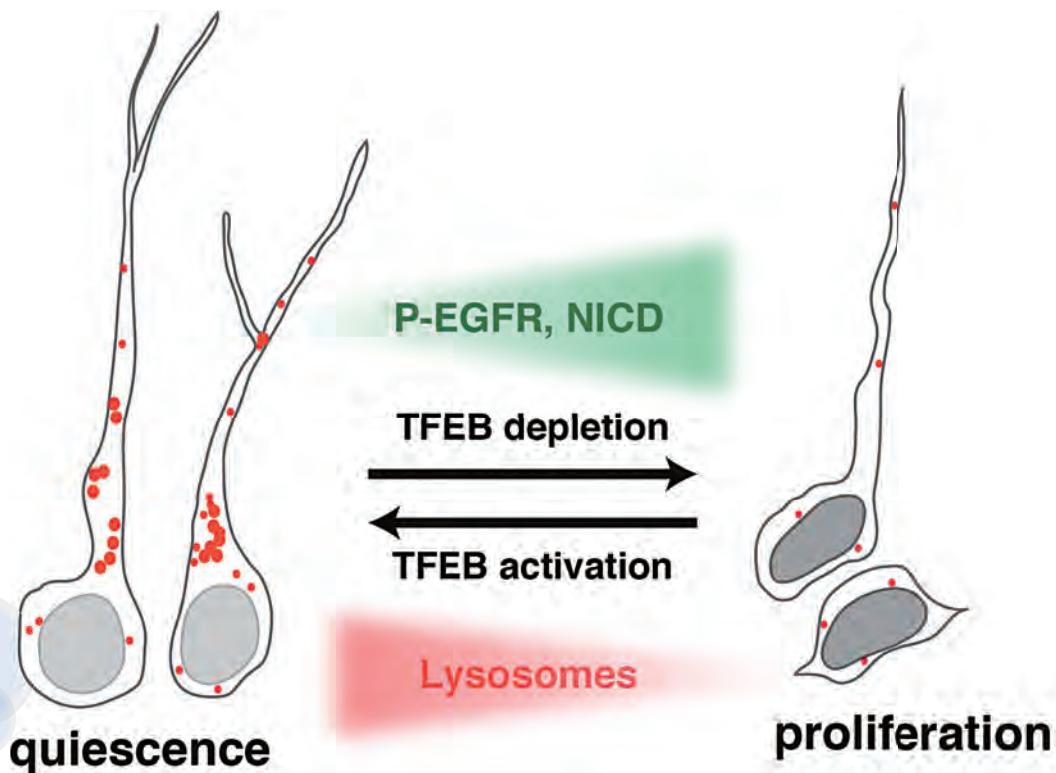


# Annual Report

of the Institute for  
Frontier Life and Medical Sciences  
Kyoto University Vol. 4 2019



Lysosomes : membrane-bound organelles for digestion

P-EGFR : activated (phosphorylated) EGF receptor

NICD : activated Notch1 receptor

TFEB : a master regulator for lysosomal biogenesis







Institute for Frontier Life and Medical Sciences  
Kyoto University

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

**Vol.4 2019**

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

表紙：

リソソームによる成体神経幹細胞の休眠（静止）と活性化（増殖）の制御：リソソーム制御因子である転写因子 TFEB がリソソームの生成を誘導し、休眠状態の神経幹細胞のメンテナンスを行っている。

Cover:

Lysosome formation in quiescent versus active neural stem cells. The master regulator TFEB induces lysosome formation, which leads to maintenance of quiescent neural stem cells.

## CONTENTS

### **Research Activities**

<b>ウイルス感染研究部門 Department of Virus Research</b>	
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 .....	12
微細構造ウイルス学分野 Laboratory of Ultrastructural Virology .....	20
がんウイルス分野 Laboratory of Tumor Viruses .....	27
細胞制御分野 Laboratory of Cell Regulation .....	31
免疫制御分野 Laboratory of Immune Regulation .....	35
<b>再生組織構築研究部門 Department of Regeneration Science and Engineering</b>	
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 .....	46
再生免疫学分野 Laboratory of Immunology .....	62
再生免疫学分野（瀬原グループ） Laboratory of Immunology (Sehara Group) .....	68
臓器連関研究チーム Inter-Organ Communication Research Team .....	73
組織再生応用分野 Laboratory of Tissue Regeneration .....	76
臓器・器官形成応用分野 Laboratory of Organ and Tissue Reconstruction .....	83
発生エピゲノム分野 Laboratory of Developmental Epigenome .....	89
胚性幹細胞分野 Laboratory of Embryonic Stem Cell Research .....	93
統合生体プロセス分野 Laboratory of Integrative Biological Science .....	97
生体再建学分野 Laboratory of Experimental Immunology .....	102
<b>生命システム研究部門 Department of Biosystems Science</b>	
ナノバイオプロセス分野 Laboratory of Nano Bioprocess .....	110
バイオメカニクス分野 Laboratory of Biomechanics .....	114
発生システム制御分野 Laboratory of Developmental Systems .....	125
システムウイルス学分野 Laboratory of Systems Virology .....	130
増殖制御システム分野 Laboratory of Growth Regulation System .....	137
RNA システム分野 Laboratory of RNA System .....	143
生体膜システム分野 Laboratory of Biological Membrane System .....	147
組織恒常性システム分野 Laboratory of Tissue Homeostasis .....	153
数理生物学分野 Laboratory of Mathematical Biology .....	156
幹細胞遺伝学分野 Laboratory of Stem Cell Genetics .....	161
がん・幹細胞シグナル分野 Laboratory of Cell Fate Dynamics & Therapeutics .....	166
<b>附属感染症モデル研究センター Research Center for Infectious Diseases</b>	
霊長類モデル分野 Laboratory of Primate Model .....	169
ウイルス感染症モデル分野 Laboratory of Infectious Disease Model .....	173
ウイルス共進化分野 Laboratory of Virus-Host Coevolution .....	178
マウス作製支援チーム Reproductive Engineering Team .....	181
<b>附属再生実験動物施設 Center for Animal Experiments</b>	184
<b>ウイルス・再生医科学研究所ネットワークシステム</b>	
Computer Network of Institute for Frontier Life and Medical Sciences .....	187
<b>共同研究</b>	189
<b>学術集会</b>	213
<b>分野主催のセミナー</b>	216
<b>構成員名簿</b>	219



## **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、それによるウィルス感染からの防御の応用研究（ヒト、家畜）
- 5) B型肝炎ウィ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型肝炎ウィルス薬剤の探索
- 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新規治療法の開発
- 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

- Takeuchi, F., Ikeda, S., Tsukamoto, Y., Iwasawa, Y., Qihao, C., Otakaki, Y., Ouda, R., Yao, W-L., Narita, R., Hijikata, M., Watashi, K., Wakita, T., Takeuchi, K., Chayama, K., Kogure, A., Kato, H., and Fujita, T. (2019). Screening for inhibitor of episomal DNA identified dicumarol as a hepatitis B virus inhibitor. **PLoS One** 14, e0212233. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212233>
- Hajake, T., Matsuno, K., Kasumba, D.M., Oda, H., Kobayashi, M., Miyata, N., Shinji, M., Kogure, A., Kasajima, N., Okamatsu, M., Sakoda, Y., Kato, H. and Fujita, T. (2019). Broad and systemic immune-modulating capacity of plant-derived dsRNA. **International Immunology** 31, 811. doi:10.1093/intimm/dxz054
- Soda, N., Sakai, N., Kato, H., Takami, M and Fujita, T. (2019). Singleton-Merten Syndrome – like Skeletal Abnormalities in Mice with Constitutively Activated MDA5. **The Journal of Immunology** 203, 1356. doi: 10.4049/jimmunol.1900354
- Ng, C.S., Kato, H. and Fujita, T. (2019). Fueling type I interferonopathies: regulation and function of type I interferon antiviral responses. **Journal of Interferon and Cytokine Research** 39, 383. <http://doi.org/10.1089/jir.2019.0037>

### List of Presentations

- Fujita, T. Light and Dark Sides of Antiviral Innate Immunity. The 2nd symposium on virus infection and host response, London March 6-7, 2019. oral
- Abe, H., Kato, H. and Fujita, T. A Distinct Role of IKK $\beta$  in IRF-3 Activation via TLR3/4 Signaling is Accompanied by the Phosphorylation of TRIF. The 2nd symposium on virus infection and host response, London March 6-7, 2019. poster
- Emralino, F.L., Onizawa, H, Ohto, T., Abu Tayeh, A., Lee, S., Soda, N., Shimizu, S., Kato, H. and Fujita, T. Inducible Inflammation in Mice Bearing the Mutant Human R822Q MDA5. The 2nd symposium on virus infection and host response, London March 6-7, 2019. poster
- Takeuchi, F., Ikeda, S., Tsukamoto, Y., Otakaki, Y., Iwasawa, Y., Yao, W.L., Narita, R., Ouda, R., Kogure, A., Kato, H. and Fujita, T. A new screaming system for HBV cccDNA via lentivirus episomal DNA. 7<sup>th</sup> Japan-Taiwan-Korea HBV resarch symposium, Tokyo April 5-6, 2019. oral
- Kimura, C., Li, R., Ouda, R., Nishimura, H., Fujita, T. and Watanabe, T. Production of antiviral compounds from sugarcane bagasse by microwave solvolysis. The 20<sup>th</sup> International Symposium on Wood, Fiber, and Pulping Chemistry, Tokyo, September 9-11, 2019.

Takeuchi, F., Ikeda, S., Tsukamoto, Y., Iwasawa, Y., Qihao, C., Otakaki, Y., Ouda, R., Yao, WL., Narita, R., Hijikata, M., Watashi, K., Wakita, T., Takeuchi, K., Chayama, K., Kogure, A., Kato, H. and Fujita, T. A novel lentiviral screening for inhibitor of episomal DNA identified dicumarol as a inhibitor of HBV replication. International HBV meeting, Melbourne October 1-5, 2019. poster

Abu Tayeh, A., Funabiki, M., Kato, H. and Fujita, T. Constitutive RIG-I Activation Causes Skin Lesion Resembling Psoriasis in Mice. 26th East Asia Joint Symposium on Biomedical Research "Metabolic Regulation", Seoul, South Korea, October 23-26, 2019. oral/poster

Abu Tayeh, A., Kato, H. and Fujita, T. Constitutive RIG-I Activation Causes Skin Lesion Resembling Human Psoriasis- Mouse model study. The 48th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Hamamatsu, December 11-13 2019. oral/poster

竹内文彦、池田宗太郎、塚本雄太、大高木結媛、岩澤嘉一、ワン・リン・ヤオ、ミアン・シン、成田亮、應田涼太、木檜周、加藤博己、藤田尚志 B型肝炎ウイルス cccDNA の排除及び解析に対する新規手法 第7回 肝炎ウイルス研修会、東京、2019年2月27-28日 口頭／ポスター

竹内文彦、池田宗太郎、塚本雄太、應田涼太、土方誠、渡士幸一、脇田隆字、茶山一彰、木檜周、加藤博己、藤田尚志 変異型レンチルイスを用いたHBVエピソームDNA阻害剤の開発 第67回日本ウイルス学会学術集会、東京、2019年10月29-31日 ポスター

## 【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

これまでにマウスの種々の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データベースを構築した。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ている。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 の産

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。

私たちは、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ている。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。これまでに受精卵を用いた 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た。2019 年度は本遺伝子改変マウスを解析し、本中皮細胞が体腔免疫系の制御に重要な役割を果たすことを明らかにした。

なお、本研究提案は科学技術振興機構さきがけ領域に令和元年度の研究課題として採択された。

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 Presentations

岡部泰賢、免疫の『場』としての脂肪組織、第 40 回 日本炎症・再生医学会、2019.7.17

Okabe Y, Regulation of Body Cavity Immunity, Osaka University, 2019.8.19

岡部泰賢、組織マクロファージの生物学、シグナル伝達医学研究展開センターセミナー（第 5 回  
神戸免疫感染症セミナー）、2019.8.28

岡部泰賢、境界から細胞社会を見る、第 6 回京都大学個体の中の細胞社会学ワークショップ、  
2019.11.21

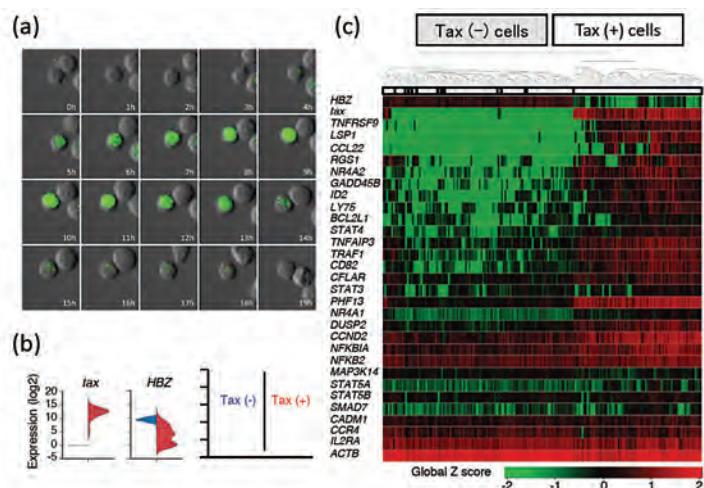
ウイルス感染研究部門  
Department of Virus Research  
  
ウイルス制御分野  
Laboratory of Virus Control

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。



**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.

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- $\kappa$ 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 トランスジェニックマウス (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 (Fig. 2)、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抑制する。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。

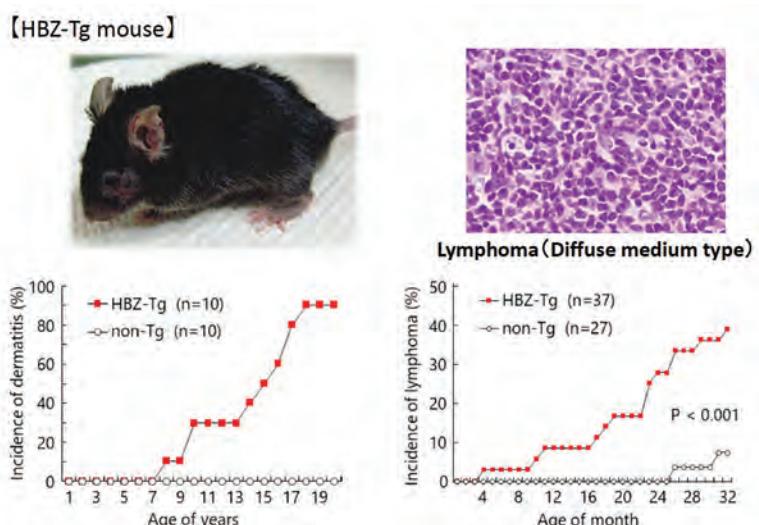


Figure 2. HBZ causes T-cell lymphoma and inflammation

## 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、その結果、長期間の服薬が求められる。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、我々は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構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報告されているが、我々は、これまで報告されていない新規プロモドメインタンパク質が潜伏感染状態の維持に寄与していることを明らかにした。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<sup>+</sup> T cells, which leads to adult T-cell leukemia (ATL), while HIV destroys CD4<sup>+</sup> 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 (Fig. 2), 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 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 reservoir 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 latency 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

- Ma, G., Yasunaga, JI., Ohshima, K., Matsumoto, T., and Matsuoka, M. (2019). Pentosan polysulfate demonstrates anti-HTLV-1 activities in vitro and in vivo. **J Virol** 93, e00413-19.
- Bangham, CRM., Miura, M., Kulkarni, A., and Matsuoka, M. (2019) Regulation of Latency in the Human T Cell Leukemia Virus, HTLV-1. **Annu Rev Virol** 6, 365-385.
- Alam, MM., Kuwata, T., Tanaka, K., Alam, M., Takahama, S., Shimura, K., Matsuoka, M., Fukuda, N., Morioka, H., Tamamura, H., and Matsushita, S. (2019) Synergistic inhibition of cell-to-cell HIV-1 infection by combinations of single chain variable fragments and fusion inhibitors. **Biochem Biophys Rep** 20, 100687.
- Noyori, O., Komohara, Y., Nasser, H., Hiyoshi, M., Ma, C., Carreras, J., Nakamura, N., Sato, A., Ando, K., Okuno, Y., Nosaka, K., Matsuoka, M., and Suzu, S. (2019) Expression of IL-34 correlates with macrophage infiltration and prognosis of diffuse large B-cell lymphoma. **Clin Transl Immunology** 8, e1074.
- Nishimura, N., Radwan, MO., Amano, M., Endo, S., Fujii, E., Hayashi, H., Ueno, S., Ueno, N., Tatetsu, H., Hata, H., Okamoto, Y., Otsuka, M., Mitsuya, H., Matsuoka, M., and Okuno, Y. (2019) Novel p97/VCP inhibitor induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in both bortezomib-sensitive and -resistant multiple myeloma cells. **Cancer Sci** 110, 3275-3287.
- Matsumura, T., Nakamura-Ishizu, A., Takaoka, K., Maki, H., Muddineni, SSNA., Wang, CQ., Suzushima, H., Kawakita, M., Asou, N., Matsuoka, M., Kurokawa, M., Osato, M., and Suda, T. (2019) TUBB1

dysfunction in inherited thrombocytopenia causes genome instability. **Br J Haematol** 185, 888-902.

Tagaya, Y., Matsuoka, M., and Gallo, R. (2019) 40 years of the human T-cell leukemia virus: past, present, and future. **F1000Res** 8 (*F1000 Faculty Rev*), 228

Cook, LB., Fuji, S., Hermine, O., Bazarbachi, A., Ramos, JC., Ratner, L., Horwitz, S., Fields, P., Tanase, A., Bumbea, H., Cwynarski, K., Taylor, G., Waldmann, TA., Bittencourt, A., Marcais, A., Suarez, F., Sibon, D., Phillips, A., Lunning, M., Farid, R., Imaizumi, Y., Choi, I., Ishida, T., Ishitsuka, K., Fukushima, T., Uchimaru, K., Takaori-Kondo, A., Tokura, Y., Utsunomiya, A., Matsuoka, M., Tsukasaki, K., and Watanabe, T. (2019) Revised Adult T-Cell Leukemia-Lymphoma International Consensus Meeting Report. **J Clin Oncol** 37, 677-687.

### List of Presentations

#### 招待講演（海外）

Masao Matsuoka. Critical roles of HBZ in HTLV-1 pathogenesis. 19<sup>th</sup> International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses, Lima, April 24-26, 2019.

Masao Matsuoka. How Human T-cell Leukemia Virus Type 1 Causes Diseases. Ohio State University Distinguished Research Award in Retrovirology, Columbus, May 1, 2019.

Jun-ichirou Yasunaga. Molecular mechanisms for persistent infection and oncogenesis by human T-cell Leukemia virus type 1. The 18<sup>th</sup> Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, September 10-13, 2019.

#### 一般演題（海外）

Jun-ichirou Yasunaga. Loss of IL-6 accelerates inflammation and lymphomagenesis in HTLV-1: bZIP factor transgenic mice by modulating Foxp3/IL-10 axis. 19<sup>th</sup> International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses, Lima, April 24-26, 2019.

Yusuke Higuchi, Jun-ichirou Yasunaga, Yu Mitagami, Koichi Ohshima, Masao Matsuoka. HTLV-1 Dysregulates IL-6 and IL-10-JAK/STAT Signaling and Induces Leukemia/Lymphoma CD4+T-Cell with Regulatory T-Cell-like Signatures. The 61<sup>st</sup> American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, Orlando, December 7-10, 2019.

#### 招待講演（国内）

松岡 雅雄 ヒトT細胞白血病ウイルス1型 up-to-date 第67回日本輸血・細胞治療学会、熊本、2019年5月23日-25日

松岡 雅雄 ヒトレトロウイルスの病原性と治療戦略 21世紀を明るく科学する会 in 2019、伊豆、2019年9月7日

## 一般演題（国内）

田中 梓、安永 純一朗、藤本 明洋、松岡 雅雄 成人T細胞白血病のクロマチン構造解析 第6回日本HTLV-1学会、宮崎、2019年8月23日-25日

井崎 幹子、安永 純一朗、松本 美穂、七條 敬文、井上 明威、河北 敏郎、アナート メラメッド、野坂 生郷、末廣 陽子、松岡 雅雄 臨床病態における HTLV-1 感染細胞クローンの生体内動態 第6回日本HTLV-1学会、宮崎、2019年8月23日-25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 HTLV-1 プロウイルス配列の臨床的意義 第6回日本HTLV-1学会、宮崎、2019年8月23日-25日

七條 敬文、安永 純一朗、大西 知帆、志村 和也、高 起良、竹之内 徳博、佐藤 佳、小柳 義夫、明里 宏文、野坂 生郷、松岡 雅雄 HTLV-1 及び STLV-1 プロウイルス配列の網羅的解析 第6回日本HTLV-1学会、宮崎、2019年8月23日-25日

馬 広勇、安永 純一朗、大島 孝一、松本 正、松岡 雅雄 Pentosan polysulfate suppresses HTLV-1 transmission and systemic inflammation induced by HBZ 第6回日本HTLV-1学会、宮崎、2019年8月23日-25日

村田 めぐみ、鷺崎 彩夏、関 洋平、Wei Keat TAN、森本 真弓、兼子 明久、夏目 尊好、鈴木 樹理、安永 純一朗、松岡 雅雄、水上 拓郎、明里 宏文 母子感染における抗体価・PVL の動態長期的調査～STLV-1 自然感染ニホンザルを用いて～ 第6回日本HTLV-1学会、宮崎、2019年8月23日-25日

長谷川 温彦、飯野 忠史、白土 基明、宇都宮 勇人、大野 博文、北浦 一孝、松谷 隆治、鈴木 隆二、永野 佳子、松岡 雅雄、神奈木 真理、末廣 陽子 Tax ペプチドパルス樹状細胞療法後の残存 ATL 細胞および Tax 特異的 CTL の TCR レパートア解析 第6回日本HTLV-1学会、宮崎、2019年8月23日-25日

川口 修治、清水 正和、安永 純一朗、高橋 めい子、岡山 昭彦、山野 嘉久、内丸 薫、研究協力施設 JSPFAD、川上 純、松岡 雅雄、松田 文彦 大規模検体における HLA・HTLV-1 プロウイルス量の統合解析における HAM/TSP 発症リスクの推定 第6回日本HTLV-1学会、宮崎、2019年8月23日-25日

樋口 悠介、安永純一朗、松岡雅雄 IL-6/IL-10 シグナル経路の攪乱における HTLV-1 bZIP factor の病原性発現機構 第6回日本HTLV-1学会、宮崎、2019年8月23日-25日

安永純一朗、松岡雅雄 HTLV-1 Tax 標的樹状細胞ワクチン療法第1相治験における液性免疫の解析 第6回日本HTLV-1学会、宮崎、2019年8月23日-25日

安永純一朗、松岡雅雄 レトロウイルスがコードするアンチセンス RNA の核局在はウイルスの持続感染に関与する 第78回日本癌学会学術総会、京都、2019年9月26日-28日

栗田大輔、安永純一朗、田中梓、松岡雅雄 Epigenetic alterations by transient expression of HTLV-1 Tax  
in ATL cell 第 81 回日本血液学会、東京、2019 年 10 月 11 日 -13 日

樋口悠介、安永純一朗、三田上悠、大島孝一、松岡雅雄 IL-10-JAK-STAT signaling pathway is involved  
in inflammation and oncogenesis induced by HTLV-1 bZIP factor 第 81 回日本血液学会、東京、2019  
年 10 月 11 日 -13 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	Project Associate. Prof.	Masayuki Horie
助 教	牧野 晶子	Assist. Prof.	Akiko Makino
特定助教	小松 弓子	Project Assist. Prof.	Yumiko Komatsu

2019年は、4月に生命科学研究科の修士課程1年に鬼丸楓と渡部雄斗、博士課程1年に川崎純菜とLin Hsien Henが入学した。また、研究生として曾我玲子が参加した。

以下、本年実施された(1)実験ウイルス学、(2)ウイルスベクター開発、(3)内在性ウイルス研究の3領域に関する研究活動とその成果の概要を記載する。

(1) 実験ウイルス学領域では、「ボルナ病ウイルスを利用するADAR2による非自己認識回避機構」と「オウムボルナウイルス4の高感度検出法の開発」についての成果を発表した。「ボルナ病ウイルスを利用するADAR2による非自己認識回避機構」では、大学院博士課程4年の柳井が、ADAR2ノックダウンまたはノックアウト細胞の作出により、ボルナ病ウイルス(BoDV)感染におけるADAR2の関与を評価した。同細胞において、BoDVの感染効率および感染の広がりは減弱し、ADAR2の過剰発現により表現型は復帰した。ADAR2ノックダウンによりBoDVのゲノムまたはアンチゲノムRNA中に観察されたA-to-G変異が検出されなくなり、RNA-IPによりADAR2とウイルスRNAの相互作用が示された。さらに、ADAR2ノックダウン細胞から回収したウイルスは野生型細胞から回収したウイルスと比較して、CXCL10やIL-6といったサイトカインを強く誘導することが示された。これらのことから、BoDVはADAR2のRNA編集活性を利用して、宿主から非自己として認識されることを回避していることが明らかとなった。「オウムボルナウイルス4の高感度検出法の開発」では、大学院博士課程3年の小森園が、オウムボルナウイルス4(PaBV-4)のRT-LAMP法を開発した。PaBV-4は愛玩鳥に致死的な前胃拡張症を引き起こす病原体で、世界中で流行して経済的な損失を起こしている。PaBV-4の簡便で高感度な検出法の確立を目的として、PaBV-4のN遺伝子で保存されている領域からRT-LAMPに用いるプライマーセットを設計し、感染細胞と鳥の脳および糞便検体から、ウイルスRNAを検出することに成功した。開発した方法は従来のRT-PCR法よりも100倍感度が高かった。本法を用いたPaBV-4のモニタリングは、同ウイルス感染症の制御に貢献すると考えられた。

(2) ウィルスベクター開発領域では、「導入遺伝子発現を切り替え可能なRNAウイルスベースのエピソームベクターの開発」と「RNA virus-based episomal vectorによるiPS細胞への遺伝子導入・分化誘導」についての成果を発表した。近年我々の研究室ではBoDVを元にしたRNA virus-based episomal vector(REVec)を開発した。「導入遺伝子発現を切り替え可能なRNAウイルスベースのエ

ピソームベクターの開発」では、大学院博士課程6年の山本が、テオフィリン依存型自己開裂リボスイッチを用いて、導入細胞での遺伝子発現が制御可能な新たなREVecシステムであるREVec-L2b9を開発した。REVec-L2b9からの導入遺伝子発現はテオフィリン非存在下で抑制され、テオフィリン投与により誘導された。逆に、REVec-L2b9からの導入遺伝子発現は、テオフィリンを除去することで発現をオフすることが示され、遺伝子発現を必要に応じて制御可能なRNAウイルスベクターの開発に成功した。「RNA virus-based episomal vectorによるiPS細胞への遺伝子導入・分化誘導」では、特定助教の小松が、異なる細胞由来のiPS細胞を用いてREVecによる遺伝子導入効率を評価した。その結果、REVecはiPS細胞へ高効率に遺伝子導入が可能であることが示された。また、myogenic transcription factor (MyoD) を組み込んだREVecをiPS細胞へ導入することで、骨格筋細胞へ分化誘導ができる事を示した。さらに、T-705の投与によりiPS細胞からREVecの除去が可能であることを示し、REVecがiPS細胞への遺伝子導入において有望なツールとなることを示した。

(3) 内在性ウイルス研究領域では、「哺乳動物ゲノムに内在するボルナウイルス由来の遺伝子配列の機能解析」について成果発表を行った。生物ゲノムにはウイルス由来の遺伝子配列が多数存在する。我々はこれまでに、ボルナウイルスに由来する遺伝子配列（内在性ボルナウイルス様エレメント：EBL）が、多くの哺乳動物ゲノムに存在することを明らかにしている。大学院博士課程1年の向井は、分子進化学的手法と分子生物学的手法を組み合わせたスクリーニングにより、ユビナガコウモリ (*Miniopterus* 属) のゲノムに内在するボルナウイルスのN遺伝子由来のEBL (miEBLN-1) が機能的なタンパク質をコードすることを強く示唆する結果を得た。解析の結果、miEBLN-1は1,200万年以上前に祖先コウモリのゲノムに組み込まれたこと、また既知のボルナウイルスのNタンパク質と44%のアミノ酸一致率を示すことがわかった。さらに、miEBLN-1がユビナガコウモリの種々の組織においてタンパク質として発現していることを確認した。ボルナウイルスのN遺伝子はウイルスのゲノムRNAに結合してカプシドを形成するNタンパク質をコードするため、miEBLN-1のRNA結合能を調べたところ、in vitro、in vivoどちらの条件においてもmiEBLN-1タンパク質がRNAに結合することを見出した。本研究は、哺乳動物が進化の過程においてRNAウイルス由来の遺伝子を獲得し、ウイルス遺伝子のもとの性質を維持したまま細胞機能へと転用していることを示唆した初めての研究である。

(4) その他の研究活動として、3月には英国日本国大使館にてJSPS Core-to-Core the 2nd symposium on Virus Infection and Host Responseを開催し、教室員数名が研究発表を行った。また、大学院博士課程1年の川崎が5月のThe 3rd Korea-Japan International Symposium for Transposable Elements (Busan, Korea)にて招待講演を行った。国際学会へは、7月の38th Annual Meeting American Society for Virology (Minnesota, USA)に大学院博士課程2年の神田が、10月のESGCT 27th annual congress (Barcelona, Spain)に小松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（東京）にて研究発表を行った。8月の第3回進化学セミナー（静岡）では、堀江と大学院博士課程1年の川崎がそれぞれポスター発表し優秀賞を授与された。

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 evolutionary significance, as well as function, of endogenous bornaviruses in many mammalian genomes, including humans. Furthermore, we are conducting the development of a novel RNA virus vector using bornavirus for regenerative medicine and gene therapies. In 2019, we conducted research on the following subjects.

In the field of experimental virology, we reported research results of following two subjects.

**1) Involvement of ADAR2 in self and nonself recognition of Borna disease virus genomic RNA.** Cells use the editing activity of adenosine deaminase acting on RNA proteins (ADARs) to prevent autoimmune responses induced by “self” dsRNA, but viruses can exploit this process to their advantage. BoDV, a nuclear-replicating RNA virus, must escape nonself RNA-sensing by the host to establish persistent infection in the nucleus. We evaluated whether BoDV utilizes ADARs to prevent innate immune induction. ADAR2 plays a key role throughout the BoDV life cycle. ADAR2 knockdown reduced A-to-I editing of BoDV genomic RNA, leading to the induction of a strong innate immune response. These data suggest that BoDV exploits ADAR2 to edit nonself genomic RNA to appear as “self” RNA for innate immune evasion and establishment of persistent infection.

**2) Development of a highly sensitive detection method for parrot bornavirus 4.** Avian bornavirus (ABV) is the causative agent of proventricular dilatation disease, which is fatal in psittacine birds. ABVs have spread worldwide, and outbreaks have led to mass deaths of captive birds in commercial and breeding facilities. We developed a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for the diagnosis of parrot bornavirus 4 (PaBV-4), a dominant ABV genotype. Using this assay, we successfully detected PaBV-4 RNA in cell cultures, brain tissues, and feces. We also developed methods for simple RNA extraction and visual detection without electrophoresis. The sensitivity of the newly established RT-LAMP assay was 100-fold higher than that of the real-time PCR (RT-qPCR) assay. Accordingly, the RT-LAMP assay developed in this study is suitable for the rapid and sensitive diagnosis of PaBV-4 without specialized equipment and will contribute to virus control in aviaries.

In the project of viral vector development, we reported research results of following two subjects.

**1) RNA virus-based episomal vector capable of switching transgene expression.** We have recently developed an RNA virus-based episomal vector (REVec), based on nuclear-replicating BoDV. REVec can transduce various cell types for a long-term; however, a major challenge to the practical use of REVec is the lack of a mechanism to turn off transgene expression from a target cell. Here, we developed a novel REVec system, REVec-L2b9, in which transgene expression can be switched on and off by theophylline-dependent self-cleaving riboswitch. Transgene expression from REVec-L2b9 is suppressed in the absence of theophylline and induced by administration of theophylline. To our knowledge, REVec-L2b9 is the first nuclear-replicating RNA virus vector capable of regulating level of transgene expression, which will expand the potential for gene therapies by increasing safety and usability.

## **2) RNA virus-based episomal vector for efficient genetic modification and differentiation of iPSCs.**

A gene delivery system that enables efficient and stable stem cell modification is critical for next-generation stem cell therapies. In this project, we analyzed susceptibility of human induced pluripotent stem cell (iPSC) lines from different somatic cell sources to RNA virus-based episomal vector (REVec), and demonstrated highly efficient REVec mediated transduction of iPSCs. Using REVec encoding myogenic transcription factor MyoD1, we further showed potential application of the REVec system for inducing differentiation of iPSCs into skeletal muscle cells. Treatment with a small molecule, T-705, completely eliminated REVec in persistently transduced cells. Thus, the REVec system offers a versatile toolbox for stable, integration-free iPSC modification and trans-differentiation, with a unique switch-off mechanism.

In the project of endogenous viruses, we reported research results of following subject.

Endogenous viral elements (EVEs) are heritable virus-derived sequences present in the eukaryotic genomes. We previously discovered that EVEs derived from bornaviruses, RNA viruses, are present in genomes of a wide range of mammals and named them endogenous bornavirus-like elements (EBLs). To understand the biological significance of EBLs, we have been focusing on EBLs encoding functional proteins in the hosts. To do so, we screened EBLs by a combination of molecular evolutionary and molecular biological analyses, strongly suggesting that an EBLN derived from an N gene of an ancient bornavirus in miniopterid bats (miEBLN-1) encodes a functional protein in the bats. miEBLN-1 was integrated into the ancestral bat genome more than 12 million years ago and its deduced amino acid sequence showed approximately 44% identity to those of modern bornaviruses. We observed that miEBLN-1 is expressed as protein in several tissues of a miniopterid bat. Because the bornaviral N gene encodes nucleoprotein that encapsidates viral genomic RNA, we analyzed the RNA-binding activity of miEBLN-1, revealing that miEBLN-1 protein binds to RNA both in vitro and in vivo. Although the detailed function of miEBLN-1 remains unclear, our findings could provide a proof-of-concept that mammals can capture genes from RNA viruses and utilized their original properties for cellular physiological functions.

### **List of Publications**

Kojima S, Sato R, Yanai M, Komatsu Y, Horie M, Igarashi M, Tomonaga K. (2019). Splicing-Dependent Subcellular Targeting of Borna Disease Virus Nucleoprotein Isoforms. **J Virol.** 93 (5): e01621-18.

Tomonaga K, Suzuki N, Berkhout B. Integration of viral sequences into eukaryotic host genomes: legacy of ancient infections". (2019). **Virus Res.** 262:1.

Horie M, Tomonaga K. (2019). Paleovirology of bornaviruses: What can be learned from molecular fossils of bornaviruses. **Virus Res.** 262:2-9.

Horie M. (2019). Parrot bornavirus infection: correlation with neurological signs and feather picking? **Vet Rec.** 184 (15):473-475.

Komatsu Y, Takeuchi D, Tokunaga T, Sakurai H, Makino A, Honda T, Ikeda Y, Tomonaga K. (2019). RNA

Virus-Based Episomal Vector with a Fail-Safe Switch Facilitating Efficient Genetic Modification and Differentiation of iPSCs. **Mol Ther Methods Clin Dev.** 14:47-55.

Kawaguchi H, Horie M, Onoue K, Noguchi M, Akioka K, Masatani T, Miura N, Ozawa M, Tanimoto A. (2019). Development of a Model of Porcine Epidemic Diarrhea in Microminipigs. **Vet Pathol.** 56 (5):711-714.

Yamamoto Y, Tomonaga K, Honda T. (2019). Development of an RNA Virus-Based Episomal Vector Capable of Switching Transgene Expression. **Front Microbiol.** 10:2485.

Mukai Y, Tomita Y, Kryukov K, Nakagawa S, Ozawa M, Matsui T, Tomonaga K, Imanishi T, Kawaoka Y, Watanabe T, Horie M. (2019). Identification of a distinct lineage of aviadenovirus from crane feces. **Virus Genes.** 55 (6):815-824.

Watanabe T, Suzuki N, Tomonaga K, Sawa H, Matsuura Y, Kawaguchi Y, Takahashi H, Nagasaki K, Kawaoka Y. (2019). Neo-virology: The raison d'etre of viruses. **Virus Res.** 274:197751.

Hirai Y, Domae E, Yoshikawa Y, Okamura H, Makino A, Tomonaga K. (2019). Intracellular dynamics of actin affects Borna disease virus replication in the nucleus. **Virus Res.** 263:179-183.

Komorizono R, Tomonaga K, Makino A. (2020). Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of parrot bornavirus 4. **J Virol Methods.** 275:113749.

Yanai M, Kojima S, Sakai M, Komorizono R, Tomonaga K, Makino A. (2020). ADAR2 is involved in self and nonself recognition of Borna disease virus genomic RNA in the nucleus. **J Virol.** 94 (6):e01513-19.

Horie M. (2020). Interactions among eukaryotes, retrotransposons and riboviruses: endogenous riboviral elements in eukaryotic genomes. **Genes Genet Syst.** 94 (6):253-267.

### List of Presentations

Madoka Sakai, Ryo Komorizono, Yumiko Komatsu, Akiko Makino, Keizo Tomonaga. The consequence of restricted glycoprotein expression for Borna disease virus. JSPS Core-to-Core the 2nd symposium on Virus Infection and Host Response, London, UK, March 6-7, 2019.

Ryo Komorizono, Yuki Kubo, Akiko Makino, Shingo Iwami, Keizo Tomonaga. Survival of the fittest strategy achieves genetic homeostasis of borna disease virus. JSPS Core-to-Core the 2nd symposium on Virus Infection and Host Response, London, UK, March 6-7, 2019.

Yahiro Mukai, Masayuki Horie, Yuki Kobayashi, Shohei Kojima, Ken Maeda, Keizo Tomonaga. Functional analysis of an RNA-binding protein encoded by a bornavirus-derived gene in miniopterid bats. JSPS Core-to-Core the 2nd symposium on Virus Infection and Host Response, London, UK, March 6-7, 2019.

Mako Yanai, Ryo Komorizono, Shohei Kojima, Masayuki Horie, Akiko Makino, Keizo Tomonaga. ADAR2 is involved in Borna disease virus infection through suppression of inflammatory response genes. JSPS

Core-to-Core the 2nd symposium on Virus Infection and Host Response, London, UK, March 6-7, 2019.

Junna Kawasaki, Shohei Kojima, Yahiro Mukai, Dong-Yun Kim, Keizo Tomonaga, Masayuki Horie.

Comprehensive identification of endogenous bornavirus-like elements reshaped the long-term evolutionary history of bornaviruses. The 3rd Korea-Japan International Symposium for Transposable Elements, Busan, Korea, May 13, 2019.

Takehiro Kanda, Masayuki Horie, Yumiko Komatsu, Madoka Sakai, Keizo Tomonaga. Nucleoprotein and phosphoprotein of Borna disease virus 2 increase the rescue efficiency of recombinant Borna disease virus 1. 38th Annual Meeting American Society for Virology, Minnesota, USA, July 20-24, 2019.

Yumiko Komatsu, Chiaki Tanaka, and Keizo Tomonaga. In vivo evaluation of replication competent and defective RNA-virus based Episomal vector system. ESGCT 27th annual congress, Barcelona, Spain, October 22-25, 2019.

向井八尋, 堀江真行, 小林由紀, 小嶋将平, 前田健, 朝長啓造. ユビナガコウモリゲノム内在性ボルナウイルス様Nエレメントは宿主のmRNAに結合するRNA結合タンパク質をコードする. The 8<sup>th</sup> Negative Strand Virus-Japan Symposium, 沖縄, 2019年1月20-22日

平井悠哉, 朝長啓造. ボルナ病ウイルスのRNPの機能発現におけるRNAヘリカーゼの機能解析. The 8<sup>th</sup> Negative Strand Virus-Japan Symposium, 沖縄, 2019年1月20-22日

神田雄大, 堀江真行, 小松弓子, 朝長啓造. ボルナ病ウイルスのゲノム末端配列と転写複製効率の評価. The 8<sup>th</sup> Negative Strand Virus-Japan Symposium, 沖縄, 2019年1月20-22日

堀江真行. 現代と古代のRNAウイルスの多様性を探る. 第66回日本生態学会大会, 兵庫, 2019年3月15-19日

Sumio Minamiyama, Madoka Sakai, Yuko Yamaguchi, Ryota Hikiami. A novel cell transplantation therapy for familial ALS using oligodendrocyte precursor cells expressing scFv recognizing misfolded SOD1. 第60回日本神経学会学術大会, 大阪, 2019年5月22-25日

Ryo Komorizono, Yuki Kubo, Akiko Makino, Shingo Iwami, Keizo Tomonaga. Intra-host diversity of borna disease virus. 第16回ウイルス学キャンプ in 湯河原, 静岡, 2019年5月28-29日

神田雄大, 堀江真行, 小松弓子, 朝長啓造. ボルナ病ウイルスのゲノム末端配列がウイルスRNAの複製に与える影響. 第16回ウイルス学キャンプ in 湯河原, 静岡, 2019年5月28-29日

Madoka Sakai, Ryo Komorizono, Yumiko Komatsu, Akiko Makino, Keizo Tomonaga. Enhancement of transduction efficiency of bornaviral vector by the modification of viral envelope glycoprotein. 第25回日本遺伝子細胞治療学会学術集会, 東京, 2019年7月21-23日

小松弓子, 朝長啓造. RNA virus-based episomal vector system and its applications in gene and cell therapy. 第25回日本遺伝子細胞治療学会学術集会, 東京, 2019年7月21-23日

朝長啓造. 希少ウイルスを研究する. ラブラボ2019, 東京, 2019年7月29日

堀江真行 . 現代と古代の RNA ウィルスの多様性 . 日本進化学会第 21 回大会 , 北海道 , 2019 年 8 月 7-10 日

朝長啓造 . ボルナウィルスと関連感染症研究の展開 . 第 4 回小動物ウィルス病研究会学術集会 , 大阪 , 2019 年 8 月 25 日

堀江真行 . 「データの再利用」によるウィルス様配列の網羅的探索 . 第 162 回日本獣医学会学術集会 , 茨城 , 2019 年 9 月 10-12 日

堀江真行 . 非モデル動物における内在性ボルナウィルス様配列の生物学的意義の解明を目指して . 第 3 回進化学セミナー , 静岡 , 2019 年 8 月 3-5 日

朝長啓造 . Evolutionarily Acquired Functions of Endogenous RNA Viral Elements in Mammals. 第 67 回日本ウイルス学会学術集会 , 東京 , 2019 年 10 月 29-31 日

Masayuki Horie, Junna Kawasaki, Shohei Kojima, Keizo Tomonaga. Comprehensive identification of RNA virus-like sequences in publicly available transcriptome data from aves. 第 67 回日本ウイルス学会学術集会 , 東京 , 2019 年 10 月 29-31 日

Takehiro Kanda, Masayuki Horie, Yumiko Komatsu, Keizo Tomonaga. Effect of Borna disease virus genome terminal sequences on viral replication and transcription. 第 67 回日本ウイルス学会学術集会 , 東京 , 2019 年 10 月 29-31 日

Junna Kawasaki, Shohei Kojima, Yahiro Mukai, Keizo Tomonaga, Masayuki Horie. Systematic analysis of endogenous bornavirus-like elements to track the long-term evolutionary history of bornaviruses. 第 67 回日本ウイルス学会学術集会 , 東京 , 2019 年 10 月 29-31 日

Akiko Makino, Chiaki Tanaka, Keizo Tomonaga. Pathogenicity of variegated squirrel bornavirus. 第 67 回日本ウイルス学会学術集会 , 東京 , 2019 年 10 月 29-31 日

Yuto Watanabe, Akiko Makino, Ryo Komorizono, Madoka Sakai, Mako Yanai, Reiko Soga, Junichi Kamiie, Chinatsu Fujiwara, Naoyuki Aihara, Keizo Tomonaga. Outbreak of avian bornaviruses in pet bird breeding facilities in Japan. 第 67 回日本ウイルス学会学術集会 , 東京 , 2019 年 10 月 29-31 日

Madoka Sakai, Ryo Komorizono, Mako Yanai, Yumiko Komatsu, Akiko Makino, Keizo Tomonaga. Role of envelope glycoprotein in particle assembly of Borna disease virus. 第 67 回日本ウイルス学会学術集会 , 東京 , 2019 年 10 月 29-31 日

Hsien-Hen Lin, Yahiro Mukai, Junna Kawasaki, Keizo Tomonaga, Masayuki Horie. Transcriptional Profiling of Cell Lines and Tissues from Bats of Genus Eptesicus. 第 67 回日本ウイルス学会学術集会 , 東京 , 2019 年 10 月 29-31 日

Ryo Komorizono, Kan Fujino, Masayuki Horie, Susanne Kessler, Solveig Runge, Takehiro Kanda, Akiko Makino, Dennis Rubbenstroth, Keizo Tomonaga. Establishment of a plasmid-based reverse genetics system for parrot bornavirus 4. 第 67 回日本ウイルス学会学術集会 , 東京 , 2019 年 10 月 29-31 日

向井八尋, 堀江真行, 小林由紀, 小嶋将平, 前田健, 朝長啓造. Endogenous bornavirus-like N element in miniopterid bat genome encodes a potentially multifunctional RNA-binding protein. 第 67 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2019 年 10 月 29-31 日

小嶋将平, 吉川剛平, 伊東潤平, 中川草, 堀江真行, 川野秀一, 朝長啓造. 機械学習を用いた内在性ウイルス様配列の新規検索手法の開発. 第 67 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2019 年 10 月 29-31 日

Mako Yanai, Shohei Kojima, Madoka Sakai, Ryo Komorizono, Akiko Makino, Keizo Tomonaga. BoDV utilizes ADAR2 for evasion of innate immune response. 第 67 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2019 年 10 月 29-31 日

Bea Clarise B. Garcia, Masayuki Horie, Shohei Kojima, Keizo Tomonaga. Ribosomal methyltransferase BUD23-TRMT112 is involved in the host chromosomal attachment of Borna disease virus 1. 第 67 回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2019 年 10 月 29-31 日

川崎純菜, 小嶋将平, 向井八尋, 朝長啓造, 堀江真行. 内在性ボルナウイルス様配列の網羅的同定: 真核生物とボルナウイルスの共進化過程の追跡. 第 42 回日本分子生物学会年会, 福岡, 2019 年 12 月 3-6 日

堀江真行. 現代と古代の RNA ウィルスの多様性の解明へ向けて. 第 42 回日本分子生物学会年会, 福岡, 2019 年 12 月 3-6 日

向井八尋, 堀江真行, 小林由紀, 小嶋将平, 前田健, 朝長啓造. ユビナガコウモリゲノムに内在するボルナウイルス由来遺伝子は多機能 RNA 結合タンパク質をコードする. 第 42 回日本分子生物学会年会, 福岡, 2019 年 12 月 3-6 日

Madoka Sakai, Ryo Komorizono, Mako Yanai, Yumiko Komatsu, Akiko Makino, Keizo Tomonaga. Cleavage of viral membrane glycoprotein enhances transduction efficiency of RNA virus-based episomal vector. 第 42 回日本分子生物学会年会, 福岡, 2019 年 12 月 3-6 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
助 教	村本裕紀子	Assist. Prof.	Yukiko Muramoto

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。2019年は、インフルエンザウイルスのゲノムパッケージング機構の解明を目的として、H1N1亜型のインフルエンザウイルスのゲノム分節間相互作用の解析を行った。また、インフルエンザウイルスの増殖を抑制することで知られている欠損干渉ウイルスの一つである244DIウイルスについて、そのクローン培養系を確立した。

#### 1) インフルエンザウイルスのゲノム分節間相互作用の解析

インフルエンザウイルスは8分節化したマイナス一本鎖のゲノムRNA(vRNA)をもつ。それぞれのvRNAは両末端に存在する非翻訳領域と、それに挟まれた翻訳領域で構成されている。また、vRNAの両末端の非翻訳領域から翻訳領域にかけての領域には分節間で異なるパッケージングシグナル配列が存在し、この配列がvRNAのウイルス粒子への取り込みに必須であることが知られている。ウイルス出芽過程においては、一つの子孫ウイルス粒子に8種類の異なるvRNAが選択的に取り込まれる選択的ゲノムパッケージングが行われていることも明らかになっている。一方、近年の研究では、vRNA間の相互作用が選択的ゲノムパッケージングに関与していることが報告されている。しかし、ゲノムパッケージングに重要であるパッケージングシグナル配列がvRNA間相互作用にどのように関与しているのかは未解明のままである。本研究では、ヒトで流行しているH1N1亜型の実験室株(A/WSN/1933)の全長およびパッケージングシグナル領域のvRNAをin vitro合成し、ゲルシフトアッセイを用いてin vitro環境下におけるvRNA間相互作用の解析を行った。8種類のvRNA間の組み合わせ全28ペアのうち、15ペアでvRNA間相互作用が認められた。これらのうち、13ペアで3'末端もしくは5'末端パッケージングシグナル領域を介したRNA間相互作用が存在することが明らかとなった。興味深いことに8種類のvRNAはいずれも複数のvRNAと相互作用していた。また、3'末端と5'末端のパッケージングシグナル領域でそれが異なるvRNAと相互作用する例も認められた。この結果は、3'末端と5'末端のパッケージングシグナルがそれぞれ異なるvRNAと相互作用することで、8種類のvRNAが集合した超複合体を形成する可能性を示している。

## 2) 欠損干渉インフルエンザウイルスのクローン培養系の確立

欠損干渉 (defective interfering; DI) ウィルスは、ウィルス粒子に取り込まれるために必要なパッケージングシグナルを保持したまま、ウィルス蛋白質翻訳領域の一部を欠失した DI ウィルスゲノムを有するウィルスである。インフルエンザウイルスで最も解析が進んでいる DI ウィルスの一つである 244DI ウィルスは、共感染した感染性インフルエンザウイルスの増殖を抑制することが知られている。244DI ウィルスは、ウィルスポリメラーゼ蛋白質 PB2 を発現できなかったため、従来の手法では 244DI ウィルスを調製する際に野生型のヘルパーウイルスを混合させる必要があった。しかしこの方法では、ヘルパーウイルスが残存するリスクがあり、治療薬や予防薬として利用できない。そこで本研究ではこの欠点を克服するため、PB2 発現細胞を用いて DI ウィルスをクローン培養する手法を確立することを目的とした。PB2 蛋白質部分欠損体の発現を防ぐ変異を加えた 244DI ウィルスをリバースジェネティクス法で作出し、PB2 蛋白質を恒常に発現する AX4/PB2 細胞に感染させたところ、十分なウイルス力値の DI ウィルスをクローン培養することができた。得られた DI ウィルスを野生型 WSN ウィルスと共に感染させたところ、DI ウィルス量依存的に野生型 WSN ウィルスの増殖を抑制した。この成果から、DI ウィルスによるインフルエンザウイルスの増殖抑制のメカニズムの解明や、DI ウィルスの抗ウイルス薬への応用が期待される。

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 2019, we analyzed vRNA–vRNA interactions in the H1N1 influenza A virus genome in order to elucidate the mechanism for genome packaging of the virus. We also generated a purely clonal defective interfering influenza virus, 244 DI virus, which has a potential for antiviral therapy by interfering with the replication of infectious virus.

## 1) *In vitro* vRNA–vRNA interactions in the H1N1 influenza A virus genome

The genome of influenza A virus consists of eight-segmented, single-stranded, negative-sense viral RNAs (vRNAs). Each vRNA contains a central coding region that is flanked by noncoding regions. It has been shown that upon virion formation, the eight vRNAs are selectively packaged into progeny virions through segment-specific packaging signals that are located in both the terminal coding regions and adjacent noncoding regions of each vRNA. Although recent studies using next generation sequencing suggest that multiple inter-segment interactions are involved in genome packaging, contributions of the packaging signals to the inter-segment interactions are not fully understood. Herein, using synthesized full-length vRNAs of H1N1 WSN virus and truncated vRNAs containing the packaging signal sequences, we performed *in vitro* RNA binding assays and identified 15 inter-segment interactions among eight vRNAs, most of which were mediated by the 3'- and 5'-terminal regions. Interestingly, all eight vRNAs interacted with multiple other vRNAs, in that some bound to different vRNAs through their respective 3'- and 5'-terminal regions. These

findings *in vitro* would be of use in future studies of *in vivo* vRNA-vRNA interactions during selective genome packaging.

## 2) Generation of a purely clonal defective interfering influenza virus

A defective interfering (DI) influenza virus carries a large deletion in a viral gene segment and shows potential for antiviral therapy by interfering with the replication of infectious virus. However, because a DI virus cannot replicate autonomously without the aid of an infectious helper virus, clonal DI virus stocks without contamination of the helper virus have not been generated. To overcome this problem, we generated a clonal DI virus with a PB2 DI gene by reverse genetics, amplified the clonal DI virus using a cell line stably expressing the PB2 protein, and confirmed its ability to interfere with infectious virus replication *in vitro*. Thus, our approach is suitable for obtaining purely clonal DI viruses, will contribute to the understanding of DI virus interference mechanisms, and can be used for the development of DI virus-based antivirals.

## List of Publications

- Takizawa, N., Ogura, Y., Fujita, Y., Noda, T., Shigematsu, H., Hayashi, T., Kurokawa, K. (2019) Local structural changes of the influenza A virus ribonucleoprotein complex by single mutations in the specific residues involved in efficient genome packaging. **Virology** 531, 126-140.
- Yamagata, Y., Muramoto, Y., Miyamoto, S., Shindo, K., Nakano, M., Noda, T. (2019) Generation of a purely clonal defective interfering influenza virus. **Microbiol. and Immunol.** 63, 164-171.
- Yamasoba, D., Sato, K., Ichinose, T., Imamura, T., Koepke, L., Joas, S., Reith, E., Hotter, D., Misawa, N., Akaki, K., Uehata, T., Mino, T., Miyamoto, S., Noda, T., Yamashita, A., Standley, D.M., Kirchhoff, F., Sauter, D., Koyanagi, Y., Takeuchi, O. (2019) N4BP1 restricts HIV-1 and its inactivation by MALT1 promotes viral reactivation. **Nat. Microbiol.** 4, 1532-1544.
- Takamatsu, Y., Kajikawa, J., Muramoto, Y., Nakano, M., Noda, T. (2019) Microtubule-dependent transport of arenavirus matrix protein demonstrated using live-cell imaging microscopy. **Microscopy (Oxf)** 68, 450-456.
- Kuwahara, T., Yamayoshi, S., Noda, T., Kawaoka, Y. (2019) G Protein Pathway Suppressor 1 Promotes Influenza Virus Polymerase Activity by Activating the NF- $\kappa$ B Signaling Pathway. **mBio** 10, e02867-19.
- Takamatsu Y, Dolnik O, Noda T, Becker S. (2019) A live-cell imaging system for visualizing the transport of Marburg virus nucleocapsid-like structures. **Virol J.** 16, 159.
- Miyamoto, S., Noda, T. (2019) In vitro vRNA–vRNA interactions in the H1N1 influenza A virus genome. **Microbiol. and Immunol.** <https://doi.org/10.1111/mim.12766>.

## List of presentations

Takeshi Noda. Formation and packaging of influenza virus ribonucleoprotein complexes. Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) Core-to-Core program The 2nd Symposium on Virus Infection and Host Response (INFECTION + IMMUNITY) × EVOLUTION, London, UK, March 6-7, 2019 (招待講演)

Takeshi Noda. Intracellular replication of influenza A viruses. Frontiers in Cellular, Viral and Molecular Microscopy with Cryo-specimen preparation techniques. Bristol, UK, September 14-17, 2019 (招待講演)

Takeshi Noda. Intracellular replication of influenza A viruses. 第 26 回東アジアシンポジウム、ソウル、韓国、2019 年 10 月 24-25 日 (招待講演)

Yuki Takamatsu, Larissa Kolesnikova, Takeshi Noda, Stephan Becker. Visualizing highly pathogenic viruses life cycle. NEUBIAS: Network of BioImage Analysts Luxembourg, February 2-8, 2019

Masahiro Nakano, Keiko Shindo, Yukihiko Sugita, Yukiko Muramoto, Yoshihiro Kawaoka, Matthias Wolf, Takeshi Noda. Ultrastructure of the influenza virus ribonucleoprotein complexes producing viral RNAs. Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) Core-to-Core program The 2nd Symposium on Virus Infection and Host Response (INFECTION + IMMUNITY) × EVOLUTION, London, UK, March 6-7, 2019

Junichi Kajikawa, Yukiko Muramoto, Ai Hirabayashi, Shuzo Urata, Shangfan Hu, Kazuya Houri, Jiro Yasuda, Masahiro Nakano, Thomas Strecker, Takeshi Noda. Mammarenavirus matrix proteins induce intracellular membrane rearrangements. Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) Core-to-Core program The 2nd Symposium on Virus Infection and Host Response (INFECTION + IMMUNITY) × EVOLUTION London, UK, March 6-7, 2019

Sho Miyamoto, Yukiko Muramoto, Keiko Shindo, Yoko Fujita, Ryoma Tamura, Jamie L Gilmore, Masahiro Nakano, Takeshi Noda. vRNA-vRNA interactions in influenza A virus HA vRNA packaging. OPTIONS X for the control of INFLUENZA, Suntec, Singapore, August 28-September 1, 2019

Yutaro Yamagata, Yukiko Muramoto, Sho Miyamoto, Keiko Shindo, Masahiro Nakano, Takeshi Noda. Generation of a purely clonal DI virus. OPTIONS X for the control of INFLUENZA, Suntec, Singapore, August 28-September 1, 2019

Yoko Fujita, Yukihiko Sugita, Masahiro Nakano, Yukiko Muramoto, Takeshi Noda. Structural analysis of Marburg virus nucleoprotein-RNA complex core. Frontiers in Cellular, Viral and Molecular Microscopy with Cryo-specimen preparation techniques, Bristol, UK, September 14-17, 2019

野田岳志 インフルエンザウイルスの RNP 複合体形成機構 第 33 回インフルエンザ研究者交流の会、京都、2019 年 6 月 7-8 日 (招待講演)

野田岳志 インフルエンザウイルスのゲノムパッケージ機構 日本パストール財団セミナー「ウイ

ルスの構造と機能」、東京、2019年5月28-29日（招待講演）

Yukihiko Sugita, Hideyuki Matsunami, Yoshihiro Kawaoka, Takeshi Noda, Matthias Wolf. Cryo-EM structure of the Ebola virus nucleocapsid core. 日本顕微鏡学会第75回学術講演会、名古屋、2019年6月16-19日（招待講演）

Yukihiko Sugita, Hideyuki Matsunami, Yoshihiro Kawaoka, Takeshi Noda, Matthias Wolf. Cryo-EM structure of the Ebola virus nucleocapsid core. 第19回日本蛋白質科学会年会・第71回日本細胞生物学大会合同年次大会、神戸、2019年6月25日（招待講演）

野田岳志 インフルエンザウイルス増殖機構のイメージング 第162回日本獣医学会学術集会、筑波、2019年9月10-12日（招待講演）

杉田征彦、松波秀行、河岡義裕、野田岳志、Matthias Wolf クライオ電子顕微鏡法を用いたエボラウイルス・核タンパク質 - RNA 複合体の構造解析 第92回日本生化学会大会、横浜、2019年9月28日（招待講演）

Yukihiko Sugita, Hideyuki Matsunami, Yoshihiro Kawaoka, Takeshi Noda, Matthias Wolf. Structure of the Ebola virus core by single-particle cryo-EM. International Symposium on Diffraction Structural Biology 2019, Osaka, Japan, October 19, 2019（招待講演）

野田岳志 インフルエンザウイルスの核内複製機構 The 42nd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Fukuoka, Japan, December 3-6, 2019（招待講演）

高松由基、Stephan Becker、野田岳志 エボラウイルスヌクレオカプシドの細胞内輸送における転写因子VP30の役割 8th Negative Strand Virus-Japan Symposium、沖縄、2019年1月23-25日

宮本翔 インフルエンザウイルスNPの核小体移行とvRNP形成における重要性 8th Negative Strand Virus-Japan Symposium、沖縄、2019年1月23-25日

梶川純一 ラッサウイルスZタンパク質が誘導する細胞膜再構築機構の解析 8th Negative Strand Virus-Japan Symposium、沖縄、2019年1月23-25日

藤田陽子 NA分節欠損7分節インフルエンザウイルスの解析 8th Negative Strand Virus-Japan Symposium、沖縄、2019年1月23-25日

山形優太朗、宮本翔、村本裕紀子、中野雅博、野田岳志 インフルエンザウイルスM2の細胞質領域と相互作用する宿主因子の探索 8th Negative Strand Virus-Japan Symposium、沖縄、2019年1月23-25日

杉田征彦、松波秀行、河岡義裕、野田岳志、Matthias Wolf クライオ電子顕微鏡法で明らかになったエボラウイルスのコア構造 8th Negative Strand Virus-Japan Symposium、沖縄、2019年1月23-25日

宮本翔 インフルエンザウイルスのRNP形成機構の解析 第16回ウイルス学キャンプ in 湯河原、静岡、2019年5月28-29日

梶川純一、平林愛、宮本翔、高松由基、胡上帆、祝部和也、浦田秀造、安田二朗、Thomas Strecker、中野 雅博、村本 裕紀子、野田岳志 アレナウイルス感染における宿主細胞膜再構成の意義 第16回ウイルス学キャンプ in 湯河原、静岡、2019年5月28-29日

藤田陽子 7分節インフルエンザウイルスにおけるゲノムパッケージング機構の解析 第16回ウイルス学キャンプ in 湯河原、静岡、2019年5月28-29日

祝部和也 エボラウイルス NP-RNA複合体形成に関わるアミノ酸残基の同定 第16回ウイルス学キャンプ in 湯河原、静岡、2019年5月28-29日

山形優太朗、藤田陽子、宮本翔、中野雅博、村本裕紀子、野田岳志 PB2発現細胞を用いたDIインフルエンザウイルスのクローニング培養 第33回インフルエンザ研究者交流の会、京都、2019年6月7-8日

梶川純一 アレナウイルス感染における宿主細胞膜再構成と持続感染への関与 新学術領域「ネオウイルス学」第6回領域班会議、兵庫、2019年6月10-12日

平林愛、梶川純一、胡上帆、中野雅博、村本裕紀子、野田岳志 アレナウイルスの細胞内増殖機構の解析 日本顕微鏡学会第75回学術講演会、名古屋、2019年6月16-19日

藤田陽子、青山一弘、平林愛、光岡薰、野田岳志 クライオ電子線トモグラフィー法によるインフルエンザウイルス粒子形成機構の解明 日本顕微鏡学会第75回学術講演会、名古屋、2019年6月16-19日

Masahiro Nakano, Sho Miyamoto, Junichi Kajikawa, Yukiko Muramoto, Takeshi Noda. Identification of amino acid residues of influenza virus NS1 important for masking of double-stranded viral RNAs. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Tokyo, Japan, October 29-31, 2019

Sho Miyamoto, Masahiro Nakano, Takeshi Morikawa, Ryoma Tamura, Yoko Fujita, Ai Hirabayashi, Yukiko Muramoto, Takeshi Noda. Nucleolar localization of influenza virus nucleoprotein is essential for ribonucleoprotein complex formation. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Tokyo, Japan, October 29-31, 2019

Yuki Takamatsu, Ai Hirabayashi, Stephan Becker, Takeshi Noda. Functional region of Nucleoprotein in assembly and transport of Ebola virus nucleocapsid-like structure. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Tokyo, Japan, October 29-31, 2019

Junichi Kajikawa, Ai Hirabayashi, Sho Miyamoto, Yuki Takamatsu, Shangfan Hu, Kazuya Houri, Shuzo Urata, Jiro Yasuda, Thomas Strecker, Masahiro Nakano, Yukiko Muramoto, Takeshi Noda. Relevance of degradative organelles in Mammarenavirus-infected cells to persistent infection. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Tokyo, Japan, October 29-31, 2019

Kazuya Houri, Yoko Fujita, Yukihiko Sugita, Yukiko Muramoto, Shangfan Hu, Sho Miyamoto, Masahiro Nakano, Matthias Wolf, Takeshi Noda. Amino acid residues of Ebola virus nucleoprotein important for

formation of nucleoprotein-RNA complex and functional nucleocapsid. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Tokyo, Japan, October 29-31, 2019

Shangfan Hu, Junichi Kajikawa, Shuzo Urata, Jiro Yasuda, Masahiro Nakano, Yukiko Muramoto, Takeshi Noda. Analysis of Lymphocytic choriomeningitis virus replication in MDCK cells. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology, Tokyo, Japan, October 29-31, 2019

梶川純一、平林愛、宮本翔、高松由基、胡上帆、祝部和也、浦田秀造、安田二朗、Thomas Strecker、中野 雅博、村本 裕紀子、野田岳志 アレナウイルス感染における分解系オルガネラの亢進と持続感染への関与 新学術領域「ネオウイルス学」第7回領域班会議、兵庫、2019年6月10-12日

Masahiro Nakano, Sho Miyamoto, Junichi Kajikawa, Yukiko Muramoto, Takeshi Noda. Influenza A virus NS1 masks double-stranded RNA produced by viral ribonucleoprotein complex. The 42nd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Fukuoka, Japan, December 3-6, 2019

Sho Miyamoto, Masahiro Nakano, Takeshi Morikawa, Ryoma Tamura, Yoko Fujita, Ai Hirabayashi, Yukiko Muramoto, Takeshi Noda. Nucleolar localization of influenza virus nucleoprotein is essential for viral ribonucleoprotein complex formation. The 42nd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Fukuoka, Japan, December 3-6, 2019

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.

