 12 月 6 日
- 城潤一郎、田畑泰彦 高分子バイオマテリアルを用いた再生医療イメージングの試み 2016KIPS 若手高分子シンポジウム、京都、2016 年 12 月 9 日

国内での一般演題

- 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までを支える高分子技術）KIPS 高分子講座、京都、2016 年 2 月 17 日
- 田畑泰彦 細胞移植治療を支えるバイオマテリアル技術の進歩 医工学フォーラム 2015 年度特別学術講演会、京都、2016 年 2 月 24 日

- 田畑泰彦 モノづくり技術からみた先端医療 医歯工薬境界領域と産学連携の重要性 平成 28 年度「現代科学技術の巨人セミナー『知のひらめき』」、京都、2016 年 5 月 11 日
- 田畑泰彦 歯の治療学「九州歯科大学特別講義」、北九州、2016 年 5 月 13 日
- 田畑泰彦 Applications of biomaterials technology in regenerative medicine Life Science: From Basics to Applications, From Molecular Biology to Systems Biology、京都、2016 年 5 月 24 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 3 年生歯科理工学特別講義、大阪、2016 年 5 月 25 日
- 田畑泰彦 体を治す高分子 高分子化学講義、京都、2016 年 7 月 13 日
- 田畑泰彦 再生医療の最前線と今後の展望、「同志社大学講義」、京都、2016 年 7 月 15 日
- 田畑泰彦 大手前サマースクール、京都、2016 年 7 月 22 日
- 田畑泰彦 ものづくりで病気を治す ー自由な異分野融合で先端医療を拓くー 京大オープンキャンパス、京都、2016 年 8 月 9 日
- 田畑泰彦 四天王寺中学校サマースクール、京都、2016 年 8 月 29 日
- 田畑泰彦 再生医療の現状と展望 医工学フォーラム、京都、2016 年 8 月 30 日
- 田畑泰彦 医工学入門講義、京都、2016 年 9 月 9 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、2016 年 10 月 11 日
- 田畑泰彦 旭硝子株式会社 共同研究報告会、神奈川、2016 年 10 月 25 日
- 田畑泰彦 Biomaterials Indispensable for Advanced Medical Therapy 最先端医療を支えるバイオマテリアル 神戸大学大学院講義：先端医学トピックス、神戸、2016 年 12 月 8 日
- 山本雅哉 再生医療のための機能性ハイドロゲルの創製 第 18 回次世代医工学研究会、東京、2016 年 1 月 29-30 日
- 山本雅哉 再生医療のための機能性ハイドロゲルバイオマテリアルの分子設計 中部ブロックバイオマテリアルセミナー、蒲郡、2016 年 4 月 19 日
- 山本雅哉 再生医療のための生体分子環境設計の試み 生きた再生医療用材料の開発研究会、名古屋、2016 年 10 月 11 日
- 山本雅哉 細胞機能を制御する機能性バイオマテリアルと再生医療への応用 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、2016 年 12 月 8 日
- 山本雅哉 細胞培養基材の基礎と様々な開発事例～必須知識から、使える材料・加工技術、2 次元／3 次元培養への展開まで～ 情報機構セミナー、東京、2016 年 12 月 19 日
- 山本雅哉、村谷誠司、有本晃佑、田畑泰彦 糖応答性ハイドロゲルを用いた管腔構造をもつコーラー

ゲン足場材料の作製 第 25 回インテリジェント材料／システムシンポジウム、東京、2016 年 1 月 8 日

山本雅哉 生体材料を利用した 3 次元微小環境の *in vitro* 構築 NanoBio 第 9 回若手ネットワークシンポジウム、仙台、2016 年 6 月 10-11 日

山本雅哉、戸田裕之、大野工司、辻井敬亘、田畑泰彦 密度の異なるポリマーブラシ表面への細胞接着の検討 第 37 回日本炎症・再生医学会、京都、2016 年 6 月 16-17 日

山本雅哉、村谷誠司、有本晃佑、田畑泰彦 血管構造をもつ細胞足場作製のための糖応答性ハイドロゲルの設計 第 65 回高分子討論会、東京、2016 年 9 月 14-16 日

山本雅哉、戸田裕之、大野工司、辻井敬亘、田畑泰彦 Notch シグナルタンパク質を配向固定化したガラス基板による造血幹細胞の体外増幅 日本金属学会 2016 年秋期（第 159 回）講演大会、大阪、2016 年 9 月 21-23 日

山本雅哉、田畑泰彦 ラマン分光を利用した部位特異的軟骨組織の判別 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016、福岡、2016 年 11 月 21-22 日

Yamamoto, M., Muratani, S., Tabata, Y. Fabrication of vascularized collagen gels with a branched-vessel structure by making use of sugar-responsive gelatin hydrogels. 3rd International Conference on Biomaterials Science in Tokyo. Tokyo, November 28-30, 2016.

城潤一郎、達富幹生、田畑泰彦 *in vivo* 炎症イメージングのための高分子ミセルを用いた水可溶性難水溶性蛍光プローブの調製 第 25 回インテリジェント材料・システムシンポジウム、東京、2016 年 1 月 8 日

城潤一郎、達富幹生、田畑泰彦 炎症イメージングのための高分子ミセルを用いた水可溶性難水溶性蛍光プローブの作製 平成 27 年度京都大学再生医科学研究所若手研究発表会、2016 年 1 月 21 日

城潤一郎、吉本雄、田畑泰彦 マクロファージの生物機能の可視化を目指したモレキュラービーコン含有抗体固定化ゼラチンナノ粒子の作製 第 11 回日本分子イメージング学会総会・学術集会、神戸、2016 年 5 月 28-29 日

城潤一郎、達富幹生、田畑泰彦 炎症の体内可視化を目指した難水溶性蛍光色素内包高分子ミセルの作製 第 37 回日本炎症・再生医学会、京都、2016 年 6 月 16-17 日

城潤一郎、吉本雄、田畑泰彦 マクロファージの生物機能の可視化を目指したモレキュラービーコン含有抗体固定化ゼラチンナノ粒子の調製 第 37 回日本炎症・再生医学会、京都、2016 年 6 月 16-17 日

城潤一郎、吉本雄、田畑泰彦 モレキュラービーコン含有抗体固定化ゼラチンナノ粒子によるマクロファージの生物機能の可視化 第 32 回日本 DDS 学会学術集会、静岡、2016 年 6 月 30-7 月 1 日

- 城潤一郎、達富幹生、吉本雄、田畑泰彦 高分子系バイオマテリアル技術によるマクロファージの生物機能イメージング 第 65 回高分子討論会、横浜、2016 年 9 月 14-16 日
- 城潤一郎、吉本雄、田畑泰彦 高分子ナノ粒子を用いたマクロファージの生物機能の可視化 公益財団法人日本化学繊維研究所 第 74 回講演会、京都、2016 年 11 月 10 日
- 城潤一郎、吉本雄、田畑泰彦 モレキュラービーコン含有ゼラチンナノ粒子によるマクロファージ生物機能の可視化 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016、博多、2016 年 11 月 21- 22 日
- 城潤一郎、田畑泰彦 酸化鉄ナノ粒子を用いた成体幹細胞の安全で簡易なイメージング法の開発 第 6 回 DDS 再生医療研究会、神戸、2016 年 12 月 17 日
- 吉澤恵子、松井誠、田畑泰彦 L-lactide による疎水化ゼラチン - インドシアニンググリーン粒子の小径化と EPR 効果による腫瘍イメージング 第 32 回日本 DDS 学会学術集会、京都、2016 年 6 月 30-7 月 1 日
- 吉澤恵子、松井誠、田畑泰彦 疎水化ゼラチン - インドシアニンググリーン粒子の小径化に対する L-lactide の効果と腫瘍イメージング 第 45 回医用高分子シンポジウム、東京、2016 年 7 月 25 日
- 吉澤恵子、松井誠、田畑泰彦 疎水化ゼラチン - ICG ナノ粒子のサイズと血清安定性に対する L-lactide の効果と腫瘍イメージング 京都大学大学院 工学研究科 高等研究院 生体医工学研究部門平成 28 年度研究発表交流会、京都、2016 年 9 月 21 日
- 田島脩平、田畑泰彦 生体吸収性ハイドロゲル足場を利用した 3 次元細胞集合体の構築 第 37 回日本炎症・再生医学会、京都、2016 年 6 月 16-17 日
- 田島脩平、田畑泰彦 分解性の異なる BMP-2 含浸ゼラチン粒子を含む細胞集合体の作製 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016、福岡、2016 年 11 月 21-22 日
- 明石 祐典、城 潤一郎、田畑 泰彦 ゼラチンミセルを用いた難水溶性の薬剤キャリアの作製 再生医療学会、大阪、2016 年 1 月 17-19 日
- 明石 祐典、城 潤一郎、田畑 泰彦 血小板を担体とする難水溶性薬剤デリバリーのための高分子ミセルの作製 炎症・再生医学会、京都、2016 年 6 月 16-17 日
- 明石 祐典、城 潤一郎、田畑 泰彦 血小板を担体とする難水溶性薬物送達のための高分子ミセルの作製 DDS 学会、静岡、2016 年 6 月 30-7 月 1 日
- 明石 祐典、城 潤一郎、田畑 泰彦 高分子ナノ粒子を用いた血小板への薬剤導入 関西若手バイオマテリアル学会、神戸、2016 年 8 月 6 日
- 明石 祐典、城 潤一郎、田畑 泰彦 高分子ナノ粒子を用いた血小板への薬剤導入と薬剤放出 バイオマテリアル学会、福岡、2016 年 8 月 6 日

- 村谷誠司、有本 晃佑、山本 雅哉、狩野光伸、田畑 泰彦 コラーゲンゲル足場内に導入した管腔構造内での血管内皮細胞の動態 第 15 回日本再生医療学会総会、大阪、2016 年 3 月 17-19 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血管様構造の作製 第 37 回日本炎症・再生医学会、京都、2016 年 6 月 16-17 日
- 村谷誠司、有本 晃佑、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構造の作製 日本バイオマテリアル学会第 11 回関西若手研究発表会、神戸、2016 年 8 月 6 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て作製した管腔構造内での血管内皮細胞の灌流培養 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016、福岡、2016 年 11 月 21-22 日
- 田中隆介、Kim Yanghee、田畑泰彦 マクロファージ動員のための難水溶性薬剤徐放システムの開発 第 32 回日本 DDS 学会学術集会、静岡、2016 年 6 月 30 日 -7 月 1 日
- 田中隆介、Yanghee Kim、田畑泰彦 難水溶性薬物の水可溶化と徐放のための高分子ミセル材料の作製 第 62 回高分子研究発表会（神戸）、神戸、2016 年 7 月 15 日
- 田中隆介、Kim Yanghee、田畑泰彦 高分子ミセルとゼラチンハイドロゲルを用いた難水溶性薬剤の徐放化 日本バイオマテリアル学会第 11 回関西若手研究発表会、神戸、2016 年 8 月 6 日
- 田中隆介、Kim Yanghee、田畑泰彦 難水溶性薬剤の徐放化による炎症部位へのマクロファージ動員促進 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016、福岡、2016 年 11 月 21-21 日
- 成田萌、戸田裕之、山本雅哉、田畑泰彦 ポリビニルアルコールを用いた糖応答性ハイドロゲルの作製 第 62 回高分子研究発表会（神戸）、神戸、2016 年 7 月 15 日
- 成田萌、戸田裕之、山本雅哉、田畑泰彦 刺激応答性ポリエチレングリコールハイドロゲルの作製 日本バイオマテリアル学会第 11 回関西若手研究発表会、神戸、2016 年 8 月 6 日
- 成田萌、戸田裕之、山本雅哉、田畑泰彦 ポリエチレングリコールからなる刺激応答性ハイドロゲルの作製 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016、福岡、2016 年 11 月 21-22 日
- 村田勇樹、城潤一郎、近藤蓉子、田畑泰彦 複合細胞イメージングを目的とした量子ドット・磁性ナノ粒子含有ゼラチンハイドロゲルナノ粒子の作製 第 11 回日本分子イメージング学会総会・学術総会、神戸、2016 年 5 月 28-29 日
- 村田勇樹、城潤一郎、田畑泰彦 量子ドット・磁性粒子含有ゼラチンハイドロゲルナノ粒子の調製 第 62 回高分子研究発表会、神戸、2016 年 7 月 15 日
- 村田勇樹、城潤一郎、田畑泰彦 量子ドット・磁性粒子含有ゼラチンハイドロゲルナノ粒子を用いた複合細胞イメージング 日本バイオマテリアル学会第 11 回関西若手研究発表会、神戸、2016 年 8 月 6 日
- 村田勇樹、城潤一郎、田畑泰彦 複合細胞イメージングを目的とした量子ドット・磁性粒子含有ゼ

ラチンハイドロゲルナノ粒子の作製 第32回日本DDS学会学術集会、静岡、2016年6月30-7月1日

村田勇樹、城潤一郎、田畑泰彦 量子ドット・磁性粒子含有ゼラチンハイドロゲルナノ粒子による細胞イメージング 第38回日本バイオマテリアル学会シンポジウム、福岡、2016年11月21-22日

Hsu, C.J., Jo, J.ichiro., Sakuma, M., Tabata, Y. Control of anti-inflammatory environment with macrophages transfected with an anti-inflammatory related mRNA. Symposium 2016 of The Japanese Society for Biomaterials, Fukuoka, November 21-22, 2016.

高田聡、中村陽子、河合勝也、鈴木茂彦、田畑泰彦 脂肪および骨髄由来間葉系幹細胞から分泌されるエクソソームの *in vitro* での機能比較 第15回日本再生医療学会総会、大阪、2016年3月17-19日

高田聡、中村陽子、川端慎吾、河合勝也、鈴木茂彦、田畑泰彦 脂肪由来間葉系幹細胞から分泌されるエクソソームの創傷治療に与える影響 第37回日本炎症・再生医学会、京都、2016年6月16-17日

新井大輔、石井暁、千原英夫、池田宏之、宮本享、田畑泰彦 抗血栓薬、およびbFGFの2方向性徐放作用を有するステント開発の基礎研究 第37回日本炎症・再生医学会、京都、2016年6月16-17日

山下幸大、土黒一郎、村上隆英、平井健次郎、森紗也香、田能村昌久、田畑泰彦、坂井義治 非ラメラ液晶製材スプレーによる術後癒着防止効果 第37回日本炎症・再生医学会、京都、2016年6月16-17日

伊井正明、小石喜典、田畑泰彦、朝日道雄、根本慎太郎 脂肪由来幹細胞とスタチン封入ナノ粒子を用いた心筋梗塞に対する新規心筋再生治療の開発 第37回日本炎症・再生医学会、京都、2016年6月16-17日

上村卓也、高松聖仁、池田幹則、横井卓哉、新谷康介、斧出絵麻、岡田充弘、田畑泰彦、中村博亮 iPS細胞とFGFを融合したハイブリッド型人工神経 自家神経移植に匹敵する人工神経をめざして 第37回日本炎症・再生医学会、京都、2016年6月16-17日

大谷亨、山本阿里、山本雅哉、田畑泰彦 血管新生に及ぼすbFGF含有ヒアルロン酸架橋ヒドロゲルへのPEGグラフト化の影響 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2016、福岡、2016年11月21-22日

木原伸介、林申也、明石裕典、永田純平、竹内裕一、羽田勝彦、鎮西伸顕、神崎至幸、橋本慎吾、黒田良祐、田畑泰彦、黒坂昌弘 エイコサペンタエン酸は軟骨細胞の変性と変形性関節症の進行を抑制する 第37回日本炎症・再生医学会、京都、2016年6月16-17日

木原伸介、林申也、明石裕典、永田純平、竹内裕一、羽田勝彦、鎮西伸顕、神崎至幸、橋本慎吾、

黒田良祐、田畑泰彦、黒坂昌弘 エイコサペンタエン酸徐放ゲルは変形性関節症の進行を抑制する 第6回 DDS 再生医療研究会、神戸、2016年12月17日

黒田隆、浅田隆太、南角学、猪原登志子、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再生医療 - 成長因子を用いたトランスレーショナルリサーチ - 第15回日本再生医療学会総会、大阪、2016年3月17-19日

黒田隆、猪原登志子、浅田隆太、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 — rhFGF-2 ゼラチンハイドロゲルを用いた低浸襲再生医療 — 第37回日本炎症・再生医学会、京都、2016年6月16-17日

黒田隆、浅田隆太、南角学、猪原登志子、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 FGF-2 を用いた再生医療 — 臨床試験から治験へ — 第6回 DDS 再生医療研究会、神戸、2016年12月17日

黒田隆、浅田隆太、猪原登志子、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成長因子を用いた再生医療 — 臨床試験から治験へ — 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016、福岡、2016年11月21-22日

古村眞、古村浩子、田畑泰彦、中山泰秀、星和人、高戸毅 組織工学による下気道再生 第15回日本再生医療学会総会、大阪、2016年3月17-19日

酒井成貴、佐藤圭祐、田畑泰彦、貴志和生 ピオグリタソ (PPAR γ アゴニスト) の局所徐放が皮膚再生を促進するメカニズム 第15回日本再生医療学会総会、大阪、2016年3月17-19日

芝田匡史、宮本正章、栗田二郎、宮城泰雄、高木元、田畑泰彦、新田隆 胸骨正中切開術後癒合不全症例に対する DDS 徐放化 PRP による新治療法の開発 第6回 DDS 再生医療研究会、神戸、2016年12月17日

鈴木敏之、小杉謙介、戸部賢、田畑泰彦、横尾聡、齋藤繁 PLGA を用いたリドカイン徐放シート のヒト炎症部位における鎮痛効果と創傷治癒 (組織の再生) への影響 第37回日本炎症・再生医学会、京都、2016年6月16-17日

ソブハンウバイダス、入江理絵、蛇口達造、山下紘正、澤芳樹、田畑泰彦、千葉敏雄 ゼラチンハイドロゲルシートと細胞シートの併用による子宮内胎児再生治療 第37回日本炎症・再生医学会、京都、2016年6月16-17日

柚本千紗、柚本聡、鈴木涼介、川端慎吾、田畑泰彦 新規遺伝子導入補助機材 — プロネクチン F (人工細胞接着性タンパク質) — 第37回日本炎症・再生医学会、京都、2016年6月16-17日

素輪善弘、岸田網郎、田畑泰彦、松田修、沼尻敏明 末梢神経欠損損傷における自作シュワン細胞付加型ゼラチンハイドロゲルチューブ移植 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016、福岡、2016年11月21-22日

高岡勇輝、木谷友哉、吉本雄、渡辺太治、上大介、田畑泰彦、五條理志 細胞内移行ペプチド (TAT)

修飾ミトコンドリアの細胞内移植 第15回日本再生医療学会総会、大阪、2016年3月17-19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
シンバスタチン含有ゼラチンハイドロゲル投与によるマウス変形性関節症進行抑制効果
第6回 DDS 再生医療研究会、神戸、2016年12月17日

田村亮、上本伸二、田畑泰彦 Pullulan 修飾による間葉系幹細胞由来エクソソームの肝障害モデル
における治療効果 第37回日本炎症・再生医学会、京都、2016年6月16-17日

千野裕太郎、戸田裕之、山本雅哉、田畑泰彦 細胞培養基材のためのポリアクリルアミドハイドロ
ゲルへのタンパク質のパターンニング 第15回日本再生医療学会総会、大阪、2016年3月
17-19日

戸田裕之、山本雅哉、田畑泰彦 生体機能性ハイドロゲルによる間葉系幹細胞のサンドイッチ培養
第15回日本再生医療学会総会、大阪、2016年3月17-19日

堀場正寛、奥村直毅、小泉範子、田畑泰彦 W/O/W エマルジョン法による抗真菌薬徐放粒子の作
製第15回日本再生医療学会総会、大阪、2016年3月17-19日

升本英利、南方謙二、熊谷基之、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 心臓血管外科領域における bFGF 徐放化ゼラチンハイドロゲ
ルの臨床試験の検討 第6回 DDS 再生医療研究会、神戸、2016年12月17日

松下雄彦、張樹蓉、西田京平、松本知之、高山孝司、田中聡一、宮地伸晃、茨木一行、荒木大輔、
神崎至幸、長宗高、田畑泰彦、黒田良祐 シンバスタチン含有ゼラチンハイドロゲル投与によ
る家兎半月板治癒促進効果 第6回 DDS 再生医療研究会、神戸、2016年12月17日

森戸亮行、吉田拓正、小野京、湯本琴美、田畑泰彦、細矢哲康 歯髄幹細胞および象牙芽細胞に対
する simvastatin ならびに bFGF の作用 第37回日本炎症・再生医学会、京都、2016年6月
16-17日

森本尚樹、覚道奈津子、小倉常敬、原朋也、山本雅哉、田畑泰彦、楠本健司 PRP とゼラチンシー
トの併用療法による難治性皮膚潰瘍治療 第6回 DDS 再生医療研究会、神戸、2016年12月17
日

山水康平、幾野毅、高久保瞳、南方謙二、田畑泰彦、山下潤 ヒト iPS 細胞由来の 3D- 心血管組織の
作製による心筋梗塞治療 第15回日本再生医療学会総会、大阪、2016年3月17-19日

山水康平、幾野毅、高久保瞳、升本英利、南方謙二、田畑泰彦、山下潤 ゼラチンハイドロゲルマ
イクロソフィアを用いたヒト iPS 細胞由来の 3D- 心血管組織の作製と心筋梗塞治療 第37回
日本炎症・再生医学会、京都、2016年6月16-17日

横田憲昌、松野智宣、又賀泉、田畑泰彦 多孔質ハイドロキシアパタイト顆粒とゼラチンハイドロ
ゲル粒子からなる複合体の骨組織再生の評価 第37回日本炎症・再生医学会、京都、2016年

6月16-17日

吉本雄、城潤一郎、田畑泰彦 細胞表面抗原認識をもつ抗体固定化ゼラチンナノ粒子の作製 第15回日本再生医療学会総会、大阪、2016年3月17-19日

渡辺太治、上大介、高岡勇輝、木谷友哉、吉本雄、田畑泰彦、五条理志 細胞内移行ペプチド (TAT) を用いたミトコンドリアの細胞内移植 第37回日本炎症・再生医学会、京都、2016年6月16-17日

鷺尾絢子、北村知昭、田畑泰彦 根尖歯周組織形成におけるゼラチン-バイオガラス複合スポンジ有効性の検討 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2016、福岡、2016年11月21-22日

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

再生増殖制御学御分野
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

私達のグループは、発生や再生の過程における幹細胞の増殖・分化制御機構に焦点を当てた研究を行っている。骨格筋に分化する成体の骨格筋幹細胞（筋衛星細胞）を中心に、移動能や多分化能に興味を持たれる神経堤細胞、骨格筋と骨を繋ぐ腱の分化などの研究も行っている。

私達が激しい運動をすると筋肉痛が起こるのは筋繊維（長細い筋細胞のこと）が壊れて、そこで炎症反応が起こるからだ。しかしこの壊れた筋肉は2週間から1ヶ月程度経つともとの状態に回復する。これが骨格筋再生である。骨格筋の再生が効率的に起こるのは、私達が骨格筋専用の幹細胞を持っているからである。骨格筋幹細胞は、いつもは静止期にあって骨格筋の横でじっとしているが、激しい運動等により筋が損傷を受けると、活性化されて増殖し、骨格筋を作る。それとともに、一部は自己複製して、再び筋幹細胞となる。(1) 筋幹細胞はどのように樹立されるのか、(2) 静止期にある筋幹細胞が、再生が必要になると活性化されるのはどのような仕組みによるのか、(3) その際どのようなメカニズムによって、もとの状態の骨格筋に還元されるのか、など疑問は尽きない。我々はこれまでに、マウスの成長の過程で、増殖していた筋幹細胞が静止期に入ること、そのプロセスに miR-195/497 という microRNA が関わることを明らかにしてきたが、逆に幹細胞がその静止期から活性化されるためには、筋再生に先行して起こる炎症反応が必要であり、再生初期に炎症細胞で発現する ADAM8 が欠損すると、傷害を受けた骨格筋が除去されず、筋再生が不完全になることも明らかにしてきた。本年度は、そのような骨格筋幹細胞の性質や再生への炎症の関与についてさらに検討している。一方、神経堤細胞の分化については、心臓発生の際に心臓内に移動する神経堤細胞に着目した研究を行い、この細胞で高発現を示す ADAM19 の役割について興味深い知見を得、論文にまとめつつある。

後者の研究は、細胞系譜やそれらの遺伝子発現を頑強に制御する転写因子とは対照的に、細胞間のシグナリングや接着は時間的空間的、あるいは量的に制御される必要があり、ADAM8 や ADAM19 などの膜型プロテアーゼはプロテオリシスによってそのような制御を行っていることを示すものである。しかし、ADAM が担うエクストドメインシェディングという現象が、実際に細胞間シグナリングや接着を時間的空間的に制御している、と言う証拠はこれまで示されていなかった。

そこで私達は、ミエリン形成やシナプスの可塑性、神経筋接合部形成、心臓形成など多様な活性をもつ膜型増殖因子ニューレグリン -1 (NRG1) について、その切断がどのように制御されているのかを、細胞レベルおよび個体レベルで検証する実験系を構築した。NRG1 は、別名グリア増殖因

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。私達は早くからその切断制御に焦点を当てた研究を行ってきた (Shirakabe K., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2001; Yokozeki T., *et al.*, *Genes to Cells*, 2007)。近年は世界的にも、その切断制御に関わる ADAM や BACE についての目覚ましい進展があり、BACE1 や ADAM10 がニューレグリンの切断に関わる事が報告されている。しかし、増殖因子を切断する酵素がわかり、切断のプロセスが NRG1 の機能制御において重要であることは示されたが、実はその制御の意義は不明のままである。また、その切断酵素や切断制御機構に関して主に培養細胞を用いて研究がおこなわれてきたが、細胞内のどこでプロテオリシスが起るのかも不明であった。そこで私達は、NRG1 の切断を生きた細胞や個体内で定量化および可視化することのできる蛍光バイオセンサー (Neuregulin 1 Cleavage Indicating SenSOR, N-CISSOR) を開発し、ライブでエクストドメインシェディングを観察する実験系を構築した。そして、N-CISSOR を培養細胞およびゼブラフィッシュ個体に適用することにより、リガンドの切断がニューレグリン-ErbB シグナリングの時間的空間的制御に関与することを示すことに成功した (Kamezaki A., *et al.*, *Scientific Rep.*, 2016)。以下はその研究の概要である。

まず、NRG1 の細胞外領域を mCherry、細胞内領域を GFP で標識した N-CISSOR を作製し (図 1)、HEK293T 細胞を用いた評価により、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の点において、N-CISSOR が NRG1 をよく模倣することを確認した。

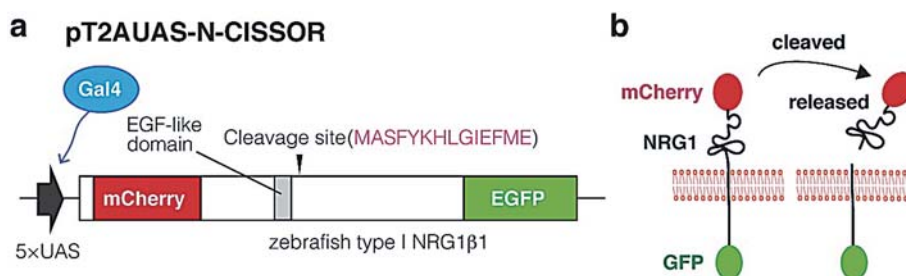


Fig. 1

そして、HEK293T 細胞に N-CISSOR を発現させタイムラプスイメージングにより経時的に蛍光強度を測定したところ、N-CISSOR の mCherry/GFP 蛍光強度比は PMA 刺激により時間とともに低下した (図 2)。この PMA 依存的な mCherry/GFP 蛍光強度比の低下は、メタロプロテアーゼ活性の抑制および NRG1 の切断部位の除去によりともにも阻害されたことから (図 3)、N-CISSOR は NRG1 の切断を mCherry/GFP 蛍光強度比の低下により評価できることが示された。さらに、mCherry/GFP 蛍光強度比の Ratio image を取得することで NRG1 の切断を可視化すると、PMA 依存的な NRG1 の切断は細胞内において局在性をもつこと、その変化は切断部位に依存することが確かめられた (図 2)。そこで、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ところ (図 4)、NRG1 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 (図 5)、そして、その切断はメタロプロテアーゼあるいは BACE により制御されていることがわかった。

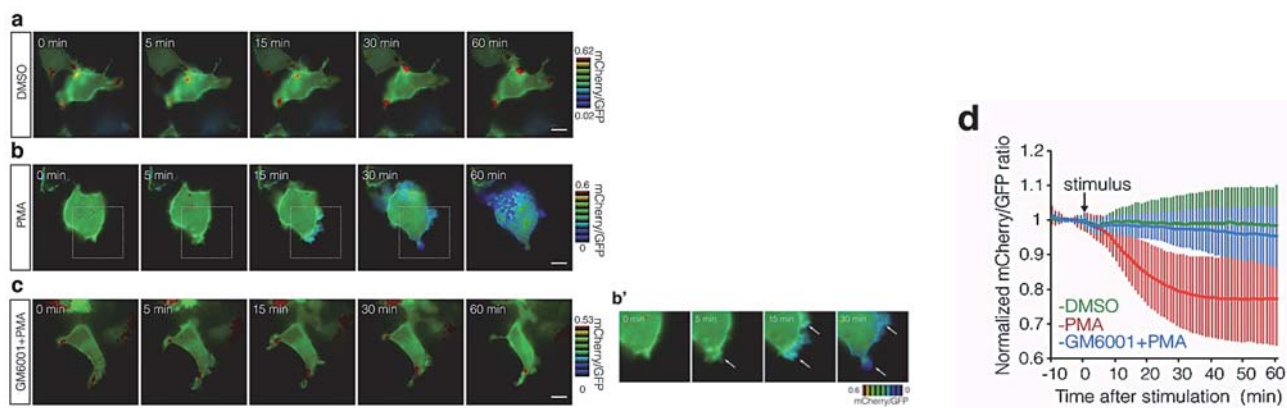


Fig. 2

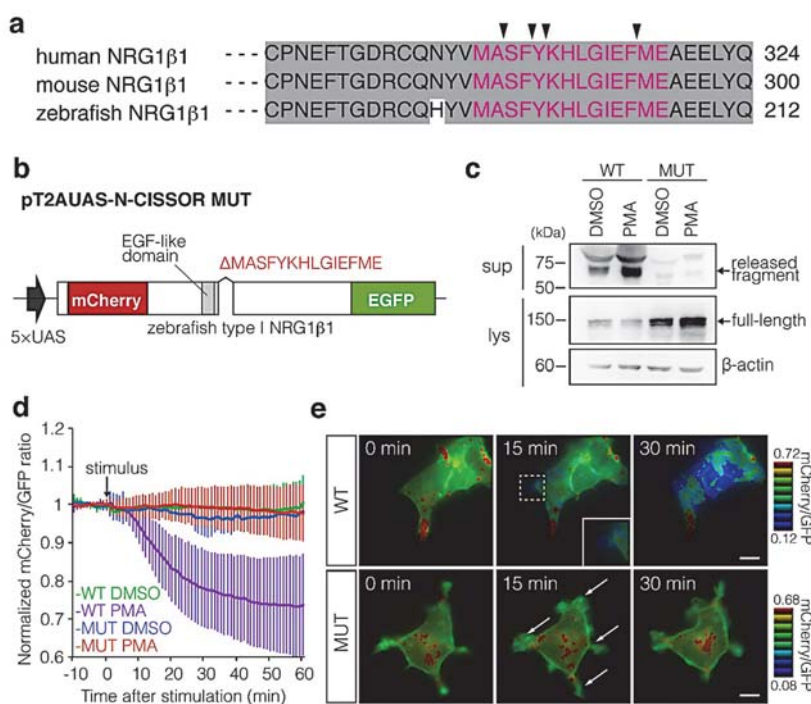


Fig. 3

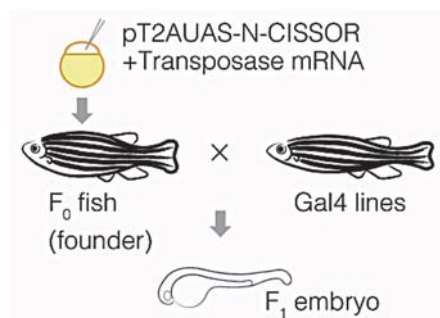


Fig. 4

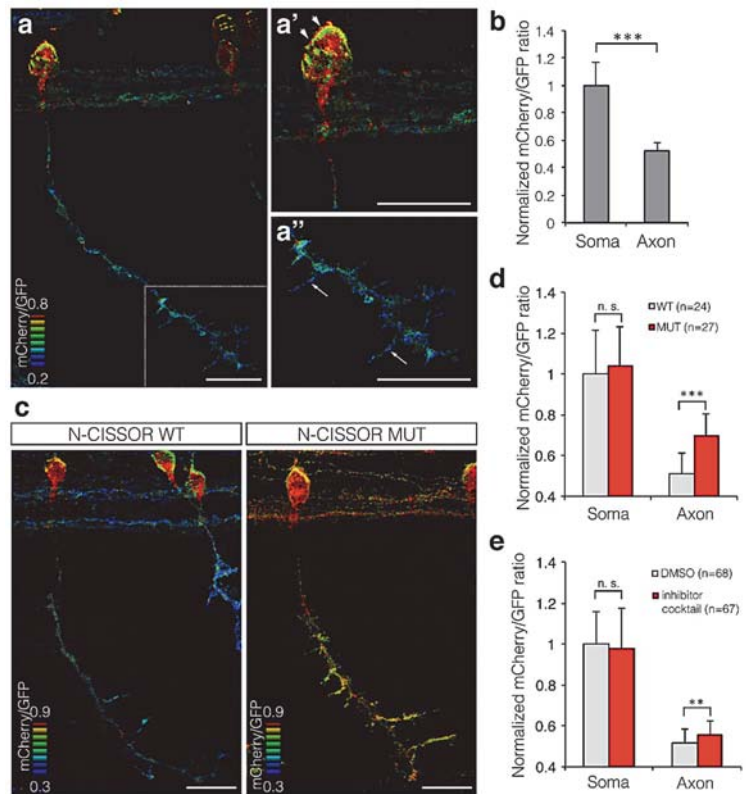


Fig. 5

以上、この研究は、N-CISSOR の開発により、従来の生化学的手法では困難であった生きた細胞内での膜型 NRG1 の切断評価を試み、細胞内で時間経過に伴い NRG1 が切断される様子を定量化および可視化することに成功した。また、N-CISSOR が神経細胞の軸索で優先的に切断されていたことは、NRG1 が細胞内で局在性をもって切断制御されていることを *in vivo* で示した重要な知見であり、N-CISSOR を個体で用いることの有用性を示した。今後、このバイオセンサーを用いて、NRG1-ErbB を中心に、膜型増殖因子による細胞間シグナリング制御機構の解明を目指す。

We are interested in molecular and cellular mechanisms of organ development and regeneration, especially from an aspect of tissue stem cells and cell-cell interactions required for cellular proliferation and differentiation.

Many membrane proteins are subjected to the ectodomain shedding, limited proteolysis at the juxtamembrane region. Shedding ectodomains of transmembrane ligands and receptors such as Notch and its ligands contribute to the progression of downstream signaling pathways, while shedding those of cell adhesion molecules such as cadherins causes loss of cell-cell contacts. Although such post-translational modifications are critical for proper cell-cell interactions during development or regeneration, we still need to clarify whether the ectodomain shedding plays instructive roles in regulation of intercellular signaling pathways or whether it solely acts as permissive roles to allow signaling to go forward.

Our group takes different kinds of approaches to this question. In this annual report, we introduce our recent work on ectodomain shedding of signaling molecule Neuregulin (NRG1), glial growth factor. Neuregulin1 (NRG1) plays diverse developmental roles and is likely involved in several neurological disorders including schizophrenia. The transmembrane NRG1 protein is proteolytically cleaved and released as a soluble ligand for ErbB receptors. Such post-translational processing, referred to as 'ectodomain shedding' is thought to be crucial for NRG1 function. However, little is known regarding the regulatory mechanism of NRG1 cleavage *in vivo*. Here, we developed a fluorescent probe, NRG1 Cleavage Indicating SenSOR (N-CISSOR), by fusing mCherry and GFP to the extracellular and intracellular domains of NRG1, respectively. N-CISSOR mimicked the subcellular localization and biochemical properties of NRG1 including cleavage dynamics and ErbB phosphorylation in HEK293T cells. mCherry/GFP ratio imaging of phorbol-12-myristate-13-acetate-stimulated, N-CISSOR-expressing cells enabled to monitor rapid ectodomain shedding of NRG1 at the subcellular level. Utilizing N-CISSOR in zebrafish embryos revealed preferential axonal NRG1 ectodomain shedding in developing motor neurons, demonstrating that NRG1 ectodomain shedding is spatially regulated at the subcellular level. Thus, N-CISSOR will be a valuable tool for elucidating the spatiotemporal regulation of NRG1 ectodomain shedding, both *in vitro* and *in vivo*. (Kamezaki A., *et al*, *Scientific Rep.*, 2016).

List of Publications

- Tokumasu, Y., Iida, A., Wang, Z., Ansai, S., Kinoshita, M. and Sehara-Fujisawa, A. (2016). ADAM12-deficient zebrafish exhibit retardation in body growth at the juvenile stage without developmental defects. **Develop. Growth Differ.** 58, 409-421.
- Kamezaki, A., Sato, F., Aoki, K., Asakawa, K., Kawakami, K., Matsuzaki, F. and Sehara-Fujisawa, A. (2016). Visualization of Neuregulin 1 ectodomain shedding reveals its local processing in vitro and in vivo. **Scientific Rep.** 6, 28873.
- Inoue, T., Iida, A., Maegawa, S., Sehara-Fujisawa, A. and Kinoshita, M. (2016). Generation of a transgenic medaka (*Oryzias latipes*) strain for visualization of nuclear dynamics in early developmental stages. **Develop. Growth Differ.** 58, 679-687.
- Itou J., Tanaka S., Li, W., Iida, A., Sehara-Fujisawa, A., Sato, F. and Toi, M. (2016). The Sal-like 4 - integrin $\alpha\beta 1$ network promotes cell migration for metastasis via activation of focal adhesion dynamics in basal-like breast cancer cells. **BBA Molecular Cell Research.** 1864, 76-88

List of Presentations

- Kamezaki, A., Sato, F., Aoki, K., Asakawa, K., Kawakami, K. and Sehara-Fujisawa A. Development of a probe to monitor ectodomain shedding of Neuregulin 1 in vitro and in vivo. International FishMed

Conference on Zebrafish Research 2016. Warsaw, March 18, 2016.

佐藤文規 宇宙で過ごした魚の骨格筋はやせるのか？～宇宙実験の結果より～ 第14回日本予防医学会学術総会、東京、2016年6月18日

瀬原淳子 年をとると筋肉が衰えるのは何故？ - 再生医学から宇宙生物学まで - 京都大学再生医科学研究所第11回公開講演会、京都、2016年7月16日

飯田敦夫 光る魚で細胞を“見る”～ライブイメージングの最前線～ 国際科学技術財団「やさしい科学技術セミナー」、東京、2016年7月30-31日

瀬原淳子 幹細胞の増殖・分化制御機構のプロテアーゼ制御 第21回日本病態プロテアーゼ学会学術集会、大阪、2016年8月5日

飯田敦夫 ゼブラフィッシュを使った血管・血球形成の研究 第1回次世代生命科学の研究会、徳島、2016年8月12日

瀬原淳子 ゼブラフィッシュは筋萎縮モデルとなりうるか？ 第62回日本宇宙航空環境医学会大会 日本宇宙生物科学会第30回大会 合同大会、愛知、2016年10月14日

亀崎青沙 膜型増殖因子の切断活性を可視化する蛍光プローブの開発とゼブラフィッシュ胚への応用 第27回関西おさかな勉強会、兵庫、2016年1月15日

瀬原淳子 膜蛋白質のエクトドメイシェディングによる血管-神経相互作用の制御 科学研究費助成事業新学術領域研究「血管と神経」成果公開シンポジウム、京都、2016年2月22日

Nishimura, D., Hiramuki, Y., Sogabe, M., Hori, S., Sakai, H., Sato, T., Sato, F., Bartsch, JW. and Sehara-Fujisawa, A. Roles of ADAM8 in elimination of injured muscle fibers prior to skeletal muscle regeneration. CiRA/ISSCR 2016 International Symposia. Kyoto, March 22, 2016.

Kamezaki, A. Development of a fluorescent probe to monitor NRG1 ectodomain shedding in vitro and in vivo. JSDB Special Symposium. Tokyo, June 2, 2016.

Nishimura, D., Sakai, H., Sato, T., Sato, F., Nishimura, S., Toyama-Sorimachi, N., Bartsch, JW. and Sehara-Fujisawa, A. Roles of ADAM8 for skeletal muscle regeneration. 第24回マクロファージ分子細胞生物学会国際シンポジウム (MMCB2016). Tokyo, June 4, 2016.

Sehara-Fujisawa, A. Roles of Meltrin β /ADAM19 in development of the heart. Swiss-Kyoto Joint Symposium of Life Science 2016, Kyoto, June 13, 2016.

Kamezaki, A., Sato, F., Aoki, K., Tabuchi, M., Asakawa, K., Kawakami, K., Matsuzaki, F. and Sehara-Fujisawa, A. Establishment of a dual-fluorescence probe to visualize Neuregulin 1 ectodomain shedding in developing zebrafish embryos. 第22回小型魚類研究会、愛知、2016年8月20日

Kamezaki, A. establishment of a fluorescence biosensor to monitor Neuregulin1 ectodomain shedding in zebrafish embryo. モデル動物研究会 ～ムシサカナの会@金沢～、石川、2016年10月7日

佐藤文規 “宇宙遊泳”がゼブラフィッシュ骨格筋におよぼす影響 第62回日本宇宙航空環境医学会大会 日本宇宙生物科学会第30回大会 合同大会、愛知、2016年10月14日

飯田敦夫 マウスで肥満に関わる ADAM12 遺伝子のゼブラフィッシュ変異体の樹立 第2回ゼブラフィッシュ創薬研究会、岐阜、2016年11月14日

Iida, A., Nishimaki, T. and Sebara-Fujisawa, A. Analysis of non-mammalian viviparous vertebrate using a livebearer fish *Xenotoca eiseni*. The 87th Meeting of the Zoological Society of Japan, 沖縄、2016年11月18日

Choi, M., Sato, F., Uchida, S., Tanigaki, F., Suzuki, Y., Kawakami, K. and Sebara-Fujisawa, A. Quantitative Assessment and Analysis of The Zebrafish Behavior in The Long-Term Space Stay. The 87th Meeting of the Zoological Society of Japan, 沖縄、2016年11月18日

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、再生した免疫細胞を用いた免疫細胞療法の開発も進めている。

1) T 前駆細胞における系列決定状態の維持にはポリコムによる PAX5 の抑制が必須

我々は以前に T 細胞系列への運命決定に不可欠な遺伝子 Bcl11b を同定したが、運命決定された後の T 前駆細胞の維持機構は不明であった。そこで、今回の研究では遺伝子発現のエピジェネティックな抑制機構として働くポリコム複合体に注目し解析を行った。

Lck-Cre を用いて T 細胞特異的にポリコム複合体遺伝子 Ring1A/B を欠損させたマウスを作製したところ、このマウスの胸腺では T 細胞が全く作られず、未分化な前駆細胞段階で分化が停滞していた (Genes & Development, 2016)。この Ring1A/B を欠損した T 前駆細胞を調べると、同じリンパ球である B 細胞系列関連遺伝子の発現が上昇していた。そこで、この細胞を放射線照射した免疫不全マウスに移植すると、T 細胞は全く生成しない代わりに、成熟 B 細胞が生成した。すなわち、T 系列の細胞が B 系列の細胞に運命転換したことになる。Ring1A/B を欠損させると同時に B 細胞分化に重要な遺伝子である Pax5 を欠損させると、T 細胞は正常に分化し、B 細胞へ運命転換しなくなった。このことから Ring1A/B は主に Pax5 の発現を抑制することにより T 前駆細胞の運命を維持していると考えられた (Fig. 1)。

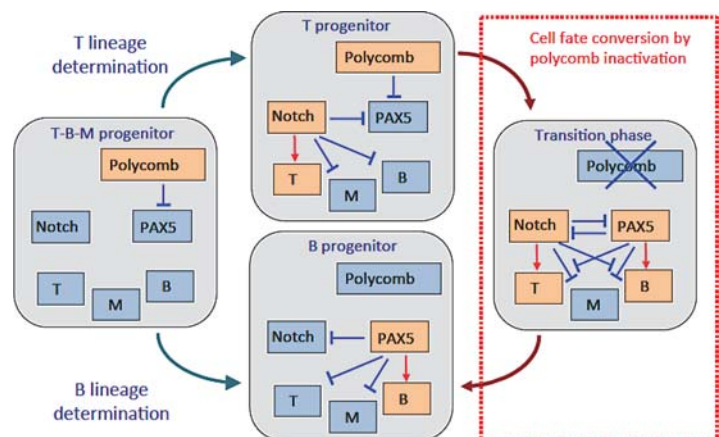


Fig. 1 Conversion of T cells to B cells by inactivation of polycomb-mediated epigenetic suppression of B lineage program.

2) ヒト iPS 細胞からがん細胞を殺傷できる強力なキラー T 細胞を再生

これまでがん細胞に反応するキラー T 細胞を体外で増やして患者に投与するとがんの治療に有効であることが示されてきた。しかしキラー T 細胞を培養するとある程度増えた時点で疲弊してしまうため、高品質な細胞を効率よく増やすことは極めて困難であった。

我々は、この問題の解決のために iPS 細胞技術を用いてきた。まずがん抗原を認識できる T 細胞レセプターを有する T 細胞から iPS 細胞を作製し、その iPS 細胞から T 細胞を再生すると、がん抗原を認識する T 細胞だけを量産することができるというアイデアである。このアイデアに基づいて、我々は 2013 年に世界で初めてがん抗原に反応するヒトのキラー T 細胞の再生に成功した (Cell Stem Cell, 2013)。

しかし、これまでの培養法では、生体中のキラー T 細胞に比べると、がん抗原を標的にして殺傷する能力の弱い細胞しかつくることができなかった。今回、この問題を解決するために、培養法の改良を行った。iPS 細胞から T 細胞を再生させる過程で、CD4/CD8 共陽性細胞が生成する。この段階の細胞を他の細胞から分離した上で細胞に刺激を加えると、がん抗原を標的にして殺傷する能力の強いキラー T 細胞がつかれることを発見した (Cancer Research, 2016)。

この手法を用いて WT1 抗原を標的とする再生キラー T 細胞を作製したところ、この再生キラー T 細胞は WT1 抗原を出す白血病細胞を試験管内で効率よく殺傷することを確認した。また、免疫不全マウスに白血病細胞を注入して作製した白血病モデルで治療効果が認められた (Fig. 2)。今回の成果は、再生キラー T 細胞を用いたがん治療の戦略を、臨床応用に向けて一歩前進させるものと考えられる。

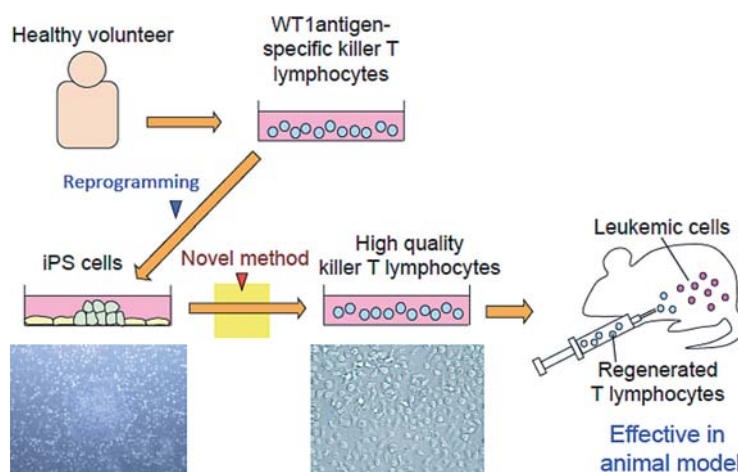


Fig. 2 Regeneration of CD8 $\alpha\beta$ T cells from T cell-derived iPSC imparts potent tumor antigen-specific cytotoxicity program.

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.

1) T cell lineage commitment status of T cell progenitors is maintained by polycomb-mediated epigenetic suppression of Pax5

In general, cell fate is primarily determined by transcription factors, followed by epigenetic mechanisms fixing the status. While the importance of transcription factors controlling cell fate has been well characterized, epigenetic regulation of cell fate maintenance remains to be elucidated. We have provided an obvious fate-conversion case, where the inactivation of polycomb-mediated epigenetic regulation results in conversion of T lineage progenitors to the B cell fate. In T cell-specific Ring1A/B deficient mice, T cell development was severely blocked at an immature stage (Genes & Development, 2016). We found that these developmentally arrested T cell precursors gave rise to functional B cells upon transfer to immunodeficient mice. We further demonstrated that the arrest was almost completely canceled by additional deletion of *Pax5* (Fig. 1). These results indicate that the maintenance of T cell fate critically requires epigenetic suppression of the B lineage gene program.

2) A novel method to regenerate CD8 $\alpha\beta$ type T cells with potent tumor antigen-specific cytotoxic activity from T cell-derived iPSCs

Whereas cytotoxic T lymphocytes (CTLs) represent the most promising therapeutic avenue in cancer immunotherapy, adoptive transfer of antigen-specific CTLs has faced difficulty in efficient expansion of CTLs from patients in ex vivo culture. To solve this issue, we have proposed that the induced pluripotent stem cell (iPSC) technology can be applied for the expansion of antigen-specific CTLs: when iPSCs are produced from antigen-specific CTLs and CTLs are induced from these iPSCs, all regenerated CTLs express the same TCR as original CTLs. Based on this idea, we have succeeded in regenerating melanoma antigen MART1 specific CTLs (Cell Stem Cell, 2013). However, one critical issue has remained to be solved. With the conventional methods, the regenerated CTLs are mostly of the CD8 $\alpha\alpha^+$ innate type and have less antigen-specific cytotoxic activity than primary CTLs. Thus, we have developed a novel method; by stimulating purified iPSC-derived CD4/CD8 double positive (DP) cells with anti-CD3 antibody, T cells expressing CD8 $\alpha\beta$ were generated and they exhibited improved antigen specific cytotoxicity compared with CD8 $\alpha\alpha^+$ CTLs (Cancer Research, 2016). Applying this method to regenerate WT1 tumor antigen-specific CTLs, we showed that they prolonged survival of mice bearing WT1-expressing leukemic cells (Fig. 2). This new method provides a convincing rationale for application of this strategy in clinical settings.

List of Publications

Maeda T, Nagano S, Ichise H, Kataoka K, Yamada D, Ogawa S, Koseki H, Kitawaki T, Kadowaki N, Takaori-Kondo A, Masuda K, Kawamoto H. (2016). Regeneration of CD8 $\alpha\beta$ T cells from T cell-derived iPSC imparts potent tumor antigen-specific cytotoxicity. **Cancer Research**. 76, 6839-6850.

Ikawa T, Masuda K, Endo TA, Endo M, Isono K, Koseki Y, Nakagawa R, Kometani K, Takano J, Agata Y, Katsura Y, Kurosaki T, Vidal M, Koseki H, Kawamoto H. (2016). Conversion of T cells to B cells by

inactivation of polycomb-mediated epigenetic suppression of B lineage program. **Genes & Development**. 30, 2475-2485.

Sato Y, Mii A, Hamazaki Y, Fujita H, Nakata H, Masuda K, Nishiyama S, Shibuya S, Haga H, Ogawa O, Shimizu A, Narumiya S, Kaisho T, Arita M, Yanagisawa M, Miyasaka M, Sharma K, Minato N, Kawamoto H, Yanagita M. (2016). Heterogeneous fibroblasts underlie age-dependent tertiary lymphoid tissues in the kidney. **JCI insight**. 1, e87680.

Kataoka K, Shiraishi Y, Takeda Y, Sakata S, Matsumoto M, Nagano S, Maeda T, Nagata Y, Kitanaka A, Mizuno S, Tanaka H, Chiba K, Ito S, Watatani Y, Kakiuchi N, Suzuki H, Yoshizato T, Yoshida K, Sanada M, Itonaga H, Imaizumi Y, Totoki Y, Munakata W, Nakamura H, Hama N, Shide K, Kubuki Y, Hidaka T, Kameda T, Masuda K, Minato N, Kashiwase K, Izutsu K, Takaori-Kondo A, Miyazaki Y, Takahashi S, Shibata T, Kawamoto H, Akatsuka Y, Shimoda K, Takeuchi K, Seya T, Miyano S, Ogawa S. (2016). Aberrant PD-L1 expression through 3'-UTR disruption in multiple cancers. **Nature**. 534, 402-406.

Satoh R, Kakugawa K, Yasuda T, Yoshida H, Sibilina M, Katsura Y, Levi B, Abramson J, Koseki Y, Koseki H, van Ewijk W, Hollander GA, Kawamoto H. (2016). Requirement of Stat3 Signaling in the Postnatal Development of Thymic Medullary Epithelial Cells. **PLoS Genet**. 12, e1005776. 2016.

