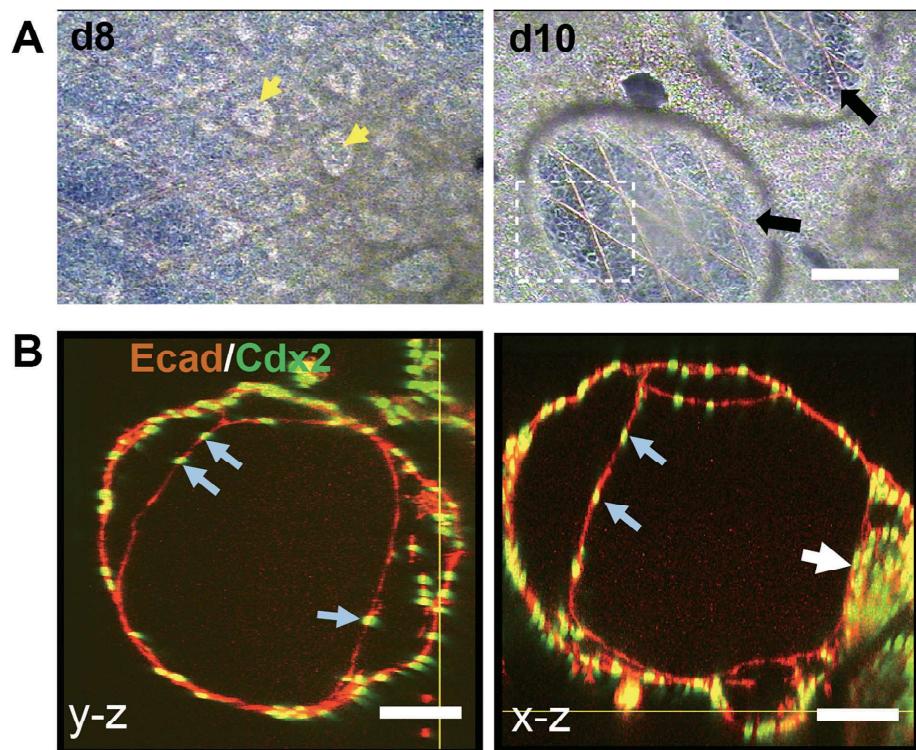


Annual Report

of the Institute for
Frontier Life and Medical Sciences
Kyoto University Vol. 3 2018



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.3 2018

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

表紙：

接着環境調節によって誘導されたヒト iPS 細胞のトロフォプラスチック構造の形成（上段、矢印）

Cover:

Self-organization of human iPS cells into trophectoderm mimicking cysts induced by adhesion restriction (upper, solid arrows)

CONTENTS

Research Activities

ウイルス感染研究部門 Department of Virus Research	
分子遺伝学分野 Laboratory of Molecular Genetics	1
ウイルス制御分野 Laboratory of Virus Control	5
RNA ウィルス分野 Laboratory of RNA Viruses	11
微細構造ウイルス学分野 Laboratory of Ultrastructural Virology	18
がんウイルス分野 Laboratory of Tumor Viruses	23
細胞制御分野 Laboratory of Cell Regulation	27
免疫制御分野 Laboratory of Immune Regulation	31
感染防御分野 Laboratory of Infection and Prevention	34
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	39
生体材料学分野 Laboratory of Biomaterials	45
再生増殖制御分野 Laboratory of Tissue Stem Cell Biology	59
再生免疫学分野 Laboratory of Immunology	65
組織再生応用分野 Laboratory of Tissue Regeneration	70
臓器・器官形成応用分野 Laboratory of Organ and Tissue Reconstruction	79
発生エピゲノム分野 Laboratory of Developmental Epigenome	87
胚性幹細胞分野 Laboratory of Embryonic Stem Cell Research	91
統合生体プロセス分野 Laboratory of Integrative Biological Science	95
生体再建学分野 Laboratory of Experimental Immunology	100
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	106
ナノバイオプロセス分野 Laboratory of Nano Bioprocess	111
バイオメカニクス分野 Laboratory of Biomechanics	115
発生システム制御分野 Laboratory of Developmental Systems	127
システムウイルス学分野 Laboratory of Systems Virology	132
増殖制御システム分野 Laboratory of Growth Regulation System	139
RNA システム分野 Laboratory of RNA System	146
生体膜システム分野 Laboratory of Biological Membrane System	150
組織恒常性システム分野 Laboratory of Tissue Homeostasis	155
数理生物学分野 Laboratory of Mathematical Biology	159
幹細胞遺伝学分野 Laboratory of Stem Cell Genetics	164
附属感染症モデル研究センター Research Center for Infectious Diseases	
霊長類モデル分野 Laboratory of Primate Model	167
ウイルス感染症モデル分野 Laboratory of Infectious Disease Model	170
ウイルス共進化分野 Laboratory of Virus-Host Coevolution	174
動物実験委員会マウス作製支援チーム Reproductive Engineering Team	177
附属再生実験動物施設 Center for Animal Experiments	180
ウイルス・再生医科学研究所ネットワークシステム	
Computer Network of Institute for Frontier Life and Medical Sciences	183
共同研究	185
学術集会	209
分野主催のセミナー	211
構成員名簿	215

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**
特定准教授 岡部泰賢 Program-Specific Assoc. Prof. **Yasutaka Okabe**
特定助教 木檜 周 Program-Specific Assist. Prof. **Amane Kogure**

【藤田グループ】

当グループでは抗ウイルス免疫応答、ウイルス感染症に対する新たな治療法の開発、抗ウイルス自然免疫応答の異常による自己免疫疾患の発症機構、その新たな治療法の開発などについて研究を行なっている。以下にそれぞれのプロジェクトを列挙する。

- 1) ウィルス感染による宿主細胞の細胞死の新たな機構の研究
- 2) ウィルスセンサーによるウィルス由来 RNA の特異的認識機構の研究
- 3) I型インターフェロン遺伝子転写抑制機構の研究
- 4) 米糠由来二本鎖 RNA の抽出法の開発、それによるウイルス感染からの防御の応用研究（ヒト、家畜）
- 5) B型肝炎ウイルスの新たな感染動物モデルの樹立
- 6) cccDNA を標的とした抗 B型肝炎ウイルス薬剤の探索
- 7) 重症熱性血小板減少症候群ウイルスの動物的感染モデルによる病原性の研究
- 8) 重症熱性血小板減少症候群ウイルスの抗炎症を標的とした神姫治療法の開発
- 9) ウィルスセンサーの異常による自己免疫疾患発症の動物モデルによる解析

We study on antiviral innate immunity, develop new therapy for viral infection and study on autoimmunity caused by dysfunction of viral RNA sensors. Below are list of our research projects.

- 1) Study on the mechanism of host cell death by viral infection
- 2) Study on the mechanism of sensing viral RNA by innate immune sensors
- 3) Study on the repression mechanism of type I interferon gene expression
- 4) Use of rice bran derived double-stranded RNA for prophylactic and therapeutic purposes against viral infections
- 5) Establishing new animal infection model for hepatitis B virus
- 6) Screening of anti hepatitis B virus chemicals by using cccDNA inhibition assay
- 7) Study on Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome virus (SFTSV) using animal infection model
- 8) Development of new anti-inflammation therapy for SFTSV infection

9) Study on autoimmunity caused by dysfunction of viral RNA sensors

List of Publications

Yamada S, Shimojima M, Narita R, Tsukamoto Y, Kato H, Saijo M and Fujita T. RLRs and TLRs Signaling Pathways Cause Aberrant Production of Inflammatory Cytokines/Chemokines in an SFTSV Infection Mouse Model. *J Virol.* 2018 Apr 11. pii: JVI.02246-17. doi: 10.1128/JVI.02246-17. [Epub ahead of print]

Rui Kamada, Wenjing Yang, Yubo Zhang, Mira C. Patel, Yanqin Yang, Ryota Ouda, Anup Dey, Yoshiyuki Wakabayashi, Kazuyasu Sakaguchi, Takashi Fujita, Tomohiko Tamura, Jun Zhu, and Keiko Ozato Interferon stimulation creates chromatin marks and establishes transcriptional memory. *PNAS* published ahead of print September 10, 2018. <https://doi.org/10.1073/pnas.1720930115>

Masataka Tsuge, Nobuhiko Hiraga, Yizhou Zhang, Misa Yamashita, Ojiro Sato, Naoya Oka, Kanma Shiraishi, Yu Izaki, Grace Naswa Makokha, Takuro Uchida, Mio Kurihara, Motonobu Nomura, Ken Tsushima, Takashi Nakahara, Eisuke Murakami, Hiromi Abe-Chayama, Tomokazu Kawaoka, Daiki Mikia, Michio Imamura, Yoshiiku Kawakami, Hiroshi Aikata, Hidenori Ochi, C. Nelson Hayes, Takashi Fujita, Kazuaki Chayama Endoplasmic reticulum-mediated induction of interleukin-8 occurs by hepatitis B virus infection and contributes to suppression of interferon responsiveness in human hepatocytes. *Virology* 525 (2018) 48-61

Structure-dependent antiviral activity of catechol derivatives in pyroligneous acid against the encephalomyocarditis virus. Ruibo Li, Ryo Narita, Ryota Ouda, Chihiro Kimura, Hiroshi Nishimura, Mitsuyoshi Yatagai, Takashi Fujita and Takashi Watanabe *RSC Adv.*, 2018, 8, 35888-35896 DOI: 10.1039/c8ra07096b

List of Presentations

Fumihiko Takeuchi, Sotaro Ikeda, Yuta Tsukamoto, Yukie Otakaki, Yoshikazu Iwasawa, Wan-Ling Yao, Mian Qin, Qihao Chen, Ryo Narita, Ryota Ouda, Amane Kogure, Hiroki Kato and Takashi Fujita. 6th TAIWAN-KOREA-JAPAN HBV Research Symposium 2018, 2018/04/07-08, Taipei, Taiwan

山田辰太郎、下島昌幸、成田亮、塚本雄太、加藤博己、西條政幸、藤田尚志 重症熱性血小板減少症候群ウイルス（SFTSV）の致死的感染動物モデルによる解析。第83回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 シンポジウム「ウイルスと感染防御」、東京、2018年7月26-27日

Fumihiko Takeuchi, Sotaro Ikeda, Yuta Tsukamoto, Yoshikazu Iwasawa, Wan-Ling Yao, Ryo Narita, Ryota Ouda, Amane Kogure, Hiroki Kato, Takashi Fujita A screening system for covalently closed circular (ccc) DNA. 2018 International HBV Meeting, Taormina Messina, Sicily, Italy, October 3-6 2018

Nobumasa Soda, Nobuhiko Sakai, Hideo Onizawa, Masamichi Takami, Hiroki Kato and Takashi Fujita
Skeletal abnormalities in mice with constitutively activated MDA5. The 13th International Symposium of
the Institute Network for Biomedical Sciences, Kyusyu University, Fukuoka, Japan, October 18-19 2018

Ahmed Samir Abu Tayeh, Hiroki Kato and Takashi Fujita Constitutive RIG-I Activation Causes Skin Lesion
Resembling Psoriasis in Mice. The 47th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology,
Fukuoka International Congress Center, Fukuoka, Japan, December 10-12, 2018

【岡部グループ】

本グループでは、生体各所に存在するマクロファージに焦点をあて、その生理機能を明らかにするとともに、その破綻によって引き起こされる病態について解析を行っている。これまでマウスの様々な組織から常在性マクロファージを単離し、ゲノムワイドな遺伝子発現解析を行うことでマクロファージの組織特異性を分子レベルで解析してきた。また、各組織マクロファージで特異的に活性化されるマスター転写因子を同定し、組織特異性の制御メカニズムを解析している。

1) マクロファージの細胞生物学

2018年は、新たに7つのマウス組織から常在性マクロファージを単離し、次世代シーケンスによるトランスクリプトーム解析を行った。本解析により精巣、腎臓、脂肪組織などの各組織のマクロファージで特異的に発現する転写因子を同定した。これら転写因子をマクロファージ特異的に欠損するマウスを樹立し、その解析を進めている。

2) 新規中皮細胞の機能解析

腹腔は身体の最も大きな体腔である。腹腔は単なる空所ではなく、他のリンパ組織にはほとんど存在しないリンパ球種（B-1細胞など）が集積し、独自の免疫コンパートメントを形成する。これらリンパ球は腹腔から血管系を介して末梢リンパ組織へと移行し、血中の自然抗体や腸管 IgA の產生に寄与する。しかし、免疫細胞は閉鎖空間である腹腔をどのようにして出入りするのか、そのメカニズムは理解されていない。

今回、腹腔と血管系を繋ぐ「閥門」と考えられる場所に限局する新規の中皮細胞種を同定した。本中皮細胞は、その特徴的な局在からリンパ球の腹腔 - 血管系の移行を制御する可能性が示唆される。2018年は、受精卵を用いたCRISPR-CAS9系により、薬剤依存的に本中皮細胞を選択的に除去することが出来るマウス系統の樹立に成功し、現在その解析を進めている。

Macrophages are one of the most multifunctional cell types performing important roles in development, host defense, homeostasis, and tissue repair. They are present in virtually every tissue and display diverse phenotypes depending on their anatomical locations where they perform specialized functions that are essential for normal tissue physiology and homeostasis. Additionally, a variety of diseases are associated with

the disruption of tissue-specific macrophage functions. Aberrant macrophage functions contribute to a broad spectrum of pathologies including cancer, metabolic diseases, atherosclerosis, asthma, inflammatory bowel disease, rheumatoid arthritis, and fibrosis. Thus, uncovering the specialized functions of tissue macrophages is critical for the understanding of normal tissue functions as well as for therapeutic implication for human diseases. Currently, we are focusing macrophage functions in tissues, such as testis, kidney, and adipose tissues. Additionally, we recently identified novel mesothelial cell type which may play a role in the regulation of body cavity immunity.

List of Publications

Ohteki T., and Okabe Y. (2018). The Origins of Macrophages and Their Roles Beyond Immunology. *Int. Immunol.* 30, 483-484

Okabe Y. (2018). Molecular Control of the Identity of Tissue-Resident Macrophages. *Int. Immunol.* 30, 485-491

岡部泰賢 (2018). 腹腔マクロファージ～機能と発生の分子基盤～, 炎症と免疫, 197-200

岡部泰賢 (2018). 組織マクロファージの分化と機能, 医学のあゆみ, 1231-1234

岡部泰賢 (2018). 組織常在性マクロファージ, *Medical Science Digest*, 420-422

岡部泰賢 (2018). 組織マクロファージの遺伝子発現制御, 細胞, 8-11

List of Presentations

岡部泰賢、生体恒常性と組織マクロファージ、東京大学先端科学技術研究センター LSBM、東京、2018年2月23日

岡部泰賢, マクロファージの組織発生, 平成29年度 北海道大学遺伝子病制御研究所「感染・免疫・がん・炎症」, 北海道, 2018年3月27日

岡部泰賢, マクロファージと組織微小環境, Scientific Exchange Meeting in Toyama -マクロファージから考える糖尿病-, 富山, 2018年3月29日

岡部泰賢, 組織マクロファージの生物学, 第三回京都大学皮膚基礎研究会, 京都, 2018年3月30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	安永純一朗	Sr. Lect.	Jun-ichirou Yasunaga
助 教	志村 和也	Assist. Prof.	Kazuya Shimura

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

1) HTLV-1の持続感染機構と発がん機序の解析

HTLV-1感染細胞の生体内での生存、増殖にはHTLV-1プロウイルスのプラス鎖とマイナス鎖に各々コードされるTaxとHTLV-1 bZIP factor(HBZ)が重要な役割を果たす。TaxはHTLV-1の転写を活性化し、ウイルスの複製、個体間伝播に必須である。一方HBZは感染細胞のクローナル増殖に重要な役割を果たすと考えられる。Taxは強力ながんタンパク質であるが、ATL細胞での発現レベルが非常に低いことから、発がんにおける意義は明らかでなかった。我々はTaxとHBZの発現レベルが新鮮ATL細胞と類似しているATL細胞株MT-1及びKK-1を用い、TaxとHBZの役割について解析を行った。これらの細胞株でTaxもしくはHBZをノックダウンすると、いずれにおいても細胞死が誘導されたことから、両遺伝子が細胞の生存、維持に必須であることが明らかとなった。次にTaxが不安定型EGFP(d2EGFP)を誘導するレポーター細胞MT1GFPを樹立しタイムラプス解析を行ったところ、Taxはごく一部の細胞(0.05-3%)に発現しており、多くの場合その発現パターンは一過性であることが明らかになった(Fig. 1)。この所見は、ごく一部の細胞に短時間発現するTaxがMT-1の維持に必須であることを示していた。シングルセル定量PCRの結果、Tax発現細胞は有意にNF- κ B経路関連遺伝子や抗アポトーシス遺伝子を高発現しており、Tax非発現細胞の中に抗アポトーシス遺伝子の発現が低い細胞群と軽度発現上昇している細胞群が混在していた。これらの所見から、MT-1はTaxの発現が消失した後も、その効果が持続することにより抗アポトーシス形質を維持し、結果として集団の維持を可能にしていると考えられた。本仮説に関して、数理モデルとコンピューターシミュレーションによる検証を行い、実験で観察されたTaxの発現動態と細胞増殖を再現できることが明らかとなった。

一方、HBZ は全ての ATL 症例で発現が検出できる。HBZ を CD4 陽性 T リンパ球に特異的に発現する HBZ トランジエニックマウス (HBZ-Tg) が皮膚炎、肺胞炎といった慢性炎症と T リンパ腫を発症することから、HTLV-1 の病原性に必須のウイルス遺伝子であると考えられる。興味深いことに、HBZ 遺伝子は翻訳されたタンパク質のみならず、機能的 RNA としても機能している。HBZ RNA は HTLV-1 感染細胞では主に核内に存在し、多くの宿主遺伝子の転写を脱制御する。本研究室では、HBZ RNA の核局在機構、RNA として作用する分子機序について解析を進めている。

HTLV-1 感染細胞は Tax の一過性発現と、HBZ のタンパク質と RNA による異なる作用機構により、宿主の遺伝子発現及び機能を複雑に制御しており、HTLV-1 の巧妙な生き残り戦略であると考えられる。

2) HTLV-1 に対する免疫応答の解析と治療法開発

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

3) HIV-1 潜伏感染の維持 / 再活性化に関する分子機序の解析

HIV-1 感染者における潜伏感染細胞の存在は、体内からのウイルス完全排除に対して大きな障壁となっており、したがって、長期間の服薬が求められている。潜伏感染細胞の再活性化誘導は、体内からの潜伏感染細胞除去につながると期待されている。そこで、潜伏感染状態の維持機構および再活性化機構に関する分子機序の解析を行っている。これまでにプロモドメインタンパク質の一種である BRD4 が潜伏感染状態の再活性化に関与することが明らかとなっているが、我々の解析によ

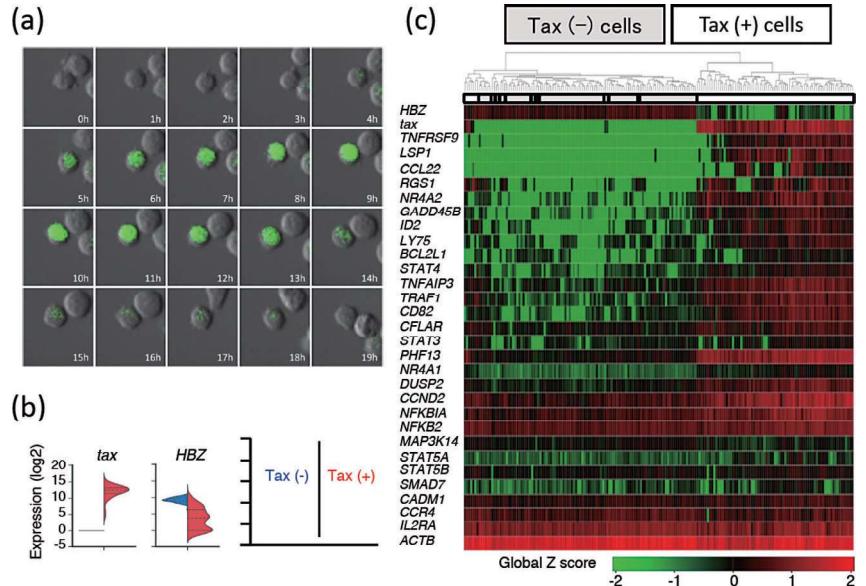


Figure 1. Transcriptional changes induced by transient Tax expression

(a) Tax is transiently expressed in a small subset of MT-1 cells.

(b) HBZ expression is negatively correlated with that of Tax.

(c) Transcriptional pattern is different between Tax (+) and Tax (-) cells.

り、これまで報告されていないプロモドメインタンパク質も潜伏感染状態の維持に寄与していることが明らかになった。さらに詳細な解析の結果、エピジェネティックな変化が関係していることが示された。

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 viruses.

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

HTLV-1 provirus encodes two oncogenes *tax* and *HTLV-1 bZIP factor (HBZ)* in its plus and minus strand, respectively. Tax is a potent activator of viral replication and many signaling pathways involved in cancer development. Tax expression is generally suppressed in infected cells to evade host immune system. Therefore, its precise roles in pathogenesis remained unclear. Live-cell imaging revealed that a small fraction of HTLV-1-induced leukemic cells expresses Tax at a given time, and its expression level is drastically changing in each cell (Fig. 1). Experimental data of single-cell analysis and computer simulation show that a small number of Tax-expressing cells are needed for the maintenance of leukemia. Tax is inducible in response to various stresses. This limited Tax expression is required to maintain the whole cell population through inhibition of apoptosis. These results suggest that Tax efficiently protects cells from cell death and enhances virus production under stressful conditions. It is an elaborated strategy of HTLV-1 to evade host immunity and enable persistence *in vivo*.

On the other hand, HBZ is detected in all ATL cells. HBZ transgenic mice (HBZ-Tg), which express HBZ in CD4+T cells, develop chronic inflammation, such as dermatitis and alveolitis, and T-cell lymphoma, it is suggested that HBZ is a critical factor in HTLV-1 pathogenesis. HBZ functions as not only protein but also RNA. *HBZ* RNA is dominantly expressed in the nucleus and dysregulates transcription of many cellular genes. We are now analyzing the molecular mechanisms for nuclear retention of HBZ and control of gene expression.

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

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

3) Molecular mechanisms of maintenance and reactivation in HIV-1 latency

In HIV-positive patients, the presence of latently infected cells hinders the complete eradication of the virus, and thus, life-long medication is required. It is believed that efficient reactivation of latency may lead to the elimination of the latently infected cells that remain in the body. We analyzed the molecular mechanisms of HIV-1 latency and reactivation. One of the bromodomain proteins, BRD4, has been reported to be involved in the reactivation of HIV-1, whereas we identified other bromodomain proteins associated with the maintenance of HIV-1 latency. Further analyses revealed that epigenetic changes are the fundamental molecular mechanism for that.

List of Publications

- Yasuma-Mitobe, K., and Matsuoka, M. (2018). The Roles of Coinhibitory Receptors in Pathogenesis of Human Retroviral Infections. **Front Immunol.** 9, 2755.
- Naito, T., Yasunaga, JI., Mitobe, Y., Shirai, K., Sejima, H., Ushirogawa, H., Tanaka, Y., Nakamura, T., Hanada, K., Fujii, M., Matsuoka, M., and Saito, M. (2018). Distinct gene expression signatures induced by viral transactivators of different HTLV-1 subgroups that confer a different risk of HAM/TSP. **Retrovirology.** 15, 72.
- Song, Z., Wu, W., Chen, M., Cheng, W., Yu, J., Fang, J., Xu, L., Yasunaga, JI., Matsuoka, M., and Zhao, T. (2018). Long noncoding RNA ANRIL supports proliferation of adult T-cell leukemia cells through cooperation with EZH2. **J Virol.** 92, pii: e00909-18. doi: 10.1128/JVI.00909-18.
- Inoue, Y., Endo, S., Matsuno, N., Kikukawa, Y., Shichijo, T., Koga, K., Takai, A., Iwanaga, K., Nishimura, N., Fuji, S., Fukuda, T., Nosaka, K., and Matsuoka, M. (2018). Safety of mogamulizumab for relapsed ATL after allogeneic hematopoietic cell. **Bone Marrow Transplant.** Epub 2018 Aug 16. doi: 10.1038/s41409-018-0291-5.
- Sato, T., Coler-Reilly, ALG., Yagishita, N., Araya, N., Inoue, E., Furuta, R., Watanabe, T., Uchimaru, K., Matsuoka, M., Matsumoto, N., Hasegawa, Y., and Yamano, Y. (2018). Mogamulizumab (Anti-CCR4) in HTLV-1-Associated Myelopathy. **New Engl J Med.** 378, 529-538.
- Mahgoub, M., Yasunaga, JI., Iwami, S., Nakaoka, S., Koizumi, Y., Shimura, K., and Matsuoka, M. (2018). Sporadic on/off switching of HTLV-1 Tax expression is crucial to maintain the whole population of virus-induced leukemic cells. **Proc Natl Acad Sci USA.** 378, 529-538.
- Tanaka, A., and Matsuoka, M. HTLV-1 Alters T Cells for viral persistence and transmission. **Front Microbiol.** 9, 461.
- Yasunaga, JI., and Matsuoka, M. (2018). Oncogenic spiral by infectious pathogens: The cooperation of multiple factors in cancer development. **Cancer Sci.** 109, 24-32.

List of Presentations

Ma, G., Yasunaga, JI., and Matsuoka, M. NUCLEAR RETENTION AND FUNCTIONS OF HTLV-1 AND HIV-1 ANTISENSE RNAs. Nature Conferences, Viral Infection and Immune Response, Shanghai, October 12-14, 2018.

Yasunaga, JI. Molecular mechanisms of oncogenesis by human T-cell leukemia virus type 1. The 13th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences joint with the 3rd Symposium of the Inter-University Research Network for Trans-Omics Medicine and the 28th Hot Spring Harbor Symposium "Biomedical Sciences in the Era of Big Data", Fukuoka, October 18-19, 2018.

Matsuoka, M. Strategy and pathogenesis of human T-cell leukemia virus type 1. 20th Annual International Meeting of the Institute of Human Virology, Baltimore, October 22-25, 2018.

Ma, G., Yasunaga, JI., and Matsuoka, M. Promoter-mediated nuclear retention of HBZ RNA is involved in proliferation of adult T-cell leukemia (ATL) cells. 25th East Asia Joint Symposium, Chongqing, October 25-26, 2018.

Kurita, D., Yasunaga, JI., Tanaka, A., Mahgoub, M., and Matsuoka, M. Dynamic Changes of Chromatin Structure and Transcription By Transient Expression of HTLV-1 Tax in ATL Cells. The 60th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, San Diego, December 1-4, 2018.

Shiratsuchi, M., Fukuda, T., Iino, T., Hasegawa, A., Yasunaga, JI., Watanabe, K., Hirata, A., Utsunomiya, H., Ohno, H., Ishida, T., Akashi, K., Matsuoka, M., Kannagi, M. and Suehrio, Y. Tax-targeting dendritic cell therapy for ATL: A Phase Ia/Ib clinical study. The 60th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, San Diego, December 1-4, 2018.

栗田大輔、三好寛明、市川理子、山田恭平、武藤礼治、佐々木裕哉、河本啓介、瀬戸加大、田丸淳一、得平通英、大島孝一 慢性関節リウマチに発症するメトトレキサート関連リンパ増殖性疾患の臨床病理学的解析：組織学的分類および予後予測因子の提唱 第58回日本リンパ網内学会総会、愛知、2018年6月28-30日

松岡雅雄、安永純一朗 ヒトT細胞白血病ウイルス1型の免疫逃避機構と治療戦略 第5回日本HTLV-1学会学術集会、東京、2018年8月31日-9月2日

七條敬文、安永純一朗、大西知帆、エドワードマーフィー、松岡雅雄 HTLV-1及びHTLV-2キャラクターにおけるプロウイルス配列の網羅的解析 第5回日本HTLV-1学会学術集会、東京、2018年8月31日-9月2日

村田めぐみ、鷺崎彩夏、関洋平、安永純一朗、松岡雅雄、水上拓郎、明里宏文 ニホンザルにおける高頻度なSTLV-1自然感染に関する疫学調査 第5回日本HTLV-1学会学術集会、東京、2018年8月31日-9月2日

宇都宮勇人、飯野忠史、長谷川温彦、大野博文、平田聖子、安永純一朗、松岡雅雄、福田哲也、宇都宮與、赤司浩一、神奈木真理、末廣陽子 ATL に対する Tax 標的樹状細胞ワクチン療法の 5 年追跡調査結果 第 5 回日本 HTLV-1 学会学術集会、東京、2018 年 8 月 31 日 -9 月 2 日

大野博文、長谷川温彦、宇都宮勇人、安永純一朗、松岡雅雄、飯野忠史、白土基明、福田哲也、石田高司、赤司浩一、神奈木真理 抗 CCR4 抗体を併用した Tax 標的樹状細胞ワクチン療法における免疫学的解析—第 1a/lb 相試験中間解析 - 第 5 回日本 HTLV-1 学会学術集会、東京、2018 年 8 月 31 日 -9 月 2 日

佐藤知雄、八木下尚子、新谷奈津美、井上永介、古田梨愛、渡邊俊樹、内丸薰、松岡雅雄、松本直樹、長谷川泰弘、山野嘉久 HAM 患者に対する抗 CCR 抗体製剤（モガムリズマブ）の安全性と有効性 第 5 回日本 HTLV-1 学会学術集会、東京、2018 年 8 月 31 日 -9 月 2 日

馬広勇、安永純一朗、松岡雅雄 HTLV-1 bZIP factor RNA はプロモーター活性依存的に核に局在し、ATL 細胞の増殖を促進する 第 77 回日本癌学会学術総会、大阪、2018 年 9 月 27-29 日

栗田大輔、安永純一朗、田中梓、Mahgoub Mohamed、松岡雅雄 間欠的 HTLV-1 Tax 発現に伴うクロマチン構造およびトラスクリプトーム変化 第 77 回日本癌学会学術総会、大阪、2018 年 9 月 27-29 日

豊田康祐、安永純一朗、崔日承、末廣陽子、鵜池直邦、岡村純、松岡雅雄 ATL に対する同種造血幹細胞移植における欠損型 HTLV-1 プロウイルスの臨床的意義：ATL-NST 試験併合解析結果 第 80 回日本血液学会学術集会、大阪、2018 年 10 月 12-14 日

Takahumi Shichijo、Jun-ichirou Yasunaga、Kazuya Shimura、Kei Sato、Yoshio Koyanagi、Patrick Green、Edward Murphy、Masao Matsuoka Comprehensive analysis of proviral sequences in HTLV-1 and HTLV-2 carriers 第 66 回日本ウイルス学会学術集会、京都、2018 年 10 月 28-30 日

Yusuke Higuchi、Jun-ichirou Yasunaga、Yu Mitagami、Koichi Ohshima、Masao Matsuoka Loss of IL-6 accelerates inflammation and lymphomagenesis in HTLV-1 bZIP factor transgenic mice 第 19 回熊本エイズセミナー、熊本、2018 年 11 月 6-7 日

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

RNA ウィルス分野
Laboratory of RNA viruses

教 授	朝長 啓造	Prof.	Keizo Tomonaga
特定准教授	堀江 真行	Program-Specific Assoc. Prof.	Masayuki Horie
助 教	牧野 晶子	Assist. Prof.	Akiko Makino
特定助教	小松 弓子	Program-Specific Assist. Prof.	Yumiko Komatsu

平成 30 年は、3 月に牧野晶子が助教になり、4 月に生命科学研究科修士課程 1 年として山元、金、追田が入学し、田中千晶が技術補佐員として加わった。また 5 月に山下はるかが事務補佐員として加わり、同氏は 7 月に特定職員となった。

本年は、以下の項目に関する研究活動を行い、その成果を発表した。(1) ネプリライシン発現ボルナ病ウイルスベクターによるアミロイド β の分解、(2) 内在性ボルナウイルス様配列の体系的な発生年代推定、(3) ボルナ病ウイルスの新規スプライシングバリエントの同定。

(1) では、大学院博士課程 1 年の酒井がネプリライシンの安定的な発現を誘導するボルナ病ウイルスベクターの作製に成功し、同ベクターを導入した細胞では効率的にアミロイド β が分解されることを示した。家族性発症の原因となる変異アミロイド前駆タンパク質、および変異のないアミロイド前駆タンパク質を用いて評価したところ、ネプリライシンを発現するボルナ病ウイルスベクターを導入した細胞では、変異の有無にかかわらず産出されたアミロイド β 量が有意に減少した。また、アミロイド前駆タンパク質および、アミロイド β 産出過程に関連するタンパク質量を測定したところ、本ウイルスベクター導入による影響はなかった。これらのことから、ボルナ病ウイルスベクターにより導入されたネプリライシンは、内在性アミロイド前駆タンパク質、および変異アミロイド前駆タンパク質から産出されたアミロイド β を分解することが明らかにした。

(2) では、大学院修士課程 2 年の向井が、コウモリのゲノム DNA を用いた実験的解析と、データベース解析を組み合わせた手法により、ヒナコウモリのゲノムに見られる 13 系統の EBL 配列の遺伝的関係を明らかにした。ヒナコウモリのゲノム中の EBL 配列は 1420 万年前から 5300 万年前の間に挿入されており、ヒナコウモリの祖先がこの間頻繁にボルナウイルスの感染を受けていたことが示された。(3) では、大学院博士課程 4 年の小嶋が、次世代シーケンス技術を用いウイルス由来の転写産物の構造を網羅的に解析することで、スプライシングを用いたウイルス遺伝子発現機構を明らかにした。ヒト由来培養細胞におけるウイルス転写産物の配列解析の結果、ヌクレオプロテイン遺伝子由来の転写産物にこれまで報告されていないイントロンが同定された。イントロンは 2 箇所あり、ヌクレオプロテイン遺伝子からは複数のアイソフォームが発現することが考えられた。また、ウイルスが感染した培養細胞において、スプライシングを受けた mRNA から一部のヌクレオプロテインアイソフォームが発現していた。全長のヌクレオプロテインは核内に局在するが、スプ

ライシングにより発現するアイソフォームの一部は小胞体に局在することが明らかとなった。さらに、スプライシングサイトを欠損した組換えウイルスを用いた解析の結果、ヌクレオプロテイン転写産物のスプライシングはウイルスの感染を抑制する負の制御機構であることが示された。

その他の研究活動として、朝長は7月の Genetic Novelty/Genomic Variations by RNA-Networks and Viruses (Salzburg, Austria) と8月の RNA virus persistence meeting: mechanisms and consequences (Freiburg, Germany) にて招待講演を行った。国際学会へは、5月の The 21th American Society of Gene and Cell Therapy Annual Meeting (Chicago, USA) に小松と大学院博士課程1年の酒井が、7月の Negative Strand Virus 2018 (Verona, Italy) に堀江、牧野、大学院博士課程4年、3年、修士課程2年の小嶋、柳井、向井が、同月の EUROPEAN SEMINARS IN VIROLOGY (Bertinoro, Italy) では牧野が、8月の RNA virus persistence meeting: mechanisms and consequences (Freiburg, Germany) では堀江がそれぞれ参加し発表を行った。その他、教室員の多くが、10月の日本ウイルス学会（京都）で研究発表を行った。

また、1月の Negative strand virus meeting -Japan (沖縄) では、大学院博士課程2年の小森園がベスト・オーラル・プレゼンテーション賞、5月の The 21th American Society of Gene and Cell Therapy Annual Meeting (Chicago, USA) では、大学院博士課程1年の酒井がベストポスター賞、7月の第20回日本RNA学会年会（大阪）では、大学院博士課程4年の小嶋がベストプレゼンテーション賞、9月の第161回日本獣医学会学術集会では、大学院博士課程2年の小森園が若手奨励賞を授与された。

The researches carried out in our group are focused on animal-derived RNA viruses, especially 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 evolutional 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 2018, we conducted research on the following subjects.

1) Degradation of amyloid β peptide by neprilysin expressed from Borna disease virus vector

Accumulation of amyloid β ($A\beta$ 40 and $A\beta$ 42) in the brain is a characteristic of Alzheimer's disease (AD). Because neprilysin (NEP) is a major $A\beta$ -degrading enzyme, NEP delivery in the brain is a promising gene therapy for AD. Borna disease virus (BoDV) vector enables long-term transduction of foreign genes in the central nerve system. We evaluated the proteolytic ability of NEP transduced by the BoDV vector and found that the amounts of $A\beta$ 40 and $A\beta$ 42 significantly decreased, which suggests that NEP expressed from the BoDV vector is functional to degrade $A\beta$.

2) Systematic estimation of insertion dates of endogenous bornavirus-like elements in vesper bats

Endogenous bornavirus-like elements (EBLs) are sequences derived from bornaviruses (the family Bornaviridae) that are integrated into animal genomes. They are formed through germline insertions of segments of bornaviral transcripts into animal genomes. Because EBLs are molecular fossils of bornaviruses, they serve as precious sources of information to understand the evolutionary history of bornaviruses. Previous studies revealed the presence of many EBLs in bat genomes, especially in vesper bats, and suggested the long-term association between bats and bornaviruses. However, insertion dates of EBLs are largely unknown because of the limitations of available bat genome sequences in the public database. Through a combination of database searches, PCR, and sequencing approaches, we systematically determined the gene orthologies of 13 lineages of EBLs in bats of the genus *Myotis* and *Eptesicus* and family Vespertilionidae. Using the above data, we estimated their insertion dates: the EBLs in vesper bats were inserted approximately 14.2 to 53 million years ago. These results suggest that vesper bats have been repeatedly infected by bornaviruses at different points in time during evolution.

3) Splicing-Dependent Subcellular Targeting of Borna Disease Virus Nucleoprotein Isoforms.

Targeting of viral proteins to specific subcellular compartments is a fundamental step for viruses to achieve successful replication in infected cells. We demonstrated that BoDV nucleoprotein (N) transcripts undergo mRNA splicing to generate truncated isoforms. In combination with alternative usage of translation initiation sites, the N gene potentially expresses at least six different isoforms, which exhibit diverse intracellular localizations, including the nucleoplasm, cytoplasm, and endoplasmic reticulum (ER), as well as intranuclear viral replication sites. Interestingly, the ER-targeting signal peptide in N is exposed by removing the intron by mRNA splicing. Furthermore, the spliced isoforms inhibit viral polymerase activity. Consistently, recombinant BoDVs lacking the N-splicing signals acquire the ability to replicate faster than wild-type virus in cultured cells, suggesting that N isoforms created by mRNA splicing negatively regulate BoDV replication.

List of Publications

A Viral (Arc) hive for Metazoan Memory. Parrish NF, Tomonaga K. (2018) **Cell.** 172 8-10.

Paleovirology of bornaviruses: What can be learned from molecular fossils of bornaviruses. Horie M, Tomonaga K. (2018) **Virus Res.** pii: S0168-1702 (18) 30096-0. doi: 10.1016/j.virusres.2018.04.006. [Epub ahead of print] Review

Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2018. Amarasinghe GK, Aréchiga Ceballos NG, Banyard AC, Basler CF, Bavari S, Bennett AJ, Blasdell KR, Briese T, Tomonaga K, et al (2018) **Arch Virol.** 163 2283-2294.

Degradation of amyloid β peptide by neprilysin expressed from Borna disease virus vector. Sakai M, Ueda S,

Daito T, Asada-Utsugi M, Komatsu Y, Kinoshita A, Maki T, Kuzuya A, Takahashi R, Makino A, Tomonaga K. (2018) **Microbiol Immunol.** doi: 10.1111/1348-0421.12602. [Epub ahead of print]

Prevalence of antibodies against Borna disease virus proteins in Japanese children with autism spectrum disorder. Honda T, Sofuku K, Matsunaga H, Tachibana M, Mohri I, Taniike M, Tomonaga K. (2018) **Microbiol Immunol.** doi: 10.1111/1348-0421.12603. [Epub ahead of print]

Two Neuropsychiatric Cases Seropositive for Bornavirus Improved by Ribavirin. Matsunaga H, Fukumori A, Mori K, Honda T, Uema T, Tomonaga K. (2018) **Jpn J Infect Dis** 71 338-342.

Systematic estimation of insertion dates of endogenous bornavirus-like elements in vesper bats. Mukai Y, Horie M, Tomonaga K. (2018) **J Vet Med Sci.** 80 1356-1363.

Splicing-Dependent Subcellular Targeting of Borna Disease Virus Nucleoprotein Isoforms. (2018) Kojima S, Sato R, Yanai M, Komatsu Y, Horie M, Igarashi M, Tomonaga K. **J Virol.** pii: JVI.01621-18. doi: 10.1128/JVI.01621-18. [Epub ahead of print]

List of Presentations

小森園亮. 核移行はボルナウイルスの適応進化の原動力である. 7th Negative Strand Virus-Japan Symposium. 沖縄, 2018年1月15-17日

小嶋将平, 佐藤涼, 柳井真瑚, 小松弓子, 堀江真行, 朝長啓造. ボルナ病ウイルスのスクレオプロテインのアイソフォームの発現および性状の解析. 7th Negative Strand Virus-Japan Symposium. 沖縄, 2018年1月16日

Yahiro Mukai, Masayuki Horie, Yuki Kobayashi, Shohei Kojima, Ken Maeda, Keizo Tomonaga. Evaluation of the evolutionary process and the inhibition of Borna disease virus of endogenous bornavirus-like elements in miniopterid bats. The 16th International Students Seminar. 京都, 2018年2月13日

Yumiko Komatsu, Keizo Tomonaga. Characterization of BoDV Vector Encoding Thymidine Kinase for Cancer Gene Therapy. The 21th American Society of Gene and Cell Therapy Annual Meeting. Chicago, USA. 2018年5月17日

Madoka Sakai, Ryo Komorizono, Yumiko Komatsu, Akiko Makino, Keizo Tomonaga. Development of transmission-deficient Borna disease virus vector with enhanced transduction efficiency in primary and stem cells. The 21th American Society of Gene and Cell Therapy Annual Meeting. Chicago, USA. 2018年5月17日

小嶋将平, 佐藤涼, 柳井真瑚, 小松弓子, 堀江真行, 朝長啓造. ボルナ病ウイルスのスクレオプロテインの細胞内局在制御機序の解析. 第15回ウイルス学キャンプ. 静岡, 2018年6月6日

Yumiko Komatsu, Keizo Tomonaga. Development of iPSC-derived nerual stem cells transduced with BoDV-TK for cancer gene therapy. The 2nd symposium of the Canadian Society for Virology. Halifax,

Canada 2018年6月15日

Masayuki Horie, Shohei Kojima, Bea Clarise B.Garcia, Dong-Yun Kim, Yahiro Mukai, Nicholas F. Parrish, Keizo Tomonaga. Systematic investigation of novel lineages of endogenous bornavirus-like elements in vertebrate genomes. 17th Negative Strand RNA Virus (NSV2018) meeting. Verona, Italy 2018年6月17-22日

Akiko Makino, Yutaro Yamamoto, Yuya Hirai, Keizo Tomonaga. Translational regulation of Borna disease virus. 17th Negative Strand RNA Virus (NSV2018) meeting. Verona, Italy 2018年6月17-22日

Shohei Kojima, Ryo Sato, Mako Yanai, Yumiko Komatsu, Manabu Igarashi, Masayuki Horie, Keizo Tomonaga. Alternative splicing unmasks an endoplasmic reticulum targeting signal of Borna disease virus nucleoprotein. 17th Negative Strand RNA Virus (NSV2018) meeting. Verona, Italy 2018年6月17-22日

Mako Yanai, Shohei Kojima, Nadine Gillich, Masayuki Horie, Akiko Makino, Keizo Tomonaga. Involvement of ADAR2 in Borna disease virus infection. 17th Negative Strand RNA Virus (NSV2018) meeting. Verona, Italy 2018年6月17-22日

Yahiro Mukai, Masayuki Horie, Yuki Kobayashi, Shohei Kojima, Ken Maeda, Keizo Tomonaga. Investigation of the biological role of an endogenous bornavirus-like element in miniopterid bat genomes. 17th Negative Strand RNA Virus (NSV2018) meeting. Verona, Italy 2018年6月17-22日

Akiko Makino, Yutaro Yamamoto, Yuya Hirai, Keizo Tomonaga. Borna disease virus utilizes IGF2BP2 for translational regulation. EUROPEAN SEMINARS IN VIROLOGY. Bertinoro, Italy 2018年6月22-24日

Keizo Tomonaga. Roles of RNA transcripts from endogenous bornavirus-like elements in host evolution. Evolution – Genetic Novelty/Genomic Variations by RNA Networks and Viruses. Salzburg, Austria 2018年7月4-8日

小嶋将平, 本田知之, 朝長啓造. 内在性ボルナウイルス様エレメント由来非コードRNAはボルナウイルスの感染を抑制する. 第20回日本RNA学会年会. 大阪, 2018年7月9-11日

柳井真瑚, 小嶋将平, Nadine Gillich, 堀江真行, 牧野晶子, 朝長啓造. ADAR2はボルナ病ウイルスの感染に関与する. 第20回日本RNA学会年会. 大阪, 2018年7月9-11日

Keizo Tomonaga. Roles of non-coding RNAs from endogenous bornavirus-like elements in Borna disease virus infection. 2nd International Symposium on RNA virus persistence: mechanisms and consequences. Freiburg, Germany 2018年8月23-25日

小松弓子. ボルナウイルスベクターを利用した遺伝子治療法の検討. 第7回K-CONNEX研究会. 京都, 2018年7月27日

Madoka Sakai, Sakiho Ueda, Takuji Daito, Megumi Asada-Utsugi, Yumiko Komatsu, Ayae Kinoshita,

Takakuni Maki, Akira Kuzuya, Ryosuke Takahashi, Akiko Makino, Keizo Tomonaga. New application of Borna disease virus vector to gene delivery. 第 24 回日本遺伝子細胞治療学会学術集会. 東京, 2018 年 7 月 27 日

Masayuki Horie, Shohei Kojima, Bea Clarise B.Garcia, Dong-Yun Kim, Yahiro Mukai, Nicholas F. Parrish, Keizo Tomonaga. Systematic investigation of novel lineages of endogenous bornavirus-like elements in vertebrate genomes. 2nd International Symposium on RNA virus persistence: mechanisms and consequences. Freiburg, Germany 2018 年 8 月 23-25 日

Masayuki Horie, Junna Kawasaki, Dong-Yun Kim, Yahiro Mukai, Shohei Kojima, Bea Clarise B. Garcia, Nicholas F. Parrish, Keizo Tomonaga. Systematic investigation of novel lineages of endogenous bornavirus-like elements in the human genome. 第 17 回あわじしま感染症・免疫フォーラム. 兵庫, 2018 年 9 月 4 日

Yahiro Mukai, Masayuki Horie, Yuki Kobayashi, Shohei Kojima, Ken Maeda, Keizo Tomonaga. Examination of the biological property of a protein encoded by an endogenous bornavirus-like element in miniopterid bat genomes. 第 17 回あわじしま感染症・免疫フォーラム. 兵庫, 2018 年 9 月 4 日

中井亮佑, 堀江真行. 未知なる微生物を求めて - 南極生態学とウイルス学の融合 -. 平成 30 年度育志賞研究発表会. 東京, 2018 年 9 月 6 日

堀江真行. 内在性ウイルスと外来性ウイルスの探索. 平成 30 年度育志賞研究発表会. 東京, 2018 年 9 月 6 日

堀江真行, 佐々悠木子, 朝長啓造. ボルナウイルス感染の実態解明に向けて. 第 161 回日本獣医学会学術集会. 茨城, 2018 年 9 月 11-13 日

小森園亮, 竹前喜洋, 上家潤一, 曾我玲子, 牧野晶子, 朝長啓造. 日本国内の愛玩鳥繁殖場における鳥ボルナウイルス感染症の流行. 第 161 回日本獣医学会学術集会. 茨城, 2018 年 9 月 11-13 日

Masayuki Horie, Ryosuke Nakai, Megumu Tsujimoto, Satoshi Imura, Keizo Tomonaga. Viral metagenomic analysis of an Antarctic moss pillar. 環境ウイルス研究集会. 京都, 2018 年 10 月 27 日

Masayuki Horie, Ryosuke Nakai, Megumu Tsujimoto, Satoshi Imura, Keizo Tomonaga. Viral metagenomic analysis of an Antarctic moss pillar. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会. 京都, 2018 年 10 月 28-30 日

Akiko Makino, Kan Fujino, Keizo Tomonaga. Generation of chimeric mammalian orthobornavirus. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会. 京都, 2018 年 10 月 28-30 日

Yumiko Komatsu, Keizo Tomonaga. Development and evaluation of neural stem cells expressing BoDV-TK for cancer gene therapy. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会. 京都 2018 年 10 月 28-30 日

Yusuke Yamamoto, Tomoyuki Honda, Keizo Tomonaga. Development of a BoDV vector capable of controlling the expression of foreign genes. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会. 京都, 2018 年 10

月 28-30 日

Shohei Kojima, Ryo Sato, Mako Yanai, Yumiko Komatsu, Manabu Igarashi, Masayuki Horie, Keizo Tomonaga. RNA スプライシングはボルナ病ウイルスのスクレオプロテインの多様な細胞内局在を制御する. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会. 京都, 2018 年 10 月 28-30 日

Mako Yanai, Shohei Kojima, Nadine Gillich, Masayuki Horie, Akiko Makino, Keizo Tomonaga. ADAR2 is involved in Borna disease virus infection through suppression of inflammatory response genes. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会. 京都, 2018 年 10 月 28-30 日

Ryo Komorizono, Akiko Makino, Keizo Tomonaga. Intra-host diversity of Borna disease virus. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会. 京都, 2018 年 10 月 28-30 日

Madoka Sakai, Ryo Komorizono, Yumiko Komatsu, Akiko Makino, Keizo Tomonaga. Cleavage of viral glycoprotein is involved in the infection efficiency of non-propagating bornaviral vector. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会. 京都, 2018 年 10 月 28-30 日

Bea Clarise B. Garcia, Shohei Kojima, Masayuki Horie, Keizo Tomonaga. "Characterization of the L protein interactome of nuclear-infecting Borna disease virus 1 by proximity-dependent biotin identification assay". 第 66 回日本ウイルス学会学術集会. 京都, 2018 年 10 月 28-30 日

Takehiro Kanda, Masayuki Horie, Yumiko Komatsu, Keizo Tomonaga. Elucidating the transcription and replication mechanisms of Borna disease virus 2 for improvement of Borna disease virus vector system. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会. 京都, 2018 年 10 月 28-30 日

向井八尋, 堀江真行, 小林由紀, 小嶋将平, 前田健, 朝長啓造. Determination of interacting host factors of an endogenous bornavirus-like element-derived protein in miniopterid bat cells. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会. 京都, 2018 年 10 月 28-30 日

Dong-Yun Kim, Yahiro Mukai, Shohei Kojima, Yumiko Komatsu, Masayuki Horie, Keizo Tomonaga. Characterization of newly discovered endogenous bornavirus-like elements in the human genome. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会. 京都, 2018 年 10 月 28-30 日

堀江真行. 哺乳動物とボルナウイルスの共進化：ドライ・ウェット・フィールドワークを組み合わせたアプローチ. 第 41 回日本分子生物学会年会. 神奈川, 2018 年 11 月 28 日

小嶋将平, 川野秀一, 伊藤潤平, 中川草, 堀江真行, 朝長啓造. 内在性 RNA ウィルス様配列の新規検索手法の開発と新たなウィルス様配列の同定. 第 41 回日本分子生物学会年会. 神奈川, 2018 年 11 月 28 日

向井八尋, 堀江真行, 小林由紀, 小嶋将平, 前田健, 朝長啓造. A bornavirus-derived gene in miniopterid bats encodes a potentially functional RNA-binding protein. 第 41 回日本分子生物学会年会. 神奈川, 2018 年 11 月 28 日

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

微細構造ウイルス学分野

Laboratory of Ultrastructural Virology

教 授 野田 岳志 Prof. Takeshi Noda
助 教 中野 雅博 Assist. Prof. Masahiro Nakano

本分野では、一般的なウイルス学的手法に加えて電子顕微鏡や原子間力顕微鏡を用いた手法により、微細構造学的観点からインフルエンザウイルス、エボラウイルス、ラッサウイルスなど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。2018年は、インフルエンザウイルスタンパク質 NS1 による二本鎖 RNA のマスキングが、リボヌクレオタンパク質複合体（vRNP）により合成される二本鎖 RNA に特異的であることを明らかにした。また、インフルエンザウイルス核タンパク質 NP の解析により、核小体が vRNP 形成の場である可能性を示唆した。さらに、ラッサウイルスのマトリックスタンパク質 Z が、ゴルジ体由来の膜構造集合体を形成することによって、感染細胞における細胞膜再構築を行うことを明らかにした。

1) インフルエンザウイルス NS1 タンパク質の二本鎖 RNA への結合

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。我々は昨年までに、vRNP によって合成されるループ状の二本鎖 RNA（dsRNA）に対し、インフルエンザウイルスタンパク質 NS1 が RNA 全体をマスクする形で結合することを見いだした。本年は、様々な dsRNA に対する NS1 タンパク質の結合について原子間力顕微鏡を用いて解析した。その結果、poly (I:C) や eGFP の配列を有する dsRNA、さらには *in vitro* 合成した vRNA の dsRNA に対しては部分的な結合しか見られなかった。すなわち、NS1 の dsRNA のマスキングは、vRNP に結合した dsRNA に特異的なものであり、インフルエンザウイルスが転写あるいは複製中に生じる dsRNA を NS1 によって覆い隠すことで宿主の免疫応答から逃れている可能性が示唆された。

2) インフルエンザウイルス NP の核小体移行とその意義

インフルエンザウイルス核タンパク質 NP は核小体移行シグナルを持ち、単独で核小体へ移行する。NP の核小体移行シグナルに変異を導入したウイルスは増殖能を欠くことから、NP の核小体局在はウイルス増殖に欠かせない重要なステップと考えられる。本年は、核小体移行シグナルに変異を導入した変異型 NP を作出し、NP の核小体局在が vRNP 形成に及ぼす影響について検証した。野生型あるいは変異型 NP を持つ vRNP を再構成し、vRNA の転写・複製量を RT-qPCR により調べた

結果、変異型 NP により再構成した vRNP では野生型と比較して vRNA、cRNA、mRNA 合成量が顕著に低下していた。さらに、それぞれの vRNP を精製し、原子間力顯微鏡によりその構造を観察した結果、野生型 vRNP ではらせん構造が見られるのに対して、変異型 vRNP ではらせん構造を持たない異常な形態が観察された。これらの結果から、vRNP が核小体において形成される可能性が示唆された。

3) ラッサウイルス Z タンパク質により誘導される細胞膜再構築機構

ラッサウイルスのマトリックスタンパク質 (Z) は、ウイルス粒子の形成や出芽のみならず、ウイルスゲノム RNA の転写や複製にも関与する多機能性タンパク質である。我々はこれまでに電子顯微鏡解析により、ラッサウイルス感染細胞において細胞膜の再構築が行われ、その再構築が Z タンパク質により誘導されることを明らかにしてきた。本年は、Z タンパク質の細胞膜再構築における役割を明らかにすることを目的とし、免疫蛍光染色法により Z タンパク質と各種細胞小器官の局在について解析した。その結果、野生型 Z タンパク質は核近傍に集積しており、ゴルジ体と共に局在していた。一方で、細胞膜結合能を消失させた変異型 Z タンパク質は細胞質全体に一様に局在し、核近傍への集積は見られなかった。以上の結果から、ラッサウイルス Z タンパク質は、主にゴルジ体由来の膜構造集合体を形成することが明らかとなった。

Virus infections are accompanied by numerous morphological changes in viral and cellular components. Our laboratory aims to elucidate the replication mechanism of influenza, Ebola and Lassa viruses from the ultrastructural point of view, by using different microscopic analytical methods such as electron microscopy and high-speed atomic force microscopy. In 2018, we found that the influenza virus NS1 protein specifically masks a double-stranded RNA produced by vRNPs. We also demonstrated that nucleolar localization of influenza virus NP is indispensable for helical vRNP formation. Moreover, we found that the Lassa virus Z protein remodels intracellular membranous structure at the perinuclear region.

1) Association of the influenza A virus NS1 with double-stranded RNA produced by vRNP

The single-stranded, negative sense RNA genome of influenza A virus (vRNA) is encapsidated by multiple nucleoproteins and an RNA polymerase to form a ribonucleoprotein complex (vRNP). We recently found that a double-stranded RNA produced by vRNPs *in vitro* associates with numerous NS1 molecules, covering and entirely masking the dsRNA. In this year, we demonstrated that poly (I:C) or *in vitro*-synthesized dsRNAs comprising vRNAs were not masked with multiple NS1 molecules, suggesting that dsRNA masking by NS1 is likely specific for dsRNAs associating with the vRNP. Our results may suggest that the function of this NS1 masking of dsRNA is to evade the immune system.

2) Significance of nucleolar localization of NP in influenza virus replication

Influenza virus NP has been reported to localize in the nucleolus and the nucleus. The polymerase activity

of the reconstituted vRNPs *in cellulo* decreases when mutations are introduced into the nucleolar localization signal (NoLS) of NP. Thus, the nucleolar localization of NP is likely important for exerting polymerase activity. In this year, in order to determine the significance of NP nucleolar localization in virus replication, we examined whether the nucleolar localization of NP is involved in transcription and replication of genomic RNA and helical vRNP formation. The NoLS-mutant NP showed aberrant vRNP formation, resulting in inefficient transcription and replication of genomic RNA. Our findings suggest that nucleolar localization of NP is involved in the proper formation of vRNPs.

3) Cellular membrane remodeling induced by Lassa virus Z protein

The matrix protein Z of Lassa virus (LASV) is a multifunctional protein which plays important roles in not only assembly and budding of virus particles, but also in regulation of viral genome transcription and replication. Recently, we found that LASV Z protein induced cellular membrane remodeling. In 2018, we examined the intracellular localization of Z protein via immunofluorescence assay. We demonstrated that LASV Z accumulated at the perinuclear region and colocalized with the Golgi apparatus. On the other hand, LASV Z mutant without membrane binding activity was evenly dispersed in the cytoplasm and accumulation in the Golgi apparatus was not observed. These results suggest that Lassa virus Z protein remodels membranous structure at the perinuclear region via its membrane binding.

List of Publications

- Noda, T., Murakami, S., Nakatsu, S., Imai H., Muramoto, Y., Shindo, K., Sagara, H., Kawaoka, Y. (2018) Importance of the 1+7 configuration of ribonucleoprotein complexes for influenza A virus genome packaging. **Nat. Commun.** 9, 54.
- Iwatsuki-Horimoto, K., Nakajima, N., Ichiko, Y., Sakai-Tagawa, Y., Noda, T., Hasegawa, H., Kawaoka, Y. (2018) Syrian Hamster as an Animal Model for the Study of Human Influenza Virus Infection. **J. Virol.** 92, e01693-17.
- Takamatsu, Y., Kolesnikova, L., Becker, S. (2018) Ebola virus proteins NP, VP35, and VP24 are essential and sufficient to mediate nucleocapsid transport. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** 115, 1075-1080.
- Takamatsu, Y., Uchida, L., Raekiansyah, M., Luz, M.A., Morita, K., Hayasaka, D. (2018) A Simple Mechanism Based on Amino Acid Substitutions is not a Critical Determinant of High Mortality of Japanese Encephalitis Virus Infection in Mice. **Viruses**, 10, 62.
- Nakatsu, S., Murakami, S., Shindo, K., Horimoto, T., Sagara, H., Noda, T., Kawaoka, Y. (2018) Influenza C and D viruses package eight organized ribonucleoprotein complexes. **J. Virol.** 92, e02084-17.
- Nanbo, A., Noda, T., Ohba, Y. (2018) Epstein–Barr Virus Acquires Its Final Envelope on Intracellular Compartments With Golgi Markers. **Frontier in Microbiol.** 9, 454.

- Hatakeyama, H., Shoji, M., Yamayoshi, S., Yoh, R., Ohmi, N., Takenaka, S., Saitoh, A., Arakaki, Y., Masuda, A., Komatsu, T., Nagano, R., Nakano, M., Noda, T., Kawaoka, Y., Kuzuhara, T. (2018) Influenza A virus nucleoprotein is acetylated by histone acetyltransferases, PCAF and GCN5. **J. Biol. Chem.** 293, 7126-7138.
- Maemura, T., Fukuyama, S., Sugita, Y., Lopes, T.J.S., Nakao, T., Noda, T., Kawaoka, Y. (2018) Lung-derived exosomal miR-483-3p regulates the innate immune response to influenza virus infection. **J. Infect. Dis.** 217, 1372-82.
- Soni, P., Yasuhara, A., Takenaga, T., Iwatsuki-Horimoto, K., Uraki, R., Ito, M., Sasaki, T., Ikuta, K., Yamayoshi, S., Kawaoka, Y. (2018) Evaluation of the fusion partner cell line SPYMEG for obtaining human monoclonal antibodies against influenza B virus. **J. Vet. Med. Sci.** 80, 1020-1024.
- Shimada, T., Yamamoto, K., Nakano, M., Watanabe, H., Schleheck, D., Ishihama, A. (2018) Regulatory role of CsqR (YihW) in transcription of the genes for catabolism of the anionic sugar sulfoquinovose (SQ) in Escherichia coli K-12. **Microbiology** 165, 78-89.
- Sugita, Y., Matsunami, H., Kawaoka, Y., Noda, T., Wolf, M. (2018) Cryo-EM structure of the Ebola virus nucleoprotein–RNA complex at 3.6 Å resolution. **Nature** 563, 137-140.

List of presentations

- 宮本翔、インフルエンザウイルスのゲノム RNA 分節間インタラクトーム解析、7th Negative Strand Virus-Japan Symposium、沖縄、2018年1月16日
- 中野雅博、原子間力顯微鏡を用いたA型インフルエンザウイルス NS1 の二本鎖 RNA に対する結合機構の解析、7th Negative Strand Virus-Japan Symposium、沖縄、2018年1月16日
- Miyamoto, S., Muramoto, Y., Shindo, K., Gilmore, J.L., Nakano, M., Noda, T. A functional vRNA-vRNA interaction important for incorporation of influenza A virus HA segment into virion. The 16th International Student Seminar, Kyoto, Japan, February 27-March 1, 2018
- 梶川純一、村本裕紀子、荊士瑋、浦田秀造、安田二朗、Thomas Strecker、野田岳志、アレナウイルス Z タンパク質の性状解析、第15回ウイルス学キャンプ in 湯河原、静岡、2018年6月6日
- 藤田陽子、川上英良、宮本翔、村本裕紀子、神道慶子、中野雅博、野田岳志、NA 分節欠損インフルエンザウイルスの性状解析、第15回ウイルス学キャンプ in 湯河原、静岡、2018年6月6日
- 藤田陽子、川上英良、宮本翔、村本裕紀子、神道慶子、中野雅博、野田岳志、NA 分節欠損インフルエンザウイルスの性状解析、第32回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム、香川、2018年6月15-17日
- Nakano, M., Shindo, K., Sugita, Y., Muramoto, Y., Kawaoka, Y., Wolf, M., Noda, T. Ultrastructure of the influenza virus ribonucleoprotein complexes producing viral RNAs. NSV 2018, Velona, Italy, June 20,

2018

Takamatsu, Y., Biedenkopf, N., Krähling, V., Kolesnikova, L., Halwe, S., Baumeister, S., Becker, S. An identification of an Ebola virus VP30-specific kinase that regulates viral transcription/replication. NSV 2018, Velona, Italy, June 20, 2018

Miyamoto, S., Muramoto, Y., Shindo, K., Gilmore, J.L., Nakano, M., Noda, T. The vRNA-vRNA interactions important for HA vRNA packaging of the influenza A virus. NSV 2018, Velona, Italy, June 20, 2018

宮本翔、田村涼馬、村本裕紀子、神道慶子、中野雅博、野田岳志、インフルエンザウイルス NP の核小体局在とその意義の解明、第 20 回日本 RNA 学会年会、大阪、2018 年 7 月 9-11 日

宮本翔、田村涼馬、村本裕紀子、神道慶子、中野雅博、野田岳志、核小体局在するインフルエンザウイルス蛋白質の同定、第 161 回日本獣医学会学術集会、つくば、2018 年 9 月 11-13 日

野田岳志、インフルエンザウイルスのゲノムパッケージング機構、The 90th Annual Meeting of the Genetic Society of Japan、奈良、2018 年 9 月 19-22 日

Takamatsu, Y., Kolesnikova, L., Becker, S. YxxL motif of Ebola virus VP24 protein is crucial for the transport of nucleocapsid-like structure. The 66th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Kyoto, Japan, October 28-30, 2018

Miyamoto, S., Tamura, R., Muramoto, Y., Shindo, K., Nakano, M., Noda, T. Identification of influenza virus proteins localized in the nucleolus of virus-infected cells. The 66th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Kyoto, Japan, October 28-30, 2018

Yamagata, Y., Muramoto, Y., Miyamoto, S., Shindo, K., Nakano, M., Noda, T. Cell culture-based generation of a clonal defective interfering influenza virus. The 66th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Kyoto, Japan, October 28-30, 2018

Kajikawa, J., Muramoto, Y., Wei, J.S., Urata, S., Yasuda, J., Strecker, T., Noda, T. Mammarenavirus matrix proteins are localized to the cis- and trans-Golgi apparatus. The 66th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Kyoto, Japan, October 28-30, 2018

Takamatsu, Y., Kolesnikova, L., Noda, T., Becker, S. Visualizing filovirus life cycle. The 59th Annual Meeting for the Japanese Society of Tropical Medicine, Nagasaki, Japan, November 9-11, 2018

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

がんウイルス分野
Laboratory of Tumor Viruses

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

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

【酒井グループ】

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

1) HPVに関する研究

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

2) Wnt経路の解析

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

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

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

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

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

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

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

List of Publications

Ajiro M., Sakai H., Onogi H., Yamamoto M., Sumi E., Sawada T., Nomura T., Kabashima K., Hosoya T., Hagiwara M.: CDK9 Inhibitor FIT-039 Suppresses Viral Oncogenes E6 and E7 and Has a Therapeutic Effect on HPV-Induced Neoplasia. **Clin Cancer Res.** 2018, 24 (18): 4518-4528, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-3119.

【土方グループ】

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

1) HCVに関する研究

日本において主要なC型肝炎ウイルス（HCV）である遺伝子型1bのHCV（HCV1b）は肝発がんとの関係が高いことで知られている。我々は、患者に感染している野生型HCV1b培養細胞系を新たに構築した。そこで野生型HCV1bとこれまでHCV複製機構の解析が行われてきた培養細胞への適応変異が導入されたHCV1bのゲノム複製機構を、それぞれのサブゲノムレプリコン（SGR）を作製し、これを用いて解析を行った。この野生型と適応変異型のサブゲノムレプリコンを比較したところ、野生型の複製効率は適応変異型に比べて低い事がわかった。また各種抗HCV薬に対する感受性も野生型が低いことが明らかになった。今後、この上記解析系はHCV複製機構の解明や細胞との相互作用に対して有力な研究ツールとしての利用が期待された。

2) HBVに関する研究

我々は、HBV産生細胞をNrf2活性化剤スルフォラファン（SFN）で処理すると、HBV産生が有意に低下することを見出した。HBV産生細胞をSFNと同時にHBV粒子産生に関与する脂肪酸合成系（FABS）産物であるパルミチン酸で処理すると完全にSFNの効果は打ち消された。また我々

は SFN で HBV 產生細胞を処理した時に FABS 関連遺伝子群の発現を解析したところ、律速酵素であるアセチル CoA デカルボキシラーゼと脂肪酸合成酵素の遺伝子発現が低下していることを見出した。このことから SFN は FABS 関連遺伝子発現を低下させることで HBV 產生を抑制することが示唆された。

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) Development of wild type HCV gt1b culture system

Hepatitis C virus genotype 1b (HCV1b) subgenomic replicon (SGR) that possesses adaptive mutation to cultured cells has been widely used for studies of HCV proliferation and anti-HCV drug development so far. Although such adaptive mutations have not been identified in the genome sequences of wild-type (WT) HCV, the influences of the adaptive mutations on those subjects have not been examined yet because of the absence of available HCV1b SGR with WT genome sequence. We analyzed such points by establishment of the SGR systems of KT9, a WT HCV1b clone, and its adaptive mutant (AM). Using this system, the differences in behavior towards various anti-HCV drugs between WT and AM KT9 SGRs were investigated. Finally we observed that the wild type HCV1b SGR replicated with lower efficiency and showed lower sensitivity towards all existing anti-HCV reagents examined in this study than the AM SGR.