## 【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。これまでHCV複製機構の解析は、主として、自然界には存在しない、培養細胞への適応変異が導入されたHCV1bゲノムを用いて行われてきたが、近年、我々は、患者由来の野生型ゲノムを有するHCV1b培養細胞系を新たに構築した。このHCVゲノム複製実験系を用いてそのゲノム複製機構の解析を行ったところ、適応変異型に比較して野生型HCV1bは、直接複製複合体を標的としていない薬剤の感受性に大きな相違はなかったが、複製複合体を形成するHCVタンパク質を標的とした抗HCV薬に対する感受性が低かった。また、同一のHCV1bゲノムと培養細胞を用いた場合でも、一過性のHCVゲノム複製に比較して、恒常に細胞内で維持されているHCVゲノム複製は効率が高かったことから、野生型HCV1bのゲノム複製の維持には未知の宿主因子が存在する可能性が示唆された。

### 2) HBVに関する研究

我々は、HBV産生細胞やHBV感染細胞をNrf2活性化剤Bardoxolone methyl（BARD）で処理すると、細胞外へのHBV産生が有意に低下することを見出した。これまでの研究からBARDによる抗HBV効果はNrf2依存的なものと非依存的なものが存在することがわかった。また、BARD処理によって、HBVpgRNAを含む細胞内HBV RNA量が低下した。HBV pgRNA転写に関わるHBVゲノム上の転写プロモーターを用いたレポーターアッセイの結果からはBARDはこの転写を抑制することはなかった。一方、pgRNAの半減期の検討から、BARD処理によりpgRNAの分解が促進される可能性が示唆された。このことからNrf2がHBV制限因子であり、他にもBARDにより制御される宿主因子が存在する可能性が示唆された。

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) Analysis of genome replication of wild type HCV gt1b

We have established the genome replication system for wild type (WT) hepatitis C virus genotype 1b (HCV1b) although the present models for HCV genome replication have been made up for HCV genome that possesses adaptive mutation (AM) to cultured cells. Using this system, we observed that the WT HCV1b genome replicated with lower efficiency and showed lower sensitivity towards anti-HCV reagents against HCV replication machinery but not HCV genomic RNA than the AM genome. The efficiency of WT genome replication maintained in the cells was much higher than that of transiently transfected genome suggesting the presence of unknown cellular factor affecting the efficiency of WT HCV genome replication.

### 2) Finding bardoxolone methyl as a new anti-HBV reagent

We have observed that bardoxolone methyl (BARD), an activator of Nrf2, significantly suppressed the production of extracellular HBV DNA in several HBV culture systems. Therefore, the molecular mechanism of the anti-HBV effect was investigated in this study. We obtained the results suggesting that the anti-HBV effect of BARD was likely to be exerted both in the Nrf2-dependent and -independent manners. We also found that BARD treatment reduced the amounts of HBV RNAs including pregenomic RNA (pgRNA). HBV core promoter reporter assay demonstrated that BARD did not suppress the transcription of HBV pgRNA. By contrast, we obtained the results showing that one of the effects of BARD could be enhancing the HBV pgRNA degradation. These results suggest that Nrf2 would be a host restriction factor for HBV and that the unknown restriction factor affected by BARD would be present.

### List of Publications

- Takeuchi F., Ikeda S., Tsukamoto Y., Iwasawa Y., Qihao C., Otakaki Y., Ouda R., Yao W-L., Narita R., Hijikata M., Watashi K., Wakita T., Chayama K., Kogure A., Takeuchi K., Kato H., Fujita T. (2019) Screening for inhibitor of episomal DNA identified dicumarol as a hepatitis B virus inhibitor. **PLoS One**, 14 (2): e0212233. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212233>
- Hishiki T., Kato F., Nio Y., Watanabe S., Tan NWW., Yamane D., Miyazaki Y., Lin C-C., Suzuki R., Tajima S., Lim C-K., Saijo M., Hijikata M., Vasudevan S. G., Takasaki T. (2019) Stearoyl-CoA desaturase-1 is required for flavivirus RNA replication. **Antiviral Res.**, 165, <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.03.002>

Nio Y., Sasai M., Okamura H., Hasegawa H., Akahori Y., Oshima M., Watashi K., Wakita T., Ryo A., Tanaka Y., Hijikata M. (2019) Bardoxolone methyl as a novel potent antiviral agent against hepatitis B and C viruses in human hepatocyte cell culture systems. **Antiviral Res.**, 169, <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.104537>

Osawa M., Uchida T., Imamura M., Teraoka Y., Fujino H., Nakahara T., Ono A., Murakami E., Kawaoka T., Miki D., Tsuge M., Hiramatsu A., Abe-Chayama H., Hayes C.N., Makokha G.N., Aikata H., Ishida Y., Tateno C., Miyayama Y., Hijikata M. and Chayama K. (2019) Efficacy of glecaprevir and pibrentasvir treatment for genotype 1b hepatitis C virus drug resistance-associated variants in humanized mice. **J. Gen Virol.**, DOI: 10.1099/jgv.0.001268

Kato F., Yasunori Nio Y., Yagasaki K., Suzuki R., Hijikata M., Miura T., Miyazaki T., Tajima S., Lim C-K., Sajio M., Takasaki T. and Hishiki T. (2019) Identification of inhibitors of dengue viral replication using replicon cells expressing secretory luciferase. **Antiviral Res.**, 172, <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.104643>

### List of Presentations

Akahori Y., Sasai M., Okamura H., Oshima M., Watashi K., Wakita T., Tanaka Y., Nio Y., Hijikata M.: Bardoxolone Methyl suppresses the HBV replication by enhancement of HBV RNA degradation. 2019 International meeting on the molecular biology of hepatitis B viruses, Melborne, Australia, Oct 1-3, 2019

Osawa M., Imamura M., Uchida T., Teraoka Y., Fujino H., Nakahara T., Ono A., Murakami E., Kawaoka T., Miki D., Tsuge M., Hiramatsu A., Abe-Chayama H., Hayes C.N., Makokha G.N., Aikata H., Ishida Y., Tateno C., Y. Miyayama, Hijikata M. and Chayama K.: Efficacy of glecaprevir and pibrentasvir treatment for genotype 1b hepatitis C virus drug resistance-associated variants in humanized mice, 2019 The Liver meeting 2019 American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, November 8-11.

Akahori Y., Okamura H., Sasai M., Hasegawa H., Watashi K., Wakita T., Tanaka Y., Nio Y., Hijikata M. : Bardoxolone methyl suppresses the hepatitis B virus (HBV) replication via degradation of HBV pgRNA. 第67回日本ウイルス学会学術集会. 東京 2019年10月29-31日

Miyayama Y., Lee H., Song HJ., Chayama H., Miki D., Imamura M., Chayama K., Hijikata M. : Effect of anti-HCV drugs on wild type and cell culture adaptive mutant in th recombineant HCV1b. 第67回日本ウイルス学会学術集会. 東京 2019年10月29-31日

竹内文彦、池田宗太郎、塚本雄太、應田涼太、土方 誠、渡士幸一、脇田隆字、茶山一彰、木檜周、加藤博己、藤田尚志 : 変異型レンチルイスを用いたHBVエピソームDNA阻害剤の開発 第67回日本ウイルス学会学術集会. 東京 2019年10月29-31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、これまでに集積したリポペプチド提示サル MHC クラス 1 分子の基本情報をもとに、ヒトリポペプチド提示分子の同定を目指した研究を開拓し、顕著な進展があった。他方、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として同定した S100A9 に着目し、前年度に樹立した S100A9 ノックアウトマウスを活用した研究を開拓した。その結果、好中球によるマクロファージ極性化制御機構が明らかとなり、結核さらにはがんの病態形成への関与が示されつつある。

### 1) リポペプチド抗原提示を担うヒト MHC クラス 1 分子の同定と X 線結晶構造の解明

タンパク質の翻訳後修飾の一つである N 末端ミリスチン酸修飾は、タンパク質の機能発現に重要な役割を果たす。ウイルスタンパク質の中にもミリスチン酸修飾反応を受けることにより、ウイルスの病原性に深く関与した機能を發揮するものが存在する。一方、サルエイズモデルを活用した免疫解析から、このミリスチン酸修飾を受けたウイルスペプチド、すなわちリポペプチドを標的とした新しい T 細胞応答の存在が明らかとなった。さらに、リポペプチドを結合し、CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞へと提示する抗原提示分子として、古典的 MHC クラス 1 分子 (LP1 分子) が同定された (Nat Commun 2016, J Immunol 2019)。

リポペプチド免疫応答はアカゲザルにおいて発見され、基礎解析がなされてきた。一方、ヒトの LP1 分子が未同定であるため、ヒトにおけるリポペプチド免疫応答の存在や機能、病態的意義については依然として不明である。これまで同定されたサル LP1 分子群の高解像度 X 線結晶構造解析の結果から、その抗原結合部位の特徴として、ミリスチン酸を収納するための大きく、疎水性の高いポケット構造 (B ポケット) が存在することが明らかとなっていた。そこで、この B ポケット構造を規定するアミノ酸に着目し、in silico 解析をもとに 1 万種を超えるヒト MHC クラス 1 (HLA-I) の中からヒト LP1 候補分子の絞り込んだ。次いで、in vitro でのリポペプチド結合試験から、最終的に 3 種の HLA-I を候補分子として選抜した。さらに、このうちの 2 種については、HLA-I : リポペプチド複合体の結晶構造の解明に成功し、リポペプチド結合能を構造学的に実証した。どちらの HLA-I 分子についても、サル LP1 分子と同様、ミリスチン酸は大きく疎水性の高い B ポケットに収納されており、リポペプチド結合における B ポケット構造の重要性が示された (Fig. 1)。また、こ

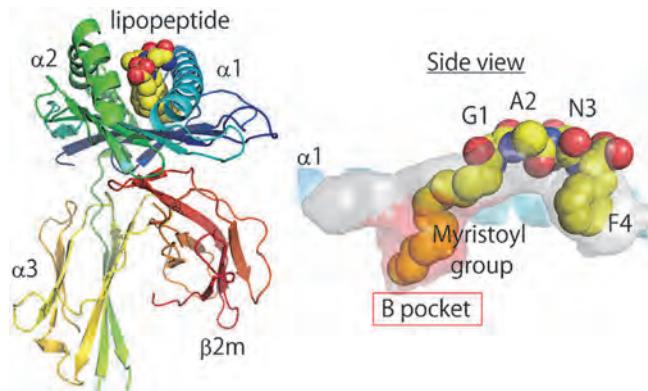
これらの分子のリポペプチド抗原提示能力の実証ならびにリポペプチド特異的T細胞応答の個体レベルでの検証を目的として、トランジェニックマウスモデルを樹立した。

## 2) 好中球 S100A9 によるマクロファージ極性化制御

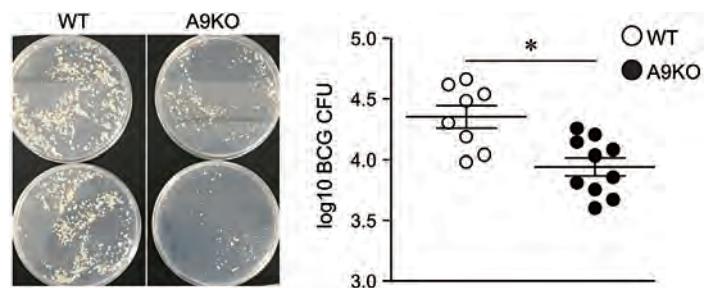
本分野で確立したモルモット結核モデルの解析から、結核肉芽腫深部には好中球が集積し、それが産生する S100A9 タンパク質が、活性化マクロファージの集合体である結核肉芽腫の形成と維持に重要な役割を果たしていることが明らかとなった (Blood Adv 2016)。そ

こで S100A9 によるマクロファージ機能制御機構の解明を目指し、前年度に樹立した S100A9 ノックアウトマウス (A9KO マウス) を活用した研究を展開した。ウシ結核菌ワクチン株である BCG をマウス腹腔内に投与し、数日後腹腔マクロファージの M1/M2 極性化を検証したところ、抗炎症性に働く M2 マクロファージの誘導が A9KO マウスにおいて顕著に障害されていた。また、BCG 投与後数時間以内にマクロファージに先立って腹腔に浸潤する好中球を単離し、ナイーブマウスから得た骨髄マクロファージとの共培養を行ったところ、野生型好中球でみられる M2 マクロファージ誘導能が A9KO 好中球では障害されていた。さらに、BCG 投与 1 週間後の腹腔内生菌数は、A9KO マウスにおいて有意な減少を認めた (Fig. 2)。以上の結果は、感染早期に浸潤した好中球が S100A9 を産生し、感染局所において抗炎症性の M2 マクロファージ応答が積極的に誘導されることにより、菌の長期生存を許容する環境が構築されることを示しており、好中球が結核の病態形成に深く関与することを強く示唆するものである。

一方、結核免疫とがん免疫の共通性に着目し、S100A9 シグナルにより誘導される M2 マクロファージ応答が結核肉芽腫だけでなくがん微小環境においても作動する可能性を想起して、担がんモデルの検証を行った。実際、B16F10 メラノーマ細胞のマウス皮下接種モデルでは、A9KO マウスにおけるがん細胞の肺転移率が野生型マウスに比べて減少することを見いだし、S100A9 が担がん個体におけるがん細胞の増殖や転移を制御する可能性が示された。



**Fig. 1. Structure of the lipopeptide-bound HLA class I heavy chain: beta-2 microglobulin complex (left panel). The myristoyl group of the ligand fits in with the B pocket of the antigen-binding groove (right panel).**



**Fig. 2. Intrapерitoneally challenged BCG microbes were controlled more efficiently in S100A9-deficient (A9KO) mice as compared with wild-type (WT) mice. (\*, P<0.01).**

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 2019, candidate molecules that were likely represent human lipopeptide-presenting molecules were identified, and their X-ray crystal structures were determined in a lipopeptide-bound form. We also addressed how lipid immunity may impact on tissue responses in tuberculosis and discovered a role of the neutrophil S100A9 protein in tuberculosis-associated granuloma formation. S100A9 knockout (A9KO) mice that we established in 2018 proved to be valuable for delineating cellular pathways in which neutrophils control macrophage M1/M2 polarization via S100A9 signaling. This novel principle has now been addressed in the context of not only tuberculosis pathology but also cancer biology.

### **1) Identification of human lipopeptide-presenting molecules**

N-myristylation occurs for some viral proteins to dictate their pathological function. On the other hand, host immunity appears to have evolved the ability to sense the lipid modification of viral proteins. By the use of a monkey AIDS model, we discovered that a group of classical MHC class I molecules captured N-myristoylated lipopeptides derived from the SIV Nef protein and present them to cytotoxic T-lymphocytes. Thus, these allomorphs, collectively termed LP1, represented a novel functional pool of MHC class I molecules with the ability to act as lipopeptide-presenting molecules (Nat Commun 2016, J Immunol 2019). However, it remains to be determined if human LP1 may exist.

Rhesus LP1 molecules contained exceptionally large and hydrophobic B-pockets to accommodate the myristoyl group of lipopeptide ligands. With the assumption that human LP1 molecules may also contain large B-pockets, we performed an extensive in silico analysis and selected eight candidates. Their potential to bind lipopeptides was assessed by ligand-induced protein refolding assays, ending up with the identification of three lipopeptide-binding HLA class I (HLA-I) allomorphs. Thus far, we have successfully determined the X-ray crystal structures of two HLA-I molecules complexed with lipopeptides. We have now established human LP1 transgenic mice, hoping to reconstruct human LP1-mediated immunity in mice.

### **2) Control of macrophage polarization by the neutrophil S100A9 protein**

By utilizing our guinea pig tuberculosis model, we have recently shown that the neutrophil-derived S100A9 protein is critical for the formation of granulomas, a globular collection of activated macrophages in which neutrophils and M2 macrophages are centrally located and closely associated. This led us to the speculation that neutrophils may control macrophage polarization via S100A9 signaling. Therefore, we generated S100A9 knockout (A9KO) mice and performed an intraperitoneal BCG challenge, known to induce neutrophil/macrophage responses in the peritoneal cavity. The total number of locally recruited macrophages was similar in wild-type (WT) and A9KO mice; however, the number of CD206-expressing M2 macrophages was significantly reduced in A9KO mice, which was associated with increased BCG survival in the peritoneal

cavity of these mice (Fig. 2). The ability of neutrophils and the S100A9 protein to induce M2-skewed macrophage polarization was further confirmed in an in vitro neutrophil/macrophage coculture system, in which neutrophils derived from the peritoneal cavity of BCG challenged A9KO mice were less efficient, as compared with WT neutrophils, in inducing bone marrow-derived macrophages to differentiate into M2. These observations highlight a novel role of neutrophils in dictating M2 macrophage differentiation. We predict that this may be of fundamental relevance not only to tuberculosis pathology but also to cancer development.

### List of Publications

Yamamoto, Y., Morita, D., Shima, Y., Midorikawa, A., Mizutani, T., Suzuki, J., Mori, N., Shiina, T., Inoko, H., Tanaka, Y., Mikami, B., and Sugita, M. (2019). Identification and structure of an MHC class I-encoded protein with the potential to present N-myristoylated 4-mer peptides to T cells. **J. Immunol.** 202, 3349-3358.

### List of Presentations

Asa, M., Morita, D., and Sugita, M. Identification of an array of molecular elements that are essential for the cell-surface expression of lipopeptide-presenting MHC class I molecules. The 17th International Student Seminar, Kyoto, March 6-7, 2019.

Kuroha, J., Morita, D., and Sugita, M. Identification and crystal structure of human lipopeptide-presenting MHC class I molecules. The 17th International Student Seminar, Kyoto, March 6-7, 2019.

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

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) 骨髓間葉系ストローマ細胞はアディポネクチンを発現し、アディポネクチンのプロモーター制御下のCre組換え酵素によって効率よく標的にされる

骨髄における造血は骨髄ストローマ細胞からなる微小環境によって支えられている。脂肪細胞から產生されるサイトカインであるアディポネクチンは抗糖尿病・抗動脈硬化作用を持つとともに、リンパ球の分化や増殖、機能を抑制することで抗炎症作用を及ぼす。アディポネクチンは骨髄のレプチニン受容体陽性ストローマ細胞と骨芽細胞で検出されているが、これはアディポネクチンのプロモーター制御下にCre遺伝子を発現するトランスジーン(Adipoq-Cre)が脂肪細胞を特異的に標的にするという従来の報告と矛盾している。したがって、骨髄ストローマ細胞がアディポネクチンを発現しているかどうかは未だ確定していない。そこで、この問題を明らかにするために、8週齢の野生型マウスの骨髄の各ストローマ細胞集団のアディポネクチンmRNA量を脂肪組織の脂肪細胞と比較した。その結果、PDGFR $\beta^+$ VCAM-1 $^+$ ストローマ細胞が脂肪細胞と比べて2倍の発現量を示したが、骨髄の血管内皮細胞、他のストローマ細胞、造血細胞では発現量が低かった。次に、骨髄におけるAdipoq-Creトランスジーンの標的特異性を調べるため、Adipoq-Cre; R26-tdTomatoレポーターマウスを解析した。その結果、8週齢ではPDGFR $\beta^+$ VCAM-1 $^+$ ストローマ細胞の94%と脂肪細胞がtdTomato陽性であるのに対し、血管内皮細胞、骨芽細胞を含む他のストローマ細胞では陽性率は10%に満たなかった。また、Adipoq-Creで標的にされるPDGFR $\beta^+$ VCAM-1 $^+$ ストローマ細胞とCre組み換え酵素を発現するPDGFR $\beta^+$ VCAM-1 $^+$ ストローマ細胞が同じ集団であったことから、PDGFR $\beta^+$ VCAM-1 $^+$ ストローマ細胞はアディポネクチン発現に関して均一な集団であることが分かった。さらに、8週齢のAdipoq-Cre; R26-tdTomato; CXCL12-GFPマウスを解析すると、CXCL12-abundant reticular(CAR)細胞のほとんどがAdipoq-Creで標的にされていた。次に、骨髄ストローマ細胞が骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞に分化する能力を有していることから、Adipoq-Creの標的

特異性の週齢による変化を解析した。その結果、4 週齢、24 週齢の Adipoq-Cre; R26-tdTomato マウスでは PDGFR $\beta^+$ VCAM-1 $^+$  ストローマ細胞のそれぞれ 84%、91%、骨芽細胞のそれぞれ 1%、21% が tdTomato 陽性であった。また、生後 0 日の骨髓では陽性細胞はほとんど検出できなかったが、生後 1 日目には陽性細胞の急激な増加が見られた。さらに、IL-7 産生細胞と Adipoq-Cre の標的細胞の関係を調べるために、8 週齢の Adipoq-Cre; R26-tdTomato; IL-7-GFP マウスを解析した。その結果、PDGFR $\beta^+$ VCAM-1 $^+$  ストローマ細胞の 57%、36% がそれぞれ tdTomato $^+$ GFP $^+$ 、tdTomato $^+$ GFP $^-$  であった。次に、Adipoq-Cre の標的細胞特異的に IL-7 を欠損させた Adipoq-Cre; IL-7-flox/flox マウスを解析すると、骨髓における B 細胞の分化が著しく障害された。以上の結果から、骨髓の PDGFR $\beta^+$ VCAM-1 $^+$  ストローマ細胞がアディポネクチンを発現し、Adipoq-Cre トランスジーンにより効率よく標的にされることが明らかとなった。

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 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) Mesenchymal stromal cells in bone marrow express adiponectin and are efficiently targeted by an adiponectin promoter-driven Cre transgene

Stromal cells in bone marrow (BM) constitute a specific microenvironment supporting development and maintenance of hematopoietic cells. Adiponectin is a cytokine secreted by adipocytes. Besides its anti-diabetic and anti-atherogenic roles, adiponectin reportedly regulates development and function of hematopoietic cells in BM. However, it remains unclear whether mesenchymal stromal cells in BM express adiponectin. Here, we show that PDGFR $\beta^+$ VCAM-1 $^+$  stromal cells express adiponectin. Lineage tracing revealed that a majority of PDGFR $\beta^+$ VCAM-1 $^+$  cells were targeted by an adiponectin promoter-driven Cre (Adipoq-Cre) transgene. Additionally, the Adipoq-Cre transgene targets a minority of osteoblasts at younger age but larger populations are targeted at older age. Furthermore, the Adipoq-Cre transgene targets almost all of CXCL12-abundant reticular (CAR) cells and that most of the stromal cells targeted by the Adipoq-Cre transgene are CAR cells. Finally, deletion of IL-7 by the Adipoq-Cre transgene resulted in severe impairment of B lymphopoiesis in BM. These results demonstrate that PDGFR $\beta^+$ VCAM-1 $^+$  stromal cells in BM express adiponectin and are targeted by the Adipoq-Cre transgene, suggesting broader specificity of Adipoq-Cre transgene.

### List of Publications

Rodríguez-Caparrós, A., García, V., Casal, Á, López-Ros, J., García-Mariscal, A., Tani-ichi, S., Ikuta, K., and

- Hernández-Munain, C. (2019). Notch signaling controls transcription via the recruitment of RUNX1 and MYB to enhancers during T cell development. *J. Immunol.* 202, 2460-2472.
- Mukohira, H., Hara, T., Abe, S., Tani-ichi, S., Sehara-Fujisawa, A., Nagasawa, T., Tobe, K., and Ikuta, K. (2019). Mesenchymal stromal cells in bone marrow express adiponectin and are efficiently targeted by an adiponectin promoter-driven Cre transgene. *Int. Immunol.* 31, 729-741.
- 榛葉旭恒、生田宏一 (2019). 概日リズムが制御する免疫応答の日内変動と炎症疾患 実験医学 37, 392-396.
- 榛葉旭恒、生田宏一 (2019). グルココルチコイドによる正負の免疫制御 生体の科学 70, 102-108.
- 榛葉旭恒、生田宏一 (2019). グルココルチコイドによる免疫応答の日内変動制御 感染・炎症・免疫 49, 64-65.

#### List of Presentations

- Asahi, T., Shimba, A., Cui, G., Abe, S., and Ikuta, K. Local IL-15 dependency of liver-resident ILC1. The 17th International Student Seminar. Kyoto, March 6, 2019.
- Takami, D., Abe, S., and Ikuta, K. Analysis on IL7- and IL15-producing microenvironment in the lung. The 17th International Student Seminar. Kyoto, March 6, 2019.
- Ejima, A., Okazaki, F., Shimba, A., and Ikuta, K. The effects of sex steroid hormones in the mouse model of asthma. The 17th International Student Seminar. Kyoto, March 6, 2019.
- 谷一靖江、生田宏一 制御性T細胞におけるIL-7レセプターの役割 Kyoto T Cell Conference 第29回学術集会、京都、2019年6月7日
- 阿部真也、原崇裕、崔広為、生田宏一 NK細胞の分化を支持するIL-15産生性骨髓微小環境の解明 Kyoto T Cell Conference 第29回学術集会、京都、2019年6月8日
- 生田宏一、榛葉旭恒 グルココルチコイドによるT細胞応答の概日制御 第42回日本分子生物学会年会、福岡、2019年12月3日
- 江島亜希、岡崎史恵、榛葉旭恒、生田宏一 気管支喘息においてアンドロゲンはTh2細胞分化を抑制することで症状を緩和する 第42回日本分子生物学会年会、福岡、2019年12月6日
- Shimba, A. and Ikuta, K. Control of immunity by glucocorticoids、第48回日本免疫学会学術集会、浜松、2019年12月12日
- Tani-ichi, S., Mukohira, H., Hara, T., and Ikuta, K. Function of IL-7R $\alpha$  in regulatory T cells、第48回日本免疫学会学術集会、浜松、2019年12月11日
- Abe, S., Ejima, A., Shimba, A., Mori, M., Cui, G., Asahi, T., Takami, D., Hara, T., Tani-ichi, S., and Ikuta, K. Estrogens suppress T cell production by a TEC-dependent mechanism、第48回日本免疫学会学術集

会、浜松、2019年12月11日

Ikuta, K., Cui, G., Abe, S., Asahi, T., and Hara, T. The cytokine-producing immune microenvironment for innate lymphocytes、第48回日本免疫学会学術集会、浜松、2019年12月13日

Takami, D., Abe, S., Shimba, A., Asahi, T., Zhu, Y., Ejima, A., Tani-ichi, S., Hara, T., Cui, G., and Ikuta, K. Role of local IL-7 in maintenance of ILC2s、第48回日本免疫学会学術集会、浜松、2019年12月13日

Cui, G. and Ikuta, K. Thymic IL-15 niche controls anti-tumor immunity by regulating a novel subset of iNKT cells、第48回日本免疫学会学術集会、浜松、2019年12月13日

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**

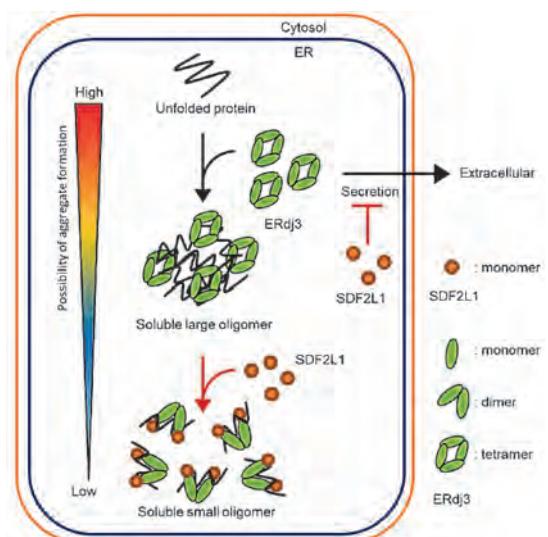
准教授	細川暢子	Assoc. Prof.	Nobuko Hosokawa
講師	平芳一法	Sr. Lect.	Kazunori Hirayoshi
助教	藤本真慈	Assist. Prof.	Shinji Fujimoto

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必要がある。小胞体には、BiP という代表的なシャペロンタンパク質が存在し、タンパク質品質管理の中心的役割を担っている。コシャペロンである ERdj3 は、BiP に基質タンパク質を受け渡したり、ATP 水解機能を促進したりすることによって BiP シャペロンサイクルを調節している。一方で最近になって、ERdj3 は分泌されて、細胞外でのタンパク質品質管理に関わることが報告されている。私たちは ERdj3 が SDF2 および SDF2L1 という小胞体タンパク質と強固な複合体を形成することを見つけた。今回私たちは、SDF2L1 が ERdj3 と複合体を形成することによって ERdj3 を細胞内に留めておき、小胞体内でシャペロンとして機能できるように保持していることを明らかにした。また、ERdj3-SDF2L1 複合体のシャペロン活性を、細胞内および精製したリコンビナントタンパク質を用いて検討し、ERdj3 単独の場合よりも ERdj3-SDF2L1 複合体の方が強いシャペロン活性を示すことを明らかにした。さらに、ERdj3 は 4 量体を形成するが、ERdj3-SDF2L1 複合体はそれぞれ ERdj3 および SDF2L1 各 2 分子からなるヘテロ 4 量体を形成することが示された。以上の結果から、巧妙なタンパク質品質管理機構の一端を明らかにすることができた (Fig. 1)。

引き続いて、小胞体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を行っている。



**Fig. 1. Model of the formation and function of the ERdj3-SDF2L1 complex.**

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。

### 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、ス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。このような様々な段階・反応が協調的に行われるしくみについて、ショウジョウバエ hsp70 遺伝子などの転写をモデルシステムとして、解明することを目的としている。我々は特にこの遺伝子の転写に関わる因子の一つである GAF に注目している。この因子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。そこで、この因子に対する RNA aptamer を用いて、一連の転写過程に関わる特定の因子間相互作用を阻害することで、GAF が転写のどのような過程にかかわり、またその過程がどの因子との相互作用によるものであるかを解明したいと考えている。これまでに GAF 特異的 RNA aptamer の選別に成功し、その機能を *in vitro* 転写系において解析したところ、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を明らかにした。GAF は転写伸長因子である FACT などと結合していることがわかっているが、今後はこれらと GAF との結合が aptamer によって阻害されうるか、解析することにより、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。これまで、合成ペプチド、native collagen を標的としたフィルター結合法による選別を行なってきたが、十分な進化的収斂が見られず、また RNA とコラーゲンとの結合解析が困難であることなどの理由から、現在は新たな選別に取り組んでいる。具体的には磁気ビーズにストレプトアビジンを介して結合させた合成ペプチドを標的とした選別を行なっている。これまで纖維性タンパク質に対する aptamer の選別は報告されていないことから、新たな標的因子に対応した選別に関する方法論的新規性も含めた研究として、今後も意欲的に取り組んでいきたい。



Fig. 2. Crustal W analysis of aptamers against collagen

3) 昨年に続き、発がんと正常なT細胞分化過程で低頻度ながらおきたT細胞レセプター $\beta$ 鎖遺伝子の非正統的なV(D)J組換えとの関連について解析をおこなっている（藤本G）。

### 12/23 ruleに反するように見えるT細胞レセプター $\beta$ 鎖遺伝子(*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。タグには2種類あり（12RSSと23RSS）、Vセグメントは3'側に23RSS、Jセグメントには5'側に12RSSが存在している。またDセグメントは5'側に12RSS、3'側に23RSSを有している。V(D)J組換えでは12RSSと23RSSを持つセグメント間で再構成がおこる（12/23 rule）。ところが、正常胸腺から23RSSを有するVとDの間の組換えを低頻度ではあるものの検出した。この構造は、以下のようにして生じたと考えられる。D1-J2.6再構成の際にまずJ2.6 coding end (CE)と23RSS (D1) signal end (SE)がつながる非正統的なhybrid joint (HJ)が1組生じた。次に、残った12RSS (J2.6)とペアリングできる23RSSを持つV14を改めてRAG complexに取り込み、正統的な組換え(signal joint (SJ)とcoding joint (CJ))をおこした（Fig. 3）。

発がん原因となる一部のonco geneの絡んだDNA再構成では、RSS様配列が認められるものの、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関しても、今回見出したのと同様の機構によって生じたのではないだろうか。

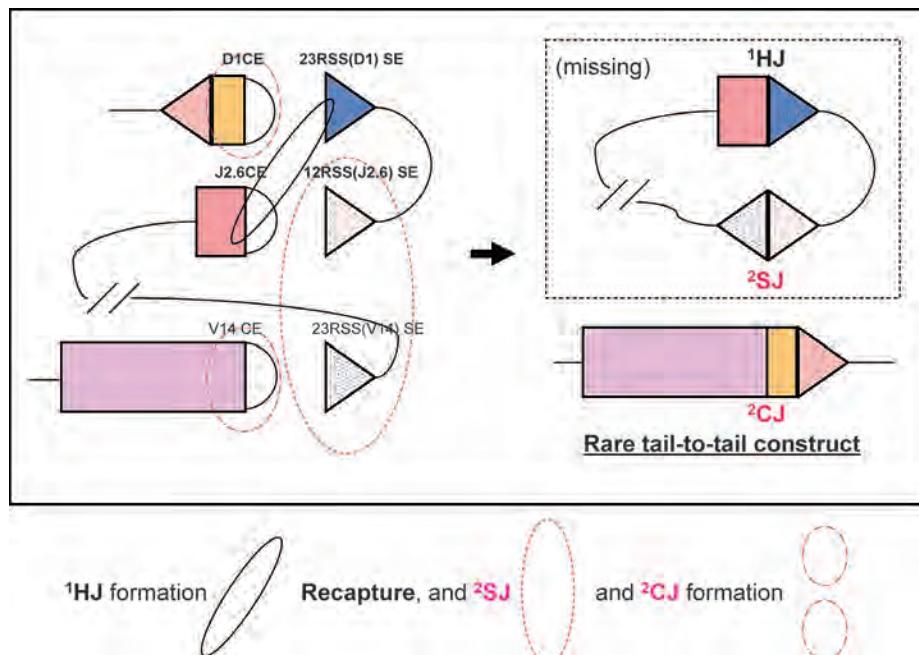


Fig. 3. Formation of an illegitimate tail-to-tail joint between D1 and V14.

This laboratory consists of three independent research groups.

### 1) Protein quality control mechanism (Hosokawa G)

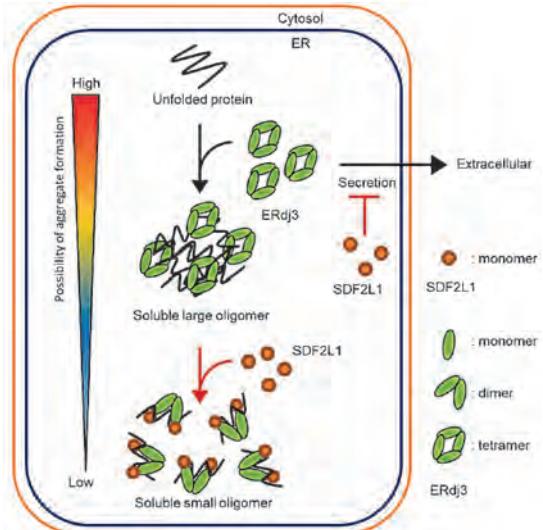
In the living organisms, newly synthesized proteins obtain their native conformations by the assistance of chaperone proteins and folding enzymes by a mechanism known as a protein quality control. BiP is the major chaperone protein in the ER (endoplasmic reticulum) that regulates the ER protein quality control. ERdj3 is a co-chaperone of BiP controlling the BiP chaperone cycle by transferring unfolded proteins to BiP and enhancing the ATPase activity of BiP. Recently, it is reported that ERdj3 is secreted to regulate the extracellular protein homeostasis. We have reported that SDF2 and its homologue SDF2L1 are ER resident proteins that make a stoichiometric complex with ERdj3. We now found that SDF2 and SDF2L1 retain ERdj3 in the ER. We have analyzed the chaperone activity of ERdj3 and ERdj3–SDF2L1 complex that inhibit protein aggregation in cells and *in vitro* using recombinant proteins. *In vitro* analyses revealed that the ERdj3 dimer incorporated two SDF2L1 molecules; otherwise, ERdj3 alone formed a homotetramer. The chaperone activities of the ERdj3–SDF2L1 complex were stronger than those of ERdj3 alone. Together, these findings suggest that, under normal conditions, ERdj3 functions as an ER chaperone in complex with SDF2/SDF2L1, but is secreted into the extracellular space when it cannot form this complex (Fig. 1).

We are also analyzing the function of molecules in the ER, intracellular transport mechanisms of collagens using live-cell imaging, and the function of the ERAD (ER-associated protein degradation) 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.

#### ① the investigation of eukaryotic gene expression mechanisms

The process that eukaryotic cells receive stimulus from outer world and respond to it to express several genes consists of several stages such as chromatin remodeling, the binding of transcription regulators, PIC formation, transcription initiation, and transcription elongation. Each stage is regulated by many factors and these cooperate with each other. Our research aim is to clarify how these factors interact with and regulate the function of other factors in the transcription apparatus. For this purpose, we use Drosophila hsp70 gene transcription as a model system and we focus on Drosophila GAF, which has been reported to involve in

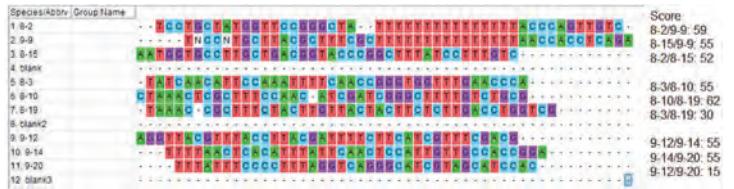


**Fig. 1. Model of the formation and function of the ERdj3–SDF2L1 complex.**

many stages of transcription. GAF specific RNA aptamer will give us an insight about the role of this factor in transcription and the molecular interactions in the protein complex essential for appropriate gene expressions. Until now, we succeeded in obtaining several kinds of domain-specific inhibitor. And we showed that 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. GAF has been reported to interact with several kinds of chromatin transcription factors such as FACT. So our next aim is to identify factors which interaction with GAF is inhibited by our aptamers. This 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 richest proteins in higher vertebrates. The fibril proteins have important roles e.g., the 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. When using synthetic polypeptide or native collagen as target molecules, he conventional selection procedures with nitrocellulose membrane didn't work well, so we are now trying to the new selection against target immobilized on the magnetic beads. The successful selection against fibril proteins has not been reported, so our research, the development of method to get aptamers specific for collagen as well as functional analyses of the protein, will be productive efforts.



**Fig. 2. Crustal W analysis of aptamers against collagen**

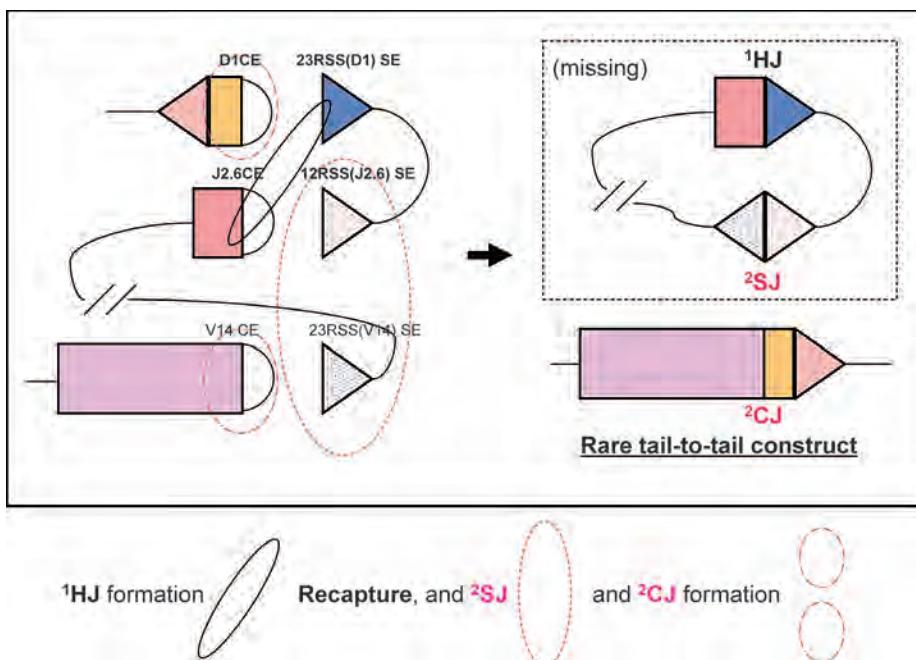
3) Analysis of illegitimate V(D)J recombination, which occurs at a very low frequency within T cell receptor  $\beta$  chain gene, during normal T cell development in relation to tumorigenicity (Fujimoto G).

## *Tcrb* V(D)J recombination which conflicts 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 is supposed to be impossible. However, we found a tail-to-tail joint from normal thymocytes, although at the very low frequency. This seemingly odd join can be explained as follows: 1. D1 to J2.6 recombination starts with non-canonical hybrid joint (HJ) between the 23RSS (D1) signal end (SE)

and the coding end (CE) of J2.6. 2. Then free 12RSS (J2.6) SE pairs all over again with 23RSS (V14). Finally 12RSS (J2.6) SE and 23RSS (V14) SE join (signal join; SJ), and D1 CE and V14 CE join (coding join; CJ), forming the tail-to-tail construct in chromosome (Fig. 3).

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. Formation of an illegitimate tail-to-tail joint between D1 and V14.**

#### List of Publications

Hanafusa K, Wada I, Hosokawa N.: SDF2-like protein 1 (SDF2L1) regulates the endoplasmic reticulum localization and chaperone activity of ERdj3 protein. *J. Biol. Chem.*: **294**, 19335-19348 (2019). doi: 10.1074/jbc.RA119.009603

Hosokawa N.: *In vitro* Mannosidase Assay of EDEMs: ER Degradation-Enhancing  $\alpha$ -Mannosidase-Like Proteins. In “Lectin Purification and Analysis: Methods and Protocols” (Ed. J. Hirabayashi) Springer (2020) ISBN 978-1-07-160429-8

#### List of Presentations

平田幸大、松井優人、和田郁夫、細川暢子：ライブイメージング法を用いたIII型コラーゲン細胞内輸送メカニズムの解析。（第19回日本蛋白質科学会年会、第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会）（口頭及びポスター発表）（2019.6.24-26、神戸市）

花房賢、細川暢子：SDF2L1はERdj3の小胞体局在に必須であり、ERdj3のシャペロン活性を増幅する。（第19回日本蛋白質科学会年会、第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会）（口頭

及びポスター発表) (2019.6.24-26、神戸市)

法邑 賢一、富永 裕貴、増田 亮、小出 隆規、平芳 一法 コラーゲンの PEDF 結合配列およびインテグリン結合配列に対する RNA アプタマーの選別 第 42 回日本分子生物学会年会、福岡、2019 年 12 月 3-6 日

藤本真慈 T 細胞レセプター  $\beta$  鎖遺伝子 (*Tcrb*) 再構成で hybrid joint が同時に 2箇所で形成されるか? 第 42 回日本分子生物学会年会、福岡、2019 年 12 月 3-6 日

Fujimoto, S. A hybrid joint which is formed during *Tcrb* D1-J2.6 recombination. 第 48 回日本免疫学会学術集会、浜松、2019 年 12 月 11-13 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

- Xin-Chi Jiang, Jia-Jia Xiang, Hong-Hui Wu, Tian-Yuan Zhang, Dan-Ping Zhang, Qian-Hao Xu, Xiao-Li Huang, Xiang-Lei Kong, Ji-Hong Sun, Yu-Lan Hu, Kai Li, Tabata Y, You-Qing Shen, and Jian-Qing Gao. (2019) Neural Stem Cells Transfected with Reactive Oxygen Species–Responsive Polyplexes for Effective Treatment of Ischemic Stroke. *Adv. Mater.* 2018, 1807591
- Imada, M., Yagyuu, T., Ueyama, Y., Maeda, M., Yamamoto, K., Kurokawa, S., Jo, J., Tabata, Y., Tanaka, Y., Kirita, T. (2019) Prevention of tooth extraction-triggered bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws with basic fibroblast growth factor: An experimental study in rats. PLOS ONE <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211928>
- Tanaka, T., Matsushita, T., Nishida, K., Takayama, K., Nagai, K., Araki, D., Matsumoto, T., Tabata, Y., and Kuroda, R. (2019). Attenuation of osteoarthritis progression in mice following intra-articular administration of simvastatin-conjugated gelatin hydrogel. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 13 (3):423-432.

Kanemaru, M., Asai, J., Jo, J., Arita, T., Kawai-Ohnishi, M., Tsutsumi, M., Wada, M., Tabata, Y., Katoh, N. (2019) Nanoparticle-mediated local delivery of pioglitazone attenuates bleomycin-induced skin fibrosis. *J Dermatol Sci.* 2019 Jan;93 (1):41-49.

Fauzi Mh Busra., Nor Fadilah Rajab., Tabata, Y., Aminuddin B.Saim., Ruszymah B.H.Idrus., shiplu R. Chowdhury. (2019) Rapid Treatment of Full-Thickness Skin Loss Using Ovine Tendon Collagen Type I Scaffold with Skin Cells. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 2019;1–18.

Yamashita, K., Tsunoda, S., Gunji, S., Murakami, T., Suzuki, T., Tabata, Y& Sakai, Y. (2019) Intraperitoneal chemotherapy for peritoneal metastases using sustained release formula of cisplatin-incorporated gelatin hydrogel granules. *Surgery Today* pages 785–794

Arai, D., Ishii, A., Ikeda, H., Abekura, Y., Nishi, H., Miyamoto, S., Tabata, Y. (2019) Development of a stent capable of the controlled release of basic fibroblast growth factor and argatroban to treat cerebral aneurysms: In vitro experiment and evaluation in a rabbit aneurysm model. *JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH PART B: APPLIED BIOMATERIALS* | MONTH 2019 VOL 000B, ISSUE 0

Tanaka, R., Saito, Y., Fujiwara, Y., Jo, J., Tabata, Y. (2019) Preparation of fibrin hydrogels to promote the recruitment of anti-inflammatory macrophages. *Acta Biomater* 89, 152-165, 2019.

Uchida, Y., Masui, T., Nakano, K., Yogo, A., Sato, A., Nagai, K., Anazawa, T., Takaori, K., Tabata, Y., and Uemoto S. (2019) Clinical and experimental studies of intraperitoneal lipolysis and the development of clinically relevant pancreatic fistula after pancreatic surgery. *BJS* 2019; 106: 616–625.

Tanaka, T., Matsushita, T., Tanaka, T., Matsushita, T., Nishida, K., Takayama, K., Nagai, K., Araki, D., Matsumoto, T., Tabata, Y., Kuroda, R. (2019) Attenuation of osteoarthritis progression in mice following intra-articular administration of simvastatin-conjugated gelatin hydrogel. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* TERM-18-0137.R1

Inui, T., Haneda, S., Sasaki, M., Furuoka, H., Ito, M., Yanagawa, M., Hiyama, M., Tabata, Y., Sasaki, N. (2019) Enhanced chondrogenic differentiation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells in zirconia microwell substrata. *Research in Veterinary Science* 125 (2019) 345–35

Kita, Y., Hamada, A., Saito, R., Teramoto, Y., Tanaka, R., Takano, K., Nakayama, K., Murakami, K., Matsumoto, K., Akamatsu, S., Yamasaki, T., Inoue, T., Tabata, Y., Okuno, Y., Ogawa, O., and Kobayashi T. (2019) Systematic chemical screening identifies disulfiram as a repurposed drug that enhances sensitivity to cisplatin in bladder cancer: a summary of preclinical studies. *British Journal of Cancer* <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0609-0>

Nakajima, N., Hashimoto, S., Sato, H., Takahashi, K., Nagoya, T., Kamimura, K., Tsuchiya, A., Yokoyama, J., Sato, Y., Wakatsuki, H., Miyata, M., Akashi, Y., Tanaka, R., Matsuda, K., Tabata, Y., Terai, S. (2019) Efficacy of gelatin hydrogels incorporating triamcinolone acetonide for prevention of fibrosis in a mouse

model. Regenerative Therapy 11 (2019) 41-46

Imaizumi, M., Nakamura, R., Nakaegawa, Y., Bayu, Tirta Dirja., Tada, Y., Tani, A., Sugino, T., Tabata, Y., Koichi, Omori. (2019) Regenerative potential of basic fibroblast growth factor contained in biodegradable gelatin hydrogel microspheres applied following vocal fold injury: Early effect on tissue repair in a rabbit model. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2019 Oct 18. pii: S1808-8694 (19) 30117-X. doi: 10.1016/j.bjorl.2019.09.003.

Nii, T., Makino, K., and Tabata, Y. (2019) A Cancer Invasion Model Combined with Cancer-Associated Fibroblasts Aggregates Incorporating Gelatin Hydrogel Microspheres Containing a p53 Inhibitor. *Tissue Eng Part C Methods.* 2019 Dec; 25 (12): 711-720

Shruthy, Kuttappan., Jo, J., Deepthy, Menon., Ishimoto, T., Nakano, T., Shantikumar, V. Nair., Tabata, Y., and Manitha, B. Nair. (2019) ONO-1301 loaded nanocomposite scaffolds modulate cAMP mediated signaling and induce new bone formation in critical sized bone defect. *Biomaterials Science* DOI: 10.1039/c9bm01352k

Tabata, Y., (2019) Biomaterials Technology Indispensable for Regenerative Medicine. International Seminar on Biomaterials and Regenerative Medicine, 26-28

Vanawati, N., Barlian, A., Tabata, Y., Judawisastra, H., Wibowo, I. (2019) Comparison of human Mesenchymal Stem Cells biocompatibility data growth on gelatin and silk fibroin scaffolds. *Data Brief.* 2019 Oct 17;27:104678. doi: 10.1016/j.dib.2019.104678.eCollection 2019 Dec. PubMed PMID: 31871963; PubMed Central PMCID: PMC6915795.

Shintani, K., Uemura, T., Takamatsu, K., Yokoi, T., Onode, E., Okada, M., Tabata, Y., Nakamura, H. (2019) Evaluation of dual release of stromal cell-derived factor-1 and basic fibroblast growth factor with nerve conduit for peripheral nerve regeneration: An experimental study in mice. *Microsurgery.* 2019 Dec 23. doi: 10.1002/micr.30548. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 31868964.

Campos, Y., Sola, FJ., Almirall, A., Fuentes, G., Eich, C., Que, I., Chan, A., Kaijzel, E., Tabata, Y., Quintanilla, L., Rodríguez-Cabello, JC., Cruz, LJ. (2019) Design, construction, and biological testing of an implantable porous trilayer scaffold for repairing osteoarthritic cartilage. *J Tissue Eng Regen Med.* 2019 Dec 11. doi: 10.1002/term.3001. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 31826327.

Li L, Xiao., B, Mu J., Zhang, Y., Zhang, C., Cao, H., Chen, R., Patra, HK., Yang, B., Feng, S., Tabata, Y., Slater, NKH., Tang, J., Shen, Y., Gao, J, A MnO. (2019) Nanoparticle-Dotted Hydrogel Promotes Spinal Cord Repair via Regulating Reactive Oxygen Species Microenvironment and Synergizing with Mesenchymal Stem Cells. *ACS Nano.* 2019 Dec 24;13 (12):14283-14293. doi: 10.1021/acsnano.9b07598. Epub 2019 Dec 2. PubMed PMID: 31769966.

Anamizu, M., Tabata, Y. (2019) Design of injectable hydrogels of gelatin and alginate with ferric ions for cell transplantation. *Acta Biomater.* Dec;100:184-190. doi: 10.1016/j.actbio.2019.10.001. Epub 2019 Oct 4.

PubMed PMID: 31589929.

Ueda, M., Jo, J., Gao, JQ., Tabata, Y. (2019) Effect of lipopolysaccharide addition on the gene transfection of spermine-introduced pullulan-plasmid DNA complexes for human mesenchymal stem cells. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2019 Nov;30 (16):1542-1558. doi: 10.1080/09205063.2019.1650240. Epub 2019 Aug 8. PubMed PMID: 31354063.

Momotori, N., Jo, J., Tabata, Y. (2019) Preparation of polymer microspheres capable for pioglitazone release to modify macrophages function. *Regen Ther.* 2019 Jul 10;11:131-138. doi: 10.1016/j.reth.2019.06.008. eCollection 2019 Dec. PubMed PMID: 31338392; PubMed Central PMCID: PMC6626069.

Jo, J., Gao, JQ., Tabata, Y. (2019) Biomaterial-based delivery systems of nucleic acid for regenerative research and regenerative therapy. *Regen Ther.* 2019 Jul 11;11:123-130. doi: 10.1016/j.reth.2019.06.007. eCollection 2019 Dec. Review. PubMed PMID: 31338391; PubMed Central PMCID: PMC6626072.

Yokoyama, R., Ii, M., Masuda, M., Tabata, Y., Hoshiga, M., Ishizaka, N., Asahi, M. (2019) Cardiac Regeneration by Statin-Polymer Nanoparticle-Loaded Adipose-Derived Stem Cell Therapy in Myocardial Infarction. *Stem Cells Transl Med.* 2019 Oct;8 (10):1055-1067. doi: 10.1002/sctm.18-0244. Epub 2019 Jun 3. PubMed PMID: 31157513; PubMed Central PMCID: PMC6766602.

Nii T., Makino K., and Tabata Y. (2019). Influence of shaking culture on the biological functions of cell aggregates incorporating gelatin hydrogel microspheres. *J. Biosci. Bioeng.* 128, 606-612.

Nii, T., Makino, K., and Tabata Y. (2019). A cancer invasion model combined with cancer-associated fibroblasts aggregates incorporating gelatin hydrogel microspheres containing a p53 inhibitor. *Tissue Eng Part C* 25, 711-720.

Nakamura, K., Saotome, T., Shimada, N., Matsuno, K., and Tabata Y. (2019). A gelatin hydrogel nonwoven fabric facilitates metabolic activity of multilayered cell sheets. *Tissue Eng. C* 25, 344

Murata, Y., Jo, J., Tabata, Y. (2019) Intracellular Controlled Release of Molecular Beacon Prolongs the Time Period of mRNA Visualization. *Tissue Eng Part A.* 2019 Nov;25 (21-22):1527-1537. doi: 10.1089/ten.TEA.2019.0017. Epub 2019 May 2. PubMed PMID: 30848167.

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. (2019) Development of a transplant injection device for optimal distribution and retention of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *J Heart Lung Transplant.* 2019 Feb;38 (2):203-214. doi: 10.1016/j.healun.2018.11.002. Epub 2018 Nov 15. PubMed PMID: 30691596.

Wu, HH., Zhou, Y., Tabata, Y., Gao JQ. (2019) Mesenchymal stem cell-based drug delivery strategy: from cells to biomimetic. *J Control Release.* 2019 Jan 28;294:102-113. doi: 10.1016/j.jconrel.2018.12.019. Epub 2018 Dec 13. Review. PubMed PMID: 30553849.

- Murakami, T., Hijikuro, I., Yamashita, K., Tsunoda, S., Hirai, K., Suzuki, T., Sakai, Y., Tabata, Y. (2019) Antiadhesion effect of the C17 glycerin ester of isoprenoid-type lipid forming a nonlamellar liquid crystal. *Acta Biomater.* 2019 Jan 15;84:257-267. doi: 10.1016/j.actbio.2018.12.009. Epub 2018 Dec 6. PubMed PMID: 30529080.
- Notodihardjo, SC., Morimoto, N., Kakudo, N., Mitsui, T., Le, TM., Tabata, Y., Kusumoto, K. (2019) Efficacy of Gelatin Hydrogel Impregnated With Concentrated Platelet Lysate in Murine Wound Healing. *J Surg Res.* 2019 Feb;234:190-201. doi: 10.1016/j.jss.2018.09.037. Epub 2018 Oct 11. PubMed PMID: 30527473.
- Fukuba, S., Akizuki, T., Hoshi, S., Matsuura, T., Shujaa, Addin A., Okada, M., Tabata, Y., Matsui, M., Tabata, MJ., Sugiura-Nakazato M., Izumi Y. (2019) Comparison between different isoelectric points of biodegradable gelatin sponges incorporating  $\beta$ -tricalcium phosphate and recombinant human fibroblast growth factor-2 for ridge augmentation: A preclinical study of saddle-type defects in dogs. *J Periodontal Res.* 2019 Jun;54 (3):278-285. doi: 10.1111/jre.12628. Epub 2018 Nov 25. PubMed PMID: 30474115.
- Washio, A., Teshima, H., Yokota, K., Kitamura, C., Tabata, Y. (2019) Preparation of gelatin hydrogel sponges incorporating bioactive glasses capable for the controlled release of fibroblast growth factor-2. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2019 Jan;30 (1):49-63. doi: 10.1080/09205063.2018.1544474. Epub 2019 Jan 2. PubMed PMID: 30470163.
- Imaizumi, M., Nakamura, R., Nakaegawa, Y., Dirja, BT., Tada, Y., Tani, A., Sugino, T., Tabata, Y., Omori, K. (2019). Regenerative potential of basic fibroblast growth factor contained in biodegradable gelatin hydrogel microspheres applied following vocal fold injury: Early effect on tissue repair in a rabbit model. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2019 Oct 18. pii: S1808-8694 (19) 30117-X. doi: 10.1016/j.bjorl.2019.09.003.
- Nagasawa, A., Masumoto, H., Yanagi, S., Kanemitsu, N., Ikeda, T., Tabata, Y., Minatoya, K. (2019) Basic fibroblast growth factor attenuates left-ventricular remodeling following surgical ventricular restoration in a rat ischemic cardiomyopathy model. *Gen Thorac Cardiovasc Surg.* In press (Published online on 2019 Aug 13).
- 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., and Fukuda K. (2019) Development of a transplant injection device for optimal distribution and retention of human iPSC-derived cardiomyocytes. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 2019 Feb;38 (2):203-214.
- Maeda, H., Kami, D., Maeda, R., Murata, Y., Jo, J., Kitani, T., Tabata, Y., Matoba, S., Gojo, S. (2020). TAT-dextran mediated mitochondrial transfer can enhance recovery from ischemia reperfusion injury in cardiomyocytes. *J Cell Mol Med.* Under submission.

- Inui, T., Haneda, S., Sasaki, M., Furuoka, H., Ito, M., Yanagawa, M., Hiyama, M., Tabata Y., Sasaki N. (2019). Enhanced chondrogenic differentiation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells in zirconia microwell substrata. *Res Vet Sci.* 125, 345-350.
- Tanaka, R., Saito, Y., Fujiwara, Y., Jo, J., and Tabata Y. (2019). Preparation of fibrin hydrogels to promote the recruitment of anti-inflammatory macrophages. *Acta Biomater* 89:152-165.
- Murata, Y., Jo, J., and Tabata, Y. (2019). Intracellular Controlled Release of Molecular Beacon Prolongs the Time Period of mRNA Visualization. *Tissue Eng Part A.* 25, 1527-1537.
- Shintani, K., Uemura, T., Takamatsu, K., Yokoi, T., Onode, E., Okada, M., Tabata, Y., Nakamura, H. (2019) Evaluation of dual release of stromal cell-derived factor-1 and basic fibroblast growth factor with nerve conduit for peripheral nerve regeneration: An experimental study in mice. *Microsurgery.* 2019 Dec 23.
- Nagasawa A, Masumoto H, Yanagi S, Kanemitsu N, Ikeda T, Tabata Y, Minatoya K. (2019). Basic fibroblast growth factor attenuates left-ventricular remodeling following surgical ventricular restoration in a rat ischemic cardiomyopathy model. *Gen Thorac Cardiovasc Surg.* 2020 Apr; 68 (4):311-318
- Nakajima N, Hashimoto S, Sato H, Takahashi K, Nagoya T, Kamimura K, Tsuchiya A, Yokoyama J, Sato Y, Wakatsuki H, Miyata M, Akashi Y, Tanaka R, Matsuda K, Tabata Y, Terai S. (2019). Efficacy of gelatin hydrogels incorporating triamcinolone acetonide for prevention of fibrosis in a mouse model. *Regenerative Therapy.* volume11, 41-46.
- 田畠泰彦、Antonios G.Mikos, Heinz Redl. (2019) 再生医療の実用化を目指して—世界における現状と課題—. *Pharma Medica* Vol.37 No.1 65-70 (2019)
- 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 公益財団法人日本化学纖維研究所講演集（第76集）2019年3月 87-90

### **List of Presentations**

#### **海外での招待講演**

- Tabata, Y. Drug Delivery Systems for Biomedical and Life science Applications. REMIX-Winter School on Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Advanced Therapeutic Products and Their Translation to Practical Uses. Bangkok, Thailand. January14-18.2019
- Tabata, Y. Biomaterial Technology Necessary for Life Sciences. Life Science Forum, Boston, USA. April24-26.2019
- Tabata, Y. Release Technology of Cell Recruitment Molecules to Induce In Situ Tissue Regeneration Therapy. 13<sup>th</sup> International Symposium on Frontiers in Biomedical Polymers, Canary Islands, Tenerife, Spain. May19-23.2019
- Tabata, Y. Tissue Engineering Technology to Enhance Cell Recruitment for Regenerative Therapy. Faculty of

Pharmacy, Zhejiang University, Hangzhou, China.June.19-21 Biomaterials Technology of Tissue Engineering to Realize Regenerative Therapy for Patients. Department of Medicine, Jiayu University, Hangzhou, China.June.19-21

Tabata, Y. Frontier of Biomaterial Technology Indispensable for Tissue Engineering. Asian Congress of Biotechnology2019 (ACB2019), Taipei, China.July.1-3.2019

Tabata, Y. Fundamental of Tissue Engineering. ASEAN+5 Course on Bioceramics and Tissue Engineering, Yogyakarta, Indnesia.July9-13.2019

Tabata, Y. Drug Delivery Systems for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. Advances in Tissue Engineering 27<sup>th</sup> Annual Short Course. Houston, USA. August.14-17.2019

Tabata, Y. Key Biomaterial Technologies for Future Advanced Medical Treatment. 2019Chinese Biomaterials Congress and International Symposium on Advanced Biomaterials, Dalniy, China. August. 22-25.2019

Tabata, Y. Tissue Engineering Technology of Cell Recruitment for Tissue Regeneration Therapy. IC-EAST2019 International Conference on Emerging Advancement in Science &Technology. New Delhi, India.September.4-6.2019

Tabata, Y. Biomaterials technology for drug delivery system. Tissue Engineering Centre, Universiti Kebangsaan Malaysia, Medical Centre. Kuala Lumpur, Malaysia.November.13 Biomaterials necessary to realize regenerative medicine. Termsympo 2019. Kuala Lumpur, Malaysia.November.14.2019

Tabata, Y. Tissue Engineering of biomaterial technology realieze regenerative medicine. Bio TERM2019, Kanpur, India.November.28-December.1.2019

Jo, J., Tabata, Y. Regeneration imaging by drug delivery technologies. Seminars at College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University and Jiaxing University, Hangzhou, Jun. 18-21, 2019.

Jo, J., Tabata, Y. Development of intracellular controlled release technologies based on biodegradable polymer nanoparticles to modify cellular biological activities. Materials Research Meeting 2019, Yokohama, Dec. 10-14, 2019.

Masumoto, H., Hirao, S., Takimoto, S., Kawatou, M., Ikeda, T., Tabata, Y., Yamashita, J.K., Minatoya, K. (2019) Preclinical Efficacy Studies of Human iPS Cell-derived Cardiac Tissue Transplantation onto Animal Heart Disease Models. American Heart Association Scientific Sessions 2019, Philadelphia, November 16-18, 2019

Akiba, R., Matsuyama, T., Tu, H-Y., Hashiguchi, T., Sho, J, m Yamamoto, S., Tabata, Y., Takahashi, M., Mandai, M. Effect of ambient light and BDNF on photoreceptor synaptogenesis after mouse ESC/iPSC-derived retinal organoid transplantation. 2019 Association for Research in Vision and Ophthalmology Annual Meeting, Vancouver, April 28 – May 2, 2019.