増田喬子、河本宏 (2016). iPS 細胞技術を用いたがん特異的キラー T 細胞の再生, **週刊医学のあゆみ** Vol.257 No.3, 219-225.

河本 宏、増田喬子、前田卓也 (2016). iPS 細胞技術により再生した T 細胞を用いたがんの免疫細胞療法の開発, **実験医学 増刊 Vol.34-No.12 2016** がん免疫療法－腫瘍免疫学の最新知見から治療法のアップデートまで－, 211-215

河本 宏、増田喬子、前田卓也 (2016). iPS 細胞由来の抗原特異的 T 細胞の作製と今後の有効性・安全性の評価, **iPS 細胞の安全・高品質な作製技術** 第 2 章 2 節 (出版: 技術情報協会)

前田卓也、増田喬子、河本 宏 (2016). XIII. 特論 iPS 細胞技術を用いた AML に対する新しい免疫療法, **日本臨牀** 74 巻 増刊号 10 別冊 白血病学 (下) - 最新の基礎、臨床研究 -, 550-556 (出版: 日本臨床社)

河本 宏、増田喬子 (2016). XII. 白血病の基礎研究と臨床研究の動向 造血幹細胞と白血病幹細胞研究の動向 血液細胞の分化経路, **日本臨牀** 74 巻 増刊号 10 別冊 白血病学 (下) - 最新の基礎、臨床研究 - (出版: 日本臨床社), 473-480

List of Presentations

前田 卓也「Cloning and expansion of antigen specific T cells using the iPSC technology: A novel strategy for cancer immunotherapy」24thNSW stem cell network workshop Stem Cells and Cancer, シドニー, 2016 年 4 月

- 前田 卓也「Regeneration of WT1 specific CTL utilizing iPSC technology」第7回 JSH 国際シンポジウム, 淡路島, 2016年4月
- 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－」第18回外科分子細胞治療研究会「最新のがんに対する基礎研究」, 大阪市, 2016年4月
- 河本 宏「Regeneration of antigen specific T cells using iPSC cell technology: Development of T cell therapy that can be used in allogeneic transplantation setting」第64回日本輸血・細胞治療学会総会シンポジウム 04「細胞免疫療法の新展開 <細胞治療サイエンス・フォーラム>」, 京都市, 2016年4月
- 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」第37回癌免疫外科研究所, 埼玉県, 2016年5月
- 河本 宏「T細胞の発生－T細胞分化過程の解明と再生 T細胞を用いた免疫細胞療法の開発」第1回 紀州 血液／腫瘍／免疫研究会, 和歌山市, 2016年5月
- 一瀬 大志「HLA ハプロタイプホモ再生組織に対してヘテロのNK細胞が起こす免疫反応とその制御法の開発」第26回 Kyoto T Cell Conference, 滋賀県, 2016年5月
- 前田 卓也「Regeneration of WT1 specific CTLs utilizing iPSC technology」21st EHA Congress, コペンハーゲン, 2016年6月
- 河本 宏「Regeneration of WT1 antigen-specific cytotoxic T lymphocytes using the iPSC cell technology」ThymUS meeting, マウイ島, 2016年6月
- 河本 宏「Epigenetic maintenance of T cell identity by Polycomb-mediated suppression of B cell lineage program」Swiss-Kyoto Joint Symposium, 京都市, 2016年6月
- 河本 宏「Cloning and expansion of antigen specific T cells using the iPSC technology: A novel strategy for cancer immunotherapy」RIKEN IMS-JSI 国際シンポジウム, 横浜市, 2016年6月
- 河本 宏「免疫反応の基本的な仕組みを学ぼう」第18回免疫サマースクール, 函館市, 2016年7月
- 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－」日本がん免疫学会総会, 大阪市, 2016年7月
- 河本 宏 日本がん免疫学会総会ランチョンセミナー座長, 大阪市, 2016年7月
- 河本 宏「免疫系の細胞再生医療」第6回細胞再生医療研究会における特別講演Ⅱの講演, 神戸市, 2016年7月
- 河本 宏「iPS細胞からキラー T細胞をつかってガンを退治！」免疫ふしぎ未来 2016, 東京都, 2016年8月
- 河本 宏「Regeneration of tumor antigen-specific T cells using the iPSC technology: a novel method of

- allogeneic T cell therapy」 The 10th international Conference on Cell Therapy, 韓国, 2016年9月
- 河本 宏「HLA ハプロタイプホモドナー由来再生組織に対してヘテロレシピエントのNK細胞が起こしうるアロ反応とその制御法の開発」第23回日本輸血・細胞治療学会 秋季シンポジウム, 金沢市, 2016年10月
- 前田 卓也「iPS細胞技術を用いたWT1特異的CTLの再生」血液学会総会, 横浜市, 2016年10月
- 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－」京阪神輸血・免疫・血液研究会第15回講演会, 大阪市, 2016年10月
- 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－」腫瘍分子免疫療法セミナー, 秋田市, 2016年11月
- 宮崎 正輝「E-protein activity cletermine the lineage coice of adaptive lymphoid all」第45回日本免疫学会学術集会, 那覇市, 2016年12月
- 嘉島 相輝「Effects of immune cell therapy using regenerated WT1 antigen specific CTLs and the synthetic lymphoid tissue-like organoids against renal cell carcinoma (ポスター)」第45回日本免疫学会学術集会, 宜野湾市, 2016年12月
- 前田 卓也「Regeneration of Tumor Antigen Specific CTLs Utilizing iPSC Technology for Off-the-shelf Immunotherapy」ASH annual meeting, 宜野湾市, 2016年12月
- 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－」再生医療・細胞療法コース 特別セミナー2, 山口市, 2016年12月
- 河本 宏「免疫学における様々な論争」日本骨免疫学会 免疫細胞分化, 再生医療について 軽井沢, 2017年1月
- 河本 宏 第36回日本胸腺研究会 集会長, 京都市, 2017年2月
- 河本 宏「免疫って何だろう? から免疫学の最前線まで」なごや地球広場 感染症を知る・防ぐ～免疫学から見える未来～, 名古屋市, 2017年2月
- 前田 卓也「iPS細胞技術を用いたWT1特異的キラーT細胞(CTL)の再生」第16回日本再生医療学会総会, 仙台市, 2017年3月
- 河本 宏「Regeneration of CD8ab type T cells with potent tumor antigen-specific cytotoxic activity from T cells-derivrd iPSCs」7th Internationnal Workshop of Kyoto T Cell Conference, 京都市, 2017年3月
- 宮崎 正輝「E-protein activity cletermine the lineage coice of adaptive versas innate lymphoid cell tate」7th Internationnal Workshop of Kyoto T Cell Conference, 京都市, 2017年3月

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

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きた。増殖制御機構に関しては、細胞周期制御因子である p16 遺伝子の発現亢進が細胞老化を誘導し、増殖停止をもたらす主因であることを報告した。続いて低酸素環境での培養により、p16 遺伝子の発現亢進が阻害でき、細胞老化に至ることなく、かつ分化能を維持ししたまま長期間増殖を継続できること、更に低酸素により ERK の活性が阻害され、それが p16 遺伝子の発現亢進阻害の一因であることを見出した。現在、培地成分の影響を解析している。

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。同一のドライバー変異を有する肉腫でも、増殖を規定するシグナル伝達系や分化度が個々の腫瘍で異なる場合があり、その相違は細胞起源の相違に起因している可能性が伺える。我々はドライバー変異を、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している（図1）。現在、滑膜肉腫における SS18-SSX 融合遺伝子と、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。

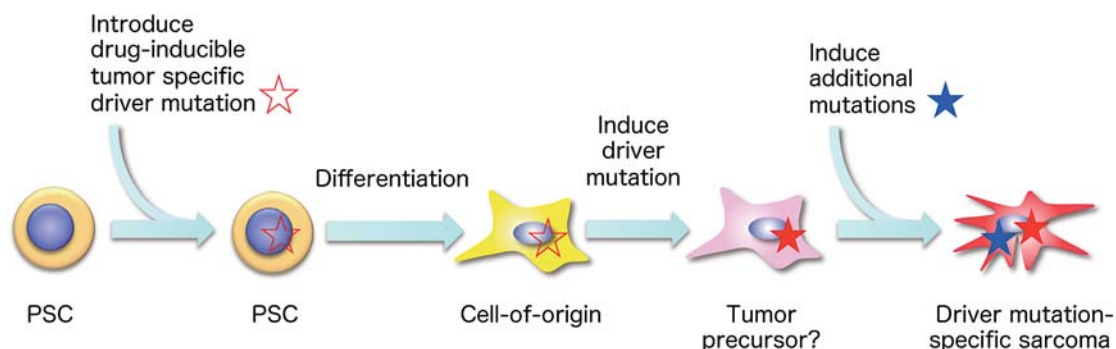


Figure 1. Strategy for in vitro sarcoma generation using PSCs

2) 疾患特異的 iPS 細胞を用いた病態解明と創薬

遺伝性の筋骨格系疾患の多くは、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、平成 24 年度より再生医療実現ネットワークプログラムの一つである「疾患特異的 iPS 細胞を活用した筋骨格系難病研究」において、複数の難治性骨軟骨疾患に対して疾患特異的 iPS 細胞を用いた研究を行っており、その一つが進行性骨化性線維異形成症（FOP）である。FOP の原因遺伝子は I 型 BMP 受容体の 1 つである ACVR1/ALK2 であるが、異常な BMP シグナルがどのように伝達されるかは明らかではなかった。我々は正常細胞では TGF- β シグナルを伝達するアクチビン A が FOP 型変異 ALK2 を介して 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（図 2）。

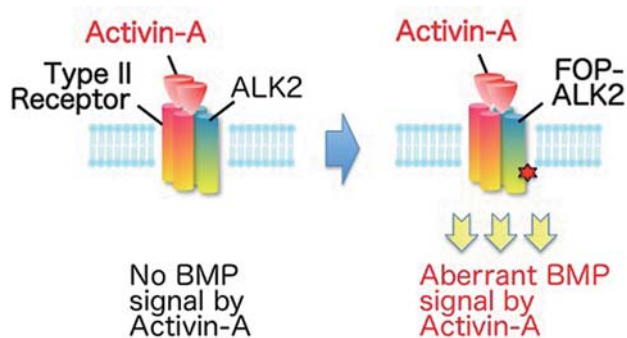


Figure 2. Neofunction of Activin-A through FOP type mutant ALK2

The objectives of our department 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 MSCs 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. As for the growth regulation, we found that increased expression of the p16 gene, which is a key regulator of cell cycle, was the main cause inducing the senescence and growth arrest of MSC. We also found that the hypoxic culture condition inhibited the upregulation of the p16 gene, and retained MSCs in the senescence-free state with multidirectional differentiation properties. We also found that hypoxia down-regulated the activity of ERK, which, at least in part, involved in the down-regulation of the p16 gene. We are currently investigating the effects of nutrients in the culture media.

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. Even tumors with same driver mutations, important signals related to growth and stage of differentiation are different, which may be caused by the cell-of-origin of each tumor. Using iPSCs with drug-inducible driver mutations, we analyze the effect of mutations in different stages of differentiation (Figure 1). 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 in synovial sarcoma.

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

In most of cases, the pathophysiology in hereditary musculoskeletal diseases are 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. Since 2012, we have been involving the project "Researches for intractable musculoskeletal diseases using disease-specific iPSCs, which is one of the projects in the Network Program for Realizing Regenerative Medicine". Recently we have discovered novel molecular mechanisms and obtained the key for drug discovery in one of such diseases, fibrodysplasia ossificans progressiva. The

disease is caused by the mutation of ALK2, one of type I receptors of BMP, although the precise mechanism of BMP signal transduction in FOP has not been elucidated. 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 (Figure 2). Based on this result, high-throughput screening has been done to identify the drug for this disease.

List of Publications

- Hayashi, Y., Hsiao, EC., Sami, S., Lancero, M., Schlieve, CR., Nguyen, T., Yano, K., Nagahashi, A., Ikeya, M., Matsumoto, Y., Nishimura, K., Fukuda, A., Hisatake, K., Tomoda, K., Asaka, I., Toguchida, J., Conklin, BR., and Yamanaka, S. (2016). BMP-SMAD-ID promotes reprogramming to pluripotency by inhibiting p16/INK4A-dependent senescence. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** *113*, 13057-13062.
- Tanaka, K., Joyama, S., Chuman, H., Hiraga, H., Morioka, H., Yoshikawa, H., Hosaka, M., Takahashi, M., Kubo, T., Hatano, H., Kaya, M., Toguchida, J., Nishida, Y., Nagano, A., Tsumura, H., and Iwamoto, Y. Feasibility and efficacy of gemcitabine and docetaxel combination chemotherapy for bone and soft tissue sarcomas: multi-institutional retrospective analysis of 134 patients. (2016). **World J. Surg. Oncol.** *14*, 306.
- Ikeguchi, R., Kakinoki, R., Ohta, S., Oda, H., Yurie, H., Kaizawa, Y., Mitsui, H., Aoyama, T., Toguchida, J., and Matsuda, S. (2016). Recipient bone marrow-derived stromal cells prolong graft survival in a rat hind limb allotransplantation model. **Microsurgery** Nov 17. Epub ahead of print
- Kobayashi, S., Watanabe, T., Suzuki, R., Furu, M., Ito, H., Ito, J., Matsuda, S., and Yoshitomi, H. (2016). TGF- β induces the differentiation of human CXCL13-producing CD4 (+) T cells. **Eur. J. Immunol.** *46*, 360-371.
- 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., and Mimori, T. (2016). Cell-contact-dependent activation of CD4+ T cells by adhesion molecules on synovial fibroblasts. **Mod. Rheumatol.** *13*, 1-9.
- Iwata, T., Ito, H., Furu, M., Ishikawa, M., Azukizawa, M., Yoshitomi, H., Fujii, T., Akiyama, H., and Matsuda, S. (2016). Subsidence of total ankle component associated with deterioration of an ankle scale in non-inflammatory arthritis but not in rheumatoid arthritis. **Mod. Rheumatol.** *23*, 1-8.
- Nishiguchi, S., Ito, H., Yamada, M., Yoshitomi, H., Furu, M., Ito, T., Shinohara, A., Ura, T., Okamoto, K., Aoyama, T., and Tsuboyama, T. (2016). Self-assessment of Rheumatoid Arthritis Disease Activity Using a Smartphone Application. Development and 3-month Feasibility Study. **Methods Inf. Med.** *55*, 65-9.
- Ogino, H., Ito, H., Furu, M., Ishikawa, M., Yoshitomi, H., and Matsuda, S. (2016). Limited extension after linked total elbow arthroplasty in patients with rheumatoid arthritis. **Mod. Rheumatol.** *26*, 347-51.

日野恭介、池谷真、戸口田淳也 (2016). 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.

池谷 真、日野恭介、松本佳久、福田誠、戸口田淳也 (2016). 間葉系幹細胞疾患としての進行性骨化性線維異形成症、第 4 章 病態からみた幹細胞の制御機構、【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】**実験医学** 17, 2913-2919.

請田雄大、岡本健、中山 富貴、坪山直生、戸口田淳也 (2016). 当院における類上皮肉腫の治療成績 **中部日本整災誌** 59, 779-780.

戸口田淳也 (2016). 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.

松本佳久、日野恭介、池谷真、戸口田淳也 (2016). iPS 細胞を用いた進行性骨化性線維異形成症の病態解明 **バイオサイエンスとインダストリー** 74, 324-326.

戸口田淳也、金永輝、玉置さくら、吉富啓之、岡本 健 (2016). 原発性骨腫瘍に対する分子生物学的アプローチ、【悪性骨腫瘍の診断と治療の最前線】 **整形・災害外科** 59, 1025-1031.

戸口田淳也、日野恭介、池谷 真 (2016). 疾患特異的 iPS 細胞を活用した難病研究 病態解明から創薬へ【運動器疾患のゲノム解析の最前線～単一遺伝子病から、common disease、ビッグデータ解析まで～】 **Clinical Calcium** 26,593-600.

Toguchida J. Genetics of osteosarcoma. Part I Basic Research and Experimental Therapy. Osteosarcoma A Multidisciplinary Approach to Treatment. p3-17. Edt Ueda T and Kawai A, Springer, Tokyo 2016

戸口田淳也 悪性骨・軟部腫瘍の遺伝子診断 6 骨・軟部腫瘍および腫瘍類似疾患 今日の整形外科治療指針 第 7 版 2016 年 5 月 15 日 医学書院 東京 土屋弘行、紺野愼一、田中康仁、田中栄、松田秀一 編集

List of Presentations

川井俊介、羽田匡孝、小山優子、池谷真、Cantas Alev、堀田秋津、池川志郎、中村雅也、松本守雄、吉富啓之、松田秀一、戸口田淳也：家族性 OPLL 患者由来の iPS 細胞を用いた、OPLL 遺伝的要素の検討 第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会、福岡、2016 年 10 月 13 日 -14 日

Kawai S, Alev C, Hada M, Koyama Y, Nagata S, Nishio M, Ikeya M, Hotta A, Yoshitomi H, and Toguchita J. Evaluation of genetic factors of OPLL using patient-specific iPSCs. CiRA Retreat 2016, 淡路島, 2016 年 7 月 28 日 -29 日

吉富 啓之、小林 志緒、岡島 章憲、布留 守敏、伊藤 宣、松田 秀一、戸口田 淳也 Transcriptional regulation of human CXCL13-producing CD4 T cell 第 45 回日本免疫学会学術集会、沖縄、2016 年 12 月 5-7 日

- 吉富啓之、小林志緒、布留守敏、伊藤宣、戸口田淳也、松田秀一 TGF- β はFoxP3非依存的にCXCL13産生CD4陽性を誘導する 第31回日本整形外科学会基礎学術集会 2016年10月13-14日
- 吉富啓之、小林志緒、岡嶋章憲、布留守敏、伊藤宣、松田秀一、戸口田淳也 CXCL13産生CD4T細胞の転写制御解析 第3回JCRベーシックリサーチカンファレンス、沖縄、2016年10月14日
- 吉富啓之、小林志緒、布留守敏、伊藤宣、松田秀一 TGF- β induces non-Tfh CXCL13-producing CD4+ T cells 第60回日本リウマチ学会総会・学術集会、横浜、2016年4月21日
- 吉富啓之、小林志緒、布留守敏、伊藤宣、松田秀一、戸口田淳也 TGF- β はIL-2に乏しい環境下でCXCL13産生ヒトCD4陽性細胞を誘導する 第2回骨免疫学会、沖縄、2016年7月7日
- 吉富啓之 関節リウマチにおける滑膜炎とT細胞-滑膜解析から見えてきた病態 - 第5回Nagoya Central Meeting、名古屋、2016年2月18日
- Yoshitomi, H., Kobayashi, S., Watanabe, T. TGF- β induces the differentiation of human CXCL13-producing CD4+ T cells. Keystone Symposia, Monterey, February 26-March 1, 2016
- Kawai S, Hada M, Koyama Y, Ikeya M, Alev C, Hotta A, Ikegawa S, Nakamura M, Yoshitomi H, Matsuda S, Toguchita J. Evaluation of genetic factors of OPLL using patient-specific iPSCs. ISSCR 2016 Annual Meeting, San Francisco, June 22-25, 2016
- 鎌倉武史、金永輝、渡辺真、岡本健史、吉富啓之、戸口田淳也 D-2-HG産生を伴うIDH1/2変異が及ぼす骨・軟骨分化への影響 第89回日本生化学会大会、宮城、2016年9月25-27日
- Kamakura, T., Jin, Y., Matsunaga, K., Watanabe, M., Tamaki, S., Okamoto, T., Yoshitomi, H., Toguchida, J. EXPLORATION OF CANDIDATE GENES TO INDUCE CARTILAGE TUMORS WITH MUTANT IDH1 GENE USING IPSC. CTOS 2016 Annual Meeting, Lisbon, November 9-12, 2016.
- 鎌倉武史、金永輝、渡辺真、松永一仁、玉置さくら、岡本健史、吉富啓之、戸口田淳也 間葉系幹細胞の分化及び形質転換に対するD-2-HG産生型変異IDH1の作用 第39回日本分子生物学会年会、神奈川、2016年11月30-12月2日
- 関口和也、日野恭介、池谷真、戸口田淳也 iPS細胞を活用した進行性骨化性線維異形成症の病態解析 第27回小児整形外科学会学術集会、仙台、2016年12月1-2日
- Amagase R., Yamanaka Y., Hamaguchi R., Uemura M., Nakajima T., Ikeya M., Woltjen K., Yoshitomi H., Alev C., and Toguchida, J. Induction of tendon/ligament progenitor cells from human iPSCs for studying human tendon development and disease presentation. 2016 Retreat for Graduate Courses of Integrated Research Training: Cell, Developmental and Systems Biology Course, Kyoto, September 3-4, 2016.
- Amagase R., Yamanaka Y., Hamaguchi R., Uemura M., Nakajima T., Ikeya M., Woltjen K., Yoshitomi H.,

Alev C., and Toguchida, J. Induction of tendon/ligament progenitor cells from human iPSCs for studying human tendon development and disease presentation. 2016 Retreat for Graduate Courses of Integrated Research Training: Regenerative Medicine and Organ Regeneration Course, Shiga, September 24 -25, 2016.

Amagase R., Yamanaka Y., Hamaguchi R., Uemura M., Nakajima T., Ikeya M., Woltjen K., Yoshitomi H., Alev C., and Toguchida, J. Induction of tendon/ligament progenitor cells from human iPSCs for studying human tendon development and disease presentation. 2016 Retreat for Graduate Courses of Integrated Research Training: Immunology, Allergy and Infection Course, Shiga, November 19 -20, 2016.

Tamaki, S., Watanabe, M., Yamamoto, R., Yoshitomi, H., Nishikomori, R., and Toguchida, J. Investigation of molecular mechanism underlying enhanced chondrogenesis in neonatal-onset multisystem inflammatory disease using patient-derived induced pluripotent stem cells. ISSCR 2016 Annual Meeting, San Francisco, June 22-25, 2016

Tamaki, S., Fukuta, M., Sekiguchi, K., Hayakawa, K., Jin, Y., Okamoto, T., Woltjen, K., Yoshitomi, H., and Toguchida, J. SS18-SSX, the oncogenic fusion protein in synovial sarcoma, is a cellular context-dependent epigenetic modifier. CTOS 2016 Annual Meeting, Lisbon, November 9-12, 2016

金永輝、Hassan Elalaf、渡辺真、玉置さくら、日根野翔、松永一仁、Knut Woltjen、岡本健、松田秀一、戸口田淳也 変異型 IDH1 は遺伝子特異的なヒストン修飾を介して、間葉系幹細胞から軟骨及び骨への分化を脱制御する 第 40 回近畿肉腫研究会、京都、2016 年 2 月 6 日

金永輝、Hassan Elalaf、渡辺真、玉置さくら、日根野翔、松永一仁、Knut Woltjen、岡本健、松田秀一、戸口田淳也 変異型 IDH1 は遺伝子特異的なヒストン修飾を介して、間葉系幹細胞から軟骨及び骨への分化を脱制御する 第 75 回日本癌学会学術総会、横浜、2016 年 10 月 6-8 日

Jin, Y., Watanabe, M., Tamaki, S., Okamoto, T., and Toguchida, J. Mutant IDH1 dysregulates the differentiation of mesenchymal stem cells in association with gene-specific histone modifications to cartilage- and bone-related genes. The CTOS 21th Annual Meeting, Lisbon, November 9-12, 2016.

Watanabe, M., Yamamoto, R., Tamaki, S., Ikeya, M., Yoshitomi, H., Sato, T., and Toguchida, J. Metabolomic analysis-based identification of predictive markers for differentiation of human ips cells into cartilage cells ISSCR 2016 Annual Meeting, San Francisco, June 22-25, 2016.

松本佳久、池谷真、日野恭介、福田誠、大塚隆信、戸口田淳也 疾患特異的 iPS 細胞を用いた創薬に向けた薬剤スクリーニング系の構築 第 89 回日本整形外科学会学術総会、横浜、2016 年 5 月 12 日

福田誠、池谷真、松本佳久、大塚隆信、戸口田淳也 iPS 細胞技術を用いた骨再生の試み 第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会、福岡、2016 年 10 月 14 日

田中麻衣、薦田博、長池碧、永田早苗、戸口田淳也、中山功一、iPS 細胞由来軟骨細胞とバイオ 3D

プリンタを用いた立体的軟骨構造体の作製第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会、福岡、2016 年 10 月 13 日

平賀博明、田仲和宏、中馬広一、森岡秀夫、松峰昭彦、戸口田淳也、永野昭仁、米本司、西田佳弘、福田治彦、岩本幸英 骨・軟部腫瘍領域でのエビデンス構築に向けた日本臨床腫瘍研究グループの取り組み 第 89 回日本整形外科学会学術総会、横浜、2016 年 5 月 13 日

西田佳弘、戸口田淳也、生越章、阿江啓介、国定他俊之、松延知哉、濱田俊介、酒井智久、川井章 厚生労働省難治性疾患政策研究事業による取り組み 第 89 回日本整形外科学会学術総会、横浜、2016 年 5 月 13 日

西田佳弘、戸口田淳也、生越章、阿江啓介、国定他俊之、松延知哉、濱田俊介、酒井智久、川井章 日整会骨・軟部腫瘍登録データに基づいたデスマイド型線維腫症の診療実態・治療成績調査 第 89 回日本整形外科学会学術総会、横浜、2016 年 5 月 14 日

Nishida, Y, Kawai, A, Toguchida, J, Ogose, A, Ae, K, Kunisada, T, Matusnobe, T, Hamada, S, and Sakai, T. Clinical features and treatment outcome of desompod-type fibromatosis based on data of the bone and soft tissue tumor registry in Japan. The CTOS 21th Annual Meeting, Lisbon, November 9-12, 2016.

岡本健、大槻文悟、藤林俊介、竹本充、朴憲之、松田秀一、戸口田淳也 片側仙腸関節全摘と骨盤輪再建を行った骨盤悪性腫瘍の治療成績 第 49 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会、東京、2016 年 7 月 15 日

岡本健、中本隆介、中本裕士、松田秀一、戸口田淳也、富樫かおり 可搬型 PET 撮影装置を利用した PET/MRI 検査の初期使用経験 第 49 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会、2016 年 7 月 15 日

Okamoto, T., Toguchida, J. Oncological and functional results of spinopelvic reconstruction following the resection of malignant bone tumors involving ipsilateral sacroiliac joint. The CTOS 21th Annual Meeting, Lisbon, November 9-12, 2016.

戸口田淳也 iPS 細胞を活用した難治性疾患の病態解明・創薬 第 13 回京大病院 iPS 細胞・再生医学研究会、京都、2016 年 1 月 28 日

戸口田淳也 iPS 細胞の医療応用：現況と展望 清交社健康懇話会、大阪、2016 年 2 月 23 日

戸口田淳也 iPS 細胞の骨軟骨疾患への応用 2016 年度医工学フォーラム、京都、2016 年 2 月 24 日

戸口田淳也 iPS 細胞の医療応用の現況と展望 第 49 回日本臨床腎移植学会、米子、2016 年 3 月 24 日

戸口田淳也、玉置さくら、関口和也、金永輝、岡本健、松田秀一 多能性幹細胞の肉腫研究への応用 第 89 回日本整形外科学会学術総会、横浜、2016 年 5 月 13 日

Toguchida, J., Hino K, Ikeya M., Horigome, K., Matsumoto, Y., Ebise, H., Nishio, M., Sekiguchi, Shibata,

M., Nagata, S., and Matsuda, S. Neofunction of ACVR1 in Fibrodysplasia Ossificans Progressiva
ISSCR 2016 Annual Meeting, San Francisco, June 22-25, 2016.

戸口田淳也 体を支える骨の病気について 2016年度再生医科学研究所公開講演会、京都、2016
年7月16日

戸口田淳也、川井俊介、福田誠、松永一仁、日野恭介、池谷真、Cantas Alev iPS細胞から骨芽細胞への誘導方法の開発 第34回日本骨代謝学会、大阪、2016年7月21日

戸口田淳也 iPS細胞由来間葉系間質細胞の基礎研究への応用 第13回病理学会カンファレンス、
六甲、2016年7月30日

戸口田淳也、日野恭介、池谷真、関口和也、金永輝、岡本健、吉富啓之、松田秀一 疾患特異的iPS
細胞を活用した骨格疾患の病態解明・創薬 第31回日本整形外科学会基礎学術集会、福岡、
2016年10月14日

Toguchida J. Application of disease-specific iPS cells for FOP research 2016 Drug Development Forum of
FOP, Boston, October 24, 2016.

戸口田淳也 肉腫を創る 野崎徳州会病院附属研究所開所記念シンポジウム、大東、2016年11月
5日

戸口田淳也 iPS細胞の医療応用：現況と展望 第43回日本赤十字リハビリテーション学会、大津、
2016年11月19日

戸口田淳也 iPS細胞の骨・軟骨疾患への応用 健康フォーラム2016、米子、2016年11月20日

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 Assistant Prof. Shoichiro Sumi

【中村グループ】

臓器再建応用分野では、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

中村達雄、稲田有史、茂野啓示 . (2016). 人工神経を用いた顔面神経麻痺の治療. 耳喉頭頸 88, 504-

510.

- 稲田有史 . (2016). 複合性局所疼痛症候群 . 今日の整形外科治療指針 第7版 . (株) 医学書院、537-538.
- Yutaka, Y., Sato, T., Zhang, J., Matsushita, K., Aiba, H., Muranishi, Y., Sakaguchi, Y., Komatsu, T., Kojima, F., Nakamura, T., Date, H. (2016). Localizing small lung lesions in video-assisted thoracoscopic surgery via radiofrequency identification marking. **Surg. Endosc.** (in press)
- Hamaji, M., Burt, BM., Date, H., Nakamura, T. (2016). Basic experiments of bioabsorbable materials in prevention of postoperative intrapleural adhesions following thoracotomy. **Gen. Thorac. Cardiovasc. Surg.** 64, 82-86.
- Koyasu, S., Tsuji, Y., Harada, H., Nakamoto, Y., Nobashi, T., Kimura, H., Sano, K., Koizumi, K., Hamaji, M., Togashi, K. (2016). Evaluation of Tumor-associated Stroma and Its Relationship with Tumor Hypoxia Using Dynamic Contrast-enhanced CT and ^{18}F Misonidazole PET in Murine Tumor. **Models. Radiology.** 278, 734-41.
- Nakaegawa, Y., Nakamura, R., Tada, Y., Nomoto, Y., Imaizumi, M., Suzuki, R., Nakamura, T., Omori, K. (2016). Effect of structural differences in collagen sponge scaffolds on tracheal epithelium regeneration. **Annals of Otolaryngology & Laryngology.** 125, 115-122.
- Seo, K., Terumitsu, M., Inada, Y., Nakamura, T., Shigeno, K., Tanaka, Y. (2016). Prognosis after surgical treatment of trigeminal neuropathy with a PGA-c Tube: Report of 10 cases. **Pain Medicine** 17, 2360-2368.
- Hiwatashi, N., Hirano, S., Suzuki, R., Kawai, Y., Mizuta, M., Kishimoto, Y., Tateya, I., Kanemaru, S., Nakamura, T., Dezawa, M., Ito, J. (2016). Comparison of ASCs and BMSCs combined with atelocollagen for vocal fold scar regeneration. **Laryngoscope** 12, 1143-1150.
- Kawai, Y., Kishimoto, Y., Suzuki, R., Tsuji, T., Hiwatashi, N., Tateya, I., Yamamoto, N., Nakamura, T., Kanemaru, S., Hirano, S. (2016). Distribution and characteristics of slow-cycling cells in rat vocal folds. **Laryngoscope** 126, E164-E170.
- 早川克己、鳴海善文、桑鶴良平、林宏光 . 造影剤の現状—X線造影剤を中心に—. **日獨医報** 61, 93-118.
- 早川克己 . (2016). 造影剤のリスクマネージメント。ステロイド前投薬に対するエビデンスの検証、重症筋無力症に対するヨード性造影剤の影響 . **臨床放射線** 61, 419-426.
- 早川克己 (2016). 私が診断で迷った症例「1」硬膜外髄外脊椎腫瘍で迷った症例：石灰化の有無がポイント . **臨床画像** 32, 564-557.
- 早川克己 (2016). 私が診断で迷った症例「2」小さな脳梗塞の存在診断で迷った症例 . **臨床画像** 32, 662-663.

List of Presentations

中村達雄 in situ Tissue Engineering (生体内再生) とその胸部外科手術への応用. 医工学フォーラム—2015 年度特別学術講演会—、京都、2016 年 2 月 24 日 .

Yojiro, Y., Sato, T., Matsushita, K., Muranishi, Y., Sakaguchi, Y., Komatsu, T., Hamaji, M., Kojima, F., Hijiya, K., Motoyama, H., Zhang, J., Menju, T., Aoyama, A., Chen-Yoshikawa, T.F., Sonobe, M., Nakamura, T., Date, H. Localization of small lung lesions using a radiofrequency identification marking system. European Conference on General Thoracic Surgery. Napoli, March 5-31, 2016. ESTS Medtronic Prize 受賞

豊洋次郎、佐藤寿彦、張吉天、村西佑介、坂口泰人、小松輝也、濱路政嗣、小島史嗣、中村達雄、伊達洋至 RFID (Radio Frequency IDentification) マーキングシステム—前臨床試験—、第 33 回日本呼吸器外科学会総会、京都、2016 年 5 月 13 日 .

豊洋次郎、佐藤寿彦、松下幸一、村西祐介、坂口泰人、小松輝也、中村達雄、伊達洋至 RFID 技術を応用した新しい術前マーキングシステムの開発～深部にある微小病変を確実に切除するために～、第 35 回近畿胸腔鏡研究会、大阪、2016 年 8 月 27 日 .

豊洋次郎、佐藤寿彦、松下幸一、村西祐介、坂口泰人、小松輝也、小島史嗣、中村達雄、伊達洋至 深部病変の位置把握を可能にする RFID マーキングシステム .、第 29 回日本内視鏡外科学会総会「COOL JSES・医工連携 ～内視鏡外科手術に革新をもたらす新技術～」、横浜、2016 年 12 月 10 日 .

早川克己 . 新生児脳症 . JSMRM 2016 第 44 回 日本磁気共鳴医学会大会 教育講演、大宮、2016 年 9 月 10 日 .

辻本源太郎 Polyglycolic acid-collagen tube による顔面神経再建に頸部交感神経節が及ぼす影響、第 44 回日本歯科麻酔学会、札幌、2016 年 10 月 29 日 .

中本裕也 脊髄損傷モデル犬を用いた、損傷脊髄の継時的な病理学的変化の評価 . 獣医神経病学会、奈良、2016 年 7 月 16 ～ 17 日 .

稲田有史 最善の治療方法について、第 34 回奈良手の外科懇話会、奈良、2016 年 2 月 20 日 .

稲田有史、中村達雄、諸井慶七郎、面川庄平、川西弘一 上肢 CRPS type II に対する血管付きならびに遊離組織移植術の問題点 . 第 59 回日本手外科学会学術集会 . 広島、2016 年 4 月 21 日 .

稲田有史、面川庄平、川西弘一、中村達雄、諸井慶七郎 CRPS 患者の損傷神経への恒久的再建法としての遊離血管柄付き組織移植術の有用性の検討—平均 8 年長期経過例の検討— . 第 14 回整形外科痛みを語る会、愛知、2016 年 7 月 24 日 .

稲田有史、中村達雄、諸井慶七郎、森本 茂、面川庄平 外傷性手根管症候群の診断と重症化について —橈骨骨折後 CRPS17 例の検討から—、第 27 回日本末梢神経学会学術集会、大阪、2016 年 8 月 26 日～ 27 日 .

稲田有史、中村達雄、諸井慶七郎、森本 茂、川西弘一、夏目由美子 CRPS 難治例への遊離・有茎組織移植術を要した生体内再生治療法の有効性の検討、第9回日本運動器疼痛学会、東京、2016年11月26日～27日。

坂口泰人、佐藤 寿彦、村西 佑介、豊 洋次郎、小松 輝也、濱路 政嗣、中村 達雄、伊達 洋至 超弾性合金（ニチノール）を用いた新規人工気管の開発、第33回日本呼吸器外科学会総会、京都、2016年5月13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を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パ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]

Our final goal 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 factors 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

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. *Journal of Orthopaedic Science* in press 2017 [Epub ahead of print]

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* 2016 Jul 22.

- Wu CC, Tsai YF, Hsu LH, Chen JP, Sumi S, Yang KC*. A self-reinforcing biodegradable implant made of poly (ϵ -caprolactone) /calcium phosphate ceramic composite for craniomaxillofacial fracture fixation. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 2016 September, 44 (9): 1333-1341.
- Yang KC, Wu CC, Chen WY, Sumi S, Huang TL. L-Glutathione enhances antioxidant capacity of hyaluronic acid and modulates expression of pro-inflammatory cytokines in human fibroblast-like synoviocytes. *Journal of Biomedical Materials Research: Part A* 2016 August;104 (8):2071-2079.
- Yang KC, Wu CC, Yu JS, Sumi S, Huang TL. L-Lysine regulates tumor necrosis factor-alpha and matrix metalloproteinase-3 expression in human osteoarthritic chondrocytes. *Process Biochemistry* 2016 Jul; 51 (7):904-911.
- Wu CC, Hsu LH, Tsai YF, Sumi S, Yang KC*. Enhancement of biodegradation and osseointegration of poly (ϵ -caprolactone) /calcium phosphate ceramic composite screw for osteofixation using calcium sulfate. *Biomed Mater* 2016 Apr 4;11 (2):025012.
- Yang KC, Chen HT, Wu CC, Lian YJ, Chen LL, Sumi S, Huang TL. L-Glutamine regulates the expression of matrix proteins, pro-inflammatory cytokines and catabolic enzymes in IL-1 β -stimulated human chondrocytes. *Process Biochemistry* 2016 March;51 (3):414-421.
- Ota A, Matsumura K, Lee JJ, Sumi S, Hyon SH. StemCell Keep™ is effective for cryopreservation of human embryonic stem cells by vitrification. *Cell Transplant*. 2016 Aug 5. [Epub ahead of print]

List of Presentations

- Yang KC, Yanai G, Sumi S. Regulation of insulin secretion in pancreatic beta cells by intercellular coupling. 15th Young Researchers' Conference Materials Science and Engineering. Belgrade, Serbia, December 7-9, 2016
- Yang KC, Sumi S, Wu CC. A honeycomb-like scaffold for tissue engineered cartilage. 9th International Conference on Fiber and Polymer Biotechnology. Osaka, Japan, Sep 7-9, 2016.
- Yang KC, Hu HH, Sumi S, Wang CC. An osteoconductive and biodegradable composite implant for fracture fixation. TERMIS-EU, Uppsala, Sweden, June 28-July 1, 2016.
- 角 昭一郎 マクロカプセル化異種膝移植の実現に向けた取り組み、医工学フォーラム 2015 年度 特別学術講演会、京都、2016 年 2 月 24 日.
- 角 昭一郎 マクロカプセル化膝皮下移植への取り組み、第 43 回日本膝・膝移植研究会、 広島、2016 年 3 月 4 日.
- 角 昭一郎 再生医療における異種動物の応用と実現に向けた枠組みについて、再生医療学会 日本異種移植研究会ジョイントシンポジウム - 臨床に向けて、再生医療と異種移植の接点 -

大阪、2016年3月17日.

角 昭一郎 我が国における再生医療の枠組みと我々の取り組み、京都医療器材協議会、京都、2016年5月27日.

Sumi S. Macro-encapsulated islets for xenotransplantation. Special lecture, Gwangju Institute of Science and Technology. Guangju, Korea. June 22, 2016.

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様になりました。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。

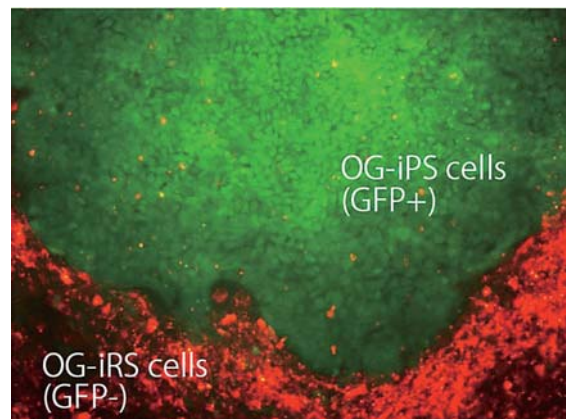


Fig. 1. A GFP-positive iPS cell colony converted from OG-iRS cell

2) ヒト ADIPONECTIN と幹細胞

ADIPONECTIN (ADIPO) は、若返りサイトカインとして知られ、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., Hirano, K., Nagata, S., Ainscough, J. and Tada, T. (2016). OCT4 activity during conversion of human intermediately reprogrammed stem cells to iPSCs through mesenchymal-epithelial transition. *Development*, 143, 15-23.

List of Presentations

Teshigawara, R., Hirano, K., Nagata, S., Ainscough, J. and Tada, T. OCT4 Activity during Conversion of Human Intermediately Reprogrammed Stem Cells to iPS Cells through MET. International Symposium on Epigenome Dynamics and Regulation in Germ Cells, Kyoto, February 17-19, 2016.

勅使河原利香、平野邦生、長田翔伍、Justin Ainscough、多田 高 Oct4 再プログラム化を視る - ヒト新型 iPS 前駆細胞へのゲノム編集技術の応用 - 第 88 回日本遺伝学会、三島、2016 年 9 月 7-9 日

亀田雅博、勅使河原利香、Sun Liang-Tso、Cho Junkwon、多田 高 抗老化ホルモン ADIPONECTIN による多能性幹細胞の保護 第 88 回日本遺伝学会、三島、2016 年 9 月 7-9 日

勅使河原利香、平野邦生、長田翔伍、Justin Ainscough、多田 高 Oct4 再プログラム化を視る - ヒト新型 iPS 前駆細胞へのゲノム編集技術の応用 - 第 39 回日本分子生物学会年会 シンポジウム「ゲノム編集応用研究の最前線」、横浜、2016 年 11 月 30 日 -12 月 2 日

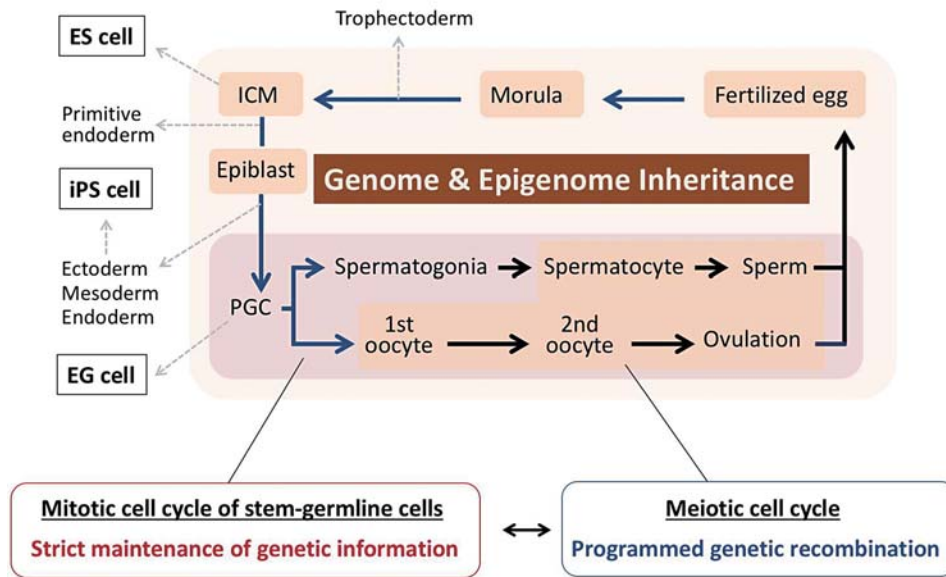
亀田雅博、勅使河原利香、Sun Liang-Tso、Cho Junkwon、多田 高 抗老化ホルモン ADIPONECTIN による多能性幹細胞の保護 第 39 回日本分子生物学会年会、横浜、2016 年 11 月 30 日 -12 月 2 日

【中馬グループ】

個体形成の過程では、一つの受精卵から多能性幹細胞、組織幹細胞等を経て各種の体細胞系譜の分化成熟が行われる一方、生殖細胞は配偶子形成プロセスを通じて遺伝情報の継承と再編を行う。これら幹細胞 - 生殖細胞サイクルにおけるゲノム、エピゲノム情報は個体および種が成立する根幹として厳密に制御され、その破綻は広範な疾患、例えば発生異常、遺伝病、癌、不妊等の原因となる。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、発生生物学、遺伝学、マルチオミクス解析等を用いて研究を進めている。

(1) 胚性多能性 (ES) 細胞は活発な細胞増殖を行い明確な分裂寿命が認められずゲノム損傷による G1 チェックポイント等が観察されない一方、DNA 変異率は ES 細胞では他の分化細胞と比べて低く、DSB 修復は HR 経路が NHEJ 経路よりも優位に利用される。また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

Genome inheritance in the stem cell-germline developmental cycle



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複製と修復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。減数分裂の制御機構の研究は主に酵母等の単細胞生物を用いて行われており、多細胞生物において詳細な分子基盤の解明は進んでいない。我々はGS細胞等を用いて体細胞型増殖から第1減数分裂前期を誘導する培養実験条件を作出し、減数分裂を促進および抑制する発生シグナルの詳細な研究を進めている。

[Chuma Group]

The germline is the cell lineage that gives rise to full ontogenesis of individuals and transmits genetic information to next generations. During the differentiation of germ cells, intriguing biological processes take place, such as epigenetic reprogramming, establishment of pluripotency and genetic DNA recombination. Our current research focuses on the molecular characterization of germinal granules/nuage, i.e. germline-specific ribonucleoprotein (RNP) assemblies in the cytoplasm. More specifically, we are working on tudor-domain containing (Tdrd) genes, which encode for specific components of mammalian germinal granules/nuage. Gene-targeted disruption of Tdrd1, 6, 7 and 9 all led to male-specific sterility due to postnatal defects in spermatogenesis. Among these, TDRD1 and TDRD9 cooperate with piwi proteins, MILI and MIWI2, respectively, and function non-redundantly in retrotransposon silencing at RNA and epigenetic levels to

protect the germline genome and epigenome. In contrast, Tdrd6 and 7 function in haploid spermiogenesis. Tdrd6 and 7 mutants show abnormal spermatid differentiation with aberrant chromatoid body architectures. Chromatoid bodies, a specialized form of germinal granules/nuage in spermatids, share some of their components with somatic processing bodies (p bodies), a form of RNP implicated in the degradation or translational control of mRNA. Of note, Tdrd7 suppresses retrotransposons independently of the piRNA biogenesis, indicating that distinct Tdrd pathways act against retrotransposons in the germline.

List of Publications

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.**

Inoue, H, Ogonuki, N, Hirose, M, Hatanaka, Y, Matoba, S, Chuma, S, Kobayashi, K, Wakana, S, Noguchi, J, Inoue, K, Tanemura, K, Ogura, A. (2016). Mouse D1Pas1, a DEAD-box RNA helicase, is required for the completion of first meiotic prophase in male germ cells. **Biochem Biophys Res Commun.** 478, 592-8.

List of Presentations

Mihoko Hosokawa, Ami Katanaya, Eri Hayashi, Ayako Mochizuki, Koji Numata, Kuniya Abe, Hirofumi Suemori, Norio Nakatsuji and Shinichiro Chuma. Meiosis priming and suppression in male germline stem cells 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 第4回公開シンポジウム、三島、2017年11月17日

中川史之. ヒト多能性幹細胞のゲノム相同組換え効率の制御メカニズムの探索. 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 ステムセルエイジングから解明する疾患原理 合同若手勉強会、別府、2016年7月28日

刀谷在美. 多能性幹細胞と体細胞のDNA損傷応答比較解析. 再生医科学研究所若手発表会、京都、2016年1月21日

Mihoko Hosokawa, Ami Katanaya, Eri Hayashi, Ayako Mochizuki, Koji Numata, Kuniya Abe, Hirofumi Suemori, Norio Nakatsuji and Shinichiro Chuma. Male germline stem cells are primed to meiosis through epigenetic and translational control in mice. International Symposium on Epigenome Dynamics and Regulation in Germ Cells, Kyoto, February 18, 2016.

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

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

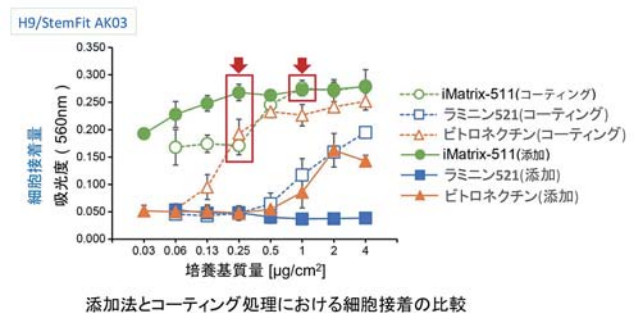
胚性幹細胞分野ではヒト ES 細胞の医療応用を目指した基盤研究を行っている。これまでに樹立したヒト ES 細胞株は国内の研究機関に分配され多くの研究成果が上げられている。また ES 細胞の未分化性維持や細胞分化の分子機構の解析の他、安全性の高い培養法の開発などの将来の医療応用において不可欠の技術開発研究をおこなっている。ヒト ES 細胞の臨床利用のための細胞プロセシング施設を有し、ヒト ES 細胞株の樹立、培養、操作、品質保証、安全性確保等にわたる技術開発及び取扱基準規格の構築を行っている。将来的には、臨床応用に使用可能な品質レベルのヒト ES 細胞リソースの構築と臨床研究施設への提供を目的と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

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。

添加法でのiPS細胞の接着効率



- ・ iMatrix-511のみ、添加法でもコーティングと同等の細胞接着が得られる
- ・ iMatrix-511の添加法ではコーティングより少ない使用量でよい

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、臨床利用に耐ると考えられる細胞ストックの作製が可能であることを示している。

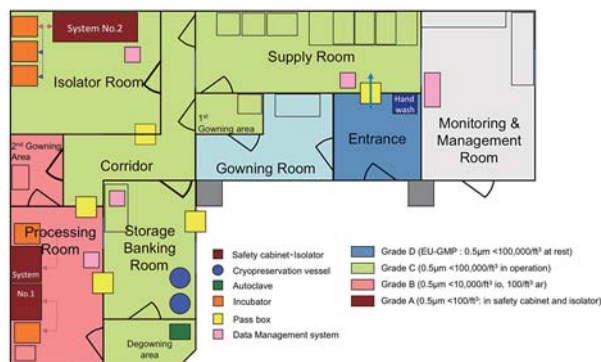
また、臨床用 ES 細胞バンクの品質管理を国際的な水準で実施するため、ISCBI (International Stem Cell Banking Initiative) による、臨床レベルでのヒト ES 細胞のバンキングのための品質基準の策定に参画している。これらをもとに、臨床利用可能なヒト ES 細胞の樹立のための手続きを進めている。

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.

Cell Processing Facility for clinical-grade human ES cells



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

Park SJ, Komiyama Y, Suemori H, Umezawa A, Nakai K. OpenTein: a database of digital whole-slide images of stem cell-derived teratomas. *Nucleic Acids Res.* 2016 Jan 4;44 (D1):D1000-4. doi: 10.1093/nar/gkv1096. PubMed PMID: 26496950; PubMed Central PMCID: PMC4702800.

Miyazaki T, Suemori H. Slow Cooling Cryopreservation Optimized to Human Pluripotent Stem Cells. *Adv Exp Med Biol.* 2016;951:57-65. PubMed PMID: 27837554.

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 trophectoderm or endoderm. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017 Jan 22;482 (4):764-770. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.11.108. PubMed PMID: 27876565.

List of Presentations

末盛博文「ヒト ES 細胞の臨床利用と日本での ES 細胞ストックの現状」ヒト ES 細胞シンポジウム「ヒト ES 細胞による再生医療研究の世界の潮流」、東京、2016 年 3 月 30 日

末盛博文「培養細胞の再生医療利用における留意点」日本組織培養学会 第 89 回大会 シンポジウム、大阪、2016 年 5 月 25-26 日

末盛博文「ES/iPS 細胞の医療応用に向けた培養技術開発の現状と今後の展望」木原記念横浜生命科学振興財団、YBIRD 技術セミナー、横浜、2016 年 7 月 8 日

末盛博文「ヒト ES 細胞の臨床研究の状況と今後の課題」東京工業大学 平成 28 年度ヒト ES 細胞教育研修会、横浜、2016 年 11 月 10 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解明に焦点をあてた研究を展開している。本年度は、常在細菌叢およびディスバイオーシスが自己免疫性関節炎に及ぼす影響、また関節炎症局所で起きている炎症性細胞の相互作用と炎症増悪機構について明らかにした。また、人事異動では、旧再生研技術職員の渡邊仁美が助教に就任した。

1) マウス精子の受精能獲得機構の解明

哺乳動物の精子は、精巣で産生された直後には受精する能力がなく、段階的な成熟過程を経て完全な受精能を獲得する。このプロセスを解明することは、不妊症の診断・治療法の開発や実験動物作出の効率化につながる。本年は、特に、マウス精子成熟における遺伝的背景の影響について研究を行った。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) 遊離とラフトの局在変化が連動して起こり、これが受精に重要な反応であることを発見した。この知見を踏まえて本研究では、実験用近交系マウスで妊孕性に差がある C57BL/6 系統と BALB/c 系統に着目し、2 系統間の精子受精能獲得過程における分子挙動を比較し、受精能との相関を検討した。その結果、両系統間で分子挙動に有意な差が認められ、これが受精能の違いを反映していることが示唆された。

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・損傷が起ることによってアレルギー反応、炎症性疾患、自己免疫疾患が惹起される。本年度、自己免疫性関節炎モデルマウスである SKG マウスを用いて、常在細菌叢が関節炎惹起性 T 細胞の胸腺選択に関わらないことを示し、一方、腸内細菌叢が自己反応性 T 細胞の活性化と関節炎惹起の鍵となる役割を果たすことを明らかにした。また、リウマチ患者の腸内細菌ディスバイオーシスが、関節炎増悪に関わることを示した。

本研究結果から、自己反応性 T 細胞の活性化に関わるディスバイオーシスの正常化および関節局

所の炎症細胞カスケードを阻害するための細菌学的・免疫学的制御法の開発は、関節リウマチ特異的な新規予防、治療法になりうる。

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 2016, we found a key interaction between self-reactive T helper cells and gut commensal bacteria in autoimmune arthritis.