2) Interaction between nuclear factor-erythroid 2 related factor 2 and hepatitis B virus

We found that sulforaphane (SFN), one of well-known activator of nuclear factor-erythroid 2 related factor 2 (Nrf2) had a potential to suppress the production of extracellular HBV particles but not HBV genome replication in the HBV culture systems. Then the role of Nrf2 in the HBV proliferation was investigated. We observed that the suppression of extracellular HBV DNA production by SFN was rescued by treatment of palmitic acid, one of products of fatty acid biosynthesis (FABS) that we already reported its contribution in HBV particle production. We also observed SFN treatment resulted in decreased expression of genes for enzymes in FABS, suggesting that SFN would suppress the production of extracellular HBV particles through down-regulation of FABS related gene expression.

List of Publications

Nio Y., Akahori Y., Okamura H., Watashi K., Wakita T., Hijikata M.: Inhibitory effect of fasiglifam on

hepatitis B virus infections through suppression of the sodium taurocholate cotransporting polypeptide.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 2018, 501, 820-825

List of Presentations

Miyayama Y., Okamura H., Sasai M., Akahori Y., Watashi K., Wakita T., Hijikata M.: Interaction between nuclear factor-erythroid 2 related factor 2 and hepatitis B virus. 2018 International meeting on the molecular biology of hepatitis B viruses, Taormina, Italy, Oct 3-6, 2018

Hotta H., Chen M., Aoki-Utsubo C., Deng L., Miyayama Y., Hijikata M., Shindo K., Noda T., Kohara M., Watashi K., Wakita T.: Comparative analysis of antiviral activity of sPLA2 against HBV and HCV. 2018 International meeting on the molecular biology of hepatitis B viruses, Taormina, Italy, Oct 3-6, 2018

Akahori Y., Okamura H., Sasai M., Hasegawa H., Watashi K., Wakita T., Tanaka Y., Nio Y., Hijikata M. : Bardoxolone methyl suppresses the proliferation of both hepatitis B and C viruses in cultured cells 第 66 回日本ウイルス学会学術集会. 京都 2018 年 10 月 28-30 日

Miyayama Y., Chen M., Aoki-Utsubo C., Deng L., Shiodo K., Noda T., Kohara M., Watashi K., Wakita T., Hijikata M., Hotta H. : Mechanistical study of antiviral activity of snake venom sPLA2 against HBV and HCV. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会. 京都 2018 年 10 月 28-30 日

Lee H., Miyayama Y., Abe-Chayama H., Miki D., Imamura M., Chayama K., Hijikata M. : Establishment of subgenomic replicon system of HCV1b for comparative study of genome replications between wild-type and adaptive mutant. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会. 京都 2018 年 10 月 28-30 日

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

細胞制御分野
Laboratory of Cell Regulation

教 授	杉田 昌彦	Prof.	Masahiko Sugita
助 教	森田 大輔	Assist. Prof.	Daisuke Morita
助 教	水谷 龍明	Assist. Prof.	Tatsuaki Mizutani

研究室のメインテーマである「脂質免疫」の発展型として、ウイルスリポペプチドに対する新しい免疫応答の学術基盤構築に向けた研究を進めている。本年度は、リポペプチドを提示するアカゲザル MHC クラス 1 アリルの構造や内因性リガンド、T 細胞認識機構について新知見を得るとともに、ヒトリポペプチド提示分子の同定作業を進め、顕著な進展があった。一方、モルモット結核脂質免疫の研究を起点として結核肉芽腫形成を制御する好中球因子 S100A9 を同定し、個体レベルでの解析を進めた。S100A9 がマクロファージ極性化を制御することにより、結核菌の長期生存を助長する微小環境構築に寄与している可能性を想起し、S100A9 ノックアウトマウスによる検証研究を開いた。

1) リポペプチドを提示する新しい MHC クラス 1 分子の構造と機能

ウイルスタンパク質の中には、その N 末端グリシン残基がミリスチン酸（C14 飽和脂肪酸）修飾を受けることにより、病原的機能を発揮するものが存在する。一方、この脂質修飾反応を検知する細胞傷害性 T 細胞応答が存在することが明らかとなりつつある。アカゲザルエイズモデルを活用した研究から、ミリストイル化 Nef タンパク質 N 末端に由来する 4-5 残基のペプチド断片、すなわちリポペプチドを結合し、細胞傷害性 T 細胞へと提示する古典的 MHC クラス I 分子（LP1 分子）を同定した（Nat Commun 2016; 論文投稿中）。さらにアカゲザル LP1 分子群の X 線結晶構造を行い、脂質結合に最適化された大きく疎水性の高いポケット構築（B ポケット）の存在を見いだした。MHC クラス I 分子は従来、8-10 残基のペプチドを提示すると考えられてきたが、一連の研究からリポペプチドを提示する新規 MHC クラス I 分子群の存在が明らかとなった（図）。

ペプチド提示 MHC クラス I 分子は、小胞体膜に発現した ATP 駆動型ペプチド輸送体 TAP を介して細胞質から小胞体内腔に到達したペプチドを結合することにより、安定発現が可能な複合体を形成する。したがってペプチド提示 MHC クラス I 分子の恒常発現は TAP 機能に深く依存する。興味深いことに、LP1 分子の細胞表面発現は TAP 機能にまったく依存しない。そこで LP1 を安定化するペプチド以外の内因性リガンドの存在を推定し、本年度その同定を試みた。その結果、LP1 の主要な内因性リガンドとしてリン脂質群を同定し、リン脂質を結合した LP1 複合体の X 線結晶構造を解明した（論文準備中）。さらに、これらの基本情報をもとに、ヒト LP1 分子の探索を進め、リポペプチドを結合する HLA クラス I 分子の同定ならびに結晶構造の解明に成功した（未発表）。

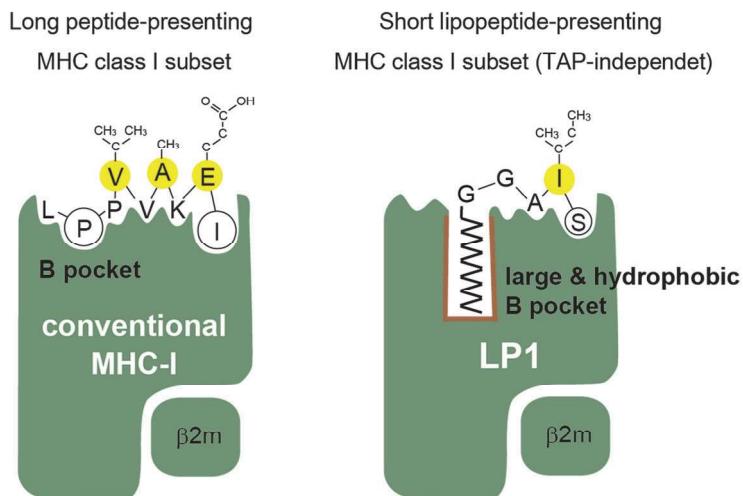


Fig. 1. LP1 (right) is marked by the presence of the large, hydrophobic B pocket that accommodates the acyl chain of the lipopeptide ligand. Note that conventional peptide-presenting MHC class I molecules (left) possess small B pockets that accommodate a single amino acid residue.

2) S100A9によるマクロファージ極性化制御

本分野で独自に確立したモルモット結核モデルの解析から、結核肉芽腫深部に存在する好中球が產生する S100A9 タンパク質が、マクロファージの集合体である結核肉芽腫の形成と維持に重要な役割を果たしていることが明らかとなった (Blood Adv 2016)。そこで結核炎症組織における好中球依存的なマクロファージ機能にフォーカスした研究を展開した。まず、結核肉芽腫深部に集簇する好中球の周辺には、菌の長期生存を許容する Arginase1 (Arg1) 陽性 M2 マクロファージが集積することを見いだした。S100A9 特異的阻害剤 tasquinimod を投与した動物においては、肉芽腫サイズが縮小するとともに、肉芽腫傍中心部の M2 マクロファージ極性化が阻害された。さらに、昨年度樹立を完了した S100A9 ノックアウトマウス (A9KO マウス) での検証実験を進め、BCG 腹腔接種により局所に集積したマクロファージにおいて、Arg1 の発現が顕著に減弱することを明らかにした。また、腹腔浸潤好中球の解析から、A9KO マウス由来好中球では複数のサイトカイン・ケモカイン発現レベルに変容が生じることを見いだした (投稿準備中)。これらの結果は、S100A9 を基軸とした好中球依存的なマクロファージ応答が結核の病態形成に深く関与することを示しており、この経路を標的にした新たな治療戦略の構築に着手した。さらに、結核のみならず他の慢性炎症病態においても共有されるプリンシップルである可能性が高く、とりわけがんにおける検証を進めている。

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. We have recently detected cytotoxic T lymphocyte responses in rhesus monkeys that are targeted specifically to viral lipopeptides and determined the molecular identity of rhesus lipopeptide-presenting proteins. In 2018, the

molecular structure, ligand repertoire, and T-cell receptor interactions of lipopeptide-presenting molecules were elucidated. Furthermore, human lipopeptide-presenting molecules were discovered. We also addressed how lipid immunity may impact on tissue responses in tuberculosis and discovered a novel role of neutrophils and their S100A9 protein in tuberculosis-associated granuloma formation. Results obtained from our guinea pig studies have indicated the possibility that the neutrophil-derived S100A9 protein may control macrophage polarization, which is now being addressed more explicitly by establishing S100A9 knockout (A9KO) mice.

1) Structure and function of lipopeptide-presenting MHC class I molecules

N-myristoylation occurs for some viral proteins to dictate their pathogenic function. On the other hand, the host immunity is equipped with cytotoxic T lymphocytes that specifically recognize lipopeptides derived from N-myristoylated proteins. By taking advantage of the rhesus model of AIDS, we have identified two classical MHC class I alleles, collectively referred to as LP1, that are capable of binding N-myristoylated 4- to 5-mer lipopeptides derived from retroviral Nef proteins and presenting them to cytotoxic T lymphocytes. X-ray crystallographic analyses of the lipopeptide-bound LP1 complexes revealed unique B pocket structures that were large and hydrophobic in order to accommodate the acyl chain of lipopeptide ligands, suggesting a distinct MHC class I subset that presents lipopeptides rather than peptides to T cells.

Conventional peptide-presenting MHC class I molecules are stabilized by binding peptides that are delivered from the cytosol to the endoplasmic reticulum via the ATP-driven peptide transporter, TAP; therefore, their expression heavily depends on TAP function. In contrast, LP1 molecules are expressed on the cell surface independently of TAP function, raising the possibility that endogenous non-peptide ligands may be utilized. We found that endogenous phospholipid ligands served to play the role and determined the crystal structure of phospholipid-bound LP1 complexes. On the basis of molecular information obtained from studies of rhesus LP1, we were also successful in determining the molecular identity of human LP1 counterparts and determining their crystal structure.

2) Control of macrophage polarization by the neutrophil S100A9 protein

By utilizing our guinea pig tuberculosis model, we have recently identified an essential role of the neutrophil S100A9 protein in inducing the formation of tuberculosis-associated granulomas, a globular collection of activated macrophages constructed at the site of infection. We found that S100A9-expressing neutrophils clustered in the central area of granulomas, which were surrounded by arginase1 (Arg1)-producing M2 macrophages. In guinea pigs treated with the S100A9 inhibitor, tasquinimod, the M2 polarization was impaired significantly, suggesting that the neutrophil S100A9 protein may control macrophage polarization. We then switched from guinea pigs to mice and generated S100A9 knockout (A9KO) mice to analyze this novel macrophage polarization pathway more explicitly. Following an intraperitoneal injection with BCG, S100A9-expressing neutrophils (within hours) and macrophages (in days) sequentially infiltrated into the peritoneal cavity in a similar efficiency in wild-type and A9KO mice; however, the Arg1 transcript in macrophages was significantly reduced in A9KO mice. We also found that

profiles of cytokines and chemokines expressed by BCG-elicited neutrophils were strikingly different between wild-type and A9KO mice. These observations highlight a key role of the neutrophil S100A9 protein in determining the quality of tuberculosis pathology, which may also be relevant to cancer.

List of Presentations

森田大輔 リポペプチド：エイズウイルス制御の新しい免疫標的分子 日本薬学会第 138 年会、金沢、2018 年 3 月 25-28 日

森田大輔、嶋燿子、杉田昌彦 靈長類研究から見えてきた、非ペプチド抗原を標的とする新しい獲得免疫機構 第 29 回日本生体防御学会学術総会、京都、2018 年 6 月 27-29 日

水谷龍明、吉岡佑弥、杉田昌彦 「肉芽腫形成を制御する S100A9」 第 29 回日本生体防御学会学術総会、京都、2018 年 6 月 27-29 日

嶋燿子、森田大輔、杉田昌彦 リポペプチドを提示する MHC class 1 分子の内因性リガンドの同定 第 29 回日本生体防御学会学術集会、京都、2018 年 6 月 27-29 日

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

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

2018年4月に旭拓真が医学研究科修士課程、高見大地が薬学研究科修士課程、江島亜希が生命科学研究科修士課程に入学した。したがって、免疫制御分野は現在、教授1名、助教2名、共同研究者1名、研究員1名、大学院生7名、学部生2名の総勢14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、ステロイドホルモンによるIL-7Rの発現制御と免疫機能の概日調節、IL-7とIL-15産生細胞の可視化と機能解析を中心に研究を進めている。本年の研究成果を以下に記載する。

1) グルココルチコイドは IL-7R と CXCR4 を誘導することで T 細胞の分布と応答の日内変動を制御する

ステロイドホルモンのひとつであるグルココルチコイド（糖質コルチコイド）は強い免疫抑制作用を持ち、抗炎症剤や免疫抑制薬としてさまざまな病気の治療に用いられている。グルココルチコイドの濃度は日内変動しているが、免疫機能との関係についてはこれまで不明であった。そこで、グルココルチコイドの濃度が日内変動することに着目し、一日の各時間帯におけるマウスのT細胞の変化を解析した。その結果、グルココルチコイドが、T細胞のサイトカイン受容体IL-7Rとケモカイン受容体CXCR4の発現量を夜間に高め昼間に下げていること、その日内変動が、昼間に血中に留まり夜間にリンパ組織に集まるT細胞の体内分布の日内変動を引き起こしていた。さらに、T細胞が夜間にリンパ組織に集まることにより、T細胞がより効率的に活性化され、強い免疫応答が引き起こされた。以上の結果から、免疫抑

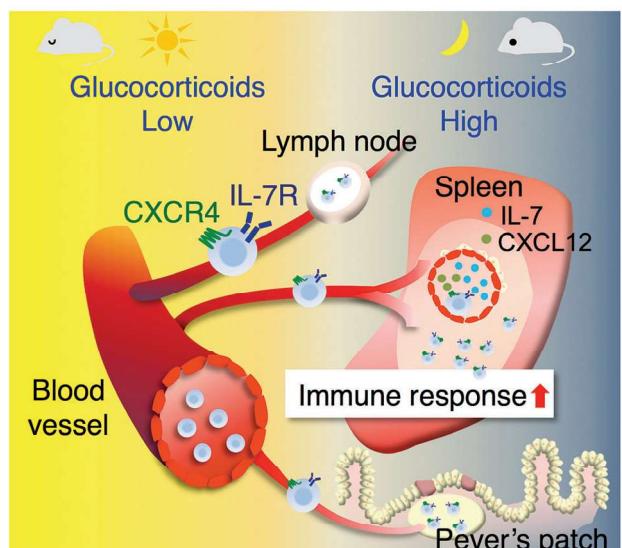


Fig. 1. Regulation of T cell distribution and immune response by glucocorticoids

制作用で有名なグルココルチコイドが、生体内においてはT細胞の循環と応答の日内変動を制御することで、逆に免疫機能を高める働きをもつことが明らかになった（Fig. 1）。今回明らかになったメカニズムは、不規則な生活によるグルココルチコイドの分泌の乱れが免疫力の低下をもたらす可能性を示唆している。

Interleukin-7 (IL-7) is a cytokine important for differentiation and maintenance of lymphocytes. Focusing on IL-7 and IL-7 receptor (IL-7R), our laboratory is now pursuing the following research projects: (1) function of IL-7R in differentiation, maturation, and response of immune cells; (2) regulation of IL-7R expression and immune function by glucocorticoids; (3) visualization and function of IL-7- and IL-15-producing stromal cells.

1) Glucocorticoids drive diurnal oscillations in T cell distribution and responses by inducing interleukin-7 receptor and chemokine receptor CXCR4

Glucocorticoids are steroid hormones with strong anti-inflammatory and immunosuppressive effects that are produced in a diurnal fashion. Although glucocorticoids have the potential to induce interleukin-7 receptor (IL-7R) expression in T cells, whether they control T cell homeostasis and responses at physiological concentrations remains unclear. We found that glucocorticoid receptor signaling induces IL-7R expression in mouse T cells by binding to an enhancer of the IL-7Ra locus, with a peak at midnight and a trough at midday. This diurnal induction of IL-7R supported the survival of T cells, and their redistribution between lymph nodes, spleen, and blood, by controlling expression of the chemokine receptor CXCR4. In mice, T cell accumulation in the spleen at night enhanced immune responses against soluble antigens and systemic bacterial infection (Fig. 1). Our results reveal the immunoenhancing role of glucocorticoids in adaptive immunity, and provide insight into how immune function is regulated by the diurnal rhythm.

List of Publications

Shimba, A., Cui, G., Tani-ichi, S., Ogawa, M., Abe, S., Okazaki, F., Kitano, S., Miyachi, H., Yamada, H., Hara, T., Yoshikai, Y., Nagasawa, T., Schütz, G., and Ikuta, K. (2018). Glucocorticoids drive diurnal oscillations in T cell distribution and responses by inducing interleukin-7 receptor and CXCR4. *Immunity* 48, 286-298.

Baumann, N., Torti, N., Welten, S. P. M., Barnstorf, I., Borsig, M., Pallmer, K., Oduro, J. D., Cicin-Sain, L., Ikuta, K., Ludewig, B., and Oxenius, A. (2018). Tissue maintenance of CMV-specific inflammatory memory T cells by IL-15. *PLoS Pathog.* 14 (4), e1006993.

生田宏一、榛葉旭恒（2018）。グルココルチコイドによる免疫機能の日内変動の制御 アンチ・エイジング医学 14, 489-493.

榛葉旭恒、生田宏一 (2018). グルココルチコイドと免疫概日リズムが制御する生体防御機構 医学のあゆみ 266, 865-866.

List of Presentations

Shimba, A., Cui, G., Tani-ichi, S., and Ikuta, K. Glucocorticoids drive diurnal oscillation in T cell distribution and response by inducing interleukin-7 receptor and chemokine receptor CXCR4. The 16th International Student Seminar. Kyoto, March 1, 2018.

Cui, G. and Ikuta, K. Competition between STAT5 and PI3K of IL-7R modulates T cell development and homeostasis. The 25th East Asia Joint Symposium on Biomedical Research. Chongqing, China. October 25, 2018.

Zhu, Y., Cui, G., and Ikuta, K. Intestinal epithelial cell-derived IL-15 supports the homeostasis of intraepithelial lymphocytes. The 25th East Asia Joint Symposium on Biomedical Research. Chongqing, China. October 26, 2018

生田宏一 Glucocorticoids drive diurnal homing and response of T cells by inducing IL-7R and CXCR4 福井大学医学研究科大学院セミナー、福井、2018年1月19日

崔広為、生田宏一 胸腺内 IL-15 產生性免疫微小環境の機能解析 Kyoto T Cell Conference 第 28 回学術集会、京都、2018 年 6 月 15 日

生田宏一 Glucocorticoids drive diurnal homing and response of T cells by inducing IL-7R and CXCR4 徳島大学医学研究科大学院セミナー、徳島、2018 年 9 月 27 日

江島亜希、岡崎史恵、榛葉旭恒、生田宏一 マウス喘息モデルにおける性ステロイドホルモンの影響の解析 第 41 回日本分子生物学会年会、横浜、2018 年 11 月 30 日

Asahi, T., Shimba, A., Cui, G., Abe, S., Zhu, Y., Ejima, A., Takami, D., Tani-ichi, S., Hara, T., and Ikuta, K. Local IL-15 dependency of liver-resident ILC1、第 47 回日本免疫学会学術集会、福岡、2018 年 12 月 10 日

Abe, S., Hara, T., Cui, G., Asahi, T., and Ikuta, K. Hematopoietic cell-derived IL-15 supports the development and maintenance of NK, NKT and memory CD8 T cells in bone marrow、第 47 回日本免疫学会学術集会、福岡、2018 年 12 月 10 日

Mukohira, H., Hara, T., Tani-ichi, S., and Ikuta, K. CXCL12-expressing bone marrow stromal cells express adiponectin and are targeted by Adipoq-Cre transgene、第 47 回日本免疫学会学術集会、福岡、2018 年 12 月 10 日

Zhu, Y., Cui, G., Shimba, A., Abe, S., Hara, T., Tani-ichi, S., and Ikuta, K. Intestinal epithelial cell-derived IL-15 supports the homeostasis of intraepithelial lymphocytes、第 47 回日本免疫学会学術集会、福岡、2018 年 12 月 12 日

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

感染防御分野

Laboratory of Infection and Prevention

教 授	竹内 理	Prof.	Osamu Takeuchi
助 教	三野 享史	Assist. Prof.	Takashi Mino
助 教	植畠 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。2018年の成果および研究活動は以下の通りである。

肺における Regnase-1 は上皮細胞と獲得免疫細胞との相互作用を制御することにより呼吸器細菌感染防御に寄与する

肺の感染防御機構は T 細胞や好中球、上皮細胞など多様な細胞群から構成されるが、それらの協調的な働きがいかに調節されているかは不明な点が多い。Regnase-1 (Reg1) は定常状態では炎症性サイトカインなどの mRNA を分解して過剰な炎症を抑制する RNase である。一方で、Reg1 は Toll Like Receptor などの刺激によって分解され、標的遺伝子の mRNA の安定化に寄与することで、それらの発現を亢進させることができることが示されている。しかしながら、肺での細菌感染の際に Reg1 がどのような機能を有するかについては報告がない。

本研究では、主に緑膿菌感染モデルを用いて、下気道細菌感染時における Reg1 の働きについて解析した。まず、加熱殺菌した緑膿菌を気管内投与することにより、数日にわたって肺全体で Reg1 タンパク量の低下が誘導されることが分かった。従来知られている血球系細胞に加え、気道上皮細胞で Reg1 の発現を認めた事から、特に気道上皮細胞に着目し、気道上皮細胞特異的に Reg1 を欠損するマウス (*Nkx2.1-Cre⁺, Reg1^{fl/fl}*, 以下 AEC-Reg1-cKO マウス) を作製した。AEC-Reg1-cKO マウスでは肺内の好中球增多を認めたほか、緑膿菌を気管内投与した際、コントロールマウスに比して緑膿菌特異的 IgA の気道内分泌が亢進し、緑膿菌再感染に対し強い抵抗性を示すことが明らかとなった。マウス気道上皮細胞を用いた transcriptome 解析の結果、Reg1 欠損マウス由来の気道上皮では各種内因性抗菌因子 (Muc5b など) や、形質細胞の遊走に寄与するケモカイン (Ccl28), 気道上皮における IgA 分泌 (transcytosis) の制御因子 (Pigr), 好中球遊走及び Th17 の遊走をもたらすケモカイン (Cxcl5, Ccl20) の発現量亢進を認めた。さらに Luciferase reporter assay や RNA 免疫沈降などによる検討の結果、Reg1 がこれらの mRNA を直接的に分解することが明らかとなった。Reg1 欠損気道上皮での発現亢進遺伝子と、既報での Reg1 欠損ヘルパー T 細胞における発現亢進遺伝子を比較したところ、重複する遺伝子は少なかったが、各々で enrich している Gene Ontology (GO)

を比較した結果、多くの GO に重複が認められ、特に粘膜免疫や感染防御に関連する GO の enrich を認めた。また、AEC-Regl-cKO マウスでは緑膿菌刺激の際、コントロールに比して肺での Th17 数增多を認める一方、T 細胞特異的 Regnase-1 欠損マウス (CD4-Cre⁺, *Regl*^{flox/flox}, 以下 T-Regl-cKO マウス) の肺では気道上皮細胞特異的な遺伝子発現の亢進を認めた。さらに致死的な放射線照射を行った AEC-Regl-cKO マウスないしコントロールマウスに T-Regl-cKO マウス由来骨髓を移入したこと、前者で肺の形質細胞数に有意な增多を認めた。以上の結果から、上皮細胞と T 細胞での Regl が、異なった標的遺伝子発現を制御しつつ、両細胞の相互作用を促進することにより相乗的に感染防御機能の活性化をもたらす可能性が示唆された。

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.

Pulmonary Regnase-1 orchestrates the interplay of epithelium and adaptive immune systems to protect against pneumonia

The pulmonary antimicrobial immune defense is mediated by the cooperation of multiple cell types including airway epithelial cells (AECs) and professional immune cells. However, mechanisms underlying pulmonary immune regulation are not fully uncovered.

Here we show that Regnase-1, an RNase critical for suppressing activation of immune cells by degrading inflammatory mRNAs, is expressed in AECs and plays pivotal roles in orchestrating pulmonary surface barrier function and immune responses against *Pseudomonas aeruginosa*. Regnase-1 in the lung is rapidly degraded upon exposure with *P. aeruginosa* or the stimulation of TLR. To investigate the influence of Regnase-1 disappearance from the lung, we analyzed the lung of *Regnase-1*^{-/-} mice, and we found the overt accumulation of neutrophils and 15-fold increase of bronchoalveolar lavage fluid IgA concentration in *Regnase-1*^{-/-} mice compared with wild-type mice.

In addition to hematopoietic cell, we found the expression of Regnase-1 in AECs, and the decrease of Regnase-1 protein in AECs after *P. aeruginosa* exposure was outstanding, therefore we focus on the function of Regnase-1 in AECs. RNA-sequencing revealed that the loss of Regnase-1 in AECs enhanced the expression of newly identified Regnase-1 target genes involved in direct exclusion of pathogens (*Muc5b*, *Sftpd*, *Ltf*), neutrophil recruitment (*Cxcl1*, *Cxcl5*), Th17 recruitment (*Ccl20*), and transportation of IgA in AECs (*Pigr*), as well as the attraction of IgA producing plasma cells (*Ccl28*). Indeed, mice lacking Regnase-1 specifically in AECs showed the enhancement of natural and adaptive immunity through the induction of neutrophils, Th17 cells, and IgA producing plasma cells. Concordantly, these mice showed the reinforcement of neutrophilic inflammation and antigen-specific IgA secretion in the course of *P. aeruginosa* airway infection *in vivo*, conferring the resistance through the accelerated elimination of the pathogen and improvement of

survival against re-infection.

Although Regnase-1 directly controls distinct sets of genes in each of AECs and T cells, degradation of Regnase-1 in both cell types is beneficial for maximizing acquired immune responses. Collectively, these results demonstrate that Regnase-1 orchestrates AEC- and immune cell-mediated host defense against pulmonary bacterial infection.

List of Publications

Nakatsuka, Y., Vandenbon, A., Mino, T., Yoshinaga, M., Uehata, T., Cui, X., Sato, A., Tsujimura, T., Suzuki, Y., Sato, A., Handa, T., Chin, K., Sawa, T., Hirai, T., Takeuchi, O. (2018). Pulmonary Regnase-1 orchestrates the interplay of epithelium and adaptive immune systems to protect against pneumonia. **Mucosal Immunology** 11, 1203-1218.

Sadahiro, A., Fukao, A., Kosaka, M., Takizawa, N., Funakami, Y., Takeuchi, O., Duncan, K.E., Toshinobu Fujiwara, T. (2018). Translation of Hepatitis A virus IRES is upregulated by a hepatic cell-specific factor. **Frontiers in Genetics** 9, 307.

Wang, J., Sekai, M., Matsui, T., Fujii, Y., Matsumoto, M., Takeuchi, O., Minato, N., Hamazaki, Y. (2018). Hassall's corpuscles with cellular-senescence features maintain IFN α production through neutrophils and pDC activation in the thymus. **Int. Immunol. in press**.

Takeuchi, O. (2018). Endonuclease Regnase-1/Monocyte chemotactic protein-1-induced protein-1 (MCPIP1) in controlling immune responses and beyond. **Wiley Interdiscip Rev. RNA**. 9, e1449.

Mino, T., Takeuchi, O. (2018). Post-transcriptional regulation of immune responses by RNA binding proteins. **Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.** 94, 248-258.

吉永正憲, 竹内理 (2018). RNA 分解酵素 Regnase-1 による鉄代謝制御 医学のあゆみ 265, 157-158.

吉永正憲, 竹内理 (2018). TAM・MDSC による免疫抑制機構 実験医学 36, 1463-1467.

吉永正憲, 竹内理 (2018). 2018 年ノーベル賞生理学・医学賞解説 「免疫を抑制する分子 “PD-1” とがん免疫療法」 月刊化学 73, 26-29.

List of Presentations

Hia, F., Murakawa, Y., Adachi, S., Fukao, A., Fujiwara, T., and Takeuchi, O. Exploring the RNA Regulatory Landscape via Codon Optimality. The 16th International Student Seminar, Kyoto, February 28-March 1, 2018.

Yamasoba, D., Sato, K., Hotter, D., EReith, E., Koepke, L., Linsenmeyer, R., Standley, D.M., Sauter, D., Koyanagi, Y., and Takeuchi, O. Identification of a host RNA binding protein as a novel HIV-1 restriction factor. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Retroviruses, New York, USA, May 23, 2018.

Yoshinaga, M., Mino, T., and Takeuchi, O. The ribonuclease Regnase-1 maintains iron homeostasis via the destabilization of iron-regulatory transcripts. RNA2018, Berkeley, May 29-June 3, 2018.

Chong, Y.K., Tartey, S, and Takeuchi, O. The role of *CyclinJ* in modulating innate immune cells and inflammation. The 25th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages. Osaka, June 19-20, 2018.

三野享史 「Regnase-1 による炎症性 mRNA 分解機構」 第 6 回 CCR4-NOT 研究会, 和歌山県西牟婁郡白浜町, 2018 年 5 月 12-14 日 .

山岨大智, 佐藤佳, 小柳義夫, 竹内理 「新規 RNA 分解酵素による HIV-1 感染制御機構の解明」 第 29 回日本生体防御学会学術総会, 京都, 2018 年 6 月 27-29 日 .

吉永正憲, 三野享史, Bassik, M. C., 竹内理 「鉄代謝を制御する転写後調節機構の解明」 第 20 回日本 RNA 学会年会, 大阪市, 2018 年 7 月 9-11 日 .

三野享史, 岩井紀貴, 赤木宏太朗, 山下暁朗, 竹内理 「SMG1 は Regnase-1 経路を介して炎症性 mRNA を制御する」 第 20 回日本 RNA 学会年会, 大阪市, 2018 年 7 月 9-11 日 .

貞廣暁利, 深尾亜喜良, 小坂実央, 滝沢直己, 船上仁範, 竹内理, Duncan, K.E., 藤原俊伸 「A 型肝炎ウイルス IRES 依存的翻訳は肝臓特異的因子により活性化される」 第 20 回日本 RNA 学会年会, 大阪市, 2018 年 7 月 9-11 日 .

山岨大智 「Identification of a Novel RNA Binding Protein as a Restriction Factor of HIV-1」 SRC (日本レトロウイルス研究会夏期セミナー), 東京 (新木場), 2018 年 7 月 11 日 .

Ichinose, T. Identification of novel RNA binding proteins regulating HIV infection. Summer Retrovirus Conference 2018, Tokyo, July 11-13, 2018.

Hia, F. Exploring the RNA Regulational Landscape via Codon Optimality. RNA Frontier Meeting 2018, Hakone (Kanagawa), September 19-21, 2018.

貞廣暁利, 深尾亜喜良, 滝沢直己, 船上仁範, 竹内理, 藤原俊伸 「+鎖型一本鎖 RNA ウィルスの組織特異的 IRES 依存的翻訳機構の解析」 RNA フロンティアミーティング 2018, 箱根, 2018 年 9 月 19-21 日 .

山岨大智, 佐藤佳, 小柳義夫, 竹内理 「MALT1-mediated cleavage of N4BP1, an antiviral RNase, contributes to the viral reactivation in latently HIV-1 infected cells」 第 66 回ウイルス学会学術集会, 京都, 2018 年 10 月 28 日 .

吉永正憲, 三野享史, 竹内理 「Regnase-1 は鉄代謝関連の mRNA を分解することで鉄恒常性を維持する」 第 41 回日本分子生物学会年会, 横浜市, 2018 年 11 月 28-30 日 .

山岨大智, 佐藤佳, 小柳義夫, 竹内理 「MALT1 による N4BP1 の分解は潜伏感染 HIV-1 の再活性化を促進する」 第 32 回日本エイズ学会学術集会・総会, 大阪 (中之島), 2018 年 12 月 2-4 日 .

Chong, Y.K., and Takeuchi, O. The role of *CyclinJ* as a Novel Regulator in Modulating Tumor-associated Macrophage (TAM). The 47th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology. Fukuoka city, December 10-12, 2018.

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.	Kazunori 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。ところがこの過程で、遺伝子の変異や様々な環境要因によって、しばしば高次構造形成に失敗したタンパク質が作られてしまう。小胞体に蓄積したこのようなミスフォールドタンパク質は、小胞体関連分解（ERAD）という機構によって、細胞質に引き出された後にプロテアソームによる分解を受ける。小胞体で生合成されるタンパク質の多くはN結合型糖鎖をもった糖タンパク質で、小胞体でのタンパク質品質管理機構には糖鎖のトリミングが重要な働きをしていることが知られている。私たちはミスフォールドした糖タンパク質の分解を促進するEDEMタンパク質をクローニングしてその機能解析を行ってきた。EDEM3タンパク質はマンノースをトリミングする酵素活性を持つと考えているが、*in vitro*における酵素活性の検出が困難であった。今回私たちは、EDEM3が小胞体中の酸化還元酵素ERp46とジスルフィド結合を介した複合体を形成することを見いだした。さらにリコンビナントタンパク質を精製して*in vitro*の実験を行った結果、EDEM3とERp46がジスルフィド結合を形成した場合に、基質の糖鎖トリミングが促進されることが明らかになった（Fig. 1）。これらの結果から、タンパク質品質管理機構が小胞体内酸化還元環境による制御を受ける可能性が示唆された。

その他、小胞体シャペロンタンパク質の機能解析や、コラーゲンタンパク質の可視化による細胞内輸送の研究、小胞体関連分解（ERAD）を担う膜複合体の解析等の研究も行っている。

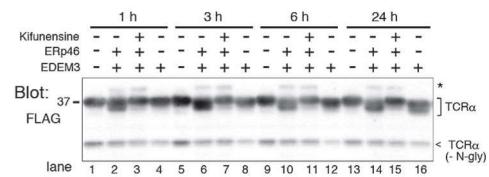
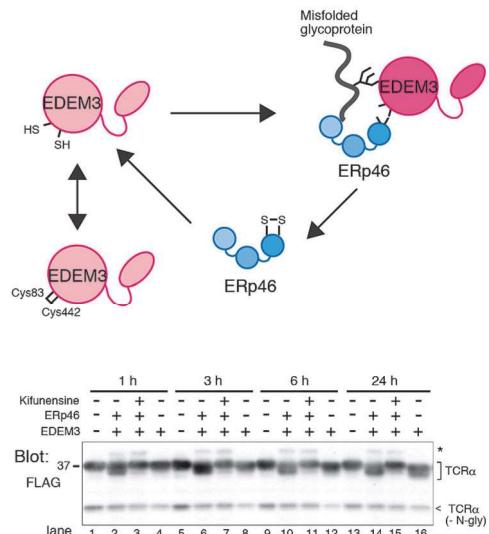


Fig. 1. ERp46 triggers the mannose-trimming activity of EDEM3

2) 本研究分野では、RNA aptamer を用いて、(1) 真核生物における転写制御機構の解析および(2) 生体内におけるコラーゲン分子の機能解析に取り組んでいる。(平芳 G)

①真核生物における転写制御機構の解析

真核生物の遺伝子が外界からの刺激に応じて発現する過程は、様々な段階からなる。すなわち、ヌクレオソームのリモデリング、種々の転写活性化因子の結合、転写開始複合体の形成、転写開始、伸長反応といった段階が、スムーズに進行しなければならない。これらに加えて、近年では RNA のプロセッシング（キャップの付加、スプライシング、Poly A tail の付加など）も転写とともに進んでいることが示唆されている。このような様々な段階・反応が協調的に行われる背景には、これらを統合する仕組みの存在が考えられる。我々の研究目的はショウジョウバエ hsp70 遺伝子の転写をモデルシステムとして、この仕組みの解明することである。特にこの遺伝子の転写に関わる因子の一つである GAF は、上記の段階のいくつかに関わっていることが報告されている。この分子の機能を GAF 特異的 RNA aptamer により解析したところ、GAF は①プロモーターの GAF 結合配列依存的な転写開始複合体形成段階での調節と② GAF 結合配列非依存的な転写開始後段階での調節に関わっていることが明らかとなった。核内での GAF の局在などから、GAF は転写の足場としての機能を有していることも報告されている。今後も GAF の機能解析を通して、真核生物の転写制御機構の一端を解明したい。

②生体内におけるコラーゲン分子の機能解析

生体内に最も多く含まれるタンパク質の一つであるコラーゲンは、生体の構造維持をはじめ様々な反応の足場として機能する纖維状タンパク質である。その機能解析には抗体のような特異的阻害剤が必要だが、種間の保存度が高いコラーゲンは免疫原性が低く、特異性の高い抗体を作成するのは難しい。そこで我々は I 型コラーゲンに対する特異的阻害剤としての RNA aptamer の選別に取り組んでいる。現在、選別の過程で得られたいいくつかのクローニングについて、そのコラーゲンへの結合解析を進めている (Fig.2)。纖維状タンパク質への RNA aptamer の選別はこれまでに報告されていないことから、選別における方法論の開発も含め、今後も研究を進めていきたい。

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

12/23 rule に反するように見える T 細胞レセプター β 鎮遺伝子 (*Tcrb*) V(D)J 組換え

V(D)J 組換えで再構成される遺伝子セグメントには、RSS と称される配列がタグとして付いている。タグは 2 種類あり (12RSS と 23RSS)、正常な V(D)J 組換えでは同じタグを持つセグメント間の再構成はおこらない (12/23 rule)。*Tcrb* の V セグメントは 3' 側に 23RSS があり、J セグメントには 5' 側に 12RSS がある。一方 D セグメントは 5' 側に 12RSS、3' 側に 23RSS を有している。正常胸腺からこれまでに、V と D の 23RSS 間の組換え、および J 同士の 12RSS 間の組換えを低頻度ではあるものの検出した (Fig. 3)。いずれの構造も一見 12/23 rule には合致しない。しかしながら、coding

end(CE)と signal end (SE) がつながる非正統的な hybrid joint が 1 組生じた後に、残されたフリーの CE と SE が改めて 12/23 rule に則り正統的な組換えをおこした可能性が高い。

発がん原因となる一部の onco gene の絡んだ DNA 再構成では、12/23 rule に反するケースが報告されている。これらの発がん性の遺伝子組換えについても、今回見出した機構によって生じたのではないだろうか。

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 by a mechanism known as a protein quality control. During this process, protein misfolding sometimes occurs due to the genetic mutations of the proteins and environmental stresses. Misfolded proteins are retained in the ER (endoplasmic reticulum), and subsequently retrotranslocated from the ER to be degraded by the cytosolic proteasomes, a mechanism named as ERAD (ER-associated protein degradation). Most of the proteins synthesized in the ER are co-translationally modified with N-linked oligosaccharides, and the sugar trimming from the N-linked glycans plays an important role in the quality control of glycoproteins. We have cloned mammalian EDEM proteins, which enhance glycoprotein ERAD, and analyzed their functions. EDEM3 protein has a mannose-trimming activity *in vivo*, however, its enzyme specificity was not clear due to the lack of an assay system *in vitro*. Now, we have identified ERp46, an oxidoreductase in the ER, make a disulfide-bonded complex with EDEM3. We then established an *in vitro* assay system to detect the mannosidase activity of EDEM3 using purified recombinant proteins. We found that disulfide bond formation between EDEM3 and ERp46 triggers the mannose-trimming activity of EDEM3 (Fig. 1). These results suggest that ERAD activity is partly regulated by the redox circumstances in the ER.

We are also analyzing the function of molecular chaperones in the ER, intracellular transport mechanisms of collagens using live-imaging technology, and the function of the ERAD complexes in the ER membrane.

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

① the investigation of eukaryotic gene expression mechanisms

Stimulus that organisms receive from outer world trigger the expression of specific genes. This process consists of several stages such as chromatin remodeling, the binding of transcription regulators, TIC formation, transcription initiation, and transcription elongation. Each stage is regulated by many factors and these cooperate with each other. To clarify how these factors interact with and regulate the function of other

factors in the transcription apparatus will lead to a deeper understanding of transcriptional mechanisms at a molecular level. We use Drosophila hsp70 gene transcription as a model system because this gene has promoter proximal pausing of RNA polymerase, which project the intermediate state between transcription initiation and elongation. And we focus on Drosophila GAF, which has been reported to involve in many stages of transcription. We succeeded in obtaining several kinds of domain-specific inhibitor. Using aptamers, we got new insights into transcription regulation mechanisms. GAF, even on naked DNA template, regulates transcription on GAF-dependent promoter, which consist of two kinds of mechanism; one, at the initiation process, is dependent on the GAGA element of the promoter region and the other, after the initiation, is GAGA element independent manner. Our next aim is to identify factors that interact with GAF in the transcriptional machinery, which will give us deeper understandings of the mechanisms of eukaryotic gene expression.

② the selection of RNA aptamers against Type I collagen

Collagens are one of the riches proteins in higher vertebrates. The fiber-proteins play a several roles such as the contribution of structural integrity of organisms or scaffolds of various biological reactions. The specific inhibitors such as antibodies are necessary to probe these functions, but, because collagens are highly conservative between species so that the immunogenicity is very low, it is difficult to get such kinds of inhibitory molecules. We now try to sort RNA aptamers which binds specifically to collages. The selection procedures gave us several candidates for the specific inhibitor, and we now assess the binding of these RNA against type I collagen (Fig.2). Fibril proteins have not been good targets for RNA aptamers, so our research, the development of method to get aptamers against fibril proteins as well as functional analyses of collagen, will be productive efforts.

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

Tcrb V(D)J recombination which conflict with the 12/23 rule

Each *Tcrb* gene segment is flanked by RSS. There are two types of RSSs (12RSS and 23 RSS). V(D)J recombination occurs between a gene segment with 12RSS and one with 23RSS (the 12/23 rule). A V gene segment has a 23RSS at the 3' end, and a J gene segment has a 12RSS at the 5' end. On the other hand, a D gene segment holds a 12RSS at the 5' end and a 23RSS at the 3' end. Under the 12/23 rule, tail-to-tail joint between V and D, and head-to-head joint between two Js are supposed to be impossible. However, we found such constructs from normal thymocytes, although at the very low frequency (Fig. 3). These seemingly odd joins can be explained as follows: 1. V(D)J recombination stars with non-canonical hybrid joint between a

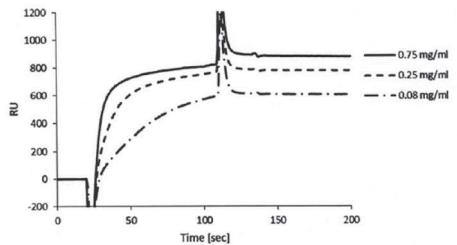


Fig.2. binding of RNA to type I collagen

signal end (SE) and a coding end (CE). 2. Then free CE and SE re-start normal V(D)J recombination by pairing with third gene segment resulting in tail-to-tail or head-to-head joint.

Some oncogenic DNA rearrangements occur between two genes with 12RSS or 23RSS. It is possible that a rare hybrid joining lead to the gene assembly against the 12/23 rule.

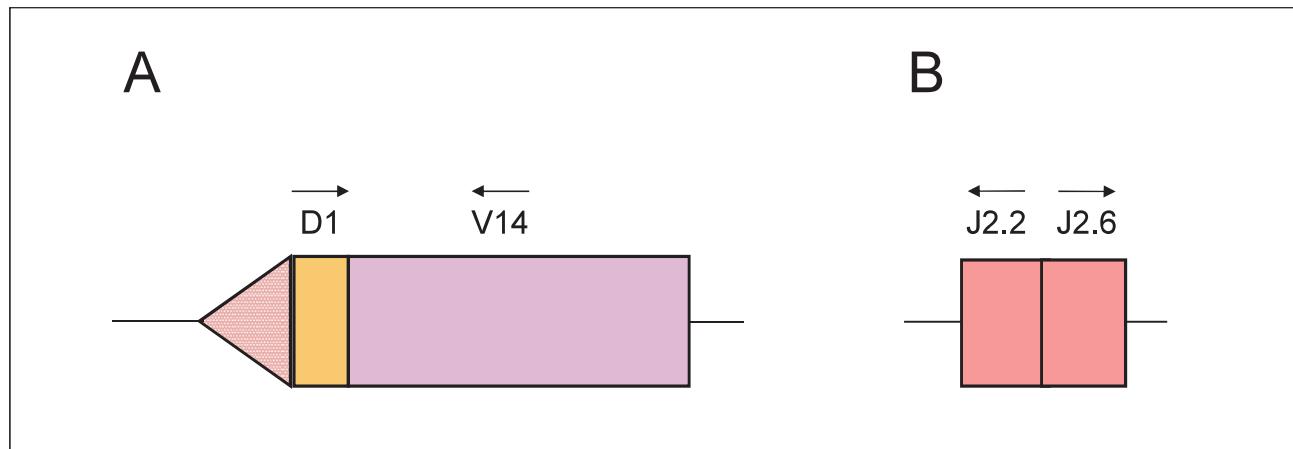


Fig. 3. Illegitimate V(D)J recombination. A. Tail-to-tail joint between D1 and V14. B. Head-to-head joint between J2.2 and J2.6.

List of Publications

Yu, S., Ito, S., Wada, I., Hosokawa, N.: ER-resident protein 46 (ERp46) triggers the mannose-trimming activity of ER degradation-enhancing α -mannosidase-like protein 3 (EDEM3). *J. Biol. Chem.*: 293, 10663-10674 (2018). doi: 10.1074/jbc.RA118.003129

List of Presentations

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

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

細川暢子、于尚誉、和田郁夫：EDEM3 による小胞体マンノーストリミング活性は ERp46 によって制御される。第 91 回日本生化学会大会、京都、2018 年 9 月 25 日

花房賢、細川暢子：小胞体タンパク質 ERdj3-SDF2L1 複合体はミスフォールドタンパク質の凝集を抑制する。第 4 回京都大学理学研究科サイエンス俱楽部デイ、京都、2018 年 11 月 3 日

法邑 賢一、富永 裕貴、増田 亮、小出 隆規、平芳 一法 I 型コラーゲンに対する RNA アプタマー

の選別 第 41 回日本分子生物学会年会、横浜、2018 年 11 月 28-30 日

藤本真慈 *Tcrb* D2-J2 再構成において正常な coding joint と signal joint の代わりに 2 箇所で hybrid joint がおこるか？ 第 28 回 Kyoto T Cell Conference (KTCC)、京都、2018 年 6 月 15-16 日

藤本真慈、柿沼志津子 正常胸腺でおきている非正統的な T 細胞レセプター β 鎖遺伝子 (*Tcrb*) V14-D1
再構成 第 41 回日本分子生物学会年会、横浜、2018 年 11 月 28-30 日

Fujimoto, S. and Kakinuma, S. Atypical V(D)J recombination, conflicting with the 12/23 rule? 第 47 回日本
免疫学会学術集会、福岡、2018 年 12 月 10-12 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 田畠 泰彦 Prof. Yasuhiko Tabata
助 教 城 潤一郎 Assist. Prof. Jun-ichiro Jo

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

1) 生体組織の再生治療のための生体材料

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

2) 幹細胞工学および再生・創薬研究のための生体材料

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

ついて研究開発を行っている。種々の生体材料からなる培養基材あるいは培養装置（バイオリアクタ）の組み合わせによる細胞培養技術の確立を目指している。これらの一連の研究は、細胞移植再生治療のために利用可能な細胞を得ることを目的としているだけではなく、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、薬物が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く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ッティングなどである。いずれの目的にも、薬物を修飾するための生体材料が必要である。本研究分野では、対象薬物として、治療薬だけではなく、予防薬、診断薬、化粧品成分、ヘルスケア物質などを取り上げ、生体材料学の観点からのDDS研究開発を行っている。

4) 外科・内科治療アシストのための生体材料

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

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

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

1) Biomaterials for Regeneration Therapy

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

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

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

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

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

3) Biomaterials for DDS

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

4) Biomaterials for Surgical and Physical Therapies

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

List of Publications

- Tanaka Y, Hamamoto Y, Niyazi A, Nagasao T, Ueno M, Tabata Y. (2018). Effects of platelet-rich plasma on tissue-engineered vascularized flaps in an *in vivo* chamber. Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery 71, 1062–1068
- Tamura T, Yokoya S, Kamata Y, Kinoshita Y, Tabata Y and Matsumoto G. (2018). Periodontal Regeneration Using Gelatin Hydrogels Incorporating Basic Fibroblast Growth Factor. Biomed J Sci & Tech DOI: 10.26717/BJSTR.2018.04.0001025 Volume 4- Issue 2
- Tanaka T, Matsushita T, Nishida K, Takayama K, Nagai K, Araki D, Matsumoto T, Tabata Y, Kuroda R. (2018). Attenuation of osteoarthritis progression in mice following intra - articular administration of simvastatin - conjugated gelatin hydrogel. J Tissue Eng Regen Med (in press).
- Hirose F, Kiryu J, Tabata Y, Tamura H, Musashi K, Takase N, Usui H, Kuwayama S, Kato A, Yoshimura N, Ogura Y, Yasukawa T. (2018) Experimental proliferative vitreoretinopathy in rabbits by delivery of

- bioactive proteins with gelatin microspheres. *Eur J Pharm Biopharm*, 129, 267-72
- Hosoyama K, Kawamoto S, Watanabe K, Sugawara Y, Tabata Y, Yamamoto M, Sasaki K, Tabayashi K, Saiki Y. (2018) Safety and durability of the biodegradable felt in aortic surgery: a propensity score-matched study. *Eur J Cardiothorac Surg*, 54, 361-368
- Jinnou H, Sawada M, Kawase K, Kaneko N, Herranz-Perez V, Miyamoto T, Kawaue T, Miyata T, Tabata Y, Akaike T, Garcia-Verdugo JM, Ajioka I, Saitoh S, Sawamoto K. (2018) Radial Glial Fibers Promote Neuronal Migration and Functional Recovery after Neonatal Brain Injury. *Cell Stem Cell*, 22 (1), 128-37 e9
- Masaki K, Sakai M, Kuroki S, Jo JI, Hoshina K, Fujimori Y, Oka K, Amano T, Yamanaka T, Tachibana M, Tabata Y, Shiozawa T, Ishizuka O, Hochi S, Takashima S. (2018) FGF2 Has Distinct Molecular Functions from GDNF in the Mouse Germline Niche. *Stem Cell Reports*, 10 (6), 1782-92
- Sakata M, Tonomura H, Itsuji T, Ishibashi H, Takatori R, Mikami Y, Nagae M, Matsuda KI, Tabata Y, Tanaka M, Kubo T. (2018) Bone Regeneration of Osteoporotic Vertebral Body Defects Using Platelet-Rich Plasma and Gelatin beta-Tricalcium Phosphate Sponges. *Tissue Eng Part A*, 24 (11-12), 1001-10
- Suzuki Y, Ii M, Saito T, Terai Y, Tabata Y, Ohmichi M, Asahi M. (2018) Establishment of a novel mouse xenograft model of human uterine leiomyoma. *Sci Rep*, 8 (1), 8872
- Tajima S, Tabata Y. (2018) Preparation of cell aggregates incorporating gelatin hydrogel microspheres containing bone morphogenic protein-2 with different degradabilities. *J Biomater Sci Polym Ed*, 29 (7-9), 775-92
- Tanaka Y, Hamamoto Y, Niyazi A, Nagasao T, Ueno M, Tabata Y. (2018) Effects of platelet-rich plasma on tissue-engineered vascularized flaps in an in vivo chamber. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 71 (7), 1062-8
- Suzuki T, Kosugi K, Suto T, Tobe M, Tabata Y, Yokoo S, Saito S. (2018) Sustained-release lidocaine sheet for pain following tooth extraction: A randomized, single-blind, dose-response, controlled, clinical study of efficacy and safety. *PLOS ONE* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200059>
- Li Z, Masumoto H, Jo J, Yamazaki K, Ikeda T, Tabata Y, Minatoya K. (2018) Sustained release of basic fibroblast growth factor using gelatin hydrogel improved left ventricular function through the alteration of collagen subtype in a rat chronic myocardial infarction model. *General Thoracic and Cardiovascular Surgery* 66, 641–647
- Tanaka A, Nakamura H, Tabata Y, Fujimori Y, Kumasawa K and Kimura T. (2018) Effect of sustained release of basic fibroblast growth factor using biodegradable gelatin hydrogels on frozen-thawed human ovarian tissue in a xenograft model. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* Vol. 44, No. 10: 1947–1955
- Ikebuchi Y, Aoki S, Honma M, Hayashi M, Sugamori Y, Khan M, Kariya Y, Kato G, Tabata Y, Penninger JM,

- Udagawa N, Aoki K, Suzuki H. (2018) Coupling of bone resorption and formation by RANKL reverse signalling. *NATURE* 561, 195-200
- Inno K, Bando H, Tabata Y. (2018) Enhanced survival and insulin secretion of insulinoma cell aggregates by incorporating gelatin hydrogel microspheres. *Regenerative Therapy* 8, 29-37
- Inno K, Bando H, Tabata Y. (2018) Insulin secretion of mixed insulinoma aggregates-gelatin hydrogel microspheres after subcutaneous transplantation. *Regenerative Therapy* 8, 38-45
- Murata Y, Jo J, Tabata Y. (2018) Preparation of cationized gelatin nanospheres incorporating molecular beacon to visualize cell apoptosis *Sci. Rep.* 8, 14839
- Wu HH, Zhou Y, Tabata Y, Gao JQ. (2018) Mesenchymal stem cell-based drug delivery strategy: from cells to biomimetic. *J Control Release*. 294, 102-113
- Notodihardjo SC, Morimoto N, Kakudo N, Mitsui T, Le TM, Tabata Y, Kusumoto K. (2018) Comparison of the efficacy of cryopreserved human platelet lysate and refrigerated lyophilized human platelet lysate for wound healing. *Regen Ther.* 10, 1-9
- Kuttappan S, Mathew D, Jo JI, Tanaka R, Menon D, Ishimoto T, Nakano T, Nair SV, Nair MB, Tabata Y. (2018) Dual release of growth factor from nanocomposite fibrous scaffold promotes vascularisation and bone regeneration in rat critical sized calvarial defect. *Acta Biomater* 78, 36-47
- Kumagai M, Minakata K, Masumoto H, Yamamoto M, Yonezawa A, Ikeda T, Uehara K, Yamazaki K, Ikeda T, Matsubara K, Yokode M, Shimizu A, Tabata Y, Sakata R, Minatoya K. A therapeutic angiogenesis of sustained release of basic fibroblast growth factor using biodegradable gelatin hydrogel sheets in a canine chronic myocardial infarction model. *Heart Vessels*, 33, 1251-1257.
- Fukuba S, Akizuki T, Hoshi S, Matsuura T, Addin AS, Okada M, Tabata Y, Matsui M, Tabata MJ, Sugiura-Nakazato M, Izumi Y. (2018) Comparison between different isoelectric points of biodegradable gelatin sponges incorporating β -tricalcium phosphate and recombinant human fibroblast growth factor-2 for ridge augmentation: A preclinical study of saddle-type defects in dogs. *J Periodont Res*, (in press).
- Kanemaru M, Asai J, Jo J, Arita T, Kawai-Ohnishi I, Tsutsumi M, Wada M, Tabata Y, Katoh N. (2018) Nanoparticle-mediated local delivery of pioglitazone attenuates bleomycin-induced skin fibrosis. *Journal of Dermatological Science*, (in press).
- Murakami T, Hijikuro I, Yamashita K, Tsunoda S, Hirai K, Suzuki T, Sakai Y, Tabata Y. (2018) Antiadhesion effect of the C17 glycerin ester of isoprenoid-type lipid forming a nonlamellar liquid crystal. *Acta Biomater*, (in press).
- Washio A, Kitamura C, Tabata Y. (2018) Preparation of Gelatin Hydrogel Sponges Incorporating Bioactive Glasses Capable for the Controlled Release of Fibroblast Growth Factor-2. *J Biomater Sci Polym Ed*, (in press).

Fukunishi Y, Tabata Y. (2018) Osteogenic differentiation enhances the MC3T3-E1 secretion of glycosaminoglycans with an affinity for basic fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein-2. *Regen Ther*, 8, 58-62.

Nii, T., Takeuchi, I., and Makino K. (2018). Effects of the conformation of PLGA molecules in the organic solvent on the aerodynamic diameter of spray dried microparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 539, 347-353.

Notodihardjo, S.C., Morimoto, N., Kakudo, N., Mitsui, T., Le, T.M., Tabata, Y., and Kusumoto K. (2018). Efficacy of gelatin hydrogel impregnated with concentrated platelet lysate in murine wound healing. *J Surg Res*. Epub 2018 Oct 11.

Notodihardjo, S.C., Morimoto, N., Kakudo, N., Mitsui, T., Le, T.M., Tabata, Y., and Kusumoto K. (2018). Comparison of the efficacy of cryopreserved human platelet lysate and refrigerated lyophilized human platelet lysate for wound healing. *Regen Ther*. 10, 1-9.

Hirose, F., Kiryu, J., Tabata, Y., Tamura, H., Musashi, K., Takase, N., Usui, H., Kuwayama, S., Kato, A., Yoshimura, N., Ogura, Y. and Yasukawa T. (2018). Experimental proliferative vitreoretinopathy in rabbits by delivery of bioactive proteins with gelatin microspheres. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 129, 267-272.

Li, Z., Masumoto, H., Jo, JI., Yamazaki, K., Ikeda, T., Tabata, Y., Minatoya, K. (2018). Sustained release of basic fibroblast growth factor using gelatin hydrogel improved left ventricular. *Gen Thorac Cardiovasc Surg.* 66:641-647.

Tabei R, Kawaguchi S, Kanazawa H, Tohyama S, Hirano A, Handa N, Hishikawa S, Teratani T, Kunita S, Fukuda J, Mugishima Y, Suzuki T, Nakajima K, Seki T, Kishino Y, Okada M, Yamazaki M, Okamoto K, Shimizu H, Kobayashi E, Tabata Y, Fujita J, Fukuda K. (2018) Development of a transplant injection device for optimal distribution and retention of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *The Journal of Heart and Lung Transplantation Volume 38, Issue 2, Pages 203-214*

素輪善弘、田畠泰彦、岸田綱郎、沼尻敏明、松田修. (2018.2). 第9章 再生医療、細胞培養用としてのゲル開発 第4節 末梢神経欠損治療に対するゼラチンハイドロゲルチューブの活用. (株)技術情報協会 514-520

楠原廣久、末吉遊、西脇仁、伊谷善仁、田畠泰彦、磯貝典孝. (2018). 徐放化塩基性線維芽細胞増殖因子の指尖部切断の治療への応用. 日本再生医療学会雑誌 17 (2): 34-40

List of Presentations

海外での招待講演

Tabata, Y. Frontier Biomaterials Technology to Realize Regenerative Therapy for Patients. MALTA Meeting. Republic of Malta, May 3.5-9, 2018.

Tabata, Y. Local Drug Delivery Technology to Allow Cells to Active their Potentials of Proliferation and Differentiation. International Advanced Drug Delivery Symposium 2018, Taipei, TAIWAN, April 12-13, 2018.

Tabata, Y. Local Drug Delivery Technology to Activate the Cell Potentials for Tissue Regeneration Therapy. 5th Asian Symposium on Pharmaceutical Science and Technology (ASPST2018). Hangzhou, China, May 8-10, 2018.

Tabata, Y. Biomaterial for Bone Regeneration. JOINT WORK SHOP BETWEEN NORWAY AND JAPAN IN REGENERATIVE MEDICINE. Tokyo, June 4, 2018.

Tabata, Y. Importance of Biomaterials in Regenerative Medicine. Conference on Definitions Biomaterials 2018. Chengdu, China, June 11-13, 2018.

Tabata, Y. Biomaterials technology indispensable to realize regenerative medicine. THERMEC'2018. Paris, France, July 9-13, 2018.

Tabata, Y. Drug Delivery Systems for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. Advances in Tissue Engineering 2018. Houston, USA, August 7-11, 2018

Tabata, Y. Significant Contribution of Chemistry to Regenerative Medicine. Congress of the Latino-American Society of Chemistry Bioengineering Technology Necessary fo Regenerative Medicine. Materials for Bioengineering and Nanomedicine Symposium, Havana, Cuba, October 9-12, 2018.

Tabata, Y. Frontier of Regenerative Medicine Based on Biomaterials Technology. THE 1st JOINT SEMINAR ON TISSUE ENGINEERING & REGENERATIVE MEDICINE. Hanoi, Vietnam, October 17-19, 2018.

Tabata, Y. Polymer Hydrogels Necessary for Regenerative Medicine. 2018 Functional Polymers for Human Health. Jerusalem, Israel, October 28-30, 2018.

Tabata, Y. Hydrogel Technology Indispensable to Realize Regenerative Medicine. ICPM (International Conference of Pharmacy & Medicine. Dubai, United Arab Emirates, November 18-21, 2018.

Tabata, Y. Regenerative Medicine Realized by Biomaterials Technology. バイオマテリアル技術によって実現する再生医療. 日越外交関係樹立 45 周年記念 第 5 回 国際先端生物学・医学・工学会議. Hanoi, Vietnam, November 22-24, 2018.

海外での一般演題

Heima, D., Masumoto, H., Kawatou, M., Osada, H., Ikeda, T., Tabata, Y., Minatoya, K., Yamashita, J.K. Human iPS Cell-Derived Cardiac Tissue Transplantation to a Rat Unloaded Ischemic Heart Model Mimicking Left Ventricular Assist Device Implantation. American Heart Association Scientific Sessions 2018, Chicago, November 10-12, 2018

Tanaka, T., Matsushita, T., Nishida, K., Takayama, K., Nagai, K., Araki, D., Matsumoto, T., Tabata, Y., and

Kuroda, R. Intraarticular Administration of the Simvastatin-Conjugated Gelatin Hydrogel Attenuates Osteoarthritis Progression in Mice. Orthopaedic Research Society 2018, New Orleans, March 10-13, 2018.

国内でのシンポジウム招待講演

田畠泰彦 バイオマテリアル技術の次世代応用としての再生医療－自然治癒力を高めて病気を治す－ 近畿化学協会 高機能材料セミナー、大阪、2018年1月24日

田畠泰彦 バイオマテリアルからみた再生医療の世界 - 再生治療と再生研究 - バイオフォーラム 2017、京都、2018年1月25日

田畠泰彦 再生医療に対するイメージを変えてみませんか。- 再生医療分野ビジネスへの参入のために - KRIC 第8回基礎セミナー&ネットワーキングイベント、神戸、2018年1月30日

田畠泰彦 バイオマテリアル技術からみた再生医療 - 細胞能力を高め自然治癒力を促す医療 - 特定非営利活動法人健康医療開発機構 第1回「細胞医療の時代 2018」、東京、2018年1月31日

田畠泰彦 獣医再生医療に期待すること - 細胞能力を高める医療の実現 - 第13回日本獣医再生医療学会年次大会、横浜、2018年2月3-4日

田畠泰彦:炎症応答から見たバイオ材料開発 科学技術未来戦略ワークショップ「生体との相互作用を自在制御するバイオ材料工学」、東京、2018年3月3日

田畠泰彦 再生医療分野における DDS 技術の最新動向 CPhI Japan2018 (国際医薬品原料・中間体展)、東京、2018年4月19日

田畠泰彦 生体組織の再生治療に与える炎症環境制御の影響 日本 DDS 学会学術集会 シンポジウム3、長崎、2018年6月21-22日

田畠泰彦 バイオマテリアルの定義と今後 ナノテクノロジー材料科学技術委員会、東京、2018年6月25日

田畠泰彦 モノつくり技術からみた先端医療と生物医学研究 - 自然治癒力を介して病気を治す再生医療を中心として - IJET-29 大阪、大阪、2018年7月1日

田畠泰彦 ライフサイエンスと高分子材料-生活、医療などに役立つ高分子材料とその応用事例- 第105回ニューフロンティア材料部会例会、大阪、2018年7月25日

田畠泰彦 バイオテクノロジーとしての再生医療 神戸再生医療勉強会、神戸、2018年9月14日

田畠泰彦 ライフサイエンスで活かせるゼラチンの特性について考える 2018 ライフサイエンス バイオマテリアル研究会、京都、2018年11月2日

田畠泰彦 バイオマテリアルから見た先端医療 和歌山県立医科大学眼科学講座 講演、和歌山、

2018年11月6日

田畠泰彦 細胞増殖因子とドラッグデリバリーシステム（DDS）技術 第8回 DDS 再生医療研究会・第10回多血小板血漿（PRP）療法研究会共催、大阪、2018年11月18日

田畠泰彦 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：グローバルメディカルサイエンス特別講義、神戸、2018年11月29日

田畠泰彦 バイオマテリアルをベースとした再生医療の現状と将来 ナノセルロース塾、京都、2018年12月1日

Jo, J. and Tabata, Y. Molecular imaging in regenerative medicine based on biomaterials. 東北大学大学院工学研究科材料システム工学専攻生体機能材料学分野セミナー、仙台 2018年10月19日

国内での一般演題

田畠泰彦 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、2018年1月11日

田畠泰彦 次世代再生医療ビジネスの具現化のために必要となるものは？ 次世代医療システム産業化フォーラム 2017 第7回例会、京都、2018年1月19日

田畠泰彦 Regenerative Therapy Based on Biomaterials Technology 101th 再生医療・臓器再建医学コースミーティング -Regenerative Medicine and Organ Reconstruction-、京都、2018年2月9日

田畠泰彦 生体機能性高分子 一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 2018、京都、2018年2月14日

田畠泰彦 炎症反応をチューニングするためのバイオマテリアル技術 医工学フォーラム -2017年度特別学術講演会-、京都、2018年2月28日

田畠泰彦 自然治癒力を高めて病気を治す②～再生医療はここまでできている～ 芦屋川カレッジ修了式、芦屋、2018年3月14日

田畠泰彦 再生医療の事業化に求められる技術と学会の最新動向 旭硝子株式会社講演、新横浜、2018年4月17日

田畠泰彦 バイオマテリアルと再生医療『高分子材料からみた再生医療分野』 住友化学株式会社講演、筑波、2018年4月26日

田畠泰彦 歯の治療学 九州歯科大学歯学部 口腔機能学講座、福岡、2018年5月18日

田畠泰彦 バイオマテリアルを用いた再生医療 大阪大学歯学部 歯科理工学特別講義、大阪、2018年5月23日

田畠泰彦 高分子材料からみた再生医療分野 日本触媒講演、大阪、2018年5月31日

田畠泰彦 体を治す高分子 高分子化学講義、京都、2018年6月27日

田畠泰彦 再生医療の最前線と今後の展望 同志社大学生命医科学講義、京都、2018年7月20日

田畠泰彦 大手前サマースクール、京都、2018年7月23日

田畠泰彦 細胞を元気にするための細胞環境づくり材料・技術・装置＝再生医療ビジネス 再生医療ビジネスシンポジウム in KRP PartXI、京都、2018年7月31日

田畠泰彦 再生医療の世界に触れてみよう -自然治癒力を高めて病気を治す- 2018年度 関西四私大生命科学公開研究会、大阪、2018年8月6日

田畠泰彦 細胞を元気にする再生医療 JSR 講演会、東京、2018年9月11日

田畠泰彦 医工学入門講義、京都、2018年9月18日

田畠泰彦 自然治癒力を高めて病気を治す①～再生医療の実際～ 芦屋カレッジ、兵庫、2018年9月19日

田畠泰彦：生体組織工学をベースとした再生医療 京都府立医科大学医学部医学科3回生総合講義（再生医療）、京都、2018年10月26日

田畠泰彦、田中隆介、城潤一郎：薬物徐放化フィブリンハイドロゲルによるマクロファージ機能の修飾 第76回日本化学纖維研究所講演会、京都、2018年11月14日

田畠泰彦 臨床化学講義 京都、2018年12月18日

田畠泰彦 材料科学からみる再生医療分野 田中貴金属工業株式会社 講演、東京、2018年12月21日

城潤一郎、明石祐典、田畠泰彦 抗がん剤含有高分子ナノ粒子 - 血小板ハイブリッド DDS のデザイン 第40回日本バイオマテリアル学会大会、神戸、2018年11月12-13日

Murata, Y., Jo, J., and Tabata, Y. Visualization of cell apoptosis by utilizing cationized gelatin nanospheres incorporating molecular beacon. 5th TERMIS World Congress, Kyoto, September 4-7, 2018.