## 海外での一般演題

- Jo, J., Yoshimoto, Y., Tabata, Y. Visualization of biological function in macrophages based on the intracellular delivery of molecular beacon with gelatin nanoparticles. 2019 World Molecular Imaging Congress, Montreal, Sep. 4-7, 2019.
- Jo, J., Murata, Y., Yukawa, H., Tsumaki, N., Baba, Y., Tabata, Y. Visualization of human iPS cell-derived 3-dimensional cartilage tissue. Tissue Engineering & Regenerative Medicine International Society – Asian Pacific Chapter ans the 7<sup>th</sup> Asian Biomaterials Congress, Brisbane. Oct. 14-17, 2019.
- Kanda, Y., Kakutani, K., Yurube T., Zhang Z., Miyazaki, S., Kakiuchi, Y., Takeoka, Y., Tsujimoto, R., Takada, T., Tabata., T, Nishida, K., Kuroda, R. The local administration of sustained release of cisplatin by gelatin hydrogel enhanced anti-tumor effect and reduced side effect: the preliminary study using bone metastasis animal model. Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, Austin, February 2-5, 2019.
- Kanda, Y., Kakutani, K., Yurube T., Zhang Z., Kakiuchi, Y., Takeoka, Y., Tsujimoto, R., Miyazaki, S., Takada, T., Tabata., T, Kuroda, R. A novel new method for bone metastasis using gelatin hydrogel incorporating anti-tumor drug as a sustained release system. The 1st Meeting of the BioSpine Japan Association, Yokohama, October 18, 2019.
- Fujiwara, Y., Saito, Y., Nakashima, Y., Nakanishi, Y., and Komohara, Y. Application of substances regulating macrophage phenotype to biomaterials. 8th International Conference on Mechanics of Biomaterials and Tissues, Hawaii, December 15-19, 2019
- Murata, Y., Jo, J., and Tabata, Y. Intracellular controlled release of molecular beacon aiming at long-term and time course visualization of mRNA. World Molecular Imaging Congress 2019, Montreal, September 4-7, 2019.
- Murata, Y., Jo, J., and Tabata, Y. Metabolic function imaging by utilizing molecular beacon to visualize cell stemness. The 46th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry and The 3rd Annual Meeting of Japan Society of Nucleic Acids Chemistry, Tokyo, October 29-31, 2019.
- Murata, Y., Jo, J., and Tabata, Y. Intracellular controlled release of molecular beacon to visualize energy metabolic pathway of cells. 15th US-Japan Symposium on Drug Delivery Systems, Maui, December 14-18, 2019.
- Tsubosaka, M., Hayashi, S., Kihara S., Takashima, Y., Kamenaga, T., Kuroda, Y., Takeuchi, K., Takayama, K., Hashimoto, S., Matsumoto, T., Tabata, Y., Kuroda, R. The Influence of Gelatin Hydrogel Including Eicosapentaenoic Acid on the Osteoarthritis Progression in Vivo. ORS 2019 Annual Meeting, Austin, February 2-5, 2019.

## 国内でのシンポジウム招待講演

田畠泰彦 再生医療の現状と今後 –細胞の能力を高め自然治癒力を促す医療– . 医薬品卸勤務薬

剤師会大阪府支部 繼続研修会、大阪、2019年1月24日

田畠泰彦 再生治療・研究の現状と今後 ジオマテック株式会社講演、横浜、2019年1月31日

田畠泰彦 日本の再生医療の未来。京都SKYシニア大学、京都、2019年2月12日

田畠泰彦 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。第10回 KIPS高分子講座、京都、2019年2月13日

田畠泰彦 バイオマテリアルからみたライフサイエンス分野。ヤマト科学企業講演、山梨、2019年3月28日

田畠泰彦 バイオマテリアル技術からみる再生医療の最前線 一再生治療と再生研究一。再生歯科シンポジウム岡山 Symposium of Regenerative Dentistry Okayama、岡山、2019年5月26日

田畠泰彦 再生治療、再生研究を具現化する組織工学の最前線。KISTEC教育講座再生・細胞医療産業の再起動2、神奈川、2019年7月5日

田畠泰彦 ライフサイエンスにおけるバイオマテリアルの役割。BIO × HARD Techシンポジウム～ライフサイエンスの異分野連携による新たなイノベーション～、京都、2019年7月30日

田畠泰彦 再生医療の実現にともなって必要となる技術とは。東レリサーチ ライフイノベーション分析セミナー、東京、2019年8月8日

田畠泰彦 バイオマテリアルが具現化する先進医療。第39回日本眼薬理学会、名古屋、2019年9月14-15日

田畠泰彦 再生医療関連ビジネスの大きな可能性について考える - 再生バイオマテリアル技術 -。第4回例会 次世代医療システム産業化フォーラム2019、京都、2019年9月20日

田畠泰彦 ますます拡がるライフサイエンスバイオマテリアルとしてのゼラチンの可能性。2019ライフサイエンスバイオマテリアル研究会、京都、2019年10月4日

田畠泰彦 バイオマテリアルからみた先端医療。岡山大学歯学部講義、岡山、2019年10月9日

田畠泰彦 再生医療（ライフサイエンス）分野における材料技術の重要性。東洋紡株式会社講演、滋賀、2019年10月11日

田畠泰彦 Drug Delivery System of Biomaterial Technology Necessary for Life Sciences. Okinawa Colloids2019、沖縄、2019年11月3-8日

田畠泰彦 ライフサイエンス（再生医療）分野における材料の重要性。第一工業製薬株式会社講演、大阪、2019年11月11日

田畠泰彦 バイオマテリアルの再生医療への貢献-細胞能力を高める環境作り-。第41回日本バイオマテリアル学会 日油(株)ランチョンセミナー、茨城、2019年11月25日(月)

田畠泰彦 再生治療、先端医療、幹細胞関連の生体材料の研究と DDS ドラッグデリバリーシステムの利用のための生体材料のアプローチ。iPSC研究協議会特別講演、東京、2019年11月27日

田畠泰彦 バイオマテリアルを活用した再生治療の最前線 . 第 39 回整形外科バイオマテリアル研究会、北海道、2019 年 12 月 7 日（土）

田畠泰彦 臨床家に役立つ再生医療の実際 . 第 49 回日本創傷治癒学会教育講演、埼玉県、2019 年 12 月 11 – 12 日

Jo, J. Biomaterials-based imaging technologies in regenerative medicine. 京都大学大学院医学研究科大学院教育コース「再生医療・臓器再建医学コース」講演、京都 2019 年 1 月 11 日

城潤一郎、田畠泰彦 DDS 技術による再生医療イメージングの開発 再生歯科シンポジウム岡山、岡山、2019 年 5 月 26 日

城潤一郎、田畠泰彦 DDS 技術を用いた再生医療イメージングの開発 シンポジウム 4 「再生医療分野で必要となる DDS 技術」 第 35 回日本 DDS 学会学術集会、横浜、2019 年 7 月 4-5 日

城潤一郎、村田勇樹、田畠泰彦 細胞機能イメージングのための DDS 技術の開発 京都大学インダストリアルディ 2019 ②、京都、2019 年 8 月 29 日

城潤一郎、田畠泰彦 再生医療イメージングを支えるバイオマテリアルと DDS 技術 あり方委員会企画（シンポジウム アドホック）「バイオマテリアルと骨代謝研究」第 37 回日本骨代謝学会学術集会、神戸、2019 年 10 月 12-14 日（台風 19 号の影響により、講演中止）

## 国内での一般演題

田畠泰彦 再生医療とは細胞能力を高める医療 - 細胞環境を作り与えるモノづくり技術 - 平成 30 年度関西再生医療産業コンソーシアム（KRIC）再生医療の全体像を見わたせる分かりやすい解説講座、京都、2019 年 1 月 16 日

田畠泰彦 細胞イメージングのためのバイオマテリアル技術 医工学フォーラム -2018 年度特別学術講演会 -、京都、2019 年 2 月 27 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 3 年生歯科理工学特別講義、大阪、2019 年 5 月 17 日

田畠泰彦 バイオマテリアルからみる再生医療 - 再生医工学 - 日本消化器病学会 School of Regenerative Medicine for Gastroenterological Disease ~ Team Japan で実践する消化器疾患に対する再生医療～、東京、2019 年 5 月 25 日

田畠泰彦 再生医療の定義と必要となる材料技術を考える . 医工学フォーラム - 再生医療を本音で語る -、京都、2019 年 9 月 9 日

田畠泰彦 バイオマテリアルからみた先端医療 岡山大学特別講演、岡山、2019 年 10 月 9 日

田畠泰彦 生体組織工学をベースとした再生医療 . 京都府立医科大学眼科講義、京都、2019 年 9 月 19 日

江見翼、村田勇樹、城潤一郎、田畠泰彦 細胞内 ATP 送達のためのカチオン化ゼラチンナノ粒子の作製 第 65 回高分子研究発表会（神戸）、兵庫、2019 年 7 月 12 日

城潤一郎、村田勇樹、湯川博、妻木範行、馬場嘉信、田畠泰彦 量子ドット・磁性ナノ粒子含有ゼラチンナノ粒子を用いたヒト iPS 細胞由来 3 次元軟骨組織の可視化 第 14 回日本分子イメージング学会総会・学術集会、札幌、2019 年 5 月 23-24 日

田畠泰彦、村田勇樹、城潤一郎 細胞機能の可視化を目指した細胞内核酸検出プローブの細胞内送達技術の開発 第 77 回日本化学纖維研究所講演会、京都、2019 年 11 月 12 日

新居輝樹、牧野公子、田畠泰彦 薬物徐放粒子を組み込んだがん細胞 - 線維芽細胞 3 次元凝集体の作製 日本薬学会第 139 年会、千葉、2019 年 3 月 20-23 日

新居輝樹、牧野公子、田畠泰彦 3 次元細胞培養と DDS 技術を組み合わせたがん浸潤モデルの創製 日本薬剤学会第 34 年会、富山、2019 年 5 月 16-18 日

新居輝樹、牧野公子、田畠泰彦 薬物徐放粒子を含むがん関連線維芽細胞 3 次元凝集体を用いたがん浸潤モデル 第 23 回日本がん分子標的治療学術集会、大阪、2019 年 6 月 12-14 日

新居輝樹、牧野公子、田畠泰彦 がん浸潤モデルのためのがん関連線維芽細胞活性化薬物の徐放化 第 35 回日本 DDS 学会学術集会、神奈川、2019 年 7 月 4-5 日

新居輝樹、牧野公子、田畠泰彦 ゼラチンハイドロゲル粒子含有細胞凝集体の細胞機能に与える培養方法の影響 第 40 回日本炎症・再生医学会、兵庫、2019 年 7 月 16-17 日

新居輝樹、牧野公子、田畠泰彦 がん浸潤モデルとしての DDS 技術を組み合わせた 3 次元がん関連線維芽細胞培養 第 28 回日本がん転移学会学術集会・総会、鹿児島、2019 年 7 月 25-26 日

新居輝樹、牧野公子、田畠泰彦 3 次元細胞培養と細胞活性化薬物徐放を組み合わせたがん浸潤モデルの創製 日本油化学会第 58 年会、東京、2019 年 9 月 24-26 日

新居輝樹、牧野公子、田畠泰彦 組織工学技術を組み込んだ 3D 細胞培養を活用した創薬がん浸潤モデル 日本再生医療学会第 1 回秋季科学シンポジウム、兵庫、2019 年 10 月 18-19 日

新居輝樹、牧野公子、田畠泰彦 DDS 技術と 3 次元培養を組み合わせた抗がん剤スクリーニングモデル 第 3 回がん三次元培養研究会、東京、2019 年 11 月 18 日

新居輝樹、牧野公子、田畠泰彦 薬物徐放ゼラチンハイドロゲル粒子と 3 次元培養を組み合わせた抗がん剤スクリーニングモデル 第 41 回日本バイオマテリアル学会大会、茨城、2019 年 11 月 24-26 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、辻本龍、高田徹、田畠泰彦、西田康太郎、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制御 第 52 回日本整形外科学会骨軟部学術集会、埼玉、2019 年 7 月 11-12 日

神田裕太郎、角谷賢一朗、由留部崇、張鍾穎、垣内裕司、辻本龍、高田徹、田畠泰彦、土井田稔、

西田康太郎、黒田良祐 徐放化抗がん剤局所投与による新たな骨転移制御の試み 第34回日本整形外科学会基礎学術集会、横浜、2019年10月17-18日

神田裕太郎、角谷賢一朗、由留部崇、張鍾穎、垣内裕司、武岡由樹、辻本龍、宮崎邦彦、高田徹、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シスプラチン局所投与によるがん骨転移局所制御 第9回 DDS 再生医療研究会、京都、2019年12月22日

Saito Y, Fujiwara Y, and Komohara Y. The possibility of CD163 as a tool of macrophage origin analysis in mouse; CD163 is expressed on resident macrophages, but not on bone marrow-derived macrophages. CD163はマウスにおける卵黄嚢-組織在住マクロファージのマーカーとなる可能性がある 第52回 日本発生生物学会大会、大阪、2019年5月14-17日

西東洋一 マウスにおいて CD163 は組織在住マクロファージのマーカーとなる可能性がある（奨励賞受賞）第29回 日本樹状細胞研究会、出雲、2019年6月28日

西東洋一、藤原章雄、菰原義弘、田畠泰彦 医療材料開発研究領域における病理学のニーズ：再生医療応用を目指したフィブリンハイドロゲルとマクロファージとの反応性解析 第16回 日本病理学会カンファレンス、札幌、2019年8月2-3日

西東洋一、藤原章雄、菰原義弘 マウス - ヒト間の CD163 発現の違いから考察するマクロファージの進化仮説 日本進化学会 第21回大会、札幌、2019年8月7-10日

村田 勇樹、城 潤一郎、田畠 泰彦 細胞生物機能の長期可視化を目指した mRNA イメージング手法の開発 第18回日本再生医療学会総会、神戸、2019年3月21-23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に基づく mRNA イメージング手法の開発 日本分子イメージング学会第14回学会総会・学術総会、札幌、2019年5月23-24日

村田 勇樹、城 潤一郎、田畠 泰彦 細胞の未分化能可視化のための代謝機能イメージングプローブの作製 第48回医用高分子シンポジウム、東京、2019年7月1-2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による細胞の増殖能イメージング 第35回日本 DDS 学会学術集会、横浜、2019年7月4-5日

村田 勇樹、城 潤一郎、田畠 泰彦 細胞の代謝機能の可視化による未分化能イメージング手法の開発 第68回高分子討論会、福井、2019年9月25-27日

村田 勇樹、城 潤一郎、田畠 泰彦 細胞の未分化能可視化のためのモレキュラービーコン代謝機能イメージング 日本再生医療学会第1回秋季科学シンポジウム、舞子、2019年10月18-19日

村田 勇樹、城 潤一郎、田畠 泰彦 細胞の代謝機能検出に基づく未分化状態イメージング技術の開発 第41回バイオマテリアル学会大会、つくば、2019年11月24-26日

村田 勇樹、城 潤一郎、田畠 泰彦 モレキュラービーコンを利用した RNA 特異検出による細胞機能イメージング 第9回 DDS 再生医療研究会、京都、2019年12月22日

高橋克、喜早ほのか、三島清香、杉並亜希子、時田義人、田畠泰彦、菅井学、別所和久：希少疾患先天性無歯症治療薬の開発研究、第 18 回 日本再生医療学会総会、神戸、2019 年 3 月 21-23 日

高橋克、喜早ほのか、三島清香、杉並亜希子、時田義人、田畠泰彦、菅井学、別所和久：歯数制御による歯の再生治療薬の開発、第 40 回 日本炎症・再生医学会、神戸、2019 年 7 月 16-17 日

新谷康介、上村卓也、高松聖仁、横井卓哉、斧出絵麻、岡田充弘、田畠泰彦、中村博亮 SDF-1 と bFGF の共徐放ゼラチンを併用した人工神経による末梢神経再生 第 62 回日本手外科学会学術集会、札幌、2019 年 4 月 18-19 日

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 ラップ腱板断裂モデルにおける bFGF と PRP 同時投与の有効性の検討 第 5 回 JAPSAM PRP 幹細胞研究会、名古屋、2019 年 6 月 8 日

壱坂正徳、林申也、木原伸介、長田純平、高島良典、亀長智幸、高山孝治、橋本慎吾、松本知之、田畠泰彦、黒田良祐 エイコサペンタエン酸含有ゼラチンハイドロゲルは変形性関節症進行を抑制する 第 34 回日本整形外科学会基礎学術集会、横浜、2019 年 10 月 17-18 日

中村耕一郎、早乙女俊樹、島田直樹、松野久美子、田畠泰彦 ゼラチンハイドロゲル不織布の細胞シートキャリア膜としての活用 第 18 回日本再生医療学会、兵庫、2019 年 3 月 21-23 日

早乙女俊樹、島田直樹、中村耕一郎、松野久美子、田畠泰彦 3 次元細胞培養足場としてのゼラチンハイドロゲル不織布の有用性 第 18 回日本再生医療学会、兵庫、2019 年 3 月 21-23 日

貴島逸斗、中村耕一郎、樺沢勇司、田畠泰彦、古屋純一、河野弥生、花輪剛 ゼラチン不織布を用いた口腔ケア用品の開発 第 29 回日本医用歯科機器学会、愛知、2019 年 7 月 22 日

中村耕一郎、早乙女俊樹、島田直樹、松野久美子、田畠泰彦 3 次元細胞培養足場としてのゼラチンハイドロゲル不織布の有用性 第 9 回 DDS 再生医療研究会、京都、2019 年 12 月 22 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。2019年はAMEDの支援を受けた新しい再生T細胞療法のプロジェクトを始めたので、これを紹介する。

### 1) 超汎用性即納型T細胞製剤の開発

本課題では、誰にでも投与できる汎用性が高いT細胞製剤を作製することを目指す。T細胞製剤はいろいろな疾患に使うことが可能であるが、最初のゴールとしてはがん治療の領域で使いたいと考えている（図1）。T細胞の材料として、まず汎用性の高い多能性幹細胞（ES細胞あるいはiPS細胞）を作製する。

患者のT細胞を取り出して遺伝子改変を加えてから患者に戻す方法はある種のがんに有効である。しかし、そのような自家移植法は、高価、時間がかかるなどの問題があった。我々は、この問題を解決するために、他家移植用の再生T細胞の量産技術に取り組んできた。

2013年に、T細胞からiPS細胞を作製して、そのiPS細胞からT細胞を再生する事に成功した（T-iPS細胞法）。さらにその後、iPS細胞にT細胞レセプター（TCR）遺伝子を発現させて、そのiPS細胞からT細胞を再生させる方法を開発した（TCR-iPS細胞法）。

現在、再生医療界では、父/母由来HLAのセットが同一であるiPS細胞をバンク化する事業が進められている（iPS細胞ストック事業）。このようなiPS細胞から再生した細胞や組織を、同じセットを片方だけ持っている患者へ移植した時、免疫反応が起きにくく期待できる。しかし、この方法では、10種類用意しても日本人の50%しかカバーできない。また、我々の研究で、この方法では一部の移植例でNK細胞による拒絶が起こりうる事が明らかになった（2017年）。

そこで、本課題では、1種類つくれば誰にでも移植できる汎用性の高いT細胞製剤の開発に取り組む。そのためには、HLAを欠失させる事を基本として、さらにその場合に起こりうる免疫反応を抑える技術を確立する。

再生したT細胞の機能を評価する方法としては、免疫不全マウスにヒトのがん組織を移植する系

(患者腫瘍組織異種移植モデル：PDX モデル) を用いる。再生 T 細胞は、患者の白血球に攻撃されないことが重要である。そこで、患者の白血球も同時に移植した PDX モデルを構築しようと考えている。

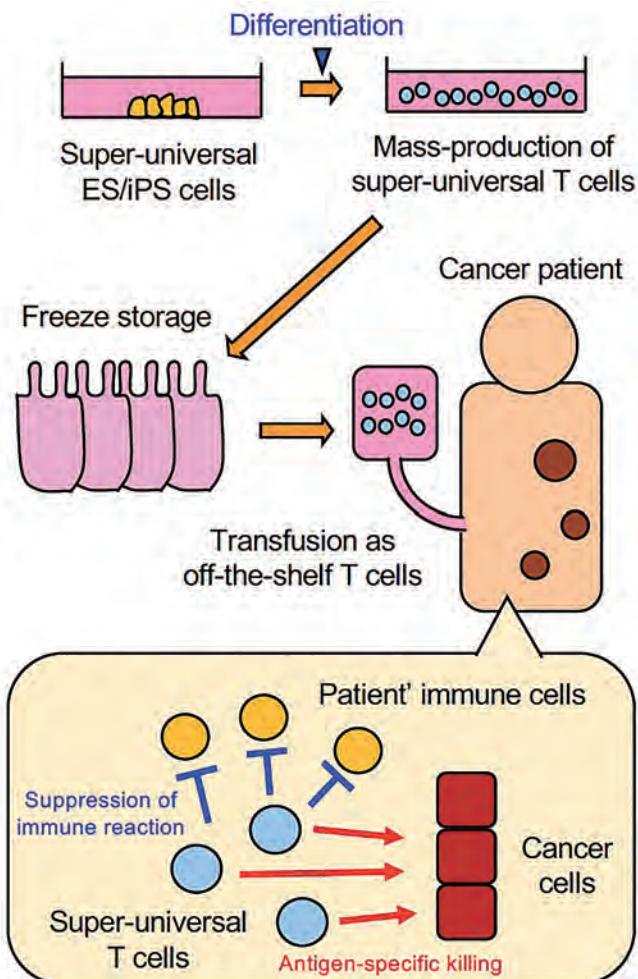


Figure 1 The goal of the project: development of “super-universal T cells”

We firstly produce universal pluripotent stem cells (ES cells or iPS cells). Then, T cells that can attack cancer cells are mass-produced from such ES/iPS cells. Such T cells will be frozen and banked as “off-the-shelf T cells”. When needed, T cells will be thawed and intravenously transfused to a cancer patient. The transfused T cells will attack cancer cells while immune cells of the patient will not attack them.

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. Here I introduce a project which we started in 2019 on regenerated T cells with the support by AMED.

### 1) Development of super-universal off-the-shelf T cells

The present project aims at producing “super universal” T cells that can be given to any patient. While such universal T cells can be used for various diseases, we plan to apply this project initially to cancer patient (Figure 1). As a material of such T cells, we are going to produce universal ES cells or iPS cells.

It has been shown that the adoptive T cell therapy is effective for some types of cancer. The currently ongoing adoptive T cell therapies have been conducted in an autologous setting; T cells collected from a patient are transferred back to the patient after genetic modification and expansion. However, such methods have faced some problems: these methods are costly, time-consuming, and unstable in quality since they depend on the patient’ T cells. To address these issues, we have developed a method to mass-produce T cells, which will make it possible to prepare T cells that can be used in an allogeneic setting; in other words, to prepare universal T cells that can be given to anyone.

To this end, in 2013, we succeeded in producing iPS cells from T cells and to regenerate T cells from such iPS cells (T-iPSC method). Subsequently, we developed a method to transduce iPS cells with exogenous T cell receptor (TCR) gene and to regenerate T cells from such iPS cells (TCR-iPSC method).

At present, in the regenerative medicine field, a major project has been promoted by Japanese government, in which HLA haplotype-homozygous iPS cells are banked. In this strategy, it is expected that cells/tissues regenerated from such iPS cells can be transplanted to patients who retain the same HLA haplotype on one allele, because immune system in such patients may make minimal immune response against the graft. While this strategy would work well, some concern remains; even when you prepare as many as top 10 frequent iPS cell lines, they can cover only 50 % of Japanese people. Moreover, our own research has revealed that the graft will be attacked by NK cells at a certain frequency (2017).

To address such issues, in the present project, we are going to develop “super universal” T cells that can be transfused to any patients. As a cell source for such T cells, HLA will be genetically deleted in the pluripotent stem cells as a basic strategy. In such a case, it is expected that NK cell-mediated immune reaction takes place. Thus, one of main aims of this project is to develop a method that can cancel such immune reaction. As a cell source, we will mainly use ES cells, while we will also use iPS cells.

To evaluate function of the regenerated T cells, we are going to use PDX (patient-derived xenograft) model of cancer, in which tumor tissue collected from a patient is transplanted in immunodeficient mouse. One point here is that the universal T cells are expected to work in the presence of white blood cells of the patient. Therefore, we plan to establish PDX model in which peripheral blood mononuclear cells from the same

patient are also transfused.

### List of Publications

#### <論文>

Good ML, Raul Vizcardo R, Maeda T, Tamaoki N, Malekzadeh P, Kawamoto H, Restifo NP. Using Human Induced Pluripotent Stem Cells for the Generation of Tumor Antigen-Specific T Cells. **J Vis Exp.** (152)

Gong B, Kiyotani K, Sakata S, Nagano S, Kumehara S, Baba S, Besse B, Yanagitani N, Friboulet L, Nishio M, Takeuchi K, Kawamoto H, Fujita N, Katayama R. Secreted PD-L1 variants mediate resistance to PD-L1 blockade therapy in non-small cell lung cancer. **J Exp Med.** 216 (4): 982-1000

Nagano, S., Maeda, T., Ichise, H., Kashima, S., Ohtaka, M., Nakanishi, M., Kitawaki, T., Kadokawa, N., Takaori-Kondo, A., Masuda, K., Kawamoto, H. (2019 (online)). High Frequency Production of T Cell-Derived iPSC Clones Capable of Generating Potent Cytotoxic T Cells. **Molecular Therapy Methods & Clinical Development.** 16, 126-135

#### <総説>

河本宏 (2019). 特別寄稿 2018 年度ノーベル生理学・医学賞解説—免疫チェックポイント阻害剤の作用機序と開発過程 生物の科学 遺伝 73 (1), 4-12.

増田喬子、河本宏 (2019). iPS 細胞由来再生細胞を他家移植で用いたときに起こりうる免疫反応 腎と透析 86 (3), 348-355.

河本宏 (2019). 再生キラー T 細胞を用いたがんの免疫細胞療法 bios (24-1), 7-8.

河本宏 (2019). 自然免疫と獲得免疫 小児内科特集小児科医に必要な免疫の知識 51 (8), 1069

河本宏、増田喬子 (2019). 多能性幹細胞由来免疫細胞を用いたがん免疫療法 実験医学増刊号 37 (15), 170-179

河本宏、永野誠治 (2019). iPSC 細胞技術を用いたがん抗原特異的 CTL の量産—他家移植用再生 T 細胞製剤の開発— 癌と化学療法 46 (11), 1677-1682

### List of Presentation

#### <海外でのシンポジウム招待講演>

Kawamoto, H. CTLS regenerated from iPSCs transduced with clinically used TCR genes exert therapeutic effect in xenograft models. ThymE: T cell and thymus biology. Rehovot, Israel, May 19-24, 2019.

#### <海外での一般演題>

Nagahata, Y., Masuda K., Takaori-Kondo, A., Kawamoto, H. Common epigenetic mechanisms for the repression of myeloid potential in various lineage blood cells. ThymE: T cell and thymus biology. Rehovot, Israel, May 19-24, 2019.

Masaki Miyazaki, The establishment of 3D genome structure for Rag1/Rag2 expression mediated by E2A/E-protein enhancer activity. "The Molecular Mechanisms of Immune Cell Development and Function Conference" FASEB Science Research Conference. Palm Springs, California, USA, Jul 28-Aug 2, 2019.

<国内でのシンポジウム招待講演>

河本宏 腫瘍免疫学の基礎と臨床 –即納型T細胞製剤の開発– 第4回日本骨免疫学会ウィンターセミナー、軽井沢、2019年1月24-27日

河本宏 よくわかる免疫学：獲得免疫編 第2回日本免疫不全・自己炎症学会、東京、2019年2月2-3日

河本宏 再生医療とがん免疫療法の現状と問題点 –再生T細胞を用いたがんの免疫細胞療法の開発– 第37回耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会、大阪、2019年2月7-9日

Kawamoto, H. Regeneration of antigen-specific T cells using the iPSC technology. 第2回 AMED-A\*STAR 合同ワークショップ -Stem Cell & Immune Cell Therapy-. Tokyo, Japan, February 26, 2019

Kashima, S., Nagano, S., Masuda, K., Kumehara, S., Kobayashi, Y., Inoue, T., Watanabe, T., Habuchi, T., Kawamoto, H. WT1-specific CTLs regenerated from T cell derived iPS cells exert therapeutic effect in xenograft model of renal cell carcinoma. 第2回 AMED-A\*STAR 合同ワークショップ -Stem Cell & Immune Cell Therapy-. Tokyo, Japan, February 26, 2019

河本宏 iPSC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18回日本再生医療学会総会、神戸、2019年3月21日

河本宏 iPSC細胞技術を用いたがん抗原特異的キラーT細胞の量産 –即納型T細胞製剤の開発に向けて– 第30回日本医学会総会2019中部、名古屋、2019年4月28日

河本宏 iPSC細胞技術を用いた抗原特異的T細胞の再生 –「即納型T細胞製剤」の開発– 第40回阿蘇シンポジウム、熊本、2019年7月26-27日

河本宏 Generation of CTLs from iPSCs transduced with TCR genes: toward the development of “off-the-shelf T cells” 第78回日本癌学会学術総会、京都、2019年9月26-28日

河本宏 iPSC細胞技術を用いた抗原特異的CTLの量産 第11回日本血液疾患免疫療法学会学術集会、東京、2019年10月5日

河本宏 iPSC細胞技術を用いたがん抗原特異的T細胞の量産 –即納型T細胞製剤の開発– 第57回日本癌治療学会学術集会、福岡、2019年10月24-26日

河本宏 Generation of CTLs from iPSCs Transduced with TCR Genes: Toward the Development of “Off-the-Shelf T cells” Cell & Gene Therapy Asia 2019、神戸、2019年11月11-12日

<国内での一般演題>

永野誠治 iPSC細胞技術を用いたがん特異的T細胞の再生 新学術領域ネオセルフ「若手の会」、熱海、2019年1月10-11日

長畠洋佑 Common epigenetic mechanisms for the repression of myeloid potential in various lineage blood cells. 第8回京都大学血液腫瘍内科学講座リトリート、京都、2019年2月10日、最優秀演題賞受賞

長畠洋佑、増田喬子、高折晃史、河本宏 Common epigenetic mechanisms for the repression of myeloid potential in various lineage blood cells. 第13回日本エピジェネティクス研究会年会、横浜、2019年5月28-29日

長畠洋佑、増田喬子、伊川友活、高折晃史、河本宏 種々の系列の血球におけるミエロイド分化能の共通抑制機構 第29回 Kyoto T Cell Conference、京都、2019年6月7-8日

永野誠治 iPS細胞技術を用いたがん抗原特異的T細胞の再生 第23回日本がん免疫学会総会、高知、2019年8月21-23日

嘉島相輝、前田卓也、永野誠治、増田喬子、井上高光、安川正貴、小林 恭、山崎俊成、小川 修、羽渕友則、河本 宏 WT1-specific cytotoxic T lymphocytes regenerated from T cell-derived iPS cells exert therapeutic effect in WT1-expressing renal cell carcinoma 第23回日本がん免疫学会総会、高知、2019年8月21-23日

Masaki Miyazaki, Hiroshi Kawamoto, Kazuko Miyazaki, The establishment of 3D genome structure for Rag1/Rag2 expression mediated by E2A/E-protein enhancer activity. The 48th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Hamamatsu, Dec 11-13, 2019.

永野誠治 Generation of CTLs from iPSCs transduced with TCR genes: development of “TCR cassette” method 第48回日本免疫学会学術集会、浜松、2019年12月11-13日

長畠洋佑、増田喬子、伊川友活、高折晃史、河本宏 Common epigenetic mechanisms for the repression of myeloid potential in various lineage blood cells. 第48回日本免疫学会学術集会、浜松、2019年12月11-13日

再生組織構築研究部門  
Department of Regeneration Science and Engineering  
再生免疫学分野（瀬原グループ）  
Laboratory of Immunology (Sehara Group)

連携教授 濑原 淳子 Coop. Prof. Atsuko Sehara  
特定助教 佐藤 文規 Assist. Prof. Fuminori Sato

私たちのグループは、骨格筋を中心に臓器の発生や再生の仕組みを研究してきた。世界的にみて近年の骨格筋発生・再生の研究は、それらに関与する幹細胞系譜やその分化の研究を中心に進められてきたが、それら幹細胞から形成される骨格筋が骨とどのように協調的に統合されて運動器を形成するのか、その肝心なところは未だ不明なところが多い。今回は、その疑問を解決するためには骨と骨格筋の間に介在する腱・結合組織の理解が必要である、という問題意識からスタートした研究を紹介する。発生過程で結合組織や腱で発現する転写因子を見出し、それが発生の早い段階で、結合組織と骨芽前駆細胞の分化を介して、胸骨形成に関与することを見出した研究である。

まず GAL4/UAS エンハンサートラップにより、ゼブラフィッシュ胚の腱・結合組織で発現する遺伝子をスクリーニングし、そのひとつとして Ebf3 という転写因子を同定した。Ebf3 の腱・結合組織における発現はマウス胚においても確認されたことから（図 1）、Ebf3<sup>flx/flx</sup> マウスを作製し運動器発生における Ebf3 の役割を検討した。

中胚葉に分類される間葉組織の発生起源には、体節と側板中胚葉（LPM）の 2 つがあり、体節からは椎骨や肋骨などの体幹の組織が、LPM からは四肢の骨や胸骨が発生する。Ebf1, Ebf2, Ebf4 との発現を比較すると、胸骨と周辺結合組織の起源となる胸部 LPM では Ebf3 のみが強く発現していた。それに対応して、全身（CAG-Cre）Ebf3 ノックアウト（KO）マウスでは椎骨と肋骨が正常に形成されたのに対し、LPM 由来の胸骨で骨化不全がみられた。胸骨の表現型は LPM（Prx1-Cre）・

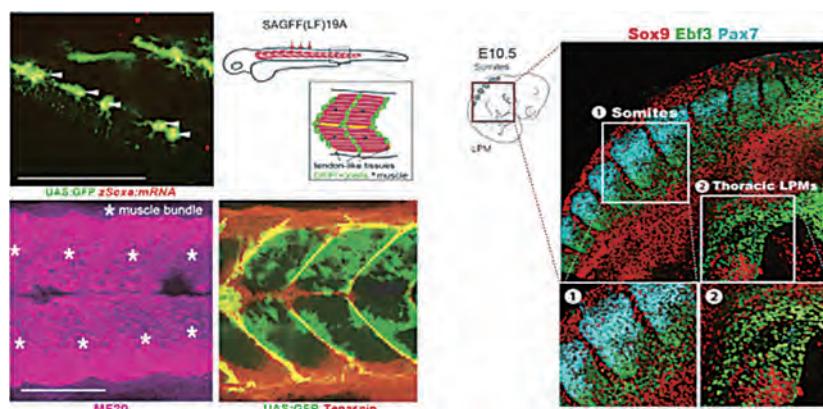


図 1 Ebf3 は、ゼブラフィッシュおよびマウスの骨格筋を取り囲む結合組織細胞（muscle connective tissue cells）や scleraxis 陽性腱前駆細胞で発現する。

腱 (Scx-Cre) 特異的 Ebf3 KO マウスにおいても再現され、Ebf3 が LPM 自律的にその骨化に関わることがわかった（図 2）。

LPM 特異的 Ebf3 KO マウスの胸部 LPM では、既に胸骨形成前の E12.5 前後で、Runx2+ 骨芽前駆細胞の減少が見られ、Ebf3 が LPM 間葉細胞からの Runx2+ 骨芽前駆細胞の産生という、早期の骨芽細胞系譜の分化を制御していることが示唆された。さらに、タモキシフェン誘導性 (Ubc-CreER<sup>T2</sup>) 時期特異的 Ebf3 KO マウスの表現型評価により、Ebf3 の骨芽細胞系譜での機能時期が、E10.5 前後であることを特定した（図 3）。この時期は、LPM での Ebf3 発現の開始時期と一致する。そこで、LPM における Runx2+ 骨芽前駆細胞の産生機構を探るため、LPM 特異的 Ebf3 KO 胚と Control 胚それぞれから、E10.5 胚の胸部 LPM 由来細胞をフローサイトメトリーで採取し、RNA-seq 解析による遺伝子発現比較を行った。その結果、KO マウスでは Runx2 の上流制御因子として報告されている Shox2 の発現低下、未分化線維芽細胞マーカー (Egr1/2, Osr1) の発現上昇などが見られた。また

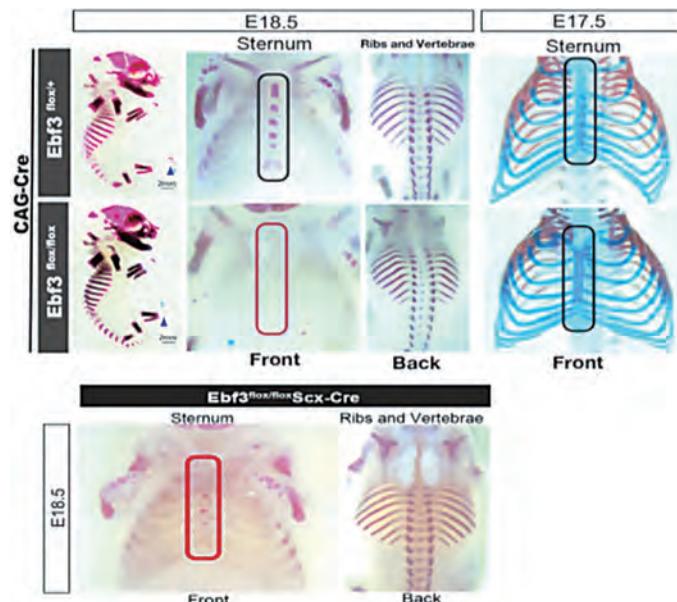


図 2 Ebf3 は、胸骨の骨化に関わる。CAG-Cre (全身) だけでなく、Prx1-Cre 側板中胚葉特異的 (Prx-Cre)・腱系譜特異的 (Scx-Cre) な欠損でも、その胸骨骨化表現型は再現される。

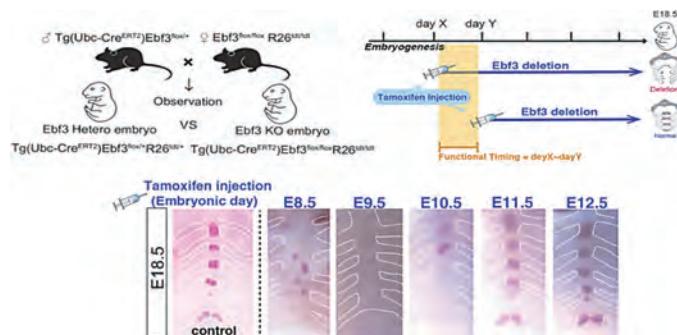


図 3 Ebf3 は、発生早期 (E9.5-10.5) に胸骨分化に関与する。

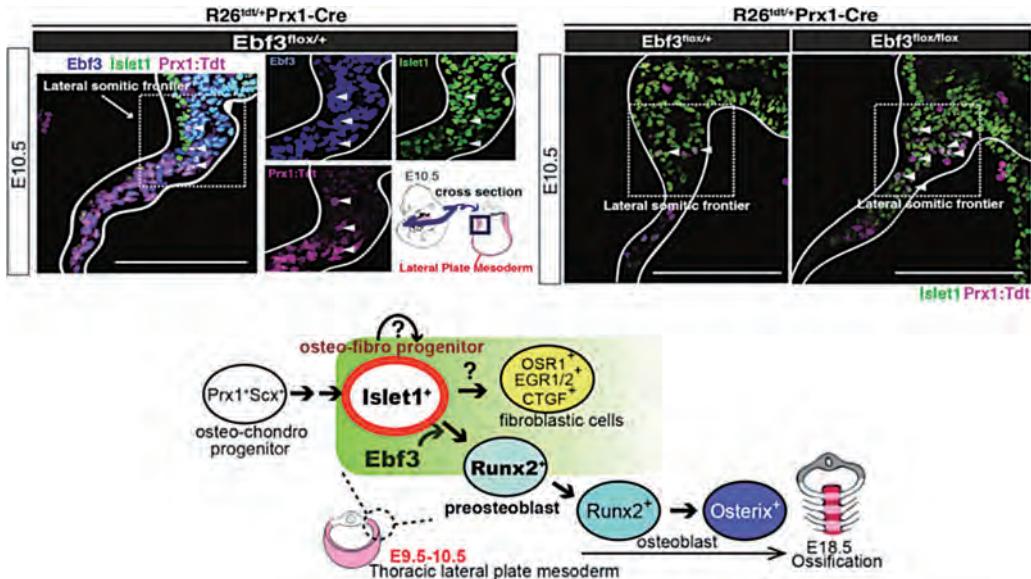


図4 *Ebf3*は、発生早期（E9.5-10.5）に胸骨分化に関与する。

この時期 *Ebf3* は、種々の未分化間葉系幹細胞で発現することが知られる *Islet1* と、沿軸中胚葉と側板中胚葉の境界領域（lateral somitic frontier と呼ばれる）で共発現する（上左図）。*Prx1-Cre* 特異的な *Ebf3* の欠損は、この境界領域の側板中胚葉内で、*Islet1*+ 細胞を増加させる（上右図）。*Ebf3* 欠損によって、種々の結合組織・線維芽細胞マーカーの発現も増加するのに対し、*Runx2*+ 骨芽前駆細胞は減少、骨芽前駆細胞の分化に関わる *Runx2*+ 細胞数は減少し、骨化は抑制される（下図）。（詳細は、Kuriki M et al, Development 2020 参照）

種々の未分化細胞の分化に関わる転写因子 *Islet1* の発現上昇が見られ、*Ebf3*KO E10.5 胚の LPM では *Islet1*+ 細胞の増加も見出された。これらの解析から、*Ebf3* が未分化 LPM 細胞からの線維芽細胞分化を抑制し、骨芽前駆細胞の産生を促進することが示唆された（図4）。これらの結果は、発生学上あるいは進化上、興味深い位置付けにある胸骨発生における *Ebf3* の役割を明らかにし、結合組織・腱・骨芽前駆細胞分化の新たな機構を示唆した（Kuriki et al, Development 2020）。

興味深いことに、結合組織・骨芽前駆細胞分化において *EBF3* が必要とされる時期は、体節から四肢や胸骨側板へと骨格筋前駆細胞が移動する時期に一致している。その時期の *EBF3* は、LPM と体節の境界領域で発現がみられることから、この領域が、体節から移動してくる骨格筋前駆細胞と側板中胚葉からなる運動器形成の開始部位と考えられる。そこで腱や骨芽前駆細胞の分化開始機構や *Ebf3* の役割を解明するとともに、この研究で見出された遺伝子群を糸口として骨格筋・軟骨・腱・骨の統合機構を解明することが重要である。

The research of our group has focused on mechanisms of stem cell differentiation during development and regeneration, mainly on those for skeletal myogenesis. Although cell lineages of skeletal muscle have been elucidated very well, we still do not know very well how skeletal muscle progenitors colonize a region near the skeletogenic cell components including osteogenic and chondrogenic cells together with tenocytes to

build the functional locomotorium during development. Recent studies on skeletal myogenesis are focusing on muscle connective tissue (MCT) cells that play critical roles in muscle development and maintenance. Different types of MCT cells intercalate into myofibers, and the heterogeneity of these MCT cells makes it difficult to understand their roles in morphogenesis of the locomotorium. Thus, the embryonic MCT cells represent a missing link to design a proof-of-concept experiment to integrate mechanisms underlying the incorporation of skeletogenic and myogenic cells into the unified locomotorium. From this idea, we screened enhancer-trap lines of zebrafish and identified the early B-cell factor 3 (Ebf3) as a transcription factor marking scleraxis (Scx)-expressing tenocytes and MCTs of zebrafish and mouse embryos in common. Ebf3 knockout mice had no effect on chondrogenesis but led to sternum ossification defects as a result of defective generation of Runx2+ pre-osteoblasts. Conditional and temporal Ebf3 knockout mice revealed requirements of Ebf3 in the lateral plate mesenchyme cells (LPMs), especially in tendon/MCT cells, and a stage-specific Ebf3 requirement at embryonic day 9.5-10.5. Upregulated expression of connective tissue markers, such as Egr1/2 and Osr1, increased number of Islet1+ mesenchyme cells, and downregulation of gene expression of the Runx2 regulator Shox2 in Ebf3-deleted thoracic LPMs suggest crucial roles of Ebf3 in the onset of lateral plate mesoderm differentiation towards osteoblasts forming sternum tissues.

### List of Publications

- Iida A, Wang Z, Sehara-Fujisawa A. (2019). Disruption of *integrin α4* in zebrafish leads to cephalic hemorrhage during development. **Genes & Genetic Systems.** 94, 177-179
- Arai H, Sato F, Yamamoto T, Woltjen K, Kiyonari H, Yoshimoto Y, Shukunami C, Akiyama H, Kist R, Sehara-Fujisawa A. (2019). Metalloprotease-dependent attenuation of BMP signaling restricts cardiac neural crest cell fate. **Cell Reports.** 29, 603-616.
- Hori S, Hiramuki Y, Nishimura D, Sato F, Sehara-Fujisawa A. (2019). PDH-mediated metabolic flow is critical for skeletal muscle stem cell differentiation and myotube formation during regeneration in mice. **FASEB J.** 33, 8094-8109.
- Gunawan F, Gentile A, Fukuda R, Tsedeke AT, Jiménez-Amilburu V, Ramadass R, Iida A, Sehara-Fujisawa A, Stainier DYR. (2019). Focal adhesions are essential to drive zebrafish heart valve morphogenesis. **J Cell Biol.** 218, 1039-1054.
- Iida A (2019). Male-specific asymmetric curvature of anal fin in a viviparous teleost, *Xenotoca eiseni*. **Zoology.** 134, 1-7

### List of Presentations

- Sogabe M, Ohzeki M, Sehara-Fujisawa A. Improving under-sampled imaging data quality in live tissue imaging. Focus on Microscopy 2019, England, April 14-17, 2019.

Kuriki M, Sato F, Sumiyama K, Kawakami K, Sehara-Fujisawa A. Roles of a transcription factor 19A in the osteoblast development of sternum. ECTS (European Calcified Tissue Society) 2019. Budapest, May 11-14, 2019.

Hori S, Hiramuki Y, Nishimura D, Sato F, Sehara-Fujisawa A. Metabolic flow from glycolysis to TCA cycle is critical for skeletal muscle stem cell differentiation and myotube formation during regeneration in mice. 2019 Myogenesis Gordon Research Conference. Berga, Italy, June 9-14, 2019.

瀬原淳子、堀新平、平向洋介、西畠大吾、佐藤文規。骨格筋衛星細胞の維持・分化における糖代謝制御の重要性。日本筋学会、東京、2019年8月2-3日

瀬原淳子。宇宙滞在の骨格筋維持への影響を探る。日本宇宙生物科学会第33回大会、千葉、2019年9月21-22日

鶴谷雅文、佐藤文規、田渕麻衣、川上浩一、瀬原淳子。ゼブラフィッシュ運動神経におけるBACE1活性の可視化。第42回日本分子生物学会、福岡、2019年12月3-6日

再生組織構築研究部門  
Department of Regeneration Science and Engineering  
臓器連関研究チーム  
**Inter-Organ Communication Research Team**

特定准教授 河岡 慎平      Associate Prof.      Shinpei Kawaoka

本研究グループでは、(1) がんに随伴する宿主の病態生理に関する研究、ならびに、(2) エンハンサー遺伝学に基づく新規ゲノム機能の解明、にとりくんでいる。

**(1) がんに随伴する宿主の病態生理に関する研究**

本研究では、がんをもつ宿主個体に生じる不調のメカニズムを解明し、がんとの共存を実現するための戦略を見つけようとしている。がん医療が発展した現在であっても、がんによる死者数は依然として多い。たとえば、2017年、我が国では37万人ががんで亡くなった。この数は総死者数の25%以上にのぼる。本グループでは、この状況を打破するための新しい方向性として、がんが治らなくてもがんで死なないようにするにはどうすれば良いかを明らかにするための研究をおこなっている。

具体的には、がんをもつ個体の宿主側の臓器で起こる変容を多階層オミクスで調べ、それぞれの変容に重要な宿主側の因子を同定する、という戦略を採用している。たとえば、後腸のがんが肝臓のコレステロール代謝遺伝子 *cyp7a1* 遺伝子を介して肝臓に炎症を起こすことを明らかにした (*Dis. Model. Mech.*, 2018)。また、乳がんが、肝臓の概日リズム遺伝子の発現パターンを搅乱し、肝臓にさまざまな異常を引き起こすこともわかった (*Oncotarget*, 2017)。本年度は、これらの研究を基盤とした研究を推進し、がんに随伴する宿主の異常に重要な遺伝子やエンハンサーを複数同定、その機能解析をおこなった。

**(2) エンハンサー遺伝学に基づく新規ゲノム機能の解明**

本研究では、エンハンサーの機能解析をとおして新しいゲノム機能を明らかにし、エンハンサーが制御する生命現象のメカニズムをあぶりだすことを目指している。ゲノミックエンハンサーは、標的遺伝子がいつ・どこで・どのくらい発現するかを決める非コードDNA領域の総称である。マウスやヒトのゲノムには10万以上のエンハンサーが存在するとされる。一方で、個体における生理機能が明らかにされたエンハンサーは0.3%未満である。ゲノム情報やエピゲノム情報が充実した今、エンハンサーの機能解析は、ゲノム科学分野において強力に推進すべき課題のひとつである。

本年度は、胸腺細胞の発生に重要な新しいエンハンサーを発見し、その機能を明らかにした (*Nat. Commun.*, 2019)。本エンハンサーは、負の選択と呼ばれるプロセスに重要なエンハンサーであった。負の選択とは、胸腺において、自己抗原と強く結合しすぎるT細胞受容体 (T cell receptor; TCR) を発現する胸腺細胞をアポトーシスにより除去するシステムを指す。負の選択では、自己抗原とTCR

の結合強度が、アポトーシス強度へと変換されることが重要であるが、そのメカニズムは不明であった。本研究では、このシグナル変換を担保する新しいエンハンサーを発見し、負の選択を支えるメカニズムのひとつを明らかにすることができた。

Our group aims to (1) understand the mechanisms behind cancer-induced host pathophysiology and to (2) explore novel genome functions via enhancer genetics.

### (1) Studies on the mechanisms underlying cancer-induced host pathophysiology

We aim to reveal the mechanisms of how host homeostasis is disrupted in cancer-bearing animals and to establish novel therapeutics that can ameliorate cancer's adverse effects on the host, realizing symbiosis with incurable cancers. Despite advancements in cancer therapeutics, there are still a lot of cancer-induced deaths. For example, approximately 370,000 people died due to cancers in Japan in 2017, which accounts for more than 25% of the total deaths in the year. Our group tackles this difficult problem from a new perspective: conferring organisms resistance against cancer-induced pathophysiology so that they do not die due to incurable cancers.

Our approach includes i) multi-omics investigation on alterations of host organs in cancer-bearing animals and ii) identification of host factors responsible for such alterations. We recently found that gut cancers promote liver inflammation via a host factor *cyp7a1* that encodes cholesterol-metabolizing enzyme (*Dis. Model. Mech.*, 2018). Furthermore, we discovered that breast cancers rewire hepatic circadian gene expression and cause various liver abnormalities (*Oncotarget*, 2017). Based on these accomplishments, in this fiscal year, we performed functional analyses on a couple of host genes and enhancers we identified.

### (2) Exploring novel genome functions via enhancer genetics

We aim to understand the mechanisms underlying biological phenomena governed by *cis*-regulatory enhancers via enhancer genetics. Genomic enhancers are non-coding DNA elements that determine when, where, and how much a target gene (genes) is expressed. In mammalian genomes, it is estimated that more than 100,000 active enhancers exist. Yet, functional analyses of genomic enhancers are far from complete: only less than 0.3% of genomic enhancers have been functionally characterized *in vivo*. Functional analyses of enhancers are one of the most important remaining tasks in genome biology.

In this fiscal year, we identified an enhancer that plays an important role for thymocytes development in the thymus (*Nat. Commun.*, 2019). In the thymocytes, a process called negative selection eliminates potentially disease-causing T cells. This process induces apoptosis for T cells harboring T cell receptor (TCR) that strongly recognize self-antigen. Yet, how affinity between a TCR and self-antigens is converted to apoptosis to establish negative selection had not been fully understood. Our study found the enhancer that is required for thymocytes to convert TCR signal strength to apoptosis, uncovering a novel mechanism of negative selection.

### List of publications

Hojo MA, Masuda K, Hojo H, Nagahata Y, Yasuda K, Ohara D, Takeuchi Y, Hirota K, Suzuki Y, Kawamoto H, and \*Kawaoka S. (2019). Identification of a genomic enhancer that enforces proper apoptosis induction in thymic negative selection. **Nature Communications.** 10: 2603.

### List of presentations

河岡 慎平 がんが個体に悪影響を与える仕組：がん悪液質（Cachexia）の解明 第40回阿蘇シンポジウム「がん、免疫、感染症研究のフロントライン」、熊本、2019年6月26日

河岡 慎平 エンハンサー遺伝学を活用した新規ゲノム機能の解明 金沢大学がん進展制御研究所 分子生体応答研究分野セミナー、金沢、2019年7月9日

Kawaoka, S. Utilizing enhancer genetics to understand the mechanisms underlying cancer-dependent alteration in host organs. The 14th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences. Osaka, October 2-3, 2019.

Kawaoka, S. Dissecting significance of single gene expression rhythm via enhancer genetics and multi-omics analyses. The 20th International Conference on Systems Biology. Okinawa, October 31, 2019.

河岡 慎平 エンハンサー遺伝学の活用：免疫、概日リズム、がん悪液質 東京大学理学部セミナー、東京、2019年11月29日

河岡 慎平 エンハンサー遺伝学と多階層オミクス解析によりがんと宿主の関係性を紐解く 第42回日本分子生物学会年会、福岡、2019年12月2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  
助 教 金 永輝 Assist. Prof. Yonghui Jin

本研究分野は骨格系組織の増殖分化機構と癌化機構を理解することで、骨格系疾患の病態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

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して下記の研究を行っている。

#### 1) iPS 細胞を用いた骨・軟骨分化過程の解析

iPS 細胞から骨及び軟骨細胞を分化誘導する方法を開発するとともに、その過程を詳細に解析することで分化機構を解明することを目指している。骨分化に関しては、神経堤由来の間質細胞を経た多段階分化法に加えて、レチノイン酸シグナルを用いた単段階誘導法を開発し、更にウイルス・再生医科学研究所安達研究室との共同研究にて、骨様結節の形成過程を共焦点蛍光顕微鏡により三次元的に可視化することに成功した(図 1)。免疫細胞染色等を応用することで、この過程が骨芽細胞から骨細胞への分化過程を再現して

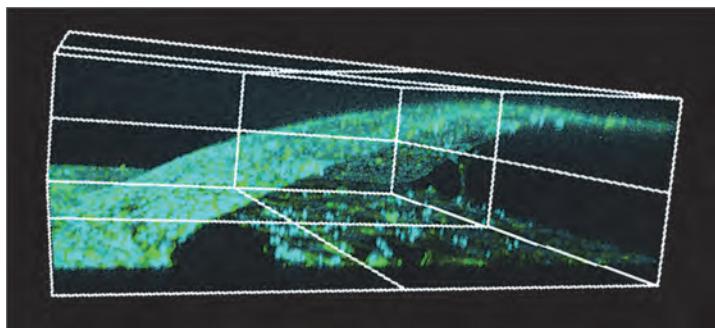


図 1. GFP 標識ヒト iPS 細胞により形成された骨様結節。結節の表面には骨芽細胞がシート状に分布し、そこから内部に細胞突起を有する骨細胞が内部に移動している。

いることを確認している。

軟骨に関しては神経堤由来の方法に加えて、沿軸中胚葉から体節を経て、骨軟骨前駆細胞を誘導する方法を開発し、そこから更に肥大軟骨細胞まで誘導することに成功した。また骨軟骨前駆細胞を免疫不全マウスへ移植することで、成長軟骨板様の構造を作製することに成功した(図2)。これは成長軟骨における軟骨細胞の増殖分化機構を解析する資材となるだけでなく、後述の成長軟骨板の異常が原因である疾患の解析にも有用である。

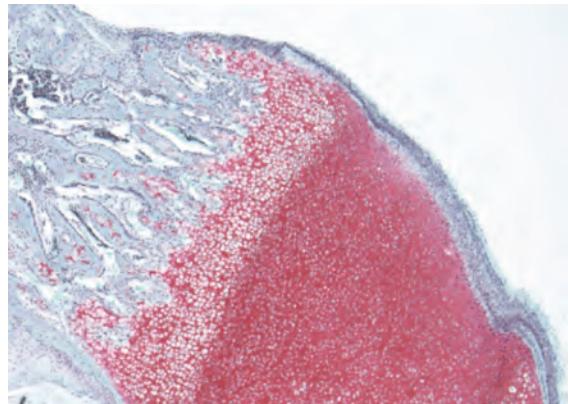


図2. 体節由来の骨軟骨前駆細胞を移植して作製された成長軟骨板様組織。サフラニンO陽性の軟骨組織と骨組織で構成されている。

## 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。我々はこれまでに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い、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、上記の骨及び軟骨分化誘導法を用いて、骨形成不全症などの骨疾患、多発性骨端異形成症などの成長軟骨疾患の病態解明ならびに創薬研究を行っている。

## 3) 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。

The objectives of our laboratory are to develop new therapeutic modalities for disorders in the skeletal system based on their molecular mechanisms by understanding the processes of physiological growth and differentiation, and also transformation of mesenchymal cells. Following projects are currently undertaken.

## **1. Researches on mesenchymal stem cells**

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

## **2. Researches on mesenchymal tissues using pluripotent stem cells**

Human iPS cells 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 differentiation process of bone and cartilage cells using iPS cells.**

We have been establishing the method to induce bone and cartilage cells from human iPS cells and also studying the molecular mechanisms of differentiation in detail. As for osteogenic differentiation, we established the multistep method to induce mesenchymal cells via neural crest, and also developed one-step method using retinoic acid signal. Using this one-step method, we have succeeded three-dimensional visualization of the bone-like nodule formation by the collaboration with Prof. Adachi of inFront (Fig. 1), which will help us to understand how osteogenic lineage cells such as osteoblasts and osteocytes develop. As for chondrogenic differentiation, in addition to the method via neural crest, we established the method to induce osteochondral precursors via paraxial mesoderm and somite, and succeeded to induce hypertrophic chondrocytes from them. We also succeeded to make growth plate like structures by transplanting pellets of osteochondral progenitor cells (Fig. 2), which will be a useful tool to understand the differentiation process of growth plate and also to study the growth plate-related diseases.

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

In most of cases, the pathophysiology in hereditary skeletal 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. Also we have identified an mTOR inhibitor, rapamycin, as a candidate drug for FOP, and started multicenter double-blinded investigator-initiated clinical trial of this drug for FOP 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 2017. Using the induction methods described in the previous section, we are now investigating the pathogenesis of intractable bone and cartilage diseases such as osteogenesis imperfecta and multiple epiphyseal dysplasia.

### 3) 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.

#### List of Publications

- Kawai S, Yoshitomi H, Sunaga J, Alev C, Nagata S, Nishio M, Hada M, Koyama Y, Uemura M, Sekiguchi K, Maekawa H, Ikeya M, Tamaki S, Jin Y, Harada Y, Fukiage K, Adachi T, Matsuda S, Toguchida J. (2019) In vitro bone-like nodules generated from patient-derived iPSCs recapitulate pathological bone phenotypes. **Nat. Biomed. Eng.** 3, 558-570.
- Otomo N, Takeda K, Kawai S, Kou I, Guo L, Osawa M, Alev C, Kawakami N, Miyake N, Matsumoto N, Yasuhiko Y, Kotani T, Suzuki T, Uno K, Sudo H, Inami S, Taneichi H, Shigematsu H, Watanabe K, Yonezawa I, Sugawara R, Taniguchi Y, Minami S, Kaneko K, Nakamura M, Matsumoto M, Toguchida J, Watanabe K, Ikegawa S. (2019) Bi-allelic loss of function variants of TBX6 causes a spectrum of malformation of spine and rib including congenital scoliosis and spondylocostal dysostosis. **J. Med. Genet.** 56, 622-628.
- Komura S, Ito K, Ohta S, Ukai T, Kabata M, Itakura F, Semi K, Matsuda Y, Hashimoto K, Shibata H, Sone M, Jo N, Sekiguchi K, Ohno T, Akiyama H, Shimizu K, Woltjen K, Ozawa M, Toguchida J, Yamamoto T, Yamada Y. (2019) Cell-type dependent enhancer binding of the EWS/ATF1 fusion gene in clear cell sarcomas. **Nat. Commun.** 10, 3999.
- Nishida Y, Kawai A, Toguchida J, Ogose A, Ae K, Kunisada T, Matsumoto Y, Matsunobu T, Takahashi K, Nishida K, Ozaki T. (2019) Clinical features and treatment outcome of desmoid-type fibromatosis: based on a bone and soft tissue tumor registry in Japan. **Int. J. Clin. Oncol.** 24, 1498-1505.
- 川井俊介、日野恭介、池谷真、戸口田淳也 FOP の発症メカニズムと分子治療薬への展開 (2019) **THE BONE** 33, 45-50.
- 戸口田淳也 疾患特異的 iPS 細胞を用いた創薬研究 (2019) **BIO Clinica** 34, 1301-1305.
- 戸口田淳也 疾患特異的 iPS 細胞を活用した病態解明から創薬 日本小児科医会会報 58, 3-5.

## List of Presentations

- 戸口田淳也 iPS 細胞を活用した希少疾患の病態解明から創薬 第15回宮城がんセンターフォーラム、名取、2019年2月16日
- 戸口田淳也 進行性骨化性線維異形成症レジストリの構築に向けて 第1回難病プラットフォーム公開シンポジウム、東京、2019年3月2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18回日本再生医療学会、神戸、2019年3月21日
- 戸口田淳也、川井俊介、須長純子、安達泰治、吉富啓之 iPS細胞を活用した骨分化過程の再構築と疾患応用 第18回日本再生医療学会、神戸、2019年3月21日
- 戸口田淳也 iPS細胞を用いた難病への挑戦 第18回日本再生医療学会、米子、2019年4月14日
- 戸口田淳也 疾患特異的iPS細胞を活用した病態解明から創薬 第30回日本小児科医会総会フォーラム、京都、2019年6月8日
- 戸口田淳也 細胞製品を用いた再生医療の展開 第56回日本リハビリテーション医学会、神戸、2019年6月14日
- 戸口田淳也 難治性骨疾患に対するiPS細胞を活用した治療法開発 第66回整形外科カレントコンセプト、東京、2019年7月6日
- 戸口田淳也 iPS細胞を活用した骨軟骨疾患の病態解析から創薬 第45回御茶ノ水整形外科卒後研修セミナー、東京、2019年7月14日
- 戸口田淳也 疾患特異的iPS細胞を活用した骨軟骨疾患の病態再現から創薬 第40回日本再生・炎症医学会、神戸、2019年7月17日
- 戸口田淳也 iPS細胞を活用した難治性骨軟骨疾患の病態解明から創薬 第18回岐阜整形外科セミナー、岐阜、2019年7月20日
- 戸口田淳也 iPS細胞を活用した病態解明から創薬 第20回京大病院iPS細胞・再生医学研究会、京都、2019年7月26日
- 戸口田淳也 疾患特異的iPS細胞を活用した病態解析と創薬 第5回日本筋学会学術集会、東京、2019年8月2日
- 戸口田淳也 難病克服に向けて～iPS細胞が開いた新しい道筋 第89回知の拠点セミナー、東京、2019年8月23日
- 戸口田淳也 iPS細胞研究の現況と展望 第38回全国社会福祉法人経営者大会、鳥取、2019年9月12日
- 戸口田淳也 iPS細胞の医療応用：現状と展望 第30回MEDDEC X HI-DEC交流会、神戸、2019年9月17日

戸口田淳也 骨軟骨疾患における iPS 細胞の医療応用 第 133 回中部日本整形外科学会、  
神戸、2019 年 9 月 20 日

戸口田淳也、川井俊介、須長純子、安達泰治 骨分化過程の *in vitro* での再構築と応用 第 37 回日本骨代謝学会学術集会、神戸、2019 年 10 月 12 日

戸口田淳也、金永輝、川井俊介、前川裕継、樋本玲菜 患者由来 iPS 細胞を活用した骨化異常疾患の病態解析 第 37 回日本骨代謝学会学術集会、神戸、2019 年 10 月 14 日

戸口田淳也 運動器の先端医療～現状と展望～ 佛教大学保健医療技術学部講演会、京都 2019 年 10 月 30 日

戸口田淳也 iPS（アイピーエス）細胞ってどんなもの？ 第 24 回青少年のための科学の祭典 京都大会、京都、2019 年 11 月 9 日

戸口田淳也 iPS 細胞による夢の医療の実現に向けて 第 18 回ゆめ講演会、米子、2019 年 11 月 21 日

Toguchida J Application of human iPS cells for *in vitro* bone research Japan Bone Academy、東京、2019 年 12 月 14 日

金永輝、吉富啓之、戸口田淳也 進行性骨化性線維異形成症における異所性骨化形成機構の解析 第 18 回日本再生医療学会、神戸、2019 年 3 月 23 日

日野恭介、池谷真、太田章、戸口田淳也 新規 mTOR signaling modulator は FOP における異所性骨化を抑制する 第 18 回日本再生医療学会、神戸、2019 年 3 月 23 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 2 回西日本肉腫研究会 大阪、2019 年 3 月 30 日

川井章、上田孝文、荒木信人、石井猛、戸口田淳也、平賀博明、松本誠一 日本サルコーマ治療研究学会（JSTAR）の発足と理念 第 92 回日本整形外科学会学術総会、横浜、2019 年 5 月 10 日

大伴直央、武田和樹、川井俊介、小倉洋二、川上紀明、小谷俊明、須藤英毅、米澤郁穂、宇野耕吉、種市洋、渡辺慶、三宅紀子、南昌平、重松英樹、菅原亮、谷口優樹、中村雅也、松本守雄、戸口田淳也、渡辺航太、千葉一裕、池川志郎 TBX6 ミスセンス変異は TBX6 タンパク質の細胞内局在異常を来し、先天性側弯症および脊椎肋骨異形成症を引き起こす 第 92 回日本整形外科学会学術総会、横浜、2019 年 5 月 11 日

大槻文悟、藤林俊介、岡本健、坂本昭夫、清水孝彬、戸口田淳也、松田秀一 骨盤仙骨悪性腫瘍に対する骨盤半截術（Enneking Type I+IV）後の再建 第 92 回日本整形外科学会学術総会、横浜、2019 年 5 月 11 日

Kamakura T、Jin Y、Tamaki S、Watanabe M、Okamoto T、Yoshitomi H、Toguchida J Functional significance of mutant IDH1 and p16INK4A in cartilage-forming tumor 第 92 回日本生化学会大会、横浜、2019

年9月18日

迎 恭輔、竹信 尚典、杉野 隆一、大平 美紀、佐藤 俊平、遠藤 悠紀、岡田 龍、春田 雅之、戸口田 淳也、長船 健二、中畑 龍俊、上條 岳彦 iPS 細胞由来神経堤細胞の神経芽種細胞モデル開発 第78回日本癌学会総会、京都、2019年9月26日

玉置 さくら、永田 早苗、湯川 愛友、西尾 恵、金 永輝、吉富 啓之、戸口田 淳也 多能性幹細胞を用いた in vitro 肉腫発生機序解明の試み 第78回日本癌学会総会、京都、2019年9月26日

鎌倉 武史、永田 早苗、湯川 愛友、西尾 恵、金 永輝、吉富 啓之、戸口田 淳也 軟骨形成性腫瘍における変異型 IDH1 及び p16 の機能的意義について 第78回日本癌学会総会、京都、2019年9月27日

樋本玲菜、川井俊介、戸口田淳也、吉富啓之 患者由来 iPS 細胞を用いた後縦靱帯骨化症の病態解析 第37回日本骨代謝学会学術集会、神戸、2019年10月12日

前川裕継、吉富啓之、川井俊介、金永輝、松田秀一、戸口田淳也 進行性骨化性線維異形成症に対する mTOR 阻害剤の有効性の検討 第37回日本骨代謝学会学術集会、神戸、2019年10月13日

川井俊介、吉富啓之、須長純子、松田秀一、安達泰治、戸口田淳也 ヒト iPS 細胞を用いた in vitro 骨分化過程の可視化の試み 第37回日本骨代謝学会学術集会、神戸、2019年10月13日

前川裕継、吉富啓之、川井俊介、金永輝、西尾恵、永田早苗、松田秀一、戸口田淳也 進行性骨化性線維異形成症に対する mTOR 阻害剤の有効性の検討 第34回日本整形外科学会基礎学術集会、横浜、2019年10月17日

川井俊介、吉富啓之、須長純子、永田早苗、西尾恵、松田秀一、安達泰治、戸口田淳也 ヒト iPS 細胞を用いた in vitro 骨分化過程の可視化の試み 第34回日本整形外科学会基礎学術集会、横浜、2019年10月17日

再生組織構築研究部門  
Department of Regeneration Science and Engineering  
発生エピゲノム分野  
**Laboratory of Developmental Epigenome**

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

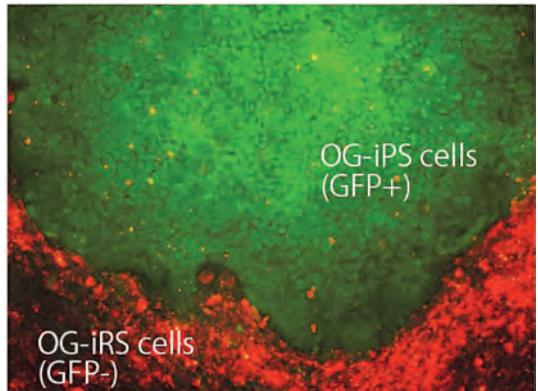


Fig.1. A GFP-positive iPS cell colony converted from OG-iRS cell

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** 24, 126-138.