1) Molecular mechanism of mammalian fertilization

Mammalian sperm undergo multiple maturation steps after leaving testis to be competent for fertilization. Serial important changes occur in the female reproductive tract on sperm, although the molecular mechanisms underlying these processes remain unclear. To investigate the sperm membrane remodeling upon sperm maturation, we developed transgenic mouse lines carrying glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored enhanced green fluorescent protein (EGFP-GPI) and traced the fate of this fluorescent protein during the fertility acquiring sperm process *in vitro* and *in vivo*. When the green-fluorescent sperm were treated with compounds for promoting acrosome reaction, EGFP-GPI was released from the sperm surface cross-linked with characteristic relocation of a lipid raft marker ganglioside GM1. Here we compared these molecular fates between two inbred mouse strains, such as C57BL/6 and BALB/c, finding significant differences associated with sperm fertilization ability.

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 found that commensal bacteria were not involved in the thymic selection of arthritogenic T cells, but significantly contributed to the initiation and severity of autoimmune arthritis. Furthermore, the reconstitution of germ-free SKG mice with feces from rheumatoid arthritis (RA) patients revealed dysbiosis present in the patients exacerbated the arthritis development. Collectively, our results indicate that intervention of gut dysbiosis involved in the activation of autoimmune T cells and the pathway of the inflammatory cellular cascade at inflamed synovium can be a therapeutic means for preventing and treating RA.

List of Publications

Maeda Y, Kurakawa T, Umemoto E, Motooka D, Ito Y, Gotoh K, Hirota K, Matsushita M, Furuta Y, Narazaki M, Sakaguchi N, Kayama H, Nakamura S, Iida T, Saeki Y, Kumanogoh A, Sakaguchi S, Takeda K. (2016). Dysbiosis Contributes to Arthritis Development via Activation of Autoreactive T Cells in the

Intestine. *Arthritis Rheumatol.* 68, 2646-2661.

廣田圭司 (2016). 自己免疫性関節炎を惹起するヘルパー T サブセットと認識自己抗原：慢性炎症性疾患の新たな展開；最新医学 . 2320-2325.

List of Presentations

Keiji Hirota: Th17 cells orchestrate an inflammatory circuit in the development of autoimmune arthritis, World Immune Regulation Meeting X, 16 - 19 March 2016, Davos, Switzerland

Keiji Hirota: Inflammatory circuit of Th17 cells, GM-CSF-producing fibroblast-like synoviocytes, and ILCs in the development of autoimmune arthritis, 第 16 回 国際免疫学会 2016, August 21-26, Melbourne, Australia

渡邊 仁美、竹田 理恵、廣田 圭司、近藤 玄：マウス精子成熟における遺伝的背景の影響について 第 63 回日本実験動物学会総会、川崎、2016 年 5 月 5-8 日

Hitomi Watanabe, Takatoku Oida, Gen Kondoh and Keiji Hirota: Development and characterization of monoclonal antibodies against a stable sperm surface antigen. 第 45 回日本免疫学会学術集会、那覇、2016 年 12 月 5-7 日

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

生体再建学分野
Laboratory of Experimental Immunology

客員教授 坂口 志文 Visiting Prof. Shimon Sakaguchi

正常な免疫系は、非自己抗原に対して免疫応答を示すが、正常自己構成成分に対しては反応しない。また、アレルギーに見られる過剰な免疫応答を阻止する機構を有している。このような免疫自己寛容、免疫恒常性維持の基礎的メカニズムとして、制御性 T 細胞 (Regulatory T cells、Treg と略) による抑制的制御が重要である。その機能異常は自己免疫病、アレルギーなどの免疫疾患の原因となる。また Treg を標的として、その数的減少、抑制能減弱により癌免疫、感染免疫の惹起・亢進を図り、その数的増大、抑制能強化により移植臓器に対する免疫寛容の誘導が可能である。

転写因子 Foxp3 は、制御性 T 細胞に特異的に発現し、制御性 T 細胞の発生、機能発現を制御するマスター制御遺伝子である。Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺制御性 T 細胞の量的・質的異常は、様々な自己免疫/炎症性疾患の直接的原因となる。Foxp3 の重要な機能として、正常 T 細胞に Foxp3 を発現させると、機能、表現型の点で内在性制御性 T 細胞と同等の制御性 T 細胞に転換できる。しかしながら、Foxp3 の発現のみでは、制御性 T 細胞の遺伝子発現プロファイルあるいは機能的安定性を付与できない。制御性 T 細胞を標的とする免疫応答制御の臨床応用に向けては、Foxp3 遺伝子のみならず制御性 T 細胞特異的遺伝子のエピジェノム制御が重要である。本年度、Treg の細胞系譜が胸腺でどのように決定され、機能的安定性が賦与されるかを解析した (Kitagawa et al., Nat. Immunol. 2017)。最初に、Treg 特異的スーパーエンハンサー (Treg-specific super-enhancer, Treg-SE) をゲノム上に探索し、Foxp3 遺伝子部位など 66 部位に Treg-SE を同定した。次に、胸腺細胞が Treg に分化して行く過程のどこで Treg-SE が活性化 (主としてヒストン修飾の変化) を受けるかを解析した結果、Treg-SE の大部分は、Foxp3 を発現していない Treg 前駆細胞の段階で活性化が始まり、Treg 分化に伴い活性化が進行することを見出した。さらに、Treg 前駆細胞の段階でゲノムオーガナイザー Satb1 を欠損させたところ、Treg 分化が前駆細胞段階で中断され、その結果 Treg 細胞の減少・欠損を招き重篤な自己免疫病を発症した。Treg-SE は Treg 特異的遺伝子発現、また特異的 DNA 脱メチル化を強力に制御し、その形成、活性化の異常は Treg の量的、機能的異常をもたらし、自己免疫病を含む様々な免疫病の原因となると考えられた。Treg 分化に伴う Treg-SE の活性化メカニズム、特に通常 T 細胞と Treg の分化分岐に於ける活性化メカニズムの解明を進め、Treg 細胞系譜決定機構の理解を進めようとしている。

This department 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 systemic autoimmune diseases, such as rheumatoid arthritis, by utilizing an animal model established in our laboratory.

Treg cells, which specifically express the transcription factor *Foxp3*, are actively engaged in the maintenance of immunological self-tolerance and homeostasis. The majority of them develop in the thymus as a functionally distinct and mature T-cell subpopulation, with their stable *Foxp3* expression chiefly maintained by Treg-specific DNA demethylation. It is poorly understood, however, how Treg-specific transcriptional and epigenetic changes are initiated and coordinated to determine the Treg cell lineage in the thymus. Here, with recently demonstrated associations of super-enhancers with cell type-specific gene regulation and lineage determination in various cell types, we first identified Treg cell-specific super-enhancers (Treg-SEs), many of which were associated with the Treg signature genes, such as *Foxp3*, *Ctla4* and *Il2ra*. The establishment of Treg-SEs developmentally began in Treg progenitor cells before *Foxp3* transcription and Treg-specific DNA demethylation, facilitating early induction of the associated genes. It required the genome organizer *Satb1*, which bound to Treg-SEs before their activation and extended its binding sites within the SEs along Treg cell differentiation. T cell-specific deletion of *Satb1* impaired Treg-SE formation in Treg precursor cells, hindering both Treg-specific DNA demethylation and the transcription of Treg-SE-associated genes including *Foxp3*. The consequent arrest of Treg cell differentiation at the precursor stage resulted in spontaneous development of severe autoimmunity and IgE hyperproduction. Our results thus demonstrate how *Satb1*-dependent Treg-SE establishment and subsequent transcriptional and epigenetic changes control Treg cell lineage specification in the thymus, and how molecular anomaly in this process causes autoimmune and other immunological diseases via affecting Treg cell development.

List of Publications

1) 原著論文

- Kitagawa Y, Ohkura N, Kidani Y, Vandenberg 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.
- 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.
- Saito T, Nishikawa H, Wada H, Nagano Y, Sugiyama D, Atarashi K, Maeda Y, Hamaguchi M, Ohkura N, Sato E, Nagase H, Nishimura J, Yamamoto H, Takiguchi S, Tanoue T, Suda W, Morita H, Hattori M, Honda K, Mori M, Doki Y, Sakaguchi S. Two FOXP3⁺CD4⁺ T-cell subpopulations distinctly control the

- prognosis of colorectal cancers. *Nature Med.* 22: 679-684, 2016.
- 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.
- Okubo K, Wada H, Tanaka A, Eguchi H, Hamaguchi M, Tomokuni A, Tomimaru Y, Asaoka T, Hama N, Kawamoto K, Kobayashi S, Marubashi S, Nagano H, Sakaguchi N, Nishikawa H, Doki Y, Mori M, Sakaguchi S. Identification of Novel and Noninvasive Biomarkers of Acute Cellular Rejection After Liver Transplantation by Protein Microarray. *Transplant Direct.* 2016 Nov 18;2 (12):e118.
- 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.
- Morita T, Shima Y, Wing JB, Sakaguchi S, Ogata A, Kumanogoh A. The Proportion of Regulatory T Cells in Patients with Rheumatoid Arthritis: A Meta-Analysis. *PLoS One.* 2016 Sep 13;11 (9):e0162306. doi: 10.1371/ journal.pone.0162306.
- Miyara M, Chader D, Burlion A, Goldstein J, Sterlin D, Norol F, Trebeden-Nègre H, Claër L, Sakaguchi S, Marodon G, Amoura Z, Gorochoy G. Combination of IL-2, rapamycin, DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibitors for the expansion of human regulatory T cells. *Oncotarget.* 2016 Jul 28. doi: 10.18632/oncotarget.10914. [Epub ahead of print]
- Haseda F, Imagawa A, Nishikawa H, Mitsui S, Tsutsumi C, Fujisawa R, Sano H, Murase-Mishiba Y, Terasaki J, Sakaguchi S, Hanafusa T. Antibody to CMRF35-like molecule 2, CD300e: a novel biomarker detected in patients with fulminant type 1 diabetes. *PLOS ONE.* e0160576, 2016.
- Sood S, Brownlie RJ, Garcia C, Cowan G, Salmond RJ, Sakaguchi S, Zamoyska R. Loss of the Protein Tyrosine Phosphatase PTPN22 Reduces Mannan-Induced Autoimmune Arthritis in SKG Mice. *J Immunol.* 197:429-40, 2016.
- Ureshino H, Shindo T, Nishikawa H, Watanabe N, Watanabe E, Satoh N, Kitaura K, Kitamura H, Doi K, Nagase K, Kimura H, Samukawa M, Kusunoki S, Miyahara M, Shin-I T, Suzuki R, Sakaguchi S, Kimura S. Effector regulatory T cells reflect the equilibrium between antitumor immunity and autoimmunity in adult T cell leukemia. *Cancer Immunol Res.* 4:644-649, 2016.
- Maeda Y, Kurakawa T, Umemoto E, Motooka D, Ito Y, Gotoh K, Hirota K, Matsushita M, Furuta Y, Narazaki M, Sakaguchi N, Kayama H, Nakamura S, Iida T, Saeki Y, Kumanogoh A, Sakaguchi S, Takeda K. Dysbiosis contributes to arthritis development via activation of autoreactive T cells in the intestine. *Arthritis Rheumatol.* 68:2646-2661, 2016.

Vandenbon A, Dinh VH, Mikami N, Kitagawa Y, Teraguchi S, Ohkura N, Sakaguchi S. Immuno-Navigator: a co-expression database for cell type-specific network inference in the immune system. *Proc Natl Acad Sci USA*. 113 (17):E2393-402, 2016.

Klocke K, Sakaguchi S, Holmdahl R, Wing K. Induction of autoimmune disease by deletion of CTLA-4 in mice in adulthood. *Proc Natl Acad Sci USA*. 113 (17):E2383-92, 2016.

Nafady-Hego H, Li Y, Ohe H, Elgendy H, Zhao X, Sakaguchi S, Bishop GA, Koshiba T. Utility of CD127 combined with FOXP3 for identification of operational tolerance after liver transplantation. *Transp Immunol*. 36:1-8, 2016.

Shimazu Y, Shimazu Y, Hishizawa M, Hamaguchi M, Nagai Y, Sugino N, Fujii S, Kawahara M, Kadowaki N, Nishikawa H, Sakaguchi S, Takaori-Kondo A. Hypomethylation of the Treg-specific demethylated region in FOXP3 is a hallmark of the regulatory T-cell subtype in adult T-cell leukemia. *Cancer Immunol Res*. 4:136-145, 2016.

2) 総説

坂口志文：制御性 T 細胞の発見 医学のあゆみ Vol.258 No.9 (877-880) 2016

川上竜司、三上統久、坂口志文：Treg の分類と自己免疫疾患 臨床免疫・アレルギー科 Vol.66 No.5 (529-535) 2016

List of Presentations

1) 学会・研究会発表

廣田圭司、伊藤能永、近藤玄、田中淳、坂口教子、坂口志文：SKG マウスの関節炎に関わる ILCs サブセット Kyoto T Cell Conference、京都、2016 年 5 月 20-21 日

田中淳、西川博嘉、野口晋佐、高橋直人、坂口教子、坂口志文：Selective control of regulatory T cells through TCR signaling molecule. Kyoto T Cell Conference, Kyoto, May 20-21, 2016.

Atsushi Tanaka : Selective control of regulatory T cells through TCR signaling molecule. 16th International Congress of Immunology Melbourne, Australia, August 21-26, 2016.

Keiji Hirota : Inflammatory circuit of Th17 cells, fibroblast-like synoviocytes, and ILCs in the development of autoimmune arthritis. 16th International Congress of Immunology, Melbourne, Australia, August 21-26, 2016.

Yohko Kitagawa, Naganari Ohkura, Yujiro Kidani, Shimon Sakaguchi: Epigenetic control of regulatory T cell identity and its assortment with autoimmune diseases in human. 第 45 回日本免疫学会総会・学術集会、沖縄、2016 年 12 月 5-7 日

James Badger Wing, Hannah Hume, Michela Locci, Yohko Kitagawa, Christopher Tay, Kyoko Matsuda,

Takeshi Inoue, Tomohiro Kurosaki, Shane Crotty, Cevayir Coban, Naganari Ohkura, Shimon Sakaguchi : A distinct subset of CD25 negative T-follicular regulatory cells localizes in the germinal centers 第45回日本免疫学会総会・学術集会、沖縄、2016.年12月5-7日

Motonao Osaki, Shimon Sakaguchi : Soluble form of CTLA-4 produced by regulatory T cells facilitates M2 macrophage differentiation in auto-inflammatory condition. 第45回日本免疫学会総会・学術集会、沖縄、2016.年12月5-7日

Yujiro Kidani, Yohko Kitagawa, Naganari Ohkura, Shimon Sakaguchi : Specific transcriptional regulation of tumor infiltrating regulatory T cells. 第45回日本免疫学会総会・学術集会、沖縄、2016.年12月5-7日

Murat Tekguc, James Badger Wing, Motonao Osaki, Shimon Sakaguchi : Role of CTLA-4 in controlling expression of costimulatory molecules by antigen-presenting cells. 第45回日本免疫学会総会・学術集会、沖縄、2016.年12月5-7日

Daniel Y. Hu, Stephen R. Daley, Christopher C. Goodnow, Naganari Ohkura, Shimon Sakaguchi : Regulatory T cell precursors develop from negative selected CCR7⁺ Helios⁺ medullary thymocytes. 第45回日本免疫学会総会・学術集会、沖縄、2016.年12月5-7日

2) 講演・シンポジウム

坂口志文：免疫制御とがん治療 広島大学がん免疫療法セミナー、広島、2016年1月14日

坂口志文：制御性T細胞研究の35年：発見から応用まで 京都大学ウイルス研究所・再生医科学研究所合同学術講演会、京都、2016年1月21日

坂口志文：制御性T細胞による疾患制御 第5回全身性炎症疾患の病因・病態の解明に関する研究発表会、東京、2016年1月23日

坂口志文：制御性T細胞による疾患制御 兵庫医科大学第11回レクチャーシップ、兵庫、2016年1月27日

坂口志文：制御性T細胞による免疫応答制御 第2回病因研究会別府シンポジウム、別府、2016年2月6-7日

Shimon Sakaguchi: Targeting Regulatory T Cells for Cancer Immunotherapy. The 31st Nagoya International Cancer Treatment Symposium : Next Generation Therapy from Bench to Bed : Kimura Memorial Lecture, Nagoya, January 13-14, 2016.

坂口志文：Transcriptional and epigenetic basis of regulatory T cell development International Symposium for RIKEN Epigenetic Program 2016, 和光, February 15-16, 2016.

Shimon Sakaguchi: Targeting Regulatory T Cells for Cancer Immunotherapy. Tenth AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research: From Biology to Therapeutics, Hawaii, USA,

February 16-20, 2016.

Shimon Sakaguchi : Transcriptional and epigenetic basis of regulatory T cell development. Seminar at Instituto de Medicina Molecular da Universidade de Lisboa, Lisbon, Portugal, February 29, 2016.

Shimon Sakaguchi : Transcriptional and epigenetic basis of regulatory T cell development. SFB 1054 Symposium, Control and Plasticity of Cell-Fate Decisions in the Immune System, Munich, Germany, March 2-3, 2016.

Shimon Sakaguchi: Targeting Regulatory T Cells for Controlling Immune Responses. Transplantation Science Symposium (TSS) Asian Regional Meeting : Keynote Lecture, Tokyo, April 8-9, 2016.

坂口志文：免疫制御とがん治療 第116回日本外科学会定期学術集会、大阪、2016年4月14-16日

Shimon Sakaguchi: Targeting Regulatory T Cells for Controlling Immune Responses. II Seville Molecular Medicine Workshop: Cell Therapy, Molecular Mechanisms and Clinical Translation, Seville, Spain, May 9-10, 2016.

Shimon Sakaguchi: Targeting Regulatory T Cells for Cancer Immunotherapy. The Distinguished Ludwig Lecturer Series in Cancer Research, Lausanne, Switzerland, May 12, 2016.

坂口志文：制御性T細胞による免疫応答制御 第37回日本炎症・再生医学会、京都、2016年6月16-17日

坂口志文：制御性T細胞と癌免疫 第10回横断的腫瘍フォーラム、大阪、2016年6月28日

坂口志文：免疫制御とがん治療 第4回がんと代謝研究会、鹿児島、2016年7月7-8日

坂口志文：制御性T細胞の発生と機能 第18回免疫サマースクール2016、北海道、2016年7月11-14日

坂口志文: Control of Immune Responses by Regulatory T cells. Bone Biology Forum、幕張、2016年8月19-20日

Shimon Sakaguchi : Transcriptional and epigenetic basis of Treg cell development and function. 16th International Congress of Immunology, Melbourne, Australia, August 21-26, 2016.

Shimon Sakaguchi : Targeting regulatory T cells for controlling immune responses. 16th International Congress of Immunology, Melbourne, Australia, August 21-26, 2016.

坂口志文：制御性T細胞による免疫応答制御 第31回日本乾癬学会、宇都宮、2016年9月2-3日

Shimon Sakaguchi: Targeting Regulatory T Cells for Cancer Immunotherapy. From the Laboratory to the Clinic: Getting closer to a Cure?, Oxford, England, September 7-9, 2016.

Shimon Sakaguchi: Targeting regulatory T cells for cancer immunotherapy. The 2016 International Cancer Immunotherapy Conference: Translating Science into Survival, New York, U.S.A., September 25-28, 2016.

- Shimon Sakaguchi : Transcriptional and epigenetic basis of Treg cell development. 46th Annual Meeting of the German Society for Immunology, Hamburg, Germany, September 27-30, 2016.
- Shimon Sakaguchi : Control of immune responses by regulatory T cells. Cold Spring Harbor Asia、淡路島、2016年10月3-6日
- 坂口志文 : 制御性 T 細胞を標的とした癌免疫療法 第 75 回日本癌学会学術総会、横浜、2016年10月6-8日
- 坂口志文 : 制御性 T 細胞による免疫応答制御 第 53 回日本小児アレルギー学会、前橋、2016年10月8-9日
- Shimon Sakaguchi : Control of immune responses by regulatory T cells. The 13th International Workshop on Autoantibodies and Autoimmunity、京都、2016年10月11-13日
- Shimon Sakaguchi : Control of immune responses by regulatory T cells. The 23th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses、京都、2016年10月11-15日
- 坂口志文 : 制御性 T 細胞による免疫応答制御 日本リウマチ学会第 3 回ベーシックリサーチカンファレンス、東京、2016年10月14-15日
- 坂口志文 : 制御性 T 細胞を標的とした癌免疫療法の可能性 第 16 回別府癌治療懇話会、別府、2016年10月17日
- 坂口志文 : 制御性 T 細胞とがん免疫療法 レギュラトリーサイエンス エキスパート研修会 がん治療の新たな選択肢、東京、2016年10月18日
- Shimon Sakaguchi : Control of immune responses by regulatory T cells. International Symposium on Advanced Immunology、大阪、2016年11月1-2日
- 坂口志文 : 制御性 T 細胞による免疫応答制御 第 46 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会、東京、2016年11月5-6日
- Shimon Sakaguchi: Targeting Regulatory T Cells for Cancer Immunotherapy. Frontiers in Cancer Science 2016, Singapore, November 7-9, 2016.
- 坂口志文 : 制御性 T 細胞による免疫疾患の制御に向けて 富山大学医学部創立 40 周年記念講演会、富山、2016年11月25日
- 坂口志文 : 制御性 T 細胞による免疫応答制御 大阪大学産婦人科学講座セミナー、大阪、2016年11月28日
- 坂口志文 : Transcriptional and epigenetic basis of regulatory T cell development. 第 39 回日本分子生物学会年会、横浜、2016年11月30日-12月2日
- 坂口志文 : Tolerance and Immune Regulation. 第 45 回日本免疫学会総会・学術集会、沖縄、2016年12月5-7日

坂口志文:免疫を制御する細胞とは？—自己と非自己の免疫学 WPI10周年記念講演会、東京、2016
年12月17日

(受賞)

The Crafoord Prize

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

生体物性学分野
Laboratory of Material Biophysics

客員教授 宿南 知佐 Visiting Prof. Chisa Shukunami

本研究分野では、運動器コンポーネントを連結する腱・靭帯と硬組織の形成・再生・疾患に焦点を当て、遺伝子改変マウスと細胞培養系を駆使して解析を行っている。

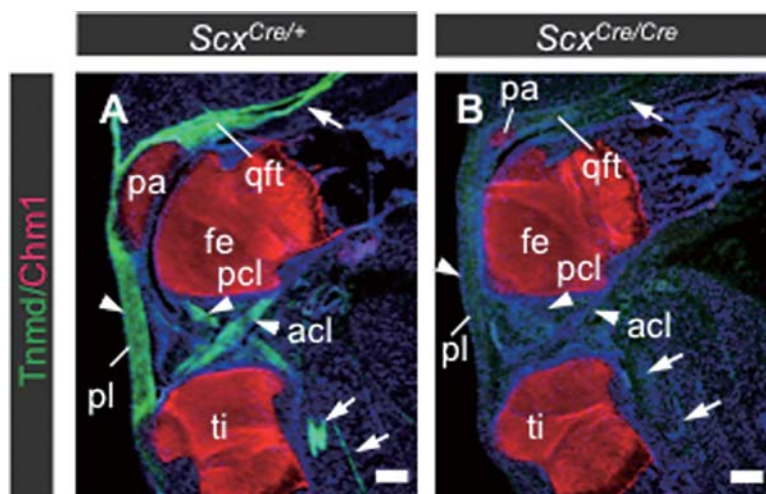
骨格組織と腱・靭帯の接合部形成の分子メカニズムの解明

発生過程では、骨格、筋、腱、靭帯などの運動器コンポーネントは、それぞれ独立した原基として形成される。組織形成の進行に伴って、硝子軟骨と腱・靭帯は連結され腱・靭帯接合部の原基が作られる。胎生期に硝子軟骨と腱・靭帯の連結部として形成された接合部には、生後、線維軟骨層が出現し、硝子軟骨には血管が侵入して骨へ置換される。これまでに、腱・靭帯接合部形成には、軟骨形成に必須の転写因子である SRY-box 9 (Sox9) と腱の成熟に必要な basic helix-loop-helix 型の転写因子である Scleraxis (Scx) を発現する Scx⁺/Sox9⁺細胞が寄与することを明らかにしてきた。Scx の発現領域で Sox9 が欠失する ScxCre; Sox9^{lox/lox} マウスでは、腱・靭帯が付着する領域の軟骨が形成されない。また、Scx の遺伝子座に Cre recombinase (Cre) をインフレームで挿入した ScxCre Knock-in (KI) マウスやゲノム編集ツールである TALEN によって Scx を欠失させた Scx knockout マウスの homozygotes では、腱、靭帯、椎間板の外線維輪での Tenomodulin の発現がほぼ消失し、Scx を一過性に発現する種子骨や接合部の軟骨でも形成不全が起こることを見出している。Scx が欠失すると、接合部近傍の軟骨では、Sox9 の発現が減弱し、Smad1/5 や Smad3 のリン酸化が低下することから、BMP や TGF-β シグナリングが影響を受けることも明らかになっている。このように、Scx は持続的に発現する腱・靭帯・椎間板の外線維輪だけでなく、胎生期に一過性に発現する接合部近傍の軟骨の形成にも必要であることが明らかになった。

We are aiming at the elucidation of the molecular and cellular mechanisms underlying the formation and regeneration of cartilage, bone, teeth, tendons and ligaments.

Molecular mechanisms underlying the establishment between skeletal tissues and tendons/ligaments.

Tendons connect muscles to the bone and function as the mechanical force transmitters, while ligaments bind bones together to stabilize joints. Each musculoskeletal primordium initially develops as independent components, but tendons and ligaments subsequently integrate each component into a single functional locomotive unit. At the early stages of development, Scleraxis (Scx), a basic helix-loop-helix transcription



Decreased expression of Tnmd in tendons and ligaments of *Scx^{Cre/Cre}* knock-in (KI) mice. (A, B) Double immunostaining of Chmd (red) and Tnmd (green) was performed in *Scx^{Cre/+}* (A) and *Scx^{Cre/Cre}* (B). Frozen sagittal sections of knee joint in KI neonates are shown. Tnmd was detected in tendons and ligaments of *Scx^{Cre/+}* (A), whereas those of *Scx^{Cre/Cre}* were negative for Tnmd (B). Arrows and arrowheads in (A) and (B) indicate tendons and ligaments, respectively. acl, anterior cruciate ligament; fe, femur; pa, patella; pcl, posterior cruciate ligament; pl, patella ligament; qft, quadriceps femoris tendon; ti, tibia. Scale bars, 200 μ m.

Scx^{Cre/Cre} マウスの腱及び靭帯における Tnmd の発現低下

(A, B) Chmd (赤) と Tnmd (緑) の二重免疫染色を *Scx^{Cre/+}* (A) 及び *Scx^{Cre/Cre}* (B) ノックイン (KI) 新生仔マウスで行った。膝関節の凍結切片の矢状断面を示す。Tnmd は *Scx^{Cre/+}* マウスの腱及び靭帯で検出されるが、*Scx^{Cre/Cre}* マウスでは検出されない。(A) と (B) の矢印と矢頭は、それぞれ腱と靭帯を示す。acl, 前十字靭帯; fe, 大腿骨; pa, 膝蓋骨; pcl, 後十字靭帯; pl, 膝蓋靭帯; qft, 大腿四頭筋腱; ti, 脛骨。スケールバー, 200 μ m.

factor, is induced and persistently expressed in the tendon/ligament primordia. Tenomodulin, a type II transmembrane glycoprotein, is then expressed in mature tendons and ligament at a high level. During the postnatal growth, hyaline cartilage in the chondrotendinous/chondroligamentous junction is gradually replaced by bone and fibrocartilage to generate the fibrocartilaginous enthesis in the osteotendinous/osteoligamentous junction. Through the lineage tracing studies, we found that *Scx⁺/Sox9⁺* cells contribute to the establishment of the chondrotendinous/chondroligamentous junction. Conditional inactivation of *Sox9* in *Scx⁺/Sox9⁺* cells resulted in defective formation of the tendon/ligament attachment site into the cartilaginous bone primordium. Recently, we generated a novel *Scx^{Cre}* knock-in (KI) allele, by in-frame replacement of most of *Scx* exon 1 with *Cre recombinase*, to drive *Cre* expression using *Scx* promoter and to inactivate the endogenous *Scx*. Reflecting the intensity and duration of endogenous *Scx* expression, Cre-mediated excision occurs in tendinous and ligamentous tissues persistently expressing *Scx*. Expression of tenomodulin was almost absent in tendons and ligaments with *Scx^{Cre/Cre}* KI mice lacking *Scx* to indicate defective maturation. In homozygotes, the transiently *Scx*-expressing entheseal regions such as the rib cage, patella cartilage, and sesamoid bones were small and defective and cartilaginous tuberosity was missing. Decreased Sox9

expression and phosphorylation of Smad1/5 and Smad3 were also observed in the developing patella, enthesal cartilage, and deltoid tuberosity of *Scx^{Cre/Cre}* KI mice. These results highlighted the functional importance of both transient and persistent *Scx* expression domains for proper integration of the musculoskeletal components.

List of Publications

(1) 原著論文

Dex, S., Lin, D., Shukunami, C., and Docheva, D. (2016). Tenogenic modulating insider factor: Systematic assessment on the functions of tenomodulin gene. *Gene* 587, 1-17.

Goto, N., Fujimoto, K., Fujii, S., Ida-Yonemochi, H., Ohshima, H., Kawamoto, T., Noshiro, M., Shukunami, C., Kozai, K., and Kato, Y. (2016). Role of MSX1 in Osteogenic Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells. *Stem cells international* 2016, 8035759.

Guo, L., Yamashita, H., Kou, I., Takimoto, A., Meguro-Horike, M., Horike, S., Sakuma, T., Miura, S., Adachi, T., Yamamoto, T., Ikegawa, S., Hiraki, Y., and Shukunami, C. (2016). Functional Investigation of a Non-coding Variant Associated with Adolescent Idiopathic Scoliosis in Zebrafish: Elevated Expression of the Ladybird Homeobox Gene Causes Body Axis Deformation. *PLoS genetics* 12, e1005802.

Shukunami, C., Yoshimoto, Y., Takimoto, A., Yamashita, H., and Hiraki, Y. (2016). Molecular characterization and function of tenomodulin, a marker of tendons and ligaments that integrate musculoskeletal components. *Japanese Dental Science Review* 52, 84-92.

(2) 総説

吉本 由紀, 滝本晶, 宿南知佐: 靱帯の形成と再生. *Keynote RA*. Vol. 4, No. 4:20-25, 2016

宿南 知佐: 腱・靱帯と骨格筋. *CLINICAL CALCIUM*. Vol. 27: 43-49, 2017

List of Presentations

(1) 学会・研究会発表

山下 寛, 吉本由紀, 宿南知佐: 新規マウス由来腱細胞株 T2S を用いた腱分化関連遺伝子の発現制御機構の解析, 第7回骨バイオサイエンス研究会, 岡山, 2016年6月4日

郭龍, 山下 寛, 滝本 晶, 池川志郎, 開 祐司, 宿南知佐: ゼブラフィッシュを用いた思春期特発性側弯症に関連する ladybird homeobox 遺伝子のノンコーディングバリエーションの機能解析. 第34回日本骨代謝学会学術集会・第3回アジア太平洋骨代謝学会議, 大阪, 2016年7月21日

山下 寛, 吉本由紀, 宿南知佐: 新たに樹立したマウス由来不死化腱細胞株 T2S を用いた成熟腱分

子マーカー Tenomodulin の発現制御に関わる細胞内シグナル伝達経路の解析. 第 34 回日本骨代謝学会学術集会・第 3 回アジア太平洋骨代謝学会議、大阪、2016 年 7 月 22 日

山下 寛、吉本由紀、宿南知佐：新たに樹立した腱細胞株 T2S を用いた成熟腱分子マーカー Tenomodulin の発現制御機構の解析. 第 2 回日本筋学会学術集会、小平市、2016 年 8 月 5 日

吉本 由紀、滝本 晶、佐久間哲司、渡邊仁美、近藤 玄、開 祐司、宿南 知佐：筋 / 骨格系を連結する組織における Scleraxis の機能解析. 日本ゲノム編集学会第 1 回大会、広島、2016 年 9 月 6 日

吉本 由紀、滝本 晶、渡邊 仁美、近藤 玄、開 祐司、宿南 知佐：筋・骨格系を連結する腱・靭帯の形成における Scleraxis の役割. 第 4 回若手による骨格筋細胞研究会、名古屋、2016 年 11 月 15 日

(2) 講演・シンポジウム

宿南知佐：第 37 回北海道大学獣医学学術交流基金群講演会「腱・靭帯形成の分子メカニズム」(招待講演)(2016. 1. 21 札幌市)

宿南知佐：北海道大学 博士課程教育リーディングプログラム「One Health に貢献する獣医科学グローバルリーダー育成プログラム」の The 21st Leading Special Lecture「Molecular mechanisms regulating tendon and ligament formation」(招待講演)、札幌、2016 年 1 月 22 日

宿南知佐：消化器・代謝内科セミナー「運動器コンポーネントを連結する組織の形成メカニズム」(招待講演)、広島、2016 年 6 月 1 日

宿南知佐：第 48 回日本結合組織学会学術大会 ワークショップ「マトリックスコネクション 2016」 「筋・骨格系を統合する腱・靭帯の形成・維持機構」(招待講演)、長崎、2016 年 6 月 25 日

宿南知佐：第 11 回しまなみ骨・関節フォーラム「bHLH 型転写因子 Scleraxis による腱・靭帯形成制御」(招待講演)、愛媛、2016 年 6 月 30 日

Chisa Shukunami：The 13th Bone Biology Forum「Molecular characterization and function of tenomodulin, a marker of tendon/ligaments to integrate the musculoskeletal components」(招待講演)、千葉、2016 年 8 月 19 日

宿南知佐：第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会 パネルディスカッション「腱・靭帯付着部の形成メカニズム」(招待講演)、福岡、2016 年 10 月 14 日

宿南知佐：第 24 回母子医療センターシンポジウム「腱・靭帯付着部形成のメカニズム」(招待講演)、和泉、2016 年 2 月 17 日

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
特定助教	滝本 晶	Program-Specific Assist. Prof.	Aki Takimoto

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. 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、

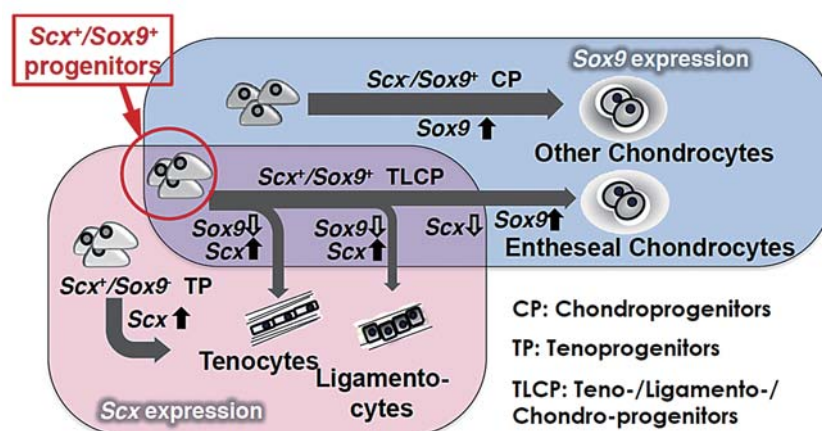


Fig. 1. Differentiation of the tenogenic, ligamentogenic and chondrogenic cell lineages along the *Scx/Sox9* axis.

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 (Fig. 1)。

2. Pax1 による軟骨細胞の分化成熟の抑制

Pax1 (Paired box gene 1) は、胚発生過程において硬節で発現し、中軸骨格の形成に重要な役割を担う転写因子である。*Pax1* は *Nk3 homeobox 2* (*Nkx3.2*) の発現を誘導することにより、初期の軟骨分化を促進することが報告されているが、軟骨成熟過程における役割は十分理解されていない。そこで我々はニワトリ胚の前肢に *Pax1* を強制発現させ、四肢における軟骨形成を解析した。その結果、軟骨形成初期には異常が認められなかったものの、軟骨細胞の成熟及び内軟骨性骨形成が阻害され、軟骨の成長が著しく抑制された。*Pax1* を強制発現した培養軟骨細胞は、細胞形態が軟骨細胞に特徴的な多角型から線維芽細胞様の紡錘型へと変化し、*Sox9*, *Nkx3.2*, *Indian hedgehog*, *type II collagen*, *Chondromodulin-1*, 及び *Aggrecan* といった軟骨マーカー遺伝子の発現が顕著に低下していた。また、*Sox9* の強制発現により促進される軟骨基質の産生は、*Pax1* との共発現により顕著に抑制された。以上の結果から、*Pax1* が軟骨細胞の成熟過程を阻害することが明らかになった。さらに *Sox9* の機能に対して *Pax1* が抑制的に作用することが示唆された。

3. 材料工学的アプローチによる細胞機能制御

1) 細胞機能改変のための細胞表面修飾技術

組み換えタンパク質のタグ配列および細胞表面修飾材 (PEG-脂質) に導入したリガンドの特異的結合により、細胞表面に組み換えタンパク質を固定化する技術を確立した。この技術を用いて細胞表面をカドヘリンで修飾することで細胞間接着を誘導することができ、また、異種細胞からなる細胞凝集体内の細胞配置を制御することができた。

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腓島移植

移植および摘出が容易な皮下への腓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腓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. Analysis of *Scx*⁺/*Sox9*⁺ progenitors during establishment of the junction between cartilage and tendon/ligament

In vertebrates, coordinated body movement is ensured by a close functional and physical association of bones, muscles, tendons and ligaments. Tendons connect muscles to the skeletal components and function as force transmitters, whereas ligaments bind bones together to stabilize joints. During the early stages of musculoskeletal development, cartilage, muscle, tendon and ligament primordia initially develop as an individual unit, but subsequently they are integrated with each other by an unknown mechanism.

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 (Fig. 1).

2. Inhibitory action of Pax1 on chondrocyte maturation.

Paired box gene 1 (*Pax1*) indirectly promotes the early stages of chondrogenic differentiation through induction and transactivation of *Nk3 homeobox 2* (*Nkx3.2*), a transcriptional repressor. We demonstrate that

Pax1 acts as a negative regulator of chondrocyte maturation, independently of *Nkx3.2*. Upon cartilage formation, *Pax1* expression in the ventral sclerotome was gradually decreased except for the perichondrial region of the vertebral bodies and the intervertebral region, both of which express *SRY-box containing gene 9* (*Sox9*). Forced expression of *Pax1* in the chick forelimb resulted in the formation of shortened skeletal elements with a significant reduction of proteoglycan accumulation in cartilage as well as a lack of the cortical bone formation and vascular invasion into primary ossification center. *Pax1*-misexpressing chondrocytes exhibited aberrant cell morphology with marked downregulation of *Aggrecan* (*Agc1*). Cultured *Pax1*-misexpressing chondrocytes failed to accumulate cartilaginous proteoglycans and became fibroblastic, in association with the marked downregulation of the expression of *Sox9*, *Nkx3.2*, *Indian hedgehog*, *type II collagen*, *Chondromodulin-1* as well as *Agc1*. In cultured chondrocytes, reduced accumulation of cartilaginous proteoglycans induced by the forced expression of *Pax1* was partially rescued by *Sox9* overexpression, but further promoted by *Nkx3.2* overexpression. Thus, the chondrogenic action of *Sox9* was antagonized by *Pax1*, which is downregulated during chondrogenic differentiation.

3. Materials engineering approaches to control cellular function

1) Modification of cell surface with biomolecules for manipulating cell function

We developed modification of cell surface with proteins using specific binding of tag sequence in recombinant proteins to ligand introduced on the cell surface. Modification of cell surface with cadherin enabled us to induce cadherin-mediated cell-cell attachment and to modulate structure of multicellular aggregates. Our method provides new approach to engineer cell-cell interaction.

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

Cell aggregates were prepared from human iPS cells 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 administrating immunosuppressive drugs.

List of Publications

Guo, L., Yamashita, H., Kou, I., Takimoto, A., Meguro-Horike, M., Horike, S., Sakuma, T., Miura, S.,

Adachi, T., Yamamoto, T., Ikegawa, S., Hiraki, Y., and Shukunami, C. (2016). Functional investigation of a non-coding variant associated with adolescent idiopathic scoliosis in zebrafish: elevated expression of the ladybird homeobox gene causes body axis deformation. **PLOS Genetics** 12, e1005802.

Shukunami, C., Yoshimoto, Y., Takimoto, A., Yamashita, H., and Hiraki, Y. (2016). Molecular characterization and function of tenomodulin, a marker of tendons and ligaments that integrate musculoskeletal components. **Jap. Dent. Sci. Rev.** 52 (4), 84-92.

Yamamoto, T., Teramura, Y., Itagaki, T., Arima, Y., and Iwata, H. (2016). Interaction of poly (ethylene glycol) -conjugated phospholipids with supported lipid membranes and their influence on protein adsorption. **Sci Technol Adv Mater.** 17 (1), 677-684.

Konagaya, S., Iwata, H. (2016). Reproducible preparation of spheroids of pancreatic hormone positive cells from human iPS cells: An in vitro study. **Biochim Biophys Acta.** 1860 (9), 2008-2016.

三浦重徳, 竹内昌治 (2016). 流体せん断力はカルシウムイオンチャンネル TRPV6 の活性化を介して微絨毛形成を誘導する **実験医学 / 羊土社** 34 (8), 1293-1296.

吉本由紀, 滝本晶, 宿南知佐 (2016). 靭帯の形成と再生 **Keynote RA** (先端医学社) 4, 20-25.

有馬祐介, 岩田博夫 (2016). DNA - ポリエチレングリコール - 脂質複合体を用いた細胞表面修飾 **表面科学** 37, 218-223.

List of Presentations

Arima, Y., Hirai, Y., Iwata, H. Control of Cell-Cell Interaction by Cell Surface Engineering using Recombinant Proteins. 3rd International Conference on Biomaterials Science in Tokyo (ICBS2016). Tokyo, November 28-30, 2016.

Arima, Y., Hirai, Y., Iwata, H. Control of multicellular aggregate structure using cell surface modification with recombinant proteins. 10th Anniversary International Symposium on Nanomedicine (ISNM2016). Tsukuba, November 24-26, 2016.

Konagaya S., Ando T., Kotera H., and Iwata H. Automated Cell Culture System for Large - scale Production of Human Induced Pluripotent Stem Cells. Cell Symposia 10 Years of iPSCs. Berkeley, September 25-26, 2016.

Kuwabara R, Iwata H. Induction of immune tolerance site under the skin by agarose rods with cyclic peptide and islets transplantation into the sites. 52nd European Association for the Study of Diabetes Annual Meeting. München, September 12-16, 2016.

Arima, Y., Iwata, H. Cell surface engineering for biomedical applications, the A3 International Conference on Nanomedicine of Cancer, Beijing, August 8.1-2, 2016.

Arima, Y., Iwata, H. DNA-mediated cell-cell attachment studied using supported lipid bilayers, 10th World

Biomaterials Congress, Montreal, May 17-22, 2016.

Arima, Y., Hirai, Y., Iwata, H. Control of Cell-Cell Interaction by Cell Surface Engineering using Recombinant Proteins. The 4th Japan-China Symposium on Nanomedicine. Kitakyushu, May 12-13, 2016.

Arima, Y., Iwata, H. Recruitment and exclusion of DNA tethered to model cell membrane upon DNA-mediated cell attachment. the 7th Taiwan-Japan Symposium on Nanomedicine. Kyoto, January 21-22, 2016.

Kuwabara R, Iwata H. Preparation of immune tolerance site by cyclic oligopeptide under the skin and islets transplantation into the site. The 7th Taiwan-Japan Symposium on Nanomedicine. Kyoto, January 21-22, 2016.

有馬祐介, 岩田博夫, 細胞表面修飾による細胞-細胞間および細胞-人工材料間接着の制御 第149回ポータル会、京都、2016年12月3日

三浦重徳、佐藤幸治、根岸みどり、手島哲彦、竹内昌治 微絨毛形成を伴う細胞の力学刺激応答とその分子メカニズム 第39回日本分子生物学会、横浜、2016年11月30日-12月2日

栗原 令、岩田 博夫 生分解性デバイスを用いた皮下への免疫寛容部位作製とその部位への臍島移植 第38回日本バイオマテリアル学会大会、福岡、2016年11月21-22日

西山 喬晴、西澤 佑馬、栗原 令、岩田 博夫 マウスモデルにおける皮下への同種臍島移植 第38回日本バイオマテリアル学会大会、福岡、2016年11月21-22日

吉本由紀、滝本品、渡邊仁美、近藤玄、開祐司、宿南知佐 筋・骨格系を連結する腱・靭帯の形成における Scleraxis の役割 /The role of Scleraxis in the formation of tendons and ligaments integrating the musculoskeletal components 第4回若手による骨格筋細胞研究会、名古屋、2016年11月14-15日

有馬祐介、松岡洋佑、岩田博夫 塩基長の異なる単鎖 DNA - ポリエチレングリコール - 脂質による細胞表面修飾 第65回高分子討論会、横浜、2016年9月14-16日

吉本由紀、滝本品、佐久間哲司、渡邊仁美、近藤玄、開祐司、宿南知佐 筋 / 骨格系を連結する組織における Scleraxis の機能解析 日本ゲノム編集学会第1回大会、広島、2016年9月6-7日

郭龍、山下寛、滝本品、池川志郎、開祐司、宿南知佐 ゼブラフィッシュを用いた思春期特発性脊柱側弯症に関連する ladybird homeobox 遺伝子のノンコーディングバリエーションの機能解析 第34回日本骨代謝学会、大阪、2016年7月21日

三浦重徳、佐藤幸治、根岸みどり、手島哲彦、竹内昌治 マイクロ流体システムを用いたヒト胎盤バリア極性構造の再構築 化学とマイクロ・ナノシステム学会第33回研究会、東京、2016年4月25-26日

小長谷 周平、栗原 令、岩田 博夫 ヒト iPS 細胞由来臍島の大量調製に向けた三次元分化培養 第

15 回日本再生医療学会総会 大阪、2016 年 3 月 17-19 日

小長谷 周平、榎原 令、岩田 博夫 ヒト iPS から膵内分泌細胞への高効率分化 第 43 回日本膵・膵島移植研究会 広島、2016 年 3 月 4-5 日

榎原 令、岩田 博夫 環状ペプチド担持ハイドロゲルにより皮下に作製した免疫寛容部位への膵島移植 第 43 回日本膵・膵島移植研究会、広島、2016 年 3 月 4-5 日

小長谷周平 ヒト iPS 細胞の自動培養装置の開発 COI2021 会議、東京、2016 年 1 月 29-30 日

有馬祐介, モデル系を用いた細胞-材料間および細胞-細胞間相互作用の解析 平成 27 年度高分子学会北陸支部富山地区講演会、富山、2016 年 1 月 19 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。

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。

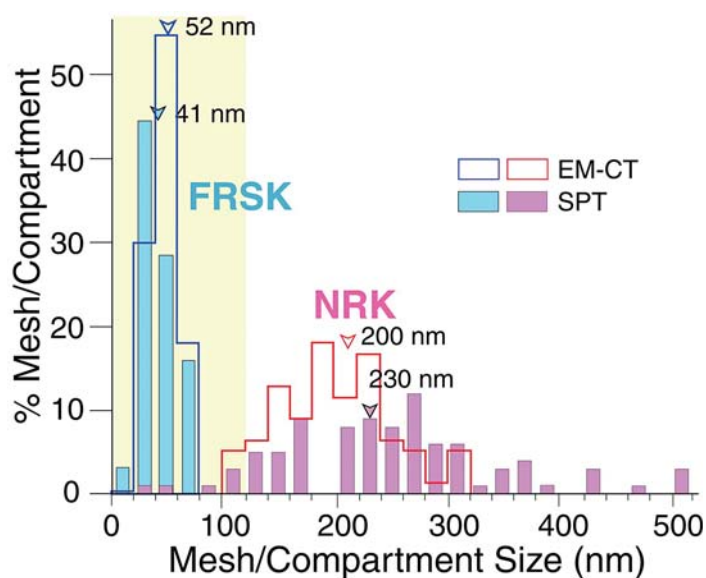


図 1

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

- Fujiwara, T.K., Iwasawa, K., Kalay, Z., Tsunoyama, T.A., Watanabe, Y., Umemura, Y.M., Murakoshi, H., Suzuki, K.G.N., Nemoto, Y.L., Morone, N., and Kusumi, A. (2016). Confined diffusion of transmembrane proteins and lipids induced by the same actin meshwork lining the plasma membrane. **Mol. Biol. Cell.** 27 (7), 1101-1119.
- Komura, N., Suzuki, K.G.N., Ando, H., Konishi, M., Koikeda, M., Imamura, A., Chadda, R., Fujiawra, T.K., Tsuboi, H., Sheng, R., Cho, W., Furukawa, K., Furukawa, K., Yamauchi, Y., Ishida, H., Kusumi, A., and Kiso, M. (2016). Raft-based interactions of gangliosides with a GPI-anchored receptor. **Nat. Chem. Biol.** 12 (6), 402-410.

Yamada, T., Yoshimura, H., Shimada, R., Hattori, M., Eguchi, M., Fujiwara, T.K., Kusumi, A., and Ozawa, T. (2016). Spatiotemporal analysis with a genetically encoded fluorescent RNA probe reveals TERRA function around telomeres. **Sci. Rep.** 6, (in press).

List of Presentations

Kusumi, A. Ultrafast single-molecule imaging for understanding signaling at the cell membrane. 1st Microscopy Mela: 8th International Bangalore Microscopy Course, Bangalore, September 25-26, 2016.

Kusumi, A. Very transient molecular interactions enable signal transduction: findings by single-molecule tracking. Xth International Workshop on EPR in Biology and Medicine. Krakow, October 2-6, 2016.

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
助教	亀尾 佳貴	Assist. Prof.	Yoshitaka Kameo
助教	都賀谷紀宏	Assist. Prof.	Toshihiro Togaya
特定助教	平島 剛志	Proj. Assist. Prof.	Tsuyoshi Hirashima

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、医科学を含む学際的研究を行っている。2016年においては、細胞間張力の作用下における α カテニン分子の適応的な力感知メカニズムを解明した。また、神経管形成における細胞活動の力学的役割の一端を、実験・数理の融合研究により解明した。

1) 張力作用下における α カテニンの適応的な力感知メカニズム

発生期の形態形成にみられる組織変形は、個々の細胞が生み出す張力により駆動される。接着結合の構成要素である α カテニンは、細胞間張力を感知し、増幅する機能を有することが近年の研究で明らかとなっている。 α カテニンは、細胞間張力のもとでその立体構造を変化させ、ビンキュリンを誘導することにより、アクチン細胞骨格の再構築を制御することが示唆されている。しかしながら、張力そのものは生体分子をアンフォールディングさせてしまうことが知られている。本研究では、 α カテニンが張力作用下で活性化状態を維持するメカニズムを明らかにすることを目的とし、AFM ナノ引張試験を行った (Fig. 1a)。その結果、 α カテニンに張力が作用すると、分子内のドメイン間相互作用の低下に伴い、その立体構造が変化し、アンフォールディングしにくい状態でシグナル分子を待ち受ける適応的な張力感知メカニズムが存在することが明らかとなった (Fig. 1b)。さらに、ビンキュリンの結合により、張力の作用下で活性化した

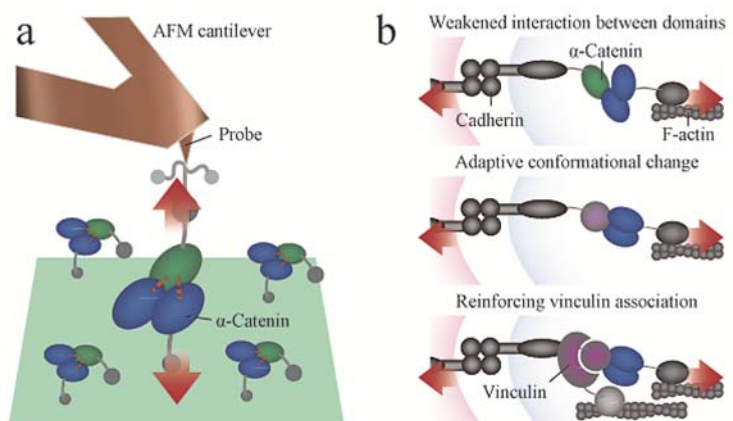


Fig. 1. (a) AFM nano-tensile testing for α -catenin. (b) Mechano-adaptive conformational change of α -catenin.