村田 勇樹、城 潤一郎、田畠 泰彦 「モレキュラービーコン内包ゼラチンナノ粒子による細胞内 mRNA のイメージング」 第17回日本再生医療学会総会、横浜、2018年3月21-23日

村田 勇樹、城 潤一郎、田畠 泰彦 「細胞内 mRNA 可視化のためのモレキュラービーコン内包ゼラチンナノ粒子の作製」 第67回高分子学会年次大会、名古屋、2018年5月23-25日

村田 勇樹、城 潤一郎、田畠 泰彦 「細胞内 mRNA 可視化によるアポトーシスのイメージング」 日本分子イメージング学会第13回学会総会・学術総会、東京、2018年5月31日-6月1日

村田 勇樹、城 潤一郎、田畠 泰彦 「モレキュラービーコンの細胞内徐放による mRNA のイメージング」 第33回日本 DDS 学会学術集会、長崎、2018年6月21-22日

村田 勇樹、城 潤一郎、田畠 泰彦 「モレキュラービーコン細胞内徐放技術による生物機能イメージ

ング」 第39回日本炎症・再生医学会、東京、2018年7月11-12日

村田 勇樹、城 潤一郎、田畠 泰彦 「細胞生物機能の長期的可視化を目指したモレキュラービーコン
細胞内徐放」 第47回医用高分子シンポジウム、東京、2018年7月19-20日

村田 勇樹、城 潤一郎、田畠 泰彦 「モレキュラービーコンの細胞内徐放による細胞生物機能の可視
化」 日本バイオマテリアル学会第13回関西若手研究発表会、京都、2018年8月31日

村田 勇樹、城 潤一郎、田畠 泰彦 「核酸の細胞内徐放技術に基づく mRNA の長期イメージング」
第67回高分子討論会、札幌、2018年9月12-14日

村田 勇樹、城 潤一郎、田畠 泰彦 「モレキュラービーコンによるアポトーシスの可視化」 第40回
バイオマテリアル学会大会、神戸、2018年11月12-13日

村田 勇樹、城 潤一郎、田畠 泰彦 「カチオン化ゼラチンナノ粒子を用いたモレキュラービーコン細
胞内徐放」 第40回バイオマテリアル学会大会、神戸、2018年11月12-13日

村田 勇樹、城 潤一郎、田畠 泰彦 「核酸の細胞内徐放技術に基づく生物機能イメージング法の開
発」 第8回 DDS 再生医療研究会、大阪、2018年11月18日

村田 勇樹、城 潤一郎、田畠 泰彦 「mRNA 長期可視化のためのモレキュラービーコン細胞内徐放
技術の構築」 2018KIPS 若手高分子シンポジウム、京都、2018年12月14日

百鳥直樹、田中隆介、田畠泰彦 マクロファージの体内動態を変化させるための2種類の薬物の徐
放化 第34回日本DDS学会、長崎、2018年6月21-22日

百鳥直樹、田中隆介、田畠泰彦 2種類の薬物徐放化がマクロファージ機能へ与える効果 第39回
炎症・再生医学会、東京、2018年7月11-12日

百鳥直樹、田中隆介、田畠泰彦 2種類の薬物徐放化による抗炎症性マクロファージの動員 日本
バイオマテリアル学会関西ブロック 第13回若手研究発表会、京都、2018年8月31日

Naoki Momotori, Ryusuke Tanaka, and Yasuhiko Tabata Preparation of gelatin hydrogels for dual drug
release to modify macrophages polarization 5th TERMIS world congress, Kyoto, September 4-7, 2018

百鳥直樹、田中隆介、田畠泰彦 薬物徐放化技術を活用した組織修復性マクロファージの体内誘導
第40回日本バイオマテリアル学会大会、神戸、2018年11月12-13日

Uchida Y, Masui T, Uemoto S, Tabata Y. Evaluation of polylactic acid/ polyglycolic acid covering material
after pancreatic surgery using rat pancreatic fistula model. The 5th TERMIS World Congress, September
4-7, 2018, Kyoto

新居 輝樹、竹内 一成、牧野 公子 溶液中におけるPLGA分子挙動がマイクロ粒子の空気力学
的粒子径に与える影響 第34回日本DDS学会学術集会、長崎、2018年6月21-22日

新居 載樹、牧野 公子、田畠 泰彦 ゼラチンハイドロゲル粒子を含有した細胞凝集体の振盪培
養 第40回日本バイオマテリアル学会学術集会、神戸、2018年11月11-12日

Kadowaki, S., Yoshizawa, K., and Tabata, Y. Gelatin hydrogel microspheres improve the activity of multi-layered cell sheet. 2018 TERMIS World Congress, Kyoto, September 4-7, 2018.

Notodihardjo, S.C., Morimoto, N., Kakudo, N., Mitsui, T., Le, T.M., Tabata, Y., and Kusumoto K. Efficacy of gelatin hydrogel impregnated with concentrated platelet lysate in murine wound healing. The 5th TERMIS World Congress, Kyoto, Japan, September 4-7, 2018.

Notodihardjo, S.C., Morimoto, N., Kakudo, N., Mitsui, T., Le, T.M., Tabata, Y., and Kusumoto K. Efficacy of gelatin hydrogel impregnated with concentrated platelet lysate in murine wound healing. The 2nd Kansai Medical University Academic Meeting, Osaka, Japan, November 17, 2018.

Notodihardjo, S.C., Morimoto, N., Kakudo, N., Mitsui, T., Le, T.M., Tabata, Y., and Kusumoto K. Efficacy comparison of cryopreserved and lyophilized human platelet lysate for wound healing. The 10th Congress of the Japanese Society for PRP Therapy/The 8th Congress of Japanese Society of the DDS Regenerative Medicine, Osaka, Japan, November 18, 2018.

Heima, D., Masumoto, H., Kawatou, M., Osada, H., Takeda, M., Ikeda, T., Tabata, Y., Minatoya, K., Yamashita, J.K. Human iPSC-derived cardiac tissue transplantation to a rat unloaded ischemic heart model. 第2回日本循環器学会基礎研究フォーラム、奈良、2018年7月22-23日

Nishio, H., Masumoto, H., Minakata, K., Kumagai, M., Yamamoto, M., Omura, T., Yokode, M., Shimizu, A., Matsubara, K., Tabata, Y., Minatoya, K. Safety and efficacy of sustained release of basic fibroblast growth factor using gelatin hydrogel: Phase I-IIa clinical trials in patients with limb or myocardial ischemia. 第5回国際組織工学・再生医療学会世界会議、京都、2018年9月4-7日

升本英利、中根武一郎、平尾慎吾、瀧本真也、李子澎、金光ひでお、植山浩二、山崎和裕、池田義、田畠泰彦、山下潤、湊谷謙司 心臓再生医療用のヒトiPS細胞由来心血管系細胞多層体の開発 第118回日本外科学会定期学術集会、東京、2018年4月5-7日

平尾慎吾、升本英利、西尾博臣、川東正英、金光ひでお、植山浩二、山崎和裕、池田義、田畠泰彦、山下潤、湊谷謙司 ミニブタ心筋梗塞モデルに対するヒトiPS細胞由来積層化心臓組織シート移植による心機能改善効果の検討 第118回日本外科学会定期学術集会、東京、2018年4月5-7日

S., sasaki, N., Inui, T., Haneda, S., Sasaki, M., Furuoka, H., Ito, M., Yanagawa, M., Tabata, Y. The formation of chondrocyte-like aggregates on zirconia porous three-dimensional microwell substrata using equine, bone marrow-derived mesenchymal stem cells. 5th TERMIS World Congress 2018 Kyoto, September 4, 2018.

Shintani, K., Takamatsu, K., Uemura, T., Yokoi, Y., Onode, E., Okada, M., Tabata, Y., Nakamura, H. Dual release of bFGF and SDF-1 accelerates peripheral nerve regeneration. The 5th Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society World Congress, Kyoto, September 4-7, 2018.

Kanda, Y., Kakutani, K., Yurube, T., Ito, M., Kakiuchi, Y., Takeoka, Y., Takada, T., Tabata, Y., Nishida, K,

Kuroda, R. A novel production method of gelatin hydrogel microsphere as a sustained release system of cisplatin aiming for clinical application. The 5th Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society World Congress, Kyoto, September 4-7, 2018.

神田裕太郎、角谷賢一朗、由留部崇、伊藤雅明、垣内裕司、武岡由樹、高田徹、田畠泰彦、土井田稔、西田康太郎、黒田良祐 がん骨転移モデルに対するゼラチンハイドロゲルを用いた徐放化抗がん剤局所投与の有効性 第33回日本整形外科学会基礎学術集会、奈良、2018年10月11-12日

神田裕太郎、角谷賢一朗、由留部崇、張鍾穎、宮崎真吾、垣内裕司、武岡由樹、辻本龍、高田徹、西田康太郎、田畠泰彦、黒田良祐 ゼラチンハイドロゲルを用いた徐放化抗がん剤局所投与による骨転移局所制御 第8回 DDS 再生医療研究会、大阪、2018年11月18日

Tanaka, T., Matsushita, T., Nishida, K., Takayama, K., Nagai, K., Araki, D., Matsumoto, T., Tabata, Y., and Kuroda, R. Intraarticular Administration of the Simvastatin-Conjugated Gelatin Hydrogel Attenuates Osteoarthritis Progression in Mice. The 5th TERMIS World Congress, Kyoto, September 4-7, 2018.

Kataoka, T., Mifune, Y., Inui, A., Nishimoto, H., Ueda, Y., Kurosawa, T., Yamaura, K., Tanaka, R., Tabata, Y., and Kuroda, R., Efficacy of combined PRP and bFGF using gelatin hydrogel sheet for rotator cuff healing in rat models 5th TERMIS World Congress, Kyoto, September 4-7, 2018.

片岡武史、美船泰、乾淳幸、西本華子、黒澤堯、山裏耕平、向原伸太郎、田畠泰彦、黒田良祐 ラップト腱板断裂に対するbFGFとPRPの治癒促進効果の検討第8回 DDS 再生医療研究会、大阪、2018年11月18日

Takahashi K, Kiso H, Saito K, Murashima-Suginami A, Mishima S, Tokita Y, Sugai M, Tabata Y, Bessho K: Feasibility of Molecularly Targeted Therapy for Tooth Regeneration: Potential for stimulation of the formation of a third dentition, 5th TERMIS World Congress, Kyoto, September 4-7, 2018.

高橋克、斉藤和幸、喜早ほのか、三島清香、杉並亜希子、原田英光、田畠泰彦、別所和久：分子標的治療による欠損歯の再生：第2のシーズ CEBP β 、第17回日本再生医療学会総会、横浜、2018年3月21-23日

高橋克、斉藤和幸、喜早ほのか、三島清香、杉並亜希子、時田義人、原田英光、田畠泰彦、菅井学、別所和久：CEBP β を標的分子とした分子標的治療による歯の再生、第39回 日本炎症・再生医療学会総会、東京、2018年7月11-12日

再生組織構築研究部門
Department of Regeneration Science and Engineering
再生増殖制御学分野
Laboratory of Tissue Stem Cell Biology

教 授	瀬原 淳子	Prof.	Atsuko Sehara
助 教	飯田 敦夫	Assist. Prof.	Atsuo Iida
特定助教	佐藤 文規	Program-Specific Assist. Prof.	Fuminori Sato

私たちのグループは、骨格筋形成・再生・維持機構を中心とする研究を行っている。それについて、簡単に報告したい。

効率的な骨格筋再生は糖代謝の変化を必要とする

骨格筋再生において筋幹細胞（SMSC）は筋損傷の際に増殖し、筋細胞に分化する。今回は、骨格筋幹細胞がどのように分化細胞を產生し、一方では自己複製により自らを維持するのか、という根本的な問題に取り組み、糖代謝の変化がその一翼を担っていることを証明した。具体的には、ピルビン酸を Acetyl CoA に変換する糖代謝の要となる酵素、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ（PDH）が、SMSC の分化促進に必須であることを見出したのである。SMSC 特異的に PDH 機能が阻害されるコンディショナルノックアウト（PDH-cKO）マウスから単離した SMSC では自己複製が優位で分化能が低下すること、筋ジストロフィーモデルマウスで SMSC の PDH が欠損すると、筋再生が不十分となること、単離した SMSC を培養すると、分化細胞の產生能が PDH を必要とすること、などの結果を得て、PDH が介する解糖系から TCA 回路へのエントリーが、SMSC の分化を促進する一因であることがわかった（図 1）（Hori *et al.*, FASEB, 2019）。

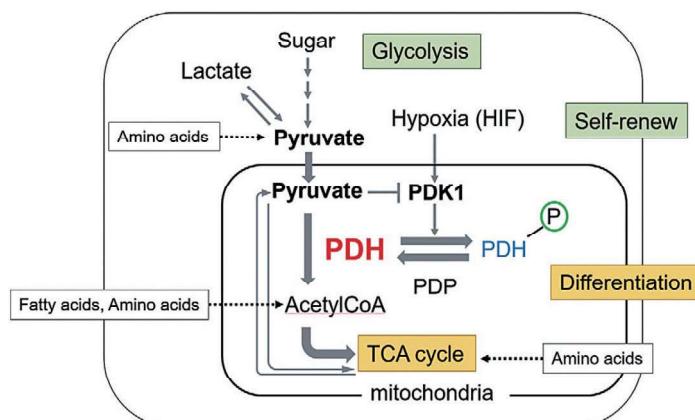


図 1

骨格筋維持における重力の役割とそのメカニズム

幹細胞だけでは、骨格筋を維持することはできない。若くとも、運動しないと筋萎縮が起きることは周知の事実である。私たちは、骨格筋を維持するもう一つのメカニズムとして、重力に注目している。重力に関しては私たち人間のみならず全ての生物が事実上終生その影響下にあるにも関わらず科学的知見の蓄積に乏しい。その理由は、重力の影響を長期的に除去することは地球上では不可能であり、現時点では地球を離れ、宇宙空間へ飛び出すしか方法がないからだ。後肢懸垂を施しても重力の影響からは逃れられない。筋萎縮予防策として宇宙飛行士は ISSにおいて毎日 2 時間程度の運動を行っているが、運動していても、長期宇宙滞在による 15% 前後の筋量減少とそれに伴う筋力低下や代謝の変化が起きる。宇宙滞在による筋萎縮は、どこまで可塑的な廃用性筋萎縮と共通性があり、また異なるのだろうか？ 私たちの疑問はそこにある。現在、地球の重力圏を離れ長期に微重力環境に滞在することが可能なのは唯一、国際宇宙ステーション（ISS）だけである。ISS には日本実験棟「きぼう」があり、そこでは宇宙環境を対象とした様々な研究が実施されている。生物実験としては、微重力環境だけではなく、宇宙放射線曝露環境や長期閉鎖環境などの極限環境やその複合的ストレス環境を対象として実施されている (http://www.jaxa.jp/projects/iss_human/kibo/index_j.html)。その中で、私たちの研究グループは宇宙滞在による骨格筋萎縮メカニズムの解明を目的として、小型魚類であるゼブラフィッシュを用いた 2 度の ISS 宇宙滞在実験 (*Zebrafish Muscle, Zebrafish Muscle2*) を実施した。宇宙滞在実験は、次世代 RNA シークエンスを用いたトランск립トームを中心とし、実施するにあたり地上帰還後も含めた経時的なサンプリングを行った。これは長期滞在による反応だけではなく初期反応、微重力環境への適応、地上帰還後の反応を知りたかったからである。多くの宇宙滞在実験が、ある一点でのサンプリングや帰還後のサンプリングを実施していたことからもこの点を重視した。また、運動を抑制した場合の筋萎縮や老化との関連・違いについても解析し、その結果極めて興味深い結果を得た。現在投稿準備中である。（佐藤文規・Choi Minyong ら）

血管形成におけるインテグリン $\beta 1$ の役割

骨格筋臓器は、骨格筋だけではなく、毛細血管が張り巡らされ、腱を介して骨と繋がり、神経支配を受けている。その一つとして血管組織に注目しているので、今回はその一つとして、細胞同士もしくは ECM（細胞外マトリックス）との相互作用を構成する主要な接着分子ファミリー、インテグリンに着目した研究も紹介する。インテグリン $\beta 1b$ 変異体ゼブラフィッシュでは、発生中の血管形成に異常が見られ、頭部での出血が引き起こされた。これらの表現型に対するインテグリン $\beta 1b$ の作用点を決定するために、ドミナントネガティブとして作用するインテグリン $\beta 1$ 細胞内ドメインのアミノ酸配列を用い、インテグリン $\beta 1$ 活性に対する機能阻害系統を作出した（図 2A）。*fli1a* プロモーターにより制御されたインテグリン $\beta 1$ ドミナントネガティブ分子は、変異体において観察された血管の異常および頭部での出血を模倣した。これらのデータは、血管内皮細胞がゼブラフィッシュにおける血管形成および血管壁の維持のためにインテグリン $\beta 1$ を必要とする事を示した。さらに、トランスジェニック胚のタイムラプス観察は、出血が起こる瞬間と場所、およびその開始時間を明らかにした（図 2B）（飯田敦夫・王梓ら、*Genes to Cells* 2018）。

A**B**

図 2

胸骨形成の新しいメカニズム

骨格筋を構成するもう一つの組織として、骨格筋と骨を結ぶ腱にも着目している。ゼブラフィッシュを用いた Gal4-Uas スクリーニングにより、腱前駆細胞集団で発現する転写因子 19A を同定し、19A コンディショナルノックアウト (KO) マウス ($19A^{flox/flox}$) を作製して、哺乳類における 19A の機能を調べてきた。全身 19A KO マウス胚 ($19A^{flox/flox}, CAG\text{-}cre$) では、胸骨に特異的な骨化遅延が観察され、骨化部位における Osx^+ 骨芽細胞や $Runx2^+$ 骨芽前駆細胞の減少が観察された。我々は更に、側板中胚葉 (LPM) 特異的 19A KO マウス胚 ($19A^{flox/flox}, Prx1\text{-}cre$) の胸骨で同様の骨化遅延を確認し、19A が LPM 由来の細胞で機能している事を確認した。また時期特異的 19A KO マウス胚の表現型解析から、19A の機能時期が胎仔期の早期であることもわかった。現在、転写因子 19A により制御される遺伝子の解明を目指している (図 3) (栗木麻央・佐藤文規ら)

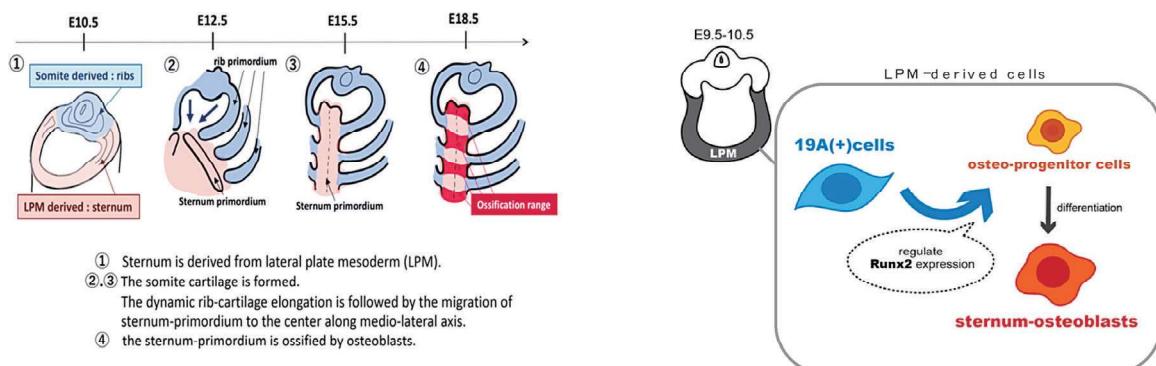


図 3

心臓神経堤細胞の分化における ADAM19 の役割

最後に、幹細胞モデルとして神經堤細胞の分化における ADAM19 の研究にも言及する。

私たちは細胞膜タンパク質の切断により細胞間相互作用を担うであろう膜型プロテアーゼ

ADAM（a disintegrin and metalloprotease）に着目してきた。ADAM ファミリーのタンパク質である Adam19 は心臓神経堤細胞で発現し、その遺伝子欠損マウスは心室中隔欠損を示す。脊椎動物において神経堤細胞は背側から生じ、心臓へと移動してくる。心臓が正しく形成されるためには、この神経堤細胞が心臓で適切に配置し、分化する必要がある。*Wnt1-Cre* マウス（神経堤細胞系譜）、Cre 依存的に蛍光タンパク（tdTomato）を発現し続ける *ROSA26^{CAG-LSL-tdTomato}*（以下 *R26^{tdT}*）マウスを用いて神経堤細胞の移動をトレースすると、ADAM19 欠損マウスで神経堤細胞の移動には異常がないことがわかった。次に、神経堤細胞の分化について解析を行った。神経堤細胞はグリア細胞、シュワン細胞、神経細胞、色素細胞、骨・軟骨細胞など多様な細胞への分化能を持つ。しかし、現在のところ心臓神経堤細胞が、最終的にどういった細胞になるのかは明確になっていない。そこで、組織染色により、心臓神経堤細胞の分化に差がないか野生型と ADAM19 欠損型とで比較解析を行ったところ、興味深い事に ADAM19 欠損型マウス心臓にはアルシアン・ブルー染色で染まる異所性の軟骨が形成される事が明らかとなった。ADAM19 が心臓神経堤細胞の分化をどのように制御しているのかについて解析し、それらの結果を投稿中である（荒井宏行ら）。

We have investigated which factors stimulate the proliferation and differentiation of skeletal muscle satellite cells (SMSCs), and have found that pyruvate, the end product of glycolysis, stimulates their differentiation. Pyruvate antagonizes the effects of hypoxia on preferential self-renewal of SMSCs through dephosphorylation or activation of pyruvate dehydrogenase (PDH), which mediates opening of the gateway from glycolysis to the tricarboxylic acid (TCA) cycle by producing acetyl coenzyme A from pyruvate. PDH kinase 1 is down-regulated under normoxic conditions, leading to an increase in dephosphorylated PDH. Conditional deletion of PDH in SMSCs affects cell divisions generating myocytes and subsequent myotube formation, inefficient skeletal muscle regeneration upon injury, and aggravated pathogenesis of dystrophin-deficient mice. Thus, the metabolic flow from glycolysis to the TCA cycle mediated by PDH plays a pivotal role in the efficient differentiation of SMSCs, which is critical for the progression of skeletal muscle regeneration.

List of Publications

- Iida A, Wang Z, Hirata H, Sehara-Fujisawa A (2018). Integrin β 1 activity is required for cardiovascular formation in zebrafish. **Genes to Cells.** 11:938-951.
- Adachi S, Niimi I, Sakai Y, Sato F, Minokawa T, Urata M, Sehara-Fujisawa A, Kobayashi I, Yamaguchi M. (2018). Anteroposterior molecular registries in ectoderm of the echinus rudiment. **Dev Dyn.** 247 (12):1297-1307

List of Presentations

一般演題（海外）

F. Sato, M. Tabuchi, A. Kamezaki, A. Asakawa, K. Kawakami, A. Sehara-Fujisawa. The ectodomain shedding of NRG1 underlies spatial and temporal regulation of synaptogenesis and myelination of developing motor neurons. 11th meeting of the Zebrafish Disease Models Society (ZDM11), Leiden, Netherlands, July 10-13, 2018.

Fuminori Sato, Minyong Choi, Zi Wang, Kiyomi Imamura, Terumi Horiuchi, Wu Quan, Ikumi Fujita, Satoko Uchida, Mitsuyasu Kato, Fumiaki Tanigaki, Akira Higashibata, Masafumi Muratani, Junya Kobayashi, Akihisa Takahashi, Sumio Sugano, Fumio Matsuzaki, Yutaka Suzuki, Koichi Kawakami, Atsuko Sehara-Fujisawa. Study on gravity-dependent skeletal muscle maintenance mechanisms using Zebrafish, aquatic organisms. 2018 ASCB EMBO Meeting, San Diego, U.S.A, Dec.8-12, 2018.

招待講演（国内）

F. Sato, M. Tabuchi, A. Kamezaki, A. Asakawa, K. Kawakami, A. Sehara-Fujisawa. The ectodomain shedding of NRG1 underlies spatial and temporal regulation of synaptogenesis and myelination of developing motor neurons. 22nd Biennial Meeting of the International Society of Developmental Neuroscience, 奈良, 2018年5月22-25日。

瀬原淳子. 動物が重力を感じるしくみと反応～ヒトは宇宙に長くいるとどうなるのか～. 大隅基礎科学創成財団主催 小中高生と最先端研究者とのふれ合いの集い、小田原、2018年6月4日。

瀬原淳子. 骨格筋維持における重力の役割 - ゼブラフィッシュの宇宙滞在から学ぶ事. 第56回日本生物物理学会年会、岡山、2018年9月15-17日。

Atsuko Sehara. Space stay of zebrafish. The 15th Korea-Japan Joint Seminar on Space Environment Utilization Research., 仙台、2018年9月20-21日。

一般演題（国内）

Mao Kuriki, Fuminori Sato, Kenta Sumiyama, Koichi Kawakami, Atsuko Sehara-Fujisawa. Roles of a transcription factor 19A in the osteoblast development of sternum. Joint Annual Meeting of JSDB 51st and JSCB 70th, 東京、2018年6月8日。

Shimpei Hori, Fuminori Sato, Atsuko Sehara-Fujisawa. Metabolic control of skeletal muscle regeneration. Joint Annual Meeting of JSDB 51st and JSCB 70th, 東京、2018年6月8日。

Choi Minyong, F Sato and A Sehara. 微重力環境下におけるゼブラフィッシュの行動解析及び、遺伝子発現変動解析. 平成30年度「宇宙に生きる」若手夏合宿、群馬、2018年7月26-27日。

飯田敦夫. グーデア科胎生魚において母親から胎仔に供給される栄養分の実態は何か? 第4回ユニークな少数派実験動物を扱う若手が最先端アプローチを勉強する会、東京、2018年8月16-17

日 .

ATSUO IIDA. Viviparous teleost: Exploration of the maternal-fetal nutritional transfer in a Goodeidae species *Xenotoca eiseni*. 第 24 回小型魚類研究会、名古屋、2018 年 8 月 25-26 日 .

佐藤文規 , Choi Minyong, 王梓 , 今村聖実 , 堀内映美 , 吳泉 , 藤田生水 , 内田智子 , 加藤充康 , 谷垣文章 , 東端晃 , 村谷匡史 , 小林純也 , 高橋昭久 , 菅野純夫 , 松崎文雄 , 鈴木穰 , 川上浩一 , 濑原淳子 . 人工重力発生装置を用いたゼブラフィッシュ宇宙滞在実験 . 宇宙生物科学会第 32 回大会、仙台、2018 年 9 月 20-21 日 .

佐藤文規、Choi Minyong、王梓、今村聖実、堀内映美、吳泉、藤田生水、内田智子、加藤充康、谷垣文章、東端晃、村谷匡史、小林純也、高橋昭久、菅野純夫、松崎文雄、鈴木穰、川上浩一、瀬原淳子 . ゼブラフィッシュ宇宙滞在実験から微小重力の骨格筋への影響とそのメカニズムを探る . 第 41 回日本分子生物学会年会、横浜、2018 年 11 月 28-30 日 .

再生組織構築研究部門
Department of Regeneration Science and Engineering
再生免疫学分野
Laboratory of Immunology

教 授	河本 宏	Prof.	Hiroshi Kawamoto
准教授	宮崎 正輝	Assoc. Prof.	Masaki Miyazaki
助 教	増田 喬子	Assist. Prof.	Kyoko Masuda

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

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

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

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

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

に遺伝子改変を加えた。すると、NK 細胞による殺傷が起こらなくなった。

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

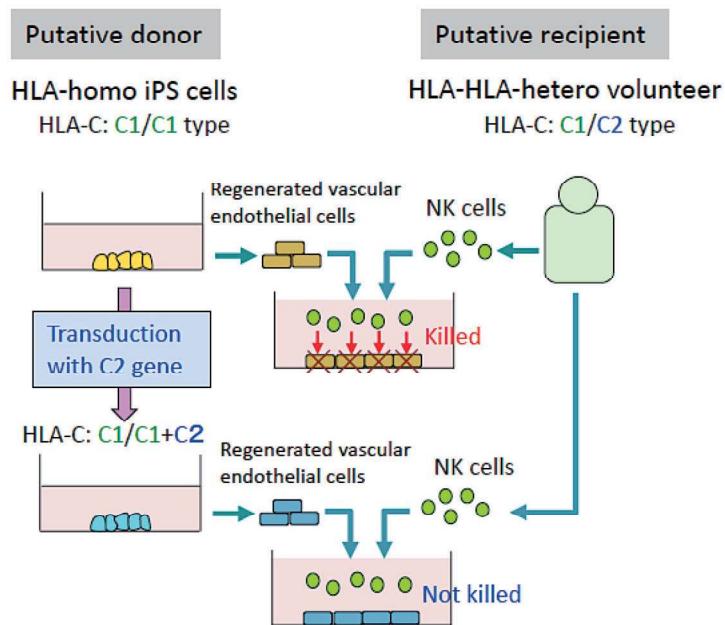


Fig. 1 NK cells from a KIR-ligand mismatched HLA-hetero person exerted cytotoxicity against regenerated tissue derived from HLA haplotype-homozygous iPS cells based on missing-self recognition, but such cytotoxicity was cancelled when missing HLA-C2 gene is over-expressed in the regenerated cells.

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

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

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

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

List of Publications

- Miyai, T., Takano, J., Endo, TA., Kawakami, E., Agata, Y., Motomura, Y., Kubo, M., Kashima, Y., Suzuki, Y., Kawamoto, H., Ikawa, T. (2018). Three-step transcriptional priming that drives the commitment of multipotent progenitors toward B cells. **Genes Dev.** 32 (2), 112-126.
- Tenno, M., Kojo, S., Lawir, DF., Hess, I., Shiroguchi, K., Ebihara, T., Endo, TA., Muroi, S., Satoh, R., Kawamoto, H., Boehm, T., Taniuchi, I. (2018). Cbf β 2 controls differentiation of and confers homing capacity to prethymic progenitors. **J Exp Med.** 215, 595-610.
- 河本宏、増田喬子 (2018). iPSC 細胞から再生した細胞に対して NK 細胞が引き起こす免疫反応 日本移植学会学会誌『移植』移植免疫の最前線 52, 505-515.
- Kawamoto, H., Masuda, K., Nagano, S., and Maeda, T. (2018). Cloning and expansion of antigen-specific T cells using iPS cell technology: development of “off-the-shelf” T cells for the use in allogeneic transfusion settings. **Int J Hematol.** 107 (3), 271-277.
- 宮崎正輝、宮崎和子 (2018). 転写因子 E-Id タンパク質の制御軸が獲得系リンパ球の分化を規定し、自然リンパ球との分化の分岐点を制御する 医学のあゆみ Vol.264 No.12, 1056-1057.
- 宮崎正輝、宮崎和子 (2018). E 蛋白質-ID 蛋白質の制御軸が T 細胞のアイデンティティを規定し胸腺における自然リンパ球の分化を抑制する 臨床免疫・アレルギー科 69, 225-232.
- Kawamoto, H., Masuda, K., Nagano, S. (2018). Cloning and expansion of antigen-specific T cells using iPSC cell technology: Possible use of regenerated T cells in personalized medicine. **Personalized Medicine Universe.** 7, 7-12.
- 永野誠治 (2018). iPSC 細胞技術のがん免疫療法への応用の可能性 炎症と免疫 2018 年 9 月号 vol.26

No.5.

List of Presentations

海外でのシンポジウム招待講演

Kawamoto, H. Generation of CTLs from iPSCs transduced with TCR genes: toward the development of “off-the-shelf T cells. Eradicate Cancer 2018. Melbourne, March 15-17, 2018.

Kawamoto, H. Generation of CTLs from iPSCs transduced with TCR genes: toward the development of “off-the-shelf T cells. Thym Oz. Heron Island, Australia, March 21-26, 2018.

Miyazaki, M. The E-Id protein axis specifies the adaptive versus innate lymphoid cell fate. Yale University, August 24, 2018.

海外での一般演題

Kashima, S. WT1-specific cytotoxic T lymphocytes regenerated from T cell-derived iPS cells exert therapeutic effect in xenograft model of renal cellcarcinoma. Keystone symposia Lymphocytes and their Roles in Cancer (R1) joint with the meeting on Emerging Cellular Therapies: T Cells and Beyond (B6). Keystone resort, USA, February 12-15, 2018.

Nagano, S. Selection process of the optimal T-iPSC clone from among clones derived from T cells specific to melanoma antigen MART-1. Thym Oz. Heron Island, Australia, March 21-26, 2018.

Nagahata, Y. Epigenetic mechanisms for the repression of myeloid potential in T cell progenitors. Thym Oz. Heron Island, Australia, March 21-26, 2018.

国内でのシンポジウム招待講演

河本宏 T 細胞の発生と再生 -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 3 回日本骨免疫学会ウインターセミナー、軽井沢、2018 年 1 月 25-27 日

河本宏 iPSC 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即納 T 細胞製剤の開発— 第 28 回日本サイトメトリー学会学術集会、東京、2018 年 5 月 26 日（教育講演）

河本宏 iPSC 細胞技術を用いた WT1 抗原特異的キラー T 細胞の作製—他家移植の系で使える即納 T 細胞製剤の開発— 日本免疫・細胞治療セミナー 2018、東京、2018 年 6 月 9 日（セミナー）

河本宏 iPSC 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即納 T 細胞製剤の開発— 第 5 回神戸血液疾患症例検討会、神戸、2018 年 6 月 22 日

河本宏 iPSC 紹介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即納 T 紹介製剤の開発— 再生医療エキスパートレクチャー、金沢、2018 年 7 月 7 日（代役）

Kawamoto, H. Regeneration of antigen-specific T cells using the iPS cell technology. The 1st International Symposium on NEO-SELF. Awaji, Japan, July 10-12, 2018.

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—他家移植用“off-the-shelf” T 細胞製剤の開発— 第 18 回神戸がん研究会、神戸、2018 年 10 月 31 日

河本宏 iPS 細胞技術を用いたがん抗原特異的 CTL の量産—即納型 T 細胞製剤の開発に向けて— 第 46 回日本臨床免疫学会総会、軽井沢、2018 年 11 月 8-10 日

国内での一般演題

嘉島相輝 iPS 細胞技術を用いた WT1 抗原特異的再生キラー T 細胞の腎細胞癌に対する抗腫瘍効果 新学術領域ネオセルフ「若手の会」、淡路、2018 年 1 月 9-10 日

長畠洋佑 T 前駆細胞におけるミエロイド分化能のエピジェネティックな抑制機構 新学術領域ネオセルフ「若手の会」、淡路、2018 年 1 月 9-10 日

嘉島相輝 iPS 細胞技術を用いた WT1 特異的再生キラー T 細胞は WT1 陽性腎細胞癌の増殖を抑制する 第 27 回泌尿器分子・細胞研究会、東京、2018 年 2 月 2 日

嘉島相輝、前田卓也、永野誠治、増田喬子、井上高光、小林恭、山崎俊成、小川修、羽渕友則、河本宏 iPS 細胞由来再生キラー T 細胞療法の固形癌への応用へ向けた基盤技術の開発 Kyoto Basic Science Forum 2018、京都、2018 年 4 月 6 日

Kashima, S., Maeda, T., Nagano, S., Masuda, K., Inoue, T., Kobayashi, T., Yamasaki, T., Ogawa, O., Habuchi, T., Kawamoto, H. WT1-specific cytotoxic T lymphocytes regenerated from T cell-derived iPS cells exert therapeutic effect in WT1-expressing renal cell carcinoma. 第 106 回日本泌尿器科学会総会、京都、2018 年 4 月 19-22 日

長畠洋佑 T 前駆細胞におけるミエロイド分化能のエピジェネティックな抑制機構 第 28 回 Kyoto T Cell Conference、京都、2018 年 6 月 15 日

Nagano, S. iPSCs transduced with TCR gene give rise to potent CTLs with antigen specific cytotoxic activity. 第 22 回日本がん免疫学会総会、岡山、2018 年 8 月 1 日 -3 日

長畠洋佑 Epigenetic mechanisms for the repression of myeloid potential in T cell progenitors. 第 47 回日本免疫学会学術集会、福岡、2018 年 12 月 10-12 日

永野誠治 Generation of CTLs from iPSCs transduced with TCR genes: toward the development of “off-the-shelf T cells” 第 47 回日本免疫学会学術集会、福岡、2018 年 12 月 10-12 日

宮崎正輝、宮崎和子、河本宏 A Synergistic role of E2A and Notch signaling upon T cell lineage commitment. 第 47 回日本免疫学会総会、福岡、2018 年 12 月 10-12 日

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

本研究分野は筋骨格系の増殖分化機構と炎症病態を理解することで、軟部組織や骨軟骨の病態機構を分子レベルで明らかにし、それに基づき新規の治療法を開発することを目標としている。現在、以下のテーマについて研究を遂行している。

1. 間葉系幹細胞に関する研究

骨髓間質細胞の中には、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、そのさらなる理解が必須である。我々は京都大学医学部整形外科学教室との共同研究として、MSC の初代培養を行い、増殖及び分化能に関する解析を行っている。

2. 多能性幹細胞を用いた間葉系組織の研究

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

1) 肉腫起源細胞の探索

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

2) 疾患特異的 iPS 細胞を用いた病態解明と創薬

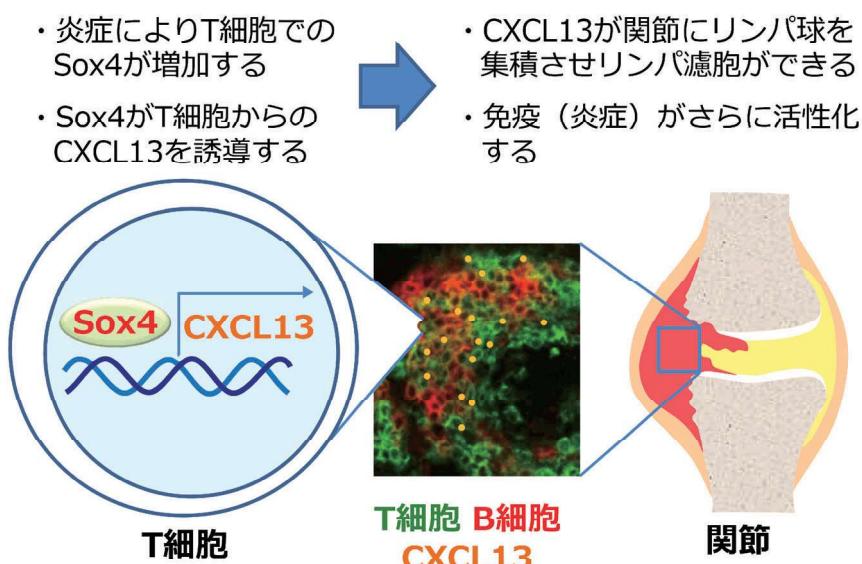
遺伝性の骨軟骨系疾患の多くは、病態が不明で有効な治療法が確立されていない。特定の個人か

ら樹立できるという iPS 細胞の特質を利用して、近年、疾患罹患者由来の iPS 細胞を樹立して病態解明から創薬に向けた研究が展開されている。我々は難治性骨軟骨疾患の 1 つである進行性骨化性線維異形成症（FOP）に対して病態解明と治療薬の探索を行った。FOP に認められる I 型 BMP 受容体の 1 つである ALK2 の FOP 型変異に対し、悪性腫瘍などに対し使用されている mTOR シグナル阻害剤、シロリムスが有効であることを見出し、平成 29 年 9 月より FOP に対するシロリムスの多施設共同二重盲検医師主導型治験を京都大学を皮切りに実施している。

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

3. 炎症局所におけるヒト T 細胞に関する研究

関節リウマチは全身性に関節腫脹から変形へと至る免疫の異常による疾患で、先行研究ではリンパ球を集積させる因子である CXCL13 を産生する PD-1^{hi}CXCR5⁻ の表現型を示すヘルパー T (peripheral helper T: Tph) 細胞が病態に重要な役割を果たすことが知られていたが、どの様な転写因子がその病態機構に関与しているのか不明であった。本研究室では転写因子の同定を試み、CXCL13 産生 Tph 細胞が誘導される条件にて発現が増加する遺伝子を探索することにより、転写因子 Sox4 が Tph 細胞の病態機構に重要な働きをすることを見出した（図）。本研究成果により、Tph 細胞の炎症局所における分子病態の一端が明らかになり、将来的に関節リウマチをはじめとした、免疫・炎症に関係する病気に対する新しい治療の開発が期待される。



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

1. Researches on mesenchymal stem cells

Mesenchymal stem cells (MSC), which exist in bone marrow stromal tissues, have a potential to differentiate to cells of various types in mesenchymal tissues. Many fundamental features of MSCs, however, are still unknown, which are crucial for the development of regeneration therapy using MSC as the evidence based medicine. In collaboration with the Department of Orthopaedic Surgery in Kyoto University Hospital, we have analyzed the growth and differentiation potential of primary human MSCs.

2. Researches on mesenchymal tissues using pluripotent stem cells

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

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

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

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

In most of cases, the pathophysiology in hereditary musculoskeletal diseases is still to be investigated and no effective treatments are available. Using the advantage that iPS cells can be established from particular individuals, a number of disease-specific iPS cells have been established and used to understand the disease and discover the drugs. We have discovered novel molecular mechanisms and obtained the key for drug discovery in one of such diseases, fibrodysplasia ossificans progressive. We have identified an mTOR inhibitor, rapamycin, as a candidate treatment for FOP. Multicenter double-blinded investigator-initiated clinical trial of rapamycin for FOP has started from September 2017.

We started new AMED project “Development and Application of Innovative Drug-screening Technology Using Patient Derived iPS Cells for Intractable Bone and Cartilage Diseases” from this year. Using a newly

developed stable and rapid protocol for engineering osteo-lineage cells from iPSCs, we are now investigating the pathogenesis of intractable bone and cartilage diseases, including Osteogenesis Imperfecta, aiming drug discovery. Furthermore, we have succeeded three-dimensional visualization of the bone-like nodule formation by the collaboration with Prof. Adachi of Infront, which will help us to understand how osteogenic lineage cells such as osteoblasts and osteocytes develop and also to investigate the pathology of bone-forming diseases.

3. Researches on human T cells of inflammatory environments

Previous reports showed that chemokine CXCL13-producing PD-1^{hi}CXCR5⁻CD4⁺ T (peripheral helper T: Tph) cells play crucial roles in rheumatoid arthritis (RA), a systemic autoimmune disease leading to multiple joint deformities. However, little was known about transcription factors regulating the pathological function of Tph cells. Our efforts to identify the transcription factors lead to the finding that Sox4 is the transcription factor responsible for CXCL13 production by Tph cells in inflamed environments (fig). This clarification of Tph molecular functions in inflammatory environments would result in the development of new treatments for diseases relating immune systems and inflammation such as RA.

List of Publications

- Hino. K., Zhao. C., Horigome. K., Nishio. M., Okanishi. Y., Nagata. S., Komura. S., Yamada. Y., Toguchida. J., Ohta. A., Ikeya. M. (2018). An mTOR Signaling Modulator Suppressed Heterotopic Ossification of Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. **Stem Cell Reports.** *11*, 1106-1119.
- Yoshitomi. H., Kobayashi. S., Miyagawa-Hayashino. A., Okahata. A., Doi. K., Nishitani. K., Murata. K., Ito. H., Tsuruyama. T., Haga. H., Matsuda. S., Toguchida. J. (2018). Human Sox4 facilitates the development of CXCL13-producing helper T cells in inflammatory environments. **Nat Commun.** *9*, 3762.
- Nakajima, T., Shibata, M., Nishio, M., Nagata, S., Alev, C., Sakurai, H., Toguchida, J., Ikeya, M. (2018). Modeling human somite development and fibrodysplasia ossificans progressiva with induced pluripotent stem cells. **Development.** *145*, pii: dev165431.
- Tanaka, K., Ogawa, G., Mizusawa, J., Naka, N., Kawai, A., Takahashi, M., Hiruma, T., Matsumoto, Y., Tsuchiya, H., Nakayama, R., Hatano, H., Emori, M., Hosaka, M., Yoshida, Y., Toguchida, J., Abe, S., Asanuma, K., Yokoyama, R., Hiraga, H., Yonemoto, T., Morii, T., Matsumoto, S., Nagano, A., Yoshikawa, H., Fukuda, H., Ozaki, T., Iwamoto, Y. (2018). Prospective comparison of various radiological response criteria and pathological response to preoperative chemotherapy and survival in operable high-grade soft tissue sarcomas in the Japan Clinical Oncology Group study JCOG0304. **World J Surg Oncol.** *16*, 162.
- Kawai, A., Goto, T., Shibata, T., Tani, K., Mizutani, S., Nishikawa, A., Shibata, T., Matsumoto, S., Nagata,

K., Narukawa, M., Matsui, S., Ando, M., Toguchida, J., Monden, M., Heike, T., Kimura, S., Ueda, R. (2018). Current state of therapeutic development for rare cancers in Japan, and proposals for improvement. **Cancer Sci.** 2109, 1731-1737.

Sakaue, S., Hirata, J., Maeda, Y., Kawakami, E., Nii, T., Kishikawa, T., Ishigaki, K., Terao, C., Suzuki, K., Akiyama, M., Suita, N., Masuda, T., Ogawa, K., Yamamoto, K., Saeki, Y., Matsushita, M., Yoshimura, M., Matsuoka, H., Ikari, K., Taniguchi, A., Yamanaka, H., Kawaji, H., Lassmann, T., Itoh, M., Yoshitomi, H., Ito, H., Ohmura, K., R Forrest, AR., Hayashizaki, Y., Carninci, P., Kumanogoh, A., Kamatani, Y., de Hoon, M., Yamamoto, K., Okada, Y. (2018). Integration of genetics and miRNA-target gene network identified disease biology implicated in tissue specificity. **Nucleic Acids Res.** 46, 11898-11909.

Azukizawa, M., Ito, H., Hamamoto, Y., Fujii, T., Morita, Y., Okahata, A., Tomizawa, T., Furu, M., Nishitani, K., Kuriyama, S., Nakamura, S., Yoshitomi, H., Nakatani, T., Tsuboyama, T., Hamaguchi, M., Matsuda, S., Yasuda, T. (2018). The Effects of Well-Rounded Exercise Program on Systemic Biomarkers Related to Cartilage Metabolism. (2018). **Cartilage.** Epub ahead of print.

Morita, Y., Ito, H., Ishikawa, M., Fujii, T., Furu, M., Azukizawa, M., Okahata, A., Tomizawa, T., Kuriyama, S., Nakamura, S., Nishitani, K., Yoshitomi, H., Matsuda, S. (2018). Subchondral bone fragility with meniscal tear accelerates and parathyroid hormone decelerates articular cartilage degeneration in rat osteoarthritis model. (2018). **J Orthop Res.** 36, 1959-1968.

Masamoto, K., Otsuki, B., Fujibayashi, S., Shima, K., Ito, H., Furu, M., Hashimoto, M., Tanaka, M., Lyman, S., Yoshitomi, H., Tanida, S., Mimori, T., Matsuda, S. (2018). Factors influencing spinal sagittal balance, bone mineral density, and Oswestry Disability Index outcome measures in patients with rheumatoid arthritis. **Eur Spine J.** 27, 406-415.

Nagai, H., Shin, M., Weng, W., Nakazawa, F., Jakt, LM., Alev, C., Sheng, G. (2018). Early hematopoietic and vascular development in the chick. **Int J Dev Biol.** 62, 137-144.

日野恭介、戸口田淳也、池谷真 (2018) 整形外科学 FOP 患者由来 iPS 細胞を用いた創薬 (解説)
医学のあゆみ 266, 796-797

戸口田淳也 (2018) 進行性骨化性線維異形成症 別冊 **Bio Clinica: 慢性炎症と疾患** 7, 16-19

戸口田淳也 (2018) 健康長寿社会をめざす iPS 細胞研究の展開 調査研究ジャーナル 7, 52-57

List of Presentations

戸口田淳也 iPS 細胞を使って「ホネ」の病気に挑む！ ナレッジキャピタル超学校 大阪、2018
年 1 月 22 日

戸口田淳也 iPS 細胞を活用した病態解明から創薬 iPS 細胞実用化勉強会、横浜、2018 年 1 月 24
日

戸口田淳也 iPS 創薬 FOP の医師主導治験について AMED 再生医療公開シンポジウム品川、
2018 年 2 月 6 日

戸口田淳也 骨軟骨疾患に対する iPS 細胞創薬について 第 4 回再生医療産業化展、大阪、2018 年
2 月 21 日

戸口田淳也 多能性幹細胞の肉腫研究への応用 第 1 回日本サルコーマ治療研究学会、東京、2018
年 2 月 24 日

戸口田淳也 iPS 細胞を用いた *in vitro* 骨様組織の作製と応用 医工学フォーラム、京都、2018 年 2
月 28 日

Toguchida J, Hino K, Horigome K, Nishio M, Komura S, Nagata S, Jin Y, Kawakami K, Yamada Y, Ohta A,
Ikeya M. Enhanced mTOR signaling triggered by Activin-A in chondrogenesis of fibrodysplasia
ossificans progressive Orthopaedic Research Society 2018 Annual Meeting, New Orleans, 11 March,
2018

戸口田淳也 京都大学 iPS 細胞研究所での取組みについて 湘南ヘルスイノベーションパーク開所
記念フォーラム、藤沢、2018 年 4 月 13 日

戸口田淳也 iPS 細胞を活用した病態再現から創薬 第 106 回日本泌尿器科学会総会、京都、2018
年 4 月 20 日

戸口田淳也 ヒト iPS 細胞の医療応用の現況と展望 第 3 回 BJRF in Japan、東京、2018 年 5 月 19
日

戸口田淳也 iPS 細胞を活用した病態再現から創薬へ Cell Medicine & Cel Culure Conference、東京、
2018 年 6 月 5 日

戸口田淳也 iPS 細胞を活用した病態解明から創薬について 天理よろず相談所医学研究所学術講
演会、天理、2018 年 6 月 14 日

戸口田淳也 iPS 細胞を活用した難治性疾患に対する創薬 第 4 回日本骨免疫学会、2018 年 6 月 25
日

戸口田淳也 iPS 細胞を活用した病態再現から創薬へ 第 17 回 Bio tech 2018 バイオ・ライフサイエ
ンス研究展、東京、2018 年 6 月 28 日

Toguchida J iPSC-based disease modeling and drug discovery for skeletal diseases 12th Catholic
International Stem Cell Symposium、Seoul, 29 June, 2018

戸口田淳也 有痛性運動器疾患の治療に対する iPS 細胞技術の応用 - 痛みに対する薬物治療の次を
見据えて、第 9 回京整会大阪病診連携の会、大阪、2018 年 7 月 21 日

戸口田淳也 疾患特異的 iPS 細胞を活用した病態解析から創薬 第 36 回日本骨代謝学会、長崎、
2018 年 7 月 26 日

戸口田淳也 異所性骨化と炎症:FOP をモデルとして 第36回日本骨代謝学会、長崎 2018年7月
28日

Toguchida J Application of iPS cell technology for bone diseases 第15回 Bone Biology Forum、千葉、
2018年8月17日

戸口田淳也 疾患特異的iPS細胞を使用した病態再現から創薬 AMED再生医療研究交流会、東京
2018年9月12日

戸口田淳也 iPS細胞を活用した病態解明から創薬について 愛知医科大学大学院特別講義、長久
手、2018年9月20日

戸口田淳也 疾患特異的iPS細胞を活用した病態解析から創薬 第91回日本生化学学会大会、京
都、2018年9月21日

Toguchida J Current status and future perspective of iPS cell research and application HIGO Program:
Governmental Seminar、熊本、2018年10月4日

戸口田淳也 整形外科基礎領域へのiPS細胞の応用 第33回日本整形外科学会基礎学術集会、奈
良、2018年10月11日

Toguchida J Application of iPS cells for disease modeling and drug discovery 第13回 International
Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences、福岡、2018年10月19日

戸口田淳也 iPS細胞を用いた難治性骨軟骨疾患への挑戦 第312回大阪臨床整形外科医会研修会、
大阪、2018年10月27日

Toguchida J Disease-specific iPS cells disclose the novel pathomechanism and provide a platform for
clinical trial for patients with FOP 第12回 International BMP Conference、東京、2018年10月28
日

戸口田淳也 iPS細胞を活用してFOPを治す 第12回 International BMP Conference、東京、2018年
10月28日

戸口田淳也 運動器疾患に対するiPS細胞技術の応用 モーラスパップ30mg発売30周年記念講演
会、福岡、2018年11月11日

戸口田淳也 骨軟骨疾患へのiPS細胞の医療応用 奈良県整形外科研究会、樋原、2018年11月24
日

戸口田淳也 iPS細胞を活用した病態解明からの創薬 島津最新医用技術ソリューションセミナー
2018 in Nagoya、名古屋、2018年12月15日

吉富啓之、川井俊介、戸口田淳也 運動器疾患に対するiPS細胞研究の進歩 iPS細胞を用いた新規
骨分化誘導法による難治性骨疾患の病態解明と創薬 第33回日本整形外科学会基礎学術集会、
奈良、2018年10月12日

玉置さくら、永田早苗、吉富啓之、湯川愛友、宗圓充、鎌倉武史、金永輝、戸口田淳也：In vitroにおける長期的な SS18-SSX 融合タンパクの機能評価方法の開発 第51回日本整形外科学会骨・軟部肉腫学術集会、静岡、2018年7月12-13日

Kawai S, Yoshitomi H, Junko S, Alev C, Nagata S, Nishio M, Hada M, Adachi T, Fukiage K, Matsuda S, Toguchida J. Visualization of bone-like nodule formation using human induced pluripotent stem cells Orthopaedic Research Society 2018, New Orleans, March 10-13, 2018

川井俊介、吉富啓之、須長純子、アレブジヤンタッシュ、永田早苗、西尾恵、羽田匡孝、吹上謙一、安達泰司、松田秀一、戸口田淳也 創薬応用を目指したヒト iPS 細胞による in vitro 骨形成過程再現系の構築 第17回日本再生医療学会、横浜、2018年3月21-23日

川井俊介、吉富啓之、松田秀一、戸口田淳也 創薬応用を目指したヒト iPS 細胞による in vitro 骨形成過程再現系の構築 第36回日本骨代謝学会学術集会、長崎、2018年7月26-28日

Kawai, S., Yoshitomi, H., Sunaga, J., Alev, C., Nagata, S., Nishio, M., Hada, M., Fukiage, K., Adachi, T., Matsuda. S., Toguchida, J. Engineering bone-like nodules from human iPS cells as a research platform for bone biology 5th TERMIS World Congress 2018, Kyoto, September 4-7, 2018

川井俊介、吉富啓之、須長純子、アレブジヤンタッシュ、永田早苗、西尾恵、羽田匡孝、吹上謙一、安達泰司、松田秀一、戸口田淳也 創薬応用を目指したヒト iPS 細胞による in vitro 骨形成過程再現系の構築 第33回日本整形外科学会基礎学術集会、奈良、2018年10月11-12日

川井俊介、樋本玲菜、戸口田淳也 iPS 細胞を活用した後縦靭帯骨化症の病態解析 H30年度第2回 OPLL 班会議基礎班：後縦靭帯骨化症に対する骨化制御機構の解明と治療法開発に関する研究班ミーティング、東京、2018年11月24日

鎌倉武史、金永輝、玉置さくら、渡辺真、岡本健、吉富啓之、戸口田淳也：軟骨形成性腫瘍における変異型 IDH の機能的意義について 第51回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会、静岡、2018年7月12-13日

宗圓充、玉置さくら、湯川愛友、鎌倉武史、金永輝、岡本健、吉富啓之、戸口田淳也：滑膜肉腫における FZD10 を介したシグナル伝達経路とその生物学的意義の解析 第51回骨軟部腫瘍学会、静岡、2018年7月12-13日

土井 浩平、吉富 啓之、伊藤 宣、岡田 随象、松田 秀一 炎症環境下 CD4 陽性 T 細胞におけるエピゲノム制御因子解析 日本国リウマチ学会総会、第62回日本リウマチ学会総会・学術集会抄録集、東京、2018年4月26日

Matsuda, M., Yamanaka, Y., Uemura, M., Osawa, M., Saito, M., Ikeya, M., Yamamoto, T., Yoshitomi, H., Woltjen, K., Ebisuya, M., Toguchida, J., Alev, C. Recapitulation of human somitogenesis and segmentation clock with pluripotent stem cells. EMBL/EMBO Symposium - Organoids: Modeling Organ Development and Disease in 3D Culture, Heidelberg, Germany, September 10-13, 2018

Matsuda, M., Yamanaka, Y., Uemura, M., Osawa, M., Saito, M., Ikeya, M., Yoshitomi, H., Yamamoto, T., Woltjen, K., Ebisuya, M., Toguchida, J., Alev, C. Modeling the segmentation clock with pluripotent stem cells. Development 2018 Meeting – From Stem Cells to Human Development, Wotton House, Surrey, UK, September 23-26, 2018

岡本健、松田秀一、戸口田淳也、梅田雄嗣、足立壮一 再発骨肉腫に対する化学療法の有用性の検討 第51回日本整形外科学会学術総会、静岡、2018年7月13日

岡本健、坂本昭夫、松田秀一、戸口田淳也 再発例から検討した atypical lipomatous tumor の治療戦略 第91回日本整形外科学会学術総会、神戸、2018年5月26日

岡本健、坂本昭夫、松田秀一、戸口田淳也 転移性骨腫瘍の局所治療戦略 第130回中部日本整形外科災害外科・学術集会 松山、2018年4月20-21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 Assoc. 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な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うる“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できます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 are should facilitate cell proliferation and cell dedifferentiation, leading to regeneration of organs completely composed of cells derived from patients.

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

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

List of Publications

Nakamura, T., Inada, Y., Shigeno, K. (2018) Artificial sensory organs: latest progress. **J Artif Organs.** 21,

17-22.

Kaneko, M., Tsuji, T., Kishimoto, Y., Sugiyama, Y., Nakamura, T., Hirano, S. (2018) Regenerative effects of basic fibroblast growth factor on restoration of thyroarytenoid muscle atrophy caused by recurrent laryngeal nerve transection. **J Voice**. 32: 645-651.

Muranishi, Y., Sonobe, Y., Hamaji, M., Kawaguchi, A., Hijiya, K., Motoyama, H., Menju, T., Aoyama, A., Chen-Yoshikawa, TF., Sato, T., Date, H. (2018) Surgery for metachronous second primary lung cancer versus surgery for primary lung cancer: a propensity score-matched comparison of postoperative complications and survival outcomes. **Interact Cardiovasc Thorac Surg**. 26: 631-637.

Muranishi, Y., Sato, T., Ueda, Y., Yutaka, Y., Sakaguchi, Y., Nakamura, T., Date, H. (2018) A novel suction-based lung-stabilizing device for video-assisted thoracoscopic surgical procedures. **J Thorac Dis**. 10: 1081-1083.

Shionoya, Y., Sunada, K., Tsujimoto, G., Shigeno, K., Nakamura, T. (2018) Ethanol-induced cervical sympathetic ganglion block applications for promoting canine inferior alveolar nerve regeneration using an artificial nerve. **J Vis. Exp.** 141: e58039.

稻田有史 (2018) 献血後神経障害性疼痛の予防策を提唱、病院のリスクマネジメント 最前線～患者の安全確保を目指す取り組み事例～、7、MSD 株式会社。

List of Presentations

中村達雄：人工神経を用いた再生治療と *in situ* Tissue Engineering. 第 46 回日本歯科麻酔学会総会・学術集会. 奈良、2018 年 10 月 7 日. 招待講演.

中村達雄：人工神経管による生体内再生治療の理論. 第 63 回 (公社) 日本口腔外科学会総会・学術大会. 千葉、2018 年 11 月 4 日.

中村達雄：生体内再生 (*in situ* Tissue Engineering) と人工気管の開発. 第 57 回西部呼吸器疾患懇話会. 倉敷、2018 年 12 月 21 日.

茂野啓示：修復治療の成功要件. 日本臨床歯科医学会新潟支部 講演. 新潟、2018 年 3 月 3 日.

茂野啓示：修復治療前準備のための歯周形成外科. 日本臨床歯科医学会福岡支部 講演. 福岡、2018 年 4 月 22 日.

茂野啓示：審美修復治療の成功要件. スタディクラブ熊本三水会 講演. 熊本、2018 年 7 月 1 日.

Nakai R, Azuma T, Togaya T, Iwata H:Analysis of the relationship between mandibular joint motion trajectory and masticatory muscle properties (volume, shape, T1&T2 value) with MR dynamic imaging. Joint Annual Meeting International Society of Magnetic Resonance in Medicine - European Society for Magnetic Resonance in Medicine and Biology 2018, Paris, 2018.6.18.

Nakai R, Azuma T, Toda M, Kodata T, Iwata H:Development and evaluation of a single-phase alloy with magnetic susceptibility equivalent to that of mammalian tissue for coil embolization of a cerebral aneurysm. Joint Annual Meeting International Society of Magnetic Resonance in Medicine - European Society for Magnetic Resonance in Medicine and Biology 2018, Paris, 2018.6.18.

浪田和樹、東 高志、小林哲：バイオニックアームに向け MRIに基づく前腕回転運動の解析に基づく前腕回転運動の解析. 電子情報通信学会 ME とバイオサネティックス研究会、北海道、2018 年 6 月 30 日.

奥畠志帆、古橋直也、東 高志、中井隆介、小林哲：拡散 MRIに基づく淡蒼球内節・外節の自動セグメンテーションに関する検討. 第 2 回ヒト脳イメージング研究会、東京、2018 年 9 月 7-8 日.

中井隆介、山口誠二、戸田満秋、東 高志、高玉博朗：物質の化学組成による磁化率アーチファクト変化の解析. 第 46 回日本磁気共鳴医学会大会、金沢、2018 年 9 月 7-9 日.

東 高志、奥畠志帆、中井隆介、古橋直也、小林哲生：3T-MRI を用いた基底核組織の高分解 3D イメージング. 第 46 回日本磁気共鳴医学会大会、金沢、2018 年 9 月 7-9 日.

Nakamoto, Y., Tsujimoto, G., Ikemoto, A., Nakamoto, M., Ozawa, T., Nakamura, T.: Sequential evaluation of pathological changes following spinal cord injury in a canine model. the 19th International Congress of Neuropathology, Tokyo, 2018.9.24.

稻田有史：重度四肢外傷診療－傷病者の 10 年・20 年後を見据えた治療戦略. 重度四肢外傷診療に関する講演会、兵庫県、2018 年 2 月 24 日.

Inada, Y.: 『In Situ-Tissue Engineering for Peripheral Nerve Regeneration』 末梢神経の生体内再生治療について、第 21 回脊椎と神経を語る会 The Study Group for Nerve and Spine、東京都、2018 年 3 月 24 日.

稻田有史：『なぜちっぽけな外傷が、中枢感作を惹起するのか？－末梢総和仮説提唱と日本赤十字社 150 万人前向き多施設検討結果－』、第 15 回神経因性疼痛研究会、東京都、2018 年 4 月 27 日.

稻田有史：『静脈穿刺後疼痛のミステリー 関西圏日本赤十字社 150 万人多施設前向き研究から』、第 9 回福島県痛みを考える会、福島県、2018 年 5 月 12 日.

稻田有史：『避けられた上肢機能障害－長期成績からの逆説的考察－』、第 19 回千葉手・肘の外科研究会、千葉県、2018 年 6 月 29 日.

稻田有史：『重度下肢損傷の再建－長期観察からの逆説的考察－』 南薩整形外科学術講演会、鹿児島県、2018 年 9 月 7 日.

稻田有史、中村達雄、諸井慶七郎、森本 茂：指神経損傷後神経因性疼痛 (NP) 並びに CRPS type II に対する PGA-Collagen tube を用いた生体内治療の長期成績. 第 61 回日本手外科学会学術

集会、東京都、2018年4月27日。

稲田有史、萩原祐介、中村達雄、諸井慶七郎、森本 茂：Painful leg and moving toes を呈した阻血性の後脛骨神経不全麻痺の2例、第16回整形外科痛みを語る会、三重県、2018年6月23日。

萩原祐介、稲田有史、中村達雄、諸井慶七郎、森本 茂：下肢 CRPS 様症状を呈した破格筋による後脛骨神経不全麻痺の2例、第16回整形外科痛みを語る会、三重県、2018年6月23日。

稲田有史、萩原祐介、中村達雄、諸井慶七郎、森本 茂：『Painful leg and moving toes を呈した阻血性の後脛骨神経不全麻痺の2例』、第9回日本末梢神経学会学術集会、山口県、2018年9月7日。

萩原祐介、稲田有史、中村達雄、諸井慶七郎、森本 茂：『下肢 CRPS 様症状を呈した破格筋による後脛骨神経不全麻痺の2例』、第9回日本末梢神経学会学術集会、山口県、2018年9月7日。

【角グループ】

私たちのグループでは、内分泌・代謝疾患に対する再生医療の研究を使命としており、糖尿病の再生医療を中心的な研究テーマとして、全世界で増加している糖尿病に対して、希望すればいつでも受けられる安全で根治的な治療法の開発を目指して研究を行っている。具体的な研究内容としては、長年研究を続けているバイオ人工膵島の実用化に向けた研究、各種の幹細胞等を用いた新しい糖尿病治療用細胞資源の探索、および、これらの作成に不可欠な周辺技術の研究開発である。さらに、近年は、細胞の三次元培養法の研究開発から、糖尿病治療に不可欠の膵島の研究に加えて、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できるとなる。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。私たちのグループでは、株式会社クラレから異物反応が非常に軽微なエバールの多孔質膜の提供を受けて、この膜でバッグを作成し、これに、温度感応性にゲル化するキトサン溶液に懸濁した膵島を充填するマクロカプセル化法を考案し、皮下血管新生前処置と組み合わせるなどして、これを皮下に移植する治療法の妥当性を検証している。これが実現すれば、細胞を漏らすことなく回収・交換することも可能となり、異種膵島移植にも応用が可能となるばかりか、腫瘍形成などが危惧される未分化細胞から分化誘導した膵島やその他の代謝・内分泌組織にも応用可能となるなど、幅広い応用範囲があると、各方面から期待を集めている。

その他の研究

これまでの研究成果として、高品質の細胞集塊を簡便かつ効率的に作製する培養面を開発し、株

式会社クラレから Elplasia MP500c 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。

また、細胞集塊の臨床応用において必要となる細胞集塊の凍結／解凍法の研究開発や、独自に開発した電気的細胞融合技術を応用して、癌免疫療法や糖尿病治療に使える融合細胞の効率的な作製法も研究しており、いずれも、その実用化に向けて各方面から期待を集めている。

[Sumi Group]

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

Studies on macro-encapsulation

Encapsulating islets in immune-isolating gel enables islet transplantation without immune suppression. Micro-encapsulation used to be studied mainly. However, micro-capsules are not retrievable and fibrous membrane formation due to foreign body reaction hampers their long-term function. Our group made bags with EVOH membrane (provided by Kuraray) that was proved to cause minimal foreign body reaction and islets suspended in chitosan solution that gels in temperature-sensitive manner are packed in a EVOH bag. This macro-capsule can be transplanted into subcutaneous site, in addition to abdominal cavity, with some modifications such as neovascularization induction. This method under validation will enable allo- and xenotransplantation 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 MP500c 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.