Teshigawara, R., Hirano, K., Nagata, S., Huang, D. and Tada, T. (2019). Visualization of sequential conversion of human intermediately reprogrammed stem cells into iPS cells. **Genes to Cells** 24; 667-673.

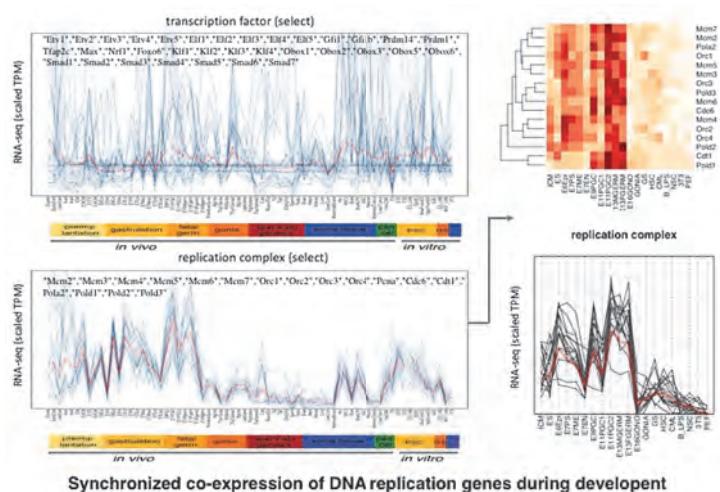
## 【中馬グループ】

当研究グループでは、哺乳類の多能性幹細胞・生殖細胞の発生サイクル（生殖系列サイクル）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の理解と再構成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、これら生殖系列サイクルと分化体細胞の遺伝的安定性の相違の分子機序は体系的に理解されていない。

我々は特に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発生段階に応じた機能調節機構の解明に取り組んでいる。特に、胚性多能性幹（ES）細胞や生殖幹（GS）細胞を用いたマルチオミクス解析と機能遺伝子スクリーニングに焦点を置いて、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、幹細胞リソースの品質管理に関する新規技術開発（バイオインフォマティクス、画像解析技術等）の研究開発を進めている。

## 【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**

- Yamauchi K, Ikeda T, Hosokawa M, Nakatsuji N, Kawase E, Chuma S, Hasegawa K, Suemori H. Overexpression of Nuclear Receptor 5A1 Induces and Maintains an Intermediate State of Conversion between Primed and Naive Pluripotency. *Stem Cell Reports.* (in press).
- Ishiguro KI, Matsuura K, Tani N, Takeda N, Usuki S, Yamane M, Sugimoto M, Fujimura S, Hosokawa M, Chuma S, Ko MSH, Araki K, Niwa H. MEIOSIN Directs the Switch from Mitosis to Meiosis in Mammalian Germ Cells. *Dev Cell.* 2020 Feb 24;52 (4):429-445.
- Shiromoto Y, Kuramochi-Miyagawa S, Nagamori I, Chuma S, Arakawa T, Nishimura T, Hasuwa H, Tachibana T, Ikawa M, Nakano T. GPAT2 is required for piRNA biogenesis, transposon silencing, and maintenance of spermatogonia in mice. *Biol Reprod.* 2019 Jul 1;101 (1):248-256.

### **List of Presentation**

中馬新一郎 . 生殖系列サイクルの発生段階に応じた遺伝的安定性の調節機構 . 遺伝研研究会「有性生殖にかかわる染色体・クロマチン・核動態に関する研究会」2019.6.5-6. 三島 .

PARI regulates both replication stress response and DNA damage response to maintain genome stability in mice. Ayako L. Mochizuki, Ami Katanaya, Eri Hayashi, Mihoko Hosokawa, Emiko Moribe, Akira Motegi, Masamichi Ishiai, Minoru Takata, Gen Kondoh, Hitomi Watanabe, Norio Nakatsuji, Shinichiro Chuma. ICRR2019. August 25-29 2019. Manchester, UK,

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。臨床研究に使用するヒト ES 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た施設で作製する必要がある。本施設はその許可を得ており、ヒト ES 細胞の樹立施設としては唯一のものである。

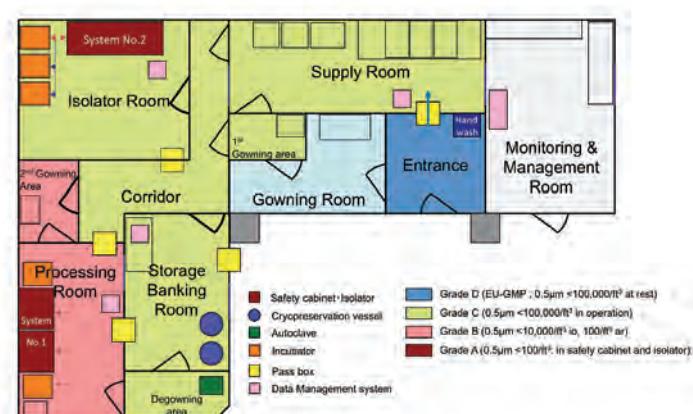
これと並行して、臨床用ヒト ES 細胞の樹立研究について文部科学大臣および厚生労働大臣の確認を 2017 年 6 月に受け、臨床用 ES 細胞の樹立を開始した。

2018年5月には初めての臨床用ヒト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、受理された。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る。

2019年12月までに4株のヒトES細胞の作製を終えており今後も年間数株のペースで細胞株を増やしていくことができると考えている。

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。

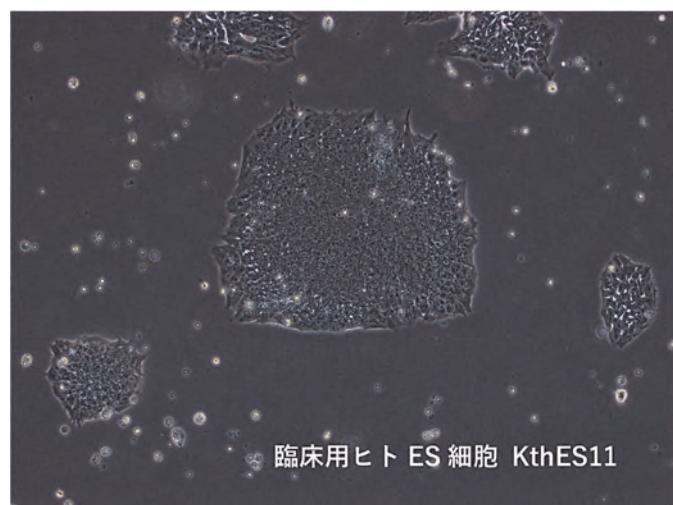
### Cell Processing Facility for clinical-grade human ES cells



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 researches, 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 total of 4 cell lines, by December 2019. Frozen stocks of these cell lines are ready for distribution to research institutes aiming clinical application of hESCs.

### List of Publications

Yamauchi, K., Ikeda, T., Hosokawa, M., Nakatsuji, N., Kawase, E., Chuma, S., Hasegawa, K., and Suemori, H. (in press). Overexpression of nuclear receptor 5A1 induces and maintains an intermediate state of conversion between primed and naive pluripotency. **Stem Cell Reports.**

Kim, JH., Alderton, A., Crook, JM., Benvenisty, N., Brandsten, C., Firpo, M., Harrison, PW., Kawamata, S., Kawase, E., Kurtz, A., Loring, JF., Ludwig, T., Man, J., Mountford, JC., Turner, ML., Oh, S., da Veiga Pereiraj, L., Pranke, P., Sheldon, M., Steeg, R., Sullivan, S., Yaffe, M., Zhou, Q., Stacey, GN. (2019) A report from a workshop of the International Stem Cell Banking Initiative, held in collaboration GAiT and the Harvard Stem Cell Institute, Boston 2017. **Stem Cells.** 37, 1130-1135

川瀬栄八郎 (2019). 『阻害剤・活性化剤ハンドブック』 第41章 ES細胞関連薬剤 「秋山徹。河府和義編」

### List of Presentations

末盛博文「標準細胞とゲノム解析・編集」第2回幹細胞情報学イニシアチブ研究、京都、2019年10月19日

末盛博文、川瀬栄八郎、高田圭、中谷良子「ES細胞による再生医療の現状と展望」「臨床用ヒトES細胞：作る、使う」第18回日本再生医療学会総会、神戸、2019年3月22日

末盛博文 「再生医療におけるES/iPS細胞応用の最前線」「企業でのES細胞の活用法」リプロセル主催プレミアムセミナー、横浜、2019年1月23日

高田圭、淺田孝、稻田淳史、後藤俊、小橋創一、川瀬栄八郎、末盛博文 CPCにおける手培養と自動培養装置を組み合わせた工程管理システムの検討、第18回日本再生医療学会総会、大阪、2019年3月21-23日

高田圭、川瀬栄八郎、中谷良子、末盛博文 ヒトES/iPS細胞の未分化性評価における遺伝子発現試験の検討 第18回日本再生医療学会総会、大阪、2019年3月21-23日

青山朋樹、佐藤圭司、中谷良子、山崎静香、川瀬栄八郎 蓄熱材を用いた超低温搬送容器の開発 第18回日本再生医療学会総会、神戸、2019年3月21日

川瀬栄八郎、高田圭、中谷良子、末盛博文：京都大学 ウィルス・再生医科学研究所における新規臨床用ヒトES細胞KthES11の樹立とストック作製 第18回日本再生医療学会総会、神戸、2019年3月21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。受精研究では、前年度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が、本年度は、サル精子やヒト精子でのこの抗原の解析を行うために、モノクローナル抗体を作製し、引き続き解析を進めている。一方、免疫研究では、自己免疫疾患を惹起するTヘルパー細胞の新規エフェクタープログラムの分子基盤を明らかにし、新しい慢性炎症の維持機構を同定した。これらの鍵となる因子を標的とした免疫学的制御法の開発により、自己免疫疾患に対する新規治療法のシーズとして期待できる。

#### 1) サルおよびヒト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、マウス精子で特異的に発現し、受精過程にも深く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。前年度は、マウス抗原に対するモノクローナル抗体を作製し、性状解析をおこなったが、本年度は、この抗原の臨床的意義を解明するために、サルおよびヒトでの解析を開始した。これまでマウス抗原に対して9種類のモノクローナル抗体を作製したので、これらでまずサル精子を用いたFACS解析を行った。その結果、これらの中にサル精子に反応するモノクローナル抗体はなかった。これは、マウス抗原とヒト抗原のアミノ酸配列が、75%程度のホモロジーしかないことに起因していると考えられた。そこで、本年度は、ヒト抗原およびサル抗原に反応するモノクローナル抗体作製を開始した。まず、ヒト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4種類のモノクローナル抗体を作製した。次にこれらを用いてFACS解析を行ったところ、この4種類の抗体はすべて、ヒトSSA発現細胞、サルSSA発現細胞およびヒト精子に反応することが確認できた。

#### 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

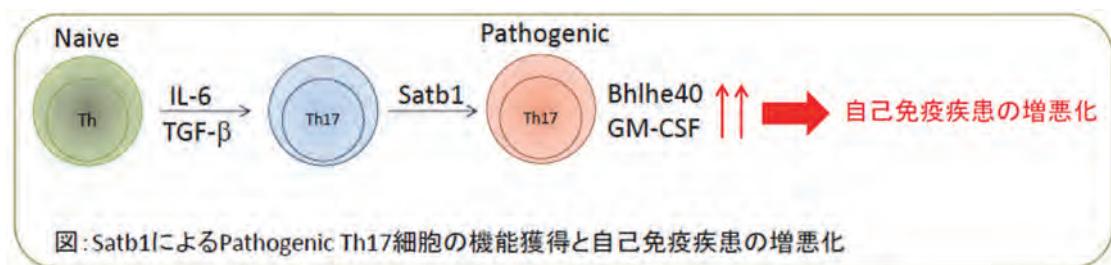
惹起される。

本年度、IL-17 産生 T ヘルパー (Th17) 細胞の新規エフェクタープログラムの制御機構を見いだし、自己免疫疾患に対する新しい免疫学的治療法のシーズとなる成果を得た。

ゲノムオーガナイザーとして知られる special AT-rich sequence-binding protein-1 (Satb1) は様々な転写因子と複合体を形成することで特定の遺伝子発現ネットワーク制御の鍵となる因子である。これまで免疫細胞の発生に関わることが報告されてきたが、末梢の T 細胞では Satb1 の発現レベルが低下し、エフェクター T 細胞の分化、機能における Satb1 の役割は不明であった。

私たちは、Th17 細胞特異的に Satb1 を欠損する遺伝子改変マウスを用い、Th17 細胞の維持、エフェクター機構における Satb1 の役割を解析した。Th17 細胞の維持および生理的なサイトカイン産生機能に Satb1 は必要なく、Satb1 欠損マウスのパイエル板や腸管の粘膜固有層に常在する Th17 細胞の細胞数、IL-17 産性能に影響は見られなかった。一方、実験的自己免疫性脳脊髄炎では、Satb1 が炎症惹起性 Th17 細胞の特異的な遺伝子発現制御に関わり、転写因子 Bhlhe40 依存性の GM-CSF 産生およびPD-1の発現抑制を介して Th17 細胞の炎症性エフェクタープログラムを促進していることを明らかにした(図)。結果として、Th17 細胞特異的な Satb1 欠損マウスでは実験的自己免疫性脳脊髄炎の誘導が強く抑制され、炎症組織内における特定の Th17 関連炎症プロファイルが低下した。

これらの結果から、自己免疫疾患に対する新規治療戦略として Th17 細胞の発現する Satb1 を標的とした免疫学的制御法の開発が期待できる。



This laboratory aims to understand the mammalian fertilization process and the molecular and cellular mechanisms underlying how immune tolerance is maintained and self-reactive T cells attack our body. In 2019, we performed characterization of the antigen stably expressed on the mouse sperm surface. In this year, we developed monoclonal antibodies to analyze this antigen in monkey or human sperm. Moreover, we elucidated a molecular basis of the effector program of inflammatory T helper cells mediating autoimmune disease. Targeting this pathway in inflammatory T helper cells could be a potential immunotherapy for various autoimmune and inflammatory diseases.

## **1) Development and characterization of monoclonal antibodies against the monkey and human sperm surface antigen**

Some female infertilities are caused by an excessive immune response to sperm antigens in the genital mucosa, but the molecular mechanisms and responsible antigens are not well understood. We previously attempted to screen for sperm surface proteins to identify highly immunogenic antigens that are specifically expressed in mouse sperm and are also deeply involved in the fertilization process. As a result, SSA was identified as one candidate molecule. In the last year, monoclonal antibodies against mouse SSA were developed and their characterizations were performed. In this year, we started analyses on monkey or human sperm to elucidate the clinical significance of this antigen. To date, nine types of monoclonal antibodies against mouse antigen have been developed, and FACS analysis using monkey spermatozoa was first performed. As a result, none of them could react to monkey sperm. This seemed to be due to the fact that the amino acid sequences between mouse and human SSA had only about 75% homology. Therefore, we have begun development of monoclonal antibodies that react with human or monkey SSA. First, human SSA-expressing cells were prepared, immunized with Balb / c mice and finally developed four monoclonal antibodies. Next, FACS analyses were performed using them and found that all of them could react to human SSA-expressing cells, monkey SSA-expressing cells or human sperm.

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

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

We found a molecular basis of the effector program in IL-17-producing T helper (Th17) cells in chronic inflammation and the development of inhibiting the key pathway could be a novel immunotherapy for autoimmune disease.

The genome organizer, special AT-rich sequence-binding protein-1 (Satb1), plays a pivotal role in the regulation of global gene networks and is indispensable for the development of thymic T cells. However, it remains unknown how the differentiation and effector program of the T helper subsets in the periphery are regulated by Satb1.

Using Th17-specific conditional knockout mice, we investigated a role of Satb1 in the maintenance and effector functions of Th17 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). Satb1 was dispensable for the differentiation and non-pathogenic functions of Th17 cells. However, Satb1 regulated gene expression profiles in pathogenic Th17 cells in the central nervous system and promoted the pathogenic effector program of encephalitogenic Th17 cells by regulating GM-CSF via the transcription factor Blhhe40 and inhibiting PD-1 expression. As a result, the development and severity of EAE were greatly reduced in Th17-specific Satb1-deficient mice, accompanying a decrease in the Th17-associated gene expression profile.

These results indicate that clinical interventions, which specifically target this molecular pathway may be a potential therapeutic strategy for the treatment of autoimmune disease.

## List of Publications

- Akamatsu M, Mikami N, Ohkura N, Kawakami R, Kitagawa Y, Sugimoto A, **Hirota K**, Nakamura N, Ujihara S, Kuroaki T, Hamaguchi H, Harada H, Xia G, Morita Y, Aramori I, Narumiya S, Sakaguchi S. Conversion of antigen-specific effector/memory T cells into Foxp3-expressing Treg cells by inhibition of CDK8/19. *Sci Immunol*. 4. pii: eaaw2707. (2019)
- Takeuchi Y, **Hirota K**, Sakaguchi S. Synovial Tissue Inflammation Mediated by Autoimmune T Cells. *Front Immunol*. 10:1989. (2019)
- Hojo MA, Masuda K, Hojo H, Nagahata Y, Yasuda K, Ohara D, Takeuchi Y, **Hirota K**, Suzuki Y, Kawamoto H, Kawaoka S. Identification of a genomic enhancer that enforces proper apoptosis induction in thymic negative selection. *Nat Commun*. 10:2603. (2019)
- Yasuda K, Takeuchi Y, **Hirota K**. The pathogenicity of Th17 cells in autoimmune diseases. *Semin Immunopathol*. 41:283-297. (2019)
- Yasuda K, Kitagawa Y, Kawakami R, Isaka Y, **Watanabe H**, **Kondoh G**, Kohwi-Shigematsu T, Sakaguchi S, **Hirota K**. Satb1 regulates the effector program of encephalitogenic tissue Th17 cells in chronic inflammation. *Nat Commun*. 10:549. (2019)
- Takimoto, A., C. Kokubu, **H. Watanabe**, T. Sakuma, T. Yamamoto, **G. Kondoh**, Y. Hiraki, and C. Shukunami. Differential transactivation of the upstream aggrecan enhancer regulated by PAX1/9 depends on SOX9-driven transactivation. *Scientific Reports*, 9-1: 4605 (2019).
- Itoh, K., **G. Kondoh**, H. Miyachi, M. Sugai, Y. Kaneko, S. Kitano, **H. Watanabe**, R. Maeda, A. Imura, Y. Liu, C. Ito, S. Itohara, K. Toshimori, J. Fujita. Dephosphorylation of protamine 2 at serine 56 is crucial for murine sperm maturation in vivo. *Science Signaling*, 12 (574) (2019).

## List of Presentations

- 廣田圭司**: 炎症組織の細胞社会学、第3回 個体の中の細胞社会学ワークショップ、京都、2019年1月11日
- Yasuda K, Kitagawa Y, Kawakami R, Isaka Y, **Watanabe H**, **Kondoh G**, Kohwi-Shigematsu T, Sakaguchi S, **Hirota K**: The Genome Organizer Satb1 Regulates GM-CSF and PD-1 Expression in Encephalitogenic Th17 Cells, The 8<sup>th</sup> NIF Winter School on Advanced Immunology, Jan.20-23, 2019, Singapore
- Hirota K**, Hashimoto M, Ito Y, Matsuura M, Ito H, Tanaka M, **WatanabeH**, **Kondoh G**, Tanaka A, Yasuda K, Kopf M, Potocnik A, Stockinger B, Sakaguchi N, Sakaguchi S: Inflammatory cascade of autoimmune arthritis by Th17 cells and GM-CSF-producing ILCs, Keystone symposia, Feb.18-22, 2019, Colorado, USA
- 廣田圭司** : The plasticity and heterogeneity of Th17 cells、第4回京都皮膚基礎研究会、京都、2019年

3月 25 日

廣田圭司：関節炎惹起性 T 細胞の分化と慢性炎症維持機構、「感染・免疫・がん・炎症」シンポジウム、北海道、2019 年 3 月 27 日

廣田圭司：関節炎モデル SKG マウスを用いた免疫学的解析、第 63 回日本リウマチ学会学術集会、京都、2019 年 4 月 15 – 17 日

川上竜司、北川瑠子、Chen K、安田圭子、大倉永也、渡邊仁美、近藤玄、廣田圭司、坂口志文：胸腺 Treg 分化における Foxp3-CNS0/CNS3 領域の重要性、Kyoto T Cell Conference 第 29 回学術集会、2019 年 6 月 7 – 8 日

北條未来、増田喬子、北条広朗、長畠洋佑、安田圭子、小原及也、竹内悠介、廣田圭司、鈴木穣、河本宏、河岡慎平：胸腺における負の選択に特化した機能を持つゲノミックエンハンサーの同定と機能解析、Kyoto T Cell Conference 第 29 回学術集会、2019 年 6 月 7 – 8 日

Hirota K, Yasuda K, Kitagawa Y, Kawakami R, Watanabe H, Kondoh G, Sakaguchi S: Satb1 controls GM-CSF and PD-1 expression by pathogenic Th17 cells, 7<sup>th</sup> Annual Meeting of the International Cytokine & Interferon Society, Oct20-23, 2019, Vienna, Austria

渡邊仁美：マウス精子における精子膜反応について、日本実験動物技術者協会関東支部 REG 部会 第 20 回特別講演会、東京、2019 年 11 月 6 日

Takeuchi Y, Watanabe H, Kondoh G, Sakaguchi N, Sakaguchi S, Hirota K: Gsdmd and Ripk3 are dispensable for the induction and chronic inflammation of SKG arthritis, 第 48 回 日本免疫学会学術集会、浜松、2019 年 12 月 11-13 日

Kawakami R, Kitagawa Y, Yasuda K, Mikami N, Ohkura N, Watanabe H, Chen K, Kondoh G, Hirota K, Sakaguchi S: A crucial role of the conserved non-coding sequences Foxp3-CNS0 and -CNS3 in the lineage specification of thymic Foxp3+ regulatory T cells, 第 48 回 日本免疫学会学術集会、浜松、2019 年 12 月 11-13 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。

2019 年度、Treg の基礎研究では、前年度に引き続き、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的感受性の関連について解析を進め、論文発表した (Ohkura et al. Immunity 2020)。

前年度の CTLA- 分子の解析 (Ha et al., PNAS 2019) より継続して腫瘍免疫における Treg、特に Treg に発現する PD-1 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 (Kamada et al., PNAS 2019)。抗 PD-1 抗体 (例えば nivolumab) はヒトの腫瘍免疫を亢進させる。しかしながら、PD-1 は、がんを攻撃するエフェクター T 細胞の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おり、抗 PD-1 抗体の Treg への作用を明らかにする必要がある。実際、Treg はがん組織での主要な浸潤 T 細胞であり、その PD-1 発現レベルは CD4<sup>+</sup> あるいは CD8<sup>+</sup>T 細胞と同程度である。興味深いことに、抗 PD-1 抗体は、エフェクター T 細胞の持続的活性化を起こすだけでなく、Treg の増殖能、抑制能を亢進させる。Treg 特異的 PD-1 欠損マウスでも同様に Treg の増殖能、抑制能が亢進し、従って腫瘍免疫が抑制され癌の増殖が促進された。即ち、抗 PD-1 阻害抗体は免疫反応に対して相反する作用を有する。この結果は、抗 PD-1 抗体治療を受けた患者の平均 10% に見られる Hyper-progressive Disease (HPD) の発症機構を説明する。実際、抗 PD-1 抗体治療を受け HPD を発症した胃がん患者について、治療前後の胃がん組織に浸潤している Treg を解析してみると、HPD では治療後に PD-1 陽性 Treg の顕著な増殖が見られ、non-HPD 患者ではそのような増殖が見られなかった。以上の結果から、抗 PD-1 阻害抗体には Treg 増強作用がある、また HPD の治療には Treg の除去が有効と考えられる。

本年度、Treg による免疫抑制に関して、CDK8/19 の阻害により通常の T 細胞 (conventional T cells, 以下 Tconv と略) を Treg に機能的に転換し得ることを見出した (Akamatsu, Mikami et al., Sci. Immunol. 2019)。Tconv で CDK8/19 のノックダウンあるいはキナーゼドメイン不活性化 CDK8 を発現させると Foxp3 が誘導される。化学物質ライブラリーから CDK8/19 の阻害能を有する小分子を取得し解析したところ、試験管内、生体中で Tconv から Treg の誘導が可能であった。しかも、抗原特異的エフェクター、メモリー T 細胞の Treg への転換が可能であり、実際、この新たな薬剤は動物モデルで自己免疫病、アレルギーを効果的に抑制した。ヒトで、CDK8/19 阻害薬による Treg 誘

導と、それに基づく免疫疾患治療への展開が期待される。

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 2019, we continued to study the role of Treg cells in tumor immunity. PD-1 blockade is a cancer immunotherapy effective in various types of cancer. However, we observed rapid cancer progression, called hyper-progressive disease (HPD), in ~10% of advanced gastric cancer patients treated with anti-PD-1 monoclonal antibody. Tumors of HPD patients possessed highly proliferating FoxP3<sup>+</sup> Treg cells after treatment, contrasting with their reduction in non-HPD tumors. *In vitro* PD-1 blockade augmented proliferation and suppressive activity of human Treg cells. Likewise, murine Treg cells that were deficient in PD-1 signaling, either due to ablation of the PD-1 gene or anti-PD-1 antibody blockade, were more proliferative and immunosuppressive. Thus, HPD may occur when PD-1 blockade activates and expands tumor-infiltrating PD-1<sup>+</sup> Treg cells to overwhelm tumor-reactive PD-1<sup>+</sup> effector T cells. It is expected therefore that depletion of the former may help treat and prevent HPD.

In 2019, we also studied how effective immune suppression can be achieved by inducing Treg cells from conventional T (Tconv) cells, especially from effector or memory T cells mediating autoimmune and other immunological diseases. We have shown that chemical inhibition of the cyclin-dependent kinases (CDK) 8/19, or knockdown/knockout of the CDK8 or CDK19 gene, is able to induce Foxp3 in antigen-stimulated effector/memory as well as naïve CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. Furthermore, *in vivo* administration of a newly developed CDK8/19 inhibitor along with antigen immunization generated functionally stable antigen-specific Foxp3<sup>+</sup> Treg cells, which effectively suppressed skin contact hypersensitivity and autoimmune disease in animal models. The results indicate that CDK8/19 is physiologically repressing Foxp3 expression in activated conventional T cells and that its pharmacological inhibition enables conversion of antigen-specific effector/memory T cells into Foxp3<sup>+</sup> Treg cells for the treatment of various immunological diseases.

## List of Publications

### 1) 原著論文

Akamatsu M, Mikami N, Ohkura N, Kawakami R, Kitagawa Y, Sugimoto A, Hirota K, Nakamura N, Ujihara S, Kuroaki T, Hamaguchi H, Harada H, Xia G, Morita Y, Aramori I, Narumiya S, Sakaguchi S. Conversion of antigen-specific effector/memory T cells into Foxp3-expressing Treg cells by inhibition of CDK8/19. *Sci. Immunol.* pii: eaaw2707. doi: 10.1126/sciimmunol.aaw2707, 2019.

Wing JB, Tay C, Sakaguchi S. Control of regulatory T cells by co-signal molecules. *Adv Exp Med Biol.*

1189:179-210, 2019.

Herppich S, Toker A, Pietzsch B, Kitagawa Y, Ohkura N, Miyao T, Floess S, Hori S, Sakaguchi S, Huehn J. Dynamic Imprinting of the Treg Cell-Specific Epigenetic Signature in Developing Thymic Regulatory T Cells. *Front Immunol.* 10:2382, doi: 10.3389/fimmu.2019.02382. eCollection 2019.2019.

Cossarizza A, et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). *Eur J Immunol.* 49:1457-1973, 2019.

Takeuchi Y, Hirota K, Sakaguchi S. Synovial tissue inflammation mediated by autoimmune T cells. *Front. Immunol.* 2019 Aug 21;10:1989. doi: 10.3389/fimmu.2019.01989. eCollection 2019.

Wing JB, Tanaka A, Sakaguchi S. Human FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cell heterogeneity and function in autoimmunity and cancer. *Immunity.* 50:302-316, 2019.

Yamaguchi T, Teraguchi S, Furusawa C, Machiyama H, Watanabe TM, Fujita H, Sakaguchi S, Yanagida T. Theoretical modeling reveals that regulatory T cells increase T cell-interaction with antigen-presenting cells for stable immune-tolerance. *Int Immunol.* 31:743-753, 2019.

Canete PF, Sweet RA, Gonzalez-Figueroa P, Papa I, Ohkura N, Sakaguchi S, Roco JA, Cuenca M, Bassett KJ, Sayin I, Canaday DH, Doglioni C, Meyer-Hermann M, Cook MC, Barry E, Lopez A, Fazekas de St Groth B, Bolton H, Vinuesa CG. Regulatory roles of IL-10-producing human follicular T cells. *J. Exp. Med.* 216:1843-1856, 2019.

Kubagawa H, Honjo K, Ohkura N, Sakaguchi S, Radbruch A, Melchers F, Jani PK. Functional Roles of the IgM Fc Receptor in the Immune System. *Front. Immunol.* 10:945. doi: 10.3389/fimmu.2019.00945. eCollection 2019.

Schmidleithner L, Thabet Y, Schönfeld E, Köhne M, Sommer D, Abdullah Z, Sadlon T, Osei-Sarpong C, Subbaramaiah K, Copperi F, Haendler K, Varga T, Schanz O, Bourry S, Bassler K, Krebs W, Peters AE, Baumgart AK, Schneeweiss M, Klee K, Schmidt SV, Nüssing S, Sander J, Ohkura N, Waha A, Sparwasser T, Wunderlich FT, Förster I, Ulas T, Weighardt H, Sakaguchi S, Pfeifer A, Blüher M, Dannenberg AJ, Ferreirós N, Muglia LJ, Wickenhauser C, Barry SC, Schultze JL, Beyer M. Enzymatic Activity of HPGD in Treg Cells Suppresses Tconv Cells to Maintain Adipose Tissue Homeostasis and Prevent Metabolic Dysfunction. *Immunity.* 50:1232-1248, 2019.

Matsuo T, Hashimoto M, Sakaguchi S, Sakaguchi N, Ito Y, Hikida M, Tsuruyama T, Sakai K, Yokoi H, Shirakashi M, Tanaka M, Ito H, Yoshifiji H, Ohmura K, Fujii T, Mimori T. Strain-Specific Manifestation of Lupus-like Systemic Autoimmunity Caused by Zap70 Mutation. *J Immunol.* 202:3161-3172, 2019.

Kamada T, Togashi Y, Tay C, Ha D, Sasaki A, Nakamura Y, Sato E, Fukuoka S, Tada Y, Tanaka A, Morikawa H, Kawazoe A, Kinoshita T, Shitara K, Sakaguchi S, Nishikawa H. PD-1<sup>+</sup> regulatory T cells amplified by PD-1 blockade promote hyperprogression of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 116:9999-10008, 2019.

Tanaka A, Sakaguchi S. Targeting Treg cells in cancer immunity. *Eur. J. Immunol.* 49:1140-1146, 2019.

Yasuda K, Kitagawa Y, Kawakami R, Isaka Y, Watanabe H, Kondoh G, Kohwi-Shigematsu T, Sakaguchi S, Hirota K. Satb1 regulates the effector program of encephalitogenic tissue Th17 cells in chronic inflammation. *Nat. Commun.* 10:549, 2019.

Svensson MN, Doody KM, Schmiedel BJ, Bhattacharyya S, Panwar B, Wiede F, Yang S, Santelli E, Wu DJ, Sacchetti C, Gujar R, Seumois G, Kiosses WB, Aubry I, Kim G, Mydel P, Sakaguchi S, Kronenberg M, Tiganis T, Tremblay ML, Ay F, Vijayanand P, Bottini N. Reduced expression of phosphatase PTPN2 promotes pathogenic conversion of Tregs in autoimmunity. *J. Clin. Invest.* 129:1193-1210, 2019.

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.* 144:2811-2822, 2019.

Ha D, Tanaka A, Kibayashi T, Tanemura A, Sugiyama D, Wing JB, Lim EL, Tang K, Adeegbe D, Newell EW, Katayama I, Nishikawa H, and Sakaguchi S. Differential control of human Treg and effector T cells in tumor immunity by Fc-engineered anti-CTLA-4 antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 116:609-618, 2019.

Nakatsukasa H, Oda M, Yin J, Chikuma S, Ito M, Koga-Iizuka M, Someya K, Kitagawa Y, Ohkura N, Sakaguchi S, Koya I, Sanosaka T, Kohyama J, Tsukada YI, Yamanaka S, Takamura-Enya T, Lu Q, Yoshimura A. Loss of TET proteins in regulatory T cells promotes abnormal proliferation, Foxp3 destabilization, and IL-17 expression. *Int. Immunol.* 31:335-347, 2019.

## 2) 総説

田中淳・坂口志文：Treg 特異的な TCR シグナル分子制御と免疫寛容の維持 臨床免疫・アレルギー科 Vol.71 No.5 497-501 2019

三上統久・坂口志文：制御性 T 細胞とサイトカイン 週刊医学のあゆみ Vol.271 No.5 496-499 2019

三上統久・坂口志文：Treg 細胞の発見から臨床応用まで 臨床免疫・アレルギー科 Vol. 72 No.6 648-653 2019

James B. Wing・木本富子・坂口志文：ヒトおよびマウスにおける制御性 T 細胞の多様性 臨床免疫・アレルギー科 Vol.73 No.3 342-347 2020

田中淳「Treg 分化と機能における TCR シグナルの役割」『医学のあゆみ』、268 (13):1086-1090, March 2019

## 学会等の講演

### 1) 学会・研究会発表

Yujiro Kidani, Yohko Kitagawa, Naganari Ohkura, Shimon Sakaguchi: Distinct transcriptional regulation in

tumor-infiltrating regulatory T cells. The 8th NIF Winter School on Advanced Immunology 2019  
(2019.1.20-23. Singapore)

James B Wing, Naganari Ohkura, Shimon Sakaguchi: High dimensional analysis of T-follicular regulatory cells. Keystone symposia: B Cell-T Cell Interactions (2019.2.10-14. Colorado, USA)

Atsushi Tanaka, Treg-specific control of TCR signaling molecules, Keystone Symposia: Uncovering Mechanisms of Immune-Based Therapy in Cancer and Autoimmunity (B3) February 18-22, 2019, Breckenridge, Colorado, USA

Yoshiaki Yasumizu: Multi-layer omics analysis reveals myasthenia gravis specific neuronal molecular regulation pattern. 第 60 回日本神経学会学術大会 (2019.5.22-25. 大阪)

Ee Lyn Lim: Phosphoinositide-3-kinase  $\delta$  as a regulator of regulatory T cell immunosuppression. The Signal Transduction in the Immune System Conference (2019.6.16-21. Nova Scotia, Canada)

James Wing: Exploring regulatory T-cell function and phenotype via mass cytometry. 8th Annual Fluidigm Mass Cytometry Summit (2019.6.19. Vancouver, Canada)

大倉永也：制御性 T 細胞を標的とした single cell 解析の実際 シングルセルゲノミクス研究会 (2019.8.29-30. 千葉)

大倉永也：制御性 T 細胞を標的とした臨床応用への取り組み 皮膚疾患治療最前線 2019 (2019.9.5. 熊本)

大倉永也：何が制御性 T 細胞の分化をドライブするのか？ - 微量 RNA-seq, single cell RNA-seq による master regulator の探索 - 日本生化学会 (2019.9.18-20. 福岡)

Atsushi Tanaka: Cancer immunotherapy targeting regulatory T cells. 第 78 回 日本癌学会学術総会 (2019.9.26. 京都)

Naganari Ohkura: Regulatory T cell manipulation for enhancing anti-tumor immune activity. 18th Surugadai International Symposium & Joint Usage/Research Program of Medical Research Institute International Symposium (2019.11.18. 東京)

TEKGUC MURAT: CTLA-4-dependent trogocytosis promotes the interactions between Tregs and Antigen-presenting cells. The 48th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology (2019.12.11-13. 浜松)

Yoshiaki Yasumizu, Naganari Ohkura, Yamami Nakamura, Atsushi Tanaka, Shimon Sakaguchi: Single-cell transcriptomic atlas of thymic Treg development. The 48th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology (2019.12.11-13. 浜松)

Ryoji Kawakami: A crucial role of the conserved non-coding sequences Foxp3-CNS0 and -CNS3 in the lineage specification of thymic Foxp3 $^{+}$  regulatory T cells. The 48th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology (2019.12.11-13. 浜松)

James Wing: Exploring regulatory T-cell function and phenotype via mass cytometry. The 48th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology (2019.12.11-13. 浜松)

James Wing: High dimensional analysis of T-follicular regulatory cells. The 48th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology (2019.12.11-13. 浜松)

## 2) 講演・シンポジウム

Shimon Sakaguchi: Regulatory T cells in common autoimmune diseases. Next Gen Immunology in Health and Disease (2019.2.7-8. 大阪)

Shimon Sakaguchi: Regulatory T cells in tumor immunity. 11th AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research: Biology to Precision Medicine (2019.2.8-12. Maui, Hawaii)

Shimon Sakaguchi: Regulatory T cells in Common Autoimmune Diseases. 3rd Annual Symposium for the Center for Mucosal Immunology, Allergy and Vaccine Development (2019.2.13-15. San Diego, USA)

坂口志文：免疫制御とがん治療 第29回日本間脳下垂体腫瘍学会（2019.2.22-23. 大阪）

坂口志文：制御性T細胞による免疫応答制御、特に移植免疫について 第46回日本臍・臍島移植研究会（2019.3.8-9. 愛知）

坂口志文：がん免疫の観点からのTreg 第41回日本造血細胞移植学会（2019.3.7-9. 大阪）

Shimon Sakaguchi: Control of immune responses by regulatory T cells. Frontiers of Science seminars, BioCity Turku (2019.3.28. Turku, Finland)

Shimon Sakaguchi: Control of immune responses by regulatory T cells. Donald Seldin Lecture, ISN World Congress of Nephrology 2019 (2019.4.12-15. Melbourne, Australia)

坂口志文：制御性T細胞による免疫応答制御 スプリセル10周年記念講演会 in 兵庫（2019.4.19. 神戸）

坂口志文：制御性T細胞とがん免疫 高橋利忠先生記念シンポジウム（2019.5.25. 愛知）

Shimon Sakaguchi: Conversion of conventional T cells into Treg cells. The 1st UCL-OU Joint Symposium on Immunology (2019.6.27-28. 大阪)

坂口志文：関節リウマチの新しい免疫治療に向けて 兵庫県整形外科医会リウマチフォーラム（2019.7.6. 神戸）

Shimon Sakaguchi: Conversion of effector T cells into Treg cells. Discovery to clinical applications of regulatory T cells in autoimmunity and transplantation (2019.7.11Birmingham, UK)

Shimon Sakaguchi: Regulatory T cells in common autoimmune diseases. University of Munich Immunology Seminar (2019.7.15. Munich Germany)

Shimon Sakaguchi: Conversion of effector T cells into regulatory T cells. International RCI symposium

(2019.7.17-18. Regensburg, Germany)

坂口志文：制御性 T 細胞：新しい免疫医療に向けて 東京理科大—ヤンセンファーマ株式会社ジョイントシンポジウム (2019.7.25. 千葉)

Shimon Sakaguchi: Targeting Regulatory T cells for Tumor Immunity. The International Academy for Advanced Oncology 2019 (2019.7.26-27. 東京)

坂口志文：制御性 T 細胞を標的とした免疫応答制御 第 56 回日本消化器免疫学会総会 (2019.8.1-2. 京都)

坂口志文：制御性 T 細胞とがん免疫 第 20 回中国・四国臨床腫瘍研究会セミナー (2019.8.3. 岡山)

坂口志文：制御性 T 細胞とがん免疫 第 23 回日本がん免疫学会総会 (2019.8.21-23. 高知)

Shimon Sakaguchi: Treg-Up or Treg-Down to control immune responses II Joint Meeting of the German Society for Immunology (DGfI) and the Italian Society of Immunology, Clinical Immunology and Allergology (SIICA), (2019.9.10-13. Munich Germany)

坂口志文：がん免疫の観点からの Treg 第 5 回新宿血液疾患懇話会 (2019.9.13. 東京)

坂口志文：がん微小環境における制御性 T 細胞の役割 第 5 回 Immuno-Oncology Forum (2019.9.14. 東京)

坂口志文：制御性 T 細胞：免疫病の新しい治療に向けて 第 2 回山田和彦賞授賞式 (2019.9.16. 大阪)

Shimon Sakaguchi: Control of immune responses by regulatory T cells. WASOG/JSSOG 2019 (2019.10.9-11. 神奈川)

Shimon Sakaguchi: Treg-Up or Treg-Down to control immune responses. the 17th International Congress of Immunology (2019.10.19-23. Beijing, China)

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 第 59 回日臨技近畿支部医学検査学会 (2019.10.26-27. 滋賀)

Shimon Sakaguchi: Targeting Regulatory T cells in Cancer Immunotherapy. Cell Research Symposium on Molecular Cell Science: Cancer Immunity and Metabolism (2019.11.1-3. Shanghai, China)

Shimon Sakaguchi: Control of immune responses by regulatory T cells. ISIR2019/34th JSIR (2019.11.13-16. 奈良)

坂口志文：患者のための免疫療法—世界最前線 第 5 回がん撲滅サミット (2019.11.17. 東京)

Shimon Sakaguchi: Regulatory T cells in autoimmune disease. NCNP 神経免疫国際シンポジウム 2019 (2019.12.2. 東京)

(賞)

文化勳章

German Immunology Prize (Avery-Landsteiner Award)

山田和彥賞

英国 Birmingham 大学名誉博士

再生組織構築研究部門  
Department of Regeneration Science and Engineering  
臓器・器官形成応用分野  
**Laboratory of Organ and Tissue Reconstruction**

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

**【中村グループ】**

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

人間の体には、本来、再生能が備わっており、我々はそれらを引き出す手法を開発しています。それが生体内再生 *in situ* Tissue Engineering です。すなわち、自己の細胞が増殖、分化できる適切な足場を体内に与えることによって、損傷を受けた自己の臓器が本来の構造と機能を再生出来るようにしています。研究の方法としては、再生医学の 3 つの柱である (1) 足場、(2) 細胞、(3) 増殖・成長因子を生体内で働かせる生体内再生 “*in situ* Tissue Engineering” という手法を独自に開発し、それを進めています。具体的には、同種・異種の臓器や組織から酵素処理で免疫原性を完全に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**

1. Machiguchi, T., Nakamura, T. (2019) Nephron generation in kidney cortices through injection of

- pretreated mesenchymal stem cell-differentiated tubular epithelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** 518: 141-7.
2. Muranishi, Y., Sato, T., Ito, S., Satoh, J., Yoshizawa, A., Tamari, S., Ueda, Y., Yutaka, Y., Menju, T., Nakamura, T., Date, H. (2019) The ratios of monounsaturated to saturated phosphatidylcholines in lung adenocarcinoma microenvironment analyzed by liquid chromatography-mass spectrometry and imaging mass spectrometry. **Scientific Reports.** 9: 8916.
  3. Muranishi, Y., Sato, T., Ueda Y., Yutaka, Y., Nakamura, T., Date, H. (2019) A novel suction-based lung-stabilizing device in single-port video-assisted thoracoscopic surgical procedures. **Gen Thorac Caridiovasc Surg.** Published online: 15 November 2019. Doi:10.1007/s11748-019-01249-6.
  4. Nakamura, R., Katsuno, T., Kitamura, M., Yamashita, M., Tsuji, T., Suzuki, R., Kishimoto, Y., Suehiro, A., Tateya, I., Nakamura, T., Omori, K. (2019) Collagen sponge scaffolds containing growth factors for the functional regeneration of tracheal epithelium. **J Tissue Eng Regen Med.** 13: 835-45.
  5. Okuyama, H., Ohnishi, H., Nakamura, R., Yamashita, M., Kishimoto, Y., Tateya, I., Suehiro, A., Gotoh, S., Takezawa, T., Nakamura, T., Omori, K. (2019) Transplantation of multiciliated airway cells derived from human iPS cells using an artificial tracheal patch into rat trachea. **J Tissue Eng Regen Med.** 13: 1019-30.
  6. Kawai, Y., Kishimoto, Y., Sogami, T., Suzuki, R., Tsuji, T., Hiwatashi, N., Tateya, I., Kanemaru, S., Nakamura, T., Omori, K., Hirano, S. (2019) Characterization of aged rat vocal fold fibroblasts. **Laryngoscope** 129: E94-E101.

## 【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マクロカプセル化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も視野に入れている。

## 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が可能となる。このうち、マイクロカプセルは一度移植すると完全除去は困難で、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たが、現在は、これを含む一連の企業がコーニング社に譲渡されている。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、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続けている。

また、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-capsules that used to be studied mainly 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 gelates 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 xeno-transplantation without immune suppression or cell leakage. So, the similar methods can be applied not only for islets but widely for other endocrine/metabolic tissues derived from undifferentiated cells with risks of tumor-

formation and others.

### **Other studies**

We have developed culture surface that enables easy and efficient formation of high quality cell spheres and the device was commercially available with a trade name of Elplasia MP500c etc (Kuraray), but now, this project was divested to Corning. 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, fusion cells for cancer immune therapy and diabetes therapy based on our own electrofusion technique are also studied. Our projects are gathering expectations for practical realization.

### **List of Publications**

Sumi S, Yang SY, Canning P, Yang KC. Our Steps toward Subcutaneous Transplantation of Macro-Encapsulated Islets. (2019) OBM Transplantation 3 (3): 16. doi:10.21926/obm.transplant.1903074.

Yang SY, Yang KC, Sumi S. Effect of Basic Fibroblast Growth Factor on Xenogeneic Islets in Subcutaneous Transplantation—A Murine Model. (2019) Transplantation Proceedings 51 (5): 1458-1462. doi. org/10.1016/j.transproceed.2019.01.135

Tian W, Yang L, Liu Y, He J, Yang L, Zhang Q, Liu F, Li J, Liu J, Sumi S, Shen Y, Qi Z. Resveratrol attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats by up-regulation of vascular endothelial growth factor B. (2019) J Nutr Biochem. 2019 Feb 8: 108132. doi: 10.1016/j.jnutbio.2019.01.018. [Epub ahead of print]

### **List of Presentations**

Yang SY, Yang KC, Sumi S. Hepatocyte growth factor improves macro-encapsulated islet engraftment in subcutaneous transplantation. Asian Pancreas and Islet Transplant Association, Feb. 2019, Seoul, Korea

Tada S, Anazawa T, Shindo T, Yamane K, Inoguchi K, Okajima H, Sumi S, Uemoto S. Establishment of islet allograft acceptance by mitogen-activated protein kinase kinase via suppression of alloreactive T cells

World Congress of the International Pancreas & Islet Transplant Association, Jul. 2019, Lyon, France

Yamane K, Anazawa T, Tada S, Inoguchi K, Masui T, Okajima H, Sumi S, Uemoto S. A promising strategy for ameliorating the islet allograft engraftment; “pre-conditioning” islet cells by mitomycin-C. World Congress of the International Pancreas & Islet Transplant Association, Jul. 2019, Lyon, France

Inoguchi K, Anazawa T, Yamane K, Tada S, Okajima H, Sumi S, Uemoto S. Problems in realization of xenogenic or iPS cell-derived islet cell transplantation from the viewpoint of development of a new

transplantation site World Congress of the International Pancreas & Islet Transplant Association, Jul. 2019, Lyon, France

Yang SY, Yang KC, Sumi S. Co-encapsulating hepatocyte growth factor enhances engraftment and function to xenogeneic islet in subcutaneous transplantation. International Xenotransplantation Association 15th Congress, Oct. 2019, Munich, Germany

Yang SY, Yang KC, Sumi S. The effect of hepatocyte growth factor supplement to type 1 diabetes treatment. American Pancreatic Association 50th Anniversary Meeting, Nov. 2019, Hawaii, USA

Yang SY, Yang KC, Sumi S. Hepatocyte growth factor enhance islet engraftment in subcutaneous transplantation. 第 46 回日本膵・膵島移植研究会 , 2019 年 3 月 , 名古屋

Yang SY, Yang KC, Sumi S. Hepatocyte growth factor improves islet engraftment in subcutaneous transplantation. 第 18 回日本再生医療学会総会 , 2019 年 3 月 , 神戸

多田誠一郎, 穴澤貴行, 山根佳, 井ノ口健太, 増井俊彦, 海道利実, 角昭一郎, 岡島英明, 進藤岳郎, 上本伸二 . 膵島移植における新たな作用機序による免疫抑制療法の開発と今後の展望 . 第 119 回日本外科学会定期学術集会 , 2019 年 4 月 , 大阪市

井ノ口健太, 穴澤貴行, 山根佳, 多田誠一郎, 増井俊彦, 海道利実, 角昭一郎, 岡島英明, 上本伸二 . 異種または iPS 細胞由来膵島細胞移植実現への課題と克服:新規移植部位開発の面から . 第 119 回日本外科学会定期学術集会 , 2019 年 4 月 , 大阪市

Yang SY, Yang KC, Sumi S. HGF 添加による一期的マクロカプセル化膵島皮下移植。第 18 回日本組織移植学会総会・学術集会 , 2019 年 8 月 , 名古屋

多田誠一郎, 穴澤貴行, 進藤岳郎, 山根佳, 井ノ口健太, 増井俊彦, 海道利実, 岡島英明, 角昭一郎, 上本伸二 . MEK 阻害剤トラメチニブは MHC 不適合マウス膵島移植で膵島毒性を示すことなく拒絶反応を抑制する . 第 28 回日本組織適合性学会大会 , 2019 年 9 月 , 名古屋市

多田誠一郎, 穴澤貴行, 山根佳, 井ノ口健太, 増井俊彦, 海道利実, 岡島英明, 角昭一郎, 上本伸二 . 脇島移植における MEK 阻害剤の可能性 . 第 55 回日本移植学会総会 , 2019 年 10 月 , 広島市

井ノ口健太, 穴澤貴行, 多田誠一郎, 山根佳, 増井俊彦, 海道利実, 岡島英明, 角昭一郎, 上本伸二 . 新規リコンビナント足場材を用いた大型動物への膵島移植 . 第 55 回日本移植学会総会 , 2019 年 10 月 , 広島市

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、生細胞中や、細胞間での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. 膜蛋白質・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

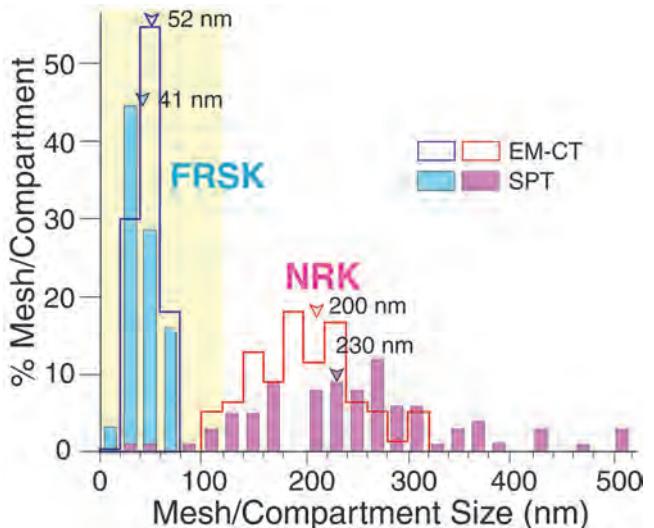


図 1. 細胞膜の細胞質側表面に存在するアクチン膜骨格の構造を、3 次元再構成法によって、定量的に可視化し、膜の内側表面の膜骨格の網目の大きさを求めた。網目の大きさの分布を、オープンバーで示す。赤が NRK 細胞、青が、FRSK 細胞。さらに、細胞膜中のリン脂質の拡散運動から求めたコンパートメントの大きさの分布を、クローズドバーで示す。両者は、各々の細胞でよく一致する。このように、網目やコンパートメントの大きさが大きく異なる 2 種の細胞で、それぞれ一致が見られたことは、膜骨格フェンスとそれに結合した膜貫通型タンパク質のピケットモデルを強く支持する。

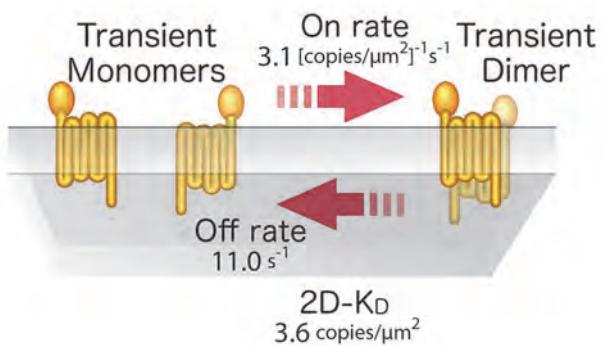


図 2. 細胞膜に存在する G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) を、細胞内蛍光 1 分子観察法を用いて調べる事で、動的なモノマー・ダイマー平衡を解明した。ダイマーのオフレート、オンレート、2 次元の平衡定数をそれぞれ示す。モノマーと、ダイマーは共存するが、両者は常に動的に交換している。

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 residence time within a compartment for 1 millisecond to 1 second could not be detected.

### **Newly identified characteristic of G-protein coupled receptor; transient dimer formation in the plasma membrane**

G-protein coupled receptors or GPCRs are the largest family of membrane receptors, and have been studied for their importance. In particular, for class-A GPCR, since late 1990s, 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 mainly expressed 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 (Kasai et al., 2011). Moreover, we found that another GPCR, dopamine D2 receptor, also forms transient dimers with the lifetime of  $\sim$ 70 milliseconds, which increases by 50% upon addition of an agonist (Kasai et al., 2018). This means that the transient dimer becomes slightly stabilized upon agonist stimulation, suggesting that transiently formed dimers have some meanings in GPCR functions. In addition to our findings, other research groups also reported that class-A GPCR forms transient dimers in live cells. Based on these results, it was found that the dynamic dimer-monomer equilibrium is probably a newly identified characteristic of class-A GPCR; both monomeric state and dimeric state of GPCRs co-exist at any moment, while they're dynamically exchanging with the dimer lifetime of  $\sim$ 100 milliseconds. Furthermore,

the transient dimerization of GPCR seems to be related to its signal generation and regulation.

#### **List of Publications**

Kusumi, A., Fujiwara, T.K., Tsunoyama, T.A., Kasai, R.S., Liu, A., Hirosawa, K.M., Kinoshita, M., Matsumori, N., Komura, N., Ando, H., and Suzuki, K.G.N. (2020) Defining raft domains in the plasma membrane. **Traffic**. 21, 106-137.

#### **List of Invited Presentations**

Kasai, R.S. Examining the transiently formed GPCR dimer: An approach by single fluorescent molecule observation in living cells. 第 57 回日本生物物理学会 年回 シンポジウム “The Quality of Proteins – Multiple Approaches for Protein Evaluation –”. 宮崎、2019 年 9 月 26 日

#### **List of Presentations**

Kasai, R.S. Examining the transiently formed GPCR dimer: An approach by single fluorescent molecule observation in living cells. 第 57 回日本生物物理学会 年回、宮崎、2019 年 9 月 24-26 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
講 師	オケヨ ケネディ	Snr. Lecturer	Okeyo Kennedy Omondi
助 教	亀尾 佳貴	Assist. Prof.	Yoshitaka Kameo
助 教	牧 功一郎	Assist. Prof.	Koichiro Maki

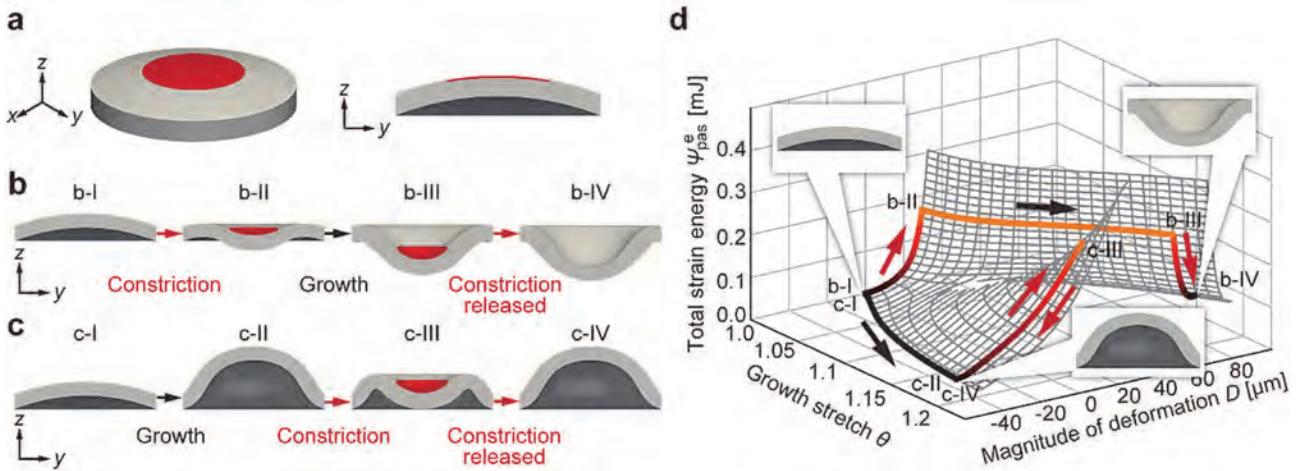
本分野では、生物の発生過程における細胞分化、形態形成、成長、さらには生体組織・器官のリモデリングや再生による環境への機能的適応など、多様な生命現象における自律的な制御メカニズムの解明を目指し、力学、生命科学、医科学を含む学際的研究を行っている。2019年においては、組織の形態形成過程において蓄積されるひずみエネルギー地形を描くことにより、力学的に可容な形態形成の全体像を理解するための新たなアプローチを提案した。また、骨芽細胞様細胞を凝集させ三次元スフェロイドを作製することにより、骨細胞分化を誘導することを示した。

**1) 組織形態形成における多様性とロバスト性の理解に向けたエネルギー地形アプローチの提案**

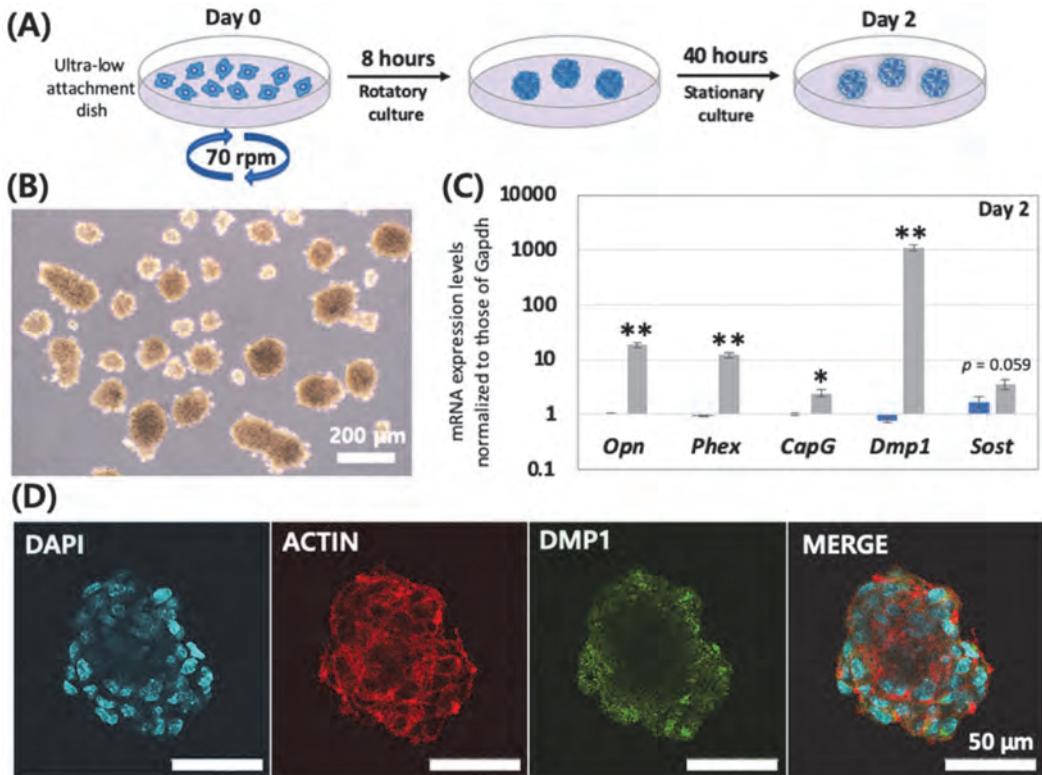
生体組織の形態形成は、細胞の増殖や収縮により生じる力の影響下で進行するが、生体内のゆらぎの中で、多様な組織形態がロバストに形成される機構は未だ不明である。本研究では、組織の形態形成過程において蓄積されるひずみエネルギー地形を描くことにより、力学的に可容な形態形成の全体像を理解するための新たなアプローチを提案した (Fig.1)。本アプローチを、曲率を持つシート状組織の形態形成に適用し、成長と収縮にともなう組織形態変化を調べた。その結果、成長と収縮の履歴に応じて質的に異なる組織形態が形成された。このような組織形態の多様性は、エネルギー地形の谷である局所安定状態の分岐として表され、各形態のロバスト性は、エネルギー地形の谷の深さや勾配により表された。これにより、組織形態形成における多様性とロバスト性の両立を、局所的なエネルギー安定状態の振舞いから理解することが可能となった。

**2) 骨芽細胞様細胞の凝集による骨細胞分化誘導**

3次元培養システムは基礎生物学研究のための強力なツールとして注目されているが、骨組織形成や骨細胞分化に関する *in vitro* 研究は、未だそのほとんどが2次元培養システムを使用して実施されている。本研究では、旋回培養法を用いてマウス骨芽細胞様細胞の3次元スフェロイドモデルを作製し、細胞凝集による骨細胞分化誘導を試みた (Fig.2)。3次元スフェロイドを2日間培養した結果、化学的な分化誘導因子を添加しないにもかかわらず、スフェロイド内の骨細胞分化マーカーの発現量は、従来の2次元培養と比べて大きく上昇し、骨芽細胞マーカーの発現量は抑制された。このことから、3次元スフェロイド構造にともなう骨芽細胞様細胞の凝縮は、骨細胞分化を促進させる



**Fig. 1. Mechanical analysis of sheet-like tissue morphogenesis.** (a) Initial geometry of the sheet-like tissue. Morphological changes when constriction occurred in the red region (b) before growth and (c) after growth. (d) Energy landscape of the morphogenesis, where the transitions of the tissue state in the two cases, (b) and (c), are represented as the colored paths. (Takeda et al., 2019)



**Fig. 2. Three-dimensional spheroids derived from osteoblast-like cells exhibited osteocyte-like characteristics within 2 days.** (A) Schematic diagram of fabrication method for spheroids under rotatory culture system. (B) Morphology of spheroids after a 2-days incubation period. (C) mRNA expression levels of osteocyte markers (*Opn*, *Phex*, *CapG*, *Dmp1*, and *Sost*) in the spheroids measured by real-time PCR. (D) Images after the staining of the spheroids, 2 days after cultivation; DAPI (blue), ACTIN (red), and DMP1 (green). (Kim et al., 2019)

ことが示された。本研究により、生体内で骨芽細胞が骨細胞分化能を獲得するためには、骨芽細胞が骨リモデリング部位で増殖し凝縮することが重要である可能性が示唆された。

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 2019, to understand variety and robustness in morphogenesis, we proposed a novel approach to capture the overall view of mechanically admissible morphogenesis by describing the landscape of strain energy in the growing tissue. In addition, we clarified that cell condensation achieved in three-dimensional spheroid structure triggers osteocytogenesis of osteoblast precursor cells.