α カテニンの構造が力学的に強化されることが示された。これらの結果から、 α カテニンの適応的な構造変化に伴うビンキュリンとの親和性の変化が、力学的に安定な α カテニン-ビンキュリン複合体の形成を導くことが示唆された。

2) アフリカツメガエルの神経管形成における頂端収縮、細胞伸長、細胞移動の力学的役割

中枢神経系の発生では、神経管形成における神経管閉鎖は重要なプロセスである。神経板の変形を伴う神経管形成には、細胞レベルの力学的挙動が必要であると考えられおり、我々は、アフリカツメガエル胚の神経管閉鎖を対象に、細胞活動の力学的役割を検討した。アフリカツメガエル胚の神経板は、重層化しており、表層の神経細胞では、細胞伸長と頂端収縮が生じ、深層における深部細胞では、正中線方向への細胞移動が生じる。これら3つの細胞活動が神経管形成に力学的に十分であるかどうかを検証するために、3次元バーテックスモデルを用い、神経管閉鎖のプロセスをシミュレーションした (Fig. 2)。この結果、細胞伸長と協調した頂端収縮により、細胞形状は頂端側に細い楔状に変化し、神経板の管形状への折りたたみが急速に生じることがわかった。しかしながら、これら2つの細胞活動のみでは、完全な神経管閉鎖には不十分であることが明らかとなった。これら2つの細胞活動に協調して、深部細胞の正中線方向への移動による組織変形が生じることで、完全な神経管閉鎖が達成されることがわかった。これらのことから、細胞伸長、頂端収縮、ならびに、細胞移動は、神経管閉鎖に必要不可欠な力学的役割を担っていることがわかった。

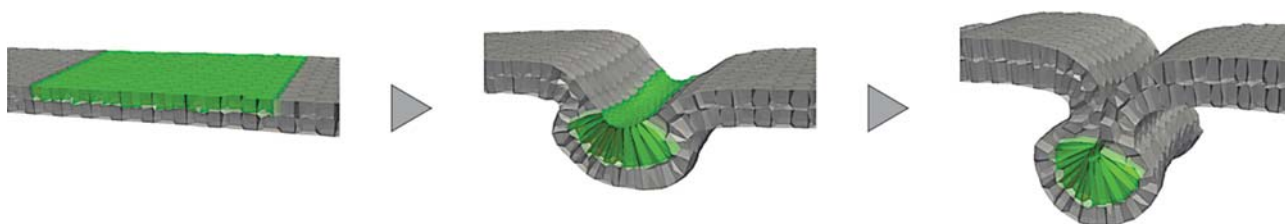


Fig. 2. Multicellular dynamics simulation suggests that the combination of cell elongation, apical constriction and cell movement is mechanically sufficient to accomplish neural tube closure in *Xenopus*.

This laboratory aims at clarifying the self-organized regulation mechanism of a diversity of biological phenomena through an interdisciplinary approach, including mechanics, life science, and medical science. In 2016, we revealed an adaptive tension-sensory mechanism of α -catenin molecule under intercellular tension. We also clarified a mechanical role of cell activities in neural tube formation using mathematical modeling and simulation of multicellular dynamics in collaboration with experiments.

1) Adaptive mechano-sensory mechanism of α -catenin under tension

The tensile forces in individual cells drive tissue deformation in morphogenesis. In the process, α -catenin molecule acts as a tension sensor at cadherin-based adherens junctions (AJs), accelerating the positive feedback of intercellular tension. Under tension, α -catenin is activated to recruit vinculin, which recruits actin

filaments to AJs. In this study, we revealed how α -catenin retains its activated state while avoiding unfolding under tension. Based on nano-tensile testing using atomic force microscopy (AFM), as shown in Fig. 1a, we found that mechanically activated α -catenin fragment exhibited higher mechanical stability than a non-activated fragment (Fig. 1b). The results of our experiments using mutated and segmented fragments showed that the key intramolecular interactions acted as a conformational switch. We also found that the conformation of α -catenin was reinforced by vinculin binding. We demonstrate that α -catenin adaptively changes its conformation under tension to a stable intermediate state, binds to vinculin, and finally settles into a more stable state reinforced by vinculin binding. Our data suggest that the plastic characteristics of α -catenin, revealed in response to both mechanical and biochemical cues, enable the functional-structural dynamics at the cellular and tissue levels.

2) Mechanical roles of apical constriction, cell elongation, and cell migration during neural tube formation in *Xenopus*.

Neural tube closure is an important and necessary process during the development of the central nervous system. The formation of the neural tube structure from a flat sheet of neural epithelium requires several cell morphogenetic events and tissue dynamics to account for the mechanics of tissue deformation. Cell elongation changes cuboidal cells into columnar cells, and apical constriction then causes them to adopt apically narrow, wedge-like shapes. In addition, the neural plate in *Xenopus* is stratified, and the non-neural cells in the deep layer (deep cells) pull the overlying superficial cells, eventually bringing the two layers of cells to the midline. Thus, neural tube closure appears to be a complex event in which these three physical events are considered to play key mechanical roles. To test whether these three physical events are mechanically sufficient to drive neural tube formation, we employed a three-dimensional vertex model and used it to simulate the process of neural tube closure (Fig. 2). The results suggest that apical constriction cued the bending of the neural plate by pursing the circumference of the apical surface of the neural cells. Neural cell elongation in concert with apical constriction further narrowed the apical surface of the cells and drove the rapid folding of the neural plate, but was insufficient for complete neural tube closure. Migration of the deep cells provided the additional tissue deformation necessary for closure. To validate the model, apical constriction and cell elongation were inhibited in *Xenopus laevis* embryos. The resulting cell and tissue shapes resembled the corresponding simulation results.

List of Publications

- Guo, L., Yamashita, H., Kou, I., Takimoto, A., Meguro-Horike, M., Horike, S., Sakuma, T., Miura, S., Adachi, T., Yamamoto, T., Ikegawa, S., Hiraki, Y., and Shukunami, C. (2016). Functional investigation of a non-coding variant associated with adolescent idiopathic scoliosis in zebrafish: elevated expression of the ladybird homeobox gene causes body axis deformation. *PLOS Genet.* 12, #e1005802.
- Han, S.-W., Shin, H.-K., and Adachi, T. (2016). Nanolithography of amyloid precursor protein cleavage with

- β -secretase by atomic force microscopy. **J. of Biomed. Nanotech.** *12*, 546-553.
- Takeishi, N., Imai, Y., Ishida, S., Omori, T., Kamm, R.D., and Ishikawa, T. (2016). Cell adhesion during bullet motion in capillaries. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.** *311*, 395-403.
- Hasegawa, M., Adachi, T., and Takano-Yamamoto, T. (2016). Computer simulation of orthodontic tooth movement using CT image-based voxel finite element models with the level set method. **Comput. Methods Biomed. Eng.** *19*, 474-483.
- Maki, K., Han, S.-W., Hirano, Y., Yonemura, S., Hakoshima, T., and Adachi, T. (2016). Mechano-adaptive sensory mechanism of α -catenin under tension. **Sci. Rep.** *6*, #24878.
- Inoue, Y., and Adachi, T. (2016). Mechanosensitive kinetic preference of actin-binding proteins to the actin filament. **Phys. Rev. E** *93*, #042403.
- Suzuki, M., Nakayama, M., Tsuji, K., Adachi, T., and Shimono, K. (2016). Electrochemical polymerization of PEDOT/biomolecule composite films on microelectrodes for the measurement of extracellular field potential. **Electrochemistry** *84*, 354-357.
- Shimizu, T., Otsuki, B., Fujibayashi, S., Takemoto, M., Ito, H., Sakamoto, T., Adachi, T., and Matsuda, S. (2016). Spontaneous anterior arch fracture of the atlas following C1 laminectomy without fusion: a report of three cases and finite element analysis. **J. Orthop. Sci.** *21*, 306-315.
- Kameo, Y., Ootao, Y., and Ishihara, M. (2016). Theoretical investigation of the effect of bending loads on the interstitial fluid flow in a poroelastic Lamellar Trabecula. **J. Biomech. Sci. Eng.** *11*, #15-00663.
- Han, S.-W., Sugimoto, T., Shin, H.-K., Epureanu, B., and Adachi, T. (2016). Evaluation of kinesin head-microtubule binding stability changes influenced by microtubule-binding molecules. **J. Nanosci. Nanotech.** *16*, 7186-7190.
- Okuda, S., Inoue, Y., Eiraku, M., Adachi, T., and Sasai, Y. (2016). Modeling cell apoptosis for simulating three-dimensional multicellular morphogenesis based on reversible network reconnection framework. **Biomech. Model. Mechanobiol.** *15*, 805-816.
- Miyoshi, H., Suzuki, K., Ju, J., Ko, J.S., Adachi, T., and Yamagata, Y. (2016). A perturbation analysis to understand the mechanism how migrating cells sense and respond to a topography in the extracellular environment. **Anal. Sci.** *32*, 1207-1211.
- Inoue, Y., Suzuki, M., Watanabe, T., Yasue, N., Tateo, I., Adachi, T., and Ueno, N. (2016). Mechanical roles of apical constriction, cell elongation, and cell migration during neural tube formation in xenopus. **Biomech. Model. Mechanobiol.** *15*, 1733-1746.
- Maki, K., Nakao, N., and Adachi, T. (2017). Nano-mechanical characterization of tension-sensitive helix bundles in talin rod. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** *484*, 372-377.

List of Presentations

- Adachi, T. Role of mechanical forces that shape living tissues and organs: multiscale modeling and simulation. 2nd International Symposium on Nanoarchitectonics for Mechanobiology, Tsukuba, July 27-28, 2016.
- Inoue, Y. Three-dimensional vertex simulation of multicellular dynamics for understanding mechanics of epithelial tissue morphogenesis. BioImage Informatics Conference 2016, Singapore, October 10-12, 2016.
- Adachi, T. Mechanical force feedback in multicellular morphogenesis: in silico & in vitro studies. Columbia University Biomedical Seminar, New York, USA, November 4, 2016.
- Adachi, T. Computational biomechanics of multicellular tissue morphogenesis. The 3rd Joint Workshop between E-JUST and SRTA-City on Advanced Materials and Its Applications, Egypt-Japan University of Science and Technology (E-JUST), Alexandria, Egypt, November 28, 2016.
- Adachi, T. Role of mechanical force feedback in multicellular morphogenesis: in silico and in vitro Studies. The 16th International Conference on Biomedical Engineering (ICBME2016), Singapore, December 6-9, 2016.
- Enomoto, Y., Inoue, Y., Yonemura, S., and Adachi, T. Three-dimensional vertex simulation on smooth surface maintenance of growing epithelial tissue based on intercellular mechano-feedback. Biophysical Society 60th Annual Meeting, Los Angeles, USA, February 27-March 2, 2016.
- Hirashima, T., and Adachi, T. Adaptive multicellular dynamics via directional mechanosensing for homeostatic radial size of proliferating tube. Mechanobiology, Vietnam, June 26-July 2, 2016.
- Takeishi, N., Imai, Y., Yamaguchi, T., and Ishikawa, T. Similarities and differences between flow mode of a leukocyte and circulating tumor cell in microvessels. Summer Biomechanics, Bioengineering and Biotransport Conference, Maryland, USA, June 29-July 2, 2016.
- Maki, K., and Adachi, T. Mechano-adaptive conformational change of α -catenin to sense and transmit intercellular force. 22th Congress of the European Society of Biomechanics (ESB2016), Lyon, France, July 10-13, 2016.
- Kameo, Y., Mitsunaga, S., Ootao, Y., and Ishihara, M. Trabecular bone remodeling simulation considering microstructure of lacuno-canalicular porosity. 22th Congress of the European Society of Biomechanics (ESB2016), Lyon, France, July 10-13, 2016.
- Inoue, Y., and Adachi, T. Thermodynamic basis for mechanosensitive kinetics of actin remodeling. STATPHYS26, Lyon, July 18-22, 2016.
- Inoue, Y., and Adachi, T. Force-velocity relation in membrane protrusion driven by actin polymerization. The 12th World Congress on Computational Mechanics (WCCM XII) and the 6th Asia-Pacific Congress on

Computational Mechanics (APCOM VI), Seoul, Korea, July 24-29, 2016.

Kameo, Y., Ootao, Y., and Ishihara, M. Poroelastic analysis of interstitial fluid flow in a lamellar osteon subjected to cyclic loading. The 12th World Congress on Computational Mechanics (WCCM XII) and the 6th Asia-Pacific Congress on Computational Mechanics (APCOM VI). Seoul, Korea, July 24-29, 2016.

Adachi, T. Modeling and simulation of bone functional adaptation by remodeling. Seminar at KAIST, Daejeon, Korea, September 27, 2016.

Adachi, T. Nanomechanical behaviors of mechanosensitive molecules under tension revealed by AFM. E-JUST MSE Advanced Seminar (MSE702), Alexandria, Egypt, October 30, 2016.

Takeishi, N., Imai, Y., Ishida, S., Omori, T., Kamm, R.D., and Ishikawa, T. Numerical analysis of cell adhesion in capillary flow. 69th Annual Meeting of the APS Division of Fluid Dynamics, Massachusetts, USA, November 20-22, 2016.

Inoue, Y. Multicellular dynamics simulation on epithelial tissue deformation. Japan-Austria joint meeting "Understanding the logic behind developmental dynamics", IST Austria, Klosterneuburg, Austria. November 28-29, 2016.

井上康博 上皮折り畳みの多細胞力学シミュレーション 基生研研究会「物理学は生物現象の謎を解けるか」、岡崎、2016年1月5-6日

井上康博、榎本祥英、米村重信、安達泰治 頂端収縮調整に関する細胞メカノフィードバックの数理モデル 第68回日本細胞生物学会大会・日本ケミカルバイオロジー学会第11回年会合同大会、京都、2016年6月15-17日

安達泰治 生体組織・器官の形づくり：多階層システムバイオメカニクス 北海道大学大学院工学研究科人間システムデザイン、札幌、2016年9月29-30日

安達泰治 立体組織の形態形成における力の役割：*in silico* 実験 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2016、福岡、2016年11月21-22日

都賀谷紀宏 歯科技工士教育—近未来の歯科技工業界を見据えて 第34回DLPフォーラム、横浜、2016年11月26日

奥田覚、井上康博、安達泰治、永樂元次 多細胞の三次元組織形成シミュレーションのためのアポトーシスの数理モデル化 日本機械学会バイオエンジニアリング部門第28回バイオエンジニアリング講演会、東京、2016年1月9-10日

榎本祥英、井上康博、米村重信、安達泰治 細胞における収縮力-形状フィードバックを考慮した上皮細胞の形態変化シミュレーション 日本機械学会バイオエンジニアリング部門第28回バイオエンジニアリング講演会、東京、2016年1月9-10日

牧功一郎、安達泰治 細胞間張力を感知する α カテニンの力学的分子適応メカニズム 日本機械学

会バイオエンジニアリング部門第28回バイオエンジニアリング講演会、東京、2016年1月9-10日

広橋佑紀、牧功一郎、安達泰治 α カテニンに対するビンキュリン結合のAFM分子イメージング
日本機械学会バイオエンジニアリング部門第28回バイオエンジニアリング講演会、東京、2016年1月9-10日

今井桂、亀尾佳貴、井上康博、安達泰治 骨の機能的適応現象におけるリモデリングシグナルの作用
日本機械学会バイオエンジニアリング部門第28回バイオエンジニアリング講演会、東京、2016年1月9-10日

藤井宣成、須長純子、亀尾佳貴、上岡寛、安達泰治 力学的負荷にともなう骨細胞動態解析に向けた組織内細胞形態の定量化
日本機械学会バイオエンジニアリング部門第28回バイオエンジニアリング講演会、東京、2016年1月9-10日

武石直樹、今井陽介、山口隆美、Roger D. Kamm、石川拓司 細管内における細胞の接着シミュレーション
日本機械学会バイオエンジニアリング部門第28回バイオエンジニアリング講演会、東京、2016年1月9-10日

安達泰治 生体組織の形態形成と機能的適応の多階層バイオメカニクス 第32回 Kyoto Orthopaedic Seminar (日本整形外科学会研修講演)、京都、2016年1月12日

亀尾佳貴 力学環境下における骨の機能的適応の数値バイオメカニクス 平成27年度京都大学再生医科学研究若手発表会、京都、2016年1月21日

Adachi, T. The role of mechanical forces that shape living tissue and organs: Multiscale modelin and simulation. Kyoto Winter School 2016: From Materials to Life: Multidisciplinary Challenges, February 22, 2016.

井上康博 上皮形態形成の多細胞力学シミュレーション 医工学フォーラム、京都、2016年2月24日

平島剛志、安達泰治 増殖する上皮管の径サイズ維持を支える多細胞動態システム 生命動態システム科学四拠点・CREST・PRESTO・理研QBiC合同シンポジウム「生命動態の分子メカニズムと数理」、広島、2016年3月25-26日

平島剛志、安達泰治 Adaptive cellular behavior for homeostatic radial size in proliferating tube. CDB Symposium 2016、神戸、2016年3月28-30日

武石直樹、今井陽介、Roger D. Kamm、石川拓司 微小循環内における細胞接着の数値解析 第21回計算工学講演会、新潟、2016年5月31日-6月2日

平島剛志、安達泰治 Adaptive system of multicellular dynamics for homeostatic radial size of proliferating tube. 49th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists (JSDB)、熊本、2016年5月31日-6月3日

- 安達泰治 骨の代謝と機能的適応の数理バイオメカニクス 骨リモデリング研究会 (MSD)、東京、2016年6月5日
- 平島剛志、安達泰治 増殖する上皮管の径サイズ恒常維持に働く多細胞動態システムについて 日本細胞生物学会／日本ケミカルバイオロジー学会、京都、2016年6月15-17日
- 安達泰治 生体組織・器官の形づくりのバイオメカニクス 岡山大学歯科矯正学セミナー特別講演、岡山、2016年7月1日
- 亀尾佳貴 骨小腔—骨細管系の微細構造を考慮した骨梁リモデリングシミュレーション 第18回生命科学研究所シンポジウム、京都、2016年7月7-8日
- 都賀谷紀宏、松井義和 レーザー溶接の基礎とレーザー溶接デモンストレーション 第8回歯科レーザー加工フォーラム、鹿児島、2016年7月9日
- 田中智代、星島光博、須長純子、西田崇、安達泰治、上岡寛 骨組織の3次元タイムラプスイメージングによる細胞内カルシウム応答の解析 第34回日本骨代謝学会学術集会／第3回アジア太平洋骨代謝学会、大阪、2016年7月20-23日
- 金英寛、亀尾佳貴、田中栄、安達泰治 骨細管内の微視的挙動を考慮した巨視的な骨再構築駆動力の検討 日本機械学会2016年度年次大会、福岡、2016年9月12-14日
- 三輪将也、亀尾佳貴、安達泰治 骨細管内の間質液流れによるシグナル分子移流拡散シミュレーション 日本機械学会2016年度年次大会、福岡、2016年9月12-14日
- 松村保之、須長純子、亀尾佳貴、安達泰治 組織内骨細胞の形態変化過程の解明を目指した実験手法の検討 日本機械学会2016年度年次大会、福岡、2016年9月12-14日
- 寶珠山美歩、平島剛志、安達泰治 力学的環境に依存する細胞凝集構造の形態イメージング解析 日本機械学会2016年度年次大会、福岡、2016年9月12-14日
- 金英寛、亀尾佳貴、田中栄、安達泰治 骨細胞による微視的な力学刺激感知機構を考慮した巨視的な骨リモデリング数理モデルの提案 第43回日本臨床バイオメカニクス学会、札幌、2016年10月8-9日
- 平島剛志、安達泰治 増殖する上皮管の径サイズ恒常維持に働く適応的な多細胞動態システム 日本発生物学会秋季シンポジウム2016、三島、2016年10月20日
- 仲尾信彦、牧功一郎、安達泰治 ECMに刺激されたインテグリン—アクチン構造体の成熟過程におけるナノ力学特性評価 日本機械学会第27回バイオフィロンティア講演会、札幌、2016年10月22-23日
- 芦谷遼太郎、須長純子、亀尾佳貴、安達泰治 マウス頭蓋冠と長管骨における単離骨細胞の形態比較 日本機械学会第27回バイオフィロンティア講演会、札幌、2016年10月22-23日
- 竹田宏典、亀尾佳貴、安達泰治 Finite element analysis of optic-cup morphogenesis mechanically

regulated by tissue growth and constriction. 日本機械学会第 27 回バイオフィロントニア講演会、札幌、2016 年 10 月 22-23 日

安藤悠太、須長純子、安達泰治 Cell shapes within self-organized optic cup from embryoid body 日本機械学会第 27 回バイオフィロントニア講演会、札幌、2016 年 10 月 22-23 日

牧功一郎、安達泰治 Nanofishing and structural imaging of tension-sensor protein employing atomic force microscopy. 日本機械学会第 27 回バイオフィロントニア講演会、札幌、2016 年 10 月 22-23 日

宮雄貴、亀尾佳貴、中島友紀、安達泰治 骨保護作用を有するシグナル分子を考慮した骨代謝数理モデルの構築 日本機械学会第 27 回バイオフィロントニア講演会、札幌、2016 年 10 月 22-23 日

立尾樹、井上康博、安達泰治 空間的に制御された細胞増殖がもたらす上皮管状組織形成の多細胞力学シミュレーション 日本機械学会第 27 回バイオフィロントニア講演会、札幌、2016 年 10 月 22-23 日

牧功一郎、安達泰治 Mechanical, structural and functional dynamics of α -catenin molecule at intercellular adherens junctions. 第 54 回日本生物物理学会年会、つくば、2016 年 11 月 25-27 日

井上康博、安達泰治 Physics of actin mechanosensing IGER International Symposium on “Now in actin study: Motor protein research reaching a new stage.” 愛知、2016 年 12 月 12-13 日

仲尾信彦、牧功一郎、安達泰治 Actin remodeling in nascent focal adhesion explored by integrin nanofishing IGER International Symposium on “Now in actin study: Motor protein research reaching a new stage.” 愛知、2016 年 12 月 12-13 日

「書籍、総説」

Spasic, M., Maki, K., Herzog, F.A., and Jacobs, C.R. Effects of Mechanical Stress on Cells. Comprehensive Biomaterials II. Second Edition, Elsevier (in press)

平島剛志、安達泰治 細胞間で働く力の受容と細胞応答による生体組織中の力の制御 実験医学、増刊号：再生医療と疾患解明の鍵となる組織幹細胞、2016-10 vol. 34、No. 17、pp. 40-45.

安達泰治 力学環境下における骨欠損内部の骨梁形態形成の予測 CLINICAL CALCIUM, 特集：メカノバイオサイエンス～力の科学と医療の最前線～、2016-12、Vol. 26、No. 12、pp. 129 (1779)-137 (1787).

安達泰治 骨再生用スキャフォールド構造設計の計算医工学支援 医学のあゆみ、医歯薬出版、2016-6、vol. 257、No. 10、pp. 1112-1118

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

本研究室は、免疫学とウイルス学の両者からの生命現象の解明を目的として研究を進めている。2016年には、ヒト造血能を有する”ヒト化マウス”モデルを用いてエイズの原因ウイルス HIV のヒトへの適応進化過程の再現・解析実験に取り組んだ。また、レンチウイルスがどのようにしてそれぞれの宿主に適応してきたのかを明らかにするために、分子進化学と実験ウイルス学の学際融合研究を展開し、レンチウイルスとほ乳類の進化的軍拡競争原理の解明に繋がる知見を得た。蝦名博貴は平成 28 年 1 月に阪大微生物病研究会に異動した。上田修平は平成 28 年 3 月に生命科学研究科修士課程を修了し、神戸大学大学院に進学した。吉川禄助は平成 28 年 6 月に長崎大学に異動した。

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

推定感染者数が 3000 万人を超えるほどのパンデミックを引き起こした HIV-1 は、一連の分子系統樹解析から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・適応進化したことより生まれたと推測されている (Keele et al, Science, 2006)。しかしながら、SIVcpz がどのようにヒトへの適応進化を遂げ、パンデミック HIV-1 へ変貌したのか、その詳細は明らかではない。本研究では、SIVcpz のヒトへの適応進化メカニズムを再現・解明を目的として、パンデミック HIV-1 にもっとも近縁な SIVcpz MB897 株、そうではない SIVcpz 2 株、パンデミック HIV-1 株を培養細胞とヒト化マウスモデル（ヒト造血幹細胞移植マウス）を使って評価した。その結果培養細胞では、各 SIVcpz の感染性および各ウイルスタンパク質の発現様式に差異は見られなかった。一方、ヒト化マウスモデルでは、興味深いことに、パンデミック HIV-1 に関連のない SIVcpz に比べ、SIVcpz MB897 株の増殖性と病原性はいずれもパンデミック HIV-1 のそれらにきわめて酷似していた。以上の結果より、もともとヒトへの適応性の高かった SIVcpz が人間集団に侵入し、パンデミック HIV-1 へと変貌したことが示唆された。

2) イエネコ APOBEC3Z3 遺伝子の多型と FIV 感受性との関係性

ヒトを含むほ乳類細胞は、宿主制御因子 (restriction factor) あるいは内因性免疫 (intrinsic immunity) と呼ばれるウイルス複製阻害タンパク質を発現している。一方ウイルスは、その宿主制御因子を中和するタンパク質を進化の過程で獲得してきたことが次々と明らかになってきた。宿主制御因子の代表例は、レンチウイルスの複製を強力に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である。一方、レンチウイルスは、viral infectivity factor

(Vif) というタンパク質をコードして、ユビキチン/プロテアソーム経路を活性化して、A3 を特異的に分解し、宿主の A3 による抗ウイルス作用を拮抗させている。

レンチウイルスの一種であるネコ免疫不全ウイルス (FIV) も Vif をコードしており、宿主であるイエネコの A3 タンパク質を分解することでその抗ウイルス能を相殺する。最近、イエネコ A3Z3 遺伝子には少なくとも 7 つの多型が存在することが報告された。本研究では、イエネコ A3Z3 遺伝子の多型の抗ウイルス活性や FIV の Vif に対する感受性を検討するとともに、これらの多型の分子進化学的解析を行った。まず、イエネコ A3Z3 の 65 番目のコドンが正の選択を受けていること、全ての A3Z3 多型は、*vif* 欠損 FIV に対して同程度の抗ウイルス活性を示す一方、あるひとつの多型 (ハプロタイプ 5) は FIV の Vif の分解能に対して抵抗性を示すことがわかった。A3Z3 各多型のアミノ酸の比較解析により、正の選択を受けていた 65 番目のアミノ酸が Vif に対する感受性決定に介在する残基であることが分かった。以上の結果より、イエネコの進化の過程において、約 30,000 年前に出現したハプロタイプ 5 は、太古の FIV やそれに近縁なウイルスに対して抵抗性であったため、自然選択されてきたのではないかと考えられる。

3) ウシ科 APOBEC3Z3 とウシレンチウイルスの進化的軍拡競争の分子ウイルス学的理解

先行研究からウシ族 (tribe Bovini) の細胞には、A3Z3 という抗レンチウイルス活性を有する A3 が発現していることが分かっている。そして、ウシ族には、ウシ免疫不全ウイルス (BIV) とジェンブラナ病ウイルス (JDV) という、系統・病原性・地理的分布が大きく異なるレンチウイルスが知られている。本研究では、ウシ族の A3 遺伝子を決定し、それらと 2 つのウシレンチウイルス (BIV, JDV) の Vif の相互作用を分子ウイルス学的実験によって検証し、ウシ族動物とレンチウイルスの進化的軍拡競争原理を理解することを目的とした。

まず、ウシ族のすべての動物種 (ウシ、ゼブウ、ヨーロッパバイソン、バンテン、ガウル、アメリカバイソン、ヤク) の体毛・組織を日本国内の動物園から入手し、そのゲノム DNA から PCR 法により各ウシ族動物種のすべての A3 遺伝子の配列を決定した。得られた遺伝子情報から実験ウイルス学的解析と分子系統学解析を実施し、ガウルというウシ族動物種の A3Z3 が、JDV Vif による分解に抵抗性を示すことが分かった。さらに、ガウル A3Z3 の JDV Vif 抵抗性は、正の自然選択を受けている 62 と 92 番目のアミノ酸が規定していた。興味深いことに、ガウルの棲息域は東アジア大陸であるのに対し、JDV はインドネシアの離島 (バリ島、スマトラ島など) でのみ分離・同定されたウイルスであることから、現在のガウルと JDV の分布に地理的重複はない。しかしながら、地質学的研究から現在半島・諸島となっているインドネシア地域は、最終氷期 (約 7 万年前 ~ 1 万年前) には「スンダランド (Sundaland)」という陸地であったことが明らかになっている。これらのことから、ガウルと JDV (あるいはその祖先ウイルス) には地理的な交流が過去にあり、それがウシ族とウシレンチウイルスの共進化・進化的軍拡競争の駆動力となっていたことが強く示唆された (Fig. 1)。本研究は、分子系統学と実験ウイルス学を駆使した学際共同研究であり、アジア大陸においてほ乳類とレンチウイルスの進化的軍拡競争が行われていたことを強く示唆する研究成果である。

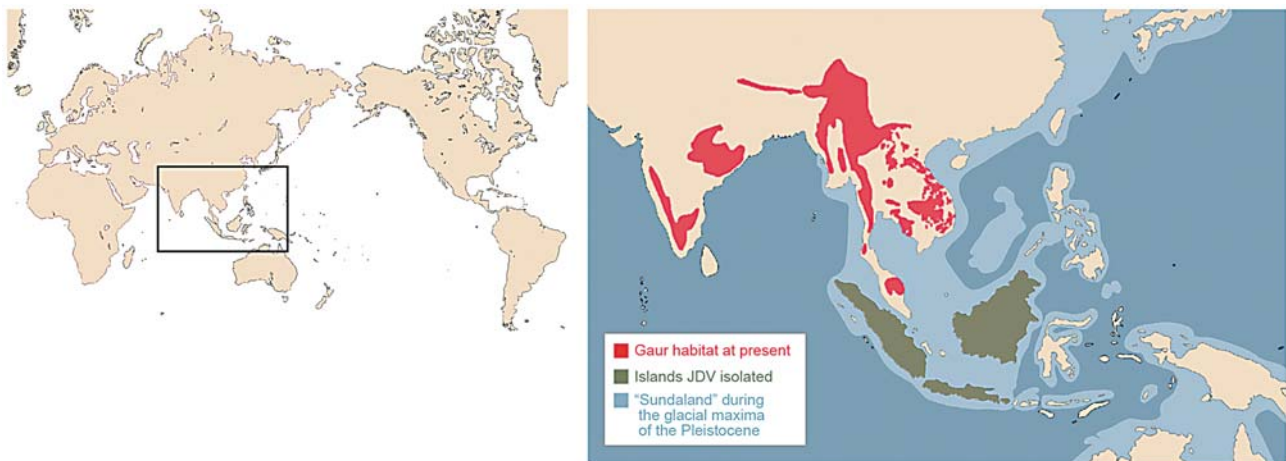


Fig. 1. Biogeographical insight into the acquisition of resistance to JDV Vif-mediated degradation in gaur A3Z3. The Asian area boxed in the world map (left) is enlarged to the right. (Right) The land at present is shown in light beige. The current habitat of gaur (red), while the islands in Southeastern Asia, where JDV is detected (Bali, Borneo, Java, and Sumatra), is shown in green. “Sundaland”, where gaur may have been exposed during the glacial maxima of the Pleistocene, is shown in light blue.

Our laboratory aims to understand the dynamics of virology from multiple scientific viewpoints. In 2016, we recapitulated the evolutionary dynamics of the emergence of human immunodeficiency virus (HIV) using “humanized mouse”, which possesses human leukopoiesis. We also investigated the evolutionary arms race of lentiviruses and mammals through the combinational approaches of experimental virology and molecular evolution. Hirotaka Ebina moved to BIKEN and Shuhei Ueda graduated in Master course of Graduate School of Biostudies. Rokusuke Yoshikawa moved to Nagasaki University.

1) Gain-of-function evolution of SIVcpz in humanized mouse model

HIV-1 has emerged through cross-species transmission of SIVcpz from chimpanzees to humans around 100 years ago (Keele et al, Science, 2006). However, it is unclear how SIVcpz has evolved as pandemic HIV-1 in humans. To address this question, we inoculated 3 SIVcpz strains (MB897, EK505, and MT145) and 4 HIV-1 group M strains into human hematopoietic-stem cell-transplanted humanized mice. We revealed that the viral pathogenicity was significantly correlated to the level of peak viral load during the acute phase of infection. Interestingly, the peak viral load of MB897, which is phylogenetically similar to HIV-1 group M, was comparable to that of HIV-1 group M and was significantly higher than those of the other SIVcpz strains. Moreover, by sequencing viral RNA in the plasma of infected humanized mice, we identified a non-synonymous mutation augmenting viral replication capacity in both in vitro and in vivo. Taken together, this is the first investigation experimentally demonstrating the dynamics of cross-species adaptive evolution of SIVcpz into humans using an animal model.

2) A naturally occurring domestic cat APOBEC3 variant confers resistance to FIV infection

APOBEC3 (A3) DNA cytosine deaminases can be incorporated into progeny virions and inhibit lentiviral

replication. On the other hand, viral infectivity factor (Vif) of lentiviruses antagonizes A3-mediated antiviral activities by degrading A3 proteins. It is known that domestic cat (*Felis catus*) APOBEC3Z3 (A3Z3), the ortholog of human APOBEC3H, potently suppresses the infectivity of vif-defective feline immunodeficiency virus (FIV). Although a recent report has shown that domestic cat encodes 7 haplotypes (hap I to VII) of A3Z3, the relevance of A3Z3 polymorphism in domestic cats with FIV Vif has not yet been addressed. In this study, we demonstrated that these feline A3Z3 variants suppress vif-defective FIV infectivity. We also revealed that codon 65 of feline A3Z3 is a positively selected site and that A3Z3 hap V is subject to positive selection during evolution. It is particularly noteworthy that feline A3Z3 hap V is resistant to FIV Vif-mediated degradation and still inhibits vif-proficient viral infection. Moreover, the side chain size, but not the hydrophobicity, of the amino acid at position 65 determines the resistance to FIV Vif-mediated degradation. Taken together, these findings suggest that feline A3Z3 hap V may have been selected for escape from an ancestral FIV. This is the first evidence for an evolutionary “arms race” between the domestic cat and its cognate lentivirus.

3) Evolutionary arms race between bovine lentiviruses and bovine APOBEC3Z3

Mammals have co-evolved with lentiviruses for a long time. As evidence, viral infectivity factor (Vif), encoded by lentiviruses, antagonizes the anti-viral action of cellular APOBEC3 of their hosts. Here, we address the co-evolutionary dynamics of bovine APOBEC3 and the following two bovine lentiviruses: bovine immunodeficiency virus (BIV) and Jembrana disease virus (JDV). We determined the sequences of three APOBEC3 genes of bovids belonging to the genera Bos and Bison and showed that bovine APOBEC3Z3 is under a strong positive selection. We found that APOBEC3Z3 of gaur, a bovid in the genus Bos, acquired resistance to JDV Vif-mediated degradation after diverging from the other bovids through conversion of the structural composition of the loop 1 domain. Interestingly, the resistance of gaur APOBEC3Z3 can be attributed to the positive selection of residue 62. This study provides the first evidence, suggesting that a co-evolutionary arms race between bovids and lentiviruses occurred in Asia.

List of Publications

- Suzuki, Y., Chin, W.X., Han, Q.E., Ichiyama, K., Lee, C.H., Eyo, W.Z., Ebina, H., Takahashi, H., Takahashi, C., Tan, B.H., Hishiki, T., Ohba, K., Matsuyama, T., Koyanagi, Y., Tan, Y.J., Sawasaki, T., Chu, J.J.H., Vasudevan, S.G., Sano, K. and Yamamoto, N. (2016) Characterization of RyDEN (C19orf66) as an interferon-stimulated cellular inhibitor against dengue virus replication. **PLOS Pathog.** 12:e1005357.
- Ebina, H., Gee, P. and Koyanagi, Y. Perspectives of genome-editing technologies 1 for HIV therapy. (2016) **Curr HIV Res.** 14:2-8.
- Yoshikawa, R., Izumi, T., Yamada, E., Nakano, Y., Misawa, N., Ren, F., Carpenter, M.A., Ikeda, T., Münk, C., Harris, R.S., Miyazawa, T., Koyanagi, Y. and Sato, K. (2016) A naturally occurring domestic cat

APOBEC3 variant confers resistance to FIV infection. **J. Virol.** 90 (1):474-485.

Yoshikawa, R., Nakano, Y., Yamada, E., Izumi, T., Misawa, N., Koyanagi, Y. and Sato, K. (2016) Species-specific differences in the ability of feline lentiviral Vif to degrade feline APOBEC3 proteins. **Microbiol. Immunol.** 60 (4):272-279.

Ikeda, H., Nakaoka, S., de Boer, R.J., Morita, S., Misawa, N., Koyanagi, Y., Kazuyuki Aihara, Sato, K. and Iwami, S. (2016) Quantifying the effect of Vpu on the promotion of HIV-1 replication in the humanized mouse model. **Retrovirology** 13:23.

Yoshikawa, R., Izumi, T., Nakano, Y., Yamada, E., Moriwaki, M., Misawa, N., Ren, F., Kobayashi, T., Koyanagi, Y. and Sato, K. (2016) Small ruminant lentiviral Vif proteins commonly utilize cyclophilin A, an evolutionary and structurally conserved protein, to degrade ovine and caprine APOBEC3 proteins. **Microbiol. Immunol.** 60 (6):427-436.

Zhang, Z., Gu, Q., Vasudevan, A.A.J., Hain, A., Kloke, B., Hasheminasab, S., Mulnaes, D., Sato, K., Cichutek, K., Häussinger, D., Bravo, I.G., Smits, S.H.J., Gohlke, H. and Münk, C. (2016) Determinants of FIV and HIV Vif Sensitivity of Feline APOBEC3 Restriction Factors. **Retrovirology** 13 (1):46.

Ueda, S., Ebina, H., Kanemura, Y., Misawa, N. and Koyanagi, Y. (2016) Insufficient anti-HIV-1 potency of the CRISPR/Cas9 system for full viral replication. **Microbiol. Immunol.** 60:483-496.

Desimmie, B.A., Burdick, R.C., Izumi, T., Doi, H., Shao, W., Alvord, W.G., Sato, K., Koyanagi, Y., Jones, S., Wilson, E., Hill, S., Maldarell, F., Hu, W.-S. and Pathak, V.K. (2016) APOBEC3 proteins can copackage and comutate HIV-1 genomes. **Nucleic Acids Res.** 44 (16):7848-7865.

Ishii, H., Matsuoka, S., Nomura, T., Nakamura, M., Shiino, T., Sato, Y., Iwata-Yoshikawa, N., Hasegawa, H., Mizuta, K., Sakawaki, H., Miura, T., Koyanagi, Y., Naruse, T.K., Kimura, A. and Matano, T. (2016) Association of lymph-node antigens with lower Gag-specific central-memory and higher Env-specific effector-memory CD8 (+) T-cell frequencies in a macaque AIDS model. **Sci. Rep.** 6:30153.

Yamada, E., Yoshikawa, R., Nakano, Y., Misawa, N., Kobayashi, T., Ren, F., Izumi, T., Miyazawa, T., Koyanagi, Y. and Sato, K. (2016) A naturally occurring bovine APOBEC3 confers resistance to bovine lentiviruses: implication for the co-evolution of bovines and their lentiviruses. **Sci. Rep.** 6:33988.

Martyushev, A., Nakaoka, S., Sato, K., Noda, T. and Iwami, S. (2016) Modelling Ebola virus dynamics: implications for therapy. **Antiviral Res.** 135:62-73.

佐藤佳、小柳義夫 . (2016) HIV-1 と APOBEC のせめぎ合い . 生化学 88 巻 第 5 号 , 569-575.

List of Presentations

Sato, K., Misawa, N., Takeuchi, J.S., Kobayashi, T., Yamada, E., Nakano, Y., Yoshikawa, R. and Koyanagi, Y. Gain-of-function evolution of SIVcpz in humanized mouse model. Cold Spring Harbor Retrovirus

meeting, New York, USA, May 26, 2016. [ポスター発表]

Desimmie, B.A., Burdick, R.C., Izumi, T., Doi, H., Shao, W., Alvord, W.G., Sato, K., Koyanagi, Y., Jones, S., Wilson, E., Hill, S., Maldarelli, F., Hu, W.-S. and Pathak, V.K. APOBEC3 proteins can co-package and co-mutate the same HIV genomes. Cold Spring Harbor Retrovirus meeting, New York, USA, May 24, 2016. [口頭発表]

Ueda, M., Kurosaki, Y., Izumi, T., Nakano, Y., Oloniniyi, O.K., Yasuda, J., Koyanagi, Y., Sato, K. and Nakagawa, S. Functional mutations in spike glycoprotein of Zaire ebolavirus associated with an increase in infection efficiency. 日本進化学会第 18 回東京大会、東京、8 月 25-28 日, 2016. [口頭発表]

Sato, K. Investigation of the interplay between cellular proteins and HIV-1-encoding proteins using humanized mouse model. The 15th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, September 6-9, 2016. [口頭発表 (シンポジウム)]

Ueda, S., Ebina, H., Kanemura, Y., Misawa, N. and Koyanagi, Y. T Anti-HIV potency of the CRISPR/Cas9 system is insufficient to fully inhibit viral replication. The 15th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, September 6-9, 2016.

Nakano, Y., Moriwaki, M., Juarez-Fernandez, G., Yoshikawa, R., Yamada, E., Soper, A., Misawa, N., Sato, K. and Koyanagi, Y. HIV-1 quickly overcomes anti-viral activity of APOBEC3H in vivo. The 15th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, September 6-9, 2016. [ポスター発表]

小柳義夫. ゲノム編集法への期待と限界. 第 18 回白馬シンポジウム、山梨, 10 月 7-8 日. [口頭発表]

Koyanagi, Y. HIV-1 evolution: Gain-of-function evolution of SIVcpz. The 23rd East Asia Joint Symposium, Taipei, October 18-20, 2016. [口頭発表]

Koyanagi, Y., Sato, M. Evolution of HIV-1 from SIVcpz in an Experimental Model. 2nd International Symposium on “Molecular Basis of Virus-Host Interactions”. Sapporo, October 22, 2016. [口頭発表]

Nakano, Y., Moriwaki, M., Juarez-Fernandez, G., Yoshikawa, R., Yamada, E., Soper, A., Misawa, N., Sato, K. and Koyanagi, Y. Impact of endogenous APOBEC3H haplotypes on HIV-1 replication in vivo. 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Sapporo, October 23-25. [口頭発表]

Yamada, E., Misawa, N., Masaki Ueda, Sato, K., and Koyanagi, Y. Contribution of anti-tetherin activity of HIV-1 Vpu on viral replication during the acute phase of infection in humanized mouse model. 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Sapporo, October 23-25. [口頭発表]

Yoshikawa, R., Takeuchi, J.S., Yamada, E., Nakano, Y., Izumi, T., Kimura, Y., Ren, F., Miyazawa, T., Sato, K. and Koyanagi, Y. Evolutionary loss-of-function strategy of feline immunodeficiency virus against feline APOBEC3 proteins. 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Sapporo, October 23-25. [口頭発表]

Koyanagi, Y. Virus researches using humanized mice. 64th Annual Meeting of the Japanese Society for

Virology, Sapporo, October 23-25. [口頭発表]

Soper, A., Misawa, N., Yamada, E., Nakano, Y., Moriwaki, M., Aso, H., Yoshikawa, R., Sato, K. and Koyanagi, Y. Evaluation of artificial HIV-1 heterogeneity in vitro and in vivo. 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Sapporo, October 23-25. [ポスター発表]

森脇美優、山田英里、三沢尚子、Soper Andrew、吉川禄助、中野雄介、佐藤佳、小柳義夫 . 生体モデルにおける HIV-1 グループ間の増殖効率の比較検討 . 64th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Sapporo, October 23-25. [ポスター発表]

Koyanagi, Y., Is HIV-1 persistent OR/AND latent in vivo? 第 30 回日本エイズ学会学術集会・総会, 鹿児島, 11 月 24 日 -26 日 . [口頭発表]

Juarez-Fernandez, G., Nakano, Y., Moriwaki, M., Yoshikawa, R., Yamada, E., Soper, A., Misawa, N., Sato, K. and Koyanagi, Y.. Role of HIV-1 Vif against APOBEC3H activity in vivo. 第 30 回日本エイズ学会学術集会・総会, 鹿児島, 11 月 24 日 -26 日 . [ポスター発表]

上田真保子、黒崎陽平、泉泰輔、中野雄介、Oloniniy K. Olamide、安田二郎、小柳義夫、佐藤佳、中川草 . エボラウイルス糖蛋白質 (GP) の 82 番目と 544 番目のアミノ酸変異は感染効率に関与する . 第 39 回日本分子生物学会年会, 横浜, 11 月 30 日 -12 月 2 日 . [ポスター発表]

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

本分野では、神経幹細胞の増殖と分化の制御を目指して、その分子機構を探っている。多分化能を持った神経幹細胞は自己複製をしつつ、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトという3種類の細胞を生み出す。塩基性領域・ヘリックス・ループ・ヘリックス (bHLH) 因子である *Ascl1/Mash1*, *Hes1*, *Olig2* は、それぞれニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトの運命決定を行うとともに、いずれも神経幹細胞の増殖に働く。ライブイメージング解析の結果、これら3種類の因子の発現が神経幹細胞では振動すること、運命決定時には選ばれた1種類の因子の発現が増えて持続することを明らかにした。次に、新たに開発した光遺伝学的方法によって *Ascl1* の発現を誘導したところ、*Ascl1* の発現が振動すると神経幹細胞の増殖が活性化され、*Ascl1* の発現が持続するとニューロン分化が起こることが分かった。さらに、*Hes1* や *Ascl1* によって制御される Notch リガンド *Delta-like1* (*Dll1*) の発現も神経幹細胞で振動しており、この発現振動が神経幹細胞の増殖や維持に重要であることが分かった。

1) *Delta-like1* の発現振動が形態形成に重要

Notch シグナルは、細胞間相互作用を通じて形態形成を制御する。Notch シグナルのエフェクターである *Hes1* や *Hes7* の発現は振動し、それぞれ神経分化や体節形成といった発生過程を制御する。Notch リガンドの *Delta-like1* (*Dll1*) mRNA の発現も振動するが、*Dll1* タンパク質の発現動態は不明で、振動したとしてもその意義はよくわかっていなかった。本研究では *Dll1* タンパク質のライブイメージング系を開発し、神経幹細胞や未分節中胚葉において *Dll1* タンパク質の発現が振動することを見出した。*Dll1* 遺伝子を短くあるいは長くすることで、それぞれ *Dll1* の発現を加速化あるいは遅延化させたところ、*Dll1* の発現振動が現弱し、定常発現に近づいた (Fig. 1)。また、*Hes1* や *Hes7* の発現振動も弱まり、定常発現に近づいた。その結果、体節の癒合が起こり、体節由来の組織である椎骨や肋骨も癒合した (Fig. 1)。さらに、発生期の脳では神経幹細胞の増殖が抑制され、神経分化が促進した。逆に、光遺伝学的手法で *Dll1* の発現振動を誘導すると、神経幹細胞の増殖が活性化された。これらの結果から、正しいタイミングでの *Dll1* の発現が発現振動ネットワークにとって必須であること、細胞間の振動的相互作用が形態形成にとって重要であることが明らかになった。

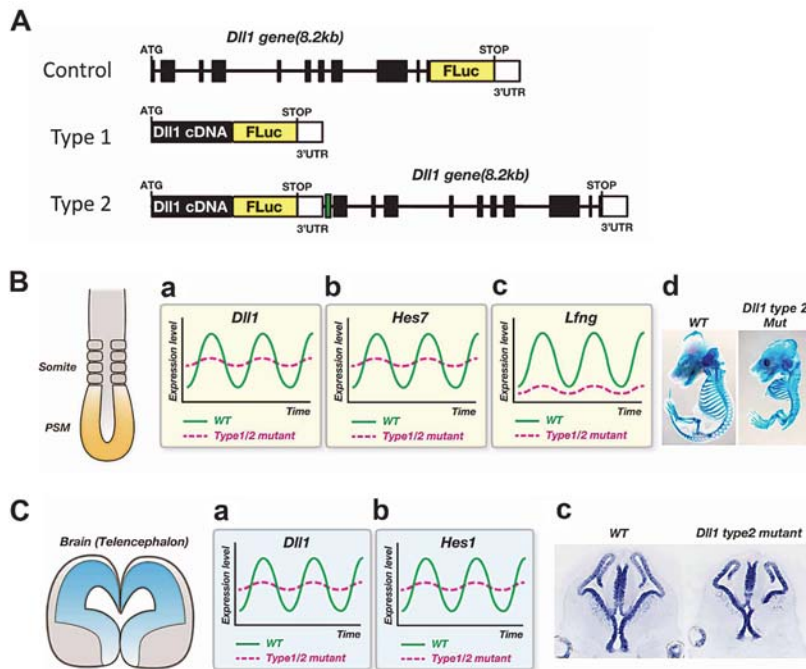


Fig. 1. The phenotypes of *Dll1* type 1 and type 2 mutant mice. (A) Structures of control, and Type 1- and Type 2-mutant *Dll1* genes. (B) In both type 1 and type 2 mutants, oscillatory expression of *Dll1*, *Hes7*, and *Lfng* is dampened, resulting in severe fusion of vertebrae and ribs. (C) In both type 1 and type 2 mutants, oscillatory expression of *Dll1* and *Hes1* is dampened, resulting in microcephaly.

2) 異なる振動動態を統一的に説明する数理モデル

神経幹細胞や未分節中胚葉細胞では、それぞれ *Hes1* および *Hes7* がネガティブフィードバックによって自律的に発現振動を引き起こす。さらに、*Hes1* や *Hes7* によって周期的に抑制されることによって *Dll1* の発現も振動する。*Dll1* は隣接細胞の *Hes1* や *Hes7* の発現を誘導することから、*Dll1* の発現振動の情報が隣接細胞に伝わる (Fig. 2Aa)。その結果、神経幹細胞間は逆位相で、未分節中胚葉細胞間は同位相で振動するが、なぜ異なる振動動態になるのかはよくわかっていない。この発現制御ネットワークは、隣接細胞間で *Hes* が抑制しあうダブルネガティブフィードバックループに簡略化できる (Fig. 2Ab)。数理モデルを構築した結果 (Fig. 2Ac)、細胞間制御にかかる時間 τ_2 によって、振動が同位相になったり、逆位相になったり、あるいは停止しうることが明らかになった (Fig. 2B)。

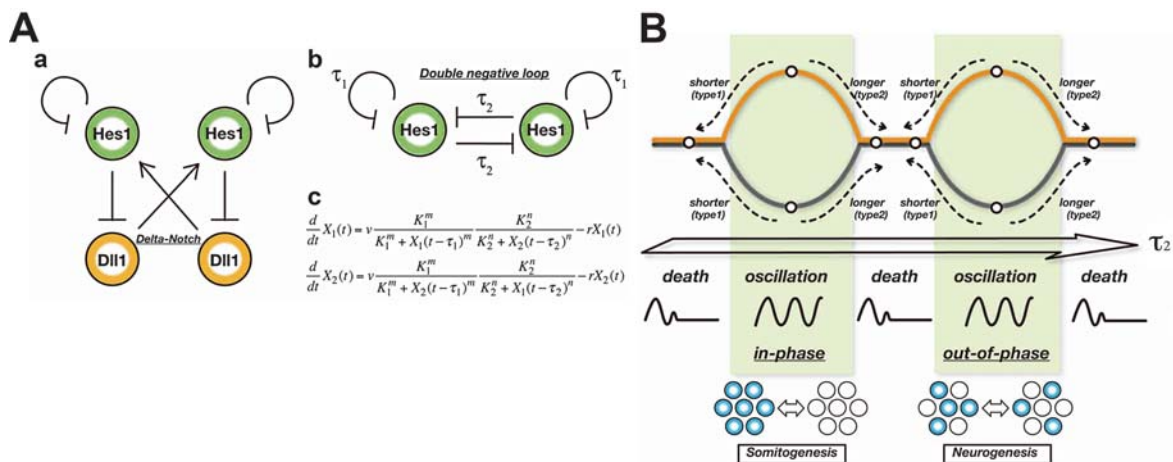


Fig. 2. Mathematical modeling for different oscillatory dynamics.