Additionally, freezing/thawing methods of cell spheres, that is needed for clinical application of cell spheres, and fusion cells for cancer immune therapy and diabetes therapy based on our own electrofusion

technique are also studied, gathering expectations for practical realization.

List of Publications

Yang KC, Yanai G, Yang SY, Canning P, Satou Y, Kawagoe M, Sumi S. Low-adhesive ethylene vinyl alcohol-based packaging to xenogeneic islets encapsulation for type 1 diabetes treatment. Biotechnology and Bioengineering 115 (9):2341-2355, 2018.

Huang TL, Yang CH, Yanai G, Liao JY, Sumi S, Yang KC*. Synergistic effect of L-ascorbic acid and hyaluronic acid on the modulation of matrix metalloproteinase-3 and -9 in human chondrocytes. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2018 106 (5):1809-1817, 2018.

Sumi S. Editorial: Self-condensation culture for vascularized organoid. Ann Transl Med 2018;6 (Suppl 1):S15, 2018. doi: 10.21037/atm.2018.09.12

角 昭一郎. 第5章 脇島など細胞集塊の作製技術. 再生医療・創薬のための3次元細胞培養技術. 紀ノ岡正博監修、第1編 3次元細胞培養技術. (株) シーエムシー出版. 2018年4月27日発行

List of Presentations

角 昭一郎. セル - スフェア - テクノロジーの展開について. 医工学フォーラム 2017年度特別学術講演会、京都. 2018年2月28日

角 昭一郎、楊心妤、楊凱強、Priyadarshini Canning、川越雅子、佐藤芳雄. 異物反応が軽微なマクロカプセル化脇島の開発. 第45回脇・脇島移植研究会、仙台. 2018年3月3日

Sin-Yu Yang, Priyadarshini Canning, Kai-Chiang Yang, Yoshio Satou, Masako Kawagoe, Shoichiro Sumi. Studies on ethylene vinyl alcohol co-polymer (EVOH) bag in macro-encapsulated islets. The 17th Congress the Japanese Society for Regenerative Medicine, Yokohama. Mar 21, 2018.

柳井伍一、大蘭三千代、楊凱強、佐久間貞俊、藤本純一郎、角昭一郎. 融合細胞を用いたがん治療へのアプローチ. 第17回日本再生医療学会総会、横浜、2018年3月23日

Kai-Chiang Yang, Shoichiro Sumi. Treatment of Type 1 Diabetes with Encapsulated Xenogeneic Islets. Tissue Engineering Regenerative Medicine International Society World Congress, Kyoto. Sep 7, 2018.

Shoichiro Sumi. Problems to be solved in islet transplantation. Tissue Engineering Regenerative Medicine International Society World Congress, Kyoto. Sep 7, 2018.

角 昭一郎、楊心妤、柳井伍一、Priyadarshini Canning、佐藤芳雄、川越雅子、楊凱強. 異種脇島移植を目指したマクロカプセル化脇島の研究. 日本先進医工学ブタ研究会、三島、2018年10月20日

Sin-Yu Yang, Kai-Chiang Yang, Shoichiro Sumi. The effect of hepatocyte growth factor supplement in

subcutaneous islet transplantation. Transplantation Science Symposium Asian Regional Meeting 2018,
Taipei, Taiwan. Nov 24, 2018.

大薗三千代、杉浦真理子、柳井伍一、楊凱強、佐久間貞俊、鶴山竜昭、角昭一郎. 担ガムマウスにおける電気融合法による腫瘍細胞と樹状細胞の融合細胞の抗腫瘍効果. 第31回日本バイオセラピイ学会学術集会総会、東京、2018年12月14日

Chen JP, Yanai G, Sumi S, Yang KC. Transplantation of Hydrogel-encapsulated Islets for the Treatment of Type I Diabetes. 1st GLowing Polymer Symposium in KANTO, Tokyo, Dec 15, 2018.

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ニングの選別を容易にしている。ゲノム編集により内在性 *OCT4* 遺伝子の下流に蛍光マーカー遺伝子 *GFP* をノックインし、可視化した (Fig. 1)。その結果、1) 外来性再プログラム化因子の不活性化と同時に内在性 *OCT4* 遺伝子が活性化、2) 内在性 *OCT4* 遺伝子活性の後に MET (Mesenchymal-Epithelial Transition) が起こる、3) MET 直後の *OCT4* の活性は不安定で、その後安定化することが明らかになった。iRS 細胞でのゲノム編集は、再プログラム化の分子機構解明に新たな展開をもたらすと期待される。

2) ヒト ADIPONECTIN と再生

ADIPONECTIN (ADIPO) は、若返りサイトカインとして知られ、血漿 ADIPO として全身を巡り血管や

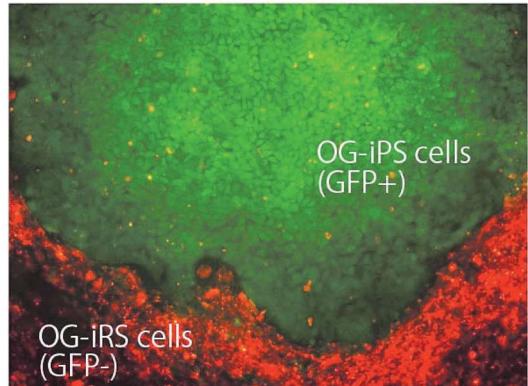


Fig. 1. A GFP-positive iPS cell colony converted from OG-iRS cell

筋肉の炎症予防に働く。血漿 ADIPO とは別に、核に局在する細胞内 ADIP (核 ADIPO) の存在を発見した。核 ADIPO の生化学的特性と分子機能を探る。

[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 nuclear ADIPONECTIN (ADIPO) on survival. 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, ADIPO and stem cell.

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) Plasma and nuclear ADIPONECTIN

Plasma 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. We found that ADIPO is localized at nuclei of cells from several tissues, including stem and germ cells. Nuclear ADIPO is characterized by truncated, and monomeric protein form. Overexpression of nuclear ADIPO induces apoptotic cell death. Nuclear ADIPO plays a role in micro-RNA-mediated post-transcription regulation, cell-cell interaction, and chromatin remodeling.

List of Publications

Cho, J., Teshigawara, R., Kameda, M., Yamaguchi, S. and Tada, T. (2019). Nucleus-localized adiponectin is survival gatekeeper through miR-214-mediated *AIFM2* regulation. *Genes to Cells*, in press.

List of Presentations

Cho, J., Teshigawara, R., Kameda, M., Yamaguchi, S. and Tada, T. Cell death by inducible overexpression of nucleus-localized adiponectin. 第 51 回日本発生生物学会、東京、2018 年 6 月 5-8 日 (ポスター)

Teshigawara, R., Hirano, K., Nagata, S. and Tada, T. Multi-colored visualization of sequential reprogramming into human iPS cells. 第 51 回日本発生生物学会、東京、2018 年 6 月 5-8 日 (ポスター)

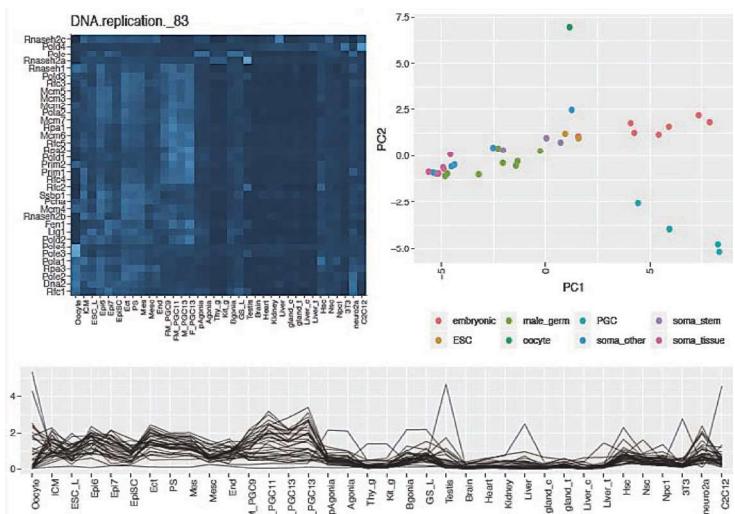
曹準権、勅使河原利香、亀田雅博、山口新平、多田 高 核局在アディポネクチンは miR-214-AIFM2 経路を介して細胞の生存を制御する 第 41 回日本分子生物学会年会、横浜、2018 年 11 月 28-30 日 (ポスター)

勅使河原利香、平野邦生、長田翔伍、多田 高 ヒト iPS 細胞へのリプログラミングを追う - 多色蛍光による解析システム 第 41 回日本分子生物学会年会、横浜、2018 年 11 月 28-30 日 (ポスター)

【中馬グループ】

当研究グループでは、幹細胞 - 生殖細胞の発生サイクルにおける遺伝情報の継承と再編の制御メカニズムの解明、またその理解に基づく細胞および個体の遺伝情報の恒常性制御を目指して研究を進めている。胚性多能性幹 (ES) 細胞や生殖幹 (GS) 細胞の遺伝的安定性の制御機構は分化体細胞とは異なる特徴を持ち、ゲノム損傷応答や DNA 複製、染色体分配などに関わる遺伝子群には特徴的な共発現パターンを示すものがある。しかし、これら胚性多能性幹 (ES) 細胞や生殖幹 (GS) 細胞と分化体細胞の遺伝的安定性の相違や分子機序は体系的に理解されていない。

我々は個体の発生サイクル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、チェックポイント制御や細胞選択、DNA 複製および染色体動態等の研究に取り組んでいる。特に胚性多能性幹 (ES) 細胞や生殖幹 (GS) 細胞のマルチオミクス解析とゲノムワイドスクリーニングに焦点を置



RNAseq expression profile of DNA replication related genes in the germline stem cell cycle and somatic cells/tissues in mice

いて、新規因子の機能解析と遺伝的安定性の再構成実験の研究を精力的に行っている。またエピゲノム / クロマチン情報の安定性制御に関する遺伝子機能解析およびバイオインフォマティクス解析を進めている。

[Chuma Group]

The genome integrity of pluripotent stem cells, which give rise to all the cell lineages including the germline, is of fundamental importance to both basic biology as well as biomedical application. However, it remains largely unclear whether and how the genetic stability of pluripotent stem cells and germline stem cells is properly coordinated with their cellular proliferation and differentiation programs. To better understand these issues, we are carrying out systematic and detailed characterization of DNA damage responses in mouse embryonic stem cells, germline stem cells and their differentiated progenies. Our research aims to understand the developmental stage and/or cellular context dependent control(s) of genome stability and diversification in the germline stem cell cycle.

List of Publication

Yoshimura, T., Watanabe, T., Kuramochi-Miyagawa, S., Takemoto, N., Shiromoto, Y., Kudo, A., Kanai-Azuma, M., Tashiro, F., Miyazaki, S., Katanaya, A., Chuma, S., Miyazaki, J.I. (2018). Mouse GTSF1 is an essential factor for secondary piRNA biogenesis. **EMBO Rep.** **19**, e42054.

List of Presentation

中馬新一郎 . PARI Regulates Stalled Replication Fork Processing To Maintain Genome Stability upon Replication Stress in Mice. 新学術領域研究「生殖細胞のエピゲノムダイナミクスとその制御」成果取りまとめ公開シンポジウム . 京都 . 2018年12月4-5日

再生組織構築研究部門
Department of Regeneration Science and Engineering
胚性幹細胞分野
Laboratory of Embryonic Stem Cell Research

准教授 末盛 博文 **Assoc. 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。臨床応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システムを確立する。

1) ヒト ES 細胞株の樹立と臨床応用を目指した基盤研究

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

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

2) 細胞プロセシング施設による臨床用ヒト ES 細胞バンクの構築

ヒト ES 細胞樹立指針や再生医療関連の法律の整備により、ヒト ES 細胞の臨床利用に向けての制度が整えられた。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ための準備を進めてきた。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、品質管理、安全性確保等にわたる取扱基準規格の検証を進め、臨床用ヒト ES 細胞のシードストックの作製の準備を整えた。

また、臨床研究に使用する細胞は再生医療等の安全性の確保等に関する法律に基づき、特定細胞加工物製造許可を得る必要がある。本施設について当該許可申請を行い、臨床用ヒトES細胞の樹立とストックのための許可を得た。これは国内で初めて許可を得たヒトES細胞の樹立施設である。

さらに、臨床用ヒトES細胞の樹立研究について文部科学大臣および厚生労働大臣の確認を2017年6月に受けた。インフォームドコンセントに基づき余剰胚の提供を受け、臨床用ES細胞の樹立を開始した。

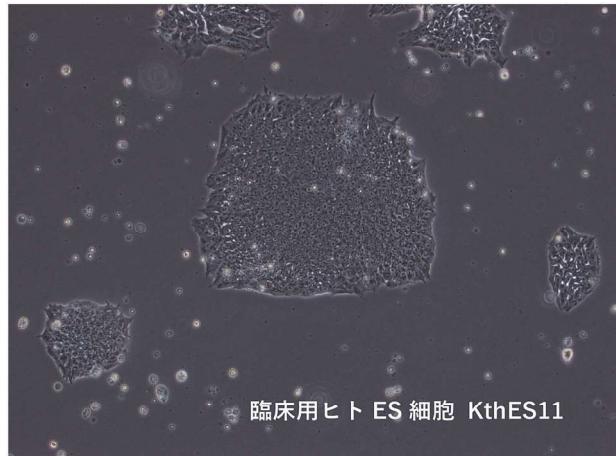
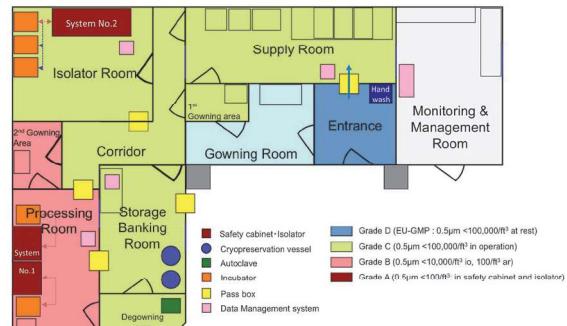
2018年5月には臨床用ヒトES細胞株の樹立報告書を文部科学大臣、厚生労働大臣提出し、受理正式に臨床用ヒトES細胞株の樹立が達成されたことになる。本施設で今後作製するストックは臨床応用を目指した国内外の研究機関に分配され様々な研究に使用されることになります。

基礎的研究や目的とする細胞への分化能の検討などに用いるための評価用ストックおよび臨床研究用目的に実際に使用可能なストックについても作製を終えている。

さらに2018年12月には2株目についても同様に樹立と分配用ストックの作製を完了している。

多能性幹細胞を用いた細胞移植医療において、iPS細胞に加え、本ヒト用ES細胞株を新たな選択肢として比較検討を進めることで、再生医療の安全性・有効性の向上に寄与することが期待される。

Cell Processing Facility for clinical-grade human ES cells



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 cell lines. We have set up standard operation procedures 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 for clinical application

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

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

For clinical application of hES cells, several issues remain to be solved such as development of complete-defined culture medium and feeder-cell free substrates. To verify these factors we should establish a standard that reaches international levels. To achieve that purpose we have been working as a member of working groups of the 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.

Based on these research, we started derivation of clinical-grade hESC lines after governmental approval of the project. We reported the derivation of the first clinical-grade hESC line, KthES11, in May 2018, and the second one, KthES12, in December 2018. Frozen stock of these cell lines are ready for distribution to research institutes aiming clinical application of hESCs.

List of Publications

Yasuda, S., Ikeda, T., Shahsavari, H., Yoshida, N., Nayer, B., Hino, M., Vartak-Sharma, N., Suemori, H., Hasegawa, K. (2018). Chemically defined and growth-factor-free culture system for the expansion and derivation of human pluripotent stem cells. **Nat. Biomed. Eng.** volume 2, 173-182

International Stem Cell Initiative: Allison, T., Andrews, P., Avior, Y., Barbaric, I., Benvenisty, N., Bock, C., Brehm, J., Brüstle, O., Damjanov, I., Elefanty, A., Felkner, D., Gokhale, P., Halbritter, F., Healy, L., Xiaoming Hu, T., Knowles, B., Loring, J., Ludwig, T., Mayberry, R., Mohamed, S. J., Miacallef, S., Müller, F., Mummery, C., Nakatsuji, N., Ng, E., Steve K. W. Oh, O'Shea, O., Pera, M., Reubinoff, B., Robson, P., Rossant, J., Schuldt, B., Solter, D., Sourris, K., Stacey, G., Stanley, E., Suemori, H., Takahashi, K., Yamanaka, S. (2018). Assessment of established techniques to determine developmental and malignant potential of human pluripotent stem cells. **Nat. Commun.** May 15; 9 (1): 1925.

Teramura T, Matsuda K, Takehara T, Shinohara K, Miyashita Y, Mieno Y, Mori T, Fukuda K, Suzuki K, Suemori H. (2018). Laser-assisted cell removing (LACR) technology contributes to the purification process of the undifferentiated cell fraction during pluripotent stem cell culture. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** Sep 18; 503 (4): 3114-3120.

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

List of Presentations

Suemori, H. A simplified protocol for subculture of hPSC lines by seeding cells with laminin fragments in a growth medium designed for use with clinical grade cell lines. ISCBI workshop, Melbourne June 25, 2018

Kawase, E. Establishment of Clinical-Grade human Embryonic Stem Cells (hESCs) in Japan. ISCBI workshop, Melbourne, June 25, 2018

Suemori, H. Derivation of clinical-grade hESC in Japan. Cell Therapy Asia. Kobe, Dec 6, 2018

末盛博文 ES 細胞の基礎第一回 幹細胞を用いた化学物質リスク情報共有化コンソーシアム研究会、東京、2018年2月16日

川瀬栄八郎、高田圭、中谷良子、山崎静香、末盛博文 京都大学 ウィルス・再生医科学研究所における臨床用ヒトES細胞の樹立とストック作製の進捗状況第19回日本再生医療学会総会、横浜、2018年3月21日

高田圭、川瀬栄八郎、中谷良子、山崎静香、末盛博文 臨床用ヒトES細胞株の樹立及びバンキングに向けた細胞調製施設の構築 第19回日本再生医療学会総会、2018年3月21日

末盛博文 臨床用ヒトES細胞の樹立と Quality Control 第19回日本再生医療学会総会、横浜、2018年3月22日

末盛博文 簡便かつ高効率なES/iPS細胞の培養法 第19回日本再生医療学会総会、横浜、2018年3月23日

再生組織構築研究部門
Department of Regeneration Science and Engineering
統合生体プロセス分野
Laboratory of Integrative Biological Science

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

当分野では、不妊症、免疫関連疾患の新規治療法開発を目指し、受精と自己免疫寛容維持の新規メカニズムの解明に焦点をあてた研究を展開している。本年度は、マウス精子表面で安定的に発現している抗原の性状解析を行なった。一方、関節炎惹起性 T ヘルパー細胞を起点とする GM-CSF 產生細胞の活性化に関わる分子基盤を明らかにし、炎症関節内に存在する新規の炎症関連リンパ球を同定した。GM-CSF 產生細胞の免疫学的制御法の開発が、自己免疫性関節炎に対する新規治療法になりうる可能性を示した。

1) マウス精子表面で安定的に発現している抗原に対するモノクローナル抗体の作製と性状解析

ある種の女性不妊症は、生殖器粘膜での精子抗原に対する過剰な免疫反応によって引き起こされるといわれているが、その分子メカニズムと責任抗原はよくわかっていない。我々は、精子で特異的に発現し、受精過程にも関与する免疫原性の高い抗原を同定するために、精子表面タンパク質のスクリーニングを試みた。その結果、一つの候補分子として SSA を同定した。この抗原は、インビトロでもインビボでも精子表面で安定的に強く発現しており、強力な免疫原であることが示唆された。そこで SSA 発現細胞を作製し、これを Balb/c マウスを免疫することによりモノクローナル抗体を作製した。次にこの抗体を用いて精子の FACS 解析を行なったところ、SSA の精子表面での強い発現を確認した。一方、精子でメスマウスを免疫したところ、この抗原に対する抗体が産生されていることを認めた。

2) 免疫寛容維持機構と T ヘルパー細胞の制御機構

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

本年度、IL-17 產生 T ヘルパー (Th17) 細胞で惹起される自己免疫性関節炎の関節炎発症・維持に関わる新規の細胞サブセットおよび分子メカニズムを同定した。最近、GM-CSF (顆粒球单球コロニー刺激因子) は、非常に強力な炎症性サイトカインであることが注目されており、主に Th17 細胞の產生する GM-CSF が自己免疫疾患発症の必須因子であることが報告されている。私たちは、

自己免疫性関節炎モデルおよび関節リウマチの臨床検体を用い炎症関節内のGM-CSF産生細胞とその制御機構について検討をおこなった。関節炎モデルでは、関節炎発症にTh17細胞の產生するGM-CSFは必要でなく、線維芽細胞様滑膜細胞(FLS)と自然リンパ球(ILCs)の產生するGM-CSFが関節炎の発症、慢性炎症化に重要な役割を果たすことを見いだした。関節炎発症期では、Th17細胞の產生するIL-17に反応したFLSからのサイトカイン(GM-CSFを含む)、ケモカインの產生が必須因子であり、慢性炎症期では、この経路に加えTh17細胞と新規に同定した滑膜ILCsから放出されるGM-CSFが関与することを明らかにした。炎症関節内では、活性化した免疫関連細胞とFLSが細胞死することでダメージ関連分子パターン(DAMPs)および自己抗原が放出され、関節炎惹起性Th17細胞からGM-CSFのみならずIL-2が產生される。滑膜ILCsはDAMPsとIL-2を感知する表面・細胞内受容体を有し、多量のGM-CSFを產生することで関節炎の増悪化に寄与する(Figure)。さらに、関節リウマチ患者の滑膜液中にもGM-CSFを產生する滑膜ILCsの割合が増加していた。これらの結果から、GM-CSFおよびその產生細胞を標的とした免疫学的制御法の開発により、自己免疫性関節炎に対する新規治療戦略になりうることを明らかにした。

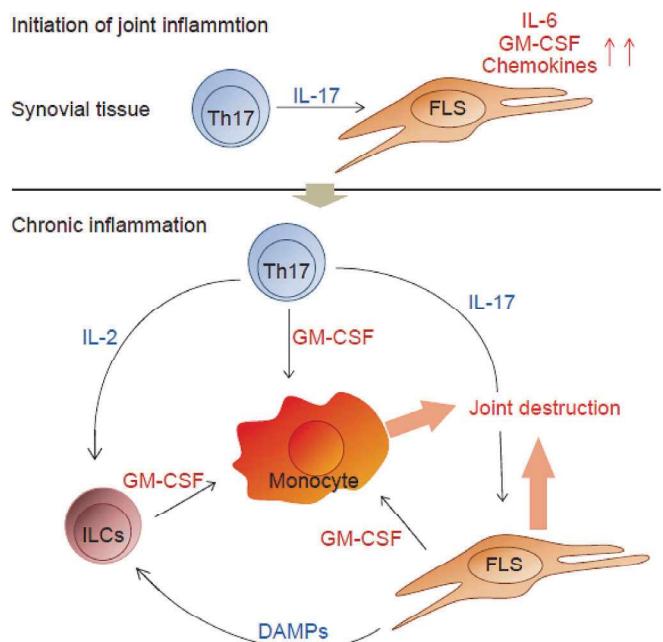


Figure. An inflammatory cellular cascade of joint inflammation

This laboratory aims to understand the mammalian fertilization process and the molecular and cellular mechanisms underlying how immune tolerance is maintained and self-reactive T cells attack our body. In 2017, we found that the relationship between GM1 movement and *in vitro* fertilization ability was confirmed in multiple mouse strains, suggesting that lipid raft movement is one of the important steps for completing the sperm maturation process. Moreover, we elucidated a molecular basis of the activation of inflammatory GM-CSF-producing cells mediated by arthritogenic Th17 cells and also identified a novel inflammatory lymphoid subset present in inflamed joints. We showed that targeting the regulation of GM-CSF-producing cells could be a potential immunotherapy for autoimmune arthritis such as rheumatoid arthritis.

1) Development and characterization of monoclonal antibodies against a stable sperm surface antigen

Some types of female infertility are known to be caused by aberrant immune responses against sperm antigens at the female genital mucosa. However, the molecular mechanism and responsible sperm antigens

are not well characterized. To identify molecules which are specifically expressed by sperm, can be involved in fertilization processes, and potentially immunogenic, we attempted a screening of sperm surface proteins and found a novel sperm-specific antigen (SSA) which showed strong expression ex vivo by western blotting when collected from the epididymis. The expression level of SSA was also stable during sperm maturation processes in vitro or in vivo, suggesting that abundant SSA could be a candidate of immunogenic male antigens for infertility. To further characterize the cellular location of SSA, we developed monoclonal antibodies (mAb) by immunizing BALB/c mice with a SSA-expressing transfectant and confirmed the staining of SSA on the sperm surface by flowcytometry. We also found that anti-SSA antibody was produced when female mice were immunized with sperm. We are now investigating with these novel mAb the function of SSA for fertilization and its immunogenic capability of causing infertility in vitro and in vivo.

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 identified a novel inflammatory lymphoid subset and molecular mechanisms involved in the development of autoimmune arthritis mediated by inflammatory IL-17-producing T helper (Th17) cells. GM-CSF (Granulocyte Macrophage colony-stimulating Factor) is recently highlighted as a potent pro-inflammatory cytokine and Th17-derived GM-CSF is reported to play a key role in the development of autoimmune diseases. Using an animal model of rheumatoid arthritis (RA) and clinical samples of patients with RA, we investigated a molecular basis of inflammatory GM-CSF-producing cells in inflamed joints. We found that GM-CSF from Th17 cells was dispensable for the development of arthritis, but GM-CSF-secreting fibroblast-like synoviocytes (FLS) and innate lymphoid cells (ILCs) were rather crucial for the initiation and exacerbation of the disease. At the initiation of joint inflammation, IL-17 from Th17 cells induced an inflammatory signature in FLS which upregulated inflammatory cytokines including GM-CSF and chemokines. In addition, GM-CSF produced by Th17 cells and synovial ILCs synergistically mediated chronic inflammation in the joints. Under chronic inflammatory conditions, damage-associated molecular patterns (DAMPs) and self-antigens can be released from dead cells in the joints. Synovial ILCs sensed DAMPs including IL-33 and endogenous TLR-9 ligands in combination with IL-2 provided by arthritogenic T cells to secrete a large amount of GM-CSF, and exacerbated autoimmune arthritis. Moreover, we showed that GM-CSF-producing synovial ILCs were also increased in synovial fluid of patients with RA. These results indicate that clinical interventions, which specifically target GM-CSF and GM-CSF-producing cells, may be a potential therapeutic strategy for the treatment of autoimmune arthritis.

List of Publications

Hirota K, Hashimoto M, Ito Y, Matsuura M, Ito H, Tanaka M, Watanabe H, Kondoh G, Tanaka A, Yasuda

K, Kopf M, Potocnik AJ, Stockinger B, Sakaguchi N, Sakaguchi S. Autoimmune Th17 Cells Induced Synovial Stromal and Innate Lymphoid Cell Secretion of the Cytokine GM-CSF to Initiate and Augment Autoimmune Arthritis. *Immunity*. 48:1220-1232 (2018)

Ohashi, M., Y. Umemura, N. Koike, Y. Tsuchiya, Y. Inada, H. Watanabe, T. Tanaka, Y. Minami, O. Ukimura, T. Miki, T. Tajiri, G. Kondoh, Y. Yamada, K. Yagita. Disruption of circadian clockwork in vivo reprogramming-induced mouse kidney tumors. *Genes to Cells*, Feb;23 (2):60-69. doi: 10.1111/gtc.12552 (2018).

Tsubaki, T., T. Kadonosono, S. Sakurai, T. Shiozawa, T. Goto, S. Sakai, T. Kuchimaru, T. Sakamoto, H. Watanabe, G. Kondoh, S. Kizaka-Kondoh. Novel Adherent CD11b+ Gr-1+ Tumor-infiltrating Cells Initiate an Immunosuppressive Tumor Microenvironment. *Oncotarget*, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24359> (2018).

Shukunami, C., A. Takimoto, Y. Y. Nishizaki, Y. Yoshimoto, S. Tanaka, S. Miura, H. Watanabe, T. Sakuma, T. Yamamoto, G. Kondoh, Y. Hiraki. Scleraxis is a transcriptional activator that regulates the expression of Tenomodulin, a marker of mature tenocytes and ligamentocytes. *Scientific Reports*, 8 (1):3155. doi: 10.1038/s41598-018-21194-3 (2018).

Morita, M., T. Sato, M. Nomura, Y. Sakamoto, Y. Inoue, R. Tanaka, S. Ito, K. Kurosawa, K. Yamaguchi, Y. Sugiura, H. Takizaki, Y. Yamashita, R. Katakura, I. Sato, M. Kawai, Y. Okada, H. Watanabe, G. Kondoh, S. Matsumoto, A. Kishimoto, M. Obata, M. Matsumoto, T. Fukuhara, H. Motohashi, M. Suematsu, M. Komatsu, K-I. Nakayama, T. Watanabe, T. Soga, H. Shima, M. Maemondo, N. Tanuma. PKM1 confers metabolic advantages and promotes cell-autonomous tumor cell growth. *Cancer Cell*, 33 (3):355-367.e7. doi: 10.1016/j.ccr.2018.02.004 (2018).

Seike, M., Y. Omatsu, H. Watanabe, G. Kondoh, T. Nagasawa. Stem cell niche-specific EBF3 maintains the bone marrow cavity. *Genes Dev.*, doi: 10.1101/gad.311068.117 (2018).

List of Presentations

渡邊 仁美、竹田 理恵、廣田 圭司、近藤 玄 マウス精子受精能とラフト局在変化の相関性。 第65回 日本実験動物学会、富山、2018年5月16-18日

Hirota K, Hashimoto M, Ito Y, Matsuura M, Ito H, Tanaka M, Watanabe H, Kondoh G, Tanaka A, Yasuda K, Kopf M, Potocnik AJ, Stockinger B, Sakaguchi N, Sakaguchi S: An inflammatory cellular cascade of autoimmune Th17 cells, GM-CSF-producing synovial ILCs and stromal cells in the development of autoimmune arthritis, Kyoto T cell Conference, Kyoto, Japan, June 15-16, 2018

Keiji Hirota: Autoimmune arthritis mediated by inflammatory Th17 cells, 25th East Asia Joint Symposium, Chongqing, China, October 25-26, 2018

Yasuda K, Kitagawa Y, Kawakami R, Isaka Y, Watanabe H, Kondoh G, Kohwi-Shigematsu T, Sakaguchi S,

Hirota K: Satb1-mediated regulation of GM-CSF and PD-1 in pathogenic Th17 cells, 6th Annual Meeting of the International Cytokine & Interferon Society, October 27-30, 2018, Boston, USA October 27-30, 2018, Boston, USA

Kawakami R, Kitagawa Y, **Hirota K, Watanabe H, Kondoh G**, Ohkura N, Sakaguchi S: Epigenetic landscape of FOXP3 enhancer sites during thymic FOXP3+ TREG development of CNS0- and cNS3-deficient mice, 6th Annual Meeting of the International Cytokine & Interferon Society, Boston, USA, October 27-30, 2018

Hirota K, Hashimoto M, Ito Y, Matsuura M, Ito H, Tanaka M, **Watanabe H, Kondoh G**, Tanaka A, Yasuda K, Kopf M, Potocnik AJ, Stockinger B, Sakaguchi N, Sakaguchi S: GM-CSF-producing synovial ILCs exacerbate Th17-mediated autoimmune arthritis, The 3rd International Conference on Innate Lymphoid Cells, Tokyo, Japan, November 29- December 1, 2018

Keiji Hirota: Autoimmune Th17 cells instruct ILC secretion of inflammatory GM-CSF to initiate and augment autoimmune arthritis, 第 47 回 日本免疫学会学術集会、福岡、2018 年 12 月 10-12 日

Yasuda K, Kitagawa Y, Kawakami R, **Watanabe H, Kondoh G**, Kohwi-Shigematsu T, Sakaguchi S, **Hirota K:** Satb1-mediated regulation of GM-CSF and PD-1 in effector Th17 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis, 第 47 回 日本免疫学会学術集会、福岡、2018 年 12 月 10-12 日

Takeuchi Y, **Watanabe H, Kondoh G**, Sakaguchi N, Sakaguchi S, Mimori T, **Hirota K:** A role of Ripk3 and Gsdmd in the development of autoimmune arthritis in SKG mice, 第 47 回 日本免疫学会学術集会、福岡、2018 年 12 月 10-12 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

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

2018 年度、Treg の基礎研究では、ヒトの Treg エピゲノムの網羅的解析を進め、Treg 特異的エピゲノムの変異と自己免疫病に対する遺伝的感受性の関連について解析を進めた (Ohkura et al. 論文投稿中)。また、腫瘍免疫における Treg、特に Treg に発現する CTLA-4 分子の役割についてヒトがん組織を用いて研究を進めた。抗 CTLA-4 抗体（例えば ipilimumab）はヒトの腫瘍免疫を亢進させる。しかしながら、CTLA-4 は、がんを攻撃するエフェクター T 細胞に活性化に伴って誘導されるのみならず、がん免疫を抑制する Treg に構成的に高発現しているため、がん免疫における抗 CTLA-4 抗体の作用機構には依然として議論がある。Treg はがん組織での主要な浸潤 T 細胞であり、その CTLA-4 発現レベルは CD4⁺ あるいは CD8⁺T 細胞より高い。実際、ADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) 活性および ADCP (antibody-dependent cellular phagocytosis) 活性を更新させたモノクローナル抗体 CTLA-4 抗体を用い、これを加えて試験管内で健常人由来末梢血 T 細胞をがん抗原ペプチドで刺激すると Treg が除去され抗原特異的 CD8⁺T 細胞が増殖する。この場合、抗体を抗原ペプチドを同時に添加すると、Treg、活性化 CD8⁺ エフェクター T 細胞共に除去され免疫応答は亢進しないが、抗原刺激を抗体添加より数日遅らせば、Treg のみが除去され CD8⁺T 細胞は除去されないため免疫反応は亢進した。同様に、マウスで、抗 CTLA-4 抗体とがんワクチンを同時に投与すれば免疫反応を惹起できないが、ワクチン投与を数日遅らせば有効な腫瘍免疫応答を誘導でき腫瘍は縮小した。このような試験管内、生体内抗腫瘍効果は、ADCC/ADCP 活性を持たない抗体では見られなかった。以上の結果は、CTLA-4 のみならず、Treg、エフェクター T 細胞と共に発現する他の分子を標的として抗腫瘍抗体療法を開発する場合に重要である。

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

In 2018, we studied the role of Treg cells in tumor immunity. It has been shown that anti-CTLA4 monoclonal antibody (mAb), such as ipilimumab, is efficacious in enhancing tumor immunity in humans. CTLA-4 is expressed by conventional T cells upon activation and also by naturally occurring FOXP3⁺CD4⁺ regulatory T (Treg) cells constitutively, raising a question of how anti-CTLA-4 mAb can differentially control these functionally opposing T-cell populations in tumor immunity. We showed that FOXP3-high potently suppressive effector Treg cells were abundant in human melanoma tissues, expressing CTLA-4 at higher levels than tumor-infiltrating CD8⁺ T cells. Upon in vitro tumor-antigen stimulation of peripheral blood mononuclear cells from healthy individuals or melanoma patients, Fc-region-modified anti-CTLA-4 mAb with high antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) and/or cellular phagocytosis (ADCP) activity selectively depleted CTLA-4⁺FOXP3⁺ Treg cells and consequently expanded tumor-antigen-specific CD8⁺ T cells. Importantly, the expansion occurred only when antigen stimulation was delayed several days from the antibody treatment to spare CTLA-4⁺ activated effector CD8⁺ T cells from killing by the mAb. Similarly, in tumor-bearing mice, high-ADCC/ADCP anti-CTLA-4 mAb treatment and tumor antigen vaccination several days later significantly prolonged their survival and markedly elevated cytokine production by tumor-infiltrating CD8⁺ T cells, whereas antibody treatment concurrent with vaccination did not. Anti-CTLA-4 mAb modified to exhibit a lesser or no Fc-binding activity failed to show such timing-dependent in vitro and in vivo immune enhancement. These findings indicate that high ADCC anti-CTLA-4 mAb is able to selectively deplete effector Treg cells and evoke tumor immunity depending on the CTLA-4-expressing status of effector CD8⁺ T cells. Our findings are instrumental in designing cancer immunotherapy with mAbs targeting the molecules commonly expressed by FOXP3⁺ Treg cells and tumor-reactive effector T cells.

List of Publications

1) 原著論文

- Hirota K, Hashimoto M, Ito Y, Matsuura M, Ito H, Tanaka, M, Watanabe H, Kondoh G, Tanaka A, Yasuda K, Kopf M, Potochnik AJ, Stockinger B, Sakaguchi N, Sakaguchi S. Autoimmune Th17 cells induced synovial stromal and innate lymphoid cells secretion of the cytokine GM-CSF to initiate and augment autoimmune arthritis. *Immunity*. 48:1220-1232, 2018.
- Kuwabara R, Hamaguchi M, Fukuda T, Sakai H, Inui M, Sakaguchi S, Iwata H. Long-term Functioning of Allogeneic Islets in Subcutaneous Tissue Pretreated with a Novel Cyclic Peptide without Immunosuppressive Medication. *Transplantation*. 102:417-425, 2018.
- Ikeno Y, Seo S, Iwaisako K, Yoh T, Nakamoto Y, Fuji H, Taura K, Okajima H, Kaido T, Sakaguchi S, Uemoto S. Preoperative metabolic tumor volume of intrahepatic cholangiocarcinoma measured by ¹⁸F-FDG-PET is associated with the KRAS mutation status and prognosis. *J. Transl. Med.* 16 (1):95. doi: 10.1186/s12967-018-1475-x.

Shigeta N, Nakamura H, Kumasawa K, Imai K, Saito S, Sakaguchi S, Kimura T. Are naïve T cells and class-switched memory (IgD_- CD27_+) B cells not essential for establishment and maintenance of pregnancy? Insights from a case of common variable immunodeficiency with pregnancy. *Med Hypotheses*. 121:36-41, 2018.

Matoba T, Imai M, Ohkura N, Kawakita D, Ijichi K, Toyama T, Morita A, Murakami S, Sakaguchi S, Yamazaki S. Regulatory T cells expressing abundant CTLA-4 on the cell surface with a proliferative gene profile are key features of human head and neck cancer. *Int J Cancer*. 2018 Nov 28. doi: 10.1002/ijc.32024.

Sekido Y, Yasumizu Y, Nishimura J, Kayama H, Matsuno H, Ogino T, Miyoshi N, Takahashi H, Haraguchi N, Hata T, Matsuda C, Doki Y, Mori M, Takeda K, Ohkura N, Sakaguchi S, Mizushima T. Innate Myeloid Cell Subset-Specific Gene Expression Patterns in the Human Colon are Altered in Crohn's Disease Patients. *Digestion*. 2018 Oct 19:1-11. doi: 10.1159/000490890.

Fuchs A, — Sakaguchi S, — Trzonkowski P. Minimum Information about T Regulatory Cells: A Step toward Reproducibility and Standardization. *Front. Immunol.* 2018 Jan 15;8:1844. doi: 10.3389/fimmu.2017.01844. eCollection 2017.

Yamazaki S, Odanaka M, Nishioka A, Kasuya S, Shime H, Hemmi H, Imai M, Riethmacher D, Kaisho T, Ohkura N, Sakaguchi S, Morita A. Ultraviolet B-Induced Maturation of CD11b-Type Langerin-Dendritic Cells Controls the Expansion of Foxp3^+ Regulatory T Cells in the Skin. *J. Immunol.* 200:119-129, 2018.

Wing JB, Tekgürç M, Sakaguchi S. Control of Germinal Center Responses by T-Follicular Regulatory Cells. *Front. Immunol.* 2018 Aug 24;9:1910. doi: 10.3389/fimmu.2018.01910. eCollection 2018.

Hashimoto T, Takahashi H, Sakaguchi S. Regulatory T-cell deficiency and autoimmune skin disease: Beyond the scurfy mouse and immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2018 Dec;142 (6):1754-1756. doi: 10.1016/j.jaci.2018.08.028.

Napier RJ, Lee EJ, Vance EE, Snow PE, Samson KA, Dawson CE, Moran AE, Stenzel P, Davey MP, Sakaguchi S, Rosenzweig HL. Nod2 Deficiency Augments Th17 Responses and Exacerbates Autoimmune Arthritis. *J. Immunol.* 201:1889-1898, 2018.

学会等の講演

List of Presentations

1) 学会・研究会発表

Yujiro Kidani, YohkoKitagawa, Naganari Ohkura, Shimon Sakaguchi: Distinct transcriptional regulation in tumor-infiltrating regulatory T cells. The 47th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology

(2018. 12.10-12. 福岡)

James B Wing, Shimon Sakaguchi : T-follicular regulatory cells in human blood. The 47th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology The 47th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology (2018. 12.10-12. 福岡)

Sayuri Yamazaki, Mizuyu Odanaka, Akiko Nishioka, Hiroaki Shime, Hiroaki Henmi, Masaki Imai, Tsuneyasu Kaisho, Naganari Ohkura Shimon Sakaguchi, Akimichi Morita: Dendritic cells expressing a unique set of genes associated with immunological tolerance are specialized to expand thymus-derived Foxp3⁺ regulatory T cells in the ultraviolet B-exposed skin. The 47th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology (2018. 12.10-12. 福岡)

Takuma Matoba, Masaki Imai, Naganari Ohkura, Daisuke Kawakita, Kei Ijichi, Tatsuya Toyama, Akimichi Morita, Shingo Murakami, Shimon Sakaguchi, Sayuri Yamazaki: A new feature of regulatory T cells in human head and neck cancer. The 47th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology (2018. 12.10-12. 福岡)

Yusuke Takeuchi, Hitomi Watanabe, Gen Kondo, Noriko Sakaguchi, Shimon Sakaguchi, Tsuneyo Mimori, Keiji Hirota: A role of Ripk3 and Gsdmd in the development of autoimmune arthritis in SKG mice. The 47th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology (2018. 12.10-12. 福岡)

Keiko Yasuda, Yohko Kitagawa, Ryoji Kawakami, Hitomi Watanabe, Gen Kondo, Terumi Kohwi-Shigematsu, Shimon Sakaguchi: Satb1-mediated regulation of GM-CSF and PD-1 in effector Th17 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. The 47th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology (2018. 12.10-12. 福岡)

2) 講演・シンポジウム

坂口志文：制御性T細胞による病的免疫応答制御 第26回関東アレルギークラブ、東京、2018年1月13日

坂口志文：新しい免疫医療を開く制御性T細胞（Tレグ細胞）如月会、京都、2018年2月5日

坂口志文：制御性T細胞と炎症制御 AMED-CREST慢性炎症成果発表シンポジウム、東京、2018年2月27日

坂口志文：制御性T細胞による病的免疫応答制御 公益財団法人 ノバルティス科学振興財団30周年記念式典、東京、2018年3月9日

坂口志文：制御性T細胞による病的免疫応答制御 第18回AKUA学術集会、東京、2018年3月9日

坂口志文：制御性T細胞の発見と免疫システムに関わる食科学研究の基盤構築 第22回安藤百福賞大賞記念講演会、東京、2018年3月12日

坂口志文：自己と非自己の免疫学 経営ビション構想懇話会、東京、2018年3月13日

坂口志文：免疫恒常性と制御性T細胞 第3回生活習慣病とがんの代謝栄養メカニズム研究会、東京、2018年3月17日

坂口志文：自己免疫病と制御性T細胞 第91回日本内分泌学会学術総会、宮崎、2018年4月26-28日

坂口志文：自己と非自己の免疫学—アレルギー・がん・臓器移植への新たなアプローチ 健康フェスティバル in Okayama、岡山、2018年5月3-4日

Shimon Sakaguchi : Control of immune responses by regulatory T cells. IID (International Investigative Dermatology) 2018, Florida. USA, May 16-19, 2018

Shimon Sakaguchi : Treg cells: Development and Function in Autoimmunity and Tumor Immunity. The Annual Marlan Elliott Koshland Memorial Lecture The University of Chicago, Chicago. USA, June 4, 2018

坂口志文：制御性T細胞による免疫応答制御 第67回日本アレルギー学会学術大会、幕張、2018年6月22-24日

坂口志文：制御性T細胞と新しい免疫医療 特定非営利活動法人近畿バイオインダストリー振興会議記念講演、大阪、2018年6月25日

坂口志文：制御性T細胞による免疫応答制御—特に自己免疫病について ヒュミラ10周年記念講演会、東京、2018年6月30日-7月1日

Shimon Sakaguchi : Molecular targeting of regulatory T cells for control of immune responses 16th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, Kyoto, July 1-6, 2018

Shimon Sakaguchi : Regulatory T cells and autoimmunity: transcriptional and epigenetic basis of Treg cell development and its anomaly. IIT Symposium and Pears Lecture 2018 at University College London, London, U.K., July 10, 2018

Shimon Sakaguchi : Genomic approaches to Treg development and function. 5th European Congress of Immunology, Amsterdam, Netherlands, September 2-5, 2018

Shimon Sakaguchi : Regulatory T cells and autoimmunity: 10th German-Japanese Symposium, Ettal, Germany, September 6-9, 2018

Shimon Sakaguchi : Treg cells in autoimmune disease : Deutsches Rheuma Forschungszentrum Seminar, Berlin, Germany, September 10, 2018

Shimon Sakaguchi : Immune suppression: how to convert conventional T cells into regulatory T cells : EMBO at BASEL LIFE 2018, Basel, Switzerland, September 11-14, 2018

Shimon Sakaguchi : New concepts of immunology – “Regulatory T cells”. XXIV World Congress of Asthma,

東京 , October 3-6, 2018

坂口志文:制御性 T 細胞による免疫応答制御 第 80 回日本血液学会学術集会、大阪、2018 年 10 月
12-14 日

坂口志文:癌免疫療法の標的としての制御性 T 細胞 第 56 回日本癌治療学会学術集会、横浜、2018
年 10 月 18-20 日

坂口志文：自己と非自己の免疫学：新しい免疫医療に向けて 徳島大学第 35 回青藍会・医学科講
演会、徳島、2018 年 10 月 25 日

Shimon Sakaguchi : Control of immune responses by regulatory T cells. (Joint International Conference on
Infection & Disease 2018 NHRI/IBMS, Taipei.Taiwan, October 31-November 2, 2018

Shimon Sakaguchi : Control of immune responses by regulatory T cells. Annual Meeting of Chinese Society
for Immunology Plenary Lecture, Shanghai, China, November 7-10, 2018

Shimon Sakaguchi: Control of immune responses by regulatory T cells. The 24th Annual Meeting of the
Kyoto Cornea Club, 京都 , November30-December 1, 2018

Shimon Sakaguchi : Thymic development of regulatory T cells and immune tolerance.The 47th Annual
Meeting of The Japanese Society for Immunology, 福岡 , December 10-12, 2018

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

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

教 授	開 祐司	Prof.	Yuji Hiraki
助 教	三浦 重徳	Assist. Prof.	Shigenori Miura
助 教	有馬 祐介	Assist. Prof.	Yusuke Arima

本研究分野では、軟骨および腱・靭帯にそれぞれ特異的に発現する血管新生抑制因子 Chondromodulin-I および Tenomodulin を切り口として、軟骨・腱・靭帯の形成と再生修復および組織血管化の分子機構の解明を主たるテーマとして研究を行っている。

1. 血管新生抑制因子 Chondromodulin-I (ChM-I) のアンカー分子と特異的切断酵素の探索

血管新生抑制因子コンドロモジュリン - I (ChM-I) は静止・増殖軟骨層の細胞外マトリックス (ECM) に特異的に局在し、分化が進んだ肥大軟骨では忽然と消失する。最近、我々はこの ChM-I による血管侵入抵抗性領域の明瞭な区画化が、(1) 軟骨 ECM に ChM-I をアンカーする分子と (2) ChM-I の N- 末端領域の切断酵素による不活性化によってもたらされていることを突き止めた。そこで本年は、2つのキーとなる分子の同定を試みた。緩和な乖離条件で調製した軟骨抽出液から ChM-I を免疫沈降することで、ChM-I と相互作用する軟骨マトリックス分子群を単離・同定した。これらの分子について組換え体タンパク質を調製し ChM-I との直接相互作用を解析したところ、1つの分子種で微弱ではあるものの ChM-I との直接相互作用が認められ、ChM-I を軟骨マトリックスにアンカリングする分子である可能性が示唆された。また、ChM-I の切断酵素活性は軟骨細胞の分化段階とは関係なく、細胞表層または軟骨マトリックスに強く保持されているとの知見を得た。今後、これらの成果をもとに、軟骨における血管侵入障壁の形成と消失に関わる分子機構の解明を目指す。

2. 転写因子 Pax1/9 による Aggrecan の発現制御

椎間板は、椎骨間において可動性のジャンクションを形成し、脊椎に負荷される力学的ストレスを吸収する役割を担っている。Aggrecan (Acan) は高い保水能を有するプロテオグリカンで、椎間板の中心に存在する髓核および髓核を取り囲む線維輪で発現し組織に膨潤圧を与えていた。発生過程において、将来椎間板線維輪へと分化する間葉系組織では、転写因子 *Paired box gene 1* (*Pax1*) 及び *Pax9* とともに、軟骨細胞分化に必須の転写因子 *Sox9* が発現している (Fig. 1)。*Pax1* ノックアウトマウスでは、椎間板線維輪において Acan の増加を伴う椎間板変性が認められ、*Pax1* が *Acan* の発現制御に関与していることが示唆された。そこで *Acan* の発現制御領域における *Pax1* の結合部位を解析した結果、*Pax1* は複数の制御領域に直接結合し、弱い転写活性化因子として作用することが

明らかになった。特に、*Acan* の転写開始点の約 10-kb 上流に存在する転写調節領域 (*Upstream Enhancer, UE*) には Pax1 及び Pax9 が結合し、その結合部位は Sox9 の結合部位と一部重複していた。*UE*では、Sox9 と共に Sox5/6 が結合することによって転写活性が著しく上昇することが明らかになっているが、Sox5/6/9 による *UE* の転写活性の上昇は Pax1 又は Pax9 によって著明に抑制された。以上の結果から、Pax1/9 は *Acan* の弱い転写活性化因子として作用するものの、*UE*における Sox9 の結合を阻害することで、Sox5/6/9 による著しい *Acan* の発現上昇を抑制し、椎間板における秩序立った *Acan* の発現に寄与してい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) 細胞表面の混在環境が細胞間相互作用へ及ぼす影響の理解

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

2) 免疫抑制剤を用いない皮下臍島移植

移植および摘出が容易な皮下への臍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臍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。

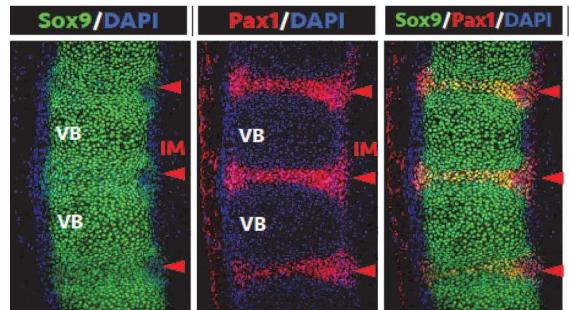


Fig. 1. Localization of Sox9 and Pax1 in the developing vertebral column (E13.5). Sagittal section of mouse embryo was double-immunostained with anti-Sox9 antibody (green) and anti-Pax1 antibody (red). Note that Sox9 and Pax1 are co-localized in the intervertebral mesenchyme (IM, arrow head). VB: vertebral body.

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. Exploring the anchoring molecules and cleaving enzymes of Chondromodulin-I, a cartilage-derived angiogenesis inhibitor

We isolated ChM-I-associating extracellular matrix (ECM) protein complexes by immunoprecipitation of ChM-I from the rib cartilage extracts prepared under mild dissociating condition. By the mass spectrometric analyses, we obtained several kinds of candidate molecules interacting with ChM-I and found one of them showed direct protein interaction with ChM-I in immunoprecipitation analyses using the recombinant protein. As for ChM-I-cleaving enzyme, we demonstrated that the cleavage activity is localized to the cell surface or cartilage ECM irrespective of differentiation states of cartilage cells. These results help us to understand the molecular mechanism underlying establishment and removal of anti-angiogenic barrier during the cartilage development.

2. Regulation of Sox9-driven transactivation of Aggrecan by Pax1/9 in the intervertebral discs

Aggrecan (Acan) provides cartilage and the intervertebral disc (IVD) with swelling properties and resistance to compression. In the developing vertebral column, the paralogous transcription factors PAX1 and PAX9 expression was inversely correlated with *Acan* expression. PAX1/9 was co-expressed with SOX9/5/6 in the intervertebral mesenchyme (Fig. 1) and the inner annulus fibrosus (AF), and with SOX9 in the outer AF. Significant *Acan* upregulation was observed in the AF of *Pax1*-deficient mice. In contrast, *Acan* expression was significantly downregulated by persistent expression of *Pax1* in the developing cartilage. In the previously reported aggrecan enhancer located 10 kb upstream of *Acan* gene (UE), PAX1/9 acts as weak transactivators through a PAX1/9-binding site that partially overlaps with a SOX9-binding site. In the presence of SOX9, which otherwise drives robust *Acan* expression along with SOX5/6, PAX1/9 competes with SOX9 for occupancy of the binding site, resulting in reduced transactivation of *Acan*. These results suggest that transactivation of the UE is differentially regulated by concerted action of PAX1/9, SOX9, and SOX5/6 in a context-dependent manner.

3. Materials engineering approaches to control cellular function

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

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

2) 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

- Shukunami, C., Takimoto, A., Nishizaki, Y., Yoshimoto, Y., Tanaka, S., Miura, S., Watanabe, H., Sakuma, T., Yamamoto, T., Kondoh, G., Hiraki, Y.: Scleraxis is a transcriptional activator that regulates the expression of Tenomodulin, a marker of mature tenocytes and ligamentocytes. *Scientific Reports*, 8 (1): 3155 (2018)
- Sono, T., Akiyama, H., Miura, S., Min Deng, J., Shukunami, C., Hiraki, Y., Tsushima, Y., Azuma, Y., Behringer, RR and Matsuda S.: THRAP3 interacts with and inhibits the transcriptional activity of SOX9 during chondrogenesis. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 36 (4): 410-419 (2018)
- 徳永琢也、有村仁志、水田博志、開祐司、宿南知佐 (2018). 特集『運動器系の制御機構と破綻』／エンテシスの形成と再生への展望 **CLINICAL CLCIUM** 2018, 28 (3), 335-343.
- Iwata, H., Arima, Y., Tsutsui, Y. (2018) Design of bioartificial pancreases from the standpoint of oxygen supply. *Artif Organs*. 42, E168–E185.
- Kuwabara, R., Iwata, H. (2018). Bioabsorbable device to prepare subcutaneous pockets for islet transplantation. *J Biomed Mater Res B. in press*.
- Kuwabara, R., Hamaguchi, M., Fukuda, T., Sakai, H., Inui, M., Sakaguchi, S., Iwata, H. (2018). Long-term functioning of allogeneic islets in subcutaneous tissue pretreated with a novel cyclic peptide without immunosuppressive medication. *Transplantation*. 102, 417-425.

List of Presentations

- 清水あづさ、三浦重徳、尾上弘晃：複合力学刺激可能な ECM マイクロ流体システム . 日本機械学会第 9 回マイクロ・ナノ工学シンポジウム (2018.10.30-11.1, 札幌)
- 三浦重徳、國府力、滝本晶、渡邊仁美、近藤玄、佐久間哲史、山本卓、開祐司、宿南知佐：脊椎動物の陸棲化に伴って新たに獲得された Pax1 硬節エンハンサーの機能的役割 . 日本ゲノム編集学会第 3 回大会 (2018.6.19-20, 広島)
- 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モデルの構築 . シンポジウム：細胞アッセイ技術の現状と将来 (2018.1.19 つくば)
- Arima Y. Cell surface engineering for controlling cell-cell interactions. Pacific Rim Nano Medicine Symposium 2018 -The 9th Japan-Taiwan Symposium on Nanomedicine-. Kobe, January 25-26, 2018.

Arima, Y. Interaction at cell-cell interface studied using model cell surface. The 6th Japan-China Symposium on Nanomedicine. Matsue, May 26-28, 2018 (**invited talk**).

Arima, Y., Shibanuma, K., Hirai, Y. Cell surface engineering for controlling multicellular aggregate formation. 5th TERMIS World Congress 2018, Kyoto, September 4-7, 2018.

有馬 祐介, 磯部 潤 細胞表面の混在分子が細胞間相互作用へ及ぼす影響 第40回日本バイオマテリアル学会大会 神戸, 2018年11月12-13日

Arima Y. Cell-cell interaction studied using model cell surface. 12th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2018). Ube, December 6-8, 2018 (**invited talk**).

Arima, Y. Interaction at cell-cell interface studied using model cell surface. 2018 Taiwan-Japan-Korea Trilateral Conference on Nanomedicine. Taipei, December 12-14, 2018 (**invited talk**).

Shibanuma, K., Hirai, Y., Arima, Y. Development of cell surface modification with recombinant proteins for controlling cell-cell interactions. The 6th Japan-China Symposium on Nanomedicine. Shimane, May 26-28, 2018.

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

助 教 笠井 倫志 Assist. Prof. Rinshi Kasai

1. 生きている細胞中の1分子観察と操作法の開発

私達の研究室の特徴は、生細胞中での1分子観察と操作をおこなうことである。そのため、生きている細胞の中で働く分子一つについて、マイクロ秒レベルの時間分解能と、ナノメートルレベルの空間精度で追跡し、さらに、活性化（反応）を司る、それら分子の結合解離までをも1分子毎に見る方法を開発してきた。こうした研究によって、従来の1生細胞レベルでのイメージングや、多数分子の計測によって得られた生物学の知見を大きく再構成する結果を次々と得ている。さらに、こうした研究は、ナノサイエンス／ナノテクノロジーと融合し、1分子ナノバイオロジー、1分子細胞生物物理学という新しい学問分野を創造しつつある。

以下では、細胞内1分子観察法を使って初めて可能になった研究成果をいくつか紹介する。

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よく一致した（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（例えば、シグナルが来た位置を数十秒程度記憶するためと考えられる）、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. G蛋白質共役型受容体（GPCR）の動的なモノマー・ダイマー平衡について

生体内で最大の蛋白質ファミリーを形成するG蛋白質共役型受容体（GPCR）は、その多様な働

きから、生体活動に極めて重要である。近年、いくつかの GPCR はダイマーを形成し、機能の調節を行っている可能性があることが報告されているが、モノマーで働くとされている従来の知見と大きく異なっており、議論が起きていた。そこで、生細胞内での蛍光一分子観察法を用いて細胞膜上の GPCR の動態を観察すると、寿命が 100 ミリ秒程度の短寿命の一過的なダイマーを形成していることが分かった。また、ダイマーを形成する分子の割合を調べることで、ダイマーとモノマーの二次元膜上での平衡定数を求め、これらから、細胞膜上での GPCR の平衡を完全に解明することができた（図 2 参照）。すなわち、生理的な GPCR の発現条件の下では、モノマーとダイマーが共存すること、さらに、両者が絶え間なく交換することが分かった。言い換えると、先に説明した、GPCR のモノマー・ダイマー論争では、どちらも正しいということを意味している。

さらに、こうしたモノマー・ダイマー平衡は、複数の GPCR で保存された性質であること、また、受容体の活性化によって、ダイマー寿命が約 50% 長くなることも分かってきた。これらの知見は、一過的なダイマー形成がシグナル生成と何らかの関連があることを示唆している。

以上の発見は、シグナル生成が、1 回毎の分子の結合や解離という単位で量子化されていることを示唆しており、多数分子の平均として観察される生化学や細胞イメージングによるシグナル変化は、量子的なシグナルパルスの積算であること、かつ、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、シグナル伝達をシステムとして理解するためには極めて重要な知見で、シグナル分子が動的に結合解離し

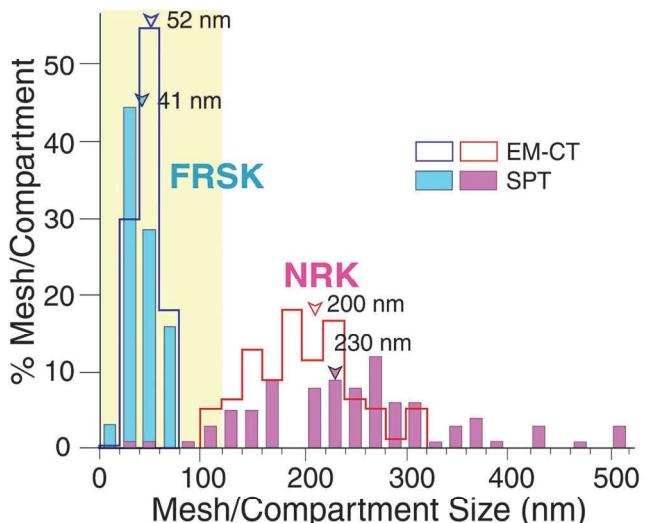


図 1. 細胞膜の細胞質側表面に存在するアクチン膜骨格の構造を、3 次元再構成法によって、定量的に可視化し、膜の内側表面の膜骨格の網目の大きさを求めた。網目の大きさの分布を、オープンバーで示す。赤が NRK 細胞、青が、FRSK 細胞。さらに、細胞膜中のリン脂質の拡散運動から求めたコンパートメントの大きさの分布を、クローズドバーで示す。両者は、各々の細胞でよく一致する。このように、網目やコンパートメントの大きさが大きく異なる 2 種の細胞で、それぞれ一致が見られたことは、膜骨格フェンスとそれに結合した膜貫通型タンパク質のピケットモデルを強く支持する。

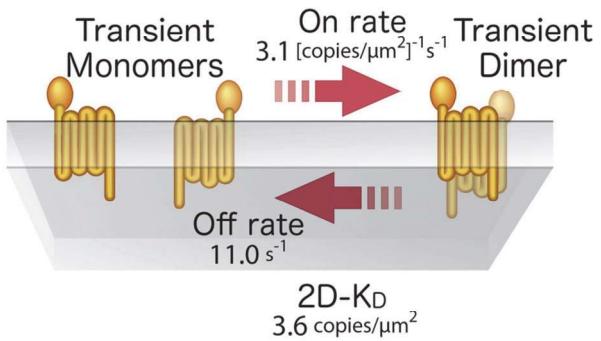


図 2. 細胞膜に存在する G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) を、細胞内蛍光 1 分子観察法を用いて調べる事で、動的なモノマー・ダイマー平衡を解明した。ダイマーのオフレート、オンレート、2 次元の平衡定数をそれぞれ示す。モノマーと、ダイマーは共存するが、両者は常に動的に交換している。

ながら、かつ、協調して働くという、生命システムの精緻な動作原理の一端が見えてきたと言える。

Paradigm shift of the concept of the plasma membrane structure

The plasma membrane has been considered to be a two dimensional liquid, with their constituent molecules, membrane proteins and lipids, diffusing freely in the plasma membrane, the Singer-Nicolson model widely accepted for these 30 years. However, we found that the plasma membrane is partitioned into many small compartments, and both membrane lipids and proteins undergo short-term confined diffusion within a compartment, and long-term hop diffusion between the compartments. These membrane compartments are delimited by the membrane skeleton and the transmembrane proteins anchored to the membrane skeleton (Fujiwara et al., 2002; Murase et al., 2004; Kusumi et al., 2005; Morone et al., 2006). This entails a paradigm shift for the concept of the plasma membrane, from the continuous two-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 millisecond to 1 second could not be detected.

Characterization of dynamic equilibrium of G-protein coupled receptor between monomers and dimers in live plasma membrane

G-protein coupled receptors or GPCRs are the largest family of membrane receptors, and have been studied for their importance. Since around 2000, some groups have reported that they work as dimers, which is totally opposite to the previous classic model that they work as monomers. By developing quantitative single fluorescent-molecule imaging technique in live cells, we found that Formyl peptide receptor or FPR, a chemotactic GPCR in neutrophil, forms very transient dimer with a lifetime of 100 milliseconds even at the resting state. We also determined the two dimensional equilibrium constant of FPR between monomers and dimers by examining the amounts of dimers at different concentrations of receptor molecules. From these observations, we finally succeeded in characterizing dynamic equilibrium of GPCR between monomers and dimers, which was the first time determination ever for any membrane molecules. Furthermore, we also found that transient dimer formation of GPCR becomes slightly stabilized upon agonist stimulation, suggesting that dimer formation has some meanings in GPCR functions. Based on these findings, we can conclude that both monomeric state and dimeric state of GPCRs coexist, while they're dynamically exchanging their states. Such dynamic equilibrium itself is probably a conserved feature among GPCRs, which is related to its signal generation and regulation.

List of Publications

Tsunoyama, T.A., Watanabe, Y., Goto, J., Naito, K., Kasai, R.S., Suzuki, K.G.N., Fujiwara, T.K., and Kusumi, A. (2018). Super-long single-molecule tracking reveals dynamic-anchorage-induced integrin function. **Nat. Chem. Biol.** 14, 497-506.

Kasai, R.S., Ito, S.V., Awane, R.M., Fujiwara, T.K., and Kusumi, A. (2018) The Class-A GPCR dopamine D2 receptor forms transient dimers stabilized by agonists: detection by single-molecule tracking. **Cell Biochem. Biophys.** 76, 29-37.

List of Invited Presentations

Kasai, R.S. Transient dimer formation of G-protein coupled receptor: single fluorescent molecule imaging in live cells. The 3rd Biosignal Research Center International Symposium “Modulation of GPCR signaling by membrane heterogeneity and molecular clustering”. Kobe, September 19, 2108.

笠井倫志 G タンパク質共役型受容体の動的なダイマー形成：蛍光1分子観察法による解明 日本農芸化学会 中部支部 第184回例会 若手シンポジウム、岐阜、2018年11月3日

List of Presentations

Kasai, R.S., Fujiwara, T.K., and Kusumi, A. Transient dimers of GPCRs are responsible for triggering GPCRs' basic constitutive signals - A finding by the two-color single fluorescent-molecule tracking in living cells. Cold Spring Harbor meeting: Single Biomolecules. Cold Spring Harbor, August 28 - September 1, 2018.