### **1) An energy landscape approach to understanding variety and robustness in tissue morphogenesis**

During morphogenesis, multicellular tissues deform under the effects of mechanical forces caused by cellular activities, such as proliferation and constriction. Various morphologies are formed through spatiotemporally regulated multicellular activities. Despite such variety, morphogenesis is surprisingly a robust process, in which qualitatively similar morphologies are reproducibly formed even under fluctuation. In this study, in order to understand variation and robustness in morphogenesis, we proposed a novel approach to capture the overall view of mechanically admissible morphogenesis by describing the landscape of strain energy accumulation in a growing tissue. We described the energy landscape by applying this approach to the morphogenesis of a sheet-like tissue with a curvature. The formation of qualitatively different morphologies, *i.e.* concave/convex shape, was represented by bifurcation of the valley on the energy landscape, which indicates a local stable state. In addition, the degree of robustness to fluctuations was represented by the depth and steepness of the valley. Thus, this approach of investigating the behavior of local stable states on the energy landscape enables us to understand variation and robustness in tissue morphogenesis from a mechanical viewpoint.

### **2) Cell condensation triggers the differentiation of osteoblast precursor cells to osteocyte-like cells**

Recently, three-dimensional (3D) culture systems, such as organoid, have brought a breakthrough in the field of fundamental biological research. On the other hand, *in vitro* bone formation and osteocyte differentiation studies were mostly conducted in the two-dimensional (2D) culture dish. In this research, we utilized a rotatory culture system to fabricate 3D spheroids reconstructed by mouse osteoblast precursor cell, without introducing any scaffolds. Despite the absence of chemical induction by osteogenic supplements, osteocyte markers in the spheroids were remarkably up-regulated within 2 days compared with the conventional 2D monolayer model. Contrastingly, osteoblast markers were significantly down-regulated within the same duration. We showed that cell condensation achieved in the 3D spheroid structure evoked a greater level of osteocyte differentiation of osteoblast precursor cells than that observed with chemical induction. The results suggested that osteoblasts might proliferate and become condensed at the targeted bone

remodeling site, through which osteoblasts may achieve osteocyte differentiation capability *in vivo*.

## List of Publications

### 1. 論文

- Hirashima, T., Adachi, T. (2019). Polarized Cellular Mechano-response System for Maintaining Radial Size in Developing Epithelial Tubes., **Development**, Vol. 146, dev181206.
- Suzuki, D., Otsubo, H., Adachi, T., Suzuki, T., Nagoya, S., Yamashita, T., Shino, K. (2019). Functional Adaptation of the Fibrocartilage and Bony Trabeculae at the Attachment Sites of the Anterior Cruciate Ligament. **Clinical Anatomy**.
- Inoue, Y., Tateo, I., Adachi, T. (2019). Epithelial Tissue Folding Pattern in Confined Geometry. **Biomechanics and Modeling in Mechanobiology**.
- Kim, J., Takeda, S., Charoensombut, N., Kawabata, K., Kishimoto, Y., Kimura, T., Kishida, A., Ushida, T., Furukawa, K. (2019). Fabrication of Uterine Decellularized Matrix Using High Hydrostatic Pressure through Depolymerization of Actin Filaments. **Journal of Biomechanical Science and Engineering**. Vol.14, No.3, p.19-00097.
- Sasaki, F., Hayashi, M., Mouri, Y., Nakamura, S., Adachi, T., Nakashima, T. (2019). Mechanotransduction via the Piezo1-Akt Pathway Underlies Sost Suppression in Osteocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**.
- Kim, J., Adachi, T. (2019). Cell Condensation Triggers the Differentiation of Osteoblast Precursor Cells to Osteocyte-like Cells. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, Vol. 7, #288.
- Nakao, N., Maki, K., Mohammad, R. K. M., Adachi, T. (2019). Talin is Required to Increase Stiffness of Focal Molecular Complex in its Early Formation Process. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Vol. 518, No. 3, pp. 579-583.
- Takeda, H., Kameo, Y., Inoue, Y., Adachi, T. (2019). An Energy Landscape Approach to Understanding Variety and Robustness in Tissue Morphogenesis. **Biomechanics and Modeling in Mechanobiology**.
- Kawai, S., Yoshitomi, H., Sunaga, J., Alev, C., Nagata, S., Nishio, M., Hada, M., Koyama, M., Uemura, Y., Kazuya, M., Sekiguchi, H., Maekawa, M., Ikeya, S., Tamaki, Y., Jin, Y., Harada, K., Adachi, T., Matsuda, S., Toguchida, J. (2019). In-vitro Bone-like Nodules Generated from Patient-derived iPSCs Recapitulate Pathological Bone Phenotypes., 2019-7, **Nature Biomedical Engineering**, Vol. 3, No. 7, pp. 558-570.
- Matsuda, A., Li, J., Brumm, P., Adachi, T., Inoue, Y., Kim, T. (2019). Mobility of Molecular Motors Regulates Contractile Behaviors of Actin Networks. **Biophysical Journal**, Vol. 116, No. 11, pp. 2161-2171.
- Okanojo, M., Okeyo, K.O., Hanzawa, H., Kurosawa, O., Oana, H., Takeda, S., Washizu, M. (2019). Nuclear

Transplantation between Allogeneic Cells through Topological Reconnection of Plasma Membrane in a Microfluidic System. **Biomicrofluidics**, Vol. 13, 034115

Ando, Y., Okeyo, K.O., Adachi, T. (2019). Modulation of Adhesion Microenvironment Using Mesh Substrates Triggers Self-organization and Primordial Germ Cell-like Differentiation in Mouse ES cells. **APL Bioengineering**, Vol. 3, #016102

Inoue, M., Ono, T., Kameo, Y., Sasaki, F., Ono, T., Adachi, T., Nakashima, T. (2019). Forceful Mastication Activates Osteocytes and Builds a Stout Jawbone. **Scientific Reports**, Vol. 9, No. 1, #4404

## 2. 書籍・総説等

安達泰治 (2019). バイオエンジニアリングの歴史：骨の形態と機能の数理バイオメカニクス 日本機械学会バイオエンジニアリング部門報 3-5.

牧功一郎、安達泰治 (2019). AFM による 1 分子レベルのメカノトランズダクション機構の解明特集：メカノバイオロジー 生体の科学 Vol. 70、No. 4、pp. 267-272、医学書院

## List of Presentations

### 1. 講演・シンポジウム

Adachi, T. Biomechanics of Epithelial Morphogenesis: From Molecular Mechanofeedback to Tissue Deformation. <Keynote> 8th International Conference on Mechanics of Biomaterials and Tissues, Waikoloa Beach, Hawaii, US, December 15-19, 2019.

Okeyo, K.O. Fabrication of Bilayer Cellular Systems for Organ-on-a-chip Applications Enabled by the Micromesh Culture Technique, <Invited> Microfluidics and Organ on a Chip Asia 2019, Hotel Nikko Narita, Chiba, Japan, November 14-15, 2019.

Okeyo, K.O. Tuning Cell Orientation based on Localized Geometry Sensing during Cell Sheet Formation by the Micromesh Culture Technique, <Invited> Cell and Gene Therapy Asia 2019, The Sheraton Kobe Bay Hotel & Towers, Kobe, Japan, November 11-12, 2019.

Adachi, T., Ishikawa, K., Sunaga, J. In vitro Model for Understanding the Mechanoregulation of Osteocyte Orientation. <Invited> The 10th Asian-Pacific Conference on Biomechanics (APBiomech2019), Taipei Taiwan, November 1-3, 2019.

Kim, J. Enhancement of Osteocytogenesis for Pre-osteoblast Cells in Three-dimensional Spheroid Culture. <Invited lecture> Biomechanics Lecture Program, Biomedical Engineering Department, Inje University, Gimhae, Korea., October 31, 2019.

Adachi, T. Multiscale Biomechanics Approach to Understanding Roles of Forces in Multicellular Tissue

Morphogenesis. <Invited> Mini-Symposium: Biomaterials and Biomechanics in Tissue Engineering, University of Sydney, Sydney, October 18, 2019.

Adachi, T. Multiscale Biomechanics Approach to Understanding Roles of Forces in Multicellular Tissue Morphogenesis. <Invited> Tissue Engineering & Regenerative Medicine International Society – AP Chapter and the 7th Asian Biomaterials Congress (TERMIS-AP2019), Minisymposium: Cellular and Tissue Biomechanics, Brisbane, Australia, October 14-17, 2019.

Adachi, T., Miya, Y., Kameo, Y. Modeling Mechano-chemical Couplings in Bone Adaptation by Remodeling. <Symposist> International Conference on Biomechanics and Medical Engineering (Yuan-Cheng Fung 100th Birthday Celebration), Symposium: Multiscale Biomechanics and Mechanobiology in Basic Sciences and Physiological Applications, September 20-23, 2019.

Adachi, T., Ishikawa, K., Sunaga, J. Cell Alignment of Differentiated Osteocytes on Collagen gel with Mechanical Constraint. <Keynote>, 4th Africa International Biotechnology and Biomedical Conference (AIBBC2019), Mombasa, Kenya, August 28-31, 2019.

Adachi, T. In-silico and In-vitro Approaches to Understanding the Roles of Forces in Multicellular Tissue Morphogenesis 第 21 回生命科学研究科シンポジウム、京都、2019 年 7 月 4-5 日

安達泰治 骨リモデリング・代謝の in silico 実験 第 92 回日本整形外科学会学術総会シンポジウム、横浜、2019 年 5 月 9-12 日

亀尾佳貴 生体組織の形態形成と力学的適応の数理モデリング 第 67 回レオロジー討論会 第 38 回バイオレオロジー・リサーチ・フォーラム、滋賀、2019 年 10 月 16 日

安達泰治 生物の形態形成の力学：分子から組織まで 理研シンポジウム：計算で物事を理解する予測する—データサイエンス 自然知能 そして圈論へ—、p. 14、和光、2019 年 12 月 23 日

Adachi, T. Forces and their Feedback in Epithelial Tissue Morphogenesis: Multiscale Biomechanics Approach. Symposium on Functions and Mechanisms of Force in Animal and Plant Live, <Symposist> The 42nd Annual meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Fukuoka, December 3-6, 2019.

## 2. 研究会・セミナー

Adachi, T. Multiscale Biomechanics: in silico Experiment. Cell Biology, Developmental Biology and Systems Biology Course, and Faculty of Biostudy Annual Retreat, Otsu, January 26-27, 2019.

Adachi, T. Bone Functional Adaptation by Remodeling: In Silico Modeling and Experiment. Department Seminar at Mechanical Engineering, University of California Berkley, Berkley. September 24, 2019.

安達泰治 生体組織・器官の形づくりのバイオメカニクス 平成 30 年度神戸大学機械クラブ記念講演会、神戸、2019 年 3 月 26 日

安達泰治、亀尾佳貴、竹田宏典、武石直樹、Yann Guyot 時間・空間場連携による大脳皮質形態形

成の数理モデリング 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4回領域班会議、金沢、2019年7月16-18日

亀尾佳貴 エネルギー地形アプローチに基づく組織形態形成の多様性と安定性の探求 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4回領域班会議、金沢、2019年7月16-18日

竹田宏典 ニューロン移動とともになう大脳皮質の層構造構築と形態形成の力学モデル 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4回領域班会議、金沢、2019年7月16-18日

仲尾信彦 タリンが接着分子複合体の形成初期におけるナノ剛性に与える影響 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4回領域班会議、金沢、2019年7月16-18日

横山優花 骨細管内骨細胞突起のImage-based流体-構造連成解析 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4回領域班会議、金沢、2019年7月16-18日

オケヨ・ケネディ “Mechanobiology of Self-assembly and Differentiation by Stems Cells under Restricted Adhesion Condition”, 「生物機械システム研究会・機能創成セミナー」、大阪、2019年5月7日

### 3. 学会講演

Matsuda, A., Li, J., Brumm, P., Adachi, T., Inoue, Y., Kim, T. Mobility of Molecular Motors Regulates Contractile Behaviors of Actin Networks. APS March Meeting 2019, Boston, U.S.A, March 4-8, 2019.

Scheuren, A. C., Vallaster, P., Kuhn, G. A., Malhotra, A., Paul, G. R., Kameo, Y., Müller, R. Effect of Loading Frequency on Trabecular Bone Adaptation in Mouse Caudal Vertebrae. 25th Congress of the European Society of Biomechanics, Vienna, Austria, July 7-9, 2019.

Adachi, T., Miya, Y., Kameo, Y. In-silico Experiment of Disruption of Bone-protective Molecule in Cancellous Bone Remodeling. 25th Congress of the European Society of Biomechanics, Vienna, Austria, July 7-9, 2019.

Kameo, Y., Cener, D. J., Scheuren, A. C., Müller, R., Adachi, T. *In Silico* Reproduction of Frequency-dependent Bone Adaptation to Cyclic Loading. 25th Congress of the European Society of Biomechanics, Vienna, Austria, July 7-9, 2019.

Adachi, T., Kameo, Y. In Silico Platform for Perturbation Experiment in Mechano-biochemical Coupling System of Bone Remodeling. 16<sup>th</sup> International Symposium on Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering (CMBBE2019), E04.4, New York City, U.S.A, August 14-16, 2019.

Kim, J., Adachi, T. Effect of Three-dimensional Structure for Pre-Osteoblast Cells on Osteocyte Differentiation.

4th Africa International Biotechnology and Biomedical Conference (AIBBC2019), Mombasa, Kenya, August 28-31, 2019.

Ando, Y., Okeyo, K.O., Adachi, T. Probing the Self-organization and Differentiation of Stem Cells by Modulating the Cell Culture Microenvironment. 4th Africa International Biotechnology and Biomedical Conference (AIBBC2019), Mombasa, Kenya, August 28-31, 2019.

Kameo, Y., Ozasa, M., Adachi, T. In Silico Evaluation of Flow-induced Strain on Osteocyte Processes Amplified by Pericellular Matrix. 4th Africa International Biotechnology and Biomedical Conference (AIBBC2019), Mombasa, Kenya, August 28-31, 2019.

Scheuren, A. C., Vallaster, P., Kuhn, G. A., Malhotra, A., Paul, G. R., Kameo, Y., Müller, R. Bone Adaptation to Load is Controlled by Local Mechanical Signals with Net Bone Changes Logarithmically Dependent on Loading Frequency. ASBMR 2019 Annual Meeting, Orlando, Florida, USA, September 20-23, 2019.

Scheuren, A. C., Vallaster, P., Kuhn, G. A., Malhotra, A., Paul, G. R., Kameo, Y., Müller, R. Loading Frequency Affects Bone Adaptation in Mouse Caudal Vertebrae as Assessed by Longitudinal Micro-CT and Dynamic In Vivo Morphometry. 16th Congress of the International Society of Bone Morphometry, Lake Buena Vista, Florida, USA, September 23-26, 2019.

Okeyo, K.O., Kouno, S., Adachi, T. A Cell Sheet-based Approach for Reconstituting in Vitro Blood-brain Barrier Model Permitting Direct Physical Interaction between Endothelial Cells and Neural Cells. The 23rd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (mTAS2019), Basel, Switzerland, October 27-31, 2019.

Kibe, Y., Okeyo, K.O., Adachi, T. Cell Orientation Control Based on Geometry Sensing in Self-organized Cell Sheet Formation under Limited Adhesion Condition. The 23rd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life sciences (mTAS2019), Basel, Switzerland, October 27-31, 2019.

Okeyo, K.O., Ando, Y., Adachi, T. Self-Organization and Differentiation of Stem Cells Triggered Mechanically by Adhesion Restriction using Suspended Microstructured Mesh Substrates. APBiomech2019, Taipei, Taiwan, November 1-3, 2019.

Kameo, Y., Ozasa, M., Adachi, T. Computational Analysis of the Effects of Canalicular Curvature on Flow-induced Strain of Osteocytes. APBiomech2019, Taipei, Taiwan, November 1-3, 2019.

Kim, J., Adachi, T. Enhancement of Osteocytogenesis for Pre-Osteoblast Cells in Three-dimensional Spheroid Culture. APBiomech2019, Taipei, Taiwan, November 1-3, 2019.

横山優花、亀尾佳貴、安達泰治 Image-based モデルを用いた骨細管内細胞突起の流体－構造連成解析 日本機械学会第30回バイオフロンティア講演会、霧島、2019年7月19-20日

玉井龍太郎、オケヨ・ケネディ、安達泰治 メッシュ構造基板による血管内皮細胞のバリア構造の

再現および評価 日本機械学会第30回バイオフロンティア講演会、霧島、2019年7月19-20日

Jeonghyun Kim, 安達泰治 骨芽細胞様細胞の3次元組織化による骨分化促進 日本機械学会第30回バイオフロンティア講演会、霧島、2019年7月19-20日

亀尾佳貴、Denis J. Cener、Ariane C. Schuren、Ralph Muller、安達泰治 マウス尾椎への繰返し力学的負荷に対する骨適応現象の *in silico* 再現 日本機械学会第30回バイオフロンティア講演会、霧島、2019年7月19-20日

坂野暢昭、亀尾佳貴、安達泰治 骨組織と骨髄の相補的関係を考慮した皮質骨・海綿骨の統合リモデリング則の提案 日本機械学会第30回バイオフロンティア講演会、霧島、2019年7月19-20日

安藤悠太、オケヨ・ケネディ、安達泰治 微細加工基板を用いた細胞接着場調節による多能性幹細胞の分化と形態変化の誘起 第1回日本メカノバイオロジー研究会、直島、岡山、2019年9月3-4日

木部善清、オケヨ・ケネディ、安達泰治 足場を限定した環境下での細胞シート形成過程における細胞配向性の誘導 第1回日本メカノバイオロジー研究会、直島、岡山、2019年9月3-4日

オケヨ・ケネディ、河野沙紀、安達泰治 血液脳関門の忠実なモデルの実現に向けた血管内皮細胞と神経系細胞の3次元培養システムの開発 日本機械学会2019年度年次大会、秋田、2019年9月9-11日

森 泉、須長純子、安達泰治 磁気ピンセットを用いて力学刺激を付与した単離骨細胞の一酸化窒素応答とアポトーシス誘導解析 日本機械学会2019年度年次大会、秋田、2019年9月9-11日

木部善清、オケヨ・ケネディ、安達泰治 細胞-基板間接着の限定化に基づく細胞シート内における細胞配向の誘導 日本機械学会2019年度年次大会、秋田、2019年9月9-11日

亀尾佳貴、竹田宏典、安達泰治 組織形態形成における多様性と安定性の理解に向けた非線形連続体力学に基づくエネルギー地形アプローチの提案 日本機械学会第32回計算力学講演会(CMD2019)、川越、2019年9月16-17日

亀尾佳貴、竹田宏典、安達泰治 Exploring Variety and Robustness in Tissue Morphogenesis Based on Energy Landscape Approach エネルギー地形アプローチに基づく組織形態形成の多様性と安定性の探求 第57回日本生物物理学会年会 The 57th Annual Meeting of The Biophysical Society of Japan、宮崎、2019年9月24-26日

竹田宏典、亀尾佳貴、安達泰治 A Coupled Mathematical Modeling for Neuronal Migration and Cerebral Growth in Brain Morphogenesis 脳形態形成におけるニューロン移動と大脳成長の連成数理モデルリング 第57回日本生物物理学会年会 The 57th Annual Meeting of The Biophysical Society of Japan、宮崎、2019年9月24-26日

- 戸口田淳也、川井俊介、須長純子、安達泰治 骨分化過程の *in vitro* での再構築と応用 第 37 回日本骨代謝学会学術集会、神戸、2019 年 10 月 12-14 日
- 金 英寛、亀尾佳貴、安達泰治、田中 栄 骨代謝数理モデルを用いた骨粗鬆症治療薬の骨質に対する薬剤効果解析 第 37 回日本骨代謝学会学術集会、神戸、2019 年 10 月 12-14 日
- 川井俊介、吉富啓之、須長純子、松田秀一、安達泰治、戸口田淳也 ヒト iPS 細胞を用いた *in vitro* 骨分化過程の可視化の試み 第 37 回日本骨代謝学会学術集会、神戸、2019 年 10 月 12-14 日
- 安達泰治、須長純子 培養コラーゲンゲルの力学的環境に依存した分化骨細胞の配向 第 37 回日本骨代謝学会学術集会、神戸、2019 年 10 月 12-14 日
- 亀尾佳貴、安達泰治 繰返し荷重に対する骨の力学的適応現象における骨リモデリング動態の数理モデルリング 第 37 回日本骨代謝学会学術集会、神戸、2019 年 10 月 12-14 日
- Okeyo, K.O., Osonoi, Y., Adachi, T. Fabrication of Epithelial-Endothelial Bilayer on a Basement Membrane Mimic for Organ-on-chip Applications. 化学とマイクロ・ナノシステム学会 (CHEMINAS) 第 40 回研究会、浜松、2019 年 11 月 19-21 日
- 上田陽子、木村 - 吉田千春、持田京子、Olivier Lefebvre、亀尾佳貴、安達泰治、爪 麻美、平松竜司、松尾 熱 マウス卵円筒形成にかかる子宮内力学環境の解析 第 42 回日本分子細胞生物学会年会 The 42nd Annual meeting of the Molecular Biology Society of Japan、福岡、2019 年 12 月 3-6 日
- 安藤悠太、オケヨ・ケネディ、安達泰治 多能性幹細胞のシート状組織形成における細胞状態の不均一性評価 日本機械学会第 32 回バイオエンジニアリング講演会、金沢、2019 年 12 月 20-21 日
- 仲尾信彦、安達泰治 接着分子複合体の形成におけるタリンの力学的役割 日本機械学会第 32 回バイオエンジニアリング講演会、金沢、2019 年 12 月 20-21 日
- Kim Jeonghyun、安達泰治 骨芽細胞様細胞の三次元スフェロイド化による骨細胞分化誘導 日本機械学会第 32 回バイオエンジニアリング講演会、金沢、2019 年 12 月 20-21 日
- 亀尾佳貴、小笠正裕、安達泰治 骨細管の曲率が骨細胞への流れ刺激に及ぼす影響の *in silico* 評価 日本機械学会第 32 回バイオエンジニアリング講演会、金沢、2019 年 12 月 20-21 日
- 竹田宏典、亀尾佳貴、安達泰治 神経細胞移動にともなう脳形態形成の連続体力学モデル 日本機械学会第 32 回バイオエンジニアリング講演会、金沢、2019 年 12 月 20-21 日
- 寺澤良亮、亀尾佳貴、安達泰治 マイクロダメージ修復機構の破綻が骨量と骨質に及ぼす影響 日本機械学会第 32 回バイオエンジニアリング講演会、金沢、2019 年 12 月 20-21 日
- 松田大輝、亀尾佳貴、Kim Jeonghyum、安達泰治 コラーゲンゲルサンドイッチ培養における骨芽細胞様細胞の形態観察と遺伝子発現解析日本機械学会第 32 回バイオエンジニアリング講演会、金沢、2019 年 12 月 20-21 日

森 泉、仲尾信彦、須長純子、安達泰治 力学刺激を受けたマウス単離骨細胞における一酸化窒素産生に依存したアポトーシス 日本機械学会第32回バイオエンジニアリング講演会、金沢、2019年12月20-21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、試験管内において多能性幹細胞を四肢の原基である肢芽組織へ自己組織化的に分化誘導する手法を確立した。

本研究では、四肢発生を模倣することでマウス多能性幹細胞から試験管内において四肢の原基である肢芽組織への自己組織化を誘導する手法の確立を目指した。

四肢の発生は体幹から肢芽と呼ばれる突起状の構造が形成されることから始まる。肢芽は体表を覆う表皮外胚葉と側板中胚葉由来の間葉系細胞の 2 種類の組織から構成される。肢芽発生は古くから形態形成のモデルとして研究されてきた。近年、ES 細胞や iPS 細胞などの多能性幹細胞から試験管内で機能的な組織を誘導するオルガノイドと呼ばれる技術が盛んに研究されているが、肢芽のよ

うに複数の胚葉由来の組織を試験管内で誘導することは困難であった。今回我々はマウス胚性幹細胞（ES 細胞）の胚葉体に表皮外胚葉と側板中胚葉を同時に誘導することにより世界で初めて肢芽様組織の試験管内誘導に成功した。我々はこれまでに、網膜組織や大脳組織などの外胚葉性の神経組織をマウスおよびヒト多能性幹細胞から誘導する方法論（SFEBq 法）を開発してきた。今回は、SFEBq 法を中胚葉誘導に拡張することで、側板中胚葉と外胚葉組織を 1 つの胚葉体に誘導することを目指した。その結果、側板中胚葉組織誘導と表皮外胚葉形成のどちらにも関与する BMP シグナルを制御することで、側板中胚葉由来の間葉細胞が表皮外胚葉に包

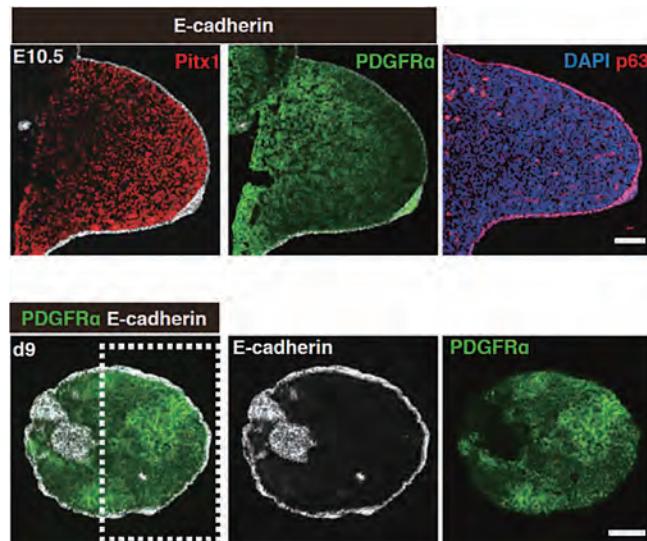


図 1、上、E10.5 のマウス肢芽。下、マウス ES 細胞から誘導した肢芽様組織。両者とも Ecadherin を発現する表皮外胚葉が PDGFR を発現する間葉細胞を覆っている。

まれた肢芽に似た組織を誘導することがわかった（図1）。また、体幹の前後軸パターンに関与するレチノイン酸シグナルを制御することで、前肢になる前方肢芽と後肢になる後方肢芽へと選択的に誘導できることも示した。さらに、RNA シークエンスによりゲノムワイドな遺伝子発現パターンを様々な組織と比較した結果、ES 細胞由来の肢芽様組織は、発生過程の肢芽とよく似た遺伝子発現パターンを示した（図2）。

さらに、人為的に局所的な背腹軸シグナルを与えることで、肢芽先端部に形成される指パターン

形成のオーガナイザーである外胚葉性頂堤（AER）の誘導にも成功した。最後に、ES 細胞由来の肢芽様組織は発生過程のマウス肢芽に移植することで、正常な四肢形成を阻害することなく軟骨組織、および結合組織へと分化することがわかり、ES 細胞由来の肢芽様組織が四肢を形成できる能力を有していることが示された（図3）。

今後は、ヒト多能性幹細胞にこの技術を応用し、ヒトの肢芽様組織を試験管内で誘導する技術を確立するとともに、損傷した四肢の再生に貢献できる可能性を探りたい。

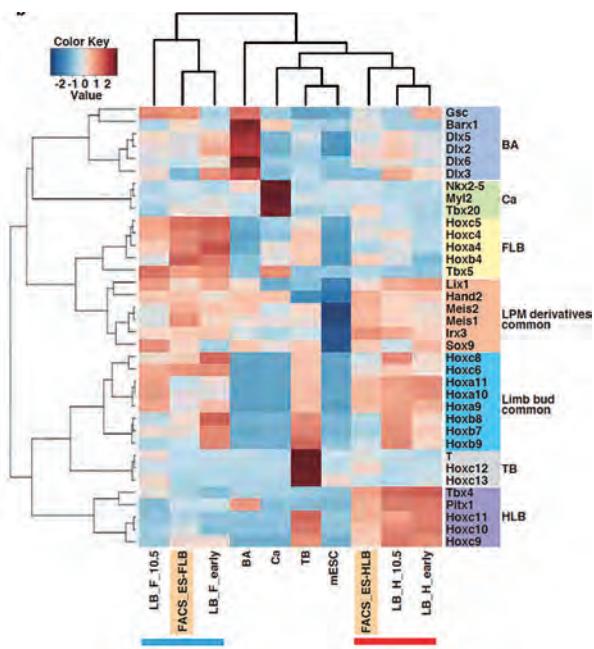


図2、RNA シークエンスによる遺伝子発現比較。  
ES 細胞由来の肢芽様組織は、発生過程の肢芽とよく似た遺伝子発現パターンを示す。

A three-dimensional (3D) culture of PSCs has been reported to enable the formation of organoids with various well-recapitulated aspects of organogenesis, such as tissue patterning, morphogenesis, proper arrangement of each cell type, and developmental

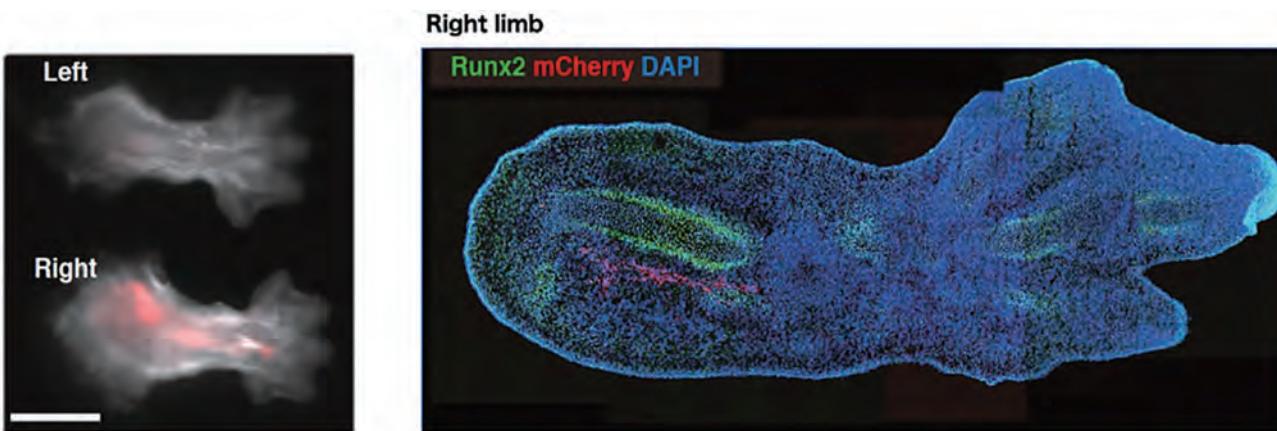


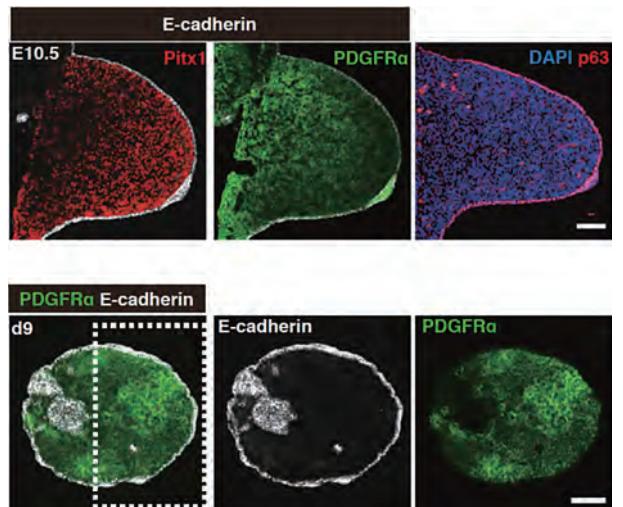
図3、ES 細胞由来の肢芽様組織を発生過程のマウス肢芽に移植した（赤色）。移植された細胞は軟骨組織および結合組織に分化し、正常な四肢形成に組み込まれた。

timing. Recently, in vitro formation of organoids for various tissues including the brain, retina, intestine, and kidney has been actively studied, whereas, in vitro induction of trunk appendage organoids such as limb bud (LB), in which mesenchymal cells are covered with a surface epithelial sheet, has not yet been reported.

In this study, we aim to establish a method for the self-organized formation of limb bud tissues from mouse pluripotent stem cells by mimicking limb development in vitro. The development of the limb begins with the formation of a protrusion called a limb bud from the trunk. The limb buds are composed of two types of tissue: the surface ectoderm covering the body surface and mesenchymal cells derived from the lateral plate mesoderm. Limb bud development has long been studied as a model for morphogenesis. Recently, a technique called organoids has been actively investigated to induce functional tissue in vitro from pluripotent stem cells such as ES and iPS cells, but it has been still difficult to induce multiple germ-derived tissues in vitro, such as limb buds. In the present study, we succeeded for the first time in formation of limb bud organoids by simultaneously inducing the surface ectoderm and lateral plate mesoderm in an embryoid body from mouse embryonic stem cells (ES cells).

We have previously developed a methodology for the induction of ectodermal neural tissues such as retinal and cerebral tissues from mouse and human pluripotent stem cells (SFEBq method). In the present study, we aimed to extend the SFEBq method to mesoderm induction to induce lateral plate mesoderm and ectodermal tissue into a single embryoid body. By regulating BMP signaling, which is involved in both lateral plate mesoderm induction and epidermal formation, we found that lateral plate mesoderm-derived mesenchymal cells formed limb bud-like tissue wrapped in the surface ectoderm (Figure 1).

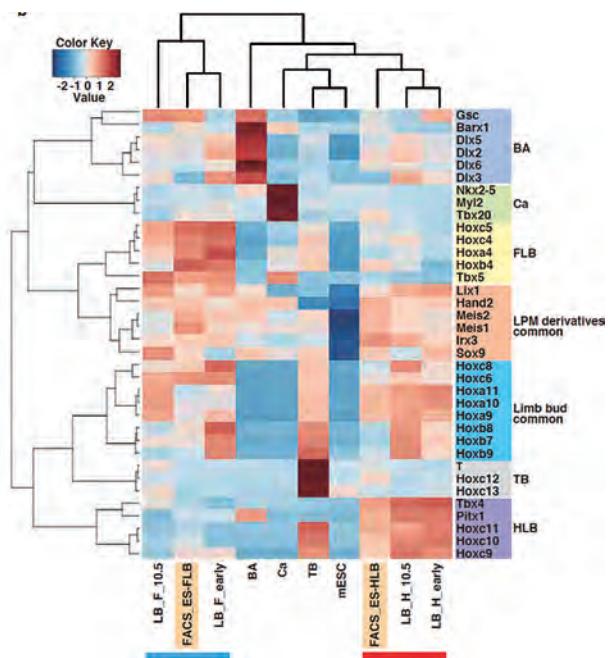
We also showed that regulation of retinoic acid signaling, which is involved in the anterior-posterior axis patterning of the trunk, can induce forelimb buds or hindlimb bud selectively. Furthermore, by comparing genome-wide gene expression patterns by RNA sequencing with various tissues, we found that ES cell-derived limb bud-like tissues showed similar gene expression patterns to developing limb buds (Figure 2). Additionally, we successfully induced the ectodermal apical crest (AER), an organizer of digit pattern formation at the tip of the limb bud, by artificially providing a local dorsoventral axis signals. Finally, the ES cell-derived limb bud-like tissue was found to differentiate into cartilage and connective tissue when transplanted into the



**Figure 1.** Upper panel: mouse limb bud (E10.5). Lower panel: mouse ESC-derived limb bud-like tissue. Each section was stained with Ecadherin (epidermis) and PDGFR $\alpha$  (mesenchyme) antibodies.

developing mouse limb bud without interfering with normal limb formation, demonstrating that ES cell-derived limb bud-like tissue is capable of limb formation (Figure 3).

We will apply this technology to human pluripotent stem cells to establish in vitro induction of human limb bud-like tissue and explore the possibility of contributing to the regeneration of damaged limbs.



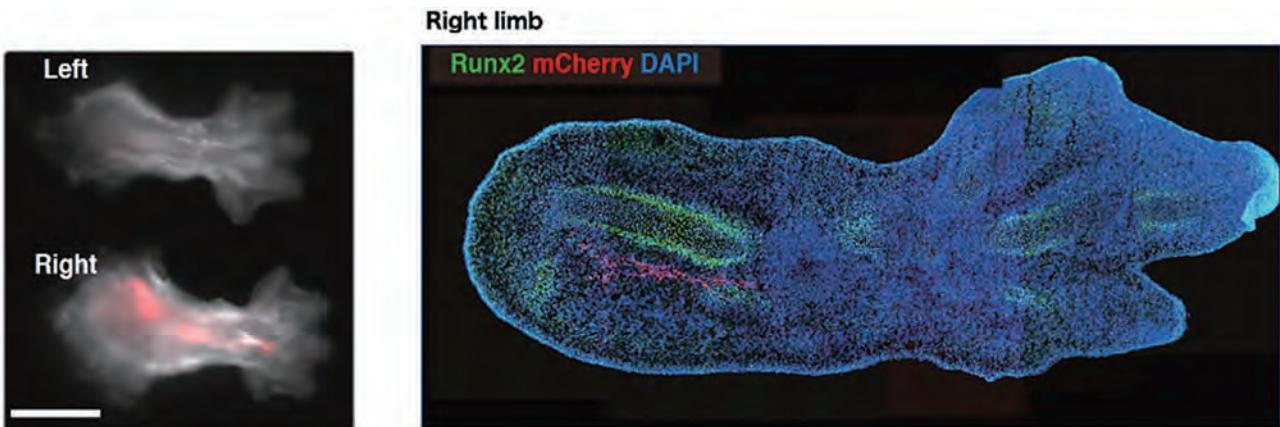
**Figure 2. Comparison of gene expression by RNA sequencing; limb bud-like tissues derived from ES cells show a similar gene expression pattern to developing limb buds.**

### List of Publications

Mori S, Sakakura E, Tsunekawa Y, Hagiwara M, Szuki T, Eiraku M. (2019) Self-organized formation of developing appendages from murine pluripotent stem cells. *Nat Commun.* 10 (2) 4802

Seto Y, Eiraku M. (2019) Toward the formation of neural circuits in human brain organoids. *Curr Opin Cell Biol.* 61, 86-91

Tu HY, Watanabe T, Shirai H, Yamasaki S, Kinoshita M, Matsushita K, Hashiguchi T, Onoe H, Matsuyama T, Kuwahara A, Kishino A, Kimura T, Eiraku M, Suzuma K, Kitaoka T, Takahashi M, Mandai M. (2019) Medium-to long-term and functional examination of human iPSC-derived retinas in rat and primate models of retinal degeneration. *EBioMedicine* 39, 562-574



**Figure 3, ES cell-derived limb bud-like tissue was transplanted into developing mouse limb buds (red) . The transplanted cells differentiated into cartilage and connective tissue and were incorporated into normal limb formation.**

Seto Y, Eiraku M. (2019) Human brain development and its in vitro recapitulation. *Neurosci res.* 138 33-42

### List of Presentations

Eiraku M., "Self-organization of patterned functional tissues from pluripotent stem cells" 119<sup>th</sup> International Titisee Conference: Tissue formation and regeneration: from molecules to models. Titisee, Mar. 27, 2019

Eiraku M., "Functional 3D tissue formation by in vitro manipulation and multicellular autonomy" State-of-the-Art 3D Tissue Culture & Organoids 2019. Naha, Apr. 18-20, 2019

永樂 元次「神経オルガノイド形成における種特異性の解析」第 19 回日本蛋白質科学会年会 第 71 回日本細胞生物学会大会合同年次大会 神戸市、6 月 24 日

永樂 元次 「幹細胞からの自己組織化による神経オルガノイド形成」 第 46 回 日本毒性学会学術年会 徳島、6 月 27 日

永樂 元次 「幹細胞からの自己組織化による神経オルガノイド形成」 NEURO2019 Brains Science Takes Flight: Bridging the Mind and Life 新潟， 7 月 26 日

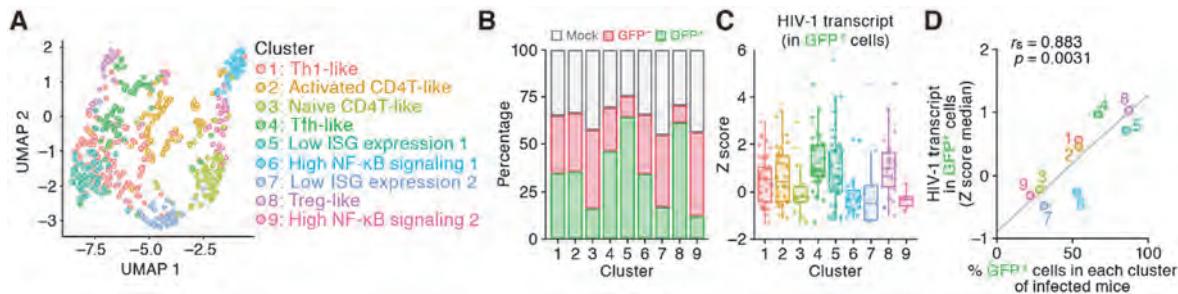
生命システム研究部門  
Department of Biosystems Science  
  
システムウイルス学分野  
**Laboratory of Systems Virology**

教 授	小柳 義夫	Prof.	<b>Yoshio Koyanagi</b>
講 師	アレックス バンデンボン	Lecturer	<b>Alex Vandenberg</b>
特定助教	古瀬 祐氣	Assistant Prof.	<b>Yuki Furuse</b>

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。バンデンボンが4月より当研究室に加わった。麻生は4月より東京大学医科学研究所に国内留学している。清水と光宗は4月に薬学研究科修士課程に入学した。2019年には、小柳はエイズウイルスがどのように感染を成立させるのかを明らかにする研究を進めている。バンデンボンは single cell RNA-seq (scRNA-Seq) 解析のためのインフォマティクス解析手法の開発、古瀬はウイルス感染症を細胞から世界レベルまで明らかにする研究開発を進めている。バンデンボンは Japanese Society for Bioinformatics Prize を受賞した。

#### 1) scRNA-Seq 解析による生体内 HIV-1 感染細胞の特徴解析（小柳）

ヒト血液幹細胞移植により造血能を付与した“ヒト化マウス”モデルを用いて、エイズウイルスである HIV-1 がどのように感染を成立させるか、一連の解析をおこなった。GFP 発現 HIV-1 を感染させたマウス脾臓の GFP 陽性細胞、GFP 隆性細胞、mock 感染細胞の scRNA-Seq のデータから、HIV-1 感染細胞の単一細胞レベルの遺伝子発現プロファイルを解析した。それぞれの細胞の scRNA-Seq データの教師なしクラスタリング解析をおこなった結果、9つの細胞群に分類された（図 1A）。GFP 陽性細胞率ならびに HIV-1 RNA 発現量はクラスター 4,5,8 で高値を、クラスター 3,7,9 では低値を示した（図 1B, 1C）。各クラスターの HIV-1 RNA 発現量と GFP 陽性細胞率は正の相関を示した（図 1D）。次に各クラスターに特徴的な遺伝子を抽出したところ、HIV-1 高発現（図 1A）であり濾胞性 T 細胞様（Tfh-like）細胞群であるクラスター 4 は高レベルの CXCL13 を発現していた（結果示さず）。クラスター 4においては Tfh 特異的発現遺伝子である CXCR5 のリガンドであり細胞遊走因子 CXCL13 が高発現していること、さらにクラスター 4 では HIV-1 RNA 量が高いことから、CXCR5-CXCL13 作用軸が HIV-1 の感染に有利に働くことが示唆される。また、HIV-1 高発現（図 1A）のクラスター 5 では、HIV-1 標的細胞特異的インターフェロン誘導遺伝子（ISG）群として見出した 107 個の common ISG (Aso, *Front. Microbiol.*, 2019) の発現量の低下を見出した。



**Fig. 1 Heterogeneous HIV-1 expression** (A) UMAP plots representing the gene expression patterns of the cells. Each dot is colored according to the cluster information. (B) Proportion of GFP-positive cells, GFP-negative cells, and mock-infected CD4+ T cells in each cluster. (C) Normalized expression level (Z score) of HIV-1 transcripts in the GFP-positive cells in each cluster. (D) Association between the HIV-1 expression level and the proportion of GFP-positive cells in the corresponding clusters. The x-axis indicates the proportion of GFP-positive cells in each cluster of CD4+ T cells of HIV1-GFP-infected mice (i.e., GFP-positive and GFP-negative cells), and the y-axis indicates the median normalized expression level of HIV-1 transcripts in the GFP-positive cells in each cluster. Each dot indicates a cluster. Spearman's rank correlation coefficient ( $r_s$ ) was applied to evaluate statistical significance of correlations.

## 2) 多角的なアプローチによるウイルス感染症実態の解明（古瀬）

エンテロウイルス D68 型による感染は、主に呼吸器症状を引き起こすが、まれに神経症状を引き起こし、さらに重篤化することもある。2010 年以降、重症例を含め当該ウイルスに関する報告が、世界各地で増加した。その理由としては抗原性の変化が示唆されているものの、詳細は不明であった。我々はこのウイルスゲノム上でタンパク質をコードしない領域を調べたところ、近年の流行株では特徴的な変異がいくつかあることを見出した。これは、ウイルスタンパク質の翻訳を制御する領域にあり、これらの変異によって RNA ゲノムの二次構造が変化しうることをバイオインフォマティクス解析によって示し、さらにこれらの変異によって呼吸器細胞や神経細胞におけるウイルスの転写活性が上昇することを実験的に示した (Furuse *et al.*, *Viruses*, 2019)。

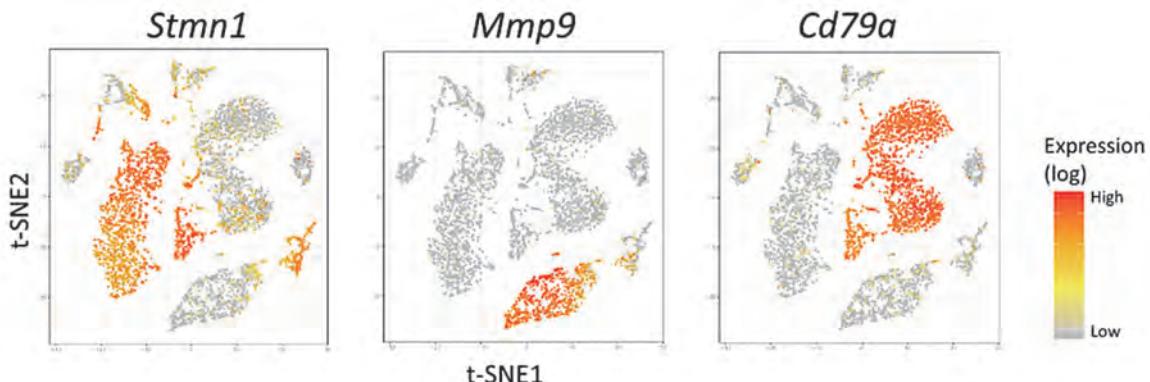
感染症の伝播動態は、差分方程式などの数理モデルによって表すことができる。これを用いて、1人のスーパースプレッダー（多くの人に感染を拡げる人）によって、コミュニティ全体での流行状況がどのように変化するのかを調べた。その結果、インフルエンザではわずかだが有意に地域全体での罹患率が上昇した。一方、麻疹では、1人のスーパースプレッダーの存在により地域での大規模な流行が起きる確率が劇的に高くなることがわかった。また、スーパースプレッダーの感染力を下げるような行動（他人との接触時間の短縮化やマスクの着用など）や、地域全体でのワクチン接種率を上げることで、このような影響をかなり小さくできることがわかった (Furuse, *Med J Aust* 2019)。

ラッサ熱は、西アフリカで地域的に流行しているウイルス性出血熱であるが、ナイジェリアでは 2017 年ごろから毎年のようにラッサ熱の大規模な流行が起り、年間で 100 人以上が死亡している。我々は実際に現地へ赴き、この流行を封じ込めるための対策活動に従事した。さらに、この流行の時空間的拡がりを疫学的に記述し、臨床的な特徴を明らかにし、死亡に係る因子や治療の有効性を統計モデルによって明らかにした (Ilori, Furuse, *et al.*, *Emerging Infect Dis*, 2019; Dan-Nwafor, Furuse, *et al.*, *Eurosurveillance*, 2019)。

## 1) Gene expression profile of scRNA-Seq data in HIV-infected cells (Koyanagi)

From unsupervised clustering analysis of single cell RNA-seq (scRNA-Seq) data of GFP<sup>+</sup>, GFP<sup>-</sup>, and CD4<sup>+</sup> T cells in spleen of HIV-1- or mock-infected humanized mice, human CD4<sup>+</sup> T cells can be classified into at least nine clusters (Fig. 1A). All nine clusters included mock-infected cells (Fig. 1B), suggesting that there were no nascent clusters produced by HIV1-GFP infection. Notably, the proportion of GFP<sup>+</sup> cells was relatively high in clusters 4, 5, and 8, and was relatively low in clusters 3, 7, and 9 (Fig. 1B). The expression levels of viral RNA in GFP<sup>+</sup> cells of each cluster were also different (Fig. 1C). In addition, the percentage of GFP<sup>+</sup> cells in each cluster was significantly and positively correlated with the expression level of HIV-1 RNA in GFP<sup>+</sup> cells of each cluster (Fig. 1D). These findings suggest that the virological properties of the respective clusters are different. Interestingly, we found that CXCL13 was uniquely and highly expressed in cluster 4, in which GFP<sup>+</sup> cells were dominant. CXCL13 expression was higher not only in GFP<sup>+</sup> cells but also in GFP<sup>-</sup> cells in cluster 4 than in the other clusters. Moreover, we assessed the expression levels of 107 'common ISGs', which are robustly upregulated upon type I interferon stimulation in multiple cell types, including in CD4<sup>+</sup> T cells. The expression levels of 'common ISGs' were significantly low in clusters 5. These findings suggest that there is a CD4<sup>+</sup> T cell subset that inefficiently express anti-HIV-1 ISGs and this population positively contributes to viral spread *in vivo*.

## 2) Predicting differentially expressed genes in scRNA-seq data (Vandenbon)



**Fig. 2 Example application of *singleCellHaystack* on a marrow tissue dataset.** t-SNE plots are shown for three high-scoring differentially expressed genes: *Stmn1*, *Mmp9*, and *Cd79a*. Each t-SNE plot shows the 5,250 cells in the dataset. The color scale represents the expression level (log scale) of each gene.

A common step in single-cell data analysis is the prediction of genes that are expressed in one subset of cells but not in others. Existing approaches for predicting differentially expressed genes (DEGs) rely on clustering cells into groups and comparing gene expression between these groups. However, clustering of high-dimensional data often results in arbitrary clusters, and comparisons between many groups of cells are time-consuming even for small datasets. We therefore are developing *singleCellHaystack*, a novel method for predicting DEGs in scRNA-seq data which does not rely on clustering of cells. (Vandenbon & Diez, Nature Comm. 2020.) *singleCellHaystack* is faster than existing methods and returns more accurate predictions. It is

a promising new approach for exploratory analysis of single-cell data and for predicting new marker genes.

In other collaborative projects we are analyzing regulatory mechanisms in hematopoiesis using single-cell data analysis. We also analyzed the role of codon bias in determining RNA degradation rates (*Hia et al., EMBO rep.*, 2019).

### 3) Multi-disciplinary approach to understand viral diseases (Furuse)

Infection with Enterovirus D68 causes respiratory symptoms. The infection sometimes causes neurological symptoms as well. Although reports about the infection with the virus has increased since 2010 all over the world, the mechanisms behind that was unclear. We found that recently circulating strains have characteristic mutations in not only a region for antigenicity but also in an untranslated region of the viral genome. Bioinformatic analysis suggested that those mutations could affect secondary structure of the viral genome, and experiments using technique of molecular biology revealed that the mutations increased translational efficiency of the viral proteins in respiratory and neuronal cell lines (*Furuse et al., Viruses*, 2019).

Transmission dynamics of infectious diseases can be investigated using mathematical modelling. We studied the impact of a super-spreader in a community using difference equations from the point of view of public health. We found that a super-spreader can make incidence of influenza in a community slightly but significantly high. In the case of measles, probability that a big outbreak of the disease happens increased dramatically by the super-spreader. Reduction of transmission efficiency from the super-spreader such as implementation of standard precaution and increase of vaccination coverage in the community can cancel the effect of the super-spreader in public health (*Furuse, Med J Aust* 2019).

Lassa fever is a viral hemorrhagic fever that is endemic in West Africa. Since 2017, Nigeria has experienced large outbreaks of the disease with >100 annual deaths. Furuse was deployed to the country for the outbreak response. In addition, we described temporal and geographical spread of the outbreak, reported clinical characteristics of the disease, and investigated risk factors for fatal outcome and effectiveness of antivirals for the disease (*Ilori, Furuse, et al., Emerging Infect Dis*, 2019; *Dan-Nwafor, Furuse, et al., Eurosurveillance*, 2019).

### List of Publications

Aso, H., Ito, J., Koyanagi, Y., and Sato K. (2019). Comparative description of the expression profile of interferon-stimulated genes in multiple cell lineages targeted by HIV-1 infection. **Front. Microbiol.** 10:429, 2019.

Yamasoba, D., Sato, K., Ichinose, I., Imamura, T., Koepke, L., Joas, S., Reith, E., Hotter, D., Misawa, N., Akaki, K., Uehata, T., Mino, T., Miyamoto, S., Noda, T., Yamashita, A., Standley, D.M., Kirchhoff, F., Sauter, D., Koyanagi, Y., and Takeuchi, O. (2019). N4BP1 restricts HIV-1 and its inactivation by MALT1 promotes viral reactivation. **Nat. Microbiol.** 4 (9):1532-1544, 2019.

Hia, F., Yang, S.F., Shichino, Y., Yoshinaga, M., Murakawa, Y., Vandenbon, A., Fukao, A., Fujiwara, T., Landthaler, M., and Natsume, T. (2019). Codon bias confers stability to human mRNAs. **EMBO Rep.** 20, e48220.

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., and Oshitani, H. (2019). Association between preceding viral respiratory infection and subsequent respiratory illnesses among children: A prospective cohort study in the Philippines. **J. Infect. Dis.**, 219, 197-205.

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, 478-483.

Ilori, E.A., Furuse, Y., Ipadeola, O.B., Dan-Nwafor, C.C., Abubakar, A., Womi-Eteng, O.E., Ogbaini-Emovon, E., Okogbenin, S., Unigwe, U., Ogah, E., Ayodeji, O., Abejegah, C., Liasu, A.A., Musa, E.O., Woldetsadik, S.F., Lasuba, C.L.P., Alemu, W., and Ihekweazu, C. (2019). Nigeria Lassa Fever National Response Team. Epidemiologic and Clinical Features of Lassa Fever Outbreak in Nigeria, January 1-May 6, 2018. **Emerging Infect. Dis.** 25, 1066-1074.

Dan-Nwafor, C.C., Furuse, Y., Ilori, E.A., Ipadeola, O., Akabike, K.O., Ahumibe, A., Ukponu, W., Bakare, L., Okwor, T.J., Joseph, G., MBA, N.G., Akano, A., Olayinka, A.T., Okoli, I., Okea, R.A., Makava, F., Ugbogulu, N., Oladele, S., Namara, G., Muwanguzi, E.N., Naidoo, D., Mutbam, S.K., Okudo, I., Woldetsadik, S.F., Lasuba, C.L., and Ihekweazu, C. (2019). Measures to control protracted large Lassa fever outbreak in Nigeria, 1 January to 28 April 2019. **Eurosurveillance**, 24 (20).

Furuse, Y., Chaimongkol, N., Okamoto, M., and Oshitani, H. (2019). Evolutionary and Functional Diversity of the 5' Untranslated Region of Enterovirus D68: Increased Activity of the Internal Ribosome Entry Site of Viral Strains during the 2010s. **Viruses**, 11, 626.

Furuse, Y. (2019). What would happen if Santa Claus was sick? His impact on communicable disease transmission. **Med. J. Aust.** 211, 523-524.

### List of Presentations

Koyanagi, Y., and Sato, K. Molecular dissection of HIV infection event. JSPS Core-to-Core program, the 2nd Symposium on Virus Infection and Host Response, London, The Embassy of JAPAN, 2019 年 3 月 6-7 日 .

Kumata, R. Kakizoe, Y., Misawa, N., Iwami, S., Koyanagi, Y., and Sato, K. The conflicting effects of IFN- $\alpha$  on two modes of HIV-1 infection. 第 18 回東京大学生命科学シンポジウム , 東京 (本郷), 2019 年 4 月 20 日 .

Sato, K. Nakano, Y., Keisuke Yamamoto, K., Takahashi-Ueda, M., Soper, A., Kumata, R., Aso, H., Misawa,

N., Konno, Y., Kimura, I., Nagaoka, S., Juarez-Fernandez, G., Ito, J., Nakagawa, S., Koyanagi, Y. Gorilla APOBEC3G restricts SIVcpz and influences lentiviral evolution in great ape cross-species transmissions. The 18th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, 2019年9月10-13日 .

熊田隆一, 柿添友輔, 三沢尚子, 小柳義夫, 岩見真吾, 佐藤佳. HIV複製におけるインターフェロンの効果の定量化. 2019年度日本数理生物学会年会, 東京(大岡山), 2019年9月14-16日.

Konno, Y., Uriu K., Morita E., Koyanagi, Y., and Sato, K. Investigation of the difference on the molecular mechanism of HIV-1 budding between viral subtypes. 第67回日本ウイルス学会学術集会, 東京(船堀), 2019年10月29-31日.

Nagaoka, S., Ito, J., Misawa, N., Islam, S., Aso, H., Satou, Y., Koyanagi, Y., and Sato, K. Investigation of proviral features of HIV-1-infected cells in vivo. 第67回日本ウイルス学会学術集会, 東京(船堀), 2019年10月29-31日.

Aso, H., Nagaoka, S., Ito, J., Misawa, N., Shiroguchi, K., Suzuki, S., Kawakami, E., Koyanagi, Y., Sato, K. Characterization of the heterogeneity of HIV-1-infected cells in vivo. 第67回日本ウイルス学会学術集会, 東京(船堀), 2019年10月29-31日.

Nakano, Y., Yamamoto, K., Soper, A., Sato, K., and Koyanagi, Y. HIV-1 group O Vif exhibits a unique mode of counteracting APOBEC3F. 第67回日本ウイルス学会学術集会, 東京(船堀), 2019年10月29-31日.

Sato, K., Aso, H., Nagaoka, S., Misawa, N., Ito, J., Islam, S., Suzuki, Y., Shiroguchi, K., Kawakami, E., Satou, Y., and Koyanagi Y. Multi-omics investigation of HIV-1-infected cells in humanized mouse model. 第33回日本エイズ学会学術集会・総会, 熊本, 2019年11月27-29日.

Vandenbon, A. Oxford Journals – Japanese Society for Bioinformatics Prize 受賞記念講演. 第8回生命医薬情報学連合大会. 東京, 2019年9月9-11日.

Vandenbon, A. singleCellHaystack, A clustering-independent method for predicting differentially expressed genes in single cell transcriptome data. 第8回生命医薬情報学連合大会. 東京, 2019年9月9-11日.

Furuse, Y., Tamaki, R., Okamoto, M., Saito-Obata, M., Suzuki, A., Saito, M., Imamura, T., Ueno, F., Alday, P.P., Tan, A.G., Inobaya, M.T., Segubre-Mercado, E., Tallo, V., Lupisan, S., and Oshitani, H. Association between preceding viral respiratory infection and subsequent respiratory illnesses among children: A prospective cohort study in the Philippines. Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2019, Sapporo, 2019年9月

古瀬祐氣. What really happened to me during Ebola outbreak. 白眉プロジェクト年次報告会(京都大学), 京都, 2019年3月

古瀬祐氣. インフルエンザ研究者交流の会のみなさんのよりよい研究のために. 第33回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム, 京都, 2019年6月

古瀬祐氣 . ウィルス学×公衆衛生×分子進化 . 学友会セミナー(東京大学医科学研究所), 東京 , 2019  
年 6 月

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

増殖制御システム分野  
Laboratory of Growth Regulation System

教 授	影山龍一郎	Prof.	Ryoichiro Kageyama
准教授	大塚 俊之	Assoc. Prof.	Toshiyuki Ohtsuka
助 教	小林 妙子	Assist. Prof.	Taeko Kobayashi
特定助教	下條 博美	Assist. Prof.	Hiromi Shimojo

本分野では、いろいろな生命現象において遺伝子発現が2～3時間周期で振動することを見出し、その意義や制御機構の解明を目指して研究を行っている。特に、神経発生や体節形成における遺伝子発現振動に注目して解析を進めてきた。塩基性領域・ヘリックス・ループ・ヘリックス (bHLH) 因子である Hes1, Hes5 や Hes7 はネガティブフィードバックによって自律的に2～3時間周期で発現が振動し、Hes1 や Hes7 の発現振動によって周期的に抑制されるためにその下流遺伝子の発現も振動する。今回、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。同様の遺伝子発現動態が筋肉細胞分化時にも観察されることが分かった。また、神経幹細胞の活性化にはリソーム機能が重要な役割を果たすことを明らかにした。

### 1) リソームが成体神経幹細胞を制御するメカニズムを解明

大人の神経幹細胞は脳内の海馬歯状回や側脳室の周辺領域にわずかに存在するが、そのほとんどが増殖や分化を停止した休眠状態にある。休眠状態の神経幹細胞は活性化されて再び増殖を始めた状態（「活性化状態」）になると、分化して成熟ニューロンを作り出すことができる。したがって、「休眠状態」は一生涯という長い期間に渡って脳内に神経幹細胞を維持するために必須のメカニズムである。様々なシグナル伝達経路が神経幹細胞の増殖・休眠を制御することが報告されているが、細胞内のタンパク質恒常性の変化については明らかになっていなかった。本研究グループは、細胞内のタンパク質恒常性を制御するタンパク質分解に着目して解析を行った。これまでに脳室周囲の休眠神経幹細胞にリソームが多く存在することは報告されていたが、「休眠状態」にリソーム機能がどのような役割を持つのかについては全く明らかにされていなかった。リソームは細胞内で様々な物質の分解を行う細胞内小器官であり、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれた膜受容体を分解する。本研

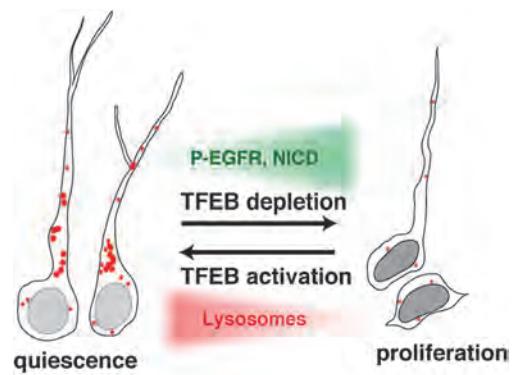
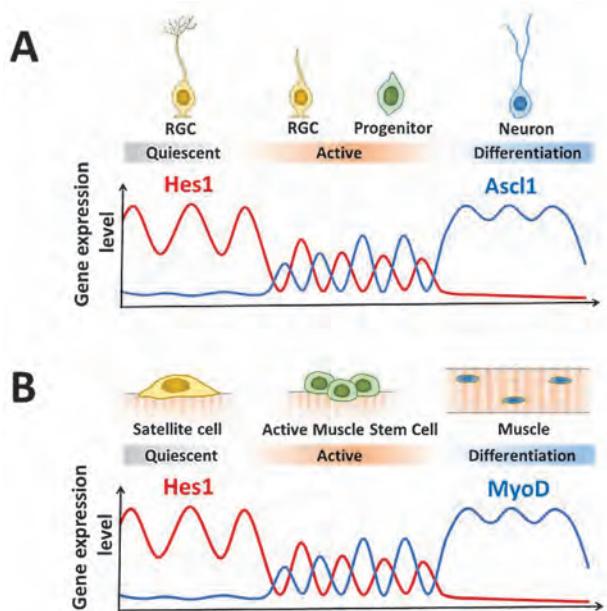


Fig. 1. Lysosome formation in quiescent versus active neural stem cells. The master regulator TFEB induces lysosome formation, which leads to maintenance of quiescent neural stem cells.