This laboratory aims to understand the mechanism of proliferation and differentiation of neural stem cells. Multipotent neural stem cells undergo self-renewal while giving rise to three cell lineages, neurons, astrocytes, and oligodendrocytes. It has been shown that the basic-helix-loop-helix (bHLH) transcription factors *Ascl1/Mash1*, *Hes1*, and *Olig2* regulate not only the fate choice of neurons, astrocytes, and oligodendrocytes, respectively, but also the proliferation of neural stem cells. Live imaging analysis revealed that these factors are expressed in an oscillatory manner by neural stem cells, whereas one of the factors becomes dominant and sustained in each differentiation lineage. Our new optogenetic approach to control expression of *Ascl1* showed that oscillatory *Ascl1* expression maintains proliferating neural stem cells, whereas sustained *Ascl1* expression promotes neuronal fate determination. We also found that the Notch ligand Delta-like1 (*Dll1*) expression, which is controlled by *Hes1* and *Ascl1*, oscillates in neural stem cells, and that *Dll1* oscillation is important for maintenance and proliferation of these cells.

1) Oscillatory control of Delta-like1 in cell interactions regulates dynamic gene expression and tissue morphogenesis

Notch signaling regulates tissue morphogenesis through cell-cell interactions. The Notch effectors *Hes1* and *Hes7* are expressed in an oscillatory manner and regulate developmental processes such as neurogenesis and somitogenesis, respectively. Expression of the mRNA for the mouse Notch ligand Delta-like1 (*Dll1*) is also oscillatory. However, the dynamics of *Dll1* protein expression are controversial, and their functional significance is unknown. Here, we developed a live-imaging system and found that *Dll1* protein expression oscillated in neural progenitors and presomitic mesoderm cells. Notably, when *Dll1* expression was accelerated or delayed by shortening or elongating the *Dll1* gene, *Dll1* oscillations became severely dampened or quenched at intermediate levels, as modeled mathematically. Under this condition, *Hes1* and *Hes7* oscillations were also dampened. In the presomitic mesoderm, steady *Dll1* expression led to severe fusion of somites and their derivatives, such as vertebrae and ribs. In the developing brain, steady *Dll1* expression inhibited proliferation of neural progenitors and accelerated neurogenesis, whereas optogenetic induction of *Dll1* oscillation efficiently maintained neural progenitors. These results indicate that the appropriate timing of *Dll1* expression is critical for the oscillatory networks and suggest the functional significance of oscillatory cell-cell interactions in tissue morphogenesis.

2) Mathematical modeling for different oscillatory dynamics

Hes1 and *Hes7* are expressed in an oscillatory manner in neural stem cells and presomitic mesoderm (PSM) cells, respectively. *Hes1* and *Hes7* oscillations periodically repress *Dll1* expression, thereby driving *Dll1* oscillation. Because *Dll1* up-regulates *Hes1* and *Hes7* expression in neighboring cells, the information of *Dll1* oscillation may be transmitted between neighboring cells (Fig. 2Aa). As a result, neighboring neural stem cells and PSM cells exhibit anti-phase and in-phase oscillations, respectively, but the mechanism of such different oscillatory dynamics is not known. These regulatory pathways can be simplified as double negative feedback loops (Fig. 2Ab). Mathematical modeling (Fig. 2Ac) suggests that gene oscillations are anti-phase,

in-phase, or dampened, depending on the delay required for intercellular regulation (τ_2 in Fig. 2B).

List of Publications

Shimojo, H., Isomura, A., Ohtsuka, T., Kori, H., Miyachi, H., and Kageyama, R. (2016). Oscillatory control of Delta-like1 in cell interactions regulates dynamic gene expression and tissue morphogenesis. **Genes & Dev.** *30*, 102-116.

Shimojo, H. and Kageyama, R. (2016). Oscillatory control of Delta-like1 in somitogenesis and neurogenesis: a unified model for different oscillatory dynamics. **Semin. Cell Dev. Biol.** *49*, 76-82.

Shimojo, H. and Kageyama, R. (2016) Making waves towards the shore by synchronicity. **Dev. Cell** *36*, 358-359.

Souilhols, C., Lendinez, J.G., Rybtsov, S., Murphy, F., Wilson, H., Hills, D., Batsivari, A., Binagui-Casas, A., McGarvey, A.C., MacDonald, H.R., Kageyama, R., Siebel, C., Zhao, S., Medvinsky, A. (2016). Developing HSCs become Notch independent by the end of maturation in the AGM region. **Blood** *128*, 1567-1577.

下條博美、影山龍一郎 (2016). 形態形成を司る Notch リズム **実験医学** *34*, 397-403.

List of Presentations

Kageyama, R. Oscillatory control of multipotency and fate choice of neural stem cells. Cortical Organization 3. Tokyo, Feb 11-12, 2016.

Kageyama, R. Understanding the mechanism of biological events by validating mathematical modeling. Kyoto Winter School 2016, Kyoto, Feb 15-26, 2016.

Maeda, Y., and Kageyama, R. How does Hes1 oscillation control cell cycle progression? The 14th International Student Seminar. Kyoto, March 9-14, 2016.

Kageyama, R. Oscillatory control of neural stem cells. The 9th Annual Meeting for Japanese Developmental Neuroscientists. Tokyo, March 18-19, 2016.

Shimojo, H., Kori, H., Isomura, A., Ohtsuka, T., Miyachi, H., and Kageyama, R. Dynamic expression of Notch ligand Dll1 during development. CDB Symposium. Kobe, March 28-30, 2016.

Kageyama, R. Oscillatory control of neural stem cells. Swiss-Kyoto Joint Symposium on Life Science. Kyoto, June 13, 2016.

Kageyama, R. Dynamic control of neural stem cells. 第 39 回日本神経科学大会、横浜、2016 年 7 月 20-22 日

Shimojo, H., Isomura, A., Ohtsuka, T., Kori, H., Miyachi, H., and Kageyama, R. Oscillatory Control of Delta-

Like1 in Cell Interactions Regulates Dynamic Gene Expression and Tissue Morphogenesis. 第 39 回日本神経科学大会、横浜、2016 年 7 月 20-22 日

Kageyama, R. Dynamic control of neural stem cells. Volga Neuroscience Meeting 2016, Saint Petersburg-Nizhny Novgorod, Russia, July 24-30, 2016.

Shimojo, H., Kori, H., Isomura, A., Ohtsuka, T., Miyachi, H., and Kageyama, R. Oscillatory Control of Delta-Like1 in Cell Interactions Regulates Dynamic Gene Expression and Tissue Morphogenesis. Gordon Research Seminar. Lewiston, USA, July 30-31, 2016.

Kobayashi, K. and Kageyama, R. Single-Cell Quantification of Synchronized Oscillation in the Mouse Segmentation Clock. Gordon Research Conference. Lewiston, USA, July 31- August 5, 2016.

Shimojo, H., Kori, H., Isomura, A., Ohtsuka, T., Miyachi, H., and Kageyama, R. Oscillatory Control of Delta-Like1 in Cell Interactions Regulates Dynamic Gene Expression and Tissue Morphogenesis. Gordon Research Conference. Lewiston, USA, July 31- August 5, 2016.

Shimojo, H., Kori, H., Isomura, A., Ohtsuka, T., Miyachi, H., and Kageyama, R. Oscillatory Control of Delta-Like1 in Cell Interactions Regulates Dynamic Gene Expression and Tissue Morphogenesis. 第 89 回日本生化学会大会、仙台、2016 年 9 月 25-27 日

Shimojo, H., Kori, H., Isomura, A., Ohtsuka, T., Miyachi, H., and Kageyama, R. Oscillatory Control of Delta-Like1 in Cell Interactions Regulates Dynamic Gene Expression and Tissue Morphogenesis. The 10th Notch Meeting. 三島、2016 年 10 月 5-6 日

Kobayashi, K., Niino, Y., Miyawaki, A., and Kageyama, R. Single-cell quantification of mouse segmentation clock. The 10th Notch Meeting. 三島、2016 年 10 月 5-6 日

Kageyama, R. Understanding the mechanism of biological events by using mathematical modeling. Life Science Seminars of EPFL. Lausanne, Switzerland, Oct 14, 2016.

Kageyama, R. Dynamic control of neural stem cells. IST, Vienna, Austria, Oct 18, 2016.

Shimojo, H., Kori, H., Isomura, A., Ohtsuka, T., Miyachi, H., and Kageyama, R. Oscillatory Control of Delta-Like1 in Cell Interactions Regulates Dynamic Gene Expression and Tissue Morphogenesis. 日本発生生物学会 秋季シンポジウム 2016、三島、2016 年 10 月 19-21 日

Shimojo, H., Kori, H., Isomura, A., Ohtsuka, T., Miyachi, H., and Kageyama, R. Ultradian oscillations in Notch signaling during tissue morphogenesis. Sapporo Symposium on Biological Rhythm. 札幌、2016 年 11 月 9-10 日

Shimojo, H., Kori, H., Isomura, A., Ohtsuka, T., Miyachi, H., and Kageyama, R. Notch signaling dynamics during murine morphogenesis. 第 39 回日本分子生物学会年会、横浜、2016 年 11 月 30 日 -12 月 2 日

影山龍一郎 神経幹細胞のダイナミックな制御 第 48 回日本結合組織学会学術大会、長崎、2016 年

6月24-25日

影山龍一郎 数理モデルを使って生命現象を理解する 第28回高遠・分子細胞生物学シンポジウム、高遠、2016年8月25-26日

小林久美子、新野祐介、宮脇敦史、影山龍一郎 分節時計遺伝子 Hes7 の発現同期機構の解明 第28回高遠・分子細胞生物学シンポジウム、高遠、2016年8月25-26日

前田勇樹、影山龍一郎 オプトジェネティクスを用いた Hes1 の発現振動による細胞周期制御メカニズムの解析 第28回高遠・分子細胞生物学シンポジウム、高遠、2016年8月25-26日

影山龍一郎 短周期遺伝子発現リズムの動作原理と意義 第23回日本時間生物学会学術大会、名古屋、2016年11月12-13日

磯村彰宏 光遺伝学による遺伝子発現リズムの細胞間情報伝達機構の解明 第39回日本分子生物学会年会、横浜、2016年11月30日-12月2日

影山龍一郎 受精から体ができるまで 世界トップレベル研究拠点プログラム10周年記念講演会「日本の科学の未来に向けて」、東京、2016年12月17日

生体情報分野
Laboratory of Integrated Biological Information

Prof. Daron M. Standley

We develop novel computational methods in order to understand the biological function of proteins involved in immune responses. In 2016, we made progress in several areas: 3D modeling of immune repertoires, miRNA integration with gene expression data and a new feature in the MAFFT multiple sequence alignment algorithm.

1) Structural modeling of immune repertoires

Emerging technology is enabling the sequencing of individual antibody and T cell receptors on a vast scale, opening up the possibility of observing the dynamics of adaptive immune responses under various conditions. We have extended the view of such data to the molecular level by modeling antibodies and T cell receptors in 3D to atomic resolution and then carrying out clustering and flexible docking of epitopes. Such simulations have several practical uses. First, we can use structure-based clustering to identify populations of antibodies or T cell receptors that appear in specific cohorts (e.g., high vs. low risk groups) or time points (e.g., pre/post vaccination). Second, we can analyze binding propensities of complimentary determining regions in order to understand which epitopes are driving observed B or T cell populations. Third, we can dock putative epitopes or antibodies to structural models of T cell receptors or antibodies. The success of such a structure-based approach depends largely on the accuracy of the underlying simulations. For this reason, we have developed various structural modeling resources, including OSCAR, an atomic-level protein force-field; Kotai Antibody Builder, a tool for modeling antibodies and TCRs in 3D; aaRNA, a tool for residue-level prediction of nucleotide binding sites on proteins. We demonstrated the accuracy of our approach by flexible docking of a single-stranded DNA antigen to an SLE-derived auto-antibody. The model was subsequently validated by x-ray crystallography (manuscript in preparation).

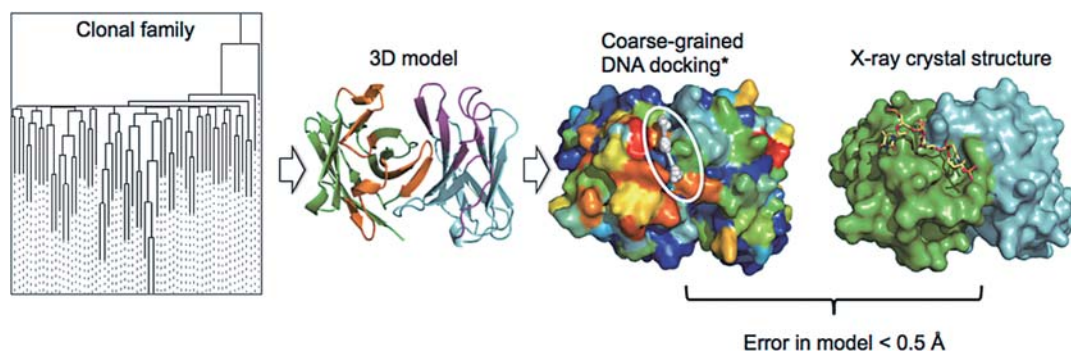


Figure1. From deep-sequencing data to a novel antibody-antigen complex structure.

2) Integration of immune gene expression and microRNA data sets

In the last decade, circulating micro RNAs (miRNAs) have gained attention as a new class of disease biomarkers due to their stability, strong correlation with disease states, and accessibility. In order to be applicable in clinical practice, however, it is important to understand the molecular mechanism of a biomarker's role in disease. When such a "mechanistic" role of an miRNA is identified, it may then be possible to use the biomarker to discover new therapeutic targets, which is an important bottleneck in the pharmaceutical industry. Many miRNAs are important post-transcriptional regulators of gene expression; as such, a mechanistic understanding involves knowledge of their target mRNAs, which can be gained using a range of target prediction methods. Given a set of putative targets for a given circulating miRNA, a natural question to ask is: In which cells or tissues are these genes expressed? As circulating miRNAs co-localize with many immune cells, which, in turn, mediate host responses to many different diseases, we speculated that the target genes of circulating miRNAs might be enriched in peripheral immune cells. It has previously been shown that more than half of solid tumor biomarkers reported in the literature are highly expressed in blood cells. Independently, a number of important miRNAs targeting immune pathways have been described in the literature.

Given the co-localization of circulating miRNA and immune cells, we sought to quantify the relationship between circulating miRNAs and genes preferentially expressed in mammalian immune cells. Specifically, we proposed two testable hypotheses:

1. Circulating miRNAs are more immune-specific than other miRNAs
2. Immune-related genes are more circulating miRNA-specific than other genes

These two hypotheses can be compared against publically available data using previously defined immune-related genes sets for humans and mice along with established target prediction methods. To this end, we constructed a consensus-based predictor.

The target prediction accuracy was improved by the consensus-based method. Our consensus-based predictor combined target predictions from several methods: Diana-MicroT-CDS, TargetScan, miRDB and miRanda. We validated it on a set of 380 randomly chosen high-confidence miRNA-mRNA targets. We included both high-confidence experimental data and high-throughput HITS-CLIP and PAR-CLIP interaction. The accuracy of the prediction method (as measured by the Matthews correlation coefficient, MCC, generally decreased with addition of high-throughput data. The consensus method achieved an average MCC value of $.42 \pm .06$ in 10 independent runs, which was higher than that of any of the individual predictors ($.38 \pm .07$, $.36 \pm .04$, $.36 \pm .04$, $.23 \pm .08$ for Diana-MicroT-CDS, TargetScan, miRDB and miRanda, respectively).

Using the consensus method, we confirmed that human circulating miRNAs have an immune-specificity of 0.89 compared with non-circulating miRNAs (0.54), a relationship that was highly significant (p-value <

0.001). Moreover, the same relationship was observed in mice (0.74 for circulating vs. 0.23 for non-circulating miRNAs). Next we confirmed the second hypothesis, that immune-related genes are more circulating miRNA-specific than other genes. The specificity of human immune-related genes to be targeted by circulating miRNAs was 0.34 compared to non-immune genes 0.24). Again, the results were highly significant (p -value < 0.001) and were observed across species (Nosirov, B. et al *Adv Appl Bioinform Chem.* 2017).

3) A new feature to prevent over alignment

Multiple sequence alignment algorithms usually assume that the input consists of homologous sequences. But even homologous sequences can contain regions of low similarity, either due to insertions of intrinsically disordered domains or sequencing errors. We developed a new feature of the MAFFT multiple alignment program to avoid aligning unrelated segments. The new method utilizes a variable scoring matrix for different pairs of sequences (or groups) in a single multiple sequence alignment, based on the global similarity of each pair. The resulting alignments contain significantly fewer mis-aligned regions in both real and simulated data. The approach is based on sound biological reasoning and should be compatible with many methods based on dynamic programming for multiple sequence alignment, in addition to its implementation in MAFFT (Kato and Standley *Bioinformatics*, 2016).

List of Publications

- Yuko Kamikawa, Yuichiro Hori, Kazuo Yamashita, Lin Jin, Shinya Hirayama, Daron M Standley, Kazuya Kikuchi. Design of a protein tag and fluorogenic probe with modular structure for live-cell imaging of intracellular proteins. **Chemical Science** 7, 308-314
- Mariko Yokogawa, Takashi Tsushima, Nobuo N Noda, Hiroyuki Kumeta, Yoshiaki Enokizono, Kazuo Yamashita, Daron M Standley, Osamu Takeuchi, Shizuo Akira, Fuyuhiko Inagaki. Structural basis for the regulation of enzymatic activity of Regnase-1 by domain-domain interactions. **Scientific reports** 6
- Kazutaka Kato, Daron M Standley. A simple method to control over-alignment in the MAFFT multiple sequence alignment program. **Bioinformatics**, btw108
- Kazuya Masuda, Barry Ripley, Kishan Kumar Nyati, Praveen Kumar Dubey, Mohammad Mahabub-Uz Zaman, Hamza Hanieh, Mitsuru Higa, Kazuo Yamashita, Daron M Standley, Tsukasa Mashima, Masato Katahira, Toru Okamoto, Yoshiharu Matsuura, Osamu Takeuchi, Tadamitsu Kishimoto. Arid5a regulates naive CD4⁺ T cell fate through selective stabilization of Stat3 mRNA. **Journal of Experimental Medicine**, jem. 20151289
- Takahisa Kouwaki, Toru Okamoto, Ayano Ito, Yukari Sugiyama, Kazuo Yamashita, Tatsuya Suzuki, Shinji Kusakabe, Junki Hirano, Takasuke Fukuhara, Atsuya Yamashita, Kazunobu Saito, Daisuke Okuzaki, Koichi Watashi, Masaya Sugiyama, Sachiyo Yoshio, Daron M Standley, Tatsuya Kanto, Masashi

Mizokami, Kohji Moriishi, Yoshiharu Matsuura. Hepatocyte Factor JMJD5 Regulates Hepatitis B Virus Replication through Interaction with HBx. **Journal of virology** 90, 3530-3542

List of Presentations

Standley, D.M. Structural analysis of adaptive immune repertoires, 39th annual meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Yokohama, Japan. Nov. 30th, 2016.

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。本年度の主な成果として、神経細胞樹状突起中の mRNA の輸送と分解の協調性の発見と真核生物リボソームの品質管理に関わる新たな因子の発見があげられる。

1) ヒト arc mRNA の樹状突起輸送エレメントは翻訳依存的な RNA 分解活性を持つ

神経細胞における mRNA の局在化は、遺伝子発現の時空間的制御のための重要なプロセスである。mRNA の細胞質内局在化は、しばしば 3' 非翻訳領域 (UTR) の輸送エレメントに依存して起こる。細胞骨格関連タンパク質 arc の mRNA は、神経細胞における局在化 mRNA のひとつであり、その局在化は、樹状突起輸送エレメント (DTE) によって媒介される。arc mRNA はその 3'UTR にイントロンを有するので、ナンセンスコドン依存的 mRNA 分解 (NMD) の天然の標的であると考えられていた。我々は、arc mRNA 3'UTR 中の DTE が NMD 経路とは無関係に RNA の不安定化活性を有することを示す。DTE 単独でレポーター mRNA の不安定性を引き起こすことができ、この分解は翻訳に依存していた。この結果は、DTE が mRNA 輸送および分解という二重の活性を有することを示し、mRNA の新規時空間的制御機構を示唆する。

2) 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。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真核生物がそなえている、ということが近年明らかになってきた。われわれは、PTC に変異がある場合に、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てきた。しかしながらこの 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、これまで知見が得られていなかった。われわれは今回、ある種の機能不全リボソームにこれまでに注目されてこなかった新たな因子が特異的に濃縮していることを報告する。この因子が E3 複合体と物理的相互作用を示したこ

とから、これが目印となって E3 複合体をリクルートしてくる、というモデルが考えられる。この因子がどのようにして機能不全リボソームにだけ結合するかについては、まだ分かっていない。

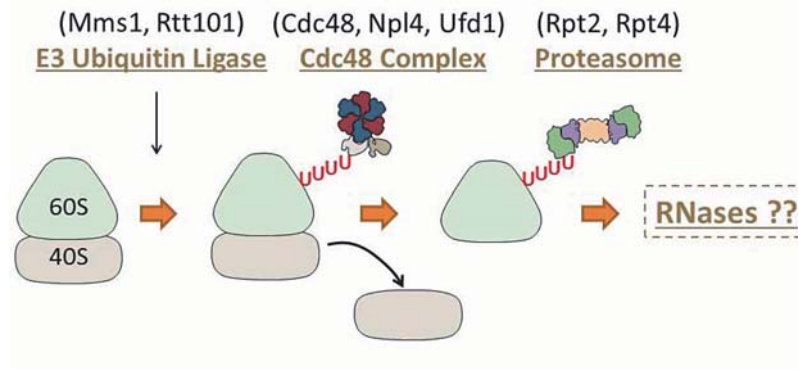


Fig.1 Model of 25S non-functional rRNA decay (NRD)

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) Dendritic Transport Element of human arc mRNA confers RNA degradation activity in a translation-dependent manner

Localization of mRNA in neuronal cells is a critical process for spatiotemporal regulation of gene expression. Cytoplasmic localization of mRNA is often conferred by transport elements in 3' untranslated region (UTR). Activity-regulated cytoskeleton-associated protein (arc) mRNA is one of the localizing mRNAs in neuronal cells, and its localization is mediated by dendritic targeting element (DTE). Since arc mRNA has introns in its 3'UTR, it was thought that arc mRNA is a natural target of nonsense-mediated mRNA decay (NMD). Here we show that DTE in human arc 3'UTR has destabilizing activity of RNA independent of NMD pathway. DTE alone was able to cause instability of the reporter mRNA and this degradation was dependent on translation. Our results indicate that DTE has dual activity in mRNA transport and degradation, which suggests the novel spatiotemporal regulation mechanism of activity-dependent degradation of the mRNA.

2) 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. Here we show 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. Possible mechanisms for the release of the factor from the normal 60S subunits will be discussed.

List of Publications

Ninomiya, K., Ohno, M., Kataoka, N. (2016). Dendritic transport element of human arc mRNA confers RNA degradation activity in a translation-dependent manner. *Genes Cells*. 21 (11), 1263-1269.

竹岩俊彦、谷口一郎、大野睦人 (2016) ncRNA の生合成経路 ノンコーディング RNA (本、廣瀬哲郎・泊幸秀 編) pp223-232 (第 21 章)

List of Presentations

北島真・坂田知子・大野睦人：真核生物リボソームの品質管理に関わる新たな因子、第 4 回 RIBOSOME MEETING、高槻、2016 年 9 月 17-18 日

Kitabatake, M., Sakata, T. and Ohno, M. A bridge that links an E3 ubiquitin ligase complex and nonfunctional 60S ribosomal particles. 18th RNA meeting. Kyoto, Jun 28-Jul 2, 2016

Takeiwa, T. and Ohno, M. Exportin-5 mediates nuclear export of SRP RNA in vertebrates. 18th RNA meeting. Kyoto, Jun 28-Jul 2, 2016

Kitabatake, M., Sakata, T. and Ohno, M. Selective ubiquitination and degradation of defective 60S particles. RNA2016 satellite-symposium. Kyoto, Jun 27, 2016

北島真・坂田知子・大野睦人：真核生物リボソームの合成時における品質管理、第 18 回 Tokyo RNA Club, 東京、2016 年 1 月 14 日

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。2016年は、膜内切断プロテアーゼ RseP と基質との相互作用を解析し、新たな基質結合部位を見出した。また、大腸菌のシグナル認識粒子 (SRP) が如何にして熱ショック転写因子 σ^{32} と相互作用しその機能を制御するかを明らかにした。

1) 大腸菌膜内切断プロテアーゼ RseP の保存された GFG モチーフ領域は基質結合に関わる

膜内切断プロテアーゼ S2P の大腸菌におけるホモログである RseP は、表層ストレス応答制御や内膜の品質管理に関わる。我々は以前、RseP の基質選別機構に関して、i) RseP のペリプラズム領域に存在する PDZ ドメインが、大きなペリプラズムドメインを持つ膜タンパク質の切断を立体障害により防ぐ (size-exclusion filter)、ii) PDZ を通過する基質候補タンパク質の中でも、RseP の膜内挿入ループ領域 (MRE β -loop) によって構造変化を受けうるもののみが RseP に切断される、というモデルを提唱した。しかしながら、このモデルで基質選別を完全に説明できるのかは不明であった。

我々は、MRE β -loop に隣接する領域のアミノ酸配列が保存されていることを見出し、C1N と名付けた。膜不透過性チオール基修飾試薬 AMS による Cys 残基の修飾を指標とした解析から、MRE β -loop と C1N が共に部分的に膜ドメイン内部に挿入していることが示唆された。C1N の中でも特に保存性が高い GFG モチーフ周辺に高次構造を不安定化するアミノ酸置換変異を導入することで RseP の機能が低下したことから、C1N の高次構造が重要であるものと考え

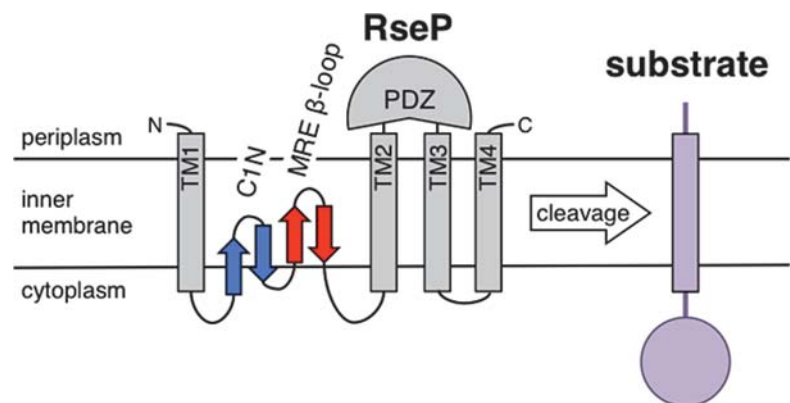


Fig. 1. Schematic representation of RseP and its substrate

られた。タンパク質架橋実験の結果から、C1N の GFG モチーフ内の残基が、MRE β -loop とは独立に基質と相互作用しうることが示唆された。以上の結果等から、C1N は、「MRE β -loop が正常な機能や構造を取ることをサポートする」「MRE β -loop とは別に基質と相互作用する」という 2 つの役割を果たし、RseP の基質認識に寄与していると考えられる (図 1)。

2) 熱ショック転写因子 σ^{32} とシグナル認識粒子の相互作用

熱ショック応答 (HSR) はタンパク質の恒常性維持に主要な役割を果たし、大腸菌においては、熱ショック転写因子 σ^{32} がその中心的な制御に働く。 σ^{32} の活性と量が熱ショック時に一過的に増加することで HSR は誘導され、その後、分子シャペロンによる負の σ^{32} のフィードバック制御 (不活性化・分解) によって終息する。我々は以前に、シグナル認識粒子 (SRP) による σ^{32} の膜への輸送過程が負のフィードバック制御に重要であることを報告した (図 2)。SRP は新生膜タンパク質の膜への輸送過程に働く因子であり、SRP は膜タンパク質の疎水的なシグナルペプチド (膜貫通領域) を認識すると考えられている。しかし、 σ^{32} はそのような疎水的な領域を有しておらず、SRP がどのように σ^{32} を認識するかは依然として不明であった。我々は、生細胞を用いた *in vivo* 光架橋実験やジスルフィド架橋実験を行い、疎水性の低い σ^{32} の保存された制御領域が、SRP 構成タンパク質 Ffh のシグナルペプチド結合部位と相互作用することを明らかにした。さらに、負のフィードバック制御を不全とする σ^{32} 制御領域内の変異によって、 σ^{32} -Ffh 相互作用が不全となることを示した。このことから、HSR の制御には SRP の新規な基質認識機構が重要であることが示唆された。

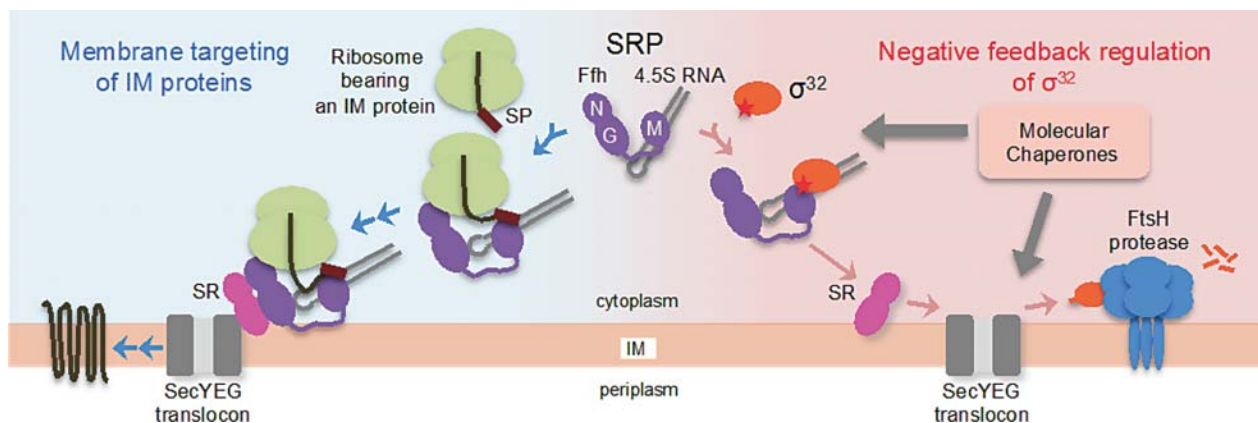


Fig. 2. A novel model for regulation of heat shock factor σ^{32} by SRP

ウイルス・再生医科学研究所の発足に伴い、当研究室はがん遺伝子分野から生体膜システム分野と名前を変え、新たなスタートを切りました。本年は、理学研究科大学院生 (M1) として三宅拓也さん、田中勇真さんが新たに加わりました。一方、坂下宗平さんが修士課程を終了し進学のため研究室を去りました。また、これまでも共同研究を進めていた檜作洋平博士が助教として着任しました。

The research projects carried out in this group 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 2016, we analyzed the substrate interaction of RseP, an *E. coli* S2P family intramembrane protease and showed the presence of a novel substrate interaction site in RseP. We also reported how SRP (signal recognition particle) interacts with *E. coli* heat shock factor σ^{32} to regulate the heat shock response.

1) Involvement of a conserved GFG motif region in substrate binding by RseP, an *Escherichia coli* S2P protease

RseP, an *E. coli* S2P family intramembrane cleaving protease, is involved in regulation of the extracytoplasmic stress response and membrane quality control through specific cleavage of substrates. Recent research suggested that the PDZ domains and the MRE β -loop are involved in substrate discrimination; the former would serve to prevent cleavage of substrates with a large periplasmic domain, whereas the latter would directly interact with the substrate's transmembrane segment and induce its conformational change. However, the mechanisms underlying specific substrate recognition and cleavage by RseP are not fully understood. Here, we investigated the roles of the N-terminal part of the first cytoplasmic loop region (C1N) of RseP that contains a highly conserved GFG motif. A Cys modifiability assay suggested that C1N is partly membrane-inserted like the MRE β -loop. Pro, but not Cys, substitutions in the GFG motif region compromised the proteolytic function of RseP, suggesting the importance of a higher order structure of this motif region. Several lines of evidence indicated that the GFG motif region directly interacts with the substrate and also aids the function of the MRE β -loop, thus contributing to substrate recognition by RseP. These findings provide insights into substrate recognition mechanism by S2P proteases (Fig. 1).

2) Interaction between heat shock transcription factor σ^{32} and signal recognition particle

Heat shock response (HSR) generally plays a major role in sustaining protein homeostasis. In *Escherichia coli*, the activity and amount of the dedicated transcription factor σ^{32} transiently increase upon heat shock. The initial induction is followed by chaperone-mediated negative feedback to inactivate and degrade σ^{32} . Previous work reported that signal recognition particle (SRP)-dependent targeting of σ^{32} to the membrane is essential for feedback control, (Fig. 2) though how SRP recognizes σ^{32} remained unknown. Extensive *in vivo* photo- and disulfide cross-linking studies now reveal that the highly conserved regulatory region of σ^{32} that lacks a consecutive hydrophobic stretch interacts with the signal peptide – binding site of Ffh (the protein subunit of SRP). Importantly, the σ^{32} -Ffh interaction observed was significantly affected by mutations in this region that compromise the feedback regulation. Homeostatic regulation of HSR thus requires a novel type of substrate recognition mechanism by SRP.

List of Publications

- 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.
- Miyazaki, R., Yura, T., Suzuki, T., Dohmae, N., Mori, M., and Akiyama, Y. (2016). A novel SRP recognition sequence in the homeostatic control region of heat shock transcription factor σ^{32} . **Sci. Rep.** 6, 24147.
- Yamagata, Y., Emura, T., Hidaka, K., Sugiyama, H., Endo, M. (2016). Triple Helix Formation in a Topologically Controlled DNA Nanosystem. **Chem. Eur. J.** 22, 1-6.

List of Presentations

- Akiyama, Y. Regulation of *E. coli* heat shock response regulator σ^{32} via SRP protein targeting pathway. 23rd East Asia Joint Symposium/15th Cross-Strait Symposium on Biochemical Research/ 13th Symposium of the Frontiers of Biomedical Sciences, Taipei, Taiwan, October 18-20, 2016.
- 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. 2015 年度国立遺伝学研究所研究会「単細胞の細胞構築・運動・増殖機構の研究」、三島、2016 年 3 月 25-26 日
- 森 博幸 ビブリオ菌 SecDF パラログの発現制御と生理機能. 2015 年度国立遺伝学研究所研究会「単細胞の細胞構築・運動・増殖機構の研究」、三島、2016 年 3 月 25-26 日
- 森 博幸、宮崎亮次、町田裕紀子、三登一八、何あゆみ、秋山光市郎、大門康志、舛井千草、塚崎智也、成田新一郎、秋山芳展 部位特異的 *in vivo* 光架橋法を用いた生細胞内の動的タンパク質間相互作用解析. 第 16 回日本蛋白質科学会年会ワークショップ「人工的にカスタマイズされた蛋白質による生命現象の再構成」、福岡、2016 年 6 月 7-9 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 第 54 回日本生物物理学会年会シンポジウム「次世代研究者による動的構造生命」、つくば、2016 年 11 月 25-27 日
- Mori, H. Environmental adaptation of marine *Vibrio* by nascent chain-mediated remodeling of protein export machinery. RNA2016 satellite-symposium “Nascent biology and Ribosome functions”、京都、2016 年 6 月 27 日
- Mori, H., Ishii, E., Chiba, S., Sakashita, S., Ito, K. and Akiyama, Y. Nascent chain-monitored remodeling of the Sec machinery for salinity adaptation of marine bacteria. NASCENT CHAIN BIOLOGY 2016、山梨、2016 年 9 月 1-3 日
- 何あゆみ、三登一八、町田裕紀子、塚崎智也、伊藤維昭、秋山芳展、森 博幸 タンパク質膜透過

関連因子 SecD の P1 ヘッド領域における基質結合部位の探索. 生体運動研究合同班会議 2016、京都、2016 年 1 月 8-10 日

石井英治 分泌能監視ペプチド VemP を介したタンパク質分泌促進装置の発現制御機構の解明～. 転写・翻訳・膜透過が共役した発現制御機構の解明に向けて～、「新生鎖の生物学」第 3 回若手ワークショップ、淡路、2016 年 5 月 23-25 日

宮崎亮次 A Novel SRP Recognition Sequence in the Homeostatic Control Region of Heat Shock Transcription Factor σ^{32} . 「新生鎖の生物学」第 3 回若手ワークショップ、淡路、2016 年 5 月 23-25 日

大門康志、舛井千草、鈴木健裕、堂前直、森博幸、成田新一郎、秋山芳展 大腸菌ペリプラズムプロテアーゼ BepA TPR domain の機能解析. 第 13 回 21 世紀大腸菌研究会、南阿蘇、2016 年 6 月 2-3 日

石井英治、千葉志信、橋本成祐、小嶋誠司、本間道夫、伊藤維昭、秋山芳展、森博幸 ビブリオ属細菌における新生ポリペプチド鎖を介した発現制御機構. 第 13 回 21 世紀大腸菌研究会、南阿蘇、2016 年 6 月 2-3 日

檜作洋平、照島功祐、秋山芳展 大腸菌 Rhomboid プロテアーゼ GlpG の生理的切断基質の探索及び基質候補の解析. 第 13 回 21 世紀大腸菌研究会、南阿蘇、2016 年 6 月 2-3 日

明後尚美、宮崎亮次、森博幸、秋山芳展 *in vivo* 光架橋法の改良による生細胞内タンパク質間相互作用の速度論的解析の試み. 第 13 回 21 世紀大腸菌研究会、南阿蘇、2016 年 6 月 2-3 日

檜作洋平、照島功祐、秋山芳展 細菌 Rhomboid プロテアーゼ GlpG の生理的切断基質の探索及びべん毛 III 型分泌装置との関係. 第 89 回日本生化学会大会、仙台、2016 年 9 月 25 日 - 27 日

石井英治、児玉年央、松田重輝、秋山芳展、飯田哲也、森博幸 腸炎ビブリオ菌における環境に応じたタンパク質分泌促進装置の使い分けと病原性との関わり. 第 50 回腸炎ビブリオシンポジウム、大阪、2016 年 10 月 20-21 日

檜作洋平 細菌膜内切断プロテアーゼの総合的理解に向けて：～機能制御機構を中心に～. 京都大学ウイルス・再生医科学研究所セミナー、京都、2016 年 11 月 24 日

檜作洋平、照島功祐、秋山芳展 Screening of physiological substrates of *E. coli* rhomboid protease GlpG: possible involvement of GlpG in the flagellar function. 第 54 回日本生物物理学会年会、つくば、2016 年 11 月 25-27 日

石井英治、坂下宗平、秋山芳展、森博幸 ビブリオ属細菌 VemP の翻訳アレストを介した V.SecD2 発現制御における *vemP-V.secD2* 遺伝子間領域で形成される巨大な二次構造の重要性. 第 39 回日本分子生物学会年会、横浜、2016 年 11 月 30 日 - 12 月 2 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

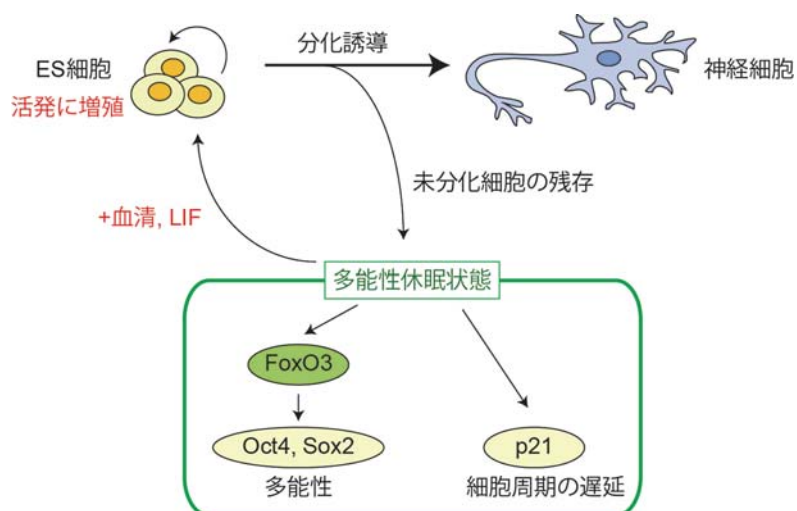
教授	豊島 文子	Prof.	Fumiko Toyoshima
助教	小田裕香子	Assist. Prof.	Yukako Oda
助教	松村 繁	Assist. Prof.	Shigeru Matsumura

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。2016年においては、マウス ES 細胞の多能性休眠状態への遷移現象を見出し、その分子機構を解明した。また、細胞外基質の幾何学情報と細胞分裂軸をリンクする分子機構を解明した。

1) マウス ES 細胞の多能性休眠状態への遷移現象の発見とその分子機構の解明

胚性幹細胞（ES 細胞）は、体を構成する全ての細胞に分化する多能性を持つ。この性質を利用して、ES 細胞から生体内の様々な組織を誘導し、疾患治療に役立てる試みがなされている。しかし、多くの分化誘導系において未分化細胞が残存し、移植後のがん化の一因となることが懸念されており、ES 細胞を用いた細胞治療の問題点の一つとなっている。これまで、ES 細胞と分化誘導後の細胞の性質の違いを利用して残存未分化細胞を除く方法が提唱されているが、「分化誘導後に残存する未分化細胞の特性」という視点からは研究がなされていなかった。そこで本研究では、マウス ES 細胞を高効率な神経誘導法である SFEBq 法で分化誘導して、未分化のまま残る細胞の性質を解析した。その結果、大半の細胞が神経細胞へ分化するなかで、1-5% の細胞は多能性マーカーである Oct4 の発現を維持し、また ES 細胞と同様に多能性と自己複製能を保持していた。しかし、これらの残存未分化細胞では細胞増殖が著しく低下し、細胞周期の進行を阻害する CDK インヒビター p21 の発現が上昇していた。

これらの残存未分化細胞は、SFEBq 法の 2 次分化誘導下時においてもほとんど増殖・分化せず、かつ多能性を保持し続けたことから、「多能性休眠状態」にあることが分かった。この細胞を LIF と血清を含む培地で培養すると再び ES 細胞様の性質を示したことから、多能性休眠状態は可逆的であることが分かった。さらに、多能



性休眠細胞は通常の ES 細胞とは異なる遺伝子発現プロファイルを示し、転写因子 FoxO3 が休眠状態における多能性維持に必要であることを明らかにした。今後、再生医療の実現に向けて、従来法に加え、休眠状態の多能性細胞を標的とした未分化細胞除去の戦略を立てる必要性があると考えられる。

2) 細胞外基質の幾何学情報と細胞分裂軸をリンクする分子機構の解明

細胞は、二つの娘細胞に分裂する際、周囲の環境に応じて分裂する方向を決める。この細胞分裂方向の制御機構は培養細胞においても見られ、フィブロネクチンやコラーゲンなどの細胞外基質によって分裂軸が制御されることが知られている。接着細胞では、細胞の形は細胞外基質-細胞間接着によって決まるため、細胞分裂の方向は、間期の細胞の形（長軸方向）と強い相関がある。しかし、分裂期には細胞は球状となり形の情報が失われることから、間期の細胞-細胞外基質接着の幾何学情報を分裂期の紡錘体軸方向に情報変換するメカニズムがあると考えられる。そこで、間期から分裂期への移行時に見られる細胞の急速な形状変化過程と分裂軸の相関を数理解析した結果、分裂期開始直後の収縮速度と分裂軸に相関があることを見出した。この収縮速度の速い細胞膜領域には分裂期初期に caveolin-1 が濃縮し、カベオラ様の陥入構造を含むコレステロールリッチな細胞膜ドメインが形成されていた。また、この caveolin-1 の収縮領域への濃縮は、インテグリンを介した細胞-細胞外基質接着と、分裂期の細胞球状化を担う RhoA シグナルに依存した。更に、caveolin-1 をノックダウンすると、紡錘体軸制御因子である Gai1/LGN/NuMA/dynein 複合体が紡錘体を牽引する機能を保持したまま細胞表層上にランダムに局在し、その結果、間期の細胞-細胞外基質接着の幾何学パターンと分裂軸の相関が消失した。これらの結果から、caveolin-1 を介した膜の不均一性という情報変換機構が、細胞の微小環境に応じた細胞分裂軸方向の制御メカニズムの一つであることが明らかとなった。

This laboratory aims to elucidate the molecular and cellular basis underlying stem cell fate determination and tissue homeostasis through symmetric and asymmetric cell division. In 2016, we found the dormant pluripotent cells emerging during differentiation of mouse embryonic stem (ES) cells and identified FoxO3 as a key regulator for maintenance of pluripotency in the dormant ES cells. We also addressed how cell-extracellular matrix adhesion geometry governs the orientation of the cell division axis by using theoretical and experimental approaches.

1) Identification of dormant pluripotent cells emerging during mouse ES cell differentiation.

One major concern for clinical applications of ES cell-derived cells is residual undifferentiated cells potentiating latent tumorigenicity. Despite intensive methodological approaches to eliminate residual undifferentiated cells, properties of these cells remain elusive. Here, we show that in a serum-free neural differentiation condition, residual undifferentiated cells markedly delay their cell cycle progression without compromising their pluripotency. This dormant pluripotency was maintained during reculture of the cells in a

serum-free condition, whereas upon serum stimulation, the cells exit the dormant state, and restart proliferation and differentiation into all three germ layers. Microarray analysis revealed a set of genes that are significantly upregulated in the dormant ESCs compared with proliferating ESCs. Among them, we identified the transcription factor forkhead box O3 (FoxO3) as an essential regulator for maintenance of pluripotency in the dormant ESCs. Our study demonstrates that transition into the dormant state endows residual undifferentiated cells with FoxO3-dependent and leukemia inhibitory factor/serum-independent pluripotency. (**Mol. Cell. Biol.** pii: MCB.00417-16., 2016)

2) Interphase adhesion geometry is transmitted to a spindle orientation regulator via caveolin-1

Despite theoretical and physical studies implying that cell-extracellular matrix adhesion geometry governs the orientation of the cell division axis, the molecular mechanisms that translate interphase adhesion geometry to the mitotic spindle orientation remain elusive. Here, we show that the cellular edge retraction during mitotic cell rounding correlates with the spindle axis. At the onset of mitotic cell rounding, caveolin-1 is targeted to the retracting cortical region at the proximal end of retraction fibres, where ganglioside GM1-enriched membrane domains with clusters of caveola-like structures are formed in an integrin and RhoA-dependent manner. Furthermore, Gai1-LGN-NuMA, a well-known regulatory complex of spindle orientation, is targeted to the caveolin-1-enriched cortical region to guide the spindle axis toward the cellular edge retraction. We propose that retraction-induced cortical heterogeneity of caveolin-1 during mitotic cell rounding sets the spindle orientation in the context of adhesion geometry. (*Nat. Commun.* 7, 11857, 2016)

List of Publications

- Ikeda, M. and Toyoshima, F. (2016). Dormant pluripotent cells emerge during neural differentiation of embryonic stem cells in a FoxO3-dependent manner. **Mol. Cell. Biol.** pii: MCB.00417-16.
- Matsumura, S., Kojidani, T., Kamioka, Y., Uchida, S., Haraguchi, T., Kimura, A., and Toyoshima, F. (2016) Interphase adhesion geometry is transmitted to an internal regulator for spindle orientation via caveolin-1. **Nat. Commun.** 7, 11857.
- Ishibashi, R., Kozuki, S., Kamakura, S., Sumimoto H., and Toyoshima, F. (2016). c-Rel Regulates Inscuteable Gene Expression During Mouse Embryonic Stem Cell Differentiation. **J. Biol.Chem.** 291, 3333-45.

List of Presentations

- Toyoshima, F. Stem and transit-amplifying cells orchestrate abdominal skin expansion during pregnancy. SPIRITS Swiss-Kyoto Joint symposium on Life Science, Kyoto, June 13, 2016.
- Ishibashi, R., Kozuki, S., Kamakura, S., Sumimoto, H., and Toyoshima, F. c-Rel Regulates *Inscuteable* Gene

Expression during Mouse Embryonic Stem Cell Differentiation. The 15th KU-NTU-UT International Mini-Symposium of Life Science, Taipei, June 18, 2016.

Okada, T. Suppression of the targeting of Dbf4-dependent kinase to pre-RC in G0 nuclei. The 15th International Joint Mini-Symposium on Molecular and Cell Biology between KU-NTU-UT. Taipei, June 18, 2016.

Ikeda, M. and Toyoshima, F. Dormant Pluripotent Cells Emerge during Neural Differentiation of Embryonic Stem Cells. Society for Developmental Biology, the 75th Annual Meeting, Boston, August 4-8, 2016.

Ichijo, R. Stem and transit-amplifying cells orchestrate abdominal skin expansion during pregnancy. The 27th CDB Meeting Body Surface Tactics cellular crosstalk for the generation of super-biointerfaces, Kobe, November 14-15, 2016.

Ichijo, R. Tbx3-dependent proliferation of transit-amplifying cells drives interfollicular epidermal expansion during pregnancy and regeneration. 41st JSID. Sendai, December 9-11, 2016.

豊島文子 妊娠期における皮膚幹細胞の増殖・分化制御機構 第1回京都皮膚基礎研究会、京都、2016年2月19日

豊島文子 Oriented stem/progenitor cell division and skin expansion during pregnancy iCeMS リトリート、彦根、2016年5月30-31日

豊島文子 妊娠期における表皮幹細胞の増殖制御機構 第68回日本細胞生物学会シンポジウム 京都 2016年6月15-17日

上月智司、豊島文子 妊娠期における肝臓の細胞動態解析 第68回日本細胞生物学会大会、京都、2016年6月15-17日

一條遼、小林大毅、米田早織、松村繁、本田哲也、豊島文子 皮膚幹細胞とTA細胞が妊娠期の皮膚伸展を可能とする 第65回日本細胞生物学会大会、京都、2016年6月15-17日

豊島文子 皮膚伸展を担う表皮幹細胞・前駆細胞の動態システム HiHA ワークショップ、広島、2016年7月8-9日

豊島文子 細胞分裂軸の制御機構と皮膚組織構築における役割 富士フィルム講演会、横浜、2016年9月30日

豊島文子 生理的体型変化を担う表皮幹細胞の対称・非対称分裂、基生研研究会、岡崎・基礎生物学研究所、2016年11月21日

池田愛、豊島文子 ES細胞の神経誘導下においてFoxO3依存的に休眠状態の多能性細胞が出現する 第39回日本分子生物学会年会、横浜、2016年11月30日-12月2日

飯塚ゆい、一條遼、豊島文子 肥満に伴う表皮幹細胞・TA細胞のダイナミクスの解析 第39回日本分子生物学会年会、横浜、2016年11月30日-12月2日

一條遼, 小林大毅, 米田早織, 松村繁, 本田哲也, 豊島文子 皮膚幹細胞と TA 細胞が妊娠期の皮膚伸展を可能とする 第 39 回日本分子生物学会年会、横浜、2016 年、11 月 30 日 -12 月 2 日

石橋 理基、上月 智司、鎌倉 幸子、住本 英樹、豊島 文子 マウス ES 細胞の分化過程において、c-Rel が Inscuteable 遺伝子の発現を制御する。第 39 回 日本分子生物学会年会、横浜、2016 年 11 月 30 日 -12 月 2 日

上月智司、豊島文子 妊娠期における肝幹細胞、前駆細胞の制御機構 第 39 回日本分子生物学会年会、横浜、2016 年 11 月 30 日 -12 月 2 日

福原充子、馬悦、長澤和夫、豊島文子 グアニン四重鎖による H19 転写制御機構の解明 第 39 回日本分子生物学会、横浜、2016 年 11 月 30 日 -12 月 2 日

岡田拓也、一條遼、福原充子、豊島文子 皮膚面積の生理的な減少時における表皮細胞のダイナミクス解析 第 39 回日本分子生物学会年会、横浜。2016 年 11 月 30 日 -12 月 2 日

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

発がん機構分野
Laboratory of Tumor Biogenesis

教授	米原	伸	Prof.	Shin Yonehara
准教授	増谷	弘	Assoc. Prof.	Hiroshi Masutani
助教	村上	昭	Assist. Prof.	Akira Murakami

【増谷グループ】

アルファアレスチンファミリーに属する thioredoxin interacting protein (Txnip) / thioredoxin binding protein-2 (TBP-2) は、ウイルス感染症、免疫・炎症制御、癌抑制に関わる多機能の調節因子である。特に癌研究における Txnip の分子機構解析の重要性が示されている。今年度は Txnip が前立腺癌細胞株で高分子複合体を形成していることを明らかにし、この複合体について解析を行った。

一方、Txnip はエネルギー代謝制御に重要な役割を果たしている。Txnip の high glucose による発現誘導を抑制する低分子化合物を得ているので、今年度はケミカルバイオロジーとして、その低分子化合物のターゲット分子の候補をプロテオミクス解析により同定した。さらに、レドックス（酸化還元）調節に中心的な役割を果たし、酸化ストレス防御や炎症抑制に作用する thioredoxin の研究を中心に、日本学術振興会第 170 委員会レドックス・ライファイノベーション委員会の委員としてレドックスシグナリングの研究分野の発展に寄与した。

1) Txnip による癌抑制の分子機構の解明

Txnip は細胞の増殖を抑制し、細胞死を促進する。Txnip のノックアウトマウスでは癌の悪性度が増強する知見が共同研究で得られている。また、Txnip は様々な癌組織で発現がエピジェネティック変異により減少しており、膀胱癌においてかなりの頻度で変異が見られることが多施設の解析により報告されており、Txnip は実際の癌抑制遺伝子であると考えられる。しかしながら、その癌抑制の分子機構は明らかになっていない。Txnip による癌抑制の分子機構を明らかにする目的で、今年度は前立腺癌細胞株 Du145、PC3 細胞あるいは 293 細胞において、プロテアソーム阻害剤ボルテゾミブの投与により Txnip が高分子複合体を形成していることを blue native PAGE により明らかにした。Txnip は刺激によりいくつかの異なったサイズの分子量の複合体を形成し、この形成には、構成成分のリン酸化による調節が必要であることを明らかにした。さらに、293 細胞 F-HA-Txnip transfectant を用いてこれらの複合体の構成成分について解析を行った。この高分子複合体の構成成分を制御することによる、癌細胞における Txnip のサイレンシングをバイパスした新たな癌抑制法の開発を目指している。

2) Txnip 発現制御低分子化合物によるケミカルバイロジ

Txnip はエネルギー代謝制御に重要な働きを持つ分子であることを示してきた。Txnip は high glucose によりその発現が増強し、膵臓のベータ細胞からのインスリンの分泌や筋肉でのインスリン感受性を抑制する。薬学研究科との共同研究により Txnip の発現に影響を与える 11 種類のヒット化合物を同定し、これらの化合物が糖代謝を改善することを示した。様々な阻害剤を用いてこれらの化合物の働くシグナル経路を明らかにした。さらに、代表的な化合物をビオチン化し、ストレプトアビジン磁気ビーズを用いて C2C12 マウス筋肉細胞でこの化合物が特異的に反応する分子の候補を精製し、医学研究科との共同研究により、プロテオミクス解析で同定した。この化合物のターゲットの解析により、Txnip 発現調節上流の未知のシグナル制御機構を明らかにできることが考えられ、エネルギー代謝制御のみならず様々な疾病制御への応用を目指して研究を行っている。

We study α -arrestin family proteins including thioredoxin binding protein-2 (TBP-2) also referred as thioredoxin interacting protein (Txnip) or Vitamin D3 up-regulated protein 1 (VDUP1). Txnip/ TBP-2 has attracted much attention as a multifunctional regulator in cancer suppression and energy metabolism, as well as immune response. We revealed that Txnip forms high order complexes in cancer cells. We also identified small molecular compounds regulating glucose-induced expression of Txnip. We analyzed the molecular targets of one of the compounds by chemical biological approaches. The other subject is redox signaling and host defense mechanism against oxidative stress. Thioredoxin is a key component of redox regulation and plays a protective role in various diseases, associated with oxidative stress and inflammation. As a member of redox life innovation committee of Japan Society of the Promotion of Science, we contribute to the development of the research field of redox signaling.