Kasai, R.S. Spontaneous activation in a transient GPCR dimer before ligation as revealed by dual-channel single fluorescent molecule imaging. 第56回日本生物物理学会 年会、岡山、2018年9月15-17日

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

バイオメカニクス分野
Laboratory of Biomechanics

教 授	安達 泰治	Prof.	Taiji Adachi
准教授	井上 康博	Assoc. Prof.	Yasuhiro Inoue
講 師	オケヨ ケネディ	Sr. Lect.	Okeyo Kennedy Omondi
助 教	亀尾 佳貴	Assist. Prof.	Yoshitaka Kameo

本分野では、生物の発生過程における細胞分化、形態形成、成長、さらには生体組織・器官のリモデリングや再生による環境への機能的適応など、多様な生命現象における自律的な制御メカニズムの解明を目指し、力学、生命科学、医科学を含む学際的研究を行っている。2018年においては、骨リモデリングのメカニズムを統合的に理解するための全く新しい *in silico* 実験プラットフォームを構築した。また、細胞—基板接着を限定するマイクロメッシュ培養法を開発し、ヒト多能性幹細胞（hiPS 細胞）の自己組織化・分化に及ぼす接着環境の影響を調べた。

1) 力学負荷に対する骨適応現象の *in silico* 再現

骨の構造と機能は、よく制御された骨代謝・リモデリングにより維持されている。近年の研究により、骨代謝を制御する分子・細胞メカニズムが次第に明らかにされてきた。しかしながら、細胞間のシグナル伝達経路は非常に複雑なネットワークシステムを形成しているため、局所的な細胞間の相互作用から、大域的な骨組織の生理的・病理的状態を予測することは容易でない。そこで本研究では、微視的な分子・細胞の相互作用と巨視的な組織・器官の適応変化とを関連付けることにより、骨リモデリングのメカニズムを統合的に理解するための全く新しい *in silico* 実験プラットフォームを構築した。構築したプラットフォームの妥当性を力学的観点から示すために、単一骨梁スケール、および複数の骨梁を含む海綿骨スケールにおいて、力学荷重に対する骨の適応現象を再現した (Fig. 1)。その結果、長軸が傾斜した円筒形状骨梁は、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成の繰返しにより、負荷した荷重方向へと配向した。また、枝分かれ構造を有する Y 形状の骨梁の場合、上部二本の骨梁が互いに近づくような形態変化を示した。さらに、マウス大腿骨の遠位部に対して同様の解析を行ったところ、内部の立方体状海綿骨領域では、各骨梁がそれぞれ荷重支持に適した形態を獲得した。以上の結果から、構築した *in silico* 実験プラットフォームは、複雑な細胞間シグナル伝達により制御される骨の力学環境への適応現象を再現可能であることが示唆された。

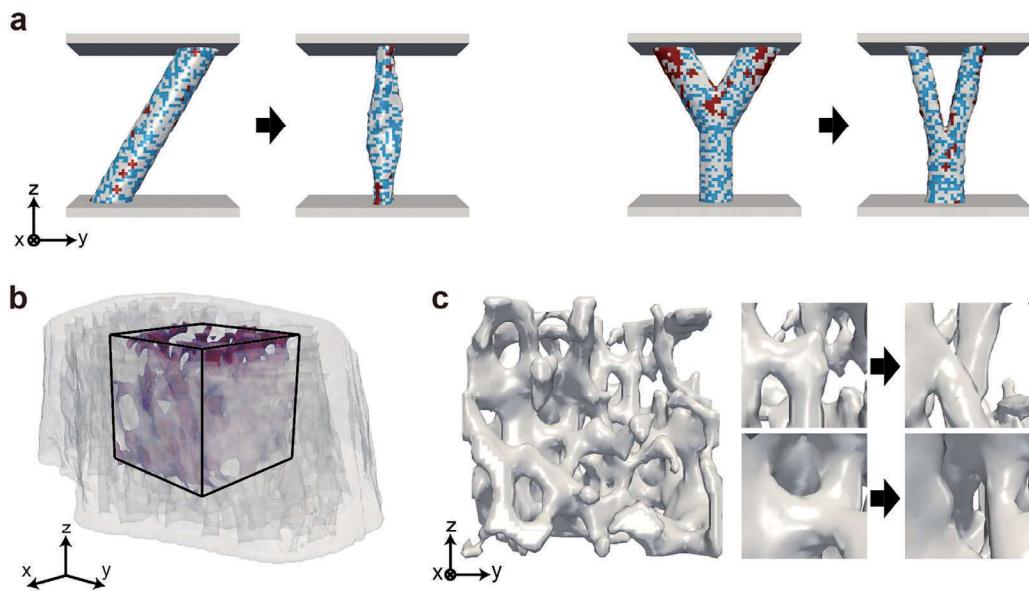


Fig. 1. *In silico* reproduction of trabecular bone adaptation to mechanical loading. (a) Morphological changes in an inclined single trabecula (left) and a Y-shaped trabecula (right) under compressive loading. (b) A three-dimensional model of a mouse distal femur reconstructed from micro-computed tomography images. (c) Morphological changes in multiple trabeculae in the cuboid region.

2) メッシュ培養基板を用いた多能性幹細胞の接着環境調節による自己組織化・分化誘導

胚発生過程における幹細胞の運命決定現象は発生生物学の中心的な課題であるが、そのメカニズムはあまり理解されていない。本研究では、独自手法であるマイクロメッシュ培養法を用い、ヒト多能性幹細胞（hiPS 細胞）の自己組織化・分化に及ぼす接着環境の影響を調べた。マイクロメッシュは開口部（網目）の内寸が 100 μm 以上、線幅が 5 μm 程度の培養基材であり、それを培養液中に浮かせて設置することで細胞—基板間接着を限定化し、結果的に細胞間結合のみによる自己組織化が誘起される。本研究では、hiPS 細胞をマイクロメッシュ培養基板で培養したところ、播種初期にメッシュ線上に沿って接着・伸展した細胞が、増殖とともに自己組織化してメッシュ開口部（網目）を徐々に埋めていき、最終的にメッシュ面を覆うようにシート状の細胞組織が形成された（Fig. 2A）。さらに培養を続けると既に形成されたシート状組織より自己組織化的にシスト構造が複数現れ、時間の経過とともに成長した（Fig. 2A）。免疫染色顕微鏡法や qPCR 法により解析を行った結果、胎盤の遺伝子として知られる Cdx2 の発現（Fig. 2B）や、hCG ホルモンの分泌がシスト構造で確認され、トロフォプラスト様分化の可能性が示唆された。比較のため、シート状組織を形成せず、メッシュ上でスフェロイド化した同一クローンの hiPS 細胞に対しても同様の解析を行った。しかしこの場合は、Cdx2 の発現も hCG ホルモンの分泌もともに著しく低下した。従って、メッシュ構造基板により誘導されるシート状組織への自己組織化がその後の hiPS 細胞の分化に影響を及ぼすことが示唆された。今後、メッシュ培養基板による接着環境調節がどのような分子的経路を介して分化や自己組織化に影響を及ぼすかを明らかにする。

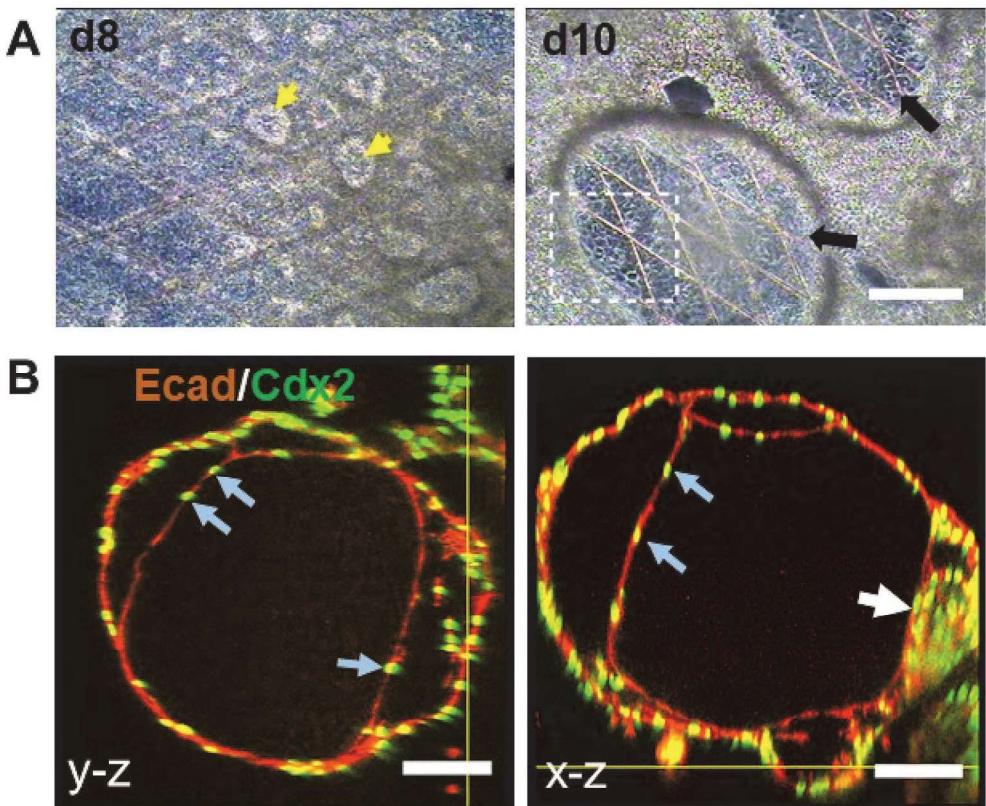


Fig. 2. Self-organization of hiPS cells on a microstructured adhesion limiting mesh substrates. A: Emergence and growth of cysts on a self-organized hiPS cell sheet which grew into transparent cysts of early-stage cysts (*left*: early stage cysts (yellow arrows), *right*: bubble-like cysts at day 10 (black arrows) with epithelial-like tiled cell arrangement (dotted square region)). **B:** Confocal images of a large cyst observed from two different planes of view, and showing the expression of E-cadherin and Cdx2. Scale bar: 100 μ m.

This laboratory aims to clarify the regulatory mechanism of self-organization which underlies diverse biological phenomena through an interdisciplinary approach, encompassing mechanics, life and medical sciences. In 2018, we developed a novel *in silico* experimental platform to synthetically understand the mechanism of bone remodeling by linking microscopic molecular/cellular interactions to macroscopic tissue/organ adaptations. In addition, to investigate the influence of adhesion microenvironment on self-organization and differentiation of stem cells, we developed a micromesh-based technique which limits cell-substrate adhesion while enhancing cell-cell adhesion.

1) *In silico* reproduction of bone adaptation to mechanical loading

Bone structure and function are maintained by well-regulated bone metabolism and remodeling. Even though the underlying molecular and cellular mechanisms are now being clarified, the complexity of intercellular signaling makes it difficult to predict bone physiological and pathological states. In this study, we developed a novel *in silico* experimental platform to synthetically understand the mechanism of bone

remodeling by linking microscopic molecular/cellular interactions to macroscopic tissue/organ adaptations. In order to show the validity of the platform from a mechanical point of view, we reproduced bone adaptation to mechanical loading at the scales of a single trabecula and a cancellous bone comprising multiple trabeculae (Fig. 1). A cylindrical trabecula with an inclined longitudinal axis reoriented parallel to the imposed loading direction due to cooperative osteoclastic bone resorption and osteoblastic bone formation. As for a Y-shaped trabecula with a branching, the upper two trabeculae moved towards each other. In a cancellous bone cube inside a mouse distal femur model, most of the individual trabeculae acquired morphology suitable for supporting the imposed load. These results show that the developed *in silico* experimental platform can successfully reproduce bone adaptation to mechanical environment, which is regulated by complex intercellular signaling.

2) Self-organization and differentiation of iPS cells triggered by modulating the adhesion microenvironment using adhesion-limiting mesh substrates

In this study, we monitored the effect of modulating the adhesion microenvironment on growth, self-assembly and differentiation of human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) using adhesion-limiting micromesh substrates set suspended in a culture medium. The substrates have characteristically large apertures (exceeding 100 μm in dimension) and thin mesh lines (less than 5 μm in width) such that when set suspended, cell-substrate interaction become limited to the narrow mesh lines. Cells seeded on the micromesh adhered along the mesh lines initially, and then began to proliferate and self-assemble, eventually patching up the considerably large mesh apertures while relying solely on cell-cell adhesion. As a result, by day 4 after seeding, hiPSCs self-organized into a sheet-like layer covering the micromesh substrate, representing the first phase of self-organization. With continued culture, spherical buds began to appear on the initially formed sheet-like layer at around day 8 (Fig. 2A, *left*), and they grew into bubble-like cysts enclosed by a thin wall (Fig. 2A, *right*). Remarkably, cysts emerging from the sheet-like layers showed the expression of Cdx2 (Caudal-type homeobox protein 2) and hCG hormone secretion, as determined by immunostaining (Fig. 2B) and qPCR analysis. This is consistent with our previous study highlighting trophoblast-like differentiation by mesh-cultured hiPSCs. In contrast, spheroids of similar cells formed without going through the first self-organization process turned out to exhibit highly reduced expression of the two markers, suggesting that the pattern of self-assembly on the adhesion limiting meshes can influence downstream differentiation. Thus, this study suggests that self-organization into sheet-like layers induced by the adhesion-limiting micromesh substrates can influence stem cell fate with regard to differentiation. Future work will clarify underlying molecular mechanisms.

List of Publications

1. 論文

Shindo, A., Inoue, Y., Kinoshita, M., Wallingford, B-J. (2018). PCP-dependent Transcellular Regulation of

Actomyosin Oscillation Facilitates Convergent Extension of Vertebrate Tissue. **Developmental Biology** (in press).

Okuda, S., Takata, N., Hasegawa, Y., Kawada, M., Inoue, Y., Adachi, T., Sasai, Y., Eiraku, M. (2018). Strain-Triggered Mechanical Feedback in Self-Organizing Optic Cup Morphogenesis. **Science Advances**, Vol. 4, No. 11, #eaau1354.

Marcotte, S., Maki, K., Reilly, C.-G., Lacroix, D., Adachi, T. (2018). Hyaluronic Acid Selective Anchoring to the Cytoskeleton: An Atomic Force Microscopy Study, **PLOS One**, #0206056.

Takahashi, T., Okeyo, K.O., Ueda, J., Yamagata, K., Washizu, M., and Oana, H. (2018). A Microfluidic Device for Isolating Intact Chromosomes from Single Mammalian Cells and Probing their Folding Stability by Controlling Solution Conditions. **Scientific Reports**, Vol. 8, #13684.

Adachi, H., Matsuda, K., Niimi, T., Inoue, Y., Kondo, S., Gotoh, H. (2018). Anisotropy of Cell Division and Epithelial Sheet Bending via Apical Constriction Shape the Complex Folding Pattern of Beetle Horn Primordia. **Mechanisms of Development**, Vol. 152, pp. 32-37.

Tanaka, T., Hoshijima, M., Sunaga, J., Nishida, T., Hashimoto, M., Odagaki, N., Osumi, R., Adachi, T., Kamioka, H. (2018). Analysis of Ca²⁺ Response of Osteocyte Network by Three-dimensional Time-lapse Imaging in Living Bone. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, Vol. 36, pp. 519-528.

Shinoda, T., Nagasaka, A., Inoue, Y., Higuchi, R., Minami, Y., Kato, K., Suzuki, M., Kondo, T., Kawaue, T., Saito, K., Ueno, N., Fukazawa, Y., Nagayama, M., Miura, T., Adachi, T., Miyata, T. (2018). Elasticity-based Boosting of the Neuroepithelial Nucleokinesis via Indirect Energy Transfer from Mother to Daughter. **PLOS Biology**, Vol. 16, No. 4, #e2004426.

Okeyo, K.O., Tanabe, M., Kurosawa, O., Oana, H., Washizu, M. (2018). Self-organization Human of iPS Cells into Trophectoderm Mimicking Cysts Induced by Adhesion Restriction Using Microstructured Mesh Scaffolds. **Growth, Development & Differentiation**, Vol. 60, Issue 3: 183-194.

Okuda, S., Miura, T., Inoue, Y., Adachi, T., Eiraku, M. (2018). Combining Turing and 3D Vertex Models Reproduces Autonomous Multicellular Morphogenesis with Undulation, Tubulation, and Branching. **Scientific Reports**, Vol. 8, #2386.

Maki, K., Han, W.-S., Hirano, Y., Yonemura, S., Hakoshima, T., Adachi, T. (2018). Real-time TIRF Observation of Vinculin Recruitment to Stretched α -catenin by AFM. **Scientific Reports**, Vol. 8, #1575.

Mori, H., Okeyo, K.O., Washizu, M., and Oana, H. (2018). Non-uniform Unwrapping along Native Chromatin Fibers with Increasing Salt Concentration as Revealed by Direct Imaging in a Microfluidic Channel. Nucleosomes Exhibit 2018-1, **Journal of Biotechnology**, Vol. 13, Issue 1, #1700245.

Ishihara, M., Ootao, Y., Kameo, Y. (2018). Analytical Technique for Thermoelectroelastic Field in Piezoelectric Bodies with D_{∞} Symmetry in Cylindrical Coordinates. **Journal of Thermal Stresses**, Vol.

41, Issue 1, pp. 17-36.

Kameo, Y., Tsubota, K., Adachi, T. (2018). Bone Adaptation: In Silico Approach, Vol. 2, Series: **Frontiers of Biomechanics**, ISBN: 978-4431565123, Springer.

List of Presentations

1. 講演・シンポジウム

Inoue, Y., Mechanochemical interplays in multicellular dynamics during tissue morphogenesis, The 2nd Workshop on Microscopic Simulation and Cell Experiments for Biological Systems, Kashiwa, Chiba, February 23, 2018, (招待講演).

Adachi, T. In Silico Modeling of Bone Metabolism and Remodeling, International Conference on Materials Science and Engineering: Recent Advances and Challenges (ICMSE-RAC), E-JUST, Alexandria, Egypt, March 11-13, 2018, (Symposist).

Okeyo, K.O. A Mesh Culture Technique for Fabricating Organ-on-chip and Organoids, Organ-on-a-Chip, Tissue-on-a-Chip Europe 2018, Rotterdam, Netherlands, June 5-6, 2018, (Invited).

Adachi, T., Ishikawa, K., Sunaga, J., Kameo, Y., Effect of Local Tensile Stress Field on Bone Matrix and Cell Alignment: An In Vitro Study, S27: Cell Mechanics and Cell Mechanobiology – 2, The European Society for Clinical Hemorheology and Microcirculation, The International Society of Clinical Hemorheology and The International Society of Biorheology (ESCHM-ISCH-ISB-2018), Krakow, Poland, July 2-6, 2018, (Symposist).

Adachi, T., Miya, Y., Kameo, Y., Nakashima T., In-silico Observation of Bone Metabolism and Remodeling Based on Mechano-biochemical Coupling Models, Japan Society of Mechanical Engineers session: Commemorative Lectures on Emerging Technologies for Biomechanics: Beyond the 120th anniversary of the JSME, 8th World Congress of Biomechanics (WCB2018), Dublin, Ireland, July 8-12, 2018, (Keynote).

Adachi, T., Miya, Y., Kameo, Y., Nakashima T., Computer Simulation Model of Bone Osteoporosis and Drug Treatment for In-silico Experiment and Observation, 13th World Congress on Computational Mechanics (WCCM2018), MS324: Mechanobiology of Bone and Cartilage, New York, US, July 22-27, 2018, (Keynote).

Adachi, T., Force Feedback in Multicellular Morphogenesis from Molecule to Tissue: In vitro and in silico Studies, ASME 2018 NEMB (NanoEngineering for Medicine and Biology Conference), Los Angeles, US, August 21-24, 2018.

Okeyo, K.O., Biophysical Approaches to Organoid Fabrication, SELECTBIO 3D-Culture & Organoids, Coronado Island, California, USA, October 4-5, 2018, (Invited).

Adachi, T., In-silico and in-vitro Studies on Mechanofeedback in Multicellular Tissue Morphogenesis (Invited Lecture), International Conference on Medicine and Biology (ICMB2018), Taipei, Taiwan, November 22-24, 2018.

Okeyo, K.O., Biophysical Approaches to Organoid Fabrication, SELECTBIO Cell Therapy Asia, Sheraton-Bay Hotel, Kobe, Japan, December 6-7, 2018, (Invited).

Okeyo, K.O., Yamada, K., Kurosawa, O., Oana, H, Washizu, M., Reconstituting a Bilayer Cellular System Using an Artificial Matrigel Basement Membrane Achieved by the Micromesh Technique, IEEE International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science (MHS2018), Nagoya, Japan, December 9-12, 2018.

安達泰治 生体組織・器官の形づくりのバイオメカニクス 第54回お茶の水疾患研究会、東京ガーデンパレスホテル、東京、2018年1月31日（特別講演）

オケヨ・ケネディ・オモンディ マイクロメッシュ培養技術による細胞組織構築 医工学フォーラム－2017年度特別学術講演会、京都リサーチパーク、京都、2018年2月28日（シンポジスト）

安達泰治 多細胞組織の形態形成における分子・細胞バイオメカニクス：実験と数理アプローチ 第18回日本蛋白質科学会年会、WS「発生ダイナミクス解明のためのツール開発とその応用」、新潟、2018年6月26-28日（ワークショップ）

井上康博 上皮形態形成を捉える多細胞力学シミュレーション 平成30年理研シンポジウム、計算で物事を理解する予測する、和光、2018年10月15-16日（シンポジスト）

安達泰治、亀尾佳貴、宮 雄貴 骨の形態リモデリングと代謝の in silico 実験 平成30年理研シンポジウム、計算で物事を理解する予測する、和光、2018年10月15-16日（シンポジスト），

井上康博 上皮形態形成の理解を目指した多細胞動力学シミュレーション 第13回医工連携セミナー、姫路、2018年11月19日（招待講演）

井上康博、木村健治 曲面上の分子拡散動態シミュレーションから予想される細胞形状の役割 第41回日本分子生物学会年会、ワークショップ「数理デザイン道場 in MBSJ2018」、横浜、2018年12月28-30日（招待講演）

2. 研究会・セミナー 記載

Inoue, Y. Computational simulation on multiple cell dynamics in tissue deformation. Japan-Toronto Morphogenesis Symposium. Toronto, Canada, July 16-17, 2018.

Adachi, T. Multiscale Biomechanics of Multicellular Tissue Morphogenesis. Egypt-Japan University of Science and Technology (E-JUST), Seminar, Alexandria, Egypt. November 29, 2018.

Okeyo, K.O. Tissue engineering by regulating the cell adhesion microenvironment. Mini-symposium of

Single Cell Sequencing, Biosensing and Biomicrofluidics, Room 132, Building II, College of Science, National Chung Cheng University, Taiwan, November 6, 2018.

オケヨ・ケネディ・オモンディ 微小培養環境制御に基づく幹細胞組織のメカノバイオロジー研究
革新的先端研究開発支援事業「メカノバイオロジー機構の解明による革新的医療器及び技術創出 メカノバイオロジー機構の解明による革新的医療器及び技術創出」研究開発領域 「平成 29 年度 キックオフ・領域会議 領域会議」、東京、2018 年 1 月 18-19 日

井上康博 多細胞組織に立体形状が作られる力学原理の数理 文部科学省科学研究費補助金新学術領域「生物の 3D 形態を構築するロジック」 2018 年度班会議、札幌、2018 年 5 月 14-15 日

齋梧 等、井上康博、安達泰治 細胞変形を考慮した細胞集団運動の数理モデル化 文部科学省科学研究費補助金新学術領域「生物の 3D 形態を構築するロジック」 2018 年度班会議、札幌、2018 年 5 月 14-15 日（ポスター）

森川健太郎、井上康博、安達泰治 組織形状に応じた細胞増殖による上皮折り畳み形成シミュレーション 文部科学省科学研究費補助金新学術領域「生物の 3D 形態を構築するロジック」 2018 年度班会議、札幌、2018 年 5 月 14-15 日（ポスター）

安達泰治 骨のかたち：力に応じて変わるしくみ 京都モーニングロータリークラブ、京都、2018 年 5 月 17 日

安達泰治、亀尾佳貴、Yann Guyot、竹田宏典、武石直樹 脳形態形成の理解に向けた *in silico* 実験基盤の構築 文部科学省科学研究費補助金新学術領域「脳構築における発生時計と場の連携」第 3 回領域班会議、八ヶ岳、2018 年 7 月 17-19 日

亀尾佳貴 代謝とリモデリングの数理バイオメカニクス メカノバイオロジー研究を学ぶ 2018、京都、2018 年 10 月 12 日

安達泰治 三次元培養系を用いた分化骨細胞の力学的配向機構の検討：バイオメカニクスの応用 AMED 再生医療実現拠点ネットワークプログラム「難治性骨軟骨疾患に対する革新的 iPS 創薬技術の開発と応用」、京都、2018 年 10 月 17 日

オケヨ・ケネディ・オモンディ メッシュ培養法を用いた組織工学：メッシュ材料開発から細胞組織構築まで 第 5 回「バイオナノミクス基盤技術研究会」、京都大学吉田キャンパス国際科学イノベーション棟、京都、2018 年 10 月 18 日

3. 学会

Kimura, K., Inoue, Y. Simulation of Brownian Dynamics on a Curved Surface. Biophysical Society 62nd Annual Meeting (BPS18), Poster #1708-Po, San Francisco, California, February 17-21, 2018.

Guyot, Y. Adachi, T. A Continous Cell Populations Dynamic Model for Neuronal Migration during Corticogenesis. Oral, International Young Scientists Workshop on Neural Development & Stem Cells

2018, p.26, Kyoto, March 19-23, 2018.

Kameo, Y., Takeda, H., Adachi, T. A Coupled Model of Cell Migration and Tissue Deformation for Simulating Cerebral Cortex Morphogenesis. Poster, International Young Scientists Workshop on Neural Development & Stem Cells 2018, p.60, Kyoto, March 19-23, 2018.

Nakao, N., Maki, K., Adachi, T. Time Dependent Change in Nano-mechanical Properties of Nascent Focal Complex. 8th World Congress of Biomechanics (WCB2018), Oral #O0703, Dublin, Ireland, July 8-12, 2018.

Takeda, H., Kameo, Y., Adachi, T. Finite Element Analysis of Coupled Behavior of Tissue Deformation and Cell Movement in Morphogenesis. 8th World Congress of Biomechanics (WCB2018), Poster #P1055, Dublin, Ireland, July 8-12, 2018.

Kameo, Y., Ozasa, M., Takeishi, N., Adachi, T. Pericellular Matrix in Canaliculus Regulates Flow-induced Deformation of Osteocyte Process. 8th World Congress of Biomechanics (WCB2018), Poster #2186, Dublin, Ireland, July 8-12, 2018.

Ando, Y., Okeyo, K.O., Adachi, T. Adhesion-restricted Microstructured Mesh Sheets Induce Spontaneous Differentiation and Cyst Formation by mESCs. 8th World Congress of Biomechanics (WCB2018), Poster #P4028, Dublin, Ireland, July 8-12, 2018.

Kim, Y.-K., Kameo, Y., Tanaka, S., Adachi, T. Modeling Spatiotemporal Activities of Bone Cells Regulated by Transforming Growth Factor- β . 8th World Congress of Biomechanics (WCB2018), Oral #O0166, Dublin, Ireland, July 8-12, 2018.

Scheuren, A., Malhotra, A., Kuhn, G., Kameo, Y., Müller, R. Cyclic but Not Static Loading Increases Bone Mass in Mouse Caudal Vertebrae. 8th World Congress of Biomechanics (WCB2018), Oral #O0624, Dublin, Ireland, July 8-12, 2018.

Inoue, Y., Adachi, T. Thermodynamic Theory of Molecular Mechanosensing. 8th World Congress of Biomechanics (WCB2018), Poster #P1123, Dublin, Ireland, July 8-12, 2018.

Kimura, K., Inoue, Y. The Effects of Shapes of Biomembrane on Molecular Diffusion. 8th World Congress of Biomechanics (WCB2018), Poster #P3754, Dublin, Ireland, July 8-12, 2018.

Okeyo, K.O., Yamada, K., Kurosawa, O., Oana, H., Washizu, M. Tissue-level Control of Cell Orientation by Geometry Sensing on a Micromesh. 8th World Congress of Biomechanics (WCB2018), Oral# 00427, Dublin, Ireland, July 8-12, 2018.

Kouno, S., Okeyo, K.O., Adachi, T. Development of a Novel Co-Culture System of Recapitulating the Interaction between Endothelial Cells and Neural Cells in the Blood-brain Barrier. 5th TERMIS World Congress, 01-P488, Kyoto, September 4-6, 2018.

Ando, Y., Okeyo, K.O., Adachi, T. Spontaneous Differentiation to Primordial Germ Cell-like Cells and Cyst

Formation from mES Cells with Microstructured Mesh Culture. 5th TERMIS World Congress, 02-P081, Kyoto, September 4-6, 2018.

Oana, H., Takahashi, T., Okeyo, K.O., Ochiai, H., and Washizu, M. Direct Acquisition of Individual Target Chromosomes Isolated from Single Mammalian Cells in a Microfluidic Channel for Single Cell/Chromosome. SELECTBIO Single Cell Analysis Summit 2018, Poster, Coronado, San Diego, USA, October 2-3, 2018.

Kibe, Y., Okeyo, K.O., Adachi, T. Controlling the Orientation of C2C12 Cells using Suspended Microstructured Mesh Substrates. 31st International Micropocesses and Nanotechnology Conference, Sapporo (MNC2018), Poster#, November 13-16, 2018.

Okanojo, M., Okeyo, K.O., Hanzawa, H., Kurosawa, O., Oana, H., Takeda, S., Washizu, M. Nuclear Transplantation between Allogeneic Cells Achieved by Fusion-based Topological Reconnection of the Plasma membrane in a Microfluidic System. Proc. of MicroTAS 2018 (22th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences), p. 1425-1427 (2018), Poster, Kaohsiung, Taiwan, November 11-15, 2018.

Okeyo, K.O., Yamada, K., Kurosawa, O., Oana, H., Washizu, M. Reconstitution of an Epithelial-Endothelial Bilayer by the Micromesh Culture Technique Employing an Artificial Matrigel Basement Membrane. Proc. of MicroTAS 2018 (22th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences), p. 1617-1619 (2018), Poster, Kaohsiung, Taiwan, November 11-15, 2018.

亀尾佳貴、小笠正裕、武石直樹、安達泰治 細胞周囲マトリックスを介した骨細胞への流れ刺激の数理解析 第38回日本骨形態計測学会、大阪、Vol. 28、No. 2、p. S118、大阪、2018年6月21-23日

林周宏、仲尾信彦、井上聖香、安達泰治、久保健一郎、仲嶋一範 リーリンはN-cadherinを基盤とした神経細胞接着を2つの経路で誘導する 第61回日本神経化学会大会、P1-5、神戸、2018年9月6-8日

河野沙紀、オケヨ・ケネディ・オモンディ、安達泰治 メッシュ構造基板に基づく血管内皮細胞と神経幹細胞の三次元共培養システムの構築 日本機械学会2018年度年次大会、No. 18-1、S0210102、大阪、2018年9月10-12日

石川敬一、須長純子、亀尾佳貴、安達泰治 三次元培養系を用いた分化骨細胞の力学的配向機構の検討 日本機械学会2018年度年次大会、No. 18-1、S0210104、大阪、2018年9月10-12日

佐藤優里佳、亀尾佳貴、須長純子、安達泰治 力学負荷を受ける培養長管骨内細胞群の遺伝子発現解析 日本機械学会2018年度年次大会、No. 18-1、S0210205、大阪、2018年9月10-12日

木部善清、オケヨ・ケネディ・オモンディ、安達泰治 細胞-基質間接着制限に基づく配向骨格筋細胞シートの作製 日本機械学会2018年度年次大会、No. 18-1、S0220102、大阪、2018年9月10-12日

齋梧 等、井上康博、安達泰治 細胞変形を考慮した細胞集団運動の数理モデル化 日本機械学会
2018年度年次大会、No. 18-1、S0230102、大阪、2018年9月10-12日

小笠正裕、亀尾佳貴、武石直樹、安達泰治 骨細胞周囲の微細環境変化が間質液流れによる細胞突起変形に及ぼす影響 日本機械学会2018年度年次大会、No. 18-1、S0230205、大阪、2018年9月10-12日

Inoue, Y. Folding Pattern Formation in a Confined Epithelial Cell Sheet. 日本生物物理学会、#1SAA-6
(Symposium Oral)、2018年9月15-17日

寺澤良亮、安達泰治、亀尾佳貴 力学荷重に応じた骨代謝にともなう骨量と骨質の *in silico* 評価 日本機械学会第29回バイオフロンティア講演会、#2A38 (oral)、千葉、2018年10月24-25日

竹田宏典、亀尾佳貴、安達泰治 生体組織の成長と収縮のタイミングが形態形成に及ぼす影響 日本機械学会第29回バイオフロンティア講演会、#2B12 (oral)、千葉、2018年10月24-25日

野山義裕、古市 格、安達泰治、伊藤 宣、勝呂 徹、石坂晴彦 人工足関節のバイオメカニクス 第45回日本臨床バイオメカニクス学会、p. 73、秋田、2018年11月16-17日

亀尾佳貴、小笠正裕、武石直樹、安達泰治 流体-構造連成解析による骨細胞への流れ刺激の *in silico* 評価 日本機械学会第31回計算力学講演会 (CMD2018)、#216 (oral)、徳島、2018年11月23-25日

木部善清、オケヨ・ケネディ・オモンディ、安達泰治 メッシュ構造基板上の細胞シート形成過程における細胞配向ダイナミクスの観察 日本機械学会第31回バイオエンジニアリング講演会、#1A13、郡山、2018年12月14-15日

竹田宏典、亀尾佳貴、安達泰治 形態形成における組織形態多様化の理解に向けた力学的アプローチ 日本機械学会第31回バイオエンジニアリング講演会、#1A21、郡山、2018年12月14-15日

石川敬一、須長純子、亀尾佳貴、安達泰治 コラーゲンゲル上における分化骨細胞の配向とゲル内部への三次元的細胞移動 日本機械学会第31回バイオエンジニアリング講演会、#1F34、郡山、2018年12月14-15日

小笠正裕、亀尾佳貴、武石直樹、安達泰治 細胞突起周囲の微細環境変化にともなう骨細胞への間質液流れ刺激の数値解析評価 日本機械学会第31回バイオエンジニアリング講演会、#1F44、郡山、2018年12月14-15日

齋梧 等、井上康博、安達泰治 発生過程の組織変形における細胞集団運動の数理モデル 日本機械学会第31回バイオエンジニアリング講演会、#1G31、郡山、2018年12月14-15日

金 英寛、亀尾佳貴、田中 栄、安達泰治 骨の力学的適応に対する骨代謝共役因子による調節効果の *in silico* 検討 日本機械学会第31回バイオエンジニアリング講演会、#2B32、郡山、2018年12月14-15日

亀尾佳貴、宮 雄貴、安達泰治 繰返し力学的負荷に応じた骨代謝・リモデリング動態の *in silico*

解析 日本機械学会第31回バイオエンジニアリング講演会、#2B33、郡山、2018年12月14-15日

河野沙紀、オケヨ・ケネディ・オモンディ、安達泰治 血液脳関門モデルの実現を目指した血管内皮細胞と神経幹細胞の三次元共培養 日本機械学会第31回バイオエンジニアリング講演会、#2C22、郡山、2018年12月14-15日

安藤悠太、オケヨ・ケネディ・オモンディ、安達泰治 メッシュ構造基板を用いて培養したマウスES細胞の始原生殖細胞様分化 日本機械学会第31回バイオエンジニアリング講演会、#2F15、郡山、2018年12月14-15日

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

発生システム制御分野
Laboratory of Developmental Systems

教授 永樂 元次 Prof. Mototsugu Eiraku
准教授 大串 雅俊 Assoc. Prof. Masatoshi Ohgushi

脳や心臓等の器官形成過程は細胞の増殖、分化、移動等を伴う極めて複雑な現象である。器官形成を実現するための原理を理解し、試験管内で機能的な器官形成を再現するために、本分野では多能性幹細胞（ES/iPS 細胞）を用いて *in vitro* での組織形成技術の開発を行なうと共に、その形成過程を解析する事で多細胞が協調して機能的な器官を作る分子機構を明らかにする事を目的として研究に取り組んでいる。本年度は、*in vitro* での網膜組織誘導系と力学シミュレーションモデルを組み合わせることで、眼の原基である眼杯の形態形成機構の力学的側面を明らかにした。

眼杯組織の形作りでは、多くの細胞が増殖したり、死んだり、異なる細胞種へと分化したり、変形したりしながら、組織全体の立体的な形を作る。このような複雑な形作りの仕組みを理解するため、コンピュータを使って組織の立体的な動きを予測するシミュレーション技術を開発した。このシミュレーション技術により、細胞の増殖、変形、粘性、細胞死、移動や力学的な特性など多様な細胞現象を再現し、コンピュータ内のバーチャルな世界で器官の形作りを再現するだけでなく、そ

の細胞レベルの変形メカニズムを予測した（Fig1）。さらに、シミュレーションによって予想された変形機構を、ES 細胞から作製した眼杯組織（Fig1）を使った実験で検証した。

数値シミュレーションからの予測と ES 細胞分化誘導系による実験的検証の結果、眼杯組織の丸い形は、図 2 のような機構により作られることが分かった。はじめに、脳から突出した神経組織の内側の面には、ミオシンが集まり、内側の面を収縮する力が働く（①）。この時、突出した組織の先端が網膜組織へ

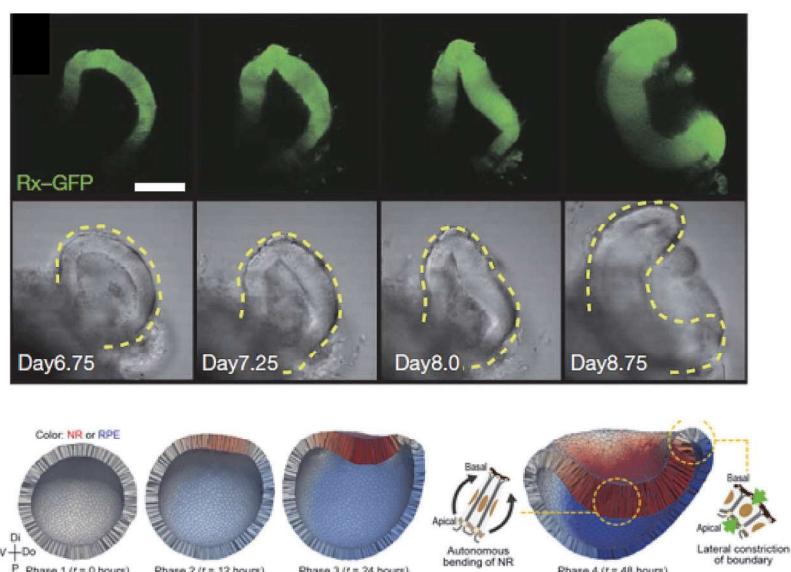


Fig1 : in vitro and in silico eye-cup organogenesis
Eye cup formation in mouse ESC culture (upper panel). Quantitative simulation of 3D multicellular dynamics during optic-cup morphogenesis (lower panel)

分化し、内側に溜まったミオシンの働きが弱まることで、網膜組織が自発的に内側へ入り込む（①）。この網膜組織の自発的な入り込みにより、網膜組織と周辺の網膜色素上皮との境界（カップの縁）の細胞は、外力により曲げられる（②）。この境界の細胞は、曲げられたことで生じる歪みを感じ取り、それをきっかけにして組織の厚み方向に沿って能動的に収縮することで、網膜組織をさらに内側へ押し込む（③）。つまり、境界の細胞は、機械的な力を通して、眼杯組織全体の変形度合いを感じながら、その丸い形を微調整していることが明らかになった。

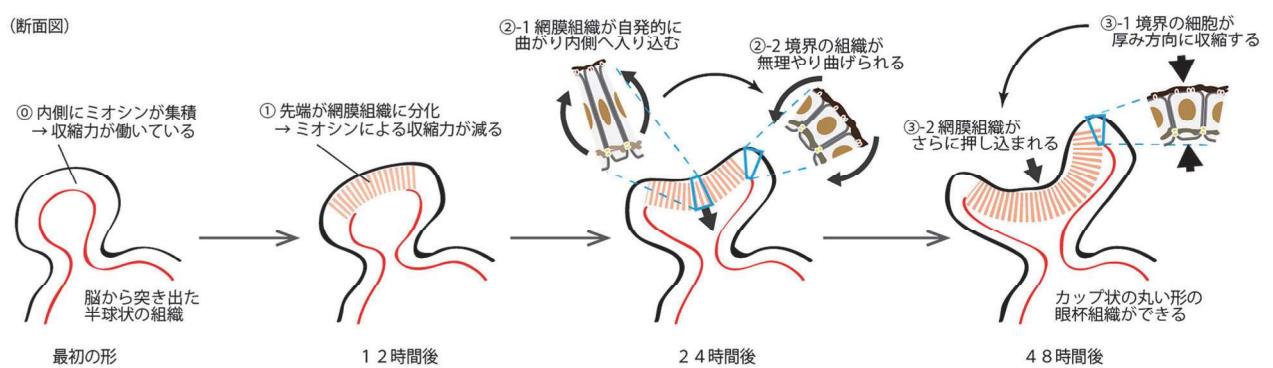


図 2：眼杯形成過程にマクロな変形に対する局所の細胞の力学応答

また、この組織形態の調節機構の発見により、本研究グループで開発したシミュレーション技術が器官の形作りの予測に役立つことが示され、器官の形作りの理解に向けた新しいアプローチとなることを提案した。また、この機構をうまく利用することができれば、試験管内の器官の形作りをより正確に制御できる可能性も考えられる（Okuda et al., *Science Advances*）。

また、我々はこれまでにマウス多能性幹細胞から誘導した網膜組織を、視細胞変性症モデルマウスの網膜下に移植することにより、成熟した視細胞を補充し機能回復に寄与できることを示してきたが、今年度は理化学研究所の万代博士らと共同で、ヒト ES 細胞から誘導した網膜組織が視機能回復に役立つかどうかを検証した。視細胞変性モデルマウス（免疫不全）を用いて、移植後のヒト網膜組織の生着、成熟および視機能の回復への寄与を調べた結果、ヒト ES 細胞由来の網膜組織は外節を持つ成熟した視細胞へと分化し、視機能の回復に寄与しうることが明らかになった（Iraha et al., *Stem Cell Report*）。

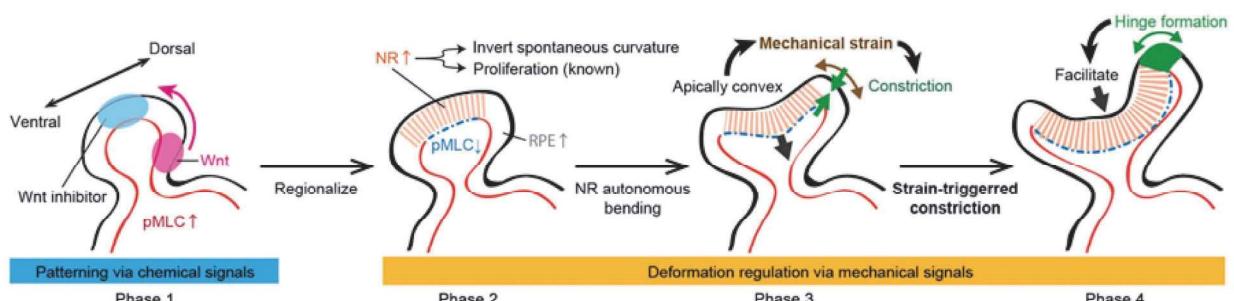
During organogenesis, morphogens dynamically organize spatial patterns of cell differentiation in three-dimensional (3D) tissues. According to the pattern, individual cells generate characteristic mechanical forces to form the entire organ structure in 3D space. Many molecules have been identified as key signaling factors that regulate each step of patterning and force generation. However, these molecular signals are not enough to explain the entire regulatory mechanism of morphogenesis. In particular, it is still unclear how individual cells sense and modulate the entire 3D tissue formation across different scales. Previous studies have revealed

cellular mechanosensing mechanisms, which may also be involved in the cross-scale regulatory mechanism of 3D tissue formation. Therefore, in this study, we focus on the mechanical aspect of morphogenesis and reveal the role of mechanical force in regulating 3D tissue formation across different scales.

Recent progress in the stem cell field has enabled us to form various 3D tissues *in vitro*. For instance, we have reported a culture system of pluripotent stem cell-derived optic-cup organoids, which well recapitulates a typical process seen *in vivo*; on the basis of the Wnt antagonism, the distal part of optic vesicle (OV) differentiates into neural retina (NR), whereas the adjacent part becomes retinal pigment epithelium (RPE). According to the differentiation pattern, the NR invaginates into the surrounding RPE in the apically convex direction. Subsequently, a hinge structure is formed along the boundary between the inner NR and outer RPE to generate a cup-like tissue shape. From a mechanical point of view, this stepwise process proceeds autonomously without external forces from the surroundings such as lens placode and periocular mesenchyme. To explain this self-organizing process, we have previously found several key candidates of driving force and suggested a relaxation-expansion model that explains the mechanism of optic-cup formation through four sequential phases. Although this model is consistent with previous experimental findings, our further mechanical analyses have prompted the investigation of more elaborate mechanisms.

In this study, we elucidate a mechanical force that is fed back from macroscopic 3D tissue deformation to individual cellular force generation during optic-cup morphogenesis. On the basis of previous mathematical models, we developed a versatile 3D vertex model that adequately describes general 3D multicellular dynamics at single-cell resolution. The *in vitro* culture of optic-cup formation enables us to observe and perturb specific cell behaviors in 3D living tissues, whereas *in silico* recapitulation enables us to predict its mechanisms comprehensively.

In silico screening predicted two key mechanisms that have not been previously mentioned and are novel to the best of our knowledge: (i) The apically convex NR invagination is autonomously driven by the force generations of NR cells themselves, and (ii) the NR invagination is facilitated by the force generations of NR-RPE boundary cells that actively constrict along the apicobasal (lateral) direction. Further, we attempted to verify each of these predictions experimentally. By combining the *in vitro* and *in silico* approaches, we found key cell behaviors required for the NR invagination and the subsequent hinge formation along the NR-RPE boundary and elucidate the key role of mechanical force in the self-organizing optic-cup formation.



Proposed model for the stepwise optic-cup morphogenesis with the strain-triggered mechanical feedback

Besides, we have previously shown that transplantation of retinal organoids derived from mouse pluripotent stem cells can contribute to functional recovery in the retinal degeneration model mouse. This fiscal year, in collaboration with RIKEN and others, we examined whether retinal tissue derived from human ES cells is useful for restoring visual function. As a result, the retinal tissue derived from human ES cells has matured into the photoreceptor cells with outer segments, and contribute to recovery of visual function (Iraha et al., *Stem Cell Report*).

List of Publications

- Okuda S, Takata N, Hasegawa Y, Kawada M, Inoue Y, Adachi T, Sasai Y, Eiraku M. (2018) Strain-triggered mechanical feedback in self-organizing optic-cup morphogenesis. *Science Advances* 4, eaau1354
- Iraha S, Tu HY, Yamasaki S, Kagawa T, Goto M, Takahashi R, Watanabe T, Sugita S, Yonemura S, Sunagawa GA, Matsuyama T, Fujii M, Kuwahara A, Kishino A, Koide N, Eiraku M, Tanihara H, Takahashi M, Mandai M. (2018) Establishment of Immunodeficient Retinal Degeneration Model Mice and Functional Maturation of Human ESC-Derived Retinal Sheets after Transplantation. *Stem Cell Reports*. 10, 1059
- Okuda S, Miura T, Inoue Y, Adachi T, Eiraku M. (2018) Combining Turing and 3D vertex models reproduce autonomous multicellular morphogenesis with undulation, tubulation, and branching. *Sci Rep* 8, 2386.
- Takata N, Eiraku M. (2018) Stem cells and genome editing: approaches to tissue regeneration and regenerative medicine. *J Hum Genet* 63, 165

List of Presentations

<海外招待講演>

Mototsugu Eiraku “Self-organization of patterned tissues from mouse and human stem cells” EMBO Workshop: Molecular mechanisms of developmental and regenerative biology. Singapore, 11-13 November, 2018

<国内招待講演>

永樂 元次 「多細胞体の自己組織的なパターン形成および形態形成メカニズム」 第6回細胞凝集研究会 酒田市、2018年7月27日

Mototsugu Eiraku “Self-organized formation of neural organoids from stem cells” The Joint Congress of the 40th Annual Meeting of Japanese Society of Biological Psychiatry and the 61st Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry) Kobe, 6-7 September, 2018

永樂 元次 「多細胞の自己組織化と発生制御による *in vitro* での機能的な神経組織形成」 第56回日本生物物理学会年会 岡山, 2018年9月16日

永樂 元次 「多能性幹細胞からの神経組織形成～海馬組織の再構成はできるか？」 第27回海馬

と高次脳機能学会 東京, 2018 年 9 月 29 日

永樂 元次「発生システムの試験管内構築と制御」JSDB 秋季シンポジウム 2018: 次の 10 年間の発
生生物学の潮流を考える 岡崎市, 2018 年 11 月 24 日

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

システムウイルス学分野
Laboratory of Systems Virology

教 授	小柳 義夫	Prof.	Yoshio Koyanagi
特定助教	古瀬 祐氣	Program-Specific Assist. Prof.	Yuki Furuse
特定助教	中野 雄介	Program-Specific Assist. Prof.	Yusuke Nakano

本研究室では、ウイルス学からの生命現象の解明を目的として研究を進めている。2018年には、ヒト血液幹細胞移植により造血能を有する”ヒト化マウス”モデルを用いてHIV-1がどのように宿主のウイルス制御因子に適応してきたのかを明らかにするために、本マウスモデルを使った研究展開を進めている。平成30年1月に古瀬が東北大学より本学白眉研究員（特定助教）として赴任し、小柳がメンターを担当している。3月に中野研究員が特定助教に昇任した。3月末に佐藤講師が東京大学医科学研究所国際感染症センター准教授に転出した。麻生は4月に薬学研究科修士課程に入学した。小柳は平成30年10月に日本ウイルス学会総会・学術集会長を担当した。

1) ヒトテザリン活性に対するVpu変異の意義の解明

これまでの培養細胞をつかったウイルス感染実験から、ヒトはレトロウイルスの感染に無防備な訳ではなく、内因性免疫と呼ばれる防御システムを進化的に獲得してきたことが知られていた。その内因性免疫の構成因子のひとつであるテザリン（tetherin）は、HIV-1粒子を感染細胞の表面上に繫留（"tether"）し、細胞外への放出阻害によって、ウイルスの複製を抑制する。一方、HIV-1は、アクセサリータンパク質と呼ばれるさまざまなタンパク質を獲得・適応進化させることにより宿主の内因性免疫システムを回避し、ヒトでの増殖を可能としてきた。その中で、アクセサリータンパク質Vpuは、さまざまな分子機能を持つことが知られている。しかし、HIV-1の生体内での複製・増殖過程において、Vpuのどの機能が重要なのかは不明であった。また、HIV-1の進化的起源は、アフリカのチンパンジーが保有するウイルス、SIVcpzであると考えられている。SIVcpzがどのような機能を獲得することでヒトに適応し、HIV-1が広範囲に流行したのかは謎に包まれていた。本研究ではヒト化マウスを用いた。リバースジェネティクス法を駆使して作製したさまざまな変異体ウイルスを用いて、Vpuのテザリン（tetherin）抑制活性が、感染初期における効率的なウイルス増殖に重要であることを明らかにした。さらに、SIVcpzの変異体ウイルスを用いて、Vpuがテザリンを拮抗阻害する活性を獲得することが、ヒトへの適応進化上で重要な要因であることを実証した。

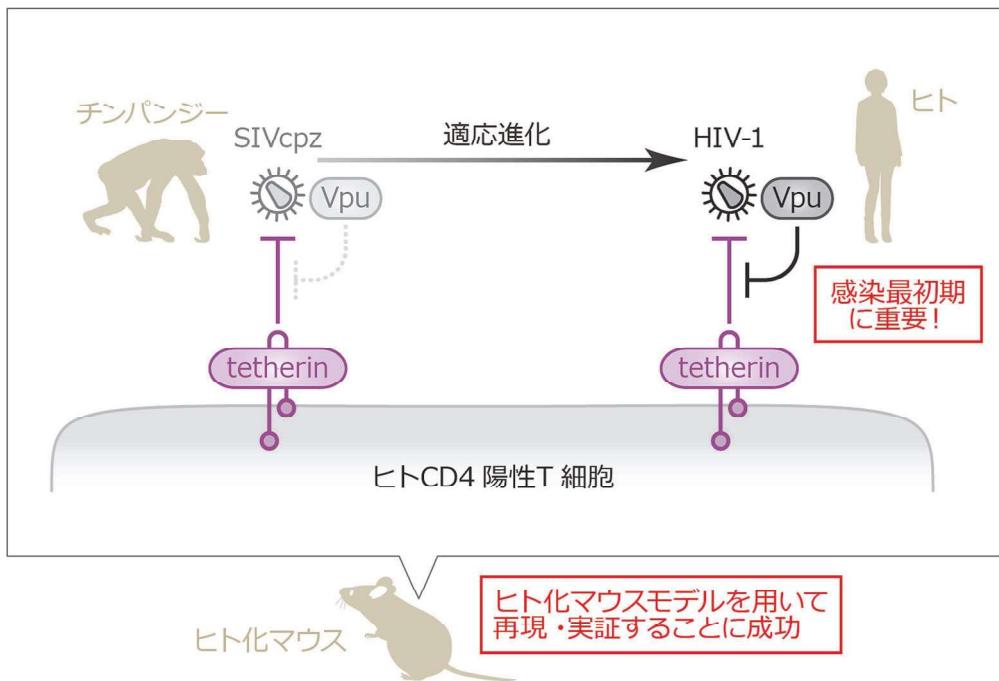


図:HIV-1Vpuのテザリン拮抗阻害がウイルス増殖に必須であること(図右)とSIVcpz Vpuのテザリン拮抗阻害活性の獲得がHIV-1としてヒトに順応進化することを実証した(図左)。

2) ウイルス感染症に関するグローバルな疫学実体の解明

本邦および世界各国より得られたウイルス検体・疫学データを用いて、ウイルス感染症に関する疫学的解析を行った。これによって、①熱帯地方で流行しているRSウイルスの全ゲノムの解明、②RSウイルスの新規遺伝子型が出現した分子メカニズムの検討、③C型インフルエンザウイルスの抗原変異に係る膜タンパク部位の同定、④特定のウイルスに感染することによって、その後に呼吸器感染症に罹患するリスクが上昇することの発見、⑤ビッグデータ解析による、より効果的かつグローバルな感染症に対する研究資源の配置に関する提言、といった成果を挙げることができた。

1) Human-specific adaptations in Vpu conferring anti-tetherin activity are critical for efficient early HIV-1 replication *in vivo*.

HIV-1 encodes three major structural proteins common to all retroviruses (Gag, Pol and Env), two regulatory proteins (Tat and Rev) that are essential for viral replication, and four accessory proteins (Vif, Vpu, Vpr and Nef). The importance of the accessory proteins as virulence factors is being more appreciated. They act altering cellular pathways via protein-protein interactions with a number of host cell factors. Notably we were able to examine *in vivo* function of HIV-1 accessory proteins (Vif, Vpr, and Vpu) using the humanized mouse model. Vpu is a membrane protein that exerts several immunomodulatory functions including counteraction of the host restriction factor tetherin, downmodulation of CD4, and inhibition of NF- κ B activity. However, the relative contribution of individual Vpu functions to HIV-1 infection remained

unclear. HIV-1 strains with selective mutations in *vpu* to demonstrate that the anti-tetherin activity of Vpu is a prerequisite for efficient viral spread during the early phase of infection. Gain-of-function Vpu mutations in SIVcpz, the simian precursor of pandemic HIV-1, corroborate this finding. Blockage of interferon signaling by inoculation of antagonist for human IFN-1 combined with transcriptome analyses revealed that basal tetherin levels are sufficient to control viral replication. These results demonstrated that tetherin as a key effector of the intrinsic immune defense against HIV-1 and Vpu-mediated tetherin antagonism is critical for efficient viral spread during the initial phase of HIV-1 infection. (Yamada *et al*, **Cell Host & Microbe** 23 (1):110-120, 2018).

2) Epidemiology and molecular analysis of viral infections

We investigated epidemiology of viral diseases using clinical samples and epidemiological/clinical/genomic data from all over the world. We elucidated: 1) whole genomic sequence of RS virus in the tropics, 2) molecular mechanisms on the emergence of the novel genotype of RS virus, 3) location of the sites in membrane protein responsible for antigenic change of influenza C virus, 4) increased risk for subsequent respiratory infections after preceding infection with specific viruses, and 5) appropriate allocation of research resources on infectious diseases according to the disease burden.

List of Publications

- Yamada, E., Nakaoka, S., Klein, L., Reith, E., Langer, S., Hopfensperger, K., Iwami, S., Schreiber, G., Kirchhoff, F., Koyanagi, Y., Sauter, D. and Sato, K. (2018). Human-specific adaptations in Vpu conferring anti-tetherin activity are critical for efficient early HIV-1 replication *in vivo*. **Cell Host & Microbe**. 23 (1):110-120.
- Soper, A., Kimura, I., Nagaoka, S., Konno, Y., Yamamoto, K., Koyanagi, Y. and Sato, K. (2018). Type I interferon responses by HIV-1 infection: association with disease progression and control. **Front. Immunol.** 8:1823.
- Sato, K., Misawa, N., Takeuchi, J.S., Kobayashi, T., Izumi, T., Aso, H., Nagaoka, S., Yamamoto, K., Kimura, I., Konno, Y., Nakano, Y., and Koyanagi, Y. (2018). Experimental adaptive evolution of simian immunodeficiency virus SIVcpz to pandemic human immunodeficiency virus type 1 by using a humanized mouse model. **J. Virol.** 92, e1905-17.
- Kurosaki, Y., Takahashi-Ueda, M., Nakano, Y., Yasuda, J., Koyanagi, Y., Sato, K. and Nakagawa, S. (2018). Different effects of two mutations on the infectivity of Ebola virus glycoprotein in nine mammalian species. **J. Gen. Virol.** 99: 704-709.
- Konno, Y., Nagaoka, S., Kimura, I., Takahashi-Ueda, M., Kumata, R., Ito, J., Nakagawa, S., Kobayashi, T., Koyanagi, Y. and Sato, K. (2018). A naturally occurring feline APOBEC3 variant that loses anti-lentiviral activity by lacking two amino acid residues. **J. Gen. Virol.** 99: 704-709.

Konno, Y., Nagaoka, S., Kimura, I., Yamamoto, K., Kagawa, Y., Kumata, R., Aso, H., Takahashi-Ueda, M., Nakagawa, S., Kobayashi, T., Koyanagi, Y. and Sato, K. (2018). New World feline APOBEC3 potently controls inter-genus lentiviral transmission. **Retrovirology**. 15 (1):31.

Furuse, Y. (2019). Analysis of research intensity on infectious disease by disease burden reveals which infectious diseases are neglected by researchers. **Proc Natl Acad Sci USA**; 116 (2):478-483.

Furuse, Y., Tamaki, R., Okamoto, M., Saito-Obata, M., Suzuki, A., Saito, M., Imamura, T., Khandaker, I., Dapat, I., Ueno, F., Alday, P.P., Tan, A.G., Inobaya, M.T., Segubre-Mercado, E., Tallo, V., Lupisan, S., Oshitani, H. (2018). Association between preceding viral respiratory infection and subsequent respiratory illnesses among children: A prospective cohort study in the Philippines. **J. Infect. Dis.** 219 (2):197-205.

Matsuzaki, Y., Sugawara, K., Furuse, Y., Shimotai, Y., Hongo, S., Mizuta, K., Nishimura, H. (2018). Neutralizing epitopes and residues mediating the potential antigenic drift of the hemagglutinin-esterase protein of influenza C virus. **Viruses** 10 (8).

Furuse, Y. (2018). Multiple or single duplication events leading to the emergence of a novel genotype of respiratory syncytial virus. **J. Infect. Dis.** 217 (12):2008-2010.

Malasao, R., Furuse, Y., Okamoto, M., Dapat, C., Saito, M., Saito-Obata, M., Tamaki, R., Segubre-Mercado, E., Lupisan, S., Oshitani, H. (2018). Complete genome sequences of 13 human respiratory syncytial virus subgroup A strains of genotypes NA1 and ON1 isolated in the Philippines. **Genome Announc.** 8;6 (10).

List of Presentations

Fukuda, H., Sarca, A.D., Yamashita, K., Li, S., Sardo, L., Jessica, L., Smith, J., Ebina, H., Shirakawa, K., Sato, K., Standley, D.M., Koyanagi, Y., Izumi, T., Takaori-Kondo, A. Structural and RNA binding model of APOBEC3G N-terminal domain for new drug designs. CROI (Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections), Boston, March 7, 2018.

Nakano, Y., Yamamoto, K., Soper, A., Ikeda, T., Harris R.S., Sato, K., Koyanagi, Y. Evolutionary journey of primate lentivirus transmission from chimpanzee to gorilla focusing on relationship between Vif and APOBEC3. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Retroviruses, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Retroviruses, May 23, 2018.

Yamasoba, D., Sato, K., Hotter, D., Reith, E., Koepke, L., Linsenmeyer, R., Standley, D.M., Sauter, D., Yoshio Koyanagi, Y., Osamu Takeuchi, O., Identification of a host RNA binding protein as a novel HIV-1 restriction factor. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Retroviruses, May 23, 2018.

Soper, A.J., Konno, Y., Nagaoka, S., Yamamoto, K., Aso, H., Kimura, I., Juarez-Fernandez, G., Misawa, N., Nakano, Y., Sato, K., Koyanagi, Y. Investigation of HIV-1 heterogeneity and compartmentalization in

humanized mouse model. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Retroviruses, May 23, 2018.

福田寛文, Anamaria D. Sarca, 山下和男、Songling Li, Luca Sardo, Jessica Smith, 蝦名博貴, 白川康太郎, 佐藤佳, Daron Standley, 小柳義夫, 泉泰輔, 高折晃史. 構造モデルを基に洞察した RNA 結合に重要な APOBEC3G N 末端アミノ酸残基の検討. 第 32 回近畿エイズ研究会学術集会, 大阪 (吹田) 2018 年 6 月 2 日

山壼大智, 佐藤佳, 小柳義夫, 竹内理. 新規 RNA 分解酵素による HIV-1 感染抑制メカニズム. 第 32 回近畿エイズ研究会学術集会, 大阪 (吹田) 2018 年 6 月 2 日

佐藤佳, 三沢尚子, 小柳義夫. チンパンジーレンチウイルスからパンデミック HIV-1への適応進化現象の再現. 第 32 回近畿エイズ研究会学術集会, 大阪 (吹田) 2018 年 6 月 2 日

Kurosaki, Y., Takahashi Ueda, M., Nakano, Y., Yasuda, J., Koyanagi, Y., Sato, K., Nakagawa, S. Different effects of two mutations on the infectivity of Ebola virus glycoprotein in nine mammalian species. NSV (Negative strand virus), Verona, Italy, June 17-22, 2018

山壼大智, 佐藤佳, 小柳義夫, 竹内理. 新規 RNA 分解酵素による HIV-1 感染制御機構の解明. 第 29 回日本生体防御学会学術総会, 京都, 2018 年 6 月 27-29 日.

佐藤佳, 今野順介, 長岡峻平, 木村出海, 麻生啓文, 熊田隆一, 伊東潤平, 小柳義夫. システムウイルス学的アプローチから紐解くウイルスと宿主の進化的軍拵競争のダイナミズム. 日本進化学会第 20 回大会, 東京 (駒場), 2018 年 8 月 23 日.

Koyanagi, Y., Sato, K. HIV-1 pathogenesis study using humanized mice. 30th International Workshop on Retroviral Pathogenesis. Awaji, October 8-12, 2018

Sato, K., Koyanagi, Y. Functional (or dysfunctional) conflict of Vif and APOBEC3 in humanized mice infected with HIV-1. 30th International Workshop on Retroviral Pathogenesis. Awaji, October 8-12, 2018

Nagaoka, S., Kawakami, E., Ito, J., Misawa, N. Aso, H., Nakaoka, S., Satou, Y., Shiroguchi, K., Koyanagi, Y., Sato, K. Characterization of HIV-1 infected cells in vivo by multi-omics analysis. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会, 京都 2018 年 10 月 28 日.

Shichijo, T., Yasunaga, J.I., Shimura, K., Sato, K., Koyanagi, Y., Green, P., Murphy, E., Matsuoka, M. Comprehensive analysis of proviral sequences in HTLV-1 and HTLV-2 carriers. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会, 京都 2018 年 10 月 28 日.

Aso, H, Ito, J., Koyanagi, Y., Sato, K. Systematic investigation of transcriptional regulations of interferon-stimulated genes. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会, 京都 2018 年 10 月 28 日.

Yamasoba, D. Sato, K., Koyanagi, Y., Takeuchi, O. MALT1-mediated cleavage of N4BP1, an antiviral RNase, contributes to the viral reactivation in latently HIV-1 infected cells. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会, 京都 2018 年 10 月 28 日.

Soper, A.J., Konno, Y., Misawa, N., Nakano, Y., Sato, K., Koyanagi, Y. Artificial Nef mutations used to investigate source of HIV in humanized mouse model. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会 , 京都 2018 年 10 月 28 日 .

Kumata, R. Kakizoe, Y., Misawa, N., Iwami, S., Sato, K., Koyanagi, Y. Quantification of antiviral effects of IFN- α on HIV cell-free and cell-to-cell infection based on experimental-mathematical investigation. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会 , 京都 2018 年 10 月 28 日 .

Nakano, Y., Yamamoto, K., Soper, A.J., Sato, K., Koyanagi, Y. Tracing the evolution of great ape lentiviruses focusing on the functional relationship between Vif and APOBEC3G. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会 , 京都 2018 年 10 月 28 日 .

Kimura, I., Ueno, T., Sato, K., Koyanagi, Y. Impact of host HLA allele influencing HIV-1 pathogenesis. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会 , 京都 2018 年 10 月 28 日 .

Fukuda, H., Sarca, A.D., Yamashita, K., Li, S., Ebina, H., Shirakawa, K., Sato, K., Standley, D., Koyanagi, Y., Izumi, T., Takaori-Kondo, A. Strucral and RNA binding model of APOBEC3G N-terminal domain for new drug designs. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会 , 京都 2018 年 10 月 29 日 .

Ito, J. Kimura, I., Soper, A.J., Koyanagi, Y., Sato, K. Pan-cancer profiling of expressions of human endogenous retroviruses. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会 , 京都 2018 年 10 月 29 日 .

Yamamoto, K., Nakano, Y., Sato, K., Koyanagi Y. HIV-1 group O Vif proteins counteract human A3D, A3F and A3H independently of DRMR and FH motifs. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会 , 京都 2018 年 10 月 30 日 .

Konno, Y., Nagaoka, S., Kimura, I., Yamamoto, K., Kagawa, Y., Kumata, R., Aso, H., Takahashi-Ueda, M., Nakagawa, S., Kobayashi, T., Koyanagi, Y., Sato, K. New World feline APOBEC3 potently controls inter-genus lentiviral transmission. 第 66 回日本ウイルス学会学術集会 , 京都 2018 年 10 月 30 日 .

Kumata, R., Kakizoe, Y., Misawa, N., Iwami, S., Sato, K., Koyanagi, Y. One Day Workshop on Virus Dynamics in Japan 2018, Tokyo 2018 年 11 月 2 日 .