究グループは、増殖している神経幹細胞が休眠状態に入る際に細胞内のリソーム活性が上昇すること、休眠状態ではリソーム活性の上昇により増殖シグナル伝達に関わる膜受容体が速やかに分解されることを見いだした。また、リソームの働きを阻害すると神経幹細胞は休眠状態を脱すること、逆にリソーム活性を人工的に上昇させると神経幹細胞は増殖をやめて休眠状態に入ることが分かった。以上から、リソーム活性が成体神経幹細胞の重要な制御因子であることが明らかになった。

## 2) Notch シグナルによる組織幹細胞の活性化状態と静止状態の制御

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 / 休眠状態）。この組織幹細胞の活性化状態と静止状態とはどちらも Notch シグナルによって制御されるが、どのようにして異なる状態に制御されるのか詳細な分子機構はよく分かっていない。最近の解析から、神経系や筋肉系の幹細胞において Notch シグナルのエフェクターである Hes1 の発現動態が活性化状態と静止状態とで異なることが分かった。活性化状態では Hes1 の発現が振動し、Hes1 によって周期的に抑制されるために神経分化決定因子 Ascl1 や筋肉分化決定因子 MyoD の発現も振動すること、一方、静止状態では Hes1 の発現が高レベルで持続し、Ascl1 や MyoD の発現が抑制されたことが明らかになった。さらに、神経系や筋肉系の幹細胞においてそれぞれ Ascl1 や MyoD の発現振動が重要な役割を担うことが示された。したがって、Hes1 の発現動態の違いによって組織幹細胞の活性化状態と静止状態が制御されることが明らかになった。



**Fig. 2. Gene expression dynamics in neurogenesis and myogenesis.**

(A) Expression dynamics of Hes1 and Ascl1 in neurogenesis.

(B) Expression dynamics of Hes1 and MyoD in myogenesis.

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 embryonic and adult neural stem cells exhibit different gene expression dynamics. Similar gene expression patterns were

also observed during myogenesis. Furthermore, we found that regulation of lysosomal activity is required for activation of neural stem cells, as described below.

### 1) Enhanced lysosomal degradation maintains the quiescent state of neural stem cells

Quiescence is important for sustaining neural stem cells (NSCs) in the adult brain over the lifespan. Lysosomes are digestive organelles that degrade membrane receptors after they undergo endolysosomal membrane trafficking. Enlarged lysosomes are present in quiescent NSCs (qNSCs) in the subventricular zone of the mouse brain, but it remains largely unknown how lysosomal function is involved in the quiescence. Here we show that qNSCs exhibit higher lysosomal activity and degrade activated EGF receptor by endolysosomal degradation more rapidly than proliferating NSCs. Chemical inhibition of lysosomal degradation in qNSCs prevents degradation of signaling receptors resulting in exit from quiescence. Furthermore, conditional knockout of TFEB, a lysosomal master regulator, delays NSCs quiescence *in vitro* and increases NSC proliferation in the dentate gyrus of mice. Taken together, our results demonstrate that enhanced lysosomal degradation is an important regulator of qNSC maintenance.

### 2) Regulation of active and quiescent somatic stem cells by Notch signaling

Somatic stem/progenitor cells actively proliferate and give rise to different types of mature cells (active state) in embryonic tissues while they are mostly dormant (quiescent state) in many adult tissues. Notch signaling is known to regulate both active and quiescent states of somatic stem cells, but how it regulates these different states is unknown. Recent studies revealed that the Notch effector Hes1 is expressed differently during the active and quiescent states during neurogenesis and myogenesis: high in the quiescent state and oscillatory in the active state. When the Hes1 expression level is high, both *Ascl1* and *MyoD* expression are continuously suppressed. By contrast, when Hes1 expression oscillates, it periodically represses expression of the neurogenic factor *Ascl1* and the myogenic factor *MyoD*, thereby driving *Ascl1* and *MyoD* oscillations. High levels of Hes1 and the resultant *Ascl1* suppression promote the quiescent state of neural stem cells, while Hes1 oscillation-dependent *Ascl1* oscillations regulate their active state. Similarly, in satellite cells of muscles, known adult muscle stem cells, high levels of Hes1 and the resultant *MyoD* suppression seem to promote their quiescent state, while Hes1 oscillation-dependent *MyoD* oscillations activate their proliferation and differentiation. Therefore, the expression dynamics of Hes1 is a key regulatory mechanism of generating and maintaining active/quiescent stem cell states.

### List of Publications

- Kageyama, R., Shimojo, H., and Ohtsuka, T. (2019) Dynamic control of neural stem cells by bHLH factors. *Neurosci. Res.* 138, 12-18.
- Isomura, A., and Kageyama, R. (2019) Light control of transcription in cells. In **Optogenetics** (Eds: S. Vriz and T. Ozawa), Comprehensive Series in Photochemical and Photobiological Sciences, Royal Society of

Chemistry, Vol 18, pp. 169-180.

Ohtsuka, T., and Kageyama, R. (2019) Regulation of temporal properties of neural stem cells and transition timing of neurogenesis and gliogenesis during mammalian neocortical development. **Semin. Cell Dev. Biol.** 95, 4-11.

Nishikawa, Y., Kodama, Y., Shiokawa, M., Matsumori, T., Marui, S., Kuriyama, K., Kuwada, T., Sogabe, Y., Kakiuchi, N., Tomono, T., Mima, A., Morita, T., Ueda, T., Tsuda, M., Yamauchi, Y., Sakuma, Y., Ota, Y., Maruno, T., Uza, N., Uesugi, M., Kageyama, R., Chiba, T., and Seno, H. (2019) Hes1 plays an essential role in *Kras*-driven pancreatic tumorigenesis. **Oncogene** 38, 4283-4296.

Sueda, R., Imayoshi, I., Harima, Y., and Kageyama, R. (2019) High Hes1 expression and resultant Ascl1 suppression regulate quiescent versus active neural stem cells in the adult mouse brain. **Genes & Dev.** 33, 511-523.

Lahmann, I., Bröhl, D., Zyrianova, T., Isomura, A., Czajkowski, M.T., Kapoor, V., Griger, J., Ruffault, P.-L., Mademtzoglou, D., Zammit, P.S., Wunderlich, T., Spuler, S., Kühn, R., Preibisch, S., Wolf, J., Kageyama, R., and Birchmeier, C. (2019) Oscillations of Hes1 and MyoD proteins regulate the maintenance of activated muscle stem cells. **Genes & Dev.** 33, 524-535.

Matsuzaki, T., Yoshihara, T., Ohtsuka, T., and Kageyama, R. (2019) Hes1 expression in mature neurons in the adult mouse brain is required for normal behaviors. **Sci Rep.** 9, 8251.

Vissers, C., and Kageyama, R. (2019) Bursting the Notch bubble: new insights into *in vivo* transcriptional dynamics. **Dev. Cell** 50, 393-394.

Tateya, T., Sakamoto, S., Ishidate, F., Hirashima, T., Imayoshi, I., and Kageyama, R. (2019) Three-dimensional live imaging of Atoh1 reveals the dynamics of hair cell induction and organization in the developing cochlea. **Development**, 146, edev177881.

Morikawa, M., Mitani, Y., Holmborn, K., Kato, T., Koinuma, D., Maruyama, J., Vasilaki, E., Sawada, H., Kobayashi, M., Ozawa, T., Morishita, Y., Bessho, Y., Maeda, S., Ledin, J., Aburatani, H., Kageyama, R., Maruyama, K., Heldin, C.-H., and Miyazono, K. (2019) The ALK-1/SMAD/ATOH8 axis attenuates hypoxia responses and protects against the development of pulmonary arterial hypertension. **Sci. Sig.** eaay4430.

Kobayashi, T., Piao, W., Miyachi, H., Kitano, S., Takamura, T., iwamoto, Y., Yamada, M., Imayoshi, I., m Shioda, S., Ballabio, A., and Kageyama, R. (2019) Enhanced lysosomal degradation maintains the quiescent state of neural stem cells. **Nat. Commun.** 10, 5446.

Shimojo, H., and Kageyama, R. (2019) Real-time bioluminescence imaging of Notch signaling dynamics during murine neurogenesis. **J. Vis. Exp.** 154, e60455.

Sakamoto, S., Tateya, T., Omori, K., and Kageyama, R. (2019) Id genes are required for morphogenesis and

cellular patterning in the developing mammalian cochlea. **Dev. Biol.** in press.

影山龍一郎 (2019). 細胞が持つ不思議なコミュニケーション能力. **Nextcom** 37, 62-63.

### List of Presentations

Kageyama R. Oscillatory control of somitogenesis and neurogenesis: imaging and control of gene expression by light technology. International symposium on Optobiotechnology, Nagoya, February 5-6, 2019.

Kageyama R. Mechanism of synchronized Hes7 oscillations in the somite segmentation clock. 2<sup>nd</sup> JSDB-GfE Young scientists exchange meeting, Kyoto, May 13, 2019.

Kageyama R. Dynamic transcriptional control of neural stem cells. IBRO 10<sup>th</sup> World Congress, Deagu, Korea, September 21-25, 2019.

Kageyama R. Live imaging of dynamic expression of the mouse segmentation clock gene *Hes7*. Zeiss-iCeMS Innovation Core Funding Commemorative Symposium. Kyoto, October 28, 2019.

Kageyama R. Regulation of active versus quiescent neural stem cells. Notch meeting XI, Athens, Greece, October 6-10, 2019.

Kageyama R. The mechanism of the somite segmentation clock. The 20th International Conference on Systems Biology, Okinawa, November 1-5, 2019.

Kageyama R. Regulation of active versus quiescent neural stem cells. International Conference of the Genetics Society of Korea, Seongnam, Korea, November 21-22, 2019.

Kageyama R. Regulation of active versus quiescent neural stem cells. International Symposium of Institute of Life Science in KNU & KSMCB, Kangwon, Korea, November 22, 2019.

Kageyama R. Mechanism of synchronized Hes7 oscillations in the somite segmentation clock. 第 42 回日本分子生物学会年会, 福岡, 2019 年 12 月 3-6 日 .

Risa Sueda, Itaru Imayoshi, Yukiko Harima, Ryoichiro Kageyama. High Hes1 expression and resultant Ascl1 suppression regulate quiescent versus active neural stem cells in the adult mouse brain. 17th International Student Seminer, Kyoto. March 6-7, 2019

Risa Sueda, Itaru Imayoshi, Yukiko Harima, Ryoichiro Kageyama. High Hes1 expression and resultant Ascl1 suppression regulate quiescent versus active neural stem cells in the adult mouse brain. 第 12 回神経発生討論会, 静岡, 2019 年 3 月 15-16 日 .

Shimojo H, Kori H, Kageyama R. Oscillations of Notch signaling in cell-cell interactions regulate dynamic gene expression networks and tissue. 第 52 回日本発生物学会大会, 大阪, 2019 年 5 月 14-17 日 .

Fujita H, Matsumiya M, Kageyama R, Matsuda Y, Suzuki T. Expression pattern of Hox11 paralogous genes in the somites is determined by GDF11 with dose-dependent manner, 大阪, 2019 年 5 月 14-17 日 .

Sueda R, Imayoshi I, Harima Y, Kageyama R. High Hes1 expression and resultant Ascl1 suppression regulate quiescent versus active neural stem cells in the adult mouse brain. NEURO2019（第42回日本神経科学大会 / 第62回日本神経化学会大会），新潟，2019年7月25-28日。

Sueda R, Imayoshi I, Harima Y, Kageyama R. High Hes1 expression and resultant Ascl1 suppression regulate quiescent versus active neural stem cells in the adult mouse brain. Cold Spring Harbor Symposium on Stem Cell Biology, Cold Spring Harbor, USA, September 17-21, 2019.

下條博美. 神経分化を制御する遺伝子発現ダイナミクス. 第92回日本生化学会大会, 横浜, 2019年9月18-20日.

Sueda R, Imayoshi I, Harima Y, Kageyama R. High Hes1 expression and resultant Ascl1 suppression regulate quiescent versus active neural stem cells in the adult mouse brain. 東アジアシンポジウム、Seoul, Korea, October 23-26, 2019.

末田梨沙、今吉格、播磨有希子、影山龍一郎. Hes1とAscl1による成体神経幹細胞の制御機構. 第42回日本分子生物学会年会, 福岡, 2019年12月3-6日.

末田梨沙、貝瀬峻、影山龍一郎. 成体脳神経幹細胞の活性化機構. 「次世代脳」プロジェクト 冬のシンポジウム、東京、2019年12月18-20日.

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

**RNA システム分野**  
**Lab. 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) 核内構造体パラスペックルの形成における新たな制御機構の解明**

長鎖ノンコーディング RNA である NEAT1 は、多数の RNA 結合タンパク質と相互作用し、パラスペックルと呼ばれる核内構造体の骨格として機能していることが知られている。NEAT1 には 3' 末端の選択的プロセシングによって作られる 2 つのアイソフォーム (NEAT1\_1, NEAT1\_2) があり、長いアイソフォームの NEAT1\_2 がパラスペックルの形成に重要である。この選択的プロセシングは、転写された NEAT1 前駆体にポリ (A) の尾の付加に先立って RNA の 3' 側を切断する因子のひとつ CFIm (cleavage factor I) が NEAT1\_1 の 3' 端にあたる部位にリクルートされるかどうかで制御されている。本研究では、この NEAT1 への CFIm のリクルートに、キャップ構造に結合する CBC (cap binding complex) を介して RNA に結合する ARS2 という因子が関与することを明らかにした。ARS2 は、CFIm と相互作用し、NEAT1 へ CFIm をリクルートすることで、短いアイソフォームの NEAT1\_1 の產生を促進した。一方で、ARS2 の発現を抑制した細胞では、このプロセシングが行わらず、NEAT1 の転写が継続するため、長いアイソフォームの NEAT1\_2 の発現量が増加した。また、ARS2 は NEAT1 の選択的プロセシングだけではなく、NEAT1 の分解にも関わることが明らかになった。このように、ARS2 は、パラスペックルの形成に重要な NEAT1\_2 の発現を制御することで、パラスペックルの形成を制御していることが示された。

**2) 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**

PHAX は、RNA polymerase II によって転写された U snRNA のキャップ構造に CBC (Cap Binding Complex) とともに結合し、核外輸送因子 CRM1 を呼び込むことで、U snRNA の輸送に重要な役割を担っている。しかしながら、RNA の輸送以外の現象に PHAX が関わるかは明らかではなかった。PHAX をノックダウンした細胞に UV 照射したところ、生存率の低下、ならびに DNA 修復効率の低下が見られた。次に、DNA 損傷応答を調べるために、各種 DNA 損傷マーカーの発現をウェスタンブロッティング、及び免疫染色で解析した結果、いくつかの DNA 損傷マーカーの発現が上昇し

た一方で、リン酸化 histone H2AX の発現が顕著に減少していた。さらに、PHAX ノックダウン細胞において、リン酸化 H2AX の発現だけでなく、全体の H2AX 発現レベルの低下がタンパクレベルだけでなく、RNA レベルでも見られた。以上の結果より、PHAX ノックダウン細胞では、DNA 損傷時におけるリン酸化 H2AX が減少し、DNA 修復効率の低下、ひいては細胞生存率の低下につながることが示唆された。現在、PHAX が H2AX の発現に関わるメカニズムを解析中である。

### 3) 真核生物リボソームの品質管理に関わる新たな因子

真核生物のリボソームは約 80 個のリボソームタンパク質と 4 本の rRNA から構成される巨大な複合体である。ペプチジル基転移反応 (PTC) をはじめ、リボソームの触媒活性には rRNA が重要な役割を果たしており、rRNA の重要塩基のひとつに点変異を導入するだけでリボソームの機能は失われてしまう。真核生物は、このような機能不全リボソームを選択的に認識して分解する品質管理機構をそなえている。われわれは、機能不全リボソームは分解前に Mms1 を含む複合体によりユビキチン化されることを明らかにしたが、この E3 複合体がリボソーム上の何を目印にして機能不全粒子を見分けているのかという点については、長い間未知のままであった。最近になってわれわれは機能不全リボソームの識別機構に Bec1 と名付けた因子が関与していることを見出した。この因子は機能不全 rRNA の発現により誘導されるユビキチン化に必須であり、正常リボソームよりも機能不全リボソームにより高い親和性をもって結合する。リボソーム上での結合部位を紫外線クロスリンクを用いて解析すると、rRNA の変異がある PTC と、ユビキチン化部位との間の空間をつなぐ場所に結合していた。以上の結果から、細胞がリボソームの機能を検査するために参照する、リボソーム上の新たなドメインが明らかになりつつある。

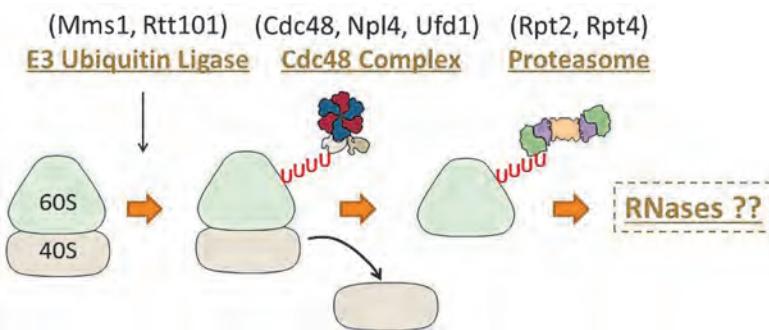


Fig.1 Model of 25S non-functional rRNA decay (NRD)

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) ARS2-mediated regulation of nuclear paraspeckle formation through 3'-end processing and stability of NEAT1 long noncoding RNA**

NEAT1 is a long noncoding RNA that functions as an essential framework of subnuclear paraspeckle bodies. Among the two isoforms (NEAT1\_1 and NEAT1\_2), produced by an alternative 3'-end RNA processing, the longer isoform NEAT1\_2 plays a crucial role on the paraspeckle formation. Here we show that the 3'-end processing and stability of NEAT1 RNAs are regulated by ARS2, a factor interacting with CBC that binds to the m7G cap structure of RNA polymerase II transcripts. Knockdown of ARS2 inhibited NEAT1's association with the mammalian cleavage factor I (CFIm) that produces the shorter isoform NEAT1\_1. In addition, knockdown of ARS2 led to a preferential stabilization of NEAT1\_2. As a result, NEAT1\_2 RNA levels are dramatically enhanced in ARS2-knockdown cells, leading to an increase in the number of paraspeckles. These results reveal a suppressive role of ARS2 on the NEAT1\_2 expression and the subsequent formation of paraspeckles.

### **2) RNA export factor PHAX is involved in DNA damage response via regulation of histone H2AX expression**

PHAX (Phosphorylated adaptor for RNA export) promotes nuclear export of short transcripts of RNA polymerase II such as spliceosomal U snRNA precursors, as well as intra-nuclear transport of small nucleolar RNAs (snoRNAs). However, it remains unknown whether PHAX has other critical functions. Here we show that PHAX is required for efficient DNA damage response (DDR) *via* regulation of phosphorylated histone variant H2AX (gamma-H2AX), a key factor for DDR. Knockdown of PHAX led to a significant reduction of H2AX mRNA levels, through inhibition of both transcription of H2AX gene and nuclear export of H2AX mRNA, one of the shortest mRNAs in the cell. As a result, PHAX-knockdown cells become more sensitive to DNA damage due to a shortage of gamma-H2AX. These results reveal a novel function of PHAX, which secures efficient DDR and hence genome stability.

### **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 Bec1 (bridge to E3 complex), is essential for the degradation of mutant 25S rRNAs. Bec1 is physically associated with 60S ribosome and the E3 ubiquitin ligase involved in 25S NRD. Biochemical analyses revealed that Bec1 is selectively enriched on the 80S particle containing a nonfunctional mutant 25S rRNA, suggesting a central role of this bridge protein in the functional inspection of the 80S ribosomes.

### **List of Publications**

Machitani, M., Taniguchi, I. and Ohno, M. (2019).

ARS2 regulates nuclear paraspeckle formation through 3'-end processing and stability of NEAT1 long non-coding RNA. *Mol. Cell. Biol.* in press.

### **List of Presentations**

Taniguchi, I. Nuclear export of RNA polymerase II transcripts. The 23rd East Asia Joint Symposium. Soul, Korea, October 23-26, 2019.

Yoshimoto, R., Taniguchi, I., Rahimi, K., Kjems, J., Ohno, M., Mayeda, A. ciRS-7 is biosynthesized using back-splicing promoted by inverted MIR elements and is exported to cytoplasm via Tap/p15 pathway. Eukaryotic mRNA Processing meeting. Cold Spring Harbor, NY, USA, August 20-24, 2019.

町谷充洋、大野陸人 ARS2-mediated regulation of nuclear paraspeckle formation through 3'-end processing and stability of NEAT1 long noncoding RNA. 第21回日本RNA学会年会、東京、2019年7月17-19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	檜作 洋平	Assist. Prof.	Yohei Hizukuri

本研究室では、大腸菌や海洋性ビブリオ菌等の細菌における細胞表層タンパク質の、折りたたみ、膜透過（分泌）、膜組み込み、局在化、分解、ストレス応答、及び、翻訳伸長の一時停止を介した遺伝子発現調節などの諸過程が、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。2019年は、大腸菌細胞質膜（内膜）の品質管理に関わると推測される膜プロテアーゼHtpXの機能解析に役立てるため、*in vivo*でのHtpXのプロテアーゼ活性を簡便にアッセイできる実験系を開発しました。また、大腸菌のペリプラズムプロテアーゼで、外膜タンパク質のアセンブリーと分解に働くBepAの全体構造をX線構造解析により決定し、その機能モデルを提唱しました。

1) 大腸菌細胞質膜プロテアーゼ HtpX の機能を解析するための *in vivo* プロテアーゼ活性アッセイシステムの構築

生体膜は細胞の生存に必須の役割を果たしており、その機能の維持は重要な問題である。異常な膜タンパク質の蓄積は膜の構造や機能に深刻なダメージを与えるため、迅速に分解・除去されねばならない。大腸菌の細胞質膜プロテアーゼHtpXはM48ファミリーに属する亜鉛メタロプロテアーゼである。*htpX*遺伝子の発現は熱ショックストレスや細胞表層ストレスにより誘導され、また、*htpX*単独の欠損では明確な表現型を示さないものの、膜タンパク質の品質管理に関するATP依存性膜プロテアーゼFtsHをコードする*ftsH*遺伝子の欠損と組み合わせると致死となることなどから、HtpXも膜タンパク質品質管理に寄与しているものと推測される。しかしながら、HtpXの具体的な機能は分かっていない。これは、その生理基質が未だ不明であり、また、その細胞内でのプロテアーゼ機能を感度良くアッセイするためのモデル基質が存在しないことに大きな原因がある。我々は、半定量的かつ簡便にHtpX機能を検出できる新たなモデル膜タンパク質基質を構築し(Fig. 1)、このアッセイ系を用いてHtpXの保存領域の種々

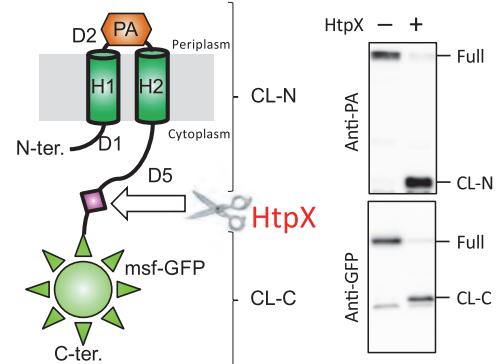


Fig. 1. The newly-constructed model substrate (left) and its *in vivo* cleavage by HtpX (right)

の変異がプロテアーゼ活性に異なる影響を与えることを示した。このアッセイシステムは、HtpX の機能解明に有用なものと期待される。

## 2) 大腸菌外膜タンパク質のアセンブリーと分解に関わるペリプラズムプロテアーゼ BepA の全長構造の決定

**大腸菌のペリプラズムタンパク質**  
 BepA は、プロテアーゼ機能とシャペロン様機能を併せ持つ多機能タンパク質であり、外膜リポ多糖（LPS）トランスロコンの主要サブユニット LptD 等の  $\beta$ -バレル型外膜タンパク質の膜アセンブリーや分解に働く。BepA は  $\beta$ -バレル型外膜タンパク質の外膜への組み込み装置である BAM 複合体と相互作用する。これまでに我々は、BepA の C 末端側 TPR (tetratricopeptide repeat) ドメインが、BAM 複合体や基質との相互作用に関わる事で BepA 機能に重要な役割を果たすことを示し、単離した TPR ドメインの構造を明らかにしたが、BepA の全体構造は不明のままだった。BepA の分子機能を理解するには、BepA の全体構造の知見が必要である。我々は、BepA の全長分子について、2.6-Å の分解能で結晶構造を解明した (Fig. 2, left)。BepA は N 末端側プロテアーゼドメインと C 末端側 TPR ドメインが密接に相互作用するコンパクトな構造を持つことが分かった。構造に基づきシスティン残基を導入して、プロテアーゼドメインと TPR ドメインをジスルフィド結合で連結させたが、BepA 機能はほとんど影響を受けなかった。このことは、BepA が機能する時に、その二つのドメインの相対配置が大きく変化しないことを示唆するものである。今回決定した BepA 全長構造は、以前に TPR ドメインの構造や架橋実験の結果から提唱したと BAM 複合体の相互作用モデルとも矛盾しないものであった (Fig. 2, right)。BepA 構造や BAM とのドッキングモデルは、BepA 機能解明の基盤となるものと考えられる。

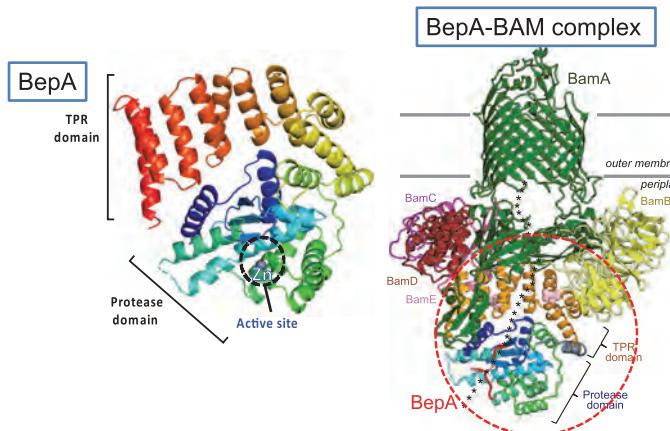


Fig. 2. Structure of BepA (left) and a model of the BepA-BAM complex (right)

本年は、理学研究科修士課程大学院生として艾 夢婷さんが、秘書として小柴里美さんが新たに研究室に加わりました。一方、理学研究科大学院生として在籍した渡邊哲朗さん、本名彩正さん、宇都滉一さん、及び吉谷亘平さんが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 membranes, membrane protein proteolysis,

extracytoplasmic stress responses and translational elongation arrest-mediated gene expression, are studied by combined molecular genetic, biochemical, biophysical and structural approaches. In 2019, we constructed a convenient and semi-quantitative assay system for analysis of the *in vivo* proteolytic activity of *E. coli* HtpX, a cytoplasmic membrane protease probably involved in membrane protein quality control. We also elucidated by X-ray cystography the entire structure of BepA, a periplasmic protease having proteolytic and chaperone-like functions, and proposed a model for the function and regulation of this protease.

**1) Construction of an *in vivo* protease activity assay system for investigating the functions of HtpX, an *E. coli* cytoplasmic membrane protease**

It is vital for cells that membranes and membrane proteins retain their integrity. Misfolded and misassembled membrane proteins, produced under stressful conditions and in non-physiological situations, could disrupt the membrane structure and function and thus should receive proteolytic quality control. *E. coli* HtpX, an M48 family zinc metalloproteinase, is located in the cytoplasmic membrane. The *htpX* gene is stress-inducible and, although disruption of *htpX* alone was silent, its combination with a disruption of the *ftsH* gene encoding an ATP-dependent membrane protease involved in elimination of malfolded membrane proteins results in a synthetic growth defect. These observations suggest that HtpX participates in proteolytic quality control of cytoplasmic membrane proteins. However, its *in vivo* proteolytic function remains largely unknown, mainly because the physiological substrates of HtpX have not been identified and also no model substrate that allows sensitive detection of the HtpX's protease activity is available. We constructed a new model membrane protein substrate of HtpX and established a semi-quantitative and convenient *in vivo* protease activity assay system for HtpX (Fig. 1). This system enabled detection of differential protease activities of HtpX mutants carrying a mutation in conserved regions. This system would be useful for investigating the functions of the HtpX protease.

**2) Determination of the whole structure of BepA, an *E. coli* periplasmic protease involved in assembly and degradation of outer membrane proteins**

Periplasmic protein BepA functions as a protease/chaperone for the enhancement of the assembly and/or degradation of  $\beta$ -barrel outer membrane proteins including LptD, a major subunit of outer membrane lipopolysaccharide translocon. It interacts with the  $\beta$ -barrel assembly machinery (BAM) complex that mediates the assembly of  $\beta$ -barrel membrane proteins into the outer membrane. Previous study demonstrated that the C-terminal TPR (tetratricopeptide repeat) domain of BepA plays critical roles in BepA functions through interactions both with substrates and with the BAM complex. Although the structure of the isolated BepA TPR domain has been elucidated, the whole structure of BepA remained unknown. To elucidate the molecular mechanism underlying the dual functions of BepA, it is important to know its full-length three-dimensional structure. We determined the crystal structure of full-length BepA at 2.6- $\text{\AA}$  resolution (Fig. 2, left). The structure showed that the N-terminal protease domain and a C-terminal tetratricopeptide repeat domain of BepA tightly interact with each other. Cross-linking of the protease and the TPR domains by

structure-guided introduction of disulfide bonds little affected the *in vivo* protease/chaperone activities of BepA, suggesting that BepA can function normally without a large alteration in arrangement of the two domains. The full-length BepA structure is compatible with the previously proposed docking model of BAM complex and the TPR domain of BepA (Fig. 2, right). These results will provide a basis to understand the functions and regulation of a unique cell envelope protein, BepA.

### List of Publications

- Yoshitani, K., Hizukuri, Y., and Akiyama, Y. (2019). An *in vivo* protease activity assay for investigating the functions of the *Escherichia coli* membrane protease HtpX. **FEBS Lett.** *593*, 843–851.
- Yoshitani, K., Ishii, E., Taniguchi, K., Sugimoto, H., Shiro, Y., Akiyama, Y., Kato, A., Utsumi, R., and Eguchi, Y. (2019). Identification of an internal cavity in the PhoQ sensor domain for PhoQ activity and SafA-mediated control. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** *11*, 1–11.
- Shahrizal, M., Daimon, Y., Tanaka, Y., Hayashi, Y., Nakayama, S., Iwaki, S., Narita, S., Kamikubo, H., Akiyama, Y., and Tsukazaki, T. (2019). Structural basis of the function of the  $\beta$ -barrel assembly-enhancing protease BepA. **J. Mol. Biol.** *431*, 625–635.
- 檜作洋平 (2019). 膜内切断プロテアーゼの基質認識・切断機構. 生物物理 *59*, 79–83.
- 秋山芳展 (2019). 大腸菌表層ストレス応答: インプットとアウトプットに働くプロテアーゼの機能. **IFO Res. Commun.** *33*, 217-220.

### List of Presentations

- Ishii, E. Nascent polypeptide-mediated gene regulation in the production of marine bacterial SecDF paralogs. The 26th East Asia Joint Symposium, Chongqing, China, November 24–26, 2019
- 檜作洋平 膜内切断プロテアーゼ RseP の新規切断基質の探索及び kinetics 解析の試み 2018 年度 国立遺伝学研究所研究会「单細胞生物における細胞装置の機能と連携」、三島、2019 年 3 月 18–19 日
- 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 2018 年度国立遺伝学研究所研究会「单細胞生物における細胞装置の機能と連携」、三島、2019 年 3 月 18–19 日
- 石井英治、秋山芳展、森 博幸 ビブリオ菌の新生ポリペプチド鎖を介した発現制御における mRNA 二次構造の役割 日本農芸化学会 2019 年度大会、東京、2019 年 3 月 24–27 日
- 渡邊哲朗、宮崎亮次、森 博幸、秋山芳展 部位特異的 *in vivo* 光架橋法を用いた大腸菌の LPS トランスロコンサブユニット LptD の生合成過程の解析 日本農芸化学会 2019 年度大会、東京、2019 年 3 月 24–27 日

石井英治、秋山芳展、森 博幸 ビブリオ菌 VemP の翻訳途上鎖を介した mRNA 分解機構に関する研究 第 16 回 21 世紀大腸菌研究会、大津、2019 年 5 月 29–30 日

宮崎亮次、秋山芳展、森 博幸 部位特異的 *in vivo* 光架橋法による VemP の翻訳停止解除機構の解析 第 16 回 21 世紀大腸菌研究会、大津、2019 年 5 月 29–30 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 の基質切断と構造維持に重要な膜表在・両親媒性ヘリックス PCT-H1 の解析 第 16 回 21 世紀大腸菌研究会、大津、2019 年 5 月 29–30 日

横山達彦、檜作洋平、秋山芳展 膜内切断プロテアーゼ RseP の新奇切断基質とその切断の生理的意義～toxin タンパク質 HokB の切断を介した persister 状態制御～ 第 16 回 21 世紀大腸菌研究会、大津、2019 年 5 月 29–30 日

渡邊哲朗、宮崎亮次、森 博幸、秋山芳展 部位特異的 *in vivo* 光架橋法による大腸菌 LptD の生合成過程の解析 第 16 回 21 世紀大腸菌研究会、大津、2019 年 5 月 29–30 日

檜作洋平、秋山芳展 FRET 蛍光ペプチドを用いた細菌 S2P ファミリー膜内切断プロテアーゼのリアルタイム切断 kinetics 計測系の構築 第 92 回日本生化学会大会、横浜、2019 年 9 月 18–20 日

宮崎亮次、秋山芳展、森 博幸 改良型部位特異的 *in vivo* 光架橋法による生細胞内での翻訳途上ポリペプチド鎖の相互作用動態解析 第 92 回日本生化学会大会、横浜、2019 年 9 月 18–20 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 の基質切断と構造維持に重要な膜表在・両親媒性ヘリックスの解析 第 92 回日本生化学会大会、横浜、2019 年 9 月 18–20 日

横山達彦、檜作洋平、秋山芳展 大腸菌膜内切断プロテアーゼ RseP の新規基質切断とその生理的意義：低分子膜タンパク質 HokB の切断を介したパーシスター形成制御 第 92 回日本生化学会大会、横浜、2019 年 9 月 18–20 日

檜作洋平、秋山芳展 Kinetic analysis of the proteolytic reaction catalyzed by S2P family intramembrane protease RseP using a FRET-based real-time assay system 第 57 回日本生物物理学会年会、宮崎、2019 年 9 月 24–26 日

石井英治、秋山芳展、森 博幸 *Vibrio alginolyticus* における新生ポリペプチド鎖依存的な mRNA 分解機構 第 53 回ビブリオシンポジウム、名古屋、2019 年 10 月 25–26 日

檜作洋平 大腸菌膜内切断プロテアーゼ RseP の切断基質探索から明らかとなってきた新奇生理機能 宮崎大学第 1 回微生物化学研究室セミナー、宮崎、2019 年 9 月 27 日

森 博幸 細胞膜を横切るタンパク質の膜透過機構 新潟薬科大学 薬学総合セミナー、新潟、2019 年 11 月 15 日

秋山芳展 細菌細胞表層におけるタンパク質動態の研究 発酵研究所寄付講座開設記念シンポジウム 「IFO がつなぐ京大微生物学のフロントライン」、京都、2019 年 11 月 22 日

石井 英治、秋山芳展、森 博幸 ビブリオ属細菌における新生ポリペプチド鎖を介した遺伝子発現制御機構について 発酵研究所寄付講座開設記念シンポジウム「IFO がつなぐ京大微生物学のフロントライン」、京都、2019年11月22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 の機能と構造の維持に重要な膜表在・両親媒性ヘリックスの解析 発酵研究所寄付講座開設記念シンポジウム「IFO がつなぐ京大微生物学のフロントライン」、京都、2019年11月22日

横山達彦、檜作洋平、秋山芳展 大腸菌 S2P ファミリープロテアーゼ RseP による Hok タンパク質の切斷とその生理的意義の検証 発酵研究所寄付講座開設記念シンポジウム「IFO がつなぐ京大微生物学のフロントライン」、京都、2019年11月22日

渡邊哲朗、宮崎亮次、森 博幸、秋山芳展 部位特異的 *in vivo* 光架橋法による大腸菌 LptD の生合成過程の解析 発酵研究所寄付講座開設記念シンポジウム「IFO がつなぐ京大微生物学のフロントライン」、京都、2019年11月22日

石井英治、秋山芳展、森 博幸 細菌の翻訳途上鎖による翻訳アレストを介した mRNA 分解機構の解明 第42回日本分子生物学会年会、福岡、2019年12月3–6日

宮崎亮次、渡邊哲朗、森 博幸、秋山芳展 部位特異的 *in vivo* 光架橋法による大腸菌外膜タンパク質 LptD の成熟過程の解析 第42回日本分子生物学会年会、福岡、2019年12月3–6日

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

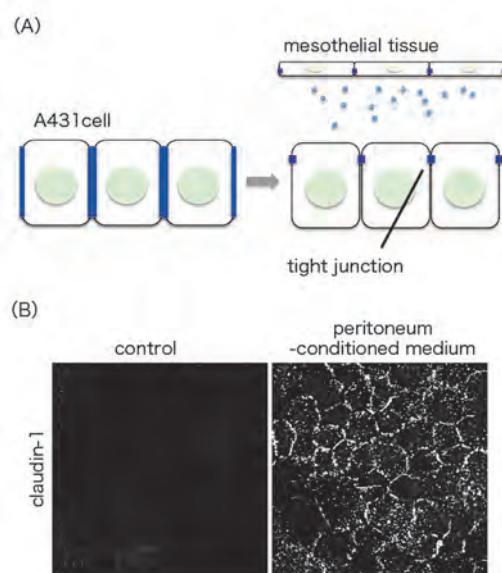
組織恒常性システム分野  
Laboratory of Tissue Homeostasis

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	Project Assist. Prof.	Ryo Ichijo

平成 31 年には、生命科学研究科修士課程 1 年として井戸那奈美と大森健太郎が入学した。廣田紗奈、森美樹、Elizabeth Shimoura が修士課程を修了して就職した。事務補佐員として原田洋子が加わった。本分野では、組織の恒常性を維持する機構とライフステージに応じた組織リモデリング機構について研究を行っている。2019 年における研究内容を以下に記載する。

1) タイトジャンクション形成誘導因子の発見と同定

生体が損傷などを受けタイトジャンクションが破綻すると、ウイルスや細菌などの病原体が上皮細胞層を透過しやすくなり、炎症が惹起・憎悪することが知られる。したがって、炎症・組織損傷を抑えるためにはタイトジャンクションの速やかな再編成が必要である。しかしながらこれまでに、タイトジャンクションを形成誘導する生体由来因子はほとんど知られていない。我々は、上皮・中皮組織由来の分泌液中に TJ 形成を誘導する液性因子が存在することを見出した。すなわち、ヒト皮膚ガン由来 A431 細胞 (TJ 構成分子は発現しているが TJ を形成していない細胞) に、様々なマウス上皮組織・中皮組織の培養液を添加すると、1 時間後にはタイトジャンクション構成因子である claudin-1 が細胞間接着部位に濃縮して TJ を形成することを見出した。さらに、この因子は 35 アミノ酸からなる新規ペプチドであることを突き止め、配列の同定に成功した。これは、生理活性ペプチドによるバリア形成という全く新しい概念を提示するものであり、このペプチドによって生体内におけるタイトジャンクション形成制御が可能になることが期待される。



**Figure1 Tissue-resident TJ-inducing molecules**  
(A) Experimental scheme.  
(B) Tight junction-like structure was induced by the treatment of peritoneum-conditioned medium in A431 cells.

## 2) Crispr-Cas9 Mediated Gene Targeting system (CriMGET) の開発

Crispr/Cas9 システムは、細菌や古細菌がウイルスなどの外来遺伝子を排除するために持つ免疫システムとして知られており、近年ゲノム編集技術として応用され、これまでにマウスやラット、ゼブラフィッシュ等様々なモデル生物で Crispr/Cas9 システムを用いたゲノム編集が行われてきてている。しかし、目的とする染色体位置への遺伝子導入個体の作製効率は未だに低い。また、目的の染色体位置への遺伝子挿入コンストラクトの作製や、個体樹立後の核型判定等に実験者は多くの時間と労力を費やす必要があり、効率よくスマートに目的の遺伝子改変個体を樹立する方法の開発が進められている。最近、相同性配列を含む遺伝子ターゲティングプラスミドを目的の染色体位置と同様に Crispr/Cas9 を用いて切断することでノックイン個体が樹立可能であることが報告された。我々はこの方法を元に、Crispr/Cas9 切断配列をマルチクローニングサイトの両端に配した pCriMGET (Crispr/Cas9-Mediated Gene Targeting) プラスミドを作製し、CAG promoter-EGFP Transgenic (Tg) マウス、及び、Tbx3 遺伝子座に 3xFlag-2A-EGFP をインフレームで挿入した Knock-in (KI) マウスの樹立に成功した (Fig.1)。本方法は、目的の遺伝子改変個体の樹立にかかる研究者の労力、時間、そしてコストを大幅に削減できる可能性が示唆された。

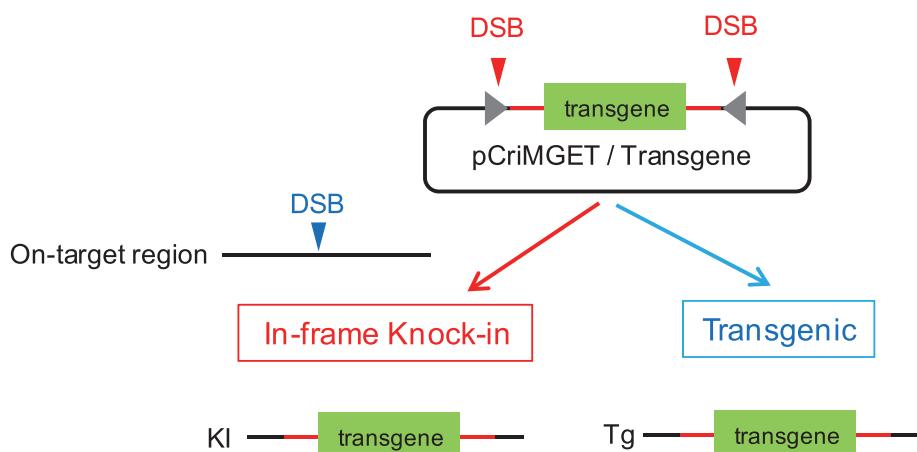


Figure2 Scheme of Knock-in and Tg mouse generation via pCriMGET system.

## 1) Discovery of mammalian tissue-derived peptides that induce tight junction formation

Tight junctions (TJ) are cell-cell adhesion structures that function as a barrier between epithelial cells to avoid dehydration, regulate ion permeability and prevent invasion of bacteria and viruses. Disruption of TJ is causative of various inflammatory diseases including inflammatory bowel diseases (IBD), atopic dermatitis and asthma. Despite the fact that restoration of TJ integrity is critical for a treatment of the diseases, whether there exist molecules in mammalian tissues that induce TJs remains unknown. We found that there was a humoral factor, which could induce TJs, in mouse peritoneum. Namely, TJ was formed in A431 cell (TJ components are expressed but not assembled) within 1 hour by the addition of peritoneum-conditioned medium. Moreover, this factor was found to be a new peptide. We have succeeded in identifying the new

35-residue peptide. These results show the new concept that TJ is formed by the bioactive peptide. It can be expected that this peptide lead to drug seeds for barrier disorder diseases such as inflammation.

## 2) Development of smart genome-editing system using synthetic crRNA-equipped donor plasmid.

The Crispr/Cas9, a well-known immune system that eliminate exogenous genetic materials in specific eubacteria and archaea, has been applied to the genome editing in model animals, which are mouse, rat, and Zebrafish. However, the generation efficiency of gene targeted animals has been low yet. In addition, researchers needed to spend a lot of time and efforts to construct the gene targeting cassette and check the genotype of generated animals, so that some researchers have developed new gene targeting methods. Recently, it has reported the new knock-in method, which was targeted gene locus and gene targeting plasmid including homology arms were cut off by Crispr/Cas9. So, we developed new Crispr Cas9 mediated gene targeting plasmid vector (pCriMGET), which harbors synthetic crRNA (or sgRNA) target sites on 5'- and 3' ends of MCS in advance, and we established CAG-promoter EGFP Tg mouse and 3xFlag-2A-EGFP in-frame knock-in mice at T-box transcription factor3 (Tbx3) gene locus with CriMGET system (Fig.1). It suggested that pCriMGET system was very powerful method to save researchers' effors, time and cost in establishment of transgenic or gene targeted cells and animals.

### List of Presentations

豊島文子 高増殖性表皮幹細胞のステムネス維持機構 第4回 京都皮膚基礎研究会、京都、2019年3月25日

石橋理基、井戸那奈美、豊島文子 Crispr/Cas9-Mediated Gene Targeting (CriMGET) システムによる遺伝子ノックイン個体の樹立 第42回 日本分子生物学会年会、福岡、熱海、2019年12月5日

上月智司、豊島文子 妊娠期におけるゾーン依存的肝細胞増殖機構の解析、第42回 日本分子生物学会年会、福岡、熱海、2019年12月5日

Ryo Ichijo, Fumiko Toyoshima Defining the highly proliferative IFE stem cell state in regional skin homeostasis and remodeling, Gordon Research Conference, Newry, July 7-12, 2019.

一條遼、佐田亜衣子、山本拓也、豊島文子 皮膚表皮幹細胞の性質は体表領域により異なる、第42回 日本分子生物学会年会、福岡、熱海、2019年12月5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  
准教授 立川 正志 Assoc. Prof. Masashi Tachikawa

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。2019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2<sup>5</sup>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

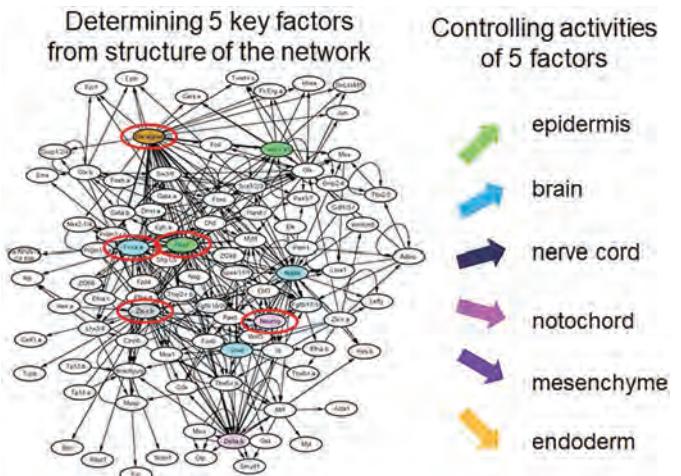


Fig. 1. Controlling cell-fate specification system by FVS genes.

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。

## 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。

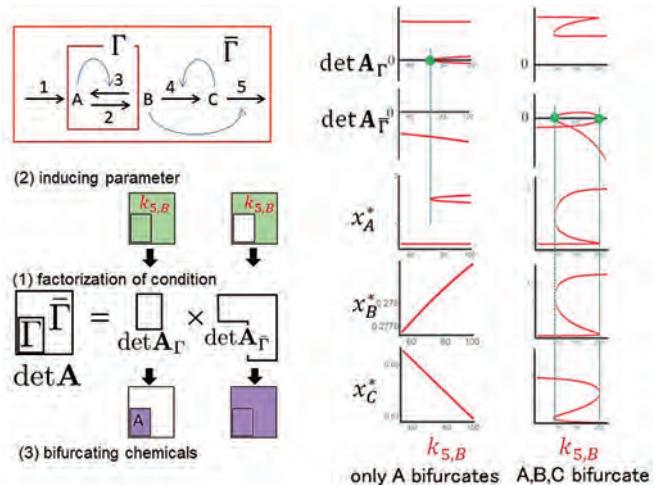


Fig. 2. Decomposition of bifurcation condition/behaviors of an example network. Left: theoretical analysis, right: numerical results.

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 among 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 study 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**

### **List of Presentations**

Mochizuki, A. "Controlling cell fate specification system based on network structure" (Plenary), International Workshop on Mathematical Biology 2019, Bohol Bee Farm Dauis, Panglao Island, Bohol, Philippines, January 6-10, 2019

Mochizuki, A. "Controlling cell fate specification system based on network structure" (Invited), NetSci Satellite Symposium – Controlling Complex Networks, University of Vermont, Burlington, Vermont, USA, May 27-31, 2019

Mochizuki, A. "Controlling cell fate specification system based on network structure" (Invited), The 7th China-India-Japan-Korea International Conference on Mathematical Biology, University of Science and Technology Beijing, Beijing, China, August 23-27, 2019

Mochizuki, A. "Origin of Adaptation and Modularity in Chemical Reaction Networks" (Invited), Special Seminar on Theoretical Biology, Institute of Physical Chemistry, Heidelberg University, Heidelberg, Germany, September 11, 2019

Mochizuki, A. "Controlling cell fate specification system based on network structure" (Invited), HeKKSaGOn Meeting Work Group 1 "Life and Natural Science Fusion", Neue Universitaet, Heidelberg University, Heidelberg, Germany, September 12, 2019

Mochizuki, A. "Origin of Adaptation and Modularity in Chemical Reaction Networks" (Invited), 4th Solar Fuel Materials Workshop, Seoul National University, Seoul, Korea, September 27, 2019

望月敦史 遺伝子ネットワークの構造に基づく細胞運命決定システムの制御（招待講演） 生態研セミナー, 京都大学生態学研究所（滋賀県大津市）, 2019年1月18日（金）

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） 明治大学現象数理学共同研究集会「生物学・化学・数理科学から見抜くりズム現象」, 明治大学中野キャンパス（東京都中野区）, 2019年3月1-2日

望月敦史 ネットワーク構造から生まれる生命システムの恒常性（招待講演） 関西ライフサイエンスリーディングサイエンティストセミナー, グランフロント大阪（大阪市中央区）, 2019年3月5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決定する（招待講演） 応用物理学会・応用電子物性分科会，東京大学生産技術研究所（東京都），2019年6月13日

望月敦史 遺伝子ネットワークの構造に基づく細胞運命決定システムの制御（招待講演） 日本蛋白質科学会年会・日本細胞生物学会合同年次大会シンポジウム「染色体のホメオスタティック制御システム」，神戸国際会議場（神戸市），2019年6月24-26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.	<b>Kosuke Yusa</b>
助 教	樽本 雄介	Assist. Prof.	<b>Yusuke Tarumoto</b>
助 教	西淵 剛平	Assist. Prof.	<b>Gohei Nishibuchi</b>

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す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。

研究室が発足してから一年強が経ち、この間研究室の整備と人材のリクルートを進めてきた。まず、研究室整備に関しては2019年度前半中ではほぼ完了することができ、基本的な培養細胞実験、分子生物学実験は問題なく行えるようになった。また、研究室スタッフのリクルートでは、7月より樽本雄介助教が米国コールドスプリングハーバー研究所より、1月から西淵剛平助教が大阪大学より異動し、本研究室での活動を開始した。

本年は、CRISPR-KOスクリーニング法を用いたがん細胞の生存・増殖必須遺伝子の網羅的探索の結果をNature誌に発表したので、その概要を以下に示す。

がん治療においては分子標的治療が様々ながらん種に適用され、効果をあげている。例えば、慢性骨髄性白血病CMLにおけるImatinibや、Her2陽性乳がんにおけるHerceptin等があげられ、特にImatinibはそれまでの治療法に比べ劇的な効果をあげている。化学療法と比べ特異性の高い治療効果が得られるが、多くのがんにおいてはまだ有効な標的が見出されておらず、分子標的薬の適用を受けられるのは一部のがん患者にとどまる。そこで、CRISPR-KOスクリーニングを用いてがん細胞の生存・増殖に必須の遺伝子を網羅的に探索し、新しい創薬標的候補を同定することとした。大規模に行うため、Cas9発現細胞の作製、ライプラリーウィルスの感染と細胞培養、DNA抽出、PCR、次世代シーケンス、統計解析の一連の流れとしてパイプライン化し、スクリーニングを進めた。各ステップに品質管理も設け、最終的に324細胞株の必須遺伝子プロファイルを得ることに成功した。生存・増殖必須遺伝子は一細胞株あたり平均1,459遺伝子、計7,470遺伝子を得た。

この中から、創薬標的として有用な遺伝子を更に選び出す必要がある。そこで、優先化スコアを設けてランキング化を行うこととした。これには、1、共通必須遺伝子は毒性が高いと考えられることから0とし、2、統計的優位値、3、バイオマーカーと遺伝子依存性の相関関係の有無によりスコアを与えた。共通必須遺伝子はスクリーニングに供した細胞株全体を使った解析では553遺伝子であ

り、主要なハウスキーピング遺伝子を含んでいた。バイオマーカーとしてはがんドライバー変異（151 塩基置換変異と 333 コピー数変異）を用い、変異の有無と増殖抑制度との間で相関関係を調べ、計 628 遺伝子を見出した。これらの情報から優先化スコアをがん種別に算出した。最後にトラクタビリティースコア（遺伝子産物に対し阻害剤が創生できるかどうか）と比較し、未だ有効な阻害剤がなくかつ優先化スコアが高いものが次の創薬標的として見出した。

これらの解析から、マイクロサテライト不安定性大腸がんの増殖が WRN 遺伝子産物に依存しており、有効な阻害剤がないことから、WRN を新規の創薬標的として見出した。また、マイクロサテライト不安定性を示す他のがん種（卵巣がん、子宮内膜がん、胃がん）も WRN に対する依存性を示した。cDNA を使ったレスキュー実験より、ヘリケース活性を欠く cDNA は増殖を相補できないことから WRN のヘリケース活性がマイクロサテライト不安定性がんの増殖に必須であることが明らかとなり、治療薬としてヘリケース阻害剤の創生が考えられた。

これらのデータは公開しており、がん研究分野において重要なリソースとして活用されると期待される。

Our laboratory was newly established in October 2018 in the Institute for Frontier Life and Medical Sciences, Kyoto University. 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, which 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 research.

A year has been passed since the lab was established in 2018. During this time, our laboratory was mostly equipped for cell culture and molecular biology works. Two staff scientists, Assistant Professor Dr Yusuke Tarumoto from the Cold Spring Harbour Laboratory and Assistant Professor Dr Gohei Nishibuchi from Osaka University, were recruited and have started their work in our laboratory.

This year, we published a milestone paper in Nature, in which we used the CRISPR-KO screening strategy to comprehensively catalogue cancer dependency and prioritize oncology drug targets. We have screened 324 cancer cell lines and found a mean of 1,459 fitness genes per cell line. In total, 7,470 genes induced a fitness effect in one or more cell lines. To identify valuable targets for drug development, we have established a prioritization system using fitness efficacy and biomarker availability. Genes that show fitness deficiency in the majority of the cell lines in consideration were considered as core fitness genes and removed from this prioritization system because higher toxicity was expected. We then compared priority scores with tractability of each gene in individual cancer types. This comparison identified the majority of currently available drugs,

indicating that our strategy is robust in identifying therapeutic targets. As one of the high priority drug targets, we identified WRN recQ DNA helicase as a cancer dependency gene of microsatellite instability-high cancers, which encompass colon, endometrial, ovarian and gastric cancers. Helicase-dead WRN could not rescue the proliferation deficiency when the endogenous gene was disrupted, indicating that small compounds that inhibits WRN helicase activity can be a potential drug for MSI-H cancers. The entire dataset including raw counts, log fold change and screening statistics values are all available from a dedicated website and would be a useful resource for oncology researchers.

### List of Publications

#### <Research articles>

Dempster JM, Pacini C, Pantel S, Behan FM, Green T, Krill-Burger J, Beaver CM, Younger ST, Zhivich V, Najgebauer H, Allen F, Gonçalves E, Shepherd R, Doench JG, **Yusa K**, Vazquez F, Parts L, Boehm JS, Golub TR, Hahn WC, Root DE, Garnett MJ, Tsherniak A, Iorio F.  
Agreement between two large pan-cancer CRISPR-Cas9 gene dependency data sets.  
**Nat Commun.** 2019;10 (1):5817

Picco G, Chen ED, Alonso LG, Behan FM, Gonçalves E, Bignell G, Matchan A, Fu B, Banerjee R, Anderson E, Butler A, Benes CH, McDermott U, Dow D, Iorio F, Stronach E, Yang F, **Yusa K**, Saez-Rodriguez J, Garnett MJ.

Functional linkage of gene fusions to cancer cell fitness assessed by pharmacological and CRISPR-Cas9 screening.

**Nat Commun.** 2019;10 (1):2198

Behan FM, Iorio F, Picco G, Gonçalves E, Beaver CM, Migliardi G, Santos R, Rao Y, Sassi F, Pinnelli M, Ansari R, Harper S, Jackson DA, McRae R, Pooley R, Wilkinson P, van der Meer D, Dow D, Buser-Doeppner C, Bertotti A, Trusolino L, Stronach EA, Saez-Rodriguez J, **Yusa K\***, Garnett MJ\*.

Prioritization of cancer therapeutic targets using CRISPR-Cas9 screens.

**Nature.** 2019;568 (7753):511-516.

Yu JSL, Palano G, Lim C, Moggio A, Drowley L, Plowright AT, Bohlooly-Y M, Rosen BS, Hansson EM, Wang QD, **Yusa K\***.

CRISPR-Knockout Screen Identifies Dmap1 as a Regulator of Chemically Induced Reprogramming and Differentiation of Cardiac Progenitors.

**Stem Cells.** 2019;37 (7):958-972.

Structural rearrangements generate cell-specific, gene-independent CRISPR-Cas9 loss of fitness effects.

Gonçalves E, Behan FM, Louzada S, Arnol D, Stronach EA, Yang F, **Yusa K**, Stegle O, Iorio F, Garnett MJ.

**Genome Biol.** 2019;20 (1):27.

Allen F, Behan F, Khodak A, Iorio F, **Yusa K**, Garnett M, Parts L.

JACKS: joint analysis of CRISPR/Cas9 knockout screens.

**Genome Res.** 2019;29 (3):464-471.

Henriksson J, Chen X, Gomes T, Ullah U, Meyer KB, Miragaia R, Duddy G, Pramanik J, **Yusa K**, Lahesmaa R, Teichmann SA.

Genome-wide CRISPR Screens in T Helper Cells Reveal Pervasive Crosstalk between Activation and Differentiation.

**Cell.** 2019;176 (4):882-896.e18.

Balmus G, Pilger D, Coates J, Demir M, Sczaniecka-Clift M, Barros AC, Woods M, Fu B, Yang F, Chen E, Ostermaier M, Stankovic T, Ponstingl H, Herzog M, **Yusa K**, Martinez FM, Durant ST, Galanty Y, Beli P, Adams DJ, Bradley A, Metzakopian E, Forment JV, Jackson SP.

ATM orchestrates the DNA-damage response to counter toxic non-homologous end-joining at broken replication forks.

**Nat Commun.** 2019;10 (1):87.

Foronda M, **Tarumoto Y**, Schatoff EM, Leach BI, Diaz BJ, Zimmerman J, Goswami S, Shusterman M, Vakoc CR, Dow LE.

Tankyrase inhibition sensitizes cells to CDK4 blockade.

**PLoS One.** 2019;14 (12):e0226645.

Irie H, Yamamoto I, **Tarumoto Y**, Tashiro S, Runge KW, Ishikawa F.

Telomere-binding proteins Taz1 and Rap1 regulate DSB repair and suppress gross chromosomal rearrangements in fission yeast.

**PLoS Genet.** 2019;15 (8):e1008335.

Oya E, Nakagawa R, Yoshimura Y, Tanaka M, **Nishibuchi G**, Machida S, Shirai A, Ekwall K, Kurumizaka H, Tagami H, Nakayama JI.

H3K14 ubiquitylation promotes H3K9 methylation for heterochromatin assembly.

**EMBO Rep.** 2019;20 (10):e48111.

**Nishibuchi G**, Machida S, Nakagawa R, Yoshimura Y, Hiragami-Hamada K, Abe Y, Kurumizaka H, Tagami H, Nakayama JI.

Mitotic phosphorylation of HP1a regulates its cell cycle-dependent chromatin binding.

**J Biochem.** 2019;165 (5):433-446.

#### <Review article>

Genome-wide CRISPR-Cas9 screening in mammalian cells.

Yu JSL, **Yusa K**.

**Methods.** 2019;164-165:29-35

生命システム研究部門  
Department of Biosystems Science  
**がん・幹細胞シグナル分野**  
**Laboratory of Cell Fate Dynamics & Therapeutics**

教 授 伊藤 貴浩 Prof. **Takahiro Ito**  
助 教 松浦 順教 Assist. Prof. **Kenkyo Matsuura**

がん・幹細胞シグナル分野は2019年に伊藤が米国ジョージア大学から異動して新しくスタートした研究分野で、幹細胞の運命制御機構に関する研究を行っている。幹細胞は多分化能を保持しつつ増殖できる「自己複製能」を持った特殊な細胞で、多細胞生物の成体においては常に新しい前駆細胞・成熟細胞を供給することで多様な細胞からなる階層性を構築し、これが組織恒常性の維持に寄与している。幹細胞に限らず、細胞分裂によって生じた新たな2つの細胞は同一あるいは異なる細胞運命を辿ることになるが、多分化能をもつ幹細胞の分裂においては、幹細胞を増やすか、あるいは特定の細胞系譜へと分化するかを決定づけるとても重要なプロセスである。一方、がん組織中にも自己複製能、分化能の異なる複数種のがん細胞が存在し、正常組織に類似した階層性を持つことが知られている。特に自己複製能を持つ「がん幹細胞」は、治療抵抗性や病期進行、転移、再発に関与するので有効な治療標的になり得る。すなわち幹細胞運命を制御するしくみの理解は、健常組織とがんの生物学の双方において重要である。本研究分野では、主に哺乳類の造血系と骨格筋組織をモデルとして幹細胞システムの作動原理の解明に取り組んでいる。2019年の研究教育活動は以下の通りである。

#### 細胞内代謝による幹細胞運命の制御機構とがんの悪性化

がん細胞は、自身の活発な増殖や転移などを可能にするため、正常細胞とは異なる代謝活動を行うことが知られている。これらの細胞内代謝の変化は、がん化の結果というよりも、むしろ遺伝子変異による積極的な変化であり、腫瘍形成の開始や維持に直接寄与することが近年明らかにされている。このような現象は「代謝リプログラミング」と呼ばれ、がん細胞が必要とするエネルギーやタンパク質・脂質・核酸等の確保をはじめとして、個体内でがんが生き延びるために重要戦略のひとつと考えられている。一方、良性腫瘍や前がん状態から、悪性度の高いがんへと進展するときにもこのような代謝変化が起きているか、また代謝リプログラミングそのものが病期進展を制御しているのか、については多くの疑問が残されている。伊藤研究室では米国ジョージア大学所属時からこの問題に取り組み、これまでに分岐鎖アミノ酸（BCAA）の代謝酵素 BCAT1 が骨髄性白血病の病期進展に必須であることを見出している。BCAT1 はアミノ酸中のアミノ基をケト酸に転移して別のアミノ酸を产生する酵素トランスアミナーゼの一種である。2019年には、生きた白血病細胞中で、BCAT1 が BCKA から BCAA に変換する過程をリアルタイムで検出する技術を開発することに成功し、論文発表した。現在、この技術を用いて BCAA 代謝と細胞運命制御の分子機構の解明に取り組

んでいる。なお、この研究はジョージア大学生化学分子生物学部 Edison 研究室、遺伝学部 Arnold 研究室及び NMR 実験施設との共同研究として行ったものである。

The long-term goal of the research programs in the Ito laboratory is to elucidate the mechanisms and regulation of cell fate decision in the biology of stem cells and cancer. Stem cells have a remarkable ability to self-renew, but it is a double-edged sword; while self-renewal promotes tissue repair and regeneration, it can also be a target of malignant transformation causing cancer. We study regulatory mechanisms of stem cell behaviors in order to better understand cellular signals regulating tissue homeostasis, regeneration and cancer. In our former lab at the University of Georgia, we have developed a productive and innovative research program by incorporating multiple cross-disciplinary experimental approaches such as metabolomics and bioinformatics. Our work on cell fate and cancer metabolism have been published in high profile journals and have also attracted invitations to speak at international conferences, national meetings and institutional seminars. In essence, we discovered a novel regulatory mechanism by an aminotransferase that maintain stem cell states in myeloid leukemia and demonstrated that inhibiting the metabolic pathway can be an effective therapeutic strategy in treating advanced cancer such as acute myeloid leukemia.