1) High order complex formation of Txnip in cancer cells

Txnip expression is silenced in HTLV-I transformed cells and many cancer tissues. Its gene is mutated in bladder cancer. We showed that Txnip acts as a cancer suppressor. To investigate the molecular mechanism of the pleiotropic functions of Txnip, we examined native Txnip condition using blue native PAGE in Du145, PC-3 prostate cancer cells and 293 cells. We showed that endogenous Txnip is involved in several forms of high molecular weight complexes. Treatment with bortezomib, a proteasome inhibitor, induced the formation of the high order complexes. Txnip has conserved PPXY motifs which are thought to interact with WW domains containing NEDD family ubiquitin ligases. These results collectively provide a model that Txnip exerts its actions through forming transient high order complexes to regulate the breakdown of signaling regulators. We are now analyzing the components of the complexes by tandem affinity purification and proteomics analyzes.

2) Chemical biology using small molecular compounds regulating glucose-induced expression of Txnip

Txnip plays an important role in the regulation of energy metabolism. Txnip expression is induced by

glucose at both transcriptional and protein levels. Txnip suppresses insulin secretion from pancreatic beta cells and insulin sensitivity in muscle. In collaboration with graduate school of pharmaceutical sciences, we identified 11 small molecular hit compounds which regulate glucose-induced expression of Txnip. These compounds improved glucose metabolism. Using various inhibitors, we revealed the signal pathway through which these compounds exerts their functions. We biotinylated one of the compound and affinity purified target proteins from C2C12 mouse muscle cells using streptavidin magnetic beads. We identified candidates of the target molecule by proteomics. The identification may open a possibility to not only elucidate the upstream signal pathways regulating glucose-induced Txnip expression but also provide approaches to control various diseases including metabolic disorders.

List of Publications

- Matsuoka, S., Ishii, Y., Nakao, A., Abe, M., Ohtsuji, N., Momose, S., Jin, H., Arase, H., Sugimoto, K., Nakauchi, Y., Masutani, H., Maeda, M., Yagita, H., Komatsu, N., Hino, O. (2016). Establishment of a Therapeutic Anti-Pan HLA-Class II Monoclonal Antibody That Directly Induces Lymphoma Cell Death via Large Pore Formation. **PLoS One**. *11*, e0150496. doi: 10.1371/journal.pone.0150496.
- Yodoi, J., Tian, H., Masutani, H., Nakamura, H. (2016). Thiol redox barrier; local and systemic surveillance against stress and inflammatory diseases. **Arch Biochem Biophys**. *595*, 88-93. doi: 10.1016/j.abb.2015.11.029.

List of Presentations

- Hirata, C., Ito S., Masutani, H. Regulation of protein degradation by Txnip in cancer suppression.
The 14th International Student Seminar, Kyoto, March 10-11, 2016.
- 増谷 弘 Thioredoxin interacting protein による癌抑制・糖代謝制御とケミカルバイオロジー
第 11 回レドックス・ライフイノベーションシンポジウム、東京、2016 年 3 月 17-18 日
- Hirata, C., Nishioka, K., Ashida, S., Mizutani, Y., Masutani, H. High order complex formation of Thioredoxin interacting protein (Txnip) in cancer cells. 第 39 回日本分子生物学会年会、横浜、2016 年 11 月 30 日 -12 月 2 日

霊長類モデル分野
Laboratory of Primate Model

准教授 三浦 智行 Assoc. Prof. Tomoyuki Miura

2016年3月に石田裕樹が人間・環境学研究科博士課程を単位取得退学し、4月からリサーチレジデントとして国立国際医療センターに就職した。また、加川裕美子がオフィス・アシスタントを終了した。5月に石田裕樹が博士（人間・環境学）を取得した。6月に Yalcin PISIL が研究生として、また、理学部2回生の高橋唯基がオフィス・アシスタントとして研究室のメンバーに加わった。11月から医学部3回生の加川裕美子が再びオフィス・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）。2016年の代表的な研究進展状況を以下に記述する。

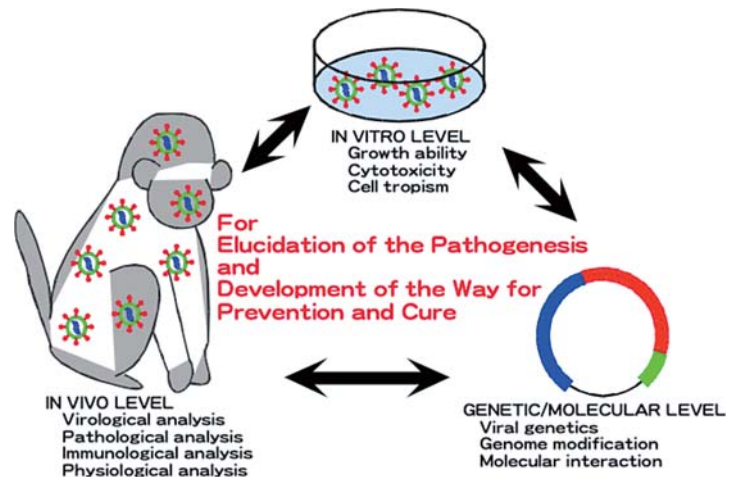


Fig. 1. Research Cycle of Primate Model for Infectious Diseases

1) 中和抵抗性 CCR5 指向性サル/ヒト免疫不全ウイルス感染アカゲザルにみられた強力な広域中和抗体

近年、ヒト免疫不全ウイルス（HIV-1）ワクチンによる広域中和能を持つ中和抗体（bNAbs）の誘導が望まれ、動物モデルでの評価が期待されている。サル免疫不全ウイルスに HIV-1Env 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 CXCR4 指向性 SHIV-KS661（KS661）を改変した CCR5 指向性 SHIV-MK1（MK1）をアカゲザルに順化させ、持続感染する中和抵抗性（Tier2 相当）CCR5 指向性 SHIV-MK38（MK38）を得た。本研究では、中和抵抗性 CCR5 指向性 SHIV 感染ザルに誘導される抗体の中和能を評価することを目的とした。MK38 の性状を最も反映した SHIV-MK38#818（#818）クローンを3頭のアカゲザルに接種した結果、1頭において高いウイルス量で持続感染した。持続感染ザルの感染27週以降の血漿で、#818が中和された。さらに感染41週以降の血漿では、別の Tier2 株に対し

でも経時的に中和能が上昇した。持続感染した1頭の血漿でのみ Tier2 相当のウイルス中和能が認められたことから、中和抗体誘導モデルには持続感染するウイルスが必要であると考えられた。また、感染41週以降に中和能が広域化し抗体の成熟が示唆されたことから、SHIV-MK38/アカゲザル感染モデルは広域中和抗体の誘導モデルになり得るものと期待された。

2) 中和抵抗性かつ CCR5 指向性の新規 HIV-1mt の構築

HIV-1/AIDS 霊長類モデルの開発に向け、これまで数多くのチャレンジウイルスが構築されてきた。その中で近年、サル細胞に存在する抗 HIV-1 因子による抑制を回避する、サル指向性 HIV-1 (HIV-1mt) の MN4/LSDQgtu が構築された。しかしながら、多くの HIV-1 臨床分離株が CCR5 (R5) 指向性であるのに対し、MN4/LSDQgtu は CXCR4 (X4) 指向性である。一方、本研究室に於いては中和抵抗性かつ R5 指向性の新規 SHIV-MK38#818 が構築されている。そこで我々は、バックボーンに MN4/LSDQgtu を用い、*env* 領域をアカゲザルに接種した MK38#818 の *env* に組換えることで、中和抵抗性並びに CCR5 指向性であり、アカゲザル個体内での持続感染が期待できる新規 HIV-1mt の構築を目指した。MN4/LSDQgtu の 5' 末端 (約 6.8kb)、3' 末端 (約 1.7kb)、MK38#818 の *env* 領域 (約 2.7kb) をそれぞれ PCR 法によって増幅し、3つの断片を得た。これらを co-transfection し、細胞内相同組換えによって組換えウイルスを得た。相同組換えによって得られたウイルスをシーケンス解析した後、SimPlot で配列比較したところ、期待通り *env* 遺伝子の開始点付近から gp41 CT 領域の途中 (*tat* 並びに *rev* 遺伝子第2エキソン境界点近傍) まだが MK38#818 由来であった。このウイルスを「HIV-1mt AK818」と命名した。AK818 は中和モノクローナル抗体 KD-247 に対して中和感受性の SHIV-KS661 と比較し5倍近い抵抗性を示した。またその挙動は、中和抵抗性である MK38#818 と類似したため、親株の中和抵抗性を十分に反映していると考えられた。コレセプター指向性については、X4 阻害剤 AMD3100 で抑制されず、R5 阻害剤 TAK-779 で抑制されたことから R5 指向性であることが確認された。サル細胞での増殖性、さらにサル個体内での感染増殖の如何について今後評価する予定である。

Our 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 2016 will be described below.

1) Development of broad and potent neutralizing antibody in rhesus monkey infected with neutralization resistant CCR5 tropic SHIV

In recent years, the induction of broad neutralizing antibodies (bNAbs) 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 have acclimatized CCR5-tropic SHIV-MK1 (MK1), which has been

modified CXCR4-tropic SHIV-KS661 (KS661), to rhesus monkeys and obtained persistently infecting neutralization resistant (Tier 2 equivalent) CCR5 tropic SHIV-MK38 (MK 38). In this study, we aimed to evaluate neutralizing ability of antibodies induced by neutralization resistant CCR5 tropic SHIV infected monkeys. Three rhesus macaques were inoculated with SHIV-MK38#818 (#818) clone, which most reflects the properties of MK38 strain, resulting in persistent infection with high viral load in one monkey. #818 was neutralized by the plasma of persistently infected monkey after 27 weeks of infection. Furthermore, neutralizing ability in plasma after 41 weeks of infection increased with time against other Tier 2 strains. Because the virus neutralizing ability equivalent to Tier 2 level was observed only in one persistently infected monkey plasma, it was considered that a persistently infecting virus is necessary for the neutralizing antibody induction model. In addition, since the neutralizing ability broadened and the maturation of the antibody was suggested after 41 weeks of infection, it was expected that SHIV-MK38/rhesus monkey infection model could be an induction model of broad-spectrum neutralizing antibody.

2) Construction of novel HIV-1mt with neutralization resistance and CCR5 tropism

To develop the HIV-1/AIDS primate model, numerous challenge viruses have been constructed so far. Among them, monkey tropic HIV-1 (HIV-1mt) MN4/LSDQgtu, which avoids suppression by anti-HIV-1 factor present in monkey cells, has recently been constructed. However, while many HIV-1 clinical isolates are CCR5 (R5) tropic, MN4 / LSDQgtu is CXCR4 (X4) tropic. On the other hand, in this laboratory, a novel SHIV-MK38#818, which is R5 tropic and resistant to neutralizing antibody, has been constructed. Therefore, we aimed to construct a new HIV-1mt, which is CCR5 tropic and neutralization resistant, and expected to develop persistent infection in rhesus monkeys using MN4/LSDQgtu as the backbone and recombined the *env* region with that of MK38#818 inoculated into rhesus monkey. The 5' end (about 6.8 kb) and the 3' end (about 1.7 kb) of MN4 / LSDQgtu, and the *env* region (about 2.7 kb) of MK38#818 were amplified by PCR. These three fragments were co-transfected, and recombinant viruses were obtained by intracellular homologous recombination. Sequence analysis of the virus by SimPlot revealed that the region from the start point of the *env* gene to the middle of the gp41 region (the second exon boundary point of *tat* and *rev* gene) was derived from MK38#818 as expected. This virus was named "HIV-1mt AK818". AK818 showed nearly 5 times resistance as compared with neutralizing susceptible SHIV-KS661 against neutralizing monoclonal antibody KD-247. Its behavior was similar to that of neutralization resistant parental strain, MK38#818. Regarding co-receptor tropism, it was confirmed that AK818 was R5 tropic because it was not suppressed by the X4 inhibitor AMD3100 and was suppressed by the R5 inhibitor TAK-779. We plan to evaluate the proliferative properties in monkey cells and the infection properties in monkey.

List of Publications

Mizuguchi, T., Harada, S., Miura, T., Ohashi, N., Narumi T., Mori, H., Irahara, Y., Yamada, Y., Nomura, W., Matsushita, S., Yoshimura, K., and Tamamura, H. (2016). A minimally cytotoxic CD4 mimic as an HIV

entry inhibitor. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** 26, 397-400.

Ishida, Y., Yoneda, M., Otsuki, H., Watanabe, Y., Kato, F., Matsuura, K., Kikukawa, M., Matsushita, S., Hishiki, T., Igarashi, T., and Miura, T. (2016). Generation of a neutralization-resistant CCR5 tropic SHIV-MK38 molecular clone, a derivative of SHIV-89.6. **J. Gen. Virol.** 97, 1249-1260.

Kato, F., Ishida, Y., Oishi, S., Fujii, N., Watanabe, S., Vasudevan, S. G., Tajima, S., Takasaki, T., Suzuki, Y., Ichiyama, K., Yamamoto, N., Yoshii, K., Takashima, I., Kobayashi, T., Miura, T., Igarashi, T., and Hishiki, T. (2016). Novel antiviral activity of bromocriptine against dengue virus replication. **Antiviral Res.** 131, 141-147.

Ishii, H., Matsuoka, S., Nomura, T., Nakamura, M., Shiino, T., Sato, Y., Iwata-Yoshikawa, N., Hasegawa, H., Mizuta, K., Sakawaki, H., Miura, T., Koyanagi, Y., Naruse, T. K., Kimura, A., and Matano, T. (2016). Association of lymph-node antigens with lower Gag-specific central-memory and higher Env-specific effector-memory CD8+ T-cell frequencies in a macaque AIDS model. **Scientific Reports** 6, 30153.

三浦智行 (2016). 霊長類モデルを用いた HIV 感染症の予防・治療法開発 公益社団法人日本実験動物学会編: 実験動物感染症と感染症動物モデルの現状 99-105.

List of Presentations

Hishiki, T., Kato, F., Ishida, Y., Oishi, S., Watanabe, S., Vasudevan, S. G., Tajima, S., Takasaki, T., Miura, T., and Igarashi, T. Bromocriptine is a novel inhibitor of dengue virus replication, The 4th Antivirals Congress 2016, Barcelona, September 18-21, 2016.

関根将、藤田悠平、陣野萌恵、三浦智行、伊吹謙太郎 サル免疫細胞を持つマウス (サル化マウス) へのサル免疫不全ウイルス (SIV) 感染実験第 159 回日本獣医学会学術集会、藤沢、2016 年 9 月 6-8 日

吉川禄助、坂口翔一、中川草、中村紳一朗、阪脇廣美、兼子明久、三浦智行、鈴木樹理、岡本宗裕、宮沢孝幸 サルレトロウイルス 5 型感染によるニホンザル血小板減少症 第 159 回日本獣医学会学術集会、藤沢、2016 年 9 月 6-8 日

志田壽利、加藤誠一、保富康宏、松尾和浩、三浦智行、五十嵐樹彦、張陔峰、井上誠、成瀬妙子、木村彰方 HIV-1 ワクチン開発とその課題 第 25 回日本組織適合性学会、札幌、2016 年 10 月 22-24 日

姫野愛、石田裕樹、米田舞、松浦嘉奈子、菊川美奈子、三浦智行 中和抵抗性 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広域化 第 64 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2016 年 10 月 23-25 日

川上朗彦、姫野愛、菊川美奈子、石田裕樹、野間口雅子、足立昭夫、三浦智行 中和抵抗性かつ CCR5 指向性の新規 HIV-1rmt の構築 第 64 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2016 年 10 月 23-25 日

日

日紫喜隆行、加藤文博、田島茂、三浦智行、五十嵐樹彦、高崎智彦、小原道法 分泌型ルシフェラーゼを有するデングウイルスレプリコン細胞の樹立 第 64 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2016 年 10 月 23-25 日

土肥直哉、石舟智恵子、安友康二、三浦智行、酒井遙介、藤本薫平、原田恵嘉、吉村和久、野間口雅子、足立昭夫 アカゲザル病原性 HIV-1 の個体内複製と病原性：腸管由来細胞での感染評価技術の確立に向けて 第 64 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2016 年 10 月 23-25 日

Seki, Y., Saito, A., Satou, Y., Harada, S., Yoshimura, K., Ode, H., Iwatani, Y., Yoshida, T., Murata, M., Watanabe, Y., Yasutomi, Y., Matano, T., Miura, T., Akari, H. R5-tropic HIV-1 infection leads to long-term latency in cynomolgus macaques カニクイザルにおける R5 指向性 HIV-1 長期潜伏感染の解析 第 64 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2016 年 10 月 23-25 日

佐野雅人、桑田岳夫、松岡佐織、関塚剛史、明里宏文、三浦智行、俣野哲朗 中和感受性株 SIVsmH635FC 感染における中和抵抗性株 SIVsmE543 交差性中和抗体誘導の経時的解析 第 64 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2016 年 10 月 23-25 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C型肝炎ウイルス（HCV）等の難治性ウイルス研究を行っている。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

ART 療法の画期的な進展により、HIV 感染症は今や慢性疾患のひとつとなった。しかし HIV 感染者は、依然として幾多のリスクに曝されている。これらの解決には、HIV 感染者の自発的な抗ウイルス免疫応答に加えて効果的な HIV 抑制機能による有効かつ終生持続するウイルス制御、さらに潜伏化したウイルスゲノムの除去による HIV 感染症の根治が求められる。そこで本研究では、新たな HIV 制御法確立およびその前臨床評価のための病態解析を総合的に推進することにより、HIV 感染症の根治を目指した実現可能な対 HIV 戦略を創出することを目的とする。本研究において、HIV-1 長期潜伏感染霊長類モデルを初めて確立することが出来た。このモデルでは、カニクイザルにて高い再現性で HIV 潜伏感染を成立する事が可能である。また潜伏感染期においては優勢な獲得免疫応答により HIV が制御され、それに対して逃避変異により HIV 潜伏感染が維持されること、さらに Tfh 細胞が HIV 感染の場となっていることを示唆する知見を得た。以上の結果は、HIV 再活性化が可能なりザーバー細胞の実証およびその定量化や生体内分布等、根治に向けた研究が大きく進捗した。特に、リンパ節の Tfh 等を経時的に解析することで HIV 感染者での介入試験が困難な HIV リザーバーサイズの正確な定量が可能となったことから、今後は shock & kill 療法の前臨床 proof-of-concept 試験を重点的に推進していく予定である。

2. 新規 C 型肝炎ワクチンに関する開発研究

C 型肝炎ウイルス（HCV）は慢性肝炎を引き起こし、肝硬変や肝癌の原因となるウイルスとして知られている。近年、HCV の複製を阻害する直接作用型抗ウイルス薬 (Direct Acting Antivirals; DAAs) が開発され、C 型慢性肝炎の治癒率は劇的に向上した。しかし DAAs を用いた治療は高額な医療費がかかり治癒後も再感染のリスクがあること、海外では今もなお発展途上国において感染拡大が見

られることから、感染・発症予防が可能な HCV ワクチンの開発が依然として求められている。しかし、現状では HCV ワクチンは実用化に至っていない。HCV のエンベロープタンパク質を抗原として用いたワクチンは、マウス、モルモット、チンパンジー等のモデルにおいて中和抗体を誘導できることが報告されており、既に第一相臨床試験が行われている。また HCV 抗原を発現させるウイルスベクターを用いたワクチンでは、細胞性免疫の誘導も報告されている。しかし感染・発症予防に必要とされている、中和抗体および細胞性免疫の両方を同時に誘導できるワクチンは開発されていない。そこで本研究では、加藤孝宣博士（国立感染症研究所）との共同研究において有効な HCV ワクチンの開発研究を進めてきた。その結果、不活化 HCV 粒子を新規アジュバントである K3-SPG とともに小型霊長類モデルであるコモンマーモセットに接種したところ、感染阻止に有効な中和抗体と細胞性免疫の両方を効率良く誘導できることを初めて明らかにした。重要なことに、不活化 HCV 粒子 + K3-SPG 群で誘導される中和抗体は、ワクチンとして使用した遺伝子型 2a だけでなく他の遺伝子型の HCV 株の感染性を阻止した。なお、いずれの接種群においてもワクチンやアジュバントによる有害事象は認められなかった。以上の実験結果より、不活化 HCV 粒子を強力な新規アジュバントである K3-SPG とともに接種することにより有効かつ安全な HCV ワクチンとして有望であることが示された。今後、不活化 HCV 粒子の大量合成技術やワクチン接種プロトコルの最適化を通じて、早期の HCV ワクチン実用化を目指したい。

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 hepatitis C virus (HCV), 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. Development of new vaccine for HCV infection

Although hepatitis C virus (HCV) is a major cause of chronic liver disease worldwide, there is currently no prophylactic vaccine for this virus. Thus, the development of an HCV vaccine that can induce both humoral and cellular immunity is urgently needed. In the current study, to create an effective HCV vaccine, we evaluated neutralizing antibody induction and cellular immune responses following the immunization of a non-human primate model with cell culture-generated HCV. To accomplish this, ten common marmosets were immunized with purified, inactivated HCV in combination with two different adjuvants: the classically used aluminum hydroxide (Alum) and the recently established adjuvant: CpG ODN wrapped by schizophyllan (K3-SPG). The co-administration of HCV with K3-SPG efficiently induced immune responses against HCV, as demonstrated by the production of antibodies with specific neutralizing activity against chimeric HCV with structural proteins from multiple HCV genotypes (1a, 1b, 2a and 3a). The induction of cellular immunity was also demonstrated by the production of interferon- γ mRNA in spleen cells following stimulation with the HCV core protein. These changes were not observed following immunization with HCV/Alum preparation. No vaccination-related abnormalities were detected in any of the immunized animals. In conclusion, the current preclinical study demonstrated that a vaccine included both HCV and K3-SPG induced humoral and cellular immunity in marmosets. Vaccination with this combination resulted in the production of antibodies exhibiting cross-neutralizing activity against multiple HCV genotypes. Based on these findings, the vaccine created in this study represents a promising, potent and safe prophylactic option against HCV.

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. (2016). Induction of humoral and cellular immunity by immunisation with HCV particle vaccine in a non-human primate model. **Gut** Oct 26. doi: 10.1136/gutjnl-2016-312208
- Sultana, T., Nakayama, E.E., Tobita, S., Yokoyama, M., Seki, Y., Saito, A., Nomaguchi, M., Adachi, A., Akari, H., Sato, H., Shioda, T. (2016). Novel mutant human immunodeficiency virus type 1 strains with high degree of resistance to cynomolgus macaque TRIMCyp generated by random mutagenesis. **Journal of General Virology** 97, 963-976.
- Sugata, K., Yasunaga, J.-i., Miura, M., Akari, H., Utsunomiya, A., Nosaka, K., Watanabe, Y., Suzushima, H., Koh, K.R., Nakagawa, M., Kohara, M., Matsuoka, M. (2016). Enhancement of anti-STLV-1/HTLV-1

immune responses through multimodal effects of anti-CCR4 antibody. **Scientific Reports** 6, 27150.

Yoshida, T., Takemoto, H., Sakamaki, T., Tokuyama, N., Hart, J., Hart, T., Dupain, J., Cobden, A., Mulavwa, M., Kawamoto, Y., Kaneko, A., Enomoto, Y., Sato, E., Kooriyama, T., Miyabe-Nishiwaki, T., Suzuki, J., Saito, A., Okamoto, M., Tomonaga, M., Matsuzawa, T., Furuichi, T., Akari, H. (2016). Epidemiological surveillance of lymphocryptovirus infection in wild bonobos. **Frontiers in Microbiology** 10, 3389.

Suzuki, S., Mori, K.I., Higashino, A., Iwasaki, Y., Yasutomi, Y., Maki, N., Akari, H. (2016). Persistent replication of a hepatitis C virus genotype 1b-based chimeric clone carrying E1, E2 and p6 regions from GB virus B in a New World monkey. **Microbiology and Immunology** 60, 26-34.

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) 屋久島ザル由来のサルフォーミーウイルスをつかった系統樹解析

サルフォーミーウイルス (SFV) はレトロウイルスの一種であり、報告されているすべてのサル目に存在する。各サル種由来の SFV を用いた系統樹はミトコンドリア DNA のものと高く相関していることから、SFV のウイルスゲノムは非常に安定しており、感染しているサル目と共種分化していると考えられる。我々は 2014 年に本州に棲息するニホンザルから SFV を分離し、インテグラーゼ遺伝子配列を利用した系統樹解析を行った。ニホンザルの SFV はタイワンザルの SFV と最も近縁であり、「共種分化」が実際に行われている事が示唆された。今回我々は、屋久島に棲息するヤクシマザルから SFV を分離し、系統樹解析を行った。その結果、ヤクシマザルの SFV はニホンザルよりもタイワンザルにより近縁である事が示され、従来のミトコンドリア DNA と相関しない結果が認められた。また、ヤクシマザル由来 SFV は他のアジア出身のサル目より古い段階で分岐していた。この事から、ヤクシマザルはアジア（中国から朝鮮半島）に大昔に分布していたサルの系統である可能性が示唆された。

2) 中和抗体存在下でのネコモルビリウイルスの持続感染

ネコモルビリウイルス (FeMV) は、2012 年に香港のイエネコから発見された新興ウイルスであり、慢性腎不全との関連が報告されている。FeMV は遺伝的に極めて多様であり、L 遺伝子の系統樹解析によって少なくとも 2 つの遺伝型に分類される。FeMV は腎臓に持続感染し、感染個体の尿中から継続的に排出されることが知られており、病原性発現機構には持続感染が重要な役割を果たすと考えられている。しかし、これまで FeMV に対する免疫応答と慢性腎不全の関わりについては不明であった。そこで我々は、FeMV に対する中和試験法を新たに確立し、感染個体における抗体応答を調べた。FeMV は系統樹解析では二つの遺伝型に分類されるが、交差中和試験の結果から FeMV の血清型は一つであると考えられた。また、FeMV に対する長期的な抗体応答を調べたとこ

ろ、少なくともおよそ4ヶ月間にわたって FeMV が持続感染した個体において抗体価の上昇が認められた。本研究で得られた知見は、FeMV の持続感染と病原性発現機構に対する重要な手がかりとなることが期待される。

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 germline 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) Phylogenetic analysis of simian foamy virus isolated from Yakushima macaques (*Macaca fuscata yakui*)

Simian foamy virus (SFV) is found virtually in all non-human primates (NHPs) throughout the world. Phylogenetic analyses of SFV correlated with mitochondria DNA (mtDNA), indicating that they are co-speciated in respective NHPs. Recently, we reported the first isolation of SFV from Japanese macaques inhabit in mainland Japan. Phylogenetic analysis showed that the SFVs are most closely related with those of Taiwanese macaques than any other NHPs, supporting the “co-speciation” phenomenon. Yakushima macaques are a subspecies of Japanese macaques inhabit in Yakushima Island. Phylogenetic study using SFVs from Yakushima macaques showed that they are closer to those of Taiwanese macaques than to Japanese macaques. Further analysis of SFV genome indicated that they are not only dissimilar with Japanese macaques, but also from the rest of the Asian macaques, branching off at the very beginning of speciation. Our result indicates the possibility that Yakushima macaques may be originated from the ancestor of Asian macaques living in East Asia, which were somehow neglected from the phylogenetic analysis using mtDNA.

2) Persistent infection of feline morbillivirus under the presence of neutralizing antibodies

Feline morbillivirus (FeMV) was recently discovered from domestic cats in Hong Kong, and it has been potentially associated with chronic kidney diseases (CKD). FeMV is genetically divergent, and the virus strains have been classified into two genotypes based on the phylogenetic analysis of the large (L) gene. A correlation between the pathogenesis and immune responses against FeMV is still not clearly understood. In the present study, we established a neutralization assay against FeMV and examined the neutralizing antibody responses in cats infected with FeMV. The cross-neutralization results indicated that there is only one FeMV serotype despite the presence of two different FeMV genotypes. To further study the neutralizing activities in cats infected with FeMV, we obtained follow-up samples and examined the long-term responses of neutralizing antibody. Our data revealed that cats infected with FeMV have elevated levels of antibody titers over approximately 4 months. The result may provide a clue to reveal the mechanisms of viral persistence and disease progression.

List of Publications

Yamada, E., Yoshikawa, R., Nakano, Y., Misawa, N., Kobayashi, T., Ren, F., Izumi, T., Miyazawa, T., Koyanagi, Y., and Sato, K. (2016) A naturally occurring bovine APOBEC3 confers resistance to bovine lentiviruses: implication for the co-evolution of bovinds and their lentiviruses. **Sci. Rep.** 6, 33988.

宮沢孝幸、下出紗弓、中川 草 (2016). RD-114 物語:ネコの移動の歴史を探るレトロウイルス (RD-114 virus story : from RNA rumor virus to a useful viral tool for elucidating the world cats' journey). ウイルス (**Virus**) 66, 21-30.

宮沢孝幸、岡本宗裕 (2016). 京都大学霊長類研究所におけるニホンザル血小板減少症流行のその後 **LABIO21** 65, 15-19.

宮沢孝幸 (2016). 古代ウイルスによる哺乳類の胎盤の進化 **チャイルドヘルス** 19, 885-889.

List of Presentations

Miyazawa, T. Endogenization process of gammaretroviruses in the koala genome. 1st Korea-Japan International Symposium for Transposable Elements. Busan, June 10, 2016.

Shimode, S., Sakuma, T., Yamamoto, T., Miyazawa, T. Establishment of the RD-114-free cell line for vaccine production by TALEN-mediated genome editing technology. European Feline Congress. Malta, June 29-July 3, 2016.

Hashimoto, A., Yoshikawa, R., Nakagawa, S., Okamoto, M., Miyazawa, T. Simian foamy virus derived from Yakushima macaque (*Macaca fuscata yakui*) reveals the cross-island communication between Yakushima and Taiwan. 第 19 回日本レトロウイルス研究会、京都、2016 年 7 月 7-8 日

岡本宗裕、吉川禄助、阪脇廣美、鈴木樹理、坂口翔一、兼子明久、中村紳一郎、三浦智行、宮沢孝幸 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 第 32 回日本霊長類学会大会、鹿児島、2016 年 7 月 15-16 日

Miyazawa, T. Roles of endogenous retroviruses in the evolution of mammals. 山口大学獣医学セミナー、山口、2016 年 8 月 26-27 日

下出紗弓、佐久間哲史、山本 卓、宮沢孝幸 TALEN によるネコ内在性レトロウイルスノックアウトと生ワクチン製造への応用 (TALEN-mediated ERV knockout in feline cell line for vaccine production) 日本ゲノム編集学会第 1 回大会、広島、2016 年 9 月 6-7 日

宮沢孝幸 哺乳類の胎盤の進化に寄与したレトロウイルス 第 159 回日本獣医学会学術集会、藤沢、2016 年 9 月 6-8 日 (招待講演)

吉川禄助、坂口翔一、中川 草、中村紳一郎、阪脇廣美、兼子明久、三浦智行、鈴木樹理、岡本宗裕、宮沢孝幸 サルレトロウイルス 5 型感染によるニホンザル血小板減少症 第 159 回日本獣医学会学術集会、藤沢、2016 年 9 月 6-8 日

- 下出紗弓、佐久間哲史、山本卓、宮沢孝幸 TALEN 技術を用いた感染性 RD-114 ウイルスフリー株化細胞の樹立とイヌネコ用生ワクチン製造への応用 第 159 回日本獣医学会学術集会、藤沢、2016 年 9 月 6-8 日
- 坂口翔一、大松勉、田向健一、片山幸枝、岡田貴志、土赤忍、岸本麻衣、粉川幸樹、宮沢孝幸、水谷哲也 ネコパラミクソウイルスの国内初の検出 第 159 回日本獣医学会学術集会、藤沢、2016 年 9 月 6-8 日
- 坂口翔一、小出りえ、谷利侯爵、入江崇、宮沢孝幸 ネコモルビリウイルス感染によるインターフェロン誘導遺伝子の発現 第 159 回日本獣医学会学術集会、藤沢、2016 年 9 月 6-8 日
- 坂口翔一、谷利侯爵、藤村正人、中川草、水谷哲也、宮沢孝幸 尿から分離されたネコフォーミーウイルスの性状および遺伝学的解析 第 159 回日本獣医学会学術集会、藤沢、2016 年 9 月 6-8 日
- 小出りえ、坂口翔一、桑原千恵子、酒井沙知、中川草、谷利侯爵、浅井健一、川上和夫、宮沢孝幸 ネコモルビリウイルスの交差中和試験による血清学的比較 第 159 回日本獣医学会学術集会、藤沢、2016 年 9 月 6-8 日
- 谷利侯爵、宮沢孝幸 LacZ シュードタイプウイルスを利用したネコ白血病ウイルス中和試験法の開発 第 159 回日本獣医学会学術集会、藤沢、2016 年 9 月 6-8 日
- 小出りえ、坂口翔一、桑原千恵子、酒井沙知、中川草、浅井健一、川上和夫、宮沢孝幸 ネコモルビリウイルスの血清診断法の開発と疫学調査 第 37 回動物臨床医学会年次大会、2016 年 11 月 18-20 日
- 宮沢孝幸 猫の新興ウイルス感染症：慢性腎不全と関連するモルビリウイルス 第 37 回動物臨床医学会年次大会、大阪、2016 年 11 月 18-20 日（招待講演）

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

動物実験委員会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
技術職員 北野さつき Technical Staff Satsuki Kitano

マウス作製支援チームは動物実験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.virus.kyoto-u.ac.jp/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

2014 年	194 系統	85,005 個
2015 年	146 系統	40,165 個
2016 年	187 系統	34,679 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
2014 年	37	18,236	142 (0.8%)
2015 年	35	17,122	139 (0.8%)
2016 年	44	18,232	113 (0.6%)

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
2014 年	23	2,442	82 (3.6%)
2015 年	22	2,249	107 (4.8%)
2016 年	18	1,872	71 (3.8%)

4) その他

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
2014 年	32	14,839	47
2015 年	15	5,906	17
2016 年	23	8,980	66

受精卵の個体還元数

	依頼数	使用胚数	仮親マウス数
2015 年	88	8,236	412
2016 年	101	10,774	510

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

2014	194 strains	85,005 embryos
2015	146 strains	40,165 embryos
2016	187 strains	34,679 embryos

2) Transgenic mouse production with cloned DNAs

	No of constructs	No of embryos injected	No of transgenic pups obtained
2014	37	18,236	142 (0.8%)
2015	35	17,122	139 (0.8%)
2016	44	18,232	113 (0.6%)

3) Production of chimeric mouse

	No of ES clones	No of embryos injected	No of coatcolor chimera obtained
2014	23	2,442	82 (3.6%)
2015	22	2,249	107 (4.8%)
2016	18	1,872	71 (3.8%)

4) CRISPR/Cas9

	No of constructs	No of embryos	No of genome edited mouse
2014	32	14,839	47 (0.3%)
2015	15	5,906	17 (0.3%)
2016	23	8,980	66 (0.7%)

List of Publications

Fukuda, M., Inoue, M., Muramatsu, D., Miyachi, H., and Shinkai, Y. (2016). Knockout mouse production assisted by Blm knockdown. *J. Reprod. Dev.* 62, 121-125.

Shimojo, H., Isomura, A., Ohtsuka, T., Kori, H., Miyachi, H., and Kageyama, R. (2016). Oscillatory control of Delta-like1 in cell interactions regulates dynamic gene expression and tissue morphogenesis. *Genes Dev.* 30, 102-116.

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 26 年度イヌ：142 頭、サル：1 頭、ウサギ：71 羽、ラット：229 匹、マウス：9,334 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・動物福祉に十分の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 20 件の遺伝子改変・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 Laboratory 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 20 gene-manipulated mouse strains in this year.

List of Publications

Maeda Y, Kurakawa T, Umemoto E, Motooka D, Ito Y, Gotoh K, Hirota K, Matsushita M, Furuta Y, Narazaki M, Sakaguchi N, Kayama H, Nakamura S, Iida T, Saeki Y, Kumanogoh A, Sakaguchi S, Takeda K. (2016). Dysbiosis Contributes to Arthritis Development via Activation of Autoreactive T Cells in the Intestine. *Arthritis Rheumatol.* 68, 2646-2661.

廣田圭司 (2016). 自己免疫性関節炎を惹起するヘルパー T サブセットと認識自己抗原：慢性炎症性疾患の新たな展開；最新医学. 2320-2325.

List of Presentations

Keiji Hirota: Th17 cells orchestrate an inflammatory circuit in the development of autoimmune arthritis, World Immune Regulation Meeting X, 16 - 19 March 2016, Davos, Switzerland

Keiji Hirota: Inflammatory circuit of Th17 cells, GM-CSF-producing fibroblast-like synoviocytes, and ILCs in the development of autoimmune arthritis, 第 16 回 国際免疫学会 2016, August 21-26, Melbourne, Australia

渡邊 仁美、竹田 理恵、廣田 圭司、近藤 玄：マウス精子成熟における遺伝的背景の影響について 第 63 回日本実験動物学会総会、川崎、2016 年 5 月 5-8 日

Hitomi Watanabe, Takatoku Oida, Gen Kondoh and Keiji Hirota: Development and characterization of monoclonal antibodies against a stable sperm surface antigen. 第 45 回日本免疫学会学術集会、那覇、2016 年 12 月 5-7 日

ウイルス研究所コンピューターネットワークシステム Computer Network of Institute for Virus Research

助 教 竹本経緯子 Assist. Prof. Keiko Takemoto

ウイルス研究所ネットワークシステムは、秋山教授、生田教授、豊島教授、竹本助教より構成されるネットワーク委員会によって管理され、ウイルス研究所、附属ゲノム医学センターおよび医学部分子医学専攻の3部局が含まれる分子生物学実験研究棟、および動物実験棟へサービスを提供している。本研究所 LAN は、LINUX サーバー及びウィンドウズサーバ等を用いて、情報伝達の高速性・機能性・安全性を満たすサービスの提供を第一に、電子メール・WEB・ファイル・ライセンスサーバー等を運用している。

今年度はウイルス研究所と再生医科学研究所の統合（10月）があり、新研究所のためにホスティングサービスを利用した新WEBサイト構築を春から計画した。研究分野や研究員の増加に対応すべくCMSを使ったサイト運営をスタートさせ、記事更新を含めサイトの管理体制を確立させた。また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も準備はほぼ完了し、来年度から運用を開始する。WEB・電子メール以外のサーバーについては情報環境機構にも相談し検討した結果、来年度以降にネットワーク環境を含め大きく変えてゆく計画である。

セキュリティの観点からは、これまで二つの研究所で対応に違いがあった情報セキュリティポリシー実施手順書を、平成27年に改正された大学本部の実実施手順書の雛形にあわせて改正した。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、長年の懸案だった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。今年度はレトロウイルスのターゲットリシーケンス、de novo シーケンス、RNA-seq と、ヒト及びマウスのRNA-seq 解析に携わり、レトロエレメントのエピジェネティックな発現制御の研究を自身のテーマにしている。

Institute for Virus Research LAN system (IVR-LAN) has administrated by the network committee consisted of four staffs (Prof. Toyoshima, Prof. Akiyama, Associate Prof. Mori and Instructor Takemoto). IVR-LAN service has covered for researchers of some medical departments as well as IVR, and the primary purpose of IVR-LAN is to offer accessibility to the Internet in support of their studies. IVR-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. Main services are working on Linux workstations.

This year our institute has merged with the Institute for Frontier Medical Sciences, and the Institute for Frontier Life and Medical Sciences was launched out to explore advanced researches. We got a network domain for new institute and built new WEB site and mail server on the university hosting service systems.

The security policy settings for new institute had to be revised because two institutes (virus and 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. Even though the security policy settings are correctly equipped, a few accidents have occurred in this year. 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 ESET, and/or DNA de novo methyltransferase Dnmt1 have been analyzed with RNA-seq and ChIP-seq.

List of Presentations

加藤雅紀、竹本経緯子、眞貝洋一 体細胞におけるヒストンメチル化酵素 Setdb1 の機能の解析、第 39 回日本分子生物学会年会、横浜、2016 年 12 月 1 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
2015年度共同研究報告（研究期間：2015年4月～2016年3月）

【骨髄ニッチの発生・維持におけるポリコーム群複合体機能の解析】

- 研究代表者 千葉大学大学院医学研究院 岩間 厚志 教授
- 再生医科学研究所共同研究者 長澤 丘司 教授、杉山 立樹 准教授
- 研究経過及び研究成果

本研究は、マウスにおいて、ポリコーム群遺伝子 *Bmi1* をニッチ細胞（血管周囲ストローマ細胞）特異的に欠損または強制発現させ、ニッチ細胞の数的・質的变化とエピゲノム変化、さらには造血幹細胞機能への影響を明らかにするものである。これまでに *Lepr-Cre* を用いて、ニッチ細胞（血管周囲ストローマ細胞）特異的に *Bmi1^{fl/fl}* と *Rosa26Stop^{FL}Bmi1* マウスを作製し、ニッチ特異的に *Bmi1* を欠損ならびに過剰発現させた。これまでの解析においては、*Bmi1* の過剰発現では特に表現系の変化は認められていない。しかしながら、*Bmi1* の欠マウスにおいて進行性に骨髄の脂肪化が観察されており、現在経時的な観察を行っている。さらに、ニッチ細胞におけるエピゲノム変化を ChIP-sequencing によるヒストン修飾の網羅的解析とともに RNA sequencing による遺伝子発現評価を組み合わせる予定である。

- 研究成果の公表

データがまとまり次第共同研究論文として発表する予定。

【Pax1 による椎間板形成機構の解明】

- 研究代表者 広島大学大学院医歯薬保健学研究院 宿南 知佐 教授
- 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
- 研究経過及び研究成果

Paired box gene 1 (*Pax1*) は、脊柱の組織構築に重要な役割を担う転写因子である。本共同研究では、椎間板細胞における *Pax1* の役割について解析し、*Pax1* による *Aggrecan* (*Agc1*) の発現と椎間板形成の制御について以下の成果を得た。

① *Pax1* のノックダウンによる *Agc1* の発現上昇

Pax1 が発現する椎間板線維輪は、*Agc1* などの酸性ムコ多糖が局在する線維軟骨性の組織である。ラットの椎間板から分離培養した椎間板線維輪細胞は、pellet culture により軟骨細胞分化が誘導される（図1）。

研究代表者らはこれまでに、*Pax1* の過剰発現が軟骨細胞の成熟を抑制することを報告してきたが（Exp Cell Res 319: 3128-3139, 2013）、*Pax1* の発現低下が軟骨細胞分化や軟骨関連遺伝子の発現にどのような影響を与えるのかは不明であった。そこで、ラットの尾椎から分離した椎間板線維輪細胞において *Pax1* をノックダウンし、軟骨細胞分化誘導過程における *Pax1* の役割を検討した。shRNA を発現するレンチウイルスを感染させた椎間板線維輪細胞から pellet を作製し、誘導培地中で3週

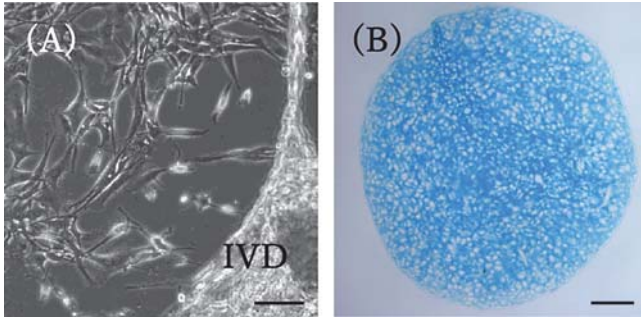


図 1. ラット椎間板線維輪細胞

(A) 椎間板組織 (IVD) から outgrowth させた椎間板線維輪細胞. (B) 軟骨細胞分化を誘導した pellet の凍結切片. 軟骨性基質をアルシアンブルーで染色している. Scale bars, 100 μ m.

間維持することにより軟骨細胞分化を誘導した。その結果、*Pax1* をノックダウンした pellet では、コントロールと比較して有意な *Agcl* の発現上昇が認められ、アルシアンブルーの染色性も顕著に上昇していた。一方で、軟骨細胞分化に必須の転写因子である *Sox9* 及び軟骨性基質である II 型コラーゲン (*Col2a1*) については、*Pax1* のノックダウンによる発現上昇は認められなかった。以上の結果から、*Pax1* は椎間板線維輪細胞において *Agcl* を含む特定の軟骨性基質分子の発現制御に関わっていることが示唆された。

② *Agcl* エンハンサー (*enAgcl*) における *Pax1* の結合と結合部位の同定

開始コドンから約 10 kb 上流に存在する 359 bp の *enAgcl* は、軟骨細胞分化に重要な転写因子である L-*Sox5*、*Sox6*、及び *Sox9* の結合部位を有している (Mol Cell Biol 28: 4099-5013, 2008)。研究代表者らは、*Pax1* が *enAgcl* の 55 bp の DNA 配列に結合することを明らかにしていたので、椎間板線維輪細胞を用いたクロマチン免疫沈降法により *enAgcl* における *Pax1* の結合について解析し、ゲルシフトアッセイにより *Pax1* の結合部位を同定した。

ラット椎間板線維輪細胞から抽出したクロマチンと抗 *Pax1* 抗体による免疫沈降物において、過去に報告されている *Agcl* (Mol Cell Biol 28: 4099-5013, 2008)、*Col2a1* (Mol Cell Biol 17: 2336-2346, 1997)、及び *Nkx3.2* (Development 130: 473-482, 2003) の発現制御領域を PCR により解析した。その結果、椎間板線維輪細胞内では *enAgcl* に *Pax1* が直接的に結合していることが明らかになった。更に、*Pax1* の結合が報告されている *Nkx3.2* の発現制御領域では、椎間板線維輪細胞においても *Pax1* の結合が確認された。一方、*Col2a1* の発現制御領域においては *Sox9* の結合は確認されたが、*Pax1* の結合は検出されなかった。

enAgcl における *Pax1* の結合部位を同定するため、*Pax1* が結合する 55 bp の DNA 配列に変異を導入したオリゴ DNA を作成し、ゲルシフトアッセイにより結合活性を解析した。14 種類の変異型オリゴ DNA を用いて解析した結果、*enAgcl* の 3' 側に存在する 18 bp の DNA 配列が *Pax1* の結合に必要であることが明らかになった。本共同研究により同定された *Pax1* の結合部位は、*Sox9* の結合部位と一部重複しており、*enAgcl* における *Pax1* の結合が *Sox9* の結合を競合的に阻害する可能性が示唆された。

③ Platinum TALEN によるゲノム編集を用いた *Pax1* 及び *Pax9* 遺伝子欠失マウスの作出と椎間板組織形成における *Pax1* の役割の解明

椎間板の形成・維持における *Pax1* 陽性細胞の特性を *in vivo* で検証していくためには、Loss of function 実験が必須となる。体節における硬節及び椎間板の線維輪には *Pax1* とそのパラログである *Pax9* が発現し、*Pax9* は *Pax1* の機能を補完することが知られている (Development 126: 5399-5408, 1999)。本共同研究では、椎間板における *Pax1* の *in vivo* での役割を解析するために、Platinum TALEN

(A) Pax1-TALEN

Wild type	GCGATGGAGCAGACGTACGGCGAAGTGAACCAACTTGGTGGCGTGTTCGTCAACGGCCGTCCC CTGCCCAATGCCATCCGCCTACGAATCGTGGAGCTAGCACAGCTGGGTATCCGACCCTGTG...
Deletion-1	GCGATGGAGC***** *****TGGGTATCCGACCCTGTG...
Deletion-2	GCGATGGAGCAGACGTACGGCGAAGTAAAC****TTGGTGGCGTGTTCGTCAACGGCCGTCCC CTGCCCAATGCCATCCGCCTACGAATCGTGGAGCTAG
Deletion-3	GCGATGGAGCAGACGTACGGCGAAGTGAAC*AACTTGGTGGCGTGTTCGTCAACGGCCGTCCC CTGCCCAATGCCATCCGCCTACGAATCGTGGAGCTAG
Deletion-4	GCGATGGAGCATAC*****CAACTTGGTGGCGTGTTCGTCAACGGCCGTCCC CTGCCCAATGCCATCCGCCTACGAATCGTGGAGCTAG

(B) Pax9-TALEN

Wild type	GCAATGGAGCCAGCCTTCGGGGAGGTGAACCAGCTGGGAGGAGTGTTCGTGAACGGAAGGCCG CTGCCCAACGCCATTTCGGCTTCGCATCGTGGGAATTAGCCCAACTGGGCATCCGACCTTGTG...
Deletion-1	GCAATGGAGCCAGC****GGGGAGGTGA
Deletion-2	GCAATGGAGCCAGC*****TGGGAGGAGTGTTCGTGAACGGAAGGCCG CTGCCCAACGCCATTTCGGCTTCGCATCGTGGGAATTAGCCCAACTGGGCATCCGACCTTGTGA
Deletion-3	GCAATGGAGCCAGC*TTCGGGGAGGTGA

図 2. Platinum TALEN を用いて作出した Pax1 及び Pax9 欠失マウスの DNA 配列

開始コドン付近 124 塩基の Pax1 (A) 及び Pax9 (B) の DNA 配列。開始コドンを赤、終止コドンを橙、変異した塩基を青、欠失した塩基をアスタリスクで示した。frameshift によりアミノ酸が変異する DNA 配列を緑で示した。DNA 結合部位である Paired domain をコードする塩基に下線を付した。Pax1-TALEN の Deletion-1 は、frameshift を伴わない 96 bp の欠失であるが、Pax1 ノックアウトマウスと同様のフェノタイプが観察されている。

を用いて Pax1 と Pax9 遺伝子の上流に欠失を作製し、frameshift によってこれらの遺伝子が欠失するマウスを作出した。その結果、これまでに 4 種類の Pax1 欠失マウス及び 3 種類の Pax9 欠失マウスの系統を確立した (図 2)。

Pax1 欠失マウスを胎生期から出生後において解析した結果、胎生期では椎間板外線維輪のわずかな低形成が観察されたが、出生後の成長に伴って外線維輪の低形成は顕著となる傾向が認められた。また、Pax1 欠失マウスの椎間板では、I 型コラーゲン等の腱・靭帯に発現する遺伝子発現レベルの低下傾向が認められ、現在、様々な遺伝子の発現変化について詳細な解析を進めている。過去の報告において、Pax1/Pax9 ダブルノックアウトマウスでは中軸骨格の形成が異常となり、出生時に死亡することが報告されているが、胎生期における椎間板の形成については報告されていない。今後、Pax1 及び Pax9 両方の遺伝子を欠失するマウス胚においても、椎間板の形成過程を解析する予定である。

○研究成果の公表

(発表論文)

Shukunami C*, Yoshimoto Y, Takimoto A, Yamashita H, Hiraki Y. Molecular characterization and function of tenomodulin, a marker of tendons and ligaments that integrate musculoskeletal components. *Jap. Dent. Sci. Rev. in press*. (Invited review).