佐藤佳 , 三沢尚子 , 長岡俊平 , 麻生啓文 , 川上英良 , 中岡慎治 , 城口克之 , 佐藤賢文 , 小柳義夫 . HIV 治癒へのオミクス解析 . 第 32 回日本エイズ学会学術集会・総会 , 大阪 (中之島) 2018 年 12 月 2-4 日

中野雄介 , 山本啓輔 , ソパー アンドリュー , 佐藤佳 , 小柳義夫 . HIV-1 及びその祖先ウイルスの Vif と抗ウイルスタンパク質 APOBEC3 の相互性解析 . 第 32 回日本エイズ学会学術集会・総会 , 大阪 (中之島) 2018 年 12 月 2-4 日

山崈大智 , 佐藤佳 , 小柳義夫 , 竹内理 . MALT1 による N4BP1 の分解は潜伏感染 HIV-1 の再活性化を促進する . 第 32 回日本エイズ学会学術集会・総会 , 大阪 (中之島) 2018 年 12 月 2-4 日

柿添友輔 , 熊田隆一 , 三沢尚子 , 小柳義夫 , 佐藤佳 , 岩見真吾 . HIV-1 感染細胞におけるインターフェ

ロン α 干渉作用の定量的解析, 応用数学合同研究集会, 滋賀 (瀬田) 2018 年 12 月 13-15 日

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

増殖制御システム分野
Laboratory of Growth Regulation System

教 授	影山龍一郎	Prof.	Ryoichiro Kageyama
准教授	大塚 俊之	Assoc. Prof.	Toshiyuki Ohtsuka
助 教	小林 妙子	Assist. Prof.	Taeko Kobayashi
特定助教	下條 博美	Program-Specific Assist. Prof.	Hiromi Shimojo

本分野では、いろいろな生命現象において遺伝子発現が2～3時間周期で振動することを見出し、その意義や制御機構の解明を目指して研究を行っている。特に、神経発生や体節形成における遺伝子発現振動に注目して解析を進めてきた。塩基性領域・ヘリックス・ループ・ヘリックス (bHLH) 因子である Hes1, Hes5 や Hes7 はネガティブフィードバックによって自律的に2～3時間周期で発現が振動し、Hes1 や Hes7 の発現振動によって周期的に抑制するためにその下流遺伝子の発現も振動する。今回、体節形成過程における遺伝子発現の振動動態を詳細に解析するために、新たにマウス ES 細胞から未分節中胚葉様組織を誘導する手法を開発した。また、成体脳の神経幹細胞における遺伝子発現動態を解析し、胎生期と異なることを見出した。

1) マウス ES 細胞から未分節中胚葉様組織を誘導する手法を開発

体節は、未分節中胚葉 (presomitic mesoderm, PSM) の前側部分が周期的に分節することにより形成される。マウス胎仔では、この周期性は分節時計遺伝子 *Hes7* によって制御される。*Hes7* の発現は、未分節中胚葉の後端から始まり前側に向かって波が伝搬するようにダイナミックに変動する。これは、未分節中胚葉の細胞間で *Hes7* の発現が同期振動することによる。今までに多くの研究がなされてきたが、未だに *Hes7* の同期振動の分子機構はよく分かっていない。この研究の遅れは生きたマウス胎仔を使わないと解析ができないことによるもので、in vitro 培養システムが開発されれば飛躍的に研究が進むと期待されていた。そこで、本研究において簡便にかつ高効率にマウス ES 細胞から未分節中胚葉様の組織を誘導する (induced PSM-like, iPSPM) 手法を開発した。この組織では *Hes7* の発現が同期振動しており、中心部から辺縁部に向かって波状に伝播する様子が観察された。また、*Hes7* の波状発現が終わる辺縁部では分節が起こっていた。したがって、未分節中胚葉で見られる後端から前側に向かう前後軸は、ES 細胞由来未分節中胚葉様組織 (iPSPM) では中心部—辺縁部軸として自己組織化されることが分かった。この方法は薬剤スクリーニングにも応用可能で、分節時計の分子機構の解析に有用であることが示された。

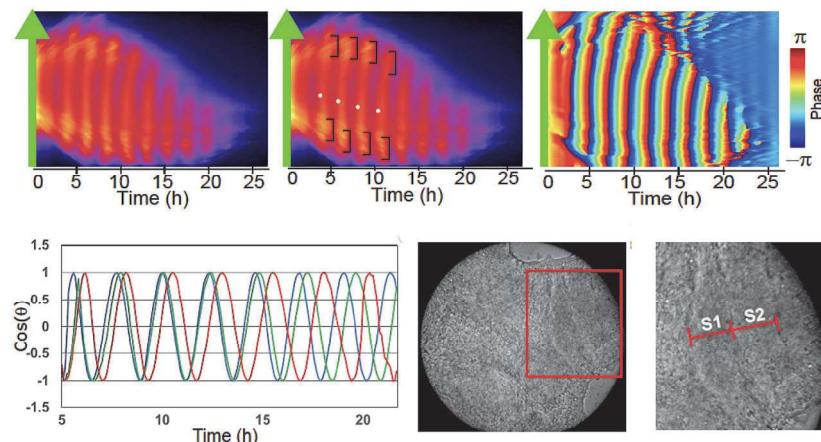


Fig. 1. Live imaging of Hes7 expression in a single iPSM. (Upper) Kymograph of Hes7 expression in a single iPSM. (Lower) Hes7 oscillations (left) and segment formation (middle and right).

2) 成体脳神経幹細胞における Hes1 および Ascl1 の発現動態

組織幹細胞は、一般に、胎生期は高い増殖能と分化能を持つが（活性化状態）、成体期は増殖能も分化能も低い（静止状態）。この組織幹細胞の活性化状態と静止状態とを制御する詳細な分子機構はよく分かっていない。活性化状態の神経幹細胞では Hes1 の発現が振動し、Hes1 の発現振動によって周期的に抑制されることでプロニューラル遺伝子 *Ascl1* の発現も振動する。*Ascl1* の発現が持続的になるとニューロン分化を誘導するが、振動すると神経幹細胞の増殖能を活性化する。また、*Ascl1* の発現が無くなると神経幹細胞の増殖能は著しく低下する。成体脳の神経幹細胞の Hes1 の発現を調べたところ、高いレベルで持続しており、そのため *Ascl1* の発現が抑制されていた。したがって、Hes1 の持続発現による *Ascl1* の発現抑制によって成体脳の神経幹細胞は静止状態になると考えられた。

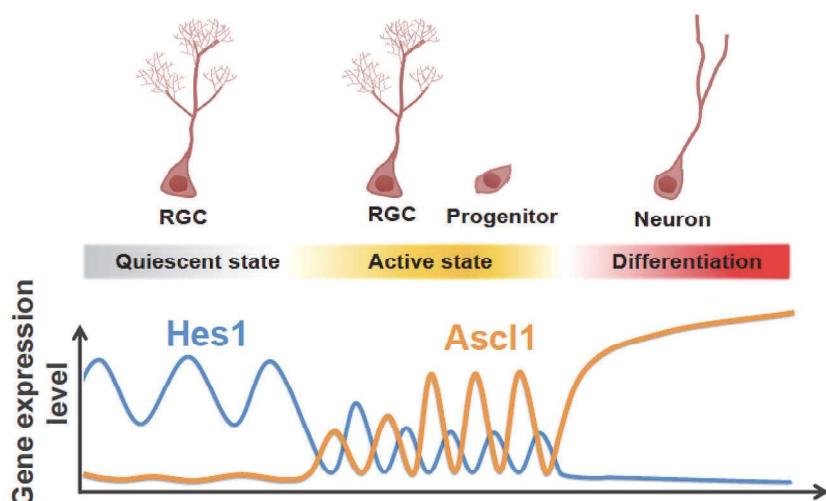


Fig. 2. Hes1 and Ascl1 expression dynamics in quiescent and active neural stem cells. RGC, radial glial cell.

We found that gene expression oscillates with a period of about 2-3 h in many biological events and try to elucidate the significance and mechanism of such oscillatory gene expression. Particularly, we have been focusing on neurogenesis and somitogenesis. The expression of the basic-helix-loop-helix (bHLH) transcription factors Hes1, Hes5 and Hes7 oscillates autonomously by negative feedback, and these oscillations drive oscillatory expression of the downstream genes. Recent studies suggested that not only the amplitude but also the period and phase of oscillatory expression encode various information. Here, to examine the oscillatory expression dynamics during somitogenesis in more detail, we developed a method to induce mouse ES cells to presomitic mesoderm-like tissues. We also analyzed the gene expression dynamics in adult neural stem cells, and found that they are different from those in embryonic neural stem cells.

1) ES cell-derived presomitic mesoderm-like tissues for analysis of synchronized oscillations in the segmentation clock

Somites are periodically formed by segmentation of the anterior parts of the presomitic mesoderm (PSM). In the mouse embryo, this periodicity is controlled by the segmentation clock gene *Hes7*, which exhibits wave-like oscillatory expression in the PSM. Despite intensive studies, the exact mechanism of such synchronous oscillatory dynamics of *Hes7* expression still remains to be analyzed. Detailed analysis of the segmentation clock has been hampered, because it requires the use of live embryos, and establishment of an in vitro culture system should facilitate such analyses. Here, we established a simple and efficient method to generate mouse ES cell-derived PSM-like tissues, in which *Hes7* expression oscillates like traveling waves. In these tissues, *Hes7* oscillation is synchronized between neighboring cells, and the anterior-posterior axis is self-organized as the central-peripheral axis. This method is applicable to chemical library screening and will facilitate the analysis of the molecular nature of the segmentation clock.

2) Sustained Hes1 expression and resultant Ascl1 suppression regulate quiescent versus active neural stem cells in the adult mouse brain

Somatic stem/progenitor cells are active in embryonic tissues but quiescent in many adult tissues. The detailed mechanisms that promote active versus quiescent stem cell states are largely unknown. In active neural stem cells, Hes1 expression oscillates and drives cyclic expression of the proneural gene *Ascl1*, which activates cell proliferation. Here, we found that in quiescent neural stem cells in the adult mouse brain Hes1 levels are oscillatory, though the peaks and troughs are higher than those in active neural stem cells, causing *Ascl1* expression to be continuously suppressed. Inactivation of *Hes1* and its related genes up-regulates *Ascl1* expression and increases neurogenesis. This causes rapid depletion of neural stem cells and premature termination of neurogenesis. Conversely, sustained Hes1 expression represses *Ascl1*, inhibits neurogenesis, and maintains quiescent neural stem cells. By contrast, induction of *Ascl1* oscillations activates neural stem cells and increases neurogenesis in the adult mouse brain. Thus, *Ascl1* oscillations, which normally depend on Hes1 oscillations, regulate the active state, while high Hes1 expression and resultant *Ascl1* suppression promote quiescence in neural stem cells.

List of Publications

- Matsumiya, M., Tomita, T., Yoshioka-Kobayashi, K., Isomura, A., and Kageyama, R. (2018). ES cell-derived presomitic mesoderm-like tissues for analysis of synchronized oscillations in the segmentation clock. **Development** 145, dev156836.
- Isomura, A., and Kageyama, R. (2018) An optogenetic method to control and analyze gene expression patterns in cell-to-cell interactions. **J. Vis. Exp.** 133, e57149.
- Perron, A., Nishikawa, Y., Iwata, J., Shimojo, H., Takaya, J., Kobayashi, K., Imayoshi, I., Mbenza, N.M., Takenoya, M., Kageyama, R., Kodama, Y., and Uesugi, M. (2018). Small-molecule screening yields a compound that inhibits the cancer-associated transcription factor Hes1 via the PHB2 chaperone. **J. Biol. Chem.** 293, 8285-8294.
- Santorelli, M., Perna, D., Isomura, A., Garzilli, I., Annunziata, F., Postiglione, L., Tumaini, B., Kageyama, R., and di Bernardo, D. (2018). Reconstitution of an ultradian oscillator in mammalian cells by a synthetic biology approach. **ACS Synth. Biol.** 7, 1447-1455.
- Ando, M., Goto, M., Hojo, M., Kita, A., Kitagawa, M., Ohtsuka, T., Kageyama, R., and Miyamoto, S. (2018). The proneural bHLH genes Mash1, Math3 and NeuroD are required for pituitary development. **J. Mol. Endocrinology.** 61, 127-138.
- Kageyama, R., Shimojo, H., and Ohtsuka, T. (2018). Oscillatory control of Notch signaling in development. **Adv. Exp. Med. Biol.** 1066, 265-277.
- Komori, H., Golden, K.L., Kobayashi, T., Kageyama, R., and Lee, C.-Y. (2018). Multi-layered control of gene activities ensures timely exit from stemness during asymmetric neural stem cell division. **Genes & Dev.** 32, 1550-1561.
- 影山龍一郎 (2018). 生き物を精密に理解する：分節時計. 京大発！ フロンティア生命科学（京都大学大学院生命科学研究科編）講談社 pp. 278-285.
- 影山龍一郎 (2018). 神経幹細胞のダイナミックな転写制御. 脳神経回路と高次脳機能（榎本和生、岡部繁男）講談社 pp. 24-30.
- 川口喬吾、影山龍一郎、佐野雅己 (2018). 細胞の集団運動とトポロジカル欠陥. 生物物理 58, 134-138.

List of Presentations

- Kageyama, R. Mechanism of synchronized Hes7 oscillations in the somite segmentation clock. Muscle Development, Regeneration and Disease, Berlin, Germany, April 22-27, 2018.
- Kageyama R. Dynamic transcriptional control of neural stem cells. The Stem Cell Niche, Copenhagen, Denmark, May 27-31, 2018.

- Kageyama R. Mechanism of synchronized Hes7 oscillations in the somite segmentation clock. EMBO/EMBL Symposium on Biological Oscillators, Heidelberg, Germany, June 3-5, 2018.
- Kageyama R. Optogenetic control of neural stem cells. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, Kyoto, July 1-6, 2018.
- Kageyama R. Mechanism of synchronized Hes7 oscillations in the somite segmentation clock. EMBO Workshop on Imaging Mouse Development, Heidelberg, Germany, July 24-27, 2018.
- Kageyama R. Dynamic transcriptional control of neural stem cells. Santa Cruz Developmental Biology meeting, Santa Cruz, USA, August 11-15, 2018.
- Kageyama R. Dynamic control of embryonic and adult neural stem cells. Royan International Twin Congress, Tehran, Iran, August 29-31, 2018.
- Kageyama R. Mechanism of synchronized Hes7 oscillations in the somite segmentation clock. Jacques-Monod Conference on Modeling Cell Fate, Roscoff, France, November 19-23, 2018.
- Shimojo, H. Dynamic gene expressions during neural development. International Young Scientists Workshop on Neural Development & Stem Cells, Kyoto, March 19-23, 2018.
- Kobayashi, T. The role of enhanced lysosomal degradation in quiescent neural stem cells. International Young Scientists Workshop on Neural Development & Stem Cells, Kyoto, March 19-23, 2018.
- Matsumiya, M. ES cell-derived presomitic mesoderm-like tissues for analysis of synchronized oscillations in the segmentation clock. International Young Scientists Workshop on Neural Development & Stem Cells, Kyoto, March 19-23, 2018.
- Maeda, Y. How does Hes1 oscillation control cell cycle progression? International Young Scientists Workshop on Neural Development & Stem Cells, Kyoto, March 19-23, 2018.
- Sueda, R. Expression dynamics of Ascl1 and Hes1 in active and quiescent neural stem cells. International Young Scientists Workshop on Neural Development & Stem Cells, Kyoto, March 19-23, 2018.
- Ohtsuka, T. Overexpression of Hes1 leads to prolonged neocortical neurogenesis and expansion of neural stem cell reservoir in postnatal brain. CDB Symposium, Kobe, March 26-28, 2018.
- Shimojo, H. Dynamic gene expressions during mammalian neural development. 22nd Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience, Nara, May 22-25, 2018.
- Sakamoto, S. The role of Id genes in mammalian developing cochlea. 22nd Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience, Nara, May 22-25, 2018.
- Kobayashi, T. Enhanced lysosomal degradation in the quiescent state of neural stem cells. 22nd Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience, Nara, May 22-25, 2018.
- Ohtsuka, T. Overexpression of Hes1 leads to prolonged neocortical neurogenesis and expansion of neural

stem cell reservoir in postnatal brain. 22nd Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience, Nara, May 22-25, 2018.

Yoshioka-Kobayashi, K. Single-cell imaging approach to elucidate the role of Lfng in synchronized oscillation in the mouse segmentation clock. EMBO/EMBL Symposium on Biological Oscillators, Heidelberg, Germany, June 3-5, 2018.

Matsumiya, M. ES cell-derived presomitic mesoderm-like tissues for analysis of synchronized oscillations in the segmentation clock. EMBO/EMBL Symposium on Biological Oscillators, Heidelberg, Germany, June 3-5, 2018.

Shimojo, H. Dynamic gene expressions during mammalian neural development. Korea-Japan Joint Symposium on Neurodevelopment, Jeju, Korea, June 8-9, 2018.

Matsumiya, M. ES cell-derived presomitic mesoderm-like tissues for analysis of synchronized oscillations in the segmentation clock. 京都大学・国立台湾大学・筑波大学合同「分子細胞生物学シンポジウム」, 筑波, June 30, 2018.

Yoshioka-Kobayashi, K. Single-cell quantification of mouse segmentation clock to understand phase-regulation mechanism. 12th GfE School “Imaging and Modeling Development,” Günzburg, Germany, October 11-13, 2018.

Shimojo, H., Kageyama, R. Dynamic gene expression during neural development. Jacques-Monod Conference on Modeling Cell Fate, Roscoff, France, November 19-23, 2018.

小林妙子. 神経幹細胞の休眠状態を制御する分解機構. ユビキチン研究会. 東京, 2018年1月19日.

磯村彰宏 . Illuminating gene expression dynamics by optogenetics. The 4th Biomedical Imaging and Sensing Conference. 横浜, 2018年4月23-27日 .

磯村彰宏 . Illuminating information transfer in genetic oscillators by optogenetics. Joint Annual Meeting of 70th JSCB and 51st JSDB. 東京, 2018年6月5-8日 .

磯村彰宏 . 遺伝子発現の細胞間リズム同期の光遺伝学による再構成 . 第 18 回日本蛋白質科学会年会 . 新潟 , 2018 年 6 月 26-28 日 .

松宮舞奈 . ES cell-derived presomitic mesoderm-like tissues for analysis of synchronized oscillations in the segmentation clock. 高遠シンポジウム , 高遠 , 2018 年 8 月 23-24 日 .

磯村彰宏 . 遺伝子発現の振動パターンの光操作 . 第 56 回日本生物物理学会年会 . 岡山 , 2018 年 9 月 15-17 日 .

磯村彰宏 . Notch シグナルの光誘導による動的情報伝達の再構成 . 第 91 回日本生化学会大会 . 京都 , 2018 年 9 月 24-26 日 .

大塚俊之 . 神経幹細胞制御による脳形態形成の改変 . 神経発達・再生研究会 . 名古屋 , 2018 年 10 月

17-18 日 .

影山龍一郎 . 分節時計における Hes7 の同期発現振動の分子機構 . 第 25 回日本時間生物学会 . 長崎 , 2018 年 10 月 20-21 日 .

磯村彰宏 . Notch シグナルによる動的情報伝達の光制御と光計測 . 第 41 回日本分子生物学会年会 . 横浜 , 2018 年 11 月 28-30 日 .

松宮舞奈 . 分節時計遺伝子の発現振動解析に有用な ES 細胞由来未分節中胚葉様組織の誘導法と分節時計遺伝子のシングルセルイメージング . 第 41 回日本分子生物学会年会 . 横浜 , 2018 年 11 月 28-30 日 .

小林妙子 . 休眠神経幹細胞におけるリソソーム機構 . 次世代脳プロジェクト . 東京 , 2018 年 12 月 12-14 日 .

越智翔平 . The significance of the oscillatory expression of hes1 gene in neuronal development. 次世代脳プロジェクト . 東京 , 2018 年 12 月 12-14 日 .

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

RNA システム分野
Laboratory of RNA System

教 授	大野 瞳人	Prof.	Mutsuhito Ohno
助 教	北畠 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。本年度は以下のような成果が得られた。

1) mTORC1 による Sox9 RNA の翻訳制御は骨格形成に寄与する

マウス遺伝学と生化学的解析を組み合わせることにより、栄養環境シグナルを統合する Mechanistic target of rapamycin (mTOR) という因子が、骨格の形成に重要な役割を果たしていることを発見し、その詳細な分子メカニズムを明らかにした。本成果は、「私たちの体はどのように“かたち”づくられて、どのように維持されているのか」という疑問に対して新たな概念を提供するとともに、“かたち”的形成異常や、その恒常性維持の破綻によって引き起こされるさまざまな骨系統疾患に対する新しい知見と解決法を提供する。(檜井博士らとの共同研究)

2) 細胞外シグナルに依存したリボソームタンパク質のリン酸化による翻訳制御

翻訳は細胞外シグナルに応じて正確に制御されている。本研究では、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の AGC ファミリープロテインキナーゼである Ypk1 および Pkc1 により、40S 小サブユニットのリボソームタンパク質 uS7 (Yjr123w / 以前は Rps5 と呼ばれていた) が、保存された C 末端領域のセリン残基 223 (Ser223) においてリン酸化されることが分かった。S223A 変異型 uS7 は、おそらく Rio2 との相互作用が損なわれているために、小サブユニット産生の著しい減少を引き起こし、翻訳の低下と細胞増殖の低下の両方をもたらした。熱ストレスを受けた S223A 変異細胞は、熱ショックタンパク質を誘導し、高い耐熱性を示した。まとめると、Ypk1 / Pkc1 を含む細胞内シグナル伝達経路は、uS7 を基質として利用して、リボソーム生合成およびその後の細胞翻訳において重要な役割を果たすと思われる。(竹松博士らとの共同研究)

3) 真核生物リボソームの品質管理に関わる新たな因子

真核生物のリボソームは約 80 個のリボソームタンパク質と 4 本の rRNA から構成される巨大な複合体である。ペプチジル基転移反応 (PTC) をはじめ、リボソームの触媒活性には rRNA が重要な役割を果たしており、rRNA の重要塩基のひとつに点変異を導入するだけでリボソームの機能は

失われてしまう。真核生物は、このような機能不全リボソームを選択的に認識して分解する品質管理機構をそなえている。われわれは、Mms1 を含む E3 ユビキチン化酵素複合体が機能不全リボソームを認識してユビキチン化を行うということを明らかにし、その後、Cdc48 複合体の助けをかりて、プロテアソームが働き、RNase を呼び込むことで RNP 全体の分解が開始される、という大枠を明らかにしてきた。これまでの結果からは「プロテアソームにより rRNA の RNase への耐性が失われる」という観察が得られているが、プロテアソームによりどのタンパク質が分解されるのか、眞の役割は分かっていない。今年度は機能不全リボソームを細胞内から選択的に回収する方法の改良を行い、プロテアソームが働く前と後の機能不全リボソームを生化学的に精製することに成功した。現在質量分析によりその差分を探索している。

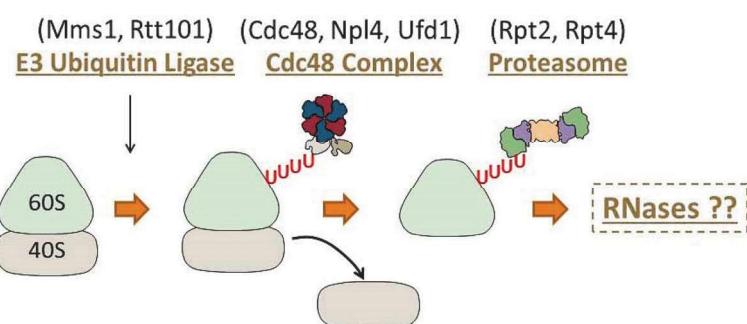


Fig.1 Model of 25S non-functional rRNA decay (NRD)

In eukaryotic cells, many genes are separated by introns into multiple exons that should be joined together. In addition, the cell itself is separated by the nuclear envelope into two major compartments, the nucleus and the cytoplasm. These two types of separations necessitate specific gene expression mechanisms such as RNA splicing and nuclear transport. Prof. Mutsuhito OHNO's laboratory is studying various aspects of eukaryotic gene expression with great emphasis on "RNA" as a key molecule.

1) Translational control of Sox9 RNA by mTORC1 contributes to skeletogenesis

The mechanistic/mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) regulates cellular function in various cell types. Although the role of mTORC1 in skeletogenesis has been investigated previously, here we show a critical role of mTORC1/4E-BPs/SOX9 axis in regulating skeletogenesis through its expression in undifferentiated mesenchymal cells. Inactivation of Raptor, a component of mTORC1, in limb buds before mesenchymal condensations resulted in a marked loss of both cartilage and bone. Mechanistically, we demonstrated that mTORC1 selectively controls the RNA translation of Sox9, which harbors a 5' terminal oligopyrimidine tract motif, via inhibition of the 4E-BPs. Indeed, introduction of Sox9 or a knockdown of 4E-BP1/2 in undifferentiated mesenchymal cells markedly rescued the deficiency of the condensation observed in Raptor-deficient mice. Furthermore, introduction of the Sox9 transgene rescued phenotypes of deficient skeletal growth in Raptor-deficient mice. These findings highlight a critical role of mTORC1 in

mammalian skeletogenesis, at least in part, through translational control of Sox9 RNA. (collaboration with Dr. Hinoi and colleagues)

2) Ribosomal protein uS7/Rps5 serine-223 in protein kinase-mediated phosphorylation and ribosomal small subunit

Cellular translation should be precisely controlled in response to extracellular cues. However, knowledge is limited concerning signal transduction-regulated translation. In the present study, phosphorylation was identified in the 40S small subunit ribosomal protein uS7 (Yjr123w/Previously called as Rps5) by Ypk1 and Pkc1, AGC family protein kinases in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Serine residue 223 (Ser223) of uS7 in the conserved C-terminal region was crucial for this phosphorylation event. S223A mutant uS7 caused severe reduction of small ribosomal subunit production, likely due to compromised interaction with Rio2, resulting in both reduced translation and reduced cellular proliferation. Contrary to optimal culture conditions, heat stressed S223A mutant cells exhibited increased heat resistance and induced heat shock proteins. Taken together, an intracellular signal transduction pathway involving Ypk1/Pkc1 seemed to play an important role in ribosome biogenesis and subsequent cellular translation, utilizing uS7 as a substrate. (collaboration with Dr. Takematsu and colleagues)

3) A bridge that links an E3 ubiquitin ligase complex and nonfunctional 60S ribosomal particles

The eukaryotic ribosomes are composed of 4 rRNAs and 80 ribosomal proteins. We and others previously reported that the defective ribosomal subunits containing mutations in their 25S rRNAs are selectively eliminated from the cytoplasm by ubiquitin-proteasome system (nonfunctional rRNA decay, NRD). However, the molecular mechanism defining the selective ubiquitination of the nonfunctional ribosomes has remained elusive. We lately showed a 60S-associating protein, which we name Bet1 (bridge to E3 complex), essential for the degradation of mutant 25S rRNAs. Importantly, Bet1 is also physically associated with the E3 ubiquitin ligase involved in 25S NRD, indicating that this protein is a bridge between defective 60S and the E3 complex. Biochemical analyses revealed that Bet1 is selectively enriched on the 60S particle containing a nonfunctional mutant 25S rRNA, suggesting a central role of this bridge protein in the functional inspection of the 60S subunits. This year we revealed Bet1 binding site on nonfunctional 60S particles by using UV crosslink mediated RNA pull down and sequencing.

List of Publications

Iezaki, T., Horie, T., Fukasawa, K., Kitabatake, M., Nakamura, Y., Park, G., Onishi, Y., Ozaki, K., Kanayama, T., Hiraiwa, M., Kitaguchi, Y., Kaneda, K., Manabe, T., Ishigaki, Y., Ohno, M., Hinoi, E. (2018) Translational control of Sox9 RNA by mTORC1 contributes to skeletogenesis. *Stem Cell Reports* 11(1), 228-241.

Tomioka M, Shimobayashi M, Kitabatake M, Ohno M, Kozutsumi Y, Oka S, Takematsu H. (2018) Ribosomal

protein uS7/Rps5 serine-223 in protein kinase-mediated phosphorylation and ribosomal small subunit maturation. *Sci Rep.* 8 (1), 1244.

List of Presentations

- 浜島りな、酒井朗恵、藤井耕太郎、北畠真、大野睦人 機能不全 25S rRNA 分解機構におけるプロテアソーム標的因子の探索 第20回日本RNA学会年会、大阪、2018年7月9-11日
- 谷口一郎、大野睦人 U snRNA 核外輸送に関する RNA ヘリカーゼの同定 第20回日本RNA学会年会、大阪、2018年7月9-11日
- 町谷充洋、大野睦人 DNA 損傷応答における RNA 輸送因子 PHAX の役割 第20回日本RNA学会年会、大阪、2018年7月9-11日
- 鎌田宏美、佐野広大、北畠真、大野睦人 リボソームの品質管理におけるリン酸化酵素 CK2 の役割 第20回日本RNA学会年会、大阪、2018年7月9-11日
- 竹岩俊彦、大野睦人 mRNA 様 long noncoding RNA の核局在化機構の解析 第20回日本RNA学会年会、大阪、2018年7月9-11日
- 芳本玲、谷口一郎、大野睦人、前田明 環状RNA(circRNA)の核外輸送機構の解明 第20回日本RNA学会年会、大阪、2018年7月9-11日
- 北畠真、鎌田宏美、佐野広大、大野睦人 リボソームの品質管理 25S NRD はリン酸化酵素 CK2 により制御されている 第5回リボソームミーティング、新潟、2018年9月13-14日
- 浜島りな、酒井朗恵、他3名 機能不全リボソーム品質管理機構 25S NRD におけるプロテアソーム標的タンパク質の探索 第5回リボソームミーティング、新潟、2018年9月13-14日
- 川本崇仁、谷口一郎、大野睦人 ヒト U snRNA 前駆体の 3'-プロセシングの in vitro 系の構築 第41回日本分子生物学会年会、横浜、2018年11月28-30日
- 町谷充洋、大野睦人 RNA 輸送因子 PHAX はヒストン H2AX の発現制御を介して DNA 損傷応答に関与する 第41回日本分子生物学会年会、横浜、2018年11月28-30日

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

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 榎作 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ます。2018年は、ビブリオ菌において、自身の翻訳伸張停止を介して下流の *secDF2* 遺伝子の発現を調節する VemP タンパク質が持つ、翻訳停止モチーフの網羅的変異解析を行い、その特徴を明らかにしました。また、大腸菌の PhoP/PhoQ 二成分シグナル伝達システムのセンサーとして働く膜タンパク質 PhoQ の研究を行い、PhoQ のペリプラズムセンサードメインに存在するポケットが、PhoQ 活性と、その小分子膜タンパク質 SafA による調節に関与することを示唆しました。

1) 網羅的変異解析による VemP 翻訳停止モチーフの同定と特徴付け

VemP (*Vibrio protein export monitoring polypeptide*) は、159 アミノ酸残基からなる分泌タンパク質であり、ビブリオ菌における分泌モニター因子として働き、下流遺伝子 *secDF2* の発現を制御している。VemP の膜透過が阻害されると、*vemP* mRNA の Q¹⁵⁶ コドンが合成途上リボソームの P サイトに到達した位置で、自身の翻訳（タンパク質合成）が安定かつ特異的に停止し、結果的に SecDF2 の合成を促す。我々の以前の研究から、VemP の C 末端 20 残基からなる高度保存領域内の多くのアミノ酸残基が翻訳停止に関与していることが示唆されていたが、個々のアミノ酸残基の正確な役割については不明であった。本研究において、我々は、VemP の *in vivo* 翻訳停止の効率を簡便かつ正確に測定可能なレポーター系を構築した。この実験系を用いて C 末端 20 残基 (H¹³⁸-F¹⁵⁷) の網羅的変異解析を行い、翻訳停止モチーフを同定した（図 1）。その結果、1) 保存領域内の 15 アミノ酸残基が翻訳アレストに関与していること、2) VemP 内の重要なアミノ酸残基とリボソーム exit トンネル内壁との複数箇所での相互作用が VemP

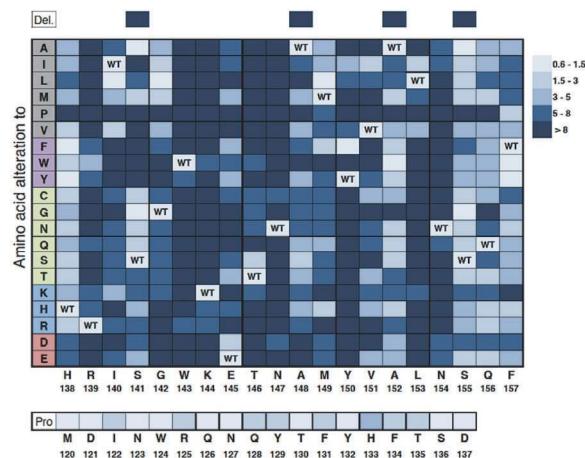


Fig. 1 Summary of LacZ reporter assay

の翻訳停止に貢献していることが明らかになった。リボソームトンネル内部で VemP ペプチドが特異的な 2 次構造を形成し、重要なアミノ酸残基がトンネル内部で空間的に適切に配置される事が VemP 翻訳停止に重要であることが示唆された。加えて、VemP の更にアミノ末端領域 (M^{120} - D^{137}) の Pro scan 解析から、N 末端領域は翻訳停止に大きな役割は持たない事が明らかになった。以上の結果から、VemP の翻訳モチーフは、主に C 末端領域の高度保存領域からなると結論した。

2) 大腸菌センサー膜タンパク質 PhoQ のシグナル感知領域に存在する構造的な窪みは、PhoQ 活性制御に関わっている

大腸菌二成分制御系 PhoQ/PhoP 系におけるセンサー膜タンパク質 PhoQ は Mg^{2+} の枯渇等を感じし自己リン酸化する。そのリン酸基を転移されたレギュレータータンパク質 PhoP は標的遺伝子の発現を制御することで大腸菌のストレス応答に寄与している。一方、一回膜貫通型小タンパク質 SafA (65 aa) は、C 末端領域で PhoQ のペリプラズム領域に位置する Sensor domain (SD) と相互作用し PhoQ/PhoP シグナル伝達系を活性化することが明らかとなっている。これまで SafA による PhoQ の活性向上において、PhoQ-SD の SafA 結合領域や活性化に重要な領域は不明であった。我々は SafA 結合不全変異型 (D179R) の PhoQ-SD の構造を結晶構造解析により決定し野生型の構造と比較した。野生型では D179 周辺に窓み (SD pocket) が形成されていたが、D179R 変異型ではそのような窓みは見られず、他の領域には構造上の差異は見出されなかった (図 2)。SD pocket を構成するアミノ酸残基の Site-directed mutagenesis による検証により、この領域が PhoQ の活性や SafA による PhoQ の活性化に強く関与していることが示された。以前の知見と今回の結果から、我々は SD pocket が SafA と PhoQ の相互作用部位の強力な候補であると考えている。

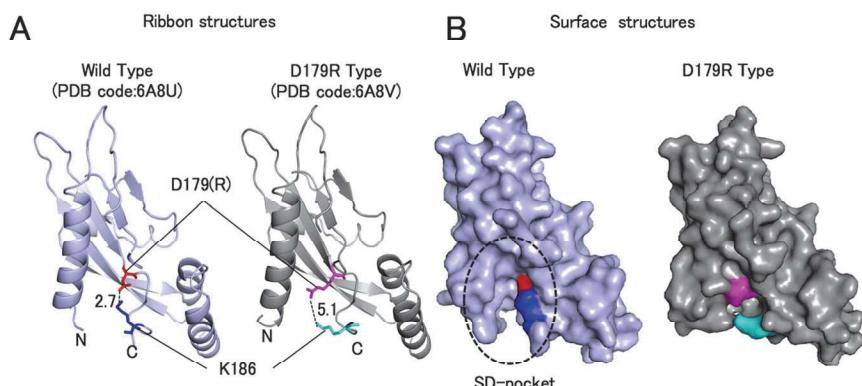


Fig. 2 Crystal structures of wil-type and D179R PhoQ-SD.

本年は、理学研究科大学院生 (M1) として横山達彦さんと田中雄太さんが四月から、宋俊勇さんが十月から新たに研究室に加わりました。一方、田中勇真さんが修士課程を終了し、就職のため研究室を去りました。

The research projects carried out in this laboratory are concerned with dynamic aspects of cell surface proteins in bacteria including *Escherichia coli* and *Vibrio alginolyticus*. Specifically, processes of protein folding, protein translocation across and integration into the membrane, membrane protein proteolysis, and extracytoplasmic stress responses are studied by combined molecular genetic, biochemical, biophysical and structural approaches. In 2018, we conducted a systematic mutational analysis of the translational arrest motif of VemP, which acts as a secretion monitor to regulate the downstream *secDF2* gene expression in *Vibrio*. We also investigated *E. coli* PhoQ, the membrane-bound sensor protein of the PhoQ/PhoP two-component signal transduction system, and suggested that a pocket in the periplasmic sensor domain of PhoQ is involved in the activity and SafA-mediated regulation of this sensor protein.

1) Identification and characterization of a translation arrest motif in VemP by systematic mutational analysis

VemP (*Vibrio* protein export monitoring polypeptide) is a secretory protein comprising 159 amino acid residues, which functions as a secretion monitor in *Vibrio* and regulates expression of the downstream *V.secDF2* genes. When VemP export is compromised, its translation specifically undergoes elongation arrest at the position where the Q¹⁵⁶ codon of *vemP* encounters the P-site in the translating ribosome, resulting in upregulation of V.SecDF2 production. Although our previous study suggests that many residues in a highly-conserved C-terminal 20-residue region of VemP contribute to its elongation arrest, the exact role of each residue remains unclear. In this study, we constructed a reporter system to easily and exactly monitor the *in vivo* arrest efficiency of VemP. Using this reporter system, we systematically performed a mutational analysis of the 20 residues (H¹³⁸ to F¹⁵⁷) to identify and characterize the arrest motif. Our results show that 15 residues in the conserved region participate in elongation arrest, and that multiple interactions between important residues in VemP and in the interior of the exit tunnel contribute to the elongation arrest of VemP (Fig. 1). The arrangement of these important residues induced by specific secondary structures in the ribosomal tunnel is critical for the arrest. Pro scan analysis of the preceding segment (M¹²⁰ to D¹³⁷) revealed a minor role of this region in the arrest. Considering these results, we conclude that the arrest motif in VemP is mainly composed of the highly conserved multiple residues in the C-terminal region.

2) Internal cavity in the PhoQ sensor domain: significant roles in PhoQ activity and SafA-mediated control

The PhoQ/PhoP two-component signal transduction system is conserved in various Gram-negative bacteria and is often involved in the expression of virulence in pathogens. The small inner membrane protein SafA activates PhoQ in *Escherichia coli* independently from other known signals that control PhoQ activity, such as restricted divalent cations, cationic antimicrobial peptides, and acidic pH. We have previously shown that SafA directly interacts with the sensor domain of the periplasmic region of PhoQ (PhoQ-SD) for activation and that a D179R mutation in PhoQ-SD attenuates PhoQ activation by SafA. We performed that structural comparison of wild-type PhoQ-SD and D179R revealed a high difference in the shape of the cavity (SD

pocket) found in the central core of this domain (Fig. 2). Site-directed mutagenesis of the residues surrounding the SD pocket has supported the SD pocket as a site involved in PhoQ activity. Furthermore, the SD pocket has also been shown to be involved in SafA-mediated PhoQ control.

List of Publications

- Yura, T., Miyazaki, R., Fujiwara, K., Ito, K., Chiba, S., Mori, H., and Akiyama, Y. (2018). Heat shock transcription factor σ^{32} defective in membrane transport can be suppressed by transposon insertion into the genes for a restriction enzyme subunit or a putative autotransporter in *E. coli*. **Genes Genet. Syst.** 93, 229-235.
- Yamano, K., Wang, C., Sarraf, S. A., Münch, C., Kikuchi, R., Noda, N. N., Hizukuri, Y., Kanemaki, M. T., Harper, J. W., Tanaka, K., Matsuda, N., and Youle, R. J. (2018). Endosomal Rab cycles regulate Parkin-mediated mitophagy. **eLife**, 7, e31326.
- Mori, H., Sakashita, S., Ito, J., Ishii, E., and Akiyama, Y. (2018). Identification and characterization of a translation arrest motif in VemP by systematic mutational analysis. **J. Biol. Chem.** 293, 2915-2926.
- Miyazaki, R., Myougo, N., Mori, H., and Akiyama, Y. (2018). A photo-cross-linking approach to monitor folding and assembly of newly synthesized proteins in a living cell. **J. Biol. Chem.** 293, 677-686.
- Ito, K., Mori, H., and Chiba, S. (2018). Monitoring substrate enables real-time regulation of a protein localization pathway. **FEMS Microbiol. Rev.** 365, fny109.

List of Presentations

- 秋山芳展：大腸菌 S2P ファミリー膜内切断プロテアーゼ RseP の選択的基質切断機構 . 東京工業大学 Cell Biology Center Colloquium、横浜、2018 年 1 月 19 日
- 秋山芳展: 大腸菌ペリプラズムプロテアーゼ・シャペロン BepA の TPR ドメインの構造と機能 . 2017 年度国立遺伝学研究所研究会「単細胞システム細胞内装置の構造と機能」、三島、2018 年 3 月 22 - 23 日
- 宮崎亮次：生細胞内の新生タンパク質動態を解析可能な光架橋法の構築 . 2017 年度国立遺伝学研究所研究会「単細胞システム細胞装置の構造と機能」、三島、2018 年 3 月 22 - 23 日
- 宮崎亮次: PiXie 法による VemP の細胞内動態解析 . 「新生鎖の生物学」第 5 回若手ワークショップ、山形、2018 年 5 月 14-16 日
- 三宅拓也、檜作洋平、秋山芳展：大腸菌膜内切断プロテアーゼ RseP の新規機能調節領域の解析 . 第 15 回 21 世紀大腸菌研究会、山形、2018 年 5 月 24-25 日
- Mori, H., Sakashita, S., Ito, J., Ishii, E. and Akiyama Y. Identification and characterization of a translation

arrest motif in VemP by systematic mutational analysis. International symposium Proteins: From the Cradle to the Grave、大津、2018年8月26-29日

Hizukuri, Y., Suzuki, T., Terushima, K., Dohmae, N. and Akiyama, Y. Multistep post-translational proteolysis/modification of a component of the bacterial flagellar type III secretion apparatus. International Symposium on “Proteins; from the Cradle to the Grave”、大津、2018年8月26-29日

Miyazaki, R., Mori, H. and Akiyama Y. Analysis of *cis* and *trans* factors involved in export and translation arrest of VemP by an *in vivo* photo cross-linking approach. International symposium Proteins: From the Cradle to the Grave、大津、2018年8月26-29日

Ishii, E., Sakashita, S., Akiyama, Y. and Mori, H.: Roles of mRNA secondary structure of *vemP-secD2* intergenic region in VemP translation arrest coupled SecD2 expression International symposium Proteins: From the Cradle to the Grave、大津、2018年8月26-29日

Miyake, T., Hizukuri, Y. and Akiyama, Y. Functional and structural roles of a membrane-periplasm interface domain in RseP, an *Escherichia coli* S2P family intramembrane protease. International symposium Proteins: From the Cradle to the Grave、大津、2018年8月26-29日

宮崎亮次、秋山芳展、森博幸：SRP 経路を介した VemP の膜透過装置への輸送と翻訳アレスト解除. 第5回 ribosome meeting、新潟、2018年9月13-14日

檜作洋平、鈴木健裕、照島功祐、堂前直、秋山芳展：A component of the bacterial flagellar type III secretion apparatus receives multistep post-translational processing. 第56回日本生物物理学会年会、岡山、2018年9月15-17日

檜作洋平、鈴木健裕、照島功祐、堂前直、秋山芳展：細菌べん毛III型分泌装置構成因子の翻訳後多段階プロセシング. 第91回日本生化学会大会、京都、2018年9月24-26日

三宅拓也、檜作洋平、秋山芳展：大腸菌膜内切断プロテアーゼRsePの構造維持と機能調節に関する新規ドメインの解析. 第91回日本生化学会大会、京都、2018年9月24-26日

吉谷亘平、秋山芳展：大腸菌内膜プロテアーゼHtpXのプロテアーゼ活性能評価系の構築 第91回日本生化学会大会、京都、2018年9月24-26日

Akiyama, Y.: Structure and function of the TPR domain of BepA, an *E. coli* periplasmic protease/chaperone involved in outer membrane protein biogenesis/degradation. The 25th East Asia Joint Symposium, Chongqing, China, October 24-27, 2018

檜作洋平：膜内切断プロテアーゼは如何にして脂質二重層内部で基質を認識・切断するか？第49回京化異分科交流若手サロン、京都、2018年10月25日

秋山芳展：大腸菌S2Pファミリー膜内切断プロテアーゼRsePの選択的基質切断機構. 新潟薬科大学薬学総合セミナー、新潟、2018年11月1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	石橋 理基	Assist. Prof.	Riki Ishibashi
特定助教	一條 遼	Program-Specific Assist. Prof.	Ryo Ichijo

平成 30 年には、研究員の石橋理基と一條遼が助教と特定助教にそれぞれ着任した。生命科学硕士研究科修士課程 1 年として南部沙季と三森はるかが入学した。松村繁助教が辞職して名古屋大学医学研究科特任講師に着任し、久保嘉一と松山奈央が修士課程を修了して就職した。技術補佐員の太田陽子が退職し、事務補佐員として村山かの子が加わった。

本分野では、ライフステージに応じた組織幹細胞の増殖・分化制御機構について研究を行っている。特に「妊娠」と「老化」に伴う体の生理変化に対する組織幹細胞の適応機構を明らかにすることを目指している。2018 年における研究内容を以下に記載する。

1) 妊娠期の腹部皮膚に出現する高増殖能を持つ表皮基底細胞の形質解析

皮膚組織は表皮、真皮、皮下組織より構成され、表皮基底層には、増殖能と未分化性を維持する表皮幹細胞が存在する。皮膚は体型変化に伴って表面積を柔軟に変化させるが、生理的な体形変化に対して表皮幹細胞がどのように応答しているのかについては不明である。当研究室では、急速に拡張する妊娠期の腹部皮膚に着目し、表皮幹細胞の制御機構について研究を進めている。これまでに、妊娠マウスの腹部皮膚において、表皮幹細胞から Tbx3 陽性の高い増殖能を持つ細胞群（TA 細胞）が産生されることを見出した。この TA 細胞は Tbx3 に依存して増殖し皮膚の拡張と胎児の成長を促すことを示した。また、妊娠期には、真皮に存在する α -SMA/Vimentin 陽性細胞が、分泌タンパク質である Sfrp1, Igfbp2 を分泌することで TA 細胞の産生を促進することを明らかにした（図 1）。本年度は、この TA 細胞の形質について解析を進めた。TA 細胞をラベルトレースできるマウスを作製し出産後の TA 細胞の運命を解析した結果、この細胞集団は出産後には表皮から排除されることが分かった。また、RNAseq により、TA 細胞で Tbx3 依存的に発現する遺伝子プロファイルを解析した結果、Tbx3 は TA 細胞で特異的に発現する遺伝子群の約 30% を制御し、特に細胞増殖や分化に関わる遺伝子

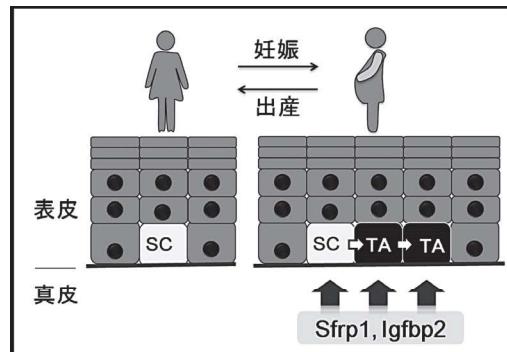


図 1：妊娠期の腹部皮膚では、真皮からのシグナルにより表皮幹細胞（SC）が非対称分裂して、増殖能の高い TA 細胞を产生する。

群が濃縮されていた。現在、TA 細胞の増殖シグナル機構とステムネス維持機構について解析を進めている。

2) 妊娠期における肝細胞ダイナミクス

胎生動物である哺乳類では、母体環境が胎児の発生に大きな影響を与える。妊娠期には、母体の複数の臓器で組織幹細胞・前駆細胞の増殖・分化が増進する。マウスでは、妊娠期に肝臓が肥大化することが知られており、母体の代謝変化との関連が指摘されている。しかし、そのメカニズムや生理機能は不明である。当研究室では、妊娠の進行に伴い、肝細胞の増殖が肝小葉内で時空間的に制御されていることを見いだした。肝細胞の代謝機能は肝小葉内の領域毎に異なるため、この結果は、妊娠の各ステージにおける母体代謝と肝細胞増殖の領域特異性をつなぐメカニズムの存在を示唆している。現在、この制御機構の解明と母体生理・胎児発生における役割について解析を進めている。

1) Characterization of highly proliferative interfollicular epidermal cells emerged during pregnancy.

During pregnancy, abdominal skin rapidly expands to accommodate foetal growth. We have previously identified a highly proliferative interfollicular epidermal (IFE) basal cell population in the abdominal skin of pregnant mice. These cells are progeny of IFE stem cells and express Tbx3 that is necessary for their propagation to drive skin expansion. The transition from stem to Tbx3-positive cell state is induced by dermal-derived secreted proteins, including Sfbp1 and Igfbp2. In this year, we generated the reporter mice for label-tracing the Tbx3-positive cells to reveal their cell fate during pregnancy and after parturition. We found that the Tbx3-positive cell population constantly propagates until dpc17, but stop dividing at dpc18 and eventually diminished from the epidermis after parturition. RNAseq analysis reveals that Tbx3 regulates the expression of about 30% genes associated with the Tbx3-positive cell population. We are now investigating the proliferation mechanism and stemness of the Tbx3-positive cell population.

2) Hepatocyte dynamics during pregnancy.

During pregnancy, tissue stem cells in several organs are activated in response to a physiological alteration of the maternal body. In mice, the maternal liver is increased in size during pregnancy, which may be essential for maternal metabolism. However, little is known how the liver cell dynamics is regulated during pregnancy. In this year, we look insight into the hepatocyte dynamics in pregnant mice and found that hepatocyte proliferation is regulated in a zone-dependent manner during the course of gestation period. As the metabolic capacity of hepatocytes varies in each zone, our finding suggests the linkage between metabolic demands and hepatocyte proliferation in a zone-dependent manner.

List of Publications

- Murata T, Honda T, Egawa G, Yamamoto Y, Ichijo R, Toyoshima F, Dainichi T, Kabashima K. (2018). Transient elevation of cytoplasmic calcium ion concentration at a single cell level precedes morphological changes of epidermal keratinocytes during cornification. *Sci. Rep.* 8, 6610
一條遼、豊島文子 (2018). 妊娠期に腹部の皮膚が広がる仕組み 医学のあゆみ 266, 607-608.

List of Presentations

- 一條 遼 肥満・老化による表皮幹細胞分裂機構の破綻 新学術領域「幹細胞老化と疾患」「細胞競合」総括班主催「若手の会」、熱海、2018年2月2-3日
- Toyoshima, F. Stem cell dynamics in skin homeostasis. Frontline in Developmental Biology, Kyoto, March 22-23, 2018
- Toyoshima, F. The epidermal cell communications in homeostasis and gestation period. Joint Annual Meeting of JSCD 51st and JSCB 70th. Tokyo, June 5-8, 2018.
- 上月智司、豊島文子 肝細胞の時空間依存的細胞分裂による妊娠期母体肝細胞再編成機構の解析 第25回肝細胞研究会、東京、2018年7月12-13日
- Satoshi Kozuki, Fumiko Toyoshima. Zonation-dependent hepatocytes dynamics during pregnancy. 25th East Asia Joint Symposium. Chongqing, China, October 25-26, 2018.
- Toyoshima, F. Epidermal stem cell dynamics during pregnancy. 第41回日本分子生物学会年会、横浜、2018年11月28-30日
- 上月智司、豊島文子 肝臓内ゾーン依存的な妊娠期母体肝細胞再編成機構の解析 第41回日本分子生物学会年会、横浜、2018年11月28-30日
- 阿部浩太、石橋理基、上月智司、豊島文子 妊娠期における転写因子 Tbx3 の機能解析 第41回日本分子生物学会年会、横浜、2018年11月28-30日
- Elizabeth Shimoura, Riki Ishibashi, Sachiko Kamakura, Satoshi Kozuki, Hideki Sumimoto, Fumiko Toyoshima Mechanisms of Hepatocyte Division During Pregnancy 第41回日本分子生物学会年会、横浜、2018年11月28-30日
- 廣田紗奈、小田裕香子、豊島文子 細胞分裂軸制御におけるメカノセンサーの機能解明 第41回日本分子生物学会年会、横浜、2018年11月28-30日
- 石橋理基、阿部浩太、豊島文子 Crispr/Cas9 システムを用いた、受精卵インジェクションによるノックイン、ノックアウト、及びコンディショナルノックアウトマウスの作製 第41回日本分子生物学会年会、横浜、2018年11月28-30日
- 三森はるか、石橋理基、豊島文子 The function of AK2 in cell division 第41回日本分子生物学会年会、横浜、2018年11月28-30日

一條遼、山本拓也、豊島文子 高増殖能を有する表皮幹細胞ダイナミクス 第41回日本分子生物
学会年会、横浜、2018年11月28-30日

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

数理生物学分野
Laboratory of Mathematical Biology

教 授 望月 敦史 Prof. Atsushi Mochizuki

本分野では、数理科学や計算機シミュレーションなどの理論的方法を用いて、生命現象の解明に取り組んでいる。理論的手法を用いることで、複雑に見えるシステムに対しても、それを支配する本質的な法則を導くことができる、と我々は考えている。2018年においては、理論が予測した少数分子の操作による細胞分化システムの制御を実験発生生物学者との共同研究により実現した。また、化学反応系の振る舞いをネットワーク構造から決定する新しい理論を構築した。その他、複数の生命現象に対して、数理モデルを用いた研究を展開した。

1) ネットワーク構造に基づき理論が予測した少数遺伝子による細胞分化システムの制御

生命科学の発展により、多くの生物現象が多数種の遺伝子が相互作用する複雑な制御ネットワークシステムに基づいていることが示されてきた。それらシステム全体が作り出すダイナミクスが、生命現象の起源だと考えられている。例えば、ホヤの初期発生で7通りの異なる組織の分化をつかさどるシステムとして、90以上の遺伝子と数百の制御を含む遺伝子制御ネットワークが同定されている。一方で制御ネットワークは相互作用の骨格だけを示しており、その情報に加えて関数やパラメータを仮定しなければ、ダイナミクスを決定できないと考えられてきた。これに対して我々は、制御ネットワークの構造だけから、一部の重要な分子を決定できる数学理論を、構築してきた。この理論によれば、ネットワークの構造だけから決まる Feedback vertex set (FVS) を観測／制御することで、システム全体のダイナミクスを観測／制御できるはずである。この理論に基づき、実際のホヤ肺を用いて細胞分化システムの制御実験を行った。FVSとして定められた5つの遺伝子を人工的に活性化あるいは抑制する25通りの網羅的制御実験を行った。制御実験の結果得られた操作胚の遺伝子発現の多様性は、正常発生で観察される7通りの細胞分化状態のうち、6通りを含むことが分かった。ホヤの遺伝子ネットワークの情報は、細胞分化を説明する上で、ほぼ完全でありながらまだ未解明部分が残ることが示唆された。この研究は京都大学大学院理学研究科の佐藤ゆたか准教授らとの共同研究である。

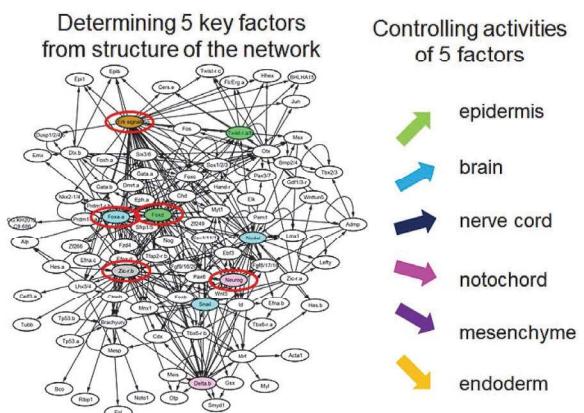


Fig. 1. Controlling cell-fate specification system by FVS genes.

2) 化学反応システムの分岐をネットワークの形だけから解析する新しい理論の構築

生体内で働く無数の化学反応は連鎖的につながり、ネットワークを形成することが知られている。このシステム全体のダイナミクスから細胞の生理機能が生まれ、さらに反応を司る酵素の量や活性が変化することで生理機能の調節が行われるのだ、と考えられている。特に、環境に対して細胞挙動が質的に変わったり、複数の状態が安定となるような定性的な変化は、化学反応システムの解の分岐に由来すると考えられる。一方で複雑な反応ネットワークの分岐の解析は、数理的に大変困難な問題であった。

今回我々は、ネットワークの構造情報だけから、化学反応システムの定常解の分岐解析が可能であることを明らかにした。具体的には、(1) 化学反応ネットワークを部分構造に分解し、それぞれの構造が分岐を生じる条件の積として、ネットワーク全体の分岐条件を与えることができる、(2) それぞれの部分構造に対し、分岐を誘発しうるパラメータを含む反応を、ネットワーク上で決定できる、(3) それぞれの部分構造が分岐条件を満たしたとき、分岐挙動を示す物質をネットワーク上で決定できる。Fig. 2 に二つの部分構造に分解できる簡単なネットワークの例を示した。ネットワークの部分構造だけで化学反応系の振る舞いを決定できるこの理論は、複雑な生命システムの振る舞いを解明する上で強力な手段になりうる。

3) 様々な生命現象に対する数理的研究

幾つかの具体的な生命現象に対し、実験生物学者と共同研究を行い、数理モデルによる予測と実験検証による解析を進めた。具体的には、(1) 染色体形成におけるコンデンシン分子の働きについて、(2) 植物導管の表層における自己組織的パターン形成について、(3) 植物代謝系におけるピロリン酸分解酵素破壊の効果をネットワーク構造のみから予測する、などを行った。

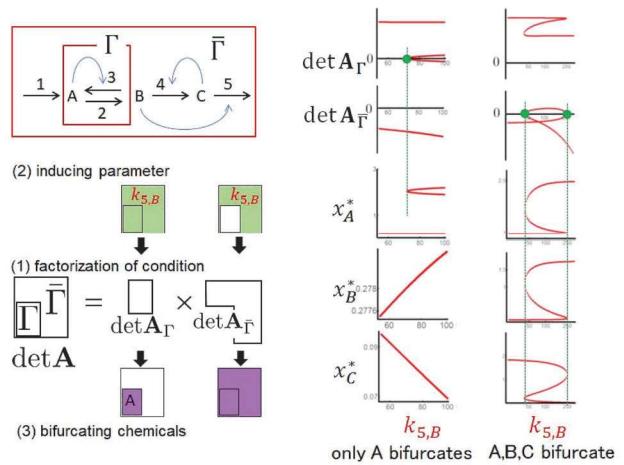


Fig. 2. Decomposition of bifurcation condition/behaviors of an example network. Left: theoretical analysis, right: numerical results.

In the laboratory we study many biological phenomena by using theoretical methods, including mathematical and computational analyses. By theoretical approaches, we obtain integrative understandings for complex systems, and identify fundamental mechanisms of biological functions of them. In 2018 we accomplished a project of controlling cell-fate specification system by a small number of genes identified by our theory. We also developed a novel mathematical theory, by which important aspects of dynamical behaviors of reaction systems from network structure alone. We also studied some biological phenomena using mathematical models by collaborating with multiple groups of experimental biology.

1) Controlling cell fate specification system based on network structure

By the success of modern biology we have many examples of large networks which describe regulatory interactions between a large number of genes. On the other hand, we have a limited understanding for the dynamics of molecular activity based on such complex networks. To overcome these problems, we developed Linkage Logic theory to analyze the dynamics of complex systems based on information of the regulatory linkages alone. It assures that (i) any long-term dynamical behavior of the whole system can be identified/controlled by a subset of molecules in the network, and that (ii) the subset is determined from the regulatory linkage alone as a feedback vertex set (FVS) of the network. We applied this theory to the gene regulatory network for cell differentiation of ascidian embryo, which includes more than 90 genes. From the analysis, dynamical attractors possibly generated by the network should be identified/controlled by only 5 genes, if the information of the network structure is correct. We verified our prediction by combinatorial experiments of knockdown and overexpression by using ascidian embryos. We found that almost all of the expected cell types, six out of seven major tissues, could be induced by experimental manipulations of these five genes (Fig. 1). This project is a collaboration with the group of Dr. Yutaka Sato, Graduate School of Science, Kyoto University.

2) Structural Bifurcation Analysis in Chemical Reaction Networks

In living cells, many chemical reactions are connected, sharing their products and substrates and constructing a large network. Biological functions are believed to arise from network dynamics of chemical reactions. One important aspect of biological reaction systems is qualitative change (sometimes called plasticity) of behaviors induced by enzyme modulations or external conditions. Mathematically, these plastic behaviors can be interpreted as “bifurcation behaviors” of chemical reaction systems. However, it has been considered difficult to analyze bifurcation properties for large complex networks, because of their large number of variables and parameters. In this study, we establish a novel theoretical method to analyze steady-state bifurcations of chemical reaction systems from the network information, alone. We found that (i) the bifurcation condition of a complex network can be studied by decomposing it into smaller subnetworks, and the bifurcation condition of each subnetwork is determined independently. (ii) For each subnetwork, inducing parameters are identifiable on the network. (iii) For each subnetwork, chemicals exhibiting bifurcation behaviors are identifiable on the network. The method determines dynamical properties of chemical reaction systems from structure of network, and will be a strong tool to study biological complex systems (Fig. 2).

3) Mathematical studies for biological phenomena

We studied some biological phenomena using mathematical modeling by collaborating experimental biologists. We developed a mathematical model for functions of condensin molecules in chromosome condensation. We also studied self-organizing pattern formations on the surface of vessel cells in plants by a reaction diffusion model. We also studied effects of knockdown of pyrophosphatases on plant metabolisms from the structure of metabolic network.

List of Publications

- Sakai Y., Mochizuki A., Kinoshita K., Hirano T., and Tachikawa M. (2018) Modeling the functions of condensin in chromosome shaping and segregation. **PLoS Comput. Biol.** 14 (6), e1006152.
- Kobayashi K., Maeda K., Tokuoka M. Mochizuki A. and Satou Y. (2018) Controlling Cell Fate Specification System by Key Genes Determined from Network Structure. **iScience** 4, 281-293.
- Okada T., Tsai J.-C. and Mochizuki A. (2018) Structural bifurcation analysis in chemical reaction networks. **Phys. Rev. E** 98, 012417.
- Nagashima Y., Tsugawa S., Mochizuki A., Sasaki T., Fukuda H., and Oda Y. (2018) A Rho-based reaction-diffusion system governs cell wall patterning in metaxylem vessels. **Sci Rep.** 8, 11542.
- Ferjani A., Kawade K., Asaoka M., Oikawa A., Okada T., Mochizuki A., Maeshima M., Hirai M.Y., Saito K. and Tsukaya H. (2018) Pyrophosphate inhibits gluconeogenesis by restricting UDP-glucose formation in vivo. **Sci Rep.** 8, 14696.

List of Presentations

Mochizuki, A. "Structural analysis for sensitivity of chemical reaction networks" (Plenary), International Workshop on Mathematical Biology 2018, Costabella Tropical Beach Hotel, Cebu, Philippines, January 7-10, 2018.

Mochizuki, A. "Origin of Adaptation and Modularity in Chemical Reaction Networks" (Invited), Gordon Research Conference 2018 on Oscillations and Dynamic Instabilities in Chemical Systems, Les Diablerets Conference Center, Switzerland, July 8-13, 2018.

Atsushi Mochizuki. Dynamical behaviors of complex biological systems determined from structure of networks. 京大医学研究科生命科学研究科合同特別講義 , Faculty of Medicine, Memorial Hall, Kyoto University, 京都 , 2018 年 4 月 20 日

望月敦史 ネットワーク構造が作る化学反応システムの分岐とモジュラー性 京都大学ウイルス・再生医科学研究所 第 4 回 生命情報研究会 , 京都大学楽友会館 , 2018 年 7 月 3 日

Atsushi Mochizuki Predicting dynamics of complex biological systems from structures of networks. The 25th Leading Seminar, Lecture Hall, Grad. Schl. Veterinary Medicine, Hokkaido University, Sapporo, 2018 年 7 月 25 日

望月敦史 生命システムの振る舞いをネットワークの形だけから予測する (招待講演) 新学術領域「数理シグナル」若手ワークショップ , アヤハレークサイドホテル , 滋賀 , 2018 年 8 月 31 日 -7 月 2 日

望月敦史 生命システムの振る舞いをネットワークの形だけから予測する (特別講演) 第 15 回生物数学の理論とその応用 – 次世代の数理科学への展開 – 、京都大学数理解析研究所、京都、

2018年9月10-14日

望月敦史 生命システムの振る舞いをネットワークの形だけから予測する（招待講演） 生命創成
探究センター第一回シンポジウム，自然科学研究機構 岡崎コンファレンスセンター，岡崎，
2018年10月15-16日

望月敦史 生命システムの振る舞いをネットワークの形だけから予測する（基調講演） JST 植物関
係4領域合同若手研究会、プラサヴェルデ，静岡、2018年10月18-19日

望月敦史 化学反応システムの応答と分岐をネットワークの形だけから予測する（招待講演）
MIMS 研究集会：細胞の代謝振動とネットワーク解析，明治大学中野キャンパス，東京，2018年
11月16-17日

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

幹細胞遺伝学分野
Laboratory of Stem Cell Genetics

教 授 遊佐 宏介 Prof. Kosuke Yusa

当分野は、2018年（平成30）年10月に新規に発足した研究室であり、ほ乳類細胞における順遺伝学的手法を基盤技術として、ヒト多能性幹細胞の未分化維持および分化機構の解明、また、ヒトがん細胞の増殖に関わる遺伝子の探索と機能解析を主たるテーマとして研究を行なっている。順遺伝学的手法のさらなる技術解析も重要な研究テーマとしている。

当分野を主宰する遊佐は、2012年から2018年の間、英國ケンブリッジにあるウエルカム・サンガーリン研究所でグループリーダーとして研究活動を展開してきた。大学院時代より一貫して、ほ乳類細胞、特にマウスやヒト多能性幹細胞（ES細胞、iPS細胞）を対象とした遺伝学的ツールの開発と応用に取り組んでおり、これまでの成果として*piggyBac* トランスポゾンを用いたiPS reprogramming法、高活性*piggyBac* トランスポゾン転移酵素、遺伝病患者由来iPS細胞における原因遺伝子の修復等を発表してきた。これらとは別に主たる研究テーマとしていたのが、ほ乳類培養細胞における順遺伝学的手法、つまり網羅的遺伝子スクリーニング法の技術開発である。これは酵母や線虫、ハエ等の下等モデル生物でよく用いられた研究手法で、幾つもの重要な生物学的プロセスに関わる遺伝子を明らかにしてきた手法である。しかし、既存のほ乳類培養細胞のほとんどは二倍体かそれ以上の異数体であるため、劣性表現形質を観察するためには全ての遺伝子コピーを破壊する必要があり、全遺伝子を網羅的に破壊することが困難であった。遊佐はこの問題を2013年に登場したCRISPR-Cas9システムを用いて解決し、ほ乳類培養細胞における遺伝子スクリーニング法CRISPR screeningを開発した（Koike-Yusa et al., 2014）。初期のスクリーニング技術に改良を加えた第二世代のCRISPR screening法（Tzelepis et al., 2016）を用いて、これまでに様々な表現型解析を行っており、解析が終わったものに関しては順次論文発表している。現在は冒頭で挙げた二つの主要研究テーマに取り組んでいる。

Our laboratory was newly established in October 2018. We focus on studies of the molecular mechanisms underlying pluripotency and cell differentiation of human pluripotent stem cells as well as cancer cell proliferation. In order to identify genes involved in these biological processes, we employ a forward genetic approach that we have developed using the CRISPR-Cas9 systems, namely CRISPR screening. We then conduct detailed molecular analyses on hit genes with a particular interest in transcriptional gene regulation. In addition, we are also interested in developing novel genetic tools that are

broadly applicable for a wide range of biological researches.

Kosuke Yusa, the lab head, run an independent research laboratory at the Wellcome Sanger Institute in Cambridge, UK between 2012 and 2018. His research interest has been development and application of genetic tools that are applicable in mammalian cells, particularly mouse and human pluripotent stem cells (ES and iPS cells). Thus far, he developed a iPSC reprogramming method using *piggyBac* transposon, hyperactive *piggyBac* transposase and a method for genetic correction of a disease-causing variant in patient-derived iPS cells. In addition, he worked for developing a method and technology that allows for forward genetics in mammalian cultured cells. Forward genetics is a powerful hypothesis-free approach to study gene function associated with a phenotype of interest. It was frequently employed in lower model organisms such as yeast, *C. elegans* and fruitfly and revealed a number of genes involved in various fundamental biological processes. Although the forward genetics approach was successfully applied in these organisms, it had been difficult to apply in mammalian cells due to the diploid (or often aneuploid) nature of mammalian genomes. To observe recessive phenotype, a method that inactivates all copies of every gene was required. He addressed this issue in 2013 by developing a new genetic screening method using the CRISPR-Cas9 system, namely CRISPR screening (Koike-Yusa et al. 2014). He further refined the method and developed a second-generation CRISPR library (Tzelepis et al. 2016). With this latest version of the CRISPR library, he conducted a number of genetic screens in various biological processes in collaboration. In the new laboratory in Kyoto University, he will focus on the aforementioned two area: pluripotent stem cells and cancer cells.