### **Metabolic reprogramming of cell fates in stem cells and cancer**

Reprogrammed cellular metabolism is a common characteristic observed in various cancers. It remains poorly understood whether such metabolic changes directly regulate development and progression in hematologic malignancies. In the study, we found that altered branched-chain amino acid (BCAA) metabolism regulates chronic myeloid leukemia (CML). BCAT1, a cytosolic aminotransferase for the branched-chain amino acids (BCAAs), is aberrantly activated during CML progression and mediates BCAA production in leukemia cells through transamination of the branched-chain keto acids. Blocking the expression or enzymatic activity of BCAT1 induces cellular differentiation and significantly impairs the propagation of blast crisis CML (BC-CML) both *in vitro* and *in vivo*. In an attempt to understand underlying molecular mechanisms, we collaborate with the Edison and Arnold labs as well as the NMR facility of the University of Georgia and have shown that BCAT1 promotes intracellular BCAA production, not breakdown, by using a novel NMR-based metabolic analysis. With this new technique we are able to visualize *in realtime* the conversion of BCKAs to BCAAs in live leukemia cells. We continue to investigate how the intracellular BCAA metabolism alters stem cell signals in hematologic and other human malignancies with the hope that our research can help develop a new therapeutic strategy to treat human cancer.

### **List of Publications**

Judge M, Wu Y, Tayyari F, Hattori A, Glushka J, Ito T, Arnold J, Edison A. (2019) Continuous *in vivo* metabolomics by NMR. **Front Mol Biosci** 6:26.

Ueda, M., Matsuura, K., Kawai, H., Wakasugi, M., and Matsunaga, T. (2019). Spironolactone - induced XPB degradation depends on CDK7 kinase and SCF<sup>FBXL18</sup> E3 ligase. **Genes Cells** 24, 284–296.

## Presentations

Ito, T. Metabolic reprogramming and regulation of cancer cell fate in myeloid leukemia. The 7<sup>th</sup> Annual Meeting on Cancer Metabolism, Sendai, Japan, August 2019.

Ito, T. Forbeck Forums on Leukemia Stem Cells, Heterogeneity and Metabolism- new directions for AML therapy. Denver, Colorado, September 2019.

Ito, T. Metabolic regulation of cancer cell fate in myeloid leukemia. The 92<sup>th</sup> Annual Meeting of Japanese Biochemical Society, Yokohama, Japan, September 2019

Ito, T. Metabolic reprogramming and regulation of cancer cell fate in myeloid leukemia. The 78<sup>th</sup> Annual Meeting of Japanese Cancer Society, Kyoto, Japan, September 2019

Ito, T. Metabolic regulation of cancer cell fate in myeloid leukemia. The 81<sup>st</sup> Annual Meeting of Japanese Society of Hematology, Tokyo, Japan, October 2019

Ito, T. Metabolic reprogramming of stem cell fates in cancer. The 26<sup>th</sup> East Asia Joint Symposium on Biomedical Research, Seoul, Korea, October 2019

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

2019年3月に姫野愛が研究員を終了し、研究室を離れた。4月から技術補佐員の松浦嘉奈子が研究員となった。徐可婧とチョウキヨンハクが、人間・環境学研究科修士課程に入学した。チョウキヨンハクは、母国韓国での兵役のため2年間休学することになった。Yalcin Pisilが、人間・環境学研究科博士課程2年に、また、山浦瑞樹と李佳霖が、人間・環境学研究科修士課程2年に進学した。2020年2月に教務補佐員の大附舞が加わった。

当研究室ではレトロウイルス（HIV, SIV, SHIV）およびフラビウイルス（DENV）の感染を分子・培養細胞・感染個体レベルで総合的に解析することにより、これらウイルスの病原性を解明し、ウイルス疾患の治療と予防法を開発することを目的としている（Fig. 1）。2019年の代表的な研究進展状況を以下に記述する。

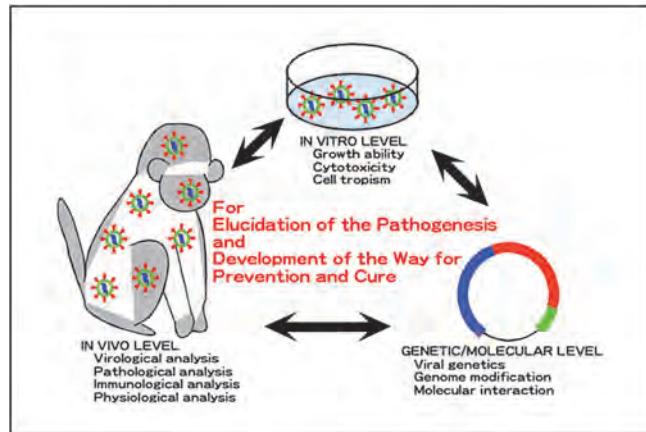


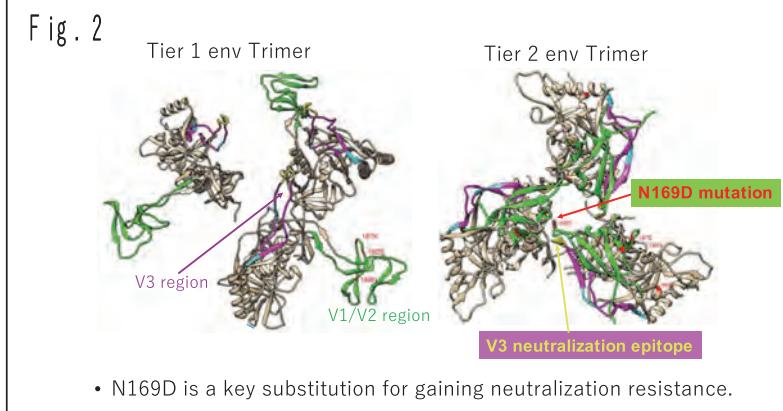
Fig. 1. Research Cycle of Primate Model for Infectious Diseases

*env gp120* の V2 領域の変異により SHIV は抗 V3 中和抗体に対する抵抗性を獲得する

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が、ワクチンによって強力な 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、ワクチン開発に貢献することが期待される。これまでの研究で中和感受性の SHIV-MK1 をサルで継代後に、中和抵抗性の SHIV-MK38 株が得られた。この SHIV-MK38 株からクローニングされた SHIV-MK38#818 は、親株と同様に、SHIV 感染サル血漿（MP）、HIV-1 感染ヒトプール血漿（HPP）、および KD247 抗 *env*V3 モノクローナル抗体（mAb）に対して中和抵抗性であった。そこで SHIV-MK38#818 の中和抵抗性、特に SHIV-MK1 に中和抵抗性を付与するアミノ酸置換について解析した。部位特異的変異誘導法により SHIV-MK1 の *env* 遺伝子にアミノ酸置換を導入し、TZM-bl 細胞を使用した中和アッセイで MP、HPP、KD247 に対する中和抵抗性を SHIV-MK38#818 と比較した。SHIV-MK1 と SHIV-MK38#818 の *env* の

アライメントに基づいて、V1、V2、C2、V4、C4、およびV5領域で11の変異を選択した。V1、C2、C4、およびV5領域で11変異中7つの変異は、電荷またはN-グリカン修飾には関与せず中和抵抗性も変えなかった。一方、V2領域に負電荷を追加するN169DとK187E変異、およびN-グリカン修飾に関与するV2領域のS190NとV4領域の

A389T変異は高い中和抵抗性を付与した。N169D+K187E、N169D+S190N、およびN169D+A389Tの組み合わせは、SHIV-MK38#818に近い中和抵抗をもたらしたが、N169Dを含まない組み合わせでは、中和抵抗性は限定的であった。したがって、N169D変異が中和抵抗性に最も重要な変異であることが明らかとなった。この研究は、SHIV-MK38#818とSHIV-MK1のV3領域の配列は同じであるにも関わらず、V3領域に結合する中和抗体がV2およびV4領域の変異によってSHIV-MK38#818を中和できなくなることを実証した。既報の構造解析データに照らし合わせると、N169D変異によってV3領域がV2領域に埋もれるようにEnvの立体構造が変化し、中和抗体が標的部位に到達できなくなった可能性が考えられる(Fig. 2)。以上の結果は、HIVの中和抵抗性獲得機構を理解する上で重要である。



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.

#### Specific substitutions in V2 and V4 regions of env gp120 confer SHIV neutralization resistance

A tier 2 SHIV-MK38 strain was obtained after two *in vivo* passages of tier 1 SHIV-MK1. SHIV-MK38#818, cloned from the MK38 strain, was neutralisation-resistant, like the parental MK38 strain, to SHIV-infected monkey plasma (MP), HIV-1-infected human pooled plasma (HPP), and KD247 monoclonal antibody (mAb) (anti-V3 gp120 env). We investigated the mechanisms underlying the resistance of #818, specifically the amino acid substitutions that confer resistance to MK1. We introduced amino acid substitutions in the MK1 envelope by *in vitro* mutagenesis and then compared the neutralisation resistance to MP, HPP, and KD247 mAb with #818 in a neutralisation assay using TZM-bl cells. We selected 11 substitutions in the V1, V2, C2, V4, C4, and V5 regions based on the alignment of env of MK1 and #818. The neutralisation resistance of the mutant MK1s with 7 of 11 substitutions in the V1, C2, C4, and V5 regions did not change significantly. These substitutions did not alter any negative charges or N-glycans. The

substitutions N169D and K187E, which added negative charges, and S190N in the V2 region of gp120 and A389T in V4, which created sites for N-glycan, conferred high neutralisation resistance. The combinations N169D+K187E, N169D+S190N, and N169D+A389T resulted in MK1 neutralisation resistance close to that of #818. The combinations without 169D were neutralisation-sensitive. Therefore, N169D is the most important substitution for neutralisation resistance. This study demonstrated that although the V3 region sequences of #818 and MK1 are the same, V3 binding antibodies cannot neutralise #818 pseudovirus. Instead, mutations in the V2 and V4 regions inhibit the neutralisation of anti-V3 antibodies. We hypothesised that 169D and 190N altered the MK1 Env conformation so that the V3 region is buried. Therefore, the V2 region may block KD247 from binding to the tip of the V3 region. These findings illuminates a genetic aspect of how HIV may evade deactivation by the B cell mediated adaptive immunity.

### **List of Publications**

- Koide, R., Yoshikawa, R., Okamoto, M., Sakaguchi, S., Suzuki, J., Isa, T., Nakagawa, S., Sakawaki, H., Miura, T., and Miyazawa, T. (2019). Experimental infection of Japanese macaques with simian retrovirus 5. *J. Gen. Virol.*, 100, 266-277.
- Miyakawa, K., Matsunaga, S., Yokoyama, M., Nomaguchi, M., Kimura, Y., Nishi, M., Kimura, H., Sato, H., Hirano, H., Tamura, T., Akari, H., Miura, T., Adachi, A., Sawasaki, T., Yamamoto, N., and Ryo, A. (2019). PIM kinases facilitate lentiviral evasion from SAMHD1 restriction via Vpx phosphorylation. *Nat. Commun.*, 10: 1844.
- Himeno, A., Ishida, Y., Mori, H., Matsuura, K., Kikukawa, M., Sakawaki, H., and Miura, T. (2019). Induction of neutralizing antibodies against tier 2 human immunodeficiency virus 1 in rhesus macaques infected with tier 1B simian / human immunodeficiency virus. *Arch. Virol.*, 164, 1297-1308.
- Hara, A., Iwanami, S., Ito, Y., Miura, T., Nakaoka, S., and Iwami, S. (2019). Revealing uninfected and infected target cell dynamics from peripheral blood data in highly and less pathogenic simian/human immunodeficiency virus infected Rhesus macaque. *J. Theor. Biol.*, 479: 29-36.
- Kato, F., Nio, Y., Yagasaki, K., Suzuki, R., Hijikata, M., Miura, T., Miyazaki, I., Tajima, S., Lim, C. K., Saijo, M., Takasaki, T., and Hishiki, T. (2019). Identification of inhibitors of dengue viral replication using replicon cells expressing secretory luciferase. *Antiviral Res.*, 172: 104643.

### **List of Presentations**

- Pisil, Y., Yazici, Z., Shida, H., Matsushita, S., and Miura, T. Particular substitutions in V2 and V4 of gp120 env confer SHIV neutralization resistance. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Tokyo, October, 29-30, 2019.
- Miura, Y., Yokoyama, H., Sekine, S., Sakawaki, H., Miura, T., and Ibuki, K. Immunological analysis of

AIDS-like diseases in SIV infected simianized mice. The 67th Annual Meeting of the Japanese Society for Virology. Tokyo, October, 29-30, 2019.

Pisil, Y., Yazici, Z., Shida, H., Matsushita, S., and Miura, T. Neutralization sensitive SHIV gain neutralization resistance with only 2 mutation in gp120 V2 area. The 33rd Annual Meeting of the Japanese Society for AIDS Research. Kumamoto, November, 27-29, 2019.

関洋平、齊藤暁、原田恵嘉、村田めぐみ、鷺崎彩夏、引地優太、吉村和久、石井洋、佐藤賢文、Islam M Saiful、大出裕高、岩谷靖雅、芳田剛、保富康宏、俣野哲朗、三浦智行、明里宏文 HIV-1 潜伏感染靈長類モデルにおける HIV 複製リザーバーの定量解析とその意義 第33回日本エイズ学会学術集会、熊本、2019年11月27-29日

野村拓志、寺原和孝、石井洋、山本浩之、三浦智行、俣野哲朗 ワクチン誘導 Gag<sub>241-249</sub> エピトープ特異的 CD8 陽性 T 細胞の交差反応性が SIV 感染に与える影響の解析 第33回日本エイズ学会学術集会、熊本、2019年11月27-29日

松岡和弘、中田佳宏、鷺崎彩夏、芳田剛、齊藤暁、大出裕高、蜂谷敦子、関洋平、保富康宏、原田恵嘉、石井洋、俣野哲朗、三浦智行、佐藤賢文、明里宏文、岩谷靖雅 *in vivo passage* で獲得したサル馴化 HIV-1 の *vif* 遺伝子領域における欠損変異の役割 第33回日本エイズ学会学術集会、熊本、2019年11月27-29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、靈長類モデルを用いた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。

### 1. 精長類モデルを用いた HIV 感染症根治のための基盤研究

今日、HIV-1 感染症は適切な抗 HIV 療法（ART）により、AIDS に至ることなく日常生活を送ることが可能な慢性疾患となった。しかし現状では、最新の ART でも HIV を体内から除去することは不可能であり、ART 中断により HIV リバウンドが生じるため終生の ART 治療が必要となる。そこで HIV 根治を目指し、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等の検討が進められている。現在、ART 治療中の健常 HIV 感染者がコホートとなる根治療法の臨床試験が欧米において行われているところであるが、ART 治療下では血漿中ウイルス RNA が検出限界以下となるため、臨床試験での有効性評価はリンパ組織内に局在するとされているリザーバーサイズの定量が不可欠となる。しかし健常 HIV 感染者である被験者への介入試験において、リザーバーサイズ評価のためのリンパ節等の生検は非現実的である。他方、Berlin patient として知られる  $\Delta$ CCR5 ドナーによる造血幹細胞移植ではこの 10 年間に 2 例の HIV 寛解例が報告されており、HIV の根治が理論的には可能であると考えられている。しかし、同様の方法で寛解に至らなかった症例が多く見られるなど患者の大きなリスクや莫大な費用などを考慮すると、現時点では現実的な治療法とは言い難く、本邦では未だ実施されていない。そこで私達は、以下のような HIV 感染症の根治療法創出に向けた研究を行っている。

1) iPS 技術とゲノム編集技術を応用した CCR5 $\Delta$ 32 造血幹細胞の移植療法：本研究では、 $\Delta$ CCR5 ドナーによる造血幹細胞移植に代わり、よりリスクが低くかつ実現可能性が高い治療法として、iPS 技術およびゲノム編集技術を応用した新規移植療法開発を進めている。これまでに、サル iPS 細胞から造血幹細胞やリンパ球、マクロファージへの分化誘導を可能とする新たな手法を確立した。さらにゲノム編集技術により  $\Delta$ CCR5 およびマーカー遺伝子をサル iPS 細胞へ導入し、クローン選抜評価を経て、 $\Delta$ CCR5 導入 iPS 細胞由来造血幹細胞（ $\Delta$ R5-iHSC）を樹立した。これと平行して、靈長類モデルを用いた iHSC 移植前臨床試験実施に向け、極めて多岐に渡る条件検討やそれらによる最適化もおおむね完了した。サル個体への  $\Delta$ R5-iHSC 自家移植パイロット実験を近々開始予定である。本治療法に関する前臨床試験が成功すれば、様々な免疫疾患や感染症にも応用が可能となり得ることからその意義は非常に大きいものと期待される。

- 2) ART 及び LRA 投与によるリザーバー縮減 (shock and kill) 療法：これまでに、PKC 活性化薬であるアブリシアトキシンの新規誘導体である 10MA-1 (ブリオスタチンと比べ低毒性かつ大量合成が容易：京都大学・入江教授との共同研究) が、BET 阻害薬である JQ-1 との併用による相乗効果で潜伏 HIV 感染細胞株からの強力な HIV 誘導活性を示すにも関わらず、その低炎症応答を両立できることを明らかにした。現在、健常サル個体における LRA および ART 投与による薬物動態試験およびサル個体への安全性・有効性に関する前臨床実験が進行中である。これらの結果に基づき、今後 LRA, ART 投薬によるリザーバーの活性化誘導能について HIV 感染カニクイザルを用いて検討を行う。
- 3) HIV 感染カニクイザルによる HIV リザーバーに関する研究：HIV 感染霊長類モデルの詳細解析により、①獲得免疫の協調的応答によりエリートコントローラーに類似した潜伏感染状態となること、②リンパ節胚中心の濾胞性ヘルパー T 細胞 (Tfh) において HIV 複製が持続していること（いわゆる「active reservoir」）、③リンパ節における vRNA:vDNA 比 (R:D 比) および感染性 HIV 定量法 (qVOA) による active reservoir size を再現良く、高感度に、かつ経時的に定量する方法論を確立したこと、④潜伏感染期における R:D 比と qVOA で示される active reservoir size が制御免疫の解除による HIV 再活性化や持続感染状態への移行 (loss of control) を反映していること、を初めて明らかにした。特に実際の治療対象は PVL が検出限界以下となる健常 HIV 感染者であることを踏まえ、それと同等なモデル動物である HIV 潜伏感染ザルからの経時的リンパ節生検試料を用いることで詳細な HIV 動態やリザーバーの推移の定量的解析が可能となったことは非常に意義深い。以上より、HIV 感染カニクイザルは HIV 根治療法の開発における前臨床試験モデル動物として HIV リザーバー縮減効果の評価に有用であると考えられる。

## 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 高感染率の原因について詳細な解析を行った結果、HTLV-1 での場合と比較して水平感染および母子感染の両方とも高頻度となっていることが強く示唆された。以上より 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。

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 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. We have recently established a novel macaque model of HIV-1 latency suitable for the basic and preclinical studies for the cure. In our model, the HIV-1-infected cynomolgus macaques generally exhibit no detectable plasma viremia without ART therapy due to efficient immune control but the virus can be re-inducible by transient depletion of CD8+ T cells, indicating the presence of reservoir. In fact, our data indicate that HIV reservoir cells are localized in the follicular helper T lymphocytes of lymph nodes. We will therefore be capable of directly evaluating the efficacy of the therapy on the elimination or reduction of the reservoir size by using periodically biopsied lymph node samples from the infected macaques, which is too hard to conduct in ART-treated healthy patients. Our proposed cure strategies include (i) transplantation of induced pluripotent stem cells (iPSC)-derived hematopoietic stem cells (iHSC) with anti-viral gene modification, and (ii) shock and kill therapy by using latency-reversing agents (LRA) and ART. In case of the former, we have already established macaque iPSC without CCR5, then we will be soon ready to start first trial of autologous transplantation of the macaque iHSC in order to examine if the autologous CCR5-deleted iHSC could survive and expand in the macaques infected with pathogenic SHIV. As for the latter, we are planning to examine the efficacy of a newly developed PKC activator in combination with other class of LRA, which may maximize the activity of HIV reactivation and also minimize cytotoxicity, to activate HIV-1 in the latently infected macaques.

### **2. Cohort study on Japanese macaque naturally infected with STLV-1**

Simian T-cell leukemia virus type-1 (STLV-1) is disseminated among various non-human primate species and is closely related to human T-cell leukemia virus type-1 (HTLV-1), the causative agent of adult T-cell leukemia and HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. Notably, the prevalence of STLV-1 infection in Japanese macaques (JMs) is estimated to be >60%, much greater than that in other non-human primates; however, the mechanism and mode of STLV-1 transmission remain unknown. Our results of this study demonstrated for the first time that the high STLV-1 prevalence in JMs was likely caused by both frequent horizontal and mother-to-child transmission, while Anti-STLV-1 antibody titers and STLV-1 proviral loads were mostly comparable to those of HTLV-1-infected humans.

## List of Publications

Miyakawa K, Matsunaga S, Yokoyama M, Nomaguchi M, Kimura Y, Nishi M, Kimura H, Sato H, Hirano H, Tamura T, Akari H, Miura T, Adachi A, Sawasaki T, Yamamoto N, Ryo A: PIM kinases facilitate lentiviral evasion from SAMHD1 restriction via Vpx phosphorylation. **Nature Communications** 10, 1844, 2019.

Seki Y, Akari H: Approaches for the achievement of HIV cure using the non-human primate models. **Journal of AIDS Research** 21, 147-158, 2019.

Miyabe-Nishiwaki T, MacIntosh AJJ, Kaneko A, Morimoto M, Suzuki J, Akari H, Okamoto M: Hematological and blood chemistry values in captive Japanese macaques (*Macaca fuscata fuscata*). **Journal of Medical Primatology** 48, 338-350, 2019.

## List of Presentations

Takuo Mizukami, Kiyoko Nojima, Yuko Sato, Keiko Furuhata, Eita Sasaki, Sahoko Matsuoka, Kazu Okuma, Hiroyuki Moriuchi, Kaoru Uchimaru, Hirofumi Akari, Masahiro Satake, Isao Hamaguchi: Development of humanized mouse model for studying mother to child HTLV-1 transmission and prevention with HTLV-1 antibody treatment. 24<sup>th</sup> Congress of European Hematology Association, June 14-17, 2019, Stockholm

Yohei Seki, Ayaka Washizaki, Akatsuki Saito, Shigeyoshi Harada, Megumi Murata, Wei Keat Tan, Yuta Hikichi, Kazuhisa Yoshimura, Hiroshi Ishii, Yorifumi Satou, Islam Mohammad Saiful, Hirotaka Ode, Yasumasa Iwatani, Takeshi Yoshida, Yasuhiro Yasutomi, Tetsuro Matano, Tomoyuki Miura, Hirofumi Akari: Active reservoir size in lymph node may determine the present status and predict the outcome of HIV-1 controller. The 37th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS. November 12-15, 2019, San Antonio

大隈和、手塚健太、北村知也、倉光球、水上拓郎、村田めぐみ、明里宏文、浜口功：HTLV-1 感染に対するウイルス療法確立に向けた腫瘍溶解性VSVの靈長類薬剤評価系の構築。 第6回日本HTLV-1学会学術集会。2018年8月23日～25日、宮崎

七條敬文、安永純一朗、大西知帆、志村和也、高起良、竹之内徳博、佐藤佳、小柳義夫、明里宏文、野坂生郷、松岡雅雄：HTLV-1及びSTLV-1プロウイルス配列の網羅的解析。 第6回日本HTLV-1学会学術集会。2018年8月23日～25日、宮崎

水上拓郎、野島清子、佐藤結子、古畑啓子、松岡佐保子、大隈和、森内浩幸、内丸薰、明里宏文、斎麦田理英子、佐竹正博、浜口功：ヒト化マウスを用いた HTLV-1 母子感染モデルの構築の試み。 第6回日本HTLV-1学会学術集会。2018年8月23日～25日、宮崎

北村知也、倉光球、手塚健太、水上拓郎、明里宏文、村田めぐみ、大隈和、浜口功：ニホンザル(*Macaca fuscata*) の STLV-1 ゲノム解析。 第6回日本HTLV-1学会学術集会。2018年8月23

日～25日、宮崎

村田めぐみ、鷺崎彩夏、関洋平、Wei Keat TAN、森本真弓、兼子明久、夏目尊好、鈴木樹理、安永純一朗、松岡雅雄、水上拓郎、明里宏文：母子感染における抗体価・PVLの動態の長期的調査～STLV-1自然感染ニホンザルを用いて～. 第6回日本HTLV-1学会学術集会. 2018年8月23日～25日、宮崎

大隈和、倉光球、手塚健太、水上拓郎、村田めぐみ、明里宏文、浜口功：組換えVSVによる抗HTLV-1ウイルス療法の開発に向けたSTLV-1感染ニホンザルのHTLV-1感染霊長類モデルへの応用. 第67回日本ウイルス学会学術集会. 2019年10月29日～31日、東京

関洋平、齊藤暁、原田恵嘉、村田めぐみ、鷺崎彩夏、引地優太、吉村和久、石井洋、佐藤賢文、Islam M Saiful、大出裕高、岩谷靖雅、芳田剛、保富康宏、俣野哲朗、三浦智行、明里宏文：HIV-1潜伏感染霊長類モデルにおけるHIV複製リザーバーの定量解析とその意義. 第33回日本エイズ学会学術集会・総会. 2019年11月27-29日、熊本

鷺崎彩夏、村田めぐみ、関洋平、Yin Pui Tang、Tan Wei Keat、入江一浩、明里宏文：PKC活性化剤とBET阻害剤の併用によるHIV再活性化能及び毒性への効果. 第33回日本エイズ学会学術集会・総会. 2019年11月27-29日、熊本

松岡和弘、中田佳宏、鷺崎彩夏、芳田剛、齊藤暁、大出裕高、関洋平、保富康宏、俣野哲朗、三浦智行、蜂谷敦子、今橋真弓、横幕能行、明里宏文、岩谷靖雅：*in vivo passage*で獲得したサル馴化HIV-1の*vif*遺伝子領域における欠損変異の役割. 第33回日本エイズ学会学術集会・総会. 2019年11月27-29日、熊本

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

ウイルスは様々な疾病を引き起こす「病原体」として発見され、長年研究されてきた。しかしながら最近のゲノム解析技術の発達により、生体内や環境中には未同定のウイルスが数多く存在し、そのほとんどは非病原性であることが分かってきた。また、ウイルスのなかには宿主の生殖細胞のゲノムに入り込んで「内在化」し、内在化したウイルスにより宿主が新しい機能をもつことも明らかになってきた。2019年においては、ほぼすべての霊長類に存在し、非病原性のサルフォーミーウイルスが発現するマイクロ RNA の網羅的発現解析ならびに機能解析をおこなった。また、ネコの新興ウイルス感染症の一つであるネコパラミクソウイルスの分子生物学的性状をメタゲノム解析により行った。

**1) ニホンザル由来のサルフォーミーウイルスがもつマイクロ RNA の網羅的解析**

マイクロ (mi) RNA は標的 mRNA の発現制御に関与している小分子 RNA である。近年、特定のウイルスに感染した細胞では、ウイルス由来の miRNA が発現していることが報告されている。今回我々は、ニホンザル由来のサルフォーミーウイルス (SFVmfu) の持続感染細胞を用いて、スマート RNA シークエンス解析を行い、SFVmfu 由来の miRNA の網羅的解析を行った。その結果、持続感染細胞が発現する miRNA の約 33% が SFVmfu 由来であることがわかった。特に高度に発現されていた miRNA (SFVmfu-miR-S7-5p) は、抗腫瘍性 miRNA として報告されている miRNA-1 とシード配列が一致していた。この miRNA の標的 mRNA を明らかにするために、トランスクリプトーム解析を行った結果、複数の候補が得られた。特に悪性腫瘍などで発現が上昇している Adenylyl cyclase-associated protein 1 (CAP1) の mRNA が顕著に抑制されていた。レポーター アッセイを行った結果、SFVmfu-miR-S7-5p は CAP1 の 5' 非翻訳領域を認識し、CAP1 の mRNA を分解に誘導していることがわかった。CAP1 の抑制が SFVmfu の増殖にどのように影響するのか、また、SFVmfu 由来 miRNA に腫瘍抑制効果があるのか、今後研究する予定である。

**2) ネコ由来ネコパラミクソウイルスの分子生物学的解析**

ネコパラミクソウイルスはネコの新興ウイルス感染症であるが、部分配列しか報告されていない。RT-PCR 検査において、ネコパラミクソウイルス陽性の個体の尿から RNA を抽出し、解析に供した。抽出 RNA を RiboGone (タカラバイオ) で処理し、リボソーム RNA (rRNA) およびミトコンドリア RNA (mtRNA) 由来配列を除去した。逆転写して得られた cDNA を用い、MiSeq でメタゲノムシークエンスを行った。得られたリード配列を CLC Genomics Workbench を使って *de novo*

assembly したところ、5'末端は N 遺伝子の途中から、3'末端はトレーラー配列までの 1 本のコンティグ配列が得られた。P 遺伝子に加え、異なるフレームでコードされる C 遺伝子の ORF が確認された。また P 遺伝子中に editing サイトが存在し、RNA editing によって V タンパク質がコードされていることが推測された。このネコバラミクソウイルスの F と G 遺伝子の間には、げっ歯類のバラミクソウイルスである J ウイルスで報告された TM 遺伝子に似た配列が含まれていた。

Most viruses have been discovered as pathogens that induce a variety of diseases in the hosts. By the development of sequencing analysis technology, we noticed that there are still many unidentified viruses, and most of them are nonpathogenic. Furthermore, retroviruses infected germ-line cells in the past and became endogenous retroviruses which confer physiological functions in the hosts. In 2019, we conducted the comprehensive, functional analysis of micro RNAs (miRNAs) derived from a simian foamy virus, which is a non-pathogenic retrovirus in Japanese macaques. Also, we characterized feline paramyxovirus, which is an emerging viral agent in domestic cats by metagenomic analysis.

### **1) Comprehensive analysis of simian foamy virus-encoded microRNAs derived from a Japanese macaque**

miRNAs are a group of small noncoding RNAs involved in the expression regulation of target mRNAs. Recently, it was reported that the cells infected with certain viruses express virus-encoded miRNAs. However, further research is required to understand how these viruses utilize their miRNAs for the replication strategy in the hosts. To gain further understanding of the viral miRNAs, we performed small RNA sequencing analyses using the cells persistently infected with simian foamy virus derived from a Japanese macaque (SFVmfu). Sequencing analyses of cells persistently infected with SFVmfu indicated that about 33% of the expressed miRNAs were SFVmfu-encoded miRNAs, indicating that SFVmfu highly expresses virus-encoded miRNAs in the persistently infected cells. Notably, SFVmfu-miR-S7-5p, which was expressed at the highest amount among other miRNAs, shares the seed sequence of a tumor-suppressive miRNA, named miRNA-1. Transcriptome analyses of cells persistently infected with SFVmfu and naïve cells revealed candidate mRNAs that SFVmfu-miR-S7-5p targets. Among them, the expression of adenylyl cyclase-associated protein 1 (CAP1) was markedly downregulated. Reportedly, CAP1-expression is upregulated in several malignant solid tumors. Reporter assays indicated that SFVmfu-miR-S7-5p recognized 5'-untranslated region of CAP1 mRNA and downregulated the expression of CAP1. These data indicate that SFVmfu suppresses the expression of CAP1 using the miRNA in infected cells. Further experiments are required to understand the effects of CAP1 suppression on the replication of SFVmfu and malignant tumors to establish symbiotic infection in the host primates.

### **2) Molecular characterization of feline paramyxovirus in Japanese cat populations**

Feline paramyxovirus (FPaV) is a member of the family *Paramyxoviridae* that has been reported only in

Germany and the United Kingdom. We detected FPaV for the first time in Japan by transcriptome sequencing of cat urine samples. We determined the genome structure of FPaV and conducted a phylogenetic analysis. It was found that FPaV belongs to the genus *Jeilongvirus* and forms a clade with Mount Mabu Lophuromys virus 1 (MMLV-1). FPaV lacks a small hydrophobic (SH) gene that is found in members of the genus *Jeilongvirus*; however, some *Jeilongviruses* also do not have this gene. These results provide information about the diversity and evolution of paramyxoviruses.

### List of Publications

- Kitao, K., Tanikaga, T., Miyazawa, T. (2019) Identification of a post-transcriptional regulatory element in the human endogenous retroviral syncytin-1. **J. Gen. Virol.** 100, 662-668.
- Koide, R., Yoshikawa, R., Okamoto, M., Sakaguchi, S., Suzuki, J., Isa, T., Nakagawa, S., Sakawaki, H., Miura, T., Miyazawa, T. (2019) Experimental infection of Japanese macaques with simian retrovirus 5. **J. Gen. Virol.** 100, 266-277.
- Sakaguchi, S., Nakagawa, S., Mitsuhashi, S., Ogawa, M., Sugiyama, K., Tamukai, K., Koide, R., Katayama, Y., Nakano, T., Makino, S., Imanishi, T., Miyazawa, T., Mizutani, T. (2019) Molecular characterization of feline paramyxovirus in Japanese cat populations. **Arch. Virol.** (Epub ahead of print)

### List of Presentations

- Kitao, K., Miyazawa, T. Endogenous retroviral syncytin-1 retains a post-transcriptional regulatory element. The 17th International Student Seminar. Kyoto, March 6-7, 2019.
- Kitao, K., Miyazawa, T. Complex retrovirus-like splicing pattern in human endogenous retrovirus W and its regulation by a *cis*-acting element. 31st International Workshop on Retroviral Pathogenesis, Padova, Italy, October 13-16, 2019.
- 北尾晃一、宮沢孝幸 Analysis of a post-transcriptional regulatory element that is necessary for endogenous retroviral envelope gene expression 第67回日本ウイルス学会学術集会、東京、2019年10月29-31日
- 後藤暁、北尾晃一、宮沢孝幸 非病原性レトロウイルス由来のmiRNAの多様性の解析 2019年環境ウイルス研究集会プログラム、京都、2019年11月2日
- 北尾晃一、水野拓也、中川草、宮沢孝幸 Identification of endogenous retroviral genes highly expressing in canine melanoma 第42回日本分子生物学会年会、福岡、2019年12月3-6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

2017年	171 系統	37,763 個
2018年	228 系統	52,601 個
2019年	248 系統	59,031 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
2017年	43	19,509	135 (0.7%)
2018年	21	8,773	65 (0.7%)
2019年	30	12,554	80 (0.6%)

3) キメラマウスの作製

	クローン数	使用胚数	毛色キメラ数
2017年	38	3,474	78 ( 2.2%)
2018年	16	1,483	57 ( 3.8%)
2019年	8	696	80 (11.5%)

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
2017年	30	11,809	49 (0.4%)
2018年	56	25,081	89 (0.4%)

2019 年	97	34,226	330 (0.9%)
--------	----	--------	------------

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

2017	171 strains	37,763 embryos
2018	228 strains	52,601 embryos
2019	248 strains	59,031 embryos

#### 2) Transgenic mouse production with cloned DNAs

	No of constructs	No of embryos injected	No of transgenic pups obtained
2017	43	19,509	135 (0.7%)
2018	21	8,773	65 (0.7%)
2019	30	12,554	80 (0.6%)

#### 3) Production of chimeric mouse

	No of ES clones	No of embryos injected	No of coatcolor chimera obtained
2017	38	3,474	78 ( 2.2%)
2018	16	1,483	57 ( 3.8%)
2019	8	696	80 (11.5%)

#### 4) CRISPR/Cas9

	No of constructs	No of embryos	No of genome edited mouse
2017	30	11,809	49 (0.4%)
2018	56	25,081	89 (0.4%)
2019	97	34,226	330 (0.9%)

#### List of Publications

Itoh, K., Kondoh, G., Miyachi, H., Sugai, M., Kaneko, Y., Kitano, S., Watanabe, H., Maeda, R., Imura, A., Liu, Y., et al. (2019). Dephosphorylation of protamine 2 at serine 56 is crucial for murine sperm

- maturation in vivo. *Sci. Signal.* 12, 10.1126/scisignal.aa07232.
- Kobayashi, T., Piao, W., Takamura, T., Kori, H., Miyachi, H., Kitano, S., Iwamoto, Y., Yamada, M., Imayoshi, I., Shioda, S., Ballabio, A., and Kageyama, R. (2019). Enhanced lysosomal degradation maintains the quiescent state of neural stem cells. *Nat. Commun.* 10, 5446-019-13203-4.
- Qian, N., Ichimura, A., Takei, D., Sakaguchi, R., Kitani, A., Nagaoka, R., Tomizawa, M., Miyazaki, Y., Miyachi, H., Numata, T., et al. (2019). TRPM7 channels mediate spontaneous Ca(2+) fluctuations in growth plate chondrocytes that promote bone development. *Sci. Signal.* 12, 10.1126/scisignal.aaw4847.
- Someda, M., Kuroki, S., Miyachi, H., Tachibana, M., and Yonehara, S. (2019). Caspase-8, receptor-interacting protein kinase 1 (RIPK1), and RIPK3 regulate retinoic acid-induced cell differentiation and necroptosis. *Cell Death Differ.*

#### **List of Presentations**

- 宮地 均、北野さつき、伊藤克彦、生田宏一 CRISPR/Cas システムによる遺伝子改変マウスの作  
製実績 第 53 回日本実験動物技術者協会、松山、2019 年 10 月 25 日
- 宮地 均、北野さつき、伊藤克彦、生田宏一 京都大学ウイルス・再生医科学研究所 附属感染症  
モデル研究センターにおけるマウス生殖工学支援について 日本実験動物技術者協会 関東  
支部 REG 部会 第 20 回特別講演会、東京、2019 年 11 月 16 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、令和元年度ラット；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 18 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 60 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 and rat 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 60 gene-manipulated mouse strains in this year.

### List of Publications

Akamatsu M, Mikami N, Ohkura N, Kawakami R, Kitagawa Y, Sugimoto A, **Hirota K**, Nakamura N, Ujihara S, Kuroasaki T, Hamaguchi H, Harada H, Xia G, Morita Y, Aramori I, Narumiya S, Sakaguchi S. Conversion of antigen-specific effector/memory T cells into Foxp3-expressing Treg cells by inhibition of CDK8/19. *Sci Immunol*. 4. pii: eaaw2707. (2019)

Takeuchi Y, **Hirota K**, Sakaguchi S. Synovial Tissue Inflammation Mediated by Autoimmune T Cells. *Front Immunol*. 10:1989. (2019)

Hojo MA, Masuda K, Hojo H, Nagahata Y, Yasuda K, Ohara D, Takeuchi Y, **Hirota K**, Suzuki Y, Kawamoto

H, Kawaoka S. Identification of a genomic enhancer that enforces proper apoptosis induction in thymic negative selection. *Nat Commun.* 10:2603. (2019)

Yasuda K, Takeuchi Y, Hirota K. The pathogenicity of Th17 cells in autoimmune diseases. *Semin Immunopathol.* 41:283-297. (2019)

Yasuda K, Kitagawa Y, Kawakami R, Isaka Y, Watanabe H, Kondoh G, Kohwi-Shigematsu T, Sakaguchi S, Hirota K. Satb1 regulates the effector program of encephalitogenic tissue Th17 cells in chronic inflammation. *Nat Commun.* 10:549. (2019)

Takimoto, A., C. Kokubu, H. Watanabe, T. Sakuma, T. Yamamoto, G. Kondoh, Y. Hiraki, and C. Shukunami. Differential transactivation of the upstream aggrecan enhancer regulated by PAX1/9 depends on SOX9-driven transactivation. *Scientific Reports*, 9-1: 4605 (2019).

Itoh, K., G. Kondoh, H. Miyachi, M. Sugai, Y. Kaneko, S. Kitano, H. Watanabe, R. Maeda, A. Imura, Y. Liu, C. Ito, S. Itohara, K. Toshimori, J. Fujita. Dephosphorylation of protamine 2 at serine 56 is crucial for murine sperm maturation in vivo. *Science Signaling*, 12 (574) (2019).

### List of Presentations

廣田圭司: 炎症組織の細胞社会学、第3回 個体の中の細胞社会学ワークショップ、京都、2019年1月11日

Yasuda K, Kitagawa Y, Kawakami R, Isaka Y, Watanabe H, Kondoh G, Kohwi-Shigematsu T, Sakaguchi S, Hirota K: The Genome Organizer Satb1 Regulates GM-CSF and PD-1 Expression in Encephalitogenic Th17 Cells, The 8<sup>th</sup> NIF Winter School on Advanced Immunology, Jan.20-23, 2019, Singapore

Hirota K, Hashimoto M, Ito Y, Matsuura M, Ito H, Tanaka M, WatanabeH, Kondoh G, Tanaka A, Yasuda K, Kopf M, Potocnik A, Stockinger B, Sakaguchi N, Sakaguchi S: Inflammatory cascade of autoimmune arthritis by Th17 cells and GM-CSF-producing ILCs, Keystone symposia, Feb.18-22, 2019, Colorado, USA

廣田圭司: The plasticity and heterogeneity of Th17 cells、第4回京都皮膚基礎研究会、京都、2019年3月25日

廣田圭司: 関節炎惹起性T細胞の分化と慢性炎症維持機構、「感染・免疫・がん・炎症」シンポジウム、北海道、2019年3月27日

廣田圭司: 関節炎モデルSKGマウスを用いた免疫学的解析、第63回日本リウマチ学会学術集会、京都、2019年4月15-17日

川上竜司、北川瑠子、Chen K、安田圭子、大倉永也、渡邊仁美、近藤玄、廣田圭司、坂口志文: 胸腺Treg分化におけるFoxp3-CNS0/CNS3領域の重要性、Kyoto T Cell Conference 第29回学術集会、2019年6月7-8日

北條未来、増田喬子、北条広朗、長畠洋佑、安田圭子、小原及也、竹内悠介、廣田圭司、鈴木穣、河本宏、河岡慎平：胸腺における負の選択に特化した機能を持つゲノミックエンハンサーの同定と機能解析、Kyoto T Cell Conference 第 29 回学術集会、2019 年 6 月 7 – 8 日

Hirota K, Yasuda K, Kitagawa Y, Kawakami R, Watanabe H, Kondoh G, Sakaguchi S: Satb1 controls GM-CSF and PD-1 expression by pathogenic Th17 cells, 7<sup>th</sup> Annual Meeting of the International Cytokine & Interferon Society, Oct20-23, 2019, Vienna, Austria

渡邊仁美：マウス精子における精子膜反応について、日本実験動物技術者協会関東支部 REG 部会 第 20 回特別講演会、東京、2019 年 11 月 6 日

Takeuchi Y, Watanabe H, Kondoh G, Sakaguchi N, Sakaguchi S, Hirota K: Gsdmd and Ripk3 are dispensable for the induction and chronic inflammation of SKG arthritis, 第 48 回 日本免疫学会学術集会、浜松、2019 年 12 月 11-13 日

Kawakami R, Kitagawa Y, Yasuda K, Mikami N, Ohkura N, Watanabe H, Chen K, Kondoh G, Hirota K, Sakaguchi S: A crucial role of the conserved non-coding sequences Foxp3-CNS0 and -CNS3 in the lineage specification of thymic Foxp3+ regulatory T cells, 第 48 回 日本免疫学会学術集会、浜松、2019 年 12 月 11-13 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のネットワークは、情報セキュリティ委員会の管理のもとリソースやシステムの統合が完了した。公式 WEB サイトによって研究所の研究成果などを活発に発信している一方、内部専用 WEB を用いて、複数の建物にあるセミナー室の予約等を行っている。また、多くの共同利用機器類をセキュアなネットワークによって統合し、実験解析データは共通の NAS に取りまとめる事とし、データの持ち運びや移動を安全に管理するシステムを構築した。

例年通り、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。また、今年度はセキュリティポリシーを更新したため、研究所の全分野を対象にしたネットワーク接続機器の一覧および無線アクセスポイントの管理、情報セキュリティ連絡管理体制等を今後見直す予定である。

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。ヒト及びマウスの内在性レトロウイルス (ERV) を研究対象として、エピジェネティックな発現制御機構や ERV の果たす役割に興味を持っている。今年度は、ワクチン接種前後に発現が変化する ERV の解析を行い、特定のレトロエレメントのクラスがワクチン後に増加すること、特に MLT-int を含んだ転写産物が著しく増加し、核内に局在することを明らかにした。MLT-int エレメントを強発現させると、刺激前の平常時インターフェロンプロモータ活性が抑制される現象が観察された事から MLT-int RNA とインターフェロンプロモーター部位の相互作用が示唆された。これは内在性レトロエレメントが自然免疫機構の恒常性を保つ働きをもつ可能性を示している。

Institute for Frontier Life and Medical Sciences LAN system (Infront-LAN) has been administrated by the information security committee consisted of three staffs (Prof. Koyanagi, Assist. Prof. Takemoto and Technical Officer, Mr. Geshi). 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. We are going to make the list of Wi-Fi routers which are used in each laboratory at the institute and an emergency communication flow for the accidents of network. All network users are supposed to get certifications of training of e-learning course which is provided by Institute for Information Management and Communication of Kyoto University.

In addition to the administration of network, Takemoto have studied the expression of retroelement-containing human transcripts during vaccination with co-researchers and found that vaccination upregulated transcripts containing some particular retroelements, such as the MLT-int element of endogenous retroviruses. MLT-int-containing transcripts were distributed mainly in the nucleus, suggesting their unique roles in the

nucleus. Furthermore, we demonstrated that MLT-int RNA suppressed interferon promoter activity in the absence of immune stimuli. Based on these lines of evidence, we speculate a model of a role of the previously unnoticed MLT-int element in preventing excess innate immune activation after elimination of immune stimuli. Our results may emphasize the importance of retroelement-containing transcripts in maintaining host immune homeostasis

#### **List of Publications**

Honda, T., Takemoto, K., and Ueda K. (2019). Identification of a Retroelement-Containing Human Transcript Induced in the Nucleus by Vaccination. **Int. J. Mol. Sci.** DOI: 10.3390/ijms20122875

#### **List of Presentations**

本田知之、竹本経緯子、上田 啓次 ワクチン接種で核内に誘導される内在性レトロウイルス由来転写産物の探索、第 67 回日本ウイルス学会年会、東京、2019 年 10 月 29-31 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 2018年度共同研究報告（研究期間：2018年4月～2019年3月）

#### 【人工胆管の作製とその移植の研究】

- 研究代表者 京都大学大学院医学研究科 田浦 康二朗 准教授
- ウイルス・再生医科学研究所共同研究者 生体材料学分野 田畠 泰彦 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】

- 研究代表者 東北大学大学院生命科学研究科 東谷 篤志 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 濑原 淳子 教授
- 研究経過及び研究成果

本共同研究においては、主に、モデル生物の一つ線虫 C エレガンスを用いて、その体壁筋の加齢やミトコンドリア活性の低下に伴う崩壊の機構を中心に研究を進めてきた。また、宇宙実験も実施し、宇宙の微小重力や地上での加圧の影響などについて、ゼブラフィッシュならびにマウスを用いて筋発生・再生の研究を行っている貴学、瀬原博士との共同研究を展開した。

その結果、線虫の老化や様々なストレス（代謝不全、高温、圧力変化、放射線障害など）に伴い、また、筋ジストロフィー症モデルの遺伝的変異体などにおいて、筋細胞のミトコンドリアが速やかに断片化する現象を見出した。また、その際、筋細胞質内で  $\text{Ca}^{2+}$  の過剰な上昇が生じることが、このミトコンドリアの断片化を誘導すること、さらに、 $\text{Ca}^{2+}$  の過剰な上昇から筋細胞の Extra Cellular Matrix (ECM) の主成分である Collagen が分解され、最終的に筋細胞の崩壊に至る過程を明らかにすることができた。なかでも、この筋崩壊に至る過程では、 $\text{Ca}^{2+}$  依存的なプロセッシング酵素 Furin の活性化により、Matrix metalloproteinase (MMP) が活性化された結果であると、それぞれの酵素阻害剤を用いた実験から明らかにすることができた。さらに、遺伝学的な解析から、 $\text{Ca}^{2+}$  の過剰な蓄積は電位依存性カルシウムチャネル (EGL-19) からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入に伴って、最終的には筋小胞体上のリアノジン受容体 (UNC-68) を介して生じることも明らかにすることができた。したがって、Furin や MMP などの ECM の分解に関わる酵素の阻害ならびに、その活性化につながる  $\text{Ca}^{2+}$  の過剰な放出を抑制することで、筋障害・萎縮を抑える可能性が強く示唆されてきた（図 1）。

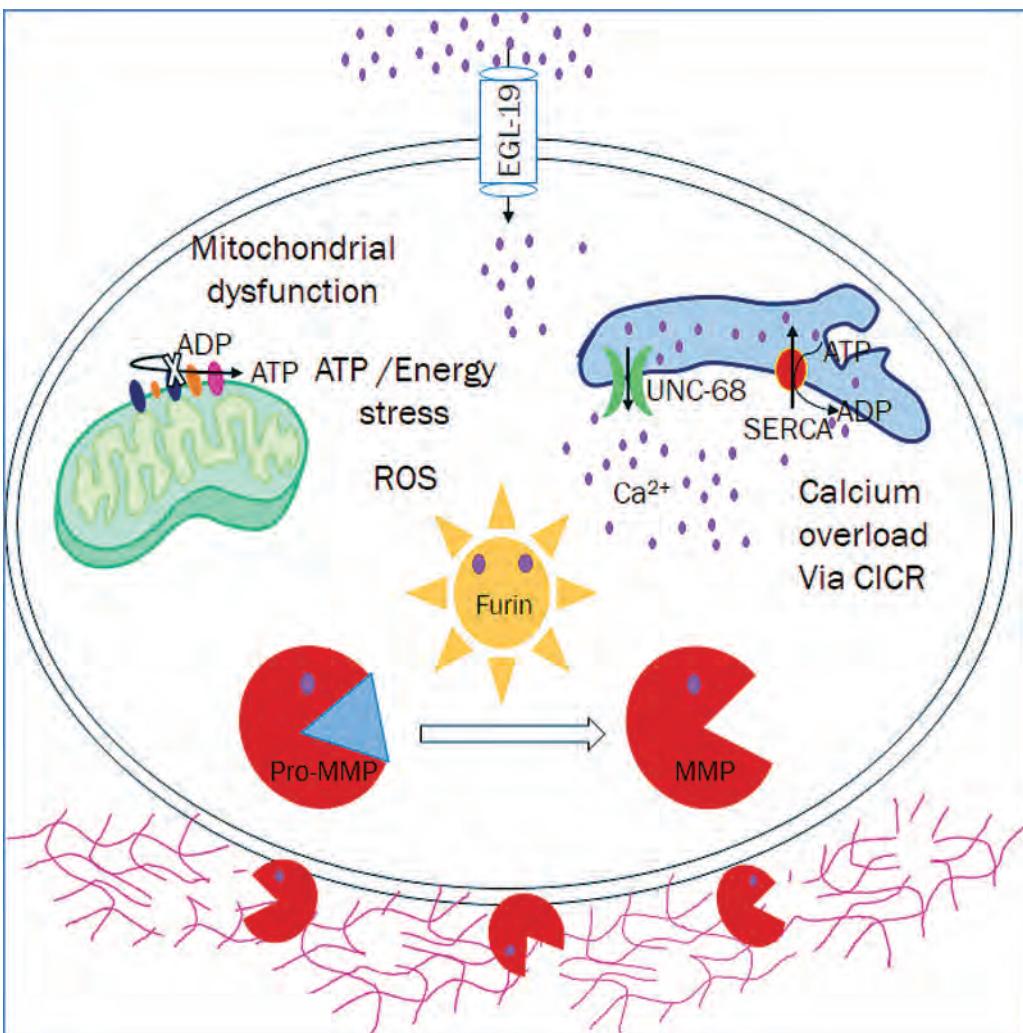


図1 モデル生物線虫の筋細胞の崩壊に至る過程

○研究成果の公表

(学会発表)

Atsushi Higashitani, Physiological alteration in spaceflown *Caenorhabditis elegans* International Symposium on Living in Space 2019 15<sup>th</sup> March, 2019. Kyoto

**[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]**

○研究代表者 滋賀医科大学 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

○研究経過及び研究成果

本研究は、がん抗原特異的T細胞からiPS細胞技術を用いてキラーT細胞を再生する方法をより発展させることを目的とする。がん抗原特異的なT細胞受容体（TCR）遺伝子をゲノム編集とカセット交換法を用いて、iPS細胞の内在性TCR遺伝子座へノックインすることにより、TCRの生理的な発現時期と高い発現レベルを再現し、それにより高品質でキラー活性の高い再生T細胞を効率

よく作製することを試みた。

まず実験系を確立するために、ヒトT細胞白血病株Jurkat細胞に薬剤耐性遺伝子カセットのノックインとカセット交換を行い、導入したTCRを正しく発現させることに成功した。そこでiPS細胞でも、同様に薬剤耐性遺伝子カセットのノックインとカセット交換が起こるか検討を行った。その結果iPS細胞では、薬剤耐性遺伝子カセットが正しくノックインされたクローンは得られたが、カセット交換されたクローンを得ることができなかった。カセット交換されたクローンでは、Puromycin耐性遺伝子がPGKプロモーターにより発現する設計であるが、そのプロモーター活性がiPS細胞では低い可能性が考えられた。そこでPGKプロモーターを、iPS細胞で活性が高いことが知られているEF-1 $\alpha$ プロモーターと交換したところ、正しくカセット交換されたクローンを再現性よく得ができるようになった。現在、カセット交換できたクローンにおいて、Puromycin耐性遺伝子を消失させ、導入したTCR遺伝子を発現させることができるか、引き続き解析を行っている。

○研究成果公表

(学会発表)

寺田晃士、近藤遼平、永野誠治、増田喬子、河本 宏、縣 保年. がん抗原特異的なTCR遺伝子を内在性TCR遺伝子座へ効率よく導入する方法の確立. 第41回日本分子生物学会（2018年11月28日, 横浜）

(特許出願)

「抗原レセプター遺伝子の細胞への導入法」(特願2018-140523)

**【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】**

○研究代表者 理化学研究所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

○研究経過及び研究成果

インフォームドコンセントのもと、詳細な臨床情報・画像情報とともに、先天性側弯症(congenital scoliosis: CS)、脊椎肋骨異形成症(spondylo-costal dysostosis: SCDO)などの脊椎の形成異常症の検体(末梢血あるいは皮膚組織)を収集した。得られた検体よりゲノムDNAを抽出し、全exome解析を含む大規模ゲノム解析により、遺伝子変異を探査した。その結果、脊椎の発生に関与する遺伝子TBX6の劣性遺伝子変異を10例のCS、1例のSCDOに同定した(Otomo *et al.* J Med Genet 2019)。TBX6変異が発見された患者のひとりの株化リンパ球よりiPS細胞を樹立し、沿軸中胚葉から未分節体節へと誘導し、その過程におけるオシレーションの異常を検索したところ、TBX6遺伝子の発現低下により、その下流遺伝子の発現が低下していることがわかった(Otomo *et al.* J Med Genet 2019)。

次にTBX6の変異のない例に対して全exome解析を行い、1例のCS(Takeda *et al.* Mol Genet Genomic Med 2018)、1例のSCD(Otomo *et al.* J Hum Genet 2019)にLNFG遺伝子の劣性遺伝子変異をみつけた。SCDでのLNFG遺伝子の変異の報告は、世界で2例目、CSでのLNFG遺伝子の変異の報告

は世界で初めてである。LNFG 遺伝子のコードするタンパクの糖転移酵素活性が変異タンパクで低下していることを証明した (Otomo *et al.* J Hum Genet 2019)。

○研究成果公表

(発表論文)

1. Takeda K, Kou I, Mizumoto S, Yamada S, Kawakami N, Nakajima M, Otomo N, Ogura Y, Miyake N, Matsumoto N, Kotani T, Sudo H, Yonezawa I, Uno K, Taneichi H, Watanabe K, Shigematsu H, Sugawara R, Taniguchi Y, Minami S, Nakamura M, Matsumoto M; Japan Early Onset Scoliosis Research Group, Watanabe K, Ikegawa S. Screening of known disease genes in congenital scoliosis. Mol Genet Genomic Med. 6 (6):966-974, 2018.
2. Otomo N, Mizumoto S, Lu HF, Takeda K, Campos-Xavier B, Mittaz-Crettol L, Guo L, Takikawa K, Nakamura M, Yamada S, Matsumoto M, Watanabe K, Ikegawa S. Identification of novel LFNG mutations in spondylocostal dysostosis. J Hum Genet, 64 (3):261-264, 2019.
3. Otomo N, Takeda K, Kawai S, Kou I, Guo L, Osawa M, Alev C, Kawakami N, Miyake N, Matsumoto N, Yasuhiko Y, Kotani T, Suzuki T, Uno K, Sudo H, Inami S, Taneichi H, Shigematsu H, Watanabe K, Yonezawa I, Sugawara R, Taniguchi Y, Minami S, Kaneko K, Nakamura M, Matsumoto M, Toguchida J, Watanabe K, Ikegawa S. Bi-allelic loss of function variants of TBX6 causes a spectrum of malformation of spine and rib including congenital scoliosis and spondylocostal dysostosis. J Med Genet (in press)

(学会発表)

【国内】

1. 病気と遺伝：これからの医学・医療を理解するための基礎知識，池川志郎，愛媛大特別講義，2018.10.04.
2. 整形外科領域のゲノム医療，第33回日本整形外科学会基礎学術集会，2018.10.12.
3. ゲノム解析の基礎知識（教育研修講演），池川志郎，第33回日本整形外科学会基礎学術集会，2018.10.12.
4. ゲノム医療の現状と課題：パーソナルゲノム時代に取り残されないためのゲノム医科学の基礎知識，池川志郎，愛媛大学医学部・理化学研究所生命医科学研究センター研究交流講演会 医科学研究とゲノムの話，2018.12.03.
5. 病気と遺伝：これからの医学・医療を理解するための基礎知識，池川志郎，広島大学歯学部特別講義，2018.12.06.
6. 骨・関節疾患のゲノム解析，池川志郎，第31回骨・関節疾患シンポジウム，2019.01.26.
7. 小児整形外科領域のゲノム解析，池川志郎，第3回北海道小児整形外科研究会，2019.02.16.

【国外】

1. Natural history and etiology of spine disorders, 口頭，池川志郎，The International Consortium for Spinal Genetics Development and Disease Conference meeting in Shenzhen, Apr.6. 2018.
2. Extension of genome-wide association study of adolescent idiopathic scoliosis, 口頭，池川志郎，"The International Consortium for Spinal Genetics Development and Disease Conference meeting in Guangzhou", Apr.8, 2018.

3. Genomic Study of Skeletal Dysplasia, 口頭, 池川志郎, 二国間交流事業, Jun.29, 2018.
4. Genetic study of bone and joint diseases, 口頭, 池川志郎, 中国医学科学院基础医学研究所セミナー, Sep. 3.2018.

### 【PRRX1<sup>+</sup> 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 独立准教授
- ウイルス・再生医科学研究所共同研究者 組織再生応用分野 戸口田 淳也 教授
- 研究経過及び研究成果

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<sup>+</sup>Sca1<sup>+</sup>* 細胞を幹細胞とした *Prrx1<sup>+</sup>* 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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。本年度は、マウス *Prrx1* 陽性細胞を発生過程の各時点において回収し、それらのシングルセル RNA シークエンス解析を実施することで、各 *Prrx1* 陽性 subgroup の網羅的遺伝子発現情報と階層構造情報源を得ることに成功した。また、昨年度作製した PRRX1 レポーター iPS 細胞株（ヒト PRRX1 発現を *tdTomato* 蛍光タンパク質にて可視化することが可能）を利用し、発生過程を模倣した形での誘導方法（側板中胚葉系譜 PRRX1 陽性細胞と、沿軸中胚葉系譜 PRRX1 陽性細胞）の確立に成功した。これら事前の研究成果と研究材料開発により、ヒト PRRX1<sup>+</sup> 細胞の subgroup 化の準備が整った。

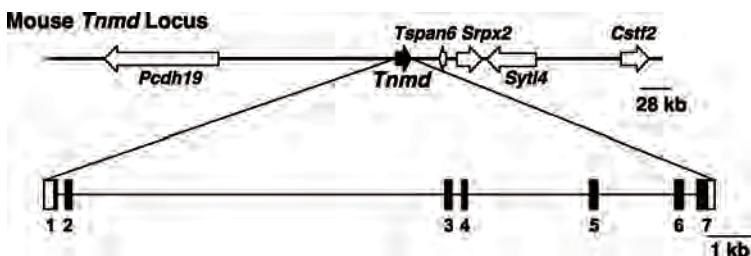
### 【筋・骨格系を統合する腱・靭帯を解析するための新たな蛍光レポーターマウスの開発】

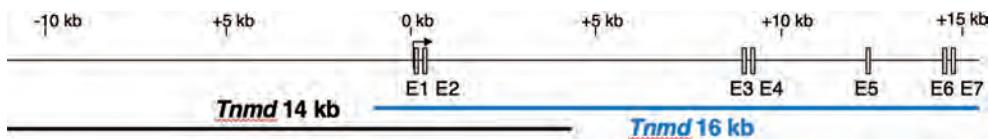
- 研究代表者 広島大学大学院医歯薬保健学研究科 宿南 知佐 教授
- ウイルス・再生医科学研究所共同研究者 統合生体プロセス分野 近藤 玄 教授
- 研究経過及び研究成果

腱は骨格筋の収縮によって生じた力を骨に伝達し、骨を連結する靭帯は可動域を制限して関節を安定化している。いずれの組織も血管網に乏しいため、一旦損傷すると、機能的な回復が難しい。本研究では、腱・靭帯の分子マーカーである *Tenomodulin* (*Tnmd*) 遺伝子の腱・靭帯特異的転写調節領域を同定し、*in vivo* での再生研究に必要な成熟した腱・靭帯で特異的に蛍光レポーターを発現する Transgenic (Tg) マウスを開発することを目指した。

下図に示すように、マウス *Tnmd* 遺伝子は 7 つの exon で構成され、intron、promoter 領域を含めて約 15 kb からなる。promoter 領域には TATA ボックスが存在し、CapSite Hunting によって 2 つの

転写開始点があることを同定している。promoter 領域を含む約 1 kb の flanking 領域においては、5 つの E-box が存在し、CAGATG と CATCTG の配列を有する E-box に b-HLH 型転写因子である *Scx* や *Twist1* が結合して転





写を正に制御していることが明らかになっている (Sci Rep. 8:3155, 2018)。*hsp68* の minimal promoter を持つ *LacZ* レポーターを用いて、上流 10 kb と exon 1, intron 1, exon 2, intron 2 の一部を含む約 14 kb の領域 (上図) に、Tg マウス胚において、腱・靭帯での発現を drive することの出来る活性が見出されている (右図)。更に分割した DNA 断片を用いて、同様のアッセイを行ったところ、promoter の上流 1 kb あたりに見出される繰り返し配列より上流には、腱・靭帯特異的な発現を制御する活性は見出されなかった。そこで、promoter の上流 1 kb からマウス *Tnmd* 遺伝子を含む 16kb の DNA 領域の enhancer 活性を検討することにした (上図)。まず、16kb のマウス *Tnmd* DNA 断片を含む BAC clone を有する大腸菌 (DH10B) に温度感受性の Red/ET 発現プラスミドをエレクトロポレーションによって導入して形質転換し、テトラサイクリン耐性によりセレクションを行った。次に、*Cole1* オリジン及びアンピシリン耐性マーカーを含む線状 DNA に相同領域を付加した断片をアラビノースによる誘導を行った大腸菌に導入し、相同組み換えによって、アンピシリン耐性のサブクローニングを得た。得られた DNA 断片は、*hsp68* の minimal promoter を持つ *LacZ* レポーターの *Ascl* 部位にサブクローニングした。*NotI* によって minimal promoter、*LacZ* レポーター、マウス *Tnmd* の遺伝子断片を含む transgene を切り出し、アガロースゲルにて電気泳動後、精製し、マウス受精卵に microinjection を行った。13.5 日胚と 14.5 日胚のファウンダー Tg マウス胚にて、X-gal 染色を行い、enhancer 活性の検討を行った結果、whole mount in situ hybridization で検出されるマウス *Tnmd* の発現領域に一致して、レポーターの活性が認められた。これまでの解析から、intron 2 内に enhancer 活性が認められることが明らかになっているので、promoter 領域から intron 2 までの約 9 kb の DNA 断片の transgene も作製しており、今後、引き続き検討を進める予定である。また、蛍光レポーター遺伝子 *EGFP* の BAC clone 上のマウス *Tnmd* 遺伝子へのノックインのために、野生型 *rpsL* 遺伝子によるストレプトマイシン感受性を利用したカウンターセレクションを行った。合成した *rpsL-Neo* カセットの両端に相同配列のアームを付加し、PCR により增幅した断片を用いて、BAC クローン上のマウス *Tnmd* 遺伝子へノックインし、カナマイシン耐性によりセレクションを行った。得られたクローンを含む大腸菌に、*EGFP* の両端にマウス *Tnmd* 遺伝子のホモロジー領域を付加した DNA 断片を導入し、ストレプトマイシン耐性によってセレクションを行った。マウス *Tnmd* 遺伝子座に *EGFP* をノックインした BAC クローンを有する DH10B から、promoter の上流 1 kb からマウス *Tnmd* 遺伝子を含む 16kb の DNA 領域を retrieve し、*Ascl* による transgene の切り出し、精製を行った。今後、transgene をマウス受精卵に microinjection することにより、enhancer 活性を確認し、蛍光レポーター Tg マウスの系統を樹立する予定である。

#### ○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  
doi: 10.1038/s41598-018-21194-3.
2. Takimoto A, Kokubu C, Watanabe H, Sakuma T, Yamamoto T, **Kondoh G**, Hiraki Y, **Shukunami C\***, Differential transactivation of the upstream aggrecan enhancer regulated by Pax1/9 depends on Sox9-driven activation. **Sci Rep.** 9:4605, 2019  
doi: 10.1038/s41598-019-40810-4. (平成 28 年度と平成 29 年度採択課題の研究成果)

(招待講演)

腱・靭帯研究の現状と展望：宿南知佐：第 36 回日本骨代謝学会学術集会 Meet the Experts 5 (長崎), 2018.