腱・靭帯形成の制御：滝本晶、吉本由紀、山下寛、宿南知佐
整形・災害外科 58 巻 10 号 p1373-1379

(学会発表)

Pax1 と Sox9 による軟骨細胞の分化制御と脊柱の組織構築：滝本 晶、開祐司、宿南知佐：第 33 回
日本骨代謝学会学術集会（東京）平成 27 年 7 月 23-25 日

【移植環境の超高解像度 3 次元可視化技術が拓く戦略的細胞移植治療法の開発】

○研究代表者 放射線医学総合研究所分子イメージング研究センター

青木 伊知男 チームリーダー

○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

高効率の細胞移植治療には、事前の移植環境の整備と可視化が必要である。本研究では、超高解像度 3 次元可視化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、血管新生による移植環境整備とその超高解像度 3 次元可視化技術を開発する。

超高解像度磁気共鳴イメージング（マイクロ MRI）による血管新生評価のための技術開発と最適化として、次の事を実施した。冷却 2ch ファイズドアレイコイルは表面コイルであるため RF パルス照射の不均一性が生じやすい。そのため、毎回の撮像が最適に実施するために、マップ SIM による磁場不均一性の補正、および計測対象組織における RF パルスの最適化法を確立した。また、造影剤として、最も感度が高く血中滞留性が長いリポソーム型造影剤を試みたが、長期間観察の頻回投与では信号減衰が生じる事が判明した。そのため、血中アルブミン結合型の造影剤を用いて、長期間の血管内造影に成功した。

モデル動物を用いた実証実験を次のように実施した。塩基性線維芽細胞増殖因子 bFGF を含浸したゼラチンハイドロゲルをマウス背部皮下へ埋入することにより、血管新生を誘導した。血管新生誘導後、超高解像度磁気共鳴イメージング（マイクロ MRI）を用いて経時的に微小血管の撮像を行った（7 テスラ、FLASH 法）。その結果、等方性 50 ミクロンの三次元画像にて、血管新生を連続的に可視化することに成功した。

今後は、血管密度あるいは血流がその後に行う細胞移植治療の効果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。さらに、血管新生は骨形成などの組織再生を誘導するための重要な因子である。来年度は、組織再生時の血管新生を可視化していく予定である。

○研究成果の公表

(発表論文)

1. Murayama S, Jo J, Arai K, Nishikido F, Bakalova R, Yamaya T, Saga T, Kato M, Aoki I. γ -PARCEL: Control of Molecular Release Using γ -Rays. Anal Chem. 2015 Dec 1;87 (23): 11625-9. doi: 10.1021/acs.analchem.5b03030. Epub 2015 Nov 16.

(学会発表)

1. 青木伊知男、高磁場 MRI による細胞トラッキングとマイクロイメージング、第 14 回日本再生医療学会、シンポジウム・イメージング画像解析、パシフィコ横浜、2015.3.19
2. 青木伊知男、「三次元マイクロイメージング技術」における高磁場 MRI の役割、第 2 回 JST ライフサイエンス計測技術に関する検討会、科学技術振興機構東京本部別館、2015.4.24
3. 青木伊知男、診断と治療の一体化～セラノスティクス、シンポジウム 4、生体イメージングと DDS の融合がもたらす新しい潮流、第 31 回日本 DDS 学会、新宿、2015.7.3
4. 青木伊知男、MRI 顕微鏡とマルチモーダル統合技術が生命科学にもたらすもの、公開シンポジウム「全細胞・マルチモーダル計測が拓く統合バイオサイエンス」、日本学術会議、大阪大学、2016.1.25
5. Ichio Aoki, Functional and theranostic contrast agents for preclinical MR imaging, Joint AMED-DFG Japan-German Workshop on Functional Metabolic Imaging, Tubingen, Germany, 2016.3.21-22
6. Ichio Aoki, Functional and theranostic MRI contrast agents, Ground Round, The university of Arizona, 2016.1.19

【安定化された成長因子の放出制御による血管再生用足場材料の創製】

○研究代表者 神戸大学大学院工学研究科 大谷 享 准教授

○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 poly (ethylene glycol) (PEG) をグラフトした hyaluronic acid (HA) (PEG-g-HA) を用いたヒドロゲルを作製し、この PEG グラフト化による放出挙動への影響、内包量と放出率、放出期間の規格化を目指した。PEG をグラフト化することで、HA とミクロ相分離することが既往の研究から明らかとなっており、インスリンが PEG ドメインへ分配することで放出制御が可能であることが明らかになっている。本研究ではこの原理を利用し、成長因子である塩基性繊維芽細胞 (bFGF) の放出制御に適用し、血管新生用の scaffold としての可能性について in vitro 及び in vivo より検討した。

HA23 (M_n : 230 kDa) と α -Methyl- ω -aminopropoxy polyoxyethylene (PEG-NH₂, M_n : 5,200) とを純水に溶解させ、縮合剤存在下にて室温にて攪拌した。このとき、多糖:PEG 重量比を変更し、透析による精製後、PEG グラフト率が 5 及び 63wt% の二つの PEG-g-HA (P5gHA23, P63gHA23) を得た。得られた PEG-g-HA をさらに両末端アミノ化 PEG と同様に縮合反応することで、P5gHA23 ゲルお

よび P63gHA23 ゲルを得た。どちらのヒドロゲルも透明のヒドロゲルであり、含水率は 95%以上と同等であった。凍結乾燥後のゲルに、フルオレセインイソチオシアネート (FITC) ラベル化した bFGF を添加して 1 日放置後、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (DPBS) 溶液に浸漬させ、適宜サンプリングを行い蛍光強度測定により FITC 化 bFGF の累積放出率を算出した。これらヒドロゲルからの bFGF 放出量は PEG グラフト化率が 63%のときに減少し、かつ放出速度も小さくなる傾向が見られた。一方、PEG グラフト率が 5%のときは、放出速度が増大し、放出量も多くなる傾向がみられた。FITC ラベル化 bFGF は PEG と HA の水性二層分離系において PEG 相へ分配される傾向が示されたことから、PEG グラフト化に伴って PEG 相へ分配された結果であると示唆された。

さらに、これらヒドロゲルからの bFGF 徐放化によるマウス背部皮下における血管新生について評価した。マウス背部皮下埋入 1 週間後のヘモグロビン量を定量したところ、血管新生は PEG グラフト化によって有意に増大し、組織学的評価からも血管新生が確認された。以上から、PEG-g-HA の PEG グラフト率の違いは、bFGF の放出制御による血管新生の規格化を推進するための大きな要因となることが示された。今後は、個々の個体差に適用可能な bFGF 放出速度・放出量を規格化し、ヒドロゲルの分解・消失制御も可能とする架橋法の検討についても推進していく。

○研究成果公表

(発表論文)

1. Ari, YAMAMOTO, Masaya, YAMAMOTO, Yasuhiko TABATA, Tooru, OOYA, Controlled Release of Basic Fibroblast Growth Factor By Poly(ethylene glycol)-*g*-*taft*-Hyaluronic Acid Hydrogels for Angiogenesis, in preparation.

(学会発表)

1. 山本阿里, 大谷 亨, “成長因子と相互作用するアニオン性ブロック共重合体の調製” 第 63 回高分子年次大会、名古屋、2014 年 5 月 30 日.
2. 山本阿里, 大谷 亨, “硫酸基とカルボキシ基を有するポリマーのヘパリン類似活性評価” 第 60 回高分子研究発表会 (神戸)、神戸、2014 年 7 月 24 日.
3. 山本阿里, 大谷 亨, “細胞増殖因子と複合化したヘパリン類似ポリマーによる細胞増殖活性制御のアプローチ” 第 36 回日本バイオマテリアル学会、船堀、2014 年 11 月 18 日.
4. 山本阿里, 大谷 亨, “ヘパリン類似ポリマーの化学構造による細胞増殖因子結合性の違い” 神戸大学研究基盤センター若手フロンティア研究会 2014, 神戸, 2015 年 12 月 24 日.
5. 山本阿里, 大谷 亨, “ヘパリン類似ポリマーを用いた細胞増殖因子内包ゲルの作製” 第 64 回高分子年次大会、札幌、2015 年 5 月 27 日.
6. 山本阿里, 大谷 亨, “超分子ゲルとヘパリン類似ポリマーを組み合わせた成長因子放出制御ゲルの調製” 第 64 回高分子討論会、仙台、2015 年 9 月 17 日.
7. 山本阿里, 大谷 亨, “ヒアルロン酸を用いた細胞増殖因子内包ゲルの精密放出制御へのアプローチ” 第 37 回日本バイオマテリアル学会、京都、2015 年 11 月 10 日.

8. 大谷 亨, “ヒアルロン酸とポリエチレングリコールを組み合わせたプロテインデリバリーの可能性” 高分子学会九州支部フォーラム～高分子科学と医療技術の交差点～、熊本、2016年1月18日.

【免疫抑制剤不使用・同種移植インスリン分泌細胞免疫寛容における免疫学的変化の分子生物学的解明】

○研究代表者 京都府立医科大学大学院医学研究科 濱口 真英 病院助教

○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

再生研のグループでは、膵ランゲルハンス氏島（膵島）の移植による1型糖尿病治療に関し、移植膵島の生着率向上を目指した技術開発などを行っている。その中で、環状ペプチド SEK を含むハイドロゲルデバイスを皮下に埋入し血管新生を誘導した後に膵島を移植したところ、免疫抑制剤を投与することなく糖尿病ラットの血糖値を長期間正常化できることを見出した(図1)。このことは、SEKによって皮下への血管新生誘導と同時に免疫寛容部位が形成され、移植した膵島が免疫反応によって拒絶されることなく生着したことを示唆している。免疫寛容部位の形成には制御性T細胞（Treg）が関与していると考え、SEK含有ハイドロゲルデバイス埋入時および膵島移植後の皮下組織に存在する Treg を調べた。

SEK100 μg を担持させたアガロースロッド（長さ 25 mm，直径 4 mm）を糖尿病 ACI ラットの背部皮下部位に埋入し 10 日後，多数の血管が形成された部位に浸潤した免疫細胞を解析した。SEK を含まないアガロースロッド使用群と比べて Fcpx3⁺CD4⁺T 細胞（Treg）の割合が高く，一方拒絶に関係する CD8⁺T 細胞の割合は低いことが分かった(図2)。所属リンパ節や脾臓においては両群に有意な差は見られなかった。これらの結果から，全身性の免疫抑制ではなく SEK 担持デバイスを埋入した箇所のみでの免疫寛容誘導が示唆された。



図1. 皮下への膵島移植の概略図

また，皮下へ膵島を移植し 5 日および 30 日後において移植部位に浸潤する免疫細胞についても解析した。移植後 30 日にわたり Treg の割合は高く，CD8⁺T 細胞は低い割合を維持していた(図3)。移植後 30 日にわたり免疫寛容環境を維持していたと考えられる。組織学的には移植 30 日後において移植膵島内部へ

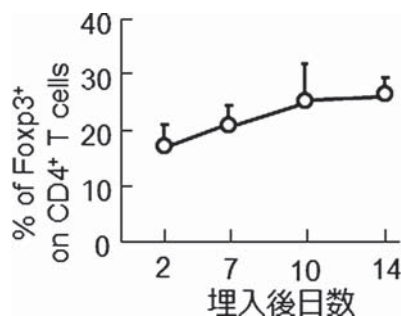


図2. SEK 担持デバイスを埋入した部位周辺へ浸潤する Treg の割合の経時変化

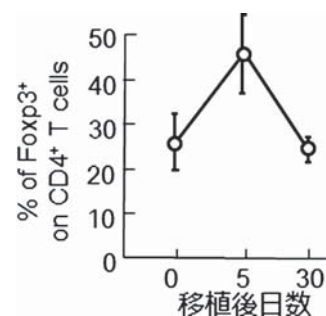


図3. 移植膵島周囲における Treg の割合の経時変化

の Treg の浸潤が観察されたが、CD8⁺T 細胞の浸潤は見られなかった。

以上のことから、SEK 担持デバイスの埋入によって皮下組織に Treg が集積し、その免疫抑制能によって移植臓器が拒絶されることなく生着したことを明らかにすることができた。

○研究成果の公表

1. 特願 2015-82847、免疫寛容部位形成剤及び免疫抑制性細胞の誘引剤」岩田博夫、榎原令、濱口真英、平野邦夫（出願日：2015. 4. 14）
2. Long-term functioning of allogeneic islets in subcutaneous tissue pretreated with a novel cyclic peptide in the absence of immunosuppressive medication. Rei Kuwabara, Masahide Hamaguchi, Takuya Fukuda, Hiroki Sakai, Makoto Inui, Simon Sakaguchi, Hiroo Iwata. (American Journal of Transplantation に投稿準備中)

【遺伝子トラップ・エンハンサートラップ法を用いた神経系支持細胞の同定と機能の解明】

○研究代表者 国立遺伝学研究所 川上 浩一 教授

○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

本研究において川上は、ゼブラフィッシュを用いた遺伝子トラップ法・エンハンサートラップ法により、神経系とその周辺の多様な細胞集団を可視化し、新規の神経系細胞の同定や神経回路の解明を行ってきた実績を生かし、中枢・末梢神経系構築における支持細胞集団の同定、機能解明を目指してきた。共同研究者瀬原は、同定細胞の性質を増殖因子や接着因子、プロテアーゼの働きを中心に明らかにしてきた実績を生かし、同様の支持機構が哺乳類でも働いていることの検証を目指した。我々が樹立した1系統、ゼブラフィッシュの感覚器である側線の神経細胞を支持する Schwann 細胞で Gal4 を発現するラインを用いて、そのトランスポゾンが ErbB2 遺伝子内に挿入し ErbB2 遺伝子を破壊していること、トランスジェニックフィッシュのホモ2倍体において Schwann 細胞移動・維持の欠損を見出した。さらにこのトランスジェニックフィッシュシステムを利用して脳神経系の発達における ErbB シグナリングの役割、そこに関わるニューレグリンアイソフォームの特定などに関する研究を行った。また、神経細胞に沿って移動・分化するグリア細胞を可視化し、ニューレグリンー ErbB シグナリングへの依存性を調べてきた。現在、ニューレグリンアイソフォーム特異的な遺伝子ノックアウトフィッシュを作成し、それを証明しようとしている（論文準備中）。

一方、視蓋（中脳）において Gal4 を発現するトランスジェニックフィッシュの作製を行なったが、この系統では中脳の神経前駆細胞が可視化でき、その動態を調べることによって、増殖因子ニューレグリンの関わる脳神経細胞の分化・増殖メカニズムにおける新たな役割を見いだすことができた。神経細胞の産生は、第1に、神経幹細胞から神経前駆細胞が産生される段階、第2に、神経前駆細胞が分裂して非増殖性の神経細胞を産生する段階である。第1段階では、FGF, Wnt, Notch シグナルの関与などが明らかにされているが、第2段階の神経前駆細胞から神経細胞を産生する過程については、そのような増殖分化シグナルが必要かどうかは知られていなかった。そこで本研究では、ErbB シグナルに着目し、ErbB シグナルが神経細胞の産生をどのように制御しているか、神

経発生の段階的過程を解析するためにゼブラフィッシュの視蓋を脊椎動物の脳のモデル系として検討した。そして作成した中脳神経幹細胞で特異的に Gal4 を発現するラインを用いて、一個の幹細胞に由来する神経前駆細胞・分化した神経細胞を可視化し、ErbB 阻害剤処理後、阻害剤除去後のタイムラプスを行い、神経前駆細胞から神経細胞が産生される過程を調べることによって、ErbB4-ニューレグリン 1 タイプ II シグナルが、神経前駆細胞から神経細胞の産生に関与することを見出した。

次の問題は、これらの現象に関与するニューレグリンの産生がどのように制御されているか、とすることである。ニューレグリンは、その細胞外ドメインがプロテアーゼの働きにより切断活性化されることが知られている。共同研究者はそのようなプロテアーゼの一種である ADAM に関する研究実績があることから、現在協力して、ニューレグリンがグリア産生や神経産生、シナプス形成などにおいて、どのように切断活性化、どのプロテアーゼにより切断活性化されるか、その活性化機構はどのようなものか、を現在検討中である。

○研究成果の公表

(発表論文)

Neuregulin 1 type II-ErbB signaling promotes cell divisions generating neurons from neural progenitor cells in the developing zebrafish brain. Sato, T., Sato, F., Kamezaki, A., Sakaguchi, K., Tanigome, R., Kawakami, K., and Sehara-Fujisawa, A. *PLoS One*, May 22;10 (5): e0127360 (2015)

High-resolution live imaging reveals axon-glia interactions during peripheral nerve injury and repair in zebrafish. Xiao Y, Faucherre A, Pola-Morell L, Heddleston JM, Liu TL, Chew TL, Sato F, Sehara-Fujisawa A, Kawakami K, López-Schier H. *Dis Model Mech*. 2015 Jun;8 (6): 553-64.

(学会発表)

Sato F, Nishimura D, Hori S, Arai H, Hiramuki Y, Sogabe M, Kuriki M, Choi M, Wang Z, Kawahara A, Kawakami K, Sehara-Fujisawa A 48th Annual meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists (第 48 回日本発生生物学会)、2015 年 6 月 5 日 (金) つくば国際会議場 (茨城県つくば市)

Sato F, Nishimura D, Hori S, Arai H, Hiramuki Y, Sogabe M, Kuriki M, Choi M, Wang Z, Kawahara A, Kawakami K, Sehara-Fujisawa A. 48th Annual meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists (第 48 回日本発生生物学会)、2015 年 6 月 3 日 (金) つくば国際会議場 (茨城県つくば市)

佐藤智美、佐藤文規、亀崎青沙、坂口和弥、谷米竜馬、梶原健、永島雅文、川上浩一、瀬原淳子、BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 会日本生化学会大会 合同大会)、2015 年 12 月 4 日 (金) 神戸ポートピアホテル (神戸市)

【抗原特異的制御性 T 細胞の iPS の作成】

○研究代表者 名古屋市立大学大学院医学研究科 山崎 小百合 教授

○再生医科学研究所共同研究者 再生免疫学分野 河本 宏 教授

○研究経過及び研究成果

現在の免疫抑制療法は全身の免疫を抑制してしまうために重篤な感染症や発ガンリスクがある。生体にとって好ましくない免疫反応を特異的に抑制する為に、移植片拒絶、自己免疫疾患、アレルギーなどに対する抗原特異的な免疫抑制療法が必要である。抗原特異的な制御性T細胞による抑制がその解決策の一つと考え、将来、iPS化する事で数的な問題にも対応し、将来の抗原特異的な治療法に応用できるのでは、と考え、河本教授と共同研究を開始した。

制御性T細胞は、マウスやヒトの末梢のCD4⁺Tリンパ球の5-10%を占める亜集団で、自己免疫、腫瘍免疫、アレルギー、移植免疫、慢性炎症など様々な免疫反応を抑制する。申請者は、坂口志文教授の下、1999-2002年に制御性T細胞が腫瘍免疫抑制に関わる事 (Shimizu, Yamazaki, Sakaguchi. *J Immunol* 1999; Ko, Yamazaki et al. *J Exp Med* 2005)、GITRが制御性T細胞の機能を制御する事 (Yamazaki et al. *Nat Immunol* 2002)を見出した。さらに、樹状細胞を発見したRockefeller大Ralph Steinman教授と共に、樹状細胞による抗原提示で抗原特異的な制御性T細胞を増殖誘導できる事を示してきた (Yamazaki et al. *J Exp Med* 2003; Yamazaki et al. *PNAS* 2006; Yamazaki et al. *Blood** 2007 *Corresponding author 引用回数 129; Yamazaki et al. *J Immunol** 2008 *Corresponding author)。

これらの成果はマウスを主に使っていたが、ヒトでも同様に樹状細胞で抗原特異的な制御性T細胞の誘導ができる可能性があり、今回、この実験系の確立を行った。最初に健常人のPBMCのCD14⁺単球由来樹状細胞を試験管内でGM-CSF, IL-4にて誘導する系をセットアップした。CD14⁺単球由来樹状細胞にLPSやサイトカインカクテルを加えることでimmatureな状態からmatureな状態に誘導できる事も確認した。末梢血液由来の各種樹状細胞サブセットもFlow cytometerにて採取する方法も検討したが、sortingによる樹状細胞へのダメージがより大きく、回収率も少なかったため、CD14⁺単球由来樹状細胞の使用が適切と判断した。制御性T細胞はPBMCよりCD4, CD25, CD45RAなどをマーカーとして同定することにした。樹状細胞による抗原提示で制御性T細胞の増殖を解析するため、細胞の条件、細胞数、日数などを中心に条件検討をFlow cytometerにて行った。制御性T細胞の数が少なく、iPS化をする場合は、制御性T細胞のより多くの増殖が必要であるため、実験系のセットアップに時間を要しつつ現在も実験を続けている。

樹状細胞による抗原提示を駆使して、抗原特異的な制御性T細胞を増殖誘導し、病態を特異的に抑制する事で将来、重篤感染症と発癌のリスクを軽減できる。さらに将来的にiPS化をする事で、数的な問題点の克服ができれば、臨床応用が平易になるのでは、と考える。

○研究成果の公表

(発表論文)

Gunawan M, Venkatesan N, Loh JT, Wong JF, Berger H, Neo WH, Li LY, Win MK, Yau YH, Guo T, See PC, Yamazaki S, Chin KC, Gingras AR, Shochat SG, Ng LG, Sze SK, Ginhoux F, Su IH.

Histone methyltransferase Ezh2 controls cell adhesion and migration through direct methylation of Talin
Nat Immunol 2015;16:505-16. Doi:10.1038/nl.3125.

Kubo R, Muramatsu S, Sagawa Y, Saito C, Kasuya S, Nishioka A, Nishida E, Yamazaki S, Morita A

Bath-PUVA therapy improves impaired resting regulatory T cells and increases activated regulatory T

cells in psoriasis (Submitted)

(学会発表)

LC2015, 14th International Workshop on Langerhans Cells

Ultraviolet B-expanded Thymus-derived Foxp3⁺ Regulatory T Cells Interact with Dendritic Cells in The Skin

Sayuri Yamazaki¹, Akiko Nishioka², Saori Kasuya², Naganari Ohkura^{3,4}, Hiroaki Hemmi^{5,6}, Tsuneyasu Kaisho^{5,6}, Osamu Taguchi², Shimon Sakaguchi³, Akimichi Morita²

¹ Department of Immunology, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences,

² Department of Geriatric and Environmental Dermatology, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences

LC2015, 14th International Workshop on Langerhans Cells

Analysis of C5a receptor expression on the various subsets of dendritic cells

Kohei Tsujimura¹, Rieko Ohta², Masaki Imai¹, Sayuri Yamazaki¹

¹ Department of Immunology, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences

² Division of Immunology, Aichi Cancer Center Research Institute

LC2015, 14th International Workshop on Langerhans Cells

Phenotype analysis of Foxp3⁺ CD4⁺ regulatory T cells and dendritic cells in the skin after Ultraviolet B exposure

Mizuyu Odanaka¹, Sayuri Yamazaki¹, Akiko Nishioka², Saori Kasuya², Syoryu Takayama¹, Masaki Imai¹, Akimichi Morita²

¹ Department of Immunology, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences

² Department of Geriatric and Environmental Dermatology, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences

第 44 回日本免疫学会学術集会

Foxp3⁺CD4⁺ Regulatory T Cells with Decreased Motility Accumulate in Aged Lymphoid Tissue

Sayuri Yamazaki¹, Masaki Imai¹, Akiko Nishioka², Saori Kasuya², Mizuyu Odanaka¹, Osamu Taguchi², Akimichi Morita²

¹ Department of Immunology, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences,

² Department of Geriatric and Environmental Dermatology, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences

第 44 回日本免疫学会学術集会

Phenotype analysis of Foxp3⁺CD4⁺ regulatory T cells in the skin after Ultraviolet B exposure

Mizuyu ODANAKA¹, Sayuri YAMAZAKI¹, Akiko NISHIOKA², Saori KASUYA², Shoryu TAKAYAMA¹, Masaki IMAI¹, Osamu TAGUCHI², Akimichi MORITA²

¹ Department of Immunology, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences,

² Department of Geriatric and Environmental Dermatology, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences

第 44 回日本免疫学会学術集会

Differential roles of complement anaphylatoxin C5a and C5adesArg

TAKAYAMA Shoryu¹, ODANAKA Mizuyu¹, Ohta Rieko^{1,2}, IMAI Masaki¹, YAMAZAKI Sayuri¹

¹ Department of Immunology, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, ²Division of Immunology, Aichi Cancer Center Research Institute

第 40 回研究皮膚科学会

Ultraviolet B (UVB) Exposure Expands Thymus-derived Foxp3⁺ CD4⁺ Regulatory T Cells with Distinctive Phenotype in The Skin

Sayuri Yamazaki¹, Mizuyu Odanaka¹, Akiko Nishioka², Saori Kasuya², Shoryu Takayama¹, Masaki Imai¹, Osamu Taguchi², Akimichi Morita²

¹ Department of Immunology, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences,

² Department of Geriatric and Environmental Dermatology, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences

第 52 回補体シンポジウム

C5a 第 2 レセプター C5L2 の発現解析

辻村幸平¹、太田里永子²、今井優樹¹、山崎小百合¹

名古屋市立大学・医・免疫¹ 愛知がんセンター研究所・腫瘍免疫部²

【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

○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

網膜芽細胞腫の患者 96 名遺伝学的情報からのジェノタイプとフェノタイプ（腫瘍発症までの期間、親子－兄弟間の疾患浸透度、腫瘍の分化度）から腫瘍形成性の高い変異パターンを解析した。その結果、多能性幹細胞への遺伝子改変を行う際の変異パターン候補の抽出を完了した。また、80 症例の網膜芽細胞腫病理組織検体を用いた Tissue Micro Array (TMA) を作製した。網羅的なトランスクリプトーム解析と TMA を用いた免疫組織化学染色ならびに in situ hybridization 解析から、これまで報告されていない網膜芽細胞腫瘍特異的に発現する転写因子 X 分子を見いだした。さらに転写因子 X 分子の直接的なターゲットを Chromatin Immuno-precipitation (ChIP) と次世代シーケンサーによる解析により methyltransferase である Y 分子を見だし、Y 分子のプロモーター領域の転写因子 X のモチーフを明らかとした。本年度の研究結果を元に次年度では遺伝子改変多能性幹細胞作製を進める。

尚、本研究により見いだされた分子は未発表の内容であり、本報告書では“X 分子” “Y 分子”として記載した。

○研究成果の公表

(学会発表)

第 120 回日本眼科学会総会 シンポジウム 網膜芽細胞腫の病理学的・分子生物学的解析

【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 グループリーダー

○再生医科学研究所共同研究者 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

膵臓はその約 9 割以上は外分泌腺が占め、その中に内分泌細胞が集まる膵島が島のように浮かんで存在している組織である。膵島細胞が腫瘍化すると膵内分泌腫瘍となり、一方で膵島の機能が破綻し、インスリン分泌が異常になると糖尿病を発症する。糖尿病患者の治療として、膵臓移植より患者の体への負担が少ないという事で膵島移植が行われている。日本においては臓器提供者が少ないため、より高い膵島の生着率が望まれており、膵島細胞を増殖させる、あるいは膵島細胞の細胞死を抑制する方法が模索されている。

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)。

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

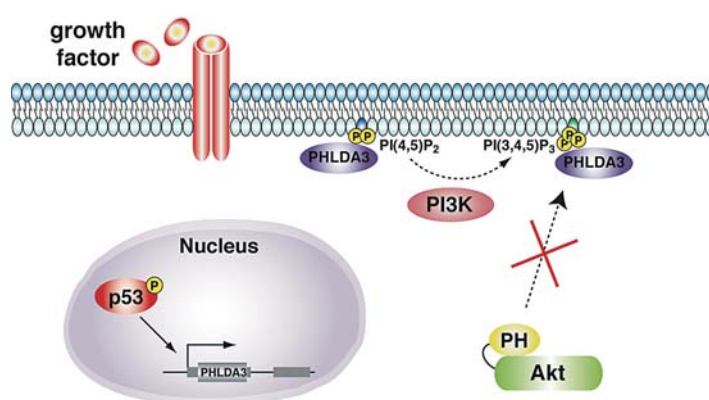


Fig. 1 p53 によって PHLDA3 が誘導されると、PHLDA3 は細胞膜上の PIPs と結合し、結果として、Akt は膜移行と活性化が阻害される。

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たいと考えている。

○研究成果の公表

(発表論文)

1. Naitoh T, Morikawa T, Tanaka N, Aoki T, Ohtsuka H, Okada T, Sakata N, Ohnuma S, Nakagawa K, Hayashi H, Musha H, Yoshida H, Motoi F, Katayose Y, Unno M. Early experience of robotic surgery for type I congenital dilatation of the bile duct. *J Robot Surg.* 2015;9:143-8.
2. Hata T, Ishida M, Motoi F, Sakata N, Yoshimatsu G, Naitoh T, Katayose Y, Egawa S, Unno M. Clinical Characteristics and Risk Factors for the Development of Postoperative Hepatic Steatosis After Total Pancreatectomy. *Pancreas.* 2016;45:362-9.
3. Tsuchiya H, Sakata N, Yoshimatsu G, Fukase M, Aoki T, Ishida M, Katayose Y, Egawa S, Unno M. Extracellular Matrix

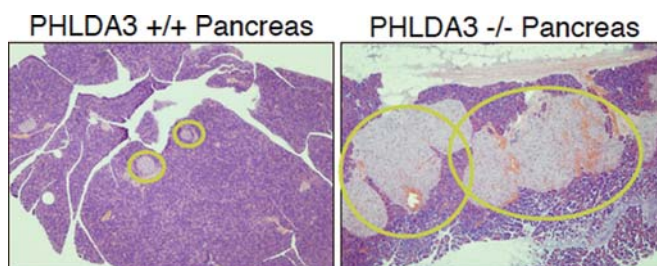


Fig. 2 同腹の野生型マウスとの膵臓組織の比較。PHLDA3 欠損マウスでは膵島が異常に大きい。

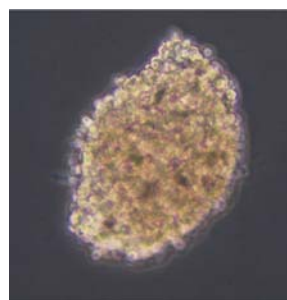


Fig. 3 分離した rat 膵島

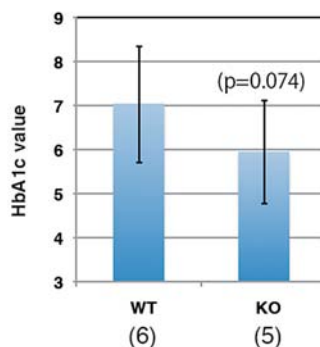
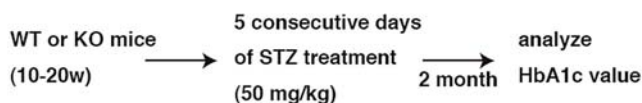


Fig. 4 PHLDA3 KO マウスでは、STZ 誘発性の高血糖が抑制される。

and Growth Factors Improve the Efficacy of Intramuscular Islet Transplantation. PLoS One. 2015;10:e0140910.

4. 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;15:2085-95.
5. 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;15:1531-42.
6. 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;99:1132-43.
7. Yoshimatsu G, Sakata N, Tsuchiya H, Minowa T, Takemura T, Morita H, Hata T, Fukase M, Aoki T, Ishida M, Motoi F, Naitoh T, Katayose Y, Egawa S, Unno M. The co-transplantation of bone marrow derived mesenchymal stem cells reduced inflammation in intramuscular islet transplantation. PLoS One. 2015;10:e0117561.
8. Komatsu H, Egawa S, Motoi F, Morikawa T, Sakata N, Naitoh T, Katayose Y, Ishida K, Unno M. Clinicopathological features and surgical outcomes of adenocarcinoma of the pancreas: a retrospective analysis of patients with resectable stage tumors. Surg Today. 2015;45:297-304.
9. 1. Yoshinori Asano, Tatsuya Kawase, Atsushi Okabe, Shuichi Tsutsumi, Hitoshi Ichikawa, Satoko Tatebe, Issay Kitabayashi, Fumio Tashiro, Hideo Namiki, Tadashi Kondo, Kentaro Semba, Hiroyuki Aburatani, Yoichi Taya, Hitoshi Nakagama and Rieko Ohki[#] ([#]corresponding author). IER5 generates a novel hypo-phosphorylated active form of HSF1 and contributes to tumorigenesis. Scientific Reports, 6, 19174; doi: 10.1038/srep19174, 2016.
10. Xiaoqi Wang, Guangyuan Li, Sanjay Koul, Rieko Ohki, Matthew Maurer, Alain Borczuk, Balazs Halmos. PHLDA2 is a key oncogene-induced negative feedback inhibitor of EGFR/ErbB2 signaling via interference with AKT signaling. Oncotarget, DOI: 10.18632/oncotarget.3674, 2015.
11. Toshitsugu Fujita, Miyuki Yuno, Daisuke Okuzaki, Rieko Ohki, and Hodaka Fujii. Identification of non-coding RNAs associated with telomeres by enChIP-RNA-Seq. PLoS One, 10, e0123387, 2015.

(特許)

PTC/JP2015/064792

発明の名称：移植材料およびその調整方法

出願人：京都大学、東北大学、大木理恵子

【ヒト多能性幹細胞由来の各種心筋細胞を用いた心臓拍動制御系の in vitro 再構築】

○研究代表者 鳥取大学医学系研究科 白吉 安昭 准教授

○再生医科学研究所共同研究者 胚性幹細胞研究分野 末盛 博文 准教授

○研究経過及び研究成果：

ヒト ES 細胞から分化誘導した心筋には、電気信号の生成にかかわるペースメーカー細胞などの特殊心筋と、生成された電気信号に基づいて拍動する心室筋・心房筋などの作業心筋が、無秩序に混在している。しかも、これらの比率は、分化誘導ごとに異なる。我々、ヒトの心臓は、特殊心筋と作業心筋、それぞれが、正確な解剖学的位置を占め、その比率も一定である。そこで、多能性幹細胞を分化誘導してできる各種サブタイプ心筋の混在した集団の中から、ペースメーカー細胞および心室筋細胞を純化した形で取り出し、それらを組み合わせることによって、生体心臓の拍動モデルの構築を目指した。

そこでマーカー遺伝子の発現を蛍光タンパク質によって可視化し、マーカー遺伝子を発現する細胞を選択的に分取できるヒト ES 細胞株の樹立を試みた。具体的には、(1) ペースメーカー細胞に関して、マーカー遺伝子である HCN4 イオンチャネルの発現を CFP あるいは GFP で、(2) 心室筋細胞について、MLC2v 遺伝子の発現を mCherry により、選択的に分取できるヒト ES 細胞株の樹立に成功した。

続いて、各蛍光タンパク質を特異的に発現する心筋細胞をセルソーターによって、分取し特性を解析した。分化誘導後 2 ヶ月目において、GFP (HCN4) 陽性細胞は、ペースメーカー細胞陽の特性を示し、mCherry (MLC2v) 陽性細胞は、心室筋細胞特性を示した。また、HCN4 陽性細胞は、HL1 心房筋細胞と電気的に結合でき、その拍動を制御できることも明らかにすることができた。最後に、比較的初期の分化誘導段階で、分取した GFP (HCN4) 陽性細胞は、その後培養を続けると mCherry の蛍光を発することが分かった。これは、HCN4 陽性細胞が、心室筋用細胞へとさらに分化することを示していて、HCN4 が、心臓発生初期には、心臓プロジェニター細胞のマーカーであることと一致する。また、本研究で、開発した分化誘導法を疾患 iPS 細胞の心筋分化へと応用し、LQT1 症候群の病因・病態解明を行った。

○研究成果の公表

(発表論文)

Sogo T, Morikawa K, Kurata Y, Li P, Ichinose T, Yuasa S, Nozaki D, Miake J, Ninomiya H, Shimizu W, Fukuda K, Yamamoto K, Shirayoshi Y, Hisatome I. Electrophysiological properties of iPS cell-derived cardiomyocytes from a patient with long QT syndrome type 1 harboring the novel mutation M437V of KCNQ1. Regenerative Therapy, in press (2016).

【動静脈の性質を規定する染色体構造解析】

○研究代表者 東京大学アイソトープ総合センター 神吉 康晴 助教

○再生医科学研究所共同研究者 幹細胞分化制御研究分野 山下 潤 教授

○研究経過及び研究成果

本研究では、細胞特異性を規定しているエピジェネティクス機構から、血管内皮細胞（特に動静脈）分化を支配する染色体構造を解き明かすことが目的である。

このためにまず、ES細胞を用いた血管内皮細胞分化系を用いて、経時的なエピゲノム情報の解析を試みた。細胞分化にとって重要なヒストン修飾である H3K4me3、H3K27me3 抗体を用いて経時的な ChIP-sequence 解析、及び mRNA 発現解析を行い、両者から内皮細胞分化に重要な 4 つの転写因子 Gata2, Fli1, Sox7, Sox18 を絞り込んだ。この 4 つの因子は既報の重要な転写因子 Etv2 の後に発現が上昇してくるものであり、中胚葉分画では H3K27me3 修飾によってその発現が抑制されているという共通のヒストン修飾のパターンを持っていた。この 4 つの因子を分化途上でノックダウンすると、それぞれのノックダウンでも内皮分化は阻害されたが、4 つ全てをノックダウンした際には内皮分化は劇的に抑制された。

以上の知見より、分化系において網羅的な発現解析及びヒストン修飾のパターン解析を統合することで、master regulator の絞込に成功し、この仕事は現在論文投稿中である。

一方で、染色体立体構造に関する網羅的な解析 ChIA-PET を行うには、現在の分化系では細胞数が少なすぎる問題点があり、難航している。既に成功しているヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) において、少量の細胞数で効率よくデータを回収する手法の検討及び、別の染色体構造解析 (Hi-C) も試みている最中である。これら手法により、少量の細胞数で解析できる目処が立てば、血管内皮細胞分化系で実験を行う予定である。

○研究成果の公表

(投稿中論文)

「Dynamics of transcriptome and histone modifications reveal a master transcription factor network necessary for endothelial cell differentiation」

Yasuharu Kanki, Ryo Nakaki, Teppei Shimamura, Taichi Matsunaga, Kohei Yamamizu, Shiori

Katayama, Jun-ichi Suehiro, Tsuyoshi Osawa, Hiroyuki Aburatani, Tatsuhiko Kodama, Youichiro Wada,

Jun K Yamashita, Takashi Minami

【ゲノム改変技術とイメージング技術を駆使したマウス体内時計の発生メカニズム解明】

○研究代表者 京都府立医科大学大学院医学研究科 八木田 和弘 教授

○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

体内時計は全身の細胞に広く備わっており、様々な生理機能の日内リズム（概日リズム）の制御に関与していると考えられている。体内時計は胎生期に形成されることが知られているが、一方で、なぜ胎生後期まで体内時計が抑制され概日リズムが消される必要があるのか、全く分かっていない。これまで我々は、体内時計の発生は細胞分化と関連し (PNAS, 2010)、ES細胞などの未分化細胞では様々な体内時計抑制メカニズムが働いていることを明らかにしてきた (PNAS, 2014 など)。本研究では、発生工学やゲノム改変技術を応用することで、発生過程で細胞が時間情報をどのように生み出し、それをどのように活用し制御するのか、について検討を行った。

消された体内時計：ES細胞と初期胚

哺乳類の概日リズムの中核は視床下部にある視交叉上核である。一方で、末梢のほとんどの細胞に体内時計があることが分かっている。さらに、我々は線維芽細胞など培養細胞でも視交叉上核と基本的に同様の体内時計が備わっていることを明らかにしている (Yagita ら, *Science*, 2001)。この唯一の例外が精粗細胞といった「生殖細胞」であり、体内時計のリズムが見られない。生殖細胞にも時計遺伝子は発現しており、概日リズムが無い理由は現在でも分かっていない。さらに、受精卵や初期胚にリズムが見られないことが報告されている。これに加えて、最近申請者は、ES 細胞や iPS 細胞といった多能性幹細胞に体内時計の振動が見られないことを発見した (Yagita ら, *PNAS*, 2010)。さらに、ES / iPS 細胞を *in vitro* で分化誘導すると、分化に伴って細胞自律性に約 24 時間周期の体内時計が形成されることを明らかにし、「概日時計は細胞分化と密接に関連する」という新概念構築につながる現象を世界で初めて発見した (Yagita ら, *PNAS*, 2010; Umemura ら, *PLoS One*, 2013)。さらに、我々は最近、DNA メチル化酵素欠損 ES 細胞などで体内時計形成が破綻していることを見出した。これらの細胞の RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析から細胞分化に関わる因子が体内時計の発現にも必須であり、これらの働きによって制御される体細胞型の転写ネットワーク形成が重要であることを発見した (Umemura ら, *PNAS*, 2014)。

一方で我々は、ES 細胞など多能性幹細胞では積極的に体内時計を抑制する「Active Suppression」機序が働いていることを明らかにし、多能性幹細胞や発生初期段階では体内時計が「ただ無い」のではなく「意味のある抑制状態」にあるという新たな視点を提供した (投稿中)。

マウス発生工学による体内時計形成メカニズム解析

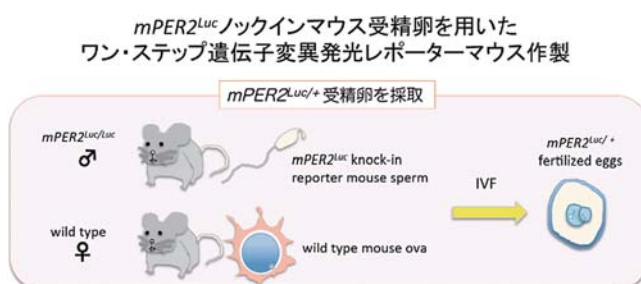
また、再生研共同研究により、*in vivo* での体内時計形成メカニズムについて検討を進め。そのなかで、近藤玄教授との共同研究により、体内時計レポーターの mPER2:Luc ノックインマウスの受精卵に CRISPR/Cas9 法によって遺伝子欠損を導入する方法で、mPER2:Luc / MeCP2 欠損マウスを簡便に作成し、これまで困難であった行動レベルと分子レベルをつなぐ体内時計解析に成功した (Tsuchiya ら, *Genes Cells*, 2015)。MeCP2 欠損マウスは Rett 症候群モデルとしても知られており、Rett 症候群で合併する睡眠障害のメカニズム理解にもつながる成果となった。

今後は、これらの成果に立脚し、本共同研究では、哺乳類の発生過程で体内時計が抑制されるメカニズムとその生物学的意義を、マウス発生工学とゲノム改変技術を用いて *in vivo* で解き明かしていく。これまでの一連の研究でタイアップしている再生研の近藤玄教授との共同研究で、発生過程における体内時計が生み出す「細胞レベルの時間情報」について検討しているところである。

○研究成果の公表

(*Corresponding author)

1. Ohashi M, Umemura Y, Koike N, Watanabe H, Yamada Y, Kondoh G, **Yagita K***, *In vivo* reprogramming induced transdifferentiation disrupts the circadian clock in mouse Wilms Tumor model. (In preparation)
2. Kunitomo T, Okubo N, Minami Y, Fujiwara H, Hosokawa T, Asada M, Oda R, Kubo T, **Yagita K***, A



PTH-responsive circadian clock operates in ex vivo mouse femur fracture healing site., *Sci. Rep.*, 6, 22409, 2016

3. Tsuchiya Y, Umemura Y, Minami Y, Koike N, Hosokawa T, Hara M, Ito H, Inokawa H, **Yagita K***., Effect of Multiple Clock Gene Ablations on the Circadian Period-Length and Temperature Compensation in Mammalian Cells., *J. Biol. Rhythm*, 31, 48-56, 2016
4. Tsuchiya Y, Minami Y, Umemura Y, Watanabe H, Ono D, Nakamura W, Takahashi T, Honma S, Kondoh G, Matsuishi T, **Yagita K***., Disruption of MeCP2 attenuates circadian rhythm in CRISPR/Cas9-based Rett syndrome model mouse., *Genes Cells*, 20, 992-1005, 2015
5. Hosokawa T, Tsuchiya Y, Okubo N, Kunimoto T, Minami Y, Fujiwara Y, Umemura Y, Koike N, Kubo T, **Yagita K***. Robust circadian rhythm and parathyroid hormone-induced resetting during hypertrophic differentiation in ATDC5 chondroprogenitor cells., *Acta Histochem. Cytochem.*, 48, 165-171, 2015
6. Oshima T, Yamanaka I, Kumar A, Yamaguchi J, Nishiwaki-Okawa T, Muto K, Kawamura R, Hirota T, **Yagita K**, Irie S, Kay SA, Yoshimura T, Itami K., C-H Activation Generates Period-Shortening Molecules That Target Cryptochrome in the Mammalian Circadian Clock., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 54, 7193-7197, 2015
7. Okubo N, Fujiwara H, Minami Y, Kunimoto T, Hosokawa T, Umemura Y, Inokawa H, Asada M, Oda R, Kubo T, **Yagita K***., Parathyroid hormone resets the cartilage circadian clock of the organ-cultured murine femur., *Acta Orthopædica*, 86, 627-631, 2015.
8. Umemura Y, Koike N, Matsumoto T, Yoo S-H, Zhen C, Yasuhara N, Takahashi JS, **Yagita K***., Transcriptional Program of Kpna2 /Importin- α 2 Regulates Cellular Differentiation-Coupled Circadian Clock Development in Mammalian Cell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111, E5039-48, 2014
9. Inada Y, Uchida H, Umemura Y, Nakamura W, Sakai T, Koike N, **Yagita K***. Cell and Tissue-autonomous development of the circadian clock in mouse embryos. *FEBS Lett.*, 588, 459-465, 2014.