List of Publications

- Tzelepis K, De Braekeleer E, Aspris D, Barbieri I, Baskar V, Liu WH, Metzakopin E, Toop HD, Gozdecka M, Dudek M, Robson SC, Hermida-Prado F, Yan YH, Babaei-Jadidi R, Garyfallos D, Ponstingl H, Dias J, Gallipoli P, Seiler M, Buonamici S, Vick B, Bannister AJ, Rad R, Prinjha R, Marioni J, Huntly B, Batson J, Morris JC, Pina C, Bradley A, Jeremias I, Bates DO, **Yusa K**, Kouzarides T, Vassiliou G. 2018 SRPK1 is a therapeutic vulnerability in acute myeloid leukemia through its effects on alternative isoforms of epigenetic regulators including BRD4. **Nature Commun.** 9:5378
- Chong ZS, Ohnishi S, **Yusa K**, Wright GJ. 2018 Pooled extracellular receptor-ligand interaction screening using CRISPR activation. **Genome Biol.** 19:205
- Iorio F, Behan FM, Goncalves E, Bhosle SG, Chen E, Shepherd R, Beaver C, Ansari R, Pooley R, Wilkinson P, Harper S, Butler AP, Stronach EA, Saez-Rodriguez J, **Yusa K**, Garnett MJ. 2018 Unsupervised correction of gene-independent cell responses to CRISPR-Cas9 targeting. **BMC genomics** 19:604
- Li M, Yu JS, Tilgner K, Ong SH, Koike-Yusa H, **Yusa K**. 2018 Genome-wide CRISPR-KO screen uncovers mTORC1-mediated GSK3 regulation in naïve pluripotency maintenance and Dissolution. **Cell Reports** 24:489

Sharma S, Bartholdson SJ, Couch ACM, **Yusa K**, Wright GJ. 2018 Genome-scale identification of cellular pathways required for cell surface recognition. **Genome Research** 28:1372

Pettitt SJ, Krastev DB, Brandsma I, Drean A, Song F, Aleksandrov R, Harrell MI, Menon M, Brough B, Campbell J, Frankum J, Ranes M, Pemberton HN, Rafiq R, Fenwick K, Swain A, Guettler G, Lee JM, Swisher EM, Stoynov S, **Yusa K**, Ashworth A, Lord CJ. 2018 Genome-wide and high-density CRISPR-Cas9 screens identify point mutations in PARP1 causing PAPR inhibitor resistance. **Nature Commun.** 9:1849

Fukuda K, Okuda A, **Yusa K**, Shinkai Y. 2018 A CRISPR knockout screen identifies SETDB1-target retroelement silencing factors in embryonic stem cells. **Genome Research** 28:846

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

靈長類モデル分野
Laboratory of Primate Model

准教授 三浦 智行 Assoc. Prof. Tomoyuki Miura

2018年3月に加川裕美子がオフィスアシスタントを終了した。4月に研究生のYalcin Pislが人間・環境学研究科博士課程に入学した。また、山浦瑞樹と李佳霖が人間・環境学研究科修士課程に入学した。7月に菊川美奈子が技術補佐員となった。

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）。2018年の代表的な研究進展状況を以下に記述する。

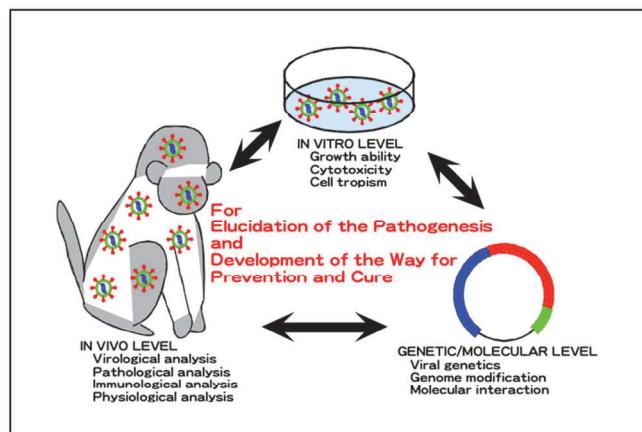
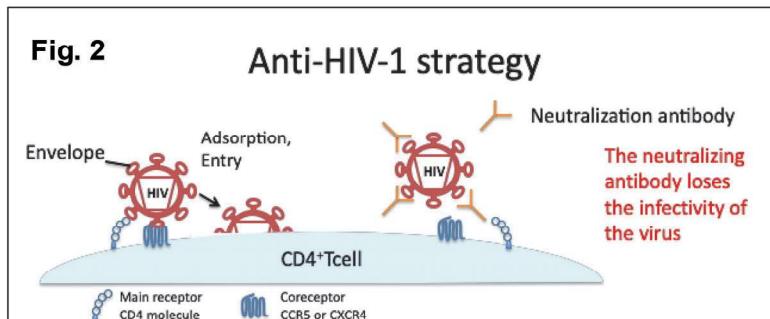


Fig. 1. Research Cycle of Primate Model for Infectious Diseases

Tier1B SHIV 感染ザルにおける抗 HIV-1 Tier2 中和抗体の誘導

ワクチン誘導中和抗体（nAb）による HIV-1 感染の予防およびウイルス増殖の抑制が望まれている（Fig. 2）。しかしながら、ワクチンによって広い交差反応性を有する強力な nAb を誘導することは未だ困難である。nAb を誘導する動物モデルは、HIV-1 に対して効果的な nAb を誘導するメカニズムを解明する一助となり、ワクチンの開発に貢献することができる。我々は以前に、HIV-1 臨床分離株と同じ CCR5 指向性および中和耐性を有する SHIV を開発した。本研究では、アカゲザルに異なる中和耐性 SHIV を感染させることにより、HIV-1 に対して nAb を誘導するモデルを構築した。CCR5 指向性の SHIV-MK1（MK1）（中和感受性 Tier 1B）は、主な共受容体として CXCR4 を用いる SHIV-KS661 に変異を加えて作製



された。さらに、MK1を3匹のアカゲザルに継代して、中和耐性（Tier 2）SHIV-MK38（MK38）を得た。SHIV-MK38#818（#818）は、MK38の分子クローンとして作製された。我々はこれらのウイルスに感染したアカゲザルにおける血漿の中和能力を、Tier 1～Tier 3の様々なHIV-1 Envを含む人工ウイルス粒子を用いて抗体存在下でのTZM-bl細胞への感染によるルシフェラーゼ活性を指標として評価した。感染アカゲザル10頭のうち持続的に高い血中ウイルス量を示した7頭のアカゲザルについて血漿中の抗体の中和能力を評価した。MK1（Tier1B）に感染したMM482の中和能力は、自己および異種のTier2ウイルスに対するnAbがTier 1Bウイルス感染により誘導されることを明らかにした。さらに、#818（Tier2）に感染したMM597の中和能力は、自己および異種のTier 2ウイルスに対するnAbがTier 1Bウイルス感染よりも早く誘導されたことを明らかにした。MK1および#818感染アカゲザルモデルは、HIV-1のnAb誘導モデルとして有用であり、これはnAb誘導性ワクチンの開発に寄与し得る。

This laboratory aims to elucidate the pathogenicity and develop therapeutic and prophylactic methods for viral infectious diseases and comprehensively analyzes the infection of retroviruses (HIV, SIV, SHIV) and Flavivirus (DENV) at the molecular level, cultured cell level and infected individual level (Fig. 1). Representative research progress in 2017 will be described below.

Induction of Tier 2 neutralizing antibody against HIV-1 in a rhesus macaque infected with Tier 1B SHIV

Prevention of HIV-1 infection and suppression of viral proliferation by vaccine-induced neutralizing antibody (nAb) are desired. However, it is difficult to induce potent nAb with broad cross-reactivity by vaccines. An animal model that induces nAb can help clarify the mechanism of inducing effective nAb against HIV-1 and can contribute to the development of vaccines. We have previously developed SHIV, which has CCR5 tropism and neutralization resistant same as HIV-1. In this study, we constructed a model to induce nAb against HIV-1 by infecting rhesus macaques with different neutralizing resistance SHIVs. SHIV-MK1（MK1）(neutralizing susceptible Tier 1B) with CCR5 tropic was generated from SHIV-KS661 using CXCR4 as the main co-receptor. In addition, MK1 was passaged through 3 rhesus macaques to obtain neutralizing resistant SHIV-MK38（MK38）(Tier 2). SHIV-MK38#818 (#818) was generated as a molecular clone of MK38. We evaluated the neutralizing ability of plasmas in rhesus macaques infected with these viruses, by reducing the expression of luciferase due to a single infection into TZM-bl cells using pseudovirus containing various HIV-1 Env of Tier 1-Tier 3. Seven out of the ten infected rhesus macaques were persistently infected, and we evaluated the neutralization ability of the plasmas for these seven macaques. The neutralization ability of MM482 infected with MK1 (Tier1B) revealed that nAb against Tier2 viruses of autologous and heterologous were induced by Tier 1 B virus infection. Furthermore, the neutralization ability of MM597 infected with #818 (Tier2) revealed that nAb against Tier2 viruses of autologous and heterologous were induced earlier than with Tier 1B virus infection. MK1 and # 818 infected rhesus macaque models are

useful as a nAb induction model for HIV-1, which can contribute to the development of nAb inducible vaccine.

List of Publications

- Kato, F., Ishida, Y., Kawakami, A., Takasaki, T., Saijo, M., Miura, T., and Hishiki, T. (2018). Evaluation of *Macaca radiata* as a non-human primate model of Dengue virus infection. **Sci. Rep.** 8, 3421.
- Doi, N., Miura, T., Mori, H., Sakawaki, H., Koma, T., Adachi, A., and Nomaguchi, M. (2018). CXCR4- and CCR5-Tropic HIV-1 Clones Are Both Tractable to Grow in Rhesus Macaques. **Front. Microbiol.** 9, 2510.

List of Presentations

姫野愛、石田裕樹、森ひろみ、松浦嘉奈子、菊川美奈子、阪脇廣美、三浦智行 Tier1B SHIV 感染ザルにおける抗 HIV-1 Tier2 中和抗体の誘導 第 66 回日本ウイルス学会学術集会、京都、2018 年 10 月 28-30 日

横山温香、陣野萌恵、関根将、三浦智行、伊吹謙太郎 SIV 感染サル化マウスの AIDS 病態モデルとしての有用性の検討 第 66 回日本ウイルス学会学術集会、京都、2018 年 10 月 28-30 日

野村拓志、寺原和孝、石井洋、山本浩之、三浦智行、俣野哲朗 ワクチンによって誘導された Gag エピトープ特異的 CD8 陽性 T 細胞の交差性 第 66 回日本ウイルス学会学術集会、京都、2018 年 10 月 28-30 日

Shida, H., Kato, S., Okamura, T., Mukai, T., Inoue, M., Shu, T., Miura, T., Yasutomi, Y., Matsuo, K. Protective effects of immunization using urease-deficient BCG, vaccinia LC16m8d, and Sendai virus expressing SIV genes 第 66 回日本ウイルス学会学術集会、京都、2018 年 10 月 28-30 日

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

ウイルス感染症モデル分野
Laboratory of Infectious Disease Model

教 授 明里 宏文 Prof. Hirofumi Akari

当分野では、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）やヒトT細胞白血病ウイルス（HTLV-1）等の難治性ウイルス感染症に関する研究を行っている。これらのウイルスには、①長い年月に及ぶ持続感染の末に発症に至る、②宿主の免疫機構を巧妙に回避する術を持つ、③非常に狭い（選択的な）宿主特異性を示す、などの共通点がある。この宿主特異性という難題に取り組み、これまでにウイルスの変異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

HIV-1 感染症は、優れた HIV 阻害薬が開発されるに至り、AIDS を発症することなく日常生活を送ることが可能な慢性疾患となってきた。しかしながら、最先端の医療技術をもってしても生体内に潜伏している HIV を除去することは不可能である。ART (抗 HIV 薬による治療) を中断すると HIV リバウンドが生じるため、終生の ART が必要である。また、HIV 感染者は治療の長期化に伴う様々な非感染性合併症（循環器疾患、脂質異常、神経認知障害、癌など）の発症リスクが高いことに加え、精神的・社会的リスクも非常に大きい。従って、HIV 根治という大きな命題を克服するべく、次世代抗 HIV 療法の開発に向けた新たな取り組みが求められている。今のところ、造血幹細胞移植、治療ワクチン、shock and kill 療法、広域中和抗体およびこれらにゲノム編集技術を組み合わせた根治療法が有望視されている。しかし実際の臨床試験実施には、多くの克服すべき難題が山積している。まず、こうした臨床試験では HIV キャリアー適切な ART を受けている限り、多くの場合臨床的には非感染者と全く遜色ない健常者一を被験者として、ART に加えて異なる薬剤やその用量・投与頻度などの実施条件の最適化や有効性比較評価を行う必要がある。従って、試験薬剤の安全性のみならず、薬剤投与による HIV への影響も考慮に入れたリスク評価が求められる。さらにやっかいなことに、ART により血漿中ウイルス RNA 量が検出限界以下となった HIV キャリアを被験者として上述の臨床試験での有効性を評価するには、体内に潜伏している HIV (HIV リザーバー) について正確に定量評価する必要がある。しかし、HIV キャリアを全身くまなく精査し、どの臓器・組織の、どの部位の、どのような細胞に、どれだけのリザーバーがどのような状態でどの程度の量が存在するのか、明らかにすることは難しい。従って、HIV 感染症根治を目指した研究推進には、次世代抗 HIV 根治療法の開発と平行して、HIV リザーバーに関する詳細情報とそれに基づく HIV リザーバーサイズ評価の指標となる (HIV キャリアへの悪影響を最小限に抑えた状態で生検可

能な) 定量系の確立が不可欠である。

そこで私達は、独自に開発した新規 HIV 感染霊長類モデルの活用という切り口で上述の問題を克服することにより、HIV 感染症の根治治療法創出に向けた実証試験への展開を目指している。これまでの研究において確立した長期潜伏 HIV 感染霊長類モデルでは、① ART 未治療にも関わらず長期にわたり血漿中ウイルス RNA が検出限界以下に制御され、②その HIV 制御は細胞性免疫及び液性免疫の協調的作用により維持されていること、また、③リンパ節の濾胞性ヘルパー T 細胞が HIV リザーバーとして機能し、免疫抑制等により人為的な HIV 再活性化が可能であることが明らかとなった (Seki et al., 論文投稿準備中)。以上の特性を踏まえ、HIV 根治のための評価試験実施に立ちはだかっている多くの難題を克服していきたい。現在までに、iPS 技術及びゲノム編集技術を活用した造血幹細胞移植および shock and kill 療法について *in vitro* による基礎的評価をほぼ終え、来年度には前臨床試験へと進めていく計画である。

2. STLV-1 自然感染ニホンザルに関する Cohort 研究：高感染率の機序

本邦では HTLV-1 キャリアは約 100 万人とされ、その陽性率は約 1% となっている。他方、日本固有の野生霊長類であるニホンザルは、HTLV-1 に非常に近縁なレトロウイルスである STLV-1 に非常に高い割合で感染していることが報告されている。この原因について、霊長類研究所の放飼場で飼育されているニホンザルコホート (N=300) 調査を行い、これまでに以下の結果を得た。

ニホンザル STLV-1 抗体陽性率は平均で約 66% であり、かつアダルト個体に絞ればほぼ 100% の陽性率を示した。このような高頻度の STLV-1 感染は他のサル類では見られず、ニホンザル特有の感染機構が示唆された。ところが、STLV-1 感染個体における抗体価やプロウイルス DNA 陽性細胞率およびその頻度分布は、HTLV-1 キャリアにおける場合とほぼ同程度を示し、super-spreader の存在も認められなかった。STLV-1 高感染率の原因として、ニホンザルの社会生態に基づく個体間感染機会の多さによることが強く示唆された。実際、当該コホートにおける STLV-1 感染個体の年齢分布を調べたところ、性成熟年齢 (5-6 歳) 以上で顕著な陽性率の上昇が見られた。また、STLV-1 感染妊娠ザル及びその子ザルについて長期フォローアップ解析を行ったところ、出生後 2 年間での STLV-1 母子感染率は 20% 程度であり、水平感染による高頻度の STLV-1 感染を裏付ける結果となつた。従って STLV-1 自然感染ニホンザルは、HTLV-1 母子感染や水平感染の阻止に向けた有用な動物モデルと考えられた。

Our laboratory is newly established in 2013 for active and effective collaboration between Institute for Virus Research and Primate Research Institute of Kyoto University. We are investigating the mechanisms for the viral persistency and pathogenesis of intractable viruses, including human immunodeficiency virus (HIV) and human T-cell leukemia/lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1), by employing novel non-human primate models for the viral infection. We also seek to contribute to the development of new therapeutics and antiviral vaccines.

1. Basic and applied study toward the cure of HIV-1 infection

Recent advance of antiretroviral therapy may result in infectious diseases caused by HIV-1 infection to be controllable. However, it is not yet 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. Currently, a number of studies for HIV-1 cure have been conducted to date, whereas breakthrough toward clinical application awaits further extensive investigation. One of the most difficult issues in terms of the intervention study of the therapy is to establish feasible and applicable protocols in order to evaluate efficacy and safety of latency reversing agents *in vivo*. Here we show that a novel nonhuman primate model of HIV latency would be suitable for the cure research. Cynomolgus macaques inoculated with macaque-tropic HIV-1 carrying the R5-tropic Env developed acute viremia, followed by virtual absence of plasma viral loads for more than 5 years in the absence of any antiretroviral treatment (ART). In the long-term latency phase of the macaques, follicular helper T lymphocytes in the germinal center of lymph nodes maintained a small population of the cells persistently expressing the virus, which is consistent with the finding in humans whose HIV replication is controlled by ART or host immunity. We further demonstrated that the latency of HIV-1 in the macaques was established by not only HIV-specific CD8+ T cell responses but also HIV-neutralizing antibodies and that these players functioned in a cooperative manner. These findings indicate that the latency phase was efficiently maintained by the host immunity and also imply the importance of the concomitant induction of cellular and humoral immunity in the development of effective anti-HIV vaccines. Taken together, the HIV-1 latency model may be useful for the purposes of characterizing HIV reservoirs, preclinical trial of cure therapy as well as for the basic study aiming at therapeutic vaccines for the functional cure.

2. Cohort study on Japanese macaques naturally infected with STLV-1

It has been shown that much greater population of Japanese macaques (JMs) is infected with STLV-1 than other primate species. We conducted the epidemiological study in a cohort of JMs in order to understand the reason for the high prevalence. It was found that (i) the distribution of antibody titer (ABT) and proviral load (PVL) among a large cohort of JMs (N=300) was comparable to those of HTLV-1-infected humans, (ii) the distribution was not influenced by troop and sex of JMs, and (iii) it is unlikely that JMs in the state of immunological anergy would develop a group of super-spreaders showing unusually high PVL without significant ABT, suggesting that the high frequency of STLV-1 infection may not be due to unusual mode of the viral transmission. Interestingly, the frequency of maternal transmission was approximately 20%, while the frequency of STLV-1 prevalence was drastically increased with age of sexual maturation and reached to almost 100% of infection. Taken together, our results in this study indicate that the ecology of JMs which includes group society and high frequency of sexual interaction may result in the high prevalence of STLV-1.

List of Publications

- Yokokawa, H., Higashino, A., Suzuki, S., Moriyama, M., Nakamura, N., Suzuki, T., Suzuki, R., Ishii, K., Kobiyama, K., Ishii, K., Wakita, T., Akari, H*, Kato, T*. (2018). Induction of humoral and cellular immunity by immunisation with HCV particle vaccine in a non-human primate model. **Gut** 67, 372-379. (*co-correspondance)
- Naruse, T., K., Akari, H., Matano, T., Kimura, A. (2018). Diversity of ULBP5 in Old-World monkeys (Cercopithecidae) and divergence of the ULBP gene family in primates. **Proc Jpn Acad Ser B** 94, 441-453.
- Ejikeugwu, C., Eze, P., Iroha, I., Esimone, C., Adikwu, M., Akari, H. (2018). Understanding the facts and minding the gap of (HIV-1/HIV-2) primate research and infectious disease laboratories in Africa. **Int J Virol AIDS** 5, 046.

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

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

本分野では、内在性レトロウイルスを研究対象として宿主とウイルスの相互作用の解明を目指している。2018年においては、内在性レトロウイルスに由来し、胎盤形成に関与する syncytin-1 遺伝子において新規の RNA 制御エレメントを同定し、機能解析をおこなった。また、syncytin-1 のレトロウイルスベクターへの応用に向けた研究を実施した。

1) 内在性レトロウイルスに由来する syncytin-1 遺伝子の新規 RNA 制御エレメントの同定

ヒト内在性レトロウイルス W (HERV-W) の *env* 遺伝子は、翻訳領域を保持しており、胎盤の栄養膜細胞の融合に必要な細胞膜融合タンパク質 (syncytin-1) として機能している。これまで syncytin-1 の発現低下と妊娠高血圧症候群との関連が指摘されており、遺伝子発現機構の解明は極めて重要であるが、転写後発現機構について解明が進んでいなかった。我々は、syncytin-1 の 3' 非翻訳配列 (3' UTR) が syncytin-1 の発現に必要であることを見出し、このエレメントが 3' UTR に挿入されると遺伝子発現が促進されることを、HIV-1 Gag のレポーター系を用いて明らかにした。同定されたエレメントは、RNA のコピー数には影響しないため、転写後発現制御に関与していると考えられた。そこで、我々はこの配列を syncytin-1 post-transcriptional regulatory element (SPRE) と命名した。さらに、欠失変異体の作製により、SPRE の活性に必要な領域を絞り込んだ結果、活性のある SPRE には共通する RNA 二次構造が存在することが示唆された。

2) 効率的な syncytin-1 レトロウイルスベクター產生系の構築

内在性レトロウイルスの *env* 遺伝子に由来する syncytin-1 は HIV-1 シュードタイプウイルスを形成することが知られており、遺伝子治療に有用な、新しいレトロウイルスベクターとして利用できる可能性がある。しかし、syncytin-1 は細胞融合活性が強く、パッケージング細胞の細胞死を誘導するという問題があった。そこで本研究では、syncytin-1 のアミノ酸変異によって、細胞融合の抑制とシュードタイプウイルスの產生効率の改善を試みた。その結果、syncytin-1 の C 末端の一部を両指向性 (amphotropic) のマウス白血病ウイルス (A-MLV) の Env と組換えることで、細胞融合が抑制され HIV-1 シュードタイプウイルスの感染価も上昇することが明らかとなった。

This laboratory aims to reveal the molecular basis underlying the co-evolution between hosts and endogenous retroviruses. In 2018, we discovered a novel RNA regulatory element in the human syncytin-1,

which is derived from an endogenous retrovirus and involved in cell-cell fusion of human placental trophoblasts. We also established the syncytin-1 expression system for the application of syncytin-1 to retroviral vectors.

1) Identification of a post-transcriptional regulatory element in the endogenous retroviral syncytin-1

Human endogenous retrovirus W (HERV-W) *env* gene, named syncytin-1, retains an open reading frame and encodes a membrane fusogenic protein which mediates cell-cell fusion in human placental trophoblasts. Although little is known about post-transcriptional regulation of syncytin-1, we revealed that the 3' untranslated region (3' UTR) of syncytin-1 is necessary for efficient gene expression, and the introduction of a small element of syncytin-1 including the 3' UTR markedly increased human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Gag expression. Introduction of the element did not affect the amounts of transcripts of HIV-1 Gag. Therefore, the element is thought to be involved in post-transcriptional regulation, and we named this element as SPRE (syncytin-1 post-transcriptional regulatory element). Deletion mapping analysis identified a required sequence for SPRE activity, and prediction of the RNA secondary structure demonstrated a unique secondary structure found among active SPRE deletion mutants.

2) Application of human endogenous retroviral syncytin-1 to retroviral vectors

HIV-1 is pseudotyped with human endogenous retroviral syncytin-1, and therefore, syncytin-1 has a potential to become new retroviral vectors useful for gene therapy. However, syncytin-1 has a strong cell-cell fusion activity and induces cell death of packaging cells. In this study, we attempted to suppress the cell-cell fusion and improve the production efficiency of pseudotyped viral vectors by introducing amino acid mutations in syncytin-1. The result showed that the recombination of the C-terminus of syncytin-1 with that of amphotropic murine leukemia virus (A-MLV) Env suppresses cell-cell fusion and increases the infectivity of syncytin-1 pseudotyped HIV-1 vectors.

List of Presentations

Sakaguchi, S., Koide, R., Nakagawa, S., Miyazawa, T., and Mizutani, T. Epidemiologic survey of the feline paramyxovirus infection in Japan. 12th China-Japan International Conference of Virology, Wuhan, May 17-19, 2018.

宮沢孝幸 レトロウイルス感染症と内在性レトロウイルス、産総研コンソーシアム 東京、2018年7月6日

Sakaguchi, S., Mitsuhashi, S., Ogawa, M., Miyazawa, T., Imanishi, T., Nakagawa, S., and Mizutani, T. Genomic and phylogenetic study of feline paramyxovirus. SMBE 2018, Yokohama, July 8-12, 2018.

北尾晃一、谷利爵公、宮沢孝幸 哺乳類内在性レトロウイルスの mRNA における新規発現制御エレメントの同定と機能解析 第20回日本RNA学会年会、大阪、2018年7月9-11日

宮沢孝幸 サルベータレトロウイルスによるニホンザル血小板減少症 日本大学動物医科学研究
セミナー、藤沢、2018年7月10日

中川草、上田真保子、今川和彦、宮沢孝幸 転移因子に由来する遺伝子の進化 日本進化学会第20
回大会、東京、2018年8月22-25日

司悠真、宮沢孝幸 ネコ白血病ウイルスのフェレット由来細胞への感染性及び増殖可能性 第161
回日本獣医学会学術集会、つくば、2018年9月11-13日

Miyazawa, T. Possibility of mammalian evolution retrotransposons activated by the cosmic rays. 第1回電磁
場生命科学ワークショップ、京都、2018年9月25日

北尾晃一、谷利爵公、宮沢孝幸 効率的なヒト内在性レトロウイルス HERV-W ウイルスベクター産
生系の構築 第66回日本ウイルス学会学術集会、京都、2018年10月28-30日

北尾晃一、宮沢孝幸 マウスのメラノーマ細胞はインターフェロン- γ に応答して細胞外小胞を制
御する 第41回日本分子生物学会年会、横浜、2018年11月28-30日

宮穂里江、中川草、宮沢孝幸 ニワトリにおける細網内皮症ウイルスの感染受容体の同定 第41
回日本分子生物学会年会、横浜、2018年11月28-30日

金村優香、宮沢孝幸 コアラレトロウイルスサブグループBの分子クローンの作製とその性状解析
第41回日本分子生物学会年会、横浜、2018年11月28-30日

宮沢孝幸、中川草、北尾晃一、今川和彦 Exaptation of endogenous retroviruses as functional genes in
mammalian placentas. 第41回日本分子生物学会年会、横浜、2018年11月28-30日

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

マウス作製支援チーム
Reproductive engineering team

技術専門員 宮地 均 **Senior Technical Specialist** Hitoshi Miyachi
技術専門職員 北野さつき **Technical Specialist** Satsuki Kitano

マウス作製支援チームはウイルス動物実験専門委員会の下でマウス受精卵の凍結保存をはじめトランスジェニックマウス（Tg）やノックアウトマウス（KO）の作製支援を行っている。また、生殖工学技術を用い、体外受精によるマウスコロニーの拡大、ホモマウス作製、胎生期解析用の受精卵準備やICSI（顕微授精）、卵巣移植なども実施可能である。最近ではCRISPR/Cas9システムを用いた遺伝子編集マウスの作製も実施している。詳細についてはホームページをご参照いただきたい。<https://www2.infront.kyoto-u.ac.jp/tgkoivf/> 過去3年間の実績は下記の通りである。

1) 胚の凍結保存

2016年	187 系統	34,679 個
2017年	171 系統	37,763 個
2018年	228 系統	52,601 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
2016年	44	18,232	113 (0.6%)
2017年	43	19,509	135 (0.7%)
2018年	21	8,773	65 (0.7%)

3) キメラマウスの作製

	クローン数	使用胚数	毛色キメラ数
2016年	18	1,872	71 (3.8%)
2017年	38	3,474	78 (2.2%)
2018年	16	1,483	57 (3.8%)

4) CRISPR/Cas9 システムによる遺伝子編集マウスの作製

	依頼数	使用胚数	遺伝子編集マウス数
2016年	23	8,980	66 (0.7%)
2017年	30	11,809	49 (0.4%)

2018 年	56	25,081	89 (0.4%)
--------	----	--------	-----------

Reproductive engineering team is a support unit for generating transgenic mouse (Tg) and knockout mouse (KO) under the animal committee of our institute. We also perform cryopreservation of mouse fertilized eggs. Current staffs are Kitano and Miyachi. Results of last three years are as follows.

1) Freezing embryos

2016	187 strains	34,679 embryos
2017	171 strains	37,763 embryos
2018	228 strains	52,601 embryos

2) Transgenic mouse production with cloned DNAs

	No of constructs	No of embryos injected	No of transgenic pups obtained
2016	44	18,232	113 (0.6%)
2017	43	19,509	135 (0.7%)
2018	21	8,773	65 (0.7%)

3) Production of chimeric mouse

	No of ES clones	No of embryos injected	No of coatcolor chimera obtained
2016	18	1,872	71 (3.8%)
2017	38	3,474	78 (2.2%)
2018	16	1,483	57 (3.8%)

4) CRISPR/Cas9

	No of constructs	No of embryos	No of genome edited mouse
2016	23	8,980	66 (0.7%)
2017	30	11,809	49 (0.4%)
2018	56	25,081	89 (0.4%)

List of Publications

Aoyama, N., Miyoshi, H., Miyachi, H., Sonoshita, M., Okabe, M., and Taketo, M.M. (2018). Transgenic mice that accept Luciferase- or GFP-expressing syngeneic tumor cells at high efficiencies. **Genes Cells**

23, 580-589.

Bending, D., Martin, P.P., Paduraru, A., Ducker, C., Marzaganov, E., Laviron, M., Kitano, S., Miyachi, H., Crompton, T., and Ono, M. (2018). A timer for analyzing temporally dynamic changes in transcription during differentiation in vivo. **J. Cell Biol.** 217, 2931-2950.

Kuroki, S., Nakai, Y., Maeda, R., Okashita, N., Akiyoshi, M., Yamaguchi, Y., Kitano, S., Miyachi, H., Nakato, R., Ichiyangai, K., Shirahige, K., Kimura, H., Shinkai, Y., Tachibana, M. (2018). Combined Loss of JMJD1A and JMJD1B Reveals Critical Roles for H3K9 Demethylation in the Maintenance of Embryonic Stem Cells and Early Embryogenesis. **Stem Cell. Reports** 10, 1340-1354.

Mori, K., Nakamura, H., Kurooka, H., Miyachi, H., Tamada, K., Sugai, M., Takumi, T., and Yokota, Y. (2018). Id2 determines intestinal identity through repression of the foregut transcription factor, Irx5. **Mol. Cell. Biol.**

Shimba, A., Cui, G., Tani-Ichi, S., Ogawa, M., Abe, S., Okazaki, F., Kitano, S., Miyachi, H., Yamada, H., Hara, T., Yoshikai, Y., Nagasawa, T., Schutz, G., Ikuta, K. (2018). Glucocorticoids Drive Diurnal Oscillations in T Cell Distribution and Responses by Inducing Interleukin-7 Receptor and CXCR4. **Immunity** 48, 286-298.e6.

List of Presentations

宮地 均、北野さつき、伊藤克彦、生田宏一 マウス超過剩排卵誘起法で作製した凍結受精卵からの遺伝子改変マウス作製 第65回日本実験動物学会総会、富山、2018年5月17日

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

教授・施設長（兼務）	近藤 玄	Prof.	Gen Kondoh
准教授（兼務）	廣田 圭司	Assoc. Prof.	Keiji Hirota
助 教	渡邊 仁美	Assist. Prof.	Hitomi Watanabe

当施設では、平成 28 年度イヌ；164 頭、ウサギ；31 羽、ラット；90 匹、マウス；12,000 匹が実験動物として飼養された。これらの実験動物の日常的な飼育・管理を教授 1 名、准教授 1 名、助教 1 名、技術職員 3 名、非常勤職員 19 名で行っている。

動物実験を行うにあたっては、生命倫理・動物福祉に十分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 30 件以上の遺伝子改変・ゲノム編集マウスの作製に携わった。

Experimental animals, such as mouse, rat and others, are housed in our 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 more than 30 gene-manipulated mouse strains in this year.

List of Publications

Hirota K, Hashimoto M, Ito Y, Matsuura M, Ito H, Tanaka M, Watanabe H, Kondoh G, Tanaka A, Yasuda K, Kopf M, Potocnik AJ, Stockinger B, Sakaguchi N, Sakaguchi S. Autoimmune Th17 Cells Induced Synovial Stromal and Innate Lymphoid Cell Secretion of the Cytokine GM-CSF to Initiate and Augment Autoimmune Arthritis. *Immunity*. 48:1220-1232 (2018)

Ohashi, M., Y. Umemura, N. Koike, Y. Tsuchiya, Y. Inada, H. Watanabe, T. Tanaka, Y. Minami, O. Ukimura, T. Miki, T. Tajiri, G. Kondoh, Y. Yamada, K. Yagita. Disruption of circadian clockwork in vivo reprogramming-induced mouse kidney tumors. *Genes to Cells*, Feb;23 (2):60-69. doi: 10.1111/gtc.12552

(2018).

Tsubaki, T., T. Kadonosono, S. Sakurai, T. Shiozawa, T. Goto, S. Sakai, T. Kuchimaru, T. Sakamoto, H. Watanabe, G. Kondoh, S. Kizaka-Kondoh. Novel Adherent CD11b+ Gr-1+ Tumor-infiltrating Cells Initiate an Immunosuppressive Tumor Microenvironment. *Oncotarget*, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24359> (2018).

Shukunami, C., A. Takimoto, Y. Y. Nishizaki, Y. Yoshimoto, S. Tanaka, S. Miura, H. Watanabe, T. Sakuma, T. Yamamoto, G. Kondoh, Y. Hiraki. Scleraxis is a transcriptional activator that regulates the expression of Tenomodulin, a marker of mature tenocytes and ligamentocytes. *Scientific Reports*, 8 (1):3155. doi: 10.1038/s41598-018-21194-3 (2018).

Morita, M., T. Sato, M. Nomura, Y. Sakamoto, Y. Inoue, R. Tanaka, S. Ito, K. Kurosawa, K. Yamaguchi, Y. Sugiura, H. Takizaki, Y. Yamashita, R. Katakura, I. Sato, M. Kawai, Y. Okada, H. Watanabe, G. Kondoh, S. Matsumoto, A. Kishimoto, M. Obata, M. Matsumoto, T. Fukuhara, H. Motohashi, M. Suematsu, M. Komatsu, K-I. Nakayama, T. Watanabe, T. Soga, H. Shima, M. Maemondo, N. Tanuma. PKM1 confers metabolic advantages and promotes cell-autonomous tumor cell growth. *Cancer Cell*, 33 (3):355-367.e7. doi: 10.1016/j.ccr.2018.02.004 (2018).

Seike, M., Y. Omatsu, H. Watanabe, G. Kondoh, T. Nagasawa. Stem cell niche-specific EBF3 maintains the bone marrow cavity. *Genes Dev.*, doi: 10.1101/gad.311068.117 (2018).

List of Presentations

渡邊 仁美、竹田 理恵、廣田 圭司、近藤 玄 マウス精子受精能とラフト局在変化の相関性 . 第65回 日本実験動物学会、富山、2018年5月 16-18日

Hirota K, Hashimoto M, Ito Y, Matsuura M, Ito H, Tanaka M, Watanabe H, Kondoh G, Tanaka A, Yasuda K, Kopf M, Potocnik AJ, Stockinger B, Sakaguchi N, Sakaguchi S: An inflammatory cellular cascade of autoimmune Th17 cells, GM-CSF-producing synovial ILCs and stromal cells in the development of autoimmune arthritis, Kyoto T cell Conference, Kyoto, Japan, June 15-16, 2018

Keiji Hirota: Autoimmune arthritis mediated by inflammatory Th17 cells, 25th East Asia Joint Symposium, Chongqing, China, October 25-26, 2018

Yasuda K, Kitagawa Y, Kawakami R, Isaka Y, Watanabe H, Kondoh G, Kohwi-Shigematsu T, Sakaguchi S, Hirota K: Satb1-mediated regulation of GM-CSF and PD-1 in pathogenic Th17 cells, 6th Annual Meeting of the International Cytokine & Interferon Society, October 27-30, 2018, Boston, USA October 27-30, 2018

Kawakami R, Kitagawa Y, Hirota K, Watanabe H, Kondoh G, Ohkura N, Sakaguchi S: Epigenetic landscape of FOXP3 enhancer sites during thymic FOXP3+ TREG development of CNS0- and cNS3-deficient mice, 6th Annual Meeting of the International Cytokine & Interferon Society, Boston, USA,

October 27-30, 2018

Hirota K, Hashimoto M, Ito Y, Matsuura M, Ito H, Tanaka M, **Watanabe H**, **Kondoh G**, Tanaka A, Yasuda K, Kopf M, Potocnik AJ, Stockinger B, Sakaguchi N, Sakaguchi S: GM-CSF-producing synovial ILCs exacerbate Th17-mediated autoimmune arthritis, The 3rd International Conference on Innate Lymphoid Cells, Tokyo, Japan, November 29- December 1, 2018

Keiji Hirota: Autoimmune Th17 cells instruct ILC secretion of inflammatory GM-CSF to initiate and augment autoimmune arthritis, 第 47 回 日本免疫学会学術集会、福岡、2018 年 12 月 10-12 日

Yasuda K, Kitagawa Y, Kawakami R, **Watanabe H**, **Kondoh G**, Kohwi-Shigematsu T, Sakaguchi S, **Hirota K**: Satb1-mediated regulation of GM-CSF and PD-1 in effector Th17 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis, 第 47 回 日本免疫学会学術集会、福岡、2018 年 12 月 10-12 日

Takeuchi Y, **Watanabe H**, **Kondoh G**, Sakaguchi N, Sakaguchi S, Mimori T, **Hirota K**: A role of Ripk3 and Gsdmd in the development of autoimmune arthritis in SKG mice, 第 47 回 日本免疫学会学術集会、福岡、2018 年 12 月 10-12 日

ウイルス・再生医科学研究所ネットワークシステム

Computer Network of Institute for Frontier Life and Medical Sciences

助 教 竹本経緯子 Assist. Prof. Keiko Takemoto

ウイルス研究所と再生医科学研究所の統合によって発足した現研究所は、情報セキュリティ委員会の管理のもと、現在もネットワークの再編途上にある。公式 WEB サイトは CMS によるスムーズな記事更新を可能にし、新研究所の研究成果などを活発に発信している。今年度は 2 台目の WEB サーバを動かし、共同利用機器や会議室等の予約システム、研究グループごとのホームページの場を統合した。今後は、複数の建物に設置された共同利用機器類をネットワークによって統合し、実験データの管理環境を慎重に構築する予定である。

セキュリティポリシーに基づき、新研究所の全分野を対象にネットワーク接続機器の一覧を作成し、無線アクセスポイントの管理体制を含め、情報セキュリティ連絡管理体制等を整えた。年度初頭にはネットワークセキュリティ講習会を開催した。

研究所ネットワーク管理に加えて、竹本は次世代シーケンサーのデータ解析を行っている。ヒト及びマウスを対象とした内在性レトロウイルス (ERV) のエピジェネティックな発現制御を研究しており、1) マウスでは生殖細胞、初期胚、ES 細胞に限らず体細胞においてもヒストンメチル化酵素 Setdb1 をノックアウト (KO) すると ERV が脱抑制する。2) 細胞種により脱抑制する ERV ファミリーが異なり、細胞種特異的な転写因子が必要である。3) 転写因子の結合には Setdb1 KO が必要である。4) 脱抑制する ERV の DNA メチル化が変化しないことを明らかにした。本研究では同時に、DNA メチル化阻害剤や DNA メチル化酵素 DNMT1 のノックダウン (KD) 実験により、冗長な制御機構と独立した制御が示唆された。ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤はマウス線維芽細胞で ERV を誘導する事が知られていたが、この時誘導される ERV は DNMT1 KD で脱抑制するファミリーではなく、Setdb1 KO で脱抑制する ERV ファミリーである事も明らかになった。

Institute for Frontier Life and Medical Sciences LAN system (Infront-LAN) has administrated by the information security committee consisted of three staffs (Prof. Koyanagi, Associate Prof. Inoue and Assist. Prof. Takemoto). Infront-LAN has provided a variety of network services, including E-Mail, WEB-mail, WWW, File-sharing, online reservation of seminar rooms, SSH and all Outgoing TCP services except for P2P. We got a network domain for this new institute and built two WEB sites and a mail server on the university hosting service systems. Now we have the list of Wi-Fi routers which are used in each laboratory at the institute and an emergency communication flow for the accidents of network. All network users are supposed to get certifications of training of e-learning course which is provided by Institute for Information Management and Communication of Kyoto University.

In addition to the administration of network, we have studied the epigenetic regulation of mouse endogenous retroviruses (ERVs) during cell differentiation. ERVs are transcriptionally silenced in both

pluripotent cells and differentiated cells via Setdb1-deposited trimethylated lysine 9 of histone H3 (H3K9me3). We utilized the tamoxifen-inducible Setdb1-cKO MEFs to perform RNA-seq and ChIP-seq analysis. H3K9me3 enrichment on ERVs was mostly diminished by Setdb1 KO, and VL30 families were strongly derepressed. By comprehensive comparison between LTR U3 subclasses of VL30 we found that a particular type of LTR (U3 I) was derepressed preferentially and cell type specific transcription factors are required for VL30-class ERV derepression on the premise that the H3K9me3 levels are reduced by Setdb1 KO. RNA-seq results showed that a viral defense response was induced in Setdb1 KO iMEF. In particular, we observed the upregulation of several genes related to type I interferon (IFN) dependent immune responses.

List of Publications

Kato, M., Takemoto, K., and Shinkai Y. (2018). A somatic role for the histone methyltransferase Setdb1 in endogenous retrovirus silencing. **Nature Communications** DOI:10.1038/s41467-018-04132-9

List of Presentations

Takemoto, K. A somatic role for the histone methyltransferase Setdb1 in endogenous retrovirus silencing. The 25th East Asia Joint Symposium. Chongqing, China, October 24-27, 2018

竹本経緯子、加藤雅紀、眞貝洋一 内在性レトロウイルスの活性化機構と自然免疫反応、第41回日本分子生物学会年会、横浜、2018年11月28-30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
2017年度共同研究報告（研究期間：2017年4月～2018年3月）

【「見える再生因子」が拓く戦略的徐放化再生医療の実現】

○研究代表者 量子科学技術研究開発機構放射線医学総合研究所

分子イメージング診断治療研究部 青木 伊知男 チームリーダー

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者 生体材料学分野 城 潤一郎 助教

○研究経過及び研究成果

再生因子を局所で持続的に放出する「徐放化技術」は生体内での組織再生の実現に必須であるが、体外から再生因子の放出を観察できないという問題があった。本研究では、申請者の専門である磁気共鳴画像装置（MRI）の撮像技術と共同研究者のもつ再生因子の徐放化技術・分子プローブ作製技術を融合、徐放化再生因子の非侵襲での可視化・評価技術を開発することを目的とする。加えて、再生因子と併せて評価されるべき課題で、昨年度の共同研究において実施してきた、再生過程を顕微鏡レベルの解像度で三次元的に可視化する技術の開発に関して、高感度高周波コイルを用いた高場磁気共鳴画像装置（MRI）による超高解像度MRI技術と再生研の材料技術を融合、骨再生過程を詳細に可視化する技術開発についても併せて報告する。

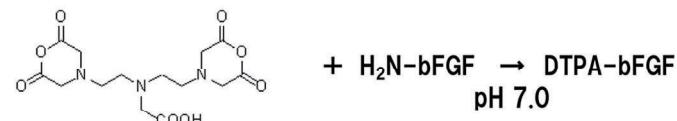
1. ゼラチンハイドロゲルおよび再生因子可視化プローブの作製（実施場所：ウイルス再生研）

既報に従いゼラチンハイドロゲルを作製した。再生因子塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）へMRIプローブ（ガドリニウム錯体など）を修飾した再生因子可視化プローブ bFGF-DTPA-Gd を作製した。再生因子可視化プローブのMRI造影能および生物活性を評価した。再生因子徐放化のための再生因子のゼラチンハイドロゲルへの含浸方法を量研に技術移転した。

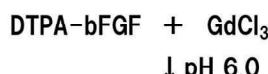
bFGF可視化造影剤の作製(試行2)

Jo

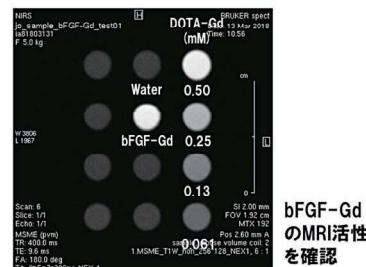
DTPA酸無水物によるbFGFのアミノ基の修飾



DTPA-bFGFへのGd配位

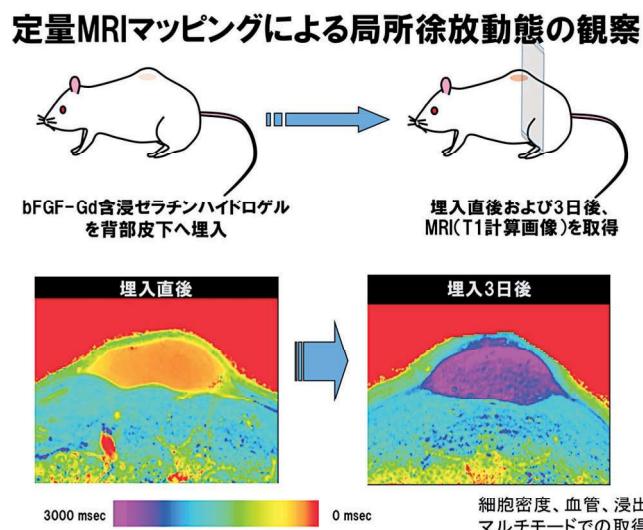


bFGF-DTPA-Gd
(bFGF-Gd)



2. MRI を用いた徐放化再生因子の可視化（実施場所：ウイルス再生研、量研）

再生因子含浸ゼラチンハイドロゲルのマウスへの埋植方法を京大から量研に技術移転した。開発した bFGF-DTPA-Gd は、現行の医療用造影剤 Gd-DOTA と同等以上の緩和能を示した。高い磁場強度、低温による低熱ノイズを達成した冷却高周波コイルにより実現した超高解像度磁気共鳴イメージング（マイクロ MRI）を用いて、撮像対象にパラメーターを最適化し、再生因子可視化プローブ含浸ゼラチンハイドロゲルを埋植したマウスを経時的に撮像した。bFGF-DTPA-Gd を徐放化させたマウス *in vivo* モデルにおいて、経時的な定量 MRI マッピングを取得し、bFGF-DTPA-Gd の徐放を定量的に可視化できた。局所の拡散は極めて限局的で、今後、全身動態を含めた検討を行う。



3. BMP-2 により誘導される骨再生過程における血管新生の経時的可視化

In *vivo* での実証実験は、次のように実施した。骨形成因子 (BMP) -2 または対照となる生理食塩水を含浸したゼラチンハイドロゲルを SIC:ddY マウス背部皮下へ埋入し、異所性の骨形成を誘導した。骨形成誘導後、マイクロ MRI を用いて経時的に微小血管の撮像を行った。MRI 撮像は、7T 前臨床装置 (Bruker Biospin, Avence-III) および 2ch フェイズドアレイ冷却コイルを用いて、血管造影剤法 (MR angiograph, 3D FLASH) にて、直後、7, 14, 21 日後に撮像し、その後、組織を摘出した

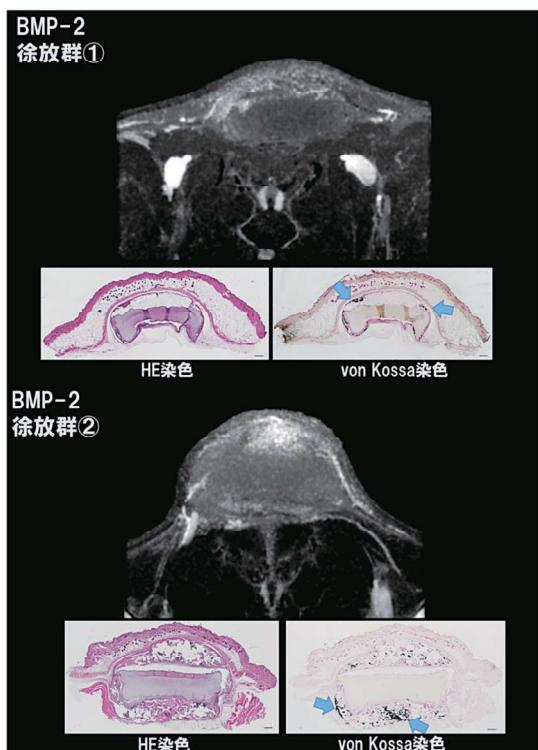
結果: 50 μm 等方性空間分解能による血管造影マイクロ MRI のシステムが構築され、異所性骨再生モデルに適用可能となった。PBS コントロール群、骨再生成功群、骨再生失敗群をそれぞれ 5 例以上の実験データの取得が終了した。BMP-2 徐放化モデルと、PBS コントロール群を比較したところ、BMP-2 では移植後 7 日後に、ゲル周辺に接觸する血管が複数観察され、移植後 14 日後に、非常に細く高密度な血管群（またはゆっくりと流れる貯留水）が、広い領域で観察され、組織切片 HE および von Kossa 染色との相同性が示唆された。

マイクロMRIによる血管造影

ゼラチンハイドロゲルをマウス背部皮下へ埋入14日後

左：対照となる生理食塩水を含浸

右：骨形成因子BMP-2を含浸



○研究成果の公表

(特許)

1. MRI の位置情報取得に関する特許 : 2017-12-15 特許第 6256968 号「固定位置表示キットおよび位置表示固定方法」青木伊知男、城潤一郎、下村岳夫、國領大介、佐賀恒夫、国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構、日本
2. MRI のナノゼラチン造影剤に関する特許 (京都大学は TLO の判断で連名を辞退) : 2017.9.26 「MRI 造影剤、及び MRI 造影剤の製造方法」田口光正、廣木章博、木村敦、大山智子、中島健吾、青木伊知男、村山周平、国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構、日本、特願 2017-116241

- ・骨再生における血管新生に関する論文を準備中
- ・再生因子造影剤に関する論文を準備中

【行動に関わる神経回路の同定とその機構】

○研究代表者 国立遺伝学研究所 川上 浩一 教授

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者 再生増殖制御学分野 瀬原 淳子 教授

○研究経過及び研究成果

- (1) ゼブラフィッシュにおいて、Tol2 を用いた遺伝子トラップコンストラクトをもつプラスミド DNA を、転移酵素 mRNA とともに受精卵にインジェクションし、F1 胚をスクリーニングすることにより、神経細胞・筋細胞を含む細胞・組織・器官特異的に変型酵母転写因子 Gal4FF を発現す

るトランスジェニックフィッシュを新規に100系統作製した。サザンブロッティング、インバースPCRによりこれらにおけるTol2挿入部位近傍のゲノムDNAの解析を行い、挿入部位を決定した。神経細胞、筋細胞特異的にGal4を発現する系統を瀬原研に提供し、共同研究を開始した。

- (2) 細胞・組織・器官特異的Gal4FF発現トランスジェニックフィッシュを用い、以下のことを明らかにした。血液脳関門形成に関わる新規細胞群の発見、小脳顆粒細胞が恐怖条件付け学習の回復期に機能することを発見、稚魚の逃避行動に関わるグリシンリセプターのサブタイプを同定、脊索障害の修復の際に機能する新規細胞群を発見。
- (3) Gal4FF発現トランスジェニックゼブラフィッシュのスクリーニングを行い、前視蓋あるいは視床下部下葉の特定の脳神経回路、および終脳の特定の神経細胞で、Gal4FFを発現するトランスジェニックフィッシュを同定した。これらを基にして、カルシウムイメージングおよび機能阻害実験を行い、エサなどの視覚刺激が食欲の中枢である視床下部下葉を活性化する神経回路を発見した(Muto et al. *Nat Comm* 2017)。また、恐怖条件付け学習に必須な終脳の特定の神経細胞を明らかにした(Lal et al. *BMC Biol* 2018)。

○研究成果の公表

(発表論文)

- (1) Activation of the hypothalamic feeding centre upon visual prey detection. Muto, A., Lal, P., Ailani, D., Abe, G., Itoh, M., and Kawakami, K. *Nature Communications* 8, 15029 (2017).
- (2) A novel perivascular cell population in the zebrafish brain. Galanternik, M.V., Castranova, D., Gore, A.V., Blewett, N.H., Jung, H.M., Stratton, A.N., Kirby, M.R., Iben, J., Miller, M.F., Kawakami, K., Maraia, R.J., and Weinstein, B.M. *eLife* 6, e24369 (2017).
- (3) Analysis of transcription factors expressed at the anterior mouse limb bud. Yokoyama, S., Furukawa, S., Kitada, S., Mori, M., Saito, T., Kawakami, K., Belmonte, J. C. I., Kawakami, Y., Ito, Y., Sato, T., and Asahara, H. *PLoS ONE* 12, e0175673 (2017).
- (4) Activin-A enhances mTOR signaling to promote aberrant chondrogenesis in fibrodysplasia ossificans progressiva. Hino, K., Horigome, K., Nishio, M., Komura, S., Nagata, S., Zhao, C., Jin, Y., Kawakami, K., Yamada, Y., Ohta, A., Toguchida, J., and Ikeya, M. *The Journal of Clinical Investigation* 127, 3339-3352 (2017).
- (5) Preface to Vertebrate Brains: evolution, structures and functions. Kawakami, K., and Murakami, Y. *Development, Growth and Differentiation* 59 (4), 160-162 (2017).
- (6) Transposons as tools for functional genomics in vertebrate models. Kawakami, K., Largaespada, D.A., and Ivics, Z. *Trends in Genetics* 33, 784-801 (2017).
- (7) Granule cells control recovery from classical conditioned fear responses in the zebrafish cerebellum. Matsuda, K., Yoshida, M., Kawakami, K., Hibi, M., and Shimizu, T. *Scientific reports* 7, 11865 (2017).
- (8) Structure/Function Studies of the $\alpha 4$ Subunit Reveal Evolutionary Loss of a GlyR Subtype Involved in Startle and Escape Responses. Leacock, S., Syed, P., James, V.M., Bode, A., Kawakami, K., Keramidas,

- A., Suster, M., Lynch, J.W., and Harvey, R.J. **Frontiers in Molecular Neuroscience** 11, 23 (2018).
- (9) *Wilms Tumor 1b* defines a wound-specific sheath cell subpopulation associated with notochord repair. Lopez-Baez, J.C., Simpson, D.J., Forero, L.L., Zeng, Z., Brunsdon, H., Salzano, A., Brombin, A., Wyatt, C., Rybski, W., Huitema, L.F.A., Dale, R.M., Kawakami, K., Englert, C., Chandra, T., Schulte-Merker, S., Hastie, N.D., and Patton, E.E. **eLife** 7, e30657 (2018).
- (10) A novel zebrafish intestinal tumor model reveals a role for cyp7a1-dependent tumor-liver crosstalk in tumor's adverse effects on host. Enya, S., Kawakami, K., Suzuki, Y., and Kawaoka, S
(学会発表 (共同研究に関わるものを抜粋))
- (1) Tabuchi M, Kamezaki A, Sato F, Aoki K, Asakawa K, Kawakami K and Sehara-Fujisawa A., Visualization of Neuregulin 1 ectodomain shedding in motor neurons in zebrafish, Annual Meeting of the Japanese Society of Development Biologists, 東京 , 2017.5.10-11.
 - (2) 佐藤文規、Choi Minyong、王梓、岩瀬海里、今村聖実、堀内映美、内田智子、小林純也、高橋昭久、菅野純夫、鈴木穂、川上浩一、瀬原淳子. 宇宙滞在が骨格筋に及ぼす影響 — 重力負荷減少だけではなさそう？日本宇宙生物科学会第31回大会 , 前橋 , 2017.9.21.
 - (3) Sato F, Choi M, Wang Z, Wu Q, Fujita I, Iwase M, Uchida S, Sakimura T, Kono Y, Shirakawa M, Tanigaki F, Chatani M, Kudo A, Takahashi A, Kobayashi J, Imamura K, Horiuchi T, Furukawa S, Muratani T, Sugano S, Suzuki U, Matsuzaki F, Kawakami K and Sehara-Fujisawa A., Studies on skeletal muscle regeneration and atrophy? What zebrafish experienced in a space tour. 第12回研究所ネットワーク国際シンポジウム , 東京 , 2017.11.28
 - (4) 佐藤文規、Choi Minyong、王梓、岩瀬海里、今村聖実、堀内映美、内田智子、谷垣文章、村谷匡史、小林純也、高橋昭久、菅野純夫、鈴木穂、川上浩一、瀬原淳子. 魚が宇宙で過ごすとどうなるの？～宇宙滞在実験の結果より～, 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017), 神戸 , 2017.12.7
 - (5) Sato F, Choi M, Wang Z, Wu Q, Fujita I, Iwase M, Uchida S, Sakimura T, Kono Y, Shirakawa M, Tanigaki F, Chatani M, Kudo A, Takahashi A, Kobayashi J, Imamura K, Horiuchi T, Furukawa S, Muratani T, Sugano S, Suzuki U, Matsuzaki F, Kawakami K and Sehara-Fujisawa A., Studies on skeletal muscle atrophy in space – what zebrafish experienced in a space tour, CDB Symposium 2018, 神戸 , 2018.3.26-28

[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]

- 研究代表者 滋賀医科大学・生化学分子生物学講座 縣 保年 教授
- ウイルス・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

[iPS 細胞を用いた脊椎の形成機構と側彎症の分子病態の解明]

○研究代表者 理化学研究所統合生命医科学研究センター・骨関節疾患研究チーム

池川 志郎 チームリーダー

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者 組織再生応用分野 戸口田 淳也 教授

組織再生応用分野 吉富 啓之 准教授

○研究経過及び研究成果

側彎をきたす骨系統疾患の中には先天性側彎症 (Congenital scoliosis: CS)、脊椎肋骨異形成症 (Spondylo-costal dysplasia: SCD) など、単一遺伝子の変異による脊椎の形成機構の異常により発症する疾患が存在する。われわれは、ゲノム解析と iPS 技術により、これらの疾患の分子病態の解明に挑んでいる。

今年度、理化学研究所での全 exome 解析にて CS、SC 遺伝子の変異を探索し、脊椎の発生にかかる転写因子 *TBX6* 遺伝子の変異を発見した。株化細胞を用いた *in vitro* の解析 (tag 付き mutant vector の HEK293 細胞への transfection) では、変異はタンパクの mis-localization を起こした。目下、ウイルス再生医科学研究所にて、この変異を持つ患者由来の株化リンパ球から iPS 細胞を樹立し、*TBX6* 遺伝子の発現誘導を始めている。この誘導細胞を用いて、患者で現実に mis-localization が起こっていることを確認する。既に細胞免染の条件等は検討済みである。

○研究成果の公表

(論文)

Nao Otomo, Kazuki Takeda, Ikuyo Kou, Long Guo, Noriaki Kawakami, Noriko Miyake, Naomichi Matsumoto, Yukuto Yasuhiko, Toshiaki Kotani, Teppei Suzuki, Koki Uno, Hideki Sudo, Satoshi Inami, Hiroshi Taneichi, Hideki Shigematsu, Kei Watanabe, Ikuho Yonezawa, Ryo Sugawara, Yuki Taniguchi, Shohei Minami, Japan Early Onset Scoliosis Research Group, Junya Toguchida, Masaya Nakamura, Morio Matsumoto, Kota Watanabe, Shiro Ikegawa. Bi-allelic loss of *TBX6* function causes a spectrum of malformation of spine and rib including congenital scoliosis and spondylocostal dysostosis (manuscript in preparation).

(発表)

1. 池川志郎. ゲノム～あなたとわたしを、患者さん・ご家族と研究者を“つなげるちから”. Rare Disease Day (世界希少・難治性疾患の日) in Tokyo 2018. (基調講演). 東京
2. 池川志郎. ゲノム医科学から見た骨系統疾患研究の進歩. 第 10 回胎児骨系統疾患フォーラム学術講演会. 東京
3. Shiro Ikegawa. Genome study of skeletal dysplasia, rare orthopedic diseases. 12th ICORD (International Conference on Rare Diseases and Orphan Drugs). Sep 9, 2017. Beijing, China.
4. Shiro Ikegawa. Genomic study of common spinal diseases. 2018 Annual meeting of Taiwan Spine Society. Mar 31, 2018. Taipei, Taiwan.

[PRRX1⁺ 細胞の不均一性理解によるヒト骨格形成過程の分子理解]

- 研究代表者 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科（医） 宝田 剛志 准教授
- ウイルス・再生医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

骨格形成過程での幹細胞を頂点とした階層性の理解は不十分である。申請者は、マウス骨格形成過程が、Prrx1⁺Sca1⁺ 細胞を幹細胞とした Prrx1⁺ 細胞内の不均一性を起点として生じることを報告した。本研究では、ヒト iPS 細胞より PRRX1⁺ 細胞を誘導し、マウス研究で得られた知見を利用することで PRRX1⁺ 集団の不均一性を分子レベルで解明し、ヒト骨格形成過程での幹細胞系譜・階層性の分子理解へと繋げることを研究目的とする。本研究期間では CRISPR/Cas9 システムを利用することで、PRRX1 遺伝子座に蛍光タンパク質をノックインした PRRX1 レポーター iPS 細胞の樹立を行った。具体的には、iPS 細胞（414C2 株）に、2 種類のベクター（ホモロジーアームと IRES-tdTomato カセットを有するターゲッティングベクター、Cas9/sgRNA 発現ベクター）を Electroporation により遺伝子導入し、導入後シングルセルクローニングにより、ノックインクローンの選別を行った。ゲノム DNA を用いた PCR 解析の結果、選別した 54 クローンの内 23 クローンにて IRES-tdTomato の PRRX1 遺伝子座へのノックインが確認された（Hetero：15 クローン、Homo: 8 クローン）。これらのクローンについて、ActivinA/BMP4 等の存在下にて胚様体形成させることで中胚葉系に分化誘導させたところ、PRRX1 遺伝子発現と時期を同じくして tdTomato の発現が確認された。つまり、iPS 細胞での PRRX1 発現を tdTomato 蛍光タンパク質にて可視化することのできる PRRX1 レポーター iPS 細胞の樹立に成功した。今後は、樹立したレポーター細胞を利用して、PRRX1 陽性細胞への分化誘導条件の最適化や、誘導した PRRX1 陽性細胞内の不均一性を解析する予定である。

- 研究成果公表

研究継続中のため、特になし

[造血幹細胞ニッチの形成と維持に必須の転写因子 Foxcl1 の作用機構の解明]

- 研究代表者 大阪大学大学院生命機能研究科 長澤 丘司 教授
- ウイルス・再生医学研究所共同研究者 統合生体プロセス分野 近藤 玄 教授
- 研究経過及び研究成果

申請者らはこれまでケモカイン CXCL12 を高発現する細網細胞（CAR 細胞）が造血幹細胞・前駆細胞の維持に必須のニッチを構成することを証明し、特異的に高発現する転写因子 Foxcl1 がその形成および維持に必須であることを明らかにした。そこで Foxcl1 の疾患における役割を解明するために、薬剤で CAR 細胞特異的に Foxcl1 遺伝子の強制発現を誘導できる Tet-On システムを用いた遺伝子改変マウスの作製を行い、順調に進行した。一方、CAR 細胞において Foxcl1 の発現の低下が認められた白血病等の疾患モデルマウスにおいて、転写因子 Ebf3 の発現が低下することを見出した。

転写因子 Ebf3 は骨髄において CAR 細胞に特異的に高発現していたことから CAR 細胞の細胞系譜解析が可能となる Ebf3-CreERT2 マウスを作製した。解析の結果、Ebf3 発現 CAR 細胞は、自己複製能を持ち、骨髄の大部分の骨芽細胞や脂肪細胞を供給する間葉系幹細胞であることが証明された。次に CAR 細胞における Ebf3 の機能を解明するため、Ebf3-flox マウスを作製し CAR 細胞特異

的 Ebf3 欠損マウスを解析したところ、老齢になると骨髓の造血幹・前駆細胞が著減し、海綿骨が異所的に著増していた。また Ebf3 欠損 CAR 細胞では、骨芽細胞の発生に必須の転写因子 Osterix の発現と骨芽細胞で高発現するアルカリホスファターゼ (ALP) の活性が著増し、CXCL12 と SCF (造血幹細胞の維持に必須のサイトカイン) の発現が著減していたことから、骨芽細胞への分化が亢進していることが示された。さらに Ebf3 と近縁な遺伝子である Ebf1 についても flox マウスを作製し CAR 細胞特異的 Ebf3/Ebf1 欠損マウスを解析したところ、若齢より骨髓が骨で埋め尽くされ、造血が著しく障害されることが明らかになった。以上の結果より、Ebf3 は CAR 細胞の骨芽細胞への分化を抑制し、骨髓腔の維持と造血幹細胞ニッチの形成・維持に必須の転写因子であることが明らかになった (Seike M. et al., *Genes Dev.*, 2018).

○研究成果の公表

Seike, M., Omatsu, Y., Watanabe, H., Kondoh, G., *Nagasawa, T.

Stem cell nich-specific Ebf3 maintains the bone marrow cavity.