(学会発表)

腱・靭帯研究のためのインビオシステムの構築：宿南 知佐：第 19 回運動器科学研究会 (岐阜), 2018

### 【造血幹細胞・前駆細胞ニッチの機能低下を誘導する分子機構の解明】

○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

申請者らのこれまでの研究により、骨髄に存在するケモカイン CXCL12 を高発現する細網細胞 (CAR 細胞) が、造血幹細胞の維持に必須のニッチを構成する間葉系幹細胞であることが示され、CAR 細胞に特異的に高発現する転写因子 Foxc1 と Ebf3 が造血幹細胞・造血ニッチの形成と維持に必須であることが明らかになった (Omatsu Y., *Nature*, 2014, Seike M., *Gene Dev.*, 2018). 一方、予備的な解析により、放射線照射マウス、敗血症モデルである LPS 投与マウス、および慢性骨髓性白血病 (CML) モデルである BCR-ABL キメラ遺伝子を導入した造血幹細胞移植マウス等において、CAR 細胞で Foxc1 をはじめとする造血幹細胞・造血ニッチに重要な遺伝子の発現低下が認められた。そこで、このような CAR 細胞の機能低下がどのようなシグナル経路によって起こるのかを明らかにするために、CAR 細胞に発現しているサイトカイン受容体に着目し本研究を開始した。

具体的には TNF $\alpha$  受容体遺伝子 (Tnfrsf1a) と IL-1 $\beta$  受容体遺伝子 (Il1r1) を CAR 細胞特異的に欠損させたマウスの解析を行うため、CRISPR/Cas9 システムを用いて flox マウスの作製を行った。さらに Osmr, Pdgfra, Pdgfrb, gp130 等サイトカイン遺伝子についても flox マウス入手した。これらと CAR 細胞特異的 Cre 発現マウスを交配することにより、種々のサイトカイン受容体の CAR 細胞特異的欠損マウスの作製が可能となった。

現在、作製したマウスを用いて種々の疾患モデルを実施し、病態の進行と回復の過程における造血幹細胞・造血ニッチの変質と再生の解析を進行している。

○研究成果の公表

(論文)

1. Sugiyama T., Omatsu Y., Nagasawa T. Niches for hematopoietic stem cells and immune cell progenitors. *Int. Immunol.* 31(1):5-11., 2019 Feb 6
2. Agarwal P., Isringhausen S., Li H., Paterson AJ., He J., Gomariz Á., Nagasawa T., Nombela-Arrieta C., Bhatia R. Mesenchymal Niche-Specific Expression of Cxcl12 Controls Quiescence of Treatment-Resistant Leukemia Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 2019 Mar 14 [Epub ahead of print]

### **【マウス ES 細胞における遺伝子発現の不均一性の機能】**

○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、ground state (Gsk3b と Mek に対する阻害剤存在下での多能性状態) のマウス ES 細胞で発現が変動する機能未知の遺伝子を同定した。この発現変動の意義を調べるために、昨年度に引き続き、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、個体への寄与率を比較した。昨年度はホスト胚として 8 細胞期胚を用いたのに対して、本年度は胚盤胞を用いた。その結果、昨年度と同様に、本遺伝子の発現レベルの低い ES 細胞分画の方が個体への寄与率が高く、我々が着目している揺らぎの重要性に確証が得られた。

○研究成果の公表

(学会発表)

堀江恭二、渡邊仁美、西村陽介、渡邊日佳流、関真秀、清田晃央、加藤輝、若本祐一、鈴木穣、山田拓司、近藤玄、吉田純子. Ground state におけるマウス ES 細胞の不均一性の同定. 第 41 回日本分子生物学会年会 2018.11.29 横浜

### **【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】**

○研究代表者 奈良先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科バイオサイエンス領域

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

申請者（笹井）は、貴研究所・廣田准教授と共に以下の 2 件の研究を推進してきた。

#### (a) サイクリン依存性キナーゼの機能解析

サイクリン依存性キナーゼ (Cyclin Dependent Kinase) は、細胞増殖だけでなく器官の形態形成など、生物の発生や器官の機能維持に関与する重要なタンパク質キナーゼ群である。これまでに哺乳動物では 20 種類の CDK と 5 種類の CDK-like 因子が単離されており、CDK1, 2, 4, 6 は主に細胞増殖に、CDK5 は器官の形態形成に重要な役割を果たすことが知られている。最近では抗がん剤の薬剤スクリーニングのターゲットとしても利用されている。一方で、一部の CDK についてはその機能がよく知られていない。

申請者（笹井）は、これまでに貴研究所と共に、このうち脳に高い発現を認める CDK について

て、CRISPR/Cas9 による遺伝子変異（ノックアウトマウス）を作成してその機能解析を進めて来た。平成 29 年度までに、このノックアウトマウスは生存可能であること、生後の体重増加が遅延すること、脳の一部で発現するホルモンの発現量が低下することを明らかにした。平成 30 年度は、ノックアウトマウス胚から抽出した MEF (mouse embryonic fibroblast) 細胞の解析を中心に行い、細胞レベルでの作用メカニズムを明らかにした。その結果、この CDK が複数の増殖シグナル因子の細胞内伝達経路に直接関与しており、その構成因子の安定化に関わっていることが明らかになった。特にその基質タンパク質を同定したほか、リン酸化がタンパク質の安定化に必須であることを明らかにした。

以上の結果から、この CDK は増殖因子のシグナル伝達経路の活性の安定化に必須の役割を果たしていることが明らかとなった。

#### (b) 底板領域に発現する WD-domain タンパク質の機能解析

上述のサイクリン依存性キナーゼと物理的に相互作用するタンパク質の 1 つとして、WD リピートドメインを持つタンパク質をコードする遺伝子が候補として挙がっており、研究所と共同でこの遺伝子の変異マウスを CRISPR/Cas9 法により作製し、その発現と表現型を解析した。

平成 30 年度は、貴研究所におけるノックアウトラインの樹立と解析クローンの選定、さらに本学への導入を完了し、本学において再樹立して表現型の解析を行った。

この結果、このマウスは生存可能だが生後光刺激とともに徐々に眼疾患を発症し、生後 8 週程度で光受容細胞が死滅するという予備データを得ている。また、生後 3 週齢程度で、炎症マーカーの発現が変異マウスの眼で上昇しており、網膜色素変性症の一次的な原因になっている可能性が高い。この解析により、光刺激を受けた光受容細胞の一次的な応答遺伝子を特定し、網膜色素変性症が起きる最も早い段階の捕捉を試みる。

眼疾患が起り始める一次的な段階は現在のところほとんど明らかになっておらず、この遺伝子変異細胞の性質の追跡により、再生医学的治療法を含めた遺伝性眼疾患の根治療法の開発につながることが期待される。

これとは別に、胚発生期の神経管においてこの遺伝子がグリア細胞に発現することを捕捉しており、radial glia 細胞の性質の解明も併せて行う。

#### ○研究成果の公表

1. Akiko Hori, Hitomi Watanabe, Rie Takeda, Ami Inoue, Minori Kadoya, Tomo Ichikawa, Manabu Shirai, Gen Kondoh, Keiji Hirota, Noriaki Sasai.  
“Essential Roles of a Cyclin Dependent Kinase in the maintenance of the Shh signal”  
準備中。
2. Minori Kadoya, Noriaki Sasai  
“WDR17 is essential for regulation of the number of glial cells during development”.  
準備中。

## 【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】

○研究代表者 東北大学大学院工学研究科 山本 雅哉 教授

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者

発生システム制御分野 有馬 祐介 助教（2018年4月～10月）

発生システム制御分野 永樂 元次 教授（2018年11月～2019年3月）

○研究経過及び研究成果

低細胞毒性かつ安定な標識を実現する細胞標識技術を開発することを目的として、研究期間に次の3点について検討を行った。すなわち、研究成果①安定な細胞膜アンカー技術の開発、研究成果②生体適合性をもつ金ナノクラスターの合成、研究成果③細胞膜アンカー技術の細胞標識ならびに細胞接着への応用である。研究期間を通じて、細胞膜アンカー能をもつペプチドの合成に成功し、それらが細胞標識や細胞接着に利用できることを示唆する結果を得た。以下に、それぞれの詳細について述べる。

### 研究成果①安定な細胞膜アンカー技術の開発

これまで、コレステロールなどの脂質や、それらの脂質にポリエチレングリコール（PEG）などの高分子を結合させた分子が細胞膜アンカー分子として利用されてきた。これらの分子は、容易に合成できるが、細胞膜から1日以内に遊離するという問題がある。より長期間の観察を実現するためには、安定な細胞膜アンカー技術の開発が必要不可欠である。研究代表者は、細胞膜に安定にアンカーされる $\alpha$ ヘリックス構造と細胞膜の親水部にある負電荷と相互作用するカチオン性のアミノ酸配列とからなる6Kペプチド（KKAAALAAAAALAAWAALAAAKKKK）をFmoc固相合成法により合成し、質量分析ならびに円偏光二色性に基づき、目的分子の合成を確認した。次に、6Kペプチドに対して、その細胞膜アンカーの安定性について、分子動力学計算（MD計算）に基づく自由エネルギー計算、示差走査熱量測定および等温滴定型カロリメトリーによるエネルギー測定により、それぞれ検討した。MD計算の結果、6Kペプチドの細胞膜アンカーに対する自由エネルギー変化 $\Delta G$ は約-140 kcal/molであることがわかった。一方、エネルギー測定の結果、6Kペプチドと人工脂質とが相互作用することによって、発熱ピークが観察され、エネルギー的にも6Kペプチドの細胞膜アンカーが示唆された。

一方、同様の配列をもつペプトイドの合成を試みたが、反応が進行せず、目的の配列からなる細胞膜アンカー型ペプトイドを合成することができなかった。この問題については、今後、さらなるペプトイドに対する合成条件の検討が必要である。

### 研究成果②生体適合性をもつ金ナノクラスターの合成

テトラクロリド金（III）酸を金に還元することによって、金ナノクラスターの液相合成を試みた。還元によって得られる金ナノクラスターに対して、そのサイズ制御のため、メチル基の置換位置が異なるメチルベンゼンチオールをリガンドとして用いて加熱することによって、有機系においてサイズフォーカシングを行った。リガンド濃度や温度などの反応条件を変化させて合成した金ナノクラスターについて、質量分析、動的光散乱、透過型電子顕微鏡、ならびに紫外可視分光による評

価を行った。その結果、いずれの反応条件についても金ナノクラスターではなく、直径数十 nm の金ナノ粒子が形成されていることがわかった。そこで、リガンドとして PEG チオールを用いて、水系においてサイズフォーカシングを行ったところ、直径約 2 nm の金ナノクラスターを合成することができた。一方、得られた金ナノクラスターについて、蛍光特性を調べたところ、イメージングに必要となる発光特性を得ることができなかった。この問題については、今後、さらなる金ナノクラスターに対する合成条件の検討が必要である。

### 研究成果③細胞膜アンカー技術の細胞標識ならびに細胞接着への応用

研究成果①で示した細胞膜アンカー能をもつ 6K ペプチドについて、培養皿に接着させた HeLa 細胞ならびに間葉系幹細胞（MSC）に対する細胞標識、および 6K ペプチドを固定化したガラス基板への MSC の細胞接着について、それぞれ検討した。

細胞標識について、FITC 標識した 6K ペプチド溶解させたリン酸生理食塩水（PBS）を用いて、接着した細胞を 30 分間処理後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察したところ、全ての細胞が標識されていることがわかった。また、標識 1 日後においても、細胞が標識されていることがわかった。この結果は、従来の PEG 脂質を用いた細胞標識では 1 日以内に PEG 脂質が遊離することから、6K ペプチドは、より安定に細胞膜アンカーされることを示唆している。一方、HeLa 細胞では、FITC 標識 6K ペプチドがドット状に観察され、エンドサイトーシスされていることを示唆する結果を得た。FITC 標識した 6K ペプチドの PBS 中での会合の有無や細胞標識条件など、さらなる検討が必要であることがわかった。

次に、細胞膜アンカー技術を利用した細胞接着について検討した。まず、ピランハ液を用いて洗浄したガラス基板表面を、スクシンイミド基をもつシランカップリング剤で処理した。導入したスクシンイミド基に対して L- システインを反応させることにより、チオール基を導入した。一方、6K ペプチドの N 末端に対してヘテロバイファンクショナル試薬を用いてマレイイミド基を導入した。このマレイイミド基とチオール基とを反応させることにより、6K ペプチドの N 末端をガラス基板表面に共有結合で固定化した。得られた基板に対して、FTIR 測定を行ったところ、ガラス基板に対して 6K ペプチドが固定化されていることがわかった。得られた 6K ペプチド固定化ガラス基板に対して、無血清培地中に懸濁させた MSC を加えて 2 時間後に位相差顕微鏡を用いて観察したところ、細胞接着が確認できた。一方、ガラス基板のみでは、細胞接着はわずかであった。以上のことから、6K ペプチドの細胞膜アンカーを利用して細胞を接着させることが可能であることがわかった。今後、細胞凝集体やオルガノイドなど、より高次の細胞組織体について、細胞膜アンカー技術を利用した固定化が可能であるかを検討する予定である。

### 【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】

- 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：

細胞や組織を取り巻く周囲組織への浸潤や立体組織の構築といった細胞集団による三次元組織形成プロセスを解明することは、がんのメカノバイオロジーや組織工学の観点から重要である。特に、細胞の足場となるハイドロゲルは、その組成に起因する生化学的要因のみならず、構造や強度に起因する力学的要因も重要である。そこで、本研究では、原子間力顕微鏡を用いてハイドロゲルの弾性率を測定し、これらの力学的特性が三次元組織形成プロセスに与える役割を検討した。

がん細胞の浸潤プロセスを調べる実験では、マウス由来のグリオーマ幹細胞を使用して、細胞が三次元ゲルの内部へ浸潤するプロセスを解析した。実験にはコラーゲンの濃度やゲル化する際のpHを調節することで様々なゲルを作製し、原子間力顕微鏡を用いてこれらのゲルの弾性率を測定した。原子間力顕微鏡のカンチレバーには、細胞と同程度の大きさのガラスビーズを接着したものを使用し、これをゲルに押し込んだ際のカンチレバーのたわみ量と力の関係（フォースカーブ）を解析することによって弾性率を算出した。これらのゲル弾性率とグリオーマ幹細胞の浸潤プロセスの関係を調べると、ゲル弾性率が高い条件ではグリオーマ幹細胞が集団で浸潤する現象が起こり、ゲル弾性率が低い条件ではグリオーマ幹細胞が単独で浸潤する現象が起ることがわかった。

また、グリオーマ幹細胞は分化状態の異なる不均一な細胞集団を形成するが、未分化なグリオーマ幹細胞の方が高い浸潤能力を有することを示唆する実験データが得られた。さらに、このような浸潤能力の高いグリオーマ幹細胞は、細胞核を柔軟に変形させながらゲルの内部を浸潤していることがわかった。そこで、グリオーマ幹細胞の分化状態と細胞核の柔軟性の関係についても原子間力顕微鏡で調べたところ、幹細胞条件でのグリオーマ幹細胞は、分化誘導した条件に比べて核近傍の細胞体の弾性率が低いことがわかった。以上の結果は、グリオーマ幹細胞の有する高い浸潤能力には、低い細胞体弾性率が関係していることを示唆している。

立体組織の構築プロセスを調べる実験では、ラット初代培養胆管上皮細胞を用いて、胆管構造の形成プロセスとゲル弾性率の関係を検討した。この実験では、同じ濃度のコラーゲン溶液を用いて、ゲル化する際のpHを調節することでゲル弾性率を制御した。原子間力顕微鏡によるゲル弾性率の測定によって、pH 9でゲル化したコラーゲンゲルは、pH 5でゲル化したコラーゲンゲルよりも弾性率が有意に大きくなることがわかった。これらのゲルを用いて胆管上皮細胞を培養すると、弾性率の高いゲルにおいて胆管上皮細胞がより大きなコロニーを形成することがわかった。さらに、胆管上皮細胞コロニーの上にゲルを重層することで胆管形成を誘導した。弾性率の異なるゲルを重層した場合、いずれの条件においても胆管は形成されたが、形成された胆管の管腔サイズには有意な差が認められなかった。

以上より本研究では、グリオーマ幹細胞による浸潤プロセスおよび胆管上皮細胞による胆管形成プロセスの2つの現象を対象として、ハイドロゲルの力学的特性が三次元組織形成プロセスに与える影響を検討した。実験結果はハイドロゲルの力学的特性が組織形成プロセスにおいて重要な役割を有することを示唆しているが、今後の研究においてさらなるメカニズムの検討が必要である。これらの研究が、三次元細胞動態のメカノバイオロジーとして展開されることが期待される。

## ○研究成果の公表

(学会発表)

1. Ryo Sudo, In vitro tissue engineering using 3D microfluidic devices, International Symposium on SSS Laser Processing, 2019年2月27日～3月1日, Keio University, Yokohama, Japan
2. Ryota Kaku, Yasuaki Tokunaga, Ryo Sudo, Analysis of morphology and function of cholangiocytes cultured on soft and rigid substrates, 3rd International Symposium on Nanoarchitectonics for Mechanobiology, 2019年3月7日～8日, National Institute for Materials Science, Tsukuba, Japan
3. 須藤亮, 微小血管網と三次元肝細胞組織を組み合わせた組織工学的手法, 第18回日本再生医療学会総会シンポジウム18「Ex vivoでの機能的な肝組織の再構築」, 2019年3月21日～23日, 神戸国際展示場(兵庫県神戸市)

### **[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]**

- 研究代表者 熊本大学発生医学研究所 丹羽 仁史 教授  
 ○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者 発生システム制御分野 大串 雅俊 准教授  
 ○研究経過及び研究成果

マウスES細胞において、Klf2/Klf4/Tbx3を同時にノックアウトすると、自己複製が停止した。このとき、細胞死が誘導されるとともに、転写因子Foxd3の発現が速やかに低下した。これまでの報告から、Foxd3のノックアウトは細胞死関連遺伝子を誘導し、自己複製を停止させることが報告されているが、新たに作成した誘導型Foxd3ノックアウトES細胞でも再現された。これより、Klf2/Klf4/Tbx3ノックアウトES細胞が自己複製を停止する要因の一つとして、Foxd3発現低下による細胞死誘導が考えられた。そこで、Klf2/Klf4/Tbx3ノックアウトES細胞のレスキュー実験を行うと、この細胞の自己複製は、Nanog+Esrrb+Foxd3の導入で維持できるとともに、Nanog+Esrrb+BclXLでも維持できた。また、Foxd3エンハンサーの解析から、その発現がKlf2、Klf4、Tbx3結合部位を含む2つのエンハンサーによって制御されていることがわかった。これらの結果は、Foxd3がナイーブ型転写因子のバランスによって制御され、そのバランスに異常をきたした細胞を排除するシステムとして機能していることを示唆するものと考えている。

### **[受精能獲得精子選別によるIn vitro単精子受精法の開発]**

- 研究代表者 熊本大学生命資源研究・支援センター 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

現在の体外受精技術では、1個の卵子を受精させるために大量の精子が必要であるため、受精効率を高める技術の開発が求められている。これまでに申請者は、環状オリゴ糖であるシクロデキストリンが精子の受精能獲得（精子が受精可能な状態）を誘導し、体外受精における受精率の向上に有用であることを見出している。また、還元型グルタチオンが、卵子の透明帯中ジスルフィド結合を切断し、精子侵入効率を高めることも明らかにしている。しかしながら、これらの技術を組み合わせても、依然として受精効率が低い場合も存在し、さらなる技術改良が必要である。一般的に、生体内の受精では、卵管に到達する精子が少数であるにも関わらず、高率で受精が成立する。申請者は、受精効率の向上の糸口として、雌性生殖道内で行われている受精能獲得精子の選別に着目し、

受精効率と精子選別の関係について検討を進めている。本研究では、物率的刺激に脆弱である精子の運動性を維持したまま回収できる精子選別システムの開発、生体内における精子選別を模倣する受精能獲得精子選別法の開発および精子選別技術を活用した体外受精技術の開発を試みた。精子選別システムの開発では、マイクロ流体チップ・セルソーターを用いることで、運動性を維持したまま精子の選別が可能であった。また、選別した精子は、体外受精における受精能を維持していた。次に、受精能獲得精子の選別では、受精能獲得マーカーを用いて精子選別を行い、受精能獲得マーカー陽性および陰性精子の分取に成功した。次に、本技術を用いた体外受精法により、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、高い受精率を示すことが明らかになった。また、本体外受精技術で作製した受精卵は、胚移植により産子へと発生することも確認した。以上、本知見は、精子選別におけるマイクロ流体チップ・セルソーターの有用性を示すと共に、受精能獲得精子の選別が受精率の向上に有効であることが明らかになった。

最後に、本研究をご支援頂きました京都大学ウイルス・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）の共同利用・共同研究事業および関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。

#### ○研究成果の公表

(学会発表)

1. 中尾聰宏、竹尾 透、渡邊仁美、近藤 玄、中瀧直己  
マイクロ流体チップ・セルソーターを用いた精子選別に関する技術開発  
第37回動物生殖工学研究会、2018年12月1日
2. 中尾聰宏、竹尾 透、渡邊仁美、近藤 玄、中瀧直己  
マイクロ流路チップ・セルソーターを用いたマウス受精能獲得精子選別システムの開発  
第111回日本繁殖生物学会、2018年9月13日
3. 中尾聰宏、竹尾 透、渡邊仁美、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、2018年5月16日

ウイルス感染症・生命科学先端融合的共同研究拠点  
2018 年度共同研究課題達成状況（研究期間：2018 年 4 月～2019 年 3 月）

**①霊長類 P3 感染実験**

霊長類 P3 実験として計 3 件の研究を行った。

**【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、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。平成 29 年度までの研究を発展させ、SIV Gag/Vif 断片連続抗原発現センダイウイルス (SeV) ベクターワクチン接種サルにおける Gag/Vif 特異的 CD4 陽性 T 細胞反応誘導を伴わない Gag/Vif 特異的 CTL 反応誘導を確認した。また、直腸生検サンプルを用い、腸管粘膜 Gag/Vif 特異的 CTL 反応誘導を確認した。さらに、一部のサルにおいて SIV 経直腸接種実験を開始し、ワクチンの感染抑制効果を示唆する結果を得た。

**【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。10MA-1 単独処理により HIV/SIV 潜伏感染細胞株およびサル末梢血細胞からのウイルス再活性化を認めた。興味深いことに、BET 阻害薬である JQ1 を併用することにより 10MA-1 単独処理の場合と比較して相乗的な HIV/SIV 再活性化能を示すと同時に、10MA-1 による IL-8、TNF- $\alpha$  等の炎症性サイトカイン産生誘導活性が抑制されることを見出した。以上の結果より、10MA-1/JQ1 併用による LRA としての有用性が示唆された。現在、カニクイザルにおける同薬剤の薬物動態試験および安全性試験を実施中である。

**【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 iPS 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）】**

- 研究代表者：京都大学 iPS 細胞研究所・増殖分化機構研究部門 准教授 金子 新
- ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：准教授 三浦 智行、教授 明里 宏文
- 達成状況：

京都大学 iPS 細胞研究所 金子新准教授と、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 iPS 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）を

行った。アカゲザル由来 iPS 細胞と同細胞由来の造血幹細胞の血液分化能を検証するために、マクロファージ分化能を in vitro で検討した。アカゲザル iPS 細胞から誘導されたマクロファージは M1 タイプのマクロファージであり、大腸菌 particle を貪食能や SIV 感染感受性があることが明らかになった。また、感染防御能の付与を目的としたゲノム編集実験にも取り組んでおり、造血幹細胞移植を介した in vivo 造血実験、感染実験の準備を進めている。

## ②マウス P3 感染実験

マウス P3 感染実験として計 2 件の研究を行った。

### 【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】

○研究代表者：東京大学医科学研究所感染症国際研究センター 准教授 佐藤 佳

○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：

東京大学 医科学研究所 感染症国際研究センター 佐藤佳准教授と、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を行った。GFP を発現する HIV-1 をヒト化マウスに接種し、感染マウスの GFP 陽性 CD4T 細胞（ウイルス産生細胞）と GFP 陰性 CD4T 細胞（非感染細胞と潜伏感染細胞の混在）を、BSL3 施設に設置したセルソーターを用いて分取した。さらに、BSL3 施設に設置した C1（フリューダイム社）を用いてシングルセル化、RNA 抽出、ライプラリ構築を行い、シングルセル RNA-sequencing 解析を実施した。

### 【新規 HIV-1 治療法の確立】

○研究代表者：京都大学大学院医学研究科血液・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 大学院医学研究科血液・腫瘍内科学 高折晃史教授と、新規 HIV-1 治療法の確立を行った。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 mKO2 陽性潜伏感染分画を sorting し遺伝子発現解析を施行し、潜伏感染細胞特異的に発現が低下する遺伝子を 32 種同定した。初代培養 T 細胞を用いて遺伝子発現変化を検討中である。また Env 中和ナノボディ 8 万クローン・50 クラスターより、74 種のナノボディを精製し、中和活性を持つナノボディを 3 クローン得た。

## ③ウイルス・生命科学研究

ウイルス・生命科学研究として計 15 件の研究を行った。

### 【ボルナウイルスベクターの產生効率の改良】

○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 准教授 本田 知之

○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 医学系研究科 本田知之准教授と、ボルナウイルスベクターの產生効率の改良を行った。ボルナウイルスの効率的な產生のためには、ウイルスの粒子形成に関わるマトリックスタンパク質(M) の機能解析が必須である。本研究では、M タンパク質の様々な変異体を作成した。M タンパク質によるウイルス粒子形成系を用いて、M タンパク質の中で粒子形成に重要な領域を決定した。また、M タンパク質と相互作用する宿主タンパク質を質量分析により同定した。今後は、その宿主因子のノックダウンや過剰発現により、ウイルスの粒子形成が変化するか検討する予定である。

**【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】**

○研究代表者：国立感染症研究所ウイルス第二部 主任研究官 渡士 幸一

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：准教授 土方 誠

○達成状況：

国立感染症研究所 ウイルス第二部 渡士幸一主任研究官と、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を行った。既存の HBV 培養系を用いた HBV 感染増殖阻害低分子物質のスクリーニングを行い、fasiglifam と bardoxolone methy (BARD) を見出した。fasiglifam は NTCP と結合し、HBV 感染抑制効果を示すものと考えられた。BARD は、Nrf2 活性化剤だが、Nrf2 依存的そして非依存的な機構で HBV pgRNA 量を転写後に低下させことがわかった。

**【抗体エピトープを挿入した S2P ホモログの機能評価】**

○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、抗体エピトープを挿入した S2P ホモログの機能評価を行った。S2P ホモログのペリプラズム領域に存在する PDZ タンデムを可溶性断片として発現させ、複数のループ領域に PA タグと呼ばれる配列を挿入した変異体を作製した。そして、PA タグを特異的に認識する NZ-1 抗体の Fab 断片を結合させた複合体試料を調製し、X 線結晶解析を行うことで結合様式の解析を行った。その結果、PDZ タンデムに多数存在する  $\beta$ -ヘアピン領域が、PA タグを挿入し、NZ-1 抗体の断片を結合させる部位として適していることが明らかになった。

**【mTOR シグナルによる骨格形成制御】**

○研究代表者：金沢大学医薬保健研究域薬学系 准教授 檜井 栄一

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授 大野 瞳人、助教 北畠 真

○達成状況：

金沢大学 薬学系 檜井栄一准教授と、mTOR シグナルによる骨格形成制御を行った。間葉系幹細胞特異的な mTORC1 不活性化マウスは、著明な四肢短縮という劇的な表現型を示し、mTORC1 の骨格形成における重要性が個体レベルで明らかになった。さらに mTORC1 不活性化間葉系幹細胞では、転写制御因子 Sox9 のタンパク質レベルが著明に抑制されていた。すなわち、間葉系前駆細

胞の mTORC1 は Sox9 の翻訳を直接的に制御することで、骨格形成を調節している可能性が示された。(Stem Cell Reports 2018)。

#### **【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】**

○研究代表者：東京理科大学生命科学研究所 教授 久保 允人

○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：

東京理科大学 生命科学研究所 久保允人教授と、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に関する研究を行った。CD4-Cre マウスとアンドロゲン受容体 (AR) -flox マウスおよびエストロゲン受容体 (ER) -flox マウスを交配し、T 細胞特異的な AR および ER 欠損マウスを作成した。このマウスにダニ抗原により喘息を誘発すると、T 細胞特異的 AR 欠損マウスで喘息の症状が悪化していたが、ER 欠損マウスではコントロールとほとんど差がなかった。したがって、アンドロゲンは T 細胞に働いて Th2 細胞への分化を抑制していると考えられる。

#### **【デングウイルス感染症非ヒト霊長類モデル構築に向けた基盤研究】**

○研究代表者：神奈川県衛生研究所微生物部 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：

神奈川県衛生研究所 微生物部 日紫喜隆行主任研究員と、デングウイルス感染症非ヒト霊長類モデル構築に向けた基盤研究を行った。デングウイルスの分子クローンに IRES (internal ribosomal entry sequence) 配列と共にインフルエンザ NS1 遺伝子を挿入した組み換えデングウイルス (NS1-DENV) の増殖能について、複数個体のアカゲザルから調整した PBMC に感染させ、培養上清中のウイルス力値を親株ウイルスと比較した結果、有意に NS1-DENV の複製能が高いことが明らかとなった。

#### **【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：京都大学大学院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 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 感染病態の解析を行った。SIVpbj 株接種サル化マウスでは腸管の組織学的变化など特異的な病態が観察された。さらにリンパ系組織や腸管だけでなく脳においてもウイルス遺伝子の存在が明らかとなった。また組織学的解析から脳内の血管周囲に多核性巨細胞様の細胞集塊が認められた。この組織像は AIDS 脳症の特徴的所見とされている。以上は、SIVpbj 株接種サル化マウスが感染初期の腸管症状だけでなく、AIDS 脳症をも反映できる動物病態モデルになり得る可能性を示唆するものである。

#### **【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】**

○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 井上淨特任准教授と、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を行った、本年度では、昨年度までのインフルエンザウイルスの HA 抗原に加え、あらたな抗原としてラッサウイルスの VLP を用いた検討を進めてきた。新規の抗原のため、まずは通常の SLOT 法による条件検討と抗体産生を確認した。今後、改良型 SLOT 法を用いた抗体作成へと進めていく。

#### **【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】**

○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、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を行った。北米大陸に生存するネコ科のピューマとボブキャットに感染する FIV、ピューマレトロウイルス (PLV) には 2 つのサブタイプが存在する。PLV サブタイプ A は両方に感染するが、サブタイプ B はピューマのみにしか感染しない。我々はこのサブタイプ間の感染宿主の違いを調べるために、宿主の抗ウイルス因子 APOBEC Z1 の多型に着目して解析を行った。その結果、178 番目のピューマでの変異 (T->M) が PLV の Vif 遺伝子の分解できないことが関連していることを明らかにした。

#### **【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】**

○研究代表者：工学院大学工学部機械システム工学科 助教 金田 祥平

○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：

工学院大学 工学部 金田祥平助教と、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を行った。

デバイスについては、炭素ナノ粒子含有シリコーンゴムを材料として採用することで、チャンバごとに異なる条件の光刺激入力を与え得るように改良した。また、チャンバの ECM コーティングや細胞播種手順について仔細な条件検討を行い、最適化を行った。

細胞については、入力 - 出力関係がクローナルな性質を持つ安定株のセレクションを実施した。また、2 入力（光刺激と TMP 濃度を）に対する出力結果から、応答特性のシミュレータ構築に必要な伝達関数を求めた。

#### **【抗ウイルス応答における自然免疫機構の役割の解明】**

○研究代表者：大阪大学大学院薬学研究科 教授 齋藤 達哉

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授 竹内 理

○達成状況：

大阪大学 大学院薬学研究科 齊藤達哉教授と、抗ウイルス応答における自然免疫機構の役割の解明を行った。RNA ウィルスに対して誘導されるオルガネラを介した防御応答を担う因子を探査した。オルガネラ膜に局在する GTPase である RAB ファミリーに対する siRNA を用いたスクリーニングから、ウィルス核酸センサーである MDA5 に依存的な防御応答において、RAB5C が重要な役割を果たすことを見出した。

#### **[Develop a selectable anti-HIV-1 gene therapy vector using CRISPR/CAS9system]**

○研究代表者：UCLA AIDS institute, UCLA School of Nursing 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：

UCLA AIDS institute, UCLA School of Nursing の An, Dong Sung 教授と CRISPR/CAS9 システムを使った選択性抗 HIV 遺伝子治療法の開発研究を行った。CRISPR/CAS9 による遺伝子編集システムとして、センダイウイルスベクターの利用の仮説の実証実験を行った。本共同研究では、遺伝子導入細胞の選択法として HPRT をを利用して CCR5 遺伝子の編集によって HIV 耐性血液幹細胞の作出をおこなった。

#### **[大腸菌 BepA プロテアーゼの構造と機能]**

○研究代表者：奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス領域 教授 塚崎 智也

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授 秋山 芳展、研究員 大門 康志

○達成状況：

奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス領域 塚崎智也教授と、大腸菌 BepA プロテアーゼの構造と機能に関する研究を行った。大腸菌 BepA の全長構造を明らかにするため、X 線構造解析および X 線小角散乱解析を行い、N 末端側のプロテアーゼドメインと C 末端側の TPR ドメインが相互作用し、コンパクトな構造をとる事を示した。また、生化学的解析により、BepA が生体内の本来の局在場所（ペリプラズム）でも上記と同様な構造を取ること、BepA は、両ドメイン間の位置関係を大きく変化させることなく機能しうる事が示唆された。

#### **[Immunological Consequences of piRNAs Derived from EBLNs]**

○研究代表者：RIKEN Center for Integrative Medical Sciences Genome Immunobiology RIKEN Hakubi Research Team Leader PARRISH, Nicholas Fredric

○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：

理化学研究所統合医療科学研究センターゲノム免疫生物学研究所研究チーム Nicholas PARRISH チームリーダーと、マウスに内在化している内在性ボルナウイルス様配列 (EBLN) 由来 piRNA の機能解明に関する研究を行った。まず、マウスゲノムにおける EBLN の存在を検索し、既知の EBLN 以外に新しい EBLN が存在しないことを確認した。また、脳で発現していると考えられる EBLN 由来 piRNA の機能を明らかにするために、ボルナ病ウイルスの脳内接種を行い、脳内で

のウイルス動態を明らかにした。

**[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]**

○研究代表者：藤田医科大学・総合医科学研究所 教授 前田 明

○ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：教授 大野 瞳人、助教 谷口 一郎

○達成状況：

藤田医科大学 総合医科学研究所 前田明教授と、環状 RNA の細胞内局在機構を明らかにし脳内環状 RNA の謎に迫った。アフリカツメガエル卵母細胞へのプラスミド DNA 注入実験を用いて、転写後にスプライシング反応によって環状化された circRNA が核から細胞質へ能動的に輸送されることを明らかにした。さらに circRNA の輸送は mRNA 核外輸送因子 TAP に依存していることが競合阻害実験および siRNA によるノックダウン実験により示された。mRNA 型輸送アダプター因子として TREX が circRNA 輸送のアダプターであることが示唆された。

## 2019 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 竹内 理 教授	統合生体プロセス分野 近藤 玄 教授	骨髓における細胞系譜バイアスを制御する新規転写後制御機構の解明
京都府立医科大学大学院医学研究科 八木田 和弘 教授	統合生体プロセス分野 近藤 玄 教授	組織形成における細胞分化と概日時計の共役関係の意義
早稲田大学理工学術院 小出 隆規 教授	細胞機能調節学分野 平芳 一法 講師	コラーゲン上のアミノ酸配列特異的な RNA アプタマーの取得と再生医学研究への利用
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
東北大学大学院工学研究科 山本 雅哉 教授	生体材料学分野 城 潤一郎 助教	組織浸透性ポリマーを用いた幹細胞凝集体深部への分子デリバリーシステムの開発
東京大学大学院医学系研究科 田中 栄 教授	バイオメカニクス分野 安達 泰治 教授	細胞動態と薬剤作用機序に基づく骨粗鬆症治療効果の数理解析
国立研究開発法人理化学研究所 眞貝 洋一 主任研究員	幹細胞遺伝学分野 遊佐 宏介 教授	転写抑制のエピゲノム制御因子の網羅的スクリーニング
広島大学大学院医歯薬保健学研究科 宿南 知佐 教授	統合生体プロセス分野 近藤 玄 教授	腱・韌帯の初期形成を司る分子メカニズムの解明
京都大学大学院生命科学研究科 山田 真弓 特定助教	発生システム制御分野 大串 雅俊 准教授	光作動性転写因子を用いた、神経幹細胞の増殖・分化メカニズムの解明
大阪大学大学院歯学研究科 磯村 恵美子 助教	生体材料学分野 田畠 泰彦 教授	組織注入可能な形で 3 次元培養させた幹細胞による筋力増強効果に関する検討
理化学研究所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	大規模ゲノム解析に基づく側弯症の分子病態、脊椎の形成機構の解明
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 樋口 隆弘 教授	再生免疫学分野 河本 宏 教授	レポーター遺伝子を用いた PET イメージングによる多能性幹細胞由来再生 T 細胞の体内動態評価法の開発
University of California Berkeley Mohammad R. K. Mofrad Professor	バイオメカニクス分野 安達 泰治 教授	Multiscale Studies of Cell Mechanobiology for Tissue Engineering and Regenerative Medicine
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 宝田 剛志 独立准教授	組織再生応用分野 戸口田 淳也 教授	PRRX1 <sup>+</sup> 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
奈良先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科 笛井 紀明 准教授	統合生体プロセス分野 廣田 圭司 准教授	ソニック・ヘッジホッギングナルの新規生理学的機能の解明
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	精子由来受精阻害因子の機能解析による新規体外受精技術の開発
The Hong Kong Polytechnic University Department of Applied Biology and Chemical Technology Keng Wee-keong Vincent Associate Professor	幹細胞遺伝学分野 遊佐 宏介 教授	Hypothesis driven loss-of-function screen in mice for cooperating genes involved with the canonical WNT signaling molecular class of hepatocellular carcinoma

奈良県立医科大学医学部 堀江 恭二 教授	統合生体プロセス分野 近藤 玄 教授	マウス ES 細胞の不均一性の機能解析
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・前駆細胞ニッチの変質を制御する分子機構の解明

## ウイルス感染症・生命科学先端融合的共同研究拠点

### ① 灵長類 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 俣野 哲朗 センター長	靈長類モデル分野 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
京都大学靈長類研究所 明里 宏文 教授	靈長類モデル分野 三浦 智行 准教授	HIV-1 感染症の根治療法創出のための基礎・応用研究
京都大学 iPS 細胞研究所 金子 新 准教授	靈長類モデル分野 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

### 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 三沢 尚子 教務補佐員 麻生 啓文 大学院生	ヒト化マウスモデルを用いたウイルス感染細胞のシングルセル解析
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
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	酸化ストレス応答転写因子 Nrf2 による肝炎ウイルス制御機構の解析および創薬への応用
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 奥野 浩行 教授	増殖制御システム分野 影山 龍一郎 教授	生後脳神経新生による記憶痕跡回路の制御機構解明
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	抗体断片と複合体を形成した S2P ホモログの機能評価

大阪大学大学院生命機能研究科 立花 誠 教授	RNA ウィルス分野 朝長 啓造 教授	CRISPR/Cas9 による長鎖 DNA ノックインマウス作製法の確立
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の恒常性維持機構の解明
京都府立医科大学・医学研究科 八木田 和弘 教授	免疫制御分野 生田 宏一 教授 樺葉 旭恒 研究員	概日リズム攪乱による生体防御機能の障害
大阪大学蛋白質研究所 杉田 征彦 特任助教	微細構造ウイルス学分野 野田 岳志 教授	マイナス鎖 RNA ウィルス・リボ核タンパク質複合体構造の解明
Korea Brain Research Institute 小曾戸 陽一 Lab Head	増殖制御システム分野 小林 妙子 助教 附属感染症モデル研究センター 宮地 均 技術専門員	Blastocyst への細胞移植効率を向上させる新規手法の開発
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	ポルナウイルスベクターからの遺伝子発現制御法の開発
慶應義塾大学先端生命科学研究所 井上 淨 特任准教授	微細構造ウイルス学分野 野田 岳志 教授	病原性ウイルスに対する高機能抗体の創出
京都産業大学総合生命科学部生命科学研究科 川根 公樹 准教授	分子遺伝学分野 藤田 尚志 教授	上皮細胞の終焉様式である細胞脱落の機構及び生理的意義の解析
京都大学大学院生命科学研究科 山田 真弓 特定助教	増殖制御システム分野 影山 龍一郎 教授	レンチウイルスを用いたオリゴデンドロサイトの分化制御メカニズムの解明
長浜バイオ大学サイエンス学部 阪上 起世 助教	増殖制御システム分野 影山 龍一郎 教授 下條 博美 特定助教 附属感染症モデル研究センター 宮地 均 技術専門員	AKT 活性化による神経変性疾患の理解
Department of Mathematics, National Tsing Hua University, Taiwan Je-Chiang Tsai Professor	数理生物学分野 望月 敦史 教授	Determining structural conditions of reaction networks for diversity of dynamical behaviors of cells
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 Sendai virus based CRISPR/CAS9 delivery system
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	A CRISPR-based reporter of Bornavirus RNA-to-RNA, virus-to-host gene flow
長崎大学熱帯医学研究所 浦田 秀造 助教	細胞制御分野 杉田 昌彦 教授 水谷 龍明 助教	蛍光プローブを利用した高病原性ウイルスに対する創薬基盤研究
筑波大学生存ダイナミクス研究センター 西村（佐田）亜依子 助教	組織恒常性システム分野 豊島 文子 教授 一條 遼 特定助教	皮膚の恒常性維持における表皮幹細胞のダイナミクス解析

# 学術集会

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」  
「ウイルス感染症・生命科学先端融合的共同研究拠点」  
平成 30 年度共同研究合同報告会

開催日：2019 年 3 月 20 日（水）

場 所：京都大学南部総合研究 1 号館・ウイルス再生研 1 号館 1 階 共同セミナー室 3

開会挨拶	所長 小柳 義夫（京都大学ウイルス・再生医科学研究所）
「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」 保野 哲朗 センター長（国立感染症研究所エイズ研究センター）	
「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」 明里 宏文 教授（京都大学靈長類研究所）	
「マウス ES 細胞における遺伝子発現の不均一性の機能」 堀江 恭二 教授（奈良県立医科大学医学部）	
「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」 渡士 幸一 主任研究官（国立感染症研究所ウイルス第二部）	
「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」 中川 草 助教（東海大学医学部）	
「Immunological Consequences of piRNAs Derived from EBLNs」	
PARRISH, Nicholas Fredric Genome Immunobiology RIKEN Hakubi Research Team Leader (RIKEN Center for Integrative Medical Sciences)	
「人工胆管の作成とその移植の研究」 田浦 康二郎 講師（京都大学大学院医学研究科）	
「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」 宿南 知佐 教授（広島大学大学院医歯薬保健学研究科）	
「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」 縣 保年 教授（滋賀医科大学生化学分子生物学講座）	
「PRRX1 <sup>+</sup> 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）	
「造血幹細胞・前駆細胞ニッチの機能低下を誘導する分子機構の解明」 長澤 丘司 教授（大阪大学大学院生命機能研究科）	
「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」 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）	
「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」 須藤 亮 准教授（慶應義塾大学理工学部）	
「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」 丹羽 仁史 教授（熊本大学発生医学研究所）	
「受精能獲得精子選別による In vitro 単精子受精法の開発」 竹尾 透 講師（熊本大学生命資源研究・支援センター）	
「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」 郭 龍 研究員（理化学研究所統合生命医科学研究センター）	
「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」 山本 雅哉 教授（東北大学大学院工学研究科）	
「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」 東谷 篤志 教授（東北大学大学院生命科学研究科）	
閉会挨拶	副所長 河本 宏（京都大学ウイルス・再生医科学研究所）

## ウイルス・再生医科学研究所 第 14 回公開講演会

開催日：2019 年 7 月 20 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

「ゲノム編集技術を使ったがん研究」  
「ウイルス感染に対抗する自然免疫機構」

遊佐 宏介（ウイルス・再生医科学研究所 教授）  
藤田 尚志（ウイルス・再生医科学研究所 教授）

## 第3回 個体の中の細胞社会学ワークショップ

開催日：2019年1月11日（金）

場 所：京都大学楽友会館2階 会議・講演室

### I. 免疫細胞が形づくる細胞社会

「炎症組織の細胞社会学」  
「Foxp3+T細胞の分化可塑性と病理学的意義の解明」  
「疾患特異的マクロファージの機能的多様性」

廣田圭司（京都大学ウイルス・再生医科学研究所）  
小松紀子（東京大学大学院医学系研究科免疫学）  
佐藤 莊（大阪大学免疫学フロンティア研究センター）

### II. 免疫系と他の組織との連関

「口腔由来クレブシエラ菌による腸管炎症誘導」  
「Structure, Mechanism & Engineering of CRISPR-Cas9」  
「リンパ器官における交感神経と免疫細胞のクロストーク」

新 幸二（慶應義塾大学医学部微生物学・免疫学教室）  
西増弘志（東京大学大学院理学系研究科）  
鈴木一博（大阪大学免疫学フロンティア研究センター）

## 第4回 個体の中の細胞社会学ワークショップ

開催日：2019年5月23日（木）

場 所：京都大学南部総合研究1号館・ウイルス再生研1号館1階 共同セミナー室3

## 開会あいさつ

小柳 義夫（京都大学ウイルス・再生医科学研究所・所長）

### I.

「がん細胞の転写ネットワーク依存性とその制御」

樽本 雄介（Cold Spring Harbor Laboratory）

### II.

「バイオソフトマター制御による人工細胞工学」

瀧ノ上 正浩（東京工業大学情報理工学院）

「マイクロ・ナノデバイスの生命・医科学研究への応用～モータータンパク質と Microphysiological System (MPS) への応用～」

横川 隆司（京都大学大学院工学研究科マイクロエンジニアリング専攻）

## 第5回 個体の中の細胞社会学ワークショップ

開催日：2019年6月10日（月）

場 所：京都大学南部総合研究1号館・ウイルス再生研1号館1階 共同セミナー室3

## 開会あいさつ

小柳 義夫（京都大学ウイルス・再生医科学研究所・所長）

「Regulation of Programmed Cell Death by Protein Ubiquitylation」

松浦 顕教（金沢大学医薬保健研究域・薬学系）

「張力感知分子およびクロマチンを介したメカノトランスダクション」

牧 功一郎（ヘルシンキ大学ライフサイエンス研究所）

「マイクロ・ナノ工学による生体システム再構築への挑戦」

亀井 謙一郎（京都大学高等研究院物質—細胞統合システム拠点）

閉会あいさつ

河本 宏（京都大学ウイルス・再生医科学研究所・副所長）

## 第6回 個体の中の細胞社会学ワークショップ

開催日：2019年11月21日（木）

場 所：京都大学南部総合研究1号館・ウイルス再生研1号館1階 共同セミナー室3

開会あいさつ

小柳 義夫（京都大学ウイルス・再生医科学研究所・所長）

「構成的ヘテロクロマチン構造の制御機構解明を目指した技術開発」

西淵 剛平（大阪大学大学院理学研究科）

「境界から細胞社会を見る」

岡部 泰賢（京都大学ウイルス・再生医科学研究所）

閉会あいさつ

河本 宏（京都大学ウイルス・再生医科学研究所・副所長）

## 分野主催のセミナー

開催日	講演者・所属	演題	主催分野
2019. 3.13	Shahragim Tajbakhsh (Stem Cells & Development Unit Institut Pasteur, Paris)	Extrinsic and Intrinsic regulation of stem cell fate	増殖制御システム
2019. 3.28	Dong Sung An (UCLA AIDS Institute/School of Nursing)	Genetic engineering of a bi-functional chimeric antigen receptor (CAR) against HIV-1 using the first heptad repeat (C46) of HIV-1 envelope glycoprotein 41.	システムウイルス学
2019. 4.23	Meirigeng Qi (Department of Translational Research and Cellular Therapeutics, Diabetes & Metabolism Research Institute City of Hope, Duarte, CA, U.S.A.)	Improvement of clinical islet transplant outcome by enhancing islet quality and immunoisolating islets	臓器・器官形成応用 学
2019. 4.26	城口 克之 (理化学研究所 生命機能科学研究 センター)	新規手法開発により生命システムの理解へ迫る： ①核酸・細胞の“デジタル”定量法の開発 ②シークエンシングとライブイメージング法の融合	免疫制御
2019. 5.20	小松 弘和 (京都大学 ウィルス・再生医科学研 究所 数理生物学分野)	部分系への分解に基づく化学反応ネットワークの解 析理論	数理生物学
2019. 6. 5	鈴木 忠樹 (国立感染症研究所 感染病理部)	臨床検体を軸とするウイルス感染症の病理学研究	微細構造ウイルス学
2019. 6. 7	Nikolaos Stergiopoulos (Laboratory of Hemodynamics and Cardiovascular Technology, Swiss Federal Institute of Technology in Lausanne (EPFL))	Inverse methods for the assessment of cardiac output and cardiac contractility using noninvasive pressure and pulse wave velocity measurements	バイオメカニクス
2019. 6. 7	東 俊一 (名古屋大学 大学院工学研究科 機 械システム工学専攻)	ネットワークシステムの構造的安定性	数理生物学
2019. 6.14	Boris N. Kholodenko (Systems Biology Ireland, University College Dublin, Belfield, Dublin, Ireland Department of Pharmacology, Yale University School of Medicine, New Haven, USA)	Can physics-based dynamic models help us understand biology?	数理生物学
2019. 6.17	横田 宏 (理化学研究所 数理創造プログラ ム／京都大学 ウィルス・再生医科 学研究所)	高分子結晶化における核生成理論とコンフォメー ションエントロピー	数理生物学
2019. 6.19	福原 崇介 (大阪大学微生物病研究所 分子 ウイルス分野)	フラビウイルス科ウイルスの指向性と進化に関する 研究	RNA ウィルス
2019. 6.26	渡土 幸一 (国立感染症研究所ウイルス第二 部) (東京理科大学大学院理工学研究 科応用生物)	B型肝炎ウイルスの宿主選り好み ～感染成功・不成功的分け目にあるもの～	システムウイルス学
2019. 6.28	Benjamin Podbilewicz (Israel Institute of Technology)	Evolution of cell fusion	再生免疫学
2019. 7. 3	今井 正樹 (東京大学医科学研究所 ウィル ス感染分野)	中国で発生した H7N9 鳥インフルエンザウイルスの パンデミックポテンシャル	微細構造ウイルス学
2019. 7. 5	八木田 和弘 (京都府立医科大学 大学院医学研 究科 統合生理学)	環境周期と細胞機能をつなぐ概日時計の役割	免疫制御

開催日	講演者・所属	演題	主催分野
2019. 7.10	有井 潤 (東京大学医科学研究所 ウィルス病態制御分野)	単純ヘルペスウイルスによる核膜通過の分子機構	RNA ウイルス
2019. 7.30	朝倉 淳 (Stem Cell Institute Paul & Sheila Wellstone Muscular Dystrophy Center, Department of Neurology University of Minnesota Medical School)	3Dイメージングによる骨格筋幹細胞の血管ニッチの解析と筋再生の分子機構	再生免疫学
2019. 7.30	Yosuke Hiramuki (Department of Pharmacology, Center for Molecular Medicine, University of Nevada, Reno)	Facioscapulohumeral muscular dystrophy: Visualization of a primate-specific DUX4-expressing lineage in mice	再生免疫学
2019. 8. 9	隈本 洋介 (Center for Immunity and Inflammation and the Department of Pathology, Immunology and Laboratory Medicine, Rutgers New Jersey Medical School, Newark, NJ)	Th2型免疫応答における樹状細胞サブセットの役割 Role of Dendritic Cell Subsets in T Helper Type 2 Responses	分子遺伝学
2019. 8.19	Je-Chiang Tsai (Department of Mathematics, National Tsing Hua University, Taiwan)	Spreading Waves in a Farmers and Hunter-Gatherers Model of the Neolithic Transition in Europe	数理生物学
2019. 9.18	Sumin Kang (Winship Cancer Institute Department of Hematology and Medical Oncology Emory University School of Medicine)	Targeting cancer signaling nodes to overcome metastasis and chemotherapy resistance	がん・幹細胞シグナル
2019. 9.27	山崎 聰 (東京大学医科学研究所)	造血幹細胞の増幅と応用 Development of hematopoietic stem cell in vitro expansion	バイオメカニクス
	小穴 英廣 (東京大学大学院工学系研究科)	マイクロ流体デバイスを用いた1細胞エピゲノム解析技術および細胞機能変改技術の開発 Development of single-cell epigenome analysis technology and cell function modification technology using microfluidic devices"	
2019.10. 9	Vanessa Sancho Shimizu (Imperial Collage of London)	Using genetics to understand herpes encephalitis	システムウイルス学
2019.10.11	Vincent Keng (Department of Applied Biology and Chemical Technology The Hong Kong Polytechnic University)	Using transposable elements to manipulate the genome for cancer research	幹細胞遺伝学
2019.10.11	Matthew Turner (Department of Physics / Centre for Complexity Science, University of Warwick, UK)	Intrinsically motivated collective motion	数理生物学
2019.11. 6	Marcelo J. Kuroda (VM: Anatomy, Physiology and Cell Biology, Center for Comparative Medicine Leader, Infectious Disease Unit, California National Primate Research Center, University of California, Davis, USA)	Understanding the role of macrophages in the pathogenesis of cardiovascular disease in HIV/AIDS using the nonhuman primate model	ウイルス感染症モデル
2019.11. 8	Susan Gottesman (Laboratory of Molecular Biology National Cancer Institute, National Institutes of Health (NCI/NIH))	Post-transcriptional Regulation of the <i>E. coli</i> General Stress Response	生体膜システム

開催日	講演者・所属	演題	主催分野
2019.11. 8	Shinobu Chiba (Faculty of Life Sciences and Institute for Protein Dynamics, Kyoto Sangyo University)	A novel ribosome rescue mechanism in <i>Bacillus subtilis</i>	生体膜システム
2019.11.20	仁木 宏典 (国立遺伝学研究所 遺伝形質研究系 微生物機能研究室)	ジャポニカス分裂酵母に見つかった36時間の転写変動周期を持つ温度応答	生体膜システム
2019.11.29	塚谷 裕一 (東京大学大学院理学系研究科・生物科学専攻)	葉の幅の制御から分裂組織制御まで：渓流沿い植物から始まったストーリー	数理生物学
2019.12. 2	Frank Jülicher (Max Planck Institut für Physik komplexer Systeme Dresden, Germany)	Symmetry Breaking of Biological Cells	数理生物学

# 構成員名簿

(2020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，生田宏一

## ◆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（帝京大学戦略的イノベーション研究センター教授）  
長田 重一（大阪大学免疫学フロンティア研究センター特任教授）  
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）  
生田 宏一（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・生命科学先端融合の共同研究拠点>

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名誉所員）  
月田 早智子（帝京大学戦略的イノベーション研究センター教授）  
長田 重一（大阪大学免疫学フロンティア研究センター特任教授）  
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 特定准教授：岡部泰賢 特定助教：木檜周

研究員：吳成旭 教務補佐員：竹内文彦 技術補佐員：小柴里美，木村春奈，吉原智美，加藤悠

大学院生：覃勉，AbuTayeh Ahmed，李受政，

沙 添威, Khalil Jumana A.T., 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, ZUO Wenjie, 河野美希, 田原成人, 橋本匡太, 谷口雅司

研究生: 大音泰介 共同研究者: 船曳正英, 鬼澤秀夫, 山田辰太郎, 李 瑞波

#### <ウイルス制御分野>

助教: 志村和也 臨床検査技師: 大西知帆

研究員: 栗田大輔 派遣職員: 目黒智美, 藤本由起子

大学院生: 豊田康祐, 七條敬文 共同研究者: 前田道之, 田中 梓

#### < 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): 小嶋将平

大学院生: 山本祐介, 柳井真瑚, 小森園亮, Bea Garcia, 酒井まどか, 向井八尋, 角家洋次, 神田雄大,

山元裕太郎, 金 東充, 川崎純菜, Lin, Jsopm Ham, 鬼丸 楓, 渡部雄斗 研究生: 曾我玲子

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: 杉田征彦

特定研究員: 平林 愛 技術補佐員: 武長 徹

大学院生: 宮本 翔, 山形優太朗, Connor Park, 藤田陽子, 梶川純一, 祝部和也, 胡 上帆

研究生: 張 子涵

派遣事務員: 斎藤千晴

#### <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: 赤堀祐一 大学院生: 宮山陽平, 二階堂篤, Song HoJong

#### <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: 鳴 燿子, 麻 実乃莉, 岩下智江里, 黒羽 仁, 鈴木 拓, 西垣皓佳, 田中良奈, 藤原愛紗, 大和勇輝

#### <免疫制御分野>

教授: 生田宏一 助教: 竹本経緯子, 原 崇裕, 崔 広為

大学院生: 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, 角間萌美, 大平慶蔵, 山田浩平

共同研究者: 谷一靖江, 高原和彦, 清水 章, 西 美幸, 植葉恒

#### <応答調節分野>

客員教授: 河岡義裕 客員准教授: 渡士幸一

#### <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, 于 尚誉, 花房 賢, 遠藤浩太郎

研究生: 松井優人, 袁 熙敏

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，鈴木貴久，内田雄一郎，上本祐介，鈴木久美子，吉根川靖，新居輝樹，田畠琢也，中上和城，江見翼，Pnitporn Laowpanitchakorn

学部生：阿部哲士，竹花祥，丹羽健太朗 研究生：Gao Lin, Yang Wen Xuan

研究員（民間等共同研究員）：中村耕一郎，松野久美子，福山嘉晃，田中健太

研究員（受託研究員）：井田昌孝，駒田行哉，上村聰，花村奈未，木村幸史，並木友亮，百瀬八州，宮崎奏，古田瑛理，小林直紀，中尾進悟，松澤綾子 研究員（内地研究員）：西東洋一

共同研究者：藤本洋平，三ツ井涼，吉崎香琳 派遣職員：桑原寿江

#### <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 特定准教授：河岡慎平 特定助教：趙向東，上堀淳二

特定研究員：永野誠治，小林由佳，長畑洋佑，加藤雄真，北條広朗 非常勤研究員：宮崎和子，渡邊武

事務補佐員：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

派遣職員（事務補佐員）：宮武明子 大学院生：西村有史，水野林，田中淳

共同研究者：嘉島相輝，島津裕 研究生：高宇嫻

#### <再生免疫学分野 濱原グループ>

連携教授：濱原淳子 特定助教：佐藤文規 特定研究員：曾我部舞奈 教務補佐員：荒井宏行，栗木麻央

技術補佐員：黒田信子

大学院生：王梓，Choi Minyong，鶴谷雅文

#### <組織再生応用分野>

教授：戸口田淳也 助教：金永輝 特定助教：玉置さくら 特定拠点助教：川井俊介（CiRA）

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（技術補助員）：西尾惠，合津麻衣

大学院生：鎌倉武史，前川裕継，樋本玲菜，Yann Pretemer，中嶋崇貴，孫麗萍

共同研究者：宝田剛志，渡辺真，水晶善之 研究生：馬璟純

#### <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

研修員：町口敏彦 技術補佐員：石田久恵 教務補佐員：矢延聰枝

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 技術補佐員：楊凱強 事務補佐員：上野小寿恵

民間等共同研究員：大薗三千代

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 事務補佐員：奥村めぐみ

研究員：Huang Denggao

#### <発生エピゲノム分野 中馬 G >

准教授：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：酒井睦美

大学院生：林瑛理，中川史之，李京航

#### <胚性幹細胞分野>

准教授：末盛博文 特定講師：川瀬栄八郎 特定職員：高田圭，中谷良子 教務補佐員：森部江美子

事務補佐員：廣富ひとみ

<統合生体プロセス分野>

教授：近藤 玄 准教授：廣田圭司 助教（兼）：渡邊仁美

<生体再建学分野>

客員教授：坂口志文 研究員：大崎一直，木本富子，川上竜司

連携研究支援員：松浦真由美 技術補佐員：山本恵津子，安富栄人，泉和弥，中村麻衣子

<生体物性学分野>

(欠員中)

<再生医工学分野>

(欠員中)

■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 講師：OKEYO Kennedy Omondi

助教：亀尾佳貴，牧功一郎

特定研究員：KIM Jeonghyun 研究員：須長純子 共同研究者：林絃三郎

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，木部善清，

寺澤良亮，森 泉，松田大輝，木上博之，坂野暢昭，下平剛司，玉井龍太郎，横山優花，福手淳平

学部生：井上立貴，藤本航成，山口嵩洋，山口大輝

研究生：Aizat bin MOHD AMINUDDIN

<発生システム制御分野>

教授：永樂元次 准教授：大串雅敏 連携研究員：瀬戸裕介，堤 璃水 民間等共同研究員：黒田貴雄

JSPS 特別研究員（PD）：田宮寛之 共同研究員：森 俊介，奥田 覚

大学院生：河嶋 照，川野紗依子，KANG JIHOON，鈴木和也，沼田章良，松枝且樹

学部生：後藤加奈，HAO RUOLIN，橋本みなみ，吉村安寧

<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：古瀬祐氣

特定研究員：三沢尚子

大学院生：Juárez Guillermo，Soper Andrew，麻生啓文，清水聰真，光宗渙社

<増殖制御システム分野>

教授：影山龍一郎 准教授：大塚俊之 助教：小林妙子

教務補佐員：吉岡久美子，前田勇樹，越智翔平，高木あかり，LEE Lilith 技術補佐員：倉橋むつみ，大西 翔

事務補佐員：吉田しのぶ

大学院生：貝瀬 峻，松崎公信，末田梨沙，朴 文惠，福井 雅弘，

SHQIRAT J.M. Mohammed, Jia Xueqi, 張 静恬，馬場麻悠子，木下晃，MAVUK Özgün 外国人共同研究者：Edgar Yuji Egawa

共同研究者：今吉 格，磯村彰宏，山田真弓，奥野浩行，阪上起世，樋谷智子，林 周宏，鈴木裕輔

<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

大学院生：川本崇仁

#### <生体膜システム分野>

教授：秋山芳展 準教授：森 博幸 助教：檜作洋平 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，小柴里美 技能補佐員：伊藤 淳，辻谷晶徳  
大学院生：三宅拓也，横山達彦，田中雄太，宋 俊勇，艾 夢婷

#### <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：原田洋子  
大学院生：上月智司，阿部浩太，三森はるか，南部沙季，井戸那奈美，大森健太郎

#### <数理生物学分野>

教授：望月敦史 準教授：立川正志 研究員：小松弘和 共同研究員：横田弘 事務補佐員：岳山裕美

#### <幹細胞遺伝学分野>

教授：遊佐宏介 助教：樽本雄介，西淵剛平 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

#### <がん・幹細胞シグナル分野>

教授：伊藤貴浩 助教：松浦顯教 特定研究員：安井ワトソン理央 大学院生：王 若冲

### ■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：松浦嘉奈子  
大学院生：YALÇIN PISİL, 山浦瑞樹，李 佳霖，徐 可婧  
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，鷺崎彩夏，村田めぐみ  
技術補佐員：辻 薫 大学院生：Tan Wei Keat, Satyajit Biswas

#### <ウイルス共進化分野>

准教授：宮沢孝幸  
大学院生：橋本 晃，北尾晃一 技術補佐員：正玄裕子  
共同研究者：坂口翔一

技術専門員：宮地 均 技術専門職員：小中（北野）さつき，阪脇廣美 技術職員：吉田 暖

### ■附属再生実験動物施設■

教授・施設長（兼）：近藤 玄 準教授・副施設長（兼）：角昭一郎 準教授（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，保野真帆 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■

福原崇介，有井 潤，鈴木忠樹，今井正樹，城口克之，青木伊知男，中村雅也，渡部良広，樋口隆弘，稻田有史，茂野啓示，

小川知彦，白水泰昌，竹尾 透，坂口教子，中島友紀，山崎 聰，仁木宏典

■事務部■

事務長：小林英治 総務掛長：神田俊明 主任：畠中あい 掛員：安本理恵 技術職員：下司和彦

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.4 2019

---

2020年11月10日 発行  
京都大学ウイルス・再生医科学研究所

---