(学会発表)

1) 国際学会

[招待講演・シンポジウム・ワークショップ]

- 1: Yagita K., Molecular Mechanisms of Circadian Clock Development in Mammalian Cells, *Asian Forum on Chronobiology in 2015*, Sapporo, Sept. 7, 2015
- 2: Yagita K., Cellular Differentiation and Circadian Clock Development in mammals., *ICCPB 2015*, Krakow, Aug. 24, 2015
- 3: Yagita K., Epigenetic and Molecular mechanisms suppressing circadian clock in pluripotent stem cells., *4th International Symposium on Molecular Clock 2015*, Kyoto, March 27, 2015

2) 国内学会

[特別講演・シンポジウム, ワークショップ]

1. 八木田和弘:「Circadian clock development: From basic to translational」, 第 93 回日本生理学会大会シンポジウム, 札幌, Mar 23, 2016
2. 八木田和弘:「"Time in the Cell" Why is the circadian clock suppressed in the pluripotent stem cells?」, BMB2015 シンポジウム, 神戸, Dec. 3, 2015
3. 八木田和弘:「Disruption of MeCP2 attenuates circadian rhythm in CRISPR/Cas9-based Rett syndrome model mice」, 第 58 回日本神経化学会 理事長企画シンポジウム, 大宮, Sept. 11, 2015

【網羅的変異導入法を用いた ES/iPS 細胞の多能性制御機構の解析】

- 研究代表者 奈良県立医科大学医学部 堀江 恭二 教授
- 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、遺伝子トラップ法を用いて、マウス ES 細胞の多能性制御に関わる新規遺伝子を探索してきた。本共同研究では、その中の 1 つである機能未知の zinc finger protein に対して、CRISPR/Cas9 システムによるマウス受精卵での遺伝子破壊法を適用し、3 系統の遺伝子破壊マウスを樹立した。現在、これらのマウスの交配により、ホモ変異体の作出を進めている。細胞レベルでの遺伝子機能解析も行っており、本遺伝子のホモ変異体 ES 細胞や、本遺伝子を強制発現させた ES 細胞を、種々の細胞系譜へ分化誘導した。その結果、本遺伝子が神経系への分化を促進するとの知見が得られており、ホモ変異体マウスを用いた個体レベルでの表現型解析の基礎データになると考えている。

- 研究成果の公表
未発表

【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
- 再生医科学研究所共同研究者 バイオメカニクス研究領域 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、骨細胞関連遺伝子の発現変化を real-time PCR により評価した。長期間培養した群では短期間培養した群と比較し、コネキシン 43 および I 型コラーゲン等の 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变化、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

未発表

ウイルス感染症・生命科学先端融合的共同研究拠点

2015 年度共同研究課題達成状況（研究期間：2015 年 4 月～2016 年 3 月）

①霊長類 P3 感染実験

霊長類 P3 実験として計 10 件の研究をおこなった（結核菌脂質免疫の研究 1 件、インフルエンザウイルスの研究 1 件、免疫不全ウイルス（SIV 及びサル指向性 HIV）に関する研究 6 件、サル T 細胞白血病ウイルスの研究 1 件、サルレトロウイルス 5 型（SRV5）の研究 1 件）。

【リポソームを利用した抗結核脂質ワクチンの開発】

○研究代表者 北海道大学大学院薬学研究院 助教 中村 孝司

○ウイルス研究所共同研究者 教授 杉田 昌彦

○達成状況

北海道大学薬学研究院・中村孝司助教とリポソームを利用した抗結核脂質ワクチンの開発についての研究を行った。これまでの研究から、アカゲザルにおいて BCG 接種により顕著な GMM 特異的 T 細胞応答を誘起できることを明らかにしてきたが、GMM リポソーム接種による GMM 特異的 T 細胞応答の誘導は限定的であり、これを鋭敏に検出する方策の確立が急務と考えられた。そこで脂質特異的 CD1 拘束性 T 細胞群を規定するマーカー分子の同定を試みた。数回のミエローマ細胞融合の結果得られた多数の抗アカゲザルリンパ球抗体プールから、GMM 特異的 T 細胞を含む脂質特異的 T 細胞を特異的かつ高輝度に染色する抗体クローン TE-1 を樹立することに成功した（未発表）。

【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 センター長 俣野 哲朗

○ウイルス研究所共同研究者 准教授 三浦 智行、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 誘導に関する研究を行った。SIV 感染サルにおける感染免疫学的解析データを蓄積するとともに、粘膜免疫解析系として、安楽殺解剖時に採取した腸管由来のリンパ球におけるウイルス特異

的 T 細胞反応解析系を構築した。また、SIV 伝播によるウイルスゲノム等の変化を解析し、伝播によって MHC-I 関連変異が蓄積することを見出した。一方、SIV 感染サルモデルにおける iPS 細胞由来 CD8 陽性 T 細胞の導入実験の第一段階として、サル末梢血より分離した CD8 陽性 T 細胞から樹立した iPS 細胞をもとに、非特異的 CD8 陽性 T 細胞を樹立した。(PLoS Pathog. 2015 他)

【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・明里宏文教授と霊長類モデルによる HIV 感染症根治に関する研究を行った。カニクイザルへの HIV 実験感染後、長期に渡り血中ウイルス RNA が検出されないにも関わらず、中和活性を有する抗体価の上昇、リンパ節におけるプロウイルス DNA 陽性細胞の存在、さらに抗 CD8 抗体投与による HIV 再活性化が示された。以上より、HIV 感染カニクイザルはリザーバー細胞が存在する潜伏感染状態にあることが明らかとなった。HIV 感染カニクイザルは、HIV 潜伏感染モデルとしてリザーバー細胞の生体内分布や局在の解析、HIV 感染症の根治に向けた新規治療法の開発推進に大きく寄与するものと期待される。(Sci. Rep. 2015 他)

【サルエイズモデルにおける中和抗体の誘導過程の解明】

○研究代表者 熊本大学エイズ学研究センター 助教 桑田 岳夫

○ウイルス研究所共同研究者 准教授 三浦 智行

○達成状況

熊本大学エイズ学研究センター・桑田岳夫助教とサルエイズモデルにおける中和抗体の誘導過程の解明に関する研究を行った。BNAbs の誘導メカニズムをあきらかにするため、6 頭のアカゲザルに SIVsmH635FC 株を接種し、中和抗体の分離と遺伝子解析を行った。感染後 12 週のリンパ節からライブラリを作成し、サル MM617 より 1 種類、MM618 から 4 種類の、以前に分離された系統とは異なる、新規の中和抗体を分離した。(未発表)

【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

○ウイルス研究所共同研究者

教授 小柳 義夫、特定教授 五十嵐 樹彦、准教授 三浦 智行、

技術職員 團塚 愛、技術職員 水田 量太

○達成状況

東京大学医科学研究所・河岡義裕教授とインフルエンザの霊長類感染モデルにおける研究を行った。高病原性 H5N1 鳥インフルエンザウイルスを、エアロゾル投与および従来法である経鼻・経気管投与にてカニクイザルに接種し、病原性発現の比較検討を行った。観察期間中、両投与群ともに、咳・くしゃみなどの臨床症状は認められなかった。また解剖時における臓器の肉眼所見においても、

両投与群の間に顕著な差は認められなかった。今後、各種臓器のウイルス力価、病理解析などを行う。(未発表)

【BCG/m8 Δワクシニア複合抗エイズワクチン効果の確定】

○研究代表者 北海道大学遺伝子病制御研究所 客員研究員 志田 壽利

○ウイルス研究所共同研究者 准教授 三浦 智行

○達成状況

北海道大学遺伝子病制御研究所・志田壽利客員教授と BCG/ m8 Δワクシニア複合抗エイズワクチン効果の確定に関する研究を行った。SIV 遺伝子発現 BCG プライム/ワクシニア m8 Δ株ブースト法による免疫サル 9 頭 (今年の本共同研究で 3 頭、過去のウイルス研究所での共同研究で 2 頭、米国との共同研究で 4 頭) と対照サル 10 頭 (過去のウイルス研究所での共同研究で 6 頭、米国との共同研究で 4 頭) に、SIVmac251 を攻撃接種した。対照は全頭感染したが、免疫サルは 1 頭で感染防御、1 頭で感染の遅延を認めた。また、免疫群と対照群のピーク時のウイルス量はそれぞれ $1.0E+7$ と $7.9E+7$ コピー /ml であり、set point では $4.2E+5$ と $1.0E+7$ コピー /ml であった。(未発表)

【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 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 教授 足立 昭夫

○ウイルス研究所共同研究者 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・病原性発現機構に関する研究を行った。構築した 6 種類の CCR5 指向性 HIV-1rmt のアカゲザル末梢血単核細胞 (PBMC) における増殖能を比較解析したところ、個体差はあるものの、MN4/LSDQgtu と同程度あるいはそれ以上に効率良く複製する CCR5 指向性 HIV-1rmt クローンが見出された (gtu+A4Y1)。また、腸管由来細胞でのウイルス増殖能評価システムの構築に向け、アカゲザル腸管生検材料からの細胞採取法を確立した。(J. Med. Invest. 2015)

【中和抗体を用いた HIV 感染症の「機能的治癒」をめざす新規治療法の開発 (霊長類モデルにおける POC 試験)】

○研究代表者 熊本大学エイズ学研究センター 教授 松下 修三

○ウイルス研究所共同研究者 准教授 三浦 智行

○達成状況

熊本大学エイズ学研究センター・松下修三教授と中和抗体を用いた HIV 感染症の「機能的治癒」をめざす新規治療法の開発 (霊長類モデルにおける POC 試験) に関する研究を行った。霊長類モデルで用いられる CCR5 指向性の SHIV は、中和抗体に感受性であり、中和抗体に抵抗性 HIV 臨床分離株とは、性質が異なる。我々は、SHIV-KS661 をサル個体で馴化し、クローン化した SHIV-MK38 を用いて検討し、HIV の臨床分離株に見られる tier 2 また 3 に匹敵する中和抵抗株であることが判明した。さらに、直腸内接種で持続感染が得られ、今後の SHIV 感染霊長類モデルとして役立つと

考えられる。(J. Gen. Virol. 2016 他)

【サル T 細胞白血病ウイルス 1 型感染ニホンザルを使った動物モデルの確立と解析】

- 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

京都大学霊長類研究所・明里宏文教授とサル T 細胞白血病ウイルス 1 型感染ニホンザルを使った動物モデルの確立と解析に関する研究を行った。STLV-1 および HTLV-1 が末梢の成熟 T 細胞を標的とする機序を PNAS に報告した。この所見は HTLV-1 が末梢血 T リンパ球を標的とし、最終的に発がんにつながる分子基盤を示すものである。また、アカゲザル、ニホンザルに Tax および HBZ を発現するワクシニアウイルスを接種し、Tax、HBZ 特異的免疫応答を誘導することができた。本結果は HTLV-1 感染者に対する新規免疫療法開発に繋がると考えられる。(Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2015)

【ニホンザルにおけるサルレトロウイルス 5 型 (SRV5) の病原性解析】

- 研究代表者 京都大学霊長類研究所 教授 岡本 宗裕
- ウイルス研究所共同研究者 准教授 宮沢 孝幸
- 達成状況

京都大学霊長類研究所・岡本宗裕教授とニホンザルにおけるサルレトロウイルス 5 型 (SRV5) の病原性に関する研究を行った。鹿児島県のサル繁殖施設でニホンザルが血小板減少症を呈して死亡する事例があった。この血小板減少症のサルからウイルス分離を行ったところ SRV-5 が分離できた。この SRV-5 分離株 (野生株) ならびに感染性遺伝子クローン由来のウイルスをそれぞれ 2 頭 (雌雄各 1 頭) のニホンザルに接種した。それぞれの群の 2 頭中 1 頭が血小板減少症を発症し、生き残った 2 頭のうち 1 頭 (感染性遺伝子クローン接種) の血小板減少率は軽度であった。(未発表)

② マウス P3 感染実験

マウス P3 感染実験として計 2 件の研究をおこなった (ヒト免疫不全ウイルス (HIV) の研究 1 件、高性能ワクチンアジュバントの開発 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・高折晃史教授とヒト化マウスを用いた HIV-1 潜伏感染モデルの確立に関する研究を行った。SIV-Vpx の導入により SAMHD1 のノックダウンを行い DuoFLuo HIV を感染させた。静止期 T 細胞の感染効率は増加したが潜伏感染細胞の相対的割合には変化がなかった。Vpx を導入しなくとも 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。この際、当初の実験計画にあった DuoFLuo HIV (RGH : R7/GFP-EF1 α -mCherry) は二種の蛍光タンパク間で相同

組換えが起こることが分かったため、蛍光蛋白の組み合わせを検討し、mKO 蛋白を用いた新たな DuoFluo HIV (OGH: Orange/Green/HIV) を作製しその挙動を検討中である。(未発表)

【DI ゲノム産生性パラミクソウイルスを用いた高性能ワクチンアジュバントの開発】

○研究代表者 広島大学大学院医歯薬保健学研究院ウイルス学 准教授 入江 崇

○ウイルス研究所共同研究者 教授 朝長 啓造

○達成状況

広島大学大学院医歯薬保健学研究院・入江崇准教授と DI ゲノム産生性パラミクソウイルスを用いた高性能ワクチンアジュバントの開発に関する研究を行った。本共同研究では、上記研究のための予備検討及び動物実験技術の習得を第一目的として、過酸化水素で不活化した DI 産生性 SeV と、アジュバント効果が報告されている poly (I:C) を経鼻接種した際の肺内 I 型 IFN 誘導性の比較、不活化インフルエンザをワクチンとして経鼻接種した際のアジュバント効果を検討し、不活化 SeV が poly (I:C) と同程度の IFN 誘導性及びアジュバント作用を持つことが確認できた。(未発表)

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 17 件行った (ウイルスに関しては、HTLV-1 の研究 2 件、HIV の研究 1 件、ボルナウイルスの研究 1 件、エボラウイルスの研究 1 件、デングウイルスの研究 1 件及び肝炎ウイルスの研究 1 件。ウイルス研究の基盤となる生命科学に関しては、自然免疫の研究 3 件、RNA スプライシングに関する研究 1 件、遺伝子発現調節機構に関する研究 2 件、細菌膜プロテアーゼに関する研究 2 件及び獲得免疫機構・免疫モデルシステムに関する研究 2 件)。

【大腸菌を用いた細菌型 S2P ホモログの大量発現と生理的機能の検証】

○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

○ウイルス研究所共同研究者

○達成状況 教授 秋山 芳展、特定助教 檜作 洋平

横浜市立大学学術院国際総合科学群自然科学系列・禾晃和准教授と大腸菌を用いた細菌型 S2P ホモログの大量発現と生理的機能の検証に関する研究を行った。RseP とそのホモログについて、結晶化に向けた発現精製条件のさらなる検討に取り組んだ。また、受け入れ先研究室との共同研究の結果、RseP が膜内に β -ヘアピンループを有することを予測し、 β -ヘアピンループが基質との選択的な結合に関わる可能性があることを実験的に示すことに成功した。この研究成果は、受け入れ先研究室との共同執筆でオンラインジャーナルである eLife 誌上で論文発表された。(eLife 2015)

【大腸菌プロテアーゼ BepA による外膜タンパク質の生合成機構の解析】

○研究代表者 盛岡大学栄養科学部 准教授 成田 新一郎

○ウイルス研究所共同研究者 教授 秋山 芳展、大学院生 大門 康志

○達成状況

盛岡大学栄養科学部・成田新一郎准教授と大腸菌プロテアーゼ BepA による外膜タンパク質の生

合成機構に関する研究を行った。BepA-TPR 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。これらの架橋産物を精製し質量分析及びイムノブロットングにより解析したところ、LptD や BAM 複合体の構成タンパク質か？同定され、これらが TPR ドメインを介して BepA と相互作用することが強く示唆された。(J. Bacteriol. 2015 他)

【遺伝子改変マウスを用いた HAM 発症機構の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

○ウイルス研究所共同研究者 講師 安永 純一郎、教授 松岡 雅雄

○達成状況

川崎医科大学医学部・齊藤峰輝教授と遺伝子改変マウスを用いた HAM 発症機構の解明と新規治療法の開発に関する研究を行った。ダブル Tg マウス (Tax-2D2-Tg または HBZ-2D2-Tg マウス) の一部が、7～8 週齢で 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異型リンパ球のほぼ左右対称性の浸潤を認めた。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。このマウスは、HAM の新規病態モデルマウス候補と考えられる。(J. Neurovirol. 2015 他)

【ボルナウイルスの宿主域決定因子の解明】

○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ボルナウイルスの宿主域決定因子の解明に関する研究を行った。培養細胞において各種ボルナウイルスの宿主指向性を検討したところ、オウムボルナウイルス 4 (PaBV-4) は鳥由来細胞には感染できるが哺乳動物由来細胞には感染できなかったため、PaBV-4 の宿主指向性を規定するウイルス遺伝子の探索を行った。種々の解析により、宿主細胞への結合・侵入に関与する M および G 遺伝子ではなく、ウイルスの核酸タンパク質複合体(vRNP) の構成因子が PaBV-4 の宿主指向性を規定していることが示唆された。(J. Vet. Med. Sci. 2016 他)

【RNA 分解酵素 Regnase-1 および関連分子の B 細胞機能における役割の解析】

○研究代表者 理化学研究所 統合生命医科学研究センター グループディレクター
黒崎 知博

○ウイルス研究所共同研究者 教授 竹内 理

○達成状況

理化学研究所統合生命医科学研究センター・黒崎知博教授と RNA 分解酵素 Regnase-1 の B 細胞機能における役割の解析に関する研究を行った。Regnase-1 の B 細胞における in vivo における役割を解明するために、Regnase-1 の B 細胞特異的コンディショナルノックアウトマウスを作製した。そして、B 細胞特異的 Regnase-1 欠損マウスにおいて、B 細胞活性化の障害を認め、B 細胞におけ

る Regnase-1 による RNA 制御制御の重要性が分かった。(未発表)

【H3K9 メチル化酵素 ESET の標的配列の探索】

○研究代表者 徳島大学疾患酵素学研究センター 教授 立花 誠

○ウイルス研究所共同研究者 教授 朝長 啓造

○達成状況

徳島大学疾患酵素学研究センター・立花誠教授と H3K9 メチル化酵素 ESET の標的配列の探索に関する研究を行った。Anh-Cre ドライバーによって Eset をセルトリ細胞で特異的に欠損させた。Eset 欠損のセルトリ細胞から得られた RNA を用い、次世代シーケンスを行った。得られたリードについてマッピングを行い、Eset 欠損で誘導される ERV の発現について解析した。in silico 解析の結果、ERV のうちで ERV1 (クラス 1)、ERVK (クラス 2) で脱抑制が起きていることが分かった。(Genesis 2015 他)

【慢性炎症環境下での非リンパ組織における Pathogenic 記憶ヘルパー T 細胞維持機構の解明】

○研究代表者 千葉大学大学院医学研究院免疫発生学 教授 中山 俊憲

○ウイルス研究所共同研究者 教授 生田 宏一

○達成状況

千葉大学大学院医学研究院・中山俊憲教授と慢性炎症環境下での非リンパ組織における Pathogenic 記憶ヘルパー T 細胞維持機構の解明に関する研究を行った。記憶ヘルパー T 細胞の大部分が iBALT 内で IL-7 産生細胞と接着し、IL-7 が iBALT 内での記憶ヘルパー T 細胞の維持に必須であることを示した。また、IL-7 産生細胞が IL-33、CCL21、CCL19 などを作る Thy-1 陽性のリンパ管内皮細胞であることを証明した。さらに、ヒトの好酸球性慢性副鼻腔炎の炎症組織でも同様の IL-7 産生細胞を同定した。(Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2016)

【エボラウイルスの病原性の進化メカニズムの解明】

○研究代表者 東海大学医学部 助教 中川 草

○ウイルス研究所共同研究者 教授 小柳 義夫、助教 佐藤 佳

○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病原性の進化メカニズムの解明に関する研究を行った。公開されている全てのフィロウイルスのゲノム配列、もしくは遺伝子配列を収集し、遺伝子ごとに多重整列を行い、系統関係を明らかにした。その系統関係に基づき、進化的にアミノ酸が変化しやすいサイト (正の淘汰)、もしくは変化しないサイト (負の淘汰) を明らかにする。そのようなアミノ酸座位がそれぞれどの機能モチーフに存在し、またどのような立体構造であるのかを構造生物学的手法により検討し、それらの情報から宿主因子との相互作用を予測する。加えて祖先配列を推定し、経時的な塩基やアミノ酸配列の変化を調べている。(未発表)

【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, Dang Sung

○ウイルス研究所共同研究者 教授 小柳 義夫、助教 蝦名 博貴

○達成状況

AIDS institute, UCLA School of Nursing, Associate professor Dr. Dong Sung An と CRISPR/CAS9 Vector のデザインに関する研究を行った。We have identified 2 functional guide RNA (gRNA) against human HPRT gene and 1 functional gRNA against human CCR5 genes. These gRNAs were co-expressed with Cas9 and GFP from a lentiviral vector. HPRT gRNA transduced human K562 cells were positively selected in vitro with 6TG chemoselection. CCR5 gRNA transduced human CCR5 MT-4 cells showed efficient CCR5 knock out. However, the vector titer was significantly affected by the co-expression of 3 transgenes. It was too low to transduce primary T cells and CD34+ cells. We have reconstructed a lentiviral vector to express gRNA and Cas9 separately. The vector titer has improved for efficient primary cell transduction. We are currently optimizing a transient Cas9 delivery system. (未発表)

【ELMO タンパク質群の抗ウイルス自然免疫応答における役割の解析】

○研究代表者 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科 准教授 河合 太郎

○ウイルス研究所共同研究者 教授 竹内 理

○達成状況

奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科・河合太郎教授と ELMO タンパク質群の抗ウイルス自然免疫応答における役割に関する研究を行った。ゲノム編集により ELMOD2 欠損マクロファージ細胞株と欠損マウスを樹立し解析を行ったところ、ウイルス RNA に対する I 型インターフェロンや炎症性サイトカインの産生が減少していることを見だし、ELMOD2 が抗自然免疫応答制御に関与することが示唆された。さらに詳しく解析したところ、ELMOD2 はウイルス認識に関わる自然免疫受容体の中でも Toll-like receptor 3 を介する自然免疫応答が減少している知見を得た。(未発表)

【サルの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系専攻 准教授 伊吹 謙太郎

○ウイルス研究所共同研究者 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サルの免疫細胞を持つマウスの作製に関する研究を行った。5-10 歳令のアカゲザルの骨髓液を採取し、比重分離法により骨髓単核球を分離した。骨髓液約 4mL/頭から分離した骨髓単核球内に CD34 陽性造血幹細胞 (CD34+HSC) が $0.5-2.0 \times 10^5$ 個含まれていることがわかった。この骨髓単核球を NOG マウスに脛骨骨髓内に移植したところ、全頭で移植後 7 週目までにマウス末梢血中にサル CD45 陽性細胞が検出され、サル細胞が生着していることが確認された。(未発表)

【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 教授 前田 明

○ウイルス研究所共同研究者 助教 谷口 一郎、教授 大野 睦人

○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 mRNA 前駆体から機能ある環状 RNA ができあがる仕組みに関する研究を行った。ciRS-7 の生合成経路を解明するため、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて ciRS-7 環状化に関与すると思われるスプライス部位を阻害する実験を遂行した。その結果、投縄状 RNA の再スプライシングによって ciRS-7 が環状化する経路を否定した。ciRS-7 エクソン両端のイントロンで、反復配列 SINE の一種である MIR 配列を介した相補的対合が起こり、逆向きスプライシングを引き起こしている実験的根拠が得られた。(Biochim. Biophys. Acta 2016 他)

【ウイルスによる肝発癌機構の解明を目指した不死化肝細胞株の研究】

○研究代表者 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科難治ウイルス感染制御研究センター
教授 池田 正徳

○ウイルス研究所共同研究者 准教授 土方 誠

○達成状況

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・池田正徳教授とウイルスによる肝発癌機構の解明を目指した不死化肝細胞株の研究を行った。申請者らが利用した不死化ヒト肝細胞株を用いて HCV と HBV の感染実験をおこなったが、有意な感染は認められなかった。一方、共同研究者が樹立した不死化ヒト肝細胞株に HBV 受容体 NTCP を恒常的に発現させた細胞株を樹立したところ、HBV の感染を許容する細胞クローンを得た。この細胞は立体培養することで HCV に対する感染も許容した。今後、HBV DNA を導入したり、HCV ゲノムを導入して肝発癌に関わる病態解明を行う準備ができた。(未発表)

【グアニン四重鎖による non-coding RNA H19 の転写制御機構の解明】

○研究代表者 東京農工大学大学院工学研究院生命工学専攻生命有機化分野
教授 長澤 和夫

○ウイルス研究所共同研究者 教授 豊島 文子

○達成状況

東京農工大学大学院工学研究院・長澤和夫教授とグアニン四重鎖による non-coding RNA H19 の転写制御機構の解明に関する研究を行った。H19 遺伝子の転写開始点直下に存在するグアニンリッチ配列を含むオリゴヌクレオチドは、in vitro で G4 を形成することが分かった。また、この G4 配列は、H19 の発現を抑制する作用があることを明らかにした。さらに、G4 リガンドをマウス ES 細胞に添加すると、ES 細胞の分化に伴う H19 の発現が顕著に抑制された。以上のことから、H19 遺伝子の転写開始点直下には G4 が存在し、遺伝子発現を制御することが分かった。(未発表)

【成人 T 細胞白血病リンパ腫のクロナリティ、ウイルス遺伝子発現と病理学的特徴の解析】

- 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・大島孝一教授と成人 T 細胞白血病リンパ腫のクロナリティ、ウイルス遺伝子発現と病理学的特徴の解析に関する研究を行った。ATL 検体のクロナリティを解析して、リンパ節病変において、クローン数の増加を検出した。更に症例を増やして解析を予定している。また、HBZ トランスジェニックマウスとインターフェロンガンマノックアウトマウスを交配して、リンパ腫の発症頻度を解析し、インターフェロンガンマがないとリンパ腫発症が有意に抑制されることを見出した。(PLoS Pathog. 2015)

【インターフェロン誘導性抗 Dengue ウイルス因子の機能解析】

- 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
- ウイルス研究所共同研究者 教授 小柳 義夫
- 達成状況

大阪医科大学医学部・鈴木陽一講師とインターフェロン誘導性抗 Dengue ウイルス因子の機能解析に関する研究を行った。RyDEN (C19orf66) の発現はヒト細胞において Dengue ウイルス (DENV) の感染に対して抑制的に働くことがわかった。また RyDEN はインターフェロン誘導性因子であり、インターフェロンによる抗 Dengue ウイルス状態の確立において重要な役割を果たしていることが示された。さらに RyDEN は他の細胞性因子と複合体を形成することによって、DENV のタンパク合成段階を阻害することが示唆された。(PLoS Pathog. 2016)

【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
- ウイルス研究所共同研究者 教授 竹内 理
- 達成状況

近畿大学大学院薬学研究科・藤原俊伸教授と自然免疫応答における転写後調節の解明に関する研究を行った。これまで上手く行かなかったマクロファージを用いたショ糖密度勾配遠心分離法による translationally active mRNA が局在する polysome 分画の分取に成功し、新規制御因子のノックアウト (KO) のマクロファージを用いた polysome 分画のサイトカイン mRNA の解析により、新規制御因子はサイトカインのタンパク質翻訳を抑制することが分かった。(Cell 2015 他)

2016 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	再生医科学研究所 共同研究者	研究課題名
早稲田大学理工学術院 小出 隆規 教授	細胞機能調節学分野 平芳 一法 講師	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
広島大学 大学院医歯薬保健学研究院 宿南 知佐 教授	生体分子設計学分野 開 祐司 教授	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
放射線医学総合研究所 分子イメージング研究センター 青木 伊知男 チームリーダー	生体材料学分野 田畑 泰彦 教授	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
岡山大学薬学部 狩野 光伸 教授	生体材料学分野 山本 雅哉 准教授	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
福井大学工学研究科 藤田 聡 准教授	組織修復材料学分野 有馬 祐介 助教	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
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	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
滋賀医科大学 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
国立がん研究センター中央病院 森 泰昌 医員	組織再生応用分野 戸口田 淳也 教授	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
国立がん研究センター研究所 大木 理恵子 グループリーダー (主任研究員)	器官形成応用分野 角 昭一郎 准教授	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
鳥取大学医学系研究科 白吉 安昭 准教授	胚性幹細胞研究分野 末盛 博文 准教授	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
奈良県立医科大学医学部 堀江 恭二 教授	再生実験動物施設 近藤 玄 教授	ES 細胞の多能性制御に関わる新規遺伝子の機能解析
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	再生実験動物施設 廣田 圭司 准教授	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
岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 上岡 寛 教授	バイオメカニクス研究領域 安達 泰治 教授	骨組織中骨細胞の形態とメカノセンシング特性

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

徳島大学大学院医歯薬学研究部 教授 足立 昭夫	霊長類モデル研究領域 准教授 三浦 智行	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
----------------------------	-------------------------	-------------------------------------

東京大学医科学研究所 教授 河岡 義裕	ウイルス病態研究領域 教授 小柳 義夫 霊長類モデル研究領域 准教授 三浦 智行 附属感染症モデル研究センター 技術職員 阪脇 廣美 技術職員 水田 量太	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
京都大学霊長類研究所 教授 明里 宏文	霊長類モデル研究領域 准教授 三浦 智行	霊長類モデルによる HIV 感染症根治のための基盤研究
国立感染症研究所エイズ研究センター 教授 俣野 哲朗	霊長類モデル研究領域 准教授 三浦 智行 附属感染症モデル研究センター 技術職員 水田 量太 技術職員 阪脇 廣美 進化ウイルス研究領域 教授 明里 宏文	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

② マウス P3 感染実験

京都大学医学研究科 血液・腫瘍内科学 教授 高折 晃史	ウイルス病態研究領域 教授 小柳 義夫	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

国立感染症研究所ウイルス第二部 主任研究官 渡士 幸一	ヒトがんウイルス研究分野 准教授 土方 誠	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
千葉大学大学院医学研究院 粘膜免疫学 教授 植松 智	感染防御研究分野 教授 竹内 理	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
鹿児島大学共同獣医学部 特任助教 堀江 真行	教授 朝長 啓造	内在性ボルナウイルス様配列の生物学的意義の解明
九州大学生体防御医学研究所 教授 吉開 泰信	教授 生田 宏一	免疫応答における IL-7 レセプターの機能解析
東海大学医学部 助教 中川 草	ウイルス病態研究領域 教授 小柳 義夫 助教 佐藤 佳	大規模配列解析によるフィロウイルスの病原性に関係するアミノ酸サイトの同定と機能解析
UCLA AIDS institute, UCLA School of Nursing Associate professor An, Dong Sung	ウイルス病態研究領域 教授 小柳 義夫 助教 蝦名 博貴	Develop a selectable anti-HIV-1 gene therapy vector using CRISPR/CAS9 system
横浜市立大学大学院 国際総合科学群自然科学系列 准教授 禾 晃和	がん遺伝子研究分野 教授 秋山 芳展 助教 檜作 洋平	構造決定に向けた細菌型 S2P ホモログの変異体作製
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	ウイルス微細構造研究領域 教授 野田 岳志	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
慶應義塾大学先端生命科学研究所 特任准教授 井上 浄	ウイルス微細構造研究領域 教授 野田 岳志	SLOT 法を用いたインフルエンザウイルスに対する重型交差性中和抗体の創出

Korea Brain Research Institute (KBRI) Principal Investigator 小曾戸 陽一	増殖制御学研究分野 助教 小林 妙子	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
川崎医科大学微生物学 教授 齊藤 峰輝	ウイルス制御研究領域 講師 安永 純一郎 教授 松岡 雅雄	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
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	細胞制御研究分野 教授 杉田 昌彦	天然脂質の免疫機能解析と応用
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 日柴喜 隆行	霊長類モデル研究領域 准教授 三浦 智行	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
京都大学医学部附属病院皮膚科 講師 本田 哲也	構造形成学研究分野 教授 豊島 文子 学振特別研究員 一條 遼	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
近畿大学薬学部生化学教室 教授 藤原 俊伸	感染防御研究分野 教授 竹内 理	自然免疫応答における転写後調節の解明
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	感染防御研究分野 教授 竹内 理	RNA 結合タンパク質の標的 RNA 構造解析とその機 能的意義
熊本大学発生医学研究所 助教 畠山 淳	増殖制御学研究分野 教授 影山 龍一郎	哺乳類間の脳の大きさの違いを作り出す仕組みの解 明
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	ウイルス病態研究領域 教授 小柳 義夫	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
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	情報高分子化学研究分野 助教 谷口 一郎 教授 大野 睦人	mRNA 前駆体から機能ある環状 RNA ができあがる仕 組み
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	霊長類モデル研究領域 准教授 三浦 智行	SIV に感染するサル免疫細胞を持つマウスの作製
久留米大学医学部病理学 教授 大島 孝一	ウイルス制御研究領域 教授 松岡 雅雄 講師 安永 純一郎	成人 T 細胞白血病リンパ腫の病態解析
近畿大学生物理工学部 講師 江口 陽子	がん遺伝子研究分野 教授 秋山 芳展 博士研究員 石井 英治 大学院生 吉谷 亘平	大腸菌ヒスチジンキナーゼセンサー PhoQ のリガン ド結合ポケットの解析

学術集会

京都大学ウイルス研究所
「ウイルス感染症・生命科学先端融合的共同研究拠点」
京都大学再生医科学研究所
「再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点」
合同学術講演会

開催日：2016年1月21日（木）

場 所：芝蘭会館 稲盛ホール

司 会：京都大学ウイルス研究所 松岡 雅雄 教授

開会の挨拶

ウイルス研究所長 小柳 義夫

第1部 「ウイルス・構造生物学」

座長：朝長 啓造（京都大学ウイルス研究所 教授）

「インフルエンザウイルスの細胞内増殖機構」

野田 岳志（京都大学ウイルス研究所ウイルス微細構造研究領域 教授）

「モリビリウイルス属の細胞侵入の構造基盤と抗ウイルス薬開発」 前仲 勝実（北海道大学薬学研究院生体分子機能学研究室 教授）

「立体構造に基づく CRISPR-Cas9 ゲノム編集ツールの開発と医療への応用に向けて」

濡木 理（東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻 教授）

第2部 「制御性T細胞」

座長：河本 宏（京都大学再生医科学研究所 教授）

「腸内フローラと免疫システム」

本田 賢也（慶應義塾大学医学部微生物学・免疫学教室 教授）

「制御性T細胞の発生と維持に関与する転写因子とエピゲノム制御」 吉村 昭彦（慶應義塾大学医学部微生物学・免疫学教室 教授）

「制御性T細胞研究の35年：発見から応用まで」

坂口 志文（大阪大学免疫学フロンティア研究センター 教授、京都大学再生医科学研究所 客員教授）

閉会の挨拶

再生医科学研究所長 開 祐司

平成 27 年度

京都大学再生医科学研究所若手発表会

開催日：2016年1月21日（木）

場 所：芝蘭会館 稲盛ホール

開会挨拶

所長 開 祐司

前半のセッション

座長 高橋 紀子（再生免疫学分野）、宮崎正輝（再生免疫学分野）

O-01 多能性幹細胞と体細胞の DNA 損傷応答の比較解析

刀谷 在美（発生分化研究分野）

O-02 力学環境下における骨の機能的適応の数値バイオメカニクス

亀尾 佳貴（バイオメカニクス研究領域）

O-03 Multi Electrode Array (MEA) 上でのグルコース刺激による単離膵島の電位測定

崔 素榮（組織修復材料学分野）

O-04 膜型増殖因子の切断の可視化

亀崎 青沙（再生増殖制御学分野）

後半のセッション

座長 松井優人（細胞機能調節学分野）、細川暢子（細胞機能調節学分野）

O-05 OCT4 再プログラム化を視る—ヒト新型 iPS 前駆細胞へのゲノム編集技術の応用—

勅使河原 利香（幹細胞加工研究分野）

O-06 炎症イメージングのための高分子ミセルを用いた水可溶性難水溶性蛍光プローブの作製

城 潤一郎（生体材料学分野）

O-07 マウス精子成熟における遺伝的背景の影響について

渡邊 仁美（附属再生実験動物施設）

O-08 小胞体シャペロンタンパク質 ERdj3 の新たな機能

花房 賢（細胞機能調節学分野）

京都大学再生医科学研究所
「再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点」
平成 27 年度共同研究報告会

開催日：2016 年 3 月 28 日 (月)

場 所：京都大学再生医科学研究所

開会挨拶

所長 開 祐司 (京都大学再生医科学研究所)

「ゲノム改変技術とイメージング技術を駆使したマウス体内時計の発生メカニズム解明」

八木田 和弘 教授 (京都府立医科大学大学院医学研究科)

「網羅的変異導入法を用いた ES/iPS 細胞の多能性制御機構の解析」

堀江 恭二 教授 (奈良県立医科大学医学部)

「安定化された成長因子の放出制御による血管再生用足場材料の創製」

大谷 享 准教授 (神戸大学大学院工学研究科)

「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)

「睪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睪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)

「遺伝子トラップ・エンハンサートラップ法を用いた神経系支持細胞の同定と機能の解明」

川上 浩一 教授 (国立遺伝学研究所)

「骨髄ニッチの発生・維持におけるポリコム群複合体機能の解析」

岩間 厚志 教授 (千葉大学大学院医学研究院)

「抗原特異的制御性 T 細胞の iPS の作成」

山崎 小百合 教授 (名古屋市立大学大学院医学研究科)

「ヒト多能性幹細胞由来の各種心筋細胞を用いた心臓拍動制御系の in vitro 再構築」

白吉 安昭 准教授 (鳥取大学医学系研究科)

京都大学再生医科学研究所
「再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点」
第 11 回 公開講演会

開催日：2016 年 7 月 16 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

「体を支える骨の病気について」

戸口田 淳也 (再生医科学研究所 教授)

「年をとると筋肉が衰えるのは何故？ - 再生医学から宇宙生物学まで -」

瀬原 淳子 (再生医科学研究所 教授)

分野主催のセミナー

開催日	講演者・所属	演 題	主催分野
2016. 1.12	内田 光子 (Center for Brain Science in Harvard University, US)	ドーパミン制御機構の網羅的研究を通じて脳を知る	再生増殖制御学
2016. 1.13	中山 俊憲 (千葉大学大学院医学研究院)	病原性記憶 Th2 細胞と慢性気道炎症制御	生体防御
2016. 1.15	Terumasa Ikeda (Institute for Molecular Virology, University of Minnesota, US)	Env Substitutions Enhance Gag-Pol Packaging and Protect from APOBEC3G Restriction	ウイルス病態
2016. 1.22	David Jörg (University of Cambridge, UK)	Wave Phenomena in Embryonic Patterning	増殖制御学
2016. 1.25	西川 博嘉 (国立がん研究センター)	がん免疫応答の制御とその克服	感染防御
2016. 1.28	石田 尚臣 (東京大学医科学研究所)	破骨細胞は HIV-1 の標的細胞となる	霊長類モデル
2016. 1.29	川上 浩一 (国立遺伝学研究所 初期発生研究部門)	The study of amygdalar and hippocampal functions in zebrafish	再生増殖制御学
2016. 2. 3	黒崎 知博 (大阪大学免疫学フロンティア研究センター / 理化学研究所統合生命医科学研究センター)	メモリー B 細胞生成メカニズム	感染防御
2016. 2. 9	吉久 徹 (兵庫県立大学大学院)	真核生物における tRNA の細胞内動態	がん遺伝子
2016. 2.23	武田 洋幸 (東京大学大学院理学系研究科 生物科学専攻)	細胞のダイナミックな移動による体節の背腹形成メカニズム	再生増殖制御学
2016. 2.29	加藤 紘之 (University of California, San Diego, US)	Dynamic Sensory representations in auditory cortex	増殖制御学
2016. 3. 9	秋山 徹 (国立国際医療研究センター)	結核菌ゲノム解析サーバー (CASTB) の開発・劇症型レンサ球菌感染症研究に関する話題	がん遺伝子
2016. 3.17	Gerard Marriott (University of California, Berkeley, US)	On new classes of genetically-encoded fluorescent proteins optimized for fluorescence anisotropy and Foerster resonance energy transfer	ナノバイオプロセス
2016. 3.22	Michael C. Bassik (Stanford University, US)	Parallel shRNA and CRISPR/Cas9 Screens Reveal Biology of Stress Pathways and Identify Novel Drug Targets	感染防御
2016. 3.31	Anna Kicheva (Institute of Science and Technology Austria, Austria)	Coordination of progenitor specification and growth in the developing spinal cord	増殖制御学
2016. 4. 7	杉山 智康 (National Cancer Institute, National Institutes of Health, US)	RNA 分解装置による条件的ヘテロクロマチン形成および選択的 mRNA 分解機構の解明	情報高分子化学
2016. 5.31	Edouard Hannezo (University of Cambridge, UK)	Self-organized actomyosion flows in patterning and morphogenesis	バイオメカニクス
2016. 6. 1	鈴木 信弘 (岡山大学資源植物科学研究所)	ウイルス多様性の魅力～菌類ウイルスを中心に～	ヒトがんウイルス
2016. 6. 8	渡辺登喜子 (東京大学医科学研究所)	インフルエンザウイルスの増殖および病原性発現のメカニズム解析	ヒトがんウイルス
2016. 6.22	小長谷周平 (京都大学ウイルス・再生医科学研究所)	ヒト iPS 細胞から臍島細胞への分化誘導	バイオメカニクス

開催日	講演者・所属	演 題	主催分野
2016. 6.22	山崎 晶 (九州大学生体防御医学研究所)	レクチン受容体を介する病原体認識と免疫応答	感染防御
2016. 6.27	Scott Kuersten (Illumina, Inc., US)	Using Ribosome Profiling and RNA Access Panels as novel approaches to RNAseq applications	情報高分子化学
2016. 6.28	秋山 尚志 (Boston University School of Medicine, US)	Role of Myeloid Cells in HIV-1 Dissemination	ウイルス病態
2016. 6.29	竹内 恒 (産業技術総合研究所創薬分子プロファイリング研究センター)	細胞内 GTP 濃度検知機構の発見と創薬への展開	分子遺伝
2016. 7. 4	松田 健太 (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, US)	Nonhuman primate model of neuroAIDS	ウイルス病態
2016. 7. 4	佐藤 健人 (東海大学大学院医学研究科)	交汎用性 iPSC の作製、オートファジー制御異常による家族性腫瘍に関するセミナー	再生免疫学
2016. 7. 5	山下 満左裕 (Aaron Diamond AIDS Research Center, US)	HIV-Host interactions: Lessons from capsid-binding cellular proteins	ウイルス病態
2016. 7. 6	三宅 健介 (東京大学医科学研究所)	Toll 様受容体による核酸認識・応答の分子基盤	感染防御
2016. 7.13	渡士 幸一 (国立感染症研究所ウイルス第二部)	肝炎ウイルスの創薬研究	ヒトがんウイルス
2016. 7.15	鈴木 康嗣 (Institut Pasteur, France)	Investigation of involvement of endogenous viral elements in mosquito vectors on dengue and chikungunya virus infections	ウイルス病態
2016. 7.15	二階堂 敏雄 (富山大学)	ヒト羊膜の再生医療への応用	生体防御
2016. 7.15	日出間 純 (東北大学大学院 生命科学研究科)	太陽紫外線 (UVB) の下で生きる植物: UVB 耐性機構と UVB 環境適応戦略	再生増殖制御学
2016. 7.15	東谷 篤志 (東北大学大学院 生命科学研究科)	モデル生物線虫 <i>C. elegans</i> を用いた宇宙ならびに地上実験 - 環境変化と筋細胞の形成、崩壊について -	再生増殖制御学
2016. 7.19	Ernst Rank (Technische Universität München, Germany)	Adaptive discretizations for bone-implant systems using the finite cell method	バイオメカニクス
2016. 7.20	伊藤 公人 (北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター)	バイオインフォマティクスによるインフルエンザウイルスの抗原変異予測	ウイルス病態
2016. 7.22	北尾 洋之 (九州大学医学研究院)	フック化ビリミジン系抗腫瘍薬の開発歴史とその作用機序	細胞機能調節学
2016. 8. 2	樫垣 伸彦 (Genentech Inc., US)	ガスダーミン D: 新たな炎症性細胞死メディエーター	感染防御
2016. 8. 2	宝田 剛志 (岡山大学大学院)	組織再生を指向した間葉系幹細胞の細胞生物学的特徴	組織再生応用
2016. 8.18	朝倉 淳 (Stem Cell Institute, Paul & Sheila Wellstone Muscular Dystrophy Center, Department of Neurology, University of Minnesota Medical School, US)	マウス Blastocyst Complementation (胚盤胞補完) 法を用いた iPS 細胞由来の骨格筋組織構築	再生増殖制御学
2016. 9. 6	内海 龍太郎 (近畿大学大学院)	細菌情報伝達ネットワークの分子機構と情報伝達阻害型薬剤の開発 Bacterial signal transduction: networks and drug discovery	がん遺伝子

開催日	講演者・所属	演 題	主催分野
2016. 9.12	Miles Davenport (Centre for Vascular Research, University of New South Wales, Australia)	Understanding the dynamics of HIV latency in vivo	ウイルス病態
2016. 9.14	加藤 哲久 (東京大学医科学研究所)	単純ヘルペスウイルスの病態発現機構	ウイルス病態
2016. 9.20	Daniel Sauter (Ulm University Medical Center, Germany)	The Host Restriction Factor Tetherin is a Key Player In Zoonotic Viral Infections	ウイルス病態
2016. 9.21	久保 允人 (東京理科大学生命医科学研究所)	インフルエンザウイルスに対する T 細胞依存性抗体 産生制御機構	生体防御
2016. 9.28	James Douglas ENGEL (University of Michigan Medical School, US)	Establishing a paradigm for the oldest mystery in Immunology	増殖制御学
2016. 9.28	後飯塚 僚 (東京理科大学生命医科学研究所)	脾臓間葉系細胞による髄外造血の制御	信号伝達学
2016. 9.29	Douglas Kim (Janelia Howard Hughes Medical Institute, US)	Fluorescent Protein sensor engineering for imaging neuronal activity	増殖制御学
2016.10. 5	五十嵐 学 (北海道大学人獣共通感染症リ サーチセンター)	ウイルスタンパク質の計算科学的解析	微細構造ウイルス学
2016.10.12	佐藤 賢文 (熊本大学大学院先端機構エイズ 学研究センター)	ヒトゲノムに組み込まれたレトロウイルスの制御機 構	システムウイルス学
2016.10.14	中井 正人 (大阪大学蛋白質研究所)	葉緑体蛋白質輸送研究における新展開：通説の検証 から新説の提唱まで	生体膜システム
2016.10.24	James Di Santo (Institut Pasteur, France)	Innate Lymphoid Cells: Novel Effectors of Immune Defense and Tissue Homeostasis	感染防御
2016.10.24	Lukas K. Tamm (University of Virginia School of Medicine, US)	Cholesterol matters for entry of HIV and Ebola viruses and for fusion in synaptic exocytosis: there is more to it than just lipid rafts!	ナノバイオプロセス
2016.10.26	藤井 耕太郎 (Stanford University, US)	Pervasive translational regulation of the cell signaling circuitry underlies mammalian development	RNA システム
2016.10.27	Ramesh Akkina, DVM (Colorado State University, US)	Modeling HIV pathogenesis, prevention and novel therapies in humanized mice	システムウイルス学
2016.10.27	寺尾 京平 (香川大学工学部知能機械システ ム工学科)	微細構造デバイスを利用した単一細胞解析	生体分子設計学
2016.10.28	吉開 泰信 (九州大学生体防御医学研究所)	IL-17 産生 $\gamma\delta$ T 細胞の分化における Notch-RBP- J κ -IL-7 受容体 α 経路の役割	免疫制御
2016.10.28	Robert Gifford (MRC-University of Glasgow Centre for Virus Research, UK)	Using endogenous retroviral (ERV) fossils data to explore the co-evolutionary relationships of retroviruses and vertebrates	システムウイルス学
2016.11. 1	Shahragim Tajbakhsh (Stem Cell and Development, Institut Pasteur, France)	Stem cell heterogeneity and function in development and regeneration	再生増殖制御学
2016.11. 4	Kensuke Hirasawa (Memorial University of Newfoundland, Canada)	IRF1 SUMOylation and viral oncolysis	RNA ウイルス
2016.11. 7	八幡 信代 (Singapore Eye Research Institute, Singapore)	Natural Killer cells - Human diversity and roles in health and disease	再生免疫学

開催日	講演者・所属	演 題	主催分野
2016.11.11	芳賀 永 (北海道大学大学院先端生命科学 研究院)	Collective Migration and 3D Morphogenesis of Epithelial Cells Induced by Cellular Contractile Forces on a Viscoelastic Substrate	バイオメカニクス
2016.11.18	David Rudner (Harvard Medical School, US)	How SMC condensin complexes compact and resolve replicated chromosomes (what Bacillus subtilis tells us)	生体膜システム
2016.11.21	Jean-Marc REICHHART (International Business Model Competition, US)	The Drosophila Immune System, an evolutionary perspective	感染防御
2016.11.28	平野 直人 (プリンセスマーガレットがんセ ンター、トロント大学、カナダ)	安全でより有効ながんに対する免疫細胞療法に関するセミナー	再生免疫学
2016.12. 2	David Ian Watkins (Pathology, University of Miami Medical School, US)	Immune responses Against HIV, Dengue and Zika	システムウイルス
2016.12. 7	Eiji Yoshihara (The Salk Institute, US)	Energy metabolic transition towards the functional beta cells	発がん機構
2016.12. 9	栄川 健 (Washington University School of Medicine, US)	MYC 関連転写因子によるリンパ球増殖とガン抑制プログラム	感染防御
2016.12.12	Valerie Verhasselt (ニース大学、フランス)	Is it possible to prevent allergic disease by oral tolerance in early life?	統合生体プロセス

構成員名簿

(2017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)
高 戸 毅 (東京大学大学院医学系研究科教授)
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特任教授)
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: 成田 亮, 塚本雄太 教務補佐員: 呉 成旭 技術補佐員: 木村春奈 事務補佐員: 小柴里美

派遣職員: 山戸恵未, 村上絵津, 木庭一美, 伊出佐那

大学院生: 姚 琬玲, 山田辰太郎, Kasumba Muhandwa Dacquain, 覃 勉, 鬼澤秀夫, 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, 岩澤嘉一, 早田信正, 西村祥子, 藤原 葉, 朱 梦婕,
田 智方, 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
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

派遣職員：刑部麻衣子，目黒智美

大学院生：Mohamed Mohamed Mahgoub Mohamed Ahmed, 古田梨愛, 紀ノ定明香, 菰原聡太郎, 木村美南, 樋口悠介

共同研究者：前田道之, 趙 鉄軍

<RNA ウイルス分野>

教授：朝長啓造 特定准教授：堀江真行 特定助教：牧野晶子 特定研究員：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, 徳永智哉, Bea Garcia, 酒井まどか, 具志堅正興, 武知美和

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

<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：水野 遼

大学院生：赤堀祐一, 李 宗南, 岡村 瞳, 笹井麻千子, 宮山陽平, 菊田駿一, 堀 一樹

<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：邑田 悟, 大内結貴, 翠川陽大, 阿野敏明, 嶋 耀子, 吉岡佑弥, 宮本歩己

共同研究者：藤原永年

<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

大学院生：榛葉旭恒, 向平妃沙, 朱 媛博, 阿部真也, 小川 真

共同研究者：谷一靖江

<感染防御分野>

教授：竹内 理 助教：三野享史 特定助教：植畑拓也 特定研究員：今村智子 研究員：若林敦子

技術補佐員：辻 桃子

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, 佐野仁美, 山嵜大智,

岩井紀貴, 道坂沙貴, 山田信之輔, Chong Yee Kien

研究生：Yang Sheng-Fan

外国人共同研究者：Sarang Tartey 共同研究者：織 大祐

<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, 田中雄大

研修員：法邑賢一

<生体材料学分野>

教授：田畑泰彦 准教授：山本雅哉 助教：城潤一郎 特定研究員：吉澤恵子，稲生佳菜子
研究員（外国人研究員/民間等共同研究員/受託研究員）：Gaston Fuentes, Shruthy Kuttappan, 萩谷祐一郎，井田昌孝，吉見智彦，
駒田行哉，窪 寛仁，上村 聡，西田和生，石丸純子，早乙女俊樹，平山奈津実，鈴木涼介，前野恵美
技術補佐員：高橋香織 事務補佐員：吉岡奈美 派遣職員：近藤蓉子，HAGHPARAST AEYED MOHAMMAD ALI
大学院生：田島脩平，明石祐典，村谷誠司，田中隆介，成田 萌，村田勇樹，許 峻睿，新井大輔，山下幸大，村上隆英，
鈴木貴久，内田雄一郎，高田 聡，有光竜樹，金丸麻衣
研究生：石井承子 学部生：西本高明，穴水美菜，森岡智子，福井佑弥

<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 研究員：西邨大吾 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
特定研究員：島津 裕，宮崎和子，前田卓也，上堀淳二 客員研究員：河田岳人
事務補佐員：藤井絵里香 派遣職員：(技術補佐員)岡田直也，増田芳恵，白数いずみ，(事務補佐員)米村 綾
大学院生：永野誠治，一瀬大志，高橋紀子，長畑洋佑，松井恭澄 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 研究開発補佐員：永田早苗 (CiRA)
教務補佐員：西尾 恵，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
大学院生：関口和也，川井俊介，宗圓 充，磯部 悠，山中良裕，鎌倉武史，天ヶ瀬凜
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

<臓器・器官形成応用分野>

准教授：中村達雄，角昭一郎
技術補佐員：石田久恵 事務補佐員：矢延聡枝，上野小寿恵
大学院生：小松輝也，若槻麻里子，豊洋次郎，村西佑介，坂口泰人，楊 凱強
研究生：金子真弓，畑山敬秀，Naskar Canning Priyadarshini
民間等共同研究員：柳井伍一，大藪三千代
研修員：中本裕也，町口敏彦

<発生エビゲノム分野>

連携教授：中辻憲夫 准教授：多田 高，中馬新一郎 特定研究員：細川美穂子 研究員：福地恵美
教務補佐員：森部江美子，酒井睦美，刀谷在美 技術補佐員：望月綾子
大学院生：藤枝雅博，勅使河原利香，曹 準権，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 事務補佐員：吉田雅代

<生体再建学分野>

客員教授：坂口志文 研究員：大崎一直，木本富子，安田圭子，北川瑤子 教務補佐員：松浦眞由美，山本恵津子

<生物物性学分野>

客員教授：宿南知佐

<再生医工学分野>

(欠員中)

■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 特定助教：滝本 晶 特定研究員：戸田満秋, 小長谷周平

技術補佐員：杉山弘美 事務補佐員：鈴木義子

大学院生：栗原 令, 西山喬晴, 磯部 潤 学部生：柴沼宏輔

<ナノバイオプロセス分野>

教授：楠見明弘 助教：笠井倫志 研究員：幸重美津子*, 坪井久恵*, 根本悠宇里*, 白居祐希*

教務補佐員：小島久美子*, 入谷真由子*

大学院生：陳 莉敏, 内藤一馬, 張 天岳

(※物質-細胞統合システム拠点所属)

<バイオメカニクス分野>

教授：安達泰治 准教授：井上康博 助教：亀尾佳貴, 都賀谷紀宏 特定助教：平島剛志

博士研究員：武石直樹 教務補佐員：須長純子 技術補佐員：木村健治 事務補佐員：坂田寿子

大学院生：牧功一郎, 大戸康平, 寶珠山美歩, 松村保之, 三輪将也, 芦谷遼太郎, 安藤悠太, 大塚莉緒, 竹田宏典,

立尾樹, 仲尾信彦, 宮 雄貴

学部生：石川敬一, 小笹正裕, 白崎哲紀, 中富陽介, 松崎真太郎, 松田淳志

特別研究学生：金 英覚 民間等共同研究員：安藤 健

<発生システム制御分野>

(欠員中)

<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, 森脇美優, Soper Andrew

<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(白眉センター)：楯谷智子

研究員：播磨有希子 学振特別研究員：小林久美子, 前田勇樹, 荒木杏菜

教務補佐員：BANSOD Shama, 大釜里央, 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：森山太陽, 桑田慎也, 山岡侑介, 中村洋貴

大学院生：坂本 進, 貝瀬 峻, 越智翔平, 高木あかり, 松宮舞奈, 松崎公信, 安枝侑平, 山口優輔, 末田梨沙, 朴 文恵,

CHAMBERS Jack

研究生：SHQIRAT J.M. Mohammed, MAVUK Özgün

共同研究者：今吉 格, 下條博美, 松田孝彦, 磯村彰宏, 馬杉美和子, 山田真弓, 畠山 淳, 小曾戸陽一

<生体情報分野>

教授：Daron M. Standley 大学院生：Ana Cecilia Davila Crespo

<RNA システム分野>

教授：大野睦人 助教：北畠 真, 谷口一郎 研究員：竹岩俊彦, 町谷充洋, 堀川 航 事務補佐員：本田典子

大学院生：川本崇仁, 壇辻さやか, 鎌田宏美

<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，秋山光市郎，吉谷亘平，何あゆみ，明後尚美，山形優太郎，米重大河，田中勇真，三宅拓也

<組織恒常性システム分野>

教授：豊島文子 助教：小田裕香子，松村 繁 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，池田 愛，福原充子，上月智司，岡田拓也，飯塚ゆい，松山奈央，久保嘉一

<発がん機構分野>

教授：米原 伸 准教授：増谷 弘 助教：村上 昭

大学院生：Cristiane Lumi Hirata

共同研究者：水谷陽一，西條美佐

<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 教務補佐員：森ひろみ 技術補佐員：松浦嘉奈子

オフィス・アシスタント：高橋唯基，加川裕美子 派遣職員：菊川美奈子

大学院生：川上朗彦 研究生：YALÇIN PISIL

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 研究員：鷺崎彩夏 教務補佐員：村田めぐみ 技術補佐員：辻 薫

研究生：寒川裕之，Tien Hsuan Chen インターン生：Yin Pui Tang

<ウイルス共進化分野>

准教授：宮沢孝幸 技術補佐員：正玄裕子

大学院生：橋本 暁，小出りえ，谷利爵公，宮穂里江

共同研究者：坂口翔一，下出紗弓，三谷 章

技術専門職員：宮地 均 技術職員：阪脇廣美，水田量太，小中(北野)さつき 派遣職員：澤田善人，木崎文也

■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，荻原智幸 教務補佐員：竹田理恵

技能補佐員：西山尚之，古卿智英，石丸英典，竹明フサ，向 一哲，竹内 宏，永井智美，佐々木勉，川北美奈子，吉田美保，

高溝一郎，吉田保子，藤堂詩子，国末朱音，吉田真紀

労務補佐員：片山龍一 事務補佐員：北澤志津江

■技術部■

再雇用職員：松下隆壽

■非常勤講師■

竹内 恒 鈴木 信弘 渡辺登喜子 五十嵐 学 渡士 幸一 久保 允人 二階堂敏雄 三宅 健介

山崎 晶 北尾 洋之 青木伊知男 小川 佳宏 金田 安史 中村 雅也 成瀬 恵治 東谷 篤志

渡部 良広 東 高志 稲田 有史 萩原 明於 茂野 啓生 堀 義生 村田 宮彦 小川 知彦

白水 泰昌 砂村 眞琴 日裏 彰人 仙石慎太郎 坂口 志文 坂口 教子 田中 淳 近藤 淳
須藤 亮 中島 友紀 中野 貴由 芳賀 永 伊藤 公人 加藤 哲久 Daron M. Standley
内海龍太郎 中井 正人 後飯塚 僚

■事務部■

事務長：古田靖高 副事務長：小林英治 総務掛長：服部和枝 主任：原 彰子 掛員：石川貴之

Annual Report
of the Institute for Frontier Life and Medical Sciences,
Kyoto University
Vol.1 2016

2017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