Genes Dev. 32 (5-6):359-372, 2018.Mar 1

【マウス ES 細胞の多能性を規定する細胞間の不均一性の解析】

○研究代表者 奈良県立医科大学医学部 堀江 恭二 教授

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者 統合生体プロセス分野 近藤 玄 教授

○研究経過及び研究成果

我々の研究室では、Venus をレポーターに用いた遺伝子トラップ法を用いて、ES 細胞で発現が変動する機能未知の遺伝子を同定した。これまで、in vitro での分化誘導実験によって、本遺伝子の発現変動に応じて ES 細胞の分化能も変動することを明らかにしてきた。しかし、この分化能の違いが、個体発生へも影響するほどの重要性を有すか否かについては、全く不明であった。そこで本年度は、本遺伝子を高発現している ES 細胞と低発現の ES 細胞を cell sorter で分画後、各々をマウス初期胚へ注入してキメラマウスを作製し、ES 細胞の個体への寄与率を比較した。その結果、本遺伝子が低発現の ES 細胞の方が個体への寄与率が高いとの結果を得、本遺伝子の発現の揺らぎの重要性が、個体発生の観点からも支持された。本遺伝子へ Venus をノックインしたマウスの系統も樹立し、本遺伝子の発現部位を個体レベルで解析するための準備も整った。

○研究成果の公表

未発表

【器官形成と個体サイズを制御する細胞増殖制御機構の解明】

○研究代表者 奈良先端科学技術大学院大学 笹井 紀明 准教授

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者 統合生体プロセス分野 廣田 圭司 准教授

○研究経過及び研究成果

ソニック・ヘッジホッグ (Sonic Hedgehog; Shh) は胚発生において前駆細胞の増殖と分化に関与する細胞外シグナル因子である。申請者は Shh によって制御されるこれらの現象を直接制御するエフェクター分子を同定する目的で、Shh の下流遺伝子を mRNA シーケンス法によるトランスクリプ

トーム解析によって網羅的に解析し、それらの中から特に細胞増殖に関与する候補遺伝子として、サイクリン関連遺伝子（vCDK）を単離し、現在その機能解析を進めている。申請者らのニワトリ胚を用いた予備的解析の結果、vCDK は神経管の中でも Shh シグナルの影響を受ける領域やのほか前脛にも発現し、前駆細胞の増殖に関わっていることが明らかとなった。そこで、vCDK の個体レベルに対する影響を、遺伝子機能を完全に破壊したマウス個体で解析することとした。

平成 29 年度は、前年度に継いで表現型を解析したほか、vCDK の発現をモニターするための eYFP ノックインマウスを作成し、その発現を追跡することとした。

(1) vCDK ノックアウトマウスの表現型についての詳細な解析

前年度の解析から、vCDK ノックアウトマウスにおいて、固体サイズの矮小化がみられることが明らかになった。しかし匹数が少なく、有意性を議論できるだけの十分なデータがえられていなかった。

そこで平成 29 年度は、ノックアウトマウス、ヘテロマウスに関して繁殖を進め、体重変化のプロファイリングや遺伝子発現について網羅的かつ系統的な解析を行った。その結果、vCDK ノックアウトマウスは生後直後はヘテロマウスなどと変化は見られなかつたが、生後 3 週目頃から体重に変化が出始め、その傾向が成体になるまで継続することが明らかになった。さらに、この体重の変化、サイズの矮小化の傾向は雄マウスで顕著であり、雌マウスでは大きな変化は見られなかつた。このことから、性別に特異的、または雄に特異性の高い遺伝子の発現量に影響が及んだものと予想された。

のことから、精巢で分泌される遺伝子の発現パターンや発現量について、定量 PCR を主な方法として解析を行つた。この結果、一部の男性ホルモンの前駆体をコードする遺伝子で発現量が著しく低下しており、これが体重減少の原因になっていることが示唆された。現在、この直接の効果を詳細に解析している。

(2) vCDK の eYFP ノックインマウスの作成と発現の解析

vCDK はニワトリ胚では神経組織（脊髄領域）の一部に強く発現しており、発現量も高い。一方で、マウスでは発現量が低い上に発現領域がはっきりせず、抗体染色や *in situ* ハイブリダイゼーションで再現性の高い発現を示す上で難点があつた。

そこで、vCDK の遺伝子座の一部に eYFP をノックインで導入した eYFP ノックインマウスを作成し、eYFP の発現によって vCDK の組織内局在を解析することとした。その結果、生後マウスの腎臓、精巢に強い eYFP の発現が見られ、特に精巢に関しては精細管の間質のライディッヒ細胞に局在していることが明らかになった。この結果は、前項の体重減少、サイズの矮小化とほぼ一致するものである。一方、マウス胚では vCDK の発現は全体に弱く、ニワトリとマウスで vCDK の発現調節に一部相違が生じている可能性が示唆された。

これらのノックアウトマウス、ノックインマウスを貴研究所より譲渡を受け、申請者の本務校である奈良先端大に導入してコロニーの再構築を行つた。表現型は以前に得られたものとほぼ一致しており、現在、組織・器官の発現解析を継続している。また、vCDK 欠損によって影響を受ける遺

伝子を網羅的に同定するため、vCDK ノックアウトマウスの細胞で mRNA シーケンスによる網羅的発現解析を行った。その結果、精巣に発現すると思われる遺伝子の発現量に影響が及んでおり、vCDK が精巣に発現するという結果と一致していた。現在、vCDK が直接相互する因子を探索し、直接の影響を同定するための解析を進めている。

○研究成果の公表

(論文)

Akiko Nishi-Hori, Hitomi Watanabe, Minori Kadoya, Tomo Ichikawa, Gen Kondoh, Keiji Hirota, Noriaki Sasai

“Essential roles of a novel Cyclin Dependent Kinase in the neurogenesis and organogenesis.” (2017)

論文準備中

【腱・靭帯付着部形成を制御する分子機構の解析】

○研究代表者 広島大学大学院医歯薬保健学研究科 宿南 知佐 教授

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者 生体分子設計学分野 開 祐司 教授

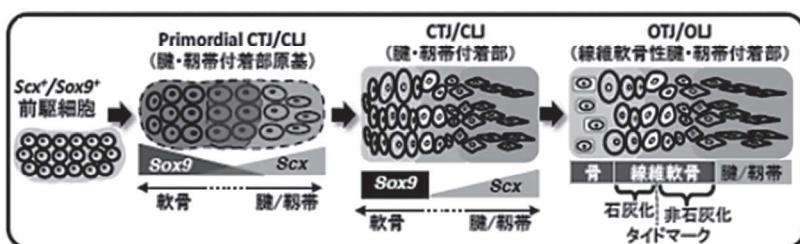
生体分子設計学分野 滝本 晶 研究員

附属再生実験動物施設 渡邊 仁美 助教

○研究経過及び研究成果

発生過程では、骨格、筋、腱、靭帯などの運動器の各原基は、それぞれ独立したコンポーネントとして形成される。やがて、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・靭帯付着部の原基が作られる。腱・靭帯付着部形成には、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(右図)。また、Scx の発現領域で Sox9 が欠失する $Scx^{Cre}; Sox9^{fl/fl}$ 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ことが明らかになっている。一方、Scx が欠失したマウスでは、成熟した腱・靭帯細胞に発現する II型膜タンパク質である Tenomodulin の発現が消失し、成長に伴って、腱・靭帯付着部の纖維軟骨層や種子骨において形成不全が観察される。

本研究課題では、腱・靭帯付着部の幹細胞である $Scx^+/Sox9^+$ 細胞の *in vivo* 可視化モデルを構築するため、*ScxGFP* マウスと同様の転写制御領域(*Scx* 遺伝子上流 4kb および下流 5kb を含む約 11.7kb の領域)を用いて、赤色蛍光蛋白質 TdTomato を発現する Tg マウスを作成した。Transgene はマウス *Scx* 遺伝子の翻訳開始点直後に in-frame で TdTomato のコーディング配列を挿入して構築した。精製した Transgene をマウス前核期受精卵にインジェクションして作製した Founder マウスを野生型



腱・靭帯付着部の形成過程

マウスと交配して *Scx* 発現領域で TdTomo を特異的に発現する *ScxTomato* Tg の系統を確立した。次に、系統化した *ScxTdTomo* Tg マウスを *Sox9GFPKI* マウスと交配し、*Scx* の発現を赤色蛍光で、*Sox9* の発現を緑色蛍光で可視化できる *ScxTdTomo* ; *Sox9GFP* マウスを得た。胎生 15.5 日の *ScxTomato* ; *Sox9GFP* マウス胚を 4% パラフォルムアルデヒドに 1 時間固定後、60% 2,2'-チオジエタノールに 1 時間浸漬することにより、蛍光蛋白質が拡散することなく、良好に透明化できることが明らかになっている。

Scx^{flx} マウスの作製では、ゲノム編集技術を用いてノックイン（KI）を行った。マウス *Scx* 遺伝子は 2 つの Exon で構成されており、アミノ酸をコードする領域の約 94% が Exon1 に含まれる。そこで、この領域を挟み込むように *loxP* 部位を挿入し、guide RNA の標的配列にサイレント変異を導入したターゲティングベクターを構築した。この際、KI されたアリルをスクリーニングできるよう、HindIII サイト、PstI サイトを導入し、また TatI サイトは欠失するように設計した。gRNA の標的配列の 5' 側には約 3.2kb、3' 側に約 4.9kb の相同配列を付与した。作成したターゲティングベクターから 8.1kb の 2 本鎖 DNA 断片を切り出し、Cas9 タンパク質、gRNA と共にマウス前核期受精卵へインジェクションし、2 細胞期に発生した胚を仮親の卵管へ移植し、Founder マウスを得た。F0 個体を野生型マウスと交配して *Scx^{flx}* マウスとして系統化し、現在、*Scx^{flx/flx}* ; *Sox9^{cre}* マウスの解析を進めている。

○研究成果の公表

(原著論文)

1. Shukunami C*, Takimoto A, Nishizaki Y, Yoshimoto Y, Tanak S, Miura S, Watanabe H, Sakuma T, Yamamoto T, Kondoh G, and Hiraki Y. *in press*. Scleraxis is a transcriptional activator that regulates the expression of Tenomodulin, a marker of mature tenocytes and ligamentocytes. *Sci Rep.* 8:3155, 2018

(招待講演)

1. Regulation of intervertebral disc development by Pax1 and Sox9 : Shukunami C : Gordon Research Conference (Barga, Italy), 2017.
2. Scx/Sox9 陽性前駆細胞は腱・韌帯付着部の形成に寄与する：吉本由紀、滝本 晶、開 祐司、宿南知佐：第 59 回歯科基礎医学会学術大会（松本），2017

(学会発表)

1. 転写因子 Scleraxis は筋骨格系を連結する組織の成熟を制御する：吉本由紀、滝本 晶、渡邊仁美、近藤 玄、佐久間哲史、山本 卓、開 祐司、宿南知佐：2017 年度生命科学系学会合同年次大会（神戸），2017.

【細胞外基質の力学的特性が多細胞の三次元動的プロセスに与える影響】

○研究代表者 慶應義塾大学理工学部 須藤 亮 准教授

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者 バイオメカニクス分野 安達 泰治 教授

バイオメカニクス分野 須長 純子 教務補佐員

バイオメカニクス分野 仲尾 信彦 大学院生

○研究経過及び研究成果：

本研究では胆管上皮細胞による管腔構造形成プロセスやグリオーマ幹細胞の三次元浸潤プロセスなどに見られる多細胞の動的なふるまいが、ゲルの弾性率によって制御される仮設に基づき研究を進めてきた。平成 29 年度はウイルス・再生医科学研究所安達泰治教授との共同研究によってゲル弾性率の測定を中心で研究を進めた。具体的には原子間力顯微鏡のカンチレバー先端に細胞と同程度の大きさである直径 $20 \mu m$ のガラスビーズを接着したカンチレバーを作製し、これを用いてゲルを押し込んだ際のフォースカーブを取得した。このフォースカーブを解析することでゲルの弾性率を算出した。その結果、濃度および pH を変えた際にコラーゲンゲルの弾性率が異なることを定量的に評価した。また、コラーゲン・ラミニン・ヒアルロン酸の混合ゲルにおいてヒアルロン酸濃度に依存した弾性率の変化を明らかにした。さらに、これらのゲルを用いた際にグリオーマ幹細胞の浸潤プロセスが変化することを見出した。たとえば、弾性率の小さなコラーゲンゲルではグリオーマ幹細胞が単一細胞レベルで浸潤し、最大浸潤到達距離が大きいのに対して、弾性率の大きなコラーゲンゲルでは細胞集団を形成しながら浸潤し、浸潤距離が抑制されることがわかった。一方、胆管上皮細胞の培養では、ゲルの弾性率によって二次元培養において形成されるコロニーの面積が異なることがわかった。以上のように、細胞外基質の力学的特性がグリオーマ幹細胞の浸潤プロセスや胆管上皮細胞のコロニー形成を支配する重要な因子の 1 つであることを明らかにした。今後の研究では、グリオーマ幹細胞の浸潤プロセスにおいて細胞がゲル弾性率に応答するメカニズムを明らかにする必要がある。一方、胆管上皮細胞の培養では、二次元培養におけるコロニー形成を評価するだけでなく、三次元培養における胆管形成プロセスに着目して解析を進めることが今後の課題である。

○研究成果の公表

(学会発表)

1. 長南友太, 多木壮太郎, 須藤亮, 血管内皮細胞が不均質なグリオblastoma細胞集団の浸潤に与える影響, 日本機械学会 第 28 回バイオフロンティア講演会, 2017 年 10 月 28 ~ 29 日, 徳島大学理工学部 (徳島県徳島市)
2. Ryo Sudo, Bioengineering approaches to the 3D tissue engineering, The first joint conference on sophisticated coupling and integration of genius kernel technologies in Grenoble and Keio, 2017 年 11 月 23 ~ 24 日, MINATEC, Grenoble, France
3. 須藤亮, バイオエンジニアリングに基づく 3 次元組織工学, 日本機械学会 第 30 回バイオエンジニアリング講演会, 2017 年 12 月 14 ~ 15 日, 京都大学百周年時計台記念館 (京都府京都市)
4. 長南友太, 大田和知輝, 須藤亮, 細胞外基質が不均質な glioblastoma 細胞集団の浸潤形態に与える影響, 日本機械学会 第 30 回バイオエンジニアリング講演会, 2017 年 12 月 14 ~ 15 日, 京都大学百周年時計台記念館 (京都府京都市)
5. 須藤亮, マイクロ培養プラットフォームを用いた三次元組織形成と細胞診断, 第 20 回 日本医工ものづくりコモンズシンポジウム, 2018 年 1 月 12 日, 高度技術社会推進協会会議室 (東京都港区)

6. 須藤亮, 三次元ハイドロゲルにおけるがん細胞浸潤プロセスの解析, 第33回バイオレオロジー・リサーチ・フォーラム, 2018年3月1日, 関西大学東京センター(東京都千代田区)
7. Ryo Sudo, Three-dimensional tumor cell migration assays using a microfluidic device, 第33回バイオメカニクスセミナー, 2018年3月16日, 京都大学ウイルス・再生医科学研究所(京都府京都市)

[受精能獲得精子選別による In vitro 単精子受精に関する研究]

○研究代表者 熊本大学生命資源研究・支援センター資源開発分野 竹尾 透 講師

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者 再生実験動物施設 渡邊 仁美 助教

○研究経過及び研究成果

哺乳動物の精子は、雌性生殖道内で選抜され、最終的には1個の精子が卵子に到達し受精が完了する。一方で、体外受精では、培養液中で精子の受精能獲得を誘起しているが、選別過程を経ていない精子を卵子に暴露するため、受精を成立させるには大量の精子が必要となる。精子選別技術の開発は、体外受精における受精効率の改善や新規技術の開発に有用であると考えられるが、精子は物理的刺激に脆弱であるため、運動能及び受精能を維持したまま精子を選別する技術は未だに確立されていない。そこで本研究では、精子の運動能および受精能を維持した状態で精子を選別する技術の確立を目指し、低侵襲性を示すマイクロ流体チップ・セルソーターを用いた精子選別法の開発を行った。さらに、体外受精における受精効率の改善に対する精子選別の有効性を評価するために、受精能獲得マーカーを用いて先体反応誘起精子を選別し、選別前後の精子を用いて受精能を評価した。マイクロ流体チップ・セルソーターによる精子選別条件を検討し、運動性を有する精子の分取に成功した。また、選別後の精子は、体外受精により受精能を有することが明らかになった。次に、受精能獲得マーカーで選別した精子の受精率を比較した結果、受精能獲得マーカー陽性精子の方が、受精能獲得マーカー陰性精子に比べて、高い受精率を示した。本研究の結果、マイクロ流体チップ・セルソーターを用いることで、精子の運動能および受精能を維持することができる新規精子選別技術の開発に成功した。本知見は、新規精子選別法を応用した体外受精技術の改良や受精の分子メカニズムの解明に有用であると考えられる。

○研究成果の公表

(学会発表)

中尾聰宏、竹尾 透、渡辺仁美、近藤 玄、中瀧直己

マイクロ流体チップ・セルソーターによる受精能獲得精子分離法の開発、第65回日本実験動物学会、平成30年5月16日、富山県民会館、富山

ウイルス感染症・生命科学先端融合的共同研究拠点
2017 年度共同研究課題達成状況（研究期間：2017 年 4 月～2018 年 3 月）

①霊長類 P3 感染実験

霊長類 P3 実験として計 4 件の研究をおこなった。

【サルエイズモデルにおける CTL の腸管感染防御能に関する研究】

- 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・再生医科学研究所共同研究者：准教授 三浦 智行、技術職員 阪脇 廣美、技術職員 水田 量太、教授 明里 宏文
- 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サルエイズモデルにおける CTL の腸管感染防御能に関する研究を行った。本研究ではこれまで、各種 MHC-I ハプロタイプ共有アカゲザル群を用いた SIV 経静脈感染モデルを樹立し、さらに本共同研究で SIV 経直腸感染モデルも樹立し、腸管粘膜感染免疫学的解析系を構築した。一方、iPS 細胞由来 CTL 導入研究に関しては、サル CD8 陽性 T 細胞由来 iPS 細胞から分化させた CD8 陽性 T 細胞の樹立に成功し、接種細胞動態分布の解析も行った。

【アカゲザルを用いた HIV-1 の個体内複製機構・病原性発現機構の解析】

- 研究代表者：徳島大学大学院医歯薬学研究部 教授 野間口 雅子
- ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：准教授 三浦 智行
- 達成状況：

徳島大学大学院医歯薬学研究部野間口雅子教授とアカゲザルを用いた HIV-1 の個体内複製機構・病原性発現機構の解析に関する研究を行った。本研究では新規に作製した組換えウイルス (HIV-1rmt) を 3 頭のアカゲザルに静脈内接種し、血液中のウイルス量と CD4 陽性細胞数を調べた。血中ウイルス量は、一過性に 3000 コピー／ml まで上昇したが、その後検出限界以下まで減少した。CD4 陽性細胞数に大きな変化は無かった。サルエイズモデルとしては、不十分なので今後も改善が必要であることがわかった。

【HIV-1 感染症の根治を目指した新規治療戦略の確立に向けた基礎研究】

- 研究代表者：京都大学霊長類研究所 教授 明里 宏文
- ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：准教授 三浦 智行
- 達成状況：

京都大学霊長類研究所明里宏文教授と HIV-1 感染症の根治を目指した新規治療戦略の確立に向けた基礎研究を行った。本研究ではサル指向性 HIV-1 の潜伏感染期において、①リンパ節で HIV RNA を高発現する濾胞性ヘルパー T 細胞が多く存在する、②細胞性免疫並びに中和抗体が高い活性を示し、協調して制御を司っている、さらに③新規 PKC activator である 10-MA および BET 阻害薬であ

る JQ1 の併用により、in vitro において低毒性でかつ効率良い HIV-1 潜伏感染細胞からの再活性化効果を示すことがわかった。

【インフルエンザウイルスの靈長類感染モデルを用いた研究】

○研究代表者：東京大学医科学研究所 教授 河岡 義裕

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授 小柳 義夫、准教授 三浦 智行、
技術職員 阪脇 廣美、技術職員 水田 量太

○達成状況：

東京大学医科学研究所河岡義裕教授とインフルエンザウイルスの靈長類感染モデルを用いた研究を行った。本共同研究では、京都大学ウイルス研究所の靈長類 P3 感染実験室において、カニクイザルを用いたインフルエンザウイルスの感染実験を行い、インフルエンザウイルスの靈長類モデルにおける病原性解析、抗ウイルス薬の効果、ワクチン効果、宿主応答などを解析することを目的とする。本年度は、感染実験に使用するウイルス株の調整とその性状解析を行い、サル感染実験に向けて体制を整えた。

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。

【ヒト化マウスモデルを用いた HIV-1 感染病態のシステムウイルス学的解析】

○研究代表者：国立遺伝学研究所人類遺伝研究部門 教授 井ノ上 逸朗

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授 小柳 義夫、講師 佐藤 佳

○達成状況：

国立遺伝学研究所人類遺伝研究部門井ノ上逸朗教授とヒト化マウスモデルを用いた HIV-1 感染病態のシステムウイルス学的解析に関する研究を行った。本研究では HIV-1 感染ヒト化マウス内のウイルス組込み部位の網羅的解析を行い、クローン性増殖した感染細胞群ではリンパ球活性化に関わる遺伝子周辺にウイルスの組込みが有意に多いことを見出した (Sci Rep 7:6913, 2017)。これに加え、HIV-1 組込み部位と公開データベースのゲノム・エピゲノム情報との照合によるバイオインフォマティクス解析は施行中である。

【ヒト化マウスを用いた HIV-1 潜伏感染モデルの確立】

○研究代表者：京都大学医学研究科血液・腫瘍内科学 教授 高折 晃史

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授 小柳 義夫

○達成状況：

京都大学医学研究科血液・腫瘍内科学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。本研究では潜伏感染細胞の検出が可能なデュアルレポーターウイルスを Jurkat T 細胞に感染させ GFP 陽性のウイルス産生分画と mCherry 陽性潜伏感染分画をソートによる遺伝子発現解析系を確立した。次に初代培養 T 細胞を用いて条件検討をおこなっている。ま

た、ウイルス Env 分子ナノボディ化によるウイルス中和分子作製実験については、スクリーニングが終了し、感染阻害活性を検討中である。

③遺伝子・細胞レベルのウイルス・生命科学研究

遺伝子・細胞レベルのウイルス・生命科学研究として計 17 件の研究を行った。

【組換え VSV システムを用いた抗ラッサウイルスモノクローナル抗体の作出】

○研究代表者：富山大学大学院 医学薬学研究部（医学）ウイルス学講座 准教授 谷 英樹

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授 野田 岳志

○達成状況：

富山大学大学院医学薬学研究部（医学）ウイルス学講座谷英樹准教授と組換え VSV システムを用いた抗ラッサウイルスモノクローナル抗体の作出に関する研究を行った。本研究では抗ラッサウイルスの表面糖タンパク質 GPC に対するモノクローナル抗体作製のため、ラッサウイルス GPC を表面に持つ組み換え VSV システムを構築し、マウスへの免疫抗原ならびに ELISA 用抗原を大量調整した。得られた抗原を利用して、現在はモノクローナル抗体のスクリーニングと性状解析を進めている。

【RNA ウィルス感染とレトロトранスポゾン活性との関連性の解析】

○研究代表者：大阪大学大学院 医学系研究科感染症・免疫学講座 本田 知之 准教授

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授 朝長 啓造

○達成状況：

大阪大学大学院医学系研究科感染症・免疫学講座本田知之准教授と RNA ウィルス感染とレトロトランスポゾン活性との関連性の解析に関する研究を行った。本研究では RNA ウィルス感染とレトロトランスポゾン活性との関連性を見出すことを目的として行われた。これまでに、レトロトランスポゾンの活性調節に重要な働きを持つ宿主因子が、核内で増殖するボルナ病ウイルスの N タンパク質と結合することを見出している。今後、ボルナ病ウイルス感染によるレトロトランスポゾン活性の制御について解析を進める。本研究により、レトロトランスポゾン転移の新しい制御方法の同定が期待される。

【デングウィルス感染症非ヒト靈長類モデル構築に向けた基盤研究】

○研究代表者：東京都医学総合研究所 感染制御プロジェクト 主任研究員 日紫喜 隆行

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：准教授 三浦 智行

○達成状況：

東京都医学総合研究所・感染制御プロジェクト日紫喜隆行主任研究員とデングウィルス感染症非ヒト靈長類モデル構築に向けた基盤研究を行った。本研究ではアカゲザル 3 頭から採血し、末梢血単核球（PBMC）を分離・培養した。PBMC で、新規に作製した組換えデングウィルス（自然免疫抑制機能を持つインフルエンザウイルスの NS1 遺伝子を組み込んだ）の増殖能を調べたところ、元

のウイルスよりも増殖能が上昇していた。また、インターフェロン存在下でも、元のウイルスよりも増殖能が上昇していることを明らかにした。デングアカゲザルモデル構築に向けて大きく前進した。

【細菌型 S2P ホモログへの安定化変異の導入】

- 研究代表者：横浜市立大学大学院 生命医科学研究科 准教授 禾 晃和
- ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授 秋山 芳展、助教 檜作 洋平
- 達成状況：

横浜市立大学大学院生命医科学研究科禾 晃和准教授と細菌型 S2P ホモログへの安定化変異の導入に関する研究を行った。本研究では細菌が有する S2P ホモログについて、大腸菌の内在性プロテアーゼによって切断を受けやすい細胞内ループ領域の配列をアフィニティー精製用のタグ配列と置き換えた。配列の置換によって S2P ホモログの活性が損なわれていないことを、受け入れ研究室との共同研究によって確かめた後、タグ配列を利用して膜画分からの精製に取り組んだ。その結果、高純度かつ分散状態も良好な、立体構造解析にも適した精製試料が得られた。

【Develop a selectable anti-HIV-1 gene therapy vector using CRISPR/CAS9 system】

- 研究代表者：UCLA AIDS institute, UCLA School of Nursing Associate professor An, Dong Sung
- ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授 小柳 義夫
- 達成状況：

An, Dong Sung (UCLA AIDS institute and UCLA School of Nursing) developed a selectable anti-HIV-1 gene therapy vector using CRISPR/CAS9 system. Koyanagi has selected 5 potential gRNAs using the MIT gRNA selection algorithm. Then, our initial experiment successfully identified 2 functional HPRT directed gRNAs that can be delivered by a lentiviral vector to positively select gene-modified cells. However, lentiviral vector mediate delivery is inefficient in human primary CD34+ cells, we will utilize SeV-Cas9-CCR5 vector that consistently transduces fetal liver derived and peripheral blood mobilized CD34+HSPCs with high efficiencies (~ 90%). We will optimize HPRT knock out in primary T cells and CD34+ hematopoietic stem cells in vitro and in vivo using several different gene delivery systems.

【インフルエンザウイルス・転写複製装置のクライオ電子顕微鏡解析】

- 研究代表者：沖縄科学技術大学院大学 生体分子電子顕微鏡解析ユニット 博士研究員 杉田 征彦
- ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授 野田 岳志
- 達成状況：

沖縄科学技術大学院大学 生体分子電子顕微鏡解析ユニット杉田征彦博士研究員と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に関する研究を行った。本研究では、インフルエンザウイルスのゲノム RNA の転写・複製を担う RNP 複合体の高分解能構造を明らかにするため、均一な構造を有するリコンビナント RNP 複合体の作出と精製を試みた。これまでに、ミニゲノムを用いてリコンビナント RNP 複合体を合成することで、比較的均一な構造を有するリコンビ

ナント RNP 複合体の精製に成功しており、現在はクライオ電子顕微鏡観察を進めている。

【フィロウイルスの感染効率・病原性に関する実験ウイルス学と分子進化学による学際融合研究】

- 研究代表者：東海大学 医学部 助教 中川 草
- ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授 小柳 義夫、講師 佐藤 佳
- 達成状況：

東海大学医学部中川草助教とフィロウイルスの感染効率・病原性に関する実験ウイルス学と分子進化学による学際融合研究を行った。本研究ではエボラウイルスなどのフィロウイルスの感染成立に関する糖タンパク質の分離株毎の時系列解析から進化的淘汰性を調べ、ウイルスの感染効率に関する可能性のある 2 つのアミノ酸部位を見出した。さらに、立体構造予測解析及び糖タンパク質の機能解析からその重要性を実証した (Ueda et al. Genes Cells 2017, Kurosaki et al. JGV 2018)

【新規 B 型肝炎ウイルス感染培養系の性状解析と複製阻害剤同定】

- 研究代表者：国立感染症研究所 ウィルス第二部 主任研究官 渡士 幸一
- ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：准教授 土方 誠
- 達成状況：

国立感染症研究所ウィルス第二部渡士幸一主任研究官と新規 B 型肝炎ウイルス感染培養系の性状解析と複製阻害剤同定の研究を行った。本研究では HuS-E/2-NTCP 細胞株の性状解析をおこない、この細胞株は立体的に培養することで、高効率に HBV の感染を許容するようになることを見出しが、この立体培養条件下において、HBV ゲノムからの転写に重要な肝特異的な転写因子群の発現が誘導されていることを明らかにした。また、新たな HBV 複製阻害剤を探索したところ、親電子物質など細胞毒性を示す物質によって活性化される転写因子である Nrf2 の活性化剤が抗 HBV 作用を有することを見出した。

【SLOT 法を用いたウイルスに対する高機能抗体の創出】

- 研究代表者：慶應義塾大学先端生命科学研究所 特任准教授 井上 浩
- ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授 野田 岳志
- 達成状況：

慶應義塾大学 先端生命科学研究所井上浩特任准教授と SLOT 法を用いたウイルスに対する高機能抗体の創出に関する研究を行った。本研究では、病原性ウイルスに対する効果的なモノクローナル抗体の新規作出法の開発を目的とし、免疫法の改良や人工リンパ節法の改良などを行っている。現在はインフルエンザウイルスおよびラッサウイルスに対するモノクローナル抗体の作出を行っており、得られたモノクローナル抗体の性状解析を通じて、高機能抗体の作出法の改良を進める予定である。

【オプトジェネティクスとマイクロフューリディクスを用いた遺伝子発現ダイナミクスの制御手法の基盤構築】

- 研究代表者：東京大学 生産技術研究所 教授 藤井 輝夫
- ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授 影山 龍一郎、共同研究者 磯村 彰宏
- 達成状況：

東京大学・生産技術研究所藤井輝夫教授とオプトジェネティクスとマイクロフューリディクスを用いた遺伝子発現ダイナミクスの制御手法の基盤構築に関する研究を行った。本研究では、青色光刺激と小分子化合物を入力として目的遺伝子の発現量を操作可能な細胞を作成し、光照射とマイクロ流体デバイスによる定量的な精密操作を可能とする基盤技術を開発することを試みた。その結果、周期的な光刺激の条件下で、小分子化合物の On/Off 入力に応じて、階段状またはパルス状応答の遺伝子発現パターンを実現することに成功した。この成果は、これまで困難だった「細胞内のパルスカウンター（階段状かつ周期的に上昇した遺伝子活性が閾値を超えることによって機能発現するとされる回路機能）」の検証に応用できると期待される。現在、成果を投稿準備中である。

【サル免疫細胞を持つマウスにおける SIV 感染病態の解析】

- 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・再生医科学研究所共同研究者：准教授 三浦 智行
- 達成状況：

京都大学医学研究科人間健康科学系専攻伊吹謙太郎准教授とサル免疫細胞を持つマウスにおける SIV 感染病態の解析に関する研究を行った。アカゲザル全骨髓細胞骨髓单核球を NOG マウスの脛骨骨髓内に移植したところ、移植後 7 週目までにサル細胞の生着が確認された。これらに SIVmac239 株と SIVpbj 株 SIVmac239 を接種したところ、両者で末梢血中のよりサル由来 CD45 陽性 T 細胞の減少が確認されたが、サル由来 CD45 陽性細胞は SIVmac239 接種マウスでは週をおって減少したが、SIVpbj 接種マウスでは逆に増加していることがわかった。サル化マウスにおいてもサルと同様の感染病態の違いを反映できる動物モデル系になり得ることが示唆された。

【ヒト多能性幹細胞からの大脳皮質ニューロン分化に細胞外の物理的環境が果たす役割】

- 研究代表者：Korea Brain Research Institute Lab Head 小曾戸 陽一
- ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：助教 小林 妙子
- 達成状況：

Korea Brain Research Institute 小曾戸陽一 Lab Head とヒト多能性幹細胞からの大脳皮質ニューロン分化に細胞外の物理的環境が果たす役割に関する研究を行った。本年度は、ヒト iPSCs からの神経分化をライブ観察するためのレポーターノックインラインを CRISPR/Cas9 法で作成し、細胞培養及び神経分化誘導を増殖制御学研究室にて小林妙子助教と共に行った。神経分化状態を認識するための GFP の発現について、通常の培養皿に加えて、脳組織の固さを模したゲル状基質においても誘導開始から 15 日から 20 日の間に発現が上昇することを確認した。さらに現在、shRNA を用いた HES1 ノックダウンを行い、神経分化誘導に対する影響を観察していくための条件検討を開始した。

【遺伝子改変マウスによる HTLV-1 関連脊髄症の発症機序解明と治療法の開発】

- 研究代表者：川崎医科大学 微生物学 教授 齊藤 峰輝
- ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：講師 安永 純一朗、客員教授 松岡 雅雄
- 達成状況：

川崎医科大学微生物学齊藤峰輝教授と遺伝子改変マウスによる HTLV-1 関連脊髄症の発症機序解明と治療法の開発に関する研究を行った。本研究では HTLV-1- 関連脊髄症（HAM）の病態モデル動物の作製を試みた。神経抗原である MOG に特異的な T 細胞受容体トランスジェニック（Tg）マウス（2D2-Tg）と HTLV-1 Tax あるいは HBZ Tg マウス（Tax-Tg or HBZ-Tg）とを交配してダブル Tg マウスを作製した。2D2-Tax-Tg および 2D2-HBZ-Tg の両系統にて、約 30% のマウスが下肢対麻痺を自然発症した。病理学的解析では、くも膜下腔から脊髄実質にわたり異型リンパ球の浸潤を認めた。これらの所見は HAM 患者の特徴と一致しており、HAM の動物モデルとして有用であると考えられた。

【脂肪組織における IL-7 の機能解析】

- 研究代表者：富山大学医学部 教授 戸邊 一之
- ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授 生田 宏一
- 達成状況：

富山大学医学部戸邊一之教授と脂肪組織における IL-7 の機能解析に関する研究を行った。本研究では脂肪細胞が産生する IL-7 の機能を解析するために、Adiponectin (Adipoq) -Cre マウスと IL-7-floxed マウスを交配して、Adipoq-Cre IL-7 cKO マウスを作製した。このマウスの脂肪組織における免疫細胞には大きな変化はなかったが、骨髓における B 細胞分化が著しく障害されており、末梢リノバ組織における B 細胞も減少していた。これらの結果から、Adiponectin が B 細胞分化を支持する骨髓ストローマ細胞に発現していることが明らかとなった。

【重症熱性血小板減少症候群ウイルスの病原性発現機序の解明】

- 研究代表者：国立感染症研究所ウイルス第一部 室長 下島 昌幸
- ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授 藤田 尚志、准教授 加藤 博己、
大学院生 山田 辰太郎
- 達成状況：

国立感染症研究所ウイルス第一部下島昌幸室長と重症熱性血小板減少症候群ウイルスの病原性発現機序の解明に関する研究を行った。本研究では重症熱性血小板減少症候群ウイルス（SFTSV）の致死的な感染のマウスモデルを用いて解析を行った。本疾患の致死的症状は、当初予測されたようなインターフェロン産生に対する不感受性ではなく、過剰な炎症性サイトカインの産生が原因であることを強く示唆する結果を得た。本研究より炎症性サイトカインの産生・作用の抑制が SFTSV の新たな治療戦略として考えられることがわかった。

【mRNA 前駆体から機能ある環状 RNA が作られ運ばれる仕組み】

- 研究代表者：藤田保健衛生大学 総合医科学研究所 遺伝子発現機構学研究分門 教授 前田 明
- ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：助教 谷口一郎、教授 大野 瞳人
- 達成状況：

藤田保健衛生大学 総合医科学研究所遺伝子発現機構学研究分門前田明教授と mRNA 前駆体から機能ある環状 RNA が作られ運ばれる仕組みに関する研究を行った。本研究ではマイクロ RNA miR-7 の吸着材として働く環状 RNA ciRS-7 の核外輸送機構をアフリカツメガエル卵母細胞への微小注入実験で明らかにした。転写後に逆スプライシング反応によって環状化された ciRS-7 が核から細胞質へ能動的に輸送されることがわかった。さらに競合阻害実験と siRNA によるノックダウン実験により、mRNA 核外輸送因子 TAP に依存していることが示された。未知の TAP アダプター因子の存在が予想され、興味深い研究に進展している。

【皮膚の恒常性維持における表皮幹細胞のダイナミクス解析】

- 研究代表者：筑波大学生命領域学際研究センター 助教 西村（佐田）亜衣子
- ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授 豊島 文子、博士研究員 一條 遼
- 達成状況：

筑波大学生命領域学際研究センター西村（佐田）亜衣子助教と皮膚の恒常性維持における表皮幹細胞のダイナミクス解析に関する研究を行った。本研究では皮膚が急速に拡張する妊娠期の腹部皮膚において、表皮基底層の細胞構成が変化し、表皮幹細胞とは異なる形質を持つ増殖細胞集団が生じることを明らかにした。2種類の表皮幹細胞に対するレポーターマウスを用いて、増殖性細胞集団の由来を検証した。増殖性細胞集団の維持に必要転写因子 Tbx3 のターゲット遺伝子の候補を同定した。

2018 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
京都大学大学院医学研究科肝胆膵・移植外科 田浦 康二朗 講師	生体材料学分野 田畠 泰彦 教授	人工胆管の作成とその移植の研究
東北大学大学院生命科学研究科 東谷 篤志 教授	再生増殖制御学分野 瀬原 淳子 教授	骨格筋の形成と老化に関するモデル生物を利用した研究
滋賀医科大学学生化学分子生物学講座 縣 保年 教授	再生免疫学分野 河本 宏 教授	iPS 細胞とゲノム編集を用いた効率のよいがん抗原特異的キラー T 細胞の再生
理化学研究所統合生命医科学研究センター 池川 志郎 チームリーダー	組織再生応用分野 戸口田 淳也 教授	大規模ゲノム解析を出発点とする脊椎の形成機構と側弯症の分子病態の解明
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 宝田 剛志 准教授	組織再生応用分野 戸口田 淳也 教授	PRPX1 ⁺ 細胞の不均一性理解によるヒト骨格形成過程の分子理解
広島大学大学院医歯薬学保健学研究科 宿南 知佐 教授	統合生体プロセス分野 近藤 玄 教授	筋・骨格系を統合する腱・韌帯を解析するための新たな蛍光レポーターマウスの開発
大阪大学大学院生命機能研究科 長澤 丘司 教授	統合生体プロセス分野 近藤 玄 教授	造血幹細胞・前駆細胞ニッヂの機能低下を誘導する分子機構の解明
奈良県立医科大学医学部 堀江 恭二 教授	統合生体プロセス分野 近藤 玄 教授	マウス ES 細胞における遺伝子発現の不均一性の機能
奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科 笛井 紀明 准教授	統合生体プロセス分野 廣田 圭司 准教授	サイクリン関連因子による脳機能の制御と器官サイズ再生への応用
東北大学大学院工学研究科 山本 雅哉 教授	発生システム制御学分野 永樂 元次 教授	細胞膜アンカー型ペプトイド被覆金ナノクラスターを用いた細胞標識技術の開発
慶應義塾大学理工学部 須藤 亮 准教授	バイオメカニクス分野 安達 泰治 教授	三次元組織形成プロセスにおけるハイドロゲル力学的特性の役割
熊本大学発生医学研究所 丹羽 仁史 教授	発生システム制御学分野 大串 雅俊 准教授	転写因子ノックアウトで誘導されるマウス ES 細胞の細胞死誘導機構の解析と制御
熊本大学生命資源研究・支援センター 竹尾 透 講師	再生実験動物施設 渡邊 仁美 助教	受精能獲得精子選別による In vitro 単精子受精法の開発

ウイルス感染症・生命科学先端融合的共同研究拠点

① 猿長類 P3 感染実験

研究代表者	ウイルス・再生医科学研究所 共同研究者	研究課題名
国立感染症研究所エイズ研究センター 侯野 哲朗 センター長	猿長類モデル分野 三浦 智行 准教授 附属感染症モデル研究センター 阪脇 廣美 技術職員 ウイルス感染症モデル分野 明里 宏文 教授	サルエイズモデルにおける CTL の腸管感染防御能に関する研究
京都大学猿長類研究所 明里 宏文 教授	猿長類モデル分野 三浦 智行 准教授	HIV-1 感染症の根治を目指した新規治療戦略の確立に向けた基礎研究
京都大学 iPSC 細胞研究所増殖分化機構研究部門 金子 新 准教授	猿長類モデル分野 三浦 智行 准教授 ウイルス感染症モデル分野 明里 宏文 教授	アカゲザル iPSC 由来遺伝子改変細胞の生体内評価 (新規治療開発のための、アカゲザル iPSC 由来遺伝子改変細胞移植によるウイルス感染モデル作製)

② マウス P3 感染実験

研究代表者	ウイルス・再生医科学研究所 共同研究者	研究課題名
東京大学医科学研究所感染症国際研究センター 佐藤 佳 准教授	システムウイルス学分野 小柳 義夫 教授	ヒト化マウスモデルを用いた HIV-1 感染細胞のマルチオミクス解析
京都大学大学院医学研究科血液・腫瘍内科学 高折 晃史 教授	システムウイルス学分野 小柳 義夫 教授	新規 HIV-1 治療法の確立

③ 遺伝子・細胞レベルのウイルス・生命科学研究

研究代表者	ウイルス・再生医科学研究所 共同研究者	研究課題名
大阪大学大学院医学系研究科感染症・免疫学講座ウイルス学 本田 知之 准教授	RNA ウィルス分野 朝長 啓造 教授	ボルナウイルスベクターの産生効率の改良
国立感染症研究所ウイルス第二部 渡士 幸一 主任研究官	がんウイルス分野 土方 誠 准教授	B 型肝炎ウイルス制限因子活性化による抗ウイルス効果と薬剤開発への応用
横浜市立大学大学院生命医科学研究科 禾 晃和 准教授	生体膜システム分野 秋山 芳展 教授 檜作 洋平 助教	抗体エピトープを挿入した S2P ホモログの機能評価
金沢大学医薬保健研究域薬学系 檜井 栄一 准教授	RNA システム分野 大野 瞳人 教授 北畠 真 助教	mTOR シグナルによる骨格形成制御
東京理科大学生命科学研究所 久保 允人 教授	免疫制御分野 生田 宏一 教授	ステロイドホルモンによるヘルパー T 細胞分化の制御機構
神奈川県衛生研究所微生物部 日紫喜 隆行 主任研究員	猿長類モデル分野 三浦 智行 准教授	デングウイルス感染症非ヒト猿長類モデル構築に向けた基盤研究

研究代表者	ウイルス・再生医科学研究所 共同研究者	研究課題名
京都大学大学院医学研究科人間健康 科学系専攻 伊吹 謙太郎 准教授	靈長類モデル分野 三浦 智行 准教授	サル免疫細胞を持つマウスにおける SIV 感染病態の 解析
慶應義塾大学先端生命科学研究所 井上 浩 特任准教授	微細構造ウイルス学分野 野田 岳志 教授	改良型 SLOT 法を用いた病原性ウイルスに対する高 機能抗体の創出
東海大学医学部 中川 草 助教	システムウイルス学分野 小柳 義夫 教授 佐藤 佳 講師	大規模塩基配列を活用したレンチウイルスと宿主因 子の共進化メカニズムの解明
工学院大学工学部機械システム工学 科 金田 祥平 助教	増殖制御システム分野 影山 龍一郎 教授 磯村 彰宏 共同研究者	オプトジェネティクスとマイクロフルイディクスを 用いた遺伝子発現ダイナミクスの制御
徳島大学先端酵素学研究所 齊藤 達哉 教授	感染防御分野 竹内 理 教授	抗ウイルス応答における自然免疫機構の役割の解明
UCLA AIDS institute, UCLA School of Nursing An, Dong Sung Professor	システムウイルス学分野 小柳 義夫 教授	Develop a selectable anti-HIV-1 gene therapy vector using CRISPR/CAS9 system
奈良先端科学技術大学院大学バイオ サイエンス領域 塚崎 智也 教授	生体膜システム分野 秋山 芳展 教授 大門 康志 研究員	大腸菌 BepA プロテアーゼの構造と機能
RIKEN Center for Integrative Medical Sciences PARRISH, Nicholas Fredric Genome Immunobiology RIKEN Hakubi Research Team Leader	RNA ウィルス分野 朝長 啓造 教授	Immunological Consequences of piRNAs Derived from EBLNs
藤田保健衛生大学・総合医科学研究 所 前田 明 教授	RNA システム分野 大野 陸人 教授 谷口 一郎 助教	環状 RNA の細胞内局在機構を明らかにし脳内環状 RNA の謎に迫る

学術集会

京都大学ウイルス・再生医科学研究所
「再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点」
平成 29 年度共同研究報告会

開催日：2018 年 3 月 30 日（金）

場 所：京都大学ウイルス・再生医科学研究所

開会挨拶

所長 開 祐司（京都大学ウイルス・再生医科学研究所）

「腱・韌帯付着部形成を制御する分子機構の解明」

宿南 知佐 教授（広島大学大学院医歯薬保健学研究院）

「iPS 細胞技術とゲノム編集を用いた効率のよいがん抗原特異的キラー T 細胞の再生」

縣 保年 教授（滋賀医科大学学生化学分子生物学講座）

「造血幹細胞ニッチの形成と維持に必須の転写因子 Foxcl1 の作用機構の解明」

長澤 丘司 教授（大阪大学大学院生命機能研究科）

「マウス ES 細胞の多能性を規定する細胞間の不均一性の解析」

堀江 恭二 教授（奈良県立医科大学医学部）

「器官形成と個体サイズを制御する細胞増殖制御機構の解明」

笹井 紀明 准教授（奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科）

「受精能獲得精子選別による In vitro 单精子受精に関する研究」

竹尾 透 講師（熊本大学生命資源研究・支援センター）

「ヒト iPS 細胞を活用した新規 3 次元胎児モデルの確立」

廣瀬 理沙 特任研究員（東京大学医科学研究所）

「行動に関わる神経回路の同定とその機構」

川上 浩一 教授（国立遺伝学研究所）

「iPS 細胞を用いた脊椎の形成機構と側弯症の分子病態の解明」

郭 龍 研究員（理化学研究所統合生命医科学研究センター）

「PRRX1⁺ 細胞の不均一性理解によるヒト骨格形成過程の分子理解」

宝田 剛志 独立准教授（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科）

「細胞外基質の力学的特性が多細胞の三次元動的プロセスに与える影響」

長南 友太 大学院生（慶應義塾大学大学院理工学研究科）

「「見える再生因子」が拓く戦略的徐放化再生医療の実現」

青木 伊知男 チームリーダー（国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構放射線医学総合研究所）

ウイルス・再生医科学研究所 第 13 回公開講演会

開催日：2018 年 7 月 21 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

「インフルエンザウイルスの謎」

野田 岳志（ウイルス・再生医科学研究所 教授）

「iPS 細胞から再生したキラー T 細胞でがん退治！」

河本 宏（ウイルス・再生医科学研究所 教授）

ウイルス・再生医科学研究所 第4回生命情報研究会

開催日：2018年7月3日（火）

場 所：京都大学楽友会館2階会議講演室

開会挨拶

「リポクオリティが解き明かす生命現象」

有田 誠（慶應義塾大学 葉学部）

「大脳皮質の自発揺らぎとネットワーク構造」

寺前 順之介（京都大学情報学研究科）

「リボソームプロファイリングのコツ」

岩崎 信太郎（理化学研究所）

「ネットワーク構造が作る化学反応システムの分岐とモジュラー性 - Structural Bifurcation Analysis -」

望月 敦史（京都大学ウイルス・再生医科学研究所、理化学研究所）

「ヒトのゲノム配列の解析～大量データの解析で分かってきたこと、これからの課題～」

藤本 明洋（京都大学医学研究科）

「幹細胞の運命制御とがん進行の分子基盤」

伊藤 貴浩（University of Georgia）

分野主催のセミナー

開催日	講演者・所属	演題	主催分野
2018. 1.19	深澤 嘉伯 (ワクチン・遺伝子研究所、オレゴン国立靈長類研究センター オレゴン健康科学大学)	Strategies to suppress SIV replication in B-cell follicle sanctuary sites.	システムウイルス学
2018. 2. 2	Kennedy O. Okeyo (Institute of Frontier Life and Medical Sciences, Kyoto University)	Tuning the Cell Culture Microenvironment: From Differentiation Induction to Tissue Engineering	バイオメカニクス
	Mohammad R. K. Mofrad (Departments of Bioengineering and Mechanical Engineering, University of California Berkeley)	Molecular Biomechanics and Cellular Mechanotransduction in Health and Disease	
2018. 2.16	Hiroshi HARADA (Kyoto Univ.)	国際ミニシンポジウム Organs under Stress — Cellular Responses to Various Stresses, Regeneration, and Cures —	再生増殖制御学
	Miria RICCHETTI (Inst. Pasteur)	Hypoxic microenvironments in malignant solid tumors	
	Fuminori KAWANO (Matsumoto Univ.)	Mitochondrial and cellular dysfunctions in the progeroid Cockayne syndrome and physiological ageing	
	Keiko NONOMURA (The Scripps Res. Inst./NIBB)	Unique epigenetics in anti-gravity skeletal muscle	
	Shahragim TAJBAKHSH (Inst. Pasteur)	Piez2-mediated detection of mechanical stress in touch sensation, proprioception and control of breathing patterns	
	Takekazu KUNIEDA (Univ. Tokyo)	Skeletal muscle stem cell and niche stability in homeostasis and stress	
	Junya TOGUCHIDA (Kyoto Univ.)	Unique strategy for amazing resilience in tardigrades	
2018. 2.26	中島 友紀 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科)	In vitro recapitulation of bone formation using iPS cells	バイオメカニクス
2018. 2.27	Terumasa Ikeda (HHMI Research Specialist, University of Minnesota)	骨リモデリングの制御機構	バイオメカニクス
2018. 3. 1	大島 孝一 (久留米大学医学部 病理学教室)	HIV-1 adaptation studies reveal a novel Vif-independent mechanism for evading lethal restriction by APOBEC3G	システムウイルス学
2018. 3. 9	Jean-Michel Claverie (Genomics and Bioinformatics, Aix-Marseille University School of Medicine, Director of the Mediterranean Institute of Microbiology of CNRS, France)	悪性リンパ腫の免疫・微小環境（ホジキンリンパ腫、AITL、ATLL）	ウイルス制御
2018. 3.16	須藤 亮 (慶應義塾大学大学院理工学研究科)	Giant viruses: the new frontier of virology	RNA ウイルス
	芳賀 永 (北海道大学大学院先端生命科学研究院)	Three-dimensional Tumor Cell Migration Assays using a Microfluidic Device	バイオメカニクス
2018. 3.22	Dong Sung An (UCLA AIDS Institute/School of Nursing)	Mechanosensitive Response of Cancer and Epithelial Cells Induced by in/on Viscoelastic Substrates	
		Highly Efficient Sendai Virus Vector Mediated CRISPR/Cas9 CCR5 editing in hematopoietic stem cells	システムウイルス学

開催日	講演者・所属	演題	主催分野
2018. 3.27	稲田 利文 (東北大学大学院 薬学研究科 遺伝子制御学分野)	翻訳品質管理におけるリボソームユビキチン化の普遍的機能	感染防御
2018. 4. 6	Charles R M Bangham (Imperial College London)	The human leukaemia virus HTLV-1: regulation of latency in vivo	ウイルス制御
2018. 5.11	鈴木 一博 (大阪大学免疫学フロンティア研究センター)	交感神経による免疫応答の調節	免疫制御
2018. 5.17	小林 志緒 (Thomas Serwold Lab, Immunobiology Section, Joslin Diabetes Center, Boston, U.S.A)	CART 細胞をベースとしたキメラ抗原受容体発現 CTL による自己応答性 T 細胞の排除 —CART 細胞を用いた自己免疫性 I 型糖尿病の新規治療法	再生免疫学
2018. 5.18	鈴木 郁夫 (Pierre Vanderhaeghen group VIB-KU Leuven Center for Brain & Disease Research)	ヒト固有遺伝子 NOTCH2NLB は Notch シグナルを促進することで大脳皮質前駆細胞を長期間維持する	増殖制御システム
2018. 5.21	François GUILLEMOT (The Francis Crick Institute London UK)	Stem cell heterogeneity in the adult brain	増殖制御システム
2018. 6.19	松田 健太 (Laboratory of Immunoregulation, NIAID, National Institutes of Health)	Prolonged Evolution of the Memory B Cell Response Induced by a Replicating Adenovirus-Influenza H5 Vector	感染症モデル研究センター 靈長類モデル
2018. 6.20	中岡 慎治 (JST・さきがけ、東京大学 生産技術研究所)	ウイルス研究における配列データの情報解析・マイニング	システムウイルス学
2018. 6.27	茂呂 和世 (理化学研究所 統合生命医科学研究センター 横浜市立大学大学院生命医科学研究所)	2型自然リンパ球の活性化によって起きる様々な疾患	感染防御
2018. 7. 4	高見 正道 (昭和大学歯学部 歯科薬理学講座)	骨代謝制御の中核因子 RANKL の機能とその臨床応用	分子遺伝学
2018. 7.11	山吉 誠也 (東京大学医科学研究所 感染・免疫部門 ウィルス感染分野)	次世代型インフルエンザワクチン開発に向けた研究	RNA ウィルス
2018. 7.18	竹田 誠 (国立感染症研究所 ウィルス第三部)	麻疹ウィルスを科学する：病態理解から新次元の応用へ	微細構造ウイルス学
2018. 9.21	齊藤 達哉 (徳島大学先端酵素学研究所)	抗ウイルス応答における自然免疫機構の役割の解明	感染防御
2018.10.10	Maxwell Wilson (Jared Toettcher's lab. Princeton University)	Tracing information flow from Erk to target gene induction reveals mechanisms of dynamic and combinatorial control	増殖制御システム
2018.10.12	清成 寛 (理化学研究所生命機能科学研究中心 生体モデル開発ユニット)	CRISPR/Cas9 による遺伝子改変マウス作製法の最適化	附属感染症モデル研究センター
2018.10.18	牧 功一郎 (東京大学大学院工学研究科、ヘルシンキ大学ライフサイエンス研究所)	マウス軟骨細胞における核の力学応答	バイオメカニクス
2018.10.31	Sam J Wilson (Principal Investigator MRC - University of Glasgow Centre for Virus Research)	Dissection and Evolution of the 'Antiviral State'	システムウイルス学

開催日	講演者・所属	演題	主催分野
2018.11. 9	畠山 昌則 (東京大学医学系研究科 微生物学 分野)	Hippo シグナル標的分子 YAP/TAZ の機能制御機構	ウイルス制御
2018.11.16	岡本 健太 (ウブサラ大学バイオメディカル センター 生物物理学教室)	二本鎖RNAウイルスと巨大ウイルスの構造とその進化	微細構造ウイルス学
2018.11.26	Tudorita Doina Tumbar (Department of Molecular Biology and Genetics Cornell University)	Hair follicle stem cells and vasculature cross-talking in normal homeostasis of adult skin	組織恒常性システム
2018.11.27	伊藤 真由美 (The Ronald O. Perleman Department of Dermatology Department of Cell Biology, New York University School of Medicine)	哺乳類における器官再生現象	組織恒常性システム
2018.11.28	Ole Schmeltz Søgaard (Department of Infectious Diseases, Aarhus University Hospital, Denmark)	Immunotherapy and Latency Reversal as Strategies to cure HIV infection	ウイルス感染症モデル
2018.12. 7	藤井 耕太郎 (Department of Developmental Biology and Genetics, Stanford University)	リボソームから伸びる RNA 触手の役割 / Decoding the Function of the Evolutionary Expansions of RNA Tentacles in Ribosomes	RNA システム分野
2018.12. 7	網塚 憲生 (北海道大学大学院歯学研究科)	Morphological Assessment of the Biological Function of Osteocytes	バイオメカニクス
2018.12.21	樋垣 伸彦 (Genentech, Inc., South San Francisco)	新しい細胞死メカニズムの発見 —細菌感染に対抗す るための宿主の戦略	システムウイルス学

構成員名簿

(2019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）：小柳義夫 副所長（兼）：河本宏，朝長啓造

◆京都大学ウイルス・再生医科学研究所諮問会議◆

井上 純一郎（東京大学医科学研究所教授）
月田 早智子（大阪大学大学院生命機能研究科教授）
長田 重一（大阪大学免疫学フロンティア研究センター教授）
岩井 一宏（京都大学大学院医学研究科教授）
中部 主敬（京都大学大学院工学研究科教授）
松田 道行（京都大学大学院生命科学研究科教授）
小柳 義夫（ウイルス・再生医科学研究所所長）
河本 宏（ウイルス・再生医科学研究所副所長）
朝長 啓造（ウイルス・再生医科学研究所副所長）

◆京都大学ウイルス・再生医科学研究所運営委員会委員◆

<ウイルス感染症・生命科学先端融合的共同研究拠点>

石野 史敏（東京医科歯科大学難治疾患研究所所長）
松浦 善治（大阪大学微生物病研究所所長）
保富 康宏（医薬基盤・健康・栄養研究所 睿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）
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）
豊島 文子（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>

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）
月田 早智子（大阪大学大学院生命機能研究科教授）
長田 重一（大阪大学免疫学フロンティア研究センター教授）
岩井 一宏（京都大学大学院医学研究科教授）
河本 宏（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）
永樂 元次（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 連携教授：加藤博己 客員教授：Raul Andino Pavlovsky 特定准教授：岡部泰賢 特定助教：木檜周
研究員：吳成旭 技術補佐員：木村春奈，吉原智美 技術補佐員：小柴里美
大学院生：覃勉，AbuTayeh Ahmed，竹内文彦，李受政，

沙 添威, Horton Amanda Claire, Khalil Jumana A.T, 清水翔太, Emralino Francine Lianne, Saikruang Wilaiporn, Duić Ivana, 阿部寛登, 早田信正, 白坂勇太郎, Lena Ang Yan Ping, IM Junghyun, 笹邊達志, 佐藤沙耶, 陳 啓昊, 船山真理子, ZUO Wenjie, LEE Sangwoo, 河野美希, 田原成人, 橋本匡太

研究生：大音泰介 共同研究者：船曳正英, 鬼澤秀夫

<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, 栗田大輔 派遣職員：目黒智美, 藤本由起子

大学院生：樋口悠介, 豊田康祐, 七條敬文 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 助教：牧野晶子 特定助教：小松弓子

特定職員：山下はるか 研究員（非常勤）：平川真弓

大学院生：山本祐介, 小嶋将平, 柳井真瑚, 小森園亮, Bea Garcia, 酒井まどか, 具志堅正興, 向井八尋, 角家洋次, 神田雄大, 山元裕太郎, 金 東充, 追田美祐希

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, 村本裕紀子 特定助教：神道慶子

日本学術振興会特別研究員：高松由基 特定研究員：平林 愛

大学院生：武長 徹, 宮本 翔, 山形優太朗, 田村涼馬, Connor Park, 藤田陽子, 梶川純一, 祝部和也

研究生：胡 上帆 派遣事務員：齋藤千晴

<がんウイルス分野 酒井 G >

准教授：酒井博幸 助教：柳川伸一 技術補佐員：石田 薫

<がんウイルス分野 土方 G >

准教授：土方 誠 研究員：李 宗南 大学院生：赤堀祐一, 宮山陽平, 李 海仁

<細胞制御分野>

教授：杉田昌彦 助教：森田大輔, 水谷龍明

大学院生：嶋 燿子, 吉岡佑弥, 国松友香, 世良隼太, 麻 実乃莉, 岩下智江里, 黒羽 仁, 鈴木 拓, 西垣皓佳

<免疫制御分野>

教授：生田宏一 助教：竹本経緯子, 原 崇裕, 崔 広為 研究員：榛葉旭恒

大学院生：向平妃沙, 朱 媛博, 阿部真也, 岡崎史恵, 旭 拓真, 江島亜希, 高見大地

共同研究者：谷一靖江, 高原和彥, 清水 章, 西 美幸

<感染防御分野>

助教：三野享史, 植畠拓也

大学院生：赤木宏太朗, 山岨大智, 市野瀬拓也, 遠藤 亮 研究生：Cai Ting

共同研究者：増谷 弘

<応答調節分野>

客員教授：河岡義裕 客員准教授：佐藤賢文

<ウイルス免疫分野>

客員教授：Charles R. M. Bangham

■再生組織構築研究部門■

<細胞機能調節学分野>

准教授：細川暢子 講師：平芳一法 助教：藤本真慈

大学院生：服部徳哉, 松井優人, 于 尚誉, 花房 賢, 氏家 梓, 中川幸大, 平田幸大, 遠藤浩太郎

研修員：法邑賢一

<生体材料学分野>

教授：田畠泰彦 助教：城潤一郎

技術補佐員：高橋香織，床田千穂子

事務補佐員：岡田千明

大学院生：村田勇樹，穴水美菜，森岡智子，村上隆英，鈴木貴久，内田雄一郎，上本裕介，百鳥直樹，鈴木久美子，古根川靖，新居輝樹

学部生：江見 翼，XU Kejing

研究員（民間等共同研究員）：藤田悠二，富田恒輝，中村耕一郎，松野久美子

研究員（受託研究員）：井田昌孝，駒田行哉，上村 聰，石丸純子，新井隆之，大庭 満，板屋敬子，花村奈未，木村幸史，並木友亮，百瀬八州，中田 克，中尾英和，宮寄 奏，古田瑛理，小林直紀

研究員（内地研究員）：西東洋一

派遣職員：井尻芳弘，門脇慎一，桑原寿江

<再生増殖制御学分野>

教授：瀬原淳子 助教：飯田敦夫 特定助教：佐藤文規 教務補佐員：荒井宏行，栗木麻央，曾我部舞奈，堀 新平

技術補佐員：黒田信子 事務補佐員：渡邊祐子

大学院生：王 梓，Choi Minyong，鶴谷雅文

<再生免疫学分野>

教授：河本 宏 准教授：宮崎正輝 助教：増田喬子 特定助教：趙 向東，上堀淳二 特定准教授：河岡慎平

特定研究員：永野誠治，小林由佳，北條広朗 非常勤研究員：宮崎和子，渡邊 武

事務補佐員：藤井絵里香，中宮真梨恵 教務補佐員：瀬和敬子 派遣職員：（技術補佐員）白数いずみ，野口友里亞
(事務補佐員) 矢崎理惠

大学院生：長畠洋佑，西村有史，糸原 俊 特別研究学生：嘉島相輝 共同研究者：縣 保年 研究生：高 宇嫗

<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，川井俊介

特定職員：永田早苗 (CiRA) 事務補佐員：安田尚代，芳野麻里絵

派遣職員（技術補助）：西尾 恵，小山優子，大塚瑞希

大学院生：宗圓 充，磯部 悠，中山良裕，鎌倉武史，前川裕繼，湯川愛友，樫本玲菜，Yann Pretemer

共同研究員：宝田剛志，渡辺 真，山本理絵，水晶善之，上杉佳子

研究生：孫麗萍 (CiRA)

<臓器・器官形成応用分野 中村 G >

准教授：中村達雄

非常勤講師：茂野啓示，稻田有史，村田宮彥，東高志，早川克己

研修員：町口敏彦，中本裕也 技術補佐員：石田久恵 事務補佐員：矢延聰枝

大学院生：豊洋次郎，村西佑介，上田雄一郎 研究生：金子真弓，畠山敬秀

<臓器・器官形成応用分野 角 G >

准教授：角昭一郎 非常勤講師：小川知彦，白水泰昌 研究員：友杉充宏

民間等共同研究員：大藪三千代

大学院生：楊 心妤，Priyadarshini Naskar Canning

<発生エピゲノム分野 多田 G >

准教授：多田 高 研究員：福地恵美

大学院生：勅使河原利香，曹 準權

<発生エピゲノム分野 中馬 G >

連携教授：中辻憲夫 準教授：中馬新一郎 研究員（非常勤）：細川美穂子 特定研究員：刀谷在美
教務補佐員：森都江美子，酒井睦美
大学院生：林 瑛理，中川史之

<胚性幹細胞分野>

准教授：末盛博文 特定講師：川瀬栄八郎 特定教授：浅田 孝 特定職員：高田 圭 特定研究員：山内香織
事務補佐員：廣富ひとみ

<統合生体プロセス分野>

教授：近藤 玄 準教授：廣田圭司 助教（兼）：渡邊仁美

<生体再建学分野>

客員教授：坂口志文 特定助教：三上統久 研究員：大崎一直，木本富子，安田圭子
連携研究支援員：松浦眞由美 技術補佐員：山本恵津子

<生体物性学分野>

（欠員中）

<再生医工学分野>

客員教授：Raul Andino Pavlovsky

■生命システム研究部門■

<ナノバイオプロセス分野>

助教：笠井倫志

<バイオメカニクス分野>

教授：安達泰治 準教授：井上康博 講師：OKEYO Kennedy Omondi

助教：亀尾佳貴

特定研究員：木村健治，KIM Jeong Hyun 研究員：須長純子 共同研究者：林紘三郎

外国人共同研究者：CENER Denis Jan 技術補佐員：寒川裕之 事務補佐員：平良美智代

大学院生：安藤悠太，竹田宏典，仲尾信彦，石川敬一，小笠正裕，齋梧 等，玉嶋雄大，木部善清，河野沙紀，佐藤優里佳，寺澤良亮，森川健太郎，森 泉，松田大輝，渡辺章太郎

学部生：小蘭井佑弥，木上博之，坂野暢昭，下平剛司，玉井龍太郎，富井沢音，横山優花

特別研究学生：金 英寛

<発生システム制御分野>

教授：永樂元次 準教授：大串雅俊 特定研究員：瀬戸裕介，森 健介

民間等共同研究員：黒田貴雄 さきがけ専任研究員：奥田 覚 JSPS 特別研究員（PD）：田宮寛之

大学院生：秋山拓海，神林 昌，柴沼宏輔，河嶋 照，川野紗依子

学部生：KANG JIHOON，鈴木和也，沼田章良，松枝且樹

<システムウイルス学分野>

教授：小柳義夫 講師：Alexis Vandenbon 特定助教：中野雄介，古瀬祐氣 特定研究員：伊東潤平

教務補佐員：三沢尚子

大学院生：Juárez Guillermo，Soper Andrew，木村出海，今野順介，長岡峻平，山本啓輔，麻生啓文

<増殖制御システム分野>

教授：影山龍一郎 準教授：大塚俊之 助教：小林妙子 特定助教：下條博美

学振特別研究員：越智翔平 教務補佐員：小林久美子，前田勇樹，岩本由美子，倉橋むつみ

事務補佐員：澤田英里 オフィス・アシスタント：榎 泰祐

大学院生：坂本 進，貝瀬 峻，高木あかり，松宮舞奈，松崎公信，山口優輔，末田梨沙，朴 文惠，

SHQIRAT J.M. Mohammed, 大木圭佑, 木下晃, MAVUK Özgün 外国人特別研究員 : Caroline Visse

共同研究者 : 今吉 格, 磯村彰宏, 山田真弓, 奥野浩行, 渡原圭一郎

<生体情報分野>

(欠員中)

<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, 浜島りな

大学院生 : 川本崇仁

<生体膜システム分野>

教授 : 秋山芳展 准教授 : 森 博幸 助教 : 榎作洋平 特定研究員 : 宮崎亮次

学振特別研究員 : 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, 細川拓弥

大学院生 : 吉谷亘平, 三宅拓也, 宇部滉一, 本名彩正, 渡邊哲朗, 横山達彦, 田中雄太, 宋 俊勇

<組織恒常性システム分野>

教授 : 豊島文子 助教 : 小田裕香子, 石橋理基 特定助教 : 一條 遼

技術補佐員 : 木曾和美 事務補佐員 : 村山かの子, 原田洋子

大学院生 : 上月智司, 岡田拓也, 阿部浩太, 廣田紗奈, 森 美樹, Elizabeth Shimoura, 三森はるか, 南部沙季

<数理生物学分野>

教授 : 望月敦史 事務補佐員 : 岳山裕美

<幹細胞遺伝学分野>

教授 : 遊佐宏介 研究員 : 竹田潤二 事務補佐員 : 上田紀子

<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

<靈長類モデル分野>

准教授 : 三浦智行 研究員 : 姫野 愛 技術補佐員 : 松浦嘉奈子, 菊川美奈子

オフィス・アシスタント : 鳥居也紗

大学院生 : YALÇIN PİSİL, 山浦瑞樹, 李 佳霖

共同研究者 : 志田壽利

<ウイルス感染症モデル分野>

教授 : 明里宏文 特定研究員 : 関 洋平, 鶴崎彩夏 教務補佐員 : 村田めぐみ

技術補佐員 : 辻 薫 大学院生 : Tan Wei Keat

<ウイルス共進化分野>

准教授 : 宮沢孝幸

大学院生 : 宮穂里江, 橋本 曜, 小出りえ, 北尾晃一

共同研究者 : 坂口翔一, 下出紗弓, 平野丈夫, 司 悠真

技術専門員 : 宮地 均 技術専門職員 : 小中 (北野) さつき 技術職員 : 阪脇廣美, 吉田 暖

■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, 侯野真帆, 教務補佐員 : 竹田理恵

技能補佐員：竹明フサ，向一哲，竹内宏，川北美奈子，高溝一郎，藤堂詩子，穴田祐子，佐治佑沙，柴山厚子

研究支援推進員：古卿智英，永井智美，佐々木勉，吉田美保，富士原達美，新謙一

事務補佐員：北澤志津江 派遣職員：西山尚之，片山龍一

■非常勤講師■

高見 正道	山吉 誠也	竹田 誠	鈴木 一博	大谷 和世	金田 安史	青木伊知男	中村 雅也
若月 修二	入江 直樹	渡部 良広	稻田 有史	茂野 啓示	村田 宮彥	東 高志	早川 克己
小川 知彦	白水 泰昌	仙石慎太郎	竹尾 透	坂口 教子	田中 淳	森川 洋匡	中島 友紀
芳賀 永	宮田 卓樹						

■事務部■

事務長：小林英治 総務掛長：服部和枝 主任：畠中あい

教務補佐員：采女久実子 派遣職員：竹島愛美，小西順子 労務補佐員：稻垣きよみ

Annual Report
of the Institute for Frontier Life and Medical Sciences,
Kyoto University
Vol.3 2018

2019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